

## 魚肉の凍結に伴う脱水と成分濃縮がリン脂質分解へ与える影響

花岡, 研一  
九州大学農学部水産製造学教室

豊水, 正道  
九州大学農学部水産製造学教室

<https://doi.org/10.15017/23287>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 33 (4), pp.225-229, 1979-06. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

## 魚肉の凍結に伴う脱水と成分濃縮 がリン脂質分解へ与える影響

花岡 研一・豊水 正道

九州大学農学部水産製造学教室

(1979年3月7日受理)

### The Effects of Dehydration and Concentration of Components on Phospholipid Decomposition in Frozen Fish Muscle

KEN'ICHI HANAOKA and MASAMICHI TOYOMIZU

Laboratory of Fisheries Technology, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University, 46-04, Fukuoka 812

#### 緒 言

コイ肉の phosphatidylcholine (PC) 分解は凍結により促進され、0°C 以下では -5°C で最大であること、およびその原因が凍結に伴う脱水にあることを著者ら(花岡・豊水, 1979)は報告した。しかし魚肉中には種々の溶質が含まれており、その中には各種来源の phospholipase A<sub>2</sub> に活性化因子として作用する Ca<sup>2+</sup> や阻害因子として作用する物質が含まれている可能性がある。そこでこれら溶質の濃縮による影響を検討した。

PC 分解は前報(花岡・豊水, 1979)と同じく glycerylphosphorylcholine (GPC) の定量によって評価した。

#### 材料と方法

##### 材料

学内の生簀に蓄養しているコイ (*Cyprinus carpio*) を即殺し、背側の普通肉をミンチ肉にして供試した。

##### GPC と PC の定量

前報の通りである(花岡・豊水, 1979)。37°C、10時間インキュベーション後の GPC 生成量 (μmol) を生肉 10g 当りに換算し GPC 生成能とした。

##### 水分活性の測定

コーンウェイユニットを用いて図式内挿法(秋場, 1974)で求めた。

##### 肉汁および遠心脱水肉の調製

ミンチ肉を 4°C で 20,000×g、30分遠心分離し、

液体部を肉汁とした。この遠心残渣を円筒ろ紙に入れ、更に 4°C で 20,000×g、30分遠心して脱水したものを遠心脱水肉とした。

##### 肉汁の分析

ベックマン寒暖計を用いて氷点降下を測定した。凍結点より浸透圧を算出した。紫外部吸収法(梅本, 1974)により可溶性たん白量を求めた。原子吸光法により Ca, Na 量を求めた。Ca の定量には共存イオンの干渉を除くために LaCl<sub>3</sub> を添加して測定した(土器・不破, 1973)。

#### 結 果

##### PC 分解に及ぼす脱水の影響

凍結乾燥によつて脱水した普通肉での GPC 生成能を微生物の影響のないようにトルエン添加ミンチ肉で調べたのが Fig. 1 である。前報の結果(花岡・豊水, 1979)とほぼ同様であり、脱水率の増加に伴い GPC 生成能は増大し、79%脱水で最大を示し、94%では急激に低下した。

##### PC 分解に及ぼす水分活性の影響

コイ普通肉の脱湿等温曲線を示したのが Fig. 2 である。GPC 生成促進が認められる 0~79%脱水肉の Aw が生肉と大差なく、GPC 生成阻害も毛管凝縮域で認められたことは、GPC 生成能の促進および阻害に魚肉中における水の存在状態が大きな影響を与えなかつたことを示している。秋場(1976)は、Aw とコイ肉アクトミオシン (AM) の ATPase 活性との関係を調べた結果、系中に KCl が存在すると毛管凝縮

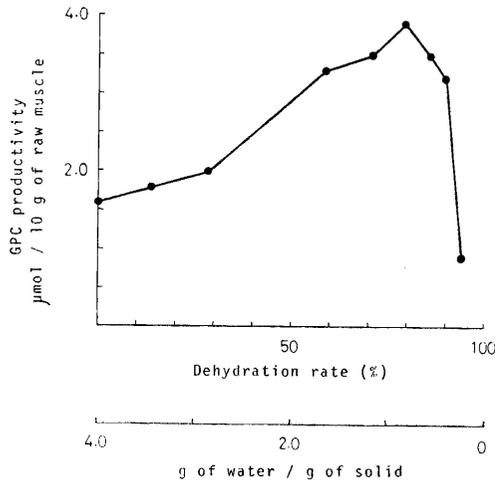


Fig. 1. Relation between GPC productivity and dehydration rate in lyophilized carp ordinary muscle in the presence of toluene (1%).

