

報 文

低温加熱処理による豚肉の可溶性たんぱく質の変化

出来 三 男, 関 川 義 明*

Changes in Properties of Soluble Proteins of Pork Muscle by Low
—Temperature Heating

Mitsuo DEKI and Yoshiaki SEKIKAWA*

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance,
531, Iwase, Matsudo—Shi, Chiba—Ken, 271 Japan

Changes in the nature and the quantities of the soluble proteins of pork muscle by heat treatment at various low temperature were investigated by using polyacrylamide gel electrophoresis and circular dichroism. Even when muscle was cooked at 55°C, the contents of soluble protein have been reduced from 9.0 mg / ml (Fresh muscle) to 7.5 mg / ml (at 55°C). The quantities of soluble proteins were almost the same degree when cooked at 65°C for 120 minutes and or at 75°C for 30 minutes. The CD spectra of soluble proteins uncooked and cooked at 55°C have trough near 238 nm, and the shape and magnitude of CD were the same. But the magnitude of CD of soluble protein cooked at 70°C over decreases, and the wave length of trough shift from 238 nm to 227 nm by cooking at 70°C over. Electrophoretic pattern of soluble proteins of uncooked muscle shows 7 bands, and one bands was more predominant. In heating at 55—65°C for 10—60 minutes, electrophoretic patterns of soluble protein were the same, but the intensities of peaks was different from the soluble protein of uncooked muscle.

Four bands were observed in electrophoretic patterns of soluble proteins cooked at 75°C for 10 minutes, however, cooked at 75—80°C for 60 minutes, the number and estimated intensity of stained protein bands were altered significantly, and only 3 bands were observed. These facts indicate that the denaturation of soluble proteins in pork muscle have shown as a function of time and temperature.

—Received Aug. 31, 1981—

1 緒 言

肉の加熱処理は、食品加工のひとつとして古くから行われており、微生物の殺菌、酵素の不活性化による貯蔵性の向上、フレーバ生成による風味の改良、水分

の低下による微生物の再汚染の防止、並びにテクスチャーの改良などを主な目的としている。加熱による筋肉の物理的、化学的变化は、たんぱく質の立体構造の変化による溶解性の低下、脂肪及び糖質等の分解に由来するフレーバの生成などが特徴的である。加熱によるたんぱく質の溶解性の変化については多くの報告がある。¹⁻³⁾ Cohen⁴⁾ は未調理ハムを材料とし、各種温

* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

度で加熱処理したものの塩類可溶性たんぱく質の変化を検討しており、約75°Cの加熱処理で可溶性たんぱく質の減少が著しいことを示している。Caldironiら⁵⁾は牛肉を60~90°C範囲で加熱処理した場合、可溶性たんぱく質量は加熱温度の上昇と共に減少し、80°C以上加熱処理した筋肉では、可溶性たんぱく質は電気泳動像として確認できないとしている。一方、Leeら⁶⁾は輸入肉について、口蹄疫病菌の殺菌処理がなされているか否かを確認するために、各種温度で処理された肉の可溶性たんぱく質の電気泳動パターンを検討し、Dバンドの挙動により70°C以上の熱処理(cooked)がされているか否かを判定することができると報告している。

食肉に適する肉類のうち、生鮮、冷凍、冷蔵の牛肉は輸入制度上の取扱いが異なっており、わが国では現在のところ輸入制限品目となっている。一方、輸入制限品目となる肉類には、湯剥(scaled)程度の熱処理を含むが、加熱調理等をしたもののは肉の調製品として取扱うこととなっている。他方、わが国では、関税率表第02・06号に分類されることになるハムについては、その熱処理の範囲を60~70°C程度としているが、これを加熱調理の区分とする国際的な合意はない。ハムは一般に豚肉を原料として、これを整形、塩漬、湯煮及びくん煙処理等の工程を経て製造されており、この工程における加熱処理の温度は50~70°C程度であるといわれているが、ここでは、豚肉を材料とし、比較的の低温(55~80°C)で加熱処理したときの可溶性たんぱく質の変化を電気泳動パターン及びCDスペクトルから検討し、加熱調理とたんぱく質の変性との関係について考察した。

