

加熱いか肉の最終到達温度の測定

三浦 徹*、上野 勝*、三浦 誠*、渡邊 裕之*、三枝 朋樹*

Measurement of the End-point Temperature of Heated Squid Meats

Toru MIURA*, Masaru UENO*, Makoto MIURA*, Hiroyuki WATANABE* and Tomoki SAEGUSA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In order to measure the highest temperature to which squid meat had ever been heated, the coagulation temperature of water soluble protein extracted from the heated squid meat was measured by a spectrophotometer equipped with a thermoelectrically temperature-controlled cell holder. For samples that had been pre-heated at 55–65°C, the coagulated temperature observed in this experiment was close to the pre-heating temperature.

However, the amount of testing liquid required for the spectrophotometer was seldom obtained from the samples pre-heated at 65°C or higher. Therefore, for boiled squids which are imported frequently, it is necessary to improve the filtering condition of the extraction procedure.

1. 緒 言

いかは、加熱あるいは保存に適する処理をされているか否かにより、税番が異なり、異なる税率が適用される。加熱あるいは保存に適する処理がなされていないものは、第3類に分類され、もんごういかを除くいかは、IQ品目となる。このため、輸入されるいかについては、加熱がなされたものか否かの判定が極めて重要なとなる。

現在、加熱がなされているか否かの判定については、カタラーゼ活性試験により行われている。カタラーゼ活性試験は、過酸化水素水中に検体を入れ、検体中のカタラーゼ触媒作用により、過酸化水素が分解されて生じる酸素の泡を観察する方法である¹⁾。検体が十分加熱されていれば、カタラーゼが失活し、泡が生じなくなる。連続的な泡の発生を確認できれば陽性、すなわち加熱不十分と判断される。この方法は、迅速かつ簡便であるが、連続的な泡が発生しているか否か判断しにくい場合があり客観性に欠けているといえる。

検体の過去の加熱温度を水溶性たんぱく質の凝固温度を測定することで推定する方法が、UDDINら²⁾³⁾により報告されている。報告では、カツオやホタテガイ等を検体としているが、今般、この方法をいかに応用することを試みたので報告する。

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 標準試料

するめいか（生鮮）：市販品
やりいか（生鮮）：市販品

2. 1. 2 水溶性たんぱく抽出用試薬

塩化ナトリウム（関東化学）
セライトNo.545（和光純薬）

2. 1. 3 ビュレット法用試薬

硫酸銅五水和物（純正化学）
(+)酒石酸ナトリウムカリウム四水和物（和光純薬）
水酸化ナトリウム（和光純薬）
ヨウ化カリウム（和光純薬）
牛血清アルブミン（以下、BSA）（SIGMA）

2. 2 装置及び測定条件

装置

分光光度計：UV-2550（株島津製作所）
電子冷熱式恒温セルホルダー：TCC-240A（株島津製作所）
温度計：SN-350ハイパーサーモ（株熱研）

測定条件

波長：540 nm（ビュレット法）
：650 nm（凝固温度測定時）

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

温度 : 室温 (ビウレット法)
 : 40°C→68°C (約 2 °C/min)
 (凝固温度測定時)

2. 3 実験方法

2. 3. 1 加熱いかの作製

約 5 cm 四方に切り取ったいかの胴部の中心部に温度計の検知部を差込み、内部温度を測定できる状態とした。次に、これを加熱温度にセットしておいた水浴中に保持した。内部温度が水浴の温度に到達した時点から 30 分間加熱を行った。加熱終了後は、直ちに氷水中にて冷却を行った。以上操作により得られた加熱いかを、検体とした。

2. 3. 2 水溶性たんぱく質の抽出

検体 5 g に 0.1% 塩化ナトリウム水溶液 20 ml を加え、ホモジナイズを行った (セルマスター CM-100 アズワン社製 12,000 rpm, 1 min)。

次に、得られた懸濁液を No.1 のろ紙を用いて吸引ろ過を行った。続いて、そのろ液を No.5c のろ紙を用いて吸引ろ過を行った。さらに、得られたろ液をセライト No.545 を 1 cm 程度敷き詰めたガラスフィルター (G4) を用いて、吸引ろ過を行った。この際、あらかじめろ液中にも少量のセライト No.545 を添加し、混和させておいた。以上のろ過操作により得られた透明溶液を検液とした。

