

# 食肉軟化剤配合から揚げ粉処理が 豚肉タンパク質成分に及ぼす影響

西山 一朗

## Effect of breader mix containing meat tenderizer on protein components in pork

Ichiro NISHIYAMA

### 緒言

パパイヤ、パインアップル、イチジク、キウイフルーツ等は、高いシステインプロテアーゼ活性を示すことが知られている。これらのフルーツプロテアーゼはそれぞれ、パパイン<sup>1)</sup>、ブロメライン<sup>2)</sup>、フィシン<sup>3)</sup>、アクチニジン<sup>4)</sup>と呼ばれ、相互のアミノ酸配列の高い相同性から、パパインスーパーファミリーとして分類されている<sup>5)</sup>。これらのプロテアーゼのうち、パパインやブロメラインは医薬品や化粧品、入浴剤などに用いられるほか、食肉軟化剤としても使用されてきた。ただし、これらの酵素を食肉軟化剤として用いる場合、食感や味に悪影響を与えずに、適度な軟らかさにするためには、処理時間や温度の厳密な制御が必要となる<sup>6)</sup>。そのため、一般家庭における食肉調理時に、これらの酵素剤が用いられることはほとんどないと思われる。しかし最近では、パパインやブロメラインが配合された、使用法の極めて簡単なから揚げ粉が広く市販されるようになった。本実験では、それらのから揚げ粉が食肉のタンパク質成分を、実際にどの程度加水分解するかという点につき、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、イムノブロットならびに免疫組織化学的手法によって検討を加えた。

### 材料と方法

**食肉** 市販の豚もも赤身肉(非凍結品)を使用した。

**から揚げ粉** フルーツプロテアーゼを含む市販のから揚げ粉3種を、それぞれの使用説明に従って、下表の通り用いた。また、比較のために0.05または0.1%パパイン(WAKO)水溶液を使用した。処理温度は20℃または30℃とした。

**SDS-PAGE** 豚もも肉を20mm角あるいは10mm×10mm×1mmの小片とし、上記の通りから揚げ粉で処理した後、粉を振り落として全体を試料として供した。タンパク質の分析は、Laemmli<sup>7)</sup>の方法に従って行った。試料0.1g当たり2mlの試料緩衝液(2%SDS、20%グリセロール、2%2-メルカプトエタノール、0.001%プロモフェノールブルー、50mmol/lトリス塩酸緩衝液)を加え、超音波破碎を20秒以内に完了し、直ちに100℃3分間の加熱処理を施した。この試料を同緩衝液で希釈し、タンパク質濃度を5mg/mlとした後、その5μlを取りポリアクリルアミドゲル(ATTO、パジェル12.5%均一あるいは3-10%勾配)にて分析した。泳動後のゲルは、常法によりクーマシー染色を施した。なお、システインプロテアーゼは、SDSや2-メルカプトエタノールなどの変

	配合酵素	使用方法
製品A	ブロメライン、パパイン	から揚げ粉をまぶし、15分間放置
製品B	ブロメライン、パパイン	
製品C	パパイン	から揚げ粉をまぶし、15分間放置
		から揚げ粉1gに対し水0.8gを加え水溶きしたものに、5分間浸漬
パパイン水溶液(0.05または0.1%)		15分間浸漬

性剤存在下でも活性を示すが、上記の超音波処理中に起きるタンパク質の加水分解は、ほとんど無視できることを、予備実験において確認した。

**イムノブロット** 上記の方法にて電気泳動を行ったゲルから、セミドライ法によりタンパク質をPVDF膜 (ATTO) に転写し、アクチン、ミオシンならびにタイプIコラーゲンに対する以下のポリクローナル抗体を用いて、各タンパク質ならびにその加水分解産物のバンドを検出した。検出にはヒストファイブ SAB(R)キット (Nichirei) を用い、3,3'-ジアミノベンチジン-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>発色を行った。

**免疫組織化学** 豚もも肉 (8 mm × 8 mm × 10 mm) を30°Cの条件下で、上記のとおりから揚げ粉で処理した後、OCT コンパウンド (Miles) 中に包埋し、ドライアイス-アセトンにより急速凍結した。クリオスタットにて5μm厚の切片を作成し、4%パラホルムアルデヒド (TAAB) 固定の後、上記3種の抗体を用いた間接蛍光抗体染色を施した。二次抗体としては、FITC-ヤギ抗ウサギIgG (ICN) を用い、*p*-フェニレンジアミン (WAKO) を含む封入剤で封入し、蛍光顕微鏡観察を行った<sup>8,9)</sup>。

