スケトウダラすり身加圧ゲルの性状に及ぼすアンモニウム塩の影響

昌子 有, 佐伯宏樹, 若目田 篤, 野中道夫

(1993年7月5日受付)

Influence of Ammonium Salt on the Formation of Pressure-induced Gel from Walleye Pollack Surimi

Tamotsu Shoji,*¹ Hiroki Saeki,*² Atsushi Wakameda,*¹ and Michio Nonaka*¹

To investigate the effect of ammonium ion on the quality of pressure-induced gel, walleye pollack surimi was ground with NaCl, or NaCl containing a small amount of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or NH_4Cl . The salt-ground meat was then treated under 300 MPa at 0°C for 10 min followed by storage at 5°C for 120 hours, and breaking strength and breaking strain together with subunit composition of myofibrillar protein were evaluated. Transglutaminase activities and ϵ -(γ -glutamyl) lysine contents were also measured.

The results obtained were as follows: (1) Transglutaminase activity of the salt-ground meat was mostly inactivated by the pressure-treatment, (2) The rates of formation of cross-linked myosin heavy chain (60% of total protein) and of ϵ -(γ -glutamyl) lysine (2.7 mg/g) in the pressure-induced gel were virtually identical with those in the setting gel from the same surimi, (3) The breaking strength of the pressure-induced gel reached more than twice that of the setting gel, (4) Addition of ammonium salts to the salt-ground meat largely suppressed the formation of cross-linked myosin heavy chain and of ϵ -(γ -glutamyl) lysine, while the breaking strength of the pressure-induced gel remained at half the level of that of the gel formed without ammonium salts. These results suggested that intermolecular hydrophobic interaction between myofibrillar proteins, which was formed through the pressure-treatment, might contribute to the production of an elastic gel.

キーワード: 高圧処理, スケトウダラ, 加圧ゲル, トランスグルタミナーゼ

著者らは、これまで、塩ずりしたスケトウダラすり身を加圧処理すると弾力性のあるゲル（加圧ゲル）が形成されること、¹⁾ および、そのゲルを低温で保存すると、保存中に破断強度が著しく増加して、さらに強い弾力を持ったゲルに変化する事実²⁾を報告した。このような加圧ゲルの性状は加圧処理しない加熱ゲルと大きく異なるが、これはすり身中のタンパク質の加圧処理による特異な変化によるものと推定した。³⁾ すなわち、加圧ゲル中の筋原線維 (Mf) タンパク質サブユニット成分について調べてみると、加圧ゲルの弾力と、ミオシン重鎖 (HC) の多量体と考えられる成分 (HCn'', HCn', および HCn) 含量との間にある程度の相関が認められるが、その含量だけでは加圧ゲルの弾力を説明できるとは限らないことも明らかとなった。⁴⁾

一方、魚肉すり身中に内在するトランスグルタミナーゼ (TGase) が、Mf タンパク質、特に HC 間に ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-link を形成し、これがすり身の

物性に関与している可能性を示唆する報告がされている。⁵⁻⁸⁾

そこで、スケトウダラすり身の加圧ゲル形成における TGase の関与の可能性を調べるため、すり身中の TGase 活性が加圧処理によってどのように変化するかを調べた。また、 NH_4^+ イオンが TGase の阻害物質であることが知られている⁹⁾ので、これを添加して加圧ゲルを調製し、その物性と Mf タンパク質サブユニット成分組成の保存中における変化について調べた。また、 ϵ -(γ -glutamyl)lysine の生成量も検討した。

実験方法

スケトウダラ冷凍すり身 マルハ(株)製のスケトウダラ (walleye pollack *Theragra chalcogramma*) の SA 級の冷凍すり身を原料として用いた。このすり身は、ショ糖 4%、ソルビトール 4%、重合リン酸塩 0.2% を含有し、水分 73~74%、pH 7.36~7.39 であり、製造後 -30°C で

*¹ マルハ(株)中央研究所 (Central Research Institute, MARUHA CORPORATION, Wadai, Tsukuba, Ibaraki 300-42, Japan).

