

微生物・酵素等の高度利用による高付加価値化食品の開発

— 酵素処理等による食肉の品質改善技術の開発 —

井上貞仁・阿部 茂・熊林義晃・山崎邦雄・下林義昭

Development of High Value-added Food by Effective
Use of Microorganisms and Enzymes
—Development of a Technique to Improve Meat Quality by Enzymatic Treatment—Sadahito INOUE, Tsutomu ABE, Yoshiteru KUMABAYASHI
Kunio YAMAZAKI and Yoshiaki SHIMOBAYASHI

On applying softening techniques using microorganisms and enzymes to low-quality meat produced in Japan from culled dairy cattle, on improving techniques to promote decomposition of the hardening factor, connective tissue protein, and to control enzyme activity as well as to effectively use the treated meat, we report the results of our investigation.

When comparing meat quality between culled dairy cattle (C.D.C.) and fattening cattle (F.C.), both meat and fat of culled dairy cattle were significantly inferior to those of fattening cattle in terms of color tone. In the case of culled dairy cattle, cooking markedly increases the ratio of meat hardness. Meat hardness is largely the result of a qualitative factor of connective tissue rather than a quantitative factor. Based on observation by electron microscope, changes of the perimysium structure due to aging was assumed to be the main cause of increasing hardness.

Examination of crude enzymes naturally existing in various fermented foods found soy sauce lees and malted rice to have strong activity and a sufficient tenderization effect. Concurrently, this revealed how enzyme activity affected the production of decomposed protein and its taste. Moreover, it clarified how protein decomposed during treatment.

Examination of available food ingredients showed that raw bovine serum proved effective in controlling inhibiting the activities of enzymes produced from malted rice.

Our promising results are now under consideration for practical application and are expected to be used in meat processing for dried meat products or as an ingredient in soups, stews, or curries.

北海道には全国の4割に相当する乳牛が飼養されている。これらは一定期間搾乳し、老齢化して泌乳量が減少すると淘汰するが、それらから発生する牛肉は肉質は硬く、肉および脂肪の色調も劣り、乳廃牛肉として極めて安価に取引されている。また同様の問題は繁殖用肉牛や採卵鶏にも発生しており、北海道のみならず全国の畜産県で、今や深刻な問題となっている。また、貿易自由化の影響でこれら低級肉は輸入加工用原料肉と真っ向から

競合し、ますます低廉化の傾向にある。このことは、全国の畜産生産農家の経営収支にも深刻な影響を与えはじめており、新鮮安価で豊富に存在する国産資源を付加価値の高い製品に加工する技術の開発が待望されている。一方、食肉の品質は色調、保水性、脂肪交雑度、テクスチャー、フレーバー等様々な要因が複雑に関連し合って決定される。これら副生物として発生する食肉の主な品質上の問題点は、加齢に伴い肉中の結合組織が堅牢にな

事業名：一般試験研究

課題名：微生物・酵素等の高度利用による高付加価値化食品の開発

り肉質が硬くなることがあげられる。特に消費者が肉質を評価する基準として重要なファクターは硬軟度特性であり、硬い食肉は消費者に嫌われ商品価値も低い¹⁾。我が国では全国で年間に、老齢化して淘汰される搾乳牛から約32,000t、採卵鶏から135,000tの食肉が副次的に発生しており、これらの付加価値化技術の開発が急務の課題である。本研究では、これら国内で発生する乳廃牛肉等低品質食肉の付加価値化技術の開発を行うため、乳廃牛(Culled dairy cattle: 以下図表中 C. D. C. と省略)肉と肥育牛(Fattening cattle: 以下図表中 F. C. と省略)肉の品質の相違、加齢に伴う筋内結合組織膜構造及び硬さの変化、軟化処理に適した細菌・酵素処理方法のスクリーニング、細菌・酵素処理による軟化のメカニズム、酵素活性の制御、処理肉の品質特性・加工適正の検討等を行った。

実験方法

1. 試料

実験用試料の乳廃牛及び肥育牛は、¹⁾北海道畜産公社札幌事業所で屠殺解体されたものを使用した。乳廃牛肉6頭分は8歳齢前後、枝肉重量280kg程度のもので、対照用試料のホルスタイン種去勢肥育牛肉3頭分は1歳7ヶ月齢程度、枝肉重量440kg前後のもので、共に屠殺後6日目の半腱様筋(*M. semitendinosus*)を使用した。

