

## 研究論文

## 発酵調味料中タンパク質分解酵素による畜産食品の物性への影響

丹羽昭夫\*1

## Effect of Protease in Fermented Seasonings on Physical Property of Livestock Food Product

Akio NIWA\*1

Food Research Center \*1

本研究は、発酵調味料に含まれるタンパク質分解酵素による畜産食品の物性変化を評価し、望ましい物性とするための指標を提供するものである。今回、各種しょうゆに含まれるタンパク質分解酵素の濃度の範囲において、タンパク質分解酵素活性と畜産食品の物性変化との相関を調査し、破断強度変化の予測式を作成した。この方法は酵素活性・反応時間から物性の事前予測が可能となるため、新製品開発の促進・効率化が期待できる。

## 1. はじめに

現在、介護食品など多様な食感の食品の製造・開発が行われており、食品物性を制御する技術が求められている。

畜産食品にはタンパク質を主な構成成分とするものが多く、加熱で硬くなりやすい。一方発酵調味料はタンパク質分解酵素によりうまみ成分であるアミノ酸を生成しており、火入れ等により失活させない製品にはタンパク質分解酵素活性が残存する。近年、開封後も空気が入らない気密性の高い容器が開発されたことにより、火入れせず膜ろ過で除菌した生(なま)しょうゆが広く販売されるようになってきている<sup>1)</sup>。そこで残存したタンパク質分解酵素活性により畜産食品の物性を制御し、多様な食感の食品を製造できると考えられる。以上のことから発酵調味料のタンパク質分解酵素が畜産食品の物性に及ぼす影響を調査し、望ましい物性とするための指標を提供することで製品開発に寄与できると考えられる。

畜産食品を酵素剤や酵素を含む食材で軟らかくすることはこれまでにも多数行われてきている<sup>2)~4)</sup>。しかし通常は酵素を含む調味液に漬けてから処理してから調理加工するため、浸漬するための設備が必要となり、酵素反応を保存のため低温で行うことで反応時間が長いといった問題がある。さらに酵素剤は価格が高額なことから、生産コストは上昇する。

そこで著者らは加熱調理の過程で酵素反応させる方法を用いることで、浸漬するための設備を不要とし、高温での酵素反応により短時間で酵素処理できる方法を提案する。なお、この方法では発酵調味料に残存するタンパ

ク質分解酵素を利用するため酵素剤は不要である。本研究では、一定の加熱調理を用いたときにどのくらいの酵素活性及び反応時間で目的のかたさが得られるかを予測することを目的とした。

## 2. 実験方法

## 2.1 試料

鳥むね肉は筋肉が集まっているため物性が均一であることと、加熱により硬くなりやすいため、本研究における物性試験用試料として選択した。組織中の酵素の影響を除去するため、鳥むね肉を65℃で30分加熱した。その後、筋膜に近い部分を除去し、約3cm角に切ったものを使用した。

発酵調味料は生の濃口しょうゆ2種類(愛知県外メーカーA社製及び県内メーカーB社製)、生引たまりしょうゆ(県外メーカーC社製)、白しょうゆ(県内メーカーD社製)各1種類を用いた(以下それぞれ濃口A、濃口B、たまり、白と表記)。各しょうゆについて、火入れにより酵素を失活させたものを用意した。火入れしょうゆは、しょうゆ100mLをねじ口びんに入れたものを85℃で30分間加熱したものを1日静置後、2号ろ紙(アドバンテック(株))でろ過したものを用いた。

## 2.2 物性測定試料の試料調製

200mL ビーカーにしょうゆ、15% (w/v) ショ糖溶液、及び水を、試料重量に対してそれぞれ体積相当量で10%、20%、20%ずつ入れた。その中に試料を入れ、試料の上に100 mL ビーカーを置き、落し蓋とした。これを25℃に調整した3L湯せんに入れ、加熱して湯せんが

\*1 食品工業技術センター 保蔵包装技術室

沸騰した後 30 分沸騰状態を続けた。試料を冷却後、筋繊維方向が長軸となるようにして短軸を 1 cm×1cm に切断した。しょうゆとして、生しょうゆ、火入れしょうゆ、及び両者の 1:1 混合の 3 通りを用い、同じ鳥むね肉由来の試料を用いて同時に加熱した。各試験はいずれも 3 連で行った。

### 2.3 破断応力の測定

破断応力はクリープメーター(RE2-330005C、(株)山電)を用いて測定した。200N ロードセルを用い、接触面積 1mm×30mm のくさび形プランジャーを使用し、条件は速度 1mm/sec、測定歪率 99%とした。試料幅をノギスで測定して接触面積を入力して測定し、破断応力を求めた。測定は 1 試験区 10 点程度行い、破断点を検出できないデータを除外した後、破断応力が最大と最小のデータを除外した。3 回分のデータをまとめ、平均値と標準偏差を求めた。破断応力相対値は、各破断応力値を同時調製した火入れしょうゆ試料の平均破断応力で除し、3 回分のデータをまとめ、平均値と標準偏差を求めた。

