

## 酵素による血合肉の液化に関する研究

高橋 喬・森下達雄・冨田和明\*

三重大学水産学部

### Solubilization of Fish Red Muscle with Proteolytic Enzymes

Takashi TAKAHASHI, Tatsuo MORISHITA and Kazuaki TOMITA

Faculty of Fisheries, Mie University

This paper describes the hydrolyses of the red muscle of skipjack with its pyloric caeca and three commercial proteolytic enzymes Denapsin (a protease of *Aspergillus* sp.), papain and Amano-P (a protease of *Aspergillus* sp.), to utilize fish red muscle which is discarded in the processing of marine products. The homogenates of the red muscle were incubated with those enzymes under suitable conditions. After incubation, the enzymatic reaction mixtures were boiled and then filtered. The filtrates (hydrolysates) obtained were subjected to determination of nitrogen, spectral analysis and gel filtration. The hydrolysate produced with the pyloric caeca contained a considerable amount of ammonia which was released during the hydrolysis. Among three commercial enzymes tested, Denapsin showed the highest ratio of solubilized nitrogen to the protein nitrogen of red muscle. The hydrolysate produced with Denapsin was a pale yellow and contained mainly lower peptides. The results obtained suggested that Denapsin is one of the most suitable enzymes for the solubilization of fish red muscle.

Key words: fish red muscle, solubilization

血合肉は特有のにおいと濃い色を有するために、加工利用に際し廃棄されることが多い。最近、多獲性赤身魚の高度利用技術の開発に関して行なわれた研究では、血合肉の多いイワシ、サバなどの合理的な利用法は、普通肉と血合肉とを分離し、それぞれ別建てで開発すべきことが指摘されている(橋本ら, 1982)。

著者らの一人は数年前からカツオの新しい加工法の開発について検討してきたが、血合肉の混入率が高くなるにしたがい、種々の点、特に色調の点で問題となることが多く、血合肉の利用法を開発することは、資源を有効に利用するうえで重要なことと考えてきた。

血合肉からにおいや色を除去する際、固形の血合肉に対して処理を施すよりも、血合肉を液化させた状態にしてから処理するほうが、除去しやすいように考えられるので、血合肉を液化し、

\* 豊醤油株式会社

精製した液化物から調味料等の加工素材を得る目的で、まず血合肉の酵素による液化を検討した。次にその結果を報告する。

## 実験方法

### 血合肉及び酵素

血合肉は凍結カツオの血合肉を使用した。

酵素はカツオ幽門垂のたんぱく質分解酵素、市販のたんぱく質分解酵素アスペルギン (*Aspergillus* sp., 長瀬産業製,  $1 \times 10^4$  PU), パンパイン (長瀬産業製,  $1 \times 10^4$  PU), アマノ-P (*Aspergillus* sp., 天野製薬製,  $1 \times 10^4$  PU) を用い、市販品は所定量を1%食塩水にとかして使用した。幽門垂のたんぱく質分解酵素は次のように調整した。液化条件を検討する際には、幽門垂を等量の海砂とともに乳鉢中でよく磨砕し、4倍量の1%食塩水を加えて30°Cに30分間放置後、10,000 rpm 15分間遠心分離して得られた上澄液を酵素液とした。実際に則した液化では幽門垂を細切したものをそのまま使用した。

### 血合肉の液化

液化条件を検討する際には、ハサミで細切した血合肉に10倍量の1%食塩水を加えてホモジナイズし、得られた懸濁液2部に0.2M MacIlvaine あるいは Atkins-Pantin 緩衝液3部を加えpHを調節後酵素を作用させた。所定時間後にトリクロル酢酸を加えて反応を停止させ、生成されたたんぱく分解物量をフォリン呈色法あるいはニンヒドリン呈色法により測定した。

実際に則した液化では、血合肉に少量の水を加えてホモジナイズしたのち、酵素液を含めて水量が血合肉の2倍量となるように水を加え、塩酸溶液または水酸化ナトリウム溶液でpHを調節後酵素を作用させた。所定時間後に反応液を煮沸し、未分解のたんぱく質をろ別して液化物を得た。酵素分解前の試料について全窒素量(a%)及びトリクロル酢酸可溶性の窒素量(b%)を、酵素分解後の試料について全窒素量(c%)及びトリクロル酢酸可溶性の窒素量(d%)をそれぞれミクロケルダール法により測定し、次式により液化率を算出した。

$$\text{液化率} = \frac{d/c - b/a}{1 - b/a} \times 100$$

### 液化物の色調の検討

液化物の全窒素濃度が0.5%となるように水で稀釈後、日立330型自記分光光度計により吸収スペクトルを測定し、各液化物の色調を比較した。また、吸光曲線とグラフの横軸及び縦軸とに囲まれた部分の面積から色の濃さを比較した。

