

酵素による小型マアジの 液化に関する研究

董 定綿*・高橋 喬・森下達雄

三重大学水産学部

Solubilization of Horse Mackerel, *Trachurus japonicus*, by Enzymic Hydrolysis

Ding-Mian DONG, Takashi TAKAHASHI and Tatsuo MORISHITA

Faculty of Fisheries, Mie University

The purpose of the present paper is to study the hydrolyses of 12 different kinds of commercially available protease preparations on whole fish body, to utilize fish of small size which are caught abundantly. In this investigation horse mackerels (body length, 13-16cm) are used as materials, and the results obtained are summarised as follows.

Among 12 kinds of the protease preparations used, the best result was achieved by Actinase and Protease M. When the hydrolysis of whole horse mackerel with Actinase was carried out at 50°C for 6 hrs under non-adjusting pH condition, the yield of soluble nitrogen in the hydrolysate obtained approximated to 89%. This hydrolysate was yellowish brown, and had a delicate, but slightly bitter flavour. The result of gel filtration of this hydrolysate indicated that its nitrogenous compounds were nearly all free amino acids and lower molecular peptides (average number of amino acid in peptides was >3).

On the other hand, when whole horse mackerel was digested with Protease M at pH 4.5 and 50°C for 6 hrs, the soluble nitrogen content in this resulting hydrolysate attainable was 84.3%. The hydrolysate was a pale yellowish brown, and had as delicate a flavour as the former, and had acidity as well, but it was less bitter than the former. The free amino acids and lower molecular peptides in the hydrolysate attainable was 86%. Consequently, it was considered that the effect of Protease M bore comparison with Actinase.

Key Words : Enzymic hydrolysis, Horse mackerel, Solubilization

マイワシ、サバなどの多獲性魚類を処理加工して有効に利用するためには、魚体処理機及び装置が必要となるが、適当なものはあまりないようである。最近、多獲性赤身魚の高度利用に関する総合的な研究が行なわれ、その研究において開発された魚体選別機、自動調理機等の機械装置は、価格や小型化等についてさらに検討すべき点があるが、生産面で活用されていることが報告されている(水産庁 研究部 1982, 1983)。この研究結果は魚体の大きさが中以上のサバ、イワシについて得られたものであり、将来はより小さい魚体のものに適する機械装置が開発されるであろうが、比較的魚体の小さいアジ、サバ、イワシなどの漁獲量も多い現状から、全魚体を一括利用する方法の一つとして全魚体の液化利用について研究を行うことにした。

近年における魚類たんぱく質の酵素分解に関する研究の多くは、筋肉やFPC (Fish protein concentrate) を対象としたもので、全魚体の分解に関する報告例は少なく、井関ら(1968, 1973)及び杉井ら(1973)が「魚類液化たんぱく」に関する一連の研究において、7種類の市販のたんぱく質分解酵素剤によるマアジ、サバ、スケトウダラなど全魚体の液化を検討した報告のほか、RAZUMOVSKAYA*ら(1980)が *Bacillus subtilis* 起源のたんぱく質分解酵素を使用してカラフトシヤモ *Mallotus villosus* と Alewife *Pomolobus pseudoharengus* などの全魚体の液化を行った報告等があるにすぎない。

このようなことから、本実験ではまず全魚体の液化についての知見を得るために、市販酵素剤12種類のなかから適当なものを選び、液化条件、窒素収量、液化物の色調、におい、ペプチド構成などについて検討を加えた。得られた結果を次に報告する。

実 験 方 法

実験材料 市販されている冷凍の小型マアジ *Trachurus japonicus* を用いた。その体長は約13-16cmで体重は約23-45gであった。全魚体の一般成分組成は、水分：75.15%、粗たんぱく質：18.25%、粗脂肪：3.30%、粗灰分：3.02%であった。

酵素剤 次の市販品を使用した。ニューラーゼ F (7×10^3 PU)、プロテアーゼ M (5.5×10^3 PU)、プロテアーゼ A (10×10^3 PU)、プロテアーゼ N (150×10^3 PU)、プロテアーゼ P (10×10^3 PU)、パンクレアチン F (26×10^3 PU)、プロテアーゼ T (90×10^3 PU)、プロレザー (10×10^3 PU)、(以上天野製薬製)、ピオプラーゼ (20×10^3 PU)、デナチーム AP (50×10^3 PU)、デナプシン (10×10^3 PU)、(以上ナガセ生化学工業製)、アクチナーゼAS (250×10^3 PU、科研製薬製)の12種類で、その起源はカビが6種類、細菌が5種類、動物が1種類である。実験に際しては1%食塩水で適当に希釈して使用した。

内臓酵素液の調製 試料マアジの全内臓をハサミで細切後、等重量の海砂と一緒に乳鉢中でよくすりつぶし、5倍量の1%食塩水を加えて30℃に30分間保ってから、10,000 rpm、30分間遠心分離し、得られた上澄液を酵素液とした。この酵素液を後述のアジ肉基質に反応させて自己消化の条件を検討した。

※ Chemical abstracts に記載されている方法にしたがい、ロシア語(文字)を英語として表現した。

酵素反応条件の検討 ハサミで細切したマアジ肉に10倍量の1%食塩水を加えてホモジナイズし、得られた魚肉懸液1 mlと緩衝液1.5 mlの混合液に酵素液を0.5 ml加えて作用させた。所定時間後に0.44Mトリクロル酢酸2.5 mlを加えて反応を停止させ、生ずる沈殿を濾別後、濾液中のたんぱく質分解物量をFolin呈色法により測定した。

緩衝液としてpH 1.6-2.9では0.2 M Glycine-NaCl-HCl 緩衝液を、pH 2.4-7.8では0.2 M MacIlvine 緩衝液を、pH 7.6-11.0では0.2 M Atkins-Pantin 緩衝液をそれぞれ用いた。

窒素収量の検討 マアジ全魚体をチョッパーにかけて細砕したものに等量の水を加え、そのままあるいは10%硫酸溶液でpHを調節後酵素を作用させた。所定時間後に反応液を茶こして濾過して骨やうろこを除き、煮沸後濾紙で濾過して濾液を得た。残渣に適量の水を加えて煮沸後、濾過して第1回の洗液を得、その残渣を同様に処理し第2回の洗液を得た。濾液と洗液のそれぞれの窒素量をKjeldhal法により測定し、試料中に含まれる全窒素量に対する濾液及び洗液中の窒素合計量の割合(百分率)をもって収率をあらわした。

なお、上記の濾液は液化物の色調及びペプチド構成を調べるための供試液として用いた。

色調の検討 上記の濾液中の窒素濃度が0.5%となるように水で希釈後、日立330型自記分光光度計により380-700mmにおける吸収スペクトルを測定し、各液化物の色調を比較した。また吸光曲線と縦軸及び横軸とによって囲まれた部分の面積から色の濃さを比べた。

