



Title	北海道産低利用魚種のすり身化およびホッケの加熱ゲル形成能の再評価に関する研究
Author(s)	蛸谷, 幸司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第12211号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12211
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61578
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Ebitani.pdf



北海道産低利用魚種のすり身化およびホッケの加熱ゲル形成能の再
評価に関する研究

(Studies on Surimi production from low-utilized fish species in Hokkaido
and re-evaluation of thermal gel forming ability of arabesque greenling
meat)

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻
Graduate School of Fisheries Sciences
Division of Marine Life Science

蛸谷 幸司
Koji Ebitani

平成 28 年(2016)

目 次

緒言	1
実験材料および実験方法	
1.実験材料	5
2.実験方法	5
(1)ホッケの冷蔵貯蔵	5
(2)ホッケ落とし身の調製と冷蔵、冷凍貯蔵	6
(3)ウロコメガレイ冷凍すり身の調製	6
(4)落とし身および冷凍すり身からの肉糊および加熱ゲルの調製	6
(5)肉糊のミオシン架橋反応と MDC 取り込み能の測定	7
(6)加熱ゲルの物性測定	7
(7)冷凍すり身の理化学分析方法	7
(8)魚肉からの定量的な筋肉ホモジネートの調製	8
(9)Mf の Ca^{2+} -ATPase 活性の測定	8
(10) Ca^{2+} -ATPase の失活速度の測定	8
(11)SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法	9
(12)アガロースを含む SDS-PAGE 法	9
(13)魚肉からの TGase の抽出と活性の測定	9
(14)粗 TGase を用いた Mf 中のミオシン架橋重合の解析	10
(15)ホッケおよびスケトウダラ TGase の熱安定性 およびソルビトール安定性の解析	11
(16)ATP 関連化合物の測定方法	11
実験結果	
第 1 章 北海道産各種低利用魚のすり身原料としての可能性の探索	12
第 1 節 低利用魚のすり身原料としての評価	12
(1)筋原線維 Ca^{2+} -ATPase の熱安定性	12

(2)加熱ゲルの物性と架橋反応	15
(3)ウロコメガレイすり身の二段加熱ゲル特性に及ぼす 予備加熱温度の影響	19
第2節 ウロコメガレイすり身製造試験	21
(1)原料魚の鮮度とすり身品質の関係	21
(2)採肉前処理方法の違いによるすり身品質への影響	22
(3)水晒し回数がすり身のゲル形成能へ与える影響	26
(4)各種魚類ミオシンの熱安定性	28
小考察	33
第2章 ホッケのすり身原料としての評価	36
(1)筋原線維 Ca^{2+} -ATPase の熱安定性の検討	37
(2)市販ホッケ冷凍すり身の品質評価	40
(3)ホッケのすり身原料としての特性	41
(4)5℃ 保管中のホッケ筋肉たんぱく質の性状	46
(5)5℃ 保管中のホッケの鮮度変化	46
小考察	51
第3章 ホッケ魚肉の架橋反応特性	54
(1)高鮮度ホッケ魚肉を用いた肉糊加温中の架橋反応の検討	55
(2)5℃ 保管したホッケの HC 架橋反応と MDC 取り込み能の変化	61
(3)ホッケ保管中の魚肉中の TGase 活性の変化	61
(4)ホッケから調製した粗酵素液保管中の TGase 活性の変化	64
(5)ホッケ TGase の熱安定性の検討	65
(6)ホッケ保管中の TGase 活性の消失に対する プロテアーゼ阻害剤添加の影響	65

(7)ホッケ TGase 粗酵素の Ca^{2+} 要求性の検討	71
(8)ホッケおよびスケトウダラの TGase と Mf の交差性の検討	71
(9)各種魚類落とし身の貯蔵中の架橋反応の変化	73
小考察	80
 第 4 章 ホッケ落とし身の坐り効果とその維持	83
(1)高鮮度ホッケ落とし身の坐り効果	83
(2)高鮮度ホッケ落とし身保管中の TGase 失活に対する ソルビトールの抑制作用	84
(3)ソルビトール添加ホッケ落とし身の凍結保管による 坐り効果の維持	88
(4)ソルビトール添加ホッケ落とし身の凍結保管による ゲル形成能の変化	92
(5) 高鮮度ホッケ落とし身混合による市販冷凍すり身の ゲル形成向上の試み	99
小考察	105
 総合考察	108
 謝辞	119
 文献	120

略 語

本論文においては以下の略語を使用した。

ATP	:	Adenosine-5'-triphosphate
AMP	:	Adenosine-5'-diphosphate
ADP	:	Adenosine-5'-monophosphate
DTT	:	Dithiothreitol
E64	:	<i>N</i> -[<i>N</i> -(<i>L</i> -3-Trans-carboxirane-2-carbonyl)- <i>L</i> -leucyl]-agmatine
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
HC	:	Myosin heavy chain
HxR	:	Inosine
Hx	:	Hypoxanthine
IMP	:	Inosine-5'-monophosphate
MDC	:	Monodansyl cadaverine
MC	:	<i>N, N</i> -dimethylated casein
SDS-PAGE	:	Sodium dodecyl sulfate –polyacrylamide gel electrophoresis
TGase	:	Transglutaminase (EC2.3.2.13)

緒 言

北海道の漁業生産量は 131 万トン(全国比 27.1%)、生産額が 2900 億円(同比 22.0%)で、量、額ともに全国第 1 位の生産規模である。主要魚種別の生産量では、ホタテガイが 45.4 万トン(全道生産比 35%)で最も多く、スケトウダラの 20.7 万トン(同比 16%)、サケの 13.6 万トン(同比 10%)、サンマの 9.2 万トン(同比 7%)と続く。魚類以外では、コンブが重要な水産資源で、コンブ、ホタテガイ、サケの 3 種で生産量全体の 51%を占めている。また、水産加工業の出荷額は 6470 億円で、全国比 21.4%を占める。北海道の水産業は漁網製造、造船、流通など関連産業のすそ野も広く、地域の基幹産業として極めて重要な役割を担っている(北海道 2015)。

北海道における漁業生産量の推移をみると、1930 年代までは日本海沿岸のニシンが最大の資源であった。1950 年代になるとスケトウダラが底びき網で漁獲されるようになり、その後、オホーツク海やベーリング海など北洋まで漁場が拡大され、1970 年代にはスケトウダラの漁獲量は 100 万トンを超え、北海道の漁業生産量は 200 万トンまで大幅に増大した。しかし、その後、1977 年の 200 海里漁業専管水域設定や、それに続く公海における漁獲規制の強化、さらに 1970 年台から 80 年台にかけて道東沖で大量に漁獲されていたマイワシの漁獲量減少などから、生産量は 1987 年の 316 万トン进行ピークに大きく減少し、近年は緩やかな減少傾向となっている。このような状況において、本道周辺の限られた水産資源の持続的な活用が強く求められ、さらに、安定的な生産が見込まれる種苗放流や養殖等による資源確保の取組がなされている(水島 2001)。

このように北海道の漁業生産が低迷する中、道内の水産加工業、特にすり身製造業界では慢性的な原料魚不足に陥っている。冷凍すり身は、ねり製品製造の中間素材として、1959 年に北海道立水産試験場の西谷らによりスケトウダラを原料に開発された(田元ら 1961)。すり身製造においては、魚肉を水晒しすることにより好ましくない水溶性タンパク質や血液などを除去した後に脱水することにより、熱ゲル形成を担う筋原線維タンパク質を濃縮することができる。さらに、筋原線維タンパク質によるゲ

ル形成能を長期間維持するため、凍結中のタンパク質変性を抑制する目的で、糖類と重合リン酸塩が添加される。通常は冷凍貯蔵されるので「冷凍すり身」と呼ばれる。

スケトウダラの冷凍すり身が高く評価されたのは、小田原かまぼこの特徴である非常に高いゲル物性を示す加熱ゲルを、この冷凍すり身を用いて生産できることが明らかになったからである。特に、小田原かまぼこを製造する際に日常的に用いられている肉糊の予備加熱の導入による坐り効果が、当時使用されていたグチと同様にスケトウダラ冷凍すり身に認められたことである。しかも、その機能を維持したまま、一年以上冷凍貯蔵でき、一定品質のすり身を安定的に利用することで一定品質の練り製品が製造できることが認知されるようになった。

この開発により、これまですり身を自社生産する場合に必要であった原魚の買い付け、原魚からの採肉、すり身を生産のための様々な設備、そして生産に用いた排水処理設備が不必要になった。同時に、すり身生産にかかわる人件費が不必要になったため、ほとんどの練り製品製造工場では原材料を冷凍すり身に替えた。同時に、その魚卵以外にあまり商品価値のなかったスケトウダラに大きな商品価値を与えることになった。それゆえ、その後、スケトウダラの主要漁場である北洋に工船を送り、高鮮度のスケトウダラを用い、現場で生産した洋上すり身の生産も盛んに行われるようになった。1976年に国内冷凍すり身生産量は42.4万トンに達した。その内、北海道産冷凍すり身は19.2万トン(46.1%)で、洋上すり身は18.1万トン(42.1%)であった。その後、洋上すり身生産の停止などの理由で、2012年には国産冷凍すり身の生産量は最盛期の半分以下の8.4万トンまで激減し、その大部分を占める北海道産冷凍すり身も7.2万トン(国内生産の85%)まで減少した。

一方、冷凍すり身を主原料とする練り製品の生産量は、1978年の119万トンをピークに徐々に減少していたが、ここ数年は50～60万トンを維持している。この製造のために冷凍すり身を年間約30万トン使用しているが、必要量の60～70%を輸入すり身に頼っているのが現実である。2010年の冷凍すり身輸入総量は、約23万トンで、輸入先は米国(30%)、タイ(24%)、中国(13%)、インド(11%)であった。また、この中にはスケトウダラ以外の多魚種(パシフィックホワイティング、ミナミダラ、イトヨリ、グ

チ、エソ、タチウオ、キントキダイ、チリアジなど)から生産されたすり身が含まれている(福田 2011)。

このようにスケトウダラ以外のすり身が広く用いられている状況において、北海道のすり身業界では、スケトウダラ以外の魚種であるナガヅカ、ホッケ、シロサケ、ニシンなどを原料とした冷凍すり身の製造が行われている。特に、ホッケは漁業生産量の約 50%がすり身原料として利用されている(北海道漁業協同組合連合会 2014)。ホッケの漁業生産量は 1998 年に過去最高の 23.5 万トンに達したが、その後、2009 年まで 15 万トン前後で推移し、この間、年間 2~3 万トンの冷凍すり身が生産された。ホッケ冷凍すり身は、スケトウダラのそれに比べて、白色度は低く、色調が劣り、さらに最終製品のゲル物性も低いことから(元広ら 1976, 橋本ら 1981, 北上 1997)、低品質のすり身と評価されて価格も低く、製品に白さや高いゲル物性を要求しない揚げかまぼこや魚肉ソーセージ等の原料として主に利用されている。

ホッケ以外の北海道産魚種から生産されるすり身の生産量はかなり少量である。ただし、これら魚種のすり身にはそれぞれ固有の特徴がある。たとえば、ナガヅカは予備加熱による坐り効果が認められないが、その高い白色度が重宝されている(宇野ら 1958)。シロサケも坐り効果は認められず、しなやかさに欠けたゲルを作る特性があるが、ピンクの色調が特徴である(高橋ら 1991)。

一般的に、練り製品の最終的なゲル物性は原料となる魚肉(すり身)の品質により決定される。しなやかな練り製品は、食塩を加えて筋原線維を溶解させて肉糊(ゾル状)とし、これを加熱することによって、ミオシン分子がネットワーク構造を形成するように凝集して形成される。先に述べたように、小田原蒲鉾の生産では伝統的に、肉糊を高温加熱する前に、40℃以下の温度でしばらく「予備加熱」を行う工程が導入される。これにより、最終的な加熱ゲルのゲル物性が向上する。この工程を「予備加熱工程」あるいは「坐り工程」と呼び、物性上昇効果を「坐り効果」と呼んでいる。「坐り工程」は伝統的に利用されてきたが、「坐り効果」の分子機構が明らかになったのは比較的最近である。肉糊の予備加熱中にミオシンが部分的な変性を受けると同時に、内因性トランスグルタミナーゼ TGase (EC2.3.2.13)により触媒されたミオシン重鎖(HC)

間のイソペプチド結合により強固な架橋体が形成され、結果としてゲル物性を向上させると言われている(関ら 1990, Wan ら 1994, Nozawa ら 1997, Kimura ら 1991, 塚正ら 2000a, 2000b)。これが顕著に起こる魚種は「坐りやすい魚種」と評価され、グチやスケトウダラはその代表的な魚種である。魚肉に含まれるこの酵素は Ca^{2+} 要求性を示す組織型 TGase であり、魚種間に広く内在している (Araki ら 1993, 酒井ら 2012)。しかし、TGase により肉糊中でミオシンの架橋反応が起きるかどうかは、酵素の存在量や活性だけでなく、架橋を受けるミオシンの構造、活性化のための Ca^{2+} 量、阻害剤の有無など、様々な因子により決定される(関ら 2001)。

本研究では、北海道周辺で漁獲される水産資源の有効利用を目的に、第 1 章では、これまで食用としての利用の少ない水産資源のウロコメガレイ、イカナゴ、オクカジカの 3 魚種について、すり身原料としての基礎的特性を把握するため、ミオシンの熱安定性とゲル化特性について検討した。また、坐り効果が認められたウロコメガレイについては、すり身の品質に影響する製造時の採肉前処理方法や水晒し回数等を検討し、その効果を検証した。第 2 章では、北海道特有の水産資源であり、現在の冷凍すり身の主要魚種であるホッケ魚肉のすり身原料としての特性について、生化学的な指標とゲル化能の点から再検討した。第 3 章では、原料魚の鮮度がすり身の品質に影響を及ぼすであろうという観点から、ホッケ魚肉の加熱ゲル形成について、死後直後もしくは硬直硬直初期の高鮮度なホッケを用い、予備加熱による坐り効果の発現の可能性、およびゲル形成能の冷蔵貯蔵による低下について詳細に検討した。この際、坐り効果に重要な役割を果たす魚肉中の TGase 活性の変化も追跡した。さらに、顕著な「坐り効果」を示す代表的な魚種であるスケトウダラの TGase とその特性および熱安定性を比較した。第 4 章では、第 3 章において確認された高鮮度なホッケ落とし身のミオシンの架橋反応、坐り効果をいかに保持できるかについて検討した。すなわち、ホッケ落とし身の冷蔵、冷凍保管中における TGase 失活およびミオシンの変性を抑制するための手段を開発した。さらに、このような高機能ホッケ落とし身の利用の試みとして、市販冷凍すり身に添加した時のゲル形成向上についても検討した。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

研究に使用したウロコメガレイ *scaleye plaice (Acanthopsetta nadeshnyi)*, ホッケ *arabesque greenling (Pleurogrammus azonus)*, スケトウダラ *walleye pollack (Theragra chalcogramma)*, アカガレイ *flathead flounder (Hippoglossoides dubius)*, ソウハチ *pointhead flounder (Cleisthenes pinetorum herzensteini)*, スナガレイ *sand flounder (Limanda punctatissima)*, ブリ *yellowtail (Seriola quinqueradita)*, シロサケ *chum salmon (Oncorhynchus keta)*, クロソイ *jacopever (Sebastes schlegeli hilgendorf)*, および, ハツメ *oweston sting fish (Sebastes oustoni)*は, 日本海近海の底びき網, もしくは刺し網等で漁獲されたものを使用した。また, オクカジカ *plain sculpin (Myoxocephalus jaok)*は釧路沖, イカナゴ *Japanese sand eel (Ammodytes personatus)* はオホーツク海で漁獲された高鮮度なものを使用した。活魚は, 函館市内の鮮魚店からアイナメ *fat greenling (Hexagrammos otakii)*, ケムシカジカ *sea raven (Hemitripterus villosus)*, ブリを購入した。また, スケトウダラ, ホッケ, ナガヅカ *long shanny (Stichaeus grigorjewi)*の冷凍すり身は北海道内のすり身工場から直接購入し, -25°C で凍結保管した。

モノダンシルカタベリン(*Monodansylcadaverine, MDC*)), および *N, N*-ジメチルカゼイン(*N, N*-dimethylated Casein, MC)はシグマアルドリッチジャパン社, E-64 (*N*-[*N*-(*L*-3-Trans-carboxirane-2-carbonyl)-*L*-leucyl]-agmatine), および, pepstatin A はペプチド研究所, アガロース(スーパーLM)はナカライテスク社をそれぞれ用いた。その他の試薬は和光純薬の特級を用いた。

2. 実験方法

(1) ホッケの冷蔵貯蔵

第2章では, 2013年8月に日本海沿岸の刺し網漁で漁獲されたホッケを用いた。水揚げ後, かけ氷保管されたホッケを実験室に搬入して試料とした。冷蔵貯蔵は, ラウンド状態のまま, 乾燥防止のため魚体表面をビニールシートで覆い,

5°C 冷蔵庫で 6 日間保管した。第 3 章では、2014 年 5 月に日本海沿岸の底びき網で漁獲されたホッケを用いた。水揚げ後の死後硬直中のホッケを実験室に搬入して試料とし、5°C 冷蔵庫で保管した。

(2) ホッケ落とし身の調製と冷蔵、冷凍貯蔵

ホッケ落とし身の調製は、魚体から普通肉を採取し、包丁で切切後、ミートチョッパー(目合 3.6 ϕ mm)を通して落とし身とした。この落とし身に 10%(w/w)ソルビトールを添加し、よく攪拌した後、水氷中で 2 時間放置してソルビトールを溶解させた。その後、この落とし身(250g)をラップに包み、プラチック製のフリーザーバックに詰め、-25°C と -80°C の凍結庫に貯蔵した。

(3) ウロコメガレイ冷凍すり身の調製

ウロコメガレイ冷凍すり身の調製は、北海道内のすり身工場で行われている製造工程に準じて行った。すなわち、魚体を水道水で洗浄し、包丁で頭部と内臓を除去した後、魚体を再度水道水でよく洗浄した。その後、ロール式(目合 4 ϕ mm)の魚肉採肉機(SY-100, ヤナギヤ社製)により魚体から採肉した。採肉機により得られた落とし身は、4 倍量(w/w)の冷水道水による水晒しを 3 回行った。水晒しは 18 L ポリ容器で 1 回あたり 3 分間緩やかに攪拌した。なお、3 回目の水晒しは 0.2 %食塩水を用いることにより、脱水を促進させた。水晒し後の脱水は遠心分離(H-122, コクサン社製)を 3000 rpm で 20 分間行い、得られた脱水肉に 6% (w/w)ソルビトールと 0.3% (w/w)ポリリン酸を加えてすり身とした。

(4) 落とし身および冷凍すり身からの肉糊および加熱ゲルの調製

落とし身もしくは冷凍すり身に 3.0% (w/w) になるよう NaCl を添加し、サイレントカッター(花木製作所製)もしくは小型フードカッター(オスター製)で 10~15 分間塩すりした。すり上がり後の肉糊の温度は 10°C 以下とした。肉糊は折径 48 mm のポリ塩化ビニリデンチューブに充填し(150g/本)、直ちに 90°C で 30 分間加熱し、直加熱ゲル

を作製した。あるいは、所定の条件で予備加熱したのち 90°C で 30 分間加熱し、二段加熱ゲルを作製した。なお、加熱はいずれも恒温水槽中で行った。加熱ゲルは、速やかに氷水中で冷却し、25°C で一夜保管後、分析に供した。

(5) 肉糊のミオシン架橋反応と MDC 取り込み能の測定

落とし身および冷凍すり身から調製した肉糊をガラス製シャーレ上に乗せ、パラフィルムを被せた後、25°C 恒温水槽で加温した。この肉糊の一部を所定の時間で採取(0.1 g)し、2 ml の SDS-UM 溶液(8 M urea, 2% SDS, 2% mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl (pH7.5))を加えて、一晚室温で溶解した。ミオシン架橋反応の解析は SDS ポリアクリルアミド電気泳動、もしくはアガロースを含む SDS ポリアクリルアミド電気泳動で行った。また、第 3 章では、肉糊の一部(1.0 g)に 2 mM MDC(終濃度)を混合後、25°C 恒温水槽で加温し、上記と同様に所定の時間で採取し、SDS-UM に溶解した。MDC 取り込みは SDS-PAGE 後のゲルに UV 照射し、MDC を取り込んだバンドを検出した。

(6) 加熱ゲルの物性測定

加熱ゲルの物性測定は冷凍すり身品質検査基準に準じて測定した(西岡 1993)。すなわち、加熱ゲルを 25 mm 幅に輪切りにし、5 φ mm の球形プランジャーを装着したレオメーター(T2010 J-CW, レオテック製)により破断強度(g)と破断凹み(cm)を測定した。試料台の上昇速度は 1 分間に 60 mm とした。

(7) 冷凍すり身の理化学分析

水分含量は常圧乾燥法、粗タンパク質量はケルダール分解法、粗脂肪はソックスレー抽出法、灰分は 550°C 直接灰化法により測定した。白色度および夾雑物は、冷凍すり身品質検査基準に準じて測定した(西岡 1993)。すなわち、白色度は、分光測色計(CM-700D, コニカミノルタ製)で測定した L*値, a*値及び b*値から次式により算出した。

$$\text{白色度} = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

また、夾雑物の測定はガラス板にすり身を 1 mm 以下に薄く伸ばし、肉眼でみえる夾雑物を数えた。なお、夾雑物は 2 mm 以上の大きさのものは 1 個、2 mm 未満の大きさのものは 1/2 個とした。

(8) 魚肉からの定量的な筋肉ホモジネートの調製

魚肉および冷凍すり身中のミオシン変性などを調べるために、筋肉ホモジネートを用いた。ホモジネートの調製は、今野ら(2014)の方法に準じて行った。すなわち、包丁で細切した魚肉あるいは半解凍状の冷凍すり身に 0.05 M もしくは 0.1M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5)を加えて数回洗浄した後、氷水で冷却しながら、同 Buffer でヒスコトロン(NS-8, マイクロテック・ニチオン製)を用いて、30 秒の冷却時間を間に入れながら、30 秒ずつ 4 回ホモジナイズした。その後、消泡のため n-Octyl alcohol を 10 μ l 加え、ホモジネート中から気泡を追い出し、懸濁液を得た。この懸濁液を 2 層のガーゼでろ過したものをホモジネートとして使用した。また、便宜上、この方法で調製したホモジネートを筋原線維(Mf)と呼ぶことにする。

(9) Mf の Ca^{2+} -ATPase 活性の測定

Mf の Ca^{2+} -ATPase 活性は、0.5 M KCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH7.0)からなる反応組成液を用い、反応温度 25°C で測定した。反応停止は過塩素酸 (PCA)を最終濃度 5%になるように加えて行い、ATP の加水分解の結果生じた無機リン酸を比色定量した。(吉富と今野 1982)

(10) Ca^{2+} -ATPase の失活速度の測定

Mf の加熱変性速度は加熱による Ca^{2+} -ATPase の失活速度を指標として求めた。この際、アクチンによって安定化を受けている条件である 0.05 M NaCl 存在下、およびアクチンによる安定化を失い、ミオシンそのものの変性速度を求めることができる 1.5 M NaCl の条件下での Mf の Ca^{2+} -ATPase の失活速度を測定した。Mf 懸濁液を試験管に採り、適当な温度で経時的に加熱した。所定の加熱時間後、氷水中にて加熱を停止さ

せ、上記の条件で Ca^{2+} -ATPase 活性を測定した。得られた活性が一次反応に従うと仮定し、残存活性の対数値を加熱時間に対してプロットした得られた直線の傾きから失活速度を算出した。(大泉ら 1981)

(11) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法

SDS-PAGE は 0.1 % SDS を含む 7.5 % アクリルアミドゲルを用いて、Leammli (1970) の方法に準じて行った。電気泳動後のタンパク質のバンドは、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R250) で染色し、50 % メタノール-7 % 酢酸で脱色した。

(12) アガロースを含む SDS-PAGE 法

HC の架橋重合により形成された多量体の分離は、今野と今村 (2000) の方法に従い、0.5%アガロースで補強にした 3%ポリアクリルアミドを支持体とするスラブゲルを使用した。まず、電気泳動用アガロース(スーパーLM, ナカライテスク製)をゲル緩衝液に沸騰水中で溶解した。その後、アガロースが凝固しない 40°C まで温水中で冷却した。それにアクリルアミド溶液(電気泳動用 HG, ビス比 20:1, 和光純薬工業製), 重合剤を連続して添加し、直ちにガラスプレートの間に流し込み、コームを差し込み、アクリルアミドを重合させた。アクリルアミドが重合した後、そのガラスプレートを水温 20°C 以下の水中に移し、アガロースを凝固させた。その後の電気泳動の操作は、通常の SDS-PAGE と同様に行った。また、SDS-PAGE 後の染色等も同じ操作で行った。

(13) 魚肉からの TGase の抽出と活性の測定

魚肉あるいはすり身に 2 倍量(v/w)の 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH7.5)を添加後、ヒスコトロン(NS-8, マイクロテック・ニチオン製)により氷水冷しながら粉碎した。その後、遠心分離(20,000 x g, 20 分間)により得られた上澄み液を粗酵素液とした。なお、実験によっては 1 M ソルビトールを添加した抽出液を用いた。

TGase 活性は Araki and seki の方法(1993)に準じて測定した。すなわち, 2 mg/ml MC, 0.5 mM MDC, 5 mM CaCl_2 , 5 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH7.5)の反応混合液(2 ml)

に粗酵素液(0.4 ml)を添加後, 25°C で 30 分間反応させた。10% (w/w)トリクロロ酢酸 (2 ml)を添加し, 反応を停止させた。変性タンパク質沈殿を遠心分離(3,000 x g, 10 分間)により回収し, エタノール-ジエチルエーテル混合液(1:1)で 4 回洗浄して, 未反応の MDC を除去した。洗浄した沈殿は自然乾燥後, SDS-UM に溶解した。この SDS-UM 液の 480 nm での蛍光強度 (励起波長 350 nm) を蛍光分光光度計 (F-2000, 日立製) により測定し, タンパク質に結合した MDC 量を定量した。また, 30 分間に 1 mg の MC に 1 nmol の MDC が結合する活性を 1 unit とした。

(14) 粗 TGase を用いた Mf 中のミオシン架橋重合の解析

TGase 粗酵素は前述した方法に準じて調製した。魚肉を 2 倍量(v/w)の 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 M ソルビトール中で, ヒスコトロン(NS-8, マイクロテック・ニチオン社製)により氷水冷しながら粉碎した。遠心分離(20,000 xg, 20 分間)により得られた上澄み液を透析チューブ(分画分子量 10,000, スペクトラ製)に充填し, 氷中で激しく攪拌しながら同 Buffer に対して 4 時間透析を行った後, 遠心分離(20,000 xg, 20 分間)し, 得られた上澄み液を粗酵素液として用いた。短時間の透析を行ったのは透析中に酵素活性が失活するのを防ぐためである。

ホッケ, スケトウダラおよびナガヅカの Mf 調製は, 基本的には上記(8)の筋肉ホモジネートの調製に準じて行ったが, ホッケについては脱脂のため, Mf 調製前に 10 倍量(v/w)の 1% (w/w)トリトン X-100 を含む 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5)で 1 回洗浄したものを試料とした。なお, Mf のタンパク質量はビウレット法(Gornall ら 1949)により測定し, 4.0 mg/ml に調整して使用した。

粗酵素液による Mf 中のミオシンの架橋重合反応は石田らの方法(2013)に準じて行った。すなわち, 粗酵素液(0.5 ml)に上記の Mf (0.25 ml)を加え, 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1 mM E-64 の組成液からなる反応組成液中で 25°C において反応を行った。反応の停止は, 反応液と等量の SDS-UM 液を加えることにより行った。さらに, 一晚室温で放置し, タンパク質を可溶化し, アガロースを含む SDS-PAGE でミオシンの重合反応を解析した。

(15) ホッケおよびスケトウダラ TGase の熱安定性とソルビトール安定性の解析

ホッケもしくはスケトウダラの魚肉から上記(13)に準じて抽出した粗酵素液を試験管に分注し(1 ml), 種々の温度に設定した恒温水槽中で 30 分間加温した後, 直ちに氷水中で冷却して TGase 活性の測定に用いた。また, ソルビトール安定化の試験では, ソルビトール濃度(終濃度)が 0.25 M, 0.5 M, 1.0 M になるように調整した粗酵素液を調製した。この粗酵素液を 5°C 保管し, 経時的に TGase 活性を測定した。

(16) ATP 関連化合物の測定

ホッケをラウンドのまま 5°C の冷蔵庫で保管し, 経日的に 4~6 尾を無作為に選び, それぞれの魚体から普通肉を採取し, ミートチョッパーで均一に混合粉碎した。魚肉からの ATP 関連化合物の抽出は, 胡らの方法(2013)に準じて行った。すなわち, 魚肉 1 g に 5%過塩素酸を 10 ml 加え, 50 ml ポリ遠沈管内でガラス棒でつぶしながら 15 分間抽出した。この抽出液に一定量の 1 M KOH 溶液を加えて, pH 3.0 前後に調製した後, 一定量の蒸留水を加え 20 ml とした。その後, 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過した抽出液 4 ml に, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.5) 1 ml を加えて分析試料とした。ATP 関連化合物の分析は, 高速液体クロマトグラフ(HPLC システム, 日立製)により, 分析カラムは Shodex Asaahipak GS-320HQ (shodex)を用い, リン酸緩衝液(pH2.8)のアイソクラティック法で行った(Matsumoto and Yamanaka 1990)。

実験結果

第1章 北海道産各種低利用魚のすり身原料としての可能性の探索

北海道の沖合底びき網漁業や刺し網漁業では、鮮魚としてあまり利用されていないウロコメガレイ、大型イカナゴ(以下オオナゴ)、カジカ類が相当量混獲の形で漁獲されている。オオナゴの水揚げ量は年間1万数千トンで、稚内地域で高付加価値化への取り組みも進められているが、その多くは価格の安い養魚用餌料に向けられている。ウロコメガレイやカジカ類に至っては、利用価値が低いので漁獲後直ちに海へ戻されているのが現実である(海中還元)。そのため正確な漁獲量は把握できていないが、混獲による推定漁獲量として前者で約300トン、後方で500~1,000トンと考えられている。

本研究では、これら低利用資源の魚肉タンパク質を利用する形態として鮮魚での流通は難しいので、魚肉の特性を活用したすり身原料としての可能性を探った。ゲル形成を担うこれらの魚種の筋肉タンパク質ミオシンの熱安定性を中心に基礎的な知見を得た。さらに、実際にすり身を製造し、ゲル化特性の把握とすり身製造条件について検討した。

第1節 低利用魚のすり身原料としての評価

(1) 筋原線維 Ca^{2+} -ATPase の熱安定性

すり身のゲル化は筋肉タンパク質ミオシンの加熱による制御された変性工程であることができる。この際、すり身中のミオシンがすでに変性していれば、優れたゲルを形成しないこともよく知られているので、すり身を製造する魚種のミオシンがどのような安定性を有しているかを知ることは重要な問題である。環境水温に適応した結果、ミオシンがその生息水温で機能できるように、水温に依存した柔軟性を有するように変化した。その結果として、低水温である寒帯に生息する魚種のミオシンは

ど脆弱な構造を持つようになり、不安定であるという評価になる(橋本ら 1982)。本研究で対象としたウロコメガレイ、オオナゴ、オクカジカは、いずれも北海道の冷水域に生息するため、そのミオシンは不安定であることが予想される。すり身原料魚として重要であり、不安定なミオシンを有することが知られているスケトウダラのみオシンとこれら魚種のミオシンの特性を比較した。ミオシンの安定性を議論するとき、ミオシンはアクチンとの結合により、安定化されるという性質があるので、ミオシンそのものの安定性とアクチン複合体として安定化を受けている場合の安定性に分けて議論する必要がある。前者は、すり身において食塩と同時に重合リン酸を加え、アクチンによる安定化が失われた場合の変性の指標となる。後者は、原料魚での貯蔵中のミオシン変性の指標となる。

これら二つの条件のミオシン変性は、筋原線維(Mf)を用いて測定することができる。Mf は、魚肉を生理的な条件でホモジナイズし、その後、同液で洗浄を繰り返すだけの簡便な操作で調製できるので、非常に有用な筋肉モデル研究試料として重宝される。NaCl 濃度が 0.05-0.1 M の条件では Mf 中でミオシンはアクチンにより強く安定化を受けている。また、1.5-2 M のような高濃度の NaCl を添加すると、アクチンが選択的に変性し、ミオシンはアクチンによる安定化を失うので、ミオシンの単離なしに Mf を用いてミオシン単独の熱安定性を測定できる(若目田ら 1983, 1984, 1986)。ミオシンの変性は Ca^{2+} -ATPase 失活速度 (k_D)から検討した。

Fig. 1-1 に 25°C における 3 魚種のミオシンの安定性を比較した。0.05 M NaCl 条件下での加熱では、これら 3 魚種の Mf の k_D はスケトウダラの k_D とほぼ同じオーダーの値を示し、予想通りスケトウダラと同等の安定性を示すことがわかった。スケトウダラの k_D を 1.0 とすればウロコメガレイは 0.9, オオナゴは 0.4, オクカジカは 1.4 の k_D を示した。

ミオシン単独の熱安定性を 1.5 M NaCl での Mf の k_D から比較した。スケトウダラ Mf の k_D に比べ、ウロコメガレイは 2.0, オクカジカは 7.0 の k_D を示した。一方、オオナゴはスケトウダラとほぼ同じ 1.0 を示した。寒帯産のスケトウダラは不安定なミオシンを有することが知られている代表的な魚種であるが、本研究で用いた魚種のミオ

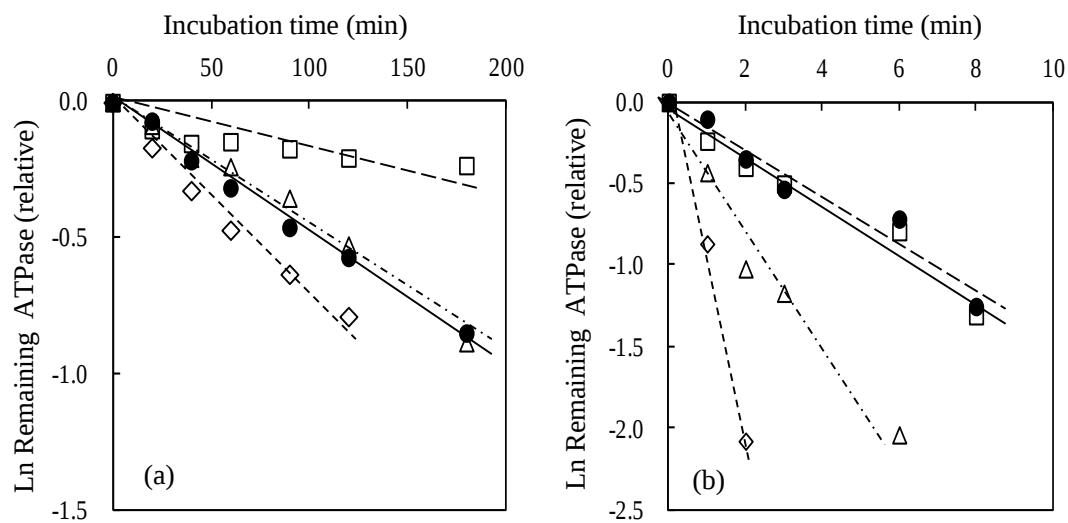


Fig. 1-1 Comparison of thermal stability among several fish species. Mf suspended at 0.05 M (a) or 1.5 M NaCl (b) was heated at 25°C and remaining Ca^{2+} -ATPase activity was analyzed by assuming the first order reaction mechanism. The fish species used are walleye pollack *Theragra chalcogramma* ($\bullet$), scaleye plaice *Acanthopsetta nadeshnyi* (Δ), plain sculpin *Myoxocephalus jaok* ($\diamond$), and Japanese sand eel *Ammodytes personatus* ($\square$). Ca^{2+} -ATPase activity was measured at 25°C in the reaction medium containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH7.0).