2 実験方法

1 試料の調製

生鮮豚肉の体脂肪を除去し、厚さ約5mmの平板状に切り、その約10gをポリエチレンの袋に入れて密封し、あらかじめ55°C、60°C、65°C、70°C、及び80°Cに保持した恒温水槽の中に置き、所定の時間(10min, 30min, 60min, 120min)加熱後、直ちに氷冷した。冷却後、試料の中心部約4gを正確に秤り取り、細断したのち0.2M Na-phosphate buffer (pH7.4) 16mlを加えて氷冷下でホモジナイザーにより2分間摩碎した。このスラリーを30分間室温に放置したのち、18, 600rpmで10

分間遠心分離した。上澄液は、東洋ろ紙No.1を用いてろ過し、ろ液を実験に供した。

加熱処理をしない生鮮肉については、体脂肪を除去した肉の約4gを秤り取り、細断したのち0.2M Na-phosphate buffer (pH7.4) 16mlを加えて氷冷下で摩碎し、以下同様に処理した。

2 電気泳動用検体の調製

前記1で調製したろ液3mlに、β-メルカプトエタノール0.03ml、0.2M Na-phosphate (pH7.4) 0.15ml及び10% SDS 0.15mlを混合し、約60分間室温に放置したのち、その混合液0.5mlを取り、これに8M尿素0.1ml及び0.05% BPB 0.1mlを加えて混合し、これを電気泳動用の検体とした。

3 SDS-ポリアクリルアミドゲル板の作成

次の試薬を順次混合して10%ポリアクリルアミドゲル板(15cm×10cm×1mm)を作成した。このゲル板には、陰極側に試料を入れる溝(3mm×1mm)を1cm間隔で設けてある。

組成:

①0.2M Na-phosphate (pH7.4)	15ml
②10% SDS	0.6ml
③10%アクリルアミド	27ml
アクリルアミド 22.2g	
メチレンビスアクリルアミド 0.6g	
0.2M Na-phosphate (pH7.4) 100ml	
④TEMED	0.06ml
⑤水	14.4ml
⑥1%過硫酸アンモニウム	3.0ml

4 電極液の調製

0.2M Na-Phosphate (pH7.4) 125ml, 10% SDS 5ml及び水370mlを加えて混合したものである。電極液は使用ごとに調製した。

5 電気泳動とたんぱく質の染色

電気泳動は20V/cm, 定電圧の条件で行い、泳動の終点はBPBの移動で判別した。泳動終了後、ゲル板を0.25%アミドブラック10B(メタノール:酢酸:水=46:8:46(V/V)の混合液に溶かしたもの)に約2時間浸して染色した。染色板は酢酸メタノール液(メ

タノール:酢酸:水=7.5:5:87.5 (V/V) 混合液)に浸し、繰り返し脱色した。泳動パターンは島津デンシトメータ S-90 で記録した。

6 円二色性 (CD) スペクトルの測定

前記 1 で調製した濾液 0.4ml に 0.2M Na-phosphate (pH7.4) 4.6ml を加えて希釈したのち、東洋ろ紙 No.6 でろ過したろ液を用い、310nm~185nm の範囲で 1cm のセルを用いて CD スペクトルを測定した。比摺円率は次式により求めた。

$$[\psi] = \frac{\theta_{\lambda}}{C \times \ell} \quad \theta_{\lambda} = \pm H \times S$$

C: 試料採取量(g)

S: deg/cm

l: セル長(cm)

H: 読み取り (cm)

7 可溶性たんぱく質の定量

試料 4g を秤り取り、0.9% NaCl 16ml を加えて氷冷したがらホモジナイザーで 2 分間摩碎したのち、18, 600rpm で 10 分間遠心分離した。上澄液は東洋ろ紙 No.1 でろ過し、ろ液について Lowry 法により比色定量した。検量線は血清アルブミンを標準品として作成した。

3 結果と考察

3・1 加熱処理による可溶性たんぱく質の変化

加熱温度と可溶性たんぱく質の変動との関係を Fig. 1 に示した。

生鮮肉では、9mg/ml の値を示すが、55°C 10 分間の加熱処理で 7.5mg/ml にまで減少する。しかし、55°C で 60 分間加熱処理すると、可溶性たんぱく質の含量は生鮮肉の約 53% にまで減少する。さらに加熱温度を高くすると、可溶性たんぱく質の含有量は急激に低下し、75°C 30 分間の加熱処理で、生鮮肉の 10% 以下になる。Paul ら⁷は Sarcoplasmic, Myofibrillarprotein の大部分は、40~60°C の加熱処理により変性することを認めているが、比較的低温における可溶性たんぱく質の減少は、熱不安定なミオシン、トロポニン、アクチンなどのたんぱく質が凝固することによるものと考えられる。

