



Title	水洗浄および塩化カルシウム洗浄したコイ筋原繊維の形態観察および生化学的性状の変化
Author(s)	飛嶋, 千尋; TOBISHIMA, Chihiro; 猪上, 徳雄 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 40(1), 72-81
Issue Date	1989-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24021
Type	departmental bulletin paper
File Information	40(1)_P72-81.pdf



水洗浄および塩化カルシウム洗浄したコイ筋原繊維の
形態観察および生化学的性状の変化

飛嶋 千尋*・猪上 徳雄**・信濃 晴雄**

**Light Microscopic Observation and Biochemical Properties of
Carp Myofibrils during Wash-treatments with
Distilled Water and/or CaCl₂ Solution**

Chihiro TOBISHIMA*, Norio INOUE** and Haruo SHINANO**

Abstract

Isolated carp myofibrils were washed with distilled water and/or 0.1% CaCl₂ solution. The cross striation of the myofibrils was observed under a light microscope (phase contrast), and their biochemical properties were measured at the same time. The myofibrils showed remarkable swelling and their cross striation disappeared after repeated wash-treatments with distilled water. Myofibrillar EDTA-ATPase activity increased gradually with an increase in the number of washings, though no change was recognized in Ca- and Mg-ATPase activities. The two-phased first-order thermal inactivation mode showed that a portion of actin was lost with repeated wash-treatments. This was confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. When the myofibrils were washed with CaCl₂ solution prior to the wash-treatment with distilled water, no change was observed under the light microscope and no increase in EDTA-ATPase activity occurred. Furthermore, no marked swelling of the myofibrils occurred. Calcium bound to the myofibrils during the wash-treatments using CaCl₂ solution, was scarcely released from them by the water wash-treatments, although it was easily released by the wash-treatments using 0.1 M KCl solution.

魚肉ねり製品製造における落とし身の洗浄(水晒し)は脱色, 脱脂, 脱臭の目的で行われるが同時に製品の弾力形成を阻害するとされている水溶性タンパク質を除去¹⁾する重要な工程でもあり, その結果塩溶性タンパク質が相対的に増量しゲル形成能が強くなることが知られている²⁾。このような洗浄が筋原繊維タンパク質の構成成分におよぼす影響についてはいくつかの報告がある。今野³⁾は筋原繊維(以下Mfと略記)について低濃度緩衝液で5-6回洗浄するとMfは脱感作されることをみている。また, 大谷⁴⁾は貝類のMfについても脱感作されることおよびアクチンが損失(流出)することを確認している。

水晒し液に塩化カルシウムを加えた塩化カルシウム溶液による洗浄(カルシウム晒し)は, 製品の品質(特に弾力増強)に関係することが知られている⁵⁾。また, 塩化カルシウムの筋原繊維タ

* 北海道立根室高等学校
(*Nemuro High School, 146 Makino-uchi, Neruro-city, Hokkaido 087, Japan*)

** 北海道大学水産学部食品製造学講座
(*Laboratory of Marine Food Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)
本文中では以下の略語を使用した。EGTA, Ethyleneglycol bis-(2-amino ethylether)-N, N'-tetraacetic acid; SDS, Sodium dodecyl sulfate.

ンパク質に対する影響については最近 2, 3 の報告^{6,7)}をみるが、水晒しとカルシウム晒しの順序などについてはまだ十分な検討が行われていない。そこで本研究ではコイ Mf を使用し、蒸留水による洗浄（ねり製品製造工程中の晒しとは異なるので本報告では洗浄と呼ぶ）を反復した時に Mf にどのような影響があるかについて検討し、その影響に対するカルシウム洗浄の関連性を明らかにすることを目的とした。

