

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580186

研究課題名(和文) 海洋生物由来コラーゲン分解酵素のスクリーニング及び同酵素による食肉軟化作用の検証

研究課題名(英文) Screening of collagen-degrading enzyme from marine organisms and its application to meat tenderization

研究代表者

小川 雅廣(Ogawa, Masahiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：10398034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：老廃牛肉や廃鶏肉などの硬い肉を、肉特有のテクスチャーを損なうことなく軟化させる技術が求められている。本研究では、肉の硬さの原因であるコラーゲン線維を分解できる酵素(CDE)を海洋生物から探し出し、その酵素が肉を軟化できるか検討した。魚介類(ハマチと帆立貝)の内臓と魚類体表に付着した細菌89菌株にCDEを見出した。最も強い活性を示したのはPseudomonas属菌SF10株(ババガレイ体表に付着)とShewanella属菌JS51株(スズキ体表に付着)由来の酵素であった。SF10由来酵素を大量生産し、牛肉塊に添加し4℃で5日間保存したところ、肉は柔らかくなった。

研究成果の概要(英文)：A method that is capable of tenderizing tough meat without losing meat-specific texture is required in meat industry. In this study, we performed screening of collagen-degrading enzyme (CDE) from marine organisms including sea animals and bacteria and evaluated the effect of CDE on the physical property of meat. Sea animal guts (yellowtail and scallop) and 89 bacterial strains adhering to fish skins showed collagen-degrading activity. Of all the marine organisms tested, Pseudomonas sp. SF10 isolated from flat fish and Shewanella sp. JS51 isolated from sea bass possessed CDEs with highest collagen-degrading activity. SF10-CDE was injected into beef chunks. The CDE-treated meat which was incubated at 4℃ for 5 days was significantly tenderer than untreated meat.

研究分野：農芸科学・食品科学

キーワード：コラーゲン 食肉軟化酵素 プロテアーゼ パパイン テクスチャー 塩漬液

1. 研究開始当初の背景

老廃牛肉や廃鶏肉などの利用価値の低い硬い食肉から、柔らかくおいしい肉製品を開発する方法が求められている。硬い肉を柔らかくする方法としては市販のタンパク質分解酵素(パepsinなど)を使って肉タンパク質を分解する方法が広く利用されているが、市販のタンパク質分解酵素の多くは肉を柔らかくするが、それと同時に肉質を著しく低下させてしまう。肉質が低下してしまう主な原因は、

- 肉の硬さ(噛み切り難さ)の原因タンパク質であるコラーゲン線維よりも肉質の良し悪しを左右する筋原線維タンパク質を優先的に分解してしまうこと
- 肉の加熱調理温度である約 70 で失活しないこと

などにある。

肉質を低下させずに肉を柔らかくするには、コラーゲン線維を優先的に分解し、70 で完全に失活する酵素が必要である。我々の研究室では独自のスクリーニング法を使って、コラーゲン線維を分解する酵素(CDE)のスクリーニングを行ってきた。その結果、寒冷地の土壌細菌 C 35 に CDE を見出した。この C 35 株由来の CDE は コラーゲン線維を強力かつ優先的に分解し、70 で完全に失活し、食肉への軟化作用を示すことを明らかにしてきた(特許第 5515057 号)。しかし、C 35 由来 CDE は、5%以上の NaCl 濃度で失活してしまうことから、多量の食塩を使う食肉加工品への応用が難しい。

2. 研究の目的

老廃牛肉や廃鶏肉などの利用価値の低い硬い食肉から、柔らかくおいしい肉製品を開発するために、

- コラーゲン線維を強力かつ優先的に分解すること
- 70 で完全に失活すること
- 5%以上の NaCl 濃度でも失活しないこと

以上の3つの条件をすべて兼ね備えた CDE を、海洋動物および海洋動物に寄生している細菌からスクリーニングし、そこから見出した酵素を食肉軟化に応用するための基礎的な情報を得ることを目的とした。この研究は、老廃牛肉や廃鶏肉など硬い肉の高付加価値化に寄与するとともに、高齢者用のやわらかい食肉加工品の開発に役立つと期待される。

