

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

魚肉冷凍すり身の加熱ゲル形成能と卵白粉末による
増強効果に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-02-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 國本, 弥衣 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1364

博士学位論文

魚肉冷凍すり身の加熱ゲル形成能と
卵白粉末による増強効果に関する研究

平成 28 年度
(2016 年 9 月)

國本弥衣

博士学位論文

魚肉冷凍すり身の加熱ゲル形成能と
卵白粉末による増強効果に関する研究

平成 28 年度
(2016 年 9 月)

國本弥衣

目次

第1章 緒論

1. 水産練り製品と冷凍すり身の現状	・・・1
2. 魚肉のゲル形成能	・・・2
3. 水産練り製品のゲル物性改良に関する既往の研究	・・・3
4. 加熱ゲルの物性評価	・・・4
5. 本論文の構成	・・・6

第2章 魚肉すり身の加熱ゲル形成に伴う物性の変化と卵白粉末による増強効果

1. 目的	・・・10
2. 方法	・・・10
3. 結果および考察	・・・12
4. 本章の結論	・・・18

第3章 溶解性からみた加熱ゲル中のタンパク質に關与する結合のタイプと卵白粉末 添加の影響

1. 目的	・・・24
2. 方法	・・・25
3. 結果および考察	・・・27
4. 本章の結論	・・・36

第4章 魚肉すり身の加熱ゲル形成に寄与するタンパク質成分の分析と卵白粉末添加の影響	
1. 目的	・・・47
2. 方法	・・・48
3. 結果および考察	・・・50
4. 本章の結論	・・・61
第5章 総括	・・・71
謝辞	・・・77
公表論文（学位論文内容に関わる審査付論文）	・・・78
引用文献	・・・79

第1章 緒論

1. 水産練り製品と冷凍すり身の現状

水産練り製品は、古くは平安時代の古文書「類聚雜要抄」に記されている日本の伝統食品である。近年では、欧米諸国やアジア諸国でも健康志向の高まりから、高タンパク質、低脂肪の優れた食品として注目されている。しかし、図 1-1 に示すように、国内での生産量は年々減少傾向にあり、2014 年にはピーク時の 1970 年代と比較して、約 45%にまで減少している（社団法人全国すり身協会，2015）。これは、水産練り製品の一世帯当たりの支出金額にも如実に表れており、1994 年には 12,635 円であったのが、2014 年には 8,721 円とこの 20 年で約 69%に減少しており、水産練り製品の市場は年々縮小傾向にある（かまぼこ新聞編，2015）。

一方、水産練り製品の原料として利用されている冷凍すり身は、主要原料であるスケトウダラ冷凍すり身の国内での生産量（陸上加工）が、1984 年をピークとして年々減少傾向にあり、それに伴い輸入冷凍すり身が増加している（図 1-1）。しかし、近年では、生産量が最も多いアメリカにおいて、スケトウダラ冷凍すり身よりも付加価値の高いフィーレ加工品の生産量が増加したために、冷凍すり身向けの原料が不足したことに加え、諸般の事情により、それまで 1 kg 当たり約 400 円前後で推移していたスケトウダラ FA 級の価格が、2008 年には約 700 円に価格が高騰した（図 1-2）。そのため、水産練り製品業者は、魚種の代替やすり身の使用量を減らすなどの対策を余儀なくされた（日刊シーフーズ・ニュース編集局，2009）。最近では、それまで冷凍すり身の原料として利用されてこなかった未利用魚も新たに加工され、世界中の海域で漁獲された多種類の魚類から冷凍すり身が生産されるようになり、水産練り製品はそれらを組み合わせて製造されている。

2. 魚肉のゲル形成能

魚肉のゲル化特性は、魚種によってそれぞれに異なり、冷凍すり身として広く利用されるスケトウダラは、坐り加熱ゲルを形成するのが特徴である。すなわち、肉糊を 35℃以下の低温域で加熱した後（予備加熱）、続いて 85～90℃の高温で加熱すると（本加熱）、初めから高温で加熱した場合よりも、極めて高い物性値の弾力に富むゲルを形成する。この低温下のゲル化が坐りと称されている（岡田, 1999）。スケトウダラの場合は、0～35℃の低温域で加熱すると坐り加熱ゲルを形成するが、予備加熱温度が高いほど形成する速度（坐りゲル化速度）が大きい（北上ら, 2004）。ちなみに、予備加熱温度が 5℃では 48 時間後、25℃では 6～7 時間後に物性値が最大に達した。すなわち、坐りを伴うゲル化は、予備加熱温度によって律速され、反応が完了するとき物性は最大値に達し、この値はしばらく安定に保たれる（北上ら, 2004；北上ら, 2005）。

一方、国内の陸上加工において、ホッケ冷凍すり身は過去にスケトウダラに次ぐ生産量であった（図 1-1）。しかし、これは同じ北方魚でありながらスケトウダラとは異なり、ゲル形成能は著しく劣り、予備加熱を行っても坐りゲルを形成しない。また、色調が灰褐色で、ホッケ特有の呈味を付与し、味の向上を図る目的でちくわや揚げかまぼこなどに広く利用されている。現在、流通されている水産練り製品の製造には単一の魚種ではなく、複数の魚種を組み合わせる場合が多く、ゲル形成能と呈味のバランス、外観の色、北方魚か南方魚かなどを考慮し、原料魚種が決められている。

3. 水産練り製品のゲル物性改良に関する既往の研究

近年の研究は、冷凍すり身の価格高騰の動きなどを考慮して、従来の製造原理や技術改良に関わる問題よりも、多岐にわたる副原料の添加によるゲル物性の改良など、製品の弾力補強を目的とした方向へと注力されてきた。例えば、大豆および小麦タンパク質（山下ら，1996），でん粉（山下ら，1999）など、その他にも様々な副原料添加によってゲル物性を向上させる試みがなされた（岡田，1999；柴，2003；山下，2003）。動物性タンパク質素材としては、特に卵白や血漿由来のタンパク質素材（牛血漿あるいは豚血漿）が良く知られており、加熱ゲルに対する添加効果に関する研究が行われ、その成果も既に紹介されている（阿部；1994，阿部ら，1996；安永ら，1998）。しかし、加熱ゲルを調製する条件とその製品のゲル物性に及ぼすこれらの添加成分の影響との関係や、加熱ゲルに供する原料魚種による添加物の効力の違いに関する情報は依然として少ない現状である。

これまでに、粘液胞子虫が寄生するためにゲル形成能が極めて劣る魚種であるパシフィックホワイティングのすり身に坐り加熱によるゲル形成能を付与する目的で、牛血漿粉末を添加したときのゲル物性の変化について調べられている（加藤ら，2003）が、ホッケ冷凍すり身についても、肉糊に牛血漿粉末を添加することで加熱ゲルの物性改良に成功している（鈴木ら，2005）。しかし、牛血漿粉末はBSE（牛海綿状脳症）の問題に関連して、その輸入販売が現在中止されており、牛血漿粉末に替わる他の食品タンパク質の添加効果について検討する必要性が生じた（石原ら，1985；若松ら，1985；田中，2005）。そのような状況下で、現在、水産練り製品のゲル物性改良剤として卵白が広く利用されている。卵白の添加により、製品の白さ，照り，艶が改善されるだけでなく、足も強化されるため水産

練り製品に幅広く使用されている。卵白の主要構成タンパク質は、オボアルブミン 54%、コンアルブミン 12~13%、オボムコイド 11%などであり、これらは 60~65℃で凝固し始め、70℃以上で硬いゲルになる（山下，2003）。そのゲル物性改良効果は、プロテアーゼインヒビターとしての作用によると報じられており（一島，1983；Chang-Lee *et al.*，1990），最近では、ホッコクアカエビに卵白を添加することで、自己消化を抑制し、加熱ゲル形成能の改善が可能であることが示されている。ただし、坐りの温度帯である 40℃加熱では、卵白の添加効果が弱く、ゲル物性向上作用であるプロテアーゼ阻害作用だけでは説明し難い点で、さらなる検討が必要であると述べている（高橋，2015）。また、卵白成分中のトリプシンインヒビター活性の強いオボムコイドを添加した場合より、活性の弱いオボアルブミンやコンアルブミンを添加した方が加熱ゲルの物性値は高く、戻りを抑制したことから、トリプシンインヒビターとしての機能とは別の作用が製品物性に強く関わっていることが示唆されている（山下ら，1995）。

4. 加熱ゲルの物性評価

冷凍すり身の等級の名称や品質規格はすり身を製造する各メーカーが独自に決めており、統一された規格はないのが現状である。国外および国内メーカーから市販されている様々な等級のスケトウダラ冷凍すり身から調製された加熱ゲルの物性上の特徴を比較すると、同じ等級であってもかなりのバラツキがあること（加藤ら，2011）が明らかであり、同じ等級のすり身を使用しても最終製品の品質に違いが生じる。そのため、品質を一定に保った水産練り製品を生産するには、予め冷凍すり身の品質を事前に検査し、目標である最終製品の品質に合わせた加水

調整（タンパク質濃度調整）や加熱ゲル形成能を最大限に引き出すため、ゲル物性改良剤を添加するなどの技術的努力が必要であり、それには品質評価を正確に行うことが重要である。冷凍すり身や最終製品の品質評価は成分および機能検査や官能評価など、複数の性状から総合的に評価されるが、弾力検査は特に指標として重要視される。日本では、押し込み試験（Punch test）による物性測定が最も多く採用されており、高さ 25 mm、直径 30 mm の円柱状試験片に 5 mm φ 球形プランジャーを押し込み、かまぼこの表面を破壊するのに要する荷重を破断強度（g）、そのときの変形を破断凹み（cm）として、レオメーターによって測定する（岡田，1999；柴，2003）。しかし、米国ではこの試験法に対して、鼓型試料をねじって破壊し、その強度と変形の大きさを測定するねじり試験法（Torsion test）を開発し（Kim *et al.*, 2000）、CODEX によるすり身品質検査基準においても日本が提案した押し込み試験とともに任意測定項目として設定されている（岡崎，2003）。そのような状況の中で、より実用的な見地に立ち、すり身からかまぼこの製造までの過程で起こる物性の変化を速度論的に解析して、加熱ゲルの形成能を評価することが望ましいと考えられる。すなわち、予備加熱条件（温度、時間）を任意に設定して調製した坐り加熱ゲルの示す物性値は、その条件を少し変更すれば動的に変動する不安定な値であり、その情報としては極めて限定的であるからである。最近になり、予備加熱に伴う加熱ゲルの各物性値パラメーターの経時変化を解析した結果から、増加する破断強度とゲル剛性の間には一定の相関関係が成り立つ事実が見出された（阿部，1998）。そこで、この関係を利用して坐り加熱ゲル形成能の強さや大きさを表し、すり身の品質を評価する方法が考案され、その成果が報じられている（佐藤ら，2015；加藤ら，2016）。本論文では、この評

価法を活用して、異なる原料魚種のすり身間の比較および卵白粉末など添加物の効果を調査することとした。

5. 本論文の構成

本研究では、品質のバラツキが大きい冷凍すり身を水産練り製品の原料としてより有効に利用することを目的として、ホッケおよびスケトウダラ冷凍すり身の加熱ゲル形成能の違いを明らかにするとともに、現在も広く使用されているゲル物性の改良剤である卵白粉末の添加によるゲル形成能の増強効果を明らかにする検討を行った。まず第 2 章では、非坐り加熱ゲルを形成するホッケ冷凍すり身と坐り加熱ゲルを形成するスケトウダラ冷凍すり身から調製される加熱ゲルについて、それぞれの物性上の特徴と、これらに卵白粉末を添加した場合のゲル形成能と物性への影響を明らかにする研究を行った。さらに大豆タンパク質粉末、カゼインナトリウム粉末を添加した場合と比較した。次に第 3 章では、ホッケおよびスケトウダラ冷凍すり身から調製した加熱ゲルについて、塩化ナトリウム (NaCl)、尿素 (U)、メルカプトエタノール (Me)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などから成る各種溶媒に対する加熱ゲル中のタンパク質の溶解度を比較し、非坐り加熱ゲルと坐り加熱ゲルに卵白粉末を添加した場合のそれぞれのタンパク質の加熱ゲル構造の相違およびゲル形成に寄与するタンパク質間の結合のタイプを推定し、比較した。また、大豆タンパク質粉末、カゼインナトリウム粉末を添加した場合とも比較検討した。最後に第 4 章では、ホッケおよびスケトウダラの冷凍すり身に、卵白粉末を添加して調製した加熱ゲルについて、上記の各種溶媒に溶解したタンパク質成分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 法によって分析し、それぞれの加熱ゲルの構造形成に強く関与する主要なタンパク質成分を同定し、非坐り加熱ゲルと坐り加熱ゲル間との相違を明らかにした。

なお、本論文で用いた略語を以下に示した。

略語一覧

AP : 卵白粉末 (Albumen powder)

SP : 大豆タンパク質粉末 (Soybean protein powder)

C-Na : カゼインナトリウム粉末 (Sodium Caseinate powder)

BS : 破断強度 (g) (Breaking strength)

bs : 破断凹み (cm) (Breaking strain)

Gs : ゲル剛性 (g/cm) (Gel stiffness)

N : 塩化ナトリウム (NaCl, Sodium chloride)

U : 尿素 (Urea)

Me : 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol)

G : グアニジン塩酸 (Guanidine hydrochloride)

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate)

PAGE : ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Poly-acrylamide gel electrophoresis)

MHC : ミオシン重鎖 (Myosin heavy chain)

MHCn : ミオシン重鎖多量体 (Cross-linked myosin heavy chain)

AC : アクチン (Actin)

TM : トロポミオシン (Tropomyosin)

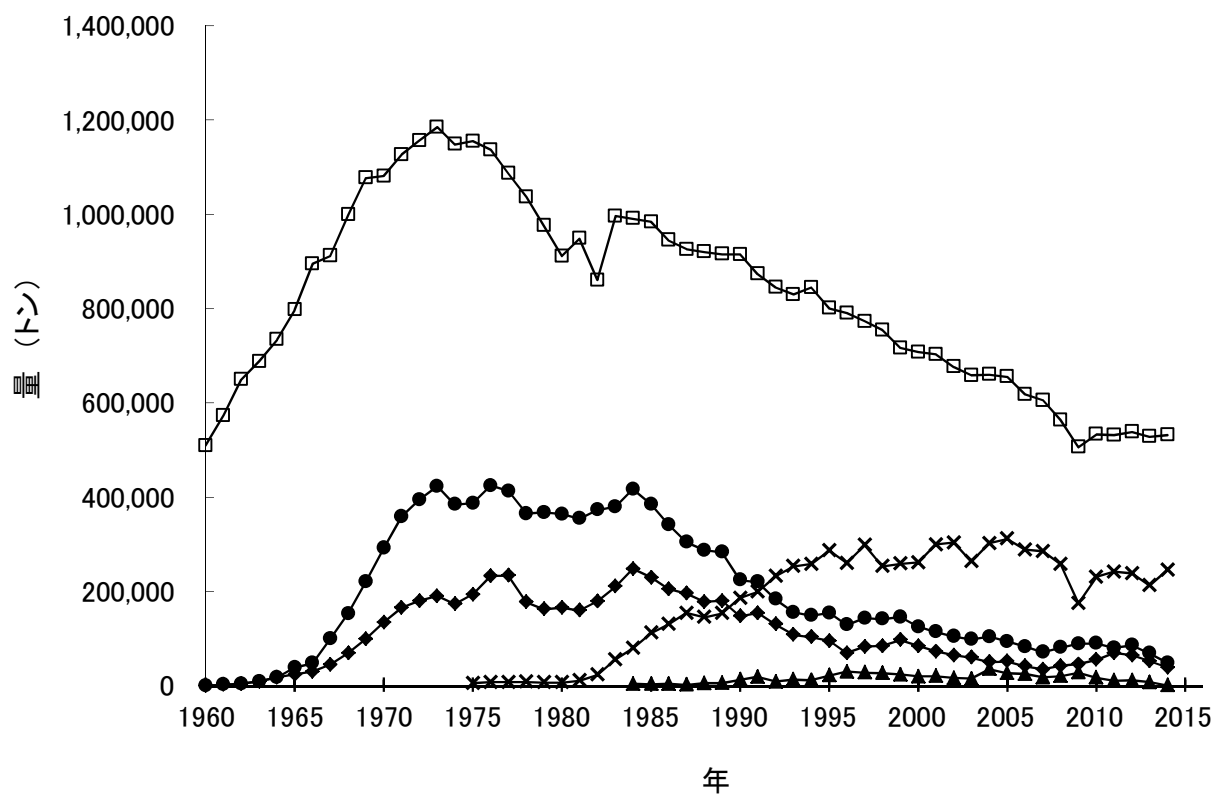


図 1-1 冷凍すり身生産量，輸入量および水産練り製品生産量の推移
(社団法人全国すり身協会, 2015)

(●)国産冷凍すり身, (×)輸入冷凍すり身, (□)水産練り製品
(◆)国産スケソウダラ冷凍すり身(陸上加工), (▲)国産ホッケ冷凍すり身(陸上加工)

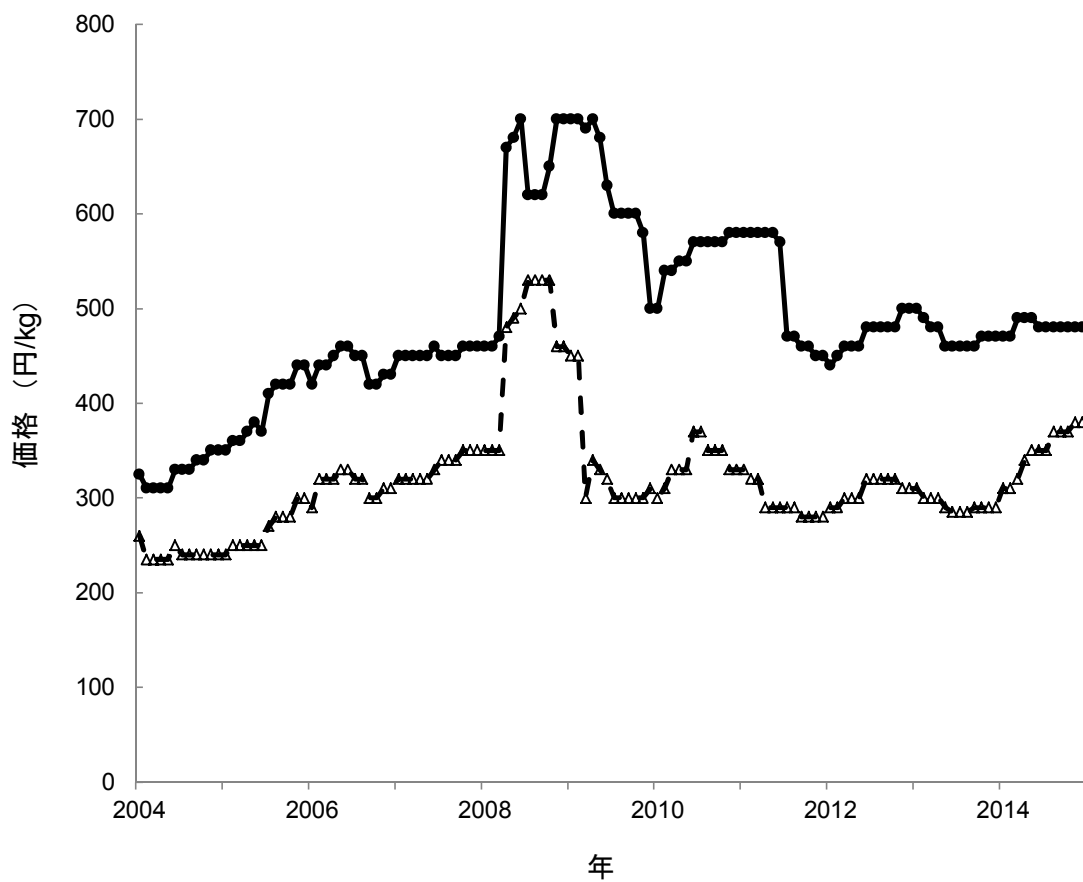


図1-2 スケトウダラ冷凍すり身の価格推移
(かまぼこ新聞編, 2015)

(●)スケトウダラFA級価格, (△)スケトウダラ陸上2級価格

第 2 章 魚肉すり身の加熱ゲル形成に伴う物性の変化と卵白粉末による増強効果

1. 目的

水産練り製品には、ゲル物性改良剤として様々な種類の副原料が使用されており、弾力補強を目的として各種のタンパク質粉末が用いられている（岡田，1999；柴，2003；山下，2003）。特に卵白は広く利用されており、その添加効果についても研究が行われてきた（加藤ら，2003；加藤ら，2004；小関ら，2006；鈴木ら，2008）。しかし、水産練り製品の生産にあたって、加熱など製造条件が異なるときに得られる製品の物性に及ぼす添加成分の影響の違いや、供するすり身の原料魚種による添加物の効果の違いなどに関する実用的な情報は依然として不十分である。

そこで本章では、ホッケおよびスケトウダラすり身に卵白粉末を添加して加熱ゲルを調製し、その物性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。また、大豆タンパク質粉末およびカゼインナトリウム粉末を添加した場合についても検討し、卵白粉末の場合と比較した。

2. 方法

実験材料

ホッケ *Arabesque greenling Pleurogrammus azonus* 冷凍すり身は北海道産、スケトウダラ *Walleye pollack Theragra chalcogramma* 冷凍すり身は北海道産の陸上 2 級品を使用した。添加するタンパク質粉末として、卵白粉末（AP）はキューピー株式会社製の乾燥卵白 K タイプを使用した。また、AP との比較として大豆

タンパク質粉末（SP）はフジプロテインテクノロジー株式会社製フジプロ PM，カゼインナトリウム（C-Na）は日本新薬株式会社製 CW をそれぞれ使用した．これらの水分，タンパク質および pH を表 2-1 に示す．

