

凍結含浸法による動物性素材の軟化処理

柴田賢哉

Tenderization of meat by freeze-thaw impregnation

Kenya Shibata

Freeze-thaw impregnation (FI) applied to an animal food material to soften the texture while retaining the shape. FI could control the meat tenderness as well as vegetable food materials by adjusting a time of enzyme reaction arbitrarily. The decomposition of a connective tissue protein of beef of round by enzyme, adjusted to the concentration of 0.5 % (w/v), led the meat so tender that the beef could be cut by chopsticks easily and developed as a tender beef for elderly persons.

FI is the method to impregnate the enzymes into food materials inside by reduced pressure. To impregnate the enzymes into the meet tissues efficiently, it was necessary to adjust the conditions which the food materials expand under reduced pressure sufficiently. This study cleared that the combination of a preparation of meat cut different direction to the muscle fibers and a vacuuming degree more than 80% could lead the optimum meat expansion under reduced pressure.

Keywords: Freeze-thaw impregnation, elderly food, enzyme, texture

キーワード：凍結含浸法，高齢者用食品，酵素，物性

凍結含浸法は食材内に酵素を急速導入する技術であり、広島県が開発した特許技術である¹⁾。食材に軟化酵素を導入することにより、食材の形と見た目を保ったまま軟らかい食品が製造できる²⁾。超高齢社会を背景に、高齢者用食品の開発が進められる中、凍結含浸法は新たな高齢者用食品の製造技術として注目されている。凍結含浸食品は刻みやすり潰した食品とは異なり、その見た目の良さから視覚的なおいしさを提供でき、食事面において高齢者の生活の質の向上に貢献できる。

著者らは、これまでに軟化根菜類の物性や消化性に関して報告してきた³⁾⁵⁾。凍結含浸食材は軟らかく食べやすいだけでなく、酵素によりあらかじめ組織が分解されているため、消化性や吸収性に優れるという特徴がある。そのため高齢者用食品の食材として不向きと言われている繊維質豊富な根菜類や葉菜類、硬い外皮をもつ大豆などの豆類も、凍結含浸処理することで提供できる。介護施設や病院では、利用できる食材の種類が増加し、食事メニューの幅が広がっている。

高齢者は加齢による体力の衰え、咀嚼や嚥下がしにくいなどの身体機能の低下により、低栄養状態に陥りやすいと言われている⁶⁾⁹⁾。肉や魚は加熱すると硬くなるため、高齢者にとって食べにくい食材であるが、タンパク質や脂質が豊富に含まれ、低栄養状態からの回復に必要な不可欠な食

材である。また、食事メニューにおいて肉や魚は主菜であり、見た目が良く食べやすい肉や魚は、食欲の増進効果をもたらし、喫食率の向上につながると期待できる。

動物性素材と植物性素材は、その細胞構造が全く異なっている¹⁰⁾。植物性素材の軟化には、ペクチンやセルロースなどの細胞間隙物質を分解するためにペクチナーゼやセルラーゼを使用するが、動物性素材の軟化では、主成分であるタンパク質を分解する必要がある¹¹⁾。酵素分解にあたっては、旨味成分を多く含む筋繊維タンパク質の分解は抑制しつつ、肉の硬さを決定づけている結合繊維タンパク質を分解しなければ、おいしくて軟らかい肉は作製できない。結合繊維タンパク質を特異的に分解する汎用酵素はないため、基質特異性の低い食品用プロテアーゼを含浸して軟化させる必要があり、含浸方法や酵素反応条件の工夫が重要である。

今回、牛モモ肉あるいは豚ヒレ肉に市販の食品用酵素を含浸して酵素反応し、軟化肉を調製した。(1)酵素反応時間と軟化度の関係、(2)減圧圧力と軟化度の関係、(3)酵素濃度と軟化度の関係、(4)調製方法(切断方法)が軟化度に及ぼす影響、の4項目について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料調整

検討項目(1)から(3)については、市販の豪州産牛モモ肉(内モモ)を使用した。-30℃の冷凍庫で48時間以上冷凍したあと解凍した牛モモ塊肉を、筋繊維タンパク質の繊維方向に対して垂直に1.0cmまたは1.5cm幅で切断した。