**食肉内への酵素の浸透性** 常法により蛍光色素

FITCを市販のパパイン (WAKO) に共有結合させた後、その0.1%水溶液中に8 mm × 8 mm × 10 mmの豚もも肉を浸漬 (30°C、15分間) した。試料を上記の方法にてOCT コンパウンド内で急速凍結した後、5μm厚の切片を作成し、乾燥させ、そのまま蛍光顕微鏡観察を行った。

## 結果と考察

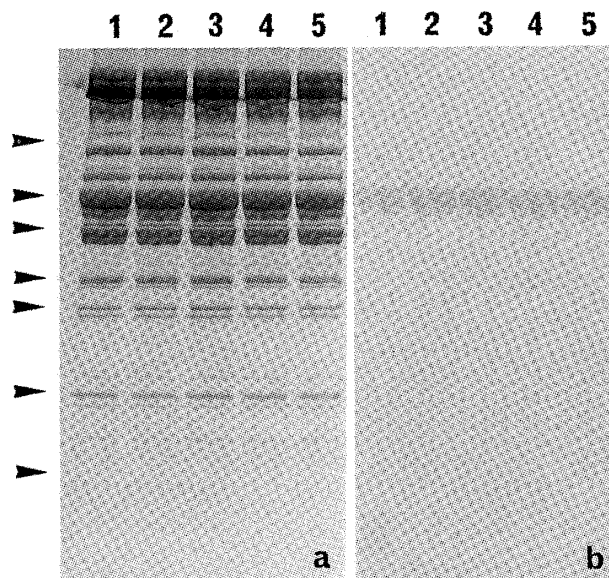
### 豚もも肉 (20mm角) に対するから揚げ粉処理の影響

豚もも肉 (20mm角) をそれぞれのから揚げ粉で処理 (20°C) し、全体を試料としてタンパク質成分を分析したところ、から揚げ粉処理の影響はほとんど認められなかった (図1 a)。また、アクチン抗体を用いたイムノブロットの結果、いずれの試料においても見かけの分子量約45,000のバンドのみが免疫反応性を示し、分解産物のバンドは検出されなかった (図1 b)。写真は示していないが、ミオシン抗体を用いた場合も、から揚げ粉処理による免疫反応性の変化は認められなかった。この結果から、いずれのから揚げ粉も食肉タンパク質に影響を及ぼさないものと判断された。しかしこの方法では、から揚げ粉が直接接している食肉の表面に、局所的に生ずる変化を見逃す危険性がある。そこで次に、食肉の表面のみにタンパク質成分の変化が起きている可能性を確かめるために、厚さ1 mmの豚もも肉薄片を試料と

メーカー	抗体	希釈率
SIGMA	ウサギ抗アクチン C11ペプチド	1 : 100
SIGMA	ウサギ抗ヒト骨格筋ミオシン [重鎖+軽鎖]	1 : 50
LSL	ウサギ抗ブタ タイプIコラーゲン	1 : 1,000

図1 豚もも肉 (20mm角) に対するから揚げ粉処理 (20°C)

豚もも肉をから揚げ粉で処理し、全体を試料として12.5%ポリアクリルアミドゲルによりタンパク質成分を分析した(a)。またアクチン抗体を用いたイムノブロット法により、免疫反応性を示すバンドを検出した (b)。1 : 対照肉、2 : から揚げ粉A処理、3 : から揚げ粉B処理、4 : から揚げ粉C処理、5 : から揚げ粉C処理(水溶性)。左端の矢尻は、上から分子量66,000、45,000、36,000、29,000、24,000、20,000および14,200のマーカータンパク質の泳動位置を示す。



して、同様の実験を行った。

**豚もも肉薄片 (10mm×10mm×1mm) に対するから揚げ粉処理の影響**

豚もも肉薄片を20°Cの条件下でから揚げ粉あるいは

はパパイン水溶液で処理した後、タンパク質成分を SDS-PAGE 法により分析した (図 2 a および図 3 a)。またアクチン (図 2 b)、ミオシン (図 2 c) およびタイプ I コラーゲン抗体 (図 3 b) を用いたイムノブロット法により、免疫反応性を示すバンドを検