*² 北海道大学水産学部食品学科 (Department of Food Science, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

約1年間貯蔵したものである。

試薬 モノダンシルカダベリン (*N*-(5-aminopentyl)-5-dimethylamino-1-naphthalene-sulfonamide) と ϵ -(γ -glutamyl)lysine は Sigma 製を用いた。アセチル化カゼインの調製と検定は Fraenkel-Conrat¹⁰⁾ の方法によった。また、イソチオシアン酸フェニル (PITC) は、和光純薬工業(株)製を用いた。

プロテアーゼ 6種類のプロテアーゼを用いた。すなわち、Sigma 製の Protease type VIII (Subtilisin Carlsberg, EC. 3. 4. 21. 14 (*Bacillus licheniformis* 起源)), Protease type XXVII (Nagarse, EC 3. 4. 21. 14), Protease type XXV (Pronase E, EC. 3. 4. 24. 4 (*Streptomyces griseus* 起源)), Leucine aminopeptidase (EC. 3. 4. 11. 1 (*Porcine kidney* 起源)), Prolidase (EC. 3. 4. 13. 9 (*Porcine kidney* 起源)), および Carboxypeptidase Y (EC. 3. 4. 16. 1 (*Bakers yeast* 起源)) を用いた。

高速液体クロマトグラフ 高速液体クロマトグラフシステム (HPLC) は日本分光(株)製のものを用い、ポンプ: 880-CO 型, 紫外外部吸収検出機: 875-UV 型, カラム恒温槽: 860-CO 型, オートサンプラー: 850-AS 型, およびシステムコントローラー: 801-SC 型で構成した。

TGase 粗酵素液の調製と加圧処理 スケトウダラすり身からの TGase 粗酵素液の調製は関ら⁷⁾の方法に準じて行った。すなわち、冷凍すり身 80 g が完全に解凍しないうちに細断し、5 倍量の 0.1 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) (8% のソルビトールを含む) を加え、日本精機(株)製ブレンダーを用いて 10,000 rpm で 2 分間、氷冷下でホモナイズした。これを 8,000 $\times$ g で 20 分間遠心分離し、得られた上澄液を透析チューブに充填して、ポリエチレングリコール 6000 の粉末中に埋没させて濃縮した。濃縮液を 0.1 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0)-5 mM 2-メルカプトエタノールに透析した後、105,000 $\times$ g で 60 分間遠心分離して得られた上澄液を粗酵素液とした。得られた粗酵素液をポリエチレン製の容器(容量約 3 ml)に気泡が入らないように充填して密栓し、0 $^{\circ}$ C で常圧から 500 MPa の範囲の圧力で 10 分間加圧処理した。加圧処理は、(株)神戸製鋼所製の超高压加圧試験機(機械番号 No. 310622)を用い、圧力容器内の圧力媒体のシリコン油に浸漬した状態で行った。加圧処理した粗酵素液を、直ちに、TGase 活性の測定に供した。

TGase 活性の測定 TGase 活性の測定は、Takagi ら⁹⁾の方法に準じて、次のように行った。すなわち、2 mg/ml アセチル化カゼイン、10 μ M モノダンシルカダベリン、10 mM CaCl_2 , 4.5 mM ジチオスレイトール、50 mM Tris-塩酸 (pH 7.5), および適量の粗酵素液からなる反応混液(全量 3 ml)を 25 $^{\circ}$ C でインキュベートし、1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 126 μ l を添加して反応を停止させた後、蛍光強度の

増大を励起波長 350 nm, 蛍光波長 480 nm で測定した。TGase の 1 unit は 1 分間に 1 nmol のモノダンシルカダベリンを 1 mg のアセチル化カゼイン中に取り込む活性量とした。

加圧ゲルの調製 スケトウダラ冷凍すり身を細断し、5 $^{\circ}$ C で放置してすり身の温度が -4 $^{\circ}$ C になるまで解凍後、タンパク質濃度が 100 mg/g 湿重量になるように水を添加し、Food machinery Inc. 製の Robot coupe で品温が -1 $^{\circ}$ C となるまで攪拌、混合した。続いて、全重量の 3.2% の塩化ナトリウム、2.5% の塩化ナトリウムと 0.533% の硫酸アンモニウム、あるいは 2.74% の塩化ナトリウムと 0.432% の塩化アンモニウムを各々添加し(イオン強度 0.55)、さらに、クロラムフェニコール 150 ppm を添加して 10 分間塩ずりした(品温約 10 $^{\circ}$ C)。これを、以下、肉糊と呼ぶ。この肉糊約 50 g をポリ塩化ビニリデン製のケーシングチューブ(直径 23 mm, 長さ 150 mm の円筒状)に充填し、温度 0 $^{\circ}$ C において、300 MPa の圧力で 10 分間加圧処理した。続いて、この加圧処理した肉糊、また、対照として加圧処理しない肉糊を直ちに恒温室中に 5 $^{\circ}$ C で 120 時間保存し、経時的にその一部を取り出して以下の実験に供した。なお、以下に、肉糊が加圧処理によってゲル化したものを加圧ゲル、加圧処理せずに保存によってゲル化したものを坐りゲルと呼ぶ。

