



Title	冷凍すり身を原料とした塩すり身のゲル形成機構に関するタンパク質化学的研究
Author(s)	船津, 保浩
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	甲第3256号
Issue Date	1993-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3071552
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49896
Type	doctoral thesis
File Information	000000265394.pdf



主 論 文

冷凍すり身を原料とした塩すり身の
ゲル形成機構に関するタンパク
質化学的研究

船 津 保 浩

平 成 5 年

①

冷凍すり身を原料とした塩すり身の
のゲル形成機構に関するタンパク
質化学的研究

船津保浩

略語

本論文では以下の略語を使用する。ただし、図の説明文についてはその限りでない。

- Mf : Myofibrils
- MB : Myosin B
- (Myosin) HC : Heavy chain
- SDS : Sodium dodecyl sulfate
- SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
- Components analyzed by SDS-PAGE ;
- HCn : Cross-linked myosin heavy chain, migrating into
5% polyacrylamide gel
- HCn' : Cross-linked myosin heavy chain, too large to
enter into 5% polyacrylamide gel
- HCn'' : Cross-linked myosin heavy chain, insoluble into
SDS-urea medium
- X₁ : Components migrating between HC and actin
- X₂ : Components migrating faster than tropomyosin
- A : Actin
- TM : Tropomyosin
- Σ HCn : Sum of cross-linked myosin heavy chains
= (HCn + HCn' + HCn'')
- K : Kilo dalton

目次

略語	1
目次	2
緒言	5
I 実験方法	8
(1) 実験試料	8
(2) 実験方法	8
1) すり身の調製	8
2) すり身の酸処理	9
3) 酸処理したすり身のMf Ca-ATPase活性の測定	9
4) かまぼこゲルの調製	10
5) かまぼこのゲル物性の測定	10
6) SDS-尿素混液による坐りゲルの可溶化および可溶化率の測定	10
7) SDS-PAGEによる坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット成分の定量	11
8) ミオシンBの調製	12
9) 坐りゲルの塩による溶解	12
10) 塩溶性タンパク質のSepharose Cl-4Bによるゲル濾過	12
II 実験結果および考察	13
第一章 肉糊のゲル形成能に及ぼすpHの効果	13
第一節 スケトウダラ肉糊の坐りによるゲル形成とミオシンHCの変化に及ぼすpHの影響	13
1) 坐りゲルの破断強度および凹みの経時変化	14
2) 坐りゲルの破断強度と凹みのpH依存性	14
3) 坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の経時変化	14

4) 肉糊のpHと坐りゲルの品質との関係	21
5) 考察	23
第二節 スケトウダラすり身の酸処理による肉糊のゲル形	
成能とミオシンHCの変化	25
1) 酸処理に伴うすり身のMf Ca-ATPase活性の経時変化	26
2) 酸処理に伴う坐りゲルの破断強度と凹みの経時変化	26
3) 酸処理に伴う坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の経時変化	30
4) すり身の酸処理時間とそれから調製した坐りゲルの品質の関係	35
5) 考察	37
第三節 乳酸添加によるマイワシ肉糊の微酸性化がゲル形	
成能とミオシンHCの多量化能に及ぼす影響	41
1) 乳酸添加した肉糊の坐りおよび坐り一加熱ゲルの破断強度と凹みの経時変化	42
2) 乳酸添加した肉糊の坐りおよび坐り一加熱ゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の経時変化	42
3) 乳酸添加した肉糊より調製した坐りゲルおよび坐り一加熱ゲルの品質の特徴	48
4) 考察	52
第二章 肉糊のゲル形成能に及ぼす糖類の効果	
特にスケトウダラ肉糊のゲル形成能とミオシンHCの変化に及ぼすソルビトールの影響	54
1) 坐りゲルおよび坐り一加熱ゲルの破断強度の経時変化に対するソルビトールの影響	55
2) 坐りゲルおよび坐り一加熱ゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の経時変化に対するソルビトールの影響	57
3) ミオシンHCの多量化とソルビトール濃度との関係	61

4) 考察	64
第三章 塩ずりおよび坐りの過程で起こるスケトウダラ	
すり身中のMfタンパク質の変化	67
1) 塩ずりおよび坐り中に起こる肉糊中のMfタンパク質	
の塩溶解性	68
2) 塩ずりおよび坐り中に起こる肉糊の破断強度と凹み	
の経時変化	72
3) 塩ずりおよび坐り中の肉糊より塩で溶解するタンパ	
ク質のサブユニット組成の経時変化	74
4) 坐りゲルより塩で溶解するタンパク質のSephrose	
C1-4Bによるゲル濾過溶出図の経時変化	81
5) 考察	91
III 総合考察	104
IV 文献	108
謝辞	113

緒言

古くから日本では多くの魚介類が主要なタンパク質供給源として食用に供されてきた。近年、食生活の欧米化に伴って畜産物の消費が急増しているが、日本人の食生活における水産物の消費は欧米に比べて極めて多く、その重要性は昔と変わっていない。¹⁾ また、魚介類のタンパク質の栄養価は畜産物には劣らないこと、またその脂質には成人病の予防効果があると言われるようになり、さらにダイエットの流行やグルメ指向²⁾ も加わって、世界各国で水産物の価値が再認識されるようになっている。

わが国の伝統的食品であり、水産加工品の中でもっとも生産量の多いのが“かまぼこ”である。³⁾ これは魚肉に2～3%の食塩を加えて、すり潰し、肉糊にしてから、加熱すると弾力のあるゲルを形成する工程を経て作られる。最近では、この“かまぼこ”などのねり製品中において起こる筋肉タンパク質の動きを解析する研究法も考案され、結果として加工食品の品質、特に食感に寄与する物性との関わりが明らかになってきた。⁴⁾ たとえば、ねり製品のゲル強度は魚肉の主要タンパク質であるミオシンHCの多量化反応に基づく高次構造(網状構造)の形成によって付与されることを示す実験事実が沼倉ら^{5~7)} によって提示された。

スケトウダラの冷凍すり身化時代は昭和40年代より始まり昭和47年にその最盛期を迎えたが、昭和52年以降は200カイリ漁業専管水域が設定されて同魚の水揚量が年々減少した。⁸⁾ そのため、スケトウダラ以外の魚をすり身原料として有効に利用する研究が進められ、^{9~11)} 特に日本近海を回遊する多獲性赤身魚にその焦点が注がれた。しかし、赤身魚は死後グリコーゲンの分解による乳酸の蓄積が起こり、それに伴いpHが低下し易い短所を持っている。^{12, 13)} pHが低下すると、一般にMFタンパク質が変性し易くなり^{14~17)}、同時にゲル形成

能の低下が起こる。¹⁵⁾ このMfタンパク質の酸変性と制御法については試験管レベルでの研究例^{18~20)}がいくつかあり、また、魚肉レベルでは、水中ミンス工法^{9, 21)}によってpHを調節して赤身魚の冷凍すり身化をする技術開発が進められてきた。しかし、肉糊レベルで、pHがゲル化に及ぼす影響についてタンパク質化学的に検討した研究例はほとんど見られない。

そこで本論文では、冷凍すり身を原料とした魚類肉糊のゲル化に伴うゲル物性の増大とミオシンHCの多量化反応に対して大きな影響を及ぼすと考えられる2つの要因、すなわち赤身魚肉などのゲル化に際して特に調節が必要となる肉糊のpHと、冷凍すり身製品中に必ず付加されている糖類の効果を詳細に検討し、その結果を基にして魚類肉糊のゲル形成機構をタンパク質化学的な視点から解明しようとした。その内容は三章から成るが、先ず第一章ではスケトウダラのすり身を使ってそのpHを微酸性から微アルカリ性の範囲に調節し、肉糊のゲル化特性に対する影響を検討した。すなわち、第一節では、初めからpHが低下しており、Mfタンパク質が既に変性しているマイワシを原料とするのを避けて、pHが中性付近を保っているスケトウダラのすり身を用いて、すり身のpHを無機酸と塩基によって変化させ、その肉糊のゲル化能とpHの関係を検討した。また、第二節では、一度酸性下で処理したスケトウダラすり身のpHを中性に戻してから塩ずりして坐らせ、肉糊のゲル化能への影響を調べ、第一節の結果と比べ、すり身のpHがゲル化に及ぼす影響と肉糊のゲル化に及ぼすpHの影響の違いを明らかにしようとした。第三節では、実際に赤身魚類肉中で生成する乳酸をマイワシすり身に加えてpHを変化させ、肉糊のゲル化能に及ぼす影響を調べ、無機酸を加えた第一節の結果と比較した。続いて、第二章では一般に冷凍すり身に含まれているソルビトールがその肉糊のゲル化に及ぼす影響を調べるために、糖を含まないスケトウダラのすり身を調製し、これに5~8%に相当するソルビ

トールを添加し、肉糊のゲル化能に対する影響を検討した。既に、糖および糖アルコールがMfタンパク質の変性を抑制する事実はよく知られている^{22~27)}ので、これらの化合物は肉糊のゲル化に対してもおそらく影響を及ぼすことが推定されるものである。なお、第三章では、スケトウダラ肉糊のゲル化の機構をタンパク質化学的な視点から明らかにするための検討をした。すなわち、上記した第一章と第二章の実験ではMfタンパク質に起こる変化をSDS-PAGEによって分析してきたが、SDS、尿素およびメルカプトエタノール共存下では肉糊中におけるMfタンパク質はそれぞれのサブユニットに解離するため、肉糊のゲル化の過程で形成されるMfタンパク質の高次構造体と、その本体を知ることは出来ない。言い換えれば、サブユニットに解離する前のタンパク質の母体、特にミオシンHCの多量体(HCn, HCn', およびHCnⁿ)を含む構造体について情報を得ることを目的とした。そのため、塩ずり後の坐り過程中にある肉糊の一部を取り出し、高濃度の塩(0.8M NaCl)溶液を加えて溶解してくるタンパク質²⁸⁾をゲル濾過に供して、ゲル化の過程で起こる溶出図型の変化と溶出成分の性状を詳しく調べた。これらの結果を総合してスケトウダラ肉糊のゲル化機構をタンパク質化学的な視点から理解する試みを行った。

実験方法

(1) 実験試料

本研究では、銚子沖で漁獲された新鮮なマイワシ *Sardine*, *Sardinops melanostictus* と函館沖で漁獲されたスケトウダラ *Walleye pollack*, *Theragra chalcogramma* を試料とし、すり身を調製した。特にマイワシの場合は、漁獲後一日以内にすり身を調製した。

また、調製した冷凍すり身は -30°C で保存したものであり、24カ月以内にゲル化の実験に使用した。なお、すり身の添加物は以下のTable 1にまとめた。また、実験にはこの他にも市販の冷凍すり身も使用した。

Table 1 List of additives in surimi.

Surimi Species	Additives(%)			protein	
	sucrose	sorbitol	polyphosphate	ng/g wet wt.	pH
Walleye pollack(A)	4.0	4.0	0.2	167.9	7.0
Walleye pollack(B)	4.0	4.0	—	181.0	6.9
Sardine	4.0	4.0	—	136.6	6.9

(2) 実験方法

1) すり身の調製

まず、マイワシの場合は、新鮮な落とし身を採肉し、4倍量の0.1% NaHCO_3 , 0.1% NaCl 混合溶液中に懸濁し、直ちに、石臼型連続式粉碎機を用いて低温で水中粉碎した。次いで遠心分離機(負荷遠心力は $11,000 \times g$)で脱水し、懸濁液中から粉碎した魚肉を回収した(この

魚肉を脱水粉碎肉と称する。)。この脱水粉碎肉に重量比で4%ソルビトール、4%シュクロースを混合し、コンタクトフリーザーを用いて冷凍後、 -30°C にて貯蔵した。なお、以後の実験に供したすり身の水分は76.4%、脂質は2.3%、pHは6.9であった。

次に、スケトウダラの場合は、三枚におろして背肉を採肉し、4倍量の0.1% NaCl溶液で低温で水晒し(3回、30分間以上)、バケツ型の遠心分離機(負荷遠心力は $1,500 \times g$)で脱水し、さらに、遠心分離機(負荷重力は $11,000 \times g$)で再脱水した。そして、0 ~ 8%のソルビトールを加え、冷凍せずにゲル化の実験に供した。すり身の水分は84.3%、pHは6.89であった。

2) すり身の酸処理

市販の重合リン酸塩を含まないスケトウダラの冷凍すり身が完全に融解しないうちに細切し、少量の0.2N HClを添加し、スピードカッター(ナショナル MK-K7)を用いて混和して、pHが6.0になるように調節した。これを 2°C に保持しながら経時的に一部を取り出し、0.2N NaOHを加えて、再びスピードカッターを用いて混和して、pHを7.0 ~ 7.1にし、酸によるすり身の処理を停止させた。(以下、すり身を一度酸性にした後中性に戻すまでの操作を酸処理と呼ぶ)。また、マイワシの冷凍すり身の場合も、HClの代わりに乳酸を使用する以外は全く同様に操作して酸処理した。

3) 酸処理したすり身のMf Ca-ATPase活性の測定

上記の方法で酸処理中のスケトウダラすり身(B)の肉糊(タンパク質濃度 161.0 mg/g)から、経時的にその一部を取り出し、加藤ら²⁹⁾の方法で定量的にMf懸濁液を調製し、それらのCa-ATPase活性を測定した。Ca-ATPase活性は0.1 ~ 0.2 mg/mlのMfタンパク質と0.1M KCl, 5mM CaCl_2 , 25mM Tris-maleate (pH 7.0)からなる反応混液に

1mM ATPを加え、25°Cにおいて遊離する無機リン酸を定量することによって測定し³⁰⁾、比活性($\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$)および全活性($\mu\text{mol pi}/\text{min}\cdot 5\text{g surimi}$)として表示した。なお、タンパク質量は牛血清アルブミンVを標準としてビュウレット法³¹⁾によって測定した。

4) かまぼこゲルの調製

マイワシの場合、冷凍すり身が完全に融解しないうちに細切し、そのまま(pH 6.9)、または乳酸でpHを6.0にした。また、スケトウダラの場合は少量のHClとNaOHですり身の最終pHを5.76 ~ 8.40にした。これらpHの異なるすり身と、他に酸処理を行ったすり身(中性に再調節)から、タンパク質濃度が130mg/gとなるように水と2.5%のNaCl(終濃度)を添加し、スピードカッター(ナショナルMK-K7)を用いて、5分間、4°Cでらいかいし、肉糊を調製した。肉糊中の気泡を抜いた後、プラスチック製円筒容器(直径3.7 cm × 高さ2cm)に充填し、キャップで密封し、25°Cの一定温度で坐りを12時間行った。(以上の操作で得たゲルを、以下坐りゲルと呼ぶ。)。さらにその一部を90°Cで20分間加熱した。(これを以下坐り一加熱ゲルと呼ぶ。)

5) かまぼこのゲル物性の測定

坐りゲルおよび坐り一加熱ゲルにつき、レオメーター(レオナーRE-3305, 山電株式会社製)を使用して、直径5mmの円柱型プランジャーで破断強度(g)と破断凹み(mm)を測定した。

6) SDS-尿素混液による坐りゲルの可溶化および可溶化率の測定

細切した坐りゲル0.4gを精秤し、7.5mlの8M 尿素-2% SDS-2% 2-メルカプトエタノール-20mM Tris-HCl (pH 8.0)溶液を加えて100°Cで2分間加熱した後、室温で24時間攪拌しながら可溶化させた。可溶化率は上記の溶液を10,000 × g, 20分間遠心分離後、供試したタ

ンパク質量に対する上清中のタンパク質量の相対値(%)で表した。

7) SDS-PAGEによる坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット成分の定量

WeberとOsbornの方法³²⁾により、5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行い、Coomassie Brilliant Blue R によって染色した。脱色は50%メタノール-7% 酢酸で6 ~ 8時間、つづいて7% 酢酸でゲルの背景が透明化するまで行った。泳動ゲル上の各Mfタンパク質のサブユニット成分量は、デンストメーター(島津製作所製CS-910型)を用いて、640nmと700nmの吸光値の差として測定し、泳動ゲル上に認められる各成分の染色強度の合計値に対する相対染色強度(%)として表した。定量した成分はミオシンHC, HCn, A, TM, X₁, およびX₂であるが、各成分の説明はそれぞれの実験結果の項、および略語として記載した。なお沼倉ら³³⁾は、先に泳動ゲル上の全染色強度の回収率が低下する場合があることを見いだしており、これは、SDS-尿素混液に可溶化したミオシンHC多量体の中でも、より分子サイズの大きい成分(これをHCn' と表した)が泳動ゲル中に侵入できないために起こったものと推測し、その量を計算によって求めた。そしてこの値を加えた全染色強度に対して泳動ゲル上の各成分の含量を求めている。さらに、坐りゲルがSDS-尿素混液に不溶化する場合は、それらの成分をミオシンHC多量体の特に巨大化した成分(これをHCn'' と表した)であるとみなして、各成分の含量を補正しているが、本実験においても同様にその方法にならって補正した。

8) ミオシンBの調製法

スケトウダラのみオシンB(MB)は、高士ら³⁴⁾が採用した方法に準じて調製した。すなわち、新鮮なスケトウダラ背肉を細切した後、リン酸緩衝液(pH 7.5, I = 0.05)で数回洗浄し、肉重量の3倍量の

0.55M KCl, リン酸緩衝液(pH 7.5, I = 0.6)を加えて3時間、MBを抽出した。その抽出液量に対して10倍量の冷水を加え、MBを希釈沈殿させて集めて、0.5M KCl, 40mM Tris-maleate (pH 7.0)溶液に溶解し、同溶液に対して透析後、20,000 × gで30分間遠心分離を行い、上清をMB標品とした。

9) 坐りゲルの塩による溶解

上記(4)のように調製した坐りゲルの一部を取り出し、30分間氷冷し、タンパク質濃度が130mg/g 湿重量の時は9倍量、また、30mg/g 湿重量の時は4倍量の0.8M NaCl-20mM Imidazol-HCl(pH 7.0)溶液中で、15,000 × rpmで30秒ずつ3回ホモジナイズした(日本精機製ホモジナイザーAM-7型)。そして、さらにガラス製のハンドホモジナイザーを用いて同溶液中に均質に溶解させた。その後、ただちに11,000 × gで30分間遠心分離を行い上清に溶解するタンパク質を集めた。

10) 塩溶性タンパク質のSepharose Cl-4Bによるゲル濾過

坐りゲルから溶解した塩溶性のタンパク質のゲル濾過は、0.8M NaCl, 20 mM Imidazol-HCl (pH 7.0)溶液で平衡化したSepharose Cl-4B (2.6 × 100 cm)を支持体としてゲル濾過を行った。負荷するタンパク質は17mgとし、流速は18ml/hで上記の溶液を用いて溶出を行い4.8mlずつを分画した。各画分のタンパク質濃度はマイクロビュレット法³⁵⁾で測定した。また、ピークの溶出位置は(V_e/V_0)で示したが、 V_0 はvoid volume, V_e はelution volumeである。なお、各フラクションに溶出する成分の同定はLaemmliら³⁶⁾の方法に従って0.1% SDSを含む10%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、Coomassie Brilliant Blue Rで染色して行った。

II 実験結果および考察

第一章 肉糊のゲル形成能に及ぼすpHの効果

第一節 スケトウダラ肉糊の坐りに伴うゲル形成とミオシンHCの変化に及ぼすpHの影響

魚肉ねり製品の製造工程の中、特に坐りの過程における肉糊のゲル化においては、肉糊のpHがその進行に大きく影響することがよく知られている。^{37~39)}しかし、その際に肉糊中のMfタンパク質に起こる変化についてはまだ十分な検討がなされていない。

そこで、本節の研究では重合リン酸塩を加えて調製したスケトウダラのすり身(A)に対してさらに少量の酸またはアルカリを加えて、その肉糊のpHを微酸性から微アルカリ性域にわたって変えた後、加熱してゲル化させ、その際に起こるミオシンHCの多量化とゲル物性の変化の関係を検討した。

1) 坐りゲルの破断強度および凹みの経時変化

スケトウダラのすり身をpH 6.00~8.03の間の種々のpHで塩ずりした後、25°Cの一定温度で、肉糊を加熱し、坐りゲルの破断強度と凹みの経時変化を測定し、結果をFig. 1((a)と(b))に示した。これによると、坐りゲルの破断強度と凹みは経時的に増加するが、その様式は両者とも坐り初期に急激に増加し、破断強度は3時間後、凹みは1時間後にほぼ最大に達した。ただし、pH 8.03のように12時間後に最大に達するものも一部ある。また、破断強度と凹みは本実験で調べた範囲内では、pH 7.35で最大値を示し、この値より微酸性になっても微アルカリ性になっても減少する傾向を示した。

2) 坐りゲルの破断強度と凹みのpH依存性

Fig. 1の結果より坐りゲルの破断強度と凹みの最大値をそれぞれ読み取って、処理したpHに対してプロットした結果をFig. 2に示す。これによると、破断強度はpH 7.35で最大となり、それより微酸性、または微アルカリ性の場合には小さくなるが、pHが7.35よりも微アルカリ性に傾く方が微酸性に傾くよりも著しく減少する傾向を示した。

一方、凹みはpH 6.5 ~ 7.5で最大で、しかもほぼ一定値を示しており、pHが6.5よりも微酸性に傾いても、また、pHが7.5よりも微アルカリ性に傾いても小さくなる傾向を示した。また、pHが8.0以上になると小さい値となりそれ以上変わらなかった。

3) 坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の経時変化

Fig. 2の場合と同様の条件下で調製した坐りゲルにつき、SDS-尿素混液に対する可溶化率を測定したところ、pH 7.24の場合が最も低かった。この時の坐り12時間後の可溶化率は57.6%であり、pHが7.24より酸性になっても、またアルカリ性になっても、可溶化率は高くなり、たとえば、pH 5.76の場合では87.0%、pH 8.03の場合ではほぼ100%

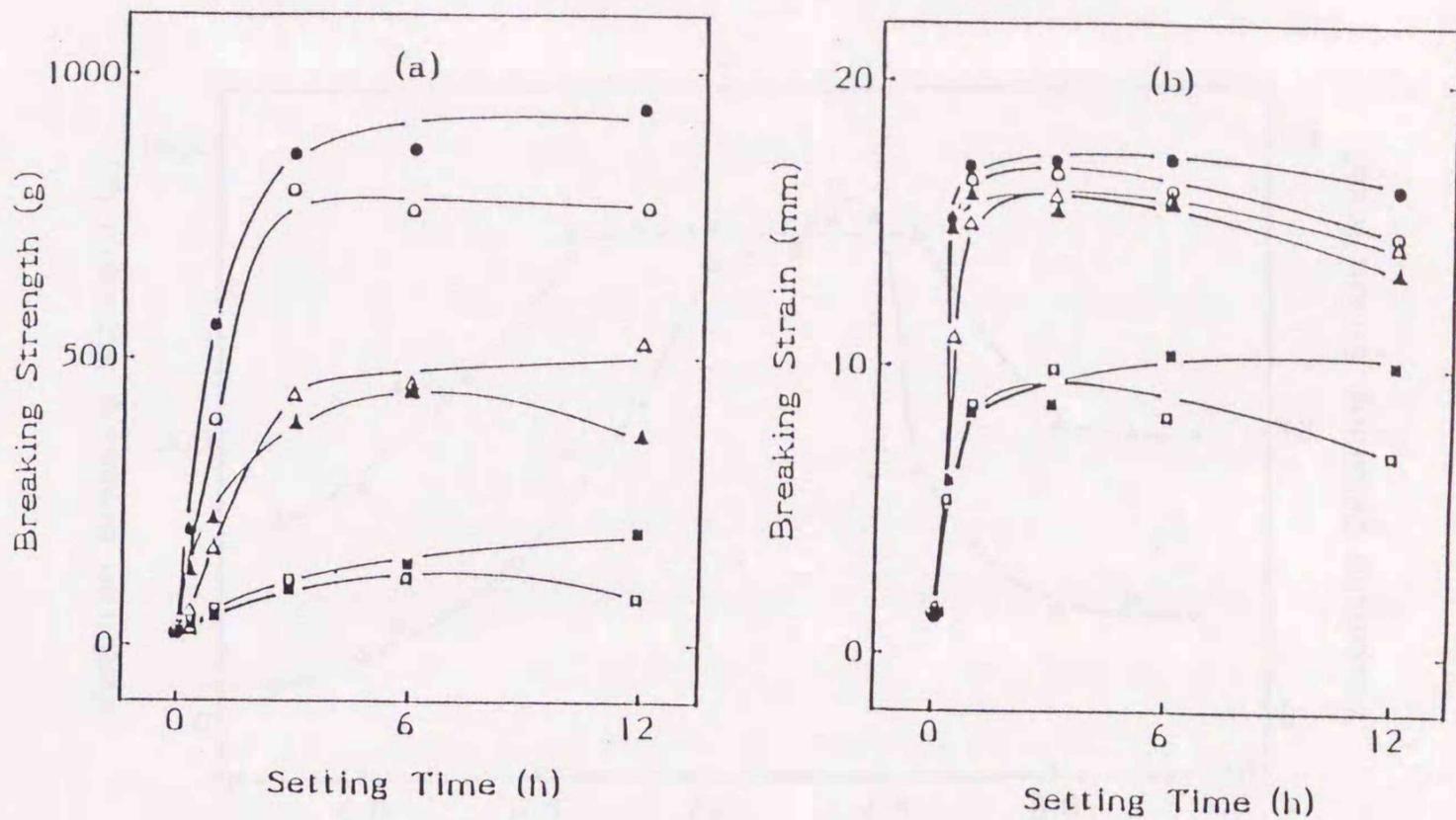


Fig.1. Changes in breaking strength and breaking strain of salt-ground meat during setting.

Surimi of walleye pollack, which contained sugar and polyphosphate, was chopped with 2.5% NaCl at a protein concentration of 130mg/g wet weight of surimi. It was prepared at pH 6.00~8.03 by addition of small amount of HCl or NaOH in a speed cutter (National MK-K7) for 5min at 4°C or below. The salt-ground meat was stuffed into a plastic vessel with a cover and incubated at 25°C to prepare "setting gel". After cooling the gels with ice water, the load values of breaking strength (g) and breaking strain (mm) at breaking point were evaluated with a rheometer equipped with a ϕ 5 mm plunger.

(a): Breaking strength.

(b): Breaking strain.

The pHs for setting were 6.00 (□), 6.60 (Δ), 7.00 (○), 7.35 (●), 7.60 (▲), and 8.03 (■).

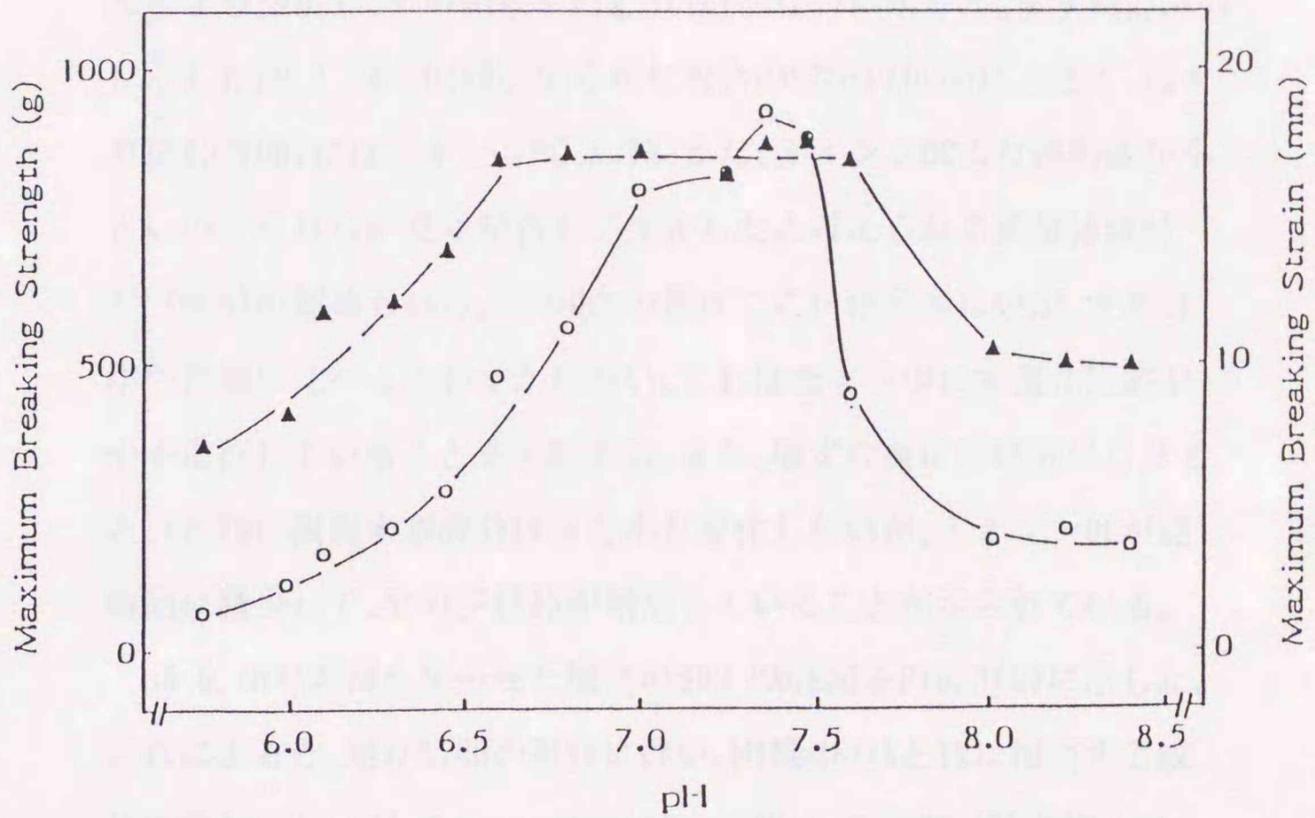


Fig.2. pH-Dependences of maximum breaking strength and breaking strain of salt-ground meat after setting.

From the data presented in Fig.1 (a) and (b), the maximum values of breaking strength and breaking strain of setting gel prepared at various pHs were estimated.

(—○—): Maximum breaking strength.

(—▲—): Maximum breaking strain.

であった。

そこで、次にSDS-尿素混液に溶けた坐りゲル中のMfタンパク質のサブユニット成分を、5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE法により分析し、その結果をFig. 3((a)~(c))に示した。まずFig. 3(a)に示したpH 7.24で肉糊を坐らせた場合のSDS-PAGE図によると、塩ずり後(0時間)にはミオシンHC、A、TM、また、ミオシンHCより移動度が小さいのでそれらが交差結合して生成したと考えられる多量体成分³³⁾ (HCn)が認められる。このHCnの量はここには示さないが、すり身中の含量に比べるとわずかに多い。これは塩ずり中に多量化反応がやや進行していることを示唆する。また、塩ずり後に12時間坐らせると、AとTMに相当する成分はほとんど変化しないが、ミオシンHCが経時的に減少して、その多量体が増加していることが示されている。

pH 6.10で肉糊を坐らせた場合のSDS-PAGE図をFig. 3(b)に示した。これによると、坐り時間の進行に伴い、肉糊中のAとTMに相当する成分は変わらないが、ミオシンHCの減少に伴い、その多量体が増えている。それ以外にミオシンHCとAの間に移動度をもつ成分(X₁成分)が増えてきていることが示された。なおこのX₁成分の本体は後で詳述する。また、pH 7.24の場合に比べるとミオシンHCの減少とその多量体の生成が極めて遅いのがこの場合の特徴である。

pH 8.03で肉糊を坐らせた場合のSDS-PAGE図をFig. 3(c)に示した。これによると、pHがここまで微アルカリ側に傾くと、Fig. 1に示したとおり坐りによる肉糊のゲル物性の経時変化は小さくなるが、ミオシンHCの減少とその多量体の生成も極めて少なくなり、全体としてあまり大きな変化が見られなくなった。また、AとミオシンHCの間に現れるX₁成分も生成しないことが示された。

次に、以上のようにして得たSDS-PAGE図をデンストメトリーによって定量的に分析し、その結果をFig. 4((a) ~ (i))に示した。まず、pH 7.24の場合(b)を見ると、坐り時間の進行とともに肉糊中のミオ

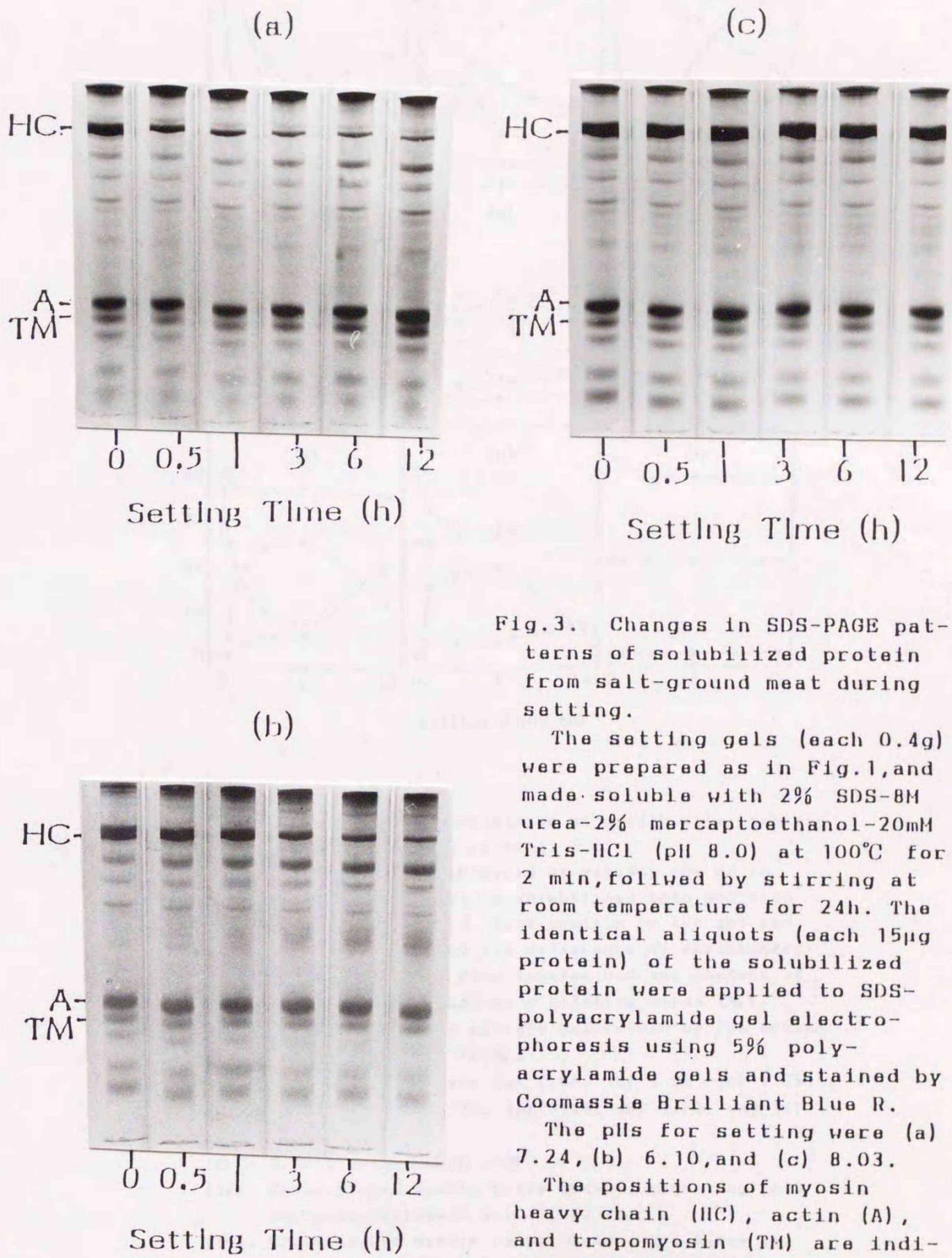


Fig.3. Changes in SDS-PAGE patterns of solubilized protein from salt-ground meat during setting.

