

9860 食用魚卵の物性に及ぼす塩の影響

助成研究者：土屋 隆英 (上智大学 理工学部)
共同研究者：神澤 信行 (上智大学 理工学部)
藤見 峰彦 (上智大学 理工学部)

キャビアやイクラに代表魚卵は各種食品の中でも噛みごたえのある独特の食感を持つものとして好まれている。これらの魚卵は放卵された後、塩漬処理されることでこのような物性を持つようになる。これは魚卵膜が硬化したために生じた性質の変化と考えられている。この硬化に関しては硬骨魚卵膜は受精後多精防止や受精卵を保護の目的があることが発生学的研究から指摘されている。硬化にはTyr-Tyr架橋酵素の活性化や-S-S-結合形成反応が関係するとされているが、近年タンパク質の多量化に関わるトランスグルタミナーゼ(TGase)の働きよる可能性も指摘されている。これらのことから卵が硬化し魚卵特有の食感持つようになるのは塩漬処理によりTGaseが活性化された結果と思われる。

本研究では塩漬処理することで魚卵独特の食感を生み出す物性変化の担い手がTGaseであるのかを明確にし、その反応機構を見出すことで魚卵の膜硬化機構を明らかにすることを目的とした。

塩漬処理するといずれの魚の卵も破断強度が高くなり、処理が卵の物性に影響与えている。この物性変化をもたらすものとして、魚卵内特に卵膜のタンパク質間でのGL架橋量が増加しているのでTGaseの関与が大きく、その酵素により卵膜が硬化するものと思われる。塩漬処理による魚卵のGL量の増加はニジマスをはじめとシマス類のヤマメ、イワナ卵でも認められる。フナ類ではGLを検出が出来なかったがTGaseの活性は認められる。これらのことから考えると、いずれの魚でもTGaseが活性化されることで卵膜硬化が起こるものと考えられる。

尚、塩漬処理後のTGaseの活性化の程度やGL量の増加率とが魚卵の破断強度の増加率とが幾分平行関係からはずれる事から察するに、魚卵膜の硬化にはTGaseが主要な酵素として働いているが、それ以外の要因も絡んでいる可能性がある。それらについても併せて考える事が卵膜硬化の機構を解明するのに必要なことであろう。いずれにしろ魚卵にはTGaseが存在し、それによりGL架橋が形成され卵膜が硬化することは疑いのないことで、塩漬はその反応を加速するものと結論される。これが魚卵の独特の食感を生み出すものになっていると考えられる。また、TGaseにより卵膜が硬化する事は発生学的研究からも支持されている。

9860 食用魚卵の物性に及ぼす塩の影響

助成研究者：土屋 隆英 (上智大学 理工学部)
 共同研究者：神澤 信行 (上智大学 理工学部)
 藤見 峰彦 (上智大学 理工学部)

1 研究目的

魚卵は各種食品の中でも噛みごたえのある独特の食感を持つものとして好まれている。イクラ、数の子などに代表される食用魚卵は放卵された後、塩漬処理されることでこの様な物性を持つようになる。これは魚卵膜が硬化したために生じた性質の変化と考えられている。一方、発生学的な研究により硬骨魚卵膜は受精後硬化し強靱な構造を持つものへと変わる事が知られている(1)。この卵膜硬化は多精防止とともに、孵化までの間、環境の激変から受精卵を保護する役割を果たしている。硬化にはTyr-Tyr架橋酵素の活性化(2)や-S-S-結合形成反応などが関係すると推定されているが、近年タンパク質の多量化反応を触媒するトランスグルタミナーゼ (transglutaminase: TGase) が卵膜硬化に働いている可能性が指摘されている。TGaseの基質であるモノダンスルカダベリン (monodansylcadaverine: MDC) を卵に注入すると膜硬化が阻害されること(3)、卵膜内にはTGaseの反応生成物である ϵ -(γ -glutamyl)lysine(GL)架橋が形成(4)されていることなどから、卵膜硬化にはTGaseの寄与が大きいと言われている。このことから卵が硬化し魚卵特有の食感持つようになるのは塩漬処理によりTGaseが活性化された結果と思われる。

