

# カリウム低減化による腎臓病食対応魚肉すり身の新規製造技術の開発

高橋 希元

東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門

## 概要

腎臓機能が低下すると、腎臓病患者に対してはナトリウムやカリウム制限を中心に多くの食事制限が課される。これまでに食品中のナトリウム含量の低減に関する研究は数多くなされているものの、カリウム含量の低減については研究例が極めて少ない。血液中のカリウム濃度が高くなると、急性心不全を引き起こすことが広く知られている。本研究では上記問題を解決するために、水産加工食品として国内外で多く消費されるすり身製品中のカリウム含量低減について検討した。

スケトウダラ筋肉を細切り、0.2%の各種溶液で水晒しを行ったところ、NaCl 溶液で最もカリウム含量の低減効果が高かった。3 回水晒しを行った試料では、水晒し前の試料と比較し 90%以上のカリウム含量の減少が観察された。

各試料で加熱ゲルの調製を行ったところ、0.2% NaCl 晒し試料で最も良好な物性を示した。これらの結果は、0.2% NaCl 水晒しは魚肉中のカリウムを効率的に除去可能であることを示した。また魚肉タンパク質とカリウムの間には主にイオン結合が存在することが示された。さらに加熱ゲル形成能の向上も期待されることから、本研究成果は 0.2% NaCl を用いた塩水晒しが、腎臓病食対応すり身の製造技術として利用できる可能性を示唆した。

## 1. 序論

近年、高齢人口の増加に伴い、慢性腎臓病患者数は増加傾向にあり、日本国内で 1,330 万人に達している。慢性腎臓病とは、慢性的に腎臓の機能が低下した状態のことであり、糸球体濾過率(GFR)が 60 (ml/min)のものとして定義されている<sup>1)</sup>。慢性腎臓病はその重症度によって分類され、重度の場合、カリウムやナトリウムなどの摂取制限が必要となる。またタンパク質についても過剰摂取は腎臓への負担となるため、少量で良質な摂取が必要となる<sup>2)</sup>。

魚肉は良質なタンパク質を有している一方、そのカリウム含有量が高く、腎臓病患者向けの食事として適していない。また、従来、水産練り製品における減塩化については研究が進められてきたが<sup>3,4)</sup>、カリウム含有量の低減化については研究がなされていない。そこで、魚肉のカリウム含有量を低減したすり身および水産練り製品を開発することで、腎臓病患者の食の選択肢拡大による QOL の向上とともに、水産物に新たな価値を付与することによる、近年

低迷傾向にある日本の水産業発展の一助となることが期待された。

一般的に、水産練り製品の原料となるすり身の製造時には水晒しと呼ばれる、魚肉を水に晒す工程が存在する。水晒しは、最終的な練り製品の臭いや色の改善のほか、加熱ゲル形成能を向上する目的で行われている<sup>5)</sup>。

魚肉中のカリウムは遊離状態で存在するものや、イオン結合や配位結合によってタンパク質と結合しイオン状態で存在しているものがあることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。そのため真水を使用する通常の水晒しでは、塩溶性タンパク質や不溶性タンパク質と結合状態にあるカリウムイオンを除去することはできない。そこで、塩化ナトリウム溶液やキレート作用を有する溶液を用いて水晒しを行うことで、より効果的に魚肉のカリウム含有量を低減することが可能ではないかと考えた。

以上より、本研究では、各種水晒しがすり身原料として一般的なスケトウダラ筋肉のカリウム含有量、および加熱ゲル形成能に及ぼす影響を検討した。

## 2. 研究方法

### 2-1. 材料

本実験の試料にはスケトウダラの冷凍落とし身(丸友シマカ有会社製)を用いた。試料は4°Cで1晩解凍し、ステンレス製金網(SA18-8金網, 7メッシュ, 株式会社TKG製)を用いて落とし身を裏ごししたのちに使用した。

