トカゲエソ肉の 40℃ 付近でのミオシン重鎖分解に及ぼす かまぼこ製造条件の影響

浅野 善啓,^a 伊藤 慶明,* Pantip Suwansakornkul,^b 小 畠 渥

(2002 年 6 月 24 日受付, 2002 年 11 月 11 日受理)

高知大学農学部栽培漁業学科

Effects of manufacturing processes on myosin heavy chain degradation
of shortfin lizardfish *Saurida elongata* meat paste at around 40°C

YOSHIHIRO ASANO,^a YOSHIAKI ITOH,*
PANTIP SUWANSAKORNKUL^b AND ATSUSHI OBATAKE

Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

Washing procedures of shortfin lizardfish meat are unable to remove the proteolytic activity degrading myosin heavy chain during the preheating process of salted meat paste. NaCl promoted the activity, and sugars and a rice wine did not affect it at all. With duration especially at 40°C, decrease in the gel strength was accompanied by a remarkable degradation of myosin heavy chain. It was therefore suggested that myosin heavy chain in the salted meat paste of shortfin lizardfish was susceptible to proteolysis during the processing of kamaboko resulting in the weakening of the gel.

キーワード：トカゲエソ, 筋原繊維結合型プロテアーゼ, ミオシン重鎖, 水晒し, 戻り, 坐り, ゲル形成能

ねり製品原料となるエソ類の主要魚種としてマエソ, ワニエソおよびトカゲエソの三種が知られている。この中でマエソ, ワニエソは高級ねり製品の原料として利用されているが, これらに比べてトカゲエソはかまぼこゲル形成能が劣る^{1,2)}ために高級品には用いられない。岡ら^{3,4)}はトカゲエソの有効利用を目的としてピロリン酸塩晒しによるゲル形成能の改善について検討し, その効果を得ているものの, トカゲエソ肉自身のゲル形成能が劣る原因はまだ解明されていない。原ら⁵⁾はワニエソ筋肉から筋原繊維結合型プロテアーゼを精製し, これが HC 分解作用を示すことから戻りに関わる重要な因子であると報告している。著者らはこれまでの一連の研究^{2,6-8)}からトカゲエソの無晒肉, 晒肉は共に 40°C 付近で他の二種よりも強い戻り現象が起こるとともにミオシン重鎖 (HC) の分解も強いことを認めた。この分解はプロテアーゼインヒビターによって抑制され, また水晒しによって戻りは促進されることから, この因子は筋原

繊維結合型のプロテアーゼと推測した。

本研究では, トカゲエソ肉の 40°C 付近での強い戻り発現とかまぼこ製造工程との関連を明らかにするために, 肉を水晒しおよび播潰処理することによって 40°C での HC 分解がどのように影響を受けるか, また加熱方法によってゲル強度および HC 分解がどのように影響を受けるかを検討した。

実験方法

供試魚 高知市中央卸売市場で硬直中あるいは硬直前のトカゲエソ *Saurida elongata* を購入し, 氷藏して研究室に持ち帰り, 実験に供した。

晒処理 供試魚から背部普通肉を採り, 4.5 mm 目および 2.0 mm 目プレートのミートチョッパーに通し, ひき肉とした。これに Table 1 に示した晒液を 5 倍量加え, 泡止めホモジナイザーを用いて 2,000 rpm で 15 分間ホモジナイズした後, 3,000 × g で 10 分間遠心分離し

* Tel : 81-88-864-5155. Fax : 81-88-864-5155. Email : itoh@cc.kochi-u.ac.jp

^a 現所属：高知県食品衛生協会食品検査センター, (Society of Kochi Prefecture Food and Sanitary Laboratory, Food Inspection Center, Marunouchi, Kochi 780-0850, Japan)

^b 現所属：Fishery Technological Development Institute, Department of Fisheries, Bangkok, Thailand

