

# 乳由来ペプチドの肉製品における発色促進機構と レオロジー特性調節機構の解明

Effects of milk protein peptides on acceleration of color  
formation and regulation of rheology property in meat  
products and their mechanisms

(研究課題番号：11556049)

平成11年度～平成13年度科学研究費補助金

(基盤研究 (B)(2))

研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者：六車三治男

宮崎大学附属図書館

(宮崎大学農学部教授)

100033809

## 【研究成果報告書】

研究課題：乳由来ペプチドの肉製品における発色促進機構と  
レオロジー特性調節機構の解明

### 【目次】

科学研究費補助金の内容	3
研究発表	4
研究結果の概要	8
報告書に掲載した論文	11
六車三治男：乳蛋白質の機能性改善と肉製品への応用に関する研究	13
Fujino, H., Muguruma, M., Shimada, S. and Nou, S. Improvement of properties of concentrated milk protein by trypsin digestion and its utilization in meat products. <i>Proceedings of 45<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology</i> , 134-135. 1999.	18
六車三治男、山内 清、河原 聡、大橋登美男、農 新介、杉田浩一：乳ホエータンパク質のゲル形成能と食肉製品のテクスチャー改善効果	20
六車三治男、山内 清、河原 聡、大橋登美男、農 新介、杉田浩一：乳ホエータンパク質の酵素処理によるゲル形成能と肉製品の発色促進効果の発現	32
Muguruma, M., Tsuruoka, K., Fujino, H., Kawahara, S., Yamauchi, K., Matsumura, S. and Soeda T. Gel strength enhancement of sausages by treating with microbial transglutaminase. <i>Proceedings of 45<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology</i> , 138-139. 1999.	51

六車三治男、山内 清、河原 聡、大橋登美男、農 新介、杉田浩一：酵素処理および乳酸発酵による機能改善乳ホエータンパク質製品の開発・53

Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Kawahara, S., Yamauchi, K. and Soeda, T  
Improvement in the functional properties of sausages by addition of biopolymers prepared from soybean protein and milk protein using microbial transglutaminase. *Proceedings of 46<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, 266-267. 2000. . . . . 68

Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S.K. and Soeda, T. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science*, 2002. (in press) . . . . . 70

坂田亮一、森田英利、乗松 毅、伊藤典之、長田貞之、岡山高秀、六車三治男：加熱食肉製品の発色に及ぼす乳清タンパク質酵素分解物の促進効果とその機構。 *日豚会誌*, 38. 115-124. 2001. . . . . 94

Sakata, R., Morita, H., Norimatsu, T., Oshida, T., Horiguchi, K., Itoh, N., Nagata, S., Okayama, T. and Muguruma, M. Accelerating effect of whey protein hydrolysate on color formation in meat products. *Proceedings of 47<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology* 20-21. 2001. . . . . 105

六車三治男、西 俊郎 加熱食肉製品の発色促進効果に及ぼすホエータンパク質酵素分解物の影響 . . . . . 107

Muguruma, M., Nishi, T., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fujino, H., Sakata, R. and Okayama, T. Accelerating effect of milk whey peptides on color formation in meat products. *Proceedings of 48<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology* 2002. (in press) . . . . . 118

## 科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））

【研究課題】 乳由来ペプチドの肉製品における発色促進機構と  
レオロジー特性調節機構の解明

【課題番号】 11556049

はしがき

近年、幼児を中心に牛乳アレルギーが増加しており、乳を食品素材として利用していく際に障害となっている。日本人の栄養摂取の中で唯一不足している成分がカルシウムであり、牛乳はそのカルシウムを豊富に含んでいる。しかし、牛乳アレルギーを持つ人は、牛乳、乳製品もしくは乳を使用した食品を食することはできない。そこで、乳を酵素処理することにより低アレルゲン化し、牛乳アレルギーの人でも摂取できるような機能性改変乳食品素材の研究・開発が求められている。

一方、日本は今後高齢化社会を迎え、食品においても消化、吸収性が高く、高齢者の咀嚼機能を考慮したより健康的な食品の開発が求められている。肉製品においても亜硝酸塩等の添加物使用量が少なく、高齢者のテクスチャー機能を考慮した製品の研究・開発が求められている。

本研究は上記の二つの問題の同時解決を目指し、乳由来ペプチドを配合することにより、亜硝酸塩添加量が少なくアレルギーにも対応した発色助剤・退色防止剤の開発と、高齢者向けのテクスチャー機能を考慮した肉製品用添加食材としての乳由来ペプチドの開発を目的として、平成11年度から平成13年度までの3年間、文部科学省科学研究費の交付を受けて実施したものである。

### 【研究組織】

研究代表者	六車 三治男	(宮崎大学農学部教授)
研究分担者	山内 清	(宮崎大学農学部教授)
	河原 聡	(宮崎大学農学部助手)
	大橋 登美男	(九州栄養福祉大学教授)
	農 新介	(オーム乳業(株) 開発部部長(研究職))
	杉田 浩一	((社) 宮崎県JA食品開発研究所所長(研究職))

## 【研究経費】

平成11年度	6,800	千円
平成12年度	4,800	千円
平成13年度	2,000	千円
総計	13,600	千円

## 【研究発表】

### (1) 学会誌等

1. 坂田亮一, 乗松 毅, 森田英利, 伊藤典之, 長田貞之, 岡山高秀, 六車三治男: 加熱食肉製品の発色に及ぼす乳清タンパク質酵素分解物の促進効果とその機構, *日本養豚学会誌*, 38(3), 115-124, 2001
2. Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, Y., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S.K. and Soeda, T. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science*, 2002. (in press)
3. Erwanto, Y., Muguruma, M., Kawahara, S., Tsutsumi, T., Katayama, K., Yamauchi, K., Morishita, T., Kai, Y. and Watanabe, S. Effect of heating on polymerization of pig skin collagen using microbial transglutaminase. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2002. (in press)

### (2) 口頭発表

1. 六車三治男、伊藤真理、伊藤肇躬、須佐康之、添田孝彦: 豚および鶏筋原線維の加熱ゲル物性に及ぼす微生物起源トランスグルタミナーゼの効果 第92回日本畜産学会大会 (明治大学、1997, 3. 28)
2. 川谷さよ子、六車三治男、藤野博史、伊藤肇躬、島田信也、農 新介: 低タンパク質濃度のホエータンパク質製品の酵素分解処理条件の検討

第93回日本畜産学会大会（帯広畜産大学、1997, 8. 28）

3. 藤野博史、六車三治男、川谷さよ子、伊藤肇躬、島田信也、農 新介：  
低タンパク質濃度のホエータンパク質製品酵素分解物の性状  
第93回日本畜産学会大会（帯広畜産大学、1997, 8. 28）
4. 鶴岡克彦、六車三治男、伊藤肇躬、山之上稔、丹野裕之、添田孝彦：  
鶏胸筋および砂囊筋より調製したソーセージのゲル物性に及ぼす微生物起  
源トランスグルタミナーゼの効果  
第94回日本畜産学会大会（神戸大学、1998, 3. 31）
5. Muguruma, M., Tsuruoka, K., Fujino, H., Yamanoue, M., Tanno, H. and Soeda, T.  
Improvement in gel strength of chicken sausages by addition of microbial  
Transglutaminase. *6<sup>th</sup> Asian Pacific poultry Congress*,  
(Nagoya, Japan, 1998. 6. 4-7)
6. 藤野博史、六車三治男、川谷さよ子、伊藤典之、島田信也、福井敬一、杉  
田浩一：酵素処理によるホエータンパク質の性質の改善と肉製品への利用  
日本農芸化学会 1999 年度大会（福岡、1999, 3. 31）
7. 鶴岡克彦、六車三治男、河原 聡、山内 清：大豆ホエータンパク質と乳  
タンパク質との架橋形成により調製されたバイオポリマーの機能性  
日本農芸化学会 1999 年度大会（福岡、1999, 3. 31）
8. Fujino, H., Muguruma, M., Shimada, S. and Nou, S. : Improvement of properties of  
concentrated milk protein by trypsin digestion and its utilization in meat products.  
*45<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, (Yokohama, Japan,  
1999. 8. 1-6)
9. Muguruma, M., Tsuruoka, K., Fujino, H., Kawahara, S., Yamauchi, K., Matsumura,  
S. and Soeda, T. : Gel strength enhancement of sausages by treating with microbial  
transglutaminase. *45<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*,  
(Yokohama, Japan, 1999. 8. 1-6)

- 1 0. Saito, K., Kawahara, S. and Muguruma, M. : Effect of humidity stabilizing sheet on cold storage of beef. *45<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, (Yokohama, Japan, 1999. 8. 1-6)
- 1 1. 鶴岡克彦、六車三治男、河原 聡、山内 清：大豆および乳タンパク質から調製したバイオポリマーの添加による食肉製品の機能改善  
第46回日本食品工学会大会（九州産業大学、1999, 9. 8）
- 1 2. 六車三治男、鶴岡克彦、阿部ふさ枝、岩垂 亮、河原 聡、山内 清：大豆および乳タンパク質から調製したバイオポリマーの機能性と食肉製品への利用  
第97回日本畜産学会大会（京都大学、2000, 3. 28）
- 1 3. 長谷川和美、六車三治男、藤野博史、鶴岡克彦、伊藤典之、福井敬一、池田吉啓、杉田浩一、河原 聡、山内 清：酵素処理ホエータンパク質の性質と肉製品への利用  
第97回日本畜産学会大会（京都大学、2000, 3. 28）
- 1 4. Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Kawahara, S., Yamauchi, K., and Soeda, T. : Improvement in the functional properties of sausages by addition of biopolymers prepared from soybean protein and milk protein using microbial transglutaminase. *46<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, (Buenos Aires, Argentina, 2000. 8.27-9.1)
- 1 5. 六車三治男、西 敏郎、河原 聡、山内 清、藤野博史、坂田亮一、岡山高秀：加熱食肉製品の発色に及ぼす乳清タンパク質酵素分解物の影響  
第98回日本畜産学会大会（東北学院大学、2001, 3. 28）
- 1 6. Sakata, R., Morita, H., Norimatsu, T., Oshida, T., Horiguchi, K., Itoh N., Nagata, S., Okayama, T. and Muguruma, M. : Accelerating effect of whey protein hydrolysate on color formation in meat products. *47<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, (Krakow, Poland, 2001. 8.26-31)

17. 西 俊郎、黒木千紗子、河原 聡、藤野博史、坂田亮一、岡山高秀、山内 清、六車三治男：加熱食肉製品の発色に及ぼすホエータンパク質酵素分解物の作用  
第100回日本畜産学会大会（日本獣医畜産大学、2002, 3. 28）
18. ユニ エルワント、堤 孝彦、甲斐靖子、渡辺昌平、森下敏朗、河原 聡、山内 清、六車三治男：トランスグルタミナーゼによるコラーゲンの融点および物性の改変  
第100回日本畜産学会大会（日本獣医畜産大学、2002, 3. 28）
19. 堤 孝彦、ユニ エルワント、甲斐靖子、渡辺昌平、森下敏朗、河原 聡、山内 清、六車三治男：トランスグルタミナーゼを用いたゼラチンバイオポリマーの調製とその物性の  
第100回日本畜産学会大会（日本獣医畜産大学、2002, 3. 28）

### (3) 出版物

1. 六車三治男 他， 編者；五十嵐脩ら：丸善食品総合辞典， 分担部分；  
食肉・畜肉加工品分野に関する用語の一部，  
丸善株式会社， pp. 1-1, 306, 1998（分担執筆）
2. 中村豊郎， 若松純一， 新村 裕， 六車三治男：ハム・ソーセージ図鑑， 財  
団法人伊藤記念財団， pp. 1-201, 2001（分担執筆）
3. 六車三治男 他， 編者；細野昭義ら：畜産食品の辞典， 朝倉書店，  
（印刷中）



## 【研究成果】

### 研究の背景：

近年、幼児を中心に牛乳アレルギーが増加しており、乳を食品素材として利用していく際に障害となっている。日本人の栄養摂取の中で唯一不足している成分がカルシウムであり、牛乳はそのカルシウムを豊富に含んでいる。しかし、牛乳アレルギーを持つ人は、牛乳、乳製品もしくは乳を使用した食品を食することはできない。そこで、乳を酵素処理することにより低アレルゲン化し、牛乳アレルギーの人でも摂取できるような機能性改変乳食品素材の研究・開発が求められている。

一方、日本は今後高齢化社会を迎え、食品においても消化、吸収性が高く、高齢者の咀嚼機能を考慮したより健康的な食品が求められてきている。肉製品においても亜硝酸塩等の添加物使用量が少なく、高齢者のテクスチャー機能を考慮した製品の研究・開発が求められている。

### 研究の目的：

我々は、乳タンパク質を酵素分解することにより牛乳アレルギーの人でも摂取できるような低アレルゲン化乳を開発している。この低アレルゲン化乳を肉製品に応用してみたところ、低濃度の亜硝酸塩存在下においても良好な発色が生じる現象を認めた。亜硝酸塩は肉製品の発色剤として広く使用されているが、発ガン物質であるニトロソアミンを生成することから、使用を控えることが望ましいとされている。現在、発色剤を使用しない肉製品が製造されているが、その色は食欲をそそらないものである。乳タンパク質を分解した低アレルゲン化乳に発色促進効果が認められたことから、牛乳アレルギーの人でも摂取でき、なおかつ硝酸、亜硝酸塩等の添加物の少ない、より健康的な肉製品を開発する可能性が見いだされた。

そこで、本研究では低アレルゲン化乳(乳由来ペプチド)を配合することにより、硝酸、亜硝酸塩添加量が少なくアレルギーにも対応した発色助剤・退色防止剤の発色促進機構の機能解析解明と製品化を目的とする。

一方、日本は今後高齢化社会を迎え、食品においても消化、吸収性が高く、高齢者の咀嚼機能を考慮したより健康的な食品が求められてきている。低アレルゲン化乳を応用した肉製品において、前述の発色促進効果以外に組織の柔軟化等の食感改

変効果も認められている。したがって、本研究では咀嚼機能が低下した、例えば高齢者向けのテクスチャー機能を考慮した肉製品用添加食材としての乳由来ペプチドのレオロジー特性調節機構の解明とそれらの製品化も目的とする。さらに、乳由来ペプチド中の新規機能性についても検討する。

本研究の学術的な特色：

乳タンパク質の酵素処理による低アレルゲン化については幾つかの論文もしくは特許が出ているが、いずれも抗原性の低下についての言及はあるが、低アレルゲン化した物の利用用途について言及した知見は少ない。肉製品に対してはタンパク質そのものによる食感改善を主眼においた研究が多く、機能性を改善した乳タンパク質の応用、さらに発色についての知見はない。現在得られている知見は過去の文献等にも記載が無く新規性の高いものであり、独創性があり、先駆的な研究と考えられる。

実用化後の社会的貢献度：

- 1) 牛乳アレルギーの人もカルシウム豊富な乳素材利用食品を摂取できるようになる。
- 2) 高齢化社会に適合した咀嚼特性を持った肉製品の製造が可能になる。
- 3) 硝酸、亜硝酸塩の少ない健康的な肉製品の製造が可能になり、魚肉製品などへの応用が可能になる。
- 4) 輸入自由化後の日本の酪農、乳業会社の生き残り方策を考える上での一つの考え方の提案になる。
- 5) 新たな生体調節機能の探索により食べるクスリを提供できる可能性がある。

得られた結果：

本研究は、乳タンパク質を酵素分解することにより調製した低アレルゲン化乳を配合して、硝酸、亜硝酸等の添加量が少なくアレルギーにも対応した発色助剤・退色防止剤の開発と、その発色促進機構の解明および製品化を目的としている。さらに、機能改善乳ペプチドの食肉製品への添加により、おとしよりにやさしいレオロジー特性調節機能を有する高齢者用の食品に添加する素材の開発をも目的としている。

そこで、3年間の研究で確立した酵素分解乳ペプチドの調製方法を用いて調製を行

い、この酵素分解乳ペプチドを添加した食肉製品を製造した結果、酵素分解乳ペプチドには食肉製品のレオロジー特性調節作用が認められ、トランスグルタミナーゼの作用も組み合わせることにより、食肉製品の品質に極めて重要な性質である保水性や結着性を付与し、リン酸塩の添加を減少させても、良好な結着性が得られ、しかも高齢者の咀嚼機能に適合するような製品を調製できることが明らかになった。また、発色試験を行った結果、亜硝酸塩を減少させても効果的な発色促進作用が認められ、天然由来の発色助剤として利用できる可能性が示唆された。次に、発色促進機構の解明を目的とした実験の結果、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸を多く含有する特定のペプチドが発色促進に関与していることが明らかになった。さらに、このペプチドによる発色促進作用としては、従来考えられていた発色促進機構に強く関与している還元作用だけではなく、ミオグロビンを加熱変性させる能力が重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに、このペプチドには免疫賦活効果も付与されることも明らかになった。

以上の結果から、酵素分解乳ペプチドを食肉製品に添加することにより食肉製品の食感が改善されると同時に、亜硝酸塩を低減しても発色効果を持つ食肉製品の製造の可能性が示唆された。その、食肉製品の発色促進機構は還元作用とミオグロビンを加熱変性させる能力との相互作用によることも明らかになった。

今後は製品化・商品化を行うにあたり、亜硝酸塩および乳由来ペプチドの様々な添加比から発色促進条件の最適化を検討する必要がある。また、ゲル化能が高い素材を配合することにより歯ごたえのある食感をもたらし、かつ発色促進、退色防止効果を有する製品を、また幼児や咀嚼機能が低下した高齢者向けにはタンパク質分解物の比率を高め、発色促進、退色防止効果を持ち、かつ柔らかい食感をもたらし製品も開発することが望まれる。

以下に得られたこれらの成果を12報にわけて報告する。

## 本報告書に掲載した論文

1. 六車三治男：乳蛋白質の機能性改善と肉製品への応用に関する研究  
本報告書のための原稿
2. Fujino, H., Muguruma, M., Shimada, S. and Nou, S. Improvement of properties of concentrated milk protein by trypsin digestion and its utilization in meat products. *Proceedings of 45<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology* 134-135. 1999.
3. 六車三治男、山内 清、河原 聡、大橋登美男、農 新介、杉田浩一：  
乳ホエータンパク質のゲル形成能と食肉製品のテクスチャー改善効果  
本報告書のための原稿 (発表予定)
4. 六車三治男、山内 清、河原 聡、大橋登美男、農 新介、杉田浩一：  
乳ホエータンパク質の酵素処理によるゲル形成能と肉製品の発色促進効果の発現  
本報告書のための原稿 (発表予定)
5. Muguruma, M., Tsuruoka, K., Fujino, H., Kawahara, S., Yamauchi, K., Matsumura, S. and Soeda T. Gel strength enhancement of sausages by treating with microbial transglutaminase. *Proceedings of 45<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology* 138-139. 1999.
6. 六車三治男、山内 清、河原 聡、大橋登美男、農 新介、杉田浩一：  
酵素処理および乳酸発酵による機能改善乳ホエータンパク質製品の開発  
本報告書のための原稿 (発表予定)
7. Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Kawahara, S., Yamauchi, K. and Soeda, T. Improvement in the functional properties of sausages by addition of biopolymers prepared from soybean protein and milk protein using microbial transglutaminase. *Proceedings of 46<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology* 266-267. 2000.

8. Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S.K. and Soeda, T. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science*, 2002. (in press).
9. 坂田亮一、森田英利、乗松 毅、伊藤典之、長田貞之、岡山高秀、六車三治男：. 加熱食肉製品の発色に及ぼす乳清タンパク質酵素分解物の促進効果とその機構. *日豚会誌*, 38. 115-124. 2001
10. Sakata, R., Morita, H., Norimatsu, T., Oshida, T., Horiguchi, K., Itoh, N., Nagata, S., Okayama, T. and Muguruma, M. Accelerating effect of whey Protein hydrolysate on color formation in meat products. *Proceedings of 47<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology* 20-21. 2001.
11. 六車三治男、西 俊郎 加熱食肉製品の発色促進効果に及ぼすホエータンパク質酵素分解物の影響  
本報告書のための原稿 (発表予定)
12. Muguruma, M., Nishi, T., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fujino, H., Sakata, R. and Okayama, T. Accelerating effect of milk whey peptides on color Formation in meat products. *Proceedings of 48<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, 2002. (in press).

# 乳蛋白質の機能性改善と肉製品への応用に関する研究

六車 三治男 (宮崎大学農学部)

## 目的

乳蛋白質は人間の成長、健康、美容などに欠かせない必須アミノ酸のすべてを含んでいる最も優秀な蛋白質の一つと言われている。さらにカルシウム含量が高いだけでなくその吸収利用性も高い<sup>1)</sup>。一方、食肉も必須アミノ酸をバランスよく含んだ非常に栄養価の高い食品である<sup>2)</sup>。本研究の目的は乳蛋白質をさらに機能改善し肉製品に取り込ませ、我が国で栄養所要量にまだ到達しない栄養素であるカルシウムも豊富に含む肉製品を開発することにある。

そこで本研究では乳蛋白質として濃縮脱脂乳、酵素分解乳およびその乳酸発酵乳を使用し肉および筋肉構造蛋白質であるミオシンBとの相互作用につき検討したので、得られた知見を報告する。

## 実験方法

### 1. 実験材料および試料の調製

脱脂乳を限外ろ過膜(分画分子量5万)により濃縮し濃縮脱脂乳(C)を得た。酵素分解乳(E)は濃縮脱脂乳にトリプシン(和光純薬製)1%溶液を4ml/lの割合で添加し37℃で3時間反応し、80℃で30分間処理して酵素活性を失活させた。酵素分解・発酵乳(EL)は酵素分解乳を*L. bulugalicus* および*S. thermophilus* をそれぞれ1.5%添加し、37℃で6時間反応させた。

一方、ソーセージ製造用の原料肉は牛の大腿二頭筋を用いた。ミオシンBは兎骨格筋からSZET-GYORGYIの方法により調製した。

### 2. 電気泳動

蛋白質成分の分子種は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法(SDS-PAGE)<sup>3)</sup>により同定した。アクリルアミド濃度7.5~17.5%のグラジエントゲルでスラブ型の泳動装置を用いて行った。ゲルのバンドの染色はC. B. B. (Commassie Brillmat Blue) あるいはNile Red(9-diethylamono-5H-benzo[a] phenoxazine-5-one)<sup>4)</sup>により行った。

### 3. 疎水性分析

疎水性を測定するために蛍光発色剤としてANS(8-anilido-1-naphthalene-sulfonic acid)を用いて富田<sup>5)</sup>およびHayakawa<sup>6)</sup>の方法により行った。1.0x10<sup>-4</sup>M ANS 1mlを66mM phosphate buffer(pH7.0)10mlに溶解した試料10mgに添加した。蛍光強度の測定は島津蛍光分光光度計FR-5000を用いて励起波長365nm、蛍光波長470nmとして測定した。

### 4. 濁度の測定

試料の加熱に伴う濁度変化は直線的温度上昇法<sup>7)</sup>により測定した。すなわち、日立557型2波長自記分光光度計に温度制御電源部と温度プログラマーを接続し、それぞれの溶液の入ったセル中の温度を1分間に2℃ずつ継続的に上昇させるようにセットした。そしてそれぞれの試料について30~80℃まで660nmの吸光度を測定した。

### 5. クリープメータによる破断強度の測定

牛肉の大腿二頭筋の挽き肉100gに30gの水と2%食塩および0.3%リン酸塩を添加しホモジナイズ後ケーシングに充填し80℃、30分間加熱して牛肉ソーセージを作製した。なお、牛乳試料添加の場合は牛肉90gに10gの牛乳試料を添加した。ミオシンBの加熱ゲル形成は50mM Na-phosphate(pH6.0), 500mM NaCl, 10mg/ml proteinの条件で80℃、30分間加熱してゲルを形成させた。なお、牛乳試料も等量の10mg/ml添加した。加熱ゲルの破断強度は山電のクリープメータRE-33005型により測定した。

### 6. 遠心分画

ミオシンB、牛乳試料および両者の混合溶液を、50mM Na-phosphate(pH6.0), 500mM NaClの条件下、40、70および100℃で30分間加熱し、直ちに氷水に10分間入れ反応を停止した。この一定温度加熱処理後の試料を5,000rpmで30分間遠心分離して上清と沈殿に分画した。それぞれの分画成分中の蛋白質成分の分子種をSDS-PAGEにより同定した<sup>8)</sup>。

### 7. 加熱ゲル微細構造の観察

ミオシンBおよびそれと牛乳試料混合溶液の加熱ゲルの微細構造は3%グルタルアルデヒドおよび1.3%オスミウム酸により固定し脱水乾燥の後、日本電子の走査電子顕微鏡JSM-5200型により観察した。

## 結果および考察

まず、本研究で使用するために調製した牛乳試料について検討した。限外ろ過膜により濃縮した脱脂乳(C)の他に、牛乳蛋白質中のアレルゲンであるカゼインおよびβ-ラクトグロブリンをトリプシンにより酵素処理し、低アレルゲン化した酵素分解乳(E)を作製した。このように酵素処理により生成したペプチドは分子量が小さくなると苦味が発生するといわれている。そこで、乳酸発酵により苦味を軽減させた酵素分解・乳酸発酵乳(EL)も作製した。

Fig. 1 は各試料の蛋白質成分の分子種をSDS-PAGEにより同定したものである。C. B. B. 染色により検討したところ、試料Cではa-hの成分が観察された。aは血清アルブミン、b, c, dはカゼイン、eは $\beta$ -ラクトグロブリン、gは $\alpha$ -ラクトアルブミンに相当するバンドと考えられる。酵素処理に伴って牛乳アレルギー発症と密接に関連しているカゼインに相当するバンドは消失し、また $\beta$ -ラクトグロブリンもその約80%が消失していた。その結果分子量約1.4万のバンドgや1.2万のバンドhが増加した。酵素処理乳の乳酸発酵によっては、その後の明瞭なバンドの変化は認められなかった。

疎水性を保持しているバンドを染色することができる蛍光試薬であるNile red染色により検討したところ、酵素処理により低分子量化したバンドも高い疎水性を保持していることが明らかになった。

疎水性度は蛋白質表面の特性、すなわち蛋白質成分同志の相互作用に密接に関連していると考えられている<sup>9)</sup>。そこで、蛍光試薬ANSを使用して表面疎水性を測定した。蛋白質溶液に塩酸グアニジンを追加して蛋白質分子内の水素結合を切断したところ、C, E, L共に塩酸グアニジン濃度の増加に伴って蛍光強度が増強し、特に試料cで顕著であった(Fig. 2)。このことは、コントロール試料では構造変化により蛋白質分子内に埋もれていた疎水性基が分子表面に露出した可能性を示唆している。次に $\beta$ -メルカプトエタノール添加により蛋白質分子内のS-S結合を切断したところ、試料cでは $\beta$ -メルカプトエタノール添加により蛍光強度が著しく増加した。このことも、S-S結合の壊裂によって蛋白質分子に高次構造の変化が生じ表面疎水性が増大したことを示唆している。一方、酵素処理した試料、E, ELではほとんど変化はなかった(Fig. 3)。

次に、各試料の熱凝集性を調査するために30℃から80℃まで直線的に温度を上昇させて濁度の変化を測定した(Fig. 4)。試料Cは最初の濁度がかかなり高いが50℃付近から濁度が上昇しはじめて60℃でピークに達し、急激に減少しはじめた。試料EおよびELでは最初の濁度はCの約半分、その後やはり50℃付近から濁度が上昇しはじめて、65~68℃で濁度のピークを形成した。この両者はCと比較して濁度の上昇およびその後の低下は緩やかであった。これらの結果は酵素処理によって低分子量化した試料も濁度形成のピーク温度は上昇するが、加熱による凝集性を保持している事を示している。

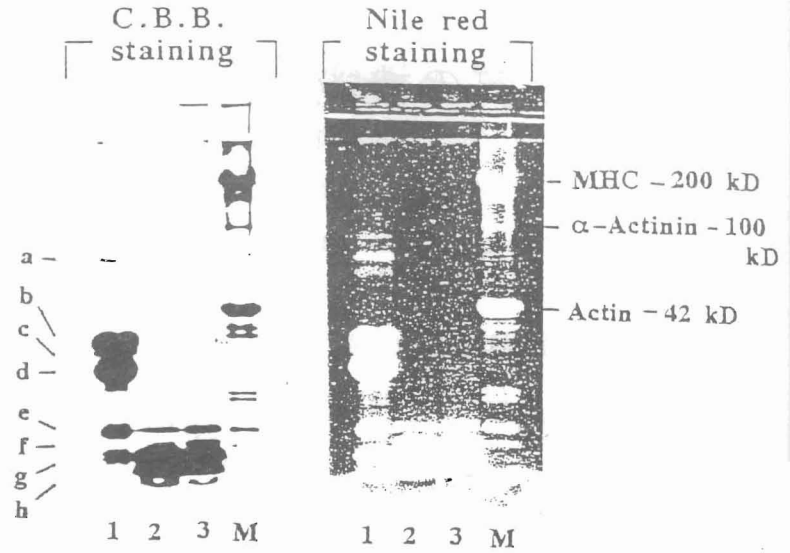


Fig.1 SDS-PAGE of milk protein samples. 1, concentrated milk protein (C); 2, enzyme treated C (E); 3, enzyme treated and fermented C (EL); M, myofibril (marker); MHC, myosin heavy chain; a ~ h, peptide bonds of milk protein

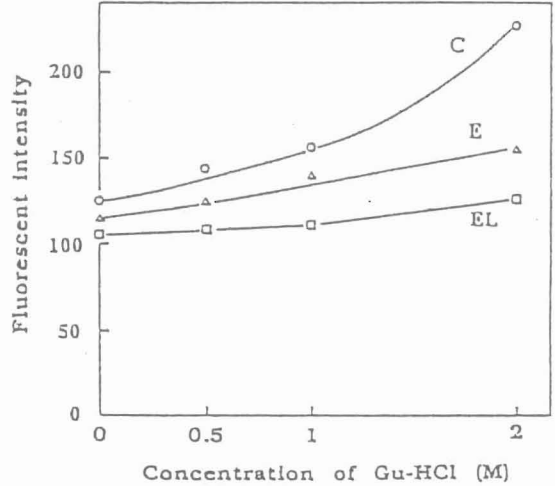


Fig.2 Effect of Gu-HCl on fluorescent intensity of protein solutions (pH7.0).

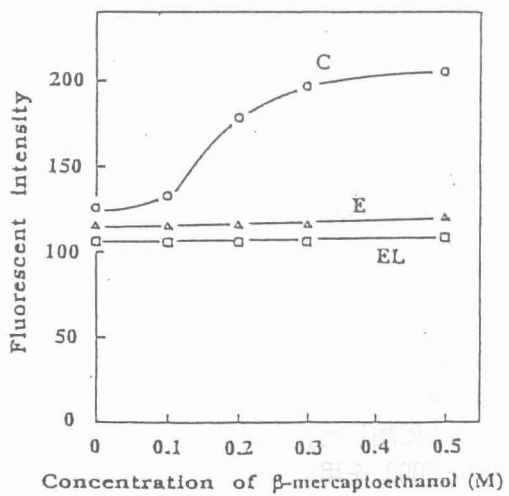


Fig.3 Effect of beta-mercaptoethanol on fluorescent intensity of protein solutions (pH7.0).

