

# 牛肉に対するキーウィフルーツプロテアーゼの 柔軟化作用

大槻 耕三・河端 信・田口 邦子

## Tenderization of Meat by Kiwifruit Protease

KOZO OHTSUKI, MAKOTO KAWABATA and KUNIKO TAGUCHI

Tenderizing effect of kiwifruit protease on beef shank were studied. Kiwifruit juice was dialyzed against citrate buffer, pH6, and the protease fraction was purified by DEAE-Sephadex CL-6B chromatography. This purified protease hydrolyzed casein at pH 3 to 7.

Tenderizing effects of this protease on beef shank which was injected and incubated for 40 min to 5 hr at 30°C or for 24 hr at 3°C were clearly observed by measuring the shear value of the meat. Extractives of the beef shank treated with the protease were also analyzed.

(Received August 14, 1987)

### I. 緒 言

キーウィフルーツ (*Actinidia chinensis*, chinese gooseberry) は、中国、揚子江原産の果物であるがニュージーランドで品種改良され、世界でも栽培されてきた果物である。果肉中には、パパインやブロメリン、フィシンなどという SH 系プロテアーゼに似た、アクチニジンと名づけられたプロテアーゼがふくまれていることが知られている<sup>1)</sup>。また、このプロテアーゼの諸性質については、数篇が報告されている<sup>2-6)11)</sup>。

パパインは昔から食肉軟化剤用の酵素として、最もよく利用されてきていて、また耐熱性が大変すぐれているので、工業的にも広く活用されている<sup>7)</sup>。パパインはよく研究され、また利用もされているが、キーウィフルーツプロテアーゼにも、またこの酵素自体のもつ特徴が、応用、利用できる可能性があると思われるので、パパインと比較しながら柔軟化作用を検討してきた<sup>10)</sup>。このキーウィフルーツプロテアーゼの利用などについて、最近、二三報告されてきている<sup>7)8)9)</sup>。本研究においては、キーウィフルーツプロテアーゼの加水分解反応の至適 pH が 3~5 であることと、食

肉が死後硬直から熟成までの間 pH が 5.4 ぐらいであり、この pH 5 付近は保水性がよく、微生物の繁殖も少なく保存に好適であることに着目し、この pH で牛肉を、この酵素を使用して柔軟化させることを試みた。

### II. 実験材料および方法

#### 実験材料

- i) キーウィフルーツ  
市販のニュージーランド産 Hayward 種のもを購入し各種の実験に使用した。
- ii) パパイン  
キーウィフルーツのプロテアーゼと比較するため、代表的な SH 系プロテアーゼとして、パパインを使用した。この標品は Merck 社製 N.F. VIII を用いた。
- iii) タンパク質基質  
酵素活性の測定には、牛血清アルブミン (米国 Sigma 社製, フラクシオン V) または、牛乳カゼイン (Merck 社製, acc. to Hammarsten) を使用した。柔軟化作用測定のためには、市販の牛肉のすね肉を使用した。

## 実験方法

### i) キーウィフルーツプロテアーゼの精製と活性測定法

キーウィフルーツの果肉を市販のジューサー（日立社製 VA-656 G 型）にかけ果汁を得る。この果汁のままでは、粘質物が多く、取り扱いに不便なので、5 mM ぐえん酸バッファー、pH 6.0、(1 mM EDTA を含む) に対して透析し、その透析内液を遠心分離にかけ、清澄な酵素液を得る。これを精製するには、この液を、0.1 M NaCl を含む上記バッファーで平衡化した DEAE-セファロース CL-6 B のカラム (3 cm × 35 cm) に通し、吸着された酵素を 0.5 M NaCl と 1 mM システインを含む同上バッファーで脱着し、精製酵素を得る。さらに酵素を精製するには、同じカラムでリクロマトグラフィーを行った。

酵素活性は酵素液 0.1 ml をガラス製遠沈管 (16.5 φ × 105 mm) にとり、10 mM システイン 0.1 ml を加え、1% 牛血清アルブミン、pH 4.0、または 0.5% カゼイン、pH 7.0、を基質として 2.0 ml 加え 37°C で 20 分間反応させた後 5% トリクロル酢酸 3.0 ml を加え反応を停止。1 時間放置後遠心分離にかけ、上清液の波長 280 nm における紫外線吸光度を測定した。なお酵素液のタンパク質濃度は、280 nm における紫外線吸光度をもって決定した。

