

## いわし肉の蛋白分解酵素による分解

田代 豊雄・田坂 京子・安藤 幾代  
岡 弘康\*・藤田 悦子

愛媛大学教育学部食品化学研究室

(昭和63年10月1日受理)

## Proteolysis of Muscles of Sardine (*Sardinops melanosticta*) by the Use of Protease

Toyoo TASHIRO · Kyoko TASAKA · Ikuyo ANDO · Hiroyasu OKA\* · Etsuko FUJITA

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Education,

Ehime University, Matsuyama-shi, Ehime 790

(Received October 1, 1988)

- (1) Proteolysis was examined in autolysis of sardine muscles. The hydrolysis of muscle protein proceeded slowly and its activity was low.
- (2) Proteolysis of sardine muscles was also investigated by the addition of proteases (endopeptidases). In this case, the hydrolysis of muscle protein proceeded rapidly and its activity was high.

Taste of substances produced by the proteolysis of sardine muscles was bitter when pepsin, neutral protease (NP-2) of *Aspergillus oryzae*, and protease (O-5N) of *Bacillus subtilis* were added, but was not bitter in the case when acidic protease (YP-SS) of *Aspergillus niger* and actinidin of Kiwifruit were used.

- (3) Proteolysis of sardine muscles was investigated by using protease (endopeptidase) together with autolysis solution of *Aspergillus oryzae* (containing endopeptidase and exopeptidase). The hydrolysis of muscle protein proceeded remarkably by additive effects of the endopeptidase and the exopeptidase.

Taste of the substances produced by the proteolysis of sardine muscles by this method was greatly delicious and not bitter.

- (4) Seasoning solutions were produced from sardine muscles through proteolysis with the proteases and the autolysis solution of *Aspergillus oryzae*. They possessed good flavor as well as good taste.
- (5) Free amino acids were determined in sardine muscles and in the concentrated season-

---

\*愛媛県工業技術センター

Ehime Prefecture Industrial Research Center, Matsuyama-shi, Ehime 790

ing solutions described above.

Histidine was contained in large quantities in sardine muscles. Glutamic acid, aspartic acid, and alanine, all of which have a strong connection with good taste, were contained abundantly in the seasoning solutions.

従来から魚体あるいは内臓などを酵素消化または自己消化させ、液化物を濃縮し、利用する研究<sup>1,2)</sup>が行われている。この濃縮液はフィッシュソリュブルと言われ、その主成分はペプチドやアミノ酸であるが、通常、飼料として使用されている。しかし、近年、魚類その他の蛋白質原料に各種の蛋白分解酵素を作用させ、その蛋白分解液を利用した食用ソリュブルの研究<sup>3)</sup>も進み、例えば、えそ、ぐちなどの魚肉を主原料として魚肉エキスが作られ<sup>4)</sup>、調味料として市販されている。

筆者らは、愛媛県近海において多獲されているいわしの食用への多面的利用の観点から、いわし肉に各種の蛋白分解酵素を添加、作用させるとともに、自己消化を行い、さらには、生成する苦味成分を分解する目的で麹菌自己消化液を添加、作用させた。その結果、いわし肉蛋白質の分解が著しく進行し、風味の良好な分解生成物が得られ、いわしの風味をもつ調味料として有効に利用し得ることが分った。

## 試料および実験方法

### 1. 試料

瀬戸内海産の新鮮なまいわし (*Sardinops melanosticta*) (大羽のもの) をそのまま冷凍、貯蔵 (-20℃以下にて) した。これを適宜解凍し、頭、内臓を除き、3枚におろし、魚肉のみをミンチにかけた後、実験に供した。

### 2. 蛋白分解酵素

次の5種類の蛋白分解酵素をプロテイナーゼ (エンドペプチダーゼ) として使用した。

(1) プロテアーゼ YP-SS (ヤクルト薬品工業KK製, 酵素力価100,000 PU/g): 黒かび (*Aspergillus niger*) より得られた帯黄色の粉末で、至適温度50~60℃, 至適 pH2~4 である。

