スライス牛肉の筋原線維の小片化, 筋肉蛋白質の抽出性 および LDH 活性に及ぼすガス置換包装の影響†

六車三治男*・岡山高秀**・村上新一***・山田裕一***

Effect of Modified Atmosphere Packaging on Myofibrillar Fragmentation, Extractability of Muscle Protein and LDH Activity of Thin Sliced Beef

(Studies on Modified Atmosphere Packaging of Thin Sliced Beef Part II)

Michio MUGURUMA*, Takahide OKAYAMA**, Shinichi MURAKAMI***
and Hirokazu YAMADA**

* Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812

** Faculty of Agriculture, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657

*** Showa Denko K.K., 13-9 Shiba Daimon 1-Chome, Minato-ku, Tokyo 105

The objective of our study was to investigate the effect of modified atmosphere packaging on myofibrillar fragmentation, extractability of muscle protein and LDH activity of thin sliced beef. The sample was packaged in atmospheres of : (a) air without gas flush treatment (control), (b) 20% CO₂ + 80% O₂ after vacuum treatment, (c) 20% CO₂ + 80% O₂ after being flushed with the gas of the same composition and then was stored at 5°C for 2, 4, 6, and 8 days. The degree of myofibrillar fragmentation of all samples gradually increased during storage. The rate of myofibrillar fragmentation increased in order of control > (b) > (c). The extractability of water- and salt- soluble muscle proteins of all samples decreased during storage. SDS-PAGE patterns of proteins extracted with GS-solution from thin sliced beef stored under different conditions exhibited a decrease in salt-soluble protein due primarily to the decrease in the extractability of myosin molecules. LDH activity of the control decreased during storage, but the samples packaged in modified atmospheres maintained their LDH activity, particularly the (c) sample did. These results suggest that samples packaged in modified atmospheres retain biological activity even after 8 days of storage. (Received Aug. 3, 1994)

近年、新鮮肉の包装形態ではガス置換包装が注目されて活発な研究がなされている¹⁾。しかし、今までの牛肉のガス置換包装に関する研究は色調²⁾、細菌数³⁾ および脂質の酸化⁴⁾ 等に関する研究が殆どであり、わずかに魚肉における核酸関連物質の変化に及ぼすガス置換包装の検討⁵⁾ が認められるぐらいで、筋原線維を含む肉質の変化に関して検討した報告はあまりみあたらない。

食肉の性状を考える場合、筋原線維の小片化は食肉の軟らかさと密接に関連し⁶⁾⁷⁾、また食肉からの蛋白質の抽出性は食肉の性状や貯蔵状態で影響されると報告⁸⁾⁹⁾ されている。さらに乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は食肉の凍結変性や熱変性等の指標として使用されている¹⁰⁾¹¹⁾。このような実験指標の他に、抽出された食肉蛋白質成分の分子種の同定ならびにその量的変動の検討等

† スライス牛肉のガス置換包装に関する研究 (第2報) (前報, 文献¹²⁾)

* 九州大学農学部 (〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1)

** 神戸大学農学部 (〒657 神戸市灘区六甲台町 1-1)

*** 昭和電工 (株) (〒105 東京都港区芝大門 1-13-9)

は、ガス置換包装による牛スライス肉の肉質を考察するうえで有効な手段と考えられる。

本研究の目的は、ガス置換包装したスライス牛肉商品の賞味期間が何故延びるかを検討することであり、前報¹²⁾ではスライス牛肉試料のpH値、細菌数、メトミオグロビン(MetMb)生成量および脂質酸化に及ぼすガス置換包装の影響につき検討した。その結果、生菌数、低温細菌数および大腸菌群ともに5℃、8日間の貯蔵を通して、対照に比較してすべて低い値が得られた。またMetMb生成量も同様の傾向を示した。一方、脂質の酸化の程度はガス置換包装においても比較的低い値を示した。

そこで本研究では、スライス牛肉の筋原線維の小片化、蛋白質の抽出性およびLDH活性に及ぼすガス置換包装の影響につき検討した。

実験方法

1. 実験材料および包装

屠殺後3日間常法で冷却したホルスタイン種去勢牛1頭(約22ヶ月齢)からランプ部位(約8.5kg)を採取し、クレハロンフィルムで真空包装し、1℃で8日間熟成した後、前報¹²⁾と同様の方法で処理後、ガス置換包装に供した。包装形態は(A)ストレッチ包装(対照):(B)チャンバー式・真空ガス置換包装:(C)横ピロー式フラッシュガス置換包装の3種類で行った。ガス組成は一般に牛肉のガス置換包装に用いられている20%CO₂+80%O₂とした。各包装試料は5℃で0, 2, 4, 6, 8日間貯蔵後、分析に供した。なお一連の実験は5回繰り返し、統計処理を必要とする結果ではそれらの平均値および標準偏差を示した。