3. 研究の方法

(1) 魚貝類消化器官からの酵素の回収法

ハマチの消化器官(胃、腸、幽門垂)およびホタテガイの中腸腺に、生理食塩水を加え均一化後、遠心分離した。上清に80%飽和の硫酸アンモニウム(硫酸)を加え酵素を回収した。

(2) 魚類細菌からの酵素回収法

10種の魚(ブリ、カンパチ、マダイ、スズキ、サンマ、チヌ、サバ、ボラ、スケトウダラ、ババガレイ)を実験に用いた。生理食塩水を使って魚体表から細菌を回収した。回収した菌液を 0.5M NaCl 入り Trypticase Soy Broth (TSB) 寒天培地に播いて細菌を単離した。単離した各菌を 0.5M NaCl 入り TSB 液体培地中で、4 で約1週間振とう培養することで酵素を生産させた。培養液を遠心分離し、培養上清に硫酸(80%飽和)を加え菌体外分泌酵素を回収した。

(3) コラーゲン分解活性測定法

コラーゲン線維と回収した酵素を 10 で3日間反応させ、SDS-PAGE によりコラーゲン分子鎖の分解が見られるものを、コラーゲン分解活性を有すると判定した。なお、SDS-PAGE によるコラーゲンバンドの分解度合いから酵素活性(Unit)を求めた。

(4) 酵素精製法および化学的性質の解析法

菌の培養液から酵素の精製を行った。酵素の精製は、粗酵素液を疎水性相互作用クロマトグラフィー(GEヘルスケアバイオサイエンス株社製 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow high sub 樹脂を使用)、イオン交換クロマトグラフィー(生化学工業社製 DEAE セルロファインおよび CM セルロファイン樹脂を使用)、ゲル濾過クロマトグラフィー(GEヘルスケアバイオサイエンス株社製 Sephacryl S-100 樹脂を使用)、分取用等電点クロマトグラフィー(バイオ・ラッド社製 Rotofor システムを使用)にかけて行った。酵素の生化学的性質の解析は、精製した酵素を用いて、基質特異性(基質としてミオシン、ミオグロビン、血清アルブミン)、最適 pH、耐熱性、酵素阻害剤の影響を調べた。

(5) 肉の軟化作用の評価法

SF10 菌を 1L の TSB 中で 4、5 日間培養し、酵素を生産させた。培養上清中から、硫酸沈殿(30%~80%飽和硫酸)により酵素を回収した。0.1%SF10 酵素液 約 60mL をローストビーフ用牛肉塊(アウトサイドフラット)約 300g に注入し、4 で5日間酵素処理を行った。なお、酵素注入肉は毎日タンブリング処理を行った。酵素処理後、厚さ 1.5cm、幅 3.0cm に整形し、(株)山電製のクレープメーカー RHEONER を使ってせん断強度測定を行い、肉軟化への酵素の作用を評価した。

4. 研究成果

(1) コラーゲン分解酵素のスクリーニング

高塩濃度でも失活しないコラーゲン分解酵素を魚介類の体内および魚類の体表に付着した細菌からスクリーニングを試みた。

魚貝類の消化器官（胃、腸、幽門垂）および魚類の体表に付着している細菌から水溶性の酵素を回収し、硫酸分画を行った。ハマチの幽門垂では 30-60%飽和硫酸分画に、ホタテ中腸腺では 40-60%飽和硫酸分画にコラーゲン分解活性がみられた。しかし、それらの酵素活性の値は、以下で述べる細菌由来酵素よりも低かったため、食肉軟化の評価には、細菌由来のコラーゲン分解酵素を使うことにした。

ブリ、カンパチ、スズキ等 10 種の魚の体表から 1323 菌株を単離した。これらの細菌にコラーゲン分解活性があるか調べたところ、6 魚種の 89 菌株に活性がみられた(表 1)。

表 1. 魚体表からの単離されたコラーゲン分解細菌

魚種	回収した菌株数	コラーゲン分解細菌株の数	各菌株の略号
ブリ(ハマチ、ツバスを含む)	252	57	YT1-57
カンパチ	96	16	AJ1-16
マダイ	132	0	
スズキ	325	1	JS51
サンマ	29	0	
チヌ	34	1	BP8
サバ	159	0	
ボラ	8	0	
スケトウダラ	96	2	WP1, 2
ババガレイ	192	12	SF1-12
合計	1323	89	