2. 肉質の評価及び分析

肉質評価は、肉及び脂肪の色調を色彩色差計(ミノルタ社製 CR-30型)でハンター表色法により測定した。一般成分値(水分、粗たんぱく、粗脂肪、灰分)は公定法により、総色素量はHornseyの方法²⁾により測定した。pH値は、試料肉5gに蒸留水20mlを加えてホモジナイズし、遠心分離して上清をpHメーター(東亜電波工業¹⁾製)で測定した。加熱ロス、定型に整形した試料肉をパックしてウォーターバス中で70°C、90分間加熱した後の重量に対する元重量の比で求めた。硬さの指標としての切断応力は、レオメーター(サン科学社製 CR-200D型)で測定した。結合組織含有量の指標としてヒドロキシプロリン含有量をWoessnerの方法³⁾により測定し、さらに結合組織の加熱耐性の指標としてコラーゲンの加熱溶解性をHillの方法⁴⁾により測定した。さらに食肉の硬さの原因となる結合組織膜⁵⁾の微細構造を、走査型電子顕微鏡(日立 S-2400)を用いて細胞消化走査電子顕微鏡法⁶⁾により比較した。

3. 供試粗酵素及びプロテアーゼ活性の測定

肉の軟化処理用酵素の給源として、比較的反応が穏や

かな各種発酵食品(醤油粕、味噌麴、麴歩合20%味噌、同30%味噌、マタタビ果実、醤油麴、魚醤油粕、味噌麴添加魚醤油粕の8種類)を用いた。プロテアーゼ活性の測定は以下の方法で行った。各発酵食品の粉碎物1gを蒸留水100mlに懸濁し、遠心分離後上清をフィルター濾過して粗酵素抽出液とした。基質として1.5%ミルクカゼイン水溶液を使用した。調製した粗酵素液を基質に添加してpH7で40°C24時間反応後0.4MTCAを添加して反応を停止し、TCA可溶画分の非タンパク態窒素化合物量(TCA可溶画分量)をLowry法により測定した。

4. 廃用牛肉の軟化処理試験

(1) 試料の軟化処理

A. sojae, *A. oryzae*及びこれらを5:1で配合したものの(Hi sojae)を、米を基質に培養し(福山醸造¹⁾提供)、各々を微粉末に粉碎後、水で4倍量に希釈してNaNO₂100ppm(終濃度)を添加し、最終食塩濃度が4%となるように調製し(軟化剤)、これに試料を浸漬した。

(2) 供試牛肉の調製及び品質測定

試験用乳廃牛肉は、個体差を最小限にとどめるため、同一牛より採取した屠殺後6日目の半腱様筋から2×2×5cmの線維方向に平行に角柱状に切出して作製した。試料は調製した軟化剤に浸漬して品質(水分、生及び加熱試料の切断応力、コラーゲンの加熱溶解性)を一週間毎に一ヶ月間測定し、経時変化を観察した。同時に軟化のメカニズムを解明するため、走査型電子顕微鏡により結合組織膜微細構造の変化を観察した(各測定方法は前述の通り)。

5. プロテアーゼインヒビターによる酵素活性の制御

(1) インヒビター溶液の調製

牛血清10%生試料は牛血液を8000r. p. m, 40min 遠心分離して得た血清を蒸留水で10倍希釈して調製した。同10%加熱試料は前述の試料を90°C, 30min 加熱して調製した。サケ精巢10%加熱試料はサケ精巢2.5gに10倍量の蒸留水を添加し、1,000r. p. m, 3min ホモジナイズ(¹⁾日本精機製作所 EXCEL AUTO HOMOGENIZER DX-11型)した後、90°C, 30min 加熱して調製した。プラズマパウダー1%溶液は市販のプラズマパウダー1gを蒸留水で100mlに希釈して調製した。

(2) 粗酵素溶液の調製

粗酵素溶液は最終濃度が、米麴(Hi-sojae)の場合は各々1%, 0.1%, 醤油粕は1%になるように蒸留水を加えてホモジナイズ(1000r. p. m, 3min)し、濾過して調製した。