域でAMが変性してATPase活性が減少したと報告している。コイ筋肉中に存在する塩類が高脱水率では濃縮され、そのためにGPC生成能が阻害された可能性がある。

#### 遠心脱水肉のGPC生成能

ミンチ肉を遠心分離あるいは凍結乾燥により脱水し、それぞれのGPC生成能を測定した結果をTable 1に示す。凍結乾燥による50%脱水肉のGPC生成能が2.3 μmol/10g生肉であつたのに対し、遠心分離による55%脱水肉では基質であるPCが65%残存していたにもかかわらずGPC生成能はほとんどなかつた。これはphospholipase A<sub>2</sub>が一部のPCと共に肉汁中に移行したことを示すので、肉汁のGPC生成能を測定した。加熱処理あるいはHgCl<sub>2</sub>を添加した肉汁では0であつたのに対し、無処理のものでは1.1 μmol/10g肉汁であつた。すなわち肉汁はPC

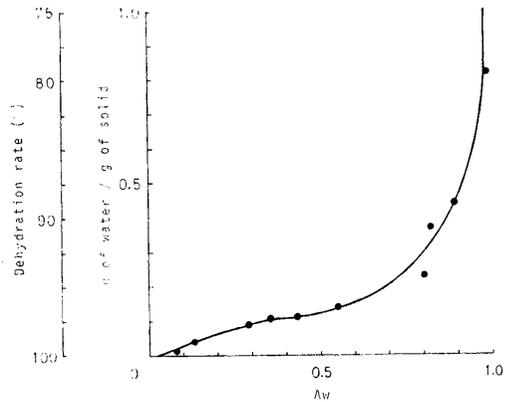


Fig. 2. Desorption isotherm of carp ordinary muscle (20°C).

と共に phospholipase A<sub>2</sub> を含んでいた。

#### GPC生成能に及ぼす肉汁添加の影響

生ミンチ肉に肉汁あるいは水を添加した後、凍結乾燥で水分を生肉相当量(80%)に調整した場合および凍結乾燥で50%脱水したミンチ肉に肉汁あるいは水を添加して水分を生肉相当量に調整した場合の相対GPC生成能を生ミンチ肉のそれを100としてTable 2に示す。水添加の場合にミンチ肉の最終肉汁濃度が生肉と同じでも、前者の調製法によると相対生成能が70で、後者によると120となつたのは、加水—脱水によるGPC生成能の阻害と脱水—加水による促進のためであると思われる。肉汁を添加して肉汁濃度を2倍とした場合にも後者による方が高かつた。また生ミンチ肉への添加が水でも加熱肉汁でも同じ値を示したことは、凍結に伴う脱水によるGPC生成促進が肉汁中の促進因子の濃縮によらないことを示唆している。50%脱水肉は肉汁添加で肉汁濃度を1.5倍、2倍にするとGPC生成能もそれにつれて高くなつた。水あるいは肉汁無添加の50%脱水肉の相対生成能が、それに2倍濃縮肉汁を添加して、酵素、基質の絶対量を

Table 1. GPC productivity of centrifuged carp ordinary muscle and fluid.

Sample	Dehydration rate (%)	PC content (μmol/10 g of raw muscle or fluid)	GPC productivity (μmol/10 g of raw muscle or fluid)
Centrifuged muscle*	55	31	0.4
Lyophilized muscle	50	48	2.3
Fluid		45	1.1
Heated			0
Added with 10 mM HgCl <sub>2</sub>			0

\* Raw muscle was centrifuged at 20,000×g, for 30 min, at 4°C, and 'centrifuged muscle' was prepared by second centrifugation of the residue in a paper extraction thimble.

Table 2. Effect of addition of fluid to raw muscle or 50%-dehydrated muscle on GPC productivity.