液化物のペプチド構成 上記の濾液2 mlを、あらかじめ0.1M酢酸水溶液で平衡化したSephadex G-15 カラム(15×900mm)に注入後、0.1M酢酸水溶液を7.8ml/hrの速さで流し、溶出液を2 mlずつ分取してninhydrin呈色値及びFolin呈色値を測定した。次に、得られた画分のピーク(あるいはピーク付近)の溶出液0.1 mlあるいは0.4 mlに、6Nあるいは8.4N塩酸溶液1 mlを加えて110°Cで24時間加水分解し、分解前後のninhydrin呈色値を測定し、それにより各画分のペプチドを構成するアミノ酸平均個数を算出した。なお、塩酸分解は減圧した密封アンプル内で行った。

実験結果及び考察

アジ肉の分解に及ぼすpHの影響

各酵素剤の説明書に記載されている酵素反応の至適pH、至適温度などの酵素化学的性質は、ミルクカゼインを基質に用いて調べられた結果である。基質が異なれば、至適pHも異なってくることが多いので、まず、各酵素剤についてアジ肉の分解に及ぼすpHの影響を調べた。

Fig. 1は酸性域で作用する3種類の酵素剤を、30°Cで20分間アジ肉に作用させた時の結果である。これらの酵素剤はいずれも2.5-3.5のpH域でよく作用し、デナプシンは2.7-3.0に、プロテアーゼMとニューラーゼFは3.0-3.3にそれぞれ至適pHがみられた。各酵素剤の説明書に記載の至適pHとくらべると、デナプシンのアジ肉分解の至適pHはやや低い、上記の至適pHはいずれも説明書のそれと大差がなかった。

Fig. 2及びFig. 3は、中性付近からアルカリ域において作用する酵素剤を30°Cで20分間アジ肉に作用させた時の結果である。これらの図から知られるように、プロテアーゼNとプロテアーゼT以外の7種類の酵素剤はpH8よりも高いアルカリ域でよく作用し、至適pHはパンクレアチンでは9.2付近に、アクチナーゼでは9.3付近に、デナチーム、プロテアーゼA及びプロテアーゼPでは9.8付近に、ビオプララーゼでは10.4付近に、プロレザーでは10.4-11.0にみられた。これらに対してプロテアーゼTは7.5-9.0のpH域でよく作用し、至適pHは8.6付近にあり、また、プロテ

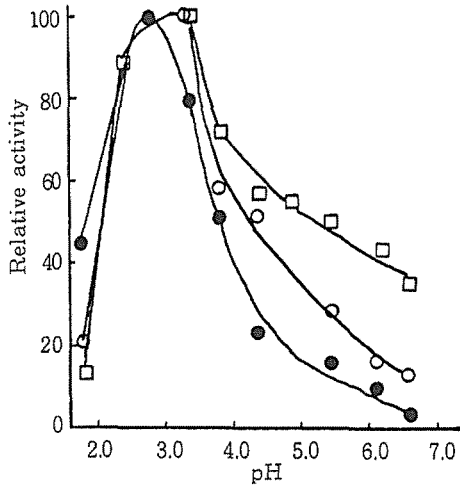


Fig. 1. Effect of pH on the hydrolyses of horse mackerel muscle with commercially available enzymes.

One ml of 10% (w/v) suspension of horse mackerel muscle in 1% NaCl solution and added to 1.5 ml of buffer solution and hydrolyzed with 0.5 ml of enzyme solution at various pHs and 30°C for 20 min. Amount of non-proteinous compound produced was measured by the Folin colorimetric method.

Buffer solution : 0.2 M Glycine-NaCl-HCl buffer solution (pH 1.6-2.9), 0.2 M MacIlvaine buffer solution (pH 2.4-7.8).

□ Protease M, ○ Newlase F, ● Denapsin.

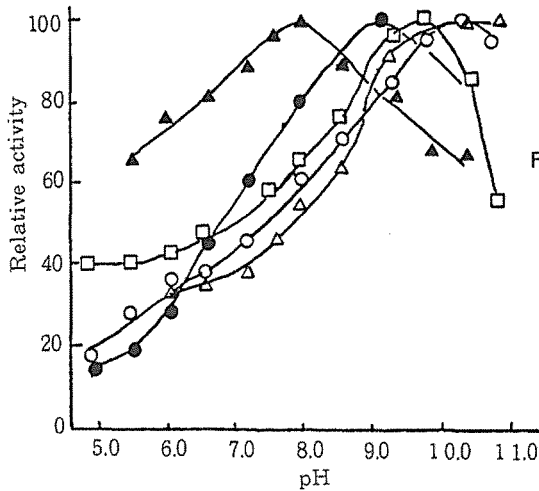


Fig. 2. Effect of pH on the hydrolyses of horse mackerel muscle with commercially available enzymes.

As to the manner of the test, refer to Fig. 1.

Buffer solution : 0.2 M MacIlvaine buffer solution (pH 2.4-7.8), 0.2 M Atkins-Pantin buffer solution (pH 7.6-11.0).

▲ Protease N, ● Pancreatin F, □ Denazyme, ○ Biopraxe, △ Proleather.

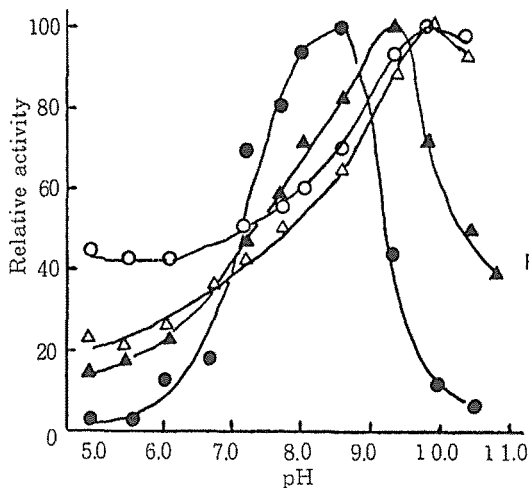


Fig. 3. Effect of pH on the hydrolyses of horse mackerel muscle with commercially available enzymes.

As to the manner of the test and the buffer solution used, refer to Fig. 1 and Fig. 2, respectively.

● Protease T, ▲ Actinase, ○ Protease A, △ Protease P.

アーゼ N は pH 6.5-9.3 の広範囲でよく作用し、至適 pH は 8.0 付近にみられた。これらの酵素剤はアジ肉に対してミルクカゼインよりも高い pH 域でよく作用する傾向を示し、いずれの酵素剤においても、アジ肉分解の至適 pH は説明書記載のそれよりも高く、特にデナチーム、プロテアーゼ A 及びプロテアーゼ P では 2.5-3 程高かった。

全魚体の液化においては、当然のことながら魚体に含まれる酵素も肉たんぱく質に作用するが、そのなかでも内臓の諸器官に含まれる酵素の影響が最も大きいと考えられるので、次に全内臓の抽出液を 30°C で 20 分間アジ肉に作用させて、酵素活性に及ぼす pH の影響を調べた。結果を示すと Fig. 4 のようである。全内臓抽出液は 9-11 の pH 域でよく作用し、至適 pH は 10.4 付近にみられた。

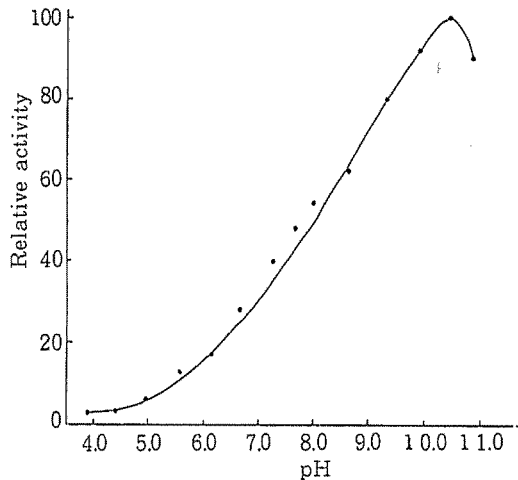


Fig. 4. Effect of pH on the proteolysis of horse mackerel muscle by the extract of its viscera.

