

かまぼこの火戻り —耐熱性プロテイナーゼによるすり身ゲルの崩壊—

牧之段保夫

Collapsing of Fish Paste Gel by Heating at Around 60°C

Yasuo MAKINODAN*

Synopsis

Elasticity (*ashi*) of boiled fish paste (*kamaboko*) is obtained when fish paste is heated at about 85°C. However, when heating is done of 60~65°C, *ashi* is slight and the *kamaboko* loses its commercial value. The cause was formerly attributed to heat denaturation of fish protein which relates to the formation of network structure in *kamaboko*. Thereafter, autolytic (proteolytic) approach was introduced and a unique heat-stable proteinase which acts specifically at 60~65°C was found in fish muscle. From enzymatic investigations relating to this proteinase, it has been cofirmed that the collapsing of fish paste gels heated at 60~65°C (*himodori*) was caused by the hydrolysis of fish paste gel by the heat-stable proteinase, which is activated at 60~65°C.

I はじめに

かまぼこは魚肉に食塩を加えてすりつぶし、得られた肉のり(すり身)を成形後85°C前後で加熱して作られる。しかし、60~65°C付近の加熱では、弾力の乏しいかまぼこになり商品価値を失う。かまぼこ製造に見られるこのような弾力の低下現象は、一般に火戻りと呼ばれている。管理のいきとどいた現在のかまぼこ製造現場では、火戻りの発現は今や過去の問題となっているかもしれない。しかし、全国かまぼこ品評会審査会で毎年火戻りと思われる物性に出くわすことからすると、なお火戻りには注意が必要と思われる。そこで本稿では、魚肉すり身が示すこの特異な現象について概説したい。

II 戻り

魚肉のすり身を室温付近のいろいろな温度に一定時間放置したのち、90°C付近で15分加熱して足(弾力)の強さを調べると、例えばクログチでは、20°C

に放置したものは放置24時間までは時間が長くなるにしたがって足の強さは増し、24時間後にはかなり強い足が形成される。ところが、27°Cでは3時間後には強い足が認められるが、24時間後には足は落ちる。37°Cでは3時間後に既に足は低下する傾向がある¹⁾。この事実は、かまぼこに関する科学的研究の創始者である故清水亘先生によって、1944年に既に明らかにされたことである。すり身を室温付近に放置したときにみられる足の低下現象は、古くから業者により戻りと呼ばれていた。その後同様の足の低下が室温付近のみならず、50°C以上の高温度域でも発現し、その程度は60°C付近で顕著に現れることが認められた (Fig. 1²⁾ および Fig. 2³⁾)。Fig. 2 から明らかのように、このような足の低下(ゲル強度の低下)はすり身ゲルを90°C付近で再加熱したときに初めて現れるのではなく、初めの加熱(予備加熱)で既に起こっている。室温付近以上での足の低下現象もまた戻りと呼ばれている。このように戻りはいろ

* 水産学科水産利用学研究室 (Lab. of Marine Food Technology, Fac. of Agriculture, Kinki Univ., Nakamachi, Nara 691, Japan)

