

〈平成18年度〉

高齢者が食べやすい食肉の調理加工方法に関する研究 －生姜プロテアーゼの利用－

杉山 寿美

(県立広島大学人間文化学部)

1. 緒 言

高齢者が食べやすい食品の物性については近年、多くの研究が行われている。しかし、食肉の柔らかさは、筋肉組織蛋白質、結合組織蛋白質の量および質、水分量、脂肪量などから決定されるため、これらの調理加工過程での変化を検討する必要がある。特に、結合組織中のコラーゲンは食肉の硬さを決定する最も大きな要因である。

一方、生姜の食肉軟化効果は広く知られており、家庭や給食施設における実際の調理過程で搾汁やすりおろしの形で加熱前の食肉に利用されており、生姜に含まれるシステインプロテアーゼの酵素特性および構造は明らかとなっている¹⁾。我々は、生姜搾汁（生姜プロテアーゼ）のコラーゲンに対する作用は、コラーゲン分子の三重らせん部位に対するコラゲナーゼ作用ではなく、その両端の三重らせんを形成していないテロペプチド部位への酸性条件下におけるプロテアーゼ作用であることを報告し、生姜搾汁が加熱変性によって生じたゼラチンや、筋原線維蛋白質に対してプロテアーゼ作用を有することも示した²⁾。このような生姜プロテアーゼの特性に由来して、生姜搾汁で食肉を処理した場合には筋原線維蛋白質が分解される一方で結合組織蛋白質が分解されず、“すじ”が残って食べにくい食肉が調製される。

本研究は、我々がこれまでに得ている蛋白質の構造変化とプロテアーゼ活性の関係に関する知見に基づいて、生姜プロテアーゼの結合組織蛋白質

への作用を利用・制御した高齢者が食べやすい食肉の調理加工方法を具体的に提案することを目的とした。

2. 方 法

2.1 試 料

鶏もも肉は広島市内で購入した。鶏肉は厚みの不均一な部分を取り除き、幅7cm、長さ8cm、厚さ1.5cm程度の大きさ（約80g）に成形し、重量の0.8%の食塩を添加、15分室温に置いた後、各条件下で調理したものを試料とした。鶏もも肉は短時間の乾式加熱が行われる部位であり低価格であることから給食施設でよく用いられること、さらに、牛肉や豚肉では軟らかい脂肪交雑部位の選択が可能であることから、本研究では鶏もも肉を試料として用いた。

2.2 調理条件

(1) 加熱

スチームコンベクションオーブン（コンボスターOSP-6.10:エフ・エム・アイ）を220℃に予熱し、熱風モード200℃で鶏肉を中心温度が75℃に達した後1分間加熱した（加熱時間：約6分）。

(2) 急速冷却・再加熱

加熱した鶏肉の一部は、ブラストチラー（エフ・エム・アイ）によって中心温度3℃まで急速冷却し、7日間3℃で保存した。その後、スチームコンベクションオーブンで中心温度75℃、1分間加熱した（加熱時間：約4分）。

(3) 温蔵

加熱した鶏肉の一部は、ラップをして専用容器に入れて、庫内温度65℃、湿度80%として、電気湿温蔵庫（日立）で7時間あるいは24時間保存した。

2.3 生姜添加

生姜は、皮ごとすりおろし、さらし布を用いて生姜搾汁を調製、精製を行わずそのまま用いた。また、プロテアーゼの自己分解による酵素活性低下を考慮して、食肉への添加直前に調製した。生姜搾汁は食肉重量の20%添加し、食肉表面全体にいきわたるようにラップで覆ったが、もみ込む等の操作はしなかった。生姜搾汁添加は、加熱1時間前（10℃で保存）、加熱直前、加熱後（65℃で7時間あるいは24時間保存）とした。なお、酵素活性の確認は、基質としてカゼインを用いてAnsonの方法で行い³⁾、既報と同程度の活性であることを確認した⁴⁾。

2.4 水溶性蛋白質および筋線維蛋白質の抽出

(1) 水溶性蛋白質の抽出

生および処理後の鶏肉をミンチにし、その約30gに0.25Mトリス塩酸緩衝液（トリスヒドロキシメチルアミノメタン12g、スクロース171.82g、EDTA0.6g/2L：pH7.6）125mlを加えて4℃で攪拌抽出した。遠心分離（8000rpm, 20分）により、上清に水溶性蛋白質を得た。抽出はSDS-PAGEでバンドが確認できなくなるまで繰り返した（3-6回）。抽出した水溶性蛋白質の定量はブラッドフォード法で行い、BSA標準溶液の検量線から蛋白質量を算出した。