One ml of 10% (w/v) suspension of horse mackerel muscle in 1% NaCl solution was added to 1.5 ml of 0.2M MacIlvaine buffer solution or Atkins-Pantin buffer solution and hydrolyzed with 0.5 ml of the extract of the viscera at various pHs and 30°C for 20 min. Amount of nonproteinous compound produced was measured by the Folin colorimetric method.

Preparation of viscera extract: The viscera was ground with sea sand and mixed with 5 times its weight of 1% NaCl solution. This suspension was kept at 30°C for 30 min and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min. The extract obtained was used as an enzyme solution after diluting to a proper concentration with 1% NaCl solution.

酵素剤の選択

全魚体の液化に際しては、魚体内の酵素、主として内臓のたんぱく質分解酵素は魚肉の分解に重要な役割を果す。後述するように、魚体の酵素のみによる全魚体の液化では、魚体たんぱく質の半量以上が分解されるから、内臓酵素と同じ条件下でよく作用する酵素剤を使用するのが望ましいことになる。そこでまず、内臓抽出液を種々の pH 及び温度において 3 時間アジ肉に作用させて、活性に及ぼす pH と温度の影響を調べた。結果を示すと Fig. 5 のようである。活性に及ぼす pH の影

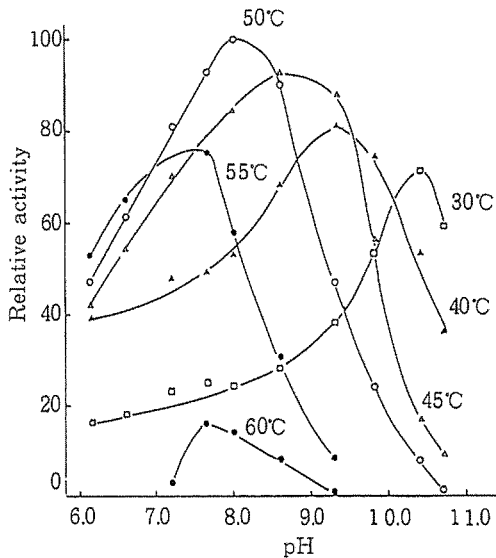


Fig. 5. Effect of pH and temperature on the proteolysis of horse mackerel muscle by the extract of its viscera. Time of hydrolysis: 3 hrs. As to the manner of the test and the preparation of the viscera extract, refer to Fig. 4.

響は温度によって異なり、温度が上昇するにしたがい至適 pH は中性側に移動し、pH 8.0 付近 50°C において酵素反応が最も進むことがわかった。酵素反応が 50°C でよく進むという点は井関ら (1968) の実験結果とよく一致していた。

したがって、pH 8.0, 50°C で液化を行うのがよいことになるが、このような pH 域で酵素を作用させて得られた液化物は、そのにおいが悪く、濃色で、しかも未分解固形物の分離がきわめて困難なことが、カツオ血合肉の液化において報告されているので、このような傾向がアジ全魚体の液化においてもみられるのかどうかについて検討した。

アジ肉にその内臓をまぜホモジナイズしたものに等量の水を加え、均一にしたのち二分し、その一つはそのまま、他の一つは pH を 8.0 に調節後、それぞれ 50°C で 3 時間自己消化させた。液化物の pH は、pH を調節しない場合液化開始時 6.25、液化終了時には 6.30 で、ほとんど変化しなかった。また、pH を 8.0 に調節したものは液化終了時には 7.79 で、これまた大きい変化はみられなかった。分解物の色やにおいを比べてみると、前者の濾液は、黄色を呈し、苦味も感ぜられるが、旨味があり、これに対し後者の濾液は黄褐色でにおいも悪く、旨味は少なく苦味が強く感ぜられた。また、濾過速度は後者のほうが遅かった。以上のことから pH を調節せずに 50°C で全魚体を液化させることにした。

死後の魚肉の pH は新鮮なカツオやマグロのように 5.8 付近まで低下するものもあるが、6.0 付近から 6.5 付近の値を示すものが多いので、次に pH 6.1 及び 6.6, 30°C において 20 分間反応させて、マアジ肉に対する各酵素剤の活性を調べた。結果は Table 1 に示すとおりである。

各酵素剤の表示された酵素単位 (実験方法、酵素剤の項を参照) はいずれもミルクカゼインを基質として測定されたものであるが、説明書によると酵素反応条件は製造会社によって異なっている。したがって厳密には、表示された数値をそのまま比較することはできないが、表示単位の高いアクチナーゼとプロテアーゼ N はアジ肉に対しても活性が高く、特にアクチナーゼは至適 pH よりもかなり離れた pH 域での反応にもかかわらず最も高い活性を示した。酸性プロテアーゼであるプロテアーゼ M, デナプシン及びニューラーゼ F は、中性に近い pH 域ではあまり作用しないが、これらのなかではプロテアーゼ M が最も高い活性を示した。また、プロテアーゼ M は表示された酵素単位

Table 1. The activities of commercial protease preparations on the muscle of horse mackerel.

Protease preparations	Activity (PU/g)	
	at pH 6.11	at pH 6.62
Protease M	8.0×10^3	6.5×10^3
Denapsin	1.5	0.5
Newlase F	2.5	1.5
Protease N	47.5	51.5
Protease T	4.5	7.5
Pancreatin	2.0	3.5
Actinase	50.0	62.0
Protease A	10.5	12.5
Protease P	7.0	9.5
Denazyme	11.5	14.5
Biopraxe	4.0	4.5
Proleather	10.5	11.5

As to the manner of the test, refer to Fig. 1.

The enzymatic reaction was carried out at pH 6.11 or 6.62, and 30°C for 20 min.

The activity was expressed as proteinase units per gram of commercial protease preparation. One proteinase unit was defined as activity which liberated per minute the hydrolyzated products of protein which give the same Folin-color as γ of tyrosine.

Table 2. Hydrolyses of horse mackerel muscle with commercial neutral and alkaline protease preparations

Enzyme preparation	Amount of protein hydrolysates	
	A *	B **
Pancreatin	2×10^{-2} mg	4.2×10^{-2} mg
Protease A	3.0	4.1
Protease N	3.5	2.5
Protease P	3.0	3.5
Protease T	1.1	5.9
Proleather	2.9	4.3
Actinase	5.7	3.5
Biopraxe	1.7	4.3
Denazyme	2.2	4.2

The hydrolysis was carried out at pH 6.11 and 50°C for 3 hours.