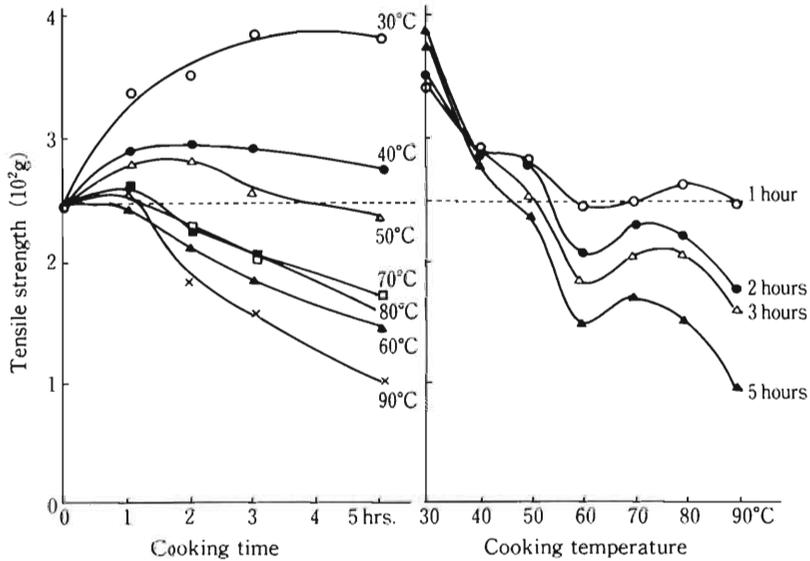


Fig. 1. Influence of temperature and period for cooking on the gel formation of fish meat paste. Tensile strength was measured after re-cooking the samples, which were previously cooked at indicated temperature for indicated time, at 90°C for 20 minutes. (Shimizu et al., 1962)

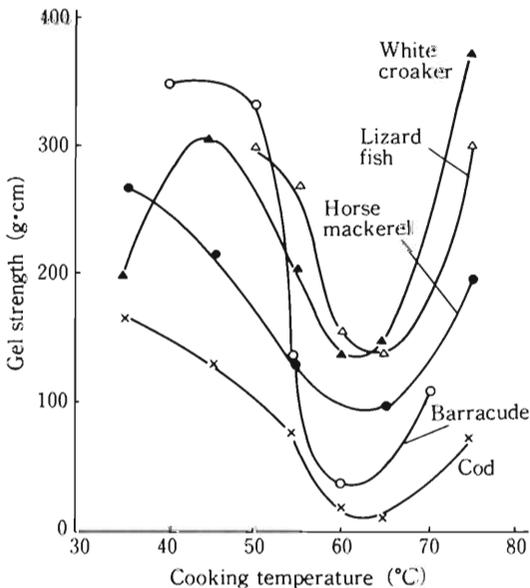


Fig. 2. Influence of cooking temperature on the gel strength of various fish meat pastes. Miced meat containing 3% of NaCl and 10% of deionized water to meat was ground in a mortar for 40 minutes. The obtained meat paste was packed with Kreharon tube of diameter 3 cm and cooked at indicated temperature for 1 hour, respectively. (Makinodan and Ikeda, 1971)

いろいろな温度で認められる現象である。これらの戻りのうち、60°C付近で認められる戻りは特異的である。それは Fig. 1 (ワニエソ) に示されているように、足の低下速度が、その前後の温度域である50°Cおよび70~80°Cにおけるものに比べて大きいからである。結果としてこのような中間温度で加熱したすり身ゲルの足は、その前後の温度域で加熱したものに比べて弱く (Fig. 2), 場合によってはほとんど弾力を示さなくなる。この中間温度における戻りを特に戻りと呼ぶのが一般化している。しかし、この戻りは室温付近の戻りと異なり、積極的な加熱に付随したものであり、他の温度域での戻りと区別する上からも、いわゆる火戻りと呼ぶのが適当と思われる。

III 火戻り

前述のように、一般に60°C付近の中間温度で現れる戻りを火戻りという。火戻りの発現あるいはその程度は、魚種²⁾、同一魚種でもその鮮度²⁾あるいは漁期⁵⁾等によって相違する。したがって、供試魚の条件が異なれば結果は相違するであろう。これまでに報告されたデータには、ときとして相違が認められるが、その原因の一つには、供試魚種の条件の違いが関係しているとも考えられる。かまぼこの原料魚のうち、有用数種について火戻りの発現状態を示す次のようである。ここで、供試魚はいずれも硬直前