The setting gels (each 0.4g) were prepared as in Fig.1, and made soluble with 2% SDS-8M urea-2% mercaptoethanol-20mM Tris-HCl (pH 8.0) at 100°C for 2 min, followed by stirring at room temperature for 24h. The identical aliquots (each 15µg protein) of the solubilized protein were applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 5% polyacrylamide gels and stained by Coomassie Brilliant Blue R.

The pHs for setting were (a) 7.24, (b) 6.10, and (c) 8.03.

The positions of myosin heavy chain (HC), actin (A), and tropomyosin (TM) are indicated on the left side.

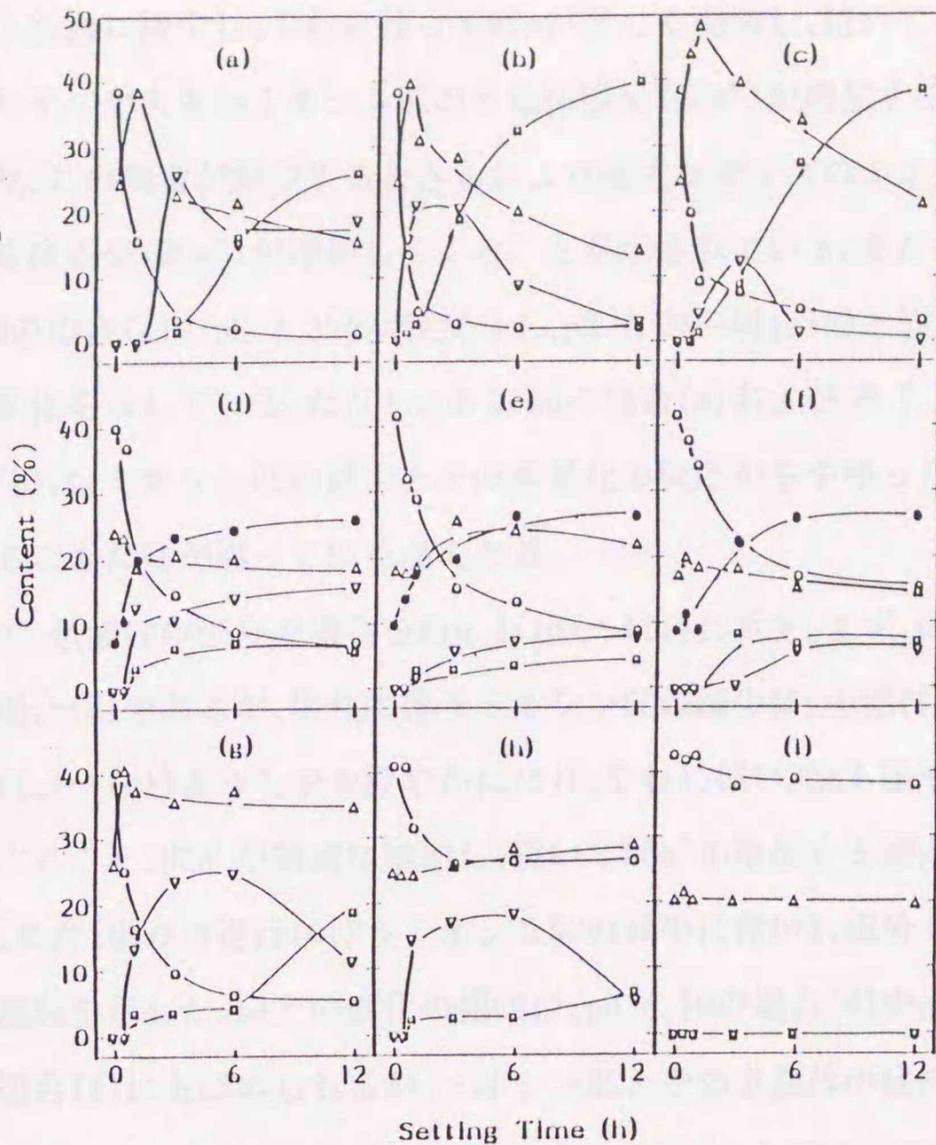


Fig. 4. Changes in subunit composition of myofibrillar protein of salt-ground meat during setting.

The setting gels were obtained at various pHs as in Fig. 1. The SDS-PAGE of protein solubilized into SDS-urea medium was made as in Fig. 3. Each protein on the gel rod was determined by measuring the difference of absorbances at 640nm and 700nm with a densitometer, and the content of each component was expressed as a relative value (%), taking the total amount of protein determined by the method of Numakura et al.⁵⁻⁷⁾ as 100%.

The pHs for setting were (a) 7.00, (b) 7.24, (c) 7.35, (d) 6.30, (e) 6.10, (f) 5.76, (g) 7.46, (h) 7.60, and (i) 8.03.

- (O): Myosin heavy chain (HC).
- (Δ): 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 medium (HCn'').
- (●): Components migrating between HC and actin (HC>X₁>A).

シンHCが急激に減少し、それに伴ってHCnが著しく増加し、続いてより分子サイズが大きいミオシンHCの多量体成分(HCn')が増加するようになり、この両者が減少するとさらにより巨大なサイズのみオシンHC多量体成分(HCn'')が増加してくることが示されている。また、pH 7.00の場合(a)とpH 7.35の場合(c)も、pH 7.24の場合(b)と同じ傾向の変化を示している。ただし、pH 7.00の場合(a)およびpH 7.35の場合(b)は、ミオシンHCの減少とその多量化の反応がややゆっくりと起こることだけが違っている点である。

続いて、微酸性の坐りの場合をFig. 4((d)~(f))に示す。まず、pH 6.30の場合(d)であるが、坐りに伴うミオシンHCの減少は、中性付近の場合((a)~(c))よりもやや緩やかになり、それに伴いHCnも緩やかに減少すること、HCn'が急激に増加し、続いてHCn''が増加する傾向を示した。また、坐りの進行に伴うミオシンHCの減少に伴いX₁成分も増加する傾向を示した。以上の変化の傾向は、pH 6.10の場合(d)やpH 5.76の場合(f)にも認められるが、ミオシンHCとその多量体の経時変化が若干異なっており、pHが低くなるにつれてミオシンHCの減少が緩やかになり、またミオシンHCの多量体であるHCn'やHCn''の増加も緩やかになる傾向が見られる。

さらに、微アルカリ性の坐りの場合をFig. 4((g)~(i))に示した。これによると、pH 7.46の場合(g)は、pH 7.00~7.35((a), (b), (c))の場合と似ており、ミオシンHCの多量化はやや緩慢であるが進行し、その減少に伴いHCnが増加し、その後減少するとHCn'が大きく増加する。そしてそれが減少した後にHCn''が増加する傾向を示した。しかし、pH 7.60の場合(h)は、ミオシンHCの減少は著しく起こりにくく、それに伴うミオシンHCの多量化も緩やかに進行するようになった。さらに、pH 8.03の場合(i)はミオシンHCの減少と多量体の生成は全く起こらなくなることが示された。

4) 肉糊のpHと坐りゲルの品質との関係

Fig. 4に示した実験結果の中から、肉糊のpHが坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の変化に及ぼす特徴を比較するため、pH 6.03, 6.60, 7.00, 7.46, および8.03の場合を選び、25°Cで12時間後の結果をFig. 5として示した。また、図中の一番左側には坐り前の肉糊を対照のため示した。なお、このヒストグラフは、上からミオシンHC多量体成分の合計(Σ HCn), ミオシンHC、 X_1 、A + TM、TMより移動度の大きい成分(X_2)の量比を示したものである。ヒストグラフ上端の活弧内の数値は、その条件で得られた坐りゲルの破断強度である。これによると、破断強度はpH 7.35が最大(937g)で、それより微酸性、または微アルカリ性になっても減少する傾向があり、たとえばpH 6.10では145g、またpH 8.03では180gであった。これら坐りゲル中のMfタンパク質の組成をみると、pH 7.35で得た坐りゲルでは、坐り前に比べてミオシンHCは減少し、 Σ HCnは著しく増加したが、 X_1 など他の成分はほとんど同じであった。しかし、pHが7.35より微酸性側で得た坐りゲルではpHが低下するにつれて、しだいにミオシンHCの減少度は小さくなり、 Σ HCnも減少するが、 X_1 成分は増加する傾向を示した。たとえば、pH 6.10の場合は Σ HCn量は33.6%でありpH 7.35のものに比べると約半分である。一方、pH 7.35より微アルカリ側で得た坐りゲルでは、pHが上昇するにつれて、ミオシンHCの減少とそれに伴う Σ HCnの増加も小さくなるが、 X_1 成分はほとんど変化がなかった。たとえば、pH 8.03の場合の Σ HCnは供試タンパク質量の22.4%でミオシンHCは40%、また、 X_1 は7.5%となり、坐り前の肉糊中の値とほとんど変わらなかった。以上の結果は微酸性域と微アルカリ性域で塩ずりして得た肉糊中で起こるMfタンパク質の変化の様式は、異なる反応経路でゲル物性の低下に関与していることを示唆している。

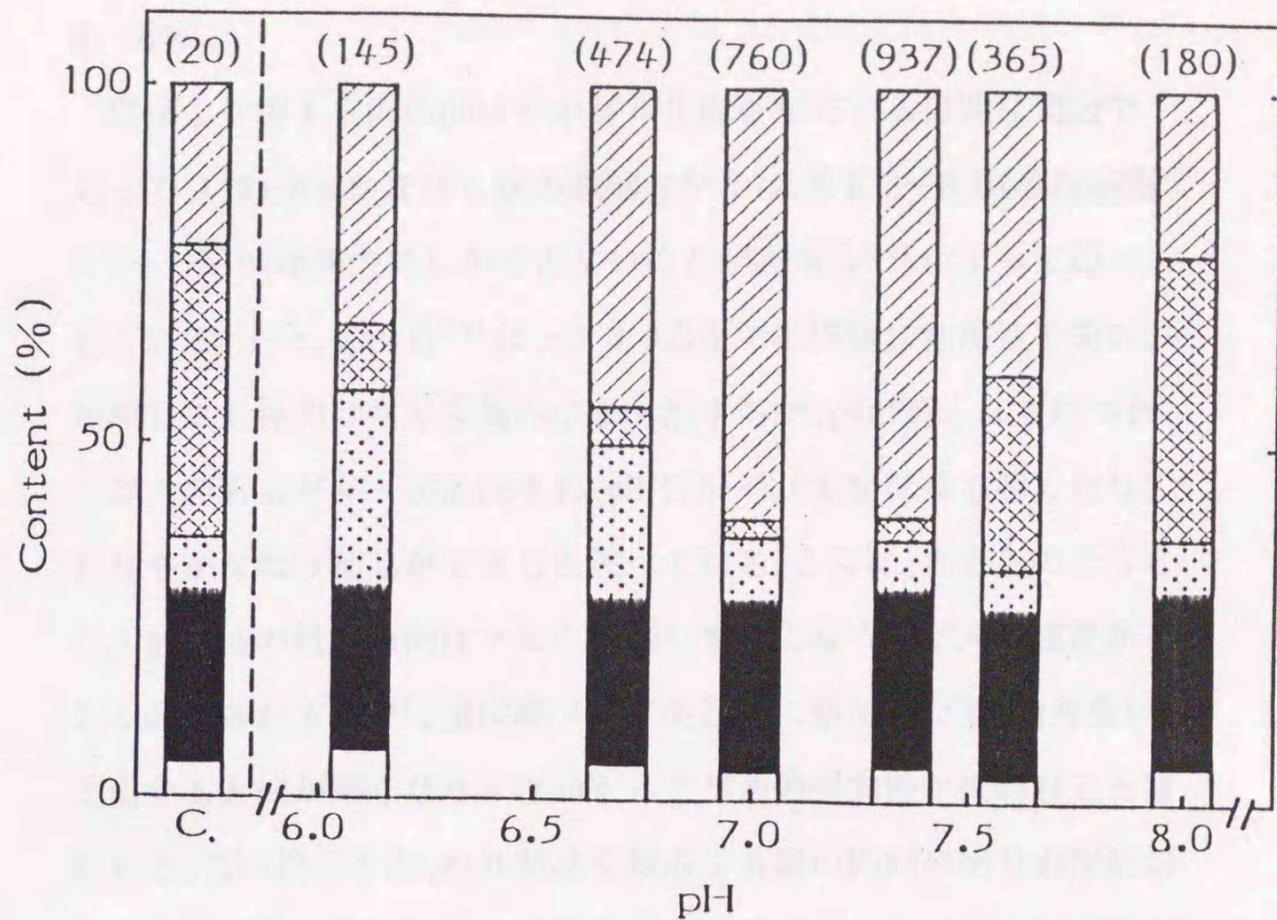


Fig.5. Comparison of subunit compositions of myofibrillar protein of salt-ground meats formed by setting at various pHs.

The content of subunit composition of myofibrillar protein of salt-ground meat was determined after setting for 12 hr at 25°C, as in Fig.4. The figures in parentheses over the histograms are the breaking strength of the same gel.

(): Sum of cross-linked myosin heavy chains, $\sum \text{HCn} = (\text{HCn} + \text{HCn}' + \text{HCn}'')$.

(): Myosin heavy chain (HC).

(): Migrating components between HC and actin ($\text{HC} > \text{X}_1 > \text{A}$).

(): Actin + tropomyosin (A+TM).

(): Components faster migrating than tropomyosin ($\text{TM} > \text{X}_2$).

C: Average subunit composition (%) of myofibrillar protein of salt-ground meats at different pH values before setting.

5) 考察

従来より塩ずり肉のpHはそのゲル化能を左右する重要な要因であって、いわゆるかまぼこ状の強靱なゲルはpH 6.0~8.0(至適範囲6.5~7.5)の範囲内でしかできないことが志水ら⁴⁰⁾によって述べられている。また、岡田ら³⁷⁾は、pH 6.0以下では肉糊は粘稠性を失い、加熱しても弾力はなく多量の水を分離するが、pHが高くなるにつれて弾力のあるゼリーが形成され、pH 6.5~7.0で足は最も強くなり、しなやかなねり製品ができると述べている。さらに、赤身魚のようなゲル形成能の低い魚肉はアルカリ晒しをおこなうとゲル形成能が著しく改良されるが⁴¹⁾、重炭酸ソーダを過剰に添加したり、白身魚に應用するとpHが高くなりすぎかえってゲルの弾力性が失われると言われる。言い換えると、ねり製品を製造する際の肉糊の坐り過程において、pHが酸性側に、またはアルカリ側に傾いているとゲル形成能が著しく低下する。

そこで本研究でも、先に沼倉ら^{5~7)}がスケトウダラの肉糊の坐りの過程を検討するために報じた方法を応用して、pH 5.76~8.40の間で坐らせたスケトウダラの肉糊中で起こるMfタンパク質サブユニット成分組成の変化を検討した。まず、ゲル物性については、西本ら³⁸⁾の報告にもあるように、pHが中性のものに比べて、微酸性、または微アルカリ性に傾くときは坐りゲルの破断強度は減少するが、本実験で検討した範囲内ではpH 7.35がもっとも破断強度が大きくなった。そこで、それぞれのpHで肉糊を坐らせた時に到達する最大破断強度を求めて、処理したpHに対してプロット(Fig. 2)したところ、pH 7.35に最大ピークがあり、またpH 7.0付近に小さなピークが認められた。これは酸性側とアルカリ側で起こる肉糊のゲル化の反応が本質的に異なるため、これらが重なり合って生じたものと推定される。一方、凹みの最大値はpHが6.5~7.6の広範囲にわたっているが、これもおそらく同じ結果によるものと推定される。

次に、坐り過程中の肉糊の破断強度の変化と肉糊中で起こっているMfタンパク質成分組成の変化との関係を考えると、pHが微酸性になっても微アルカリ性になってもいずれも坐りゲルの破断強度は減少するが、肉糊中で起こるMfタンパク質成分組成の変化の様式は異なる。すなわち、微酸性域ではミオシンHCの減少に伴いミオシンHC多量体の他にX₁成分の増加が起こること、そのためにミオシンHC多量体の相対含量が減ったことが破断強度の減少に対応している。一方、微アルカリ性域ではミオシンHCの減少に伴って、X₁成分は生成せずに、ミオシンHC多量体のみを生成するが、全体の変化が起こりにくくなり、ミオシンHC多量体の生成量が減少することが破断強度の減少に対応している。言い換えると、微酸性域と微アルカリ性域で起こる肉糊のゲル化に伴う破断強度の変化には、明らかに異なるMfタンパク質の変化の反応に対応していることが示唆された。

既に沼倉ら³³⁾は、中性域においてはミオシンHC多量体の生成がゲル物性の増加と強く関わる事実を報じている。そこで、ここには示さないが微酸性域(pH 6.10~7.00)と微アルカリ性域(pH 7.24~7.60)におけるゲル化においてもミオシンHC多量体の生成量と破断強度との強さとの相関を調べると、微酸性域では相関係数が0.905(回帰直線は $Y=22.3X-26.6$ で表される関係)で、微アルカリ性域では相関係数が0.929(回帰直線は $Y=22.2X-82.2$ で表される関係)となり、両者間には強い相関が成立した。

本実験の結果から、塩ずり後における肉糊のpHが中性に保たれていることが、その後続く坐り過程でミオシンHCの多量化反応を進行させて坐りゲルの物性発現に寄与するのに必要な条件であると考えられる。

第二節 スケトウダラすり身の酸処理による肉糊のゲル形成能とミオシンHCの変化

第一節では、坐りに伴って起こる肉糊のゲル形成能とその中のMFタンパク質の変化に対するpHの影響について、スケトウダラ肉糊をモデルとして検討した。しかし、この実験はpHが酸性のままですり身を塩ずりし続いて加熱して坐らせているので、上記の変化が酸性下の原料肉中で起こったのか、または酸性下で塩ずりして坐らせたために起こったのかは未だ明らかではない。

そこで、この節ではスケトウダラのすり身(B)を酸で処理した後、pHを中性に戻してから塩ずりして坐らせ、その際に起こるミオシンHCの多量化とゲル物性の変化の関係を調べ、酸性のまま塩ずりして坐らせた前節の実験結果と比較した。

1) 酸処理に伴うすり身のMf Ca-ATPase活性の経時変化

pH 6.0、氷蔵下ですり身を保管し、経時的にその5gを取り出して、定量的にMf懸濁液とし、Mfタンパク質濃度とMf Ca-ATPase比活性を測定し、これらに乗じてMf Ca-ATPase全活性を求め、酸処理に伴う経時変化をプロットし、その結果をFig. 6((a)と(b))に示した。これによると、酸処理前のMf Ca-ATPase比活性(a)、およびMf Ca-ATPase全活性(b)はそれぞれ $0.287 \mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 、および $180 \mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot 5\text{g surimi}$ の値を示すが、酸処理時間とともに次第に低下し、たとえば酸処理48時間後にはそれぞれ $0.162 \mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$ および $102 \mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot 5\text{g surimi}$ となり両者とも酸処理前の57%に低下している。

2) すり身の酸処理に伴う坐りゲルの破断強度と凹みの経時変化

酸処理後のすり身を中性下で塩ずりした後、 25°C の一定温度で肉糊を加熱し、坐りゲルの破断強度と凹みの経時変化を測定し、結果をFig. 7に示した。これによると、まずFig. 7((a)と(b))に示すように坐りゲルの破断強度と凹みは経時的に増加するが、その様式は両者の場合ともに坐り初期に急激に増加し、破断強度は12時間後、凹みは6時間後にほぼ最大に達した。一方、対照のために示したpH 6.0のまま塩ずりして坐らせたゲルの場合はほぼ3時間で最大に達した。また、破断強度と凹みの最大値は、酸処理時間の長いものほど、それから得た坐りゲルは低い値を示し、酸処理48時間後の破断強度と凹みの最大値は、pH 6.0のまま塩ずりして坐らせたゲルの場合とほぼ同じレベルの低い値を示した。

なお、Fig. 6に示した酸処理したすり身のMf Ca-ATPase全活性(X)とそのすり身から調製した坐りゲルの破断強度の最大値(Y)との関係をプロットすると、Fig. 8に示すように両者の間に強い相関(相関係数 $(r) = 0.946$)が確かめられることから、酸処理によるすり身の

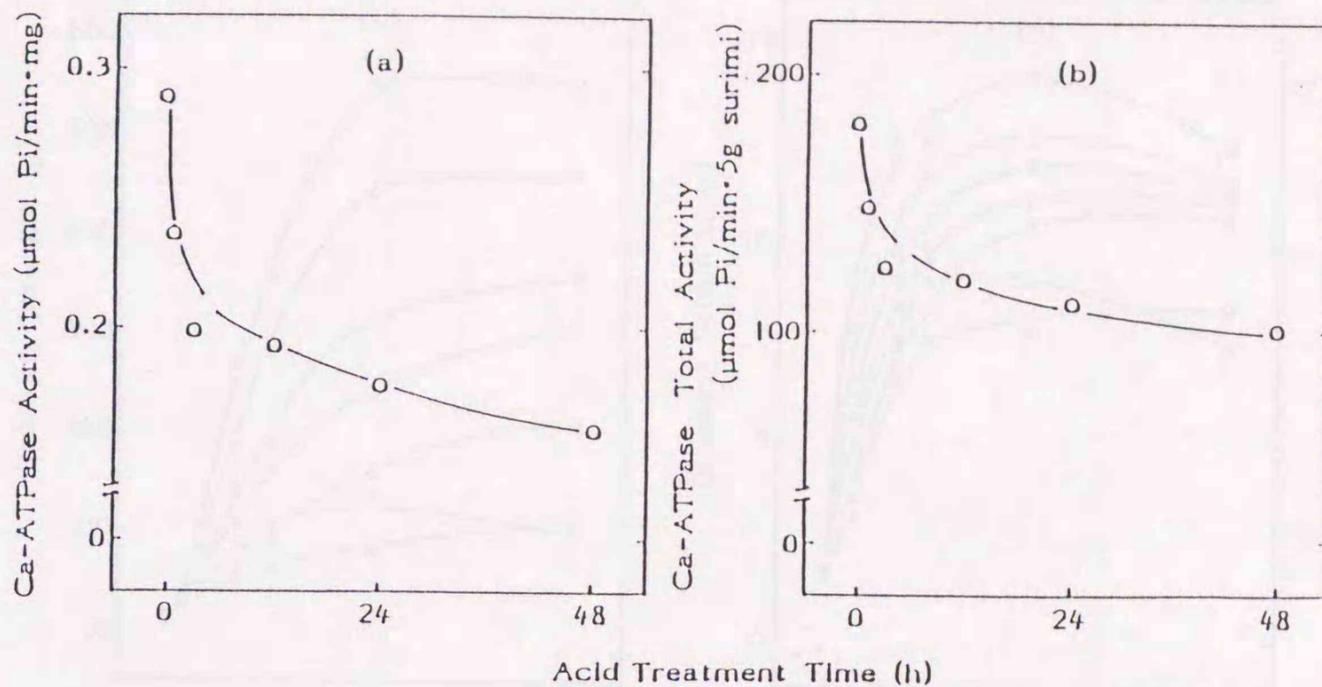


Fig.6. Change in myofibrillar Ca-ATPase activity of walleye pollack surimi during acid treatment.

Walleye pollack surimi which contained sugar but no polyphosphate was chopped with a small amount of dilute acid in a speed cutter (National MK-K7) at 4°C or below and subjected to acid treatment at 2°C. During the acid treatment, part of the surimi was neutralized with dilute alkali and used for ATPase assay.

Myofibrils suspended in 0.1M KCl containing 20mM Tris-maleate (pH 7.0) were quantitatively prepared from the surimi by the method of Kato et al²⁹⁾. The ATPase assay of myofibrils was carried out at 25°C in reaction medium containing 0.1M KCl, 5mM CaCl₂, 1mM ATP, and 25mM Tris-maleate (pH 7.0) and 0.1-0.2mg/ml of protein.

Myofibrillar Ca-ATPase specific activity (a) and total activity (b) of surimi were expressed as µmol Pi liberation / min·mg of protein and µmol Pi liberation / min·5g surimi (wet weight), respectively.

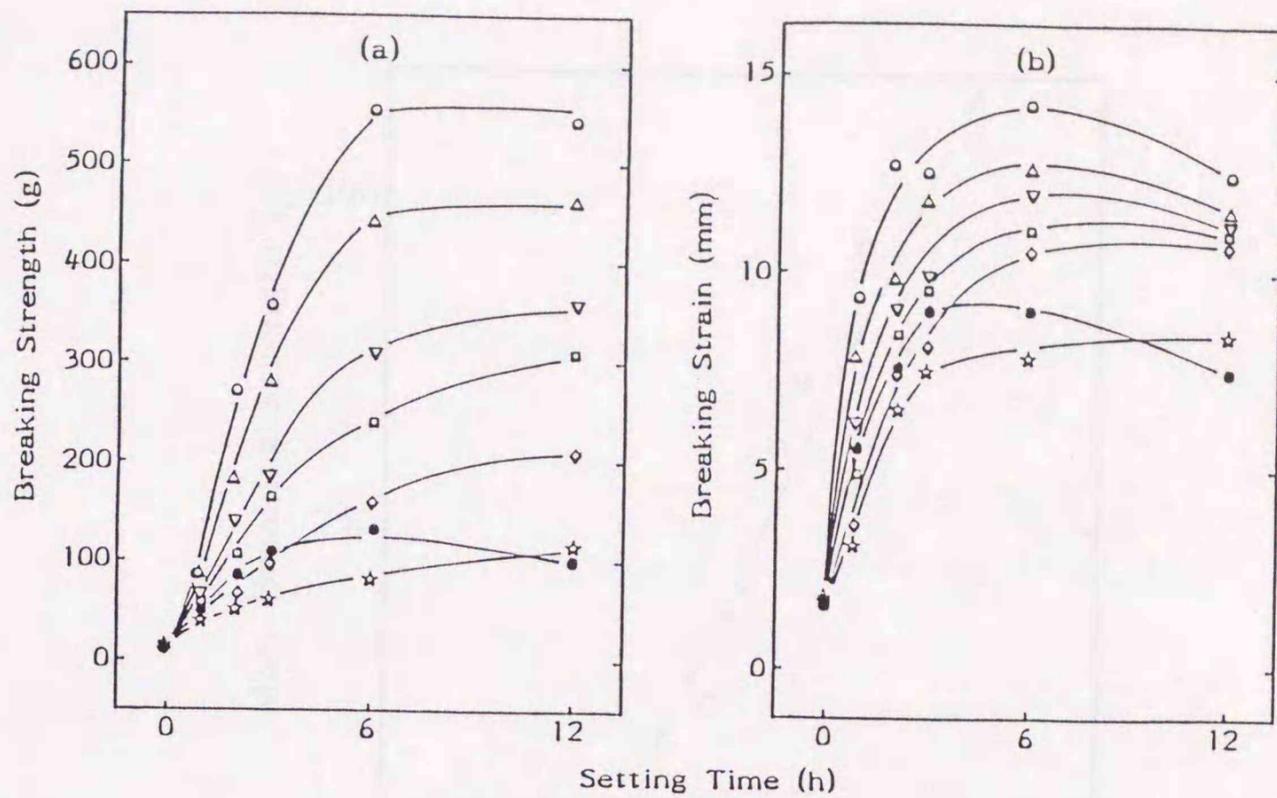


Fig.7. Changes in breaking strength and breaking strain of salt-ground meat from acid treatment of surimi during setting.

The surimi was treated with acid and neutralized as in Fig.6. The surimi thus treated was chopped with 2.5% NaCl at a protein concentration of 130mg/g wet weight of surimi in a speed cutter for 2min at 4°C or below. The setting gel was prepared as in Fig.1. The measurement of breaking strength and breaking strain was made as in Fig.1.

(a): Breaking strength.

(b): Breaking strain.

The time of acid treatment of the surimi was 0 (○), 1 (△), 3 (▽), 12 (□), 24 (◇), and 48 (☆)h.

(●) Setting gel of salt-ground meat from acid-treated surimi without neutralization.

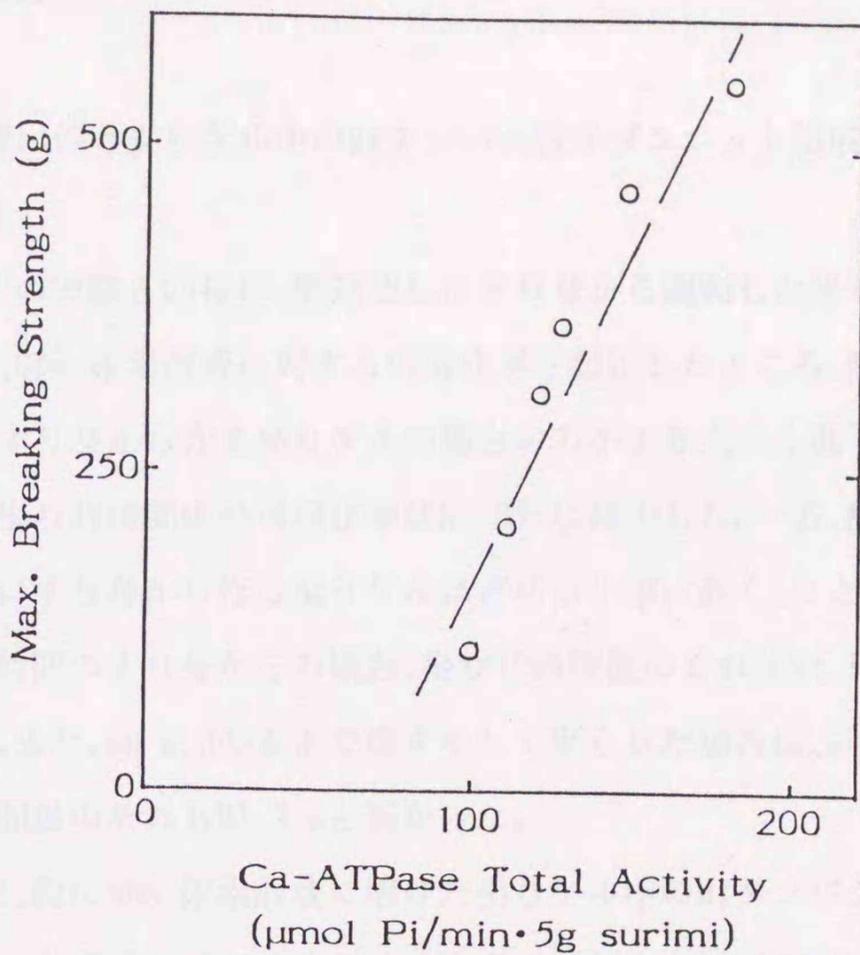


Fig.8. Relation between myofibrillar Ca-ATPase total activity of frozen surimi and maximum breaking strength of setting gel from the same surimi.

The myofibrillar Ca-ATPase total activity of frozen surimi and the maximum value of breaking strength of setting gel from the same surimi were quoted from the data in Figs.6 and 7, respectively.

ゲル形成能の劣化はすり身中のミオシンの酸変性に起因していることが認められる。なお、両者の間には、 $Y = 5.47 X - 388$ の関係式が成り立った。

3) 酸処理に伴う坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の経時変化

Fig. 7の実験と同様に、酸処理したすり身から調製した坐りゲルについて、SDS-尿素混液に対する可溶化率を測定したところ、酸処理をしないすり身から作る坐りゲルの場合の方がより大きく低下し、たとえば坐り12時間後の可溶化率は56.3%に減少した。一方、酸処理時間の長いすり身から作る坐りゲルほど可溶化率は高く、たとえば酸処理48時間のすり身からの場合、坐り12時間後のそれは94.1%と高かった。また、pH 6.0のまま塩ずりして坐らせた場合は、同じく坐り12時間後のそれも91.2%と高かった。

そこで、次にSDS-尿素混液に溶けた坐りゲル中のMfタンパク質のサブユニット成分を、5%ポリアクリルアミドゲルと1.8%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE法により分析し、その結果をFig. 9((a)~(f))に示した。まず(a)に示したpH 6.9で肉糊を坐らせた場合のSDS-PAGE 図の変化を、5%ポリアクリルアミドゲルを用いた結果で見ると、塩ずり直後(0時間)にはミオシンHC、A、TM、および、ミオシンHCより移動度が小さいのでミオシンHCの多量体成分³³⁾(HCn)と推定される成分などが認められる。HCn成分の量は、塩ずり前のすり身中の含量に比べるとわずかに多いので、塩ずり中にも多量化反応がやや進行していることが示唆される。また、塩ずり後は、坐りに伴いAとTMに相当する成分はほとんど変化しないが、ミオシンHCが経時的に減少してHCnおよびX₁成分が増加していることが示されている。次に(b)には、pH 6.9で坐らせた場合のSDS-PAGE 図の変化を1.8%ポリアクリルアミドゲルを用いて検討した結果を示した。これによる

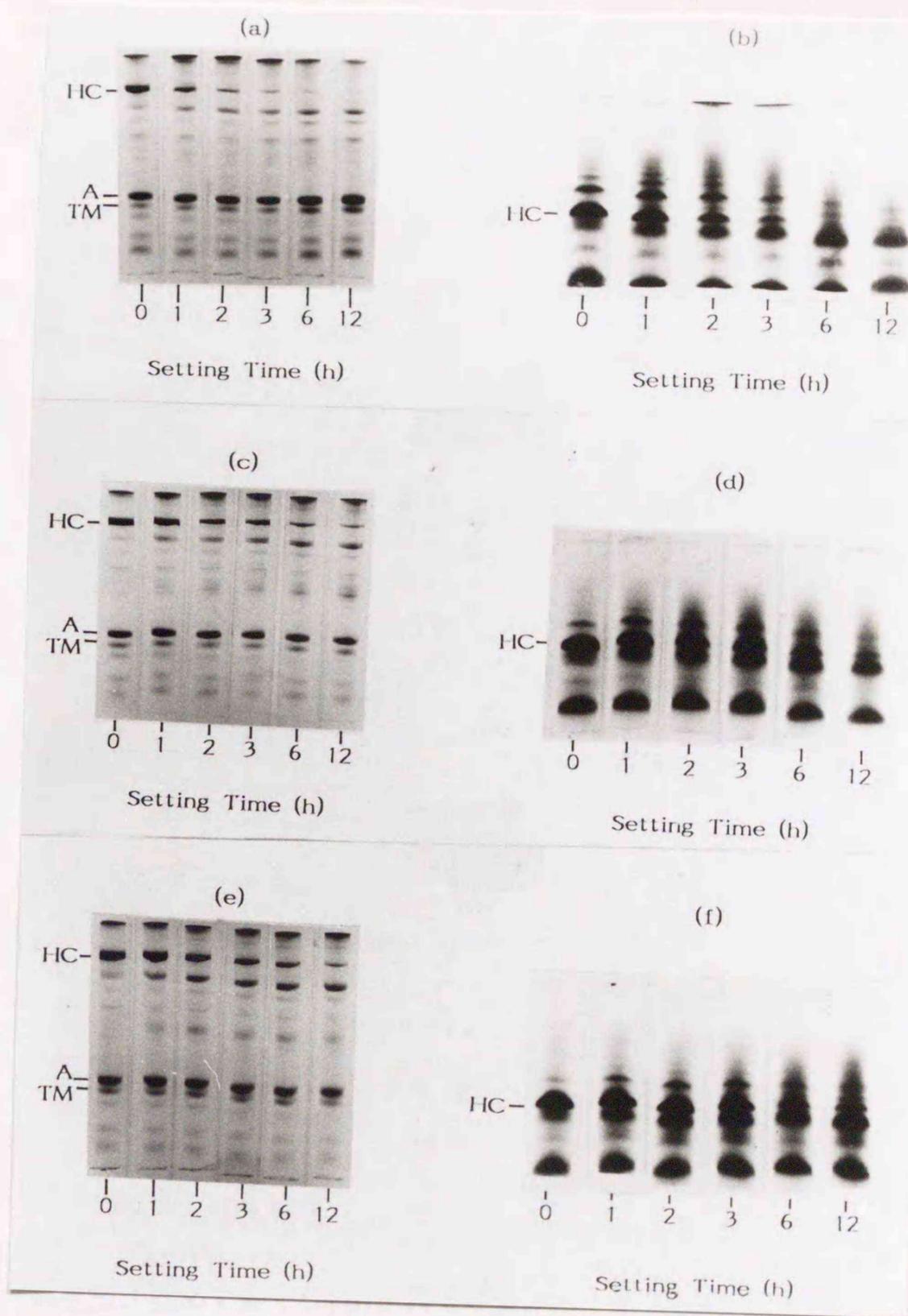


Fig.9. Changes in SDS-PAGE patterns of SDS-urea solubilized protein of salt-ground meat during setting.

