



Title	CaCl ₂ を利用した魚類冷凍すり身の製造に関する食品生化学的研究
Author(s)	佐伯, 宏樹
Citation	北海道大学. 博士(水産学) 乙第4204号
Issue Date	1992-12-25
DOI	10.11501/3065042
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/32720
Type	theses (doctoral)
File Information	4204.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（水産学）	氏名	佐伯宏樹
学位論文題名			
CaCl ₂ を利用した魚類冷凍すり身の製造に関する食品生化学的研究			
<p>水産ねり製品は我が国における重要な加工食品群であるが、その主原料であるスケトウダラすり身の国内生産量は、近年の国際漁業秩序の変化に伴って減少傾向にある。そこで、未利用資源から冷凍すり身を製造する試みが活発に行なわれている。この研究の過程において、CaCl₂を含む用水中で魚肉を水晒し処理すると、その後の脱水を容易にするばかりでなく冷凍すり身のゲル形成能が改善される事実が見出された。この水晒し法は一般にカルシウム晒し法（本論文では、Ca晒し法と称する）と呼ばれ、現在、冷凍すり身の製造技術のひとつとして利用されている。しかし、Ca晒し法の効果とその技術原理については十分な検討が行なわれていないのが現状である。そこで著者は、Ca晒し法の技術原理を明らかにすることを目的として本研究を行なった。</p> <p>本論文では、第1章において、CaCl₂が魚類の筋原線維（Mf）の保水能（WHC）に及ぼす影響を定量的に解析し、その脱水に対する促進効果を他の塩類と比較しながら把握する試みを行なった。第2章と第3章では、Mfタンパク質の温度安定性に及ぼすCaCl₂の影響を、Ca-ATPase活性を指標として魚種間で比較検討し、同塩によってMfタンパク質が不安定化する原因について検討した。第4章では、CaCl₂が肉糊のゲル化とその過程で起こるミオシン重鎖（HC）の多量化反応に及ぼす影響を調べ、そのゲル形成能の改良効果を魚種間で比較した。そして、第5章においては、Ca晒し法を採用した冷凍すり身の製造過程で起こる魚肉タンパク質成分の収支とその製品の品質について検討し、その結果から、冷凍すり身製造におけるCa晒し法の効果を総括する試みを行なった。得られた結果は以下のとおりである。</p>			

【1】 CaCl_2 が 8 種類の魚類 Mf の WHC に及ぼす影響を検討したところ、Mf の WHC はイオン強度 (I) が 0.05~0.10 に相当する同塩の存在下で最も低値となることを認めた。この傾向は SrCl_2 、 MgCl_2 、 NaCl および KCl の場合にも同様に観察されたが、 CaCl_2 には Mf の WHC を大きく減少させる作用があることを確かめた。また、 CaCl_2 が Mf の WHC を低下させる効果の大きさは、系全体の I の影響を受けて複雑に変化し、さらに、Mf タンパク質の変性に伴って小さくなることも明らかになった。

【2】 CaCl_2 (5~50mM) が 10 種類の魚類 Mf タンパク質の温度安定性に及ぼす影響を調べたところ、 CaCl_2 が Mf の WHC を低下させる低イオン強度下 (I = 0.26 以下) においては、同塩によって Mf タンパク質が受ける影響は小さかった。ただし、その影響の大きさは魚種によって異なり、スケトウダラやマダラのように温度安定性の劣る魚類の Mf タンパク質ほど強く不安定化する傾向を示した。一方、Mf が溶解する高イオン強度下 (I = 0.50~0.65) においては、いずれの魚類の Mf タンパク質も CaCl_2 によって著しく不安定化したが、その影響の大きさが魚種によって異なる傾向は低イオン強度下の場合と同様であった。

【3】 Mf タンパク質の温度安定性が CaCl_2 共存下において低下する原因を、カツオとスケトウダラの Mf およびミオシン B (MB) を用いて検討した。まず、①カツオ MB を 50mM CaCl_2 で処理すると、その Ca-ATPase の熱変性様式は単純な一次反応から初期に速く後期に遅い二段階の一次反応にしたがうように変化した。一方、スケトウダラの Mf と MB をそれぞれ 30mM および 50mM CaCl_2 で処理すると、それらの Ca-ATPase は急速に失活したが、熱変性の様式は変化しなかった。そこで、1.0M ソルビトール共存下で CaCl_2 処理を行なったところ、その MB·Ca-ATPase の熱変性様式は、カツオの場合と同様に二段階の一次反応にしたがうようになった。また、②50mM CaCl_2 で処理した両魚類の MB·Ca-ATPase の熱変性様式は、F-アクチンの添加によって処理前と同じ単純な一次反応にしたがうようになり、その温度安定性がほぼ回復することが確かめられた。さらに、③ CaCl_2 処理によって MB から低イオン強度の溶媒中にアクチンとトロポミオシンが可溶化してくる事実を見いだした。以上の結果より、 CaCl_2 処理によって Mf タンパク質の温度安定性が低下するのは、同塩が Mf タンパク質中のアクチンを優先的に変性させ、

ミオシンが解離状態になった結果起こったと判断した。

【4】CaCl₂をカツオ、コイおよびスケトウダラの肉糊に添加し、そのゲル形成能とミオシンHCの多量化反応に及ぼす影響を調べたところ、CaCl₂は肉糊中のミオシンHCの多量化反応を加速し、破断強度を著しく高めるように働くことを見出した。この効果の大きさは、肉糊のCaCl₂濃度が5~10 mmol/kg（湿重量）で最大であった。肉糊のゲル化に伴う破断強度の増加速度とミオシンHCの減少速度（=多量化速度）との間には強い正の相関関係が成立したので、同塩によって肉糊のゲル化反応が速められる理由は、ミオシンHCの多量化反応が加速された結果であると判断した。さらに、肉糊のゲル化反応とミオシンHCの多量化反応に対するCaCl₂による促進効果は、Mfタンパク質の温度安定性の高い魚類の場合ほど顕著に認められた。それゆえ、これらの差は、Mfタンパク質の構造的性に関する魚種間の相違を反映しているものと推定した。

【5】以上で得た知見を参考にしてCa晒し法を適用する条件を選定した後、同法を採用してシログチとスケトウダラの冷凍すり身を製造し、各製造過程における魚肉中の各種成分の挙動について検討した。その結果、①落とし身を5mMまたは15mM CaCl₂共存下で水晒し処理すると、Caが肉質中に速やかに浸透し、その膨潤が抑制されるとともに、脱水工程において水分の除去が促進され、Mfタンパク質濃度の高いすり身の製造が可能となることを認めた。なお、水晒し処理から脱水に至る過程では肉質中の水溶性タンパク質量の減少とMfタンパク質量の増加が並行して起こったが、これらの変化は肉質中のCa濃度が異なってもほとんど影響を受けなかった。したがって、冷凍すり身の製造におけるCa晒し法の効果は、水晒しにおける水溶性タンパク質の溶出を妨げることなく落とし身の保水能を制御し、その中に含まれるMfタンパク質の濃縮を行なわせることにあると考えられる。また、②Ca晒し法を採用した冷凍すり身の製造過程において、特に水晒しから脱水に至る過程でMfタンパク質の変性がわずかに進行するが、その収量増加のほうがそれを越えるほど大きいこと、③10mmol/kg以上のCaを含む冷凍すり身では、そのゲル形成能が凍結貯蔵中に大きく劣化すること、さらに、④肉質中に浸透した数mMのCaによって肉糊のゲル化反応が促進され、そのゲル物性が強化されるが、この時、肉糊中のミオシンHCの

多量化反応も著しく速やかに進行することを確かめた。

本論文の成果を総合すると、Ca晒し法は、落し身の保水能、冷凍すり身の凍結貯蔵性、およびそれから得た肉糊のゲル形成能などの全てに対して影響を及ぼし、結果として製品の品質を制御する極めて複雑な加工処理技術であるということが出来る。それゆえ、同法を採用して冷凍すり身を製造する場合には、原料魚肉のMfタンパク質の温度安定性を考慮しながら、肉質中に浸透するCaによって起こるMfタンパク質の不安定化の度合い、肉糊のゲル物性の変化、および冷凍すり身の凍結貯蔵性の変化などを調べたうえで、その適用条件を選定することが必要である。

CaCl₂を利用した魚類冷凍すり身の
製造に関する食品生化学的研究

佐伯宏樹

目次

緒言	1
略語	4
実験試料および実験方法	5
1. 実験試料	5
2. 冷凍すり身の製造法	5
3. タンパク質標品の調製法	6
3.1 筋原線維 (Mf)	6
3.2 ミオシン B (MB)	6
3.3 アクチン	6
4. タンパク質濃度の測定	7
5. Mfの保水能の測定	7
6. MfまたはMBのCa-ATPase比活性の測定	8
7. MfまたはMBのCa-ATPaseの温度安定性の検討	8
8. 魚肉または冷凍すり身のMf・Ca-ATPase全活性の定量	8
9. 魚肉または冷凍すり身の成分分析	9
9.1 一般成分	9
9.2 Ca濃度	9
10. 魚肉または冷凍すり身のpHの測定	9
11. 肉糊のゲル化とゲル物性の測定	9
12. ゲルのSDS-尿素混合液に対する可溶化と可溶化率の算出	10
13. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による坐りゲル および坐り加熱ゲル中のMfタンパク質成分の分析と定量	10
14. 坐りゲルの破断強度の増加量と増加速度の算出	11
15. 坐りに伴う肉糊中のミオシン重鎖(HC)の減少量と減少速度の算出	12
第1章 筋原線維の保水能に及ぼすCaCl ₂ の影響	13
1.1 遠心力によるMfのWHCの測定条件の検討	13
1) Mf懸濁液の遠心分離条件がWHCに及ぼす影響	13
2) 塩との混和時間がMfのWHCに及ぼす影響	14

3) MfのWHCに対するMfタンパク質濃度の影響	14
4) MfのWHC測定値の統計的精度について	17
5) 魚肉の貯蔵期間がMfのWHCに及ぼす影響	17
1.2 CaCl ₂ 存在下の各種魚類Mfの保水能の比較	22
1) CaCl ₂ およびNaClの添加によるMfのWHCの変化	22
2) CaCl ₂ 共存下, 一定のイオン強度下における各種魚類MfのWHCの比較	24
3) CaCl ₂ によるMfの保水能の低下とその可逆性	28
4) MfのWHCに及ぼすCaCl ₂ とpHの効果の比較	28
5) CaCl ₂ によるMfの脱水効果	32
6) 塩の種類がMfのWHCに及ぼす影響(脱水効果)の比較	34
7) 魚肉の貯蔵に伴うMfのWHCとCa-ATPase比活性の変化の関係	34
8) サメMfのWHCに及ぼすCaCl ₂ と尿素の影響	39
小考察	42
第2章 Mfタンパク質の温度安定性に及ぼすCaCl ₂ の影響	45
1) 種々の濃度のCaCl ₂ 存在下におけるMf・Ca-ATPaseの加熱による失活速度	45
2) 低イオン強度下におけるMf・Ca-ATPaseの温度安定性に及ぼすCaCl ₂ の影響	45
3) 高イオン強度下におけるMf・Ca-ATPaseの温度安定性に及ぼすCaCl ₂ の影響	53
4) 魚類Mf・Ca-ATPaseの温度安定性がCaCl ₂ によって受ける影響の比較	53
小考察	58
第3章 CaCl ₂ によるMfタンパク質の温度安定性の変化の機構	60
1) CaCl ₂ によって起こるスケトウダラMf・Ca-ATPaseの温度安定性の低下とアクチンによる回復	60
2) CaCl ₂ によって起こるカツオのMB・Ca-ATPaseの温度安定性の変化とアクチンによる回復	62
3) CaCl ₂ 処理によって起こるスケトウダラのMB・Ca-ATPase比活性の低下	64
4) CaCl ₂ によって起こるスケトウダラのMB・Ca-ATPase比活性の低下に対するソルビトールの抑制効果	67

5) CaCl_2 によって起こるソルビトール存在下でのスケトウダラの MB·Ca-ATPaseの熱変性様式の変化とアクチンによる回復	69
6) CaCl_2 処理によってスケトウダラMBから遊離するアクチンと トロポミオシンの定量	72
小考察	74
第4章 肉糊のゲル化とミオシンHCの多量化反応に及ぼす CaCl_2 の影響	78
1) 坐りに伴う肉糊の破断強度の経時変化に及ぼす CaCl_2 の影響	78
2) CaCl_2 共存下の坐りに伴う肉糊の破断強度の変化の温度依存性	80
3) 坐りゲルのSDS-尿素混合液に対する溶解性に及ぼす CaCl_2 の影響	82
4) 坐りに伴う肉糊中のMfタンパク質成分の変化に及ぼす CaCl_2 の影響	84
5) CaCl_2 共存下の坐りに伴う肉糊中のミオシンHCの変化の温度依存性	91
6) CaCl_2 共存下の坐りに伴う肉糊の破断強度の変化とミオシンHCの 多量化反応の関係	95
7) CaCl_2 共存下の坐りに伴って肉糊中に生ずる分子サイズの異なる ミオシンHC多量体の量と組成	97
小考察	101
第5章 冷凍すり身の製造過程における魚肉タンパク質の収支に及ぼす CaCl_2 の影響	104
5.1 Ca晒し法を採用した冷凍すり身の製造過程における魚肉中の 各種成分の変化	104
1) 肉質中へのCaの浸透	104
2) 肉質中の水分とMfタンパク質量の変化	108
3) 肉質からの水溶性タンパク質の除去とMfタンパク質の濃縮	110
4) Mfタンパク質の流出の抑制	114
5) Mf·Ca-ATPase活性の変化に及ぼす影響	116
5.2 Ca濃度の異なる冷凍すり身の凍結貯蔵性	119
1) Ca晒し法を採用して製造した冷凍すり身の凍結貯蔵中に起こる 品質(ゲル形成能とMf·Ca-ATPase比活性)の変化	119

5.3 Ca濃度の異なる冷凍すり身のゲル形成能とミオシンHC多量化	121
反応の関係	
1) Ca濃度の異なるすり身から調製した坐りゲルおよび坐り-加熱ゲルの物性	121
2) Ca濃度の異なるすり身から得た肉糊の坐り過程におけるミオシンHC多量化反応	126
総合考察	129
謝辞	136
文献	137

緒 言

我が国は世界最大の水産物消費国¹⁾であり、水産物の国内消費量の約70%が食用に供されている。²⁾ また、このうちの約6割がなんらかの形に加工されたうえで消費されていると推計される。³⁾ 水産加工食品のうち、かまぼこやちくわに代表される水産ねり製品は年間約90万トンが生産され、²⁾ 我が国における重要な加工食品群である。²⁾ 水産ねり製品の主原料には、スケトウダラの冷凍すり身が用いられており、1980年ごろには年間約40万トンが生産されていた。⁴⁾ しかし、アメリカ合衆国およびソビエト連邦（現在の独立国家共同体：C I S）による200海里漁業専管水域の設定と、それに続く国際漁業秩序の変化に伴って、スケトウダラの漁獲は著しく減少した。その結果、我が国におけるスケトウダラすり身の生産量は激減し（1990年の国内生産量は約20万トンと推定される）、現在、その輸入量が急増する傾向にある。⁴⁾

このような背景から、未利用資源をスケトウダラにかわる冷凍すり身の原料として有効に利用するための製造技術の開発が望まれ、オキアミ、多獲性赤身魚、底ダラ類、サメ類等を対象とした研究が積極的に行なわれた。⁵⁾ その結果、これらの魚類の筋肉が、いずれもスケトウダラのそれとは異なる性質を有し、従来のすり身生産技術を直ちに適用するとさまざまな問題が生じることが明らかとなり、これらを解決する手段として新しい製造技術が開発された。たとえば、マイワシやマサバのような多獲性赤身魚の場合には、肉質を希アルカリ溶液で洗浄することによって魚肉タンパク質を安定化する方法⁶⁾が採用され、また、肉質から脂質を効果的に除去する製造技術^{7)、8)}が開発された。また、オキアミの場合には、その消化酵素の除去技術^{9)、10)}と筋肉タンパク質の安定化¹¹⁾が検討されるに至った。

一方、これら一連の研究の過程において、マサバやマイワシなどの多獲性赤

身魚, 12), 13), 14) サメ類, 15), 16) 底だら類¹⁷⁾ を原料として冷凍すり身を製造する際に, CaCl_2 を含む溶媒で魚肉を水晒し処理すると, 脱水を容易にするばかりでなく, そのゲル形成能が改善される事実が見出された。この水晒し法は, 一般にカルシウム晒し法 (本論文では, 以下, Ca晒し法と記す) と呼ばれ, 現在, 冷凍すり身の製造技術のひとつとして知られている。しかし, Ca晒し法の効果については, いまだ十分な検討がなされておらず, 確定的な結論が得られていないのが現状である。それゆえ, 種々の魚類の冷凍すり身の製造に際して同法を有効に利用するためには, ねり製品の製造過程における CaCl_2 の働きを明らかにし, Ca晒し法の技術原理を解明することが急務である。そこで, 著者らは, Ca晒し法の技術原理を明らかにすることを目的として本研究に着手した。

Ca晒し法が冷凍すり身の品質に及ぼす影響を明らかにするためには, 水晒し後の脱水過程ばかりでなく, 冷凍すり身の貯蔵性, さらに塩ずり肉のゲル化過程におけるCaの働きを検討する必要がある。そこで本論文においては, まず, 第1章において, CaCl_2 が魚類の筋原線維の保水能に及ぼす影響を定量的に解析し, その脱水に対する促進効果を他の塩類と比較しながら把握する試みを行なった。次に, 第2章と第3章では, 筋原線維タンパク質の温度安定性に及ぼす CaCl_2 の影響をCa-ATPase活性を指標として魚種間で比較検討し, さらに, 同塩によってその温度安定性が低下する原因について追及し, 塩ずり後の肉糊中で起こるタンパク化学的変化を推定する試みを行なった。また, 第4章では, CaCl_2 が肉糊のゲル化とミオシン重鎖の多量化反応に及ぼす影響を調べた後, そのゲル形成能の改善効果を魚種間で比較検討した。そして最後に, 第5章において, Ca晒し法を採用して冷凍すり身を製造する過程で起こる魚肉タンパク質成分の収支と, この冷凍すり身からねり製品を製造する際のゲル形成能に対する影響についてタンパク化学的視点から検討した。さらに冷凍すり身の凍結

貯蔵性についても検討した。そして、第1章から第4章で得られた結果を踏まえて、冷凍すり身の製造においてCa晒し法を採用した場合の有効性について総合的な整理と考察を行なった。

略 語

本論文では以下の略語を使用する。

Mf	: Myofibrils
MB	: Myosin B
WHC	: Water holding capacity
I	: Ionic strength
r	: correlation coefficient
ATP	: Adenosine 5'-triphosphate
ATPase	: Adenosine triphosphatase
K_D	: First order rate constant for inactivation of Ca-ATPase
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
e_{BS}	: extent of increase in breaking strength
e_{HC}	: extent of decrease in myosin heavy chain
v_{BS}	: Rate of increase in breaking strength
v_{HC}	: Rate of decrease in myosin heavy chain
HC	: Myosin heavy chain
HcN	: Cross-linked myosin heavy chain, migrating into 5% polyacrylamide gel
HcN'	: Cross-linked myosin heavy chain, too large to migrate into 5% polyacrylamide gel
HcN''	: Cross-linked myosin heavy chain, insoluble into SDS-urea buffer

実験試料および実験方法

1. 実験試料

本研究に供試した魚類を一括して以下に示す。

カツオ	Skipjack tuna, <u>Katsuwonus pelamis</u>
コイ	Carp, <u>Cyprinus carpio</u>
ティラピア	Tilapia, <u>Tilapia nilotica</u>
シログチ	White croaker, <u>Argyrosomus argentatus</u>
マエソ	Lizard fish, <u>Saurida undosquamis</u>
コノシロ	Gizzard shad, <u>Clupanodon punctatus</u>
タチウオ	Hairtail, <u>Trichiurus lepturus</u>
マイワシ	Sardine, <u>Sardinops melanostictus</u>
スケトウダラ	Walleye pollack, <u>Theragra chalcogramma</u>
マダラ	Pacific cod, <u>Gadus macrocephalus</u>
アオザメ	Mako shark, <u>Isurus oxyrinchus</u>
ヨシキリザメ	Blue shark, <u>Prionace glauca</u>

2. 冷凍すり身の製造法

第4章で実験に供したカツオ、コイおよびスケトウダラの冷凍すり身は、血合肉を含まない新鮮な落とし身を原料として一般的な方法にしたがって製造した。すなわち、コイとスケトウダラの場合には、落とし身を4倍量 (v/w) の50mM NaCl中で2回水晒しを行なった後、加圧して脱水した。また、カツオの場合には、水晒しの工程で、魚肉懸濁液に0.1N NaOHを滴下し、そのpHを7.1に

調整してから脱水処理に供した。続いて、このようにして得た脱水肉から、小骨や皮などの夾雑物を裏ごし機を用いて除去した後、8.0%ソルビトールと0.2%重合リン酸塩を混合して凍結した。第5章では、シログチとスケトウダラ落し身を、CaCl₂濃度の異なる3種類の溶媒中で水晒し処理して冷凍すり身を製造したが、その概略はFig. 5.1に示した。冷凍すり身は-30℃に貯蔵し、製造後速やかに実験に供した。

3. タンパク質標品の調製法

3.1 筋原線維 (Mf)

魚類の背部普通筋から加藤らの方法¹⁸⁾によって調製し、10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) または0.16M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁した。第2章の一部の実験では、0.16M KCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したMfも調製した。

3.2 ミオシンB (MB)

0.16M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したMfに、終濃度で0.5MのNaClを添加して溶解し、30,000×gで45分間遠心分離して得た上清をミオシンBとして供試した。¹⁹⁾

3.3 アクチン

コイの背部普通筋のアセトンパウダーからSpudichとWatt²⁰⁾の方法によってG-アクチンを調製し、これを0.1M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に透析してF-アクチンとして使用した。

4. タンパク質濃度の測定

タンパク質標品の濃度は、牛血清アルブミン分画Vを標準とし、ビウレット法²¹⁾で比色定量した。なお、ソルビトールの含まれる試料を定量する場合には、あらかじめ同濃度のソルビトール共存下で検量線を作成して定量に用いた。

5. Mfの保水能の測定

Mfの保水能は関ら²²⁾が報告した遠心力を利用した簡便法を採用して測定した。その測定条件については、第1章で詳細に検討した後、以下のように決定した。すなわち、10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したMfを、内容量10mlのガラス製スピッツ型遠心沈殿管（日電理化硝子機製、スピッチグラスAタイプ）に分注し、さらに所定の終濃度になるように塩溶液を加えた後、密栓して数回振盪し、5℃で60分間放置した。次に、スイング式冷却遠心機を用いて2,100×gで60分間遠心分離し、沈殿にMfを集めてその湿重量を求めた。このMfの湿重量から別に定量しておいたMfタンパク質量を差引いて、便宜的にMf中に保持された水の量を算出した。さらに、遠心分離した上清中に溶解したタンパク質量（遊離タンパク質量と記す）を考慮し、次式によって保水能の指標 WHCを算出した。

$$\begin{aligned} \text{WHC} &= (\text{沈殿重量} - \text{全Mfタンパク質量} + \text{遊離タンパク質量}) \div \\ &\quad (\text{全Mfタンパク質量}) \\ &= (\text{沈殿中の水分量} / \text{全Mfタンパク質量}), \quad (\text{g H}_2\text{O} / \text{g Mf}) \end{aligned}$$

なお、測定時のMfタンパク質濃度は、7.0～10.0mg/mlの範囲に調節した。

6. MfまたはMBのCa-ATPase比活性の測定

0.2~0.3mg/mlのタンパク質と0.1M NaCl, 5mM CaCl₂, 25mM Tris-maleate (pH 7.0) からなる反応混液に1mM ATPを加え, 25°Cにおいて保持した。次に, 経時的に一部を取り出し, 1/2容量の15% HClO₄を加えて反応を停止させた後, 遊離した無機リン酸の量をGomori法²³⁾によって比色定量し, その比活性 ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg of protein}$) を求めた。

7. MfまたはMBのCa-ATPaseの温度安定性の検討

一定の温度下に保持した時に起こるMfまたはMBのCa-ATPase活性の失活を一次反応式にしたがって解析し, その変性速度定数 (K_D) を次式²⁴⁾によって算出して検討した。

$$K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t, \quad (\text{s}^{-1})$$

ここで C_0 および C_t は試料をそれぞれ一定温度下に保持する前および t 秒間保持後におけるCa-ATPase活性 (一定温度下に保持する前の値を1としたときの相対値) である。

8. 魚肉または冷凍すり身のMf・Ca-ATPase全活性の定量

Mfを定量的に調製して, そのCa-ATPase比活性を測定した後, あらかじめ定量しておいた試料中のMfタンパク質量を乗じてMf・Ca-ATPase全活性 ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot 5\text{g of sample}$) を算出した。²⁵⁾

9. 魚肉または冷凍すり身の成分分析

9.1 一般成分

水分の定量は105°C常圧乾燥法²⁶⁾によって行なった。粗タンパク質はケルダール分解法によって定量した全窒素量に6.25を乗じて算出した。²⁶⁾ また、脂質の定量はBligh-Dyer法²⁷⁾によって行なった。

9.2 Ca濃度

試料を金属製のふるい（メッシュサイズ：65 μ m）で裏ごしした後、原子吸光分析法²⁸⁾によって分析し、試料1Kg（湿重量）に含まれるCaのmmol数（mmol/Kg）で表した。

10. 魚肉または冷凍すり身のpHの測定

試料を5倍量（v/w）の蒸留水中でホモジナイズして得た懸濁液について、pHメーター（東亜電波工業㈱ HM-20E型）を用いて測定した。ただし、マイワシ筋肉のpHを測定する場合は、20mM モノヨード酢酸ナトリウム中でホモジナイズして測定した。^{29), 30)}

11. 肉糊のゲル化とゲル物性の測定

冷凍すり身を解凍後、3.0%（w/w）NaClを加え、小型サイレントカッターを用いて塩ずりして肉糊を調製した。第4章において、同一の冷凍すり身からCa濃度の異なる肉糊を調製する場合には、所定の終濃度になるように調製したCaCl₂溶液を、解凍したすり身に対して1/50重量比で加えて塩ずりした。肉糊は折り径35mmの塩化ビニリデン製ケーシングに充填し、恒温水槽中に保持して

ゲル化させた。生成したゲル（以後、坐りゲルと称する）の一部はさらに90℃で30分間加熱した（以後、坐り-加熱ゲルと称する）。

これらのゲル物性の指標として破断強度と凹み値を測定した。まず、坐りゲルまたは坐り-加熱ゲルを高さ25mmの円筒状の断片に切断し、測定用試料を作成した。次に、レオメーター（不動工業㈱製，NRM-2003J）に装着した直径5mmの球状プランジャーを6.0cm/minの速度で試料に押し込み、それが破断した際の荷重を破断強度（g）とし、また、破断までのプランジャーの侵入距離を凹み（mm）として表わした。

1 2. ゲルのSDS-尿素混合液に対する可溶化と可溶化率の算出

細切した試料100mgに5mlの2% SDS-8M 尿素-2% 2-メルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液を加え、ホモジナイズ（ヤマト科学㈱製，ウルトラディスペーサー LK-21型を使用）した。続いて100℃で2分間加熱し、さらに室温で22時間攪はんして溶解させ、10,000×gで20分間遠心分離して上清を得た。これに等量の15% トリクロロ酢酸を加え、30分間放置後、10,000×gで20分間遠心分離してタンパク質を沈殿させた。上清のタンパク質濃度は、沈殿したタンパク質を風乾し、1.0N NaOHに溶解した後、ピウレット法により比色定量して求めた。可溶化率は、塩ずり直後の肉糊について測定したタンパク質量に対する上清中のタンパク質濃度の相対値（%）として表わした。³¹⁾

1 3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による坐りゲルおよび坐り加熱ゲル中のMfタンパク質成分の分析と定量

前述のようにして得た遠心上清を、Laemmliの方法³²⁾により5%ポリアクリ

ルアミドゲルを用いて電気泳動分析に供した。泳動後のゲルは0.25% クマシーブリリアントブルーRで染色後、脱色を50% メタノール-7% 酢酸で6~8時間、次いで7% 酢酸でバックグラウンドが完全に透明になるまで行なった。各タンパク質サブユニット成分の定量は沼倉ら³¹⁾の方法に準じた。すなわち、各タンパク質成分のバンドの染色強度をデンストメーター(島津製作所備製、二波長クロマトスキャナCS-910)を用いて640nmと700nmの染色強度の差として測定し、ミオシン重鎖とその多量体およびその他のサブユニット成分の含量をゲル中の全成分の総染色強度に対する割合(%)で示した。なお、沼倉ら³³⁾は、肉糊の坐りに伴って泳動ゲル中の総染色強度が減少する場合には、これをSDS-尿素混合液に可溶化したミオシン重鎖の多量体の中でも分子サイズの大きい成分がゲル中に侵入できないために起こったものと推定し、その量を計算によって求めた(この成分を以後、HCn'と表現する)。さらに、沼倉ら³³⁾は、ゲルがSDS-尿素混合液に不溶化する場合には、不溶化した成分をミオシン重鎖の多量体の中でも特に巨大化した成分(以後、HCn''と表現する)であるとみなして、各成分の含量を補正しているので、本研究においても同様に補正して各成分を算出した。なお、これらの成分の計算法はFig. 4.5に記した。

14. 坐りゲルの破断強度の増加量と増加速度の算出

坐りゲルの破断強度の経時変化から増加量と増加速度を求めた。すなわち、肉糊のゲル化に伴う破断強度の変化を経時的に測定し、その最大値(e_{BS} , g)および最大値の1/2に達するまでに要した時間を求め、その逆数をゲル強度の増加速度(v_{BS} , sec^{-1})として表した。³⁴⁾

15. 坐りに伴う肉糊中のミオシンHCの減少量と減少速度の算出

ミオシンHCの経時変化からその減少量と減少速度を算出した。すなわち、坐りゲル中のミオシンHCの量は、坐りに伴って減少し、一定時間後に最少値となったので、最小値の1/2に達するまでの時間を求め、その逆数を減少速度(v_{HC} , sec^{-1})とした。³⁴⁾ なお、ミオシンHCの減少量 (e_{HC}) は塩ずり直後の肉糊中のミオシンHCの量を1とした相対値で表した。

第1章 筋原線維の保水能に及ぼすCaCl₂の影響

魚肉落とし身の水晒しは、ねり製品を製造するにあたって最初に行なわれる基本的な処理である。その役割は、単に汚物や脂質を取除くだけにとどまらず、水溶性タンパク質の除去やMfタンパク質の濃縮等の問題をめぐって多くの研究が行なわれてきた。³⁵⁻³⁸⁾ また、水晒しに際して使用する用水の質に関する研究も古くから行なわれており、魚肉の保水性が用水中の種々の塩類によって影響を受けることが知られている。^{39), 40)} 従来、魚肉の保水性は、試料を加圧した際に滲み出るドリップ量⁴¹⁾や、魚肉の膨潤度、⁴²⁾ 吸水率⁴³⁾等を指標として測定されてきた。しかし、筋肉の主構成単位であるMfについてその保水能を直接測定した例は少なく、さらに、Mfの保水能の変化をねり製品製造時の用水の質と関連づけた研究は見当たらない。

本章では、魚類Mfの保水能を測定する方法として関ら²²⁾が報告した遠心力を利用した簡便法を採用し、先ずその測定の基礎的な条件を検討した。そして、数種の魚類MfのWHCに及ぼすCaCl₂の影響を、他の塩の場合と比較しながら検討し、その脱水に対する効果を定量的に論ずる試みを行なった。また、魚肉の貯蔵に伴うMfタンパク質の変性とWHCの変化の関係を調べ、鮮度の異なる魚肉のWHCとそれに対するCaCl₂と尿素の影響についても検討を加えた。

1. 1 遠心力によるMfのWHCの測定条件の検討

1) Mf懸濁液の遠心分離条件がWHCに及ぼす影響

10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に懸濁したコイのMfを用い、遠心分離によってそのWHCを測定する際の条件を検討した。まず、Mfを500×g

で60分間遠心分離したところ、上清と沈殿の分離がやや困難であった。そこで、遠心力を1,100~2,100×gの範囲で、また、遠心分離する時間（以下、遠心時間と称する）を6~120分まで変化させてMfのWHCを測定した。結果をFig. 1.1(a)に示す。これによると、MfのWHCは遠心力と遠心時間の双方の影響を受ける値であることが示された。すなわち、いずれの遠心力においてもWHCは遠心時間に伴って減少し、30~60分で一定値に達した。また、WHCは遠心力の増加に伴って減少し、1,800×g以上でほぼ一定の値となることが確かめられた。

次に、10mM、100mMおよび200mMのNaClを含む40mM Tris-maleate (pH 7.0)に懸濁したMfを2,100×gで6~120分間遠心分離した際のWHCの変化をFig. 1.1(b)に示す。この結果によると、Mfを懸濁する溶媒のIを変化させても、MfのWHCはFig. 1.1(a)の結果と同様に約60分で一定の値に達することが明らかとなった。また、10mM NaClと200mM NaCl共存下のWHCは近似していたが、100mM NaCl共存下のWHCはより低い値の一定値に達していた。

2) 塩との混和時間がMfのWHCに及ぼす影響

MfのWHCに対する塩の混和時間の影響を調べるため、10mM NaCl、40mM Tris-maleate (pH 7.0)に懸濁したMfに、50mM NaClまたは17mMおよび50mM CaCl₂（それぞれ終濃度）を添加して転倒攪はん後、5℃で6~120分間静置してからWHCを測定しその変化を検討した。結果をFig. 1.2に示す。これによると、NaClまたはCaCl₂の添加後、MfのWHCは時間の経過とともに減少したが、いずれの場合も約30分で一定の値となることが示された。

3) MfのWHCに対するMfタンパク質濃度の影響

供試するMfタンパク質濃度がWHCの測定値に及ぼす影響を調べた。すなわち、50mM NaCl、17mMおよび33mM CaCl₂を含む40mM Tris-maleate (pH 7.0)に懸濁

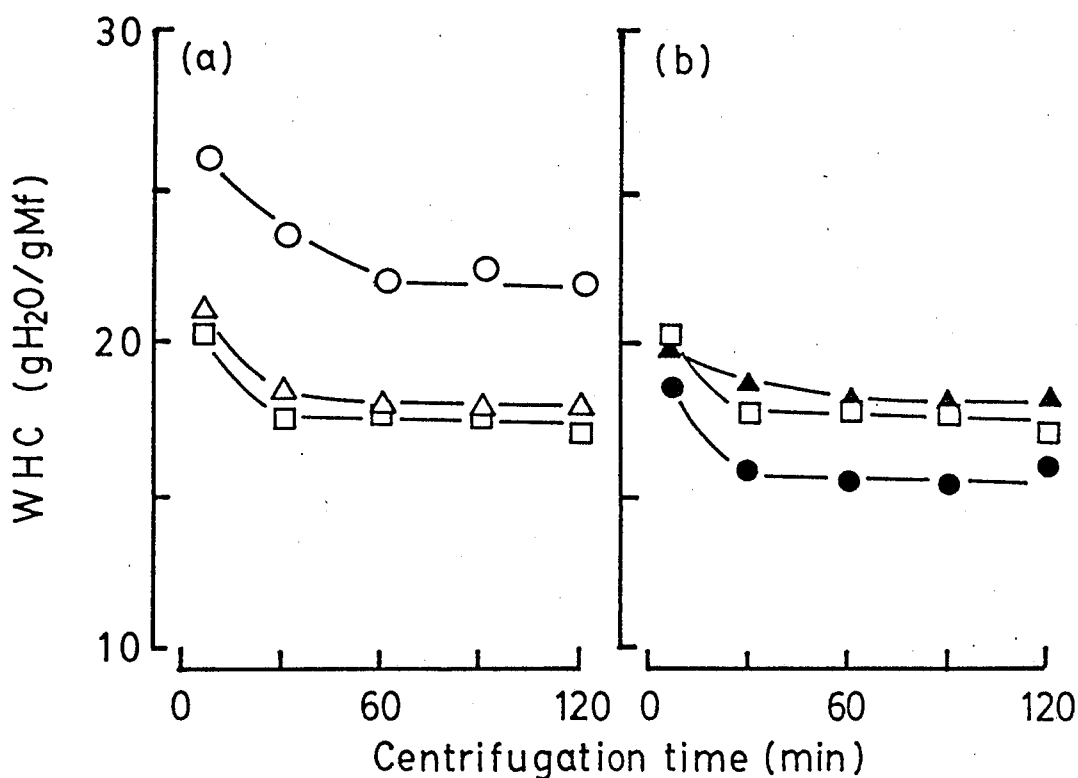


Fig. 1.1. Effect of centrifugal conditions on water holding capacity of carp myofibrils.

(a) Carp myofibrils suspended in 10 mM NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) were centrifuged at 1,100 (○), 1,800 (△) or 2,100 (□) x g using a swing-out rotor at 5 °C.

(b) Myofibrils suspended in 100 mM (●) or 200 mM (▲) NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) were centrifuged at 2,100 x g.

After centrifugation for various periods (6-120 min), myofibrils were collected as a precipitate in a tube. Then, the amount of protein in the supernatant (A), the weight of precipitate (B), and the total amount of myofibrillar protein (C) were measured. The water holding capacity (WHC) was conveniently expressed as the moisture content relative to the total myofibrillar protein in the following equation: $WHC = (B - C + A) / C$, (g H₂O/g Mf).

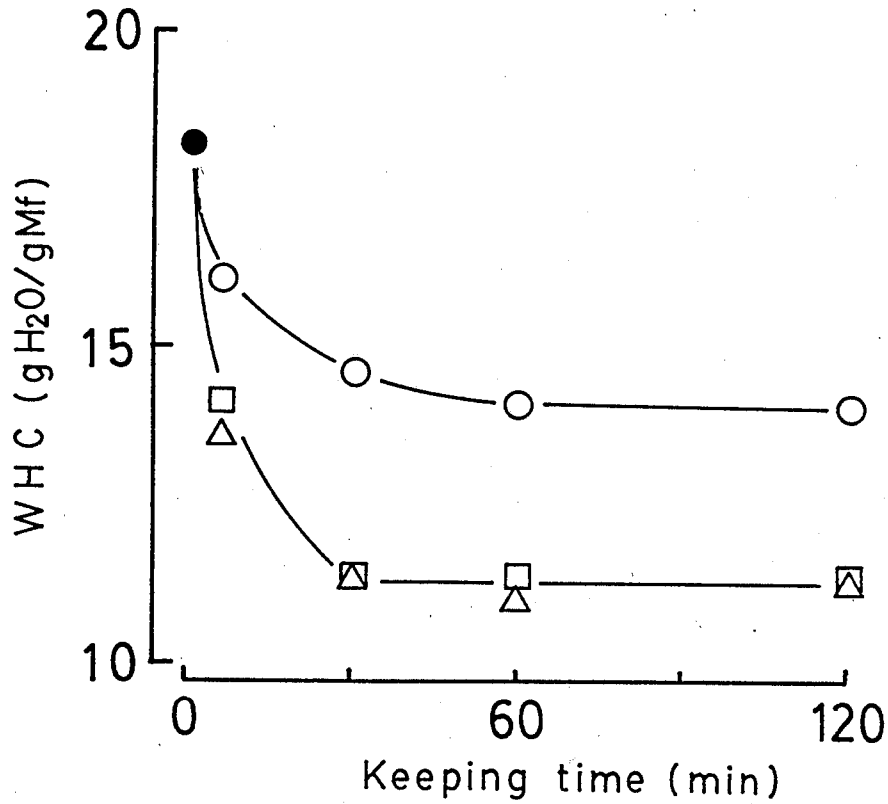


Fig. 1.2. Time-course of change in WHC of fish myofibrils induced by salt.

To carp myofibrils suspended in 10 mM NaCl (●) containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), 50 mM NaCl (○), 17 mM (△) or 33 mM (□) CaCl₂ was added. During keeping for 120 min at 5°C, the myofibrils were centrifuged at 2,100 xg for 60 min with a lapse of keeping time. The measurement of WHC was as in Fig. 1.1.

したMfのタンパク質濃度を3.8~13.2mg/mlの範囲に調整した後、2,100×gで60分間遠心分離してそれらのWHCを測定した。結果をFig. 1.3に示す。これによると、MfのWHCはいずれの塩を添加した場合も、測定時のMfタンパク質濃度の高低に無関係にほぼ一定の値を示し、50mM NaCl共存下のWHCが最も高く、また、33mM CaCl₂共存下のWHCが最も低かった。なお、タンパク質濃度がこれ以上高くなるとMf懸濁液の粘性が高くなり、正確な操作が不可能となった。また、Mfタンパク質濃度が低くなると沈殿重量の測定精度が低下した。

4) MfのWHC測定値の統計的精度について

Fig. 1.1からFig. 1.3までの実験結果をふまえて、MfのWHCの測定条件を以下に述べるように決定した。すなわち10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH7.0)に懸濁したMf (タンパク質濃度は7.0~10.0 mg/ml) に、種々の濃度の塩を加え、転倒攪はん後5℃で60分間保持し、冷却式遠心機を用いて2,100×gで60分間遠心分離した。この条件下で測定したコイ、シログチおよびアオザメのMfのWHCと、それらに15mM CaCl₂を添加した場合のWHCをそれぞれ10検体ずつ測定した。測定値とその平均値、標準偏差および変動係数をTable 1.1に示す。これによると本研究で採用したMfのWHC測定における変動係数は0.7~1.6%であり、測定精度が比較的高いことが示された。この結果より、以下の実験では特に断らない限りWHCは3回の測定値の平均で表すことにした。

5) 魚肉の貯蔵期間がMfのWHCに及ぼす影響

即殺したコイと、漁獲後1日経過したスケトウダラおよびカツオから背部普通筋を分取し、サラン樹脂製のラップに包んでさらに2℃に貯蔵した。これらの一部から経時的にMfを調製し10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0)に懸濁した後、直ちにWHCを測定した。その結果をFig. 1.4(a)に示す。

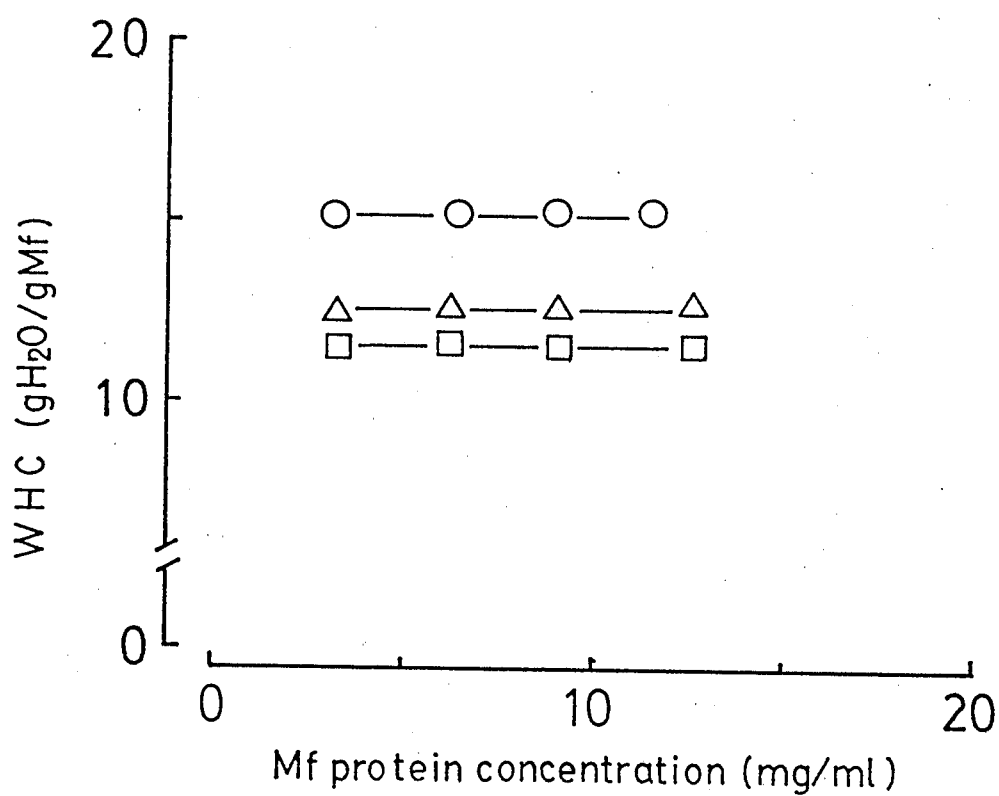


Fig. 1.3. Protein concentration dependence of WHC of fish myofibrils.

