

サメ筋肉ミオシン B の加熱ゲル形成性の測定法について

御木 英 昌, 上 西 由 翁, 西 元 諄 一

Method of Measurement for Heat-induced Gel Forming Ability in Myosin B prepared from Shark muscle

Hidemasa Miki*, Yoshio Kaminishi*, and Jun-ichi Nishimoto*

Keywords : Rigidity, shark muscle, myosin B, jelly strength, heat-induced gel

Abstract

The gel forming ability of heating myosin B (MB) prepared from shark muscle was investigated by a slightly modified apparatus of Saunders and Ward's method for measuring rigidity (R).

The MB-gels, so-called heat-induced gels of MB, were obtained by heating MB-sol (protein concentration : 20-60mg/g) of pH 5.0-7.5 at 80°C for 20 min in a water-bath and then cooled at 0-3°C for 20 min in an ice-bath. The maximal R of MB-gel was equivalent to the R of that after heating MB-sol of pH 6.0. For the MB-sol of pH 5.0-5.5, MB-gels were unformed by heating. It seemed that this property was derived from the effect of the isoelectric point of this protein. An increase of protein concentration enhanced the gel-R. A plot of double logarithms of protein concentration and gel-R gave straight lines at pH 6.0 and 6.8. The heating temperature required to obtain the maximal R of MB-gel was 70°C among degrees from 40°C to 90°C at pH 6.0 and 6.8 in MB-sol.

Further, the R of MB-gel was compared with the jelly strength of Kamaboko. As a result, the R of MB-gel mostly corresponded to jelly strength of Kamaboko.

We may conclude that the gel forming ability of shark muscle is estimated from R of pure MB for a molecular model instead of making Kamaboko practically.

魚類筋肉から調製したミオシン B は、畜肉に比べ Ca^{2+} ATPase 活性の熱に対する不安定さや、また、ある魚種にとっては坐りといわれるタンパク質の凝集が起こるなどその取扱いに慎重さを要する。

畜肉および魚類筋肉から調製したミオシン B の加熱ゲル形成性を判断する実験装置として、石下ら¹⁾の帯型粘度計や丹羽ら²⁾の帯型粘度計改良型、また、伊藤ら³⁾の Saunders & Ward 改良法などが紹介された。

先に、帯型粘度計を用いてサメ筋肉ミオシン B の加熱ゲル形成性を測定したが、測定に

* 鹿児島大学水産学部保蔵学研究室 (Laboratory of Food Preservation, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4, Kagoshima, 890 Japan)

熟練を要すること、測定値のばらつきが大きいこと、低濃度のタンパク質が対象となっていること、さらに測定に長時間を必要とすることなどの難点があった。

本報では、サメ筋肉のゲル形成機構を解明するための分子レベルのモデル系を確立するために、サメ・ミオシン B の加熱ゲル形成性を短時間に、しかも多くの検体を測定できるよう企画し Saunders & Ward 法⁴⁾を一部改良した測定装置を吟味した。さらに、この改良法によるミオシン B の加熱ゲル形成性とかまぼこのゼリー強度との関連性についても検討した。

試料魚及び実験方法

試料魚

ホシザメ *Mustelus manazo* は、鹿児島県川内市沖で水揚げされたもので、 -25°C で保管され、3 カ月以内に使用した。ネズミザメ *Lammadi tropis*, ヨゴレ *Carcharhinus longimanus*, アオザメ *Isurus glaucus*, カマスサワラ *Acanthocvbium solandri* は練習船で漁獲後、 -25°C で凍結貯蔵されたものを、また、エソ *Saurida undosquimis* は鹿児島中央市場より購入し、 -70°C で凍結貯蔵したものを用いた。

ミオシン B の調製

Fig. 1 に示したように、新井の方法⁵⁾に準じてミオシン B を抽出した。最後に得られた沈殿は、最終イオン強度が0.5 (0.45 M KCl-phosphate buffer) になるように調整した。また、ミオシン B に気泡が入るのをさけるため、 $8,000\times g$ で10分間遠心分離した後サンプル管にミオシン B を注入した。タンパク質の定量は Gornall 法⁶⁾によった。