実験方法

（1）加熱ゲルの調製

冷凍すり身を $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫から前日に $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に移して解凍し，高速冷却式真空カッター（UM-5 Universal, Stephan, ドイツ）で細切した後，3% NaCl（w/w）とともに塩ずりした．また，塩ずり後，各種のタンパク質粉末をすり身に対する重量比で3%添加して混合した．すり上がり温度は $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 未満とした．調製した肉糊は折径 48 mm のポリ塩化ビニリデンチューブに充填し， $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽中でホッケの場合は8時間，スケトウダラの場合は15時間まで予備加熱し，経時的にその一部を取り出して $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で30分間本加熱し，直ちに氷水中で冷却した．予備加熱を経て形成された加熱ゲルを二段加熱ゲルとし，予備加熱をせずに $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ で30分間本加熱したものを直加熱ゲルとした．なお，タンパク質濃度はケルダール法で定量した．

（2）調製した加熱ゲルの物性測定とゲル剛性の算出

氷水中に一晩保管した加熱ゲルを取り出し，品温を $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ に戻した後，直径 30 mm×高さ 25 mm の円柱状試験片とし，レオメーター（レオテックスタイプ SD-700, サン科学社製, 東京）を使用し，直径 5 mm の球形プランジャーにより，進入速度 60 mm/min において，破断強度（BS, g）と破断凹み（bs, cm）を測定

した。本方法は、従来から全国の水産練り製品業界および研究界に採用されている「国産すり身品質検査基準」の中のすり身の機能検査法（加熱ゲルの破断特性の測定条件およびその表示単位）にほぼ忠実に準拠し、測定試料ごとに6回以上測定し、その平均値を用いた（新井ら，1986；水産庁，1994；CODEX，2005）。また、加熱ゲルの物性上の特徴の一つとしてゲル剛性（ $G_s=BS/bs$, g/cm）を算出した。

3. 結果および考察

(1) 加熱ゲルの物性値の経時変化に及ぼす卵白粉末添加の影響

ホッケ冷凍すり身を塩ずりし、0～3%のAPを添加した肉糊から調製した直加熱ゲルと二段加熱ゲルについて、予備加熱時間に伴うBS、bsおよび G_s の経時変化を図2-1に示す。これによると、ホッケの加熱ゲルでは、BSは8時間まで予備加熱を行っても経時変化は極めて小さく、ほとんどみられなかった。一方、bsは予備加熱に伴いわずかに減少した。また、 G_s は予備加熱に伴いわずかに増加する結果となった。なお、APを添加すると、加熱ゲルのBS、bsおよび G_s は全体にわたって高値となったが、予備加熱に伴うこれら物性値の経時変化の様式はほとんど変わらなかった。以上のように、本来坐りゲル形成能を有しないホッケすり身の場合は、AP添加の効果は全体的な物性値の増強をもたらすに留まり、坐り加熱ゲルを形成させるような効果はみられなかった。

次に、スケトウダラ冷凍すり身の加熱ゲル化についても同様に、予備加熱時間に伴う物性値の経時変化を図2-2に示す。スケトウダラの加熱ゲルでは、BSは予備加熱に伴い著しく増加したが、bsの変化は小さかった。また、 G_s は予備加熱に

伴い著しく増加した。なお、AP を添加すると、両物性値は全体にわたって一律に高くなり、最大値も大きくなった。しかし、予備加熱に伴う物性値の経時変化の様式は無添加とほとんど同じであった。このことから、スケトウダラの冷凍すり身からは、坐り加熱ゲルが形成され、AP の添加による物性の増強効果がもたらされることが認められた。

(2) 加熱ゲルの破断強度とゲル剛性の関係からみたすり身ゲル形成能の評価と卵白粉末添加の影響

ホッケおよびスケトウダラの冷凍すり身から加熱ゲルを調製するとき、加熱に伴って起こる肉糊の物性変化の様式は魚種によって異なり、また、AP の添加効果にも明らかな違いがあることがわかった。そこで、加熱ゲル形成能の特徴を比較するために、図 2-1 および 2-2 の測定結果を基に、加熱ゲルの BS と Gs 値間の関係を作図し、その結果を図 2-3 に示す。先に阿部らは、この BS と Gs の関係図を利用して、すり身のゲル形成能を評価する方法について提案した(阿部, 1998 ; 北上, 2009)。すなわち、予備加熱に伴って形成される加熱ゲルについて測定した Gs を X 軸、BS を Y 軸にとって作図をすると、坐りを伴わない加熱ゲルでは両物性値は経時的に増加しないので、全てのプロットはほぼ一定の低値に留まり、図中では集中して位置するが、坐りを伴った加熱ゲルでは、予備加熱時間に依存して BS と Gs が経時的に増加するため、全てのプロットは高値を示した。また、両値の間には一定の比例関係があるので一本の直線上に図示される(阿部, 1994 ; 阿部ら, 1996)。そこで本研究においても、この方法に従ってゲル形成能の評価を試みた。また、坐りを伴ったゲル化では、関係は $BS = a \times Gs - b$ の一次式で表す

ことができるので、最小二乗法で回帰式を求めた（阿部，1994）．この式中の値を様々な等級のすり身の間で比べると，坐りゲル形成能の強い場合ほど a および b 値は高値となることが確かめられた（北上ら，2008；加藤ら，2011）．そこで，上で求めた回帰式の a ならびに b 値を原料魚種の間で，また，AP の添加の前後で比べる試みをした．求めた結果は，表 2-2 に示すが，図 2-3 および表 2-2 を併せてみると，ホッケの加熱ゲルでは予備加熱に伴って G_s はわずかに変化するものの， BS はほぼ同じ値に留まるため，両値の関係はほぼ一定で変わらず， BS と G_s との関係プロットは図中の近接した低値の位置に集中した．これは坐りを伴わないゲル化が起こるときの特徴である．これは AP を添加した加熱ゲルの場合も同様であった．一方，スケトウダラ加熱ゲルの場合は，予備加熱に伴って二段加熱ゲルの BS と G_s はともに経時的に増加し，さらに，両値の間には正の相関があり，直線関係が認められた．AP を添加した場合，関係直線は同図中の右方にわずかに移動して位置したが，回帰式は無添加の加熱ゲルのそれとほぼ同じであった．この結果は，AP を 3% 添加しても形成される加熱ゲルの物性上の特徴は，無添加の加熱ゲルのそれと質的に似ていることを示唆している．なお，異なる等級のスケトウダラ冷凍すり身を用いた既報の研究でも，同様の結果が認められている（加藤ら，2003；鈴木ら，2008）．

（3）加熱ゲルの物性値の経時変化に及ぼす大豆タンパク質，カゼインナトリウム粉末添加の影響と卵白粉末添加との比較

AP を添加した場合と同様に，ホッケ冷凍すり身を塩ずりし，3% の SP と C-Na を添加して調製した加熱ゲルの予備加熱時間に伴う BS ， bs および G_s の経時変化

を測定した結果を図 2-1 に示す。これによると、SP を添加した場合にも、AP 添加の場合と同様に、BS と bs はともに大きく経時変化することはない、また、C-Na を添加したときも、経時変化はほとんど起こらなかった。ただし、加熱ゲルの物性値は、高い方から、BS は添加物が $AP > SP > C-Na \geq$ 無添加の順に、また、bs は $AP \geq SP >$ 無添加 $> C-Na$ の順になった。この結果より、ホッケ冷凍すり身から形成される加熱ゲルでは、SP や C-Na を添加すると物性値は全体に高値とはなるものの、坐り加熱ゲルを形成させるような効果はもたらされないことが示された。

次に、スケトウダラの加熱ゲルでは、SP を添加すると、AP の場合と同様に、BS と bs はともに経時的に増加する傾向を示したが、C-Na を添加したときは、増加しなかった（図 2-2）。この経時的に増加しない傾向はホッケの加熱ゲル形成の場合（図 2-1）と良く類似していた。ただし、各種タンパク質を添加した加熱ゲルの物性値は、高い方から、BS は添加物が $AP \approx SP >$ 無添加 $\approx C-Na$ の順となり、bs は $AP > SP \approx$ 無添加 $> C-Na$ の順になった。この結果より、スケトウダラすり身から形成された加熱ゲルでは、坐り加熱ゲルが形成され、AP あるいは SP 添加によってさらに坐り加熱ゲル形成能が増強され、前者の方がより効果的であること、C-Na 添加では逆に坐り加熱ゲル形成が抑制されることが示唆された。

(4) すり身中の加熱ゲル形成能に対する大豆タンパク質、カゼインナトリウム粉末添加の影響と卵白粉末添加との比較

ホッケおよびスケトウダラの冷凍すり身の加熱ゲル形成能に対する SP および C-Na の添加の影響を評価するため、形成された加熱ゲルの BS と Gs の関係をプロットして図 2-3 に示す。これによると、ホッケのすり身に SP を添加した場合

も、AP の場合と同様に、関係プロットは AP を添加した加熱ゲルのそれとほとんど同じ位置の図中右下方に集中した。また、C-Na を添加したときも、関係プロットはほとんど同じ、図中左下方に集中して位置した。これらの結果から、ホッケのすり身からは、SP や C-Na の添加によっても、AP 添加の場合と同様に、坐りゲルを形成しないことが示された。

一方、スケトウダラすり身に SP を添加すると、加熱ゲルの BS と Gs の関係は直線となり、関係直線は AP を添加した加熱ゲルよりもやや右側に位置した。また、C-Na を添加したときは、加熱ゲルの BS と Gs は低値に留まり、関係プロットは直線とならず、同図中の下方に集中した。これらの結果から、スケトウダラのすり身からは、SP を添加すると AP 添加の場合と同様に坐り加熱ゲルを形成するが、質的にはやや異なり変形に際しやや脆い加熱ゲルを形成し、C-Na を添加すると坐り加熱ゲル形成は抑制され、非坐り加熱ゲルと同様な物性となることが示された。

スケトウダラのすり身は典型的な坐り加熱ゲル形成能を示すが、AP の添加はその加熱ゲル形成能を増強した。SP の添加も同様に増強する効果を示すが、加熱ゲルの物性はやや異なり、変形に際してより壊れやすい、しなやかさにやや欠けるタイプのゲルを形成することがわかった。なお、C-Na を添加すると、スケトウダラすり身が持っている坐りゲル形成能は発揮されなくなるが、その原因解明については今後の課題である。

本研究では、3 種のタンパク質粉末の添加量を一律 3%にしたが、これは先に AP の添加量が 0~3%の間では、形成される坐り加熱ゲルの BS と Gs の相関を示す関係式がほぼ合致し、坐りゲル形成能と物性上の特徴が類似することが確かめられたからである（加藤ら，2004；鈴木ら，2008）。しかし、SP や C-Na に関し

ては、その添加量と加熱ゲルの物性との関係は未だ十分に明らかでないため、今後はより詳細な検討が必要である。なお、AP 添加によってもたらされる効果は、魚肉中に内在するプロテアーゼを阻害する作用に起因していること（一島ら、1983; Hu *et al.*, 2008a, b), または添加粉末中のタンパク質自体が加熱ゲル化し、ゲル形成に参加することに起因すること（丹羽、1990; 岡田、1999) などがその理由として論じられているが、不明な点が多い。さらに、最近、冷凍すり身が形成する加熱ゲル中のタンパク質濃度と物性値との関係を解析した結果によると、タンパク質濃度の増加によって BS および Gs は指数関数的に増加する事実は明らかにされたので（北上ら、2005; 北上ら、2009), 添加物中のタンパク質量も影響を及ぼす可能性が示唆された。加藤らは、ホッケおよびスケトウダラすり身に AP を添加し、加水してタンパク質濃度を変えて調製した加熱ゲルについて、加熱ゲルの物性のタンパク質濃度依存性を比較し、AP 由来のタンパク質が物性に及ぼす影響を検討した。その結果、すり身の原料魚種に関わりなく、形成される加熱ゲルが非坐りゲルか坐りゲルかによって、添加する AP による物性の増強度合いが異なることを明らかにしている（加藤ら、2010)。これらの事実は、加熱ゲルの形成に参加する各種タンパク質成分間の結合のタイプやその強さが異なっている可能性を示唆している。

そこで、第 3 章の研究では、加熱ゲル中のタンパク質の加熱ゲル構造の形成に寄与するタンパク質成分間の結合タイプやそれらが構造に寄与する度合い（強さ）を明らかにするため、SDS、尿素、メルカプトエタノールおよび NaCl など、各種の溶媒（タンパク質変性剤）に対する溶解性とそれらのバランスについて詳細な検討を行うこととした。

4. 本章の結論

ホッケおよびスケトウダラすり身に0~3%の3種のタンパク質粉末（卵白粉末（AP）、大豆タンパク質粉末（SP）、カゼインナトリウム（C-Na））をそれぞれ加えて調製した肉糊を、25℃でホッケでは8時間、スケトウダラでは15時間にわたって予備加熱し、さらに90℃で30分加熱して直加熱ゲルと二段加熱ゲルを調製した。加熱ゲルのBSとbs値をレオメーターで測定し、ゲル剛性（ $G_s = BS/bs$ ）を求めた。結果を以下に示す。

(1) ホッケのすり身から調製された直加熱ゲルと二段加熱ゲルは、3種のタンパク質粉末の添加に関わらず、全て坐りを伴わない加熱ゲルとなり、物性は低値であった。

(2) スケトウダラのすり身の直加熱ゲルは、3種のタンパク質粉末の添加に関わらず、全て坐りを伴わない加熱ゲルとなった。二段加熱ゲルは坐り加熱ゲルとなり、物性は高い値になり、APおよびSPの添加は、坐りゲル形成能を増強し、物性はさらに高値となった。しかし、C-Naの添加は坐りゲル化を抑制し、物性は低値に留まった。

表 2-1 実験材料の水分量，粗タンパク質量および pH

	水分 (%)	粗タンパク質 (%)	pH*
ホッケ冷凍すり身	76.7	14.2	7.16
スケトウダラ冷凍すり身	79.0	13.8	7.44
卵白粉末 (AP)	9.5	74.9	7.05
大豆タンパク質粉末 (SP)	6.9	76.8	7.24
カゼインナトリウム粉末 (C-Na)	8.7	83.7	7.36

*蒸留水で 10 倍希釈した溶液を用いて測定

表 2-2 形成される加熱ゲルの破断強度とゲル剛性との関係直線式および各種タンパク質粉末の添加の影響

添加物および濃度		破断強度 = a × ゲル剛性 - b		相関係数 R ²
		a	b	
ホッケ	0%	-0.54	288.1	—
	3%卵白粉末 (AP)	-0.71	574.6	—
	3%大豆タンパク質粉末 (SP)	1.05	-122.4	—
	3%カゼインナトリウム粉末 (C-Na)	0.08	191.4	—
スケトウダラ	0%	1.59	-79.8	0.9868
	3%卵白粉末 (AP)	1.74	-115.3	0.9915
	3%大豆タンパク質粉末 (SP)	1.13	-7.7	0.8385
	3%カゼインナトリウム粉末 (C-Na)	0.81	-5.4	0.7744

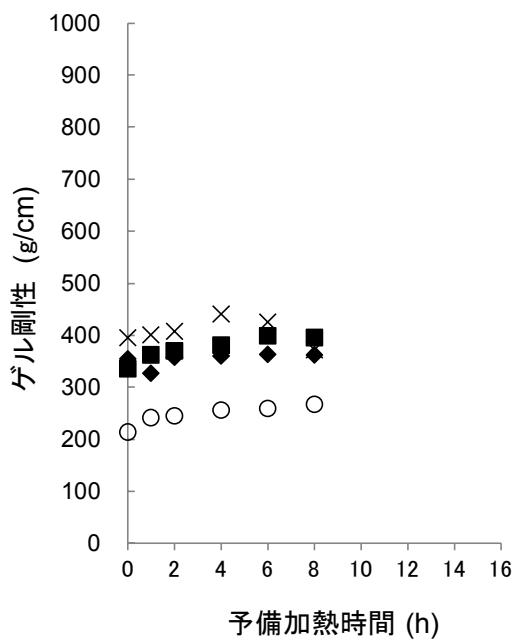
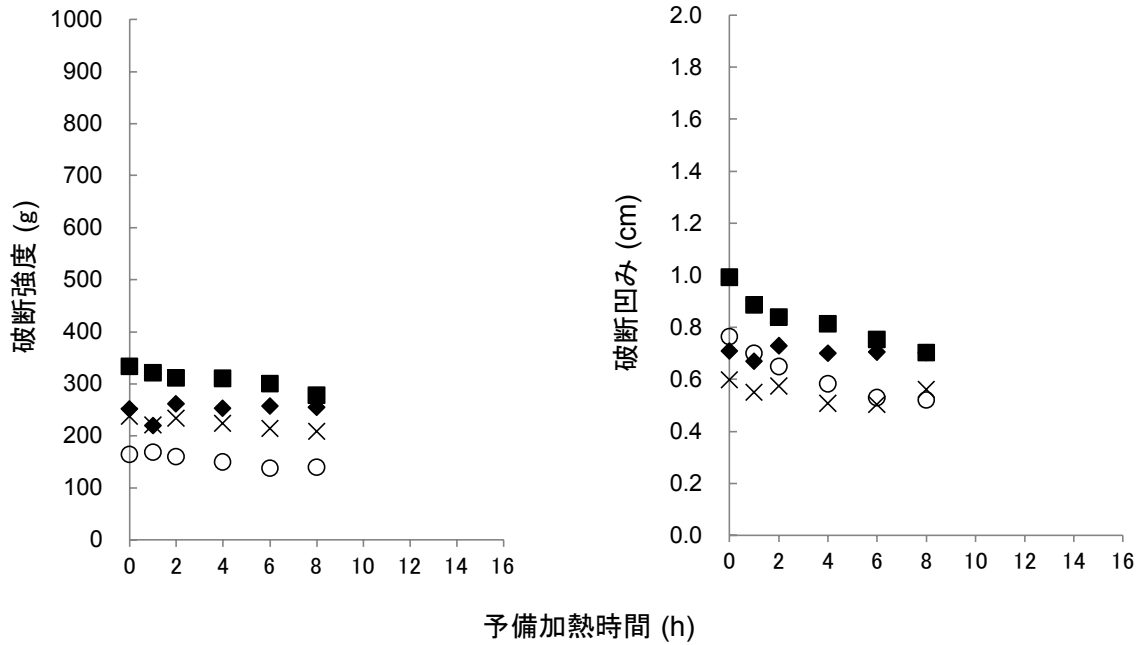


図 2-1 予備加熱に伴って起こるホッケすり身の加熱ゲルの物性の経時変化と各種タンパク質添加物の影響

添加物: (○)無添加, (■)3%卵白, (◆)3%大豆, (×)3%カゼインナトリウム

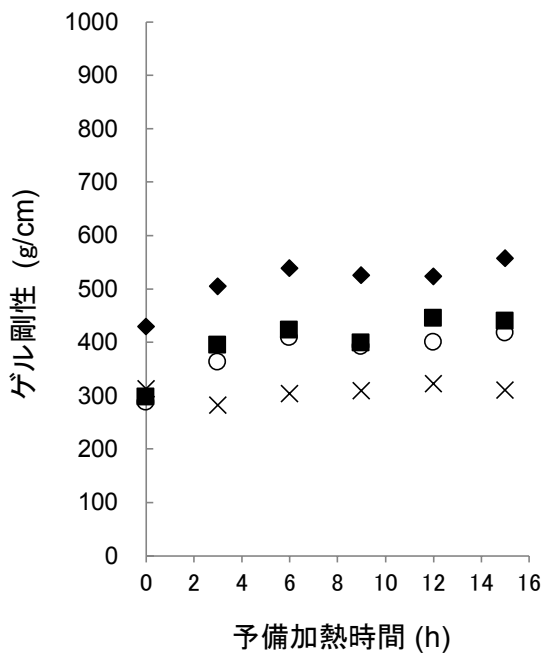
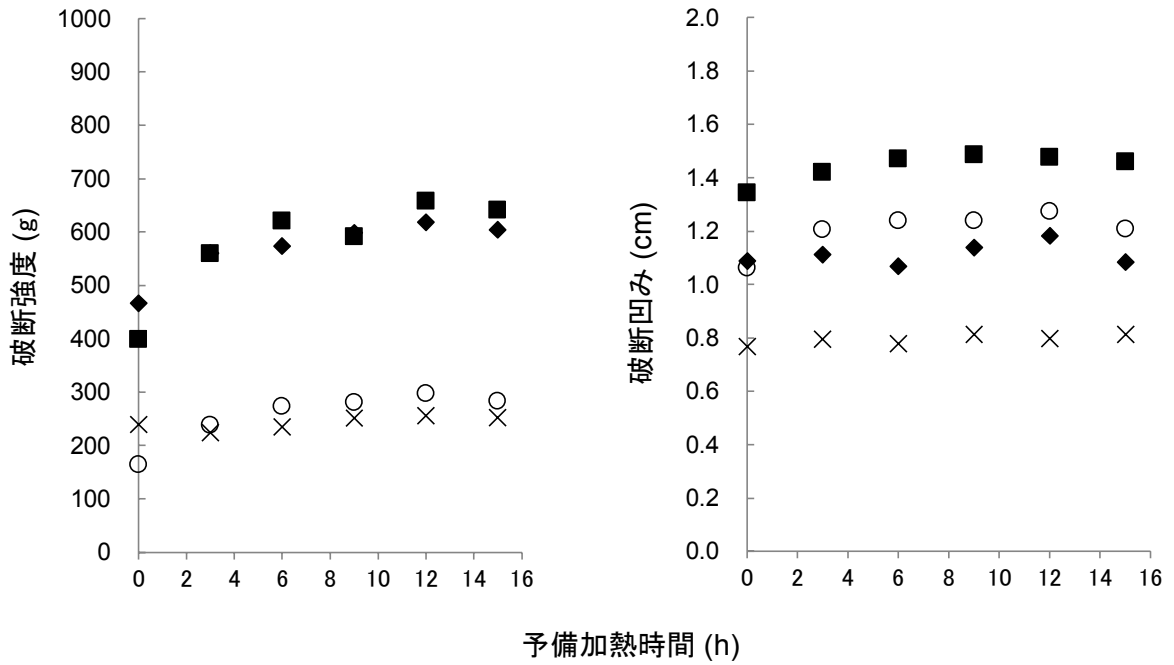