The various setting gels were prepared as in Fig.6, and solubilized as in Fig.3. The identical aliquots (each 15 μ g (a, c, e) or 30 μ g (b, d, f) protein) of the solubilized protein were applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 5% polyacrylamide gels (a, c, e), 1.8% polyacrylamide gels (b, d, f) and stained as in Fig.3.

(a), (b): Setting gel at pH 6.9.

(c), (d): Setting gel at pH 6.0.

(e), (f): Setting gel at pH 7.0 after treatment of surimi at pH 6.0 for 48 h.

Positions corresponding to the bands of myosin heavy chain (HC), actin (A), and tropomyosin (TM) are indicated on the left side.

と、坐りに伴うミオシンHCの減少に伴い、初期には2量体および数量体に相当する成分の増加が起こり、次にゲルの上端に滞留するような多量体が生成し、さらに坐りが進行するとゲル中に侵入できなくなるほどに高分子化した多量体が生成する事実が見られる。

対照のためにpH 6.0で塩ずりして坐らせた場合のSDS-PAGE 図の変化を5%ポリアクリルアミドゲルで検討した場合を(c)に示した。これによると、坐りの進行に伴って、ミオシンHCの減少、HCnの生成、およびAとTMに相当する成分が不変である点は同じであるが、X₁成分はpH 6.9で坐らせた場合よりもやや増えている傾向が示された。また、1.8%ポリアクリルアミドゲルを用いて検討した場合を(d)に示したが、pH 6.9で坐らせた場合に比べると、ミオシンHCの減少とその多量体の生成が相対的に遅く、抑制されているのが特徴として示されている。

pH 6.0で酸処理を48時間した後、中性下で塩ずりして坐らせた場合のSDS-PAGE 図の変化を5%ポリアクリルアミドゲルで検討した結果を(e)に示した。これによると、酸変性がかなり進行したすり身を塩ずりして坐らせた場合のタンパク質成分の変化は、pHが6.0のまま塩ずりして坐らせた場合(c)とほとんど同じであった。また、1.8%ポリアクリルアミドゲルで検討した結果(f)も、ほとんどpH 6.0で塩ずりして坐らせた場合(d)と同様で、ミオシンHCの減少とその多量体の生成が極めて遅く、抑制されている傾向が示されている。

以上に示したSDS-PAGE 図型をデンストメトリーによって定量的に解析し、その結果をFig. 10((a)~(g))に示した。まず、pH 6.9で塩ずりして坐らせた場合の結果(a)を見ると、坐り時間の進行とともに肉糊中のミオシンHCが急激に減少し、それに伴ってHCnが増加し、続いてほぼ同時により分子サイズが大きいミオシンHCの多量体成分(HCn')が著しく増加するようになり、この両者が減少するとさらにより巨大なサイズのミオシンHC多量体成分(HCn'')が急激に増加して

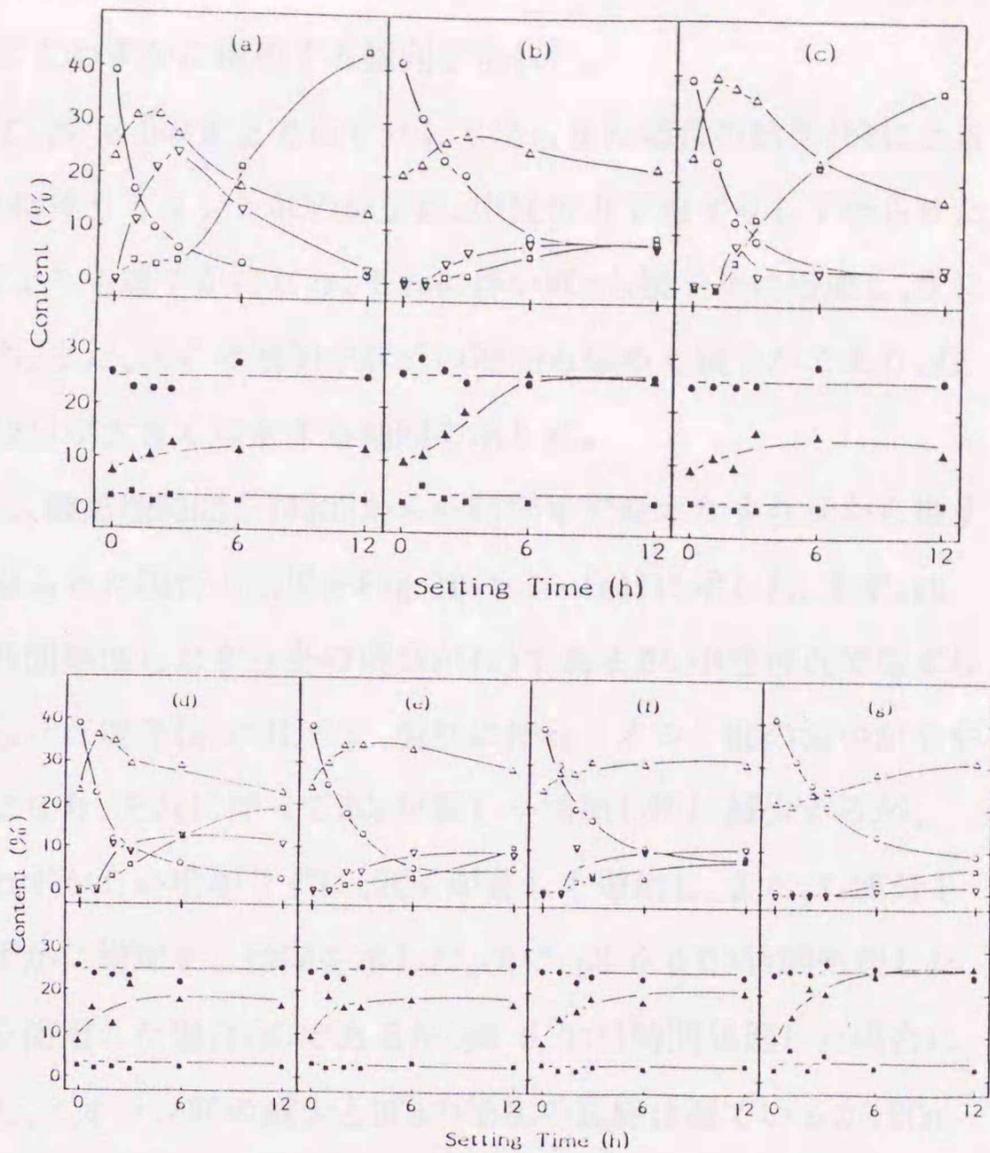


Fig.10. Changes in subunit composition of myofibrillar protein of salt-ground meat from acid-treated surimi during setting.

The various setting gels were prepared as in Fig.6. The SDS-PAGE of solubilized protein of setting gel into SDS-urea medium was made as in Fig.3. The quantitative determination of each subunit of myofibrillar protein were conducted as in Fig.4.

(a), Setting gel at pH 6.9.

(b), Setting gel at pH 6.0.

(c ~ g), Setting gel at pH 7.0 after acid-treatment of surimi at pH 6.0 for 1 (c), 3 (d), 12 (e), 24 (f), and 48 (g) h.

(O): Myosin heavy chain (HC).

(Δ): Cross-linked myosin heavy chain, migrating into 5% polyacrylamide gel (HC_n).

(∇): Cross-linked myosin heavy chain, too large to migrate into 5% polyacrylamide gel (HC_n').

(□): Cross-linked myosin heavy chain, insoluble into SDS-urea medium (HC_n'').

(▲): Components migrating between HC and actin (X₁).

(●): Actin + tropomyosin (A+TM).

(■): Components migrating faster than tropomyosin (X₂).

ることが示されている。また、ミオシンHCの減少に伴い X_1 成分も緩やかにごくわずかに増加する傾向を示した。

続いて、pH 6.0のまま塩ずりして坐らせた場合の結果(b)によると、坐りに伴うミオシンHCの減少は、中性付近で塩ずりして坐らせた場合(a)よりも緩やかになり、それに伴いHCnも緩やかに増加し、次に減少する。また、HCn'の増加やHCn''の増加も極めて緩やかであり、むしろ X_1 成分が大きく増加する傾向を示した。

さらに、酸処理時間を1時間から48時間まで変えたすり身から塩ずりして坐らせた場合の結果をFig. 10((c)~(g))に示した。まず、pH 6.0で1時間処理したすり身の場合が(c)であるが、中性付近で塩ずりして坐らせた場合(a)に比べて、坐りに伴うミオシンHCの減少がやや緩やかになり、それに伴ってHCnが著しく増加し次に減少するが、HCn'はわずかしか増加せずに、HCn''が著しく増加し、また、 X_1 成分もごくわずかに増加する傾向を示した。次に、pH 6.0で3時間処理したすり身を使用した場合(d)であるが、pH 6.0で1時間処理した場合に比べると、ミオシンHCの減少とHCnの増加の経緯は似ているが、HCn'がわずかに多く増加するものの、HCn''の生成は極めて少なくなり、また、 X_1 成分の生成が大きくなる傾向を示した。そして、さらに酸処理時間が長くなり、12時間以上に及んだすり身を使用した場合((e)~(g))は、酸処理時間が短いすり身を用いた場合(c)に比べて、ミオシンHCの減少とHCnの増加が緩やかに進行するようになり、またHCn'やHCn''の生成もより遅く、かつ少量となる傾向を示した。この傾向はすり身の酸処理時間が長くなるほど著しいが、同時に酸処理時間が長いほど X_1 成分が多量に増加する傾向を示した。なお、いずれの場合でもA + TMの成分やTMより移動度の大きい未同定の成分(X_2 成分)は変化しなかった。

4) すり身の酸処理時間とそれから調製した坐りゲルの品質の関係

Fig. 10((a)~(g))の実験結果を基にして、pH 6.0で酸処理したすり身、また酸処理をせずにpH 6.9およびpH 6.0のままのすり身を塩ずりし、25°Cで12時間後に得た坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット組成をヒストグラフで表し、Fig. 11((a)~(g))で比べた。図中の一番左側には、坐りを行わせる前の肉糊について測った値を対照のため示した。このヒストグラフは、上からミオシンHC多量体成分の合計($\sum \text{HCn} = \text{HCn} + \text{HCn}' + \text{HCn}''$)、ミオシンHC、 X_1 成分、A + TM、および X_2 成分の量比を示したものである。また、ヒストグラフ上端の括弧内の数値は同じ坐りゲルの破断強度である。これによると、すり身をpH 6.9で塩ずりして坐らせた場合(a)の破断強度は543gで大きい、pH 6.0で塩ずりして坐らせた場合(b)の値は100gと非常に小さい。また、酸処理1時間のすり身を使用したもの(c)は453gだが、さらに酸処理時間が長くなる((d)~(g))につれて破断強度は次第に小さくなり、酸処理48時間のものからの場合(g)は115gであった。一方、これらの坐りゲル中のMfタンパク質の組成をみると、pH 6.9で塩ずりして坐らせたもの(a)は、坐り前に比べてミオシンHCが減少し、 $\sum \text{HCn}$ 量が67%と著しく増加したが、 X_1 はごくわずかしか増加しなかった。なお、A + TMなど他の成分はほとんど同じであった。しかし、pH 6.0で塩ずりして坐らせたもの(b)では、ミオシンHCは減少するが $\sum \text{HCn}$ の量は39.2%であり、pH 6.9で塩ずりして坐らせたもの(a)に比べて極めて少量だった。一方、酸処理したすり身を用いたもの((c)~(g))では、酸処理時間が長くなるにつれてしだいにミオシンHCの減少度は小さくなり、 $\sum \text{HCn}$ の生成度も小さくなるが、一方、 X_1 成分の生成度が大きくなる傾向を示した。そして、酸処理48時間のすり身からのもの(g)は、pH 6.0で塩ずりして坐らせたもの(b)とほとんど同じMfタンパク質組成から成ることを示した。

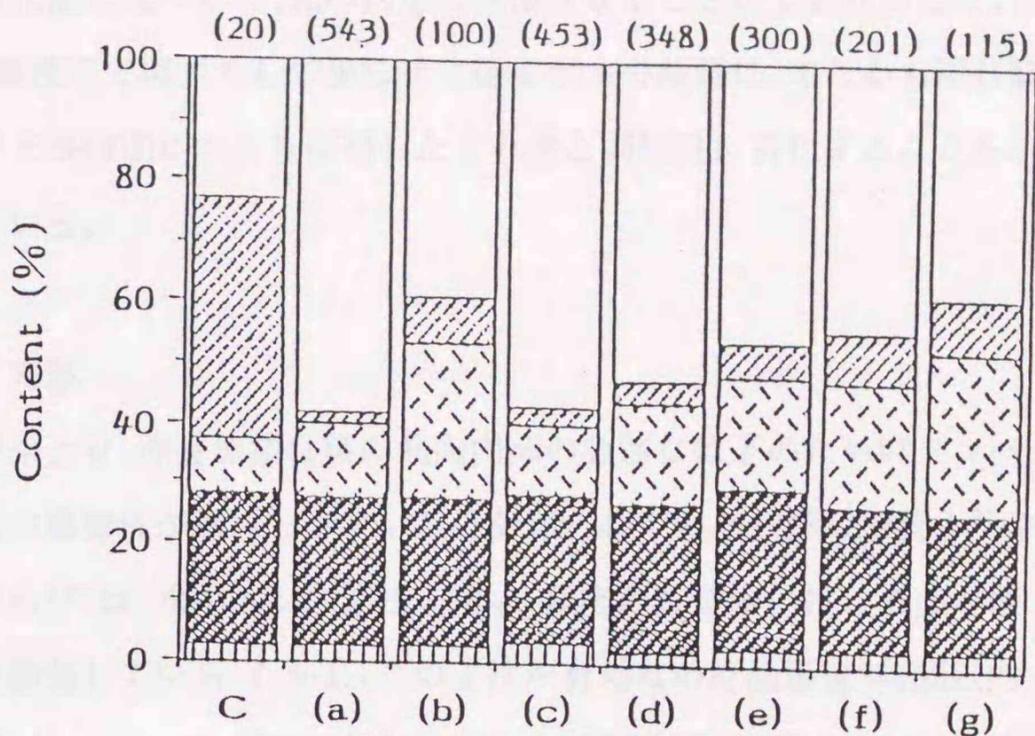


Fig.11. Comparison of subunit compositions of myofibrillar protein of salt-ground meats among setting gels from acid-treated surimi.

The content of subunit composition of myofibrillar protein of salt-ground meat was determined after setting for 12 h at 25°C, as shown in Fig.10. The figures in parentheses over the histograms are the breaking strength of the same gel.

C : Subunit composition of myofibrillar protein of salt-ground meats before setting.

(a), Setting gel at pH 6.9.

(b), Setting gel at pH 6.0.

(c ~ g), Setting gel at pH 7.0 after acid treatment of surimi at pH 6.0 for 1 (C), 3 (d), 12 (e), 24 (f), and 48 (g) h.

(□): Sum of cross-linked myosin heavy chain,
 $\Sigma HC_n = (HC_n + HC_n' + HC_n'')$.

(▨): Myosin heavy chain (HC).

(▤): Migrating components between HC and actin (X_1).

(▧): Actin + tropomyosin (A+TM).

(▩): Components faster migrating than tropomyosin (X_2).

以上の結果は、一度酸性下で劣化したすり身の品質は、そのpHを中性に戻してから塩ずりして坐らせても、ゲル形成能とミオシンHCの多量化能で比べると、元の状態に回復させることができないこと、また、酸性下で塩ずりして坐らせて得るゲルの品質は、あたかも同じ酸性下で長時間にわたり保管したすり身と同程度に劣化することを示している。

5) 考察

従来より、赤身魚類は後の筋肉内pHの急速な低下のためMfタンパク質の酸変性が進行しやすいことが知られており、近年、加藤ら⁹⁾や野中ら¹⁰⁾は、水中ミンス工法を用い、魚肉の貯蔵中に起こるpHの低下を抑制している。しかし、この工法が有効なのは漁獲後2時間以内の新鮮なマイワシ筋肉に対してであり、貯蔵時間が長くなり酸変性の進行した筋肉では無効であった。これはおそらく魚肉のゲル形成能とミオシンHCの多量化能の不可逆的な劣化が起こっているからであり、実際に野中らはゲル形成能に関してそれを認めている。

本実験でも、先に沼倉ら^{5~7)}がスケトウダラの肉糊の坐りの過程を検討するために用いた方法を応用して、意図的に酸変性させたスケトウダラのすり身について、肉糊のゲル形成能とミオシンHCの多量化能の変化を検討したが、そのいずれの能力においても酸性下における不可逆的な劣化が進行する事実を認めた。また、酸性のすり身をそのまま塩ずりして坐らせた場合と、一度中性に戻してから塩ずりして坐らせた場合を比べると、前者の方が上記した2つの能力の劣化が著しいので、酸性下におけるすり身の品質劣化は、単に貯蔵中ばかりでなく、塩ずりと坐りの過程でも依然として進行していることが明らかである。なお、ゲル形成能の低下は破断強度だけでなく凹みについても認められたが、これらは酸処理したすり身のCa-ATPase全活性と強い相関が得られたのでミオシンの酸変性に起因すること

が明らかであった(Fig. 8)。

坐り過程中における肉糊の破断強度の変化と肉糊中で起こるMfタンパク質成分組成の変化との関係を考えると、すり身の酸処理が進行するほど坐りゲルの破断強度は減少するが、この時肉糊中で起こるMfタンパク質成分組成の変化の様式は以下のように対応している。すなわち、酸処理が進行すると、ミオシンHCの減少に伴うその多量体の生成が進行しにくくなるが、その他にX₁成分の増加が起こる分だけミオシンHC多量体の生成量が減っており、それが破断強度の減少と対応している。先に、西本ら³⁸⁾は、肉糊の坐りに伴って起こる破断強度の経時的な増加とミオシンHCの経時的な減少の測定結果を基にして、肉糊のゲル形成能とミオシンHCの交差結合能(多量化能)を表し、両者の関連について論じているので、ここでも同じように両者の関係を求め、Fig. 12に結果を描いた。これによると、本実験における酸処理によって起こるすり身の品質劣化の場合においても、両者の間に強い相関($r = 0.960$)が成り立った。それゆえ、坐りゲルの物性の低下には、中性の場合と同様にミオシンHCの多量化能の低下が強く反映しているものと考えられる。なお、特に酸処理48時間後のすり身を用いた場合には、坐りゲルの破断強度とMfタンパク質成分組成は、酸性のすり身を中和することなく、そのまま塩ずりして坐らせた場合のそれとほぼ一致し多量のX₁成分の生成が認められた。なお、このX₁成分の由来については第三章で詳述する。

以上述べたように、酸性下ですり身を塩ずりして坐らせたゲル中には、ミオシンHC多量体と共に比較的多量のX₁成分が生成し蓄積することが、中性下で塩ずりして坐らせた場合と相違する大きな特徴であった。一方、本実験の場合のように、酸処理を行ったすり身のpHを再び中性に戻しても、それから調製した坐りゲル中には酸性条件下で調製したゲルの場合と同じ程度のX₁成分が見いだされた。それゆえ、酸処理中に起こるすり身の品質劣化はおそらくMfタンパク質

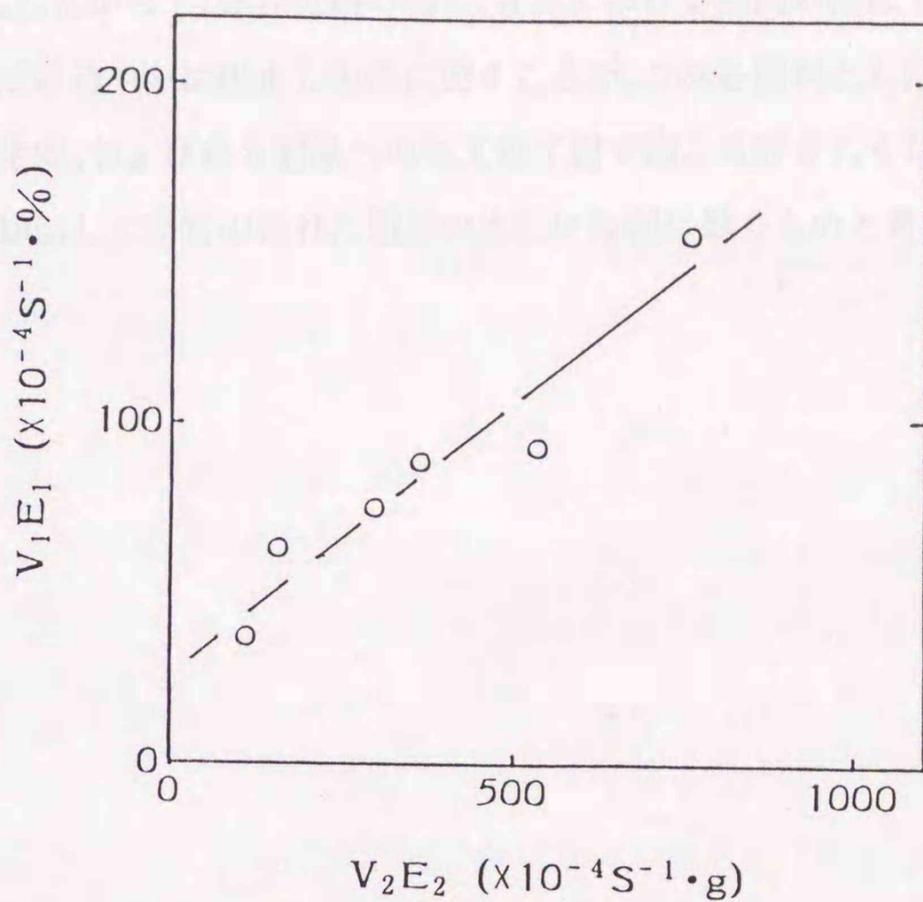


Fig.12. Relation between cross-linking ability of myosin heavy chain and gel-forming ability of setting gel from acid-treated surimi.

From the data shown in Fig.10, cross-linking ability of myosin heavy chain of salt-ground meat was calculated as $V_1 \times E_1$, where V_1 and E_1 are the rate and the extent of decrease in myosin heavy chain during setting^{3,8)}. The V_1 was defined as the reciprocal values of time (h) required for half maximum decrease in myosin heavy chain and E_1 was the difference between the contents of myosin heavy chain before and after setting.

From the data shown in Fig.6, gel-forming ability of salt-ground meat was calculated as $V_2 \times E_2$, where V_2 and E_2 are the rate and extent of increase in breaking strength during setting; the V_2 was defined as the reciprocal values of time (h) required for half maximum increase in breaking strength and E_2 was the difference between the values of breaking strength (g) before and after setting.

に起こる不可逆的な反応の反映であり、これはゲルの物性にも影響している。したがって、赤身魚類の場合、死後における筋肉のpH低下をできるだけ速やかに阻止し中性に戻すことが、これを原料としたすり身の生産、およびねり製品への加工の工程で起こる好ましくない変化を抑制して品質の優れた製品の生産に有利に働くものと考えられる。

第三節 乳酸添加によるマイワシ肉糊の微酸性化がゲル形成能とミオシンHCの多量化能に及ぼす影響

第一節および第二節の研究では、すり身および肉糊のpHを微酸性、中性、および微アルカリ性に調節し、これから調製した坐りゲルの品質を詳細に比較してきた。この中で特に微酸性のpHは赤身魚肉中の値を参考として選択した値である。ただし、その調節にあたっては無機酸(HCl)を使用し、しかもスケトウダラのすり身を原料として使用しているため、厳密な意味では、実際の赤身魚肉の場合とは相違している可能性が考えられる。そこで本節の実験ではマイワシのすり身を調製し、そのpHの調節は実際に魚肉中に生成蓄積する乳酸で行うことにした。すなわち、乳酸を加えてpHを微酸性とした肉糊について、加熱によるゲル形成能とミオシンHCの多量化能を調べ、前章までの結果と比べた。なお、本節の実験では、前章までの場合と異なり、25℃での坐りゲルばかりでなく、さらに90℃に加熱した坐りー加熱ゲルについても検討することにした。

1) 乳酸添加した肉糊の坐りおよび坐り一加熱ゲルの破断強度と凹みの経時変化

マイワシのすり身に乳酸を添加してpHを6.0に調節し塩ずりした肉糊と、乳酸を加えずpHが7.0のままで塩ずりした肉糊を同じように25°Cで加熱し、経時的に坐りおよび坐り一加熱ゲルを調製し、その破断強度を測定した結果をFig. 13((a)と(b))に示した。まず、坐りゲルの場合(a)、その破断強度は経時的に緩やかに増加し、pH 7.0の方がpH 6.0よりも常に高い値を示した。一方、坐り一加熱ゲルの場合(b)は、pH 6.0における破断強度が緩やかに増加する傾向を示す点は坐りゲルの場合と同じであるが、pH 7.0のそれは急激に増加して坐りの効果が大きく現れ、破断強度の最大値は坐りゲルの約3.0倍に達した。また、pH 7.0の破断強度の最大値はpH 6.0の約3.6倍の値を示した。

次に上記と同じ坐りゲルと坐り一加熱ゲルの凹みの経時変化を測定した結果をFig. 14((a)と(b))に示した。まず、坐りゲルの場合(a)、pH 7.0における凹みは坐りの初期に急激に増加し、最大に達した後緩やかに減少した。また、pH 6.0の場合(b)はpH 7.0の時ほど急激ではないが、初期に増加して3時間後に最大に達した後その値を保持した。また、pH 7.0の場合の方がpH 6.0のそれよりも常に全体的にやや大きい傾向を示した。一方、坐り一加熱ゲルの場合(b)は、いずれのpHの肉糊でも坐りが4時間後に最大値となり、その後一定の値を保持した。pH 7.0の場合のその最大値はpH 6.0のその約2倍に達している。

2) 乳酸添加した肉糊の坐りおよび坐り一加熱ゲル中のMfタンパク質サブユニット組成の経時変化

Fig. 13の場合と同じ条件で調製した坐りゲルのSDS-尿素混液に対する可溶化率を測定したところ、pH 7.0の条件で作る坐りゲルの可溶化率の方がより大きく低下し、たとえば坐り16時間後の可溶化率

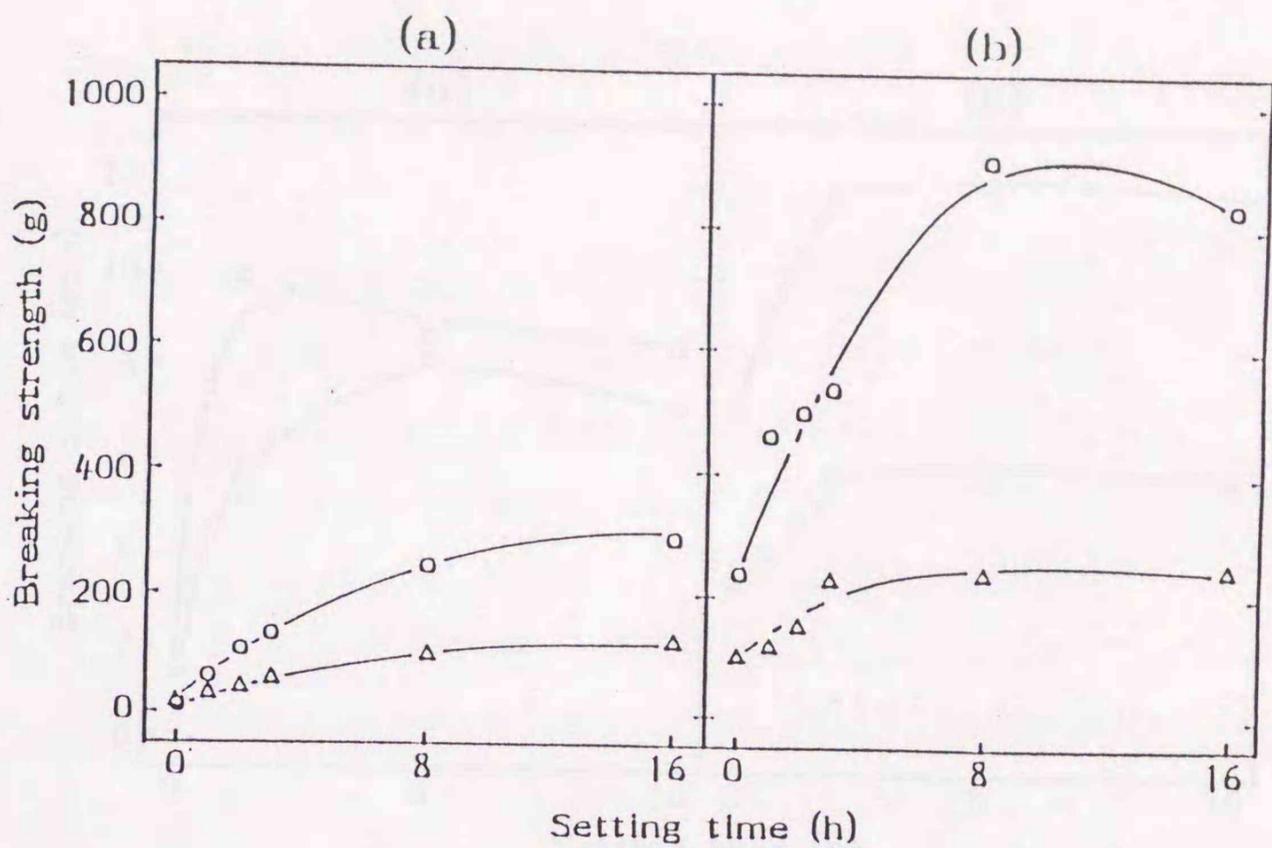


Fig.13. Changes in breaking strength of setting gel and setting-heating gel as a function of setting time.

Surimi of sardine was chopped with 2.5% NaCl at a protein concentration of 130mg/g wet weight of surimi which was prepared at pH 7.0 or pH 6.0 by the addition of a small amount of lactic acid in a speed cutter (National MK-K7) for 5 min at 4°C or below. The setting gel was prepared as in Fig.1. It was subsequently heated at 90°C for 20 min to prepared the "setting-heating gel". The measurement of breaking strength was made as in Fig.1.

(a): Setting gel.

(b): Setting-heating gel.

The pHs for setting were (O) 7.0, (Δ) 6.0.

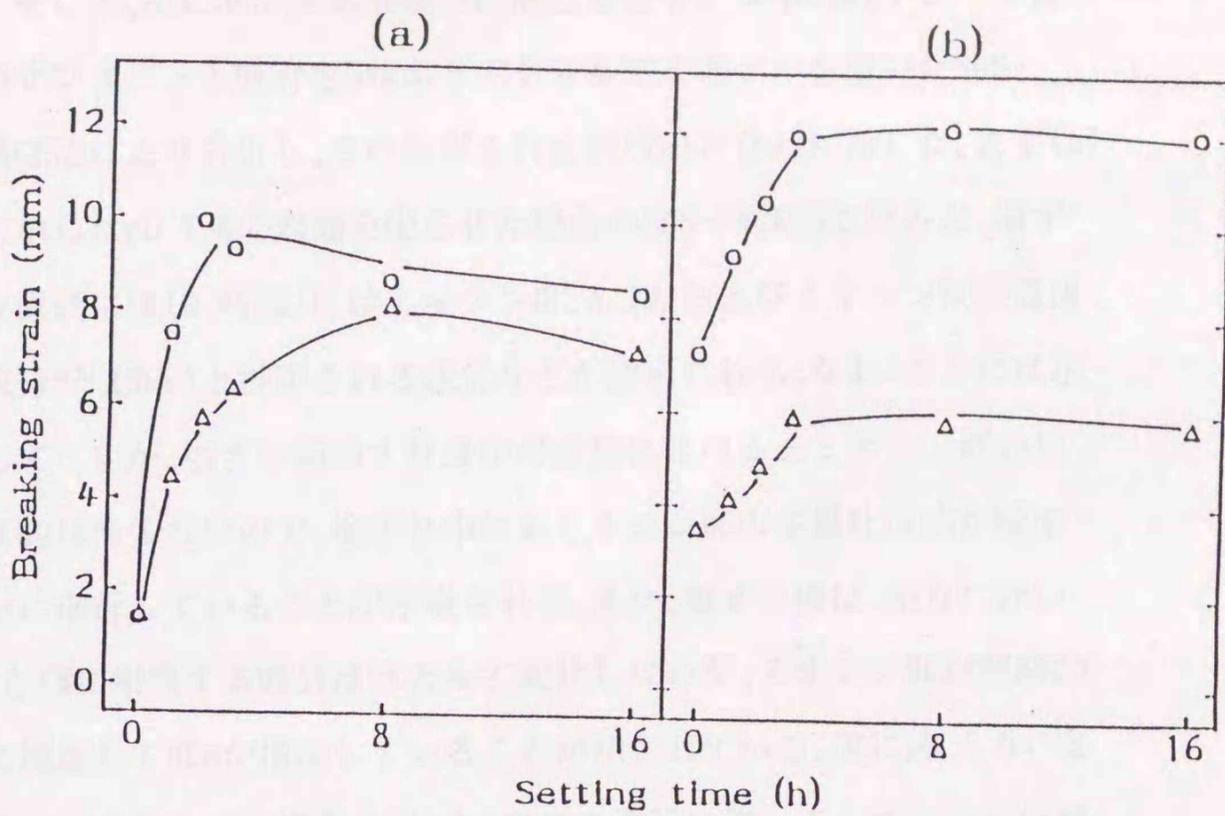


Fig.14. Changes in breaking strain of setting gel and setting-heating gel as a function of setting time.

