

魚肉冷凍すり身の
坐りおよび戻り反応に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻
博士後期課程

山田晃樹

2020

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 各種冷凍すり身の一般成分および加熱ゲル形成に及ぼす坐り反応	6
2. 1. 各種冷凍すり身の一般成分測定	8
2. 1. 1. 試料および方法	8
2. 1. 2. 結果	10
2. 2. 加熱ゲル形成に及ぼす坐り反応	14
2. 2. 1. 方法	14
2. 2. 2. 結果	16
2. 3. 考察	18
第 3 章 坐り反応を用いた各種冷凍すり身の品質評価	19
3. 1. 坐り反応ゲルの破断強度測定	20
3. 1. 1. 試料および方法	20
3. 1. 2. 結果	21
3. 2. 坐り速度解析	29
3. 2. 1. 方法	29
3. 2. 2. 結果	29
3. 3. 坐り反応の活性化エネルギー測定	31
3. 3. 1. 方法	31
3. 3. 2. 結果	31
3. 4. 考察	34
第 4 章 各種冷凍すり身の戻り反応に関与するプロテアーゼの特定	35
4. 1. 戻り反応ゲルの破断強度測定	36
4. 1. 1. 試料および方法	36
4. 1. 2. 結果	36

4. 2. プロテアーゼインヒビター添加戻り反応ゲルの SDS-PAGE による 構成タンパク質の観察	39
4. 2. 1. 試料および方法	39
4. 2. 2. 結果	41
4. 3. ミオシン率の解析による戻り反応に関与するプロテアーゼの特定	55
4. 3. 1. 方法	55
4. 3. 2. 結果	55
4. 4. 考察	61
第 5 章 総括	62
謝辞	65
参考文献	66

第 1 章 緒言

「かまぼこ」や「ちくわ」に代表される魚肉練り製品は、魚肉タンパク質の特性を活かした日本の伝統的な加工食品である¹⁾。その主原料となる冷凍すり身は、変性しやすい魚肉の長期保管を目的に開発された中間製品で、現在多くの魚種から様々な等級の冷凍すり身が製造・販売されている。冷凍すり身の国内の年間生産量は約 40,000 t であるのに対し、年間輸入量は約 300,000 t と、世界で漁獲される魚種を原料にした冷凍すり身が国内で広く利用されている (2016 年)²⁾。海外では冷凍すり身の製造に留まらず健康志向の高まりに伴い、近年カニかまを中心にして「かまぼこ」の生産量ならびに消費量が増加している。一方、日本国内の水産練り製品の生産量は減少傾向にあるが、食品加工品生産量の加工種類別構成割合で 32.3% (平成 29 年) と、未だに水産加工品の中で最も高い割合を占めており、重要な産業である³⁾。

スケトウダラは冷凍保存中に、エキス成分の 1 つであるトリメチルアミノオキサイド (TMAO) が分解してホルマリンを生成する。これによりタンパク質が著しく変性するため、魚体のままでは長期冷凍保存が難しい魚種である。冷凍すり身は、そうしたスケトウダラ魚肉の長期保存を目的に 1960 年に開発された⁴⁻⁶⁾。冷凍すり身の製造工程には「水晒し」という工程がある。この工程では、水溶性の TMAO ならびにこれを分解するプロテアーゼの大部分が除かれるため、タンパク質変性が起こりにくくなる⁷⁾。また、冷凍すり身には、スクロースやソルビトールなどの糖類や重合リン酸塩が冷凍変性防止剤や pH 調整剤として添加されている。これによって、魚肉タンパク質を未変性のまま長期保存することが可能となり、例えば一年間以上貯蔵した冷凍すり身であっても、ゲル物性に優れる魚肉練り製品の製造が可能になった^{8,9)}。

魚肉練り製品には特有の弾力やしなやかさがあり、そうした物性は「足」

と呼ばれている。足の発現には、魚肉の主要構成タンパク質であるミオシンが必要不可欠であり、本タンパク質を主体とする網目構造の形成が関係している。また、魚肉練り製品の物性は加熱履歴によっても大きく影響を受ける。特に、魚肉練り製品の物性発現にとって「坐り」と「戻り」反応を把握することは重要である。

坐り反応は 20～40°C の温度域で生じる現象で、魚肉中に存在するトランスグルタミナーゼによりミオシン分子間に共有結合からなる架橋が生じ、ゲル構造が増強する反応である¹⁰⁻¹²⁾。この反応の強弱は、魚種や生息域、季節などによるミオシンの性状の違いや、pH、塩分量などによって大きく左右される¹³⁻²⁰⁾。魚類の内在性トランスグルタミナーゼは、イトヨリダイやシログチ、マダイなど数種の魚類組織から精製されてその特性が調べられ、魚卵の卵膜硬化や、筋肉タンパク質の架橋結合を促進することが報告されている²¹⁻²³⁾。本酵素は水溶性タンパク質であるが、水晒しの工程で完全に除かれることは無く、すり身の坐り反応に関与する²⁴⁾。

魚肉練り製品の衛生面での管理には、HACCPなどの衛生管理システムが導入されている²⁵⁾。その一方で、冷凍すり身の品質に基づく等級分けの基準は明確には定めらおらず、品質面の管理は未だ不十分である。現状では、製品の一部を取り出して加熱ゲルを作製し、その物性から等級を決定するなど、製造業者が独自の基準で品質を評価している。

そこで本研究では、まず魚肉冷凍すり身に特有の現象である坐り反応に着目し、食品工学的手法による解析を試みた。Katohらは本手法を用いてスケトウダラ、シログチおよびティラピア冷凍すり身の品質の差を数値化しているが²⁶⁾、同魚種の等級間で差を示せるかは不明である。本研究では、市販のスケトウダラ、ホキおよびイトヨリダイの異なる等級の冷凍すり身を比較対象とした。スケトウダラ(学名：*Gadus chalcogrammus*、英名：*Alaska pollack*)はタラ目タラ科に属し、北太平洋に生息する冷水性の魚類である。その資源

量は非常に多く、すり身原料として世界最大で、最もすり身に関する研究が進んでいる魚種でもある。スケトウダラすり身の坐り反応は長時間を要するが、20°Cで最も高い破断強度になり、次いで30°Cで破断強度が高くなると報告されている²⁷⁻³³⁾。ホキ(学名：*Macruronus novaezelandiae*、英名：Blue grenadier)は、タラ目メルルーサ科に属するニュージーランドなどの南半球に生息する冷水性の魚類である。ホキすり身は、30°Cまでは破断強度が増加するが、40°C以上になるとゲル構造が崩壊し始める。ホキ冷凍すり身は、スケトウダラすり身と似た特性を持つが、戻り反応が起こりにくいという特徴がある³⁴⁾。イトヨリダイ(学名：*Nemipterus vigatus*、英名：Threadfin bream)は、スズキ目イトヨリ科に属する温熱帯海域に生息する魚種である。東南アジアでは昔からイトヨリダイを原料にしたフィッシュボールが生産されている。イトヨリダイすり身は、10°Cだと坐り反応がそれほど起きず、20°Cになってから坐り反応が起きる。その坐りの至適温度は37~38°Cにあるとされている。また、イトヨリダイすり身は冷水性の魚類よりも、高温度加熱による劣化耐性が高い^{35,36)}。本研究ではこれら3魚種の市販されている数種冷凍すり身を用いた。各冷凍すり身につき、坐り反応中の破断強度の変化から坐り速度を求め、さらに坐り反応の活性エネルギーを算出し、これが魚種間ならびに等級間の品質の差を表す指標となるかを検討した。

一方、戻り反応は50~70°Cの温度域で、ゲル構造が脆弱化する反応で、複数の内在性プロテアーゼが温度依存的に働くためだと推察されている。この反応が進むと坐り反応により形成されたゲルが崩壊する。戻り反応は、酵素反応に起因することから反応温度と時間に大きく影響を受け、それらは魚種やすり身の等級によって異なる³⁷⁻⁴⁴⁾。例えば、比較的低温度である40°C程度でも反応を起こす魚種(スケトウダラ、ホキなど)もいる⁴⁵⁾。戻り反応には、カテプシンBやカテプシンL、カテプシンB様酵素、筋原線維結合型セリンプロテアーゼなど複数のプロテアーゼが関与すると報告されており、こ

れらは Modori-inducing protease (MIP) と総称される⁴⁶⁻⁴⁸⁾。

実際の冷凍すり身の製造工程では、採肉したミンチ肉を多量の水で複数回洗浄する水晒し工程があり、筋原線維結合型セリンプロテアーゼ以外のプロテアーゼは、この工程でそのほとんどが除去される。したがって、戻り反応に関与しているのは主として筋原線維結合型セリンプロテアーゼと考えられており、コイやシログチ、ヨーロッパブナ、ワニエソなどの魚種で、その構造や特性が研究されている⁴⁹⁻⁵²⁾。一方、筋原線維結合型セリンプロテアーゼが高い活性を示さない魚種も報告されている⁵³⁾。また、その他のプロテアーゼにも種特異性が認められている。例えば、メタロプロテアーゼは、魚類ではコラーゲンを分解するのが一般的であるが^{54,55)}、イトヨリダイやマダイでは、メタロプロテアーゼの活性が高く、筋原線維タンパク質を分解する戻り反応に関与していると示唆されている⁵⁶⁾。魚類以外の水産物では、イカ筋肉でミオシンを分解する Astacin-like squid metalloprotease (ALSM) というイカ類に特異的なプロテアーゼの存在と、その特性が報告されている⁵⁷⁻⁶⁰⁾。

本研究では、魚肉冷凍すり身に特有の現象である戻り反応にも着目し、従来から報告されている魚種間の違いに加え、等級間での戻り反応の違いとプロテアーゼの関係を明らかにすることを試みた。ここでは戻り反応を生じ易いとされるスケトウダラおよびホキの冷凍すり身を対象とした。これらの冷凍すり身に対し、メタロプロテアーゼインヒビターである EDTA および 1,10-Phenanthroline monohydrate (Phenanthroline)、セリンプロテアーゼインヒビターである Aprotinin および Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride (PMSF)、システインプロテアーゼインヒビターである E-64 をそれぞれ添加し、40、50 および 60°C の各温度で戻り反応を行い、それぞれの温度で活性を示すプロテアーゼを魚種や等級ごとに特定することを試みた。

なお、本研究で得られた成果の一部は下記の学術雑誌で発表済みである。

①. Ymada, K., Kajita, T., Matsumiya, M., & Fukushima, H. (2018). Evaluation of

the quality of frozen surimi using suwari reaction speed and activation energy.

CyTA-Journal of Food, 16(1), 723-729.

②. Yamada, K., Matsumiya, M., & Fukushima, H. (2020). Modori reaction in blue grenadier and Alaska pollock frozen surimi and myosin degradation behavior upon addition of protease inhibitors. *CyTA-Journal of Food*, 18(1), 451-460.

第2章 各種冷凍すり身の一般成分および加熱ゲル形成に及ぼす坐り反応

冷凍すり身は、資源量が多いものの魚肉が変性しやすいスケトウダラの長期保存を目的に開発された製品である。その製造は、まず漁獲した魚体をよく洗浄し、鱗を取り除く。その後、ヘッドカッターや、フィレマシーンにより魚体をフィレの状態とし、採肉機により骨や皮と肉を分離する。ここで得られる魚肉は金属板に空いた孔を通る為、ミンチ肉となる。採肉されたミンチ肉の数倍～数十倍の水を加え、穏やかに攪拌する「水晒し」工程で、ミンチ肉に含まれる骨や皮、脂質や血液などの、夾雑物を取り除く。同時に水溶性タンパク質も除かれ、筋原線維タンパク質の割合が高まる。通常、水晒し肉は軽く脱水した後、複数回水晒しされる。脱水後、リファイナーで裏ごしして、筋などの不溶性タンパク質を取り除く。裏ごし肉に対して、4～10%のスクロース、ソルビトールなどの糖類、ならびに0.3%の重合リン酸塩を加え、リボンミキサーでよく混合する。各種の糖類は、魚肉タンパク質の冷凍変性防止を、重合リン酸塩はすり身のpH調整を目的に添加される。最終的にコンタクトフリーザーで一枚10kgの板状の形状で、芯温が-25°C以下まで急速に凍結され完成する。

冷凍すり身の品質は、原料鮮度や水晒しの回数、脱水強度、夾雑物の量、タンパク質の組成や濃度、添加物の量、凍結条件など多くの因子に影響される。そのため、冷凍すり身の品質を評価することは安易ではない。また現在では、スケトウダラ以外の多くの魚種でも冷凍すり身が製造されるようになり、ホキやイトヨリダイ、シログチなどの白身魚や、イワシやサバなどの赤身魚、サメ類などの軟骨魚類などが利用されている。冷凍すり身は、等級の高いものよりSA>FA>AA>A>KA>B>BK>RA>RBの順に分類されている。

本章では、スケトウダラ（SAおよびRA級）、ホキ（FAおよびKA級）お

よびイトヨリダイ（SA および KA 級）の 3 魚種から計 6 種類の冷凍すり身を用いて、一般成分および加熱ゲル形成能が等級間でどのように異なるかを分析した。

2. 1. 各種冷凍すり身の一般成分測定

2. 1. 1. 試料および方法

2. 1. 1. 1. 試料および方法

スケトウダラ（SA 級および RA 級）、ホキ（FA 級および KA 級）およびイトヨリダイ（SA 級および KA 級）冷凍すり身をニチモウ株式会社（東京）より購入した。購入した冷凍すり身は 1 kg 前後に小分けにして、-25°C で保管した。本研究では、スケトウダラ SA 級、ホキ FA 級およびイトヨリダイ SA 級を等級が高いもの、スケトウダラ RA 級、ホキ KA 級およびイトヨリダイ KA 級を等級が低いものとして使用した。試料の成分測定は「日本食品標準成分表 2015 年版」に記載の方法に基づいて行った⁶¹⁾。

2. 1. 1. 2. 水分測定

各冷凍すり身の水分測定は常圧加熱乾燥法（乾燥助剤法）で行った。水分測定乾燥条件は、105°C、5 時間とした。

2. 1. 1. 3. タンパク質測定

各冷凍すり身のタンパク質測定は、燃焼法（改良デュマ法）で行った。

2. 1. 1. 4. 脂質測定

各冷凍すり身の脂質測定は、エーテル抽出法（ソックスレー抽出法）で行

った。

2.1.1.5. 炭水化物測定

各冷凍すり身の炭水化物測定は、全体量から水分、タンパク質、脂質、灰分の合計（g）を差し引いて算出した。

2.1.1.6. 灰分測定

各冷凍すり身の灰分測定は、直接灰化法で行った。

2.1.1.7. ナトリウム測定

各冷凍すり身のナトリウム測定は、原子吸光光度法（灰化法）で行った。

2.1.1.8. 食塩相当量測定

各冷凍すり身の食塩相当量測定は、ナトリウム量より算出した。

2.1.1.9. 熱量測定

各冷凍すり身の熱量測定は、修正アトウォーター法で行った。

2. 1. 2. 結果

2. 1. 2. 1. 水分

スケトウダラの水分は、SA 級が 74.0 g/100 g、RA 級が 74.6 g/100 g であった (Table1)。ホキは、FA 級が 74.4 g/100 g、KA 級が 75.1 g/100 g であった。イトヨリダイは、SA 級が 73.5 g/100 g、KA 級が 77.1 g/100 g であり、イトヨリダイの等級間で水分の差が認められたものの、他の 2 魚種では等級間に顕著な差は認められなかった。

2. 1. 2. 2. タンパク質含量

スケトウダラは、SA 級が 19.0 g/100 g、RA 級が 17.4 g/100 g であった (Table 1)。ホキは、FA 級が 17.0 g/100 g、KA 級が 16.5 g/100 g であった。イトヨリダイは、SA 級が 17.6 g/100 g、KA 級が 16.9 g/100 g であり、いずれの魚種においても等級の高いすり身でタンパク質含量が高かった。

2. 1. 2. 3. 脂質含量

スケトウダラは、SA 級が 0.6 g/100 g、RA 級が 0.4 g/100 g であった (Table 1)。ホキは、FA 級が 0.7 g/100 g、KA 級が 0.3 g/100 g であった。イトヨリダイは、SA 級が 0.1 g/100 g、KA 級が 0.1 g/100 g であり、いずれの魚種、等級においても 1%以下の含量であった。

2.1.2.4. 炭水化物含量

スケトウダラは、SA 級が 5.9 g/100 g、RA 級が 7.2 g/100 g であった (Table 1)。ホキは、FA 級が 7.3 g/100 g、KA 級が 7.6 g/100 g であった。イトヨリダイは、SA 級が 8.4 g/100 g、KA 級が 5.4 g/100 g であった。ここでの炭水化物は、冷凍すり身に添加された数種の糖を測定していると推定されるが、スケトウダラでは等級が高いすり身が少なく、ホキではほぼ等量、イトヨリダイでは等級が高いすり身が多かった。

2.1.2.5. 灰分

スケトウダラは、SA 級が 0.5 g/100 g、RA 級が 0.4 g/100 g であった (Table 1)。ホキは、FA 級が 0.6 g/100 g、KA 級が 0.5 g/100 g であった。イトヨリダイは、SA 級が 0.4 g/100 g、KA 級が 0.5 g/100 g であり、いずれの魚種および等級においても 1%以下の含量であった。

2.1.2.6. ナトリウム含量

スケトウダラは、SA 級が 151 mg/100 g、RA 級が 158 mg/100 g であった (Table 1)。ホキは、FA 級が 170 mg/100 g、KA 級が 138 mg/100 g であった。イトヨリダイは、SA 級が 161 mg/100 g、KA 級が 96 mg/100 g であった。

2.1.2.7. 食塩相当量

スケトウダラは、SA 級が 0.384 g/100 g、RA 級が 0.401 g/100 g であった (Table 1)。ホキは、FA 級が 0.432 g/100 g、KA 級が 0.351 g/100 g であった。

イトヨリダイは、SA 級が 0.409 g/100 g、KA 級が 0.244 g/100 g とごく微量に含まれていた。

2. 1. 2. 8. 熱量

スケトウダラは、SA 級が 105 kcal/100 g、RA 級が 102 kcal/100 g であった (Table 1)。ホキは、FA 級が 104 kcal/100 g、KA 級が 99 kcal/100 g であった。イトヨリダイは、SA 級が 105 kcal/100 g、KA 級が 90 kcal/100 g であった。

Table 1 General ingredients of various frozen surimi

Species	Grade	Moisture (g/100 g)	Protein (g/100 g)	Lipids (g/100 g)	Carbohydr ates (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Sodium (mg/100 g)	Salt equivalent (g/100 g)	Calorie (kcal/100 g)
Alaska pollack	SA	74.0	19.0	0.6	5.9	0.5	151	0.384	105
	RA	74.6	17.4	0.4	7.2	0.4	158	0.401	102
Blue grenadier	FA	74.4	17.0	0.7	7.3	0.6	170	0.432	104
	KA	75.1	16.5	0.3	7.6	0.5	138	0.351	99
Threadfin bream	SA	73.5	17.6	0.1	8.4	0.4	161	0.409	105
	KA	77.1	16.9	0.1	5.4	0.5	96	0.244	90