2. 分析方法

(1) 筋原線維の小片化率の測定

筋原線維の小片化率の測定はTAKAHASHIらの方法⁶⁾に従って行った。即ち、1~4個のサルコメアから成る筋原線維フラグメントの数[F]と全筋原線維の数[Σ]をニコンVFD-TR位相差顕微鏡により観察した。それぞれの場合、約500以上の数を測定し、小片化率は小片化インデックス[F]/[Σ]として表現した。

(2) 蛋白質の抽出量

試料からの蛋白質の抽出性は下記の4種類の溶液により求めた。(1)H₂O(2mM NaNa₃)(2)Enzyme-溶液(100mM K-phosphate buffer, 1mM EDTA, 5mM 2-mercaptoethanol, 1mM NaNa₃, pH 7.5)(3)GS-溶液(0.3M- KCl, 0.15M K-phosphate buffer, pH 6.5)(4)GS-

ATP-溶液(0.3M KCl, 0.15M K-phosphate buffer, 1mM ATP, pH 6.5)。試料のひき肉5gに対し各種上記溶液をそれぞれ10倍量添加、ホモジナイズ後0℃で10分間静置した。10,000×gで20分間遠心分離後、得られた上清の蛋白質濃度をマイクロケルダール法により標準化したビウレット法¹³⁾により定量した。

(3) 電気泳動

抽出蛋白質成分の分子種はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)¹⁴⁾により同定した。アクリルアミド濃度は7.5~17.5%のグラジェントでスラブ型の泳動装置を用い行った。

(4) 乳酸脱水素酵素(LDH)活性の測定

YAMADA and MUGURUMAの方法¹⁵⁾に準じて試料からの酵素溶液の抽出および酵素活性の測定を行った。1gの筋肉試料に19倍量のEnzyme-溶液を添加し2~4℃で30秒間を3回ホモジナイズ後、22,000×gで30分間遠心し上清を得た。さらに沈殿画分に同様の操作を繰り返し2度目の上清を得た。この2回の上清画分を混合して酵素溶液とした。LDH活性は66mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.15mM NADH, 2.5mM pyruvate, 5mM EDTAを含む溶液で30℃で反応させ、340nmの吸光度変化を測定することにより求めた。酵素活性の1ユニットは1分間当たり1μモルの基質を変換触媒できる標品の量として示した。

結果および考察

1. 筋原線維の小片化の変化

小売用の牛肉の色調の悪化および細菌の増殖を抑制する目的では20%CO₂+80%O₂のガス組成による充填包装が一般に好ましいと報告されており¹⁶⁾、本実験でも同条件でガス包装を行った。CO₂は細菌や酵母、カビに対して殺菌作用あるいは静菌作用を有しており³⁾、前報¹²⁾でも顕著な効果が認められている。一方、O₂の効果としてはミオグロビンと結合してオキシミオグロビンを生成し、牛肉の内部へと浸透して、鮮やかな赤色を長期に保つと同時に、牛肉の組織が引き締まった状態になって肉汁の流出を防ぎ、熟成して到達した味覚のクライマックスを長く保つとされている¹⁷⁾。牛肉の色に関しては前報¹²⁾でもメトミオグロビンの生成量の顕著な抑制効果が認められている。

まず、筋原線維の小片化に及ぼすガス置換包装の影響をFig. 1に示した。貯蔵0日で約0.53であった小片化率が5℃で8日間の貯蔵期間を通じて徐々に増加し、約0.60になり、熟成の進行に伴って小片化も進行すること

Fig. 1 Effect of storage time on the fragmentation of myofibrils

□—□, control; △—△, 20% CO₂+80% O₂ after vacuum treatment; ○—○, 20% CO₂+80% O₂ after flushed with the gas of the same composition. Each point shows an average of five determinations. Vertical lines represent standard deviation at each point.

