ホシザメ筋肉の加熱ゲル化反応に及ぼす温度の影響

上西由翁, 御木英昌, 磯端 徹, 西元 諄一

(1990 年 2 月 16 日受付)

Effect of Temperature on Reactions of Heat-induced Gel Formation
in Smooth Dogfish MuscleYoshio Kaminishi,*¹ Hidemasa Miki,*² Tooru Isohata*²
and Jun-ichi Nishimoto*²

Effects of temperature on gel hardness of heat-induced meat paste gel and turbidity of myosin B solution prepared from shark muscle were investigated by applying to kinetics.

Their changes with time apparently proceeded to first-order reaction. The Arrhenius plots of their change rates for gel hardness and turbidity showed two straight lines with different slopes and indicated in the transition at 50 and 51°C, respectively. On the other hand, the gel hardness changed little up to 40°C and then increased to 70°C. The turbidity increased at 40-50°C and then decreased gradually on increasing the temperature. The typical network structure of heat-induced myosin B gel was observed above 50°C by scanning electron micrographs.

The results described above showed that the gel-forming reaction system of meat paste from smooth dogfish muscle during heating could be divided into two characteristic temperature ranges: below and above 50°C. The aggregation reaction takes place below 50°C and the gelation reaction occurs above 50°C.

かまぼこは、独特のテクスチャーを有するため、そのゲル化機構に関して多くの研究がなされてきた。志水¹⁾は、多くの魚種のすり身からかまぼこゲル形成性を調べ、30~40°C および 60°C の 2 つの温度域に起こる坐り、火戻り現象の有無別に加熱ゲル形成性を 4 タイプに大別している。一方、かまぼこのネットワーク構築に關与するミオシン B レベルでの研究では、ホシザメについて御木²⁾は最大ゲル剛性率は 70°C であったと報告している。また、Sano ³⁾は昇温加熱によるコイのミオシン B の動的粘弾性から加熱ゲル化機構を 4 つの特徴的な温度帯、つまり 32°C までの温度では弾性率にほとんど変化がみられず、32~43°C では弾性率の急激な増加と粘性率の著しい低下、43~52°C で弾性率が著しく低下するが 52~80°C で再び弾性率は増加する温度帯にわけている。さらに、Ishioroshi ⁴⁾ Samejima ⁵⁾は、ウサギ筋肉のミオシンおよびミオシン構成成分中の各サブフラグメントで加熱温度別に加熱ゲル剛性率および構造変化を調べ、ミオシンには 2 つのゲル化反応が存在し、43°C でミオシン頭部の凝集反応および、53~55°C 付近でミオシン尾部の架橋結合を述べている。このよう

に、魚肉の肉糊や塩溶性タンパク質の加熱ゲル化に及ぼす加熱の影響を調べるにあたっては、一定の加熱時間を設けて加熱温度を変化させる方法や、昇温加熱による方法などが一般に用いられてきたが、加熱温度と加熱時間を相互に関連づけて述べた例は乏しい。

本実験では、上述のような加熱温度によるゲル化反応をより理解するために、ホシザメを試料としてすり身の加熱ゲル化に及ぼす温度の影響を速度論的観点から検討した。また、加熱温度と加熱ゲルの構造を明らかにするために、走査電子顕微鏡 (SEM) にて各加熱温度における加熱ゲルの微細構造について観察した。さらに、すり身ゲルのネットワークを構成しているといわれるミオシン B の加熱中の挙動とゲル化過程との関連をみる一助として、希薄溶液の加熱に伴う凝集体形成を濁度を指標にゲル化反応とあわせて加熱温度の影響を検討した。

実験方法

加熱ゲルの調製およびゲル強度の測定 加熱ゲル試料は、ホシザメ *Mustelus manazo* (鹿児島県川内市沖で漁獲) 精肉を 10 倍量の氷水にて水晒し後、0.2% ポリリン

*¹ 鹿児島大学大学院連合農学研究科 (The United Graduated School of Agricultural Science, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan).