または硬直初期の鮮魚で、すり身は食塩のみを含み、冷凍すり身（無塩）に添加される重合リン酸塩を含まないものである。シログチ、エソ類、マアジ等についての加熱温度—ゲル強度曲線は既に Fig. 1 および Fig. 2 に示したとおりである。シログチすり身は明らかに火戻りを示し、他の報告⁶⁾からもグチ類は火戻りしやすい魚といえる。エソ類すり身もまた火戻りを示すが、ある報告⁷⁾ではその程度は弱く、エソ類はむしろ火戻りにくい魚とみなされている。マアジでは足の強さは50°Cで最も弱いとするもの⁸⁾、あるいは火戻りは発現しにくいとする報告⁷⁾があるなど統一を欠く。スケトウダラ⁶⁾、ホシザメ⁷⁾ではほとんど火戻りは認められない。ただし、報告⁷⁾によっては、スケトウダラの冷凍すり身（工船SA級）では2時間の加熱で火戻りが観察されている。ハモ⁶⁾、ホキ⁷⁾（冷凍魚）のすり身は火戻りにくい性質を示す。なお、最近かまぼこへの利用が試みられているマサバ、マイワシは火戻りしやすい魚である⁷⁾。

IV 火戻りの機構

さて、火戻りはどのようにして起こるのであろうか。火戻りを含めいろいろな温度における戻りは、Fig. 1 から分かるように、いったんできたゲル構造が時間の経過とともに変化し、あるいは壊されていくことによる。そのすり身のゲル構造は、魚肉中のある種のタンパク質が立体的に網目構造を作ることによってできている。すなわち、落し身を水さらしすると、壊された筋細胞（筋繊維）中の水溶性タンパク質が除かれる。水さらし肉に食塩を加えてすると、筋細胞中の筋原繊維や筋原繊維の構成タンパク質であるミオシン、アクチンが溶出してくる。ミオシンとアクチンとは結合しやすく、糸状の巨大なアクトミオシンになる。ミオシン同志の結合も起こるであろう。筋原繊維や生成した糸状のタンパク質は熱運動によって互いに絡まり合い、あるいは化学的に結合して網目を作り、網目の中に水を封じ込めながら弾性ゲル構造を作ると考えられる。火戻りでは、この網目構造の崩壊が60°C付近の中間温度で発現するところに特徴がある。

魚肉タンパク質の熱変性 火戻りの原因としては、当初、魚肉タンパク質の熱変性が考えられた^{2,9)}。タンパク質は、多くのアミノ酸がペプチド結合で連結してできたポリペプチド鎖が、空間的に折りたたまれてできている。このようにしてできた、繊維状あるいは球状をしたタンパク質の立体構造は、水素

結合、イオン結合、疎水結合などいわゆる弱い結合で保持されている。タンパク質が加熱されると弱い結合が切れ、立体構造がほぐれてそのタンパク質の性質や機能が変化する。これがタンパク質の熱変性である。

ワニエソを用いた実験²⁾によると、火戻りの発現状態は、原料肉の水洗、すり身のpH、あるいは加えた塩の種類によっては影響されなかった。このような結果からこの研究者らは、火戻りはタンパク質分子外囲のイオン雰囲気にかかわらず、アクトミオシンなどタンパク質分子がこうむる必然的な変化—恐らく熱変性に基づいて起こる何らかの変化—によって、いったんできたタンパク質の網目構造が壊されていく過程と考察した。網目構造を作るタンパク質が熱変性すると、立体構造がほぐれ、構造の緻密性は失われよう。しかし、タンパク質の熱変性は60°C付近でのみ起こるわけではなく、この考察では中間温度で発現する火戻りを説明できないように思われる。

火戻りしたかまぼこを電子顕微鏡で観察した報告¹⁰⁾によると、通常のかまぼこ組織に比べて火戻り組織では、タンパク質繊維群の凝集が認められる。この観察から報告者らは、火戻りとは分子内の熱運動が何かの原因により、タンパク質の空間構造が著しく変化し、ほぐれた分子が無秩序に凝集した結果であると考えた。しかし、タンパク質のほぐれがなぜ中間温度で起こるのか、またタンパク質繊維群の不連続な凝集がどうして起こるのかについては明らかでない。ほぐれた分子が凝集し、組織中にタンパク質の不連続な凝集体が増していくためには、ほぐれ（変性）以外の網目構造の切断が必要である。この切断は何によって起こるのであろうか。筋原繊維タンパク質の分解は60°C付近での加熱では起こらないことが知られている¹¹⁾。