		Added fluid	Concentration of <sup>1)</sup> fluid in sample	Relative GPC productivity
(a)	To raw muscle <sup>2)</sup>	Original fluid	2	161
		Heated fluid (100°C, 30 min)	2	70
		Water	1	70
(b)	To 50%- dehydrated muscle <sup>3)</sup>	Original fluid	1.5	145
		2-times fluid	2	200
		Water	1	120
		none	2	210
		Raw muscle	1	100

<sup>1)</sup> Final water contents of all the samples except added none were regulated to original water content of 80%.

<sup>2)</sup> To 10 g of raw muscle each 8 ml of fluids or water was added, and water content was regulated by lyophilization.

<sup>3)</sup> To 6 g of 50%-dehydrated muscle each 4 ml of fluids or water was added.

増大させたが肉汁濃度は同一であるものに匹敵する生成能を示したことは注目すべき点である。前報（花岡・豊水, 1979）で推論したように、魚肉中の phospholipase A<sub>2</sub> は表在性たん白質として存在している可能性が高い。表在性たん白質を膜から遊離させるには塩濃度を高めたり、たん白質濃度を下げるといった温和な処理が行なわれている（香川, 1977）。すなわち表在性たん白質は遊離しやすい状態で膜と結合しているため、肉汁中の phospholipase A<sub>2</sub> は遠心脱水により本来の酵素、基質の位置関係が攪乱されると思われる。一旦攪乱されると酵素—基質複合体の形成が難しくなるため、50%脱水肉に濃縮肉汁を添加して酵素、基質の絶対量を増加しても GPC 生成に与える影響は大でない。また一方酵素—基質複合体が形成されやすくなっている 50%脱水肉に位置関係が攪乱している肉汁を添加することは、水添加と同様に GPC 生成能の低下をもたらす。これらの総合結果として 50%脱水肉に 2 倍濃縮肉汁を添加しても 50%脱水肉とほぼ同程度の相対 GPC 生成能しか示さなかったと推論した。

#### 肉汁成分濃縮の影響

肉汁中の Ca, Na その他についての分析結果を Table 3 に、それら添加の影響を Table 4 に示す。Ca<sup>2+</sup> の影響を調べるため Ca<sup>2+</sup> の濃度が 3 倍になるように CaCl<sub>2</sub> を生ミンチ肉に添加したが、GPC 生成能は促進されなかった。Ca<sup>2+</sup> は phospholipase A<sub>2</sub> の活性促進因子として知られているが（Brockerhoff and Jensen, 1974）、脱水による GPC 生成能促進は Ca<sup>2+</sup> の濃縮によるものでなかった。Mg<sup>2+</sup> を

Table 3. Analysis of fluid of carp ordinary muscle.

Freezing point	-0.82°C
Osmotic pressure	441 mosM
pH	6.49
Soluble protein	125 mg/ml
P C	4.7 μmol/ml
Ca	0.132 mg/ml
Na	0.775 mg/ml
GPC productivity	1.1 μmol/10 ml

Ca 濃度の 6 倍になるように添加したが、生成能に影響しなかった。浸透圧が 3 倍になるように NaCl を添加したが、大きな影響がなく、脱水による浸透圧の増加は GPC 生成能促進と無関係であつた。卵アルブミンを可溶性たん白量の 3 倍添加すると GPC 生成能は阻害された。脱水に伴う可溶性たん白の濃縮の場合 phospholipase A<sub>2</sub> とたん白との濃縮比は変化しないのに対し、添加実験では可溶性たん白濃度が増大したため、phospholipase A<sub>2</sub> と P C との結合が妨害されたと考えられる。EDTA を肉汁中の Ca 濃度の 1.5 倍相当量添加すると GPC 生成能は促進され、6 倍相当量添加するとより促進され、60%脱水ミンチ肉でも GPC 生成能が促進された。phospholipase A<sub>2</sub> を阻害する金属イオンとして Cu などがあるので（Brockerhoff and Jensen, 1974）EDTA が魚肉中に微量含まれていると考えられるこれら金属イオンをキレートして阻害効果を抑えることがまず考えられる。この他に、単分子膜を用いた *in vitro* 実験で、金属イオンあるいは両親媒性物質をリン脂質単分子膜に結合させると、単分子膜の荷電の状態が変化するこ

Table 4. Effect of fluid components on GPC productivity.

raw muscle	
Added component	GPC productivity
Ca added as CaCl <sub>2</sub>	0.7
Mg added as MgCl <sub>2</sub>	1.0
Egg albumin	0.3
NaCl	1.1
EDTA; [Ca]×1.5	2.3
EDTA; [Ca]×6	3.1
None	1.3

Ca and egg albumin were added 2 times as much as original contents, so that their concentrations were 3-fold over original value. Mg was added 6 times as much as Ca content. NaCl was added to increase the osmotic pressure up to 3 times as high as original value. EDTA was added 1.5 or 6 times as much as the content corresponding to Ca.

