加熱食肉製品の発色に及ぼす乳清タンパク質 酵素分解物の促進効果とその機構

坂田亮一・森田英利・乗松 毅・伊藤典之*

長田貞之*・岡山高秀**・六車三治男***

麻布大学獣医学部, 神奈川県相模原市渕野辺 1-17-71, 229-8501

* オーム乳業(株), 福岡県大牟田市新勝立町 1-38-1, 836-0895

** 神戸大学農学部, 神戸市灘区六甲台町 1-1, 657-8501

*** 宮崎大学農学部, 宮崎市学園木花台西 1-1, 889-2192

(2001 年 1 月 4 日受付, 2001 年 3 月 6 日受理)

要 約 乳清タンパク質の酵素分解物が有する食肉製品への発色促進効果について検討を行った。この分解物は、乳清タンパク質濃縮物（タンパク質を 80% 含有, 以下 WPC80 と略記）を基質とし、65℃で 30 分間低温殺菌した後、市販の食品用酵素剤を用い 50℃, 16 時間の条件で分解して粉体化することにより調製した。試作ソーセージ（塩化ナトリウム 2% および亜硝酸ナトリウム 100 ppm 添加）の発色率によって L-アスコルビン酸ナトリウム（0.1%）と WPC80 酵素分解物（5%）の発色促進効果を比較したところ、ほぼ同じであった。ゲルろ過/HPLC 法で分析した結果、酵素処理により乳清タンパク質の大部分は分子量 1,000 以下のペプチドに分解されていることが示された。また WPC 酵素分解物のエタノール抽出画分において、低分子量であるほど発色促進効果が高いことが認められた。ミオグロビンの加熱モデル系による実験で、WPC80 酵素分解物の濃度が増加するほど発色率は上昇する一方で、残存亜硝酸塩量は減少する傾向がみられた。エリソルビン酸ナトリウム（NaEry, 0.1%）添加時と比べ、WPC80 酵素分解物は同程度の発色促進効果を示した。赤血塩法による還元力の測定で、NaEry では加熱のはじめの段階で還元力は高かったが、加熱により減少した。WPC80 酵素分解物の還元力は、はじめ低かったが、加熱により次第に増加する傾向を示した。亜硝酸塩の分解量は NaEry が最も多かった。また、WPC80 酵素分解物がミオグロビンの熱変性を最も促進し、変性ミオグロビンの発色度も最も高い値を示した。本実験結果から、低分子量（主に分子量 1,000 以下）のペプチドからなる乳清タンパク質酵素分解物は、加熱時に還元力が増加することに加え、ミオグロビンの熱変性を促進することによって、発色を促進している可能性が示唆された。

Effect of Whey Protein Hydrolysate on the Acceleration of Color Formation in Meat Products and its Mechanism

R. SAKATA, H. MORITA, T. NORIMATSU, N. ITOH*, S. NAGATA*, T. OKAYAMA** and M. MUGURUMA***

School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara-shi 229-8501

* Omu Milk Products Co., Ltd., Omuta-shi 836-0895

** Faculty of Agriculture, Kobe University, Nada-ku, Kobe-shi 657-8501

*** Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki-shi 889-2192

緒 言

牛乳・乳製品は我々の食生活において重要な栄養食品であるが、その反面、乳成分には強力な食品アレルゲンが含まれている。牛乳アレルギーは、成人ではその発症頻度が低下するものの、乳幼児においては最も深刻なアレルギー疾患の一つと考えられている。牛乳アレルギーを引き起こす可能性があるとは指摘されている乳成分は20種類以上にも及ぶが、その中でも特に重要なのは α _{SI}-カゼインと β -ラクトグロブリンである¹⁾。このようなアレルゲン性を保持したままの乳タンパク質や高分子量のペプチドが腸管から生体内へ吸収されることが、アレルギーを引き起こす直接の原因となっている¹⁾。牛乳アレルギーの発症を防止するため、酵素処理で乳タンパク質を低分子量のペプチドまたはアミノ酸レベルにまで分解することによりアレルゲン活性の低減化が行われている²⁾。タンパク質分解酵素による牛乳アレルゲンの分解はアレルゲン上の抗原決定基を破壊する上で、もっとも簡便かつ有効な方法である。また近年、牛乳中のタンパク質由来ペプチドの持つ機能について、興味深い知見が多く報告されており³⁾、乳ペプチドの食肉製品への適用によっても、栄養機能や生体調節機能などへ貢献し得ることが考えられる。