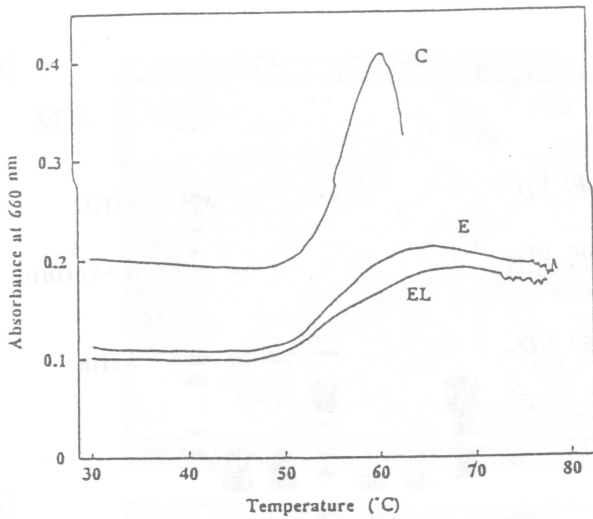


Fig. 4 Turbidity changes of milk protein samples as a function of temperature.

The samples were heated by a linearly increasing rate at 2 °C/ min. Each reaction mixture contained 50 mM imidazole-HCl(pH6.0), 200 mM NaCl and 5 mg/ml of protein.

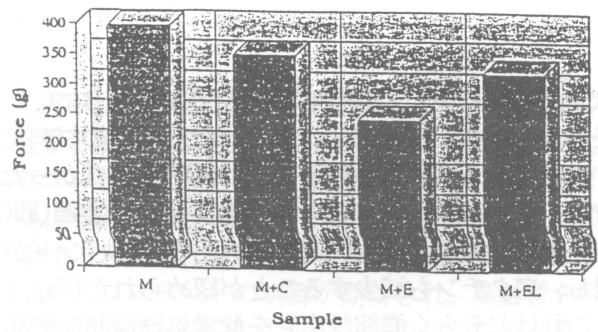


Fig. 5 Effects of milk proteins on breaking force of beef sausage.

M, meat alone; M+ C, meat + C; M + E, meat + E; M + EL, meat + EL.

各試料を一定加熱処理後遠心分離して上清と沈殿に分け、それぞれに含まれる成分をSDS-PAGEにより分析した。まず、単独標品について40°Cで30分間加熱して遠心した場合には、各乳蛋白質およびミオシンBは沈殿しなかった(データ省略)。70°Cで30分間加熱すると(Fig. 7)、試料Cは約40%が沈殿画分に移行した。なおバンドeのβ-ラクトグロブリンは約95%が上清画分に残存した。一方、EおよびELにおいてはバンドgおよびhが上清画分に約35%残存するだけであった。ミオシンBではミオシン、アクチンや高分子量のバンドは沈殿し、上清中にほとんど残存しなくなる。しかし、トロポミオシン以下の低分子量のバンドには上清に残るものも存在した(Fig. 7-Sup.-4)。このようにトロポミオシン系が上清中に遊離するのは500mM NaClの存在するイオン強度下ではトロポミオシンがアクチンフィラメントから遊離すること<sup>10)</sup>に起因するものと思われる。またこの結果はアクチンフィラメントを高塩濃度下で加熱しゲルをつくった後に遠心分離すると、加熱ゲルの蛋白質マトリックスに組み込まれていない分離上清液中に大部分のトロポミオシンが放出されて出現することを明らかにしたSamejimaら<sup>11)</sup>の結果と一致した。

Fig. 5は牛肉ソーセージに各種乳蛋白質をそれぞれ10%添加して製造した製品の破断強度を示した。牛肉だけで製造したコントロールに比べてC, E, ELを添加すると破断強度がそれぞれ、87, 61, 80%に減少した。特に試料Eがソーセージの加熱ゲル強度を低下させることが明らかになった。

筋肉蛋白質を液状化したミオシンBに添加した場合でも酵素処理乳Eの添加は著しく形成ゲル強度を減少させた(Fig6)。今回は筋肉蛋白質と等量の乳蛋白質を添加したが、添加量を変化させることによって、液状化筋肉蛋白質の加熱ゲルのレオロジー特性を調節できると考えられる。

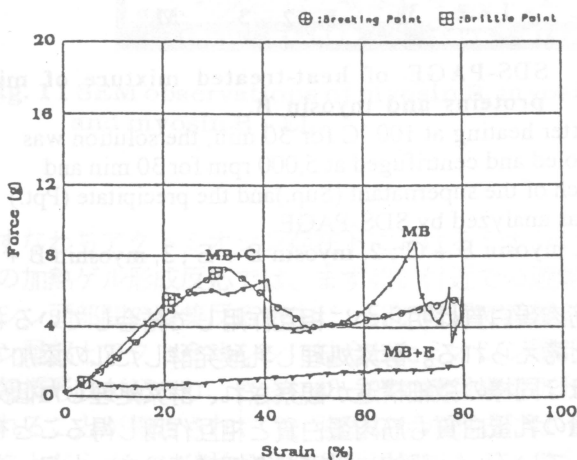


Fig. 6 Effects of milk proteins on breaking force of myosin B gel.

MB, myosin B; MB + C, myosin B + C; MB + E, myosin B + E.

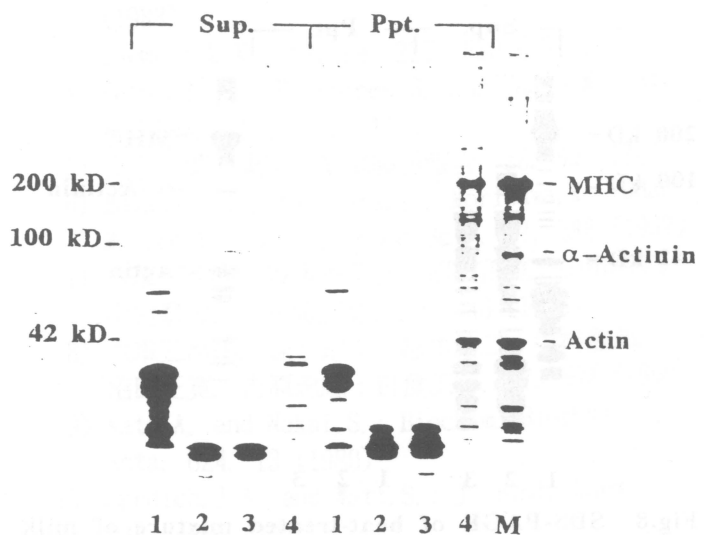


Fig. 7 SDS-PAGE of heat-treated milk proteins and myosin B.

After heating at 70 °C for 30 min, the solution was cooled and centrifuged at 5,000 rpm for 30 min and each of the supernatant (Sup.) and the precipitate (Ppt.) was analyzed by SDS-PAGE.

1, C; 2, E; 3, EL; 4, myosin B.



次に混合物について観察すると、ミオシンBにC, E, ELを添加して40℃で加熱した場合にはいずれの試料においても遠心により沈殿する成分は認められなかった。しかし、E およびELを添加した時はミオシン重鎖(MHC)が完全に分解され130kD以下の沢山の分解バンドが出現し、アクチンも減少することが認められた(Fig. 8)。これはおそらく濃縮脱脂乳を酵素処理後80℃で30分間加熱して酵素を失活させたが、E およびEL中にはまだ活性を有する酵素トリプシンがわずかに残存していたものと考えられる。

70℃で加熱した時にはさらにミオシンB中の高分子量の筋肉蛋白質の分解が進行し、それらのほとんどが遠心によって沈殿画分に移行した(Fig. 9)。

100℃加熱では(Fig. 10)、C試料を添加した時は約40%の筋肉蛋白質が、ミオシン重鎖も含めて牛乳蛋白質と共に上清画分に残存した。E およびEL添加では、やはりミオシン重鎖はほとんど分解されるが、130kD-100kDの高分子量のバンドの形成割合が70℃加熱の場合に比較して多かった。また遠心後はアクチンより低分子量の筋肉蛋白質のバンドは上清画分に残存する割合が多いことも認められた。これらのことは筋肉蛋白質が乳蛋白質と相互作用して本実験条件の遠心力では沈殿しない分散分子として存在する可能性を示唆している。また70℃加熱よりも100℃加熱の場合に筋肉蛋白質の分解の程度が少ないのは、残存トリプシンの活性が高温度の加熱の結果失活したためと想定される。

Fig. 11は70℃で30分間加熱したミオシンBおよびミオシンBとC およびEL添加ゲルの走査電子顕微鏡写真を示したものである。ミオシンB単独では比較的ルーズなゲルが形成されているが、Cの試料を添加した場合には濃縮脱脂乳蛋白質が筋肉構造蛋白質と結合してネットワークの緻密な凝集体が形成され、牛乳蛋白質

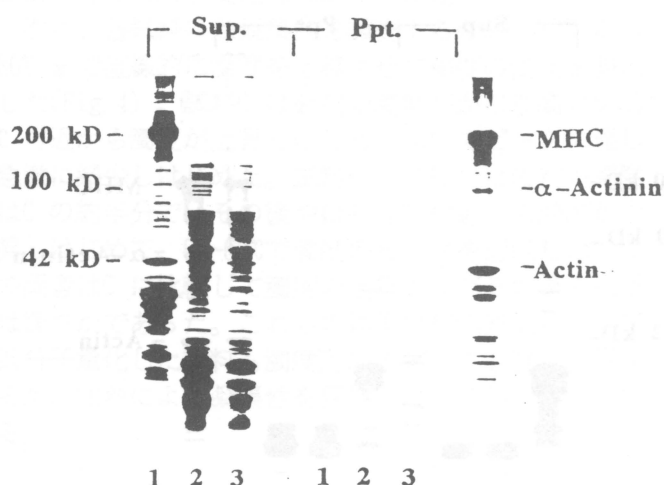


Fig. 8 SDS-PAGE of heat-treated mixture of milk proteins and myosin B.

After heating at 40 °C for 30 min, the solution was cooled and centrifuged at 5,000 rpm for 30 min and each of the supernatant (Sup.) and the precipitate (Ppt.) was analyzed by SDS-PAGE.

1, myosin B + C ; 2, myosin B + E ; 3, myosin B + EL.

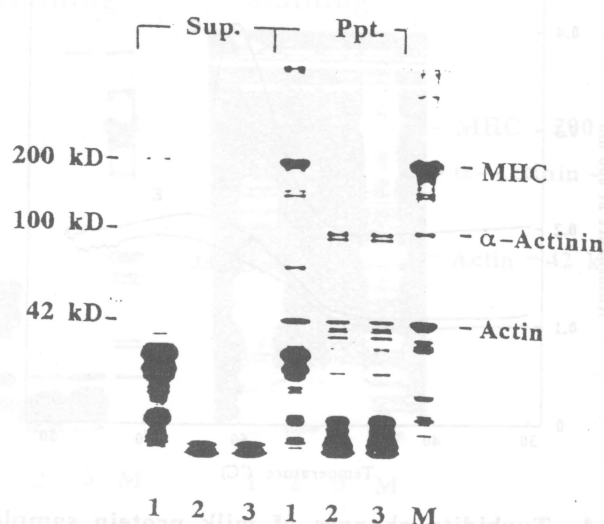


Fig. 9 SDS-PAGE of heat-treated mixture of milk proteins and myosin B.

After heating at 70 °C for 30 min, the solution was cooled and centrifuged at 5,000 rpm for 30 min and each of the supernatant (Sup.) and the precipitate (Ppt.) was analyzed by SDS-PAGE.

1, myosin B + C ; 2, myosin B + E ; 3, myosin B + EL.

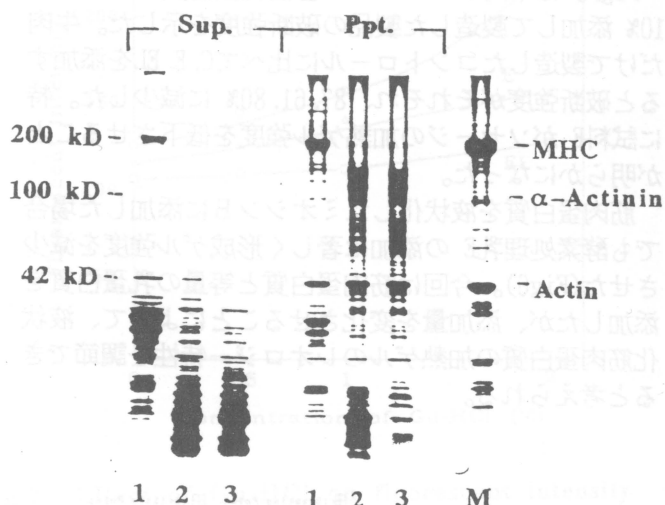


Fig. 10 SDS-PAGE of heat-treated mixture of milk proteins and myosin B.

After heating at 100 °C for 30 min, the solution was cooled and centrifuged at 5,000 rpm for 30 min and each of the supernatant (Sup.) and the precipitate (Ppt.) was analyzed by SDS-PAGE.

1, myosin B + C ; 2, myosin B + E ; 3, myosin B + EL.

と筋肉蛋白質は明らかに相互作用して結合しているものと考えられる。酵素処理し乳酸発酵したELの添加でもほぼ同様の微細構造が観察され、酵素処理した低分子量の乳蛋白質も筋肉蛋白質と相互作用し得ることを示している。一般的に緻密な微細構造のネットワークを示すゲルの方が破断強度が高いと考えられるが、本実験の結果では緻密な構造であるにもかかわらず酵素処理試料を添加した場合は破断強度の低いゲルが形成された。この原因は酵素処理乳蛋白質の添加に伴って、強固な加熱ゲル形成に必要なとされる筋肉蛋白質中のミオシン分子が大きく構造変化したためと考えられる。

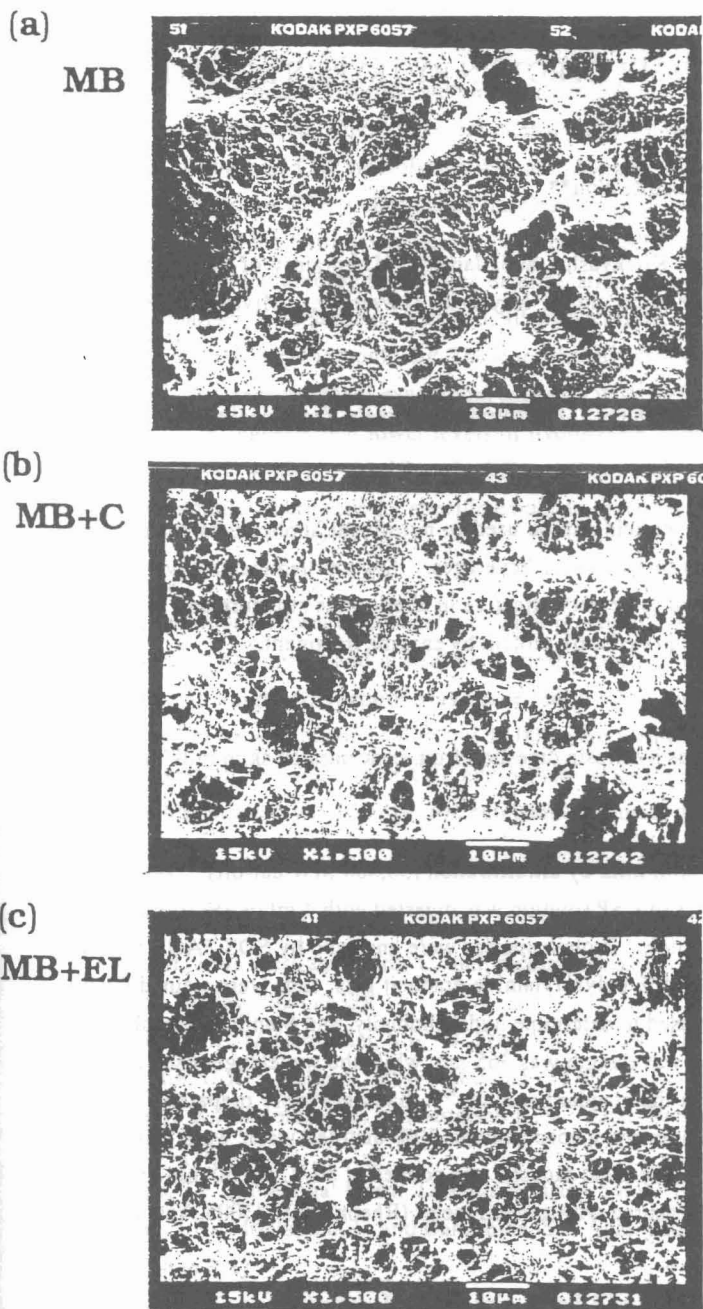


Fig. 11 SEM observations of myosin B, myosin B + C and myosin B + EL.

すなわちアクトミオシン存在下におけるミオシン分子の加熱ゲル形成反応では、まず43℃付近での遊離ミオシン頭部間の凝集反応が生じ、55℃付近で遊離ミオシン尾部とアクトミオシンに結合したミオシン尾部間の架橋形成が起こり、さらに60~70℃で網目構造が形成されることが報告され<sup>12)</sup>、強固なゲル形成にはインтактなミオシン分子の存在が不可欠であると考えられる。しかし、本実験では、ミオシン分子の分解によってミオシンを介した相互作用が発生されずに、強固なゲルが形成されなかったものと想定される。

近年、肉製品に酵素を添加してレオロジー特性を変化する試みがなされているが、酵素の作用を製造工程でコントロールすることが極めて難しいといわれている。本研究の結果は、牛乳蛋白質を酵素処理し機能改善すると共に、試料中に残存する酵素によって、肉製品のテクスチャーの制御が期待され、高齢者や病人の咀嚼機能にも適合した、さらにカルシウムも豊富に含む製品の製造が期待される。

#### 要約

乳蛋白質を機能改善し肉製品に取り込ませ、我が国で栄養所要量にまだ到達しない栄養素であるカルシウムも豊富に含む肉製品を開発する目的で本実験を遂行した結果、次のことが明らかになった。

(1) 牛乳アレルギーを分解した酵素処理乳および酵素処理・発酵乳は低分子量化され、筋肉蛋白質と相互作用をする性質を保持していた。

(2) それらを肉に混合してソーセージを製造した結果、健康な成人のみならず、高齢者、幼児や病人の咀嚼機能にも適合した様々なテクスチャーを有し、さらにカルシウムも豊富に含む肉製品製造の可能性が明らかになった。

#### 文献

- 1) 山内邦男:「牛乳成分の特性と健康」山内邦男, 今村経明, 守田哲朗編著, 光生館(1993)
- 2) 「食肉と健康」食肉と健康問題懇談会編, 光琳(1988)
- 3) Laemmli, U. K.: Nature, 227, 680 (1970)
- 4) Daban, J. -R., Bartolome, S. and Samsó, M.: Anal. Biochem., 199, 169 (1991)
- 5) 富田 繁:東京工業試験所報告, 58, 99 (1963)
- 6) Hayakawa, I., Kajihara, J., Morikawa, K., Oda, M. and Fujio, Y.: J. Food Sci., 57, 288 (1992)
- 7) 六車三治男, 坂本季美枝, 沼田正寛, 山田浩之, 中村豊郎:日食工誌, 37, 446 (1990)
- 8) 六車三治男, 速水紀文, 杉本浩二, 中村豊郎, 沼田正寛, 吉原忠志:日食工誌, 37, 594 (1990)
- 9) Kato, A. and Nakai, S.: Biochim. Biophys. Acta, 624, 13 (1980)
- 10) Spudich, J. A. and Watt, S.: J. Biol. Chem., 246, 4866 (1971)
- 11) Samejima, K., Ishioroshi, M. and Yasui, T.: Agric. Biol. Chem., 46, 535 (1982)
- 12) 安井 勉, 鮫島邦彦:New Food Industry, 27, 117 (1985)

# 乳ホエータンパク質のゲル形成能と 食肉製品のテクスチャー改善効果

六車 三治男、山内 清、河原 聡（宮崎大学農学部）

大橋 登美男（九州栄養福祉大学）

農 新介 （オーム乳業（株）開発部）

杉田 浩一 （（社）宮崎県JA食品開発研究所）

# 要 旨

## 1. 目 的

近い将来(2001年), 乳製品の輸入が完全に自由化され, 一定量のホエータンパク質製品の輸入が避けられない情勢となっており, さらに利用拡大につながる具体的な利用法を開発する必要性に迫られている。我々は, 現在までにホエータンパク質濃縮物(WPC,76.5%)およびホエータンパク質分離物(WPI,92.75%)の有効利用を目的にそれらの製品の幾つかの機能特性について検討し, pH調整, 塩類の添加, 加熱処理等によって機能特性改質の可能性について重要な知見をすでに得ている。

本研究の目的は, ホエータンパク質製品のうち輸入拡大が求められ, すでに輸入が始められたタンパク質含量が34%のホエータンパク質濃縮物(WPC,34%)に焦点をあてて, この製品を有効利用するための基礎的知見を得ることにある。そこで今回はまず主にWPC-34標品の基本的な特性の把握を行うとともに, 酵素処理により機能性の改質を得る手掛かりについても検討したので得られた知見を報告する。

## 2. 実験方法

本研究ではWPC-34標品の基礎的な性質の検討およびWPC-34と筋肉構造タンパク質のミオシンBを用いた相互作用の検討を行った。まず, 加熱凝集性を直線的温度上昇法による濁度変化より測定し, 加熱ゲル物性を回転粘度計やクリープメータを用いて検討した。さらにソーセージの破断強度を測定することによりゲル物性の検討を行った。また, WPC-34およびミオシンBの相互作用を共沈法により検討し, 遠心により得られた上清および沈殿画分のタンパク質成分の分子種はSDS-PAGEにより同定した。WPC-34含有ソーセージの試作品の作製や乳タンパク質の酵素処理についても検討した。

## 3. 結果および考察

本研究の結果から, WPC-34単独標品は優れたゲル形成能を保持していた。肉製品へのWPC-34の添加実験では, 良好なテクスチャー特性を有し, 官能特性の好ましい食肉製品が製造された。このようにWPC-34を添加すると, 乳と肉の両者の栄養的特性を持ち合わせた優れた食肉製品の製造が可能となった。また近年, 極力脂肪の摂取をひかえる傾向があり, ゲル化能力を有するWPC-34を増量剤として肉製品に添加することにより, 脂肪低減化食肉製品の製造の可能性も示唆された。

乳タンパク質の機能性改善を目的に濃縮脱脂乳を3種類の酵素により処理したところ, 分解様式がかなり異なるもののWPC-34の主要成分である $\beta$ -ラクトグロブリンや $\alpha$ -ラクトアルブミンも酵素によってはかなり分解の進行が認められ, WPC-34の酵素処理による機能性改質の可能性が示唆された。

## 1. 目的

ホエータンパク質は必須アミノ酸バランスに優れ、保水性、乳化性およびゲル化性等の機能特性に優れているために、限外ろ過等によりタンパク質含量を高めたホエータンパク質濃縮物(WPC)の食品への有効利用の試みがなされている<sup>1, 2)</sup>。近い将来(2,001年)、乳製品の輸入が完全に自由化され、一定量のホエータンパク質製品の輸入が避けられない情勢となっており、さらに利用拡大につながる具体的な利用法を開発する必要性に迫られている。我々は、現在までにホエータンパク質濃縮物(WPC,76.5%)およびホエータンパク質分離物(WPI,92.75%)の有効利用を目的にそれらの製品の幾つかの機能特性について検討し、pH調整、塩類の添加、加熱処理等によって機能特性改質の可能性について重要な知見をすでに得ている<sup>3~7)</sup>。

本研究の目的は、ホエータンパク質製品のうち輸入拡大が求められすでに輸入が始められた、タンパク質含量が34%のホエータンパク質濃縮物(WPC,34%)に焦点をあてて、この製品を有効利用するための基礎的知見を得ることにある。そこで今回はまず主にWPC-34標品の基本的な特性の把握を行うとともに、酵素処理により機能性の改質を得る手掛かりについても検討したので得られた知見を報告する。

## 2. 実験方法

### 1. 実験材料および試料の調製

WPC-34はタカナシ乳業株式会社および畜産振興事業団より提供していただいた。ソーセージ製造用の原料肉は豚肉および牛肉モモ肉を用いた。ミオシンBは兔骨格筋からSZENT-GYORGYI<sup>8)</sup>の方法により調製した。

### 2. 濁度の測定

試料の加熱に伴う濁度変化は直線的温度上昇法<sup>9)</sup>により測定した。すなわち、日立557型2波長自記分光光度計に温度制御電源部と温度プログラマーを接続し、それぞれの溶液の入ったセル中の温度を1分間に2℃ずつ継続的に上昇させるようにセットした。そしてそれぞれの試料について30～95℃まで660nmの吸光度を測定した。

### 3. ゲル形成能の測定

WPC-34試料をタンパク質濃度60,80および100mg/ml[5 mM NaN<sub>3</sub>, 50 mM イミダゾール塩酸緩衝液(pH 6.0)]に調整し、加圧防止の目的で蓋に穴をあけたネジ蓋付きサンプル瓶(40×16mm)に3ml分注した。恒温水槽で80℃、30分間加熱し、氷冷した後、RE-33005型クリープメータ(山電製)により破断強度を測定し、ゲル形成能とした。

### 4. 食肉製品(ソーセージ)の破断強度の測定

豚肉あるいは牛肉の挽き肉100gに30gの水と2%食塩および0.3%リン酸塩を添加し、スピードカッターでホモジナイズ後、塩化ビニリデン製ケーシングに充填し、80℃で30分間水煮し、RE-33005型クリープメータ(山電製)により破断強度を測定した。

### 5. 粘度測定

WPC-34およびミオシンBの各試料をタンパク質濃度1%[5 mM NaN<sub>3</sub>, 50 mM イミダゾール塩酸緩衝液(pH 6.0), 500 mM 食塩]にそれぞれ調整し、WPC-34およびミオシンBの単独系と混合系(1:1)

について、既報<sup>3)</sup>に準じて、E型回転粘度計(東京計器製)を用いて粘度を測定した。また、試料のずり応力とずり速度の履歴現象についてLin and Ito<sup>10)</sup>が実施した方法に準じて測定した。

## 6. 電気泳動

タンパク質成分の分子種は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法(SDS-PAGE)<sup>11)</sup>により同定した。アクリルアミド濃度7.5~17.5%のグラジエントゲルでスラブ型の泳動槽を用いて行った。ゲルのバンドの染色はC. B. B. (Coomassie Brilliant Blue R-250)により行った。

表1 WPC-34の化学組成

項目	含量
タンパク質 (%)	33.90
脂肪 (%)	3.90
灰分 (%)	6.70
水分 (%)	4.70
乳糖 (%)	50.80
カルシウム (mg/100 g)	700
マグネシウム (mg/100 g)	100
ナトリウム (mg/100 g)	630
カリウム (mg/100 g)	1,900
リン (mg/100 g)	540
塩素イオン (mg/100 g)	12

## 7. 遠心分画

WPC-34, ミオシンBおよび両者の混合溶液を、50mM イミダゾール塩酸緩衝液(pH 6.0), 500mM 食塩存在下で50℃, 70℃あるいは90℃で30分間加熱後5,000 rpm, 30分間の遠心により得られた上清および沈殿画分のタンパク質成分の分子種をSDS-PAGEにより同定した。

## 3. 結果および考察

### 1. 一般組成

本研究で用いたホエータンパク質濃縮物(WPC-34)の一般化学組成を表1に示した。タンパク質含量は約34%で脂質, 灰分および水分は前回用いたWPC-76やWPIとそれほど大きな差異は認められなかったが<sup>3)</sup>, 乳糖含量が51.80%とWPC-76の11.66%やWPIの2.39%と比較すると著しく高かった。ホエータンパク質の主成分はβ-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンであり, それぞれタンパク質中の60%および20%を占めていた。また, その他に含有される微量成分のカルシウムやカリウムイオンもWPC-76やWPIと比較すると高い値を示した。

### 2. 加熱による濁度変化に及ぼすpH, 食塩および塩化カルシウムの影響

WPC-34の熱凝集性に及ぼすpH, 食塩および塩化カルシウムの影響を調査するために, 30℃から95℃まで直線的に温度を上昇させ, 濁度の変化を測定した。それらの結果をpHについて図1に, 食塩について図2に, 塩化カルシウムについて図3に示した。

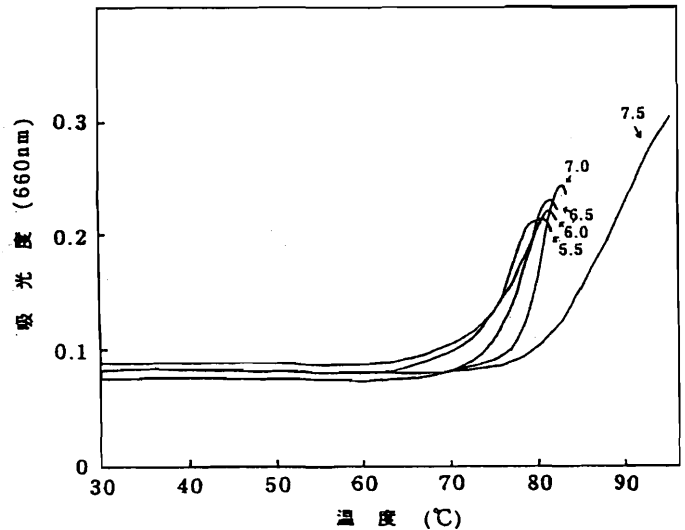


図1 直線的な温度上昇法によるWPC-34の濁度の変化に及ぼすpHの影響

反応条件: 50mM Imidazole-HCl 緩衝液  
(pH 5.5~7.5)

試料濃度: 1%

加熱速度: 2℃/分

測定温度範囲: 30~95℃

pHの影響について見ると、pH5.5およびpH6.0では63℃付近から濁度の上昇が始まり79～81℃で最大濁度に達した。pH6.5では67℃付近から濁度の変化が認められ81℃で最大濁度を示した。pH7.0では濁度の上昇開始温度が70℃付近と高くなるがかなりシヤープに濁度が上昇し、82℃でピークを形成した。pH7.5になると75℃付近から濁度がゆるやかに上昇し始め、95℃でもまだ上昇を続ける傾向が見られた。この結果を以前の研究で得られたWPC-76と比較すると<sup>3)</sup>、pH 5.5～7.0の範囲でも加熱による凝集が観察されており中性近傍でも加熱凝集体を形成できるものと推察される。この差異は試料に含まれる乳糖含量に起因するかもしれない。食肉製品中のpHは6.0に近いことから、以下の実験にはpH6.0に設定して検討することにした。

食塩を添加した場合、50, 100, 200, 500 mMと食塩濃度が増加するにつれて濁度上昇開始温度が65～75℃へと変化し、それに伴い濁度のピーク温度も上昇した。0～200mMの食塩添加量の増加に伴い、最大濁度発生温度は79～85℃へと増加した。WPC-76では200mM食塩添加で濁度の最大値を示し、食塩無添加よりも食塩添加区の方が濁度を発生する結果を得たが<sup>3)</sup>、本実験のWPC-34ではそれとは若干異なった。この違いはpH保持のために使用した緩衝溶液がWPC-76ではリン酸緩衝液、WPC-34ではイミダゾール緩衝液であり、用いた緩衝溶液の違いに起因するかも知れない。

塩化カルシウム添加では、0～10mMへと添加量の増加に伴い、濁度上昇開始温度が65～55℃へ、また最大濁度発生温度が80～70℃へと低下した。この傾向はWPC-76およびWPIの結果ともよく一致している<sup>3)</sup>。微量のカルシウムイオンの添加により低温度で熱凝集体が形成されることは、ホエータンパク質濃縮物の比較的高い熱凝集温度をそれよりも低い筋肉タンパク質の熱変性温度に低下させるためには効果的な手法である。

