

論文内容の要旨

氏名:山田 晃樹

博士の専攻分野の名称:博士(生物資源科学)

論文題名:魚肉冷凍すり身の坐りおよび戻り反応に関する研究

第1章 緒言

古くから練り製品産業の発展している我が国では、水産ねり製品の生産量は、水産の食品加工品生産量の加工種類別構成割合で 32.3%(H29 年)と、水産加工品の中で最も高い割合を占めている。魚肉冷凍すり身は、かまぼこやちくわなどの魚肉練り製品の原料に広く用いられる中間製品である。冷凍すり身の国内年間生産量は約 40,000t であるのに対し、年間輸入量は約 300,000t であり、その多くは海外の資源に頼っている(2016 年)。今日では、世界で漁獲される魚種を原料に様々な等級の魚肉冷凍すり身が製造・販売されている。海外では、カニかまを中心にして魚肉練り製品の生産量ならびに消費量が増加しており、年々冷凍すり身の需要が高まっている。しかしながら、冷凍すり身の魚種間および等級間の品質を表す指標の基準は明確ではない状況である。

魚肉ねり製品には特有の弾力やしなやかさがあり、そのような物性は「足」と呼ばれ重視されている。足の発現には、魚肉の主要な構成タンパク質であるミオシンが必要不可欠であり、ミオシンやアクチンによる網目構造の形成が主となる。網目構造は 80°C 以上の加熱によって形成され、これを一般に加熱ゲルと呼ぶが、80°C 以上に達するまでの温度と時間の加熱履歴は練り製品の物性に大きく影響する。特に、魚肉練り製品の物性発現にとっては、特定の温度帯で生じる「坐り」および「戻り」反応を把握することが重要である。

坐り反応とは、20~40°C の温度帯で、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形成が生じ、ゲル構造が増強する現象である。この反応の強弱は、魚種や生息域、季節などによる筋肉タンパク質の組成の相違、pH および塩分量などによって異なる。

一方、戻り反応とは、50~70°C の温度帯でゲル構造が脆弱化する現象である。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。戻り反応には魚肉すり身に含まれる複数のプロテアーゼが関与することが報告されており、こうしたプロテアーゼは Modori-inducing protease(MIP)と総称される。坐りおよび戻り反応は、酵素反応に起因することから加熱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。

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等級の異なる冷凍すり身を対象に、まず各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について検討した。次に、魚肉冷凍すり身に特有の現象である坐り反応を用いて、食品工学的的手法による冷凍すり身の品質評価を試みた。すなわち、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、坐り反応の活性化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。次に、坐り反応より高温帯で生じる戻り反応に着目し、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。すなわち、冷凍すり身に対し、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼ活性をそれぞれ阻害する各種プロテアーゼインヒビターを添加し、40、50 および 60°C の 3 温度で戻り反応を進行させ、魚種や等級ごとに各温度で活性を示すプロテアーゼの特定を試みた。

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

2-1 一般成分

魚肉冷凍すり身の等級は高いものより SA>FA>AA>A>KA>B>KB>RA>RB の順に分類されている。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)冷凍すり身の一般成分(水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分および食塩)を測定した。水分は、スケトウダラおよびホキではいずれも 74~75%であったが、イトヨリダイでは SA 級で 73.5%、KA 級で 77.1%と等級間で大きく異なった。タンパク質含量は、いずれの魚種においても等級の高いすり身で 0.5~1.6%高かった。脂質、灰分および食塩含量はいずれの冷凍すり身においても 0.1~0.7%と微量であった。また、炭水化物含量は、シュークロスを主成分とする冷凍変性防止剤が添加されているため、各冷凍すり身で 6~8%であった。

2-2 加熱ゲル形成に及ぼす坐り反応

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)の冷凍すり身について加水率 30%および 2.5%食塩添加の条件で肉糊を作製し、坐り反応を行わない直加熱(85°C、30 分)および坐り反応を行う二段加熱(30°C で 20 分坐り反応後 85°C で 30 分)で加熱ゲルを作製し、物性を測定した。