これまでに、乳タンパク質酵素分解物を食肉製品に適用する研究において、添加した濃縮脱脂乳酵素分解物が低濃度の亜硝酸塩（亜硝酸ナトリウム）共存下で加熱食肉製品の発色を明らかに増強する現象を見出した⁴⁾。乳タンパク質はカゼインと乳清タンパク質に大きく分けられるが、乳清タンパク質の酵素分解物の方が、発色促進効果は高いことが認められた⁵⁾。よって本実験では、乳清タンパク質酵素分解物（以下、WPC80 酵素分解物と略記）の発色促進効果とその機構を解明し、これを発色促進剤として食肉製品に利用する可能性について検討することを目的とした。

材料および方法

1. 酵素分解物の調製

図1に、WPC80 酵素分解物の調製方法を示し

図 1. WPC80 酵素分解物の調製法

た。乳清タンパク質を80%含有する濃縮物（以下WPC80と略記。AMPC Inc., AMP800使用）に蒸留水を加えて固形分を10%となるようにし、65°Cで30分間低温殺菌した後、プロテアーゼであるフレーバーザイム（Novo Nordisk Industry社製）を0.207%添加し、50°Cで16時間反応させた。反応後90°Cで20分間加熱して酵素を失活させ、10,000×gで15分間遠心分離し、上清を得た。これを凍結乾燥法により粉体化したものをWPC80 酵素分解物とし、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により含まれるタンパク質の分解状態を調べた。またWPC80 酵素分解物中のペプチドを極性の違いから分別する目的で、その溶媒としてエタノールを用い、次のように分画した。90%エタノール抽出画分：WPC80 酵素分解物を90%エタノールで抽出し遠心分離（2,500×g, 5分間）し、得られた上清。50%エタノール抽出画分：その沈殿物を50%エタノールで抽出し、遠心分離で得られた上清。50%エタノール抽出残渣画分：その沈殿物。これら3つのエタノール抽出画分についても、凍結乾燥法によりそれぞれ粉

体化したのち供試した。HPLC分析では、WPC80酵素分解物または各エタノール抽出画分を0.1%となるように溶離液に溶かし、これを20 μ l注入して行った。測定条件は以下の通りである：機種；Shimadzu Waters 600, カラム；TSK-GEL G2000SW_{XL}, 移動相（試料の溶離液）：45% アセトニトリル+0.1% トリフルオロ酢酸, 検出波長：210 nm。

2. ソーセージの試作

豚もも部の挽肉を用い、ソーセージ試料を調製した。塩化ナトリウムを2%, 亜硝酸ナトリウムを100 ppm, WPC80酵素分解物またはWPC80を5%, もしくはL-アスコルビン酸ナトリウム(NaAsc)を0.1%, ならびに氷15%をフードプロセッサーに入れて、1分間磨砕し混和した。混合物を脱気した後、クレハロンケーシングに充填し75℃で45分間加熱した。試作ソーセージの発色の程度は、75%アセトン抽出液の波長395 nmにおける吸光度を測定して調べたニトロシルヘム色素量と75%アセトン-0.7% HCl抽出液の波長395 nmにおける吸光度測定による全ヘム色素量から算出した発色率⁶⁾を用いて表した。

3. ミオグロビンの加熱モデル系による実験

0.1%のミオグロビン(Mb)を含む0.1 M酢酸緩衝液(pH5.5)中にWPC80酵素分解物および、エタノール抽出画分を最終濃度が5%となるように添加し、十分に窒素ガスで置換した後、亜硝酸ナトリウム(最終濃度100 ppm)を添加し、再度窒素ガス置換して75℃で30分および60分間加熱した。これを直ちに0℃で十分冷却後、発色率を測定した。またWPC80酵素分解物およびエタノール抽出画分の代わりにWPC80およびエリソルビン酸ナトリウム(NaEry)を最終濃度が各々5%および0.1%となるように添加したMbモデル系で、同様に発色率を測定した。次に、WPC80酵素分解物を最終濃度が5%, 2.5%, 1.25%および0.625%になるように添加し、発色率を求めた。これらのMb反応液で、加熱後残存している亜硝酸塩の量をMIRNA and SCHÜTZの方法⁷⁾により測定し、NO₂⁻量として示した。

