

5 1

助成番号 0051

魚肉水溶性タンパク質のゲル化特性とその高機能化—混合タンパク質—脂肪酸塩複合システムによる常温下でのゲル形成機構—

助成研究者：太田 尚子（日本大学 短期大学部）

未利用食品タンパク質の1つである魚肉水溶性タンパク質（WSP）の高度利用を目指してWSPのレオロジー特性、更にWSP濃縮物（WSPC）のゲル化特性を調べた。加熱・冷却の影響を調べたところWSPは、およそ55℃付近より加熱に伴い貯蔵弾性率が増加し、加熱過程に引き続く冷却過程で貯蔵弾性率が急増した。更に食塩の添加で貯蔵弾性率が減少した。これらの事から、水素結合や静電的相互作用がWSPの分子間相互作用に強く寄与している事が示唆された。

またWSPは親水性ポリマー（Ficoll 400）を用いて簡単に濃縮する事ができ、得られたWSPCは90℃10 minの加熱処理により白濁ゲルを形成した。更に、著者らがこれまでの研究で種々のタンパク質のゲル形成能の増大（常温下でのゲル形成）やそのゲル特性の向上（ゲルに対する保水性の付与や透明ゲルの形成）に有効である事を明らかにしてきた炭素鎖長10以上の脂肪酸塩の添加効果を調べたところ、WSPC単独のタンパク質では脂肪酸塩を添加しても常温下でゲルを形成するには至らなかった。しかしながら、本系にOVAまたはβ-ラクトグロブリン（β-LG）を混合する事（WSP+OVAまたはWSP+β-LGの混合タンパク質系）により、脂肪酸塩誘導ゲルを形成できる事が常温下での経時的な貯蔵弾性率の増加により明らかになった。また、OVA、脂肪酸塩共存下の魚肉WSPのタンパク質二次構造解析の結果、脂肪酸塩誘導ゲル形成時の構造変化は、加熱誘導ゲルに比べて非常にマイルドである事が示唆された。

16

助成番号 0051

魚肉水溶性タンパク質のゲル化特性とその高機能化—混合タンパク質—
—脂肪酸塩複合システムによる常温下でのゲル形成機構—

助成研究者：太田 尚子（日本大学 短期大学部）

1. 研究目的

魚肉水溶性タンパク質（WSP; Water Soluble Protein）は、筋肉タンパク質中20～50%と多く含まれているが、水産加工食品の品質低下をもたらすとされ、加工（水さらし）過程で廃棄されているのが現状である。これは海洋の汚染にもつながる点で有効利用が強く望まれているが、低分子タンパク質である為、そのものの機能特性は未知である。

我々はこれまでの取り組みにより、魚肉よりこの水溶性タンパク質を抽出後、親水性高分子ポリマーを用いて濃縮した魚肉水溶性タンパク質濃縮物（WSPC; Water Soluble Protein Concentrate、抽出液のおよそ10倍濃縮物）を得られる事および10%WSPC、90℃10 min（付加イオン強度 0）加熱により保形成の良い白濁ゲルを形成する事を見出した。

そこで本研究では、魚肉 WSPC の付加価値を更に高める事を目的として、著者らがこれまでに明らかにしてきた、ゲル形成時における脂肪酸塩添加法^{1,2)}の適用の可能性を調べ、更に他の動物性球状タンパク質（ここでは卵白アルブミンや β -ラクトグロブリンを使用）との混合タンパク質の手法を用いてゲル化特性を向上させる事を試み、その際のタンパク質二次構造の変化の解析を行った。

2. 材料および研究方法

2.1 材料

生の甘鯛を3枚おろしにしたものを購入し、皮を取り除いた後、魚重量のおよそ3倍の蒸留水を添加後フードプロセッサーを用いて小片とし、摩砕物を遠心分離にかけ（8,000 rpm, 30 min., 4℃）上清を得た。これを透析チューブに入れ、ficolle 400（アマシャムファルマシア製、中性の親水性ポリマー）を散布し、4℃でおよそ24時間濃縮した。得られた濃縮物のタンパク質含量をローリー法で決定し、WSPCとして以下の実験に用いた。また、卵白アルブミン（OVA）及び β -ラクトグロブリン（ β -LG）はそれぞれ太陽化学（株）並びにシグマ社製用いた。