(3) 活性阻害率の測定

1.5%ミルクカゼイン溶液 1 mlに、粗酵素抽出液 1 ml, インヒビター溶液 1 mlを添加して40°C, 5時間 (pH7) 反応させた。0.4MTCA 3 mlを添加して反応を停止し、遠心分離して上清の TCA 可溶画分量を Lowry 法により測定した。対照区 (インヒビター無添加区) の吸光度増加分に対する阻害剤添加試験区の吸光度増加分の比率を活性阻害率として求めた。

6. 粗酵素処理条件及び製品の試作

(1) 食肉製品の製造

食肉製品の製造工程を基本に、酵素を含まない対照区及び酵素処理区 (I~IV) の計 5 種類の浸漬剤を調製し、各々加熱食肉製品、乾燥食肉製品、非加熱食肉製品の 3 品種15種類及び追加試験分 3 種類、計18種類の製品を試作した。

浸漬剤の配合は対照区は食塩 4%, 亜硝酸ナトリウム 100ppm の水溶液とした。試験区 I は対照区成分に醤油粕25%含有の配合とし、醤油粕は自身に塩分を含有するため配合塩分終濃度 4%となるように調製した。試験区 II は試験区 I の醤油粕臭のマスクングを目的に人参ジュース粕10%, 地ビール63%の配合とした。試験区 III は試験区 I に酵素活性強化を目的に米麴 (A. soya) 10%を追添加した。試験区 IV は麴歩合を30%に増量して酵素活性を強化した味噌66.7%, 亜硝酸ナトリウム100ppm, 地ビール33.2%を配合して味噌風味の製品の試作を試みた。さらに一回目の試作結果に改良を加え二回目の試作を行った。試験区 I は醤油粕25%, 米麴10%, 亜硝酸ナトリウム100ppm, 食塩を終濃度 4%となるように地ビールに溶解して調製した。試験区 II は麴歩合30%味噌15%, 醤油粕15%, 亜硝酸ナトリウム100ppm, 食塩を終濃度 4%となるように地ビールに溶解して調製した。試作品の製造は、原料肉として乳廃牛半腱様筋を縦横に 4 分割 (約500g/本) し、試作用試料とした。原料を各々の浸漬剤に冷蔵庫 5°C 中で10日間浸漬後、スモークハウス (独アスカ社製) で50°C, 5時間保持してプロテアーゼの反応促進処理を行った。冷蔵庫 5°C で一晚冷却後各々の

試験区について三種類の製品を試作した。

- i) 加熱食肉製品 : 加熱最終中心温度63°C, 30分以上
- ii) 乾燥食肉製品 : 加熱温度90°C, 水分活性0.87未満
- iii) 被加熱食肉製品: 恒温恒湿器温度17°C, 湿度70%, 水分活性0.95未満

(2) たんぱく質の分解度

粗酵素処理肉のたんぱく分解度は TCA 可溶画分量を測定して求めた。さらに電気泳動法 (SDS-PAGE) により製造工程別に分解の進行度を観察した。SDS-PAGE は Laemmli の方法によりミニスラブゲルを使用し、分離ゲルのアクリルアミドの濃度を7.5%で行った。試料からのたんぱく抽出には Hasselbach-Schneider Solution (0.6MKCl, 0.1MKphosphate, 10mMsodium pyrophosphate, 1 mMMgcl₂, pH6.4) を使用した。

(3) 製品の官能評価

製品化に協力頂いた食肉加工メーカー開発担当社員 3 名と、試作品18種類を官能評価した。

結果及び考察

1. 乳廃牛と肥育牛の肉質の差

(1) 色調

肉の色調は鮮紅色が望ましいとされているが、乳廃牛肉 (図表中 C. D. C. と略) の色調は L 値, a 値, b 値共に肥育牛肉 (図表中 F. C. と略) よりも低い値を示し、明度が低く、赤み, 黄色みともに乏しい。脂肪色は白色が望ましいとされているが、乳廃牛肉は明度が低く、赤み, 黄色みとも非常に強いことがわかる。このことから、乳廃牛肉は肉色および脂肪の色沢の項目で格付け等級が極端に劣り、商品価値が低いことがわかった (Table 1)。