図4はWPC-34の濁度変化に及ぼすカルシウムイオンおよびDTTの効果を示している。還元試薬の

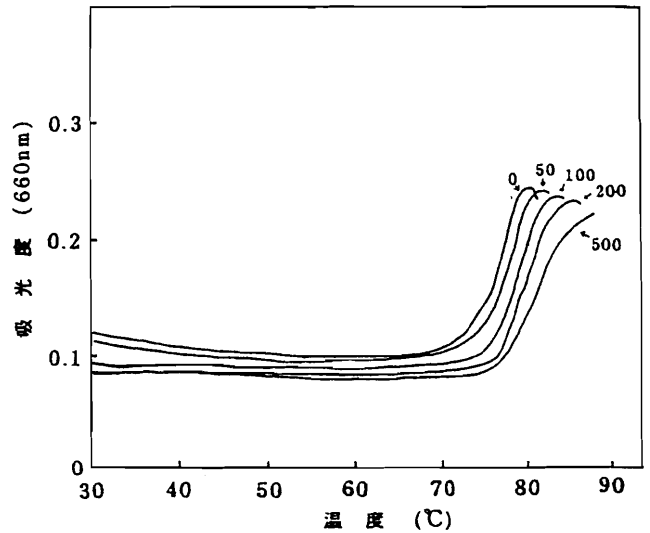


図2 直線的な温度上昇法によるWPC-34の濁度の変化に及ぼすNaClの影響

反応条件：50mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 6.0),  
0～500mM NaCl  
試料濃度：1%  
加熱速度：2℃/分  
測定温度範囲：30～95℃

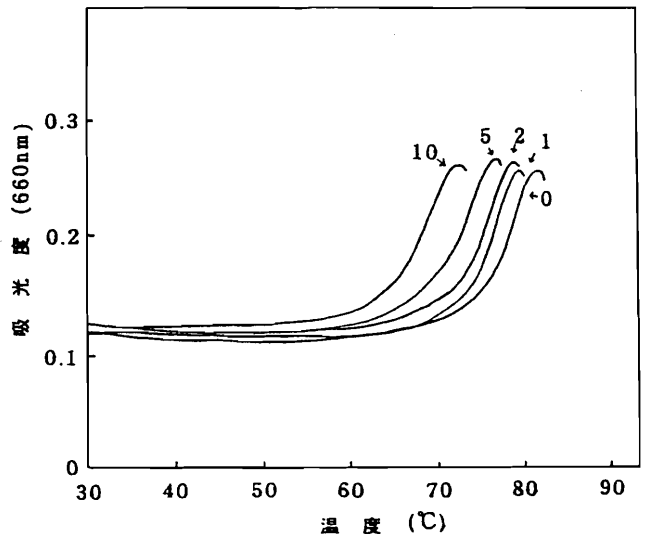


図3 直線的な温度上昇法によるWPC-34の濁度の変化に及ぼすCaCl<sub>2</sub>の影響

反応条件：50mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 6.0),  
0～10 mM CaCl<sub>2</sub>  
試料濃度：1%  
加熱速度：2℃/分  
測定温度範囲：30～95℃

DTTによりS-S結合を切断してWPC-34の分子構造を変化させると濁度上昇開始温度が65~55℃へ、最大濁度発生温度が79~69℃へと顕著に減少し、WPC-34の場合はWPIに比較して含有される成分の分子構造の変化、とくに各成分の分子内構造の露出が著しく加熱凝集体形成を促進することが明らかになった。なお構造をほぐしてカルシウムイオンを添加してもWPIで観察されたような濁度発生温度の変化は認められなかった。このカルシウムイオンによる熱凝集温度の変化はWPIで得られた結果<sup>7)</sup>と同様に結合および遊離のカルシウムイオンの双方がWPC-34の加熱凝集性に影響したものと考えられる。

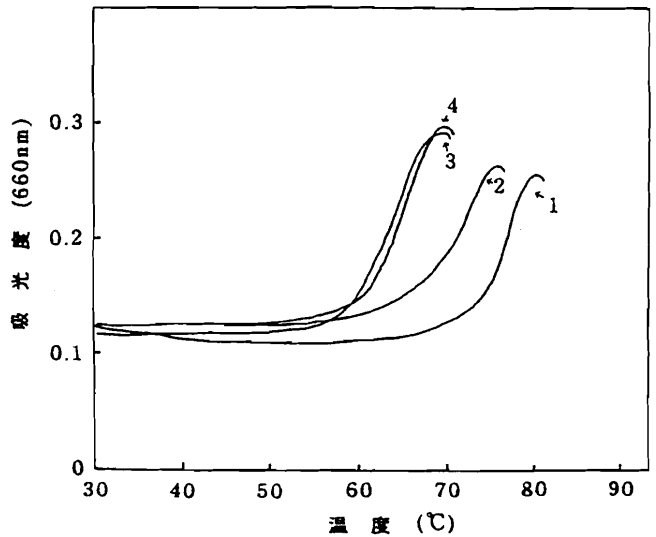


図4 直線的な温度上昇法によるWPC-34の濁度の変化に及ぼすCaCl<sub>2</sub>およびDTTの影響

反応条件：50mM Imidazole-HCl 緩衝液(pH 6.0),  
0~10 mM CaCl<sub>2</sub>

試料濃度：1%

加熱速度：2℃/分

測定温度範囲：30~95℃

1, Control; 2, + 5 mM CaCl<sub>2</sub>;

3, + 2 mM DTT; 4, + 5 mM CaCl<sub>2</sub>および2 mM DTT

### 3. 加熱凝集性およびゲル物性

次に、加熱ゲル形成温度80℃におけるWPC-34ゲルの破断強度に及ぼすタンパク質濃度の影響を検討した。pH6.0で80℃30分間保持すると、タンパク質濃度6%で測定可能なゲルが形成され、8%で4g、10%では5.5gのゲル強度を示した。これらの値は同様の加熱条件で測定したWPIの値よりは低かった<sup>6)</sup>。次に筋肉構造タンパク質を溶液状にしたミオシンBあるいはWPC-34単独標品およびそれらの混合物の粘度変化を回転粘度計を用いて測定した。反応は筋肉構造タンパク質が溶液系で分散状態を保てるように500 mM食塩が存在する高イオン強度下で行い、加熱(50℃, 30分間)による影響も検討した(図6)。未加熱での測定ではミオシンB、WPC-34それぞれ単独および両者の混合系ではそれぞれ4.3cp, 1.3cpおよび2.3cpを示した。50℃で30分間加熱するとミオシンB、WPC-34それぞれ単独および両者の混合系ではそれぞれ3cp, 3.25cpおよび1.35cpの値を示した。この結果から、未加熱ではミオシンB単独標品がかなり高い粘度を示すのに比較して、WPC-34は約30%程度の低い値を示している。両者を混合するとほぼ中間の値を示すようになった。これは筋肉タンパク質の周りをホエータンパク質が取り囲むようにして存在し、筋肉タンパク質に由来する高い粘度を低減させたものと想定される。50℃, 30分間加熱した場合にはミオシ

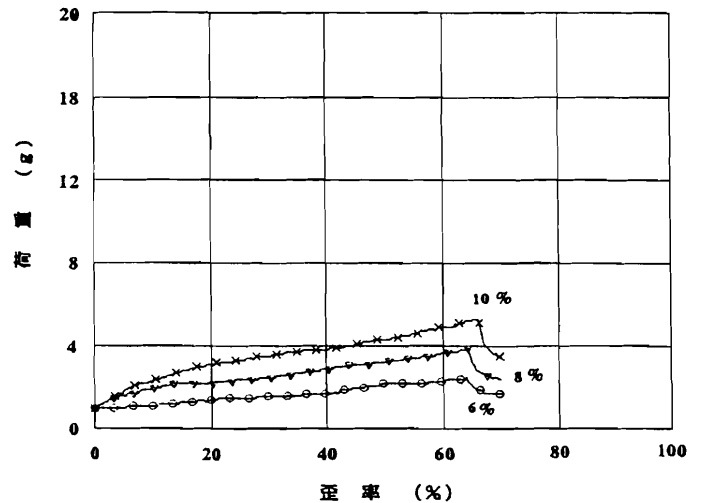


図5 加熱WPC-34ゲルの破断強度に及ぼすタンパク質濃度の影響

反応条件：50mM Imidazole-HCl 緩衝液(pH 6.0)

加熱条件：80℃, 30分間



ンB 単独では未加熱と比較して、粘度が減少しているが、この原因は加熱により形成された凝集体が回転粘度計による測定時の負荷により壊されたためと思われる。一方、ミオシンB および WPC-34の混合系では加熱により両者の間に相互作用が起こりミオシンB 単独の場合よりは粘度を増加したものと考えられる。

また、ミオシンB および WPC-34についてそのずり速度とずり応力の履歴現象について測定した。まず、未加熱試料（図7）に関してはミオシンB 単独ではわずかにチキソトロピー的挙動（時間に関係した軟化現象）を示し、ミオシンB 標品中のミオシンフィラメントやアクチンフィラメントの会合が崩壊するように作用したものと思われる。以前の研究でWPI はわずかにレオペクシー的挙動（時間に関連した濃厚化現象）を示したが<sup>6)</sup>、WPC-34単独標品についてはチキソトロピーともレオペクシーとも判別できなかった。ミオシンB と WPC-34の混合系ではミオシンB 単独で観察されたチキソトロピー的挙動が消失した。この結果は、やはりホエータンパク質が筋肉タンパク質の周りを取り囲み、ミオシンB に由来するチキソトロピー的挙動を消失したことを想定させる。これは図6で得られた結果とも一致している。

次に、加熱試料（図8）に関しては、ミオシンB 単独標品では低速のずり速度の時に急激に粘度が増加し、その後ずり速度の増加とともに一旦減少し、さらにずり速度を増加させるとずり応力が滑らかに上昇していくというパターンを示した。この現象は加熱によってゲル化の兆候を表したミオシンB がある程度の高回転でその構造を崩してしまい、粘度の低下を示すものと推定された。また一旦ずり速度を増加させて、その後低下させた時に観察されているわずかな粘度の増加は、加熱ミオシンB 中にまだ回転応力により崩壊しないような凝集体が残存していることを想定させる。しかし、ミオシンB と WPC-34の混合系では、粘度の急激な変化は観察されず、滑らかな典型的なレオペクシー的挙動を示した。大豆タンパク質においてその粘度変化がレオペクシーからチキソトロピーへと変化するのゲル化の前兆を示すものであると想定されているが<sup>10)</sup>、今回得られた結果が

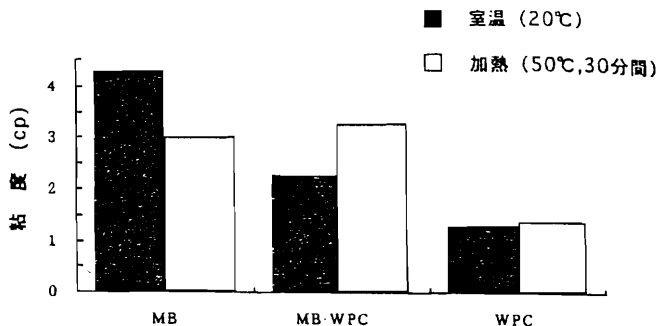


図6 Myosin BあるいはWPC-34単独標品および混合物の粘度の変化

反応条件：50mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 6.0),  
500mM NaCl  
加熱条件：50°C, 30分  
MB, Myosin B (1%) ;  
MB-WPC, Myosin B (1%) + WPC-34 (1%) ;  
WPC, WPC-34 (1%)

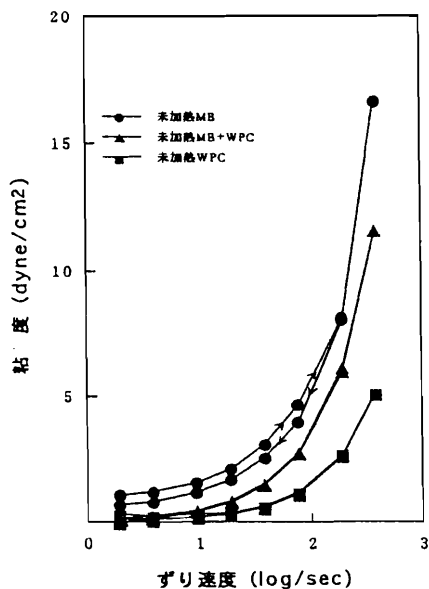


図7 WPC-34あるいはMyosin B単独標品および混合物のずり応力とずり速度の履歴曲線

反応条件：50mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 6.0),  
500mM NaCl  
MB, Myosin B (1%) ;  
MB-WPC, Myosin B (1%) + WPC-34 (1%) ;  
WPC, WPC-34 (1%)

ら筋肉タンパク質とホエータンパク質が共存すると、加熱によりゲル化の前兆を有した凝集体を経て、均一なゲルが形成される可能性が示唆された。

#### 4. 共沈法によるWPC-34と筋肉タンパク質の相互作用

各試料を一定加熱処理後遠心分離して上清と沈殿に分け、それぞれに含まれる成分をSDS-PAGEにより分析した。まず、40℃で30分間加熱して遠心した場合はミオシンB、WPC-34単独標品および混合物共に沈殿しなかった(図9)。70℃で30分間加熱すると(図10)ミオシンBのほとんどが沈殿し、WPC-34成分も約10%が沈殿するようになった。両者の混合系ではβ-ラクトグロブリン(分子量18,362)の約30%が、またα-ラクトアルブミン(分子量14,146)の約55%が沈殿画分に移行した。90℃で30分間の加熱では(図11)、WPC-34単独ではβ-ラクトグロブリンおよびα-ラクトアルブミンのそれぞれ約60%および45%が沈殿し、BSAや免疫グロブリン系を含む30kDaより大きい高分子量の成分の殆どが沈殿した。またミオシンBとWPC-34の混合系ではβ-ラクトグロブリンの約85%、α-ラクトアルブミンの約95%が沈殿画分に移行した。これらの結果より、両タンパク質の共存系で加熱によりβ-ラクトグロブリンやα-ラクトアルブミンの沈殿量が著しく増加することは筋肉タンパク質とホエータンパク質が相互作用して結合し沈殿ゲルマトリックス中に明らかに移行することを示している。さらにホエータンパク質単独標品の加熱ではβ-ラクトグロブリンがα-ラクトアルブミンよりも熱変性しやすかったが<sup>12~13)</sup>、筋肉タンパク質との共存系では単独系でβ-ラクトグロブリンよりも熱変性に安定であったα-ラクトアルブミンの方が筋肉タンパク質との結合量が顕著に増加することも明らかになった。

#### 5. ソーセージのレオロジー特性

ソーセージの破断強度測定値に及ぼすWPC-34添加効果を調査するために原料肉の10%をWPC-34に置換して、測定することにした。図12はポークソーセージの破断強度測定波形に及ぼすWPC-34添加の影響

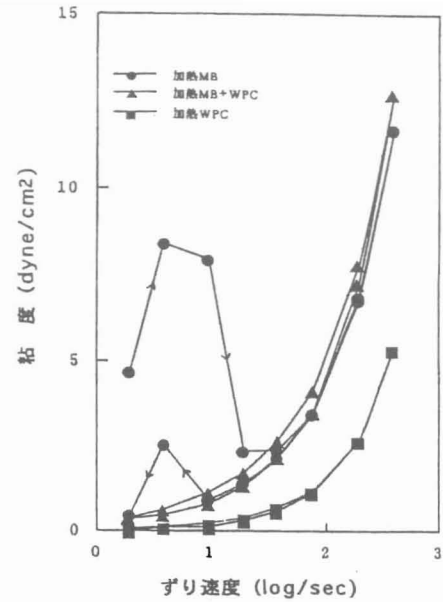


図8 加熱処理WPC-34あるいはMyosin B単独標品および混合物のずり応力とずり速度の履歴曲線

反応条件: 50mM Imidazo(pH 6.0),  
500 mM NaCl  
加熱条件: 50℃, 30分  
MB, Myosin B (1%);  
MB-WPC, Myosin B (1%) + WPC-34 (1%);  
WPC, WPC-34 (1%)

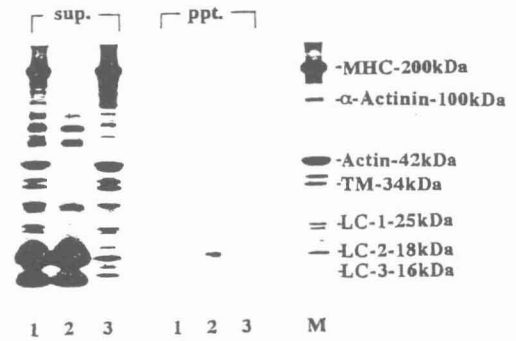


図9 加熱処理(40℃)したWPC-34およびMyosin BのSDS-PAGEパターン

反応条件: 50mM Imidazole-HCl緩衝液(pH 6.0), 500 mM NaCl  
加熱条件: 40℃, 30分間 遠心分画: 5,000 rpm, 30分間

1, WPC-34+Myosin B; 2, WPC-34; 3, Myosin B;  
M, マーカー(筋原線維); sup., 上澄液; ppt., 沈殿

を測定した結果を示した例である。豚肉と WPC-34 を 10% 置換しても良好な破断強度を示す測定波形が得られた。またビーフソーセージの破断強度に及ぼす WPC-34 添加の影響を検討しても (図 13), 破断強度が若干減少するが, 良好なゲル強度が測定された。ポークおよびビーフソーセージの破断強度をそれぞれ 10 の試料について測定した結果を図 14 に示した。この結果から, ポークソーセージでは WPC-34 添加による有意な差は認められなかった。一方, ビーフソーセージでは WPC-34 を加えることで 12% 程度の加熱ゲルの破断強度の低下が見られた。WPC-34 を添することで豚肉, 牛肉ともに加熱ゲルの破断強度のばらつきが低減され, ホエータンパク質の添加によりより均一なレオロジー特性を有する製品ができることが判明した。

#### 6. WPC-34 添加ソーセージ試作品

次に, 実際の試食用ソーセージの製造を豚肉あるいは牛肉, 豚脂肪, 水, 澱粉, グルコース, キュアリング製剤, ソルビン酸カリウム, 白コショウおよび WPC-34 をそれぞれ 100, 6.5, 23.5, 3, 0.5, 1, 0.2, 0.2 および 3% の割合で添加し, サイレントカッターを用いて試作した。混合時間は 1,400rpm で約 2 分間, 2,800rpm で約 1 分間とした。混合終了時の肉温は約 9℃であった。混合した練り肉は, 速やかに塩蔵豚腸に詰め, スモークハウスで乾燥 (50℃, 20 分間および 60℃, 20 分間), スモーク (65℃, 60 分間) およびスチームボイル (75℃, 40 分間) を行い冷蔵庫中で冷却した。図 15 は WPC-34 を添加したポークソーセージ試作品のカラー写真を示している。(a) には対照と比較した全体写真を (b) には切断面の写真を示した。対照と同じか, それよりは若干良好な発色効果が認められ, きめの細かいソーセージが作製できた。ビーフソーセージについても同様の傾向が認められた (データ省略)。真空パックした試験試料を 80℃で 15 分間加温し, 官能評価を行ったところ, テキスチャー特性や風味ともに, 対照とほとんど差異のないことが明らかになった。

本研究の結果から, 10% 添加では多少のゲル強度の減少は見られるが, 均一性が増し, テキスチャー特性が改善された食肉製品が製造された。また, 3% 添加では良好な官能特性を保持した, 乳と肉の良質なタンパク質を持ち合わせた栄養学的に優れた食品の製造が可能であった。

近年, 欧米諸国では極力脂肪の摂取をひかえる傾向があり, 日本でも脂肪摂取低減化思考が広まりつつあ

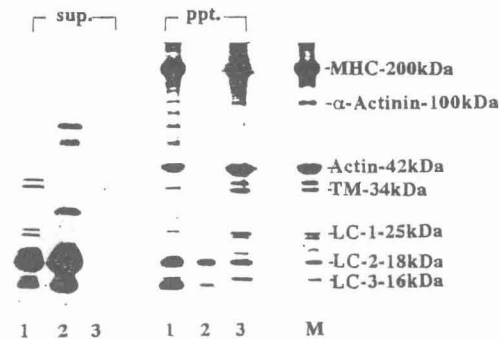


図10 加熱処理 (70℃) したWPC-34およびMyosin BのSDS-PAGEパターン

反応条件: 50mM Imidazole-HCl緩衝液(pH 6.0), 500 mM NaCl  
加熱条件: 70℃, 30分間 遠心分画: 5,000 rpm, 30分間

1, WPC-34+Myosin B; 2, WPC-34; 3; Myosin B;  
M, マーカー (筋原線維); sup., 上澄液; ppt.; 沈殿

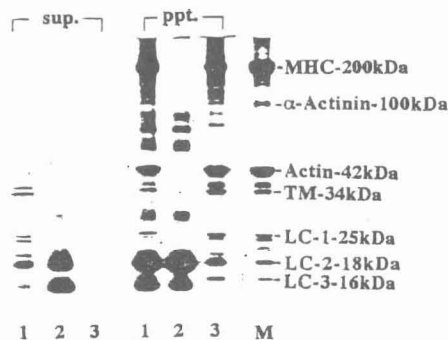


図11 加熱処理 (90℃) したWPC-34およびMyosin BのSDS-PAGEパターン

反応条件: 50mM Imidazole-HCl緩衝液(pH 6.0), 500 mM NaCl  
加熱条件: 90℃, 30分間 遠心分画: 5,000 rpm, 30分間

1, WPC-34+Myosin B; 2, WPC-34; 3; Myosin B;  
M, マーカー (筋原線維); sup., 上澄液; ppt.; 沈殿

る。ホエータンパク質は脂肪代替品の一つでもあり、食肉製品への添加により脂肪含量低減化の試みがなされている<sup>14-15)</sup>。本研究の結果もゲル化能力を有する WPC-34 を増量剤として肉製品に添加することにより、脂肪低減化の可能性が示唆されている。

## 7. 乳タンパク質の酵素処理による加水分解率の測定

食品の安全性に対する関心が高まっている今日、酵素による食品の改質、改良が見直されている。酵素で分解する方法は、タンパク質の機能性向上のための優れた方法であり、乳タンパク質ではそのアレルギーの低減を目的に酵素処理が行われている<sup>16)</sup>。上記の様に今までに WPC-34 標品の基礎的諸性質について検討してきたが、今後さらに WPC-34 の有効利用の可能性を検討するために、本標品の機能性の改善を試みる必要がある。そこで予備実験として、限外ろ過膜により濃縮脱脂した濃縮脱脂乳を用いて、酵素処理の影響を検討した。使用される酵素にはエンド型プロテアーゼ（ポリペプチド鎖内部のペプチド結合を切断）やエキソ型ペプチダーゼ（ポリペプチド鎖の端からアミノ酸を切断）がある。今回はエンド型プロテアーゼおよびエキソ型ペプチダーゼ/エンド型プロテアーゼ複合酵素の3種類の酵素 A、F および T 酵素を用いて検討し、濃縮脱脂乳のタンパク質加水分解率の経時変化を SDS-PAGE により検討した（図 16～18）。3種類の酵素により乳タンパク質の分解様式がかなり異なるが WPC-34 の主要成分である  $\beta$ -ラクトグロブリンや  $\alpha$ -ラクトアルブミンも酵素によってはかなり分解の進行が認められ、WPC-34 の酵素処理による機能性改質の可能性が示唆された。

今後は、機能性を改質した WPC-34 の諸性質の把握や食品への応用を検討する必要がある。また、WPC-34 標品からの各種タンパク質成分の分画を試みるとともに、それらの中に存在する可能性がある生体調節機能物質の検索についても検討していきたい。

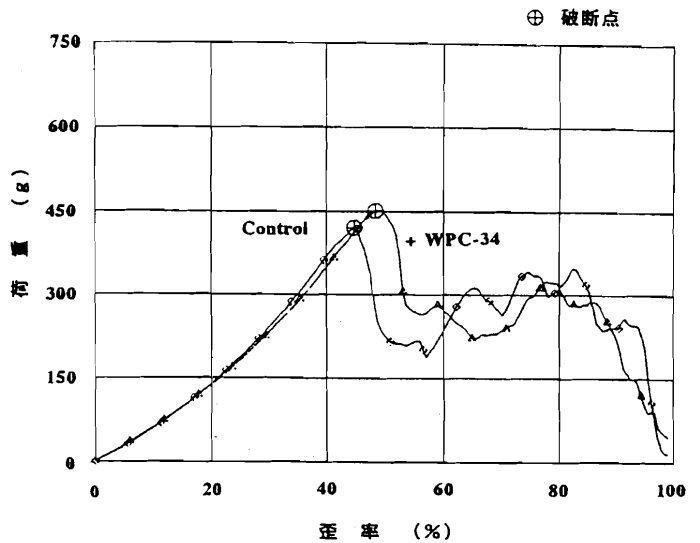


図12 ポークソーセージの破断強度測定波形に及ぼすWPC-34添加の影響

Control, 豚肉 (100%) ;  
+WPC-34, 豚肉 (90%) と WPC-34 (10%)

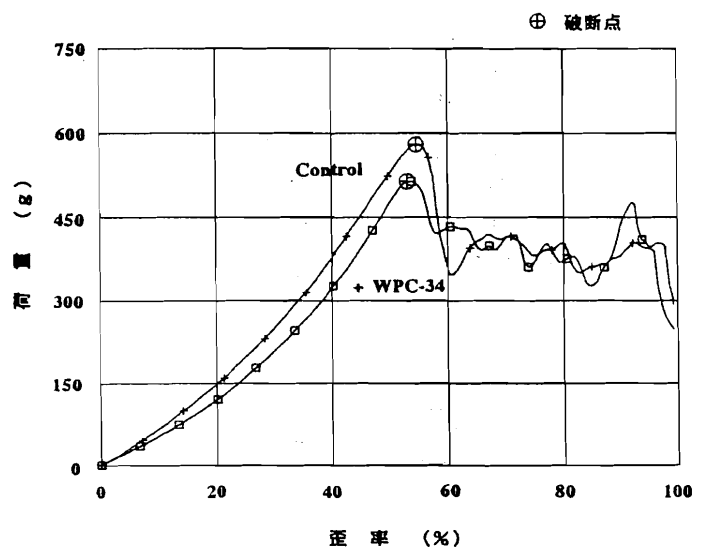


図13 ビーフソーセージの破断強度に及ぼすWPC-34の添加の影響

Control, 牛肉 (100%) ;  
+WPC-34, 牛肉 (90%) と WPC-34 (10%)

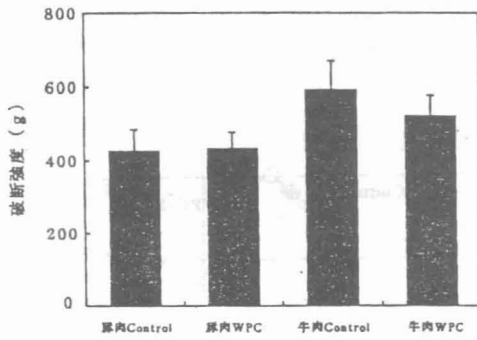


図14 ビーフおよびポークソーセージの破断強度に及ぼすWPC-34添加の影響

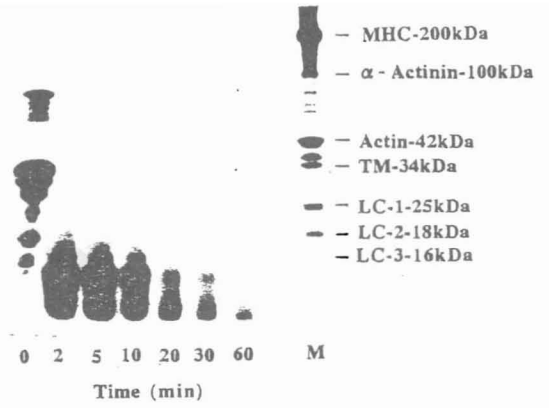


図16 A酵素処理による濃縮脱脂乳の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン

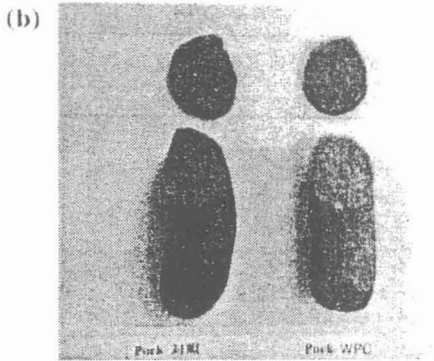
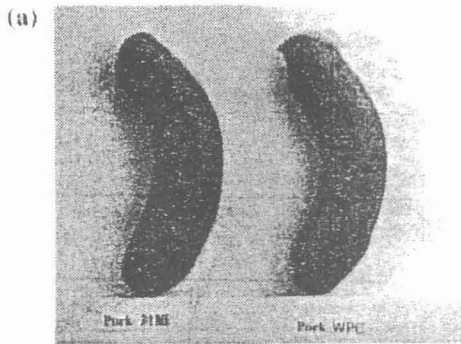


図15 WPC-34を添加したポークソーセージ試作品

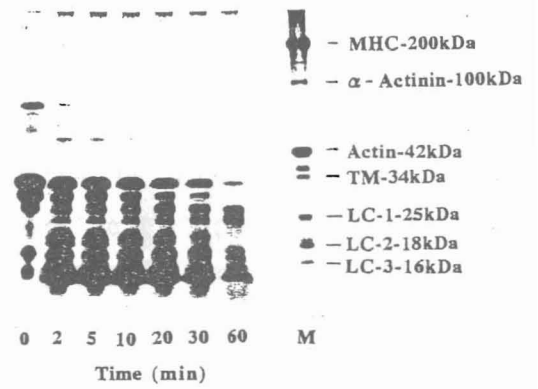


図17 F酵素処理による濃縮脱脂乳の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン

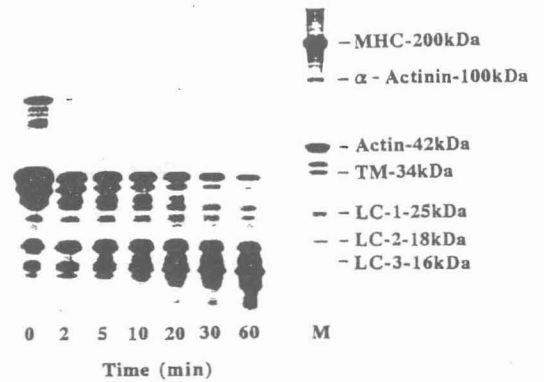


図18 T酵素処理による濃縮脱脂乳の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン

## 文 献

- 1) 鵜田文三郎：フードケミカル， 6, 25(1987)。
- 2) 鵜田文三郎：New Food Industry, 30, 1(1988)。
- 3) 藤野博史，六車三治男，伊藤肇躬，大橋登美男：日食工誌， 40, 309(1993)。
- 4) 藤野博史，六車三治男，伊藤肇躬，大橋登美男：酪農科学・食品の研究， 42, A-117 (1993)。
- 5) 藤野博史，六車三治男，森 和彦，津江野大輔，笹木明弘，伊藤肇躬，大橋登美男：日食工誌， 42, 756 (1995)。
- 6) 藤野博史，六車三治男，緒方朋子，伊藤肇躬，大橋登美男：日食工誌， 42, 762 (1995)。
- 7) 藤野博史，六車三治男，鬼木浩子，伊藤肇躬，大橋登美男：日食工誌， 42, 769 (1995)。
- 8) A. Szent - Györgyi : Chemistry of Musclar Constraction, 2nd. ed., Acad. Press, New york(1951).
- 9) 六車三治男，坂本季美枝，沼田正寛，山田浩之，中村豊郎：日食工誌， 37, 446(1990)。
- 10) L. C. Lin and T. Ito : J. Food Technol. , 21, 133 (1986).
- 11) U. K. Laemmli : Nature, 227, 680 (1970).
- 12) 清水 誠：「ミルク総合事典」，山内邦男・横山健吉編，朝倉書店（東京）， pp.33(1992).
- 13) J. N. de Wit : "Developments in Dairy Chemistry-4", ed. P.F. Fox, Elsevier Applied Science Publishers, London, pp.285 (1980).
- 14) R. Rahardjo, L. A. Wilson, and Sebaranek : J. Food Sci. , 59, 1286 (1994).
- 15) J. Carballo, G. Barreto, and F. Jiménez Colmenero : J. Food Sci. , 60, 673 (1994).
- 16) 川瀬興三：食品と開発， 30 (3),14 (1995).