ゲル剛性率の測定

Saunders & Ward の装置を一部改良して行った。改良点は、Fig. 2 に示すように短時間で多くの検体が測定できるようにサンプル管部分を容易に交換はめ込みができるようにカートリッジ式にしたことである。なお、本装置の作成に当たっては毛管部にオストワルド粘度計 (No. 3) を、サンプル管部にガラス接手管 (共通球面摺合わせ) を利用した。また、測定誤差を最小にするため、ゲル変形に伴う毛細管内の液量変位 (h) を1-5 mmまでそれぞれ1 mmごとに加圧されたマンオメーター変位 (p) を測定し、最小2乗法にてその傾きを求め Fig. 2 に示す計算式に代入した。なお、今回の測定では、すべてにおいて h と p の間は相関係数 $r > 0.99$ であり、「ずり弾性率は、微小変形下でのひずみ角である」という定義⁷⁾でゲルの変形を考えた場合、5 mmまでの加圧に対しては、安定した変形角が与えられていたことになる。

計算式は $R = Pr_1^4 / 8lr_2^2h$ である。ただし、 R は剛性率 (dyn/cm^2) *、 P は試料にかかった圧力、 r_1 はサンプル管の半径 (cm)、 r_2 は毛細管の半径、 l は試料の長さ (cm)、 h は試料のひずみによって生じる指標物質 (CCl_4) のメニスカスの移動距離 (cm) である。($r_1 = 0.45$, $r_2 = 0.05$, $l = 3.0$ (cm))

* $\text{dyn}/\text{cm}^2 = \text{dPa}$ (SI 単位)

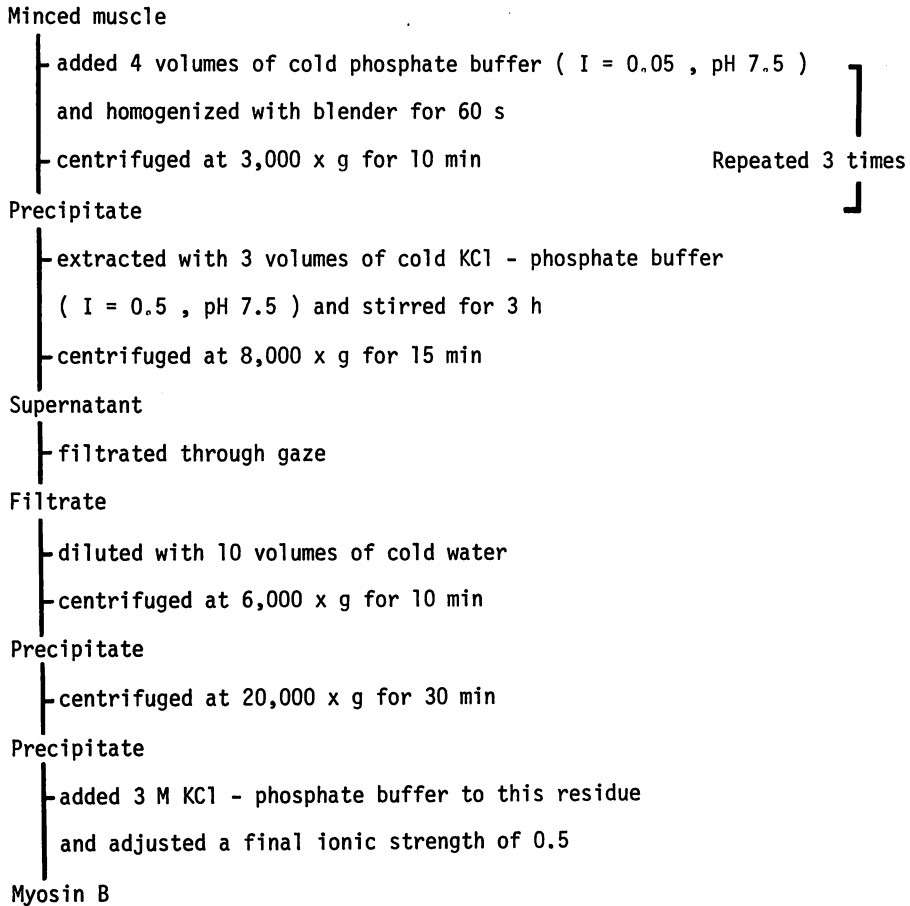


Fig. 1. Method of preparation of myosin B from shark muscle.

