スケトウダラおよびティラピアの肉糊の坐り中に起る 筋原繊維タンパク質の変化

加藤 登, 橋本昭彦, 野崎 恒, 丸山 勉, 新井健一

(1985 年 10 月 2 日受理)

Change in Myofibrillar Protein of the Salted Meat Paste from Alaska Pollack and Tilapia during the Setting

Noboru Katoh,^{*1} Akihiko Hashimoto,^{*2} Hisashi Nozaki,^{*1}
Tsutomu Maruyama,^{*1} and Ken-ichi Arai^{*2}

Salted meat pastes from Alaska pollack and tilapia were cooked in a water-bath at 35°C to induce the setting. During the setting, the jelly strength of the paste and several properties of myofibrils prepared from the paste were investigated with a lapse of cooking time.

The gelation of Alaska pollack meat paste proceeded more rapidly than that of tilapia meat paste; the maximal jelly strength was obtained at about 2 h-setting for Alaska pollack and at 10 h-setting for tilapia, respectively. Solubility of myofibrils in 0.5 M KCl, viscosity of the soluble protein, and myofibrillar ATPase activity were all decreased as the jelly strength of the source paste was increased; when the jelly strength was reduced to about 40% of the maximum, a bulk (80-90%) of the original biochemical properties was lost for both fish species.

Microscopic observation of the myofibrils revealed that the meat paste was coagulated with the size growing larger as the setting proceeded. In addition, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that myosin heavy chain in the meat paste gradually disappeared as the setting time prolonged.

These results indicated that heat-induced gelation of the salted meat paste was caused by the denaturation of myofibrillar protein in it. It was further suggested that the above changes occurred more rapidly for cold-water fishes than tropical-water fishes.

魚肉を塩ずりして得られる肉糊を放置すると、ゲル化、いわゆる坐り現象を起すが、この機構についての研究が近年さかんであり、¹⁻³⁾坐りゲルの網目構造の形成にはミオシン重鎖の重合反応が関与している可能性が示唆されている。²⁾

著者らは先に、同じ様な観点から、温度感受性の異なるミオシンを保持している三魚種、^{4,5)}すなわち、寒帯性のスケトウダラ、温帯性のシログチ、および、熱帯性のティラピアの肉糊の坐り反応速度を比較した。¹⁾その結果、肉糊のゲル化は、スケトウダラ、シログチ、ティラピアの順に速く進行することが明らかになった。

そこで本研究は、スケトウダラとティラピアの肉糊の坐り中に起る、筋原繊維 (Mf) タンパク質の性質の変化を比較検討することを目的とした。また、本研究から得られる結果は、実際に肉糊の坐り工程の管理を行う上で有用な指標を提供することを期待した。

実験方法

試料 スケトウダラ *Theragra chalcogramma* の冷凍すり身は市販の SA 級のものを購入し、-30°C に貯蔵して使用した。試料すり身は、水分: 75~77%, pH: 7.1~7.2, 粗脂肪 0.5% 以下, 粗タンパク質: 14~16%, のそれぞれの範囲にあった。また、添加物は、ソルビール 4%, 砂糖 4%, リン酸塩 0.2%, と表示されていた。ティラピア *Tilapia mossambica* の冷凍すり身は、即殺した新鮮魚の普通筋より一般的な方法に従って調製した。すなわち、落し身を 5 倍量の水で 3 回晒し、加圧脱水、裏ごし、添加物の混合を行った後、1 kg ずつ急速凍結し -30°C で貯蔵した。水分, pH, 添加物の配合は、スケトウダラのすり身試料と同じになるよう調製した。ティラピアすり身の粗脂肪は 1% 以下, 粗タンパク質は 16% であった。

^{*1} 株式会社 紀文 (KIBUN Co., Ltd., 7-14-13, Ginza, Chuo, Tokyo 104, Japan).

^{*2} 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

肉糊の坐りとゼリー強度の測定 冷凍すり身を細かいブロック状 (約 50 g) に切断し, 冷蔵庫中で中心温度が -4°C となるまで解凍後, Hobart 社製小型フードカッターで品温が -1°C となるまで空すりした。続いて, 3% の食塩を添加して, 約 6~11 分塩すりを行い, 品温が $7\sim 10^{\circ}\text{C}$ の粘り肉糊を得た。^{*} この肉糊を, 折径 48 mm のケーシングに詰め, 35°C の恒温槽中に保持して坐らせた。そのゼリー強度の測定は, レオロメーター (飯尾電機社製 RMT-1300) で, V 型プランジャー (1×12 mm 幅の刃, 角度は 16°) を用いて行い, 試料を厚さ 13 mm の輪切りとし, 表面よりプランジャーを 11 mm まで進入させた時に起る最初の破断に必要な荷重をゼリー強度とした。⁹⁾