シンはスケトウダラのみオシンと同等かさらに不安定であることがわかった。今回用いた魚種の貯蔵ではスケトウダラと同等の配慮が必要である。

0.05 M および 1.5 M NaCl における Mf の示す Ca^{2+} -ATPase 失活速度の差はみオシンがアクチンにより安定化を受けている程度の指標になる。すでに、この程度が魚種により異なることが若目田らによって報告されている(若目田ら 1983, 1984, 1986)。この程度が、スケトウダラでは約 30 倍であったのに対し、ウロコメガレイ、オクカジカ、オオナゴはそれぞれ 78 倍、159 倍、96 倍であり、3 魚種ともアクチンによる安定化がスケトウダラよりも大きい魚種であることがわかった。

(2) 加熱ゲルの物性と架橋反応

これら 3 魚種の魚肉がどのようなゲル化特性を有しているか、特に予備加熱による坐り効果が検出されるか調べた。それぞれの魚肉からスケトウダラ冷凍すり身製造に準じて、水晒し処理を 3 回行った冷凍すり身を製造し、それを材料に加熱ゲル化特性を検討した。はじめに、各すり身に 3%(w/w)になるよう NaCl を添加して肉糊を調製した。この肉糊約 100g を塩化ビニリデンチューブ(折径 48mm)に充填後、90°C で 30 分間加熱して「直加熱ゲル」を調製した。また、25°C あるいは 30°C で予備加熱(坐り)を行った後に 90°C で 30 分間加熱し、「二段加熱ゲル」を調製した。それぞれの加熱ゲルの「破断強度」と「破断凹み」を測定し、ゲル化特性を検討した。なお、肉糊の予備加熱条件は予備実験の結果から、最大限の効果が得られたウロコメガレイでは 25°C で 6 時間、オクカジカとオオナゴでは 30°C で 3 時間とした。

Fig. 1-2 に 3 魚種の直加熱ゲルと二段加熱ゲルの破断強度と破断凹みを示した。ウロコメガレイから製造した直加熱ゲルおよび二段加熱ゲルの破断強度はそれぞれ 235 g, 417g で、予備加熱を導入することにより約 2 倍に増加し、坐り効果が確認された。また、破断凹みも予備加熱により 1.1cm から 1.2cm にわずかに増加した。坐り効果は、魚種により異なり、魚種に固有であると言われている(志水ら 1981)。ウロコメガレイのすり身はスケトウダラと同様にその魚肉は坐り効果が期待できる魚種であることがわかった。一方、オクカジカ冷凍すり身から製造した直加熱ゲル、二段加熱ゲルの破

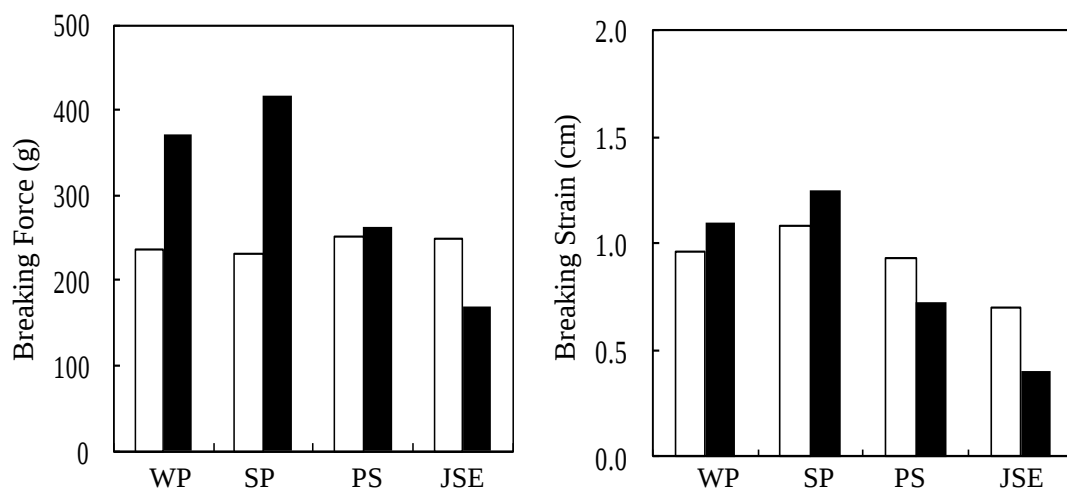


Fig. 1-2 Thermal gel formation by several species of fish meat. Frozen surimi of walleye pollack (WP), scaley plaice (SP), plain sculpin (PS), and Japanese sand eel (JSE) was thawed, and ground with 3.0% NaCl. The salt-ground surimi was heated at 90°C for 30 min (white columns). The same ground surimi was preheated at 25°C for 6 h (WP,SP) or at 30°C for 3 h (PS,JSE) and heated at 90°C (black columns). Breaking force and breaking strain of the gels were measured by using the rheometer equipped with ϕ 5mm cylindrical plunger.

断強度はそれぞれ 253 g, 263g で、予備加熱による破断強度の増加はほとんど認められなかった。また、破断凹みは予備加熱をすることにより 0.9cm から 0.7cm に低下した。オオナゴについては、直加熱ゲルが 250 g の破断強度を示したが、二段加熱ゲルでは 170g に低下した。破断凹みも 0.7cm から 0.3cm に低下したので、予備加熱はゲル物性を劣化させる効果しかないことがわかった。すでに予備加熱の効果について、「坐り効果が認められる」、「坐り効果がほとんどない」、「逆にゲル物性を劣化させる」と大まかに 3 種に分類されるが、ここで用いた 3 種は、たまたまこれら 3 種に分類された。

魚肉肉糊の予備加熱中にミオシン重鎖(HC)の架橋重合体が形成され、その進行が坐り効果、あるいは加熱ゲルの物性増加には大きく関係していることが報告されている(沼倉ら 1985, 1989, 1990)。今回用いた 3 魚種のすり身は異なる予備加熱効果が得られたため、肉糊の予備加熱中における HC の変化を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により検討した結果を Fig. 1-3 に示した。アガロースを含む SDS-PAGE において、対照として用いたスケトウダラ冷凍すり身は、予備加熱により HC 単量体が減少し、移動度が小さい架橋重合体が泳動ゲル上部に確認された。ウロコメガレイの場合も、スケトウダラとよく似た変化を示し、HC の架橋重合体と考えられる HC より移動度の小さな複数のバンドが検出された。さらに、スケトウダラの場合は予備加熱により HC より移動度の大きい HC の分解物と思われるバンドの生成が認められたが、ウロコメガレイのすり身ではほとんど認められなかった。

一方、オクカジカとオオナゴの場合は、7.5%ポリアクリルアミドのスラブもしくはディスクゲルによる SDS-PAGE でそれぞれ測定しているため、HC の架橋重合体の確認はできない。しかし、オクカジカでは HC 上部に検出されるバンドに変化がなく、逆に HC の下に分解物と思われる新たなバンドが形成されている。オオナゴの場合も HC 上部の変化は認められず、予備加熱の経過に伴い HC バンドは減少した。そして、予備加熱 6 時間後には HC のバンドはほとんど消失した。オオナゴすり身から製造した二段加熱ゲルは予備加熱により破断強度と破断凹みが顕著に低下したが、予備加熱中のミオシン分解がその大きな理由であろうと推定した。

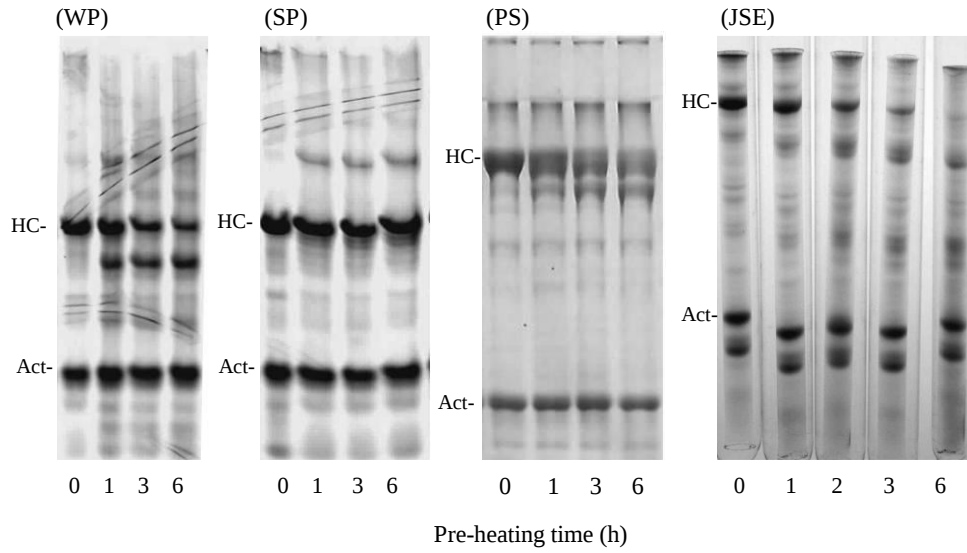


Fig. 1-3 Cross-linking and degradation of myosin during the preheating step of salt-ground surimi.

The same pre-heated salt-ground surimi as in Fig. 1-2 were used for the analysis. The incubated surimi was dissolved into 20 volumes of solution consisted of 2% SDS, 8 M urea, 5% mercaptoethanol, 50 mMTris-HCl (pH7.5). Changes in SDS-PAGE patterns upon incubation at 25°C or at 30°C were analyzed on 3% polyacrylamide-0.5% agarose slab gel, or 7.5% polyacrylamide gel. The same abbreviations as in Fig. 1-2 were used for showing fish species. MHC, myosin heavy chain; Act, actin.

(3) ウロコメガレイすり身の二段加熱ゲル特性に及ぼす予備加熱温度の影響

ウロコメガレイ冷凍すり身(タンパク質濃度 13.5%)に 3%(w/w) NaCl を添加し、サイレントカッター(花木製作所製)を用いて肉糊を調製した。肉糊はポリ塩化ビニリデンチューブに充填した後、10、20、30、および 40°C の恒温水槽中で予備加熱を行い、直ちに 90°C で 30 分間加熱して二段加熱ゲルを調製した。得られた直加熱ゲルおよび、二段加熱ゲルの破断強度と破断凹みを測定した。

Fig. 1-4 に示すように、直加熱ゲルの破断強度は 354g、破断凹みは 1.1cm であった。10°C および 20°C で予備加熱をすると加熱時間の経過により破断強度は増加し、10°C では 48 時間後に 734g に達した。20°C ではそれより短い 24 時間後に 762g まで上昇し、いずれも、直加熱ゲルの破断強度の 2 倍以上まで増加した。一方、30°C および 40°C の場合は、物性上昇は短時間で認められたが、10°C や 20°C に比べて、破断強度の増加は小さく、加温時間を長くすると破断強度の低下が起きた。30°C では 3 時間の予備加熱で最大値の 607g に達し、40°C ではより短時間の 1 時間の予備加熱により最大値の 470g を示した。

予備加熱による破断凹みの変化に関しては、10°C および 20°C では破断強度が最大値に達する時間より早い 12 時間後に最大値 1.2~1.3cm に達し、その後はその値を維持した。30°C での予備加熱では破断強度が最大値に達する 3 時間で破断凹みも最大となり 1.3cm まで増加した。しかし、20°C と異なり、加熱時間をさらに延長しても減少するだけであった。また 40°C では破断凹みに顕著な変化がみられなかった。これらの結果から、ウロコメガレイの坐り特性を最大限に活用するには、20°C 以下で長時間の加温を行うのがよいと思われた。ただし、現実的な練り製品製造を考えた場合、十分な効果が期待される多少高温の 30°C で短時間予備加熱するのがよい選択かもしれない。

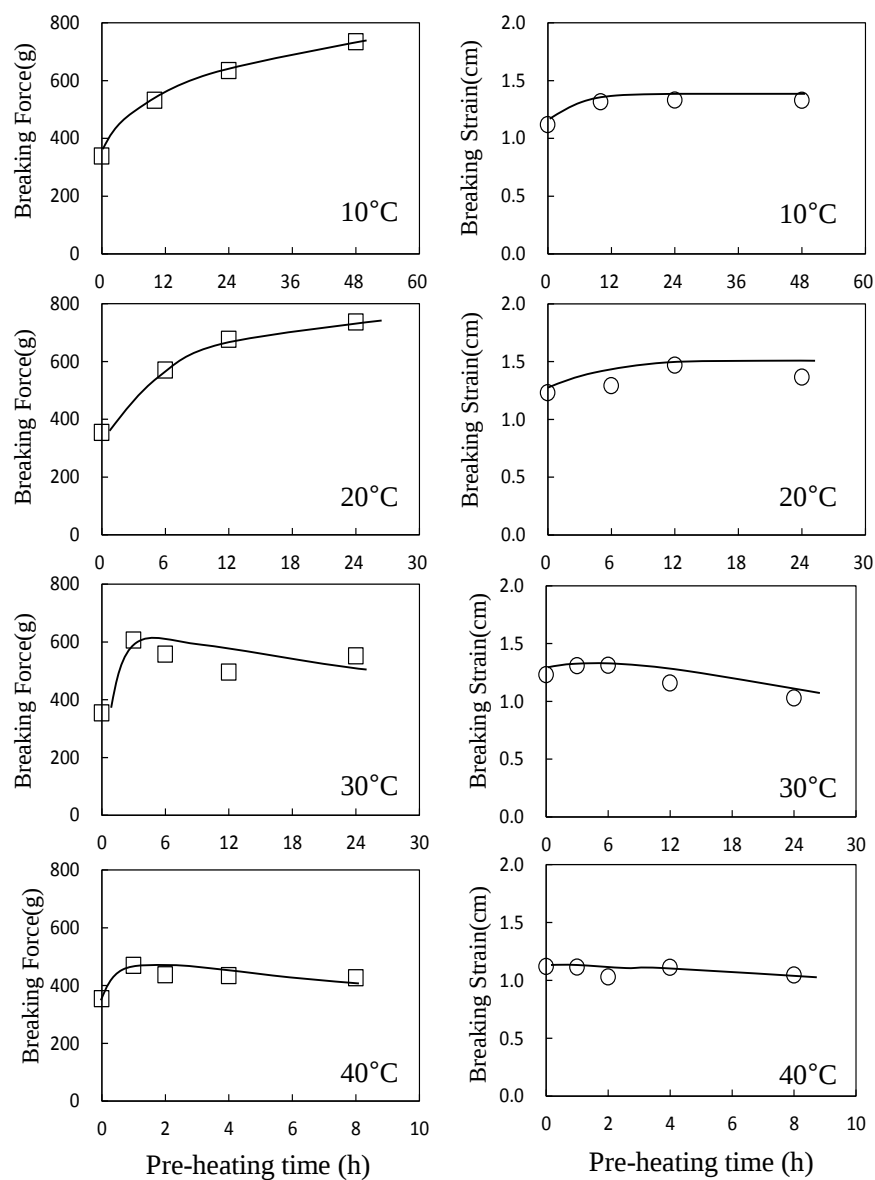


Fig. 1-4 Effect of pre-heating temperature on the setting effect of scaleye plaice surimi.

Salt-ground surimi of scaleye plaice was pre-heated at 0°C, 20°C, 30°C, and 40°C and further heated at 90°C for 30 min. Breaking force and breaking strain of two-heated gels were measured as in Fig.1-2. Pre-heating temperatures are in the figures.

第2節 ウロコメガレイすり身製造試験

ウロコメガレイはスケトウダラと同様な坐り効果を有することが明らかとなったことから、ウロコメガレイすり身製造条件について検討した。すり身のゲル化特性は、原料魚の鮮度や漁獲時期等の原料性状が大きく影響する。さらに、すり身製造時の各種段階での取り扱いによっても影響を受けることが知られている。そこで、ウロコメガレイの原料鮮度が最終生産物である加熱ゲルの物性に与える影響を検討した。

また、ウロコメガレイは、カレイ類独特の平べったい形態を有し、スケトウダラやホッケと異なり、採肉時に魚皮、腹腔内側の「黒皮」および鰭に由来する小骨等の夾雑物が混入しやすいことが予想される。そこで、この独特の形状に配慮し、採肉前の魚体に対して様々な前処理を行い、その方法の違いがすり身品質やすり身中の夾雑物の量に与える影響についても検討した。さらに、ウロコメガレイの特長である魚肉の白色を活用するため、すり身製造における水晒し回数の影響についても検討した。なお、すり身の品質評価はそこから製造した二段加熱ゲルの破断強度と破断凹み、さらに製品の白色度により評価した。

(1)原料魚の鮮度とすり身品質の関係

マダラ刺し網漁で混獲されたウロコメガレイを実験試料とした。水揚げ当日に研究室に搬入したが、漁獲からの貯蔵方法、貯蔵温度、経過時間に関しては明確ではないが、掛け氷の状態で、漁獲から10時間以内に搬入したと推察している。到着後、直ちに、ポリバットに10kg程度ずつ小分けし、魚体をビニールシートで覆い、かけ氷を施し、5℃の保管庫で保管した。すり身は、前述の実験方法(3)で述べた水晒し処理を3回行う基本的な製法により、搬入当日(0日目)、1日目、2日目および4日目にそれぞれ調製し、-25℃で1週間程度凍結保管した。得られたすり身から肉糊を調製し、ポリ塩化ビニリデンチューブに充填した。予備加熱は25℃で16時間行い、その後90℃で30分間加熱して二段加熱ゲル(最終製品)を調製した。

Fig. 1-5 に 5℃ 保管中の原料から調製したすり身のゲル形成能の変化を示した。搬

入当日に調製したすり身から製造した加熱ゲルの破断強度が最も高く 565g であった。この破断強度は 5℃ 保管の日数経過とともに低下し、保管 1 日目で 553g、保管 2 日目で 467g、保管 4 日目で 431g となった。また、破断凹みも破断強度と同様に保管日数の経過により多少低下し、漁獲当日の 1.5cm から保管 4 日目には 1.3cm となった。宇野ら(1958)はスケトウダラを 5℃ で保管したときのゲル物性の変化を検討し、保管 2 日目で漁獲当日の 80%、保管 4 日目には 64%まで低下することを報告している。この変化は、本研究で用いたウロコメガレイの場合とよく似ているので、ウロコメガレイをすり身原料とする場合、スケトウダラと同様な取り扱いで利用可能と判断された。

(2) 採肉前処理方法の違いによるすり身品質への影響

すり身製造では、採肉機による採肉前に、頭部や内臓を除去する前処理が必要である。スケトウダラやホッケを原魚として用いる北海道のすり身工場では、この魚体処理は、主に人手により行われている。この処理では包丁にて頭部を切り裂き、同時に腹側に斜めに包丁を入れ、頭・内臓・腸の引き抜きを同時に行っている。この方法は腹須部分を残すことから採肉の歩留まりが高くなるが、内臓等が混入する確率も高くなり、採肉前の十分な洗浄が必要となっている(木村 2003)。ウロコメガレイの場合は魚体周縁の柔らかい鰭の混入が考えられることから、採肉前の原魚処理における腹須と鰭の取り扱いの影響について検討した。

Fig. 1-6 に前処理方法の違いによるウロコメガレイ原料の状態を示した。前処理 1 は頭部と内臓のみを除去したもの。前処理 2 は頭部と内臓に加えて、腹須も除去したもの。前処理 3 は頭部、内臓、腹須に加えて鰭も除去したものである。これら前処理方法の違う原料から、同じ採肉機(SY100, ヤナギヤ製)で採肉し、同じようにすり身を製造した。得られたすり身の原料魚に対する歩留まり(水分 80%換算)は、それぞれ 31.0%、26.5%、24.9%であり、前処理で除去部位が多いほど歩留まりは低かった。

Table 1-1 に前処理方法の違いによるウロコメガレイすり身の一般成分と夾雑物を示した。前処理 1 の原料から調製したすり身は、腹須や鰭を除去した前処理 2, 3 のすり身に比べて、水分が 1.4~1.8%低く、逆に粗脂肪が 1.1%高かった。粗たんぱく質は、

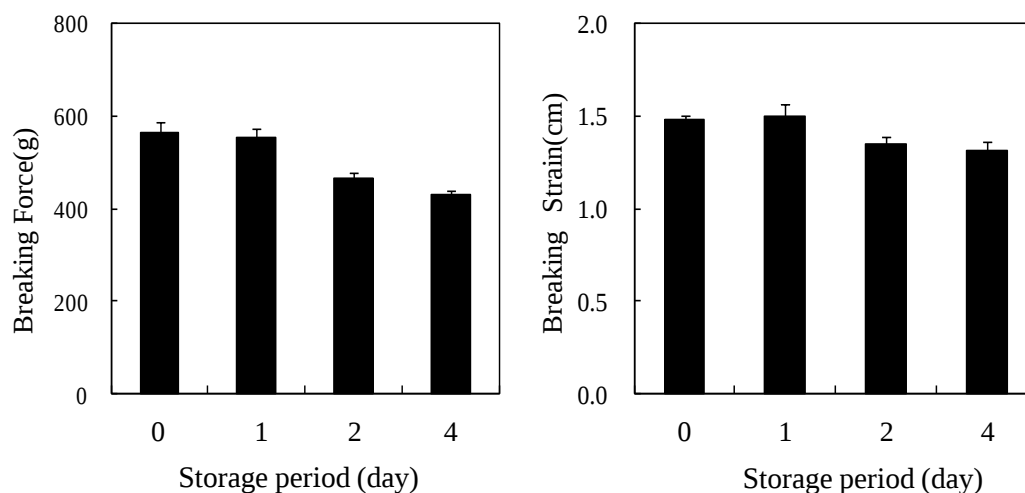


Fig. 1-5 Effect of storage of scaleye plaice for surimi production on their thermal gel properties.

scaleye plaice was stored at 5°C up to 4 days and surimi was produced. Two-step heated gels were produced as in Fig. 1-4 with pre-heating of salt-ground surimi at 20°C for 12 h and heating at 90°C for 30 min. Breaking force and breaking strain of two-heated gels were measured as in Fig. 1-2.

(Method 1)



(Method 2)



(Method 3)



Fig. 1-6 Pre-processing of scaleye plaice for surimi production. headed and gutted (Method 1) ; headed, gutted, and removal of belly parts (Method 2) ; headed, gutted, and removal of belly parts and fin (Method 3).

Table 1-1 Chemical compositions and contaminant content for scaleye plaice surimi made from fish with various pre-processing.

	g/100g				piece/10g
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	contaminant
Method 1	77.2	12.0	4.7	0.6	20
Method 2	78.6	11.8	3.6	0.6	17
Method 3	79.1	11.4	3.6	0.6	12

Method 1, 2, and 3 are the same as in Fig. 1-6. Contaminant includes pieces of small bone, black inner skin, and fin.

前処理 1 が 12.0%，前処理 2 が 11.8%，前処理 3 が 11.4%で，前処理方法の違いによる大きな差はなかった。

すり身 10g 中に混入している夾雑物は，前処理 1 は 30 個検出され最も多く，前処理 2 が 14，前処理 3 が 11 であった。市販スケトウダラ陸上 2 級冷凍すり身の夾雑物を同様に調べたところ，夾雑物は 19 であった。それゆえ，少なくとも前処理 1 では市販スケトウダラすり身レベルの品質を得ることが出来ないが，前処理 2 あるいは前処理 3 では十分そのレベルまで夾雑物を含まないすり身を製造することが可能であることが確認された。

次に，前処理方法の違いによるゲル物性への影響について比較した。Fig. 1-7 に前処理方法の違いによる二段加熱ゲルの破断強度，破断凹みおよび白色度を示した。破断強度は前処理方法の違いによる差がなく，前処理 1 が 437g，前処理 2 が 467g，前処理 3 が 440g であった。また，破断凹みについても差は認められず，それぞれ 1.3cm，1.4cm，1.4cm であった。分光測色計(CM-700D, コニカミノルタ製)により測定した表面の色調(L*値, a*値, b*値)から算出した白色度についても前処理方法の違いにより差は認められず，それぞれ 73，74，75 であった。すなわち，現実的には腹須や鰭の混入の差はさほど白色度に影響を与えないことが示された。対照とした市販スケトウダラ冷凍すり身の白色度は 69 であったので，これよりも白色度において優れたものであった。

これらの結果から，加熱ゲルの物性のみを判断するならば，どのような前処理でも差がないので，より簡単な処理である前処理 1 で十分であろう。しかし，どうしても夾雑物由来による外観が重要な場合は前処理 3 が必要となろう。ウロコメガレイのすり身はスケトウダラ並みのすぐれたゲル形性能を保持しているので，その状況に応じた前処理を採用すればよいと判断された。

(3)水晒し回数がすり身のゲル形成能へ与える影響

冷凍すり身の製造において，水晒しは落とし身の血液成分や臭気成分等を除去し，さらにゲル形成能を阻害する成分を除去し，すり身の色調やゲル物性改善のために重

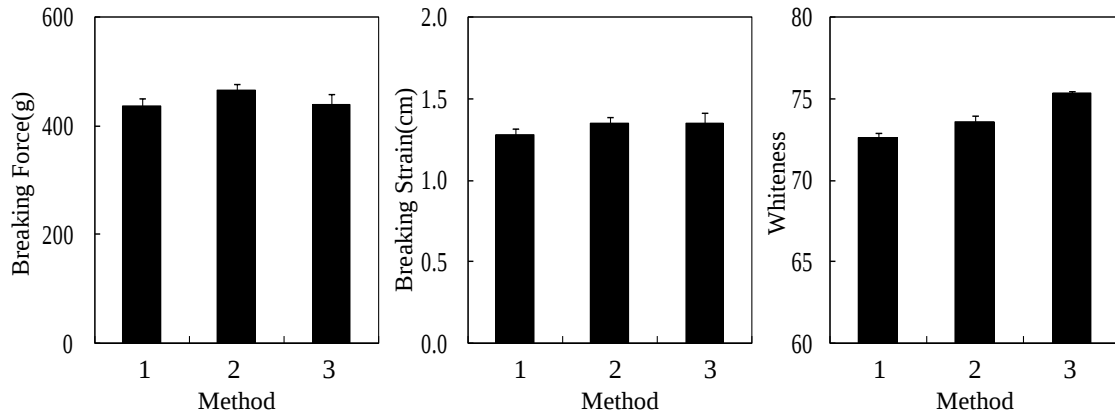


Fig. 1-7 Effect of pre-processing method on the gel properties of the final thermal gel products.

Two step heated gels were produced as in Fig. 1-4 with pre-heating at 25°C for 16 h and heating at 90°C for 30 min. Breaking force, breaking strain , and whiteness of the gel were compared. Method 1, 2, and 3 are the pre-processing methods in table 1-1.

Breaking force and breaking strain of two-heated gels were measured as in Fig. 1-2.

Whiteness index was calculated by the following equation.

Whiteness index = $100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$, where L^* , lightness ; a^* , redness to greenness ; b^* , yellowness to blueness.

要な工程である。ウロコメガレイの特長は魚肉の白色度がスケトウダラに比べて高いことである。その特性を活用するために必要な水晒し回数について検討した。

水晒し試験は、前処理で頭部・内臓を除去した原料から採肉した落とし身を用いた。この落とし身 1,500g に対して 6 L の冷水を加え、3 分間緩やかに攪拌後、2000 rpm で 20 分間遠心分離(H-122 型, コクサン製)し、脱水肉を得た。この操作を 2 回, 3 回, 4 回繰り返した。なお、水晒しの最終回は脱水促進を図るため、冷 0.2%食塩水を用いた。Fig. 1-8 に水晒し回数の違いにより最終的に得られた二段加熱ゲルの破断強度と判断凹み、および白色度を示した。破断強度は水晒し回数が増すにつれ増大傾向となり、2 回晒しが 282g, 3 回晒しが 319g, さらに 4 回晒しでは 333g となった。一方、破断凹みは差が認められず、それぞれ 1.1cm, 1.2cm, 1.2cm であった。白色度は水晒し回数の増加により有意に増加し、2 回水晒しで 70, 3 回水晒しで 71, 4 回水晒しで 72 となった。水晒しの目的として、血液などの着色成分を除くことが指摘されているが、ウロコメガレイの場合もそれが当てはまるようであった。ウロコメガレイのすり身製造では、2 回以上の水晒しをした方が優れたゲル物性の製品が製造できると考えられた。

(4)各種魚類ミオシンの熱安定性

本章で用いた 3 魚種以外にも、北海道周辺では小型魚や、鮮魚としての商品価値が低く、鮮魚として流通されないカレイ類などが混獲などの形で漁獲されている。これらは将来、すり身化を含め、いろいろな目的の加工品の原料として利用される可能性がある。そのため、これら魚種がどの程度の安定性を有するミオシンを含むのかを調べた。それぞれの魚種から Mf を調製し、 Ca^{2+} -ATPase 失活速度(k_D)を指標に検討した。ここでも、アクチンにより安定化を受けている条件(0.05 M NaCl), および、アクチンの保護を失いミオシンそのものの変性速度が求められる条件(1.5 M NaCl)の 2 つの条件で測定した。

Fig. 1-9 に検討したアカガレイ、ソウハチ、スナガレイのカレイ類 3 魚種の結果を示した。アクチンにより安定化を受けている条件でのミオシンの安定性は、スケトウダラ Mf の k_D を 1.0 とすると、アカガレイは 0.1(10 倍安定), ソウハチで 0.3(約 3 倍安定),

スナガレイで 0.1(10 倍安定)であり、すり身化の可能性が示されたウロコメガレイより安定であった。一方、ミオシン単独の安定性をスケトウダラの k_D を 1.0 として比較すると、アカガレイが 2.2, ソウハチが 1.8, スナガレイが 2.2 の大きな k_D を示した。すなわち、これら 3 種のカレイ類は、ミオシンそのものは不安定であるが、アクチンによる安定化が大きい魚種であり、貯蔵性の優位性が示唆された。アクチンによる安定性の程度は、スケトウダラの 30 倍に対して、アカガレイでは 235 倍, ソウハチでは 696 倍, スナガレイでは 677 倍と計算された。これらの値はこれまで検討された魚種の中でもシログチなどを含むアクチンにより大きな安定化を受けるグループに分類される(若目田ら 1983, 1984, 1986)。

さらに、最近の北海道で漁獲量が増加しているブリ *Seriola quinqueradita*, 常に重要魚種であり続けるシロサケ *Oncorhynchus keta* およびクロソイ *Sebastes schlegeli hilgendorf*, および最近注目されているハツメ *Sebastes oustoni* のミオシンの熱安定性を調査した。結果を Fig. 1-10 に示した。アクチンの安定化を受けている条件でのミオシンの安定性は、ハツメを除く魚種でスケトウダラに比べて比較的安定で、ブリが 10 倍, サケが 3 倍, クロソイが 3 倍安定であった。ハツメはスケトウダラとほぼ同じ安定性を示した。また、ミオシン本来の安定性については、ハツメとサケのミオシンの安定性はスケトウダラと同程度であり、ハツメが 1.25 倍, サケが 1.7 倍の k_D を示した。

一方、クロソイとブリのミオシンの安定性は高く、それぞれスケトウダラに比べてそれぞれ 10 倍, 5 倍安定であった。なお、アクチンによる安定性の程度は、先のカレイ類に比べて小さく、スケトウダラと同程度の 16~59 倍であった。

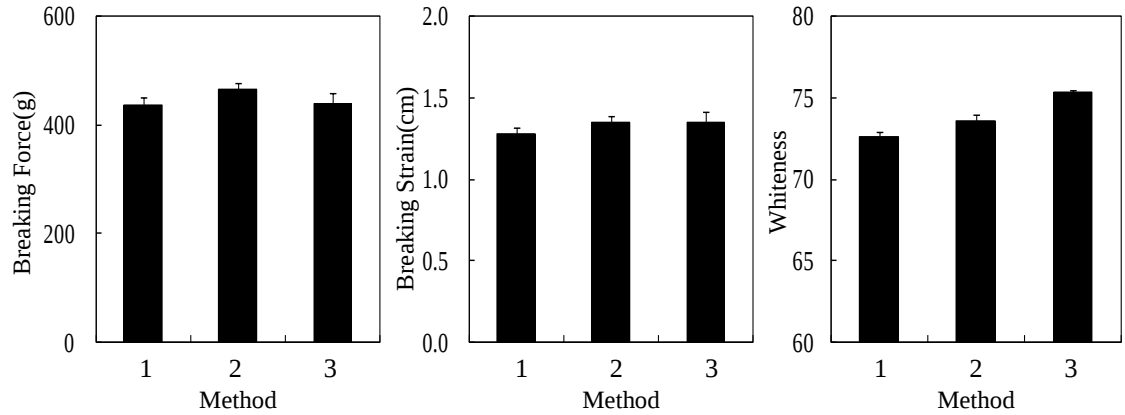


Fig. 1-7 Effect of pre-processing method on the gel properties of the final thermal gel products.