が認められた。その筋原線維の小片化の速度は対照>(B)>(C)の順であった。FUKAZAWA ら¹⁸⁾は死後の鶏骨格筋肉の筋原線維の電子顕微鏡観察で小片化の増加は筋原線維Z線のzig-zag構造の崩壊とZ-I接合部位での切断が密接に関係することを指摘している。Z線の崩壊には骨格筋中の内因性のプロテアーゼであるカルパインの関与¹⁹⁾²⁰⁾やCa²⁺によるZ線の脆弱化²¹⁾が報告されている。本実験での貯蔵8日目におけるカルパイン活性は対照およびガス置換包装間で有意な差が認められないことから(データ省略)、Ca²⁺によるZ線の脆弱化^{21~23)}に差異の原因があるのかもしれない。死後筋肉の遊離のCa²⁺濃度は約10⁻⁴Mに増加するが²⁴⁾、20% CO₂+80% O₂のガス組成が細胞内のCa²⁺濃度に影響した可能性がある。

2. 蛋白質の抽出性および抽出蛋白質成分の分子種の同定

蛋白質の抽出性の変化をH₂O、Enzyme-溶液、GS-溶液およびGS-ATP溶液の4種類の溶液を用いて検討した(Fig. 2)。H₂Oは牛肉中の水溶性蛋白質を抽出し、Enzyme-溶液はイオン強度の増加により牛肉中の酵素系を含む水溶性蛋白質の抽出をより高め、筋肉構造蛋白質の一部も抽出することができる。GS-溶液は筋肉から

Fig. 2 Comparisons of amounts of protein extracted with four solutions from thin sliced beef stored under different conditions

(a), control; (b), 20% CO₂ + 80% O₂ after vacuum treatment; (c), 20% CO₂ + 80% O₂ after flushed with the gas of the same composition. Each point shows an average of five determinations under each condition. Vertical lines represent standard deviation at each point. □—□, H₂O; △—△, enzyme-solution; ○—○, GS-solution; ●—●, GS-ATP-solution.

ミオシンを抽出精製する際に使用される溶液であり、GS-ATP溶液は硬直結合を起こしたミオシンとアクチンの結合を解離させミオシンの抽出量を増大させることができる。まずH₂Oによる抽出では保存により徐々に僅かではあるが抽出量が低下した。Enzyme-溶液やGS-溶液ではさらに多くの蛋白質が抽出され、GS-ATP溶液ではH₂O抽出の約3倍の蛋白質が抽出された。これら3種類の溶液による抽出性は貯蔵時間と共にやはり低下する傾向が認められた。特にGS-溶液による抽出性の低下が8日間のガス包装によって認められた。

Fig. 3はH₂OとEnzyme-溶液による抽出液中の蛋白質成分の分子種をSDS-PAGEにより同定した結果を示している。H₂Oでは95 kD, 46 kD, 36 kD, 33 kD, 30 kD成分の貯蔵による減少が認められ、特に36 kDのバンドは8日間の貯蔵で著しく減少した。対照とガス置換包装間の顕著な差異はなかった。Enzyme-溶液による抽出では分子量85 kD以上のバンドも観察され、僅かな量のミオシン重鎖(MHC)の抽出も認められた。ここでも36 kDおよび30 kD成分の8日間貯蔵による著しい

減少が確認された。次にガス置換包装した時のGS-溶液により抽出された成分の経時変化をFig. 4に示した。GS-溶液ではMHCの抽出が観察されたが、貯蔵時間と共にMHCや175 kD, 165 kD, 150 kD, 36 kD, 30 kD成分が減少することが認められ、175 kDおよび30 kD成分は貯蔵4日目から著しく減少した。MHCの変化では真空ガス置換包装(a)では経時的にバンドが減少したが、フラッシュガス置換包装(b)では6日目まではそのバンドの変化は緩やかであった。しかし8日目で著しく減少した。これらの変化はFig. 3の抽出量の変化とよく一致している。Fig. 5はGS-溶液(a)およびGS-ATP溶液(b)により抽出された成分のSDS-PAGEパターンを示したものである。GS-溶液による抽出蛋白質量の減少は主にMHCや36 kD, 30 kD成分の減少に起因することが明らかである。ミオシンとアクチンの硬直結合を解離すると著しくミオシンの抽出性が增大することが認められ、GS-ATP溶液による蛋白質量の増大は主としてミオシンによることがここでも確認された。GS-溶液により抽出されるミオシン重鎖は8日間貯蔵すると減少する

Fig. 3 SDS-PAGE of proteins extracted from thin sliced beef with H₂O (a) and enzyme solution (b). 1, 0-day sample; 2, control (8 days); 3, vacuum gas packaged (8 days); 4, flush gas packaged (8 days); 5, myofibrillar protein standard; MHC, myosin heavy chain.