(以後 YP-SS とする)。

(2) ペプシン (半井化学薬品KK製, 酵素力価10,000 PU/g): 豚胃粘膜から得られた黄白色の粉末で、至適 pH1.8~2.0 である。

(3) アクチニジン (愛媛県工業技術センター串井光雄氏提供, 酵素力価3,000 PU/g): キウイフルーツ果汁から塩析法により得られた淡黄褐色の粉末である。作用温度20~40℃, 至適 pH4.2 である。

(4) パンチダーゼ NP-2 (ヤクルト薬品工業KK製, 酵素力価40,000 PU/g): 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) より得られた淡褐色の粉末で、至適温度40~50℃, 至適 pH6~8 である。

(以後 NP-2 とする)。

(5) オリエンターゼ 5 N (上田化学工業KK製, 酵素力価50,000 PU/g): 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) より得られた白色の粉末で、至適温度は50~55℃, 至適 pH7.0 である。(以後 O-5N とする)。

### 3. 麹菌自己消化液

ペプチダーゼ（エキソペプチダーゼ）の酵素剤として麹菌自己消化液（福岡県醤油醸造協同組合製，中性プロテイナーゼ酵素力価<sup>5)</sup> 230 PU/ml，ロイシンアミノペプチダーゼ酵素力価<sup>6)</sup> 0.05 PU/ml）を使用した。醤油麹 1 kg に対し食塩濃度 5～30% の冷食塩水を 1～2 l 加え，低温（10℃以下）にて熟成させ，1～3 週間後に濾過し，麹菌自己消化液を得る<sup>7)</sup>。

### 4. いわし肉の自己消化による蛋白質の分解

いわし肉 2 g に対し緩衝液 4 ml を加え，一定の温度に保った。これを実験の 1 区分とした。緩衝液には Mcllvaine 緩衝液を使用した。自己消化の反応条件として，pH2.2，pH3.0，pH4.2 にて 20℃ で，また，pH7.0 にて 50℃ で行った。

これらの自己消化させたものについて，経時的に 0，5，24 時間後に遊離チロシンを定量した。このチロシン量からいわし肉の自己消化による蛋白質の分解の程度を判定した。

チロシンの定量は Anson 法<sup>8)</sup> に準じて行った。すなわち，前記の実験区分に水 9 ml および 20% 三塩化酢酸（以後 TCA とする）5 ml を加え，激しく振とうし，30 分後に東洋濾紙 No.5C にて濾過した。濾液 1 ml をとり，水 4 ml，0.5N NaOH 10 ml，フェノール試薬<sup>9)</sup>（3 倍稀釈液）3 ml を加え，10 分後に 590 nm にて吸光度を測定し，チロシン量を算出した。

### 5. 蛋白分解酵素によるいわし肉蛋白質の分解および分解生成物の呈味

いわし肉 2 g に対し蛋白分解酵素 0.02 g 添加の緩衝液 4 ml を加え，一定の温度に保った。これを実験の 1 区分とした。緩衝液には Mcllvaine 緩衝液を使用した。蛋白分解酵素の反応量はいわし肉に対し 1% に相当する。

蛋白分解酵素の種類，緩衝液の pH，反応温度を表 1 に示した。

これらの酵素反応させたものについて，経時的に 0，5，24 時間後に前記の 4 の実験と同様の方法にて遊離チロシン

を定量した。このチロシン量からいわし肉の自己消化と蛋白分解酵素による相乗的な蛋白質の分解の程度を判定した。

これらの酵素反応させたものについて，5 および 24 時間後に加熱殺菌（100℃ にて 5 分間）し，次いで濾過し，濾液を中和した後に，呈味を検した。

表 1 いわし肉に対する蛋白分解酵素の反応条件

酵素名	緩衝液 pH	反応温度℃
ペブシン	2.2	20
YP-SS	3.0	55
アクチネジン	4.2	20
NP-2	6.0	55
O-5N	7.0	50

### 6. 蛋白分解酵素と麹菌自己消化液によるいわし肉蛋白質の分解および分解生成物の呈味

いわし肉 2 g に対し蛋白分解酵素 0.02 g 添加の緩衝液 3 ml および麹菌自己消化液 1 ml を加え，一定の温度に保った。これを実験の 1 区分とした。蛋白分解酵素の反応量はいわし肉に対し 1% であり，麹菌自己消化液の添加量はいわし肉に対し 50% である。