*² 鹿児島大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan).

酸, 4% ソルビット, 4% サッカロースを添加し, スピードカッター (ナショナル MK・K3 型) にて 2 分間ホモジナイズし得られたすり身を -25°C で凍結後, 必要な量だけを適宜取り出し流水解凍 (1 h) して用いた。加熱ゲルは, 流水解凍したすり身に 3% の NaCl を加え, 3 分間ホモジナイズ後, 得られた肉のり (水分含量 80%) を内法 $12 \times 12 \times 30 \text{ mm}$ (厚さ 1 mm) のアルミ製ホルダーに詰め, 所定の温度で所定の時間加熱後直ちに 10 分間冷却し, ホルダーからゲルを取り出した。

加熱ゲルのゲル強度は, 加熱ゲルを 12 mm 立方のサイズに成形した試料に直径 3 mm の円柱 プランジャーを試料厚さの 8 割 ($12 \text{ mm} \times 0.8 = 9.6 \text{ mm}$) の深さまで押し込んだときの最大応力 (g/cm^2) をレオナー (山電 RE-3305 型) で検出して求めた。

ミオシン B の調製 ミオシン B は, ホンザメ精肉にソルビットを 8% 混合してホモゲナイズし, -25°C に保管したものを必要量だけを適宜流水解凍 (1 h) 後, 高士⁹⁾の方法にしたがい調製した。加熱に用いたミオシン B 溶液は, 終濃度で 0.45 M KCl-リン酸緩衝液 (pH 6.8, イオン強度 0.5) になるように調整し, 遠心分離 ($20,000 \times g$) 後, その上清区分である。ミオシン B 濃度は, ビウレット法により測定し, 所定の濃度に調整した。

濁度の測定 濁度はガラス製試験管 (内径 11 mm) に濃度 0.4 mg/ml のミオシン B 溶液 2 ml を分取し, 所定の時間加熱, 10 分間冷却後, 350 nm における吸光度を測定した。なお, ミオシン B の加熱前後におけるスペ

クトルより 350 nm 付近で濁度の極大変化がみられたので, 濁度の測定波長は 350 nm とした。

SEM による加熱ゲルの微細構造の観察 加熱ゲルはミオシン B (49.8 mg/g) を 5 mm 角のホルダーに注入し, 所定の温度で 10 分間加熱・冷却したものを用いた。加熱ゲルを 鋭利な刃で約 $2 \times 2 \times 5 \text{ mm}$ の大きさにトリミングし, 2.5%-グルタルアルデヒド (20 mm-リン酸緩衝液, pH 7.0) で 30 分間固定し, ピンセットで引き裂き, 約 $1 \sim 1.5 \text{ mm}$ 角になるように成形した後, さらに同液にて 1 次固定後, 1%-四酸化オスミウム (20 mm-リン酸緩衝液, pH 7.0) による二次固定を行った。固定後の試料は, 濃度の異なるエタノール中で順次脱水後, ブチノールで置換し, 凍結乾燥の後イオンスパッタリングで金蒸着してから SEM (日本電子製 ISM-25 型) で引き裂いた面の微細構造の観察を行った。

ゲル化および濁度の変化速度 ゲル化および濁度の変化速度は, 加熱過程の各加熱温度におけるゲル強度および濁度のそれぞれの最大値を G_{max} , T_{max} , 初期値を G_0 , T_0 とし, 反応速度式を適用して反応次数 (n), 変化速度を求めた。 n については, 1, $3/2$, 2, および $5/2$ 次について検討したが, 1 次であることがわかったので, 両者とも見かけ上の 1 次反応式を適用し, ゲル化速度定数 (k_G) および濁度の変化速度定数 (k_T) を次式により求めた。

$$k_G = 1/t \cdot \ln ((G_{max} - G_0)/(G_{max} - G_t))$$

$$k_T = 1/t \cdot \ln ((T_{max} - T_0)/(T_{max} - T_t))$$

Fig. 1. Effect of heating time on gel hardness of heat-induced meat paste. Water content of meat paste was adjusted to 80%.

