

## パパインによる馬肉消化液の苦味物質について

三浦弘之・三上正幸・中村敏男

(帯広畜産大学畜産物保蔵学教室)

1973年11月30日受理

### Bitter Substance in Papaic Hydrolyzate of Horse Meat

Hiroyuki MIURA,\* Masayuki MIKAMI\* and Toshio NAKAMURA\*

#### 緒 言

蛋白質を比較的多く含んだ食品にプロテアーゼを作用させると苦味物質が生成するという事については古くから知られており、畜産食品についてみれば RAADVELD<sup>9)</sup> や CARR<sup>1)</sup> がチーズの苦味について報告し、さらに鴛田<sup>10)</sup>はその総説の中で「苦味の生成は微生物を用いて製造される蛋白質含量の高い発酵食品に認められる一つの大きな欠点である」と指摘している。

市川<sup>7)</sup>は枯草菌中性プロテアーゼによる蛋白質分解の際に生ずる苦味ペプチドの生成機構、分離法およびその性質について報告している。また、GORDON および SPECK<sup>8)</sup>は *Streptococcus cremoris* を牛乳培地に接種し、その結果生じた苦味ペプチドについて報告している。その他にチーズの苦味物質に関する研究は数多く報告されている<sup>4,6)</sup>。

しかしながら、畜肉のプロテアーゼ処理の結果生じる苦味に関しては、わずかに小浜<sup>8)</sup>が、苦味の消去方法に関連してふれているにすぎない。

そこで本研究では、畜肉の軟化剤として古くからしばしば用いられるパパインを馬肉に作用させた時に生じる苦味物質について、セファデックスによるゲル濾過と、ペーパークロマトグラフィーによる分離の組合せにより単一にし、その構成アミノ酸を定量的に分析したところ、Leucine 50.8%、Isoleucine 16.7%を主にした16種のアミノ酸で構成されるペプチドであることがわかった。

#### 実験材料および方法

##### 1. 試料の調製

馬肉のパパイン消化液をうるために、脂肪部分を注意深く取り除いた馬肉をミンチで細切

\* Laboratory of Preservation of Livestock Products, Obihiro Zootechnical University, Obihiro, Hokkaido, Japan.

し、その 200 g に蒸留水 300 ml を加え、攪拌後、10% NaOH で供試ペパインの至適 pH である 6.7 に調整した。これに 0.6% ペパイン ((株)ミドリ十字製) 溶液 100 ml を加え、温浴中で  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 、2 時間加温し、加温終了後沸騰水浴中に 15 分間浸して酵素反応を停止し、冷却後遠心分離 (4,000 r.p.m. 15 分間) によって沈渣を取り除き、上澄を濾紙 (東洋濾紙 No. 3) で濾過し、その濾液を凍結真空乾燥したものを試料とした。以上の操作を図示すると Fig. 1 のようになる。

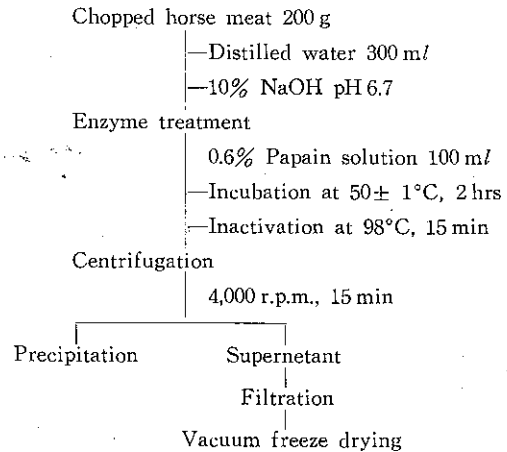


Fig. 1 Preparation of sample

## 2. 苦味フラクションの分離

### i) Sephadex G-100 による苦味フラクションの分離

凍結真空乾燥した試料 0.3 g を 2 ml の蒸留水に溶かし、これを Sephadex G-100 カラム (23×880 mm) に静かに添加し、室温 (18~20°C) で蒸留水を流速 25 ml/hr の条件で溶出させ、フラクションコレクターを用いて 10 ml ずつ試験管に捕集した。

