

Title	CaCI2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			
Туре	theses (doctoral)			
File Information	4204.pdf			



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	賃冷凍すり身の製造	に関する食	品生化学的研究			
水産ねり製品は我が国	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伴って減少傾向にある。)身の国内生産量は そこで,未利用資	,近年の国 源から冷凍	際漁業秩序の変化に 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、CaCl ₂ 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げかりでなく						
冷凍すり身のゲル形成能	という。 とが改善される事実	が見出され	た。この水晒し法は			
一般にカルシリム いして 花,冷凍すり身の製造	を(本舗又では、 Ga 支術のひとつとして	咽し伝と称 利用されて	りる)と呼ばれ, 境 いる。しかし, Ca晒			
│ し法の効果とその技術♪ │ 現状である。そこで著者	原理については充分 皆は,Ca晒し法の技	な検討が行 術原理を明	なわれていないのが らかにすることを目			
的として本研究を行なっ	った。 こちいて CaCL がも	も粗の筋盾も	息維(Mf)の倶水能			

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。

--- 1 --

[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】 CaCl₂(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、CaCl₂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CaCl₂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CaCl₂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 CaCl₂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 CaCl₂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CaCl₂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 CaCl₂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,③CaCl₂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,CaCl₂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落し身を5mMまたは15mM CaClo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中においては、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できる。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

緒	言	1
略	語 ••••••••••••••••••••••••••••••••••••	4
実懸	検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.	坐りに伴な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)	CaCl2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CaCl₂の影響 ······· 45

- 1) 種々の濃度のCaCl₂存在下におけるMf·Ca-ATPaseの ・・・・・ 45 加熱による失活速度
 2) 低イオン強度下におけるMf·Ca-ATPaseの温度安定性に ・・・・ 45 及ぼすCaCl₂の影響
- 3) 高イオン強度下におけるMf・Ca-ATPaseの温度安定性に・・・・・ 53 及ぼすCaCl₂の影響
- 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 ・ 53 小考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58

第3章 CaCl₂によるMfタンパク質の温度安定性の変化の機構 ・・・・・・・ 60

- 1) CaCl₂によって起こるスケトウダラMf・Ca-ATPaseの温度安定性の・・・・ 60 低下とアクチンによる回復
- 2) CaCl₂によって起こるカツオのMB·Ca-ATPaseの温度安定性の ······ 62 変化とアクチンによる回復
- CaCl₂処理によって起こるスケトウダラのMB・Ca-ATPase ・・・・・ 64 比活性の低下
- 4) CaCl₂によって起こるスケトウダラのMB·Ca-ATPase比活性の ······ 67 低下に対するソルビトールの抑制効果

- II -

- 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 ····· 69 MB・Ca-ATPaseの熱変性様式の変化とアクチンによる回復 6) CaCl₂処理によってスケトウダラMBから遊離するアクチンと ······ 72 トロポミオシンの定量 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・・・・ 78 1) 坐りに伴う肉糊の破断強度の経時変化に及ぼすCaCloの影響 ・・・・・・ 78 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 ・・・・・ 80 3) 坐りゲルのSDS-尿素混合液に対する溶解性に及ぼすCaCl₂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CaCl2の影響 · 84 5) CaCl₂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) CaCl₂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・・・・ 95 多量化反応の関係 7) CaCl2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・・・・ 97 ミオシンHC多量体の量と組成 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・・104 CaCl₂の影響 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・・・・・ 104 各種成分の変化 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・・・・ 119 品質(ゲル形成能とMf・Ca-ATPase比活性)の変化

— Ш –

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・・121 の物性
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・・・・・・ 126 ミオシンHC多量化反応
総合	考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
謝鸹	¥····· 136
文 南	£····· 137

— IV —

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:CIS)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^{1,8}¹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⁹¹⁰と筋肉タンパク質の安定 化¹¹¹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

- 1 -

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, CaCl₂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,いまだ充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CaCl₂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、CaCl₂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CaCl₂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、 CaCl₂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

- 2 -

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					
Ι	: 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					
е _{нс}	: 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					