### 2.4 酵素活性の測定(40℃、pH7 での測定)

しょうゆ醸造における麴の酵素活性測定に使用される全プロテアーゼ活性の反応条件である 40℃、pH7 で酵素反応させ、酵素反応後残存するカゼインを呈色させる方法で行った<sup>5)</sup>。この方法はタンパク質分解産物の影響を受けないことが特徴である。

表 1 の構成の酵素反応液を調製して測定した。表 1 の構成液のうち生しょうゆを除いた液を試験管に調製して 40℃に保ち、そこに生しょうゆを加えた。生しょうゆを加えた直後(0 分)、5 分後及び 15 分後に酵素反応液 25μL を取り、表 2 の構成の CBB 液 1.225mL に加えた。30 分静置後 595nm の吸光度を測定し、酵素反応液の残存カゼイン量を求めた。残存カゼイン量と反応時間から酵素活性を求めた。1 mL のしょうゆが 1 分間にカゼインを 1mg 分解する活性を 1mg/(mL・min) とした。

表 1 酵素反応液の構成

2%カゼイン水溶液	0.05mL
0.1M リン酸緩衝液 (pH7)	0.4mL
生しょうゆ	0.05mL
水	0.5mL

表 2 CBB 液の構成

クマシーブリリアントブルーG250	50mg
メタノール	25mL
リン酸	100mL
水	25mL

上記混合液を 5 倍希釈して用いた。

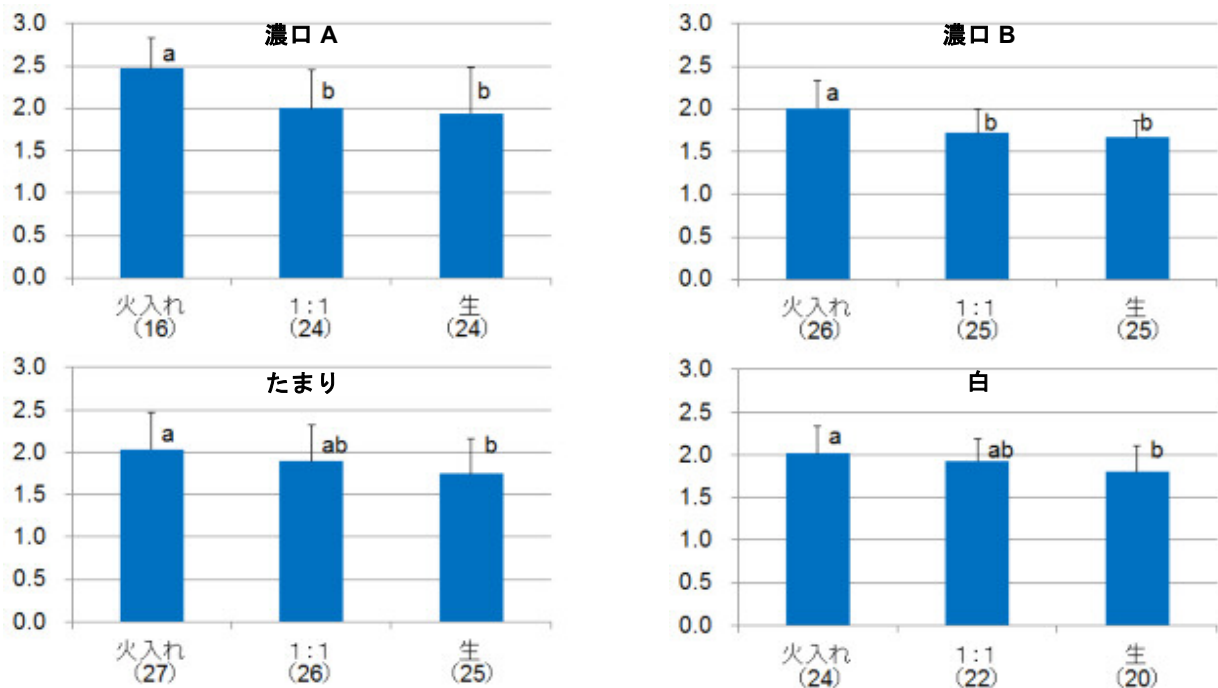


図 1 鳥むね肉の破断応力(縦軸:単位 MN/m<sup>2</sup>)

