

9554 食肉加工製品の塩漬工程におけるフレーバー形成機構

助成研究者：西村 敏英 (広島大学 生物生産学部)

共同研究者：三原 丈典 (広島大学)

【目的】 ハムやソーセージなどの食肉加工製品の製造には塩漬工程があり、この間に精肉とは異なる色調が付与されると同時に、テクスチャーやフレーバーが改良される。しかし、近年製造コストを下げる為に、塩漬期間を短縮したハムが多く製造され、本来のフレーバーに欠けることが大きな問題となっている。このような問題を解決する為、本研究では塩漬工程でのフレーバー成分の変化を調べると同時に、フレーバー成分の形成に寄与するプロテアーゼを特定し、その生成機構を調べた。

【方法および結果】 豚肉を塩漬剤 (2% NaCl, 0.1% KNO₃) 添加並びに無添加で5日間4℃で貯蔵した時、ペプチドの増加が認められた。前者での増加量は後者のものに比べて少なかった。カルパインの活性は塩漬剤により影響を受けなかった。また、カテプシンBとLの活性は、NaClにより阻害されることから、ペプチド増加が塩漬剤添加で抑制されたのは、両酵素の塩漬剤による活性低下によると推察された。

塩漬剤を添加して貯蔵した豚肉の遊離アミノ酸の増加量は、無添加で貯蔵した場合に比べて、30%少なかった。しかし、両者で各アミノ酸の増加パターンにほとんど差は認められず、塩漬工程での遊離アミノ酸の増加は、食肉熟成の場合と同様、主にアミノペプチダーゼCとHによると推察された。次に、各アミノペプチダーゼ活性の貯蔵による変化を陰イオン交換クロマトグラフィーで調べた。いずれの肉でも、5つのアミノペプチダーゼ活性が認められた。各酵素の溶出位置と基質特異性から、アミノペプチダーゼB、C、Hの存在が確認された。いずれの酵素も5日間の貯蔵により活性の減少が認められたが、塩漬剤添加で貯蔵した場合の活性は無添加の場合とほとんど差は認められなかった。従って、塩漬剤添加貯蔵で遊離アミノ酸の増加が、無添加のものに比べて少なかったのは、酵素の塩漬剤による失活によるものでないと推察された。また、いずれの場合もアミノペプチダーゼCとHの活性が最も高かったことから、両酵素が塩漬工程での遊離アミノ酸の増加の寄与因子であると確認された。

各アミノペプチダーゼ活性はNaClにより大きな影響を受けた。その影響は同一酵素でも基質により異なっていた。アミノペプチダーゼCのLeu-NAに対する活性はあまり影響を受けなかったが、Lys-NAに対する活性が約50%阻害された。また、アミノペプチダーゼHのGlu-NAに対する活性は全く阻害されなかったが、Leu-NAに対する活性が32~34%阻害された。このように、遊離アミノ酸の増加に最も貢献しているアミノペプチダーゼCとHの活性がNaClの影響を大きく受けることが明らかとなり、このことが塩漬剤添加で遊離アミノ酸の増加を抑制した主因であると推察された。

9554 食肉加工製品の塩漬工程におけるフレーバー形成機構

助成研究者：西村 敏英（広島大学 生物生産学部）

共同研究者：三原 丈典（広島大学）

1. 研究目的

わが国の食生活の洋風化、多様化並びにライフスタイルの変化にともない、ハムやソーセージなどの食肉加工製品の消費量は増加している。これらの製品の製造には食塩、亜硝酸塩、香辛料を含む塩漬剤を肉表面にすりこんだり（乾塩法）、塩漬剤を含むピクル液に肉を数日間漬け込む塩漬工程（湿塩法）が必須である。この工程によって、食肉加工製品は精肉とは異なる色調が付与されると同時に、テクスチャーやフレーバーが改良される。特に、長期間塩漬したものは、フレーバーにすぐれていることが経験的に知られている。しかし、近年製造コストを下げするために、ピクル液を強制的に原料肉に注射、浸透させ塩漬期間を短縮したハムが多く製造されており、本来のフレーバーに欠けることが大きな問題となっている。