図 2-2 予備加熱に伴って起こるスケトウダラすり身の加熱ゲルの物性の経時変化と各種タンパク質添加物の影響

添加物: (○)無添加, (■)3%卵白, (◆)3%大豆, (×)3%カゼインナトリウム

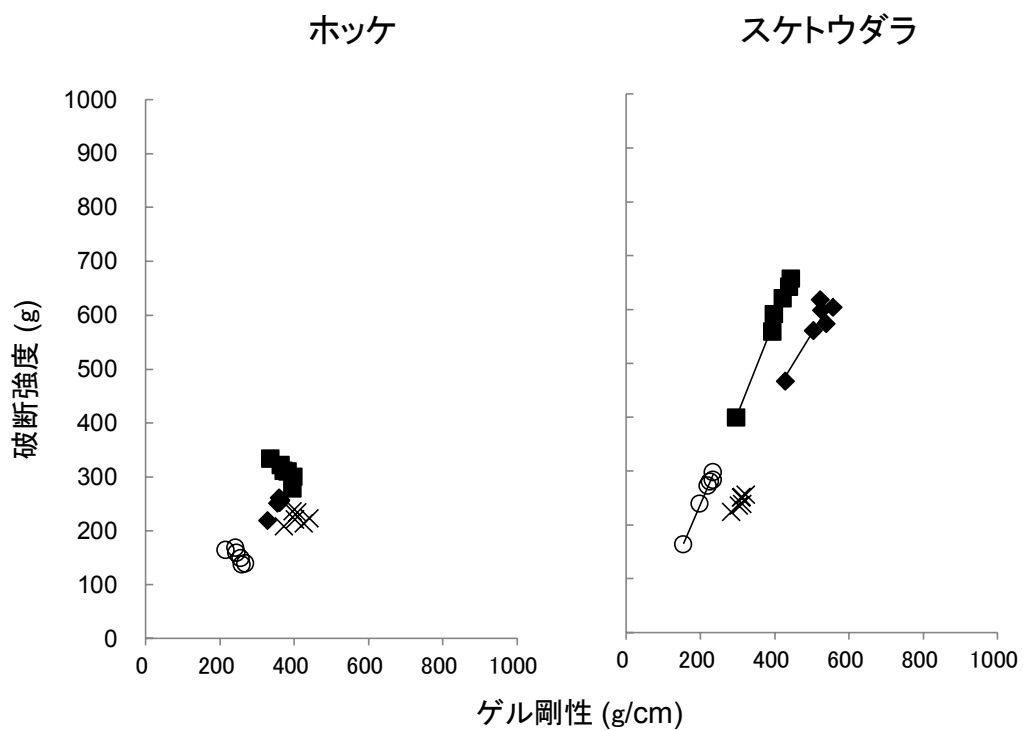


図2-3 ホツケおよびスケトウダラのすり身から調製した加熱ゲルの破断強度とゲル剛性の関係の変化に及ぼす卵白粉末, 大豆粉末およびカゼインナトリウム添加の影響

添加物: (○)無添加, (■)3%卵白, (◆)3%大豆, (×)3%カゼインナトリウム

第3章 溶解性からみた加熱ゲル中のタンパク質に関与する結合のタイプと卵白粉末添加の影響

1. 目的

第2章で行った研究結果から、非坐り加熱ゲルと坐り加熱ゲルとでは、加熱ゲルの構造形成に関与するすり身タンパク質成分間の結合タイプとそのバランスが異なること、また卵白粉末を添加する場合、卵白中のタンパク質成分のゲル構造形成への寄与、すなわち結合様式が、両加熱ゲルの間で異なることが示唆された。

冷凍すり身から調製される加熱ゲル特有の3次元の網目構造は、タンパク質化学的には未だ解明されていないが、一般にタンパク質が形成するゲルは隣接するポリペプチド鎖間の引力と反発力とのつり合いから成っていると考えられており、静電的相互作用（イオン結合）、水素結合、疎水性相互作用、またジスルフィド架橋など各種結合の相対的な寄与の度合いが影響を及ぼすとされている（シェフテルら、1988）。非坐り加熱ゲルと坐り加熱ゲルに関しては、そのタンパク質の加熱ゲル構造に違いのあることが、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡による観察結果から報じられており、坐り加熱ゲルの方がより密な網状構造から成っているとされている（牧之段ら、1996；岡田、1999）。しかし、両加熱ゲルのタンパク質の加熱ゲル構造上の差異については、ほとんど知見が得られていない。これは、ゲル構造を解析する適切な研究方法が確立されていないためであると考えられる。

そこで本章では、加熱ゲルのゲル形成に関与するタンパク質の各種溶媒（NaCl、尿素、メルカプトエタノールから成る混合溶媒）に対する溶解度を測定し、加熱ゲルの構造形成に関与するタンパク質間の結合（または相互作用）のタイプを推

定し、さらにそれらが関与する度合いを推測することによって、ゲル構造上の特徴を明らかにする試みを行った。また、同時に卵白粉末を添加したときの影響を同じ方法によって調べ、ゲル構造や加熱ゲルの物性の関わりを明らかにすることを目的とした。さらに、大豆タンパク質粉末およびカゼインナトリウム粉末を添加した場合についても検討し、卵白粉末の場合と比較した。

2. 方法

実験材料

ホッケ *Arabesque greenling Pleurogrammus azonus* 冷凍すり身およびスケトウダラ *Walleye pollack Theragra chalcogramma* 冷凍すり身はともに北海道産の陸上 2 級品を使用した。卵白粉末 (AP) はキューピー株式会社製の乾燥卵白 K タイプを使用した。AP との比較として大豆タンパク質粉末 (SP) はフジプロテインテクノロジー株式会社製フジプロ PM, カゼインナトリウム (C-Na) は日本新薬株式会社製 CW をそれぞれ使用した。なお、これらの水分量、タンパク質量および pH をそれぞれ表 3-1 に示す。

実験方法

(1) 加熱ゲルの調製

ホッケおよびスケトウダラの冷凍すり身を用いて、第 2 章と同様の方法で加熱ゲルの調製を行った。AP, SP および C-Na の添加量は、すり身重量に対して 3% とした。なお、タンパク質濃度はケルダール法で定量した。さらに、AP 単独の加熱ゲルは、AP に 7 倍量 (w/w) 加水し攪拌してタンパク質濃度を 9% に調整した

後、直接 90°C, 30 分加熱して調製した.

(2) 加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒に対する溶解度の測定

調製した加熱ゲルを細切し, 約 0.27g を精秤し, 0.6 M NaCl (N), 1.5~8.0M 尿素 (U) および 2%2-メルカプトエタノール (Me) を組み合わせて混合した後, 20 mM Tris-HCl 緩衝液を添加して pH を 7.5 に調整した組成の異なる溶媒(表 3-2) を 5 倍量 (v/w) 加え, マグネチックスターラーを用いて室温で 48 時間攪拌して溶解させた (Perez-Mateos *et al.*, 1997). さらに, これらの溶媒には加熱ゲルが完全に溶解しにくいため, 新たに 2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) + 8.0 M U + 2%Me 混液を追加して, 5 種の溶媒を使用した. 溶解後, 遠心分離 (2,100×g, 20 min) して上澄を取り, 水を加えて 10 倍に希釈し, 15%トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を等量加えて室温で 30 分放置後, 遠心分離 (2,100×g, 30 min) してタンパク質の沈殿を回収した. この沈殿に, 3.0 ml の石油エーテルを加えて攪拌し, 遠心分離 (2,100×g, 30 min) して上澄中の脂質など夾雑物を除去した. 風乾後, 沈殿タンパク質を 1.0 ml の 1 M 水酸化ナトリウムに溶解してビュレット法によって 560 nm で比色定量した (Gornall *et al.*, 1949). また, 各種溶媒へのタンパク質の溶解度は, 塩ずり身 (肉糊) 中の全タンパク質量を測定して, これを基準とした百分率 (%) で表した. なお, 測定は 3 回繰り返し, 平均値で表示した.

なお, 上記の各種溶媒の他に, 2.0 M および 7.0 M グアニジン塩酸 (G) [20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を含む], さらに 2%Me [20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を含む] の溶媒に対する溶解度も同様に測定した.

(3) 加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒への溶解度とゲル構造に關与する結合タイプの検討

5種の溶媒に対する加熱ゲル中のタンパク質の溶解度の相違から、加熱ゲルのゲル形成に關与するタンパク質間の結合（または相互作用）のタイプとその影響の度合いを推定する試みを行った。すなわち、S1への溶解度はゲル構造に寄与するタンパク質間のイオン結合に強く依存して定まり、またS2とS1、S3とS2およびS4とS3への溶解度の差異は、さらにそれぞれタンパク質間の水素結合、疎水性相互作用、およびジスルフィド（S-S）結合などが加わって定まると考えられるので、これらの値を算出し比較した（Perez-Mateos *et al.*, 1997）。またS1～S4の溶媒に不溶性のタンパク質成分（不溶性成分）は上記4種のタイプよりもなお強力な結合に依存して定まると推定されるので、 $(100-S4)$ として求めた。この不溶性成分量から推定されるタンパク質間の結合を、本論文ではより強い結合（more intensive bond）と表現する。なお、本実験において調製した各種の加熱ゲルは、全てS5の溶媒に対しては完全に溶解するので、不溶性成分量は $(S5-S4)$ として算出する量と合致した。

3. 結果および考察

(1) 予備加熱に伴って起こる加熱ゲル中におけるタンパク質の各種溶媒に対する溶解度の変化と卵白粉末添加の影響

ホッケおよびスケトウダラの直加熱ゲルと二段加熱ゲルおよびAPを添加した両加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒に対する溶解度を図3-1および3-2にそれぞれ示す。これによると、加熱ゲル中のタンパク質はすり身の原料魚種に関わり

なく、また非坐り加熱ゲルか坐り加熱ゲルかに関わりなく、S5 に対しては完全に溶解した。また、S1~S4 では、溶解度の低い方から順に $S1 < S2 < S3 < S4$ となった。この傾向は、全ての加熱ゲルに共通していた。詳細な内訳をみると、直加熱ゲルでは、原料魚種に関わりなく、S1 への溶解度は 10%強、S2 へは 20~30%、S3 へは 70%前後、S4 へは 80%強、不溶性タンパク質成分である不溶性成分は 10~20%となり、それぞれが近似する値となった。AP 添加した直加熱ゲルの場合もわずかな差異はあるが、S1~S4 への溶解度とその相対比率は、無添加の場合とあまり変わらなかった。

次に、二段加熱ゲルでは、まずホッケ加熱ゲルのタンパク質は予備加熱初期に S2, S3 へ溶解度がわずかに、後期には S4 への溶解度がわずかに増加しものの、予備加熱時間に伴う大きな変化はなく、直加熱ゲルと近似したレベルの溶解度であった。また、AP 添加した二段加熱ゲルのタンパク質は、S3 への溶解度は低いが、その他は予備加熱に伴う大きな変化はなく、直加熱ゲルの場合とほぼ同じレベルの溶解度であった。したがって、ホッケ加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒に対する溶解度は、AP 添加の有無に関わりなく、予備加熱時間の影響は大きく受けなかった。これは非坐り加熱ゲルの特徴の一つである。

一方、スケトウダラの加熱ゲル中のタンパク質の溶解度は予備加熱に伴って変化し、S2, S3 および S4 への溶解度が著しく低下し、それに対応するように不溶性成分が増加した。また、AP 添加した加熱ゲルでも、無添加の加熱ゲルの場合とほとんど同じ変化を示した。不溶性成分が最大値に達するのは、無添加の加熱ゲルでは 6~9 時間後、AP 添加した加熱ゲルではやや遅く予備加熱 9~12 時間後であるが、その溶解度は AP 添加の方がやや高く、約 70%の高値となった。なお、

この不溶性成分は、8.0 M U を含む溶媒である S4 には溶解しないが、2% SDS を含む溶媒である S5 には完全に溶解した。

SDS はタンパク質にきわめて強い親和性を持ち、疎水性相互作用を切断し、難溶性タンパク質を可溶化するためにしばしば使用されてきた（丹羽，1990；Niwa *et al.*；1999；Lanier *et al.*，2000）。不溶性成分はホッケ加熱ゲルでは10～20%の低値に留まり予備加熱に伴って増加しないが、スケトウダラ加熱ゲルでは予備加熱に伴って大きく増加するので、これはすり身原料としての2種の魚種間の大きな相違である。また、不溶性成分の増加は加熱ゲル中のタンパク質間のきわめて強い結合（または相互作用）に依存しているが、これは坐り加熱ゲルを形成した際の物性の増加と関連していると考えられる。

なお、本研究では、2.0 M G と 7.0 M G に対する加熱ゲル中のタンパク質の溶解度も測定した。結果を図 3-3 に示す。G は、尿素と同様に変性タンパク質を溶解させる有機化合物として利用されており（シェフテルら，1988）、低濃度では水素結合を、高濃度では疎水性相互作用を切断することが知られている（丹羽，1990）。図 3-3 に示した結果から、2.0 M G に対する溶解度は、S3 に対する溶解度とほぼ同じであり、また 7.0 M G には S5 に対する場合と同様にほぼ完全に溶解した。また、2.0 M G への溶解度の予備加熱に伴う変化は、ホッケの加熱ゲルではほとんど起こらず、スケトウダラの加熱ゲルでは大きく減少する点は、図 3-1 および 3-2 に示す S3 と S5 への溶解度の変化と同様であった。

(2) 加熱ゲルのゲル構造に寄与するタンパク質間の結合タイプの推定および卵白粉末添加の影響

加熱ゲルのゲル構造に寄与するタンパク質間の結合のタイプを 2 魚種の冷凍すり身から調製した直加熱ゲルと二段加熱ゲルおよび AP 添加の有無の間で比較した結果を図 3-4 および 3-5 にそれぞれ示す。これらの値はそれぞれ、S1 はイオン結合、S2-S1 は水素結合、S3-S3 は疎水性相互作用、S4-S3 は S-S 結合およびこれらよりもさらに強い結合によって、加熱ゲルのゲル構造に寄与するタンパク質の量的割合を表わすと見なした (図 3-4 および 3-5)。これをみると、まず直加熱ゲルでは、すり身原料がホッケかスケトウダラかに関わらず、加熱ゲルのゲル構造におけるイオン結合、水素結合および S-S 結合の寄与は比較的小さく、疎水性相互作用の寄与が極めて大きいことが推察された。また、AP を添加すると、ホッケ加熱ゲルでは、疎水性相互作用の寄与がやや小さくなり、S-S 結合の寄与が大きくなることが示唆された。一方、スケトウダラ加熱ゲルでは、AP の添加による影響は小さかった。次に、二段加熱ゲルの場合、ホッケ加熱ゲルでは予備加熱の初期には疎水性相互作用の寄与がやや小さくなり、S-S 結合の寄与がやや大きくなるが、ゲル構造に寄与する結合タイプの割合 (バランス) は、直加熱ゲルの場合と大きな差はみられなかった。一方、スケトウダラ加熱ゲルでは、予備加熱に伴って 4 種の結合タイプの寄与率はいずれも減少傾向を示し、それに代わって不溶性成分 (100-S4) が増加することから、より強力なタンパク質間の結合 (または相互作用) が形成され、ゲル構造に寄与するようになることが示唆された。

スケトウダラ二段加熱ゲル (坐り加熱ゲル) のタンパク質間に形成される強い結合力の実態については未だ分からない点が多い。これまでの知見として、2% SDS + 8.0 M U + 2% Me を媒体とする SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析によると、坐り加熱ゲル中には共有結合により生じた二量体～十量体と推定され

るミオシン重鎖の多量体が検出され、またより巨大な多量体の生成も推定されること（沼倉ら，1987），坐り加熱ゲルのプロテオリシス生成物の中に ϵ - γ （グルタミル-リジン）に相当する成分の存在が確認されていること（木村，1991），また本研究で分析した不溶性成分は8.0 M Uに不溶であるが，2%SDSに易溶であるという特徴的な溶解性を示すことなどから考慮すると，坐り加熱ゲル中のタンパク質間には，より広範囲にわたる疎水性領域に生ずる強い相互作用や絡み合い（丹羽，1990）およびグルタミル酸とリジン側鎖間のイソペプチド結合などが協調して作用しているとも考えられる．なお，S-S結合の寄与率は，S4とS3へのタンパク質の溶解度の差を基に推定した結果であるが，どちらの溶媒にも0.6 M Nと8.0 M Uが含まれているので，加熱ゲル中のイオン結合，水素結合および疎水性相互作用も全て切断されており，S-S結合が加熱ゲル中のタンパク質間のどのような構造部位に存在しているかについては明らかにできない．そこで，2%Meの単独溶媒への溶解度を測定した．結果を図3-6に示す．これをみると，予備加熱に伴う加熱ゲルの溶解度は，ホッケでは7.9~13.1%，APを添加すると31.5~36.3%，またスケトウダラでは11.2~15.5%，APを添加すると8.2~9.4%となり，僅かな差異はあるものの，図3-1および3-2とほぼ同様の値となった．したがって，形成されるS-S結合は加熱ゲルの構造の表面に近い易反応性の部位にあると推定される．

さらに，比較のためにAP単独の直加熱ゲルについてもゲル構造の形成に寄与するタンパク質の結合タイプを同様に検討した．その結果を図3-7に示す．これをみると，イオン結合，水素結合，疎水性相互作用の寄与は10%未満と低値を示したが，S-S結合およびより強力なタンパク質間の結合（または相互作用）の寄与は

高値を示した。第 2 章の研究結果では、AP の添加によって起こるスケトウダラ加熱ゲルの予備加熱に伴う物性の増強は、AP 由来のタンパク濃度の増加だけでは説明がつかないが、後述する図 3-7 によると、卵白タンパク質は極めて S-S 結合し易く、さらにより強い結合の生成も促進させるので、すり身タンパク質と相互作用して加熱ゲル中の不溶性成分の形成にも強く関与すると考えられる。

(3) 予備加熱に伴って起こる加熱ゲル中におけるタンパク質の各種溶媒に対する溶解度の変化と卵白粉末、大豆タンパク質粉末およびカゼインナトリウム粉末添加の影響

ホッケおよびスケトウダラすり身に 3%SP および C-Na を添加して調製した加熱ゲルの各種溶媒に対する溶解度と予備加熱に伴って起こる変化を図 3-1 および 3-2 にそれぞれ示す。これによると、ホッケの場合、SP 添加の直加熱ゲルでは、S1 と S3 への溶解度が AP を添加した場合よりもやや低値となったが、二段加熱ゲルの S1~S4 への溶解度および不溶性成分の生成量は、予備加熱に伴って大きく変化することはない、直加熱ゲルの溶解性と同様の値に留まった。C-Na 添加の直加熱ゲルでは、S2 への溶解度が数%高値となることを除けば、S1, S3, S4 への溶解度および不溶性成分の生成量は無添加の加熱ゲルの場合と近似する値となった。また、二段加熱ゲルの溶解性は、予備加熱によって変化せず、直加熱ゲルとほぼ同じ値を示した。それゆえ、ホッケから形成される直加熱ゲルの構造は、添加する各種タンパク質の種類によってそれぞれわずかに異なるが、予備加熱に伴ってほとんど変化することはない、保持されると推測された。

次にスケトウダラの場合、SP を添加すると、直加熱ゲルの溶解性は変化し、S1

への溶解度は低値となり，S3 への溶解度も著しく低値となった．また，予備加熱に伴って二段加熱ゲルの S1，S2 および S3 への溶解度は経時変化せず，S4 への溶解度だけが大きく減少して，不溶性成分が増加したが，これは無添加の加熱ゲルの場合とほとんど同じであった．C-Na 添加の直加熱ゲルでは，S1～S4 への溶解度とその相対比率は無添加の加熱ゲルの場合とほとんど変わらなかった．また，予備加熱に伴って二段加熱ゲルの溶解度は変化するが，S1 と S2 への溶解度は低値でその変化も極めて小さく，S3 と S4 への溶解度は経時的に減少するもののその度合いは小さく，不溶性成分生成量も低値の 40%に留まった．それゆえ，C-Na を添加した加熱ゲルのタンパク質の加熱ゲル構造は，AP や SP を添加した加熱ゲルのそれらとは明らかに異なっていると考えられる．S1～S4 溶媒に対する溶解度が予備加熱に伴って変化する度合いがかなり小さく，不溶性成分の生成量も少ない点は，ホッケの非坐り加熱ゲル形成の場合に共通していた．

(4) 卵白粉末と大豆タンパク質粉末，カゼインナトリウム粉末を添加した加熱ゲルの構造に寄与する結合タイプの比較

加熱ゲルのゲル構造に寄与するタンパク質間の結合のタイプを直加熱ゲルと二段加熱ゲルおよび各種タンパク質粉末を添加した加熱ゲル間で比較した．結果を図 3-4 および 3-5 にそれぞれ示す．ホッケの直加熱ゲルでは，SP を添加すると，ゲルの構造には疎水性相互作用に代わって S-S 結合がより強く影響を及ぼすようになり，これは二段加熱ゲルでも同じであることが示唆されたが，これは AP 添加の場合と同様の傾向であった．また，C-Na を添加した加熱ゲルの構造には，無添加の直加熱ゲルと同様に，疎水性相互作用の関与が大きく，二段加熱ゲルの場合

も同じで、予備加熱で変わらないことが示唆された。

一方、スケトウダラの直加熱ゲルでは、SP 添加した加熱ゲルの構造には、疎水性相互作用に代わって、S-S 結合が極めて強い影響を及ぼしていることが示唆されたが、二段加熱ゲルの構造には予備加熱に伴ってより強い結合が寄与する度合いが大きくなった。これは AP を添加した加熱ゲルでも同じであった。しかし、C-Na を添加した直加熱ゲルは、無添加の加熱ゲルの場合と変わらず、疎水性相互作用が強く寄与することが示唆され、二段加熱ゲルの構造には予備加熱に伴って疎水性相互作用の影響する度合いが減少し、その代わりにより強い結合が関与するようになるが、その度合いは AP や SP 添加の二段加熱ゲルに比べて約 60% の低値に留まった。

