スケトウダラすり身加熱ゲルの戻りに及ぼす 豚プラズマ成分の影響

谷本 昌太,^{1*} 山下 民治,¹ 関 伸夫²

(2003 年 6 月 26 日受付, 2003 年 11 月 18 日受理)

¹広島県立食品工業技術センター, ²北海道大学大学院水産科学研究科

Effect of pig plasma components on the modori of walleye pollack surimi gel

SHOTA TANIMOTO,¹ TAMIHARU YAMASHITA¹ AND NOBUO SEKI²

¹Hiroshima Prefectural Food Technology Research Center, Hiroshima 732-0816, ²Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido, 041-8611, Japan

Pig plasma was freeze dried and fractionated into 5 fractions, namely I, II + III, IV-1, IV-4, and V, according to the method of Cohn. Walleye pollack surimi paste was prepared by mixing surimi with 2.7% NaCl and 25% water containing various amounts of pig plasma powder or plasma fractions and then preheated at 60°C for 0-120 min to induce modori prior to heating at 90°C for 30 min. During preheating, the surimi gel strength and deformation greatly decreased. The addition of pig plasma more than 0.2% completely inhibited not only modori but also the breakdown of myosin. To investigate active components in pig plasma, each fraction was added to the surimi paste and heated at 60°C. The fractions II + III and IV-4 showed higher inhibitory effects on modori and myosin degradation. The mixture of fractions II + III and IV-4 almost completely inhibited both reactions. These results suggest that the modori inhibitory activity of pig plasma is mainly ascribed to the inhibition of myosin degradation by more than two components in the fractions II + III and IV-4 containing proteinase inhibitors.

キーワード：豚プラズマ成分, 戻り, スケトウダラ, 加熱ゲル

魚肉肉糊の熱ゲル化でいったん形成されたゲルが 50°C から 60°C 付近の温度帯において脆弱化したり, 崩壊したりする現象を戻りと言う。戻りを生じたかまぼこは品質が著しく劣化することから, かまぼこ製造企業にとってその防止は重要な課題となっている。戻りが生じる原因としては, 加熱ゲル形成時にアクトミオシンの構造が変化する場合と魚肉中に存在するプロテアーゼによってミオシンが分解される場合とが知られている。¹⁾

家畜がと殺される際に副産物として生じるプラズマは, 高い食品機能特性^{2,3)}とプロテアーゼ阻害活性^{4,5)}を有することが知られている。そのため, これまでに様々な種類の魚肉ゲルへの添加効果が検討され,⁶⁻¹⁵⁾特にゲル形成能の弱い魚種に対するゲル形成能の増強¹⁰⁻¹³⁾や戻りの抑制^{14,15)}に大きな効果を有することが報告されている。また, これらの効果はプラズマ中に存在するプロテアーゼインヒビターによると考えられている。例えば, 牛プラズマによるパンフィクホワイティング¹⁰⁾や

アラスカアブラガレイ¹³⁾のゲル増強効果にプロテアーゼインヒビターの一つである α_2 -マクログロブリンの関与が報告されている。しかし, かまぼこの主要原料であるスケトウダラの戻りに対する抑制効果については, プラズマ中のいかなる成分がどのように作用しているのかは明らかにされていない。

一方, 我が国においては豚由来のプラズマが生産され, その有効利用が望まれている。しかし, これまでの研究は牛由来のものが多く,^{6-8,10-15)}しかも, その大部分は噴霧乾燥等を行った市販プラズマ製品を用いており, 製造過程での加熱等によりタンパク質やプロテアーゼインヒビター等が変性している可能性がある。より自然に近い状態のプラズマの影響を調べるには, 凍結乾燥などの温和な処理をした試料を用いて検討する必要がある。これまでに筆者らは, 豚プラズマを魚肉ゲルへ利用する目的でスケトウダラすり身の直接加熱ゲル (90°C, 30 分間) に対する豚プラズマ凍結乾燥物の添加効果を