4

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</u> <u>nilotica</u>
シログチ	White croaker, <u>Argyrosomus</u> argentatus
マエソ	Lizard fish, <u>Saurida</u> <u>undosquamis</u>
コノシロ	Gizzard shad, <u>Clupanodon</u> <u>punctatus</u>
タチウオ	Hairtail, <u>Trichiurus lepturhs</u>
マイワシ	Sardine, <u>Sardinops melanostictus</u>
スケトウダラ	Walleye pollack, <u>Theragra</u> chalcogramma
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, Prionace glauca

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,落し身を4倍量(v/w)の 50mM NaC1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0.5 M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。

- 6 -

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10m1のガラス製スピッツ型遠心沈殿管(日電理化硝子㈱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。

WHC=(沈殿重量-全Mfタンパク質量+遊離タンパク質量)÷

(全Mfタンパク質量)

= (沈殿中の水分量/全Mfタンパク質量), (g H₂0/g Mf) 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。

- 7 -

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℃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 (μmol Pi/min·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。

 $K_{\rm D} = (\ln C_{\rm O} - \ln C_{\rm t})/t, (s^{-1})$

ここでCoおよびCt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 (μmol Pi /min・5g of sample) を算出した。²⁵

- 8 -

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℃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:65μm)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(nm)として表わした。

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

細切した試料100mgに5m1の2% SDS-8M 尿素-2% 2-メルカプトエタノール を含む20mM Tris-HC1 (pH 8.0) 溶液を加え,ホモジナイズ (ヤマト科学㈱製, ウルトラディスパーサー 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,ビウレット法により 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

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

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シトメーター(島津製作所㈱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

- 11 -

15. 坐りに伴な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

- 13 -

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 Trismaleate (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

- 14 -



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 (\bigcirc), 1,800 (\triangle) or 2,100 (\bigcirc) x g using a swing-out rotor at 5 °C.

(b) Myofibrils suspended in 100 mM (\bigcirc) or 200 mM (\triangle) 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, $(g H_2O/g Mf)$.

- 15 -



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

To carp myofibrils suspended in 10 mM NaCl (\bigcirc) containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), 50 mM NaCl (\bigcirc), 17 mM (\triangle) or 33 mM (\square) 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.

• 16 -

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検体づつ測定した。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。

- 17 -



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

Carp myofibrils were suspended in 50 mM NaCl (O), 17 mM CaCl₂ (Δ) or 33 mM (\Box) 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.

18

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

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

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。

- 20 -



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

Muscles were separated from carp in $alive(\bigcirc)$, walleye pollack (\triangle) and skipjack tuna (\Box) 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.

- 21 -

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、NaC1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)。

- 22 -



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 (\bigcirc) or CaCl₂ (\bigcirc) , 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).

23

(a) Skipjack tuna, (b) Carp, (c) Walleye pollack,

(d) Sardine, (e) White croaker, (f) Tilapia,

(g) Mako shark, (h) Blue shark.

2) CaCl₂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CaCl2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CaCl2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CaCl2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CaClo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CaCl2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CaCle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 CaClo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、CaCle濃度が15mMを越えると、いずれのI下にお いても、CaCl2濃度の上昇に伴うWHCの減少の度合い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、CaCl2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CaCl₂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CaCl2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

- 24 -



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.

25 -



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 (O), 0.10 (Δ), 0.15 (\square) 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.

- 26 -


Fig. 1.8. CaCl₂ concentration dependence of WHC of walleye pollack myofibrils under different ionic strengths.

The ionic strengths of media were fixed to 0.05 (O), 0.10 (Δ), 0.15 (\square) and 0.20 (∇) by mixing the calculated amount of NaCl with various concentrations of CaCl₂. The WHC was measured as in Fig. 1.5.

- 27

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

- 28 -



Fig. 1.9. Reversible change in WHC of fish myofibrils induced by CaCl₂.

Skipjack tuna (a), carp (b) and walleye pollack (c) myofibrils in a medium containing 10 mM NaCl were mixed with varied concentrations of CaCl₂ (0-15 mM), and calculated concentration of NaCl to give the ionic strength fixed to 0.05 (O). The WHC of myofibrils was then measured as in Fig. 1.5. After removing CaCl₂ from the medium by dialysis against 10mM (\Box) or 50 mM (Δ) NaCl solution (pH 7.0), the WHC of myofibrils was again measured.