(2) 筋線維蛋白質の抽出

Uylterhaegen らの方法により抽出した⁵⁾。すなわち、水溶性蛋白質抽出後の沈殿を蒸留水で洗浄後、0.25Mトリス塩酸緩衝液（トリスヒドロキシメチルアミノメタン6g、SDS20g、イミダゾール0.68g、2-メルカプトメタノール10ml/1L：pH7.0）125mlで攪拌抽出した。遠心分離により、

上清に筋原線維蛋白質を得た。

2.5 結合組織蛋白質（コラーゲン）の抽出

Satoらの方法により、すべての試薬を4℃に冷却して抽出した⁶⁾。

(1) 筋線維蛋白質の除去

生および処理後の鶏肉をミンチにし、その約30gに0.1N水酸化ナトリウム溶液125mlを加えて攪拌、遠心分離により、筋線維蛋白質を除去した。抽出はSDS-PAGEでバンドが確認できなくなるまで繰り返した。得られた結合組織蛋白質（コラーゲン）をpH7.0に調整した。

(2) 酸可溶性コラーゲン（ASC）の抽出

筋線維蛋白質を除去、洗浄後の沈殿に0.01N塩酸溶液125mlを加え、pH3.0に調整、攪拌、遠心分離し、上清に酸可溶性コラーゲン（ASC）を得た（抽出は3-6回繰り返した）。コラーゲン分子は三重らせん部位と分子間・分子内に架橋が存在するテロペプチド部位から構成されている。中性溶液中では三重らせん部位で会合して線維を形成し、酸性溶液中でコラーゲン分子の一部は分散して可溶化する。

(3) ペプシン可溶化コラーゲン（PSC）の抽出

ASC抽出後の沈殿に、0.5M酢酸溶液125mlを加えてろ過した後、0.5M酢酸溶液125mlとペプシン（片山化学）を約30mg加え、攪拌、遠心分離し、上清にペプシン可溶化コラーゲン（PSC）を得た（抽出は3-6回繰り返した）。ペプシンはコラーゲンの三重らせん部位に作用せず、テロペプチド部位および加熱変性部位のみに作用する。そのため、未変性のコラーゲンではテロペプチド部位がペプシンにより切断され、PSCは三重らせん部位のみで構成されている。

(4) 不溶性コラーゲン（ISC）の処理

ASC, PSC抽出残査を不溶性コラーゲン（ISC）とし、蒸留水で洗浄後、均質化した。

(5) コラーゲンの定量

得られたコラーゲンは塩酸加水分解（130℃，3時間），コラーゲン分子に特有のアミノ酸であるヒドロキシプロリン量をWossener法で測定した⁷⁾。得られたヒドロキシプロリン量は10倍し，コラーゲン量とした。

2.6 SDS-電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (10%ゲル) は，Laemmliの方法にしたがって行った⁸⁾。

2.7 剪断強度の測定

剪断強度の測定はレオメーターEZ-Test (島津)で行った。アダプターは噛み切りやすさを把握するために，クサビ形ではなく，かみそりの替え刃を装着させた。剪断は線維に垂直方向で行い，鶏肉 (3 mm × 3 mm × 15 mm) を，10 mm/minで測定，最大荷重を剪断強度とした。

2.8 脂質の抽出と脂肪酸分析

生および処理後の鶏肉をミンチにし，Bligh & Dyer法で行った⁹⁾。0.001%BHT含有クロロホルム・メタノール混液 (1 : 2) を抽出に用いた。抽出した脂質は1.8%塩化ナトリウム溶液で洗浄した後，クロロホルムに溶解して，分析まで-80℃で保存した。脂質中の脂肪酸量の測定は，既報と同様にガスクロマトグラフィーによって行った⁴⁾。

抽出脂質の一部に，内部標準物質としてトリペンタデカノイン (Sigma) を加え，5%塩酸メタノール (東京化成) を用いてメチル化を行った。脂肪酸メチルエステルはガスクロマトグラフィー (GC-2010, 島津) で分析した。カラムはキャピラリーカラムDB-WAX (60 m × Φ0.253 mm, J&W Scientific, USA), 温度設定は170℃から230℃ (昇温速度 7℃/min) とした。トリグリセリド量として算出された脂肪酸量は調理前重量100g当りに換算した。

2.9 官能検査

同様に調製した試料について，識別試験を5点評点法で行った。パネルは管理栄養士課程の女子大学生25名とした。統計処理はTukey-Kramerの多重比較によって行った。

3. 結果および考察

3.1 加熱による重量変化

図1に示したとおり，加熱によって重量は約70%となり，その後の温蔵で60%，再加熱50%に減少した。この減少は，後述の脂肪量の減少がそれほど大きくないことから，水分量の減少が大きな要因であると考えられる。また，生姜搾汁添加