各捕集液は分光光度計で紫外部 (280 m $\mu$ ) における吸光度を測定した。吸光曲線から得られた 2 つのフラクションは、おのおの 2 ml に減圧濃縮し、それらの苦味の程度は、カフェイン稀釈溶液を基準にして官能的に判定した。

### ii) Sephadex G-50 による苦味フラクションの分離

Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーで得られたフラクション II を減圧濃縮したものは、Sephadex G-50 カラム (23×665 mm) に添加し、室温下で蒸留水を流速 50 ml/hr の条件で溶出した。溶出液はフラクションコレクターを用いて 10 ml ずつ試験管に捕集した。

各捕集液は分光光度計で紫外部 (280 m $\mu$ ) における吸光度を測定し、その吸光曲線から得たフラクション II を 2 ml に減圧濃縮し、官能的に苦味を判定した。

### iii) Sephadex G-25 による苦味フラクションの分離

Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーで得たフラクション II の濃縮液 2 ml を Sephadex G-25 カラム (23×630 mm) に添加し、室温において蒸留水を流速 85 ml/hr の条件で溶出した。溶出液はフラクションコレクターを用いて 10 ml ずつ試験管に捕集した。

各捕集液は分光光度計で紫外部 (280 m $\mu$ ) における吸光度を測定し、その吸光曲線から得た 4 つのフラクションは、減圧濃縮によって 0.5 ml にまで濃縮し官能的に苦味を判定した。

## 3. ペーパークロマトグラフィーによる苦味物質の分離

Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィーで得られた 4 つのフラクションのうち、苦味の

あるフラクション II の濃縮液を試料とし、40×40 cm の濾紙 (東洋濾紙 No. 51) の一辺から 5 cm の位置に帯状につけ、風乾後、展開溶媒に *n*-ブタノール：酢酸：水 (5:1:4) を用いて、ペーパークロマトグラフィーによる分析を行なった。展開後の濾紙は乾燥後 0.25% ニンヒドリン・アセトン溶液を噴霧し、110°C で数分間加熱し発色させた。

各スポットは、ガイドストリップ法により、3 ml の蒸留水で抽出し、0.5 ml に減圧濃縮後、それらについて官能的に苦味を判定した。

#### 4. 高圧濾紙電気泳動

ペーパークロマトグラフィーの結果から抽出した苦味物質は、その単一性を確認するために高圧濾紙電気泳動を行なった。緩衝液はピリジン：酢酸：水 (10:0.4:90), pH 6.2 を用い、2 kV/6 cm, 70分間泳動後、風乾して、0.25% ニンヒドリン・アセトン溶液で発色させた。

#### 5. 苦味ペプチドの構成アミノ酸分析

ガイドストリップ法により抽出した苦味物質溶液 1 ml に同量の 12 N-HCl を加えて減圧下で封管し、110±1°C で 24 時間加水分解した。加水分解後は管の上部を切りとって HCl を蒸発乾固せしめ、試料にクエン酸緩衝液 (pH 2.2) 5 ml を加え、このうち 0.8 ml をアミノ酸分析の試料とした。この場合のアミノ酸分析は、日本電子(株) JLC-6AUS 型により行ない、クロマトグラムの面積測定は HW 法<sup>5)</sup>により算出した。

### 実験結果

#### 1. Sephadex の組合せによる苦味フラクションの分離

Fig. 1 の操作にしたがって凍結真空乾燥した馬肉のパペイン消化液は黄色を示し、官能的にきわめて強い苦味を呈した。

この苦味を呈する試料は、Sephadex G-100 カラムによるゲル濾過の 280 m $\mu$  における吸光曲線で示すと Fig. 2 のごとくで、2つのフラクションに分画された。Fraction I (以下 F-I... F-IV と略す) の濃縮液は、水溶性蛋白質にみられる特有の混濁を呈し、苦味は全くない。F-II の濃縮液は濁りのある淡黄色を示し、非常に強い苦味が感じられた。