異なる文字間(a, b)には有意差があることを示す(p<0.05)。( )内は n 数。

## 2.5 酵素活性の測定(物性測定試料調製条件で加熱した測定)

表 3 の構成の反応液を 1mL マイクロチューブに調製し、100mLの水とともに 200mL ビーカーに入れた。その上に 100 mL ビーカーを置き、落とし蓋とした。これを 25°C に調整した 3L の湯せんに入れ、85°C まで加熱した。冷却後反応液にリン酸緩衝液と水を加えた後、25 $\mu$ L を取り、CBB 液 1.225mL に加えた。以降は 2.4 と同様に行った。残存カゼイン量からしょうゆ 1 mL あたりのカゼイン分解量を求め、加熱時間により除した値を酵素活性とした。

表 3 酵素反応液の構成

2%カゼイン水溶液	0.05mL
15%(W/V)ショ糖	0.1mL
生しょうゆ	0.05mL
水	0.3mL
酵素反応後に下記を追加	
0.1M リン酸緩衝液 (pH7)	0.4mL
水	0.1mL

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 鳥むね肉の破断応力

鳥むね肉の各種しょうゆごとの破断強度を図 1 に示す。

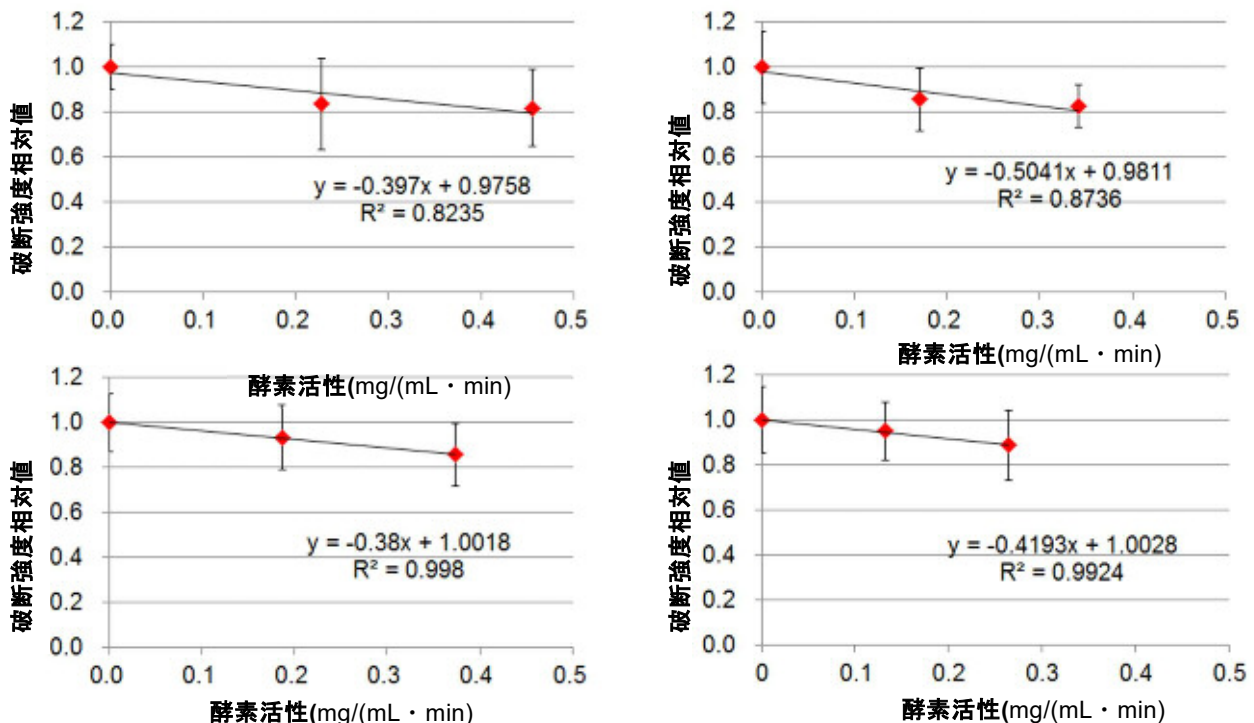


図 2 鳥むね肉の破断応力変化(縦軸: 破断応力相対値、横軸: 酵素活性(物性測定試料調製条件))

いずれのしょうゆの場合も、破断応力は火入れしょうゆ、1:1 混合、生しょうゆの順で低下した。火入れしょうゆ

と生しょうゆの間では全てのしょうゆで少なくとも 5% の危険率で有意差があり、濃口しょうゆ 2 種では火入れしょうゆと 1:1 混合との間にも有意差が認められた。これは火入れしょうゆ、1:1 混合、生しょうゆの順で酵素活性が高くなり、酵素活性が高いほどより破断強度が低下するためと考えられた。

