

助成番号 9959

魚肉の塩漬による筋原繊維タンパク質の変化と食塩の浸透の相互関係に関する研究

助成研究者：大泉 徹(福井県立大学 生物資源学部 海洋生物資源学科)

【目的】水産加工品に添加される食塩(NaCl)が魚肉の貯蔵性を高めるとともに、その呈味とテクスチャーの改善に寄与することはよく知られている。このような NaCl の作用はその濃度に依存して発揮されるので、水産加工品の品質を制御するためには、浸漬や撒布によって添加される NaCl の魚肉に対する浸透特性や拡散特性についての理解を深め、その濃度を調節することが必要である。一方、NaCl は魚肉の主成分である筋原繊維(Mf)タンパク質の変性と溶解に影響を及ぼすことが知られているが、このような Mf タンパク質の変化と NaCl の浸透性の関係については研究がなされていない。そこで、本研究では魚肉の塩漬中に起こる Mf タンパク質の変化が NaCl の浸透に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。また併せて Mf タンパク質の変化と魚肉内部の水分挙動との関係についても検討した。

【方法】NaCl によって引き起こされる Mf タンパク質の溶解と変性は Mf を用いたモデル実験により検討した。すなわち、Mf タンパク質の溶解性は Mf 懸濁液の濁度を測定するとともに、実際に可溶化するタンパク質量を定量して検討した。また、Mf タンパク質の溶解に伴う保水性の変化を遠心分離により遊離する水分量から検討した。さらに、Mf タンパク質の主成分であり、魚肉の食品機能に深く関与しているミオシンの変性を、Ca-ATPase 活性、塩溶解性、40%飽和硫酸抽出性、およびキモトリプシン消化性の変化から検討した。これらのモデル実験に加えて、実際に魚肉を塩漬し、浸透した NaCl 濃度と水分量を測定するとともに、Mf の Ca-ATPase 活性の変化を追跡した。

【結果と考察】塩処理による Mf タンパク質の変化 0.2M 以上の NaCl をマアジ Mf 懸濁液に添加すると、著しい濁度の低下を伴って可溶化タンパク質量が増加し、Mf が溶解することが示された。これらの変化に対応して Mf タンパク質の保水性が大きく増大した。一方、2.0 M NaCl でマアジ Mf を処理すると、Mf 中のミオシンの Ca-ATPase 活性と 40%飽和硫酸抽出性は処理時間の経過とともに低下したが、塩溶解性はほとんど変化しなかった。また、Mf のキモトリプシン消化性から、NaCl 処理によるミオシンの変性は専らその頭部(S-1)で起こり、尾部(rod)はほとんど変性していないことが示された。

魚肉の塩漬中に起こる Ca-ATPase 活性の変化 塩漬魚肉中の Mf の Ca-ATPase 活性は浸透した NaCl 濃度と浸漬時間に依存して低下した。この結果は、NaCl 濃度の高い塩漬魚肉の表層部でタンパク質の変性が大きく進行することを示唆している。供試した魚種のなかではマアジ>ハマチ>キダイの順に塩漬中における Ca-ATPase 活性の低下の度合いが大きかった。NaCl の浸透量と浸透圧の関係 魚肉中への NaCl の浸透量は浸漬液の浸透圧に比例して増大した。NaCl の浸透量と浸透圧の関係はタンパク質の変性を抑制するために添加したソルビトールの共存下においてもほとんど変化せず、また、塩漬中に起こるタンパク質の変性度合いの異なるハマチとマアジのいずれを用いた場合にもほとんど差異が見られなかった。魚肉内部の水分挙動 一方、塩漬魚肉中の水分の分布を検討した結果、表層部では水分が増加し中心部では減少する傾向が見られた。これらのことから、塩漬中に魚肉表層部に起こるタンパク質の変化は、NaCl の浸透よりもむしろ魚肉内部の水分の挙動に影響を及ぼすことが示唆された。

助成番号 9959

魚肉の塩漬による筋原繊維タンパク質の変化と食塩の浸透の相互関係に関する研究

助成研究者：大泉 徹 (福井県立大学 生物資源学部 海洋生物資源学科)