Table 1. Washing solutions used for washing procedures

Washing Method ^{a)}	1st	2nd	3rd
saline washing	0.3% NaCl	0.3% NaCl	0.3% NaCl
alkaline washing	0.15% NaHCO ₃ - 0.15% NaCl	0.15% NaHCO ₃ - 0.15% NaCl	0.3% NaCl
ppNa ^{b)} washing	0.27% ppNa	deionized water	0.3% NaCl
ppNa-MgCl ₂ washing	0.27% ppNa - 0.2% MgCl ₂	deionized water	0.3% NaCl

^{a)} 5 volumes of the solution were used for the washing except for the saline washing (4 volumes)

^{b)} sodium pyrophosphate

上清を捨て、晒し操作とした。この操作は3回行った。

加熱ゾルまたは加熱ゲルの調製 晒肉からのゲルの調製法は以下の実験ごとに示した。なお、晒処理の影響を検討したとき以外は塩水晒肉 (0.3% NaCl で3回処理した晒肉) を用いた。

晒処理の影響 晒肉のタンパク質濃度を2%, NaCl濃度を3%に調整し、乳鉢で10分間播潰したのち、試験管に1gずつ入れ、40℃の湯浴中で0-120分間加熱後、氷水中で急冷した。対照として無晒肉についても同様に処理した。

pHの影響 晒肉のタンパク質濃度を2%, NaCl濃度を3%とし、0.1N HCl溶液またはNaOH溶液を用いてpH調節 (pH 5-9) を行い、40℃の湯浴中で2時間加熱した。

各種添加物の影響 晒肉のタンパク質濃度を2%, NaCl濃度を3%とし、冷凍すり身やかまぼこに添加されるサッカロース、ソルビトール、ピロリン酸塩、みりんを加えて40℃の湯浴中で2時間加熱した。

食塩濃度の影響 タンパク質濃度11%, NaClの終濃度0-4%となるように晒肉に冷脱イオン水およびNaClを添加した後、乳鉢中で20分間播潰した。この塩すり身を高さ3.0 cm, 内径3.1 cmのステンレス製のリングに充填し、調理用ラップで包装後、40℃の湯浴中で2時間加熱した。

二段加熱の影響 晒肉をタンパク質濃度14%, NaCl濃度3%に調整して播潰後、ステンレスリングに充填したものを30, 40および50℃で水蒸気飽和状態の送風恒温乾燥器 (エアバス) 中あるいは湯浴中で種々の時間 (0-120分間) 予備加熱し、その後、80℃の湯浴中で20分間加熱した。

中心温度の測定 温度センサー (CHINO製EB-22005) の先端をステンレス製リングに充填したすり身の中心に挿入し、エアバスおよび湯浴中での加熱による温度上昇の様子を調べた。

ゲル強度の測定 志水らの方法⁸⁾に従ってレオメーター (サン科学製CR300) で引っ張り試験を行いゲル強度 (gw/cm²) を求めた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) ゾルおよびゲルを10倍量の8M尿素-2% SDS-10% 2-メルカプトエタノール-50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) あるいは8M尿素-2% SDS-10% 2-メルカプトエタノール-50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で溶解し、沸騰水中で3分間加熱した後、氷水中で急冷したものを試料とし、5%のポリアクリルアミドゲルを用いてWeberとOsbornらの方法⁹⁾に従って泳動した。

デンシトメトリ 島津製作所製DUAL-WAVELENGTH FLYING-SPOTSCANNER CS-9000を用いて波長640 nmで泳動ゲルの吸光度を測定し、全染色強度に対する各タンパク質バンドの相対染色強度 (%) を求めた。

結果および考察

水晒し工程 魚肉の水晒し方法として、水溶性画分の除去効果の高いといわれているアルカリ塩水晒し¹¹⁾、ゲル増強効果の見られるピロリン酸塩晒し^{3,4,12-14)}等が知られているので、これらの晒処理をトカゲエソ肉に施し、その塩すり身の40℃でのHC分解に対する影響を調べた。その結果はFig. 1に示したように、いずれの晒処理をした肉 (Fig. 1b, c) も無晒肉 (Fig. 1a) と同様に、その加熱時間に応じてHCが著しく減少し、HCより低分子側に新たなバンドの生成が認められた。次に、アクトミオシン (AM) を可逆的に解離させるとの報告^{15,16)}があるピロリン酸塩-MgCl₂晒しを施すと晒し効果があがるのではないかと考え、この処理効果を検討