2. 2. 加熱ゲル形成に及ぼす坐り反応

2. 2. 1. 方法

2. 2. 1. 1. 直加熱および二段加熱ゲルの作製

直加熱および二段加熱ゲルの作製工程を Fig.1 に示す。まず、 -25°C で保存してあった冷凍すり身を 4°C の冷蔵庫内で一晩解凍した。解凍したすり身をフードプロセッサー (MK-K48P, Panasonic, 大阪) または高速真空攪拌機 (UMC-5, Stephan, 千葉) を用いて約 1 分間、「粗ずり」を行った。次に、水をすり身に対し 30%加えて約 1 分間、「水伸ばし」を行った。最後に、食塩を水伸ばし肉に対して 2.5%加えて約 1 分間「塩ずり」を行い、肉糊を調製した。以上の攪拌は全て 10°C 以下で行った。調製した肉糊をケーシングフィルム ($\Phi 23\text{ mm}$) (株式会社クレハ社製, 東京) に充填し、恒温水槽 (THERMO MINDER SM-05R, TAITEC, 埼玉) で直加熱 (85°C 、30 分) および二段加熱 (30°C で 20 分加熱後 85°C で 30 分) で加熱ゲルを作製した。作製した加熱ゲルをレオメーター (NRM-3002D, Rheotech, 東京) を用いて破断強度および凹みを測定した。レオメーターは、球形のプランジャー (直径 5 mm) を用いて、ステージ速度を 6.0 cm/min に設定した。

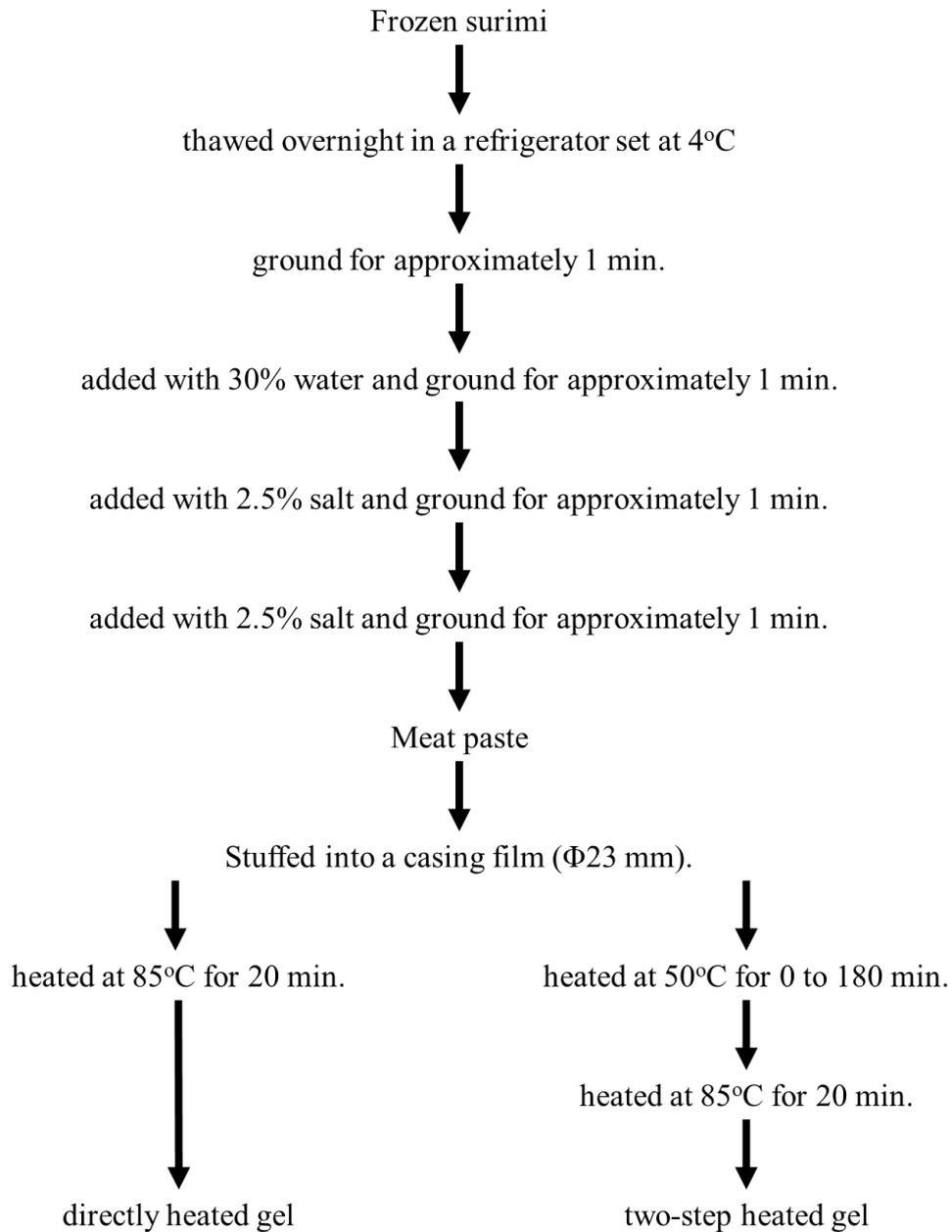


Fig. 1. Preparation procedure for directly heated and two-step heated gel.

2.2.2. 結果

2.2.2.1. 加熱ゲル物性測定

各加熱ゲルの物性測定の結果を Fig.2 に示す。直加熱と二段加熱を比較すると、二段加熱が破断強度および破断凹みともに高い数値を示し、いずれの魚種、等級においても坐り反応の効果が認められた。同魚種の等級間で比較すると、どの魚種においても等級が高いすり身の破断強度および破断凹みが等級が低いすり身の値よりも大きくなった。特にホキでは、直加熱と二段加熱ゲルはともに等級間の破断強度に大きな差が認められ、加熱ゲル物性に及ぼす坐り反応の効果が顕著であった (Fig.2a)。破断凹みも同様の傾向が認められ (Fig.2b)、坐り反応により、加熱ゲルのしなやかさの向上が確認された。

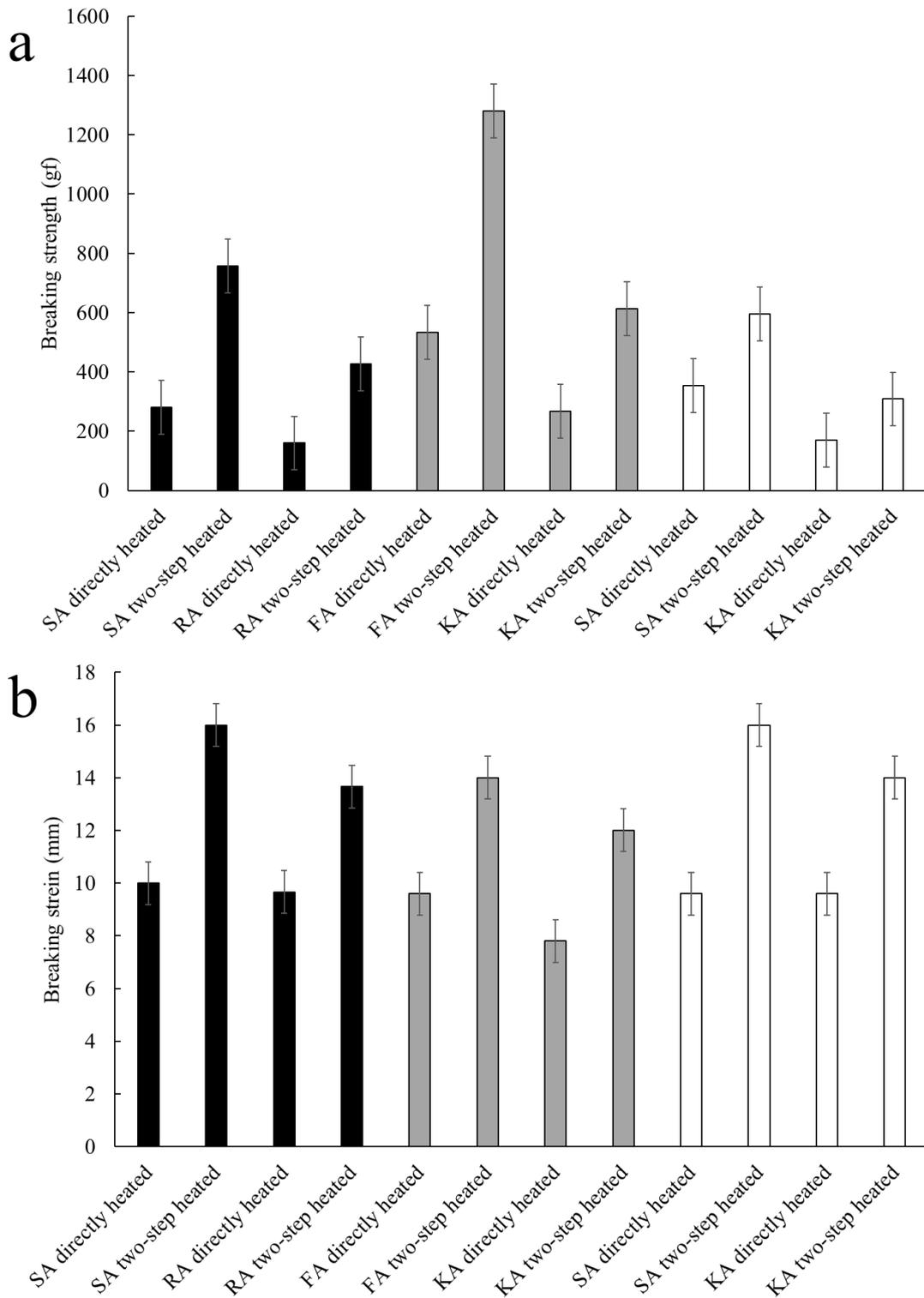


Fig. 2. Changes in physical properties of thermal gels from various frozen surimi by directly and two-step heating.

a: Breaking strength, b: Breaking strain.

■: Alaska pollack, ■: Blue grenadier, □: Threadfin bream.

2.3. 考察

各冷凍すり身の一般成分測定の結果から、等級が高いすり身は等級が低いすり身よりも水分が少なく、タンパク質量が多い傾向が認められた。こうした違いは、加熱ゲル物性にも表れており、3 魚種いずれにおいても等級が高いすり身の方が高いゲル物性を示した。しかし、糖量を表す炭水化物は、スケトウダラでは等級の高いすり身では少なかったのに対し、イトヨリダイでは反対に多く、成分と等級が逆転しているものもあった。したがって、一般成分の差だけで等級間の品質差を示すのは困難であった。

本章で用いた 3 魚種 6 種類の冷凍すり身は、いずれも二段加熱で破断強度および凹みが向上しており、「坐り」反応を起こす性状を示した。そこで次章では坐り反応に着目し、その反応が等級間で異なるかを明らかにすることとした。

第3章 坐り反応を用いた各種冷凍すり身の品質評価

坐りとは魚肉すり身に特有の現象で、家畜肉ではこうした現象はみられない。塩ずりした魚肉を 20~40°C の温度域でしばらく加温すると坐り反応が進行し、透明感のあるゲルを形成する。これは、魚肉中に存在するトランスグルタミナーゼによるミオシン分子間の架橋結合によって生じる現象である¹⁰⁻¹²⁾。

坐り反応は魚種特異性を示す。スケトウダラは、20°C で最も高い破断強度になり、次いで 30°C で破断強度が高くなる²⁷⁻³³⁾。同様に冷水性の魚類であるホキはスケトウダラと似た反応を示す³²⁾。一方、ミナミダラは冷水性の魚類だが、30°C で非常に強いゲルを形成する¹⁵⁾。また、亜熱帯海域に生息するイトヨリダイやグチは、20°C 以下ではそれほど坐り反応は起こさず、坐りの至適温度は 35~38°C と高温度域にある^{16,19,35,36)}。淡水魚であるコイは、どの温度においても、坐り反応をそれほど起こさない¹¹⁾。季節によっても坐り反応の挙動は異なる。これは、季節によって魚種の成熟度が異なりタンパク質量に差が生じるためである¹⁸⁾。また、pH はトランスグルタミナーゼの至適域かつ魚肉の等電点である中性で最も反応が進む。また、塩分量が 10% までは坐りゲルの破断強度が高くなり物性が向上するが、それ以上添加してしまうと破断強度が低くなり物性が低下する^{19,20)}。このように、坐り反応は魚種や生息域、季節などによる違いや、pH、塩分量などによってその挙動は大きく影響される。

本章では、前章で坐り反応が確認されたスケトウダラ (SA および RA 級)、ホキ (FA および KA 級) およびイトヨリダイ (SA および KA 級) の冷凍すり身を対象に、坐り反応中の破断強度変化から坐り速度を求め、さらに坐り反応の活性化エネルギーを算出し、こうした数値が魚種間ならびに等級間の品質の差を表す指標となるかを検討した。

3. 1. 坐り反応ゲルの破断強度測定

3. 1. 1. 試料および方法

3. 1. 1. 1. 試料

試料は、2. 1. 1. 1.と同様のものを使用した。

3. 1. 1. 2. 坐り反応ゲルの作製

2. 2. 1. 1.と同様の方法で肉糊を調製し、20、25 および 30°C（イトヨリダイのみ 23°C での反応も行った）で反応を行い、坐り反応ゲルを作製した。

3. 1. 1. 3. 破断強度測定

2. 2. 1. 1.と同様の方法で測定した。

3. 1. 1. 4. SDS-PAGE

12.5%のポリアクリルアミドゲル（e-PAGEL, ATTO Corporation, 東京）を用いて Laemmli の方法で SDS-PAGE を行った⁶²⁾。サンプル（0.2 g）とタンパク質溶解液（20 mM Tris-HCL (pH 8.0), 2% SDS, 8 M urea, 2% β -mercaptoethanol）を試験管内で混合し、2 分間沸騰水中で加熱した。試験管内にスターラーを入れ試料と溶解液を一晩攪拌した。完全に溶解したことが確認できたら、サンプルを 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し卓上遠心機（Force Mini, BM Bio, 東京）で遠心分離を行った。その後、中層からサンプルを 200 μ l 抽出し、

サンプル調整液（0.5 M Tris-HCL, 2% SDS, 0.45 M グリセロール, 2% β -mercaptoethanol）を 50 μ l 加え、1 分間沸騰水中で加熱し、これをサンプルとした。分子量マーカーとして Prestained molecular weight markers（Bio-Rad）を用いた。電気泳動したゲルは、Comassie Brilliant Blue（CBB）R-250 を含む染色液で 1.5 時間染色し、その後脱色液（30% methanol, 10% acetic acid）で背景が透明になるまで脱色した。

3. 1. 2. 結果

3. 1. 2. 1. 坐り反応ゲルの破断強度の経時変化

各冷凍すり身の破断強度の変化と近似曲線を Fig.3-9 に示した。いずれの魚種および等級のすり身であっても、各反応温度において時間経過に伴って破断強度が増加し、坐り反応ゲルを形成することが示された。スケトウダラ SA 級および RA 級の挙動は良く似ており、20、25 および 30°C の反応温度でそれぞれ 48、24 および 3 時間で最大破断強度に達した（Fig.3-5）。ホキ FA 級は、反応の温度帯に関わらず 24 時間で最大破断強度に達した（Fig.6）。反応温度 20、25 および 30°C でそれぞれ 1,308、1,790 および 1,464 g であった。ホキ KA 級もホキ FA 級と同様に変化し最大破断強度は、反応温度 20、25 および 30°C でそれぞれ 1,140、1,322 および 1,140 g であった（Fig.7）。スケトウダラはホキとは異なり、反応温度によって最大破断強度に達するまでの時間に大きな差が認められた。イトヨリダイでは、KA 級 30°C の結果を除けば SA 級および KA 級で最大破断強度に達するまでの時間は同じく、20、25 および 30°C でそれぞれ 24、24 および 48 時間であった（Fig.8,9）。どの魚種においても、等級が高いすり身の方が等級が低いすり身の値よりも坐り反応ゲルの最大破断強度は高くなった。スケトウダラとイトヨリダイは、等級が高

いすり身が低いすり身のおおよそ 2 倍以上の数値を示したのに対し、ホキでは、1.1~1.3 倍であった。イトヨリダイ KA 級の 30°C の反応では、短時間で最大破断強度に達しており、その値も 25°C の反応と比較して著しく低かったことから、戻り反応が関与していることが示唆された。以後の測定にイトヨリダイ KA 級の結果を加えると、結果に大きな影響があると推測されたため、30°C のデータは用いずに新たに 23°C での挙動を調べた。23°C では、48 時間で最大破断強度に達し、その値は 357 g となった。

最大破断強度に達するまでの反応時間を魚種間で比較すると、イトヨリダイが 48 時間と他の 2 種よりも多くの時間を要した。これは生息温度に起因するトランスグルタミナーゼ活性の温度依存性を反映するものと考えられた。また、スケトウダラとイトヨリダイは、等級の違いによって破断強度の経時変化に大きな差が生じたが、ホキの場合では大きな差が生じなかったことから、魚種により等級間の坐り反応における品質差が異なることが示唆された。

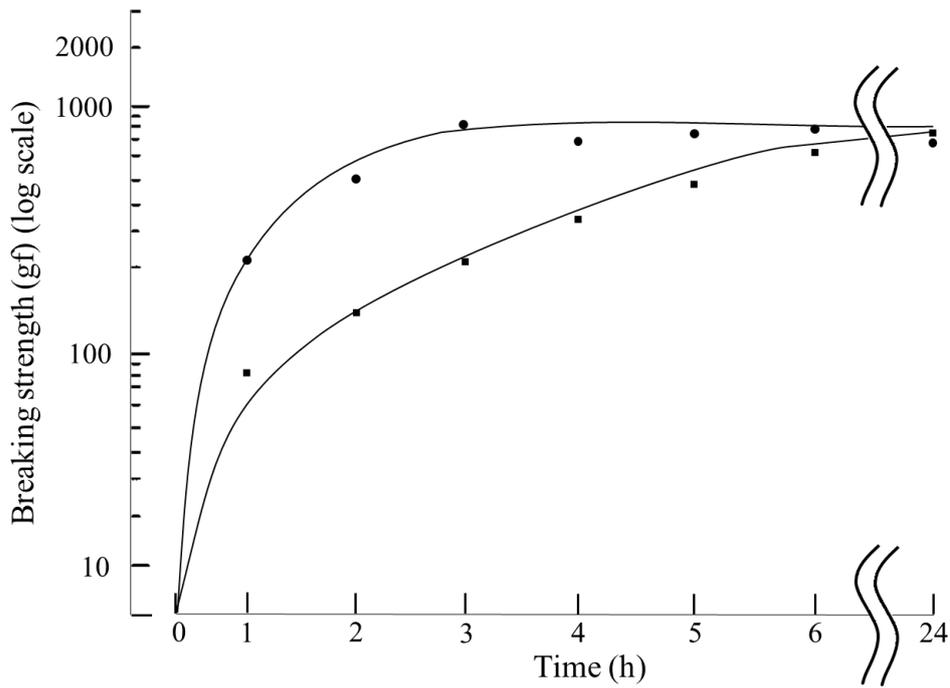


Fig. 3. Approximate curve of breaking strength of Alaska pollack SA grade during surimi setting at 25 and 30°C.
 ●: 30°C, ■: 25°C.