本研究では塩漬処理することで魚卵独特の食感を生み出す物性変化の担い手がTGaseであるのかを明確にし、その反応機構を見出すことで魚卵の膜硬化機構を明らかにすることを目的とした。魚卵膜硬化に関する研究を行うことで、日本人が食物の美味しさの重要な要因としてあげている食感が、食品の如何なる構造を感じとっているのかを解明する糸口ともなりうる。さらにこの研究結果を用いることで従来と異なる新しい物性を持つ食品の製造を可能とし、応用面での食品物性の制御方法を開発する道を拓くものと期待される。

2 研究方法

2-1 魚卵

本実験には当日得られた、排卵後、産卵直前の受精可能な魚卵を使用した。

ヤマメ： *Oncorhynchus masou* イワナ： *Salvelinus leucomaenis*

ニジマス： *Oncorhynchus mykiss*

排卵後の未受精卵を東京都水産試験場奥多摩分場海沢試験池より入手した。空気採卵法により人工採卵させた卵をビニル袋に入れ、冷却保存したものを使用した。

ギンブナ: *Carassius auratus langsdorfii* ワキン: *Carassius carassius auratus*

モツゴ: *Pseudorasbora parva*

排卵後の未受精卵を東京都水産試験場葛飾支場より入手した。生きたままの状態で池の水を加えたビニール袋に入れて研究室まで運んだ。切開法により人工的に卵を取り出した

2-2 塩漬

実験当日に入手した魚卵を生理食塩水で洗浄後、7% NaClに漬け3日間4℃で放置した。

2-3 接水

実験当日に入手した魚卵を生理食塩水で洗浄後、脱イオン水に漬け3日間4℃で放置した。魚卵洗浄に使用した生理食塩水は下記の通りである。

NaCl 9.04 g、KCl 0.24 g、CaCl₂ · 2H₂O 0.26 gをそれぞれ計りとり、脱イオン水に溶解し、全量を 1000 mlとした。

2-4 transglutaminase (TGase)の抽出

魚卵をガラスシャーレの外蓋と内蓋の間に挟んでつぶした。黄色い付着物を取り除き卵膜を得た。その卵膜をホモジナイズした後、遠心分離し上清を卵膜画分抽出液とした。

2-5 GLの調製と検出

2-5-1 GL画分

魚卵内容物を除去した卵膜をホモジナイズしたものをGL測定用試料とした。

2-5-2 酵素消化

GL測定試料にタンパク質分解酵素を加え、37℃で一晩インキュベートした。消化終了後、煮沸した湯につけることで消化酵素を失活させ、再びProlidase、Leucine aminopeptidase Carboxy peptidase Aを加えた。それを凍結乾燥し-20℃に保存した。

2-6 免疫染色

2-6-1 試料の調製

全卵: 5粒ずつ液体窒素で急速凍結した後ハンマーで粉碎し、SDS処理した。

卵膜: 卵を潰し、内容物を除去した卵膜は生理食塩水で3回洗浄後、SDS処理した。

内容物: 卵の内容物に対し、2倍量のSDS処理液を加えて電気泳動試料とした。

2-6-2 免疫反応

SDS電気泳動後PVDF膜に転写し、膜をブロッキングした。それに適当な濃度の一次抗体150 mlを滴下し、PVDF膜全体に染み渡るように置いた。これを洗浄後、二次抗体液を用いて、室温で30 min放置して浸透させた後、発色を行なった。

2-7 TGase活性

TGase活性はLorand, L and Gotoh, T. (5)の方法をもとに、ジメチル化カゼインに結合したMDCの蛍光強度を測定した。

2-8 破断強度

魚卵の破断強度は卵の物理的な強度を定量的に表すためレオメーターによる押し込み試験法で測定した。

魚卵中央に直径 10 mmの平面状プランジャーを 6 cm/minで押し込み、破断時の応力 breaking stress(g)、及び、歪み breaking distance(cm)を、それぞれレコーダーの記録 (chart speed 30cm/min)から読み取った。また、破断応力と破断歪みとの積を破断強度(g・cm)とした。測定には各20サンプル用いて、値は全て平均値±SDで表した。

3 結果

3-1 卵の物性変化

3-1-1 水重量

処理前後の魚卵の水重量を求めた。乾燥前の魚卵重量から乾燥後の値を差し引いた分を水の減少量とし、魚卵100 gあたりの水分量を求めた。試料毎に3サンプルを用意し、値は全て平均値±SDで表した。以後、単位重量あたりのGL量とTGase活性を求める際にはこの値を用いた。

