

酵素を利用したたんぱく資源の高度利用

誌名	研究報告
ISSN	03889181
著者	福田, 和弘 渡辺, 忠美
巻/号	36号
掲載ページ	p. 11-18
発行年月	1989年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



酵素を利用したたんぱく資源の高度利用

— 酵素法によるチキンエキスの製造 —

(第一報) 原料前処理法と使用酵素剤の検討

福田和弘・渡辺忠美

Advanced Usage of Protein Resources by Enzyme

— Preparation of Chicken Extract by the Method of Enzymatic Hydrolysis —

(Part I) Examination of the Methods of the Previous Disposition of the Material and Screening of Enzyme.

Kazuhiro FUKUTA and Tadaharu WATANABE

昭和62年の本県のブロイラー出荷羽数は32,729千羽で、これは全国第4位であり¹⁾、ブロイラーは本県の主要産物（農業粗生産額23,850百万円、同構成比17%）となっている。

しかし近年アメリカおよびブラジル、タイ等から安価なブロイラー生肉および半加工製品が輸入され、ブロイラーの市況は低迷している。

このような状況は今後も続くと考えられ、国内のブロイラー産業界は対応策としてより高品質な肉質のブロイラーの生産や付加価値の高い加工製品の開発等が求められている。

ブロイラーの解体処理加工に際して、と体の約10%の骨がらが産出されるが、これは従来利用度が比較的到低く、この有効な利用が望まれていた。

このような現状を背景として、利用度の低い資源を利用して付加価値の高い天然調味料（ここではチキンエキスと称する）を効率よく製造する技術を開発することにより、ブロイラー産業の振興を図ることを目的として本研究を行った。

ブロイラー骨がらを原料として酵素分解法によるチキンボンエキス製造方法は既に一部検討されている²⁾が、今回原料の前処理法およびたんぱく質分解に供した酵素剤についてさらに検討したので報告する。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

昭和63年6月に県内I工場にて解体処理されたブロイラー（アーパーエーカー種）の胴がらを用いた。

表1に一般成分分析値を示す。

表1. 胴がらの一般成分

水分	53.0%
全窒素（粗たんぱく）	1.9(11.9)%
脂質	28.7%
灰分	6.0%

2. 供試酵素剤

表2に示した22種類の市販酵素剤を用いた。

3. 微生物数の測定と定性

(1) 一般生菌数

標準寒天培地を用い、37℃で48時間培養後形成したコロニーを数えた。

(2) 大腸菌群数

デゾキンコレート培地を用い、37℃で24時間培養後形成した赤色コロニーを数えた。

(3) 黄色ブドウ球菌

卵黄加マンニット食塩培地を用い、37℃で36時間培養後コロニー周辺の培地を黄変し、形成した黄色のコロニーについて定性試験を行った。

(4) サルモネラ

供試試料をEEMブイヨンにて37℃で24時間増殖前培養後、その一白金耳をDHL寒天平板に塗布、37℃で24時間培養後、形成した黒色コロニーを釣菌しその生理的な性質を確認した。

なお、培地はすべて日水製薬製を用いた。

4. 原料前処理（洗浄）

胴がらを水道水にて1分間流水洗浄した。また、熱水（80℃前後）に1分間もしくは3分間浸漬し、それぞれの区分につき微生物数の変化を測定した。

5. チキンボンエキスの調製（熱水抽出法）

原料に対して2倍量の水を加え、弱い沸騰状態（94℃前後）で一定時間加熱抽出した。

原料の大きさは、がらを5～6cmに切断したものと、さらに径1cm目のプレートを用いてミンチしたものの2区分とした。これらは、経時的にサンプリングし、No.2のろ紙にてろ過した後のろ液について全窒素を測定した。

6. 酵素分解

振とうフラスコに原料（がらミンチを用いて一時間加熱抽出したチキンボンエキス残渣）50 gに水100mlを加え、原料に対して0.1%（w/w）の酵素剤を添加し、50℃でゆるく振とうしながら4時間酵素分解した。反応終了後120℃で5分間オートクレーブ処理し、酵素を失活させた。なおpHは無調整（pH7前後）で行った。