(2) 一般成分値等

乳廃牛と肥育牛肉間に大差は認められなかったが、加熱ロスが乳廃牛で約 3%大きかった点は加工をする上で重要である (Table 2)。

(3) 切断応力, ヒドロキシプロリン含有量及びコラーゲンの加熱溶解性

肥育牛生肉の切断応力を100%として乳廃牛肉の切断

Table 1 Color hue comparisons of meat and fat between C.D.C. and F.C.

| | Meat color* | | | Fat color* | | |
|--------|-------------|-------|-------|------------|------|-------|
| | L | a | b | L | a | b |
| C.D.C. | 38.26 | 18.25 | 9.10 | 63.73 | 8.87 | 26.81 |
| F.C. | 41.10 | 21.04 | 10.76 | 75.27 | 1.37 | 7.26 |

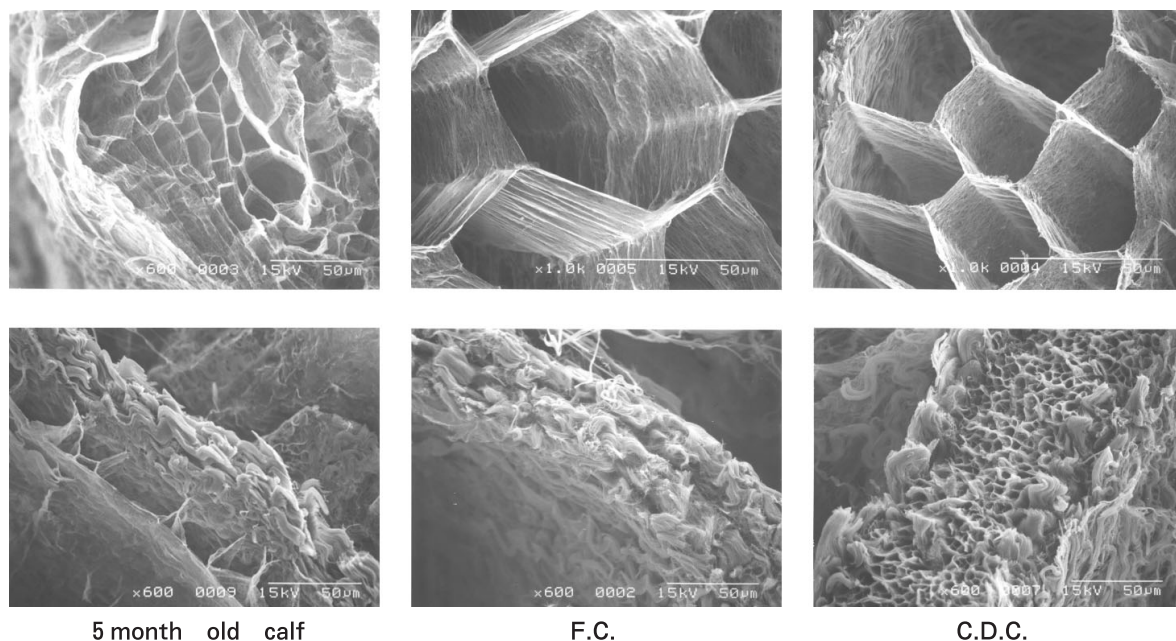
* Hunter color numbers

Table 2 Comparisons of main components between C.D.C. and F.C.

| | Main components (%) | | | | Total pigment (mg/g) | pH value | Cooking loss (%) |
|----------|---------------------|---------------|-----------|------|----------------------|----------|------------------|
| | Moisture | Crude protein | Crude fat | Ash | | | |
| C. D. C. | 74.68 | 22.35 | 1.24 | 1.12 | 0.14 | 5.76 | 32.48 |
| F. C. | 73.24 | 21.55 | 2.77 | 1.07 | 0.16 | 5.52 | 29.45 |

Table 3 Comparisons of shear force value(raw and cooked meat), Hydroxyproline content and Collagen cooked solubility between C.D.C. and F.C.

| | Shear force value (gf) | | Hydroxyproline content (μ g/g) | Collagen cooked solubility (%) |
|--------|------------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| | Raw meat | Cooked meat | | |
| C.D.C. | 4874 | 7014 | 1180 | 2.44 |
| F.C. | 4377 | 4315 | 1515 | 6.22 |

Fig. 1 Comparisons of Endomysium (upper) and Perimysium (lower) of *M.Semitendinosus* between 5 month old calf, F.C. and C.D.C.