As a control (\bigcirc), the WHC in the absence of CaCl₂, was also measured.

-29 -

て起こる魚類MfのWHCの変化を調べ, CaCl₂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×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CaCl₂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、CaCl₂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、CaCl₂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、CaCl₂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タンパク質の変性が関わっており、この点でCaCl₂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。

30



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.

31

5) CaCl_o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濃度の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。

 $D = (WHC_{b} - WHC_{a}) / (a - b), \qquad (g H_{2}0 / g Mf \cdot mM^{-1})$

ここでWHC_a, WHC_bは, CaCl₂をそれぞれaおよびbmM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。

- 32 -

Ionic strength Fish species 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)

Table 1.2. The dehydrative effect induced by CaCl₂ of fish myofibrils under the fixed ionic strength between 0.05 and 0.20.

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, $D=(WHC_b-WHC_a)/(a-b)$, 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MgCl₂、CaCl₂、SrCl₂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MgCl₂>CaCl₂>SrCl₂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、MgCl2またはSrCl2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、CaClo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

- 34 -



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 (\Box), CaCl₂ (O) or SrCl₂ (Δ). In Fig. 1.11, the WHC of myofibrils in media of different ionic strength set with NaCl and KCl(\odot) was also shown.

- 35 -

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。477 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

- 36 -



Fig. 1.12. Changes in WHC, dehydrative effect induced by CaCl₂ 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 (\bigcirc). Myofibrils prepared from fresh sardine muscle were also stored in the same condition (\triangle).

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.

37 -



Fig. 1.13. Relation between changes in myofibrillar Ca-ATPase activity and dehydrative effect induced by CaCl₂ 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).

38 -

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CaClo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 NaC1 (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 素の存在下では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.

- 39 -



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 (\bullet), $\overline{0}.05$ (\bigcirc), 0.1,(\triangle), 0.15 (\Box), 0.20 (\diamondsuit).

Table 1.3. The dehydrative effect induced by CaCl₂ of shark myofibrils in the presence of urea under the fixed ionic strength between 0.05 and 0.10.

Fish species	Ionic	<u>Urea concent</u>	ration (M)
	strength	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 CaCl₂ 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

- 42 -

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、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CaCl₂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CaCl₂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CaCl₂の能力

- 43 -

- 44 -

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℃ (コイ) または30℃ (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 KC1, 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℃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

- 45 -



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 (\bigcirc), 20 mM (\triangle), 50 mM (\square), 100 mM (\bigtriangledown).

- 46 -



Fig. 2.2. Effect of CaCl₂ 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). CaCl₂ (O) 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_O - ln C_t)/t, where C_O and C_t are the ATPase activities of myofibrils before and t seconds of heat treatment.

47

付与するNaCl (30~150mM)をMfに添加した際のKp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CaCloを加えた場合(Fig. 2.2(a)),その 濃度が20mM程度まではKp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 KC1, 40mM Tris-maleate (pH 7.0) に 懸濁したMfにCaCl₂を加えた場合(Fig. 2.2(b))では,CaCl₂濃度の増加に伴 ってKp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CaCl₂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Kp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CaCl2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CaCl₂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CaCl₂とNaClを添加し、38℃で加熱してそれ らのKn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、CaCl₂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Kp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Kp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CaCl₂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CaCl₂を添加し,さらに所

- 48 -



Fig. 2.3. Effect of CaCl₂ 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 CaCl₂ (O) or NaCl (\triangle), 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.

49

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CaCl₂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℃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CaClo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 CaCl₂または30~150mM NaClを添加した後, 30℃におけるCa-ATPaseの失活を経時的に測定してKpを求めた。なお, 10mM NaCl, 40mM Trismaleate (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、CaCl₂およびNaClの添加量の増加に伴ってK_pは比例的に増大する傾 向を示したが,CaCl2がMfのKD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Kpの直線関係の 勾配を比較すると,CaCl2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、 CaCl₂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CaCl₂によって受ける影響は

- 50 -



Fig. 2.4. Effect of CaCl₂ concentration on the thermal stability of myofibrils of carp and tilapia under the fixed ionic strength.

