キダイ酢漬け魚肉の低温貯蔵に伴うドリップ生成に対する食塩の抑制効果と塩漬魚肉中の筋原繊維タンパク質の変化

奈須亮耶, 松川雅仁,* 大泉 徹, 加納竜一, 大田 慎司

(2015年9月19日受付, 2016年2月23日受理, 2016年4月29日J-STAGE 早期公開)

福井県立大学海洋生物資源学部

Prevention of drip exudation by pre-salting during ice storage of yellowback seabream meat slices pickled in vinegar associated with biochemical changes in myofibrillar proteins of sliced meat caused by the salting process

RYOYA NASU, MASAHITO MATSUKAWA,* TOORU OOIZUMI, RYUITI KANO
AND SINJI OOTA

Fukui Prefectural University, Obama, Fukui 917-0003, Japan

The effect of pre-salting on preventing drip exudation during ice storage of yellowback seabream meat slices pickled in vinegar was investigated in connection with biochemical changes in myofibrillar proteins (Mf). The decrease in the yield of vinegared meat slices during ice storage for 5 days was suppressed by salting prior to pickling in vinegar, suggesting that drip exudation was prevented by pre-salting. This preventive effect developed with higher NaCl concentration in the range from 0.5% to 6.0% as well as longer salting time for up to 24 h. Salt-ing of meat slices did not cause significant changes in the protein composition of Mf analyzed by SDS-PAGE. Furthermore, the recovery of Mf from meat slices and its Ca-ATPase activity were not affected by salting. On the other hand, NaCl solubility of Mf dropped by salting with insolubilization of myosin and actin in the same degree. These results suggested that the prevention of drip exudation from vinegared meat slices by pre-salting due to the increase of water-holding capacity of Mf was accompanied by structural changes of Mf with insolubilization of myosin and actin.

キーワード : Ca-ATPase, NaCl 溶解性, キダイ, 筋原繊維タンパク質, 小鯛ささ漬け

水産加工品の中には、魚肉を酢漬けすることによって製造される製品が見られる。¹⁾ 福井県小浜市を中心にキダイ *Dentex hypselosomus* を原料として生産される小鯛ささ漬けもその一つであり、その基本的な製造工程は塩漬とそれに引き続く酢漬けからなる。小鯛ささ漬けでは酢漬けによる魚肉中への酢酸の浸透と pH 低下を通じて冷蔵で約 1 週間の保存性が賦与されるとともに、製造工程を通じて生み出される粘りのある食感がその特徴となっている。酢漬けに先だって行われる塩漬は、製品からのドリップの滲出を防止し、小鯛ささ漬け特有の食感の維持に重要な役割を果たしていると言われている²⁾ が、必ずしも十分な検証が行われていない。

塩漬は小鯛ささ漬けだけでなく、魚肉加工品の製造に

おいて広く行われており、それらの品質形成に不可欠とされている。これに関連して古くは魚肉加工品の品質に密接にかかわる魚肉タンパク質の変性の進行を筋原繊維タンパク質（以下 Mf と略す）の食塩（NaCl）による溶解性の変化から検討した報告がある。³⁻⁶⁾ また、特に Mf に対する NaCl の作用を、ねり製品のゲル物性と関連づけた研究例も数多く認められる。⁷⁾ さらに、若目田ら^{8,9)} および若目田と新井¹⁰⁻¹³⁾ は、コイとグチの魚肉から単離したアクトミオシンあるいは Mf に対する NaCl の作用機序について詳細に研究し、高濃度の NaCl によって過半量のアクトミオシン中のアクチンが変性し、ミオシンから解離することを明らかにしている。また、高濃度の NaCl の存在下でアクトミオシンの一部はアクチ

ンとミオシンの結合を保ったまま構造変化することも示唆されている。一方、伊藤ら¹⁴⁾および丹保ら¹⁵⁾は塩漬に伴う魚肉中の Mf の性状変化についてスケトウダラとマアジを用いて研究している。そして、低温下での塩漬中にミオシン分子が SDS、尿素および 2-メルカプトエタノールで解離しない強固な結合を介して多量体を形成すること、同時にミオシンの Ca-ATPase 活性が徐々に低下することを示した。さらに、舊谷¹⁶⁾はマアジ筋肉組織中への NaCl の浸透がきわめて緩やかに進行することを実証し、そのことを裏付けるように ATP-Mg 共存下におけるイオン強度 0.5 のリン酸緩衝液中に抽出される塩溶解性タンパク質量は魚肉内部よりも NaCl 含量の高い魚肉表層部で明らかに速く低下する事実を示した。しかしながら、魚肉から単離した Mf を用いた試験管レベルの研究から明らかにされた Mf 中のミオシンとアクチンに対する NaCl の作用が、筋肉構造を保持した魚肉中の Mf にも起こっているのかという点については未だ不明であり、また魚肉中の Mf に対する NaCl の作用と魚肉加工品の品質とを関連づけた研究もほとんど見られない。故に、魚肉加工品の品質形成における NaCl の役割についても十分に理解されていないのが現状である。そこで本研究では、小鯛ささ漬けの品質形成における NaCl の役割を検証することを目的として、酢漬けたキダイ魚肉からのドリップの生成に及ぼす NaCl の影響を検討した。さらに、塩漬魚肉から調製した Mf の生化学的な性状変化を検討し、NaCl によるドリップ抑制効果との関連についても検討した。