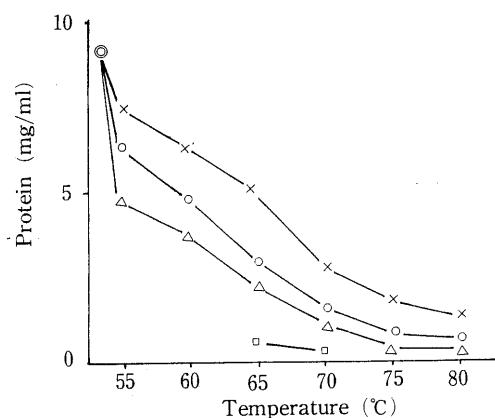


Fig. 1 Soluble Protein in meat as affected by heating at different temperature and for different time

◎ Fresh meat

×—× 10 min heating

○—○ 30 min heating

△—△ 60 min heating

□—□ 120 min heating

Fig. 1 に示したように、可溶性たんぱく質の変動は、加熱処理温度が高いほど大きいが、加熱処理時間によっても大きく影響される。すなわち、65°C 30 分間の熱処理は、70°C 10 分間の熱処理に相当しており、65°C 120 分間加熱処理したものでは、75°C 及び 80°C 30 分間加熱処理したものに対応している。このように加熱処理によるたんぱく質の変性(凝固)は、加熱時間と温度の関数として現われているので、可溶性たんぱく質の割合と加熱処理温度との相関性を明確にするのは困難である。

3・2 CD スペクトルの挙動

生鮮豚肉の CD スペクトルでは、265nm に正の弱い極大(山)が見られ、238nm に負の強い極小(谷)が現われている。この強い負のコットン効果は 55~65°C 30 分間の加熱処理でも差がなく、比摺円率は 6.50~5.30 の値を示す。しかし、Table 1 及び Fig. 2 に示したように、加熱処理温度を 60°C 以上にあげると、極小(谷)の波長は低波長側へシフトし、70°C 以上の

加熱処理では227~226nmと生鮮肉よりも10nm程度シフトする。一方、比極円率は、70°C30分間熱処理すると $-\langle\psi\rangle_{227}=3.80$ まで減少しており、さらに80°C30分

Table 1 Changes in circular dichronism of soluble proteins by heating

Heating time (min)	0	10	30	60
Temp. (°C)	$-\langle\psi\rangle \lambda$ ($\times 10^{-2}$) (nm)			
Fresh	650 238	— —	— —	— —
55	— —	650 238	650 238	630 235
60	— —	630 231	630 231	630 229
65	— —	530 230	560 230	440 228
70	— —	410 227	380 227	330 226
75	— —	360 227	310 226	260 226
80	— —	130 227	150 226	180 226

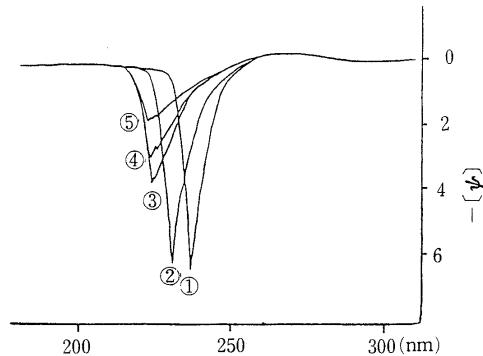


Fig. 2 CD spectra of soluble protein extracted from meat cooked at various temperature for 30 minutes

① : Fresh meat, ② : 60°C heating, ③ : 70°C heating, ④ : 75°C heating, ⑤ : 80°C heating

間の熱処理では、 $-\langle\psi\rangle_{226}=1.50$ に低下する。このような負のコットン効果の減少と極小(谷)波長のシフトは、たんぱく質の立体構造の変化及び可溶性たんぱく質の質的な変化が寄与しているものと考えられる。

可溶性たんぱく質の量的変化で示したように、加熱処理によるたんぱく質の凝固は、温度と時間により連続的に変化しているので、加熱調理の有無の判別を直接たんぱく質の含有量から規定するのは困難であるが、Fig.3に示すように、CDスペクトルにおける比極円率と加熱処理温度との相関関係をみると、かなり幅

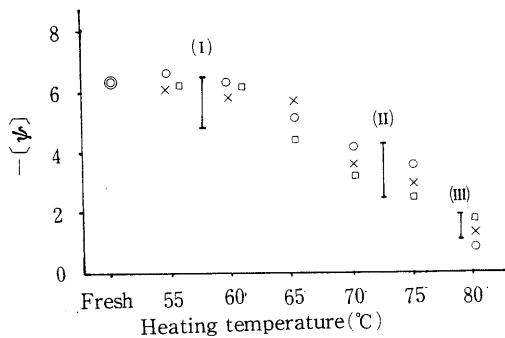


Fig. 3 Correlation between magnitude of CD and heating temperature

◎ : Fresh, ○ : 10 min heating, × : 30 min heating, □ : 60 min heating.