Carp myofibrils were suspended in 50 mM NaCl (○), 17 mM CaCl₂ (△) or 33 mM (□) CaCl₂ containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). Then, measurements of WHC were made on such myofibrils suspensions of protein concentration ranging from 3.8 to 13.2 mg/ml by the method described in Fig. 1.1.

Table 1.1. Measurement error of WHC of fish myofibrils by centrifugal separation method.

Fish species	Medium ^{a)}	Mean ^{b)}	Standard deviation	Coefficient of variation
		(g H ₂ O/g Mf)		(%)
Carp	10mM NaCl	17.42	0.12	0.7
	10mM NaCl +15mM CaCl ₂	12.26	0.20	1.6
White croaker	10mM NaCl	18.39	0.23	1.3
	10mM NaCl +15mM CaCl ₂	13.31	0.19	1.4
Mako shark	10mM NaCl	20.80	0.15	0.7
	10mM NaCl +15mM CaCl ₂	13.44	0.17	1.3

a) Medium contained 40 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0).

b) Average of 10 determinations.

まずコイの場合、死後2～96時間（すなわち4日間）貯蔵中の筋肉から調製したMfのWHCはほぼ一定の値を示した。ところが、即殺後直ちに調製したMf（Mf-0と称する）のWHCは、2時間以上貯蔵してから調製したMfのWHCよりも約30%低い値であった。顕微鏡観察によると、Mf-0は塊状を呈し、Mf断片のそれぞれを判別できず、また横紋構造も全く観察されなかった。一方、2時間以上貯蔵した筋肉から調製したMfでは、それぞれのMf断片が判別でき、特徴的な横紋構造が観察された。なお、魚肉の貯蔵に伴ってMfは断片化して短くなり、また、そのサルコメア長が徐々に長くなったが、WHCはほとんど変化しなかった。

次に、漁獲後1日経過したスケトウダラとカツオから調製したMfでは、いずれのMfにおいてもMf断片がそれぞれ判別でき、横紋構造が観察された。しかし、スケトウダラの筋肉を2℃で3日間貯蔵してもそれから調製したMfのWHCはほとんど変化しなかったのに対し、カツオの場合には、筋肉の貯蔵に伴ってそれから得たMfのWHCが低下する傾向を示した。またFig. 1.4(b)には、同時に測定したMf・Ca-ATPase比活性を示したが、それによると、コイとスケトウダラのMf・Ca-ATPase比活性は貯蔵中ほとんど変化しなかったのに対し、カツオのMf・Ca-ATPase比活性は貯蔵に伴って徐々に低下していた。それゆえ、Ca-ATPaseの失活とMfのWHCの間には密接な関係があるように思われる。なお結果は図示しないが、いずれの魚類においても、その筋肉から調製したMfのCa-ATPase比活性とWHCは、調製後5日間に渡って氷蔵しても全く変化しないことを確かめた。なお、MfのWHCとCa-ATPase活性の関係については後に詳述する。

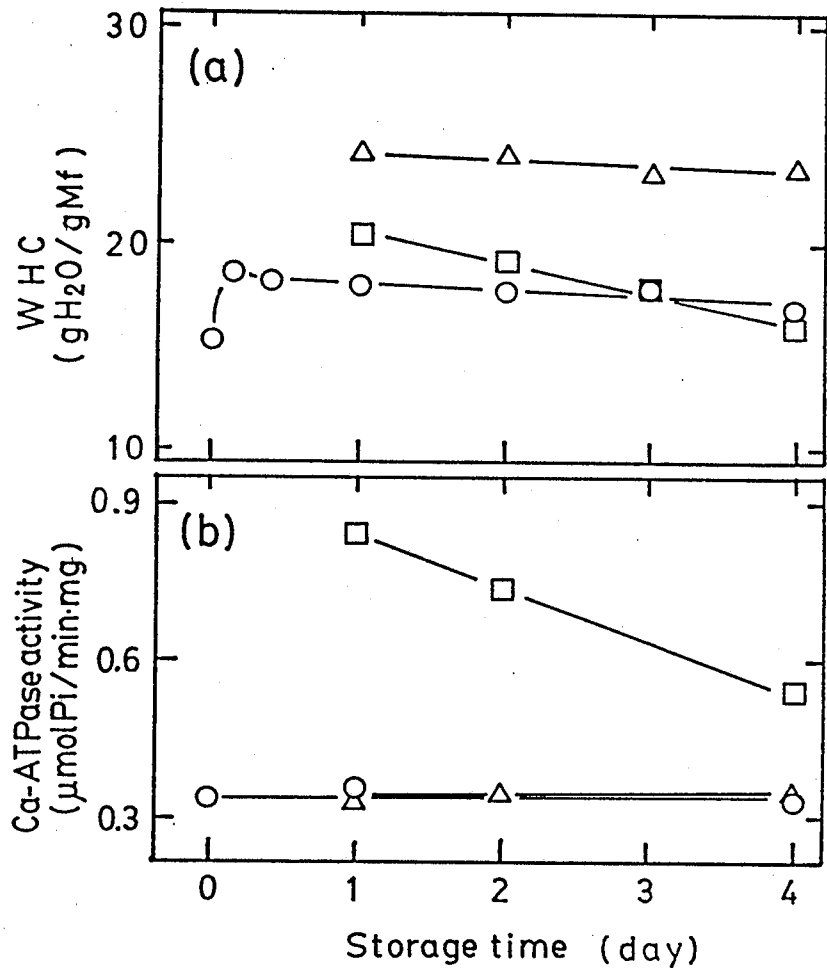


Fig. 1.4. Freshness dependence of WHC of fish myofibrils.

Muscles were separated from carp in alive (○), walleye pollack (△) and skipjack tuna (□) stocked in iced water for one day after catch. They were stored at 2 °C for various periods (0 to 4 days). Myofibrils were prepared from such fish muscles and subjected to following assay. The WHC of myofibrils (a) was measured in the same way as described in Fig. 1.1. The ATPase assay of myofibrils (b) was carried out at 25 °C in a reaction medium containing 0.1M NaCl, 5mM CaCl₂, 1mM ATP and 25 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 0.2-0.3 mg/ml of myofibrillar protein.

1. 2 CaCl₂存在下の各種魚類Mfの保水能の比較

1) CaCl₂およびNaClの添加によるMfのWHCの変化

10mM NaCl (pH 7.0)に懸濁した8種の魚類のMfに、CaCl₂ (終濃度が0~84mM) およびNaCl (終濃度が0~250mM) を添加し、MfのWHCを測定した。結果をFig. 1.5に示す。なお、同図ではNaClとCaCl₂の添加量をIに換算して表示した。

Fig. 1.5によると、いずれの魚類のMfの場合も、それを懸濁している溶媒中の塩濃度の上昇に伴ってWHCは減少し、塩の添加量がIに換算して0.05から0.15の付近で最小となった。また、NaClに比べCaCl₂を添加した場合のほうがWHCを減少させる効果は大きかった。たとえば、コイのMfにCaCl₂を添加した場合は、NaClを添加した場合に比べ、I=0.05で2.0倍、I=0.10で2.3倍、そしてI=0.15では2.7倍の減少率であった。一方、いずれの魚種においても、塩の添加によって溶媒のIがさらに上昇すると逆にWHCは増加する傾向に転じ、NaClの場合はI=0.15以上で、またCaCl₂の場合はI=0.20以上でMfが強く膨潤する傾向を示した。そして250mM以上のNaClまたは100mM以上のCaCl₂を添加した場合にはMfは著しく膨潤し、遠心分離が困難になった。この時、Mfを高速で遠心分離して得た上層部をSDS-PAGE分析に供したところ、ミオシンHCやアクチン、トロポミオシン等のMfを構成するタンパク質成分が全て観察されるので、これらの条件下ではMfは部分的に溶解しているものと推定される。

塩の添加に伴うWHCの変化量は魚種によってやや異なり、たとえば、コイとスケトウダラの場合を比較すると、後者のほうがWHCの変化量が大きかった。このように魚種による差が生じる原因については未だ不明であるが、Fig. 1.5に示した条件下ではMf・Ca-ATPaseの失活は起こらないので、変性度の相違が原因ではないことが明らかである (第2章でさらに詳述する)。

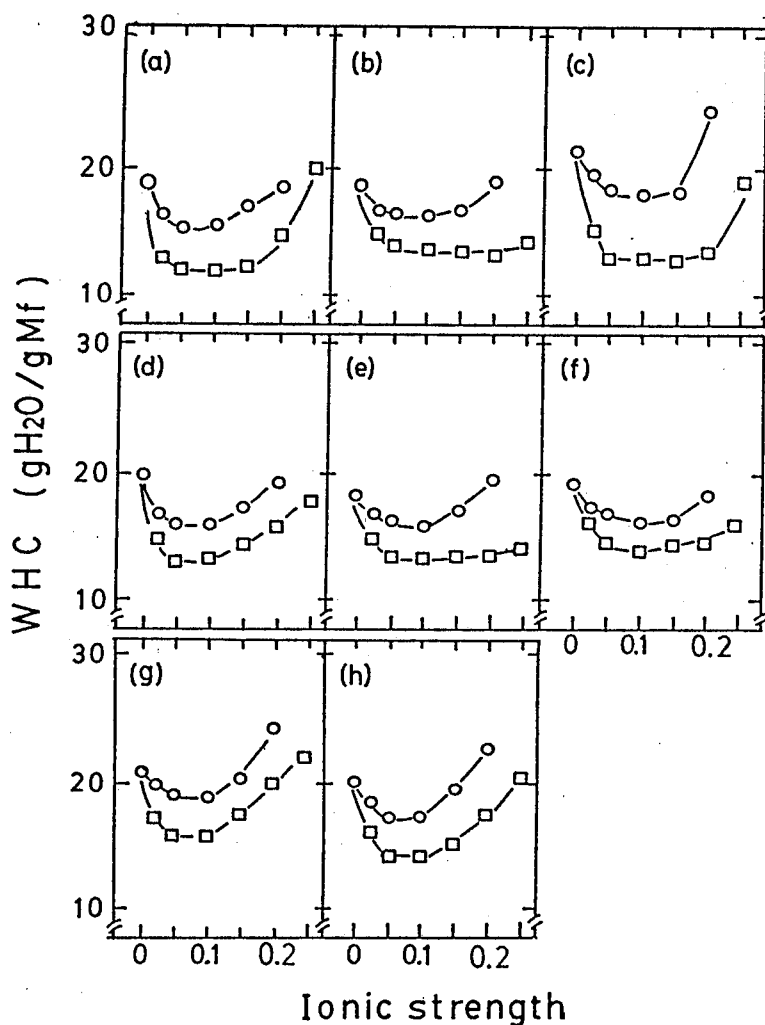


Fig. 1.5. Salt concentration dependence of WHC of myofibrils from various fish species.

The WHC of fish myofibrils was measured in a medium containing various concentrations of NaCl or CaCl₂ and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) at a protein concentration between 7.0-10.0 mg/ml. Ionic strength was calculated from the salt concentration in the medium and plotted on abscissa.

After keeping for 60 min at 5 °C on addition of NaCl (○) or CaCl₂ (□), the myofibrils were centrifuged at 2,100xg for 60 min at 10 °C. The amount of protein in the supernatant (A), the weight of precipitate (B), and the total amount of myofibrillar protein (C) were measured. The water holding capacity (WHC) was expressed as the moisture content relative to the total myofibrillar protein in the following equation: $WHC = (B - C + A) / C$, (g H₂O/g Mf).

(a) Skipjack tuna, (b) Carp, (c) Walleye pollack,
 (d) Sardine, (e) White croaker, (f) Tilapia,
 (g) Mako shark, (h) Blue shark.

2) CaCl_2 共存下, 一定のイオン強度下における各種魚類MfのWHCの比較

Fig. 1.5に示した実験では, 塩の添加に伴って溶媒のIが上昇している。そこで, 10mM NaCl (pH 7.0) に懸濁したMfに種々の濃度の CaCl_2 を添加した後, さらに所定量のNaClを加えて溶媒のIを一定に調整し, その条件下でWHCを測定した。まず, コイのMfに, 5, 10および15mMの CaCl_2 を添加した後, さらにNaClを補充してMf懸濁液のIの和が0.05になるように調整し, この場合におけるMfのWHCと CaCl_2 濃度の関係をFig. 1.6(a)に示した。その結果, 一定のI下においても, MfのWHCは CaCl_2 濃度の上昇に反比例して減少する傾向を示した。次に, Mfに添加した CaCl_2 とNaClのIの総和をそれぞれ0.10, 0.15および0.20に調整して上の場合と同様にMfのWHCと CaCl_2 濃度の関係を調べた。それぞれFig. 1.6(b), (c)および(d)に結果を示す。これらによると, いずれの場合も CaCl_2 濃度の上昇に反比例してMfのWHCが減少するが, この傾向はI=0.05の場合と同様であった。ただし, CaCl_2 濃度が15mMを越えると, いずれのI下においても, CaCl_2 濃度の上昇に伴うWHCの減少の割合はやや小さくなる傾向を示した。なお, Fig. 1.6(b)の実験においては, CaCl_2 のかわりに同じIに相当するKClを加えてIの総和が0.10となるようなMf懸濁液を調製し, そのWHCを測定した結果も同時に示した。それによると, NaClとKClによってIを0.10になるように調節したMfのWHCは, 塩の種類に無関係に一定値になることが示された。したがって, Iが同じ0.10であっても CaCl_2 を含むMfのWHCが大きく減少するのは, CaイオンがMfタンパク質に対してなんらかの作用を及ぼした結果であると推定される。

次に, カツオとスケトウダラのMfを用いて同様の実験を行なった結果を, それぞれFigs. 1.7および1.8に示す。それによると, いずれのI下においても, これらのMfのWHCは添加した CaCl_2 濃度の増加に伴って反比例的に減少することが示された。また, Iが0.10, 0.15および0.20の条件下において, 添加した

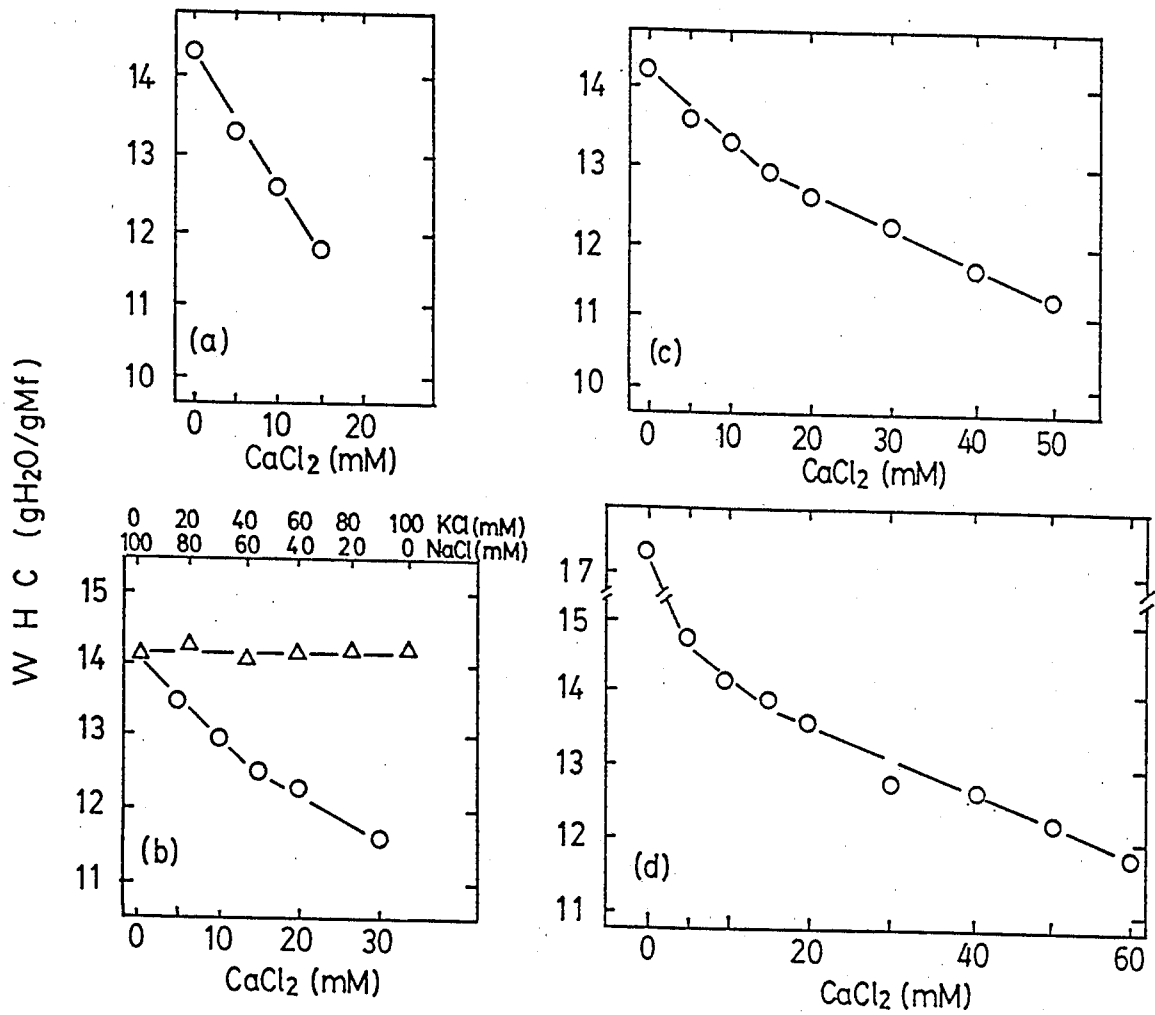


Fig. 1.6. CaCl₂ concentration dependence of WHC of carp myofibrils under different ionic strengths.

The ionic strengths of media were fixed to 0.05 (a), 0.10 (b), 0.15 (c) and 0.20 (d) by mixing the calculated amount of NaCl with various concentrations of CaCl₂, respectively. In Fig. 1.6(b), the WHC of myofibrils in a medium of ionic strength set with NaCl and KCl (Δ) was also shown. The measurement of WHC was conducted as in Fig. 1.5.

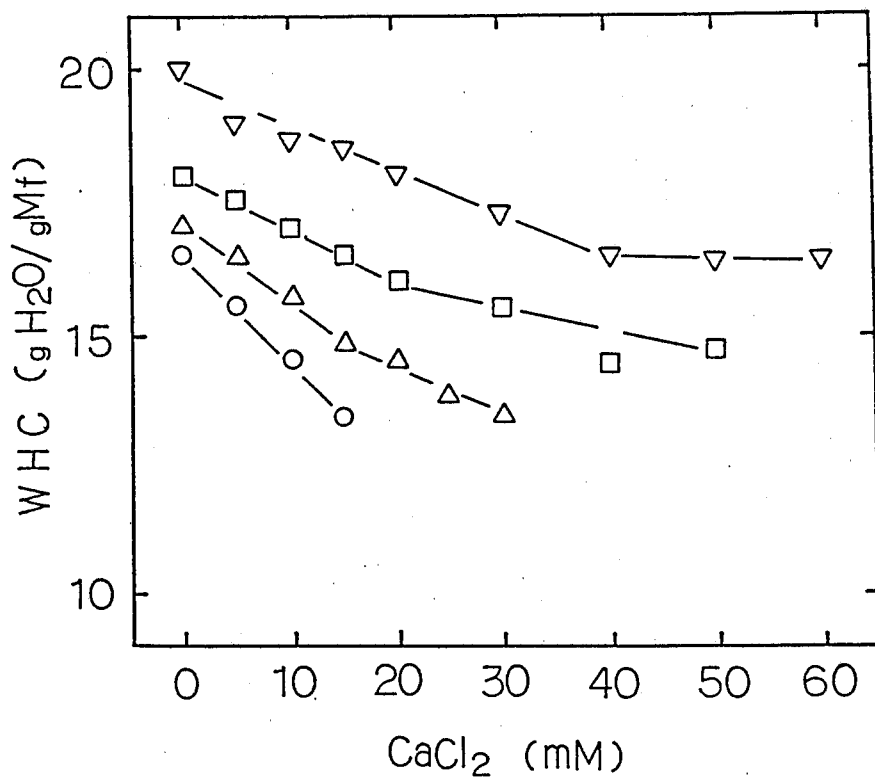


Fig. 1.7. CaCl₂ concentration dependence of WHC of skipjack tuna myofibrils under different ionic strengths.

The ionic strengths of media were fixed to 0.05 (○), 0.10 (△), 0.15 (□) and 0.20 (▽) by mixing the calculated amount of NaCl with various concentrations of CaCl₂. The measurement of WHC was conducted by the same manner as in Fig. 1.5.

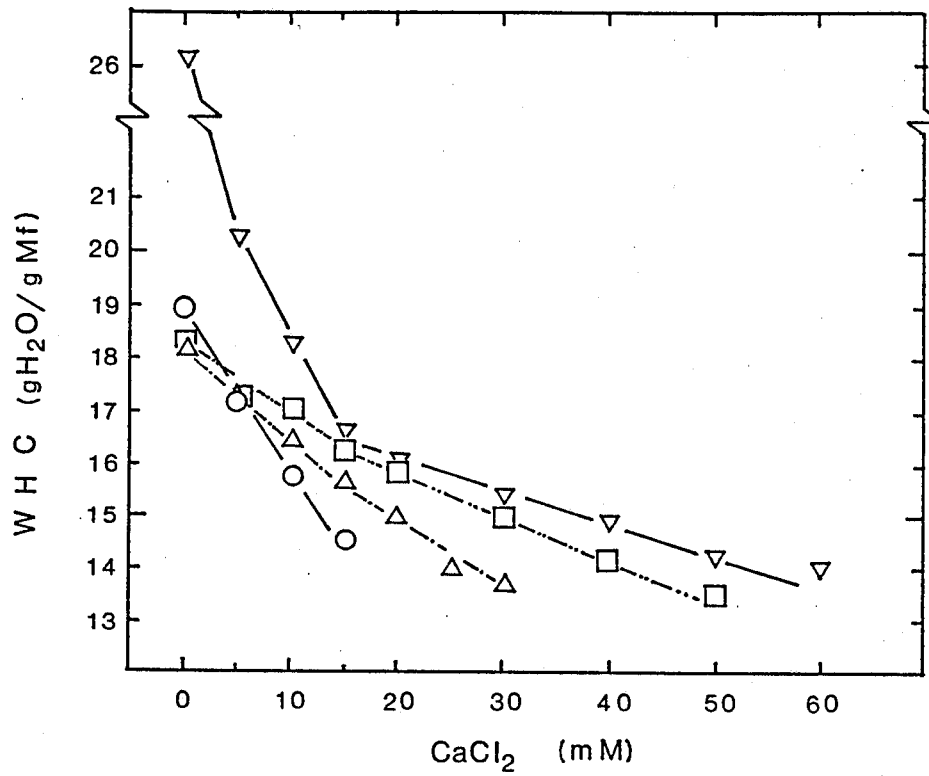


Fig. 1.8. CaCl_2 concentration dependence of WHC of walleye pollack myofibrils under different ionic strengths.

The ionic strengths of media were fixed to 0.05 (○), 0.10 (△), 0.15 (□) and 0.20 (▽) by mixing the calculated amount of NaCl with various concentrations of CaCl_2 . The WHC was measured as in Fig. 1.5.

CaCl₂濃度が15mMを越えるとWHCの減少度が小さくなる傾向も、先のコイの場合と同様であった。

3) CaCl₂によるMfの保水能の低下とその可逆性

CaCl₂の添加によってWHCが低下したMfの懸濁液を透析し、CaCl₂を除去した後、再度WHCを測定し、その回復性を調べた。すなわち10mM NaCl (pH 7.0) に懸濁したカツオ、コイおよびスケトウダラのMfに5~15mMのCaCl₂を添加し、さらにNaClを加えて溶媒のIを0.05に調整した後、一部を分取してWHCを測定した。また、対照として50mM NaCl (I=0.05) に懸濁したMfのWHCを測定した。次いで、これらのMfを50mM NaCl (pH 7.0) と10mM NaCl (pH 7.0) に透析してCaCl₂を除去した後、WHCを測定した。結果をFig. 1.9に示す。まずカツオの場合、10mM NaClに懸濁したMfのWHCは18.0であったが、これに5~15mMのCaCl₂と50mMのNaClを添加するとWHCは減少し、13.8から16.0の値を示した。次に、これらのMfを透析処理に供したところ、MfのWHCは18.2 (10mM NaClに透析) と16.2 (50mM NaClに透析) まで上昇し、対照のWHCの値にほぼ等しい値となった。この結果はコイとスケトウダラのMfでも全く同様であった。したがって、塩の添加による魚類Mfの保水能の低下は、塩の除去によって回復する可逆的な変化であることが明らかである。なお、上記の操作の前後においてMf・Ca-ATPase比活性に変化は認められなかった。

4) MfのWHCに及ぼすCaCl₂とpHの効果の比較

筋肉のpHがその保水性に影響を及ぼすことは既に良く知られている。Hamm⁴⁴⁾ は、牛の筋肉ホモジェネートと肉小塊の保水性と膨潤度が、pH 5.0附近で最低となることを報告している。それゆえ、pHの変動によってMfの脱水を行なう試みも、現在なお、しばしばみられる。⁴⁵⁾ そこで、本研究でもpHの変動によっ

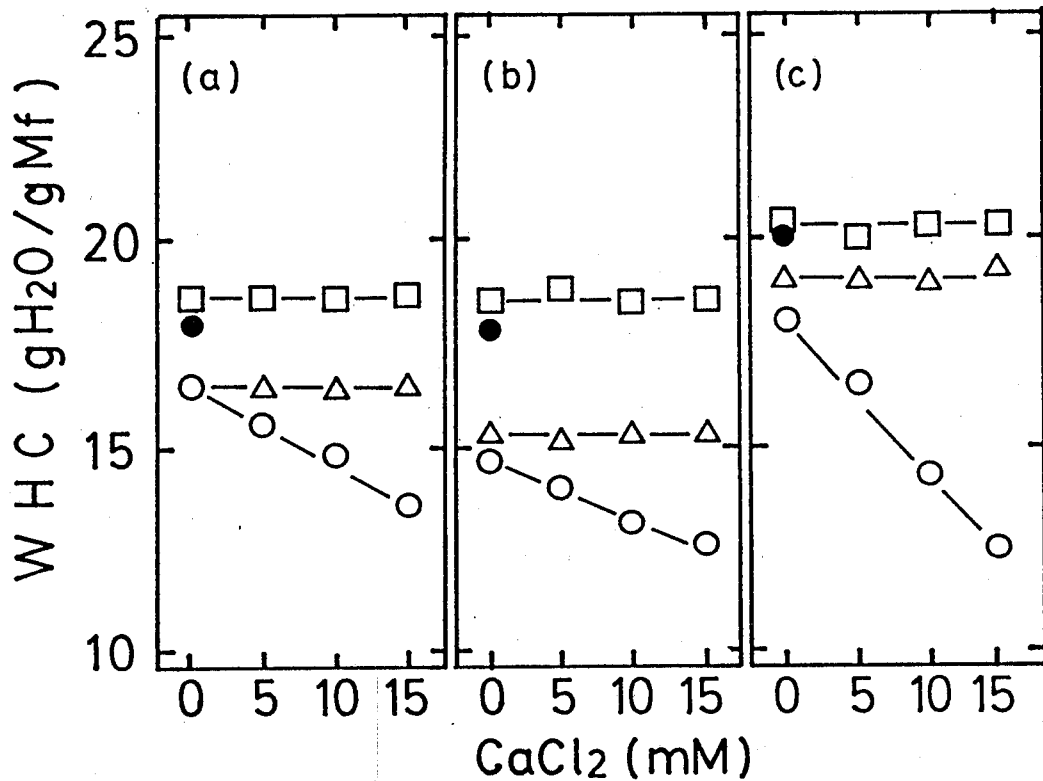


Fig. 1.9. Reversible change in WHC of fish myofibrils induced by CaCl_2 .

Skipjack tuna (a), carp (b) and walleye pollock (c) myofibrils in a medium containing 10 mM NaCl were mixed with varied concentrations of CaCl_2 (0-15 mM), and calculated concentration of NaCl to give the ionic strength fixed to 0.05 (○). The WHC of myofibrils was then measured as in Fig. 1.5. After removing CaCl_2 from the medium by dialysis against 10mM (□) or 50 mM (△) NaCl solution (pH 7.0), the WHC of myofibrils was again measured.

As a control (●), the WHC in the absence of CaCl_2 , was also measured.

て起こる魚類MfのWHCの変化を調べ、 CaCl_2 を添加した場合の影響と比較した。まず、コイのMfに0.1N NaOHまたは0.1N HClを滴下し、5℃で30分間放置した後、 $2,100\times g$ で60分間遠心分離してMfのWHCを測定した。加えたNaOHまたはHClの量は極微量なので、これらの添加によるIの変化は本実験では無視した。その結果をFig. 1.10に示す。これによると、pHが5.0~8.0の範囲では、MfのWHCはpHの低下に伴って比例的に減少する傾向を示した。たとえば、pHが7.0から6.0および5.0に低下すると、WHCはそれぞれ12%および28%減少し、また、pHが8.0に上昇するとWHCは16%増加した。

同図中には、NaClまたは CaCl_2 を添加したMfのWHCも併せて示したが、これらの比較によると、 CaCl_2 を30mM添加した際のWHCの変化は、Iを変えずに溶媒のpHを7.0から5.0に下げた時に生じるWHCの変化にほぼ等しかった。しかし、溶媒のpHを5.0にしてWHCを測定した後にはMf·Ca-ATPase活性は完全に失活しているが、一方、 CaCl_2 により同じ量のWHC変化をひき起こしたMfを遠心分離によって洗浄し、 CaCl_2 を除去した後、あらためてそのCa-ATPase活性を測定した際には、Mf·Ca-ATPase比活性の変化は認められなかった。以上の結果は、pHの低下に伴うWHCの減少には、Mfタンパク質の変性に関わっており、この点で CaCl_2 による減少とは全く異質の現象であることを示している。

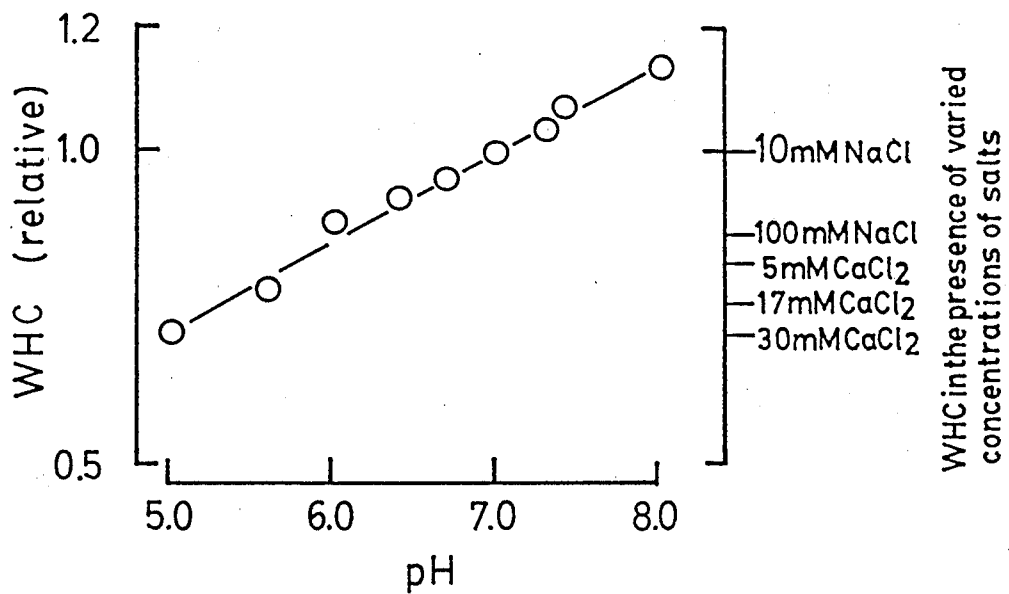


Fig. 1.10. pH-Dependence of WHC of carp myofibrils.

The pH of myofibrils was adjusted by adding a small amount of 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH. After keeping for 30 min at 5 °C, myofibrils were centrifuged at 2,100 x g for 60 min. The WHC was measured by the method described in Fig. 1.1. In Fig 1.10, the right side ordinate shows the WHC of myofibrils in the solution at pH 7.0 containing varied concentrations of NaCl or CaCl₂ and 40 mM Tris-maleate.

5) CaCl₂によるMfの脱水効果

Figs. 1.6, 1.7および1.8に示したMfのWHCとCaCl₂濃度間に成立つ関係直線の勾配は、一定のイオン強度下におけるMfのCaCl₂による脱水の難易度（以下、Caの脱水効果と呼ぶ）を表している。そこで、この直線の傾き（以下、D値と称する）を次式によって算出した。

$$D = (\text{WHC}_b - \text{WHC}_a) / (a - b), \quad (\text{g H}_2\text{O} / \text{g Mf} \cdot \text{mM}^{-1})$$

ここでWHC_a, WHC_bは、CaCl₂をそれぞれaおよびb mM添加した時のMfのWHCである。すなわち、D値は一定のI下における単位濃度のCaCl₂によるWHCの変化量である。

Table 1.2に、I = 0.05~0.2の間の一定のI下におけるD値を示す。これによると、いずれの魚類のMfにおいても、溶媒のIが高い場合の方がD値は減少する傾向を示した。たとえばIが0.05から0.15に上昇すると、コイとスケトウダラのMfのD値は約1/2に、またカツオの場合は約2/3に減少した。また、Table 1.2のカッコ内の数字はCaCl₂濃度が15mMを越えた場合のD値であるが、これによると、同じI下でも溶媒中のCaCl₂濃度が15mM以上に増加するとMfに対するその脱水効果が低下することが示されている。以上の結果は、CaCl₂によるMfの脱水効果が、溶媒のIとCaCl₂濃度の両方を指標として考慮すれば、かなり正確に予測できることを示している。

Table 1.2. The dehydrative effect induced by CaCl_2 of fish myofibrils under the fixed ionic strength between 0.05 and 0.20.

Fish species	Ionic strength			
	0.05	0.10	0.15	0.20
Skipjack tuna	0.19	0.16(0.10)	0.13(0.04)	-
Carp	0.20	0.11(0.05)	0.10(0.04)	0.09(0.06)
Walleye pollack	0.29	0.17(0.13)	0.13(0.09)	0.36(0.06)

Fish myofibrils were suspended in the media containing varied concentrations of CaCl_2 and mixed with calculated amount of NaCl to give the ionic strength of 0.05, 0.10, 0.15 or 0.20 as in Figs. 1.6, 1.7 and 1.8. The WHC was measured by the same manner as in Fig. 1.5. The dehydrative effect (D value) was defined by the relation, $D = (\text{WHC}_b - \text{WHC}_a) / (a - b)$, where WHC_a and WHC_b were the WHC of myofibrils in the presence of a and b mM of CaCl_2 . The values with and without parenthesis indicate the dehydrative effects induced by higher and lower concentrations of CaCl_2 than 15mM, respectively.

6) 塩の種類がMfのWHCに及ぼす影響（脱水効果）の比較

3種の二価金属塩がMfのWHCに及ぼす影響を検討した。すなわち、Fig. 1.6の実験と同様に、種々の濃度の $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $SrCl_2$ をコイMfに添加し、Iが0.05および0.10におけるWHCを測定した。結果をFig. 1.11に示す。この結果によると、3種の塩はいずれもMfのWHCを低下させる効果を示した。また、前記した方法でこれらのD値を算出して比較すると、Iが0.05の場合にはそれぞれ0.10、0.19、0.20であり、また、Iが0.10の場合にはそれぞれ0.03、0.11および0.14となり、塩共存下におけるMfのWHCは常に $MgCl_2 > CaCl_2 > SrCl_2$ の順に高値を示した。さらにFig. 1.11には、NaClとKClの混合比を変化させてWHCの変化を調べた結果も併記したが、既にFig. 1.6で述べたように両者に差異は認められなかった。なお、結果は図示しなかったが、 $MgCl_2$ または $SrCl_2$ だけをそれぞれMfに添加してIの補正をしない際のWHCを調べたところ、 $CaCl_2$ の場合と同様に溶媒中の塩濃度の上昇に伴ってWHCは減少し、両塩の添加量がIに換算して0.05から0.15の付近で最小となり、また、I=0.20以上で強く膨潤する傾向を示した。すなわち、これらの結果は、3種の二価金属塩によってMfのWHCが変化する度合いはその種類によってやや異なるが、これらの塩の添加に伴うWHCの変化の傾向は極めてよく似ていることを示している。

7) 魚肉の貯蔵に伴うMfのWHCとCa-ATPase比活性の変化の関係

新鮮なコイとマイワシの筋肉を細切し、乾燥を防ぐため密封して2℃で4日間貯蔵した。この間、コイの筋肉のpHは貯蔵中に6.9から6.7へとわずかに低下する傾向を示した。一方、マイワシの筋肉のpHは貯蔵直前は6.4であったが、貯蔵に伴って速やかに低下し、1日後には5.7となり、その後ほとんど変化しなかった。なお両魚肉のK値⁴⁷⁾は4日後にはコイで13.3、マイワシで17.8に上昇しただけであった。次にこれらの筋肉からMfを調製し、そのWHCとCa-ATPase

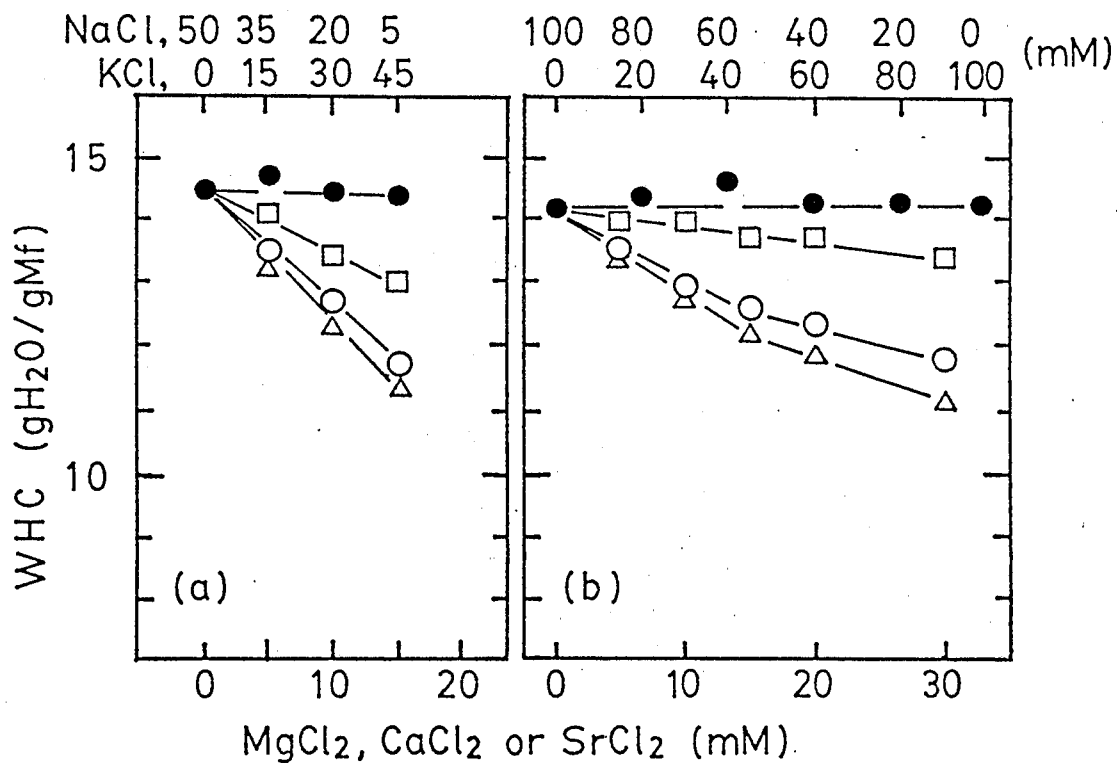


Fig. 1.11. Different salt concentration dependence of WHC of fish myofibrils.

The ionic strengths of myofibrils suspensions were fixed to 0.05 (a) and 0.10 (b) by mixing the calculated amount of NaCl with various concentration of MgCl₂ (□), CaCl₂ (○) or SrCl₂ (△). In Fig. 1.11, the WHC of myofibrils in media of different ionic strength set with NaCl and KCl(●) was also shown.