Fig. 4 SDS-PAGE of proteins extracted from thin sliced beef with GS-solution
(a), vacuum gas packaged; (b), flush gas packaged; 1, 0-day; 2, 2 days; 3, 4 days; 4, 6 days; 5, 8 days; 6, myofibrillar protein standard; MHC, myosin heavy chain.

が対照よりもガス置換包装の方が僅かに抽出量が少なかった。

死後筋肉の硬直の状態が水溶性および塩溶性の蛋白質の抽出性に大きく影響することが報告され⁹⁾、また食肉の保存や脱水の状態変化によってもかなり異なることや²⁵⁾²⁶⁾、死後硬直前の骨格筋からの塩溶性の蛋白質の抽出性は死後硬直後の骨格筋からのそれよりは抽出されやすいことも認められている²⁷⁾。本研究の結果から、貯蔵中に水溶性（酵素系の蛋白質と想定される）および塩溶性蛋白質（特にミオシン）は抽出されにくくなることや、GS-ATP 溶液によりミオシンとアクチンの硬直結合を解離させた場合でもミオシン重鎖の抽出量は依然として減少傾向にあることから、死後硬直はまだ進行している可能性が示唆された。また、若干ではあるが対照よりもガス置換包装がミオシンの抽出性を抑制した原因はガス成分が牛肉の組織を引き締まった状態にすることにより抽出性を抑制するように作用したことも考えられる。

3. 乳酸脱水素酵素活性の変化

LDH は解糖系の鍵酵素ですべての動物細胞に広く分

布しており、食肉の加熱変性¹⁰⁾や保存した場合の細胞の生物活性保持の指標として利用されている²⁵⁾。また魚肉における LDH 活性の低下と鮮度との間に有意な相関関係があることが報告され、LDH 活性は初期汚染の変化を検出するための非常に有効な指標ともなりうることが報告されている¹¹⁾。そこで本研究でも LDH 活性の変化を測定し、得られた結果を Table 1 に示した。0 日の試料と比較して対照の 8 日間保存した試料では、LDH 活性は約 89% に低下したが、真空ガス置換包装では約 95.6%、フラッシュガス置換包装では約 98.7% の高い活性が保持されていた。この様にガス包装、特にフラッシュガス置換包装が貯蔵による牛肉中の生物活性の低下を抑制する効果が認められた。これはおそらくガス中に含有される 20% CO₂ により、微生物細胞の増殖が著しく抑制されたことと密接な関係があるものと想定される。

以上の結果を総合すると、スライス牛肉のガス置換包装、特にフラッシュガス置換包装により、筋原線維の小片化が適度に進行して、さらに鮮度とも密接に関連のあ

Fig. 5 SDS-PAGE of proteins extracted from thin sliced beef with GS-solution (a) and GS-ATP-solution (b)

1, 0-day sample ; 2, control (8 days) ; 3, vacuum gas packaged (8 days) ; 4, flush gas packaged (8 days) ; 5, myofibrillar protein standard ; MHC, myosin heavy chain.

Table 1 Activity of lactate dehydrogenase

Sample	Enzyme activity ^{a)} (Units/g wet weight)
0-Day sample	973±13 ^b
Control (8 days)	865±21 ^c
Vacuum gas packaged (8 days)	930±14 ^d
Flush gas packaged (8 days)	960±13 ^b

^{a)} LDH activity was assayed in a solution containing 66 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.15 mM NADH, 2.5 mM pyruvate and 5 mM EDTA. The assay was carried out at 30°C in a final volume of 3.0 ml, following the change of optical density at 340 nm with a Hitachi two wavelength double beam spectrophotometer, type 557. One unit of enzyme was defined as the amount of the preparation which catalyzes the transformation of 1 μmol of substrate per min. Each value was the mean for five preparations with the associated standard deviation.^{b~d} Means followed by different superscripts were significantly different at $p < 0.05$.