2.2 動的粘弾性測定

動的粘弾性の温度および周波数依存性測定は、レオメトリックサイエンス社製応力制御型レオメーター（アメリカ）を用いて、一方、一定周波数における動的粘弾性の経時変化の測定はレオグラフゾル（東洋精機製）を用いて行った。

2.3 フーリエ変換赤外分光分析

ゲル形成時におけるタンパク質二次構造変化の解析をフーリエ変換赤外分光分析（FTIR 島津 8300 型）を用いて行った。但し、試料中の水のバックグラウンド、 1600 cm^{-1} 付近のピークを消去する為、試料溶液を予め重水に対して透析する事により置換した。スペクトルは厚さ 15μ のゲルを調製し、透過法により測定した。また、加熱による影響を調べる際には、試料室から一旦、試料溶液を挿んだ窓板（CaF）を取り外し、別に恒温水槽中にて 80°C 30 分処理し放冷後、再びスペクトル測定した。

3. 研究結果および考察

3.1 加熱誘導魚肉 WSP ゲルの保水性に及ぼす OVA 添加の影響

これまでの研究に基づき、10% WSPC、 90°C 10 min（付加イオン強度 0）加熱により保形成の良い白濁ゲルを形成する事が明らかになっているが、著者らがこれまで用いてきた OVA や β -LG ゲルに比べ、ゲルの保水性が低いという問題点をもっている。そこで OVA を添加してどの程度ゲルの保水性が向上するかを検討した。その結果、魚肉 WSPC 単独の場合、重力加速度 $100\times g$ 、3 分間の遠心分離により、ゲル中の水の約 55% が放出されるが、等量（タンパク質濃度 5% 相当）の OVA を添加し、魚肉 WSPC、OVA それぞれ 5% を混合したゲルでは、付加イオン強度 0.2、pH 7 の条件下で離水率約 45% と WSPC 単独の 80% まで離水率が僅かに低下し、若干ゲルの保水性が向上した（図示せず）。（ちなみに本条件下では、OVA 単独で 36% の離水率を示した。）

3.2 加熱誘導魚肉 WSP の動的粘弾性に及ぼすオレイン酸ナトリウム添加の影響

既に報告したように 10% 魚肉 WSPC は付加イオン強度（0~0.2）pH 7.5 で加熱により白濁ゲルを形成する。ここでは、これまで加熱誘導ゲルの保水性や透明度の向上に有効である事が示唆された脂肪酸塩（ここではオレイン酸ナトリウム）を添加し、その分散系がどのような動的粘弾性を示すかを無添加時と比較検討した。およそ濃縮前の魚肉 WSP の濃度に相当する 1.2% 魚肉 WSP を用いて、0.36% オレイン酸ナトリウム（10% タンパク質に対して 3% 相当の脂肪酸塩）を添加し、 20°C ~ 90°C へ昇温後再

び20℃まで冷却するプログラム下での貯蔵弾性率の変化を図1に示した。オレイン酸ナトリウム存在下非存在下に関わらず、最初の加熱過程で貯蔵弾性率は次第に増加し、その後の冷却過程で貯蔵弾性率が急増した。この降温過程での貯蔵弾性率の増加率は、オレイン酸ナトリウム存在下でおよそ3倍、非存在下で約2倍と、脂肪酸塩存在下の方が著しく、このタンパク質-脂質混合による分散系の貯蔵弾性率の増加に水素結合の寄与がより大きい事が示唆された。その結果、それぞれの系の最終弾性率を比較すると脂肪酸塩存在下魚肉 WSPの方が約3倍大きな弾性率を示した。