活性の変化を検討した。結果をFig. 1.12に示す。

まず、Fig. 1.12 (a, c, e) に示したコイの場合、MfのWHCは筋肉の貯蔵に伴ってやや減少する傾向を示したが、さらにCaCl₂の添加によってWHCが低下する傾向は変らなかった。一方、I = 0.05におけるCaCl₂によるD値を比べると、貯蔵開始時の0.22から4日後には0.19まで減少し、CaCl₂による脱水効果がやや低下する事実が示された。なお、調製したそれぞれのMfを4日間氷蔵した後、そのWHCを測定した場合は顕著な変化は認められないので、上記の変化は魚肉の貯蔵中にのみ起こる現象である。なお、同図に示したように、コイ筋肉の貯蔵中にはそのMf・Ca-ATPase比活性の低下はわずかであり、4日間で10%程度の減少にとどまっていた。

次に、Fig. 1.12 (b, d, f) に示したマイワシの場合、筋肉の貯蔵に伴ってMf・Ca-ATPase比活性は速やかに低下し、1日後には貯蔵開始時の値の90%に、また、4日後には61%にまで減少した。また、MfのWHCも、Ca-ATPase活性の減少と同様に速やかに低下する傾向を示し、4日後には貯蔵開始時の72%にまで低下した。この時、CaCl₂によるD値の低下も同様に観察され、貯蔵4日後にはほぼ半減することが示された。これらの変化は、先に述べたコイの場合との大きな相違であった。一方、マイワシ筋肉の貯蔵開始時に一部の試料からMfを調製して2℃に貯蔵した場合は、そのWHCとCa-ATPase比活性はいずれもほとんど変化せず、また、D値の低下も極めてわずかであった。そこで、マイワシMfのCa-ATPase活性とD値の関係を調べた。結果をFig. 1.13に示すが、これによると、魚肉の貯蔵に伴って生じたMfのD値の低下がMfタンパク質の変性と極めて良く対応していることが明らかとなった。既に、マイワシ筋肉中のMfタンパク質は、筋肉のpHの低下に伴って著しく不安定化する事実が知られている。⁴⁷⁾ それゆえ、上記の結果は、マイワシMfのWHCがMfタンパク質の酸変性が原因となって低下すること、またCaCl₂による魚肉の脱水は酸変性したMfタンパク質

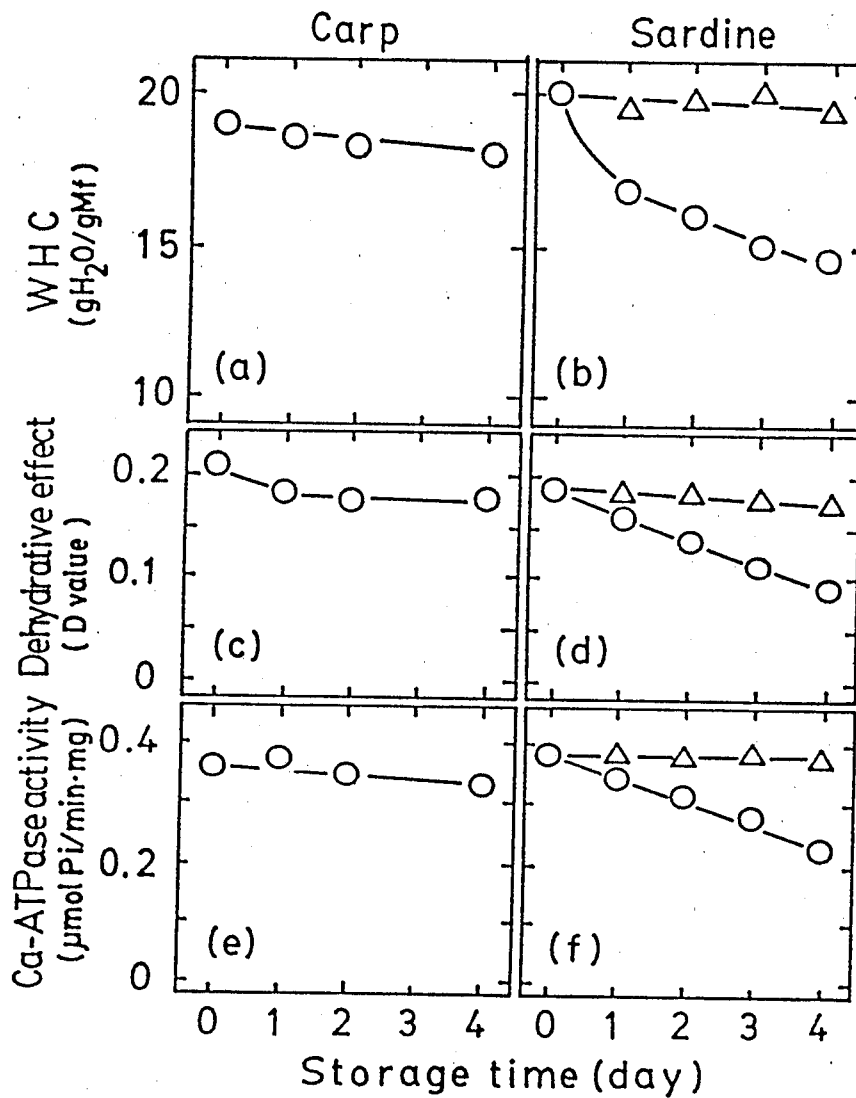


Fig. 1.12. Changes in WHC, dehydrative effect induced by CaCl_2 and Ca-ATPase activity of myofibrils prepared from fish muscle during storage at 2 °C.

Myofibrils suspended in 10 mM NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) were prepared from carp and sardine muscles, which were stored at 2 °C for different length of time (○). Myofibrils prepared from fresh sardine muscle were also stored in the same condition (△).

The WHC (a,b) was measured by the method shown in Fig. 1.5. The dehydrative effect (D value) (c,d) of myofibrils was evaluated under the fixed ionic strength of myofibrils suspensions ($I=0.05$) by the method described in Fig. 1.6 and Table 1.2. The method for Ca-ATPase (e,f) assay was described in Fig. 1.4.

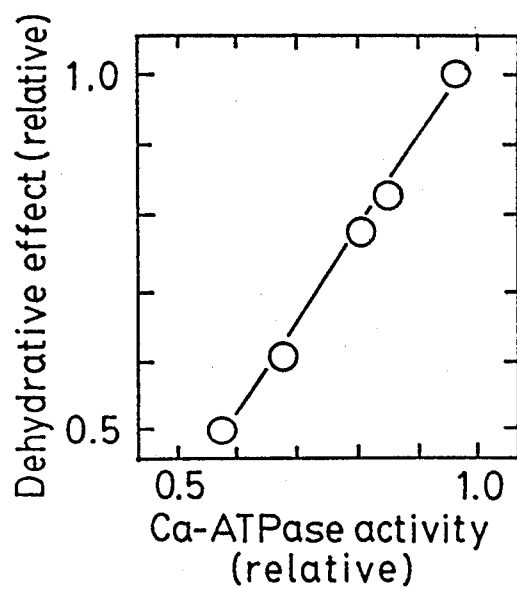


Fig. 1.13. Relation between changes in myofibrillar Ca-ATPase activity and dehydrative effect induced by CaCl_2 during storage of sardine muscle.

Data concerning to the myofibrillar Ca-ATPase activity and the dehydrative effect (D value) were quoted from Figs. 1.12 (d) and (f).

ではほとんど起こらなくなり、その効果が期待できなくなることを示している。

8) サメMfのWHCに及ぼすCaCl₂と尿素の影響

Fig. 1.5に示したように、サメ類のMfのWHCに及ぼすCaCl₂の影響は他の魚類Mfの場合と同様であった。しかし、サメ類の筋肉は0.3M程度の尿素を含有している。¹⁶⁾そこで、尿素の共存下におけるMfのWHCに及ぼすCaCl₂の影響を調べるため、アオザメ (Mako shark) とヨシキリザメ (Blue shark) のMfに対してIで0.05から0.20に相当するNaClまたはCaCl₂を加え、さらに尿素を0~0.5M添加してWHCを測定した。MfのWHCに対する尿素濃度の影響を、共存する塩との関わりにおいてプロットした結果をFig. 1.14に示す。

まず、10mM NaCl (pH 7.0) に懸濁したMfのWHCは、0~0.5Mの尿素濃度では影響を受けず、一定の値を示した。このMfに対し、さらにNaClやCaCl₂を添加すると、そのWHCはFig. 1.5に示したような傾向で変化し、その変化の程度は添加した塩濃度と尿素濃度の両方の影響を受けることを示した。すなわち、いずれの塩の場合も、Iが0.05~0.10に相当する添加によってWHCは減少したが、共存する尿素濃度が増加すると、塩によるWHCの減少が抑制されるようになった。たとえば、アオザメMfのWHCに50mM NaClを添加した場合、尿素が存在しないとそのWHCは15.8まで低下したが、一方、0.3Mおよび0.5M尿素が共存すると、そのWHCはそれぞれ16.2および17.0にとどまった。また、50mM CaCl₂ (I=0.15に相当する) を添加した場合も、尿素濃度の増加に伴ってそのWHCは上昇する傾向を示し、たとえば尿素が存在しない場合のWHCは14.8であったが、0.5M尿素有存在下では17.5と高い値を示した。また、Mfに添加したNaClまたはCaCl₂の濃度が異なっても、MfのWHCは尿素濃度に比例して上昇する傾向は変わらないが、塩濃度が増加するほど上昇の度合いが大きくなる傾向も示された。すなわち、アオザメとヨシキリザメのMfについて求めたD値をTable 1.3に示したが、

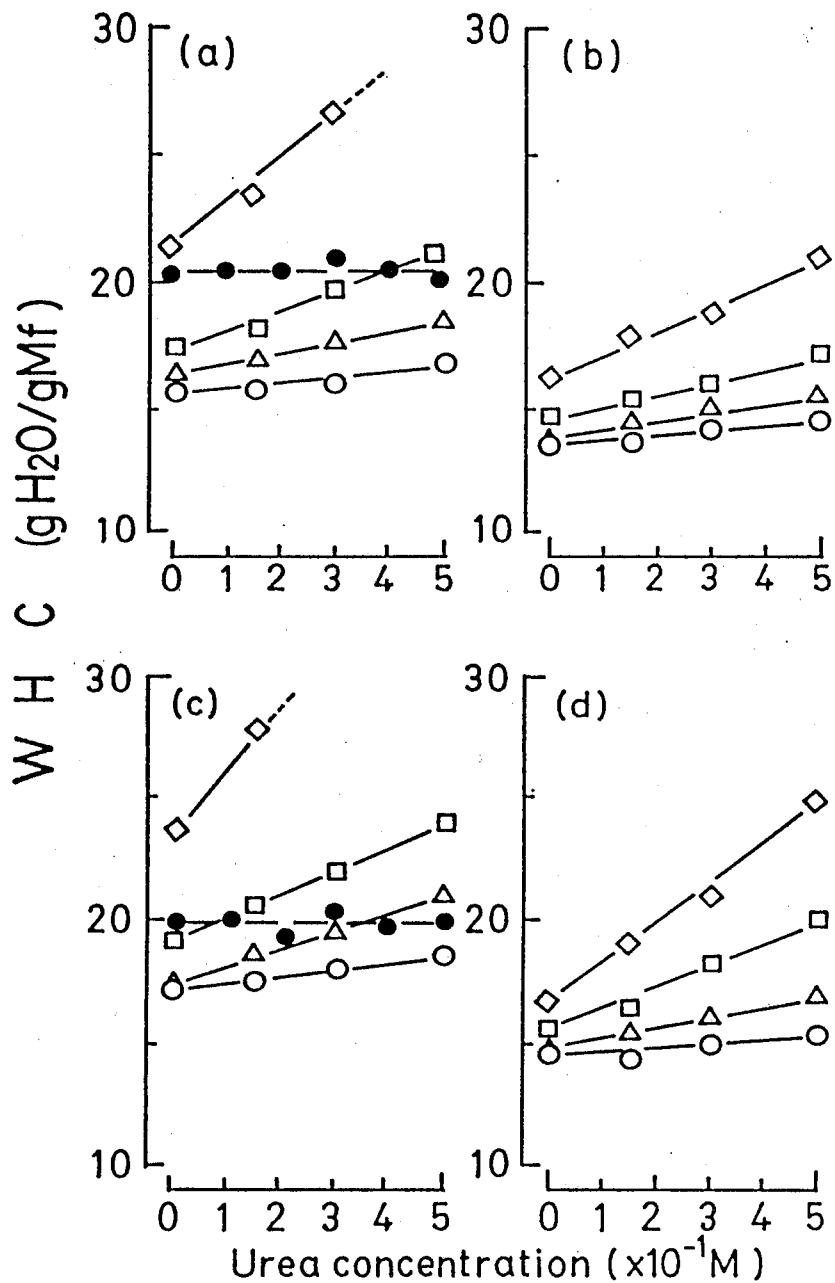


Fig. 1.14. Effect of urea concentration on the WHC of shark myofibrils in the co-presence of various salts.

To Mako shark (a,b) and blue shark (c,d) myofibrils suspended in a medium containing various concentrations of NaCl (a,c) or CaCl_2 (b,d) and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), urea was added to give a final concentration of 0-0.5 M. The WHC was measured as described in Fig. 1.5. The ionic strength of the medium was calculated from the concentration of NaCl or CaCl_2 .

Ionic strength: 0.01 (●), 0.05 (○), 0.1, (△),
0.15 (□), 0.20 (◇).

Table 1.3. The dehydrative effect induced by CaCl_2 of shark myofibrils in the presence of urea under the fixed ionic strength between 0.05 and 0.10.

Fish species	Ionic strength	Urea concentration (M)	
		0	0.3
Mako shark	0.05	0.16	0.13
	0.10	0.13(0.07)	0.10(0.06)
Blue shark	0.05	0.24	0.20
	0.10	0.13(0.07)	0.09(0.05)

The dehydrative effect induced by CaCl_2 was estimated by the method described in Table 1.2. The values with and without parenthesis indicate the dehydrative effects induced by higher and lower concentrations of CaCl_2 than 15 mM, respectively.

これによるとMfに対するCaの脱水効果は、いずれも0.3M尿素の存在下では、尿素が存在しない場合の約70~80%に抑制されることが示されている。

小考察

魚肉落とし身の製造工程では、水晒し処理によって膨潤した魚肉を効果的に所定の水分含量まで脱水することが重要である。魚肉の膨潤度はその主成分であるMfタンパク質の保水能を反映していると考えられるので、本研究では、先ず、塩の添加によるMfの保水能の変化を遠心分離によって定量的に測定する条件を検討し、研究に着手した。

MfのWHCに及ぼすIの影響を定量的に検討した結果によると、Iの上昇（最高I=0.20まで）とMfの保水能の関係は、Iの増加に関わる塩の種類がNaCl、CaCl₂のいずれの場合でも同じ傾向となり、I=0.05~0.10の附近で最も低いWHCを示した。この結果は、従来の魚肉³⁹⁾や肉ホモジェネート⁴⁶⁾を用いた報告とほぼ同様なので、魚肉の膨潤度がMfタンパク質の保水能を反映しているという考えを支持するものである。それゆえ、塩によって魚肉の脱水効果を高める際には、塩の種類を問わずIを指標にして0.05~0.10に調節されるように加えられるべきであり、一様の重量比(%)で加えられるべきではないことになる。また、魚肉懸濁液のIが0.15以上になるのは避けるべきである。しかし、塩の添加によって起こるMfのWHCの変化の大きさは塩の種類によって異なっており、影響の大きい方から順にSrCl₂、CaCl₂、MgCl₂、NaCl=KClとなった。SrCl₂は食品への使用が許可されていないので、これらの結果から判断すると、Mfの保水能を制御する目的で用水にCaCl₂を添加する選択は非常に効果的であるといえる。

CaCl₂によっていったん低下したMfのWHCは、CaCl₂を除去することによって

完全に回復することが確かめられたので、このWHCの低下はMfタンパク質の大きな変性を伴っていないことが確認された。また、 CaCl_2 がMfのWHCに及ぼす影響は数種の魚種間で全く同様であるので、これらの結果はおそらく魚類のMfに共通にあてはまるもののように推定される。それゆえ、本章で示した一連の成果は、魚肉すり身製造時の水晒し及び脱水工程の制御に応用することが可能であると考えられる。なお、塩の添加によるWHCの減少の度合いは、Mfを懸濁する溶媒のIの合計が低い方が大きい傾向を示したが、晒し工程では筋肉中に含まれる塩が溶け出して用水中のIが上昇するので、晒し時の魚肉と用水の割合が異なると CaCl_2 の添加による脱水効果にも差が生じると考えられる。さらに、サメ類の場合には筋肉中の尿素の影響も併せて考慮する必要があることが示唆された。

マイワシの筋肉は、死後そのpHが速やかに低下し、氷蔵してもMfタンパク質が酸変性することが既に知られている。⁴⁷⁾ 本研究においても、低温で貯蔵中のマイワシ筋肉から調製したMfのCa-ATPase比活性は速やかに低下したが、この時MfのWHCも同時に低下していた。このような変化はスケトウダラやコイでは認められないので、貯蔵中のマイワシのMfタンパク質の酸変性が、結果としてWHCの低下を導いたものと考えられた。さらに酸変性したMfでは CaCl_2 がそのWHCを低下させる効果も半減することを認めた。実際に、マイワシのMfのpHを中性に維持して低温で貯蔵すると、Mfタンパク質の変性は抑制され、その時MfのWHCもほとんど変化しないことを確かめた。既に関ら²²⁾は、Mfタンパク質の保水能は加熱による変性に伴って低下することを報告しているが、これは酸変性したMfタンパク質においても同様であり、魚肉の保水能がMfタンパク質の変性と密接に係わっていることが確かめられた。これら一連の事実は、すり身の製造に使用される魚肉原料の鮮度が、落とし身の水晒し工程における脱水の難易度に強く係わっており、それを調節するために利用されるNaClや CaCl_2 の能力

にもある程度の限界があることを示すものである。

第2章 Mfタンパク質の温度安定性に及ぼすCaCl₂の影響

第1章では、すり身の製造時にCaCl₂を含む用水を使用して魚肉の保水能を制御し、晒し肉の脱水を容易にする条件を明らかにした。しかし、実際の使用にあたっては、CaCl₂が魚肉の保水力ばかりでなくMfタンパク質の他の性状に対しても影響を及ぼす可能性があるため、次にこれを検討する必要がある。本章では、特にMfタンパク質の温度安定性に及ぼすCaCl₂の影響を、種々の魚種間で比較しながら検討した。

1) 種々の濃度のCaCl₂存在下におけるMf·Ca-ATPaseの加熱による失活速度

はじめに0.16M KCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したコイとスケトウダラのMfに、終濃度が0~100mMのCaCl₂を添加し、38°C (コイ) または30°C (スケトウダラ) で加熱してMf·Ca-ATPaseの失活を経時的に測定した。結果をFig. 2.1に示す。これによると、いずれの魚類の場合も、CaCl₂を添加したMf·Ca-ATPase活性の失活の反応様式はCaCl₂非存在下の場合と同じくほぼ一次反応にしたがい、CaCl₂濃度の高い場合のほうが失活が速やかに起こることが示された。以上に述べた結果は、本研究で検討した10種類の魚類のMfすべてについて認められた (結果は図示しない)。そこで、本研究においては、Mf·Ca-ATPaseの加熱に伴う失活の一次反応速度定数 (以後K_Dと称する) を求めて、Mfタンパク質の温度安定性の検討を行なった。

2) 低イオン強度下におけるMf·Ca-ATPaseの温度安定性に及ぼすCaCl₂の影響

蒸留水および0.16M KCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したコイMfに終濃度が10~50mMのCaCl₂を添加後、38°Cで加熱してMf·Ca-ATPase活性のK_Dを測定した。結果をFig. 2.2に示す。図中には、添加したCaCl₂濃度と同じIを

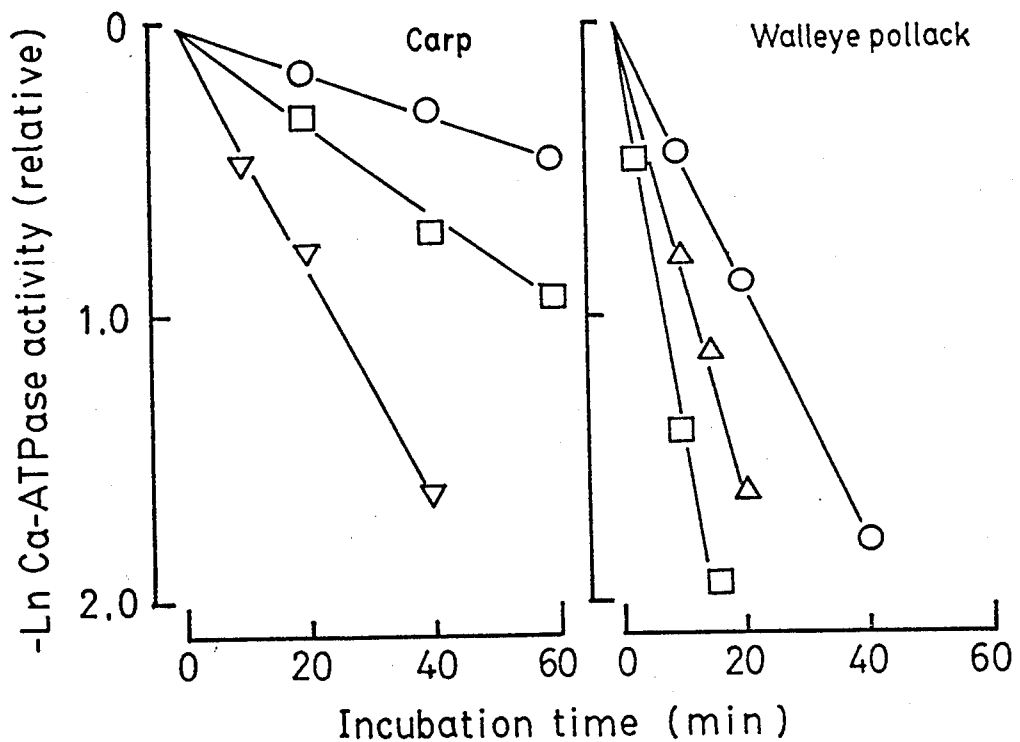


Fig. 2.1. Decrease in the myofibrillar Ca-ATPase activity of carp and walleye pollack during heat treatment in the presence of CaCl₂.

Myofibrils were suspended in 0.16 M KCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) in the presence of various concentrations of CaCl₂. Heat treatment of myofibrils was conducted at the protein concentrations of 2-4 mg/ml and at 38 °C for carp or at 30 °C for walleye pollack, and stopped by cooling in ice-water. The loss of Ca-ATPase activity during heat treatment was measured. The ATPase assay of myofibrils was carried out at 25 °C in a reaction medium containing 0.1M KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP and 25 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 0.2-0.3 mg/ml of myofibrillar protein.

CaCl₂: 0 mM (○), 20 mM (△), 50 mM (□),
100 mM (▽).

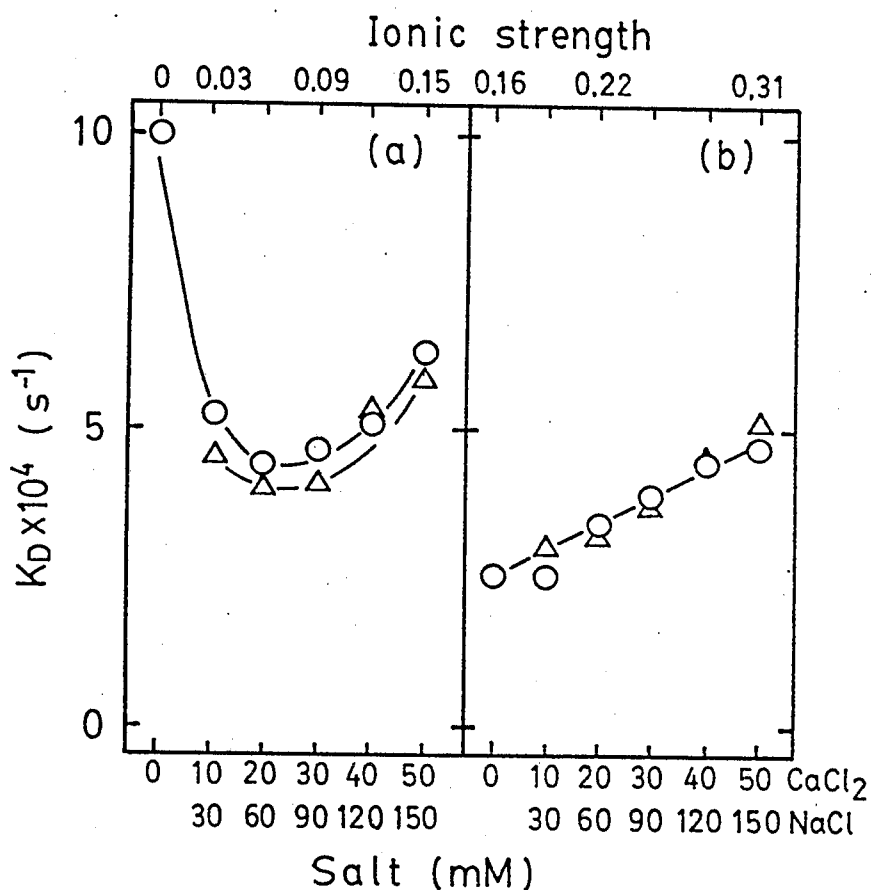


Fig. 2.2. Effect of CaCl_2 and NaCl concentrations on the rate constants for thermal inactivation of carp myofibrillar Ca-ATPase under low ionic strength.

Myofibrils were suspended in distilled water (a) or 0.16 M KCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) (b). CaCl_2 (\bigcirc) or NaCl (\triangle) was further added to the suspension at the indicated concentrations on the abscissa. Then the suspension was heated at 38 °C. Other experimental conditions and the method for ATPase assay were the same as in Fig. 2.1. The first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was calculated using the relation, $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t)/t$, where C_0 and C_t are the ATPase activities of myofibrils before and t seconds of heat treatment.

付与するNaCl (30~150mM) をMfに添加した際の K_D も併記した。この結果によると、まず、蒸留水に懸濁したMfに CaCl_2 を加えた場合 (Fig. 2.2(a)) , その濃度が20mM程度までは K_D はやや減少する傾向を示したが、20mM以上の濃度では増加する傾向を示した。一方、0.16M KCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したMfに CaCl_2 を加えた場合 (Fig. 2.2(b)) では、 CaCl_2 濃度の増加に伴って K_D はわずかに増加する傾向のみを示した。また、いずれの溶媒に懸濁したMfの場合も、添加した塩のIが同じであればその種類が CaCl_2 とNaClの区別を問わず、その K_D はほとんど同値であった。なお、Fig. 2.2(a)とFig. 2.2(b)において同じ濃度の塩を添加した場合の K_D を比較すると、常に前者のほうが高い値を示した。この原因は、前者の溶媒中に緩衝液を含んでいないためMf懸濁液のpHが CaCl_2 の添加によって微酸性になり、Mfタンパク質が不安定化したためと推定される。⁴⁸⁾ すなわち、この場合は、NaClを含む溶媒のpHは6.3~6.4に、また CaCl_2 を含む溶媒のpHは5.9~6.0となっていた。さらに、Fig. 2.2の場合と同様、0.16M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したカツオとティラピアのMfに種々の濃度の CaCl_2 とNaClを添加し、38°Cで加熱してそれらの K_D の変化を調べた。結果をFig. 2.3に示す。これによると、Fig. 2.2(b)の場合と同様に、 CaCl_2 とNaClのいずれを添加した場合も、系のIの上昇に伴ってMfの K_D は若干増加する傾向を示したが、コイの場合と同様、二種の塩による K_D の増加度の差はわずかであった。

Fig. 2.2とFig. 2.3に示した結果は、低イオン強度下においては、50mM程度の CaCl_2 の添加が、コイ、カツオおよびティラピアのMfタンパク質の温度安定性にあまり大きな影響を及ぼさないことを示している。しかし、わずかな変化が起こることは事実であるので、その変化がIの増加に起因しているかどうかを次に検討した。すなわち、0.16M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したコイとティラピアのMfに対して種々の濃度の CaCl_2 を添加し、さらに所

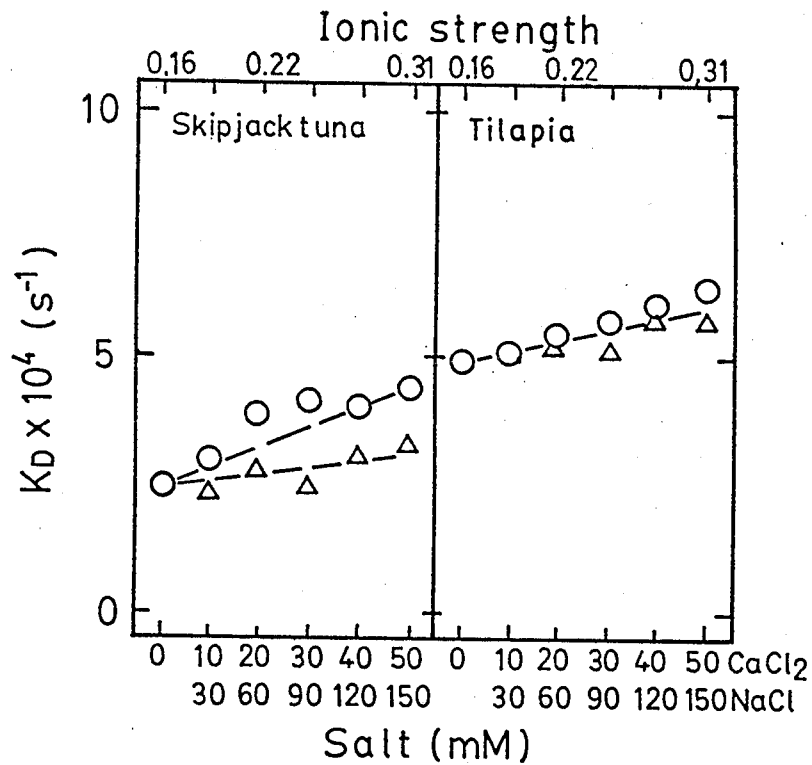


Fig. 2.3. Effect of CaCl_2 and NaCl concentrations on the rate constants for thermal inactivation of myofibrillar Ca-ATPase of skipjack tuna and tilapia under low ionic strength.

Myofibrils were suspended in 0.16 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). Heat treatment was conducted at 38 °C in a medium containing various concentrations of CaCl_2 (○) or NaCl (△), and the first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was calculated as described in Fig. 2.2. The ATPase assay was carried out as described in Fig. 1.4.

定量のNaClを加えて溶媒のIを一定に調整した条件下で K_D を測定し、その変化を検討した。すなわち、Mfに5, 10および15mMの $CaCl_2$ を添加した後、さらにNaClを加えて溶媒のIの総和が0.21または0.26になるように調整した。これらのMfの38°CにおけるCa-ATPase活性の失活を測定し、その K_D を求めた結果をFig. 2.4に示す。これによると、同じI下におけるMf·Ca-ATPaseの K_D は、添加した塩の組成に関わりなく一定値を示すことが確かめられた。したがって、Fig. 2.2とFig. 2.3において観察された K_D の変化は、Mfを懸濁した溶媒のIの上昇が原因であると考えられた。

次に、スケトウダラのMf·Ca-ATPaseの温度安定性に $CaCl_2$ が及ぼす影響を調べた。すなわち、0.16M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したMfに対して、10~50mM $CaCl_2$ または30~150mM NaClを添加した後、30°CにおけるCa-ATPaseの失活を経時的に測定して K_D を求めた。なお、10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したMfについても同様の検討を行なった。これらの結果をまとめてFig. 2.5に示す。これによると、いずれの溶媒に懸濁したMfにおいても、 $CaCl_2$ およびNaClの添加量の増加に伴って K_D は比例的に増大する傾向を示したが、 $CaCl_2$ がMfの K_D に及ぼす影響は、溶媒に対して同じIを付与する量のNaClが及ぼす影響よりも極めて大きかった。すなわち、Fig. 2.5(a)およびFig. 2.5(b)における両塩の濃度（または付与したI）と K_D の直線関係の勾配を比較すると、 $CaCl_2$ の場合のほうがNaClのそれよりも約3~5倍大きいことが示されている。以上の結果は、Figs. 2.2および2.3に示された他の魚種のMfの場合と明らかに異なっていた。すなわち、スケトウダラのMfの場合は、 $CaCl_2$ の添加による K_D の増加が単なるIの増加にのみ起因するのではなく、Mfタンパク質の熱変性を促進するなんらかの他の反応が起こった結果であると推定される（第3章で詳述する）。また、Figs. 2.2, 2.3および2.5の結果を併せて考えると、魚類のMf·Ca-ATPase温度安定性が $CaCl_2$ によって受ける影響は

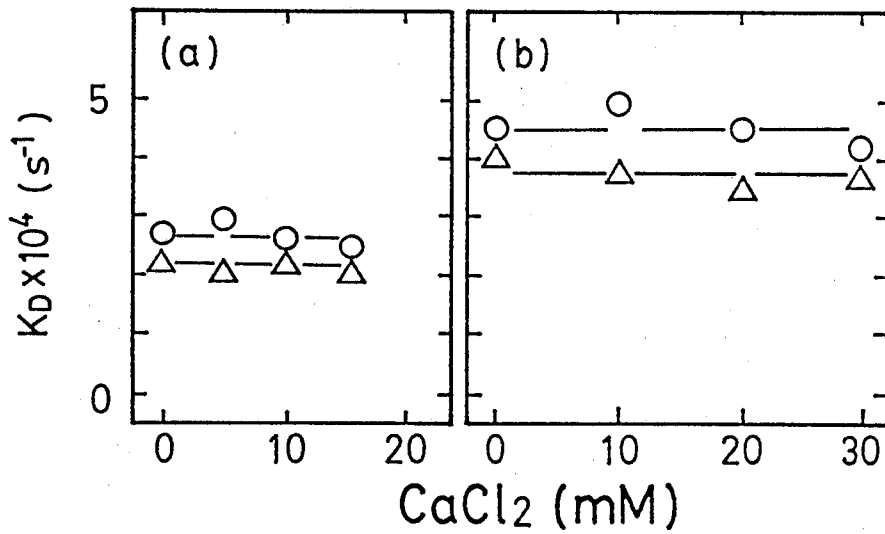


Fig. 2.4. Effect of CaCl_2 concentration on the thermal stability of myofibrils of carp and tilapia under the fixed ionic strength.

Carp (○) and tilapia (Δ) myofibrils were suspended in 0.16 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) with various concentrations of CaCl_2 , and the ionic strengths of the myofibrils suspensions were fixed to 0.21 (a) or 0.26 (b) by mixing the calculated amount of NaCl.

Procedure for the heat treatment of myofibrils and the measurement of Ca-ATPase activity were the same as in Figs. 1.4 and 2.2.

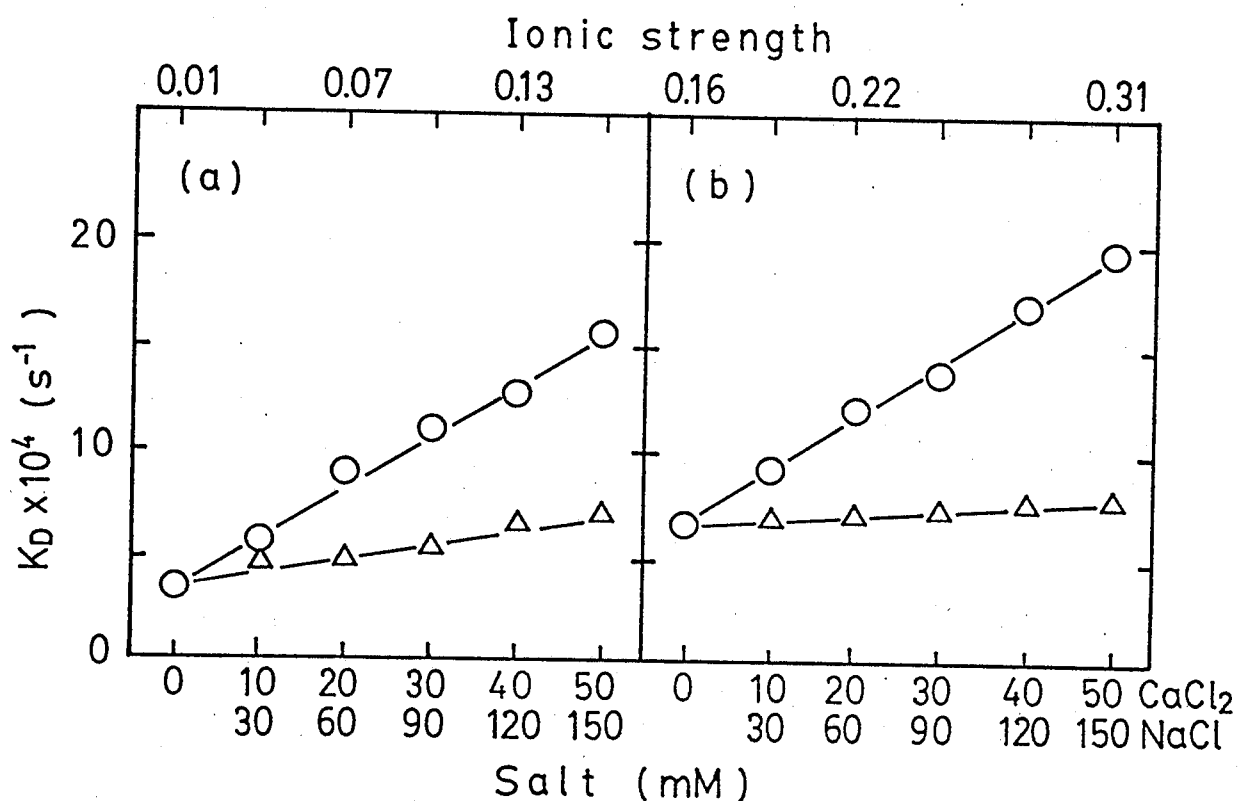


Fig. 2.5. Effect of CaCl_2 and NaCl concentrations on the rate constants for thermal inactivation of myofibrillar Ca-ATPase of walleye pollack under low ionic strength.

Myofibrils were suspended in 10 mM (a) or 0.16 M (b) NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). Heat treatment of that was conducted at 30 °C in a medium containing various concentrations of CaCl_2 (\bigcirc) or NaCl (\triangle). The first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was calculated as described in Fig. 2.2.

魚種によって異なり、不安定化される度合いが特に相違することが明らかになった。

3) 高イオン強度下におけるMf·Ca-ATPaseの温度安定性に及ぼすCaCl₂の影響

0.5M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に溶解したカツオ, コイおよびスケトウダラのMBに対し, 終濃度が10~50mMのCaCl₂, または同じIを付与する濃度のNaClを添加した後, 直ちに加熱してCa-ATPaseの失活を測定した。なお, カツオとコイのMBは38°Cで, またスケトウダラMBは30°Cで加熱した。結果をFig. 2.6に示すが, これによると, いずれの魚種のMBの場合も, CaCl₂の添加がMfタンパク質の温度安定性に及ぼす影響はNaClを添加する場合とは極めて異なっており, CaCl₂のほうがMBの温度安定性を著しく大きく低下させることが示された。すなわち, 3種のMBにおけるCaCl₂によるK_Dの増加の度合いを比べると, まず, カツオとコイのMBの場合には, 38°CにおけるK_Dはそれぞれ $3.8 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ および $7.0 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ であるが, これに30mM CaCl₂を添加するとそれらのK_Dはそれぞれ $7.2 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ および $13.0 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ に増加し, CaCl₂添加前の1.9倍に達した。また, 50mM CaCl₂の添加により両魚種のMBのK_Dはそれぞれ $16.2 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ および $29.8 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ となり, いずれもCaCl₂添加前の値の4.3倍に達した。一方, スケトウダラの30°CにおけるK_Dは, 30mMと50mMのCaCl₂の添加でそれぞれ3.1倍および5.4倍に達し, 他の魚種の場合より大きかった。以上のMBについて得た結果と先に述べたMf (低イオン強度下) の場合 (Fig. 2.2, Fig. 2.3およびFig. 2.5) を比較すると, CaCl₂がMB·Ca-ATPaseの温度安定性に及ぼす影響はMfの場合よりも極めて大きいことが明らかである。

4) 魚類Mf·Ca-ATPaseの温度安定性がCaCl₂によって受ける影響の比較

これまで述べた結果を総括し, CaCl₂がMfタンパク質の温度安定性に及ぼ

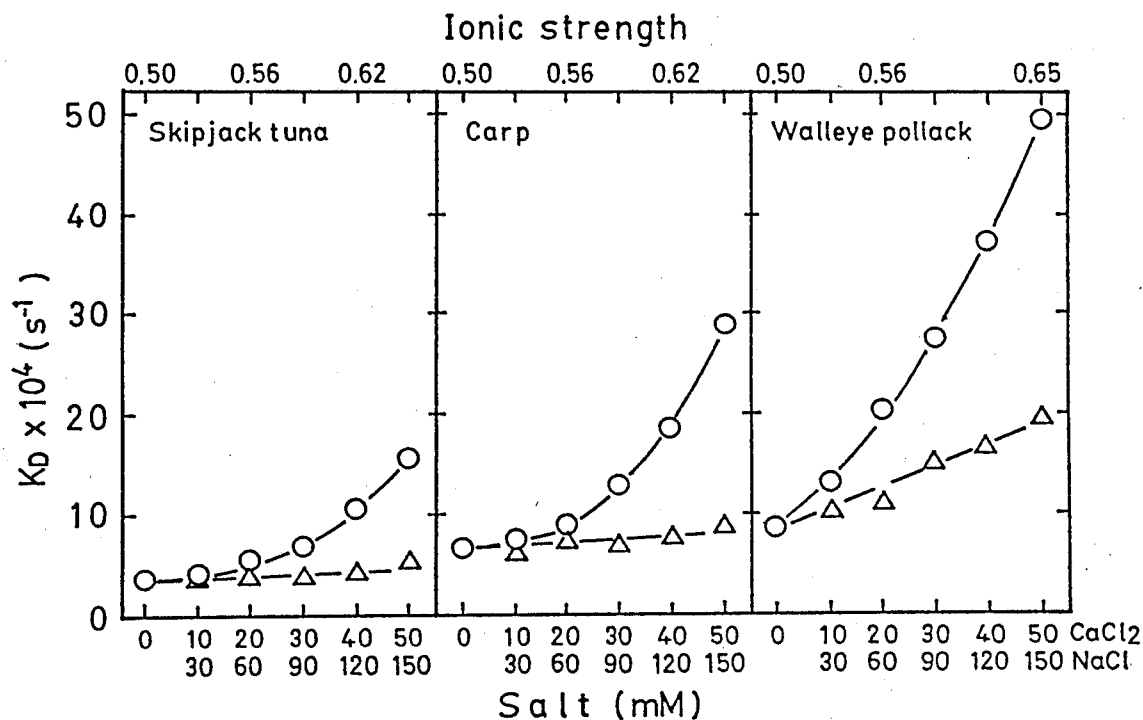


Fig. 2.6. Effect of CaCl_2 and NaCl concentrations on the rate constant for thermal inactivation of myofibrillar Ca-ATPase under high ionic strength.

Myosin B of skipjack tuna, carp and walleye pollack was dissolved in 0.5 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). After mixing with varied concentrations of CaCl_2 (O) or NaCl (Δ), myosin B was incubated at 38 °C (skipjack tuna, carp) or at 30 °C (walleye pollack). The loss of Ca-ATPase activity of myosin B was measured as a function of heating time, and the first order rate constant (K_D) for inactivation of that was calculated by the method described in Fig. 2.2.