検討項目(4)の「調製方法(切断方法)が軟化度に及ぼす影響」の検討については、市販の国産豚ヒレ肉を使用した。-20℃の冷凍庫で48時間以上冷凍したあと解凍した豚ヒレ塊肉を、1cm厚に切断して試料を調製した。この時、筋繊維タンパク質の繊維方向に対して垂直になるように切断した試料と、筋繊維タンパク質の繊維方向に対して並行になるように切断した2種類の試料を調製して比較実験に供した。

2. 酵素液の調製

牛モモ肉の軟化には、細菌由来プロテアーゼ(天野エンザイム(株)製)を、豚ヒレ肉の軟化には植物由来プロテアーゼ(天野エンザイム(株)製)を使用した。所定の濃度になるように、0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH5.8)に溶解して使用した。

3. 凍結含浸処理

牛モモ肉の凍結含浸処理は次の手順で行った。細菌由来プロテアーゼを0.5% (w/v)濃度となるようにリン酸緩衝液に溶解して酵素液を調製した。あらかじめ調製した試料を1分間酵素液に浸漬し、試料全体に酵素液を接触させた。酵素液から取り出して真空包装用真空袋に移し替えた後、真空包装機(V-380G-II, (株)TOSEI製)で減圧処理した。所定の真空度まで減圧したあと、1分間減圧状態のまま保持した。減圧保持後、常圧復帰とともにシールして脱気包装し、含浸工程を終了した。4℃の低温庫(LTI-600SD, 東京理科器械(株))で所定の時間酵素反応を行った。真空袋から肉を取り出し、220℃に加熱したホットプレート(KZ-HP2000, パナソニック(株)製)で、表面70秒、裏面100秒焼いて酵素を失活させた。検討項目(1)「酵素反応時間と軟化度の関係の検討」では、真空度98%、反応時間を3, 6, 9, 24時間とし、検討項目(2)「減圧圧力と軟化度の関係」の検討では、真空度を0, 20, 40, 60, 80, 98%とし、酵素反応時間を16時間に設定した。検討項目(3)「酵素濃度と軟化度の関係」の把握では、真空度98%、酵素濃度を0.2%及び0.5%、酵素反応時間を20時間に設定した。

検討項目(4)「調製方法(切断方法)が軟化度に及ぼす影響」については、豚ヒレ肉を使用して実験した。使用する植物由来プロテアーゼは0.5%濃度とした。凍結含浸処理の手順は基本的に牛モモ肉と同様であるが、減圧下の試料膨張率を測定するため、真空袋内ではなくアルミバット上に試料を置き、真空度95%で5分間減圧保持したあと常圧に戻し、含浸処理を終了した。その後、真空袋に移し替えて再び減圧処理し、真空度98%設定で脱気包装した。そのまま4℃で16時間酵素反応を行った。酵素失活加熱は、真

空袋から試料を取り出しアルミバットに移したあと、スチームコンベクションオープン(マルゼン(株), SSC-04MSC)で95℃, 10分加熱して行った。

4. 物性測定

2種類の物性評価方法を用いた。牛モモ肉の物性測定にはテンシプレッサー(TTP-50BXII, (有)タケトモ電機製)を使用して多重積算バイト法により評価した。すなわち、直径5mmの中空型プランジャーを使用し、貫入速度2mm/s, Add Value 0.05mm, 2nd Distance 0.3mm, Clearance 0.5mmの設定で貫入させた。圧縮応力曲線と背圧応力曲線で囲まれた面積(仕事量)を、試料の硬さ(Toughness, J/m²)とした。硬さは試料5点の平均値±標準偏差で表した。

豚ヒレ肉の物性測定では、テンシプレッサー(TTP-50BXII, (有)タケトモ電機製)を使用して1バイト法により評価した。すなわち、直径3mmの円柱型プランジャーを使用し、貫入速度10mm/s, Clearance 30%の条件で測定し、得られた最大応力値を試料の硬さ(Hardness, N/m²)とした。硬さは試料5点の平均値±標準偏差で表した。

5. 減圧下における素材膨張率の測定と軟化

1cm厚に調製した豚ヒレ肉を酵素液に1分間浸漬したあと、アルミバットに取り出した。デジタルカメラ(GR digital 2, リコー(株)製)で試料上面と側面の写真を撮影した。そのまま真空包装機内で真空度95%まで減圧して5分間減圧保持状態とし、再度デジタルカメラで減圧下での食材上面と側面の写真を撮影した。