1.研究目的

魚肉に添加される食塩(NaCl)が水産加工品の貯蔵性を高めるとともに、その呈味やテクスチャーの改善に寄与していることはよく知られている。従って、水産加工品の品質を制御するためには、魚肉中における NaCl の濃度を調節することが必要である。ねり製品などを製造する場合には、NaCl はすり身に直接添加・混合されるが、塩干品などフィレーや切り身を原料とする加工品の製造においては、NaCl は浸漬や撒布によって添加されている。このような製品では NaCl の魚肉に対する浸透特性や魚肉中における拡散特性をふまえて、魚肉中の NaCl の濃度を調節することが重要である。

一方、魚肉の主成分である筋原繊維(Mf)タンパク質に及ぼす NaCl の影響については従来から多くの研究がなされ、その結果、本来、水に不溶の Mf タンパク質は NaCl などの塩濃度の上昇とともに溶解すること¹⁾や、高濃度の NaCl が Mf タンパク質の変性を促進すること^{2,3)}もよく知られている。しかしながら、これらの Mf タンパク質の変化と NaCl の浸透の関係については研究例が見られない。そこで、本研究では塩漬中に起こる Mf タンパク質の変化が、魚肉中への NaCl の浸透に及ぼす影響を検討した。また、併せて Mf タンパク質の変化と魚肉内部の水分の挙動との関連についても検討した。

2.研究方法

2.1 NaCl 処理による Mf タンパク質の生化学的性質の変化

まず、塩漬中に NaCl によって引き起こされることが予想される Mf タンパク質の溶解と変性について、マアジ Mf を用いたモデル実験により検討した。すなわち、Mf の溶解性は Mf 懸濁液に種々の濃度の NaCl を添加して 0℃で一晩保持した後、懸濁液の濁度を 350nm における吸光値として測定するとともに、1mM ATP-Mg の存在下で可溶化するタンパク質量をビュレット法⁴⁾により測定して検討した。また、約 60mg/g の Mf に 0.1 ~1.0 M の NaCl を添加して 25,000g で 20 分間遠心分離し、遊離する水分を定量して Mf の溶解に伴う保水性の変化を検討した。さらに、高濃度の NaCl 処理によって引き起こされる Mf タンパク質中のミオシンの変性を、Ca-ATPase 活性、塩溶解性、40%飽和硫酸抽出性、およびキモトリプシン消化性の変化から検討した。Ca-ATPase 活性は、0.5 M NaCl、5 mM CaCl₂、25 mM Tris-maleate (pH7.0)、1mM ATP からなる反応組成液に 0.3~0.4mg の Mf を加えて 25℃で反応させ、遊離する無機リン酸を定量して測定した。塩溶解性は 0.5 M NaCl、1 mM ATP-Mg 存在下で Mf から可溶化されるミオシン量を、

また、40%飽和硫安抽出性は同上条件で可溶化される Mf に、40%飽和となるように飽和硫安を加えて抽出されるミオシン量を、それぞれ SDS-PAGE のデンストメトリーにより測定して検討した。なお、40%飽和硫安で抽出されるミオシンはモノマーであり、凝集したミオシンは抽出されることがすでに明らかにされている。⁵⁾また、塩溶解性はミオシンの凝集の度合いが大きくなると低下することもすでに報告されている。⁶⁾また、これらの変性指標とともに変性部位を検出する手段として ⁷Mf を 50 mM NaCl、1 mM EDTA 存在下で、重量比 1/250 のキモトリプシンを用いて消化し、消化パターンを SDS-PAGE により検討した。

2.2 魚肉の塩漬による NaCl の浸透と水分量の変化

マアジ、ハマチ、およびキダイを材料として用い、これらのフィーレまたは一定の形状の肉片を 2 倍量の種々の濃度の NaCl 溶液に浸漬した。経時的に浸漬液から取り出して表面の水分を濾紙でふき取った後、細切して NaCl 濃度と水分量を測定するとともに、Mf を調製して Ca-ATPase 活性を測定した。NaCl 濃度の測定はフォルハルト余剰滴定法⁸⁾により、水分量は 110℃常圧乾燥法によって定量した。また、塩漬魚肉の一部を 8 M 尿素-2%SDS-2% 2-メルカプトエタノール-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) (以下 SDS-尿素混液と略す) を用いて可溶化して SDS-PAGE に供し、タンパク質サブユニット組成の変化についても検討した。