一方、イシガレイのアクトミオシン溶液を40, 60, 90°Cで加熱すると、いずれの温度でも、加熱初期には時間とともにアクトミオシン分子の表面近くで疎水結合の集合が認められ、その程度は60°Cで著しい⁹⁾。この事実から、タンパク質濃度の高いすり身でも、60°Cで同様の集合（疎水結合）が過剰に生成し、これが網目構造の形成を阻害するのではなからうかとの考察もなされた。しかし、この考察は火戻りが網目構造の形成の阻害によるのではないという事実、またこの実験では、疎水基の集合は加熱初期にのみ認められたが、これは火戻りが加熱時間とともに進行するという事実と相入れない。

中間温度で発現する火戻りには、熱の作用が関与することは明らかである。しかし、以上のように、この現象はすり身タンパク質の熱変性では、あるいは熱変性が関与するとしてもそれのみでは説明できないように思われる。

耐熱性プロテイナーゼの関与 生物の各種組織にはいろいろな種類の酵素が存在する。このことから、もし魚肉中に火戻り発現温度付近に最適温度を示し、しかもすり身のpHで働くプロテイナーゼが存在すれば、この酵素は火戻りの原因になる可能性がある。

火戻りの機構が魚肉タンパク質の熱変性の観点から論じられていた1960年代前半、この現象が契機となり、魚肉中に、魚肉はもとよりウシやラットなど陸上動物肉でもかって報告をみなかった、温度的性質の極めて特異なプロテイナーゼが発見された¹²⁾。トリプシン、キモトリプシン等細胞外プロテイナーゼの研究とは異なり、筋肉あるいは組織のプロテイナーゼの研究は、当時はまだ黎明期にあり、動物肉に存在するプロテイナーゼは、酸性域で作用する¹³⁻¹⁷⁾ [現在のカタレプシンD (EC3.4.23.5)] 熱に不安定^{13,17)} な酵素と考えられていた。ただ一例、ラット骨格筋にアルカリ性で作用する(熱に不安定な)プロテイナーゼの存在¹⁸⁾ が報告されているにすぎなかった。筋肉プロテイナーゼに関するこのような情報、および酵素活性の測定温度は37°Cかそれ以下が常識であった当時の酵素研究の背景からすると、この魚肉に認められたプロテイナーゼは当時としてはまことに非常識な酵素であったと言ってよいであろう。

魚肉を材料として新しく見出されたプロテイナーゼは、Fig. 3に示されるように、最適温度(4時間反応。当時、魚肉中に中性付近のプロテイナーゼ活性を見出すため、各種の反応条件を組み合わせ、試行錯誤した。その結果の反応時間である。)を60~65°Cに示し、45°C以下の温度ではほとんど活性を示さなかった。したがって常識的な活性測定温度では、それまで、この酵素の存在を知ることはできなかったのである。最適pHが8.0~8.5であることから、本酵素はその後耐熱性アルカリ性プロテイナーゼ(Heat-stable alkaline proteinase, HAP)と呼ばれるようになった。

HAPは筋肉細胞内ではマイクロソーム画分、すなわち筋小胞体など主に膜系に存在する¹⁹⁾。したが

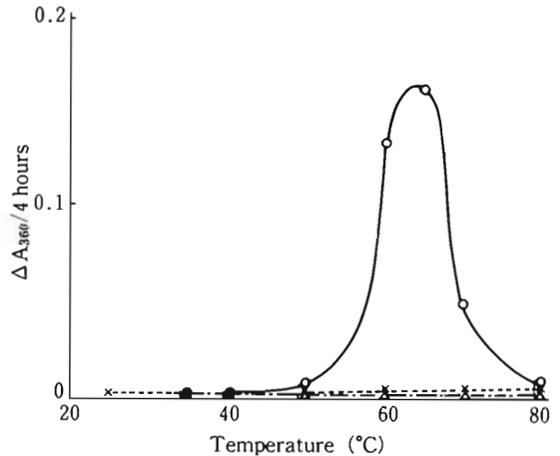


Fig. 3. Optimum temperature of muscle proteinase of white croaker (pH 8.0). Reaction mixture containing 3 ml of 0.33% buffered DNP-casein solution (pH 8.0) and 1 ml of water extract of muscle was incubated at indicated temperature for 4 hours. After stopping the reaction by adding 5 ml of 5% trichloroacetic acid, A_{360} of the filtrate was measured. Blank value was that of 0 time reaction.