調べた。⁹⁾ その結果、豚プラズマは 2-3% までの添加量であれば市販のかまぼこらしい食感を保った状態で弾力を増強できることがわかった。

そこで、本研究では凍結乾燥した豚プラズマのスケトウダラすり身加熱ゲルの戻りに及ぼす影響を調べた。さらに豚プラズマのタンパク質成分を Cohn et al. の方法¹⁶⁾ により分画し、各画分の戻りに及ぼす影響について詳しく検討した。

実験方法

試料 魚肉としてスケトウダラ *Theragra chalcogramma* の冷凍すり身（アメリカンシーフーズ社製，アメリカ，SA 級）を用いた。添加物としてショ糖 4%，ソルビトール 4%，重合リン酸塩 0.25% を含んでいた。豚プラズマは南日本畜産血液センター協同組合製の凍結品（0.07% のクエン酸を含む）を蒸留水で透析してクエン酸を除去後、凍結乾燥して用いた。凍結乾燥した豚プラズマの一般成分は、水分 2.1%，灰分 0.8%，タンパク質 94.8%，粗脂肪 0.1% であった。豚プラズマのタンパク質成分の分画は、Cohn et al. の方法¹⁶⁾ により行った。すなわち、豚プラズマ中のタンパク質のエタノール濃度、イオン強度および pH に対する溶解度の違いを利用して I、II + III、N-1、N-4、V の 5 つの画分に分画した。分画した成分の割合は I 画分が 10.7%，II + III 画分が 34.4%，N-1 画分が 3.4%，N-4 画分が 17.5%，V 画分が 32.9% であった。

加熱ゲルの調製 5℃ で解凍した冷凍すり身に塩化ナトリウムを終濃度で 2.7% (W/W) 加え、20 分間らいかいした。これに豚プラズマまたは豚プラズマ成分と蒸留水の合計値が常に 25% (W/W) になるように添加し、さらに 10 分間らいかいして肉糊を調製した。肉糊をポリ塩化ビニリデンケーシング（直径 3 cm）に 140 g ずつ詰め、60℃ で 0, 60, 120 分間加熱後、直ちに 90℃, 30 分間加熱してゲルを調製した。なお、60℃ で加熱せず直接 90℃ で 30 分間加熱したものを以下直接加熱ゲルと表記した。加熱ゲルは流水中で冷却後、10℃ に一晩放置し、各種の測定に供した。

加熱ゲルの物性測定 加熱ゲルの破断強度および凹みの大きさは、レオメーター（不動工業株式会社製，NRM-2010J-CW 型）により測定を行った。測定条件は、試料の高さを 3 cm とし、球形プランジャー（直径 0.5 cm）を用い、試料ゲルへの貫入速度を 6 cm/min、測定温度を 25℃ とした。なお、破断強度および凹みの大きさの測定値は、4 試料の平均および標準偏差として表した。

加熱ゲルの可溶化と可溶化率の測定 SDS-PAGE の試料の調製は、沼倉らの方法¹⁷⁾ に準じて行った。すなわち、細切した加熱ゲル 0.4 g に 7.5 mL の SDS-尿素

混合液（2% SDS-8M 尿素-2% 2-メルカプトエタノール，20 mM トリス塩酸，pH 8.0）を加え、100℃ で 2 分間加熱した後、室温で 20 時間攪拌し、タンパク質を可溶化させた。加熱ゲルのタンパク質の SDS-尿素混合液に対する可溶化率の測定は、前報¹⁸⁾ と同様に行った。

SDS-PAGE SDS-PAGE は 0.05% の SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドを用いて、Laemmli の方法¹⁹⁾ によって行った。SDS-PAGE への供試量は魚肉タンパク質の 20 μ g とした。

結果および考察

豚プラズマの加熱ゲルの戻りに及ぼす影響 加熱ゲルの戻りに対する豚プラズマの影響を検討した。豚プラズマを 0~3% 添加した肉糊を 60℃ で 0~120 分間加熱後、直ちに 90℃, 30 分間加熱して調製した加熱ゲルの破断強度と凹みの大きさを Fig. 1 に示した。直接加熱

Fig. 1 Effect of pig plasma on the gelation of walleye pollock surimi paste. The paste was heated at 60℃ for up to 120 min prior to heating at 90℃ for 30 min. Textural properties of the gel were measured on a rheometer equipped with a ϕ 0.5 cm plunger at 25℃. The data are presented as means of 4 specimens. The bars indicate the standard deviations. ○, control (without pig plasma); △, with pig plasma 0.2%; □, with pig plasma 0.5%; ▽, with pig plasma 1.0%; ●, with pig plasma 3.0%.