3. 研究結果と考察

3.1 NaCl 処理による Mf タンパク質の変化

まず、NaCl との反応により Mf タンパク質にいかなる変化が起こるのかを明らかにするために、Mf タンパク質の溶解と変性に及ぼす NaCl の影響を、マアジ Mf を用いたモデル実験により検討した。Mf の溶解に及ぼす NaCl 濃度の影響を Mf 懸濁液の濁度と可溶化タンパク質量から検討した結果を Fig.1 に示した。これによると、0.2M 以上の NaCl をマアジ Mf 懸濁液に添加すると、著しい濁度の低下を伴って可溶化タンパク質量が増加し、Mf が溶解することが示された。Fig.1 中には、Mf の保水性の指標として、遠心分離により Mf から遊離する水分量も併せて示した。遊離水分量は Mf の溶解とともに激減し、Mf の保水性が著しく高まることが示された。

2.0 M の NaCl でマアジ Mf を処理しミオシンの Ca-ATPase 活性、塩溶解性および 40% 飽和硫安抽出性の変化を検討した結果を Fig.2 に示した。Mf 中のミオシンの変化に注目した理由は、ミオシンが Mf タンパク質の主成分であるだけでなく、その変化が水産加工品の変化に深くかかわっていることが知られているからである。この結果によると、Mf 中のミオシンの Ca-ATPase 活性は処理時間の経過とともに低下し、12 時間後には処理前の 40%程度となった。Ca-ATPase の失活にほぼ対応して 40%飽和硫安抽出性が低下し、ミオシンの凝集が同時に進行することが示された。しかし、ミオシンの塩溶解性はほ

とんど変化せず、ミオシンの凝集は塩溶解性を低下させるほど大規模なものではないと考えられた。NaCl 処理によってミオシン分子のいずれの部位で変性が起こるのかを知るために、Mf をキモトリプシンで消化し、消化パターンの変化を検討した (Fig.3)。本実験で用いた消化条件では、未処理の Mf 中のミオシンは、その頭部(S-1)と尾部(rod)のジャンクションで切断され、消化生成物は S-1 と rod のみであった。NaCl 処理した Mf では S-1 の生成量が低下し、代わって rod よりも僅かに高分子の分子断片が新たに生成した。この分子断片は、消化がさらに進行すると消失し、rod の最終的な生成量にはほとんど変化が見られなかったため、S-1 の一部を含む rod であることが推察された。S-1 の生成量の低下は Ca-ATPase の失活とほぼ対応していた。これらの結果は、NaCl 処理による Mf 中のミオシンの変性が専ら ATPase 活性中心を含む S-1 で起こり、その凝集を伴って進行するが、rod の α -ヘリックス構造にはその影響が及ばず、未変性のまま保たれることが示唆された。なお、Fig.3 によると NaCl 処理によりアクチンがキモトリプシンによって消化されやすくなっていることも示されており、その変性が進行していることが確かめられた。このように高濃度の NaCl による Mf 中のミオシンの変性は S-1 で起こることが明らかになったので、以後、塩漬中の Mf タンパク質の変性は Ca-ATPase 活性を指標として検討した。

3.2 魚肉の塩漬中に起こる Ca-ATPase 活性の変化

続いて、マアジのフィーレを 0.3~3.0 M に至る濃度の NaCl 溶液に浸漬し、魚肉中の NaCl 濃度の変化を検討した結果を Fig.4 に示した。これによると、浸漬液の NaCl 濃度にかかわらず、魚肉中の NaCl 濃度は浸漬の初期に大きく増加したが、徐々にその増加は緩やかになって 20 時間以上浸漬するとほとんど変化しなくなり、ほぼ一定の値を示した。それらの値は浸漬液の NaCl 濃度にほぼ対応していた。

これらの塩漬魚肉から Mf を調製し、その Ca-ATPase 活性を測定した結果を Fig.5 に示した。Ca-ATPase 活性は浸漬液の濃度にかかわらず、塩漬時間とともに低下したが、低下の度合いは魚肉中の NaCl 濃度の増加とよく対応しており、NaCl 濃度が高いほど大きかった。これらの結果は、相対的に NaCl 濃度が高い塩漬魚肉の表層部では中心部よりもタンパク質の変性が大きく進行することを示唆している。Ca-ATPase 活性の低下には、NaCl 濃度と塩漬時間の両方が影響を及ぼすと考えられたので、Fig.4 に示した NaCl 濃度と塩漬時間の関係を塩漬時間で積分し、その積分値と Ca-ATPase の関係を Fig.6 に示した。この積分値は、Mf タンパク質が接触した NaCl の濃度の積算値と考えることができる。Fig.6 に見られるように、浸漬液の NaCl 濃度にかかわらず、Ca-ATPase 活性はほぼ一本の曲線上にプロットされ、NaCl 濃度と塩漬時間の積分値に依存して低下した。従来、試料の大きさや形状が異なると NaCl の浸透量も異なるため、塩漬中に起こる Ca-ATPase 活性の低下を相互に比較することは困難であったが、このような関係を利用すると、塩漬中におけるタンパク質変性の起こり易さを統一的に比較することができる。そこ