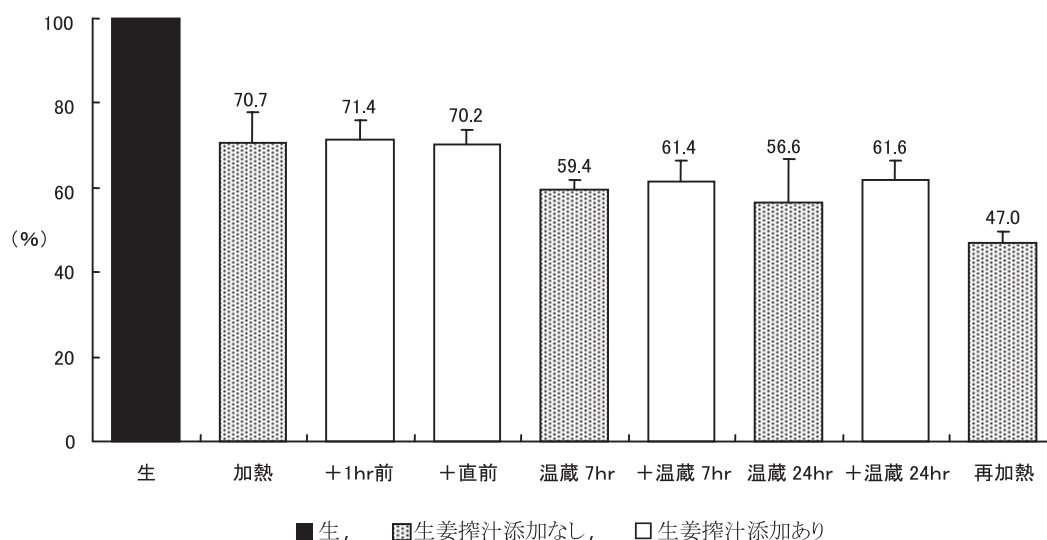


図1 調理による重量変化

による重量減少は認められなかったが、生姜搾汁の水分によって、鶏肉由来の水分減少が補われたのかもしれない。

3.2 水溶性蛋白質

水溶性蛋白質量（加熱前の鶏肉100gあたり）を図2に示した。水溶性蛋白質量は加熱によって、著しく減少した。また、その後の温蔵、再加熱によっても減少したままであった。これは加熱により水溶性蛋白質が凝固、不溶化したためと考えられる。生姜搾汁を添加した場合は、添加していない場合と比較してわずかに増加し、SDS-PAGEでも低分子量のバンドが認められた（SDS-PAGEパ

ターンは示していない）。

3.3 筋原繊維蛋白質

筋原繊維蛋白質のSDS-PAGEパターンを図3に示した。生肉では、ミオシン（20.5kd）、アクチン（4.5kd）のバンドが、はっきりと認められ、加熱肉では、水溶性画分が凝固移行してきたと思われる生で確認されなかったバンドが認められた。しかし、温蔵、再加熱によってSDS-PAGEパターンに変化は生じなかった。生姜搾汁を添加したものでは、ミオシン、アクチンなどのバンドが添加していないものと比較して薄くなっており、筋原繊維蛋白質がプロテアーゼの作用を受けてい