Two step heated gels were produced as in Fig. 1-4 with pre-heating at 25°C for 16 h and heating at 90°C for 30 min. Breaking force, breaking strain , and whiteness of the gel were compared. Method 1, 2, and 3 are the pre-processing methods in table 1-1.

Breaking force and breaking strain of two-heated gels were measured as in Fig. 1-2.

Whiteness index was calculated by the following equation.

Whiteness index = $100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$, where L^* , lightness ; a^* , redness to greenness ; b^* , yellowness to blueness.

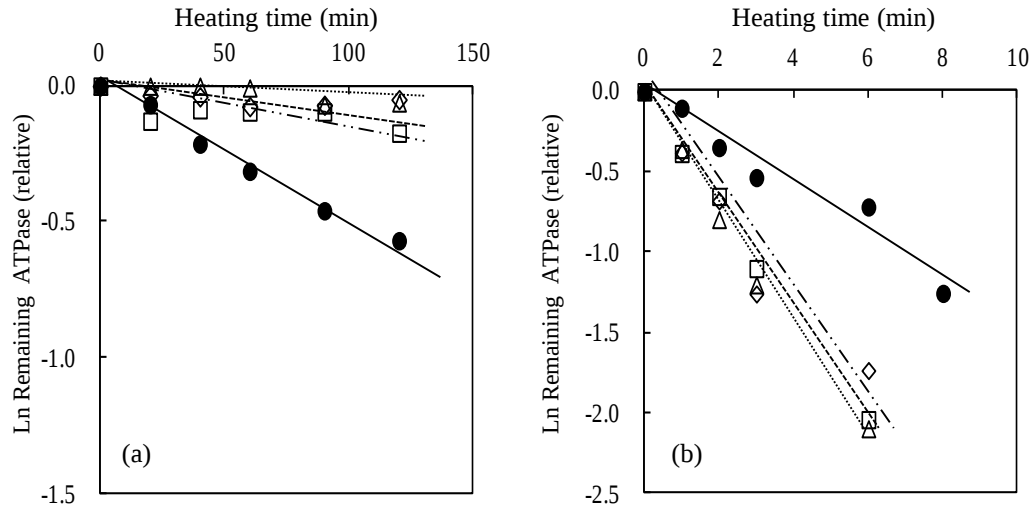


Fig. 1-9 Thermal stability of myosin for various species of flounder. Mf of walleye pollack (●), sand flounder *Limanda punctactissima* (△), pinthead flounder *Cleisthenes pinetorum herzensteini* (◇), and flathead flounder *Hippoglossoide dubius* (□) was heated at 25°C in the presence of either 0.05 M NaCl (a) or 1.5 M NaCl (b). Remaining Ca-ATPase activity was measured. Other experimental conditions are the same as described in Fig. 1-1.

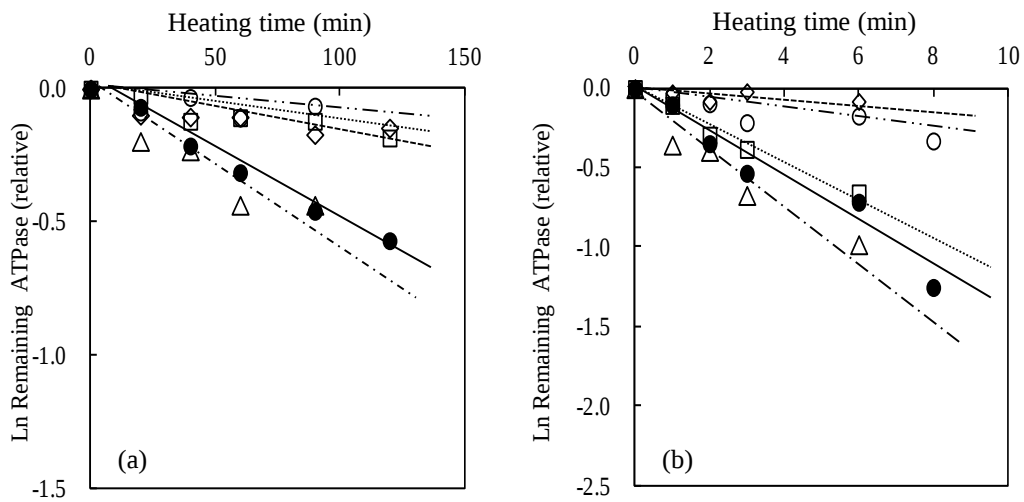


Fig.1-10 Thermal stability of myosin for some fish species.

Fish species used are jacobever *Sebastes schlegeli* ($\diamond$), chum salmon *Oncorhynchus keta* ($\square$), yellowtail *Seriola quinqueradita* ($\circ$), and oweston sting fish *Sebastes oustoni* ($\triangle$). walleye pollack ($\bullet$) was also plotted as a control. (a) and (b) are the same as in Fig. 1-9, and experimental conditions are also the same as in Fig. 1-1.

小考察

本章では、北海道の沖合底びき網漁において比較的多量に混獲される低利用魚のウロコメガレイ、オオナゴ、オクカジカの3魚種について、これらの魚肉のすり身原料としての可能性について検討を行った。はじめに、3魚種の筋肉タンパク質ミオシンの熱安定性についてスケトウダラを対照に比較した。原魚の貯蔵性およびすり身肉糊の貯蔵性を想定し、Mfの熱安定性をミオシンがアクチンにより安定化を受けている0.05 M NaCl条件とミオシン単独の安定性を示す1.5 M NaClの2つの条件で測定した(若目田ら 1983, 1984, 1986)。ミオシン変性速度は Ca^{2+} -ATPase失活速度(k_D)を指標にした。これら3魚種のミオシンの熱安定性はアクチン保護下ではスケトウダラとほぼ同じ値を示したが、ミオシン単独の1.5 M NaCl条件下においてはスケトウダラと同等か、それ以上に不安定であり、スケトウダラと同等の配慮が必要であることを確認(Fig.1-1)した。これら3魚種から製造したすり身のゲル化特性、特に坐り効果の有無について検討したところ、ウロコメガレイのすり身はスケトウダラと同様に、予備加熱の導入により二段加熱ゲルの物性は顕著に増加し、さらに予備加熱中にミオシンの架橋反応が認められ、坐り効果が期待できる魚種であることがわかった。一方、オクカジカとオオナゴについては坐り効果は認められず、特にオオナゴについては予備加熱により逆にゲル物性は低下した(Fig.1-2)。SDS-PAGEにより、オオナゴとオクカジカについては、ミオシンの分解物と思われる新たなバンドが認められた(Fig.1-3)ので、内在性プロテアーゼの影響を考慮する必要がある魚種と判断した。

ウロコメガレイのすり身は顕著な坐り効果を示したので、最適予備加熱条件を調べた。ウロコメガレイのすり身は30°C以下であれば、坐り効果が認められたが、最大の坐り効果が発揮できる温度は長時間の加温が必要であるが20°Cとなった(Fig.1-4)。これはスケトウダラの場合と基本的に同じであった。しかし、現実的にはスケトウダラすり身の肉糊の予備加熱は20°C以下では行われていないので、それに準じれば、ウロコメカレでもスケトウダラすり身で使用されている30°C程度で、短時間に予備加熱を行うことが現実的な対応となろう。

すり身のゲル化特性は、原料魚の性状や製造工程での取り扱いが影響することが知

られている。このため、ウロコメガレイのすり身製造において、原料魚の鮮度、魚体処理方法の違いや水晒し回数がすり身品質に及ぼす影響について検討した。5°C 保管中のウロコメガレイから製造したすり身のゲル物性は保管日数の経過により低下 (Fig1-5) し、原料魚の鮮度低下によるゲル物性への影響が大きいことがわかった。また、すり身の夾雑物と白色度はすり身品質あるいは価格を決定する重要な指標である (西岡 1993)。ウロコメガレイやヒラメ等の異体類はその形態から採肉時に魚皮や小骨などの混入がスケトウダラ等の他の魚種に比べて多くなると予想されたので、一般的な頭部と内臓除去の前処理に加え、腹須や鰭を除去する前処理方法の有効性について検討した。腹須、鰭除去を行う前処理方法は夾雑物の混入が少なかったが (Table.1-1)、ゲル物性および白色度への影響はほとんどなく (Fig.1-7)、歩留まりを考慮すると、ここまでの前処理は必要がないのではないかと推定した。ただし、どうしても異物の除去が必要となれば、それに応じた腹須、鰭除去を伴う処理を採用すればよい。すり身製造工程の水晒しは製品の白色度向上に寄与し、肉眼的にも白色度が上昇したと確認された。

本章では、上記 3 魚種以外の 7 魚種についてもミオシンの熱安定性について検討した。これら 7 魚種のゲル化特性は検討しなかったため、すり身原料としての活用できるかは不明であるが、他の加工原料として利用する場合も、貯蔵中の変性がそれから製造した製品の品質低下を引き起こすことが十分考えられるので、これら熱安定性に関するデータは各魚種の加工特性を論じる目的のためにも使用できると考えている。

すり身化を想定した場合、ウロコメガレイで問題となった鰭など異物の混入はアカガレイ、スナガレイ、ソウハチなどでも同じように生じる可能性は高いので、ウロコメガレイで得られた知見はそのまま利用できると考えている。これらのカレイ類は煮付けや干物など加工用途に限られるが、新たな用途開発としてすり身化も一つの利用方法としての可能性は残っている。また、ハツメはスケトウダラに近い水深に生息し、トロール等で大量に漁獲される魚種であるが、魚体が小さく、加工原料としての利用が少ない状況である。そのミオシンの安定性がスケトウダラと同程度であった (Fig.1-10) ので、スケトウダラと同等の変性管理が必要であることが明らかになった。

ブリについては大型種であり，鮮魚としての価値が高いため，すり身化などは想定できない魚種である。しかし，近年北海道周辺での漁獲量が急増していることから，鮮魚以外の有効活用のためには貯蔵中のミオシン変性に関する情報が必要であるので，ここで得られた基礎的な情報は利用されることが考えられる。

第2章 ホッケのすり身原料としての品質

ホッケは北海道周辺のほぼ全域で漁獲され、国内の生産量のほぼ全て(99%)を占め、北海道特有の魚種であるといえる。ホッケの生産量は1998年に過去最高の23.5万トンに達し、その後は2008年まで11.5万トンから17.3万トンの間を増減しながら推移してきた。しかし、2009年以降、生産量は大きく減少し、2013年には、5.2万トン(生産額51億円)まで急減した。一方、ホッケの加工においては、大型のものは生鮮向けや一夜干し等の塩蔵品に利用されているが、価格の安い小型のものはすり身原料やフィッシュミール、養魚用餌料に利用されている(北海道漁業連合会2014)。特に、すり身原料としての利用は、1980年代後半からスケトウダラの漁獲量および輸入量が減少したことにより、その代替原料として利用されるようになり、1990年代には沖合底びき網による漁獲量も増加した。近年、漁獲量が減少しても、ホッケの原料処理配分においては、依然、「すり身」と「冷凍加工(一夜干し原料等)」で全体の8~9割を占めているが、低価格と大量供給がホッケの優位点であったすり身の生産は価格高騰の影響を受け厳しい状況となっている。

これまでホッケのすり身原料としての実用化研究は数多く行われてきた。1950年代には、すでに谷川ら(1959)が血合い肉混合による色調の悪さが練り製品の品質低下の原因となることを指摘している。その後、1970年代後半になりスケトウダラの代替すり身原料として底びき網漁により日本海やオホーツク海で未成熟魚(小型魚)が漁獲されるようになり、さらなる取り組みがなされた。ホッケのすり身製品は血合いを取り除いてもスケトウダラに比べて色調が劣り、さらに最終製品である加熱ゲルの物性が低いことが明らかにされている(橋本ら1981)。しかし、スケトウダラすり身に比べ呈味性が高いこと、すり身価格が比較的安く、ある一定量が国内生産で確保できること等から、揚げかまぼこ製品や魚肉ソーセージ向けのすり身として広く活用されるようになった(北上ら1997, 岡田2008a)。

本章では、北海道特有の水産資源であるホッケのすり身原料としての特性について、筋肉タンパク質の性状およびゲル化特性の点から検討した。

(1)筋原線維 Ca^{2+} -ATPase の熱安定性の評価

スケトウダラがすり身原料として利用可能になったのは、本来有しているミオシンの不安定さをソルビトールなどの糖類を添加し、安定化させる技術が確立したからである。ホッケをすり身原料として利用するにあたり、まず、ミオシンの安定性について、スケトウダラのものと比較しながら検討した。ここでも、すり身の中での状況に相当するアクチンに安定化を受けている生理的塩濃度の条件と、すり身に食塩や重合リン酸塩を添加してミオシンがアクチンから解離した状況に相当する二つの条件で筋原線維(Mf)を材料に用いて測定した。

スケトウダラとホッケ冷凍すり身からそれぞれ調製した Mf を用い、0.1 M および 2.0 M NaCl 条件下、様々な温度で加熱し、 Ca^{2+} -ATPase 失活速度(k_D)を測定した。この失活速度の対数値を加熱温度(絶対温度)の逆数に対してプロットし、アウレニウスプロットとして表した(Fig. 2-1)。同図によると、いずれの組み合わせでも、変性温度($1/T$)と $\text{Log}(k_D)$ の間には直線関係が認められた。アクチンにより安定化を受けている 0.1 M NaCl 条件では、これまでの報告(橋本ら 1982)を確認するようにホッケはスケトウダラと同等あるいは、僅かに不安定であった。また、ミオシンそのものの安定性を示す 2.0 M NaCl 条件では、ホッケの方が僅かに不安定であった。いずれにせよ、ホッケのミオシンは非常に不安定であると言われてきたスケトウダラと同等かそれ以上に不安定であることを再確認した。

Fig. 2-2 にスケトウダラとホッケの Mf の 25°C 加熱による NaCl 濃度依存性を求め、どれくらいの濃度の食塩の添加がアクチンによる安定化を消失させるかを比較した。両魚種とも食塩濃度が上昇するにつれ、 k_D の対数値は直線的に上昇した。アクチンの安定化が消失する折れ曲がり点はホッケでは 1.0 M 付近に、スケトウダラでは 1.5 M 付近に得られた。すなわち、ホッケのミオシンはアクチンによる安定化を低い塩濃度で消失することがわかった。ホッケミオシンのアクチンによる安定化程度を 0.1 M NaCl での k_D に対する値と比較すると、1.0 M NaCl では約 16 倍、2.0 M NaCl では 53 倍であった。一方、スケトウダラではそれぞれ 9 倍、34 倍であり、本来ホッケミオシ

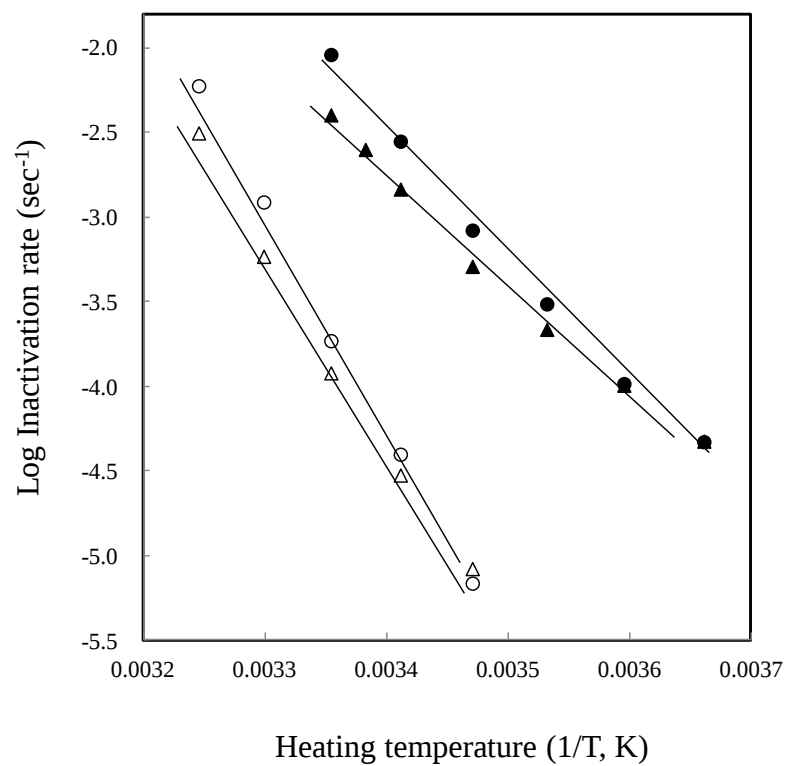


Fig. 2-1 Thermal stability of AG and walleye pollock myosin. Mf of AG (○●) and walleye pollack (△▲) either at 0.1M NaCl (○,△) or at 2.0M NaCl (●▲) were heated at various temperatures. Myosin denaturation was studied by measuring Ca^{2+} -ATPase inactivation.

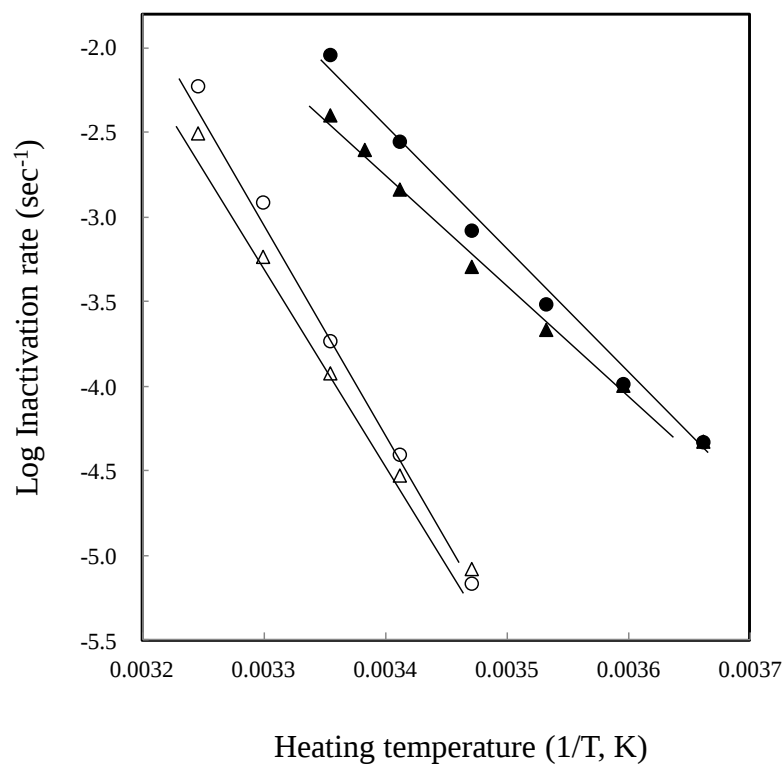


Fig. 2-1 Thermal stability of AG and walleye pollock myosin. Mf of AG (○●) and walleye pollock (△▲) either at 0.1M NaCl (○,△) or at 2.0M NaCl (●▲) were heated at various temperatures. Myosin denaturation was studied by measuring Ca^{2+} -ATPase inactivation.

ンは不安定であるが、筋肉中ではアクチンによる安定化が大きく、スケトウダラとほぼ同程度の安定性を示していることが示された。

(2)市販ホッケ冷凍すり身の品質評価

すでに、ホッケのすり身のゲル化特性については研究がなされ、坐り効果が認められないことはよく知られている。そこで、このことを再確認するため、商業的に北海道のすり身工場(5社)で製造されたホッケ冷凍すり身(平成23年～平成24年製造)を試料にして、ホッケのゲル特性を冷凍すり身品質検査基準(西岡 1983)に準じて調べた。各ホッケすり身のタンパク質含量は、A社(14.4%)、B社(15.0%)、C社(15.4%)、D社(16.1%)、E社(13.3%)で、対照としたスケトウダラすり身はF社のもので13.3%であった。加熱ゲルの調製は、スピードカッター(MK-K75, ナショナル製)を用いて、5分間空ずりを行った後、加水(タンパク質濃度 13%(w/w)調整)と、すり身重量に対して3%(w/w)のNaClを添加し、塩ずりを2分間(すり上がり温度 10℃以下)行った。塩ずり後の肉糊をポリ塩化ビニリデンフィルムチューブに充填し、一部を90℃で30分間加熱して直加熱ゲルとした。また、残りを25℃の恒温水槽中で6時間予備加熱後、90℃で30分間加熱して二段加熱ゲルとした。直加熱ゲルと二段加熱ゲルはレオメーター(T2010J-CW, レオテック製)により、破断強度と破断凹みを測定した。

Fig. 2-3 にホッケすり身(5社)およびスケトウダラすり身の加熱ゲルの破断強度と破断凹みを示した。これらホッケすり身の直加熱ゲルの破断強度は140g～178g(平均値162g)で、すり身工場間による大きな差はなかった。二段加熱ゲルの破断強度は108g～161g(平均値130g)で、いずれのすり身も予備加熱の導入により破断強度は低下し、特にE社すり身は直加熱ゲルより30%以上低下した。一方、破断凹みについても、直加熱ゲルでは0.9cm～1.0cm(平均値0.9cm)であったが、二段加熱ゲルでは0.5cm～0.8cm(平均値0.7cm)に低下した。

対照のスケトウダラすり身はホッケとほぼ同様な方法で製造されている北海道産の陸上2級のものを使用した。この直加熱ゲルの破断強度は243gでホッケすり身に比べて1.5倍高い値であった。スケトウダラすり身は予備加熱を導入した二段加熱ゲルで

は破断強度が直加熱ゲルの約 2 倍(464g)に増大し、明らかな坐り効果が認められた。また、破断凹みについても 1.1cm から 1.3cm に増大した。

これらの結果は、北海道内の冷凍すり身工場で生産されているホッケすり身は、スケトウダラすり身にみられる坐り効果は期待できないことを確認したことになり、これまでの報告(鈴木ら 2008, 加藤ら 2010)を支持する結果であった。また、本研究で用いた市販ホッケすり身のタンパク質含量は 13.3%から 16.1%まで約 3%の差がみられたが、タンパク質濃度を 13%に調整した加熱ゲルの破断強度と破断凹みに大きな差はみられず、すり身工場間におけるすり身品質差は小さいと思われる。なお、二段加熱により E 社すり身は他のすり身に比べて物性低下が著しかったが、原因は不明である。

冷凍すり身の品質検査基準の検査項目には、すり身に混入している夾雑物と白色度の項目がある。ホッケすり身の夾雑物(10g 中の個数)は 7 個~25 個(平均値 15 個)であり、対照のスケトウダラすり身の 19 個と大きな差はなかった。また、白色度についても、ホッケの 68~71(平均値 69)に対して、スケトウダラは 67 で、夾雑物と同様に大きな差はなかった。この白色度の結果は用いたスケトウダラの冷凍すり身が陸上 2 級であったため、歩留まりを大きくするため血合肉の混入があったためか、多少着色が認められたためであると考えられる。

(3)ホッケのすり身原料としての特性

すり身の品質や特性は、原料魚の種類や鮮度、漁獲時期等に影響を受ける。特にすり身製造方法の改良などでは対処することができない魚種固有の問題がある。それには、生息温度に依存したミオシンの熱安定性の違い、内在性プロテアーゼ活性のレベル、トランスグルタミナーゼ(TGase)活性のレベルなどであり、これらが総合して最終的なゲル形成能を決定する。市販のホッケ冷凍すり身はどのような原魚を用い、どのように製造されたか不明の点が多い。そこで市販すり身に認められたホッケのゲル化特性について、新鮮なホッケを試料に研究室レベルで検証を試みた。特に、現実的に漁獲後数日経た原魚をすり身製造原料とすることを想定し、5°C 保管中におけるゲル化特性の変化について検討した。

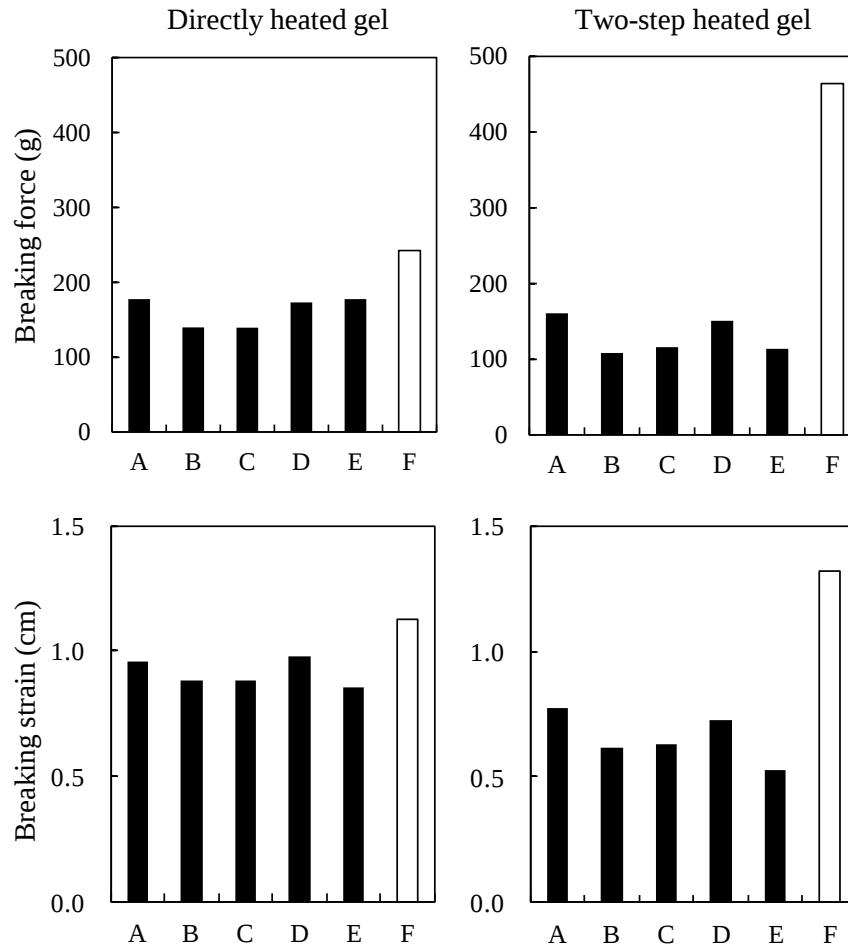


Fig. 2-3 Thermal gel production by commercially distributed surimi from AG and walleye pollock. Surimi from AG (black columns) and walleye pollock (white column) were purchased from companies. Gel properties of the thermal gels from various kinds of surimi were compared. Frozen surimi were thawed, ground with 3.0% NaCl, and heated at 90°C for 30 min (Directly heated gel). The same salt-ground surimi was preheated at 25°C for 6 h and followed by heating at 90°C (Two-step heated gel). Breaking force and breaking strain of the gels were measured as in Fig.1-2.

ホッケは、2013年8月日本海沿岸の刺し網漁で漁獲されたものを用いた。試験に供したホッケの体長は、 $29.5 \pm 0.4 \text{ cm}$ 、体重は、 $405.5 \pm 21.4 \text{ g}$ であった。試料はラウンドのまま 5°C 冷蔵庫で保管し、0日目、1日目、2日目、3日目、6日目に、4~6尾を無作為に選び、普通肉を採取した。普通肉はミートチョッパーで粉碎後、一部を分取し K 値から鮮度を、 Ca^{2+} -ATPase 活性からミオシンの変性程度を推定した。また、すり身製造を模倣するため、粉碎魚肉の重量に対して3倍量(v/w)の 0.1 M NaCl , 20 mM Tris-HCl ($\text{pH}7.5$)を用い、水晒し処理を1回行った後、遠心分離で得られた脱水肉に $6\%(\text{w/w})$ ソルビトールと $0.3\%(\text{w/w})$ ポリリン酸塩を加えて便宜的にすり身とした。なお、すり身のたんぱく質濃度は、ビュレット法(Gornall ら 1949)により測定し、 170 mg/g となるよう調整した。すり身は真空包装して1週間程度 -25°C 保管した後に実験に用いた。

ホッケの 5°C 保管によるゲル化特性の変化は、保管日数毎に製造したすり身のゲル物性と SDS-PAGE による架橋重合体の形成から検討した。Fig. 2-4 に 5°C 保管中のホッケから調製したすり身のゲル物性を示した。直加熱ゲルの破断強度は0日目が最も高く 250 g で、3日目が 159 g (0日目の 36% 減)、6日目には 172 g (0日目の 33% 減)に緩やかに低下した。破断凹みも0日目が 1.3 cm で最も高く、6日目には 0.8 cm (0日目の 33% 減)まで低下した。二段加熱ゲルにおいても破断強度、破断凹み共に、0日目が最も高く、それぞれ 207 g , 0.9 cm であった。

これらの結果から、ホッケの鮮度低下はすり身のゲル形成能に影響することがわかった。宇野ら(1958)はスケトウダラの 5°C 保管実験を行い、保管4日後の原料から製造した加熱ゲルの物性は保管0日目の物性を1とすると 0.635 まで低下すると報告しているが、本研究のホッケの結果とよく似ていた。

また、市販すり身の試験結果と同様、予備加熱を導入しても坐り効果は認められず、ゲル物性は低下することがわかった。そこで、これらホッケすり身を予備加熱した時のミオシンの架橋重合と分解について 3% アルリルアミド/ 0.5% アガロースを支持体とした SDS-PAGE で解析した。得られた SDS-PAGE パターンを Fig. 2-5 に示した。保管0日目、1日目、2日目、6日目のホッケから製造したいずれのすり身においても、予備加熱によるミオシン HC の架橋重合体の形成はみられなかった。また、予備加熱時

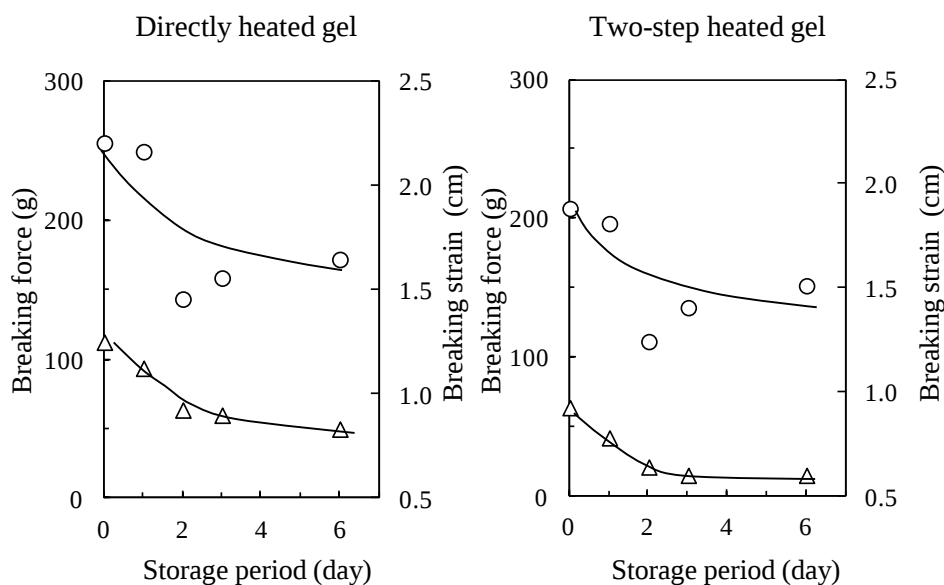


Fig. 2-4 Thermal gel production from stored AG.

AG was stored at 5°C. Mince (2 kg) from the fish was washed with 8 L of chilled 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5) once to simulate leaching process. Dewatered mince obtained by centrifugation at 2,000 rpm for 20 min was mixed with 5% sorbitol, 0.3% polyphosphates, 3% NaCl, and 5 mM CaCl₂ to prepare salt-ground mince. The salt-ground mince was stuffed in the casing and incubated at 25°C for 6 h and heated at 90°C for 20 min to produce two-step gel. A directly heated gel was produced without incubation at 25°C. The breaking force (○) and breaking strain (Δ) of the gels were measured as in Fig. 1-2.