広い範囲であるがひとつの傾向がみられる。すなわち、65°C30分間の加熱処理までのグループ(I), 75°C10分間の加熱処理までのグループ(II), 及び80°C10分間以上加熱処理したグループ(III)である。

グループ(I)は、肉色等の外観は生鮮肉に近いものといえる。CDスペクトルにおいて、正の極大(山)の265nmは大きな強度を示さないが、加熱時間及び加熱温度に全く影響をうけていないことから耐熱性たんぱく質が寄与しているものと考えられる。

3.3 加熱処理による電気泳動図の変化

各種温度で10分間加熱処理したときの可溶性たんぱく質の電気泳動図をFig.4に示した。

生鮮肉では7個のピークが現われており、ピーク③の強度は他のピークに比較して極めて顕著である。各ピークの同定は行っていないが、この実験に供した可溶性たんぱく質は、Sarcoplasmic, 及びMyofibrillarproteinを主要な構成たんぱく質としているので、泳動距離からピーク③はトロポニン及びアクチンに相当するものと考えられる。55~65°Cで加熱処理したものの泳動図は類似しており、出現ピーク数は生鮮肉との間に差がないが、泳動パターンに差がみられる。すなわち、65°Cでは、ピーク③の強度が相対的に減少し、ピーク⑦が顕著になっている。トロポニン及びミオシンは熱に不安定であり、比較的低い温度(40~46°C)の熱処理でも凝固するので、⁸⁾これらのたんぱく質が減少し相対的に他のたんぱく質の割合が

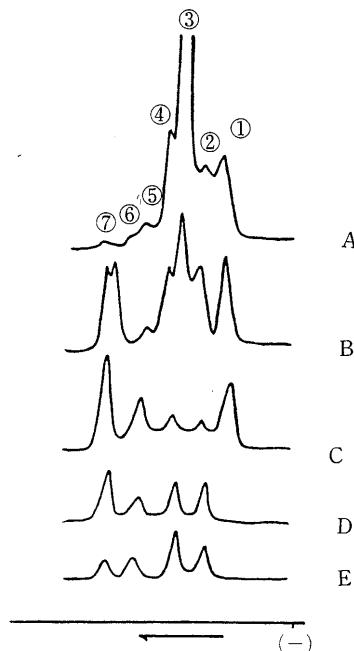


Fig. 4 Electrophoretic patterns of proteins in soluble proteins extracted from meat cooked at various temperature for 10 minutes

A : Fresh meat, B : 65°C heating, C : 70°C heating, D : 75°C heating, E : 80°C heating

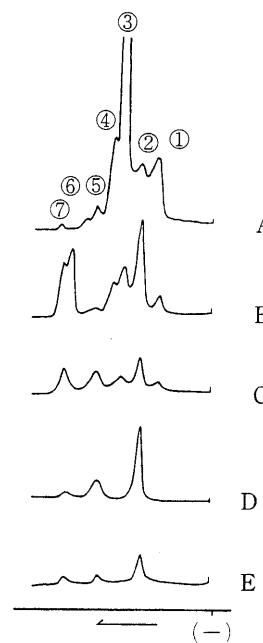


Fig. 5 Electrophoretic patterns of proteins in soluble protein extracted from meat cooked at various temperature for 60 minutes

A : Fresh meat, B : 65°C heating, C : 70°C heating, D : 75°C heating, E : 80°C heating

増加したものと考えられる。Cohen⁴⁾も熱処理により低分子たんぱく質の電気泳動像の強度が相対的に増加することを認めている。ミオグロビン、ミオアルブミンは比較的熱に安定であるので、⑥ ピーク①、ピーク⑦は、これらのたんぱく質に相当するものと考えられる。70°Cに加熱処理したものでは、ピーク④及び⑤が消失し、ピーク②及び③の相対強度も低下している。75°C及び80°Cで加熱処理したものでは、ピーク①、④、及び⑤は現われず、他のピークの強度も著しく低下している。