加圧ゲルの物性(弾力)の測定 加圧ゲルの物性の指標として破断強度と凹みを測定した。すなわち、室温にもどした加圧、および坐りゲルを高さ 25 mm の円筒状の断片に切断し、直径 5 mm の球形プランジャーによりレオメーター(不動工業(株)製 NRM-2003J)で押し込み試験を行った。

加圧ゲルの SDS-尿素溶液に対する可溶性率の測定 沼倉ら¹¹⁾の方法に準じて、加圧ゲル 80 mg に 5 ml の 2% SDS-8M 尿素-2% 2-メルカプトエタノール-20 mM Tris-maleate (pH 8.0) 溶液を加え、ヤマト科学(株)製ウルトラディスペンサーで細碎し、100 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱した後、室温で 24 時間振盪して可溶化させた。この可溶化液、およびこの可溶化液を 10,000 $\times$ g で 20 分間遠心分離して得た上澄液について西本ら¹²⁾の方法に準じてタンパク質濃度を求めた。なお、タンパク質濃度の測定は、ビウレット法¹³⁾によった。そして、原料のすり身から可溶化したタンパク質量を基準とした相対値(%)を求めて可溶性率とした。¹²⁾

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による加圧ゲル中の Mf タンパク質サブユニット成分の分別定量 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、0.05% の SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて Laemmli¹⁴⁾の方法によって行った。すなわち、上記の可溶化タンパク質 20 μ g を SDS-PAGE に供し、

0.25% Coomassie Brilliant Blue R で染色後、50% メタノール-7% 酢酸水溶液、次いで 7% 酢酸水溶液でバックグラウンドが透明になるまで脱色した。タンパク質サブユニット成分のバンドの染色強度は、島津製作所(株)製 Dual-Wavelength Flying Spot Scanner CS-9000 を用いて波長 640 と 700 nm の吸光度の差として測定し、各タンパク質サブユニット成分のバンドの全染色強度に対する相対染色強度 (%) を求めた。この場合、SDS-尿素溶液に対する可溶化率が減少したり、あるいは電気泳動ゲル上の全染色強度が減少した時は、沼倉ら¹¹⁾の方法に従って、各サブユニット成分量を補正した。ただし、加圧ゲル中の Mf タンパク質サブユニット成分を、HC (ミオシン重鎖に相当する成分)、C₁ (電気泳動ゲルの上端部に染色される成分)、C₂ (SDS-尿素溶液には可溶化するが、電気泳動ゲルに侵入できずに染色されない成分)、C₃ (SDS-尿素溶液に可溶化しない成分)、Ac (アクチンに相当する成分)、およびその他の成分に分別した。

加圧ゲル中の ϵ -(γ -glutamyl) lysine の定量 加圧ゲル中の ϵ -(γ -glutamyl)lysine 含量を測定するために、Griffin ら¹²⁾の方法に従って、6 種のプロテアーゼを用いて加圧ゲルを加水分解した。すなわち、加圧ゲルを凍結乾燥して粉碎し、0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) (チモール 2 mg/ml 含有) 溶液に 10 mg/ml の濃度で懸濁させた。凍結乾燥加圧ゲルに対して 1% の Protease type VIII と Protease type XXVII を添加し、34°C で 12 時間加温し、これを 3 回繰り返した。次に、1.5% の Protease type XXV を加え、34°C で 12 時間加温した。次に、100°C で 15 分間加熱して、これらのプロテアーゼを失活させた後、0.75% の Leucine aminopeptidase と Prolidase を加えた。34°C で 10 時間加温した後、さらに 0.75% の Leucine aminopeptidase を加えて 34°C で 10 時間加温した。1 N 塩酸で pH を 6.5 に調整した後、2% の Carboxypeptidase Y を添加して 32°C で 12 時間加温して加水分解を終了した。加水分解液を 10,000×g で 15 分間遠心分離し、その上澄液を Ultrafree C3-LGC (Millipore 製) で限外ろ過し、プロテアーゼを除去した。

加圧ゲル加水分解物中のアミノ酸の PITC (イソチオシアン酸フェニル) による誘導体化と ϵ -(γ -glutamyl) lysine の phenylthiocarbamyl (PTC) 誘導体の HPLC による分離定量は、Sato ら¹³⁾の方法に準じて行った。すなわち、加水分解物を減圧下で十分に乾燥し、20 μ l の誘導体化試薬 (メタノール: 水: トリエチルアミン: PITC 7: 1: 1: 1 (v/v)) を加え、25°C で 20 分間加熱して反応させた。反応終了後、再び減圧下で十分に乾燥した。乾燥物を 5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 10% のアセトニトリルを含む) に溶解し、孔径 0.45 μ m の膜でろ過した後、HPLC に導入した。HPLC のカラムは Cosmosil ARC₁₈

Fig. 1. Influence of pressure-treatment on transglutaminase activity in crude extract prepared from walleye pollack surimi.