材料と方法

材料 若狭湾沿岸で延縄漁法によって漁獲された体重約 450 g/尾のキダイを材料として用いた。キダイは、漁船が小浜市内の漁港に帰港した直後に入手した死後硬直完了直後のきわめて新鮮なものであり、筋肉中の ATP 関連化合物組成を測定したところ、イノシン酸 (IMP) が 90% を占め、K 値は 2.0% 以下であった。入手後 30 分以内に研究室に持ち運び三枚に卸したフィレーから背肉部位を採取し、厚さ約 5 mm になるよう筋繊維に対して垂直に切り出した魚肉片 (約 3 g 程度) を調製した。食酢は市販の穀物酢 (株式会社ミツカン、酸度 4.2%) を用い、NaCl は特級試薬を乳鉢で粉末状にして使用した。

塩漬魚肉の調製 魚肉片の重量に対して 0.5–6.0% の NaCl をプラスチック製の皿 (BIO-BIK 社製 D-M 70 × 70 × 22 mm) に秤量した。次に、NaCl を皿の上に均一に分散させたうえで、魚肉片を載せてその表面にできるだけ均一になるように NaCl を付着させた後、魚肉片を裏返してもう一方の面にも同様に NaCl を付着させた。このように NaCl を撒布した魚肉片を氷冷下で 24 時間

まで保持し塩漬魚肉とした。なお、それぞれの実験の対照にはフィレーから切り出した直後の魚肉片 (未塩漬魚肉) を用いた。

酢漬け処理とドリップ生成量 未塩漬および塩漬魚肉に等重量の氷冷した食酢を加え、氷冷下で 5 分間浸漬した。酢漬けた魚肉片を食酢から取り出してペーパータオルで魚肉表面の食酢を拭き取り、氷冷下で 5 日間貯蔵した。酢漬けた魚肉からのドリップの生成量は魚肉の重量変化 (歩留まり) から検討した。すなわち、貯蔵中の 24 時間ごとに魚肉から滲出したドリップをペーパータオルで拭き取り、魚肉の重量を計測した。魚肉の歩留まりは酢漬けた直前の魚肉片 (塩漬魚肉) の重量を基準とした相対値で表した。

魚肉中の Na イオン濃度 未塩漬および塩漬魚肉を細切して均一にした後、プラスチック製のサンプリングチューブ (5 mL 容量) に約 0.35 g を秤量し、蒸留水を 3.2 mL 加えた。さらに振幅攪拌粉碎機 (MIKRO-DIS-MEMBRATOR U, B. Braun Biotech International) を用いて直径 5 mm のジルコニアビーズ 1 個を投入して 2,000 rpm で 30 秒間処理した。続いて 50% トリクロロ酢酸 (TCA) を 0.4 mL 加えて 20,000 × g, 20 分間で遠心分離し、得られた上清をポアサイズが 0.45 μm のフィルターでろ過して抽出液とした。抽出液の Na イオン濃度が 0–2 ppm になるように 1% HCl で希釈した後、原子吸光度計 (ZA3300, 株式会社日立ハイテクサイエンス) に供した。

Mf の調製 Mf は加藤らの方法¹⁷⁾を一部改変して調製した。改変した点は、ホモジナイズ処理を魚肉の洗浄後に行ったことと、ガーゼによるろ過処理を省いたことであり、改変した理由は考察において述べる。具体的には、手術用のメスで細切した魚肉片の全量を遠心チューブに移し、魚肉片の重量に対して 20 倍量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え良く攪拌した。1,220 × g で 10 分間遠心分離し、上清を除いた。次に 20 倍量の 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加えて同様の操作を 2 回行った。得られた沈殿に 30 mL の 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加えポリトロンホモジナイザーを用いて 6,500 rpm で 30 秒間ホモジナイズした。30 秒間の間隔をおいて再度ホモジナイズを行ない得られた懸濁液を Mf 標品とした。以上の操作はすべて氷冷下で行った。なお、未塩漬魚肉から Mf を調製する場合は、1 回目の魚肉の洗浄から 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用いた。調製した Mf のタンパク質濃度はビウレット法¹⁸⁾により比色定量した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

未塩漬または塩漬魚肉の約 3 g に冷却した 5% HCl 溶液を 25 mL 加え、直ちにポリトロンホモジナイザーで摩砕した。次に NaOH を加えて pH を中性に調整した

後、得られた懸濁液 1.0 mL に対して 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を含む 4% SDS, 8 M 尿素および 4% 2-メルカプトエタノールの混合液 (以下 SDS 混液とする) を 3.0 mL 加えて室温下で 48 時間攪拌して溶解した。また、魚肉から調製した Mf (5 mg/mL) 1.0 mL に 3.0 mL の SDS 混液を加えて同様に溶解した。これらの可溶化液を SDS-PAGE 用サンプルとした。SDS-PAGE は Leammli の方法¹⁹⁾に準じて行った。SDS-PAGE 上のタンパク質成分は Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いて染色し、メタノール-酢酸溶液で脱色した。電気泳動図型を透過型スキャナー (GELSCAN, アイメジャー株式会社) でデジタル画像として取り込み、画像解析ソフト Image J (NIH) を用いてミオシン重鎖 (MHC) とアクチンのバンドの染色強度を解析した。