応力の相対値を求めたところ、生肉の場合111.4%とやや硬い程度であったが、加熱すると乳廃牛肉で160.2%となり肥育牛肉の98.6%と比較して大きく上昇した。結合組織の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリン含有量、コラーゲンの加熱溶解性は、ともに乳廃牛肉よりも肥育牛肉の方が高く、結合組織量で1.28倍、加熱溶解性で2.55倍であり、食肉の硬さは結合組織の量的ではなく、質的要因が大きく影響していることを示している (Table 3)。

(4) 走査型電子顕微鏡による結合組織膜微細構造の観察
筋肉の結合組織である筋内膜、筋周膜の強度は食肉の

硬さに直接的に関係している。乳廃牛の筋内膜、筋周膜はともに厚く、加齢に伴い堅牢な構造へ変化する様子が観察された (Fig. 1)。

2. 各種発酵食品等のプロテアーゼ活性

プロテアーゼ活性を測定した結果、醤油粕等に強い分解活性が認められたが、特に麴類が強い活性を示し、他と比較して測定に際して反応時間 (24時間分解) を短縮 (5時間分解) せざるを得ないほど強力であった (Table 4)。この結果から、以降の食肉軟化処理試験、処理肉の製品化試作には軟化剤を醤油粕及び麴類に絞って

実施した。

3. 乳麩牛肉の軟化処理試験

水分は浸漬剤の浸透圧により2週目まで急速に低下してその後緩やかに上昇して安定した (Fig. 2-A)。生肉の切断応力は急速に減少した後、水分の減少により一時上昇あるいは停滞し、その後平衡に達した (Fig. 2-B)。加熱肉の切断応力は生肉同様急速に低下した後一時上昇して緩やかに減少あるいは平衡に達した (Fig. 2-C)。コラーゲンの加熱溶解性は漬込み期間の長さに伴って次第に上昇した (Fig. 2-D)。また、酵素による軟化のメカニズムを解明するため、走査型電子顕微鏡により一ヶ月処理後の結合組織膜 (筋内膜, 筋周膜)

の微細構造変化を観察した。いずれの処理区も筋内膜は六角構造の緊張が緩み (Fig. 3 A-a), 筋周膜も板状の緊密な構造がほぐれてともに膨潤したような変化を示し (Fig. 3 A-b), プロテアーゼによるとみられる膜構造の崩壊が観察された。また、さらに高倍率で観察したところ対照区 (塩水処理) のコラーゲン細線維は一定の方向性を持っているが (Fig. 3 B-c), 処理肉は方向性が失われていた (Fig. 3 B-d)。これらのことから、酵素処理による食肉の軟化機構は酵素により線維を固定している構造がはずれ、コラーゲン細線維が緩むことが原因と推定された。

4. 酵素活性の制御

Table 4 Protease activities in various fermented foods (Absorbance/g of enzyme source paste)

| | Protease activities (Abs/g of enzyme source paste) | |
|-------------------------------------|---|----------------------|
| | After 24hr incubation | After 5hr incubation |
| Soy sauce lees | 0.68 | 0.10 |
| <i>A.oryzae</i> | 0.41 | 1.30 |
| <i>A.sojae</i> | 1.76 | 1.45 |
| Hi.sojae | - | 1.39 |
| Miso 20 | 0.17 | - |
| Miso 30 | 0.16 | - |
| Silver vine | 0.06 | - |
| Fish sauce lees | 0.25 | - |
| Fish sauce lees and <i>A.oryzae</i> | 0.30 | - |

