かまぼこの足形成に及ぼすシステインおよびシスチンの影響

伊藤慶明・吉中禮二・池田静徳

(1978年9月8日受理)

Effects of Cysteine and Cystine on the Gel Formation of Fish Meat by Heating

Yoshiaki Itoh^{*1,2}, Reiji YOSHINAKA^{*1}, and Shizunori IKEDA^{*1}

In order to elucidate the role of SH groups and SS bonds of fish protein in the gel formation of fish meat by heating, the effects of L-cysteine and L-cystine on the gel formation were examined. The gel forming ability was evaluated via the gel strength, which is given as the product of the tensile strength and the breaking length. By adding cysteine and cystine to the fish meat pastes from Alaska pollack, cod, tuna, and carp, the gel strengths of their gels were increased. Cystine added to carp meat paste and to carp actomyosin solution was reduced to cysteine upon heating. These findings indicate the possibilities that the promoting effects of cysteine and cystine on the gel formation are due not only to the oxidation of SH groups to intermolecular SS bonds by cystine, but also to the formation of mixed disulfides by SH-SS interchange and to the enhancement of SS interchange between protein molecules by cysteine.

かまぼこの足形成における魚肉タンパク質のSH基およびSS結合の役割については、まだよくわかっていない。岡田ら¹⁾および田端ら²⁾は、足形成の際のSH基の酸化によるタンパク質分子間のSS結合の形成に関して否定的な報告をしている。坐りにおけるSS結合の形成に関しても、丹羽ら³⁾により否定的な結果が報告されている。また、YASUIら⁴⁾およびSAMEJIMAら⁵⁾はウサギミオシンの加熱凝固にSH基の酸化によるSS結合の形成が直接関与していないと報告している。一方、田端ら²⁾は、SH試薬の添加によりかまぼこの足形成能が低下したと報告している。

本報では、かまぼこの足形成におけるタンパク質のSH基およびSS結合の役割を理解するための手がかりを得るため、かまぼこの足形成に及ぼすシステインおよびシスチンの添加効果を調べた。

実験材料および方法

試料 スケトウタラ (*Theragra chalcogramma*) 冷凍すり身は前報⁶⁾と同様、北海道の冷凍すり身業者から入手したものを用いた。マダラ (*Gadus macrocephalus*) およびマグロ (*Thunnus thynnus*) は舞鶴漁連より入手したもの、コイ (*Cyprinus carpio*) は養殖場より入手した活魚を用いた。

かまぼこの調製 冷凍すり身を用いた場合には、すり身 300 g に所定量の試薬を加え、8°C の低温室で 15 分間擂潰した。他の魚肉を用いた場合には、常法通り採肉・水晒した挽肉 400 g に対し 3% の食塩と所定量の試薬を加え、30 分間擂潰した。擂潰したすり身をクレハロンケーシングに充填し、8°C に 35 分間放置したのち、90±2°C で 60 分間加熱した。添加試薬は水溶液または水懸濁液として加えた。L-システイン塩酸塩およびL-システイン酸は添加直前にその溶液を中和した。添加液量は 300 g のすり身に対して 10 ml となるようにした。

ゲル強度の測定 志水ら⁷⁾の方法で環状の試料片(厚さ 3 mm)を作り、Food Rheometer (田葉井製作所製)で破断強度と破断伸長を測定した。これらの積をゲル強度 (g×cm) とした。

システインの定量 試料 1 g を 3% メタリン酸溶液 10 ml とともにガラスホモジナイザーでホモジナイズし、汙過後、汙液を GRUNERT ら⁸⁾のニトロプルシッド法によりシステインを定量した。シスチンを加えたアクトミオシン溶液中のシステインの定量は GAITONDE⁹⁾の酸ニンヒドリン法により行った。

アクトミオシンの調製 前報¹⁰⁾の方法にしたがって、コイ筋肉より WEBER-EDSALL 溶液でアクトミオシンを

^{*1} 京都大学農学部水産学科 (Dept. Fish., Fac. Agr., Kyoto Univ., Kyoto, 606 Japan).

^{*2} 現在の勤務先: 京都栄養専門学校食品学研究室 (Present address: Lab. Food Sci., Kyoto College of Nutritional Sciences, 18 Setogawa-cho, Saga-Tenryuji, Ukyo-ku, Kyoto, 616 Japan).