# 乳ホエータンパク質の酵素処理によるゲル 形成能の改変と肉製品の発色促進効果の発現

六車 三治男、山内 清、河原 聡 (宮崎大学農学部)

大橋 登美男 (九州栄養福祉大学)

農 新介 (オーム乳業 (株) 開発部)

杉田 浩一 ((社) 宮崎県 J A 食品開発研究所)

# 要 旨

## 1. 目 的

近年、ホエータンパク質製品の輸入拡大が求められ、その利用拡大につながる具体的、かつ効果的な利用方法の試験開発が必要とされている。そこで前回、すでに輸入が始まっているタンパク質含量が34%のホエータンパク質濃縮物（WPC-34）に焦点をあてて、その製品の基本的な特性の把握を行った。その結果、WPC-34単独標品は優れたゲル形性能を保持し、肉製品への添加実験では、良好なテクスチャー特性を有し、さらに官能特性の好ましい食肉製品が製造された。このようにWPC-34はそれ単独でも十分に利用できることが明らかになったが、さらに機能性の改善を行い、より効果的な利用方法を探索することにした。

そこで今回は、各種酵素処理によるWPC-34製品の機能性の改質を試みたので得られた知見を報告する。

## 2. 実験方法

WPC-34標品をトリプシンや新しく食品産業用に開発されたフレーバーザイムおよびアルカラゼを用いて酵素分解を試みた。各種酵素による分解率は酵素反応後の溶液に、冷却したトリクロロ酢酸（TCA）溶液を終濃度が5%になるように添加して30分間放置後、12,000rpmで40分間遠心して得られた上清画分の吸収（280nm）を測定することにより求めた。試料の加熱に伴う濁度変化は直線的温度上昇法により測定した。酵素分解標品の分解様式は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析や電気泳動法によるタンパク質成分の分子種や分子量の同定により検討した。さらに、酵素分解製品を添加した食肉製品（ソーセージ）の破断強度の測定や試食評価も行った。また、WPC-34酵素分解調整品によるソーセージの発色試験も検討した。

## 3. 結果および考察

一般的にホエータンパク質濃縮物（WPC）は溶解性が低いことが負の要因と考えられ、WPC-34標品も同様の傾向が認められるが、本研究の結果から、酵素処理はWPCの溶解性を高め利用性を向上させることが認められた。

次に、豚肉を用いてソーセージを作製し、原料肉の10%のWPC酵素分解物（フレーバーザイムおよびアルカラゼの混合分解物）を添加してレオロジー特性を測定したところ、酵素分解ホエータンパク質の添加により、より均一なレオロジー特性を有する食肉製品を製造できることが明らかになり、高齢者の咀嚼機能にあった食肉製品の製造も可能となった。

さらに、WPC-34の酵素分解物を食肉製品製造の際に添加すると、亜硝酸塩の使用量を減少させて、効果的な発色促進および保色作用が認められ、天然由来物の発色助剤の開発が示唆された。

以上の結果から、ホエータンパク質を酵素処理することにより、ホエータンパク質が本来有している必須アミノ酸バランスに優れ、栄養性も十分に持った、しかも新たな機能性が付与されて付加価値の向上した、新規な乳肉製品製造の可能性が高まった。



## 1. 目的

近年、ホエータンパク質製品の輸入拡大が求められ、その利用拡大につながる具体的、かつ効果的な利用方法の試験開発が必要とされている。ホエータンパク質製品の機能性改善に関する研究を現在まで進めてきたが<sup>1~6)</sup>、前回はすでに輸入が始まっているタンパク質含量が34%のホエータンパク質濃縮物(WPC-34)に焦点をあてて、その製品の基本的な特性の把握を行った<sup>7,8)</sup>。その結果、WPC-34単独標品は優れたゲル形成性能を保持し、肉製品への添加実験では、良好なテクスチャー特性を有し、さらに官能特性の好ましい食肉製品が製造された。このようにWPC-34はそれ単独でも十分に利用できることが明らかになったが、さらに機能性の改善を行い、より効果的な利用方法を探索することにした。

食品産業において、酵素は従来から醸造・発酵食品をはじめとした様々な食品と深いつながりをもってきた。近年はバイオテクノロジーの発展により、新しい酵素がいくつか開発されている。

そこで今回は、新しい食品用の酵素も含む各種処理によるWPC-34製品の機能性の改質を試みたので得られた知見を報告する。

## 2. 実験方法

### 1) 実験材料

WPC-34は農畜産業振興事業団より提供していただいた。ソーセージ製造用の原料肉は豚肉のモモの部位を使用した。

### 2) WPC-34の各種酵素による加水分解

#### (1) 使用した酵素

- (a) トリプシン；トリプシンはタンパク質のアルギニンとリシンのC-末端側を切断するエンド型プロテアーゼである。
- (b) フレーバーザイム；フレーバーザイムは中性あるいは弱酸性下でタンパク質を加水分解させるために開発されたカビ起源の酵素製剤である。すなわちエンド型プロテアーゼとエキソ型プロテアーゼの両活性を有する複合酵素である。
- (c) アルカラーゼ；アルカラーゼはすべての種類のタンパク質の加水分解のために開発された非常に効率の優れた細菌プロテアーゼである。その主要な酵素成分はサブティリシンAであり、活性中心はセリンのエンド型プロテアーゼである。

#### (2) 酵素処理方法

WPC-34原液は、それを10%濃度になるように蒸留水に溶解して8,000rpmで30分間遠心後その上清画分を試料とした。3種類の酵素は溶液状態になるように溶解して、タンパク質濃度を測定して使用した。酵素反応条件はWPC-34を20mg/ml濃度になるように添加して、20mM Imidazole-HCl緩衝液でpHを調整して反応させた。トリプシンは37℃、pH7.5で、フレーバーザイムおよびアルカラーゼは50℃、pH6.5で反応させた。酵素反応の停止は酵素の阻害剤であるPMSF(Phenylmethylsulfonyl Fluoride)を添加して反応を停止させる方法と、実用性を考慮に入れて、90℃で20分間加熱して酵素を失活させる方法の両方で検討

した。さらに肉製品（ソーセージ）への添加用の酵素分解物の調製は10%WPC-34の水溶液を65℃で30分間低温殺菌し、50℃にした後にフレーバーザイム（0.042%）とアルカラゼ（0.02%）を添加して攪拌させながら分解した。5時間後および24時間後に90℃で20分間加熱し、酵素を失活させて凍結乾燥を行った。

### 3) 酵素処理による分解率の測定

酵素による分解率は酵素反応後の溶液に、冷却したトリクロロ酢酸（TCA）溶液を終濃度が5%になるように添加して30分間放置後、12,000rpmで40分間遠心して得られた上清画分の吸収（280nm）を測定することにより求めた。

### 4) 濁度の測定

試料の加熱に伴う濁度変化は直線的温度上昇法<sup>9)</sup>により測定した。すなわち、島津UV-2400PC型自記分光光度計に温度制御電源部と温度プログラマーSPR-8型を接続し、それぞれの溶液の入ったセル中の温度を1分間に2℃ずつ継続的に上昇させるようにセットした。そして、それぞれの試料について30~95℃まで660nmの吸光度を測定した。

### 5) 高速液体クロマトグラフィーによる分析

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析はTSKgel G2000SW<sub>XL</sub>カラム（7.8mmI.D.x30cm）をWatersのLC Module 1型的高速液体クロマトグラフィー装置に接続して、溶出液として0.1%TFA+45%アセトニトリルのimmobile phaseで分析した。

### 6) 電気泳動

タンパク質成分の分子種や酵素分解の程度は、2種類の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法（SDS-PAGE）により同定した。即ち、一つはLaemmliの方法<sup>10)</sup>で、アクリルアミド濃度7.5~17.5%のグラジエントゲルでスラブ型の泳動槽を用いて行った。ゲルバンドの染色はC.B.B.(Coomassie Brilliant Blue R-250)により行った。もう一つは低分子量の成分の分画に適しているトリシンシステム<sup>11)</sup>によりミニゲルを用いて行った。ゲルバンドの染色は感度の高い銀染色法を用いた。

### 7) 食肉製品（ソーセージ）の破断強度の測定および試食評価

豚肉100gに15gの水と食塩1.5%、0.3%リン酸塩、香辛料0.2%、砂糖1%、馬鈴薯澱粉3%添加して、およびWPC-34あるいはその酵素分解物は10g添加してスピードカッターでホモジナイズした。塩蔵豚腸に詰めた後、スモークハウスで乾燥（65℃、10分間）、スチームボイル（73℃、20分間）およびスモーク（65℃、15分間）した。調製したソーセージ試料の破断強度を山電RE-33005型クリープメーターにより測定した。さらに試食評価を7人のパネラーにより行った。

### 8) WPC酵素分解物によるソーセージの発色試験

豚肉100gに15gの水と食塩2%を加え、亜硝酸Naの添加量を0、17、85ppmと変化させてWPC酵素分解物を10g添加してケーシングに充填し、実験<sup>7)</sup>と同様の方法でソーセージを製造した。ソーセージ切断

面のカラー写真を撮影すると共に、発色の程度はMinolta分光測色計により測定した。

### 3. 結果および考察

本研究で用いたホエータンパク質濃縮物 (WPC-34) の一般化学組成は前回報告したようにタンパク質含量が約34%、脂肪3.9%、灰分6.7%、水分4.7%、乳糖50.8%であり、現在までに、ホエータンパク質濃縮物 (WPC) およびホエータンパク質分離物 (WPI) に関する研究を遂行してきた標品に比べるとタンパク質含量が少なく、乳糖がかなり多く含まれている<sup>7)</sup>。しかし、ホエータンパク質の主要成分の割合はタンパク質含量の違いによっては、大きな差異はなく、 $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -Lg) と $\alpha$ -ラクトアルブ ( $\alpha$ -La) がそれぞれタンパク質中の60%および20%を占めており、その次に血清アルブ (BSA) 含量が多く、その他にラクトフェリンや免疫グロブリン、その他の成分が含まれていた。極く最近の研究でも酵素によるホエータンパク質の機能性改善の試みがなされている<sup>12, 13)</sup>。今回の酵素による分解は主として $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブおよびBSAを各種酵素で分解することである。

そこで、大きく分けて4つの実験を設定して検討することにした。

#### 1) 各種酵素処理によるWPC-34の限定分解物の性状 (PMSF添加による酵素反応停止)

この項の実験では、酵素反応をすべて正確に停止するために、酵素の阻害剤であるPMSF添加により得られた結果を示した。

まず、図1にWPC-34の加水分解率に及ぼす各種酵素処理の影響を示した。トリプシン、フレーバーゼイム、アルカラゼの順に加水分解率が増加することが認められた。

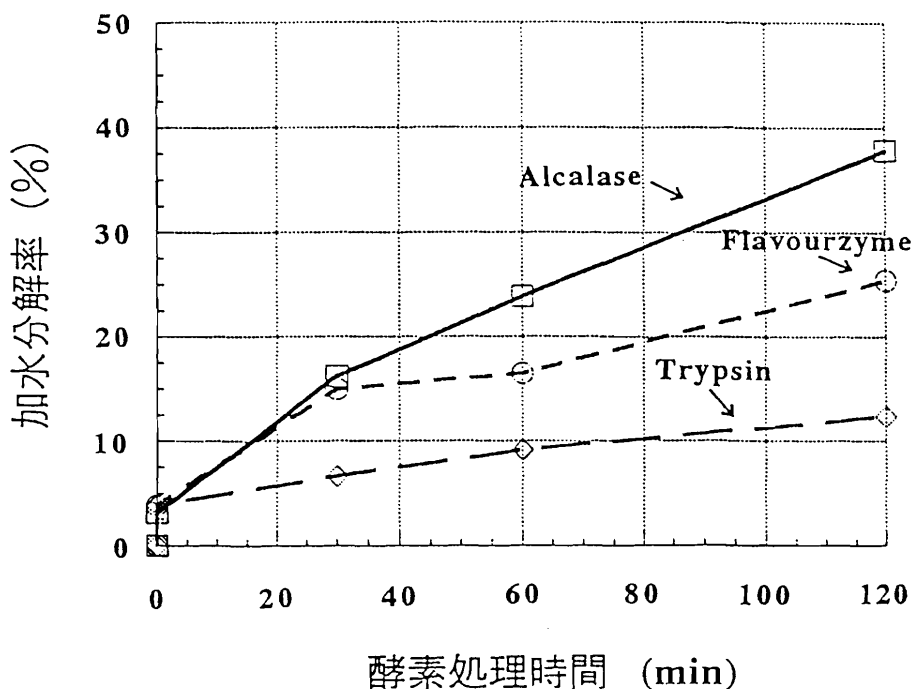


図1 WPC-34の加水分解率に及ぼす各種酵素処理の影響

WPC-34濃度; 20mg/ml  
酵素濃度; 0.4mg/ml

加水分解物の分子量分布をHPLCにより分析した。使用したカラムは低分子量成分の分画に適しているゲルろ過カラムを用いて、一般的な逆相カラムクロマトグラフィーに使用される溶媒系でペプチドの分析を行った。その結果、酵素処理に伴って、カラムから溶出してくる時間が長くなるピークバンドが現れ、またその量が増加することが明らかになった。カラムから溶出してくる時間が長くなるほど低分子量化していると考えられることから、トリプシンおよびフレーバーザイムで120分間処理した場合には、酵素による分解が進行していることを示している。その分解の程度はトリプシンよりもフレーバーザイムで大きいことが認められた(図2)。同様にアルカラーゼ処理によっても酵素処理による低分子量化が観察され、さらに酵素処

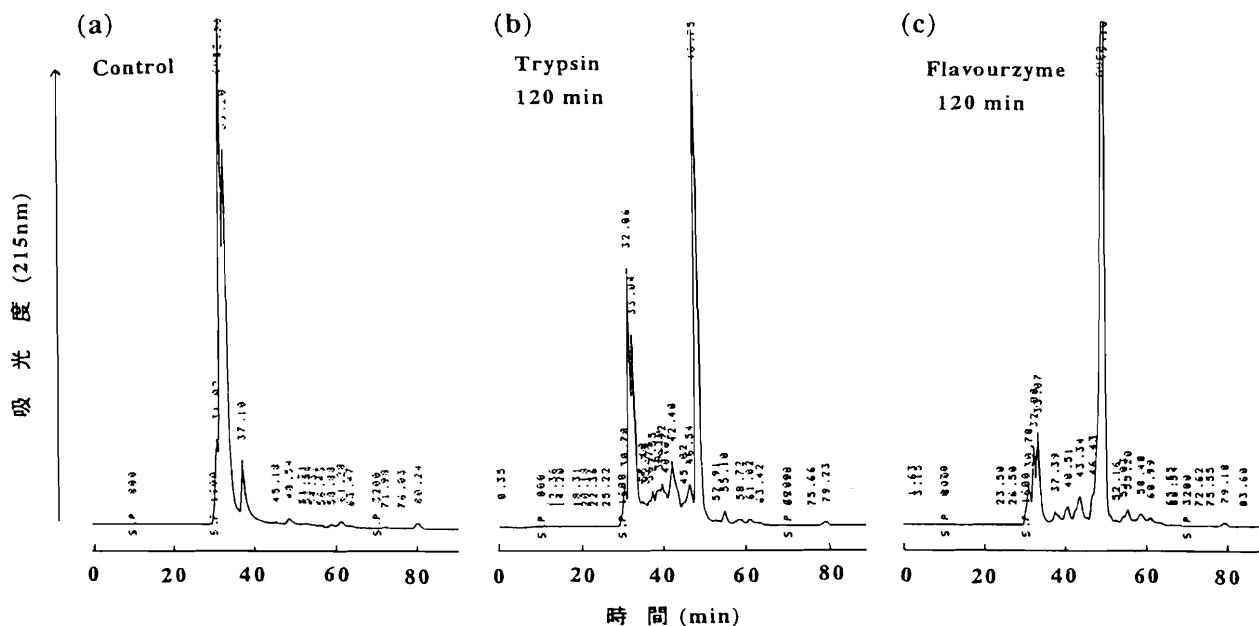


図2 WPC-34のトリプシンあるいはフレーバーザイム処理試料のHPLC分析

カラム ; TSKgel G2000SW, 7.8mmI.D.×30cm  
 溶出液 ; 0.1% TFA + 45% アセトニトリル  
 流速 ; 0.2ml/min

理時間の増加に伴った、酵素分解の進行も認められた(図3)。図4には各種酵素処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターンを示した。低分子量成分の検出が可能なトリプシンシステムにより行った。トリプシン処理により、 $\beta$ -Lgより高分子量の成分が酵素反応5分ですでに分解することが認められたが、 $\beta$ -Lgそのものの大きな分解は観察されなかった。しかし、120分間の処理では $\alpha$ -Laのわずかな減少が観察された。フレーバーザイム処理では60分間や120分間の処理で明瞭な $\alpha$ -Laの減少が認められた。アルカラーゼ処理ではさらに $\alpha$ -Laの分解は進行し、120分間処理ではバンドの染色は不明瞭になってきた。また、 $\beta$ -Lgについてもかなり分解によるバンドの量の減少が認められた。

酵素処理標品の熱凝集性を調べる目的で、直線的温度上昇法によるWPC-34の濁度変化に及ぼすアルカラーゼ処理の影響を検討した(図5)。前回は本方法により検討しているが<sup>7)</sup>、その際は日立の分光光度計を用いてタンパク質濃度10mg/mlで検討を行った。今回は分光光度計が異なり、測定感度が大幅に上昇したために、3mg/mlの低濃度溶液で検討した。しかし、温度上昇に伴う濁度の増加パターンには差異は認

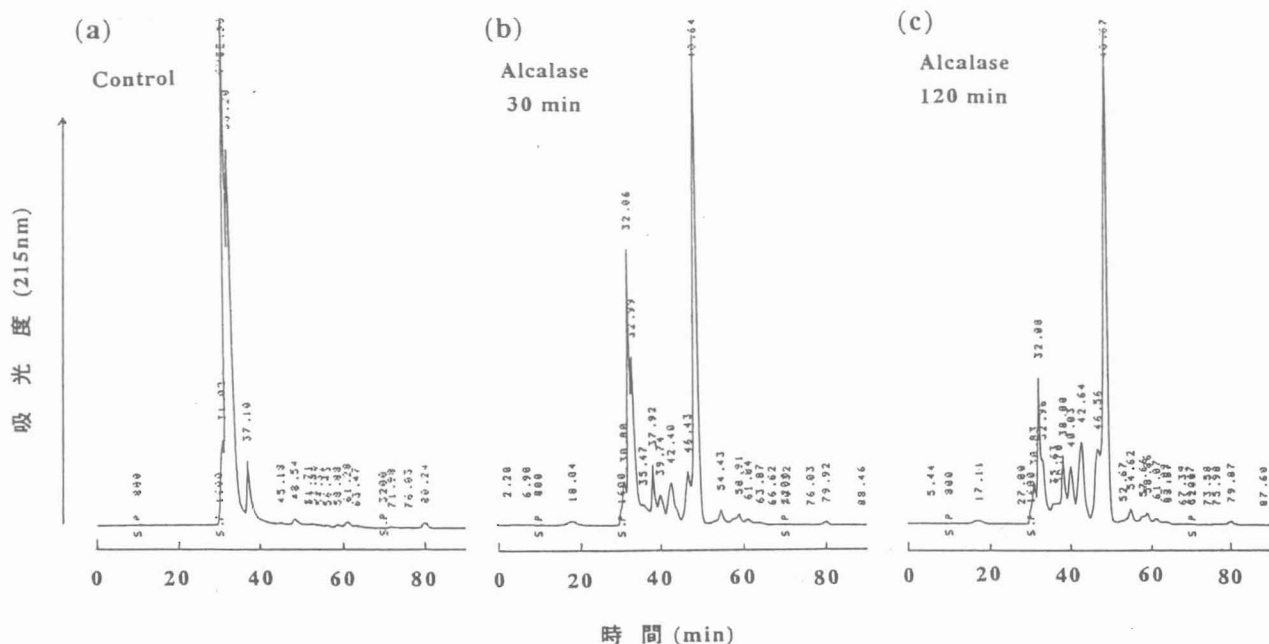


図3 WPC-34のアルカラゼ処理試料のHPLC分析

カラム ; TSKgel G2000SW, 7.8mmI.D. × 30cm  
 溶出液 ; 0.1%TFA + 45%アセトニトリル  
 流速 ; 0.2ml/min

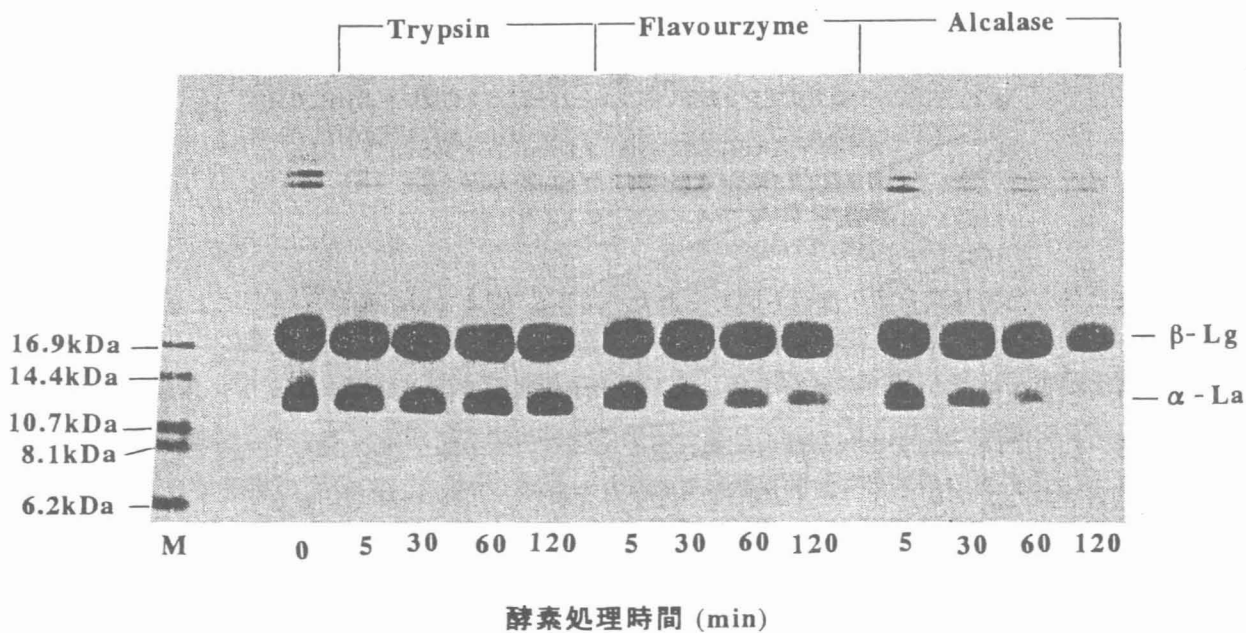


図4 各種酵素処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン(トリシンシステム)

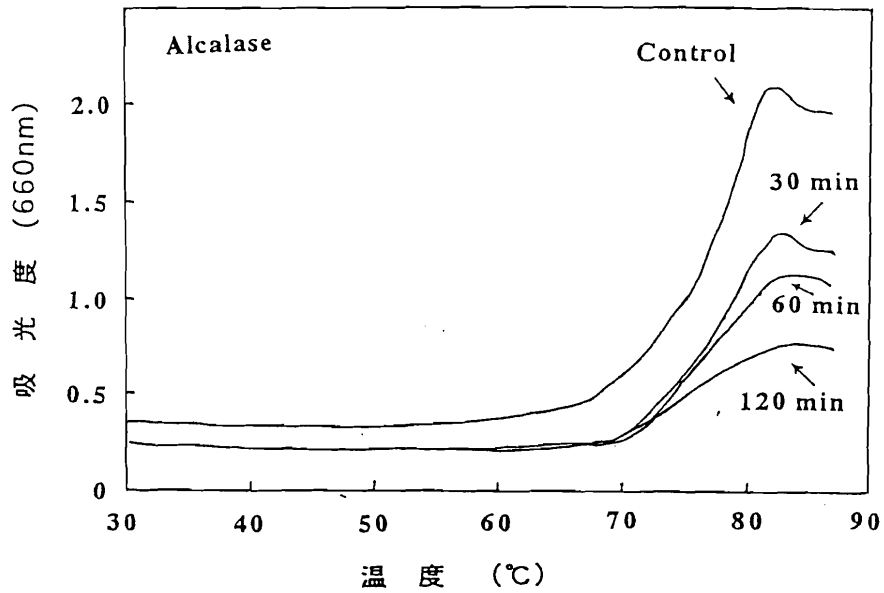


図5 直線の温度上昇法によるWPC-34の濁度の変化に及ぼすアルカラーゼ処理の影響

測定条件；50mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 6.0)  
 試料濃度；3 mg/ml  
 加熱速度；2 °C/分  
 測定温度範囲；30~95 °C

められず、ほぼその傾向は変化がなかった。アルカラーゼ処理の時間経過に伴って、濁度の上昇開始温度に差異は認められないが、最大濁度の値が酵素処理に伴って低下することが明らかになった。図6にはトリプ

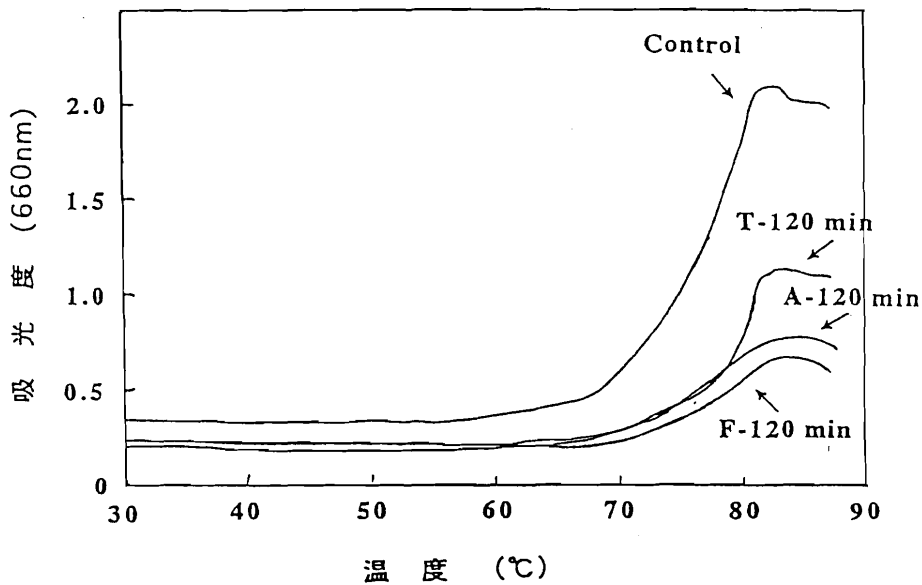


図6 直線の温度上昇法によるWPC-34の濁度の変化に及ぼすトリプシン、アルカラーゼおよびフレーバーザイム処理の影響

反応条件；50mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 6.0)  
 試料濃度；3 mg/ml  
 加熱速度；2 °C/分  
 測定温度範囲；30~95 °C

シン (T-120)、フレーバーザイム (F-120) およびアルカラゼ (A-120) で120分間処理した標品の値を示している。対照に比較していずれも最大濁度の値が減少し、その傾向はトリプシンが中間で、アルカラゼおよびフレーバーザイムに関してはそれらの値はかなり低くなった。このように酵素処理により、最大濁度が減少する傾向がみられることは、酵素による極めて限定的な加水分解でも、加熱による凝集性を変化させることが明らかになった。

## 2) 各種酵素処理によるWPC-34の限定分解物の性状 (加熱処理による酵素反応停止)

実用的な食品への酵素処理を念頭に置いて、酵素反応の停止を酵素阻害剤のPMSF添加ではなくて、90℃で20分間の加熱により酵素反応を停止させた。図7および8には、トリプシン処理による分解のSDS-PAGEパターンを示した。0.5mg/mlの酵素濃度では顕著な分解は観察されないが、1mg/mlになると酵素処理2分間でBSAは全て分解し、 $\beta$ -Lgおよび $\alpha$ -Laも徐々に減少する傾向が認められた。フレーバーザイム処理によるWPC-34の分解の経時変化を図9および図10に示した。0.5mg/mlのフレーバーザイム添加で $\beta$ -Lgのかなりはやいバンドの減少が見られ、1mg/mlの添加では分解2分間で矢印で示したバンドが出現してきた。また、30分間の処理でほぼ完全に分解が進行した。アルカラゼ処理によるSDS-PAGEパターンでも0.1mg/mlの少量の酵素の添加で、フレーバーザイムと同様に矢印に示す低分子量の領域のバンドが認められた (図11)。0.5mg/mlの酵素処理では非常に急速にタンパク質成分の分解が進み、特に $\beta$ -Lgは2分間の処理で完全な分解が認められた (図12)。トリプシンとフレーバーザイムおよびアルカラゼは反応温度も反応pHも異なり、また純度も異なるために比較はできないが、本実験の条件で比較すると、トリプシンよりもフレーバーザイムおよびアルカラゼの方がWPC-34の分解には効果的であった。最初の実験系では酵素阻害剤PMSFの添加で反応を停止させたために、限定分解の様式を呈している。

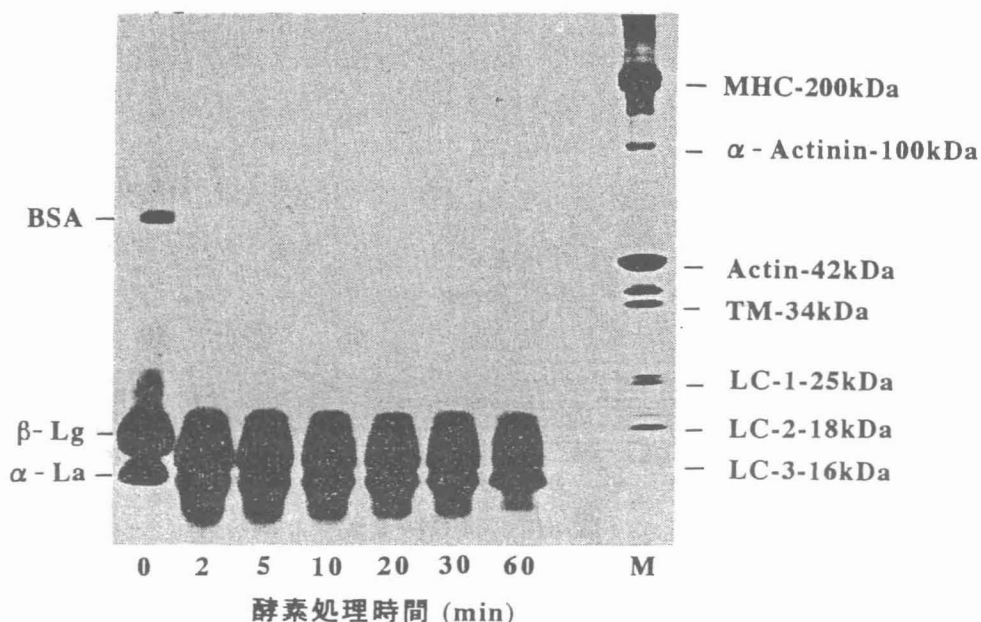


図7 トリプシン処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン  
酵素濃度 ; 0.5 mg/ml

