水産動物肉に関する研究—XXXIX.

魚筋肉プロテアーゼについて*

牧之段保夫・山本正男・清水 亘

(1963年5月16日受理)

STUDIES ON MUSCLE OF AQUATIC ANIMALS—XXXIX.
PROTEASE IN FISH MUSCLE

Yasuo MAKINODAN, Masao YAMAMOTO, and Wataru SHIMIDU**

Fish muscle paste turns into a tough and elastic gel when kept at elevated temperatures. It has been observed¹⁾ that the muscle paste shows a higher gel strength either at 30°~40°C. or above 70°C, while a lower one at about 60°C. Some proteolytic enzyme were assumed to be connected with this phenomenon, the lowering of gel strength at about 60°C.

As seen in Fig. 1, addition of trypsin clearly depressed the gel formation of muscle paste at all the temperatures, especially above 50°C. This was also true for the crude preparation of proteolytic enzyme from fish muscle. The optimum pH and temperature of this enzyme preparation were found at pH 7~8 at 60°C and 60°C at pH 8, respectively, in the fish species examined (Figs. 2 and 3). Temperature quotient, Q_{10} , was calculated to be 1.6 between 40° and 50°C, whereas as high as 7.6 between 50° and 60°C (Fig. 4).

These results may suggest that the lower gel strength observed at about 60°C is partly due to the action of proteolytic enzymes originally present in fish muscle paste.

清水ら¹⁾は魚肉すり身を加熱するとき、ある温度域 (30~40°C) において足 (ゲル強度) を増し (坐りの現象)、他の温度域 (50~60°C) において急激に足が落ちる (火もどりの現象) ことを観察した。これらの現象は魚肉タンパクに対する熱の作用によつて起こることが想像されるが、もし熱の作用によるものとすれば、30~40°C において現われる坐りの現象は、それよりも高い温度域においても継続されるだろうと思われる。しかるに、50~60°C において起こる現象は、まったく別の形で (ゲルの崩壊が) 現われるのである。これをいかに説明したらよいか。おそらく熱以外の作用、たとえばプロテアーゼによるタンパクの変性あるいは分解に原因するのではなからうか。

しかし魚を含む、多くの動物肉のプロテアーゼは、過去の文献によれば、50°C 以下にその至適温度をもつように報告されている。たとえば大谷²⁾は魚肉の自己消化は pH 4.5 において、もつとも強く、海産魚では至適温度は 40°C 付近であると報告し、斎藤・鮫島ら³⁾はコイ、ゴマサバ、シロザメについて、その筋肉抽出液が示すタンパク分解作用は至適 pH は 3.5~5.0 であり、至適温度は作用時間 10 時間、pH 3.5 において 35°C 前後と認めた。

これらの文献におけるプロテアーゼは、至適 pH が酸性側にある。秦・浅尾・土井ら⁴⁾も、DNP-カゼインを基質として調べた数種魚肉プロテアーゼが pH 6.0 付近に最大活性を示すことをみた。しかし藤井・広瀬・江良ら⁵⁾は魚筋肉プロテアーゼは、幽門垂プロテアーゼと同様に至適 pH 8.5 付近であると報告している。

* 1963 年 4 月 3 日、日本農学大会水産部会において発表した。

** 京都大学農学部水産学教室 (Department of Fisheries, University of Kyoto.)

著者らはエソ、グチ、カマス等につき、筋肉の水抽出液が示すタンパク分解力をカゼインおよび DNP-カゼインを基質として調べたところ、最大活度を与える pH 域は 8.0 付近にあり、しかも 60~65°C において最大の活度が示された。作用時間 90 分間における温度係数 (Q_{10}) は 40~50°C では 1.6 であつたが、50~60°C ではじつに 6.7 を示し、70°C では活度が急激に低下するのがみられた。

これらのことから考察すると、魚の筋肉中に含まれるプロテアーゼは、至適 pH を異にする、いくつかの種類があり、至適作用温度もそれぞれに異なるのではあるまいか。もし著者らが認めた 60~65°C に至適温度を有するプロテアーゼの存在が事実とすれば、同温度域におけるすり身の足が急に低下する現象は、プロテアーゼによるタンパクの分解または変性が、その原因になると思われる。