これら 89 の陽性菌の酵素について、1.5M (8.8%) NaCl を添加してもコラーゲン分解活性が見られるか調べた。この 1.5M (8.8%) NaCl とは、食肉加工に用いる塩漬液の標準的な食塩濃度である。0.04(Unit/10 μL 酵素液あたり)以上の高いコラーゲン分解活性値を示したのは、BP3 (チヌ由来)、JS51 (スズキ由来)、YT3 (ブリ由来)、SF9~12 (ババガレイ由来) の 7 菌株であった(図 1a)。なお、この中で最も高い活性を示したのは SF10 であった。高い活性値を示したこれら 4 菌株 (BP3、JS51、YT3、SF10) の酵素について耐塩性を調べたところ、YT3 と JS51 の酵素は、NaCl 無添加と 1.5M NaCl 添加とでほとんど酵素活性が変わらなかったことから、高い耐塩性を持つことがわかった(図 1b)。一方、最も高い活性を示した SF10 酵素は、NaCl 添加により 36%活性が減少することから、YT3 や JS51 の酵素に比べ耐塩性は劣ることが分かった。

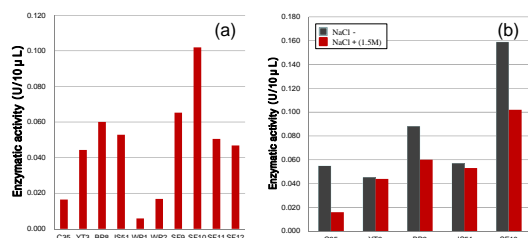


図 1. 各菌株粗酵素液の(a)高塩濃度下での活性および(b)その耐塩性

(a)菌体外液の1.5M NaCl存在下でのコラーゲン分解活性
(b)1.5M NaClの存在下、非存在下でのコラーゲン分解活性の比較

以上のことより、魚貝類の消化管および魚類体表に付着している細菌ともにコラーゲン分解酵素を生産することが、高塩濃度下でも高いコラーゲン分解活性を有するのは SF10 菌、高い耐塩性を有するのは YT3 菌と JS51 菌であることがわかった。

(2) コラーゲン分解細菌の特性

細菌が菌体外に分泌する酵素を大量生産するには、菌の特性を知る必要がある。研究成果(1)のスクリーニングにおいて、高いコラーゲン分解活性を有した JS51、SF10 について菌の特性を調べた。

顕微鏡による菌の形態観察から、JS51 は長径約 3 μm、短径約 1 μm の桿菌、SF10 は長径約 5 μm、短径約 2 μm の桿菌であった。また、両菌ともグラム陰性菌であり、運動性を示した。16S rRNA 遺伝子の配列解析から、JS51 菌株は *Shewanella* 属、SF10 菌株は *Pseudomonas* 属の細菌であることが分かった。

両菌株の栄養要求性を調べたところ、JS51 はアルギニン (Arg)、グルタミン酸 (Glu)、リジン (Lys) を必要としたが、SF10 には必須アミノ酸がなかった。酵素生産に適した合成培地の検討を行ったが、両菌株とも合成培地では十分量のコラーゲン分解酵素が生産されなかった。合成培地に 7 種類のアミノ酸 (Arg, Glu, Lys, Leu, Ser, Val, Ile) 20mM とゼラチンペプトン 2mg/ml を添加した半合成培地によって、酵素の生産量は大幅に増加した。

(3) 酵素の生化学的性質

酵素の生化学的性質を知るためには、コラーゲン分解酵素を分離精製する必要がある。研究成果(2)で見出した半合成培地を使って JS51、SF10 両菌を培養し酵素を生産させた。培養上清からコラーゲン分解酵素の分離精製を試みた。酵素の分離は、疎水性相互作用クロマトグラフィー (疎水クロマト)、分取用等電点クロマトグラフィー (等電点クロマト)、イオン交換クロマトグラフィー (IE クロマト) により行った。疎水クロマト樹脂には、JS51、SF10 両酵素とも 1.0M 硫酸の存在下で吸着し、JS51 酵素は硫酸を含まない溶液で溶出、SF10 酵素は 0.25M 硫酸で溶出した。IE クロマト (SF10 のみ実施) では、DEAE セルロファイン (移動相の pH8.6) には吸着したが、CM セルロファイン (移動相の pH7.5) には吸着しなかった。等電点クロマトでは、JS51、SF10 とも pH8.0 から pH9.0 の間にコラーゲン分解酵素が溶出した。これらのことから、両酵素の等電点は、8.0 から 8.6 の間にあるものと推定された。疎水クロマトの酵素分画をゲル濾過クロマトグラフィーにかけ精製度を高めた。SDS-PAGE 解析により、JS51 酵素の分子量は 45~50kDa、SF10 酵素の分子量は 45kDa と推定された。