蛋白分解酵素の種類，緩衝液（Mcllvaine）の pH，反応温度を表 2 に示した。

これらの酵素反応させたものについて，経時的に 0，5，24 時間後に前記の 4 の実験と同様の方法にて遊離チロシンを定量した。このチロシン量からいわし肉の自己消化，蛋白分解酵素，

麹菌自己消化液などによる相乗的な蛋白質，ペプチドの分解の程度を判定した。

これらの酵素反応させたものについて、5および24時間後に加熱殺菌（100℃にて5分間）し、次いで濾過し、濾液について呈味を検した。

表2 いわし肉に対する蛋白分解酵素および麹菌自己消化液の反応条件

酵素名	緩衝液pH	反応温度℃
NP-2	7.0	20
NP-2	7.0	45
O-5N	7.0	20
O-5N	7.0	45

## 7. いわし肉を原料にした調味料の製法

### (1) YP-SS およびアクチニジンの場合

いわし肉50gに対し蛋白分解酵素0.1g添加の水100mlを加え、YP-SSではpH3.0に、アクチニジンではpH4.2にHClにて調整し、いずれも45℃に保った。

### (2) NP-2 および O-5N の場合

いわし肉50gに対し蛋白分解酵素0.1g添加の水75mlおよび麹菌自己消化液25mlを加え、いずれもpH7.0に調整し、NP-2では45℃に、O-5Nでは50℃に保った。

これら4種類の酵素反応液について、反応5時間後に加熱殺菌（100℃、5分間）し、濾過した。濾液は中和し、遠心分離（14,500 rpm）し、上澄液を得た。さらに、これをエバポレーターにて1/5容量まで濃縮し、濃厚調味液を得た。

## 8. いわし肉原料の調味液の遊離アミノ酸類含量

いわし肉および前記の7の実験で得られた濃厚調味液について、常法により遊離アミノ酸類を定量した。すなわち、試料にエチルアルコールを75%になるように加え、遊離アミノ酸類の抽出を繰り返し行った。その抽出液を濃縮し、エチルエーテルにて脱脂した後、減圧乾固した。その乾固物を1/100 N HClに溶解し、アミノ酸分析に供した。各アミノ酸の分離・定量は日立製液体クロマトグラフ（034形）を使用し、日立イオン交換樹脂2611のワンカラムを用いる自動分析法によって行った。

## 結果および考察

### 1. いわし肉の自己消化による蛋白質の分解

いわし肉の自己消化によって生成するチロシン量を表3に示した。

自己消化の時間の経過とともに遊離チロシン量は増加した。すなわち、いわし肉の自己消化は進行し、蛋白質が分解されるが、その程度は低い。自己消化過程のいわし肉において、この条件では24時間後も、腐敗はおこらない。

表3 いわし肉の自己消化におけるチロシン量 (mg/いわし肉g)

自己消化pH 作用時間	2.2 (20℃)	3.0 (20℃)	4.2 (20℃)	7.0 (50℃)
0	0.6	0.5	0.5	0.6
5	0.8	0.7	0.8	1.0
24	1.4	1.0	1.0	1.1

### 2. 蛋白分解酵素によるいわし肉蛋白質の分解および分解生成物の呈味

自己消化および蛋白分解酵素の相乗的な作用によるいわし肉蛋白質の分解によって

表4 いわし肉の自己消化および蛋白分解酵素作用におけるチロシン量 (mg/いわし肉g)