実験方法

Mf の調製 コイ *Cyprinus carpio* の新鮮肉（背筋）から前報⁸⁾と同様の方法で調製した。

洗浄の方法 0.16 M KCl 緩衝液 (0.16 M KCl-40 mM Tris · HCl, pH 7.5) に懸濁した Mf を 20,000×g, 20 分間遠心分離して得た“沈殿 Mf”を供試した。水洗浄：沈殿 Mf に対して沈殿量の 9 倍量の冷蒸留水を加え 5 分間攪拌混合したのち、20,000×g, 20 分間遠心分離して得た沈殿 Mf を 1 回目の水洗浄 Mf とした。2 回目以降は 6 倍量の冷蒸留水を加えて同様に遠心分離を反復し、2-4 回目の各水洗浄 Mf を得た。なお 3 回目および 4 回目における Mf は遠心分離により上澄液を分離し得ない程度の膨潤をおこしたので、この場合には終濃度が 0.1 M となるように KCl を添加して沈殿 Mf を得た。それぞれ的水洗浄 Mf は 0.16 M KCl 緩衝液を使用し、600×g, 10 分間の遠心分離によって 3 回洗浄を行い、最終的に 0.16 M KCl 緩衝液に均質に懸濁し以下の各測定に供した。塩化カルシウム溶液による洗浄（以下 Ca 洗浄と略記）：0.1% CaCl_2 水溶液 (pH 7.0-7.2) を使用し、水洗浄のときと同様に遠心分離法によって洗浄した。なお、水洗浄と Ca 洗浄との関連性を検討するために以下に記述した 4 種類の洗浄方法により得た試料を供試した。

- 1) Ca 洗浄のみを行ったもの (C_n^{*1})
- 2) Ca 洗浄後に水洗浄を行ったもの
($C_n-H_n^{*2}$)
- 3) 水洗浄後に Ca 洗浄を行ったもの
(H_n-C_n)
- 4) 2) の Ca 洗浄後に 0.16 M KCl 緩衝液で洗浄し、続いて水洗浄を行ったもの
($C_n-K_n^{*3}-H_n$)

ATPase 活性の測定には最終洗浄後、Mf を 0.16 M KCl 緩衝液で遠心分離 (600×2, 10 分間) により 3 回洗浄したものを使用した。Ca 洗浄および 0.16 M KCl 緩衝液による洗浄には毎回 Mf 沈殿容積の 10 倍量の溶液を用いた。

形態観察 Mf 懸濁液 1 滴をスライドガラス上にのせカバーガラスを使用し、ニコン S-Ke 型位相差顕微鏡を用い 400 倍で観察した。

ATPase 活性の測定 Mg-, Ca-, および EDTA-ATPase 活性は前報⁹⁾と同様の方法で測定した。Ca 感受性の測定は今野らの方法⁹⁾に準じて行った。測定条件は 0.1 M KCl, 25 mM Tris · maleate 緩衝液 (pH 7.0), 2 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, Mf の濃度は 0.05-0.1 mg/ml の反応混液とし、0.1 mM CaCl_2 または 2 mM EGTA を加え、25°C で反応を行い生成した無機リン酸を比色定量した¹⁰⁾。Ca-ATPase 活性の 35°C における失活速度恒数 (k_0) は室塚ら¹¹⁾の方法によって算出した。失活曲線の一次反応プロットが二つの直線からなるときは初期の速い失活およびその後の遅い失活について、失活速度恒数をそれぞれ k_{01} , k_{02} とした。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Weber and Osborn の方法¹²⁾および関の方法¹³⁾に

*1 Ca 洗浄を n 回行ったことを示す。

*2 水洗浄を n 回行ったことを示す。

*3 0.16 M KCl-40 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液で n 回洗浄したことを示す。

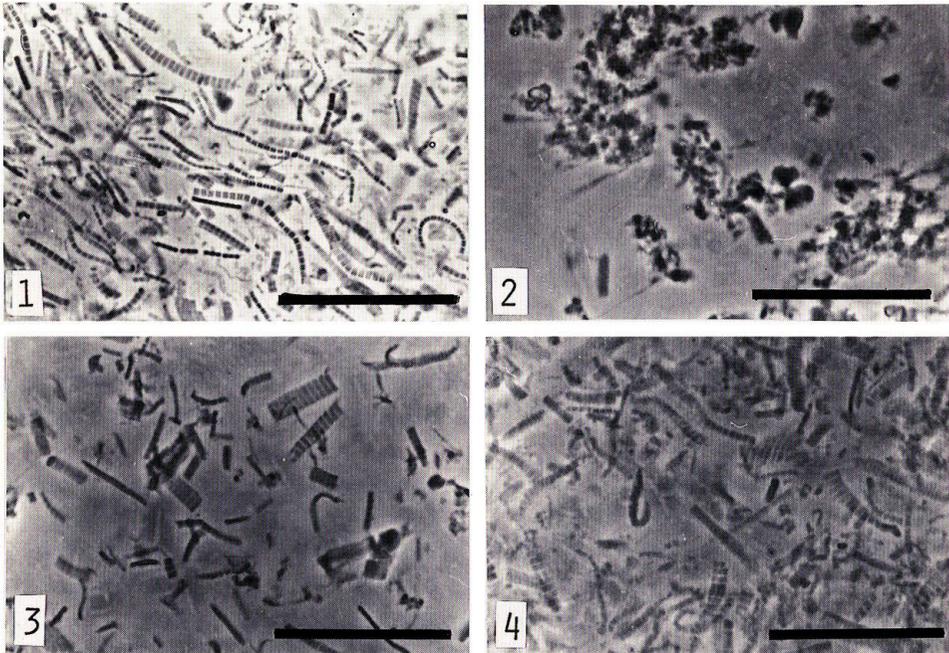
従って、0.1% SDSを含む10%ポリアクリルアミドゲルで行った。染色ゲルをOZUMOR 82 デンシトメーター (明日香工業) によりトレースし、その全面積に対する各バンドの相対面積を求めて相対含量とした¹⁴⁾。