- ×-----× : Enzyme solution only.
- △-----△ : DNP-casein solution only.
- : Enzyme solution + DNP-casein solution.

(Makinodan et al., 1963)

って本酵素は筋原繊維に密着した形で調製される場合もあるであろう。電気泳動的に均一に精製されたHAP (Fig. 4)^{20,21)} について次のことが知られている。

まず本酵素は極めて耐熱性である。50°C (pH 8.0) では60分後もほとんど失活しない。この耐熱性はタンパク質の変性剤である尿素の共存下では濃度に依存して失われ、温度-活性曲線もまた低温度域へ移行する。しかし、このような変化は尿素を除けば回復する。また本酵素は分子量3万前後の多数のサブユニットからなる分子量数10万の高分子物質である。以上の温度的性質に関する尿素の影響および分子構造からすると、HAPの特異な温度的性質は次の理由によって説明されそうである。本酵素の活性部位はある種のサブユニット(仮に活性サブユニットとする)に存在し、このサブユニットは他の多く

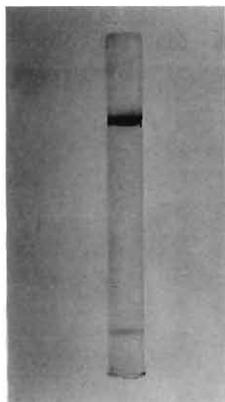


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified shark muscle heat-stable alkaline proteinase. The purified sample (15 μ g) was applied on a 5% polyacrylamide gel at pH 8.8. (Makinodan et al., unpublished data)

のサブユニット（仮に調節サブユニットとする）で囲まれ分子内部に存在する。調節サブユニットの覆いが開き、活性サブユニットが分子表面に露出して酵素作用を発揮するためには、例えば加熱では60~65°Cの温度が必要である。60°C以下の温度では活性化は起こらず、また活性サブユニットは調節サブユニットの防護を得て熱に対して安定である。HAPの活性化におけるこのような立体構造の変化（変性）は、調節サブユニットの完全な離脱を伴わない可逆的な変化と考えられる。なお活性化、特に熱により活性化したHAPは基質の存在下では60°Cで30分は安定である。

HAPはもともとカゼインを基質として発見された酵素であり、システインプロテイナーゼの阻害剤であるPCMBやモノヨード酢酸で阻害されるが、セリンプロテイナーゼの阻害剤である大豆トリプシンインヒビター（STI）やジイソプロピルフルオロリン酸（Dip-F）ではほとんど阻害されないことからシステインプロテイナーゼに類別された²⁰⁾。その後本酵素はトリプシンに対する合成基質（例えばBoc-Phe-Ser-Arg-MCA）やキモトリプシンに対する合成基質（例えばSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA）をも分解し、このような基質を用いたときにはPCMBやモノヨード酢酸のほかSTIやDip-Fによっても阻害されることが明らかになった²¹⁾。なお本酵素は筋肉タンパク質、特にミオシン、アクチン、トロポ

ミオシン等にもよく作用することが知られている²⁰⁾。

HAPは上記の、特に中性~弱アルカリ性（最適pH 8.0~8.5）でかつ60~65°Cでよく作用することを特徴とするが、最近このような温度特性を持ち、より低分子量のプロテイナーゼの存在が報告されるようになった^{21~25)}。これらの酵素はいくらかの性質に関してHAPと異なるが、大きくみればHAPに包括されうる酵素と考えられる。なお、HAPは魚類の各種組織に存在する²¹⁾ほか、ニワトリやラットの骨格筋にも存在するようである²⁶⁾。