る牛肉の生物活性を高い値で保持し、しかも良好な色調のスライス牛肉の小売販売が期待される。

要 約

スライス牛肉の筋原線維の小片化、蛋白質の抽出性およびLDH活性に及ぼすガス置換包装の影響を検討した。スライス牛肉を(A)ストレッチ包装(対照)、(B)20% CO₂+80% O₂真空ガス置換包装、(C)20% CO₂+80% O₂フラッシュガス置換包装し、5℃に2, 4, 6, 8日間貯蔵した。その結果、すべての試料の筋原線維の小片化の程度は徐々に増加した。筋原線維の小片化の速度は対照>(B)>(C)の順であった。すべての試料の水溶性および塩溶性の蛋白質の抽出性は貯蔵中に減少した。異なる条件下で貯蔵した牛スライス肉からのGS-溶液で抽出される蛋白質のSDS-PAGEパターンは、塩溶性蛋白質の減少は主にミオシンの抽出性の減少に起因することを示している。対照のLDH活性は貯蔵中に減少した。しかし、ガス置換包装の試料はLDH活性を維持し、特に試料(C)ではよく保持された。これらの結果は、ガス置換包装した試料では貯蔵8日後でさえも生物活性を保持していることを示唆している。

文 献

- 1) TAYLOR, A.A. : Developments in Meat Science-3, ed. by LAWRIE, R., (Elsevier Applied Science Publishers, London and New York), p. 89 (1985).
- 2) BARTKOWSKI, L., DRYDEN, F.D. and MARCHELLO, J.A. : *J. Food Prot.*, **45**, 41 (1982).
- 3) SPAHL, A., REINECCIUS, G. and TATINI, S. : *J. Food Prot.*, **44**, 670 (1981).
- 4) OKAYAMA, T. : *Meat Sci.*, **19**, 179 (1987).
- 5) BOYLE, J.L., LINDSAY, R.C. and STUIBER, : *J. Food Sci.*, **56**, 1267 (1991).
- 6) TAKAHASHI, K., FUKAZAWA, T. and YASUI, T. : *J. Food Sci.*, **32**, 409 (1967).
- 7) OLSON, D.G., PARRISH, F.C.Jr. and STROMER, H. : *J. Food Sci.*, **41**, 1036 (1976).
- 8) XIONG, Y.L. and BREKKE, : *J. Food Sci.*, **56**, 210 (1991).
- 9) LAN, Y.H., NOVAKOFSKI, J., CARR, T.R. and MCKEITH, F.K. : *J. Food Sci.*, **58**, 963 (1993).
- 10) STALDER, J.W., SMITH, G.L., KEETON, J.T. and SMITH, S.B. : *J. Food Sci.*, **56**, 895 (1991).
- 11) DAMODARAN NAMBUDIRI, D. and GOPAKUMAR, D. : *J. Food Sci.*, **57**, 72 (1992).
- 12) 岡山高秀・六車三治男・村上新一・山田裕一 : 日食工会誌, **42**, 498 (1995).
- 13) GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S. and DAVID, M. M. : *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).
- 14) LAEMMLI, U.K. : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 15) YAMADA, M. and MUGURUMA, M. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **61 B**, 331 (1978).
- 16) TAYLOR, A.A. and MACDOUGALL, D.B. : *J. Food Technol.*, **8**, 453 (1973).
- 17) 海沼祐治 : 包装技術, **30**, 1123 (1992).
- 18) FUKAZAWA, T., BRISKEY, E.J., TAKAHASHI, K. and YASUI, T. : *J. Food Sci.*, **34**, 606 (1969).
- 19) GOLL, D.E., OTSUKA, Y., NAGAINIS, P.A., SHANNON, J.D., SATHE, S.K. and MUGURUMA, M. : *J. Food Biochem.*, **7**, 137 (1983).
- 20) KOOHARAIE, M., BABIKER, A.S., MERKEL, R.A. and DUTSON, T.R. : *J. Food Sci.*, **53**, 1253 (1988).
- 21) HATTORI, A. and TAKAHASHI, K. : *J. Biochem.*, **92**, 381 (1982).
- 22) TAKAHASHI, K., KIM, O.H. and YANO, K. : *J. Biochem.*, **101**, 767 (1987).
- 23) YAMANOE, M., AKAMATSU, Y., OKAYAMA, T. and NISHIKAWA, I. : *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, **65**, 320 (1994).
- 24) NAKAMURA, R. : *Anal. Biochem.*, **53**, 531 (1973).
- 25) MUGURUMA, M., NISHIMURA, T., UMETSU, R., GOTO, I. and YAMAGUCHI, M. : *Meat Sci.*, **20**, 179 (1987).
- 26) MUGURUMA, M., KATAYAMA, K., NAKAMURA, M. and YAMAGUCHI, M. : *Meat Sci.*, **21**, 99 (1987).
- 27) SOLOMON, L.W. and SCHMIDT, G.R. : *J. Food Sci.*, **45**, 283 (1980).

(平成6年8月3日受理)