膨潤度 Mf懸濁液 (8-9 mg/ml) 40 ml を遠心分離 (20,000×g, 20 分間) し、沈殿 Mf の容積を求めた。この沈殿 Mf を蒸留水あるいは0.1% CaCl₂ 水溶液による洗浄処理を行い20,000×g, 20 分間の遠心分離後の沈降容積を測定し、洗浄処理前の容積に対する容積比を膨潤度とした。

タンパク質はビウレット法およびマイクロケルダール法により定量した。Ca の定量は Yanagisawa の方法¹⁵⁾で行った。

結果と考察

洗浄による形態変化 調製後の Mf は図1にみられるように明瞭な横紋構造を有するサルコメアとして観察された。このような Mf を1-3 回水洗浄をおこなった直後にそれぞれ顕微鏡観察すると、1 回目の洗浄後で既に Mf の横紋構造を認め得ない程度の不鮮明な映像となっていた。この



Figs. 1-4. Light micrographs (phase contrast) of freshly prepared and wash-treated myofibrils. In all light micrographs, the bars represent 50 μ m. The numbers in the micrographs indicate the figure number.

Fig. 1. Myofibrils in 0.16 M KCl solution after preparation. Fig. 2. Myofibrils which were washed once with distilled water and then three times with 0.16 M KCl solution. Fig. 3. Myofibrils which were washed five times with 0.1% calcium chloride solution (pH 7.0). Fig. 4. Myofibrils which were washed twice with 0.1% calcium chloride solution and then five times with distilled water. Each KCl solution contains 40 mM Tris·HCl buffer (pH 7.5).

水洗浄後のMfを再び0.16 M KCl緩衝液で遠心分離による洗浄を行うとMfは離水収縮をおこすが、図2にみられるように横紋構造は消失したままで、一見して凝塊状を呈していた。

Mfを水洗浄した時に横紋構造が認められなくなることは前報⁹⁾と同様に水和膨潤によると考えられる。このことは3回以上の遠心分離操作によって沈降しないことから裏付けられた。前報⁹⁾で採用した透析による方法では、膨潤したMfを0.16 M KCl緩衝液に透析することにより正常な横紋構造を有するMfに還元したが、本実験での遠心分離による水洗浄では0.16 M KCl緩衝液で洗浄してももはや水洗浄前の正常な像には還元しなかった。この両者の相違は、透析法が比較的温和な脱塩条件であるのに対して、本実験で採用した遠心分離によるバッチ式洗浄操作はきわめて過激な条件であるためと考えている。

次にCa洗浄との関連で観察した結果を図3,4に示した。これらからも明らかなようにCa洗浄のみを行っても形態的变化は認められず(図3), Ca洗浄を2回行った後、水洗浄を5回繰り返したもの(C₂-H₅)についても横紋構造は明瞭に認めることができ、特に変化は観察できなかった(図4)。一方、図には示さなかったが、最初に水洗浄を2回行い、その後Ca洗浄を3回反復したMf(H₂-C₃)では横紋構造を認めることができず、図1と同様に凝塊像となった。