### 液化物のペプチド構成の検討

液化物1mlをあらかじめ0.2M酢酸水溶液で平衡化したBio-Gel P-2カラム(15×900nm)に注入後、0.2M酢酸水溶液を7.1ml/hrで流し、溶出液を3mlずつ分取してニンヒドリン呈色値及びフォリン呈色値を測定した。次に、得られた画分のピークの溶出液0.1mlあるいは0.2mlに、6N塩酸を1ml加えて110°Cで24時間加水分解し、分解前後のニンヒドリン呈色値を測定した。なお、塩酸分解は減圧した密封試験管内で行なった。

## 実験結果ならびに考察

### 血合肉の液化

1. 幽門垂による液化 幽門垂中にはたんぱく質やペプチドを分解する種々の酵素が含まれているので、これら酵素により生成された分解生成物を測定するには、フォリン呈色法により行なうよりもニンヒドリン呈色法によるほうが適當であると考え、ニンヒドリン呈色法によって液化条件を検討した。

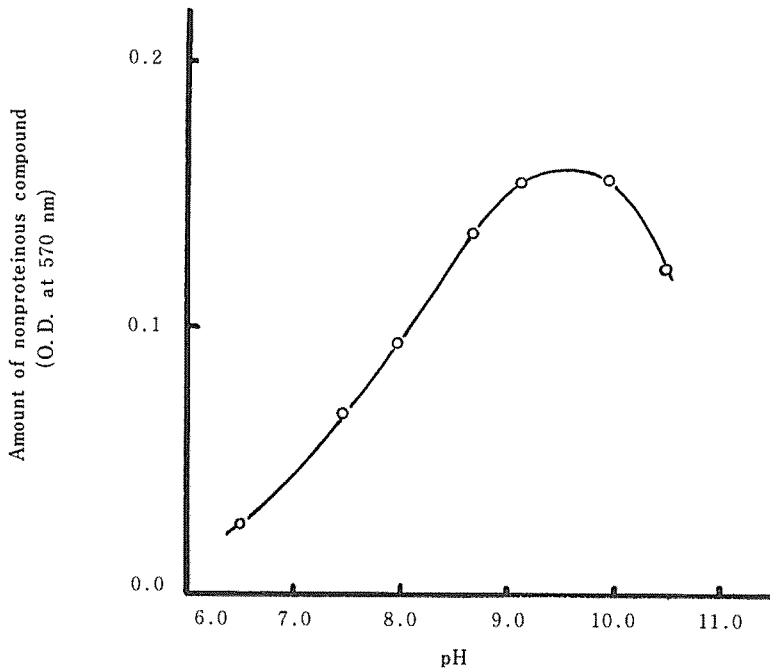


Fig. 1. Effect of pH on the proteolysis of skipjack red muscle with its pyloric caeca. Two ml of 10% (w/v) suspension of the red muscle in 1% NaCl solution were added to 3 ml of 0.2 M MCLVAINE buffer solution or ATKINS-PANTIN buffer solution, and hydrolyzed with 1 ml of the extract of the pyloric caeca. Hydrolysis was carried out at various pHs and 30°C for 20 min. Amount of nonproteinous compound produced was measured by the ninhydrin colorimetric method and expressed as optical density at 570 nm.

Fig. 1 は基質血合肉に幽門垂抽出液を種々の pH において 30°C、20 分間作用させたときの結果である。この図から明らかなように、血合肉の分解は pH 9.2~9.8 で最もよく進む。次に pH 8.0, 8.6, 9.2 において幽門垂抽出液を種々の温度で 3 時間基質に作用させ、血合肉の液化に及ぼす pH と温度の影響を調べた。Fig. 2 はその結果である。この図からもわかるように pH 8.0, 8.6, 9.2 における至適温度はいずれも 50°C にみられたが、液化が最もよく進むのは pH 8.0~8.6、温度 50°C 付近であることがわかった。

