報 文

魚肉ねり製品の製造工程におけるポリリン酸塩の消長
—酵素分解に及ぼすマグネシウムの影響—

(平成8年7月25日受理)

松永 明信^{*1} 大泉 徹^{*2} 山本 敦^{*1}
川崎 賢一^{*3} 松川 雅仁^{*4}Degradation of Polyphosphates during the Manufacturing
Process of Surimi-Based Products
—Effect of Magnesium Concentration on Enzymatic Degradation—Akinobu MATSUNAGA^{*1}, Tooru OOIIZUMI^{*2}, Atsushi YAMAMOTO^{*1},
Ken-ichi KAWASAKI^{*3} and Masahito MATSUKAWA^{*4}(*¹Toyama Institute of Health: 17-1, Nakataikoyama, Kosugi-machi, Imizu-gun, Toyama
939-03, Japan; *²Department of Marine Bioscience, Fukui Prefectural University:1-1, Gakuen-cho, Obama-shi, Fukui 917, Japan; *³Toyama Food Research

Institute: 360, Yoshioka, Toyama-shi, Toyama 939, Japan;

*⁴Central Research Institute, Maruha Co., Ltd.: 16-2,

Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-42, Japan)

The effect of magnesium (Mg) concentration on the degradation of polyphosphates (PP) in salted meat paste (SMP) during the setting process has been investigated. Surimi was prepared from minced walleye pollack muscle by washing twice with a buffer solution (pH 7.5). The SMPs, which were mixtures of surimi, NaCl, tripolyphosphate (P3), pyrophosphate (P2) and various concentrations of Mg, were incubated at 20°C for 0~20 hr. Amounts of P3 and P2 remaining in SMP were measured. While P3 was completely degraded within about 8 hr, regardless of Mg concentration (3~13 mmol/kg), P2 degradation was dependent on Mg concentration in SMP. P2 was hardly degraded in the presence of 3 mmol/kg Mg for 20 hr, but was completely degraded at 13 mmol/kg Mg for 8 hr.

The effect of Mg on pyrophosphatase (P2ase) and tripolyphosphatase (P3ase) activities has been investigated at various concentrations of P2 and P3. The relation between activity and Mg concentration was hyperbolic for P3ase and sigmoid for P2ase. Both P3ase and P2ase activities were saturated at Mg concentrations higher than the P3 and P2 concentrations. Moreover, P2ase activity decreased with increasing P2 concentration below 3 mmol/kg Mg. It was presumed that these differences in Mg concentration dependence of P2ase and P3ase are relevant to the degradation rate of PP in SMP.

On the other hand, the gel strength of SMP was recognized to increase in the presence of Mg at a concentration sufficient to form Mg-PP complex. Therefore, it is suggested that increase of Mg concentration in SMP not only accelerates P2 degradation, but also enhances gel strength.

(Received July 25, 1996)

*¹ 富山県衛生研究所: 〒939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山 17-1*² 福井県立大学生物資源学部: 〒917 福井県小浜市学園町 1-1*³ 富山県食品研究所: 〒939 富山市吉岡 360*⁴ マルハ(株)中央研究所: 〒300-42 茨城県つくば市和台 16-2

Key words: 魚肉ねり製品 surimi-based product; ピロリン酸塩 pyrophosphate; トリポリリン酸塩 tripolyphosphate; 分解 degradation; マグネシウム magnesium

