魚類の肉質変化に関する生化学的研究—VI*

コイ筋肉の凍結による myosin 区 ATPase 活性と 関連成分の変化について

齊藤 要・日高 富男

(鹿児島大学水産学部)

Studies on the Biochemical Change in the Fish Muscle—VI.

On the Changes in Amount of Myosin Fraction-N, ATP, Free SH Group and
ATPase Activity of Carp Muscle by Treatment of Freezing and Thawing

Kaname SAITŌ and Tomio HIDAKA

In this paper the authors dealt with the changes of carp muscle derived by the treatment of air freezing (-20°C) and thawing (25°C) in the following elements, the amount of myosin fraction-N, ATP, free SH group and ATPase activity.

1) Through the process of freezing the apparent amount of myosin A fraction-N, obtained from carp muscle, seemed to increase by a little extent. The ATPase activity of myosin fraction showed hardly any change during the storage of the muscle within 24 hours at -20°C . The amount of SH group in the muscle showed comparatively rapid increase at the beginning of the freezing, while ATP showed not a little decreasing tendency. But any considerable change in the above mentioned substances was unperceived during about 3 hours after the freezing.

2) At the first stage of thawing, the apparent amount of myosin A fraction-N in the muscle showed an increase, but a comparatively rapid reduction appeared at about 3 hours after the treatment. The separation of myosin fraction became almost impossible after 20~25 hours of thawing.

The Qp value per 1 mg of myosin A fraction-N, obtained from the muscle at the beginning of thawing, showed a reducing tendency. In this stage, the amount of ATP and SH group in the muscle decreased at a rapid speed, but at the putrefaction term the amount of the latter increased again.

3) In the case of thawing by direct immersion to the trichloroacetic acid, the amount of ATP in the muscle was larger than in the case of direct air contact thawing. (See Table 1)

The amount of free inorg.-P in the mixed solution of ATP and purified myosin fraction showed not a little increase by being treated through the process of freezing, but the same solution, being stored at 0°C during the same stage, showed no considerable increase of inorg.-P.

前報²⁾ではコイ筋肉の鮮度による ATPase 活性度の変化について検討したが、本報では引き続き凍結解凍処理による精製 myosin 区窒素量及び ATPase 活性の変化と、基質である筋肉中の ATP 量並に ATPase 作用の活性基と考えられる遊離 SH 基の消長等について検討し若干の知見を得たので報告する。

実験材料及び実験方法は前報²⁾と略々同様である。

実験結果及び考察

1. 凍結処理による変化 直殺したコイ肉の一定量を約 -20°C で空気凍結を行い、各所定時間毎に直ちに解凍(解凍所要時間は筋肉 10 g 量で5分以内)して myosin A 区の2回沈澱区分の窒素量及び ATPase

1955 年 6 月 14 日受理

* 1955 年 4 月日本水産学会年次大会発表

Fig. 1. Changes in amount of myosin A fraction-N, ATP, free SH group and ATPase activity of carp muscle by treatment of freezing.

* N mg. of twice pptd. fraction per 100 cc. of KCl extract obtained by extracting 10 g. muscle for some 15 to 20 min.

** Qp per 100 cc. of the KCl soln. as above mentioned.

*** Chromaticity of SH group (Ferricyanide method) denoted by $-\log T$ per 5 cc. of the KCl solution as above mentioned.

**** $-\log T$ per 5 cc. of the 10 times dilution of the extract obtained from muscle (HITACHI electric photometer, Model EPO-A, Filter 460 m μ , Thickness of solution layer in cell; 10 mm.)

いは 0°C 附近に放置した場合よりも ATP の分解が促進される傾向が認められた。既にⅢ報で述べた如く in vitro の観察では myosin 区の ATPase 活性の最適温度は作用時間 5 分間では 30~35°C であり、0°C でもその 15% 前後の作用力を示す。従つて筋肉の凍結初期にみられる ATP の分解も ATPase 作用によるものとすれば、筋肉の凍結点に達する迄の間にその作用が進行する可能性もある。その際凍結の進行に伴い体液の塩類濃度及び pH が変化し、更に体液に共存する ATP と myosin の濃度が高くなつて、酵素基質結合体を形成する機会が多くなり活性が促進されることも考えられるがこれ等の点については尙検討中である。

次に SH 基量は筋肉を室温に放置した場合には一般に死直後の ATP 分解期には減少し、腐敗期に入り増加する傾向であつたが、凍結処理をした筋肉ではその初期において一般に増加する傾向が認められ、凍結完了後は一昼夜程度の放置では殆んど増減を示さない様である。凍結試料では SH 基量の変化がしばしば不同となる事を経験したが、これは後述の如く解凍操作中にそれが減少する傾向にあるためと思われる。従つて解凍所用時間を可及的短縮する必要を感じ本実験では何れもその時間を 5 分以内に限定した。一方定量法自体にも検討の必要を感じている。次に所定時間凍結した筋肉より抽出した myosin A 区の単位量当りの SH 基量は凍結前後において殆んど変化が認められなかつた。