SF10 酵素の生化学的性質を調べた。ローストビーフなどの加工肉は、60~70 で加熱処

理される。そこでまず SF10 酵素の加熱による影響を調べた。酵素活性は 60 加熱によって約 90%減少し、70 加熱で完全に失活した。60 で大方熱失活したことから、SF10 酵素は市販の食肉軟化酵素パパインよりも加熱制御しやすい酵素であることがわかった。SF10 酵素の最適 pH は、pH9 と弱アルカリ性で強く働く酵素であった。pH6、pH7 での酵素活性は、pH9 での活性値のそれぞれ 22%、64%でありかなり低かった。食肉の pH は pH6 付近であることから、食肉中での酵素の働きは最適ではないと考えられる。耐塩性については塩濃度が上昇するにつれて酵素活性値は若干減少傾向にあるが、塩漬液中の塩濃度に相当する 1.5M (8.8%) NaCl では十分な酵素活性を保持していることから、SF10 酵素は食肉の塩漬工程でも十分に働くことが示唆された (図 2)。

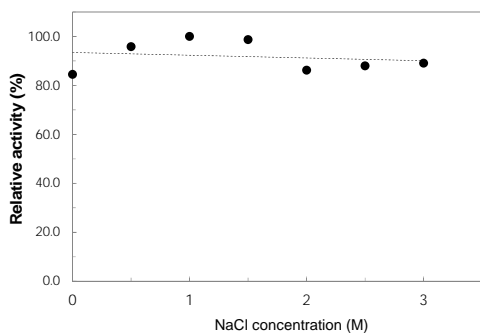


図2 . SF10由来酵素のコラーゲン分解活性へのNaClの影響

また、酵素阻害試験の結果から SF10 酵素は PMSF、EDTA、1,10-Phenanthroline により阻害された。このことより、SF10 酵素はセリンプロテアーゼで、酵素活性に金属が関係していることが示唆された。

酵素の基質特異性については、コラーゲンとミオシンを同程度分解した (図 3)。パパインなど市販の食肉軟化酵素は、コラーゲンよりもミオシンをより強く分解することから、SF10 酵素は従来の食肉軟化酵素と比べて、コラーゲンへの親和性が高い酵素であることが示唆された。

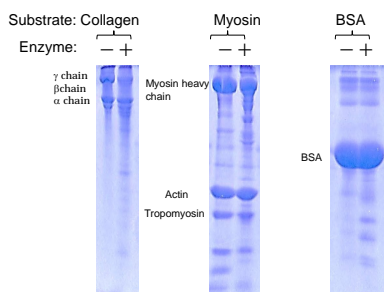


図3 . SF10由来酵素の基質特異性

+: 酵素あり、-: 酵素なし、BSA: Bovine Serum Albumin

(4) 酵素の食肉軟化作用

SF10 酵素を食肉に添加して、肉の軟化作用を評価した。SF10 酵素で処理した牛肉の内部組織は、1.5M NaCl 処理肉の組織と類似しており、外観からはそれほど肉タンパク質の分解が進んでいるように見えなかった (図 4)。一方、パパイン処理肉では、ところどころに白色のすじがみられ、肉眼でも見えるほど肉タンパク質の分解が進んでいることが分かる。

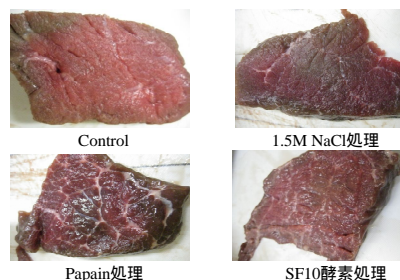


図4 . 酵素処理肉(未加熱)の内部組織

Controlは未処理で4、5日間放置後の肉；
1.5M NaCl処理は1.5M NaCl溶液で4、5日間処理(Blank)；
Papain処理は(1.5M NaCl + 0.1% Papain)溶液で4、5日間処理；
SF10 酵素処理は(1.5M NaCl + 0.1% SF10 酵素(186U/mL))溶液で4、5日間処理