食肉の熟成によるフレーバー形成には、熟成中に増加する遊離アミノ酸やペプチドが貢献している^{1,2)}。これらの増加は、食肉に内在するプロテアーゼの作用によりもたらされることが知られている³⁾。一方、食肉加工製品の塩漬工程におけるフレーバーの形成機構についての研究は非常に少ない。これまでに、ソーセージやハム作成時の塩漬工程での遊離アミノ酸の変化についての報告^{4,5)}がある。また、豚肉抽出物を用い、肉内在性プロテアーゼであるカテプシンやアミノペプチダーゼの活性に及ぼす塩漬剤の影響を調べた報告^{6,7)}がある。しかし、いまだに塩漬工程におけるフレーバー形成についての知見は少なく、フレーバー成分の生成機構についてほとんど解明されていないのが現状である。

そこで、本研究では塩漬工程でのフレーバー成分の変化を調べると同時に、フレーバー成分の形成に寄与する内在性プロテアーゼを特定し、フレーバー成分の生成機構を推察した。さらに、それらの食塩等の塩漬剤に対する影響を明らかにすることにより、塩漬工程の改良点を考察した。

2. 研究方法

2.1 実験材料

試料として、屠殺後2日目の豚ロース (*M. longissimus thoracus*) を用いた。

イオン交換樹脂はDE-52 (ワットマン社製) を用いた。アミノペプチダーゼの基質として、Ala- β -ナフチルアミド (Ala-NA) (Shigma社製) および Arg-, Glu-, Leu-, Lys-, Pro-NA (Bachem社製) を使用した。アミノペプチダーゼの阻害剤として使用したEDTA とヨード酢酸は、それぞれ関東化学とナカライテスク社より購入した。

2.2 塩漬方法

豚ロースの塊に肉塊重量の1/10量のピクル液 (20% NaCl、1% KNO₃水溶液) を注射器で注入し、4°Cで5日間保存した。同量の蒸留水を注入した豚ロースの塊を同条件で貯蔵したものをコントロールとした。

2.3 アミノペプチダーゼの分画法

貯蔵前の豚ロース、および塩漬剤添加並びに無添加で貯蔵した豚ロースを挽き肉にした後、3倍量の0.1%のメルカプトエタノールを含む40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) を加えてホモジナイズし、酵素を抽出した。この抽出物を10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) に透析後、同じ緩衝液で平衡化したDE-52カラムにかけた。平衡化に用いた緩衝液で非吸着タンパク質を完全に溶出した後、吸着したタンパク質を食塩濃度傾斜法 (0-0.4 M NaCl) で溶出した⁸⁾。

2.4 アミノペプチダーゼの活性測定法

200 μ l の酵素溶液を200 μ l の1 mM アミノ酸- β -ナフチルアミド/2 mM DTTを含んだ100mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) と混合し、37°Cで一定時間インキュベートした。遊離した β -ナフチルアミンを*p*-ジメチルシナムアルデヒドで発色させ、その吸光度を540 nm で測定した⁸⁾。

2.5 遊離アミノ酸およびペプチド測定試料の調製法

貯蔵前の豚ロース、および塩漬剤添加並びに無添加で貯蔵した豚ロースを挽き肉にした後、1.7倍量の蒸留水を加え、1分間ホモジナイズした。このホモジネートに5%になるようにトリクロロ酢酸を添加し、除タンパク質処理を行った。遠心分離後、得られた上清を用い、遊離アミノ酸量を測定した。さらに、この上清を6 N塩酸存在下、110°Cで24時間加水分解し、全アミノ酸量を測定した。全アミノ酸量から遊離アミノ酸量を差し引いたアミノ酸量をペプチド態アミノ酸量とした⁹⁾。

2.6 アミノ酸分析

アミノ酸量はベックマン 6300E 型アミノ酸分析計を用いて定法により定量した。

2.7 カルパインの調製法

石浦ら¹⁰⁾の方法に従い、豚胸最長筋より調製した。豚挽き肉に3倍量の1mM EDTA を含む20mM 炭酸水素ナトリウム溶液を加え、5分間ホモジナイズした。10,000 x

gで20分間遠心分離し得られた上清を1N酢酸でpH 4.9に調整した後、7,000 x gで遠心分離した。得られた沈殿を、0.1%メルカプトエタノール、5 mM EDTA、10 mM NaClを含む20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）で懸濁し、同じ緩衝液で平衡化したDE-52カラムにかけた。活性画分をウルトロゲルAcA34にかけ、部分精製カルパインを得た。