そこでこの F-II を Sephadex G-50 によってゲル濾過を行ない、280 m $\mu$  における吸光曲線で示すと Fig. 3 のごとく

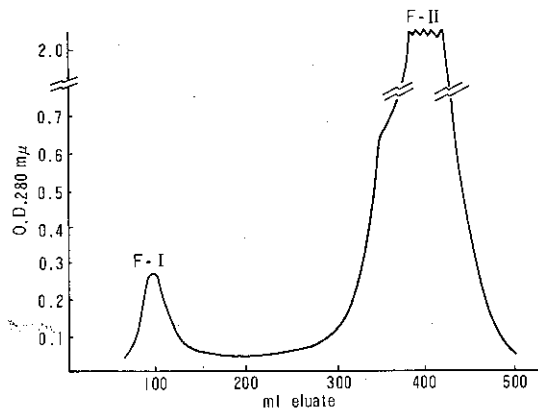


Fig. 2. Gel filtration pattern of bitter material on Sephadex G-100 Sample: 0.3 g/2 ml. Column: 2.3×88 cm. Flow rate: 25 ml/hr. Eluent: distilled water. Temp.: 18°C. 10 ml/1 tube.

くである。F-I はほとんど無色透明で、苦味が認められず、F-II は濁りのある淡黄色を示して強い苦味を呈した。

この F-II を 2 ml まで減圧濃縮し、さらに Sephadex G-25 によるゲル濾過を行なうと Fig. 4 のごとくで、F-I より F-IV までの4つのフラクションに分画された。これらの各フラクションを 0.5 ml にまで減圧濃縮し、官能的に苦味を判定すると、淡黄色を示す F-II に強い苦味が認められ、F-I および F-III はわずかで、F-IV には全く認められなかった。

## 2. ペーパークロマトグラフィーによる

### 苦味物質の分離

Sephadex G-25 によるゲル濾過で得られた苦味物質 (F-II) 濃縮液のペーパークロマトグラムは、Fig. 5 に示した。Rf 値が異なる A, B のスポットと、不鮮明な C, D, E の5スポットが検出された。

スポット A と B を別にし、C, D, E を一つにして蒸留水で抽出し、減圧濃縮後の苦味を官能的に判定すると、A にやや強い苦味が認められ、B および C, D, E 抽出液には認められなかった。この A 抽出液は淡黄色を示していた。

## 3. 高圧濾紙電気泳動

苦味物質 A の単一性を確認するため、緩衝液にピリジン：酢酸：水 (10 : 0.4 : 90), pH 6.2 を用い、2 kV/6 cm, 70 分間の条件で泳動を行なったところ陽極側に移動するスポットであることが確認され (Fig. 6), 2つのスポットが十分に分離せずに癒着した状態で移動し、泳動時間を延長したり、電圧をあげても分離することはないことが確かめられた。

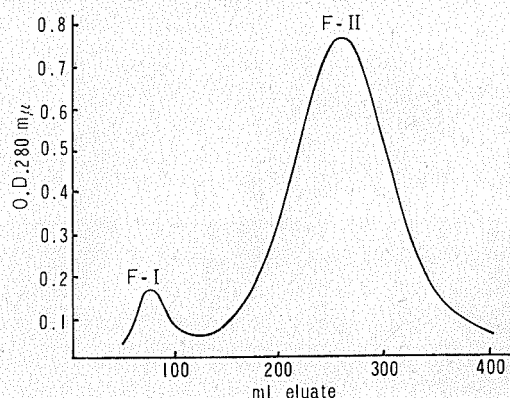


Fig. 3. Gel filtration pattern of bitter material on Sephadex G-50  
Sample : Fig. 2 F-II concentrated solution 2 ml. Column : 2.3×66.5 cm. Flow rate : 50 ml/hr. Eluent : distilled water. Temp. : 18°C. 10 ml/1 tube.