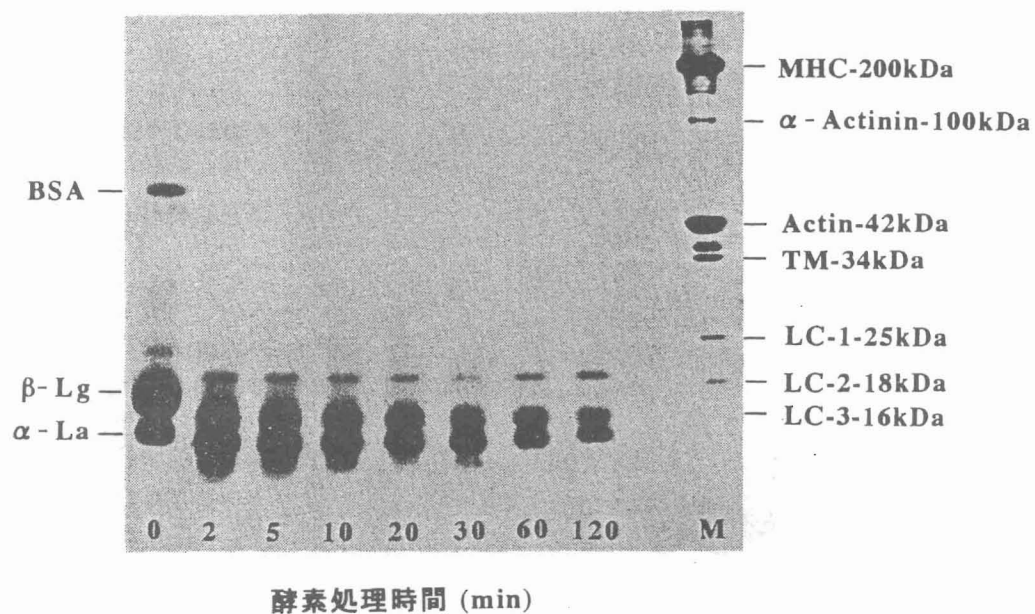


図8 トリプシン処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン  
酵素濃度：1.0 mg/ml

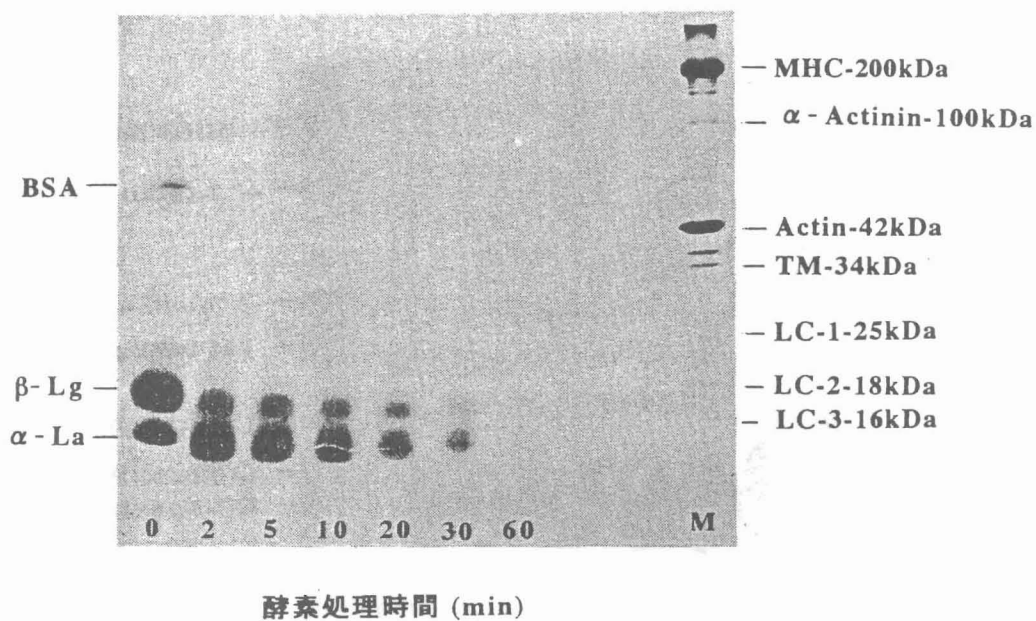


図9 フレーバザイム処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン  
酵素濃度；0.5 mg/ml



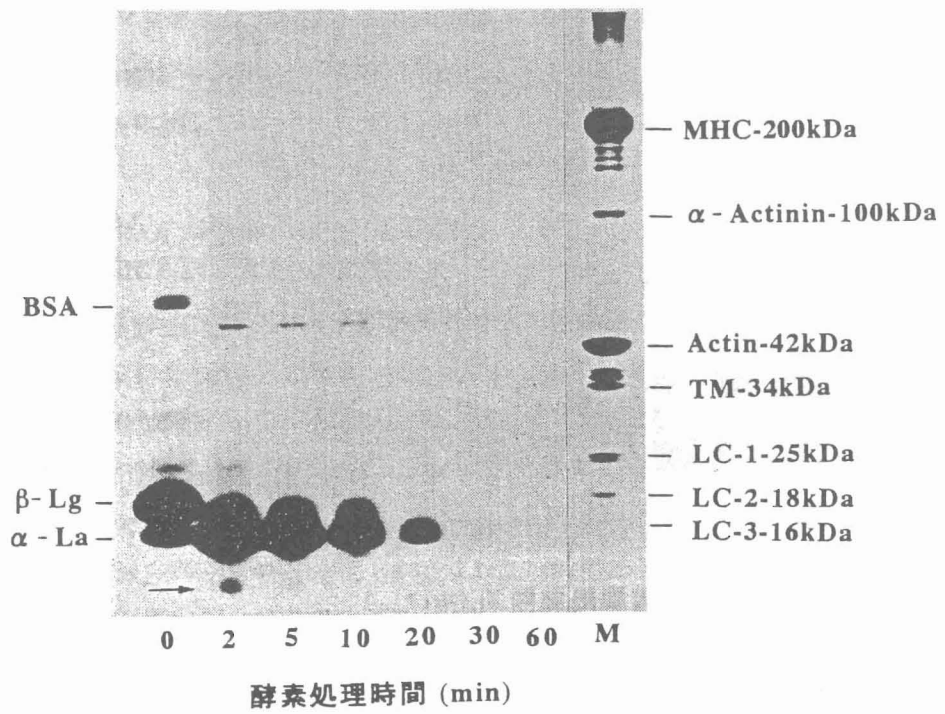


図10 フレーバピザム処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン  
酵素濃度 ; 1.0 mg/ml

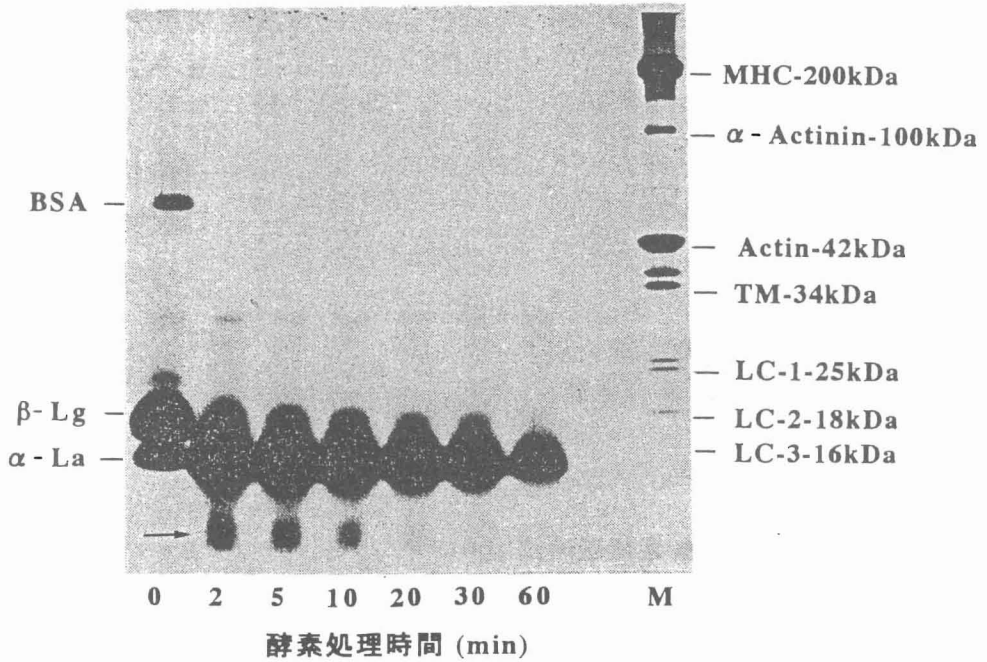


図11 アルカラーゼ処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン  
酵素濃度 ; 0.1 mg/ml

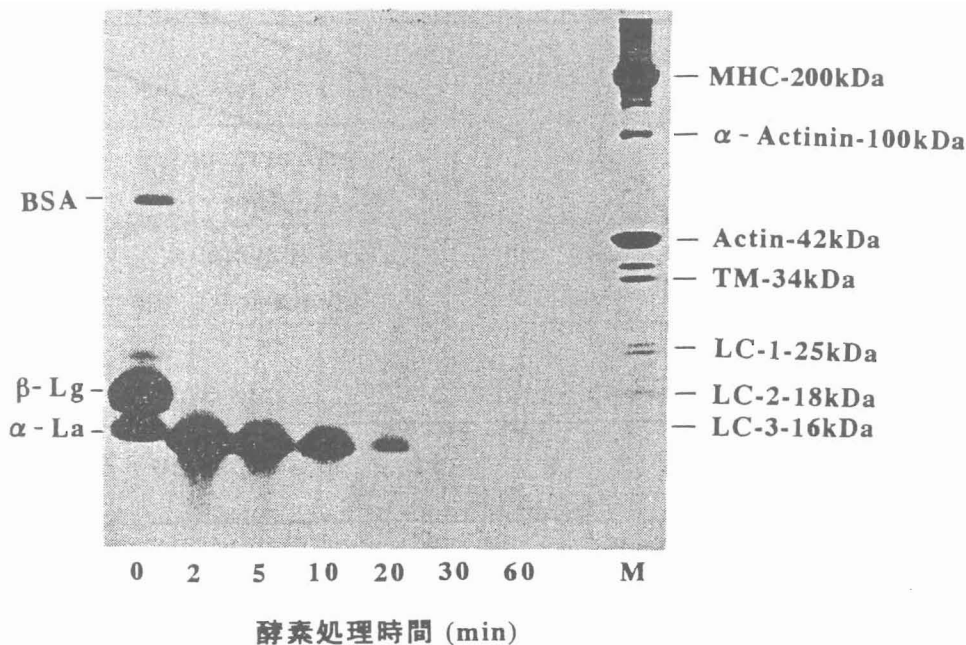


図12 アルカラーゼ処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン

酵素濃度 ; 0.5 mg/ml

この項では、酵素反応後90℃に温度を上昇させて反応を停止させるために、特に温度上昇過程で残存酵素による酵素分解が進行する可能性もあり、PMSF添加による酵素反応の停止よりも加熱による酵素反応の停止の方が、WPC-34の分解より進行したものと考えられる。

### 3) フレーバーザイムおよびアルカラーゼ処理によるWPC-34分解物の性状

上記の実験では各酵素を単独で使用したが、以下の実験では酵素分解が速いフレーバーザイムおよびアルカラーゼを混合して使用し、酵素分解物をある程度量的に必要とすることから、大量の反応系で行った。

酵素反応は10% (100mg/ml) のWPC-34溶液に0.042% (0.42mg/ml) のフレーバーザイムと0.02% (0.2mg/ml) のアルカラーゼを混合して同時添加し、加水分解率を求めたところ、5時間で約50%、24時間で90%以上の分解が認められた (図13)。

HPLC分析で5時間の混合酵素処理でコントロールに見られたピークはすべてなくなり、カラムからの溶出が遅れてくるバンドが沢山出現した。さらに24時間の加水分解では、カラムからの溶出時間が約47分の非常に小さなペプチドと思われるピークが主要なバンドを占めるようになった (図14)。

図15にはフレーバーザイムとアルカラーゼ同時処理によるWPC-34の分解の経時変化のSDS-PAGEパターンを示した。BSA、 $\beta$ -Lgおよび $\alpha$ -Laは、5時間処理ですべての分解が進行していることが認められた。さらに24時間処理では染色試薬のC.B.B.で染まるバンドが殆ど消失していた。トリシンシステムで電気泳動し、銀染色によりバンドを染色すると、フレーバーザイムとアルカラーゼ同時処理により5時間分解すると、矢印に示した分子量7.0kDa~7.8kDaの新たなバンドが出現していた (図16)。

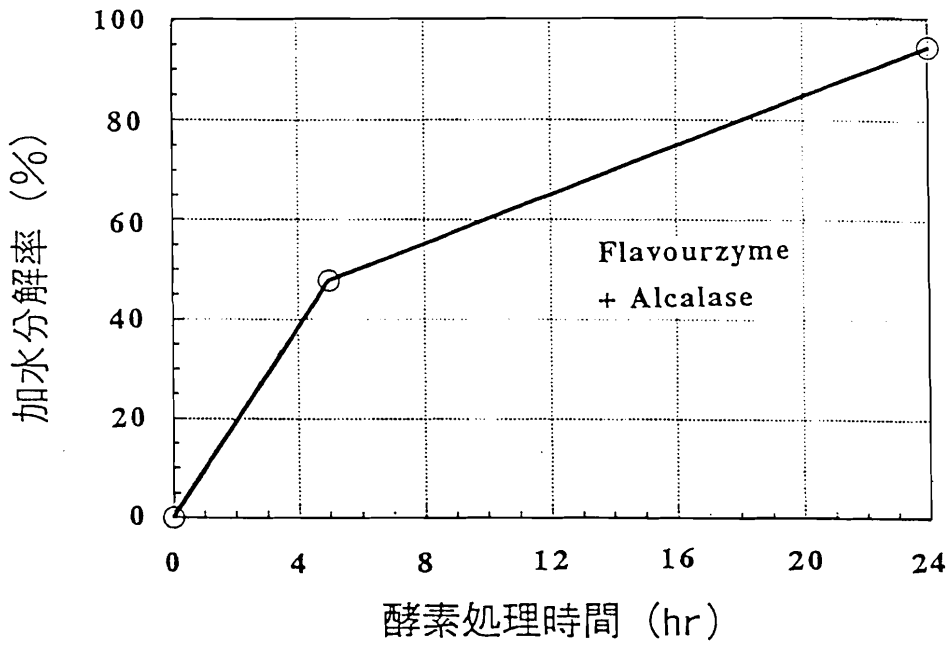


図13 WPC-34の加水分解率に及ぼすフレーバーザイムとアルカラゼ同時処理の影響

WPC-34 濃度 ; 10%

酵素濃度 ; フレーバーザイム (0.042%) + アルカラゼ (0.02%)

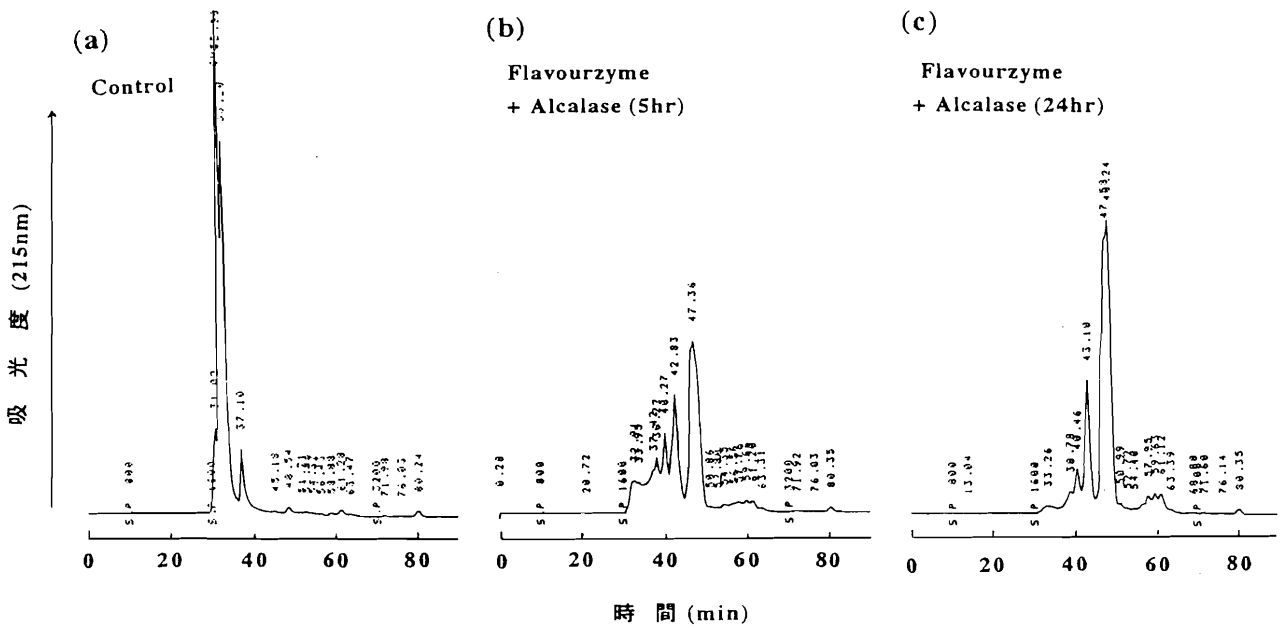


図14 WPC-34のフレーバーザイムとアルカラゼ同時処理試料のHPLC分析

カラム ; TSKgel G2000SW, 7.8mmI.D. × 30cl

溶出液 ; 0.1% TFA + 45% アセトニトリル

速度 ; 0.2 ml/min

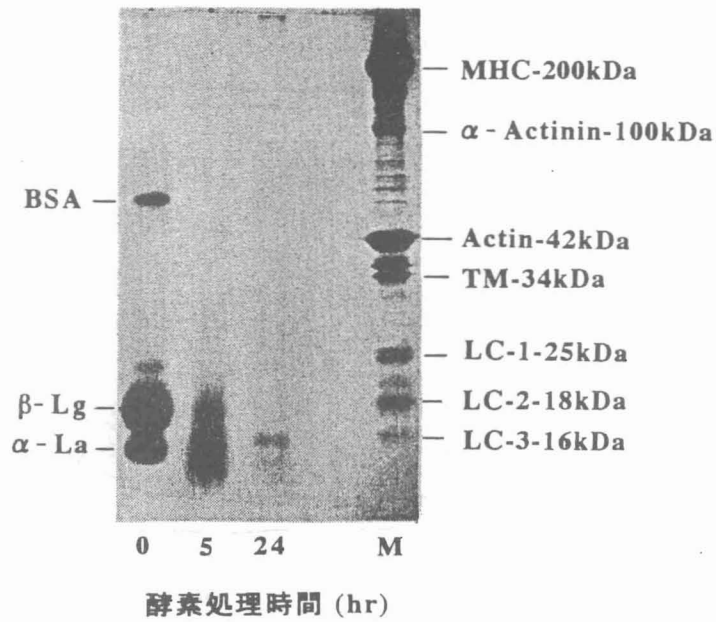


図15 フレーバザイムとアルカララーゼ同時処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン

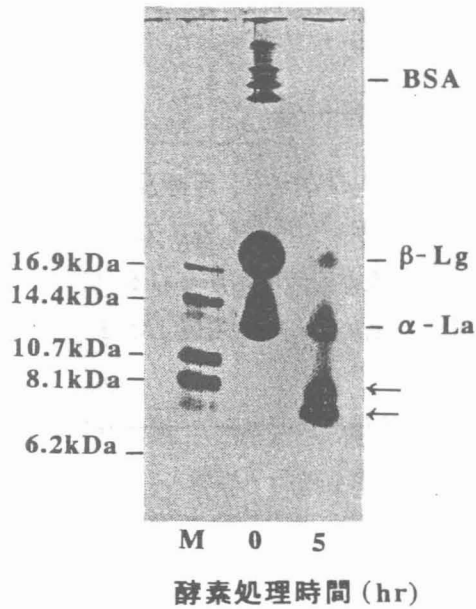


図16 フレーバザイムとアルカララーゼ同時処理によるWPC-34の分解の経時変化を示すSDS-PAGEパターン (トリシロシステム)

24時間処理では、トリシンシステムで電気泳動し、銀染色によりバンドを染色しても明瞭なバンドは観察されなかった。この結果は、おそらく様々な分子量の小さなペプチドが混在していることを予想させる。

フレーバザイムとアルカララーゼ同時処理により得られた分解物の加熱による濁度変化を直線的温度上昇法により検討した (図17)。コントロールで濁度の発生が明瞭に分かる5.0の低いpHの条件で検討したが、

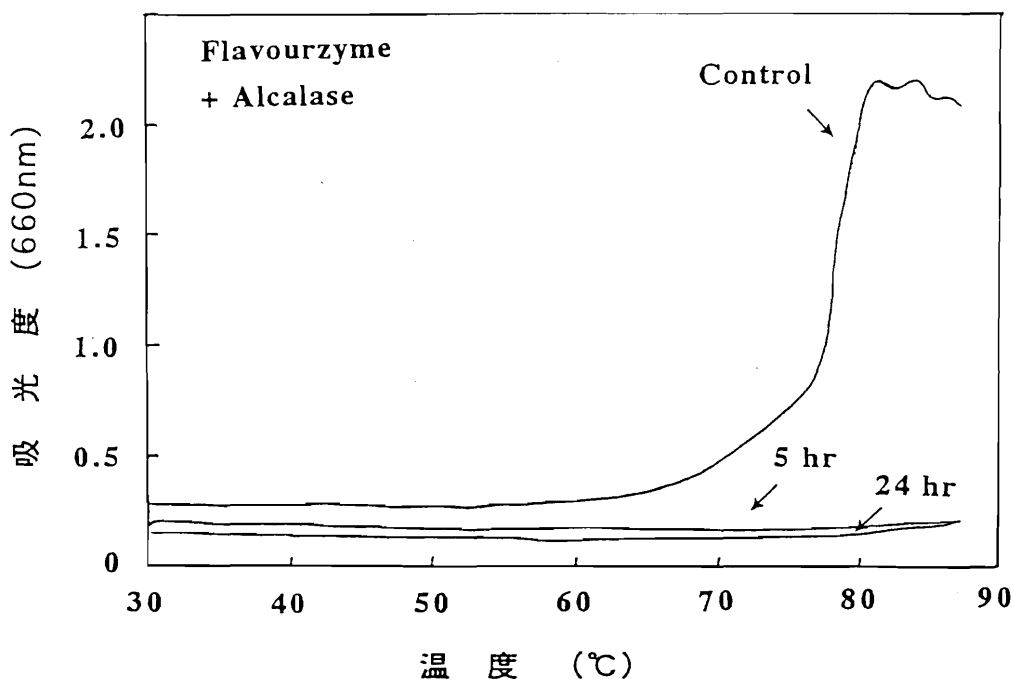


図17 直線的溫度上昇法によるWPC-34の濁度の変化に及ぼすフレーバーザイムとアルカララーゼ同時処理の影響

反応条件；50mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 5.0)  
 試料濃度；3 mg/ml  
 加熱速度；2 °C/分  
 測定温度範囲；30～95°C

5時間および24時間共に濁度の発生は認められなかった。このことは、本実験条件下のタンパク質濃度では、分散している加水分解ペプチドは加熱により互いに凝集しないことを示唆している。一般的にホエータンパク質濃縮物(WPC)は溶解性が低いことが負の要因と考えられるが、WPC-34標品も同様の傾向が認められることから、酵素処理はWPCの溶解性を高め、利用性を向上させるものと考えられる。

#### 4) フレーバーザイムおよびアルカララーゼ処理によるWPC-34分解物の機能性

次に、実際の試食用ソーセージの製造を豚肉を用いて作製し、原料肉の10%のWPCあるいはWPC酵素分解物を添加してレオロジー特性を検討した。

いずれも8サンプルの測定から得られた値を統計処理して求めたものである。まず、破断応力に及ぼす酵素分解物添加の影響を検討した結果、破断応力はコントロールと5時間の酵素処理分解物添加との間に殆ど差異は認められないが、24時間処理分解物を添加すると、破断応力の低下が認められた(図18)。破断エネルギーに及ぼす影響でも破断応力の結果とほぼ同じ傾向が認められ、24時間の酵素処理ではコントロールと比較して、その値のかなりの低下が認められた(図19)。さらに測定値のばらつきが著しく減少することが明らかになった。歪率の結果も同様の傾向が観察された(図20)。これらの結果から、酵素分解ホエータンパク質の添加により、より均一なレオロジー特性を有する食肉製品の製造ができるものと考えられる。また、長時間の酵素処理分解物の添加では、高齢者の咀嚼機能に適合した食肉製品の製造にも貢献する可能性が認められた。

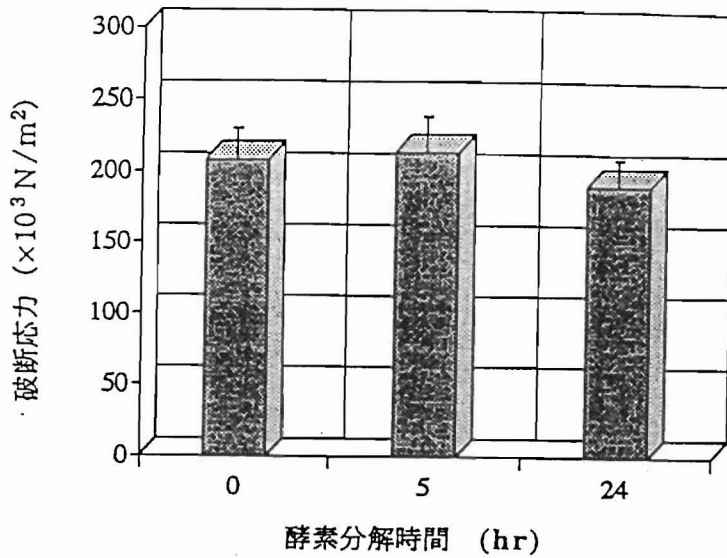


図18 ポークソーセージの破断応力に及ぼすフレーバーザイムとアルカラゼ同時処理WPC-34分解物添加の影響

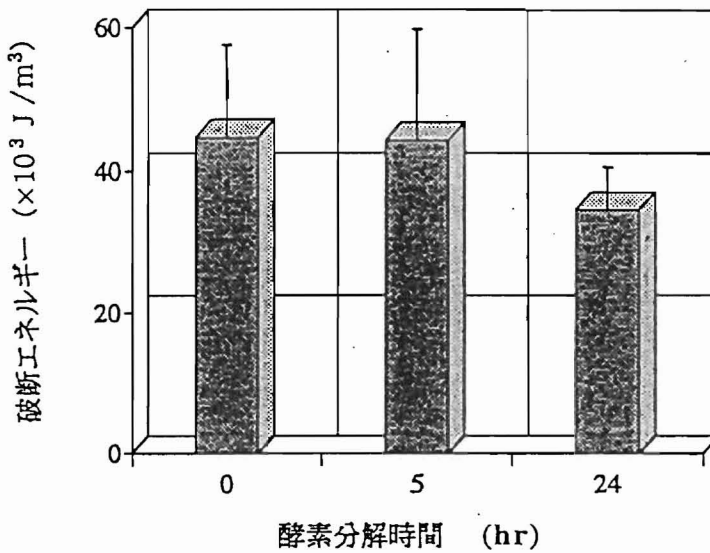


図19 ポークソーセージの破断エネルギーに及ぼすフレーバーザイムとアルカラゼ同時処理WPC-34分解物添加の影響

7人のパネラーによる試食では、酵素分解物の添加は10%とかなり多量に添加しているにもかかわらず、好評であった。今後はさらに詳細な官能検査を実施する予定である。

現在、食肉製品製造に際しては、商品価値を高め購買意欲を出すために、赤み色を増し、それを保持する添加剤として亜硝酸塩が使用されている。一方、亜硝酸塩は発癌物質（ニトロソアミン）を生成する可能性があることが見いだされ、その使用をできるだけ抑制するべきであると指摘されている。一部には、亜硝酸塩無添加の製品も製造されているが、商品の棚持ち寿命は短く、また完全なコールドチェーンの流通システ