加熱処理の時間を 60 分間にしたときの泳動パターンを Fig. 5 に示した。

65°Cでは 10 分間の熱処理のものと著しい相違はみられないが、ピーク③の相対強度の減少が大きい。70°Cまでは、ピーク数に著しい差はないが、75°C以上の加熱処理のものでは、ピーク②、⑥及び⑦のみが現われ

ており、ピーク②の相対強度が増加している。泳動距離からピーク②はミオグロビンに相当するが、ミオグロビンは 90°Cの熱処理でも電気泳動像として観察されることが Lee ら⁶⁾によって報告されている。

Fig. 6 に 70°Cにおける加熱時間と泳動パターンの変化を示した。10 分間、30 分間、及び 60 分間加熱処理したものでは、ピーク数に差はないが、ピーク①の相対強度が 60 分間熱処理したものでは著しく低下している。120 分間熱処理すると、ピーク数は 3 個になり、ピーク②の相対強度が増加し、泳動パターンは、75°C及び 80°C 60 分間熱処理したものと類似している。

これらの泳動パターンに示されているように、70°C 10 分間程度の熱処理では可溶性たんぱく質の質的な相違はなく、ピーク①の挙動から加熱処理の温度を推定できる可能性がある。

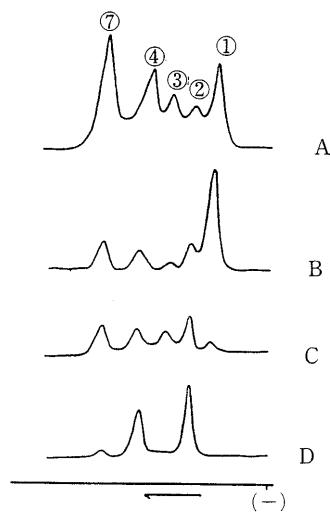


Fig. 6 Electrophoretic patterns of proteins in soluble protein extracted from meat cooked at 70°C for various heating time

A : 10 min heating, B : 30 min heating,
C : 60 min heating, D : 120 min heating

4 要 約

生鮮豚肉を原料とし、加熱処理温度と加熱時間による可溶性たんぱく質の変化について検討した。

筋肉中の可溶性たんぱく質の割合は、55°Cの低い加熱処理でも減少し、加熱処理温度の上昇、加熱処理時間の長さに対応して低下する。65°C120分間の熱処理と75°C30分間熱処理したときの可溶性たんぱく質の含有量はほぼ類似しており、たんぱく質の凝固(変性)が熱処理の温度と時間の関数とし現われることを示した。

可溶性たんぱく質のCDスペクトルでは、負の強いコットン効果が現われ、65°C30分間の熱処理ではコットン効果に著しい差はみられないが、極小(谷)波長が低波長側へシフトする。比摺円率の値は、65°C30分間の熱処理と生鮮肉とでは類似している。

可溶性たんぱく質の電気泳動パターンは、55°C、60°C及び65°Cで熱処理したものでは良く類似しているが、生鮮肉とは各ピークの相対強度に著しい相違がある。特にピーク③の減少が顕著である。75°C以上で熱処理したものではピーク数及び泳動パターンが異なっており、ピーク①及び③の消失が特徴的である。

可溶性たんぱく質のCDスペクトル及び電気泳動パターンから、65°C60分間、又は70°C10分間程度の加熱処理をしたものには、比較的生鮮肉に類似した挙動を示すものといえる。

文 献

- 1) 出来三男、佐藤宗衛：本誌、12, 83 (1972)
- 2) N. E. Fogg and D. L. Harrison : J. Food Sci., 40, 28 (1975)
- 3) J. R. Quinn and M. Pearson : J. Food Sci., 29, 429 (1964)
- 4) E. H. Cohen : J. Food Sci., 31, 746 (1966)
- 5) H. A. Caldironi and N. G. Bazan : J. Food Sci., 45, 901 (1980)
- 6) Y. B. Lee, D. A. Rickansrud, E. C. Hagberg and E. J. Briske : J. Food Sci., 39, 428 (1974)
- 7) P. C. Paul, L. Butcher and A. Wierenga : J. Agr. Food Chem., 14, 490 (1966)
- 8) E. Lakkonen, J. W. Sherbon and G. H. Wellington : J. Food Sci., 35, 178 (1970)