Ca-ATPase 活性 Ca-ATPase 活性は 0.5 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP および約 0.2–0.3 mg/mL の Mf からなる反応混液中で測定した。反応温度は 25°C とし、遊離する無機リン酸 (Pi) を比色定量²⁰⁾し、Ca-ATPase 活性 ($\mu\text{mol Pi/min/mg of protein}$) を算出した。

NaCl 溶解性 NaCl 濃度を 0.1–1.0 M に調整した Mf (2–3 mg/mL) を数時間おきに攪拌しながら 24 時間氷蔵した後、 $20,000 \times g$ で 20 分間 (2°C) 遠心分離した。遠心分離前の Mf のタンパク質濃度に対する遠心分離後の上清のタンパク質濃度の割合 (百分率) を Mf の NaCl 溶解性とした。また、種々の濃度の NaCl 溶液に溶解した Mf を SDS-PAGE に供し、SDS-PAGE 上の遠心分離前の MHC とアクチンの染色強度に対する上清中のそれらの相対値をミオシンまたはアクチン溶解性とし

て示した。

結 果

氷蔵に伴う酢漬け魚肉の歩留まり低下に対する NaCl の影響 未塩漬魚肉と 0.5, 3.0, および 5.0% の NaCl を撒布した塩漬魚肉の Na^+ 含量を原子吸光法で実測したところ、それぞれ 0.01, 0.12, 0.54 および 0.87 mol/kg であったことから、撒布した NaCl のほとんどが魚肉中に浸透したことが示唆された。これらの魚肉を 24 時間氷冷した後、酢漬けして 5 日間氷蔵した時の歩留まりの変化を Fig. 1(a) に示した。その結果によれば、酢漬け直後の歩留まりは NaCl の撒布量が少ない魚肉ほどやや高くなる傾向を示したが、撒布した NaCl 量にかかわらず、歩留まりは氷蔵 1 日目で大きく低下し、それ以降は緩やかに低下した。また、歩留まりの低下度合は未塩漬魚肉で最も大きく、氷蔵 5 日目で約 70% となった。これに対して、塩漬魚肉の酢漬け後の氷蔵に伴う歩留まりの低下度合は、NaCl の撒布量が増加するほど小さくなった。なお、NaCl 撒布量を 10% (Na^+ 含量は 1.71 mol/kg となる) まで増やしても、氷蔵に伴う歩留まりの低下度合は 5.0% の NaCl を撒布した場合と変わらなかった (結果は図示しない)。次に、NaCl の撒布量を 5.0% に固定して、塩漬時間を 0.5–24 時間の間で変化させた塩漬魚肉を酢漬けし、氷蔵中の歩留まりの変化を検討した結果を Fig. 1b に示した。これによると、塩漬時間にかかわらず酢漬け後の氷蔵時間の経過に伴って歩留まりは低下したが、その度合は塩漬時間が長いほど小さくなった。なお、塩漬時間を 72 時間まで延長したが、歩留まりの変化は 24 時間塩漬した場合と変わらな

Fig. 1 Effect of pre-salting on yield decrease by drip exudation during ice storage of meat slices pickled in vinegar prepared from yellowback seabream. Meat slices prepared from yellowback seabream salted with 0.5% (△), 3.0% (□), and 5.0% (◇) NaCl for 24 h (a) and those salted with 5.0% NaCl (b) for 0.5 h (△), 3 h (□), 12 h (◇), and 24 h (×) were subjected to pickling in vinegar for 5 min at 2°C and subsequent ice storage at 4°C for up to 5 days. Meat slices without salting (○) were also subjected to pickling and cold storage. To estimate drip exudation, the meat slices were weighed every 24 h and yield was expressed as a percentage of the weight to that before pickling.

かった (図示しない)。以上の結果から, キダイ魚肉を塩漬せずに酢漬けすると, その後の水蔵中に多量のドリップが生成して歩留まりは低下するが, 歩留まりの低下は酢漬け前に魚肉を塩漬することによって抑制されることが明らかとなった。そして, このような塩漬によるドリップ抑制効果は, 魚肉に撒布する NaCl 量と塩漬時間に依存して増大した。塩漬によるドリップ抑制効果は魚肉中への NaCl の浸透に伴って Mf の保水性が増大するためと考えられている²¹⁾。したがって本研究の結果は, Mf の保水性が NaCl との反応の強度に依存することを示唆している。そこで次に NaCl の浸透によって引き起こされる魚肉中の Mf の生化学的性状の変化を検討した。

塩漬に伴う魚肉中の Mf タンパク質サブユニット成分の変化 魚肉の重量に対して 0–6.0% (Na^+ は 0.01–1.04 mol/kg となる) の NaCl を撒布し, 24 時間塩漬した魚肉を, SDS 混液に可溶化して SDS-PAGE に供した結果を Fig. 2 に示した。図示はしないが, NaCl の撒布量にかかわらず, 魚肉中のタンパク質は SDS 混液に 100% 可溶化した。また, Fig. 2 に見られるように SDS-PAGE 図型にも変化は認められなかった。Fig. 2 に示した SDS-PAGE 上の主要な成分である MHC に相当する 200 kDa のバンドとアクチンに相当する 42 kDa のバンドの染色強度を測定し, それらの値から算出した MHC とアクチンの比率と NaCl の撒布量との関係を Fig. 3 に示した。その結果, 未塩漬魚肉中の両成分の比は 1.7 前後を示し, 魚肉への NaCl 撒布量が増加してもその比はほとんど変化しなかった。