Crude transglutaminase extract was prepared by the method of Seki *et al.*,⁷⁾ and the crude extract was treated at 0°C under various pressure ranging from atmospheric pressure to 500 MPa for 10 min. After the treatment, transglutaminase activities were measured. The transglutaminase assay was achieved by the method of Takagi *et al.*⁹⁾

カラム (250 mm×4.6 mm i.d. 粒径 5 μ m, Nacalai tesque 製) を用い、グラジエント溶出を行った。溶離液 A は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0, 5% のアセトニトリルを含む)、および溶離液 B はアセトニトリル: 水 (6:4 (v/v)) の組成であり、グラジエントパターンは以下のものである。0~2 分, 0% B; 2~20 分, 5~48% B; 20~25 分, 48~90% B; 25~35 分, 100% B; 35~45 分, 0% B。流量は 1 ml/min で、カラム温度を 43°C に保持した。

実験結果および考察

スケトウダラすり身中の TGase 活性と加圧処理による失活 スケトウダラすり身から TGase 粗酵素液を調製し、0°C で、常圧から 500 MPa の範囲の圧力で 10 分間加圧処理した後の TGase 活性を測定した結果を Fig. 1 に示す。加圧処理しない粗酵素液中の TGase 活性は、9.19 m unit/ml であったが、350 MPa 以上の圧力でほとんど失活した。実際には、加圧ゲルの調製は 0°C、300 MPa、10 分間の加圧処理条件で行っている。そこで、次に、NH₄⁺ イオンを添加しない肉糊を 0°C、300 MPa、10 分間処理して得た加圧ゲルから、同様の方法で TGase 粗酵素液を調製し、TGase 活性を測定した。その結果を Table 1 に示す。これによると、肉糊中の活性は、肉糊 1 g あたり 3.11 m unit となったが、加圧ゲルでは 1 g あた

Table 1. Transglutaminase activities in salt-ground meat and pressure-induced gel of walleye pollock surimi

	Transglutaminase activity*** (m unit/g)
Salt-ground meat*	3.11
Pressure-induced gel**	0.33

* Salt-ground meat was prepared by grinding walleye pollock surimi (protein content: 100 mg/g) with 3.2% NaCl (w/w).

** Pressure-induced gel was prepared from salt-ground meat by the treatment at 0°C under 300 MPa for 10 min.

*** See Fig. 1.

り 0.33 m unit であり, 加圧処理によって活性は約 10% に低下した。それゆえ, TGase 活性は粗酵素液中でも肉糊中でも同じように圧失活することが分かった。

著者らは, 既にスケトウダラ肉糊の処理圧力と, 形成された加圧ゲルの弾力との関係を報告しているが,^{1,2)} それによると, 加圧ゲルの弾力は 100 MPa では弱く, 300 MPa で最も強くなり, それ以上でむしろ弱まる傾向を示していた。この加圧ゲルの弾力の処理圧力依存性は, Fig. 1 で示した加圧処理における TGase 活性の安定性のパターンとは異なっていた。したがって, 加圧ゲルの弾力形成はすり身中の TGase 活性によって起こるものではないことが強く示唆される。

スケトウダラすり身加圧ゲルの弾力に及ぼす NH_4^+ イオン添加の影響 スケトウダラすり身の塩すり時に NH_4^+ イオンを添加して, 0°C, 300 MPa, 10 分間加圧処理し, 直ちに 5°C で 120 時間保存して弾力の変化を調べた。 NH_4^+ イオン源としては, 硫酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムを用い, その添加量は, TGase 活性測定時に反応を終了させるために添加されている濃度⁹⁾ (NH_4^+ イオン終濃度 80 mM) と同じになるように設定した。また, 塩すり時に添加する塩化ナトリウムは, 全体のイオン強度が 0.55 になるように調整した。すなわち, アンモニウム塩を添加しない場合は, すり身 1 kg (水のばしを行い, タンパク質濃度を 100 mg/g 湿重量に調整してある) に対して塩化ナトリウム 32.1 g, 硫酸アンモニウムの場合は 5.33 g と塩化ナトリウム 25 g, 塩化アンモニウムの場合は 4.32 g と塩化ナトリウム 27.4 g を添加して塩すりした。各々について, 加圧処理したものとし, 5°C 保存中の破断強度と凹みを測定した結果を Fig. 2 に示した。これによると, NH_4^+ イオンを添加しない場合は, 加圧ゲルおよび対照の坐りゲルはともに破断強度が増加し, 120 時間保存後の加圧ゲルの破断強度は坐りゲルの約 2.6 倍に達した (Fig. 2a, b)。また, 加圧ゲルの凹みは加圧直後からほぼ一定であり, 坐りゲルのそれは 25 時間保存後に一定となったが,