緒 言

ポリリン酸塩 (PP) は金属封鎖, pH の緩衝, 分散乳剤, 結晶析出防止及びタンパク質の可溶化などの多様な作用を有し, 広範な食品に添加物として使用されている¹⁾。魚肉ねり製品原料の冷凍すり身にも, その保存・流通におけるタンパク質の変性防止及び最終製品のゲル物性改善などのため, ピロリン酸塩 (P2) とトリポリリン酸塩 (P3) の混合製剤が添加されている²⁾。魚肉ねり製品の品質に及ぼす PP (以下, 本研究では P2 と P3 を表す) の役割については, 魚肉筋原線維タンパク質に対する PP の作用などに関する研究が進められ, 多くの知見が得られている^{3)~6)}。しかしながら, 製造工程における PP 自身の分解挙動についての報告はほとんどない。著者らは, すり身に添加される PP 製剤中の PP 組成比と市販魚肉ねり製品中のそれとが大きく異なることを見いだした⁷⁾。そして, 魚肉ねり製品の製造工程における PP の組成変化とその要因を解明するため, スケトウダラから実験的にねり製品を試作し, 各工程における PP の消長の検討を行った。その結果, ①坐り工程の肉糊中で P3 は P2 とオルトリン酸塩 (P1) に, P2 は P1 に, それぞれ酵素的に分解されること, ②P3 と P2 の分解速度は 20℃ 前後で最大になること, ③すり身の製造工程における魚肉の水晒し処理で, P3 分解酵素 (P3ase; EC 3.6.1.25) は洗浄液へ溶出されないが, 洗浄回数の増加に伴って, P2 分解酵素 (P2ase; EC 3.6.1.1) の溶出量が増加すること, ④両分解酵素の活性発現にはマグネシウム (Mg) が必須であること, ⑤加熱工程で PP は熱分解するが, その分解量は坐り工程での酵素分解量に比べて小さいこと, などを初めて明らかにした^{7)~10)}。前報では, 水晒し回数の異なるすり身を用いて坐り工程における PP の消長を検討したが, 水晒しにより, P2ase と Mg が共に減少しているため, PP 分解に及ぼす Mg の影響だけを把握することは困難であった。本研究では, 一定量の PP 分解酵素を含む肉糊を用い, 坐り工程における PP の消長に及ぼす Mg 濃度の影響を, 製品のゲル物性との関連性をも併せて詳細に検討した。

実験方法

1. 材料及び試薬

新鮮なスケトウダラ (*Walleye pollack Theragra chalcogramma*) を購入して用いた。P3 は Sigma 社の製品 (純度 98%), P2 及びトリクロロ酢酸は和光純薬工業 (株) の特級品及び生化学用, その他の試薬は特級品を用いた。

2. すり身の調製

スケトウダラの筋肉を採取して細切した。筋肉に対し

て 3 倍量の緩衝液 (0.16 mol/L 塩化カリウム, 0.04 mol/L Tris-塩酸 (pH 7.5), 以下, 単に緩衝液と呼ぶ) で 2 回洗浄した後, 得られた脱水肉に対して 5% のソルビトールを添加してすり身を調製した。このすり身の水分, タンパク質及び Mg 含量は, それぞれ 81.0%, 12.5% 及び 3.4 mmol/kg であった。

3. 肉糊中でのポリリン酸塩の分解反応条件

4 g のすり身に, 最終濃度 2.4% 食塩, 4 mmol/kg P2, 4 mmol/kg P3 及び 3~13 mmol/kg $MgCl_2$ を添加して 5 g (4 g のすり身と 1 mL の溶液の混合物である) の肉糊を調製した。Mg 濃度は, すり身に含まれている量と添加量との和である。これらの肉糊を 20℃ で一定時間保温した後, 氷冷した 6% トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて分解反応を停止させた。残存する P2 と P3 を著者らが開発した方法^{11), 12)} で測定した。

4. 酵素活性のマグネシウム濃度依存性の検討

P2ase 活性の Mg 濃度依存性を検討するための粗酵素としては, 第 1 回目の水晒しに使用した洗浄液を緩衝液に透析し, Mg を完全に除去したものを用いた。所定濃度の基質 (P2), 0.16 mol/L 塩化カリウム, 0.04 mol/L Tris-塩酸 (pH 7.5), 2.4% 食塩, 0~16 mmol/L $MgCl_2$ 及び 1 mL の粗酵素液から成る全量 5 mL の反応混合液を 20℃ で 1 時間反応させ, 6% TCA を加えて反応を停止し, 残存する P2 を測定した。P3ase の場合には, 粗酵素として, 魚肉を緩衝液で 4 回洗浄して調製したすり身 1 g を用い, 基質として所定濃度の P3 を含み, その他は P2ase の場合と同様な組成の 5 mL の反応混合液を 20℃ で 10 分間反応させ, 残存する P3 を測定した。なお, このすり身には 1 mmol/kg の Mg が含まれており, Mg 濃度は添加量との和であり, 10 mmol/L EDTA 添加の場合を 0 mmol/L Mg とした。活性はそれぞれ基質の分解量を $\mu\text{mol P2}$ (又は P3)/h·g (洗浄液又はすり身) (以下, 単位) で表示した。

5. 坐り-加熱ゲルの物性の測定

実験方法 3 に述べた方法に準じて調製した肉糊を, プラスチック製円筒型容器 (直径 3.7 cm 高さ 2 cm) に充てんし, キャップで密栓した後, 20℃ で 20 時間保温し, 更に 90℃ で 20 分間加熱した。得られた坐り-加熱ゲルの物性は, レオメーター (レオナー RE-3305, 山電(株)製) を使用して, 直径 5 mm の円柱型ランジャーで破断強度 (g) と凹み (cm) を測定し, その積で表されるゼリー強度を算出した。

Fig. 1-A. Effect of Mg concentration on the degradation of P3 in the salted meat paste

Mg concentrations in the salted meat paste were 3 (○), 5 (■), 7 (△), 9 (●) and 13 mmol/kg (□).