The undigested muscle protein was precipitated with trichloroacetic acid (TCA), and the amount of TCA-soluble hydrolysates was determined by Folin colorimetric method and expressed as mg of tyrosine.

* A : The hydrolysis was carried out with enzyme solution which contained 2×10^{-2} mg of the enzyme preparation per ml.

** B : The hydrolysis was carried out with enzyme solution which contained 1 proteinase unit of the enzyme preparation per ml.

が低いわりには、アジ肉をよく分解するようである。

以上の結果から、pHを調節せずに全魚体の液化を行なう場合には、中性及びアルカリ性プロテアーゼを使用することが妥当と考えられるので、中性及びアルカリ性プロテアーゼについて次の実験を行った。すなわち、酵素剤の同一量を、また同一単位を（Table 1に示した単位数を基準にした）pH 6.11、50°Cで3時間基質に作用させた。Table 2はその結果である。同一量の酵素剤を使用した場合に生成される分解物量は、アクチナーゼが最も多く、酵素剤を同じ単位になるように加えた場合はプロテアーゼTによる分解物量が最も多かった。

以上のことから、アクチナーゼ及びプロテアーゼTをえらび、以下の実験を行なうことにした。

プロテアーゼTは熱に安定で酵素反応の至適温度が70°Cとされている（説明書）。Fig. 6はプロテアーゼTをpH 6.11、50-70°Cで3時間アジ肉に作用させて、液化に及ぼす温度の影響を調べたものである。これからも知られるように、分解物量は、反応時間が1時間であれば60°Cにおいて、2時間及び3時間では50°Cにおいて最も多く生成された。これに対して70°Cにおける分解物量はかなり少なかった。説明書に記載の至適温度と著しく異なる点については特に検討しなかった。

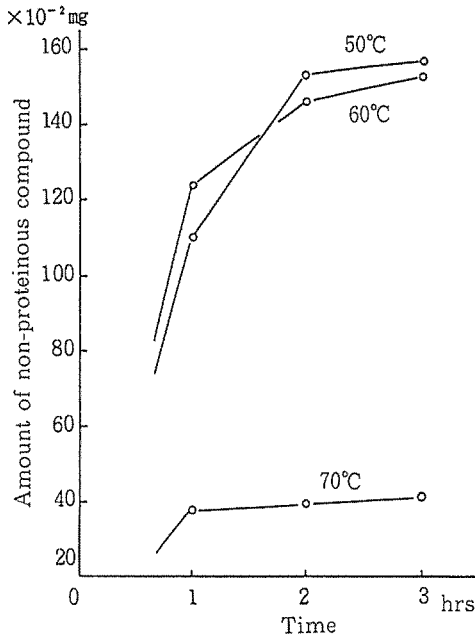


Fig. 6. Hydrolysis curves for Protease T, effect of temperature.

The mixture of enzyme reaction: One ml of 10% (w/v) suspension of horse mackerel, 1.5 ml of 0.2 M MacIlvaine buffer solution (pH 6.11) and 0.5 ml of the enzyme solution. The concentration of the enzyme preparation: 0.3% of the weight of the fish muscle.

Expression of the amount of non-proteinous compound was the same as that in Table 2.

全魚体の液化

アクチナーゼとプロテアーゼTを用いて実際に即した液化を試みるに先立ち、これら酵素剤の添加量と液化時間との関係を検討した。

基質には、アジ肉一尾分に対し内臓を一尾分の割合で混合したものを用い、ホモジナイザー（Polytron, スイス Kinematica 製）により均一にしたのち、3倍量の1%食塩水に懸濁させた。酵素剤を基質に対し0.03-0.3%の範囲で加えて50°Cで6時間反応させ、所定の時間ごとに生成された分解物量（トリクロル酢酸可溶性）を測定した。Fig. 7及び8はそれぞれアクチナーゼ及びプロテアーゼTを反応させた時の結果である。これらの結果からもわかるように、自己消化のみの場合も、酵素剤を添加した場合も、アジ肉の分解は時間が経過するにしたがって進まなくなり、自

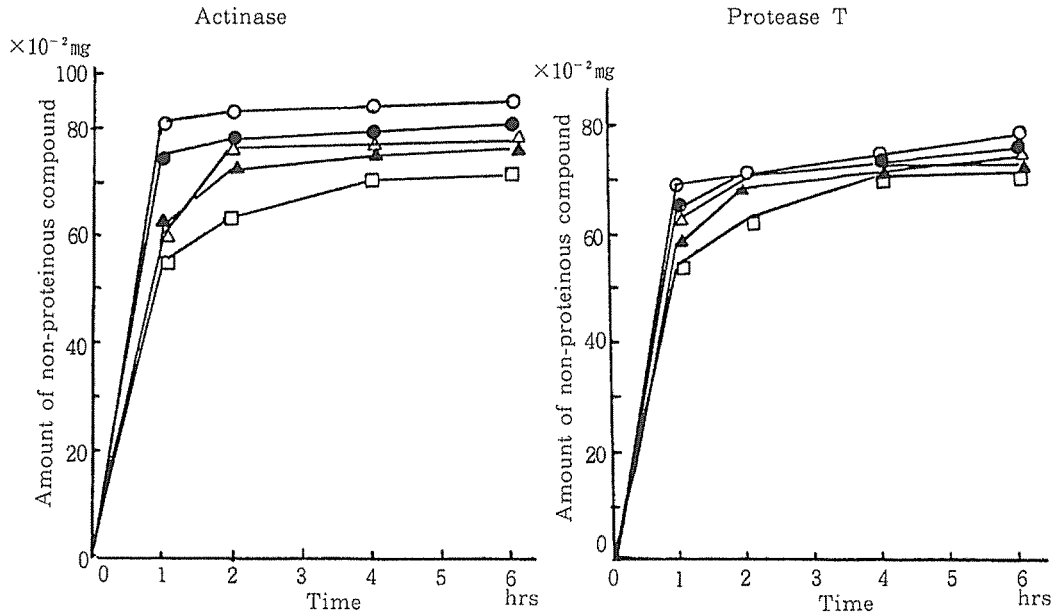


Fig. 7. Hydrolysis curves for Actinase, effect of the concentration of enzyme preparation.

Preparation of substrate : The muscle and the viscera from some of the horse mackerels were ground with Polytron (Kinematica, Switzerland). One part of the resulting paste like mixture was suspended in 3 parts of 1% NaCl solution and used as the substrate.

Hydrolysis was carried out at 50°C under non-adjusting pH condition.

The concentration of enzyme preparation was expressed as % of the weight of the psate like mixture, □ 0.0%, ▲ 0.03%, △ 0.05%, ● 0.1%, ○ 0.3%.

Expression of the amount of non-proteinous compound was the same as that in Table 2.

Fig. 8. Hydrolysis curves for Protease T, effect of the concentration of enzyme preparation.

As to the preparation of substrate, the condition of hydrolysis, the expression of enzyme concentration and its symbol, refer to Fig. 7.

Expression of amount of non-proteinous compound was the same as that in Table 2.