### 3.2 酵素活性測定法の比較

各測定条件での酵素活性及び 40°C、pH7 での酵素活性に対する物性測定試料調製条件で加熱した酵素活性の比を表 4 に示す。40°C、pH7 での酵素活性は濃口 A が高く、濃口 B とたまりが同程度で、白が低かった。物性測定試料調製条件で加熱した酵素活性も濃口 A が高く、濃口 B とたまりが同程度で、白が低かった。なお物性測定試料調製条件での平均加熱時間は 10 分 21 秒だった。

表 4 各種生しょうゆの酵素活性及び 40°C、pH7 での酵素活性に対する比

	濃口 A	濃口 B	たまり	白
活性(mg/(mL·min))				
40°C、pH7(a)	0.33	0.19	0.23	0.13
物性測定試料(b)	0.46	0.34	0.37	0.26
比(b/a)	1.39	1.79	1.61	2.00

物性測定試料調製条件で加熱した酵素活性は、いずれのしょうゆも 40°C、pH7 より高かった。これはより高

温で反応させるためと考えられた。また白でより酵素活性が高くなっており、結果として各しょうゆ間の酵素活性の差が小さくなっていった。これは、しょうゆには至適 pH・温度が異なる複数のタンパク質分解酵素が混在しており、白に含まれる酵素群は他のしょうゆの酵素群に比べて物性測定試料調製条件で加熱する場合は 40℃、pH7 より適した条件になったことが考えられた。

### 3.3 酵素活性と破断応力との相関

40℃、pH7 での酵素活性と各種しょうゆの鳥むね肉破断応力相対値との一次回帰式を求めたところ、酵素活性の低い白が傾き-0.87、濃口 B が-0.88 と傾きが大い一方で、濃口 A は-0.55、たまりは-0.61 と傾きが小さく、しょうゆの種類によって差が出ていた。

これに対して、物性測定試料調製条件で加熱した酵素活性と各種しょうゆの鳥むね肉破断応力相対値との間では、**図 2** に示すとおり、濃口 B がやや近似式の傾きが大いものの、他のしょうゆでは近似式の傾きが同等の数値となった。調理条件を考慮した酵素活性を把握することによりしょうゆの種類によらず、破断応力低下を予測できると考えられた。

### 3.4 酵素活性による破断強度の予測式

予測式は、物性測定試料調製条件での酵素活性と全ての鳥むね肉破断応力相対値との一次回帰式に火入れしょうゆで調理した鳥むね肉の平均破断応力(2.1 MN/m<sup>2</sup>)を乗じて算出した。その結果、予測式は破断応力 Y(MN/m<sup>2</sup>) = -0.89x + 2.08、相関係数は 0.840 となった。生しょうゆに残存する酵素活性の範囲であれば、鳥むね肉破断強度の予測に上記式を利用できると考えられた。

## 4. 結び

発酵調味料であるしょうゆを用いて所定の方法で調理された鳥むね肉の物性の評価を行った。調味料のタンパク質分解酵素の活性を測定し、それと物性との相関を検討したところ、鳥むね肉について破断応力とタンパク質分解酵素活性との関係を一次回帰式にすることができた。また酵素活性測定を調理加工条件で加熱した測定にすることによりしょうゆの違いは考慮しなくてよいことが分かった。

今後は酵素活性を調整した発酵調味料を用い、所定の方法で調理された畜水産食品の物性の評価を行い、より広い範囲の酵素活性と物性との相関を調査する。より広い範囲の酵素活性の予測式を得ることで、望ましい物性での製品開発に寄与できる。

## 文献

- 1) 農林水産省:農林物資規格調査会平成 27 年 9 月 8 日 会議資料日本農林規格の改正について「しょうゆの日本農林規格」, [http://www.maff.go.jp/j/jas/kaigi/pdf/h270908\\_jas\\_tyou\\_siryoul\\_kai.pdf](http://www.maff.go.jp/j/jas/kaigi/pdf/h270908_jas_tyou_siryoul_kai.pdf), (2018/9/10)
- 2) 矢野未右紀、石川健一、鳥居貴佳: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **4**, 116(2015)
- 3) 朝倉富子、田村倫子、舟木淳子: 種実由来のプロテアーゼを用いた高齢者向け多機能食品の開発, <http://urakamizaidan.or.jp/hp/jisseki/2007/vol17urakamif-01asakura.pdf>, (2018/9/10)
- 4) 株式会社フードケア: スベラカーゼミートパンフレット, <http://www.food-care.co.jp/pdf/sbm.pdf>, (2018/9/10)
- 5) 柏木豊: 微生物遺伝資源利用マニュアル, **16**, 1 (2004)