120 時間保存後の加圧ゲルの凹みは坐りゲルの約 1.2 倍であった (Fig. 2c, d)。これは従来と同じ結果^{2,4)}である。一方, NH_4^+ イオンを添加した肉糊では, NH_4^+ イオンとして硫酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムを添加した両方の場合とも, 保存中に弾力のある坐りゲルは形成しなかった (Fig. 2b)。これに対し, 加圧処理したものは, 加圧直後の破断強度は NH_4^+ イオンを添加しない場合の約 1/2 となったが, 保存中に破断強度が増加して弾力のある加圧ゲルを形成した。また, 破断強度の増加の度合いは硫酸アンモニウム添加の場合の方がわずかに大きかった (Fig. 2a)。凹みについては, 保存初期にはほとんど増加しなかった対照の肉糊の場合 (Fig. 2d) と異なり, 加圧直後からほぼ一定値を保ち, NH_4^+ イオンを添加しない場合よりわずかに小さかった (Fig. 2c)。万ら¹⁰⁾は, スケトウダラすり身への少量 (mM 量) の NH_4^+ イオンの添加が加熱による坐りゲル形成を阻害することを報告しているが, 本実験結果でもそのことが確認された。しかし, 加圧ゲル形成は坐りゲル形成ほどには阻害されず, 弾力の約半分は加圧処理に起因して生じることが示された。

加圧ゲル中の Mf タンパク質サブユニット成分の変化に及ぼす NH_4^+ イオン添加の影響 NH_4^+ イオン無添加の加圧ゲルと坐りゲル, および NH_4^+ イオン添加の加圧ゲル, あるいは NH_4^+ イオンを添加したためゲル化しなかった肉糊の 5°C 保存中に起こる Mf タンパク質サブユニット成分の変化を SDS-PAGE 法によって調べた。その結果を Fig. 3 に示す。

NH_4^+ イオン無添加の加圧ゲルと坐りゲルの Mf タンパク質サブユニット成分は, 5°C 保存中に, 弾力の増強に伴って変化し, HC が減少して, HC 多量体が生成して増加した (Fig. 3a, d)。今回用いた冷凍すり身から調製した加圧ゲルと坐りゲルでは, HC 多量体の中で SDS-尿素溶液に不溶な成分 (C_2) がかなり多く生成し, 両ゲルとも全タンパク質の 60% 以上の含量に達した。これは, 著者らが以前に報告した値^{2,4)}より大きかった。また見かけ上, C_2 成分がほとんど検出されなかった。これらのゲルのように SDS-尿素溶液への可溶化率が大きく低下した試料では, 可溶化タンパク質中に占める HC 以外の成分, つまり Ac, トロポミオシン, あるいはトロポニンなどに相当する成分の割合がかなり高くなっている。そして, Coomassie Brilliant Blue R に対するこれらの成分の染色感度は HC などの高分子成分に対するそれよりも高いと考えられるため,¹⁰⁾ これらの成分の含量が高い時には分析に誤差を生じる可能性がありうる。この誤差のために C_2 成分が検出されなかったのではないかと考えられるが, 現在このような場合の分別定量法については再検討を行っている。また, 保存中の各ゲルについて Ac

Fig. 2. Changes in breaking strength and breaking strain of pressure-induced gel with or without ammonium salts during storage at 5°C for 120 h.

Walleye pollack surimi was ground with 3.2% NaCl (○), 2.5% NaCl + 0.533% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (△), or 2.74% NaCl + 0.432% NH_4Cl (□) by weight, and treated under 300 MPa for 10 min at 0°C. After the treatment, the pressure-induced gels thus formed were stored at 5°C. The gels were sliced into pieces of 25 mm thickness, and breaking strength (a, b) together with breaking strain (c, d) were measured with a rheometer adopting a plunger of 5 mm in diameter as a function of storage time. As a control, the same salt-ground meats with 3.2% NaCl (●), 2.5% NaCl + 0.533% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (▲), or 2.74% NaCl + 0.432% NH_4Cl (■) were stored at 5°C without the pressure-treatment, and subjected to the measurements of breaking strength (a, b) and breaking strain (c, d).

The data in the diagram show the average of six measurements.