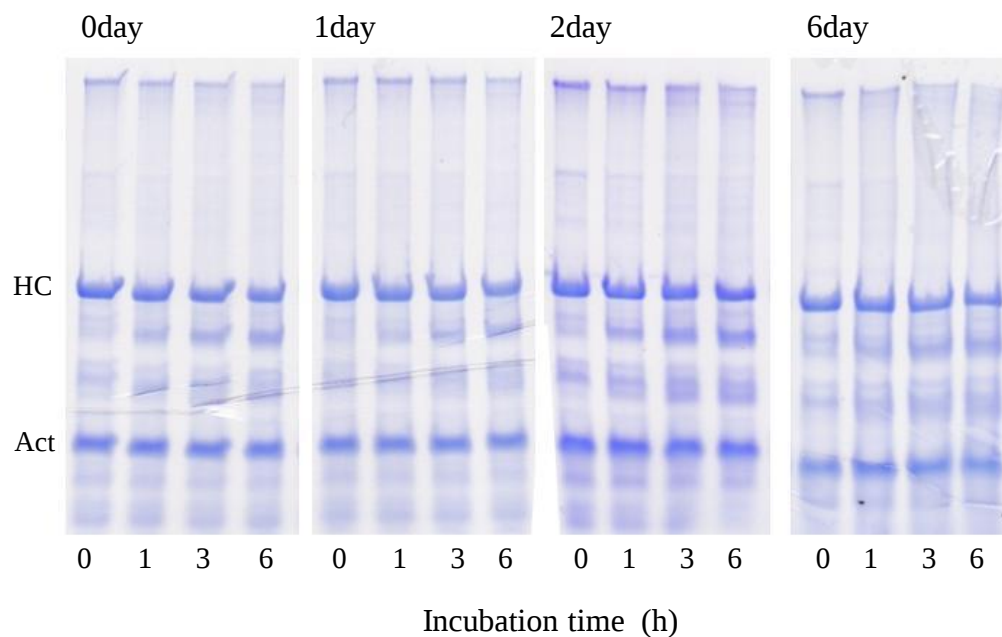


Fig. 2-5 Effect of storage of AG for surimi production on protein composition change upon pre-heating. Surimi was prepared from stored AG. Storage preiods were shown in the figure top. The salt-ground surimi was incubated at 25°C, and protein subunit components was analyzed on 3% polyacrylamide/0.5% agarose slab gel. Incubated salt-ground meat was dissolved in 2% SDS, 8 M urea, 5% mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl (pH7.5) for SDS-PAGE analysis. HC; myosin heavy chain, Act; actin.

間の経過によりミオシン HC の下部に分解物と考えられるバンドが検出された。しかし、この SDS-PAGE パターン図からは 5°C 保管日数の経過に伴う HC の顕著な変化は確認することができなかった。

(4)5°C 保管中のホッケ筋肉タンパク質の性状

5°C 保管中のホッケのゲル物性の低下する理由がミオシン変性によるものではないかと推定し、5°C 保管中のホッケ魚肉のタンパク質含量と Ca^{2+} -ATPase 比活性の変化を追跡した。Fig. 2-6 にその結果を示した。ホッケ魚肉のタンパク質含量は 190~212 mg/g(平均 202 mg/g)で、5°C 保管中に顕著な増減は認められなかった。一方、ホッケ魚肉の Ca^{2+} -ATPase 比活性は、保管開始日の 0 日目が $0.105 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ であったが、3 日目が $0.080 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (24%減)、6 日目には $0.075 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (29%減)になり、タンパク質含量と Ca^{2+} -ATPase 比活性から算出される Ca^{2+} -ATPase 全活性 ($\mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{すり身 g}^{-1}$)は、5°C 保管中に緩やかに低下した。冷凍すり身の Ca^{2+} -ATPase 全活性とゲル形成能の相関性が高いことが報告されている(川嶋ら 1973, 加藤ら 1979, Konno ら 2002)。本試験において、5°C 保管中のホッケから製造したすり身のゲル物性の低下は、ホッケミオシンの変性によるものと判断された。

(5)5°C 保管中のホッケの鮮度変化

上記の試験により、ホッケの 5°C 保管においてミオシン変性は緩やかに進行した。ホッケは経験的に鮮度低下が早いことが知られていることから、5°C 保管中における鮮度、すなわち ATP 関連化合物の変化についても確認した。Fig. 2-7 に結果を示した。保管開始(0 日目)のホッケ魚肉の ATP 関連化合物は、ATP、ADP、AMP がいずれも $1.0 \mu\text{mol/g}$ 以下であり、その分解物の IMP が $2.5 \mu\text{mol/g}$ で、ATP 関連化合物総量の 61% を占めていた。5°C 保管中に IMP は徐々に減少し、3 日目には $0.8 \mu\text{mol/g}$ に低下した。HxR は保管開始時 $1.2 \mu\text{mol/g}$ (総量の 29%)であったが、3 日目には $2.5 \mu\text{mol/g}$ 、6 日目には $2.9 \mu\text{mol/g}$ (総量の 66%)まで増加した。

これら ATP 関連化合物の消長より算出した K 値の変化を Fig. 2-8 に示した。0 日目

の K 値はすでに 30%であった。K 値は 3 日目には 70%まで増加し、6 日目は 78%であった。成田(2004)によると底びき網漁による漁獲直後のホッケ K 値は約 6%であったが、6 時間後には約 15%に上昇し、陸揚げ直前の 17 時間後には 40%まで上昇した。K 値の変化は魚種により異なることが知られているが、ホッケはスケトウダラと同様に K 値上昇が早い魚種(小関ら 2006)であると判断された。

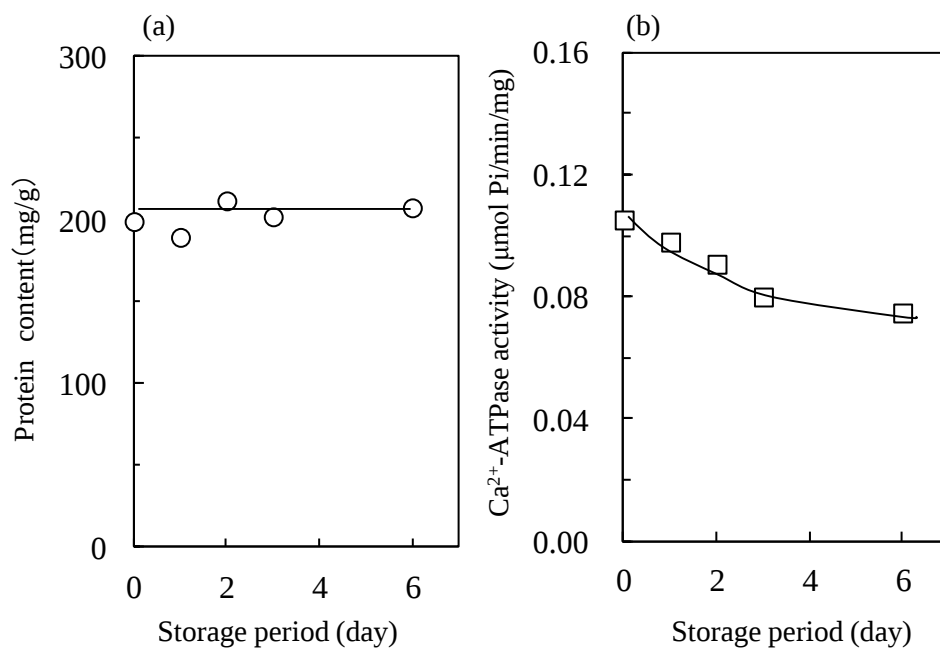


Fig. 2-6 Myosin denaturation during the storage of AG Meat. Minced dorsal muscle of stored AG (1.0g) was washed with 40 ml of 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5) and washed mince was homogenized on physcotron NS-10 (Microtec co.,LTD) for 2 min at 15,000 rpm. Protein content (a) and Ca^{2+} -ATPase activity (b) of the homogenates were measured to evaluate myosin denaturation in AG meat.

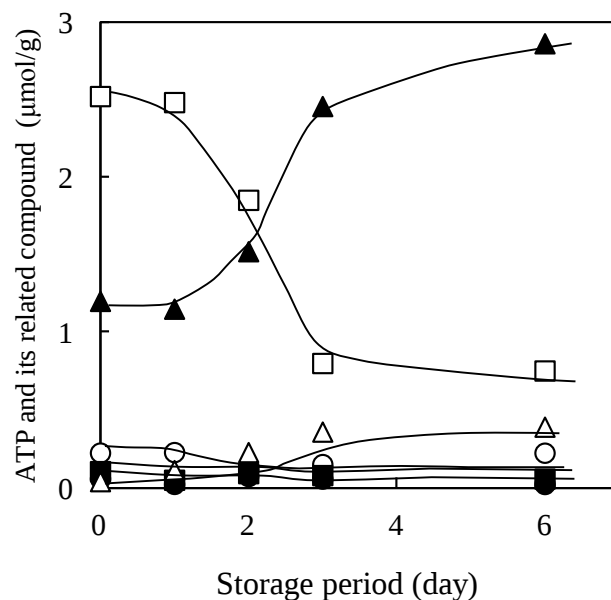


Fig. 2-7 Changes in ATP and its related compounds composition during the storage of AG. AG was stored at 5°C. ATP-related compounds were extracted from the dorsal muscle of the fish with 5% PCA. Their composition was analyzed on HPLC (Hitachi D-2000) by using 0.1 M phosphate (pH 3) as elution buffer. ATP (●), ADP (○), AMP (■), IMP (□), HxR (▲), and Hx (△) contents were measured.

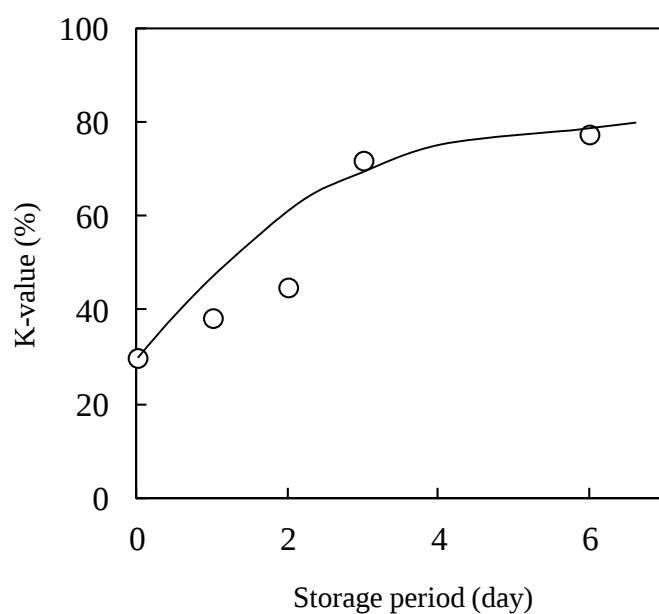


Fig. 2-8 Increase in K-values during storage of AG.
 K-value of the fish (○) was calculated by using the data in
 Fig. 2-7 and the following equation.

$$\text{K-value (\%)} = \frac{(\text{HxR} + \text{Hx})}{(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx})} \times 100$$

小考察

ホッケすり身は、輸入冷凍すり身に対して低価格であること、大量供給ができることをメリットとして、ゲル物性を重視しない揚げかまぼこ製品や魚肉ソーセージ向けのすり身として広く活用されてきた。しかし、最近のホッケ漁獲量は減少しており、それを原材料とするすり身価格もかつてのような低価格は維持できず、メリットを失い需要も低迷している。このような状況においても、ホッケは依然として北海道特有の水産資源であり、資源の高付加価値を与えつつ、持続的な活用を目指す必要がある。そのためには、筋肉タンパク質の基本的な特性およびゲル化特性を再検討する必要があった。

これまでの研究（橋本ら 1982）から、ホッケミオシンの安定性は、非常に劣ることが明らかにされている。本章では、ミオシンの安定性について、アクチン結合による安定化を受けている状態、および、ミオシン単独の2つの状態で再検討したが、どちらの条件でも、不安定なミオシンの代表であるスケトウダラ以上に不安定であった(Fig.2-1)。また、アクチンによる安定化を失う NaCl 濃度はスケトウダラより低く、食塩を加え肉糊にする工程でも容易に不安定になることがわかった(Fig.2-2)。ホッケの表皮はスケトウダラに比べて厚く、貯蔵中も正常な外観を維持していることから、スケトウダラに比べホッケの貯蔵耐性があるような印象を与えるため、鮮度保持のための努力がおろそかになっている可能性が示された。

実際に、北海道内で製造され、流通している市販のホッケ冷凍すり身のゲル化特性を調べた。すり身のタンパク含量はすり身工場間で約 3%の差がみられた。すり身のタンパク質濃度は加熱ゲルの物性に影響することがスケトウダラ冷凍すり身を用いた研究により報告されている(北上ら 2005)ので、タンパク質濃度を調整して加熱ゲルの破断強度と破断凹みを比較したところ、調査した北海道内のすり身工場では加熱ゲルの物性に大きな差はみられなかった(Fig.2-3)。また、25℃で6時間の予備加熱を行い、坐り効果の有無についても調査したが、用いたどのすり身にも坐り効果は認められなかった(Fig.2-4)。逆に、予備加熱により破断強度と破断凹みは低下する傾向にあった。

これらの結果は、一般的にホッケすり身に対して持たれている印象を再確認するも

のであった(鈴木ら 2008, 加藤ら 2010)。すなわち、北海道産ホッケ冷凍すり身には、坐り効果は期待できないことを確認した。しかし、この市販ホッケ冷凍すり身の実験結果が、ホッケのゲル化特性を正しく反映しているか、どうか疑問が残った。これまでの、すり身の品質に与える各種因子の研究から、原料の鮮度、漁獲時期、製造工程中の取り扱いが最終製品のゲル物性に大きく影響することが知られている(木村 2003)。

本章では、漁獲当日のホッケからモデル的にすり身を製造し、そのゲル形成能について検討した。このため、基本的に価格が低いために、丁寧な取り扱いが期待できない、いわゆる「ローソクホッケ」や「ハルボッケ」と呼ばれる小型魚(夏目 2003)は用いず、新鮮な成魚を試料とした。早朝に漁獲後、上氷を施して水揚げされたホッケは、研究室に搬入した時点で ATP はほぼ消失していたので、硬直が起きている魚体であった。しかし、このような新鮮なホッケを用いて製造した冷凍すり身の肉糊を 25°C で 6 時間にわたる予備加熱を行っても、二段加熱ゲルの物性向上はみられず、坐り効果は確認 (Fig.2-4) されなかった。これを支持するように、予備加熱中に TGase によるミオシンの架橋重合体の形成も検出 (Fig.2-5) されなかった。

Araki and seki(1993)によると、ホッケ筋肉中の TGase 量はスケトウダラやシロサケより低く、ニジマスより高い。また、ホタテガイやイカ TGase のように高濃度の Ca^{+2} を要求(Nozawa ら 1997)せず、コイやニジマスと同程度であることが明らかとなっている。しかしながら、魚肉中の TGase が肉糊中でミオシンを架橋するかどうかは、TGase 酵素の活性、その存在量に加え、基質であるミオシン構造や活性化因子である Ca^{2+} 濃度、さらに酵素活性阻害因子の有無などが関係している(関ら 2001)ことから、ホッケすり身の予備加熱において架橋重合体がみられないのは、これら要因のいずれかに起因していると思われる。

坐り効果とは別に、ミオシン変性がゲル形成能の劣化を引き起こすことが知られている(今野 2003)。そこで、新鮮なホッケを 5°C で保管し、そこから冷凍すり身を製造し、直加熱ゲルの破断強度(Fig.2-4)、および、保管中のミオシン変性の進行を Ca^{2+} -ATPase 活性の低下 (Fig.2-6) から比較したところ、両者は同じように緩やかに低

下した。この5℃保管中のゲル形成能の低下は、スケトウダラの試験結果(宇野ら 1958)とほぼ一致しており、両魚種のコシンの熱安定性が影響していると推察される。なお、スケトウダラすり身中のコシン変性がすり身の品質の指標となる(Koseki ら 2005)という提案は、ホッケすり身の品質指標としても活用できることがわかった。

第3章 ホッケ魚肉の架橋反応特性

前章において、これまで坐らないすり身として知られているホッケ冷凍すり身の肉糊は、加温してもミオシン HC の架橋反応もゲル物性向上作用も確認できないことを確認した。また、漁獲当日の新鮮なホッケを用い、研究室においてモデルのすり身を製造し、冷凍すり身と同様に調べたが、それでも坐り効果は認められなかった。

本章では、さらに高鮮度を考慮し、死後硬直前、もしくは硬直開始直後程度の鮮度のホッケについて検討した。本研究では、水晒し処理による TGase の損失が懸念されたので、すり身ではなく落とし身を調製し、このような高鮮度のホッケが、予備加熱による坐り効果が認められるのか、さらにそれを冷蔵貯蔵したときの坐り効果に対する影響について検討した。なお、坐り効果については、主に間接的な手法である肉糊の加温中のミオシン HC の架橋反応から検討した。また、貯蔵中のホッケ魚肉の TGase 活性の変化も追跡した。さらに、すり身の坐り効果が顕著であるスケトウダラの TGase との特性の比較検討も行った。

(1) 高鮮度ホッケ魚肉を用いた肉糊加温中の架橋反応の検討

本研究では、入港直後のホッケ底建て網漁船から死後硬直前あるいは硬直開始直後のホッケを選別し、これらホッケから採肉した普通肉の落とし身を試料とした。落とし身に対して 3%(w/w)の NaCl を加え、肉糊を調製した。さらに、TGase の十分な活性化のために 10 mM CaCl₂ を添加し、25°C で加温し、肉糊中のミオシン HC の架橋反応の進行を SDS-PAGE により観察した。その結果を Fig. 3-1 に示した。これによると、落とし身をそのまま用いた場合は、加温 3 時間で SDS-PAGE パターンからミオシン HC が消失し、3 %ポリアクリルアミド/0.5%アガロースゲルにも進入できない高分子成分に変化していた。SDS-PAGE パターン図ではミオシン HC が架橋されて形成された 2 量体などの多量体は検出されないが、ミオシン HC の分解がほとんど認められないので、架橋体形成が急激に進んだものと推定された。一般的なすり身製造では水晒し工程が含まれる。しかし、この処理により、TGase が水溶性画分に流出することで

ミオシンの架橋反応が低下する可能性もある。そこで、水晒しの影響についても検討した。そのため、落とし身の一部は水晒しのモデルとして、3倍量の 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5)液で2回洗浄した。得られた水晒し肉の肉糊でも 25°C での加温によりミオシン HC は減少し、それに伴う2量体から4量体程度の架橋成分が検出された。なお、反応の進行が緩やかに進むためか、水晒し肉の場合にはゲルに侵入できないような高分子の架橋体の生成は認められなかった。すなわち、ホッケ肉は水晒しの有無にかかわらず、ミオシン HC の架橋反応が検出されることが見出された。これは、ホッケにおいて初めての報告である。水晒し処理により、明らかな架橋反応の進行の遅延が認められた。この水晒し処理による TGase の流出を確かめるため、新たに落とし身を3倍量の 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH7.5)で1回洗浄した水晒し肉を調製し、この工程でどの程度の TGase 活性が低下するかを測定した。活性測定は *N,N*-ジメチルカゼイン(MC)に取り込まれる MDC 量から求めた。Table 3-1 にその結果を示したが、落とし身では 12.0 unit の値であったものが、本研究で用いた3倍量で1回洗浄しただけで、活性は 5.5 unit へと低下した。

水晒し工程の役割は、血液、無機成分、水溶性のタンパク質成分除去であるが、高鮮度なホッケ落とし身を用いた場合は逆に、HC の架橋反応を低下させる結果となった。また、水晒し工程は、プロテアーゼの除去も期待されるが、かえって、水晒し肉では HC の分解物と考えられる低分子成分が落とし身そのものよりも多量検出された。これらの結果から、高鮮度ホッケ魚肉の TGase の作用を最大限に利用するには水晒しは行わない方がよいと考えられた。このような高鮮度のホッケでは、問題となるような魚臭の発生もほとんど認められず、さらに呈味成分が取り除かれていないので、美味しい製品となることが予想された。

(2) 5°C 保管したホッケの HC 架橋反応と MDC 取り込み能の変化

高鮮度なホッケ魚肉を用いると、これまで報告された例がないような著しい HC 架橋反応が起こることが見出された。しかし、第2章で確認したように、商業的に生産されたホッケ冷凍すり身でも、市場で購入した比較的高鮮度のホッケから製造した

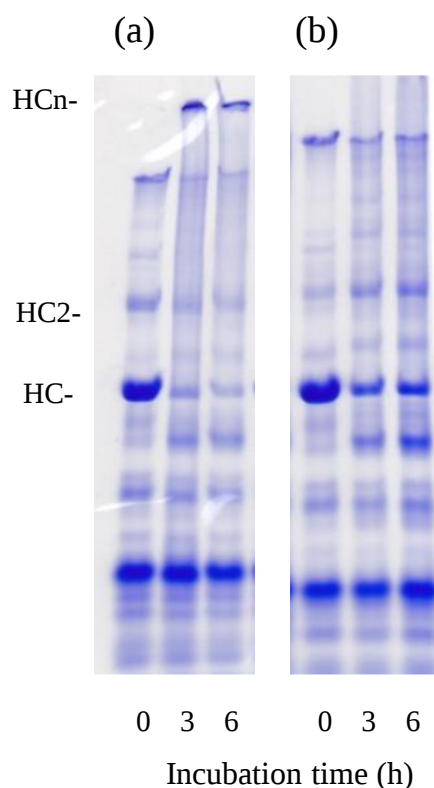


Fig. 3-1 Effect of washing of mince on the myosin cross-linking reaction of salt-ground AG meat.

AG mince was washed twice with 3 volumes of 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). Salt-ground mince (a) and washed mince (b) were prepared by grinding with 3 % NaCl and 10 mM CaCl_2 . The ground mince was incubated at 25°C for 6 h and dissolved in SDS-UM solution. SDS-PAGE was conducted with a slab gel consisted of 3 % polyacrylamide and 0.5 % agarose containing 0.1 % SDS. HC, HC2, HCn show myosin heavy chain monomer, dimer, and polymer, respectively.

Table. 3-1 Effect of washing of AG mince on the TGase activity and moisture content.

	Moisture (%)	TGase activity (unit/wet-g)
Mince	81.3	12.0
Washed mince	83.0	5.5

Washed mince was washed with 3 volumes of 0.1 M NaCl, pH 7.5. TGase activity was measured by monitoring MDC incorporation into dimethyl casein.

すり身でも、架橋反応が起こらないことを再確認した。この大きな違いは、原魚の鮮度の違いと考えられた。現実的なホッケすり身の製造では漁獲当日の硬直初期のような高鮮度の原料魚が使われることはなく、通常は1~2日程度経過したものを使用している。そこで、死後硬直中のホッケを5°Cの冷蔵庫に保管し、経時的に落とし身を採取し、そこから肉糊を調製し、加温中のHC架橋反応の進行がどのように変化するか追跡した。さらに、TGaseによるミオシンHCへのモノダンシルカダベリン(MDC)の取り込み反応からTGase活性の変化も調べた。

Fig. 3-2に5°C保管した時のホッケ落とし身から調製した肉糊を25°Cで加温した時のミオシンHC架橋反応の進行の様子を示した。Fig. 3-1と同じように、漁獲当日の死後硬直中のホッケ魚肉を用いた場合は、すでに肉糊を作製している段階からミオシンHCの架橋生成物が確認され、ミオシンHCは加温1時間ですでに全てアガロースを含むSDS-PAGEパターンから消失し、ゲルに進入できない高分子多量体に変化していた。また、ミオシンHCの分解物はほとんどみられなかったので、ホッケ肉に含まれているプロテアーゼの作用はさほど顕著でないことが確認された。保管1日目(Fig. 3-2b)と3日目(Fig. 3-2c)のホッケから同様に肉糊を作成し、ミオシンHC架橋反応の進行を分析したところ、翌日(1日目)にはHCの高分子体の形成は著しく減少し、逆に分解が認められるようになった。さらに3日目では架橋反応ほとんどみられなかった。1日目以降のホッケでもミオシンHCの減少は認められるが、それはミオシンHCの分解による減少であると考えられる。

ホッケの低温貯蔵により、ミオシンHCの架橋反応が大きく減少したため、架橋に関わっているTGaseの活性が実際に低下しているのかを、ホッケ肉糊に2 mM MDCを添加し、ミオシンHCへのMDCの取り込み反応の有無を検討した。肉糊を同じように25°Cで加温し、所定の加温時間毎に肉糊を採取し、SDS-UMで溶解した。このSDS-UM液をSDS-PAGEに供し、紫外線を照射してタンパク質に結合したMDC由来の蛍光を写真撮影した。Fig. 3-3に結果を示す。死後硬直中のホッケを用いた場合は、加温1時間の試料においてHCに明瞭な蛍光が認められた。この蛍光強度はその後、加温12時間までほとんど変化がなかった。これはミオシンHCの架橋反応が1時間の

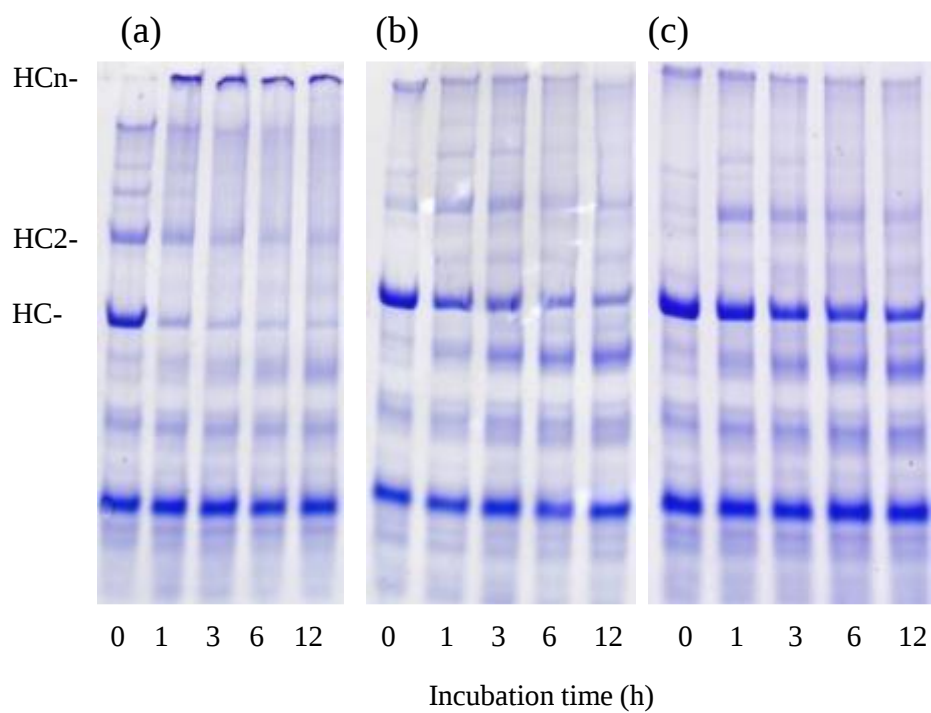


Fig. 3-2 Decrease in myosin cross-linking reaction upon storage of AG meat. AG meat was stored at 5°C for 0day(a), 1day(b), and 3days©, respectively. Salt-ground meat was prepared from the AG meat with 3 % NaCl. Salt-ground meat was incubated at 25°C. Other procedures are the same as in Fig. 3-1. HC, HC2,and HCn show myosin heavy chain monomer, dimer, and polymer, respectively.

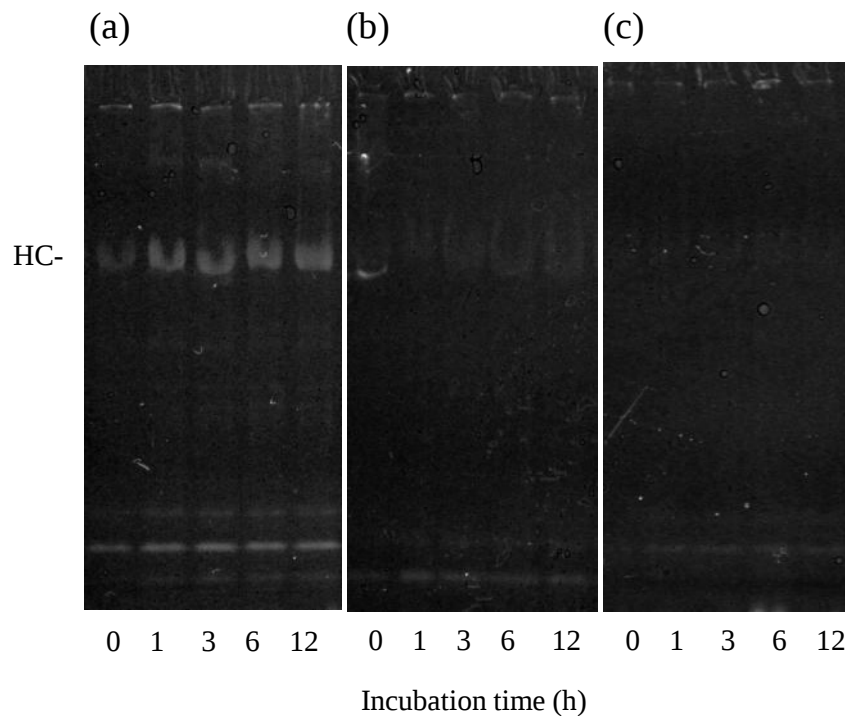


Fig. 3-3 Decrease in MDC incorporation into myosin heavy chain upon storage of AG meat.

The same AG meats as in Fig. 3-2 were used. Salt-ground meat was incubated at 25°C together with 2 mM MDC. MDC incorporation was monitored by observing fluorescence from protein bands revealed by SDS-PAGE. SDS-PAGE was conducted with 5 % polyacrylamide slab gel. Fluorescent image of the protein bands was photographed under UV light. (a), (b), and (c) are the same as in Fig. 3-2.

加温でほとんど高分子成分に変化したことに対応していると考えられ、1時間の反応でほぼ最大の MDC 結合が得られたものと考えられた。このような MDC の取り込みによるミオシン HC の蛍光は、1 日保管以降のホッケ落とし身を用いた場合には僅かにしか検出されなかった。

(3)ホッケ保管中の魚肉中の TGase 活性の変化

以上の結果から、ホッケ魚肉にはかなり高い活性を有する TGase が存在するが、その活性はホッケ保管中に急激に検出されなくなることがわかった。しかし、これらの結果からは TGase が活性を失ったのか、HC が酵素反応を受けないように変化したのかの区別はできない。そこで、TGase 活性がホッケの貯蔵中に失われるのかどうかを、ホッケ肉中の TGase 活性を MC への MDC の取り込み反応を用いて再度検討した(Araki and seki 1993, Tsukamasa ら 2002)。死後硬直中のホッケを 5°C で貯蔵し、その背肉(n=3)から普通肉を 1 g 採取し、できるだけ高濃度の TGase を回収するために、2 倍量 (v/w) の 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 M ソルビトール溶液で TGase を抽出した。この抽出液を 20,000 xg で 20 分間遠心分離して得た上清を粗酵素液としてそのまま活性測定に用いた。その結果を Fig. 3-4 に示した。死後硬直中のホッケの TGase 活性は 10.0 unit であったが、保管 1 日目に 2.6 unit にまで減少した(76%の減少)。その後、保管 2 日目には 1.6 unit (85%の減少)となった。これらの結果は、5°C 保管中のホッケ魚肉中で TGase 活性が明らかに失活していることを示している。それゆえ、保管ホッケ肉から調製した肉糊が HC 架橋反応を示さないのは TGase の失活が原因であると考えられた。

(4)ホッケから調製した粗酵素液保管中の TGase 活性の変化

ホッケを 5°C で保管中に魚肉の TGase 活性が減少したことから、TGase そのものがかなり不安定であることが推定された。そこで、ホッケから粗酵素を抽出し、その粗酵素液を冷蔵保管したときの活性低下をさらに調べた。高鮮度ホッケ魚肉から 2 倍量の 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH7.5)で水溶性画分を得、それを粗 TGase

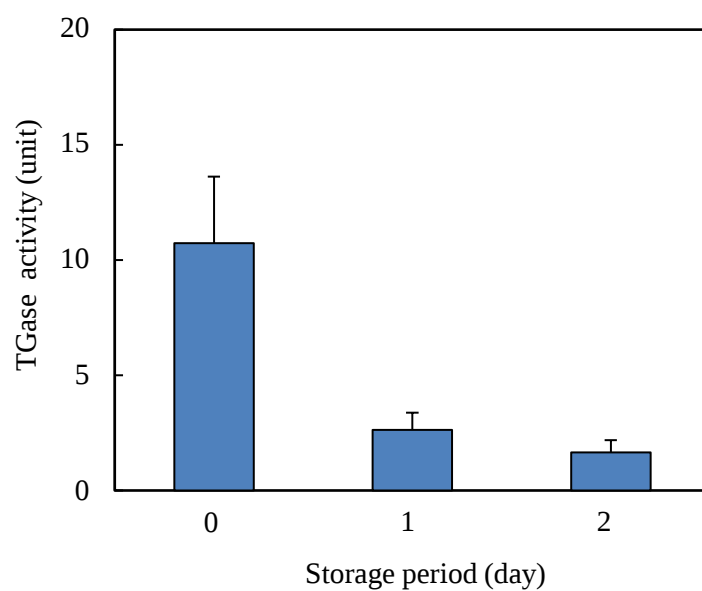


Fig. 3-4 Change in TGase activity in AG meat during the storage. AG meat was stored at 5°C as in Fig. 3-1. The stored meat was homogenized in 2 volumes of 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH7.5) containing 1M sorbitol. The supernatant obtained by centrifugation at 20,000 xg for 20 min was used as crude enzyme. Error bars represent standard deviation (n=3).