肉糊からの筋原繊維懸濁液の調製 坐り中の肉糊の約 50 g を取り出して充分冷却後, 小型粉砕器 (三洋電機 (株)・SM-G 90 型) で 20 秒間粉砕し, 均質化した。この肉糊の 10 g を精秤し, 50 ml の 40 mm ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) を加え, 充分冷却しながら 1 分間ずつ三回ホモジナイズし遠心分離した。集めた沈殿を 0.1 M KCl, 40 mm ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) で数回, 遠心分離により洗滌した。なお, 以上の操作は全て定量的に行い,¹⁰⁾ 特に, 洗滌により Mf の流失が起らないよう注意した。沈殿として得た Mf は最終的に同上洗滌液 100 ml に対して均質に懸濁させ水中で保管した。なお, 坐りによってゲル化した肉糊中の Mf は, 上記の操作では均質化しにくい傾向を示した。本文中ではこれをゲル化した魚肉の懸濁液と表現した。これら懸濁液のタンパク質量はビュレット法により比色定量し,⁹⁾ 全タンパク質量 (mg/10 g 肉糊) として表わした。

ATPase 活性の測定 Mf の ATPase 活性 (EC 3.6.1.3) は, Ca-ATPase 活性を 5 mm CaCl_2 , 50 mm KCl, 25 mm Tris-maleate (pH 7.0), および 1 mm ATP の混液中で, Mg-ATPase 活性を 1 mm MgCl_2 , 0.25 mm CaCl_2 , 50 mm KCl, 25 mm Trismaleate (pH 7.0), および 1 mm ATP の混液中で, それぞれ 25°C で反応させ, 生成する無機リン酸を比色定量した。⁹⁾ Mf タンパク質の終濃度は, $0.1\sim 0.5\text{ mg/ml}$ の範囲で行った。

溶解性の測定 タンパク質濃度 $8\sim 10\text{ mg/ml}$ の Mf 懸濁液 (0.1 M KCl, 40 mm ホウ酸緩衝液 pH 7.0) 25 ml に対し, 1 M NaCl, 40 mm ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) を 25 ml 加え, 氷中で 1 時間よく攪拌しながら塩溶性タンパク質の抽出を行った。続いて, $3500\times g$ で 15 分間遠心分離を行い, 上澄と沈殿に分け, 上澄のタンパク質量を全タンパク質量で割って溶解性 (%) を算出した。なお, 遠心後タンパク質溶液は三層に分離する場合があっ

たが, 上層と中層の両画分をあわせて可溶性タンパク質とした。また, ゲル化した魚肉より得られた懸濁液の溶解性についても, 同一の方法で測定した。

粘度の測定 先に調製した Mf, または, ゲル化した魚肉懸濁液 60 ml を, 一度, 遠心分離を行って沈殿を集め, 次に, タンパク質終濃度が $20\pm 2\text{ mg/ml}$ となるよう, 0.1 M KCl, 40 mm ホウ酸緩衝液を再び加え, 均質な懸濁液とした (全量はほぼ 30 ml となる)。続いて, その懸濁液の終濃度が 0.5 M NaCl となるように結晶の食塩を加え, よく攪拌しながら氷水で 1 時間放置後, 回転粘度計 (東京計器社製, BL 型粘度計) を用い, ざり速度 $D (\text{s}^{-1})$ が $0.1\sim 1.0$ の範囲で $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ でみかけの粘度 η_{app} (CP) を測定した。¹⁰⁾ 肉糊ゾルの両パラメーターの間には, $\log \eta_{app} = (n-1) \cdot \log D + \log \mu$ の関係が成立したので, 各試料について, ニュートン指数 (n) およびニュートン係数 (μ) を算出したが, 本研究では指標として μ (CP) を用いた ($D=1$ のときの η_{app} に等しい)。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 先に調製した Mf または, ゲル化した魚肉の懸濁液 ($8\sim 10\text{ mg/ml}$) に対して, 10 倍量の SDS-尿素溶液 (終濃度が 1% SDS, 8 M 尿素, 1% 2-メルカプトエタノール, 10 mm リン酸緩衝液, pH 7.2 になるような混液) を加え,¹¹⁾ 室温で一晩放置後, $10,000\times g$ で 20 分間遠心分離して, 90% 以上のタンパク質を可溶化させた。続いて, 0.1% SDS-5 mm リン酸緩衝液に透析後, 一定量を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (10% ゲル使用)¹²⁾ に供し, Coomassie Brilliant Blue R-250 により染色して Mf タンパク質の組成を調べた。