2.8 カルパインの活性測定法

カルパインを0.7 mlの0.17%カゼイン、0.7%メルカプトエタノール、3.6 mM 塩化カルシウムを含む70 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）中、30°Cで30分間インキュベートした。終濃度4%となるようにトリクロロ酢酸を加えて反応を停止した。4°Cで1時間放置後、15,000 x gで15分間遠心分離し、得られた上清の280 nmでの吸光度を測定した。

3. 結果および考察

3.1 塩漬工程でのペプチドの変化

豚肉を塩漬剤添加並びに無添加で5日間4°Cで貯蔵したとき、いずれの場合もペプチドの増加が認められた（Fig. 1）。しかし、塩漬剤を添加して貯蔵した場合には、その増加量が無添加のものに比べて少なかった。それぞれの増加量は、添加した場合に5.0 $\mu\text{mol amino acids/g}$ 肉、無添加の場合には15.0 $\mu\text{mol amino acids/g}$ 肉であった。

食肉熟成中のペプチド増加に貢献しているプロテアーゼとしてはカルパイン並びにカテプシンBとLが知られている。そこで、豚ロースよりカルパインを調製し、その塩漬剤に対する影響を調べた。データは示していないが、カルパインの活性は塩漬剤により全く影響を受けないことが明らかとなった。一方、カテプシンBとLの活性は、長期の塩漬工程において、徐々に低下してゆくものの数カ月後にも検出されると報告されている¹¹⁾。また、これらの活性は食塩濃度4~5%存在下で、25~35%阻害されることが知られている⁵⁾。これらの知見より、塩漬剤添加の豚肉貯蔵でペプチドの増加が抑制されたのは、カルパインでなく、カテプシンの塩漬剤による活性低下によると推察された。

3.2 塩漬工程での遊離アミノ酸の変化

豚肉を塩漬剤添加並びに無添加で5日間4°Cで貯蔵したとき、いずれの場合も遊離アミノ酸の増加が認められた（Fig. 2）。それぞれの増加量は、添加した場合および無添加の場合に、それぞれ6.3、9.1 $\mu\text{mol/g}$ 肉であった。特に多く増加したアミノ酸は、いずれの場合もAla, Leu, Glu, Serであった（Fig. 3）。一方、増加量の少なかったアミノ酸は、Pro, Trp, Cys, Asnであった。これまでに、ソーセージ製造での塩漬工程では、Ala, Thr, Glx, Ser, Leuが、ハムの製造における塩漬工程では、Glu, Pro, Ala, Val, Ser, Lysが

多く増加すると報告されている^{3, 4)}。本研究での結果もこれらと同様の傾向を示した。

塩漬剤を添加して貯蔵した場合には、遊離アミノ酸の増加量が無添加のものに比べて31%少なかった。ソーセージ製造における2日間の塩漬工程では、15%しか抑制されなかったと報告されている³⁾。これは、塩漬条件の違いに起因していると考えられる。また、いずれのアミノ酸の増加も塩漬剤添加により抑制された。しかし、その増加パターンは、塩漬剤無添加の場合とほぼ同じであったことから、塩漬工程での遊離アミノ酸の増加は食肉熟成の場合と同様、主にアミノペプチダーゼCとHによってもたらされると推察された。

3.3 塩漬工程でのアミノペプチダーゼ活性の変化

豚肉を塩漬剤添加並びに無添加で5日間4℃で貯蔵することにより、内在性のアミノペプチダーゼの活性がどのように変化するかを調べた。貯蔵前、貯蔵後の各肉からアミノペプチダーゼを抽出後、陰イオン交換クロマトグラフィーでアミノペプチダーゼを分画し、各基質に対する活性を測定した (Fig. 4, 5)。