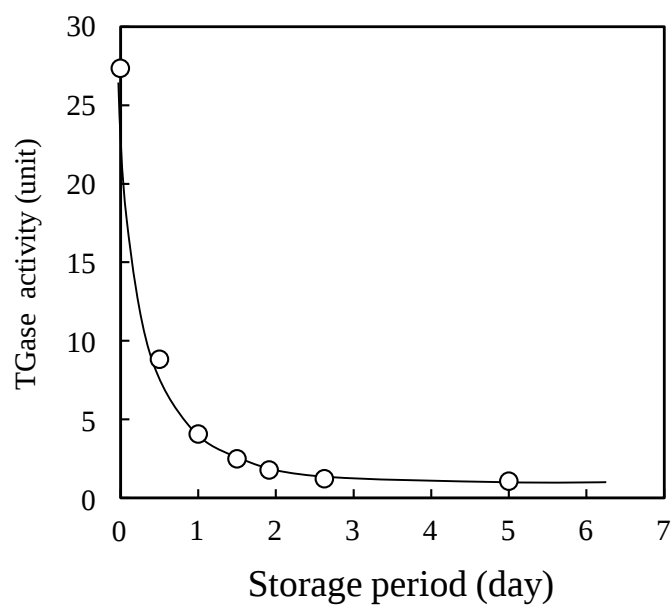


Fig. 3-5 TGase inactivation during the storage of crude enzyme.

Crude TGase was extracted from fresh AG meat as in Fig. 3-4 and stored in test tubes at 5°C. The activity was assayed at 25°C for 30 min in the reaction medium of consisted of 2 mg/ml dimethylated casein 0.5 mM MDC, 5 mM CaCl_2 , 5 mM DTT, and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5).

として用いた。この場合、Fig. 3-4 の実験と異なり 1 M ソルビトールは添加していない。抽出液に加えたソルビトールの役割については後ほど述べる。この粗酵素液を 5°C で保管し、経時的に取り出して、TGase 活性を測定した結果を Fig.3-5 に示す。保管当日の粗酵素液の TGase 活性は 27.3 unit であった。先の実験で用いた魚肉の活性に比べて、約 3 倍の活性を示した。複数の個体を用いて TGase 活性を測定したが、個体により活性値は変動した。この個体で得られた活性が最大のものであった。粗酵素液を 1 日貯蔵しただけで活性は 4.1 unit に低下したが(85%低下), この減少の程度は魚肉の 5°C 保管(Fig.3-4)と同様のレベルであった。保管 2.5 日目には 1.2 unit まで低下した(94%低下)。これらの結果から、ホッケの TGase は魚肉中でも粗酵素の状態でも非常に不安定であり、低温保管中に容易に失活すると判断された。

(5)ホッケ TGase の熱安定性の検討

ホッケの TGase が魚肉や粗酵素液の 5°C 保管において、翌日には活性が著しく低下する不安定であることが認められたことから、TGase の熱安定性について、MC への MDC 取り込みを指標にさらに検討した。また、ホッケ TGase の安定性をスケトウダラの TGase と比較した。ホッケおよびスケトウダラ背肉から調製した粗酵素液をそれぞれ試験管に分注し(1 ml), 種々の温度で 30 分間加熱し、その時の残存活性を測定した。その結果を Fig. 3-6 に示した。両者ともほぼ同じ温度帯で失活が認められ、MDC 取り込み活性は 30°C で 30 分間の加熱でほぼ 50%に減少し、35°C では 10%まで低下した。このことから、ホッケとスケトウダラの TGase の熱安定性には大きな差はなく、ホッケの TGase がスケトウダラに比べて大きく劣ることはない結論された。

さらに、ホッケおよびスケトウダラの TGase の熱安定性をスケトウダラ Mf を基質として用いたミオシン HC 架橋反応を指標に検討した結果を Fig.3-7 に示す。各粗酵素液は、前述と同様に各魚肉に対して、2 倍量 の抽出液(組成 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 M ソルビトール)を用いたが、ここでは抽出液に 1 M ソルビトールを添加しているので、ソルビトール存在下での安定性を比較していることになる。TGase に関する実験が進行するにつれ、酵素の不安定さが明らかになったため、その後の粗酵

素抽出,あるいは透析には酵素の安定化のためにソルビトールを添加した。これにより,処理中の失活が抑制されたため,実験の再現性が高くなった。特に透析を必要とするような場合は,長時間放置することになるので透析液にも 1 M ソルビトールを加えた。ここでは,遠心分離で得た抽出上清を抽出に使用した液で 4 時間透析したものを粗酵素液とした。この粗酵素液を試験管に分注し,種々の温度で 30 分間加熱した。その後,各粗酵素液(0.5 ml)にスケトウダラ Mf(0.25 ml)を加えて, 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , 5 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH7.5)の条件下, 25°C で 30 分間反応させた。Fig. 3-7 に示すように,加熱温度の上昇に伴い,ホッケおよびスケトウダラ TGase による架橋反応は低下し,残存ミオシン HC 量が増加した。両者とも 40°C 以上の加熱でゲルに進入できない高分子成分の蓄積が顕著に減少し,残存ミオシン HC の量が多くなった。なお,この加熱実験は 1 M ソルビトール下で行っているため, Fig. 3-6 で得られた失活が起こる加熱温度を直接比較できない。しかし,ホッケとスケトウダラの TGase の熱安定性がほとんど変わらないという結論は同じであった。

(6)ホッケ保管中の TGase 活性の消失に対するプロテアーゼ阻害剤添加の影響

5°C 保管中のホッケの TGase 酵素の失活の原因として,ホッケ魚肉の保管中に内因性プロテアーゼによる TGase 自身が加水分解され,その結果として失活が起きた可能性もある。事実, Fig. 3-2c の肉糊の加熱実験において,僅かなミオシン HC 分解が認められたのでホッケ肉に内在性プロテアーゼが存在することは確かである。高鮮度なホッケから調製した落とし身に大豆トリプシンインヒビター, E64, ペプスタチン A をそれぞれ 2 mg/g, 280 $\mu\text{mol/kg}$, 10 $\mu\text{Mmol/kg}$ になるよう個別にまぶして混合し, 5°C で 1 日間保管した。プロテアーゼインヒビターを添加して保管した落とし身から調製した肉糊を 25°C に加温し,ミオシン HC 架橋反応が貯蔵前と同じように観察されるか検討した。Fig. 3-8, Fig. 3-9, Fig. 3-10 に結果を示した。大豆トリプシンインヒビターを添加した魚肉(Fig. 3-8)でも,保管前はミオシン HC 架橋反応体が観察されたが,保管 1 日後には架橋体量は低下した。E-64 やペプスタチンを加えた場合も同様であり,架橋反応の低下を抑制させることはなかった(Fig. 3-9, Fig. 3-10)。これらの結果から, TGase

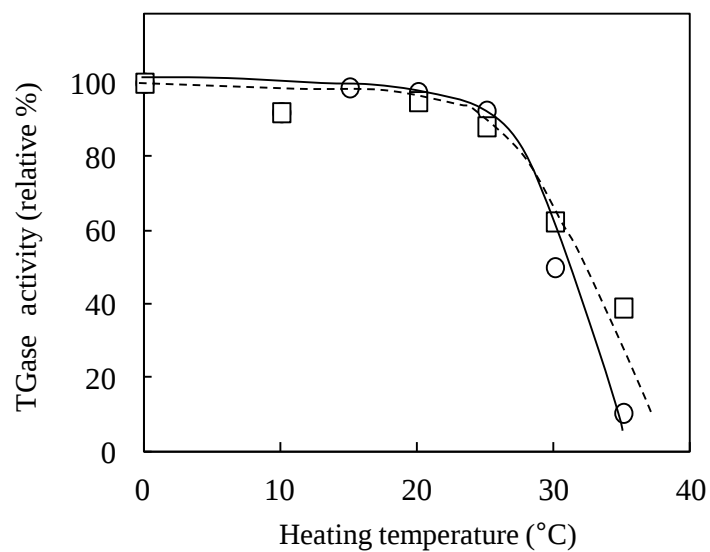


Fig. 3-6 Thermal stability of crude AG TGase. Crude AG TGase (circles) extracted as described in Fig. 3-4 was heated in test tubes at various temperature for 30 min and the remaining activity was assayed by the method used in Fig. 3-5. To compare the stability, crude TGase from walleye pollock (squares) was also used.

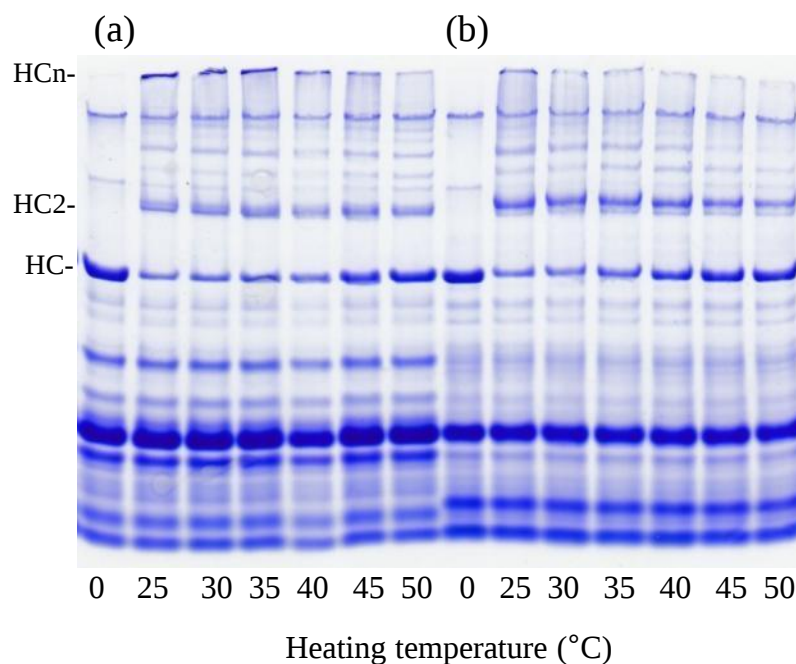


Fig. 3-7 Thermal stability of AG and walleye pollock TGase. Crude TGase from AG (a) and walleye pollock (b) were heated at various temperatures for 30 min, and their remaining activity was monitored by studying myosin cross-linking reaction with walleye pollock Mf. The activity was assayed at 25°C for 30 min in the reaction medium of 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM DTT, 50 mM TrisHCl (pH7.5). SDS-PAGE was conducted with a slab gel consisted of 3 % polyacrylamide and 0.5 % agarose containing 0.1 % SDS. HC, HC2, HCn are myosin heavy chain monomer, dimer, and polymer, respectively.

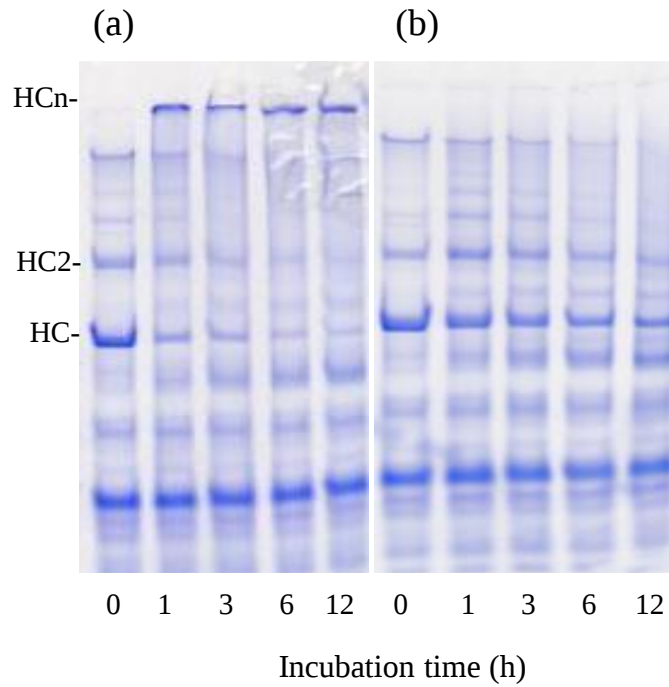


Fig. 3-8 Effect of trypsin inhibitor on TGase inactivation during the storage of AG mince. AG mince was mixed with soybean trypsin inhibitor (2 mg/g) (a) and the mixture was stored for 1 day (b). Salt-ground mince prepared from these two was incubated at 25°C for up to 12 h. Myosin cross-linking reaction was analyzed on SDS-PAGE as described in Fig. 3-1. HC, HC2, HCn show myosin heavy chain monomer, dimer, and polymer, respectively.

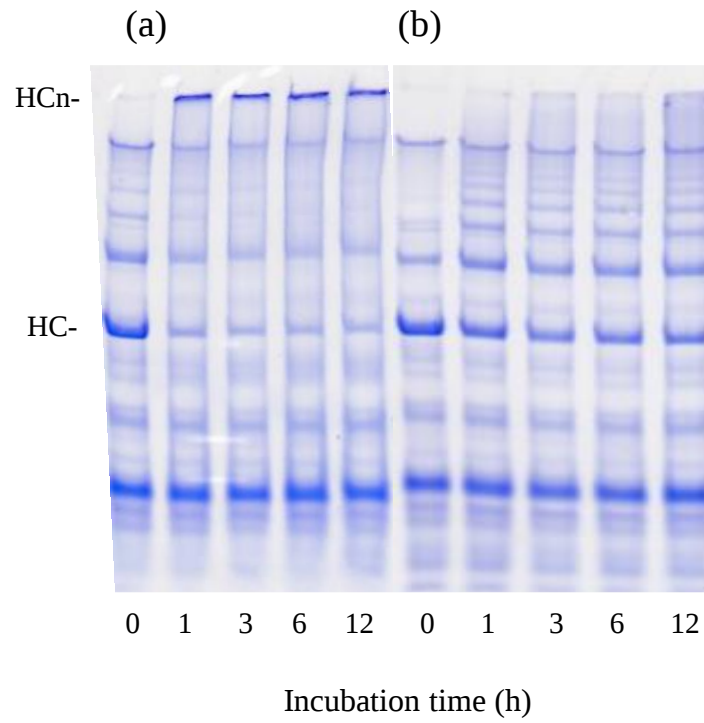


Fig. 3-9 Effect of E64 on TGase inactivation during the storage of AG mince.

The same experiments as in Fig. 3-8 was conducted by using E-64 (280 μmol/kg). Other conditions, procedures, and symbols are the same as in Fig. 3-8.

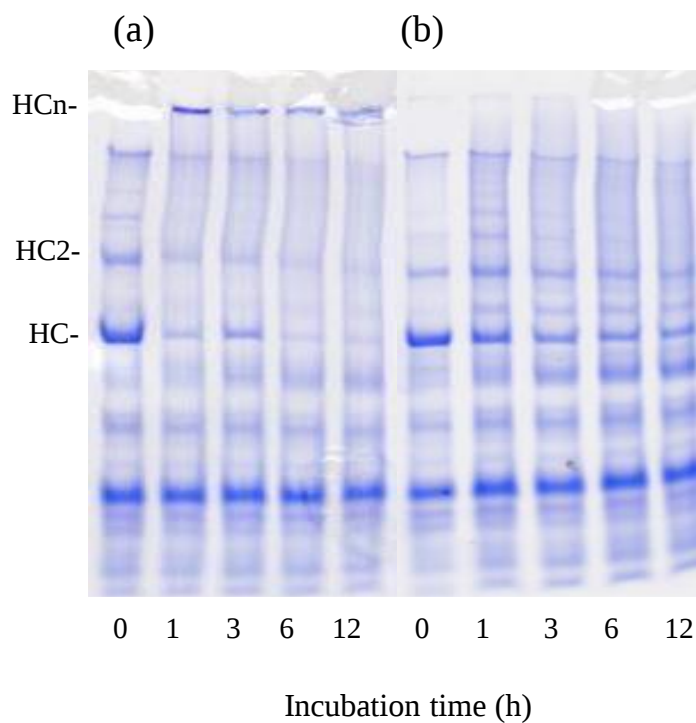


Fig. 3-10 Effect of pepstatin A on TGase inactivation during the storage of AG mince. The same experiments were conducted by using pepstatin A (10 $\mu\text{mol/kg}$) as in Fig. 3-8. Other conditions, procedures, and symbols are the same as in Fig. 3-8.

活性の失活には魚肉中のプロテアーゼは関与していないことが示された。なお、E64の添加は肉糊の 25°C 加熱でのミオシン HC の分解を明らかに抑制していたので、この添加は内在性システインプロテアーゼを阻害したことが確かである。

(7) ホッケ TGase 粗酵素の Ca^{2+} 要求性の検討

魚肉の TGase の場合は活性化のために 2~5 mM 程度の Ca^{2+} が必要であることが報告されている(佐伯ら 1988, Wan ら 1994)。これまでの実験系では、魚肉 TGase の活性化に十分と考えられる 5 mM (あるいは 10 mM) CaCl_2 をホッケ TGase の反応組成液に添加している。この濃度が、ホッケ TGase の活性を最大化させるのに十分であるのかスケトウダラ TGase を対照として再検討した。ここでは、スケトウダラ Mf を基質とした。得られたミオシン HC 架橋反応の結果を Fig. 3-11 に示した。 Ca^{2+} を添加しなかった場合は両 TGase 粗酵素で架橋反応は起こらなかった。 CaCl_2 濃度の増加に伴い両酵素による架橋反応の進行は同じように促進され、スケトウダラ Mf の HC は徐々に減少し、高分子のミオシン HC 架橋体成分が増加した。これらの結果は、ホッケ TGase の Ca^{2+} 要求性は、これまでに Wan ら(1994)が報告した魚類の TGase の要求性(2 - 5 mM)と同じであり、スルメイカ筋肉の TGase(Nozawa ら 2001)のように高濃度の Ca^{2+} (20 mM) を要求するものではなかった。

(8) ホッケおよびスケトウダラの TGase と Mf の交差性の検討

これまでの結果から、高鮮度なホッケ落とし身に含まれる TGase は高い活性を示し、この酵素はスケトウダラの Mf にも強く作用することが確認された。しかし、両魚種の TGase と Mf の交差性を定量的に調べたわけではない。そこで、両 TGase は両 Mf に同様に作用するのか、あるいは Mf の種類を変えると架橋反応が変化するのかについて検討した。そのため、それぞれの魚肉から TGase を 1 M ソルビトール存在下で抽出し、両魚種の Mf に対して交差実験を行った。また、抽出された粗酵素の活性が同じであるのかも知るため、ここでは用いる酵素量を変化させて HC 架橋反応の進行を比較した。各 TGase 粗酵素液を段階的に希釈して、それぞれの Mf に対して添

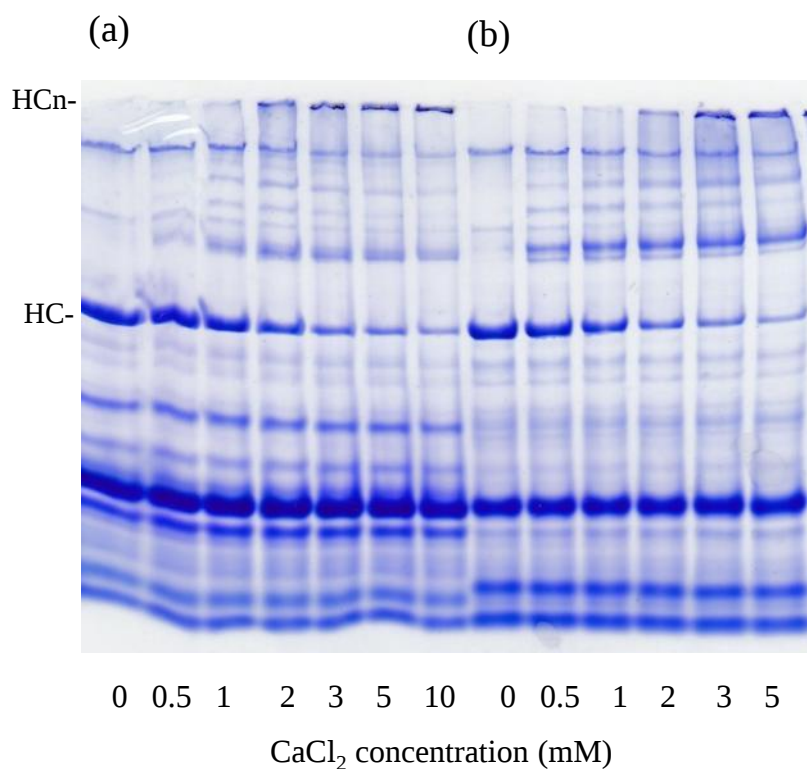


Fig. 3-11 CaCl₂ requirement for AG TGase.
Myosin cross-linking for AG (a) and walleye pollock (b) Mf by TGase from AG were compared by changing CaCl₂ concentrations. Other experimental conditions are the same as described in Fig. 3-7.

加し、25℃で2時間作用させた。なお、TGase 添加量は粗酵素液の原液をそのまま添加した場合を1.0として相対濃度で表した。結果をFig. 3-12, Fig. 3-13に示す。ホッケ TGase を用いた場合(Fig. 3-12), ホッケ, スケトウダラ両 Mf に対しても, 同様に架橋反応を進行させ, HC 残存量は粗酵素添加量の増加とともに減少し, 添加量 0.2(粗酵素液の 1/5 希釈)で HC は完全に消失した。この結果から, ホッケ TGase はホッケとスケトウダラの Mf をほとんど区別することなく HC を架橋させることが確認された。

Fig. 3-13 にスケトウダラの粗酵素を用いた場合を示す。ホッケ粗 TGase と同様に酵素量が増加するにつれ, 架橋反応が進行した。ホッケ TGase に比べ, 粗酵素液の同一希釈率で比較した場合, 明らかに架橋の進行はスケトウダラ TGase の方が少なかった。そして, 0.8 の添加でもミオシン HC の完全な消失は認められなかった。本研究においては, スケトウダラ TGase の特性について詳細に検討していないが, ホッケ TGase と同様, スケトウダラ TGase の失活も急速に進行するものと考えられる。今後, スケトウダラの鮮度と TGase 活性について検討する必要がある。

以上, 本研究で用いた高鮮度なホッケ魚肉は, 非常に高い TGase 活性を有することが確認された。そして, ホッケ TGase はホッケおよびスケトウダラ各ミオシンに対して同じように架橋反応を進行させると結論した。すなわち, ホッケのミオシンの構造がスケトウダラのミオシンに比べて, 酵素による架橋が起きにくいわけではないことが確認された。

(9)各種魚類落とし身の貯蔵中の架橋反応の変化

すでに, 志水ら(1981)によって, 魚肉のゲル形成特性として坐りやすい魚種, 坐りにくい魚種があることが提案されている。本章において, 坐り効果を示さず, ミオシン HC の架橋反応も起こらないと言われているホッケが, 高鮮度であれば十分に架橋反応が認められること, さらにその作用が冷蔵中に簡単に消失することを明らかにした。そこで, ホッケ以外の魚種でも同じような現象が認められるのか数魚種で検討した。用いた魚種は, アイナメ, ケムシカジカ, ブリである。いずれも, 硬直前の魚体を使用した。

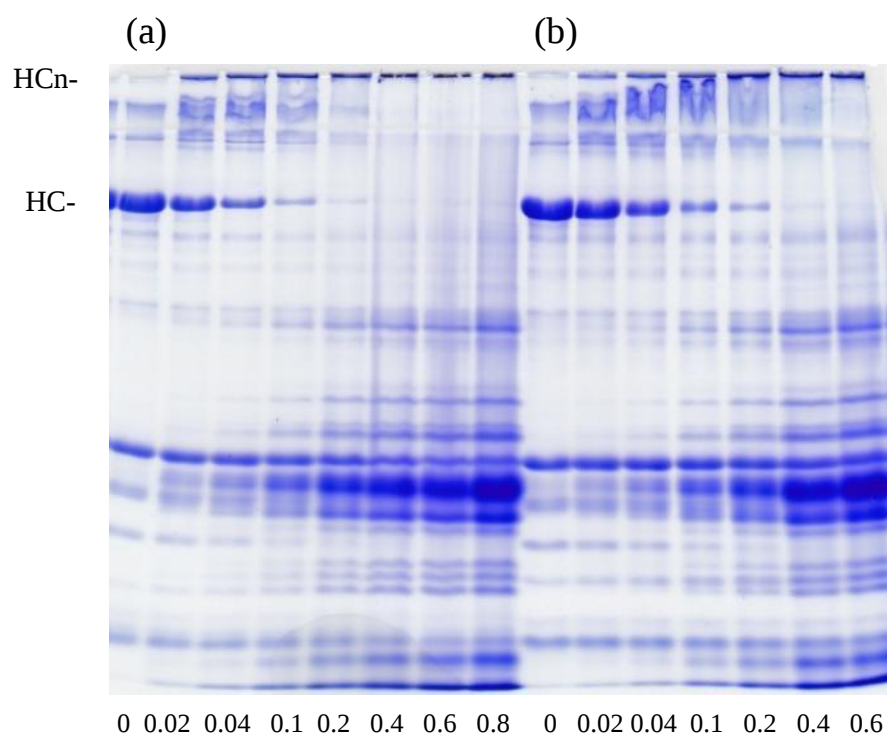


Fig. 3-12 AG TGase activity against Mf of AG and walleye pollock.

Myosin cross-linking reaction was conducted by changing crude AG TGase content. The medium consisted of 0.5 ml of crude enzyme with various dilutions and 0.5 ml of other components including 0.25 ml of Mf from either AG (a) or walleye pollock (b). Crude TGase was diluted with the buffer used for extraction. Other conditions for the reaction were the same as in Fig. 3-7. SDS-PAGE was conducted with 5 % polyacrylamide containing.

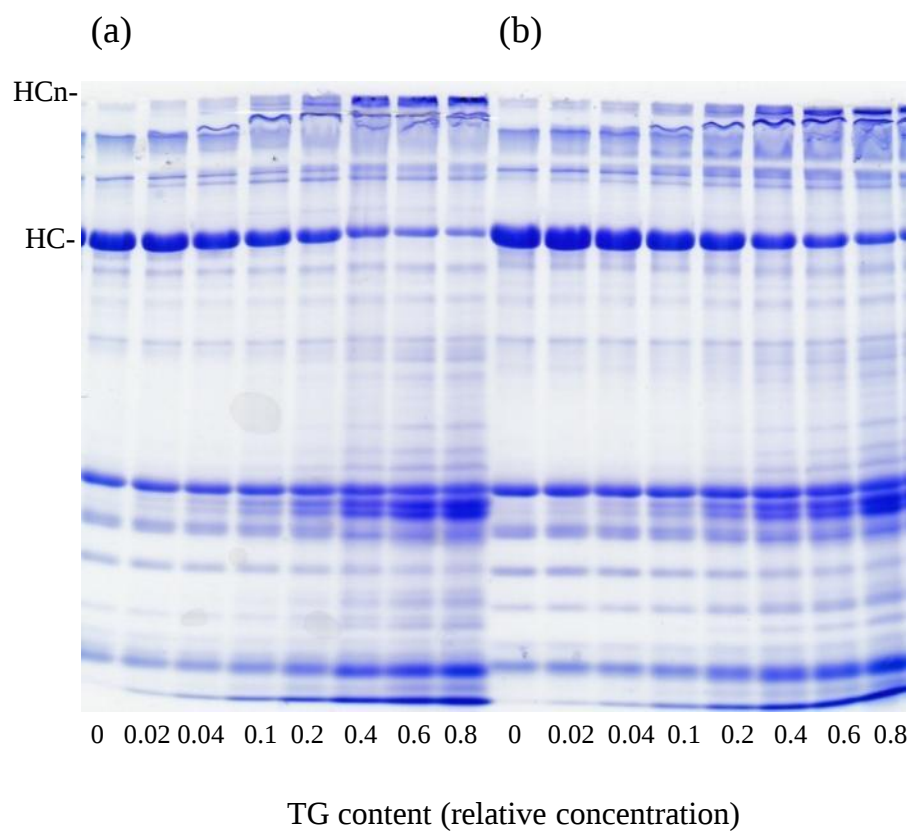


Fig. 3-13 TGase activity of walleye pollock against Mf of AG and walleye pollock.

The same experiments as in Fig. 3-12 were conducted by replacing AG TGase by walleye pollock TGase. Other conditions are also the same as in Fig. 3-12. Mf from AG (a) and walleye pollock (b) were used.

Fig. 3-14, Fig. 3-15, Fig. 3-16 にそれぞれの魚肉を 5°C で保管した時の、ミオシン HC 架橋反応の変化を示した。アイナメはホッケと同様に、保管前には 25°C での加温 4 時間にわたり、ミオシン HC の架橋反応が進行し、4 時間でほぼミオシン HC は消失した。しかし、翌日には架橋反応は大きく減少し、4 日後には全く架橋反応が認められなくなった。ケムシカジカも当日の試料ではミオシン HC の架橋反応が顕著に確認された。1 日後でも架橋反応は低下していたがまだ検出された。さらに、2 日後には架橋体がまだ検出されるが、HC の分解成分も多量検出されるように変化した。4 日後には架橋は認められず、ミオシン HC の分解のみが検出されるようになった。ホッケ、アイナメに比べ、貯蔵による架橋反応の低下が緩やかであるため、ケムシカジカの TGase はこれらに比べ多少安定であることが示された。

ブリを用いた場合、アイナメやケムシカジカに比べて、漁獲当日の落とし身でも 25°C 加温中の架橋反応の進行は遅かった。しかし、この活性は 1 日後ではほとんど減少せず、4 日後でもまだ架橋反応の進行が認められたので、ブリの TGase は比較的安定であると推察された。これらの結果から、魚種によりその TGase の安定性が異なり、寒帯に生息する魚種の TGase はミオシン HC と同様に不安定であり、これまであまり配慮されてこなかった TGase の失活の速度、程度がすり身の品質に大きく関わる可能性が高いことが示された。

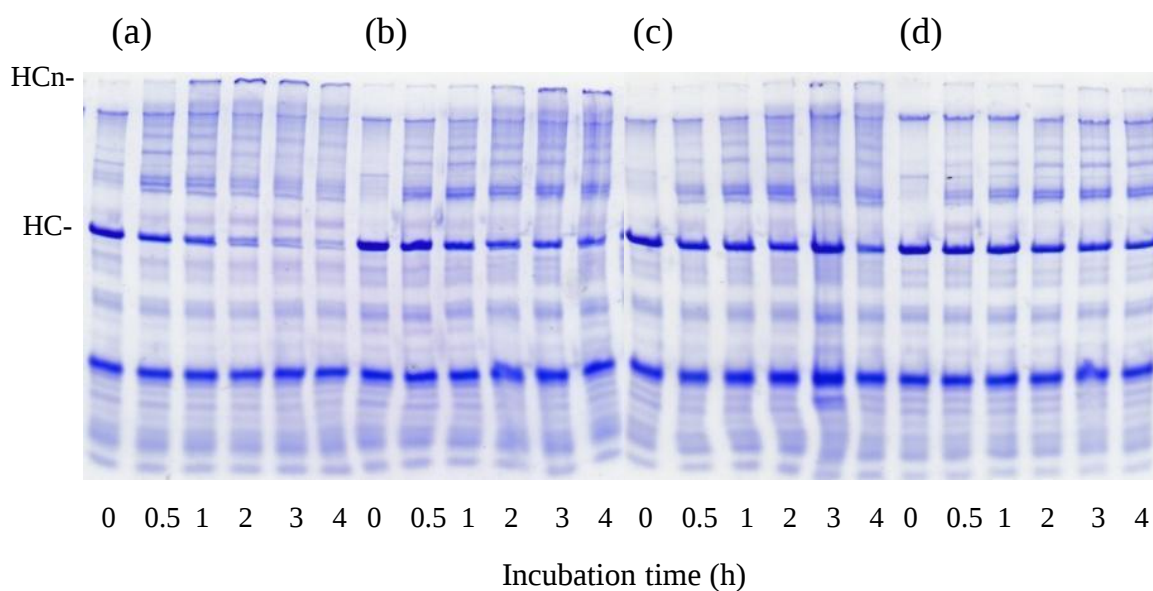


Fig. 3-14 Effect of storage of fat greenling *Hexagrammos otakii* meat on its myosin cross-linking reaction.

Fat greenling meat was stored at 5°C for up to 4days. Salt-ground meat was prepared from the stored meats and incubated at 25°C for up to 4 h. Myosin cross-linking reaction was monitored as in Fig. 3-2. (a), (b), (c), and (d) indicate the meats stored for 0 day, 1 day, 2 days, and 4 days, respectively.

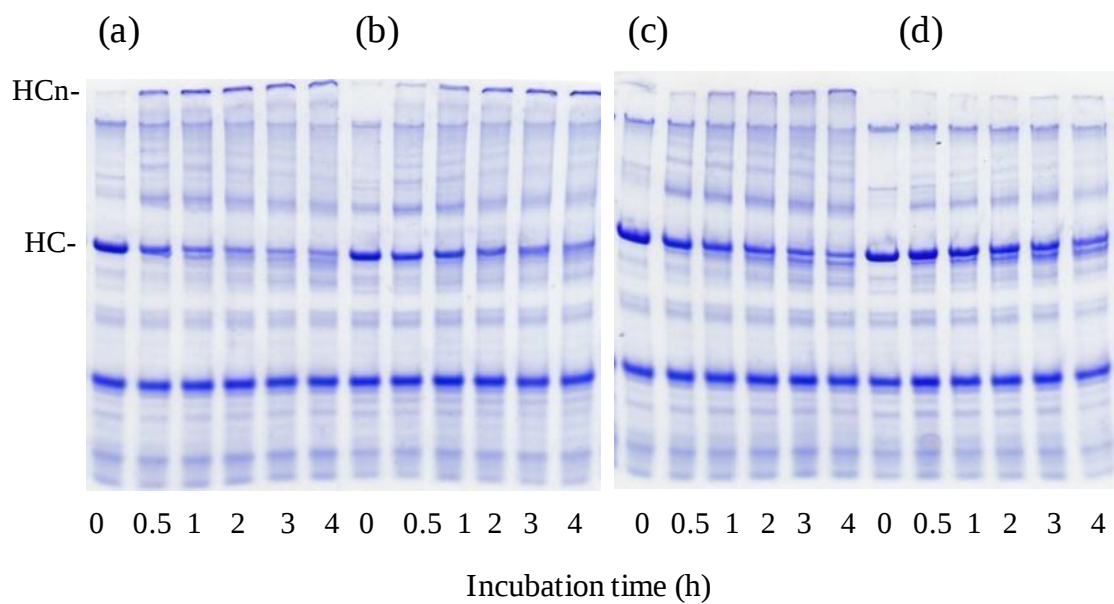


Fig. 3-15 Effect of storage of sea raven *Hemitripterus villosus* on its myosin cross-linking reaction.