顕微鏡による観察 先に調製した Mf, または, ゲル化した魚肉の懸濁液について, 位相差顕微鏡 (ニコン SR 型) により倍率 $10\sim 20$ 倍で形態観察を行った。

結果および考察

肉糊の坐り中に起るタンパク質の性質の変化 スケトウダラおよびティラピアの肉糊を 35°C で坐らせ, その間におこるゲル形成能, Mf タンパク質の溶解性, 粘度, および ATPase 活性の変化を測定し, 結果を Fig. 1 に示した。坐りの進行速度は既に報じたように,¹⁾ スケトウダラでは速く, 一方, ティラピアでは遅いことが示された。また, Mf タンパク質の溶解性, 粘度, および ATPase 活性の変化は, いずれの魚種についても, やはりゲル形成能の変化とよく対応しており, ゼリー強度が最大値の約 40% に達すると, それらはいずれも, もとの値の約 $10\sim 20\%$ 程度にまで減少することを示した。この事実は肉糊の坐りが, Mf タンパク質の変性と

* 橋本昭彦, 加藤 登, 野崎 恒: 昭和 59 年度, 日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 239.

Fig. 1. Changes in several properties of myofibrils prepared from the salted meat paste of Alaska pollack and tilapia during the setting.

The surimis from Alaska pollack and tilapia were chopped with 3% salt using a Hobart silent cutter for 8–12 min until a temperature of about 8°C was attained. The comminuted surimi was stuffed into the casing and cooked in a water-bath at 35°C. At appropriate intervals, the jelly strength of salted meat paste was assessed using a rheometer and the myofibrils were prepared from the same paste to investigate protein solubility, its viscosity and ATPase activity. The viscosity was measured after adding crystal NaCl to the myofibrils (20 mg/ml) at a final concentration of 0.5 M, using a rotational viscometer at 60 rpm. (Tokyo Seiki, Type BL). ATPase activity was measured in the following conditions: Ca-ATPase: 50 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM ATP/Mg-ATPase: 50 mM KCl, 0.25 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM ATP. For all measurements, duplicate assays were made and the mean values were used to give the relative values. Observed values for 100% were as follows:

Alaska pollack: Jelly strength (○) is 1280 g, Solubility (△) is 82%, Viscosity (□) is 51000 cp., Ca-ATPase (▽) and Mg-ATPase (◇) activity are 210 and 820 $\mu\text{mol Pi/min} \cdot 10 \text{ g of paste}$.

Tilapia: Jelly strength (●) is 1200 g, Solubility (▲) is 88%, Viscosity (■) is 48000 cp., Ca-ATPase (▼) and Mg-ATPase (◆) activity are 290 and 300 $\mu\text{mol Pi/min} \cdot 10 \text{ g of paste}$.

密接に関係していることを示唆するものであった。

肉糊の坐り中に生ずる凝集物とミオシンの重合 次に、坐りが進行中の肉糊から経時的に調製した Mf, または、ゲル化した魚肉の懸濁液を光学顕微鏡で観察し、Fig. 2 の結果を得た。これによると、いずれの魚種の場合も、坐り前の肉糊は、一見細かな粒子から成り、横紋構造を有する Mf はほとんど観察されなかった。また、スケトウダラの場合は、30 分坐らせた肉糊中にはすでにタンパク質の凝集体と推定される塊状の物質が観察され、1 時間後にはさらに大きくなった。一方、ティラピアでは、坐りの速さが遅く、1 時間坐らせた肉糊でも小さな塊状物が認められるだけで、4 時間後に初めて大きな塊状物が生成されることを示した。なお、図中に示されている塊状物の色調のコントラストが魚種によって異なり、スケトウダラでは暗く、ティラピアでは明るい部分として写っているのは、スケトウダラの肉糊のゲル化生成物がホモジナイズによって粉碎されにくく、厚い試料となるために光を遮っていることと、また、ティラピアの場合は目盛を表示するために、試料に当てる光の通路を変えたことが原因と考えられる。

