

冷凍マグロ魚肉の解凍中における
タンパク質変性の進行とドリップ流出量の増大

小林 りか* 田村 朝章* 渡辺 学* 鈴木 徹*†

* 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科食機能保全科学専攻 (108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

要 約

食品冷凍において、凍結、低温貯蔵、解凍といった一連の冷凍操作すべてが品質劣化に影響を与える。特に大部分をタンパク質で構成される魚介類の品質は、タンパク質の冷凍変性に大きく影響を受ける。そのような中、解凍過程におけるタンパク質変性挙動に関する研究は、凍結貯蔵過程と比較してあまり着目されてこなかった。そこで本研究では、マグロ魚肉の解凍過程でのタンパク質変性の反応速度を Ca-ATPase 活性値を指標として算出し、解凍中保持温度による影響を議論した。同時にドリップ流出量を測定して両者の相関性を検証した。結果として、10°C以下の解凍中保持温度によってタンパク質変性進行は抑制され、Ca-ATPase 比活性値とドリップロスには緩やかな相関関係が確認された。

キーワード: 解凍, タンパク質変性, ドリップロス, マグロ魚肉, Ca-ATPase 比活性値

1. 緒 言

食品冷凍は、優れた食品保存技術の一つであり、生食される魚介類にとって加工度が低い状態で保存期間を飛躍的に延長できるという大きな利点を持っている。しかしながら、食品は凍結、低温貯蔵、解凍といった一連の冷凍操作を経ることでテクスチャーの劣化、色調の劣化、ドリップの流出などといった品質劣化が、食品の種類によって程度は異なるが必ず生ずる。これら変化は、物理的または生化学的な多数の要因が凍結、低温貯蔵、解凍それぞれの過程において複雑に作用し合って引き起こされるので、品質劣化メカニズムをすべて理解することは難しい。しかし、そのような中で、タンパク質の冷凍変性が魚介類の品質劣化に影響を及ぼすことが既往研究によって明らかにされており¹⁾、特に凍結および低温貯蔵過程での魚肉タンパク質の変性についての研究が多い。魚肉の場合、冷凍操作中のタンパク質変性は代表的に筋原繊維の Ca-ATPase 比活性値の変化や SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量の変化²⁾ま

たは Differential Scanning Calorimetry (DSC) 測定による熱量変化³⁾によって求められる。それら既往研究では、タンパク質変性は凍結速度には大きく影響を受けない、すなわち凍結過程ではタンパク質変性はあまり進行しないことが明らかにされている。しかしながら、低温貯蔵過程では貯蔵期間が長くなるほど、そして貯蔵温度が高いほど変性が進むことが報告されている⁴⁾、他方、解凍過程においても、マサバ筋肉のタンパク質変性が緩慢な解凍によって進むことが報告されている⁵⁾。また阿部等⁷⁾によって、冷凍マサバや冷凍キハダマグロの解凍後のドリップ流出量が Ca-ATPase 活性値の低下と直線的に対応することが報告されている。すなわち、解凍中に進行するタンパク質変性がドリップロスに影響することが明らかとなった。

しかしながら、阿部等の研究では解凍時の試料内温度分布を考慮せず、直径 2.5cm 円柱状試料を用いたため、解凍時間に大幅な差がある場合のみの議論であった。そのため実際の冷凍マグロブロックやサク等の、解凍時のドリップ流出予測には適用し得なかった。実際の冷凍マグロブロックやサク等の大きなか

たまりを解凍する際には、必然的に試料内部に温度分布が生じ、部位によって温度履歴が異なる。

一方、上野等⁸⁾は冷凍マグロサクの解凍時における内部温度上昇のシミュレーションを試み、任意の解凍条件のもとで冷凍マグロサク解凍時の部位ごとの温度履歴を予想することに成功した。さらにそれら温度履歴と既知のメト化反応速度式を組み合わせ、冷凍マグロ解凍時のマグロサク表面部や中心部など任意の部位のメト化進行度を予測する方法を提案した。同様の方法論を用いて解凍時のドリップ流出量予想を試みようとした時、解凍過程における試料各部位が経るであろう温度範囲内の所定一定温度での、筋肉タンパク質の変性速度あるいはドリップ流出量増大速度を定式化し、記述する必要がある。しかし魚肉のような組織組成の複雑な固体系試料では利用可能な程度の上記速度の定式化さえ困難な場合が多い。