で、マアジ、ハマチおよびキダイのフィレートを塩漬し、魚肉中の NaCl 濃度と塩漬時間の積分値と Ca-ATPase 活性の関係を検討した (Fig.7)。用いた 3 魚種の間には Ca-ATPase 活性の低下の度合いにかなりの差異がみられ、マアジ>ハマチ>キダイの順に低下の度合いが大きかった。

一方、塩漬魚肉の一部を SDS-尿素混液で可溶化して SDS-PAGE に供した結果、タンパク質サブユニット成分に変化は認められず、本実験条件下では、これらの魚種においてミオシン重鎖の多量化反応は進行しないことが示された（結果は図示しない）。

3.3 NaCl の浸透と浸透圧の関係

塩漬中に起こる Mf タンパク質の性状変化が NaCl の浸透量に及ぼす影響を、浸漬液中の NaCl の浸透圧との関連で検討した (Fig.8)。Fig.8 の横軸に示した浸透圧は、浸漬液の濃度から小川⁹⁾に従って算出した。また、縦軸にはマアジおよびハマチの肉片 (1×1×6 cm) を 30 時間以上浸漬して、ほぼ一定値となった魚肉中の NaCl 濃度を、浸透量として示した。魚肉中への NaCl の浸透量は浸漬液の浸透圧に比例して増大した。Fig.8 中には、塩漬中のタンパク質変性を抑制するため、1 M のソルビトールを共存させた場合の結果も示したが、NaCl の浸透量と浸透圧の関係はほとんど変化しなかった。また、塩漬中における Ca-ATPase 活性の低下の度合いが異なるハマチとマアジのいずれを用いた場合にもほとんど差異が見られなかった。これらの結果は、塩漬中に起こるタンパク質の変性が NaCl の浸透に影響を及ぼさないことを示唆している。

3.4 魚肉内部の水分の分布

次に、塩漬中に起こる Mf タンパク質の性状変化が魚肉内部の水分の挙動に及ぼす影響を検討した。この目的のために、塩漬魚肉を表層部から内部に向かって 4 層に分離し、それらの部位の水分量を測定した結果を Fig.9 に示した。これによると塩漬魚肉の表層部では水分量が増加し、内部では減少する傾向が見られた。Fig.10 には魚肉中の水分量と NaCl 濃度の関係を示した。魚肉中の水分量は NaCl 濃度が 0.4 M までは減少したが、0.4 M 以上になると増加した。水分量の減少は浸透圧差による脱水のためであろうと考えられるが、表層部における水分量の増加には Mf タンパク質の溶解に伴う保水性の増大が影響を及ぼしていることが推察された。

以上のことから、塩漬中に魚肉表層部で起こるタンパク質の変化は、NaCl の浸透よりもむしろ魚肉内部の水分の分布に影響を及ぼすことが強く示唆された。

4. 今後の課題

本研究で用いた魚種では、いずれも塩漬中にミオシン重鎖の多量化反応の進行が認められなかったため、今後、スケトウダラなど多量化反応が強く起こる魚種を用いて、NaCl の浸透に及ぼすその影響を検討する必要があると考える。また、本研究では、実際の塩漬魚肉中で起こるタンパク質変性の進行について、Ca-ATPase 以外の指標を用いた詳細な