結果及び考察

1. 肉糊中のポリリン酸塩の分解に及ぼすマグネシウムの影響

肉糊中の Mg 濃度を変化させて、20℃ における P2 と P3 の分解を経時的に調べ、Fig. 1-A~C に示した。まず P3 については、Fig. 1-A に示すように、3 mmol/kg Mg 存在下では、P3 は 1 時間で半減し、その後徐々に減少して 20 時間で消失した。Mg 濃度の増加に伴って P3 の分解は速くなったが、5 mmol/kg Mg 以上では顕著な差はみられなかった。一方、P2 については、Fig. 1-B に示すように、P3 の分解によっていったん増加し、その後減少する傾向がみられた。Mg 濃度の増加により、P2 の最大値及び最大値に達する時間はそれぞれ減少した。いずれの Mg 濃度においても、P3 の分解が P2 の分解よりも先行することが明らかである。特に 3 mmol/kg Mg 存在下では、P3 の分解により増加した P2 は減少せず、また P2 と P3 の合計値は常にほぼ一定 (8 mmol/kg) であり (Fig. 1-C)、P2 は全く分解しないことが示された。5 mmol/kg 以上の Mg 濃度では、P2 と P3 の和は減少したが、この減少量が P2 の分解量に対応する。Mg 濃度の増加に伴って、この減少速度が速くなったが、P2 の分解速度が速くなることを反映していると考えられる。これらの結果から、肉糊中における P3ase の全活性が P2ase のそれよりも著しく高いこと、両酵素の活性発現における Mg 濃度依存性が異なっていることが強く示唆された。著者らの調査では、市販スケトウダラ冷凍すり身中の Mg 濃度は 4~10 mmol/kg 程度であった¹³⁾。これらを原料とする市

Fig. 1-B. Effect of Mg concentration on the production and degradation of P2 in the salted meat paste

Mg concentrations in the salted meat paste were the same as described in Fig. 1-A.

Fig. 1-C. Effect of Mg concentration on the degradation of P2 in the salted meat paste

Mg concentrations in the salted meat paste were the same as described in Fig. 1-A.

販ねり製品の製造工程でも、すり身中の Mg 濃度の差異によって P2 の分解パターンは大きく異なり、最終製品の PP 残存量に影響を及ぼすことが推定される。そこで、次に P3ase 及び P2ase の活性発現に及ぼす Mg 濃度依存性を詳細に検討した。

Fig. 2. Effect of Mg concentration on P3ase activity

P3 concentrations in the reaction mixture were 2 (●), 4 (□) and 8 mmol/L (▲).

2. 酵素活性のマグネシウム濃度依存性

P3濃度を2, 4, 8 mmol/Lと変化させて、P3ase活性に及ぼすMgの影響を検討してFig. 2に示した。いずれの基質濃度の場合にも、Mg濃度の増加とともに活性は増加したが、基質濃度以上のMg存在下では一定値を示した。2, 4, 8 mmol/L P3の場合の最大活性は、それぞれ9, 15, 28単位であった。P2aseについても、Fig. 3に示すように、いずれの場合もMg濃度の増加とともに活性は増加し、2, 4, 8 mmol/L P2の場合は、基質濃度以上のMg存在下で活性は一定値に達したが、それぞれの最大活性は3.8, 4.3, 4.5単位であった。

酵素活性発現のためのMgの役割については、①酵素タンパク質に結合し、非活性型構造から活性型構造に変化させること、②基質と複合体を形成することにより、酵素と反応可能な基質に変化させること、などが考えられることは前報でも述べた⁹⁾。今回の結果からは、両酵素ともに、最大活性に達するMg濃度は基質濃度とほぼ一致しており、両酵素の活性発現のために、Mgは少なくとも②に関与し、基質と等モル組成の複合体を形成して、反応可能な基質になることが推定される。しかしながら、P2ase活性のMg濃度依存性は、いずれの基質濃度においてもシグモイド曲線となり、Mg濃度が3 mmol/L以下の低濃度の場合には、P2濃度が高いほど酵素活性は低いという特異な現象がみられ、P3ase活性の場合とは顕著に異なった。また4 mmol/L P2と4 mmol/L P3を反応混合液に共存させた場合には、Fig. 3に示すように、P2ase活性が最大となるのは10 mmol/L Mgであり、P2が単独で存在する場合とは明

Fig. 3. Effect of Mg concentration on P2ase activity

P2 concentrations in the reaction mixture were 2 (●), 4 (□), 8 mmol/L (▲) and 4 mmol/L P2 plus 4 mmol/L P3 (×).

