

# カツオ塩辛に関する研究—I

—幽門垂中の Proteolytic enzyme について—

大城 善太郎・出口 重遠

Studies on "Katsuo-shiokara,"—I

—On the Proteolytic Enzyme in the Pyloric Coeca of Skipjack.—

Zentaro OOSHIRO and Shigeto DEGUCHI

"Katsuo-shiokara," is a kind of food exclusively fit for the Japanese taste. Its making consists of mellowing the skipjack pyloric coeca stomach and intestine after being doused with a considerable amount of salt with the purpose of preventing the bacterial spoilage.

Its good flavor is widely appreciated by the Japanese.

The authors investigated on the proteolytic enzyme of the pyloric coeca of skipjack, which was assumed to be a chief catalyzer of mellowing the "Katsuo-Shiokara," from the point of enzyme chemistry and food technology.

## 緒 言

カツオ塩辛はカツオ節製造の際の廃棄物たる 幽門垂・胃・腸、場合によつては肝臓を混合し、之に食塩を20%前後の濃度となるように加えて防腐しつつ長期間熟成させたものである。製品は極めて旨味を有し而も生鮮時又は仕込直後における 腥臭は殆んど消失し、むしろ特殊な香味さえ感じられる吾国独特の嗜好食品である。

カツオ塩辛の熟成に関する報告はあまり多くは見当たらないが、奥田<sup>1)</sup>、清水<sup>2)</sup>等の研究がある。奥田はカツオ塩辛から強力な Trypsin, Amylase を抽出し、又作用力は弱い Lipase をも分離証明している。清水は熟成の進行と共に好塩菌による分解作用が起ることを指摘している。

而し乍らカツオ塩辛製品のように高濃度の食塩溶液 (約 20 % NaCl Soln. に相当) において、原料中の所謂自己消化酵素がどの程度の activity を示し且つ安定であるか等の問題についてはあまり明らかでない。

筆者等はカツオ塩辛の熟成に関与する酵素の中で特に proteolytic enzyme (proteinase が自己消化の主役を演ずると思われるが、peptidase も当然それに参加するから、総括的な名称として便宜上 proteolytic enzyme とする) の性質を塩辛製造加工の面から検討したので、茲にその結果の概要を報告する。

## 実 験 方 法

### I. 試料

鹿児島県山川港に水揚げされた極めて新鮮なカツオより採取した内臓を氷藏して本学部実験室へ持帰り、幽門垂、胃・腸を夫々充分洗滌し、胃腸はやや大き目に切断して水切す

る。然る後三者を配合して、その 2 割 5 分に相当する食塩を加えて (19 % NaCl soln. に相当) 1 日に 1 回ずつ攪拌して熟成させた。又酵素実験は上記の幽門垂を 50 倍量の蒸溜水と共にミキサーにかけて抽出し、更にそれを 10 倍に稀釈して用いた。又熟成後期における enzyme activity の低下したものは適宜稀釈して測定し、換算して比較した。

## II. Proteolytic enzyme activity の測定法

Anson,<sup>3)</sup> 萩原<sup>1)</sup>等の方法に準拠した。即ち 2 % カゼイン溶液に Atkins-Pantin の PH 8.8 の borate buffer soln. 1 ml を加えて 37°C で 10 分反応せしめ、之に 0.4 M トリクロール酢酸 2 ml を添加して 37°C で 10 分加温し沈澱を完成させて濾過する。濾液 1 ml に 0.4 M 炭酸ソーダ 5 ml, Folin 試薬 (原液 5 倍稀釈) 1 ml を加え 37°C で 20 分加温呈色せしめる。後 10 mm のキューベットに移し、660 m $\mu$  で吸光値 (O. D.) を読み対照との差を以て proteolytic enzyme の relative activity とした。

## 実験結果並びに考察

### I. 至適 PH

2 % カゼイン溶液 1 ml に Sørensen-Palitzch の phosphate buffer 若くは Atkins-Pantin の borate buffer を 1 ml 宛加えて PH を調節し、之に酵素液 1 ml を加えて 37°C で 10 分反応せしめて、至適 PH を求めたところ Fig. 1 の如くなり、おおむね 8.6~9.0 であった。

### II. 至適作用温度

2 % カゼイン溶液に borate buffer を加えて PH 8.8 となし、之に酵素液を加えて反応させ、最適作用温度を求めたところ、Fig. 2 に示すように 45~50°C であった。