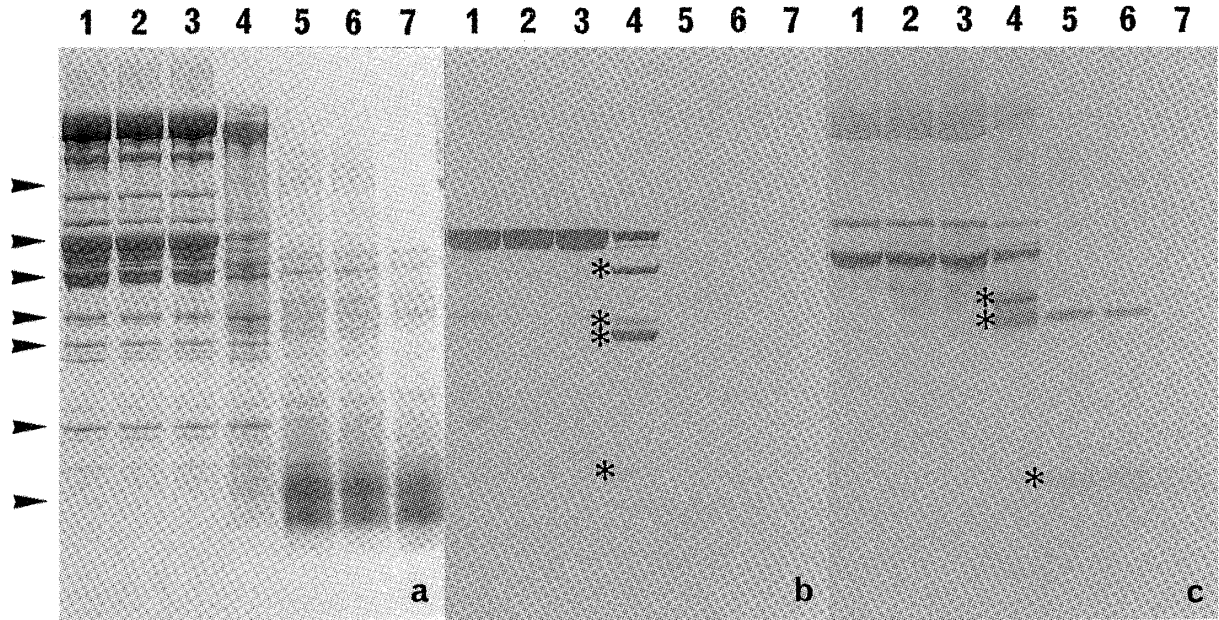
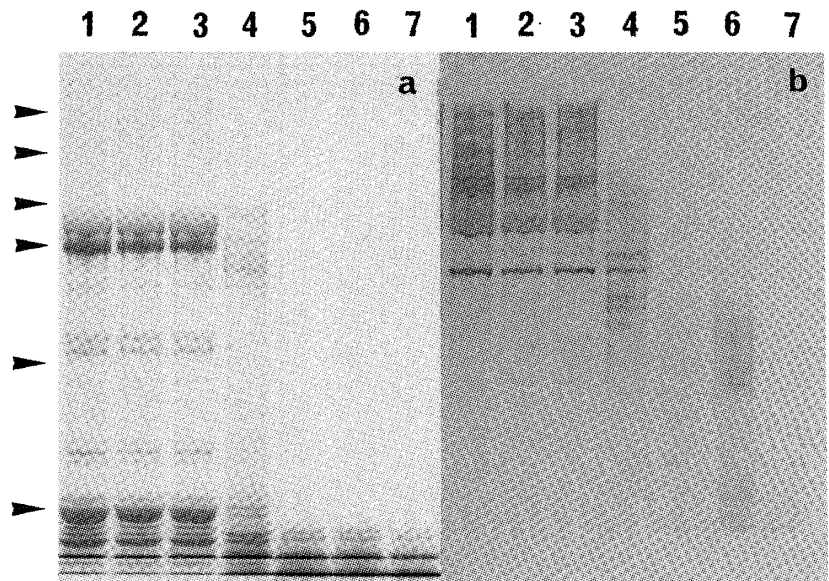


図 2 から揚げ粉およびパパイン処理 (20°C) によるアクチンとミオシンの変化

豚もも肉薄片を、から揚げ粉あるいはパパイン水溶液で処理した後、12.5%ポリアクリルアミドゲルによりタンパク質成分を分析した (a)。またアクチン (b) およびミオシン (c) 抗体を用いたイムノブロット法により、免疫反応性を示すバンドを検出した。1: 対照肉、2: から揚げ粉A処理、3: から揚げ粉B処理、4: から揚げ粉C処理、5: から揚げ粉C処理 (水溶き)、6: 0.05%パパイン水溶液処理、7: 0.1%パパイン水溶液処理。左端の矢尻は、上から分子量66,000、45,000、36,000、29,000、24,000、20,000および14,200のマーカートンパク質の泳動位置を示す。