### ii) キーウィフルーツプロテアーゼの牛肉柔軟化作用

#### a) 牛肉への酵素添加方法

牛のすね肉を 1 片あたり約 5 g に切り、試料とす。酵素添加量は、肉 1 g あたり 0.05 ml の酵素液 (0.3~2 mg の DEAE・セファロース精製キーウィフルーツプロテアーゼ/ml, 1 mM システインを含む 0.1 M ぐえん酸バッファー、pH 5) を注射器にて肉全体に平均に注射する。作用温度は 30°C または 3°C で一定時間のインキュベーションを行った。コントロールは、それぞれの処理牛肉のごく近傍から採取した肉に 1 mM システインを含む 0.1 M ぐえん酸バッファー、pH 5、を本実験と同量注射し、同様に処理した。

#### b) 剪断力の測定

酵素処理した牛肉およびコントロール肉は、電子レンジ (日本電気社製 MC-5020 型) で 1 分間加熱し、牛肉の内部に赤味がない状態にする。

上皿バネばかり (石田式、秤量 4 kg) の皿に試料の牛肉を置き、肉の上面から垂直に片刃のカミソリ (フェザー S、炭素鋼刃厚 0.245 mm) を肉の繊維方

向に対し直角にあて、徐々に力を加えて行き、切断ははじめから終りまでの指針読みとり値のうち最大値を剪断力 (kg/cm 刃長) とした。

### c) 肉汁の分析

酵素処理した牛肉 および コントロールをそれぞれ 50 ml のビーカーに入れ、サランラップでカバーし、電子レンジで 2 分間、途中で位置をかえながら、均一に加熱する。その後、肉汁を絞り出し、固形物を蒸留水で 2 回洗浄し、その洗液を肉汁に合わせ 25 ml のメスフラスコで定容にする。

総エキスの測定は、この肉汁液 10 ml を、110°C の電気乾燥器で乾固し、蒸発残渣重量を秤量して行った。

肉汁中の総窒素量の測定は A. O. A. C. のマイクロケールダール法<sup>12)</sup>にて行った。

タンパク態窒素量 (トリクロル酢酸による沈殿法) は肉汁 2 ml をガラス製遠沈管 (16.5 φ × 105 mm) にとり 5% トリクロル酢酸 3 ml を加えてよく攪拌する。3,000 rpm、で 30 分間、遠沈し、傾斜して上澄を捨て、沈殿は 2.5% トリクロル酢酸 5 ml を加え、攪拌、遠沈、傾斜し洗う。これを数回くり返した後、沈殿 (タンパク質) を少量の水に懸濁し、ケールダールフラスコに移し、あとは総窒素量と同様の操作を行ない窒素量を求める。

非タンパク態窒素量は、各試料の総窒素量からタンパク態窒素量を差し引いたものを、その量とする。

## Ⅲ. 結果と考察

### i) キーウィフルーツプロテアーゼの精製

キーウィフルーツプロテアーゼは pH 3 から 8 付近までの間で活性をもつが、至適 pH は 4 である。この酵素の DEAE-Sepharose による精製は、基質に牛血清アルブミン (BSA) を使用して測定した結果を前報にまとめた<sup>10)</sup>。また前報での結果として、この酵素は BSA を基質とした場合、pH 7 と 9 では活性が殆んどなく、pH 3 でのみ見られ、カゼインを基質とした場合は pH 3, 7, 9 でかなりの活性が見られた。これはこれら基質間の加水分解されやすさの違いが発現されたか、あるいは、BSA 中に微量存在すると思われる SH 酵素インヒビターが働いたとも考えられる。今回は、このプロテアーゼの精製の程度をカゼインを基質として pH 7 で測定した結果を Table 1 に示す。pH 7 で働く酵素の回収率は 30.7% と、pH 4 BSA に働いた時 (69.4%) に比べ約 1/2 であった。また比活性も DEAE-Sepharose で精製したものは、も

Table 1. Purification of Kiwifruit Protease  
(Substrate: 0.5% Casein pH 7)

	Volume (ml)	Act. (A280 Enz. 0.1ml)	Total Act.	Act. Yield (%)	Protein (mg/0.1 ml)	Specific Act.
Juice	2200	0.411	9042	100	4.23	0.097
Dialysate	2400	0.256	6144	67.9	0.590	0.434
DEAE-Sephrose	600	0.463	2778	30.7	0.720	0.643
Rechromatography on DEAE-Sephrose	380	0.488	1854	20.5	1.028	0.475

との約6倍に上昇した。前報の結果と Table 1 の結果とを考慮合わせると、この精製酵素には Mc Dowall<sup>3)</sup>らのプロテイナーゼ A<sub>1</sub> と A<sub>2</sub> とがある比率で混在するものと考えられる。ii) 以後の実験では pH 5 で柔軟化反応をさせているので、上記両種の酵素とも働いていると思われる。