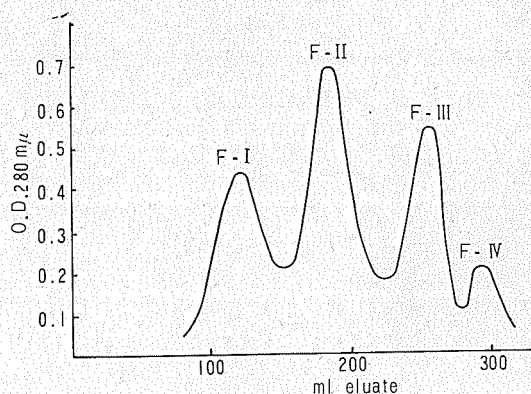


Fig. 4. Gel filtration pattern of bitter material on Sephadex G-25  
Sample : Fig. 3 F-II concentrated solution 2 ml. Column : 2.3×63 cm. Flow rate : 85ml/hr. Eluent : distilled water. Temp. : 18°C. 10 ml/1 tube.

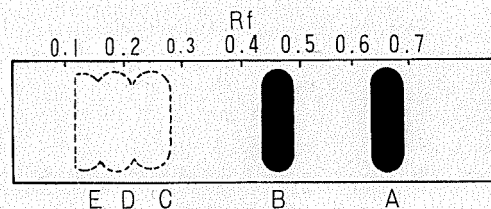


Fig. 5. Paper chromatography of bitter fraction (Fig. 4 F-11)  
Solvent : *n*-butanol : acetic acid : distilled water (5 : 1 : 4)  
Development : 0.25% ninhydrin  
Time : 19 hrs. Temp. : 18°C.

#### 4. 苦味ペプチドの構成アミノ酸

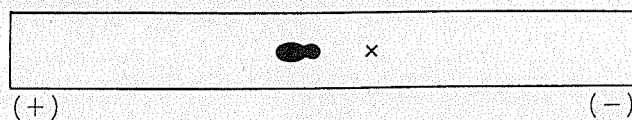
苦味ペプチドを塩酸で加水分解したのちそのアミノ酸組成を調べ、苦味ペプチドの百分率であらわすと Table 1. のごとくであり、Leucine が 50.844%、Isoleucine が 16.693% のペプチドである。

#### 考 察

RAADSVELD<sup>9)</sup> は、ゴータチーズの苦味物質をクロロホルムによって抽出し、その性状から苦味の本体はペプチドであるとのべており、CARR<sup>1)</sup>らは、トリプシン、キモトリプシンによるカゼイン消化物から苦味を呈するペプチドを分離し、その性質について詳細に調べている。また CZULAK<sup>10)</sup>らは、チーズに苦味を生じる原因をいくつかあげ、レンネットにわずかに共存するペプシンや乳酸菌スターターのプロテアーゼ作用が苦味を生じさせるとのべ、蛋白分解によって生じるペプチドが苦味の原因であると示唆している。

このように、蛋白分解によって生じるペプチドが苦味の原因であることが明らかにされるに従って、その消去方法や、苦味を生じない分解条件などが検討され、生じた苦味ペプチドを、パンクレアチンの硫酸 0.3~0.5 飽和沈澱部分で二次分解したり、ロイシンアミノペプチダーゼで二次分解すると苦味がある程度消去されることから、Leu-Gly あるいは Gly-Leu の位置の分解が苦味の消去に有効な方法の一つと考えられている。

また FUJIMAKI<sup>2)</sup>らは、大豆のプロテアーゼ消化液に生じる約 10 種の苦味ペプチドを単離し、それらのアミノ酸配列あるいは部分配列を決定し、いずれも末端(多くは C 末端)に Leucine 残基を有することを見出している。このように、カゼインあるいは大豆のような高蛋白質食品を酵素的に加水分解すると生じる苦味は、末端に Leucine を持ったペプチドが存在すると生じやすいと考えられているが、畜肉の軟化剤として加えられる蛋白分解酵素(パパン、フィシン、



**Fig. 6.** High-voltage paper electrophoresis of bitter peptide  
Sample: bitter peptide (Fig. 5 A) 0.1 to 0.2 mg  
Buffer: pyridine: acetic acid: distilled water (10:0.4:90) pH 6.4.  
Time: 70 min.