Mf の収量とその Ca-ATPase 活性に及ぼす塩漬の影響 次に, 未塩漬および種々の条件で塩漬した魚肉から調製した Mf の収量と Ca-ATPase 活性の結果を Fig. 4 (a), (b) に示した。Figure 4(a) は塩漬を 24 時間で一定とし, NaCl の撒布量を変化させた場合の Mf の収量と Ca-ATPase 活性を示している。Mf の収量は NaCl の撒布量とは無関係に未塩漬魚肉のそれとほぼ同じ値で推移していた。Ca-ATPase 活性も, NaCl の撒布量が 5.0% までは未塩漬魚肉と同程度でほぼ一定の値を示したが, NaCl を 6.0% 撒布した魚肉ではやや低い値になった。Figure 4(b) は, NaCl の撒布量を 5.0% に固定し, 塩漬時間を変化させた場合の Mf の収量と Ca-ATPase 活性を示している。この場合も Mf の収量は塩漬時間にかかわらず, ほぼ一定値を示した。また, Mf の Ca-ATPase 活性も塩漬時間にかかわらずほぼ一定であった。先に述べたように, 塩漬による NaCl の浸透により Mf の保水性が増大して酢漬け魚肉のドリップ生成は抑制される。しかし, このような Mf の保水性の増大をもたらす構造変化は魚肉中のミオシン頭部の変性を伴わないことが示唆された。

未塩漬と塩漬魚肉中の Mf の NaCl 溶解性 先の結果

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of proteins in meat slices salted with different concentrations of NaCl. Meat slices salted with different concentrations 0–6.0% of NaCl for 24 h were minced with 5.0% HCl, neutralized with NaOH, and then subjected to solubilization in 3% SDS–6 M urea–3% 2-mercaptoethanol containing 37.5 mM Tris-maleate (pH 8.0) by continuous stirring at room temperature for 48 h. The solubilized proteins were analyzed by SDS gel electrophoresis with 13% polyacrylamide (SDS-PAGE). The protein bands on the gel were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. Molecular weight markers were indicated in lane M. MHC, myosin heavy chain; Ac, actin.

Fig. 3 Ratio of MHC to actin on SDS-PAGE of meat slices salted with different concentrations of NaCl. Staining intensities of MHC and actin (Ac) on SDS-PAGE shown in Fig. 2 were densitometrically measured and the ratios of MHC to actin were plotted against NaCl concentrations in the salting of meat slices.

から, 塩漬魚肉からの Mf の収量と Ca-ATPase 活性は, 対照とした未塩漬魚肉のそれらと同じであることを知った。そこで次に NaCl を 5.0% 撒布して, 24 時間塩

Fig. 4 Changes in recovery of myofibrillar proteins prepared from meat slices and their Ca-ATPase activity by salting. Myofibrillar proteins were quantitatively prepared from meat slices salted with 0–6.0% NaCl for 24 h (a) and those salted with 5.0% NaCl for 0–24 h (b). Recovery of myofibrillar proteins (○) was estimated from protein concentration and volume of myofibril suspension. Ca-ATPase activity (●) was assayed at 25°C in a medium containing 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM ATP and 0.2–0.3 mg/mL of myofibrillar protein (MP). (mean ± SD, *n* = 8)

Fig. 5 NaCl concentration dependency of solubility of myofibrillar proteins prepared from meat slices with or without salting. Myofibrillar proteins were prepared from unsalted meat slices (○) and those salted with 5% NaCl (●) for 24 h in the same manner as in Fig. 4. Myofibril suspension (2.0–3.0 mg/mL) with a constant NaCl concentration in the range from 0.1 M to 1.0 M was stored on ice for 24 h and subsequently subjected to centrifugation at 20,000×*g* for 20 min to separate soluble protein in the supernatant. NaCl solubility was expressed as a percentage of protein concentration in the supernatant to that of myofibril suspension before centrifugation.

漬した魚肉から調製した Mf の 0.1–1.0 M NaCl 溶液に対する溶解性を未塩漬魚肉から調製した Mf と比較した。その結果を Fig. 5 に示した。これによると塩漬の有無にかかわらず Mf の溶解性は、NaCl 濃度が 0.2 M 以下では 20% 以下であるが、0.2 M 以上の NaCl 濃度では、NaCl 濃度とともに増加した。しかしながら、NaCl 濃度と溶解性の関係は両魚肉で大きく異なっていた。すなわち、未塩漬魚肉から調製した Mf の溶解性は、0.3 M NaCl で大きく増加し、0.5 M NaCl ではほぼ最大値の 80% に達したのに対して、塩漬魚肉から調製した

Mf の溶解性は 1.0 M NaCl まで緩やかに増加し、その最大値は 60% に留まった。なお図示はしないが、2.0 M まで NaCl 濃度を増加させても塩漬魚肉から調製した Mf の溶解性は 60% 以上に増加することはなかった。