Carp (\bigcirc) and tilapia (\triangle) myofibrils were suspended in 0.16 M NaCl containing 40 mM Tris-maleate(pH 7.0) with various concentrations of CaCl₂, 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.

51



Fig. 2.5. Effect of CaCl₂ 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 $CaCl_2$ (() or NaCl (\triangle). The first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was calculated as described in Fig. 2.2.

- 52

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℃で,またスケトウダラMBは30℃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℃におけるKヮはそれぞれ3.8× 10-4·s-1および7.0×10-4·s-1であるが、これに30mM CaCl2を添加するとそれ らのKnはそれぞれ7.2×10-4・s-1および13.0×10-4・s-1に増加し、CaClo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Kpはそれ ぞれ16.2×10-4・s-1および29.8×10-4・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℃におけるKp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

- 53 -



Fig. 2.6. Effect of CaCl₂ 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 CaCl₂ (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 th method described in Fig. 2.2.

- 54 -

す影響の大きさを,魚種間で比較した。すなわち. 0.16M NaCl. 40mM Trismaleate (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Kpを算出 した。そして、塩を添加する前の各魚種のMfのKp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でもKp 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,Kp(+Ca)とKp(+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_p(+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CaClo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 なった結果を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。

- 55 -



Fig. 2.7. Thermal stability of myofibrillar protein of various fish species in the absence and presence of CaCl₂ 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 CaCl₂ (O) or 150 mM NaCl (Δ) 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 CaCl₂ or NaCl as ordinate, and K_D in the absence of the salts as Qabscissa.

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.

56



Fig. 2.8. Thermal stability of myofibrillar protein of various fish species in the absence and presence of CaCl₂ 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 CaCl₂ (\bigcirc) or 150 mM NaCl (\triangle) 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 CaCl₂ or NaCl as ordinate, and K_D in the absence of the salts as abscissa.

57

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,魚種による特徴を充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

- 58 -

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 CaCl₂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、CaCl₂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CaCl₂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。

CaCl₂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、CaCl₂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=0.01~0.50)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 CaCl₂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 CaCl₂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CaCl₂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CaCl₂を添加し、直ちに同溶媒に透析してCaCl₂を除去 した後(この一連の操作を以後、CaCl₂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

- 60 -



Fig. 3.1. Change in thermal inactivation rate of myofibrillar Ca-ATPase activity of walleye pollack by treatment with CaCl₂ 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 CaCl₂ was added (\triangle). After removal of $CaCl_2$ (\blacktriangle) 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.

- 61 -

の変性は単純な一次反応にしたがっていた。まず、 $CaCl_2$ 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、 $CaCl_2$ 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 $CaCl_2$ 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、 $CaCl_2$ 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たがい、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

- 62 -


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

skipjack tuna myosin B dissolved То in a medium containing 0.5M NaCl and 40 mM Trismaleate(pH 7.0), CaCl₂ was added to give a final concentration of 50 mM. After CaCl2treatment at 0 °C for 0 (\diamondsuit), 20 (\Box) or 60 (\bigcirc) the myosin B was dialyzed to exclude h, 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 $CaCl_2$ (Δ) was also examined.

Incubation time (min)

63

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 Trismaleate (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℃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℃において0.5M NaCl, 40nM Tris-maleate (pH 7.0) に溶解した スケトウダラMBを、50nM 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150nM 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150nM 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2.0×10⁻⁵·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℃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

- 64 -



Incubation time (min)

Fig. 3.3. Effect of the addition of F-actin on thermal inactivation mode of Ca-ATPase activity of CaCl₂-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 CaCl₂ was added. After treatment for 60 h at 0 °C (\bigcirc), the myosin B was dialyzed against the medium without CaCl₂. To the dialyzate, carp Factin was added in an equal amount of actin content within myosin B (\blacktriangle). As a control, myosin B without addition of CaCl₂ was dialyzed as the same manner as above (\triangle). Thermal inactivation of Ca-ATPase activity of myosin B at 38 °C was examined as in Fig. 3.1.

65 -



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 (\bigcirc) was measured as a function of time at 0 °C. As a control (\triangle), 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.