Fig. 1. Effect of L-cysteine on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The brayed-meat of Alaska-pollack, which was of a commercial product in frozen state, contained 2.5% of sodium chloride, 10% of D-sorbitol, 11.6% of protein, and 76% of moisture. The brayed-meat was mixed with L-cysteine at about 8°C for 15 min. The paste stuffed into casing was heated at 90°C for 60 min to form gel. Each value represents the mean $\pm$ S.D. for 5 determinations.

抽出し、沈殿・溶解を二回くり返して精製した。

実験結果

システインの効果 Fig. 1に示したように、スケトウタラ冷凍すり身 1g 当り 8 μ mol の L-システインを添加したとき、ゲル強度は最大になった。この効果がL-システインの SH 基によるものかどうかを確かめるため、SH 基が -H に置き換わった L-アラニンおよび -SO₃H に置き換わった L-システイン酸の足形成に及ぼす影響を

Fig. 2. Effects of L-alanine and L-cysteic acid on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The gel was prepared by the same procedure as described in Fig. 1. —●—: L-alanine, —○—: L-cysteic acid. Each value represents the mean $\pm$ S.D. for 5 determinations.

Fig. 3. Effect of L-cystine on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The gel was prepared by the same procedure as described in Fig. 1. Each value represents the mean $\pm$ S.D. for 5 determinations.

調べた。その結果、Fig. 2に示したように、L-アラニンおよびL-システイン酸の添加はともに全く効果がなかった。このことからシステインの添加効果はその SH 基に由来するものであり、そのアミノ基やカルボキシル基を含む SH 基以外の部分によるものでないと考えられた。

また、グルタチオンおよびチオ乳酸のような SH 化合物もシステインと同様、足増強効果を示した。すなわち、冷凍すり身 1g 当り 8 μ mol のグルタチオンあるいは 4 μ mol のチオ乳酸を添加したとき、かまぼこのゲル強度はいずれも対照の 1.5~1.6 倍であった。

シスチンの効果 Fig. 3に示したように、冷凍すり身 1g 当り 10~20 μ mol の L-シスチンを添加することによりゲル強度は最大となり、シスチンもまた足増強効果を持つことが認められた。この結果は、スケトウタラ冷凍すり身にシスチンを加えても、そのかまぼこのジェリー強度は対照とほとんど変わらなかったという三宅ら¹¹⁾

Fig. 4. Effect of the simultaneous use of L-cysteine and L-cystine on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The gel was prepared by the same procedure as described in Fig. 1. Each value represents the mean $\pm$ S.D. for 5 determinations.

Table 1. Effects of L-cysteine and L-cystine on the gel formation of fish meats from cod, tuna, and carp. Each dressed meat was chopped, washed with cold water, and minced. The minced meat was brayed in a mortar with 3% of sodium chloride and with L-cysteine or L-cystine. The resulting paste was stuffed into casing and heated at 90°C for 60 min to form gel

Fish used	Additive	$\mu\text{mol/g}$ of fish meat	Gel strength (g $\times$ cm)	pH ^{*4}	Protein ^{*5} (%)	Moisture ^{*5} (%)
Cod (<i>Gadus macrocephalus</i>)	None	—	89 $\pm$ 11 ^{*3}	6.52	15.9	80.7
	CySH ^{*1}	8	153 $\pm$ 18	6.52		
	CySSCy ^{*2}	10	139 $\pm$ 19	6.51		
Tuna (<i>Thunnus thynnus</i>)	None	—	386 $\pm$ 34	6.24	18.1	76.4
	CySH	8	408 $\pm$ 36	6.22		
	CySSCy	10	424 $\pm$ 41	6.24		
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	None	—	120 $\pm$ 15	6.22	24.5	71.0
	CySH	4	124 $\pm$ 15	6.18		
	CySH	8	149 $\pm$ 15	6.26		
	CySSCy	10	156 $\pm$ 13	6.27		

*1 L-Cysteine.

*2 L-Cystine.

*3 Mean value $\pm$ S.D. for 5 determinations.

*4 pH of fish meat paste before heating.

*5 Protein and moisture in fish meat gels.