いずれの肉でも、多くのタンパク質がカラムに吸着せず溶出し、アミノペプチダーゼ活性は、非吸着画分 (0 M) に1つ、NaClによる溶出画分に4つ (0.11, 0.13, 0.20 M) 認められた。0 M画分は、それほど大きな活性を示さなかったが、Ala-, Arg-, Glu-, Leu-, Pro-NAのすべてに同程度の活性を示した。0.11 M画分は、Ala-, Leu-, Pro-NAに対し活性が認められた。特に、Ala-NAに対する作用が大きかった。0.13 M画分は、Arg-NAに対して活性を示した。0.20 M画分は、すべての基質に対し全画分の中で最も大きな活性を示した。特に、Ala-, Arg-NAに対する作用が大きかった。これらの結果は、先に我々が新鮮な豚肉で得られた結果¹²⁾とほぼ一致していた。溶出したNaClの濃度から、0.13 M画分はアミノペプチダーゼB、0.20 M画分はアミノペプチダーゼCとHによると推察された。この画分の両酵素の識別は、それぞれの阻害剤を用いて行った。すなわち、EDTA (Cの阻害剤) あるいはヨード酢酸 (Hの阻害剤) 存在下での活性をそれぞれアミノペプチダーゼHあるいはCによるとした。

いずれのアミノペプチダーゼも5日間の貯蔵により活性の減少が認められた。しかし、塩漬剤添加で貯蔵した場合の酵素活性の強さは、無添加の場合とほとんど差は認められず、いずれも0.20 M画分のアミノペプチダーゼCとHの活性が最も高いことが判明した。従って、この両酵素が塩漬工程での遊離アミノ酸の増加の寄与因子であると確認された。このように、塩漬剤存在下でも酵素の安定性が非存在下に比べて低下しないことから、塩漬剤添加貯蔵で遊離アミノ酸の増加が、無添加のものに比べて少なかったのは、酵素の塩漬剤による安定性の低下によるものでないと推察された。

0 M 画分の Leu-NA 分解活性は貯蔵により増加した。この画分には多くのタンパク質が含まれており、各活性も同一酵素によるとは考えられないので、今後さらに分画して詳細な検討が必要である。

3.4 アミノペプチダーゼの塩漬剤による影響

塩漬剤添加により貯蔵した豚肉での遊離アミノ酸の増加が、無添加貯蔵に比べて抑制された理由を解明するため、各アミノペプチダーゼの塩漬剤に対する影響を調べた (Table 1)。

いずれの画分の酵素活性も0.1% 亜硝酸塩の影響を全く受けなかった。一方、NaCl は0.11 M 画分の酵素以外の酵素活性に大きな影響を及ぼした。また、同一酵素でも基質によりその影響が異なっていた。0 M 画分の Leu-NA 分解活性は、NaCl 存在下で2～3 倍に増加した。0.13 M 画分の酵素は、NaCl により約35% 阻害された。さらに、0.20 M 画分のアミノペプチダーゼHのGlu-NAに対する活性は全く阻害されなかったが、Leu-NA に対する活性が32～34% 阻害された。同じ画分のアミノペプチダーゼCのLeu-NA に対する活性はあまり影響を受けなかったが、Lys-NA に対する活性が約50% 阻害された。このように、豚肉の熟成による遊離アミノ酸の増加に最も貢献しているアミノペプチダーゼCとHの活性がNaCl の影響を大きく受けることが明らかとなった。このことが、塩漬剤添加で遊離アミノ酸の増加を抑制した主因であると推察された。

4. 今後の課題

本研究により、食肉加工製品の塩漬工程におけるペプチドの増加は、カテプシンとカルパインの作用により、また遊離アミノ酸の作用は主にアミノペプチダーゼCとHの作用によりもたらされると推察された。また、塩漬工程でペプチド並びに遊離アミノ酸の増加が抑制されたのは、カテプシン並びにアミノペプチダーゼCとHの活性がNaCl により阻害されたことによると推定された。しかし、アミノペプチダーゼの阻害には基質特異性があることから、遊離アミノ酸の生成機構の全容を解明するためには、種々の合成ペプチドを用いて、その特異性をさらに詳細に検討する必要がある。

また、塩漬工程でペプチドや遊離アミノ酸の増加を促進するために、塩漬剤の影響を全く受けなかったカルパインを活性化することが考えられる。具体的には、Caイオンを塩漬剤の中に添加し、塩漬工程でカルパインを活性化することにより、ペプチドおよび遊離アミノ酸生成を促進することが可能になるであろう。

5. 文献

- 1) 沖谷明紘、松石昌典、西村敏英 (1992) 食肉のおいしさと熟成、調理科学、25、

314-326.