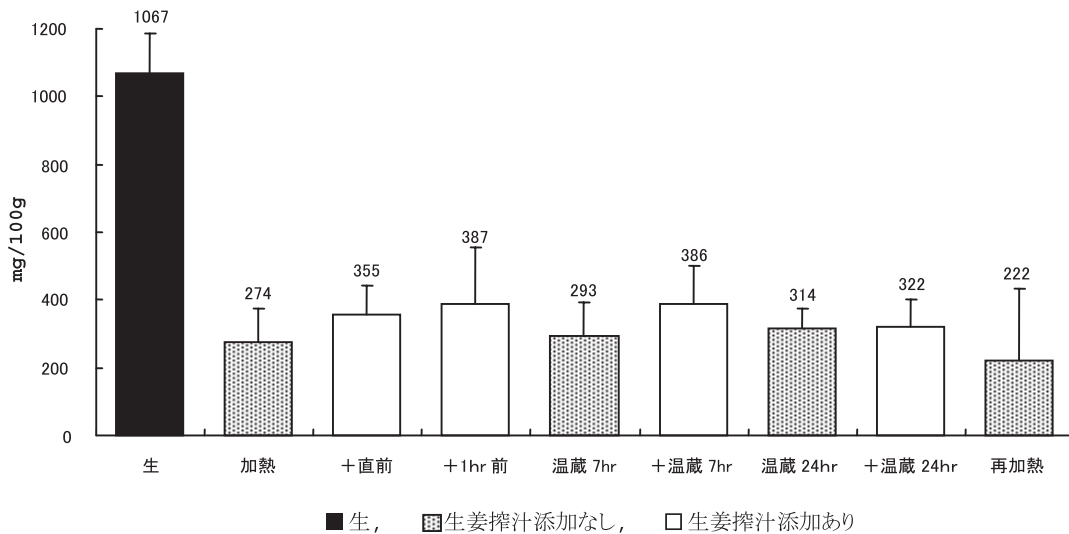


図2 水溶性蛋白質の変化

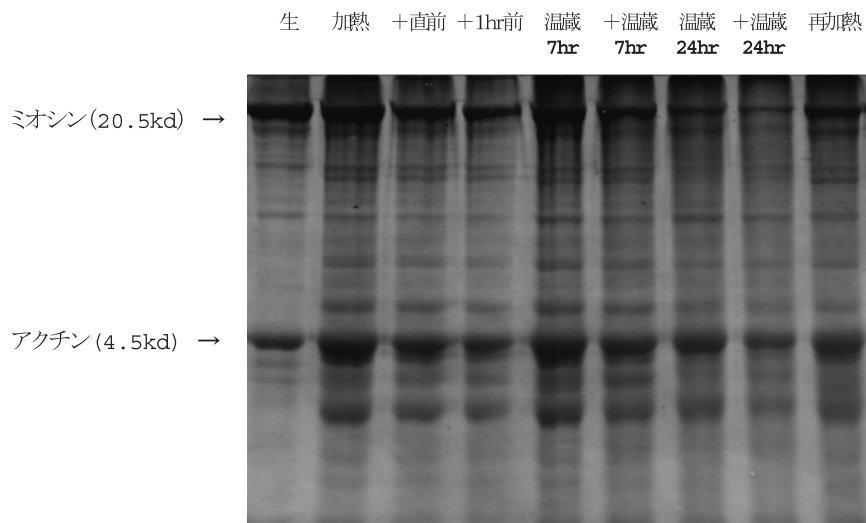


図3 筋原線維蛋白質のSDS-PAGEパターン（+生姜搾汁添加あり）

ることが示唆されたが、SDS-PAGEパターンに変化は認められず、作用を受けた場合かなり低分子化すると考えられた。

3.4 結合組織蛋白質

(1) 酸可溶性コラーゲン (ASC)

図4にASCのSDS-PAGEパターンを示した。生肉では、 β 鎖、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖がはっきりと認められるが、加熱肉では α 鎖の下に分解物の濃いバンドが認められ、コラーゲンが β 鎖、 α 鎖として高分子量のまま存在していると同時に、分解も生じていることが認められた。温蔵7時間後では、 β 鎖、 α 鎖のバンドは薄くなり、温蔵24時間、再加熱では β 鎖、 α 鎖が認められなかった。このことは、乾式加熱においても、温蔵、再加熱によって、変性（ゼラチン化）、分解（低分子化）が進行していることを示している。生姜搾汁を添加した場合、加熱前に添加したものでは、 β 鎖、 α 鎖のバンドが認められるものの、温蔵7時間では、認められなかった。生姜プロテアーゼは、コラーゲンのテロペプチド部位にのみ作用すること（ β 鎖から α 鎖へ変化させる）、コラーゲンが変性したゼラチンに対して速やかに作用することから、ここで認められた α 鎖の分解は、加熱、温蔵によってほどけた α 鎖にプロテアーゼが作用した結果と

考えられた。

(2) ペプシン可溶性コラーゲン (PSC)

図5にPSCのSDS-PAGEパターンを示した。未変性のPSCはテロペプチド部位を有しない三重らせん部位のみから構成される。生肉から抽出したPSCでは、 β 鎖、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖がはっきりと認められたが、加熱処理さらに生姜搾汁を添加したPSCでは、 β 鎖、 α 鎖のバンドは非常に薄く、濃い分解物のバンドが認められた。このコラーゲンの分解が、生姜プロテアーゼによるものであればASC画分あるいは水溶性画分として除去されるため、この分解はペプシンの作用によるものであるといえる。すなわち、コラーゲンのテロペプチド部位が切断され三重らせん部位がきりだされると同時に、その三重らせん部位にペプシンが作用し、低分子化していることを示している。ペプシンは未変性の三重らせん部位には作用できないことから、加熱肉のPSCの構造が、三重らせんがほどけた、あるいは、低分子化した部位が架橋でつながった不均一な構造であることを示している。

(3) 不溶性コラーゲン (ISC)