至適温度における activity は 20°C における夫の約 5 倍、25°C における夫の 2.5 倍に相当する。

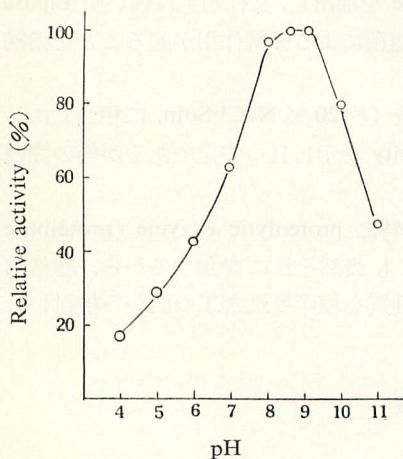


Fig. 1. Effects of pH on proteolytic enzyme activity of the pyloric coeca of skipjack.

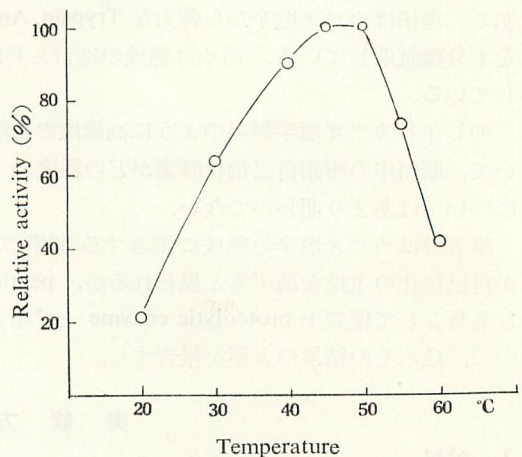


Fig. 2. Effects of temperature on proteolytic enzyme activity of the pyloric coeca of skipjack.



### III. 酵素の安定性に及ぼす PH の影響

幽門垂を 10 倍容の蒸溜水とミキサーにかけて酵素を抽出し、その 1 ml に Mc Ilvaine の citrate-buffer, Atkins の borate-buffer を夫々 1 ml づつ加えて PH を 4, 5, 6, 7, 8, 8.8, 9 に調節し、37°C で 24 時間 incubate する。後各々に蒸溜水を加えて約 20 ml とし、1N-NaOH で PH 8.8 として更に蒸溜水を加えて 25 ml とす。

その 1 ml に PH 8.8 の borate buffer を 1 ml 加え、之に 2% カゼイン溶液 1 ml を加えて 37°C で 10 分反応せしめて、activity を測定してその安定性を検討した。

その結果は Fig. 3. の通りで PH 7.0~8.0 では殆んど安定であるが、それよりアルカリ側か酸性側で処理されると酵素が失活することが認められた。前述の至適 PH 8.8 においては 24 時間で 5% の失活さえ見られ PH 9 では 15% も失活することが認められた。このことから酵素作用の至適 PH において、その酵素が安定であるとは言い切れない。吾々の実験結果からは、酵素蛋白分子が幾分 modify されるようなところにむしろ酵素作用の至適 PH が存在するようにさえ思われた。

### IV. 酵素の加熱操作に対する安定性

酵素液 1 ml を 30°C, 35°C, 40°C, 53°C, 64°C, 70°C の恒温水槽中で 10 分間加熱して、水道水で冷却し、後 37°C で前記諸実験と同様にカゼインを基質として activity を測定し、その熱に対する安定度を検討した。結果は Fig. 4 の通りである。これから明らかなように 40°C 迄は殆んど影響を受けないが、45°C で幾分失活し、53°C で initial activity の約 92%, 64°C で 22.5% と云うように急速に失活し、70°C では完全に変性失活する。

加熱処理の場合にも PH の影響と同じように酵素作用の至適温度 (45~50°C) ではむしろ酵素蛋白がやや不安定であることが認められた。

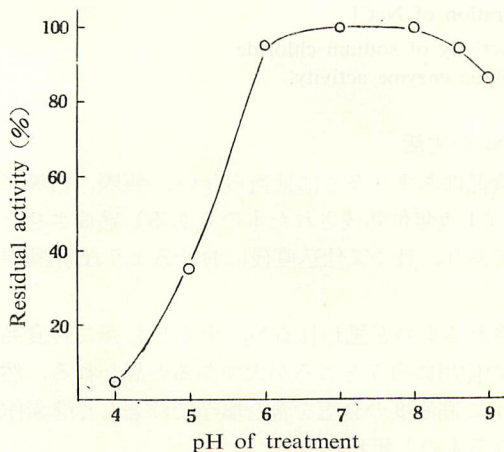


Fig. 3. Variations of enzyme activity of the enzyme solution after being subjected to acid or alkaline treatment.