上面写真の画像から、上面の縦、横の長さを算出し、減圧処理前と減圧下のそれぞれの上面面積を求めた。両者の面積比から表面拡大率(A)を計算した。また側面写真の画像から試料の厚みを測定し、減圧処理前と減圧下それぞれの側面厚みを求めた。両者の厚み比から、側面伸張率(B)を計算した。減圧処理による素材膨張率を(A)×(B)で求めた。

実験結果および考察

1. 酵素反応時間と軟化度の関係

1cm厚に調整した牛モモ肉を使用して、酵素反応時間と肉の軟化度の関係を調べた。結果を図1に示した。酵素反応初期段階に急激に軟化し、3時間で約2分の1の軟らかさとなった。その後は徐々に軟化が進行し、9時間で約4分の1となり、9時間以降はほぼ平衡状態となった。野菜類に酵素を含まない酵素反応すると時間経過とともに軟化することが知られているが²⁾、牛モモ肉においても同様に酵素反応時間を調節することにより、任意の軟らかさに調整できることが分かった。

2. 減圧圧力と軟化度の関係

1cm厚の牛モモ肉を用いて酵素含浸に必要な減圧圧力について検討した。到達減圧圧力を0, 20, 40, 60, 80,

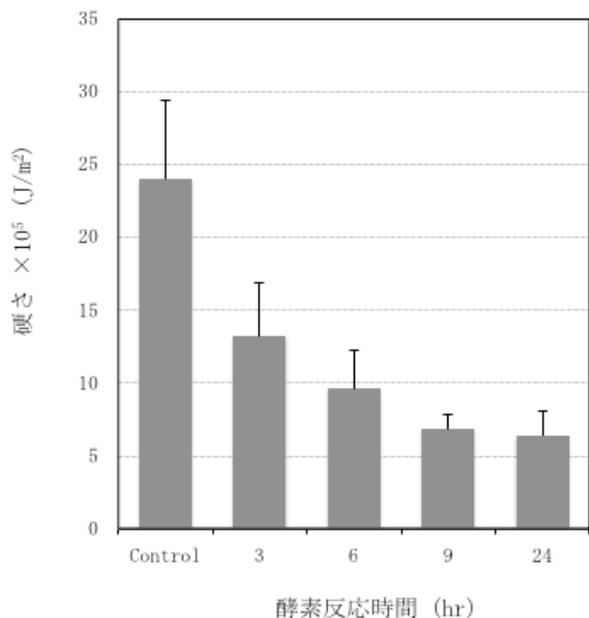


図1 酵素反応時間による硬さ変化

試料：牛モモ肉 (1cm厚)
 酵素：細菌由来プロテアーゼ
 酵素濃度：0.5%/0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH5.8)
 真空度：98%。減圧保持時間：1分
 加熱酵素失活：22°C (表70秒、裏100秒)
 平均値±標準偏差 (n=5)

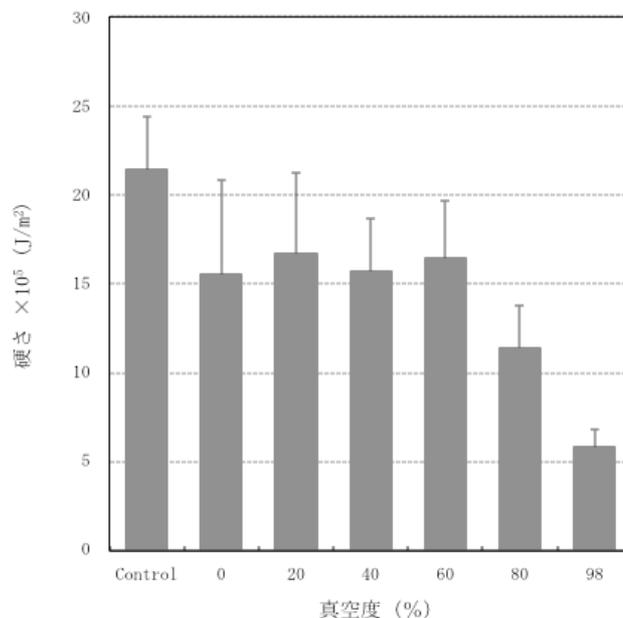


図2 減圧時の真空度と硬さの関係

試料：牛モモ肉 (1cm厚)
 酵素：細菌由来プロテアーゼ
 酵素濃度：0.5%/0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH5.8)
 減圧保持時間：1分、酵素反応時間：16時間
 加熱酵素失活：22°C (表70秒、裏100秒)
 平均値±標準偏差 (n=5)