次に、70℃の一定条件下(但し、応力は0.02 Pa一定)、で貯蔵弾性率の周波数依存性を調べた。(尚、脂肪酸塩添加によるイオン強度増加分を考慮する為の対照として、脂肪酸塩の代替として塩化ナトリウムを添加した系を含めて、3種類の条件下の貯蔵弾性率の周波数依存性を比較した。)その結果、測定した最大周波数である10 rad/sでは図1のデータを反映するような、脂肪酸塩存在下でのより高い貯蔵弾性率が観察されたものの、周波数依存性(周波数の変化による貯蔵弾性率の変化量、即ちグラフの傾き)は脂肪酸塩存在下の方が大きく、70℃の一定温度では、脂肪酸塩添加の方が無添加より柔らかい事が示唆された(図2)。この図1と2のくい違いは、WSPの脂肪酸塩存在下と非存在下での加熱変性温度の違いに起因していると思われる。即ち、図1で無添加 WSPの貯蔵弾性率がおよそ55℃付近で増加し始めるのに対して、オレイン酸塩存在下 WSPでは75℃付近から貯蔵弾性率が増加し始めていた事に関連している。

3.3 魚肉 WSPC および卵白アルブミン混合タンパク質系におけるカプリン酸ナトリウム誘導ゲルの形成性

上記の実験により、魚肉 WSP のもつレオロジー特性とそれに及ぼすオレイン酸ナトリウム添加の影響について明らかになったが、我々のこれまでの研究によりある種の動物性タンパク質の場合に、タンパク質に炭素鎖長10以上の脂肪酸塩を添加しただけで常温下でもゲルを形成する現象を見出ししている事に関連して、魚肉 WSP を上記の方法により濃縮し更に、カプリン酸ナトリウム(最も常温下でのゲル形成能が優れていると考えられる脂肪酸塩)の添加を試みた。魚肉 WSPC はカプリン酸ナトリウムの添加により、その混合系の分散性が感覚的には向上していることが観察されたが、数日常温で放置してもゲルを形成するには至らなかった(図示せず)。そこで、これまで単独のタンパク質で脂肪酸塩添加により常温でゲル化する事が観察されている、卵白アルブミンが脂肪酸塩誘導魚肉 WSPC のゲル化助剤として機能する事を期待して、これら2種のタンパク質(卵白アルブミンのタンパク質濃度7%、魚肉タンパク質5%)とカプリン酸ナトリウム(3%)を混合しその後の常温下での動的粘弾性の変化を測定した(図3)。その結果、混合後徐々に貯蔵弾性率および損失弾性率は

増加し、およそ 50 分後ゾル-ゲル転移が観察され、8 時間後貯蔵弾性率 2500 Pa に達した。この時の貯蔵弾性率を損失弾性率と比較してみると、貯蔵弾性率の大きさは、損失弾性率のおよそ 4 倍の値に相当していた。

3.4 魚肉 WSPC および β -ラクトグロブリン混合タンパク質系におけるカプリン酸ナトリウム誘導ゲルの形成性

β -ラクトグロブリンも OVA 同様カプリン酸ナトリウムを添加するだけで常温下でゲルを形成する事から、次に魚肉 WSPC の脂肪酸塩誘導ゲル形成の為のゲル化触媒剤として β -ラクトグロブリンを共存させる事を試みた(図4)。元来、脂肪酸塩誘導 β -ラクトグロブリンゲルの形成には 25°C の室温で 24 時間を必要とするのに対して、OVA は 1~2 時間でゲル化する事から、両者のタンパク質ではゲル化速度に顕著な違いがあるが(図示せず)、図4に見られる最終貯蔵弾性率は 5000Pa に達し、これは図3の OVA の場合に比べて匹敵またはそれ以上の高値であり、 β -ラクトグロブリンは魚肉 WSPC の脂肪酸塩誘導ゲルの形成を促進する作用を有する事が判った。