Fig. 1. Effect of washing medium on the degradation of myosin heavy chain in tokageeso meat paste upon heating at 40°C. SDS-PAGE Patterns of tokageeso *Saurida elongata* meat washed with various solutions and heated at 40°C in the presence of 3% NaCl. a: unwashed meat, b: alkaline-washed meat, c: ppNa-washed meat, d: ppNa-MgCl₂-washed meat

した。しかし、Fig. 1d に示しように、HC 分解は先の晒処理と同様に起こり、改善効果が認められなかった。このことから、HC 分解因子は晒処理工程では除去されないものであり、筋原繊維に強く結合しているか、あるいは晒液に溶解しない成分であると推測した。ピロリン酸塩晒しによるトカゲエソ肉のゲル形成能の向上が報告^{3,4)}されているが、本実験結果からそれは HC 分解の抑制によるものではないと考えた。

播潰工程 かまぼこ製造に必須の食塩の 40℃での HC 分解に及ぼす影響について調べた。その結果、Fig. 2 に示したように、食塩濃度が高くなるにつれて HC の量が減少するとともに HC より低分子側の成分の量が増加した。すなわち、すり身の 40℃加熱時の HC 分解は食塩の存在によって促進された。このことは、食塩の存在によって HC 分解因子が活性化されるためか、あるいは HC 自身が食塩に溶解している状態の方が分解を受けやすいためか、あるいは両者によるためと思われる。

Fig. 2. SDS-PAGE patterns of saline-washed meat (2% protein, 3% NaCl) gels heated at 40℃ for 2 h with various concentrations of NaCl. UH, unheated meat paste without NaCl

Fig. 3. Effect of pH on the degradation of myosin heavy chain in saline-washed meat (2% protein, 3% NaCl). heated at 40℃ for 2 h. HC<, polymer substances larger than HC on SDS-PAGE patterns; HC, myosin heavy chain; HC~Ac, the substances between HC and actin — heated only at 80℃ for 20 min in water bath

HC 分解に対するすり身 pH の影響をみるため、pH 5～9 に調整した晒肉塩すり身を 40℃で 2 時間加熱した。その SDS-PAGE 像の全染色強度に対する三成分、すなわち HC より高分子物（以下 HC<成分）、HC 成分、および HC とアクチン（Ac）との間の成分（以下 HC~Ac 成分）の相対染色強度をデンストメトリーで解析し Fig. 3 に示した。HC<成分はいずれの pH でもあまり変化が認められなかったが、HC 成分は pH 7-8 付近で最も減少しており、その HC の分解物と考えられる HC~Ac 成分はこの pH 域で最も多かった。従って、HC の分解が最も強いのは pH 7-8 の弱アルカリ性付近であることが分かった。この場合も、弱アルカリ性域での HC 分解因子の活性化、あるいは HC 自身の構造変化、あるいはこれら両方の要因によるものと思われる。すり身の pH を最もゲル形成能が強いとされている中性付近に調整すると HC 分解を受けやすくなると言える。

冷凍すり身にはタンパク質変性防止剤として、サッカロース、ソルビトール、ピロリン酸塩が含まれており、また、ねり製品の焼き色をつけるために播潰時にみりんが添加される。これらの添加物の HC 分解に対する影響を調べるため、一般に用いられる程度の量だけ晒肉塩すり身に加えて、HC 分解挙動を調べた。その結果、いずれの添加物を加えた場合も無添加の場合と同様、HC の分解が生じ、その抑制効果は認められなかった(図略)。従って、糖類やピロリン酸塩に HC 分解抑制効果がないことから、トカゲエソ肉に市販冷凍すり身を混合して用いても、また、変性防止剤として糖類を添加した冷凍すり身を調製しても加温中の HC 分解を阻止できないと判断した。