水洗浄およびCa洗浄によるATPase活性の変化 コイアクトミオシン^{4,9)}およびMf³⁾を低濃度緩衝液で洗浄を繰り返すと、それらは脱感作されることが既に報告されている。ここでは水洗浄とCa洗浄によってATPase活性がどのように変化するのか、またCa感受性にも影響するかどうかについて検討した。図5に水洗浄反復に伴うATPase活性の変化を示した。Ca-ATPase活性(60 mMおよび0.5 M KCl存在下)は1-3回にわたる洗浄によって変化は認められなかった。Mg-ATPase活性も同様にほとんど変化はみられなかったが、3回目の水洗浄で約10%上昇することもあった。一方、EDTA-ATPase活性は洗浄回数が増すにしたがって、比活性の増大することが認められた。これはミオシンとアクチンの結合の弱まった可能性¹⁰⁾を支持する結果であった。

次に水洗浄とCa洗浄の併用による変化について検討した。図6に水洗浄とCa洗浄の組み合わせによる各種ATPase活性値を示した。Ca-ATPase活性(60 mMおよび0.5 M KCl存在下)はいずれの洗浄処理によっても変化は認められなかった。EDTA-ATPase活性は水洗浄により上昇し、この水洗浄処理によって一旦上昇したEDTA-ATPase活性は、その後のCa洗浄によって元に戻

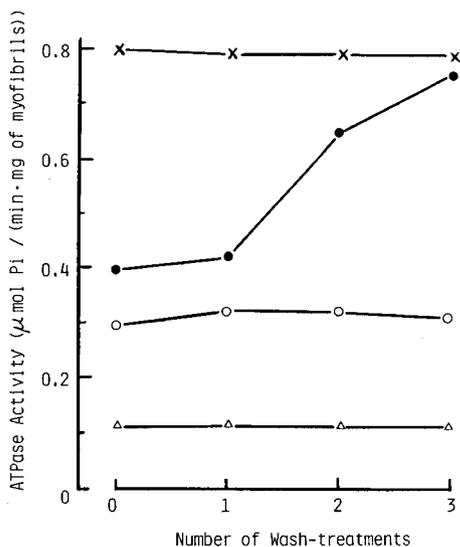


Fig. 5. Effect of repeated wash-treatments with distilled water on Ca-, Mg-, and EDTA-ATPase activity of carp myofibrils.

○, Ca-ATPase activity (60 mM KCl);
 △, Ca-ATPase activity (0.5 M KCl); ×,
 Mg-ATPase activity; ●, EDTA-ATPase
 activity.

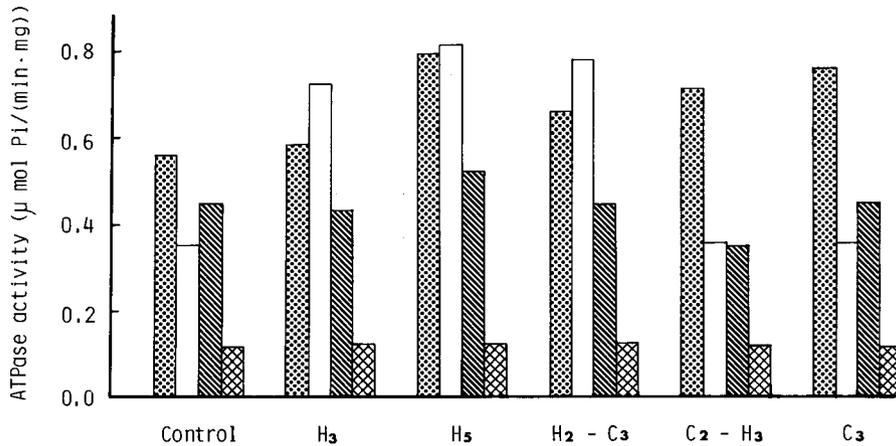


Fig. 6. Changes in ATPase activity of carp myofibrils wash-treated with distilled water and/or 0.1% calcium chloride solution.

Capital H and C, and the figure of subscript are the same as in Table 2.

▨: Mg-ATPase activity, □: EDTA-ATPase activity,
▧: Ca (60 mM KCl)-ATPase activity, ▩: Ca (0.5 M KCl)-ATPase activity.

Table 1. Effect of repeated wash-treatments using distilled water on Mg-ATPase activity and Ca-sensitivity of carp myofibrils.