2. 3. 3 凝固温度の測定

石英セルに検液 2.5 ml を量り取った。分光光度計の電子式冷熱式恒温セルホルダーの試料側に上記セルをセットした。対照側には 0.1% 塩化ナトリウム水溶液 2.5 ml を量り取ったセルをセットした。そして、試料セル中の検液に温度計の検知部が浸かるようにセットし、検液中の温度を測定できるようにした。設定温度を 40°C にし、電子式冷熱式恒温セルホルダーの実測温度表示が 40°C に到達した後、1 分後に毎分約 2°C で昇温を開始した。同時に 10 秒間隔で波長 650 nm における吸光度及び検液中の温度を測定した。

2. 3. 4 水溶性たんぱく質の定量 (ビウレット法)

650 nm で吸光を示す物質がたんぱく質であることを確認するため、ビウレット法によるたんぱく質の定量を行った。

2. 3. 4 (1) ビウレット試薬の調製

硫酸銅五水和物 1.5 g 及び (+)-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物 6.0 g を蒸留水 500 ml に溶解した。この水溶液を攪拌しながら、10% 水酸化ナトリウム水溶液 300 ml を入れ、全量を 1000 ml にした。これにヨウ化カリウム 1 g を加えた⁴⁾。

2. 3. 4 (2) 検量線用標準試験液の調製

BSA 15 mg を 0.1% 塩化ナトリウム水溶液 1 ml に溶解した。この溶液を 25, 50, 75 及び 100 μl を別々の試験管に量り取り、0.1% 塩化ナトリウム水溶液をそれぞれ 275, 250, 225 及び 200 μl を入れ、全量を 300 μl とした。これにより、BSA 濃度を 1.3, 2.5, 3.8 及び 5.0 mg/ml に調製できる。上記試験管にビウレット試薬をそれぞれ 3 ml 入れ、ボルテクスを用い十分混合した。混合後、30 分間放置した。

2. 3. 4 (3) サンプル試験液の調製

検液 300 μl 及びビウレット試薬 3 ml を試験管に入れ、ボルテクスを用い十分混合した。混合後、30 分間放置した。

2. 3. 4 (4) 水溶性たんぱく質の定量

上記操作により調製した試験液について、波長 540 nm における吸光度を測定した。検量線用標準試験液の測定結果から検量線を作成し、検液中のたんぱく質濃度を求めた。

3. 結果及び考察

3. 1 水溶性たんぱく質の抽出

UDDIN らにより報告された方法²⁾³⁾では、抽出溶媒に 0.9% 又は 0.25% の塩化ナトリウム水溶液が用いられている。しかし、いかについてこの濃度で抽出を行うと、抽出液が激しく乳化を起こし、ろ過操作により、分析に必要となる量の透明な測定液を得られないことが多かった。このため、本実験では 0.1% の塩化ナトリウム水溶液を用いた。また、激しい乳化を避けるために、UDDIN らは検体 50 g、溶媒 100 ml で行っているところを、検体 5 g、溶媒 20 ml で行った。

加熱条件 60°C 以下の検体では、水溶性たんぱく質の抽出操作時に懸濁液はかなり乳化を起こすことから、測定に必要な量の検液を回収することが困難であった。一方、加熱条件 65°C 以上の検体については、水溶性たんぱく質の抽出時に乳化はあまり起こらなかった。しかし、より高温で加熱した検体の方が、たんぱく質の変性が進んでおり、凝固したたんぱく質が多量に存在するため、ろ過による除去が困難であった。今回の実験では、加熱条件 65°C 以上では、透明検液を得られないことが多かった。

3. 2 凝固温度

加熱やりいかの凝固温度の測定結果を Fig.1 に示す。図は検液の温度と吸光度の関係をプロットしたものである。Fig.1 の(a), (b) 及び(c)について、ある温度を境に、吸光度が急上昇していることが分かる。すなわち、55°C で加熱した検体では 56.0°C, 60°C で加熱した検体では 62.0°C, 65°C で加熱した検体では 64.2°C で吸光度の急上昇がみられた。吸光度の上昇は検液の白濁により起こることから、水溶性たんぱく質の変性はこれら温度で開始していると推察される。このことから、これら温度をそれぞれの加熱条件における凝固温度とみなした。また、70°C で加熱した検体 (Fig.1(d)) については今回の分析条件において、凝固温度を測定することができなかった。これは、分析に用いた電子冷熱式恒温セルホルダーが、検液温度を約 68°C までしか昇温できないため凝固温度に達しなかったものと思われる。