■: 30°C , ▲: 40°C , ●: 50°C
□: 60°C , △: 70°C , ○: 80°C

Fig. 2. Arrhenius plots of increasing rate of gel hardness obtained by heating meat paste at 30–80°C.

また、各加熱温度に対する K_G , k_T の Arrhenius plot の直線の傾き (S) から、次式にしたがってゲル化と濁度変化について見かけ上の活性化エネルギー (E_a) を求めた。

$$E_a = -2.303 \times R \times S$$

ただし、 R は気体定数 ($1.987 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) である。

結果および考察

ホシザメすり身のゲル化速度に及ぼす温度の影響 各加熱温度における加熱時間に対するゲル強度の対数値の変化を Fig. 1 に示した。ゲル強度は、30, 40°C 加熱では低い値を示したが、50°C 以上になるとしだいに高くなり 60–80°C では最高値となりほぼ平衡に達した。また、加熱時間に対するゲル強度の対数値は、ゲル強度が平衡状態になる直前で一定の傾きをもつ直線を示した。30, 40°C では 90 分間まで加熱したが、それぞれ 60 分、16 分以降に平衡状態に達した。それぞれの傾きは、低温加熱ほど緩やかで高温になるほど大きくなった。さらに、加熱によるゲル化反応の反応次数および変化速度を求めたところ、見かけ上の一次反応にしたがった。各加熱温度におけるゲル化速度定数 (見かけのゲル化速度) は、Table 1 のように加熱温度の上昇に伴い高くなった。

ゲル化速度に及ぼす温度の影響は、Arrhenius plot (Fig. 2) に示すように、50°C 付近を転移温度とする 2 つの直線からなり、加熱 30–50°C の低温側直線が 50–80°C の直線よりも大きい傾きを示した。なお、ホシザメは坐りにくくて戻りにくい魚種¹⁾とされているが、逆の性質を有するスケソウダラ冷凍すり身 (SA 級) における Arrhenius plot においても、図示しないがホシザメと同様にこれらの転移温度は低温側に移り、傾きの異なる 2 つの直線が示された。このように相反する性質の魚肉

Table 1. The apparent increasing rate for gel hardness of heat-induced meat paste

Temperature (°C)	Increasing rat of gel hardness (min ⁻¹)
30	0.050
40	0.104
50	0.256
60	0.436
70	0.594
80	0.897

が同じような 2 つの直線を示すことから、2 つの直線を示す現象は坐りや戻りに関係ないと考えられる。これらの直線の傾きから、それぞれの見かけ上の E_a の値は、30–50°C で $E_{a1} = 15.9 \text{ kcal/mol}$ 、50–80°C で $E_{a2} = 9.24 \text{ kcal/mol}$ であり、 E_a は 50°C 前後で低温側が約 1.7 倍と高い値を示した。

以上のように、異なる 2 つの E_a 値がみられたことは、加熱温度が上昇するとある律速段階から別の段階に変化し、それによって 50°C 付近に転移温度⁷⁾をもつ異なる 2 つの反応系を示したものであろう。 E_a の値から反応速度に及ぼす温度の影響は、50°C 以下では温度の上昇によりゲル化速度が著しく影響をうけるが、50°C 以上では、ゲル化速度に顕著な影響を及ぼさない。

一方、各加熱温度とその最大ゲル強度との関係は Fig. 3 のようで、サメ筋肉から調製した肉糊の加熱ゲル強度の値は、30–40°C で低く、60°C で低下がみられず、70°C で最大値を示した。これは志木のホシザメでの報告¹⁾と同様にいわゆる坐りにくくて戻りにくいゲル化特性であった。前報²⁾でのホシザメミオシン B の 40–90°C 加熱における剛性率も、Fig. 3 のような 70°C に

Fig. 3. Changes in a maximal gel hardness on heart-induced meat paste gel at a given temperature.