The setting gel (a) and setting-heating gel (b) were prepared as in Figs.1 and 13. The measurement of breaking strain was made as in Fig.1.

The pHs for setting were (O) 7.0, (Δ) 6.0.

は58.7%に減少した。一方、pH 6.0の条件で作る坐りゲルの場合には例外なくほぼ100%可溶化した。

そこで、次にSDS-尿素混液に溶解した坐りゲル中のMFタンパク質のサブユニット成分を5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE法により分析し、その結果をFig. 15((a)と(b))に示した。まず(a)に示したpH 7.0で肉糊を坐らせた場合のSDS-PAGE図で見ると、塩ずり直後には(0時間)にはミオシンHC, A, TM, およびミオシンHC多量体成分³³⁾ (HCn)と推定される成分などが認められる。なお、ここには示していないが、塩ずり前のすり身中の含量に比べるとミオシンHCの量は約10%少ないので、塩ずり中にもミオシンHCの多量化反応が緩やかに進行していることが示唆される。また、塩ずり後は、坐りに伴いAとTMに相当する成分はほとんど変化しないが、ミオシンHCが経時的に増加してHCnが増加していることが示されている。次にpH 6.0で塩ずりして坐らせた場合(b)にも、坐りの進行に伴ってミオシンHCの減少とHCnの生成が起こり、またAとTMに相当する成分は不変であるがミオシンHCの減少速度とHCnの生成速度がやや小さくなる傾向を示した。

上記に示したSDS-PAGE図型をデンストメトリーによって定量的に解析し、その結果をFig. 16((a)と(b))に示した。まず、pH 7.0の肉糊を、坐らせた場合の結果(a)を見ると、坐り時間の進行とともに肉糊中のミオシンHCが急激に減少し、それに伴ってHCnが増加し、続いてほぼ同時により分子サイズが大きいミオシンHCの多量体成分(HCn')が著しく増加するようになり、この両者が減少するとさらにより巨大なサイズのみオシンHC多量体成分(HCn'')が急激に増加してくることが示されている。続いてpH 6.0の肉糊を坐らせた場合の結果(b)によると、塩ずり中のミオシンHCの減少はpH 7.0の場合よりもやや少なかったが、また坐りに伴うミオシンHCの減少もpH 7.0で塩ずりして坐らせた場合(a)よりも緩やかになり、それに応ずるようにHCnは

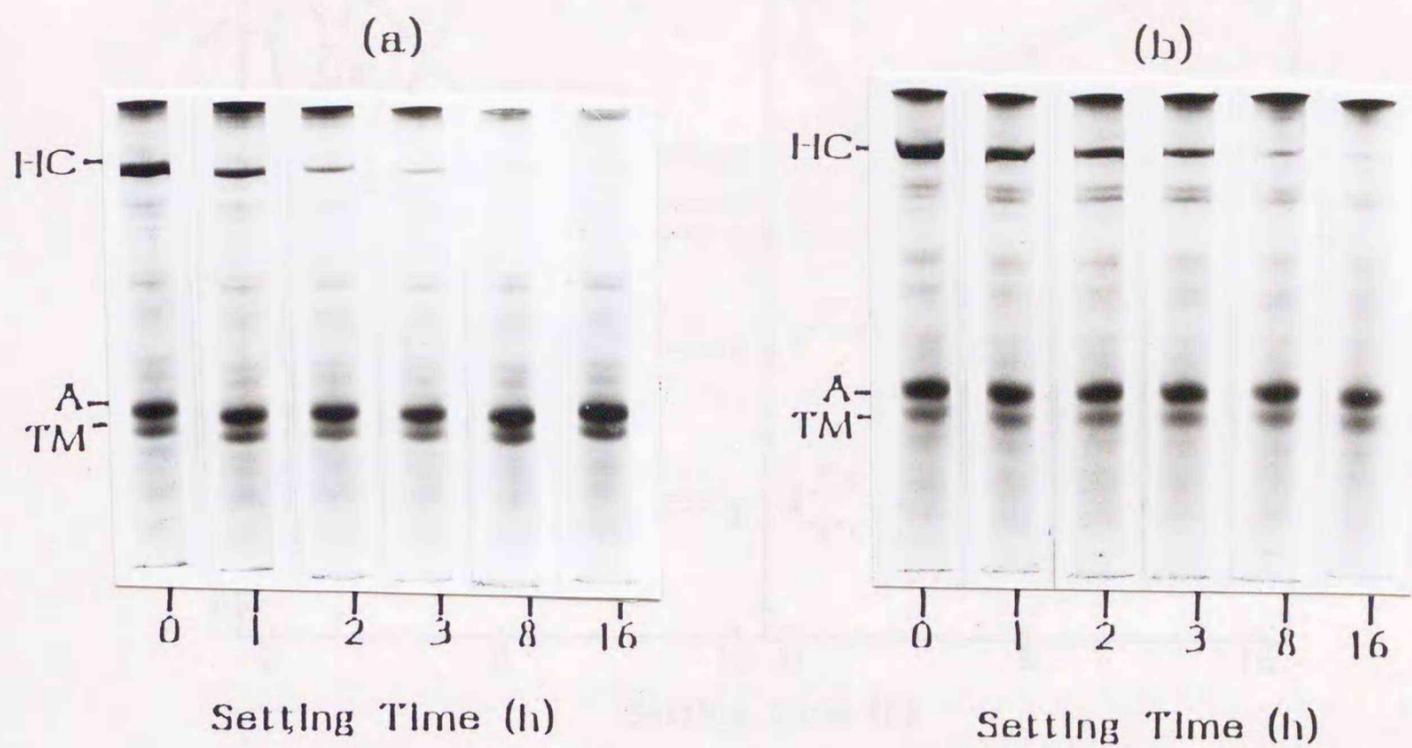


Fig.15. Change in SDS-PAGE patterns of solubilized protein of setting gel as a function of setting time.

The preparation of setting gel was conducted as in Fig.13. The setting gels were solubilized and applied to SDS-PAGE as in Fig.3.

The pHs for setting were (a) 7.0, (b) 6.0.

The positions of myosin heavy chain (HC), actin (A), and tropomyosin (TM) are indicated on the left side.

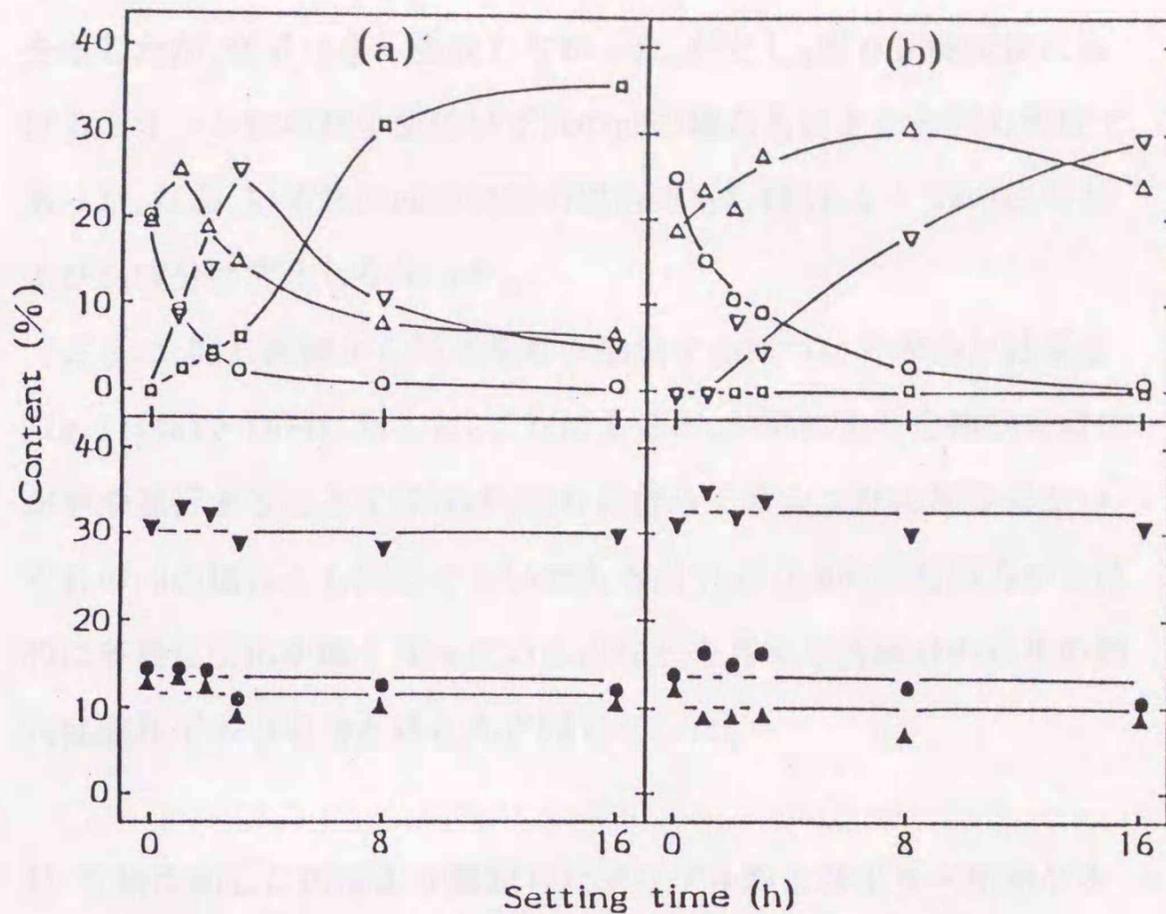


Fig.16. Changes in subunit composition of myofibrillar protein of setting gel as a function of setting time.

The setting gels were obtained at pH 7.0 and 6.0 as in Fig.1. The SDS-PAGE of protein solubilized into SDS-urea medium was made as in Fig.3. The quantitative determination of each subunit of myofibrillar protein were conducted as in Fig.4.

The pHs for setting were (a) 7.0, (b) 6.0.

(O): Myosin heavy chain (HC).

(Δ): 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 medium (HCn'').

(●): Components migrating between HC and actin (HC>X₁>A).

(∇): Actin + tropomyosin (A + TM).

(▲): Components migrating faster than tropomyosin (TM>X₂).

増加して蓄積する傾向を示し、HCn' もゆっくりと増加する傾向のみを示したが、HCn'' は全く生成しなかった。ただし、坐り16時間後におけるミオシンHCの減少量はいずれのpHの場合もほとんど同じ程度であった。なお、いずれのpHの肉糊の場合でもX₁成分、A + TMの成分およびX₂成分は変化しなかった。

さらに、同じ肉糊から得た坐り一加熱ゲルについて求めた結果をFig. 17((a)と(b))に示した。これによると、加熱により全体的な変化がやや進行することを除けば、坐りに伴うミオシンHCの減少量がいずれのpHの場合とも同じぐらいである点やpH 7.0の場合の方が全体的に多量化反応が速くなっている点などを含めて各成分の変化の傾向は坐りゲルの場合とほとんど同じだった。

3) 乳酸添加した肉糊より調製した坐りゲルおよび坐り一加熱ゲルの品質の特徴

Fig. 16と17の実験結果を基にして、pH 6.0とpH 7.0の肉糊を塩ずりして25°Cで16時間後に得た坐りゲルとこれらを90°Cで加熱した坐り一加熱ゲル中のMfタンパク質サブユニット組成をヒストグラフで表し、Fig. 18((a)~(d))で比べた。各図中の一番左側にはすり身について測った値を対照のために示した。このヒストグラフは、ミオシンHC多量体成分をHCn、HCn'、HCn''に分け、ミオシンHC、X₁成分、A + TM、およびX₂成分と共にそれぞれの量比を示したものである。また、ヒストグラフ上端の括弧内の数値は同じ坐りゲルの破断強度である。これによると、いずれの場合でもこれらの成分の中でX₁、A + TM、およびX₂成分の量はややばらついてはいるもののほとんど差異がなかった。まず、坐りゲルの場合(A)を見ると、すり身をpH 7.0で塩ずりして坐らせた場合(a)は、ミオシンHC量はすり身に比べると26.9%から0.6%に減少し、また \sum HCn(HCn+HCn'+HCn'')の量を図から計算するとその量は18.7%から47.6%に大きく増加した。この時、破断強度の値

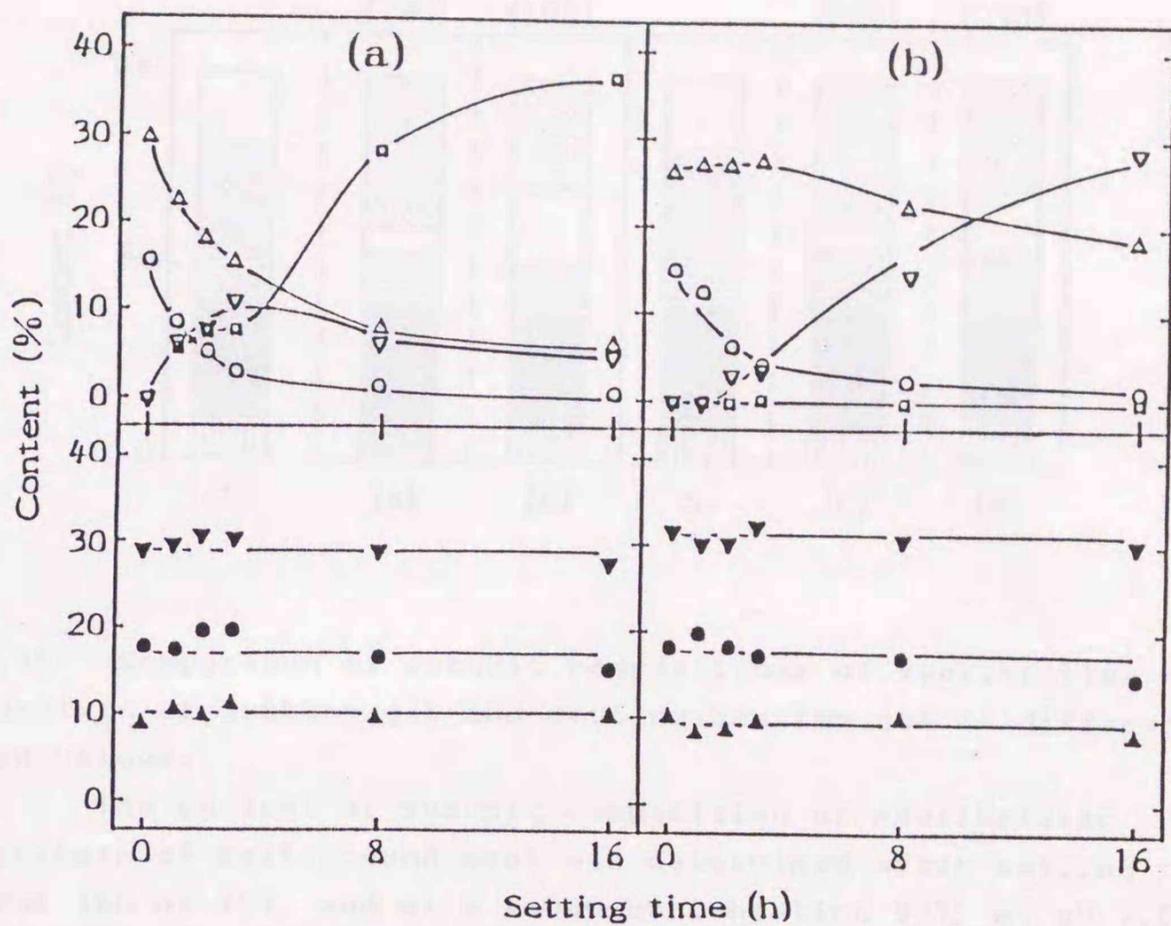


Fig.17. Changes in subunit composition of myofibrillar protein of setting-heating gel as a function of setting time. The preparation of setting-heating gel was conducted as in Fig.13. Conditions and symbols are the same as in Figs. 13 and 16.

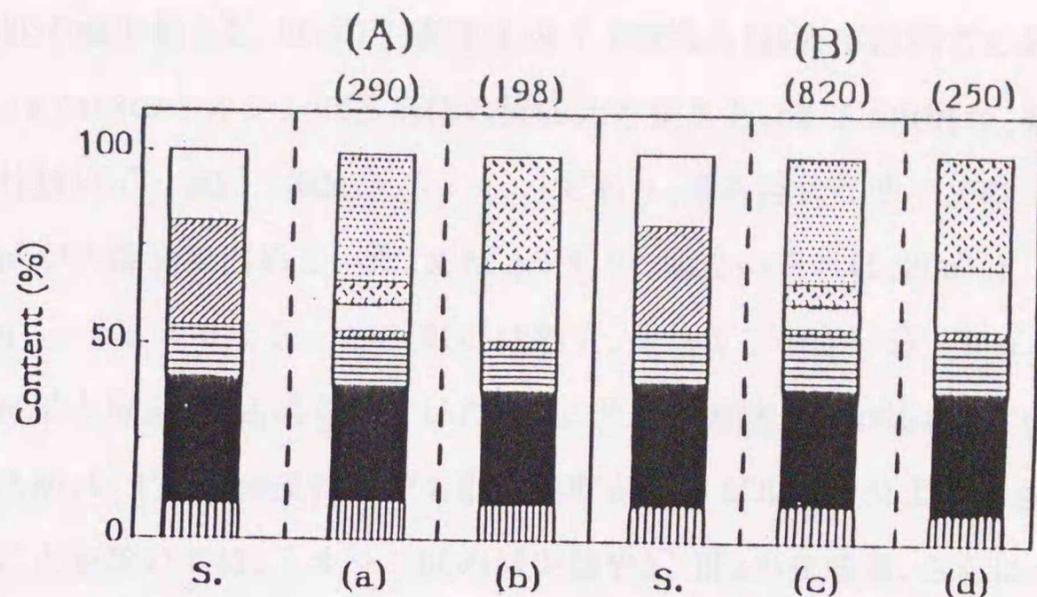


Fig.18. Comparison of subunit compositions of myofibrillar protein of setting gel and setting-heating gel at different pH values.

The content of subunit composition of myofibrillar protein of salt-ground meat was determined after setting for 16h at 25°C and at a subsequent heating 90°C at pH 7.0 or pH 6.0, as shown in Figs.16 and 17. The figures in parentheses over the histograms are the breaking strength of the same gel.

- (): Cross-linked myosin heavy chain, insoluble into SDS-urea medium (HCn").
- (): Cross-linked myosin heavy chain, too large to migrate into 5% polyacrylamide gel (HCn').
- (): Cross-linked myosin heavy chain, migrating into 5% polyacrylamide gel (HCn).
- (): Myosin heavy chain (HC).
- (): Components migrating between HC and actin (HC>X₁>A).
- (): Actin + tropomyosin (A + TM).
- (): Components migrating faster than tropomyosin (TM>X₂).

(A): Setting gel.

(B): Setting-heating gel.

S: Surimi.

The pHs for setting were 7.0 (a,c), 6.0 (b,d).

は290gであった。一方、すり身をpH6.0で塩ずりして坐らせた場合(b)は、破断強度の値は198gとpH 7.0の場合(a)よりも小さいが、ミオシンHCの減少量と Σ HCnの生成量はpH 7.0の場合(a)とほぼ同じであった。その時のミオシンHC多量体の構成比を見ると、pH 7.0の場合、その比はHCn^{''}:HCn':HCn \approx 7:1:1であり、最も巨大なサイズのHCn^{''}が大部分を占めていた。また、pH 6.0の場合のそれは、HCn^{''}:HCn':HCn \approx 0:3:2で、HCn^{''}は無く、それより小さい分子サイズのHCn'とHCnとで占められていた。次に坐り一加熱ゲルの場合(B)であるが、いずれのpH条件下でも破断強度が坐りゲルのそれより大きいことを除いては、ミオシンHCの減少量や Σ HCnの生成量、さらにミオシンHC多量体の構成比も坐りゲルのそれと同じであった。すなわち、pH 6.0の場合、pH 7.0のそれに比べて、ミオシンHCの減少速度は小さいものの、減少量はほぼ同じであり、また、ミオシンHC多量体の合計(Σ HCn)を見ると、その生成量はpH 6.0の場合でもpH 7.0のそれとほぼ同じであった。しかし、pH 7.0の場合、分子サイズの大きいHCn^{''}の生成量がpH 6.0のそれに比べて非常に多い点で前節に示したスケトウダラ肉糊の場合とよく似ている。

本節では図示していないが、マイワシでも無機酸(HCl)を用いて乳酸と同じ実験を行ったところ、ゲル物性とミオシンHCの変化は上記した結果とほぼよく似た結果を示すことを認めた。

以上の結果より、微酸性下におけるマイワシ肉糊の坐りにおいては、スケトウダラ肉糊の場合と異なり、ほとんどX₁成分は生成しないことが特徴である。それゆえX₁成分の生成が微酸性下におけるゲル物性の劣化の直接原因ではないことが明らかである。また、微酸性下ではミオシンHCの減少が抑制され、巨大なサイズのミオシンHC多量体であるHCn^{''}の生成が起こらなくなる点でスケトウダラの場合と似ており、これがゲル物性の劣化に対応していると考えられた。

4) 考察

野中ら²¹⁾はマイワシ筋肉中の肉糊のpHは乳酸の生成に伴って漁獲後2時間で6.7まで下り、そのまま魚体をラウンド状態で2°Cで4時間貯蔵すると、さらにpHは5.9まで低下すると報告している。そこで本研究ではすり身に乳酸を添加してpHを6.0に調節したのでこれは漁獲後約5.5時間に相当することになる。このpHにおけるすり身から調製した肉糊を25°Cで坐らせると、pH 7.0のものに比べてその破断強度は緩やかにしか増加せず、一例を挙げると、Fig. 18に示すように16時間後の坐り一加熱ゲルの値は、pH 7.0では820gに達するのに対して、pH 6.0では250gにとどまった。同じ坐り一加熱ゲル中のミオシンHCの変化を見ると、pH 6.0の坐り一加熱ゲル中のミオシンHC多量体の生成量は、pH 7.0のゲル場合とほぼ同じであるが、その多量体の組成が異なり、その中にはHCn^{''}がなくHCn'とHCnで占められていた。一方、pH 7.0の場合のゲルの方はHCn^{''}が大部分で一部がHCn'とHCnで占められていた。しかし、このミオシンHC多量体の量と構成比は、坐りゲルでも坐り一加熱ゲルでもほとんど同じであった。一方、坐りゲルと坐り一加熱ゲルの破断強度には非常に大きな差異がある。それゆえ、このゲル物性の大きな差は、ミオシンHC多量体の量と構成比だけからは説明できないものである。したがって、上記した坐り一加熱ゲルと坐りゲルの示す大きなゲル物性(破断強度と凹み)の相違は、ゲルを可溶化するのに使用した溶媒、すなわち2% SDS-8M urea-2% 2-メルカプトエタノールの存在によって容易に開裂するような結合によって生み出されているものと推定される。ミオシンHC間に生ずる結合は同溶媒中で開裂しないので、あたかも共有結合のような強い結合のように見え、あるいはミオシンHC(ポリペプチド鎖)間の絡み合いによることも考えられるが、坐り一加熱ゲルの示す大きなゲル物性は多数の非共有結合に依存して支持されていると判断される。坐り一加熱ゲルは90°Cの高温で加熱されているので、常識的にはお

そらく疎水性相互作用(結合)^{42~44)}の寄与が大きいものと考えら
べきである。ただし、この疎水性の結合が大きなゲル物性の強化をもた
らすにはあらかじめミオシンHC間に強い結合(またはポリペプチド
鎖の絡み合い)が形成されていることが必要条件であり、pH 6.0の肉
糊のゲル形成能が低下したのは、ミオシンHC間の強い結合(HCn⁺の生
成量)が形成されにくいことだけが原因ではなく、90°Cの高温加熱に
よって形成される疎水性の相互作用もまた著しく低下したことに起
因するものであろう。スケトウダラやマイワシのMfタンパク質(Mf
Ca-ATPase活性を尺度とする)がpH 6.0において速やかな変性を受け
ることは既によく知られているので、上記したゲル形成能の大きな
低下はおそらくミオシンHCの酸変性による結果であるように推定さ
れるものである。

第二章 肉糊のゲル形成能に及ぼす糖類の効果

特にスケトウダラ肉糊のゲル形成能とミオシンHCの変化に 及ぼすソルビトールの影響

スケトウダラ冷凍すり身には、凍結貯蔵中の品質劣化を防ぐために糖(および糖アルコール)と重合リン酸塩が添加されている。この中で重合リン酸塩の役割はすり身のpHを中性に保持することにあると報じられているが⁴⁵⁾、その効用はすり身のゲル形成能にも影響を及ぼすことが第一章の研究結果から明らかになった。一方、糖類については、すり身中のMFタンパク質の変性防止作用を示す事実^{22~27)}は既に良く知られている。なお、これが同じすり身から調製した肉糊のゲル形成に際しても何らかの効果を示す可能性があると考えられるが、十分な検討はなされていない。そこで、本章では主にソルビトールを使用して、肉糊のゲル化とその際に起こるミオシンHCの多量化反応に及ぼす影響を調べ、ゲル形成機構に関する情報を得ようと試みた。

1) 坐りゲルおよび坐り一加熱ゲルの破断強度の経時変化に対する
ソルビトールの影響

函館近海で漁獲されたスケトウダラよりすり身を調製し、冷凍せずに直ちにMfタンパク質濃度が115mg/g(湿重量)となるように水、0～8%の間のソルビトール、0.3%の重合リン酸および2.5%のNaClを添加し、10℃以下の低温で塩ずりし、肉糊を調製した。これを20℃と40℃で坐らせた場合と、さらに90℃で20分間加熱した場合の破断強度の経時変化をFig. 19((a)～(d))に示した。まず、20℃で坐らせた場合(a)、いずれの肉糊の場合も破断強度は坐りの進行とともに緩やかに増加したが、ソルビトール濃度の高い方が破断強度は僅かながら高い値を示した。一方、40℃で坐らせた場合(b)は、坐りの初期に破断強度は急激に増加しその後ほぼ一定値を保ったが、ここでもソルビトール濃度の高い方がやや高い値を示した。

一方、20℃で坐らせて90℃で加熱した坐り一加熱ゲルの場合(c)は、ソルビトールを添加しないのものでは、坐りが6時間後までは破断強度は急激に増加するが、その後僅かに減少した。5%ソルビトールを添加したものでは、坐り12時間後までは破断強度が増加するが、その後やや減少した。しかし、8%ソルビトールを添加したものでは、破断強度は18時間後でもなお減少せず増加傾向を示すだけとなった。いずれの場合も坐りゲルに比べて、その破断強度は著しく増加し、いわゆる坐りの効果が認められた。また、40℃で坐らせて90℃で加熱した坐り一加熱ゲルの場合(d)は、ソルビトールを添加しないものと5%添加したものでは破断強度は経時的にあまり増加しないが、8%ソルビトールを添加したものでは、その坐り初期に破断強度はやや増加し、その後僅かに減少する傾向を示した。いずれの場合も、破断強度は坐りゲルよりも全体的に高いが、その増加傾向は小さく、坐りの効果はかなり弱かった。

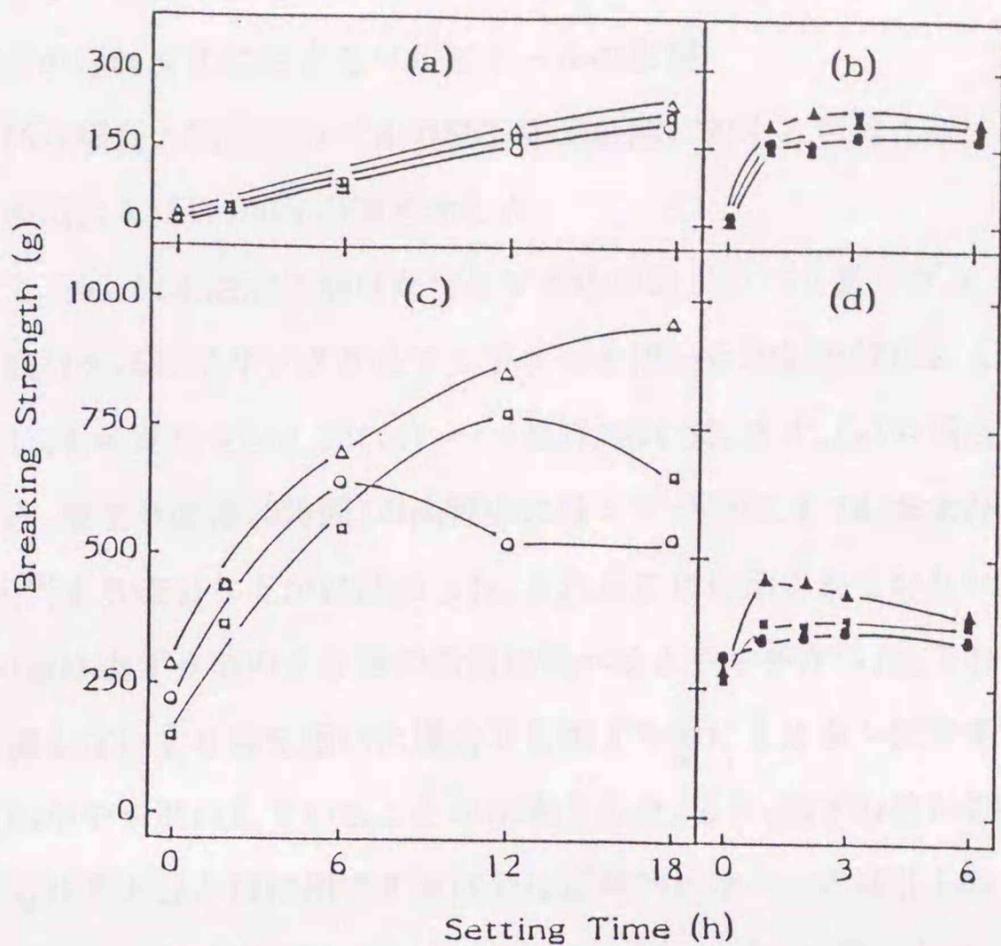


Fig.19. Changes in breaking strength of setting and setting-heating gels from salt-ground meat as a function of setting time.

The surimi from walleye pollack, which was not frozen and contained no additives, was chopped with 2.5% NaCl at a protein concentration of 115mg/g wet weight of surimi on addition of 0.3% polyphosphate and 0 ~ 8% sorbitol in a speed cutter (national MK-K7) for 5 min at 10°C or below. The setting (a,b) and setting-heating (c,d) gels were prepared as in Figs.1 and 13, excepting the setting temperature (20 and 40°C) of salt-ground meat. The measurement of breaking strength was made as in Fig.1.

The temperatures for setting were 20 (a,c) and 40 (b,d)°C.

The sorbitol concentrations for setting were 0 (O, ●), 5 (□, ■), and 8 (Δ, ▲)%.

2) 坐りゲルおよび坐り一加熱ゲル中のMfタンパク質サブユニット
組成の経時変化に対するソルビトールの影響

Fig. 19の場合と同じ坐りゲルのSDS-尿素混液に対する可溶化率は、
いずれの場合もほぼ100%の値を示した。

そこで、SDS-尿素混液に溶けた坐りゲル中のMfタンパク質サブユ
ニット成分を、5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE法によ
り分析し、その結果をFig. 20((a) ~ (d))に示した。まず、(a)の場合
を見ると、塩ずり直後(0時間)の肉糊中にはミオシンHC, A, TM, および、
HCnに相当する成分などが認められ、またここには示されていない
がHCnの量は塩ずり前のすり身の含量に比べるとやや多かった。それ
ゆえ冷凍しないすり身を用いた場合でも塩ずり中にミオシンHCの多
量化反応がやや進行していることが示唆された。また、塩ずり後に20
°Cで坐らせると、AとTMに相当する成分は経時的にほとんど変化しな
いが、ミオシンHCは経時的に減少してHCnおよび X_1 成分が増加して
いることが示されている。一方、20°Cで8%ソルビトールを添加した
ものを坐らせた場合(b)は、ミオシンHCの減少とHCnの生成が起こる
点、およびAとTMに相当する成分が不変である点は同じであるが、 X_1
成分の生成はソルビトールを添加しないものの場合(a)よりもむし
ろやや少ないことが示された。

次に、(c)の場合を見ると、すり身を塩ずり中にHCnがやや増加する
点では既に上記したとうりである。次に塩ずり後に40°Cで坐らせる
と、AとTMに相当する成分はほとんど経時的に変化しない点は20°Cの
場合と同じであるが、ミオシンHCの減少はあまり起こらず、HCn、およ
び X_1 成分の生成もあまり認められなかった。一方、8%ソルビトール
を添加したものを坐らせた場合(d)も、ソルビトールを添加しない場
合(c)とほぼ同じような結果を示した。

Fig. 20に示したSDS-PAGE図型をデンストメトリーによって定量的
に解析し、その結果をFig. 21((a) ~ (f))に示した。なお、いずれの

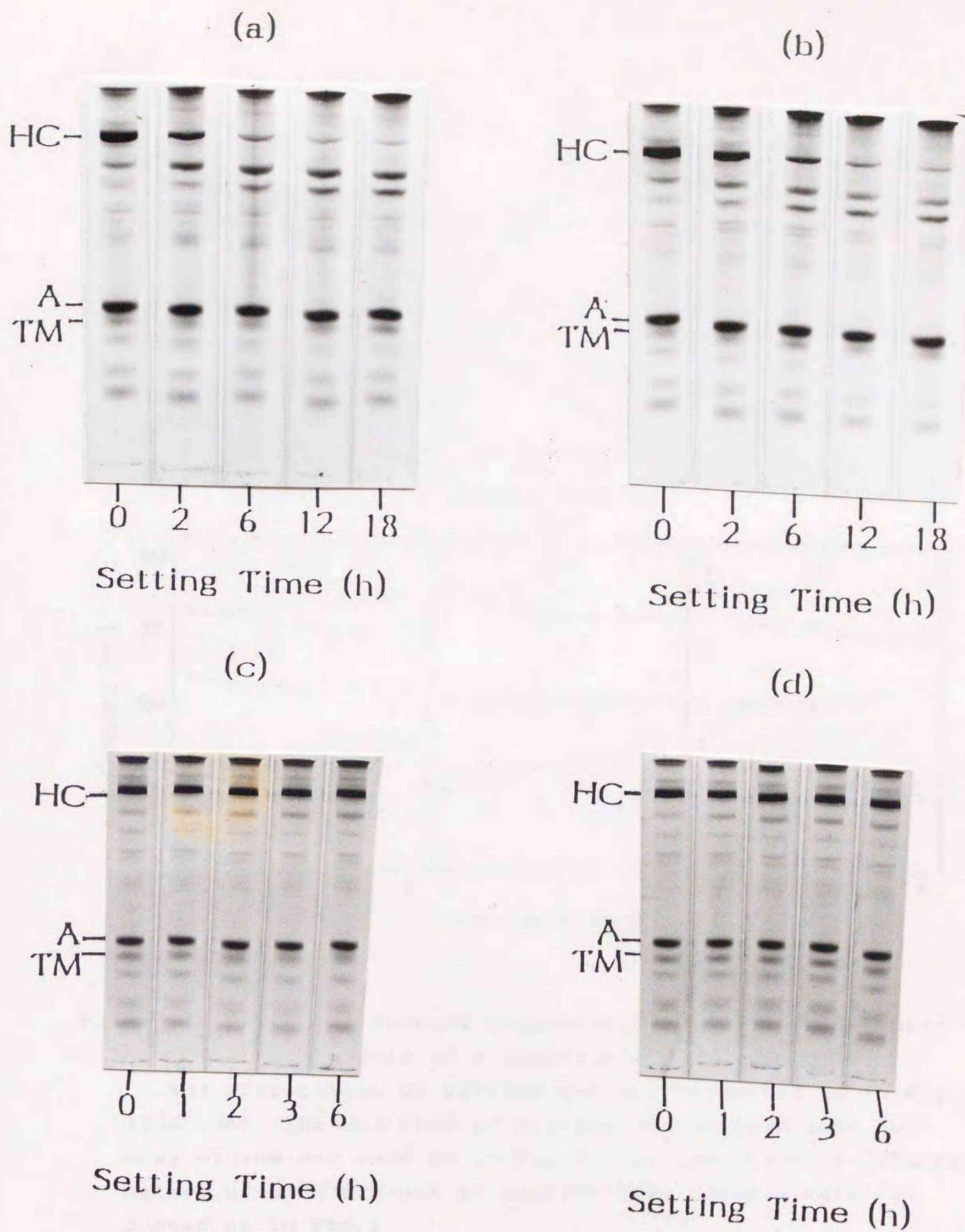


Fig.20. Changes in SDS-PAGE patterns of solubilized protein from setting gel as a function of setting time.