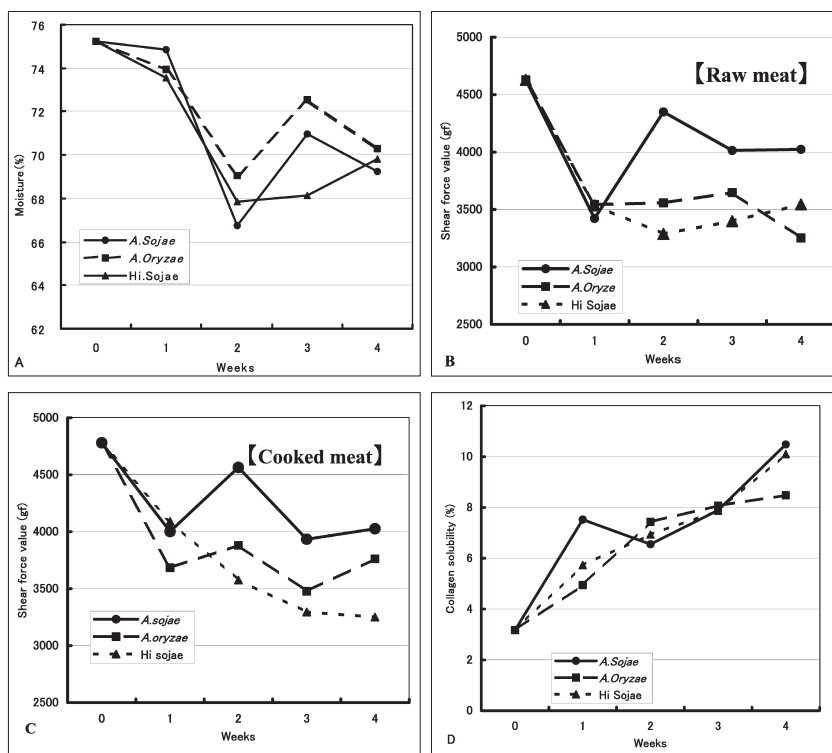


Fig. 2 Changes of moisture content, shear force value (Raw and Cooked meat) and collagen cooked solubility of C.D.C. meat during enzyme treatment

酵素処理肉の製品化に際しては、適度な軟化、分解状態で酵素活性を停止することが不可欠である。加熱食肉製品は酵素が熱失活するため問題はないが、本研究では非加熱製品の開発も考慮しているためプロテアーゼインヒビターによる活性停止を検討した。インヒビターは動物の各種組織や血液、体液また米、豆類等の植物種子に含まれることが明らかにされている。本研究では食品素材として利用可能なサケ精巣及び牛血清による活性停止を検討した。この結果、牛血清の活性阻害率が最も強く、続いてプラズマパウダー、牛加熱血清、サケ精巣の順であった。特にハイソヤに対する牛血清の阻害率は90%程度にまで達した。サケ精巣には数種のインヒビター

の存在が明らかにされているが今回は大きな効果は認められなかった (Fig. 4)。

5. 処理肉の製品化検討

(1) たんぱく質の分解パターン

TCA 可溶画分量は対照区と比較して、いずれの試験区も著しく増加し、分解が進行していることがわかる (データは不掲載)。また、さらに詳細に分解度を観察する目的で SDS-PAGE を行った (Fig. 5)。漬込み直後はミオシン重鎖 (MHC) が残っているが (Fig. 5 A)、インキュベート後は極めて薄くなりさらに低分子側のバンドもほとんど消失して軟化剤処理により分解がよく促進される事がわかった (Fig. 5 B)。生ハムは最