さらに、種々の NaCl 濃度における Mf 中のミオシンとアクチンの NaCl 溶解性を未塩漬魚肉と塩漬魚肉で比較した。その結果を Fig. 6a, b に示した。ミオシン (Fig. 6a) あるいはアクチン (Fig. 6b) の溶解性は NaCl 濃度とともに増加し、それらの増加傾向は、未塩漬魚肉と塩漬魚肉のいずれについても、Fig. 5 に示した Mf 全体の溶解性の变化と良く対応していた。また、種々の NaCl 濃度におけるミオシンとアクチンの溶解性の相関性を検討したところ²²⁾、塩漬の有無にかかわらず、きわめて高い正の相関関係が認められた。(Y = 1.1604X – 11.8, Y: ミオシン, X: アクチン, 相関係数 0.990)。これらのことから、塩漬魚肉から調整した Mf の NaCl 溶解性の低下は、その Mf 中のミオシンとアクチンが NaCl 溶液に対して不溶化するためであることが確かめられた。また、ミオシンとアクチンは、一定の比率を保って不溶化していることが示唆された。

ミオシンとアクチンの NaCl 溶解性の低下に及ぼす NaCl 撒布量と塩漬時間の影響 5% の NaCl を撒布して 24 時間塩漬した魚肉から調製した Mf 中のミオシンとアクチンの NaCl 溶解性は、未塩漬魚肉から調製した Mf のそれらよりも明らかに低下していた。そこで、塩漬魚肉中のミオシンとアクチンの不溶化に対する NaCl 撒布量と塩漬時間を検討した。Figure 7(a)–(d) には検討した 0.1–2.0 M までの NaCl 濃度における両タンパク質の溶解性の中から、0.3, 0.5 および 1.0 M NaCl における溶解性を抜粋して示した。塩漬時間を 24 時間として、NaCl の撒布量を 0–6.0% の範囲で変化させた魚肉

Fig. 6 NaCl concentration dependency of solubility of myosin and actin in myofibrillar proteins prepared from meat slices with or without salting. Myofibrillar proteins were prepared from unsalted meat slices (○) and those salted with 5.0% NaCl (●) for 24 h as in Fig. 5. Soluble proteins separated in the same manner as in Fig. 5 were subjected to SDS-PAGE and staining intensity of MHC and actin was densitometrically determined. Solubility of myosin and actin was expressed as a staining intensity of MHC (a) and actin (b) in soluble protein to that before centrifugation of myofibril suspension.

Fig. 7 Changes in solubility of myosin and actin in myofibrillar proteins by salting of meat slices with different conditions. Myofibrillar proteins were prepared from meat slices salted with 0–6.0% NaCl for 24 h (a, b) and those salted with 5.0% NaCl for 0–24 h (c, d) and subjected to measurement of NaCl solubility of myosin (a, c) and actin (b, d) with 0.3 M (○), 0.5 M (△), and 1.0 M (□) NaCl in the same manner as in Fig. 6.

から調製した Mf 中のミオシンとアクチンの 0.3, 0.5 および 1.0 M NaCl への溶解性を検討した結果, 0.3 M と 0.5 M ではミオシンとアクチンの溶解性は NaCl の撒布量が 3% まで大きく低下し, それ以上の撒布量では緩やかに低下した。また, 1.0 M NaCl 溶解性では NaCl の撒布量の増加に伴って, ミオシンとアクチンの溶解性

は非常に緩やかに低下した (Fig. 7a, b)。次に, NaCl の撒布量を 5% として, 塩漬時間の異なる魚肉から調製した Mf 中のミオシンとアクチンの NaCl 溶解性を検討した結果を Fig. 7(c), (d) に示した。これによると 0.3 M では, 塩漬初期の 3 時間でミオシンとアクチンの溶解性は約 50% まで急激に低下し, その後は徐々に低下した。0.5 M NaCl におけるミオシンとアクチンの溶解性は, 0.3 M NaCl におけるそれらに比べて低下の度合いは小さいものの, 同様の傾向を示した。1.0 M NaCl におけるミオシンとアクチンの溶解性は塩漬初期に僅かに低下し, その後は非常に緩やかに低下した。以上のように, NaCl 撒布量と塩漬時間に依存して魚肉中のミオシンとアクチンの NaCl 溶解性が低下した。このような傾向は酢漬魚肉からのドリップ生成が NaCl 撒布量または塩漬時間に依存して減縮される関係と非常に良く対応していた。なお, 塩漬条件の異なる魚肉から調製した Mf についても種々の NaCl 濃度におけるミオシンとアクチンの溶解性の関係を解析したが, この場合も両タンパク質の溶解性の間には高度な正の相関関係が認められた ($Y=1.225X-18.328$, Y : ミオシン, X : アクチン, 相関係数 0.982)。

考 察

魚介類を原料とした酢漬け製品とは, その製造工程に酢洗い, 酢じめおよび酢漬けなどと呼ばれる工程を含む製品の総称である。¹⁾ 酢漬け製品は水産漬け物に分類されるが, 微生物による発酵作用が品質形成に関与しない点でいずし等のなれずしとは区別されている¹⁾。これらの酢漬け製品の製造工程にみられる共通点は, いずれも酢漬け前に原料を塩漬する工程が組み込まれている点である。塩漬の方法や塩漬に用いる食塩量や時間はそれぞ