ミオシン B の加熱ゲルの調製

サンプル管に高さ3.0 (cm) になるまでミオシン B を流入し, 所定の温度で所定の時間加熱した後, 氷水中にて20分間冷却した。このサンプル管を測定装置の共通摺合わせ接手管にセットし, 20 ± 1 °C の恒温水中で5分間放置した後, 試料をピストンビューレットで加圧し, それぞれの毛細管移動距離に対応するマンメーターの変位を測定した。

かまぼこの調製

かまぼこの調製は, 志水の方法⁸⁾に従った。水分含量83%, pH 6.8 に調整し, 90°C で30分間加熱した後, 氷水中にて急冷し5°C で一夜放置した。ゼリー強度は, 直径8mmの球状プランジャーを用いて, 山本式フードチェッカー (K. K. サン科学) にて破断強度と凹みを測定し, 両者の積から求めた。

結果および考察

pH の影響

pH 調整は, pH 5.0-5.5ではクエン酸緩衝液, pH 6.0-7.5ではリン酸緩衝液を用いたが, それぞれの pH における剛性率の測定結果は Fig. 3 に示すように, pH 6.0において測定可能なゲルとなり, pH が上昇するにしたがって剛性率は低下した。pH 5.0-5.5では, ミオシン B の加熱によって, 液と凝固物が分離白濁し測定不可能であった。この原因は, Table 1 に示すように pH 6.0 においてクエン酸, リン酸両緩衝液とも近似値が得られたことから, 試薬の影響というより pH に依存していると考えられ, ミオシン B の等電点が pH 5.0-5.5 にあるためと推測された。pH 6.0におけるゲル剛性率最大値は, 石下ら¹⁾のウサギ・ミオシン B, 伊藤ら³⁾のコイ・ミオシン B の結果と同様であった。

ミオシン B 濃度の影響

濃度20-60 (mg/g) の範囲において, ミオシン B を80℃, 20分間加熱した場合の剛性率とタンパク質濃度との関係を求めた。両者の対数プロットは Fig. 4 に示すように, 傾き 1.90の直線関係を示した。これは, ミオシン B 濃度が高くなるにしたがって剛性率も順次上昇することを示している。また pH 6.8の場合も pH 6.0と同様の傾向を示し (図示していない), 対数プロットは直線になり, その傾きは2.08で, pH 6.0のものに近かった。ミオシ