す影響の大きさを、魚種間で比較した。すなわち、0.16M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁した10種類のMfに対して、50mM CaCl₂および150mM NaClを添加した後、30℃または38℃で加熱した際のMf·Ca-ATPaseのK_Dを算出した。そして、塩を添加する前の各魚種のMfのK_D値に対してCaCl₂とNaClを添加した後のK_D (以後、それぞれK_D(+Ca)およびK_D(+Na)と略記する) をプロットした。結果をFig. 2.7に示す。まず、38℃における検討結果によると、カツオ、コイ、ティラピアのMfにおいては、いずれの塩を添加した後もK_Dには差が認められなかったが、シログチ、マエソ、コノシロのMfの場合は、K_D(+Ca)がK_D(+Na)よりも明らかに高くなり、タチウオとマイワシでは両者の差がさらに大きくなる事実が認められた。また、30℃における検討結果によると、カツオ、コイ、ティラピアに加えシログチでも、K_D(+Ca)とK_D(+Na)の差があまり認められなかったが、マイワシでは両値の間に差が認められ、K_D(+Ca)のほうが大きな値となった。さらにスケトウダラとマダラでは両値の差がより大きくなることが示されている。なお、図中のより左側にプロットされる魚種のMfタンパク質ほど、その温度安定性が高いことを示している⁴⁹⁾ので、温度安定性の低い魚種のMfタンパク質ほどCaCl₂の影響を強く受けて不安定化されることが明らかである。

次に、0.5M NaCl (pH 7.0) に溶解した5種類のMBを用いて同様に検討を行った結果をFig. 2.8に示す。それによると、より温度安定性の低い魚種のMBほどCaCl₂によって不安定化する傾向はMfの場合と同様であったが、Fig. 2.7とFig. 2.8において同じ魚種のMBとMfを比較すると、前者のほうがCaCl₂の影響を強く受けて不安定化することが明らかであった。

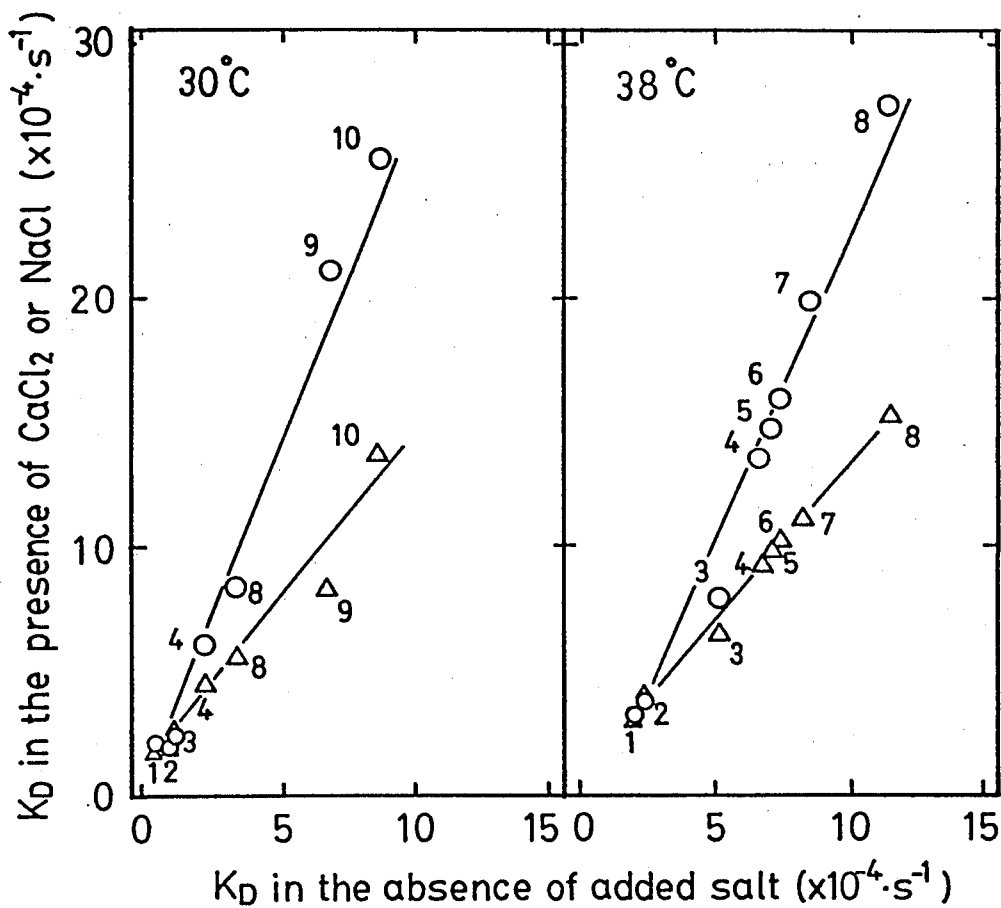


Fig. 2.7. Thermal stability of myofibrillar protein of various fish species in the absence and presence of CaCl_2 or NaCl under low ionic strength.

Myofibrils from ten fish species were suspended in 0.16 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). Heat treatment of myofibrils in the presence and absence of 50 mM CaCl_2 (○) or 150 mM NaCl (△) was conducted at 30 °C or at 38 °C.

The data were plotted with the first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase in the presence of CaCl_2 or NaCl as ordinate, and K_D in the absence of the salts as abscissa.

- 1:Skipjack tuna, 2:Carp, 3:Tilapia,
 4:White croaker, 5:Lizard fish, 6:Gizzard shad,
 7:Hairtail, 8:Sardine, 9:Walleye pollack,
 10:Pacific cod.

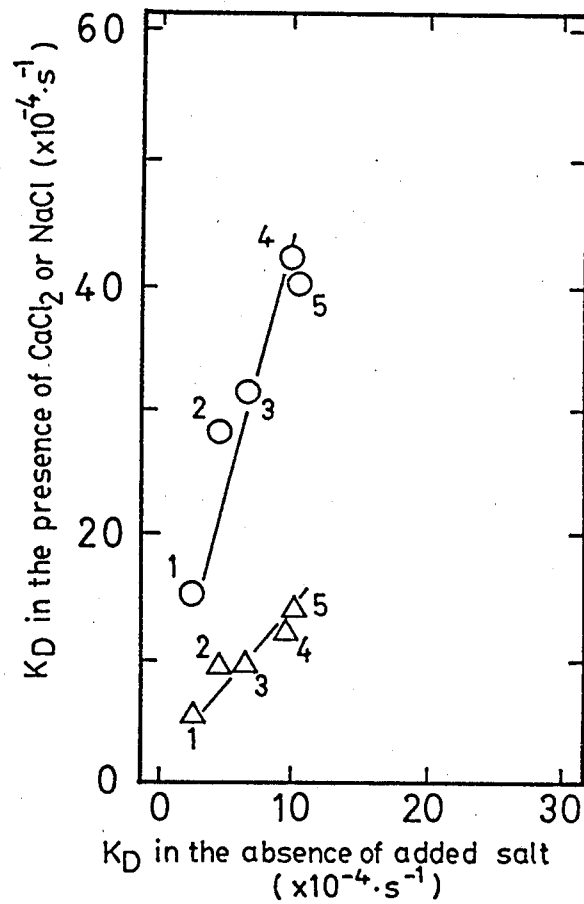


Fig. 2.8. Thermal stability of myofibrillar protein of various fish species in the absence and presence of $CaCl_2$ or $NaCl$ under high ionic strength.

Myosin B from five fish species were dissolved in 0.5 M $NaCl$ containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). Heat treatment of myosin B in the presence and absence of 50 mM $CaCl_2$ (○) or 150 mM $NaCl$ (△) was conducted at 38 °C.

The data were plotted with the first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase in the presence of $CaCl_2$ or $NaCl$ as ordinate, and K_D in the absence of the salts as abscissa.

1:Skipjack tuna, 2:Carp, 3:Tilapia,
4:Lizard fish, 5:Gizzard shad.

小考察

一般に魚肉すり身の品質は、そのゲル形成能の優劣を評価することで判定される⁵⁰⁾が、ゲル形成能はMfタンパク質の変性に伴って低下することが知られている。^{51)、52)}したがって、高品質のすり身を製造するためには、その製造工程中におけるMfタンパク質の変性をできるだけ抑制することが重要である。本章では、すり身の製造時の水晒しおよび脱水工程の制御に利用される0~50 mMのCaCl₂がMfタンパク質の温度安定性に及ぼす影響を、Ca-ATPaseの変性速度の変化を指標として検討した。

まず、低イオン強度下におけるMfのタンパク質の温度安定性に対するCaCl₂の影響を調べたところ、CaCl₂がMfタンパク質を不安定化させる度合いは魚種によって異なり、温度安定性の劣るMfほどCaCl₂によって不安定化することが明らかになった。たとえば、スケトウダラやマダラのMfの場合には、CaCl₂によって温度安定性の低下が顕著に起こったのに対し、カツオやコイのMfでは温度安定性の低下はほとんど認められなかった。これらの事実は、魚種によってはCa晒し法を採用したすり身の製造過程でそのMfタンパク質が不安定化する可能性があること、また、同法を採用して製造した冷凍すり身は、その貯蔵（特に凍結貯蔵をも含む）に際して不安定であり、長期の保管を行なう時にはなんらかの配慮（たとえば、添加する糖濃度の増加を図る）が必要であることを示唆するものである。CaCl₂が冷凍すり身の製造過程におけるMf・Ca-ATPaseの変化に及ぼす影響と、冷凍すり身の凍結貯蔵性に及ぼす影響については、第5章で述べる。また、スケトウダラMfのような温度安定性の劣るMfのCa-ATPaseが低イオン強度下で不安定な状態にあり、CaCl₂の影響を受けやすくなっている原因については第3章で検討するが、いずれにせよCaCl₂を含む用水の使用にあたっては、魚種による特徴を十分に理解することが必要である。

本章の実験によると、CaCl₂の添加によって起こるMfタンパク質の温度安定

性の低下は、Mfの保水能の減少が起こる低イオン強度下では比較的わずかであるが、Mfが溶解するような高いイオン強度下では著しく大きくなったが、この場合も、CaCl₂がMfタンパク質 (MB) に及ぼす不安定化の度合いは魚種によって異なり、低イオン強度下における場合と同様、温度安定性の劣るMBほど同塩によってさらに大きく不安定化することが示された。高イオン強度下の魚類Ca-ATPaseは、低イオン強度下のそれに比べれば著しく不安定なので、18)、53) この条件下における変性速度の増加は無視できないほどの大きさである。近年、魚類におけるMfタンパク質の温度安定性の違いは、その肉糊のゲル化反応の起こりやすさと密接に関係しており、温度安定性の高い魚種ほど反応が起こりにくく、低い魚種ほどそれが起こりやすい事実が報じられている。54)、55)、56) それゆえ、すり身の製造に用いる魚の種類によっては、水晒しに際して用いたCaCl₂は、その肉糊、すなわちアクトミオシンゾルのゲル化反応に対してもなんらかの影響を及ぼす可能性がある。この肉糊のゲル化に及ぼすCaCl₂の影響に関しては第4章で詳述する。

第3章 CaCl_2 によるMfタンパク質の温度安定性の変化の機構

前章では、 CaCl_2 が魚類MfのCa-ATPaseの温度安定性に及ぼす影響の大きさが魚種によって異なり、また共存するNaCl濃度によっても変化する事実を示した。本章では、Ca-ATPaseの温度安定性が本来異なるカツオとスケトウダラのMfおよびMBを例にとり、Mfタンパク質の温度安定性が CaCl_2 によって低下する機構を明らかにするための検討を行なった。

1) CaCl_2 によって起こるスケトウダラMf・Ca-ATPaseの温度安定性の低下と

アクチンによる回復

前章において、 CaCl_2 を添加したスケトウダラMfのCa-ATPaseの30℃における加熱変性速度は、系のIの高低 ($I=0.01\sim 0.50$)に関わりなく低下する事実を示した。しかし、10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0)に懸濁したスケトウダラのMfに50mM CaCl_2 を添加し、0℃に48時間保持して経時的にMf・Ca-ATPase活性を測定したところ、その比活性はほとんど変化しなかった(結果は図示しない)。それゆえ、0℃では低イオン強度下でのMfタンパク質に対する CaCl_2 の作用はCa-ATPase活性部位の変性を伴わない反応である。そこでMf・Ca-ATPaseの加熱変性速度が CaCl_2 によって低下する原因を調べる目的で以下の実験を行なった。すなわち、10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0)に懸濁したMfに、終濃度で30mMの CaCl_2 を添加し、直ちに同溶媒に透析して CaCl_2 を除去した後(この一連の操作を以後、 CaCl_2 処理と称する)、透析前後におけるMf・Ca-ATPaseの30℃における熱変性の経時変化を検討した。また、透析処理後のMfに対し、そのミオシン含量(60%とみなした⁵⁷⁾)にほぼ等しい量のコイのF-アクチンを添加した後、同様に30℃における熱変性の経時変化を測定した。結果をFig. 3.1に示すが、これによると、いずれのMfの場合も、そのCa-ATPase

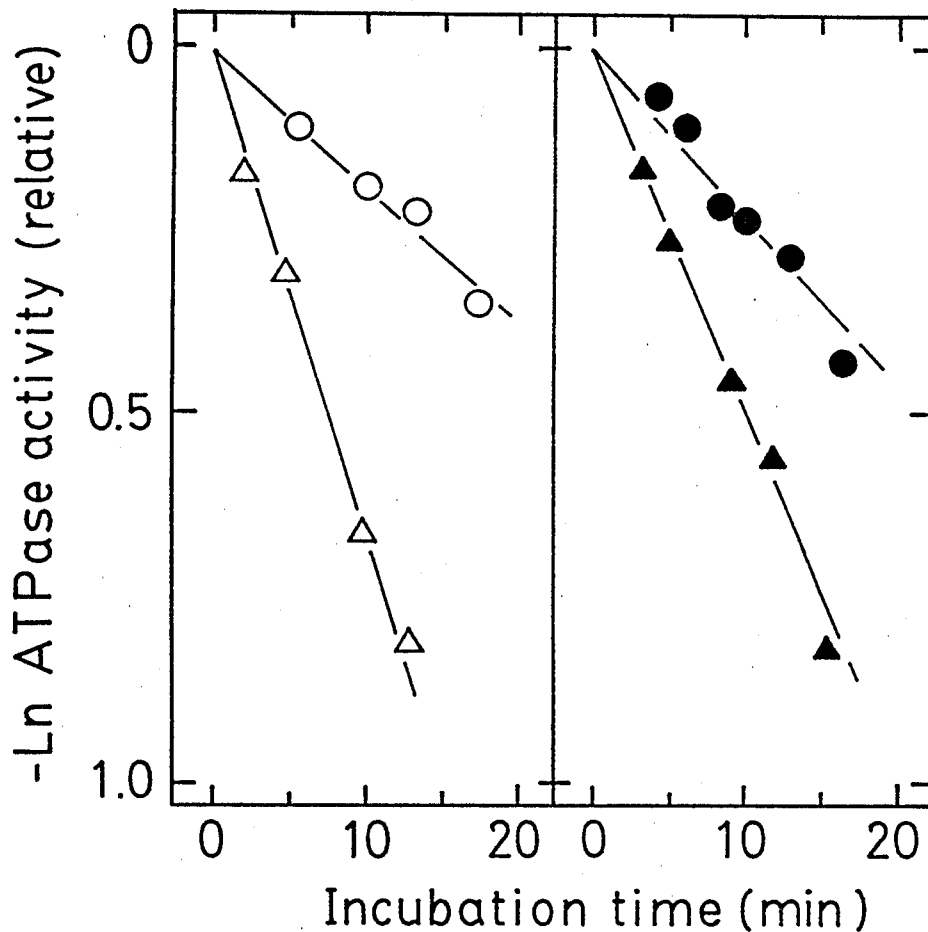


Fig. 3.1. Change in thermal inactivation rate of myofibrillar Ca-ATPase activity of walleye pollack by treatment with CaCl_2 and by addition of F-actin.

To the myofibrils suspension (○) in a medium containing 10 mM NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), 30 mM CaCl_2 was added (△). After removal of CaCl_2 (▲) by dialysis against the same medium, carp F-actin was added in an equal amount of myosin content in myofibrils (●). Thermal inactivation of their Ca-ATPase at 30 °C was measured as described in Fig. 2.1. Ca-ATPase assay was carried out as shown in Fig. 1.4.

の変性は単純な一次反応にしかついでいた。まず、CaCl₂処理の前と後におけるMfのK_Dは、それぞれ2.9×10⁻⁴・s⁻¹および11.0×10⁻⁴・s⁻¹となり、CaCl₂の存在下でMfタンパク質は著しく不安定化した。また、透析によってCaCl₂を除去しても、その温度安定性は低下したままであった。ただし、このようなMfに対してF-アクチンを添加した後にK_Dを求めると、その値は3.8×10⁻⁴・s⁻¹となり、CaCl₂処理を行なう前のMfタンパク質の温度安定性をほぼ回復することが確かめられた。

2) CaCl₂によって起こるカツオのMB・Ca-ATPaseの温度安定性の変化と

アクチンによる回復

まず、0.5M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に溶解したカツオMB (タンパク質濃度 3.5mg/ml) に50mMのCaCl₂を加えて0℃で20時間及び60時間処理した後、同溶媒に透析してCaCl₂を除去した。この間におけるMB・Ca-ATPase比活性を測定したところ、その失活は認められなかった。そこで、CaCl₂処理後のMBを38℃で加熱し、Ca-ATPaseの失活を経時的に測定した。結果をFig. 3.2に示す。なお、対照としてCaCl₂処理前のMBの加熱変性も図示した。これによるとCaCl₂処理したMBのCa-ATPaseの熱失活の反応様式は、初期に速く後期に遅い速度の二段階の一次反応にしかついで、また処理時間の長い方が初期の変性段階がより大きく起こる事実を示した。すなわち、CaCl₂処理を低温下でおこなっても、カツオMBの温度安定性が低下することが明らかである。ただし、CaCl₂処理前のMBのCa-ATPaseの失活は遅い速度の一次反応となり、そのK_Dは2.6×10⁻⁴・s⁻¹であったが、処理後直ちに透析によってCaCl₂を除去したMBのそれは2.9×10⁻⁴・s⁻¹であった。それゆえ、CaCl₂に起因しない処理時間中の変化は極めてわずかであるように推定される。

Fig. 3.2の結果のように、MB・Ca-ATPaseの加熱変性の様式が二段階となる場

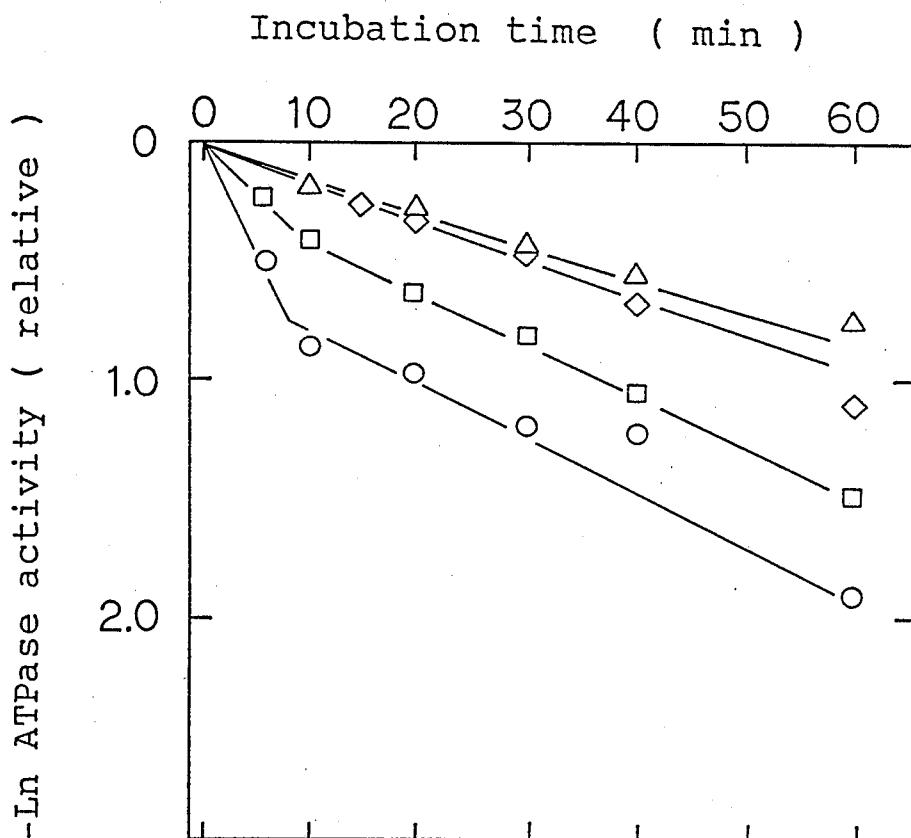


Fig. 3.2. Change in thermal inactivation mode of Ca-ATPase activity of skipjack tuna myosin B induced by treatment with CaCl₂.

To skipjack tuna myosin B dissolved in a medium containing 0.5M NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), CaCl₂ was added to give a final concentration of 50 mM. After CaCl₂-treatment at 0 °C for 0 (◇), 20 (□) or 60 (○) h, the myosin B was dialyzed to exclude CaCl₂ against the same medium. After removal of CaCl₂, myosin B (3.5mg/ml) was incubated at 38 °C, and inactivation mode of Ca-ATPase of myosin B was examined by the same manner as in Fig. 3.1. As a control, the inactivation mode of the same Ca-ATPase without addition of CaCl₂ (Δ) was also examined.

合は、MB中のアクチンに選択的な変性が起こっている可能性が推察される。⁵⁸⁾、⁵⁹⁾ そこで、CaCl₂処理を60時間行なったカツオMBを0.5M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に透析処理してCaCl₂を除去した後、このMBに対して、MB中の含有量に相当する⁵⁷⁾コイのF-アクチン (Mfタンパク質の20%) を添加した後、38°Cで加熱してCa-ATPaseの失活を測定した。結果をFig. 3.3に示す。この結果によると、CaCl₂処理によって変化したカツオMB・Ca-ATPaseの熱変性の様式は、F-アクチンの添加によって遅い速度の単純な一次反応にしたがうようになり、その温度安定性がほぼ回復することが確かめられた。

3) CaCl₂処理によって起こるスケトウダラのMB・Ca-ATPase比活性の低下

Fig. 3.1に示したように、CaCl₂によって起こったスケトウダラのMf・Ca-ATPaseの温度安定性の変化は、F-アクチンの添加によって回復することが確かめられた。そこで次に、スケトウダラのMBについても同様の検討を行なった。すなわち、0°Cにおいて0.5M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に溶解したスケトウダラMBを、50mM CaCl₂で処理し、その一部を経時的に透析処理してCaCl₂を除去した後、そのCa-ATPaseを測定した。結果をFig. 3.4に示す。なお、対照として、CaCl₂の代りにこれと同じIを付与する150mM NaClをMBに添加し同様の検討を行なった。Fig. 3.4によると、CaCl₂処理したMBのCa-ATPase比活性は経時的に低下し、9時間後に55%、24時間後には17%となった。一方、対照の150mM NaClを添加したMBのCa-ATPase比活性はその間全く変化しなかった。同じ条件下で処理中のカツオのMB・Ca-ATPaseは全く失活しないことは先に述べたが、これはスケトウダラとの大きな相違である。この条件下におけるスケトウダラMB・Ca-ATPaseの失活は一次反応にしたがい (結果は図示しない)、そのK_Dは $2.0 \times 10^{-5} \cdot s^{-1}$ であった。この値は既報⁶⁰⁾のスケトウダラのMB・Ca-ATPaseの0°Cにおける熱変性速度 (アレニウスプロットより算出) よりも極め

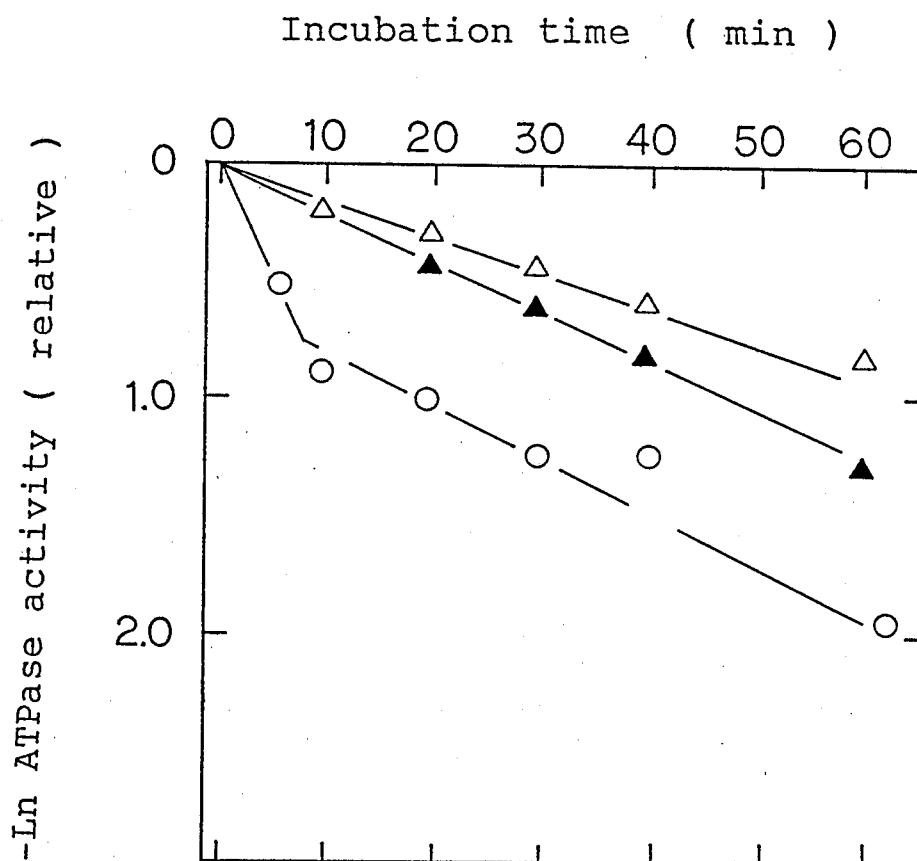


Fig. 3.3. Effect of the addition of F-actin on thermal inactivation mode of Ca-ATPase activity of CaCl_2 -treated skipjack tuna myosin B.

To skipjack tuna myosin B dissolved in 0.5 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), 50 mM CaCl_2 was added. After treatment for 60 h at 0 °C (○), the myosin B was dialyzed against the medium without CaCl_2 . To the dialyzate, carp F-actin was added in an equal amount of actin content within myosin B (▲). As a control, myosin B without addition of CaCl_2 was dialyzed as the same manner as above (△). Thermal inactivation of Ca-ATPase activity of myosin B at 38 °C was examined as in Fig. 3.1.

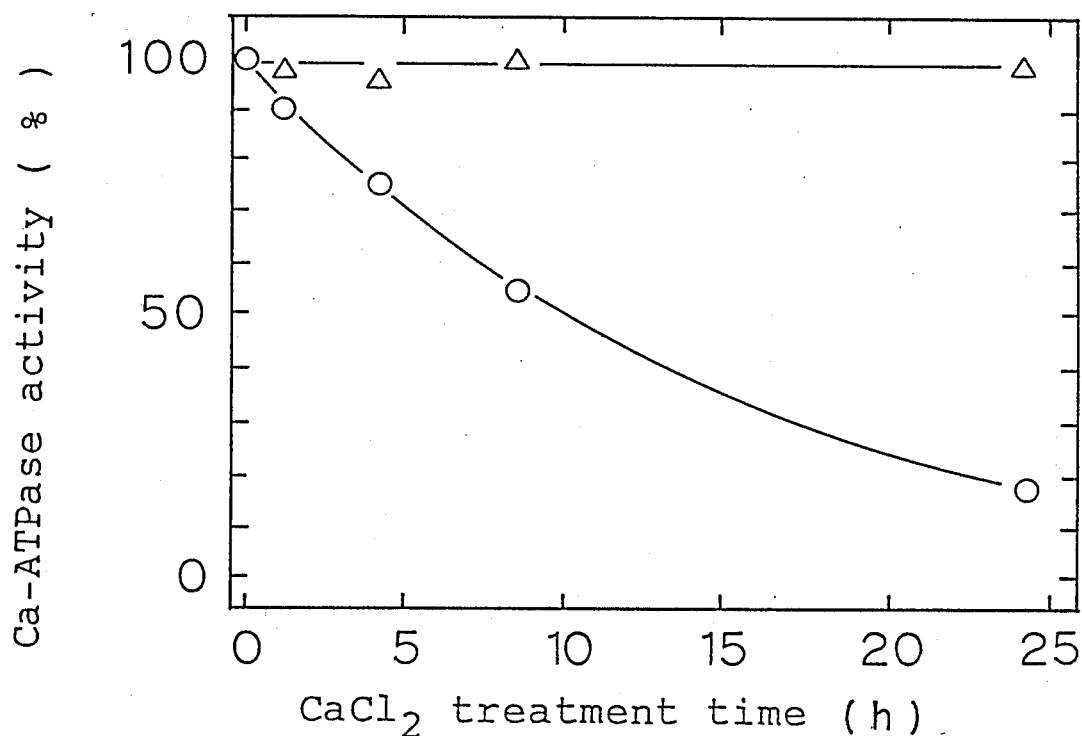


Fig. 3.4. Change in Ca-ATPase activity of walleye pollack myosin B induced by treatment with CaCl₂.

To walleye pollack myosin B dissolved in 0.5 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), CaCl₂ was added to make a final concentration of 50 mM. During treatment with CaCl₂ at 0 °C, a portion of the myosin B was taken out and dialyzed against the same medium to exclude CaCl₂. Ca-ATPase of the dialyzates (○) was measured as a function of time at 0 °C. As a control (Δ), 150 mM NaCl was added to myosin B in place of 50 mM CaCl₂, and their Ca-ATPase was measured in the same condition. Ca-ATPase assay was carried out as shown in Fig. 1.4.

て大きな値である。したがって、 CaCl_2 処理によってMBになんらかの大きな構造変化が起こっている可能性が示唆される。

そこで、 CaCl_2 処理を0～24時間行なったスケトウダラMBの一部を経時的に分取し、Fig. 3.4と同様に透析によって CaCl_2 を除去した後 30°C で加熱して経時的なCa-ATPase比活性の変化を測定した。結果をFig. 3.5に示す。既に述べたように、スケトウダラMBのCa-ATPase比活性は CaCl_2 添加後に減少する傾向を示すが、それとは無関係に、加熱による失活は単純な一次反応にしたがっていた。また、その K_D は CaCl_2 添加後経時的にやや増加するが、その値は $8.0 \sim 12.4 \times 10^{-4} \cdot \text{s}^{-1}$ の範囲となり、Fig. 2.6に示したスケトウダラMBの K_D にほぼ一致した。一方、 CaCl_2 の代わりに150mM NaClを添加した対照のMBの場合はCa-ATPaseの比活性に変化はなく、また、その K_D は CaCl_2 を添加した場合とほぼ等しい値を示した。これらの結果は、高濃度のNaCl (0.5～0.65M) 共存下でスケトウダラのMfタンパク質の温度安定性に起こる変化と、 CaCl_2 を添加した時に起こる変化とが、同じか、または良く似ているように見えるが、前者ではCa-ATPase比活性の低下が起こらず、後者では起こる点で、本質的に異なっていることを示している。そして、スケトウダラのMBの場合は、 CaCl_2 によってMB中のミオシンに選択的な変性が起こっていると仮定すると極めて良く説明できるものである。

4) CaCl_2 によって起こるスケトウダラのMB・Ca-ATPase比活性の低下に対する ソルビトールの抑制効果

ソルビトールはMfタンパク質の熱変性⁶¹⁾やプロテアーゼによる消化⁶²⁾を抑制する効果があることが知られている。そこで、 CaCl_2 によってスケトウダラMB・Ca-ATPaseに起こる急激な失活を抑制し、変性の機構を推定する試みを行なった。すなわち、0.5M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に溶解したMBに1.0Mソルビトールを添加し、次に50mM CaCl_2 を添加した。続いて、1.0M ソル

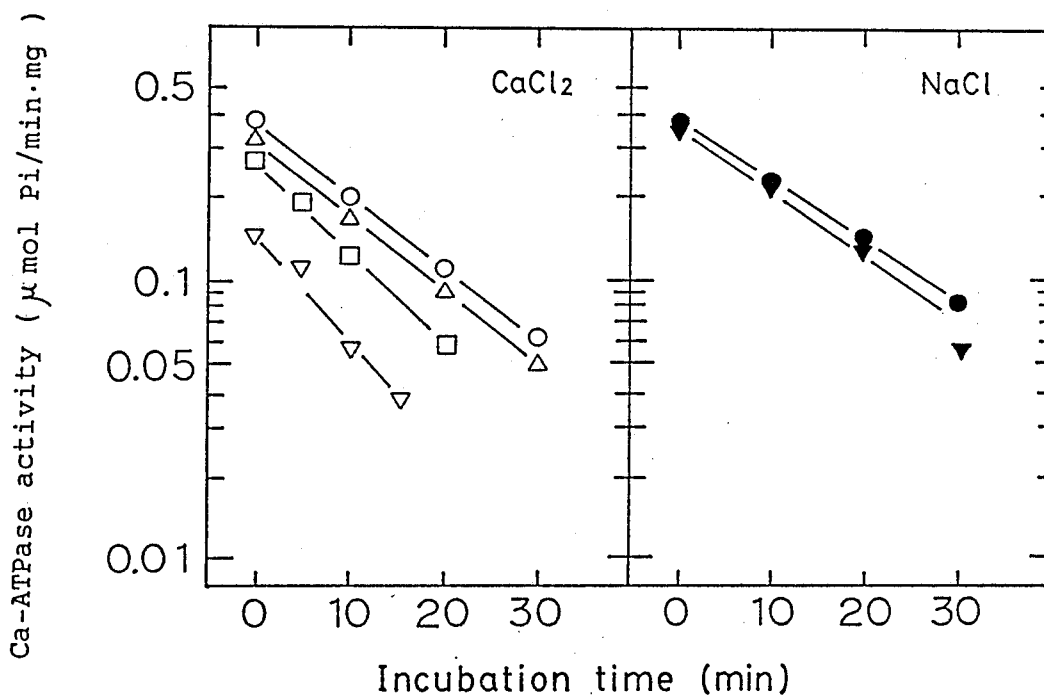


Fig. 3.5. Change in thermal inactivation mode of Ca-ATPase activity of walleye pollack myosin B induced by treatment with CaCl_2 .

To walleye pollack myosin B dissolved in 0.5 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), 50 mM CaCl_2 was added. After treatment with CaCl_2 at 0 °C for 0 (○), 4 (△), 8 (□) or 24 (▽) h, a portion of the myosin B was taken out and dialyzed as in Fig. 3.4. As a control, 150 mM NaCl was added to myosin B, and immediately (●) or after storing for 24 h at 0 °C (▼), the myosin B was dialyzed as above. The dialyzate thus obtained was incubated at 30 °C, and thermal inactivation of its Ca-ATPase activity was measured. The method for Ca-ATPase assay was also as in Fig. 1.4.

ピトールを含む0.5M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) 混液に透析した後, MB·Ca-ATPaseの経時的変化を測定した。なお, これらの操作はすべて0℃で行なった。その結果をFig. 3.6に示す。それによると, 1.0M ソルビトールの共存は, CaCl₂によるMBのCa-ATPase比活性の低下を極めて強く抑制する事実が認められ, たとえば, 10時間後の活性はソルビトール非存在下では約50%まで低下するが, その存在下では92%の活性が保持されていた。

5) CaCl₂によって起こるソルビトール存在下でのスケトウダラのMB·Ca-ATPaseの熱変性様式の変化とアクチンによる回復

ソルビトール存在下でCaCl₂処理をしたMB·Ca-ATPase活性の熱変性様式の変化を検討した。まず, 1.0M ソルビトールを含む0.5M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に溶解したスケトウダラMB (3.0mg/ml) に50mM CaCl₂を添加し, 0℃で10時間処理した。次に, 1.0Mソルビトールを含む同溶媒に透析してCaCl₂を除去し, 25℃で加熱してMB·Ca-ATPaseの経時的変化を測定した。結果をFig. 3.7に示すが, それによると, MB·Ca-ATPaseの熱変性の様式は, ソルビトール非存在下でCaCl₂処理をしたMBの場合 (Fig. 3.5に示した) とは異なり, 初期に速く後期は遅い速度の二段階の一次反応にしたがうこと, また後期の速度はCaCl₂処理をしないMBの場合に良く近似した値になることを示した。

そこで次に, CaCl₂処理後に透析をしたMBに対して, 未処理のMB中のアクチン含有量⁵⁷⁾に相当するコイのF-アクチンを添加した後, 25℃で加熱してCa-ATPase比活性の熱変性の様式を検討した。これによると, CaCl₂処理に伴っていったん変化したMB·Ca-ATPaseの熱変性の様式は, F-アクチンの添加によってCaCl₂添加前の様式にほぼ回復する事実を示した。すなわち, F-アクチン添加後のMB·Ca-ATPaseの熱変性は単純な一次反応にしたがうようになり, そのK_Dは $3.2 \times 10^{-5} \cdot s^{-1}$ となったが, この値はソルビトール共存下でCaCl₂処理したMB·

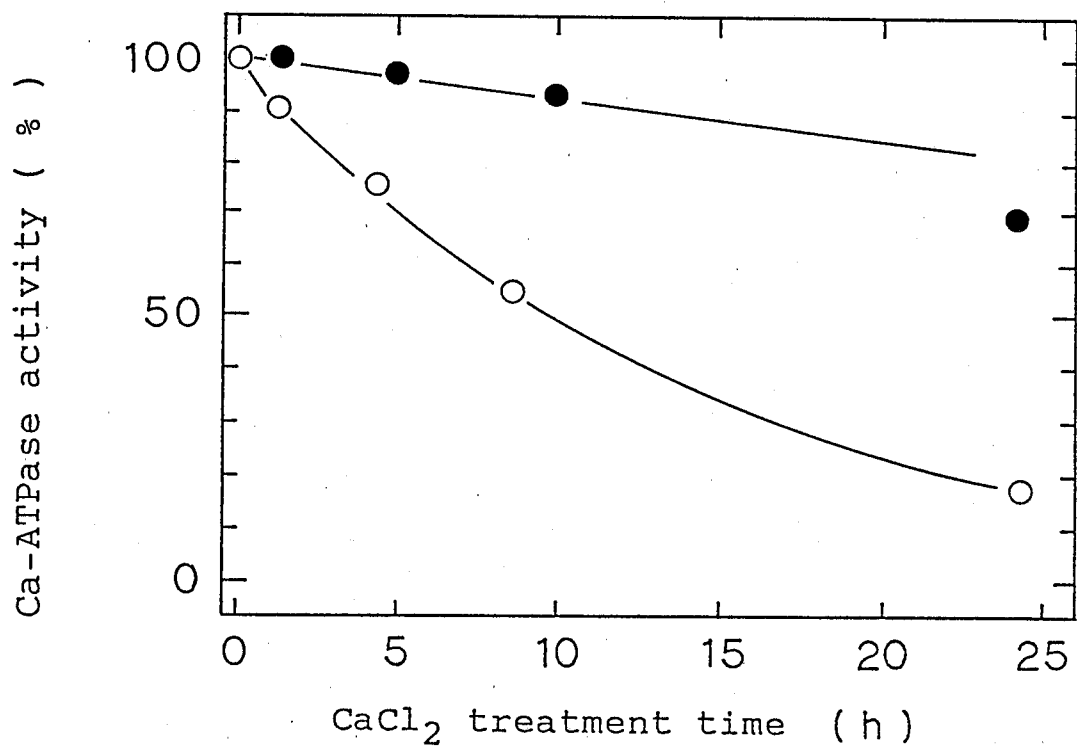


Fig. 3.6. Change in Ca-ATPase activity of walleye pollack myosin B induced by treatment with CaCl_2 in the presence of sorbitol.

Walleye pollack myosin B was dissolved in 0.5 M NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 1.0 M sorbitol. During treatment with 50 mM CaCl_2 at 0°C , a portion of myosin B was dialyzed against the same medium containing 1.0 M sorbitol as a function of time. After removal of CaCl_2 , Ca-ATPase activity of the dialyzate was measured (●) as in Fig. 1.4. As a control, change in Ca-ATPase activity of myosin B induced by treatment with CaCl_2 in the absence of sorbitol was examined (○).

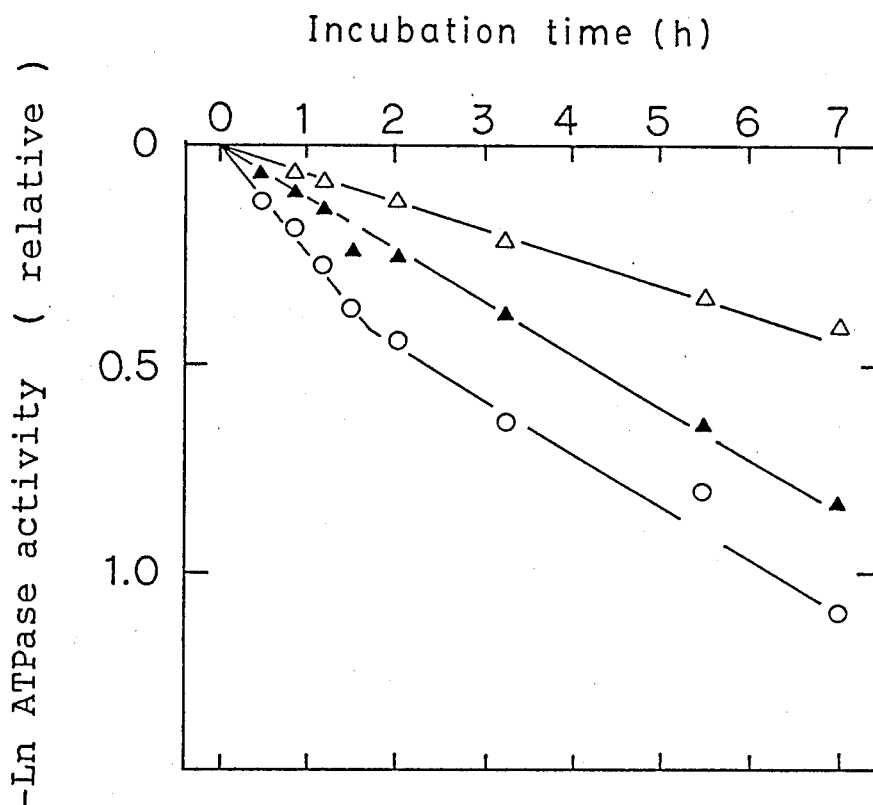


Fig. 3.7. Effect of F-actin on the change in thermal inactivation mode of Ca-ATPase of walleye pollack myosin B induced by CaCl_2 in the presence of sorbitol.

As described in Fig. 3.6, walleye pollack myosin B was dissolved in a medium containing 1.0 M sorbitol, and 50 mM CaCl_2 was added to it. After treatment with CaCl_2 at 0 °C for 10 h, the myosin B was dialyzed to remove CaCl_2 against the same medium containing sorbitol (○). To the dialyzate, carp F-actin was added in an equal amount of actin content in myosin B (▲).

As a control, myosin B without addition of CaCl_2 was dialyzed as above (Δ). Thermal inactivation of Ca-ATPase of the dialyzates thus obtained was examined as in Fig. 3.1, except incubation was conducted at 25 °C.