7. 分析方法

(1) 一般分析

水分は常圧加熱乾燥法、全窒素はセミマイクロケルダール法、脂質はエーテル抽出法、灰分は直接灰化法を用いた。

(2) 窒素回収率

チキンボンエキス（熱水抽出法）は、ろ過後の抽出液の全窒素量を測定し、抽出液量と原料の全窒素量から窒素回収率を求めた。また、酵素分解液は、酵素失活後、遠心分離（4,000 rpm, 10分）し、その上澄液について全窒素を測定した。得られた上澄液量と原料の全窒素量から窒素回収率を求めた。

(3) 遊離アミノ酸総量

酵素失活前の分解液20mlに等量の10%（w/v）トリクロロ酢酸（TCA）水溶液を加えて10分間放置後、遠心分離（4,000rpm, 10分）を行い、その上澄液を遊離アミノ酸総量の分析試料とし、改良カドミウムーニンヒドリン法³⁾（MCN法と略す）により分析した。

すなわち分析試料0.5ml、カドミウムーニンヒドリン試薬（ニンヒドリン0.8gをエタノール80mlに溶解し、酢酸10mlと塩化カドミウム水溶液（1g/ml）1mlを添加混合したもの）1mlを径18mmの試験管内で混合し、試験管の口にガラス玉を置き、84℃で5分間加熱後、氷水中にて冷却し507nmにおける吸光度を測定した。検量線はL-ロイシンを標準として作成し、遊離アミノ酸総量をL-ロイシン等量として求めた。

(4) 遊離アミノ基総量

分析試料は、前記MCN法と同様のものを用いトリニトロベンゼンスルホン酸法⁴⁾（TNBS法と略す）により遊離アミノ基総量を求めた。

分析試料液1mlに4%（w/v）炭酸水素ナトリウム溶液（pH8.5）1mlおよび0.1%（w/v）トリニトロベンゼンスルホン酸水溶液1mlを加え、40℃で30分間反応させた（L-ロイシンのトリニトロフェニール〔TNP〕化は本条件で100%進行する）。⁵⁾ 1N塩酸0.5mlを添加して反応停止後、335nmにおける吸光度を測定した。検量線はMCN法と同様にL-ロイシンを標準として作成し、遊離アミノ酸およびペプチド由来の遊離アミノ基の総量をL-ロイシン等量として求めた。

表2. 供試酵素剤

酵 素 名	起 源	至適pH	公 称 活 性
プロテアーゼAアマノ	Aspergillus oryzae	7.0 4.0	10,000 u/g (アマノ法)
プロテアーゼBアマノ	Penicillium SP.	6.0 10.0	—*
プロテアーゼMアマノ	Aspergillus oryzae	3.0	5,500 u/g (アマノ法)
プロテアーゼNアマノ	Bacillus subtilis	7.0	150,000 u/g (アマノ法)
プロテアーゼPアマノ	Aspergillus melleus	8.0	10,000 u/g (アマノ法)
プロテアーゼSアマノ	Bacillus SP.	8.0	10,000 u/g (アマノ法)
ニューラーゼF	Rhizopus niveus	3.0	7,000 u/g (アマノ法)
プロレザー	Bacillus SP.	10.0	10,000 u/g (アマノ法)
パンクレアチンF	Animal Pancreas	8.0	26,000 u/g (カゼイン-フォーリンB法)
パパインW・40	Carica Papaya	8.0	400,000 u/g
中性プロテアーゼ	Streptomyces SP.	7.0~7.5	100,000 u/g
サーモライシン	Bacillus thermoproteolyticus	7.9~9.0	8,360,000 pu/g
ヌクレイシン2L	Bacillus subtilis	6.0	100,000 u/g
プロメリン	Pineapple Stem Juice	8.0~8.5	—
フィシン	Fig Tree Latex	6.4	—
トリプシン	Bovine Pancreas	7.5~8.5	—
アルカラーゼ0.6L	Bacillus licheniformis	8.0	0.6Au/g (アンソソ法)
プロナーゼ	Streptomyces griseus	7.5	約65,000PUKu/g
プロティナーゼK	Tritiachium album	8.0~11.5	約200,000 u/g (ヘモグロビン)
ズブチリシン	Bacillus subtilis	8.0	5,000 u/g (カゼイン-フォーリンB法)
パンチターゼNP	Aspergillus oryzae	7.0	—
コラゲナーゼ	Clostridium histolyticum	6.5~7.0	<500 u/g