ゲルの破断強度 (Fig. 1, 0 時間) は, 豚プラズマの添加量が多くなるにつれて大きくなった。凹みの大きさは, 豚プラズマの添加量が 0.5% のときに最大値を示し, それ以上添加すると幾分か低下した。これらの結果から, 豚プラズマは, 直接加熱ゲル形成に対して弾力補強効果を持つことが認められた。

次に, 60℃で120分間まで加熱した時の破断強度は, 豚プラズマ無添加の場合, 加熱時間の経過とともに急激に低下し, 直接加熱ゲルでは 260 g であったものが加熱 120 分後には 45 g になった。一方, 豚プラズマを 0.2~3% 添加した場合は, 60℃で120分間加熱後でも破断強度の低下はみられなかった。凹の大きさは, 60℃で120分間加熱すると, 豚プラズマ無添加の場合, 加熱時間の経過とともに低下した。しかし, 豚プラズマを添加した場合は, いずれの添加量においてもその低下する割合は, 無添加のものと比べて小さかった。これらの結果から, 豚プラズマはスケトウダラすり身加熱ゲルの 60℃における戻りを抑制する効果も有していると考えられる。

次に, 戻りを抑制する原因を調べるため, Fig. 1 と同じ条件で調製した加熱ゲルの筋原繊維タンパク質のサブ

ユニット成分を SDS-PAGE により分析した。結果を Fig. 2 に示した。加熱ゲル中のタンパク質の SDS-尿素混合液に対する可溶化率は, 豚プラズマの添加量にかかわらずほぼ 100% であった。豚プラズマ無添加の場合, 60℃での加熱時間の経過とともに, ミオシン重鎖の減少とミオシンが分解して生成されたと考えられるバンドの増加が観察された。これに対して, 豚プラズマを添加した場合は, いずれの添加量においても, 60℃, 120 分間加熱してもミオシン重鎖は減少せず, また, ミオシンが分解して生成されたと考えられるバンドの増加も観察されなかった。これらのことから, 豚プラズマはミオシン重鎖の分解を抑制し, 戻りを抑制していることが示唆された。牛プラズマ¹⁵⁾やその加水分解物¹⁴⁾についてもスケトウダラ, アラスカアブラガレイ, パシフィックホワイティングの魚肉ゲルのミオシン重鎖の分解を抑制し, 戻りを抑制することが報告されており, 今回の実験も同様の結果が得られた。

豚プラズマ成分の加熱ゲルの戻りに及ぼす影響 豚プラズマの戻りに対する抑制効果がいかなる成分に由来するかを調べるために, 豚プラズマのタンパク質成分を Cohn et al. の方法¹⁶⁾によって分画した。そして, 各画

Fig. 2 SDS-PAGE of walleye pollack surimi gels with pig plasma. The surimi paste was heated at 60℃ for up to 120 min prior to heating at 90℃ for 30 min. Each 20 μ g protein was applied on the lane. MHC, myosin heavy chain; Ac, actin; Arrow head shows protein component from pig plasma. a, control (without pig plasma); b, with pig plasma 0.2%; c, with pig plasma 0.5%; d, with pig plasma 1.0%; e, with pig plasma 3.0%.

Fig. 3 Properties of walleye pollack surimi gel with pig plasma components fractionated by the method of Cohn. The surimi paste was heated at 60°C for up to 120 min prior to heating at 90°C for 30 min. Textural properties of the gel were measured on a rheometer equipped with a $\phi 0.5$ cm plunger at 25°C. Pig plasma was fractionated into I (Δ), II+III ($\blacksquare$), IV-1 (∇), IV-4 ($\diamond$) and V ($\circ$) by the method of Cohn (Ref. 16). $\square$, control (without pig plasma); $\bullet$, with pig plasma (0.5%). The data are presented as means of 4 specimens. The bars indicate the standard deviations.