れの製品や製造者によっても異なるが、一般に酢漬け製品の製造における塩漬の意義は、原料の浸透圧脱水により魚肉を引きしめることや、NaClの浸透による水分活性の低下を通じて製品の保存性を向上させること、あるいは製品に塩味を賦与することにあると言われている。¹⁾ 本研究の対象とした小鯛ささ漬けも酢漬け製品に含まれている。その製造工程の基本は塩漬と酢漬けからなり、まずキダイフィレーを塩漬した後、原酢に近い酸度の調味酢に数分間フィレーを浸漬し、木樽に詰めて製品とされている。小鯛ささ漬けの重要な品質要素は、キダイ表皮の鮮やかな赤い色調と、NaClと酢によって引きしめられた独特の食感にあると言われている²⁾。キダイ表皮の赤い色調は、酢漬け後の冷蔵中に著しく退色することや、その退色は酸素バリア性のある包材を用いて真空包装することによって防止できることを著者らはすでに報告している²³⁾。一方、ささ漬け独特の食感については、著者らは魚肉のレオロジー的な変化を直接評価していないが、酢漬け後の冷蔵中に魚肉の保水性が低下してドリップ量が増加することを認めている²⁴⁾。このことは実際に小鯛ささ漬けを詰めた木樽にもかなりの量のドリップが浸透していることと対応しており、製品の食感と食味が劣化させる要因となっている。²⁾ そこで本研究では、酢漬け魚肉のドリップ生成に対する塩漬の抑制効果を、酢漬け魚肉の氷蔵中に起こる歩留まりの変化から検討した。その結果、歩留まりの低下（ドリップの生成）は未塩漬魚肉で最も大きく起こること、また酢漬け前の塩漬は歩留まりの低下を抑制し、その抑制効果は撒布したNaCl量と塩漬時間に依存して増大することを示した。ちなみに塩漬によるドリップ生成抑制効果は、5%以上のNaClを撒布して、24時間塩漬したときに最大となった。これらのことから、塩漬中に起こる魚肉中のタンパク質とNaClとの反応が酢漬け魚肉のドリップ生成抑制に密接に関係していることが考えられた。そこで、塩漬に伴う魚肉中のタンパク質の性状変化を検討した。

まず塩漬魚肉中のタンパク質をSDS混液に溶解し、主成分であるMfのタンパク質サブユニット組成をSDS-PAGEによって検討した。その結果、塩漬の有無にかかわらず、SDS-PAGE上の主要なタンパク質のサブユニット組成にはほとんど差異は認められなかった。魚肉塩乾品の製造工程におけるタンパク質の変化を検討した伊藤ら¹⁴⁾と丹保ら¹⁵⁾の報告によれば、低温下における塩漬中と引き続く乾燥工程中にスケトウダラとマアジ魚肉ではミオシンの多量化反応が進行し、塩乾品の品質に影響を及ぼすことを推察している。しかし、キダイ魚肉の塩漬中にはミオシンの多量化反応はほとんど進行しなかったことから、塩漬による酢漬け魚肉のドリップ抑制にかかわるMfの性状変化はミオシン分子間の強固

な結合を介した多量化反応を伴わないものである。なお、塩漬魚肉から5%TCA溶液中に遊離する酸可溶性タンパク質量は、魚肉中の全タンパク質の1%前後で、塩漬の有無にかかわらず一定値を示していたことから、キダイ魚肉では塩漬中にタンパク質の分解がほとんど起こらないことが示唆された（図示しない）。

次に未塩漬および塩漬魚肉から調製したMfの収量とその性状を調べた。「材料と方法」で述べたように本研究で用いたMfの調製法は、低イオン強度の中性緩衝液による魚肉の洗浄を繰り返した後にホモジナイズした点と、ホモジナイズしたMf懸濁液のガーゼによるろ過を省略した点が常法と異なっている。このように本研究でMfの調製法を改変した理由は、魚肉中の水溶性成分や魚肉に撒布したNaClが共存している状態でホモジナイズすることによってMfに起こるアーティファクトとガーゼろ過によるMfの定量的回収の阻害を回避するためである。以上のようにMfを調製することにより、塩漬の有無にかかわらずMfの回収量は150–160 mg/gではほぼ一定の値を示した。キダイ魚肉をSDS混液に溶解して測定したタンパク質量は約200 mg/gであり、また硬骨魚類の普通肉中の筋肉タンパク質の20–30%が筋形質タンパク質とされていることから²⁵⁾、本研究で用いたMf標品中には筋基質タンパク質もほとんど除かれることなく含まれていると考えられる。しかし、いずれにしてもFig. 4の結果から、魚肉中のほとんどのMfが定量的に回収されていると判断される。なお、塩漬の有無にかかわらず調製したMfのSDS-PAGE上でのMHCとアクチンの比率も魚肉中のそれと類似した一定値を示し、また調製したMfの加熱に伴うCa-ATPase活性の低下も単純な一次式反応式に従って進行した。これらのことから、塩漬魚肉からMfを調製する際に懸念された洗浄操作によるアクチンの溶出もほとんど起こっていないと判断された。以上の結果は、調製したMfの性状変化は、魚肉中のMfの全体像を反映することを示している。

そこで、塩漬に伴う魚肉中のMfのCa-ATPase活性の変化について検討した。その結果、Ca-ATPase活性はNaClの撒布量が6.0%で24時間塩漬した場合に僅かに低下したが、それ以外の条件ではほとんど変化しなかった。なお、未塩漬魚肉と5.0%のNaClを撒布して24時間塩漬した魚肉から調製したMfのCa-ATPase活性を、生成物のPi濃度の増加と高速液体クロマトグラフィーを用いて直接測定したATP濃度の減少の両方から検討したが、比活性にはほとんど差異がなかった（図示しない）。すなわち、本研究で採用したMfの調製法では、細切魚肉を洗浄した後にホモジナイズしているため、洗浄が不十分でミオキナーゼやAMPデアミナーゼが残存してCa-ATPase活性に影響を及ぼすことも考え