已消化では4時間以後の分解物の増加量はきわめて少ない。これに対し酵素剤を添加した場合は、いずれの酵素剤においても、2時間までは急速に分解が進み、それ以後の分解は徐々に進行した。分解物量はいずれの酵素剤においても0.3%添加の場合に最も多く、またアクチナーゼのほうがプロテアーゼTよりも分解物量が多かった。

次に実際に即して、マアジ全魚体をチョッパーで細砕したものに当量の水を加え、酵素剤を細碎物に対して0.05、0.1および0.3%となるように加え、50°Cで攪拌しながら液化を行ない、酵素剤添加量と窒素収率との関係を調べた。液化時間は上記の結果から3時間とした。結果を示すと Table 3

Table 3. Relation between the concentration of enzyme preparation and the yield of nitrogen in hydrolysis of horse mackerel with Actinase or Protease T.

Concentration of enzyme preparation	Yield of nitrogen	
	Actinase	Protease T
0.05%	76.78%	74.08%
0.1	81.10	79.08
0.3	86.02	83.65

Whole horse mackerel was ground with a meat chopper and mixed with an equal weight of water, and the enzyme preparation was added to the mixture. Hydrolysis was carried out at 50°C for 3 hrs under non-adjusting pH condition. At the end of the hydrolysis, the mixture was heated up to about 98°C, and insoluble matters in the mixture were filtered off and washed with water. The nitrogen content of the filtrate and the washing was determined by Kjeldahl analysis.

Concentration of enzyme preparation was expressed as % of the weight of the fish ground.

Yield of nitrogen was expressed as the ratio (%) of nitrogen amount in hydrolysate (the sum of nitrogen amount in the filtrate and the washing) to the nitrogen amount in the ground fish.

のようである。酵素剤を0.3%加えた場合、アクチナーゼでは50°C、3時間の分解により窒素の収率が85%以上に達し、プロテアーゼTの収率はアクチナーゼのそれよりもやや低かった。この両分解物の色調は黄褐色を呈し、また、においにおいても差異を認めることができなかつたが、味では若干相違し、アクチナーゼの液化物は旨味がつよいが、苦味も感じられるのに対し、プロテアーゼTの液化物は旨味があるが苦味がよりつよく感ぜられた。

井関ら(1968)、HALE(1969)はプロナーゼ(製造会社によるとプロナーゼとアクチナーゼとは同じ酵素剤とのことである)が魚肉に対して高い分解率を示すことを既に指摘している。本実験においても同様の結果を得ただけでなく、若干の苦味があるが、旨味のつよい液化物が得られたので、分解時間をさらに延長して液化を検討した。すなわち、アクチナーゼの添加量を0.3%とし、温度50°Cで3時間、6時間及び24時間液化させた。24時間液化させる場合には腐敗のおそれがあるのでエタノールを3%添加した。結果を示すとTable 4のようである。アクチナーゼを添加した時の窒素の収率は、3時間では86%、6時間では89%、24時間後には91%に達した。これを酵素無添加、すなわち自己消化のみの液化とくらべると、3時間及び6時間では、収率は自己消化よりも20%程高く、分解が平衡に達すると思われる24時間後においても約9%も高かった。井関らは(1968)55°Cで4時間アジ全魚体を自己消化させた時の窒素収率は約60%であることを報告している。液化条件や試料が用一ではないが、本実験においても3時間の自己消化で窒素収率が68%であり、酵素剤による全魚体の液化では内臓酵素の果す役割がきわめて大きいことが確かめられた。しかしながら、自己消化のみによってこれ以上の窒素収率を上げることは容易ではなく、24時間の自己消化によって収率が約83%まで上昇するのに対し、酵素剤を添加する場合には3時間の液化で、これを上回る86%の収率が得られており、窒素の収率が著しく向上されることを確認した。

築瀬(1982)は魚類廃棄物の自己消化を検討し、消化終了後に加熱を行う場合、骨を除いてから

Table 4. Relation between the time of hydrolysis and the yield of nitrogen in hydrolysis of whole horse mackerel with or without Actinase.

Time of hydrolysis (hrs)	Yield of nitrogen	
	Actinase*	Autolysis**
3	86.02%	67.73%
6	88.90	69.21
24	92.08	83.24

* The concentration of enzyme preparation was 0.3% of the weight of the fish ground.

** Hydrolysis was carried out without Actinase.

As to the manner of the test and the expression of nitrogen yield, refer to Table 3.

加熱したほうが、骨を除去せずに加熱したものよりも、濾過速度が速く、濾液量も多いことを報告している。本実験においても同様のことが確かめられた。

アクチナーゼを添加し液化して得られた分解液においては、3時間及び6時間の分解液では同一で、特に不快なおいはいないが、24時間の分解液では前二者と異なり、腐敗に近いにおいがわずかではあるが感ぜられた。各分解液には旨味が感ぜられるが、24時間液化したものは他のものよりも、旨味が若干つよく感ぜられた。また、苦味は3時間、6時間、24時間の各分解液とも同じようであり、自己消化のみによる分解液も同じ苦味を有するから、苦味成分の大部分は胆汁成分に由来するものと考えられる。アクチナーゼ添加の分解液の色調は黄褐色で、液化時間の違いによる差異はみられなかった。しかしながら自己消化のみの分解液とくらべると、アクチナーゼを添加したほうが幾分濃色であった。すでに述べたように分解液の色調は分解液のpHと関係があるので（酵素剤の選択の項参照）、両者のpHを測定したところ、自己消化のものでは6.5付近、アクチナーゼ添加のものでは6.9付近であった。また、プロテアーゼTで分解したものもpHは約6.9であった。同一の魚体細碎物を用いながら、自己消化による分解液と酵素添加による分解液とのpHが相違してくることは特に検討を加えなかった。カツオ血合肉の液化に関する研究では、酸性のたんぱく質分解酵素により液化する時は（酸性域での液化）分解液の色調やにおいが改善されることが報告されている（高橋ら1984）。次に分解液のにおいと色調を改善するために酸性のたんぱく質分解酵素剤による全魚体の液化を検討した。

酸性たんぱく質分解酵素剤による全魚体の液化

マアジ全魚体をチョッパーにかけて細碎したのち、当量の水を加え、プロテアーゼM、デナプシンあるいはニューラーゼFを加えて液化を検討した。予備実験結果（50℃で3時間の酵素反応）に基づき、それぞれの酵素剤の至適pHあるいはその付近のpHにおいて、50℃、3時間酵素を作用させた。pHの調節は液化開始時に10%硫酸溶液により行ない、液化途中での再調整は行なわなかった。酵素剤の添加量は魚体に対し0.3%とした。液化終了後、窒素の収率を求めた結果を示すとTable 5のようである。これら3種類の酵素剤のなかではプロテアーゼMが最もすぐれ、pH 4.5、50℃、3時間の液化で約75%の窒素収率を示した。

次にプロテアーゼMの添加量を0.3%、pH 4.5、50℃で3時間、6時間、24時間、及び37℃で24

Table 5. Yields of nitrogen from 3 hrs hydrolyses of whole horse mackerel at 50 °C and optimum pH or near optimum pH by acid protease preparations.

pH	Yield of nitrogen		
	Protease M*	Denapsin*	Newlase F*
3.0	59.49%	55.12%	— %
3.5	70.10	—	—
4.0	—	55.29	64.30
4.5	74.98	—	—

* The concentration of enzyme preparation was 0.3% of the weight of the ground fish.