そこで本研究では、これら問題を克服するために、タンパク質変性を抑えつつマグロ筋肉をミンチ肉とすることで組織組成の均一化を図り、さらに温度条件が試料内で一定となるよう、薄いシート状に整形した試料（詳細は実験方法で詳しく述べる）を用いて解凍過程を想定した一定温度条件でのタンパク質変性量の反応速度を求め、ドリップ流出量との対応関係を調べた。

2. 実験方法

まず、食品中の局所的な温度分布を排除し、また伝熱を良くすることを目的にマグロ魚肉をペースト状にし、構造をホモジネートした厚み2mmの試料を作成した。これを3条件の媒体温度を持った水中で解凍し、媒体温度に試料温度が到達した後、最大12時間まで保持した。その過程でのタンパク質変性とドリップロス測定し、速度論的解析を試みた。またこの厚さ2mmの試料から得られるタンパク質変性およびドリップ流出の挙動は、実際食品の表面部分で起こる挙動と理解できると考える。試料および実験条件の詳細は次に示す。

2. 1 実験試料

築地市場で購入した未凍結のメバチマグロ魚肉（勝浦産、背側、赤身部分）のブロック肉を室温10°Cの実験室中でブロック肉をミンチ状にし、ポリエチレンフィルムを用いて2mmの厚さに成形した後、20mm×20mmのサイズに切り出した。これの重量を測定した後、-80°Cのストッカー内（SANYO社製、MDF-192）で凍結した。この際、一部の試料中心部に線径0.076mmのT型熱電対（石川産業株式会社製、T-T-40）を挿入した。

2. 2 解凍方法

解凍は20°Cと10°Cの恒温水槽中および0°C氷水中で行った。解凍履歴をFig. 1に示す。品温が-80°Cからそれぞれの解凍媒体温度に達するまでに、20°C水中では約100[sec]、10°C水中では約150[sec]、0°C氷水中では約600[sec]の時間を要した。ここでは厚み2mmの試料を使用しているため、異なる解凍温度媒体中での解凍時間は保持時間に対して短くなり、この方法では解凍中の非平衡部分を無視できると考えられる。

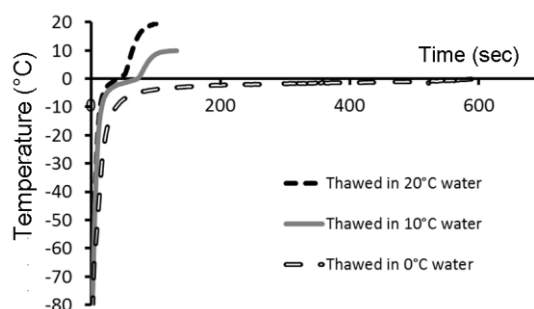


Fig. 1 Thawing curves of frozen tuna meat sample in water of the different temperature

試料はそれぞれの媒体温度に達した後最大12時間まで保持し、一定時間経過ごとにドリップ流出量測定およびCa-ATPase比活性測定に供した。

2. 3. ドリップ流出量評価方法 所定の時間経過した後、直ちにドリップ評価を行った。測定はふき取り法を用いておこなった。すなわち、あらかじめ乾燥させ、重量測定したろ紙(P₀)を凍結試料と一緒にポリエチレン袋に入れ、各媒

体中で解凍を行った。任意の時間が経過した後、ろ紙だけを取り出して重量測定し(P)、解凍前後でのろ紙重量の差から離水量を求め、あらかじめ測定しておいた凍結前の試料重量 (W_0) に対する割合として式(1)に従ってドリップ流出量 (%) を算出した。

$$Drip\ loss\ (\%) = (P_0 - P) / W_0 \times 100 \quad (1)$$

2. 4. Ca-ATPase 比活性測定

タンパク質変性の指標として筋原繊維の Ca-ATPase 活性を測定した。任意の時間保持した試料を解凍媒体から取り出し、直ちに 0.16MKCl と 40mM Tris-maleate 緩衝液(pH 7.5)を加え、氷中で冷やしながら試料中の筋原繊維の細砕および洗浄を5回行った後に、0.16MKCl 40mM Tris-maleate 緩衝液(pH 7.5)を再び加え、筋原繊維懸濁液(Mf 懸濁液)を作成した。Mf 懸濁液の Ca-ATPase 比活性値の測定には、0.5MKCl, 5mMCaCl₂, 25mM Tris-maleate 緩衝液(pH 7.0), 1mM ATP から成る反応液に Mf 懸濁液を加え、25°Cで反応させ、生成した無機リン酸量を比色定量することで Ca-ATPase 比活性値を求めた。