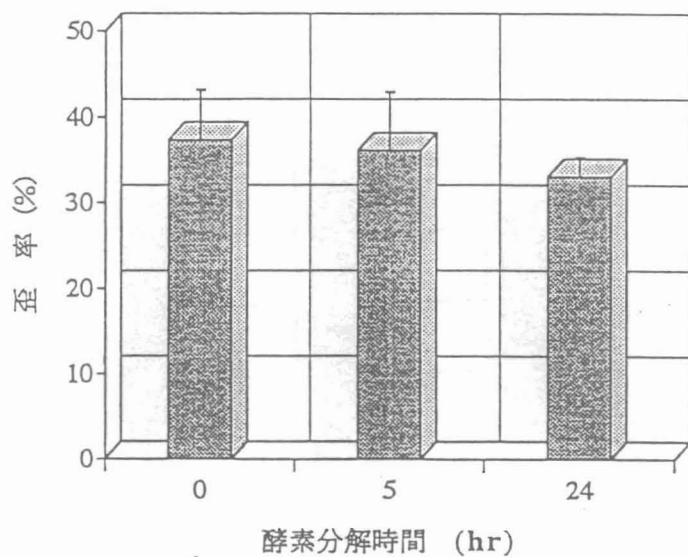


図20 ポークソーセージの歪率に及ぼすフレーバーザイムとアルカラゼ同時処理WPC-34分解物添加の影響

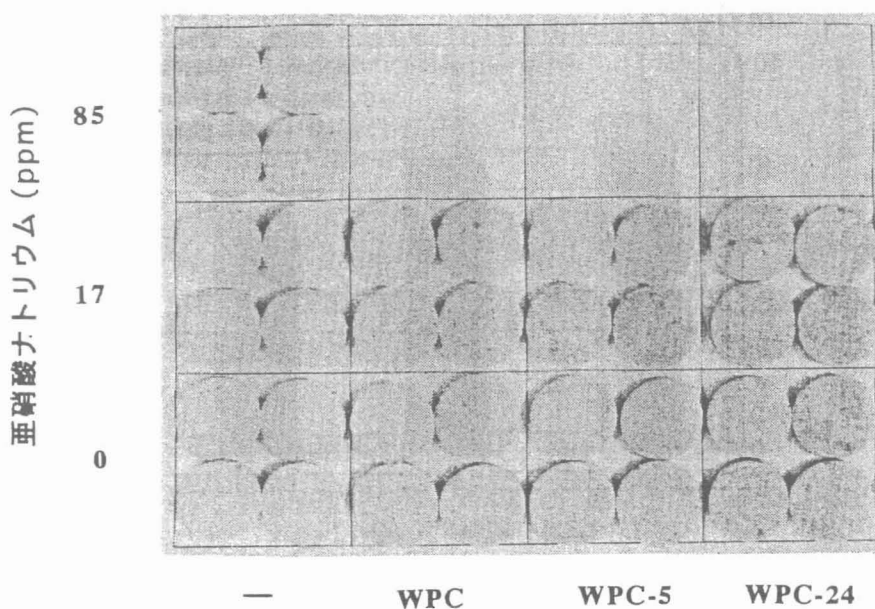


図21 フレーバーザイムとアルカラゼ同時処理WPC-34分解物添加のポークソーセージの発色効果

ムが必要なこともあり、まだ多くの問題点が残されている。ある程度の食味をそそるためにも発色、保色効果を保つことは重要と考えられる。

そこで、亜硝酸塩の使用量を減少させて、効果的な発色促進および保色作用のある、天然由来物の発色助剤の開発が望まれている。

図21はポークソーセージの発色に及ぼす酵素処理分解物の効果を示したカラー写真である。また、図22に

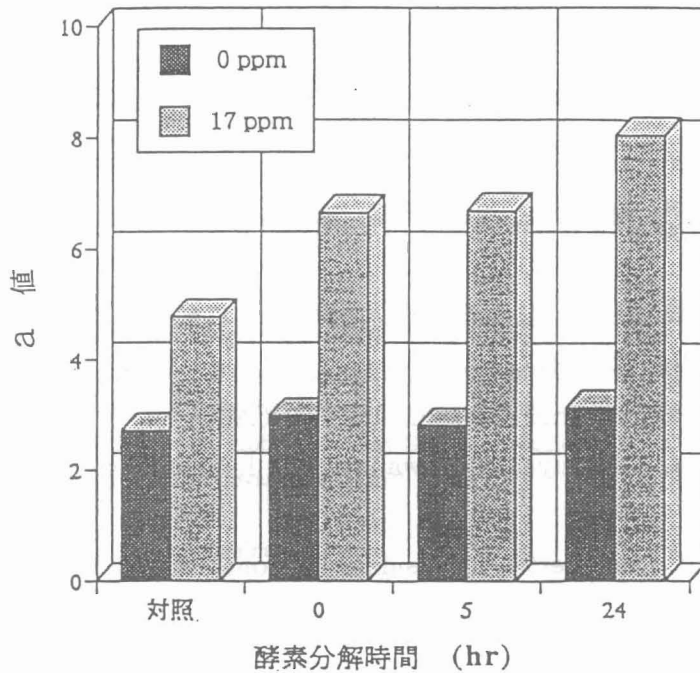


図22 フレーバーザイムとアルカラゼ同時処理 WPC-34 分解物添加の  
ポークソーセージの a 値に及ぼす効果

は分光測色計により測定した a 値（赤み）を示した。これらの結果から、亜硝酸塩無添加でも WPC-34 の酵素処理分解物を添加すると赤みを増す傾向があり、亜硝酸 Na 含量が 17 ppm でも酵素分解物を添加すると、亜硝酸 Na のみを 85 ppm 添加した時以上に赤みが促進することが認められた。

以上の結果から、ホエータンパク質を酵素処理することにより、ホエータンパク質が本来有している、必須アミノ酸バランスに優れた、栄養性も十分に持った、しかも新たな機能が付与されて付加価値の向上した新規な乳肉製品製造の可能性が高まった。

今後は、さらに酵素分解物中に含まれる肉製品の発色促進物質の検索と、その発色促進機構の解明が早急に望まれる。また、酵素分解と同時に乳酸発酵による製品の改質をてがける予定である。

## 文 献

- 1) 藤野博史、六車三治男、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、40、309 (1993)
- 2) 藤野博史、六車三治男、伊藤肇躬、大橋登美男：酪農科学・食品の研究、42, A-117 (1993)
- 3) 六車三治男：平成 5 年度基盤技術研究成果報告所（財団法人九州産業技術センター）、40 (1994)
- 4) 藤野博史、六車三治男、森 和彦、津江野大輔、笹木明弘、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、42、756 (1995)



- 5) 藤野博史、六車三治男、緒方朋子、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、42、762 (1995)
- 6) 藤野博史、六車三治男、鬼木浩子、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、42、769 (1995)
- 7) 六車治男、藤野博史、津江野大輔、鬼木浩子：平成7年度畜産物需要開発調査研究事業報告書（畜産振興事業団）、389 (1996)
- 8) 川谷さよ子、六車三治男、藤野博史、津江野大輔、鬼木浩子、伊藤肇躬：第92回日本畜産学会講演要旨集、p32 (1997)
- 9) 六車三治男、坂本季美枝、沼田正寛、山田浩之、中村豊郎：日食工誌、37、446 (1990)
- 10) U. K. Laemmli : Nature, 227, 680 (1970)
- 11) H. Schagger and G. Jagou : Anal.Biochem., 166, 368 (1987)
- 12) K.Sato, M. Nakamura, T.Nishiya, M. Kawanari, and I. Nakajima : Milchwissenschaft, 51, 324 (1996)
- 13) C. Blecker, M. Paquot, I.Lamberti, A. Sensidoni, G. Lonay and C. Deroanne : J. Food Sci., 62, 48 (1997)

# 酵素処理および乳酸発酵による機能改善 乳ホエータンパク質製品の開発

六車 三治男、山内 清、河原 聡（宮崎大学農学部）

大橋 登美男（九州栄養福祉大学）

農 新介（オーム乳業（株）開発部）

杉田 浩一（（社）宮崎県JA食品開発研究所）

# 要 旨

## 目 的

ホエータンパク質製品の効果的な利用法の開発を目的に、タンパク質含量が34%のホエータンパク質濃縮物（WPC-34）に焦点をあてて、その製品の基本的な特性の把握を行ってきた。その結果、WPC-34単独標品は優れたゲル形性能を保持し、肉製品へ添加すると、良好なテクスチャー特性を有し、さらに官能特性の好ましい食肉製品が製造された。このように WPC-34はそれ単独でも十分に利用できることが明らかになったが、さらに酵素処理により機能性の改善を行った。酵素分解ホエータンパク質製品を豚肉ソーセージに添加するとレオロジー特性を改善し、さらに、亜硝酸塩の使用量を減少させても効果的な発色促進および保色作用が認められる製品ができることから、WPC-34を酵素処理すると乳タンパク質から調製される天然物由来の発色助剤開発の可能性が認められた。

そこで今回は、さらに酵素処理についても検討を進めると共に乳酸発酵も行うことにより、WPC-34製品のさらなる機能性の改善を試みたので得られた知見を報告する。

## 実験方法

WPC-34標品をフレーバーザイム、アルカラゼおよびトリプシンを用いて酵素分解を行った。一部の試料は酵素分解の後、乳酸発酵を行った。各種酵素による分解率は、酵素反応後の溶液にトリクロロ酢酸（TCA）溶液を添加するTCA沈殿法により求めた。酵素分解標品の分解様式は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）や電気泳動法を用いてタンパク質成分の分子種や分子量を同定することにより検討した。酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品を添加したソーセージの破断強度の測定や、それらの添加によるソーセージの発色試験も行った。さらに、それらの生体防御促進効果についてもマクロファージの貪食能を指標に求めた。

## 結果および考察

WPC-34を酵素処理すると WPC の負の要因と考えられている低い溶解性を改善する効果が認められた。また、酵素分解標品は低分子化してもゲル化剤として必要な、ある程度の表面疎水性を有していた。豚肉を用いて原料肉の10%の WPC 酵素分解製品（フレーバーザイムおよびアルカラゼの混合分解物）あるいは酵素分解・乳酸発酵製品を添加してソーセージを作製しレオロジー特性を検討したところ、レオロジー特性が均一な破断強度の低下した製品が得られ、高齢者の咀嚼機能に優しい食肉製品を製造できることが明らかになった。次いで食肉製品を製造する際に、WPC-34の酵素分解製品あるいは酵素分解・乳酸発酵製品を添加すると、亜硝酸塩の使用量を減少しても、それらの製品は効果的な発色促進および保色作用を有していた。この事は天然物である乳由来の肉製品の発色助剤が製造できる可能性を示唆している。さらに、WPC-34にはマクロファージの貪食能を活性化させる因子が存在し、その活性化能は酵素処理により高められことや、添加濃度依存性も認められた。

以上の結果から、ホエータンパク質を酵素処理や乳酸発酵することにより、ホエータンパク質が本来有している必須アミノ酸バランスに優れて栄養価値が高く、しかもレオロジー特性も改善される製品が得られた。さらに、亜硝酸塩を低減させても良好な発色を示すとともに、生体防御機能を向上させるような付加価値が著しく付与された新規な乳肉製品製造の可能性が示唆された。

## 1 目的

ホエータンパク質はチーズやカゼイン製造時の副産物として得られる乳中のタンパク質であり、高い栄養価とゲル化性、気泡性、乳化性、保水性を有していることから、優れた食品用ゲル化剤あるいは増粘安定剤であると考えられている。現在まで私共は、比較的タンパク質含量の高いホエータンパク質濃縮物(WPC)やホエータンパク質分離物(WPI)について、それらの基本的な性状の把握や機能改善に関する研究を行ってきた<sup>1-6)</sup>。近年、日本国内へのホエータンパク質製品の輸入拡大が求められ、しかもタンパク質含量が低く品質が劣ると考えられている製品の輸入量が増えてきたことから、それらの製品の効果的な利用法の開発が必要となってきた。そこで、それらの製品の利用拡大につながる付加価値が高められた製品の開発を目的に、タンパク質含量が34%のホエータンパク質濃縮物(WPC-34)に焦点をあてて、その製品の基本的な特性の把握を行ってきた。その結果、WPC-34単独標品は優れたゲル形性能を保持し、肉製品へ添加すると、良好なテクスチャー特性を有し、さらに官能特性の好ましい食肉製品が製造された<sup>7,8)</sup>。このようにWPC-34はそれ単独でも十分に利用できることが明らかになったが、さらに酵素処理により機能性の改善を行った。酵素分解ホエータンパク質製品を豚肉ソーセージに添加するとレオロジー特性を改善し、さらに、亜硝酸塩の使用量を減少させても効果的な発色促進および保色作用が認められる製品ができることから、天然物由来の発色助剤開発の可能性が認められた<sup>9-12)</sup>。

そこで今回は、さらに酵素処理を検討し乳酸発酵も行うことにより、WPC-34製品のさらなる機能性の改善を試みたので得られた知見を報告する。

## 2 実験方法

### 1) 実験材料

WPC-34は農畜産業振興事業団よりご提供いただいた。ソーセージ製造用の原料肉は豚肉のモモの部位を使用した。

### 2) WPC-34の各種酵素による加水分解

#### (1) 使用した酵素

- フレーバーザイム；フレーバーザイムは中性あるいは弱酸性下でタンパク質を加水分解させるために開発されたカビ起源の酵素製剤である。すなわちエンド型プロテアーゼとエキソ型プロテアーゼの両活性を有する複合酵素である。
- アルカラーゼ；アルカラーゼはすべての種類のタンパク質の加水分解のために開発された非常に効率の優れた細菌由来のプロテアーゼである。その主要な酵素成分はサブティリシンAであり、活性中心はセリンのエンド型プロテアーゼである。
- トリプシン；トリプシンはタンパク質のアルギニンとリシンのC-末端側を切断するエンド型プロテアーゼである。

#### (2) 酵素処理方法

WPC-34を10%濃度になるように蒸留水に溶解して8,000rpmで30分間遠心後その上清画分を試料とし

た。3種類の酵素は溶液状態になるように溶解して、タンパク質濃度を測定して使用した。酵素反応条件はWPC-34を20mg/ml濃度になるように添加して、20mM Imidazole-HCl緩衝液でpHを調整した。フレーバーザイムは50℃で pH7.0、アルカラーゼは50℃で pH7.5、トリプシンは37℃で pH7.5の条件下で反応させた。酵素反応は酵素の阻害剤である PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) を添加して停止させた。さらに肉製品への添加実験や生体防御促進効果を検出するために、10%濃度の WPC-34の溶液を65℃で30分間低温殺菌し50℃にした後に、フレーバーザイム (0.042%) とアルカラーゼ (0.02%) を添加して攪拌させながら分解した。実用性を考慮に入れて、1時間後、5時間後および24時間後に、90℃で20分間加熱して酵素反応を停止させ、凍結乾燥を行った。

### 3) 酵素分解製品のエタノール沈殿による可溶化処理

WPC-34の水溶液にフレーバーザイム (0.042%) とアルカラーゼ (0.02%) の酵素を同時に添加して50℃で5時間分解した製品に対して、等量のエタノールを添加して沈殿してくる成分を5,000回転で20分間遠心分離することにより不溶物を除去した。

### 4) 酵素分解製品の乳酸発酵

フレーバーザイムおよびアルカラーゼで5時間酵素処理後の試料に、*L. burgaricus*, *L. helveticus* および *Str. thermophilus* の各乳酸菌をそれぞれ1%接種し、37℃で6時間発酵させた。その後、80℃で20分間加熱して乳酸菌を失活させて凍結乾燥を行った。

### 5) 酵素処理による分解率の測定

酵素による分解率は、酵素反応後の溶液に冷却したトリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を、終濃度が5%になるように添加して30分間放置後、12,000rpm で40分間遠心して得られた上清画分の吸収 (280nm) を測定することにより求めた。

### 6) 高速液体クロマトグラフィーによる分析

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析は、TSKgel G2000SWXL カラム (7.8mmI.D. x 30cm) を Waters の LC Module 1 型の高速液体クロマトグラフィー装置に接続して、溶出液として0.1%TFA+45%アセトニトリルのイソクラティック溶出法で分析した。

### 7) 電気泳動による分析

タンパク質成分の分子種や酵素分解の程度は、2種類の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法 (SDS-PAGE) により同定した。即ち、一つは Laemmli の方法<sup>13)</sup>で、アクリルアミド濃度7.5~17.5%のグラジエントゲルでスラブ型の泳動槽を用いて行った。ゲルバンドの染色は C.B.B. (Coomassie Brilliant Blue R-250) により行った。もう一つは低分子量の成分の分画に適しているトリシンシステム<sup>14)</sup>によりミニゲルを用いて行った。ゲルバンドの染色は感度の高い銀染色を行った。また、Nile Red (Nile Blue A Oxazone) による染色法<sup>15)</sup>により、疎水性のバンドを検出した。

### 8) 豚肉ソーセージの破断強度の測定

豚肉100gに15gの水と食塩1.5%、0.3%リン酸塩、香辛料0.2%、砂糖1%および馬鈴薯澱粉3%を添加し、スピードカッターでホモジナイズした。WPC-34あるいはその酵素分解製品は豚肉と置換して10g添加した。それらのソーセージミックスを塩蔵豚腸に詰めた後、スモークハウスで乾燥(65℃、10分間)、スチームボイル(73℃、20分間)およびスモーク(65℃、15分間)し、山電のRE-33005型クリープメーターにより破断強度を測定した。

### 9) 豚肉ソーセージの発色試験

豚肉100gに15gの水と食塩2%を加え、亜硝酸Naの添加量を0、20、85ppmと変化させてWPC-34酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品を豚肉と置換して10g添加しケイシングに充填後、実験8と同様の方法でソーセージを製造した。ソーセージ切断面のカラー写真を撮影するとともに発色の程度はミノルタ分光測色計CM-508dにより測定した。

### 10) マクロファージの貪食能の測定

マウス由来マクロファージ様細胞株J771A.1(理研細胞開発銀行)を使用し、5%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地で $5 \times 10^5$  cells/mlの濃度になるように懸濁後、滅菌済みカバーグラスをあらかじめ入れたディッシュに移した。濃度を調整した検査試料を添加して、CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベーター中にて37℃で20時間培養し、Molecular Probes, Inc.より購入した蛍光ラテックスビーズを $1 \times 10^7$ 個/mlの割合になるように添加して2時間培養した。培地を除去し洗浄後、カバーグラスを取り出してメタノールで固定した。ジクロロメタンで細胞外のビーズを溶解し、グリセロールでスライドグラスに封入後、ニコン蛍光顕微鏡VFD-TRを用いて付着している細胞数およびそれらに取り込まれているビーズの数を測定した。マクロファージの貪食能(%)は細胞に取り込まれているビーズの数を全細胞数で割り100を乗じて求めた<sup>16,17)</sup>。

## 3 結果および考察

### 1. WPC-34の化学組成

今回本研究で用いたホエータンパク質濃縮物(WPC-34)はDomo社製で、その一般化学組成を表1に示した。初回報告した米国製の製品と基本的にはほぼ同じで、タンパク質含量が約34%、脂肪3.9%、灰分6.7%、水分4.7%、乳糖50.8%であった。その他にカルシウム、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、リン等を含有していた。ホエータンパク質分離物(WPI)や一般的なホエータンパク質濃縮物(WPC)に比較するとタンパク質含量がかなり少なく、乳糖含量が極めて高いことが特徴であった<sup>7)</sup>。しかしホエータンパク質の主要成分の割合に大きな差異はなく、β-ラクトグロブリン(β-Lg)とα-ラクトアルブミン(α-La)

表1 WPC-34の化学組成

項目	含量
タンパク質 (%)	33.90
脂肪 (%)	3.90
灰分 (%)	6.70
水分 (%)	4.70
乳糖 (%)	50.80
カルシウム (mg/100g)	700
マグネシウム (mg/100g)	100
ナトリウム (mg/100g)	630
カリウム (mg/100g)	1,900
リン (mg/100g)	540
塩素イオン (mg/100g)	12

がそれぞれタンパク質中の約60%および20%を占め、次いで血清アルブミン (BSA) 含量が高く、その他にラクトフェリン、免疫グロブリンやいくつかの微量成分が含まれていた。

## 2. WPC-34の各種酵素による分解様式と分子量分布

まず、今回の実験で用いた WPC-34製品の各種酵素処理による加水分解率を測定した。図1に WPC-34の加水分解率に及ぼす各種酵素処理の影響を示した。WPC-34に対して各酵素をタンパク質濃度を基準に50:1添加して酵素反応を開始させ、酵素反応の停止は酵素の阻害剤である PMSF を添加させる方法を用いた。フレーバーザイムおよびアルカラゼは50℃、pH7.5で、トリプシンは37℃、pH7.5の条件で反応させた。トリプシンは比較的緩やかな分解パターンを示したが、フレーバーザイムおよびアルカラゼはトリプシンよりも約2倍の加水分解率で WPC-34を分解することが認められ、120分間の反応で約60%の加水分解率を示した。

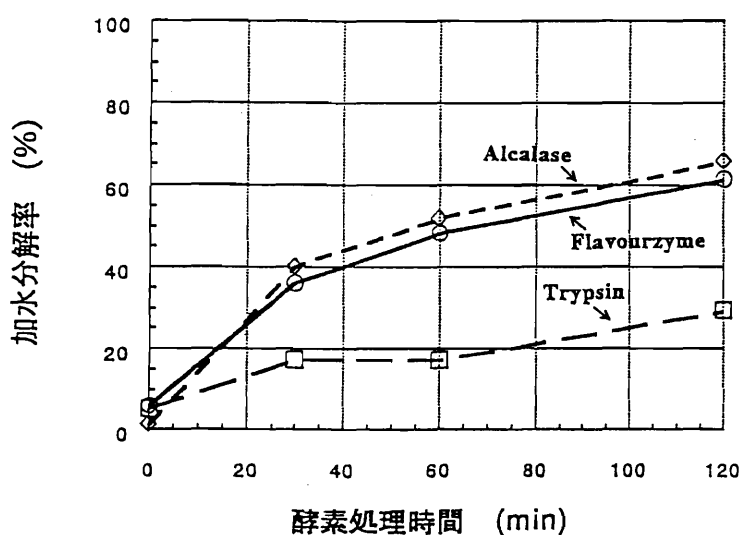


図1 WPC-34の加水分解率に及ぼす各種酵素処理の影響  
WPC-34濃度; 20mg/ml  
酵素濃度; 0.4mg/ml

加水分解物の分子量分布を低分子成分の分画に適しているゲルろ過カ

ラムである TSKgel G2000SWXL カラムを用いた HPLC により分析した。カラムからの分離溶出は、一般的に逆相カラムクロマトグラフィーに用いられるアセトニトリルを含む溶媒系により、イソクラティック溶出法で行った (図2)。分子量マーカーとして、分子量12,400ダルトンのチトクロームと分子量204ダルトンのトリプトファンを用いた。その結果、酵素処理に伴ってカラムからの溶出時間が長くなるピークのバンドが多数出現し、それらの量比が増加することが明らかになった。カラムから溶出してくる時間が長くなるほど低分子化していると考えられることから、120分間の酵素処理で著しく酵素による分解が進行していることが明らかになった。分解の程度はトリプシンよりもフレーバーザイムやアルカラゼで大きいことが認められた。分画パターンから分子量分布を解析すると、120分間の酵素処理後にアミノ酸残基が10個以下のオリゴペプチドが多数を占めることが明らかになった。しかし、アミノ酸残基がそれ以上のポリペプチドもかなりの量残存していた。トリプシンよりもアルカラゼやフレーバーザイム処理により、低分子化されたオリゴペプチドの割合が増加していくことも認められた。図3は各種酵素処理による WPC-34の分解の経時変化を示した SDS-PAGE パターンである。低分子量成分の検出が可能なトリプシンシステムにより泳動し、C.B.B.を用いて染色を行った。フレーバーザイム処理では時間経過に伴う  $\beta$ -Lg や  $\alpha$ -La を含む各バンドの減少が顕著に現れた。アルカラゼ処理ではそれがさらに顕著になり、30分間の処理でほとんどのバンドが5キログルトン以下になった。トリプシン処理では反応開始後  $\beta$ -Lg より高分子量の成分が酵素反応5分間ですでに分解することが認められたが、その後の時間経過に伴う大きな変化は観察されなかった。120分間

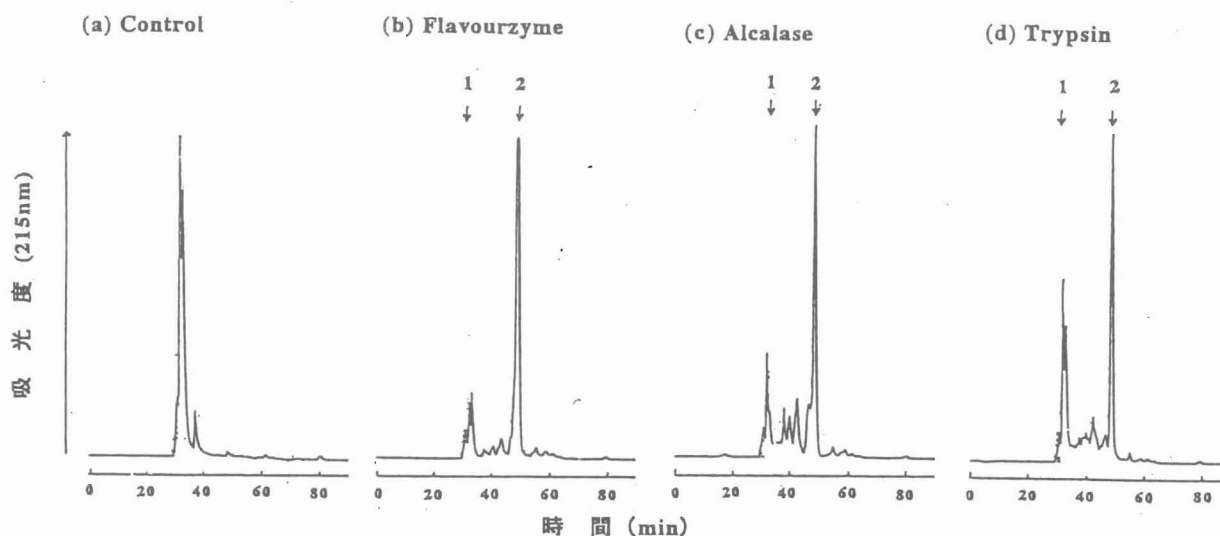


図2 WPC-34の各種酵素処理 (min) による酵素分解物のHPLC分析

分子量マーカー 1 : Cytochrom(12.4kDa) 2 : Tryptophan(204 Da)

カラム ; TSKgel G2000SW, 7.8mm I.D. x 30cm

溶出液 ; 0.1% TFA+45% アセトニトリル

流速 ; 0.2ml/min

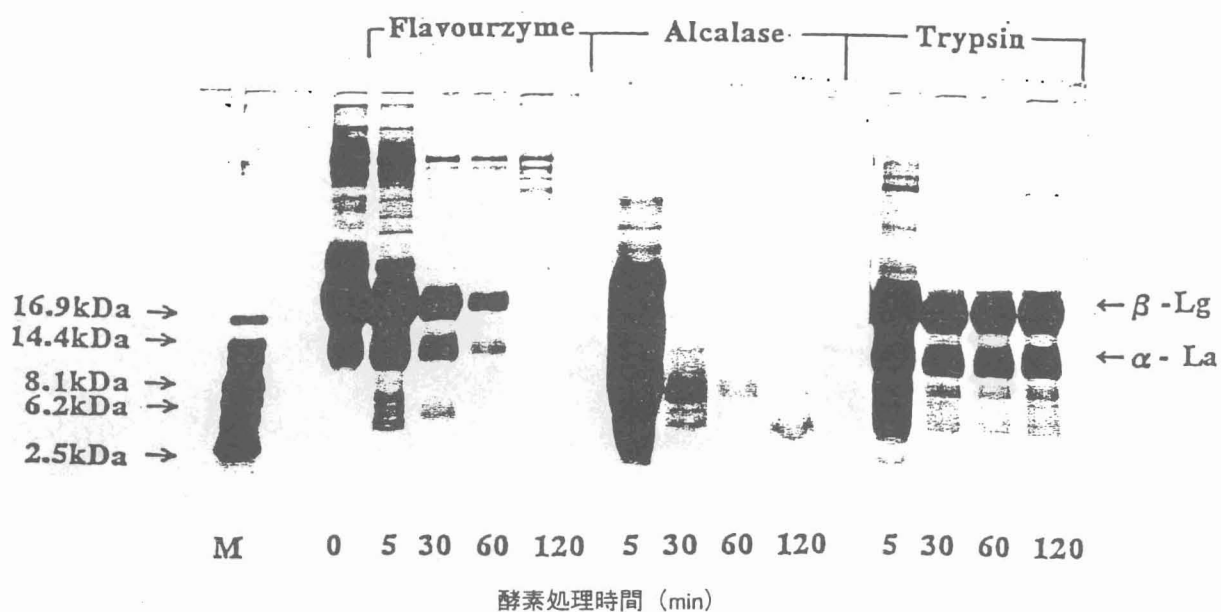


図3 各種酵素処理によるWPC-34の分解の経時変化を示す SDS-PAGE パターン (トリシンシステム)

の処理では  $\alpha$ -La のわずかな減少が観察された。

これらの HPLC 分析および SDS-PAGE パターンの結果から、フレーバーザイムおよびアルカラゼは、分解したポリペプチド鎖を反応時間とともに次々と小さく切断していく反応様式と考えられた。フレーバーザイムおよびアルカラゼのタンパク質分子中のペプチド鎖の詳細な切断箇所はまだ明瞭ではないが、フレーバーザイムはタンパク質のペプチド鎖の内部のペプチド結合を断片化するエンド型プロテアーゼと、ポリペプチド鎖を順次分解するエキソ型プロテアーゼの両活性を有する複合酵素であり、アルカラゼは非常



に効率の良い細菌由来のエンド型プロテアーゼである事が明らかにされている。得られた結果はこれらの反応様式に適合していると考えられた。一方、トリプシンによる分解は初期に反応が進むとその後は顕著な分解が認められなかった。この事は、トリプシンがタンパク質のペプチド鎖中のアルギニンとリシンのC-末端側を断片化するエンド型プロテアーゼであることから、WPC-34の各構成タンパク質成分中の切断箇所は限られており、この結果も理論的に適合していると考えられた。

次に酵素分解物の疎水性について、SDS-PAGE後のゲルをナイルレッド染色することにより検討した。図4に示すようにトリプシンはもとよりフレーバーザイムやアルカラゼにより非常に小さく分解されたバンドも、蛍光発色性のバンドとして白く染色された。ナイルレッドにより染色されたバンドは疎水性を有するとされることから<sup>15)</sup>、加水分解物は低分子化されてもある程度の疎水性を有することが推察された。ホエータンパク質の酵素分解物を食品に添加させ、ゲル化剤や安定化剤として加熱ゲル中で作用させるためには、ある程度の疎水性を有することが必要であると考えられることから、分子量が2,000~4,000の低分子化したポリペプチドが疎水性の性質を保持していることは、食品に添加する素材としては好ましい結果と思われる。

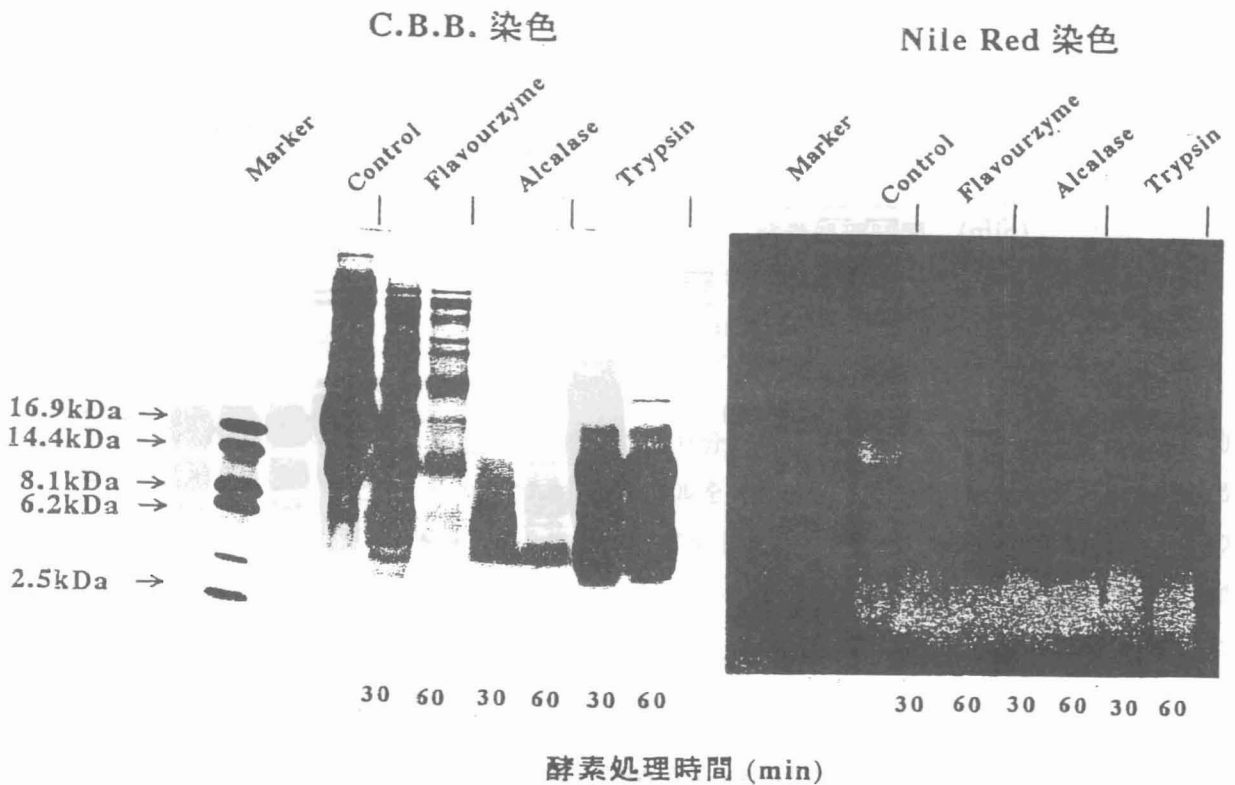


図4 WPC-34の各種酵素処理による SDS-PAGE の染色法による検討 (トリプシンシステム)