- 66 -

て大きな値である。したがって、CaCl₂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、CaClo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CaCl₂を除去した後30℃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 CaCl2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KnはCaCl2添加後経時的にやや増加するが、その値は8.0~ 12.4×10-4・s-1の範囲となり、Fig. 2.6に示したスケトウダラMBのKpにほぼ 一致した。一方、CaCl2の代りに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KpはCaCle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NaC1(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、CaCle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,CaCl2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) CaCl₂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、CaCl₂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 CaCl₂を添加した。続いて、1.0M ソル

- 67 -



Fig. 3.5. Change in thermal inactivation mode of 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), 50 mM CaCl, was added. After treatment with CaCl₂ at $\tilde{0}$ °C for 0 (\bigcirc), 4 (\triangle), 8 (\square) or 24 (\bigtriangledown) 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 (igvee), 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.

68

ビトールを含む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・

- 69 -



o/0

Change in Ca-ATPase activity of Fig. 3.6. walleye pollack myosin B induced by treatment with CaCl₂ 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 CaCl₂ 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 Ca-ATPase activity of the dialyzate CaCl₂, was measured (igoplus) as in Fig. 1.4. As a control, change in Ca-ATPase activity of myosin B induced by treatment with CaCl₂ in the absence of sorbitol was examined (O).

70



Fig. 3.7. Effect of F-actin on the change in thermal inactivation mode of Ca-ATPase of walleye pollack myosin B induced by CaCl₂ 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 (\bigcirc). To the dialyzate, carp F-actin was added in an equal amount of actin content in myosin B (\blacktriangle).

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

- 71 —

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,CaCl₂を添加しない対照のMBのK_D(1.5×10⁻⁵·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、CaCl₂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CaCl₂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) CaCl₂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CaCl₂処理よってMfタンパク質を構成するアクチン部分が変性する事実が強 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,CaCl₂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に 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50nM CaCl₂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,40nM Trismaleate (pH 7.0) に透析した後,10,000×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シトメーターで定量し,同じ方法で定量 したCaCl₂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,150nM NaClを添加したMBについて同様な定量

— 72 —



CaCl₂ treatment time (h)

Fig. 3.8. Change in amount of actin and tropomyosin released from walleye pollack myosin B induced by treatment with CaCl₂.

walleye pollack myosin B dissolved а in To 0.5 M NaCl and 40 mM Tris-maleate medium of (pH 7.0), 50 mM CaCl₂ was added. During treatment with CaCl₂ at 0[°]°C, a portion of myosin B dialyzed against 0.1M NaCl and 40 mM was The dialyzate was cen-Tris-maleate (pH 7.0). trifuged at 10,000 xg for 20 min to separate the Α fixed and the precipitate. supernatant the myosin B and the supernatant volume of subjected to SDS-polyacrylamide was from it gel electrophoresis using a 10 % polyacrylamide disc gel containing 0.05% SDS.

The amounts of actin (\bigcirc) and tropomyosin (\triangle) released from CaCl₂-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(\bigcirc , \blacktriangle), 150 mM NaCl was added to myosin B and treated in the same way.

73

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 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

- 74 -

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Mf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、スケトウダラのミオシン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CaCl。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℃におけるスケトウダラのMB·Ca-ATPaseのKnは、CaClo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℃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ミ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ミオシンの存在を推定させるKp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。

スケトウダラのミオシンは、魚類のミオシンの中でも極めて不安定であるこ

- 75 -

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Nakamura^{69⁺}は鶏砂嚢 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、CaCle処理によってスケトウダラとカツオのMfタンパク質

- 76 -

の温度安定性が低下する現象は、CaCl₂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CaClo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0~20nmol/kgすり身湿重量のCaCl₂(以後,nmol/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、

- 78 -



Fig. 4.1. Changes in breaking strength of saltground 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 (\bigcirc) and presence of 2 (\triangle), 5 (\square), 10 (\bigtriangledown) and 20 (\diamondsuit) mmol/kg (surimi wet weight) of CaCl₂.

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.

79

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

0~20mmo1/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,

- 80 -



Fig. 4.2. Effect of CaCl₂ 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 CaCl₂/kg of surimi.