のトロポミオシンに対する染色強度比が減少するので、Ac の減少傾向が明らかであるが、これについては著者らが既に考察した。^{2,3)}特に HC 多量体の生成量が多い場合には、高分子量成分である C_1 , C_2 , および C_3 に HC 多量体の他に Ac などの成分が混入している可能性が考えられる。この推定は、坐りゲル中の塩溶性タンパク質をゲルろ過により分析すると同じ現象が認められるので、

その結果からも支持される。^{*}

既に Fig. 2 に示したように、加圧ゲルと坐りゲルとでは弾力がかなり異なっていた。それに対して、その Mf タンパク質サブユニット成分の組成は類似しており、むしろ坐りゲル中の HC 多量体の生成量の方が多かった。このことは、前報⁴⁾でも述べたように、加圧ゲルの強い弾力は HC の多量化の度合いだけでは説明できないこと

* 船津保浩, 新井健一, 加藤 登: スケトウダラ肉糊の坐りに伴う塩溶性タンパク質の凝集体形成。平成 5 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 282.

を示している。

次に、 NH_4^+ イオンを添加した場合を調べると、硫酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムの添加の場合とともに、加圧処理の有無にかかわらず、 5°C 保存中の HC の減少と HC 多量体の生成は少ししか起こらず (Fig. 3b, c, e, f), C_3 成分は全く生成しなかった。加圧処理の有無での Mf タンパク質サブユニット成分組成の変化は類似していたが、加圧処理しない場合に、HC と HC 多量体の含量の合計がわずかに減少する傾向が認められた (Fig. 3e, f)。ただし、この場合、Fig. 2 に示したように、加圧処理しない肉糊はほとんどゲル化しなかったのに対し、加圧処理したものはかなり弾力のあるゲルを形成したので、この結果は、加圧ゲルの弾力と HC 多量体生成との関係があまり単純ではないとする上記の結果を支持している。これは、SDS-PAGE 法では認知できない水素結合や疎水の相互作用のような非共有結合が加圧ゲル物性に関与していることを示唆するものであり、既に、坐リゲルを高温で加熱する際にもその関与の可能性が予想されている。¹⁹⁾

加圧ゲル中の ϵ -(γ -glutamyl)lysine 含量 すり身中の TGase は、カマボコゲル形成過程で Mf タンパク質に作用し、Mf タンパク質間で架橋結合を形成するといわれている。⁶⁻⁸⁾ 架橋結合の結果、イソペプチド結合である ϵ -(γ -glutamyl)lysine 部位を生じるが、その含量を、 NH_4^+ イオン無添加および添加の肉糊を加圧処理したものと、対照として加圧処理しないもの各々について 5°C で 120 時間保存したもの、および原料のすり身について測定した。その結果を Table 2 に示した。

すり身、および NH_4^+ イオンを添加した加圧ゲルや NH_4^+ イオンの添加のためゲル化しなかった肉糊では、

ϵ -(γ -glutamyl)lysine は検出されなかった。それに対し、 NH_4^+ イオン無添加の坐リゲルで、ゲル 1 g 当たり 2.73 mg、同じく加圧ゲルで 2.65 mg 検出され、両ゲル中ではほぼ同値を示した。以上の結果から、 NH_4^+ イオンを

Table 2. Content of ϵ -(γ -glutamyl) lysine in pressure-induced gel and setting gel prepared from walleye pollack surimi.

	ϵ -(γ -Glutamyl) lysine (mg/g)
Walleye pollack surimi	N.D.
Without ammonium salts	
Pressure-induced gel*	2.65
Setting gel*	2.73
With $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
Pressure-induced gel**	N.D.
Salt-ground meat (**)	N.D.
With NH_4Cl	
Pressure-induced gel**	N.D.
Salt-ground meat (**)	N.D.

* Pressure-induced gel without ammonium salts was prepared by the same method as given in Fig. 2, followed by storage at 5°C for 120 h. Setting gel was prepared by storage (5°C , 120 h) of the control salt-ground meat without ammonium salts as shown in Fig. 2.

** The pressure-induced gels containing ammonium salts were prepared by the same procedure as shown in Fig. 2, followed by storage at 5°C for 120 h. As a contrast against the case of setting gel*, elastic gels were not formed from the control salt-ground meats with ammonium salts as shown in Fig. 2 after storage at 5°C for 120 h. (**)

ϵ -(γ -Glutamyl) lysine contents in these gels or salt-ground meats together with surimi were determined by the method of Sato *et al.*¹⁶⁾

N.D. Not detected.

Fig. 3. Changes in subunit compositions of myofibrillar protein in pressure-induced gels with or without ammonium salts during storage at 5°C for 120 h.