*—:記載なし

結果および考察

1. 原料前処理方法の検討

原料中の微生物数を表3に示した。

通常骨がらは、一般生菌数で 10^5 個/gレベル、大腸菌群数で $10^3 \sim 10^4$ 個/gレベルであり、黄色ブドウ球菌およびサルモネラもがらの部位（内臓、肛門部の近辺）によっては陽性となる場合も少なくない。このように原料は微生物数が多く、そのまま用いた場合には

加工工程中に微生物汚染が進行し、製品へも移行する恐れがあるため何らかの方法で原料の微生物汚染を軽減させることが必要と考えられた。微生物汚染を軽減させる方法としては、薬剤等による殺菌もあるが、本報では製品への影響を考慮し、流水洗浄および熱水浸漬法について検討した。表4に原料の洗浄方法と微生物数の変化を示した。

表4. 原料の洗浄方法と微生物数の変化（個/g）

	対照（無処理）	流水（1分）	熱水（1分）	熱水（3分）
一般生菌数	2.6×10^5	2.0×10^1	6.6×10^3	7.5×10^2
大腸菌群数	1.5×10^3	<300 (100)	<300 (陽性)	<300 (陽性)

流水洗浄では、一般生菌数および大腸菌群数とも無処理の1/10となった。一方、熱水浸漬（1分間）では一般生菌数が1/100程度、大腸菌群数で陰性となり、3分間浸漬では、一般生菌数は1/1,000に減少した。

この結果より、微生物汚染の軽減には加熱処理する方が効果的であった。通常、チキンボンエキ스는熱水抽出法により製造されることから、酵素分解の原料としては、がらを一定時間加熱処理し、チキンボンエキスを抽出後、その残渣を用いた方が効率的であると思われた。

次に、原料の大きさおよび加熱抽出時間による窒素回収率の変化を表5に示した。

原料の大きさが5~6cmでは、加熱2時間後で窒素回収率は11%程度であるのに対し、1cm目のプレート

を通したがらミンチでは、30分でそれと同等以上となり、約60分で頭打ち状態を示し、以後の増

表3 原料中の微生物数

微生物数	
一般生菌数	3.8×10^5 個/g
大腸菌群数	6.6×10^3 個/g
黄色ブドウ球菌	陰性
サルモネラ	陰性

表5. 原料の大きさと窒素回収率の経時変化

時間	窒素回収率 (%)	
	がら (5~6 cm)	がらミンチ (1 cm目)
30分	8.5	12.1
60分	7.4	13.1
90分	10.6	13.6
120分	10.8	14.6

加率は低かった。

このようなことから、がらはミンチ処理し、加熱抽出時間は作業性も考慮すれば1時間程度がよいと考えられた。

2. 使用酵素剤の検討

表2に示した22種の市販酵素剤を用いて、胴がらを基質とした場合の分解用酵素のスクリーニングを行った。ここでの選択基準は窒素回収率が高くかつアミノ酸等の呈味成分生産量が多く苦味の少ないものとした。表6に種々の酵素剤使用による窒素回収率、遊離アミノ酸総量、遊離アミノ基総量を示した。

表6. 骨がらミンチ(チキンボーンエキス残渣)の酵素分解

供試酵素剤	窒素回収率 (%)	遊離アミノ酸総量 MCN法 (L-ロイシン換算mg/ml)	遊離アミノ基総量 TNBS法 (L-ロイシン換算mg/ml)
プロテアーゼAアマノ	60.0	8.8	17.6
プロテアーゼBアマノ	54.8	4.0	10.4
プロテアーゼMアマノ	61.6	11.2	17.6
プロテアーゼNアマノ	61.3	0.8	10.0
プロテアーゼPアマノ	60.7	7.2	15.2
プロテアーゼSアマノ	49.1	0.4	6.0
プロレザー	48.2	1.2	6.0
ニューラーゼF	37.8	1.2	4.4
パンクレアチンF	47.5	4.0	10.0
パパイーンW・40	34.7	0.4	3.6
コラゲナーゼ	25.0	0.4	2.4
中性プロテアーゼ	48.5	1.2	7.2
サーモライシン	68.9	0.6	9.2
ヌクレイシン2L	46.0	0.4	5.6
ブロメリン	46.5	0.7	6.0
フィシン	41.8	0.6	5.2
トリプシン	39.0	0.6	0.8
プロナーゼ	73.9	6.0	16.8
アルカラールゼ0.6L	35.3	0.7	4.0
プロティナーゼK	59.8	2.0	10.8
ズブチリシン	61.4	1.2	9.6
パンチターゼNP	29.9	0.7	4.0
プロテアーゼBアマノ* ¹	24.9	0.6	2.2
プロテアーゼMアマノ* ¹	32.3	1.6	6.0
ニューラーゼF* ¹	22.2	0.4	2.0

