

凍結貯蔵が鶏胸筋筋原線維に及ぼす影響

山本克博*・細川敏治*・鮫島邦彦*

(肉製品製造学研究室)

Effect of Freezing on the Myofibril from Hen Breast Muscles

Katsuhiko YAMAMOTO, Toshiharu HOSOKAWA
and Kunihiko SAMEJIMA

(April, 1974)

序 論

死後の筋肉が硬直、解硬、自己消化というプロセスを経ることは周知の事実である。筋肉の死後変化として観察される一連の現象には、死後の筋肉から調製した筋原線維は切れやすくなる(いわゆる fragmentation)^{2),4),12),15),17),18)}、いったん収縮したサーコマーが再び弛緩する^{7),17)}、あるいは shear force が減少する^{12),15)}などが知られている。このような一連の筋肉の死後変化は生筋において機能していた代謝系の機能停止により、筋原線維をとりまく環境の変化が筋原線維構成タンパク質に変化を及ぼしたものと考えられる。

一般に屠体の熟成は0~4°Cという低温域で行なわれるが、貯蔵温度を高めることにより熟成すなわち筋肉の死後変化が促進されることが知られている¹²⁾。また、氷結点以下の温度での凍結貯蔵も広く行なわれているが、凍結状態での筋肉の死後変化に関する研究は少ない⁹⁾。そこで鶏を用い、4°Cで貯蔵した場合と-20°Cで凍結貯蔵した場合の筋原線維の変化を fragmentation と SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ゲル電気泳動法による筋原線維タンパク質の変化を指標として調べた。

材料と方法

実験材料

白色レグホン種約500日齢を刺殺後湯剥ぎ(60°C, 1分間)し、抜羽し、内臓を除去し、流水にて水洗した。屠体はポリエチレン袋に入れて貯蔵した。冷蔵貯蔵の場合は屠体を4°Cで貯蔵を行なった。凍結貯蔵の場合は凍結時の筋肉の状態が貯蔵中の筋肉の変化にどのような影響をもつのかを調べるために、(1)刺殺後直ちに凍結、(2)4°Cで4時間貯蔵後凍結(硬直中凍結)、(3)4°Cで24時間貯蔵後凍結(解硬後凍結)の3種類に分けて貯蔵を行な

* Lab. of Meat Research, The College of Dairying, Nopporo, Hokkaido, Japan

った。凍結貯蔵は -20°C のディープフリーザーを用いて行なった。実験に供する24時間前に 4°C の冷蔵庫に移し解凍を行なった。実験に供した筋肉は冷蔵貯蔵、凍結貯蔵とも胸筋を用いた。

筋原線維の調製

PERRYの方法¹³⁾により筋原線維を調製した。Fragmentationの算出は前報の方法¹⁴⁾により行なった。

SDS ゲル電気泳動

WEBERらの方法¹⁹⁾により SDS ゲル電気泳動を行なった。

筋原線維のタンパク質濃度を3 mg/ml, 1% SDS, 1% β -メルカプトエタノールとし、 100°C で3分間処理した。SDS処理したタンパク質溶液0.3 ml, グリセリン0.125 ml, 0.05% ブロムフェノールブルー溶液0.075 mlを混合し、その25 μl をゲル上への泳動を行なった。カラムは 5×100 mm, ゲル濃度は7.5%である。8 mA/ゲルで数時間通電し、染色は0.2% Coomassie Brilliant Blue (45.4% メタノール, 9.2% 酢酸中)を用い室温で2時間行なった。脱色は5% メタノールを含む7.5% 酢酸を用いて自然脱色を行なった。