**Table 1** Amino acid composition of acid hydrolysates of bitter peptide as determined by use of the amino acid analyzer

Amino acid	Amino acid %
Hydroxproline	4.244
Aspartic acid	1.556
Threonine	2.294
Serine	2.987
Glutamic acid	3.900
Proline	2.618
Glycine	2.695
Alanine	2.710
Valine	3.374
Isoleucine	16.693
Leucine	50.844
Tyrosine	0.830
Phenylalanine	2.534
Histidine	0.706
Lysine	1.793
Arginine	0.204
Total	99.982

ブロメリンその他) によって肉エキス中に生じる苦味に関しては、その本体がまだ明らかにされていない。

苦味物質を得るために、細切した馬肉にパepsinを作用させ、その消化液を凍結乾燥すると非常に苦味の強い淡黄色の粉末が得られる。これを冷蔵庫 ( $3\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) に保蔵し、用に応じて水に溶解して試料とした。

Sephadex G-100 によるゲル濾過の結果、蛋白質フラクションに相当する F-I と、ペプチドおよびアミノ酸フラクションに相当する F-II に分画される (Fig. 2)。このように、各種の窒素化合物が混在するようなものを出発物質として、その中から蛋白質を除く場合、G-100 によるゲル濾過は有効である。

蛋白質部分をとり除いたフラクション F-II は、分子量の大きなペプチドと小さなペプチドに分画するために Sephadex G-50 によるゲル濾過を行なうと (Fig. 3)、低分子のペプチドを含んだ F-II に苦味物質を含むことがわかった。このことは、大豆消化液から苦味ペプチドを分離した FUJIMAKI<sup>2)</sup>らが、透析部分から単離した苦味ペプチドの種類が、非透析部分のそれよりも多いと述べていることなどから、馬肉消化液に生じる苦味物質も低分子のペプチドと推察されるが、さらに Sephadex G-25 によって F-II を分画すると、F-I, F-II, F-III および F-IV の4つに分画され (Fig. 4)、苦味の中心は F-II にあつまることが明らかとなった。しかしながらこの苦味は、F-I および F-III にもわずかに感ぜられ、F-II にあつまった苦味が、F-I および F-III に混入していることが想像される。

Sephadex G-25 によって得られた F-II を減圧濃縮して試料とし、ペーパークロマトグラフィを行なうと、Fig. 5 に示すごとく、明確な分離を示す A および B と、不明確なバンドを示す C, D, E にわかれる。おのおののニンヒドリン発色位置に相当する部分をニンヒドリン噴霧を行なわないクロマトグラムから切りとって、水で抽出し、その濃縮液について苦味を官能検査すると、スポット A に相当する部分に苦味が感ぜられる。この分部の単一性について検討するために高圧濾紙電気泳動を行なうと、Fig. 6 に示すごとく、2種のペプチドの混在を推定させるような、マイナスにチャージされたスポットが認められ、この2つのスポットは、通電時間や電圧を変えても分離することはできなかった。

完全に分離することができなかったこの苦味ペプチドを最終的な分画物として、塩酸で加水分解し、その構成アミノ酸を調べた (Table 1)。

アミノ酸は16種によって構成され、Leucine, Isoleucine がそれぞれ 50.844% および 16.693% と多いのが特徴である。

これは RAADSVELD<sup>3)</sup>の報告と一致するが、前川<sup>10)</sup>らが13種、市川<sup>7)</sup>らが12種、CARR<sup>1)</sup>および GORDON<sup>2)</sup>が8種としていることとは異なる。このことは、苦味の生成がペプチドのアミノ酸配列によって起こるのであって、アミノ酸の数ではないことを示唆している。苦味は、C

末端に Leucine が露出している場合に強く感ずるといふ報告が多く、前川<sup>10)</sup>らは13種のアミノ酸のうち Leucine が57%を占めると報告している。