Number of wash-treatments	Mg-ATPase activity (μmol Pi/(min·mg))		Ca-sensitivity* (%)
	with Ca	with EGTA	
0	0.833	0.204	75.5
1	0.830	0.276	66.8
2	0.953	0.511	46.4
4	0.768	0.698	8.2

$$* \text{Ca-sensitivity (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{ATPase activity with EGTA}}{\text{ATPase activity with Ca}} \right)$$

らなかった (H₂-C₃)。一方, Ca 洗浄のみをおこなった場合 (C₃) および Ca 洗浄後に水洗浄した場合 (C₂-H₃) には EDTA-ATPase 活性の上昇は認められなかった。また, Mg-ATPase 活性は水洗浄と Ca 洗浄の組み合わせで 20-30% の上昇を認めた。

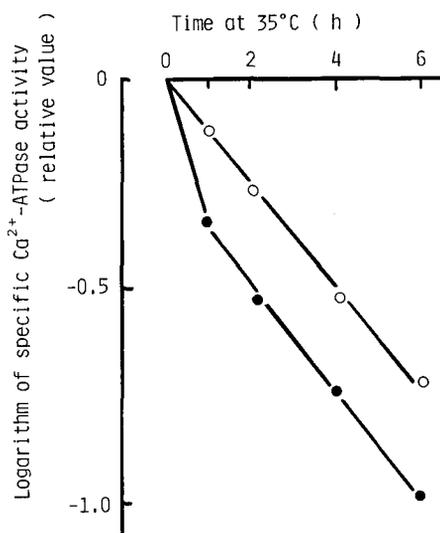
Mf の Ca 感受性を比較した結果を表 1 に示した。洗浄前に 75.5% であったものが水洗浄回数の増加とともに徐々に低下し, 水洗浄 4 回目では 8.2% になり明らかに脱感作されたことを示した (表 1)。また表には示していないが Ca 洗浄を先行した場合 (C₂-H₃) の Ca 感受性は 56.6% であり, 水洗浄を先行した場合 (H₂-C₃) は 25.9% で Ca 洗浄を先行した時のほうが高い Ca 感受性を保持していた。

このように水洗浄の反復によってみられた EDTA-ATPase 活性の上昇および Ca 感受性の低下減少傾向は, Ca 洗浄を先に行うことによって抑制されることが明らかとなった。

洗浄による Mf Ca-ATPase 活性の熱失活様式の変化 洗浄によりイオン B¹⁷⁾ や Mf^{3,4)}

Fig. 7. Logarithmic plots of the remaining Ca-ATPase activities for the thermal inactivation of carp myofibrils before and after wash-treatments with distilled water.

○, Before the wash-treatment with distilled water. The k_D is $8.64 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.
●, After the wash-treatment with distilled water (three times). The k_{D1} and k_{D2} are $22.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and $9.58 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, respectively.



を脱感作するとき、アクチンの一部が流出していることは既に知られている。この点について、ここでは水洗浄あるいはCa洗浄処理したMfを用いて35°CにおけるCa-ATPase活性の熱失活曲線から検討した。図7に失活曲線の一次反応プロットを示した。洗浄前のMfは一次反応式に従う単一直線で示され、その失活速度恒数(k_D)は $8.64 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ であった。一方、水洗浄3回後のものでは最初に速やかで、次いで緩やかな失活を示し、いずれも一次反応式に従う直線で表わすこ

Table 2. The apparent rate constants for thermal inactivation of carp myofibrils wash-treated using distilled water and/or a calcium chloride solution.

The apparent rate constant (k_D) for the thermal inactivation of Ca-ATPase activity was calculated by the method described by Murozuka et al.¹¹⁾ k_{D1} represents the apparent rate constants for the initial rapid phase and k_{D2} the slower second phase which are calculated from the two-phased first-order plots.

Wash-treatment	Apparent rate constant ($\times 10^5 \text{ s}^{-1}$)		
	k_D	k_{D1}	k_{D2}
H ₀ * ¹	11.2		
C ₂ * ² -H ₁	9.26		
C ₂ -H ₂	10.2		
H ₂		12.5	5.76
H ₂ -C ₁		13.3	7.14
H ₂ -C ₂		13.9	8.15

*¹ Capital H means water wash-treatment and the subscript figure indicates the number of wash-treatments.

*² Capital C means 0.1% CaCl₂ wash-treatment and the subscript figure indicates the number of wash-treatments.

Table 3. Proportion of the myofibrillar components calculated from the densitometric tracing of SDS-polyacrylamide gels.