3. 結果

Fig. 2 に解凍後それぞれの保持温度におけるドリップ流出量の経時変化を示す。試料品質温度が解凍媒体温度と同等(±0.1°C)になった時間を0時間とし、そこから6時間までドリップ流出量を追ったものである。いずれの保持温度でも初期は急激にドリップ流出量が増し、4時間から6時間の間では、増加速度は緩やかになり、ほぼ流出平衡に達した。また解凍直後では、ドリップ流出量に対する保持温度の影響は小さいが、時間の経過と共に、保持温度が高いほどドリップ量が多くなる傾向が顕著にみられた。

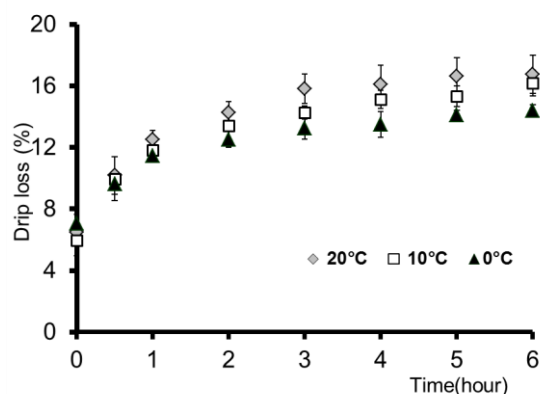


Fig. 2 Increase of drip loss when frozen-thawed tuna meat were hold at different temperatures. (N=3)

次に解凍過程でのマグロ魚肉のタンパク質変性挙動を調べるため、0°C解凍試料では解凍後3, 6, 12時間の、10°Cおよび20°Cの解凍試料では解凍後1, 3, 6時間のCa-ATPase活性値を測定し、未凍結サンプルの値に対しての割合として求めた。その結果をFig. 3に示す。結果から10°Cや20°Cでの保持試料は、時間が経過するほどCa-ATPase比活性が低下しており、10°C保持試料よりも20°C保持試料でより顕著にCa-ATPase比活性値の低下が見られた。他方、0°C保持試料では、6時間までは他条件と比較してCa-ATPase比活性値の低下が小さかった。また、0°C保持試料では、12時間経過後でもCa-ATPase活性値は96%となり、ばらつきは大きい10°Cや20°C保持の6時間経過サンプルよりも高い活性値を保持していた。以上よりタンパク質変性は解凍後の保持温度に大きく影響を受け、温度が低いほどその進行が抑制されることが示唆された。これらのタンパク質変性反応の温度依存性を定量的に議論するため、まずFig. 4に示すように、測定したCa-ATPase活性値を時間に対してプロットした。このプロットは直線関係を示すことから、タンパク質変性反応は近似的に一次反応であり、なおかつ今回測定した範囲は、一次反応の反応初期部分であると判断した。

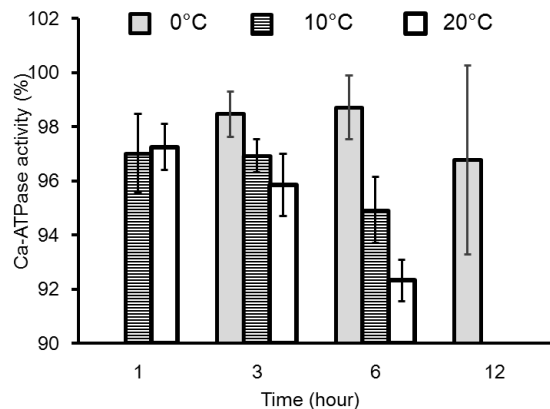


Fig. 3 Decrease of Ca-ATPase activity when frozen-thawed tuna meat were held at different temperatures. (N=3)

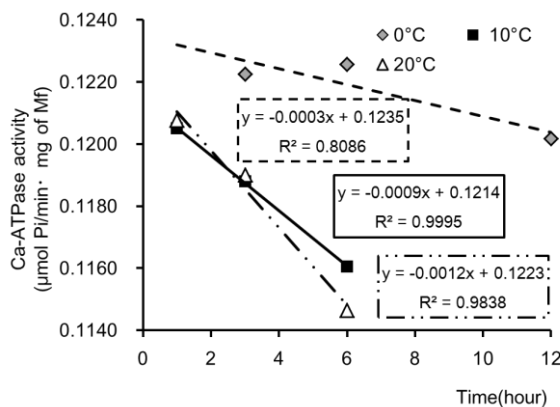


Fig. 4 Changes of Ca-ATPase activity when frozen-thawed tuna meat were held at different temperatures.