4. WPC80酵素分解物の還元力の測定

酸化剤である赤血塩を用い還元力を測定した。

酢酸緩衝液によりpHを5.5に調整した赤血塩(フェリシアン化カリウム)とWPC80酵素分解物、WPC80もしくはNaEryをスピットグラスに入れ、窒素ガス置換後、75℃で加熱し、420 nmの波長で吸光度を測定した。赤血塩は1 mMのとき420 nmで吸光度1.0を示すので、これが還元され黄血塩(フェロシアン化カリウム)になると吸光度が減少することを利用し、サンプル1 ml当たり赤血塩を黄血塩に還元した量(μ moles/ml)を算出した。これを各サンプルの還元力として表示した⁸⁾。

5. ミオグロビンの加熱変性実験

0.2%のMbを含む酢酸緩衝液中に、WPC80酵素分解物、WPC80(最終濃度5%)もしくはNaEry(最終濃度0.1%)を添加し、十分窒素ガスで置換した後、NaNO₂(最終濃度100 ppm)を注入し、再度窒素ガス置換して75℃で加熱した。加熱後十分に冷却して1,500 $\times$ gで15分間遠心分離し(設定4℃)、その上清中の未変性(溶解している)部分から酸性アセトンで抽出したMbの量(A)と、加熱変性前のMb量(B)を測定し、A/Bの百分率として未変性率を算出した。また、熱変性し沈殿した部分から75%アセトンによりニトロシルヘモクロム(加熱塩漬肉色素)を抽出し、変性Mbの発色度⁸⁾として表示した。

これらすべての実験において、統計処理は行わなかったが、その傾向の再現性を確かめた上で、各試料2点の平均値で表示した。

結果と考察

1. 試作ソーセージの発色率

図2に、発色率の測定結果を示した。WPC80酵素分解物とNaAscを添加したソーセージの発色率はほぼ同じであった。WPC80は他と比べ発色率は低く、発色促進効果はほとんどみられなかった。この結果、WPC80酵素分解物は、本実験で用いた濃度においてNaAscと同程度の発色促進効果が認められた。また、WPC80とWPC80酵素分解物の発色促進効果に差がみられたことから、酵素で生じたペプチドが発色の促進に関与していることが示唆された。

2. HPLC法による分析結果

図 2. 試作ソーセージにおける発色率 (75℃で 60 分間加熱)

図 3. WPC80 酵素分解物の HPLC クロマトグラム

図 3 に WPC80 酵素分解物の HPLC による分析結果を示した。クロマトグラフィーは、ゲルろ過カラムを用いて行った。高分子量領域にピークはみられず、未分解の乳清タンパク質は加熱後の遠心分離により除かれているので、このクロマトグラムにおける溶出時間から、WPC80 酵素分解物の大部分は分子量 1,000 以下のペプチドであることが確認された。

図 4 に WPC80 酵素分解物エタノール抽出画分の HPLC 分析結果を示した。90% エタノール抽出画分は、大部分が分子量 1,000 以下の物で、図 3

との比較から、WPC80 酵素分解物中の低分子量領域部分が抽出されていた。50% エタノール抽出画分では、その前の 90% エタノール抽出操作で低分子量領域部分が抽出されているため、その平均分子量は大きくなることが示された。図 3 の WPC80 酵素分解物自体の HPLC の図と比べ、図 4 では 50% エタノール抽出画分および 50% エタノール抽出残渣画分の溶出パターンが大きい。これは HPLC にかける際に各試料の濃度を一定値に調整したので、すでに低分子量側にあるものが除かれ、微量でも比較的高分子量のペプチドが