られたが, その可能性は事実上ないことが確かめられた。以上のことから, キダイ魚肉の保水性の増加を引き起こす塩漬による Mf の性状変化はミオシン頭部の変性を伴わないことが示唆された。

続いて, 塩漬魚肉中の Mf の NaCl 溶解性を検討した。新井²⁶⁾は NaCl 溶解性を Mf の性状変化の指標とする場合は, 一連の実験における測定条件を統一する必要があると述べている。そこで本研究では, Mf のタンパク質濃度を 2.0–3.0 mg/mL とし, 抽出温度は熱変性を最小限に抑制するために 0°C とした。また溶解時間については予備的な実験から溶解性がほぼ最大値となるのに十分な時間として 20–24 時間を設定した。さらに Mf の NaCl 溶解性は NaCl 濃度の上昇に伴って一方的に増加して一定値に達することから 0.1–2.0 M に至る種々の NaCl 濃度で溶解性を評価した。なお, 従来から行われている魚肉からのアクトミオシンの抽出量の測定では, 0.5 あるいは 0.6 M NaCl でアクトミオシンを抽出し, その抽出物を冷水で希釈して沈殿に集め (希釈沈殿), 0.5 M NaCl に再溶解して遠心分離した上清画分中のタンパク質量を測定する方法が用いられている。^{27,28)} 本研究で採用した方法は希釈沈殿を省略しているので溶解したタンパク質画分にはアクトミオシン以外のタンパク質成分も含まれている。そのため, 本研究では溶解したタンパク質成分を SDS-PAGE に供しゲル上の MHC とアクチンに相当するバンドの染色強度からミオシンとアクチンの溶解性を同時に検討した。その結果, 未塩漬魚肉から調製した Mf の NaCl 溶解性は 0.3 M NaCl で大きく増加し, それ以上の NaCl 濃度では Mf の約 80% が溶解した。一方, 塩漬魚肉の NaCl 溶解性は未塩漬魚肉のそれより明らかに低かった。Mf の NaCl 溶解性は NaCl 撒布量が増加するほど, あるいは塩漬時間が長いほど低下する傾向を示した。特に 0.3 M NaCl における Mf の溶解性が NaCl 撒布量と塩漬時間に依存して大きく低下したことは, 塩漬による酢漬け魚肉のドリップ抑制効果と良く対応していた。舊谷¹⁶⁾はマアジの塩漬魚肉から ATP-Mg 共存下でイオン強度 0.5 のリン酸緩衝液中に抽出されるタンパク質の割合が塩漬時間の経過に伴って低下することから, このような抽出性の低下は死後のマアジ筋肉の酸性 pH と NaCl とが協同的に作用して引き起こされたことを推察している。しかしながら, 死後のキダイ筋肉の pH は 6.8 前後で一定しているので, キダイの塩漬魚肉の場合は NaCl の作用のみで Mf の NaCl 溶解性の低下が引き起こされたと考えられる。そしてこのような Mf の NaCl 溶解性の低下は, Mf の主要構成タンパク質であるミオシンとアクチンの不溶化によるものであり, それら両タンパク質は一定の比率を保って不溶化する点が特徴であった。

以上の結果をまとめると, 小鯛ささ漬けの製造におけ

る塩漬は, 酢漬けした製品の冷蔵中に起こるドリップの滲出を抑制して, その食感の維持に寄与していることが示唆された。そして, このようなドリップ抑制効果はミオシンとアクチンの NaCl 溶解性の低下を伴う Mf の保水性の増大を通じて発揮されていることも明らかとなった。

従来魚肉から単離した Mf やアクトミオシンへの高濃度の NaCl の作用機序は, 主にアクチンの塩変性による脱重合変性とそれに伴うミオシン頭部の不安定化を引き起こすことであるが, 一部のアクトミオシンはアクチンとミオシンに解離せずに Ca-ATPase 活性を保持したまま未変性のアクトミオシンとは異なる構造に変化すると説明されてきた。^{11–13)} しかし, 本研究で示したようにキダイ魚肉に直接 NaCl を作用させた場合にはアクチンの脱重合変性はほとんど認められず, むしろ Mf 中のミオシンとアクチンの不溶化を伴った Mf の構造変化が主体となって起こることが示唆された。このことは, 筋肉構造を保持した魚肉中の Mf に対する NaCl の作用機序は, 魚肉から単離した Mf への NaCl の作用がそのまま当てはまるものではないことを示しており, 故にその詳細についてはさらなる検討が必要である。さらに, 船津と新井²⁹⁾はコイ魚肉から単離した Mf の酸変性に対するイオン強度の影響について研究し, コイ Mf 中のミオシンとアクチンの酸変性はイオン強度の増加に伴って促進されると報告している。この結果に従えば, 本実験条件で酢漬けしたキダイ魚肉の pH は塩漬条件にかかわらず 5.0 前後まで低下するので, キダイ魚肉中の Mf は酸変性し, しかも塩漬はその Mf 変性をさらに促進すると推察される。一方, キダイ酢漬け魚肉のドリップの生成は塩漬によって抑制されるので, 塩漬中に引き起こる Mf の構造変化と酢漬け魚肉中の Mf の変性についてはそれぞれ分けて検討し, 酢漬け製品の製造における塩漬と酢漬けの意義についてさらに理解を深めることが必要であると考えられる。