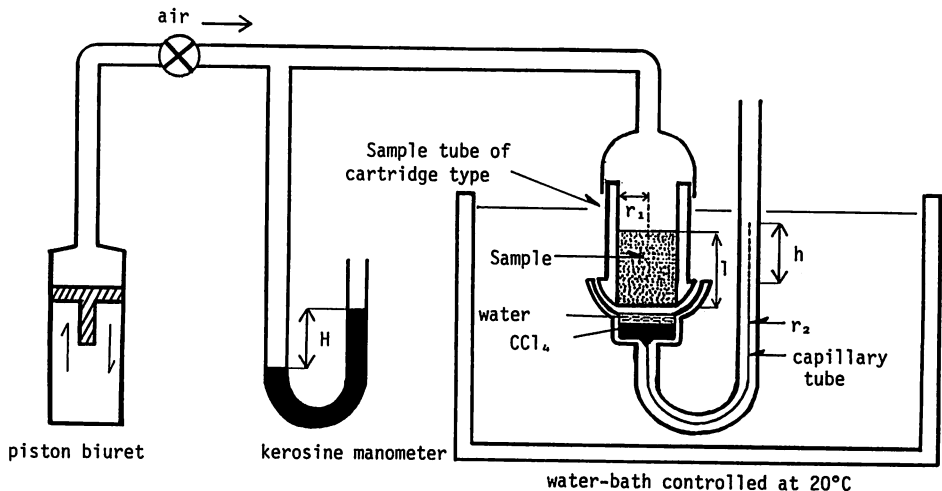


Fig. 2. Schematic diagram of apparatus used for the rigidity measurement of heat-induced gel.

$$R = \frac{P \times r_1^4}{8 \times l \times r_2^4 \times h}$$

R : The rigidity of heat-induced gel. (dyn/cm²)

l : Length of sample. (cm)

r₁ : Inside radius of sample. (cm)

r₂ : Inside radius of capillary tube. (cm)

h : Recovered displacement of index. (cm)

P : H × 980 × γ (dyn/cm²)

H : Differential distance. (cm)

γ : Density of kerosine, 0.8 (g/cm³)

ン B 濃度が20 (mg/g) 以下の時には, ゲルが脆弱なため, pH 6.0と pH 6.8いずれの場合も測定が不可能だった。剛性率の変動が最も小さかった30-40 (mg/g) のミオシン B 濃度に試料を調製すればよいと思われた。

加熱時間の影響

80℃で加熱した時のミオシン B の剛性率に及ぼす加熱時間の影響を Fig. 5 に示した。ゲルは最初の 5 分間でかなり形成され, その後, 60分間までゆるやかな上昇を示した。Fig. 6 は, サンプル管にミオシン B を注入した後, 80℃で20分間加熱し, その後 0℃,

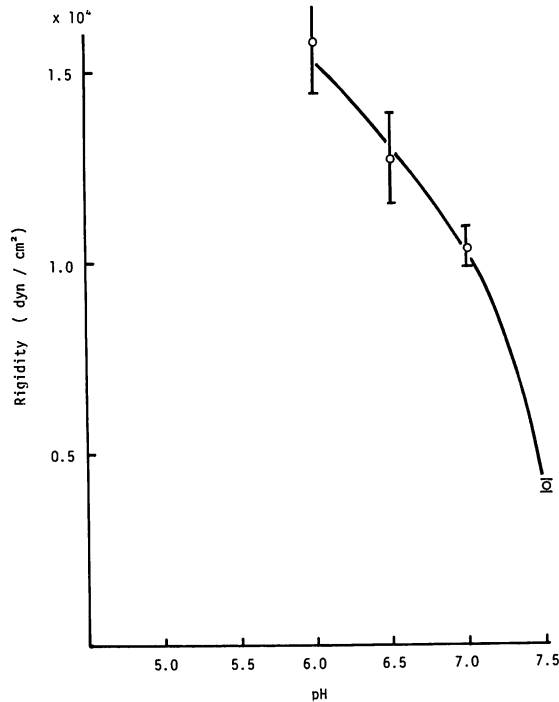


Fig. 3 Effect of pH on gel formation of myosin B from shark muscle. Myosin B (39.4mg/g) was heated at 80℃ for 20 min and cooled at 0-3℃ for 20 min. Citrate buffer was used for myosin B adjusted pH from 5.0 to 5.5 and phosphate buffer was used for myosin B adjusted pH from 6.0 to 7.5.

Table 1. Effect of buffers on the gel formation of myosin B from shark muscle.