加熱するめいかの凝固温度の測定結果を Fig.2 に示す。凝固温度はそれぞれ、55°C で加熱した検体では 51.7°C, 60°C で加熱した検体では 61.4°C, 65°C で加熱した検体では 66.8°C, 70°C で加熱した検体では 67.1°C であった。

凝固温度をまとめた表を Table 1 に示す。やりいかについては複数回分析を行った結果も合わせて示す。一部例外はあるものの、凝固温度は、あらかじめ検体が加熱を受けた温度と 1~2°C 程度の

誤差で測定できた。するめいかの加熱温度 55°C 及び 70°C については、理由は不明であるが、加熱温度と比較して、凝固温度は 3°C 程度低く測定された。

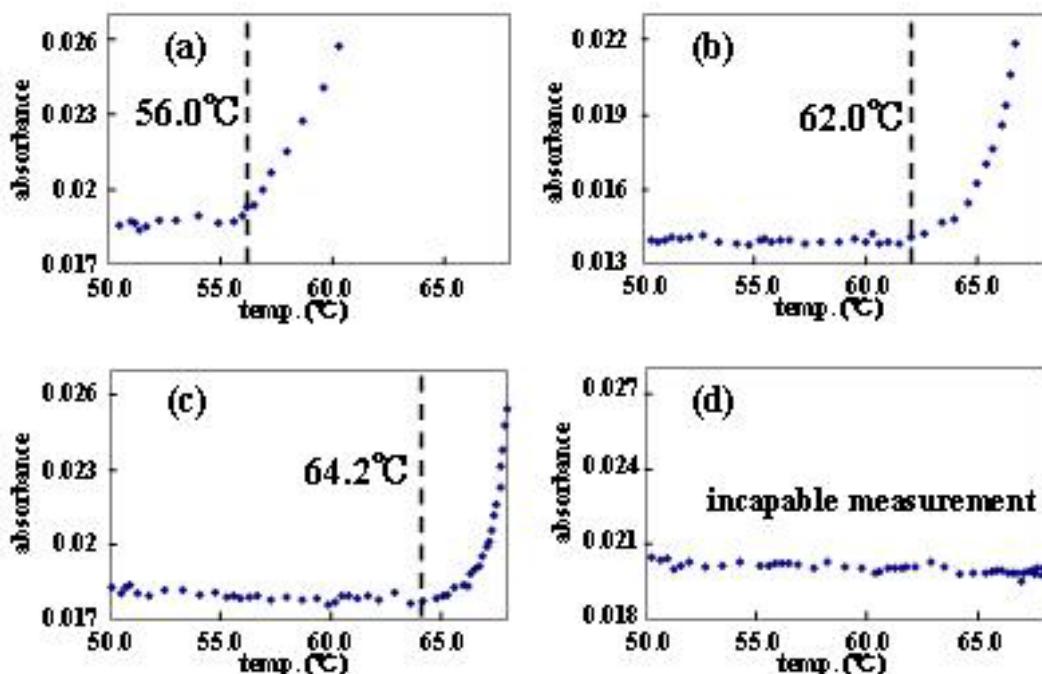


Fig. 1 Coagulation temperature of heated spear squid at each heat condition
(a) 55°C, 30min., (b) 60°C, 30min., (c) 65°C, 30min., (d) 70°C, 30min.