2. 解凍放置による変化 直殺したコイ肉の一定量を約 -20°C で空気凍結を行い、22 時間後之を 25°C で解凍放置した場合の各所定時間における myosin A 区窒素量及び ATPase 活性度、並に筋肉中の ATP, SH 基量の変化を求めた結果は Fig. 2 の如くである。

活性度並に筋肉中の ATP 及び SH 基の変化を求めた結果は Fig. 1 の如くである。

myosin A 区窒素量及び ATPase 活性度：窒素量は前報²⁾ 同様の 出法で得た KCl 調製液 100cc 当りの窒素量を求め凍結時間による相対的な変化を比較した。

即ち見掛上の窒素量は死直後凍結してから 24 時間頃迄は、極めて緩慢であるが当初に於て幾分増加する傾向が見られた。この現象は凍結に伴う筋肉の組織学的な状態変化、例えば氷晶生成による筋鞘相互間の分離或は筋肉細胞の損傷等によつて特定操作による抽出が容易になる事も一因と考えられる。次に所定時間凍結した筋肉より抽出した各 myosin 区の単位量当りの力価は略々同様であり。従つて抽出される myosin 区に関する限りこの程度の凍結条件ではその酵素活性を失わないことが知られた。一方調製した myosin 区溶液はこの程度の凍結により著しく変性する事⁴⁾⁵⁾ より考えて myosin 区は native な筋肉中では in vitro の場合より安定化されているものと思われる。

ATP 量及び遊離 SH 基量：筋肉中の ATP は凍結初期において急速に減少し、凍結完了(約 3 時間後)迄に過半量が消失し 10 時間後頃からその減少が極めて緩慢となり、筋肉を凍結した場合その当初にお

Fig. 2. Changes in amount of myosin A fraction-N, ATP, free SH group and ATPase activity of carp muscle as the function of time after thawing at 25°C.

た。しかもその消失はI報で述べた苦悶死筋肉を25°Cに放置した場合よりも極めて迅速に起る結果となっている。SH基は解凍と同時に約3時間後迄に急激に減少し、その後次第に緩慢となり腐敗期には再び増加する結果となっている。解凍時にSH基等が激減する現象は冷凍鯉肉の解凍に際して既に天野等³⁾が認めている。

次に延髄刺殺したコイ肉を25°Cに放置した場合は約3時間後に硬直現象が明瞭に見られたが、直殺後-20°Cで凍結し5時間後之を25°Cで解凍した試料には1時間後迄はATPの存在が認められるに拘わらず、肉眼的には解凍硬直の現象は不明瞭であつた。即ち解凍硬直の現象は凍結初期におけるATPの急減、或は組織破壊等により自然硬直よりも硬直度は弱いものと思われるが、この点については尙検討中である。

3. 解凍処理条件によるATP量の相違 凍結初期に見られるATPの分解は凍結進行中に起るものと思

うが更に解凍操作中にも可成り分解する可能性も考えられる。次に解凍中におけるATPの分解を出来るだけ避けるため凍結筋肉を9.3倍量の10%三塩化酢酸液中で解凍したものと、自然解凍したものについてATP量を比較した結果はTable 1の如くである。この場合の解凍所要時間は約15分である。

Table 1. Changes in amount of ATP in the carp muscle by treatment of thawing.

	0	1	2		3	
Time kept frozen (hours)	(Control)	TCA*	TCA	Air**	TCA	Air
ATP (mg %)	38.0	18.7	12.5	6.7	9.5	3.6
Ratio of rest (%)	100.0	49.3	32.9	17.6	25.0	9.5

* Thawing by direct immersion of trichloroacetic acid,

** by direct air contact at 25°C. during about 15 min.

この結果三塩化酢酸液中で解凍した筋肉は自然解凍したものよりATP含量が2倍程度多く、短時間の自然解凍でも可成りのATPが分解する事は明らかである。又筋肉ATP量の凍結時間による変化を三塩化酢酸液中で解凍した試料のATP残存率より考察すれば、筋肉中のATPは凍結初期主として氷晶生成期迄に分解するものと考えられ、又この条件下では解凍時のATPの分解は凍結初期のそれに比し少い事が知られた。

4. ATPase反応液の凍結処理によるATPの分解 以上の各実験は凍結解凍処理による筋肉中のATP

myosin A 区窒素量及びATPase作用:

筋肉の凍結初期においては前述の如く myosin 区の収量が幾分増加する様であるが解凍放置の初期には更に増加し、その後減少し約23時間後には精製区分の沈澱分離が不可能となつた。この初期における myosin 区収量の増加は凍結解凍処理による筋肉の組織学的な状態変化によつて同一操作による抽出が容易になつた事も一因と考えられるが、一方この時期においては抽出区分の単位窒素量当りQpの値が幾分減少する事より活性を有しない窒素化合物の混入が多くなつた可能性も考えられる。又この場合の窒素量の変化は一般に直殺後直ちに同一温度に放置した筋肉の減少傾向に比べて急激であつた。これは凍結肉の肉質変化が解凍後早く進行すると言う事と関連性がある様にも思える。

ATP及びSH基量: 凍結処理により著しく分解されたATPは更に解凍放置により急速に減少し、1時間半前後には完全に消失し

Table 2. Changes in amount of inorg.-P in the mixed solution of ATP and purified myosin A fraction by treatment of freezing (°).