報告とは異なっている。

システインおよびシスチンの併用効果 システインおよびシスチンのどちらもかまぼこの足を増強したので、これらの併用により相乗効果がみられるかどうかを調べた (Fig. 4)。L-システイン 8 μmol と L-シスチン 8 μmol とを併用したときのゲル強度は、それぞれ単独に添加されたときのゲル強度のほぼ中間の値となり、システインとシスチンの相乗効果は認められなかった。

二三の魚種のかまぼこの足形成に及ぼすシステインおよびシスチンの効果 システインおよびシスチンの足増強効果をスケトウタラ冷凍すり身以外の魚肉についてさらに確かめるため、マダラ、マグロ、およびコイの肉を用いて、それら試薬の効果を調べた。その結果、Table 1 に示したように、いずれの魚肉においても L-システインおよび L-シスチンの添加により、そのゲル強度は増加した。

コイ肉すり身に添加したシステインおよびシスチンの挙動 L-システインおよび L-シスチンを添加したコイ肉すり身の加熱前後におけるシステイン量を定量し、これらの添加試薬の作用機作を考えるための一助とした (Fig. 5)。システイン添加の場合、加熱前後とも添加したシステイン量の約 70% が、その添加量に関係なく検出された。シスチン添加の場合、加熱前ではシスチンのシステインへの還元はごくわずかであった。魚肉 1 g 当り 10 μmol の L-シスチンを添加した場合には、加熱後にかまぼこから 7.2 μmol のシステインが検出された。

Fig. 5. Cysteine content in the carp meat, to which L-cysteine or L-cystine was added, before and after heating at 90°C for 60 min. The carp meat was identical with that described in Table 1. : before heating, : after heating.

この加熱によるシスチンのシステインへの還元が、魚肉タンパク質とシスチンとの反応によるものかどうかを確かめるために、コイアクトミオシンに L-シスチンを添加し、種々の温度に温置後、システインを定量した。添加したシスチンはコイアクトミオシンにより還元され、その還元量は温置の温度が高いほど多かった (Fig. 6)。HAMM ら¹²⁾は、筋原繊維を加熱したとき、その加熱温度が高いほどタンパク質の SH 基の露出量が増加すると報告している。アクトミオシンの加熱においても、加熱温度が高いほど SH 基の露出量は増加し、そのため添加

Fig. 6. Reduction of L-cystine to cysteine by carp actomyosin during incubation at various temperatures for 20 min. Reaction mixture contained 53 mg of actomyosin and 1 μmol of L-cystine in 5 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 6.7.

したシスチンのシステインへの還元量が増加したものと推察される。

考 察

かまぼこの足がシステインおよびシスチンの添加により増強される機構として、タンパク質の SH 基および SS 結合とシスチンおよびシステインとの反応性から、次の三つの可能性が考えられる。

(1) シスチンがタンパク質の SH 基を酸化することによるタンパク質分子間 SS 結合の生成 (酸化反応): 臭素酸カリウム¹⁾ や α -ヒドロアスルビン酸⁶⁾ の添加によってかまぼこの足が強くなることは、タンパク質分子間に SH 基の酸化による SS 結合が形成されるためと考えられている。また、パン生地 of 抗張力も酸化剤によって大きくなること¹³⁾ や、フェリシアン化カリウムによって分子間に SS 結合が形成されること¹⁴⁾ が報告されている。本実験で、すり身に添加した L-シスチンが還元されたことから、タンパク質の SH 基が酸化されることが推測される。システインは、いったん酸化されてシスチンになって足増強効果をもたらすものと考えられる。

(2) タンパク質の SH 基とシスチン、およびタンパク質の SS 結合とシステインとの SH-SS 交換反応による混合ジスルフィドの生成 (SH-SS 交換反応): ウサギミオシンの SH 基と低分子 SS 化合物との間で SH-SS 交換反応が生じ、混合ジスルフィドが生成されることが報告されている¹⁵⁻¹⁸⁾。また、パン生地の混ねつ中に S³⁰ でラベルされたシステインおよびシスチンが、やはり SH-SS 交換反応によりタンパク質中にとり込まれることが確かめられている¹⁹⁾。

すり身やアクトミオン溶液に添加されたシスチンが還元されることから、(II) の反応が起っていることも考えられる。(III) および (IV) の反応のようなシステインによる分子間 SS 結合および分子内 SS 結合の切断が起っているとすると、システインの添加により検出されなかった残り 30% のシステインはタンパク質にとり込まれたのかもしれない。(II), (III), および (IV) の反応が起こるとすれば、システインおよびシスチンの添加により足が強くなったのは、タンパク質の分子間 SS 結合以外の分子間結合によるものと考えられる。

(3) システインが SS 交換反応を促進することによるタンパク質分子間 SS 結合の生成 (SS 交換反応): HUGGINS ら²⁰⁾ は、SH 基と SS 結合を持つタンパク質の尿素変性下でのゲル化の機構として、タンパク質分子間の交換反応 (V) による SS 結合の形成を推論した。