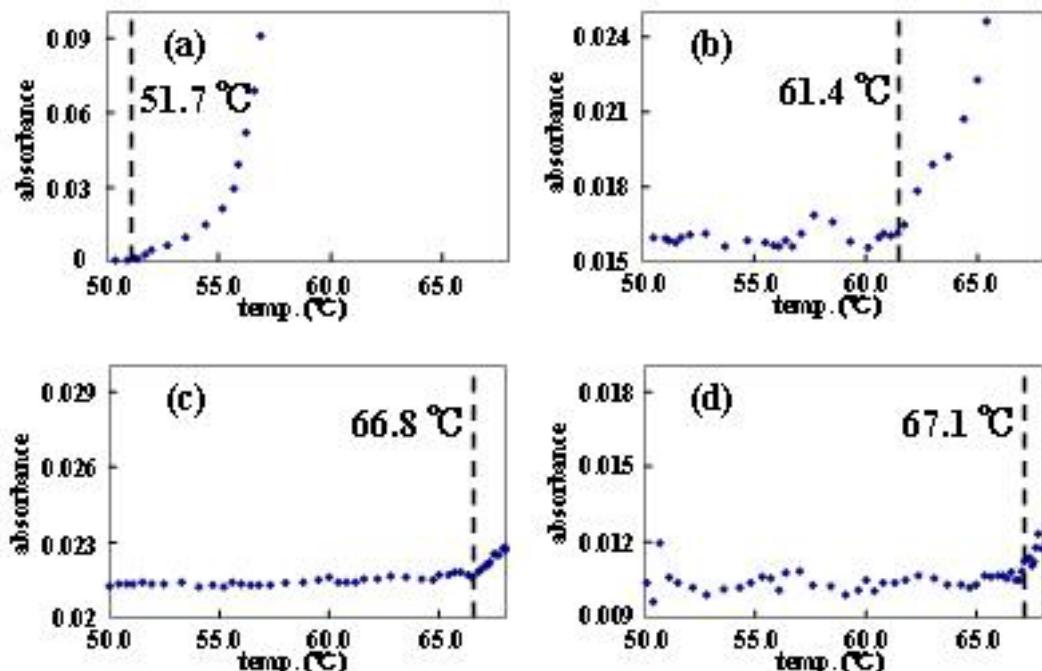


Fig. 2 Coagulation temperature of heated Japanese common flying squid at each heat condition
(a) 55°C, 30min., (b) 60°C, 30min., (c) 65°C, 30min., (d) 70°C, 30min.

Table 1 Coagulation temperature and concentration of protein

	Heat Condition	55°C 30min.	60°C 30min.	65°C 30min.	70°C 30min.
Spear squid	Coagulation temp. (°C)	56.0	62.0	65.2	i.m.
	Concentration of protein (mg/ml)	2.1	1.9	2.6	1.8
	Coagulation temp. (°C)	56.6	61.5	64.2	n.d.
	Concentration of protein (mg/ml)	2.0	1.7	2.6	
	Coagulation temp. (°C)	56.2	60.8	n.d.	n.d.
Japanese common flying squid	Concentration of protein (mg/ml)	1.6	1.6		
	Coagulation temp. (°C)	51.7	61.4	66.8	67.1
	Concentration of protein (mg/ml)	1.8	1.4	1.7	0.9

* i.m.: incapable measurement, n.d.: no data

3. 3 水溶性たんぱく濃度

ビウレット法より得た水溶性たんぱく質濃度を Table 1 に示す。一般に、より高温で加熱した検体の方が、たんぱく質の変性は進み、水溶性たんぱく質の量は減るはずである⁵⁾。しかし、65°C 加熱のものの方が、60°C 加熱のものよりも水溶性たんぱく質の量が多く観察された。これは、加熱温度 60°C 以下では、水溶性たんぱく質の抽出時に検体が相当程度乳化して、検体中の水溶性たんぱく質の一部が安定なミセルを形成するため、検体中の水溶性たんぱく質の一部が検液に移行しないためであると考えられる⁶⁾。

4. 要 約

いか肉をあらかじめ加熱したときの最高温度を測定するため、加熱いか肉より抽出した水溶性たんぱく質の凝固温度を、電子冷熱式恒温セルホルダーを搭載した分光光度計を用いて測定した。55°C～65°Cで加熱したサンプルについて、実験により得られた凝固温度は、あらかじめ加熱をした温度と近似した。

しかしながら、65°C以上の温度で加熱をした検体は分光光度計での測定に必要な量の検液を得られないことが多かった。したがって、輸入申告されるボイルいかに本方法を適用するためには、ろ過条件の改良が必要である。

文 献

- 1) 日本薬学会編集：“衛生試験法・注解 2005”，p.519 (2005)，(金平出版)
- 2) M UDDIN, S ISHIZAKI, M TANAKA : *Fisheries Science*, **66**, No.1, 153 (2000)
- 3) M UDDIN, S ISHIZAKI, M ISHIDA, M TANAKA : *Fisheries Science*, **68**, No.4, 768 (2002)
- 4) 堀尾武一編集：“蛋白質・酵素の基礎実験法（改訂第2版）”，p.456 (1997)，(南江堂)
- 5) 奥田九一郎：“生化学の基礎”，p.38 (1970)，(南江堂)
- 6) 安藤銳朗，今堀和友，伊勢村寿三，早石修：“タンパク質化学3 高次構造”，p.349 (1973)，(共立出版)