As to the manner of the test and the expression of nitrogen yield, refer to Table 3.

Table 6. Relation between the time of hydrolysis and the yield of nitrogen in hydrolysis of whole horse mackerel with or without Protease M.

Time of hydrolysis (hrs)	Yield of nitrogen			
	Protease M*		Autolysis**	
	at 50°C	at 37°C	at 50°C	at 37°C
3	74.98%	— %	47.24%	— %
6	84.28	—	55.34	—
24	84.29	86.68	67.22	68.04

* The concentration of enzyme preparation was 0.3% of the weight of the fish ground.

** Hydrolysis was carried out without Protease M.

pH of the hydrolysis : 4.5. Temperature of the hydrolysis : 50°C or 37°C

As to the preparation of substrate and the expression of nitrogen yield, refer to Table 3.

時間それぞれ酵素を作用させて液化を検討した。24時間反応させる場合は腐敗防止を考慮して念のためエタノールを3%加えた。その結果を示すと Table 6 のようである。窒素の収率は pH 4.5, 50°C, 3時間で約75%, 6時間で約84%, 24時間でも約84%となり, 6時間以上酵素を作用させても窒素収率はほとんど変らなかつた。また, 同じ pH で 37°C, 24時間酵素を作用させた場合には, 窒素収率が87%弱で, 24時間の液化では温度を高くする必要のないことがわかつた。プロテアーゼ M により得られた分解液は pH が低いから酸味が感ぜられるが, 旨味があり, 苦味はあまり感ぜられなかつた。色は薄い黄褐色を呈し, これをアクチナーゼにより得られた分解液とくらべると, Fig. 9 に示すように両分解液の吸光曲線の形が非常によく似ているから, 両者の色調はほぼ同じといえる。しかしながら, 色の濃さでは, プロテアーゼ M の分解液はアクチナーゼの分解液の約1/3の濃さであつた。また, プロテアーゼ M 分解液の色やにおいては, 液化時間が異なつても, ほとんど差界がなく, 味においても大差がなかつた。したがって窒素収量を考え合せると, プロテアーゼ M

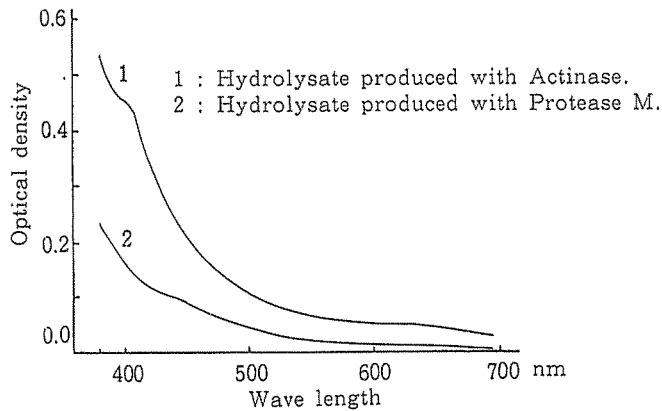


Fig. 9. Absorption spectra of hydrolysates with Actinase and Protease M.
Hydrolysate with Actinase : the hydrolysate from 6 hrs hydrolysis in the experiment described in Table 4.
Hydrolysate with Protease M : the hydrolysate from 6 hrs hydrolysis in the experiment described in Table 6.
These hydrolysates were diluted with distilled water to be a 0.5% solution of total nitrogen, and subjected to the spectral analysis.

でもアクチナーゼと同様6時間の分解が適当と考えられる。

マアジ全魚体液化物のペプチド構成

アクチナーゼを添加して得られた分解液及びプロテアーゼMを添加して得られた分解液のペプチド構成を調べた。比較参考のためにこれら酵素剤を加えない場合、すなわち、同一条件下で自己消化させて得られた分解液についてもペプチド構成を調べた。Fig. 10はアクチナーゼを0.3%添加し、pHを調節せずに50°Cで6時間液化した時の分解液のゲル濾過溶出曲線と自己消化液のゲル濾過溶出曲線を示したものであり、Fig. 11はプロテアーゼMを0.3%添加し、pH 4.5、50°Cで6時間液化させた時の分解液のゲル濾過溶出曲線とpH 4.5における自己消化液のゲル濾過溶出曲線を示したものである。これらの図からもわかるように、各試料の溶出曲線のピーク的位置には多少のずれがみられるが、ninhydrin 呈色曲線とFolin 呈色曲線とを考え合せると、各試料はいずれもそれぞれ対応するIからVIIまでの7つの画分に分けることができる。酵素剤を加えて全魚体を液化する場合、内臓酵素が魚肉の分解に重要な役割を果すことは上述のとおりで、すでにTable 4に示したように、pHを調節せずに50°Cで6時間自己消化させると窒素の収率は約70%に達した。一方、アクチナーゼを添加した場合の窒素収率は約89%で、このうちの約78%は自己消化作用によるものとみなすこともできる。また、pH 4.5において自己消化した場合とプロテアーゼMを添加した場合とをくらべても、同様の傾向がみられた。このことはゲル濾過の分析結果にもあらわれており、溶出曲線の形はFig. 10においてもまたFig. 11においても、酵素添加の場合と自己消化の場合とはほとんど差異がなく、ピークの高さが自己消化のものが酵素添加のものよりも低くなっているにすぎない。

Table 7は各ゲル濾過溶出液について、画分IからVIIまでのninhydrin 呈色値の合計に対する各画分ninhydrin 呈色値の割合、各画分ピークの塩酸分解前と分解後のninhydrin 呈色値の比率、