- 81 -

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CaCl₂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 CaCl₂の濃度が上昇すると両値が増加するが、さらに5~10nmol/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CaCl₂を添加するとき にそのゲル形成能が最大となることが示されたので、CaCl₂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CaCl₂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CaCl₂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CaCl₂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、CaCl₂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

- 82 -



Fig. 4.3. Temperature dependence of rate and extent of increase in breaking strength of salt-ground meat induced by CaCl₂.

The salt-ground meats of skipjack tuna((), carp (Δ) and walleye pollack ([]) containing 0 or 5 mmol/kg of CaCl₂ 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 CaCl₂ were calculated by the following equation:

The increasing rate of v_{BS} or e_{BS} induced by CaCl₂ =(v_{BS} or e_{BS} of salt-ground meat containing 5 mmol/kg of CaCl₂)/ (v_{BS} or e_{BS} of salt-ground meat without CaCl₂).

- 83 ·

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ミオシン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ミオシン 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ので,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ので,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)中ではミオシン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。

- 84 -



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

The salt-ground meat containing 0-20 mmol/kg of CaCl₂ 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 determined 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 CaCl₂ during setting.

(Text continued on next page)

86 ·

Fig. 4.5. Changes in subunit composition of myofibrillar protein in skipjack tuna salt-ground meats containing different concentrations of CaCl₂ during setting.

The salt-ground meats containing 0 (a,b,c,d) and 5 (a',b',c',d') mmol/kg of CaCl₂ 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 μ g of the soluble protein was applied to SDS-PAGE using 5 % poly-acrylamide 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):

- (\bigcirc) : myosin heavy chain (HC).
- (Δ) : 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:

HC, HCn or x = S(I/Tg)(Tg/Tp)=SI/Tp (%). HCn'= S(Tp-Tg)/Tp (%). 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.

87 -



Fig. 4.6. Changes in subunit composition of myofibrillar protein in carp salt-ground meats containing different concentrations of CaCl₂ during setting.

The salt-ground meats containing 0 (a,b,c,d) and 5 (a',b',c',d') mmol/kg of CaCl₂ 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 CaCl₂ during setting.

The salt-ground meats containing 0 (a,b,c,d) and 5 (a',b',c',d') mmol/kg of CaCl₂ 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.

- 89 -

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ので、その結果 は図示しなかった。

- 90 -

5) CaCl₂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℃の範囲では、肉糊 中のCaCl2濃度の増加に伴ってVHCは増加して5mmol/kgの場合に最大となり. また、10mmo1/kgを越えるとその値は低下する傾向を示した。ただし40℃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℃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CaCl2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℃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℃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℃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CaClo濃度の高低に関係なく 起こった。したがって、40℃における肉糊のゲル化は、35℃以下の場合とは異

- 91 -



Fig. 4.8. Effect of CaCl₂ 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 CaCl₂ were incubated at 10, 20, 30, 35 and 40 °C for setting. The rate $(\ensuremath{v_{\text{HC}}}) \ensuremath{\text{of}}$ decrease in myosin heavy chain in the setting gel (a,b,c) was expressed as the reciprovalue of time cal 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 saltground 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.

92 -

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℃でゲル化した場合のv_{HC}とe_{HC}は算出 しなかった。

次に、е_{нс}に及ぼすCaCl₂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CaCl₂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е_{нс}は、いずれの坐り温 度においても肉糊のCaCl₂濃度の上昇に伴って高い値となり、30℃と35℃にお いては5 mmol/kg以上のCaCl₂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е_{нс}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 CaCl₂の影響は温度によって異なっていた。すなわち、10℃と20℃では、スケ トウダラのе_{нс}はCaCl₂濃度の上昇に伴って高い値となったが、30℃以上では CaCl₂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CaCl₂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CaCl₂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℃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。

- 93 -



Fig. 4.9. Temperature dependence of rate and extent of decrease in myosin heavy chain in salt-ground meat induced by CaCl₂.