赤外線ランプ加熱乾燥法によりマス類であるヤマメ、イワナ、ニジマス卵の水分量を測定したところ、いずれも60%弱であった。一方、ワキン、ギンブナ、モツゴ卵の水分量はマス類より高く、65%以上であった。特にモツゴ卵は76.5%と他の魚のものより著しく高かった。

塩漬した魚卵の水分量は数%増加し、塩漬処理の影響があった。また、接水した場合も水分量は増加したが、塩漬処理との差は認められなかった。

受精卵では表層が崩壊するため囲卵腔の拡大が起こり、水がそこに流入するため水分量が増加した。

3-1-2 破断強度

卵膜の高分子量化を定量的に測定する手段として、アルカリ溶液に対する卵膜の溶解度の減少量や卵に対する共振周波数の変化を調べる方法が報告されている。本研究では、卵全体の物理的な強度とその変化を調べるため、レオメーターによる押し込み試験法で破断強度を測定した。

粒が極めて小さいワキン、ギンブナ、モツゴ卵を除くヤマメ、イワナ、ニジマス卵を測定したところ、いずれも増加率に違いがあるが、塩漬後卵の強度が高くなった。ヤマメ、イワナ、ニジマスの各20サンプルのデータを用いてt-検定を行ったところ、0.1%の危険率で有為差が認められた(Table 1)。また脱イオン水による接水処理したところ、イワナ、ニジマス卵ではレオメーターで破断出来ない程強靱な硬化が起きていた。同時に卵内部のタンパク質の凝集も観察された。卵の強度の増加は塩漬処理と接水処理とで異なり、

接水処理で卵の強度が急激に増加するのに対し、塩漬処理では緩やかに増加する。すなわち塩漬処理の方が硬化が穏やかに進行し、塩漬と接水の両処理法の違いで卵の物性変化の仕方が著しく異なることを明らかにした。

3-2 走査型電子顕微鏡(SEM)による卵の形態観察

3-2-1 外層および内層

魚卵を塩漬あるいは接水処理したとき卵膜は硬化する。このときの卵膜の構造的な変化を調べるため、ニジマス卵をSEMで観察した。

塩漬未処理のニジマス卵の外層は繊維状の物質がネットワーク様の構造を取り、多数の空洞が観察された上、構造物には多くの付着物が認められた。一方、内層は外層に比べ太い繊維が絡み合っていた。卵膜の外層と内層とでは構造は大きな違いがあった。

次に魚卵を塩漬処理したところ、外層では未処理とほぼ同様な構造であったが、内層では太い繊維が若干厚みを増したように見られた。この結果はイワナ卵でも同様であった。

しかし、イワナ卵を凍結切断したときの観察結果では処理前後で違いがほとんど認められなかったことから、卵膜硬化は膜構成タンパク質間での架橋形成が生じるものの、卵の大きな構造変化を伴わないものと思われる。

3-3 卵膜硬化に対するTGaseの関与

塩漬すると外力に対しても、形態に対しても処理効果が認められるようになる。これがTGaseによるものかを、その活性と生成物量の変化とを調べる事にした。

3-3-1 GL量

漬した魚卵から卵膜を分離し、それを各種酵素で消化後、2種類の逆相クロマトグラフイーでGL含有画分を分離し、OPAで蛍光ラベルして蛍光強度を測定した。

<ヤマメ、イワナ、ニジマス(マス類)>

魚卵サンプル中のGL量は、乾燥魚卵100 g 当たりの物質質量(m mol)として計算した。マス類のヤマメ、イワナ、ニジマス卵では、塩漬未処理でも卵膜画分からGLが検出された。このGL量の多いものはニジマスの一回産卵型で20.1、少ないもので二回産卵型の3.76となった。塩漬処理するとGL量はいずれの魚卵でも増加し、魚種間で差があるものの塩漬の影響が認められた(Table 2)。

<ワキン、ギンブナ、モツゴ(フナ類)>

マス類と種の異なるフナ類の塩漬未処理時モツゴ卵でGLが痕跡程度に検出されたが、ワキン、ギンブナ卵からはGLが検出されず、さらに塩漬してもGLと思われる極微量のシグナルしか認められるなかった。このことは材料としたフナ類の卵にもTGaseが存在するが、いずれも直径1 mm程度と小さく、卵中のGL量が相対的に少ないため検出が困難であったものと思われる(Table 2)。