Ca-ATPaseが示した後期の遅い K_D の値にほぼ一致した。なお、F-アクチンの添加によって温度安定性が回復したMBの K_D は、 CaCl_2 を添加しない対照のMBの K_D ($1.5 \times 10^{-5} \cdot \text{s}^{-1}$) に比べるとやや大きい値であった。この不一致の理由は明らかではないが、 CaCl_2 処理によってMBのCa-ATPase比活性が約7%低下している事実を考慮すると、アクチンを加えても完全に元の状態に回復しない変化がミオシンに起こっている可能性が考えられる。これらの結果は、ソルビトール共存下では、スケトウダラのMB・Ca-ATPaseの温度安定性は、カツオのMB・Ca-ATPaseの場合と本質的に良く似た CaCl_2 による影響を受けることを示している。すなわち、ソルビトールが存在しない場合には、MB中のアクチンばかりでなくミオシンも変性し、そのCa-ATPaseの失活が起こっていることが明らかである。

6) CaCl_2 処理によってスケトウダラMBから遊離するアクチンとトロポミオシンの定量

Fig. 3.7の実験結果から、カツオMBの場合と同様、スケトウダラMBにおいても CaCl_2 処理によってMbタンパク質を構成するアクチン部分に変性する事実が強く示唆された。ただし、スケトウダラMBではミオシンもまた変性している。そこで、 CaCl_2 処理によってスケトウダラMBのCa-ATPase比活性が低下するときを上清中に遊離するタンパク質成分を調べた。⁶³⁾ すなわち、MBに50mM CaCl_2 を添加して0℃で保持し、経時的にその一部を取り出して0.1M NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に透析した後、 $10,000 \times g$ で20分間遠心分離して上清中に可溶化するタンパク質を集めた。この上清中のタンパク質成分をSDS-PAGE分析に供したところ、アクチンとトロポミオシンに相当する成分が増加する事実が認められたので、これらの成分をデンストメーターで定量し、同じ方法で定量した CaCl_2 処理をする前のMB中の両成分に対する割合を求め、Fig. 3.8にその変化を示した。また対照として、150mM NaClを添加したMBについて同様な定量

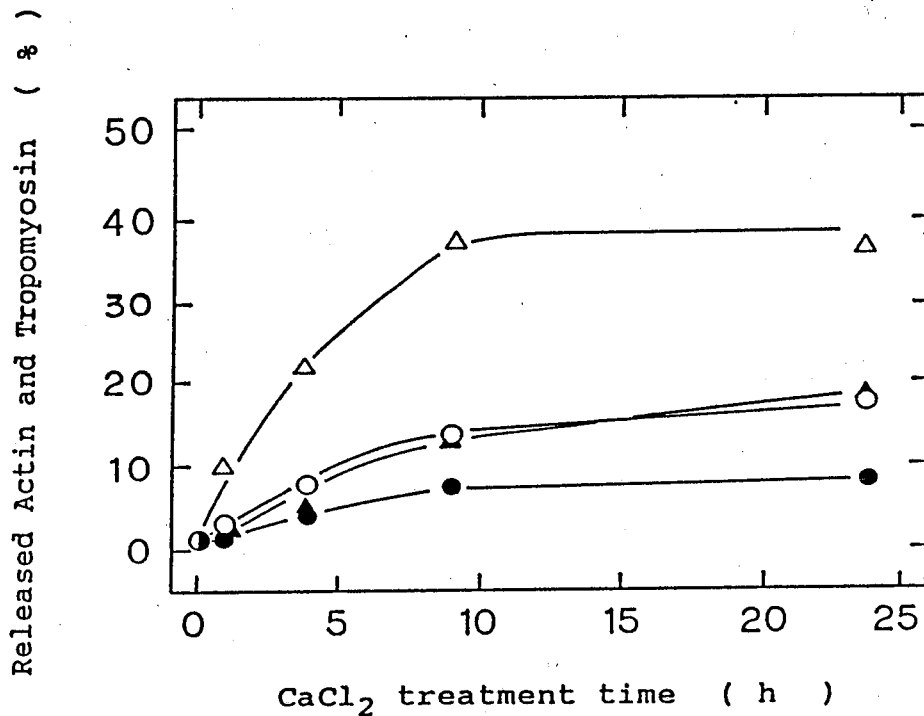


Fig. 3.8. Change in amount of actin and tropomyosin released from walleye pollack myosin B induced by treatment with CaCl_2 .

To walleye pollack myosin B dissolved in a medium of 0.5 M NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), 50 mM CaCl_2 was added. During treatment with CaCl_2 at 0 °C, a portion of myosin B was dialyzed against 0.1M NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). The dialyzate was centrifuged at 10,000 xg for 20 min to separate the supernatant and the precipitate. A fixed volume of the myosin B and the supernatant from it was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using a 10 % polyacrylamide disc gel containing 0.05% SDS.

The amounts of actin (○) and tropomyosin (△) released from CaCl_2 -treated myosin B were determined by measuring the absorbance on the gel rod at 640 nm and expressed as relative intensity (%) on the basis of actin and tropomyosin content of native myosin B. As a control (●, ▲), 150 mM NaCl was added to myosin B and treated in the same way.

を試みた。その結果によると、CaCl₂処理直後のMB (Fig. 3.8中では0時間の試料) からのアクチンの遊離量はわずか3.5%で、対照としたNaClを添加したMBからの量の3.0%と大差がなく、またトロポミオシンの遊離は認められなかった。その後、MBよりCaCl₂処理によって遊離するアクチンとトロポミオシンの量は経時的に増加し、9時間後にはMB中に含まれる量の14.1%のアクチン、また37.2%のトロポミオシンの遊離が起こった。一方、NaClを添加した対照のMBからはアクチンが8.0%およびトロポミオシンが13.0%に達するだけであった。以上述べたように、CaCl₂処理によってそのCa-ATPase比活性が低下するとき、MBから少量のアクチンと相対的に多量のトロポミオシンが遊離する事実が認められたが、これはFig. 3.7の実験結果から得られたMB中のアクチンが変性したという結論を支持するものである。

小考察

本章ではCaCl₂によってMf・Ca-ATPaseの温度安定性が低下する原因を明らかにする目的の検討を行なった。まず、低イオン強度の溶媒に懸濁したスケトウダラMfについて検討した結果によると、CaCl₂処理によってMfタンパク質中のアクチンの一部が変性し、ミオシンが解離状態になる可能性が示唆された。アクトミオシン中のアクチンの一部が変性してミオシンが解離状態になると、一般にCa-ATPaseの熱変性の様式が二段階になる^{58), 59)} ことが既に報じられているが、10mM NaCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁したスケトウダラMfをCaCl₂処理した場合は初期の速い変性だけで、後期の遅い段階の変性が認められにくかった。これはMf中のアクチンの大部分がおそらくCaCl₂によって極めて速やかに変性し、その結果としてアクトミオシン中の多量のミオシンが解離したため、初期の速い変性だけが認められ、後期の遅い変性は観察されなく

なったものと考えられる。なお、添加したCaCl₂を除去しないままでアクチンを添加しても、その温度安定性は回復しないので、CaCl₂がMb中のアクチンの変性を促している要因であることは疑いがない。

一方、高イオン強度下では、スケトウダラのみオシンCa-ATPase活性は低温下においてもCaCl₂処理中に急速に失活するので、MBになんらかの大きな構造変化が起こっていることが示唆された。しかし低イオン強度下における場合とは異なり、CaCl₂処理をしてもそのCa-ATPaseの熱変性速度はCaCl₂を添加する前の値と変らなかった。なお、カツオMBをCaCl₂処理した場合はCa-ATPaseの失活は起こらないが、その熱変性速度が増加する傾向を示した。さらに、その熱変性反応の様式は初期に速く後期は遅い（後期の速度はCaCl₂処理前のMBの値に一致）二段階の一次反応となった。しかし、スケトウダラMBの場合には遅い速度（CaCl₂処理前のMBの値に一致）の単一の一次反応になった。そして、この変性速度はCaCl₂処理の時間には無関係にほぼ一定の値を保つこと、すなわちCa-ATPaseの失活の度合いとはほとんど無関係であることが示された。また、30°CにおけるスケトウダラのMB・Ca-ATPaseのK_Dは、CaCl₂処理に関わりなく、Fig. 2.6に示した値にほぼ一致するが、一方、0°CでCaCl₂処理中に起こるCa-ATPaseの失活の速度を概算すると、これは既報⁶⁰⁾のMBのK_Dに比べて著しく大きかった。それゆえ、カツオの場合には、CaCl₂の添加によってMB中のアクチンが変性して遊離のみオシンが生成している可能性が示されたが、スケトウダラの場合は遊離のみオシンの存在を推定させるK_Dは示されず、これは両魚類のMBのCaCl₂処理における大きな相違であった。そこで、スケトウダラMBをCaCl₂で処理する際に1.0Mのソルビトールを共存させてCa-ATPaseの失活を抑制したところ、その熱変性の反応様式はカツオのMBをCaCl₂処理した場合と同様に二段階の一次反応にしたがうようになった。

スケトウダラのみオシンは、魚類のみオシンの中でも極めて不安定であるこ

とが示唆されており、^{49)・64)} CaCl₂処理したMBから生成したミオシンのCa-ATPaseが氷温下でさえ速やかに失活する可能性は強い。したがって、CaCl₂処理をしたMBのCa-ATPaseの熱変性では、初期の速い変性段階が認知できないのは当然と判断される。ソルビトールの共存下でCaCl₂処理をしたスケトウダラのMBにおいてはそれが認められるが、CaCl₂を除去した後にF-アクチンを添加すると、そのCa-ATPaseの熱変性速度と反応様式がCaCl₂添加前のMBのそれにほぼ回復する事実も上記の判断を支持している。また、CaCl₂処理に伴って低いイオン強度の溶媒中に少量のアクチンと相対的に多量のトロポミオシンがMBから可溶化してくる事実もそれをさらに支持するものと考えられる。本来、MfおよびMB中のトロポミオシンはアクチンフィラメント上に規則的に結合して局在しているが、⁶⁵⁾ このようなアクチンフィラメントの構造を考慮すると、Fig. 3.8の条件で得た上清中にアクチン量に比べてトロポミオシン量が異常に多く見出される事実は、実際に変性し遊離したアクチン量はより多量であるが、その一部が凝集し沈殿したため見かけ上少なくなったものと推定される。

魚類のMfタンパク質を各種の条件下で処理するとき、その中のアクチンが優先的に変性してミオシンが遊離状態となるためにCa-ATPaseの熱変性の初速度が大きくなり、Mfタンパク質の温度安定性が見かけ上低下する事実は、高濃度のNaCl、⁶⁶⁾ 重合リン酸塩、⁶⁷⁾ の存在下や、酸性のpH下⁶⁸⁾におかれたMfタンパク質について見出されているが、トロポミオシンの遊離量はアクチンに比べて少ないと報じられた場合が多い。その点で、本研究の成果は、上記のアクチン変性に関する事例とは異なっている。しかし、先にNakamura⁶⁹⁾は鶏砂囊筋中のF-アクチンがCaCl₂によって著しく不溶化すること、特に50mM CaCl₂の存在下ではその50%が不溶化する事実を報告しており、これは本実験条件下のMB中のアクチンがCaCl₂による変性に伴って不溶化する事実と良く似ている。

本章の結果から、CaCl₂処理によってスケトウダラとカツオのMfタンパク質

の温度安定性が低下する現象は、 CaCl_2 がMfタンパク質を構成するアクチンを優先的に変性させた結果起こるものと判断される。また、Fig. 3.5に示したスケトウダラMBで観察された特異な速い変性の速度は、Mfタンパク質中のアクチンの優先的な変性に伴って生じる遊離ミオシンの温度安定性が著しく劣ることの反映であることが明らかである。

第4章 肉糊のゲル化とミオシンHCの多量化反応に及ぼすCaCl₂の影響

魚類の肉糊を加熱すると弾力に富むゲルを形成する。このゲル化は温度と時間に依存する反応であるが、^{54), 70), 71)} 初期に比較的低温でゲル化させてから高温で加熱すると、さらに強固なゲルを形成する。^{72), 73)} この低温下におけるゲル化の強化は「坐り」と呼ばれ、魚肉ねり製品を製造する際の重要な工程であるが、また、その過程ではMf·Ca-ATPaseが急速に失活し、⁵¹⁾ 同時にミオシンHCの多量化反応が進行する事実が報じられている。³¹⁾ 前章では、CaCl₂によって魚類のMfタンパク質、特にMB·Ca-ATPaseの熱変性が起こりやすくなり、著しく不安定化する事実を述べた。したがって、CaCl₂を含む用水で晒し処理した落とし身からすり身を製造すると、肉糊中にCaCl₂が残存してそのゲル化反応がなんらかの影響を受ける可能性が考えられる。本章では、CaCl₂が肉糊のゲル化とミオシンHCの多量化反応⁷¹⁾に及ぼす影響を調べ、魚種間で比較した。

1) 坐りに伴う肉糊の破断強度の経時変化に及ぼすCaCl₂の影響

カツオ、コイおよびスケトウダラの冷凍すり身を解凍後、3%(W/W) NaClと終濃度で0~20mmol/kgすり身湿重量のCaCl₂ (以後、mmol/kgと略記する) を添加して塩ずりした (この時の肉糊のタンパク質濃度は120mg/gに調整した)。このようにして得た肉糊を30℃に保持してゲル化させ (これを以後坐りゲルと称する)、その破断強度の変化を経時的に測定した結果をFig. 4.1に示す。まず、カツオの場合、CaCl₂を添加する前の肉糊は極めてゲル化しにくく、4時間にわたって粘稠な状態のままであった。また、5時間後にはゲル化したが、破断強度が約80gの脆弱な坐りゲルしか形成し得なかった。これに対し、CaCl₂を添加した肉糊では、同塩を添加しない場合に比べて速やかにゲル化し、また、

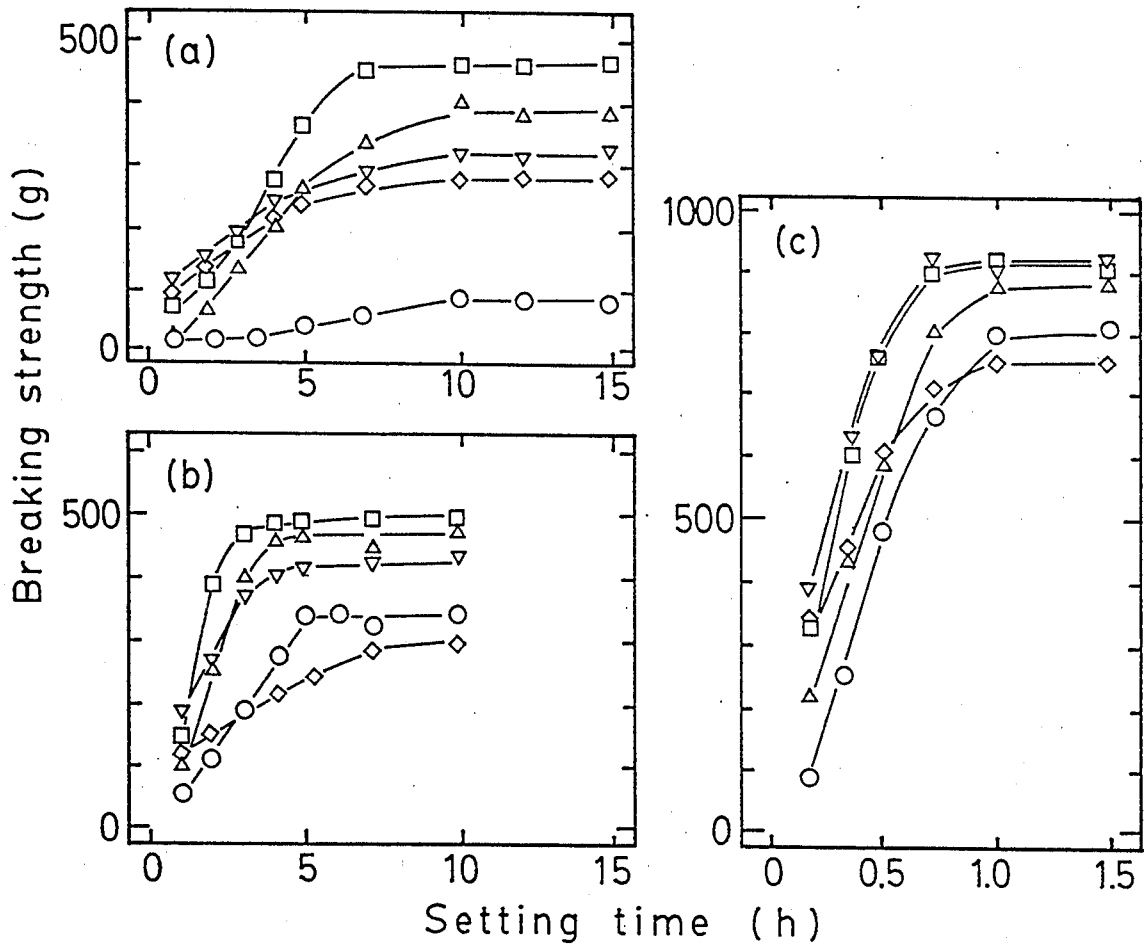


Fig. 4.1. Changes in breaking strength of salt-ground meats containing different concentrations of CaCl_2 during setting.

Frozen surimis of skipjack tuna (a), carp (b), and walleye pollack (c) were partially thawed and ground with 3% NaCl in the absence (\circ) and presence of 2 (\triangle), 5 (\square), 10 (∇) and 20 (\diamond) mmol/kg (surimi wet weight) of CaCl_2 .

The salt-ground meat was stuffed into polyvinylidene casing (ϕ 30mm) and incubated at 30 °C for different length of time. The setting gel thus obtained was sliced into 2.5cm thickness. The breaking strength of the setting gel was measured with a rheometer equipped with a ϕ 5mm plunger as a load value (g) from the breaking point.

その破断強度の最大値も250~475gに達し、強固な坐りゲルを形成した。次に、コイの場合、CaCl₂を添加しない肉糊のゲル化はカツオの場合よりも速やかに起こり、その破断強度も10時間後には310gと高い値に達したが、CaCl₂を添加した肉糊の破断強度はさらに速やかに増加して高い値(500g)を示した。さらに、スケトウダラの場合においても、CaCl₂を添加した肉糊の破断強度は、同塩を添加しない肉糊よりも速やかに増加して最大値に達し、その値は後者の場合(805g)よりも高い値(923g)を示した。

以上のように、いずれの魚類の場合も、その肉糊はCaCl₂の添加によって速やかにゲル化するようになり、また、その破断強度はより高い値に達することが確かめられた。ただし、いずれの肉糊においても、10mmol/kg以上のCaCl₂を添加すると、そのゲル化速度と破断強度は共に低下する傾向に転じた。なお、結果は図示しないが、Fig. 4.1に示した坐りゲルをさらに90℃で30分間加熱して坐り-加熱ゲルを調製したところ、その破断強度は坐りゲルよりも高い値となった。ただし、この場合も、CaCl₂によるゲル化反応の促進と破断強度の増加が坐りゲルの場合と同様に観察できた(第5章でさらに述べる)。

2) CaCl₂共存下の坐りに伴う肉糊の破断強度の変化の温度依存性

0~20mmol/kgのCaCl₂を肉糊に加え、10, 20, 30, 35および40℃に保持してゲル化させ、坐りゲルの破断強度を経時的に測定した。そして、それぞれの温度(以後、坐り温度と称する)における肉糊のゲル化速度(以後、 v_{BS} と記す)と坐りゲルの破断強度の増加度(e_{BS} と記す)を算出した。³⁴⁾ これらの結果をまとめてFig. 4.2に示す。まず、カツオの肉糊を10℃で保持した場合には、そのCaCl₂濃度の高低にかかわらずゲル化しなかった。しかし、坐り温度が20℃以上になると肉糊のゲル化が起こるようになり、その坐り温度が高くなるほど v_{BS} と e_{BS} はより大きな値となった。一方、コイとスケトウダラの肉糊では、

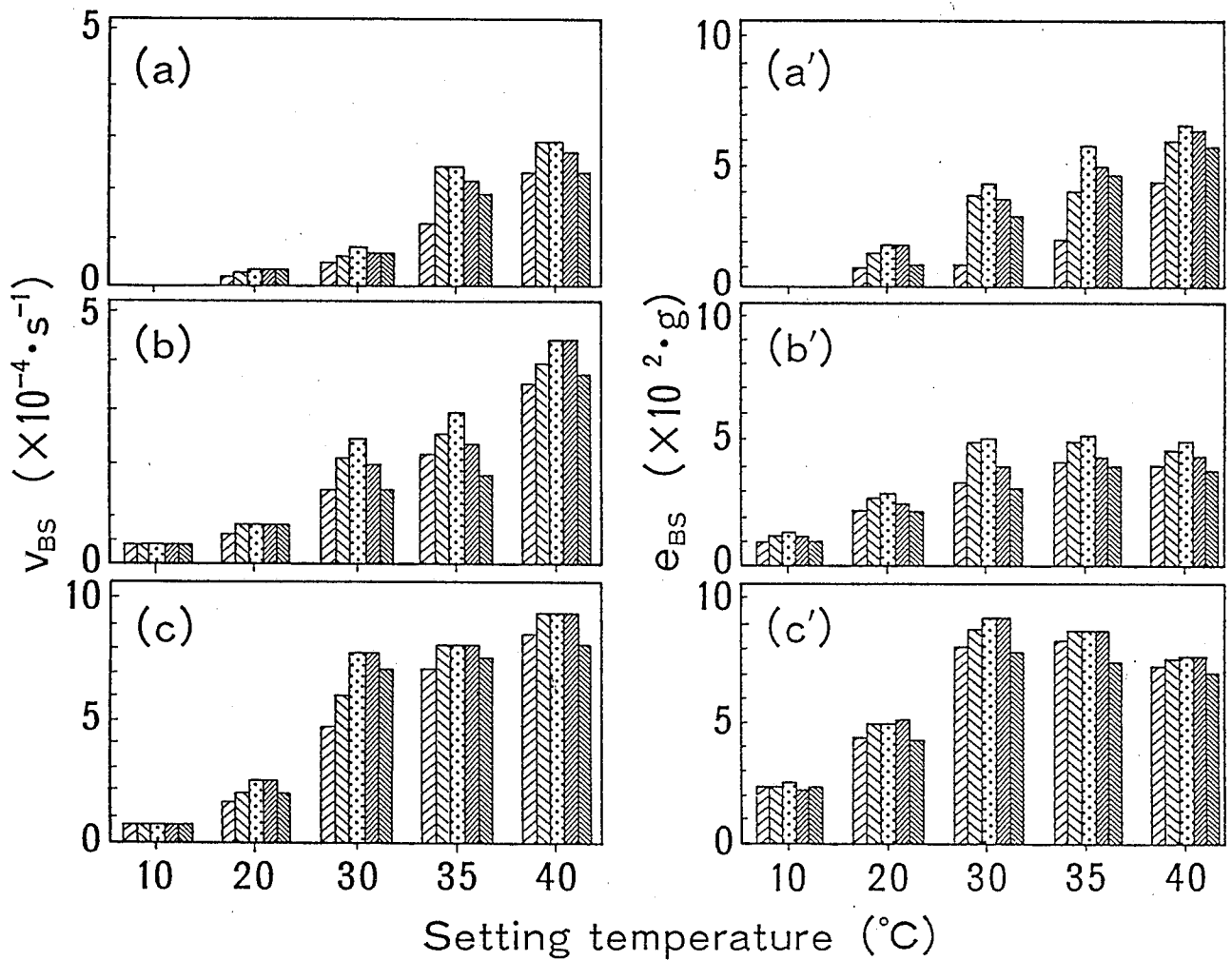


Fig. 4.2. Effect of CaCl_2 concentration on rate and extent of increase in breaking strength of salt-ground meat during setting.

The salt-ground meats of skipjack tuna (a,a'), carp (b,b') and walleye pollack (c,c') containing different concentrations of CaCl_2 were incubated at 10, 20, 30, 35 and 40 °C for setting. The rate (v_{BS}) of increase in breaking strength of the setting gel (a,b,c) was expressed as the reciprocal value of time required for half maximum increase in breaking strength. The extent (e_{BS}) of increase in breaking strength of setting gel (a',b',c') was expressed as the maximum increase by value after setting.

(□): 0, (▨): 2, (▩): 5, (▧): 10 and (▦): 20 mmol CaCl_2 /kg of surimi.

いずれの坐り温度に保持してもゲル化が起こったが、カツオの場合と同様、その v_{BS} は坐り温度が高くなるほど高い値を示した。しかし、 e_{BS} は、コイの場合は30~40℃ではほぼ同値を示すのに対し、スケトウダラの場合は30℃で最大となり、35℃および40℃ではむしろ減少する傾向を示した。このように、肉糊のゲル化反応の温度依存性は3種の魚類間で相違がみられたが、一方、いずれの魚類においても、坐り温度が高くなると v_{BS} と e_{BS} に対する $CaCl_2$ の影響が顕著になる傾向を示した。すなわち、20℃以上の坐り温度においては、肉糊中の $CaCl_2$ の濃度が上昇すると両値が増加するが、さらに5~10mmol/kgを越えるとこれらの値は小さくなる傾向を示すようになった。これはいずれの魚類の場合も同じであった。

Fig. 4.2において、いずれの魚類の肉糊も5 mmol/kgの $CaCl_2$ を添加するときはそのゲル形成能が最大となることが示されたので、 $CaCl_2$ が肉糊のゲル化に及ぼす影響を異なる坐り温度の間で比較するため、肉糊に5 mmol/kgの $CaCl_2$ を添加することによって起こる v_{BS} と e_{BS} の見かけの増加率を算出し、坐り温度に対してプロットした。結果をFig. 4.3に示すが、これによると $CaCl_2$ によって起こった両値の増加率は坐り温度によって大きく異なり、いずれの魚類の場合も30℃で最大の増加率を示した。また、両値の増加率はカツオ>コイ>スケトウダラの順に大きいことが示された。

3) 坐りゲルのSDS-尿素混合液に対する溶解性に及ぼす $CaCl_2$ の影響

肉糊のゲル化過程におけるMfタンパク質サブユニット成分の挙動を調べるため、 $CaCl_2$ 濃度の異なる肉糊から得た坐りゲルのSDS溶液に対する溶解性について検討した。すなわち、上記した3種の魚類の30℃における坐りゲル (Fig. 4.1において破断強度を測定した同じ試料) を8M 尿素と2% 2-メルカプトエタノールを含む2% SDS溶液 (以下、SDS-尿素混合液と称する) に溶解し、そ

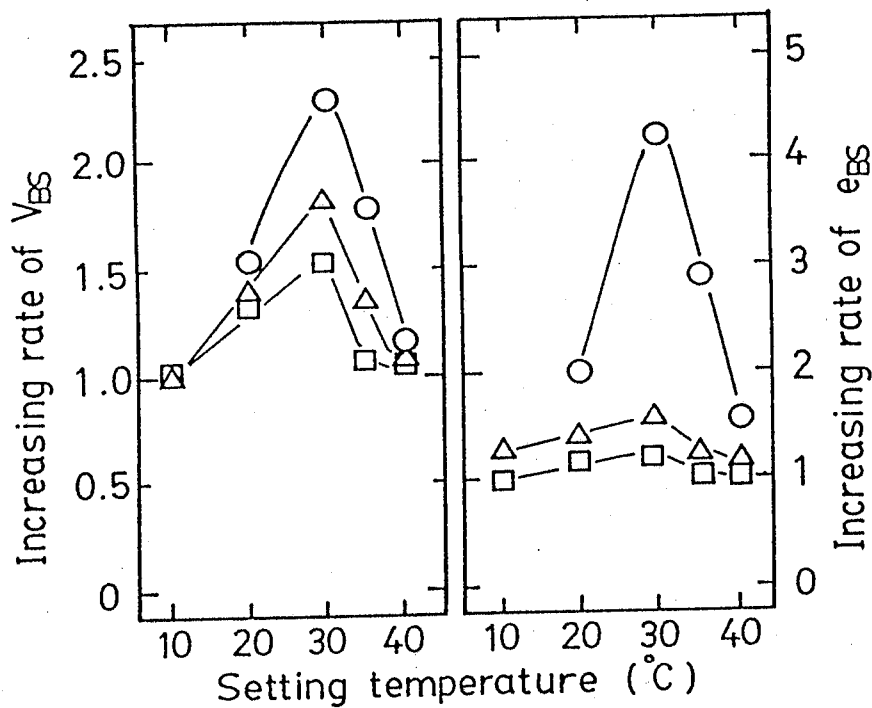


Fig. 4.3. Temperature dependence of rate and extent of increase in breaking strength of salt-ground meat induced by CaCl_2 .

The salt-ground meats of skipjack tuna (○), carp (△) and walleye pollack (□) containing 0 or 5 mmol/kg of CaCl_2 were incubated at 10-40 °C for setting. The measurement of the rate (v_{BS}) and the extent (e_{BS}) of increase in the breaking strength of their setting gel were as in Fig. 4.2. The increasing rates of v_{BS} (a) and e_{BS} (b) induced by CaCl_2 were calculated by the following equation:

The increasing rate of v_{BS} or e_{BS} induced by CaCl_2
 $= (v_{BS} \text{ or } e_{BS} \text{ of salt-ground meat containing 5 mmol/kg of } \text{CaCl}_2) / (v_{BS} \text{ or } e_{BS} \text{ of salt-ground meat without } \text{CaCl}_2)$.

の可溶化率を坐り時間に対してプロットした。結果をFig. 4.4に示す。まず、カツオとコイの坐りゲルは、肉糊のCaCl₂濃度とその坐り時間に関係なくSDS-尿素混合液に対して完全に溶解した。また、これは10~40℃のいずれの温度における坐りゲルでも同様であった（結果は図示しない）。一方、スケトウダラの場合は、CaCl₂を添加しない肉糊の坐りゲルの可溶化率が96~100%の範囲であったのに対し、CaCl₂を添加した肉糊では、ゲル化に伴って可溶化率が著しく低下した。この可溶化率の低下は、坐りゲル中でSDS-尿素混合溶液にも溶解しない巨大な分子サイズのみオシンHC多量体が生成した結果と推定されている。^{31), 71), 74)} それゆえ上記の結果は、肉糊のゲル化に伴って生成するみオシンHC多量体の大きさにCaCl₂が影響を及ぼしている可能性を示唆している。

4) 坐りに伴う肉糊中のMfタンパク質成分の変化に及ぼすCaCl₂の影響

カツオ、コイおよびスケトウダラの肉糊をそのまま、または5 mmol/kgのCaCl₂を添加した後、20, 30, 35および40℃に保持してゲル化させた。このようにして得た坐りゲル（以後それぞれGel(-Ca)およびGel(+Ca)と表わす）を、Fig. 4.4で述べたようにSDS-尿素混合液に溶解して、可溶化率を測定した後、SDS-PAGE分析に供した。各魚類について肉糊中のMfタンパク質サブユニット成分の定量値⁷¹⁾を坐り時間に対してプロットし、Figs. 4.5, 4.6および4.7に示す。なお、Fig. 4.2で示したように、CaCl₂は10℃における肉糊のゲル化にほとんど影響を及ぼさなかったため、他の図では省略した。また、Gel(-Ca)とGel(+Ca)中のアクチンに相当する成分の量は、上記した3種の魚類のいずれのゲル化過程でも変化しなかったため、その結果は図示しなかった。

まず、Fig. 4.5に示したように、カツオの肉糊を20, 30および35℃でゲル化させると、Gel(-Ca)中ではみオシンHCが減少してHCnが生成し、経時的にその量が増加した。ただし、それ以上大きな分子サイズの多量体は生成しなかった。

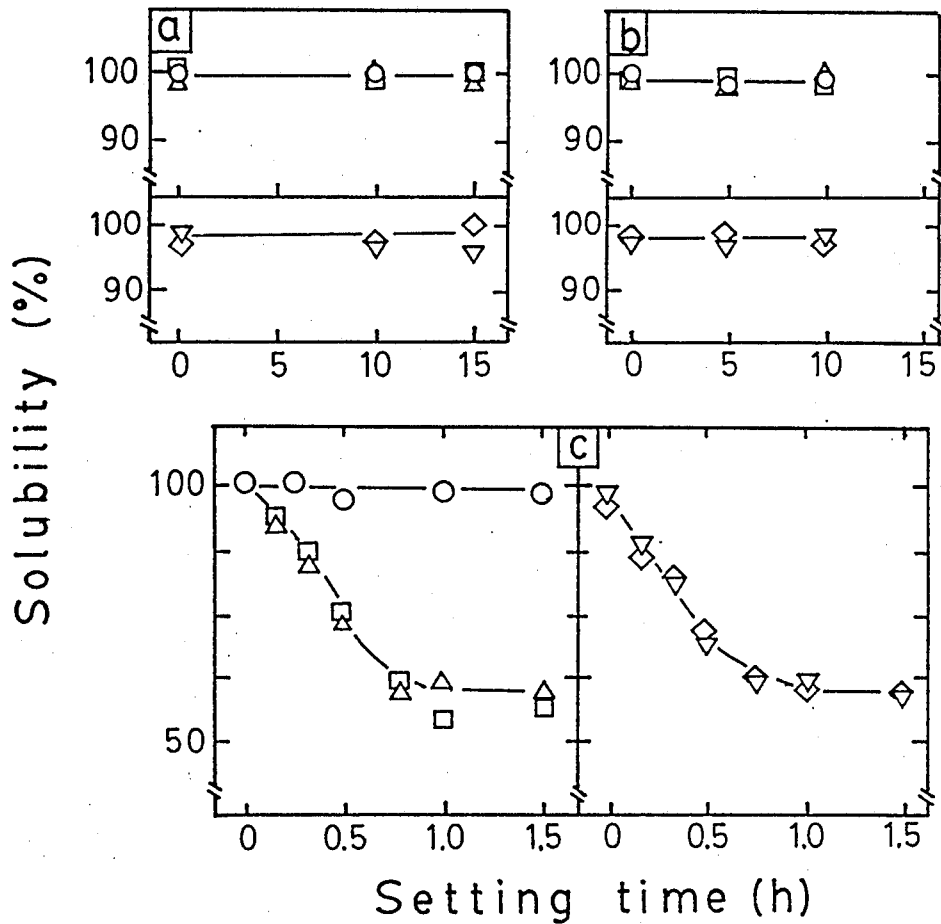


Fig. 4.4. Effect of CaCl_2 concentration on change in solubility of myofibrillar protein in salt-ground meat with SDS, urea and 2-mercaptoethanol medium during setting.

The salt-ground meat containing 0-20 mmol/kg of CaCl_2 was incubated at 30 °C for setting. The setting gel was homogenized with 60 volumes (v/w) of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 2% SDS, 8 M urea and 2% 2-mercaptoethanol, and heated at 100 °C for 2 min, followed by stirring at 20 °C for 22 h. After centrifugation at 10,000 x g for 20 min, the amount of soluble protein in the supernatant was determined by the biuret method, and expressed as a relative value (%) taking the amount of soluble protein of each salt-ground meat before setting as 100 %. (a): skipjack tuna, (b): carp, (c): walleye pollack. Symbols are the same as in Fig. 4.1.

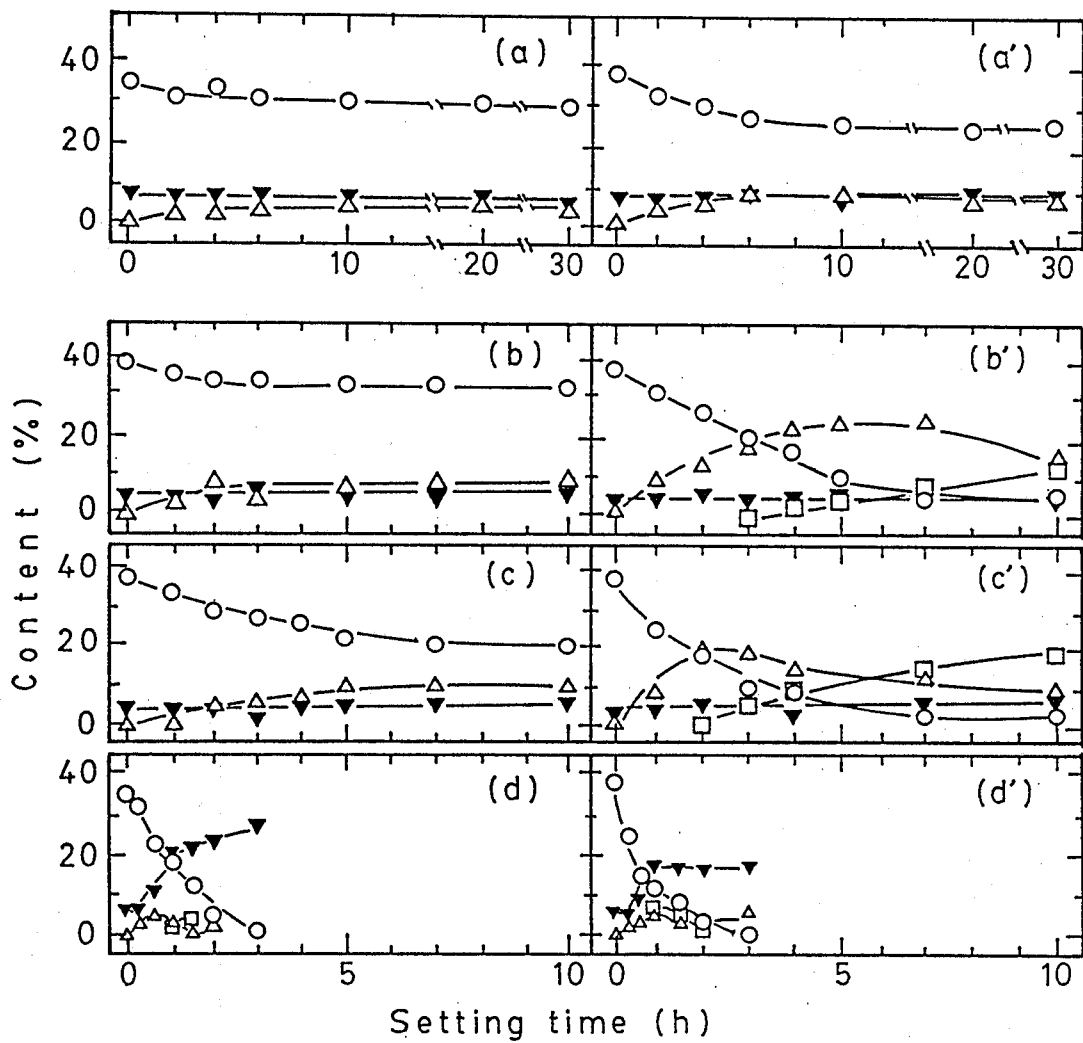


Fig. 4.5. Changes in subunit composition of myofibrillar protein in skipjack tuna salt-ground meats containing different concentrations of CaCl_2 during setting.

(Text continued on next page)

Fig. 4.5. Changes in subunit composition of myofibrillar protein in skipjack tuna salt-ground meats containing different concentrations of CaCl_2 during setting.

The salt-ground meats containing 0 (a,b,c,d) and 5 (a',b',c',d') mmol/kg of CaCl_2 were incubated at 20 (a, a'), 30 (b, b'), 35 (c, c'), and 40 °C (d, d') for setting. The salt-ground meat and setting gel from it were dissolved in a medium containing SDS, urea and 2-mercaptoethanol as shown in Fig. 4.4. Each 25 μg of the soluble protein was applied to SDS-PAGE using 5 % polyacrylamide gel by the method of Laemmli.³²⁾ The protein on the gel rod was stained with Coomassie Brilliant Blue R, and identified from its mobility as follows (Ref. 31):

- (○): myosin heavy chain (HC).
- (△): cross-linked myosin heavy chain, migrating into 5% polyacrylamide gel (HCn).
- (□): components corresponding to cross-linked myosin heavy chain, too large to migrate into 5% polyacrylamide gel (HCn').
- (●): components corresponding to cross-linked myosin heavy chain, too large to solubilize into SDS-urea buffer (HCn").
- (▼): components migrating between myosin heavy chain and actin (x).

The absorbance at 640 nm of each protein component on the gel rod was measured with a densitometer, and the content was determined by the following equations:

$$\text{HC, HCn or x} = S(I/Tg)(Tg/Tp) = SI/Tp (\%)$$

$$\text{HCn}' = S(Tp - Tg)/Tp (\%)$$

$$\text{HCn}'' = 100 - S (\%)$$

- I: Absorbance of each component on gel rod.
- S: Solubility (%) of the meat into SDS-urea buffer (cited in Fig. 4.4).
- Tp: Sum of absorbances of all components giving from surimi before setting.
- Tg: Sum of absorbances of all components giving from setting gels.

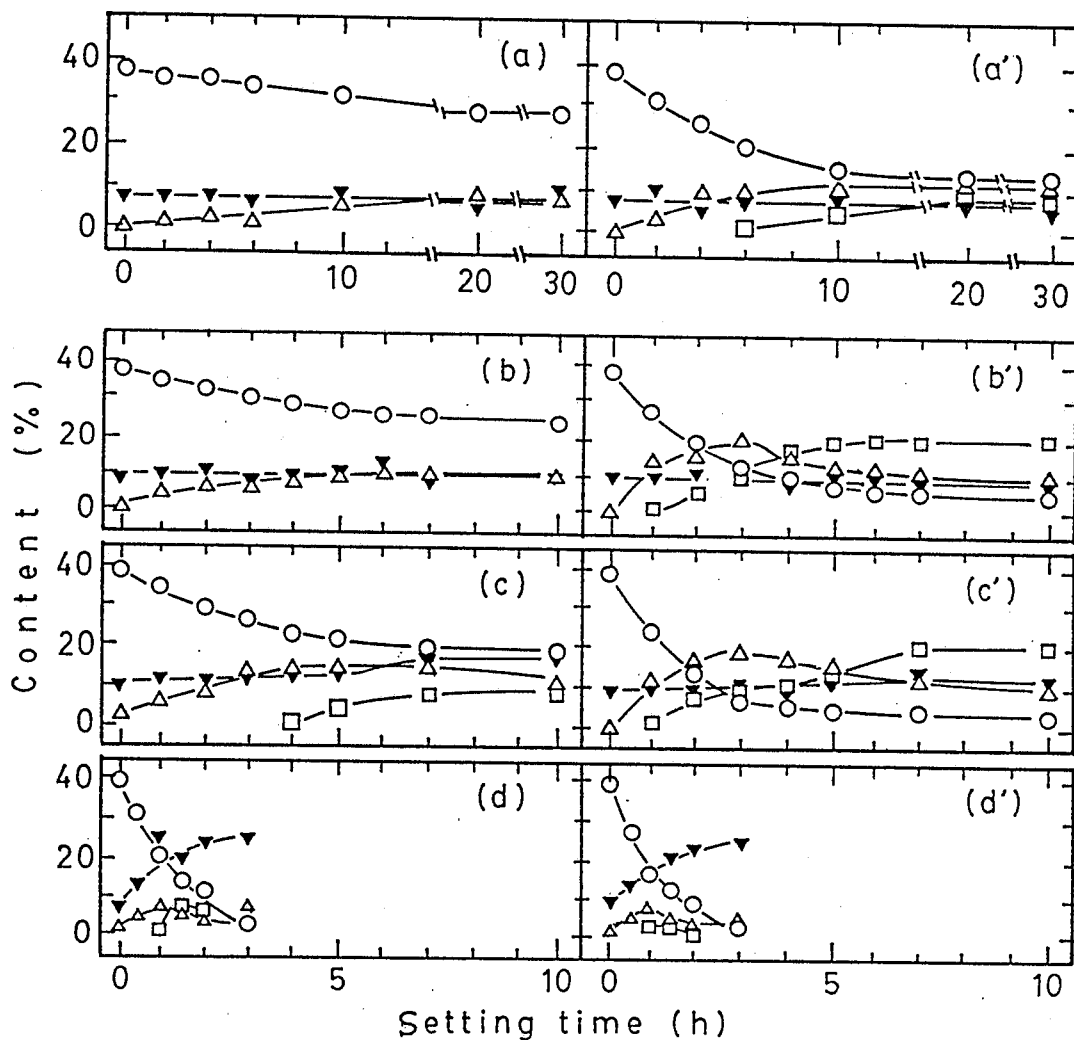


Fig. 4.6. Changes in subunit composition of myofibrillar protein in carp salt-ground meats containing different concentrations of CaCl_2 during setting.