The salt-ground meats of skipjack tuna((), carp (Δ) and walleye pollack ([]) containing 0 or 5 mmol/kg of CaCl₂ 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 CaCl₂ were calculated by the following equation:

The increasing rate of v_{HC} or e_{HC} induced by CaCl₂ = $(v_{HC} \text{ or } e_{HC} \text{ of salt-ground meat containing 5 mmol/kg} \text{ of CaCl}_2) / (v_{HC} \text{ or } e_{HC} \text{ of salt-ground meat without CaCl}_2).$

94

6) CaCl₂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、CaClo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 $v_{BS} \ge v_{HC}$ の間、および $e_{BS} \ge e_{HC}$ 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、CaCl2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, eBS(x)とeHC(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、CaCl2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VBSとVHC 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。

- 95 -



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.

- 96

7) CaCl₂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の関係には、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CaCl₂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 CaCl₂ 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' (\Box, \blacksquare) , and HCn" (\bigcirc, \bullet) cited from Figs. 4.5, 4.6 and 4.7, were plotted against the content of decrease in myosin heavy chain $(-\Delta(HC))$.

Open symbols: salt-ground meat without CaCl2.

Closed symbols: salt-ground meat with 5 mmol/kg of CaCl2.

98
肉糊を30℃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、CaClo濃度が10 nmol/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5mmol/kgまではあまり変らないが、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、CaClo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CaClo濃度が上昇してもほと んど変化しなかった。

99



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 nmol/kgになると、検討を加えた3種の魚類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(10nmo1/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

-101 -

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, CaClo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,CaClo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、CaClo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CaCloによって大きな構造変化を受け,

-102 -

(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

-104 -

Minced meat

Wash with 4 volumes (v/w) of a cold aqueous solution of 0, 5 or 15 mM CaCl₂ (I=0.06) at 5-7 °C for 10 min

Filter through screen

Flesh from 1st wash

Wash with the same solution at 5-7 °C for 10 min

Filter through screen

Flesh from 2nd wash

Dehydrate with a hydraulic press of 50 kg/cm² for 40 min at 8-10 °C

Dehydrated meat

Mix with 8% sorbitol and 0.2% polyphosphate

Freeze with a contact freezer at -30 °C

Frozen surimi

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℃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CaCl2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0.2mmol/kg(湿重量)となった。 一方、CaCle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 し身を5mMおよび15mM CaCl2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12.1 nmol/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。

- 106 -



Fig. 5.2. Change in Ca content of minced meat during preparation of frozen surimi through CaCl₂ washing.

The minced meats of white croaker (a) and walleye pollack (b) were washed with four volumes (w/v) of a cold aqueous solution containing 0 (\bigcirc), 5 (\triangle) or 15 (\square) mM CaCl₂ 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.

- 107 -

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,落し身を5mM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、シログチの場合には、それぞれ13.4 g/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

- 108 -



Fig. 5.3. Changes in moisture, crude protein and myofibrillar protein contents of minced meat during processing frozen surimi through CaCl₂ washing.

The minced meats (\bigcirc) of white croaker (a, c, e) and walleye pollack (b, d, f) were washed with cold water containing 0 (\bigcirc), 5 (\bigtriangleup) or 15 (\square) mM CaCl₂ 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 Katoh 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.

109 -

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

- 110 -



Fig. 5.4. Change in water soluble protein content of minced meat during processing frozen surimi through CaCl₂ washing.

The minced meats (\bigcirc) of white croaker (a) and walleye pollack (b) were washed with cold water containing 0 (\bigcirc), 5 (\triangle) or 15 (\square) mM CaCl₂ 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.

- 111 -

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10.9 g/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17.0 g/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 濃縮されたということができる。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

- 112 -



Fig. 5.5. Change in myofibrillar protein content of minced meat during processing frozen surimi through CaCl₂ washing.

The minced meats (\bigcirc) of white croaker (a) and walleye pollack (b) were washed with cold water containing 0 (\bigcirc), 5 (\triangle) or 15 (\square) mM CaCl₂ 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.

- 113 -

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。^{963,977}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、落し身中のそれの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度合い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

- 114 -



Fig. 5.6. Change in relative content of myofibrillar protein during processing frozen surimi through CaCl₂ washing.

The minced meats (\bigcirc) of white croaker (a) and walleye pollack (b) were washed with cold water containing 0 (\bigcirc), 5 (\triangle) or 15 (\square) mM CaCl₂ as in Fig. 5.1. The content of myofibrillar protein at each stage of processing frozen surimi was measured by the method of Katoh 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.