98%の真空度に設定して含浸処理を行った。各真空度での硬さを図2に示した。0%~60%の低真空度では、酵素処理していない牛モモ肉コントロールよりは軟らかくなっているものの、表面のみ軟らかく素材内部は硬かった。これは減圧前の酵素浸漬によって表面に付着した酵素によって肉表面は分解されたが、0%~60%の低真空度では素材内部へ酵素を十分に含浸できず、素材内部が分解できていないためと考えられた。一方、真空度80%を境に素材の内部も酵素分解が可能となり、特に真空度98%では素材内部にも十分量の酵素が含浸され、素材内部と表面のいずれも均一に軟化した。

肉を減圧処理すると、一部の肉で肉全体が膨張する様子が目視で確認できた。60%以下の低真空度では素材の膨張はほとんど見られず、80%以上の高真空度設定ではじめて素材膨張が確認され、98%で著しく膨張した。野菜類の凍結含浸処理において、減圧下の素材の膨張現象が酵素の含浸と密接な関係にあることが明らかとなっている¹²⁾。真空度を変えた場合、膨張した肉は軟化しており、動物性素材においても、素材膨張と酵素の含浸とは密接な関係があると考えられた。すなわち、減圧による圧力低下によって素材内空気が膨張して筋繊維間を押し広げ、減圧からの常圧復帰により、表面に塗布した酵素が膨張して広がった筋繊維間の空隙に含浸されると推測される。低真空度では大気圧との圧力差が小さく、筋繊維間を押し広げるだけの十分な空気膨張力が得られない。その結果、素材内部への酵素

含浸が不十分になり、筋繊維を接着させる結合繊維タンパク質の分解が不十分になると考えられた。このことから、如何に素材全体を均一に膨張させて酵素を含浸するかが、バラツキの少ない軟化素材の作製に重要と思われた。

3. 酵素濃度と軟化度の関係

肉の軟らかさに及ぼす酵素濃度の影響について検討した。加熱酵素失活後の牛モモ肉の見た目、硬さ (仕事量)、破断応力曲線と背圧応力曲線のグラフを図3に示した。なお、グラフの横軸は多重積算バイトでの貫入回数 (距離, point) を、縦軸は応力 (N/m²) であり、硬さは圧縮応力曲線と背圧応力曲線で囲まれた面積 (仕事量, J/m²) で比較した。

凍結含浸処理後の牛モモ肉の外観は変わらなかったが、酵素濃度の増加に伴って軟化していた。グラフから、圧縮応力及び背圧応力のいずれも低下したことが分かる。官能で評価したところ、酵素処理していない牛モモ肉コントロールは硬く噛み応えがあったが、0.2%濃度処理では、軟らかく適度な弾力感を持ち、健常者にも食べやすい牛モモ肉であった。0.5%濃度処理では、容易に箸で切れるほど軟化した。弾力性が失われる一方、適度な付着性が感じられ、口腔内で纏まりやすい牛モモ肉となった。官能評価と物性測定結果はほぼ一致しており、破断応力が硬さを、背圧応力が弾力性及び付着性を示していると考えられた。