以上のことから、播潰工程で食塩を添加することおよび pH を中性的ないし弱アルカリ性付近に調節することは 40℃で HC 分解を受けやすくなること、また、タンパ

ク質冷凍変性防止剤やみりんを添加しても分解は阻止できないことが明らかになった。

加熱工程 かまぼこ製造時にはスチームによる蒸煮や電熱による焙焼などの加熱方法が用いられているが、これらは著者らが一連の実験で行ってきた湯浴による加熱とは異なり、当然、熱の伝わる速度が異なると予想されるので、このことを確かめるため水蒸気飽和に近い状態のエアバス中で加熱した場合のゲル中心温度の上昇と湯浴中の場合とを比較した。その結果、Fig. 4 に示したように、30, 40 および 50℃ のいずれの加熱温度でもエア

バス中の方が湯浴中に比べてゲル中心温度の上昇が緩慢であった。したがって、50℃ で予備加熱する場合、エアバス中では湯浴中より 40℃ 付近での停滞時間が長いことから HC の分解程度が大きいこと、また、40℃ では逆に湯浴中の方がエアバス中より速く 40℃ 付近に達するので湯浴中の方が HC 分解が大きいものと予想される。エアバスおよび湯浴中のいずれの加熱方法においても HC 分解とゲル強度の低下が対応するのかを知る必要がある。

そこでまず、エアバスおよび湯浴中で予備加熱した二段加熱ゲルの強度を調べ、ゲル形成に及ぼす予備加熱方法の影響を検討した。その結果を Fig. 5 に示した。30℃ 加熱の場合、エアバス中および湯浴中ともに予備加熱時間とともにゲルの増強効果が認められた。ただし、湯浴中では 60 分以降減少した。40℃ 加熱の場合、エアバス中では 60 分以上加熱すると増強効果が減少し、120 分の加熱で効果がなくなり、温度上昇の大きい湯浴中では 30 分以上の加熱で増強効果が減少し、60 分で効果がなくなった。エアバス中よりも湯浴中の方が速くゲルが劣化した。50℃ 加熱の場合、エアバス中では 30 分以上加熱すると増強効果が減少し、60 分で効果がなくなったが、湯浴中では 10 分以降加熱時間とともにゲル強度は弱くなり、30 分で予備加熱効果がなくなり、その後は徐々に減少した。エアバス中よりも湯浴中の方が速くゲルが劣化した。いずれの温度においても湯浴中の方が速くゲル強度が強くなるが、ゲルの劣化も速く起こることが分かった。

エアバス中と湯浴中とでゲル形成能が異なるのは HC の分解並びに高分子化の程度の違いによるのではと考え、加熱ゲルの SDS-PAGE 像を調べ、HC 成分、HC 成分および HC~Ac 成分の挙動を Fig. 6 に示した。

30℃ 加熱の場合、HC 成分はエアバス中では 60 分まで増加し、その後一定であったが、湯浴中では 30 分まで増加するが、その後減少した。一旦生成された HC

Fig. 4. Rising curves of the central temperature in gels heated in air bath (broken lines) with saturated vapor and in water bath (solid lines) at various temperatures. Meat paste (8% protein, 3% NaCl) was stuffed into stainless steel tubes (3.1 cm in diameter, 3.0 cm in height) and wrapped with cooking film. The central temperature of the samples was measured by using a thermometer.

Fig. 5. Effect of preheating conditions on the gel strength of two-step heating gels. Two-step heating gels were prepared by heating at 80℃ for 20 min in water bath after preheating at various temperatures (30, 40, 50℃) in air bath and water bath. ●—● AB, air bath ○---○ WB, water heated only at 80℃ for 20 min in water bath

成分は加熱時間が長くなると分解を受けるものと考えられる。HC 成分の減少は、湯浴中の方がエアバス中よりも著しかった。HC~Ac 成分はエアバス中ではほとんど変化がなかったが、湯浴中では加熱時間と共に増加した。30℃ 加熱では湯浴中の方がエアバスよりも HC 分解を受けやすいことが分かった。このことは湯浴中の方がエアバス中よりもゲルの中心温度が早く 30℃ に達し、40℃ に近くなるためと考えられる。