Component	Proportion of component (%) ^{*1}		Loss in each component (%) ^{*3}
	before wash-treatment	after wash-treatment ^{*2}	
Myosin ^{*4}	54.2	65.3	0.00
Actin	20.4	17.8	27.5
Tropomyosin	6.4	2.8	64.1
Troponin	8.1	3.2	66.7
Others	10.9	10.9	17.4

^{*1} The percentages show the relative densitometric area of each component to the total densitometric area.

^{*2} The myofibrils were washed three times using distilled water followed by three times using 0.16 M KCl-40 mM Tris · HCl buffer (pH 7.5).

^{*3} The loss in each component was calculated on the assumption that no myosin loss occurred in the myofibrils.

^{*4} Heavy and light chains are included.

とができた。それぞれの失活速度恒数 (k_{D1} と k_{D2}) は、 $22.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ と $9.58 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ であった。このことは水洗浄の反復によってミオシンと結合しているアクチン量が相対的に減少した可能性を示すもので従来⁴⁾の報告⁴⁾に照らし合わせて考えるとアクチンの流出を強く支持する結果であった。大谷⁴⁾はコイ Mf を 2 mM Tris · maleate 緩衝液 (pH 7.5) で洗浄する実験において Ca-ATPase の 35°C における熱失活によってアクチンの流出を確認していないが、本実験の蒸留水による洗浄では明らかに 2 段階の変性様式を示した。このような違いがみられた原因として、洗浄に用いた溶液の違い (緩衝液と蒸留水) および筋原繊維調製法の違い (本実験では Triton × 100 を使用しており、さらに洗浄回数も多い) にあるのではないかと考えている。

水洗浄と Ca 洗浄を組み合わせた時の 35°C での失活速度恒数 (k_D あるいは k_{D1} と k_{D2}) を表 2 に示した。洗浄前 (H_0) および Ca 洗浄を先行した Mf (C_2-H_1 と C_2-H_2) では単一直線で示される一次反応式に従って失活した。これに対して水洗浄のみ (H_2) および Ca 洗浄に先だてて水洗浄を行った Mf (H_2-C_1 と H_2-C_2) では速やかな失活とそれに続く緩やかな失活を示し、それぞれ一次反応式に従う 2 段階の失活様式で表わされた。このように水洗浄を先行した時には 2 段階で失活が進行することから、前述したようにアクチンの流出を支持する結果が得られ、Ca 洗浄を先行した場合には、アクチンの流出に対して抑制的に作用していることが示された。

水洗浄 Mf の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 水洗浄前および 3 回水洗浄を行った Mf について SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、そのトレース図より Mf の各構成タンパク質の組成比を求めたのが表 3 である。トロポミオシンおよびトロポニンの調節系タンパク質区分の損失は 64-67% と大きい値を示し、またアクチン区分が約 28% の損失を示した。大谷⁴⁾が Mf からアクチン損失を知るための指標として用いたアクチン (Ac) とミオシン重鎖 (HC) の比 (Ac/HC) を求めたところ、水洗浄前後で 0.43 から 0.32 に低下していた。水洗浄による同様の実験を 4 回繰り返して行ったが、同様の結果が得られた。このように Ca 感受性の低下や Ca-ATPase 活性の熱失活様式の変化から推測した調節系タンパク質やアクチンの損失を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によっても確認することができた。

膨潤度およびタンパク質の溶出 Mf を蒸留水で透析した時に著しい水和膨潤をおこすことを

Table 4. Comparison of the swelling of carp myofibrils under various washing conditions.

Wash-treatment solution	Number of wash-treatments	Swelling* ¹		
		H ₂ ^{*2} -C ₂ ^{*2}	C ₂ -H ₅	C ₂ -K ₃ ^{*3} -H ₃
Before washing	—	1.00	1.00	1.00
Distilled water* ⁴	1	1.09	↓	↓
	2	7.09		
0.1% Calcium chloride	1	1.36	0.72	0.73
	2	0.73	0.58	0.64
0.16 M KCl-40 mM Tris · HCl buffer (pH 7.5)	1	—* ⁵	↓	0.82
	2	—		0.87
	3	—		0.91
Distilled water	1	—	0.83	1.09
	2	—	2.30	6.82
	3	—	3.30	NP* ⁶
	4	—	3.50	—
	5	—	3.67	—

*¹ Swelling = $\frac{\text{The volume of myofibrils after wash-treatment}}{\text{The volume of myofibrils before wash-treatment}}$

*² Capital and subscript are the same as in Table 2.