コントロールと0.5%濃度処理区の牛モモ肉の筋繊維間の写真を示した (写真)。対照区の牛モモ肉では筋繊維タンパク質同士を結合している結合繊維タンパク質がスジとし

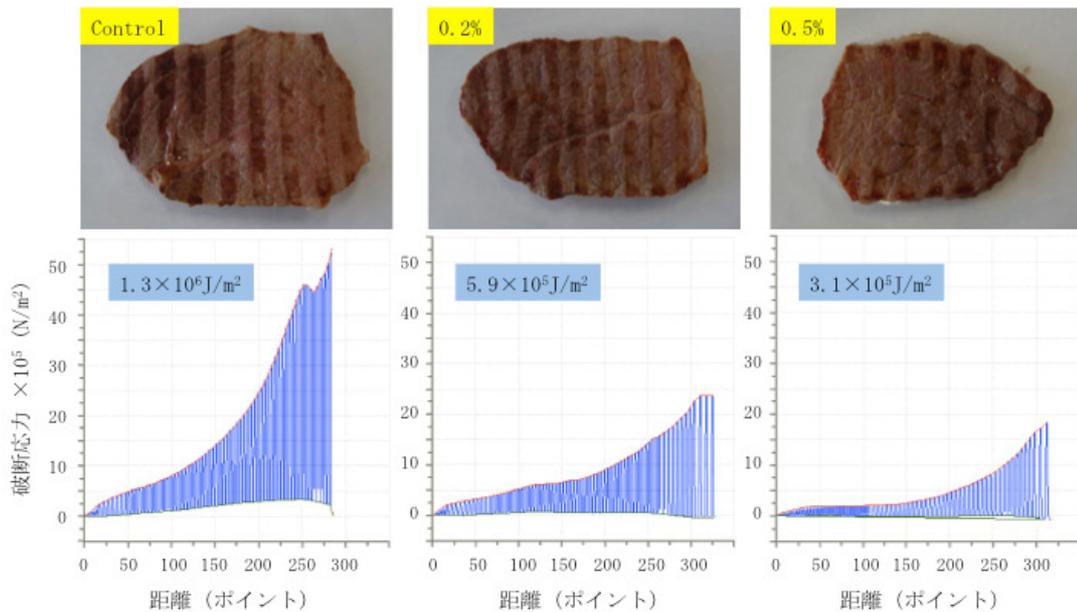


図3 軟化処理した牛モモ肉の外観、測定グラフ、および硬さ(仕事量)

試料：牛モモ肉(1.5cm厚)、酵素：細菌由来プロテアーゼ
 真空度：98%、減圧保持時間：1分、酵素反応時間：20時間
 加熱酵素失活：220°C(表70秒、裏100秒)、(n=5)

て明確に見られるが、凍結含浸処理肉では結合繊維タンパク質がほぼ分解されており、容易に裂くことができた。凍結含浸法では、減圧処理により素材膨張効果を利用して筋繊維間に酵素を浸透させるため、筋繊維間に多く存在する結合繊維タンパク質部位に酵素がしみ込み易い。そのため筋繊維タンパク質より結合繊維タンパク質が優先的に分解されると考えられた。なお、酵素濃度を調整し、筋繊維タンパク質を適度に分解すると食べた時のネトつきは気にならないが、酵素を過剰に含浸したり、長時間反応した場合には、筋繊維タンパク質が過度に分解され、付着性が増加する傾向が見られた。データは示していないが、本実験においてさらに高濃度の酵素液を含浸し、筋繊維タンパク質を過分解したところ、背圧応力はマイナス値となり、肉らしさが失われたベタついた食感となった。軟化度を調整するには、酵素濃度、酵素反応時間を適宜設定する必要がある。

4. 調製方法(切断方法)が軟化度に及ぼす影響

「2. 減圧圧力と軟化度の関係」のとおり、減圧下における肉の素材膨張が、軟化度に影響を与えると考えられた。様々な条件下で肉への酵素含浸を試したところ、試料の調整方法によっても減圧下における素材膨張現象が著しく異なることに気付いた。そこで、試料調整時の切断方向が、肉の膨張と軟化度に及ぼす影響について検討した。

筋繊維タンパク質の繊維方向に垂直に切断した素材と、平行に切断した素材のそれぞれの減圧下での素材膨張率を表に、酵素含浸後の硬さを図4に示した。筋繊維方向に垂直に切断した試料1では元の素材の1.2倍に膨張したのに対して、平行に切断した試料2ではほとんど膨張しなかった。各試料の凍結含浸後の硬さを比較すると、膨張した試