- 115 -

おいても、CaCl₂が5mM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、 CaCl₂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CaCl₂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し身をCaCl2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CaCl2を含む水中で落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 CaClo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 CaClo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

- 116 -



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

The minced meats $(\bigtriangledown, \checkmark)$ of white croaker and walleye pollack were washed with cold water containing 0 (\bigcirc, \bigcirc) 5 $(\bigtriangleup, \bigstar)$ or 15 (\bigcirc, \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 µmole Pi liberation/min mg of myofibrillar protein and µmole 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.

- 117 -

がやや大きかった。既に,第2章と第3章において,CaCl₂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ので,CaCl₂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、落し身 を0、5および15mM CaCl₂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 μ mol Pi/min・ 5g (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 μ mol Pi/min・5g (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

- 118 -

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うことができる。

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℃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℃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℃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。

- 119 -



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 (O), 3.9 (\triangle) or 12.1 (\square), and 0.2 (\odot), 4.8 (\triangle) or 12.9 (\blacksquare) 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.

- 120

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、 CaClo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CaClo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、塩ずり後の肉糊に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

-122 -



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 (O), 3.9 (\triangle) 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.

123



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 (\bigcirc), 4.8 (\blacktriangle) and 12.9 (\blacksquare) 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.

124

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12.1mmo1/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,それの 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ュア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 のテクスチュアーを比較した。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 スチュアーは,よりCa濃度の低い肉糊から調製したゲルのテクスチュアーとは 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ュアーが損なわれて 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

-125 -

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,そのテクスチュア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

-126 -



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.

- (\bigcirc) : 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").

- 127 -

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。

- 128 -

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

-129 -

質の溶出を妨げることなく落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

-130 -

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 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IIC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IIC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。

-131 -

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 詳細な研究を行なっており,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IIC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

-132 -

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、そのテクスチュア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,塩ずり過程 でも肉糊の温度が高くなるとき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 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全活性の間の関係式も変動す 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、落し身の保水能と冷凍すり身標品の凍結貯蔵性、およ

- 133 -

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5nmol/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。
General quality of Frozen surimi		White croaker			Walleye pollack			
	Washing medium	Control*1	5 mM CaCl ₂	15 mM CaCl ₂	Control*1	5 mM CaCl ₂	15 mM CaCl ₂	Available effect
Materials								· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Ca content (mmol/kg)		0.2	3.9	12.1	0.2	4.9	12.9	Promotion of dewatering
Moisture content remained.(%)		100	96	94	100	97	94	myofibrils and
Water soluble protein elimination (%))	100	98	97	100	97	93 -	concentration of Mf
Mf protein content remained (%) Mf·Ca-ATPase total activity remained (%)		100	117	130	100	109	114	protein at washing and
		100	112	120	100	105	106	dehydrating processes.
Mf·Ca-ATPase specific activity remain	ned (%)	100	99	95	100	94	91	
Cryostability*2								Regulation of freeze
Gel-forming ability remained (%)		100	100	76	100	100	86	denaturation of
Mf·Ca-ATPase activity remained (%)		100	98	95	100	93	91	Mf protein during
·							-	frozen storage.
Gel-forming ability ^{*3}			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Maximum of breaking strength (%)		100	174	182	100	120	114	Promotion of gel forma-
of setting-heating gel								tion and cross-linking
Cappe Linking shility of sussin 110%4								reaction of myosin HC
Total amount of anona-linkod (0)		100	100	040	100	110	110	during setting of salt-
myosin HCs produced		100 -	192	240	100.	110	112	ground meat.

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

*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.

135

1

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わりました。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。

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,水產庁研究部,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).

- 137 -

- 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, 小松一宫, 新井健一: 日水誌, 45, 1027-1032(1979).
- 26) 科学技術庁資源調查会: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).

- 138 -

- 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ュアー,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).

— 139 —

- 55) T. Sano, S.F. Noguchi, T. Tsuchiya, and J.J. Matsumoto: J. Food Sci., 53, 924-928(1988).
- 56) 志水 寬, 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) 字野 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.

- 140 -

- 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) 舩津保浩,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) 硲 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).

- 141 --

- 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 薰,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).

- 142 -

- 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: Theramal 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).