図6にISCのSDS-PAGEパターンを示した。未変性のISCは架橋により密な構造をしている。加

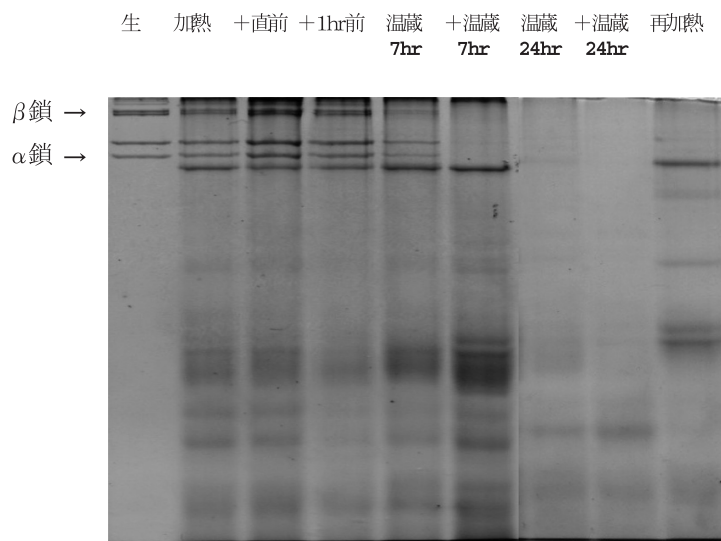


図4 酸可溶性コラーゲン (ASC) のSDS-PAGEパターン (+生姜搾汁添加あり)

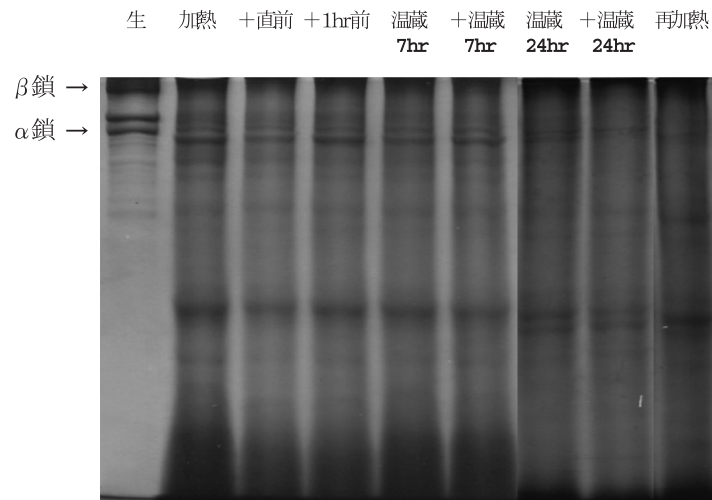


図5 ペプシン可溶化コラーゲン (PSC) のSDS-PAGEパターン (+生姜搾汁添加あり)

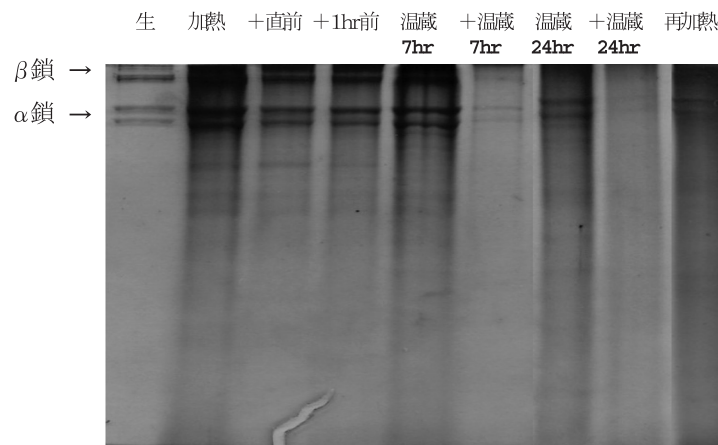


図6 不溶性コラーゲン (ISC) のSDS-PAGEパターン (+生姜搾汁添加あり)

熱肉では生肉に比較してISCのバンドが濃くなっているが、加熱により架橋が形成されるとは考えられず、このISC量の増加はコラーゲンの加熱収縮により、ペプシンが作用できない密な構造になったものと考えられる。また、温蔵では加熱肉よりも、バンドが薄くなっており、これは構造の弛緩に伴いペプシンが作用しPSC等へ移行したと考えられる。また、加熱、温蔵、再加熱ではバンドが不鮮明である。これらのことから、加熱肉のISCにはペプシンが作用できない密な部位に、加熱変性した部位が共存していると考えられる。生姜搾汁を加熱前に添加した場合、ISCのバンドは薄くなっており、また、バンドが鮮明に現れてい

る。温蔵時に生姜搾汁を添加した場合、バンドはほとんど認められない。生姜プロテアーゼは密な構造である未変性のISCには作用できないことから、このISC量の減少は、加熱前添加では酵素失活前の加熱過程で、加熱後添加では温蔵過程で変性部位に選択的に、プロテアーゼが作用した結果と考えられる。

(4) コラーゲンおよびコラーゲン関連ペプチド量

ヒドロキシプロリン (Hyp) 量から算出したコラーゲンおよびコラーゲン関連ペプチド量を図7に示した。加熱変性・低分子化によって、SDS-PAGEでは検出されない数1000kd程度の低分子量