検討は行わなかったが、モデル実験の場合とのタンパク質濃度の相違が変性の進行様式に影響を及ぼしていることも考えられるので、現在引き続き検討を行っている。

5. 文献

- 1) 川嶋孝省・新井健一・斎藤恒行：魚類筋肉構成タンパク質に関する研究ⅠX. スケトウタラ冷凍すり身中のアクトミオシンの定量条件の検討, 日水誌, 39, 207-214 (1973).
- 2) 若目田 篤・野澤誠子・新井健一：魚類筋原繊維 Ca-ATPase の加熱変性に及ぼす中性塩の影響. 日水誌, 49, 237-243 (1983).
- 3) 若目田 篤・新井健一：高濃度の塩存在下におけるミオシン B の変性機構. 日水誌, 50, 635-643 (1984).
- 4) A.G.Gornall, C.J.Bardawill, and M.M.David : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751-765 (1949)
- 5) 小関宏明・加藤早苗・今野久仁彦：コイ筋原繊維加熱変性の敏感な指標としてのミオシン抽出性の低下. 日水誌, 59, 515-518 (1993).
- 6) S.Kato, H.Koseki, and K.Konno : Oligomerization of carp myosin which retain its ATPase activity. *Fisheries Science*, 62, 985-989 (1996).
- 7) 今野久仁彦・加藤早苗・江湖正育：コイ筋原線維を出発材料としたミオシン・サブフラグメント-1 の簡便な調製法. 日水誌, 56, 1885-1890 (1990).
- 8) 分析化学研究会：定量分析, 改訂版, 廣川書店, 東京, 1979, pp.115-117.
- 9) 小川敏男：漬物製造学, 光琳, 東京, 1989, pp.39-46.

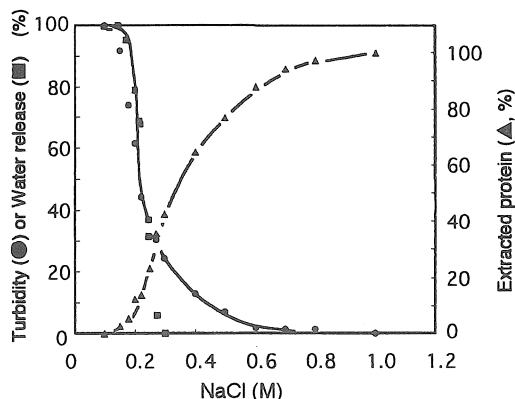


Fig.1 Effect of NaCl concentration on solubilization of myofibrillar protein.

Various concentrations of NaCl were mixed with horse mackerel myofibrils and the mixture was incubated at 0°C overnight. After incubation, turbidity(●) of myofibril suspension was measured at 350nm and the amount of extracted protein(■) was determined by measuring protein concentration of the supernatant after centrifugation of the mixture with 1 mM ATP-Mg. Water release(▲) after centrifugation of concentrated myofibrils (60mg / g) was used as an index of water holding capacity of myofibrils.

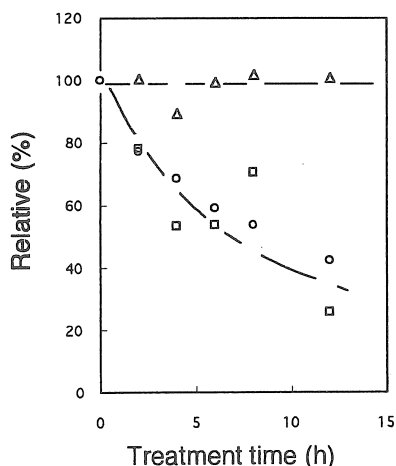


Fig.2 Changes in Ca-ATPase activity, salt solubility, and extractability with 40% saturated ammonium sulfate of myosin upon treatment of high concentration of NaCl.

Horse mackerel myofibrils were incubated with 2.0 M NaCl at 4 °C. At appropriate intervals, the aliquot of the mixture was taken and Ca-ATPase activity(○), salt solubility(△), and extractability(□) with 40% saturated ammonium sulfate of myosin were measured. Ca-ATPase was assayed in a medium of 0.5 M NaCl, 25 mM Tris-maleate(pH7.0), 1mM ATP, 5mM CaCl₂. Salt solubility of myosin was estimated by densitometry of myosin heavy chain band on SDS-PAGE of extracted protein with 0.5 M NaCl and 1 mM ATP-Mg. Extractability of myosin was also determined the amount of myosin extracted with 40% saturated ammonium sulfate in the presence of 0.5 M NaCl and 1 mM ATP-Mg with the same manner.