さて、火戻りの原因に原料魚肉に含まれるプロテイナーゼが関与するのであれば、火戻りを起こしたかまぼこでは、プロテイナーゼの作用によるタンパク質の分解が認められるのではなかろうか。シログチのすり身（食塩終濃度2.5%）は65°Cの加熱で明らかに火戻りを起こす。この65°Cにおける経時的加熱ゲルのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を見るとFig. 5²²⁾のとおりである。加熱時間の増加とともにミオシンヘビーチェーンの消失と、より低分子物質の生成とが明らかに認められる。この事実は、火戻りゲルでは、魚肉の主要タンパク質であるミオシンがプロテイナーゼによって分解されていることを示すものである。

次に、シログチを原料とした場合、65°Cで発現する火戻りはプロテイナーゼインヒビターの一つロイペプチンの添加で顕著に阻害される²²⁾。同様の事実はウマツラハギ（ロイペプチン²³⁾およびマイワシ（ロイペプチンおよびE-64²⁷⁾の火戻りについてもすでに報告されている。このときゲルタンパク質の分解は認められない（Fig. 6）²²⁾。この事実もまた筋肉プロテイナーゼが火戻りに関与するとの考えを支持している。

さらに、筋肉より精製したプロテイナーゼをすり身に添加して火戻りの発現状態を検討した結果^{24,22)}によると、酵素添加試料ではミオシンの分解を伴う火戻りが誘発あるいは増進されている。

以上の酵素的実験事実からすると、原料魚肉に含まれる耐熱性プロテイナーゼの火戻り発現への関与は確かと考えてよい。

V おわりに

消費者の好みが多様化したとはいえ、かまぼこがほどよい足を持つことはその品質上不可欠の要件で

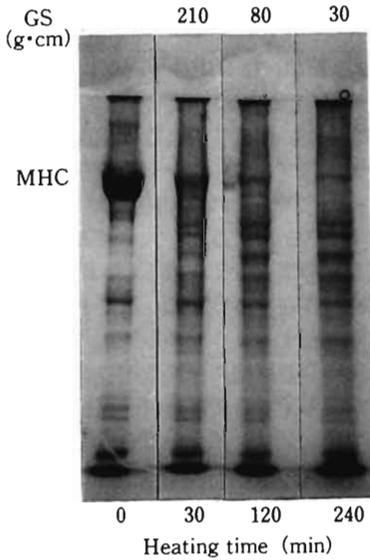


Fig. 5. Decomposition of white croaker's meat paste protein during heating at 65°C. After meat pastes were heated at 65°C for indicated period, about 10 μ g protein of each gel was applied on SDS-polyacrylamide gel (7.5%). Gel strength (GS, g·cm) is expressed as the product of breaking strength (g) and breaking dent (cm) obtained by a food rheometer. MHC: myosin heavy chain. (Makinodan et al., unpublished date)

ある。足は魚肉のすり身を加熱して得られるが、加熱が60~65°C付近の中間温度で行われると、いわゆる火戻りを起こし、かまぼこは商品価値を失う。

火戻りは中間温度における加熱によってもたらされるが、古くはかまぼこの網目構造の形成にかかわる魚肉タンパク質の熱変性が原因と考えられていた。しかし、火戻りが中間温度で現れる現象であることから、自己消化的検討がなされるようになり、魚肉から特異な耐熱性プロテイナーゼが発見された。その後この酵素を中心とした酵素的研究の結果、火戻りは加熱による、恐らく酵素タンパク質の熱変性を伴う、プロテイナーゼの活性化とそれに続くプロテイナーゼによるすり身ゲル(網目構造)の分解によって惹起されることが明らかとなった。

引用文献

- 1) 藪水 亘: 日水誌, 12, 165~172 (1944)
- 2) 志水 寛・吉本晴樹・藪水 亘: 同誌, 28, 610~615 (1962)