以上の結果に基づき、次に実際に則した液化を試みた。幽門垂にはたんぱく質分解酵素のほか、エキス分やビタミン等の有効成分が多量に含まれているので、これらの有効成分をも利用するために、血合肉に等量の幽門垂を細切して加え、若干の水を加えて pH を 8.5 に調節後、50°C で 3 時間攪拌しながら液化した(液化終了時の pH 8.13)。液化終了時に酵素反応懸濁物を煮沸し、

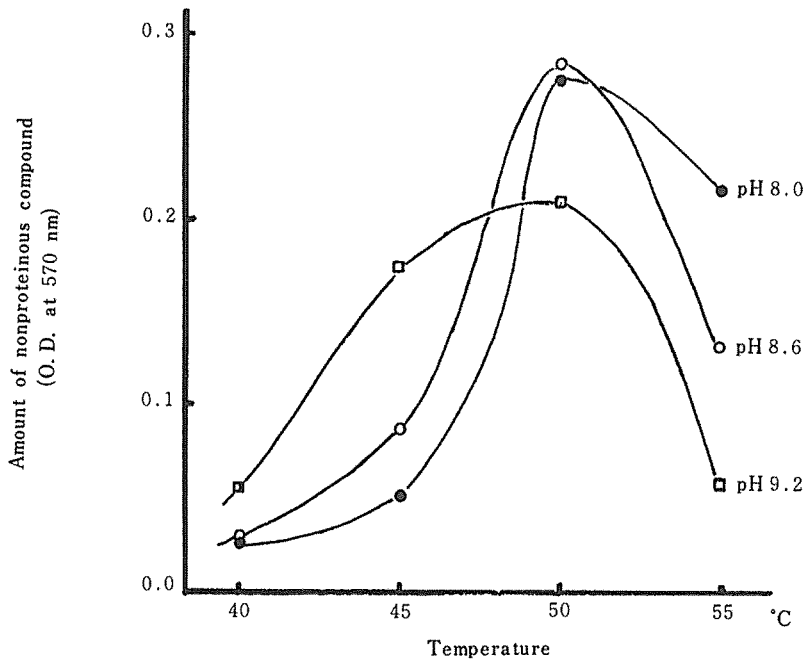


Fig. 2. Effect of temperature on the proteolysis of skipjack red muscle with its pyloric caeca.

Proteolysis was carried out at various pHs (8.0, 8.6 and 9.2) for 3 hours.

ろ過したところ、ろ過はきわめて困難であり、ようやく得られた液化物は濃い黒ずんだ褐色を帯び、強いアンモニア臭と肉臓特有のにおいが混じったきわめて不快な臭気を有していた。

カツオ幽門垂中には、魚肉からアンモニアを生成するたんぱく質分解酵素が存在し、カツオ肉からは他の魚肉からよりも多量のアンモニアが生成されることが既に報告されている(柏田, 1955 a, 1955 b, 1958)。また一方では、幽門垂はカツオ塩辛の製造には不可欠なもので、呈味成分の生成には重要な役割を果していることも古くから知られている。呈味成分の増強からも幽門垂による血合肉の液化を考えたのであるが、予想以上に著量のアンモニアが生成され、においが悪くなることを知った。アンモニアの生成は液化中にも感知され、実際の工場生産では種々問題があると考えられたので、これ以上の検討は行なわなかった。

2. 市販の酵素による液化 使用した3種類の酵素のうち、デナプシンおよびパンパインによる魚肉の液化条件については、サメ肉のほかに既にアジ肉を用いた実験においてもサメ肉と同様の結果を得ているので、ここではまずアマノールPによる血合肉の液化条件を調べた。

Fig. 3は種々のpHにおいて30°C、20分間反応させた時の結果である。血合肉のアマノールPによる加水分解はpH 10付近で最も進むことがわかった。

次に加水分解に及ぼすpHと温度の影響を調べた。アマノールPの説明書によると至適温度は45°Cといわれているので、念のため45°Cと50°CでpH 6.4~9.9において酵素を3時間反応させた。結果はFig. 4に示すとおりで、アマノールPはpH 7.5付近、45°Cで最もよく作用するが、7.0~6.4のpH域でもかなり作用することがわかった。