### 3. WPC-34の酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品の調製およびそれらの性状の検討

上記の実験結果に基づいて、以下の実験では効率的にタンパク質を小さなペプチドに断片化していくことが明らかになった、食品用に開発されたフレーバーザイムおよびアルカラゼを混合して使用し、WPC-34の酵素分解製品を大量に調製した。さらに5時間の酵素分解製品から乳酸発酵製品も製造した。酵素反応は10%濃度のWPC-34溶液に0.042%のフレーバーザイムと0.02%のアルカラゼを同時に混合して添加し、50℃で反応させた。図5にWPC-34酵素分解製品の加水分解率を示した。5時間の反応で約50%、24時間

で90%以上の高い分解が認められた。

図6に混合酵素により5時間処理した製品(WPC-E)とそれにエタノールを50%濃度になるように添加し、エタノール沈殿により不溶物を除去した製品(WPC-ES)、および5時間酵素処理後に乳酸発酵させた製品(WPC-EL)のHPLC分析パターンを示した。コントロールに見られたピークは5時間の酵素処理で減少し、カラムからの溶出が遅れてくる小さなペプチドを含有していると思われるバンドが沢山現れた。エタノール沈殿により不溶物を除去した

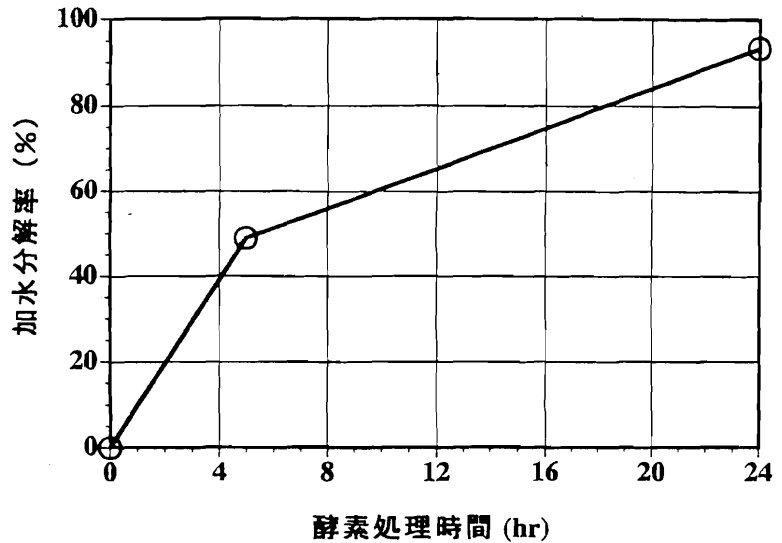


図5 WPC-34酵素分解製品の加水分解率  
WPC-34濃度; 10%  
酵素濃度; フレーバーザイム(0.042%) + アルカラゼ(0.02%)

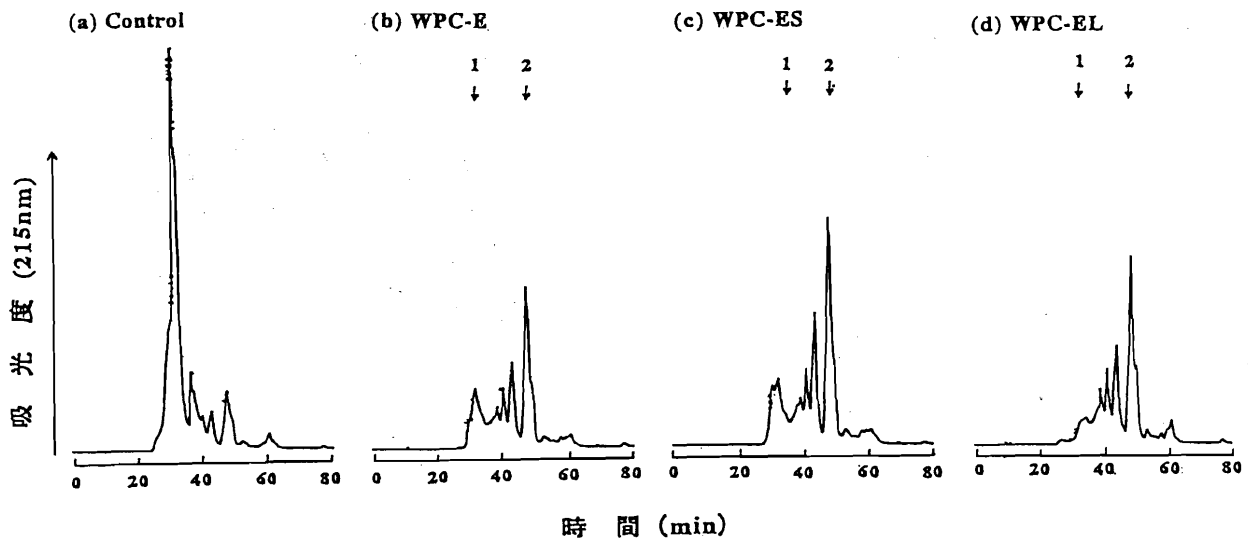


図6 WPC-34の酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品のHPLC分析

分子量マーカー 1: Cytochrom(12.4kDa) 2: Tryptophan(204 Da)

カラム; TSKgel G2000SW, 7.8mm I.D. x 30cm

溶出液; 0.1% TFA+45% アセトニトリル

流速; 0.2ml/min

Control, WPC-34; WPC-E, WPC-34酵素分解物; WPC-ES,

WPC-34酵素分解物の上清画分; WPC-EL, WPC-34酵素分解・乳酸発酵物

酵素分解製品の上清画分や酵素分解・乳酸発酵製品もほぼ同様な溶出パターンを示した。それらのピークにはポリペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸が3個のトリペプチド、2つのアミノ酸がペプチド結合でつながったジペプチドやアミノ酸そのものも含有されていると想定された。図7にはフレーバーザイムとアルカラゼ同時処理によるWPC-34の酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品のSDS-PAGEパターンを示した。ここでは1時間の酵素処理製品の泳動パターンも示したが、 $\beta$ -Lgより大きなBSAやその他のバンドはすでに低分子のバンドに分解されていた。5時間の分解では、 $\beta$ -Lgおよび $\alpha$ -Laともにさらにか

なり分解が進行していくことが認められた。5時間分解製品の上清画分には分子量が4,000付近のバンドが主要な成分として認められた。5時間酵素分解・乳酸発酵製品は基本的には5時間分解製品と顕著な差異は認められなかった。

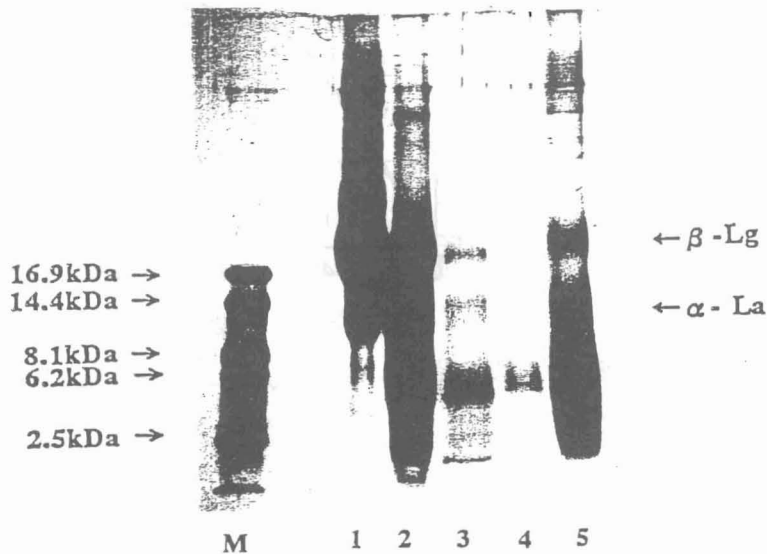


図7 WPC-34の酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品のSDS-PAGEパターン(トリシンシステム)

M, マーカー; 1, WPC-34; 2, WPC-34酵素分解物(1hr); 3, WPC-34酵素分解物(5hr); 4, WPC-34酵素分解物(5hr)の上清画分; 5, WPC-34酵素分解(5hr)・乳酸発酵物

#### 4 WPC-34酵素分解製品の機能性の検討

##### (1) ソーセージのレオロジー特性の改善効果

原料肉の10%を酵素分解製品で置換して豚肉ソーセージを製造し、レオロジー特性を検討した。いずれも10サンプルの測定から得られた値を統計処理して求めた。

まず、破断応力に及ぼす酵素分解製品添加の影響を検討した結果、WPC-34を添加した製品はコントロールに比較して低い破断応力を示した。これは、酵素分解製品添加の効果によるものと考えられた。5時間の酵素処理分解製品を添加するとコントロールに近い値に回復した。酵素分解製品の上清画分を添加すると、破断応力の低下が認められた。

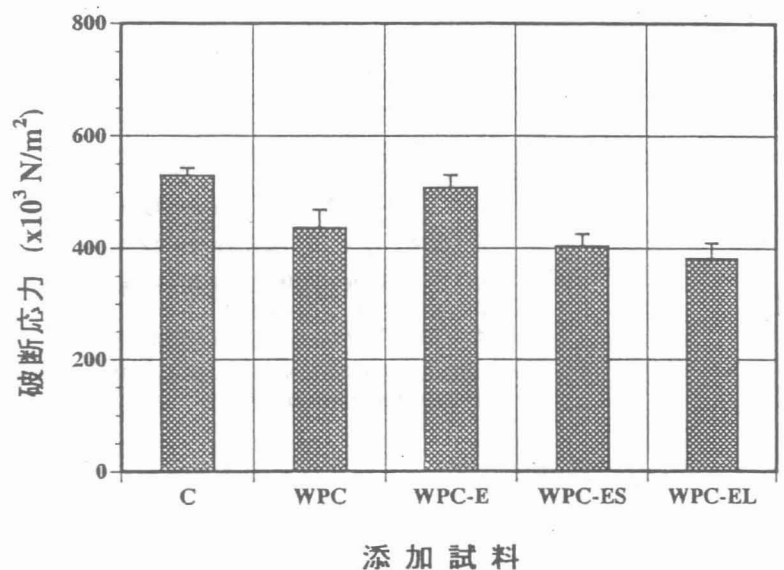


図8 ポークソーセージの破断応力に及ぼすWPC-34酵素分解製品添加の影響

C, 未添加; WPC, WPC-34; WPC-E, WPC-34酵素分解物; WPC-ES, WPC-34酵素分解物の上清画分; WPC-EL, WPC-34酵素分解・乳酸発酵物

また、酵素分解・乳酸発酵製品の添加では、さらに破断応力の低下が観察された(図8)。破断エネルギーに及ぼす影響ではWPC-34、5時間の酵素処理分解製品および酵素分解製品の上清画分の添加は、すべてコントロールの70%程度のほぼ同じ値を示した。酵素分解・乳酸発酵製品を添加すると、コントロールに比較して約50%の低い破断エネルギーを示した。

前回の報告<sup>10)</sup>では、酵素分解ホエータンパク質の添加により、より均一なレオロジー特性を有する食肉製品の製造ができる結果がすでに得られている。さらに、長時間(24hr)

の酵素処理分解製品を添加すると、高齢者の咀嚼機能にあった優しい食肉製品の製造の可能性も認められている。今回の結果からも、酵素分解製品の添加により同様な効果が認められ、特に乳酸発酵製品にその効果の大きいことが新たな知見として得られた。10人のパネラーの試食試験では前回とほぼ同様に、酵素分解製品や酵素分解・乳酸発酵製品を10%豚肉と置換して多量に添加したにもかかわらず、かなり好評な結果が得られた。

## (2) 肉製品の発色助剤としての効果

図10はポークソーセージの発色に及ぼす酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品添加による効果を示したカラー写真である。色の数値化を表色系として見ると、現在あらゆる分野で最もポピュラーに使用されているものにL、a、b表色系がある。それは明度をL、色相と彩度を示す色度をa(赤方向)、b(青方向)で表している。そこで、図11には分光測色計により測定したa値(赤み)を示した。これらの結果から、亜硝酸塩無添加の場合に、WPC-34そのものを添加しても赤みを増加させることが認められた。亜硝酸Naの添加量が20ppmの時に、酵素分解製品、酵素分解製品の上清画分、さらに酵素分解・乳酸発酵製品を添加すると、WPC-34そのものの添加で現れた赤み以上に、その値を増加させていく傾向が認められた。また、各種酵素分解製品を添加すると、亜硝酸Na添加量が85ppmの時以上の赤み促進効果も認められた。

現在、食肉製品製造に際しては、商品価値を高め購買意欲を出すために、赤み色を増し、それを保持する添加剤として亜硝酸塩が使用されている。一方、亜硝酸塩は発癌物質(ニトロソアミン)を生成する可能性があることが見いだされ、その使用をできるだけ抑制すべきであると指摘されている。そこで、亜硝酸塩の使用量を減少させて、効果的な発色促進および保色作用のある、天然物由来の発色助剤の開発が望まれており、本研究で得られた結果は、実用的なレベルでそれに貢献することが可能と考えられる。今後は、さらに酵素分解製品に含まれる肉製品の発色促進物質の検索と、その発色促進機構の解明が早急に望まれる。

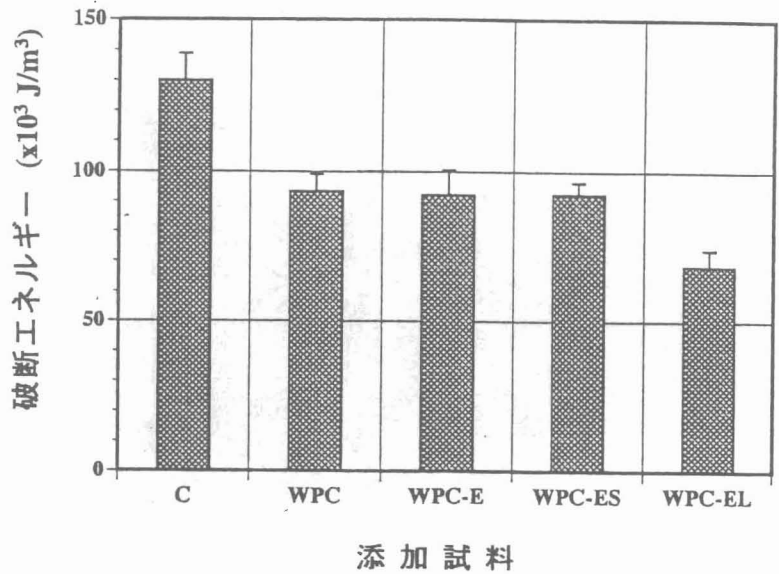


図9 ポークソーセージの破断エネルギーに及ぼすWPC-34酵素分解製品添加の影響

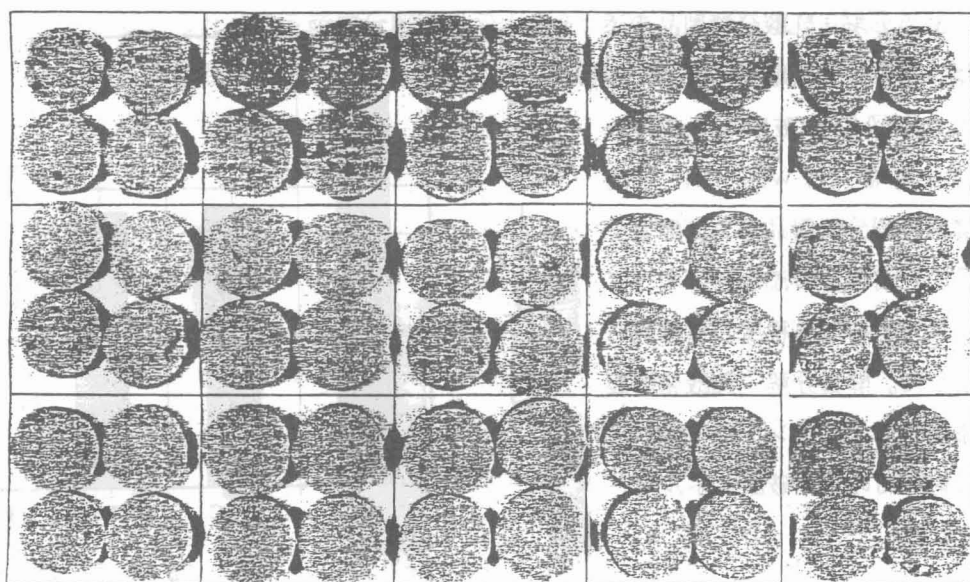
C, 未添加; WPC, WPC-34; WPC-E, WPC-34酵素分解物;  
WPC-ES, WPC-34酵素分解物の上清画分;  
WPC-EL, WPC-34酵素分解・乳酸発酵物

亜硝酸ナトリウム (ppm)

85

20

0



Control +WPC +WPC-E +WPC-ES +WPC-EL

図10 WPC-34の酵素分解および酵素分解・乳酸発酵製品添加によるボークソーセージの発色効果

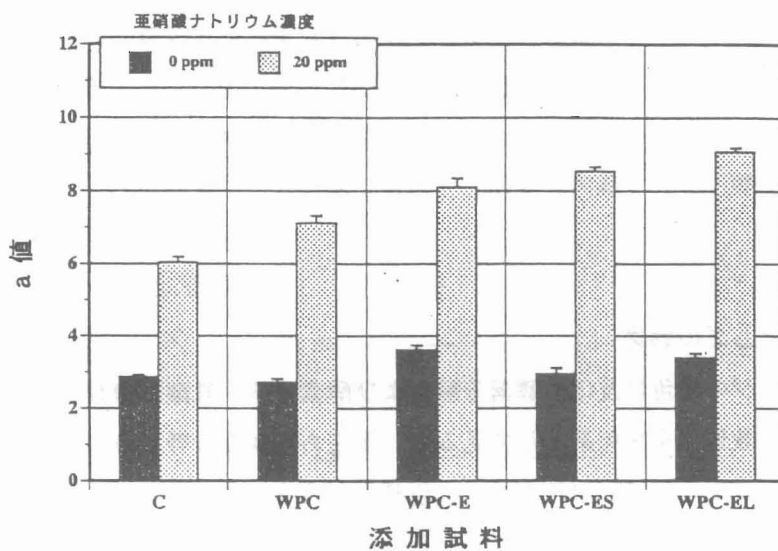


図11 ボークソーセージの色調に及ぼす WPC-34酵素分解製品添加の影響

C, 未添加; WPC, WPC-34; WPC-E, WPC-34酵素分解物;  
WPC-ES, WPC-34酵素分解物の上清画分;  
WPC-EL, WPC-34酵素分解・発酵物

### (3) 生体防御促進効果

次に、マクロファージの貪食能を指標として WPC-34酵素分解製品の生体防御促進作用の有無について検討した。マクロファージは10%牛胎児血清を含む RPMI-1640培地で37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%のインキュベータで培養した。添加試料には WPC-34と WPC-34酵素分解製品を用いた。貪食能は蛍光顕微鏡にてマクロファージの蛍光ラテックスビーズの取り込みを測定することにより求めた。図12はマクロファージの蛍光ラ

テックスビーズの取り込み像を示したカラー写真である。各試料を0.1 mg/mlになるようにマクロファージに添加した時の貪食能を図13に示した。コントロールに対してWPC-34そのものも貪食能を増加させるが、5時間の酵素分解製品の方がよりマクロファージの貪食能を促進した。24時間処理製品も5時間処理の場合とほぼ同様の結果が得られた。さら

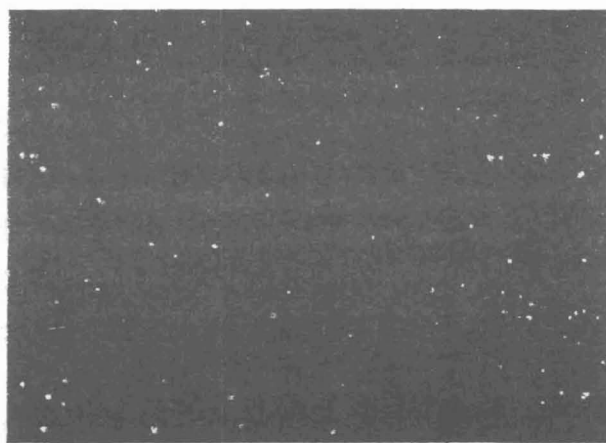


図12 マクロファージによる蛍光ラテックスビーズの取り込み像

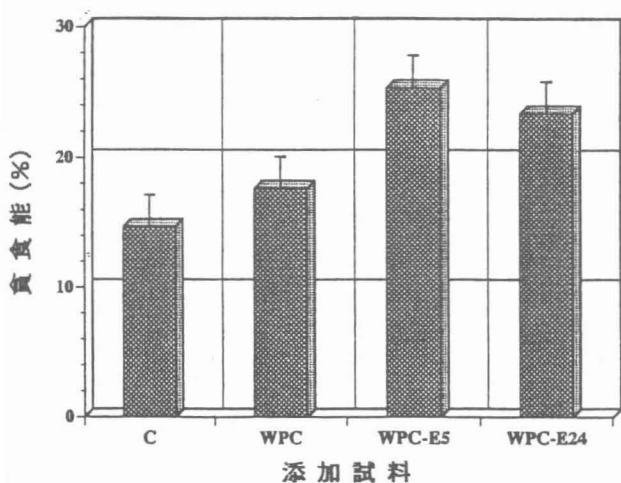


図13 マクロファージの貪食能に及ぼす WPC-34 酵素分解物添加の影響

C, 未添加; WPC, WPC-34;  
WPC-E5, WPC-34酵素分解物(5hr);  
WPC-E24, WPC-34酵素分解物(24hr)

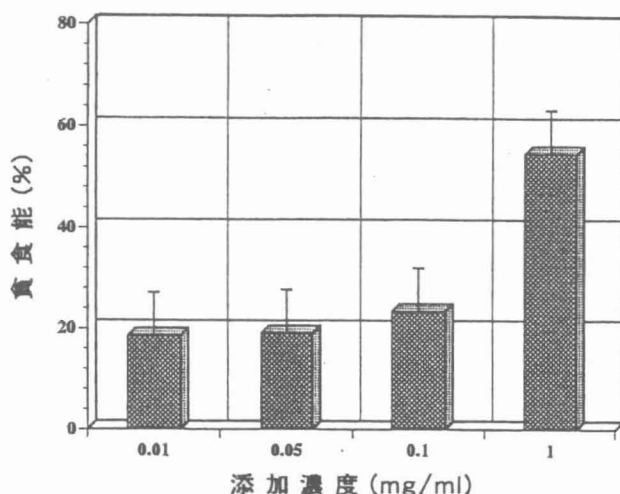


図14 マクロファージの貪食能に及ぼす WPC-34 酵素分解物 (5 hr) の添加濃度の影響

に、マクロファージの貪食能に及ぼす5時間処理酵素分解製品の添加濃度の影響を検討したところ、添加濃度が増すにつれて貪食能が増加する傾向が見られた(図14)。このことから、酵素分解製品添加による貪食能促進作用に、添加濃度依存性があることも明らかになった。

マクロファージは血液中の単球が組織中に分化した細胞で、生体防御における異物の排除においてそれを取り込み、分解、除去する代表的な貪食細胞である。最近、ホエータンパク質の成分であるラクトフェリンがコレステロールの蓄積を阻害する作用が報告されている<sup>18)</sup>。さらにホエータンパク質中には動物細胞の分化や増殖を活性化する因子が存在することも示唆されている<sup>19,20)</sup>。これらの報告の知見からも推察されるように、本研究で得られた結果は、酵素処理によりWPC-34からマクロファージの貪食能を活性化させる何らかの機能性因子が出現した可能性を示唆している。現在まだその活性化因子の同定はできていないが、WPC-34酵素分解製品は様々な大きさのペプチドに断片化されており、それらを分画することによってマクロファージの貪食能を活性化する因子を検索していく必要があると思われる。

## 4 要約

現在までに明らかになった結果の要点をまとめて記載する。

- (1) 低いタンパク質含量のために利用価値が少ないと考えられている WPC-34 単独標品も優れたゲル形成性を保持し、肉製品への添加実験では、良好なテクスチャー特性を有し、さらに官能特性の好ましい食肉製品が製造された。このように WPC-34 はそれ単独でも十分に利用できることが明らかになった。
- (2) WPC-34 を酵素分解や乳酸発酵すると、豚肉ソーセージのレオロジー特性の改良剤としての価値が付加された。
- (3) WPC-34 を酵素分解および乳酸発酵すると、肉製品中の亜硝酸塩の使用量を減少させても効果的な発色促進および保色作用として作用する、天然物由来の発色助剤としての効果が認められた。
- (4) WPC-34 を酵素分解すると、生体防御機能を向上させるようなペプチドが出現した。

以上のように WPC-34 を酵素処理や乳酸発酵により処理して肉製品に添加すると、ホエータンパク質が本来有している必須アミノ酸バランスに優れた、栄養性も十分に持った、しかも新たな機能性が付与されて付加価値の向上した新規な乳肉製品製造の可能性が高まった。

## 文献

- 1) 藤野博史、六車三治男、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、40, 309(1993)
- 2) 藤野博史、六車三治男、伊藤肇躬、大橋登美男：酪農科学・食品の研究、42, A-117(1993)
- 3) 六車三治男：平成 5 年度基盤技術研究成果報告書（財団法人九州産業技術センター）、40(1994)
- 4) 藤野博史、六車三治男、森 和彦、津江野大輔、笹木明弘、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、42, 756(1995)
- 5) 藤野博史、六車三治男、緒方朋子、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、42, 762(1995)
- 6) 藤野博史、六車三治男、鬼木浩子、伊藤肇躬、大橋登美男：日食工誌、42, 769(1995)
- 7) H. Fujino, M. Muguruma, T. Ito and T. Ohashi : Proc. 8 th Anim. Sci. Cong. AAAP Vo. 2, 1024(1996)
- 8) 六車三治男、藤野博史、津江野大輔、鬼木浩子：平成 7 年度畜産物需要開発調査研究事業報告書（畜産振興事業団）、389(1996)
- 9) 川谷さよ子、六車三治男、藤野博史、津江野大輔、鬼木浩子、伊藤肇躬：第92回日本畜産学会大会講演要旨集、p32(1997)
- 10) 六車三治男、藤野博史、川谷さよ子：平成 8 年度畜産物需要開発調査研究事業報告書（農畜産業振興事業団）、413(1997)
- 11) 川谷さよ子、六車三治男、藤野博史、伊藤肇躬、島田信也、農 信介：第93回日本畜産学会大会講演要旨集、p195(1997)
- 12) 藤野博史、六車三治男、川谷さよ子、伊藤肇躬、島田信也、農 信介：第93回日本畜産学会大会講演

要旨集、p195(1997)

- 13) U. K. Laemmli : *Nature*, 227, 680(1970)
- 14) H. Schagger and G. Jagou : *Anal. Biochem.*, 166, 368(1987)
- 15) J-R. Daban, S. Bartolome, and M. Samsó : *Anal. Biochem.*, 199, 169(1991)
- 16) 高須賀直美、赤川清子 : 「マクロファージ実験マニュアル」講談社、p12(1992)
- 17) 森川 實、原田直樹 : 「マクロファージ実験マニュアル」講談社、p151(1992)
- 18) M. Kajikawa, T. Ohta, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura and I. Matsuda : *Biochim. Biophys. Acta*, 1213, 82(1994)
- 19) G. L. Francis, G.O. Regester, H.A. Webb and F.J. Ballard : *J. Dairy Sci.*, 78, 1209(1995)
- 20) Y. Takada, S. Aoe and M.Kumegawa : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223, 445(1996)



# 加熱食肉製品の発色促進効果に及ぼす

## ホエータンパク質酵素分解物の影響

六車 三治男、 西 俊郎  
宮崎大学農学部

### 【目的】

加熱食肉製品における商品価値は外観、味、香り、テクスチャー、風味などの様々な要因によって決定されるが、消費者の購入意欲を高めるにはどれも不可欠で重要なポイントである。特に外観は商品にとって顔のようなものであり、外観が悪いと購入意欲が低下してしまう。食肉製品の色は鮮赤色で、加熱しても褐色に変化せず、非常に安定である。これは塩漬過程で食塩とともに加えられる発色剤の亜硝酸塩と硝酸塩の作用によって、ミオグロビン亜硝酸のヘム色素がニトロソ化されるためである。しかし、亜硝酸塩は、発癌物質であるニトロソ化合物を生成する可能性があり、添加量を低減することが好ましいと考えられている。これまでに、乳タンパク質であるカゼインおよびホエータンパク質を、低濃度の亜硝酸塩共存下で加熱食肉製品中に添加することによって、発色を明らかに増強する現象が認められている<sup>1)</sup>。さらに、そのホエータンパク質を酵素処理することによってより発色が促進されることが本研究によって明らかになった<sup>2)</sup>が、未だにどのような発色機構であるかは不明な点が多い。

そこで、本研究の最後の項ではホエータンパク質酵素分解物を添加した加熱食肉製品を製造し、ホエータンパク質酵素分解物の発色促進剤としての詳細な検討を行うと共に、その発色促進機構の解明を行うことを目的とした。

### 【実験材料および方法】

#### 1. 試料

ホエータンパク質濃縮物(WPC80)はオーム乳業から提供していただいた。フレーバーザイムは Novo Nordisk 社から提供していただいた。ソーセージ製造用の原料肉は、JA 食品開発研究所より提供していただいた。ミオグロビンは Sigma 社製の標品を使用した。

#### 2. ホエータンパク質酵素分解物の調製

ホエータンパク質濃縮物(WPC80)を蒸留水で 10%になるように溶解し、フレーバーザイムを 0.1%添加して、50℃で 16 時間反応させた。反応後、90℃で 20 分間加熱することにより酵素を失活させた。その後、十分に冷却し、遠心分離(5,000×g、4℃、10min)し、上清を回収、凍結乾燥したものを酵素分解物とした。また、WPC80 の分解状態を調べるためにゲルろ過 HPLC を用いた。HPLC の条件は次の通りである：機種；LC-10A Shimadzu、

カラム ; TSK-gel G2000SW<sub>XL</sub>、移動相 ; 20mM リン酸緩衝液(pH 7.0)、検出波長 ; 225nm。

### 3. ソーセージの製造

豚肉のロース部の挽肉を用い、ソーセージ試料を調製した。食塩 2.5%、酵素分解物または WPC80 を 5%、亜硝酸塩をそれぞれ 0、10、20、50ppm および氷 15%加えた後、ホモジナイズし、ケーシングに充填した。それを 1 晩 4℃で塩漬し、75℃で 30 分間ボイルした。その後、十分冷却した後、ソーセージを切断し、切断面の写真撮影および a\*値(赤色度)を Minolta 分光測色計 CM - 1000 により測定した<sup>3)</sup>。

### 4. 発色率の測定

加熱食肉製品のニトロシルヘム色素の定量は、食肉の色素タンパク質であるミオグロビン(Mb)と発色剤として使用している亜硝酸塩を用いたモデル実験系で行った。即ち、0.1%Mb、50ppm 亜硝酸塩、0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5)にサンプルを混合し、窒素置換後、75℃で 60 分間加熱させた。その後すぐに冷却し、アセトン を 75%になるように加え、30 分間放置しニトロシルヘム色素を抽出した。その抽出液をろ過し、395nm での吸光度を測定しニトロシルヘム色素量を定量した。