4-3-2 TGase活性

魚卵中にGL架橋が形成されているのはTGaseが存在しているからである。そこで卵でのTGaseの局在を知るため、塩漬未処理のヤマメ卵の内容物、膜画分での活性を調べた。

卵膜画分を超音波処理した上清では僅かしか活性が認められなかったが、卵膜画分をホモジナイズすると、その上清にはTGase活性が認められるようになる。ヤマメの場合、卵膜画分にTGaseが存在しているものと思われるが、そのTGaseは超音波処理では遊離しない程度の強さで膜に結合しているものと思われる。内容物画分でも僅かに蛍光強度が観測されたが、強度を経時変化が認められないので、卵内容物にはほとんどTGaseは存在しないものと思われた。尚、イワナ、ニジマス卵でもTGase活性は認められた(Table 3)。

フナ類は卵が小さいため膜と内容物との分画難しく、全卵を直接ホモジナイズした。しかし、活性は認められなかった。モツゴ卵などでGLがわずかに検出されるので、フナ類でもTGaseは存在するものと思われる。GLの測定結果と併せて考えると、卵のサイズがTGase活性やGL量の測定値に影響するため、卵径が実験の制度を決定する重要な要素となる。

粒径の大きいヤマメ、イワナ、ニジマス卵の塩漬処理で、卵膜画分のTGase活性はいずれも1.5～2倍程度高くなった。接水させた場合も同様に活性の上昇が見られた。

3-3-3 塩漬処理前後の破断強度、TGase活性、GL量の増加率

塩漬処理により卵のTGase活性やGL架橋が増加するが、それが卵の破断強度を増加させる要因になるのかを、卵のそれぞれの測定値と比較した。ここでは塩漬前の卵の値に対して塩漬後の変化の割合を増加率として比べた。

ヤマメ、イワナ、ニジマスでは各測定で増加率が高くなっていたので、塩漬による卵膜の破断強度の増加にTGaseが関与していることが考えられた(Fig. 1)。

尚、ニジマスの一回産卵型では破断強度とTGase活性の増加率は100%以上になった。また、ニジマスの二回産卵型を除き、破断強度増加率はTGase活性とGL量の増加率より高かった。ニジマスの二回産卵型は、1～2月および5～6月の2回産卵時期がある。本実験では産卵間隔の短い6月に採卵された卵を使用したため、一回産卵型に比べ粒も小さく、強度も劣っていた。

3-4 抗原抗体反応によるTGaseの局在

3-4-1 魚卵TGaseの局在

モルモット肝臓TGaseを抗原としたポリクローナル抗体を用いて魚卵TGaseの局在を調べた。1次抗体にはantitransglutaminase (typeII) goat polyclonal IgG、2次抗体にはbiotinylated rabbit anti-goat immunoglobulinsを使用した。

イワナ卵をSDS-PAGEし、PVDF膜に転写後、タンパク質染色すると、分子量6～9万付近にバンドが認められた。そのうち7万付近のバンドが抗体と交差した。

今回使用した一次抗体は、抗原がモルモット肝臓TGaseであるが、この1次抗体が魚卵

試料と交差したことから、魚卵にも免疫学的に肝臓と同様のTGaseが存在することが分かった。その上、魚卵TGaseの分子量はおよそ7万であり、モルモット肝臓のもの（7.6万）とはほぼ同じであった。魚卵TGaseが肝臓のものと交差したことから、肝臓と魚卵のTGaseとは同じ認識部位を持つものと思われる。尚、TGase活性測定時卵膜画分にしか認められなかったが、卵内容物にも抗体と反応するバンドが僅かに認められるので、量の違いがあるものの両画分ともTGaseが存在していると思われる。

3-5 未受精卵へのTGaseやMDCの注入による破断強度への影響

卵膜硬化へのTGaseの影響を直接調べるため、モルモット肝臓TGaseの競争阻害剤であるMDCをイワナ卵に直接注入した。それを生理食塩水に2日間4℃で放置後、脱イオン水に6時間漬けた後、卵の破断強度を測定した。

MDCやTGaseを注入したものと、生理食塩水を注入したものとを比較した。

今回注入物の効果が最大になるように、硬化させるのに接水処理の方法を採用した。生理食塩水では注入前後で、接水処理による有為な差は認められなかった。TGaseの競争阻害剤であるMDCを注入後、接水処理させた場合でも未処理のものと有為な差は認められなかった。また、TGaseを添加した場合も未処理のものと有為な差は認められなかった。