60% dehydrated muscle	
Added EDTA	GPC productivity
[Ca]×6	7.5
None	3.5

と、およびリン脂質単分子膜の荷電状態が酵素の結合や作用に影響することが Dawson and Bangham (1959), Bangham and Dawson (1960), Dinesh and Schulman (1965) により示されている。EDTA が生体膜に結合した金属イオンをキレートすることにより生体膜の荷電状態を変化させ、その結果として phospholipase A<sub>2</sub> と PC との結合を促進させることも考えられる。

## 考 察

著者ら (花岡・豊水, 1979) は、魚肉の凍結による PC 分解促進の原因が凍結に伴う脱水による phospholipase A<sub>2</sub> と膜ミセルとの複合体形成促進に基づくと考えた。本実験では肉汁中に存在する溶質の濃縮による影響について検討したが、濃縮により PC 分解を促進する因子は見い出せなかつた。それ故、脱水による PC 分解促進は溶質の濃縮によるものでないと結論される。Ca<sup>2+</sup> は GPC 生成に対し阻害的に作用した。Ca<sup>2+</sup> は一般的に膜結合型の phospholipase A<sub>2</sub> に対し促進的、非結合型のものに対し阻害的ないしは無効果であるといわれているが (松本・鈴木, 1975)、本系での Ca<sup>2+</sup> による阻害の結果のみからコイ肉中の phospholipase A<sub>2</sub> が非結合型であると結論するのは

早計である。Ca<sup>2+</sup> と phospholipase A<sub>2</sub> との関係は複雑で、de Haas *et al.* (1971), Zografis *et al.* (1971) は膵臓 phospholipase A<sub>2</sub> が Ca<sup>2+</sup> を要求すると述べ、Condrea *et al.* (1970), Salach *et al.* (1971) は来源あるいは基質の違いにより要求する場合もしない場合もあると報告している。また Brockerhoff and Jensen (1974) はヘビ毒 phospholipase A<sub>2</sub> は Ca<sup>2+</sup> を要求し、反応系に Ca<sup>2+</sup> 添加が不要の場合は少量だが充分な Ca<sup>2+</sup> が存在している場合であると述べている。それ故にコイ肉においても phospholipase A<sub>2</sub> が Ca<sup>2+</sup> を要求しないとは断言できないが、脱水による PC 分解促進が Ca<sup>2+</sup> の濃縮によるものではないとは結論できる。高率脱水による GPC 生成阻害は GPC 生成が EDTA 添加で促進されることから阻害金属濃縮、あるいは水分活性で言及した塩類濃縮による phospholipase 活性阻害のためと考えられる。この他、高率脱水により、生体膜の形態あるいは荷電状態が酵素との結合を受けにくいように変化していることも考えられる。

以上より、魚肉の凍結によるリン脂質分解促進は促進因子が濃縮されるためではなく、脱水により phospholipase A<sub>2</sub> と PC とが複合体を形成しやすい状態になり、それが阻害金属の濃縮などによる阻害を上まわるからだと考えた。

## 要 約

凍結乾燥による 50% 脱水コイ肉の GPC 生成能は生肉より高かつたが、速心脱水による 55% 脱水肉の生成能はほとんどなかつた。凍結乾燥で 50% 脱水後、加熱肉汁を添加したものは水を添加したものと同等の GPC 生成能を示し、肉汁中に GPC 生成能を促進させる物質のないことを示唆した。凍結乾燥で 50% 脱水後 2 倍濃縮肉汁を添加して酵素と基質の絶対量を増大させたものは 50% 脱水のみしたものとほぼ同等の GPC 生成能を示し、酵素対基質の位置的關係が GPC 生成能促進に関連することを示した。Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, 可溶性たん白質の添加は、いずれも GPC 生成能を増大させなかつた。これらの結果から凍結によるリン脂質分解促進は溶質の濃縮によるものでないと結論した。