Fig. 4 Properties of walleye pollack surimi gel with a mixture of II+III and IV-4. The surimi paste was heated at 60°C for up to 120 min prior to heating at 90°C for 30 min. Textural properties of the gel were measured on a rheometer equipped with a $\phi 0.5$ cm plunger at 25°C. The data are presented as means of 4 specimens. The bars indicate the standard deviations. $\bullet$, control (without pig plasma); Δ , with a mixture of II+III and IV-4; $\square$, with reconstructed pig plasma from all separated fractions; $\circ$, with pig plasma (0.5%).

分をスケトウダラすり身に添加し、60°Cで0～120分間加熱後、直ちに90°Cで30分間加熱して調製した加熱ゲルの物性測定を行った。結果をFig. 3に示した。なお、各成分の添加量はFig. 1の結果から豚プラズマを0.2%以上添加することで戻りを抑制することが分かったので、豚プラズマ0.5%中に含まれる割合（I画分は0.054%、II+III画分は0.170%、IV-1画分は0.017%、IV-4画分は0.088%、V画分は0.160%）とした。I、IV-1およびV画分を含むゲルの破断強度および凹みの大きさは、豚プラズマ無添加の場合と同じように60°Cでの加熱時間の経過とともに急激に低下した。一方、II+IIIとIV-4画分を添加したゲルは、他の画分に比べて破断強度および凹みの大きさの低下する割合が小さかった。これらの結果から、豚プラズマの戻り抑制効果は、II+IIIとIV-4画分にあると考えられた。しか

し、それらの画分を単独で添加したときの抑制効果は、あまり大きくなかった。

そこで、次にII+IIIとIV-4の両画分を混合して添加した時の戻りの抑制効果について調べた。II+III画分を0.170%、IV-4画分を0.088%混合して添加した肉糊を60°Cで0～120分間加熱後、直ちに90°Cで30分間加熱して調製した加熱ゲルの物性測定を行った。また、I、II+III、IV-1、IV-4、V画分を豚プラズマに含まれる割合に基づいて混合して調製した再構成プラズマについても検討を行った。結果をFig. 4に示した。破断強度は、豚プラズマ無添加の場合、60°Cでの加熱時間の経過とともに大きく低下するのに対して、II+IIIとIV-4の両画分を混合して添加した場合、60分間加熱してもほとんど変化せず、120分間加熱するとやや低下した。また、この破断強度の変化は、再構成した豚プラズマを

Fig. 5 SDS-PAGE of walleye pollack surimi gel with pig plasma components. The surimi paste was heated at 60°C for up to 120 min prior to heating at 90°C for 30 min. MHC indicates myosin heavy chain. Each 20 μ g protein was applied on the lane. MHC, myosin heavy chain; Ac, actin; Arrow head shows protein component from pig plasma. a, I; b, II + III; c, IV-1; d, IV-4; e, V; f, a mixture of II + III and IV-4; g, reconstructed pig plasma; h, with pig plasma (0.5%).

0.5% 添加した場合とほぼ同様の傾向を示した。II + III と IV-4 の両画分を混合して添加した場合や再構成した豚プラズマを添加した場合は、豚プラズマ無添加の場合と異なり、60°C で 120 分間加熱しても凹の大きさの低下はほとんど認められなかった。これらの結果は、豚プラズマの戻り抑制成分が、II + III と IV-4 の二つの画分に存在することを示唆している。