*³ Capital K means wash-treatment using 0.16 M KCl-40 mM Tris · HCl buffer (pH 7.5) and the subscript figure indicates the number of wash-treatments.

*⁴ A forty ml aliquot of the sample suspension (9 mg/ml) was centrifuged at 20,000 × g for 20 min, and following a wash-treatment was again centrifuged under the same conditions.

*⁵ Not tested.

*⁶ No precipitate was found.

前報⁸⁾で報告した。ここでは水洗浄とCa洗浄との組み合わせによる膨潤度の変化について検討するとともに遠心分離後の上澄液に溶出するタンパク質も定量した。膨潤度の測定結果を表4に示した。洗浄処理前のMfの膨潤度1に対して、水洗浄2回目では約7の膨潤度を示した。水洗浄2回に続いてCa洗浄を行うと(H₂-C₂)、膨潤度は1以下となった。Ca洗浄後の膨潤度が1以下になるのは、従来から知られているように離水を促進するため¹⁸⁾(保水力が低下するため¹⁹⁾であると考えている。これに対してCa洗浄を先行すると(C₂-H₅)、膨潤度は少し低下し、5回回復しても約3.7で水洗浄のみの時のような著しい膨潤は認められなかった。しかし、Ca洗浄後に0.16 M KCl-Tris · HCl (pH 7.5)で3回洗浄してから水洗浄を行うと(C₂-K₃-H₃)、膨潤性は回復し2回目の水洗浄で膨潤度は約7を示した。3回目の水洗浄では水洗浄のみのときのように著しく水和膨潤し、遠心分離によって沈殿区分は認められなかった。水洗浄による膨潤はCa洗浄を先に行うことによって抑制することができ、このことは形態観察の項で述べた横紋構造を保持していた結果とよく対応するものであった。

膨潤度測定の時と同様の処理を行い、その時の遠心分離上澄液に溶出するタンパク質を定量したところ(表には示していない)、H₂-C₂で5.89%、C₂-H₂で1.59%、C₂-K₃-H₂で5.80%であった。H₂-C₂とC₂-K₃-H₂においてタンパク質溶出量の82-92%は第2回目の水洗浄時に溶出した。

Table 5. Calcium content of the calcium treated myofibrils which were washed using distilled water or 0.1 M KCl solution.

Wash-treatment solution	Number of wash-treatments	Calcium content ($\mu\text{g Ca}/100 \text{ mg protein}$)	Remaining calcium (%)
Distilled water	0	574.7*	100
	1	475.7	82.8
	2	441.0	76.7
	3	434.3	75.6
	4	434.5	75.6
0.1 M KCl- 25 mM Tris · HCl buffer (pH 7.5)	0	574.7	100
	1	162.5	28.3
	2	57.3	10.0
	3	26.4	4.6
	4	11.5	2.0

* Myofibrils were washed twice using 0.1% CaCl_2 solution. The ratio of 0.1% CaCl_2 solution to the precipitated myofibrils is 10:1 by volume.

このことは膨潤度の結果ともよく対応していた。そして熱失活様式の変化および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を考え併わせると、膨潤をおこす程度にまで達した Mf はタンパク質の一部を溶出し易い状態にあることを示唆している。

カルシウム量の変化 次に Ca の量的変化について検討した結果を表 5 に示した。水洗浄では Ca が除去され難く、低イオン強度の溶液で容易に除去されることがわかる。この結果に基づき前項で示した膨潤度について考えてみると、Ca 洗浄後の水洗浄で著しい膨潤が認められなかったのは Ca が残存するためであり、また Ca 洗浄と水洗浄の間に低イオン強度の溶液で洗浄すると Ca は除かれ、したがって Mf は膨潤し易くなったためであることがうまく説明できる。

福見¹⁹⁾は脱イオン水を用い、スケトウダラ肉を洗浄した時、Ca 溶出量の少ないことを報告しており、さらに 0.1% 食塩水を用いて洗浄した場合²⁰⁾、Ca と Mg は効果的に溶出することをみている。Berman and Swift²¹⁾は 3°C において子牛肉から 0-3.7% の食塩水によって溶出される Ca 量を定量し、塩濃度の高いほうが Ca 溶出量の多いことを報告している。このような生体中に存在する Ca と本実験のようにあとから添加によってタンパク質表面に静電的に結合した Ca^{2+} とを同一視することには無理があるかも知れないが、生体内に遊離状態で存在する Ca を考える場合、今回の実験結果はこれら既報の結果を支持するものといえる。