らかに異なった。このことから、P2及びP3が共存する場合には、Mg・P2複合体の形成力よりもMg・P3複合体の形成力が強いこと、遊離のP2, P3あるいはMg・P3複合体がP2aseを阻害することなどが示唆される。また、低濃度Mg存在下で、MgとP2が等量存在する場合に比較して、P2が過剰に存在するとP2ase活性が低くなる理由は、Mg・P2複合体の生成量が少なくなるためとは考えにくい。本研究の結果だけから、その原因を解明することは不可能である。しかしながら、Mgと酵素の複合体（活性型酵素）の生成が抑制されること、あるいは遊離のP2が酵素と結合してアロステリック効果により酵素を不活性型構造に変化させることなどが、活性が低い原因となっている可能性が考えられる。酵素活性の測定系と肉糊の反応系とは、タンパク質濃度や水分などの条件が異なるので、単純には比較できない。しかしながら、肉糊中でのP3の分解速度に及ぼすMg濃度の影響に比較して、P2の分解がMgにより顕著な影響を受ける理由の一つは、酵素及び基質とMgとの複合体形成などのメカニズムが複雑であることなどに起因していると推定される。

3. 坐り-加熱ゲルの物性とポリリン酸塩の消長

肉糊中のMgが、坐り処理中におけるPPの分解、特にP2の分解に影響を及ぼすことは前述した。次に、Mg濃度に起因するP2の消長の差異と、最終製品となる坐り-加熱ゲルの物性との関連を検討した。Mg濃度を変化させて調製した坐り-加熱ゲルの破断強度と凹みを測定し、ゼリー強度を算出してFig. 4に示した。Mg

Fig. 4. Effect of Mg concentration on jelly strength of setting-heating gel of the salted meat paste

4 mmol/kg P2 plus 4 mmol/kg P3 were present (□) in the salted meat paste and absent (■).

濃度の増加とともに、破断強度及び凹みはそれぞれ増加し、その積で表されるゼリー強度も増加したが、7 mmol/kg Mg 以上ではほぼ一定値 (900 g·cm 程度) になった。このゼリー強度が最大になる Mg 濃度では、坐り工程中に PP が速やかに消失している。なお PP 無添加の場合には、Mg 濃度を変化させても、ゼリー強度は 1,000 g·cm 程度と一定であり、Mg がゲル物性に対して直接的に影響を及ぼすものでないことは明らかである。

ゼリー強度は、すり身中の筋原線維タンパク質 (ミオシン) の鮮度、肉糊中のミオシン濃度及びトランスグルタミナーゼ (EC 2.3.2.13) 活性、坐り温度や時間などの多くの因子に依存し^{14)~16)}、結果的には坐り-加熱ゲル (製品) 中のミオシン重鎖の多量化反応の進行度合を反映すると報告されている^{17), 18)}。今回のゲル物性についての測定は、限定された特定の条件下で行われたものであり、ミオシン重鎖の多量化反応などについては何ら解析していないので、十分に考察することはできない。しかしながら、坐り工程におけるミオシンの多量化に Mg が直接的に寄与するのではないことは明らかである。Mg 濃度が PP 濃度より高い場合にゲル物性が最大になることから、すべての PP が Mg と複合体を形成することがゲル物性の増大に必要であり、また、その結果として坐り工程中で P2 が速く消失することもゲル物性の増大に寄与するものと推定される。冷凍すり身の保存中のミオシンの変性防止に PP は役立つ^{4), 7)}。塩ずり操作中には、P2 は筋原線維タンパク質からミオシンの

溶出、解離及び変性を促進するとされている^{5), 6)}。松川らは、ミオシン重鎖の多量化反応に及ぼす P2 の影響を詳細に検討し、まず塩ずり工程で P2 が多量化反応を惹起し、坐り工程では多量化反応を促進するが、特に高分子な多量体の生成は抑制すると報告している^{19), 20)}。今回の結果はこのことは矛盾するものではない。