今回の添加前後で有意差が認められなかったのは注入箇所が卵内部であったため、硬化部位である卵膜での反応に影響しなかった可能性がある。今後実験法などの改良が必要と思われる。

4 考察

ニジマス卵のcadaverine感受性の卵膜硬化や、タラ未受精卵をMDC存在下で接水させても卵膜硬化が起こらない。これらのことから魚卵にはTGaseが存在し、それが活性化することで卵膜硬化を引き起こしていると考えられる。受精以外で魚卵膜を硬化させる方法として接水処理と共に、食品加工時に利用されている塩漬法がある。しかし、塩の使用方法については経験に基づいて行われている面が強く、塩漬により魚卵が硬化し独特の食感を如何に持つ様になるかについて、食品化学的な見地からの研究はなされていない。しかし、卵膜硬化反応に最も可能性のある酵素としてTGaseが挙げられ、この酵素の働きと魚卵の物性変化との関係について検討する必要性は高い。

塩漬処理するといずれの魚卵も破断強度が高くなり、処理が卵の物性に影響与えている。この物性変化をもたらすものとして、魚卵内特に卵膜のタンパク質間でのGL架橋量が増加しているためTGaseの関与が大きく、その酵素により卵膜が硬化するものと思われる。塩漬処理による魚卵のGL量の増加はニジマスをはじめとシマス類のヤマメ、イワナ卵でも認められる。フナ類ではGLが検出出来なかったがTGaseの活性は認められるので、いずれの魚でもTGaseで卵膜硬化が起こるものと考えられる。

尚、塩漬処理後のTGaseの活性化の程度やGL量の増加率とが魚卵の破断強度の増加率とは幾分平行関係からはずれる事から察するに、魚卵膜の硬化にはTGaseが主要な酵素として働いているが、それ以外の要因も絡んでいる可能性があり、それらについても併せて考える事が卵膜硬化の機構を解明するために必要なことかもしれない。

いずれにしろ魚卵にはTGaseが存在し、それによりGL架橋が形成され卵膜が硬化するのは疑いのないことで、塩漬はその反応を加速するものと結論される。このことは発生学的研究からも指示されている。

5 今後の課題

魚卵が硬化し独特の食感を持つようになる。この硬化はTGaseによる卵膜の構成タンパク質間にGL架橋が生じる事でもたらされる。しかし、硬化がTGase活性によるGL架橋形成によるとの確固たる証拠は未だ見出されていない。これを解明することが一つの課題である。また、塩漬処理によるTGase活性やGL量の増加が破断強度の増加と平行関係にならないことも、今後の課題となる。

6 文献

- (1) Iuchi,I. Masuda,K. and Yamagami,K.: Change in component proteins of the egg envelop (chorion) of Rainbow Trout during hardening. *Dev. Growth Diff.*,33, 85-92, 1991
- (2) Foerder,C.A. and Shapiro,B.M.: Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks.*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 4214-4218, 1977
- (3) Masuda,K. Iuchi,I. and Yamagami,K.: Analysis of hardening of the egg envelope (chorion) of the fish, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Diff.*,33, 75-83, 1991
- (4) Hagenmaier,H.E. Scmits,I. and Foehles,J.: Zum Vorkommen von Isopeptidbindungen in der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Rich). *hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, 357, 1435-1438, 1976
- (5) Lorand,L. and Gotoh,T.: Fibrinolytic: The fibrin stabilizing factor system. *Met. Enz.*,19,770-782, 1970

Table 1 Breaking strength of fish egg

fish	Breaking strength / g · cm		
	not preserved	salt preserved	water preserved
landlock salmon	13.6 ± 3.6	22.7 ± 4.4	241 ± 10.3
japanese char	23.1 ± 3.3	39.6 ± 4.1	> 4000
rainbow trout (first spawn)	12.3 ± 3.9	32.5 ± 10.1	> 4000
rainbow trout (second spawn)	3.64 ± 1.0	6.11 ± 0.8	317 ± 4.6

samples(n) = 20

Table 2 TGase activity of fish egg

fish	TGase activity / units · mg ⁻¹		
	not preserved	salt preserved	water preserved
landlock salmon	33.2 ± 1.2	52.5 ± 3.6	50.3 ± 2.4
japanese char	41.2 ± 0.8	61.3 ± 2.0	69.8 ± 1.1
rainbow trout (first spawn)	64.2 ± 4.9	133 ± 3.5	95.5 ± 3.1
rainbow trout (second spawn)	70.0 ± 5.1	121 ± 7.3	120 ± 6.4