40℃ 加熱の場合、HC< 成分はエアバス中では 30 分後に増加し、その後ほぼ一定であったが、湯浴中では 30 分までいったん増加するものの 30℃ の場合と同様その後減少した。HC 成分はエアバス中および湯浴中で共に同様に減少した。HC~Ac 成分は、湯浴中の方がエアバス中よりも多く生成した。このことから、40℃ 加熱でも湯浴中の方がエアバス中よりも HC 分解を強く受

けていることが分かった。これは湯浴中の方が速くゲルの温度が 40℃ に達するためと考えられる。

50℃ 加熱の場合、HC< 成分はエアバス中では 30 分まで増加し、60 分でもとの量まで減少し、その後ほぼ一定であったが、湯浴中では、ほとんど変化がなかった。HC の高分子化は肉中のトランスグルタミナーゼによると考えられ、50℃ ではトランスグルタミナーゼが失活するため、¹⁷⁾ HC の高分子化が進まなくなるものと推察した。HC 成分はエアバス中の方が湯浴中よりも減少が大きかった。HC~Ac 成分は、エアバスでは 60 分まで増加し、その後ほぼ一定となったが、湯浴中では 30 分まで急増し、その後はほぼ一定であった。HC 分解の進行はエアバス中では 60 分以降、湯浴中では 30 分以降ほとんど止まっていた。HC 分解因子は 50℃ ではほとんど活性がないものと推察した。なお、エアバス中での HC~Ac 成分の生成量が湯浴中よりも多かったことから、50℃ 加熱では、40℃ 以下の加熱の場合とは逆に、エアバス中の方が湯浴中よりも HC 分解を強く受けることが分かった。これはエアバス中の方が 40℃ 付近での通過時間が長いためと考えられる。

Fig. 5 および 6 から、HC の高分子化と分解およびゲル強度の三者間には密接な関係があることが示唆されたので、40℃ の場合を取り上げ、これらの関係をわかりやすくするため、HC~Ac 成分量と HC< 成分の関係および HC~Ac 成分量とゲル強度の関係を Fig. 7 のように表わした。これから、いずれの加熱方法においても、ゲル強度は単に HC 分解の進行とともに低下するのではなく、HC の高分子化が進行しているとゲル強度は増加し、更に HC 分解が進み、一旦形成された高分子化物も分解されて少なくなっていくとゲル強度は低下することが分かった。

以上の結果、かまぼこゲル形成能はすり身の予備加熱時における 40℃ 付近への到達速度、この温度での滞留時間、およびこの温度の通過速度によって影響されるミオシンの架橋反応、分解反応が複合して決定しているこ

Fig. 6. Effect of preheating condition on the protein composition of two-step heating gel. The behavior of protein components in two-step heating gels was the same as in Fig. 5. HC<, polymer substances larger than HC on SDS-PAGE patterns; HC, myosin heavy chain; HC~Ac, the substances between HC and actin ●—● AB, air bath ○---○ WB, water

Fig. 7. Relationship between gel strength and protein components of two-step heating gels. ●—● AB ○---○ WB

とが確認された。

これらの結果から, トカゲエソ肉に代表されるような 40°C 付近で HC 分解を著しく生じる魚肉すり身からかまぼこを調製する場合, 坐らせるなら低温 (30°C) で長時間 (60 分程度) 行い 40°C での加熱を避けるか, あるいは, 高温 (40 および 50°C) で短時間 (30 分程度) 行うことによって 40°C 付近の温度を速く通過するように加熱方法および予備加熱温度を設定することが重要であると結論した。

なお, 本実験からトカゲエソ晒肉中の HC 分解因子は NaCl で促進され, 中性付近の pH で且つ 40°C 付近で良く作用する筋原繊維結合型プロテアーゼと推察した。また, 先に⁶⁾トカゲエソ晒肉の 40°C での HC 分解がセリンプロテアーゼインヒビターおよびシステインプロテアーゼインヒビターのいずれによっても抑制されたことから, 晒肉中にセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ両者が存在するものと推察した。近年, ワニエソについて Cao ら⁵⁾によって筋原繊維結合型のセリンプロテアーゼが精製され, この酵素の性質は, 至適 pH 7-8, 至適温度 50°C と報告されている。この条件はトカゲエソ肉の HC 分解条件と似ていることから, トカゲエソ肉中のセリンタイプのプロテアーゼはワニエソ中のものと類似の可能性がある。この点については今後の課題としたい。