結 果

鶏屠体を 4°C で貯蔵した場合の筋原線維の fragmentation の変化が Fig. 1 に示してある。刺殺直後では筋原線維は長く連なり fragmentation は観察されないが、死後1日では全筋原線維の約55%が fragments となった。死後3日を経ると fragmentation は86%におよび、以後7日までは同じレベルにあった。 4°C での貯蔵における筋原線維性タンパク質の変化を SDS ゲル電気泳動によって観察した結果が Fig. 2 に示してある。刺殺後直ちに調製した筋原線維性タンパク質の泳動図では、ミオシン、アクチン、トロポミオシン、トロポニンなどが明瞭に識別され、またその他の minor components が見られた。刺殺後4時間の泳動パターンは刺殺直後の場合と差はないが、刺殺後24時間では、トロポミオシン(分子量37,000)とミオシンの Light chain(分子量24,000)のバンドの間に分子量30,000と27,000の成分が出現し、貯蔵期間の増加にともなってそれらのバ

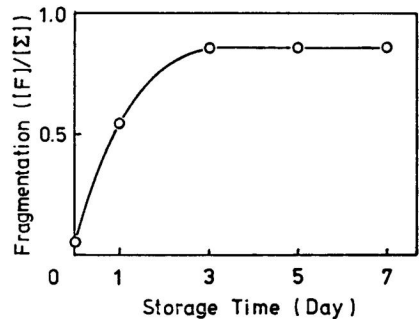


Fig. 1. Effect of storage on the fragmentation of myofibrils from hen breast muscle at 4°C .

During storage, at various intervals, hen breast muscle was homogenized and fragmentation measured.

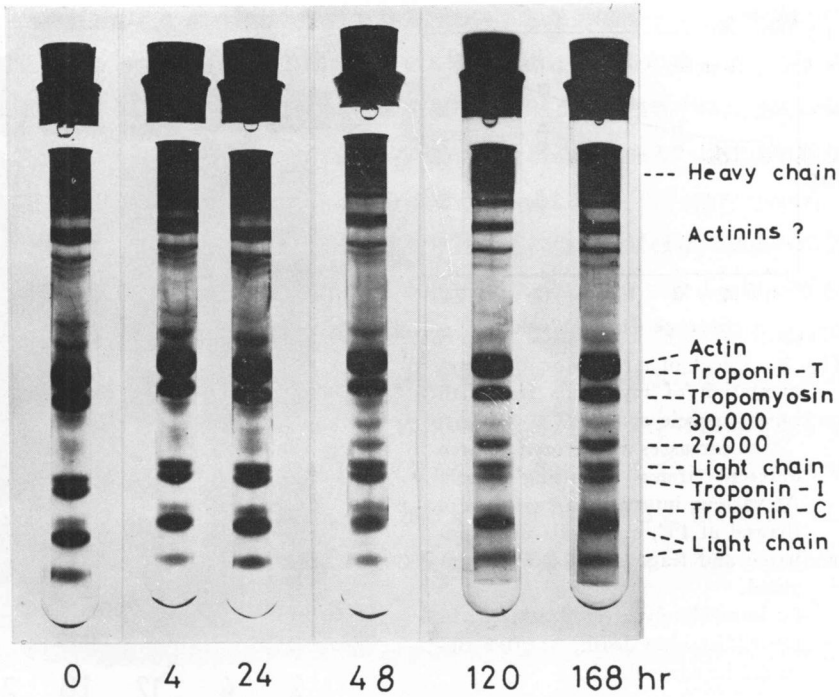


Fig. 2. SDS-gel electrophoresis of myofibrillar proteins extracted from hen breast muscle stored for 0, 4, 24, 48, 120 and 168 hr at 4°C.

ンドは明瞭となった。Z帯を構成していると考えられる α -アクチニンのバンドには明瞭な変化は見られなかった。

鶏屠体を -20°C で凍結貯蔵を行ない、fragmentationの変化を観察した結果がFig. 3に示してある。凍結貯蔵1週間ではfragmentationは60~70%であり、貯蔵期間の増加とともにfragmentationは漸増し、16~24週間では全筋原線維の90%がfragmentsとなった。 4°C での貯蔵の場合と比較してみると、凍結貯蔵が12週までは 4°C で貯蔵した場合の1~2日に相当し、凍結貯蔵16~24週のは 4°C 貯蔵での3日以降に相当するfragmentationといえる。凍結貯蔵の場合、凍結開始時を死直後、死後4時間、死後24時間の3種に分けてfragmentationを測定したが、3者の間に顕著な差は見られなかった。死後24時間で凍結した屠体では凍結時点ですでにfragmentationが50%生じている訳であり、凍結貯蔵期間中に生ずるfragmentationは10~40%である。一方、死直後に凍結した屠体では、fragmentationが数%の時点で凍結するのであるが、最終的な値は24時間後凍結の場合と同じになった。凍結貯蔵という状態においてもなおfragmentationの変化は徐々にではあるが進行することが分った。