**図 3 から揚げ粉およびパパイン処理 (20°C) によるタイプ I コラーゲンの変化**

豚もも肉薄片を、から揚げ粉あるいはパパイン水溶液で処理した後、3—10%勾配ポリアクリルアミドゲルによりタンパク質成分を分析 (a) すると共に、タイプ I コラーゲン抗体を用いたイムノブロットを行った (b)。1: 対照肉、2: から揚げ粉 A 処理、3: から揚げ粉 B 処理、4: から揚げ粉 C 処理、5: から揚げ粉 C 処理 (水溶き)、6: 0.05%パパイン水溶液処理、7: 0.1%パパイン水溶液処理。左端の矢尻は、上から分子量487,000、389,600、292,200、194,800、97,400、45,000のマーカートンパク質の泳動位置を示す。



出した。その結果、から揚げ粉AおよびBによる処理では、タンパク質成分の変化はほとんど認められなかったのに対し、から揚げ粉Cおよびパパイン処理では、アクチンおよびミオシン重鎖などの主要なタンパク質の著しい減少と共に、低分子領域に新たなスメアバンドの出現が観察された(図2 a)。この結果から、から揚げ粉の種類によって食肉タンパク質加水分解効果に著しい差異があることがわかった。イムノプロットの結果からも、から揚げ粉Cによる処理では、アクチンやミオシンの分解に伴って、免疫反応性を示す新たなバンドの出現が確認された(図2 bおよびc、\*印)。アクチンの主要な分解産物は、分子量26,000および37,000のタンパク質であり、一方ミオシンの主要な分解産物は、分子量29,000および32,000のタンパク質であった(図2 bおよびc)。なお、から揚げ粉のみを試料としてイムノプロットを行ったところ、免疫反応性を示すバンドは全く認められなかったため、これらのバンドは食肉タンパク質の加水分解により生じたものであるといえ

る。またタイプIコラーゲンに関しても、から揚げ粉AおよびBでは変化が生じなかったが、から揚げ粉Cによる処理では低分子化することが示唆された(図3 b)。から揚げ粉Cについて比較すると、ただまぶして15分間処理するよりも、水溶きして5分間処理した方が、アクチン、ミオシン、タイプIコラーゲンのすべてについて、低分子化が顕著であった(図2 b、cおよび図3 b、レーン4と5を比較せよ)。

同様の実験を室温30°Cの条件で行ったところ、やはりから揚げ粉AおよびBでは、タンパク質成分の変化はほとんど認められず、から揚げ粉Cでは顕著な低分子化が認められた(図4および図5)。また、図2と図4、図3と図5とをそれぞれ比較することにより、30°Cでの処理では20°Cの場合よりも、加水分解速度が明らかに大きいことが示された。この結果は、同じから揚げ粉を一定の方法で使用しても、夏と冬とではその効果に大きな差異を生ずる可能性を示唆する。