酵素処理肉の柔らかさについてせん断強度測定により評価した。SF10 酵素処理肉(未加熱)は、コントロール肉や 1.5 M NaCl 処理肉とせん断時での応力に大差がなかったが、歪率 40%での応力の値はコントロール肉の約 20%であった (図 5)。パパイン処理肉も SF10 酵素処理肉と同等の柔らかさであった。このことから SF10 酵素処理によって肉が柔らかくなることがわかった。

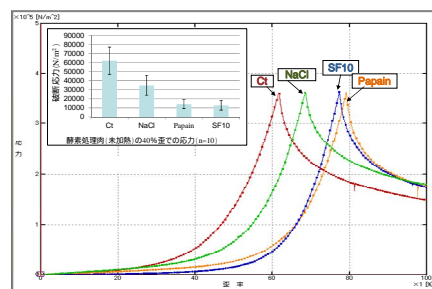


図5 . 酵素処理肉(未加熱)の柔らかさ評価

図は、未加熱肉のせん断強度測定の結果を示す。また、挿入図は40%歪での応力を示す(n=10)。

Controlは1.5M NaCl溶液で4、5日間処理(Blank)；
NaClは1.5M NaCl溶液で4、5日間処理；
Papainは(0.1% Papain + 1.5M NaCl)溶液で4、5日間処理；
SF10は(0.1% SF10酵素(186U/mL) + 1.5M NaCl)溶液で4、5日間処理

65 で加熱した肉の柔らかさを未加熱肉と同様にせん断強度測定により評価した。SF10 酵素処理肉の歪率 40%での応力は、コントロール肉や 1.5 M NaCl 処理肉の約 60%であり、加熱肉においても軟化効果がみられた。一方、パパイン処理肉は、歪率 40%での応力の値がコントロール肉や 1.5 M NaCl 処理肉のわずか 10%と、実験に用いた 4 試料のうちで最も柔らかかったが、加熱後のパパイン処理肉にはせん断点が見られないことが

ら、肉としての弾力性を失っていた。以上の結果を総合して判断すると、SF10 酵素は食肉軟化酵素として最もよく利用されているパインよりも、柔らかくておいしい肉製品を開発するのに適していることが示唆された。今後 SF10 酵素の実用化には、安全性の確認や安価な大量生産方法の確立が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

J.N. Losso and M. Ogawa: Thermal stability of chicken keel bone collagen, Journal of Food Biochemistry, 査読有、DOI:10.1111/jfbc.12059 (Article first published online: 9 DEC 2013)

〔学会発表〕(計 13 件)

Ogawa, M. : Meat tenderization by novel bacterial collagenases, International Symposium on Food and Agro-biodiversity (ISFA) 2014, Download file from keynote speakers (Protected), 2014 年 9 月, Semarang, Indonesia.

小川 雅廣、河尻 芙生子、竹内 千智、早川 茂、安倍 恵、田邊 学、中出 浩二、東久邇 眞彦、小齊 喜一 : 魚類付着細菌由来コラーゲン分解酵素のスクリーニングおよび同酵素の食肉軟化作用、日本食品科学工学会第 59 回大会、2012 年 8 月、藤女子大学 (北海道)

〔図書〕(計 1 件)

小川 雅廣 他、**養賢堂**、農学入門 **食料・生命・環境科学の魅力** 第 6 章 おいしさの科学、2013、137-168

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 2 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/?research=%e5%b0%8f%e5%b7%9d%e9%9b%85%e5%bb%a3%e3%80%80%ef%bc%88%e9%a3%9f%e5%93%81%e3%82%bf%e3%83%b3%e3%83%91%e3%82%af%e8%b3%aa%e5%8c%96%e5%ad%a6%ef%bc%89>

6 . 研究組織

小川 雅廣 (OGAWA, Masahiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号 : 1 0 3 9 8 0 3 4