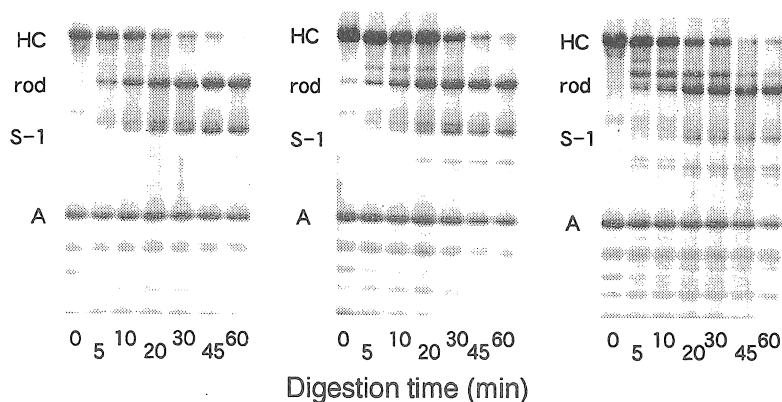


Fig.3 Change in chymotryptic digestion pattern of myofibrils upon treatment with high concentration of NaCl.

Horse mackerel myofibrils treated with 2.0 M NaCl as in Fig.2 were digested in a medium of 0.05 M NaCl, 20 mM Tris-maleate(pH7.0), 1mM EDTA by using 1/250 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C. The digests were submitted to SDS-PAGE analysis.

(A) untreated myofibrils, (B) treated for 2 h , (C) treated for 12 h
 HC; myosin heavy chain, rod; myosin rod, S-1; myosin subfragment1, A; actin

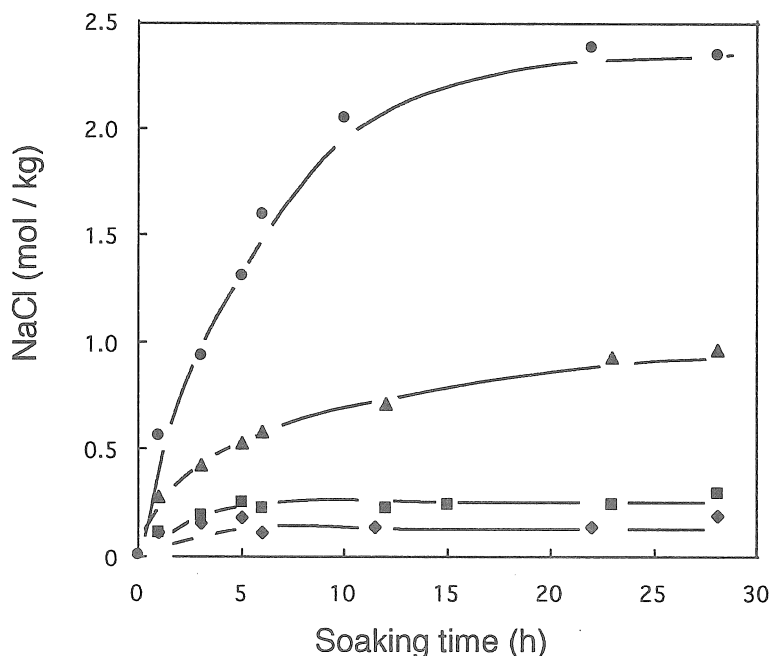


Fig.4 Increase in NaCl concentration in fish meat during soaking in various concentration of NaCl solution.

Horse mackerel fillets were soaked in 0.3 M(◆), 0.5 M(■), 1.5 M(▲), or 3.0 M(●) NaCl solution. At appropriate intervals, the fillets were taken out from the solution for the measurement of NaCl concentration by thiocyanometric titration.

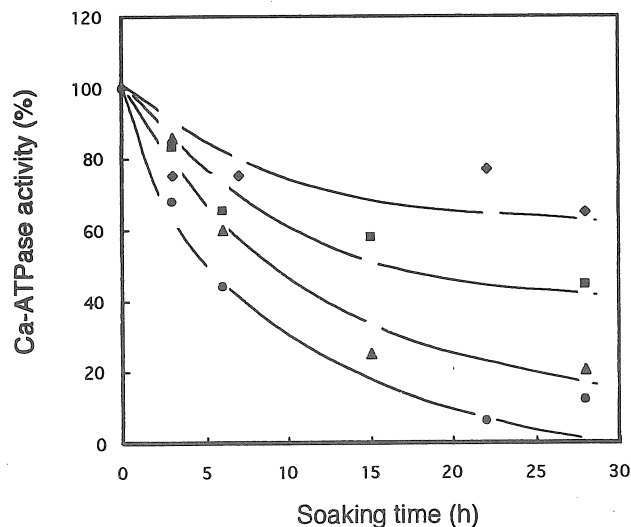


Fig.5 Decrease in myofibrillar Ca-ATPase activity of fish meat during soaking in NaCl solution.