- 2) Nishimura, T., Rhyu, M.R., Okitani, A. and Kato, H. (1988) Components Contributing to the Improvement of Meat Taste during Storage, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2323-2330.
- 3) 西村敏英 (1994) 食肉の熟成による呈味向上に寄与する成分の生成機構、*酪農科学・食品の研究*, 43、A101-108.
- 4) 塚正泰之、福本憲治、朝井 大、藤間能之、赤羽義章、鈴木富久子、安本教傳 (1989) 豚肉の塩漬期間中の呈味成分の変化、*日本食品工業学会誌*, 36、279-285.
- 5) Cordoba, J.J., Rojas, T.A., Gonzalez, C.G., Barroso, J.V., Bote, C.L., and Asensio, M.A. (1994) Evolution of Free Amino Acids and Amines during Ripening of Iberian Cured Ham, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2296-2301.
- 6) Rico, E., Toldra, F., and Flores, J. (1991) Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsin B, H, and L activity, *Z. Lebens. Unters. Forchs.*, 193, 541-544.
- 7) Toldra, F., Cervero, M.C., and Part, C. (1993) Porcine Aminopeptidase Activity as Affected by Curing Agents, *J. Food Sci.*, 58, 724-726.
- 8) Nishimura, T., Okitani, A. and Kato, H. (1988) Identification of Neutral Aminopeptidases Responsible for Peptidolysis in Postmortem Rabbit Skeletal Muscle, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2183-2190.
- 9) Okumura, T., Inuzuka, Y., Nishimura, T., and Arai, S. (1996) Changes in Sensory, Physical and Chemical Properties of Vacuum-Packed Pork Loins during the Prolonged Conditioning at 4 °C, *Animal Science and Technology (Jpn.)*, 67, 360-367.
- 10) Ishiura, S, Murofushi, H., Suzuki, K., and Imahori, K. (1978) Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle, *J. Biochem.*, 84, 225-230.
- 11) Toldra, F., Rico, E., and Flores, J. (1993) Cathepsin B, D, H and L Activities in the Processing of Dry-Cured Ham, *J. Sci. Food Agric.*, 62, 157-161.
- 12) Nishimura, T., Okitani, A., Rhyu, M.R. and Kato, H. (1990) Survey of Neutral Aminopeptidases in Bovine, Porcine, and Chicken Skeletal Muscles" *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2769-2775.

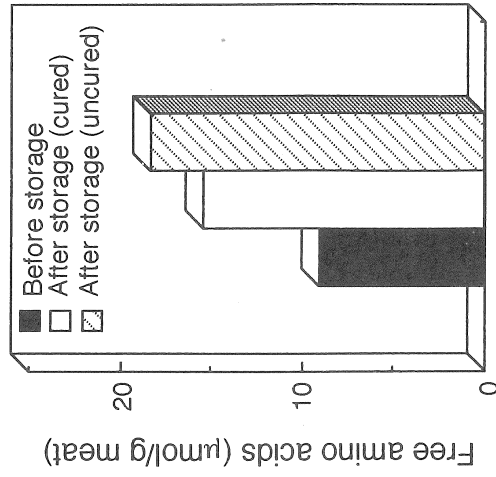


Fig. 2 Changes in the amounts of total free amino acids during the storage of pork with and without curing agents.

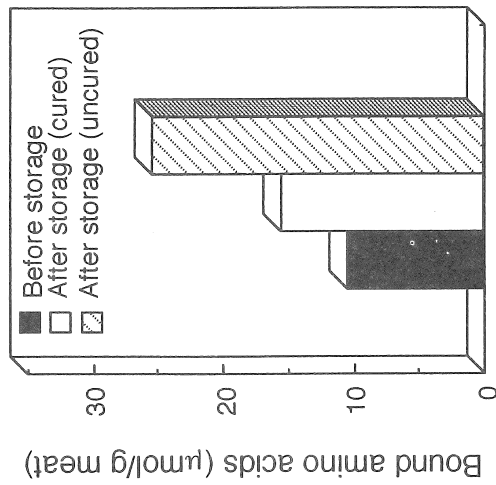


Fig. 1 Changes in the amounts of total bound amino acids during the storage of pork with and without curing agents.