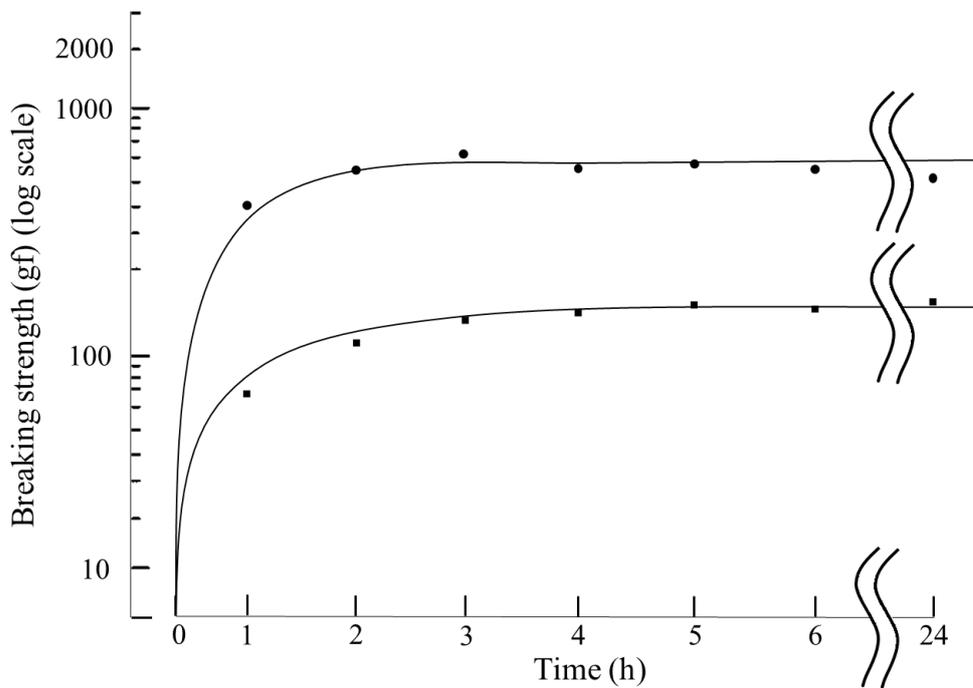


Fig. 4. Approximate curve of breaking strength of Alaska pollack RA grade during surimi setting at 25 and 30°C.
 ●: 30°C, ■: 25°C.

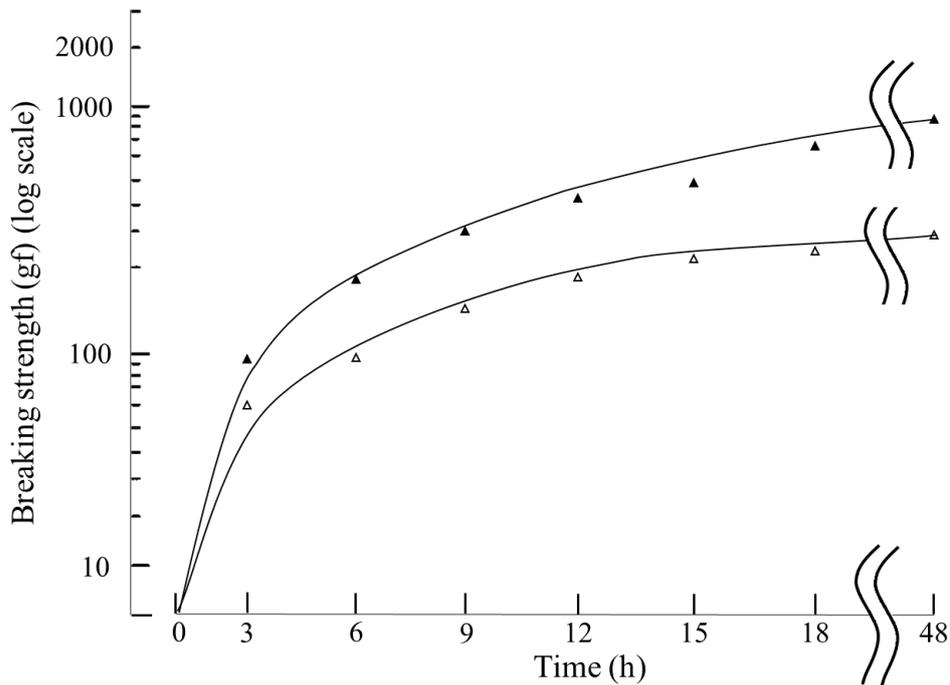


Fig. 5. Approximate curve of breaking strength of Alaska pollack SA and RA grade during surimi setting at 20°C.
 ▲: 20°C, △: 25°C.

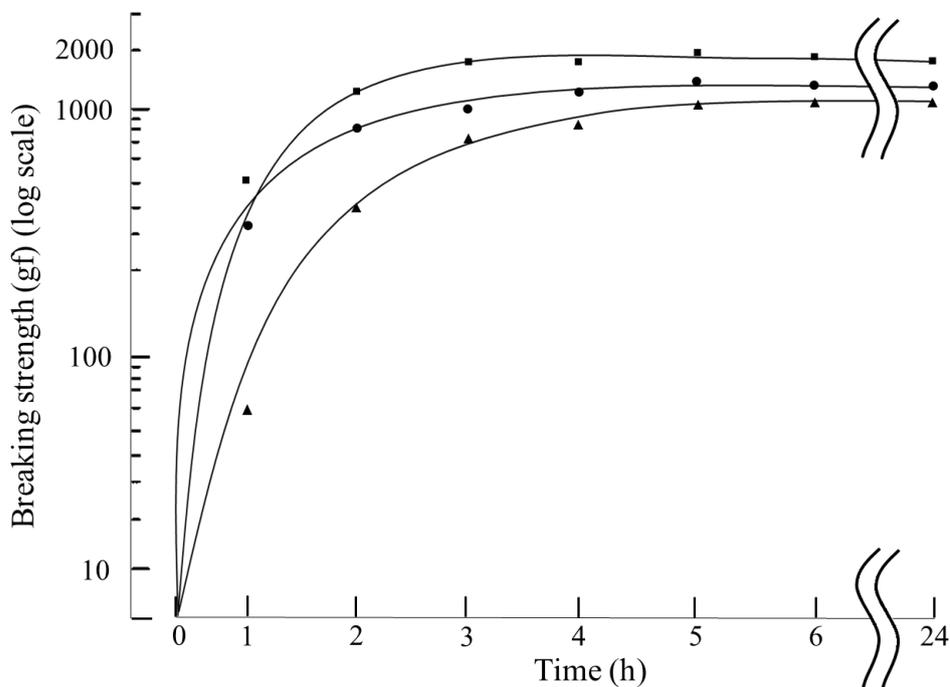


Fig. 6. Approximate curve of breaking strength of blue grenadier's FA grade during surimi setting at 20, 25 and 30°C.
 ●: 30°C, ■: 25°C, ▲: 20°C.

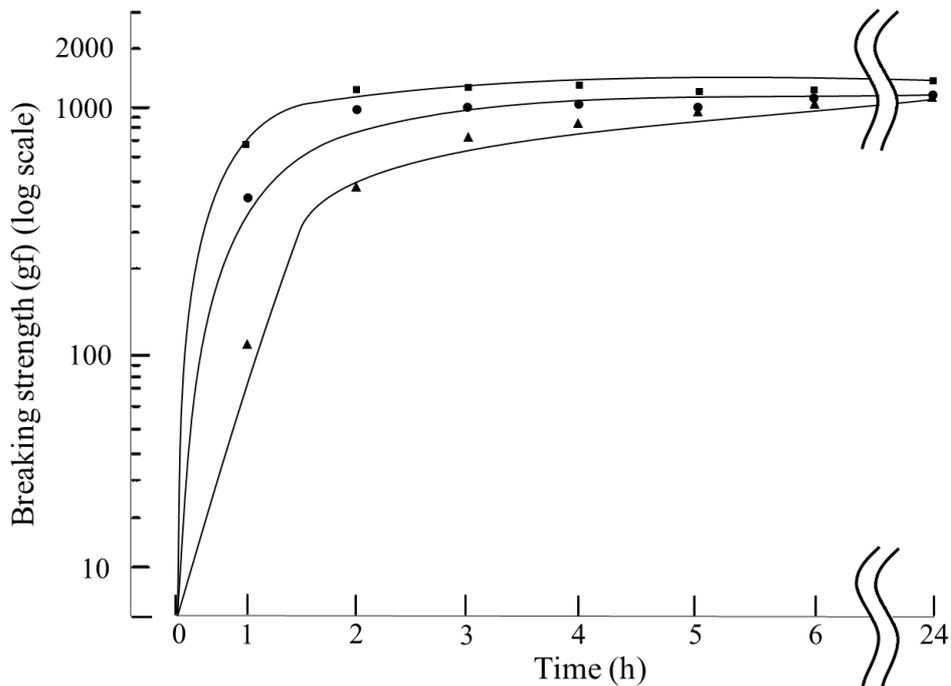


Fig. 7. Approximate curve of breaking strength of blue grenadier's KA grade during surimi setting at 20, 25 and 30°C.
 ●: 30°C, ■: 25°C, ▲: 20°C.

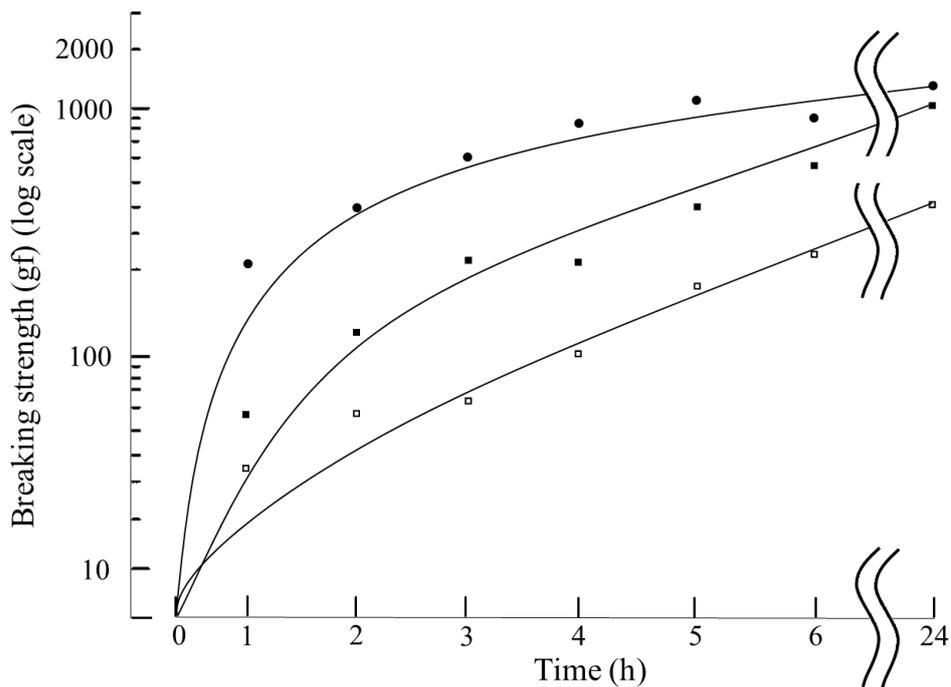


Fig. 8. Approximate curve of breaking strength of threadfin bream's SA grade during surimi setting at 25 and 30°C and KA grade during surimi setting at 25°C.
 SA ●: 30°C, ■: 25°C, KA □: 25°C.

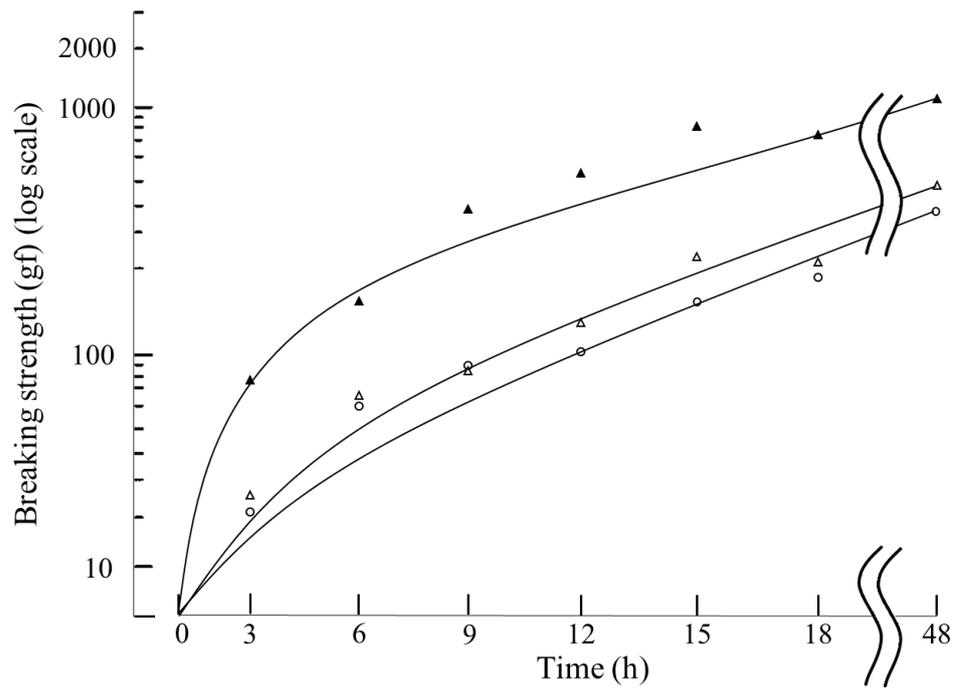


Fig. 9. Approximate curve of breaking strength of threadfin bream's SA grade during surimi setting at 20°C and KA grade during surimi setting at 20 and 23°C SA ▲: 20°C, KA △: 20°C, ○: 23°C.

3. 1. 2. 2. SDS-PAGE

イトヨリダイ KA 級では 30°C の反応温度において 20 および 25°C に比べ著しい破断強度の低下が確認された。本結果に戻り反応が関与しているかを確認するために、イトヨリダイ KA 級の肉糊を 20、25 および 30°C で反応させた際のタンパク質組成の変化を SDS-PAGE で確認した (Fig.10)。その結果、反応温度が 20 および 25°C の場合はミオシン単量体を示す 200 kDa のバンド強度に大きな変化が無く、さらにミオシン単量体より低分子量のバンドは出現しなかった。これに対し、30°C の場合は時間の経過とともにミオシン単量体のバンド強度が低下していることが確認できた。30°C の反応では、ミオシン単量体より低分子量のバンドが新たに確認されたことから、イトヨリダイ KA 級を 30°C で反応させた際には、坐り反応と同時に戻り反応も起こり、ミオシン分子が分解されることでゲル物性が低下することが示唆された。冷凍すり身の等級は原料に用いた魚肉部位の鮮度や、水晒しの回数などによって分けられる^{61,62)}。したがって、鮮度低下に伴う反応生成物や水晒しによって除かれる水溶性物質やタンパク質の多寡が影響していると考えられる。また、過去の報告では、二段加熱ゲルの物性は、イトヨリダイなどの温暖な水域に生息している魚のすり身の方が、冷たい水域に生息している魚よりも破断強度が高くなる傾向にある^{14,17,33,34)}。一方、今回の結果では冷たい水域に生息しているホキのすり身が最も高い値を示したように、坐り反応ゲルは二段加熱ゲルとは異なる傾向を示した。

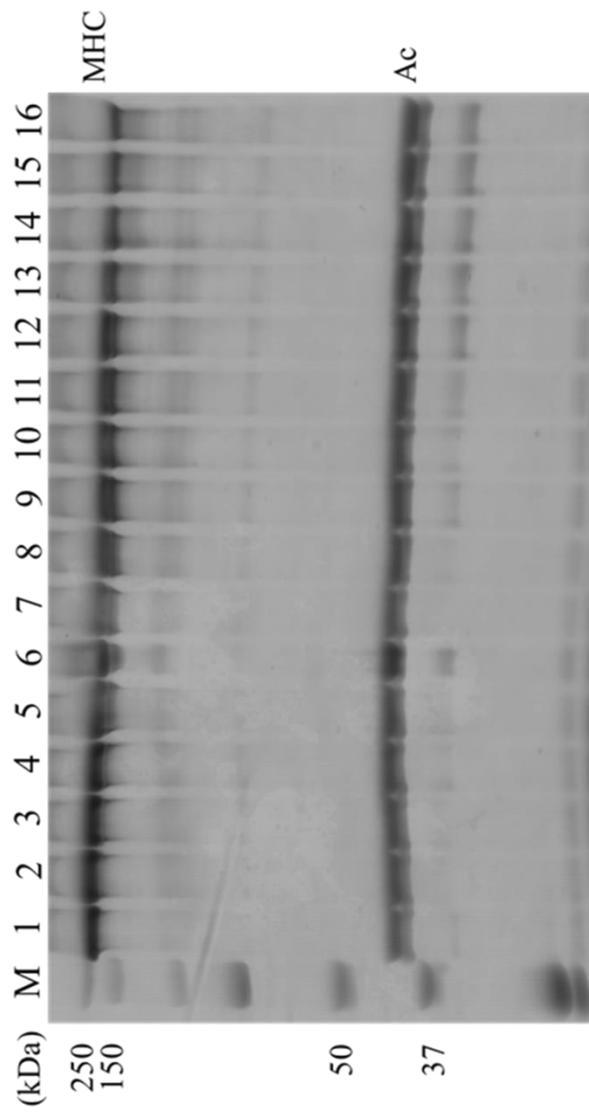


Fig. 10. SDS-PAGE of threadfin bream's KA grade during surimi setting at 20, 25 and 30°C. M: Molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. 1: Control, 2-6: 20°C, 7-11: 25°C, 12-16: 30°C. The heating times were arranged in the order of 1, 2, 3, 4 and 5 hours from the left side, respectively.