As for samples (gels), see Fig. 2. These samples were solubilized with SDS-urea medium containing 2% SDS, 8 M urea, 2% 2-mercaptoethanol, and 20 mM Tris-maleate (pH 8.0), and were heated at 100°C for 2 min, followed by stirring for 24 hours at room temperature. The supernatant was collected by centrifugation at $10,000\times g$ for 20 min, and the solubilized protein content was determined by the biuret method.¹³⁾ Identical aliquot of protein (20 μg each) was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis by the method of Laemmli¹⁴⁾ using a 7.5% polyacrylamide disc gel containing 0.05% SDS. After electrophoresis, the gel rod was stained with Coomassie Brilliant Blue R. The stain intensity of protein bands on the gel rod was measured densitometrically in absorbances at 640 nm and 700 nm. The contents of myosin heavy chain (HC), actin (Ac), and components moving more slowly than HC (C_1) were expressed as relative intensity (%), taking the sum of absorbance on the gel rod as 100%. The contents thus obtained were corrected by taking account of C_2 (soluble component in SDS-urea medium, not entering into a 7.5% polyacrylamide gel) and C_3 (insoluble component in SDS-urea medium), since both C_2 and C_3 components were supposed to be highly cross-linked myosin heavy chains.¹¹⁾

The gels with pressure-treatment, (a) without ammonium salts, (b) with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (c) with NH_4Cl .

The salt-ground meat (without pressure-treatment), (d) without ammonium salts, (e) with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (f) with NH_4Cl .

S: surimi (before salt-grinding), ■: Actin (Ac), ▨: Myosin heavy chain (HC), ■: Sum of cross-linked myosin heavy chain ($\text{C}_1 + \text{C}_2 + \text{C}_3$).

添加した加圧ゲルでは, ϵ -(γ -glutamyl)lysine が形成されないにもかかわらずかなり弾力のあるゲルが形成されること, また, NH_4^+ イオン無添加の加圧ゲルは, 坐りゲルよりも弾力が著しく大きいにもかかわらず, その含量は同レベルにとどまるので, 加圧ゲルの弾力形成が TGase 作用に依存しないことが明らかである。

なお, NH_4^+ イオン無添加の加圧ゲルにおいて, 加圧処理の際に TGase 活性の約 90% が失活しているにもかかわらず (Table 1), ϵ -(γ -glutamyl)lysine 含量が坐りゲルのそれと同程度であることについては, その生成が酵素作用に依存していない可能性があること (加圧処理によるすり身中の Mf タンパク質の unfolding²¹⁻²⁵⁾ により, 常温でも起こりうること),²⁰⁾ あるいはまた, この Mf タンパク質の構造変化により TGase の基質として作用し易くなった結果, 加圧処理によりわずかにしか残存していない TGase 活性によって同程度に生成した可能性も考えられる。

沼倉らは, 坐りゲルの弾力は HC 多量体生成と密接な関係があると報告し,¹¹⁾ さらに, Kimura らは, HC 多量体生成とすり身中の TGase 活性との関係について報告した。^{7,8)} しかしながら, 本実験では, 加圧ゲルの場合は坐りゲルの場合と異なり, その弾力の形成が Mf タンパク質間の水素結合や疎水的相互作用の寄与によるところが大きいことが示された。^{26,27)} また, 前報⁴⁾の結果に示されているが, 5°C で 120 時間保存した加圧ゲルと坐りりゲルをさらに 90°C で 30 分間加熱処理すると, 加圧ゲルの弾力はあまり変化しないが, 坐りゲルの弾力が大きく増加したのは, 加圧ゲルでは 5°C 保存中に Mf タンパク質間に特に疎水的相互作用が十分に形成されるためその後の加熱処理ではそれ以上増加しないのに対して, 坐りゲルの場合は, 保存中にあまり疎水的相互作用が増加せずに保存後の加熱処理中に大きく増加するためであると推定した。これらはいずれも上記の考え方とよく合致するものである。

加圧ゲルの品質を, 従来の坐りゲル, あるいは坐り-加熱ゲル (例えば, 30°C と 90°C で 2 段階加熱を行ったもの) と比較すると, 透明感があり, 破断強度や凹みはともに大きい値を示す, 特徴ある性状と優れた弾力性を有する。その弾力は, Mf タンパク質間に, 従来の坐りゲルの場合と異なる相互作用 (または反応) が起こった結果として生じることが明らかである。最近では, 冷凍すり身に外因性の TGase を添加して, カマボコゲルの弾力の向上を図る試みがなされようとしている。しかし, 加圧処理によると, TGase の活性には関係なく, 優れた弾力のゲルを作ることができることが明らかである。言い換えると, 加圧処理法はすり身 (魚肉 Mf タンパク質) 自身の持つゲル化能を最大限に発揮させる物理的加圧法で