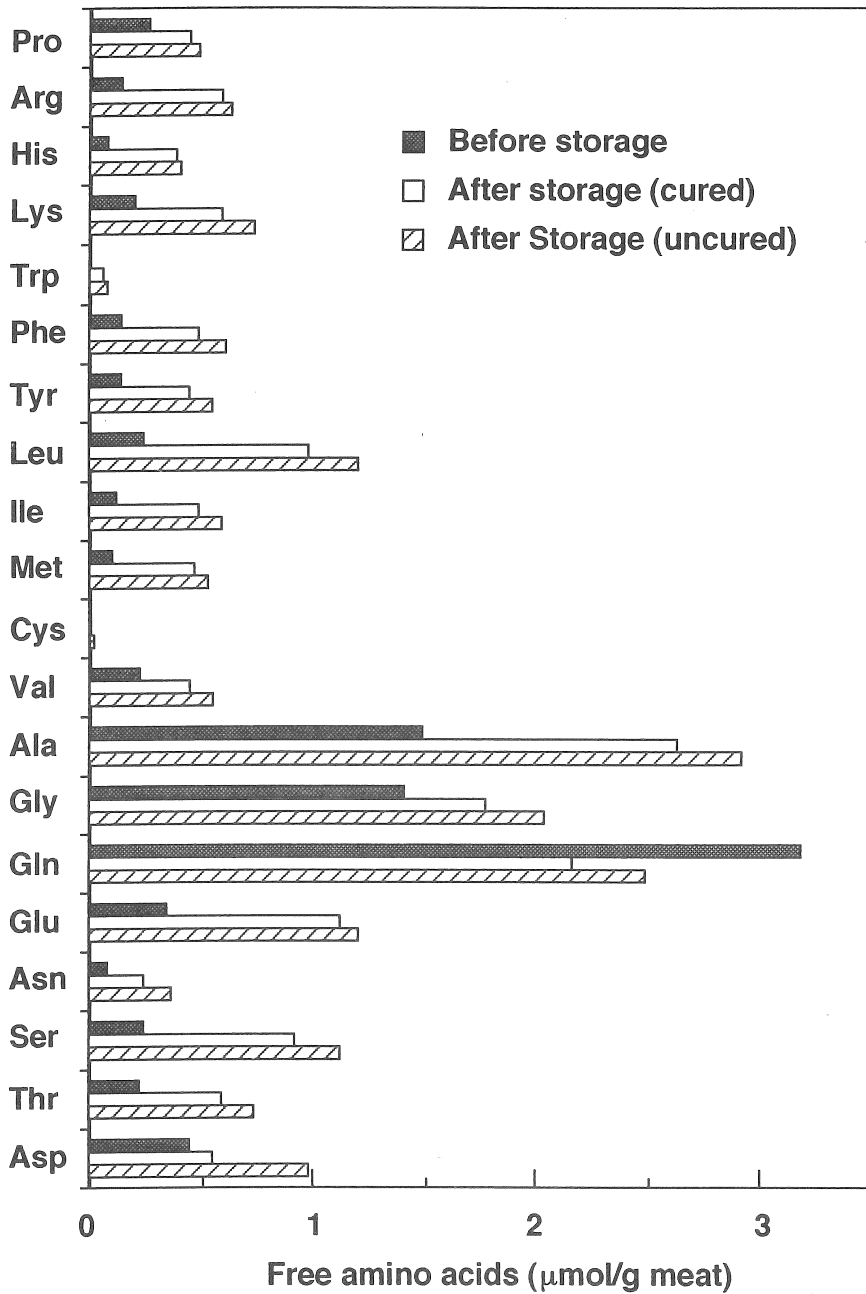


Fig. 3 Change in each amino acid during the storage of pork with and without curing agents.