Myofibrils were prepared from fish meat soaked in NaCl solution as in Fig.4 and their Ca-ATPase activities were measured. The same symbols were used as in Fig.4.

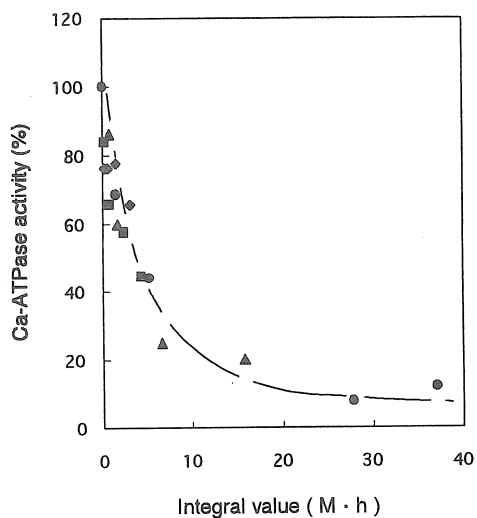


Fig.6 Relationship between Ca-ATPase activity and integral value of NaCl concentration.

Ca-ATPase activities shown in Fig.5 were replotted as a function of the integral values estimated from the relations between NaCl concentration and soaking time in Fig.4. The symbols were the same as in Fig.4.

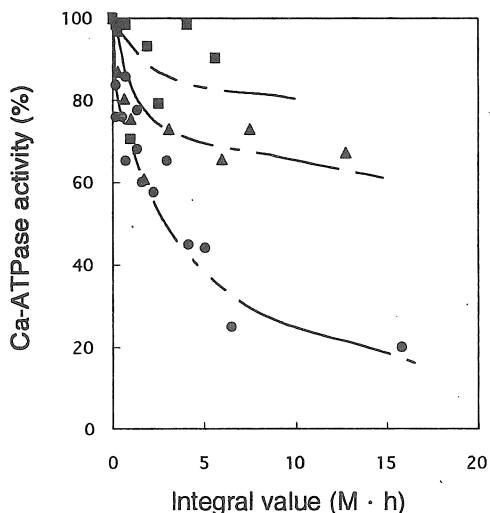


Fig.7 Comparison of Ca-ATPase decrease of three kinds of fish species.

Yellowtail(▲) and yellow sea bream(■) fillet were soaked in NaCl solution with the same manner as horse mackerel fillet(●) shown in Fig.4. Decrease in myofibrillar Ca-ATPase activity was analyzed as a function of the integral value as in Fig.6.

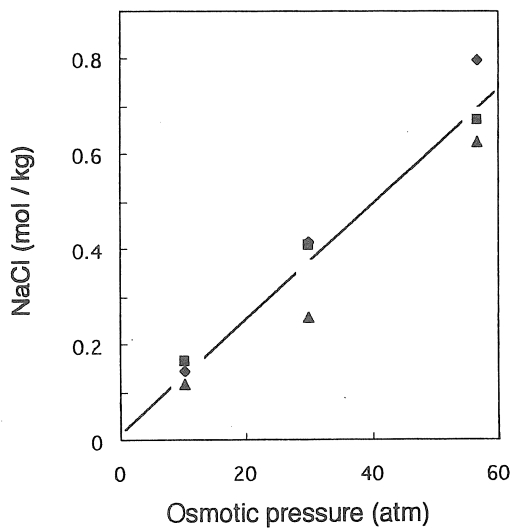


Fig.8 Relationships between the permeation of NaCl and the osmotic pressure of soaking solution.