*¹ pHを3.0に調整したもの

窒素回収率は、プロナーゼ、サーモライシン、プロテアーゼアマノM、ズブチリシンの順で高く、遊離アミノ酸総量は、プロテアーゼMアマノ、プロテアーゼAアマノ、プロテアーゼPアマノまた遊離アミノ基総量は、プロテアーゼMアマノ、プロテアーゼAアマノ、プロテナーゼ、プロテアーゼPアマノの順に高かった。窒素回収率は、放線菌、細菌起源のプロテアーゼが高く、遊離アミノ酸およびアミノ基総量は麴菌等カビ起源のプロテアーゼが多い傾向であった。このことは、プロテアーゼにはたんぱく質を主としてペプチドまで分解するエンド型ペプチダーゼとアミノ酸まで分解するエキソ型ペプチダーゼのあることが知られているが、細菌起源プロテアーゼには主にエンド型ペプチダーゼが存在し、窒素回収率は上がるもののアミノ酸生成量は少なく、カビ起源プロテアーゼにはさらにエキソ型ペプチダーゼも存在するためアミノ酸生成量が多くなったと考えられた。

また、得られたエキスの呈味性を官能的に評価した場合、特に窒素回収率が高い酵素剤の中でサーモライシン、ズブチリシン、プロナーゼ、プロテアーゼNアマノに強い苦味が感じられた。これは、たんぱく質を酵素分解した時の苦味はペプチドに由来することが多く、このことから、これらの酵素剤にはエンド型ペプチダーゼの存在が示唆された。

一方、プロテアーゼMアマノ、プロテアーゼBアマノ、ニューラーゼFは公称至適pHが3付近であるため、分解条件のpHを1N塩酸で3.0に調整し、それぞれ分解を行った。いずれの試験区もpH無調整区(pH7前後)と比較して窒素回収率は1/2程度、アミノ酸生成量は1/3以下であった。これは、基質により働くペプチダーゼが異なり、がらを基質とした場合には、中性付近に至適pH持つペプチダーゼが主に分解に関与しているためと推察された。

以上の結果より、熱処理後の骨がらを原料とし、単一の酵素剤を使用する場合には、プロテアーゼMアマノが最も有効であると考えられた。

今後は、さらに酵素分解条件および呈時成分等について検討を加える予定である。

要 約

ブロイラー骨がら(胴がら)を原料とし、酵素分解によりエキスを製造する場合の原料前処理法と市販酵素剤のスクリーニングを検討し、次の結果を得た。

- (1) 骨がらの微生物数を軽減する方法としては流水洗浄より熱水浸漬が有効であった。
- (2) 酵素分解前に原料を熱水抽出法によりチキンボンエキスを製造することは、窒素回収率、微生物汚染防止の面で有効であり、原料の大きさは、ミンチ(1cm目プレート使用程度)にした方が良かった。
- (3) 単一の酵素剤を使用する場合には、プロテアーゼMアマノが最も有効であった。

文 献

- 1) 中国四国農政局徳島統計情報事務所編集，；徳島農林水産統計年報，昭和62～63年，（1988）
- 2) 石田賢吾・鍛冶義延・山本淳：日食工誌，26，168（1979）
- 3) DOI, E., SHIBATA, D. and MATOBA, T. : Anal. Biochem., 118, 173 (1981)
- 4) HABEED, A.F.S.A. : Anal. Biochem., 14, 328 (1966)
- 5) 福田和弘・谷敏文・渡辺忠美・小川正：日食工誌，33，186（1986）