文 献

- 1) 福田 裕, 山澤正勝, 岡崎恵美子 (監修). 全国水産加工品総覧. 光琳, 東京. 2005; 395–400.
- 2) 山本 徹. 若狭小鯛—その歴史と笹漬の科学—. 朝日カルチャーセンター, 大阪. 1998; 103–124.
- 3) 右田正男, 大竹茂夫. 致死条件が肉蛋白におよぼす影響—I. 日本水産学会誌 1960; **26**: 140–148.
- 4) 鈴木たね子, 右田正男. 魚の死後経過にともなうミオシン区蛋白の変性—I. 日本水産学会誌 1962; **28**: 61–72.
- 5) 鈴木たね子, 神名孝一. 魚の死後経過にともなうミオシン区蛋白の変性—III. 日本水産学会誌 1963; **29**: 879–886.
- 6) 鈴木たね子, 神名孝一. 魚の死後経過にともなうミオシン区蛋白の変性—IV. 日本水産学会誌 1966; **32**: 590–599.
- 7) 若目田篤. 塩による変性. 「水産加工とタンパク質の変性

- 制御」(新井健一編) 恒星社厚生閣, 東京. 1991; 17-24.
- 8) 若目田篤, 野澤誠子, 新井健一. 魚類筋原繊維 Ca-ATPase の加熱変性に及ぼす中性塩の影響. 日本水産学会誌 1983; **49**: 237-243.
- 9) 若目田篤, 尾崎弘忠, 野中道夫, 新井健一. 高濃度の食塩存在下で起こるグチとコイのミオシン B の変性. 日本水産学会誌 1986; **52**: 293-300.
- 10) 若目田篤, 新井健一. 魚類ミオシン B の粘性に及ぼす中性塩の影響. 日本水産学会誌 1983; **49**: 643-650.
- 11) 若目田篤, 新井健一. 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. 日本水産学会誌 1984; **50**: 635-643.
- 12) 若目田篤, 新井健一. 魚類ミオシン B より中性塩の存在下で解離するアクチンの定量. 日本水産学会誌 1985; **51**: 497-502.
- 13) 若目田篤, 新井健一. 高濃度の塩存在下で起こるコイミオシン B のアクチンとミオシンへの解離. 日本水産学会誌 1986; **52**: 293-300.
- 14) 伊藤 剛, 北田長義, 山田典彦, 関 伸夫, 新井健一. スケトウダラ筋肉の塩漬中に起こる筋原繊維タンパク質の生化学的变化. 日本水産学会誌 1990; **56**: 687-693.
- 15) 丹保岳人, 山田典彦, 北田長義. 塩漬によって起こる魚肉中の筋原繊維タンパク質の変化. 日本水産学会誌 1992; **58**: 677-683.
- 16) 舊谷亜由美. 浸漬魚肉の内部で起こる添加物の拡散にともなう組織構造と構成成分の変化. 博士論文, 福井県立大学, 福井. 2009
- 17) 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一. 魚類筋原繊維 ATPase の生化学的研究. 日本水産学会誌 1977; **43**: 857-867.
- 18) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; **177**: 751-766.
- 19) Leammli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; **227**: 680-685.
- 20) Gomori G. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 1942; **27**: 955-960.
- 21) Ooizumi T, Kawase M, Akahane Y. Permeation of sodium chloride into fish meat and its effect on moisture content as a function of the osmotic pressure of the soaking solution. *Fish. Sci.* 2003; **69**: 830-835.
- 22) 今野久仁彦, 上田陽一. 加熱に伴うコイ筋原繊維 Mg-ATPase 活性の上昇. 日本水産学会誌 1989; **55**: 1457-1462.
- 23) 松川雅仁, 加納竜一, 大泉 徹. 包装材の酸素バリア性の違いが小鯛のささ漬けの冷蔵貯蔵性に及ぼす影響. 水産物の利用に関する共同研究 2012; **52**: 25-28.
- 24) 松川雅仁, 奈須亮耶, 大泉 徹. 塩漬した凍結原料から調製した小鯛のささ漬けの品質. 水産物の利用に関する共同研究 2013; **53**: 31-34.
- 25) 志水 寛, 柄田 哲, 西岡不二男. 低イオン強度領域における魚類筋肉からのタンパク質溶出パターン. 日本水産学会誌 1976; **42**: 1025-1031.
- 26) 新井健一. 変性の指標と測定法. 「魚肉タンパク質」(鈴木たね子, 橋本周久, 志水 寛編) 恒星社厚生閣, 東京. 1977; 75-90.
- 27) Noguchi S, Matsumoto J. Studies on the Control of the Denaturation of the Fish Muscle Proteins during the Frozen Storage-I. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1970; **36**: 1078-1087.
- 28) 川島孝省, 新井健一, 斎藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究—Ⅱ—. 日本水産学会誌 1973; **39**: 207-214.
- 29) 船津保浩, 新井健一. 酸処理によって起こるコイ筋原繊維タンパク質の変性. 日本水産学会誌 1990; **56**: 2061-2067.