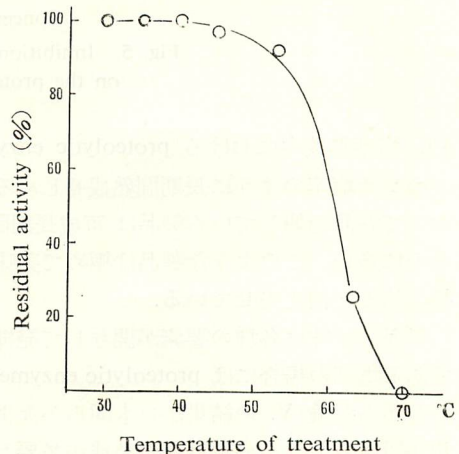


Fig. 4. Variations of enzyme activity of the enzyme solution after being subjected to heat treatment.

### V. 酵素作用に及ぼす食塩濃度の影響

カツオ塩辛の食塩含量は 17~22% にも相当するから、内臓酵素特に proteolytic enzyme による消化作用も可成り阻害されることが考えられる。永田<sup>2)</sup> は塩蔵鰯の品質に及ぼす内

臓液汁の影響を試験し、食塩濃度 21 % のような環境でも徐々に蛋白酵素が作用することを報告している。

筆者等はカツオ塩辛に就いて、proteolytic enzyme の作用が食塩によつてどの程度阻害されるかを検討した。即ち 2 % カゼイン溶液に食塩を加えて各種濃度のものを作り、その 3 ml に 0.5 ml の酵素液を加えて 37°C で 10 分反応せしめ、常法の如く処理してフェノール試薬で呈色させ activity を測定し夫々を比較した。その結果が Fig. 5 の通りである。図より明らかなようにカツオ塩辛は自己消化特に proteolytic enzyme の作用を期待する食品ではあるが、食塩濃度が 19 % (2 割 5 分塩) のときは対照 (無塩の場合) の 10 %, 又 22 % (3 割塩) のものでは僅か 4 % 相当の activity しか示さないことが認められた。

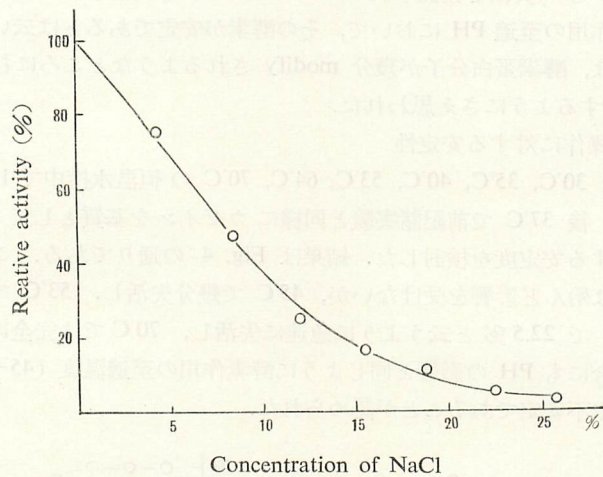


Fig. 5. Inhibition-activity of sodium chloride on the proteolytic enzyme activity.

#### VI. 塩辛熟成中における proteolytic enzyme の失活

カツオ塩辛のように長期間熟成せしめる食品はあまり多くは見当たらない。実際、市場において好評を博している製品は可成長期間 (1 カ年位熟成されたものもある) 熟成させたものに多い。このような製品は極めて美味であり、且つ又仕込直後におけるような所謂腥臭は殆んど消え失せている。

製品の旨味は各種の要素が関与して発揮されるものと思われるが、少なくとも蛋白性食品である塩辛の場合には proteolytic enzyme の作用に負うところが大であると思われる。然しながら実験 V. の結果からも明らかなように高濃度の食塩を含む塩辛では著しく酵素作用が阻害されるため長期間の熟成が必要となるものと思われる。