直加熱と二段加熱を比較すると、二段加熱の方が破断強度および凹みともに高い数値を示し、坐り反応の効果が認められた。等級間で比較すると、いずれの魚種においても等級の高いすり身が破断強度および凹みともに低級なすり身の値よりも高かった。特にホキでは等級間の物性値が大きく異なり、また直加熱と二段加熱間で破断強度に大きな差が認められ、坐り反応の効果が顕著であった。

第 3 章 坐り反応を用いた各種冷凍すり身の品質評価

3-1 坐り反応ゲルの破断強度測定

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)のすり身から肉糊を調製し、20、25 および 30°C(イトヨリダイ KA 級のみ 23°C で加熱)で坐り反応させ、経時的にゲルを回収し、レオメーターを用いて破断強度の変化を測定した。

スケトウダラ SA 級および RA 級では共に、反応温度 20、25 および 30°C で、それぞれ 48、24 および 3 時間で最大破断強度に達した。ホキ FA 級および KA 級は、どの温度でも 24 時間で最大破断強度に達した。イトヨリダイでは、KA 級 30°C を除けば SA 級および KA 級は共に、反応温度 20、25 および 30°C ではそれぞれ、24、24 および 48 時間で最大破断強度に達した。最大破断強度は、スケトウダラおよびイトヨリダイでは等級の高いものが低いものより 2 倍以上の数値を示し、ホキでは 1.1~1.3 倍であった。イトヨリダイ KA 級の反応温度 30°C では戻り反応が生じていることが示唆されたため、イトヨリダイ KA 級のみ 23°C で反応させた。スケトウダラとイトヨリダイでは、等級の違いによって破断強度の経時変化は大きく異なったが、ホキでは明確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差があることが示唆された。

3-2 坐り速度解析

坐り反応ゲルの破断強度測定で得られた数値を片対数グラフの Y 軸に、反応時間を X 軸に取り、結果をプロットして、各点を通る近似曲線から最大破断強度(BSmax)の半分の値(1/2BSmax)に達するまでの時間(T1/2)を求め、その逆数値を坐り速度 K(s⁻¹)とした。

同魚種の等級間で坐り速度を比較したところ、いずれの魚種においても明確な差は認められなかった。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、ホキ>スケトウダラ>イトヨリダイの順に速かった。30°C ではスケトウダラ>ホキ>イトヨリダイという順になり、等級が低いものでは 20、25 および 30°C のいずれの坐り温度においてもホキ>スケトウダラ>イトヨリダイの順となった。魚種により坐り反応に適す

る温度が異なることが示唆された。

3-3 坐り反応の活性化エネルギー測定

片対数グラフの Y 軸に坐り速度を、X 軸に温度(絶対温度)の逆数値(1/T)をプロットした Arrhenius plot より、次式を用いて活性化エネルギーを算出した。 $E_a = -2.303 \times R d (\log K) / d$ R: Gas constant(1.98cal/deg)

活性化エネルギーとは、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で、ここでは坐り能力の指標とした。すなわち、数値が高いと坐りにくく、低いと坐り易いすり身と推定した。

同魚種の等級間で比較すると、等級の高いものより低いものの値がスケトウダラで 1.3 倍、ホキで 2.2 倍、イトヨリダイで 2.5 倍に高くなり、明確に差があることが判明した。魚種間で比較すると、等級に関わらず、スケトウダラ>イトヨリダイ>ホキの順となり、ホキがこの 3 種の中では最も坐り能力が高いことが分かった。これらの結果より、坐り反応の活性化エネルギーは冷凍すり身の品質評価を表す指標になりえると示唆された。

第 4 章 各種冷凍すり身の戻り反応に関するプロテアーゼの特定

4-1 戻り反応ゲルの破断強度測定

坐り反応ゲルと同様の手順で肉糊を調製し、50°C で 20~180 分間戻り反応後、85°C で 20 分間加熱して加熱ゲルを作製し、レオメーターで破断強度の変化を測定した。

6 種の冷凍すり身の挙動を比較すると、スケトウダラ SA 級、ホキ FA 級、イトヨリダイ SA 級および KA 級は戻り反応時間 20 分までは一旦破断応力が高くなり、その後低下したが、スケトウダラ RA 級およびホキ KA 級は反応後すぐに破断応力が低下した。一旦破断応力が上がった理由として、坐り反応ゲルが形成されたと考えられる。またスケトウダラ冷凍すり身では、等級間で物性の変化に大きな差が生じていた。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に大きな差があると推察された。