3.2. 坐り速度解析

3.2.1. 方法

3.2.1.1. 坐り速度解析

片対数グラフの Y 軸に 3.1.1.3. で測定した破断強度を、X 軸に坐り加熱時間をプロットして、各点を通る近似曲線を引いた。最大破断強度 (BSmax) の半分の値 ($1/2BS_{max}$) に達するまでの時間 ($T_{1/2}$) を求め、その逆数の値を坐り速度 K (s^{-1}) とした。

3.2.2. 結果

3.2.2.1. 坐り速度解析

同魚種の等級間で坐り速度を比較したところ、スケトウダラおよびホキでは、坐り反応ゲルの最大破断強度でみられた明確な差は認められなかった (Table 2)。同様にイトヨリダイは、戻り反応の影響がみられた 30°C を除いた反応温度での坐り速度も等級間で明確な傾向は見られなかった。

次に魚種間で坐り速度を比較した。等級が高いものでは、20 および 25°C では、速いものからホキ > スケトウダラ > イトヨリダイの順になり、30°C ではスケトウダラ > ホキ > イトヨリダイの順になった。等級が低いものだと 20、25 および 30°C の反応温度においてホキ > スケトウダラ > イトヨリダイの順になったが、30°C のイトヨリダイ KA 級すり身については戻り反応が生じている可能性を考慮する必要がある。

Table 2 Analytical parameters of the six frozen surimi samples used in this study

Species	Grade	Temperature (°C)	1/2BSmax (gf)	T1/2 (sec)	Sitting speed (/sec)
Alaska pollack	SA	30	370	4212	2.4×10^{-4}
		25	355	12600	7.9×10^{-5}
		20	435	48240	2.1×10^{-5}
	RA	30	215	2700	3.7×10^{-4}
		25	105	7200	1.4×10^{-4}
		20	140	29520	3.4×10^{-5}
Blue grenadier	FA	30	732	5516	1.8×10^{-4}
		25	895	6336	1.6×10^{-4}
		20	654	12456	8.0×10^{-5}
	KA	30	570	2376	4.2×10^{-4}
		25	661	3528	2.8×10^{-4}
		20	570	9756	1.0×10^{-4}
Threadfin bream	SA	30	618	46170	2.2×10^{-5}
		25	581	71116	1.4×10^{-5}
		20	647	151110	6.6×10^{-6}
	KA	*30	112	4320	2.3×10^{-4}
		25	201	64260	1.6×10^{-5}
		23	179	93000	1.1×10^{-5}
		20	298	160020	6.3×10^{-6}

* The results of additional measurements at 23°C are include for the KA grade threadfin bream, due to the effects of the modori reaction observed at 30°C.

3.3. 坐り反応の活性化エネルギー測定

3.3.1. 方法

3.3.1.1. 活性化エネルギー測定

片対数グラフの Y 軸に坐り速度の対数値を、温度(絶対温度)の逆数値(1/T)を X 軸に取り、3.2.2.1.の結果をプロットして近似線を引いた (Arrhenius plot)。その結果より次式を用いて活性化エネルギーを算出した。

$$E_a = -2.303 \times R d (\log K) / d \quad R: \text{Gas constant (1.98 cal/deg)}$$

3.3.2. 結果

3.3.2.1. 活性化エネルギー測定

3 温度域で得た坐り速度を片対数グラフの Y 軸に、絶対温度の逆数を X 軸に取り、3 点をプロットして各点を通る直線を引いた (Fig.11)。スケトウダラ SA、RA 級、ホキ FA、KA 級およびイトヨリダイ SA 級は 20、25 および 30°C の反応温度を用いて 3 点を通る直線を引くことができた。一方、イトヨリダイ KA 級は、先述の様に 30°C の反応温度を用いると 20 および 25°C の 3 点を通る直線が引けず、この結果からも 30°C での戻り反応の影響が確認された。そこでイトヨリダイ KA 級では、20、23 および 25°C の反応温度を用いて 3 点を通る直線を引き、活性化エネルギーを求めた (Fig.11c)。

各冷凍すり身の活性化エネルギーを算出し、それらを Table 3 に示した。活性化エネルギーは、反応の出発物質の基底状態から遷移状態に励起するのに必要なエネルギーにあたり、ここで算出された活性化エネルギーを坐り能力

の指標とした。すなわち、この数値が高いと坐りにくく、低いと坐り易いすり身であると推定した。

同魚種の等級間で比較すると、スケトウダラが 1.3 倍、ホキが 2.2 倍、イトヨリダイが 2.5 倍等級が低いものの活性化エネルギーが高く、その差は明確であった。魚種間で比較すると、等級の高いものは活性化エネルギーの数値が高い順にスケトウダラ>イトヨリダイ>ホキとなった。また、等級の低いものはスケトウダラ>イトヨリダイ>ホキの順になった。この結果から、ホキがこの 3 種の中では最も坐り能力が高いことが示唆された。

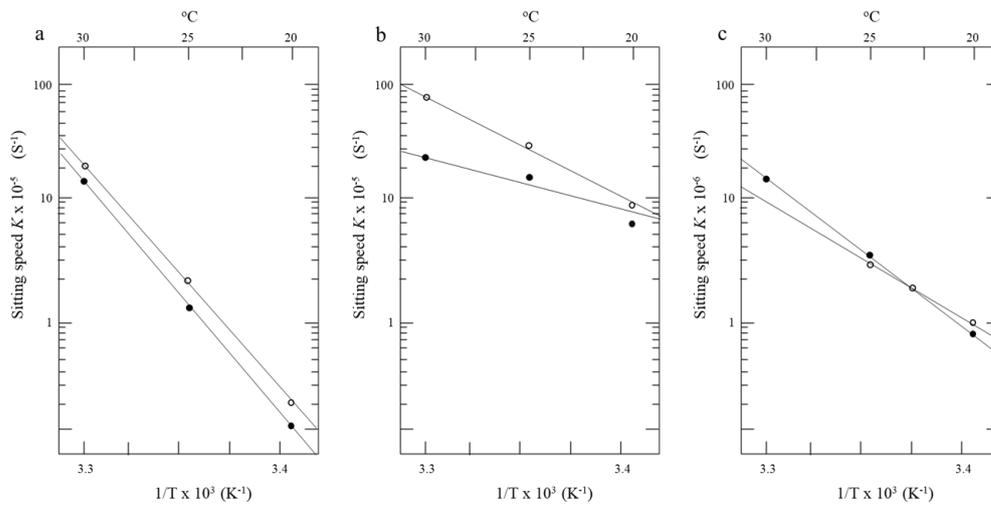


Fig. 11. Approximate suwari speed of various frozen surimi.

a: Alaska pollack ● SA, ○ RA.

b: Blue grenadier ● FA, ○ KA.

c: Threadfin bream ● SA, ○ KA.

Table 3. Activation energy of the six kinds of frozen surimi in this study

Species	Grade	Activation Energy (cal/mol)
Alaska pollock	SA	3.1×10^4
	RA	4.1×10^4
Blue grenadier	FA	5.8×10^3
	KA	1.3×10^4
Threadfin bream	SA	8.3×10^3
	KA	2.1×10^4

3.4. 考察

坐り反応ゲルの破断強度 (Fig. 3-9) と、二段加熱の破断強度 (Fig. 2) を魚種間および等級間で比較すると、両者は異なる傾向を示した。例えば、坐り反応ゲルの破断強度を魚種間で比較すると、反応時間の長さに比例して破断強度が高くなるのではなく、魚種によって大きく変わることが分かった。このことから、冷凍すり身の等級分けに坐り反応の特徴を加味することは有効であると考えられた。また坐り速度測定の結果 (Table 2) から、全ての魚種で等級が低いすり身の方が等級が高いすり身よりも速い坐り速度を示した。この原因は、等級が低いすり身の坐り能力が等級が高いすり身に比べ低く、結果的に早く最大破断強度に達するためだと考えられた。魚種間での比較から、冷たい水域に生息しているスケトウダラやホキが坐り速度が速く、温暖な水域に生息しているイトヨリダイが坐り速度が遅い傾向が認められた。以上の結果から、坐り速度では等級間ならびに魚種間の品質を判断するのは困難であると考えられた。それに対し、活性化エネルギー測定の結果 (Table 3) は、等級間および魚種間で明確な差を示した。すなわち、どの魚種においても等級の高いすり身では坐りの活性化エネルギーが低い数値を示し、より坐り易いと判断された。このことから活性化エネルギーは冷凍すり身の品質の1つである坐り反応の差をよく表す指標として用いることができると考えられた。

第4章 各種冷凍すり身の戻り反応に関与するプロテアーゼの特定

前章において魚肉の坐り反応に着目し、坐り反応の活性化エネルギーが等級間の品質差を表す指標として有効であることが示された。次に魚肉すり身に特有の反応で、より高温域で生じる戻り反応に着目した。戻り反応は、一般的には50~70°Cの温度域でゲル構造が脆弱化し、反応が進むとゲルが崩壊する現象だと言われている。しかし、40°C程度でも戻り反応を引き起こす魚種や、反応温度を上げてても戻り反応が起こらない魚種あるなど、本反応も原料魚種により反応が大きく異なる。なお、スケトウダラやホキ、イトヨリダイなどは、40°Cの反応で戻り反応が起きる魚種で、サメやコイなどは高温で反応を続けても戻り反応がそれほど起こらない魚種である³⁷⁻⁴⁵⁾。

戻り反応に関与するプロテアーゼは、Modori-inducing protease (MIP) と総称され、具体的にはカテプシン B やカテプシン L、カテプシン B 様酵素、筋原線維結合型セリンプロテアーゼなどが報告されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。冷凍すり身の製造工程にある、水晒し工程において、筋原線維結合型セリンプロテアーゼ以外のプロテアーゼはほとんどが除去されると考えられるが、実際には戻り反応には多くのプロテアーゼが関与し、その詳細は不明な点が多く残されている⁴⁹⁻⁶⁰⁾。

また、戻り反応に関与するプロテアーゼの至適温度や温度安定性が異なることも示唆されることから、本章では、魚肉冷凍すり身の戻り反応について、従来から報告されている魚種間の違いに加え、等級間での戻り反応の違いと、どのプロテアーゼがすり身タンパク質を分解しているかを反応温度ごとに特定することを目的とした。

4. 1. 戻り反応ゲルの破断強度測定

4. 1. 1. 試料および方法

4. 1. 1. 1. 試料

2. 1. 1. 1.と同様の試料を使用した。

4. 1. 1. 2. 戻り反応ゲルの作製

2. 2. 1. 1.と同様の方法で肉糊を調製し、50°Cで0～180分間反応させた後、85°Cで20分間加熱して戻り反応ゲルを作製した。

4. 1. 1. 3. 破断強度測定

2. 2. 1. 1.と同様の方法で測定した。

4. 1. 2. 結果

4. 1. 2. 1. 戻り反応ゲルの破断強度測定

スケトウダラ SA、RA 級、ホキ FA、KA 級およびイトヨリダイ SA、KA 級の 50°Cでの反応に伴う破断強度の変化を Fig.12 に示した。スケトウダラ SA 級、ホキ FA 級、イトヨリダイ SA 級および KA 級は戻り反応を開始して 20 分までは一旦破断応力が高くなり、その後低下した。一方、スケトウダラ RA 級およびホキ KA 級は戻り反応後、直ちに破断強度が低下した。前者 4 種の

破断強度が一旦上がったのは、加熱途中で坐り反応ゲルを形成したためだと考えられる。3 魚種の等級間ではいずれも物性の変化は異なったが、特にスケトウダラ冷凍すり身では、等級間の物性の差が顕著であった。これらのことから、魚種間および等級間でプロテアーゼの含有量ならびに活性に大きな差があると推察された。

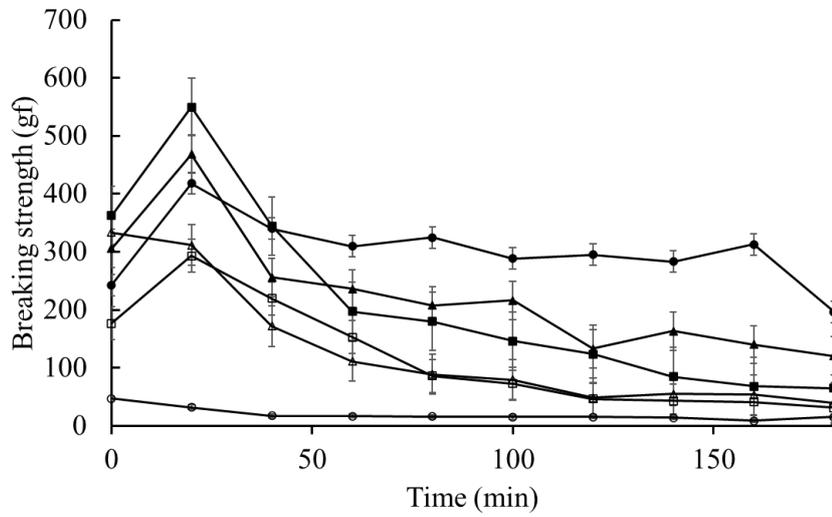


Fig. 12. Change of breaking strength in Modori reaction of various frozen surimi.
 ●: SA grade of Alaska pollack, ○: RA grade of Alaska pollack.
 ■: FA grade of blue grenadier, □: KA grade of blue grenadier.
 ▲: SA grade of threadfin bream, △: KA grade of threadfin bream.

4. 2. プロテアーゼインヒビター添加戻り反応ゲルの SDS-PAGE による構成タンパク質の観察

4. 2. 1. 試料および方法

4. 2. 1. 1. 試薬

EDTA は富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）、1,10-Phenanthroline monohydrate、Aprotinin および Phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)は SIGMA-ALDRICH（東京）、E-64 は株式会社ペプチド研究所（大阪）から購入した。

4. 2. 1. 2. インヒビターを添加した戻り反応ゲルの作製

インヒビターを添加した戻り反応ゲルの作製工程を Fig.13 に示す。-25°C で保存してあった冷凍すり身を 4°C の冷蔵庫内で一晩解凍した。解凍したすり身をフードプロセッサー（MK-K48P, Panasonic, 大阪）または高速真空攪拌機（UMC-5, Stephan, 千葉）を用いて約 1 分間、粗ずりを行った。次に、水ですり身に対し 30%加えて約 1 分間、水伸ばしを行った。この際に各プロテアーゼインヒビター（1.8 mM 1,10-Phenanthroline monohydrate, 5 mM EDTA, 1 mM E-64, 0.2 mM PMSF, 0.01 mM Aprotinin）を表記の終濃度に合わせ添加した⁶⁴⁾。最後に、食塩を水伸ばし肉に対して 2.5%加えて約 1 分間塩ずりを行い、肉糊を調製した。調製した肉糊をケーシングフィルム（Φ23 mm）（株式会社クレハ社製，東京）に充填し、恒温水槽（THERMO MINDER SM-05R, TAITEC, 埼玉）で 40、50 および 60°C で反応させ、戻り反応ゲルを作製した。

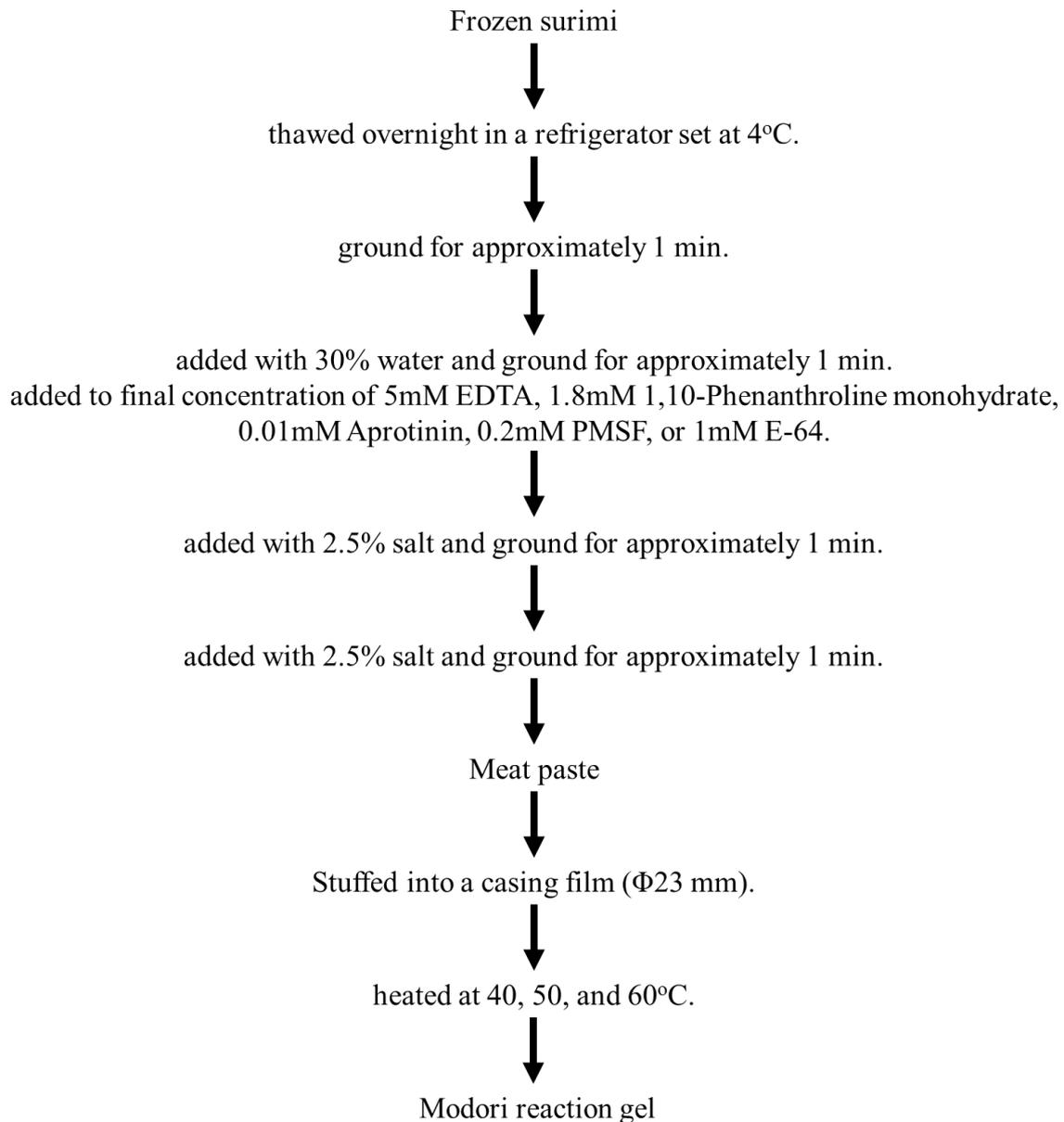


Fig. 13. Preparation procedure for Modori reaction gel.