酵素 作用時間	ペプシン	YP-SS	アクチニジン	NP-2	O-5N
0	2.1	1.9	1.0	2.1	1.3
5	4.0	6.2	3.6	8.9	8.1
24	5.7	10.5	5.0	9.8	12.0

生成するチロシン量を表4に、またそのチロシンの増加によるいわし肉蛋白質の分解経過を図1に示した。

いわし肉蛋白質は蛋白分解酵素の添加により急速に分解され、遊離チロシン量は自己消化の場合に比べ著しく増加した。特に蛋白分解酵素のYP-SS, NP-2, O-5Nでは蛋白質の分解の程度は大きい。

蛋白分解酵素によるいわし肉蛋白質の分解生成物の呈味を表5に示した。

これらの酵素の添加によって、旨味は時間の経過とともに増加する。しかし、ペプシン, NP-2, O-5Nを添加したものでは苦味が強く、よい味が得られなかった。これらの酵素の場合には、いわし肉蛋白質の分解により苦味を呈するペプチド<sup>10)</sup>やアミノ酸が多量に生成される

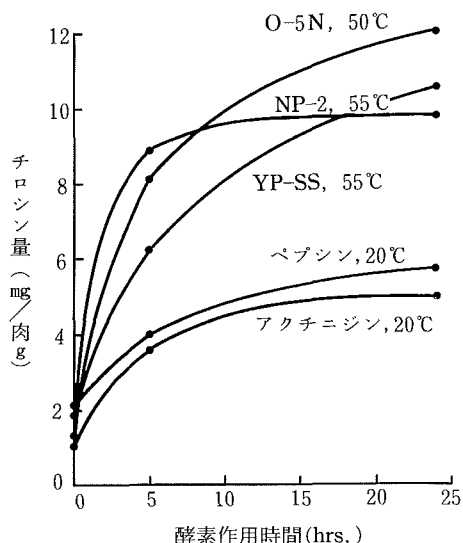


図1 自己消化および蛋白分解酵素作用によるいわし肉蛋白質の分解経過

表5 いわし肉における自己消化および蛋白分解酵素作用による分解生成物の呈味

酵素	酵素作用時間	呈味
ペプシン	5	旨味あり, 苦味強い, 生ぐさい
	24	上に同じ
YP-SS	5	旨味あり, 生ぐささ少しあり
	24	旨味強い, 香りよい
アクチニジン	5	旨味あり, キウイフルーツの香りあり
	24	上に同じ
NP-2	5	旨味あり, 苦味, 渋味あり, 生ぐさい
	24	上に同じ
O-5N	5	旨味あり, 苦味少しあり, 生ぐさい
	24	旨味強い, 苦味, 渋味あり, 香りよい

のであろう。YP-SS, アクチニジンを添加したものは苦味がほとんどなく、旨味があり、良質な味であった。

### 3. 蛋白分解酵素と麴菌自己消化液によるいわし肉蛋白質の分解および分解生成物の呈味

表5にあるように、ペプシン、NP-2、O-5Nの蛋白分解酵素作用によるいわし肉蛋白質の分解生成物は苦味が強い。そこで、実験6のごとく、蛋白分解酵素と同時にペプチダーゼ酵素剤として麴菌自己消化液を添加し、作用させた。いわし肉蛋白質の分解によって生成するチロシン量の増加経過を図2に示した。

図1と2の比較によって分かるように、蛋白分解酵素単独の場合に比べ、麴菌自己消化液を添加すれば、麴菌自己消化液に含まれる蛋白分解酵素およびペプチド分解酵素の相乗的な作用効果があられ、いわし肉蛋白質の分解によりチロシン量は急速に著しく増加した。また、NP-2・麴菌自己消化液、O-5N・麴菌自己消化液のいずれの場合も作用温度20℃よりも45℃の方がいわし肉蛋白質の分解が著しく進行した。