著者らが調べた魚肉プロテアーゼの性質はつぎのようなものであつた。

実験方法

実験材料 舞鶴近海で漁獲された硬直中のもの、または硬直魚体をそのまま -15°C に数日間凍結貯蔵したものをを用いた。

トリプシンの活度測定 所定温度にあらかじめ加熱しておいた試験管に pH 7.6 の 1% カゼイン (和光純薬工業株式会社製) 溶液 2 ml, および、トリプシン (MERCK 製) の 100 r/ml 溶液 1 ml を加え、1 時間反応せしめたのち、10% トリクロル酢酸 3 ml を加えて 45 分間放置し、汙液について 280 $\text{m}\mu$ における吸光度を測定した。反応時間 0 のときの値を差し引いて、トリプシン活度を求めた。

かまぼこのゲル強度の測定 食塩 3% およびトリプシン添加試料には 0.02% 濃度にトリプシンを添加してすり身を作り、クレハロンケーシングに詰めて所定温度で 1 時間加熱し、冷却後、志水・清水⁶⁾の方法でゲル強度を測定した。

基質の調製 基質としてカゼイン (和光純薬工業株式会社製) および DNP-カゼイン⁷⁾ を用い、蔭山・国定⁸⁾の方法に準じて、いろいろの pH 価をもつ buffered casain 液を調製した。すなわち pH ≤ 5.0 のものを作るには基質 0.5 g 当り 0.01 M-乳酸 50 ml を加え、煮沸溶解し、冷却後 0.1 M-NaOH および 0.1 M-乳酸で所定 pH 価に規正し、さらに該 pH 価をもつ乳酸塩緩衝液を加えて全液量を 150 ml とした。5.0 < pH ≤ 8.0 のものは、乳酸の代りに 0.2 M-NaOH 50 ml を加え、煮沸溶解してから 0.1 M-NaOH および 0.1 M-H₃PO₄ で所要 pH 価に規正し、該 pH 価のリン酸塩緩衝液で 150 ml とした。また pH > 8.0 のものは、0.1 M-NH₄OH 50 ml を加えて、前記同様に溶解したのち、0.1 M-乳酸で pH 価を規正し、該 pH 価の NH₄OH-NH₄Cl 緩衝液で所定量にした。

粗酵素液の調製 魚肉を 2 倍量の蒸留水とともにブレンドし、8°C で 15 分間放置後、4500 R.P.M., 15 分遠心分離してえた上澄液を粗酵素液とした。

酵素活度の測定 上記基質溶液 3 ml に酵素液 1 ml を加え、所定温度で所定時間反応せしめたのち、5% トリクロル酢酸 5 ml を加え、40 分間放置したのち汙過し、汙液について 280 $\text{m}\mu$ (DNP-カゼインを基質とした場合には 360 $\text{m}\mu$) の吸光度を島津光電分光光度計 QB 50 型を用いて測定し、反応時間 0 のときの値を差し引いて酵素活度を求めた。なお酵素液のみにについての活度の測定には基質溶液の代りに該 pH 価の緩衝液を同量使用し、基質溶液のみの場合には酵素液の代りに該 pH 価の緩衝液を用いた。

実験結果および考察

かまぼこの足におよぼすトリプシンの影響 かまぼこの加熱温度とゲル強度との関係、およびトリプシンの反応温度と活度との関係を図示すれば Fig. 1 のようになる。図から明らかなように、かまぼこのゲル強度は 60~70°C で急速に低下しており、トリプシンを添加したものは、その低下度がいつそうはなはだしい。これとまづ対称的にトリプシンの活度は 60°C 付近において最大値が示されている。

すり身のらいかい (播潰) は 8°C で行なわれ、トリプシンの温度活性曲線からみて、この温度では、トリプシンの活性はほとんど無視してよいであろう。したがって、らいかい中のトリプシンの影響は考える必

Fig. 1. Effect of the addition of trypsin on the gel strength of KAMABOKO made of *Saurida argyrophanes* (Richardson)
 A: Temperature-gel strength curve, without trypsin added.
 B: Temperature-gel strength curve, with trypsin added.
 C: Temperature-activity curve of trypsin itself.