図 4. WPC80 酵素分解物のエタノール画分の HPLC クロマトグラム

図 5. WPC80 酵素分解物のエタノール抽出画分を含む Mb モデル溶液における発色率 (75°Cで加熱)

濃縮された形で検出されたことに起因すると考えられる。これらの結果から、乳清タンパク質の酵素分解で得られたペプチドの中でも、その疎水性が高いものほど分子量は低いことがわかった。次に、これらエタノール抽出画分を用い、Mb モデル系で発色試験を行った。

3. ミオグロビンの加熱モデル系による実験結果

図 5 に WPC80 酵素分解物とそのエタノール抽

出画分を含む Mb モデル系における発色率を示した。WPC80 酵素分解物の中で、分子量が比較的小さいペプチドを多く含む 90% エタノール抽出画分の系が最も発色率が高く、分子量が大きい 50% エタノール抽出残渣画分では最も低かった。また、WPC80 酵素分解物と 50% エタノール抽出画分における発色率を比較すると、前者の方が値が高く、したがって分子量の小さなペプチドほど発色促進効果が高いことが明らかになった。この

図 6. WPC80, WPC80 酵素分解物およびエリソルビン酸ナトリウム (NaEry) を含む Mb モデル溶液における発色率 (75°Cで加熱)

図 7. WPC80 酵素分解物を含む Mb モデル溶液における発色率および残存亜硝酸塩量 (75°Cで 60 分間加熱)

結果, 分子量 1,000 以下のペプチドの関与が大きいと思われるが, さらに効果の高い部分を特定していく必要がある。

図 6 に各 Mb モデル系における発色率の測定結果を示した。これらの実験では, NaAsc と同等の発色促進効果が期待される NaEry を用いた⁹⁾。その添加量は, 各々の分子量の比から NaAsc (0.1%) の 1.1 倍とした。これは NaEry 製剤が,

結晶水を含むからであり, NaEry そのものの濃度は 0.1% となる。その結果, NaEry の系では, 加熱 5 分後から発色率が高く, 10 分後にはほぼ最高値に達した。WPC80 酵素分解物の場合, 発色率の上昇の仕方は緩やかであったが, 60 分後には NaEry の時と同程度の発色率を示した。WPC80 では, WPC80 酵素分解物と同じように緩やかな発色率の上昇を示したが, 他と比べすべての加熱

図 8. 赤血塩を用いた還元力の測定結果 (75°Cで加熱)

図 9. Mb モデル溶液における残存亜硝酸塩量の測定結果 (75°Cで加熱)

時間において低かった。

図 7 に、WPC80 酵素分解物における発色率と残存亜硝酸塩量の結果を示した。WPC80 酵素分解物の濃度に依存して発色率が高くなり、また残存亜硝酸塩量は減少する傾向を示した。これらの結果から、WPC80 酵素分解物は亜硝酸塩を還元し、発色反応に必要な一酸化窒素 (NO) を生成する能力のあることが示唆された。

4. WPC80 酵素分解物の還元力および残存亜

硝酸塩量

還元力の測定結果を図 8 に示した。比較として調べた NaEry の系では、他の試料に比べ加熱のはじめの段階で高い値を示したが、加熱が進むにつれ還元力は減少した。WPC80 酵素分解物の還元力ははじめ低かったが、加熱により次第に増強する傾向がみられ、加熱 30 分後から他の試料よりも高くなる傾向を示した。

図 9 に亜硝酸塩の残存量の結果を示した。

図 10. Mb モデル溶液における Mb の未変性率と変性 Mb の発色度 (75°C で加熱)

——: 未変性率

-----: 発色度

●, ○: WPC80

■, □: WPC80 酵素分解物

▲, △: NaEry

NaEry の系で、最も残存亜硝酸塩量が少ないことから、ここでは NO の生成量が多いことが示唆される。WPC80 酵素分解物の場合、残存亜硝酸塩量は徐々に減少していったのに対し、WPC80 では、この加熱時間範囲では、ほとんど変化がみられなかった。したがって、WPC80 酵素分解物は、亜硝酸塩の分解量が少ないにもかかわらず発色を促進していることから、還元作用の他にも発色を促進させる機能を有すると考えられた。