### 2-2. 異なる水晒し液によるすり身の調製

水晒しはChaijanらの方法に準じて行った<sup>7)</sup>。すなわち、落とし身に対して3倍量の水道水(清水晒し), 0.2%塩化ナトリウム水溶液(塩水晒し), 0.2%クエン酸三ナトリウム水溶液(クエン酸晒し), およびEDTA三ナトリウム水溶液(EDTA晒し)を加えてスパーテルで攪拌した。氷中内で15分静置した後、遠心分離機(日立高速冷却遠心機CR22GII, 工機ホールディングス株式会社製)を用いて遠心分離(15,000 × g, 15 min, 2°C)を行い、上清を除去し沈殿物を得た。沈殿物に対して新たに水晒し用液を加えて同様の作業を行い、計1-3度の水晒しを行った。最終的に得られた沈殿物のみを脱水のためにさらに1度遠心分離し、すり身を調製した。

### 2-3. カリウムおよびカルシウム含量の測定

水晒しによる、すり身のカリウム含有量への影響、および加熱ゲルのカルシウム含有量に及ぼす影響の検討を行った。カリウム含有量およびカルシウム含有量は、日本食品成分表分析マニュアルの方法に準じて定量した<sup>8)</sup>。すなわち、試料を乾式灰化法により調製し、ICP-OES (SPS-7800, 株式会社日立ハイテクサイエンス)を用い分析を行った。

### 2-4. 加熱ゲルの調製

3度の水晒しを行ったすり身を晒し布およびキッチンペーパーで包み、重石を載せて氷中で1晩脱水を行ったのち、加熱ゲルの調製に用いた。

加熱ゲルの調製はTakahashiらの方法に準じた<sup>9)</sup>。すなわち、すり身を石川式攪拌播漬機(第20号, 石川工業株式会社)を用い、15分間空摺りした。その際に、冷イオン交換水およびスクロースを添加し、最終水分含量および最終スクロース含量をそれぞれ81%および4.8%となるよう

調整した。その後、終濃度3%(w/w)になるように塩化ナトリウム(国産化学株式会社, 特級)を加えてさらに15分間播漬を行った。なお、播漬時は試料温度を10°C以下に保った。

播漬後、試料を直径32 mm, 高さ30 mmのステンレス容器に充填し、恒温水槽内で40°C(30分) + 90°C(30分), 60°C(30分) + 90°C(30分), もしくは90°C(30分)の3つの条件で加熱した。加熱後のゲルはただちに3分以上氷中で冷却した。

### 2-5. 加熱ゲル物性の測定

加熱ゲルの物性測定は高橋らの方法に従った<sup>10)</sup>。すなわち、レオメーター(FUDOHレオメーター, RCT-2002D・D, 株式会社レオテック)および球形プランジャー(直径5 mm)を用いて押し込み試験により行った。荷台上昇速度を1(mm/sec)に設定して各試料について4点測定し、破断強度(N)を算出した。

### 2-6. pHの測定

加熱ゲルのpHは高橋らの方法に準じて測定した<sup>10)</sup>。すなわち、試料1 gをイオン交換水10 mLとともにホモジナイザー(ポリロンホモジナイザー, PT 10-35 GT, KINEMATICA)を用いてホモジナイズした。得られたホモジネートのpHをpHメーター(卓上型pH計, CyberScanpH700, ケニス株式会社)を用いて測定した。

### 2-8. SDS-PAGE

魚肉ゲルの中心部を0.25 g採取し、10 mLの2% SDS-8M尿素-20 mM Tris-HCl(pH 8.8)および200 μLの2-メルカプトエタノールを加え、振とう機(SEESAW SHAKER, MODEL BC-700, 株式会社バイオクラフト製)で一晩振とうした。この溶液を遠心分離機(日立高速冷却遠心機CR22GII, 工機ホールディングス株式会社)を用いて遠心分離(20,000 × g, 10分, 25°C)したのち、得られた上清をSDS-PAGEの試料とした。