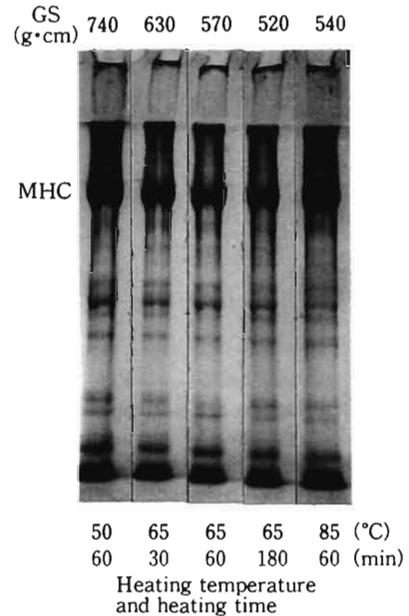


Fig. 6. SDS-PAGE patterns of fish paste gel containing leupeptin. Each paste consisting of 100 g of fish meat, 20 g of distilled water, 3 g of NaCl and 50 mg of leupeptin is heated at indicated temperature for indicated time. About 10 μ g protein of each gel was applied on SDS-polyacrylamide gel (7.5%). Gel strength (GS, g·cm) is expressed as the product of breaking strength (g) and breaking dent (cm) obtained by a food rheometer. MHC: myosin heavy chain. (Makinodan et al., unpublished data)

- 3) Y. MAKINODAN and S. IKEDA: 同誌, 37, 518~523 (1971)
- 4) 志水 寛・西岡不二男・町田 律・シアウ・ミン・シュ: 同誌, 49, 1239~1243 (1983)
- 5) T. LANIER, T.S. LIN, D.D. HAMANN and F.B. THOMAS: *J. Food Sci.*, 46, 1643~1645 (1981)
- 6) 岡田 稔: 東海水研報, 24, 73~79 (1959)
- 7) 志水 寛・町田 律・竹並誠一: 日水誌, 47, 95~104 (1981)
- 8) 岡村一弘: 同誌, 27, 755~762 (1961)
- 9) 丹羽榮二: 同誌, 41, 907~910 (1975)
- 10) 三宅正人・上住南八男: 三重県立大学水産学部紀要, 6, 313~316 (1965)
- 11) 関 伸夫: 日水誌, 42, 1169~1176 (1976)
- 12) 牧之段保夫・山本正男・藪水 亘: 同誌, 29, 776~780 (1963)

- 13) 齊藤 要・鮫島宗雄：同誌, 24, 201~204 (1958)
- 14) G. SIEBERT: *Experientia*, 14, 65~66 (1958)
- 15) G. SIEBERT: in "Fish in Nutrition" (E. Heen and R. Kreuzer, ed.) 80~82, Fishing News (Books), London (1962)
- 16) J.E. SNOKE and Neurath: *J. Biol. Chem.*, 187, 127~135 (1950)
- 17) R.A. SLIWINSKI, D.M. DOTY and W.A. LANDMANN: *Agric. Food Chem.*, 7, 788~791 (1959)
- 18) T.R. KOSZALKA and L.L. MILLER: *J. Biol. Chem.* 235, 665~668 (1960)
- 19) Y. MAKINODAN, N.N. KYAW and S. IKEDA: *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B, 785~789 (1982)
- 20) Y. MAKINODAN, Y. YOKOYAMA, M. KINOSHITA and H. TOYOHARA: *ibid*, 87B, 1041~1046 (1987)
- 21) L. BUSCONI, E.J. FOLCO, C. MARTONE, R.E. TRUCCO and J.J. SANCHEZ: *FEBS letters*, 176, 211~214 (1984)
- 22) H. TOYOHARA, M. KINOSHITA and Y. SHIMIZU: *J. Food Sci.*, 55, 259~260 (1990)
- 23) H. TOYOHARA, T. SAKATA, K. YAMASHITA, M. KINOSHITA and Y. SHIMIZU: *ibid*, 55, 364~368 (1990)
- 24) M. KINOSHITA, H. TOYOHARA, Y. SHIMIZU and M. SAKAGUCHI: 日水誌, 57, 1935~1938 (1991)
- 25) S. YANAGIHARA, H. NAKAOKA, K. HARA and T. ISHIHARA: 同誌, 57, 133~142 (1991)
- 26) Y. MAKINODAN, H. TOYOHARA, Y. YOKOYAMA and M. KINOSHITA: *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B, 359~361 (1988)
- 27) 塚正泰之・志水 寛: 日水誌, 57, 2161 (1991)