Buffer	Rigidity ($R \times 10^4 \text{ dyn/cm}^2$)
20mM Phosphate, pH 6.0	1.40
20mM Citrate, pH 6.0	1.30

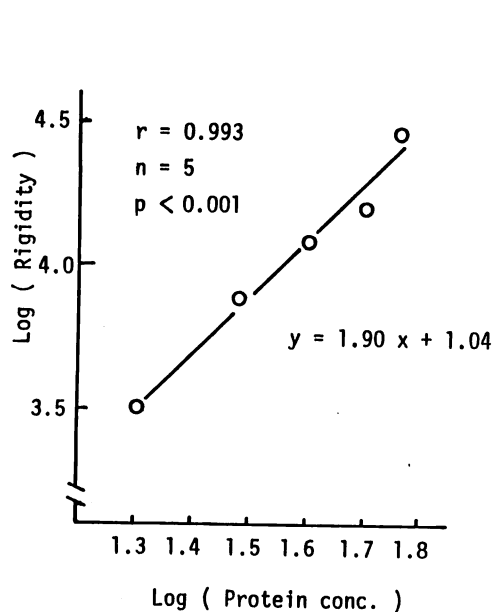


Fig. 4 Double logarithmic plots for protein concentration and rigidity of heat-induced gel of myosin B. Myosin B with pH 6.0 was heated at 80°C for 20 min and cooled at 0-3°C for 20 min.

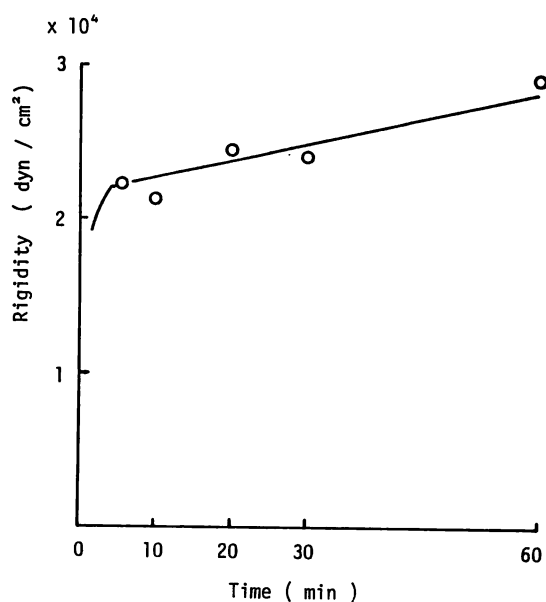


Fig. 5 Effect of heating time on gel formation of myosin B from shark muscle. Myosin B (53.5mg/g) adjusted at pH 6.0 was heated at 80°C for various lengths of time and cooled at 0-3°C for 20 min.

20分間冷却した際のサンプル管内の中心温度を測定した結果である。この加熱温度分布図と比較して、加熱ゲル形成性は温度履歴に密接に関係していた。ここには図示していないが、pH 6.8の場合も同様の結果が得られた。

加熱温度の影響

ミオシン B の加熱ゲル形成性に及ぼす加熱温度の影響を調べた結果、Fig. 7 のように、70°C に最大ゲル剛性率値を示した。また、測定可能なゲルが形成されたのは40°C 以上で、30°C 以下の加熱ではゲルは形成されずに測定不可能だった。図示していないが、pH 6.8の場合も同様の傾向であった。70°C で最大ゲル剛性率値が得られた理由については、今後さらに検討していく必要があると思われる。

以上の結果から、80°C で加熱したときのサメ・ミオシン B のゲル形成性は pH 6.0 で最大値を示し、加熱時間で5分以上、タンパク質濃度で20 (mg/g) 以上の条件でゲルが形成されることがわかった。20分間の加熱時間で、pH 6.0 と pH 6.8 とともに加熱温度は70°C で最大ゲル剛性率を示した。よって、ミオシン B の加熱ゲル形成性の測定は、加熱時間20分間、タンパク質濃度30-40 (mg/g) 加熱温度70°C の条件を用いた。pH は、かまぼこの製造条件である6.8で行った。

また、Saunders & Ward 改良法は、帯型粘度計と比較して、あまり熟練を要さないことや短時間に多くの試料を測定できること、測定値の再現性が高いなどの利点がみられた。た