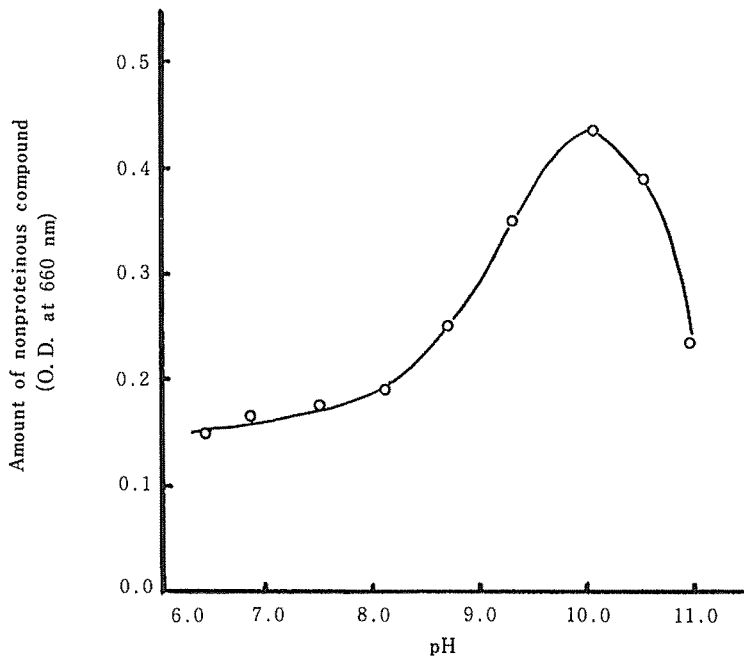


Fig. 3. Effect of pH on the proteolysis of skipjack red muscle with Amano-P. Proteolysis was carried out at various pHs and 30 °C for 20 min. Amount of nonproteinous compound produced was measured by the Folin colorimetric method and expressed as optical density at 660 nm.

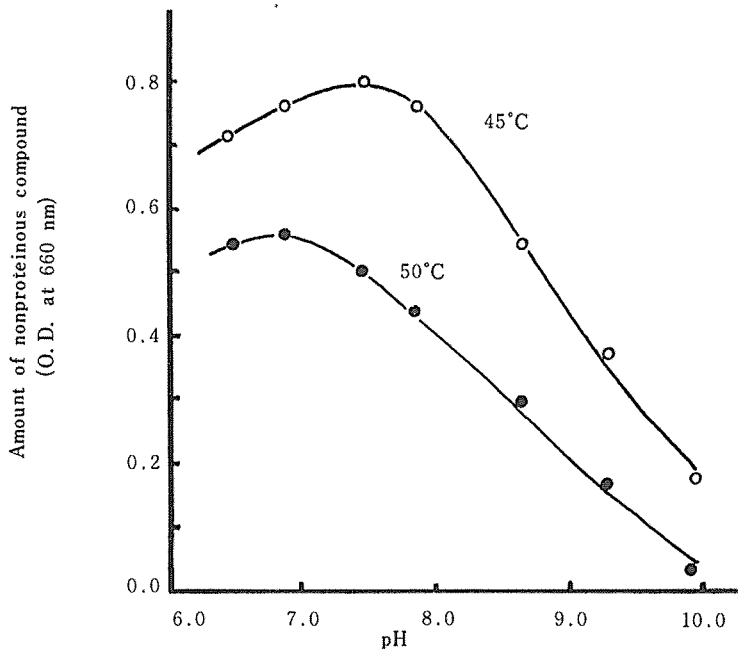


Fig. 4. Effect of pH and temperature on the proteolysis of skipjack red muscle with Amano-P. Time of proteolysis : 3 hours.

以上の結果と既に検討されたデナプシン及びパパインによる液化条件とに基づき、次のような条件下で実際に則した液化を試みた。すなわち、デナプシンでは pH 3.0, 50°C, パパインでは pH 7.0, 70°C, アマノ-P では pH 7.4, 45°C でそれぞれ 3 時間酵素を作用させた。酵素の添加量は血合肉に対して 0.5% である。酵素反応懸濁液の pH は液化中にも調節して所定の pH を保つようにした。

液化終了後、酵素反応懸濁液を煮沸しろ過したところ、パパイン及びアマノ-P の懸濁物はろ過が困難であり、ようやく得られたろ液（液化物）は血合肉特有の腥臭が強く、濃い褐色を帯び、その味は苦味があり旨味に乏しかった。これらに対しデナプシンの懸濁物はろ過が非常に容易で、得られた液化物においては若干の酸臭を感じさせるが不快臭ではなく、その色は蛍光を帯びた淡黄色で、血合肉から得られたものとは考えられない程の淡色であった。また味は前二者と同様に苦味が感ぜられるが、旨味があり pH が低いだけに酸味も感ぜられた。