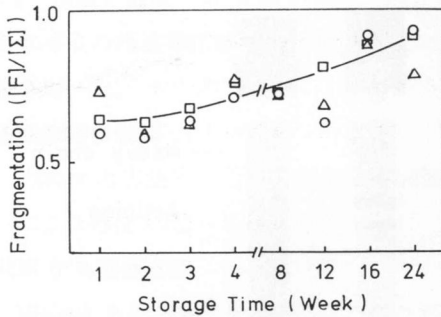
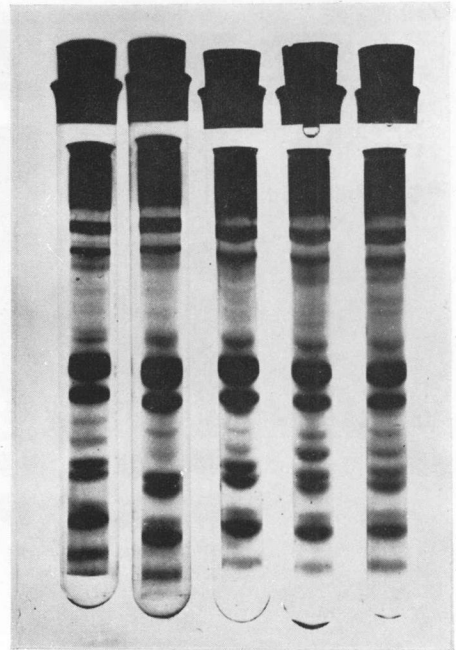


Fig. 3. Effect of storage on the fragmentation of myofibrils from hen breast muscle at -20°C .

Hen carcasses were frozen at three different times following death. At various intervals carcasses were thawed at 4°C , myofibrils were prepared and fragmentation was measured.

○: immediately after death, △: in rigor (4 hr after death, □: after rigor (24 hr after death)

凍結貯蔵での筋原線維性タンパク質のSDSゲル電気泳動パターンがFig. 4に示されている。冷蔵貯蔵での場合と同様に分子量30,000と27,000の成分が貯蔵期間の増加とともに増すことが観察された。冷蔵貯蔵と凍結貯蔵でのfragmentationの割合とSDSゲル電気泳動パターンには一致した関係があると思われた。



2 4 12 16 24
Storage Time (Week)

Fig. 4. SDS-gel electrophoresis of myofibrillar proteins extracted from hen breast muscles stored at -20°C .

Hen carcasses were frozen immediately after death, and thawed at 4°C for preparing myofibrils. SDS-gel electrophoresis was carried out as described in "Materials and Methods".

考 察

Fig. 1に示されたように、筋肉は熟成することにより fragmentation の割合が増加してくるが、これはZ帯の崩壊によるものと考えられている^{2),3),4),5),7)}。Z帯崩壊の原因として考えられる可能性として、(1)Z帯を構成しているタンパク質(主に α -アクチニン)の結合が loose になる、(2) α -アクチニン自体の変性、がある。PENNY¹¹⁾はデン粉ゲル電気泳動を用い、bovine muscleの死後変化を研究し、個々のタンパク質自体の変化よりもむしろタンパク質間の結合の弱化を示唆している。FUKAZAWAら⁵⁾は熟成による α -アクチニンの抽出量の増加を示唆している。我々の実験では、SDSゲル電気泳動法を用いて筋原線

維性タンパク質の変化を調べたが、Z帯を構成していると考えられる α -アクチニンのバンドには明瞭な変化は見られなかった。SDSゲル電気泳動は分子量の差によってタンパク質が分画されると考えられている¹⁹⁾ので、Z帯構成タンパク質が熟成中に分子量の変化を生ずるような大きな変化をきたさないまでも、局所的な構造変化あるいはイオンに対する感受性の変化などが生じている可能性は十分に考えられる。