SDS-PAGEはLaemmliらの方法に準じて行った<sup>11)</sup>。電気泳動には市販のポリアクリルアミドゲル(e-PAGEL, ゲル濃度5-20%, アトー株式会社)を用いた。

## 3. 研究結果

### 3-1. 異なる水晒し液がすり身中のカリウム含有量に及ぼす影響

スケトウダラ落とし身および0-3度の水晒しを行ったすり身のカリウム含有量の測定結果を Fig. 1 に示した。いずれの水晒しにおいてもカリウム含有量は低減され、水晒しの回数が増加するとともにその効果は有意に大きくなった。また、水晒しを2回もしくは3回行った場合、清水晒しと比較して、塩水晒し、クエン酸晒し、および EDTA 晒しのいずれにおいてもカリウム低減効果は有意に大きかった。

特に、塩水晒しが最も低減効果が大きく、3回塩水晒しを行ったすり身のカリウム含有量は100(mg/100g dry basis)程度となり、3回清水晒しを行った場合(238.3 ± 5.6 mg/100g dry basis)と比較して、半分以下まで低減していた。また、スケトウダラ落とし身の結果と比較すると、94%以上のカリウムが3回の塩水晒しによって除去されることが明らかとなった。

### 3-2. 異なる水晒しがすり身の加熱ゲル形成能に及ぼす影響

清水晒し、塩水晒し、クエン酸晒し、および EDTA 晒しを行った本種筋肉の加熱ゲル物性の結果を Fig. 2 に示した。各水晒しにより、すべての加熱条件において本種筋肉の加熱ゲル形成能は有意に高められ、特に塩水晒しがすべての加熱条件で最も効果的であった。

また、40°C + 90°C加熱の場合、クエン酸晒し、および EDTA 晒しと比較して、塩水晒しでは加熱ゲル形成能が顕著に高められた。

### 3-3. 加熱ゲルの pH

結果は図示しないが、本研究で得られた加熱ゲルの pH はいずれも  $6.9 \pm 0.2$  であり、各水晒しによる明らかな差は見られなかった。

### 3-4. SDS-PAGE

各水晒しを行った本種筋肉および加熱ゲルの SDS-PAGE によるタンパク質分子量分布の結果を Fig. 3 に示した(論文発表予定のため、一例のみ図示した)。水晒しにより分子量 10,000 程度の低分子タンパク質が除去されたことが確認され、既存の研究結果と一致した。

また画像解析を行ったところ、40°C + 90°C加熱時におけるミオシン重鎖の多量化が、塩水晒し試料と比較して、クエン酸晒しおよび EDTA 晒し試料では、抑制されていたことが明らかとなった。一方で、60°C + 90°C加熱、および 90°C加熱時において、各水晒し間でのタンパク質分子量分布に明確な差は確認されなかった。