同じ食品の抽出液でも抽出液の pH によって、その色調やにおいの異なることがしばしばみられる。パパインやアマノ-P の液化物の色調やにおいを改善し、酵素反応懸濁物のろ過を容易にするために種々検討した結果、反応懸濁物のろ過は pH が 6.5 ぐらいまで下がってくると容易になること、液化開始時に pH を 6.5 に調節し途中で pH の再調節を行わなければ、液化の終りには pH は 6.15~6.25 になること、6.0~6.5 の pH 域でパパインを作用させた場合、反応温度を 65°C としてもあるいは 70°C としても血合肉の液化率はほとんど変わらないこと、及び液化時の pH が低くなるにしたがい、液化物の色やにおいが改善されることがわかった。

既に述べたようにアマノ-P は温度 45°C で pH 6.4~7.0 でもよく作用し、また前報（高橋ら、1979）のように、パパインは pH 6.0~6.5 でもかなりよく作用するので、至適 pH からややはずれるが、6.1~6.5 の pH 域でこれら酵素を作用させることにした。また、液化の途中で pH を再調節することは、実際に工場で行なう場合には煩雑であり、上記程度の pH の移動は酵素活性にそれ程影響を与えないとは考えられないので、途中で pH の再調節を行わないこととし、Table 1 に示すような条件下で実際に則した液化を行なった。酵素使用量は血合肉に対して 0.5% である。Table 1 には血合肉たんぱく質の液化率をも併せ示した。

Table 1. Hydrolyses of skipjack red muscle with three commercial proteolytic enzymes

Enzyme	Conditions of hydrolysis			Ratio of nitrogen solubilized <sup>a</sup> (%)
	pH	Temperature (°C)	Time (hr)	
Denapsin	3.0	50	3	73.9
			6	82.8
Papain	6.5	65	3	67.5
			6	70.6
Amano-P	6.5	45	3	56.8
			6	71.1

a: Ratio of the nitrogen solubilized to the protein nitrogen of red muscle.

One part of the red muscle was suspended in two parts of distilled water and subjected to the action of each enzyme (ratio of enzyme to red muscle (w/w), 1:200).

これらの酵素のなかではデナプシンが最もよくたんぱく質を分解し、その液化率は 3 時間の液化では約 74%、6 時間では約 83% であった。アマノ-P は 3 時間の液化では液化率が最も低く約 57% にすぎないが、6 時間液化すると 71% まで向上する。これらに対し、パパインは 3 時間の液

化で約68%、6時間でも約70%と液化時間が長くなっても液化率にはほとんど差異がみられなかった。液化時間を延長してもその効果が認められないのはサメ肉をパパインで液化した場合と同様である。

前に報告したサメ肉の液化(高橋ら, 1979)ではデナブシンとパパインを使用したのであるが、たんぱく質の液化率をくらべてみると、デナブシンによる6時間の液化では、サメ普通肉が76~79%、カツオ血合肉が約83%で、両者の間には大きな差異がみられず、カツオ血合肉の液化率が高くなる傾向がみられるのに対し、パパインによる3時間の液化では、サメ普通肉が85~88%、カツオ血合肉が約68%で、カツオ血合肉の液化率が20%程低くなっている。至適pHをややなれたpH域でカツオ血合肉を液化させたのであるから、至適pHにおけるサメ普通肉の液化にくらべて、液化率が低くなるのは当然のことと考えられるが、そのことを考慮に入れても差異が大きすぎるように思われる。SYROVY *et al.* (1970)はコイの血合肉ミオシンは普通肉ミオシンよりもトリプシンの作用を受けにくく、その分解速度は普通肉ミオシンの $\frac{1}{6}$ であることを報告している。カツオ血合肉の液化率が低くなる原因はいろいろあろうが、血合肉はパパインの作用を受け難いのではないかと思われる。

デナブシン液化物のおいと色については上述のとおりである。パパイン液化物のおいと色はアマノ-P液化物のそれらとほとんど同じであり、これら液化物のおいと色はデナブシン液化物には及ばないが、pH 7.0(パパイン)あるいは7.4(アマノ-P)で液化させたものよりも魚腥臭がうすれ、色も黒みがとれてかなり淡色となった。Fig. 5はデナブシン、パパイン、アマノ-P、各液化物の380~700 nmにおける吸収スペクトルを示したものである。パパイン液化物の吸光曲線はアマノ-P液化物の吸光曲線とほとんど同じである。これらにくらべるとデナブシ