ピークをもつ同様の曲線を示すことから、水晒し後の肉糊の加熱ゲルはミオシン B がゲルの主体をなしている

ものと思われる。

加熱温度の異なるゲルの SEM による観察 加熱ゲル化は 50°C を境にして 2 つの異なる反応系が存在していたことより、各加熱温度における微細構造を SEM を用いて観察した。ここでは試料にミオシン B を用いたが、それは水晒し後のすり身の加熱ゲル強度がミオシン B の剛性率と同様の傾向を示したことから、また、基質タンパク質等の夾雑物を除きゲルの主体をなしているといわれるミオシン B の微細構造を観察するためである。

SEM による網状構造 (×7,500) は Fig. 4 に示すように 50°C 以上の温度から認められ、加熱温度が高くなるほど網状構造は発達していた。一方、40°C では剛性率を測定できるようなゲルを形成していたにもかかわらず、網状構造はみられなかった。これは 10,000 倍でも網状構造はみられなかった。ゲル化の定義⁸⁾を“無限網状高分子の生成”とすると 7,500 倍の SEM 写真では 50°C がゲル化点として考えられた。

ミオシン B 溶液の加熱による濁度変化と凝固率との関連 50°C 以上で生成したゲルで従来いわれたように網状構造が確認できたが、40°C 以下は一応ゲル状態

Fig. 4. Scanning electron micrographs of heat-induced myosin B gel at each temperature for 10 min; (×7,500). Protein concentration was 49.8 mg/g.

Fig. 5. Effect of temperature on the turbidity of heat-treated myosin B solution.

Myosin B solution (0.4 mg/ml) in medium containing 0.45 M KCl and 18.8 mM phosphate buffer (pH 6.8) was heated at a given temperature for 10 min and cooled at ice-water for 10 min. The turbidity was determined by measuring at 350 nm in a spectrophotometer.

Fig. 6. Effect of myosin B concentration on coagulative rate by heating myosin B solution at 30–80°C for 10 min. After heat-treatment, myosin B was cooled in ice-water for 10 min, and then centrifuged at $20,000\times g$ for 15 min. The coagulative rate was calculated from the equation, $(C_s/C_o)\times 100$ (%), where C_o and C_s are the protein concentrations before and after centrifuging.

▲: 0.4 mg/ml, △: 1.0 mg/ml

●: 10.0 mg/ml, ○: 20.0 mg/ml

にはなるものの網状構造がみられなかったので、その原因解明の一つとしてタンパク質の凝集性について検討した。タンパク質の凝集性は濁度を指標とした。ミオシンの加熱による濁度の上昇について Katsura⁹⁾ らはミオシン同士の凝集反応に依存していることを明らかにしているが、ミオシン B の加熱による濁度の上昇については Deng¹⁰⁾ らがタンパク質同士の相互反応による光散乱の影響によって吸光度が増加することを述べていることから、濁度の上昇はミオシンと同様に凝集体形成を示唆するものと考えられる。

本実験では、濁度の測定に際し、タンパク質濃度によって沈澱を生ずるなどの濁度測定に支障があったので希薄タンパク質溶液での濃度依存性について調べた。ミオシン B 濃度 0.1-1.0 mg/ml の範囲において、加熱前と後 (50°C) の濁度の変化はそれぞれ直線を示し ($r=0.999$, $n=7$)、このタンパク質濃度範囲においては、加熱後の濁度の測定値に急激な変動はみられなかった。50°C 以外に 45, 60°C でも同様であった。したがって、0.4 mg/ml のような低タンパク質濃度での実験で差し支えないと判断し、このタンパク質濃度において各加熱温度で、10 分間加熱したときの濁度を測定した (Fig. 5)。濁度は、40°C からわずかに変化し始め、45°C から急激な上昇がみられ 51°C でピーク値に達した。さらに 60°C までは、ほぼ平衡状態であったが、70, 80°C ではピーク値の約 1/2 まで減少した。このピーク値 (51°C) は、中山ら¹¹⁾ が hen meat のミオシン B で行った結果 (60°C) よりかなりずれていたが、供試試料の相違によるものである