5. WPC80 酵素分解物によるミオグロビンの熱変性促進効果

図 10 に Mb の未変性率と変性 Mb の発色度を示した。加熱 5 分後には、すべてのサンプルにおいて顕著に Mb が変性し、その後も徐々に変性は進んだが、WPC80 酵素分解物が最も Mb を変性させた。WPC80 では NaEry より低い値を示した。また変性 Mb の発色度は、WPC80 酵素分解物が最も高い値を示した。一方、熱変性の度合いと同じく、WPC80 が最も低い発色の値であった。これらの結果から WPC80 酵素分解物は、加熱塩漬肉色の本体であるニトロシルヘモクロムをより多く生成する作用のあることが認められた。

これまでに、豚肉の筋漿中の低分子量画分に発色促進効果を見出し、その画分が発色促進効果

を示すのは、加熱により還元力が増加することに加え、Mb の熱変性を促進する作用によるものと推定した¹⁰⁾。WPC80 酵素分解物によるニトロソヘモクロム生成の促進機構として、亜硝酸塩を添加してすぐに加熱することから、一定期間の塩漬を行わないカッターキュアリング法の場合と同様に、Mb が変性して変性グロビンヘミクロムを生じた後、これに NO が結合しニトロシルヘモクロムを形成する経路¹¹⁾ が関与していると考えられる。したがって、WPC80 酵素分解物においても、Mb の熱変性を促進することにより、発色を促進している可能性が示唆された。

亜硝酸塩は、食肉製品の発色剤として硝酸塩と共に広く用いられ、発色以外にも抗菌、抗酸化、特有の風味醸成などに機能するが、前報⁴⁾でも述べたように、発癌性物質ニトロソアミン生成の懸念に加え、それ自体の毒性や過剰使用による亜硝酸塩¹²⁾などのリスクがあるので、食肉加工業界では使用量低減化を踏まえながら食肉製品の製造を実施している。一方で、亜硝酸塩の添加量不足による発色不良や退色の進行といった問題も同時に抱えている。今回の結果から、乳タンパク質酵素分解物に十分な発色促進効果が認められ、食肉製品の発色の面から亜硝酸塩の低減化をカバーす

る添加物として使用の可能性が示唆された。

これまでの食肉製品の発色に関する一連の研究の中で、カルノシン（筋肉中に含まれるペプチドの一種）を用いた場合、亜硝酸塩量を低下させても十分な発色が得られることを見出した¹³⁾。今回の結果からも、これらペプチドの発色促進効果が注目される。一方、物性の面から、乳清タンパク質の酵素分解物中の低分子のペプチドは、食肉製品のレオロジー特性調節作用も有することが報告されている¹⁴⁾。また、カゼインを主成分とする濃縮脱脂乳の酵素分解物にも発色促進効果が認められたこと⁴⁾から、これら乳タンパク質酵素分解物を使用することによって、牛乳アレルギーの人でも摂取でき、かつ発色剤の添加量を低減化した安全で、品質の良い食肉製品の開発が期待される。