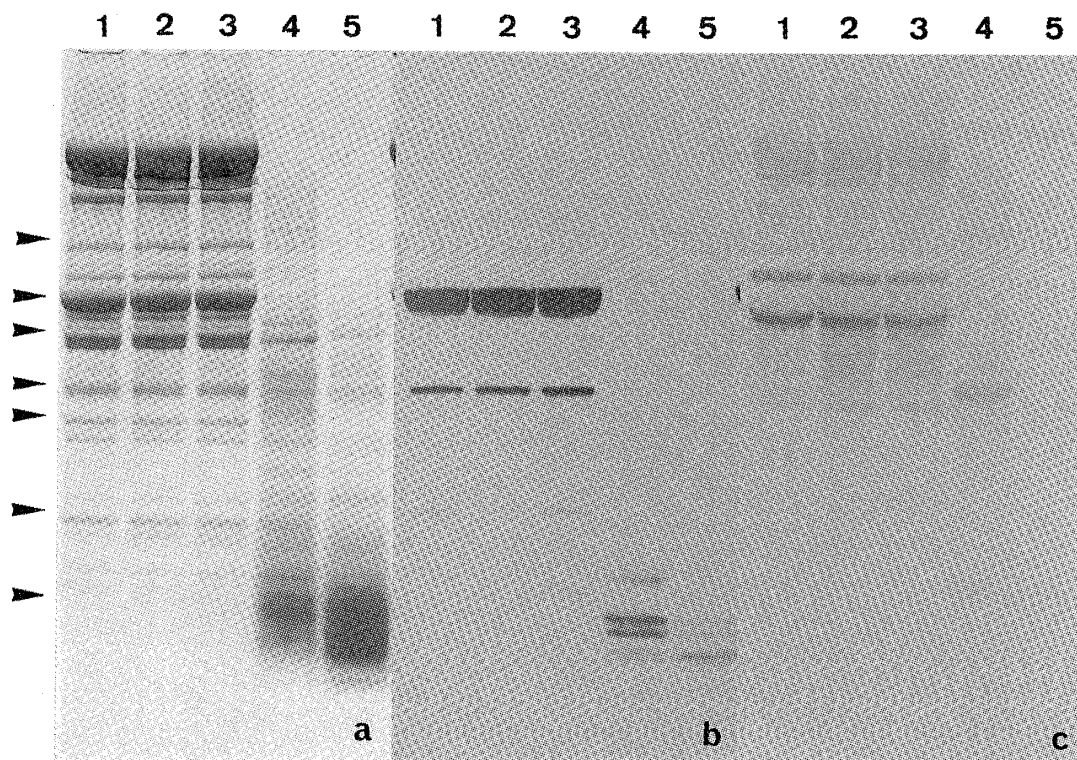
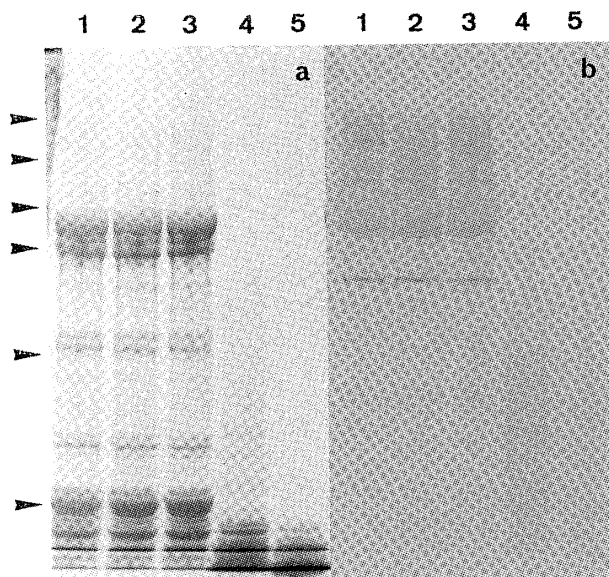


図4 から揚げ粉処理(30°C)によるアクチンとミオシンの変化

豚もも肉薄片を、から揚げ粉あるいはパパイン水溶液で処理した後、12.5%ポリアクリルアミドゲルによりタンパク質成分を分析した(a)。またアクチン(b)およびミオシン(c)抗体を用いたイムノプロット法により、免疫反応性を示すバンドを検出した。1：対照肉、2：から揚げ粉A処理、3：から揚げ粉B処理、4：から揚げ粉C処理、5：から揚げ粉C処理(水溶き)。左端の矢尻は、上から分子量66,000、45,000、36,000、29,000、24,000、20,000および14,200のマーカートンパク質の泳動位置を示す。

図5 から揚げ粉処理 (30°C) によるタイプIコラーゲンの変化

豚もも肉薄片を、から揚げ粉あるいはパパイン水溶液で処理した後、3—10%勾配ポリアクリルアミドゲルによりタンパク質成分を分析(a)すると共に、タイプIコラーゲン抗体を用いたイムノブロットを行った(b)。1：対照肉、2：から揚げ粉A処理、3：から揚げ粉B処理、4：から揚げ粉C処理、5：から揚げ粉C処理(水溶き)。左端の矢尻は、上から分子量487,000、389,600、292,200、194,800、97,400、45,000のマーカータンパク質の泳動位置を示す。