以上のことから、水洗浄によって Mf は水和膨潤をおこし、ミオシンとアクチンの結合が弱められ、この時アクチンなど一部のタンパク質の流出を生ずるが、Ca 洗浄はこのような現象に対し抑制的に作用することが明らかになった。

文 献

- 1) 岡田 稔 (1964). かまぼこの足に対する水晒しの影響. 日本誌 30, 255-261.
- 2) 新井健一 (1986). 冷凍すり身製造の化学的原理. pp. 79-84. 冷凍すり身. 265 p. 日本食品経済社, 東京.
- 3) 今野久仁彦 (1978). コイ背肉およびウサギ骨格筋筋原線維の Ca 脱感作の比較について. 日本誌 44, 239-246.
- 4) 大谷 修・引地 聡・西田清義・関井利之・新井健一 (1983). 洗浄による貝類および魚類の筋

- 原線維とミオシン B からのアクチンの損失, 日水誌 **49**, 415-424.
- 5) 西岡不二男 (1984). 水晒, pp. 62-73. 魚肉ねり製品—研究と技術 (水産学シリーズ 50). 134 p. 恒星社厚生閣, 東京.
 - 6) 佐伯宏樹・尾崎弘忠・野中道夫・若目田篤・信太茂春・新井健一 (1985). コイ筋原繊維の保水能と温度安定性に及ぼす塩化カルシウムの影響, 日水誌 **51**, 1311-1317.
 - 7) 佐伯宏樹・若目田篤・尾崎弘忠・野中道夫・新井健一 (1986). スケトウダラ筋原繊維の保水能と温度安定性に及ぼす塩化カルシウムの影響, 日水誌 **52**, 1771-1777.
 - 8) 飛嶋千尋・猪上徳雄・信濃晴雄 (1989). 種々の KCl 濃度下におけるコイ筋原繊維の顕微鏡観察像と ATPase 活性, 粘度, 膨潤度との関連性について, 北大水産葉報 **40**, 65-71.
 - 9) 今野久仁彦・関伸夫 (1974). コイ筋肉アクトミオシンの脱感作について, 日水誌 **40**, 1277-1284.
 - 10) Gomori, G. (1942). A modification of the colorimetric phosphorous determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 955-960.
 - 11) 室塚剛志・新井健一 (1976). キハダマグロ冷凍肉からミオシン ATPase の精製と温度安定性について, 日水誌 **42**, 65-70.
 - 12) Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
 - 13) 関伸夫・北尾勝・今野久仁彦・新井健一 (1973). ティラピア筋肉アクチンの精製について, 日水誌 **39**, 1211-1219.
 - 14) 高士令二・室塚剛志・新井健一 (1974). コイおよびティラピア背筋ミオシンとウサギ骨格筋ミオシンの light chain. 日水誌 **40**, 1063-1069.
 - 15) Yanagisawa, F. (1955). New colorimetric determination of calcium and magnesium. *J. Biochem.* **42**, 3-11.
 - 16) 若目田篤・新井健一 (1984). 高濃度の塩存在下におけるコイのミオシン B の変性機構, 日水誌 **50**, 635-643.
 - 17) 新井健一 (1977). 変性の指標と測定法, pp. 75-90. 魚肉タンパク質 (日本水産学会編). 126 p. 恒星社厚生閣, 東京.
 - 18) 三宅正人 (1959). 用水, pp. 222-229. 水産煉製品ハンドブック (全国水産煉製品協会編), 709 p. 全国水産煉製品協会, 東京.
 - 19) 福見徹 (1964). 水産動物肉に関する研究-2. 水晒による有機物, 灰分, カルシウム, マグネシウム, 銅, 鉄量の変化, 北水試月報 **21**, 379-386.
 - 20) 福見徹・田元馨・秀里尊寿 (1965). 冷凍すり身製造における水晒しの合理化—水量節約の可能性について—, 北水試月報 **22**, 78-86.
 - 21) Berman, M.D. and Swift, C.E. (1964). Meat curing — The action of NaCl on meat electrolyte binding. *J. Food Sci.* **29**, 182-189.
 - 22) 大高文男 (1963). 肉製品製造上の諸問題, pp. 293-323. 食肉・肉製品ハンドブック (橋本吉雄・木塚静雄・安藤則秀・藤巻正生編), 670 p. 朝倉書店, 東京.