(5) 加熱ゲルの物性と、タンパク質の溶解性ならびに構造に寄与するタンパク質結合タイプの関係および各種タンパク質添加の影響

調製した各種加熱ゲルの物性値と、加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒に対する溶解度およびこれらから推測した加熱ゲル構造に寄与する結合タイプとの関係について詳細に考察すると、以下のような一定の関連があることがわかった。ホッケすり身から形成される直加熱ゲルおよび二段加熱ゲル、またスケトウダラすり身から形成される直加熱ゲルは、全て非坐り加熱ゲルであった。つまり、予備加熱は、形成される二段加熱ゲルの物性値に影響を及ぼさず、物性値は常に低値に留まった。また、これは 3 種のタンパク質粉末を添加しても同様であった。一方、スケトウダラすり身から形成される直加熱ゲルは非坐り加熱ゲルであるが、二段加熱ゲルは全て坐り加熱ゲルであった。つまり、予備加熱に伴って物性は増

加し、高値に達した。また、AP と SP の添加では、坐り加熱ゲル形成能を著しく増強し、物性値はより高値に達した。しかし、C-Na の添加は坐り加熱ゲル形成を阻害し、予備加熱による物性値の増加は起こらなくなった。原因は不明であるが、C-Na 添加によって、本来スケトウダラすり身が有する坐りゲル形成能が抑制されたと考えられる。

形成された加熱ゲルの各種溶媒に対する溶解性を比較すると、非坐り加熱ゲルと坐り加熱ゲルの場合とでは明らかに異なり、非坐り加熱ゲルのタンパク質の大部分は、8 M U と 2%Me を含む S4 の溶媒に溶解した。これは、AP、SP および C-Na を添加した加熱ゲルでも変わらなかった。タンパク質の加熱ゲル構造の形成には、疎水性相互作用が強く影響しているが、AP 添加の場合は疎水性相互作用とともに S-S 結合も寄与するようになり、SP 添加の場合は S-S 結合がより強く影響するようになることが示唆された。また、C-Na 添加の場合はタンパク質間の結合タイプは無添加の加熱ゲルと変わりなく、非坐り加熱ゲルとなり、物性は比較的 low 値に留まった。図 2-1 および 2-2 の結果と照らし合わせると、疎水性相互作用が強く寄与する加熱ゲルに比べて、S-S 結合がより強く寄与する加熱ゲルの物性は、BS に対する Gs の相対値が高い (bs が低い) のが特徴であると思われた。一方、坐り加熱ゲルは 8.0 M U と 2%Me を含む S4 の溶媒には難溶性であった。不溶化の度合いは予備加熱に伴って増加するが、このとき、同時に加熱ゲルの物性値の増加も起こっており、物性が最大値に達するときには加熱ゲル中のタンパク質の 50-60% が不溶化することが示された。不溶性のタンパク質の加熱ゲル構造は、より強い可溶化作用を示す SDS には易溶であり、極めて強い結合力によって形成されているため、坐り加熱ゲルの高い物性値に関与すると考えられる。なお、物性

値が予備加熱に伴って増加するので、最大値に達した加熱ゲルの間で比べると、APを添加した二段加熱ゲルの物性値は、無添加のものに比べてほぼ2倍に達した。このとき、加熱ゲル中には不溶性成分が増加し最大値に達するが、この量は無添加の加熱ゲル中の値よりも明らかに（10%以上）多かった。また、SPを添加した二段加熱ゲルでは、BSは2倍、Gsは2.5倍になったが、bsは低値となった。このとき二段加熱ゲル中の不溶性分量は無添加の二段加熱ゲルとほぼ同値で、差異はなかった。しかし、直加熱ゲルで比べると、無添加とSP添加の加熱ゲルとは明らかに異なり、前者では疎水性相互作用が、後者ではS-S結合がより強く影響しているため、この差異が影響している可能性がある。すなわち、予備加熱における低温および本加熱における高温の加熱処理の段階で起こるゲル形成において関与するタンパク質間の結合のタイプとバランスの相違が、加熱ゲルの物性上の特徴に影響を及ぼしていると考えられる。SP添加の二段加熱ゲルは、APを添加したものに比べればBSに対するbsの相対値が小さいので、同じBSで比べればより脆い物性であった。なお、C-Na添加は、強い結合力による不溶性成分の形成を抑制し、それが及ぼす物性への影響を減少させるとともに、相対的に疎水性相互作用の影響を増加させるが、これはC-Naを添加したスケトウダラすり身が坐りゲル形成能を示さなくなることに関係があるように考えられる。

4. 本章の結論

ホッケおよびスケトウダラの冷凍すり身を3%NaClと播潰後、3%の各種タンパク質粉末〔卵白粉末（AP）、大豆タンパク質粉末（SP）およびカゼインナトリウム粉末（C-Na）〕を添加し、90℃で30分加熱した直加熱ゲルと、25℃で数時間

予備加熱後に 90°C で 30 分間加熱した二段加熱ゲルを調製した。次に、細切した加熱ゲルを 0.6 M NaCl (N), 1.5 M または 8.0 M 尿素 (U) および 2%-2 メルカプトエタノール (Me) および 2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の組み合わせから成る各種溶媒とともに攪拌し、タンパク質の溶解度を測定した。また、これらの結果を基にして、加熱ゲルの構造に関与するタンパク質間の結合タイプを推定した。その結果を下記に示す。

(1) 非坐り加熱ゲルは、ゲル構造に寄与するタンパク質の大部分が 0.6 M N-8.0 M U-2%Me 溶媒 (S4) に溶解した。0.6 M N-8.0 M U 溶媒 (S3) への溶解度との差から、疎水性相互作用がゲル形成に強く寄与すること、また AP と SP を加えた非坐り加熱ゲルでは S-S 結合も関与することが示唆された。

(2) 坐り加熱ゲルでは、ゲル構造に寄与するタンパク質は予備加熱の進行に伴い 0.6 M N-8.0 M U-2%Me 溶媒 (S4) に溶解しなくなり、不溶性成分が大きく増加した。AP や SP を加えた坐り加熱ゲルでは不溶化を増強したが、C-Na はむしろ抑制した。不溶性成分は 2%SDS-8.0 M U-2%Me 溶媒 (S5) には完全に溶解するので、不溶性成分は極めて強い結合力により坐り加熱ゲル形成に寄与すると推定された。

表 3-1 実験材料の水分量，粗タンパク質量および pH

	水分 (%)	粗タンパク質 (%)	pH*
ホッケ冷凍すり身	76.7	14.2	7.16
スケトウダラ冷凍すり身	79.0	13.8	7.44
卵白粉末 (AP)	6.4	82.5	7.49
大豆タンパク質粉末 (SP)	6.9	76.8	7.24
カゼインナトリウム粉末 (C-Na)	8.7	83.7	7.36

*蒸留水で 10 倍希釈した溶液を用いて測定

表 3-2 各種溶媒の組成

溶媒の組成	
S1	0.6 M N-20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
S2	0.6 M N-1.5 M U-20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
S3	0.6 M N-8.0 M U-20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
S4	0.6 M N-8.0 M U-2%Me-20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
S5	2%SDS-8.0 M U-2%Me-20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

N : 塩化ナトリウム (NaCl, Sodium chloride)

U : 尿素 (Urea)

Me : 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol)

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate)

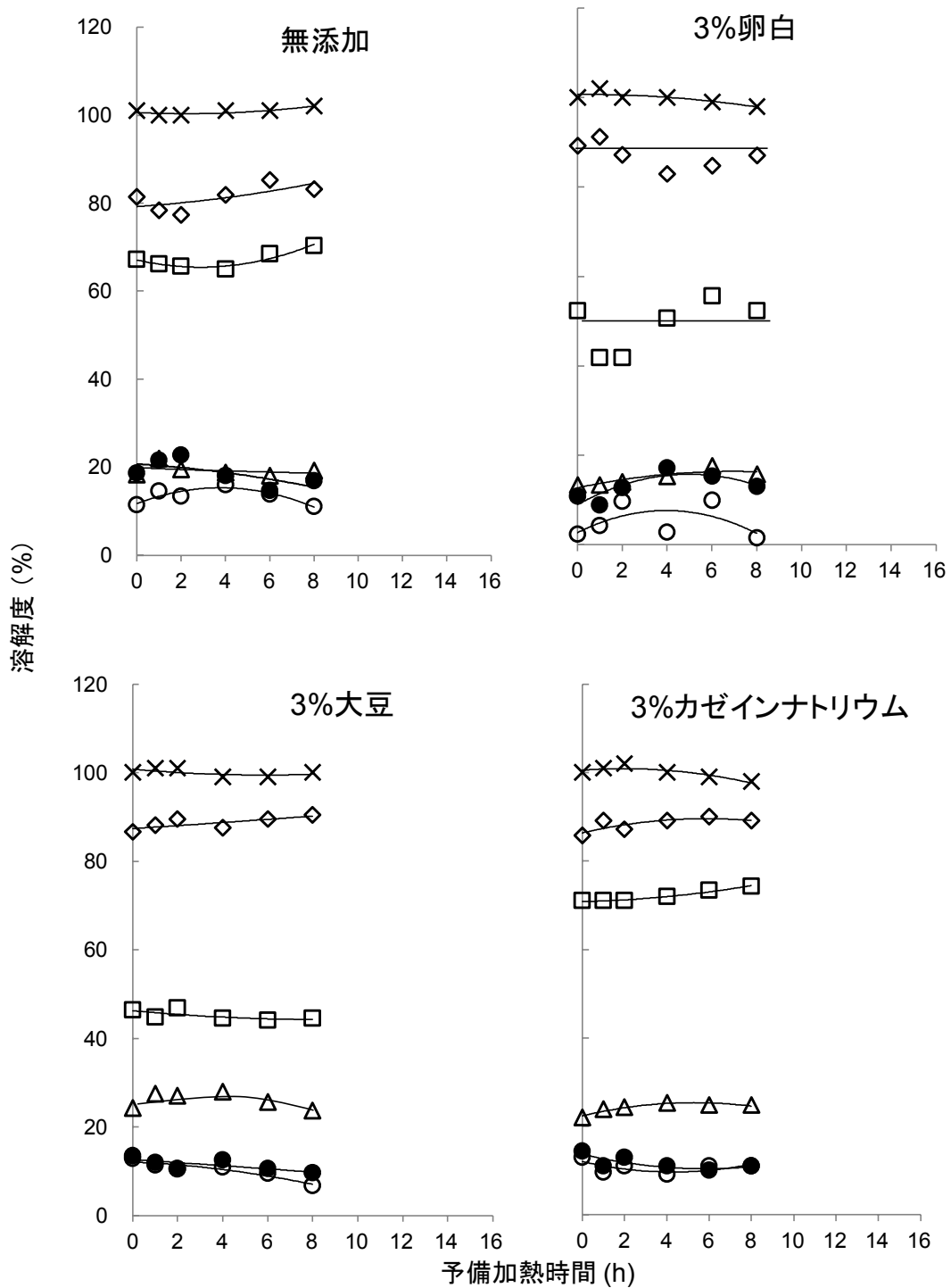


図 3-1 ホツケ加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒に対する溶解度
 溶媒: (○)S1, (△)S2, (□)S3, (◇)S4, (×)S5, (●)不溶性成分

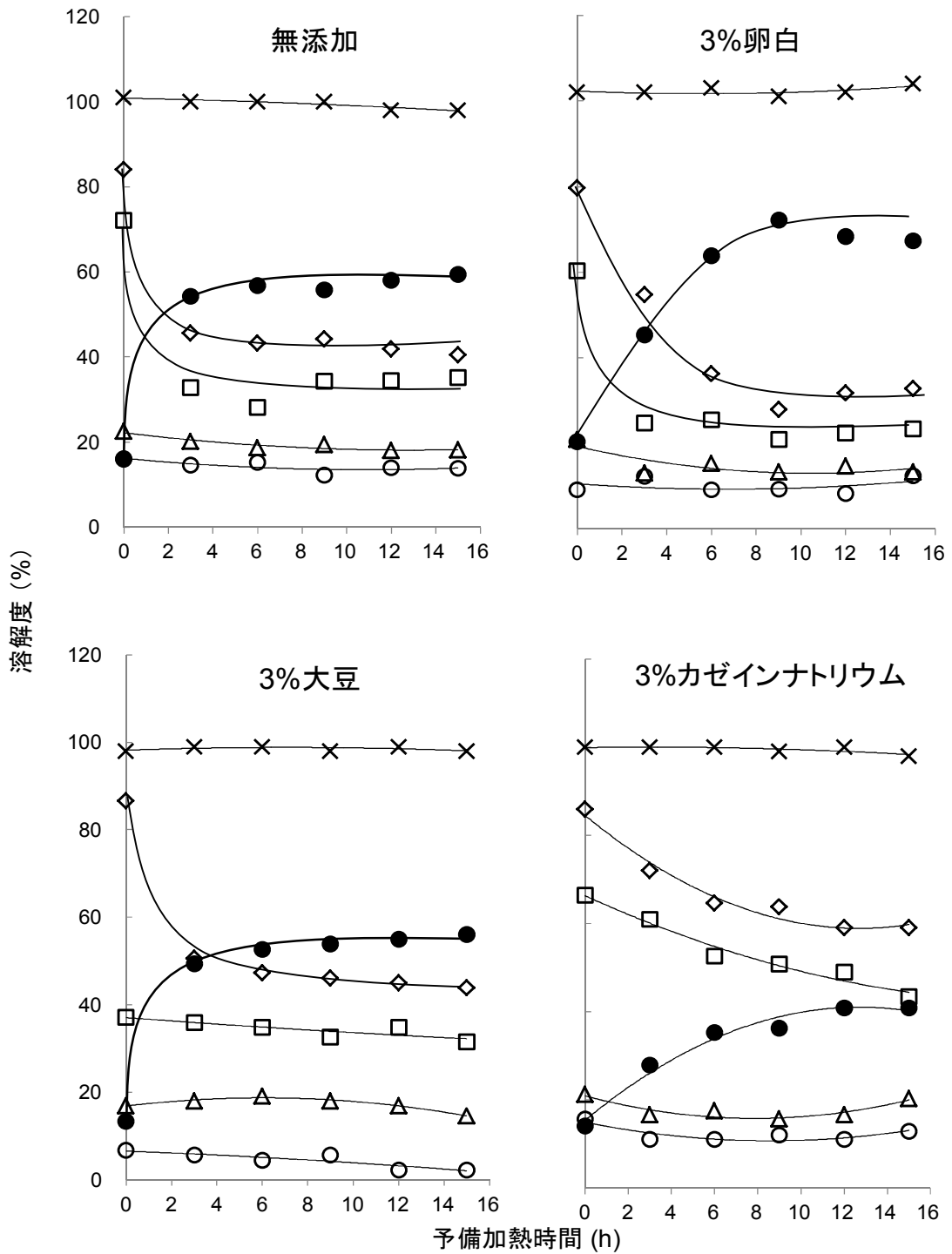


図 3-2 スケトウダラ加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒に対する溶解度
 溶媒: (O)S1, (△)S2, (□)S3, (◇)S4, (×)S5, (●)不溶性成分

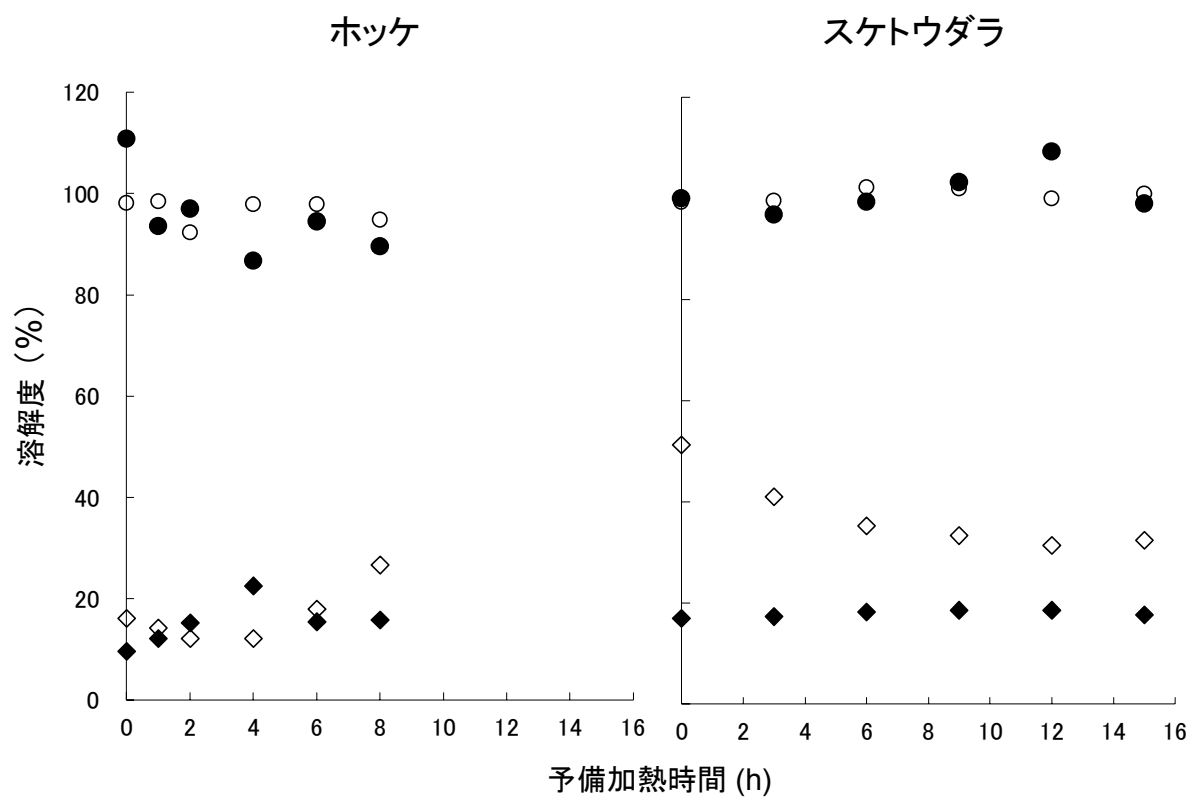


図 3-3 ホツケおよびスケトウダラ加熱ゲル中のタンパク質の
 グアニジン塩酸溶媒に対する溶解度
 添加物: (○) 無添加, 2 M グアニジン塩酸, (◇) 無添加, 7 M グアニジン塩酸
 (●) 3% 卵白, 2 M グアニジン塩酸, (◆) 3% 卵白, 7 M グアニジン塩酸

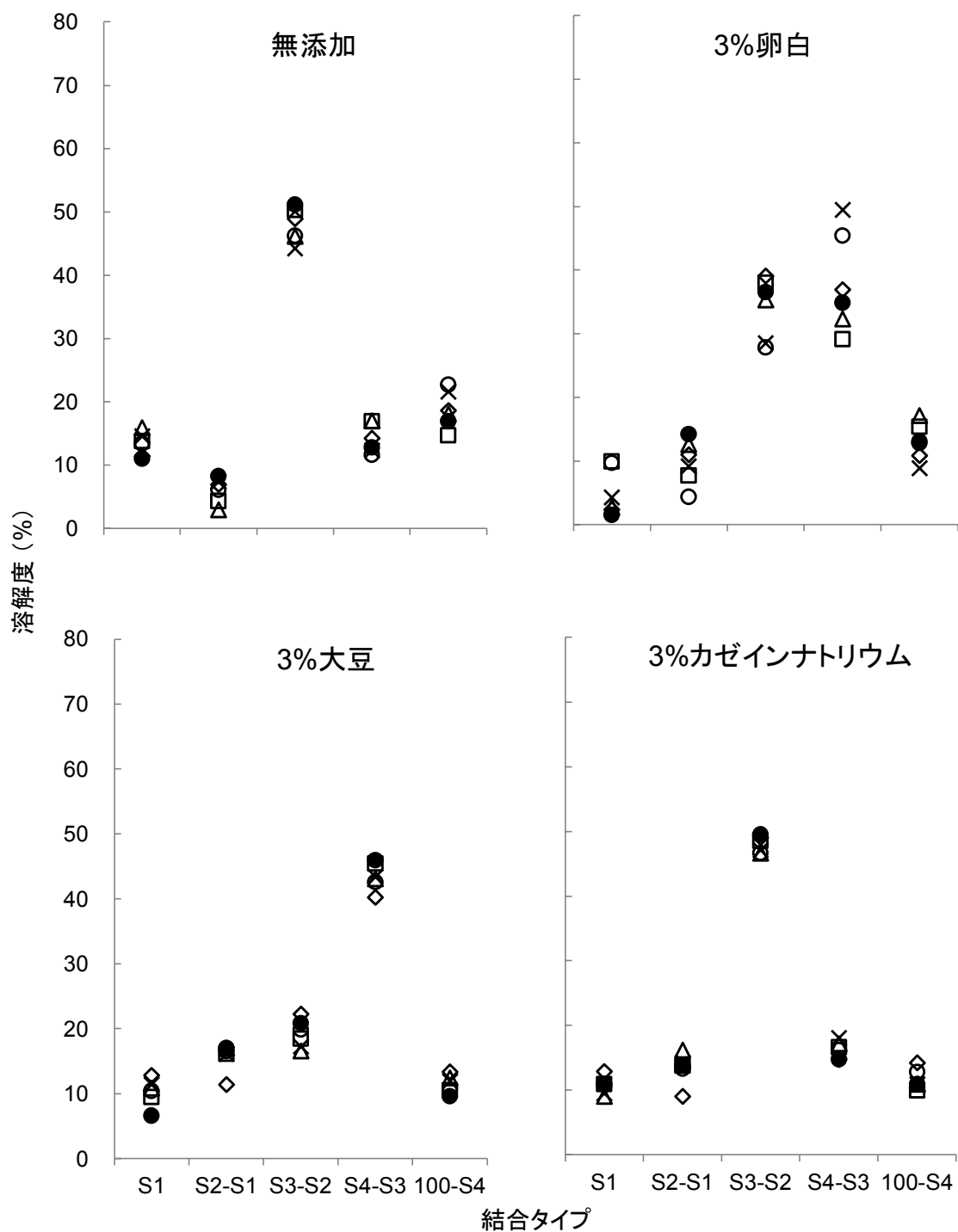


図 3-4 ホツケの加熱ゲル構造に寄与するタンパク質間の結合タイプと予備加熱の影響
 予備加熱時間 (h): (◇)0, (×)1, (○)2, (△)4, (□)6, (●)8
 結合タイプ: イオン結合 (S1), 水素結合 (S2-S1), 疎水性相互作用 (S3-S2), S-S結合 (S4-S3), より強い結合 (100-S4)