また、全ヘム色素の定量は酸性アセトン法を用いた。即ち、0.1%Mb、0.1M 酢酸緩衝液、アセトン、濃塩酸を混合し、60 分間放置後、Toyo filter No.5A でろ過し 383nm での吸光度を全ヘム色素量とした。

発色率の算出は、全ヘム色素に対するニトロシルヘム色素の割合から発色率を求めた。この発色率の算出法を次式に示した<sup>4)</sup>。

$$\text{発色率(\%)} = B \times F / A \times 100$$

A : 全ヘム色素抽出液の 383nm における吸光度

B : ニトロソヘム色素抽出液の 395nm における吸光度

F : 係数 1.2

### 5. 残存亜硝酸塩量の測定

ニトロシルヘム色素の測定に使用した反応液を用い、加熱後に残存している亜硝酸塩量を Mirna and Schütz の方法により測定した<sup>5)</sup>。

### 6. 還元力の測定

還元力の測定は赤血塩が還元されると黄血塩になる性質を利用した赤血塩法を用いた。即ち、2mM の赤血塩とサンプルを入れ、窒素置換後 75℃で 60 分間反応させた。反応後、十分に冷却し、420nm における吸光度を測定した。還元力の算出は次式により求めた<sup>6)</sup>。

$$\text{還元力(\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A : サンプルを添加せずに反応させたときの 420nm における吸光度

B : サンプルを添加したときの 420nm における吸光度

### 7. ミオグロビンの加熱変性率の測定

0.2%Mb、100ppm 亜硝酸塩、0.1M 酢酸緩衝液(pH=5.5)にサンプルを混合し、窒素置換

後、75℃で加熱した。加熱後十分冷却し、遠心分離(1,500×g 15min)し、その上清中の未変性ミオグロビン量を酸性アセトン法により抽出した。加熱後の未変性ミオグロビン量を A、加熱変性前のミオグロビン量を B として変性率を次式より算出した<sup>6)</sup>。

$$\text{変性率(\%)} = (B - A) / B \times 100$$

## 8. カラムクロマトグラフィーによる酵素分解物の分画とその画分の発色率、還元力およびミオグロビンの変性率の測定

酵素分解物をゲルろ過クロマトグラフィー(Superdex 30pg、1.6Å×95cm)にかけ分画した。溶出は 20mM 酢酸緩衝液(pH6.0)、150mM 塩化ナトリウム、0.5%アジ化ナトリウムで行い、フラクションコレクターを用いて回収した。その画分の発色率、還元力、ミオグロビンの加熱変性率を測定した。次に、発色率が最も高かった画分をイオン交換クロマトグラフィー(DE53 イオン交換セルロース、2.5 Å×28cm)を用いて分画した。溶出には 20mM トリス-酢酸緩衝液(pH7.5)、1%アジ化ナトリウム、0~500mM 塩化ナトリウムのリニアグラジエント溶出を行い、フラクションコレクターで回収した。それらの画分の発色率、還元力、ミオグロビンの加熱変性率を測定した。

## 9. アミノ酸分析

試料を 6N HCl (0.1% フェノール含有)で 110℃、24 時間分解し、イソチオシアン酸フェニル(PITC)を用いてアミノ酸を PTC 化し、Wakosil-PTC Column(4.0 Å×200mm)を用いて分析した。

## 【結果および考察】

### 1. HPLC による酵素分解物の分析結果

酵素分解物のゲルろ過 HPLC による分析を行ったところ WPC80 の主要な成分である α-ラクトアルブミンと β-ラクトグロブリンのピークが消失し、溶出時間から分子量 1,000~5,000 のペプチドやジペプチドやトリペプチドのような小さなペプチドを多く含むことが確認された(図.1)。このことから WPC80 はフレーバーザイムによって高度に分解されていることが明らかになった。

### 2. ソーセージの a\*値の測定

WPC80 および酵素分解物を添加したソーセージを製造したところ無添加のものよりもそれらを加えた方が a\*値が高くなっていた(図.2)。また、WPC80 と酵素分解物を添加したソーセージの a\*値を比較すると酵素分解物を添加したものの方が高くなっていた。これらにより、WPC80 および酵素分解物は発色促進効果を有することが明らかになり、WPC80 を酵素消化すると発色を促進することから、酵素消化により WPC80 から発色促進効果を有するペプチドが生成されている可能性が示唆された。また、その発色の度合いを比較するとサンプルを添加していない無添加、亜硝酸塩 50ppm のソーセージの a\*値は酵素分解物、亜硝酸塩 10ppm 添加したソーセージの a\*値は同等の値を示した。以前坂田

らによって WPC80 酵素分解物 5%を添加したソーセージの発色率とアスコルビン酸 0.1% 添加したソーセージの発色率が同等であったことが報告されている<sup>2)</sup>ことと同様にこの酵素分解物は強い発色促進効果を有し、加熱食肉製品の発色促進剤としての使用が示唆された。

### 3. ミオグロビンの加熱モデル実験系による発色率および残存亜硝酸塩量の測定結果およびサンプルの還元力

食肉製品の発色モデル実験としてミオグロビン(Mb)、亜硝酸塩および WPC80 か酵素分解物を試験管内で 75℃、60 分間加熱し、発色率および残存亜硝酸塩量を測定した。その結果、発色率は WPC80 および酵素分解物の添加量が増すにつれて高くなり、WPC80 と酵素分解物の発色率を比較したところ、ソーセージの a\*値の結果と同様に、酵素分解物の方が高かった(図.3)。次に、その発色率を測定した反応液の残存亜硝酸塩量を測定したところ、WPC80 より酵素分解物の方が残存亜硝酸塩量の減少が認められた(図.4)。このことから一酸化窒素の生成量は酵素分解物の方が多く、その生成された一酸化窒素と Mb とが結合して加熱食肉製品の発色色素であるニトロシルヘム色素を多く生成したと推測された。

次に WPC80 および酵素分解物の還元力を測定したところ、WPC80 および酵素分解物の両方に還元力が認められたが酵素分解物の還元力の方が強かった(図.5)。以上の結果より、ミオグロビン中の 3 価の鉄から 2 価の鉄への還元作用と亜硝酸からの一酸化窒素の還元作用に関与しているサンプルの還元作用は酵素分解物の方が強く、より多くの鉄イオンの還元および一酸化窒素の生成する可能性が示唆された。

### 4. ミオグロビンの加熱変性作用

WPC80 および酵素分解物による Mb 加熱変性率を測定したところ、酵素分解物の方が WPC80 よりも高かった(図.6)。このことは坂田らによって豚肉の筋漿中の低分子量画分に発色促進効果を見だし、その画分の発色促進効果を示すのは、加熱により還元力が増加することに加え、Mb の熱変性を促進する作用によるものであると推定している<sup>7)</sup>のと同様にこの酵素分解物による発色促進機構としては亜硝酸塩を添加して一定期間の塩漬を行わないカッターキュアリング法と同様に、Mb が変性して変性メトミオグロビンを生じた後、これに NO が結合、還元されてニトロシルヘムクロムを形成する経路が関与していると可能性が示唆された。

### 5. 発色促進効果を及ぼすペプチドの分離分画

酵素分解物を分子量で分画するゲルろ過クロマトグラフィーにより分離したときのクロマトグラムを図.7 に記した。これらの画分の発色率、還元力、ミオグロビンの加熱変性率を測定した。その結果、発色率はゲルろ過画分 No.5、6(分子量で約 1,000~3,000 の画分)が最も強く、還元力、ミオグロビンの加熱変性率も同じ画分であるゲルろ過画分 No.5、6 が高い値を示した。次に最も発色率が高かったゲルろ過画分 No.5 を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画し、そのクロマトグラムを図.8 に記した。それらの画分を Sep-Pak で脱塩を行い、発色率、還元力、ミオグロビンの加熱変性率を測定した。発色率の最も強かった画分はイオン交換画分 No.8 であったが、還元力はイオン交換画分 No.2、3 の方がイ

オン交換画分 No.8 よりも強かった。一方、ミオグロビンの加熱変性率を測定したところイオン交換画分 No.8 の方が強くなっていた。これらの結果より、WPC80 酵素分解物の加熱食肉製品の発色促進効果には還元作用が弱くても発色をしている画分が存在していることから、還元作用以外の作用の可能性が示唆された。また、発色率が高かった画分のミオグロビン加熱変性率は高い値を示していることから、このミオグロビンの加熱変性作用は酵素分解物の発色促進機構に強く関係する可能性が示唆された。

## 6. 各画分のアミノ酸組成分析

初めの分離段階であるゲルろ過画分 No.5 およびイオン交換画分の吸着画分である No.8 のアミノ酸組成比を表. 1 に示した。ゲルろ過画分 No.5 はアスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、チロシンおよびリジンが多かった。イオン交換 No.8 はアスパラギン酸、グルタミン酸およびプロリンが比較的多かった。初めの分画であるゲルろ過画分 No.5 はチロシンとリジンが多かったが次に行ったイオン交換クロマトグラフィーではその 2 つのアミノ酸が少なくなった。以上の結果より、加熱食肉製品の発色にはチロシンおよびリジンはあまり関与しなく、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸の関与が強い可能性が示唆された。

これまでの食肉製品の発色に関する一連の研究でカルノシン(筋肉中に含まれるペプチドの一種)を用いた場合に亜硝酸塩量を低下させても十分な発色が得られること<sup>8)</sup>やリボース、キシロースおよびアラビノースなどにも食肉製品の発色を促進することが明らかになっている<sup>9)</sup>。今回の研究でホエータンパク質酵素分解物中のペプチドが発色を促進することが明らかになっている一方で、ホエータンパク質酵素分解物は食肉製品のレオロジー特性調節作用も有することが報告されている<sup>10)</sup>。これらのことから、この乳タンパク質の酵素分解物を加熱食肉製品に添加することにより亜硝酸塩を減少させても十分な発色が得られ、食感の良い製品の製造が期待される。

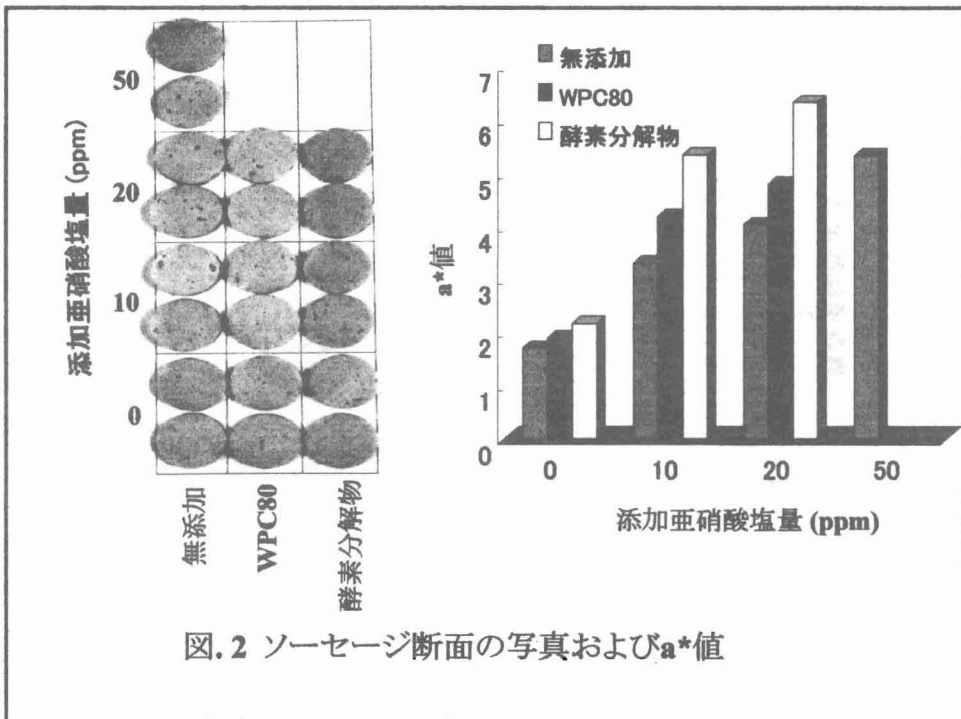
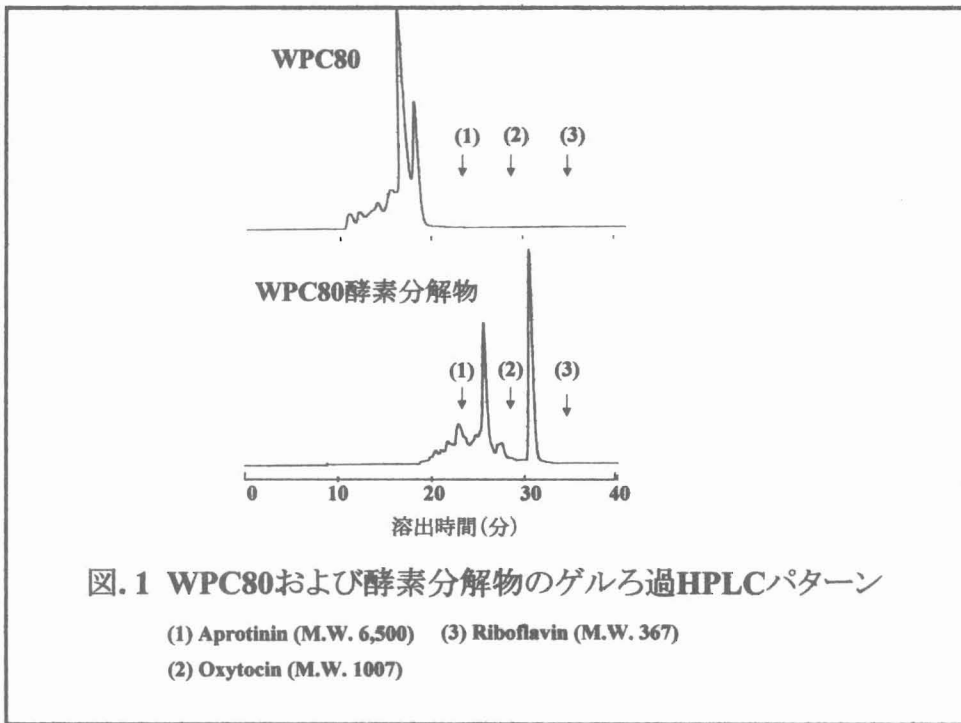
## 【要 約】

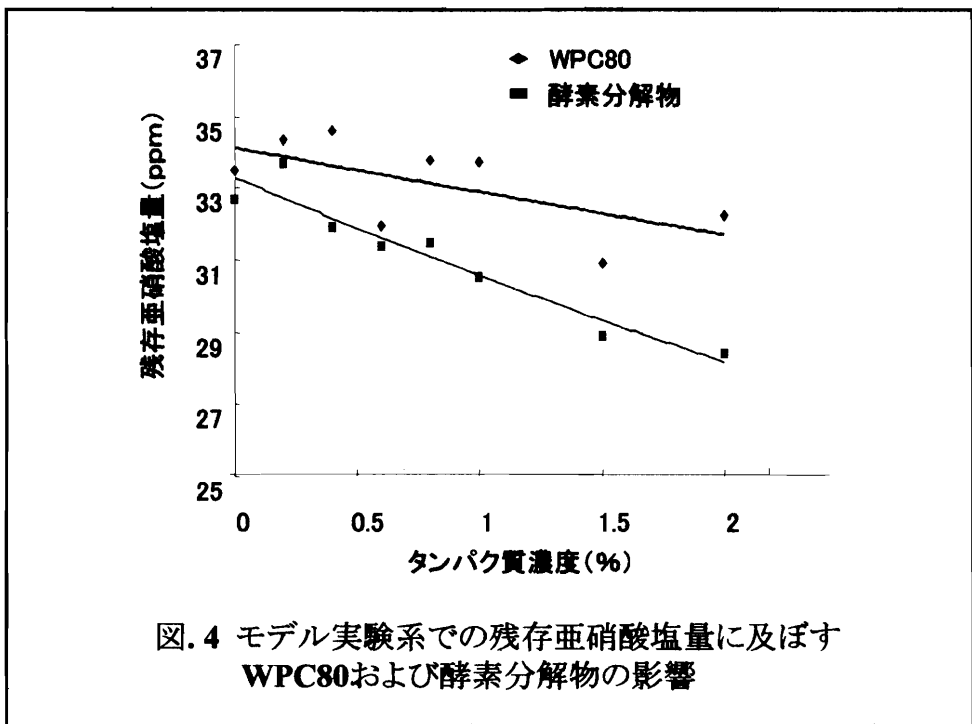
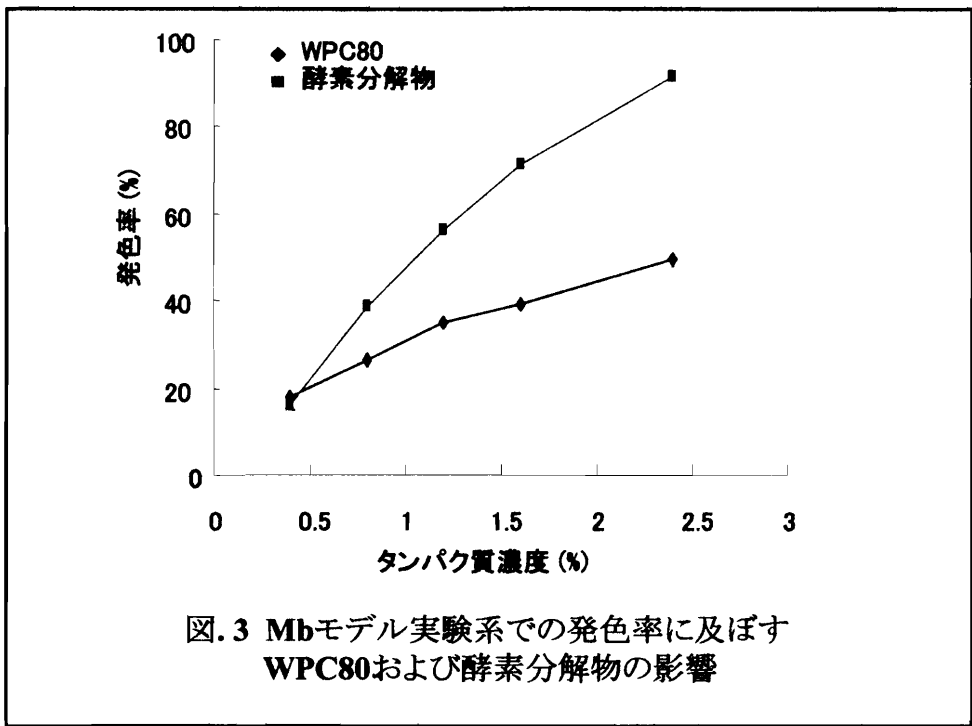
ホエータンパク質の酵素分解物が有する加熱食肉製品の発色促進効果と発色機構の解明について検討した。この酵素分解物はホエータンパク質濃縮物(WPC80, タンパク質濃度 80%)をフレーバーザイムで 50℃、16 時間分解させたものを使用した。WPC80 および酵素分解物を添加したソーセージを試作し、発色促進効果を a\*値を測定することにより比較したところ酵素分解物の方が a\*値が高かった。ミオグロビンの加熱モデル実験系の結果、WPC80 および酵素分解物の添加量が増加するほど発色率は上昇しており、その効果は酵素分解物の方が高かったが、残存亜硝酸塩量は酵素分解物の方が減少していた。赤血塩法による還元力の測定の結果、酵素分解物の方が WPC80 よりも強かった。また、酵素分解物の方が WPC80 よりもミオグロビンを加熱変性させていた。この酵素分解物をゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーにより分画した結果、発色促進効果を有しているペプチドは分子量が 1,000~3,000 であり、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸を多く含んでいること可能性が示唆された。また、発色率は高く還元力が低いミオグ

ロビンの加熱変性率が高い画分が存在していたことから、この酵素分解物の発色促進機構は還元作用だけではなく、ミオグロビンの加熱変性させる作用も深く関係している可能性が示唆された。

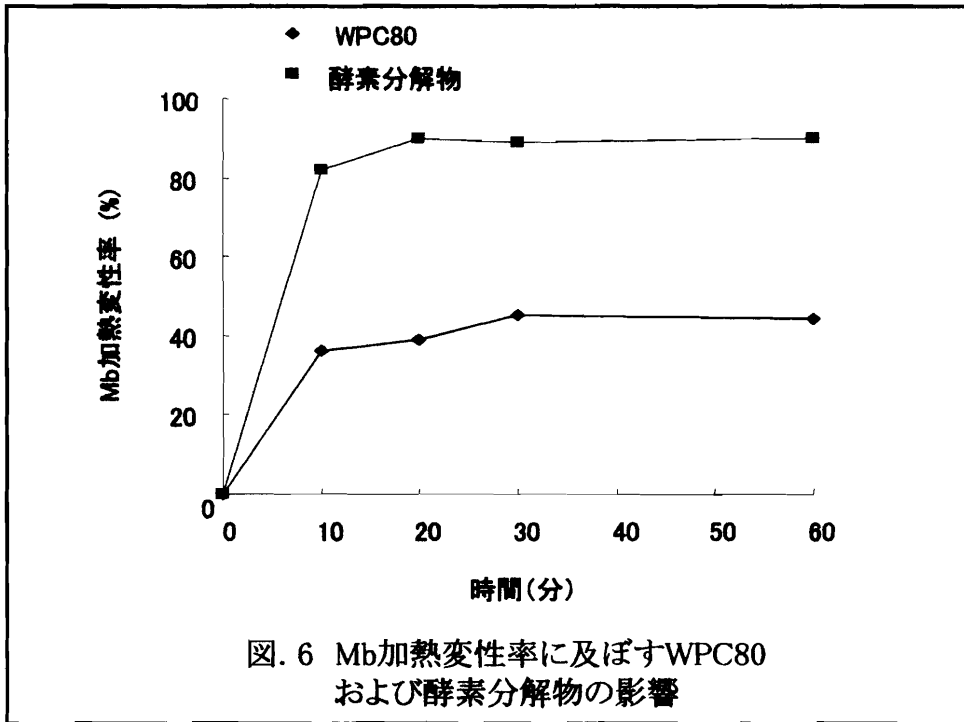
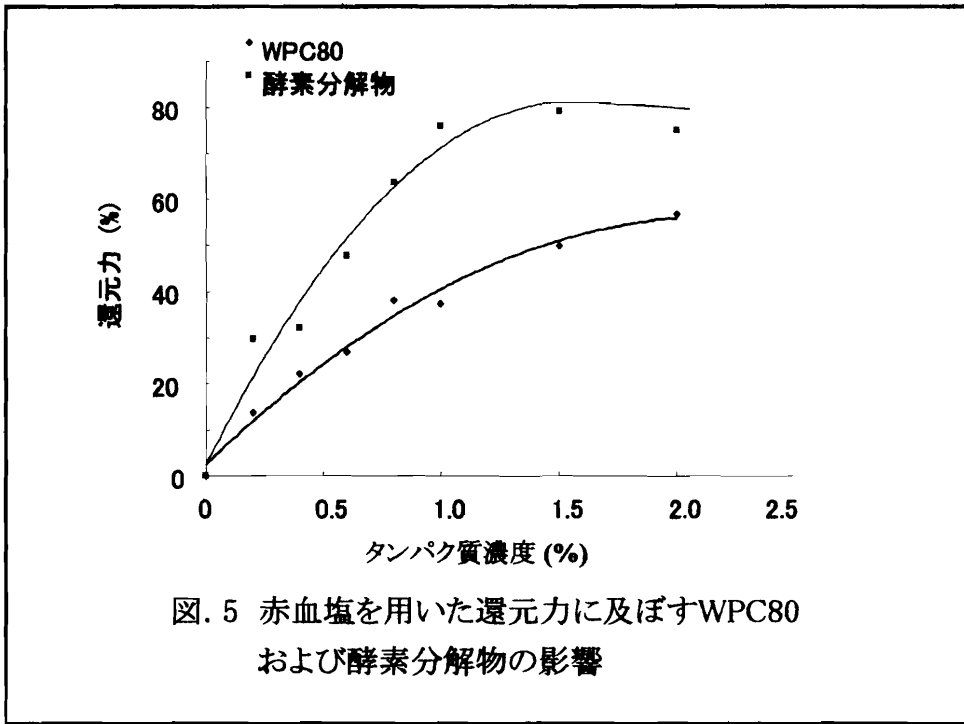
## 【参考文献】

- 1) SAKATA, R., H.MORITA., N. ITOH and S.-S.CHOU: Stability of heme Pigment and color formation in meat products : Effects of vitamin E, carnosine and milk protein hydrolysates. Proc. 45<sup>th</sup> Inter. Cong. Meat Sci. Technol., 1, 154-155, 1999.
- 2) 坂田亮一・森田 毅・伊藤典之・長田貞之・岡山高秀・六車三治男：加熱食肉製品の発色に及ぼす乳清タンパク質酵素分解物の促進効果とその機構，日豚会誌，38，115-124. 2000.
- 3) CIELAB. 1976. Color space adapted by CIE in 1974 with recommendations for associations (CIE, 1974). Method of measuring and specifying color rendering properties of light source, Publication CIE N° 13-2 (TC.3.2) Paris: Bureau central de la CIE, 1976.
- 4) 坂田亮一：食肉・食肉製品の分析技術／第2章食肉・食肉製品の品質評価法／色調およびヘム色素，食肉の科学，40，221 - 224. 1999
- 5) MIRNA, A. and G.SCHÜTZ : Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung des Pokelfarbstoffes Fleischwirtsch.,52,1337-1338,1972.
- 6) 永田致治・坂田亮一：豚筋肉中の発色促進成分に関する研究，食肉に関する助成研究調査成果報告書，(財)伊藤記念財団編，2，176-181，1984.
- 7) SAKATA, R. and Y. NAGATA : Promoting action of low-molecular weight sarcoplasm fraction on color formation. Fleischwirtschaft-International, No.1, 54-58, 1989.
- 8) 坂田亮一・森田英利・永田致治：食肉および食肉製品の赤色色素の安定性に及ぼすカルノシンの添加効果，日豚会誌，36，47-51，1999.
- 9) OKAYAMA, T., M, YAMANOUÉ and K, KONDO : Effect of Ribose, Xylose and Arabinose on colour formation in processed meat products. Meat science., 26, 39-45, 1989.
- 10) 長谷川和美・六車三治男・藤野博史・鶴岡克彦・伊藤典之・福井敬一・池田吉敬・杉田浩一・河原 聡・山内 清：酵素処理ホエータンパク質の性質と肉製品への利用，日本畜産学会第97回大会講演要旨，p.72，2000.









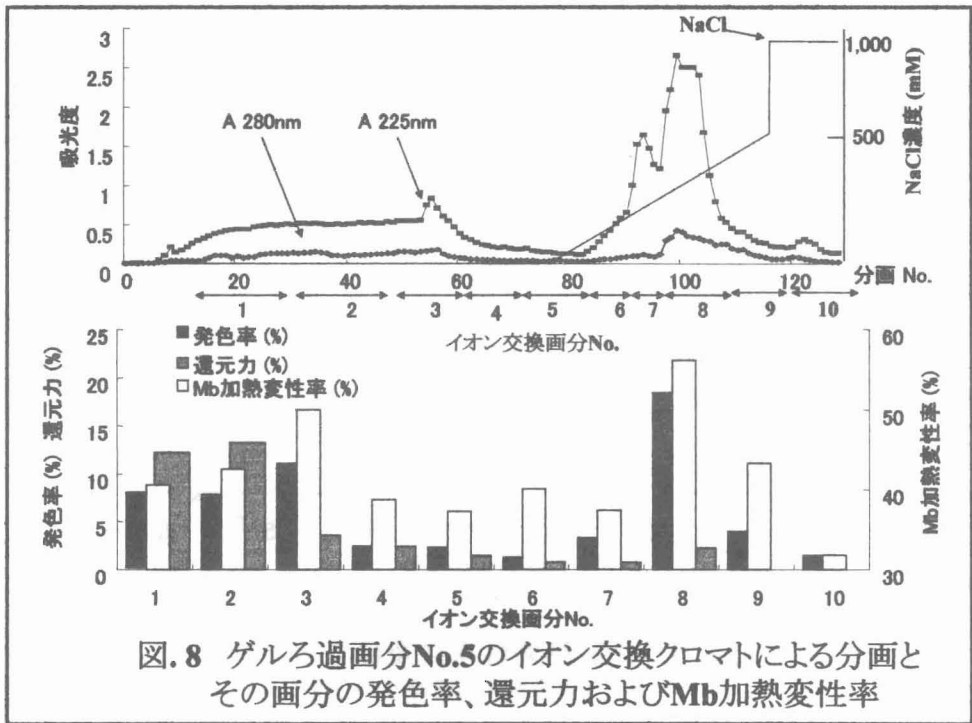
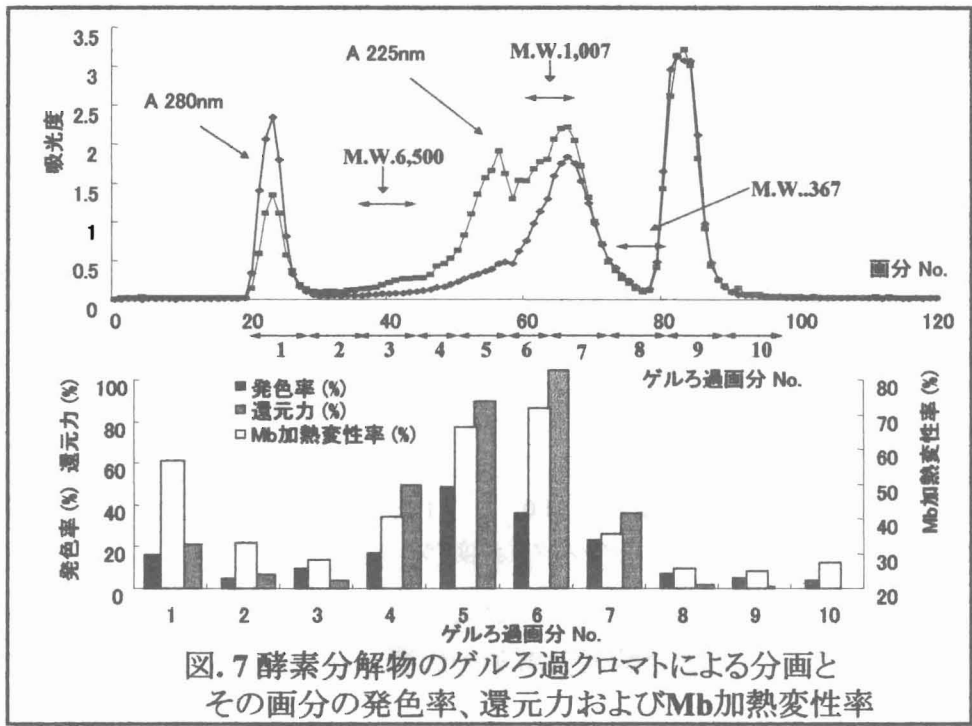


表.1 ゲルろ過画分No.5およびイオン交換画分No.8のアミノ酸組成比

	アミノ酸組成比 (%)	
	ゲルろ過No.5	イオン交換No.8
Asp/Asn	5.53	12.73
Glu/Gln	11.34	25.04
Ser	3.48	5.68
Gly	1.98	4.41
His	0.74	2.57
Arg	0.57	2.43
Thr	3.91	3.42
Pro	8.87	12.98
Ala	6.82	3.59
Tyr	15.96	2.03
Val	10.13	6.3
Met	1.02	1.18
Cys	0.74	2.67
Ile	5.91	5.56
Leu	5.99	4.29
Phe	3.56	1.76
Lys	13.46	3.36