Treatment	Cold storage (0°C.)	(-20°C.) Freezing
Myosin soln.	5.0	6.0
ATP soln.	22.5	21.5
Mixed soln.*	33.5	59.5

* [ATP] : 1×10^{-3} Mol/Lit., [CaCl₂] : 2.2×10^{-3} Mol/Lit., Protein-N : 0.15 mg./cc.

量の変化を追究したものであるが、Ⅲ報²⁾で述べた ATPase の反応条件で myosin A 区 KCl 溶液 (蛋白態窒素 0.15 mg/cc) に ATP (1×10^{-3} Mol/Lit) を添加して凍結 (-20°C, 20 分間直接凍結) した場合の ATP 分解の有無を遊離無機磷量の変化により求めた結果は Table 2 の如くである。酵素或は基質を夫々添加しない反応液を凍結した場合、液中の無機磷量は殆んど変化しないが、両者の混液を凍結した場合には無機磷が明らかに増加し、而もその増加率は混液を 0°C に同時間放置した場合よりも大きい、尙この関係は筋肉の場合にも認められた。又本報では省略したが myosin 区以外の抽出区分、卵白及び Casein と ATP との混液を凍結しても分解作用は殆んど認められなかつた事より考え筋肉或は反応液の凍結による ATP の分解は ATPase 作用によるものと思う。この場合凍結操作は液相が固相に変る過程において反応系に一種の刺激作用を与え、これにより活性化が誘発されるものと考えられる。尙電氣的刺激を与えた場合の影響については目下検討中である。

以上述べた筋肉の凍結解凍処理による ATP 及び SH 基の消長は勿論その処理条件により可成り異なるとは思われるが、現在冷凍法は魚肉の鮮度保持の手段として最も普遍的な方法であつて、その究極の目的は魚肉を生活時に近い状態で保つことであるとすれば生活エネルギーの根源である ATP の破壊を極力避ける凍結法の確立が望ましい事となる。

要 約

コイ肉の凍結 (-20°C 空気凍結) 解凍 (25°C) 処理による精製 myosin A 区窒素量及び ATPase 活性の変化と筋肉中の ATP 及び遊離 SH 基の消長について検討した。

- 1) 凍結処理により筋肉の見掛上の myosin A 区窒素量は幾分増加する傾向が認められ、その ATPase 活性は 1 昼夜程度の放置では殆んど変化がないものと考えられる。凍結初期においては筋肉中の ATP は急激に減少し、SH 基量は増加の傾向を示したが、両者共に凍結完了後 24 時間頃迄は殆んど変化しなかつた。
- 2) 解凍放置の初期には見掛上の myosin A 区窒素量は増加するが其後比較的速かに減少し遂にはその沈澱分離が困難となつた。解凍初期には myosin A 区窒素量 mg 当りの ATPase 活性 (Qp) 値は幾分減少する傾向が認められた。又解凍初期に筋肉中の ATP 及び SH 基量は急激に減少し、後者は腐敗期には再び増加する傾向を示した。本実験では一般に解凍硬直の現象を肉眼的に判定する事は困難であつた。
- 3) 凍結筋肉を三塩化酢酸液中で解凍した場合は同一解凍所要時間で、自然解凍したものより ATP 含量が多く、又本実験では解凍時の ATP の分解は凍結初期のそれに比し少い傾向が得られた。
- 4) ATPase の反応条件に基づき、myosin A 区と ATP との混液を凍結すれば ATP 分解による遊離無機磷の増加が明らかに認められ、而もその場合は 0°C に同時間放置した混液より分解率は大きい。又他の蛋白質と ATP の混液或は myosin 区液及び ATP 液を各々単独で凍結した場合には殆んど無機磷の増加が認められない事より、筋肉或は反応液の凍結による ATP の分解は ATPase 作用によるものであり、而も凍結が一種の刺激となり ATPase 作用が活性化されるものと考察した。

本研究に際し御指導を賜つた本学高田幸二教授並に実験結果について御討議を頂いた東海区水研右田正男博士、松本重一郎氏、岡田稔氏に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 斎藤 要・日高富男：本研究第Ⅰ報 鹿大水産学部紀要 4. 88 (1955)
- 2) 斎藤 要・日高富男：日水誌 21, 1025 (1956)
- 3) 天野慶之・富谷章子・木下良雄・樽見みづ子：日本水産学会臨時大会 (1952.9) 発表。
- 4) J.M. SNOW : *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 7, 599 (1950)
- 5) 斎藤要・日高富男：日本水産学会臨時大会 (於長崎) 発表 (1955)