と思われた。このように、濁度に及ぼす温度の影響は Fig. 3 のゲル強度や前報⁹⁾での剛性率と異なった結果を示し、濁度形成とゲル形成はそれぞれ異なる反応であると思われる。

濁度として測定される凝集体形成は“溶液中に分散していたものが集合して塊をつくる現象”であるから、濁度と凝集体形成性との関係は加熱後のミオシン B の遠心分離によって生じる沈澱の量、いわゆる凝固率と濁度との関連になる。その結果は、Fig. 6 に示すように、ミオシン B 濃度が高い場合、50°C 以上の加熱では、その凝固率はほぼ一定であったが、ミオシン B 濃度の低下にしたがって 50°C 以上における凝固率は減少した。また、タンパク質濃度が低下するにしたがい各加熱温度における最大凝固率は低下した。

いずれにしても、ホシザメにおいては、ミオシン B 溶液 (0.4 mg/ml) における加熱凝固率と濁度が両者とも 50°C 付近にピークを持ちその後低下するという同じ傾向を示すことから、濁度と凝固率とは密接な関係があるものと考えられ、ミオシン B の凝集性に及ぼす加熱温度の影響を速度論的に解析した。

濁度の変化速度に及ぼす温度の影響 濁度を 40-60°C で経時的に測定し、その結果を Fig. 7 に示した。加熱は 40-60°C の間で 8 点の温度で測定したが、図には 4 点 (40, 44, 47, 60°C) のみを表示した。濁度はいずれの温度でも時間とともに上昇したが、上昇の割合や最大値は加熱温度により相違した。

これらの結果から、濁度の変化速度は見かけ上の 1 次

Fig. 7. Effect of heating time on the turbidity of myosin B solution (0.4 mg/ml). The turbidity was measured under the conditions shown in Fig. 5.

○: 40°C, ●: 44°C
△: 47°C, ▲: 60°C

Fig. 8. Effect of heating time on turbidity of myosin B solution (0.4 mg/ml).

The extent of the turbidity change (A) was calculated by using the relationship: $A = (T_{\max} - T_0)/(T_{\max} - T_t)$, where T_0 and T_t are the turbidity values before and after t minutes of heat-treatment. $T_{\max}$ is the maximal turbidity values at a given temperature.

○: 40°C, ●: 44°C

△: 47°C, ▲: 60°C

Fig. 9. Arrhenius plots of increasing rate of the turbidity obtained by heating myosin B solution at 40-60°C.

反応にしたがっており、Fig. 8 に示すように、いずれの加熱温度でも初期反応と後期反応の2つの直線が示され、40°C では初期に遅く後期に速い反応であり、43-60°C の間では初期に速く後期に遅い反応であった。Kimura¹²⁾ らは、カツオとウサギのミオシンの加熱による濁度の変化速度が、初期に速く後期に遅い2つの一次反

応であることを認めているが、本実験では40°C で逆の結果が得られた。この理由は不明である。濁度の変化速度はTable 2 のように加熱温度が上昇するにしたがって高い値を示した。また、各加熱温度の初期反応における濁度の変化速度の Arrhenius plot は Fig. 9 に示したように、ゲル化の場合と同様に2つの直線からなってお

Table 2. The apparent increasing rate for the turbidity of heat-treated myosin B solution.