次に、これらのゲル化した肉糊の懸濁液を尿素-SDS 溶液を加えて可溶化し、Mf タンパク質の組成をゲル電気泳動により検討した (Fig. 3)。その結果によると、スケトウダラの肉糊の場合は、約 30 分間の坐りにより、ミオシン重鎖 (HC) の大部分が消失し、2 時間後にはほぼ完全に消失している事実が示された。一方、同じ様な消失がティラピアの肉糊についても認められたが、HC の消失速度は遅く、3~4 時間後にその大部分が消失し、6 時間以上坐らせたときにはほぼ完全に消失することが示された。この現象は、すでに沼倉らが見出しており、ミオシン重鎖の高分子化が原因とされている。²⁾ 上記した結果は、肉糊の坐りの進行には Mf タンパク質の変性が密接に関与していることを明らかに示しているが、寒帯産のスケトウダラの肉糊ではそれらの変化がすばやく、一方、熱帯産のティラピアの肉糊では変化が遅かった。すなわち、スケトウダラの場合は、35°C、1 時間坐りによって肉糊中の Mf タンパク質の溶解性や粘性、さらに、ATPase 活性が激減するが、これは、肉糊のゲル化の進行に伴って、肉糊の懸濁液中に大きな凝集塊を生ずる現象と良く対応していた。なお、この凝集塊は高濃度の塩溶液を加えてももはや溶解しないものであるが、これを含んでいる肉糊の懸濁液は尿素-SDS 溶液では可溶化されるため、SDS ゲル電気泳動に供すると、Mf タンパク質中のミオシン重鎖は著しく消失しており、その高分子化が起ったことを示唆している。²⁾ しかしながら、ティラピアの場合は、35°C で 1 時間の坐りでは肉糊のゲル化はほとんど起らず、また、Mf タンパク質の溶解

Alaska pollack

Tilapia

Fig. 2. Change in phase-contrast micrographs of myofibrils prepared from the salted meat paste during the setting.

The preparations of salted meat paste and myofibrils from it were conducted as in Fig. 1. Setting time (h) at 35°C was indicated in the figures. Practical length (mm)=the scale in the figure $\times 1/10$.

0 1/6 1/2 1 2 hr

Alaska
pollack

0 1 2 3 4 5 6 hr

tilapia

Fig. 3. Change in SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of myofibrillar proteins from the salted meat paste during the setting.

Myofibrils were prepared from the salted meat paste as described in Fig. 1 and dissolved in 1% SDS, 8 M urea, 1% 2-mercaptoethanol, 10 mM phosphate buffer (pH 7.2). Electrophoresis was performed by 10% acrylamide gel containing 0.1% SDS at 8 mA/tube for about 6 h according to Weber and Osborn.¹²⁾ The setting time was indicated in the bottom of each run.

性、粘性、ATPase 活性などの諸性質も変化せず、さらに、ミオシン重鎖の消失、および肉糊懸濁液中の凝集塊の形成も認められなかった。

したがって、肉糊の坐り現象とは肉糊中に分散したアクトミオシン分子中の、特に、ゲルを形成する主要成分と考えられるミオシン分子^{13,14)}が、不可逆的な相互作用を起してからみ合い、高分子化して、いわゆる網目（ネットワーク）構造を形成する1種の熱変性反応であるように思われる。そしてこの推定は、Mf タンパク質の熱変性が遅く起るような魚種の肉糊では、その坐りの速さも遅く進む事実からも支持される。

文 献

- 1) 加藤 登, 橋本昭彦, 野崎 恒, 新井健一: 日水誌, **50**, 2103-2108 (1984).
- 2) 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: 日水誌, **51**, 1559-1655 (1985).
- 3) T. C. Lanier, T. S. Lin, Y. M. Lin, and D. D. Hamann: *J. Food Sci.*, **47**, 1921-1925 (1982).
- 4) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一: 日水誌, **48**, 671-684 (1982).
- 5) A. Hashimoto and K. Arai: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 853-864 (1984).
- 6) 橋本昭彦, 加藤 登, 野崎 恒, 丸山 勉: 日水誌, **49**, 1429-1436 (1983).

- 7) 橋本昭彦, 加藤 登, 野崎 恒, 新井健一: 日水誌, **51**, 847-853 (1985).
- 8) A. G. Gornall, C. T. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-765 (1949).
- 9) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法, 各論 2 (関根隆光編), 南江堂, 東京, 1962, pp. 13-14.
- 10) 川崎種一: ニューフードインダストリー, **42**, 23, 84-86 (1981).
- 11) 関 伸夫: 日水誌, **42**, 1169-1176 (1976).
- 12) K. Weber and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 13) 安井 勉: 化学と生物, **19**, 336-344 (1981).
- 14) 西岡不二男, 町田 律, 志水 寛: 日水誌, **49**, 1233-1238 (1983).