3.5 魚肉 WSPC および卵白アルブミン混合タンパク質系におけるカプリン酸ナトリウム誘導ゲルの形成時のタンパク質二次構造の変化

FTIR は測定可能な試料の状態が広範で、例えば液体から固体までと種々の状態でタンパク質二次構造の解析ができる点で、本実験系に好適な手法である。これまでの研究で卵白アルブミン単独のタンパク質にカプリン酸ナトリウムを添加した場合、時間経過に伴い、分子間 β -シートの増加が観察されている。既に卵白アルブミンのゲル化の際のタンパク質二次構造変化については多くの研究者の報告があり、二次構造の帰属についても明白である。しかし、ここで用いた魚肉 WSPC のそれについては未だ報告は無い為、ここでは卵白アルブミンの FTIR の二次構造の帰属を用いて、魚肉 WSPC の OVA とカプリン酸塩共存下での状態変化を、経時的および加熱による変化をモニターした(図5)。その結果、魚肉 WSPC と OVA の混合タンパク質にカプリン酸ナトリウムを添加後、17 時間常温下で保存したもの(b)では、混合直後のもの(a)に比べ、僅かに β -シートの増加(ベースラインからの高さの増大)が観察され、更にその後加熱処理を施したもの(c)では β -シートの増加(1620 cm^{-1} 辺りのショルダーの出現)が顕著に観察された。ここで観察されたスペクトル変化と上記のレオロジー測定の結果と考えあわせると、常温下でもある程度 β -シートの増加が観察されるが、加熱処理を伴う場合に比べその変化がより小さい事が明らかになった。

3.6 まとめ及び今後の課題

未利用タンパク質の1つである魚肉水溶性タンパク質(WSP)は、親水性ポリマーを用いて簡便に濃縮する事ができ、90°C10 minの加熱により白濁ゲルを形成した。更に、OVA や β -ラクトグロブリン等の球状タンパク質との共存下で、脂肪酸塩誘導ゲルを形成できることを示す経時的な常温下での貯蔵弾性率の増加が観察された。今回のOVA、脂肪酸塩共存下の魚肉WSPのFTIRによるタンパク質の二次構造解析の結果、魚肉WSPCと他種タンパク質の混合系での脂肪酸塩誘導ゲル形成時の構造変化は、非常にマイルドなものである事が示唆された。今後、 β -ラクトグロブリン、脂肪酸塩共存下の魚肉WSPCの経時的構造変化を明らかにするとともに、魚肉WSPCのゲル形成能を最も向上させ得るタンパク質の更なる検索を試みたいと考えている。

引用文献

- 1) Yuno-Ohta, N., Maeda H., Okada, M. and Hasegawa, K. *J. Food Sci.* 1992, 57, 86-90
- 2) Yuno-Ohta, N., Higasa, T., Tatsumi, E., Sakurai H., Asano, R., and Hirose, M., *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 4518-4523

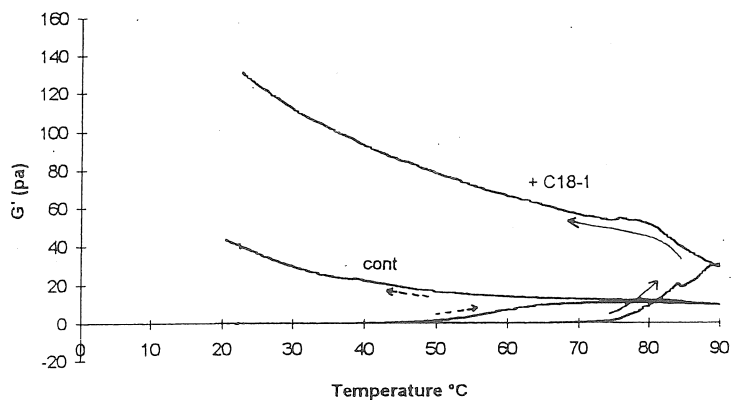


Fig.1 Effect of Temperature on Dynamic Viscoelasticity of Water Soluble Protein (WSP) from Sea Bream

Temperature of WSP was increased and cooled to such as 20°C→90°C→20°C.