Temperature (°C)	Increasing rate of turbidity (min ⁻¹)
40	0.017
43	0.036
44	0.045
47	0.073
49	0.100
51	0.137
55	0.149
60	0.163

り、転移温度は 51°C であった。それぞれの直線の傾きから 40-51°C の間で $Ea_1=37.05$ kcal/mol, 51-60°C の間で $Ea_2=4.125$ kcal/mol と見かけ上の Ea が算出され、このようにミオシン B を用いた濁度についてもゲル強度と同様に 50°C 付近に転移温度をもつ 2 つの反応系の存在が考えられた。

濁度の変化がミオシン B 同士の相互作用による凝集性を示した点、Fig. 5 より濁度の上昇が 40°C から 50°C だけでみられたことなどを考えると、2 つの反応系での 50°C 以下では凝集反応が起こっているものと思われた。

以上より、ゲル化反応に及ぼす温度の影響を試料魚にホシザメを用い加熱ゲル強度を指標に速度論的観点から検討した結果、50°C 付近を境にした温度域で見かけ上の活性化エネルギーの異なる 2 つの反応系が存在しているものと考えられた。加熱ゲル化は丹羽が総説¹³⁾で述べているように多様な結合からなっており、単に 1 つの反応だけに依存しない複雑な反応形態をとっているものであろうが、加熱ゲルを形成するまでの多くの反応においては、加熱温度が 50°C までのある律速段階から、50°C 以上の加熱によって別の段階に変化し、そのために 50°C 付近に転移温度をもつ 2 つの反応系を示したものと思われた。さらに、SEM による微細構造の観察より、50°C 以上では網状構造の発達が認められたが、50°C 以下では網状構造は認められなかった。そこで、濁度を指標にミオシン B の凝集性を検討した結果、ゲル化速度の場合と同様に 50°C 付近を境に 2 つの反応系がみられ

たが、40-50°C だけで濁度の上昇がみられたため 50°C までのゲルは凝集反応によると思われた。したがって、ホシザメすり身のゲル化反応に及ぼす温度の影響は、SEM による網状構造の形成が確認されたことより 50°C 以上の温度ではゲル化反応、濁度の結果より 50°C 以下では凝集反応であろうと推察された。

終わりに、走査電子顕微鏡写真撮影に便宜や御助言をいただいた本学農学部教授大塚閑一博士、松本光春先生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 志水 寛, 町田 律, 竹並誠一: 日水誌, **47**, 95-104 (1981).
- 2) 御木英昌, 上西由翁, 西元諄一: 鹿児島大学水産学部紀要, **37**, 35-43 (1988).
- 3) T. Sano, S. F. Noguchi, T. Tsuchiya, and J. J. Matsumoto: *J. Food Sci.*, **53**, 924-928 (1988).
- 4) M. Ishioroshi, K. Samejima, and T. Yasui: *J. Food Sci.*, **44**, 1280-1284 (1979).
- 5) K. Samejima, M. Ishioroshi, and T. Yasui: *J. Food Sci.*, **46**, 1412-1418 (1981).
- 6) 高士令二, 新井健一, 斉藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 7) I. H. Segel: シーゲル生化学計算法 (永井裕, 石倉久之, 林 利彦訳), 廣川書店, 東京, 1979, pp. 312-314.
- 8) 「高分子科学の基礎」編集委員会: 高分子科学の基礎 (高分子学会編), 東京化学同人, 東京, 1988, pp. 250-252.
- 9) I. Katsura and H. Noda: *J. Biochem.*, **69**, 219-229 (1971).
- 10) J. Deng, R. T. Toledo, and D. A. Lillard: *J. Food Sci.*, **41**, 273-277 (1976).
- 11) T. Nakayama and Y. Sato: *J. Texture Studies*, **2**, 475-488 (1971).
- 12) I. Kimura, K. Arai, K. Takahashi, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **88**, 1703-1713 (1980).
- 13) 丹羽栄二: 水産物製品技術研究会誌, **7**, 241-251 (1981).