Meat blocks (1×1×6 cm) from horse mackerel or yellowtail were soaked in various concentrations of NaCl solution with or without 1.0 M sorbitol. NaCl concentrations reached a plateau were plotted against the osmotic pressure of soaking solution.

yellowtail without sorbitol(■), yellowtail with sorbitol(▲), horse mackerel with sorbitol (◆)

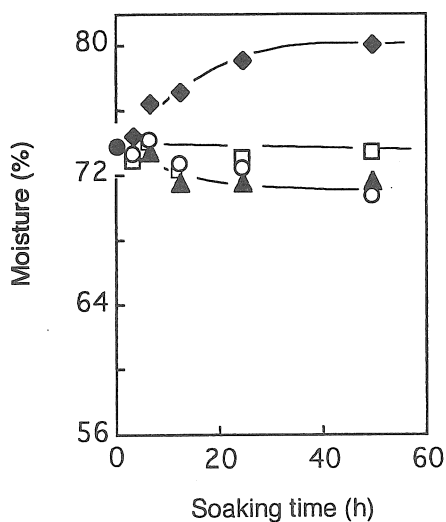


Fig.9 Changes in moisture content at the different depth of fish meat during soaking.

Yellowtail meat blocks (2×2×6 cm) were soaked 1.5 M NaCl. At appropriate intervals, the meat blocks were taken out from the solution and separated to 4 layers from the surface to the center of the blocks. Moisture content of each part was measured.

Depth from the surface of the meat;

0~3.0 mm (◆), 3.0~5.7 mm (■), 5.7~8.8 mm (▲), 8.8mm~ (●)

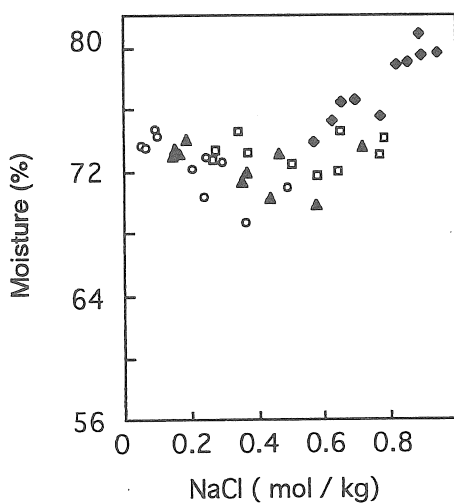


Fig.10 Relationship between moisture content and NaCl concentration at the different depth of soaked meat.

The moisture contents shown in Fig.9 were replotted against NaCl concentration. The same symbols were used as in Fig.9.

A Study on the Interaction between Permeation of Salt and Changes in Myofibrillar Protein during Soaking of Fish Meat in NaCl Solution

Tooru Ooizumi

Department of Marine Bioscience, Faculty of Biotechnology,
Fukui Prefectural University

Summary

Sodium chloride (NaCl) added to fish meat plays essential roles in processing seafood. Therefore, it is important to study on the permeability of NaCl into fish meat for controlling the concentration. In this study, the effects of the biochemical changes in myofibrillar protein during soaking on permeation of NaCl and distribution of moisture in the meat were investigated. Firstly, the solubilization and the denaturation of myofibrillar protein induced by NaCl treatment were studied by using myofibril preparation. As results, more than 0.2 M of NaCl solubilized myofibrillar protein accompanied with increase in water holding capacity. On the other hand, high concentration of NaCl (2.0 M) caused the denaturation of myosin S-1 including ATPase active site rather than myosin rod portion. Accordingly, Ca-ATPase activity was used as an index of protein denaturation during soaking of NaCl solution.

During soaking of fish meat in NaCl solution, myofibrillar Ca-ATPase activity decreased with the increase in the concentration of NaCl of meat and the prolongation of soaking period. Among three species of fish used in this study, most significant Ca-ATPase decrease during soaking occurred in horse mackerel followed by yellowtail and yellow sea bream.

Permeation of NaCl was relative to osmotic pressure of soaking solution. Addition of sorbitol to soaking solution to prevent the protein denaturation gave no effect on the relationships between permeation of NaCl and osmotic pressure. Moreover, in spite of the deference in the extent of the Ca-ATPase decrease during soaking, osmotic pressure dependency of permeation of NaCl into horse mackerel meat was similar to that into yellow tail meat.

Moisture content in external part of fish meat increased whereas that in internal one decreased during soaking. The increase of water holding capacity accompanied with solubilization of myofibrillar protein of the external part was thought to be a cause of heterogeneous distribution of moisture in the meat. It was, therefore, suggested that the biochemical changes in myofibrillar protein during soaking affected distribution of moisture in the meat rather than permeation of NaCl.