reaction mixture : 50 mM Tris-HCl(pH 7.2), 5 mM CaCl₂, 5 mM 2-ME, 0.5 mM MDC,
0.2% Dimethylcasein

reaction time : 30 min wave length : ex 350 nm, em 510 nm samples(n) = 3

Table 3 GL contents of fish egg

fish	GL / μ mol \cdot 100 g ⁻¹ (dry egg)		
	not preserved	salt preserved	water preserved
landlock salmon	14.4 \pm 2.1	21.4 \pm 2.3	52.6 \pm 3.0
japanese char	11.9 \pm 0.9	16.1 \pm 3.3	65.2 \pm 1.6
rainbow trout (first spawn)	20.1 \pm 2.1	38.1 \pm 3.4	43.2 \pm 1.0
rainbow trout (second spawn)	3.76 \pm 0.4	6.2 \pm 0.6	10.8 \pm 0.3
goldfish	0	1.83 \pm 0.9	—
gibel	0	4.61 \pm 2.1	—
stone morokol	7.04 \pm 2.4	8.90 \pm 3.1	—
samples(n) = 3			

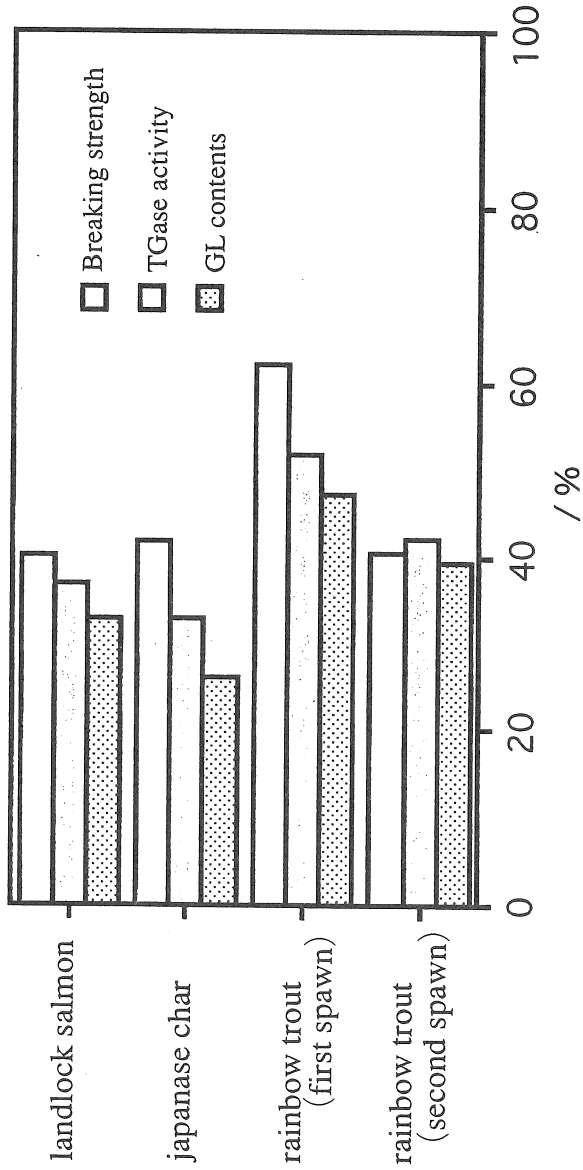


Fig.1 The increment of Breaking strength, TGase activity and GL contents on fish egg by salt preserved.

The effect of salt preservation on fish eggs

Takahide TSUCHIYA, Nobuyuki KANZAWA and

Takahiko FUJIMI

Department of chemistry, Sophia University

Summary

The texture of fish eggs changes into a unique chewy texture, for example, caviar, during preservation in salt solution. In this work, the changes in fish eggs after preservation in salt solution were investigated. After salt preservation, fish eggs stiffened, and an increase of ϵ -(γ -glutamyl)lysine(GL) cross-linked products in the chorion fraction was observed. Transglutaminase(TGase) also activated after salt preservation. Therefore, it can be hypothesized that the change of breaking strength after salt preservation was due to the increment of the GL cross-linked products, which was produced by the activation of TGase.