The preparation of setting gel was conducted as in Fig. 19(a), (b). The setting gels were solubilized and applied to SDS-PAGE as in Fig.3.

The temperatures for setting were 20(a,b) and 40(c,d)°C.

The positions of myosin heavy chain (HC), actin (A), and tropomyosin (TM) are indicated on the left side.

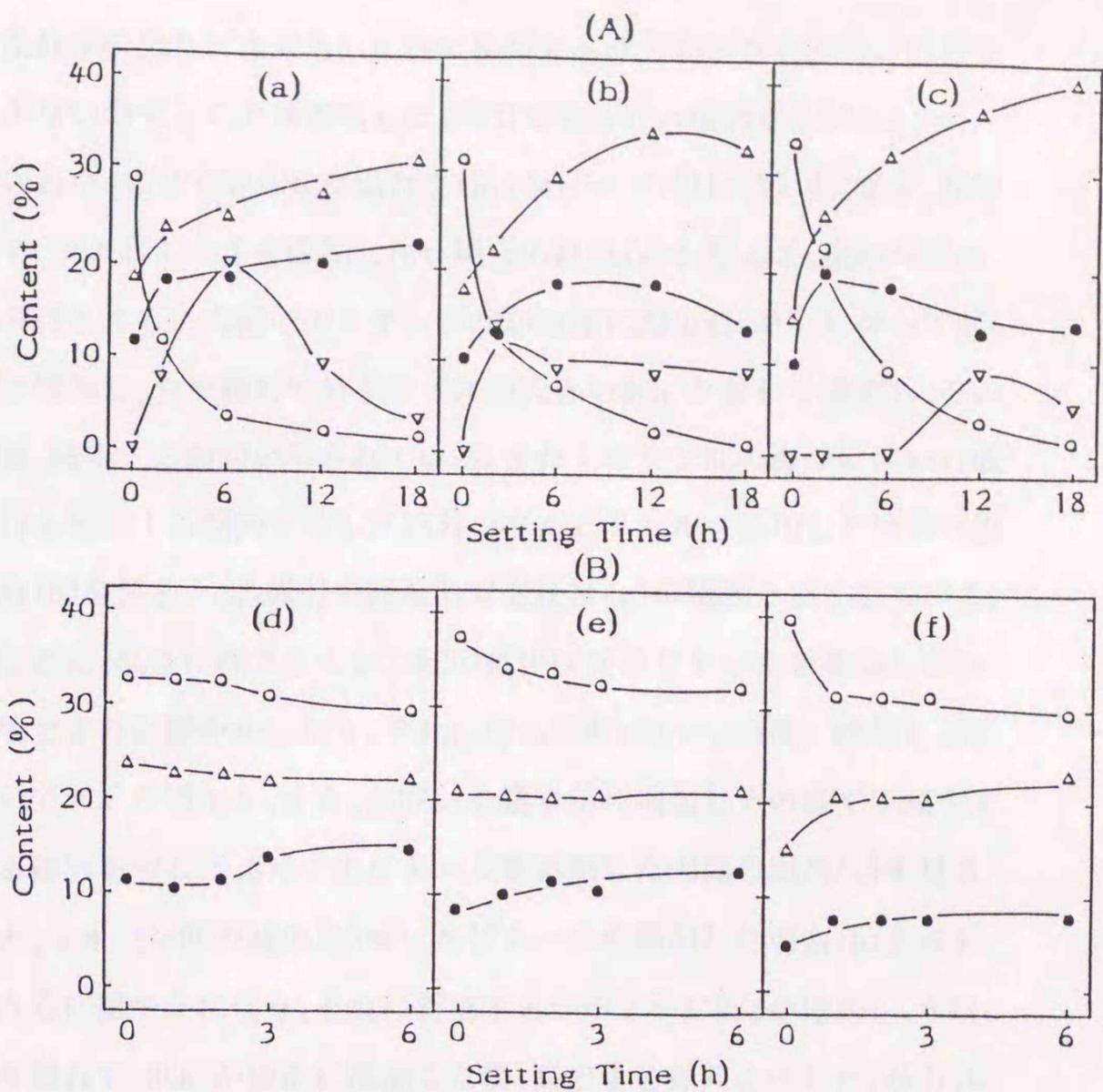


Fig.21. Changes in subunit composition of myofibrillar protein of setting gels as a function of setting time.

The preparation of setting gel was conducted as in Fig. 19(a), (b). The SDS-PAGE of protein solubilized into SDS-urea medium was made as in Fig.3. The quantitative determination of each subunit of myofibrillar protein were conducted as in Fig.4.

The temperatures for setting were 20(A) and 40°C (B).

The sorbitol concentration was 0(a,d), 5(b,e), and 8(c,f) %.

(O) : Myosin heavy chain (HC).

(Δ) : 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').

(●) : Components migrating between HC and actin (HC > X₁ > A).

条件下の坐りゲルでもA + TMに相当する成分および X_2 成分には変化がないのでここでは省略した。20°Cで坐らせた場合を(A)((a) ~ (c))に、40°Cで坐らせた場合を(B)((d) ~ (f))に示した。まず、20°Cで、ソルビトールを添加しない場合の結果(a)を見ると、坐り時間の進行とともに肉糊中のミオシンHCが急激に減少し、それに伴ってHCnが増加し、やや遅れて分子サイズの大きいHCn'が著しく増加し、その後、減少する傾向が示されている。またミオシンHCの減少に伴い X_1 成分も増加する傾向を示した。5%のソルビトールを添加した肉糊の場合(b)を見ると、各成分の経時的な変化は(a)の場合と良く似ている。ただし、坐りに伴うミオシンHCの減少はソルビトールを添加しない場合よりも緩やかになり、それに伴ってHCnがやや急激に増加し、次いでHCn'が増加し、また、 X_1 成分も緩やかに増加しその後やや減少する傾向を示した。8%ソルビトールを添加した肉糊の場合(c)を見ると、ミオシンHCの減少は5%ソルビトールを添加した場合(b)よりもさらに緩やかになり、それに対応するかのようHCnが増加し、かなり遅れて、HCn'が僅かに増加した後、減少する傾向を示した。なお、いずれの場合も塩ずり直後のHCの含量がすり身中の値に比べてやや少なく、HCn量がやや増加しているのは塩ずりしてからケーシングして、加熱に供するまでの時間がやや長くかかったため、ミオシンHCの多量化反応が進行したものと推定される。しかし、この塩ずりの過程におけるミオシンHCの多量化反応もソルビトール濃度が高いほどやや緩やかであった。以上の結果として、ソルビトール濃度が高いほどミオシンHCの減少が抑制され、HCnの生成蓄積量は大きくなる傾向が示された。

一方、40°Cの場合(B)を見ると、各成分の変化はかなり小さくなり、(e)に示したソルビトールを添加しない肉糊の場合は、塩ずり中にミオシンHCの減少は認められるものの、40°Cに加熱した時はミオシンHCは僅かしか減少せず、またHCnの生成もほとんどなく、 X_1 成分がほ

んの僅かに生成する傾向を示すのみであった。5%ソルビトールを添加した肉糊の場合(f)は、塩ずり中のミオシンHCの減少はソルビトールを添加しない肉糊の場合よりも遅いが、40°CでのミオシンHCの減少とX₁成分の増加が極めて僅かに起こり、HCnの生成はほとんどないことを示した。8%ソルビトールを添加した肉糊の場合(f)は、塩ずり中のミオシンHCの減少とそれに伴うHCnとX₁成分の増加が、5%ソルビトールを含む肉糊の場合よりやや強く起こることを示した。しかし、ソルビトールの影響は余り大きなものではなかった。

次に坐り一加熱ゲルの場合をFig. 22((a) ~ (f))に示した。その結果を見ると、20°Cおよび40°Cで調製した坐りゲル中に起こった変化に比べ、全体的に反応がやや進行している傾向があるものの、各サブユニット成分の変化の傾向は極めて良く似ており、たとえば、20°Cでは、肉糊中の速やかなミオシンHCの減少、HCnの生成とHCn'を多く蓄積する傾向はほぼ同じであり、ソルビトールはHCnの生成と蓄積を起こり易くしている。また、40°Cではいずれの肉糊においてもミオシンHCの僅かな減少、それに対応する僅かなHCnとX₁成分の生成などが認められるものの、変化は全体的に小さく、さらに、ソルビトール濃度の高い方がその変化がやや大きいことが示されている。ただし、変化は極めて少なかった。それゆえ、これらの変化は同ゲルのゲル物性の変化と良く対応しており、特にHCnの生成とゲル物性の増加は良く関連しているように推定される。

3) ミオシンHCの多量化とソルビトール濃度との関係

Fig. 21とFig. 22に示された坐りに伴う肉糊中のMfタンパク質サブユニット成分組成の経時変化より、ミオシンHCの減少量、HC多量体成分の生成量、またX₁成分の生成量に注目して、これらに対するソルビトールの効果を整理してFig. 23((a) ~ (k))に示した。まず、20°Cの坐りゲルの場合(A)を見ると、ミオシンHC(a)の坐り中の減少は、ソ

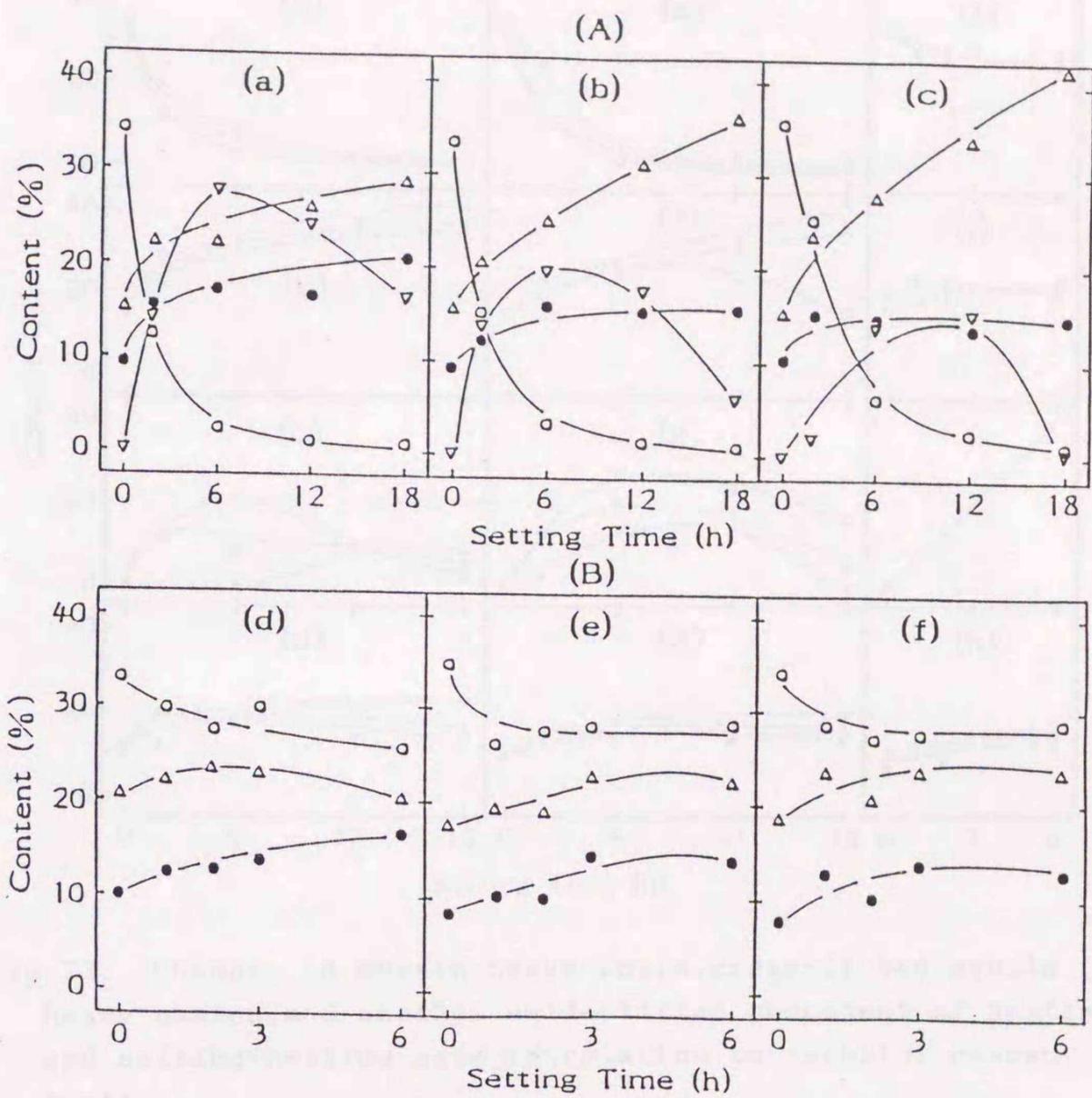


Fig.22. Changes in subunit composition of myofibrillar protein of setting-heating gels as a function of setting time.

The preparation of setting-heating gel was conducted as in Fig.19(c), (d). The SDS-PAGE and the quantitative determination of each subunit were conducted as in Figs.3 and 4. Symbols are the same as in Fig.21.

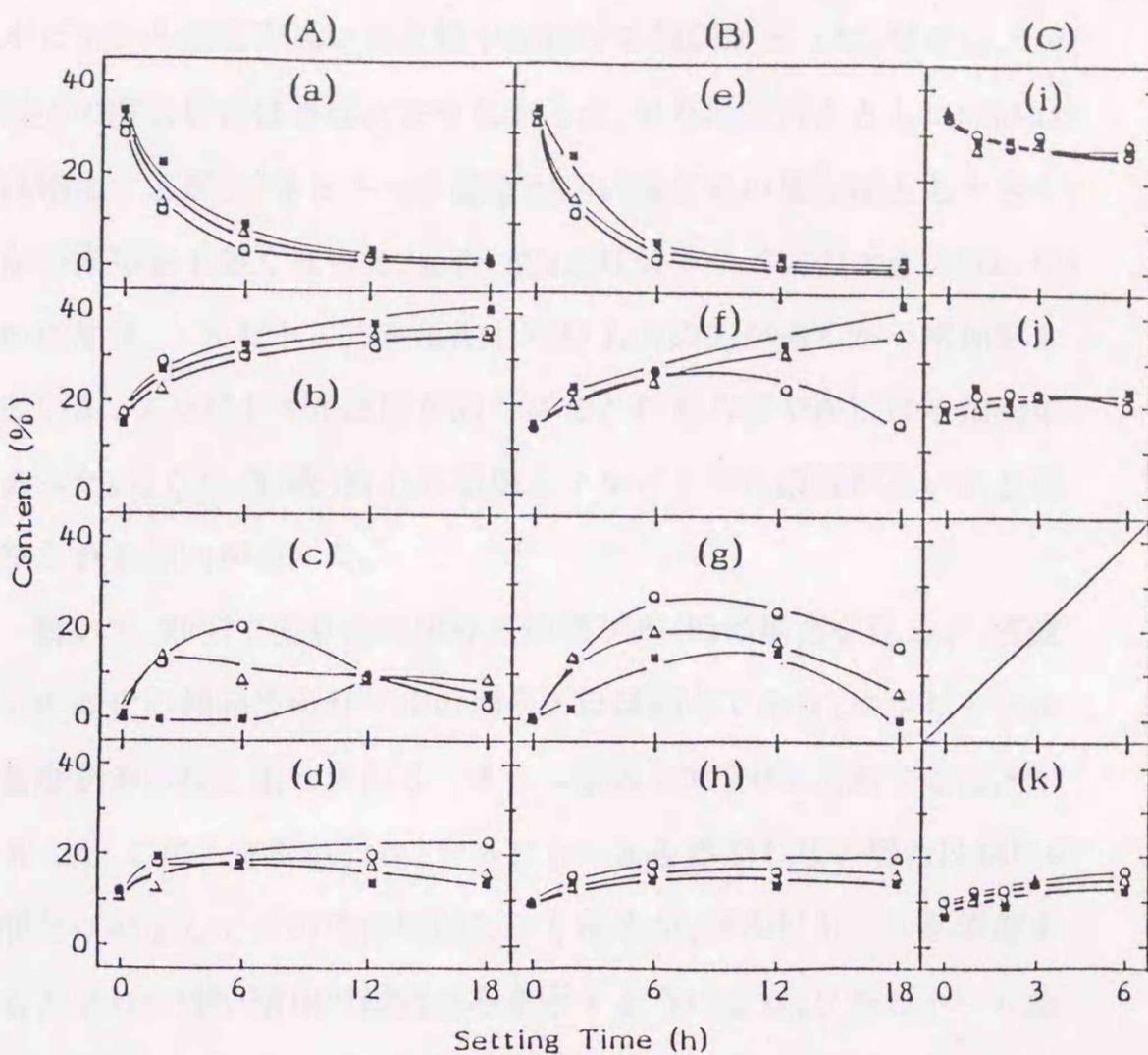


Fig.23. Changes in myosin heavy chain, cross-linked myosin heavy chains, and another unidentified component of setting and setting-heating gels in relation to sorbitol concentration.

The preparation of setting gel (A,C) and setting-heating gel (B) was conducted as in Fig.19 (a ~ c). Other conditions are the same as in Fig.21 and 22.

(A) : Setting at 20°C .

(B) : Setting at 20°C , followed by heating at 90°C for 20 min.

(C) : Setting at 40°C .

The sorbitol concentrations are 0(O), 5(Δ), and 8(\blacksquare)% .

(a, e, i) : Myosin heavy chain (HC) .

(b, f, j) : Cross-linked myosin heavy chain, migrating into 5% polyacrylamide gel (HCn) .

(c, g) : Cross-linked myosin heavy chain, too large to migrate into 5% polyacrylamide gel (HCn') .

(d, h, k) : Components migrating between HC and actin (HC > X₁ > A) .

ルビトール濃度が高いほど緩やかになる傾向があった。ただし、その減少の度合いには差はあまりなかった。坐りの進行とともにHCn(b)は増加するが、ソルビトール濃度が高いほどその増加速度も大きく、かつ増加量も多くなった。また、HCnより分子サイズの大きいHCn'(c)の増加は、ソルビトールを添加しないものの方が速くかつ増加量も多いが、ソルビトール濃度が高くなるとむしろ緩やかになる傾向があった。さらに、X₁成分(d)の増加もソルビトール濃度が高いほど抑制される傾向があった。

続いて、20°Cで坐り後の坐り一加熱ゲル(B)の場合を見ると、各成分の変化の傾向は坐りゲルの場合とほぼ同じであり、ソルビトール濃度が多いほど坐りに伴うミオシンHC(e)の減少を抑制する傾向があった。このときHCn(f)は、ソルビトールを添加しない場合は初期の間だけ増加してその後は増加しなくなるが、ソルビトールを添加すると坐りに伴い増加の傾向のみを示すようになり、ソルビトール濃度が高いほど増加の度合いが大きくなった。また、HCn'(g)は坐りの進行とともに緩やかに増加した後減少するが、ソルビトール濃度が高いほど増加が遅くなり、かつ増加量も少なくなった。さらに、X₁成分(h)もソルビトール濃度が高いほどその増加が遅くなり、増加量も少なくなる傾向を示した。

最後に、40°Cの坐りゲルの場合(C)を見ると、ミオシンHC(i)の減少、HCn(j)の増加、および、X₁成分(k)の増加のいずれの場合においても、ソルビトール濃度の高いほど変化量はやや多い傾向にあるが、余り顕著な差ではなく、変化量も少なかった。

4) 考察

シュクロースやソルビトールなどの糖や糖アルコール類が魚肉タンパク質の冷凍変性を防止する事実は以前からよく知られており、その優れた実用例はスケトウダラ冷凍すり身の製造および貯蔵に

見られる。^{46~48)} また、Mfタンパク質の冷凍変性に対する糖の保護効果と糖の種類の関係については、野口ら⁴⁹⁾ や松本ら²⁵⁾ によって報告されている。特に松本らはすり身に添加されているレベルの濃度の糖がMfタンパク質の冷凍変性に対する抑制効果を強く発揮するのは、肉質のpHが中性域に保持されている時に限られるのであって、酸性域やアルカリ域ではその効果は弱められ、その際にはさらに多量の糖によってのみそれが可能となることを報告している。

本研究ではスケトウダラのすり身を調製し、塩ずりの際にソルビトールを添加し、肉糊を坐らせる時に起こるゲル物性とミオシンHCの変化に対してソルビトールが及ぼす影響について検討した。まず、20°Cでの坐りの場合、ソルビトールを添加すると坐りに伴う肉糊中のミオシンHCの多量化反応が抑制され、ミオシンHCの減少は緩やかになり、HCnを多く蓄積して、HCn'の増加を少なくし、またX₁成分の生成を抑える効果が認められた。また、このとき形成される坐りゲルの破断強度はやや高い値を示すだけであったが、この坐りゲルをさらに90°Cで加熱した場合はいわゆる坐りの効果が発揮されて坐りゲルの破断強度は著しく大きくなった。これはソルビトールを添加しない肉糊でも起こるが、やや大きな増加が坐りの初期の間だけ起こり、後期にはその度合いは減少した。一方、ソルビトールを8%添加したものでは破断強度は長時間にわたって低下する事なく大きく増加する傾向のみを示した。なお、坐り—加熱ゲル中のミオシンHCの多量化の度合いは全体的に反応がやや進んでいることを除けば、90°Cで加熱する前の坐りゲルの場合とよく似ていた。

坐り—加熱ゲル中のミオシンHCの多量化の度合いが、坐りゲル中のそれとほとんど同じであるにも係わらず、坐り—加熱ゲルの破断強度が坐りゲルのそれよりも著しく大きいことの原因は、前章第三節において述べたとうりであると推定している。その推定が正しいとすると、ソルビトールは肉糊中のMfタンパク質、特にミオシンHC

の変性(おそらくpHの変化に伴う変性や加熱に伴う変性など)をある程度抑制し、低温(20°C)下ではミオシンHC間に起こる多量化反応を緩慢に進行させるように作用し、また高温(40°C)においては多数の非共有結合を形成し易く作用するものと考えられる。この2つの作用はいずれも肉糊の形成するかまぼこゲルの物性を強化するように貢献している。すなわち、前者はミオシンHC間の強い結合であるが、これだけでは十分でなく、後記したような多数の弱い結合力の協同作用がいわゆる坐りの効果を発揮させるものと推定できる。なお、40°Cでは、肉糊中のミオシンHC間に強い結合が形成されにくいため、これをさらに90°Cで加熱してもそのとき形成される弱い結合だけでは坐りの効果を発揮できないだろうと推定した。それゆえ、40°C以上の高い温度で形成されるかまぼこゲルのゲル物性は、ミオシンHCを主成分としたMfタンパク質およびそのサブユニット間に生ずる多数の非共有結合、おそらく疎水結合^{42~44)}によって付与されるものと考えられる。

以上の結果から、ソルビトールはすり身中のMfタンパク質の冷凍変性を防止するだけでなく、それから調製した肉糊の坐りに伴って起こるミオシンHCの多量化反応をコントロールし、ゲル物性の強化に大きく寄与すること、また、低温下で起こる坐りを伴った加熱ゲルの場合ほどその効果が大きく発揮されることが明らかとなった。

第三章 塩ずりおよび坐り過程で起こるスケトウダラすり身中のMf タンパク質の変化

本章に至るまでの研究では、加熱によってゲル化した肉糊を2% SDS-8M 尿素-2% 2-メルカプトエタノール(pH 8.0)溶液中に溶解させた後、可溶化した魚肉中のMfタンパク質をSDS-PAGE法によって分析し、染色後比色定量してきた。したがって、この方法で定量されるタンパク質成分はそのほとんどが各種タンパク質のサブユニットに相当している。また、加熱に伴って露出することが常識である疎水性領域の間の相互作用に基づく各種タンパク質や凝集体(aggregate)の形成などをこの方法で認知、同定することは不可能である。

そこで本章の実験においては、ゲル化した肉糊を高濃度のNaCl溶液に可能な限り多量に溶解させて、溶解したMfタンパク質をSephacrose Cl-4Bを用いたゲル濾過法によって分析し、肉糊のゲル化に伴って起こるMfタンパク質の変化を調べることによって、ゲル化の機構を明らかにする試みを行った。またゲル濾過によって分画された各タンパク質の性状とSDS-PAGEの図型からそれらを構成しているサブユニットの母体を明らかにすることを目的とした。

1) 塩ずりおよび坐り中に起こる肉糊中のMfタンパク質の塩溶解性

加熱で得られる坐りゲル中のMfタンパク質のNaCl溶液に対する溶解性について検討した。まず、高い溶解性を得るため、塩ずりに供するMfタンパク質濃度を通常的肉糊よりも低くして、加熱に伴うMfタンパク質の塩溶解性の経時変化を調べ、Fig. 26に示した。すなわち、タンパク質濃度が30mg/g湿重量で0.43M(2.5%) ~ 0.8MとなるようにNaCl溶液(pH 6.0)を加え、25°Cで加熱し、得られる坐りゲル^{*}(ゾルからゲルに変化中の状態のもの)の一部を経時的に取り出し、20分間氷蔵下で冷却した。次いで、これを11,000 × gで30分間遠心分離して上清に溶解するタンパク質量(mg)の全供試タンパク質量(mg)に対する割合(%)を求め、破線で示した。これによると、NaCl濃度が0.43Mの時は塩ずり直後は10.8%が溶解したが、坐り時間の進行に伴い溶解性は徐々に上昇し、6時間で最大になった後緩やかに減少し、24時間後では2.2%まで減少した。なお、NaCl濃度が0.6Mでは塩ずり直後は24.6%が溶解し、以下経時的には0.43Mの場合よりも高い値を示しながら似たような変化傾向を示した。しかし、NaCl濃度を0.8Mに上げると、塩ずり直後には59.3%が溶解し、その後6時間まではほぼ同じ値を示すが6時間後には減少の傾向をたどり、24時間後では9.1%までに減少した。

* 本章では、タンパク質濃度が高い条件(130mg/g湿重量)と低い条件(30mg/g湿重量)下で肉糊を加熱する実験を行っているが、タンパク質濃度が低い場合は強固なゲルを形成しにくい。しかし、タンパク質濃度が高い場合と同様に、この場合でも塩ずり(NaClと共にスピードカッターで攪拌)、坐り(25°Cで加熱)、坐りゲル(ゾルからゲルへの転移状態のもの)などの用語を、便宜上そのまま使用した。

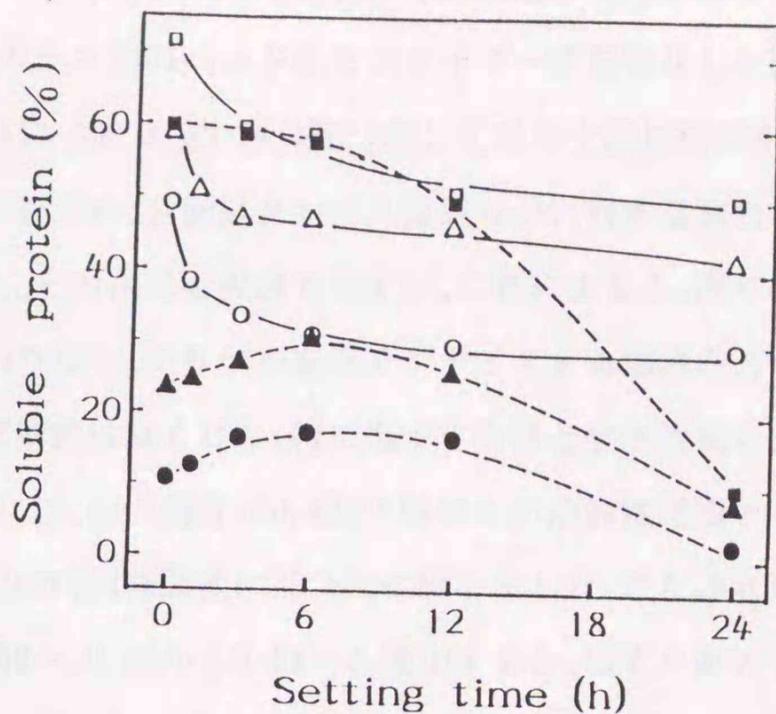


Fig.26. Change in salt-soluble protein content of salt-ground meat during setting.

Surimi of walleye pollack, which contained sugar but no polyphosphate, was chopped with 0.43M ~ 0.8M NaCl at a protein concentration of 30mg/g wet weight of surimi and at pH 6.0 with small amount of HCl in a speed cutter (National MK-K7) for 3 ~ 5 min at 4°C or below. The gel was prepared as in Fig.1. After cooling in an ice water, the gel (10g) was homogenized with 15ml of 0.43M ~ 0.8M NaCl-20mM Imidazol-HCl (pH 7.0) at 15,000 rpm in a mixer (Nihon seiki type) for 30 sec and repeated the homogenization 3 more times with each interval of 30 sec. After mixing with 0.43M ~ 0.8M NaCl (pH 7.0) solution using a glass homogenizer, it was measured up to 50ml, and centrifuged at 11,000 x g for 30min. The protein concentrations of the supernatant and precipitate were measured by the biuret method³¹⁾.

$$\text{Soluble protein (\%)} = (A/B) \times 100$$

Where A is amount of supernatant protein (mg), B is amount of total protein (mg) before centrifugation.

Solid line : Soluble protein from the gel with homogenization.

Dotted line : Soluble protein from the gel without homogenization.

The NaCl concentrations were 0.43M (O, ●), 0.6M (Δ, ▲), and 0.8M (□, ■).

一方、上記のように調製した坐りゲルの一部に、さらに4倍量の0.43M ~ 0.8M NaCl, Imidazol-HCl (pH 7.0)溶液を加えてホモジナイズし、さらにガラス製のハンドホモジナイザーで均質化した後直ちに(15分以内)11,000 × gで30分間分離して得た上清に溶解するタンパク質量(mg)を求め、全供試タンパク質量(mg)に対する割合(%)を溶解度とした。その結果を実線で示すが、これによると、坐りの際の塩濃度に関わりなく、坐りゲルをホモジナイズする場合の方がMfタンパク質の溶解性は高くなり、特に塩ずり直後と坐り後期の値が高かった。実際には、NaCl濃度が0.43Mの時はその溶解性は塩ずり直後は、49.8%となり、24時間後に29.5%の値を示した。また、NaCl濃度が0.43Mから0.6Mへ、0.6Mから0.8Mへと増加すると、塩ずり直後や坐り中の溶解性は高くなり、特に0.8M NaClでは塩ずり直後に72.0%、24時間後でも50.2%と高い溶解性を示した。なお、ホモジナイズ時間を上記の条件より長くしても、溶解性は僅かにしか上昇せず、また、塩溶液でホモジナイズ後の時間を長くすると、その保管中にミオシンHCの多量化がやや進行する傾向が認められるので、操作時間を厳守する必要があった。以上述べたように、本実験条件下でMfタンパク質が高い溶解性を示すのは、坐りゲルを0.8M NaCl溶液でホモジナイズした場合であるから、以下の実験ではこの条件を採用し溶解させることにした。

次に、Mfタンパク質濃度が高い条件下、すなわち130mg/g湿重量で、pHは6.9と6.0とし、また0.8MになるようにNaCl溶液を加えてからスピードカッターでホモジナイズし、25°Cで加熱した。得られた坐りゲル中からのMfタンパク質の溶解性の経時変化を測定した結果をFig. 27(a)に示した。まず、pH 6.9の場合は、塩ずり直後におけるその溶解性は73.2%と高いが、その後に急激に低下し、たとえば3時間後には17.9%と低い値を示した。一方、pH 6.0の場合は、塩ずり直後の溶解性は58.4%であり、pH 6.9の場合よりは劣るが、比較的高い値を示し、

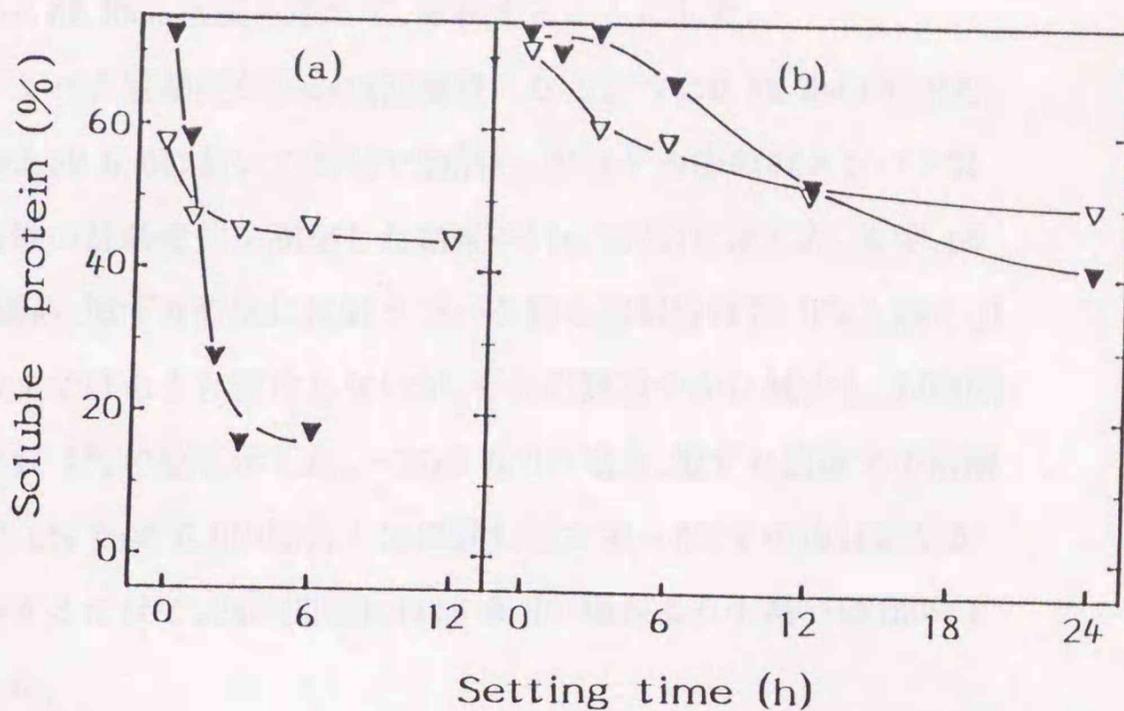


Fig.27. Change in salt-soluble protein content of salt-ground meat during setting.