のペプチドの存在を確認するために行った。加熱によるコラーゲン関連ペプチドの減少はわずかであり、再加熱による減少もわずかであった。これは加熱変性・低分子化による水溶化が少ないことを示している。一方、温蔵、生姜搾汁添加により著しい減少が認められた。ISC量は、加熱により増加し、再加熱によっても減少しないが、温蔵、生姜搾汁添加で著しく減少していた。前述のSDS-PAGEでは、温蔵時に生姜搾汁を添加した場合にコラーゲンのバンドはほとんど認められなかったが、Hypの定量結果からは添加していないものの1/2量程度が検出されており、ペプチド

として残存していた。なお、生姜プロテアーゼは60-70℃の比較的高温でも活性が維持されることをこれまでに確認している。

3.5 剪断強度

鶏肉の剪断強度を図8に示した。加熱中の肉の硬さは筋原線維蛋白質の凝固・収縮による硬化と、コラーゲンの変性・低分子化による軟化の兼ね合いで決定される。そのため、剪断強度の低下はISC量の低下ほど大きいものではないが、温蔵により、また、生姜搾汁添加により剪断強度が低下していることが示された。特に、加熱後（温蔵前）に生姜搾汁を添加した場合の減少は著しい

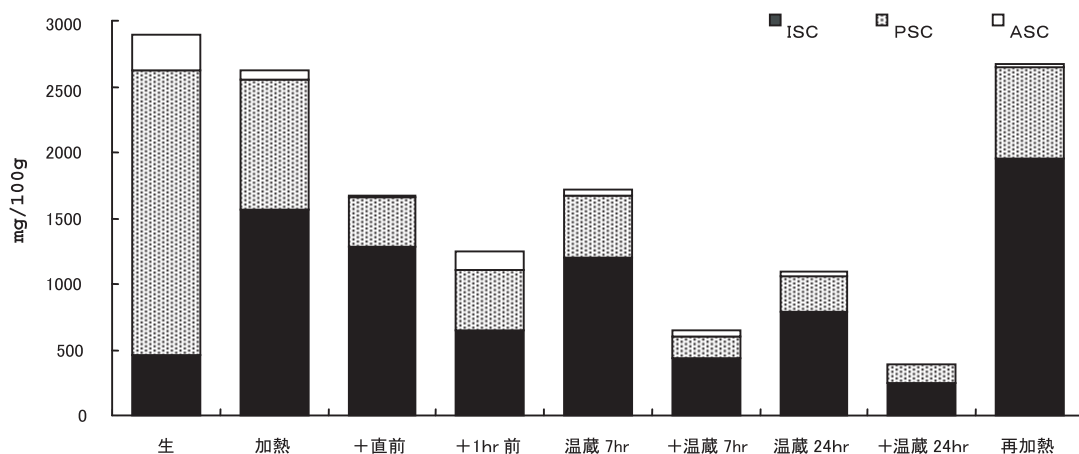


図7 コラーゲンおよびコラーゲン関連ペプチド量 (+生姜搾汁添加あり)

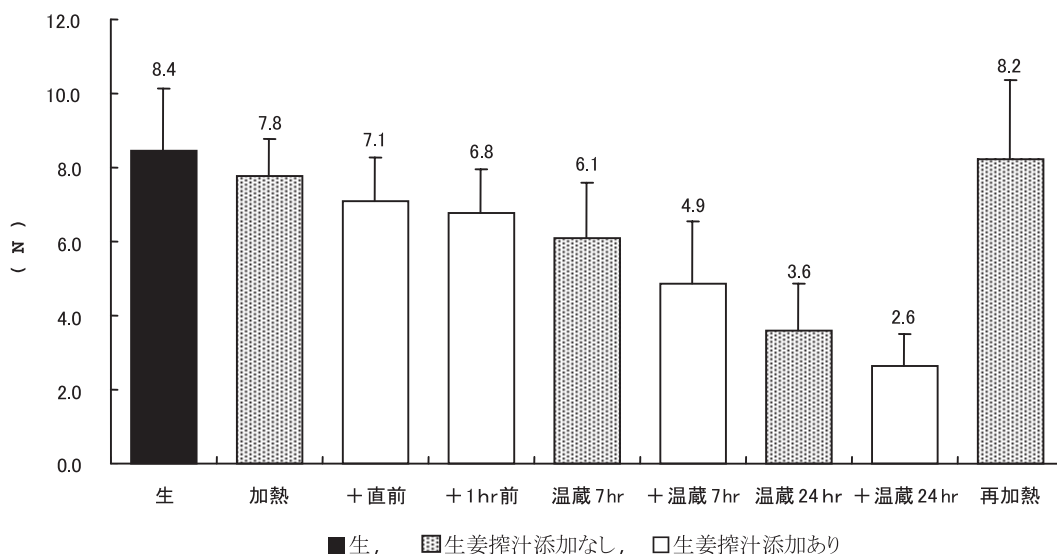


図8 剪断強度

ものだった。加熱前に生姜搾汁を添加した場合はISC量が減少していたにも関わらず(図7)、剪断強度に差が認められなかった要因は、生姜プロテアーゼがISCのゼラチン化した部分に作用し、ISCの強固な構造部分は維持されたためと考えられる。