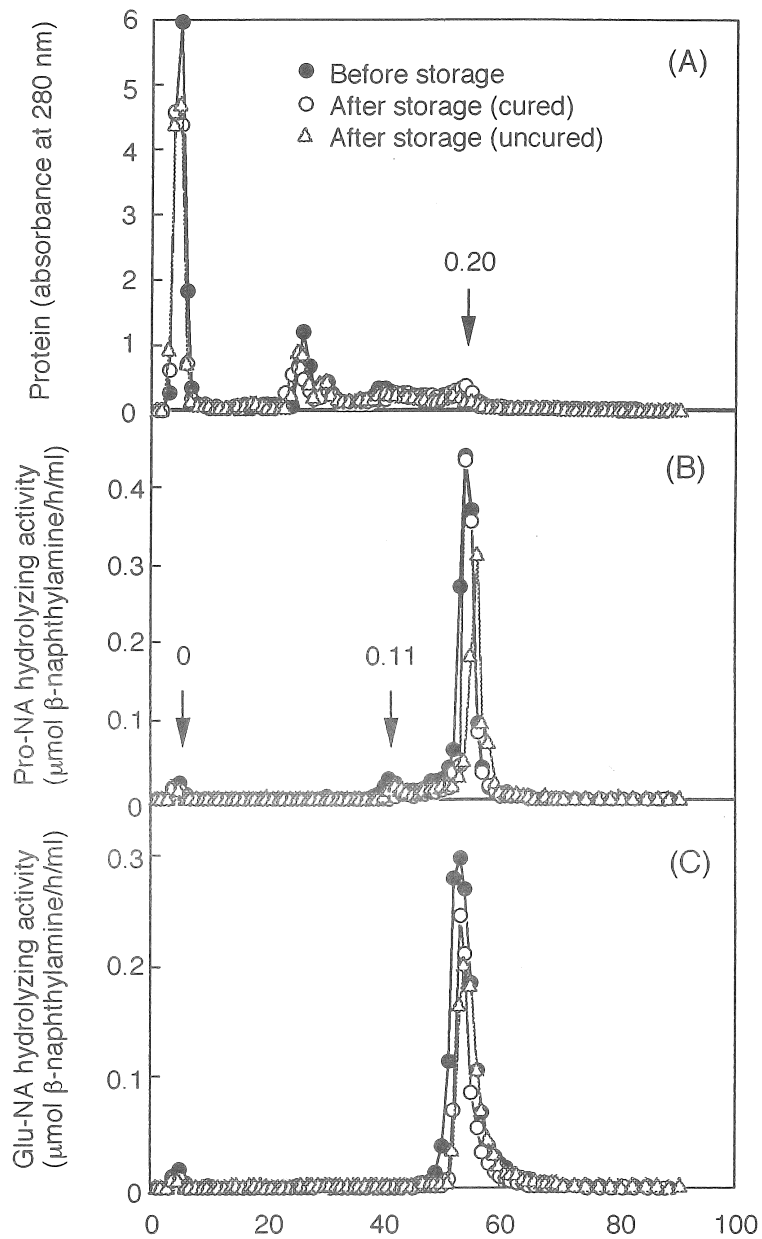


Fig. 4 DEAE-cellulose column chromatography of the extract from pork before storage, and after storage with and without curing agents. (A) protein, (B) Pro-NA hydrolyzing activity, (C) Glu-NA hydrolyzing activity