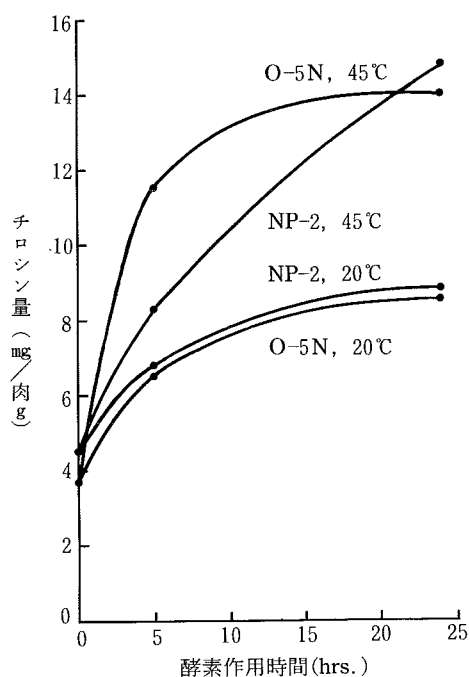


図2 蛋白分解酵素と麴菌自己消化液の作用によるいわし肉蛋白質の分解経過

表6 蛋白分解酵素と麴菌自己消化液によるいわし肉蛋白質の分解生成物の呈味

酵素名	酵素作用		呈味
	時間	温度℃	
NP-2	5	20	旨味あり，苦味なし，甘味あり
		45	上に同じ
	24	20	旨味強い
		45	腐敗
O-5N	5	20	旨味あり，苦味なし，甘味あり
		45	旨味強い，苦味なし，甘味強い
	24	20	旨味強い，甘味強い
		45	腐敗

蛋白分解酵素と麴菌自己消化液によるいわし肉蛋白質の分解生成物の呈味を表6に示した。

蛋白分解酵素と同時に麴菌自己消化液を添加することにより、いわし肉蛋白質の分解生成物は旨味が強くなるとともに苦味は消失した。また、甘味も強かった。苦味の消失は麴菌自己消化液に含まれるペプチダーゼによる苦味ペプチド類の分解に起因すると考えられる。

なお、45℃にて24時間作用させたものは、いずれの蛋白分解酵素の場合も腐敗した。したがって腐敗防止のためには酵素作用を短時間にとどめるか、または作用温度を55℃に上げる必要がある。

表7 いわし肉を原料にした調味液の味、香り、色

酵素名	味・香り・色
YP-SS	旨味あり、渋味あり、香りよい、茶橙色
アクチニジン	旨味あり、香りよい、淡茶橙色
NP-2・ 麹菌自己消化液	旨味あり、塩味あり、香りよい、濃茶褐色
O-5N・ 麹菌自己消化液	旨味あり、塩味あり、香りよい、濃茶褐色

表8 いわし肉およびいわし原料調味液の遊離アミノ酸類の含量

試料 アミノ酸	いわし肉 (mg/100g)	いわし原料調味液 (mg/100ml)			
		YP-SS 処理	アクチニジン 処理	NP-2・麹菌自己 消化液 処理	O-5N・麹菌自己 消化液 処理
アスパラギン酸	2.6	400	60	700	400
スレオニン	11.5	200	120	600	600
セリン	8.1	200	75	600	500
グルタミン酸	10.9	600	60	900	700
プロリン	10.8	100	15	400	300
グリシン	10.0	120	75	200	200
アラニン	24.1	200	135	700	400
シスチン	—	—	—	—	—
バリン	7.3	120	60	600	500
メチオニン	1.0	160	135	300	300
イソロイシン	6.0	200	150	600	600
ロイシン	12.7	1,000	450	1,500	900
チロシン	4.8	400	150	500	400
フェニルアラニン	8.5	400	150	1,000	500
リジン	15.0	800	150	1,100	800
アンモニア	10.1	100	45	300	200
ヒスチジン	141.3	600	600	600	400
アルギニン	—	600	150	1,100	600
総計*	274.6	6,100	2,535	11,400	8,100