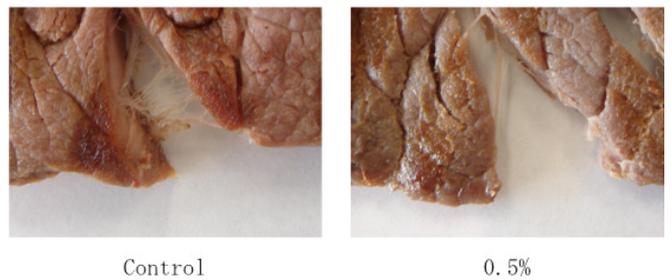


写真 牛モモ肉における結合繊維タンパク質の分解

(左：酵素未処理 右：酵素濃度0.5%での凍結含浸処理)

表 豚ヒレ肉の切断方法の違いが減圧時の試料膨張率に及ぼす影響

筋繊維に対する切断方向	表面拡大率 (A)	側面伸長率 (B)	素材膨張率 (A) × (B)
試料1 (垂直に切断)	1.22	1.01	1.23
試料2 (平行に切断)	1.01	1.01	1.02

料1では非常に軟らかくなったのに対して、膨張しなかった試料2では軟化しなかった。ここでも減圧下の素材膨張と軟化度には密接な関係があり、減圧下で膨張する肉は軟らかくなった。すなわち、減圧下で膨張可能な切断方法を選択することが重要であることが分かった。酵素は膨張した筋繊維間に沿って含浸されると考えられる。筋繊維に沿って切断した場合は、筋繊維を断ち切る方向に切断した場合よりも、筋繊維を結合している結合繊維量が筋繊維量に対して相対的に多く、減圧下での素材膨張が起こりにくい

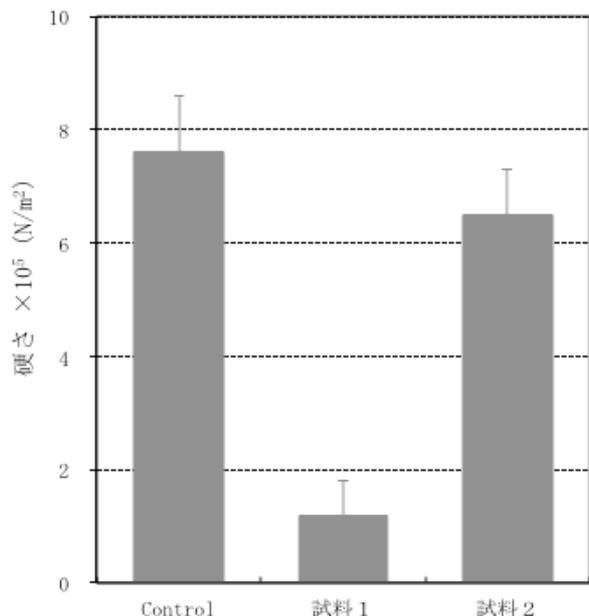


図4 切断方法に起因する豚ヒレ肉の硬さの違い

試料：豚ヒレ肉 (1.0cm厚)
 酵素：植物由来プロテアーゼ
 酵素濃度：0.5% / 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH5.8)
 真空度：98%、減圧保持時間：5分
 酵素反応時間：16時間
 加熱酵素失活：95°C、10分
 平均値±標準偏差 (n=5)

と推察される。真空度や試料の切断方法を調整し、減圧下で素材が膨張する条件が揃ってはじめて十分に酵素が含浸されると考えられた。

5. まとめ

凍結含浸法は素材内に酵素を急速に導入する技術である。植物性素材においては凍結解凍後、酵素液中で減圧処理することにより、酵素を細胞間隙に導入でき、酵素分解によって形状ある軟化素材を作製できる。動物性素材においても同様に酵素液を素材表面に塗布したのち減圧処理することにより、形状ある軟化素材を作製できる。ただし、個体差や一個体内でムラなく品質の良い軟化肉を作製するには、減圧下で素材全体を均一に膨張させることが重要で、筋繊維タンパク質の繊維方向を断ち切る方向に切断した試料を、一定以上の減圧圧力下で処理することが必要不可欠であった。酵素濃度、酵素反応時間を調節することによって硬さを自由に調整でき、少し軟らかく食べやすい肉から箸で切れる軟らかさのものまで、目的に応じて硬さを調整できる。

動物性素材はタンパク質が豊富で高齢者用食品に必要不可欠である。魚類の凍結含浸法も開発しており¹³⁾¹⁴⁾、様々な軟化食材が提供できる。また、凍結含浸法は高齢者用食品のみならず、機能的食品¹⁵⁾¹⁶⁾や造形検査食品¹⁷⁾の製造にも利用できることから、今後、様々な分野での活用が期待できる。