The same experiments as in Fig. 3-12 were conducted by using sea raven meat. (a), (b), (c), and (d) are the experiments done with fish stored for 0 day, 1 day, 2 days, and 4 days, respectively.

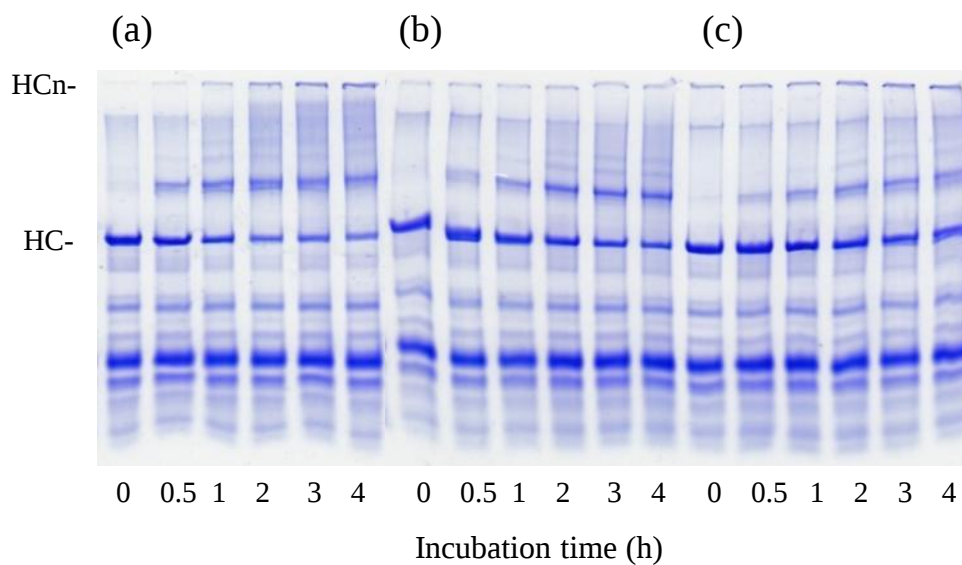


Fig. 3-16 Effect of storage of yellowtail meat on myosin cross-linking reaction.

The same experiments as in Fig. 3-12 were conducted by using yellowtail. (a), (b), and (c) are the experiments done with fish stored for 0 day, 1 day, and 4 days, respectively.

小考察

第2章では、生鮮ホッケからモデル的にすり身を製造し、ゲル化特性を調べた。その結果、市販のホッケ冷凍すり身と同様に、そのゲル化特性には坐り効果が期待できないことが確認され、これまでの知見を支持するものであった。しかしながら、スケソダラ洋上すり身では、漁獲後ただちにすり身が生産されることから、かなり高鮮度の魚体が用いられていたことが推察される。そこで、本章では、死後硬直前あるいは硬直開始直後の非常に高鮮度なホッケを用い、すり身ではなく、落とし身を用いて、25°C 予備加熱による HC 架橋反応が起きるか再試験した。驚いたことに、3 %ポリアクリルアミド/0.5%アガロースゲルに進入できないような高分子 HC 架橋体が1時間以内(25°C)に形成(Fig.3-1)されることを認めた。これは、ホッケの魚肉でミオシン架橋反応が検出された最初の報告であり、スケトウダラ陸上2級すり身で認められる反応と比べても著しいものであった。落とし身中の TGase 活性は高く、12 unit という値(Table.3-1)が得られた。しかし、水晒し1回処理で5.5 unit(Table3-1)に大きく減少したので、TGase の機能を最大限に利用するには落とし身をそのまま利用の方が良いことが示唆された。市販ホッケすり身に残存している TGase 活性を測定したところ、活性は低く 1.5 unit 程度であった。一般的に、すり身工場では水晒し処理が2~3回程度行われていることから、水晒し処理による TGase の損出も大きいと判断される。

Araki と seki (1993) は、種々の魚肉およびすり身の TGase 活性について、25°C で1分間当たり 1 nmol の MDC をアセチル化カゼインに取り込ませる活性を 1 unit と定義して調べた結果、スケトウダラでは、魚肉が 0.41 unit, すり身(SA 級)が 0.33 unit, シロサケでは、それぞれ 0.33 unit, 0.05 unit であり、水晒しによる TGase の溶出による活性低下を示唆している。本研究では、25°C で 30 分間当たり 1 nmol の MDC を MC に取り込ませる活性を 1 unit と定義しているため、数値そのものの直接の比較はできない。市販ホッケすり身の TGase 活性を Araki らの定義(1993)に基づき計算すると 0.05 unit となり、シロサケすり身と同じ程度であった。また、ホッケの有する活性は 0.40 unit と換算され、スケトウダラ落とし身程度の値であることがわかる。ただし、Araki らが用いた魚類がどの程度の鮮度のものであったかは不明であるので、貯

蔵中の TGase 失活も考慮に入れた再検討が必要であると思われる。

死後硬直中の高鮮度なホッケ肉では、25℃予備加熱により、HC 架橋体の形成(F3-2)と MDC 取り込みによる明瞭な蛍光が HC に観察(Fig.3-3)された。しかし、保管 1 日目のホッケでは HC 架橋体形成が著しく減少し、MDC 取り込みも僅かに検出される程度にまで低下するので、保管中の TGase 失活が非常に大きいことが示された。ホッケの TGase は魚肉中でも粗酵素として抽出したものでも、失活が顕著であったことから、ホッケ TGase は根本的に非常に不安定であると結論された。

このような、TGase 活性の急激な失活には、ホッケに含まれる内因性プロテアーゼによる TGase の分解が関与しているのではないかと考え、プロテアーゼ阻害剤の大豆トリプシンインヒビター、E64、ペプスタチン A の 3 種類を落とし身に個別にまぶして混合し、保存した。しかし、いずれの阻害剤も保管中の TGase 活性の失活を抑制することができなかった (Fig.3-8,3-9,3-10)。本研究では 3 種類以外のプロテアーゼインヒビターについては検討していないが、ホッケの TGase 活性の失活がプロテアーゼによる TGase 自体の分解による可能性は低いと思われる。

このような不安定なホッケ TGase が特別なのだろうか、熱安定性を中心にスケトウダラ TGase と比較した。その結果、MC に対する MDC の取り込み活性において両酵素の熱安定性に差は認められず、ホッケの酵素が特別不安定であるという結果 (Fig.3-6) は得られなかった。また、スケトウダラ Mf を基質とした時のミオシン架橋反応においても、両 TGase に差は認められず (Fig.3-7)、ホッケのミオシンが特別に TGase を受け付けないわけでもないことが推察された。また、Ca²⁺要求性についても同じ結果 (Fig.3-11) であった。さらに、両魚種間で TGase とミオシンを交差させ、架橋反応を見ることにより、TGase、Mf どちらの性質が架橋反応を決定づけているのかを探ったが、どちらの TGase もどちらの Mf に対しても同じように作用したので、特別な基質選択性は認められない (Fig.3-12,3-13) と結論された。すなわち、ホッケのミオシンの構造がスケトウダラのミオシンに比べて、TGase による架橋が起きにくい原因ではないことが確認された。同じ方法で抽出した TGase で活性を比較すると、高鮮度なホッケ魚肉中の方がスケトウダラに比べ明らかに高い活性を示した。この点については、

さらに高鮮度の試料を用いて検討する必要がある。

これらの結果から、ミオシンの架橋反応を触媒する TGase の性状において、そのすり身に坐り効果が認められないホッケと坐り効果があるスケトウダラには大きな差は認められなく、また、TGase の基質となるミオシンの構造においても大きな違いはないと結論された。

これまでの研究により、坐りにくい魚種に分類されるコイ、シロサケ、マサバでは、TGase によるミオシンの架橋反応が認められないと言われているが、その原因は同じではない。コイにおいては TGase 活性は十分に高いがミオシン構造が TGase の作用を受けないことが理由である(塚正ら 1991, Nakahara ら 1998)。一方、シロサケでは TGase 活性がもともと低いことに加え、魚肉に多量に含まれているアミノ酸であるアンセリンが TGase 活性を阻害することが理由である(Ni ら 1999)。マサバでは Ca^{2+} が不足していることが理由であり、 Ca^{2+} の添加により架橋が起こるように変化するとされている(塚正ら 1990)。

ホッケについては、TGase 活性そのもの、すなわち、TGase の急激な失活が大きな要因であると推察される。第 2 章においても、漁獲当日の新鮮なホッケを用いたが、ミオシン HC の架橋反応は確認できなかった。その理由として、この試験に用いたホッケは、実験室に搬入した時点で、すでに硬直が起こっており、ATP もほぼ消失していたことから、TGase の失活はかなり進行していたと推察される。さらに、すり身製造時の水晒し処理により TGase は流出した。これらのことが、同じ漁獲当日のホッケでもミオシン HC の架橋反応が認められなかった理由と考えられる。

なお、ホッケ以外の魚種についても、硬直前のような高鮮度な状態であれば、架橋反応が認められたことから、魚種による坐りやすさに関して TGase の失活を考慮した解析が必要である。

第4章 ホッケ落とし身の坐り効果とその維持

第3章において、冷凍すり身では認められなかった著しいミオシンの架橋反応が死後硬直初期レベルの高鮮度なホッケ落とし身で観察されることを示した。また、このような高鮮度ホッケの落とし身を水晒しすると逆にミオシン架橋反応を低下させることも観察した。この結果はホッケを落とし身のままで用いれば、坐り効果が期待できる練り製品が生産できることを示している。これまで、様々な低利用魚種の魚肉を練り製品原料とすることを想定した研究では、スケトウダラでの成功例にならい、冷凍すり身化が目標となってきた。第1章において、未利用魚のであるウロコメガレイの練り製品原料としての利用を目的とした研究でも、この手法を用いた。水晒し工程を含むすり身化の利点もあるが、落とし身を用いる利点もある。たとえば、水晒しのための装置、排水処理が不要であること、収量が大きくなること、魚肉が本来有している旨味成分を活用した製品が製造できることなどである。

高鮮度ホッケ落とし身のミオシン架橋反応が、ホッケを1日保管ただけで大きく低下するという問題に直面した。落とし身のこの機能を利用するには、ミオシン架橋反応、あるいは坐り作用を消失させることなく保管できる技術の開発が必須となる。本章では、ホッケ落とし身の冷蔵、冷凍保管中におけるTGase失活、および、それを抑制するための手段について検討した。また、高鮮度ホッケ落とし身の高い架橋反応能を活用したゲル物性改善法について検討した。

(1) 高鮮度ホッケ落とし身の坐り効果

死後硬直初期のホッケ落とし身を用いた場合、肉糊の予備加熱中に顕著なミオシン架橋反応が起きることを見出したが、この現象が加熱ゲルの物性上昇効果、すなわち坐り効果を伴っているのかを確認した。死後硬直初期のホッケから普通肉(2.5kg)を採取し、ミートチョッパー(目合 3.6 φmm)に通して落とし身とした。この落とし身に3% (w/w) NaCl と 5 mmol/kg CaCl₂ を添加して肉糊を調製し、直ちに 25°C で予備加熱を所定時間行った後、90°C で 30 分間加熱して二段加熱ゲルを製造した。なお、市販ホッ

ケすり身(高野冷蔵(株), 余市)では, 坐り効果が認められないことも確認した。

Fig. 4-1 に高鮮度ホッケ落とし身から調製した二段加熱ゲルの破断強度と破断凹みを示した。破断強度は予備加熱 1 時間で 443g まで上昇し, 予備加熱を行わない直加熱ゲルの 1.7 倍に増大した。また, 破断凹みについても 0.9cm から 1.2cm に増加した。しかし, 予備加熱を 1 時間より長く行くと破断強度と破断凹みはともに減少した。これらの結果は, 高鮮度ホッケ落とし身をそのまま利用する場合, 25°C での予備加熱時間は比較的短時間に設定すべきであることを示している。確認のために行った, ホッケ市販冷凍すり身は予備加熱しても加熱ゲルの破断強度と破断凹みは加熱時間とともに緩やかに減少した。

(2) 高鮮度ホッケ落とし身保存中の TGase 失活に対するソルビトールの抑制作用

スケトウダラ冷凍すり身には通常 8%程度の糖類が添加されるが, この糖類(おもにソルビトール)は不安定なスケトウダラミオシンを安定化させ, 凍結保存中のミオシン変性を抑制している。これにより, 冷凍すり身はゲル形成能を失わずに長期凍結保管が可能となった。ホッケのミオシンはスケトウダラと同等あるいはより不安定であることを第 1 章で示した。ホッケの落とし身に長期間ゲル形成能を維持させるためには, スケトウダラ冷凍すり身の同様に, ソルビトールによるミオシンの安定化は必須である。さらに, 第 3 章において述べたように, ホッケの TGase は非常に不安定で, 冷蔵 1 日で著しく失活するので, ホッケ肉のミオシン架橋反応, あるいは坐り効果を維持させるためには TGase の安定化も同時に達成させる必要がある。ソルビトールにそのような機能があるかどうか検討した。すなわち, TGase 失活に対するソルビトールの影響について, ホッケ肉を用いて調べた。高鮮度ホッケ落とし身に終濃度が 0.3 mol/kg となるようにソルビトールを混合して 5°C で保管した。Fig. 4-2 に保管前, 保管 1 日後の落とし身の架橋反応を比較した結果を示す。保管前の落とし身は, これまで示したように, 非常に強いミオシンの架橋反応が認められ, 25°C 予備加熱 1 時間でミオシン HC は消失し, 高分子なミオシン架橋体が観察された(Fig. 4-2a0)。しかし, 保管 1 日後

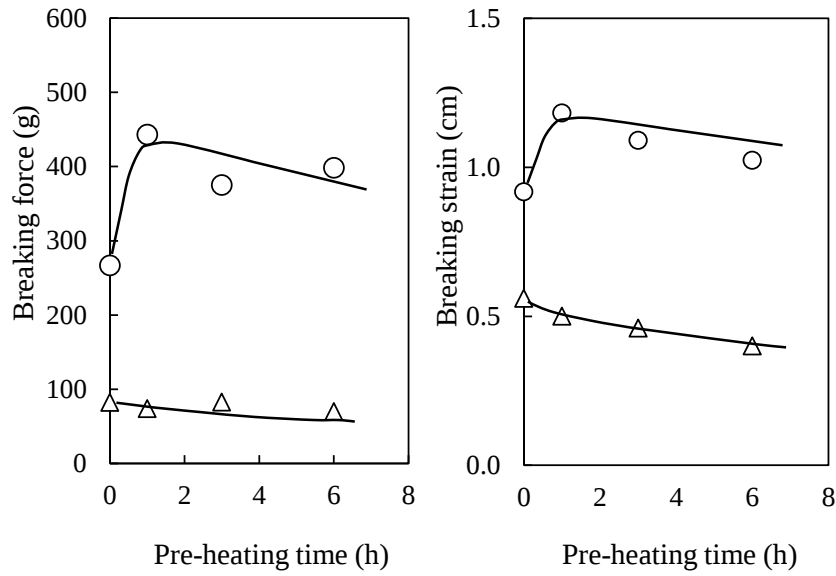


Fig. 4-1 Setting effect of fresh AG meat.

Salt-ground meats of fresh AG (○; 140 mg protein/g) and commercially distributed AG surimi (△; 100 mg protein/g) were pre-heated at 25°C and heated at 90°C for 30 min. Breaking force and breaking strain of the gels were measured as in Fig.1-2.

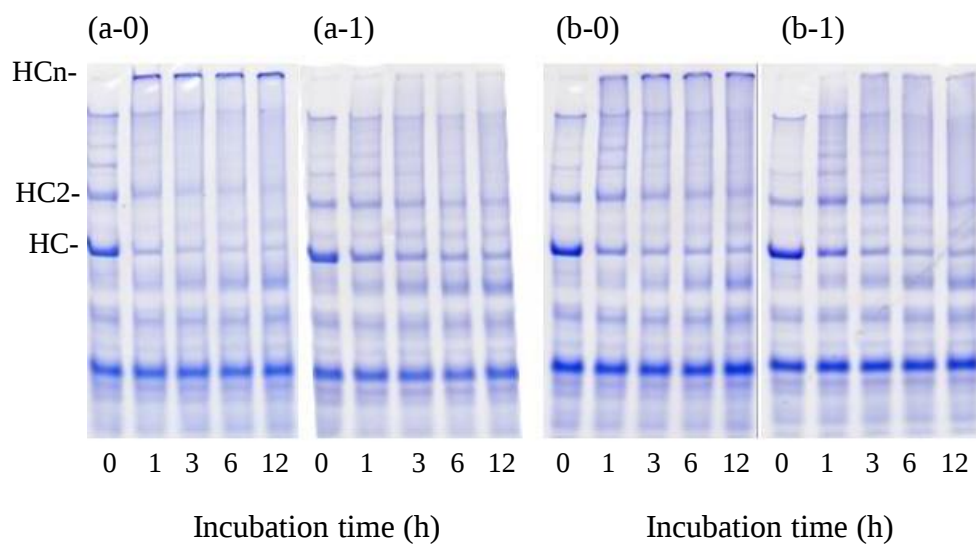


Fig. 4-2 Suppression of TGase inactivation during the storage of AG mince by adding sorbitol.
 AG mince was mixed with 0.3 M sorbitol (b) and stored for 1 day. The same mince without sorbitol (a) was also stored. Salt-ground meat from AG mince without storage (a-0, b-0) and with 1 day storage (a-1, b-1) was incubated at 25°C. Myosin cross-linking reaction was evaluated by SDS-PAGE. HC, HC2, and HCn are myosin heavy chain monomer, dimer, and polymers, respectively.

には顕著な架橋反応の低下が認められた(Fig. 4-2a1)。

一方、ソルビトール添加落とし身では、保管前の架橋反応は落とし身に比べ、ミオシン HC の減少は緩やかになり、二量体などが顕著に検出された。そして加熱時間が長くなると、ゲル先端に蓄積するような高分子な架橋成分も形成された(Fig. 4-2b0)。ソルビトール添加により架橋反応そのものが多少抑制されたが、これは、船津ら(1993)が報告しているスケトウダラすり身で認めた結果と同じである。保管 1 日後の架橋反応は、保管前に比べて高分子な架橋成分の形成が緩やかに進行したが、落とし身の保管 1 日後に比べて、ミオシン HC の二量体などの形成が多く認められた。ソルビトールはホッケ落とし身の TGase 失活を抑制していることが示された(Fig. 4-2b1)。これらの結果から、不安定なホッケの TGase の失活は糖類の添加で容易に抑制できる可能性が高くなった。

魚肉へのソルビトール添加により、ホッケ TGase 失活が抑制されたことから、さらに TGase そのものの安定性に及ぼすソルビトールの影響を粗酵素液を用いて詳細に調べた。ホッケから調製した粗酵素溶液に種々濃度のソルビトールを添加し、65 時間まで 5°C で保管し、TGase 活性の変化を追跡した。Fig. 4-3 に結果を示した。保管前の粗酵素液の TGase 活性は 28 unit であったが、1 M ソルビトール存在下で測定すると活性は 20 unit となり、約 30%の阻害が認められた。すなわち、ソルビトールそのものが TGase 活性をも抑制することを示している。この結果は Fig. 4-2 に示した落とし身のミオシン架橋反応がソルビトール存在下で多少抑制される事実を支持するものであった。粗酵素液をそのまま保管すると、活性は保管期間が長くなるにつれ低下したが、共存するソルビトール濃度の増加とともに失活の進行は抑制された。1 M ソルビトール存在下で粗酵素を保存すると、24 時間後でも 80%の活性を、63 時間後でも 72%の活性を示した。この結果はソルビトールが濃度依存的に TGase の失活抑制していることを示す。そこで、抑制作用を定量的に解析するため、保管中の TGase 失活を一次反応式とみなし、失活速度を定量的に解析した。その結果を Fig. 4-4 に示す。TGase 残存活性の対数値と保管時間の間に直線関係が得られ、一次反応を用いて失活速度の解析が可能であった。そこで、得られた直線の傾きから TGase の失活速度(k_D , sec^{-1})を算

出した。1mol/kg ソルビトールの添加で、 k_D は 9.5×10^{-4} から 8.7×10^{-5} まで減少し、TGase は約 10 倍安定化されることがわかった。さらに、得られた k_D のソルビトール濃度に対するプロットを Fig.4-5 に示した。得られた両者の関係は下に凸の曲線となったので (Fig. 4-5a), 大泉ら (1981) が糖の種類によるミオシン変性抑制作用の違いを示すために提案した方法に準じて、 k_D の対数値をソルビトール濃度に対してプロットしたところ、両者の間に直線関係が得られた (Fig. 4-5b)。すなわち、ソルビトールの TGase 失活抑制作用は濃度が規定されれば、定量的に予測できることが確認された。1mol/kg ソルビトールによる安定化は約 1 対数単位(10 倍)であり、マイワシやマサバ等のミオシンに対するソルビトールの変性抑制作用に近似した値(大泉ら 1981)となった。

(3) ソルビトール添加ホッケ落とし身の凍結保管による坐り効果の維持

高鮮度ホッケ落とし身は市販冷凍すり身では認められない 25°C 予備加熱による加熱ゲルの物性改善、すなわち坐り効果が認められた。練り製品原料として用いることを想定した場合、ゲル形成能を維持したままで落とし身を凍結保管できるかが重要な問題である。落とし身へのソルビトール添加が冷蔵保管中のミオシンの架橋反応を維持させたことから、同じように冷凍中もその機能を維持させることが予想された。そこで、高鮮度ホッケ落とし身に、冷凍すり身に準じて、10% (w/w) のソルビトールを添加し、5 ヶ月間凍結保管した。この際、TGase の不安定さを考慮し、一般的に用いられる -25°C に加え、超低温の -80°C でも凍結保管した。

まず、ソルビトールが落とし身中のミオシンを凍結変性から保護していることを確認するため、凍結保管落とし身から定量的にホモジネート(Mf)を調製し、得られたホモジネートを用い、タンパク質量と Ca^{2+} -ATPase 活性を測定した。Fig. 4-6 に凍結保管中の落とし身のタンパク質量 (Fig. 4-6a) と Ca^{2+} -ATPase 活性 (Fig. 4-6b) の変化を示した。タンパク質量はいずれの試料でも大きな差はなく (174~189 mg/g), ホモジネートが落とし身からほぼ定量的に調製されたことが示された。このようにして調製したホモジネートを用い、 Ca^{2+} -ATPase 活性を測定したが、いずれの凍結保管温度でも保管 5 ヶ月までにほとんど失活は認められなかった。すなわち、10% (w/w) ソルビトールの添加は

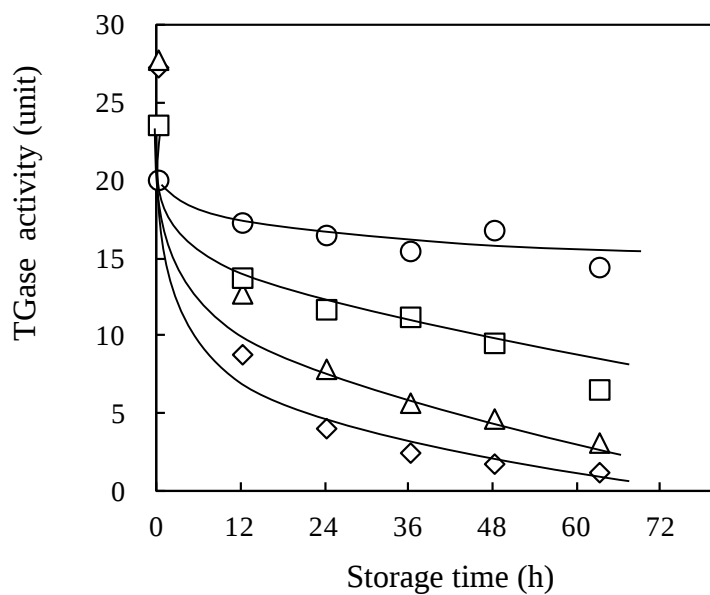


Fig. 4-3 Sorbitol concentration dependent suppression of TGase inactivation during the storage. Crude enzyme extracted from fresh AG meat was stored at 5°C in the presence of various concentrations of sorbitol. TGase activity was measured at 25°C for 30 min in the following medium; 2 mg/ml MC, 0.5 mM MDC, 5 mM CaCl₂, 5 mM DTT and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). Sorbitol concentrations added are 0 M (◇), 0.25 M (△), 0.5 M (□), and 1.0 M (○), respectively.

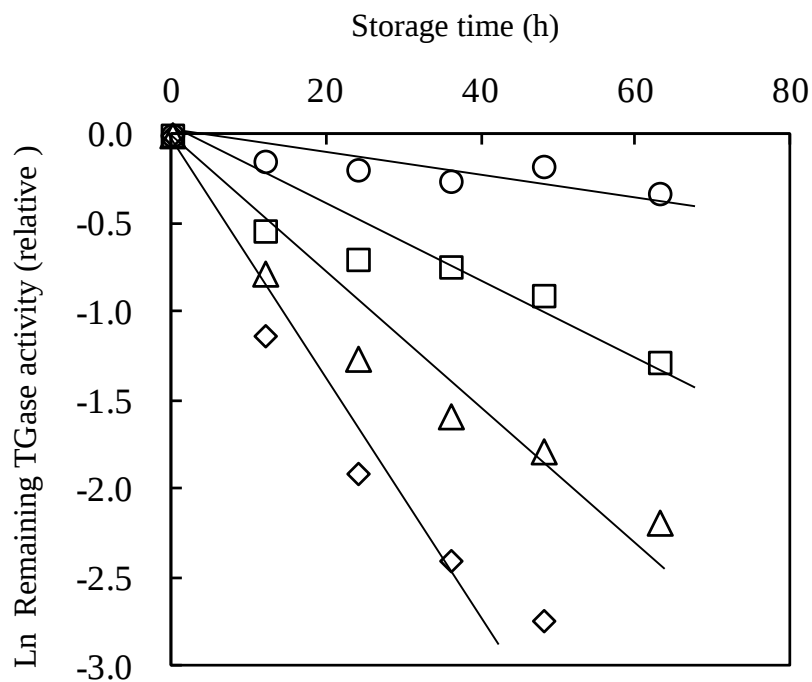


Fig. 4-4 The first order inactivation of TGase activity during its storage at 5°C.

TGase inactivation was analyzed by assuming the first order reaction mechanism. The data in Fig.4-3 were used to make the graph. The first order rate constant (k_D) for inactivation of TGase was calculated by using the relation, $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$, where C_0 and C_t are the TGase activities before and after t second of heating. The same symbols as Fig.4-3 were also used.

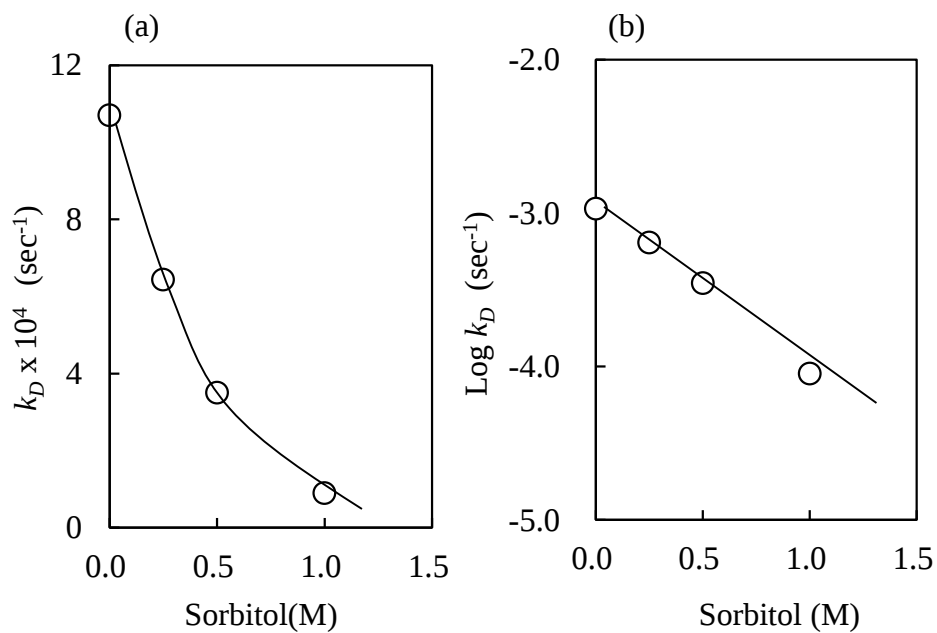


Fig. 4-5 Effect of sorbitol concentration on TGase inactivation. The inactivation rates (k_D) calculated from the graph in Fig. 4-4 were plotted. Inactivation rates (a) and their logarithmic values (b) were plotted against sorbitol concentrations.

-25°Cでも-80°Cでも5ヶ月間はミオシン変性を十分に抑制していることが確認された。

Fig. 4-7 に凍結保管中の落とし身中の TGase 活性の変化を追跡した結果を示した。落とし身の TGase 活性は凍結前の活性が 15.4 unit であったものが、5ヶ月後でも-25°C の凍結保管で 11.7 unit を、-80°C 凍結保管で 12.2 unit の活性を示し、高い活性を維持していた。同じ凍結保管落とし身中のミオシン変性がどちらの保管温度でもほぼ完全に抑制されていたことを考えると、TGase はミオシン以上に不安定であることが推定された。少なくとも、10% (w/w) ソルビトールを添加することで凍結保管期間が5ヶ月間程度であれば、-25°C でも高鮮度ホッケ落とし身が有していた TGase 活性をかなり維持できると判断した。

(4) ソルビトール添加ホッケ落とし身の凍結保管によるゲル形成能の変化

ソルビトールを添加して凍結保管した落とし身がまだ坐り効果を示すのかについて検討した。凍結保管落とし身に、CaCl₂（終濃度 5 mmol/kg）と蒸留水を加えた後、全重量に対して 3% (w/w) の NaCl を添加して肉糊（タンパク質濃度 160 mg/g 調整）を調製した。この肉糊を直ちに 90°C で 30 分間加熱して直加熱ゲルを、25°C 予備加熱を 2 時間行った後に 90°C で 30 分間加熱し二段加熱ゲルを製造した。得られた加熱ゲルの破断強度と破断凹みを測定した。また、25°C 予備加熱時間による坐り効果についても詳細に検討した。-25°C で 5 ヶ月凍結保管した落とし身を用い、上記と同様に肉糊を調製した。その際、3% NaCl と 5 mmol/kg CaCl₂ に加えてプロテアーゼインヒビターの E64 を 200 μmol/kg になるよう添加した。これは Fig. 4-2 において架橋反応に加えて、多少のミオシン分解が認められたため、このミオシン分解の影響を取り除くためである。肉糊のタンパク質濃度は 130 mg/g とした。この肉糊は 25°C 予備加熱を所定の時間行った後、90°C で 30 分間加熱し二段加熱ゲルを製造した。

Fig. 4-8 に凍結保管中の落とし身のゲル形成能の変化を示した。凍結保管前の落とし身から調製した直加熱ゲルは、破断強度が 273 g、破断凹みが 1.0 cm であった。二段加熱ゲルの値はそれぞれ 540 g、1.2 cm で、明らかな坐り効果が認められた。この落とし身の破断強度と破断凹みは5ヶ月間に渡る凍結保管中にほとんど変化せず、十分な

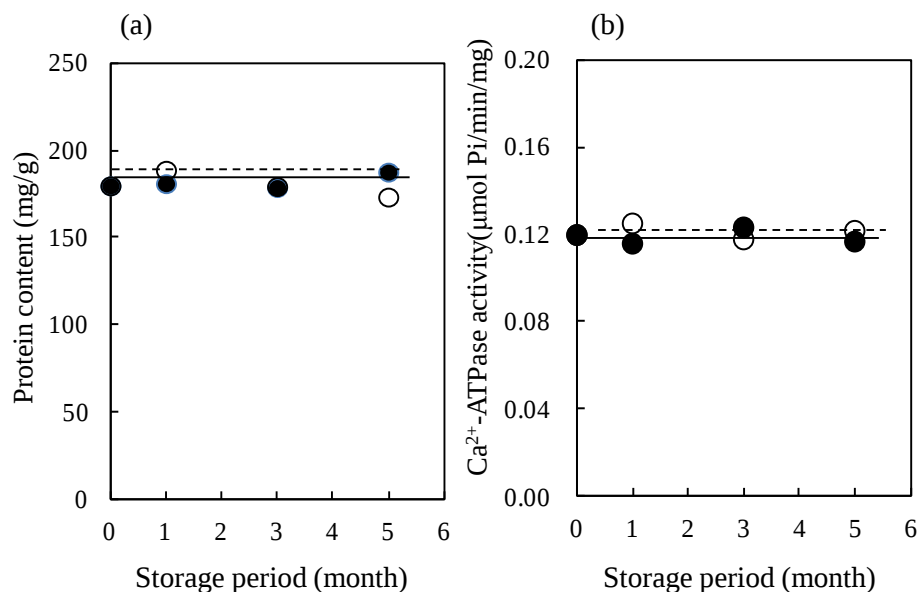


Fig. 4-6 Myosin denaturation during the frozen storage of AG mince containing 10% sorbitol.