Surimi of walleye pollack, which contained sugar but no polyphosphate, was chopped with 0.8M NaCl at a protein concentration of 130mg/g or 30mg/g wet weight of surimi and pH was adjusted at 6.0 or 6.9 with small amount of HCl in a speed cutter (National MK-K7) for 3 ~ 5 min at 4°C or below. The gel was prepared as in Fig.1. After cooling in an ice water, the gel (5 ~ 10g) was homogenized with 15ml of 0.8M NaCl-20mM Imidazol-HCl (pH 7.0) at 15,000 rpm in a mixer (Nihon seiki type) for 30 sec and repeated the homogenization 3 more times with each interval of 30 sec. After mixing with 0.8M NaCl (pH 7.0) solution using a glass homogenizer, it was measured up to 50ml. Centrifugation was conducted as in Fig.26.

(a) Mf protein 130mg/g wet weight.

(b) Mf protein 30mg/g wet weight.

The pHs for setting were 6.9 (▼), 6.0 (▽).

また、その値は坐りの進行と共に緩やかに減少するものの、12時間後でも45.0%の値を維持した。ただし以上の実験の場合、タンパク質濃度が高く粘性が大きいので、ホモジナイズする際には肉糊に対して9倍量の0.8M NaCl溶液を加えて、希釈することにした。

Mfタンパク質濃度が30mg/g湿重量となるように0.8M NaClを加え、pH 6.9とpH 6.0において25°Cで加熱し、坐りゲル中のMfタンパク質の溶解性の経時変化を測定した結果をFig. 27(b)に示した。まず、pH 6.9の場合、塩ずり直後にはMfタンパク質の溶解性は74.9%と高く、3時間後まではあまり変化しないが、それ以降緩やかに減少し、24時間後には41.1%の値を示した。一方pH 6.0の場合、塩ずり直後での溶解性は72.0%でpH 6.9の場合とほぼ同じ値であった、その後は緩やかに減少するだけで、24時間後にはpH 6.9の場合よりも高い値(50%)を示した。

2) 塩ずりおよび坐り中に起こる肉糊の破断強度と凹みの経時変化

Fig. 27の実験に示した条件で得られた坐りゲルについて破断強度と凹みの経時変化を測定する試みをした。しかし、(b)に示したタンパク質濃度が低い時は肉糊のゲル化が強く起こらないので正確な破断強度と凹みは測定できなかった。そこで、ここにはタンパク質濃度が130mg/g湿重量の肉糊のゲル化の際の破断強度と凹みの経時変化のみを測り、結果をFig. 28((a)と(b))に示した。これによると、まず、坐りゲルの破断強度については、pH 6.9の場合は、坐り時間の進行と共に急激に増加し、12時間後でも増加を続けた。一方、pH 6.0の場合は、破断強度はごくわずかにしか増加せず、坐り3時間後に最大となりその後緩やかに減少する傾向を示した。また、その最大値はpH 6.9の場合のその約1/12にすぎなかった。

次に凹み値については、pH 6.9の場合は、坐りの進行と共に急激に増加し、3時間後にほぼ最大となり、その後ほぼ一定の値を示した。

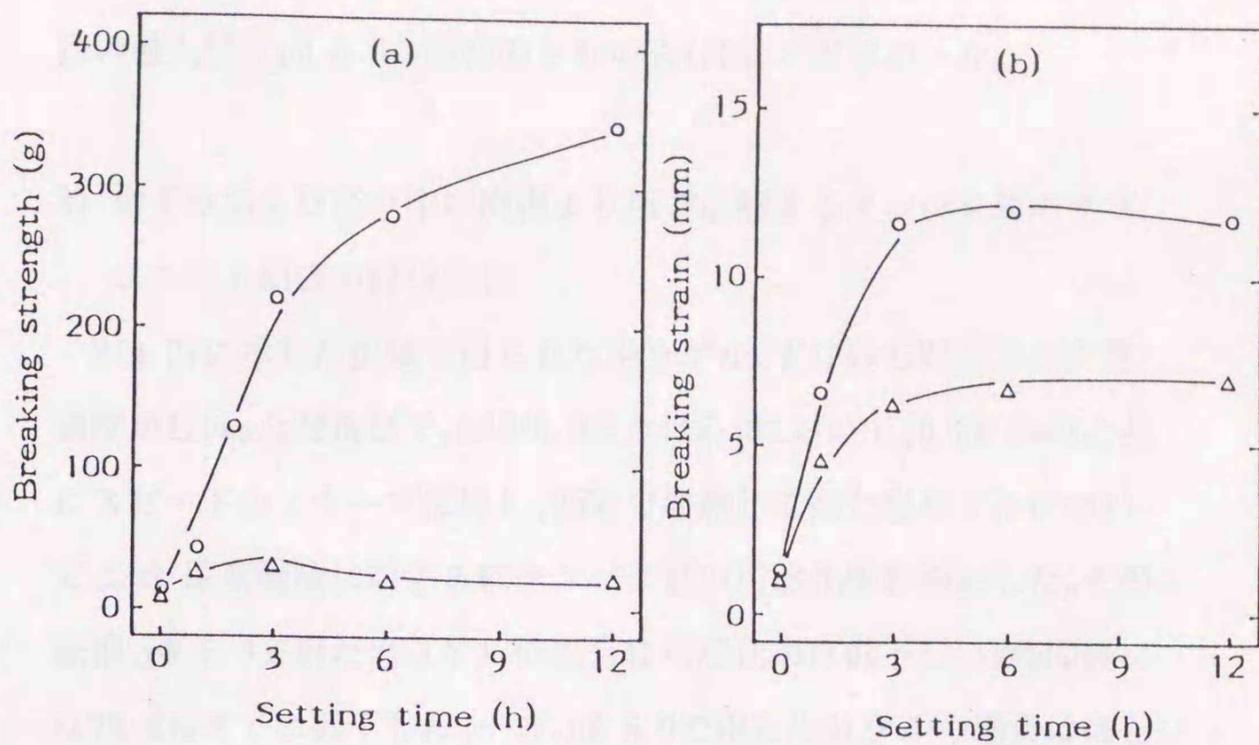


Fig.28. Changes in breaking strength and breaking strain of salt-ground meat during setting.

The gel was prepared from surimi mixed with 0.8M NaCl, followed by heating as in Figs.1 and 27. The measurement of breaking strength and breaking strain were made as in Fig.1.

(a) : Breaking strength.

(b) : Breaking strain.

The pHs for setting were 6.9 (O), 6.0 (Δ).

一方、pH 6.0の場合は、pH 6.9の場合ほどではないが、3時間後までは急激に増加し、その後一定値を保つ傾向を示した。また、pH 6.0の場合の最大値はpH 6.9の場合のその約1/2にすぎなかった。

3) 塩ずりおよび坐り中の肉糊より塩で溶解するタンパク質のサブユニット組成の経時変化

Fig. 27に示した実験で得られた坐りゲル、すなわちMfタンパク質濃度が130mg/g湿重量で、pHが6.9または6.0において、0.8M NaClと共にスピードカッターで攪拌し、25°Cで加熱して得た坐りゲルについて、SDS-尿素混液に対するMfタンパク質の可溶化率を測定した。その結果、pH 6.9で得た坐りゲルの場合は可溶化率は低下し、12時間後には79.6%までに低下した。一方、pH 6.0で得た坐りゲルの場合はほとんど100%の可溶化率を保持した。なお、Mfタンパク質濃度が30mg/g湿重量で、NaCl濃度は0.8M、またpHが6.9または6.0でホモジナイズし、25°Cで加熱した場合も坐りゲル中のMfタンパク質の可溶化率はともにほとんど100%を保持した。そこで、SDS-尿素混液に溶けた坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット成分を、5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE法で分析し、デンストメトリーによって定量的に解析し、その結果をFig. 29 ((a) ~ (d))に示した。

これによると、まず、肉糊中のMfタンパク質濃度が130mg/g湿重量でpHが6.9の場合(a)は、坐り時間の進行とともにその中のミオシンHCが急激に減少し、それに伴ってHCnが著しく増加してから減少し始めると、続いてより分子サイズが大きいHCn'が緩やかに増加し、ほぼ同時により巨大なサイズのHCn''が僅かながら増加してくることが示された。また、X₁成分は坐り初期にやや増加しその後減少する傾向を示した。次に、Mfタンパク質濃度が130mg/g湿重量で、pHが6.0の場合(b)は、(a)の場合に比べると、ミオシンHCの減少がかなり遅くなり、HCn''成分は全く生成せずに、HCnの生成量はかなり少なく、HCn'の生

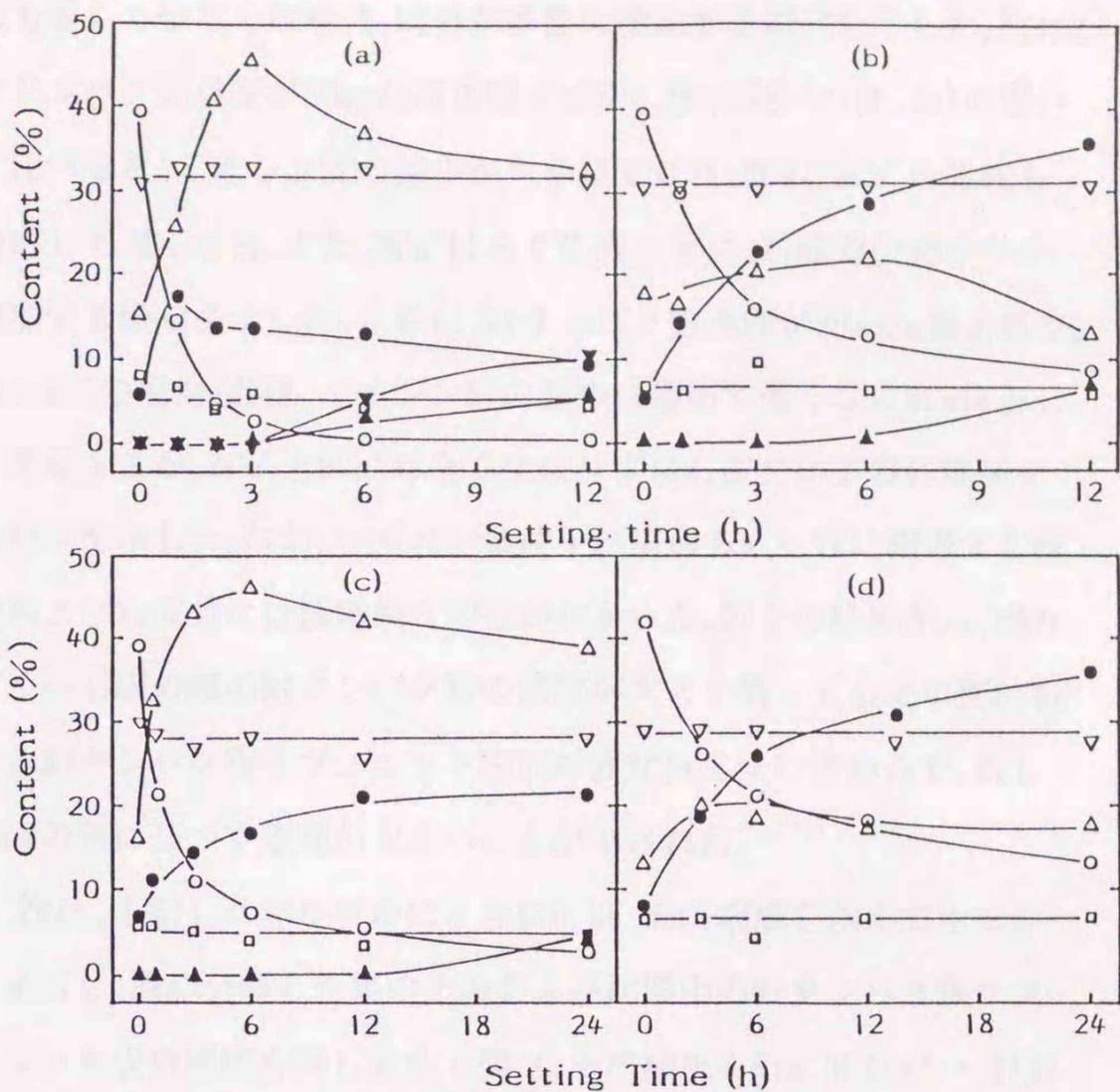


Fig.29. Change in subunit composition of myofibrillar protein of salt-ground meat during setting.

The setting gel was prepared from surimi mixed with 0.8M NaCl, followed by heating as in Figs.1 and 27. The SDS-PAGE of protein solubilized into SDS-urea medium was made as in Fig.3. The quantitative determination of each subunit of myofibrillar protein were conducted as in Fig.4.

- (a) Mf protein 130mg/g wet weight, pH 6.9.
- (b) Mf protein 130mg/g wet weight, pH 6.0.
- (c) Mf protein 30mg/g wet weight, pH 6.9.
- (d) Mf protein 30mg/g wet weight, pH 6.0.
- (▼) : Cross-linked myosin heavy chain , insoluble into SDS-urea medium (HCn").
- (▲) : Cross-linked myosin heavy chain , too large to migrate into 5% polyacrylamide gel (HCn').
- (△) : Cross-linked myosin heavy chain , migrating into 5% polyacrylamide gel (HCn).
- (○) : Myosin heavy chain (HC).
- (●) : Components migrating between HC and actin (HC>X₁>A).
- (▽) : Actin + tropomyosin (A + TM).
- (◻) : Components migrating faster than tropomyosin (TM>X₂).

成も著しく少なくなり、 X_1 成分が多量に増加する傾向を示した。次に、 Mf タンパク質濃度が 30mg/g 湿重量で pH が 6.9 の場合(c)は、(a)の場合に比べると、ミオシンHCの減少がやや遅くなり、 HCn と HCn' の生成も対応して遅くなる。また、 HCn'' は全く生成せずに、 X_1 成分が緩やかに増加する傾向を示した。さらに、 Mf タンパク質濃度が 30mg/g 湿重量で、 pH が 6.0 の場合(d)は、ミオシンHCの減少は極めて遅くなり HCn は著しく増加するが、 HCn' と HCn'' は全く生成せずに X_1 成分が多量に増加する傾向を示した。なお、いずれの条件下の場合も $A + TM$ に相当する成分および X_2 成分には経時的な変化がなかった。以上の結果から、坐りゲルの形成の際の Mf タンパク質の濃度が大きく異ってもその際における Mf タンパク質サブユニット組成の変化はあまり変わらず、むしろ pH の差に基づく差異が大きいことが示された。

次に、上記した坐りゲルにさらに $0.8M$ NaCl 溶液を加えてホモジナイズし、遠心分離した後の上清および沈殿中の Mf タンパク質サブユニット成分組成を同じ方法で調べ、その結果をFig. 30((a) ~ (1))に示した。これによると、いずれの坐りゲルの場合もSDS-尿素混液への可溶化率はほとんど 100% であった。

初めに、 Mf タンパク質濃度が 130mg/g 湿重量で、 pH が 6.9 において得た坐りゲルを $0.8M$ NaCl と共にホモジナイズし、遠心分離する前(a)の Mf タンパク質サブユニット組成を見ると、 HCn'' が生成しない点を除いて、その変化の傾向はFig. 29(a)の場合(これはホモジナイズする前の坐りゲル中のサブユニット組成に相当している)とよく似ており、ミオシンHCの減少、大量の HCn の生成、初期の X_1 の生成、後期の HCn' の生成などが見られる。次いで(a)を遠心分離して得た上清中の Mf タンパク質の場合(b)は、タンパク質の塩に対する溶解性が経時的に急減するため各成分の検討は3時間後までしかできなかったが、ミオシンHCが急激に減少して、初めに HCn が増加するが多量に蓄積することはなく減少した。また、分画前に比べて $A + TM$ に相当する成

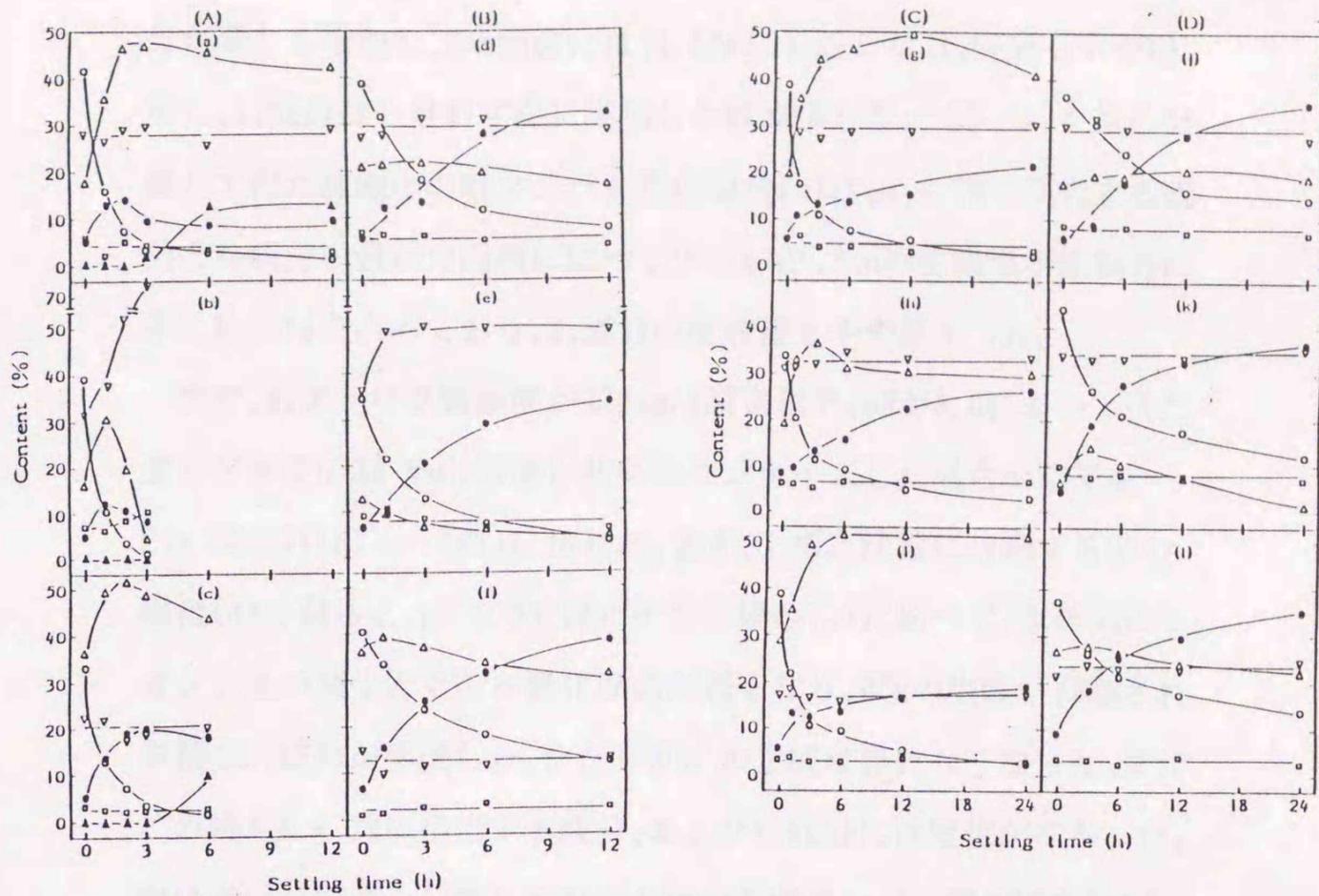


Fig.30. Change in subunit composition of 0.8M NaCl-soluble protein from salt-ground meat during setting.

The setting gel was prepared from surimi mixed with 0.8M NaCl, followed by heating as in Figs.1 and 27. The SDS-PAGE of protein solubilized into SDS-urea medium was made as in Fig.3. The quantitative determination of each subunit of myofibrillar protein were conducted as in Fig 4.

(A) Mf protein 130mg/g wet weight, pH 6.9.

(B) Mf protein 130mg/g wet weight, pH 6.0.

(C) Mf protein 30mg/g wet weight, pH 6.9.

(D) Mf protein 30mg/g wet weight, pH 6.0.

The total protein before centrifugation (a,d,g,j), and the proteins in the supernatant (b,e,h,k) and precipitate (c,f,i,l) after centrifugation of the homogenized gel with 0.8M NaCl were subjected to SDS-PAGE.

(▲) : Cross-linked myosin heavy chain , too large to migrate into 5% polyacrylamide gel (HCn').

(△) : Cross-linked myosin heavy chain , migrating into 5% polyacrylamide gel (HCn).

(○) : Myosin heavy chain (HC).

(●) : Components migrating between HC and actin (HC > X₁ > A).

(▽) : Actin + tropomyosin (A + TM).

(□) : Components migrating faster than tropomyosin (TM > X₂).

分が著しく増加し、3時間後には74.5%にも達した。 X_2 成分もやや増加し、 X_1 成分は一旦わずかに増加した後減少した。一方、(a)を遠心分離して得た沈殿中のMfタンパク質の場合(c)は、A + TMに相当する成分と X_2 成分の量が分画前に比べて少ないが、HCnの生成量が圧倒的に多く約50%を占めており、 X_1 成分の生成量もやや多かった。

次に、Mfタンパク質濃度が130mg/g湿重量で、pHが6.0において得た坐りゲルを0.8M NaCl溶液と共にホモジナイズした場合の結果をFig. 30(B)((d) ~ (f))に示した。まず、上清と沈殿に分画する前の場合(d)を見ると、pH 6.9で得たゲルの場合(a)に比べて、全体的にミオシンHCの減少とその多量化反応が遅くなり、HCnの生成が抑制され、多量の X_1 成分が生成した。ただしHCn'の生成は見れなくなった。また、この時もA + TMに相当する成分、および X_2 成分には変化がなかった。次いで、(d)を遠心分離して得た上清中のMfタンパク質の場合(e)を見ると、ミオシンHCの減少は分画前に比べてやや速いが、A + TMに相当する成分は坐り初期にやや増加して約50%になった後その値を保持した。また、 X_2 成分の量はやや多く、HCnが極めて少なかった。さらに、(d)を遠心分離して得た沈殿中のタンパク質(f)を見ると、A + TMに相当する成分と X_2 成分の量が上清中のそれに比べて全体的に少なく、HCnの生成量が多く、そして X_1 成分の生成量もやや多かったが、全体的には分画前(d)の場合とほとんど同じ変化傾向を示した。

一方、Mfタンパク質濃度が30mg/g湿重量で、pHが6.9において得た坐りゲルを0.8M NaCl溶液と共にホモジナイズした場合の結果をFig. 30(C)((g) ~ (i))に示した。上清と沈殿に分画する前の結果(g)を見ると、時間の進行とともにミオシンHCが速やかに減少し、HCn成分が急激に増加して大部分を占めるようになるが、6時間後にはやや減少する傾向を示した。また、この時A + TMに相当する成分や X_2 成分は変化しないが、 X_1 成分は緩やかに増加し、24時間後には21.9%になった。これらの変化はMfタンパク質が高塩濃度の場合(a)とよく似て

いる。続いて、(g)の上清中のMfタンパク質の場合(h)は、分画前の(g)に比べればA + TMに相当する成分とX₂成分が全体的に多く、HCnの生成量がやや少ない点を除けばほとんど同じ変化傾向を示した。さらに、(g)から得た沈殿(i)中のMfタンパク質は、ミオシンHCの減少に伴うHCnの生成が多い点は同じであるが、A + TMに相当する成分とX₂成分の量が上清中のそれに比べれば全体的に少なく、X₁成分の生成量もやや少ない点を除けば(g)の場合とほとんど同じ変化傾向を示した。

次に、Mfタンパク質濃度が30mg/g湿重量で、pHが6.0で得た坐りゲルを0.8M NaCl溶液と共にホモジナイズした場合をFig. 30(D)((j)~(l))に示した。分画する前の結果(e)を見ると、pH 6.9の場合(g)に比べて全体的にミオシンHCの減少とその多量化反応は遅くなり、HCnの生成量もかなり少なかった。しかし、X₁成分が多量に生成し24時間後では35.4%に達した。また、A + TMに相当する成分、およびX₂成分には変化がなかった。続いて(j)から得た上清中のMfタンパク質の場合(k)は、分画前の場合に比べてX₁成分が多く、またA + TMに相当する成分もやや多いが、HCn成分の量がかなり少ない点が異なっていた。さらに、(j)から得た沈殿中のタンパク質(l)は、A + TMに相当する成分とX₂成分の量がかなり少なく、HCnの生成量がやや多い点を除けば、分画前(j)の場合とほとんど同じ変化傾向を示していた。

これらの結果から、坐りゲル中で起こるMfタンパク質サブユニット組成の変化は、Mfタンパク質濃度の高低よりもpHの相違による影響が大きいことが示された。

SDS-PAGE法によって坐りに伴う肉糊中のMfタンパク質サブユニット組成の変化を解析すると、加熱による肉糊(pH 7.0)のゲル化の過程では、ミオシンHCは減少してその多量体(HCn)を生成するが、HCnはさらに分子サイズの大きいHCn'に変化してゆくことが示された。しかし、肉糊のpHが6.0(微酸性)になるとミオシンHCの多量化反応の

進行が全体的に遅くなると同時に、ミオシンHCの一部がX₁成分に変化してゆくように見える。ゲル化の進行中の肉糊を高濃度(0.8M)のNaCl溶液中でホモジナイズし、溶解してくるタンパク質溶液を遠心分離して上清(可溶性画分)と沈殿(不溶性画分)に分画し、それぞれの画分中のタンパク質サブユニット成分を調べたところ、pH 7.0の肉糊からの場合は主にA + TM成分が可溶化し、坐り初期の間(約2時間)だけHCnとX₁成分の一部が可溶化した。ただし、坐り初期には可溶性画分のタンパク質量は約20%である。なお、不溶性画分中には主にHCnが含まれ、X₁成分とA + TM成分の一部も含まれていた。坐りの後期はこの不溶性画分中のタンパク質量は約80%を占めるようになった(Fig. 27(a)とFig. 30(A))。一方、pH 6.0の肉糊からの場合は、多量のA + TM成分の他に、X₁成分が可溶化してくるのが特徴的であった。また、不溶性画分中には、HCnの大部分が含まれるが、他に大量のX₁成分が含まれるようになるのが極めて目立った特徴である。なお、この間可溶性画分と不溶性画分中のタンパク質量の割合は約45 : 55である(Fig. 27(a)とFig. 30(B))。これらの結果は、既述のように、ゲル化の際の肉糊中のタンパク質濃度には余り大きな影響を受けないので、pHの変動が第一要因であると判断されるが、ゲル化に伴って、pH 7.0ではHCnの他にミオシンHCの一部とA + TMの一部が、そしてpH 6.0の時はその他にX₁成分の一部が弱い結合力を介して不溶性の巨大な複合体を形成している可能性がある。また、ミオシンHCの一部は可溶化するが、他の一部は不溶化しているので、相互に弱い結合(非共有結合)によって集まり、凝集体を形成していることも考えられる。

4) 坐りゲルより塩で溶解するタンパク質のSepharose Cl-4Bによる
ゲル濾過溶出図の経時変化

まず、コントロールとしてスケトウダラの背肉より調製したミオシンB (MB)を0.5M KCl中でSepharose Cl-4Bのゲル濾過に供し、その溶出図型をFig. 31(A)に示した。これによると、未変性のMBは $(V_e/V_0)=1.14$ の溶出位置(F_2 画分)および $(V_e/V_0)=2.11$ の溶出位置(F_4 画分)の2つの成分からなっていた。 F_2 画分は約85.5%を占め、SDS-PAGEではA(G-アクチン相当成分)とミオシンのサブユニット(HCとLC成分)が検出されるのでアクトミオシン(AM)に相当すると判断された。一方、 F_4 画分は同図中のSDS-PAGE図が示すように、主にAとTMの相当する成分からなっており、少量であるが遊離状態のG-アクチンがMB中に存在することを示した。なお、本方法では負荷したタンパク質の約92.6%が回収された。

次に、Fig. 27に示したような条件で作った坐りゲルを0.8M NaCl溶液と共にホモジナイズした後、遠心分離して得た上清中に溶けてくるタンパク質をゲル濾過に供し、その溶出図型の解析を行った。また、得られたゲル濾過溶出図型から求めた各画分の組成とタンパク質量をTable 2に、各画分中のタンパク質サブユニット組成をTable 3に示した。まず、Mfタンパク質濃度が130mg/g湿重量で得た坐りゲルから溶解したタンパク質の溶出図型をFig. 31((C) ~ (D))に示した。これによると、pH 6.9で形成したゲルからの場合(C)は、塩ずり直後(a)には $(V_e/V_0)=1.0$ の溶出位置(F_1 画分)と $(V_e/V_0)=1.39$ の位置に新しい成分(F_3 画分)が溶出され、さらに $(V_e/V_0)=2.19$ の F_4 画分が溶出した。これは、MBで同定した未変性のAMに相当している F_2 画分が減少し、それに伴って F_1 画分と F_3 画分が生成し、かつ、 F_4 画分が増加すると言う結果である。SDS-PAGEによると、 F_1 画分には、Aとミオシンのサブユニットと一致する成分が含まれるので、おそらく凝集したAMと推定され、また F_3 画分は主にミオシンのサブユニットと少量のAも

Table 2. Distribution of myofibrillar protein in setting gel as fractionated by gel filtration.

The setting gel from salt-ground meat was prepared, was homogenized with 0.8M NaCl, and centrifuged as described in the legend of Figs. 1 and 27. The gel filtration was performed as in Fig. 31.

Condition for setting	Distribution (%)			
	Fractions from Gel Filtration			
	F ₁ ($>2.0 \times 10^7$)	F ₂ (1.5×10^7)	F ₃ ($5.5 \sim 6.8 \times 10^6$)	F ₄ ($1.3 \sim 2.4 \times 10^5$)
<hr/>				
130mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)				
pH 6.9, 0h	17.8		35.0	47.2
pH 6.9, 1h	43.2			56.8
pH 6.9, 3h	24.7			75.3
pH 6.0, 0h	30.1		18.7	51.2
pH 6.0, 3h	61.5			38.5
pH 6.0, 12h	54.6			45.4
<hr/>				
30mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)				
pH 6.9, 0h	21.1		36.2	42.7
pH 6.9, 3h	61.5			38.5
pH 6.9, 12h	60.5			39.5
pH 6.9, 24h	69.0			31.0
pH 6.0, 0h	20.4		20.9	58.7
pH 6.0, 3h	52.8			47.2
pH 6.0, 12h	70.6			29.4
pH 6.0, 24h	82.0			18.0
MB (0.5M KCl) pH 7.0		85.5		14.5
MB (0.8M NaCl) pH 7.0	39.5		31.8	28.7

Figures in parenthesis show the approximate molecular weights, roughly estimated by using high molecular weight calibration kit.