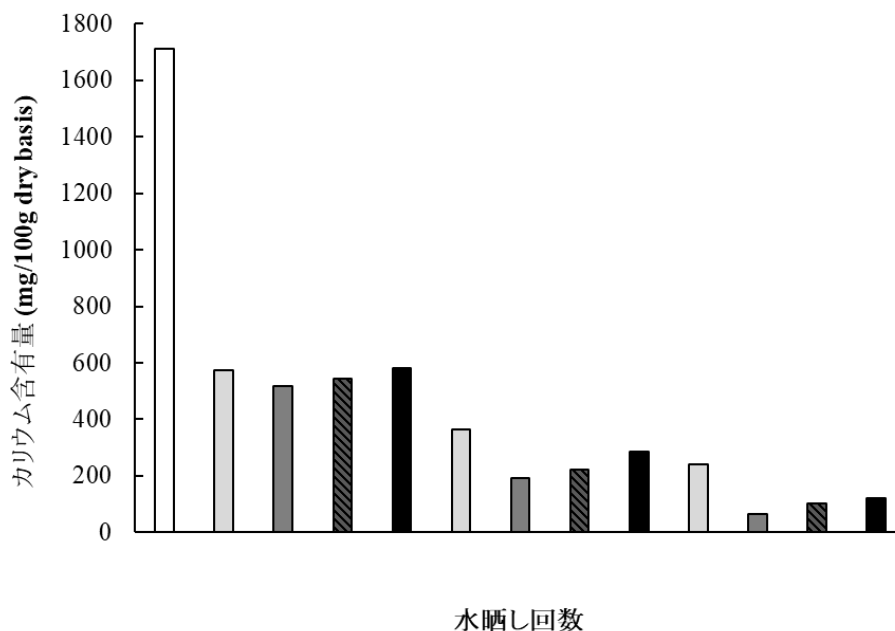


Fig. 1. 各水晒しによるスケトウダラ筋肉カリウム含有量の変化。■: 落とし身, ■: 清水晒し, ■: NaCl晒し, ■:クエン酸晒し, ■: EDTA晒し。

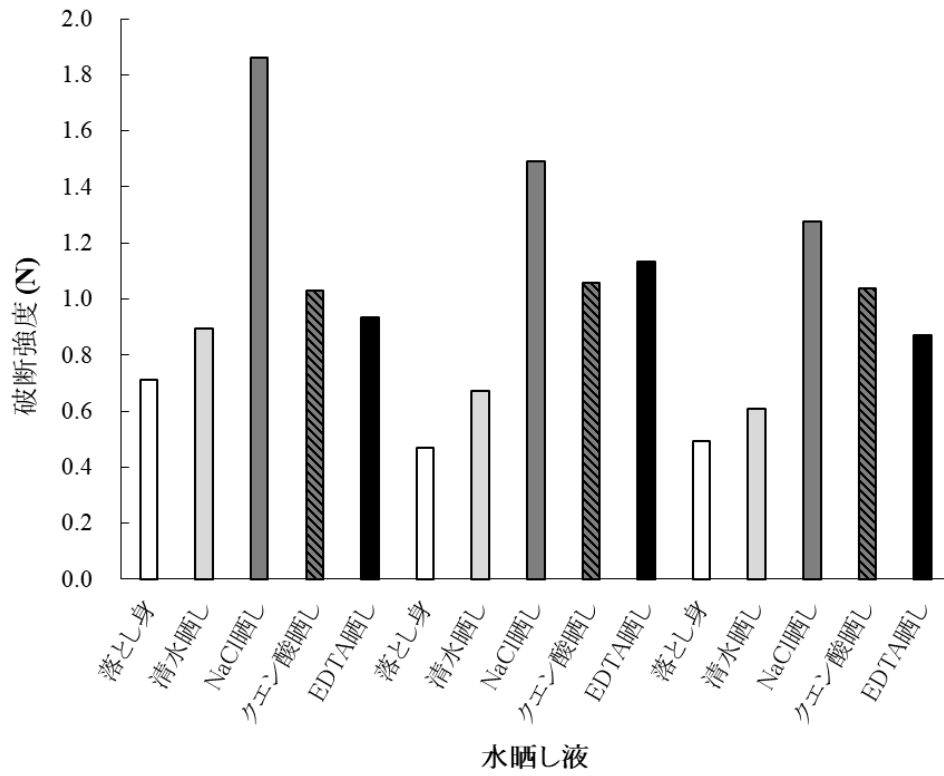


Fig. 2. 各水晒しによるスケトウダラ筋肉加熱ゲルの破断強度.