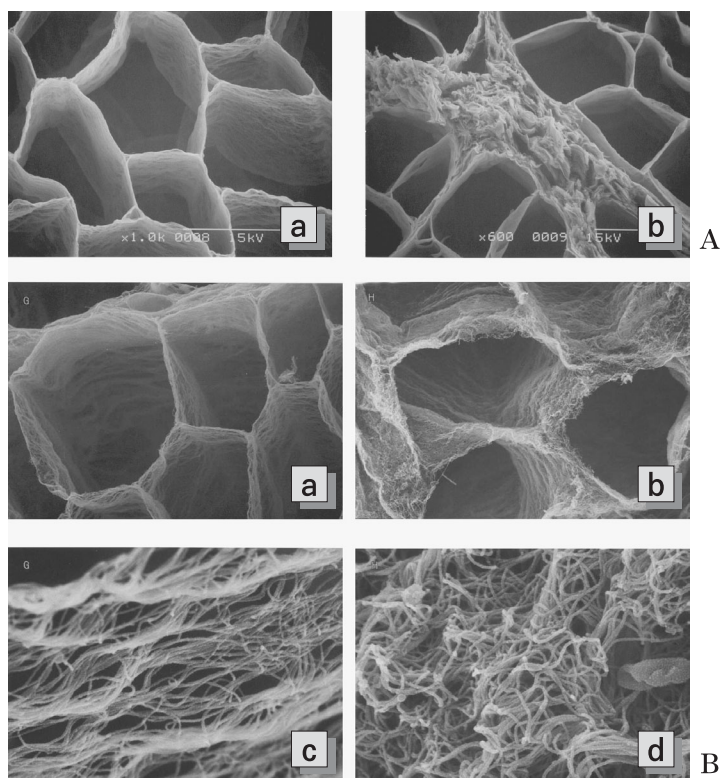


Fig. 3 A:Endomysium (a) and Perimysium (b) structures of enzyme treated C.D.C. raw meat
B:Collagen microfibril structure of C.D.C. raw meat before and after enzyme treatment
(a,b: Endomysium c,d: Perimysium a,c: untreated b,d: treated)

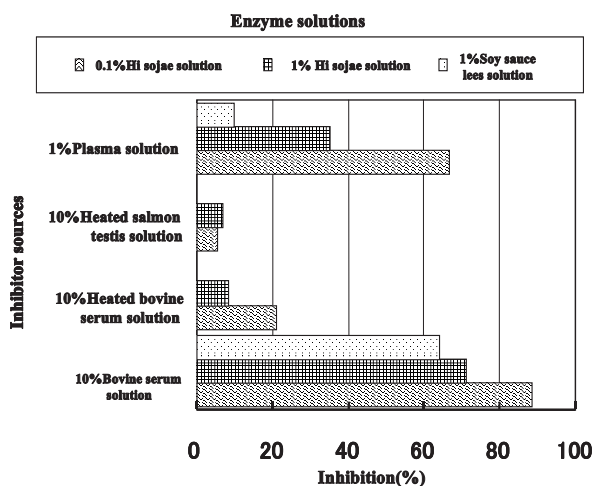


Fig. 4 Protease inhibition activities in various natural sources

終工程を17°Cで Aw0.95未満まで乾燥熟成するが、本工程（2-I, 2-II）でも分解が進行し、終了時にはMHCは完全に消失していた（Fig. 5 C）。

(2) 製品の官能評価

対照区（非酵素処理）は、色調は良好であるが香り、風味に乏しくテクスチャーも硬かった。醤油粕は活性は強いが多量に使うと特有の臭い、味が出て好ましくない。

しかし、適量を麴などと混合して使うと肉の消臭効果がある。味噌を使用したものは、風味のバランス良く高い評価となった。試験区は対照区と比較すると全般にうま味が出ているという評価となり、酵素による分解物の呈味性に及ぼす効果が認められた。

要約

1 乳廃牛と肥育牛の肉質の比較では、色調は乳廃牛が肉及び脂肪とも極端に劣る。乳廃牛肉は加熱による硬さの増大率が非常に大きい。この硬さは結合組織の量的ではなく、質的要因が大きく影響している。電子顕微鏡観察の結果から、加齢に伴う筋周膜構造の変化が主に硬さの増大の原因となっていると推察された。

2 各種発酵食品等に天然に存在するたんぱく質分解活性を検討した結果、醤油粕及び麴類に強い活性が認められ、十分な食肉軟化効果があり、同時に分解物の呈味効果が明らかになった。また、処理過程におけるたんぱく