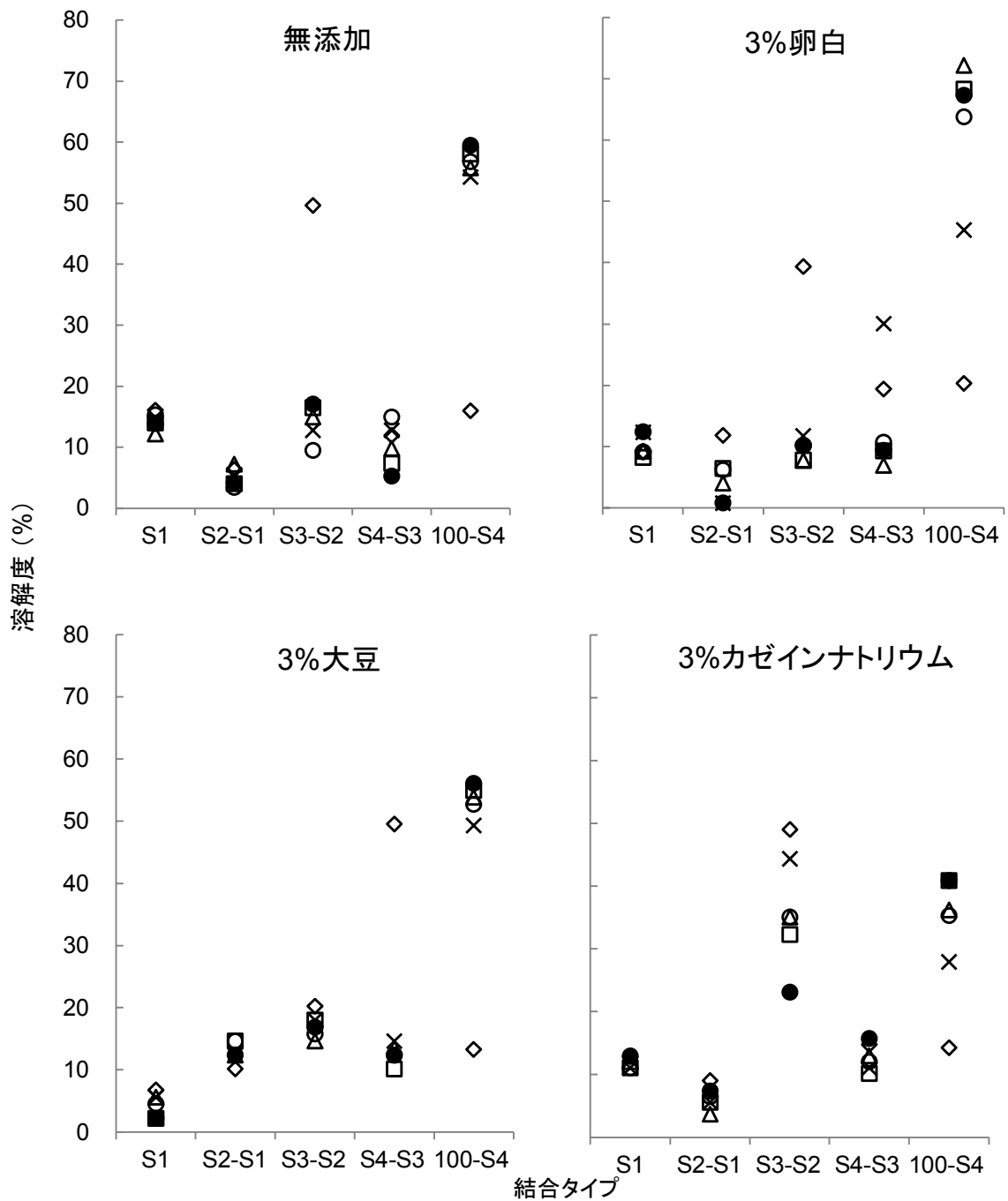


図 3-5 スケトウダラの加熱ゲル構造に寄与するタンパク質間の結合タイプと予備加熱の影響
 予備加熱時間 (h): (◇)0, (×)3, (○)6, (△)9, (□)12, (●)15
 結合タイプ: イオン結合 (S1), 水素結合 (S2-S1), 疎水性相互作用 (S3-S2), S-S結合 (S4-S3), より強い結合 (100-S4)

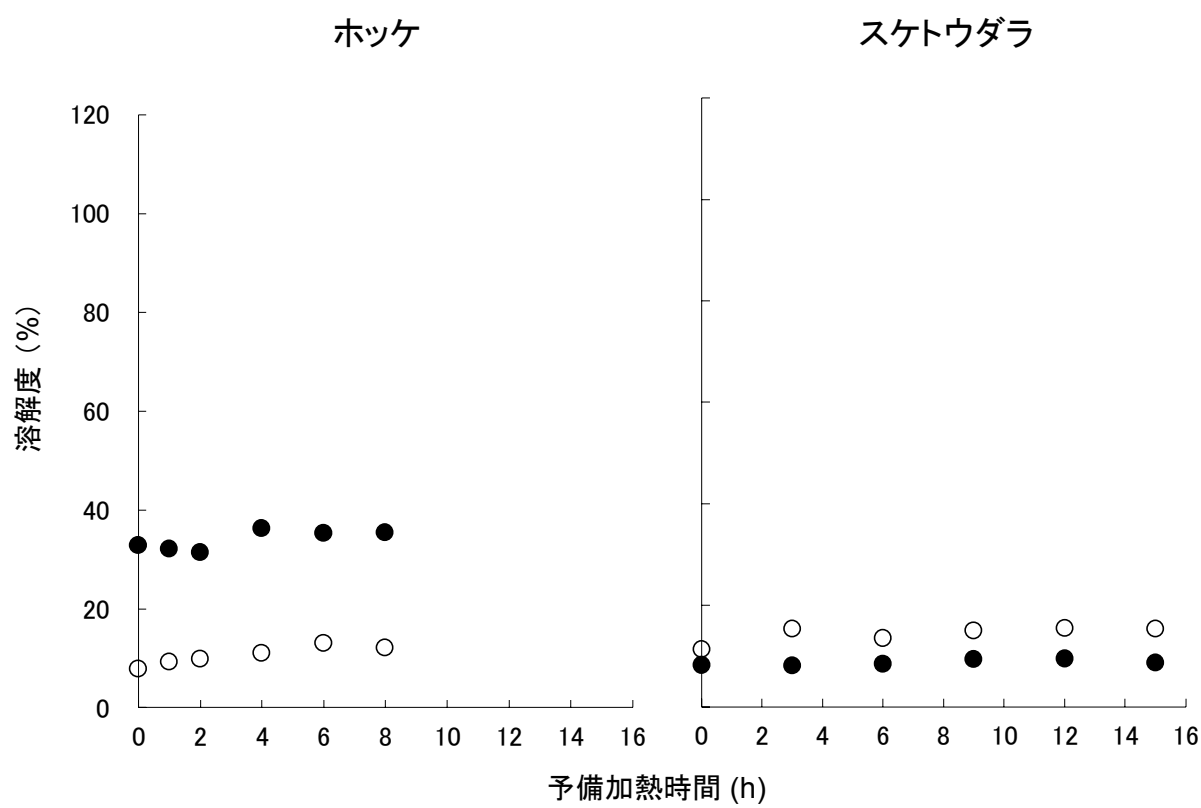


図 3-6 ホッケおよびスケトウダラ加熱ゲルの2%2-メルカプトエタノールに対する溶解度
 添加物: (○)無添加, (●)3%卵白

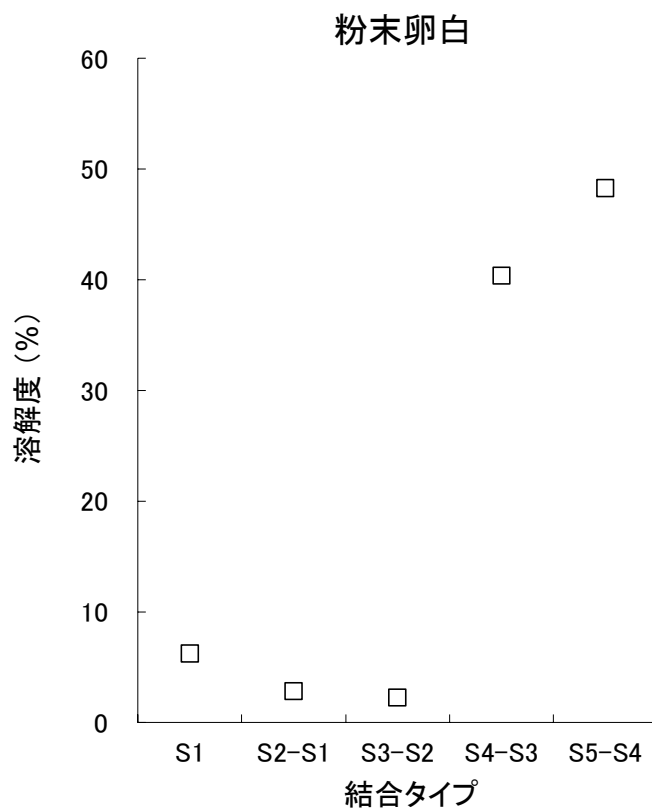


図 3-7 卵白ゲルのタンパク質構造に寄与するタンパク質間結合タイプ
 結合タイプ: イオン結合(S1), 水素結合(S2-S1), 疎水性相互作用(S3-S2)
 S-S結合(S4-S3), より強い結合(100-S4)

第4章 魚肉すり身の加熱ゲル形成に寄与するタンパク質成分の分析と卵白粉末添加の影響

1. 目的

第3章の研究で、形成されたかまぼこ（加熱ゲル）を NaCl, 尿素, メルカプトエタノールおよびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）から成る混合溶媒に対して溶解し、これらのタンパク質の溶解度の差異と予備加熱に伴って起こる経時変化から、かまぼこのゲル構造の形成に関与するタンパク質間の結合タイプを推定する試みを行った。また、かまぼこの弾力補強材として使用されることが多い卵白粉末などのタンパク質添加物の影響についても検討を加えた。その結果、坐りを伴った加熱ゲルと伴わない加熱ゲルでは、ゲル構造の形成に関与するタンパク質間の結合力のタイプが全く異なり、前者では強い結合力が、また後者では比較的弱い結合力が作用してかまぼこの物性に関与することが明らかになった。また、卵白粉末による補強効果には S-S 結合が関与することも示唆された。しかしながら、加熱ゲルの構造形成に際しては、すり身に含まれている数種以上に及ぶタンパク質成分の中で、どの成分間にどのようなタイプの結合力が作用しているかは、全く予想することができなかった。

そこで本章では、NaCl, 尿素, メルカプトエタノールおよび SDS から成る数種の溶媒に溶解するタンパク質成分を SDS-PAGE 法によって分析し、ゲル構造に関与するタンパク質成分と結合力のタイプを特定することによって、坐りゲル形成との関わりや卵白粉末による強化作用との関わりを検討することを目的とした。

2. 方法

実験材料

ホッケ Arabesque greenling *Pleurogrammus azonus* 冷凍すり身およびスケトウダラ Walleye pollack *Theragra chalcogramma* 冷凍すり身はともに北海道産の陸上 2 級品を使用した。卵白粉末 (AP) はキューピー株式会社製の乾燥卵白 K タイプを使用した。なお、これらの水分量、タンパク質量および pH を表 4-1 にそれぞれ示す。

実験方法

(1) 加熱ゲルの調製

第 2 章と同様の方法で調製した。

(2) 加熱ゲル中のタンパク質の可溶化と溶解度の測定

第 3 章と同様の方法で、加熱ゲル中のタンパク質を 0.6 M NaCl (N), 1.5~8.0 M 尿素 (U) および 2%2-メルカプトエタノール (Me) および 2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) から成る 5 種類の混合溶媒 (表 3-2) に溶解させた。また、5 種の溶媒に溶解したタンパク質は、15%トリクロロ酢酸を等量加えて沈殿させ、少量の石油エーテルで洗浄した後、集めた沈殿を 1 M NaOH で溶解し、ビウレット法によって 560 nm で比色定量した。

(3) 各種溶媒に溶解した加熱ゲル中のタンパク質の SDS-PAGE による成分分析

5 種の溶媒に溶解した加熱ゲル中のタンパク質を試料溶液とし、SDS-PAGE 分

析に供した。なお、S1に溶解するタンパク質成分は、その量が少なく、溶解度は1.5%~13.5%で最も低い値に留まった(第3章)。したがって、S1に溶解する成分は、単独に分析に供しなかったが、同じ成分はS2に対しても溶解するので、その中に一括して含まれているものとして分析結果を考察した。

SDS-PAGEはLaemmliの方法(Laemmli, 1970)に従い、市販のポリアクリルアミドスラブゲル(5.0%および7.5%, パジエルNPU-5Lおよび7.5L, アトー社製)を支持体に用いた。なお、供試したタンパク質量はそれぞれ約10 μgとした。電気泳動後のゲルは、0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB) - 45% メタノール-9% 酢酸溶液で染色し、45% メタノール-9% 酢酸溶液に一定時間(15 min, 5 times)浸漬して脱色し、余分な色素を除去した後、泳動ゲルの画像(図4-1)をスキャナー(CanoScan LiDE 700F, Canon, 東京)(300 dpi以上)によりパーソナルコンピュータに取り込み、画像解析ソフト(Image J, National Institutes of Health, USA)によって、各バンドの染色強度を一定の幅2 mmで読み込み、測定した。各タンパク質成分の量は、総染色強度に対する割合(%)で表した(図4-2)。

泳動図には、ミオシン重鎖(MHC)、アクチン(AC)およびトロポミオシン(TM)のように、本来多量に含まれており同定し易い成分と、その他に微量で未同定のタンパク質成分が数種類検出された。本研究では、加熱ゲル中のタンパク質成分を泳動図上で移動度の小さい(分子量の大きい)方から順に、Xn, MHC, X1, X2, X3, X4, AC, TMおよびX5の9成分に分画した。これらのうち、Xn, X1~X5は全て未同定のタンパク質成分である。なお、直加熱ゲルでは、MHC, AC, TMが主要な成分であり、二段加熱ゲルでは、ホッケの場合はX1が、またスケト

ウダラでは Xn と X1 が新たに認められる主要成分であり，その他の X2, X3, X5 などの成分は相対的にかなり少量であった．また，X4 については，近似する分子量の 2 成分から成っている場合もあったので，それぞれ X4a と X4b に分けした．これらの未同定の成分については，標準タンパク質分子量マーカーである Page Ruler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) を利用して，泳動図上の移動距離から加熱ゲル中の各タンパク質成分の相対移動度と分子量を求め，結果を表 5-2 に示したが，これらはいずれの加熱ゲル中にも認められる共通の成分であった．

3. 結果および考察

(1) 加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒への溶解度

ホッケおよびスケトウダラの直加熱ゲルと二段加熱ゲルおよび卵白粉末を添加した両加熱ゲル中のタンパク質成分の各種溶媒に対する溶解度を図 4-1 に示す．これによると溶解度は，原料魚種がホッケかスケトウダラかを問わず，また，卵白粉末の添加の有無にも関わりなく， $S1 > S2 > S3 > S4 > S5$ の順に高かった．また，予備加熱によって，ホッケの加熱ゲルではほとんど変わらなかったが，スケトウダラでは，S2, S3 および S4 に対する溶解度は経時的に減少し，それに伴って S1~S4 の溶媒に不溶性のタンパク質成分（不溶性成分）が増加することが示された．この事実は，形成される二段加熱ゲルのタンパク質構造がすり身の原料魚種によって明らかに異なること，すなわち，加熱ゲルの構造形成に寄与するタンパク質成分と成分間の結合力のタイプが異なっていることを強く示唆している．そこで本研究では，次に S1~S5 の溶媒に溶解したすり身原料由来のタンパク質成

分と予備加熱に伴って起こる経時変化を分析して、それぞれの加熱ゲル間で比較検討した。

(2) 各種溶媒に溶解した加熱ゲル中のタンパク質成分

数種の溶媒 (S1~S5) に溶解するタンパク質成分を SDS-PAGE 法によって分析し、加熱ゲル構造に関与する主なタンパク質成分を特定する試みを行った。S2~S5 に溶解したタンパク質成分について、得られた泳動図形を図 4-2 に示す。また、泳動図形を画像解析した結果を図 4-3~4-6 に示す。

S2 に溶解したタンパク質成分は、ホッケの場合、主成分は X4 と TM および少量の X5 相当成分であって、他に極めて僅かながら Xn, MHC および X1 に相当する成分も認められた (図 4-2)。また、これらの成分はいずれも予備加熱時間 (4~8 時間) にわたって、大きく経時変化しないことも示された。画像解析した結果 (図 4-4) を見ると、予備加熱に伴って X4a 成分は増加し、X4b と TM 成分が減少する傾向がみられるので、僅かに変化している可能性が示唆された。なお、スケトウダラの場合も、主成分は X4, TM および X5 相当成分であり、その他に Xn 成分も認められたが、予備加熱時間 (3~9 時間) に伴う大きな経時変化はみられなかった。これは画像解析した結果 (図 4-5) にも示されていた。一方、AP を添加した加熱ゲルについてみると (図 4-4 および 4-6)、S2 に溶解するタンパク質成分は、ホッケおよびスケトウダラともに、無添加の加熱ゲルと同様に X4, TM および X5 が主成分であった。ただ、スケトウダラの場合は、Xn 成分が経時的に大きく消失したように見える (図 4-6)。また画像解析の結果によると、スケトウダラでは溶解する X4 と TM の量がわずかに増加し、ホッケでは X4b が経時的に減

少する傾向を示すようになることが無添加の加熱ゲルとの違いであった（図 4-4）。しかし、加熱ゲル中のタンパク質の S2 溶媒に対する溶解度は、原料魚種がホッケかスケトウダラかを問わず、また AP 添加の有無にも関わりなく、予備加熱によって経時変化することがなく、15~20%の間に留まった。それゆえ、溶解したタンパク質成分である X4, TM および X5 は、それぞれ単独の成分含量にすれば全て数%に相当し、少量であった。

S2 に溶解するタンパク質成分は、主としてイオン結合（静電的相互作用）と水素結合によって、加熱ゲルのタンパク質の加熱ゲル構造の形成に参加しているすり身由来のタンパク質成分に該当していると考えられる。いずれの魚種の加熱ゲルからも Xn, X4, TM および X5 の成分が例外なく見出されたが、これらはそのタンパク質の加熱ゲル構造に比較的弱い結合力で関与すると推定された。また、これらの成分は、坐り加熱ゲルの形成（スケトウダラ）および非坐り加熱ゲルの形成（ホッケ）のいずれかを問わず共通して検出されるので、加熱ゲルのタイプによる特徴的な物性とは関わりがないと考えられる。なお、主成分である X4 に相当する成分は移動度の近接した 2 種の成分から成っているが、本研究ではその実体は未だ同定していない。しかし、いずれの魚類の加熱ゲルにも存在しているので、筋原線維タンパク質（調節タンパク質）に属する成分である可能性が高いが（安井, 1993）、水晒しによってすり身から除去できなかった筋形質タンパク質に属する成分である可能性もある（Arnold *et al.*, 1968）。ただし、S2 に溶解するタンパク質量は、いずれの魚種の加熱ゲルの場合も 15~20%に留まるので、その一部である X4 成分の含量はさらに少ない（第 3 章）。また、泳動ゲルの上端部に留まる高分子量相当の成分（Xn）が認められるが、この成分は見かけ上少量であり、

加熱によっても変化しないので、おそらくすり身中に混在している鱗，表皮などに由来する魚類コラーゲンに由来する可能性があると考えられる（水田，2001）。

S3 に溶解したタンパク質成分を見ると，S2 に溶解したタンパク質のそれらと非常によく似ており，ほとんど同じであるように見える．すなわち，主たる成分は X4，TM および少量の X5 であり，他に，Xn，X1 および X3 に相当する成分が僅かに認められた．S2 に溶解するタンパク質成分は主として水素結合によって結合している成分であるが，S3 に溶解する成分は水素結合と疎水性相互作用によって結合している成分であると考えられる．それゆえ，この事実から疎水性相互作用の切断によって，X4，TM，X5 以外に新しく溶解するようになる成分は無いことが分かった．ただし，ホッケおよびスケトウダラいずれの加熱ゲルの場合も，Xn 相当成分がやや増加しているように見える．また，スケトウダラでは，卵白を添加すると，予備加熱によって Xn 成分が減少する傾向を示すことは，S2 に溶解したタンパク質の場合と同じであった．

S3 に対する加熱ゲル中のタンパク質の溶解度は，S2 へのそれに比べて増加し，直加熱ゲルではホッケかスケトウダラかを問わず，1.5～2.5 倍になったが，AP 添加によって僅かに減少した．さらに予備加熱によって，その溶解度はホッケでは変わらないが，スケトウダラでは大きく減少し，半減した（第3章）．しかし，図 4-1 に示すように溶出されるタンパク質成分およびそれらの割合は，S2 の場合といずれの魚種の場合も良く類似しており，主に X4，TM，X5 および Xn から成る点で，共通していた．

S3 に溶解するタンパク質成分は，イオン結合，水素結合に加えてさらに疎水性相互作用を介して，タンパク質の加熱ゲル構造の形成に関与するタンパク質成分

に相当すると考えられる。いずれの魚類の加熱ゲルの場合も、S3 へのタンパク質の溶解度は、70%前後の高値であった（AP を添加すると僅かに減少した）が、溶解するタンパク質成分は、S2 に溶解した成分の場合とほとんど同じで、Xn, X4, TM および X5 が主成分であった。したがって、これらの成分には、S2 に溶解するような比較的弱く結合している部分と、S2 に不溶だが S3 には溶解するような強く結合している部分があると考えられ、後者の結合には疎水性相互作用が新たに関与すると考えられる。