4. 2. 1. 3. SDS-PAGE

3. 1. 1. 4.と同様の方法で行った。

4. 2. 2. 結果

SDS-PAGE の試料を調製する際に、イトヨリダイの戻り反応ゲルではスケトウダラやホキとは異なる挙動を示した。すなわち、イトヨリダイ SA 級の戻り反応ゲルは、タンパク質溶解液に対して完全に溶解することなく、ゲル状のものが残存した。可溶化した部分を SDS-PAGE に用いたところ、時間の経過とともにミオシン単量体が減少したものの、反応ゲルはしっかりとしたゲルを形成していたことから、戻り反応による変化ではなく、坐り反応も同時に進行し、不溶性のゲルが形成されたものと推察された。イトヨリダイ冷凍すり身では、戻り反応のみを解析することが困難であると判断し、以後の実験には用いないこととした。

4. 2. 2. 1. SDS-PAGE

スケトウダラ SA および RA 級の結果を Fig.14-19、ホキ FA および KA 級の結果を Fig.20-25 に示した。スケトウダラ SA 級すり身では、いずれの反応温度においても 0~100 分まではミオシン単量体に大きな変化は見られないが、120~600 分でミオシン単量体のバンド強度が低下した (Fig.14)。インヒビターを添加すると、40°C ではどのインヒビターを添加しても戻り反応を抑制した。50 および 60°C では、ミオシン単量体の分解速度がやや減速したが、ミオシン単量体の分解挙動に大きな変化は見られなかった (Fig.15-19)。インヒビター未添加のスケトウダラ RA 級すり身では、SA 級に比べどの温度帯でも

ミオシン単量体のバンド強度の低下が短時間で起きた。さらに、50°C では、240 分以上の長時間の反応でアクチンのバンド強度の低下も確認された (Fig.14)。インヒビターを添加しても、40°C では戻り反応の抑制は認められなかった (Fig.15-19)。50°C では、Aprotinin および E-64 添加で若干戻り反応の抑制が見られたが、他のインヒビターではあまり抑制しなかった (Fig.17,19)。60°C では、EDTA および E-64 添加で若干戻り反応の抑制が見られたが (Fig.15,19)、他のインヒビターでは抑制は見られなかった (Fig.16-18)。

インヒビター未添加のホキ FA 級のすり身では、どの温度帯でも 0~120 分まではミオシン単量体のバンド強度に大きな変化は見られないが、240~600 分反応を続けるとミオシン単量体のバンド強度が低下した (Fig.20)。インヒビターを添加すると、40°C ではどのインヒビターを添加しても戻り反応を抑制した (Fig.21-25)。50 および 60°C では、Aprotinin および E-64 を添加した際に顕著な戻り反応の抑制が見られた (Fig.23,25)。インヒビター未添加のホキ KA 級すり身では、FA 級に比べどの温度帯でもミオシン単量体のバンド強度の低下が短時間で起きていることが確認できた (Fig.20)。インヒビターを添加すると、40°C では FA 級同様、どのインヒビターを添加しても戻り反応を抑制した (Fig.21-25)。50 および 60°C では、EDTA および E-64 を添加したすり身で特に戻り反応を抑制することが確認された (Fig.21,25)。

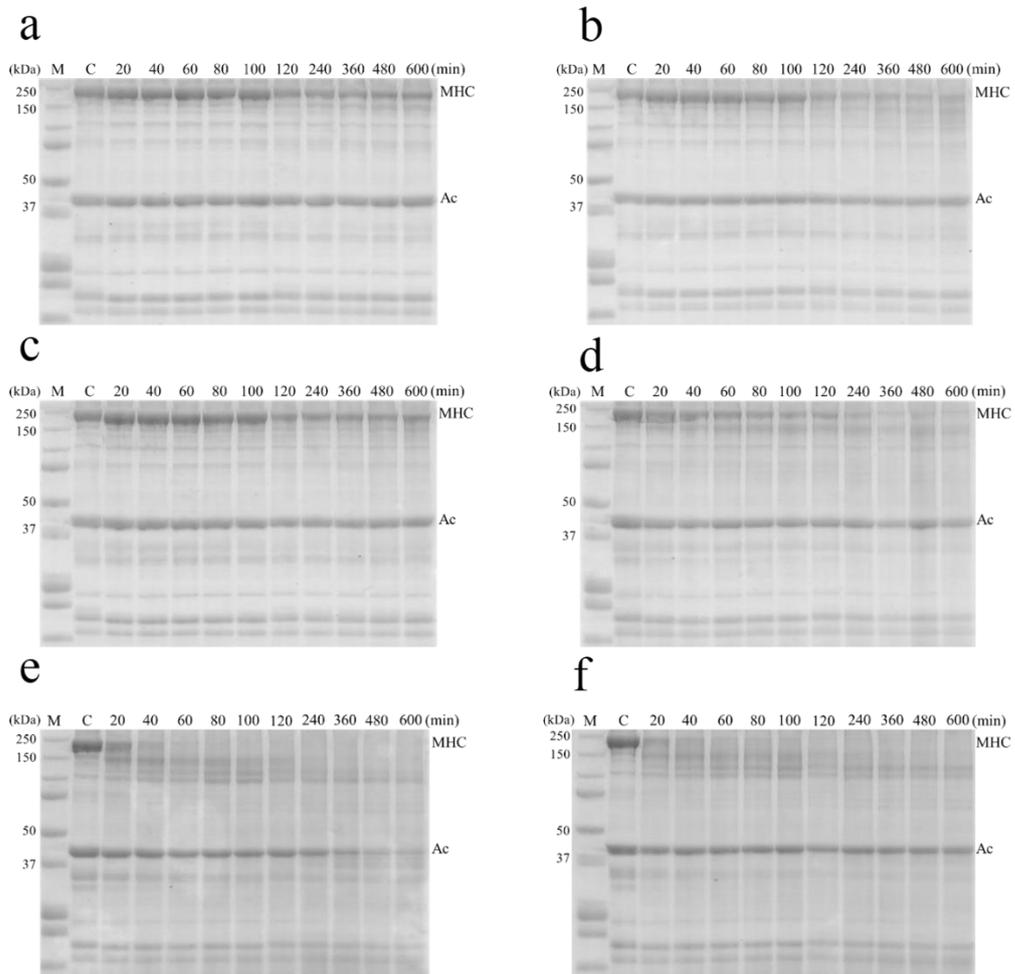


Fig. 14. SDS-PAGE pattern of Alaska pollock at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of SA grade, b: 50°C of SA grade, c: 60°C of SA grade, d: 40°C of RA grade, e: 50°C of RA grade, f: 60°C of RA grade.

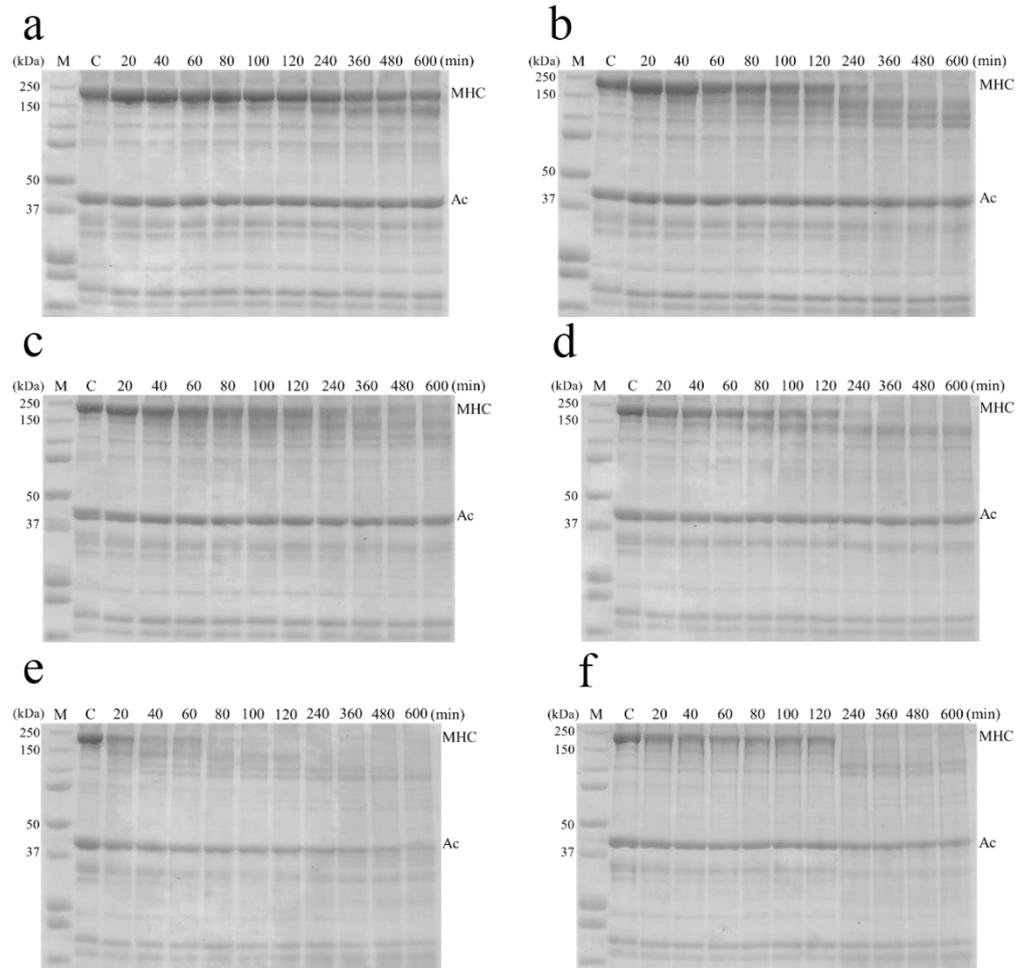


Fig. 15. SDS-PAGE pattern of Alaska pollock with EDTA at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin.
a: 40°C of SA grade, b: 50°C of SA grade, c: 60°C of SA grade,
d: 40°C of RA grade, e: 50°C of RA grade, f: 60°C of RA grade.

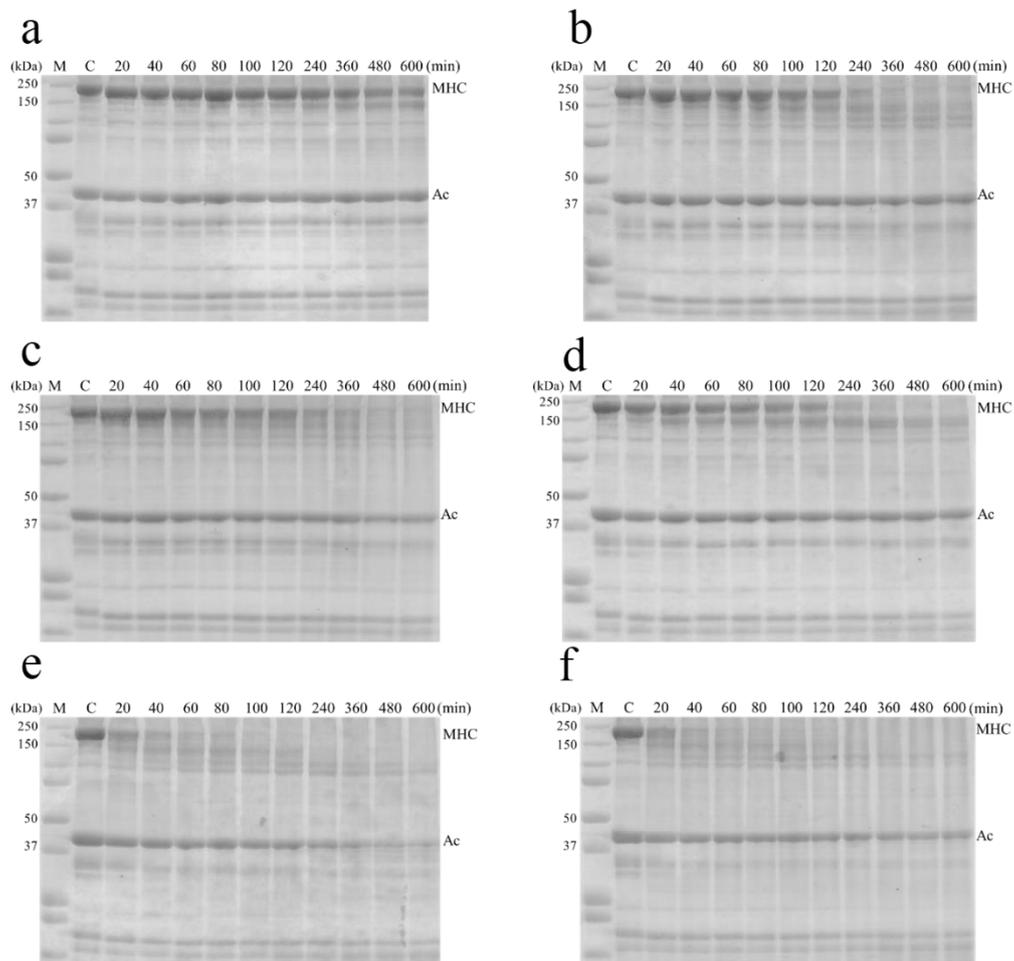


Fig. 16. SDS-PAGE pattern of Alaska pollock with phenanthrolin at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of SA grade, b: 50°C of SA grade, c: 60°C of SA grade, d: 40°C of RA grade, e: 50°C of RA grade, f: 60°C of RA grade.

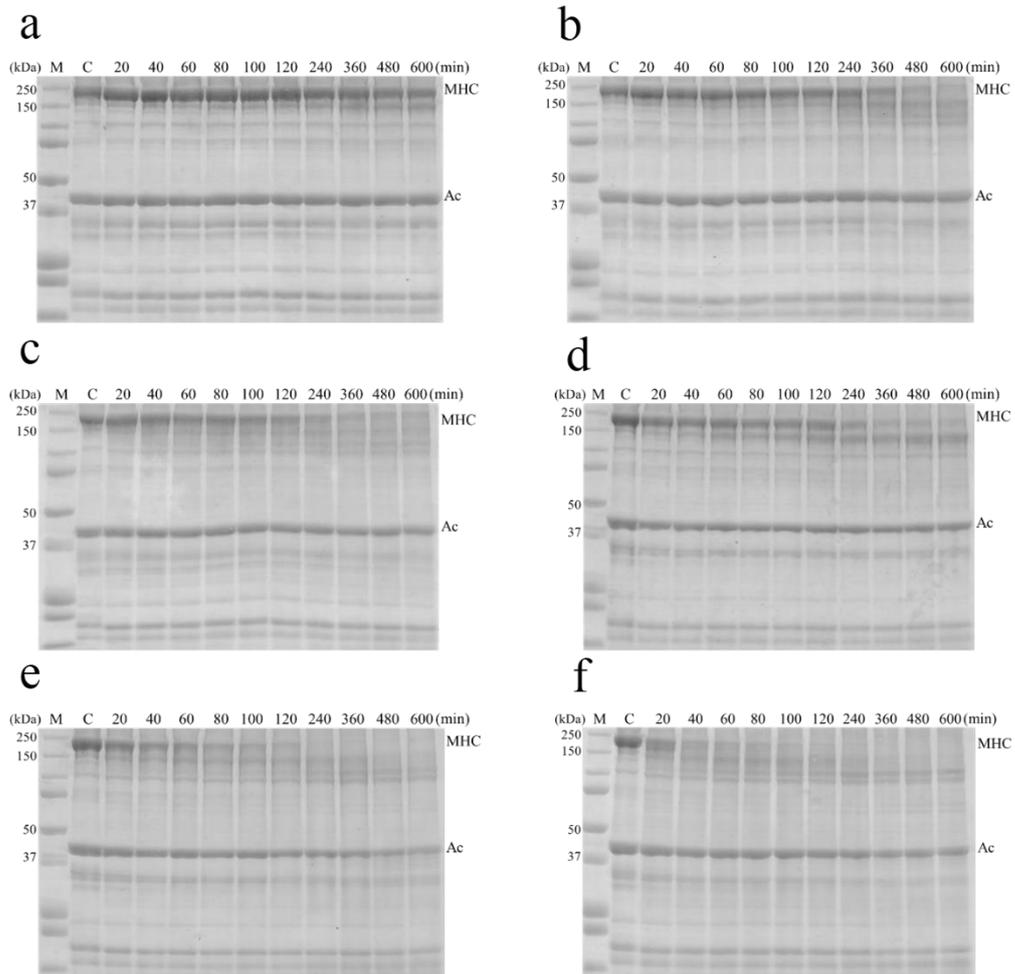


Fig. 17. SDS-PAGE pattern of Alaska pollock with aprotinin at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin.
a: 40°C of SA grade, b: 50°C of SA grade, c: 60°C of SA grade,
d: 40°C of RA grade, e: 50°C of RA grade, f: 60°C of RA grade.

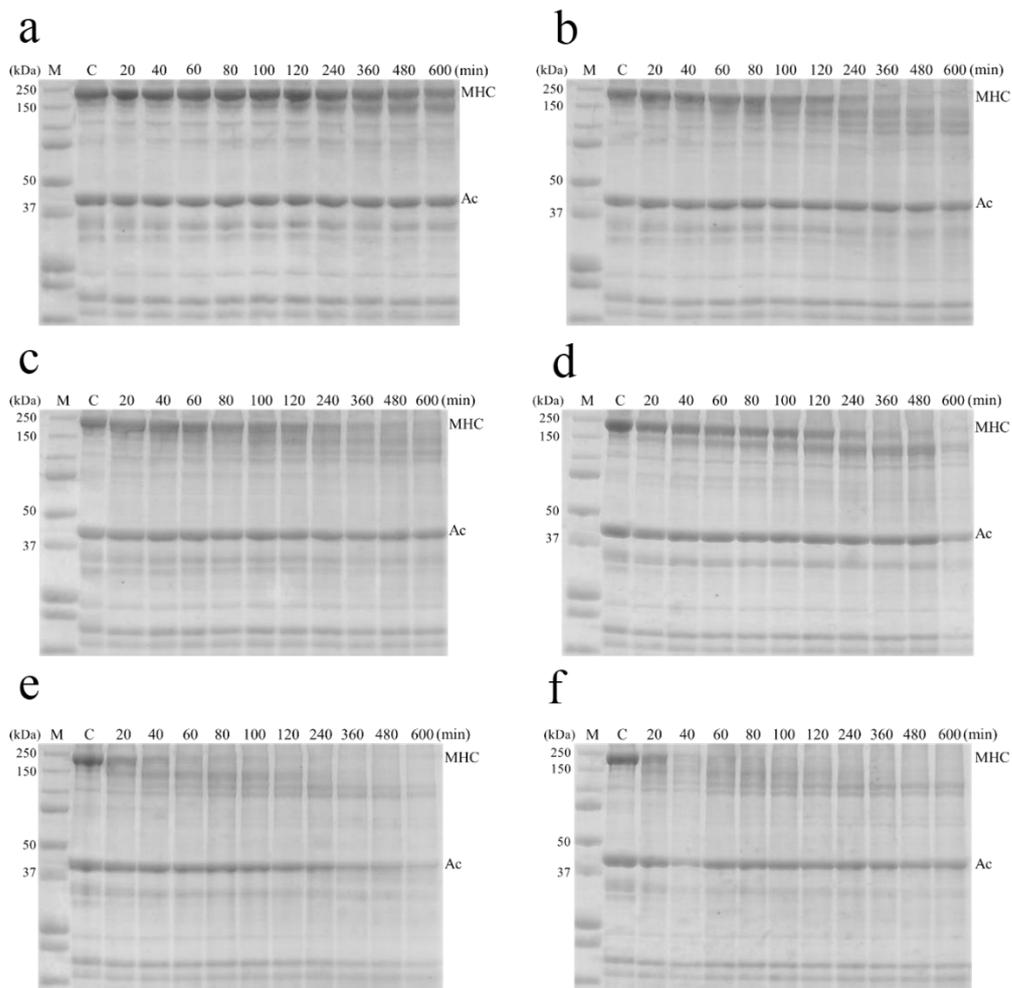


Fig. 18. SDS-PAGE pattern of Alaska pollock with PMSF at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of SA grade, b: 50°C of SA grade, c: 60°C of SA grade, d: 40°C of RA grade, e: 50°C of RA grade, f: 60°C of RA grade.