今後は、苦味ペプチドの1次構造を明らかにすると同時に、その量的な検討も必要であろうと思われる。

### 要 約

馬肉の酵素的加水分解物から苦味フラクションを分離した。300 ml の水に、細切した馬肉 200 g とパペイン 0.6 g を加えて、 $50 \pm 1^\circ\text{C}$  で2時間消化した。遠心上清の消化液を凍結乾燥し、Sephadex G-100, G-50 および G-25 によるゲル濾過で分画し、そのフラクションについてペーパークロマトグラフィー、高圧濾紙電気泳動およびアミノ酸分析を行なった。

消化液の苦味画分をブタノール：酢酸：水で展開し、すべてのニンヒドリン発色バンドはガイドストリップ法で溶出した。

Rf 値が 0.65~0.67 の早くに移動するバンドに苦味が認められた。高圧濾紙電気泳動による苦味ペプチドは、2つのニンヒドリン陽性物を示した。苦味ペプチドスポットの構成アミノ酸は、ヒドロキシプロリン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジン、アルギニンで、ロイシンが50.844%ときわめて高かった。

### 参 考 文 献

- 1) CARR, J. W., LOUGHED, T. C. and BAKER, B. E. (1956): Studies on protein hydrolysis. IV. Further observations on the taste of enzymic protein hydrolysates. J. Sci. Food Agric., 7, 629-637.
- 2) FUJIMAKI, M., KATO, H., ARAI, S. and TAMAKI, E. (1968): Applying proteolytic enzymes on soybean. 1. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. Food Technology, 22, 77-81.
- 3) GORDON, JR. D. F. and SPECK, M. L. (1965): Bitter peptide isolated from milk cultures of *Streptococcus cremoris*. Applied Microbiology, 13, 537-542.
- 4) HARWALKER, V. R. and ELLIOTT, J. A. (1965): Isolation and partial purification of bitter components from cheddar cheese. J. Dairy Sci., 48, 784.
- 5) 波多野博行 (1964): アミノ酸自動分析法, 化学同人, 53~57.
- 6) HETTINGA, D. H. (1965): Amino acid analyses of fractions from bitter and nonbitter gouda cheese. J. Dairy Sci., 48, 784.
- 7) 市川和宏・山本武彦・福本寿一郎 (1959): プロテイナーゼの生成する苦味物質に関する研究 (第1報) 枯草菌中性プロテイナーゼによる苦味ペプチドの生成とその分離方法. 日農化, 33, 1044-1047.
- 8) 小浜行雄 (1967): 万能的な酵素パペイン, 糊ミドリ十字学術部報告集 (第1版), 49-52.
- 9) RAADSVELD, C. W. (1953): Bitter compounds from cheese. Intr. Dairy Congr., 2, 676-680.
- 10) 鶴田文三郎 (1966): 苦味ペプチドの生成およびその諸性質. 酪農科学の研究, 15, 23-30.
- 11) 吉岡道夫 (1968): 馬肉消化液の苦味成分について. 帯広畜産大学酪農学科昭和43年度卒業論文.

### Summary

Bitter fraction was isolated from the papaic hydrolyzate of horse meat. A three hundred ml mixture containing 200 g of chopped horse meat and 600 ml of papain was incubated at  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  for 2 hrs.

The resulting papaic hydrolyzate was vacuum freeze dried, investigated by gel filtration using Sephadex G-100, G-50, G-25, and paper chromatography with butanol : acetic acid : water (5 : 1 : 4).

The paper chromatogram of the bitter fraction from the papaic hydrolyzate was developed with butanol-acetic acid-water and each ninhydrin-positive zone was eluted from the paper strips.

After being concentrated at  $40^\circ\text{C}$ , only the most rapidly moving band ( $R_f$  0.65-0.67) was bitter.

High-voltage paper electrophoretic bitter peptide patterns (Pyridine : acetic acid : water (10 : 0.4 : 90) , 2 kV/6 cm. 70 min.) indicated two ninhydrin-positive compounds.

The amino acids in acid hydrolyzate of the bitter components were determined with the Nihondenshi model JLC 6AUS amino acid analyzer.

Amino acid composition was found in the bitter peptides ; hydroxproline, aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine and arginine. A high percentage (50.844%) of leucine was also found.