熟成の進んだ筋肉から得られた筋原線維では死直後に得た筋原線維には見られなかったタンパク質が観察された。この成分はトロポミオシンとミオシンのLight chainのバンドの間に出現し、分子量は30,000と27,000であった。このバンドは他の研究者らによっても報告され、DABROWSKAら¹⁾は30,000成分はタンパク質分解酵素によるトロポニンTの分解産物と考えている。一方、HAYら⁶⁾は30,000成分がミオシンに由来するものと考えている。DABROWSKAやHAYは30,000成分を主要な変化と考えているが、我々の実験では30,000成分よりもむしろ27,000成分の方に大きな変化があると思われた。しかし30,000成分にしる27,000成分にしるこれらの成分が筋原線維性タンパク質のどの画分に由来するものかは確証が得られなかった。

凍結という処理は化学的にも生物的(酵素的)にもその反応速度を鈍らせる効果があると考えられる。それにもかかわらず、我々の実験条件下では、凍結1週で60%ものfragmentationが観察されたが、これはcold shortening^{8),16)}の影響が現われたためかもしれない。凍結貯蔵1週から24週にかけてfragmentationは徐々にではあるが増加しており、凍結中にも熟成が進行していることを示唆するものである。

牛肉などでは凍結貯蔵する場合ある程度熟成させてから凍結すると良いとされているが、鶏を用いた今回の実験では、凍結中にも一連の死後変化が進んでいることが分かり、また凍結開始の時期についても、死直後、硬直中、解硬後のいずれの時期に凍結してもfragmentationの割合は同じであり、凍結開始の時期をそれほど考慮する必要はないのではないかと思われた。しかし凍結貯蔵中のサーコマの収縮、弛緩がどのように行なわれているのかについては不明であり、サーコマ長がtendernessの一要因であるという点を考慮すると、凍結貯蔵中のサーコマ長の変化をより明確にすることにより、凍結開始の時期を決めることができるようになるだろう。

要 約

鶏屠体を冷蔵貯蔵および凍結貯蔵し、筋原線維のfragmentationとSDSゲル電気泳動法による観察を行なった。

冷蔵貯蔵ではfragmentationは死後急激に増加し、3日では90%に達し、以後一定の

レベルを保った。筋原線維性タンパク質は熟成が進むにつれ、分子量 30,000 と 27,000 の成分が出現した。

凍結貯蔵では凍結開始時期を死直後、硬直中、解硬後の 3 種に分けて行なったが、fragmentation は 3 者の間に差は見られず、1 週で 60% の fragmentation が見られ、以後 24 週まで漸増の傾向を示し、24 週では 90% に達した。死直後に凍結した鶏屠体の筋原線維性タンパク質の変化は冷蔵貯蔵の場合と同じく、30,000 成分と 27,000 成分の出現が認められた。