Arrows in figure show the changes of G'.

Cont., control WSP (1.2%protein) ; +C18-1, 1.2%WSP in the presence of 0.36% sodium oleate

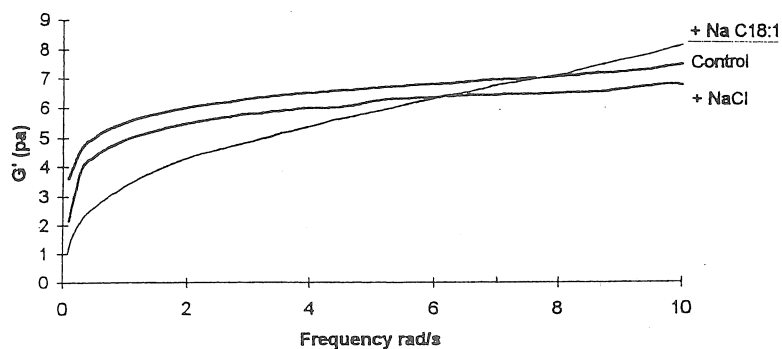


Fig. 2 Changes in Dynamic Viscoelasticity of WSP from Sea Bream with Frequency

Stress and Temperature were adjusted to 0.02 Pa and 70°C, respectively.

Control, WSP (1.2% protein) ; +NaCl (ionic strength $I=0.1$); +NaC18-1, 1.2% WSP in the presence of 0.36% sodium oleate

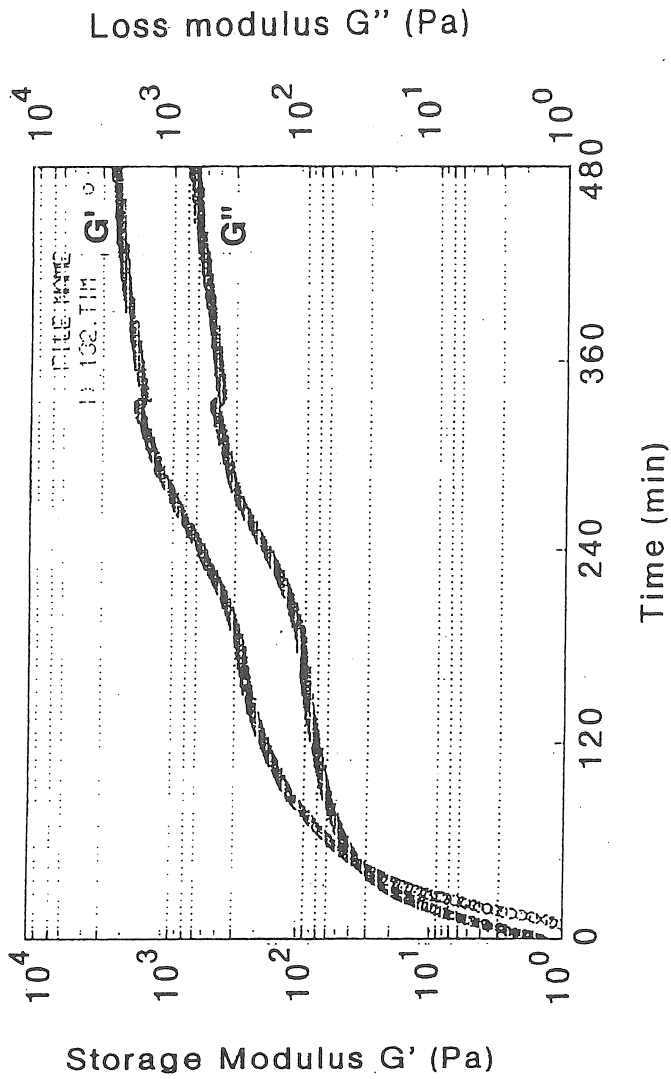


Fig. 3 Dynamic Viscoelasticity of mixed Protein of WSP from Sea Bream with Ovalbumin
Changes of dynamic viscoelasticity of the mixed protein of 5% WSP with 7% OVA
with time at 25°C in the presence of 3% sodium caprate. Total ionic strength was 0.35.