The salt-ground meats containing 0 (a,b,c,d) and 5 (a',b',c',d') mmol/kg of CaCl_2 were incubated at 20 (a, a'), 30 (b, b'), 35 (c, c'), and 40 °C (d,d') for setting. The contents of protein components in salt-ground meat and setting gels were determined by the method described in Fig. 4.5. Symbols are the same as in Fig. 4.5.

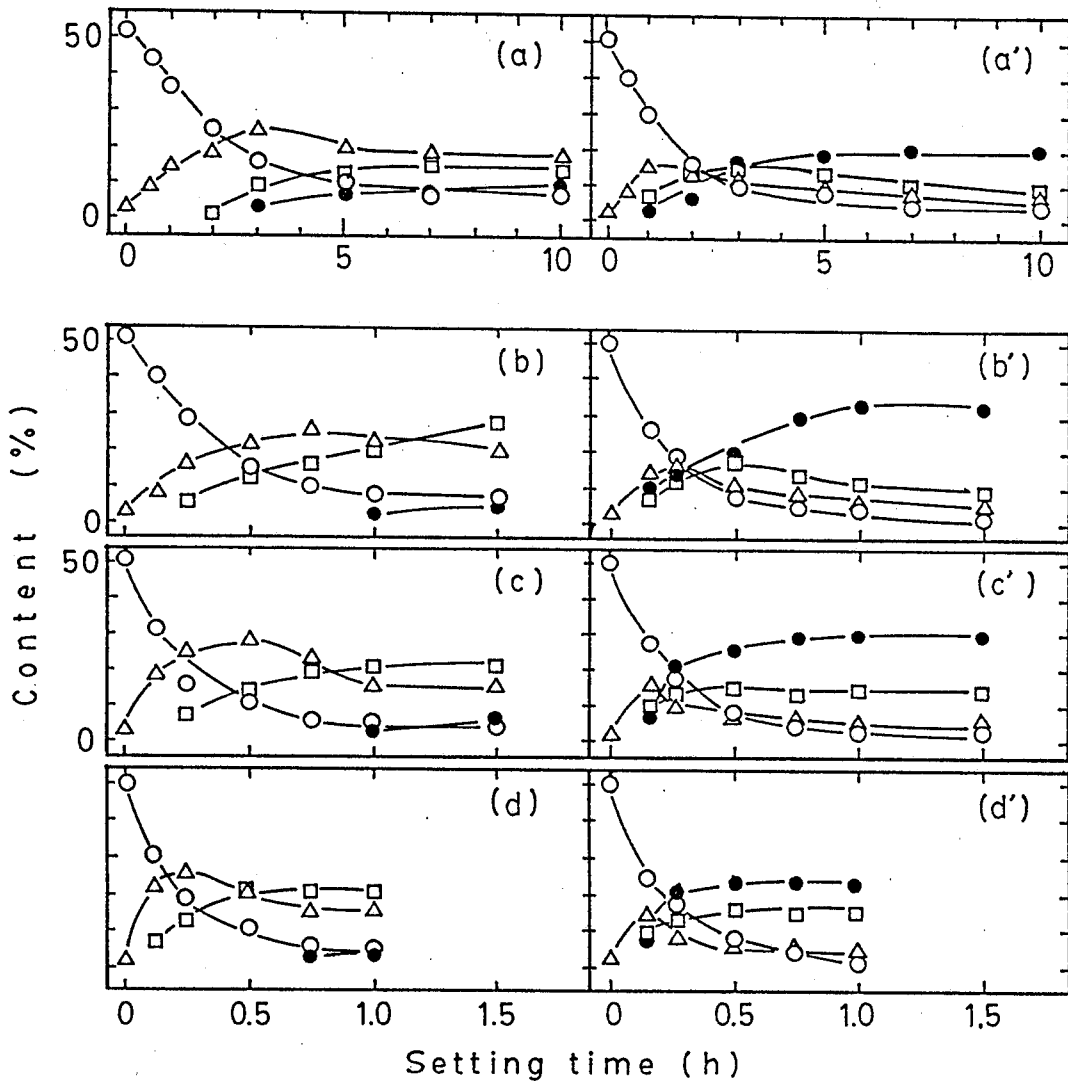


Fig. 4.7. Changes in subunit composition of myofibrillar protein in walleye pollack salt-ground meat containing different concentrations of CaCl_2 during setting.

The salt-ground meats containing 0 (a,b,c,d) and 5 (a',b',c',d') mmol/kg of CaCl_2 were incubated at 20 (a, a'), 30(b, b'), 35(c, c'), and 40 (d,d') °C for setting. The content of each protein components was determined by the method described in Fig. 4.5. Symbols are the same as in Fig. 4.5.

この傾向はFig. 4.6に示したコイの場合もほぼ同様で、コイの場合は35℃におけるゲル化においてわずかにHCn'が生成しただけであった。一方、両魚種のGel(+Ca)中のミオシンHCは、同じ坐り条件におけるGel(-Ca)中の場合より速やかに減少し、それに伴ってHCnとHCn'の生成が起こった。以上の結果は、坐り温度が高いほど反応速度が大きくなるという差はあるものの、これらの魚類の肉糊におけるミオシンHCの多量化反応がCaCl₂によって促進される事実を示している。なお、Figs. 4.5と4.6中には、泳動ゲル中でミオシンHCとアクチンの間に移動する複数成分（以下、x成分と記す）の合計量の変化を示したが、それによると、40℃における両魚類の肉糊のゲル化では、10℃～35℃の場合とは異なり、経時的にx成分の著しい増加が観察された。ただし、Gel(-Ca)とGel(+Ca)間では、Mfタンパク質サブユニット成分の変化に違いは認められなかった。

さらにFig. 4.7に示したスケトウダラのGel(-Ca)の場合は、そのゲル化に伴ってミオシンHCが減少し、HCnの生成が起こる点ではカツオとコイの場合と同じであるが、さらにHCn'次いでHCn"の生成も起こる点が異なっていた。また、同魚類のGel(+Ca)中では、HCの減少に伴ってHCnがゲル化の初期に生成したが、さらに大きな分子サイズのHCn'やHCn"の生成が大きく起こるのが特徴であり、これはGel(-Ca)の場合との相違であった。すなわち、坐り温度が高いほどゲル化が速やかに進行し、かつ、CaCl₂によって肉糊中のミオシンHCの多量化反応が促進される事実は、カツオやコイの場合と全く同様であるが、ミオシンHC多量体が著しく巨大化する点が相違している。また、両魚類の場合とは異なり、いずれの坐り温度においてもx成分の増加は認められなかったため、その結果は図示しなかった。

5) CaCl_2 共存下の坐りに伴う肉糊中のミオシンHCの変化の温度依存性

Figs. 4.5, 4.6および4.7に示したいずれの魚類の肉糊の場合も、 CaCl_2 によってゲル化に伴うミオシンHCの多量化反応が促進された。そこで、 CaCl_2 濃度の異なる肉糊をゲル化させた際に起こるミオシンHCの減少速度（以後、 v_{HC} と記す）と減少度³⁴⁾（以後 e_{HC} と表記し、ゲル化に伴って減少したミオシンHCの量をゲル化前のミオシンHCを1とした相対値で表す）を算出した。結果をFig. 4.8に示す。

まず、いずれの魚類の肉糊においても、坐り温度が高いほどミオシンHCの多量化反応が起こり易くなった。そして、坐り温度が20~35°Cの範囲では、肉糊中の CaCl_2 濃度の増加に伴って v_{HC} は増加して5 mmol/kgの場合に最大となり、また、10mmol/kgを越えるとその値は低下する傾向を示した。ただし40°Cにおける肉糊の v_{HC} については、カツオとコイの場合にはそれ以下の坐り温度に比べて著しく大きくなる（Figs. 4.5と4.6に示したように生成物が異なるため図示しない）が、スケトウダラでは35°Cの場合よりやや小さくなり、 v_{BS} の場合と同様、ここでも魚種による差が明らかに認められた。また、同じ CaCl_2 濃度の肉糊の v_{HC} を、それぞれの坐り温度ごとに魚種間で比較すると、20°C以下の場合を例外として常にスケトウダラ>コイ>カツオの順に大きい値を示した。これらの傾向はFig. 4.2で示した v_{BS} の温度依存性の場合にもほぼ同様に認められている。なお、Figs. 4.5および4.6で示したように、カツオとコイの肉糊を40°Cでゲル化させた場合には、肉糊のゲル化に伴ってミオシンHCは減少するものの、その多量体の生成量は20~35°Cにおけるゲル化の場合よりも著しく少なくなり、代ってx成分の増加が起こり、その量は減少する前のミオシンHC量の半分以上に達した。また、この変化は肉糊中の CaCl_2 濃度の高低に関係なく起こった。したがって、40°Cにおける肉糊のゲル化は、35°C以下の場合とは異

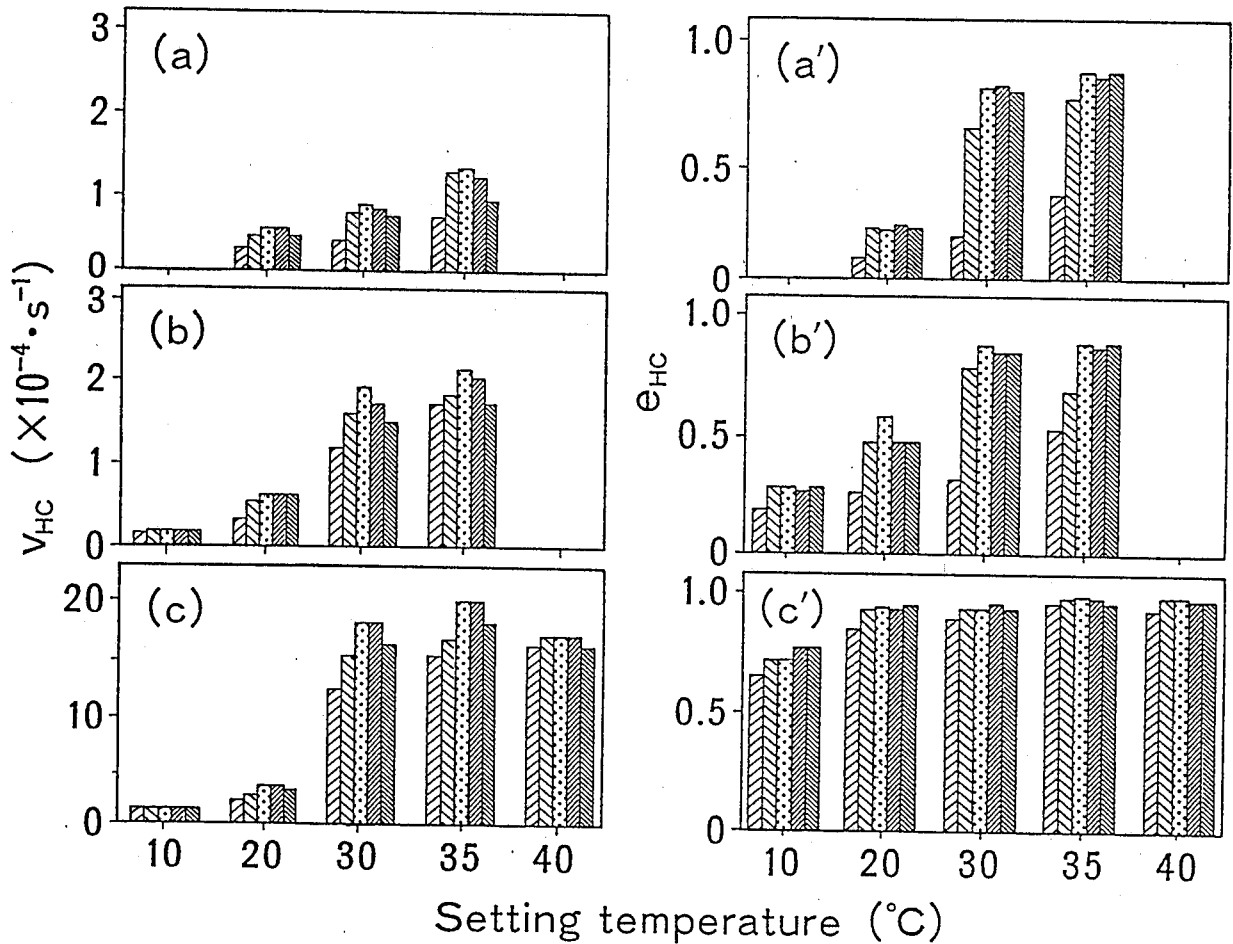


Fig. 4.8. Effect of CaCl_2 concentrations on rate and extent of decrease in myosin heavy chain in salt-ground meat during setting.

The salt-ground meats of skipjack tuna (a,a'), carp (b,b') and walleye pollack (c,c') containing different concentrations of CaCl_2 were incubated at 10, 20, 30, 35 and 40 °C for setting. The rate (v_{HC}) of decrease in myosin heavy chain in the setting gel (a,b,c) was expressed as the reciprocal value of time required for half maximum decrease in myosin heavy chain. The extent (e_{HC}) of decrease in myosin HC (a',b',c') was expressed as a relative value taking the content of myosin heavy chain in salt-ground meat before setting as 1.0. The content of myosin heavy chain in salt-ground meat or setting gel was determined by the method described in Figs. 4.4 and 4.5. Symbols are the same as in Fig. 4.2.

なるMfタンパク質の変性反応を介して起こっている可能性が示唆される。⁷¹⁾
76) それゆえ、カツオとコイの肉糊を40°Cでゲル化した場合の v_{HC} と e_{HC} は算出
しなかった。

次に、 e_{HC} に及ぼす $CaCl_2$ の影響を魚種間で比較したところ、いずれの魚類に
おいても坐り温度の高いほうがその値が大きくなり、また、同じ $CaCl_2$ 濃度の
肉糊間で比べると、わずかな例外を除いてスケトウダラの値が常にコイとカツ
オのそれよりも大きかった。そして、カツオとコイの e_{HC} は、いずれの坐り温
度においても肉糊の $CaCl_2$ 濃度の上昇に伴って高い値となり、30°Cと35°Cにお
いては5 mmol/kg以上の $CaCl_2$ を添加した肉糊では、ほとんどのミオシンHCが多
量化することを示した。また上記したように、スケトウダラの e_{HC} はいずれの
坐り温度においても先の2魚種の場合より高い値を示したが、それに対する
 $CaCl_2$ の影響は温度によって異なっていた。すなわち、10°Cと20°Cでは、スケ
トウダラの e_{HC} は $CaCl_2$ 濃度の上昇に伴って高い値となったが、30°C以上では
 $CaCl_2$ 濃度の高低に関わりなく全て高値に達し、差異が認められなくなった。

そこで、Fig. 4.3の場合と同様に、肉糊に5 mmol/kgの $CaCl_2$ を添加したとき
の v_{HC} と e_{HC} の見かけの増加率をそれぞれの坐り温度ごとに算出した。結果を
Fig. 4.9に示すが、これによると $CaCl_2$ の添加によって生じる肉糊の v_{HC} と e_{HC}
の増加率は、いずれの魚種においても30°Cで最大となり、またカツオ>コイ>
スケトウダラの順に大きかった。これはFig. 4.3に示した v_{BS} と e_{BS} の温度依存
性と合致している。

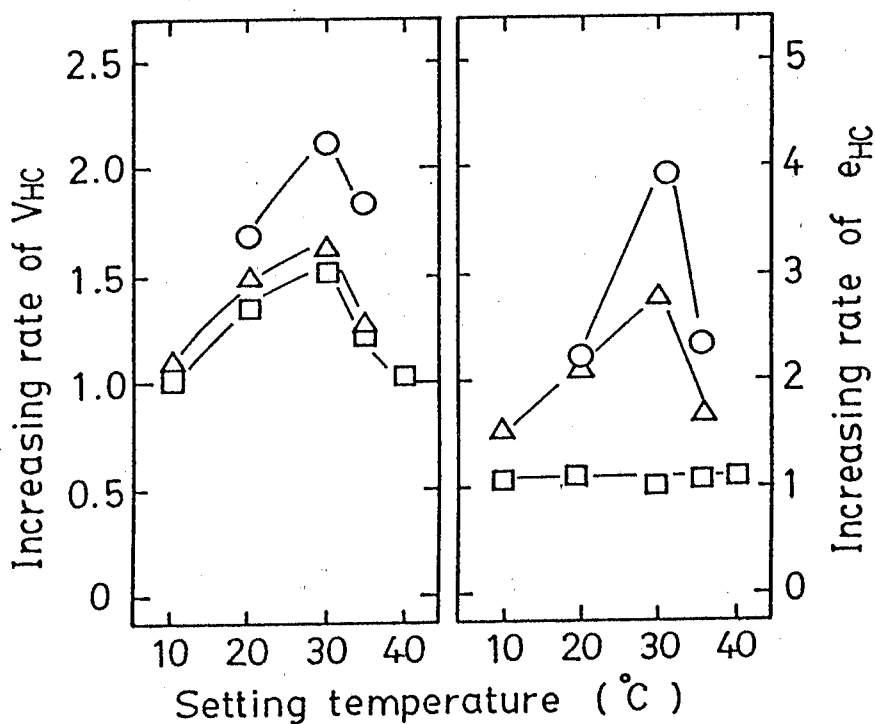


Fig. 4.9. Temperature dependence of rate and extent of decrease in myosin heavy chain in salt-ground meat induced by CaCl_2 .

The salt-ground meats of skipjack tuna (○), carp (△) and walleye pollack (□) containing 0 or 5 mmol/kg of CaCl_2 were incubated at 10-40 °C for setting. The measurement of the rate (v_{HC}) and the extent (e_{HC}) of decrease in myosin heavy chain in the setting gel were as in Fig. 4.8. The increasing rates of v_{HC} (a) and e_{HC} (b) induced by CaCl_2 were calculated by the following equation:

$$\text{The increasing rate of } v_{\text{HC}} \text{ or } e_{\text{HC}} \text{ induced by } \text{CaCl}_2 = (v_{\text{HC}} \text{ or } e_{\text{HC}} \text{ of salt-ground meat containing 5 mmol/kg of } \text{CaCl}_2) / (v_{\text{HC}} \text{ or } e_{\text{HC}} \text{ of salt-ground meat without } \text{CaCl}_2).$$

6) CaCl_2 共存下の坐りに伴う肉糊の破断強度の変化とミオシンHCの多量化反応の関係

上記した結果から、 CaCl_2 共存下の肉糊のゲル化とミオシンHCの多量化反応の温度依存性が類似していることが示された。そこで、Fig. 4.2とFig. 4.8の結果から求めた CaCl_2 濃度の異なる肉糊の v_{BS} と v_{HC} の間、および e_{BS} と e_{HC} の間の相互関係を調べた。結果をFig. 4.10に示す。これによると、いずれの魚種においても v_{BS} (x) と v_{HC} (y) の間には高い正の相関関係が成立することが認められた。すなわち、カツオ、コイおよびスケトウダラについて両値の間の相関係数 (r) は、それぞれ0.93 ($y=0.40x+0.26$)、0.98 ($y=0.83x-0.09$) および0.97 ($y=2.34x-1.36$) であった。したがって、 CaCl_2 によって肉糊のゲル化反応が速められたのは、ミオシンHCの多量化反応が速やかに進行した結果として生じたものと推定できる。一方、 e_{BS} (x) と e_{HC} (y) の関係についても調べたところ、コイでは両値の間にほぼ正の相関関係が認められた ($r=0.84$: $y=0.21x-0.14$) が、カツオとスケトウダラにおいては e_{HC} が0.80以上になると両値の間には比例関係は成立しなくなった。魚種によってこのような相違が認められた理由は未だ不明であるが、この結果は肉糊の坐りに伴う破断強度の増加が、肉糊中のミオシンHCの減少量の増加だけからは説明できないことを示しており、おそらく、坐りゲルの物性が形成されたミオシンHCの多量体の分子サイズと組成に関連している可能性が考えられる。なお、結果は図示しなかったが、 CaCl_2 濃度の異なる肉糊から得た坐り-加熱ゲルにおいても、その v_{BS} と v_{HC} の間および e_{BS} と e_{HC} の間には、坐りゲルの場合と同様に正の相関関係が成立していた。

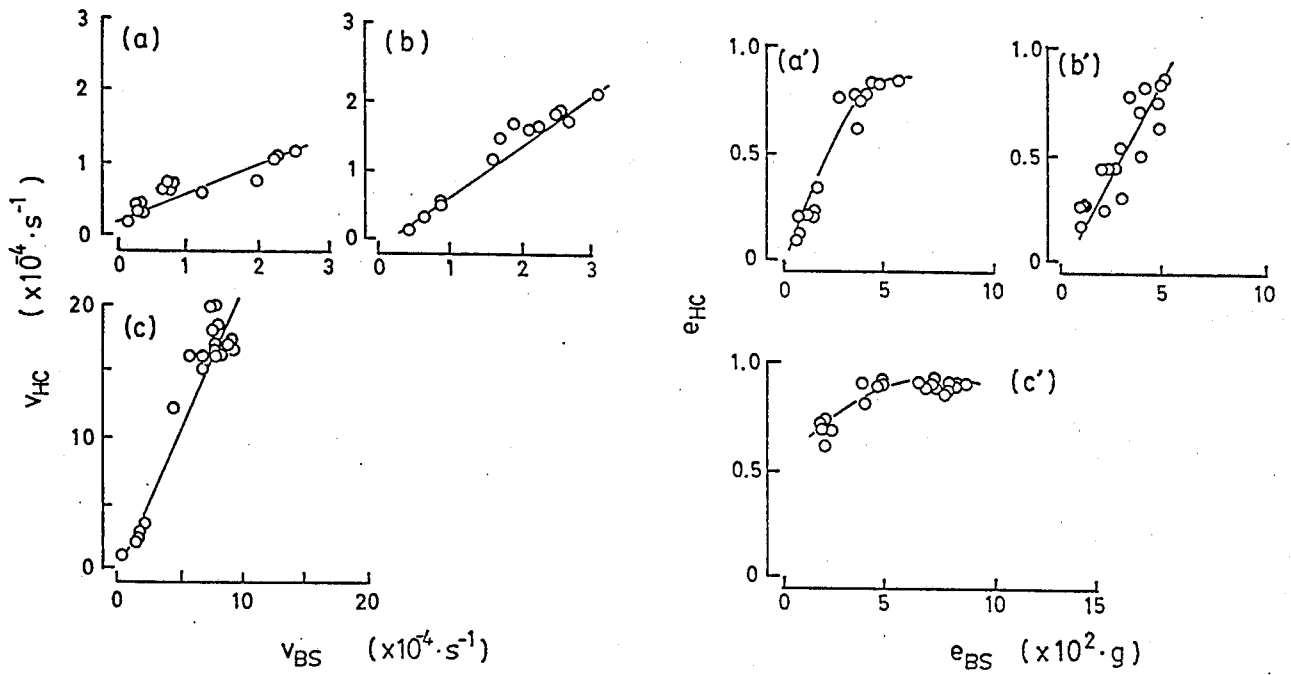


Fig. 4.10. Relation between cross-linking ability of myosin heavy chain and gel-forming ability of salt-ground meat.

(a, b, c): v_{BS} versus v_{HC} . (a', b', c'): e_{BS} versus e_{HC} . Data of skipjack tuna (a, a'), carp (b, b') and walleye pollack (c, c') for estimation of v_{BS} , v_{HC} , e_{BS} and e_{HC} were quoted from Figs. 4.2 and 4.8.

7) CaCl_2 共存下の坐りに伴って肉糊中に生ずる分子サイズの異なるミオシンHC多量体の量と組成

Figs. 4.5, 4.6および4.7のデータから, Gel(-Ca)およびGel(+Ca)の中のHCn, HCn' およびHCn''の生成量を求め, ミオシンHCの減少量との関係をプロットした。結果をFig. 4.11に示す。なお, ミオシンHCの減少量は坐りの前後におけるミオシンHC量の差で表わした。まず, カツオの場合, 既にFig. 4.5に示したように, Gel(-Ca)中にはHCn' とHCn''は生成せず, HCnだけが生成したが, その生成量はミオシンHCの減少量とほぼ一致していた。一方, Gel(+Ca)中においても, ミオシンHCの減少量が20%に達するまではほぼ等しい量のHCnが生成したが, その減少量が20%を越えるとHCnの量は減少し, そのかわりにHCn'が増加した。また, このようなミオシンHCの減少とその多量体の生成の相互関係は, コイのGel(-Ca)とGel(+Ca)の場合においても同様であり, コイのGel(+Ca)の場合はミオシンHCの減少量が15%を越えるとHCn'が生成する点がわずかに異なっているだけであった。次に, スケトウダラの場合は, Gel(-Ca)とGel(+Ca)中におけるミオシンHCの減少とその多量体の生成の間関係には, 先の2魚種の場合とは大きな相違が認められた。すなわち, スケトウダラのGel(-Ca)では, いずれの坐り温度においてもミオシンHCの減少量が35%に達するまではHCnの増加が認められたが, 一方, Gel(+Ca)の場合は, ミオシンHCの減少量が20%を越えるといったん生成したHCnはむしろ減少してHCn' とHCn''が生成するが, さらに, ミオシンHCの減少量が40%以上になると, 生成したHCn'も減少してHCn''が顕著に増加した。以上の結果は, Gel(-Ca)とGel(+Ca)では, それを構成するミオシンHC多量体の分子サイズや組成が極めて異なっており, それがおそらく, それぞれのゲル物性に寄与していることを示唆している。

そこで次に, 3種の魚類について CaCl_2 濃度の異なる肉糊より得た坐りゲル中のHCn, HCn' およびHCn''の生成量とその物性との関係を検討した。すなわち,

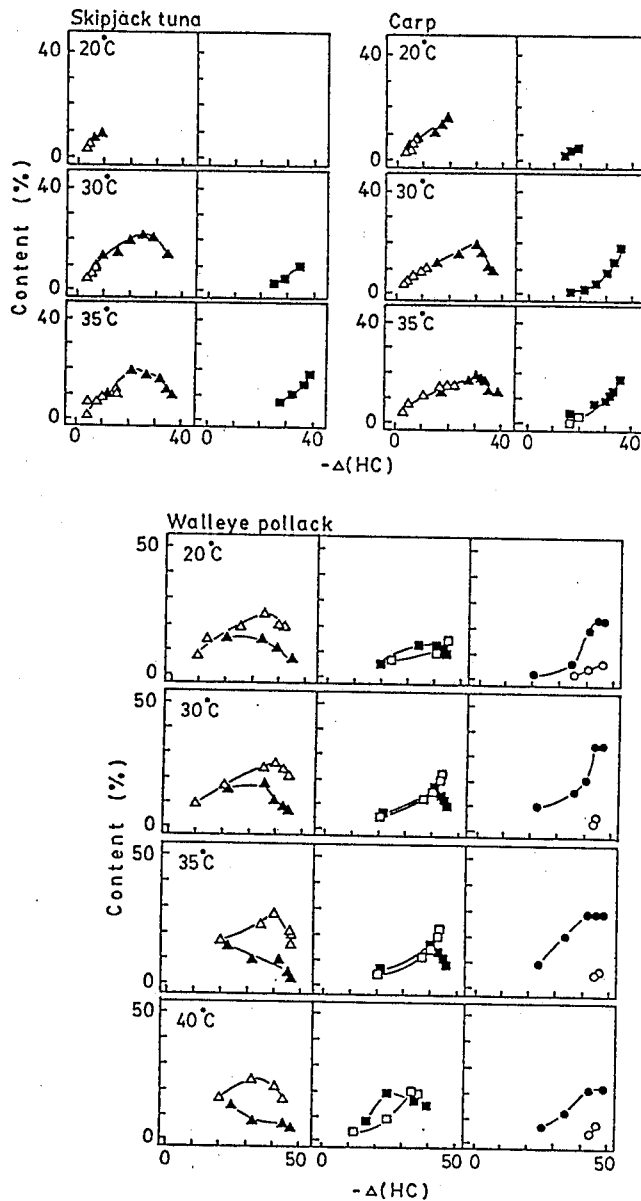


Fig. 4.11. Effect of CaCl_2 on change in contents of cross-linked myosin heavy chains of salt-ground meat during setting.

The salt-ground meats of skipjack tuna, carp and walleye pollack containing 0 or 5 mmol/kg of CaCl_2 were incubated at 20-40 °C for setting.

The contents of cross-linked myosin heavy chains in setting gel, expressed as HCn (Δ, \blacktriangle), HCn' (\square, \blacksquare), and HCn'' (\circ, \bullet) cited from Figs. 4.5, 4.6 and 4.7, were plotted against the content of decrease in myosin heavy chain ($-\Delta(\text{HC})$).

Open symbols: salt-ground meat without CaCl_2 .

Closed symbols: salt-ground meat with 5 mmol/kg of CaCl_2 .

肉糊を30°Cでゲル化させた際にその破断強度が最大値に達した時点のMfタンパク質サブユニット成分の組成とその破断強度および凹み値を選びだして、Fig. 4.12に比較した。これによると、いずれの魚類の場合も、CaCl₂濃度が10 mmol/kg以下の肉糊では、塩濃度の上昇に伴って坐りゲルの破断強度が増加し、それに対応して坐りゲル中のミオシンHC多量体の合計も増加することが示された。ただし、肉糊のCaCl₂濃度が10mmol/kgを越えると、その破断強度はやや低下するが、この場合にはミオシンHC多量体の合計と各成分の量比の変化はあまり大きくなかった。また、坐りゲルの凹み値は、カツオとコイの場合には破断強度と同じ傾向で増減したが、一方、スケトウダラの場合には、肉糊のCaCl₂濃度が5 mmol/kgまではあまり変わらないが、それ以上では減少して坐りゲルのしなやかさが失われる傾向を示した。すなわち、これらの結果は、CaCl₂によって坐りゲルを構成するミオシンHC多量体の量と組成が影響を受け、結果としてその物性が変化することを示している。なお、坐りゲルの破断強度が最も高い値を示しているスケトウダラの場合ではHCn^{''}が多く、これに次ぐコイの場合にはHCn[']が、そして相対的にゲル物性が脆弱なカツオではHCnが多い傾向がみられたが、このような魚種による特徴は、肉糊のCaCl₂濃度が上昇してもほとんど変化しなかった。

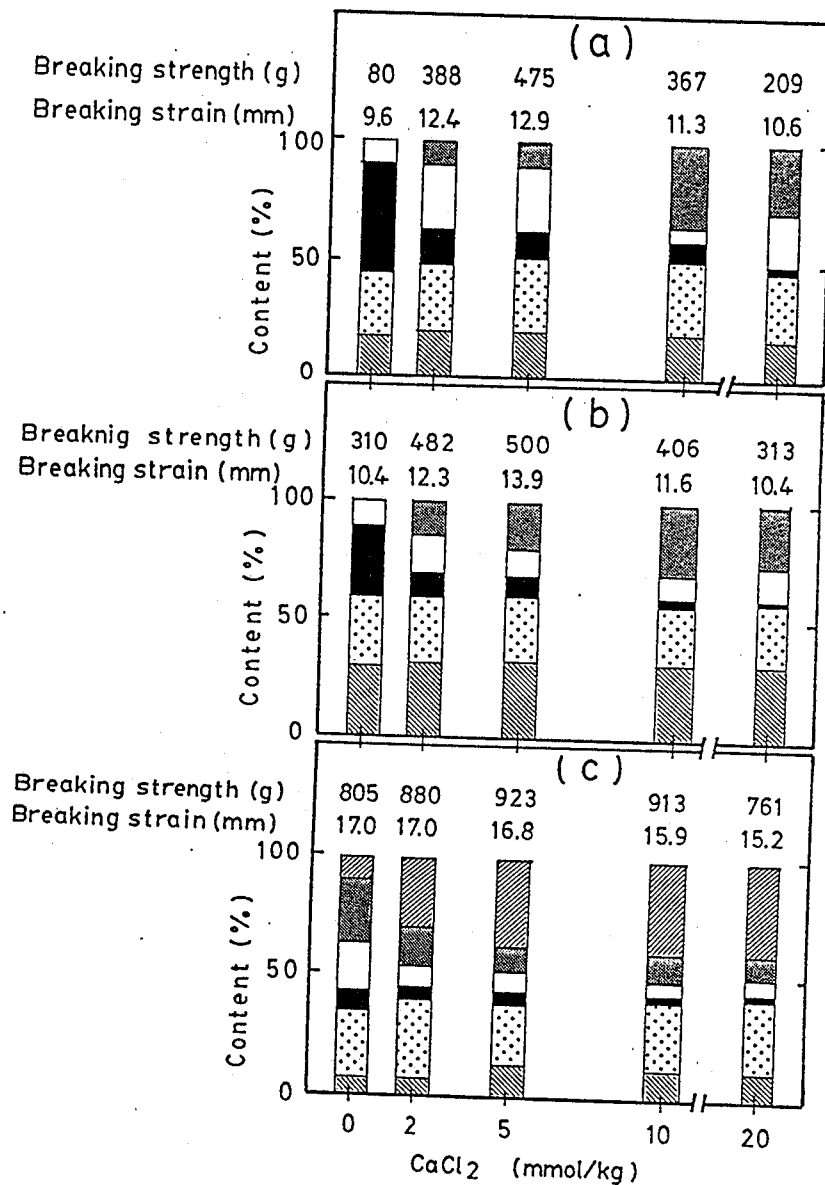


Fig. 4.12. Comparison of subunit composition of myofibrillar protein of setting gel formed at 30 °C and breaking strength also with breaking strain of the same gel.

The salt-ground meats of skipjack tuna (a), carp (b) and walleye pollack (c) were incubated at 30°C for 10 h (skipjack tuna, carp) or 1.5 h (walleye pollack) for setting. Data were quoted from Figs. 4.1, 4.5, 4.6 and 4.7. In Fig. 4.12, the breaking stress (mm) at breaking point of the same setting gels were also shown.

(▨): HCN'', (▩): HCN', (□): HCN,
 (■): HC, (⋯): Actin+tropomyosin,
 (▧): Sum of other components.

小考察

CaCl₂は魚類の肉糊のミオシンHCの多量化反応を加速し、坐りゲルの凹み値をやや減少させるものの、破断強度を著しく高める（すなわち、物性を改変する）ように働くことが確かめられた。それゆえ、CaCl₂を含む用水で晒しを行なってすり身を製造すると、そのCaCl₂はすり身の塩ずり後におけるゲル化に対しても影響を及ぼすことが明らかである。なお、熱安定性の高いMfタンパク質をもつ魚類の肉糊のゲル化反応ほど上記したCaCl₂の影響を大きく受ける傾向が示されたので、より多種にわたる魚類の肉糊についてCaCl₂の効果の大きさを詳細に調べる必要があると思われる。また、肉糊中のCaCl₂濃度が5~10 mmol/kgになると、検討を加えた3種の魚類の肉糊はいずれも強くゲル化するようになったが、CaCl₂の効果は肉糊を加熱する温度と時間にも依存することも明らかなので、実際には適切な坐り条件を慎重に選択することが重要である。

魚類の肉糊の「坐り」とは、ミオシンHCの多量化反応に伴うゲル化の現象であると理解されつつある。^{31), 71), 75), 76)} また、生成したミオシンHCの多量体の量^{76), 77)}や分子サイズの相違^{78), 79)}が坐りゲルの物性に寄与していることを示す報告もなされている。そこで、本研究では、ゲル化に及ぼすCaCl₂の影響を、ミオシンHCの多量化反応の変化と関連づけて検討した。その結果、いずれの魚種においても、ゲル化に伴う肉糊中のミオシンHCの減少速度とその破断強度の増加速度の間に強い正の相関関係が成立することが認められた。それゆえ、CaCl₂によって肉糊のゲル化反応が速められる理由は、ミオシンHCの多量化反応が加速された結果であると判断される。また、CaCl₂がミオシンHC多量体の生成量やその分子サイズに影響を及ぼすことも明らかとなった。すなわち、カツオやコイの肉糊のゲル化の場合は、CaCl₂濃度（10mmol/kg以下）の上昇に伴ってミオシンHCが顕著に減少してその多量体を生成し、その量と坐りゲルの破断強度の間に正の相関関係が認められた。一方、スケトウダラの肉

糊のゲル化の場合には、上の2魚種の場合とは異なり、ミオシンHCの減少と多量体の生成が速やかに起こり、ミオシンHCの減少量はCaCl₂濃度が異なってもほとんど変わらなかった。しかし、CaCl₂非共存下の場合に比べてより分子サイズの大きいミオシンHC多量体を多量に生成することが特徴であった。なお、CaCl₂を添加したスケトウダラの坐りゲルでは、凹み値が低下してそのしなやかさが失われる傾向が認められたが、これは、ミオシンHCの多量体が巨大化しすぎたことと関係があるように思われる。^{31), 33)}

CaCl₂がミオシンHCの多量化反応を促進する反応機構は未だ明らかではないが、(1)CaCl₂による肉糊のゲル化とミオシンHCの多量化反応に対する見かけの促進効果は、より安定なMfタンパク質から成る魚種(カツオ)の肉糊において顕著に認められた。しかし、そのような魚類の肉糊ほど本来はゲル化しにくい傾向がある^{54), 80), 81)}ため、CaCl₂共存下で形成される坐りゲルのゲル物性は依然として脆弱であり、大きな分子サイズのミオシンHC多量体の生成は起こらなかった。一方、(2)不安定なMfタンパク質から成るスケトウダラの肉糊では、CaCl₂による促進効果は見かけ上小さいが、本来、ゲル化しやすく、ミオシンHCの多量化反応が極めて速く進行するため、CaCl₂は巨大なミオシンHCの多量体を形成するように働いた。これらの事実から、CaCl₂によるミオシンHCの多量化反応の促進効果の魚種間における差は、魚種間でMfタンパク質の構造性にかかなりの相違があることを反映しているものと考えられる。また、(3)すり身の主成分はアクトミオシンであるが、多量化に参加するタンパク質成分はミオシンHCであってアクチンは強く関与しない事実、^{31), 91)} (4)魚類のアクトミオシンは高濃度のNaClの存在下、⁶⁶⁾さらには数mMオーダーの重合リン酸塩の共存下⁶⁷⁾においてアクチンとミオシン間の親和性が弱まる事実が知られているが、既に第2章と第3章で述べたように、(5)試験管中における魚類のMfタンパク質、特にMB(高塩濃度溶液)はCaCl₂によって大きな構造変化を受け、

(4)と類似の現象を呈するので、肉糊中のMfタンパク質についても同じ変化が起こっている可能性が考えられる。したがって、(1)から(5)に述べた事実を考慮すると、肉糊中のミオシンHCの多量化反応のCaCl₂による促進は、同魚肉のアクトミオシンに起こる大きな構造変化によって引き起こされるものと推定できる。

第5章 冷凍すり身の製造過程における魚肉タンパク質の収支に及ぼすCaCl₂の影響

第1章から第4章においては、CaCl₂が冷凍すり身の主成分であるMfタンパク質の諸性状に影響を及ぼす事実について述べた。そこで本章では、CaCl₂共存下で魚肉を水晒し処理して冷凍すり身を製造するまでに経る各過程で起こる魚肉タンパク質の収支と、それに及ぼす同塩の影響について検討した。また、冷凍すり身のゲル形成能とその凍結貯蔵性に対するCaCl₂の影響についても検討し、これらの結果から、冷凍すり身の製造におけるCa晒し法の効果を総括する試みを行なった。

5. 1 Ca晒し法を採用した冷凍すり身の製造過程における魚肉中の各種成分の変化

1) 肉質中へのCaの浸透

はじめに、ここで用いた冷凍すり身の製造方法の概略をFig. 5.1に示す。すなわち、新鮮なシログチとスケトウダラの落とし身を4倍量(v/w)のCaCl₂濃度の異なる晒し液(NaClでIを0.06に調整)中に懸濁し、10分間攪はんしてCa晒しを行なった。なお、晒し処理中の落とし身懸濁液のCaCl₂濃度は0, 5および15mM(終濃度)に調整した。次に、この魚肉懸濁液をナイロンスクリーンで濾過し、その中に含まれる肉質を捕集した後、これを再び同じCaCl₂濃度の晒し液中に懸濁してCa晒し処理を繰返した。続いてCa晒し後の肉質をナイロン製の濾過袋に入れ、平均圧力50kg/cm²で40分間加圧して水分を除去し、脱水肉を得た。この脱水肉に8.0%ソルビトールと0.2%重合リン酸塩を混合した後、コン

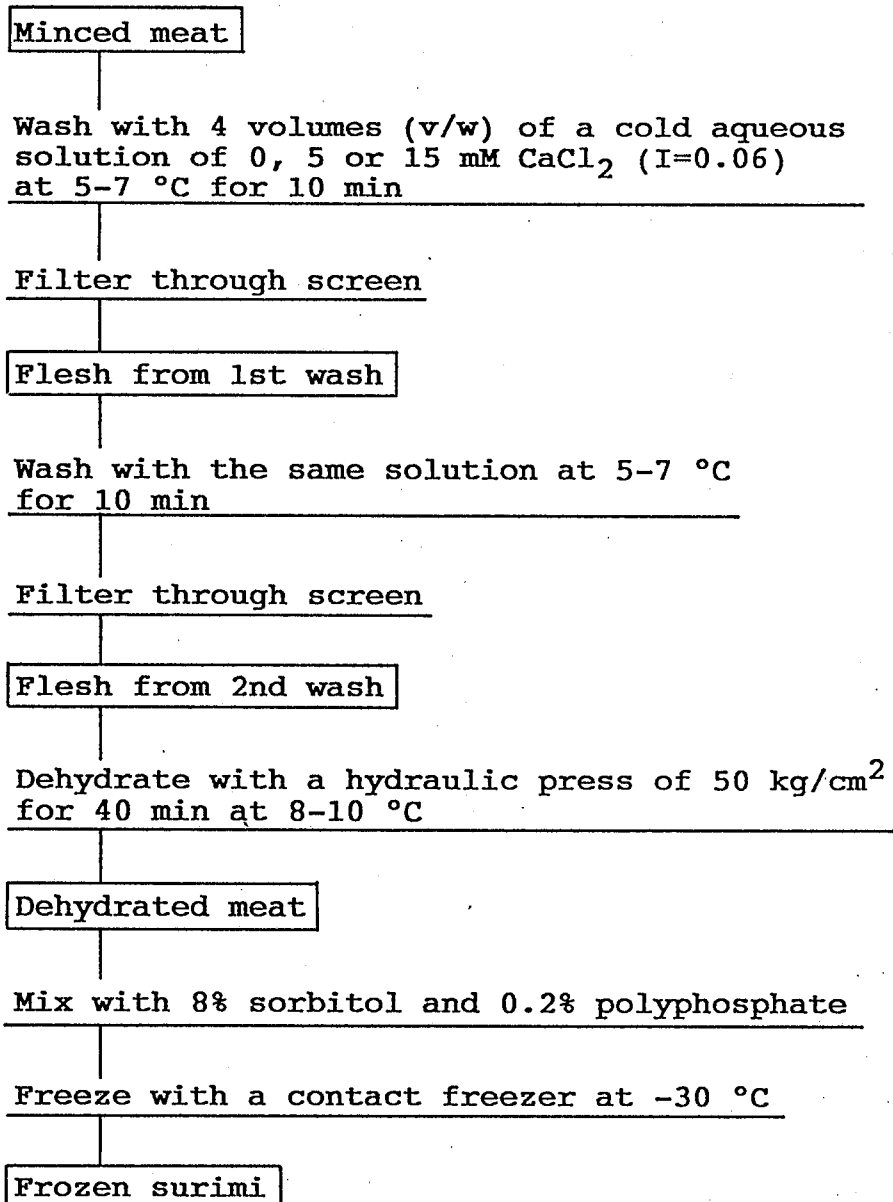


Fig. 5.1. Outline of procedure for processing frozen surimi.