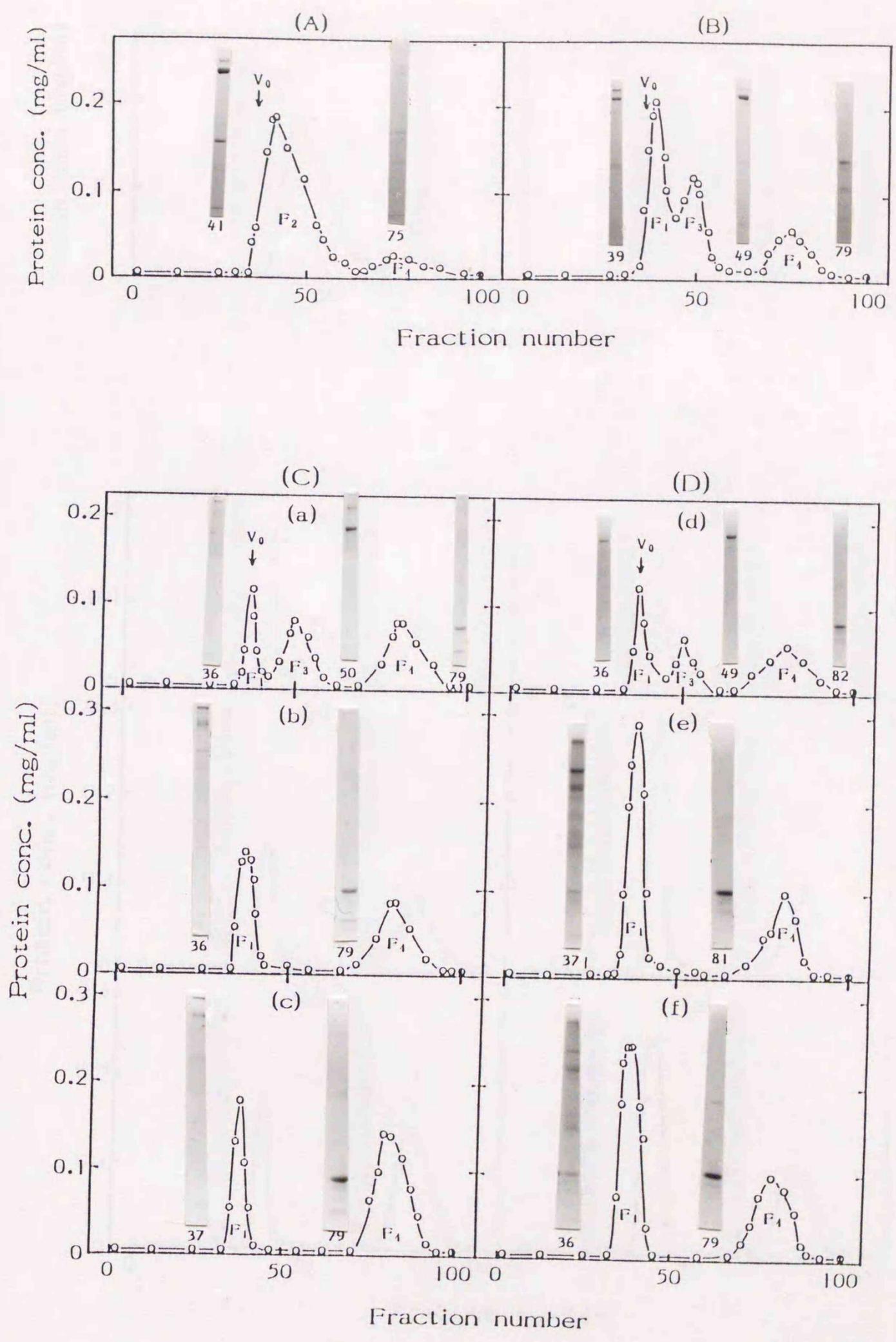
$$\text{Distribution (\%)} = \frac{\text{Protein in each fraction}}{\text{Sum of eluted protein}} \times 100$$

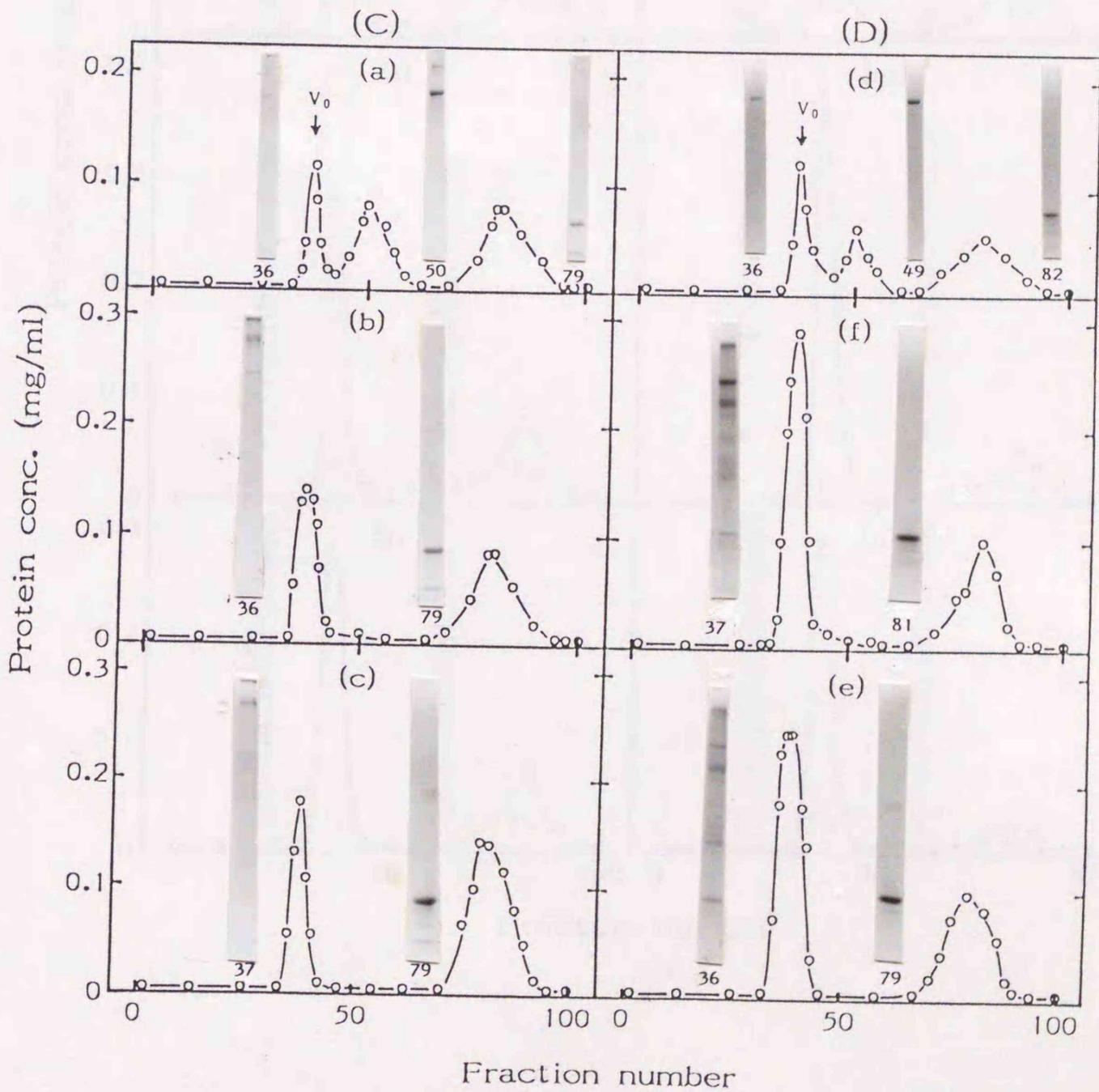
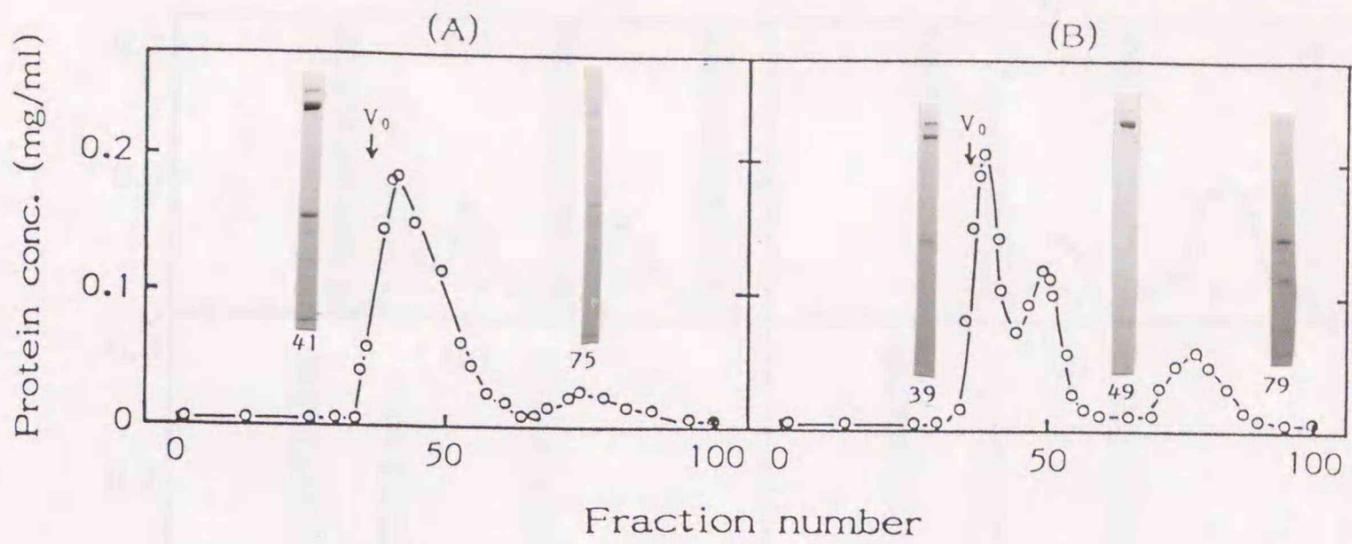
Table 3. Change in subunit composition of eluted protein fractionated by gel filtration of salt-soluble protein from salt-ground meat during setting.

The setting gel from salt-ground meat prepared, homogenized with 0.8M NaCl and centrifuged as described in the legend of Figs. 1 and 27. The gel filtration was performed as in Fig. 31 and eluted protein was subjected to SDS-PAGE.

Condition for setting	Subunit Composition			
	Fractions from Gel Filtration			
	F ₁ (Ve/V ₀ ≐1.0)	F ₂ (Ve/V ₀ =1.14)	F ₃ (Ve/V ₀ =1.32~1.39)	F ₄ (Ve/V ₀ =2.11~2.31)
130mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)				
pH 6.9, 0h	HCn'+HCn+HC +A		HCn+H C +A	A+TM
pH 6.9, 1h	HCn'+HCn+HC +150K+A			A+TM
pH 6.9, 3h	HCn'+HCn+HC +150K+A			A+TM
pH 6.0, 0h	HCn'+HCn+HC +A		HCn+H C +A	A+TM
pH 6.0, 3h	HCn'+HCn+HC +150K+80K+A			A+TM
pH 6.0, 12h	HCn'+HCn+HC +150K+80K+A			A+TM
30mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)				
pH 6.9, 0h	HCn'+HCn+HC +A		HCn+H C +A	A+TM
pH 6.9, 3h	HCn'+HCn+HC +150K+A			A+TM
pH 6.9, 12h	HCn'+HCn+HC +150K+A			A+TM
pH 6.9, 24h	HCn'+HCn+HC +150K+A			A+TM
pH 6.0, 0h	HCn+H C +A		HCn+H C +A	A+TM
pH 6.0, 3h	HCn+H C +150K+A			A+TM
pH 6.0, 12h	HCn+H C+150K +80K+A			A+TM
pH 6.0, 24h	HCn+H C+150K +80K+A			TM
MB(0.5M KCl) pH 7.0		HCn+H C +A		A+TM
MB(0.8M NaCl) pH 7.0	HC+HCn +A		HCn+H C +A	A+TM

The detection of HCn' was made by estimating the reduction of total absorbances on 5% polyacrylamide gel rod.





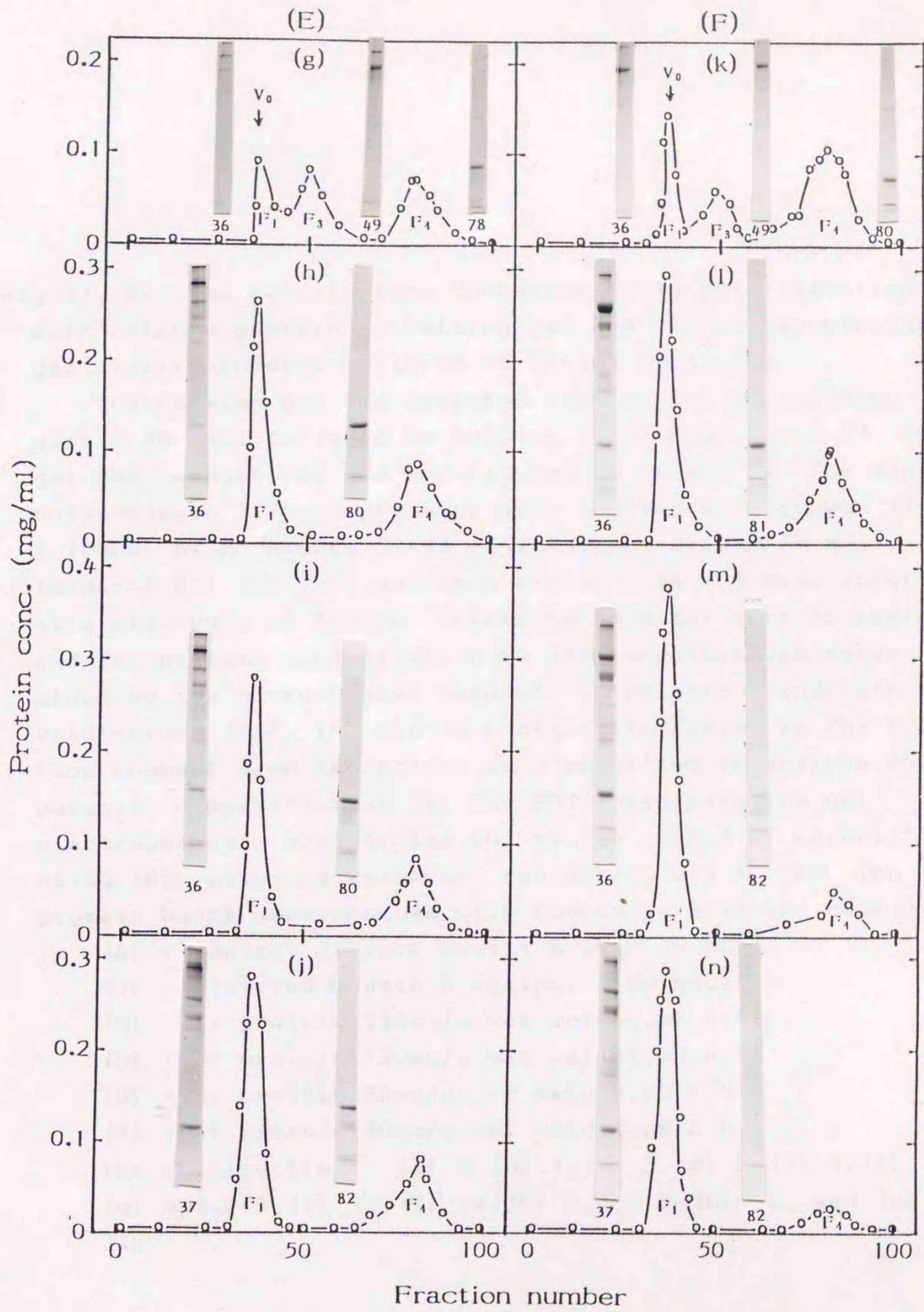


Fig.31. Elution profile from Sepharose Cl-4B gel filtration of salt-soluble protein in setting gel and SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of eluted fractions.

The setting gel was prepared from surimi on grinding with 0.8M NaCl, followed by heating as in Figs.1 and 27. The gel was homogenized and centrifuged as in Fig.27. The supernatants (each 17mg of protein) were applied on a column (2.6 x 100cm) of Sepharose Cl-4B equilibrated with 0.8M NaCl, Imidazol-HCl (pH 7.0), and then eluted with the same solution at a flow rate of 18ml/h. Fractions of 4.8ml were collected and the protein concentration in each fraction was determined by the micro-biuret method³⁵⁾. The arrows indicate the void volume (V_0). The eluted protein (indicated as the fraction number) from the column were submitted to analyze the subunits composition of it. The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out by the method of Laemmli³⁶⁾ using 10% polyacrylamide gel containing 0.1 % SDS. The protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R.

(A) : Control (intact myosin B in 0.5M KCl).

(B) : Dialyzed Myosin B against 0.8M NaCl.

(C) : Mf protein 130mg/g wet weight, pH 6.9.

(D) : Mf protein 130mg/g wet weight, pH 6.0.

(E) : Mf protein 30mg/g wet weight, pH 6.9.

(F) : Mf protein 30mg/g wet weight, pH 6.0.

The setting time : (a) 0, (b) 1, (c) 3, (d) 0, (e) 3, (f) 12, (g) 0, (h) 3, (i) 12, (j) 24, (k) 0, (l) 3, (m) 12, and (n) 24h.

検出されるのでミオシン(その溶出位置から凝集したミオシンを含むと判断される)と少量のAMからなり、そしてF₄画分は主にAとTMのサブユニットに相当する成分から成っていた。この時、それぞれの各画分の割合をタンパク質量から求めると、F₁画分が17.8%、F₃画分が35.0%、F₄画分が47.2%であった。なお、スケトウダラのすり身からMBを調製し、0.8M NaCl溶液中でゲル濾過に供した場合をFig. 31(B)に示したが、(C)の(a)の場合とよく似た溶出図型となり、3つの画分に分かれたが、最も分子サイズの大きい成分の溶出位置は $(V_e/V_0)=1.08$ でF₁画分とF₂画分の間に相当し、他の2つの成分の溶出位置はほぼF₃画分とF₄画分に相当していた。したがって、F₁とF₂の間の画分は0.8M NaClにより生成したAM凝集体である可能性が強い。続いて、塩ずり後、25°Cで1時間を経過した坐りゲルから溶解したタンパク質の溶出図型(b)であるが、F₃画分は消失し、F₁画分が43.2%で、F₄画分が56.8%となった。また、F₁画分は主にAMのサブユニットからなっているが、その他にSDS-PAGE図上で $150K^{50\sim 52)}$ に相当する成分(X₁成分の主成分)が含まれ、さらに、10%アクリルアミドゲル中に侵入できない、いわゆるHCn'成分も含まれていることを認めた。それゆえ、この画分はミオシンHC多量体を中心とし、AやX₁成分をも含んだ巨大なタンパク質の凝集体(その主体はAM凝集体である)と推定される。また、F₄画分は主にAとTMに相当する成分であった。次に、塩ずり後3時間の坐りゲルから溶解したタンパク質の溶出図型(c)では、タンパク質量の割合はF₁画分が24.7%で、F₄画分で75.3%あった。このとき、F₁画分とF₄画分の成分はSDS-PAGEで見るとかぎり塩ずり1時間の坐りゲルから得た画分(b)とほとんど変わらなかった。

一方、Mfタンパク質濃度が130mg/g湿重量で、かつpHが6.0で得た坐りゲルから溶解したタンパク質のゲル濾過溶出図型(D)をFig. 31((d)~(e))に示した。まず、塩ずり直後からの場合(d)は、 $(V_e/V_0)=1.0$ の溶出位置にF₁画分、 $(V_e/V_0)=1.32$ の溶出位置にF₂画分、および (V_e/V_0)

=2.22の溶出位置にF₄画分が見られ、さらに各画分のタンパク質量を比較すると、それぞれ30.1%, 18.7%および51.2%であった。なお、SDS-PAGEで見るかぎり、F₁画分は主にAMに相当するサブユニット成分からなっており、F₃画分はミオシン(凝集したミオシンを含む)と少量のAMに相当する成分で、また、F₄画分は主にAとTMに相当する成分からなっていた。また、塩ずり3時間後からの場合(e)は、F₂画分は消失してF₁画分が大きく増加し、F₄画分は余り変わらなかった。各画分中のタンパク質量を比べると、F₁画分は61.5%であり、F₄画分は38.5%であった。また、SDS-PAGEで見るかぎり、F₁画分は主にAMのサブユニットに相当する成分からなっているが、その他に150Kおよび、80Kの成分も含まれていることを見いだした。F₄成分は主にAとTMに相当する成分からなっていた。また、ここでもF₁画分にはHCn'が含まれていることがSDS-PAGEにより示唆された。さらに、塩ずり12時間後からの場合(f)は各画分中のタンパク質量の割合を見ると、F₁画分は54.6%で、F₄画分は45.4%であった。また、この場合もSDS-PAGEで見るかぎり、F₁画分とF₄画分は塩ずり3時間後からの場合(e)とほとんど同じサブユニット成分よりなっていた。なお、この際の溶解性の低下はpH 6.9よりpH 6.0の場合の方がむしろ少なかったが、この時に溶解する成分は主にF₁画分に溶出するAMの凝集体(150Kや80Kをも含む)であることが示された。

次に、Mfタンパク質濃度が30mg/g湿重量で、得た坐りゲルから0.8M NaCl溶液で溶解するタンパク質をゲル濾過に供した結果をFig. 31(E) ~ (F))に示した。まず、pH 6.9で塩ずりして得た坐りゲルからの場合(E)を見ると、塩ずり直後からの場合(g)は、 $(V_e/V_0)=1.0$ に溶出するF₁画分、 $(V_e/V_0)=1.39$ の位置に溶出するF₃画分、および $(V_e/V_0)=2.19$ の位置に溶出するF₄画分の3画分からなっていた。また、各画分中のタンパク質量の割合を見ると、F₁画分は21.1%, F₃画分は36.2%, そしてF₄画分は42.7%であった。また、SDS-PAGEで見るかぎりF₁画

分はAMに相当するサブユニット成分からなり、F₃画分はミオシン(凝集したミオシンを含む)と少量のAM、また、F₄画分は主にAとTMに相当する成分からなっていた。続いて、塩ずり3時間後からの場合(h)は、溶出したタンパク質量の割合は、F₃画分が消失し、F₁画分が61.5%で、F₄画分が38.5%であった。また、SDS-PAGEで見るとF₁画分は、AMのサブユニットとその他に150K成分が見られ、また10%アクリルアミドゲルに侵入できないHCn'成分が含まれていた。またF₄画分は主にAとTMに相当する成分であった。次に、塩ずり12時間後からの場合(i)は、タンパク質の割合はF₁画分は60.5%、F₄画分は39.5%であり、塩ずり後3時間からの場合とほぼ同じであり、SDS-PAGEで見たF₁画分やF₄画分のサブユニット成分も塩ずり3時間後の場合(b)とほぼ同じであった。さらに、24時間後からの場合(d)も、タンパク質の割合で見るとF₁画分は69.0%で、F₄画分は31.1%であり、また、F₁画分やF₄画分も塩ずり12時間後の場合(c)とほぼ同じ成分からなっていた。

一方、pH 6.0で塩ずりして得た坐りゲルから溶解するタンパク質をゲル濾過に供した結果を示したFig. 31(F)を見ると、まず、塩ずり直後からの場合(k)は、 $(V_e/V_0)=1.0$ の溶出位置にF₁画分、 $(V_e/V_0)=1.36$ の溶出位置にF₂画分、および $(V_e/V_0)=2.23$ にF₄画分が見られ、さらに各画分のタンパク質量の割合は、それぞれ、20.4%、20.9%および58.7%であった。なお、SDS-PAGEによるとF₁画分はAMのサブユニットからなり、F₃画分はミオシン(凝集したミオシンを含む)と少量のAMに相当する成分、またF₄画分は主にAとTMに相当する成分からなっていた。次に、塩ずり3時間後からの場合(l)は、溶出したタンパク質の割合はF₁画分は52.8%で、F₃画分は消失するが、F₄画分は47.2%であった。また、SDS-PAGEによりF₁画分にはAMのサブユニットとその他に150Kと80K成分が含まれていた。F₄成分は塩ずり直後からの場合(k)と同じくAとTMに相当する成分であった。次に、塩ずり12時間後からの場合(m)は、分画されたタンパク質量の割合はF₁画分が71.6%、F₄

画分が29.4%であった。また、SDS-PAGEによってF₁画分とF₄画分は塩ずり3時間後からの場合(1)とほとんど同じ成分よりなっていた。さらに、塩ずり24時間後からの場合(n)は、分画されたタンパク質の割合はF₁画分が82.0%で、F₄画分が18.0%であった。またSDS-PAGEによるとF₁画分は塩ずり12時間後からの場合(m)とほとんど同じ成分からなるが、F₄画分にはAに相当する成分はほとんど認められず、その主成分はTMに相当する成分であった。

本章で行ったゲル濾過の実験結果から肉糊のゲル化に際してMfタンパク質に起こる変化を以下のように考察した。すなわち加熱(25°C)によって形成中の坐りゲルを0.8M NaCl溶液中でホモジナイズして、可溶化したMfタンパク質をゲル濾過によって分析した結果である。まず、塩ずり直後に溶解したMfタンパク質サブユニットは3成分からなりミオシン(凝集したミオシンを含む)と少量のAM(溶出位置がMBよりやや小さい $MW^* \approx 5.5 \sim 6.8 \times 10^6$)、AMの凝集体($MW^* > 2.0 \times 10^7$)、およびA + TM($MW^* \approx 1.6 \sim 2.4 \times 10^5$)に相当していた。しかし、坐りによるゲル化が進むと、溶解するMfタンパク質の中の一成分(F₂成分)が消失して2成分となり、それはX₁成分(SDS-PAGE図上で150Kおよび80K成分が主成分)をも複合したAMの凝集体とA + TMに相当する成分であった。MBを対照として同定したAMの画分は消失しているため、おそらくその凝集体に変化したものと考えられる。以上の変化はpHが中性の時の坐りゲルの場合であるが、もし微酸性(pH 6.0)になると、中性の場合よりも上記の変化がかなり抑制され遅くなる。ただし、ゲル化に伴う溶解したMfタンパク質のゲル濾過図に起こる変化傾向はよく似ており、中性の場合と同様なAMの凝集が起こって

* いずれも高分子量タンパク質マーカーキットを使用して得た標準曲線を延長し、外挿して求めた概算分子量である。

いることは確かである。なお、中性下で形成される坐りゲルから溶解したMfタンパク質中にはA画分に比べてAM凝集体の画分の量比が、pH 6.0で形成される坐りゲルの場合に比べて、少ないのが特徴である。これは、pH 7.0で形成される坐りゲル中ではAMの凝集がより速く進み、速やかに不溶化してゆくことを反映していると考えられるが、実際にゲル化に伴って塩溶性タンパク質量が急激に減少している。さらにこの際にSDS-PAGE図上でHCnよりも高分子量のHCn'が増加することもそれを支持するものである。一方、pH 6.0で形成される坐りゲルでは、その中の塩溶性タンパク質量は急激に減少することなく比較的高い値を保持している。このとき、ゲル濾過で分画されるA画分に対するAM凝集体の量比も多かったが、これはAMの凝集が速やかに進行しないためであり、このようなときは坐りゲルの塩溶性タンパク質は余り不溶化しなかった。さらにまたHCn'の生成も顕著でなかった。なお、以上に述べた坐りゲル中で起こるMfタンパク質の変化の様式は、その進行速度に差異はあるものの、ゲル化に供したMfタンパク質濃度の高低(130mg/g湿重量と30mg/g湿重量)にはあまり影響されず、むしろpHによって大きく抑制されることも示された。これは直接SDS-PAGEによって解析した坐りゲル中のMfタンパク質サブユニット組成に起こる変化が、Mfタンパク質濃度には影響されず、pHによって支配されることを示した実験結果(Fig. 30)とも良く合致している。

5) 考察

これまで、肉糊の熱ゲル化の機構については安井ら^{53~59)}が詳細な研究をしている。そして、その主体をなすものはMfタンパク質の主要成分であるミオシンであるが、アクチンは補助的に関与すること報じている。またそれらが形成する網状構造についても走査型電子顕微鏡による観察をしている。ただし、これらの成果は全て畜肉の筋肉タンパク質に関わる研究例である。魚肉を用いた研究例は志水ら

^{60, 61)}によって報じられているが、未だ十分ではない。最近に至り、沼倉ら³³⁾は水産魚肉ねり製品のゲル強度の発現はミオシンHCの多量化反応の進行と強く関わることを示し、ミオシンHC多量体の形成によって付与されることを推定した。そこで、本研究の第一章と第二章でも沼倉らと同じSDS-PAGE法によって坐りゲルおよび坐り一加熱ゲル中のMfタンパク質サブユニット組成を分析し、ミオシンHCの多量化とゲル物性との関係を論じた。しかし、SDS、尿素、およびメルカプトエタノール共存下で肉糊を可溶化させると、肉糊中のMfタンパク質はそれぞれのサブユニット成分に解離してしまうためにゲル化の過程でMfタンパク質が形成する高次な構造体の母体については情報が得られない。特にミオシンHCの多量体であるHCn, HCn', HCn"などの本体が把握出来ない。また、微酸性下におけるゲル形成能の劣化に関わっているように見える未同定の成分、すなわちSDS-PAGE上でミオシンHCとAの間に泳動されるX₁成分の母体も未だ明らかではない。そこで本研究の第三章では上記成分の本体を調べるために、SDSや尿素およびメルカプトエタノールが存在しない条件下で肉糊中のMfタンパク質のゲル濾過を行い、ゲル化に関与しているタンパク質の本体を明らかにしようと試みた。

ゲル化途中にある肉糊を高濃度の塩溶液で溶解する試みを行ったが、一般にタンパク質濃度の低い肉糊をゲル化させた場合の方が溶解し易かった。また中性の肉糊の場合の方が良くゲル化するがこのゲル中のMfタンパク質は逆に溶解しにくく、一方微酸性の肉糊の場合にはゲル化しにくいとその中のMfタンパク質は良く溶ける傾向を維持した。さらにゲルの可溶化にあたっては、溶媒中のNaCl濃度の高い方が溶解度も高い傾向にあるので本実験では肉糊の4~9倍量の0.8M NaCl溶液と共にホモジナイズし、遠心分離して可溶化するMfタンパク質を集めることにした。塩ずり後の肉糊の一部を経時的に取り出して0.8M NaCl溶液と共によくホモジナイズし、溶解して上清に得

たタンパク質をSephacrose C1-4Bを用いたゲル濾過に供し溶出図型の変化を調べた。筋肉の構造タンパク質は0.5M KCl溶液に溶解させるのが常法であるので、0.5M KCl(pH 7.0)の条件下でMBをゲル濾過に供すると、溶出するタンパク質の回収率も極めて高く92.6%に達した。しかし、上記した坐りゲルから溶解したタンパク質をゲル濾過に供すると、溶出するタンパク質の回収率は低く、約61～88%の値に留まった。特にゲル化が進行した坐りゲルの場合に比較的大きく回収率が低下する傾向を示した。これは、坐りゲル中のMfタンパク質の一部は完全な溶解状態にならず、いわばミセル状に会合したタンパク質が沈殿せず、上清中に残るためであろうと推定される。これらの会合したタンパク質成分はゲル濾過に際してはゲル担体中に侵入できず、結果としてタンパク質の回収率の低下を招くものと考えられる。実際に、このような場合はゲル濾過の速度が低下し、分画が困難となる事実を経験している。そこで回収されない成分は不溶性の状態画分と同じ組成であると推定した。

MBのゲル濾過の溶出図型を0.5M KCl溶液と0.8M NaCl溶液を使用して比べると、前の条件下では二つの画分(F₂とF₄)が得られるのに、後の条件下では上記二つの画分中、F₂画分の相対的量比が減り、F₂より分子サイズの大きいF₁と小さいF₃画分が出現する。ただし、このF₃画分は経時的に増加することはなく、F₂画分と共にF₁画分に変化してゆく事実が例外なく認められた。F₂画分の一部が0.8M NaCl溶液中で一部F₃画分になるのは、若目田ら^{62, 63)}の報告にあるようにAMの一部がAとミオシンに解離したためか、またはAMのままで構造変化したためかどちらかであるが、その両方が起こっているのかも知れない。しかし、そのいずれにせよ、塩ずり直後の肉糊を0.8M NaCl溶液で溶解する際に生ずるF₃画分は、その条件下で形成された人為的な生成物(AMと比較的多量のミオシンまたはその凝集体を含む)であり、通常の水産ねり製品の生産中(NaCl濃度が0.43M)には生成しない成

分であると判断される。

Fig. 32に示したように、0.8M NaCl溶液でホモジナイズした坐りゲル中で、AMの一部が解離してAとミオシンを生成しているかどうかを確かめるために、0.8M NaCl溶液で溶解したタンパク質画分と沈殿したタンパク質画分、さらに、溶解したタンパク質については、ゲル濾過で溶出した各タンパク質画分(F_1) ~ (F_3)と未回収のタンパク質画分(F_4)に分け、各画分中のタンパク質とA量を定量した。なお、ゲル濾過で得た画分は、 $(V_e/V_0)=1.0$ の位置に溶出するタンパク質(F_1)、 $(V_e/V_0)=1.32\sim 1.39$ の位置に溶出するタンパク質(F_2)、および $(V_e/V_0)=2.11\sim 2.31$ の位置に溶出するタンパク質(F_3)の3成分である。また F_4 画分は上記した理由から F_5 画分と同じA含量であると仮定した。それぞれの画分中のタンパク質量を、 P_1 から P_5 と表し、またそれらの合計量を100mgとして換算した。それぞれの画分中のA量はSDS-PAGEにより求め、 A_1 から A_5 と表した。それらの結果をそれぞれTable 4およびTable 5に示した。これによると、まず、Mfタンパク質濃度が130 mg/g湿重量でpHが6.9の場合は、肉糊の坐りの進行に伴い P_5 が急激に増加し、また、 A_5 も急激に増加した。 P_1 は坐り1時間後に増加しその後減少するが、 A_1 はあまり変化しなかった。 P_3 および A_3 もあまり変化しなかった。したがって、この坐り条件下では肉糊中のAMの一部がNaClによってAとミオシンに解離する可能性はほとんどないものと思われる。また、不溶性のタンパク質画分に相当するのは $P_4 + P_5$ で、その中のA量は $A_4 + A_5$ であるが、前者は経時的に激増し、後者はやや増加する傾向が見られる。次にMfタンパク質濃度が130mg/g湿重量でpH 6.0の場合、坐りの進行に伴い P_1 は増加し、 A_1 も増加したが、 P_3 および A_3 はほとんど変化しなかった。また、 $P_4 + P_5$ と $A_4 + A_5$ は坐りの進行に伴いあまり増加しない傾向を示していた。これらの結果より、pH 6.0における坐りの場合も坐り過程中にはAMの一部がAとミオシンに解離する傾向は認められなかった。なお、Mfタンパク質濃度が

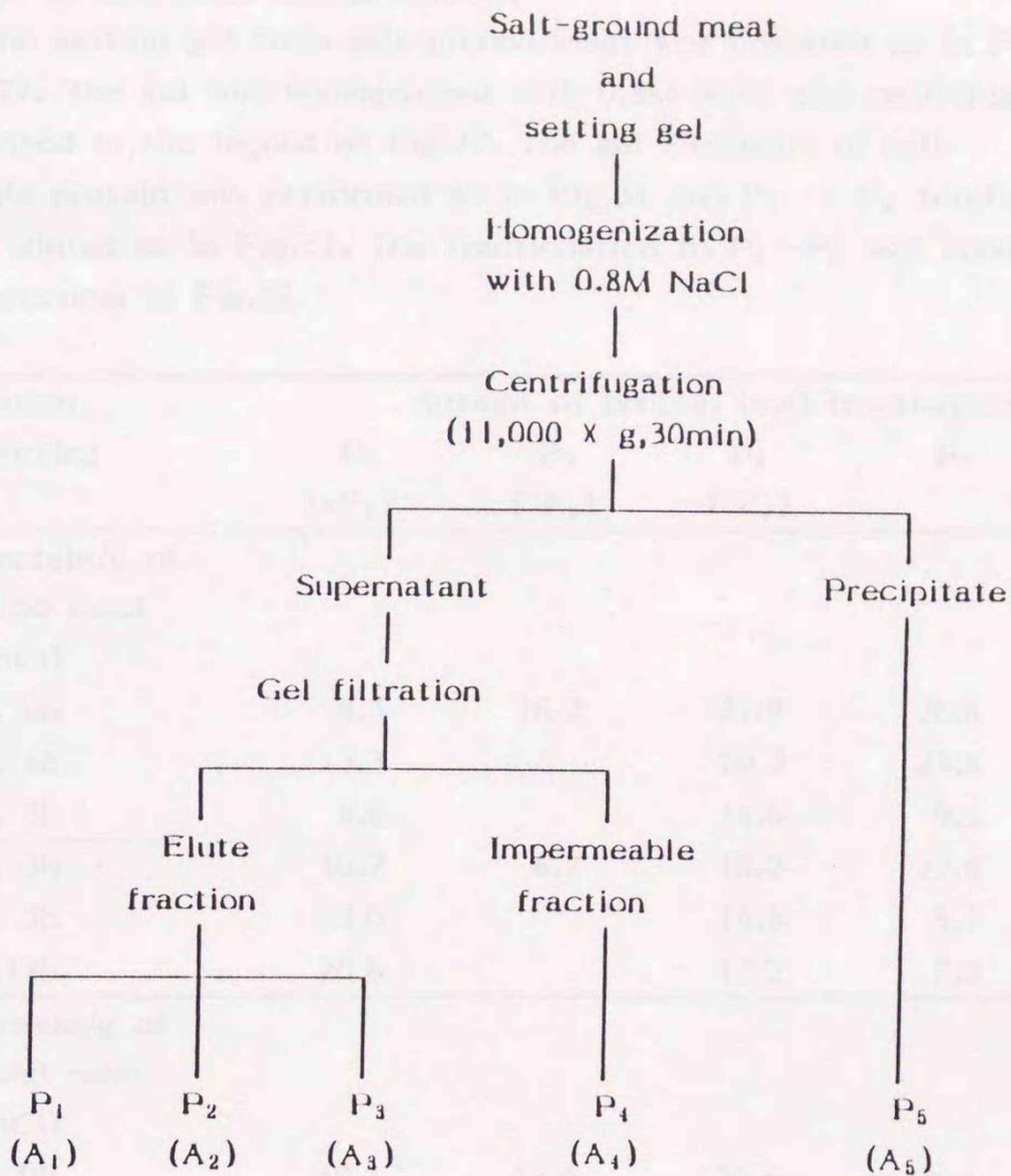


Fig.32. Salt-fractionation of myofibrillar protein in setting gel.