#### ii) 牛肉軟化作用

牛肉に方法の所に前述したように酵素液を注射し、30°C でのインキュベーションの時間を変化させて、軟化効果を検討した。定めた時間がくれば電子レンジで加熱し、剪断力を測定した。Fig. 1 にその結果を示す。それぞれの時間で2点ずつ試料を使用し、1つの試料について数カ所の剪断力を測定し、これらの平均値を Fig. 1 にプロットした。この結果から 30°C で40分以上のインキュベーションにより、剪断力が0分

の時のそれより約25%の低下が見られた。

使用する酵素量と肉の軟化効果を、横軸に注射果汁液量を縦軸に剪断力をとって Fig. 2 に示した。30°C 1時間インキュベーションした後電子レンジで加熱し剪断力を測定した。果汁量が 25 mg までは軟化効果は著しいが、それ以上の量では一定である。即ちこの酵素量(もとの果汁液相当量)で効果的な軟化作用が期待できる。

#### iii) 肉汁の分析

前報において、可溶性タンパク質基質(カゼインやBSA)に対してこの酵素は、パインよりも大きいペプチドを生成するような加水分解をすることが明らかとなったが、実際この酵素を使用する場合にはこれは有利な性質である。なぜなら軟化作用が強い酵素であっても、固形タンパク質を非タンパク態の液状にまで加

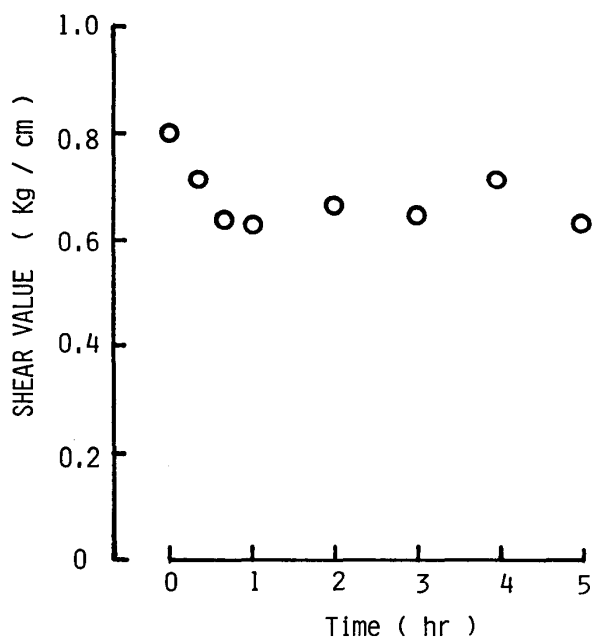


Fig. 1. Shear value of kiwifruit protease-treated beef shank incubated at 30°C, Enzyme, 25 mg juice eq./g of meat.

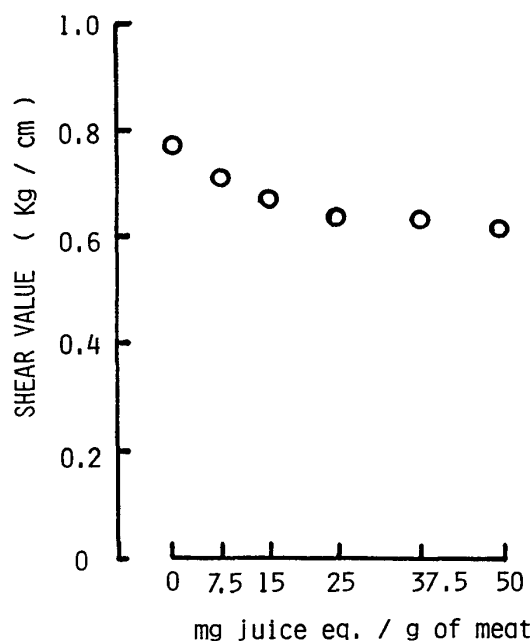


Fig. 2. Shear value of the beef shank incubated with various amount of K. protease at 30°C for 1 hr.