要はなく、トリプシンのかまぼこゲル強度におよぼす影響は、加熱時間中における作用によるとみられる。ゆえに、30~60°Cにおけるトリプシンの温度活性曲線とかまぼこのゲル強度とは細かい点を別としてほぼ逆の関係にあり、ゲル強度の低下は、酵素トリプシンの活性をそのまま反映し、トリプシンのためにタンパクが変化し、ゲル強度が低下したものととして注目される。ただ 80°Cにおけるトリプシンの活性は、きわめて小さいから、トリプシン添加かまぼこの足はこの温度において、強いゲル強度が期待されるのであるが、事實は、そのゲル強度はきわめて弱い。(もつとも 80°Cに達すまでにトリプシンが作用したとも考えられるが、その影響は部分的であるはずである。)また、トリプシン無添加かまぼこの、30°Cにおけるゲル強度は 40°Cにおけるよりも小さく、自己消化酵素の作用を考慮に入れると、むしろゆるくなるようであるが、これは 40°Cにおいては“坐り”の作用が大きく、40°Cではまだ十分強くない酵素作用を圧倒したと考えれば解釈がつかないでもない。さらに 60°Cでは 70°Cにおけるよりもゲル強度が大きく、トリプシンの活性からすれば、逆になるものと思われる。これも魚肉プロテアーゼの至適温度が標品トリプシンよりもやや高いことを仮定すれば説明されるかも知れない。

このように、細かい点において、実際とは一致しないかも知れないが、だいたいにおいて、かまぼこのゲル強度と、トリプシンの温度活性曲線とは逆の関係が示され、かまぼこ製造過程において 60°C付近で足が急速に低下するという現象は、原料魚肉中に存在するプロテアーゼが関与しているように思える。

魚類筋肉タンパク分解酵素の至適 pH 値 魚肉を 2 倍量の蒸留水とともにブレンドし、遠心分離してえた粗酵素液をいろいろの pH 値に調節したカゼイン溶液に加え、60°C で 4 時間反応させ、その作用力を比較した。その結果は Fig. 2 のようである。ここに供試したグチおよびカマスは硬直中のもの、エソは硬直中のものを -15°C で 2 日間凍結貯蔵したものである。各魚種とも、その酵素力は pH 7.0~8.0 において最大となり、pH 8.0 以上で急激に低下する。エソ酵素液の 35°C 反応のものでは、pH 7.0 付近にピー

Fig. 2. pH-activity curve of fish muscle protease (60°C)
 A: *Siaena schlegeli* (Bleeker) in rigor mortis.
 B: *Sphyræna pinguis* (Günther) in rigor mortis.
 C: *Saurida argyrophanes* (Richardson) stored at -15°C for 2 days.

クが認められ、秦らの報告とはほぼ一致するが、この実験条件下では再現性にいささか難があつた。とにかく最大活度は pH 7.0~8.0 付近であるが、pH 6.0~7.0 付近でもかなりの活性を示していることは、かまぼこのゲル強度との関連において、注目に値する。

魚類筋肉タンパク分解酵素の作用温度 前記のようにして作った粗酵素液を、pH 8.0 に調節したカゼインおよび DNP-カゼイン溶液に加え、いろいろの温度 ($\pm 1^\circ\text{C}$) で4時間反応せしめた。その結果は Fig. 3 のごとくである。供試魚のグチは硬直中のもの、エソおよびカマスは硬直中のものを -15°C で、それぞれ2日および7日間凍結貯蔵したものである。

緒言で紹介したごとく、従来、魚肉プロテアーゼは 35°C ないし 140°C に至適温度をもつと報告されており、これは YURI and ROSE ら⁹⁾ のヒナドリの胸筋プロテアーゼ (ヘモグロビン基質) についての報告とも一致しており、この種の試験ではもつぱら 35°C が採用されてきた。しかるに Fig. 3 をみれば、いずれも $60\sim 65^\circ\text{C}$ において最大値をとり、 $50\sim 60^\circ\text{C}$ における活度の増大はまったく飛躍的であり、Fig. 4 に示したように、初めの 90 分間における温度係数 (Q_{10}) は $40\sim 50^\circ\text{C}$ における 1.6 に比し、じつに 6.7 を示している。