タクトフリーザーを用いて急速凍結して冷凍すり身を製造し、実験に供するまで -30°C で貯蔵した。

Fig. 5.1に示した各処理段階から肉質の一部を分取し、それらのCa濃度（試料1kg湿重量あたりに含まれるミリモル数で表わした）を測定した。結果をFig. 5.2に示す。それによると、グチとスケトウダラの落とし身は、本来、それぞれ2.0および1.9mmol/kg（湿重量）のCaを含んでいるが、これを CaCl_2 を含まない水中で晒し処理した場合には、肉質中のCa濃度は徐々に減少し、製造した冷凍すり身のCa濃度は両魚類の場合ともわずかに0.2mmol/kg（湿重量）となった。一方、 CaCl_2 を含む液中で晒し処理を行なった場合には、肉質のCa濃度は速やかに上昇し、第1回目のCa晒し処理（10分間攪はん）を終えた肉質のCa濃度はほぼ最大値に達し、晒し液中のCa濃度に近似するようになった。すなわち、落とし身を5mMおよび15mM CaCl_2 を含む液中で晒し処理して製造した冷凍すり身に含まれるCa量は、シログチの場合でそれぞれ3.9mmol/kg（湿重量）および12.1mmol/kg（湿重量）、またスケトウダラの場合には、それぞれ4.8mmol/kg（湿重量）および12.9mmol/kg（湿重量）となった。なお、Ca晒し処理直後の肉質に比べて、冷凍すり身中のCa濃度がやや低下しているのは、ソルビトールおよび重合リン酸塩の混合に起因していることが計算によって確かめられた。以上の結果は、用水中のCaが肉質の吸水に伴って速やかにその中に浸透し、そのまま冷凍すり身標品中に移行して含まれることを示している。

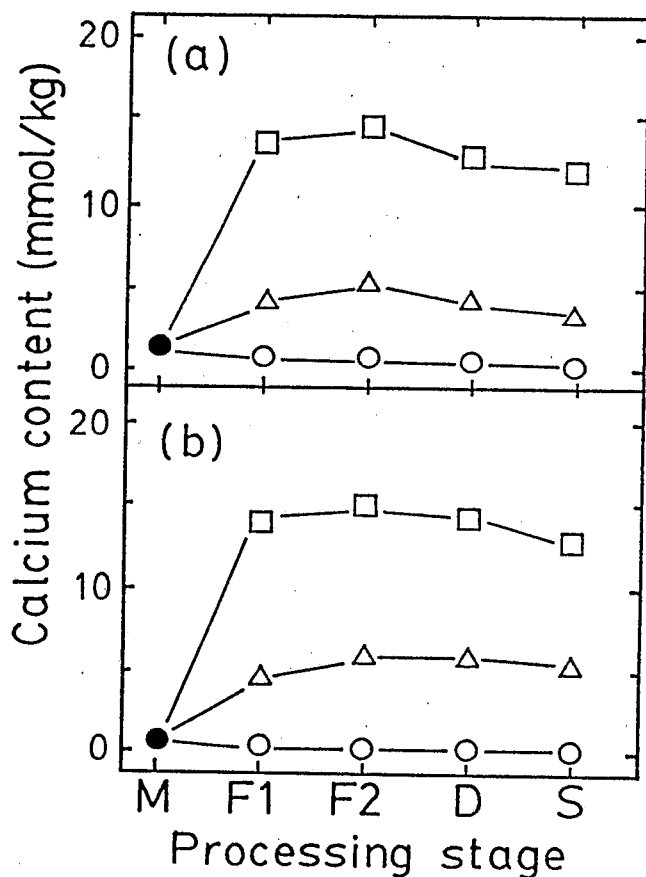


Fig. 5.2. Change in Ca content of minced meat during preparation of frozen surimi through CaCl_2 washing.

The minced meats of white croaker (a) and wall-eye pollack (b) were washed with four volumes (w/v) of a cold aqueous solution containing 0 (○), 5 (△) or 15 (□) mM CaCl_2 as in Fig. 5.1. Ca content of the minced meat from each stage of processing frozen surimi (in Fig. 5.1) was measured by an atomic absorption spectrophotometry and expressed as mmol/kg wet weight of specimen.

- M: Minced meat (●).
- F1: Flesh from 1st-washing.
- F2: Flesh from 2nd-washing.
- D: Dehydrated meat.
- S: Frozen surimi.

2) 肉質中の水分とMfタンパク質量の変化

冷凍すり身の製造過程における各処理段階から肉質の一部を分取して、その水分量、粗タンパク質およびMfタンパク質量を測定した。結果をまとめてFig. 5.3に示す。

まず、製造過程における肉質の水分量の変化を示したFig. 5.3 (a, b) によると、いずれの魚類の落とし身も晒しの工程において吸水して膨潤し、それらの水分は晒し処理を繰り返すことによってさらに増加した。晒し工程における肉質の膨潤はCaCl₂共存下の場合でも同様に観察されたが、肉質のCa濃度が上昇するとその水分の増加は抑制される傾向を示した。次に、晒し処理中に膨潤した肉質は脱水の工程においてその水分が減少するが、Ca晒しを行なった肉質は脱水され易く、その水分値は落とし身のそれとほぼ等しい値まで回復した。一方、CaCl₂を含まない水で晒し処理を行なった肉質からは水分の除去が困難となり、落とし身の水分値よりも高い値にとどまった。

製造過程における肉質の粗タンパク質とMfタンパク質量の変化をそれぞれFig. 5.3 (c, d) および (e, f) に示した。それによると、これらの成分の変化は水分の変化とは全く逆の傾向を示し、晒しの工程でいったん減少した後、脱水工程を経ることによって増加した。また、上記したいずれの工程においても、肉質のCa濃度が上昇するとその中に含まれる粗タンパク質とMfタンパク質量が増加する傾向を示した。すなわち、落とし身をCaCl₂を含まない水中で晒し処理して得た冷凍すり身中のMfタンパク質量は、シログチの場合で13.3g/100g (湿重量)、また、スケトウダラの場合では12.0g/100g (湿重量) であるのに対し、落とし身を5 mMおよび15mM CaCl₂を含む水中で晒し処理して製造した冷凍すり身中のMfタンパク質量は、シログチの場合でそれぞれ15.4g/100g (湿重量) および17.1g/100g (湿重量)、また、スケトウダラの場合には、それぞれ13.4g/100g (湿重量) および13.7g/100g (湿重量) となった。それゆえ、Ca晒し法

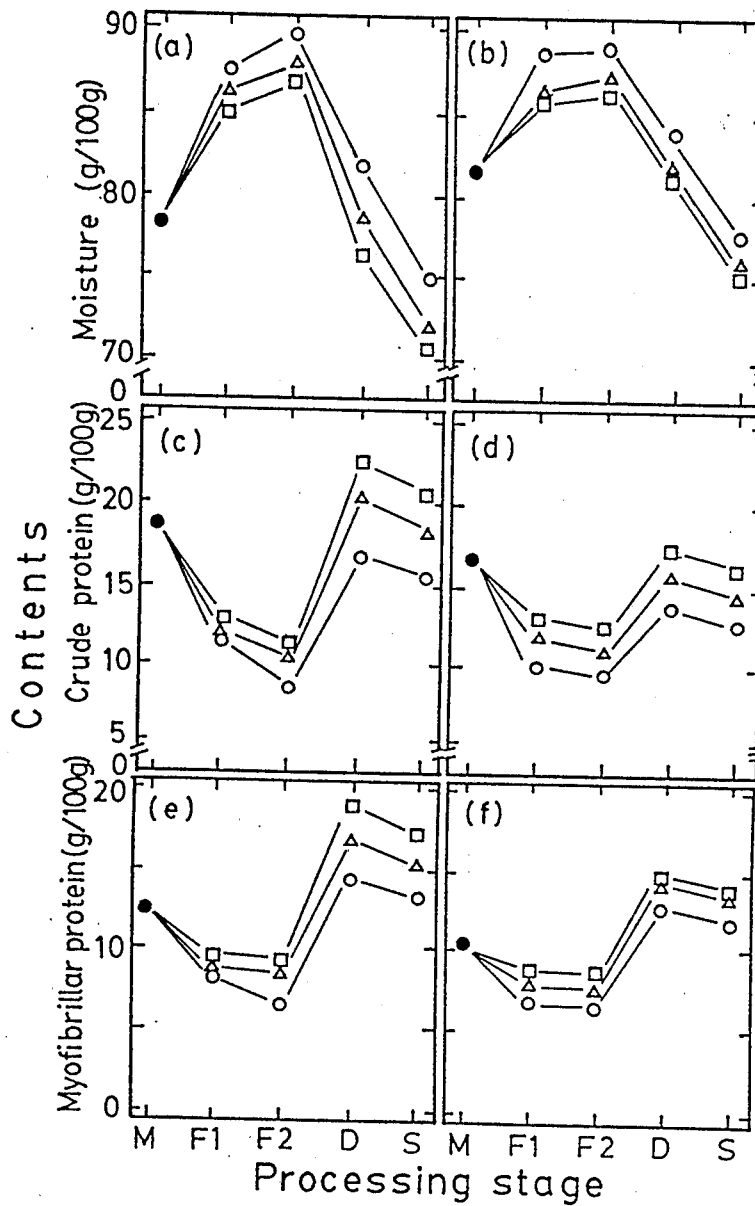


Fig. 5.3. Changes in moisture, crude protein and myofibrillar protein contents of minced meat during processing frozen surimi through CaCl_2 washing.

The minced meats (●) of white croaker (a, c, e) and walleye pollack (b, d, f) were washed with cold water containing 0 (○), 5 (△) or 15 (□) mM CaCl_2 as in Fig. 5.1. Moisture was determined by drying the meat at 105 °C for 18 h. Crude protein was calculated by multiplying the nitrogen content by a factor of 6.25. The nitrogen content was determined by the kjeldahl method. Myofibrillar protein was quantitatively prepared from the minced meat by the method of Kato et al.²⁵ The calcium content of minced meat was measured as in Fig. 5.2. Alphabetic codes used are the same as in Fig. 5.2.

を用いて冷凍すり身を製造すると、冷凍すり身中のMfタンパク質量 (%)が増加することが明らかである。なお、脱水肉に添加物を混合する工程においては肉質の水分、粗タンパク質、およびMfタンパク質の含量 (%)がいずれも減少したが、これはソルビトールと重合リン酸塩を添加した結果として起こったことが計算によって確かめられた。

3) 肉質からの水溶性タンパク質の除去とMfタンパク質の濃縮

冷凍すり身の製造過程において肉質中で起こるMfタンパク質量の増加は、主に、脂質や水溶性タンパク質等の成分が除去された結果として起こると考えられている。^{92), 93), 94)} 本研究で用いたシログチとスケトウダラの落とし身中の脂質量はそれぞれ2.1%および0.3%とわずかであったので、これらの量的な変化はMfタンパク質の濃縮にはそれほど影響を及ぼさないものと推定できる。そこで、冷凍すり身の製造過程で起こる肉質中の水溶性タンパク質量の変化について検討した。結果をFig. 5.4に示す。なお、肉質中の水溶性タンパク質量は粗タンパク質量とMfタンパク質量の差として計算によって求めた。また、Fig. 5.3で示したように、肉質中の水分量は試料間で大きく異なるので、各肉質中の水分量がそれぞれの魚類の落とし身中の水分値 (シログチの場合には78.1%, また、スケトウダラの場合には81.8%)と同じになった場合を仮定して、水溶性タンパク質量を補正してから比較した。Fig. 5.4によると、両魚類の肉質中の水溶性タンパク質量は晒し処理の進行に伴って徐々に減少する傾向を示した。なお、冷凍すり身中の水溶性タンパク質量が脱水肉のそれに比べて少ないのは、混合した添加物の量を考慮すると説明ができるので、水溶性タンパク質の変性に基づく不溶化などがその原因ではないと考えられる。そこで、製造過程における水溶性タンパク質の減少度を肉質からの除去率とみなすと、落とし身から脱水肉までの間の除去率は、シログチの場合では約50%, またスケトウダラの場合

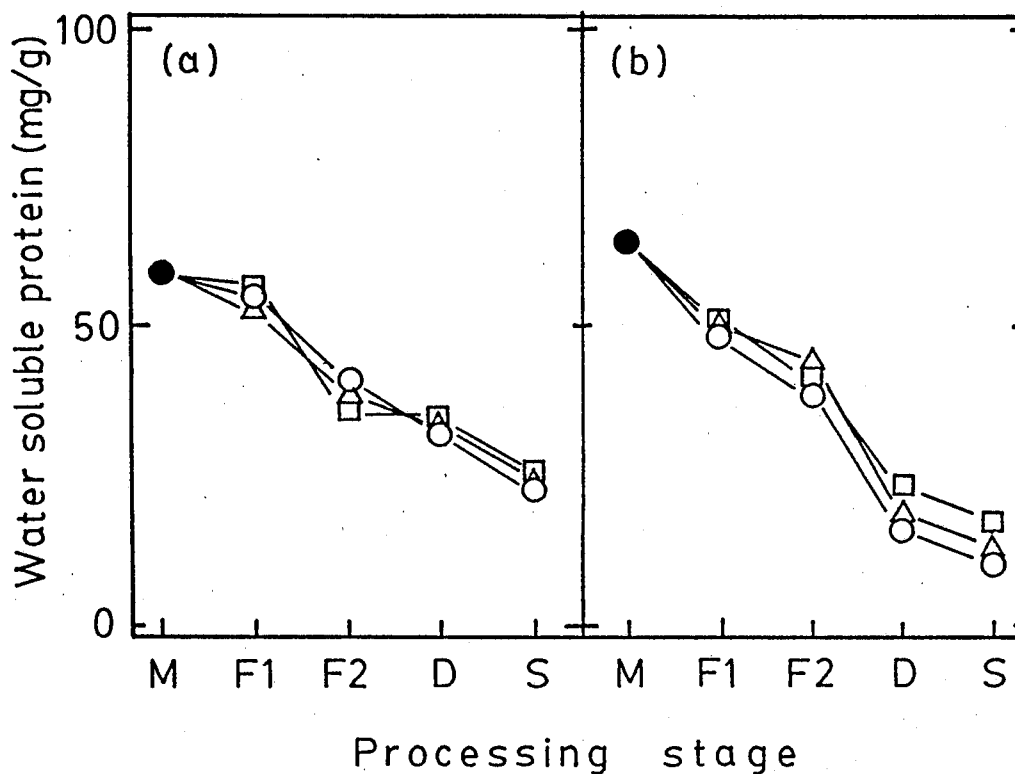


Fig. 5.4. Change in water soluble protein content of minced meat during processing frozen surimi through CaCl_2 washing.

The minced meats (●) of white croaker (a) and walleye pollack (b) were washed with cold water containing 0 (○), 5 (△) or 15 (□) mM CaCl_2 as in Fig. 5.1. The content of water soluble protein of minced meat at each stage (in Fig. 5.1) was calculated as the difference between the contents of crude protein and myofibrillar protein, and expressed by supposing the moisture in the specimen was regulated to 78.1% (for white croaker) or 81.8% (for walleye pollack). Alphabetic codes used are the same as in Fig. 5.2.

合では約60%となった。ただし、Ca晒し法を採用して肉質のCa濃度が上昇しても、晒し処理から脱水までの過程における水溶性タンパク質の除去率はほぼ同じ値であった。以上の結果は、肉質中のCa濃度が0~15mmol/kg(湿重量)の範囲では、冷凍すり身の製造過程における水溶性タンパク質の減少度に大きな差異がないことを示している。

次に、冷凍すり身の製造過程で起こるMfタンパク質の濃縮率について調べた。各製造過程における肉質中のMfタンパク質量の変化をFig. 5.5に示す。肉質中のMfタンパク質量は、先に示した水溶性タンパク質の場合と同様に、肉質の水分値が一定になるように補正して算出した。まず、両魚類の落とし身中のMfタンパク質量は、シログチの場合で12.7g/100g、またスケトウダラの場合で10.9g/100gであったが、晒し処理とそれに続く脱水工程においてその量が徐々に増加し、その結果として脱水肉中のMfタンパク質量は、シログチの場合では17.0g/100gに、またスケトウダラの場合では14.0g/100gに達した。なお、すり身中のMfタンパク質濃度は脱水肉のそれに比べ減少しているが、これは添加物の混合によって起こったことが計算によって確かめられた。それゆえ、落とし身の晒し処理から脱水にいたる一連の製造過程において、Mfタンパク質は約1.3倍に濃縮されたといえることができる。ただし、各処理段階における肉質中のMfタンパク質量をその絶対含量として比べれば、落とし身から冷凍すり身にいたる全過程にわたって変化せず、ほぼ一定の値を保持していた。さらに、Figs. 5.4と5.5のデータから各処理段階における肉質中の水溶性タンパク質とMfタンパク質量の合計値を算出したところ、全製造過程にわたってシログチの場合には約19g/100g、また、スケトウダラの場合には約17g/100gの一定値となった。これらの事実は、製造過程で起こる肉質中のMfタンパク質の濃縮は、ほとんど水溶性タンパク質量の除去に起因していることを示している。したがって、Ca晒し法を採用して冷凍すり身を製造する際に起こるMfタンパク質濃度の増加は、肉

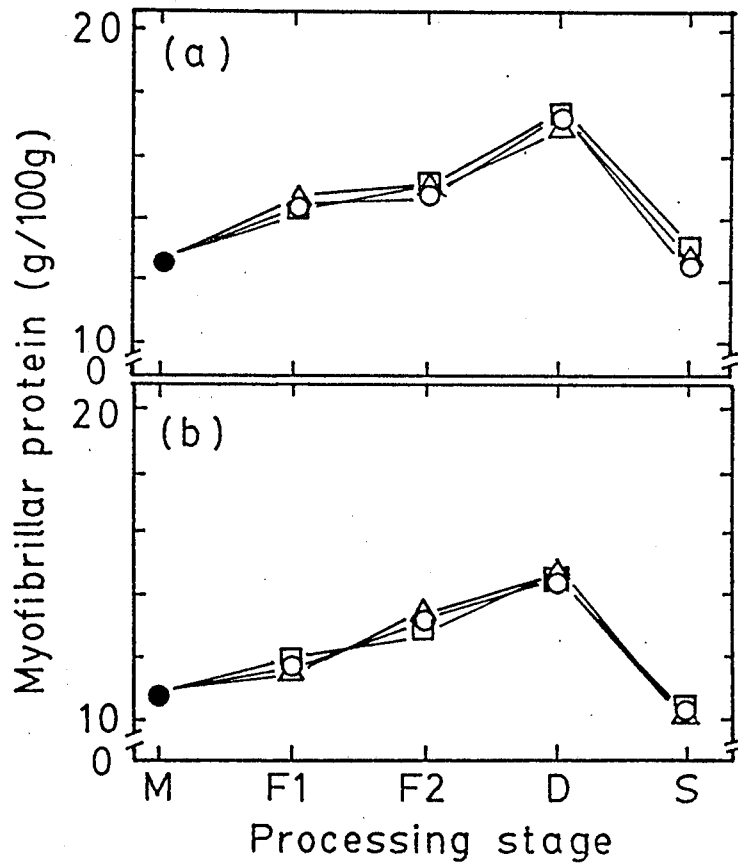


Fig. 5.5. Change in myofibrillar protein content of minced meat during processing frozen surimi through CaCl_2 washing.

The minced meats (●) of white croaker (a) and walleye pollack (b) were washed with cold water containing 0 (○), 5 (△) or 15 (□) mM CaCl_2 as in Fig. 5.1. Myofibrillar protein content of minced meat at each stage (in Fig. 5.1) was expressed by supposing the moisture in the specimen was regulated to 78.1% (for white croaker) or 81.8% (for walleye pollack). Alphabetic codes used are the same as in Fig. 5.2.

質中に浸透したCaによって肉質の保水能が低下し、脱水が促進されると同時に、水溶性タンパク質が流出したことによって起こる現象であるといえる。

4) Mfタンパク質の流出の抑制

先に川島ら⁹⁵⁾は、スケトウダラすり身の水晒し工程で微細化した肉質が流出し、塩溶性タンパク質に換算して約9%が失われた事実を報告している。製造過程におけるMfタンパク質の流出を抑制することは、冷凍すり身の収量を増加させるためにも極めて重要であり、実際のすり身工場では水晒しおよび脱水工程の廃水から肉質を回収する試みが行なわれている。^{96),97)}そこで、CaCl₂の添加が製造過程におけるMfタンパク質の流出量に及ぼす影響を調べた。すなわち、各処理段階における肉質中のMfタンパク質総量を求め、その量を比較した結果をFig. 5.6 (a, b) に示した。なお、同図中における肉質のMfタンパク質の総量は、落とし身のそれを100%とした相対値で表わした。

まず、Fig. 5.6 (a) に示したシログチの場合、CaCl₂を含まない水中で落とし身を晒し処理してすり身を製造する過程では、Mfタンパク質の総量は減少し、水晒し工程が終了した時点では落とし身中のその量の14%が失われていた。さらに、脱水の工程においてもわずかに減少を続け、落とし身中のその2%がさらに流出したことが示された。なお添加物の混合過程ではMfタンパク質の減少は見られなかった。一方、落とし身を5mMまたは15mM CaCl₂共存下で晒し処理した場合は、CaCl₂を含まない水中で晒し処理を行なった場合に比べ、各処理段階におけるMfタンパク質の減少の割合が小さくなる傾向を示し、全過程を通じてのMfタンパク質の減少率は10%以下になった。さらに、Fig. 5.6(b)に示したスケトウダラの場合においても、落とし身をCaCl₂共存下で晒し処理した場合は、CaCl₂を含まない水中で処理した場合に比べて、製造過程におけるMfタンパク質の減少度が小さくなることを確かめた。ただし、いずれの魚類の場合に

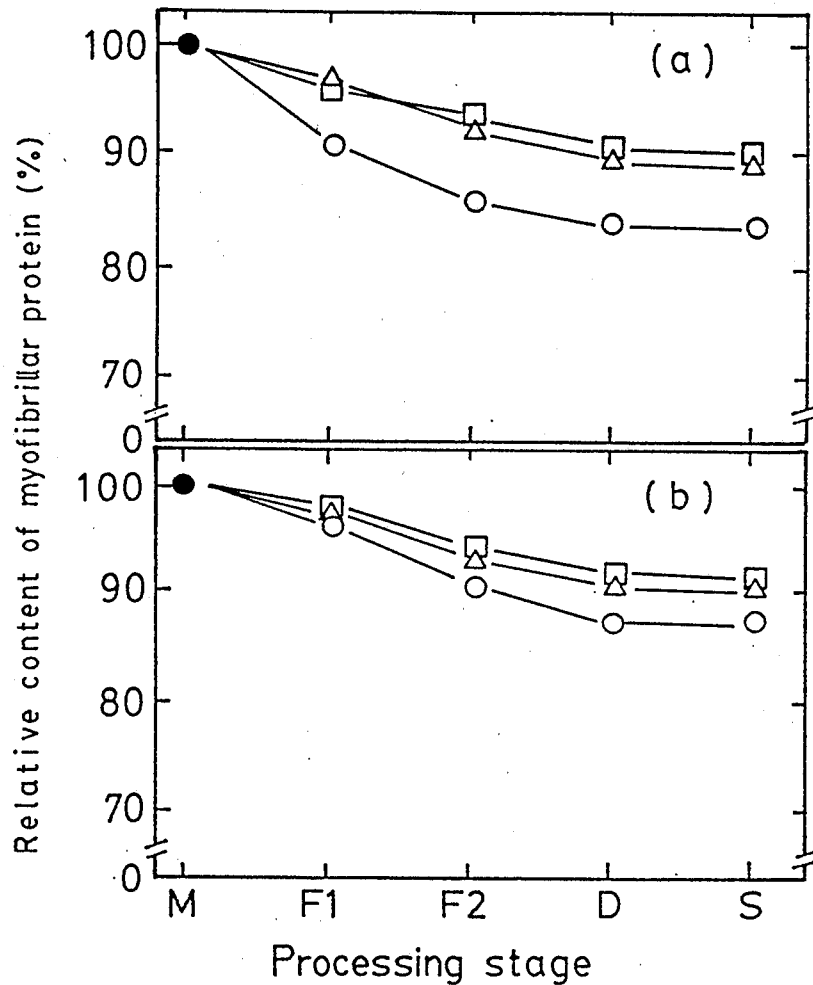


Fig. 5.6. Change in relative content of myofibrillar protein during processing frozen surimi through CaCl_2 washing.

The minced meats (●) of white croaker (a) and walleye pollack (b) were washed with cold water containing 0 (○), 5 (△) or 15 (□) mM CaCl_2 as in Fig. 5.1. The content of myofibrillar protein at each stage of processing frozen surimi was measured by the method of Kato et al.²⁵⁾ The relative content of myofibrillar protein at each stage was expressed by taking the content of myofibrillar protein of minced meat before washing as 100%. Alphabetic codes used are the same as in Fig. 5.2.

においても、 CaCl_2 が5 mMと15mMの場合の差は認められなかった。以上の結果は、冷凍すり身の製造過程中、特に晒しの工程で起こるMfタンパク質の流出が、 CaCl_2 の添加によって抑制されることを示している。その理由は現在のところ明らかではないが、おそらく、晒し工程における肉質の膨潤が CaCl_2 によって抑制された事実となんらかの関係がある^{98), 99)}と思われる。

5) Mf·Ca-ATPase活性の変化に及ぼす影響

各処理段階より分取した肉質から定量的にMfを調製し、²⁵⁾ そのMf·Ca-ATPase比活性と全活性を測定した。結果をまとめてFig. 5.7に示す。まず、肉質中に含まれるMf·Ca-ATPase比活性の変化を示したFig. 5.7 (a, b)によると、シログチとスケトウダラの落とし身を CaCl_2 を含まない水中で晒し処理した場合には、その製造過程のうち、特に脱水の工程においてMf·Ca-ATPase比活性がやや低下する傾向を示した。また、同図から製造の全過程にわたるMf·Ca-ATPase比活性の減少率（落とし身のそれを100%とした相対値で表わす）を算出したところ、その値は両魚類の場合とも約5%であり、低下は極めてわずかであった。これに対し、5mMおよび15mMの CaCl_2 を含む水中で落とし身を晒し処理した場合には、製造過程のうち特に脱水工程におけるMf·Ca-ATPase比活性の低下の度合いが大きくなった。そこで、Ca晒し法を採用した冷凍すり身の製造の全過程を通して起こるMf·Ca-ATPase比活性の減少率を比較したところ、5mM CaCl_2 共存下で晒し処理を行なった場合には6.5%（シログチ）および10.6%（スケトウダラ）、また15mM CaCl_2 共存下で晒し処理を行なった場合には、それぞれ9.5%（シログチ）および13.4%（スケトウダラ）となった。それゆえ、Ca晒しによって肉質のCa濃度が上昇すると、冷凍すり身の製造過程においてその中に含まれるMfタンパク質の変性が進行しやすくなることが明らかである。この傾向はグチとスケトウダラで同様に認められたが、スケトウダラの場合のほうがその度合い

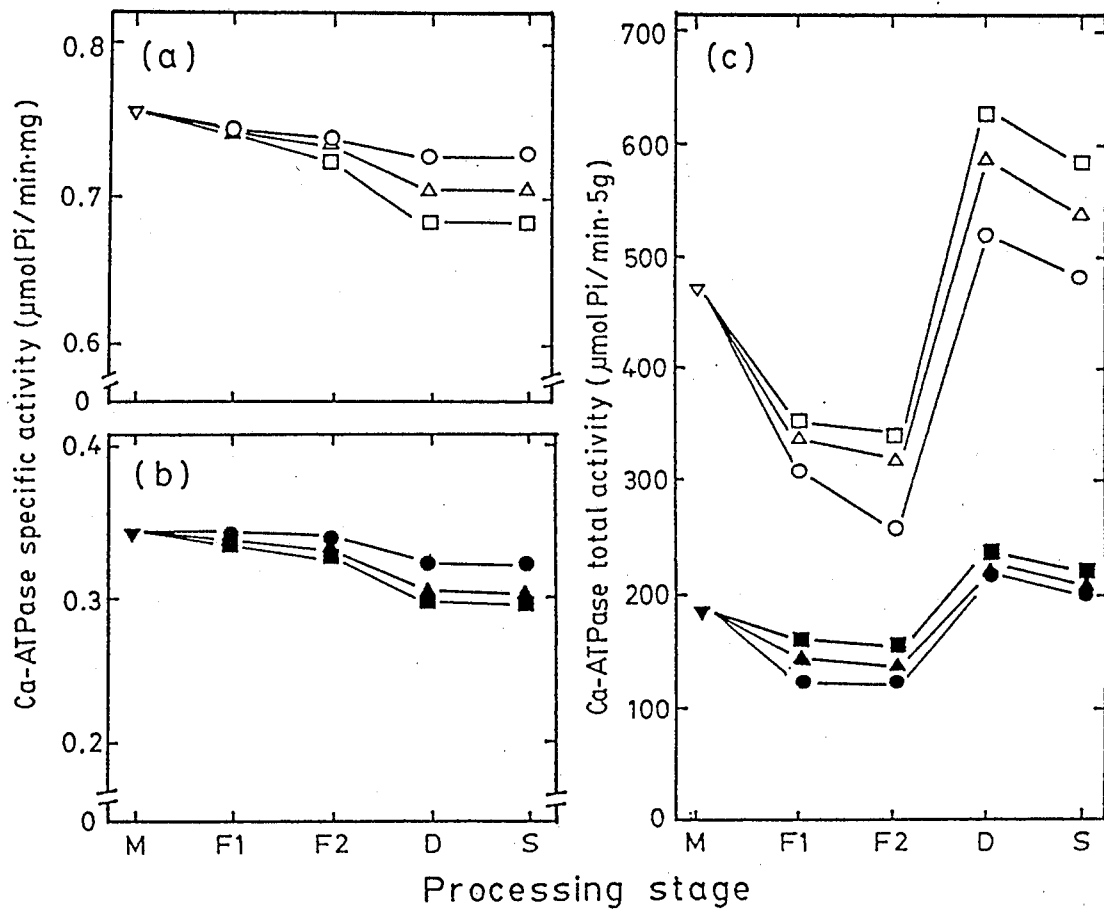


Fig. 5.7. Changes in myofibrillar Ca-ATPase activities of minced meat during processing frozen surimi through CaCl₂ washing.

The minced meats ($\nabla, \blacktriangledown$) of white croaker and walleye pollack were washed with cold water containing 0 (\circ, \bullet) 5 ($\triangle, \blacktriangle$) or 15 (\square, \blacksquare) mM CaCl₂ as in Fig. 5.1. The method for Ca-ATPase assay of myofibrils was described in Fig. 1.4. The myofibrillar Ca-ATPase specific activity (a: white croaker, b: walleye pollack) and its total activity (c) of minced meat were expressed as $\mu\text{mole Pi liberation/min mg}$ of myofibrillar protein and $\mu\text{mole Pi liberation/min 5g}$ of sample wet weight, respectively. Alphabetic codes used are the same as in Fig. 5.2.

Open symbols: white croaker.

Close symbols: walleye pollack.

がやや大きかった。既に、第2章と第3章において、 CaCl_2 共存下ではMfタンパク質が不安定化すること、特に、Mf·Ca-ATPaseの温度安定性の低い魚類の場合のほうがその度合いが大きい事実を述べたが、これらの結果は、Fig. 5.7の結果とよく対応している。したがって、Ca晒し処理を行なうと、肉質中に浸透したCaが同肉中のMfタンパク質を不安定化するため脱水工程においてわずかなCa-ATPaseの変性が起こることは避けられず、また、スケトウダラの場合のほうがその変性がやや大きく起こることは当然であるように推定される。なお、脱水肉に添加物を混合して凍結する過程では、Mf·Ca-ATPase比活性の低下はほとんど起こらなかったため、 CaCl_2 による肉質中のMfタンパク質の変性をできるだけ抑制するためには、水晒しから脱水までの工程をできるだけ低温に保ちながら速やかに進行させることが重要である。

次に、製造過程における肉質のMf·Ca-ATPase全活性の変化をFig. 5.7 (c)に示す。これによると、肉質のMf·Ca-ATPase全活性値は、その晒し処理に伴って減少したが、脱水工程では増加し、さらに添加物を混合する過程でやや減少した。この変化はいずれの魚類の場合も同様に観察されるが、Fig. 5.3 (e, f)に示した冷凍すり身の製造過程における肉質中のMfタンパク質の量的変化とよく類似していた。また、Ca晒し法を採用した場合、肉質のMf·Ca-ATPase全活性は肉質中のCa濃度の上昇に伴って高値となる傾向を示した。すなわち、落とし身を0, 5および15mM CaCl_2 共存下で晒し処理して製造した冷凍すり身のMf·Ca-ATPase全活性は、シログチの場合にはそれぞれ482, 540および581 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot 5\text{g}$ (すり身湿重量) に、また、スケトウダラの場合にはそれぞれ194, 204および205 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot 5\text{g}$ (すり身湿重量) となった。しかし、Fig. 5.5の場合と同様に、それぞれの肉質の水分を落とし身の水分値と同じになるように補正して、そのMf·Ca-ATPase全活性を比較したところ、Fig. 5.5に示したMfタンパク質の量的変化の場合とよく類似し、水晒しから脱水にいたる一連の過程で増加する

傾向を示した。この事実は、冷凍すり身の製造過程におけるMfタンパク質の濃縮の度合いが、肉質のCa濃度の上昇に伴って起こるMf・Ca-ATPase比活性の低下の度合いよりもかなり大きいことを示している。したがって、Ca晒し法によって、肉質中のMfタンパク質にはわずかながら質的な劣化が起こるものの、水晒しと脱水に伴って肉質中のMfタンパク質量が著しく増加する結果としてMf・Ca-ATPase全活性値が上昇するため、同法の採用が冷凍すり身の品質改善に有効に役立つといえることができる。

5. 2 Ca濃度の異なる冷凍すり身の凍結貯蔵性

1) Ca晒し法を採用して製造した冷凍すり身の凍結貯蔵中に起こる品質（ゲル形成能とMf・Ca-ATPase比活性）の変化

Fig. 5.1に示した方法で製造したCa濃度の異なるシログチとスケトウダラのすり身を -30°C で8ヵ月間貯蔵し、その間に起こるゲル形成能とMf・Ca-ATPase比活性の変化を検討した。冷凍すり身のゲル形成能は、これらの肉糊のタンパク質濃度を 120mg/g （湿重量）に調節した後、 30°C で10時間（シログチ）または2.5時間（スケトウダラ）保持し、続いて 90°C で30分間加熱して得た坐り-加熱ゲルの破断強度を測定することによって調べた。なお、結果は図示しないが、上記した加熱条件で肉糊の破断強度が最大値となることをあらかじめ確かめた。これらの冷凍すり身の凍結貯蔵に伴うゲル形成能の変化をFig. 5.8 (a, b) に、また、Mf・Ca-ATPase比活性の変化をFig. 5.8 (c, d) に示す。なお、Fig. 5.8 (a, b)において、Ca濃度の異なる冷凍すり身から得た坐り-加熱ゲルの破断強度が試料間で著しく異なっているが、これは後に詳述するようにCaが肉糊のゲル化反応に影響を及ぼした結果である。

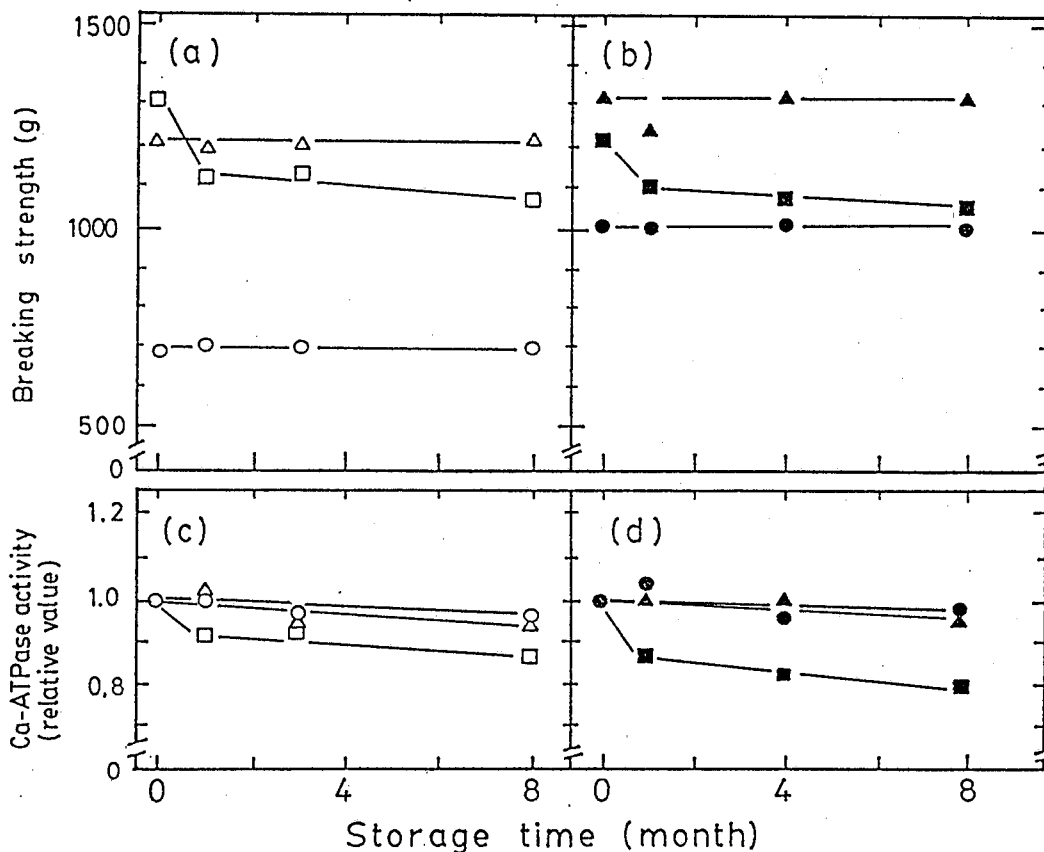


Fig. 5.8. Changes in gel-forming ability and myofibrillar Ca-ATPase activity of frozen surimi containing different amounts of calcium during frozen storage.

White croaker (a, c) and walleye pollack (b, d) frozen surimis containing different amounts of calcium were stored at -30°C for eight months. The calcium contents of white croaker and walleye pollack frozen surimis were found to be 0.2 (○), 3.9 (△) or 12.1 (□), and 0.2 (●), 4.8 (▲) or 12.9 (■) mmol/kg, respectively.

The heat-induced gel was prepared from the frozen surimi as follows: Frozen surimi was ground with 3 % NaCl and incubated to induce setting at 30°C for 10 h (White croaker) or for 2.5 h (walleye pollack), followed by heating at 90°C for 30 min. The breaking strength of the heat-induced gel (a, b) was measured as described in Fig. 4.1.

The measurement of myofibrillar Ca-ATPase activity of frozen surimi (c, d) was conducted by the same manner as in Fig. 5.7.