次に、S4 への加熱ゲル中のタンパク質の溶解度は、直加熱ゲルの場合は、ホッケかスケトウダラかを問わず、いずれも 80%前後の高値に達した（第 3 章）。AP 添加で僅かに減少し、予備加熱を経ると、ホッケではほとんど変わらないが、一方、スケトウダラでは経時的に大きく減少し、ホッケの場合と明らかに異なった。図 4-3 の結果を見ると、S4 に溶解したタンパク質は、Xn, MHC, X1, X2, X3, X4, AC, TM および X5 など多数の成分から成っているが、Xn, X2, X3, X5 成分は相対的に少量であった。また、X4, TM および X5 の成分は S2 や S3 に溶解した成分と共通していた。それゆえ、S4 に対して選択的に溶解した成分は、直加熱ゲルでは MHC, X1 および AC であるが、これは両魚種ともに同じであった。また、二段加熱ゲルでは予備加熱に伴って MHC が減少したが、同時にそれに伴って、ホッケの場合は、X1 に相当する成分が生成、増加した。一方、スケトウダラでは X1 成分は極めて僅かで、大きく増加しなかった。さらに、これらの変化の相違は AP を添加しても大きく変わらなかった。これら一連の変化は、図 4-3~6 に示した画像解析の結果にも示されているが、ホッケでは、Xn 成分が比較的多量に含まれているものの、AP を添加するとそれが減少すること、また、スケトウダ

ラでは、予備加熱が長時間になると、TM成分が増加する傾向を示すことなどが特徴的であった。

S4に溶解するタンパク質成分は、イオン結合と水素結合および疎水性相互作用（8.0 M尿素により切れる結合領域）を切断する他に、さらにS-S結合を切断したときに、タンパク質の加熱ゲル構造から遊離してくる成分に該当していると考えられる。それゆえ、S2やS3溶媒には溶解しないが、S4に対して溶解してくるタンパク質成分はタンパク質の加熱ゲル構造の形成に際して、S-S結合が強く関与することを示唆しているが、直加熱ゲルでは、ホッケかスケトウダラかを問わずMHCとACが、また、二段加熱ゲルの場合は、ホッケではMHCとX1成分が、またスケトウダラではX1とAC成分がそれに相当することが示され、魚種による特異性であると考えられる。なお、スケトウダラの場合は、X1相当成分が少なく、MHCの減少に見合うほどの量の生成物は検知されなかった。これはS4に溶解し難い成分に変化したためであって、S5溶媒中にはその成分が認められる。

X1に相当する成分は現時点では同定されていないが、MHCの減少に伴って生成するので、内因性プロテアーゼによる分解生成物に相当する可能性がある。標準タンパク質分子量マーカーで判定すると、X1成分の分子量は140.2 kDaに相当することがわかったが（表4-2）、既報の論文によると、パシフィックホワイティングのすり身に見出された活性の強いシステインプロテアーゼ：カテプシン-Lの作用によって類似の成分が生成することが知られている（An *et al.*, 1994）。カテプシンはリゾチームに局在するプロテアーゼの総称で、自己消化（タンパク質の異化）に関わる酵素であるが、この中でカテプシン-Lはペプチドの内部の結合に作用してこれを断片化するエンドペプチダーゼである。精製したカテプシン-L

を作用 (55°C) させると、筋原線維では MHC が 74.5~145.0 kDa の成分が、またミオシンでは 67.0~145.0kDa の成分が中間生成物として分解 (自己消化) される事実が明らかになっている (An *et al.*, 1994). それゆえ、坐り加熱ゲル形成時の予備加熱は通常低温度で行われるため、分解の中間産物である 140.2 kDa 成分が生成、蓄積した可能性がある。また、今野らも、スケトウダラの坐り加熱ゲル中に生成する 150 kDa の成分について検討し、H-メロミオシン様のペプチド成分であると報じている (今野ら, 2000). さらに、カテプシン-L は、底生魚、表層 (回遊) 魚および淡水魚など多種にわたる魚肉から調製したアクトミオシン中に分布し、ミンチ肉を水晒ししても失われないと報じられている (Hu *et al.*, 2008a, b). なお、食肉の熟成現象との関わりで、鶏肉の自己消化中に起こるタンパク質の分解の過程について極めて詳細な研究が既に行われており、精製したカテプシン-L による筋原線維およびミオシンの分解においては、160 kDa の成分が生成、蓄積することも知られている (一島, 1983). これら一連の研究成果より、X1 成分は MHC 由来の成分である可能性があるが、詳細な解析は今後の課題である。

なお、S4 溶媒は 0.6 M N, 8.0M U および 2%Me から成っているため、S-S 結合だけでなく、その他のタンパク質間の結合タイプをも切断する。そこで、0.6 M N, 8.0 M U および 2%Me 単独の溶媒に対するタンパク質の溶解度を別途に測定して比較したところ、直加熱ゲルでは、ホッケおよびスケトウダラに関わりなく、0.6 M N には約 10%, 2%Me には 10~15%前後、そして 8.0 M U には 55%前後の溶解度を示した。AP を添加したスケトウダラでは 2%Me への溶解度がやや増加し、また 8.0 M U へのそれもやや減少するに留まった。それゆえ、S4 に溶解した MHC の一部、X2 および AC などは、スケトウダラの二段加熱ゲルでは S-S 結

合ばかりでなく、その他に疎水性相互作用なども協調的に関与しながら、タンパク質の加熱ゲル構造の形成に寄与すると推定される。また、二段加熱ゲルについては、ホッケでは直加熱ゲルの場合と同じで変わらなかった。一方、スケトウダラでは 0.6 M N や 2% Me への溶解度は直加熱ゲルの場合と同程度であったが、8.0 M U へのそれは 50% 以下となり、AP を加えるとさらに半減した。それゆえ、S-S 結合よりも強い結合力が関与して、タンパク質の加熱ゲル構造の不溶化が進行していることが示唆された。

S5 溶媒に対しては、加熱ゲルを構成するタンパク質はほとんど全て溶解した(第 3 章)。これはタンパク質に強い親和性を持ち、可溶化させる機能に優れた SDS を溶媒に使用しているからである。かまぼこ製品のほとんどは SDS を含む溶媒によく溶解するが、微生物由来のトランスグルタミナーゼによって人為的に強く架橋重合させた製品は溶解しにくいことが、例外として知られている(阿部, 1998)。

図 4-2 の結果によると、S5 に溶解したタンパク質成分は、S4 に溶解したタンパク質のそれとほとんど同じであった。ただし、ホッケでは MHC, X1, TM および AC などの主成分の染色強度が S4 の場合よりも著しく顕著に認められる傾向が認められた。一方、スケトウダラの場合は、同じようにこれらの成分が顕著に認められる他に、泳動ゲルの上端部に MHC の多量体と推定される成分の存在が顕著に認められた。また、予備加熱に伴ってホッケの場合は Xn と MHC が減少し、それに伴って X1 成分が増加した。一方、スケトウダラの場合は、MHC がより大きく減少するが、それに伴う X1 成分の増加は僅かで、代わりに Xn 成分が大きく増加する傾向が認められた。画像解析の結果を見ると、ホッケの場合は、MHC と X1 の含量が、S4 に溶解したタンパク質成分の場合と比べて、相対的に大きく増加し、

AC はほとんど変わらないが，その他の成分は全体的に減少した．また，AP を添加すると，X1 の含量が全体に減少することを除けば，その他の一連の変化傾向は変わらないことが示された．一方，スケトウダラの場合も，MHC と X1 の含量が，S4 に溶解したタンパク質成分の場合と比べて，相対的に大きく増加し，AC はほとんど変わらないが，その他の成分は全体的に減少した．また，AP を添加すると X1 の含量が全体的に減少するなどの一連の変化の傾向は同じであった．ただし，Xn 成分は正確に定量できないものの，増加する傾向が認められた．なお，Xn 成分については，S2，S3 および S4 に溶解するタンパク質中にも同様な成分が見られるが，これらは予備加熱によって増加する傾向は示さず，また，AP を添加すると一様に減少した（これはスケトウダラの場合に特に顕著であった）．さらに，S5 に溶解するタンパク質中の Xn 相当の成分は，ホッケでは検出され難くなるが，スケトウダラでは予備加熱に伴ってその量が徐々に増加する傾向を示し，また，AP を添加するとその量がさらに増加することが示され，魚種によって異なっていた．

S5 に溶解するタンパク質中の Xn 相当の成分は，S2～S4 に含まれている Xn 成分とは異質であり，既知の多くの成果から MHC の多量体に相当すると考えられる（沼倉ら，1987）．MHC 多量体（MHCn）に相当する成分は，今回採用した泳動条件ではその変化を定量的に検知することはできなかった．しかし，スケトウダラの二段加熱ゲルでは，予備加熱に伴って，S4 溶媒に対する溶解度の急激な減少が起こるときには，極めて強力な結合力による MHCn の生成が起こる事実は既に知られている（沼倉ら，1987）．また，このようなタンパク質成分の変化は，坐りを伴ったゲル形成に際して認められ，経時的な物性値の大きな増加に強く関わることは第 3 章において述べた．

AP に由来するタンパク質は、加熱ゲルの形成に際して S-S 結合を介して参加していると推定されるが（第 3 章）、同 AP が単独で形成する加熱ゲル [加水量が 7 倍 (v/w) で 90°C, 30 分加熱] についてタンパク質の溶解性を測定してみると、S1, S2 および S3 に対する溶解度はそれぞれ 10% 前後であり、 $S1 < S2 < S3$ の順であった。S4 には 52%、S5 には 95% の溶解度を示したので、卵白タンパク質の加熱ゲル自体が強い S-S 結合によって構築されていると推定された。また、S5 溶媒に溶解したタンパク質成分を同じく SDS-PAGE 法によって分析すると、分子量が 70~85kDa と 40kDa 前後に相当する 2 種の成分が認められた。これはコンアルブミンとオボアルブミンの分子量に近似している (シェフテルら, 1988)。なお、S2 および S3 溶媒に溶解したタンパク質成分中には、上記 2 種の成分の存在は明らかではなく、むしろ僅かに Xn に相当する成分の存在が認められた。この Xn 成分は Me を含む S4 および S5 中には認められないので、卵白に含まれるタンパク質に由来する多量体の可能性がある。また、加熱ゲルの S4 や S5 中に溶解するタンパク質中にも上記した AP 由来の 2 種のタンパク質成分の存在は明らかではなかったが、これは添加量が少量 (3%) であるためと考えられる。

7.5% ポリアクリルアミドスラブゲルを支持体とした SDS-PAGE 法は、粒子サイズの大きなタンパク質成分の分析には不利なために、5.0% ポリアクリルアミドスラブゲルを支持体として泳動し、分析を試みた。その結果を図 4-7 に示す。しかし、Xn に相当するタンパク質成分はこの泳動ゲル中にも侵入できず、上端部に蓄積した状態で染色された。したがって、5.0% ポリアクリルアミドスラブゲルに依ってもなお正確に定量できなかった。しかし、加熱ゲルから S2, S3 および S4 に溶解したタンパク質中に含まれている Xn 成分は、原料魚種がホッケかスケトウ

ダラかに関わりなく，予備加熱に伴って変化しなかった（ただし，スケトウダラでは卵白タンパク質の添加によって一様に減少した）．一方，S5 に溶解したタンパク質中の Xn 成分はホッケでは著しく減少し，消失したように見えるが，スケトウダラでは予備加熱に伴って明らかに増加する傾向を示した．それゆえ，加熱ゲルから溶解したタンパク質中の Xn 成分には，加熱に伴って経時変化することがなく，また AP の添加によっても影響を受けない性質の成分と，予備加熱に伴って増加する傾向を示し，AP の添加によって増加傾向がさらに強まる性質の成分，上記 2 種の異質なタンパク質成分が存在すると判断された．

以上を総括すると，加熱ゲルのタンパク質の加熱ゲル構造が形成される際に参加するすり身中の主要なタンパク質成分は MHC と AC であるが，ホッケでは MHC と X1 成分（より正確に云えば，直加熱ゲルでは MHC が主体で，また二段加熱ゲルでは MHC と X1 成分が主体）が AC とともに強い S-S 結合と疎水性相互作用を介して関与する．一方，スケトウダラでは，MHC，MHCn（直加熱ゲルでは MHC が主体で，二段加熱ゲルでは MHCn が主体）が AC とともに，極めて強い結合力（強い疎水性相互作用，S-S 結合およびおそらく他にイソペプチド結合などの協調作用（木村，1991）を介して関与することが示唆された．

なお，一部の Xn 相当成分（コラーゲンに由来すると推定される成分），X2，X3，X4 および X5 などの成分は，すり身中の主要タンパク質成分（例えば MHC や AC）とイオン結合や水素結合などを介して結合していることが示唆された．これらの成分はホッケおよびスケトウダラのいずれにも存在しており，予備加熱によって増減することはない，また，いずれも比較的微量であるため，タンパク質の加熱ゲル構造への関与は極めて小さいと考えられる．

4. 本章の結論

ホッケおよびスケトウダラのすり身から、3%卵白粉末 (AP) の有無の下で、直加熱ゲル (90°C) と二段加熱ゲル (25~90°C) を調製した。形成した加熱ゲルは、0.6 M NaCl, 1.5-8.0 M 尿素, 2%メルカプトエタノールと 2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を組み合わせた溶媒 (S1~S5) に溶解させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で、成分を分析した。これらの結果から、加熱ゲル構造に寄与する主要なタンパク質は、ホッケの場合、直加熱ゲルではミオシン重鎖 (MHC)、二段加熱ゲルでは MHC と X1 (140.2kDa) 成分であり、これらがアクチン (AC) とともに、強い S-S 結合と疎水性相互作用を介してゲル形成に関与することが示唆された。一方、スケトウダラの場合、直加熱ゲルでは MHC、二段加熱ゲルではその多量体が AC とともに、強い疎水性相互作用、S-S 結合およびイソペプチド結合などの協調作用を介してゲル形成に関与することが示唆された。なお、これらの傾向は AP を加えた加熱ゲルでも著しく変わらなかった。

表 4-1 実験材料の水分量，粗タンパク質量および pH

	水分 (%)	粗タンパク質 (%)	pH*
ホッケ冷凍すり身	76.7	14.2	7.16
スケトウダラ冷凍すり身	79.0	13.8	7.44
卵白粉末 (AP)	6.4	82.5	7.49

*蒸留水で 10 倍希釈した溶液を用いて測定

表 4-2 加熱ゲル中の各タンパク質成分の相対移動度と分子量

加熱ゲル中の 各タンパク質成分	7.5%アクリルアミドゲル での相対移動度	分子量 (kDa)
Xn	—	—
MHC	1	215.7
X1	1.42	140.2
X2	1.74	109.6
X3	1.90	98.5
X4a	2.44	72.7
X4b	2.58	68.1
AC	3.80	42.3
TM	4.36	35.8
X5	4.71	32.6

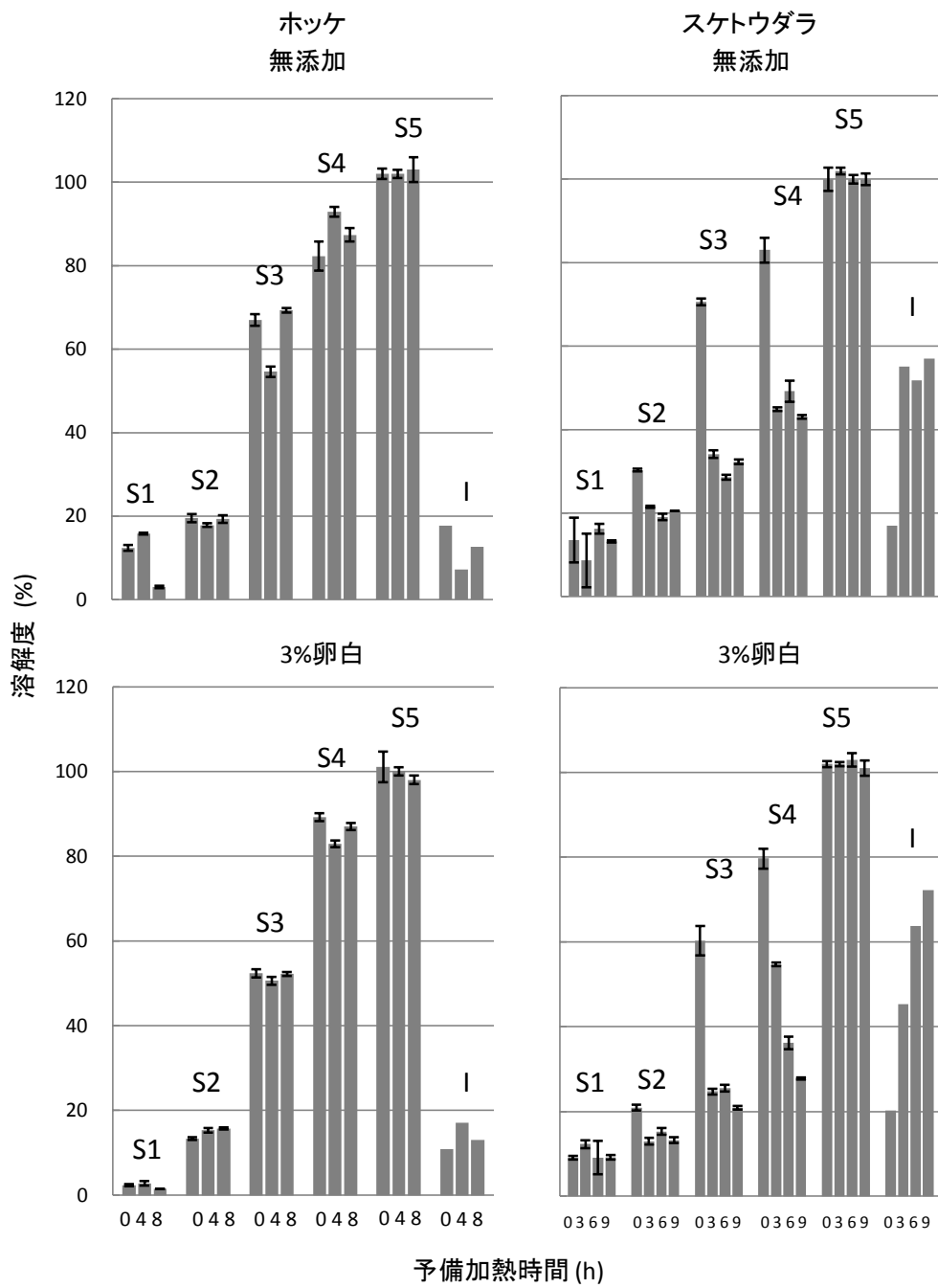


図 4-1 予備加熱に伴って起こる加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒に対する溶解度の変化
 溶媒の組成: (S1)0.6 M NaCl, (S2)0.6 M NaCl-1.5M 尿素, (S3)0.6 M NaCl-8.0 M 尿素
 (S4)0.6 M NaCl-8.0 M 尿素-2%-メルカプトエタノール
 (S5)2%ドデシル硫酸ナトリウム-8.0 M 尿素-2%メルカプトエタノール

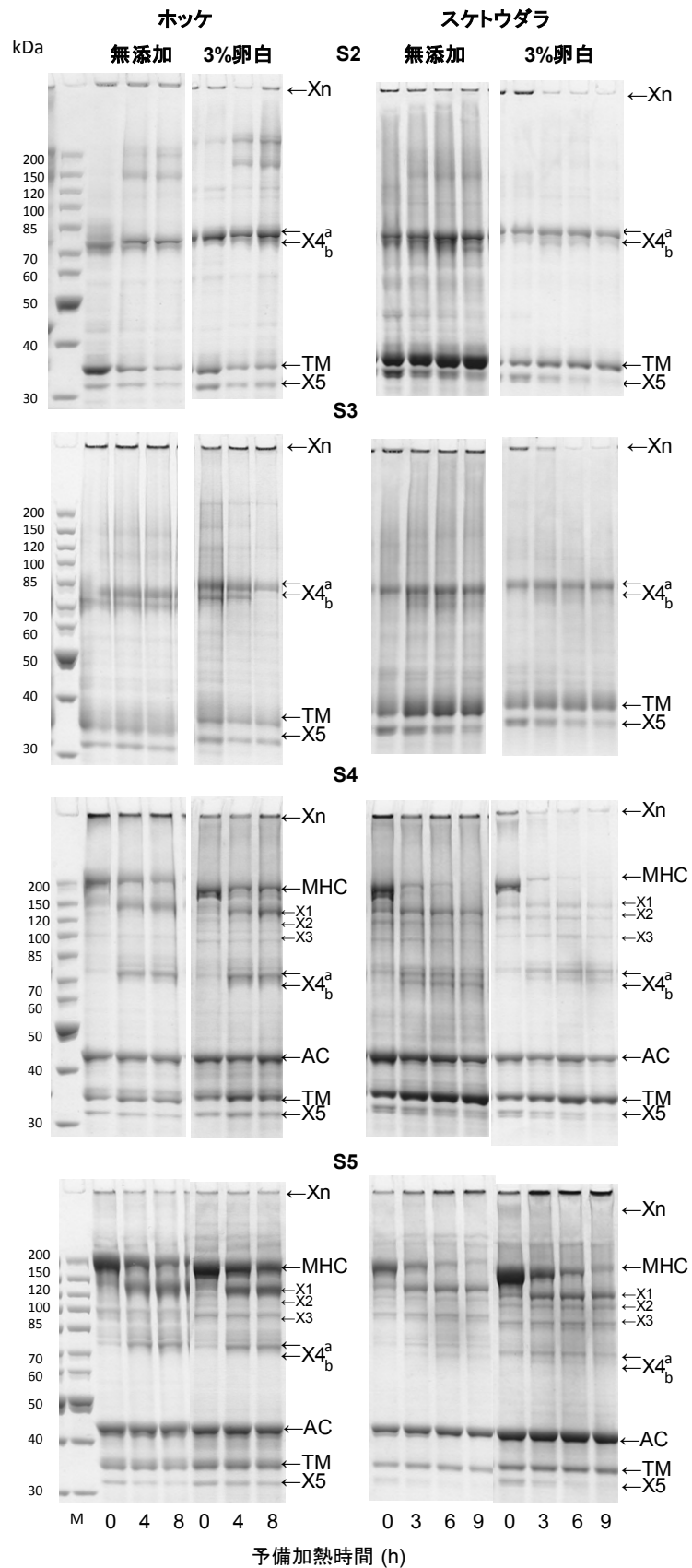


図 4-2 予備加熱に伴って起こるホッケおよびスケトウダラ加熱ゲル中のタンパク質成分の変化 (7.5%アクリルアミドゲル)