## 文 献

- 秋場 稔 1974 水分活性の測定. 斎藤恒行ら編: 水産生物化学・食品学実験書. 恒星社厚生閣, 東京, 341-351 頁  
 秋場 稔 1976 たんぱく質変性と水分活性. 日本水

- 産学会編：食品の水，第二版。恒星社厚生閣，東京，101-116頁
- Bangham, A. D. and R. M. C. Dawson 1960 The physicochemical requirements for the action of *Penicillium notatum* phospholipase B on unimolecular films of lecithin. *Biochem. J.*, 75: 133-138
- Brockhoff, H. and R. G. Jensen 1974 *Lipolytic enzymes*. Academic press, New York (USA), pp. 197-243
- Condrea E., M. Barzllay and J. Mager 1970 Role of cobra venom direct lytic factor and  $Ca^{2+}$  in promoting the activity of snake venom phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta*, 210: 65-73
- Dawson, R. M. C. and A. D. Bangham 1959 The action of surface films of lecithin by amphipathic molecules. *Biochem. J.*, 75: 133-138
- de Haas, G. H., P. P. M. Bensen, W. A. Piter-son and L. L. M. van Deenen 1971 Studies on phospholipase A and its zymogen from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, 239: 252-266
- Dinesh, O. S. and J. H. Shulman 1965 Binding of metal ions to monolayers of lecithins, plasmalogen, cardiolipin, and dicetylphosphate. *J. Lipid Res.*, 6: 341-349
- 土器由紀子・不破敬一郎 1973 原子吸光分析の医学および農学における応用。鈴木正己ら編：原子吸光分析の実際（化学の領域，増刊100号）。南江堂，東京，127-138頁
- 花岡研一・豊水正道 1979 魚肉の凍結によるリン脂質分解促進。日水誌，45(4): 465-468
- 香川靖雄 1977 生体膜の再構成。生体膜（日本生化学会編）。東京化学同人，東京，159-165頁，253-261頁
- 松本 亮・鈴木康夫 1975 脂質の代謝（日本生化学会編）。東京化学同人，東京，288-297頁
- Salach, J. I., R. Seng, H. Tisdale and T. P. Singer 1971 Phospholipase A of snake venoms. *J. Biol. Chem.*, 246(2): 340-347
- 梅本 滋 1974 タンパク質の迅速定量。斎藤恒行ら編：水産生物化学・食品学実験書。恒星社厚生閣，東京，203-217頁
- Zografi G., R. Verger and G. H. de Haas 1971 Kinetic analysis of the hydrolysis of lecithin monolayers by phospholipase A. *Chem. Phys. Lipids*, 7: 185-206

### Summary

The authors have pointed out that phosphatidylcholine (PC) decomposition was accelerated in frozen carp ordinary muscle and that the acceleration was caused by dehydration of muscle accompanied with freezing. Since the dehydration of muscle would result in the concentration of components which might accelerate the PC decomposition, we studied the effects of the concentration of components on the acceleration of PC decomposition. Glycerolphosphorylcholine (GPC) productivity was measured at 37°C, for 10 h to evaluate the PC decomposition.

GPC productivity was 2.3  $\mu\text{mol}/10\text{ g}$  of raw muscle for 50%-dehydrated carp ordinary muscle which was minced and lyophilized, whereas it was scarcely detected for 55%-dehydrated ordinary muscle prepared by centrifugation. GPC productivity of minced muscle only lyophilized to 55% dehydration was almost equivalent to that of muscle, which was lyophilized to 50% dehydration and then added with 2-fold concentrated fluid to regulate the water content to that of raw muscle, in spite of enrichment of enzyme and substrate.

GPC productivity of minced muscle added with heated fluid was equal to that with water, this fact indicated that there might be no component in fluid to accelerate the GPC productivity. Addition of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and ovo protein to minced muscle did not result in the acceleration of GPC productivity, neither did the addition of NaCl to elevate the osmotic pressure.

From these results, authors concluded that the acceleration of PC decomposition in frozen muscle was attributed not to the concentration of the components, but to some change in the arrangement of the enzyme, phospholipase A<sub>2</sub>, and the substrate, PC.