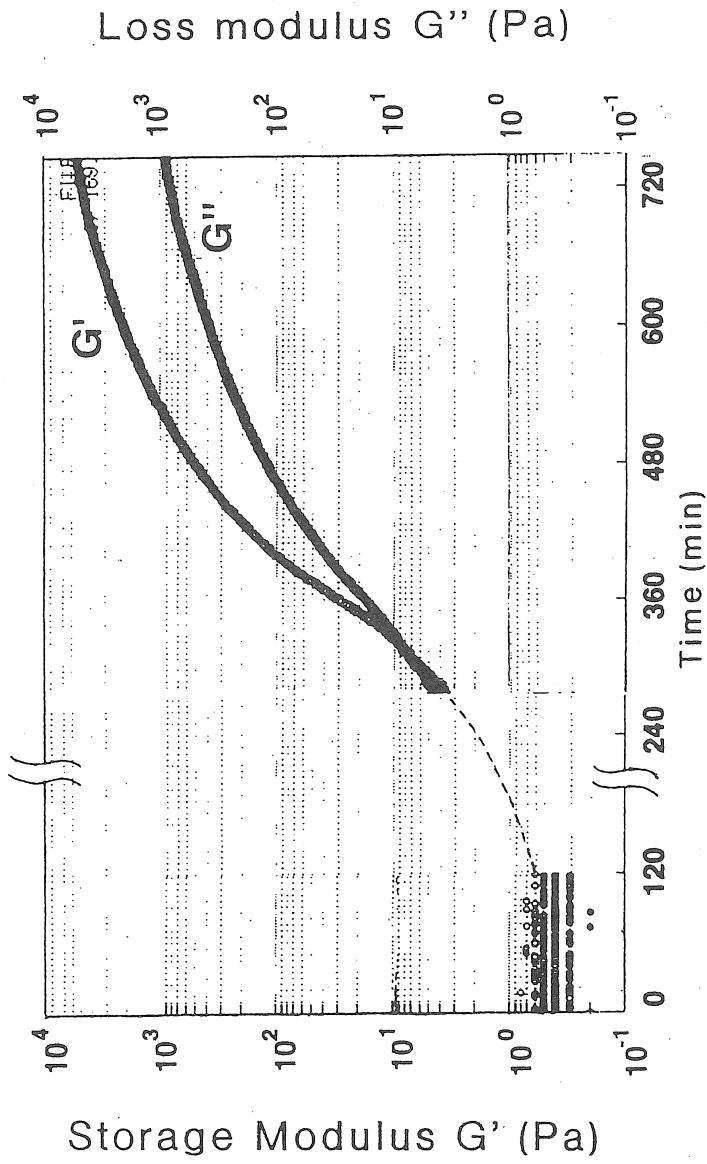


Fig. 4 Dynamic Viscoelasticity of Mixed Protein of WSP from Sea Bream with β -lactoglobulin
 Changes of dynamic viscoelasticity of the mixed protein of 7% WSP with 7% β -LG
 with time at 25°C in the presence of 2.4 % sodium caprate. Total ionic strength was 0.32.
 (The broken line shows a supposed line.)