M: 標準タンパク質の分子量

MHC: ミオシン重鎖, AC: アクチン, TM: トロポミオシン, Xn~X5: 未同定成分

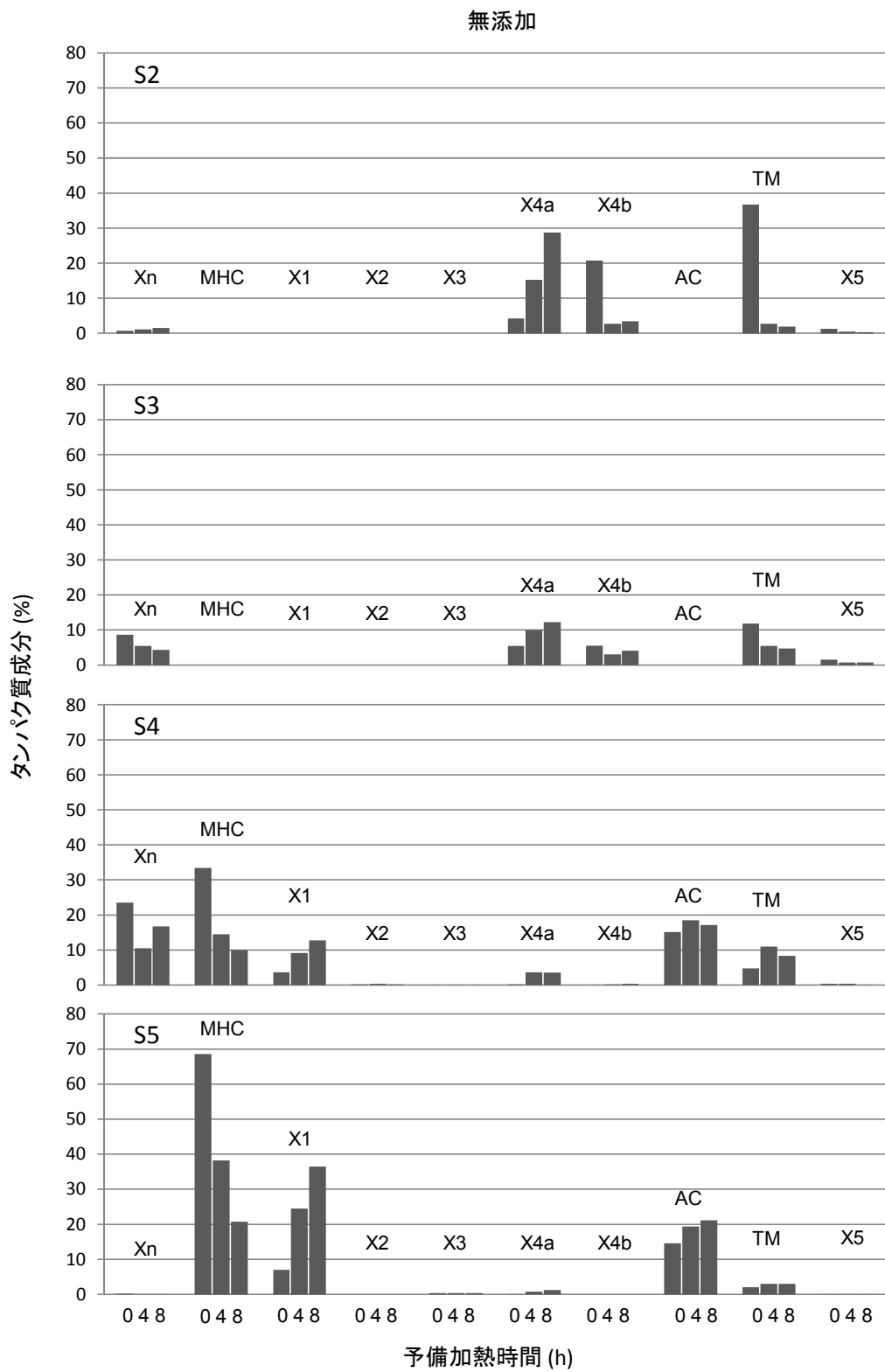


図 4-3 予備加熱に伴うホツケ加熱ゲル中のタンパク質成分の経時変化

MHC:ミオシン重鎖, AC:アクチン, TM:トロポミオシン, Xn~X5:未同定成分

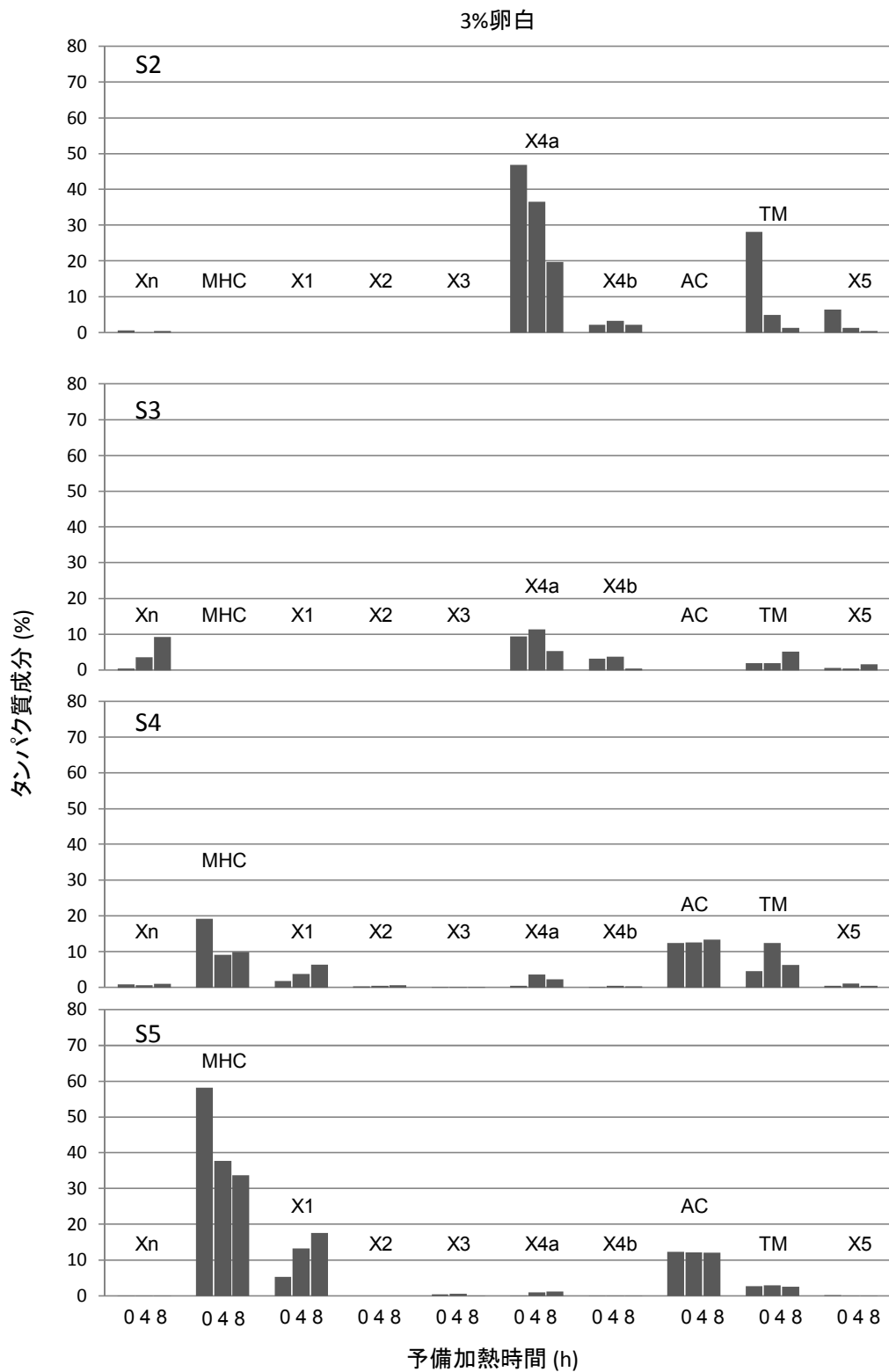


図 4-4 予備加熱に伴う卵白 3%添加したホッケ加熱ゲル中のタンパク質成分の経時変化
MHC:ミオシン重鎖, AC:アクチン, TM:トロポミオシン, Xn~X5:未同定成分

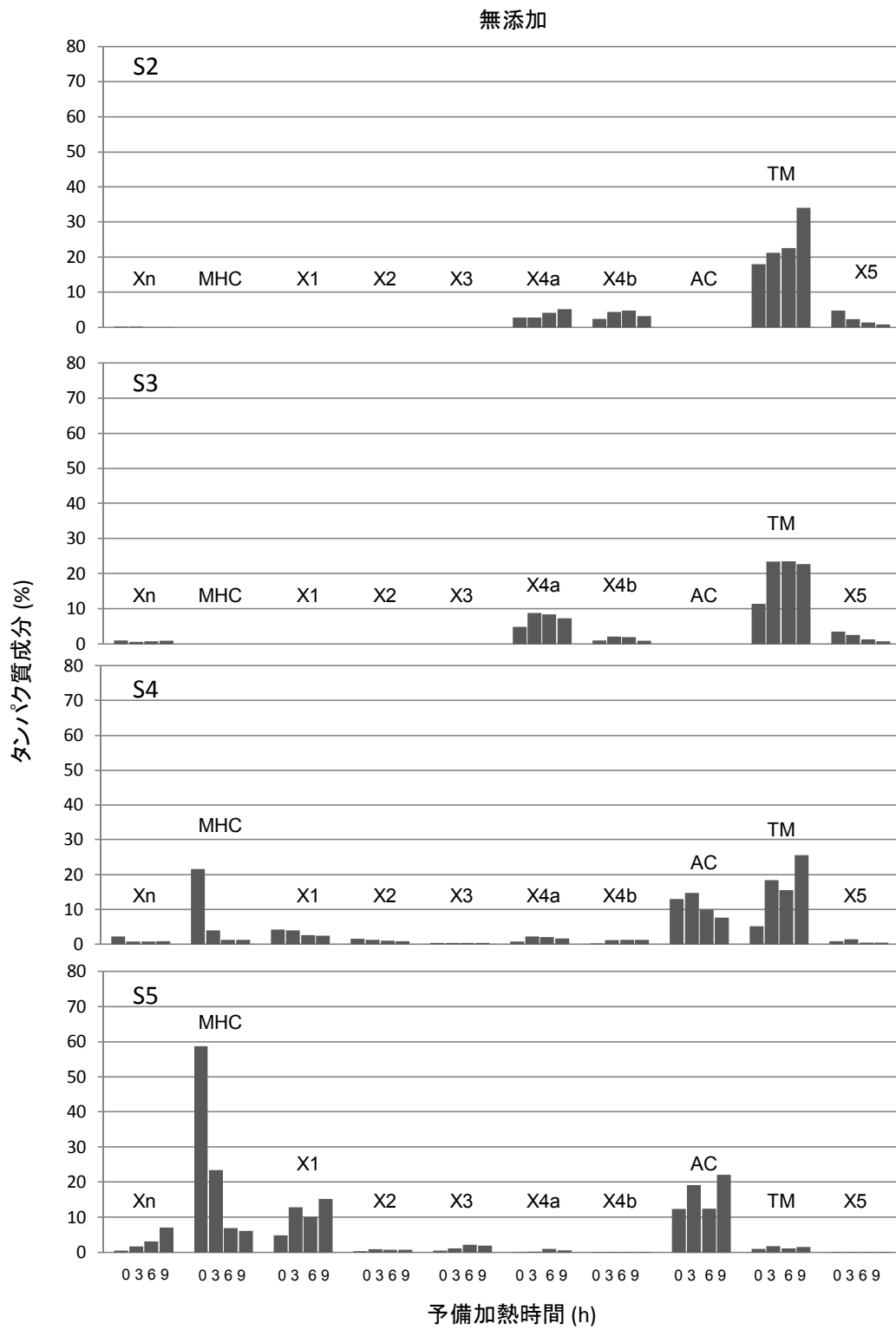


図 4-5 予備加熱に伴うスケトウダラ加熱ゲル中のタンパク質成分の経時変化

MHC:ミオシン重鎖, AC:アクチン, TM:トロポミオシン, Xn~X5:未同定成分

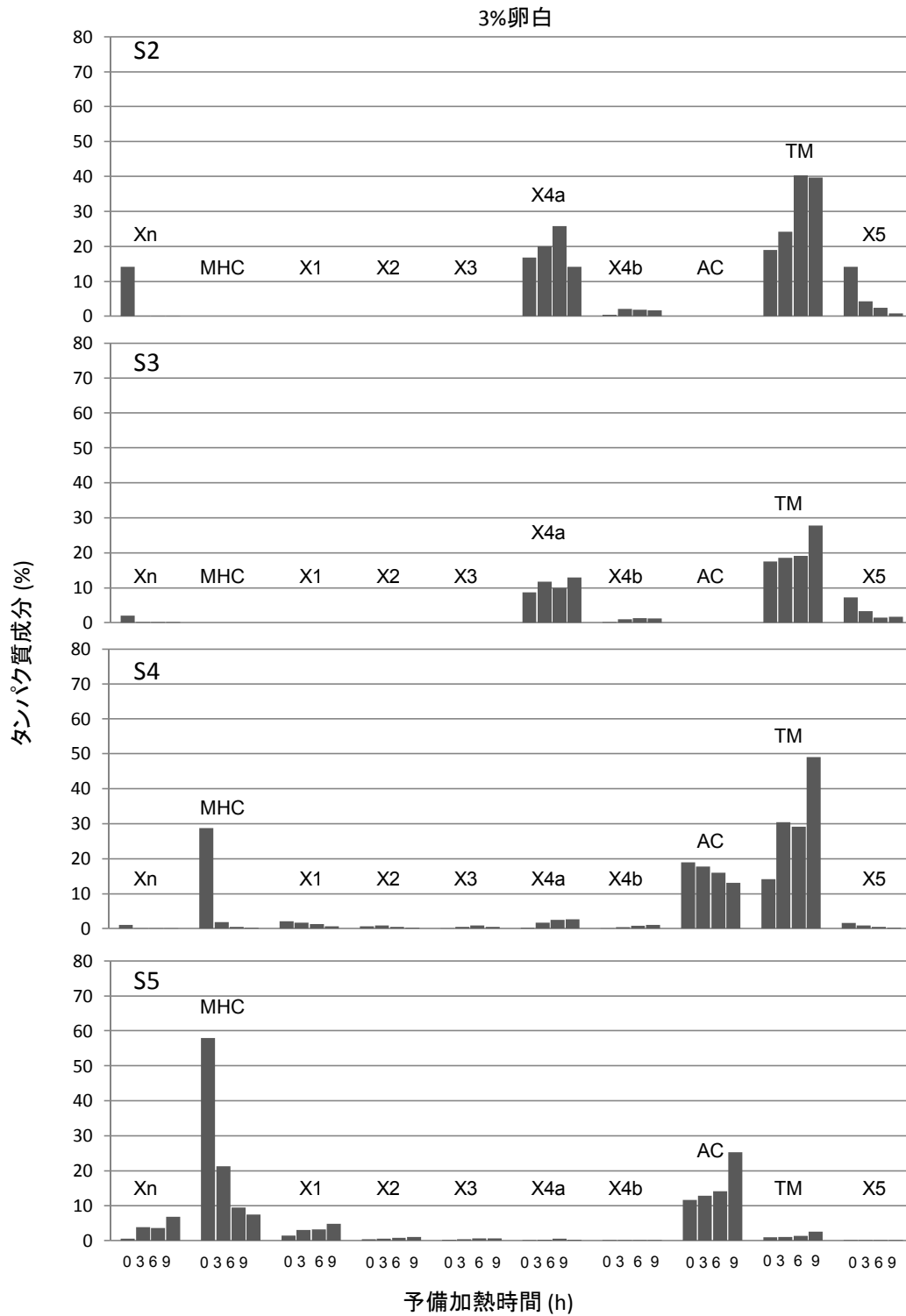


図 4-6 予備加熱に伴う卵白 3%添加したスケトウダラ加熱ゲル中のタンパク質成分の経時変化

MHC:ミオシン重鎖, AC:アクチン, TM:トロポミオシン, Xn~X5:未同定成分

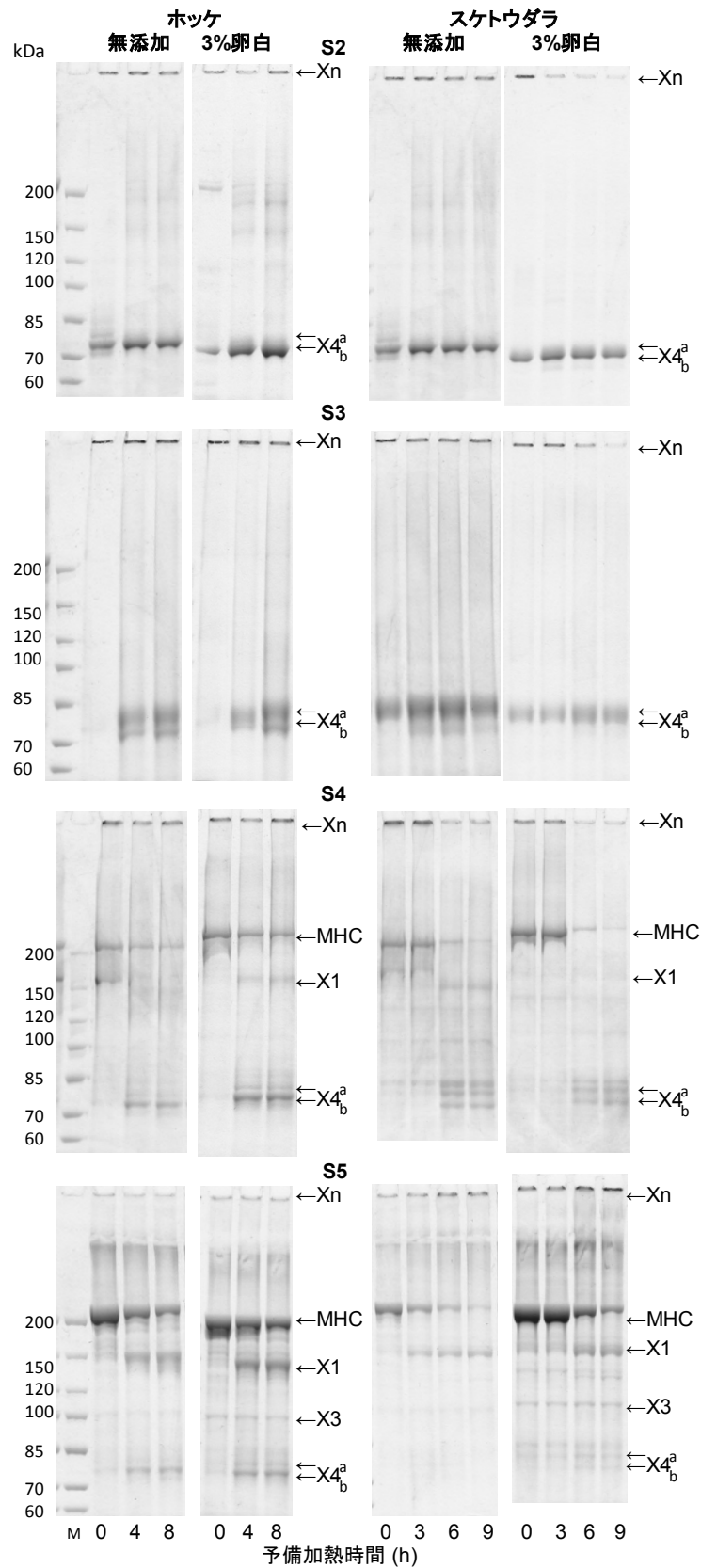


図 4-7 予備加熱に伴って起こるホッケおよびスケトウダラ加熱ゲル中のタンパク質成分の変化 (5%アクリルアミドゲル)

M: 標準タンパク質の分子量
MHC: ミオシン重鎖, Xn~X4: 未同定成分

第 5 章 総括

水産練り製品の市場は年々縮小傾向にあり、これに伴い国内の冷凍すり身の生産量も減少傾向にある。現在では、輸入冷凍すり身が増加しており、世界中の様々な魚類から生産された冷凍すり身を原料として、水産練り製品は製造されている。そして、冷凍すり身の主原料であるスケトウダラは、諸般の事情により 2008 年に価格が高騰し、各メーカーは魚種の代替やすり身の使用量を減らすなど対応を余儀なくされた。そのような状況の中で、冷凍すり身の持つ加熱ゲル形成能を最大限に引き出すことが求められており、近年の研究では、多岐にわたる副原料の添加によるゲル物性の改良など、製品の弾力補強を目的とした方向へと注力されてきた。現在では、ゲル物性改良剤として卵白が広く利用されており、その成果も既に紹介されているが、加熱ゲルを調製する条件とその製品のゲル物性に及ぼすこれらの添加成分の影響との関係や、加熱ゲルに供する原料魚種による添加物の効力の違いに関する情報は依然として少ない。そこで本研究では、冷凍すり身原料をより有効利用することを目的として、非坐り加熱ゲルを形成するホッケ冷凍すり身と、坐り加熱ゲルを形成するスケトウダラ冷凍すり身の加熱ゲル形成能、および現在でも広く使用されている卵白粉末の添加による増強効果を明らかにするための、研究を行った。また、卵白粉末だけでなく、大豆タンパク質粉末やカゼインナトリウム粉末添加についても同様の検討を行った。