から揚げ粉処理による免疫反応性の変化

から揚げ粉で処理 (30°C) した豚もも肉の組織切片 (横断面) を作成し、タイプIコラーゲン抗体による免疫染色を施した(図6)。無処理のもの、あるいはから揚げ粉AまたはB処理を行ったものでは、筋内膜や筋周膜に一致してはっきりとしたタイプIコラーゲン免疫反応性が見られる (図6 AおよびB)のに対し、から揚げ粉Cによる処理を行ったものでは、表層部において免疫反応性の消失が認められた(図6 C、☆印)。この結果は、表層部においては免疫反応性が消失する程度まで、タイプIコラーゲ

ンが加水分解されたことを示しており、図5に示すイムノブロットの結果ともよく一致している。

一方、ミオシン抗体による免疫染色を施した場合には、無処理のもの、あるいはから揚げ粉AまたはB処理を行ったものでは、すべての筋細胞に横紋としてほぼ一様に免疫反応性が見られる (図7 A)のに対し、から揚げ粉Cによる処理を行ったものでは、表層部での免疫反応性の消失が観察された (図7 BおよびC、☆印)。また、写真は示していないが、アクチンについても同様の結果が得られた。これらの結果もイムノブロットの結果 (図4) とほぼ対応し

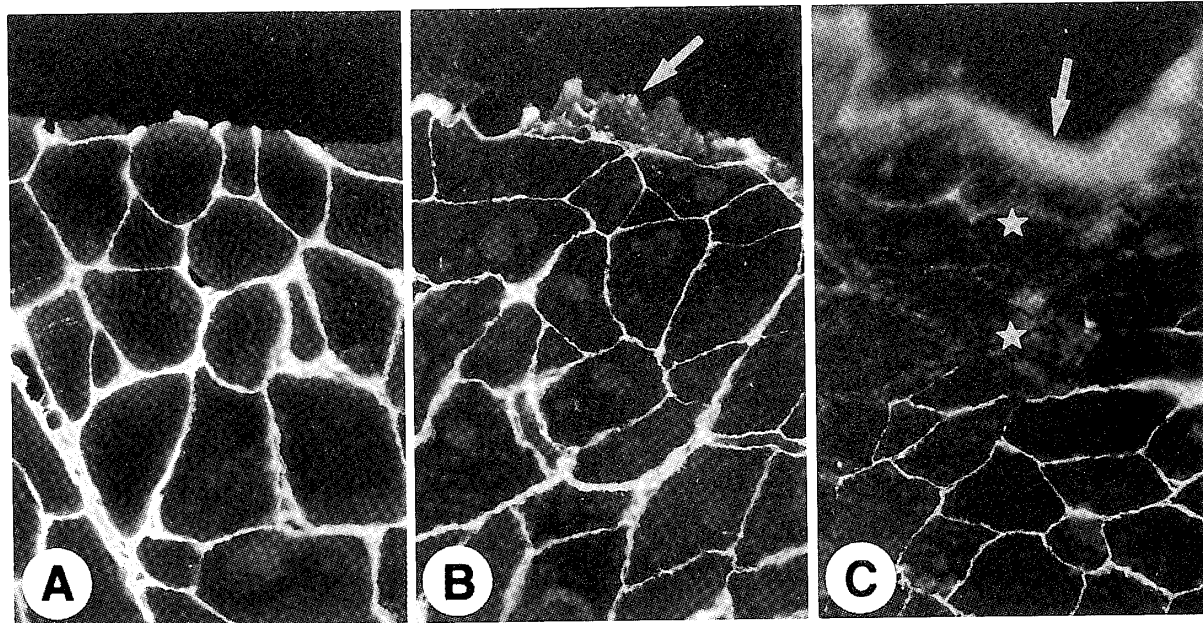


図6 から揚げ粉処理によるタイプIコラーゲン免疫反応性の変化

から揚げ粉A処理 (B) およびから揚げ粉C処理 (C) を施した豚もも肉切片に対し、タイプIコラーゲン抗体を用いた免疫染色を行った。対照肉 (A) では、筋周膜に強い免疫反応性が見られるのに対し、から揚げ粉C処理では、食肉表面での免疫反応性の消失が認められた (☆印)。矢印はから揚げ粉に起因する非特異的蛍光を示す。×270