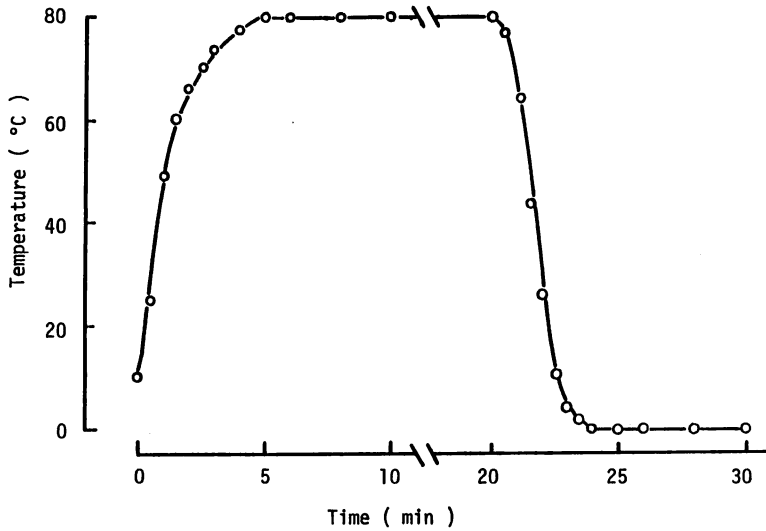


Fig. 6 Distribution of central temperature in the sample tube on heating myosin B from shark muscle. The sample tube was heated at 80°C for 20 min in a water-bath and cooled at 0°C for 20 min in an ice-bath.

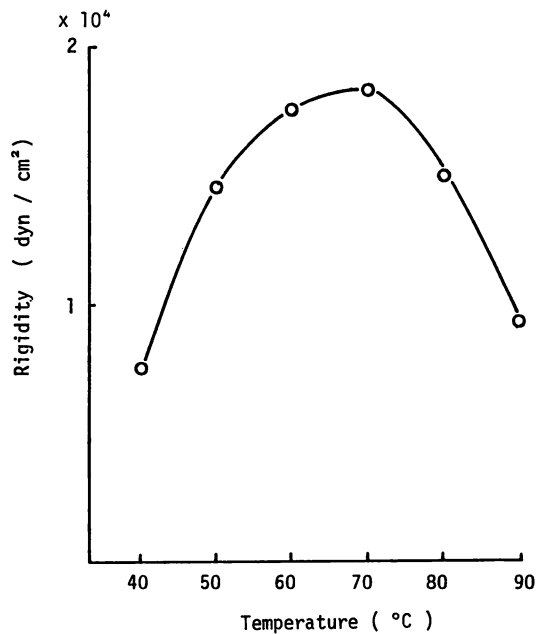


Fig. 7. Effect of heating temperature on gel formation of myosin B from shark muscle. Myosin B (47.0mg/g) adjusted at pH 6.0 was heated at given temperature for 20 min and cooled at 0-3°C for 20 min.

だし、本装置では剛性率の絶対値というよりはむしろそれに近い相対値を測定しているといえる。剛性率の絶対値を求めるためには、標準物質を測定して本装置に対する補正係数を決定する必要があり、今後の検討課題である。

改良装置による加熱ミオシン B の剛性率とかまぼこのゼリー強度との関係

種々のサメ筋肉から調製したかまぼこのゼリー強度とサメ筋肉ミオシン B の加熱ゲル剛性率との関連性を調べた。ゲル剛性率とゼリー強度は、同一魚体から抽出および調製されたミオシン B とすり身に100 mM-350 mM の尿素を添加し、尿素無添加区を100としてそれぞれの相対値を示している。ゲル剛性率の測定は、測定時間の関係より、タンパク質濃度は水分含量92% (pH 6.8) に調整してある。また、加熱は70℃で20分間、氷水中にて20分間冷却したものを測定した。その結果、Fig. 8 に示すように、各魚種に対して両者の間に正の相関関係が認められ、相関係数はネズミザメ; 0.77, ヨゴレ; 0.72, アオザメ; 0.89, エン; 0.92, カマスサワラ; 0.96と高いものであった。