まず、Ca濃度が0.2および3.9mmol/kg（湿重量）のシログチの冷凍すり身では、凍結貯蔵中にゲル形成能の劣化は起こらず、また、それらのMf・Ca-ATPase比活性もほとんど変化しなかった。また、Ca濃度が0.2および4.8mmol/kg（湿重量）のスケトウダラの冷凍すり身の場合も、凍結貯蔵中にそのゲル形成能の劣化とMf・Ca-ATPase比活性の低下はみられず、貯蔵前のゲル形成能が長期にわたって維持されることを確かめた。一方、Ca濃度が12.1mmol/kg（湿重量）のシログチの冷凍すり身、および12.9mmol/kg（湿重量）のスケトウダラの冷凍すり身を凍結貯蔵したところ、それらのゲル形成能は1ヵ月間の貯蔵中に明らかに劣化し、また、これらの試料のMf・Ca-ATPase比活性も貯蔵初期に低下していることが見出された。それゆえ、これらの冷凍すり身のゲル形成能の劣化は、CaCl₂によるMfタンパク質の凍結変性の進行に起因していることが明らかである。また、その後の貯蔵期間中にも、ひき続いて冷凍すり身のゲル形成能の劣化とMf・Ca-ATPaseの低下が認められたが、貯蔵初期の変化に比べてそれらは極めて小さいものであった。それゆえ、10mmol/kgを越える高濃度のCaCl₂存在下で晒し処理を経て製造した冷凍すり身は、8.0%ソルビトール共存下においてもその凍結貯蔵性がかなり劣化する可能性を危惧しなければならない。

5. 3 Ca濃度の異なる冷凍すり身のゲル形成能とミオシンHC多量化反応の関係

1) Ca濃度の異なるすり身から調製した坐りゲルおよび坐り-加熱ゲルの物性

第4章においては、塩すり後の肉糊にCaCl₂を加えて、そのゲル形成能とミオシンHCの多量化反応に及ぼす同塩の影響について検討した。一方、既にFig. 5.2で示したように、落とし身の晒し用水中に含まれるCaは容易に肉質中に浸透

するため、Ca晒し法を採用して製造した冷凍すり身から得た肉糊の場合にも、そのゲル形成能が影響を受ける可能性が考えられる。そこで、Fig. 5.1に示した方法で製造したCa濃度の異なる冷凍すり身から作った肉糊を、30℃で保持して経時的に坐りゲルを、また、その一部をさらに90℃で30分間加熱して坐り-加熱ゲルをそれぞれ調製し、これらの破断強度と凹み値の変化を坐り時間に対してプロットした。シログチの場合をFig. 5.9に、またスケトウダラの場合をFig. 5.10に示す。なお、肉糊のタンパク質濃度は、そのCa濃度が変化しないように配慮しながら120mg/g（湿重量）に調整した。

まず、Fig. 5.9 (a) によると、Ca濃度が0.2mmol/kgのシログチの肉糊は極めてゲル化しにくく、破断強度の最大値が82gの脆弱な坐りゲルしか形成し得なかった。これに対し、Ca晒し法を採用して製造した3.9および12.1mmol/kgのCaを含むシログチすり身の肉糊は速やかにゲル化し、それらの破断強度は4時間後にそれぞれ675gおよび880gとなり、Ca濃度の高いほうがより高値に達した。一方、Fig. 5.9 (b) によると、いずれの坐りゲルの凹み値も2時間後に最大値に達したが、破断強度の場合とは異なり、Ca濃度が3.9mmol/kgの肉糊から得た坐りゲルのそれが三者の中で最も高い値を示していた。また、肉糊のCa濃度が12.1mmol/kgの坐りゲルがそれに次ぐ値であったが、この値はいったん増加した後やや低下する傾向を示した。次に、坐り-加熱ゲルの破断強度の変化を調べたFig. 5.9(c)によると、その最大値は坐りゲルの場合と同様、肉糊のCa濃度の上昇に伴ってより高い値に達した。ただし、坐りゲルの場合とは異なり、Ca濃度が0.2mmol/kgの肉糊はしなやかで強固な坐り-加熱ゲルを形成し、また、3.9および12.1mmol/kgのCaを含む肉糊から調製した坐り-加熱ゲルでは、それらの破断強度の間の差異はわずかであった。さらに、Fig. 5.9 (d) によると、坐り-加熱ゲルの凹み値の経時変化は破断強度のそれとは異なる挙動を示した。すなわち、Ca濃度が0.2 mmol/kgと3.9mmol/kgの肉糊から得た坐り-加熱ゲルで

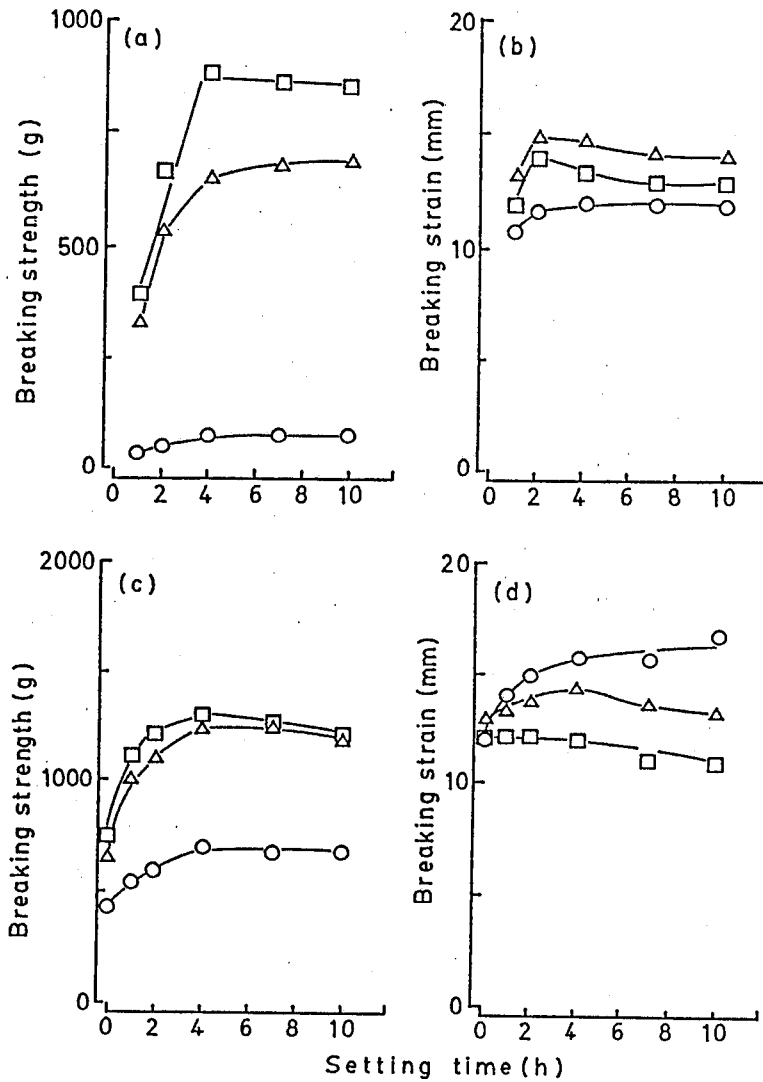


Fig. 5.9. Changes in breaking strength and breaking strain of salt-ground meats from white croaker frozen surimis containing different amounts of calcium during setting and followed by subsequent heating.

White croaker surimis containing 0.2 (○), 3.9 (△) and 12.1 (□) mmol/kg of calcium were ground with 3% NaCl at a protein concentration of 120 mg/g wet weight of surimi. The salt-ground meats thus obtained were incubated at 30 °C for different length of time (setting gel: a, b), followed by heating at 90 °C for 30 min (setting-heating gel: c, d). The breaking strength (a, c) and the breaking strain (b, d) of each gel were measured by the method described in Figs. 4.1 and 4.12.

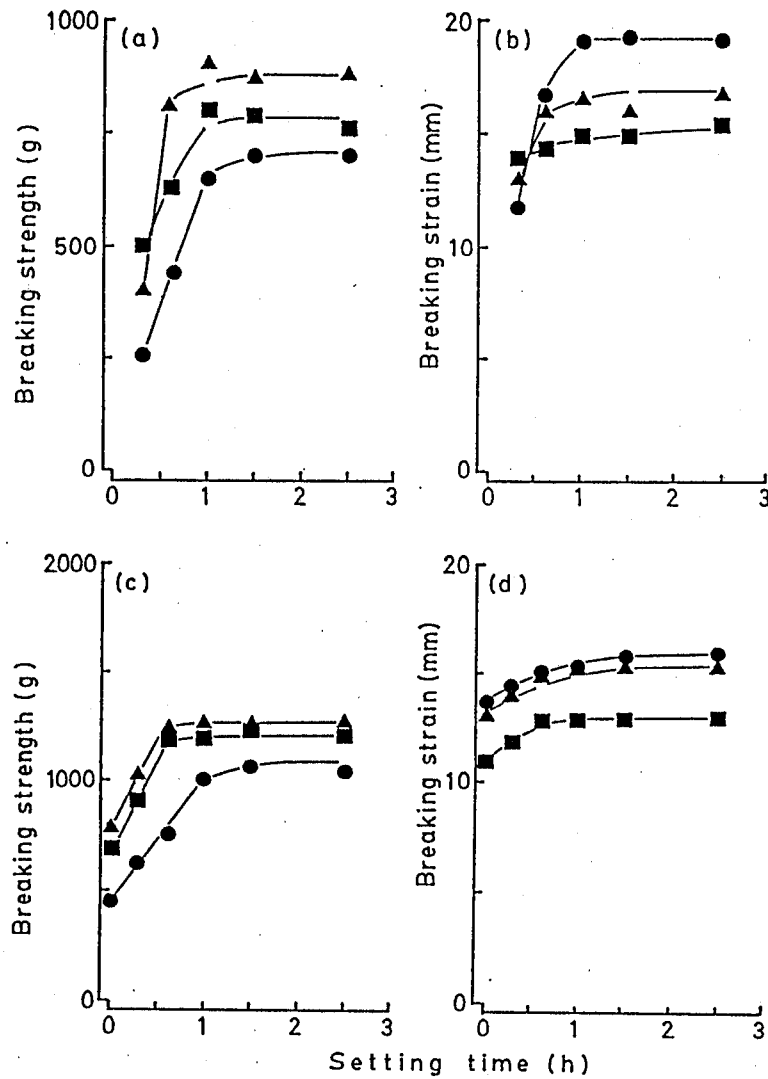


Fig. 5.10. Changes in breaking strength and breaking strain of salt-ground meats from walleye pollack surimis containing different amounts of calcium during setting and followed by subsequent heating.

Walleye pollack surimis containing 0.2 (●), 4.8 (▲) and 12.9 (■) mmol/kg of calcium were ground with 3% NaCl at a protein concentration of 120 mg/g wet weight of surimi. The methods for preparation of setting gel (a,b) and setting-heating gel (c,d) from salt-ground meats were the same as in Fig. 5.9. The breaking strength (a, c) and the breaking strain (b, d) of each gel were measured by the method described in Figs. 4.1 and 4.12.

は、坐りに伴って凹み値も上昇する傾向を示し、その値はCaを多く含むもののほうがより高値に達し、また、Ca濃度が12.1mmol/kgの肉糊から得た坐り-加熱ゲルの凹み値は最も低値であり、坐りに伴ってむしろわずかに低下する傾向を示した。

次に、Fig. 5.10 (a, c) に示したスケトウダラの肉糊の場合も、そのCa濃度が上昇するとゲル化が速やかに進行し、坐りゲルと坐り-加熱ゲルの破断強度がより高い値に達した。しかし、Ca濃度が0.2mmol/kgの肉糊でも、そのゲルの破断強度は高い値に達する点、また、4.8mmol/kgのCaを含む肉糊の破断強度が最も高値に達する点で、シログチの場合と異なっている。また、Fig. 5.10 (b, d) に示したスケトウダラの坐りゲルと坐り-加熱ゲルの凹み値は、いずれも約1時間後に最大値に達したが、その増加の度合いはむしろ肉糊のCa濃度の高い場合ほど小さく、12.9mmol/kgのCaを含む肉糊から得たゲルの凹み値が最も低値となった。

一方、これらのゲルのテクスチャーの変化を官能検査によって検討した。すなわち、Ca濃度の異なる両魚類の肉糊から得た坐り-加熱ゲル（坐り時間はシログチの場合で7時間、またスケトウダラの場合で1.5時間の試料）を厚さ5mmの試料片とし、ねり製品の物性を熟知しているパネリストによってそれらのテクスチャーを比較した。その結果、Ca濃度が12.1mmol/kg（シログチ）および12.9mmol/kg（スケトウダラ）の肉糊から調製した坐り-加熱ゲルのテクスチャーは、よりCa濃度の低い肉糊から調製したゲルのテクスチャーとは明らかに異なっており、咀嚼による破壊には強い抵抗を示すが、変形しにくく、しなやかさに欠ける（すなわち、魚肉ゲル特有のテクスチャーが損なわれている）という評価になった。

以上の結果は、落し身を適切な条件下でCa晒し処理することが、それから調製した冷凍すり身のもつゲル形成能の改良にも役立つことを示している。ただ

し、冷凍すり身（肉糊）のCa濃度が10mmol/kg以上に上昇すると、それから調製したゲルの物性が損なわれ、そのテクスチャーが変化することが明らかである。また、第4章でも述べたように、魚種によってゲル形成能の改良に必要なCa濃度が異なる可能性があるので、Ca晒し法の採用に当ってはその実施条件を冷凍すり身の製造過程における魚肉の脱水効果の向上とゲル物性の改良効果の両方の見地から慎重に検討しなければならない。

2) Ca濃度の異なるすり身から得た肉糊の坐り過程におけるミオシンHC多量化反応

Ca濃度の異なるシログチとスケトウダラのすり身から調製した坐りゲル (Figs. 5.9と5.10で物性を測定した同じ試料) をSDS-尿素混合液に溶解して可溶化率を測定した後、SDS-PAGE分析に供し、肉糊のゲル化に伴うMfタンパク質サブユニット成分の経時変化を調べた。結果をFig. 5.11に示す。なお、同図には各肉糊のCa濃度を併記した。これによると、Ca濃度の異なるいずれの肉糊においても、ゲル化に伴ってミオシンHCは経時的に減少し、その多量体と推定される成分⁸⁾の生成が起こったが、これらMfタンパク質成分の一連の変化はCa濃度の異なる各試料間で大きく異なっていた。まず、0.2mmol/kgのCaを含むシログチの肉糊の場合は、ゆるやかなミオシンHCの減少に伴ってその多量体であるHCnとHCn'が生成して増加し、ほぼ一定の値に達したが、HCn''は全く生成しなかった。これに対し、3.9および12.1mmol/kgのCaを含む肉糊の場合には、ミオシンHCはより速やかに減少し、その度合いも大きくなった。そして、HCn、続いてHCn'が最大値に達した後に減少すると、さらに遅れてHCn''が生成して著しく増加する傾向を示した。また、Ca濃度の高いほうがこれらの反応も速く進行した。一方、0.2mmol/kgのCaを含むスケトウダラの肉糊の場合には、ミオシンHCの減少に伴ってHCnとHCn'が出現し、やや遅れてHCn''の生成がみられた

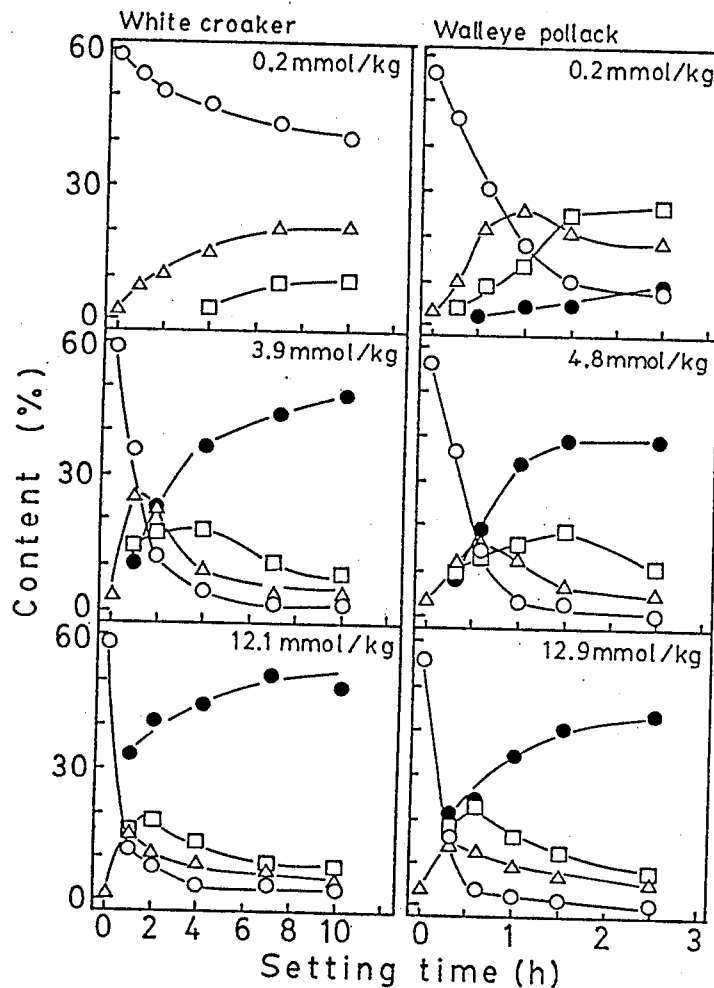


Fig. 5.11. Changes in subunit composition of myofibrillar protein of white croaker and walleye pollack salt-ground meats containing different amounts of calcium during setting.

As shown in Figs. 5.9 and 5.10, the salt-ground meats containing different amounts of calcium were incubated at 30 °C for setting. The contents of calcium were shown in the figure. The contents of subunits of myofibrillar protein of meat were measured as in Fig. 4.5.

- (○): myosin heavy chain (HC).
- (△): cross-linked myosin heavy chain, migrating into 5% polyacrylamide gel (HCn).
- (□): components corresponding to cross-linked myosin heavy chain, too large to migrate into 5% polyacrylamide gel (HCn').
- (●): components corresponding to cross-linked myosin heavy chain, too large to solubilize into SDS-urea buffer (HCn'').

が、そのミオシン HCの減少は同濃度のCaを含むシログチの場合に比べて極めて速やかに進行し、また、その変化の度合いも大きかった。ただし、同魚類の肉糊の場合も、Ca濃度の上昇に伴ってミオシンHCの減少がより速やかに進行するようになり、また、HCnとHCn'の生成に続いてHCn''の生成量が著しく増加するようになる傾向はシログチの場合と同様であった。なお、坐り-加熱ゲルについても本実験と同様の検討を行なったが、いずれの肉糊の場合もその坐りゲルと坐り-加熱ゲルのMfタンパク質サブユニット成分の間にはほとんど差異がみられなかったので、結果は省略した。

このように、Ca晒し法を採用して冷凍すり身を製造すると、Caを含有する標品が得られるため、その肉糊中のミオシンHC多量化反応が速やかに進行するようになることが確かめられたが、この結果は、肉糊に直接CaCl₂を添加してゲル化反応への影響を調べた第4章の結果と極めてよく類似するものであった。一方、調製したCa濃度の異なる肉糊中に含まれるCl量は試料間でほとんど差異がみられないので、上記したミオシンHCの多量化反応に起こる変化は、水晒しの過程で魚肉中に浸透したCaの働きによって起こったことが明らかである。

CaによるミオシンHCの多量化反応の促進効果とゲル形成能の増進効果との関係については、第4章において詳述したので、ここでは省略する。

総合考察

冷凍すり身の製造においては、水晒し処理によって膨潤した魚肉から水分を効果的に除去する事が必要であり、その手段として種々の無機塩を晒し液中に添加する試みが行なわれている。そこで、第1章において、Mfをモデルとして使用し、そのWHCに及ぼすCaCl₂の影響を定量的に検討したところ、MfのWHCはIで0.05から0.10に相当する同塩の存在下で最も低値となり、脱水が容易になることが示された。この傾向は、本論文中で検討した他の4種類の塩類 (SrCl₂, MgCl₂, NaCl, KCl) の場合にも同様に観察されたが、これらの塩類の中でもCaCl₂にはMfのWHCを大きく減少させる特別な作用があることが確かめられた。さらに、同塩がMfのWHCを低下させる効果の大きさは、系全体のIの影響を受けて複雑に変化する事実も明らかになった。ただし、CaCl₂がMfのWHCに及ぼす影響は数種の魚種間で全く同様であり、おそらく魚類のMfに共通にあてはまるもののように推定される。それゆえ、本章の実験で得た一連の知見は、冷凍すり身製造時の水晒しおよび脱水工程の制御に応用することが可能であると考えられる。

そこで、第5章の実験では、第1章で得た知見を参考にしてCa晒し法を適用する条件を選定した後、同法を用いてシログチとスケトウダラの魚肉から冷凍すり身を製造し、それらの製造過程における魚肉中の各種成分の挙動について検討した。その結果、CaCl₂共存下で落とし身を水晒し処理すると、その膨潤が抑制されるとともに、脱水工程では水分の除去が促進され、結果としてMfタンパク質濃度の高い冷凍すり身の製造が可能となることが確かめられた。また、水晒し処理から脱水に至る過程では、落とし身中の水溶性タンパク質量の減少とMfタンパク質量の増加が並行して起こることが明らかとなった。したがって、冷凍すり身の製造におけるCa晒し法の効果は、水晒しにおける水溶性タンパク

質の溶出を妨げることなく落とし身の保水能を制御し、その中に含まれるMfタンパク質の濃縮を行なわせることにあると考えられる。さらに、第5章で示すように、Ca晒し法を採用したシログチとスケトウダラの冷凍すり身の製造過程では、水晒しから脱水に至る過程でMf·Ca-ATPase活性が減少し、特に10mM以上の高濃度のCaCl₂存在下で水晒し処理を行なって製造した冷凍すり身では、そのゲル形成能もが凍結貯蔵中に著しく劣化することが明らかになった。これらの事実は、肉質中に浸透したCaによってMfタンパク質が不安定化するため、その変性が冷凍すり身の製造過程やその凍結貯蔵中にも進行するという同法の問題点を指摘している。また、第2章と第3章の実験によると、そのCa-ATPaseの温度安定性の劣る魚類のMfタンパク質ほどCaCl₂によって不安定化されやすいことが示されたが、実際に、シログチとスケトウダラの落とし身からCa晒し法を採用して冷凍すり身を製造したところ、その製造過程におけるMf·Ca-ATPaseの失活の度合いは、Mfタンパク質の温度安定性の低いスケトウダラの場合のほうが大きいことが確かめられた。したがって、Ca晒し法の採用にあたっては、対象とする魚類のMfタンパク質の安定性を考慮しながら、Ca濃度や脱水方法など、その適用条件を詳しく検討することが重要である。

冷凍すり身のゲル形成能はその品質を評価するうえで重要な性質のひとつであるが、第4章と第5章の実験によると、CaCl₂によって魚類の肉糊のゲル化反応が促進され、そのゲル物性が強化される事実が示された。それゆえ、適切な条件でCa晒し法を採用すると、その製造過程で肉質中に浸透するCaの働きによって、冷凍すり身のゲル形成能が改良される可能性が大きいことが予想された。実際に、Ca晒し法を採用して製造した冷凍すり身から調製した肉糊では、その坐り過程におけるミオシンHCの多量化反応が著しく速く進行し、ミオシンHC多量体の生成量が増加する事実を確かめることができた。魚肉の肉糊のゲル化の機構については、現在のところ、Mfタンパク質間のイオン結合、⁸²⁾ 水素

結合⁸²⁾ 疎水結合^{83),84),85)} ジスルフィド結合^{86),87)}等の関与や、酵素(トランスグルタミナーゼ^{88),89)}あるいは酵素によらない⁹⁰⁾分子間架橋形成の関与が推定されている。これらの結合が肉糊のゲル化に関与している度合いについてはいまだに不明であるが、近年の研究^{31),33)}によると、肉糊が形成するいわゆる坐りゲルの物性発現にはミオシンHCの多量化反応が強く関わっていることが明らかになってきた。本研究においても、種々のCa濃度の肉糊から調製した坐りゲルと坐り-加熱ゲルにおいて、その破断強度の増加とミオシンHC多量体の生成量の間には正の相関関係が成立することを認めた。それゆえ、Ca晒し法の採用に伴って起きる肉糊のゲル物性の向上は、肉糊中のCaがミオシンHCの多量化反応を促進した結果であることが明らかである。ただし、Ca濃度の異なる肉糊から調製した坐りゲルをさらに高温で加熱して坐り-加熱ゲルを調製するときには、後半の高温加熱によって破断強度が著しく増加するにもかかわらず、加熱処理の前後におけるゲル中のミオシンHC多量体の組成には顕著な差異が生じなかった。したがって、坐り-加熱ゲルの物性発現には、ミオシンHC間の多量化をひき起こす強い結合力の他に水素結合や疎水結合などのような弱い結合力が強く関わっていると推定できる。ただし、坐りゲルだけでなく坐り-加熱ゲルにおいても、その破断強度とミオシンHC多量体の生成量の間には高い正の相関関係が成立するので、坐りゲルの場合と同様、坐り-加熱ゲルの物性発現にもミオシンHC間の強い結合による多量体の形成が関わっている事実は疑う余地がない。なお、肉糊のCa濃度の上昇に伴う魚肉ゲルの物性の変化のすべてを、生成するミオシンHC多量体の量とその組成だけから説明することはできないが、上記したように魚類の肉糊のゲル化反応にはタンパク質分子間の各種の結合が関与しており、そのうえ、それら各種の結合に対するCaの影響力が相違している可能性を考慮すると、それはむしろ当然の結果であると思われる。

Yasuiら¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾は、先に哺乳類の骨格筋ミオシンの熱ゲル化反応に関する詳細な研究を行っており、その結果として、まず加熱によってミオシン頭部の熱凝集反応や尾部のヘリックス→コイル転移反応が起こり、それに伴ってミオシン分子間に結合（架橋）が生じ、不可逆的な三次元網状構造が形成されるというゲル化機構を提唱している。¹⁰⁵⁾ 一方、土屋⁸¹⁾とSanoら¹⁰⁶⁾は、魚類のミオシンゾルを加熱した際の動的粘弾性の変化を詳細に検討し、そのゲル化が哺乳類のミオシンの場合と類似の反応によって起こっていると推定している。これらの結果から、魚類肉糊の坐り過程で起こるミオシンHCの多量体形成が、哺乳類の場合¹⁰⁷⁾と同様に、ミオシン分子間の絡みあいによって起こっている可能性が推定されるが、⁷⁶⁾ 現在のところ直接的な証明はなされていない。また、ミオシンHCの多量化反応の様式に魚種間でいくつかの相違点がみいだされる理由についても解明されていない。さらに、近年になって、魚肉中のトランスグルタミナーゼによるミオシンHC間の架橋形成と肉糊の坐りの関連が推定されているが、^{88), 89)} 肉糊中の架橋形成が酵素作用によって起こることは実証されておらず、また、その分子間結合がゲル化に寄与していることも定量的には証明されていないため、今後の研究を待たねばならない。すなわち、肉糊のゲル化に関する反応の機構はまだ完全に解明されていないため、CaがミオシンHCの多量化反応を促進する機構も未だ確定できない。ただし、肉糊中のミオシンHCの多量化反応に及ぼすCaの影響はMf·Ca-ATPase活性がより安定で通常はゲル化しにくい魚種の肉糊において見かけ上ははっきりと認められる事実、一方、Mf·Ca-ATPaseの温度安定性の劣る魚種のMfタンパク質ほどCaCl₂によって不安定化されやすく、また、CaCl₂は肉糊中のアクチンとミオシンの変性をひきおこし、同時にそれらの親和性を弱めている可能性が示唆される事実などを考慮すると、CaによるミオシンHC多量化反応の促進とCaによる魚肉アクトミオシンの構造変化（すなわち、Ca-ATPaseの失活を伴うような構造変化）との間には

なんらかの関係があると推定される。

魚肉ゲルの物性はCaの影響を強く受けて変化し、一定の混合条件下ではゲル物性が改善されるが、一方、肉糊のCa濃度が10mmol/kgを越えると魚肉ゲルの物性の特徴であるしなやかさが失われ、そのテクスチャーが著しく変化することも明らかになった。したがって、Ca晒し法の採用に当っては、その実施の条件を、冷凍すり身の製造過程における落とし身の脱水を促進させる効果と、肉糊のゲル化に際してその物性を改良する効果などの全ての見地から選定しなければならない。さらに、冷凍すり身の凍結貯蔵性を低下させないような対策も講じておく必要がある。また、最近、ミオシンHCの多量化反応は、塩すり過程でも肉糊の温度が高くなる時に起こる事実が報じられている。¹⁰⁸⁾ それゆえ、Ca晒し法によって製造した冷凍すり身を使用する場合においては、その塩ずりの工程と当該肉糊を所定の形に成形する工程での温度管理を特に慎重に行わない、肉糊中のミオシンHCの多量化反応を阻止することもまた重要であると思われる。なお、第4章と第5章の実験結果から、肉糊のゲル化は、そのCa濃度が相違しても、なおかつ魚の種類および加熱の条件（温度と時間）に依存するところが大きい点に変わりはないので、Ca晒し法を採用して製造した冷凍すり身においても、その肉糊の適切なゲル化条件を慎重に選定することが必要である。また、冷凍すり身のゲル形成能はそのMf·Ca-ATPase全活性と強く関連し、一定の相関式で表わすことができるが、²⁵⁾ 本研究の結果によると、冷凍すり身のCa濃度が異なるとそのゲル形成能とMf·Ca-ATPase全活性の関係式も変動することが当然と考えられる。したがって、Ca晒し法を採用した冷凍すり身については両者の関係式をあらためて検討して、その品質管理に利用するべきであろう。

本論文の結果を総括すると、従来冷凍すり身の製造過程の水晒し工程で採用されてきたCa晒し法は、落とし身の保水能と冷凍すり身標品の凍結貯蔵性、およ

びそれを原料とした肉糊のゲル形成能などに対して同時に影響を及ぼし、製品の品質を制御する効果を示すという極めて複雑な加工技術であることが明らかである。全工程にわたって総合的な検討を行なったシログチとスケトウダラの場合を例とし、Ca晒し法が冷凍すり身の製造過程およびそれを用いたカマボコゲルの品質に及ぼす影響をTable 6.1にまとめたが、概括していえば、上記2種の魚類に関しては、肉質中のCa濃度が5mmol/kg以下になるような条件で水晒し処理を実施することが望ましいといえる。ただし、他の魚類からの冷凍すり身およびねり製品の製造にCa晒し法を適用する場合には、本研究で得た知見を参考にして、肉質中に浸透したCaによって起こるMfの保水能の減少度合いとMfタンパク質の不安定化の度合いを調べ、さらに、肉糊のゲル物性の変化と冷凍すり身の凍結貯蔵性に及ぼす影響を検討することが必要である。

Table 6.1. Material balance in processing steps of frozen surimi by adopting CaCl₂-washing of minced meat.

General quality of Frozen surimi	White croaker			Walleye pollack			Available effect	
	Washing medium	Control* ¹	5 mM CaCl ₂	15 mM CaCl ₂	Control* ¹	5 mM CaCl ₂		15 mM CaCl ₂
Materials								
Ca content (mmol/kg)		0.2	3.9	12.1	0.2	4.9	12.9	Promotion of dewatering myofibrils and concentration of Mf protein at washing and dehydrating processes.
Moisture content remained.(%)		100	96	94	100	97	94	
Water soluble protein elimination (%)		100	98	97	100	97	93	
Mf protein content remained (%)		100	117	130	100	109	114	
Mf-Ca-ATPase total activity remained (%)		100	112	120	100	105	106	
Mf-Ca-ATPase specific activity remained (%)		100	99	95	100	94	91	
Cryostability*²								
Gel-forming ability remained (%)		100	100	76	100	100	86	Regulation of freeze denaturation of Mf protein during frozen storage.
Mf-Ca-ATPase activity remained (%)		100	98	95	100	93	91	
Gel-forming ability*³								
Maximum of breaking strength (%) of setting-heating gel		100	174	182	100	120	114	Promotion of gel forma- tion and cross-linking reaction of myosin HC during setting of salt- ground meat.
Cross-linking ability of myosin HC*⁴								
Total amount of cross-linked myosin HCs produced (%)		100	192	240	100	110	112	

*¹ Washing in the absence of CaCl₂ added.

*² Storage at -30°C for 8 months.

*³ Setting at 30°C.

*⁴ Total amount of cross-linked myosin heavy chains (HCn+HCn'+HCn'') produced in the setting-heating gel,
whose breaking strength was at the maximum value.

謝 辞

本研究の遂行にあたっては、北海道大学水産学部生物化学講座 新井健一教授より終始有益なる御指導と御助言を賜りました。ここに記して深甚なる謝意を表します。また、本論文の作成にあたり有益な御助言と御校閲の労を賜わった同講座教授 関 伸夫博士，同助教授 今野久仁彦博士，食品製造学講座教授 信濃晴雄博士，同助教授 猪上徳雄博士，ならびに水産食品製造実習工場助教授 沼倉忠弘博士に御礼申し上げます。最後に、本研究の遂行に御配慮いただいた大洋漁業株式会社中央研究所所長 野中道夫博士，および同研究所関係者各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Fishery statistics-Commodities, FAO Yearbook 69, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1989, pp.18-35.
- 2) 平成2年度漁業白書, 農林統計協会, 東京, 1991, pp.40-42, p.126.
- 3) 1992年度水産年鑑, 水産社, 東京, 1992, pp.63-64.
- 4) 山本常治: 水産ねり製品技術研究会誌, 17, 49-61 (1991).
- 5) 新井健一, 山本常治: 冷凍すり身, 日本食品経済社, 東京, 1986, pp.171-223.
- 6) 志水 寛: 晒し肉の製造法, 特許公報, 昭40-21224(1965).
- 7) 藤井 豊: 多獲性赤身魚の有効利用, 水産学シリーズ35(日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp.83-87.
- 8) 野中道夫, 平田史生, 佐伯宏樹, 笹本泰彦: 日水誌, 55, 1575-1581(1989).
- 9) 柴田宣和, 尾崎弘忠: 日水誌, 49, 1097-1101(1983).
- 10) 柴田宣和, 尾崎弘忠, 藤井 豊: 日水誌, 49, 1721-1729(1983).
- 11) 大泉 徹, 中村将俊, 橋本昭彦, 新井健一: 日水誌, 49, 967-974(1983).
- 12) 志水 寛, 西岡不二男: 多獲性赤身魚の高度利用技術開発に関する総合報告書, 水産庁研究部, 1982, pp.170-177.
- 13) 是枝 登: 昭和56~57年度未利用魚食用化技術開発研究成果の概要, 水産庁研究部, 1983, pp.185-193.
- 14) 猪上徳雄, 吉岡孝正, 秋場 稔: 昭和54年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.158, 1979.
- 15) 是枝 登: 水産ねり製品技術研究会誌, 6, 446-450 (1981).
- 16) 是枝 登: 水産ねり製品技術研究会誌, 9, 118-124 (1983).
- 17) 西 紘平: 水産ねり製品技術研究会誌, 9, 125-130 (1983).

- 18) 加藤 登, 内山 均, 塚本志郎, 新井健一: 日水誌, 43, 857-867(1977).
- 19) 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, 40, 1187-1194(1974).
- 20) J.A. Spudich and J. Watt: J. Biol. Chem., 246, 4866-4871(1970).
- 21) A.G. Gornall, C.J. Bardwill, and M.M. David: J. Biol. Chem., 177, 751-766(1949).
- 22) 関 伸夫, 松原 久, 柳沢大貴, 新井健一: 日水誌, 51, 793-798(1985).
- 23) G. Gomori: J. Lab. Clin. Med., 27, 955-960(1942).
- 24) 新井健一, 川村久美子, 林千恵子: 日水誌, 39, 1077-1085(1983).
- 25) 加藤 登, 野崎 恒, 小松一宮, 新井健一: 日水誌, 45, 1027-1032(1979).
- 26) 科学技術庁資源調査会: 三訂補日本食品標準成分表, 1980, pp.11-12.
- 27) E.G. Bligh and W.J. Dyer: Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917 (1959).
- 28) The Association of Official Analytical Chemists: Official methods of Analysis of the AOAC, 12 edition, Washington D.C., 1975, p.22.
- 29) 福田 裕, 柞木田善治, 新井健一: 日水誌, 50, 845-852(1984).
- 30) 尾藤方道: 東海区水研報, No.103, 65-72(1980).
- 31) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一: 日水誌, 51, 1559-1565(1985).
- 32) U.K. Laemmli: Nature, 227, 680-685(1970).
- 33) 沼倉忠弘, 溝口 竜, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, 55, 1083-1090(1989).
- 34) 西本真一郎, 橋本昭彦, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, 54, 1227-1235 (1988).
- 35) 田元 馨: New Food Industry, 13(12), 61-69(1971).
- 36) 川島孝省: 水産ねり製品技術研究会誌, 6, 341-352(1981).

- 37) 川島孝省, 大堀忠志: 北水誌月報, 31(4), 13-22(1974).
- 38) 川島孝省, 大島浩, 橋本健司: 北水誌月報, 24(11), 50-58(1967).
- 39) 岡村一弘: 日水誌, 26, 60-65(1960).
- 40) 三宅正人: 水産ねり製品ハンドブック, 食品資材研究会, 東京, 1959, pp.225-227.
- 41) R.M. Love: J. Sci. Food Agric., 6, 30-37(1955).
- 42) 岡田 稔, 多田節子: 日水誌, 19, 178-184(1953).
- 43) 岡村一弘, 松田敏生, 横山里雄: 日水誌, 24, 826-832(1959).
- 44) R. Hamm: Muscle as food (ed. P.J. Bechtel), Academic press, London, 1986, p.135.
- 45) 岡田 稔: 魚肉ねり製品 (岡田稔, 衣巻豊輔, 横関源延編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp.196-197.
- 46) J.M. Regenstein, C.A. Jauregui, and R.C. Baker: J. Food Biochem., 8, 123-131(1984).
- 47) 野中道夫, 平田史生, 佐伯宏樹, 中川敬一, 大泉 徹, 川崎賢一: 日水誌, 56, 1667-1672(1990).
- 48) 橋本昭彦, 新井健一: 日水誌, 44, 1389-1393(1978).
- 49) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一: 日水誌, 48, 671-684(1982).
- 50) 加藤 登: 水産食品のテクスチャー, 水産学シリーズ67 (丹羽栄二編), 恒星社厚生閣, 東京, 1987, pp.77-86.
- 51) 橋本昭彦, 加藤 登, 野崎 亘, 新井健一: 日水誌, 51, 847-853(1985).
- 52) 橋本昭彦: 水産ねり製品技術研究会誌: 11, 451-459(1986).
- 53) 八木 浩, 坂本正博, 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, 51, 667-675(1985).
- 54) 加藤 登, 橋本昭彦, 野崎 恒, 新井健一: 日水誌, 50, 2103-2108(1984).

- 55) T. Sano, S.F. Noguchi, T. Tsuchiya, and J.J. Matsumoto: *J. Food Sci.*, **53**, 924-928(1988).
- 56) 志水 寛, 町田 律, 竹並誠一: *日水誌*, **47**, 95-104(1981).
- 57) 丸山工作: *筋収縮の制御*, 岩波書店, 東京, 1976, pp.50-51.
- 58) T. Yasui, H. Kawakami, and F. Morita: *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 225-233 (1968).
- 59) 室塚剛志, 新井健一: *日水誌*, **42**, 65-70(1976).
- 60) 内山 均, 加藤 登, 工藤雄司, 新井健一: *日水誌*, **44**, 491-497(1978).
- 61) 大泉 徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一: *日水誌*, **47**, 901-908(1981).
- 62) 大泉 徹, 中村将俊, 橋本昭彦, 新井健一: *日水誌*, **49**, 967-974(1983).
- 63) 若目田 篤, 新井健一: *日水誌*, **51**, 497-502(1985).
- 64) 西本真一郎, 新井健一: *日水誌*, **54**, 1429-1436(1988).
- 65) S. Ebashi and A. Kodama: *J. Biochem.*, **58**, 107-108(1965).
- 66) 若目田 篤, 新井健一: *日水誌*, **50**, 635-643(1984).
- 67) 八木 浩, 新井健一: *日水誌*, **52**, 1573-1580(1986).
- 68) 橋本昭彦: *魚肉筋肉タンパク質の温度およびpH依存性に見られる特性に関する研究*, 昭和62年度北海道大学学位論文, pp. 63-69, (1987).
- 69) R. Nakayama: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1703-1707(1974).
- 70) 宇野 勉, 中村全良: *北水研報*, No.18, 45-53(1958).
- 71) 沼倉忠弘, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫: *日水誌*, **56**, 2035-2043(1990).
- 72) 岡田 稔: *新版魚肉ねり製品* (岡田 稔, 衣巻豊輔, 横関源延編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp.205-208.
- 73) 丹羽栄二: *魚肉ねり製品*, 水産学シリーズ50 (志水 寛編), 恒星社厚生閣, 東京, 1984, pp.31-33.

- 74) 佐伯宏樹, 尾崎弘忠, 野中道夫, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, **54**, 259-264(1988).
- 75) 李 南赫, 関 伸夫, 加藤 登, 中川則和, 照井正三郎, 新井健一: 日水誌, **56**, 329-336(1990).
- 76) 李 南赫, 関 伸夫, 加藤 登, 中川則和, 照井正三郎, 新井健一: 日水誌, **56**, 2093-2101(1990).
- 77) 船津保浩, 新井健一: 日水誌, **57**, 1973-1980(1991).
- 78) 松川雅仁, 新井健一: 平成2年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p.221, (1990).
- 79) 裕 真範・松川雅仁・佐伯宏樹・平田史生・野中道夫: 平成3年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp.179, (1991).
- 80) 加藤 登, 橋本昭彦, 野崎 恒, 丸山 勉, 新井健一: 日水誌, **52**, 875-880(1986).
- 81) 土屋隆英: 水産加工とタンパク質の変性制御, 水産学シリーズ84 (新井健一編), 恒星社厚生閣, 東京, 1991, pp.25-33.
- 82) E. Niwa, Y. Matsubara, and I. Hamada: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **48**, 667-670(1982).
- 83) 丹羽栄二: 日水誌, **41**, 907-910(1975).
- 84) E. Niwa, K. Sato, R. Suzuki, T. Nakayama, and I. Hamada: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **47**, 817-821(1981).
- 85) E. Niwa, R. Suzuki, and I. Hamada: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **47**, 1389(1981).
- 86) 伊藤慶明, 吉中禮明, 池田静徳: 日水誌, **46**, 617-620(1980).
- 87) 伊藤慶明, 吉中禮明, 池田静徳: 日水誌, **46**, 621-624(1980).

- 88) I. Kimura, M. Sugimoto, K. Toyoda, N. Seki, K. Arai, and T. Fujita :
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **57**, 1389-1396(1991).
- 89) 関 伸夫, 宇野秀樹, 李 南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一 :
日水誌, **56**, 125-132(1990).
- 90) R. Miller, J. Spinelli, and J.K. Babbit : J. Food Sci., **48**,
296-297(1983).
- 91) 佐伯宏樹, 尾崎弘忠, 野中道夫, 関 伸夫, 新井健一 : 日水誌, **54**,
259-264(1988).
- 92) 新井健一 : 冷凍すり身 (新井健一, 山本常治編), 日本食品経済社, 東京,
1986, pp.81-87.
- 93) 大泉 徹, 川崎賢一, 本江 薫, 野中道夫, 平田史生, 佐伯宏樹, 中村誠 :
日水誌, **56**, 1619-1626(1990).
- 94) 元広輝重, 沼倉忠弘 : 冷凍, **49**, 953-957(1974).
- 95) 川島孝省, 西田 孟 : 北水試月報, 36(6), 112-121(1979).
- 96) 川島孝省, 橋本健司, 大堀忠志, 川合義春, 猪川喜久夫 : 北水試月報,
32(6), 8-25(1975).
- 97) S.C. Sonu : Surimi, U.S. Dept. Commerce, National Marine Fisheries
Service, Washington D.C., 1986, pp.85-89.
- 98) 渡辺尚彦, 高井陸雄, 関川明彦, 長谷川 浩 : 日水誌, **48**, 869-871(1982).
- 99) K.S. Yoon, C.M. Lee, and L.A. Hufnagel : J. Food Sci., **56**, 294-298
(1991).
- 100) K. Samejima, K. Takahashi, and T. Yasui : Agric. Biol. Chem., **40**,
2455-2464(1976).
- 101) K. Samejima, M. Ishioroshi, and T. Yasui : J. Food Sci., **46**, 1412-
1418(1981).

- 102) T. Yasui, M. Ishioroshi, and K. Samejima: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1049-1059(1982).
- 103) K. Samejima, H. Yamauchi, A. Asghar, and T. Yasui: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2225-2232(1984).
- 104) K. Samejima, K. Kuwayama, K. Yamamoto, A. Asghar, and T. Yasui: *J. Food Sci.*, **54**, 1158-1162(1989).
- 105) 安井 勉, 鮫島邦彦: 筋肉タンパク質の加熱ゲル形成, 食品タンパク質の科学 (山内文男編), 食品資材研究会, 東京, 1986, pp.117-148.
- 106) T. Sano: Thermal Gelation of Fish Muscle protein, (A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of science, Sophia University), 1988, pp.320-325.
- 107) J.I. Morita, I.S. Choe, K. Yamamoto, K. Samejima, and Y. Yasui: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2895-2900 (1987).
- 108) 加藤 登, 中川則和, 照井正三郎: 日水誌, **55**, 1243-1251(1989).