本研究では、すり身に含まれる Mg に着目して、坐り工程における PP の分解パターン及び製品の品質に及ぼす影響を検討した。筋原線維タンパク質の主要構成成分であるミオシンから、その多量体を含む三次元網状構造が形成されるまでには、各工程において複雑な反応が連続して進行しており、いくつかの反応に P2 あるいは Mg·P2 複合体が関与している。Mg は坐り工程における PP の消長に影響を及ぼし、PP の挙動を介して多量化反応を制御し、製品の品質に影響を及ぼしていると推定される。食品衛生学的には、製造の各工程で役割を終えた PP は分解され、最終製品には残らないことが望ましい。そのように製造方法を工夫することは、すなわち肉糊中で PP 濃度より Mg 濃度が高くなるように工夫し、PP の分解を促進させることは、良質の製品を製造することとともに重要なことであると考えられる。

まとめ

緩衝液で洗浄したスケトウダラ筋肉から製造したすり身に、食塩、PP 及び Mg を加え、塩ずりして肉糊を調製し、坐り操作中における PP の消長 (分解) に及ぼす Mg 濃度の影響を検討した。Mg の増加につれて P3 の分解速度は速くなった。しかしながら、Mg の濃度にはほとんど依存せず、P3 は 8 時間前後で消失した。一方、P2 分解の Mg 濃度依存性は顕著であり、3 mmol/kg Mg では P2 は全く分解せず、13 mmol/kg Mg では 8 時間で消失するなど、Mg 濃度が P2 の残存量に大きな影響を及ぼした。

次に、両分解酵素の活性発現に及ぼす Mg 濃度依存性を、基質濃度を変化させて検討した。Mg 濃度の増加に伴って P3 分解活性は双曲線的に増大し、Mg 濃度が基質濃度より増加すると活性は飽和した。一方、P2 分解活性は、Mg 濃度の増加に伴ってシグモイド曲線的に増加し、3 mmol/L Mg 以下の低濃度域では、P2 濃度が高いほど、活性は低くなるという特異な現象がみられた。このことが、坐り工程において、P2 の分解が Mg 濃度に顕著に依存することの原因の一つであると推定された。

また、P2、P3 と複合体を形成するのに十分な量の Mg が存在すれば、坐り-加熱ゲルのゼリー強度が大きくなる傾向が認められ、PP 分解を促進する Mg は肉糊のゲル形成にも影響を及ぼすことが示唆された。

文 献

- 1) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄監修: “食品添加物公定書解説書” p. D-1,045~1,056 (1992) 廣川書店。

- 2) 西岡不二男: さかな No. 34, 2~7 (1985) 東海区水産研究所.
- 3) 新井健一: 水産ねり製品技術研究会誌 14, 97~104 (1988).
- 4) 八木 浩, 新井健一: 日水誌. 52, 1,573~1,580 (1986).
- 5) 岩見史郎, 新井健一: 同上 54, 2,019~2,027 (1988).
- 6) 熊沢義之, 大寄良孝, 岩見史郎, 松本行司, 新井健一: 同上 56, 105~113 (1990).
- 7) 松永明信, 大泉 徹, 山本 敦, 川崎賢一, 水上英一: 同上 56, 2,077~2,082 (1990).
- 8) 大泉 徹, 松永明信: 水産ねり製品技術研究会誌 17, 161~167 (1992).
- 9) 松永明信, 大泉 徹, 山本 敦, 川崎賢一, 水上英一: 日水誌. 58, 79~83 (1992).
- 10) 松永明信, 山本 敦, 水上英一, 大泉 徹, 川崎賢一, 松川雅仁: 富山県衛生研究所年報 17, 140~143 (1994).
- 11) 松永明信, 山本 敦, 水上英一, 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学 34, 70~74 (1988).
- 12) 松永明信, 山本 敦, 水上英一, 川崎賢一, 大泉 徹: 日食工誌. 37, 20~25 (1990).
- 13) 松永明信, 山本 敦, 水上英一: 富山県衛生研究所年報 16, 206~209 (1993).
- 14) 加藤 登, 野崎 恒, 小松一宮, 新井健一: 日水誌. 45, 1,027~1,032 (1979).
- 15) 関 伸夫, 宇野秀樹, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一: 同上 56, 125~132 (1990).
- 16) 佐伯宏樹, 昌子 有, 平田史生, 野中道夫, 新井健一: 同上 58, 2,137~2,146 (1992).
- 17) 加藤 登, 橋本昭彦, 野崎 恒, 新井健一: 同上 50, 2,103~2,108 (1984).
- 18) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一: 同上 51, 1,559~1,565 (1985).
- 19) 松川雅仁, 桜田克彦, 新井健一: 同上 58, 735~742 (1992).
- 20) 松川雅仁, 平田史生, 木村省二, 新井健一: 同上 62, 94~103 (1996).