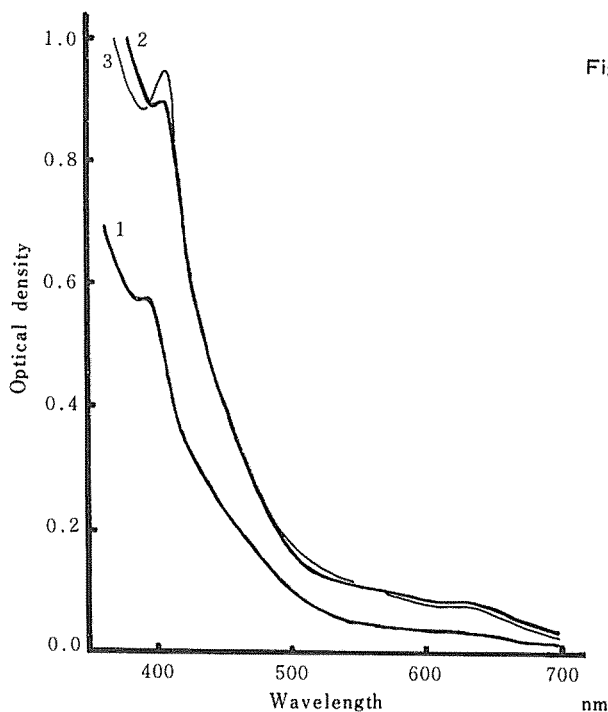


Fig. 5. Absorption spectra of Denapsin, papain and Amano-P hydrolysates. The hydrolysates were those from the experiments described in Table 1. The hydrolysates were diluted with distilled water to be a 0.5% solution of total nitrogen, and subjected to the spectral analysis.  
1: Denapsin hydrolysate,  
2: Papain hydrolysate,  
3: Amano-P hydrolysate.

ン液化物の吸光曲線は395-405 nm にかけて曲線の形が異なるが、総体的にみると似たような形の曲線とみることが出来る。デナプシン液化物は若干蛍光を帯びているが、これらの吸収スペクトルから上記3液化物の色調はほぼ同じと考えられる。またこの図から、液化物の色の濃さは吸光曲線とグラフの縦軸及び横軸によって囲まれる面積をもってあらわすことが適当と考え、面積比を求めた結果、パパイン液化物及びアマノ-P液化物の色の濃さは、デナプシン液化物の約2倍であった。

#### 血合肉液化物のペプチド構成

実際に則した液化で得られた血合肉液化物のペプチド構成を知るために、液化物を Bio-Gel P-2 カラムに注入しゲルろ過を行なった。Fig. 6 はデナプシン、パパイン及びアマノ-P の各液化物をゲルろ過したときの結果である。ニンヒドリン呈色値から、デナプシン液化物は Tube No. 28, 30, 35, 43, 50をピークとする I から V までの5つの画分にわけられる。パパイン液化