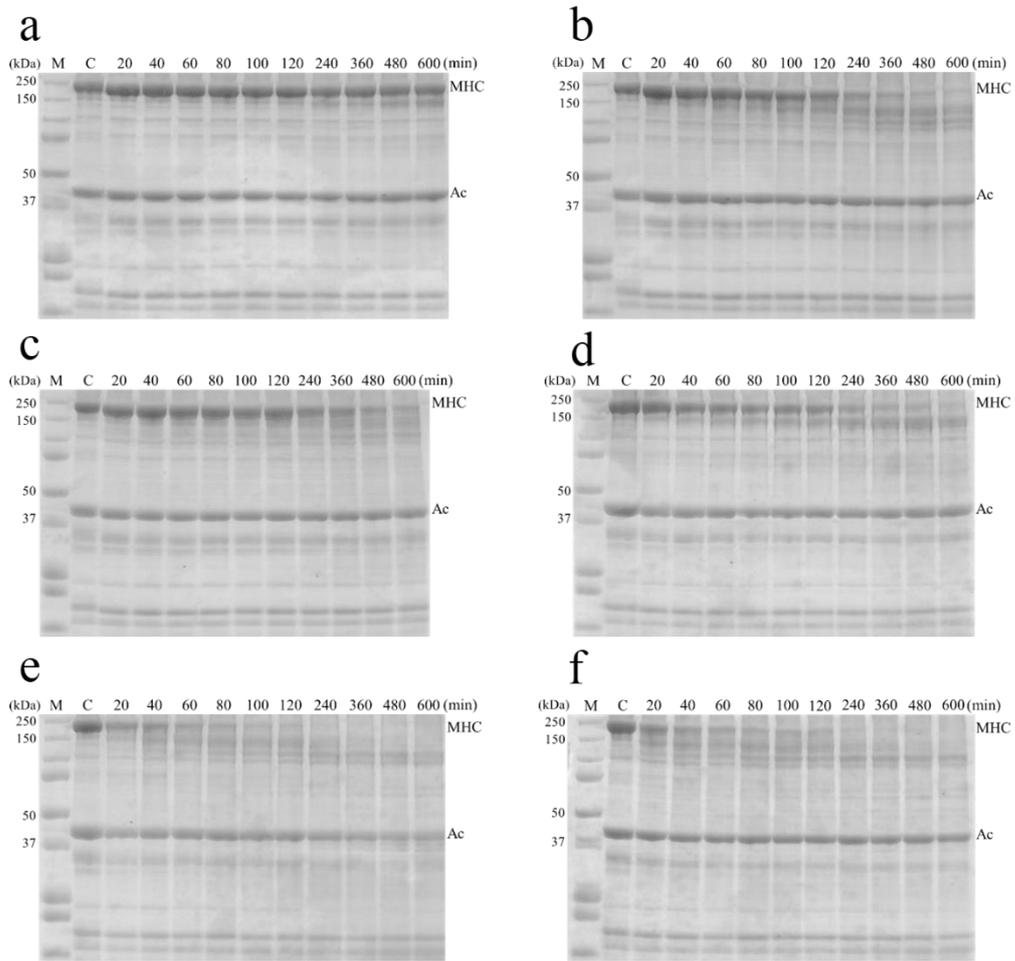


Fig. 19. SDS-PAGE of Alaska pollock with E-64 at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of SA grade, b: 50°C of SA grade, c: 60°C of SA grade, d: 40°C of RA grade, e: 50°C of RA grade, f: 60°C of RA grade.

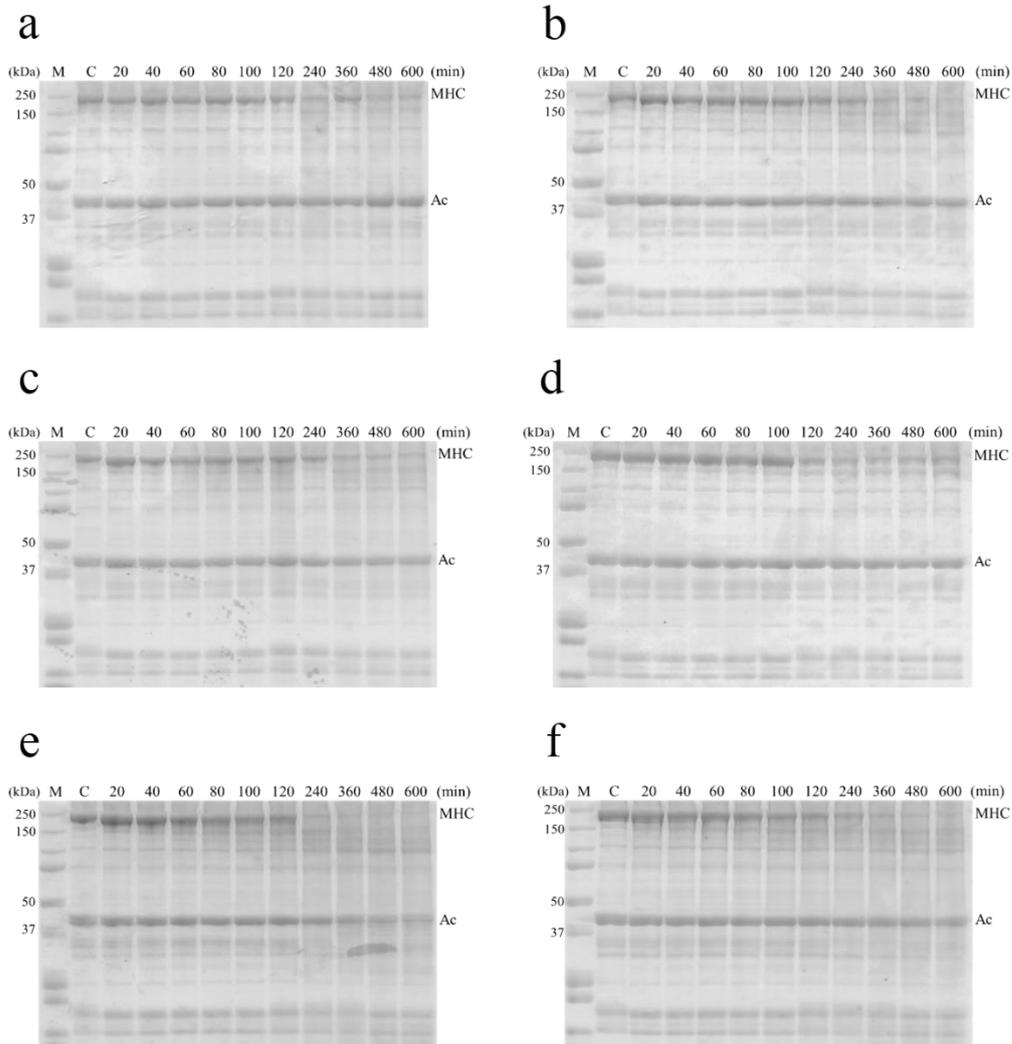


Fig. 20. SDS-PAGE pattern of blue grenadier at Modori reaction.
M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin.
a: 40°C of FA grade, b: 50°C of FA grade, c: 60°C of FA grade,
d: 40°C of KA grade, e: 50°C of KA grade, f: 60°C of KA grade.

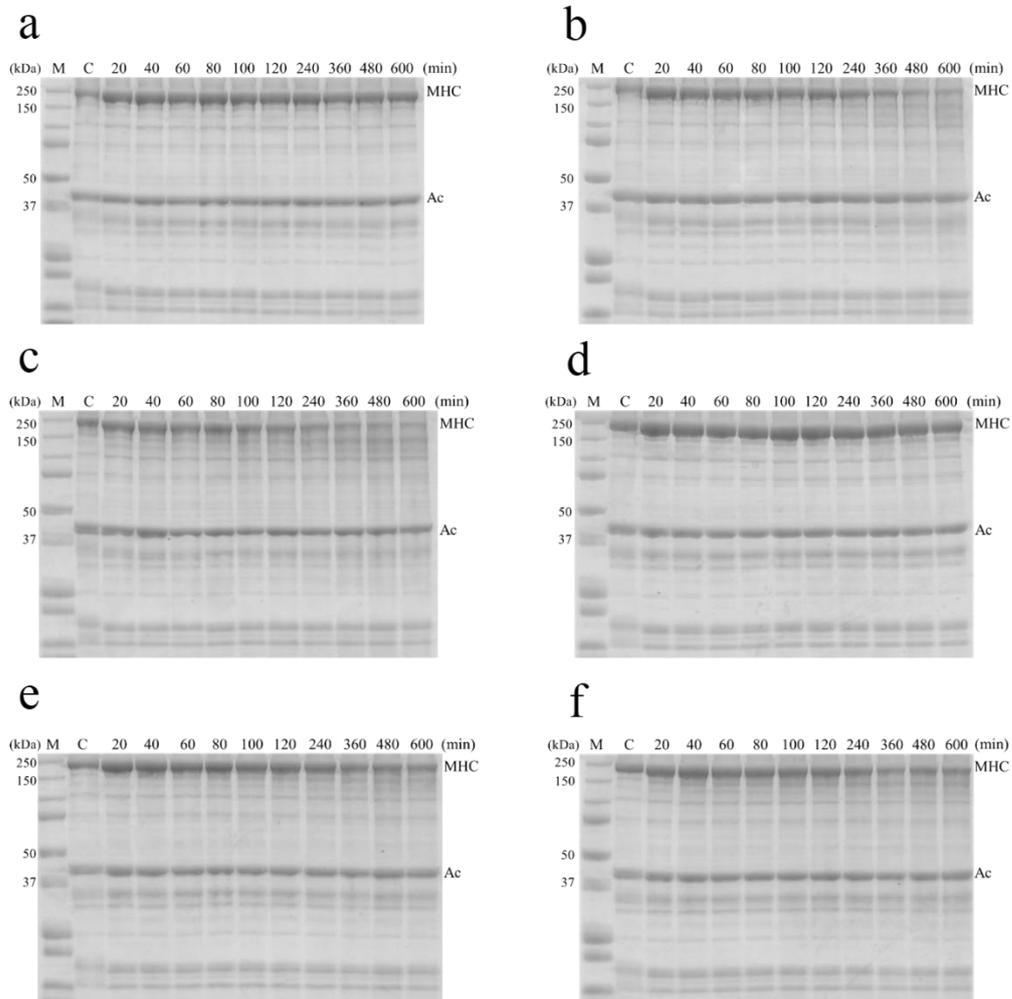


Fig. 21. SDS-PAGE pattern of blue grenadier with EDTA at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of FA grade, b: 50°C of FA grade, c: 60°C of FA grade, d: 40°C of KA grade, e: 50°C of KA grade, f: 60°C of KA grade.

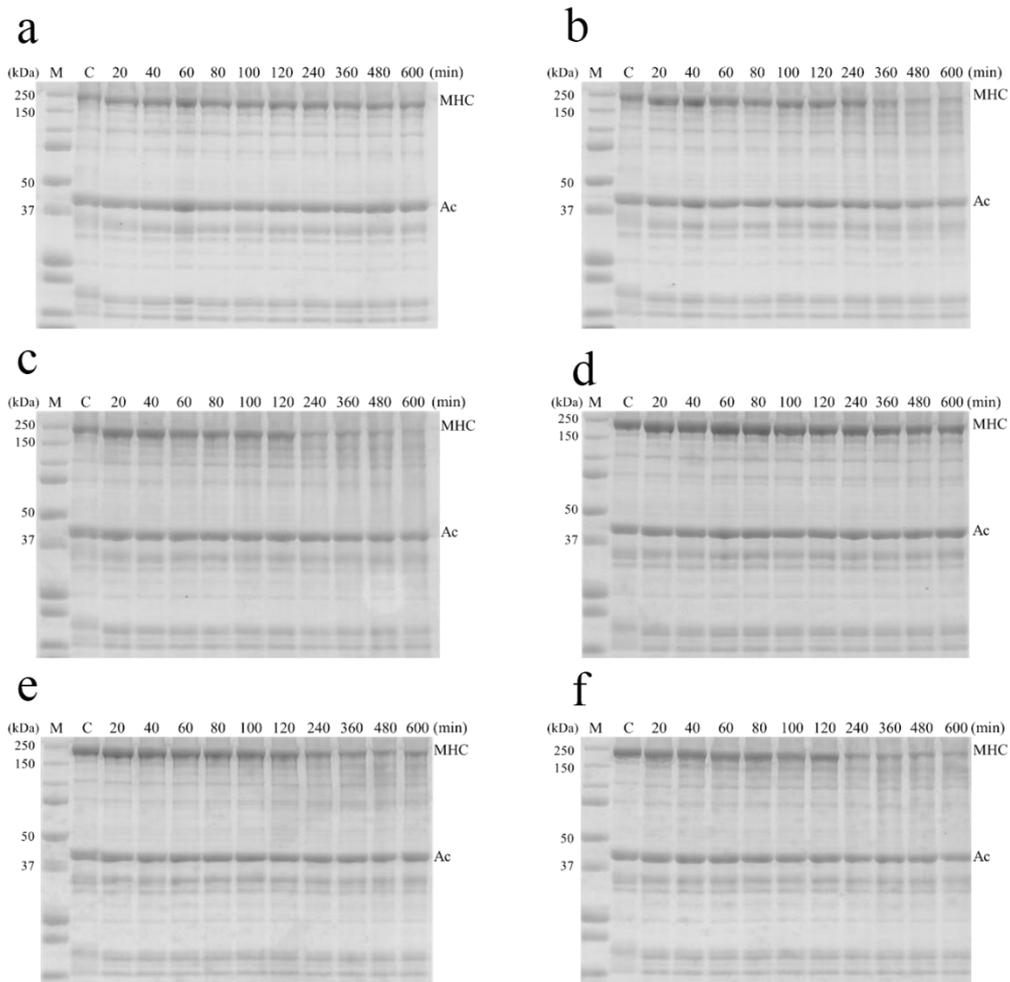


Fig. 22. SDS-PAGE pattern of blue grenadier with phenanthrolin at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin.
a: 40°C of FA grade, b: 50°C of FA grade, c: 60°C of FA grade,
d: 40°C of KA grade, e: 50°C of KA grade, f: 60°C of KA grade.

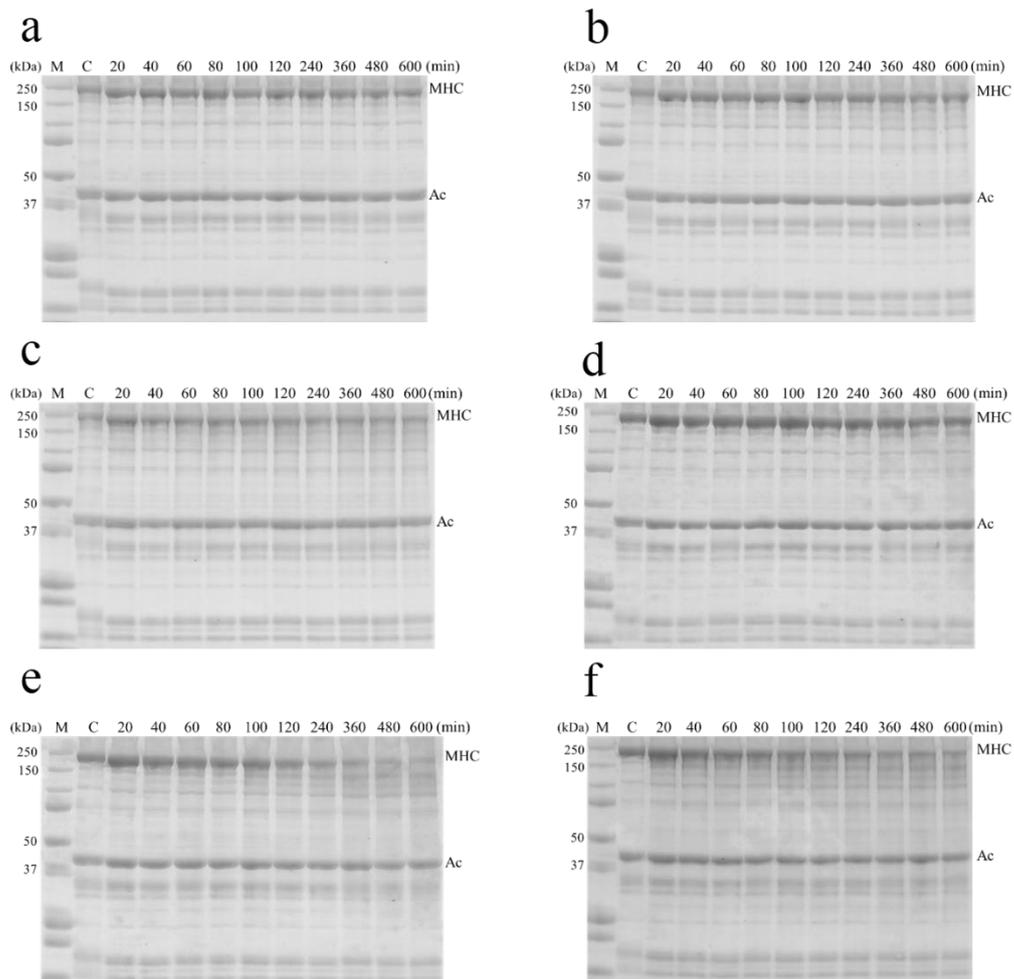


Fig. 23. SDS-PAGE pattern of blue grenadier with aprotinin at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of FA grade, b: 50°C of FA grade, c: 60°C of FA grade, d: 40°C of KA grade, e: 50°C of KA grade, f: 60°C of KA grade.

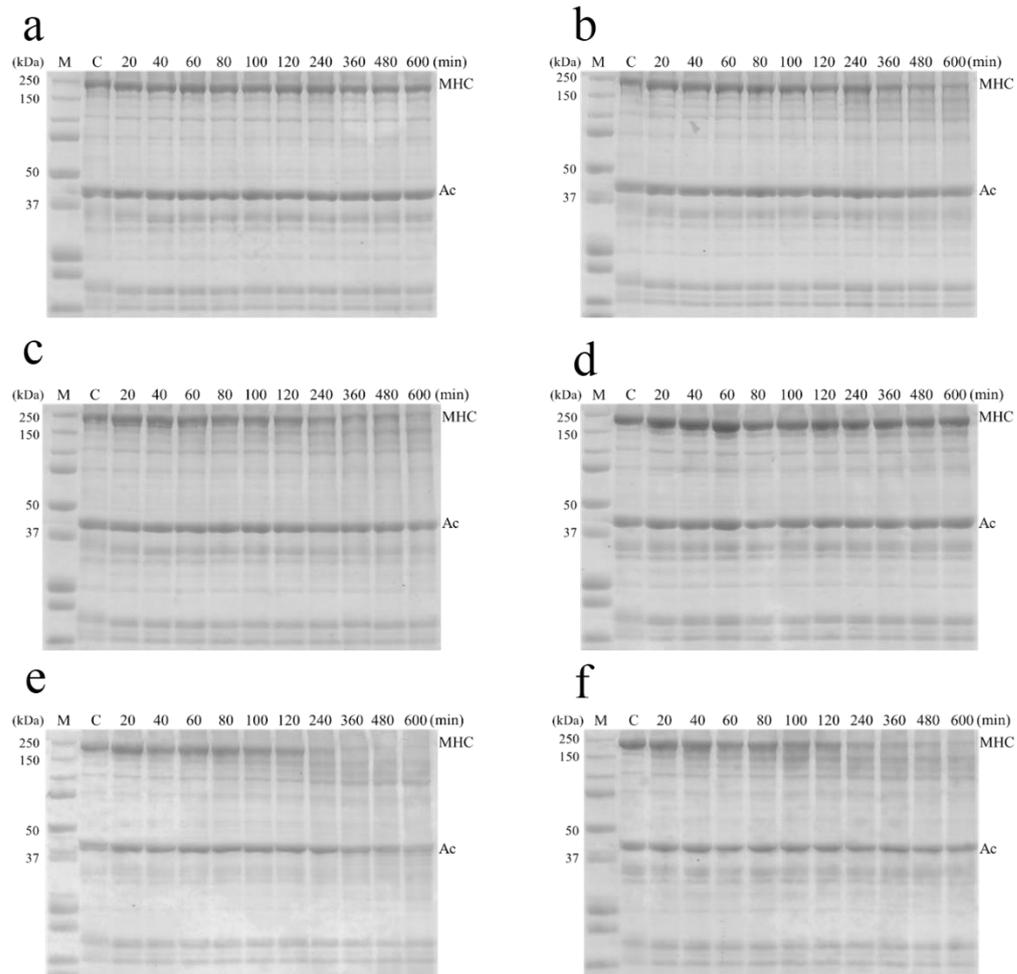


Fig. 24. SDS-PAGE pattern of blue grenadier with PMSF at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of FA grade, b: 50°C of FA grade, c: 60°C of FA grade, d: 40°C of KA grade, e: 50°C of KA grade, f: 60°C of KA grade.