次に、II + III と IV-4 画分の戻りを抑制する原因を調べため、Fig. 3 および 4 と同じ条件で調製した加熱ゲルの筋原繊維タンパク質のサブユニット成分を 7.5% アクリルアミドを用いた SDS-PAGE により分析し、結果を Fig. 5 に示した。加熱ゲル中のタンパク質の SDS-尿素混合液に対する可溶化率は、いずれの試料においてもほぼ 100% であった。豚プラズマ無添加や I, IV-1 および V 画分は 60°C での加熱時間の経過とともにミオシン重鎖の減少とミオシンが分解して生成されたと考えられるバンドの増加が認められた。一方、II + III や IV-4 画分は、他の画分に比べてミオシン重鎖の減少を抑制することが観察された。また、II + III と IV-4 画分の両成分を混合して添加した場合は、豚プラズマや再構成した豚プラズマを 0.5% 添加した場合と同様に、60°C 加熱によるミオシン重鎖の減少をほぼ抑制していた。

I 画分に含まれるプロトランスグルタミナーゼである血液凝固Ⅲa 因子²⁰⁾は、イワシのゲル強度を増強することが報告されている。²¹⁾ しかし、I 画分はスケトウダラ

すり身加熱ゲルの戻りを抑制しなかった (Fig. 3, Fig. 5) ことから、血液凝固Ⅲa 因子は、豚プラズマによるスケトウダラの戻りの抑制にほとんど関与しないと考えられた。また、血漿中に最も多く含まれるタンパク質であるアルブミンは、V 画分に含まれ、²⁰⁾ パシフィックホワイティングのミオシン重鎖のプロテアーゼによる分解を阻害しないことが報告されている。¹²⁾ スケトウダラにおいても V 画分は、ミオシン重鎖の分解を抑制せず (Fig. 5)、アルブミンのスケトウダラの戻りへの影響は、小さいことが示唆された。

Kinoshita et al.²²⁾ は、戻りが起きる温度帯と戻り誘導プロテアーゼの所在により 12 種類の魚種を 5 つのグループに分類し、スケトウダラの戻りは、60°C で筋漿タンパク質中の戻り誘導プロテアーゼにより起こされるグループに属することを報告している。プラズマは、セリンプロテアーゼインヒビター、チオールプロテアーゼインヒビターやさまざまなプロテアーゼに対して阻害活性を持つ α_2 -マクログロブリンなど数多くのプロテアーゼインヒビターを含有する。²³⁾ 豚プラズマ成分の中で戻りの抑制効果が大きかった II + III は、 α_2 -マクログロブリン、インター- α -トリプシンインヒビターなどの、また、IV-4 は、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -アンチキモトリプシンなどのプロテアーゼインヒビターを多く含む画分である。²⁰⁾ Fig. 5 においてプラズマ成分の中で II + III や IV-4 画分は、他の画分と比べて戻りによるミオシン

重鎖の減少を抑制し、Ⅱ + ⅢとⅣ-4画分の両成分を混合して添加することでミオシン重鎖の減少に対して豚プラズマと同等の抑制効果を示した。杉山ら²⁴⁾は、卵白中のトリプシンインヒターであるオボムコイドがスケトウダラの魚肉ねり製品の戻りを抑制することを報告している。一方、筆者ら¹⁸⁾は、スケトウダラのカマボコの戻りを抑制する卵白の成分が単一の成分ではなく、少なくともオボアルブミン、コンアルブミン、オボムコイドの3種類に存在することを報告した。

これらのことから、豚プラズマによるスケトウダラすり身加熱ゲルの戻り抑制効果は、プロテアーゼインヒターを含むⅡ + Ⅲ、Ⅳ-4画分中の複数の成分の働きによると示唆された。今後、豚プラズマのⅡ + ⅢやⅣ-4画分中に含まれるプロテアーゼインヒター成分を単離することにより、豚プラズマのスケトウダラすり身加熱ゲルの戻り抑制物質の特定と抑制機構の解明ができるものと考えられる。