要約

凍結含浸法を用いて動物性素材を軟化した。植物性素材と同様に、酵素反応時間を調整することにより軟化度を制御することができた。0.5%濃度の酵素液で軟化した牛モモ肉は、結合繊維タンパク質が分解されており、箸で容易に切れるほど軟化した。高齢者用食品として利用できる軟らかさであった。凍結含浸法では減圧処理により食材内に酵素を含浸するが、肉組織に酵素を効率よく含浸するためには、減圧下で素材が膨張する条件が必要であり、筋繊維を断ち切るように切断した素材を用いて80%以上の真空度で減圧する必要があった。

文献

- 1) 坂本宏司, 井上敦彦, 柴田賢哉, 石原理子, 植物組織への酵素急速導入法, 特許第3686912号 (2005. 8. 24).
- 2) 坂本宏司, 石原理子, 柴田賢哉, 井上敦彦, 凍結減圧酵素含浸による植物組織の軟化及び単細胞化, 日本食品科学工学会誌, **51**, 395-400 (2004).
- 3) Sakamoto, K., Shibata, K. and Ishihara, M., Decreased hardness of dietary fiber-rich foods by the enzyme-infusion method. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 1564-1570 (2006).
- 4) 中津沙弥香, 柴田賢哉, 坂本宏司, 凍結含浸法により軟化処理したレンコンの消化性, 日本食品科学工学会誌, **57**, 434-440 (2010).
- 5) 中津沙弥香, 石原理子, 柴田賢哉, 坂本宏司, 凍結含浸法による軟化根菜類の高齢者による摂食評価, 日本摂食嚥下リハビリテーション学会誌, **14**, 95-105 (2010).
- 6) 金谷節子, 嚥下困難者のための食, 食感創造ハンドブック, 第1版 (株式会社サイエンスフォーラム, 東京), pp.125-133 (2005).
- 7) 大越ひろ, 高齢者食・介護食に求められるテクスチャー, 食感創造ハンドブック, 第1版 (株式会社サイエンスフォーラム, 東京), pp.143 (2005).
- 8) 渡瀬峰男, 流れるゲル(ゼリー)物語, 食品工業, **52**, 65 (2009).
- 9) 神山かおる, 野仲美保, 小堀千春, 中城巳佐男介護食のテクスチャー, 日本咀嚼学会雑誌, **16**(1), 17-23 (2006).
- 10) 沖谷明紘, 肉の科学, 朝倉書店, 39-47 (1996).
- 11) 柴田賢哉, 硬さ制御技術 (凍結含浸法) を用いた高齢者・介護用食品の開発, 食肉の科学, **54**, 9-14 (2013).
- 12) Shibata, K., Sakamoto, k., Ishihara, M., Nakatsu, S., Kajihara, R. and Shimoda, M., Effects of freezing conditions on enzyme impregnation into food materials by freeze-thaw infusion, *Food Sci. Technol. Res.*, **16**, 359-364 (2010).

- 13) 永井崇裕ほか, 凍結含浸処理した魚介類の軟化と筋肉タンパク質の変化, 日本水産学会誌, **77**, 7 日本水産学会誌 (2011).
- 14) 永井崇裕, 坂本宏司, 柴田賢哉, 中津沙弥香, 石原理子, 加工食品, その製造方法, 及びエキス, 特許第 4986188 号 (2012.7.25).
- 15) Shibata, K., Sakamoto, k., Nakatsu, S., Kajihara, R. and Shimoda, M., Enzymatic Production of Malto-oligosaccharide in Potato by Freeze-Thaw Infusion, Food Sci. Technol. Res., **16**, 273-278 (2010).
- 16) Kajihara, R., Shibata, k., Nakatsu, S. and Sakamoto, k., Production of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides in a freeze-thaw infusion-treated soybean. Food Sci. Technol. Res., **7**, 561-565 (2011).
- 17) 平位知久, 福島典之, 小野邦彦, 羽嶋正明, 片桐佳明, 益田 慎, 凍結含浸食品の嚥下造影所見についての検討, 日本耳鼻咽喉科学会会報, **113**, 110-114 (2010).