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

スケトウダラ(SA 級および RA 級)およびホキ(FA 級および KA 級)から肉糊を調製する際にプロテアーゼインヒビター(セリンプロテアーゼインヒビター:Aprotinin、Phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)、システインプロテアーゼインヒビター:E-64、メタロプロテアーゼインヒビター:EDTA、1,10-Phenanthroline monohydrate)をそれぞれ添加し、恒温水槽で 40、50 および 60°C で 20~600 分間戻り反応させ SDS-PAGE により構成タンパク質の挙動を観察した。なお、イトヨリダイすり身 2 種も同様の測定を行ったが、SDS-Urea に不溶の高分子構造を形成していたため、以後の分析対象から除外した。

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 分の反応でミオシン単量体のバンド強度が減少した。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が抑制された。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。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減少が短時間で生じ、50 °C 反応では、240 分以上の長時間反応でアクチンのバンド強度の減少も確認された。インヒビター添加は、40 °C ではあまり戻り反応を抑制しなかった。50 °C では、E-64 および Aprotinin が若干戻り反応を抑制したが、他のインヒビターはあまり抑制しなかった。60 °C では、E-64 および EDTA が戻り反応を若干抑制したが、他のインヒビターはあまり抑制しなかった。

ホキ FA 級のすり身のみで、どの温度帯でも 0~120 分まではミオシン単量体に大きな変化は見られないが、240~600 分反応によりミオシン単量体のバンド強度が減少した。インヒビターを添加すると、40 °C ではどのイ

ンヒビターも戻り反応を抑制した。50 および 60 °C では、E-64 および Aprotinin を添加した際に特に戻り反応を抑制した。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減少が短時間で生じ、分解も確認できた。インヒビターを添加すると、40 °C では FA 級同様、どのインヒビターも戻り反応を抑制した。50 および 60 °C では、E-64 および EDTA が特に戻り反応を抑制した。

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

画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて SDS-PAGE ゲルを解析した。ミオシン単量体 (MW:210KDa) とアクチン (MW:約 42KDa) のバンド強度を数値化し、両者の比をミオシン率として算出した。ここで得られたミオシン率を Y 軸に、反応時間を X 軸にしたグラフから、反応時間によるミオシン率の経時変化を求めた。

スケトウダラ SA 級では、EDTA、PMSF および E-64 の添加で短時間であれば戻り反応を抑制することができた。一方、長時間では戻り反応を十分に抑制することは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。スケトウダラ RA 級では、40 および 50 °C 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 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ったことから、RA 級も複数のプロテアーゼが関与していると推察された。

ホキ FA 級では、40 °C 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、さまざま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 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していることが示唆された。ホキ KA 級は、40、50 および 60 °C 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ていた。その中でも、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大きく寄与していた。

第 5 章 総括

魚肉練り製品の原料に広く用いられる冷凍すり身は、様々な魚種から複数の等級の製品が販売されている。本研究では各種魚肉冷凍すり身について坐り反応ゲル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、これが魚種間および等級間でどのように異なるかを検討した。その結果、坐り速度は同魚種すり身の等級間の品質の差を示すことはなかったが、坐り反応の活性化エネルギーは等級間の差を良く示した。したがって、坐り反応の活性化エネルギーは冷凍すり身のゲル形成能を主とする品質の差を示す良い指標であることが示唆された。

戻り反応に関する研究結果から、魚種間や等級間、温度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では、単一のインヒビターではミオシン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。ホキ FA 級では、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ミオシンを分解していることが示唆された。KA 級では、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に関与していることが示唆された。また、プロテアーゼ量の違いが等級間の戻り反応の違いに寄与すると考えられた。これらの結果は、戻り反応を回避(ジュール加熱など)あるいは阻害(天然物由来プロテアーゼインヒビター添加など)などにより、坐り反応により形成されたゲルを崩壊させない加工条件を検討する上で、貴重な知見になると考えられる。