KOSZALKA and MILLER ら¹⁰⁾ のネズミ骨骼筋プロテアーゼ (尿素変性ヘモグロビン基質, pH 9.0) についての試験における $37\sim 47^\circ\text{C}$ 区間の Q_{10} は 2.0 であり、エソの場合 (Fig. 5) における $40\sim 50^\circ\text{C}$ 区間の Q_{10} 1.6 に近い。また氏等は

Fig. 4. Time-activity curve of muscle protease of *Saurida argyrophanes* (Richardson) in rigor mortis (pH 8.0).

Fig. 3. Temperature-activity curve of fish muscle protease (pH 8.0, 4 hours). Substrate: Casein for A, B and C. DNP-casein for B' and C'. A: *Sphyræna pinguis* (Günther) stored at -15°C for 7 days. B and B': *Sciaena schlegelii* (Bleeker) in rigor mortis. C and C': *Saurida argyrophanes* (Richardson) stored at -15°C for 2 days.

Fig. 5. Optimum temperature of muscle protease of *Sciaena schlegelii* (Bleeker) in rigor mortis (pH 8.0).
×.....×: Enzyme solution only
△---△: DNP-casein only.
○—○: Enzyme solution + DNP-casein.

同試験においてネズミのプロテアーゼは 70°C, 10 分間の加熱処理によつて, ほとんど破壊されたと報告しているが, エソ硬直筋内プロテアーゼの, pH 8.0, カゼインに対する作用力は 70°C, 15 分間の加熱ではほとんど失活することが認められた。これは, DRAKE, GIFFE and DYER ら¹¹⁾ がプロテアーゼの失活を目的として行なつた試験における 160°F (71°C), 10 分間とほぼ一致している。

なお念のため, 前記試験に用いた粗酵素液および基質の, 各温度における性状を検討したところ, Fig. 5 のような結果が得られた。これによれば, 粗酵素液および DNP-カゼインの各温度における 360 m μ 吸光度にはほとんど変化が認められなかつた。したがつて, 粗酵素液を添加した DNP-カゼインが 60~65°C 付近において示す最大吸光値は, 酵素の作用によることが確認された。

要 約

(1) 数種魚肉から抽出した粗酵素液の pH 8.0 におけるカゼインおよび DNP-カゼインの分解は 60°C 付近に最大値を示した。

(2) 同粗酵素液の 60°C における活度は pH 8.0 付近において最高が示された。

(3) 魚肉すり身を加熱するとき 60°C 付近で急速に足を落すが, その原因の少なくとも一つは, 魚肉内プロテアーゼによるタンパクの変性 (または分解) によるのであらうと推論した。

文 献

- 1) 清水 亘・志水 寛・西出 亨: 京大食研報告, **23**, 1 (1960).
- 2) 大谷武夫・奥田 譲: 水産食品化学, p. 116, 日本評論社, (1933).
- 3) 斎藤 要・鮫島宗雄: 本誌, **24**, 201 (1958).
- 4) 秦 忠夫・浅尾俊夫・土井悦四郎: 京大食研報告, **24**, 43 (1960).
- 5) 藤井 実・広瀬 浩・江良至徳: 本誌, **16**, 553 (1951).
- 6) 志水 寛・清水 亘: 本誌, **26**, 911 (1960).
- 7) 秦 忠夫・土井悦四郎: 農化誌, **33**, 366 (1959).
- 8) 藤山公雄・国定則定: 醸工, **33**, 28 (1955).
- 9) S. BANDACK YURI and DYSON ROSE: *Food Technol.*, **15**, 186 (1961).
- 10) THOMAS R. KOSZALKA and LEON L. MILLER: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3, 665 (1960).
- 11) MAURICE P. DRAKE, J.W. GIFFEE, JR., ROBERT RYER III, and HUBERT HARRIMAN: *Science* **125**, 23 (1957).