謝 辞

本研究の実験の企画と遂行にあたり、有益な御意見をいただいた麻布大学名誉教授 永田致治博士に感謝致します。

文 献

- 1) 榎本 淳：「9. 牛乳とアレルギー」, 乳の科学, 上野川修一編, 朝倉書店, 東京, 135-147, 1996.
- 2) 伊藤典之：酵素法と発酵法による低アレルギー化乳の開発, 食品工業, 41, No. 24, 32-38, 1998.
- 3) 栗崎純一：「8. 牛乳・乳製品の機能成分/8.2 ペプチド」, 乳の科学, 上野川修一編, 朝倉書店, 東京, 111-117, 1996.
- 4) 坂田亮一・森田英利・乗松 毅・伊藤典之：食肉製品の発色に及ぼす乳タンパク質酵素分解物の促進効果, 日豚会誌, 37, 133-138, 2000.
- 5) SAKATA, R., H. MORITA, N. ITOH and S.-S. CHOU : Stability of heme pigment and color formation in meat products : Effects of vitamin E, carnosine and milk protein hydrolysates. Proc. 45th Inter. Cong. Meat Sci. Technol., 1, 154-155, 1999.
- 6) 坂田亮一：「食肉・食肉製品の分析技術/第2章 食肉・食肉製品の品質評価法/色調およびヘム色素」, 食肉の科学, 40, 221-224, 1999.
- 7) MIRNA, A. and G. SCHÜTZ : Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung des Pökelfarbstoffes. Fleischwirtsch., 52, 1337-1338, 1972.
- 8) 永田致治・坂田亮一：豚筋肉中の発色促進成分に関する研究, 食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団編, 2, 176-181, 1984.
- 9) 坂田亮一・森田英利・乗松 毅・塩見利紀：食肉製品の発色に及ぼす加温処理とエリソルビン酸塩の効果, 日豚会誌, 37, 43-49, 2000.
- 10) SAKATA, R. and Y. NAGATA : Promoting action of low-molecular weight sarcoplasm fraction on color formation. Fleischwirtschaft-International, No. 1, 54-58, 1989.
- 11) SAKATA, R : Study on physicochemical characteristics of red pigments in meat products. Anim. Sci. J., 71, 1-16, 2000.
- 12) 永田致治：「第5章. 食肉および食肉製品の色と変色」, 食品の変色の化学, 木村 進ら編, 光琳, 東京, 385-407, 1995.
- 13) 坂田亮一・森田英利・永田致治：食肉および食肉製品の赤色色素の安定性に及ぼすカルノシンの添加効果, 日豚会誌, 36, 47-51, 1999.
- 14) 長谷川和美・六車三治男・藤野博史・鶴岡克彦・伊藤典之・福井敬一・池田吉敬・杉田浩一・河原 聡・山内 清：酵素処理ホエータンパク質の性質と肉製品への利用, 日本畜産学会第97回大会講演要旨, p.72, 2000.

Effect of Whey Protein Hydrolysate on the Acceleration of Color Formation in Meat Products and its Mechanism

Ryoichi SAKATA, Hidetoshi MORITA, Takeshi NORIMATSU, Noriyuki ITOH*,
Sadayuki NAGATA*, Takahide OKAYAMA** and Michio MUGURUMA***

School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagami-hara-shi 229-8501

*Omu Milk Products Co., Ltd., Omuta-shi 836-0895

**Faculty of Agriculture, Kobe University, Nada-ku, Kobe-shi 657-8501

***Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki-shi 889-2192

Promoting effect of whey protein hydrolysate on the color formation of meat products was investigated. Whey protein concentrate (80%, WPC80) as a substrate, was hydrolysed at 50°C for 16 hours using commercial protease and then freeze-dried. The sausages prepared with sodium chloride (2%), sodium nitrite (100ppm) and WPC 80 hydrolysate (5%) or sodium ascorbate (0.1%) had essentially the same color forming ratio (CFR). The main part of the powdered preparation was estimated to be peptides having molecular weight of below 1,000 using HPLC with gel-filtration column. Of the ethanol soluble fractions in WPC80 hydrolysate, the component having lower molecular weight exhibited higher promoting effect on the color formation. In case of heated myoglobin (Mb) model solution, the CFR increased and residual nitrite level decreased with the concentration of WPC80 hydrolysate. Color accelerating effect of WPC80 hydrolysate was almost the same as the case of sodium erythorbate (NaEry, 0.1%). Using a ferricyanide method, the reducing ability (RA) of NaEry was shown to decrease during heating process, although the value was higher at the beginning of the heating. The RA of WPC80 hydrolysate was initially lower, but tended to increase during heating. The high level of nitrite decomposed with heating was found in the NaEry-added sample. WPC80 hydrolysates had an accelerating effect on the heat-denaturation of Mb, and the denatured Mb showed the high color forming ability. In this research, the possible action of the WPC80 hydrolysate, which contained mainly peptides appeared to accelerate heat denaturation of Mb during heating with increase in RA, thus enhancing the color formation of cooked cured meat products.

Jpn. J. Swine Science, **38**, 3 : 115-124

Key words : Color formation, Nitrite, Peptides, Pork sausage, Whey protein hydrolysate