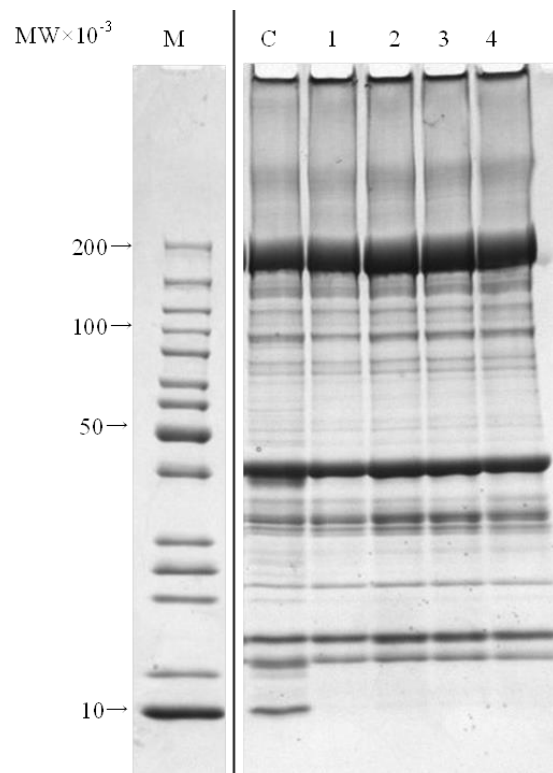


Fig. 3. 90°C加熱時の各水晒しによるスケトウダラ筋肉加熱ゲル SDS-PAGE パターン. M: タンパク質分子量マーカー, C: 落とし身, 1: 清水晒し, 2: NaCl晒し, 3: クエン酸晒し, 4: EDTA晒し.

### 3-5. 異なる水晒し液が加熱ゲルのカルシウム含有量に及ぼす影響

上記の結果をうけ、40°C加熱時のゲル物性の向上が、カルシウム依存性のトランスグルタミナーゼが触媒する坐りによる可能性が推察されたため<sup>12)</sup>、加熱ゲルのカルシウム含有量を検討した。Table. 1 に示したように、加熱ゲルのカルシウム含有量はクエン酸晒しおよびEDTA晒しにより有意に低減した。一方で、清水晒しにより、加熱ゲルのカルシウム含有量は落とし身から調製した加熱ゲルと比較して2倍程度に増加した。

## 4. 考察

### 4-1. 異なる水晒し液が本種筋肉のカリウム含有量に及ぼす影響

本種筋肉中のカリウム含有量の低減を目的とし、水晒しによるカリウム含有量に及ぼす影響を検討した。その結果、本種筋肉のカリウム含有量は、水晒しによって低減され、その低減効果は水晒し液によって異なることが明らかとなった。

野崎らは、魚肉筋肉において、カリウムがタンパク結合型のもので遊離型のものに分類され、多くの魚種で遊離型のもので総カリウム含有量の過半数を占めることを明らかにしている<sup>13)</sup>。本研究において、水晒しにより大きくカリウム含有量が低減したことから、いずれの水晒しにおいても遊離型のカリウムイオンが除去されたことが示唆された。

また、清水晒しと比較して塩水晒し、クエン酸晒し、およびEDTA晒しはより大きなカリウム低減効果を示した。魚肉タンパク質とカリウムイオンはイオン結合状態もしくは配位結合状態にあることが知られている<sup>6)</sup>。本研究で用いた水晒し液は塩化ナトリウム水溶液、クエン酸三ナトリウム水溶液、EDTA三ナトリウム水溶液、水道水の順にイオン強度が高いと推察される。本研究では、水晒し液のイオン強

度が大きくなるほど、より大きなカリウムの低減効果が確認され、塩水晒しが最も大きな低減効果を示した。一方で、EDTA三ナトリウム水溶液やクエン酸三ナトリウム水溶液といったキレート能を有するがイオン強度が比較的小さい水晒し液を用いた場合では、塩水晒しと比較してカリウムの低減効果が小さかった。

以上の結果から、本種筋肉において、タンパク結合型のカリウムはイオン結合によって魚肉タンパク質と結合したものが大半を占め、その除去には塩化ナトリウム水溶液など、よりイオン強度が大きい溶液を用いた水晒しが効果的であることが示唆された。

### 4-2. 水晒しが本種筋肉の加熱ゲル形成能に及ぼす影響

本種筋肉の加熱ゲル形成能は水晒しにより高められた。そこで、SDS-PAGEによるタンパク質分子量分布の検討を行った結果、水晒しによって低分子タンパク質(分子量10,000程度)のバンドの消失が確認された。水晒しによって加熱ゲル形成能が向上する理由としては、水溶性タンパク質の除去およびミオシンの濃縮が指摘されている<sup>5)</sup>。本研究結果はこれら既存の知見と一致した。