Fig. 4 の傾きから反応速度定数 k をそれぞれ求め、これを温度の逆数に対してアレニウスプロットした。(Fig. 5) その傾きから活性化エネルギー E を求めた。Fig. 5 から分かるように、各温度における反応速度定数 k と温度の逆数とのプロットは、一直線上に乗らなかった。これは、すなわち 0°C から 20°C までの温度帯で起こる変性反応の活性化エネルギーが温度によって変化することが示唆された。ここで仮に 0°C から 10°C 間と 10°C から 20°C 間の 2 つの温度帯に分けて活性化エネルギーを算出すると、後者の活性化エネルギーが前者の $1/2$ 程度と小さかった。すなわち 10°C から 20°C の温度帯のほうが倍近

く変性が進みやすいと言え、タンパク質変性の進行を防ぐという側面から、解凍終了温度は 10°C よりも低温が良いと言える。しかしながら今回の実験では 0°C 、 10°C 、及び 20°C の 3 点しか反応速度定数を算出していないため、 10°C 以下のうち、どの温度帯がどの程度変性進行を防ぐか明らかになっておらず、至適解凍終温を導くことが難しい。今後 10°C 以下の温度帯について今回と同一な系を用いた、より詳細な検討が必要である。

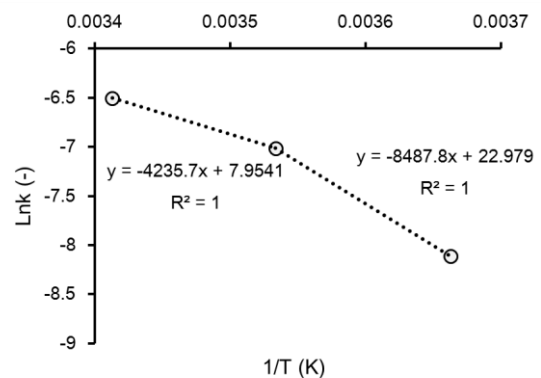


Fig. 5 Arrhenius plot of Ca-ATPase activity changes in tuna meat thawed and kept at different temperature

ここまでの結果から、タンパク質変性が解凍過程で生じ、その進行度は直接的に温度に依存するだけでなく、温度帯によって変性の進行しやすさが倍近く変化することが分かった。明らかとなったタンパク質変性挙動と Fig. 2 に示したドリップ流出量挙動は定性的に似た傾向を示している。そこで Fig. 6 において、Ca-ATPase 比活性値とドリップ流出量に相関性があるかどうか確認を行った。ここでは定常状態の議論を行うため、用いたドリップ流出値は各温度保持後 3 時間後以降の値とした。結果、Ca-ATPase 比活性値とドリップ流出量には緩やかな相関が見られ、阿部等⁸⁾の既往研究結果と同一の傾向であったことが確認された。しかしながら、ドリップ流出量はタンパク質変性とは別の因子、例えば、酵素反応によるタンパク質の分解による保水能低下や pH 変化などが影響を及ぼし、温度帯や保持時間によっては、これら別因子がドリップ流出の主因子となっている可能性が考えられる。そのため、今回の結果では、ドリッ

ブ流出量と Ca-ATPase 比活性値は曲線相関を示したと考えられる。

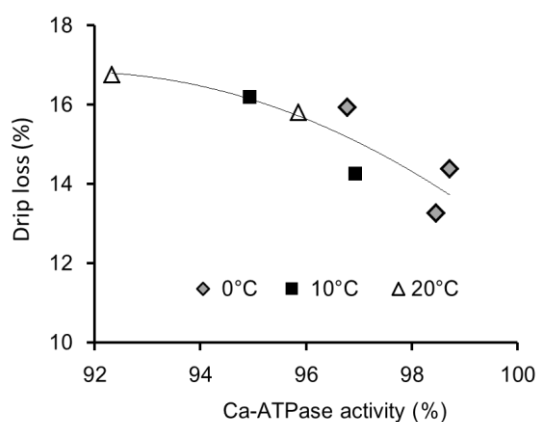


Fig. 6 Relationship between Ca-ATPase activity and Drip loss in tuna meat after thawing