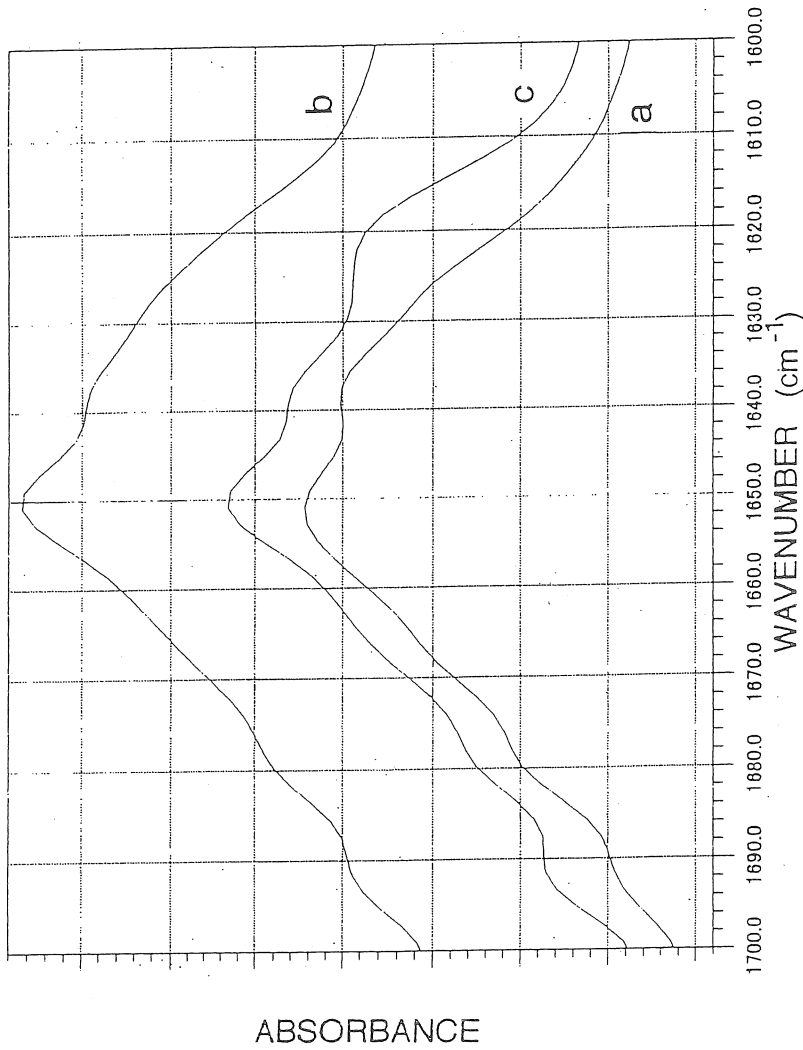


Fig. 5 The Changes of FTIR Spectra of the mixed Protein of WSP from Sea Bream with Ovalbumin

The amide I' region was monitored under the three different states of the mixed protein of 4% WSP with 7% OVA in the presence of 3% sodium caprate. Total ionic strength was 0.35. (a) sol state (b) gel state without heat treatment (c) gel state with heat treatment

The Gel Characteristics and its Improvement of Water-soluble Protein from Fish -The mechanism for formation of fatty acid salts-induced gel of mixed protein-

Naoko Yuno-Ohta

Junior College at Mishima, Nihon University,
Bunkyo-Cho, Mishima City, Shizuoka 411-8555, Japan

Summary

Although water-soluble protein from fish is abundant as a co-product in fish processing, the utilization is still low because of the low molecular weight and its very dilute protein solution. In this study, our purpose is to characterize and improve the gel of water-soluble protein concentrated with hydrophilic polymer. And furthermore, we tried to make a mixed protein gel of water soluble protein concentrate (WSPC) and ovalbmin (OVA), and investigated the effects of fatty acid salts (FAS) which is useful to improve water holding ability of many protein gels on the gel properties of WSPC.

When we used 10% protein solution from Sea Bream, it formed a turbid and low water-holding gel by heat treatment. By the addition of OVA, the water-holding ability was a little improved. In the presence of both OVA and FAS, the WSPC formed a gel at room temperature. We found that β -lactoglobulin (β -LG) also accelerated increasing of dynamic storage modulus at ambient temperature similarly to OVA.

We analyzed the changes of secondary structure of the protein during the gelation using FTIR, the spectra suggested that the absorbance around 1620cm^{-1} corresponding to β -sheet structure of the mixed protein clearly increased by heat treatment.