40°C + 90°C加熱を行った場合、塩水晒し試料ではクエン酸晒しおよびEDTA晒しと比較して有意に加熱ゲル形成能が高められた。また、塩水晒し試料と比較して、クエン酸晒し試料、およびEDTA晒し試料では同加熱条件におけるミオシン重鎖の多量体化が抑制されていた。通常、40°C付近の低温域で加熱を行うことで、「坐り」とよばれる、カルシウムイオン依存性トランスグルタミナーゼによるミオシン重鎖の重合反応が進行する<sup>12)</sup>。そのため、40°C付近で加熱したのちに90°Cで加熱する方法は二段加熱法とよばれ、加熱ゲル物性の向上を目的として広く利用されている。

Table. 1. 各水晒しによるスケトウダラ筋肉加熱ゲルのカルシウム含有量 (mg/100g wet basis)

落とし身	清水晒し	NaCl 晒し	クエン酸晒し	EDTA 晒し
8.3	16.0	7.2	4.8	3.6

そこで、加熱ゲル中のカルシウム含有量を検討したところ、クエン酸晒しおよび EDTA 晒し試料では、塩水晒し試料と比較して有意に低下したことが明らかとなった。これは、クエン酸や EDTA の有するキレート作用によって、水晒し液がカルシウムイオンと特異的に結合し、効果的な除去が行われたものであると示唆された。したがって、クエン酸晒し試料および EDTA 晒し試料では、キレート作用によって本種筋肉のカルシウム含有量が低減し、坐りが抑制されたと示唆された。

一方で、60°C + 90°C および 90°C 加熱時では、水晒し液のイオン強度と加熱ゲル形成能に正の相関関係が見られた。赤身魚の場合、塩類を含む水晒しによって、筋形質タンパク質が清水晒しと比較してより効率的に除去され、結果として加熱ゲル形成能が高められることが知られている<sup>14)</sup>。しかし、本実験の SDS-PAGE の結果からは、各水晒し間でタンパク質分子量分布に顕著な違いは確認されなかった。したがって、水晒し液の違いによる加熱ゲル形成能の違いは、タンパク質の分解や、共有結合による重合によるものではないことが示唆された。

高橋らはアカアマダイ筋肉の表面疎水性が塩水晒しによって上昇したことを明らかにしている<sup>10)</sup>。表面疎水性の上昇は、タンパク質間の疎水性相互作用を強化し、加熱ゲル物性を向上することが明らかとなっている<sup>15)</sup>。また、表面疎水性の変化はタンパク質の立体構造の変化によって起こり、高橋は水晒し液のイオン強度がタンパク質構造変化に影響している可能性を示唆している<sup>10)</sup>。本研究においても、塩水晒しやクエン酸晒しによって本種筋肉の表面疎水性が高まり、その結果として加熱ゲル物性が向上したことが示唆された。

## 5. 結論

本研究により、0.2% NaCl を用いた塩水晒しにより、スケトウダラ筋肉中の遊離型のみならず、イオン結合型のカリウムも効率的に除去できる可能であることが示された。加えて、加熱ゲル物性も向上したことから、0.2% NaCl による塩水晒しは、腎臓病食対応すり身の製造技術として利用可能であることが示唆された。