あることが再確認された。⁴⁾

文 献

- 昌子 有, 佐伯宏樹, 若目田篤, 中村 誠, 野中道夫: 高圧によるスケトウダラすり身のゲル化と筋原線維タンパク質の変化. 日水誌, **56**, 2069-2076 (1990).
- 昌子 有: 加熱処理中のタンパク質の変性 超高压下の変性. 水産学シリーズ 84, 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, pp. 40-46.
- 昌子 有, 佐伯宏樹, 若目田篤, 中村 誠, 野中道夫: スケトウダラすり身加圧ゲルの弾力と筋原線維タンパク質の変化に及ぼす保存温度の影響. 日水誌, **58**, 329-336 (1992).
- 昌子 有, 佐伯宏樹, 若目田篤, 中村 誠, 野中道夫: スケトウダラすり身加圧ゲルの加熱による性状変化. 日水誌, **58**, 2055-2061 (1992).
- 塚正泰之, 志水 寛: マイワシ肉とマサバ肉の坐り特性. 日水誌, **56**, 1105-1112 (1990).
- 塚正泰之, 志水 寛: トランスグルタミナーゼによる坐りに関与するいくつかの要因. 日水誌, **57**, 535-540 (1991).
- 関 伸夫, 守野秀樹, 李 南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一: スケトウダラ筋肉およびすり身中のトランスグルタミナーゼ活性とミオシン B との反応. 日水誌, **56**, 125-132 (1990).
- I. Kimura, M. Sugimoto, K. Toyoda, N. Seki, K. Arai, and T. Fujita: A study on the cross-linking reaction of myosin in kamaboko "Suwari" gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1389-1396 (1991).
- J. Takagi, Y. Saito, T. Kikuchi, and Y. Inada: Modification of transglutaminase assay: use of ammonium sulfate to stop the reaction. *Anal. Biochem.*, **153**, 295-298 (1986).
- H. Fraenkel-Conrat: in "Methods in Enzymology" (ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Vol. IV, Academic Press, New York, 1957, pp. 247-269.
- 沼倉忠弘, 溝口 竜, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 関伸夫, 新井健一: 加熱により変質したスケトウダラすり身の坐りゲル形成能とミオシン重鎖の交差結合能. 日水誌, **55**, 1083-1090 (1989).
- 西本真一郎, 橋本昭彦, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一: スケトウダラ肉糊の坐り中に起るミオシン重鎖とゲル強度の変化に影響する要因. 日水誌, **53**, 2011-2020 (1987).
- A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- M. Griffin, J. Wilson, and L. Lorand: High-pressure liquid chromatographic procedure for the determination of ϵ -(γ -glutamyl) lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, **124**, 406-413 (1982).
- K. Sato, Y. Tsukamasa, C. Imai, K. Ohtsuki, Y. Shimizu, and M. Kawabata: Improved method for identification and determination of ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *J. Agric. Food. Chem.*, **40**, 806-810 (1992).
- 万 建栄, 関 伸夫: スケトウダラの坐りにおけるミオシンの酵素架橋重合に及ぼす影響. 日水誌, **58**, 2181-2187 (1992).
- J. D. Potter: The content of troponin, tropomyosin, actin,

- and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils. *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 436-441 (1974).
- 19) 松津保浩, 加藤 登, 新井健一: 乳酸の添加により微酸性化したマイワシ肉糊のゲル形成能とミオシン重鎖の多量化. 日水誌, **59**, 1093-1098 (1993).
 - 20) R. E. フィニー, J. R. ウィテカー: 食品・栄養・薬学のための蛋白質の修飾 (荒井綜一監訳). 学会出版センター, 東京, 1984, pp. 104-107.
 - 21) Yu. N. Berg, N. A. Lebedeva, E. A. Markina, and I. I. Ivanov: Influence of high pressure on some properties of myosine. *Biokhimiya*, **30**, 277-281 (1965).
 - 22) J. M. O'Shea and R. K. Tume: Pressure-induced changes in myofibrillar proteins. *Aust. J. Biol. Sci.*, **32**, 415-421 (1979).
 - 23) W. C. Ko, M. Tanaka, Y. Nagashima, H. Mizuno, and T. Taguchi: Effect of pressure treatment on depolymerization of fish F-actin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 2109-2112 (1990).
 - 24) J. M. O'Shea, D. J. Horgan, and J. J. Macfarlane: Some effects of pressure treatment on actomyosin systems. *Aust. J. Biol. Sci.*, **29**, 197-207 (1976).
 - 25) 月向邦彦: 生体高分子の水和と圧力効果, 加圧食品一研究と開発 (林 力丸編). さんえい出版, 京都, 1990, pp. 23-35.
 - 26) E. Niwa, Y. Matsubara, and I. Hamada: Hydrogen and other polar bondings in fish flesh gel and setting gel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 667-670 (1982).
 - 27) E. Niwa, T. Nakayama, and I. Hamada: The third evidence for the participation of hydrophobic interactions in fish flesh gel formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1763 (1983).