$P_1 \sim P_3$ (mg) : Eluted proteins from gel filtration.

P_4 (mg) : Impermeable protein on gel filtration.

P_5 (mg) : Precipitated protein by centrifugation.

The amount of actin in the fractions of $P_1 \sim P_5$ are $A_1 \sim A_5$ (mg), respectively.

Table 4. Change in salt-fractionation profile of myofibrillar protein in salt-ground meat during setting.

The setting gel from salt-ground meat was prepared as in Figs. 1 and 27. The gel was homogenized with 0.8M NaCl and centrifuged as described in the legend of Fig. 27. The gel filtration of salt-soluble protein was performed as in Fig. 31 and $F_1 \sim F_4$ fractions were eluted as in Fig. 31. The fractionation to $P_1 \sim P_5$ was conducted as described in Fig. 32.

Condition for setting	Amount of protein (mg) fractionated				
	P_1 (= F_1)	P_2 (= F_3)	P_3 (= F_4)	P_4	P_5
130mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)					
pH 6.9, 0h	8.3	16.2	21.9	26.8	26.8
pH 6.9, 1h	15.3		20.2	23.4	41.1
pH 6.9, 3h	4.6		14.4	9.3	72.1
pH 6.0, 0h	10.7	6.7	18.2	22.8	41.6
pH 6.0, 3h	23.0		14.4	8.1	54.5
pH 6.0, 12h	20.6		17.2	7.2	55.0
30mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)					
pH 6.9, 0h	10.1	17.6	20.6	26.6	25.1
pH 6.9, 3h	39.6		24.9	12.0	23.5
pH 6.9, 12h	26.5		17.3	8.9	47.3
pH 6.9, 24h	24.9		11.3	4.9	58.9
pH 6.0, 0h	11.6	12.0	33.5	14.9	28.0
pH 6.0, 3h	25.7		22.9	11.4	40.0
pH 6.0, 12h	30.3		12.5	8.2	49.0
pH 6.0, 24h	27.6		6.1	16.5	49.8

$$P_1 + P_2 + P_3 + P_4 + P_5 = 100\text{mg}$$

Table 5. Distribution of actin content in various fractions by salt-fractionation of myofibrillar protein in setting gel.

The setting gel from salt-ground meat was prepared, homogenized with 0.8M NaCl, and centrifuged as described in Figs.1 and 27. The gel filtration was performed as described in Fig.31. The amount of A₁~A₅ was estimated by SDS-PAGE as described in Figs.29 and 31. A₁ ~ A₅ are the amount of actin in the fractions of P₁ ~ P₅, respectively. The amount of actin in P₄ was estimated by assuming the protein composition is identical with that of P₅.

Condition for setting	Amount of Actin (mg) in P ₁ ~ P ₅				
	A ₁ (in F ₁)	A ₂ (in F ₃)	A ₃ (in F ₄)	A ₄	A ₅
130mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)					
pH 6.9, 0h	0.2	0.2	11.7	4.0	4.0
pH 6.9, 1h	0.4		12.9	3.5	6.2
pH 6.9, 3h	0.4		9.0	1.4	10.8
pH 6.0, 0h	0.2	*	9.0	2.3	4.2
pH 6.0, 3h	1.0		9.5	0.8	5.6
pH 6.0,12h	2.0		11.1	0.7	5.5
30mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)					
pH 6.9, 0h	0.4	0.2	11.6	3.5	3.3
pH 6.9, 3h	1.8		14.3	1.6	3.1
pH 6.9,12h	2.9		10.2	1.2	6.2
pH 6.9,24h	7.5		6.8	0.6	7.7
pH 6.0, 0h	0.6	0.3	15.4	2.7	5.0
pH 6.0, 3h	2.6		10.7	2.1	7.2
pH 6.0,12h	8.1		2.8	1.5	8.8
pH 6.0,24h	7.6		*	1.2	9.0

* N.D. P₁ + P₂ + P₃ + P₄ + P₅ = 100mg

30mg/gでpHが6.9または6.0で塩ずりした時、いずれの場合も $P_4 + P_5$ および $A_4 + A_5$ は塩ずりの進行と共に僅かに増加し、 P_3 と A_3 はやや減少する傾向を示し、また P_1 と A_1 は増加する傾向を示していた。したがって、このMfタンパク質濃度の低い条件下でも坐り過程に多量のAMがAとミオシンに解離している証拠は認められなかった。

次に、Fig. 31((C) ~ (F))に示したゲル濾過で分画した各画分中のタンパク質を同定するため、タンパク質サブユニット成分組成をSDS-PAGEのデンストメトリーで定量した。それぞれの成分のAに対する比率を求めTable 6に結果を示した。これによると、先ずMB中のミオシンHCとAの比は3.0:1.0であるが、MBを0.8M NaCl溶液中でゲル濾過に供すると F_1 画分と F_3 画分が得られ、ミオシンHCとAの比はそれぞれ4.7:1.0および19.5:1.0となった。したがって、0.8M NaCl溶液と共に処理しゲル濾過をする間にAMの一部がAとミオシンに解離しているものと判断される。ただし、この変化は人為的なものと推定される。事実、塩ずりの際のMfタンパク質濃度が130mg/g湿重量でpHが6.9の場合は、塩ずり直後における F_1 画分と F_3 画分中のミオシンHCとAの比率はそれぞれ10.9:1.0および75.5:1.0であって、Mfタンパク質濃度が高いだけにAとミオシンへの解離の度合いが明確に認められる。しかし、坐りが進行するにつれて F_1 画分中のミオシンHCとAの比は減少し、14.0:1.0から1.0:1.0へと変化した。また、坐り中に現われる150K成分とAの比も坐りが進行するにつれて5.5:1.0から1.8:1.0と減少した。なお、ここには示さないが、 F_1 画分中には塩ずり直後でも既に泳動ゲル(2%あるいは5%ポリアクリルアミドゲル)中に侵入できないほど大きな分子サイズのタンパク質成分が生成している。この成分が含まれていることは泳動ゲルの上端部位が染色されたり、また泳動ゲル上の全染色強度が減少することから検出できるが、これはMfタンパク質濃度が高く、中性で坐らせた肉糊の場合(Fig. 31(C))に顕著であり、しかも坐りの進行に伴ってその成分がやや増加する傾

Table 6. Change in protein subunit composition of eluted fraction from gel filtration. The gel filtration was made as described in Fig.31. The subunit composition of eluted protein was analyzed by SDS-PAGE, and demonstrated by relative intensity of each component to that of actin on gel rod.

Condition for setting	Subunit composition				Fraction eluted
	HC	150K	80K	Actin	
130mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)					
pH 6.9, 0h	10.9			1.0	F ₁
	75.5			1.0	F ₃
pH 6.9, 1h	14.0	5.5		1.0	F ₁
pH 6.9, 3h	1.0	1.8		1.0	F ₁
pH 6.0, 0h	26.1	0.1		1.0	F ₁
	154.5	10.1		1.0	F ₃
pH 6.0, 3h	10.0	6.7	1.4	1.0	F ₁
pH 6.0, 12h	1.3	1.3	0.9	1.0	F ₁
30mg protein/g of salt-ground meat (0.8M NaCl)					
pH 6.9, 0h	18.7			1.0	F ₁
	70.0			1.0	F ₃
pH 6.9, 3h	6.5	2.7		1.0	F ₁
pH 6.9, 12h	1.8	1.5		1.0	F ₁
pH 6.9, 24h	0.5	0.6		1.0	F ₁
pH 6.0, 0h	16.4			1.0	F ₁
	56.1			1.0	F ₃
pH 6.0, 3h	5.8	1.2	1.0	1.0	F ₁
pH 6.0, 12h	1.2	1.0	0.3	1.0	F ₁
pH 6.0, 24h	1.0	1.2	0.4	1.0	F ₁
MB (0.5M KCl)	3.0			1.0	F ₂
pH 7.0					
MB (0.8M NaCl)	4.7			1.0	F ₁
pH 7.0	19.5			1.0	F ₃

向が見られる。また、タンパク質濃度が130mg/g湿重量で、pHが6.0の場合(Fig. 31(D))は、塩ずり直後はF₁画分とF₃画分のミオシンHCとAの比はそれぞれ26.1:1.0および154.5:1.0であり、pH 6.9の場合のそれらより歴然としていた。したがって、0.8M NaClで処理中に起こるAMからのAとミオシンへの解離量はpH 6.0の方がpH6.9よりもやや多いものと推定される。これは著者らが先に報じたモデル実験の報告とも一致している。²⁰⁾しかし、坐りが進行するにつれてF₁画分中のミオシンHCとAの比が10.0:1.0から1.3:1.0と減少した。また、150K成分は塩ずり中に現れ、F₁画分とF₃画分中の150KとAの比はそれぞれ0.1:1.0および10.0:1.0であるが、坐りの進行とともに6.7:1.0から1.3:1.0に変化した。さらに、80K成分は坐り過程中に現れ、その成分とAの比もまた坐りが進行するにつれて1.4:1.0から0.9:1.0と変化した。なお、この場合においても塩ずり中に5%ポリアクリルアミドゲルに侵入できない分子サイズの大きな成分が現われ、坐り中にやや増加する傾向があった。

一方、Mfタンパク質濃度が30mg/g湿重量で、pH 6.0の場合(Fig. 31(F))は、塩ずり中に150K成分の生成が見られず、またその後の坐り過程でもあまり増加しない点を除けば、タンパク質成分の変化とそのサブユニット組成は、上記した高いタンパク質濃度で肉糊を坐らせた場合とほぼ同じであった。特に、pH 6.9の場合(Fig. 31(E))は、塩ずり中に5%ポリアクリルアミドゲルに侵入できない分子サイズの大きな成分が現われ、経時的にやや増加するが、pH 6.0の場合はそのような成分はいずれの過程でもほとんど現れない点でも、その変化傾向はよく似ていた。

以上の結果から、スケトウダラのすり身を塩ずりするとMfタンパク質は可溶化すると同時に凝集を始めるものと判断される。本実験の場合は、すり身を通常のねり製品の製造に用いる場合よりも高濃度(0.8M NaCl = 4.65%)の塩によって処理しているので、それがも

たらず影響についても考慮する必要がある。しかし、すり身をねり製品の場合と同じ2.5% (0.43M)のNaClと共に塩ずりし、同様な検討をして見ると、肉糊中のMfタンパク質は全く同様に速やかな凝集をしていることが確かめられた。(結果は図示しない。)本実験のような高濃度の塩存在下ではMfタンパク質(主成分のAM)の一部はAとミオシンに解離するが、0.43M (2.5%)NaCl存在下でも僅かながらそれが起こるその可能性あり得る。しかし、その場合でもおそらく凝集反応が主に進行することは疑う余地のないことである。すり身の塩ずりに伴うAMの凝集反応は極めて速く進行し、塩ずり直後の肉糊中でも既に認められ、中性の場合は、25°Cでも1時間後には未凝集のAMは全く残っていなかった。一方、微酸性の場合でも同様に速く進むが、生成する凝集体の分子サイズは中性の場合より小さかった。また中性の場合には生成する凝集体の分子サイズは急激に大きくなり、不溶化につながるが、加えて0.8M NaCl溶液中に可溶化したタンパク質の成分組成を見ると、A(F₃画分)に比べて凝集体(F₁画分)の量比が少ないこと、またF₁画分の中にはSDS-PAGEの泳動ゲル中に侵入出来ないほどの大きな分子サイズの成分が含まれるようになる事実は、この凝集反応の速さを反映している。

塩ずりに伴って生成する凝集体については、SDS-PAGEから判断すると、先ずミオシンHCとその多量体と推定される成分、およびAから構成されており、分子量は少なくとも2千万以上(Sepharose Cl-4Bのvoid volumeに溶出することから推定)に達するほどである。塩ずりの初期に生成する凝集体中には、相対的に多量のミオシンHCが含まれているが、これは0.8M NaClによって解離した量に相当しており、坐りの過程ではその量はむしろ減ってゆく傾向にある。凝集体(F₁画分)についてそのサブユニット組成を比べると、その組成比は坐りの進行につれて変化し、Aに対するミオシンHC、150K、および80K成分の比率は減少する傾向を示した。また、経時的に一定の比率に近づく

ような傾向も認められなかった。それゆえ塩ずりおよびその坐りに伴う凝集体の形成に際しては肉糊中のミオシンHC、ミオシンHCの多量体、A、150K成分、および80K成分などが、それぞれ別途に参加し、相互に結合しているものと推定される。150Kと80K成分の由来に関しては未だ明らかではないが、既存のプロテアーゼによって開裂し生成したようにも考えられる。しかし、その生成量は経時的に増加しないので酵素反応生成物とは確定出来ない。また、いずれの成分も遊離状態では存在しないことはゲル濾過法により確かめられた(Fig. 31)。したがって、プロテアーゼによるペプチド開裂が起こるとすればそれは分子内開裂である可能性もありうる。他方、塩ずりおよび坐りの過程では、肉糊中のタンパク質成分がいずれも凝集して大きな分子サイズの構造体を形成するように働いているので、150Kと80K成分は、いずれも既存の小分子量タンパク質成分が多量化し、その結果として出現したようにも考えることができる。

以上のように考察すると、塩ずりおよび坐りの過程における肉糊中のMfタンパク質をSDS、尿素、およびメルカプトエタノール混液に溶解してSDS-PAGEに供し、そのサブユニット成分組成に起こる変化を調べた従来の研究成果は次のように解釈することができる。すなわち、肉糊の坐りに伴うゲル化においては肉糊中のあらゆるタンパク質成分は相互に結合して大きな分子サイズの凝集体を構成する。しかも凝集体を構成するタンパク質成分の組成は坐りの進行と共に僅かに変動し、かつ分子サイズは徐々に巨大になってゆくが、現時点では巨大タンパク質のサイズと構造を正確に測定する方法が無いため、便宜的に各種組成の溶媒に対する溶解性の変化から判断すると、一般に分子の巨大化は不溶化につながることを示された。2% SDS-8M 尿素-2% 2-メルカプトエタノールから成る溶媒で溶解後にSDS-PAGEを行うと凝集に参加した各種サブユニット成分の中、ミオシンHCだけは相互に強く結合してその多量体を形成していることは既

に報じられたとおりである。上記溶媒中においても切断されないの
で、ミオシンHCの結合はあたかも共有結合の形成に基づくようにも
推定されるが、ポリペプチド鎖間の絡み合いに起因している可能性
も充分にあり得る。⁶⁵⁾ その他のA、150K、80Kなどの成分はゲル濾過で
用いた0.8M NaCl溶液中では切断されず、SDS-尿素-メルカプトエタ
ノール混液中では切断されるので、相対的に弱い結合(非共有結合)
によって凝集体形成に参加しているものと判断される。AMを構成し
ているAとミオシンは、AMが塩と反応するとその一部が解離するため、
0.5M KCl共存下の場合よりも0.8M NaCl共存下の場合の方が可溶化
するAの量が多い(Fig. 31(A)と(B))。また塩ずりおよびその坐りの過
程においては、Aの一部は0.8M NaClと共にホモジナイズしてもなお
溶解しないような巨大なタンパク質凝集体の中に取り込まれ、他の
一部は、塩溶液中に溶解はするものの、ゲル濾過ではvoid volume (
排除体積)に溶出する巨大タンパク質凝集体の中に取り込まれるな
ど、Fig. 31に示した様々な画分(A₁~A₅)に分布している。しかし、こ
れらの各成分中におけるAの結合が相対的に弱いために、SDS-PAGE法
による分析では、全てのAが解離して単一の成分となり泳動される。
それゆえすり身の塩ずりとそれに続く坐りの過程においては見かけ
上A量に変化がなく、坐りゲルの形成にはなんら関与していないよう
に見える。したがって、SDS-PAGE法による肉糊および坐りゲル中のMf
タンパク質のサブユニット組成の変化の研究は、肉糊のゲル化に伴
うMfタンパク質の変化のほんの一面に関わる情報よりもたらさない
ことが明らかである。

総合考察

本論文では、冷凍すり身を原料として魚類肉糊のゲル化に伴うゲル物性の増加とミオシン重鎖の多量化反応に対して大きな影響を及ぼすと考えられる要因の中で特に添加物によってもたらされる影響に焦点をおいて研究を行った。すなわち先ず初めに重合リン酸塩の添加によるすり身のpH調節、または赤身魚肉のすり身化に際して必要とされているアルカリ(NaHCO_3)晒しによるpHの調節がゲル化に及ぼす影響、さらに冷凍すり身中に必ず添加されている糖類がゲル化に及ぼす影響について詳細な検討を行い、併せて肉糊のゲル形成機構をタンパク質化学的な視点から明らかにすることを目的としてきた。この中の第一の課題については、 HCl や NaOH のような無機酸やアルカリによってpHを調節してスケトウダラのすり身のゲル形成能を調べ、または乳酸を付加してマイワシのすり身のpHを調節してそのゲル形成能を調べた。ただし、実際にすり身のpH調節のため役立っている重合リン酸塩がゲル形成能に及ぼす影響についてはここでは検討しなかった。次に、第二の課題として、すり身のゲル形成能に対するソルビトールの効果について調べたが、実際的にはシュクロースを使用されている場合も多いので現在検討を続けている。

冷凍すり身に添加されている重合リン酸塩の役割に関わる研究は以下に示すようにいろいろある。それらの研究成果によると、(1)第一の効果はすり身のpHを中性に保持することにある。すなわち、実際には0.2~0.3%のタリンサンやマスコリンなどの重合リン酸塩(ピロリン酸ナトリウムとトリポリリン酸ナトリウムの混合物)を添加すると、すり身のpHは6.7 ~ 6.8から7.1~7.2付近に上がることが既に知られており、しかもすり身の主成分であるMfタンパク質の冷凍変性は上記した中性付近において最も起こりにくく、さらに冷凍変性に対する糖類の防止効果が最も強く発揮される。²⁵⁾ (2)第二の

効果はイオン強度を制御することにある。すなわち、水晒し後の脱水肉のイオン強度が低下すると、その保水性が高まりMfタンパク質の安定性が劣化するため、重合リン酸塩によるイオン強度の補正は品質の安定化のために役立っていると言われる。次に(3)第三の効果は各種イオンへのキレート作用にある。一例を上げると、八木ら⁶⁶⁾は Mg^{2+} イオンと重合リン酸塩が共存すると、塩ずり肉のような高塩濃度存在下においてはアクトミオシンに働きかけ、その一部をアクチンとミオシンに解離させる事実を報告しているが、これはピロリン酸Mg塩の効果に他ならないと考えられる。最近品質改良の目的でCa塩類を添加した製品が増えているので、この問題はさらに今後重要になるように思われる。なお最近、(4)松永ら⁶⁷⁾は、すり身を塩ずりし坐りを行う過程で、トリポリリン酸塩はピロリン酸(PPi)と無機リン酸に加水分解されるため、肉糊中にはPPiが主成分として蓄積する事実を明らかにしたが、松川ら⁶⁸⁾は肉糊の坐りに伴うゲル化に及ぼすPPiの影響を調べ、肉糊の坐り反応が起こり易い低温域では、肉糊中のミオシンHCの多量化反応の速度を制御し、結果として形成されるゲルの破断強度を変えずに破断凹みのみを高めるように作用することを見い出している。この事実は、PPiとMfタンパク質中のミオシンとの直接の結合がゲル物性に影響を及ぼす可能性を示唆している。

すり身のゲル形成能に対するシュクロースやソルビトールの効果については、従来から研究した例はあるが、その成果は定量的ではなく、結論ははっきりしていない。本論文では、ソルビトールを用いてスケトウダラ肉糊の坐りに伴うゲル化とミオシンHCの多量化に対する影響について詳細な検討をした。結果としてソルビトールは坐りに伴う肉糊中のミオシンHCの多量化反応に影響を及ぼし、ゲル物性を強化するように働くことを見いだした。添加されているソルビトールがすり身の冷凍貯蔵性を高めるだけでなく、それを原料とし

たねり製品の品質を向上させる効果をも示す事実は本研究において初めて見いだされたことである。なお、すり身の品質に対するソルビトールの効果は魚種によってやや異なるが、これは魚種によるMfタンパク質の熱安定性の相違¹⁷⁾を反映しているものであろう。ただし、一般に坐りにくい魚の肉糊に対するソルビトールの添加効果は余り顕著でなく、たとえばホッケのすり身のゲル形成能に対しては、坐り易い魚の場合ほど強い改良はできなかった。坐り易い魚(スケトウダラやマイワシ)の肉糊のゲル形成能に対してはソルビトールは顕著な効果を及ぼす傾向があった。

最近、山本ら⁶⁹⁾はウサギの骨格筋ミオシンを用いて加熱による網状構造形成の最初の段階ではミオシンの頭部どうしが癒着する現象を電子顕微鏡によって観察し、また、Sharpら⁷⁰⁾もウサギの背筋ミオシンの頭部どうしがゲル化の最初の段階で癒着し、しだいに凝集体を形成してゆく段階を電子顕微鏡を用いて観察している。これらはいずれも試験管レベルでの実験結果であるが、魚肉のミオシンについて検討した例は少ない。魚類肉糊のゲル形成過程ではミオシンHC間の多量化反応が顕著に進行することが知られているのであるから、ウサギの場合と同様にミオシンの頭部どうしの癒着が塩ずりの段階で起こる可能性があると思われる。一方Gillら⁶⁵⁾は加熱変性させたMfタンパク質についてzero-length cross linker (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)を用いて化学的に架橋すると、ウサギの場合にはそれが起こらないのに、タラのミオシンHC(尾部)間では極めて速やかに架橋を生じ、その多量体が形成されてSDS-PAGEの泳動ゲル中に侵入出来ない程に多量化してゆくこと、またミオシンHC間の架橋反応が優先的に起こり、Aやその他の低分子量成分にはそれが起こりにくいことなどを見いだしている。

動物種の起源が異なるミオシンが熱に対して著しく異なる感受性を示すことは既に知られているが、⁷¹⁾それがどのような構造の相

違に基づくものであるかは依然として分かっていない。しかし、上記したGillらの実験事実はタラ筋肉のミオシンは極めて凝集し易い構造をしており、それはポリペプチド鎖上にあるアミノ酸側鎖が反応し易い状態にあるため相互に結合したり、または絡み合う原因となることを示唆している。これは魚類筋肉のミオシンが一般に、熱力学的に無秩序状態でOPENな構造をしていると言う従来からの報告¹⁷⁾と合致しているものである。

現在、分子量が2千万以上に及ぶような巨大なタンパク質を分画、定量する適切な技術が開発されていないため、水産ねり製品に品質を支配しているすり身の塩ずり、およびそれに続く坐り(加熱)の過程で起こるゲル化の分子機構をタンパク質化学的視点から完全に理解することが出来ない。しかし、本研究の成果を含め、最近における魚類筋肉タンパク質の変性とその制御に関する研究の成果は、徐々にではあるが、着実にその課題を解明しているように思われる。

文献

- 1) 水野治夫 : 水産加工技術基礎講座, 全国水産加工技術協同組合連合会, p. 32 (1990).
- 2) 漁業白書 : 水産物の需要, 農林統計協会, pp 9 - 19 (1987).
- 3) 志水 寛 : 水産食品学(須山三千三、鴻巣章二編), 恒星社厚生閣, 東京, p 258 (1987).
- 4) 北田長義, 水産加工とタンパク質の制御(新井健一編) : 水産学シリーズ, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 81 - 88 (1990).
- 5) 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).
- 6) 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, 53, 633 - 639 (1987).
- 7) 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, 53, 2060 - 2065 (1987).
- 8) 新井健一 : 冷凍すり身, 日本食品経済社, 東京, pp. 21 - 52 (1986).
- 9) 加藤 登, 橋本昭彦, 中川則和, 新井健一 : 日水誌, 55, 507 - 513 (1989).
- 10) 野中道夫, 平田史生, 佐伯宏樹, 中村 誠, 笹本泰彦 : 日水誌, 55, 1575 - 1581 (1989).
- 11) 野中道夫, 平田史生, 佐伯宏樹, 中村 誠, 笹本泰彦 : 日水誌, 55, 2157 - 2162 (1989).
- 12) 福田 裕 : 冷凍, 57, 807 - 818 (1982).
- 13) 石川宣次, 中村邦典, 藤井 豊, 山野玄三, 杉山豊樹, 篠崎和夫, 飛田 清, 山口安男 : 東海区水研報告, 99, 31 - 42 (1979).
- 14) 福田 裕, 掛端甲一, 新井健一 : 日水誌, 43, 717 - 725 (1977).

- 15) 新井健一 : 多獲性赤身魚の有効利用, 35, 水産学シリーズ, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 20 - 32 (1981).
- 16) 橋本昭彦, 新井健一 : 日水誌, 44, 1389 - 1393 (1978).
- 17) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一 : 日水誌, 48, 671 - 684 (1982).
- 18) 橋本昭彦, 加藤 登, 野崎 恒, 新井健一 : 日水誌, 51, 425 - 432 (1990).
- 19) 船津保浩, 橋本昭彦, 今野久仁彦, 新井健一 : 日水誌, 56, 2061 - 2067 (1990).
- 20) 船津保浩, 新井健一 : 日水誌, 56, 2061 - 2067 (1990).
- 21) 野中道夫, 平田史生, 佐伯宏樹, 佐々木勇人, 松川雅仁 : 日水誌, 56, 1871 - 1876 (1990).
- 22) 大泉 徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一 : 日水誌, 47, 901 - 908 (1981).
- 23) 大泉 徹, 山村寛仁, 新井健一 : 日水誌, 48, 219 - 226 (1982).
- 24) 大泉 徹, 中村政俊, 橋本昭彦, 新井健一 : 日水誌, 49, 967 - 974 (1983).
- 25) 松本行司, 大泉 徹, 新井健一 : 日水誌, 51, 833 - 839 (1985).
- 26) 松本行司, 新井健一 : 日水誌, 52, 2033 - 2038 (1986).
- 27) 松本行司, 新井健一 : 日水誌, 53, 2195 - 2199 (1987).
- 28) 川島省吾, 新井健一, 斎藤恒行 : 日水誌, 39, 207 - 214 (1972).
- 29) 加藤 登, 野崎 恒, 小松一宮, 新井健一 : 日水誌, 45, 1027 - 1032 (1979).
- 30) G. Gomori : J. Lab. Clin. Med., 27, 955 - 960 (1942).
- 31) A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David : J. Biol. Chem., 177, 751 - 765 (1949).
- 32) K. Weber and M. Osborn : J. Biol. Chem., 244, 4406 - 4412 (1962).

- 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) 高士玲二, 新井健一, 斎藤恒行 : 日水誌, 36, 169 - 172 (1970).
- 35) J. Goa : Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5, 218 (1953).
- 36) U. K. Laemmler : Nature, 227, 680 - 685 (1979).
- 37) 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. 189 - 201.
- 38) 西本真一郎, 橋本昭彦, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫,
新井健一 : 日水誌, 53, 2011 - 2020 (1987).
- 39) 志水 寛 : 水産食品学(鴻巣章二, 須山三千三編), 恒星社厚生閣,
東京, 1987, pp. 264 - 268.
- 40) 志水 寛 : 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. 58 - 59.
- 41) 西岡不二男 : 魚肉ねり製品(志水 寛編), 水産学シリーズ, 恒星
社厚生閣, 東京, pp. 62 - 73 (1984).
- 42) E. Niwa, R. Suzuki, T. Nakayama, and I. Hamada : Nippon Suisan
Gakkaishi, 47, 817 - 821 (1981).
- 43) E. Niwa, T. Wang, S. Kanoh, and T. Nakayama : Nippon Suisan
Gakkaishi, 54, 1851 (1988).
- 44) E. L. Chan, S. Nakai, and D. F. Wood : J. Food Sci., 49, 345 - 350
(1984).
- 45) 八木 浩, 阪本正博, 若目田 篤, 新井健一 : 日水誌, 51, 667 -
675 (1985).
- 46) 志水 寛 : 魚肉ねり製品(岡田 稔, 横関源延, 衣巻豊輔編), 恒星
社厚生閣, 東京, pp. 62 - 76 (1974).
- 47) 右田正男 : 日水誌, 28, 456 - 470 (1962).
- 48) 松本重一郎 : 魚肉ソーセージ, No. 207 (1978).
- 49) 野口 敏 : New Food Industry., 13, 56 - 60 (1971).

- 50) 関 伸夫, 高田早苗 : 日水誌, 53, 457 - 463 (1987).
- 51) 村元 学, 関 伸夫 : 日水誌, 55, 1605 - 1613 (1989).
- 52) 村元 学, 関 伸夫 : 日水誌, 55, 1615 - 1622 (1989).
- 53) T. Fukazawa, Y. Hashimoto, and T. Yasui : J. Food Sci., 26, 331 - 336 (1961).
- 54) T. Fukazawa, Y. Hashimoto, and T. Yasui : J. Food Sci., 26, 550 - 555 (1961).
- 55) K. Samejima, Y. Hashimoto, T. Yasui, and T. Fukazawa : J. Food Sci., 34, 242 - 245 (1969).
- 56) M. Ishioroshi, K. Samejima, and T. Yasui : J. Food Sci., 44, 1280 - 1284 (1979).
- 57) M. Ishioroshi, K. Samejima, Y. Arie, and T. Yasui : Agric. Biol. Chem., 44, 2185 - 2194 (1980).
- 58) K. Samejima, M. Ishioroshi, and T. Yasui : J. Food Sci., 46, 1412 - 1418 (1981).
- 59) K. Samejima, H. Yamaguchi, A. Asgar, and T. Yasui : Agric. Biol. Chem., 48, 2225 - 2232 (1984).
- 60) 西岡不二男, 町田 律, 志水 寛 : 日水誌, 49, 1233 - 1238 (1983).
- 61) 志水 寛, 西岡不二男, 町田 律, 篩 照明 : 日水誌, 49, 1239 - 1243 (1983).
- 62) 若目田 篤, 新井健一 : 日水誌, 50, 635 - 643 (1984).
- 64) 若目田 篤, 新井健一 : 日水誌, 52, 293 - 300 (1986).
- 65) T. A. Gill and Conway : Agric. Biol. Chem., 53, 2553 - 2562 (1989).
- 66) 八木 浩, 新井健一 : 日水誌, 52, 1573 - 1580 (1986).
- 67) 松永明信, 大泉 徹, 山本 敦, 川崎賢一, 水上英一 : 日水誌, 56, 2077 - 2082 (1990).

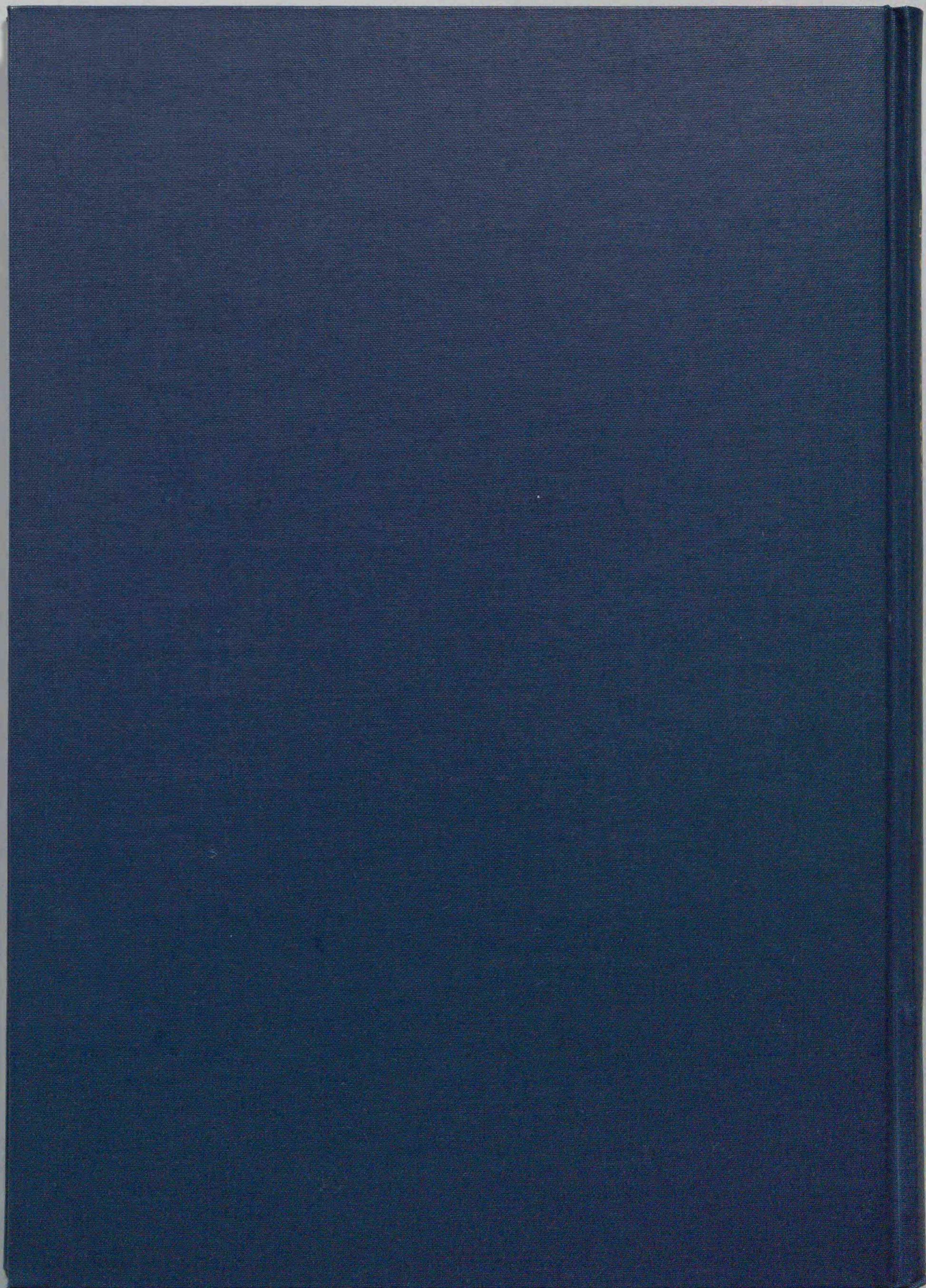
- 68) 松川雅仁, 桜田克彦, 新井健一 : 日水誌, 58, 735 - 742 (1992).
- 69) K. Yamamoto : J. Biochem., 108, 896 - 898 (1990).
- 70) A. Sharp and G. Offer : J. Sci. Food Agric., 58, 63 - 73
(1992).
- 71) A. Hashimoto and K. Arai : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50,
853 - 864 (1984).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御助言と御指導を賜った北海道大学水産学部教授新井健一博士に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

また、本論文を作成するにあたり、有益なる御指導と御校閲をしていただいた酪農学園大学教授鮫島邦彦博士、さらに北海道大学水産学部教授信濃晴雄博士、同学部教授関 伸夫博士、同学部助教授猪上徳雄博士、並びに同学部助教授今野久仁彦博士に心から感謝致します。

最後に、本研究の遂行のために、すり身を提供していただいた大洋漁業(株)に謝意を表します。



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