3.6 脂肪量

脂肪量は加熱により約80%に減少し、温蔵、再加熱したものでもさらに減少した(図9)。これは、コラーゲンがゼラチン化することによって結合組織が弱化し、結合組織に沈着した脂肪が溶出したためと考えられた。生姜搾汁を添加した場合、加熱前、加熱後(温蔵前)のいずれでも脂肪量の減

少は認められなかった。我々は、フライパンで焼いた鶏肉生姜搾汁(10%, 30%)に一晩浸漬した鶏肉をフライパンで加熱調理した場合、脂肪量が有意な減少ではないものの約90%となることを報告し、結合組織の脆弱化が脂肪量に影響を及ぼすことを示している⁴⁾。本研究は、オープン加熱であり、鶏肉をゆり動かすことなく加熱調理を行ったために、溶出した脂肪が表面に付着したのかもしれない。

3.7 官能検査

温蔵時に生姜搾汁を添加した場合、コラーゲンの分解および剪断強度の低下が認められたため官能評価を行った(図10)。なお、本研究では微生

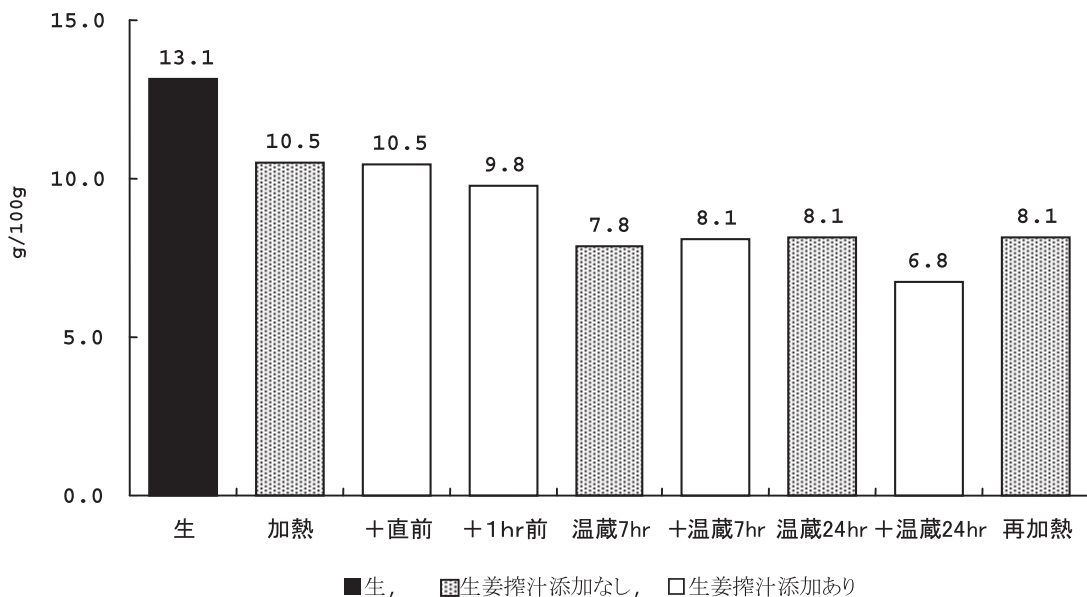


図9 脂肪量

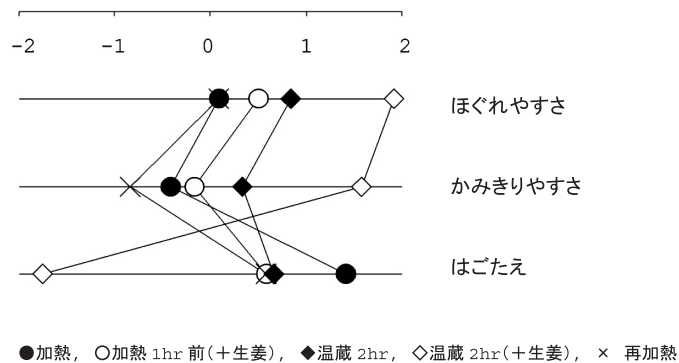


図10 官能検査

物試験を行っていないため、官能検査は衛生的観点から温蔵時間を2時間とした。その結果、加熱後に添加した場合、有意にほぐれやすく、かみきりやすくなり、歯ごたえが低下していた。外見上に差は認められず、物性に明らかな差が認められたことから、高齢者向きの調理方法として有効であると考えられる。なお、生姜搾汁を鶏肉重量の20%添加しているが、特有の刺激臭は感じられなかった。