\*アンモニアは除く

#### 4. いわし肉を原料にした調味料

作製された濃厚調味液の味、香り、色を表7に示した。これらの調味液はいずれも美味で香りよく、種々の調理に有効に利用され得るであろう。

#### 5. いわし肉原料の調味液の遊離アミノ酸類含量

いわし肉の遊離アミノ酸含量といわし肉を原料にした調味液の遊離アミノ酸類の含量を表8に示した。

表8から分かるように、いわし肉には遊離アミノ酸類のうち特にヒスチジンが多量に含まれている。

いわし肉を原料にした調味液には酵素作用によるいわし肉蛋白質の分解の結果、すべての遊離アミノ酸類が多量に含まれている。特に NP-2・麹菌自己消化液によるものでは遊離アミノ酸量が最も多く、ついで O-5N・麹菌自己消化液、YP-SS 処理の順で、キウイフルーツ酵素のアクチニジン処理では遊離アミノ酸量は比較的に低い。全般的に遊離アミノ酸のうちでは、ロイシン、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンなどが比較的によく含まれ、グルタミン酸、アスパラギン酸はこれら調味料の旨味に、アラニンは甘味に大いに関与している。

## 要 約

(1) いわし肉の自己消化における蛋白質の分解の推移を調べた。いわし肉の蛋白質は自己消化によって徐々に分解されるが、その程度は低い。

(2) 蛋白分解酵素（エンドペプチダーゼ）の添加によるいわし肉蛋白質の分解の推移を調べた。いわし肉の蛋白質は蛋白分解酵素の添加により急速に分解され、その程度は高い。ペプシン、麹菌中性プロテアーゼ（NP-2）、枯草菌中性プロテアーゼ（O-5N）による分解生成物では苦味が強いが、黒かび酸性プロテアーゼ（YP-SS）、キウイフルーツプロテアーゼ（アクチニジン）の場合にはほとんど苦味がない。

(3) いわし肉に蛋白分解酵素（エンドペプチダーゼ）と同時に麹菌自己消化液（エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼを含む）を添加し、いわし肉蛋白質の分解の推移を調べた。いわし肉の蛋白質は蛋白分解酵素と麹菌自己消化液に含まれる酵素類との相乗効果により著大に分解が進行する。その分解生成物は旨味、甘味が強く、苦味はない。

(4) いわし肉に各種の蛋白分解酵素を、さらには麹菌自己消化液を添加し、作用させ、濃厚調味液を作製した。旨味の強い、香りのよい調味液が得られた。

(5) いわし肉の遊離アミノ酸類の含量およびいわし肉を原料にした濃厚調味液の遊離アミノ酸類の含量を調べた。いわし肉には遊離アミノ酸類のうち特にヒスチジンが多量に含まれていた。濃厚調味液には旨味に関与するグルタミン酸、アスパラギン酸、甘味に関与するアラニンが比較的が多量に含まれていた。

## 文 献

- 1) 須山三千三：東京水産大学紀要， 53, 41 (1967).
- 2) 築瀬正明：東海水研報告， 75, 15 (1973).
- 3) 森山昭・林清・原口和朋・羽根茂雄：日本食品工業学会第35回大会講演集， p31 (1988).
- 4) 三輪勝利編：水産加工総覧， p401, 光琳 (1983).
- 5) パンチダーゼ NP-2， p7 ヤクルト薬品工業KK (1984).
- 6) 中台忠信・那須野精一・井口信義：調味科学， 18， 435 (1971).
- 7) 調味液の製法，特許出願人：上田化学工業KK，出願日：昭和62. 9. 17.
- 8) ANSON M. and A. MIRSKY : *J. Gen. phys.*, 16, 59 (1932). cf. SUMNER J.B. and G.F. SOMERS : *Chemistry and Methods of Enzymes*, 3 Ed., p167 ; 174 (1953).
- 9) 赤堀四郎編：酵素研究法， 1， p165, 朝倉書店 (1957).
- 10) 一島英治編：食品工業と酵素， p94, 朝倉書店 (1983).