Frozen AG mince (1 g) was washed with 40 ml of 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5) and the washed residue was homogenized on phycotron NS-10 (Microtec co.,LTD) for 2 min at 15,000 rpm. Protein content (a) and Ca^{2+} -ATPase activity (b) for the homogenates were measured to evaluate myosin denaturation in AG mince. Storage temperature used are -25°C (○), and -80°C (●), respectively.

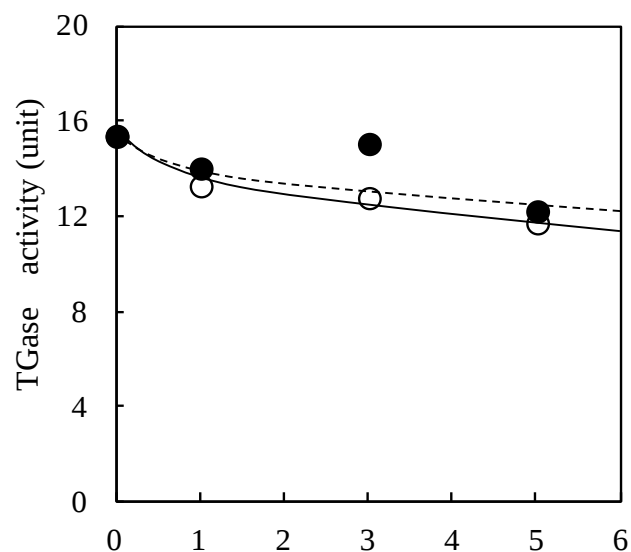


Fig. 4-7 Change in TGase activity during the frozen storage of AG mince containing 10% sorbitol.

AG mince was frozen stored for up to 5 months at either -25°C (O) or -80°C (●). AG mince was homogenized in 2 volumes of 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH7.5) containing 1 M sorbitol and the supernatant obtained by centrifugation at 20,000 xg for 20 min was used as crude enzyme. TGase activity was assayed at 25°C for 30 min in the reaction medium consisted of 2 mg/ml dimethyl casein, 0.5 mM MDC, 5 mM CaCl₂, 5 mM DTT, and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5).

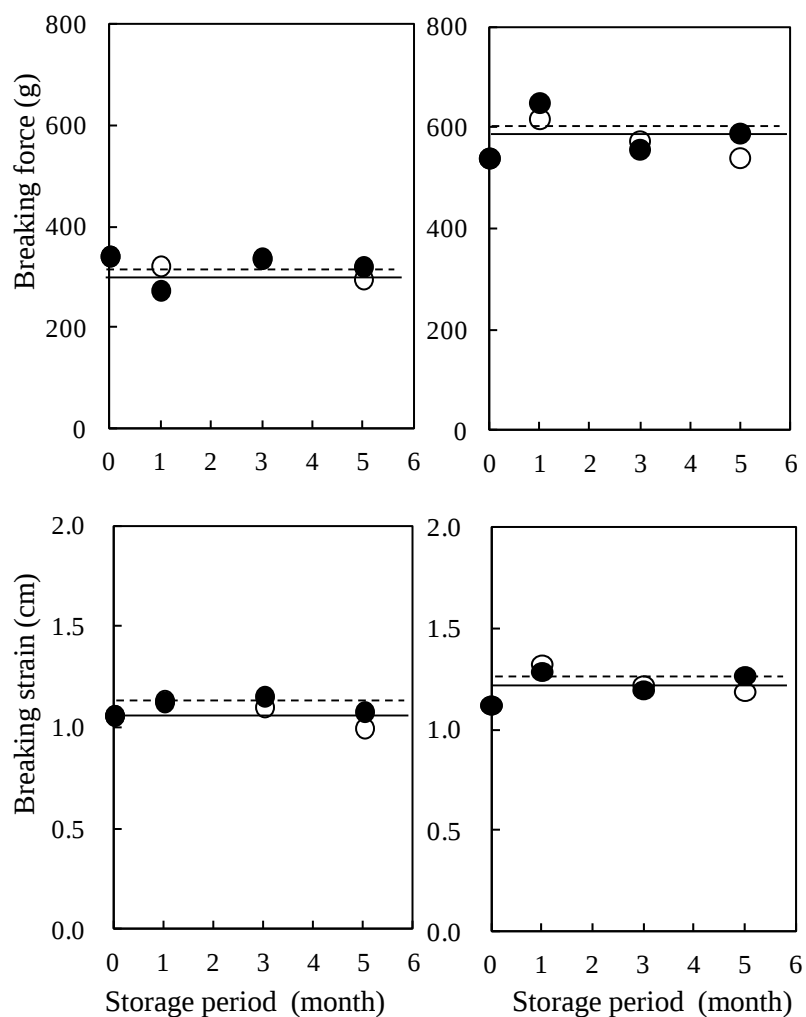


Fig. 4-8 Gel properties of the thermal gels produced from frozen stored AG mince containing 10% sorbitol.

AG mince containing 10% sorbitol was frozen stored either at -25°C (○) or at -80°C (●). Salt-ground mince was directly heated at 90°C for 20 min to produce directly heated gel and other part of the salt-ground mince was incubated at 25°C for 2 h and heated at 90°C to produce two-step heated gel. Breaking force and breaking strain were measured as in Fig. 1-2.

坐り効果が維持されたままであった。また、凍結保管温度が -25°C でも -80°C と同じように維持されたので、通常の凍結条件でも坐り効果を維持したまま凍結保管できることがわかった。

Fig. 4-9 に凍結保管 5 ヶ月間のホッケ落とし身の二段加熱ゲルの破断強度と破断凹みを示した。直加熱ゲルの破断強度は 275g であったが、予備加熱が長くなると破断強度は上昇し、加熱 4 時間で約 3 倍の 826g に増大した。この結果は先の Fig. 4-1 で示した高鮮度ホッケ落とし身からの肉糊では加温 1 時間で最大値に達するという結果とは多少異なったが、ソルビトールを 10%(w/w)添加することで、 25°C 予備加熱中の TGase の失活が抑制され、長時間にわたり、その活性が維持されていることも関係しているのではないと思われる。市販のホッケ冷凍すり身にも同じような量の糖類が添加されているが、全く坐り作用が認められない(Fig.4-1)ので、すでに凍結する前に TGase が失活していることが予想された。また、E64 によるミオシンの分解が抑制されていることも関与しているかもしれない。破断凹みについても、 25°C 予備加熱時間が長くなると増大し、加熱 2 時間で 1.2cm から 1.7cm まで増加した。これらの結果は、落とし身を坐り効果を残したまま保存するにはソルビトールを添加する必要があるが、同時にソルビトールは肉糊の加温中の TGase 活性の失活も抑制し、さらに大きな坐り効果を与える可能性が示された。

Fig. 4-10 に凍結保管 5 ヶ月間のホッケ落とし身の 25°C 予備加熱中のミオシンの架橋反応の変化を示した。ミオシンの架橋反応体の形成は加熱 0.5 時間でも観察され、予備加熱の経過により HC は徐々に減少し、ゲルに進入できない高分子成分が増加した。また、予想通り E64 を添加することによって、Fig. 4-2 の E64 未添加の高鮮度落とし身の予備加熱で観察されたミオシンの分解は検出されなかった。

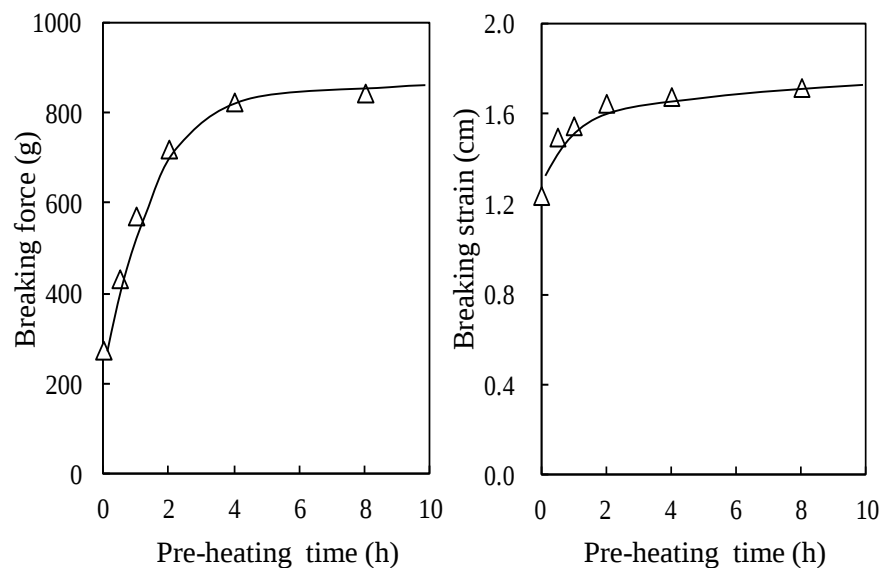


Fig. 4-9 Setting effect for froze stored AG mince with 10 % sorbitol. AG mince was frozen stored for 3 months. Salt-ground mince containing 3% NaCl, 10 mM CaCl_2 , and 200 μM E64 was pre-heated at 25°C and heated at 90°C for 30 min to produce two-step heated gel. Breaking force and breaking strain of the gels were measured as in Fig. 1-2.

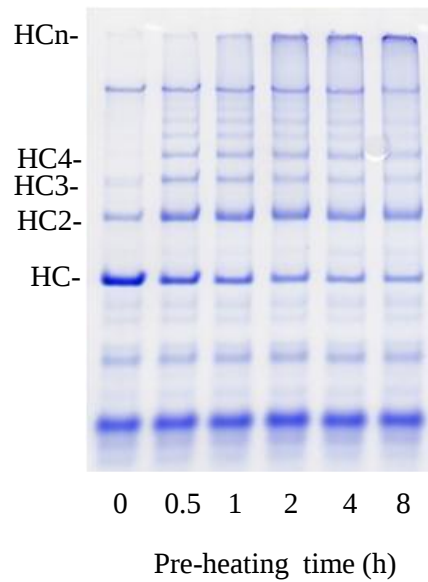


Fig. 4-10 Myosin cross-linking reaction detected with salt-ground mince prepared from frozen stored AG mince containing 10% sorbitol.

The same salt-ground mince as in Fig. 4-10 was incubated at 25°C. Incubated salt-ground mince was dissolved into SDS-UM solution, and myosin cross-linking was analyzed on 3% polyacrylamide and 0.5 % agarose containing 0.1 % SDS. HC, HC2, and HCn are myosin heavy chain monomer, dimer, and polymers respectively. Numbers after HC show polymerization extent.

(5)高鮮度ホッケ落とし身混合による市販冷凍すり身のゲル形成向上の試み

高鮮度ホッケ落とし身の有している非常に高い架橋反応性，坐り効果を有効に利用する一つの試みとして，この高鮮度ホッケ落とし身をゲル形成の低下した他のすり身に混合し，ゲル物性改善が得られるかについて検討した。用いたすり身は，スケトウダラ，ホッケに加え，ナガヅカの市販すり身である。ナガヅカ冷凍すり身は白色度が高いことが特徴で，北海道で生産される高級すり身であるが，坐り効果が認められないと評価されている魚種である。落とし身混合試験に先立ち，ホッケ TGase が各すり身の Mf に対しても架橋反応を示すかを検討した。前章においても，高鮮度ホッケ肉から抽出した TGase はホッケ及びスケトウダラ Mf に同じように作用することを示したが，ここでは，現実的な実験として，市販の各種冷凍すり身から調製した Mf を用いた。また，ここでは粗 TGase の添加量を変化させることで，個々の魚種の Mf に同じような架橋反応を示すかどうかを検討した。Fig. 4-11 に結果を示す。ホッケとスケトウダラ Mf に対しては，これまでの実験結果と同様に同じ TGase 添加量が同じであれば，同じように架橋反応体の形成が確認された。また，ナガヅカの Mf に対しても，同じ量の TGase 添加で架橋体の形成が認められた。

そこで，高鮮度ホッケ落とし身を各市販すり身に混合し，ゲル物性の改善が得られるかについて検討した。高鮮度ホッケ落とし身，および，各市販すり身に 3%(w/w)NaCl, 5 mM CaCl₂, 200μM E64 を加えて肉糊（たんぱく質濃度 150mg/g 調整）をそれぞれ調製した。また，高鮮度ホッケ落とし身と各市販すり身のたんぱく質濃度がそれぞれ 75mg/g となるように混合した肉に，3%(w/w)NaCl, 5 mM CaCl₂, 200μM E64 を加えて肉糊をそれぞれ調製した。各肉糊はプラスチック製容器(直径 3.7cm, 高さ 2cm)に充填後，90℃ で 30 分間加熱した直加熱ゲルと 25℃ で 2 時間の予備加熱後に 90℃ で 30 分間加熱した二段加熱ゲルとした。Fig. 4-12 に直加熱ゲル，Fig. 4-13 に二段加熱ゲルの破断強度と破断凹みに対するホッケ落とし身添加効果を示した。ホッケ落とし身（Samples a, 以下同じ）から製造した直加熱ゲルの破断強度，および，破断凹みは，それぞれ 381 g, 1.0 cm であった。この値はホッケすり身(b)，スケトウダラすり身(c)，ナガヅカすり身(d)の示す値に比べて明らかに高かったが，ミオシンの変性程度の違い

がその理由と考えられる。ホッケ落とし身とホッケすり身混合(e), ホッケ落とし身とスケトウダラすり身混合 (f), ホッケ落とし身とナガヅカすり身混合(g)の直加熱ゲルの破断強度と破断凹みは, それぞれ単独で得られた値の単純平均値 $((a+b)/2, (a+c)/2, (a+d)/2)$ よりも同等, もしくは低い値となり, 高鮮度ホッケ落とし身の添加効果は全く認められなかった。

一方, Fig.4-13 に示した二段加熱ゲルの破断強度, および, 凹みでは, ホッケ落とし身(a)は, それぞれ 745 g, 1.4 cm となり, 破断強度は直加熱ゲルの約 2 倍に増大し, 明らかな坐り効果が確認された。ホッケすり身(b)の破断強度は 238 g であったが, ホッケ落とし身とホッケすり身混合(e)は 573 g に増大した。この値はホッケ落とし身(a)の示す値から低下しているが, ホッケ落とし身(a)とホッケすり身(b)の単純平均 $(a+b)/2$ の 492 g より大きく, ホッケ落とし身添加は市販ホッケすり身のゲル物性を向上させることを示している。同じように, スケトウダラすり身(c)の破断強度 318 g がホッケ落とし身とスケトウダラすり身混合(f)657 g に上昇し, ホッケ落とし身(a)とスケトウダラすり身(c)の単純平均 $(a+c)/2$ の 532 g より大きくなった。しかし, ナガヅカすり身(d)の 262 g が, ホッケ落とし身とナガヅカすり身混合(g)では 463 g に増大しているが, ホッケ落とし身(a)とナガヅカすり身(d)の単純平均が 504 g で僅かに低い値であった。高鮮度ホッケ落とし身は, ホッケ, および, スケトウダラのすり身に対して坐り向上作用が認められたが, ナガヅカのすり身には作用を示さなかったもので, 作用は単純ではないこと, すなわち, 作用を受けるすり身側の性質も影響することがわかった。

ホッケ落とし身添加は破断強度に比べて破断凹みの上昇により大きな効果が認められた。すなわち, ホッケすり身(a)とスケトウダすり身(b)の破断凹みは 0.9 cm であったが, ホッケ落とし身を混合すると, ホッケ落とし身(a)の示す 1.4 cm とほぼ同じ値まで増大した。しかし, ナガヅカすり身(d)は 0.7 cm からホッケ落とし身とナガヅカすり身混合(g)の 1.0 cm に増加したが, 単純平均 $(a+d)/2$ の 1.1 cm と変わらなかった。

西本ら (1988) は, スケトウダラとシロサケすり身の混合すり身が示す加熱ゲルの破断強度と破断凹みの値は, それぞれのすり身の示す値の平均となり, 優れたゲル形成能を有するすり身を混合しても, ゲル形成能の劣るすり身のゲル形成能を向上させ

ることはできないと結論している。また、鈴木ら(2008)はホッケとスケトウダラの市販すり身を等量(重量比)で混合した肉糊の予備加熱においてはゲル物性の改善は少なく、乾燥卵白の添加が物性向上に有効であると報告している。

本研究から、TGase 活性の高い高鮮度ホッケ落とし身を混合した場合、ゲル形成能の劣る市販ホッケすり身のゲル物性の改善効果が確認された。そして、それは加熱ゲルの破断強度により破断凹み上昇に効果的であった。ただし、ナガヅカのすり身への添加効果はほとんど認められず、これまでの異種すり身混合実験の結果と類似したものであった。すり身中のどのような因子が、このような効果をもたらすために必須かは現時点で不明であるが、ミオシンの変性がゲル物性を低下させるという事実から、TGase 活性を失っていても、ゲル形成のためのミオシンが未変性に維持されていることが必須なのかもしれない。

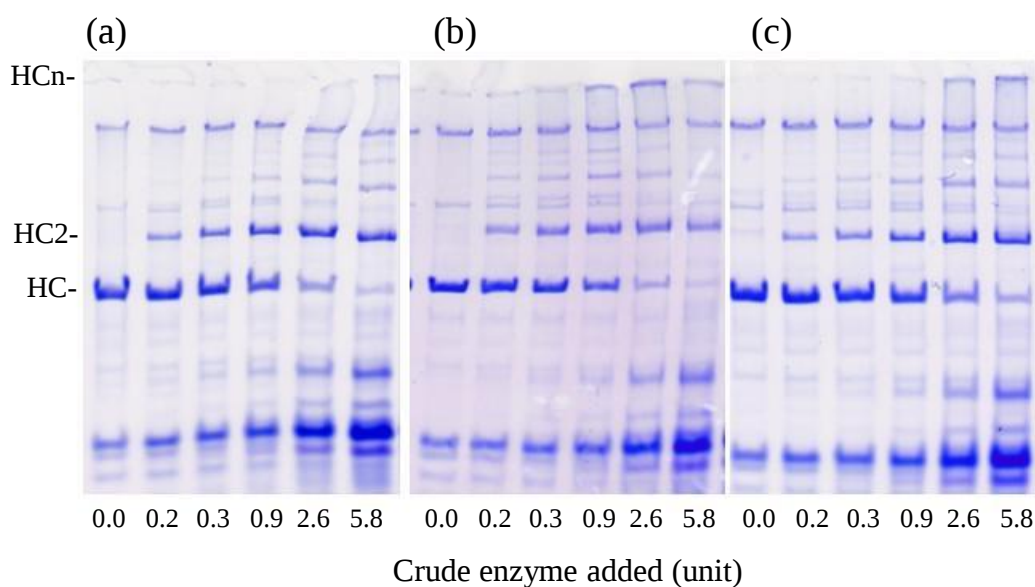


Fig. 4-11 Myosin cross-linking of Mf from various species of fish by AG TGase. Mf was prepared from commercial frozen surimi of AG (a), walleye pollock (b), and long shanny *Stichaeus grigorjewi* (c). Crude TGase was prepared from fresh AG meat. Myosin cross-linking was assayed in the medium consisted of 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , 5 mM DTT, 50 mM TrisHCl (pH7.5) at 25°C for 2 h. SDS-PAGE was conducted as in Fig. 4-10. HC, HC2, HCn are myosin heavy chain monomer, dimer, and polymers, respectively.

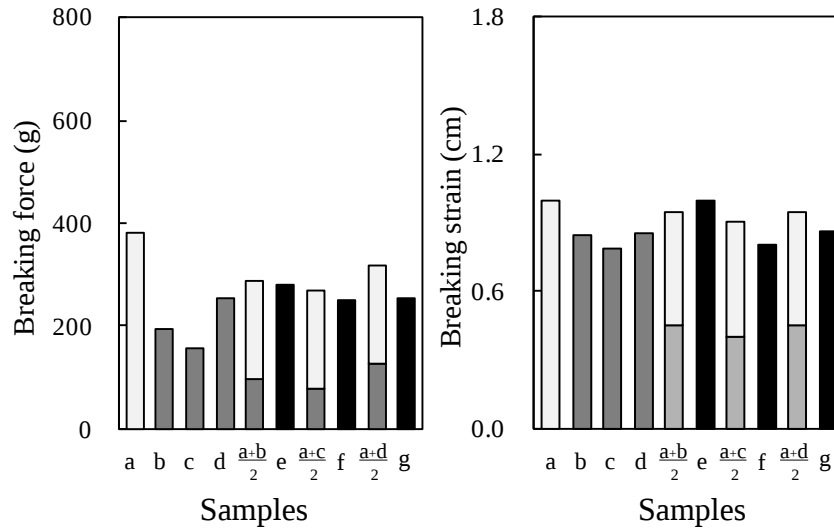


Fig.4-12 Effect of AG mince mixing on the thermal gel production by commercial frozen surimi.

Thermal gels were produced from frozen stored AG mince containing 10% sorbitol (a), commercial frozen surimi of AG (b), walleye pollock (c), and long shanny (d). Thermal gels were also produced from the mixture of frozen AG mince and commercial surimi at same protein concentration (75 mg/g). (e), (f), and (g) are the mixtures consisted of frozen surimi of AG, walleye pollock, and long shanny, respectively. These salt-ground mince or surimi were heated at 90°C for 30 min to produce directly heated gel. Breaking force and breaking strain of the gels were measured as in Fig.1-2. The mathematical averages of the respective samples were calculated. These are shown as $(a+b)/2$, $(a+c)/2$, and $(a+d)/2$, respectively, where (a), (b), (c), and (d) are the values obtained with the respective materials.

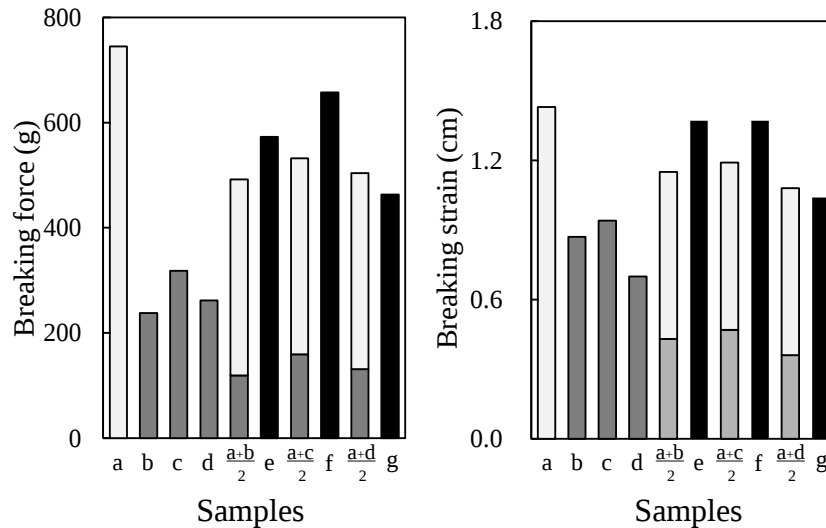


Fig. 4-13 Effect of AG mince mixing on two step heated thermal gel production by commercial frozen surimi for gel.

The same sets of experiments as in Fig. 4-13 were conducted by introducing pre-heating process in thermal gel production. Salt-ground surimi or mince were incubated at 25°C for 2 h and heated at 90°C for 30 min. Breaking force and breaking strain of the gels were measured as in Fig.1-2. The abbreviations and types of columns used are the same as in Fig. 4-12.

小考察

第3章において、死後硬直初期レベルの高鮮度なホッケ落とし身を用いた場合、肉糊の加温中に顕著なミオシン架橋反応が起きることを見出した(Fig.3-1)。本章では、二段加熱ゲルを作成し、実際に坐り効果が確認した。25°Cでの予備加熱の導入により破断強度と破断凹みは顕著に増加し、市販すり身には認められなかった坐り効果を確認することができた(Fig.4-1)。この結果から、高鮮度ホッケ落とし身は坐り効果を有する優れた練り製品材料としての活用が期待できた。

第3章において、落とし身中のTGase失活は、その不安定さが理由であることが推定されたので、ミオシンの安定化作用(大泉ら 1981)が認められているソルビトールによるTGase失活抑制効果について検討した。落とし身にソルビトールを添加すると冷蔵保管中のTGase失活が抑制された(Fig.3-?)。粗酵素液を用いたソルビトール添加試験から、ソルビトールのTGase失活抑制作用は定量的に予測できることも確認できた(Fig.3-?)。その作用はこれまで詳細に研究されているミオシンに対する加熱変性抑制作用とほぼ同じであったので、タンパク質の種類が異なってもソルビトールは同様に変性抑制することが示された。

通常、冷凍すり身の製造では、落とし身を水晒し処理することにより、魚肉に含まれる水溶性タンパク質、無機成分、エキス、有機酸などの水溶性成分を溶出させ、色調改善や筋原線維タンパク質の濃縮によるゲル形成能の強化が図られている(木村 2003, 岡田ら 2008b)。また、ゲル形成を阻害する物質を除去することも水晒し処理の目的である。高鮮度ホッケ落とし身の練り製品材料を想定した場合、ホッケ魚肉に含まれている全ての成分が残存したまま長期保管が可能かどうかを知ることが重要である。そこで、ソルビトール添加によりホッケ高鮮度落とし身の冷凍保管中にゲル形成能が維持されるか検討した結果、凍結保管5ヶ月間において、10%(w/w)ソルビトール添加によりホッケTGase失活は強く抑制した(fig.4-?)。

スケトウダラは凍結保管中にトリメチルアミンオキシド(TMAO)の非酵素的分解(木村ら 2002)によるホルムアルデヒド生成が魚肉タンパク質を変性させ、ゲル形成能へ影響するとされる(徳永 1974)。ホッケにはスケトウダラと同程度のTMAOが含まれ

ていることが報告(徳永 1964)されているため、凍結保管中における影響が懸念された。しかし、定量は行わなかったが、TMA や DMA に由来する特有の臭気は5ヶ月間までは官能的に認められず、加熱ゲル物性も本実験の凍結保管中に大きく低下しなかったので、残存する TMAO の分解はこの程度の保管期間であればその影響は無視しても良いであろうと判断した。

本章では、高鮮度ホッケ落とし身の非常に高い架橋反応性、坐り効果を有効に利用する一つの試みとして、この高鮮度ホッケ落とし身をゲル形成の低下した他のすり身に混合し、ゲル物性改善が得られるかについて検討した。直加熱ゲルを作成した場合、混合した時の破断強度も破断凹みもほぼそれぞれの試料で得られた平均の値を示した(Fig.4-12)。すなわち、高鮮度ホッケ落とし身を直加熱ゲルに利用するメリットは認められなかった。ホッケの TGase は、用いたスケトウダラ、ホッケ、ナガヅカのすり身から調製した Mf に対し、同じようにミオシン架橋反応を進行させた(Fig.4-11)。この結果は、これら市販3魚種すり身のゲル物性改善において、特にホッケやナガヅカの坐り効果がみられないすり身でも、適切な TGase 量が存在すれば、ミオシン架橋反応が起こる可能性が示唆される。このため、これら市販すり身に対する高鮮度ホッケ落とし身の混合は、二段加熱ゲルのゲル物性改善効果が期待された。25℃で2時間の予備加熱を導入した二段加熱ゲルでは、市販のホッケ、スケトウダラすり身を用いた場合は、それぞれの単純平均した値より約1.2倍高い値が得られた。この値が十分に高いものか評価は難しいが、ミオシンの架橋が起きてもそれに比例して坐り効果が得られるのかの議論も必要である。ナガヅカのすり身に対してはミオシン架橋作用は認められるのに対して、坐り効果が認められないので、ゲルを形成するミオシンの変性程度も坐り作用向上に影響を与えている可能性が残されている。

本研究はまだ不十分な点が多いので、さらに高鮮度ホッケ落とし身に含まれている高 TGase 活性を利用した坐り効果の導入に関する研究が必要である。これまで、ホッケすり身は坐り作用を示さないことから、スケトウダラ冷凍すり身に比べてホッケの市場価値は著しく低く評価されてきた。このことが、ホッケ冷凍すり身製造における原魚の選別、慎重な取り扱いに重きが置かれなかった理由でもある。本研究におい

て、ホッケ肉本来の有する優れた加熱ゲル形成能を引き出すことに成功したことに加え、他の低品質すり身に添加し、坐り効果を付与するという利用法も提案した。ホッケに限らず、これまで、低評価を受けてきた種々の魚類についてもこのような観点からの再評価が行わる必要があるだろう。

総合考察

北海道は四方を海に囲まれ、その全域が優れた漁場である。当然のことながら、それぞれの魚種に合わせた漁法が用いられている。底生魚の漁獲を目的とした漁法に沖合底びき網漁法がある。北海道の主要魚種であるスケトウダラ、ホッケなどの大量に漁獲されるものの他に、マダラ、カレイ、イカ、カニ、ハタハタ、キンキ、ニシンなども漁獲対象魚となっている。この漁法では、その生息環境に生育している目的の魚種に加え、それ以外の魚類も混獲という形で漁獲することになる。目的魚種や高価値が見込まれる魚種は丁寧に扱われるが、商品価値の低い魚種は粗雑に扱われるか、最悪の場合はそのまま海中に投棄(海中還元)されてしまう。船上での限られた空間、時間、経済効率を考えると、現実的な対応ともいえるが、限られた水産資源利用の観点からは問題が多い現実である。このような状況において、すでに資源として利用されている魚種に関しては、さらなる高度利用を、また、現在のところ価値が低いため利用されていない混獲で漁獲される未利用魚種に関しては、あらたな資源としての有効利用の観点からの努力が求められている。

第1章では、現在北海道の沖合底びき網漁において比較的多量混獲されている低利用魚であるウロコメガレイ、オオナゴ、オクカジカの3魚種について、これらの魚肉がすり身原料として利用されることを想定し、それぞれの魚肉のゲル化特性を明らかにした。魚肉のゲル形成はミオシンが担っているが、その変性はゲル形成能の低下を引き起こす。そこで、原料魚の貯蔵性に関連して、これら3種のミオシンの熱安定性を、スケトウダラを対照に評価した。魚肉中の状態を反映するアクチンと結合した条件のミオシンの安定性は、3魚種ともスケトウダラとほぼ同じ程度(Fig. 1-1)であった。さらに、肉糊に変換された状態を反映するミオシンそのものの安定性はスケトウダラと同等か、それ以上に不安定である(Fig. 1-1)ことがわかった。これは、原魚の貯蔵やすり身製造中のミオシン変性抑制にはスケトウダラと同等の配慮が必要であることを示している。魚類ミオシンの熱安定性の違いは、魚類の生息水温の順応から説明されている。すなわち、低水温でも自由に運動(遊泳)できるためには、ミオシンがその温

度環境で十分な強固さと柔軟性を持つように適応した必要と考えられる。このようなミオシンを生合成できるようにミオシンのアミノ酸配列，そのもとになる遺伝子配列を少しずつ変えてきたのが進化の過程でおきた長期にわたる環境適応である。短期的な温度順化には，コイ科淡水魚が周年の水温変化に適応して夏と冬に異なる安定性を有するミオシンを発現する例がある(Watabe ら 1998, Yuan ら 2006)。熱帯産および寒帯産魚種のミオシンを同一温度にさらせば，寒帯産魚種のミオシンは容易に構造を維持できず変性が起き，寒帯産魚種のミオシンは不安定であると評価される(橋本ら 1982)。本研究で用いた上記 3 種の生育環境はスケトウダラのそれに類似しているため，それらミオシンの不安定さがスケトウダラと同等なのは予想通りの結果であった。

すでに，加熱ゲル化特性は魚種により異なることが知られている(志水ら 1981)ので，3 魚種はどのような特性を持つかが興味を持たれた。ウロコメガレイのすり身は，予備加熱中にミオシンの架橋反応が認められ(Fig. 1-3)，予備加熱の導入により加熱ゲルの物性が顕著に増加する坐り効果が期待できる魚種であることがわかった。一方，オクカジカとオオナゴについては予備加熱の効果は認められず(Fig. 1-3)，坐り効果が期待できない魚種であると判断された。特に，オオナゴについては予備加熱により逆にゲル物性は低下(Fig. 1-2)し，予備加熱中にミオシンの分解が認められた。これら 2 種は予備加熱工程を含まない直加熱ゲルタイプの製品，たとえば揚げかまぼこの材料としての利用が考えられた。この点では，第 3 章のホッケの結果を踏まえて，高鮮度魚を用いて再評価する必要がある。

坐り効果の認められたウロコメガレイの予備加熱温度依存性の実験結果から，低温で長時間(たとえば，10℃ で 24 時間以上)行えば最大の坐り効果が得られる(Fig. 1-4)ことがわかったが，この結論はスケトウダラすり身を用いた場合と基本的に同じである(沼倉ら 1985, 松川ら 1992)。ウロコメガレイのすり身も 35℃ 以下であれば，坐り効果が認められたので，すでにスケトウダラすり身の予備加熱で採用されている，肉糊を比較的高温で短時間加温するのが(30℃，60~120 分)現実的な対応であろう。