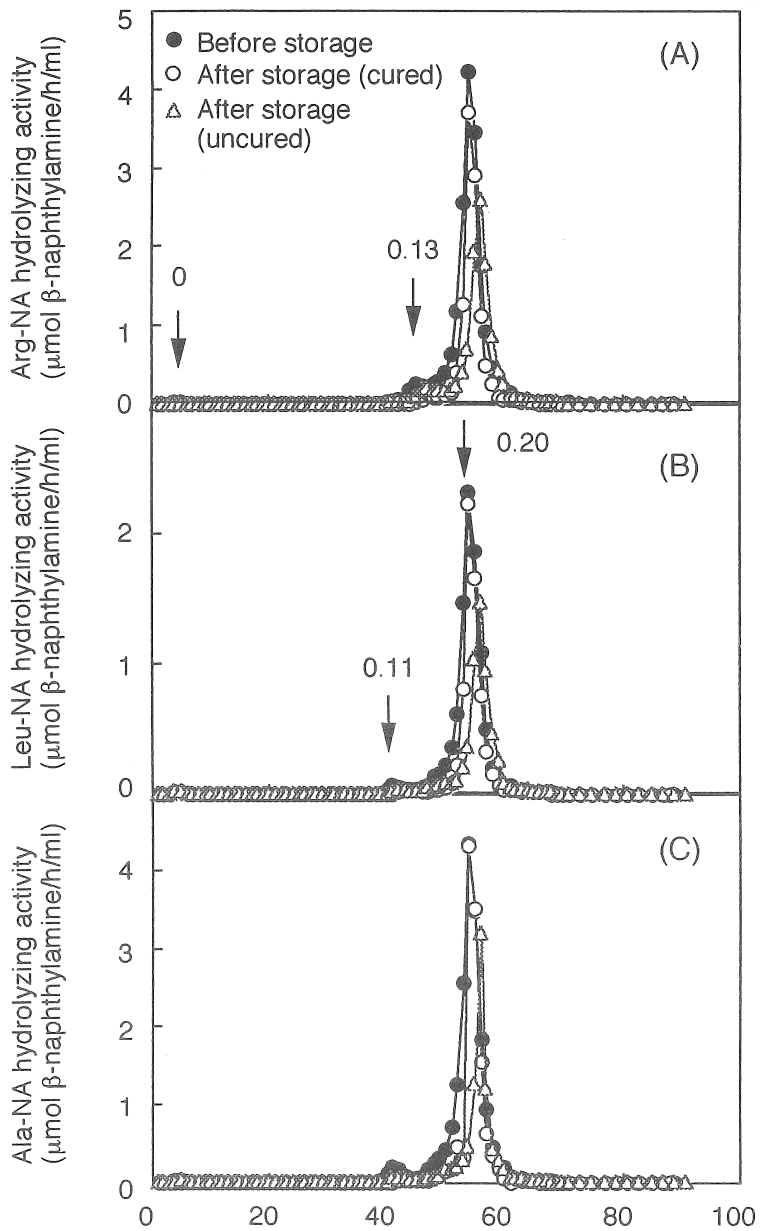


Fig. 5 DEAE-cellulose column chromatography of the extract from pork before storage, and after storage with and without curing agents. (A) Arg-NA hydrolyzing activity, (B) Leu-NA hydrolyzing activity, (C) Ala-NA hydrolyzing activity

Table 1 Effect of curing reagents on aminopeptidase (APase) activities

APase	Substrate	None	0.1% KNO ₃	2% NaCl	2% NaCl +0.1% KNO ₃
0 M	(Leu-NA)	100	129.0	245.0	270.4
0.11 M	(Leu-NA)	100	90.0	85.1	85.1
0.13 M (APase B)	(Lys-NA)	100	95.4	66.7	65.5
0.20 M # (APase H)	(Leu-NA)	100	124.4	68.4	65.8
	(Glu-NA)	100	99.5	108.6	101.0
0.20 M (APase C)	(Leu-NA)	100	101.3	87.4	83.8
	(Lys-NA)	100	98.1	55.3	49.6

#; The activities of aminopeptidase C and H in the 0.20 M NaCl fraction were measured by adding Iodoacetic acid and EDTA, respectively.

Mechanism of the production of flavor compounds in the curing-process of meat products

Toshihide Nishimura and Takenori Mihara
Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University

Summary

In this study, the changes in flavor compounds during the curing-process of meat products were examined, and the proteases contributing to their productions were identified.

Peptides increased during the storage of pork with or without curing agents (2% NaCl and 0.1% KNO₃). Its increment during the storage of pork with curing agents was smaller than that without curing agents. Calpain involved in the increase of peptides during the storage of meats was not inhibited by both curing agents. A curing agent, NaCl, has been reported to inhibit the activities of cathepsins B and L contributing to the peptides increase. The decrease of their activities in the presence of NaCl seems to result in the depression of the peptides increase during the storage of pork with curing agents.

Free amino acids increased during the storage of pork with or without curing agents. Its increment during the storage of pork with curing agents was smaller than that without curing agents. However, there were scarcely differences in the pattern of the increase of free amino acids between porks with and without curing agents, indicating that the increase of free amino acids during the curing-process of meat as well as during the storage of meat is caused by aminopeptidases C and H.

Five aminopeptidases were detected on ion-exchange chromatography of the extract from pork before and after storage. The activities of these aminopeptidases in pork decreased after storage with and without curing agents. However, the intensities of aminopeptidase activities in the pork stored with curing agents did not differ from those in the pork stored without curing agents at all. Furthermore, these aminopeptidase activities were shown to be appreciably inactivated by the curing agent, NaCl. Only 50-55 % of the original aminopeptidase C activity toward Lys- β -naphthylamide (Lys-NA) was recovered in the presence of 2% NaCl. Aminopeptidase H was also affected by 2% NaCl, recovering around 66-68% of its original activity toward Leu-NA. From these results suggested that the inactivation of aminopeptidases C and H by NaCl caused the depression of the increase of free amino acids during the storage of pork with curing agents.