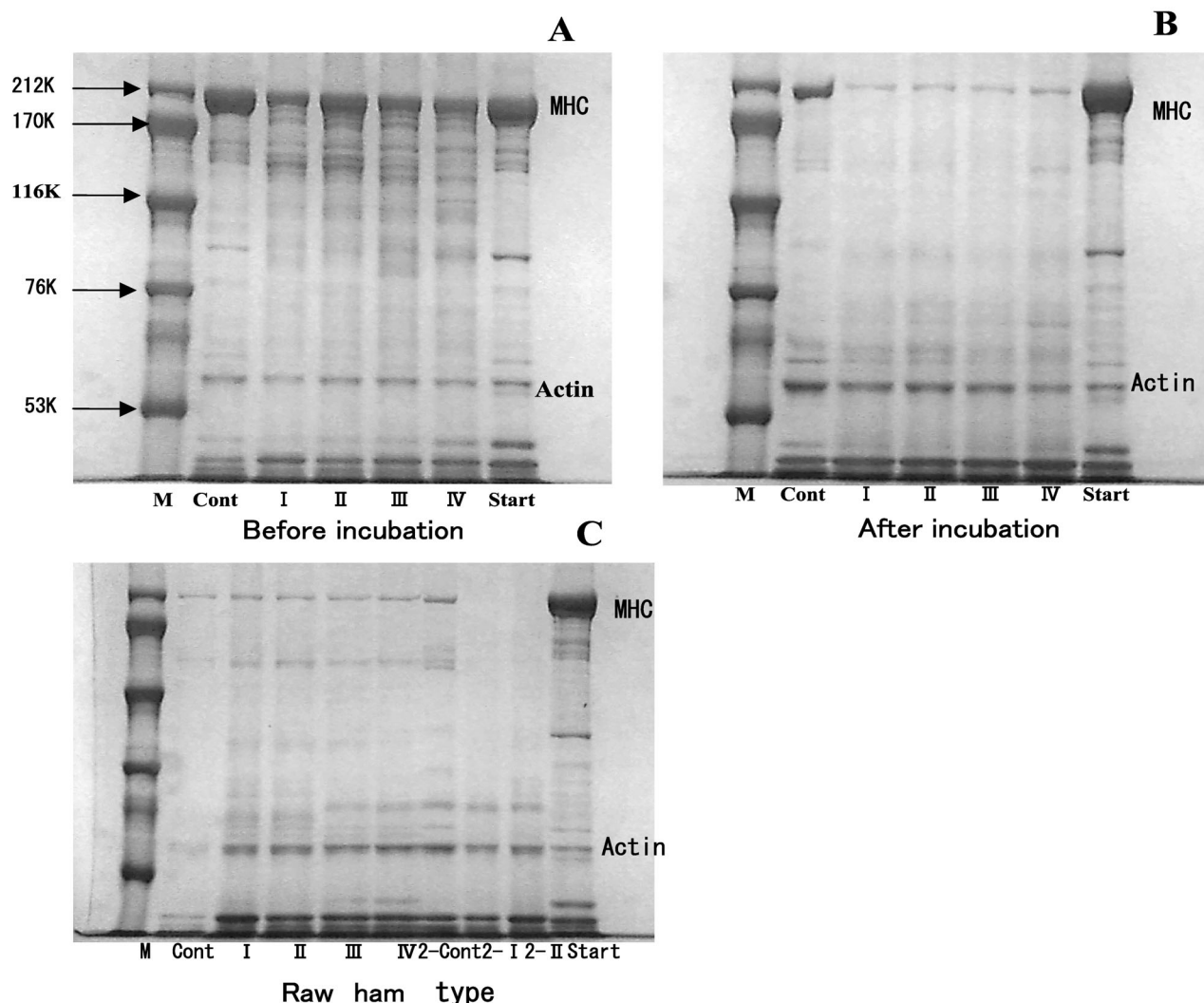


Fig.5 SDS-PAGE of proteins extracted with HS-solution from various enzyme treated meats

M, Molecular Weight maker; CONT, Control plot; I, Experimental plot I; II, Experimental plot II; III, Experimental plot III; IV, Experimental plot IV; Start, Second day after slaughter; 2-Cont, Control plot in the second experiment; 2-I, Experimental plot I in the second experiment; 2-II, Experimental plot II in the second experiment

の分解パターンが明らかになった。

3 酵素活性の制御について、食品素材として利用可能な範囲で検討した結果、麴類の産生する酵素に対しては牛生血清が強い阻害作用を示した。

4 軟化处理肉はその品質特性から、乾燥食肉製品あるいはスープ、シチュー、カレーの具材等への利用が適していると考えられた。

文 献

- 1) 安井 勉：日本畜産学会北海道支部会報, **28**, 23 (1986)
- 2) Hornsey, H. C. : *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 534-540 (1956)
- 3) J. F. WOESSNER, JR : *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 440 (1961)
- 4) F. HILL : *J. FOOD. Sci.*, **31**, 161 (1966)
- 5) 高橋興威, 畜産の研究, **10**, 17 (1992)
- 6) Ohtani, O., Ushiki, T., Taguchi, T., Kikuta, A. : *Arch. Histol. Cytol.*, **51**, 249 (1988)

1) 安井 勉：日本畜産学会北海道支部会報, **28**, 23