カレイ類は扁平の魚体に加え，周縁に構造的に脆弱な鰭があり，ウロコメガレイから採肉する際に不純物の混入が問題となった。すなわち，内臓を包んでいる黒色の腹

須や鰭の表皮由来の黒色成分が採肉の際にすり身に混入した。この混入そのものはゲル化特性にほとんど影響を与えなかったので、すり身のゲル化特性に関してはその混入は無視できた。異物の混入量もすり身の品質評価(西岡 1993)にかかわるので、その削減を試みた。その結果(Table. 1-1), 手作業によるハラス、鰭除去をすれば、軽減できたが、すり身としての歩留まりが悪くなる上、そのための人件費がさらに必要となることを考慮すると、このような前処理を行う経済的な意味がないと結論した。さらに、カレイすり身のゲル化特性に対する原料魚の鮮度の影響を調べたところ、スケトウダラの冷凍すり身製造において明らかになっているように、冷蔵貯蔵したウロコメガレイから製造したすり身のゲル化能が低下(Fig. 1-5)していたので、高品質のすり身を製造するにはなるべく高鮮度の原料魚を使用すべきであることを確認した。

第2章では、すでに北海道で製造されるスケトウダラ以外の冷凍すり身の大部分を占めているホッケすり身を再評価した。特に、原魚の鮮度がどの程度ゲル化特性に影響を与えるかについて検討した。ホッケすり身は、坐り効果が認められず、白色度も低いため、揚げかまぼこ製品や魚肉ソーセージなど、これらの性質が問題とならない製品に広く活用されてきた。しかし、最近のホッケ漁獲量の低下に伴い、すり身の原料となる魚体の確保が難しくなっている。そして、その価格も上昇し、低価格すり身を生産すること自体も難しくなっている。このような状況においては、ホッケすり身の高品質化が望まれる。道内で製造され、市場に流通している数種の市販ホッケ冷凍すり身のゲル化特性を調べたところ、これまでの評価通り(鈴木ら 2008, 加藤ら 2010), どのすり身にも「坐り効果」は認められず (Fig. 2-3), 低品質のすり身と認めざるえないものであった。

ホッケの表皮はスケトウダラに比べて厚く、貯蔵中も漁獲後の外観を維持していることから、スケトウダラに比べ貯蔵耐性があるような印象を与えている。結果として、同じ日数保存した原魚で比べれば、ホッケの方がスケトウダラより鮮度がよいような印象を与えているように思える。これはホッケの鮮度保持のための努力をおろそかにする一つの理由かもしれない。しかし、実際にホッケ魚肉を構成するミオシンの安定性をスケトウダラのものと比較すると、ホッケの方がより不安定である (Fig.2-1, Fig2-2)

ことがわかった。北海道のすり身工場では原料魚として北海道各地で漁獲したいわゆる「ローソクホッケ」や「ハルボッケ」と呼ばれる小型で廉価なものを使用している。これらは、すり身工場まで、厳密な温度管理をせずにトラックで輸送され、漁獲後数日経た後にすり身に加工されているのが現実である。この間でミオシン変性が起きれば、当然それを原料に製造したすり身のゲル化能は低いものとなる。

このような低鮮度の原魚を用いて製造した市販ホッケすり身の示すゲル化特性がホッケ本来の有しているゲル化特性を示しているのか疑問である。すでに、スケトウダラにおいて、すり身の品質は原料の鮮度、漁獲時期、製造工程中の取り扱いによって決定されることが知られているので、鮮度の低下したホッケ原魚から製造することが、ホッケすり身が低評価される理由ではないかと推察した。そこで、漁獲当日に市場から購入したホッケを用いてゲル化能を検討した。研究室に搬入した時にはすでに硬直が起きており、ATP はほぼ消失していた(Fig.2-7)。実際のすり身工場で使用している原魚と比較すれば、かなり高鮮度の原魚である。それにも拘わらず、そのホッケから調製したすり身は、市販のすり身と同じで、坐り効果は確認されなかった(Fig.2-4)。そして、肉糊の予備加熱中に TGase によるミオシンの架橋重合体の形成も検出されなかった(Fig2-5)。この結果は、ホッケに坐り効果を期待できないということを示している。さらに、原料魚の冷蔵貯蔵中に緩やかなミオシン変性が検出 (Fig.2-6) され、これに対応するように、作製したすり身の直加熱ゲルの物性は低下(Fig.2-4)したので、鮮度低下したホッケを材料としたすり身のゲル化能は低いという結果とも一致する。この結果は、スケトウダラ冷凍すり身中のミオシンの変性がすり身のゲル物性を低下させるという報告を支持していた(加藤ら 1979)。また、原魚貯蔵によるゲル物性低下はスケトウダラの低温保管(宇野ら 1958)やサバの水氷貯蔵(藤井 1981)でもすでに報告されている。

第2章で得られた結果は、高鮮度の原料を使用することによって、ホッケすり身にさらなるゲル化能の向上、特に坐り効果の発現を期待するのは無理であることを示している。第3章では、この結論に納得せず、死後硬直に達する前のさらに高鮮度のホッケを用いて、すり身の代わりに落とし身を使用することにした。すり身製造時に通

常必要な水晒しと脱水の工程で起こるかもしれない影響を排除するためである。

高鮮度落とし身から作った肉糊を 25℃ で予備加熱すると、これまで観察したことのないような著しいミオシンの架橋反応が検出(Fig. 3-1)された。3 %ポリアクリルアミド /0.5%アガロースゲルを使用して、ミオシンの架橋反応と追跡したところ、加温 1 時間以内に、SDS-PAGE パターンからミオシン HC は消失し、すべてのミオシン HC はゲルに進入できないような高分子架橋体に変化していることを認めた。これは、ホッケ肉糊の加温でミオシン架橋反応が検出されることを示した最初の例である。また、ミオシン HC への MDC の取り込み(Fig. 3-3)も認められたので、内在性 TGase が活性を発現していることを確認した。ちなみに、同じホッケ落とし身を水晒し 1 回しただけで、非常に高かったホッケ肉中の TGase 活性は 1/2 まで減少した(Table.3-1)ので、水晒しによる TGase の流出あるいは失活が推察された。以上の結果から、水晒しによる TGase の消失がホッケすり身でミオシン架橋が認められない一つの理由であると判断した。しかし、洗浄肉の残存 TGase 活性は十分に高く、この洗浄肉から作った肉糊を加温したところ、反応性は確実に低下していたが、ミオシン架橋反応が確認(Fig.3-1)された。このことは、魚肉の水晒し(洗浄)による TGase 流出のみが理由でないことを示している。ただ、ホッケ肉中の TGase 活性を最大限に利用するには、落とし身をそのまま利用の方が良いことは間違いない。一般に、未利用魚の魚肉利用ではすり身化の手法がよく採用される。この結果は、すり身化が常に最良の手段とは限らず、落とし身としての利用という選択肢もありうるということを示すものである。

高鮮度のホッケ落とし身で起こるミオシンの架橋が市販のホッケすり身ではなぜ起こらないのかという新たな問題に直面することになった。水晒しだけでは説明できなかったのも、すり身原料としての鮮度の違い、すなわち魚肉の貯蔵の影響が予測された。著しいミオシン架橋反応を示すホッケを 5℃ で貯蔵すると、翌日(保管期間 1 日)にはミオシン架橋体の形成(Fig. 3-2)と MDC 取り込み(いずれも TGase 活性の指標)(Fig. 3-3)は大きく激減していた。さらに、TGase 活性そのものの激減が認められ(Fig. 3-4)、これまで誰も想定していなかったような短期間での TGase 失活が示された。これは、ホッケ肉から抽出した粗酵素の貯蔵でも確認された(Fig. 3-5)ので、ホッケの

TGase そのものが非常に不安定であることが見出された。スケトウダラの TGase はコイの酵素に比べて不安定であり、魚種により TGase の安定性に違いがあることが示されている(関ら 2001)。しかし、これまで、魚類筋肉中の TGase がこれほど不安定であるという認識はなかった。あらゆるタンパク質の組織化、あるいは魚肉のゲル化のために開発された微生物由来の TGase を含む製剤は非常に熱安定性が高く(Ando ら 1989)、室温保存も可能である。このことが、魚肉の内在性 TGase もそれに比べれば不安定ではあるが、それほど不安定だと思わせなかったのかもしれない。各種魚種の坐り特性について、TGase の不安定さに依存した失活を考慮して再検討すれば、異なった分類がなされることが期待される。これまで、坐り作用が認められない魚種と分類されているものの中には、その不安定な TGase が理由である魚種も存在するかもしれない。ここで使用した程度の鮮度を有する落とし身を用いて検討すれば、これまで坐らない魚種と考えられていたものの中に TGase の失活が原因で分類されていた魚種が現れるであろう。

ホッケ保管中の TGase 活性の急激な消失は、TGase そのものの不安定性が原因であると考えられた。それ以外の可能性として、内因性プロアーゼによる TGase そのものの分解も排除できない。そこで、その可能性について各種プロテアーゼ阻害剤の添加実験から確認した。プロテアーゼ阻害剤として大豆トリプシンインヒビター (セリン酵素)、E64 (システイン酵素)、ペプスタチン A (アスパラギン酸酵素) を用いたが、貯蔵中の TGase 活性の失活を抑制することができなかった(Fig. 3-8, 3-9, 3-10)。なお、金属プロテアーゼの阻害剤は TGase 活性発現に必要な Ca^{2+} をキレートし、活性そのものを阻害するため、使用しなかった。本研究ではそれ以外のインヒビターについては検討していないが、ホッケの TGase 活性の失活がプロテアーゼによる TGase 自体の分解による可能性は低いと思われる。

この結果は、TGase そのものが不安定であるという可能性を大きくした。そこで、ホッケ TGase の安定性をスケトウダラ TGase と比較すると、両酵素の間に熱安定性に違い(Fig. 3-6))認められず、ホッケの TGase が特別不安定であるという結果は得られなかった。北海道で生産された陸上 2 級スケトウダラすり身は洋上すり身に比べれば、

明らかに坐り効果が小さい(阿部ら 1996)。これは、筋肉中で原魚の貯蔵中に TGase 失活が起きていることを示唆しており、基本的にはスケトウダラでも起きている現象であると思われる。これまで、スケトウダラ陸上2級すり身の坐り効果は小さいという事実を受け入れ、それを向上させる試みはなされてこなかったが、この結果から、新鮮度の原料を用いれば船上すり身と同等の品質のすり身が製造されるのは明らかである。スケトウダラすり身製造では取り扱いが、ホッケに比べて丁寧なのか、水晒しによる TGase の流出の程度が小さいのかは、今後の課題である。

肉糊中のミオシンに架橋が起きるかどうかは TGase 活性の高さに加え、基質であるミオシンの性質も決定因子であるという報告もある(Araki and Seki 1993)。そこで、陸上2級スケトウダラすり身にはミオシンの架橋が認められるものも存在することから、ホッケのミオシンが TGase の作用を受けにくいという可能性もある。それを確かめるため、同一の TGase をそれぞれの Mf に作用させ、架橋反応が同じように進行するか、あるいは魚種の影響を受けるかを検討したが、TGase が同じであれば、どちらの Mf に対しても同じように作用すると結論された。ホッケすり身中で架橋が起これないのはミオシンの構造がスケトウダラのミオシンと異なり、TGase による架橋が起きにくいわけではないことが確認された。

これまでの研究により、坐らない魚種に分類されているコイ、シロサケ、マサバでは、TGase によるミオシンの架橋反応が認められないが、その原因は同じではない。コイでは TGase 活性は十分に高いので、ミオシン構造が TGase の作用を受けないことが理由である(塚正ら 1991, Nakahara ら 1998)。一方、シロサケでは TGase 活性がもともと低いことに加え、魚肉に多量に含まれているアミノ酸であるアンセリンが TGase 活性を阻害することが理由である(Ni ら 1999)。マサバでは Ca^{2+} が不足していることが理由であり、 Ca^{2+} の添加により架橋が起これるように変化するとされている(塚正ら 1990)。本研究の結果から、ホッケすり身で架橋が起これないのは原魚貯蔵中の TGase 消失が大きな要因であると推察された。

このような減少がホッケだけで観察されるのか興味をもたれる。そこで活魚あるいは硬直前の状態で入手可能であった魚種(アイナメ、ケムシカジカ、ブリ)を用いて貯

蔵中のミオシン架橋反応の変化を追跡した。このような高鮮度の材料を用いた場合、いずれの魚種の落とし身でも、架橋反応が認められた。しかし、ホッケの場合のように、アイナメ、ケムシカジカの架橋反応は貯蔵1日で大きく減少した。もし、このような鮮度の試料を用いて架橋反応を評価すれば、かなり低いと評価されることになる。北方、寒帯産の魚種については、ホッケと同様そのTGaseはかなり不安定であることが普遍的であることが類推された。第1章において、ウロコメカレイは坐り効果を示したが、カジカは示さないと述べた。第4章で用いたカジカと第1章で用いた種は異なるので直接の比較はできないが、オクカジカのミオシンはスケトウダラよりもかなり不安定であることを考えれば、そのTGaseも不安定である可能性がある。第1章で用いたオクカジカは、その筋肉中のTGaseがすでに失活している原魚を使用した可能性が高い。ウロコメカレイでは坐り効果が認められたが、さらに高鮮度の原魚を用いれば、スケトウダラ船上すり身レベル程度の坐り効果が得られるものと推察される。現在、北海道海域でブリの漁獲が増えているが、本来温帯産の魚種であり、そのミオシンの安定性も高い。このような魚種では、ミオシンの架橋反応は同じ温度条件では数日間維持されたので、魚種によりTGaseの安定性が異なることがその理由であろう。また、ブリでは25℃より30℃の方がミオシンの架橋反応が速やかに進行したので、魚種によるミオシンの安定性、TGaseの安定性が最適坐り温度を決定しているように思える。

第4章では、高鮮度なホッケ落とし身の有しているミオシン架橋反応および坐り効果を長期間維持するための手段について検討した。第3章の結果から、TGase失活は、5℃のような冷蔵条件でも起きることが示された。この不安定さを克服する手段として、スケトウダラすり身に添加され、冷凍貯蔵中のミオシン変性を抑制する(新井ら1973)ソルビトールの利用を考えた。まず、ソルビトール(0.3 M)を添加して落とし身を5℃で貯蔵すると、1日貯蔵後でも架橋反応が維持される(Fig. 4-2)ように変わった。さらに、TGase粗酵素液にソルビトールを添加して冷蔵すると、ソルビトール濃度依存的に失活は抑制された(Fig.4-3)。そして、1 M ソルビトール濃度によるTGase失活抑制程度は、大泉ら(1981)がMfを用いて行ったミオシンに対する変性抑制程度とほぼ同

じであったので、タンパク質の種類にかかわらず、ソルビトールは同じように変性抑制することが示された。そこで、大泉ら (1981)の糖によるミオシン変性抑制の解析法に倣い、失活速度の対数値をソルビトール濃度に対してプロットすると、直線関係 (Fig.4-5)を示した。この結果は、ソルビトールによる TGase 安定化効果を定量的に評価できることを示している。

高鮮度ホッケ落とし身を練り製品製造材料として使用するにあたり、優れたゲル化能を維持したまま長期貯蔵する必要がある。落とし身の長期保存には冷凍保存が必要である。そこで、冷凍すり身に準じ、落とし身に 10%(w/w)のソルビトールを添加し、-25°C と -80°C で貯蔵し、坐り効果が維持できるかどうか検討した。いずれの温度でも、5 ヶ月間の貯蔵期間中 TGase 活性は 80%程度維持 (Fig. 4-7)された。これは 5°C, 1 日保存で 15%にまで低下することと比べれば、ほとんど変性抑制されていると言ってもよい。また、貯蔵中にミオシンの変性は認められなかった (Fig. 4-6)ので、ミオシンも 10%(w/w)ソルビトールで変性抑制されていることを確認した。なお、凍結貯蔵中に TGase に多少であるが活性低下が認められたことから、アクチンによって安定化を受けているホッケ肉中のミオシンより TGase の方が多少不安定であるかもしれない。しかし、この程度の TGase 活性の低下では、顕著な坐り効果の低下は認められず、25°C での予備加熱を導入することにより破断強度は約 3 倍に上昇 (Fig. 4-10)した。この上昇は、高鮮度の落とし身をそのまま肉糊にした場合 (Fig. 4-1)に比べても大きい。両者で詳細に比較すると、高鮮度落とし身の場合(糖無添加)、架橋反応も坐り効果も 25°C の予備加熱 1 時間で最大値に達し、その後の進行は認められないのが特徴であった。しかし、10% (w/w) ソルビトールを含む冷凍落とし身の場合は、25°C での予備加熱 6 時間まで継続的に破断強度は上昇し、結果として直加熱ゲルに比べ、約 3 倍の値が得られた。この継続した上昇は、落とし身由来のソルビトールが 25°C における肉糊中の TGase 失活を抑制した結果と考えられる。

高鮮度ホッケ落とし身を材料として、弾力性の優れた二段加熱ゲルを形成させることは可能となった。ホッケ落とし身の非常に高い TGase 活性あるいは架橋反応能を有効に利用する一つの試みとして、ゲル形成能が低いと言われている 3 種の市販冷凍す

り身に落とし身を混合し、ゲル物性改善が得られるかについて検討した。まず、ホッケ落とし身由来の TGase が使用したすり身(スケトウダラ、ホッケ、ナガヅカ)の Mf に対して同様に架橋反応を触媒するかを確認した。本酵素は3者に対してほとんど区別なく反応した(Fig. 4-12)ので、これらすり身の二段加熱ゲルの物性を向上させる可能性が期待された。しかし、ホッケ落とし身をこれらのすり身に混合しても、直加熱ゲルの破断強度は、本来の落とし身が示す破断強度に比べれば、明らかに低かった (Fig. 4-12)。一方、二段加熱ゲルの破断強度は、スケトウダラやホッケすり身に混合した場合、落とし身およびそれぞれのすり身が示す破断強度の単純平均より約 1.2 倍高い値が得られた (Fig. 4-13)。この値が十分に高いものか評価は難しいが、高鮮度ホッケ落とし身に含まれる TGase 活性の活用によるゲル化能向上作用が期待された。用いた市販のスケトウダラ冷凍すり身は陸上2級であるので、ミオシンの変性が進んでいる可能性が高い(Koseki ら 2005)。それが十分な坐り効果を付与できなかった理由かもしれない。ナガヅカのすり身に対しては全く混合による坐り効果はなく、すり身中のミオシンが変性していたのかもしれない。落とし身の混合効果が顕著なのは、破断凹みに対してであった。スケトウダラとホッケすり身はたんぱく質の半量をホッケ落とし身のたんぱく質に置き換えることにより、ホッケ落とし身だけから製造した二段加熱ゲルの破断凹みの値と同程度の値となった (Fig. 4-13)。すなわち、ホッケ落とし身の添加でしなやかなゲルを形成させるように改善することが可能と考えられた。しかし、ナガヅカに対しては、このような向上効果は得られなかった。これまで、同じような向上効果を期待し、すり身の混合実験が行われている。ほとんどの場合、単純平均となる場合が多い(鈴木ら 2008, 加藤ら 2010, 西本 1988)。このホッケ落とし身に含まれる TGase 活性を有効的に利用するためには、より詳細な研究が必要である。また、落とし身を用いた場合に最終製品で影響が想定される、臭気成分であるが、高鮮度のホッケを用いる限り鮮度低下に伴う臭気などは確認されず、ホッケの味を利用した新たな練り製品が製造可能である。

北海道における漁業生産が低迷する中、周辺海域の限られた水産資源の有効利用が求められている。北海道内の各地域では、ウロコメガレイやオクカジカなどの数多く

の低利用魚が混獲されており，地域特産のすり身原料等への活用が期待されている。本論文では，これら低利用魚のすり身化特性を，ミオシンの熱安定性，坐り効果，ゲル物性から評価し，その活用への可能性を明らかにした。さらに，スケトウダラと並ぶ北海道の主要なすり身原料であるホッケについて，本来有するゲル化特性を再評価したことにより，落とし身利用や他のすり身への添加などの新たな発想の利用法が示唆された。今後，低利用魚においても，高鮮度の原料魚を用いたゲル化特性の検討を行い，その結果を踏まえて最適な利用方法を開発することが，北海道水産業の振興に繋がると考える。

謝 辞

本研究を行うにあたり，終始ご指導およびご助言をいただきました北海道大学水産科学研究院・今野久仁彦特任教授に深く感謝申し上げます。

また，論文をまとめるに際し，ご助言とご指導をいただいた北海道大学水産科学院・佐伯宏樹教授，川合祐史教授，埜澤尚範准教授に心より感謝申し上げます。

本研究は，北海道総合研究機構中央水産試験場の皆さんのご協力のもとに行うことができました。（前）鳥澤雅場長，（前）飯田訓之加工利用部長，菅原玲主査，武田忠明主査，小玉裕幸研究主任，ならびに関係者各位に深く感謝いたします。また，網走水産試験場加工利用部宮崎亜希子主査，釧路水産試験場加工利用部武田郁浩主査の両名には，実験サンプル等にご協力いただきました。厚くお礼申し上げます。

ウロコメガレイやホッケ等の購入にご協力いただきました，小樽機船協同組合並びに余市郡漁業共同組合の関係者の皆様に感謝の意を表します。

皆様のご協力により遂行できました本研究が，水産加工業の発展に寄与することを切に望みます。

文 献

- 阿部洋一, 安永廣作, 北上誠一, 村上由里子, 太田隆男, 新井健一(1989).
等級の異なるスケトウダラ冷凍すり身にトランスグルタミナーゼ製材を添加して調製したかまぼこの品質. 日水誌. 62. 439-445.
- Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchii R, Tanaka H, Motoki M(1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism. Agric. Biol. Chem. 53. 2613-2617.
- 新井健一, 福田道代(1973). 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究-XII. コイ筋肉アクトミオシン ATPase の加熱変性について. 日水誌. 39. 625-631.
- Araki H, Seki N(1993). Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. Nippon Suisan Gakkaishi. 59. 711-716.
- 石田貴之, 久保田光俊, 豊原治彦(2013). ミナミダラすりみの坐り特性に関する生化学的研究. 日水誌. 79. 410-415.
- 宇野勉, 中村全良(1958). 魚肉の特性に関する研究 I 蒲鉾形成能について 北海道区水産研究所研究報告. 5. 45-53.
- 大泉徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一(1981). 魚類筋原繊維の加熱変性に対する糖および糖アルコールの保護効果の定量的考察. 日水誌. 47. 901-908.
- 岡田稔(2008a). 第 5 章 主な原料魚「新訂かまぼこの科学」 成山堂書店, 東京. 106-125.
- 岡田稔(2008b). 第 6 章 かまぼこの作り方「新訂かまぼこの科学」 成山堂書店. 東京. 126-152.
- 加藤登, 野崎亘, 小松一宮, 新井健一(1979). スケトウダラ冷凍すり身の一新品質判定法. 日水誌. 45. 1027-1032.
- 加藤登, 藤井陽介, 國本弥衣, 北上誠一, 新井健一(2010). 3 種の魚類冷凍すり身に卵白粉末を添加した加熱ゲルの物性値とタンパク質濃度との関係. 日食科工誌. 57. 414-419.
- 川島孝省, 大場明子, 新井健一(1973). 魚類筋肉構成タンパク質に関する研究 X III ス

- ケトウダラ冷凍すり身中のアクトミオシン量とかまぼこの品質の関係.日水誌.39.1201-1209.
- 北上誠一(1997).冷凍すり身の昨日, 今日, 明日.日食保蔵誌.23. 145-155.
- 北上誠一, 村上由里子, 安永廣作, 加藤登, 新井健一(2005).スケトウダラ冷凍すり身タンパク質のゲル形成能とその濃度依存性.日水誌.71.957-964.
- 木村郁夫(2003).第2章 冷凍すり身「かまぼこ その科学と技術」(山澤正勝, 関伸夫, 福田裕編) 恒星社厚生閣.東京.107-131.
- Kimura I, Sugimoto M, Toyoda K, Seki N, Arai K, Fujita T(1991). A Study on the cross-linking reaction of myosin in Kamaboko SUWARI gels.Nippon Suisan Gakkaishi.57.1389-1396.
- 木村メイコ, 関伸夫, 木村郁夫(2002). 0℃以下の温度におけるトリメチルアミン-N-オキシドの酵素的および非酵素的分解.日水誌.68.85-91.
- 胡亜芹, 張佳琪, 蛭谷幸司, 今野久仁彦(2013).魚肉からの ATP 関連化合物抽出法の簡便化.日水誌.79.219-225.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM(1949). Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J. Biol. Chem..177.751-766.
- Koseki S, Ootake R, Katih N, Konno K(2005). Quality evaluation of frozen surimi by using pH stat for ATPase assay. Fish. Sci..71.388-396.
- 小関聡美, 北上誠一, 加藤登, 新井健一(2006). 魚介類の死後硬直と鮮度 (K 値) の変化.東海大学紀要海洋学部.4.31-46 頁
- 今野久仁彦, 今村浩二(2000). スケトウダラ肉糊の加温中に生成する 150 及び 70kDa 成分の同定とその存在状態.日水誌.66.869-875.
- Konno K, Nomura K, Ohtake R, Abe Y, Katoh N(2002). Quality analysis of frozen surimi measured by ATPase activity. Fish. Sci..68.1529-1532.
- Konno Y, Konno K(2014).Myosin denaturation in Burnt Bluefin tuna meat. Fish. Sci..80.381-388.
- 今野久仁彦(2003).魚肉タンパク質の熱変性とゲル形成「かまぼこ その科学と技術」

- (山澤正勝, 関伸夫, 福田裕編) 恒星社厚生閣.東京.32-50.
- 佐伯宏樹, 尾崎弘忠, 野中道夫, 関伸夫, 新井健一(1988).スケトウダラ塩ずりみの坐りにおけるミオシン重鎖交差結合反応に及ぼす塩化カルシウムの影響.日水誌.54.259-264.
- 酒井清悟, 久保田光俊, 石田貴之, 前川真吾, 豊原治彦(2012).水晒し工程におけるトランスグルタミナーゼの挙動に関する免疫学的研究.日水誌.78. 966-972.
- 志水寛, 町田律, 竹並誠一(1981).魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性.日水誌.47.95-104.
- 鈴木潤, 藤井陽介, 北上誠一, 新井健一, 小関聡美, 加藤登(2008).ホッケとスケトウダラおよび混合肉糊から調製した加熱ゲルの品質に対する感想卵白の添加効果.東海大学紀要海洋学部.6.27-35.
- 関伸夫, 宇野秀樹, 李南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一(1990). スケトウダラ筋肉およびすり身中のトランスグルタミナーゼ活性とミオシン B との反応.日水誌.56.125-132.
- 関伸夫, 埜澤尚範(2001).Ⅲ 内在性酵素のゲル形成への関与 8.トランスグルタミナーゼ「かまぼこの足形成」 (関伸夫, 伊藤慶明編) 恒星社厚生閣.東京.98-107.
- 高橋玄夫, 北川雅彦, 錦織孝史, 大石岩樹, 船岡輝幸, 福士暁彦, 川嶋孝省(1991).ブナサケ冷凍すり身製造技術確立試験. 釧路水試事業報告書 平成 3 年度.131-149.
- 谷川英一, 藤井豊(1959).北海道における多獲魚の煉製品原料としての価値について.北大水産彙報.10.147-166.
- 田元馨, 田中修, 武田二美雄, 福見徹, 西谷喬助(1961). 搗り身の凍結とその応用に関する研究 第 4 報 凍結魚肉におよぼす糖の影響について.北海道区水産研究所研究報告.23.50-60.
- 成田正直(2004).沖合底びき網漁船における漁獲物高鮮度保持技術の確立「平成 15 年度中央水産試験場 事業報告書」.余市.156-159.
- 塚正泰之, 志水寛(1990).マイワシ肉とマサバ肉の坐り特性.日水誌.56. 1105-1112.
- 塚正泰之, 志水寛(1991).トランスグルタミナーゼによる坐りに関与するいくつかの要

- 因.日水誌.56.535-540.
- 塚正泰之, 三宅康賀, 安藤安史, 牧之段保夫(2000a).熱変性したコイのアクトミオシンに対する内在性トランスグルタミナーゼの影響.日水誌.66. 469-474.
- 塚正泰之, 三宅康賀, 安藤安史, 牧之段保夫(2000b).内在性エンドペプチターゼ及びトランスグルタミナーゼの制御がコイ肉の坐り特性に及ぼす影響. 日水誌.66.719-725.
- Tsukamasa Y, Miyake Y, Ando M, Makinodan Y(2002).Total activity of transglutaminase at various temperatures in several fish meats.Fish. Sci..68.929-933.
- 徳永敏夫(1964).スケトウダラ筋肉の冷凍貯蔵中における Formaldehyde と Dimethylamine の生成について I . 北海道区水産研究所研究報告.29. 108-122.
- 徳永敏夫(1974).冷凍スケトウダラの品質におよぼすトリメチルアミンオキサイド分析物の影響.日水誌.40.167-174.
- Nakahara C, Nozawa H, Seki N(1999).A Comparison of cross-linking of fish myofibrillar proteins by endogenous and microbial transglutaminases.Fish. Sci..65.138-144.
- 夏目雅史(2003).42.ホッケ「新 北のさかなたち」(水島敏博,鳥澤雅編) 北海道新聞社.札幌.196-201.
- Ni S, Nozawa H, Seki N(1999).The combined effect of TGase and protease inhibitors on the thermal gelation of actomyosin sol from carp and salmon muscles. Fish. Sci..65.606-612.
- 西岡不二雄(1993).冷凍すり身の品質検査基準.日水誌.60.281-284.
- 西本真一郎, 橋本昭彦, 関伸夫, 新井健一(1988).二種の魚の混合肉糊の坐りとミオシン重鎖の交差結合.日水誌.54.1227-1235.
- 沼倉忠弘, 関信夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一(1985). 坐りによる肉糊のゲル形成とミオシンの交差結合反応.日水誌.51. 1559-1565.
- 沼倉忠弘, 溝口竜, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 関信夫, 新井健一(1989). 加熱により変質したスケトウダラすり身の坐りゲル形成能とミオシン重鎖の交差結合能.日水誌.55.1083-1090.
- 沼倉忠弘, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫(1990).スケトウダラ肉糊の坐りに伴うゲル強度とミオシン重鎖の変化の温度依存性.日水誌.56.2035-2043.

- Nozawa H, Mamegoshi S, Seki N(1997). Partial purification and characterization of six TGase from ordinary muscle of various fishes and marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*11B.313-317.
- Nozawa H, Cho S-Y, Seki N(2001).Purification and characterization of TGase from squid gill. *Fish. Sci.*67.912-919.
- 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一(1982).魚類筋原繊維 Ca-ATPase の温度安定性と環境適応. *日水誌*.48.671-684.
- 橋本健司, 北林透, 今村琢磨, 坂本正勝, 西田孟(1981).ホッケ肉の利用試験 第1報 冷凍すり身製造試験. *北水試月報*.38.176-191.
- 福田 裕(2011).我が国のねり製品産業に及ぼすすり身供給の動向「構造再編下の水産加工業の現状と課題 平成22年度事業報告」(財団法人東京水産振興会).東京.13-25.
- 藤井豊(1981).加工技術「多獲性赤身魚の有効利用」(日本水産学会) 恒星社厚生閣. 東京. 76-88.
- 船津保浩, 細川一, 南部正一, 新井健一(1993).スケトウダラ肉糊のゲル形成能とミオシン重鎖の多量化に及ぼすソルビトールの影響. *日水誌*.59. 1599-1607.
- 北海道漁業協同組合連合会(2014).(8)ホッケ「北海道水産物の生産・流通動向 平成26年度」.札幌.20.
- 北海道 (2015).第1部水産業・漁村の動向「北海道水産業の・漁村のすがた」.札幌.15-70.
- 松川雅仁, 桜田克彦, 新井健一(1992).スケトウダラ塩すり肉のゲル化とミオシン重鎖の多量化に及ぼすピロリン酸塩の影響. *日水誌*.58.735-742.
- Matsumoto M, Yamanaka H(1990).Post-mortem biochemical changes in the muscle of Kuruma prawn during storage and evaluation of the freshness. *Nippon Suisan Gakkaishi*.56.1145-1149.
- 水島敏博(2001).北海道の水産業の現況「北水試百周年記念誌」(北海道立水産試験場). 余市.43-52.
- 元広輝重, 沼倉忠弘(1976).過酸化水素により漂白処理したホッケ冷凍すり身のアクトミオシンとその色調について. *冷凍*.51.559-564.

- Yuan C, Kaneniwa M, Wang X, Chen S, Cheng Y, Qu Y, Fukuda Y, Konno K(2006). Seasonal expression of 2 types of myosin with different thermostability in silver carp muscle (*Hypophthalmichthys molitrix*). J. Food Sci.71.39-43.
- 吉富文司, 今野久仁彦(1982).スルメイカミオシン ATPase の酵素的特性. 日水誌.48.581-586.
- Laemmli UK(1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature.227.680-685.
- 若目田篤, 野澤誠子, 新井健一(1983).魚類筋原繊維 Ca-ATPase の加熱変性に及ぼす中性塩の影響.日水誌.49.237-243.
- 若目田篤, 新井健一(1984).高濃度の塩存在下におけるコイのミオシン B の変性機構. 日水誌.50.635-643.
- 若目田篤, 新井健一(1986).高濃度の塩存在下で起るコイミオシン B のアクチンとミオシンへの解離.日水誌.52.293-300.
- Watabe S, Hirayama Y, Nakaya M, Kakinuma M, Kikuchi K, Guo XF, Kanoh S, Chaen S, Ooi T(1997).Carp expresses fast skeletal myosin isoforms with altered motor functions and structural stabilities to compensate for changes in environmental temperature. J. Therm.Biol.22.375-390.
- Wan J, Kimura I, Satake M, Seki N(1994). Effect of calcium ion concentration on the Gelling properties and TGase activity of Walleye Pollock Surimi paste. Fish. Sci..60.107-113.