## 6. 文献

- 1) 日本腎臓学会. (2018). エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018. 東京医学社, 東京.
- 2) 日本腎臓学会. (2014). 慢性腎臓病に対する食事療法基準 2014. 東京医学社, 東京.
- 3) Tehergorabi, R., Beamer, S. K., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2012). Salt substitution in surimi seafood and its effects on instrumental quality attributes. *LWT-Food Science and Technology*, 48, 175-181.
- 4) Tehergorabi, R., & Jaczynski, J. (2012). Physicochemical changes in surimi with salt substitute. *Food Chemistry*, 132, 1281-1286.
- 5) Zhang, L., Li, Q., Shi, J., Zhu, B., & Luo, Y. (2018). Changes in chemical interactions and gel properties of heat-induced surimi gels from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during setting and heating: effects of different washing solutions. *Food Hydrocolloids*, 75, 116-124.
- 6) 加藤広介. (2010). タンパク質の性質を知る, タンパク質の性質は?. 「目的別で選べるタンパク質発現プロトコール」(永田恭介, 奥脇暢 編). 羊土社, 東京. 16-25.
- 7) Chaijan, M., Soottawat, B., Wonnop, V., Cameron, F. (2004). Characteristics and gel properties of muscles from sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) caught in Thailand. *Food Research International*, 37, 1021-1030.
- 8) 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室. (2016). 日本食品成分表分析マニュアル 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂). 建帛社, 東京.
- 9) Takahashi, K., Kurose, K., Okazaki, E., & Osako, E. (2016). Effect of various protease inhibitors on the heat-induced myofibrillar protein degradation and gel-forming ability of red tilefish (*Branchiostegus japonicus*) meat. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 717-723.
- 10) 高橋希元, 黒瀬光一, 岡崎恵美子, 大迫一史. (2017). アルカリ塩水晒しによるアカアマダイ

Branchiostegus japonicus 筋肉加熱ゲル形成能の改善. Nippon Suisan Gakkaishi, 83, 777-784.

- 11) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- 12) Benjakul, S., Visessanguan, W., & Pecharat, S. (2004). Suwari gel properties as affected by transglutaminase activator and inhibitors. Food Chemistry, 85, 91-99.
- 13) 野崎征宜, 宮崎昭二郎. (1974). 海産魚類組織中のナトリウムおよびカリウムの含量と形態について. 長崎大学水産学部研究報告, 37, 23-28.
- 14) Park, J. W., Graves, D., Draves, R., & Yongsawatdigui, J. (2014). Manufacture of surimi: harvest to frozen brock. In: Park JW (eds). Surimi and Surimi Seafood, Third Edition. CRC Press, Florida. 56-100.

- 15) Benjakul, S., Visessanguan, W., Ishizaki, S., & Tanaka, M. (2001). Differences in gelation characteristics of natural actomyosin from two species of bigeye snapper, Priacanthus tayenus and Priacanthus macracanthus. Journal of Food Science, 66, 1311-1318.

## 7. 謝 辞

本研究はソルト・サイエンス財団 2019 年度一般公募研究助成により行ないました。ここに深く感謝の意を表します。

## Development of a Novel Technology to Produce Fish Surimi with Low Potassium Content for a Renal Diet.

Kigen Takahashi

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology.

### Summary

Patients with severe renal disease need to keep many dietary restrictions, such as sodium and potassium restrictions. Although many studies have focused on the reduction of sodium content, there are few studies to reduce potassium content in foods. It is well known that elevated potassium levels in the blood cause acute heart failure. In this study, in order to solve the above problems, we investigated the reduction of potassium content in surimi products, which have been consumed worldwide.

Alaska pollock mince (surimi) was washed using various solutions including 0.2% NaCl, Na-citrate, and EDTA, respectively. The 0.2% NaCl solution significantly affected on the reduction of the potassium content in the surimi. A 90% or more decrease in the potassium content was observed in the surimi after three time washing with 0.2% NaCl as compared to that in the raw sample. In addition, the surimi sample after the 0.2% NaCl washing exhibited the highest thermal gelation properties among the tested samples.

These results indicated that use of 0.2% NaCl solution can efficiently remove potassium in fish meat. It was also shown that ionic bonds mainly present between fish meat protein and potassium. Furthermore, thermal gel-forming ability of the surimi was improved using the 0.2% NaCl washing. This study indicated that the 0.2% NaCl washing might be useful to produce surimi for a renal diet.