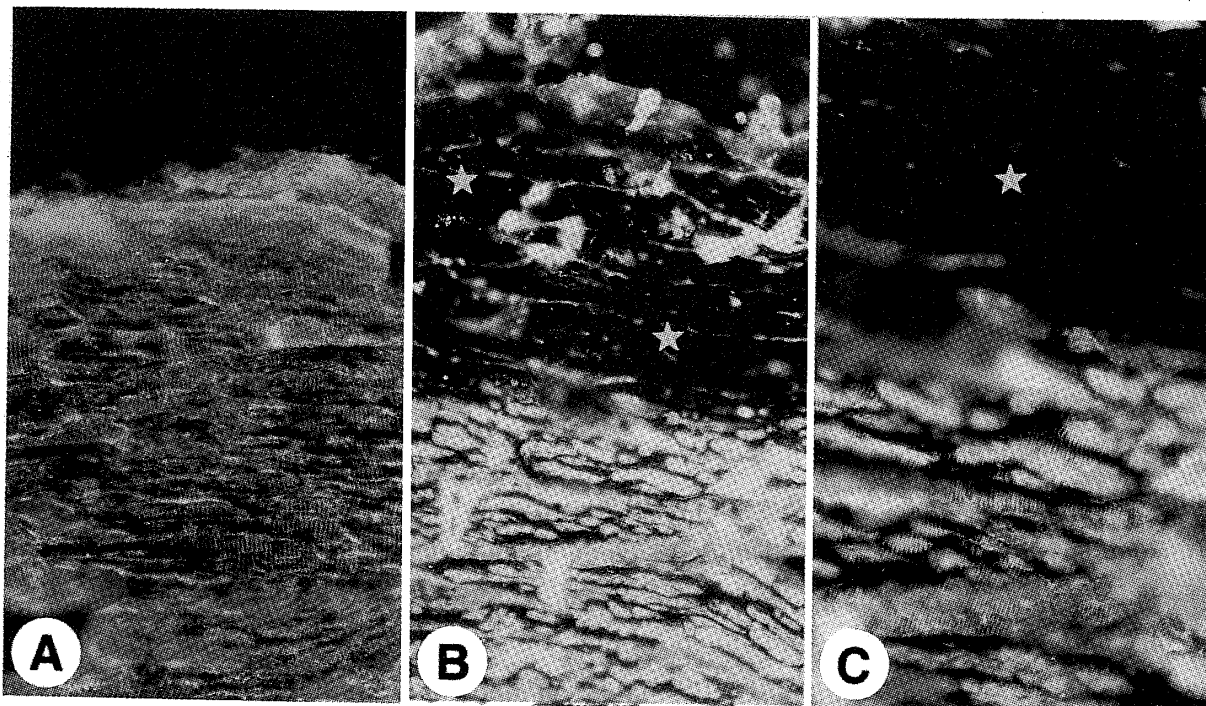


図7 から揚げ粉処理によるミオシン免疫反応性の変化

から揚げ粉C処理を施した豚もも肉切片に対し、ミオシン抗体を用いた免疫染色を行った(BおよびC)。対照肉(A)ではミオシン免疫反応性が、筋細胞全域に横紋として認められるのに対し、から揚げ粉C処理では、食肉表面での免疫反応性の消失が見られた(☆印)。×135(A、B)、×270(C)

ている。

食肉のかたさは、大きく二種類に分けられる。一方は屠畜前の生体時に決定される「background toughness」であり、他方は屠畜後の死後硬直に由来する「rigor toughness」である<sup>10)</sup>。前者は結合組織に起因するもので、主にコラーゲン線維の量と質によって規定されるのに対し、後者はアクトミオシンを主とする筋原線維に起因するものである<sup>10)</sup>。から揚げ粉Cによる処理は、コラーゲン、アクチン、ミオシンのいずれに対しても顕著な加水分解効果を示すため、食肉軟化に有効に作用するものと考えられる。図6および7に示す免疫組織化学的実験の結果より、はっきりとしたタンパク質分解作用は、食肉表面からせいぜい0.5mm程度にとどまることが示唆された。

#### FITC 標識パピンの浸透性

食肉に対するパピンの浸透性について検討を加えるため、FITC で標識したパピンの水溶液中に豚もも肉を浸漬した後、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、FITC 標識パピンは、表面から0.2~0.5mm程度浸透することが示唆さ

れた(図8)。FITC 標識を施すことにより、パピンの分子量や電荷などの物理化学的性質が変化するため、この結果をそのまま無標識のパピンの挙動と捉えることは早計である。しかし、上記の免疫組織化学的実験の結果と考え合わせると、15分間程度の短時間では、酵素は食肉の表面から0.5mm程度しか浸透できないものと考えられる。