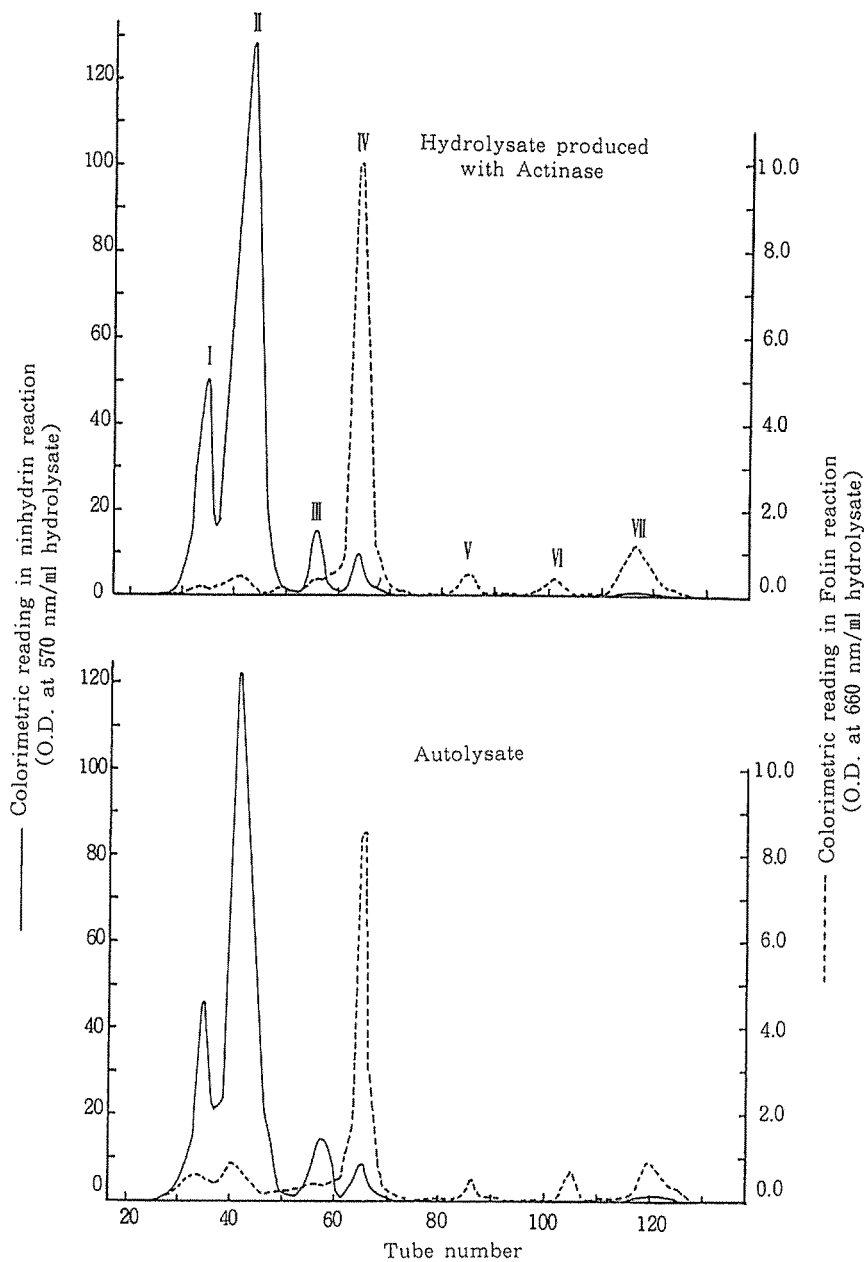


Fig. 10. Gel chromatography of whole horse mackerel hydrolysates. The hydrolysates were those from 6 hrs hydrolyses in the experiment described in Table 4. Two ml of hydrolysate was added to a column of Sephadex G-15 (15×90cm) and eluted with 0.1 M acetic acid (7.8ml/hr). Two ml fractions were collected and the absorbance at 570 nm (ninhydrin color) and 660 nm (Folin color) was determined.

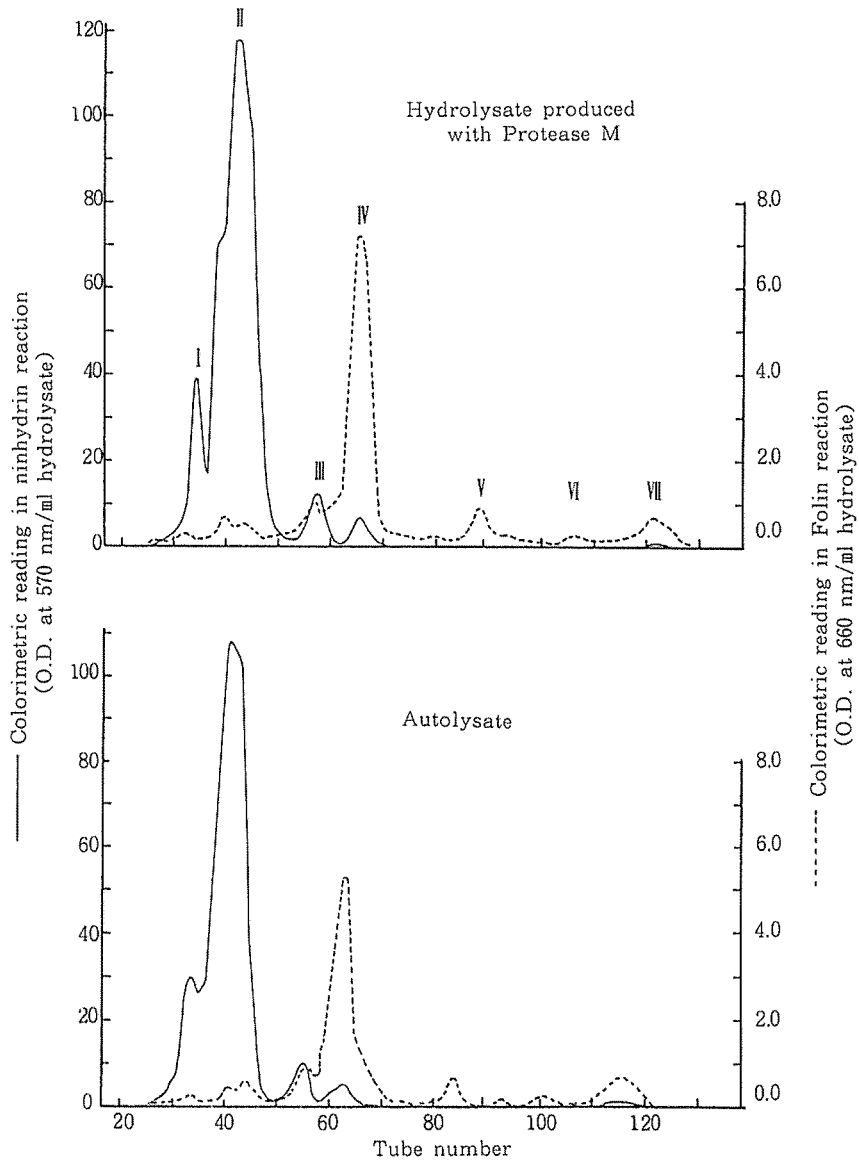


Fig. 11. Gel chromatography of whole horse mackerel hydrolysates. The hydrolysates were those from 6 hrs hydrolyses in the experiment described in Table 6. As to the gel chromatography of hydrolysate, refer to Fig. 10.

Table 7. Analyses of the fractions from Sephadex G-15 gel filtration of whole horse mackerel hydrolysates.

Sample	Fraction	Peak of fraction (tube No.)	Color with ninhydrin reaction		% in color with Folin reaction
			% in color*	Ratio of color(%)**	
Hydrolysate with Actinase (A)	I	3 5	2 0.0 4	2.1 1	3.5 5
	II	4 3	6 8.9 6	1.1 3	7.0 7
	III	5 5	5.3 5	1.2 9	4.5 0
	IV	6 3	3.5 3	1.5 3	6 3.5 9
	V	8 5	0.5 9	3.1 2	4.7 5
	VI	1 0 3	0.3 4	1.5 0	3.6 8
	VII	1 1 5	1.2 0	0.5 4	1 2.8 8
Autolysate (B)	I	3 3	2 2.0 5	3.4 4	8.5 6
	II	4 3	6 7.2 0	1.1 0	1 0.3 5
	III	5 7	5.1 4	1.6 0	4.2 8
	IV	6 5	3.8 1	1.7 9	5 4.7 6
	V	8 7	0.2 9	5.7 1	4.9 6
	VI	1 0 5	0.2 3	7.5 2	5.7 7
	VII	1 1 9	1.2 5	0.8 0	1 1.3 3
Hydrolysate with Protease M (C)	I	3 5	1 3.3 6	3.3 0	3.1 3
	II	4 3	7 9.1 0	1.3 3	7.4 4
	III	5 7	4.0 0	1.6 3	9.8 0
	IV	6 5	2.5 5	1.7 3	6 3.7 2
	V	8 9	0.3 9	1 6.7 0	6.9 1
	VI	1 0 7	0.1 7	3.9 2	2.7 2
	VII	1 2 1	0.4 5	1.0 7	6.7 2
Autolysate (D)	I	3 3	1 4.5 4	3.2 4	5.3 3
	II	4 1	7 5.7 5	1.8 0	1 0.2 8
	III	5 5	3.9 0	1.9 0	1 3.1 9
	IV	6 3	3.3 0	2.3 0	5 0.5 8
	V	8 3	1.0 7	5.4 7	8.2 8
	VI	1 0 1	0.4 3	2.6 3	2.6 9
	VII	1 1 5	1.0 2	1.5 2	9.6 8