文 献

- 1) 関 伸夫. 貯蔵・加工中のタンパク質の変化. 「タンパク質の科学」(鈴木敦士, 渡部終五, 中川弘毅編) 朝倉書店, 東京. 1998; 116-125.
- 2) Hermansson AM, Lucisano M. Gel characteristics-water-binding properties of blood plasma gels and methodological aspects on the waterbinding of gel systems. *J. Food Sci.* 1982; **47**: 1955-1959.
- 3) 斉藤昌義, 石橋恵美子, 平 春枝. 血漿蛋白質の乳化特性. 日食工誌 1990; **37**: 805-809.
- 4) 斉藤昌義, 門間美千子, 千國幸一. 血漿蛋白質のもつプロテアーゼ阻害活性の食品素材への利用. 日食工誌 1992; **39**: 901-906.
- 5) Weerasinghe VC, Morrissey MT, An H. Characterization of active components in food-grade proteinase inhibitors for surimi manufacture. *J. Agric. Food Chem.* 1996; **44**: 2584-2590.
- 6) 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. 日水誌 1994; **60**: 779-785.
- 7) 阿部洋一, 安永広作, 北上誠一, 太田隆男. 等級の異なるスケトウダラ冷凍すり身のかまぼこの品質に対する牛血漿粉末添加の影響. 日水誌 1995; **61**: 750-755.
- 8) 阿部洋一, 安永広作, 北上誠一, 村上由里子, 太田隆男, 三崎友雄, 新井健一. TGase 製剤または牛血漿粉末を添加して調整したかまぼこゲルの特徴. 日水誌 1996; **62**: 446-452.
- 9) 谷本昌太, 山下民治. スケトウダラ魚肉ゲルの品質に及ぼす豚プラズマの影響. 広島県立食品工業技術センター研究報告 2000; **22**: 19-23.
- 10) Seymour TA, Peters MY, Morrissey MT, An H. Surimi gel enhancement by bovine plasma proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1997; **45**: 2919-2923.
- 11) Reppond KD, Babbitt JK. Protease inhibitors affect physical properties of arrowtooth flounder and walleye pollock surimi. *J. Food Sci.* 1993; **58**: 96-98.
- 12) Akazawa H, Miyauchi Y, Sakurada K, Wasson DH, Reppond KD. Evaluation of protease inhibitors in Pacific whiting surimi. *J. Aquat. Food Prot. Technol.* 1993; **2**: 79-95.
- 13) Wasson DH, Reppond KD, Babbitt JK, French JS. Effects of additives on proteolytic and functional properties of arrowtooth flounder surimi. *J. Aquat. Food Prot. Technol.* 1992; **1**: 147-165.
- 14) Hamann DD, Amato PM, Wu MC, Foegeding EA. Inhibition of modori (gel weakening) in surimi by plasma hydrolysate and egg white. *J. Food Sci.* 1990; **55**: 655-669.
- 15) Morrissey MT, Wu JW, Lin D, An H. Protease inhibitor effects on torsion measurements and autolysis of Pacific whiting surimi. *J. Food Sci.* 1993; **58**: 1050-1054.
- 16) Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 1946; **68**: 459-475.
- 17) 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. 坐りによる肉糊のゲル形成とミオシンの交差結合反応. 日水誌 1985; **51**: 1559-1565.
- 18) 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. 日水誌 1995; **61**: 580-587.
- 19) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
- 20) Heide K, Haupt H, and Schwick HG. Plasma Protein Fractionation: In Putnam FW (eds) The Plasma Protein III. Academic Press, New York, 1977; 545-596.
- 21) Jiang ST, Lee JJ. Purification, characterization, and utilization of pig plasma factor XIIIa. *J. Agric. Food Chem.* 1992; **40**: 1101-1107.
- 22) Kinoshita M, Toyohara H, Shimizu Y. Diverse distribution of four distinct types of Modori (gel-degradation)-inducing proteinases among fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1485-1492.
- 23) 篠原兵庫. 血漿プロテアーゼインヒター. 「プロテアーゼとそのインヒター—生理的意義および病態との関連」(早石修編) メジカルビュー社, 東京. 1993; 88-96.
- 24) 杉山雅昭, 三代達也, 塚正泰之, 鈴木鐵也, 高間浩蔵. 等殺菌価で加熱温度の異なるオボムコイド添加魚肉ねり製品の破断特性. 日水誌 1998; **64**: 73-81.