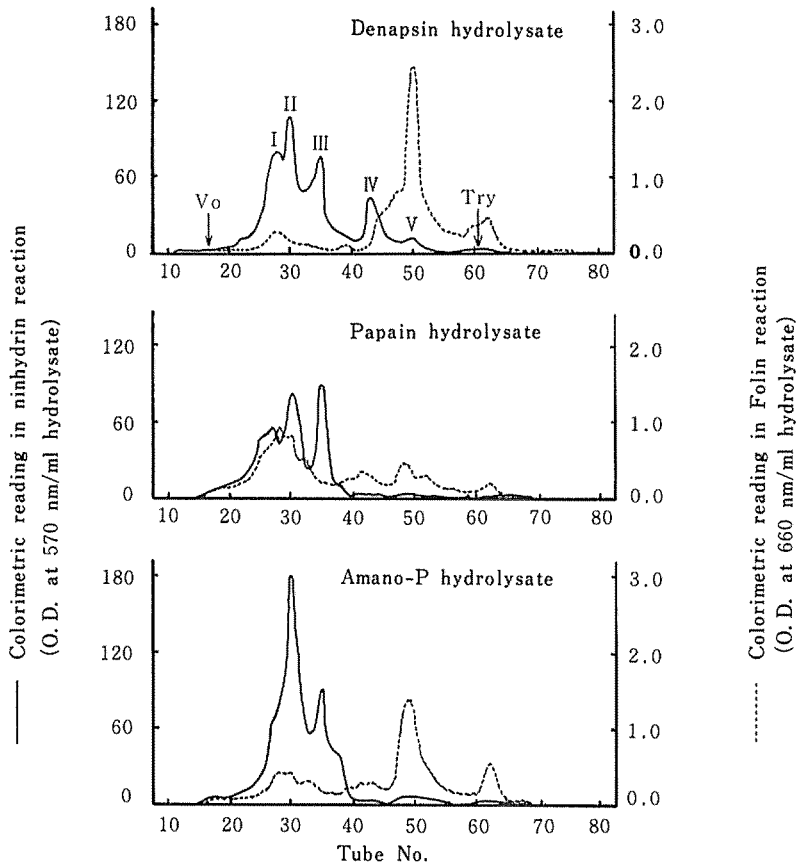


Fig. 6 Chromatography of enzymatic hydrolysates from skipjack red muscle on Bio-Gel P-2. The hydrolysates are those from the experiments described in Table 1. One ml of hydrolysate was added to a column of Bio-Gel P-2 (1.5 × 90 cm) and eluted with 0.2 M acetic acid (7.1 ml/hr). Three ml fractions were collected and the absorbance at 570 nm (ninhydrin color) and 660 nm (Folin color) was determined.

Vo : Void volume, Try : Tryptophan.



物は3つの画分にわけられ、これらはデナブシン液化物のI, II, IIIに相当する。アマノ-P 液化物は2つの画分にわけられ、これらの画分のピークは Tube No. 30 と35でデナブシン液化物のII及びIIIの各ピークと一致する。それでアマノ-P 液化物の画分をII及びIIIと表示したが、この画分IIでは Tube No. 28 付近に肩がみられるので、これはデナブシン液化物のIとIIの画分が一緒になったものに相当する。デナブシン液化物にみられるIV, Vの画分に相当するものは、パパイン液化物にはみられず、アマノ-P 液化物ではVに相当するものがごくわずかにみられるにすぎない。

フォルリン呈色値を測定して得られた各液化物の呈色曲線をくらべてみると、デナブシン液化物とアマノ-P 液化物とは総体的に似た傾向を示し、Tube No. 50に最も大きなピークがあり、次いで62、さらに小さいものが28~30にあるのに対し、パパイン液化物では28~30にかけて最も大きなピークがあり、50, 62はいずれも小さい。フォルリン呈色はチロシン、トリプトファンによる呈色である。標準アミノ酸混合物をゲルろ過すると、チロシンは中、酸性アミノ酸よりもおくれで溶出され、トリプトファンはさらにおくられて溶出されることが報告されている(杉井ら, 1973)。実際にトリプトファンをゲルろ過してみると Tube No. 60 付近に溶出してくる。したがって Tube No. 50 付近にみられるピークにはトリプトファンやチロシンを構成アミノ酸中にもつペプチドがかなり多く含まれるものと考えられる。

次にデナブシン液化物のピーク、Tube No. 28, 30, 35, 43及び50の一定量を塩酸分解してニンヒドリン呈色値を測定し、塩酸分解前のそれと比較した。その結果と、画分IからVまでのニンヒドリン呈色値の合計に対する各画分ニンヒドリン呈色値の比率とを Table 2 に示した。また Table 2 には、パパイン液化物及びアマノ-P 液化物についても、画分ニンヒドリン呈色値の合計に対する各画分ニンヒドリン呈色値の比率を併せ示した。

Table 2. Ninhydrin analysis of the fractions from Bio-Gel P-2 gel filtration of skipjack red muscle hydrolysates

Fraction	Peak of fraction (tube No.)	Ratio of color <sup>a</sup> (%)	Color with ninhydrin reaction		
			% in color <sup>b</sup>		
			Denapsin hydrolysate	Papain hydrolysate	Amano-P hydrolysate
I	28	2.80	32.1	29.8	} 80.0
II	30	2.26	25.6	42.6	
III	35	1.22	25.5	27.6	20.0
IV	43	2.01	13.3		
V	50	3.00	3.5		

The hydrolysates are those from the experiments described in Table 1.

a: The ratio of ninhydrin color before and after acid hydrolysis in the peak of each fraction; small aliquots of the peak were hydrolyzed in 6 N HCl solution at 110°C for 24 hours, and the hydrolysate obtained was subjected to ninhydrin colorimetric analysis.

b: The ratio of each fraction to the total of the fractions in ninhydrin color.