要 約

従来提唱されているいずれの晒処理によっても HC 分解は抑制されなかった。ゲル化に必須の塩化ナトリウムの添加は HC 分解を促進したが, 一般的すり身の添加物は HC 分解を抑制しなかった。また, 弱アルカリ性で最も強く HC が分解された。さらに, 肉糊加熱中の 40°C 付近の通過時間が HC 分解ならびにゲル形成能に強く影響した。

実際のかまぼこ製造工程は上記の HC 分解が起きやすい条件であるため, 加熱方法によっては, HC 分解が強く起き, ゲル物性に影響することが明らかとなった。よって, トカゲエソ肉のように 40°C で戻りを起こす魚をねり製品原料として用いる際には加熱温度と速度に注意が必要と思われる。

文 献

- 1) 岡 弘康. エソのかまぼこ形成能. 水産ねり製品技術研究会誌 1987; **13**: 241-250.
- 2) Suwansakornkul P, Itoh Y, Hara S, Obatake A. The gel-forming characteristics of lizardfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1029-1037.
- 3) 岡 弘康, 安田 傑, 西川清文. 水産ねり製品の原料魚と品質に関する研究 (第 7 報) ピロリン酸塩晒しによる弾力の増強効果. 愛媛県工技研究報告 1985; **23**: 83-88.
- 4) 岡 弘康, 安田 傑, 西川清文. 水産ねり製品の原料魚と品質に関する研究 (第 8 報) ピロリン酸塩晒しによるトカゲエソ肉のたんぱく溶出性とかまぼこ形成性. 愛媛県工技研究報告 1985; **23**: 89-95.
- 5) Cao M-J, Osatomi K, Hara K, Ishihara T. Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2000; **125**: 255-264.
- 6) Suwansakornkul P, Itoh Y, Hara S, Obatake A. Identification of proteolytic activities of gel-degradation factors in three lizardfish species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1039-1045.
- 7) Itoh Y, Maekawa T, Suwansakornkul P, Obatake A. Seasonal variations of gel-forming characteristics of three lizardfish species. *Fish. Sci.* 1995; **61**: 942-947.
- 8) Itoh Y, Maekawa T, Suwansakornkul P, Obatake A. The effects of meat-washing on the gel formation and the polymerizing and degrading behavior of lizardfish meat proteins at 40 and 60°C. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 286-290.
- 9) Shimizu Y, Machida R, Takenami S. Species variation in the gel-forming characteristics of fish meat paste. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1981; **56**: 1485-1492.
- 10) Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969; **224**: 4406-4412.
- 11) 志水 寛. 特許公報 1965 ; 昭 40-21224.
- 12) 田元 馨. 北水試報告 1965; **3**: 57.
- 13) 岡 弘康, 大野一仁. 水産ねり製品の原料魚と品質に関する研究 (第 10 報) 瀬戸内海産トカゲエソの鮮度, 凍結条件とかまぼこ形成能. 愛媛県工技研究報告 1987; **25**: 45-55.
- 14) 岡 弘康, 大野一仁. 瀬戸内海産トカゲエソの鮮度, 凍結条件とかまぼこ形成能. 水産ねり製品技術研究会誌 1987; **13**: 152-163.
- 15) 八木 浩, 新井健一. ピロリン酸塩と MgCl₂ の存在下で起るコイ・ミオシン B の変性機構. 日水誌 1986; **52**: 1573-1580.
- 16) 岩見史郎, 新井健一. 重合リン酸塩によって起こる MgCl₂ の存在下のコイ・ミオシン B 中のアクチンの変性. 日水誌 1988; **54**: 2009-2017.
- 17) Takeda H, Seki N. Enzyme-catalyzed cross-linking and degradation of myosin heavy chain in walleye pollack surimi paste during setting. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 462-467.