4. 要 約

生姜プロテアーゼは、筋原線維蛋白質やコラーゲンが加熱変性したゼラチンに対して作用する。一方、コラーゲンに対しては、テロペプチド部位へ酸性条件下でのみ作用し、三重らせん部位へは作用しない。そのため、生姜搾汁で食肉を処理した場合、筋原線維蛋白質が分解される一方で結合組織蛋白質が分解されず、“すじ”が残った食肉となる。食肉の硬さを決定する最も大きな要因はコラーゲンであることから、本研究では調理工程と生姜プロテアーゼのコラーゲンに対する作用を把握し、高齢者が食べやすい食肉の調理加工方法を検討することを目的とした。

その結果、以下のことが明らかとなった。加熱過程によって総コラーゲン量は減少するが、不溶性コラーゲン (ISC) 量が増加した。不溶性コラーゲンのSDS-PAGEパターンから、加熱により収縮したコラーゲン繊維には三重らせんがほどけた部位や低分子化した部位が架橋でつながっているこ

とが示唆された。また、加熱後の温蔵により、総コラーゲン量は減少しゼラチン化が進行していた。生姜搾汁の添加によって、コラーゲン量、特にISC量が減少した。この減少は、温蔵時に生姜搾汁を添加した場合に著しいものだった。これは、加熱、温蔵により不均一な構造となったISCの加熱変性部位に、生姜搾汁が作用したためと考えられた。レオメーターによって測定した剪断強度は、コラーゲン量の減少に比例していた。さらに、官能検査の結果は、温蔵時に生姜搾汁を添加した食肉が、ほぐれやすく、かみきりやすい食肉であることを示した。

これらのことから、加熱後に温蔵工程を組み込むことによって結合組織蛋白質の構造変化をおこし、さらにプロテアーゼを作用させることで、噛み切りやすい食肉を調製することが可能であることが明らかとなった。

文 献

- 1) Ohtsuki, K. et.al. (1995) *Biochem. Biophys. Acta.* 1243, 181-184
- 2) Sugiyama, S. et.al. (2005) *J. Nutr. Sci. Vitam. 51,* 27-33
- 3) Anson, ML. (1939) *J. Gen Physiol.* 22, 79-89
- 4) 杉山寿美ら (2005) *日本家政学会誌*, 56, 607-615
- 5) Uytterhaegen, K. et.al. (1994) *J. Anim. Sci.* 72, 1209-1223
- 6) Sato, K. (1988) *Comp Biochem Physiol.* 90B, 155-158
- 7) Woesnner, JF. (1961) *Arch biochem Biophys.* 93, 440-447
- 8) Laemmli, UK. (1970) *Nature*, 227, 680
- 9) Bligh, EG. and Dyer, WJ. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917

Study of cooking methods to make meat easier to eat for the elderly - Tenderization of meat with ginger protease -

Sumi Sugiyama

(Department of Health Science, Prefectural University of Hiroshima)

Ginger protease acts on myofibrils and gelatin, which is generated by the thermal denaturation of collagen. The action of this protease on collagen occurs only in the telopeptide region under acidic conditions, and not in the triple-helical region. Therefore, when meat is treated with ginger juice, myofibril proteins are degraded, but connective tissue proteins are not, resulting in meat with residual fibers. The major factor determining the toughness of meat is collagen. In this study, we evaluated cooking methods to make meat easier to eat for the elderly, based on cooking procedures and the action of ginger protease on collagen.

As a result, the following findings were obtained: The total amount of collagen in the meat samples decreased with heating, but the amount of insoluble collagen (ISC) increased. The SDS-PAGE pattern of ISC in the meat samples suggested that sites with a loosened triple-helical structure and depolymerized regions were cross-linked in collagen shrunken by heating. Maintaining the hotness of the cooked meat samples by heating decreased the total amount of collagen, and increased gelatinization. The amount of collagen, ISC in particular, was decreased by the addition of ginger juice, which was significant when ginger juice was added to the cooked meat samples of which the hotness was maintained. This was probably because ginger juice acted on thermally denatured regions of ISC with irregular structures caused by heating and maintaining the hotness. The shear force measured using a rheometer was proportional to the decrease in the amount of collagen. Furthermore, sensory evaluation indicated that the ginger juice-added meat samples whose hotness was maintained were unstiffened, and could be easily chewed.

These results indicate that connective tissue proteins in meat were structurally altered by maintaining the heat after cooking, and meat could be made easier to chew by the application of protease.