それぞれの画分に含まれるペプチドを構成するアミノ酸の平均個数は、画分Iでは2-4、画分IIでは2-3、画分IIIでは約1、画分IVでは1-3、画分Vでは2-4と考えられる。ゲルろ過では分子量が大きいものほど早く溶出するはずであるが、画分IIIにくらべて画分IV及びVでは

分子量の大きいものが溶出している。これについては次のように考えられる。

トリプトファン及びチロシンは他のアミノ酸よりもおくれで溶出してくるので、トリプトファンやチロシンを含むペプチドも、これらのアミノ酸を含まない同じ分子量のペプチドよりもおくれで溶出してくるものと考えられる。既に述べたようにトリプトファンは Tube No. 60付近に溶出してくるから、Tube No. 43付近、50付近に溶出しているフォリン呈色物はフォリン呈色アミノ酸を構成アミノ酸中にもつオリゴペプチドと考えられる。一方、フォリン試薬で呈色しない低分子のペプチド及びアミノ酸は Tube No. 40以降では溶出の終了期にあたり、漸減しながら溶出するものと思われる。したがって、フォリン呈色オリゴペプチドが溶出し始める画分Ⅳでは溶出物の構成アミノ酸平均個数は画分Ⅲよりも多くなり、フォリン呈色オリゴペプチドの溶出が最高に達する画分Ⅴではアミノ酸平均個数がさらに多くなるものと考えられる。

液化物の画分構成割合（ニンヒドリン呈色値）は使用酵素によって異なる。大まかに言ってアミノ酸平均個数3以下のペプチド及びアミノ酸は、デナブシン液化物では全窒素化合物の約66%、パパイイン液化物では約70%で、これらのうち遊離アミノ酸は両液化合物とも35~40%と思われる。アマノ-P 液化物は画分ⅠとⅡの分離が不充分なので、デナブシン液化物やパパイイン液化物と比較することはできないが、遊離アミノ酸を主体とする画分Ⅲ（平均個数1.22）だけについて言うとデナブシン液化物及びパパイイン液化物では、全体の約25%を画分Ⅲが占めるのに対し、アマノ-P 液化物では20%であった。

## 要 約

カツオ幽門垂及び3種類の市販のたんぱく質分解酵素を用いてカツオ血合肉の液化を検討した。その結果を要約すると次のようである。

カツオ幽門垂による血合肉の液化では、液化中に幽門垂の酵素によって多量のアンモニアが生成され、そのために得られた液化物においてはきわめてわるく、また液化物は濃い黒褐色を帯びていた。用いた市販酵素のなかではデナブシンが最も高い液化率を示し、デナブシン液化物は淡い黄色で、その窒素化合物は低分子のペプチドが主体であり、デナブシンは血合肉の液化に最も適した酵素の一つであることを示唆する結果を得た。

本研究の一部は昭和58年度三重県受託研究費により行なった。記して謝意を表します。

## 文 献

- 橋本周久・山口勝巳・渡辺終五, 1982. 血合肉の特性. 多獲性赤身魚の高度利用技術開発研究に関する総合報告書. 水産庁研究部研究課, 昭和57年10月, 63-71.
- 柏田研一, 1955 a. 水産動物組織の酵素分解に関する研究-I. 筋肉よりアンモニアの生成(i), 日水誌, 21(7): 494-497.
- , 1955 b. 水産動物組織の酵素分解に関する研究-II. 筋肉よりアンモニアの生成(ii), 同誌, 21(7): 498-500.
- , 1958. 水産動物組織の酵素分解に関する研究-III. アンモニア生成とアミドとの関係, 同誌, 23(10): 656-659.
- 杉井麒三郎・衣巻豊輔, 1973. 魚類液化たんぱくに関する研究-VI. 使用酵素剤の種類と液化たんぱくの組成. 東海水研報, 第73号: 103-112.
- SYROVY, I., A. GASPARD-GODFROID and G. HAMOIR, 1970. Comparative study of the myosins from red and

white muscles of the carp. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 78(5): 919-934.

高橋 喬・森下達雄・上野隆二・坪井敏彦, 1979. 酵素によるサメ肉の脱尿素液化物の製造について. 本誌, 第6号: 199-207.