終りに臨み、本研究に際し、種々の御助言ならびに御校閲を賜った北海道大学安井勉教授、九州大学深沢利行教授に深謝する。

文 献

- 1) Dabrowska, R., B. Barylko, E. Nowak and W. Drabikowski, 1973. The origin of 30,000 dalton protein in troponin preparations. *FEBS Letters*, **29**: 239-242.
- 2) Davey, C. L. and M. R. Dickson, 1970. Studies in meat tenderness. 8. Ultrastructural changes in meat during aging. *J. Food Sci.*, **35**: 56-60.
- 3) Fukazawa, T. and T. Yasui, 1967. The change in zigzag configuration of the Z-line of myofibrils. *Biochem. Biophys. Acta*, **140**: 534-537.
- 4) Fukazawa, T., E. J. Briskey, K. Takahashi and T. Yasui, 1969. Treatment and post-mortem aging effects on the Z-line of myofibrils from chicken pectoral muscle. *J. Food Sci.*, **34**: 606-610.
- 5) Fukazawa, T., H. Nakai, S. Ohki and T. Yasui, 1970. Some properties of myofibrillar proteins obtained from low ionic strength extracts of washed myofibrils from pre- and post-rigor chicken pectoral muscle. *J. Food Sci.*, **35**: 464-468.
- 6) Hay, J. D., R. W. Currie and F. H. Wolfe, 1973. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of fresh and aged chicken muscle proteins in sodium dodecyl-sulfate. *J. Food Sci.*, **38**: 987-990.
- 7) Hay, J. D., R. W. Currie, F. H. Wolfe and E. J. Sanders, 1973. Effect of postmortem aging on chicken muscle fibrils. *J. Food Sci.*, **38**: 981-986.
- 8) Locker, R. H. and C. J. Hagyard, 1963. A cold shortening effect in beef muscles. *J. Sci. Food Agr.*, **14**: 787-793.
- 9) Marsh, B. B., P. R. Woodhams and N. G. Leet, 1968. Studies in meat tenderness. 5. The effects on tenderness of carcass cooling and freezing before the completion of rigor mortis. *J. Food Sci.*, **33**: 12-18.
- 10) Masaki, T., M. Endo and S. Ebashi, 1967. Localization of 6S component of α -actinin at Z-band. *J. Biochem. (Tokyo)*, **62**: 630-632.
- 11) Penny, I. F., 1970. Conditioning of bovine muscle. *J. Sci. Food Agr.*, **21**: 303-306.
- 12) Parrish, F. C., R. B. Young, B. E. Miner and L. D. Andersen, 1973. Effect of postmortem conditions on certain chemical, morphological and organoleptic properties of bovine muscle. *J. Food Sci.*, **38**: 690-695.

- 13) Perry, S. V. and A. Corsi, 1958. Extraction of proteins other than myosin from isolated rabbit myofibril. *Biochem. J.*, **68**: 5-12.
- 14) 鮫島邦彦・菊地 敏・山本克博, 1974. パパイン処理した鶏胸筋肉の小片化に関する研究. 酪農大紀要, **5**: 111-118.
- 15) Sayre, R. N., 1970. Chicken myofibril fragmentation in relation to factors influencing tenderness. *J. Food Sci.*, **35**: 7-10.
- 16) Smith Jr., M. C., M. D. Judge and W. J. Stadelman, 1969. A "cold shortening" effect in avian muscle. *J. Food Sci.*, **34**: 42-46.
- 17) Takahashi, K., T. Fukazawa and T. Yasui, 1967. Formation on myofibrillar fragments and reversible contraction of sarcomere in chicken pectoral muscle. *J. Food Sci.*, **32**: 409-413.
- 18) Takahashi, K., A. Hattori and T. Yasui, 1970. Effect of contraction on the fragmentation of myofibrils. *J. Biochem. (Tokyo)*, **67**: 609-610.
- 19) Weber, K., J. R. Pringle and M. Osborn, 1972. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel, in "Methods in Enzymology" vol. 26. (C. H. W. Hirs, ed.) pp. 3-27, Academic Press, New York.

Summary

Hen carcasses were stored at 4°C for 1 week and at -20°C for 24 weeks. Myofibrils were prepared from hen breast muscles and fragmentation was measured. Electrophoresis of the myofibrillar proteins was carried out in SDS-gels.

During storage at 4°C, fragmentation increased very rapidly, especially after death the values reached 90% on the 3rd day, and remained at this level for 7 days. In SDS-gel electrophoresis 30,000 and 27,000 dalton components, not present in fresh myofibril, appeared in the electropherogram of the myofibrils taken from aged muscle.

In the case of storage at -20°C, samples were frozen in three different lots following death; 1. immediately after death, 2. in rigor mortis (4 hr after death), 3. after rigor mortis (24 hr after death). No difference in fragmentation related with these variations were observed. In all three cases, fragmentation was 60% after one week of storage, and increased gradually to 90% during 24th week. It was found that at -20°C, intensity of the 30,000 and 27,000 dalton components of the myofibrils taken from hens muscle frozen immediately after death, also increased with the length of storage time.