この0.5mmという値は、通常のから揚げの大きさを考えると小さすぎるようにも思われる。しかしタンパク質分解酵素を食肉表面から作用させる場合、深部まで浸透するような条件で用いると、過度の加水分解により食肉特有のテクスチャが失われ、かえって味を損ねる危険性が大きい。堤らは、キウイフルーツ果汁処理を行った豚ロース赤身肉において、食肉表面近くの筋原線維の加水分解のみでも、官能検査などにより、有意に軟らかいと判定される例を報告している<sup>11)</sup>。以上のことを考え合わせると、家庭で簡便に食肉軟化酵素を利用するためには、食肉表面のみにタンパク質の加水分解が起きるような条件で用いることが望ましいものと考えられる。

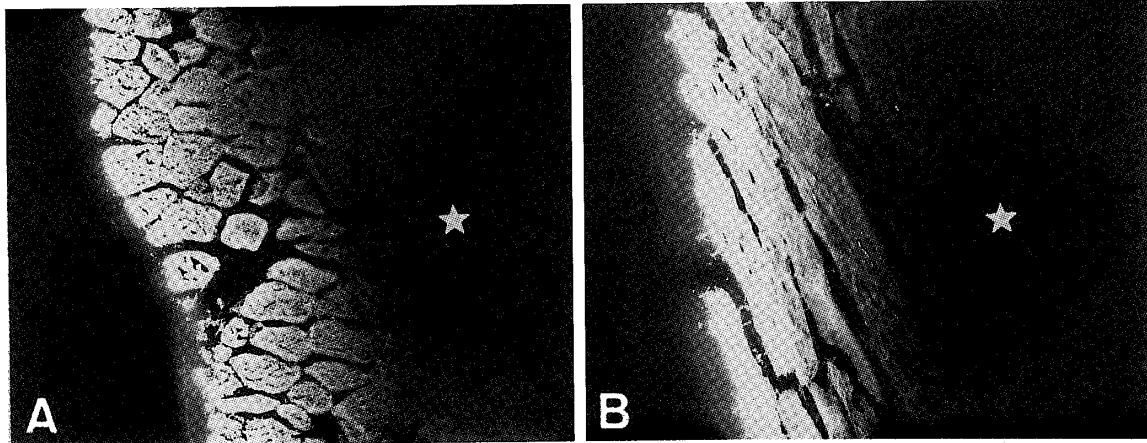


図8 FITC 標識パパインの浸透性

食肉に対するパパインの浸透性を調べるため、FITC 標識したパパインの水溶液中に豚もも肉を15分間浸漬した後、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡による観察を行った。FITC 標識パパインは、表面から0.2~0.5mm程度浸透することが示唆された。A：横断面、B：縦断面 ×100

#### 要 約

食肉薄片に対し、市販の食肉軟化酵素配合から揚げ粉処理を施したところ、その種類によりタンパク質加水分解効果に大きな差異があることが判明した。タンパク質加水分解効果をもつから揚げ粉で、室温15分間の処理を行ったところ、アクチン、ミオシン重鎖、タイプIコラーゲンなどの主要なタンパク質の顕著な加水分解が起きることが確認された。このタンパク質加水分解作用は、から揚げ粉を水溶きして用いた方が、より効果が大きく、また処理温度は20℃よりも30℃の方が、効果が顕著であった。通常の使用方法では、食肉軟化酵素配合から揚げ粉のタンパク質加水分解効果は、食肉表面から0.5mmまでに止まることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Kimmel, J.R. and Smith, E.L. : *J. Biol. Chem.*, 207, 515 (1954)
- 2) Murachi, T. and Neurath, N. : *J. Biol. Chem.*, 235, 99 (1960)
- 3) Kramer, D.E. and Whitaka, J.R. : *J. Biol. Chem.*, 239, 2178 (1964)
- 4) Arcus, A.C. : *Biochem. Biophys. Acta*, 33, 242 (1959)
- 5) 上野川修一他編：生物化学実験法31 蛋白質分解酵素II (1993) 学会出版センター
- 6) 沖坂浩一：食品と科学、38、105 (1996)
- 7) Laemmli, U.K. : *Nature*, 227, 680 (1970)
- 8) Nishiyama, I *et al.* : *Anat. Embryol.*, 194, 419 (1996)
- 9) Johnson, G.D, and Nogueira Araujo G.M.de C. : *J. Immunol. Method*, 43, 249 (1981)
- 10) 沖谷明紘、松石昌典、西村敏英：調理科学、25、314 (1992)
- 11) 堤ちはる他：家政誌、45、603 (1994)