一般に酵素が塩析されないで溶解している状態では、塩析沈澱した状態の酵素蛋白よりも不安定であることから、筆者等は塩辛のように高濃度の食塩溶液とも考えられる製品では proteolytic enzyme も亦不安定であろうと思われたのでその点について検討した。即ち試料の項で述べたような方法で 2 割 5 分塩 (19 %) のカツオ塩辛を調製し、熟成中の activity の変化を前記の方法で追跡した。その結果は Fig. 6 に示すように、かなりの速さで変性失活することが確認された。即ち仕込後 10 日で 50 %, 30 日で 11 %, 40 日目には



7%相当の activity しか残らなかった。このことは塩辛の熟成と云うことから甚だ重要なことであり、塩辛製造時に期待し得る酵素作用は極めて微々たるものであつて、食塩による inhibition を計算に入れると、2割5分塩(19% NaCl) のときには仕込後10日目で5%、30日目で1%の酵素作用しか期待出来ない。

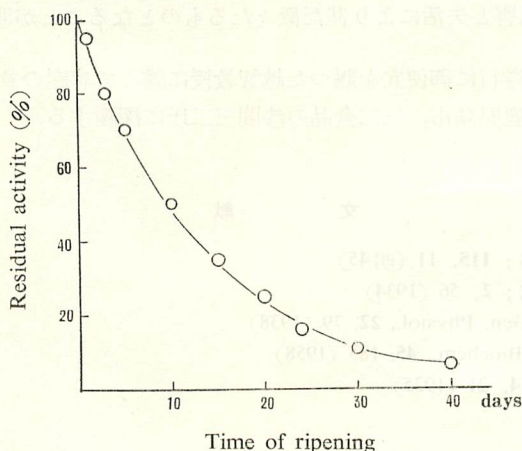


Fig. 6. Inactivation of proteolytic enzyme during the mellowing term of "Katsuo-shiokara".

### 要 約

カツオ塩辛の熟成過程において主要な役割を担っていると思われる proteolytic enzyme の性質を検討し、次のような事実を明らかにした。

1) カツオ幽門垂の proteolytic enzyme の至適 PH は 8.6~9.0 である。而して塩辛熟成時 (PH≒6.0) における酵素作用は至適 PH における夫の約 50% 相当と見て差支えない。

2) 至適作用温度は 45~50°C であり、他の一般の proteinase に比し少々高めである。

3) 酵素の安定性に及ぼす PH の影響を検討し PH 7.0~8.0 で最も安定であることを確めた。PH 4~5 では著しく不安定であり、又 PH 9 では幾分失活することが認められた。

4) 酵素の安定性に及ぼす温度の影響を検討し、40°C 迄は安定であることを認めた。而し、45°C で 97%, 50°C で 92%, 64°C で 25% しか activity が残らず、70°C で 10 分処理すると殆んど完全に失活する。従つて至適作用温度(45~50°C)では、酵素蛋白はむしろ幾らか不安定である。

5) 1)~4) の結果から、酵素蛋白分子の二次構造に幾分 modification が起るような極めて delicate な状態にこの酵素の至適作用があるように思われた。

6) 酵素作用に対する NaCl の影響は著しく大きく、2割5分塩の場合 90%, 3割塩のときで 96% 阻害する。

7) 塩辛熟成中に proteolytic enzyme が速かに失活する。2割5分塩 (19% NaCl 相当) の塩辛では 10 日で 50%, 30 日で 90%, 40 日で 93% 失活する。失活は主として高濃度の NaCl 溶液に溶解されているために起るものと思われる。

8) 6) ~ 7) の結果から、カツオ塩辛の熟成に關与する proteolytic enzyme の作用は高濃度の NaCl による阻害と失活により甚だ微々たるものとなることが明らかとなつた。

終りに臨み本実験の遂行に御便宜を賜つた越智教授に謹んで感謝の意を表する。なお、実験試料を提供頂いた鹿児島市、三二食品の漆間三二氏に深謝する。

#### 文 献

- 1) 奥田 譲: 農学会報; **115**, 11 (明 45)
- 2) 清水 亘: 水製会誌; **2**, 56 (1934)
- 3) M. L. ANSON: J. Gen. Physiol., **22**, 79 (1938)
- 4) HAGIWARA, B.: J. Biochem., **45**, 185 (1958)
- 5) 永田米作: 日水誌; **4**, 21 (1935)