第 2 章では、非坐り加熱ゲルを形成するホッケ冷凍すり身から調製される加熱ゲルと、坐りゲルを形成するスケトウダラ冷凍すり身から調製される加熱ゲルについて、それぞれの物性上の特徴と、これらに卵白粉末を添加したときに認められる物性への影響を比較検討した。その結果、非坐り加熱ゲルと坐り加熱ゲルで

は、その物性に対する卵白粉末による増強効果が異なり、ホッケのすり身では、坐り加熱ゲル形成能が付与されることもなく、物性値の増加は相対的に小さいことや、破断強度の増加の度合いが破断凹みのそれよりも大きいのが特徴であることがわかった。一方、スケトウダラのすり身では坐り加熱ゲル形成能がより増強された。

これまでに坐り加熱ゲルは、非坐り加熱ゲルに比べて物性が高値に達し、弾力性に富んでおり、その構造が相違していると考えられている。すなわち、先行研究によれば、坐り加熱ゲル中のタンパク質の分散状態はより均一で網目構造は密であることが報じられている。加熱ゲルに特有な三次元の網目構造の形成機構は、タンパク質化学的には未だ解明されていないが、隣接するポリペプチド鎖間の疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合、およびジスルフィド架橋などが加熱ゲル形成に相対的に寄与するとされている。

続く第 3 章では、ホッケおよびスケトウダラの冷凍すり身から卵白粉末添加の有無の下で形成された坐り加熱ゲルと非坐り加熱ゲルについて、加熱ゲル中のタンパク質の各種溶媒（NaCl, 尿素, メルカプトエタノールから成る）に対する溶解度を測定し、加熱ゲルの構造形成に関与するタンパク質間の結合（または相互作用）のタイプとそれらのバランスを予測する研究を行った。また、3種のタンパク質添加物（卵白, 大豆タンパク質およびカゼインナトリウム粉末）の影響を比較し、それらの加熱ゲルの構造形成に関与するタンパク質間の結合タイプを比較する試みも行った。その結果、非坐り加熱ゲルと、坐り加熱ゲルでは、ゲル構造の形成に関与するタンパク質間の結合力のタイプが全く異なることが明らかになった。すなわち、非坐り加熱ゲル中のタンパク質はその大部分が 0.6 M NaCl-8.0 M

尿素-2%メルカプトエタノール溶媒 (S4) に溶解した。0.6 M NaCl-8.0 M 尿素溶媒 (S3) への溶解度との差から、疎水性相互作用がゲル形成に強く関与すること、また卵白粉末と大豆タンパク質粉末を加えると S-S 結合も関与することがわかった。一方、坐り加熱ゲル中のタンパク質は、予備加熱の進行に伴って 0.6 M NaCl-8.0 M 尿素-2%メルカプトエタノール溶媒 (S4) に溶解しなくなり、不溶性成分が増加した。卵白粉末や大豆タンパク質粉末を加えると加熱ゲル中のタンパク質の不溶化を促進するが、カゼインナトリウム粉末はむしろ抑制した。この不溶性成分は 2%ドデシル硫酸ナトリウム-8.0 M 尿素-2%メルカプトエタノール (S5) には完全に溶解するので、極めて強い結合力により坐りゲル形成に関与すると推定された。しかし、これらの結果からは、加熱ゲルの構造形成に関与するすり身に含まれている数種以上に及ぶタンパク質成分の中で、どの成分間にどのようなタイプの結合力が作用しているかは、予想できない。

そこで第 4 章では、上記の溶媒に溶解するタンパク質成分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析し、ゲル構造に関与するタンパク質成分と結合力のタイプを特定して、坐りゲル形成能との関わりや卵白粉末によるゲル物性の増強効果との関わりを検討する試みを行った。その結果、加熱ゲルの形成に参加するすり身中の主要なタンパク質成分は、ホッケではミオシン重鎖と X1 成分（より正確に言えば、直加熱ゲルではミオシン重鎖が主体で、また二段加熱ゲルではミオシン重鎖と X1 成分が主体）で、これらがアクチンとともに強い S-S 結合と疎水性相互作用を介してゲル形成に関与する一方、スケトウダラでは、ミオシン重鎖とミオシン重鎖の多量体（直加熱ゲルではミオシン重鎖が主体で、二段加熱ゲルではミオシン重鎖の多量体が主体）で、これらがアクチンとともに、極め

て強い結合力（強い疎水性相互作用，S-S 結合およびおそらく他にイソペプチド結合などの協調作用）を介してゲル形成に関与することが示唆された。

以上のように，本論文では，練り製品原料として使われている 2 種の魚類の冷凍すり身から調製される魚肉に特有な異なるタイプの加熱ゲル（非坐り加熱ゲルと坐り加熱ゲル）について，レオロジカルな物性上の特徴，卵白粉末など各種タンパク質粉末の添加によるゲル物性改良効果の相違および形成されるタンパク質の加熱ゲル構造上の差異と添加物による影響の差異について新しい知見を得ることができた。

加熱ゲルの物性値と予備加熱時間との関係を調べたところ，非坐り加熱ゲルの場合は経時変化がほとんど見られず，坐り加熱ゲルを形成する場合は経時的な増加が認められた。また，この変化の様式は，卵白粉末を添加しても変わらないので，いずれの加熱ゲル形成の場合も，添加した卵白由来のタンパク質は消失することなく，ゲルの構造形成に参加して，その物性に寄与すると考えられる。これまでに，卵白粉末に含まれるタンパク質成分の中にトリプシンなど，プロテアーゼ活性を阻害する作用があることが知られているため，この阻害作用がすり身中のタンパク質成分を保護し，加熱ゲル製品の物性改良に役立つという説が多く，それを立証するための研究成果も既に報じられている（山下，2003）。山下らは，スケトウダラの冷凍すり身の加熱ゲル形成に対する鶏卵成分の影響を調べており，卵白成分（卵アルブミン）は直加熱ゲルのゲル強度（BS×bs）を増加するが，坐り加熱ゲルの場合は効果が弱く，また戻りを抑制する効果が著しいと報じている（山下ら，1995）。高橋らは，ホッコクアカエビの加熱ゲル形成に対する卵白の影響について研究し，エビの筋肉は 5%卵白の共存下で 50～90℃において加熱ゲル

を形成するが、30～40℃で坐り加熱ゲルを形成しないこと、また、60℃での加熱ゲル形成では卵白は MHC の分解を著しく抑制するが、40℃では強い阻害作用を示さないことから、卵白を添加したエビ筋肉の至適な加熱条件を見出した。しかし、坐りを示す 40℃での卵白の添加効果は、プロテアーゼの阻害作用だけでは説明できないと報じている（高橋ら、2015）。これら一連の研究成果から、形成される加熱ゲルの物性に対する卵白による改良効果は、加熱ゲルに利用される原料魚介類の種類、加熱ゲル形成の条件、さらに添加する卵白の量的割合などによって、複雑に影響され、変動すると考えられる。一方、添加した卵白が混在しているプロテアーゼ活性を阻害して加熱ゲルの物性改善に役立つこと、また、プロテアーゼが混入しないか、またはその活性が低い時は、卵白由来のタンパク質が原料肉（すり身）タンパク質とともに協調してタンパク質ゲルの構造形成に参加し、物性の強化に利用されると考えられる。

現在は、アレルギー物質を含む食品に関する表示が義務付けられており、卵白は症状の重さや患者数の多さなどから、必ず表示しなければならない 7 品目に挙げられている。アレルギーフリーの水産練り製品の製造には、今後卵白の代替品を探す必要があるが、本研究で行った研究方法や成果の解析法を使って、添加物についてより広領域にわたる探索を続け、それを利用するより高度な技術の開発、製品の品質向上を果たすことが研究上の今後の急務であると考えている。

実際の水産練り製品の製造では、様々な魚種のすり身を使用しており、その中にはパシフィックホワイティングなど寄生虫由来のプロテアーゼによってゲル形成能が劣化するもの（加藤ら、2003）や、すり身ではうま味や魚種独特の風味が減少しているので、あえてエキス成分や水溶性タンパク質を含み、かつ自己消化

を促す各種の酵素を混在している落とし身を使用する場合もあるので、卵白は本研究の成果や上記の文献にある両方の作用を持つゲル物性改良剤として非常に貴重である。また、どちらの効果を重視するかによって、その添加濃度や攪拌時に加えるタイミングなど適切な技術的対応が異なってくるので、本研究にて得られた情報を基にして、すり身の加熱ゲル形成能を最大限に引き出し、原料である冷凍すり身の有効利用に繋がる路を拓くことが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり，多大なご支援とご指導を賜りました東京海洋大学 濱田奈保子教授，元東海大学海洋学部 故加藤 登教授，東京海洋大学 岡崎恵美子教授ならびに酪農学園大学 船津保浩教授に深く感謝，厚く御礼を申し上げます．本論文を審査いただきました東京海洋大学 鈴木徹教授に御礼申し上げます．

また，本研究を進め，論文をまとめるにあたり，多くのご指導，ご協力を頂きました，社団法人全国すり身協会 技術顧問 新井健一博士（元北海道大学水産学部教授，元酪農学園大学客員教授）に深く感謝申し上げます．

社会人での学位取得にあたり，様々なご配慮を頂きました，株式会社紀文食品 取締役兼専務執行役員 弓削 渉氏，商品・技術開発室製品開発部長 伊藤寿美氏，そして研究開発室の皆様にも厚く御礼申し上げます．

共同で研究を行った奥村知生氏，渡邊宗一郎氏，そしてご協力を頂いた東海大学加藤研究室の学生諸氏に感謝の意を表します．

最後に，これまで温かく見守り支援して下さった両親，姉に対して，深い感謝の意を表して謝辞と致します．

公表論文（学位論文内容に関わる審査付論文）

1. 國本弥衣, 奥村知生, 渡辺宗一郎, 加藤登, 新井健一, 各種タンパク質粉末を添加した冷凍すり身加熱ゲルのレオロジー的性質とタンパク質の溶解性との関係, 日本食品科学工学会誌, 60, 567-576 (2013).
2. 國本弥衣, 奥村知生, 加藤登, 新井健一, タンパク質の溶解性からみた冷凍すり身加熱ゲルの特徴と卵白添加の影響, 日本食品科学工学会誌, 61, 19-26 (2014).
3. Kunimoto, M., Hamada-Sato, N., Kato, N., Main protein components in frozen surimi contributed to heat-induced gel formation, International Food Research Journal (5th February 2016 accepted).

参考論文

1. 加藤 登, 鈴木康宏, 國本弥衣, 北上誠一, 村上由里子, 新井健一, 三種の魚肉すり身製加熱ゲルの物性に及ぼす豚血漿と卵白粉末の添加効果の比較, 日本食品科学工学会誌, 57, 26-31 (2010).
2. 加藤登, 藤井陽介, 國本弥衣, 北上誠一, 新井健一, 三種の魚類冷凍すり身に卵白粉末を添加した加熱ゲルの物性値とタンパク質濃度との関係, 日本食品科学工学会誌, 57, 414-419 (2010).
3. 加藤 登, 阿部洋一, 安永廣作, 中川則和, 佐藤繁雄, 國本弥衣, 新井健一, 加熱ゲル形成能からみたスケトウダラ冷凍すり身の品質に関する研究の展開, 東海大学紀要海洋学部「海－自然と文化」, 9, 1-11 (2011).
4. 加藤 登, 國本弥衣, 後藤慶一, 北上誠一, 新井健一, 押し込み試験法によるすり身加熱ゲル形成能の評価の適用性, 東海大学紀要海洋学部「海－自然と文化」, 印刷中 (2016).

引用文献

- An, H., Weerasinghe, V., Seymour, T. A. and Morrissey, M. T., Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. *Journal of Food Science*, 59, 1013-1017 (1994).
- Arnold, H. and Pette, D., Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *European Journal of Biochemistry*, 6, 163-171 (1968).
- Chang-Lee, M. V., Lampila, L. E. and Crawford, D. L, Yield and composition of surimi from Pacific whiting (Merluccius products) and the effect of various protein additives on gel strength. *Journal of Food Science*, 55, 83-85 (1990).
- CODEX, Report of the twenty-seventh session of the Codex committee on fish and fishery products. Codex Alimentarius Commission, ALINORM 05/28/18, 154-156 (2005).
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M., Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 763-765 (1949).
- Hu, Y., Morioka, K. and Itoh, Y., Distribution of cathepsins B, H, L and Trypsin-like proteases in natural actomyosin from washed meat of various fishes. *Fisheries Science*, 74, 693-695 (2008a).
- Hu, Y., Morioka, K. and Itoh, Y., Effect of meat-bleaching and dilution-precipitation procedures on the removal of cathepsin L-like contained in the actomyosin of various fish species. *Fisheries Science*, 74, 696-698 (2008b).

- Kim, B. Y. and Park J. W., Rheology and texture of surimi-based gels. In “Surimi and Surimi Seafood”, eds. Park, J. W., Marcel Dekker, New York, pp. 267-324 (2000).
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- Lanier, T.C., Surimi gelation chemistry. In “Surimi and Surimi Seafood”, eds. Park, J. W., Marcel Dekker, New York, pp. 239-266 (2000).
- Niwa, E., Chemistry of surimi gelation. In “Surimi Technology”, eds. Lanier, T.C. and Lee, C.M., Marcel Dekker, New York, 389-427 (1999).
- Pérez-Mateos, M., Lourencüo, H., Montero, P. and Borderi´as, A.J., Rheological and biochemical characteristics of high-pressure- and heat-induced gels from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 44-49 (1997).
- 阿部洋一, 牛血漿粉末を添加したスケトウダラかまぼこの品質, 日本水産学会誌, 60, 779-785 (1994).
- 阿部洋一, 安永廣作, 北上誠一, 村上由里子, 太田隆男, 三堀友雄, 新井健一, TGase 製剤または牛血漿粉末を添加して調製したかまぼこゲルの特徴, 日本水産学会誌, 62, 446-452 (1996).
- 阿部洋一, かまぼこゲルの品質に及ぼす微生物起源のトランスグルタミナーゼと牛血漿タンパク質の影響, 学位論文, 東京水産大学, 東京, 66-77 (1998).
- 新井健一, 山本常治, 冷凍すり身の使い方, 「冷凍すり身」, 第1版, (日本食糧新聞社, 東京), pp. 262-263 (1986).

石原良三，森下貞二，水産練製品への利用，「卵—その化学と加工技術—」，第 1 版，太陽化学株式会社編，（光琳，東京），pp. 291-297（1985）.

一島栄治，食肉の熟成，「食品工業と酵素」，第 1 版，（朝倉書店，東京），pp. 120-130（1983）.

岡崎恵美子，かまぼこの物性の評価技術，「かまぼこの科学と技術」，第 1 版，山澤正勝，関 伸夫，福田 裕編，（恒星社厚生閣，東京），pp. 328-348（2003）.

岡田 稔，動物性タンパク質素材，「かまぼこの科学」，第 1 版，（成山堂書店，東京），pp. 204-208（1999）.

加藤 登，及川 寛，安永廣作，矢野 豊，阿部洋一，新井健一，Pacific whiting 冷凍すり身のゲル化特性と牛血漿粉末添加の影響，東海大紀要，56，49-61（2003）.

加藤 登，及川 寛，安永廣作，矢野 豊，北上誠一，新井健一，Pacific whiting 冷凍すり身とスケトウダラ混合肉糊のゲル化特性と牛血漿粉末の影響，東海大紀要，2，45-53（2004）.

加藤 登，藤井陽介，國本弥衣，北上誠一，新井健一，三種の魚類冷凍すり身に卵白粉末を添加した加熱ゲルの物性値とタンパク質濃度との関係，日本食品科学工学会誌，57，414-419（2010）.

加藤 登，阿部洋一，安永廣作，中川則和，佐藤繁雄，國本弥衣，新井健一，加熱ゲル形成能からみたスケトウダラ冷凍すり身の品質に関する研究の展開，東海大学紀要海洋学部「海—自然と文化」，9，1-11（2011）.

加藤 登，國本弥衣，後藤慶一，北上誠一，新井健一，押し込み試験法によるすり身加熱ゲル形成能の評価の適用性，東海大学紀要海洋学部「海—自然と文化」，印刷中（2016）.

かまぼこ新聞編,「蒲鉾年間平成 27 年版」, 第 1 版, (食品経済社, 千葉), pp. 116

(2015).

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, 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, 354-364

(2004).

北上誠一, 村上由里子, 安永廣作, 加藤 登, 新井健一, スケトウダラ冷凍すり
身タンパク質のゲル形成能とその濃度依存性, 日本水産学会誌, 71, 957-964

(2005).

北上誠一, 村上由里子, 小関聡美, 加藤 登, 新井健一, スケトウダラ例とすり
身構成成分が加熱ゲルの物性に及ぼす影響, 日本水産学会誌, 74, 199-206(2008).

北上誠一, 村上由里子, 安永廣作, 阿部洋一, 加藤 登, 新井健一, 加熱ゲルの
物性値とそのタンパク質濃度依存性から見た各種の等級のスケトウダラ冷凍す
り身の加熱ゲル形成能, 日本水産学会誌, 75, 250-257 (2009).

木村郁夫, 練り製品中の挙動,「水産加工とタンパク質の変性制御」, 新井健一編,
(恒星社厚生閣, 東京), pp. 73-80 (1991).

小関聡美, 藤井陽介, 加藤 登, 安永廣作, 北上誠一, 新井健一, スケトウダラ
とパシフィックホワイティングの混合肉糊から調製した坐りを伴った加熱ゲル
と坐りを伴わない加熱ゲルの品質に対する牛血漿粉末の効果, 東海大紀要, 4,
21-29 (2006).

今野久仁彦, 今村浩二, スケトウダラ肉糊の加温中に生成する 150 および 70kDa
成分の同定とその存在状態, 日本水産学会誌, 66, 869-875 (2000).

佐藤繁雄, 弓削 渉, 後藤慶一, 加藤 登, 新井健一, 3 魚種から混成したすり身の

- 坐り加熱ゲル形成能, 東海大学紀要海洋学部「海—自然と文化」, 13, 1-9 (2015).
- 柴真, 動物性タンパク質, 「水産練り製品入門」, 第1版, 日本食糧新聞社, 東京, pp. 64-65 (2003).
- 社団法人全国すり身協会, すり身関係統計諸資料, (社団法人全国すり身協会, 札幌), pp. 1-25 (2015).
- ジャンークラウドシェフテル, ジャンールイクック, ドロニーロリアン, タンパク質ゲル形成の概論, 「食品タンパク質ハンドブック」, 第1版, (N.T.N, 東京), pp. 60-65, 26-47, 155-210 (1988).
- 水産庁, 冷凍すり身の品質検査基準の設定について, 水産庁漁政部長通達, 6水漁第1065号 (1994).
- 鈴木 潤, 北上誠一, 村上由里子, 安永廣作, 加藤 登, ホッケとスケトウダラ混合肉のゲル形成能と牛血漿粉末による加熱ゲルの品質改良, 平成17年度日本水産学会大会要旨集, p. 157, 東京 (2005).
- 鈴木 潤, 藤井陽介, 小関聡美, 加藤 登, 北上誠一, ホッケとスケトウダラおよび混合肉のりから調製した加熱ゲルの品質に対する乾燥卵白の添加効果, 東海大紀要, 6, 27-35 (2008).
- 高橋希元, 板倉もね, 雨宮弘和, 岡崎恵美子, Ha Thi Nhu Nguyen, 大迫一史, 卵白がホッコクアカエビ *Pandalus eous* 筋肉の加熱ゲル形成能に及ぼす影響, 日本水産学会誌, 81, 987-994 (2015).
- 田中敏治, しなやかなゲルを形成する新しい乾燥卵白の機能と食品における効果, 食品と科学, 7, 71-77 (2005).
- 日刊シーフーズ・ニュース編集局, 日刊水産通信編集局, 冷凍スリミの需給と市

- 況の動向, 「水産物パワーデータブック」, 第 1 版, (水産通信社, 東京), pp. 242-283 (2009).
- 丹羽栄二, かまぼこの足とその補強—メカニズム研究の現状—, 食品加工技術, 10, 88-94 (1990).
- 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, 坐りに伴うミオシン重鎖の交差結合に及ぼす冷凍すりみの品質の影響, 日本水産学会誌, 53, 633-639 (1987).
- 牧之段保夫, 中川孝之, 安藤正史, 松野 智, 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, 654-658 (1996).
- 水田尚志, コラーゲンの性状とゲル形成, 「かまぼこの足形成」, 第 1 版, 関 伸夫, 伊藤慶明編, (恒星社厚生閣, 東京), pp. 86-97 (2001).
- 安井 勉, 筋原線維の構成タンパク質, 魚介類筋肉の主要成分, 「水産食品学」, 須山, 鴻巣編, (恒星社厚生閣, 東京), pp. 22 (1993).
- 安永廣作, 阿部洋一, 西岡不二男, 新井健一, 牛血漿粉末を加えたスケトウダラとサケの予備加熱ゲルと二段加熱ゲルの品質, 日本水産学会誌, 64, 779-785 (1998).
- 山下民治, 関 伸夫, スケトウダラかまぼこゲルの物性に及ぼす鶏卵成分の影響, 日本水産学会誌, 61, 580-587 (1995).
- 山下民治, 関 伸夫, スケトウダラ肉糊の坐りに及ぼす大豆および小麦タンパク質添加の影響. 日本水産学会誌, 62, 806-812 (1996).
- 山下民治, 関 伸夫, スケトウダラ肉糊の坐りに及ぼす糊化でん粉添加の影響. 日本水産学会誌, 67, 881-886 (1999).

山下民治, 各種副素材の添加効果, 「かまぼこその科学と技術」, 第 1 版, 山澤正

勝, 関 伸夫, 福田 裕編, (恒星社厚生閣, 東京), pp. 273-295 (2003).

若松利男, 鶏卵タンパク質のゲル化に及ぼす要因とその機構, *New Food Industry*,

27, 61-70 (1985).