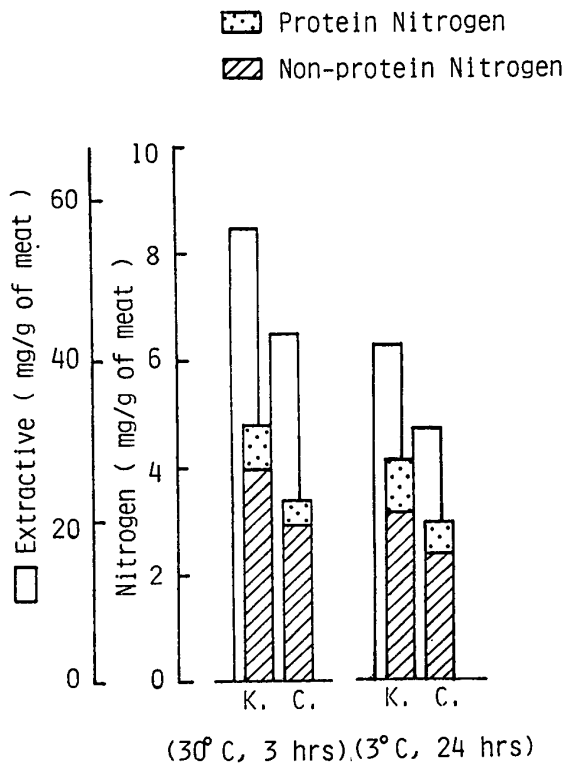


Fig. 3. Extractives of K. protease-treated beef shank incubated at 30°C and 0°C.  
K, K. protease-treated meat  
C, Control

水分解してしまうようなものであつては、牛肉の固形を保つという点から不向きであるからである。この点からキーウィフルーツプロテアーゼはパパイインより牛肉の柔軟化作用に相当と思われる。この非タンパク態窒素量の変化を知るために、次に Fig. 3 に示すような肉汁成分の変化を調べた。前報<sup>10)</sup>での条件下 (30°C 5hr または 3°C 24hr) で剪断力において25%以上の柔軟作用があつたが、同じような条件下で肉汁成分の変化を見たのが Fig. 3 である。これらの値は、それぞれ3点ずつの測定値を平均したものである。30°C, 3 hr の処理により、または 3°C, 24 hr の処理により、肉汁中の総エキス分は、コントロールに比べ約3割の増加が見られる。粗タンパク質量は、総窒素量×6.25として、Fig. 3 の右から 18.8, 26.3, 21.4, 29.6 mg/g 肉であつて、それぞれの総エキス分中にしめる割合は50~60%である。また柔軟処理による非タンパク態窒素の増加は、30°C で約25%, 3°C で約30%であり、総エキス分の増加とほぼ同じいものである。このプロテアーゼは柔軟処理に用いても特に牛肉中に非タ

ンパク態窒素を生成させるとはいえない。

#### IV. 要 約

- (1) キーウィフルーツの果汁をくえん酸バッファーに透析、遠心分離した後の上澄液を DEAE-セファロース CL-6 B を用いたクロマトグラフィーによりプロテアーゼを精製した。
- (2) 牛肉のすね肉柔軟処理のための条件を検討し、単位牛肉量あたりの最適酵素量を求めた。
- (3) 柔軟処理条件下 (30°C, 3 hr または 3°C 24 hr) における牛肉エキス分、肉汁中のタンパク態窒素、非タンパク態窒素、総タンパク質などの各量を求めた。

本研究に御協力戴きました竹中久美子氏に感謝致します。本研究の一部は伊藤記念財団の昭和60年度研究助成による。

(1987年 8月14日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) A. C. Arcus, *Biochim, Biophys, Acta*, **33**, 242 (1959).
- 2) M. A. McDowall, *Eur, J. Biochem*, **14**, 214 (1970).
- 3) M. A. McDowall, *Biochim, Biophys, Acta*, **293**, 226 (1973).
- 4) E. N. Baker, *J. Mol, Biol*, **115**, 263 (1977).
- 5) A. Carne & C. H. Moore, *Biochem, J*, **173**, 73 (1978).
- 6) K. Brocklehurst, B. S. Baines, & J. P. G. Malthouse, *Biochem, J*, **197**, 739 (1981).
- 7) 和辻敏子, 宮本悌次郎, *調理科学*, **18**, 128 (1985)
- 8) 橋永文男, 福留哲朗, 伊藤三郎, 鹿大農学術報告第36号65 (1986).
- 9) 曾田 功, 金子美穂, 佐藤隆英, 中川弘毅, 小倉長雄, *日本食品工業学会誌*第34巻36 (1987).
- 10) 大槻耕三, 河端 信, 昭和60年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 (vol. 4) 伊藤記念財団.
- 11) M. Kaneda, Y. Tomita, & N. Tominaga, *Experientia*, **43**, 318 (1987).
- 12) W. Horwitz; "Method of Analysis of the A. O. A. C.", 11 th ed, Association of Official Analytical Chemists, Washington, p 858 (1970).