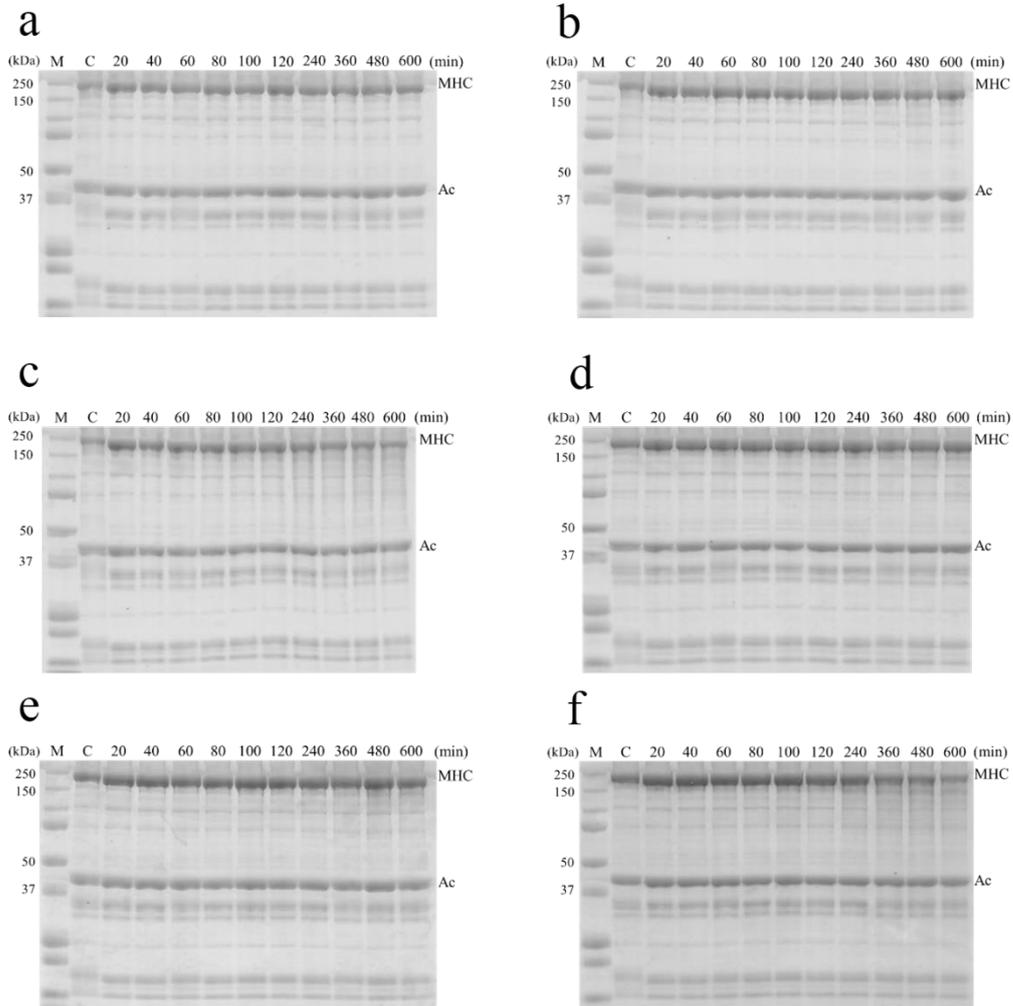


Fig. 25. SDS-PAGE pattern of blue grenadier with E-64 at Modori reaction. M: molecular weight marker, MHC: myosin heavy chain, Ac: actin. a: 40°C of FA grade, b: 50°C of FA grade, c: 60°C of FA grade, d: 40°C of KA grade, e: 50°C of KA grade, f: 60°C of KA grade.

4.3. ミオシン率の解析による戻り反応に関与するプロテアーゼの特定

4.3.1. 方法

画像解析ソフトウェアである ImageJ (National Institutes of Health) を使用してゲルの画像解析を行った。ミオシン単量体とアクチンのバンド強度を分析し、ミオシン単量体のバンド強度をアクチンのバンド強度で割ることによってミオシン率を算出した。また、縦軸にミオシン率、横軸に反応時間をプロットし、反応時間とミオシン率の関係を折れ線グラフで示した。

4.3.2. 結果

4.3.2.1. ミオシン率の解析による戻り反応に関与するプロテアーゼの特定

スケトウダラ SA および RA 級のミオシン率の経時変化を Fig.26 に、ホキ FA および KA 級の経時変化を Fig.27 に示した。また、各温度で戻り反応に関与するプロテアーゼを Table4 にまとめた。スケトウダラ SA 級は、40 および 50°C では短時間 (20~60 分) の反応であれば EDTA および PMSF がミオシン率の減少を抑制したが、長時間 (120~600 分) の反応では、どのインヒビターを添加しても同じようにミオシン率は減少した (Fig.26a,b)。60°C では、E-64 を添加した際に短時間であればミオシン率の減少を抑制できたが、長時間の反応ではインヒビターでもミオシン率は減少した (Fig.26c)。スケトウダラ RA 級では、40 および 50°C の反応では、Aprotinin および E-64 がミオシン率の減少を抑制した (Fig.26d,e)。60°C の反応では、EDTA がミオシン率の減少を最も抑制したが、長時間の反応を行うとミオシン率は大きく減少した (Fig.26f)。

スケトウダラ SA 級では、EDTA、PMSF および E-64 を添加すると短時間であれば戻り反応を抑制することができた。一方、戻り反応が長時間になると十分に抑制することはできなかつたことから、複数のプロテアーゼが偏りなく関与していることが示唆された。スケトウダラ RA 級では、40 および 50°C の反応では、システインプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼが、60°C の反応では、メタロプロテアーゼが主に戻り反応に寄与すると推察された。しかし、SA 級と同様、単一のインヒビターでは戻り反応を十分に抑制することができなかつたことから、RA 級も様々なプロテアーゼが偏りなく関与していることが示唆された。

ホキ FA 級の、40°C での反応は、どのインヒビターを添加してもミオシン率の減少を抑制したが、その中でも EDTA が最も抑制し、そのほかのインヒビターでは大きな差は見られなかつた (Fig.27a)。50°C の反応では、Aprotinin および E-64 がミオシン率の減少を大きく抑制した (Fig.27b)。その他のインヒビターもミオシン率の減少を抑制した。60°C の反応でも、Aprotinin および E-64 がミオシン率の減少を大きく抑制したが、50°C とは異なりその他のインヒビターの添加では抑制を示さなかつた (Fig.27c)。ホキ KA 級では、40°C の反応を行うと、どのインヒビターを添加してもミオシン率の減少をよく抑制した (Fig.27d)。50 および 60°C の反応では、E-64 が最もミオシン率の減少を抑制し、次いで EDTA が高い抑制を示した (Fig.27e,f)。Phenanthroline および Aprotinin も抑制を示したが、PMSF のみ抑制しなかつた。

ホキ FA 級の結果から、40°C の反応ではセリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼ、メタロプロテアーゼなど、様々なプロテアーゼが戻り反応に関与しており、その中でもメタロプロテアーゼが最も寄与していることが示唆された。50 および 60°C の反応では、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼが戻り反応に関与することが示唆された。ホキ KA 級は、全ての温度帯でシステインプロテアーゼやセリンプロテアーゼ、メタロプロテ

アーゼが戻り反応に関与した。その中でも、50 および 60°C の反応では、システインプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼが大きく寄与した。

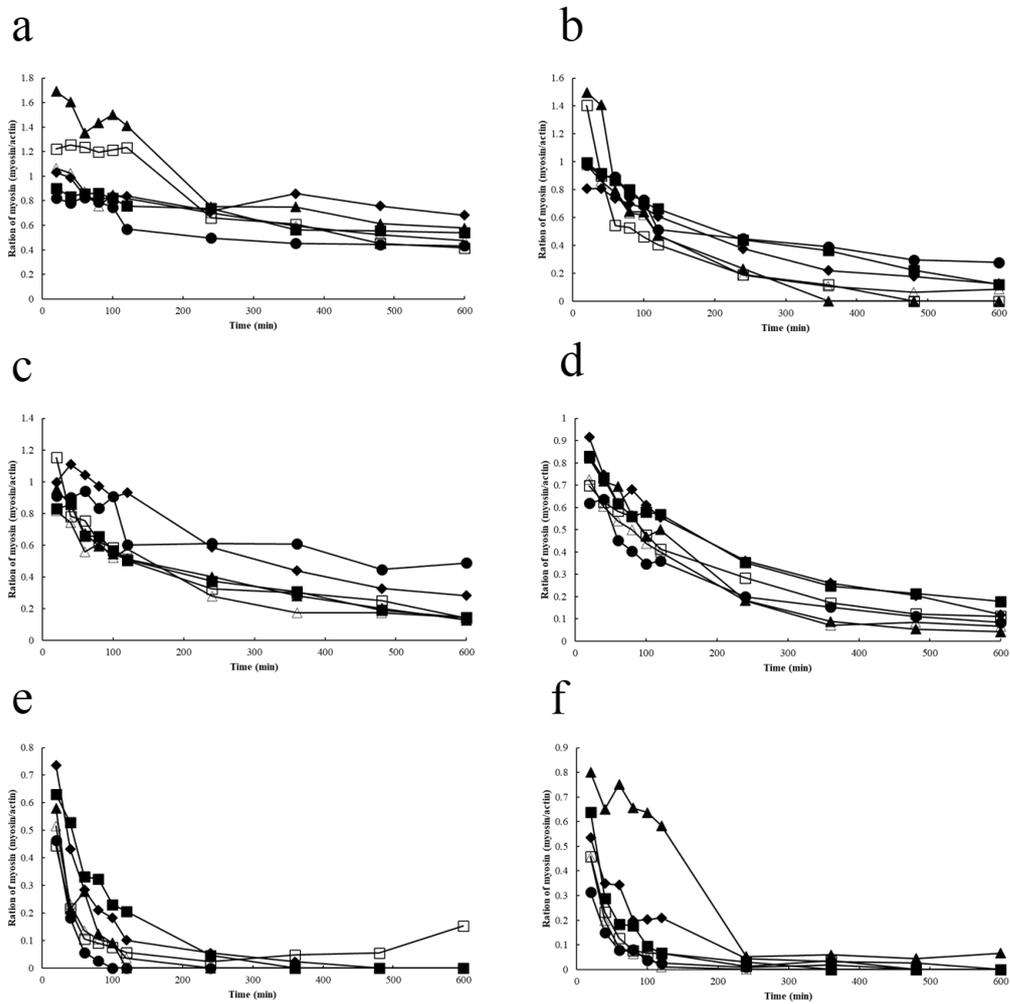


Fig. 26. Myosin/actin ration of Alaska pollock.
a: 40°C of SA grade, b: 50°C of SA grade, c: 60°C of SA grade,
d: 40°C of RA grade, e: 50°C of RA grade, f: 60°C of RA grade.
●: non-added, ◆: E-64, ▲: EDTA, △: Phenanthroline,
■: Aprotinin, □: PMSF.

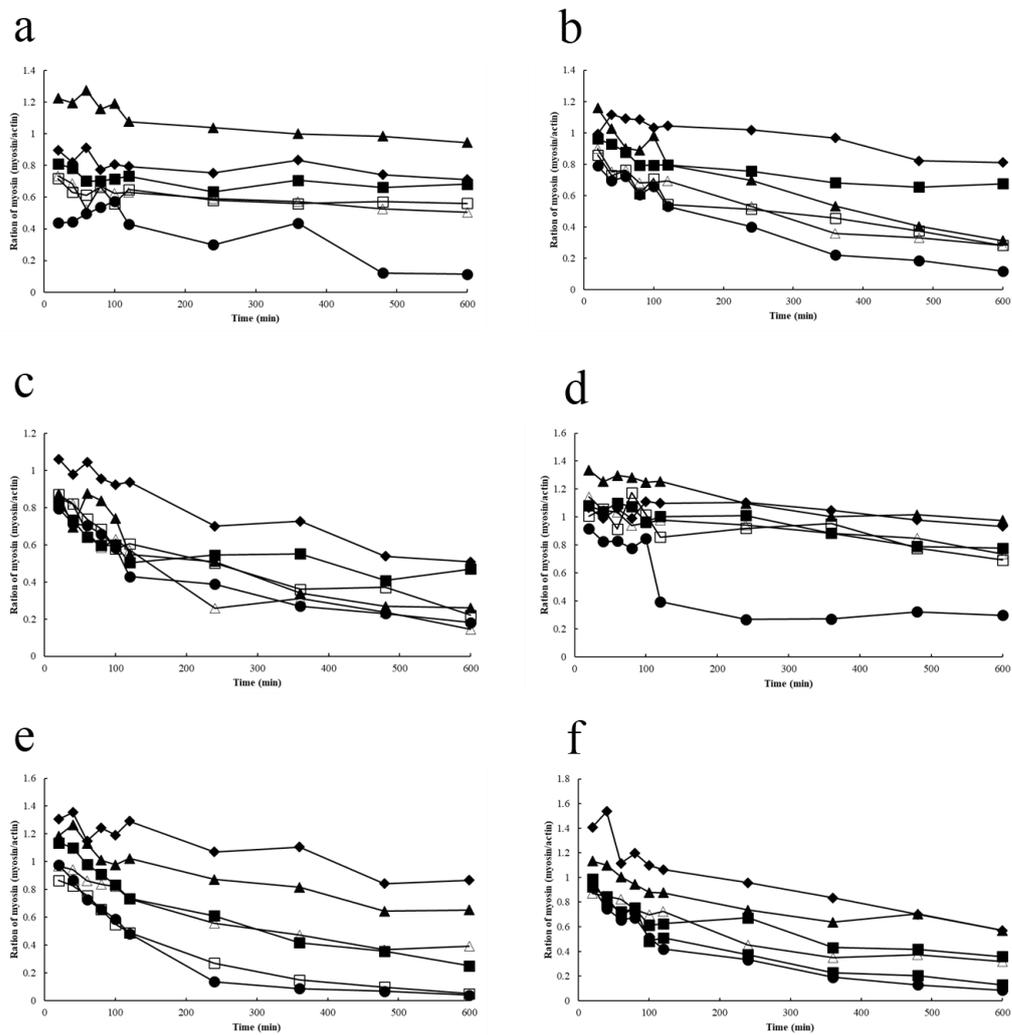


Fig. 27. Myosin/actin ration of blue grenadier.
 a: 40°C of FA grade, b: 50°C of FA grade, c: 60°C of FA grade,
 d: 40°C of KA grade, e: 50°C of KA grade, f: 60°C of KA grade.
 ●: non-added, ◆: E-64, ▲: EDTA, △: Phenanthroline,
 ■: Aprotinin, □: PMSF.

Table 4 Protease involved in the Modori reaction of each frozen surimi

		temperature (°C)	serine protease	cysteine protease	metalloproteinase	
Alaska pollock	SA	40	—	○	○	
		50	—	○	○	
		60	○	○	○	
Blue grenadier	RA	40	○	○	—	
		50	○	○	—	
		60	—	—	○	
Alaska pollock	FA	40	—	—	◎	
		50	◎	◎	—	
		60	—	○	—	
	Blue grenadier	KA	40	◎	◎	◎
			50	○	◎	—
			60	○	○	—

◎: showed high activity, ○: showed activity, - : showed low or non activity.