Saunders & Ward 改良法で得られたミオシン B の加熱ゲル剛性率は、同一魚体から調製したかまぼこのゼリー強度と強い相関性を示し、ゲル剛性率を測定することで、実際にかまぼこを調製しなくてもかまぼこのゼリー強度を推定することが可能となった。したがって、本研究によるゲル剛性率測定装置は、魚肉の加熱によるゲル化機構 (ゲル形成性) をミオシ

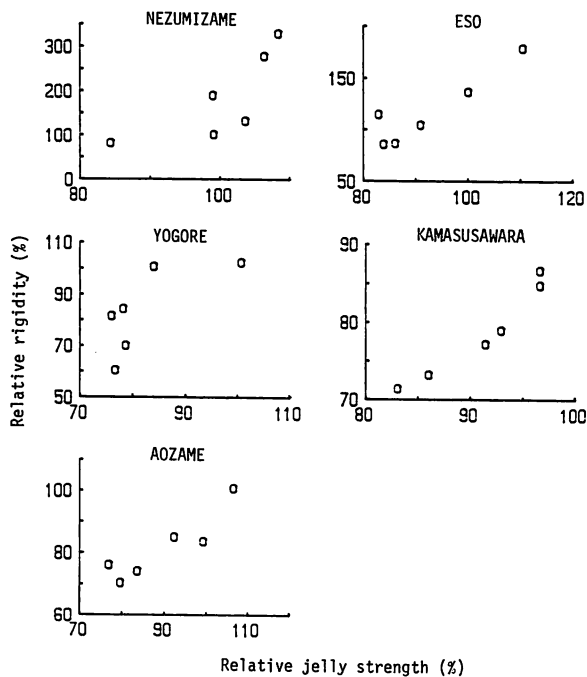


Fig. 8. Relationship between jelly strength of Kamaboko and rigidity of heat-induced gel of myosin B. In preparing Kamaboko, surimi adjusted to 83% moisture (pH 6.0) was heated at 90℃ for 30 min and cooled at 0-3℃ for 30 min. Myosin B adjusted to 92% moisture (pH 6.8) was heated at 70℃ for 20 min and cooled at 0-3℃ for 20 min. The graph indicated the relative values of jelly strength and of rigidity of samples added urea from 100 mM to 350 mM to the control (fraction of non-added urea.)

ン B さらには分子レベルで解明するために利用できるものと思われた。
本研究を行うにあたり, ご協力いただいた進藤 稯氏に謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) T. Yasui, M. Ishioroshi, H. Nakano, and K. Samejima(1979): Changes in Shear Modulus, Ultrastructure and Spin-spin Relaxation Times of Water Associated with Heat-induced Gelation of Myosin. *J. Food Sci.*, **44**, 1201-1211.
- 2) E. Niwa, Y. Matsubara, and I. Hamada(1982): Hydrogen and Other Polar Bondings in Fish Flesh Gel and Setting Gel, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 667-670.
- 3) 伊藤慶明, 吉中禮二, 池田静徳 (1979): コイアクトミオシンのゲル形成能. 日水誌, **45**, 73-77.
- 4) P. R. Saunders and A. G. Ward(1954): in "Proceedings of the Second International Congress on Rheology" (ed. by V. G. W. Harrison), pp. 284-290, Butterworths Scientific Publications, London.
- 5) 新井健一 (1974): 魚類筋肉タンパク質の調製法. "水産生物化学・食品学実験書" (斉藤恒行, 内山 均, 梅本 滋, 河端俊治 編), pp. 179-188 (恒星社厚生閣, 東京).
- 6) 菅原 潔, 副島正美 (1981): "タンパク質の定量法", 第 2 版, pp. 79-82 (学会出版センター, 東京).
- 7) H. G. Muller (1977): "食品レオロジー入門" (松本幸雄訳), pp. 14-15 (医歯薬出版, 東京).
- 8) 志水 寛 (1974): 魚肉すり身ゲル形成能の魚種特異性. 日水誌, **40**, 175-179.