4. 総括

ミンチ状にして均質化させたマグロ魚肉を用いた厚み 2mm の成型片を実験試料として、0°C、10°C、20°C 水中で解凍し、解凍終了温度および保持時間がタンパク質変性の進行速度とドリップ流出量に与える影響について検討を行った。ドリップ流出もタンパク質変性も環境温度が高いほど進む傾向にあったが、環境温度が 10°C 以上の場合と 0°C の場合とでは、タンパク質変性の反応速度定数および活性化エネルギーが大きく異なり、0°C から 10°C 間の温度帯においてタンパク質変性の速度は急激に変化することが示唆された。またタンパク質変性とドリップロスには、緩やかな曲線の相関関係が見られた。よって、マグロ魚肉解凍中のドリップ流出量を予測するための基礎データが得られたと考えられる。しかしながら、解凍過程で生じるドリップロスに及ぼす因子は、タンパク質変性の進行だけでなくことが示唆され、今後 0°C から 10°C までの温度帯のタンパク質変性挙動に加えて、酵素活性や pH 変化などを合わせて調べることで、解凍過程におけるドリップ流出挙動を体系的に理解することが可能になると考えられる。

References

- 1) Konno, K. Structural Changes of Myosin upon Freezing, *Refrigeration*, 2006, 81(941), pp. 163-170, (in Japanese).
- 2) Fukuda, Y. Denaturation by Freezing of Fish Muscle Proteins, *Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci.*, 1995, 8, pp77-92. (in Japanese)
- 3) Shengjun Wu, Saikun Pan, Hongbin Wang., Effect of trehalose on *Lateolabrax japonicus* myofibrillar protein during frozen storage, *Food Chemistry*, 2014, 160, pp.281-285
- 4) Fukuda, U., Tarakita, Z., Arai, K., Denaturation of Myofibrillar Protein in Chub Mackereck during Freezing and Storage, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1982, 48(11), pp1627-1632 (in Japanese)
- 5) Fukuda, U., Kakehata, K., Arai, K., Denaturation of Myofibrillar Protein in Deep-sea Fish by Freezing and Storage, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1981, 47(5), pp663-672 (in Japanese)
- 6) Fukuda, Y., Wada, R., Fukushima, H., *Proceedings of 2007 JSRAE Annual Conference, Tokyo* (2007), pp.379-380. (in Japanese)
- 7) Abe, S., Osako, K., Watanabe, M., Suzuki, T., The Effect of Thawing Condition for Frozen Fish Meats-The Thawing Speed Dependence on Fish Muscle Protein Denaturation and Drip Amount, *Trans. of the JSRAE*, 2009, 26(2), pp. 149-158 (in Japanese).
- 8) Ueno, S., Murakami, N., Watanabe, M., Suzuki, T., Prediction of Quality Change during Thawing of Frozen Tuna Meat by Numerical Calculation : 2nd report : Influence of thawing condition on the Myoglobin oxidation in tuna meat, *Trans. of the JSRAE*, 2012, 29(2), pp. 299-305 (in Japanese).

Kinetics evaluation of muscle protein denaturation and drip amount in frozen tuna meat during thawing process

Rika KOBAYASHI*

Tomaoki TAMURA*

Manabu WATANABE*

Toru SUZUKI**

* Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and
Technology (4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477)

Summary

Each process such as freezing, storage, and thawing in food refrigeration, induces the quality degradation of frozen food. Especially, as for the denaturation of fish muscle protein during freezing and storage process many studies have been investigated. However, the protein denaturation in thawing process has been paid few attentions. In this study, the denaturation speed of tuna muscle protein at different temperature corresponding to thawing process was investigated by using Ca-ATPase activity. At the same time, the drip amount was measured. It was revealed that the thawing below 10°C prevents the denaturation of protein and drain of drip, and that the relationship between protein denaturation and drip loss describes a curve.

Keywords: Thawing, Protein denaturation, Drip loss, Tuna meat, Ca-ATPase activity