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

** The ratio of ninhydrin color before and after acid hydrolysis in the peak of each fraction ; 0.1ml (fraction I - IV) and 0.4ml (fraction V - VII) of each peak was hydrolyzed in 6 N HCl and 8.4 N HCl solution, respectively, at 110°C for 24 hrs.

Sample A and B : The hydrolysate and the autolysate from 6 hrs hydrolysis and autolysis, respectively, in the experiment described in Table 4.

Sample C and D : The hydrolysate and the autolysate from 6 hrs hydrolysis and autolysis, respectively, in the experiment described in Table 6.

および画分 I から VII までの Folin 呈色値の合計に対する各画分 Folin 呈色値の割合を示したものである。各試料とも ninhydrin 呈色物質の 90 % は画分 I および II で占められ、特に画分 II はいずれの試料においても最も大きな画分で、全溶出液中の ninhydrin 呈色物質の 67~79 % がここに溶出している。また、画分の大きさは各試料とも II > I > III > IV > VII > の順であった。

一方、Folin 呈色曲線においては各試料とも画分 IV のピークが最も高く、Folin 呈色値の総量に対するこの画分の Folin 呈色値の割合は、アクチナーゼ添加の場合には約 63 %、pH を調節せずに自己消化した場合は約 55 %、プロテアーゼ M 添加では約 63 %、pH 4.5 における自己消化では約 50 % であった。杉井ら (1973) は標準アミノ酸混合物をゲル濾過すると、チロシンは中性、酸性アミノ酸よりもおくれて溶出され、トリプトファンはさらにおくれて溶出されることを報告している。実際にチロシンとトリプトファンをゲル濾過したところ、チロシンは Tube No. 66 をピークとする 65 から 70 にかけて溶出し、トリプトファンは Tube No. 120 をピークとする 113 から 125 にかけて溶出された (ゲル濾過に付す供試量によって溶出範囲が広くなったり狭くなったりする)。したがって画分 IV には、主としてチロシンを構成アミノ酸中に含む低分子ペプチドおよび遊離チロシンが含まれ、また画分 VII にはトリプトファンを構成アミノ酸中に含む低分子ペプチドおよび遊離トリプトファンが多く含まれるものと考えられる。

各画分のピークおよびピーク付近の溶出液を塩酸分解し、分解後の ninhydrin 呈色値を分解前のそれと比較した結果 (Table 7) から、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次のように考えられる。平均個数は試料によって多少の差異があるが総体的に言えば、画分 I ではアクチナーゼを添加したものを除くと 3-4 で、アクチナーゼを添加したものは 2-3、II、III および IV 画分では 1-2、すなわちデペプチドと遊離アミノ酸が主体であり、V および VI 画分では試料によってかなり相違がみられ、一概にはいえないが、アクチナーゼを添加したものを除くと、平均個数は 3 以上でチロシンやトリプトファンを含むオリゴペプチドが主体であり、VII 画分では 1 で、遊離のトリプトファンが大部分を占めるものと考えられる。

ninhydrin 呈色値から求めた各画分の割合と各画分中に含まれるペプチドの平均アミノ酸個数とを考え合せると、上記の 4 試料に含まれる分解生成成分はその大部分が低分子ペプチドおよび遊離アミノ酸とみなすことができる。プロテアーゼ M を添加して液化した場合、分解生成物の 86 % は遊離アミノ酸と低分子ペプチド (アミノ酸平均個数 3 未満) で占められ、アクチナーゼを添加して液化した場合の分解生成物では、その 99 % が遊離アミノ酸と低分子ペプチドと考えられる。アクチナーゼ (プロナーゼ P) はたんぱく質を細分することができる酵素剤であるといわれているが (RAZUMOVSKAYA ら 1980.) 本実験においてもこのことを示す結果が得られた。

酵素剤としてアクチナーゼとプロテアーゼ M を選び、これら酵素剤による全魚体の液化について検討してきたが、窒素の収率や分解液の旨味においてはアクチナーゼがまさに、窒素収率は若干低い分解液の色とにおいてはプロテアーゼ M がすぐれており、値段においても後者は前者の 1/7 であるので、全魚体を液化する酵素剤としてアクチナーゼに劣らないと考えられる。

要 約

12 種類の市販たんぱく質分解酵素剤を用いてマアジ全魚体の液化を検討し、アクチナーゼとプロテアーゼ M が全魚体の液化に最も適した酵素剤と考えられる次の結果を得た。

用いた酵素剤のなかでは、pH を調節せずに (pH 6.3 付近) 酵素を作用させる場合にはアクチナー

ぜが、酸性域 (pH 4.5) で酵素を作用させる場合にはプロテアーゼ M が最も高い窒素収率を示した。アクチナーゼを加えて液化して得られた分解液は黄褐色を呈し、旨味が強いが苦味も感ぜられた。分解生成物のほとんどは遊離アミノ酸と低分子ペプチドであった。一方、プロテアーゼ M を加えて液化して得られた分解液は薄い黄褐色で、pH が低いから酸味も感ぜられるが、旨味があり、苦味はあまり感ぜられなかった。分解生成物の 86 % は遊離アミノ酸と低分子ペプチドであった。

文 献

- HALE, M. B. 1969. Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein. *Food Technol.*, **23** : 107-110.
- 井関重夫・渡辺武彦・衣巻豊輔, 1968. 魚類液化たんぱくに関する研究-IV. 製造条件の吟味. 東海水研報, 第59号 : 81-99.
- ・———・———, 1973. 魚類液化たんぱくに関する研究-V. 分解収率の検討. 同誌, 第73号 : 85-101.
- RAZUMOVSKAYA, R. G., et al., 1980. *Rybne Khozyaistvo*, **10** : 66-69.
- 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.
- 水産庁研究部, 1982. 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, 235-348
- , 1983. 多獲性赤身魚の高度利用技術開発, 水産加工廃棄物等利用技術開発研究成果の概要. 137-189.
- 高橋 喬・森下達雄・富田和明, 1984. 酵素による血合肉の液化に関する研究. 本誌. 第11号 : 207-217.
- 築瀬正明, 1982. 自己消化による魚類廃棄物の利用, 東海水研報, 第108号 : 1-7.