4.4. 考察

本章では、戻り反応に関与しているプロテアーゼの特定を目的として、スケトウダラ SA、RA 級およびホキ FA、KA 級の冷凍すり身に対して 5 種のプロテアーゼインヒビターをそれぞれ添加した際のみオシン単量体の分解挙動の変化を調べた。その結果、魚種間や等級間、温度帯によって戻り反応を引き起こすプロテアーゼが異なることが示唆された。スケトウダラ冷凍すり身は、単一のインヒビターではみオシン単量体の分解を抑制できなかったことから、複数のプロテアーゼが偏りなく関与していることが示唆された。この傾向は、高い等級の SA 級と低い等級の RA 級で共通していたことから、両すり身に含まれるプロテアーゼの組成は大きく変わらず、単にプロテアーゼの相対量が異なることが、戻り反応の差として表れていると考えられた。

一方、ホキ冷凍すり身は等級によって関与するプロテアーゼが異なり、ホキ FA 級は、40°C ではメタロプロテアーゼが、50°C ではセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼが、60°C ではシステインプロテアーゼが主にみオシン単量体を分解した。これに対し、KA 級は、40°C では複数のプロテアーゼが、50 および 60°C ではシステインプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼが戻り反応に関与しており、等級間ですり身に含まれるプロテアーゼの組成が異なることが示唆された。

第 5 章 総括

魚介類の主な可食部である筋肉は牛や豚などの家畜のそれに比べ不安定で、長期保存には適さない。天然資源に多くを依存する水産物では、一度に多くの漁獲を得ることもあり、漁獲物の長期保存は重要な課題であった。1960年にスケトウダラを原料に開発された冷凍すり身化技術により、魚肉タンパク質の長期保存が可能となった。ここで確立した方法は様々な魚種に合わせて改良され、今日では多くの魚種を原料に様々な等級の冷凍すり身が製造・販売され、世界中で利用されている。本研究ではこうした冷凍すり身を対象に、坐りおよび戻り反応に着目して魚種間のみならず等級間での品質の差を明らかにすることを試みた。

生産量が多く、広く魚肉練り製品の原料に用いられているスケトウダラ、ホキおよびイトヨリダイの3魚種の高い等級および低い等級の計6種類の冷凍すり身を対象に、初めに第2章にて一般成分および基本的な加熱ゲル物性の違いを調べた。一般成分測定から、等級が高いすり身は等級が低いすり身よりも水分が少なく、タンパク質量が多い傾向が認められた。これに伴い、加熱ゲル物性もどの魚種においても等級が高いすり身で優れていた。しかし、糖量を表す炭水化物は、スケトウダラでは等級が高いすり身が少なかったのに対し、イトヨリダイでは逆転しているなど一般成分の差だけで等級間の品質差を示すのは困難であった。

そこで、第3章ではKatohらの報告²⁶⁾を参照し、坐り反応中の破断強度測定から坐り速度および活性化エネルギーを求め、これが等級間と魚種間の品質の差を表すかを検討した。坐り反応ゲルの破断強度の経時変化は、最大破断強度になるまでの時間で異なることなど、単に加熱ゲルの物性を測定するだけでは得られない性質を明らかにすることができた。この面からも、冷凍すり身の等級分けに坐り反応の特徴を加味することは有効であると考えられ

た。坐り速度を等級間で比較すると、全ての魚種で等級が低いすり身の方が等級が高いすり身よりも坐り速度が速くなった。この原因は、等級が低いすり身の坐り能力が等級が高いすり身に比べ低く、結果的に早く最大破断強度に達するためだと考えられた。魚種間での比較から、冷たい水域に生息しているスケトウダラやホキが坐り速度が速く、温暖な水域に生息しているイトヨリダイが遅い傾向が認められた。総じて坐り速度からでは、等級間ならびに魚種間の品質を判断するのは困難であった。一方、活性化エネルギー測定は、等級間および魚種間で明確な差を示した。どの魚種においても等級の高いすり身では坐りの活性化エネルギーが低い数値を示し、より坐り易いと判断された。したがって、活性化エネルギーは冷凍すり身の品質の差を表す良い指標であると考えられた。しかし、イトヨリダイ KA 級の 30°C の結果のように坐り温度が適切でないと戻りの影響を受けてしまい算出ができない場合もある。戻りを起こさない温度で測定する必要があるが、Fig.11 の様に直線の傾きを求めるには最低でも 3 温度での測定が必要である。しかし、あまり低温にすると坐り反応が進行しないため、魚種や等級によって坐り温度を設定する温度帯に留意する必要がある。また本研究では、市販の冷凍すり身において最も高い等級と最も低い等級での比較だったため、差が生じ易かった可能性もある。そのため、様々な魚種や等級で本研究の方法が適用できるか検討する予定である。また、坐り反応を示さない魚種もあり、そうした魚種では別の方法で評価する必要がある。

第 4 章では、魚肉冷凍すり身の戻り反応に着目した。スケトウダラ SA 級戻り反応ゲルは、反応時間に伴って緩やかに破断強度が低下したのに対し、RA 級は加熱後直ちに低下し、その後も低値を維持した。高い等級のスケトウダラ SA 級およびホキ FA 級は 20 分の加熱までは一旦破断強度が高くなったが、スケトウダラ RA 級およびホキ KA 級は加熱後すぐに破断強度が低下した。このことから、等級間のプロテアーゼの含有量や活性に大きな差がある

と推察された。

そこで、冷凍すり身に数種インヒビターを添加した際のタンパク質の分解挙動を SDS-PAGE および画像解析によって確認した。スケトウダラ冷凍すり身は、等級に関わらず単一のインヒビターでは戻り反応を十分に抑制できなかったことから、複数のプロテアーゼが偏りなく関与していることが示唆された。一方、ホキ冷凍すり身では、戻り反応温度によって主に働くプロテアーゼが同定できた。すなわち、FA 級の 40°C ではメタロプロテアーゼが、50 および 60°C ではセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼが主に関与していた。KA 級では、50 および 60°C でメタロプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼの関与が顕著であった。

スケトウダラ冷凍すり身のように、戻り反応に関与しているプロテアーゼが複数存在する場合はジュール加熱などによって戻り反応が生じる温度を素早く通過させ、ゲル物性の劣化を抑制する方法も有効である。ホキ冷凍すり身のように、戻り反応に関与しているプロテアーゼを特定しやすい場合は、食品由来のプロテアーゼインヒビターを添加することで、戻り反応を抑制する。現在でもインヒビターとしての働きに加え、ゲルを補強する目的で卵白を添加する製品もある。この他、食品由来のインヒビターは、小麦や大豆などが検討されている⁶⁶⁾。これによって、加熱ゲル化という魚肉タンパク質機能をより活用でき、品質の良い魚肉練り製品を提供することが可能になると考えられる。本研究では、プロテアーゼインヒビター添加により、戻り反応に関与するプロテアーゼの同定を試みた。これ以外では、合成基質を用いて魚肉に含まれる各タイプのプロテアーゼ活性を測定する手法が報告されている^{67,68)}。今後は、この手法を用いて各冷凍すり身の戻り反応に関与するプロテアーゼの詳細を明らかにする予定である。

謝辞

本研究を行うに当たり、多くの方々にご助力いただきましたことを心から感謝いたします。

本論文の学位審査において、熱心にご指導いただいた日本大学生物資源科学部生命科学科 西尾俊幸 教授ならびに動物資源科学科 川井泰 教授に心から御礼申し上げます。

終始熱心に研究や論文作成に対し有益なご助言をいただいた日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 松宮政弘 教授ならびに福島英登 准教授に心から御礼申し上げます。

最後になりますが、本研究に対しご配慮とご協力していただきました海洋生物資源利用学研究室の皆様にご心より感謝します。

参考文献

1. 辻雅司. (2003). 冷凍すり身産業の展開と国際化の課題. 漁業経済研究, 48(1), 19-41.
2. 平成 28 年度 農林水産物輸出入概況. (農林水産省統計情報部).
3. 平成 29 年度 水産加工統計. (農林水産統計情報部).
4. 徳永俊夫. (1970). 魚類血合肉中のトリメチルアミンオキシサイドならびにその分解— 1 .日本水産学会誌, 36(5), 502-509.
5. 徳永俊夫. (1970). 魚類血合肉中のトリメチルアミンオキシサイドならびにその分解— 2 . 日本水産学会誌, 36(5), 510-515.
6. 徳永俊夫. (1974). 冷凍スケトウダラの品質におよぼすトリメチルアミンオキシサイド分解物の影響. 日本水産学会誌, 40(2), 167-174.
7. 福島英登, 黒川清也, 石上翔, 桑田智世, 山内春奈, 福田裕. (2013). 水晒しがエソ肉冷凍すり身の品質に及ぼす影響について. 水産大学校研究報告, 61(4), 220-225.
8. 熊沢義之, 大寄良孝, 岩見史郎, 松本行司, 新井健一. (1990). コイ筋原線維タンパク質の冷凍変性にたいするピロリン酸塩と糖の協同保護効果. 日本水産学会誌, 56(1), 105-113.

9. 加藤登, 中川則和, 佐藤繁雄, 國本弥衣, 鈴木康宏, 奥村知生, 齋藤寛, 阿部洋一, 新井健一. (2012). 冷凍すり身の加熱ゲル形成の耐凍性に及ぼすソルビトールと重合リン酸塩の協調作用. *海-自然と文化*, 10(1), 1-10.
10. Ni, S., Nozawa, H., and Seki, N. (1998). Effect of microbial transglutaminase on thermal gelation of carp actomyosin sol. *Fisheries Science*, 64(3), 434-438.
11. Ni, S., Nozawa, H., and Seki, N. (1999). The combined effect of transglutaminase and protease inhibitors on the thermal gelation of actomyosin sol from carp and salmon muscles. *Fisheries Science*, 65(4), 606-612.
12. 沼倉忠弘, 関伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一. (1985). 坐りによる肉糊のゲル形成とミオシンの交差結合反応. *日本水産学会誌*, 51(9), 1559-1565.
13. 浅野喜啓, 伊藤慶明, Pantip Suwansakornkul, 小島渥. (2003). トカゲエソ肉の 40°C 付近でのミオシン重鎖分解に及ぼすかまぼこ製造条件の影響. *日本水産学会誌*, 69(3), 393-398.
14. Benjakul, S., Chantarasuwan, C., and Visessanguan, W. (2003). Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from some tropical fish. *Food Chemistry*, 82, 567-574.
15. 石田貴之, 久保田光俊, 豊原治彦. (2013). ミナミダラすりみの坐り特性に関する生化学的研究. *日本水産学会誌*, 79(3), 410-415.

16. Matsuoka, Y., Wan, J., and Ushio, H. (2013). Thermal gelation properties of white croaker, walleye pollack and deepsea bonefish surimi after suwari treatment at various temperatures. *Fisheries Science*, 79(4), 715–724.
17. 阿部洋一, 安永廣作, 北上誠一, 村上由里子, 太田隆男, 新井健一. (1996). 等級の異なるスケトウダラ冷凍すり身にトランスグルタミナーゼ製剤を添加して調製したかまぼこの品質. 日本水産学会誌, 62(3), 439–445.
18. Itoh, Y., Maekawa, T., Suwansakornkul, P., and Obatake, A. (1995). Seasonal variation of gel-forming characteristics of three lizardfish species. *Fisheries Science*, 61(6), 942–947.
19. 牧之段保夫, 中川孝之, 安藤正史, 松野智. (1996). 坐りによる減塩かまぼこの足の補強とかまぼこ組織の電子顕微鏡観察. 日本水産学会誌, 62(4), 654–658.
20. Ni, S., Nozawa, H., and Seki, N. (2001). Effect of pH on the gelation of walleye pollack surimi and carp actomyosin pastes. *Fisheries Science*, 67, 920–927.
21. Dag, O. O., Jon, V. H., and Brent, T. W. (1990). The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening. *Developmental Biology*, 137, 258–265.
22. Nozawa, H., Mamegoshi, S., and Seki, N. (1997). Partial Purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes

and marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 118(2), 313-317.

23. Tsukamasa, Y., Miyake, Y., Ando, M., and Makinodan, Y. (2002). Total activity of transglutaminase at various temperatures in several fish meats. *Fisheries science*, 68, 929-933.

24. 酒井清悟, 久保田光俊, 石田貴之, 前川真吾, 豊原治彦. (2012). 水晒し工程におけるトランスグルタミナーゼの挙動に関する免疫学的研究. 日本水産学会誌, 78(5), 966-972.

25. Tzouros, N. E. and Arvanitoyannis, I. S. (2000). Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) system to the fish / seafood. *Food Reviews International*, 16(3), 273-325.

26. 加藤登, 橋本昭彦, 野崎恒, 新井健一. (1984). スケトウダラ, シログチおよびティラピアの肉糊の坐り速度に及ぼす温度の影響. 日本水産学会誌, 50(12), 2093-2101.

27. 北上誠一, 村上由里子, 小関聡美, 阿部洋一, 安永廣作, 新井健一. (2004). スケトウダラ塩ずり身のゲル形成能とその加熱温度依存性. 日本水産学会誌, 70(3), 354-364.

28. Konno, K., Imamura, K., and Yuan, C. H. (2011). Myosin denaturation and cross-linking in Alaska pollack salted surimi during its preheating process as affected by temperature. *Food Science and Technology Research*, 17(5), 423-428.

29. 沼倉忠弘, 関伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一. (1987). 坐りに伴う塩ずり肉たんぱく質の SDS-ゲル透過図の変化. 日本水産学会誌, 53(11), 2045–2049.
30. 関伸夫, 宇野秀樹, 李南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一. (1990). スケトウダラ筋肉およびすり身中のトランスグルタミナーゼ活性とミオシン B との反応. 日本水産学会誌, 56(1), 125–132.
31. Seki, N., Nozawa, H., and Ni, S. (1998). Effect of transglutaminase on the gelation of heat-denatured surimi. *Fisheries Science*, 64(6), 959–963.
32. 万建栄, 関伸夫. (1992). スケトウダラの坐りにおけるミオシンの酵素架橋重合に及ぼす塩の影響. 日本水産学会誌, 58(11), 2181–2187.
33. Matsuoka, Y., Wan, J., Ushio, H., and Watabe, S. (2013). Thermal gelation properties of white croaker, walleye pollack and bonefish surimi after suwari treatment at various temperatures. *Food Science of Technology*, 79, 715–724.
34. 李南赫, 関伸夫, 加藤登, 中川則和, 照井正三郎, 新井健一. (1990). ホキの肉糊の坐りおよび加熱によるゲル形成とミオシン重鎖の変化. 日本水産学会誌, 56(12), 2093–2101.
35. 加藤登, 中川則和, 照井正三郎. (1989). 筋原線維タンパク質の性状変化からみた連続ミキサーによるすり身の塩摺り条件の検討. 日本水産学会誌, 55(7), 1243–1251.

36. 李南赫, 関伸夫, 加藤登, 中川則和, 照井正三郎, 新井健一. (1990). イトヨリダイの肉糊のゲル形成能とミオシン重鎖の交差結合能. 日本水産学会誌, 56(2), 329–336.
37. Kinoshita, M., Toyohara, H., and Shimizu, Y. (1990). Diverse distribution of four distinct types of Modori (gel-degradation)-inducing proteinases among fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(9), 1485–1492.
38. 木下政人. (1998). 戻り誘発プロテアーゼ群に関する研究. 日本水産学会誌, 64(4), 593–596.
39. Ohkubo, M., Osatomi, K., Hara, K., Ishihara, T., and Aranishi, F. (2005). Myofibrillar proteolysis by myofibril-bound serine protease from white croaker *Argyrosomus argentatus*. *Fisheries Science*, 71, 1143–1148.
40. Ohkubo, M., Osatomi, K., Hara, K., Ishihara, T., and Aranishi, F. (2005). A novel type of myofibril-bound serine protease from white croaker (*Argyrosomus argentatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 141, 231–236.
41. 土屋隆英, 佐野猛. (1988). 魚介肉タンパク質のゲル形成能. 日本食品工業学会誌, 35(5), 367–376.
42. 野村明, 伊藤慶明, 宗圓貴仁, 小島渥. (1993). 土佐湾産魚種の戻り発現に及ぼす水晒しの影響. 日本水産学会誌, 59(5), 857-864.
43. 下元哲, 野村明, 北村有里, 伊藤慶明. (2006). 魚肉水溶性画分のプロテ

アーゼ阻害活性並びにスケトウダラ冷凍すり身の戻り抑制効果. 日本水産学会誌, 72(1), 58-64.

44. Ueki, N., Wan, J., and Watabe, S. (2016). Proteolytic profiles of walleye pollack (*Theragra calcogramma*) and white croaker (*Pennahia argentata*) meats in the presence of intestinal extracts from their own or different fish species. *Food Science and Technology Research*, 22(6), 787-792.

45. 志水寛, 町田律, 竹並誠一. (1981). 魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性. 日本水産学会誌, 47(1), 95-104.

46. Ho, M., Chen, G., and Jiang, S. (2000). Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation of mackerel surimi. *Fisheries Science*, 66, 558-568.

47. Wang, B. and Wang, C. (2000). Characterization of the proteases involved in hydrolyzing paddlefish (*Polyodon spathula*). *Journal of food biochemistry*, 24, 503-515.

48. Hu, Y., Morioka, K., and Itoh, Y. (2008). Distribution of cathepsins B, H, L, and trypsin-like proteases in natural actomyosin from washed meat of various fishes. *Fisheries Science*, 74, 693-695.

49. Cao, M., Osatomi, K., Pangkey, H., Hara, K., and Ishihara, T. (1999). Cleavage specificity of a myofibril-bound serine proteinase from carp (*Cyprinus carpio*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 123, 399-405.

50. Cao, M., Osatomi, K., Matsuda, R., Ohkubo, M., Hara, K., and Ishihara, T. (2000). Purification of a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272, 485-489.
51. Cao, M., Osatomi, K., Hara, K., and Ishihara, T. (2001). Purification of a novel myofibril-bound serine proteinase inhibitor (MBSPI) from the skeletal muscle of lizard fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 128, 19-25.
52. Du, C., Han, L., Cai, Q., and Cao, M. (2013). Secretory expression and characterization of the recombinant myofibril-bound serine proteinase of crucian carp (*Carassius auratus*) in *Pichia pastoris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 164, 210-215.
53. Noguchi, H., Okazaki, T., Minoshima, R., Wakamiya, E., Tsuji, Y., and Takano, K. (2016). Factors decreasing the gel-forming ability of threadfin bream surimi and effect of soybean whey addition. *Food Preservation Science*, 42(3), 119-124.
54. 豊原治彦. (2008). 魚肉軟化機構の解明と遺伝子導入技術を用いた肉質改善技術の開発. 水産総合研究センター研究報告, 26, 69-75.
55. Xu, C., Wang, C., Cai, Q., Zhang, Q., Weng, L., Liu, G., Su, W., and Cao, M. (2015). Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) plays a critical role in the softening of common carp muscle during chilled storage by degradation of type I and V collagens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 10948-10956.

56. Yoshida, A., Kurihara, M., Ogata, H., Cao, M., Osatomi, K., and Hara, K. (2014). Proteolytic degradation of myofibrillar components by endogenous proteases in red sea bream muscle. *Japanese Journal of Food Chemistry*, 21(2), 107-114.
57. Okamoto, Y., Otsuka-Fuchino, H., Horiuchi, S., Tamiya, T., Matsumoto, J.J, and Tsuchiya, T. (1993). Purification and characterization of two metalloproteinases from squid mantle muscle, myosinase I and myosinase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1161, 97-104.
58. Tamori, J., Kanzawa, N., Tajima, T., Tamiya, T., and Tsuchiya, T. (1999). Purification and characterization of a novel isoform of myosinase from spear squid liver. *Journal of Biochemical*, 126, 969-974.
59. Yokozawa, Y., Tamai, H., Tatewaki, S., Tajima, T., Tsuchiya, T., and Kanzawa, N. (2002). Cloning and biochemical characterization of astacin-like squid metalloprotease. *Journal of Biochemical*, 132, 751-758.
60. Kanzawa, N., Ogawa, T., Asakura, M., Okiyama, K., Honda, M., and Tsuchiya, T. (2008). Comparative expression and tissue distribution analyses of astacin-like squid metalloprotease in squid and cuttlefish. *Zoological Science*, 25, 14-21.
61. 日本食品標準成分表 2015 年版（7 討），文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会編，国立印刷局。

62. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 277(5259), 680–685.
63. 植木暢彦. (2017). 食品企業での取り組み事例など～伝統的な職人技から学ぶ高品質なかまぼこの作り方～. 日本水産学会誌, 83(1), 90.
64. Ueki, N., Wan, J., and Watabe, S. (2016). Deterioration of white croaker (*Pennahia argentata*) meat thermally-induced gel products caused by proteolytic enzymes in the contaminated intestine and kidney. *Food Chemistry*, 199, 416–422.
65. Park, S., Toshioka, T., Kimura, M., Nozawa, H., and Seki, N. (2003). Influence of endogenous proteases and transglutaminase on thermal gelation of salted squid muscle paste. *Journal of Food Science*, 68, 2473-2478.
66. 長富潔, 吉田朝美, 原研治. (2016) 魚介肉内在性プロテアーゼ 最新の生化学と食品加工への応用. 恒星社厚生閣, 101-109.
67. Matsumiya, M., Mochizuki, A., and Otake, S., (1989). Purification and characterization of cathepsin B from ordinary muscle of common mackerel *Scomber japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(12), 2185-2190.
68. Liu, H., Yin, L., Zhang, N., Li, S., and Ma, C. (2008). Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening. *Food Chemistry*, 110, 310-318.