BENESCH ら²¹⁾ は分子内 SS 結合を導入したゼラチンの溶液に、わずかな SH 化合物を添加すると、SS 交換反応により分子間 SS 結合が促進され、熱に安定なゲルがすみやかに形成されたと報告している。タンパク質の熱変性においても SS 交換反応が起こるという報告がある²²⁻²⁴⁾。RYLE ら²⁵⁾ は、SS 化合物間の交換反応が SH 化合物により促進されることを証明している。

かまぼこの足形成に対するシステインの添加効果も、魚肉タンパク質分子間の SS 交換反応の促進によるものと考えられる。また、SS 化合物がタンパク質の SH 基と反応し混合ジスルフィドを形成したとき生成される SH 化合物が、タンパク質の SS 結合と反応するという報告²⁶⁾ がある。したがって、シスチンの足形成に対する効果も、(II) の反応により生成するシステインがタンパク質分子間の SS 交換反応を促進するためであると考えられるであろう。

本報で認められたシステインおよびシスチンのそれぞれの足増強効果が、以上に挙げた反応仮説のいずれによるかは、今のところ断定することはできない。しかし、これまでの報告にみられる SH 基の酸化反応による足増強効果だけでなく、SH-SS 交換反応 (II-IV) ならびに SS 交換反応 (V-VI) の促進による足増強の可能性についても今後さらに検討することは、足形成機構の解明に役立つものと考えられる。

文 献

- 1) 岡田 稔・中山正夫: 日水誌, **27**, 203-208 (1961).
- 2) 田端義明・野崎征宜・金津良一: 長崎大水産学部研報, **41**, 29-33 (1976).
- 3) 丹羽栄二・三宅正人: 日水誌, **37**, 884-890 (1971).
- 4) T. YASUI, Y. HASHIMOTO, and Y. TONOMURA: *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 55-62 (1960).
- 5) K. SAMEJIMA, Y. HASHIMOTO, T. YASUI, and T. FUKAZAWA: *J. Food Sci.*, **34**, 242-245 (1969).
- 6) R. YOSHINAKA, M. SHIRAISHI, and S. IKEDA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 511-515 (1972).
- 7) 志水 寛・吉本晴樹・清水 亘: 日水誌, **28**, 610-615 (1962).
- 8) P. R. GRUNERT and R. H. PHILLIPS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **30**, 217-225 (1951).
- 9) M. K. GAITONDE: *Biochem. J.*, **104**, 627-633 (1967).
- 10) 伊藤慶明・吉中礼二・池田静徳: 日水誌, **45**, 73-77 (1979).
- 11) 三宅正人・川上 謙: 日水誌, **32**, 446-449 (1966).
- 12) R. HAMM and K. HOFMANN: *Nature*, **207**, 1269-1271 (1965).
- 13) R. FRATER, F. J. R. HIRD, H. J. MOSS, and J. R. YATES: *Nature*, **186**, 451-454 (1960).
- 14) I. M. KOLTHOFF and A. ANASTASI: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4248-4250 (1958).
- 15) M. BÁRÁNY: in "Symposium on sulfur in proteins" (ed. by R. BENESCH, R. E. BENESCH, P. D. BOYER, I. M. KLOTZ, W. R. MIDDLEBROOK, A. G. SZENT-GYÖRGYI, and D. R. SCHWARTZ), Academic Press, New York, 1959, pp. 317-328.
- 16) A. STRACHER: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1118-1121 (1964).
- 17) E. GAETJENS, T. THERATTIL-ANTONY, and M. BÁRÁNY: *Biochim. Biophys. Acta*, **86**, 554-566 (1964).
- 18) A. G. WEEDS and B. S. HARTLEY: *Biochem. J.*, **107**, 531-548 (1968).
- 19) C. A. M. MAURITZEN and P. STEWART: *Nature*, **197**, 48-49 (1963).
- 20) C. HUGGINS, D. F. TAPLEY, and E. V. JENSEN: *Nature*, **167**, 592-593 (1951).
- 21) R. BENESCH and R. E. BENESCH: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 848-853 (1958).
- 22) L. K. STEINRAUF and W. B. DANDLIKER: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3833-3835 (1958).
- 23) R. C. WARNER and M. LEVY: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5735-5744 (1958).
- 24) I. M. KOLTHOFF and B. H. TAN: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2717-2720 (1965).
- 25) A. P. RYLE and F. SANGER: *Biochem. J.*, **60**, 535-540 (1955).
- 26) I. M. KLOTZ, J. AYERS, J. Y. C. HO, M. G. HOROWITZ, and R. E. HEINEY: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2132-2141 (1958).