

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16194

研究課題名(和文)再凍結された冷凍すり身の有効利用および再凍結によるゲル形成能劣化抑制に関する研究

研究課題名(英文) Study on utilization of refrozen surimi and inhibition of deterioration of gel forming ability by refrozen

研究代表者

阿部 周司 (ABE, Shuji)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：60733657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：冷凍すり身は予期せぬ温度上昇によって再凍結されることがある。そこで、本研究は再凍結された冷凍すり身のゲル形成能劣化のメカニズムの解明と再凍結された冷凍すり身の有効利用について検討した。再凍結によって、すり身中の筋原繊維タンパク質の変性が確認され、それがゲル形成能劣化に寄与していることが示唆された。特に再凍結された冷凍すり身は坐りゲルの形成能が劣化した。その一方で、坐りを伴わない直加熱ゲルでは大きなゲルの物性の低下は確認されなかった。また、卵白の添加は再凍結された冷凍すり身のゲル形成に有効であった。

研究成果の概要(英文)：Frozen surimi may be refrozen due to unexpected temperature rise. In this study, we investigated the deterioration mechanism of gel forming ability of re-frozen surimi and utilization of refrozen surimi. The myofibrillar of surimi was denatured due to refrozen. It was suggested that the denaturation contribute to deterioration of gel forming ability. Especially, setting gel forming ability of refrozen surimi was decreased. On the other hand, mechanical property of direct heat induced gel which made from refrozen surimi decreased slightly. And, addition of egg white was effective for gel forming of refrozen surimi.

研究分野：食品加工

キーワード：冷凍すり身 再凍結 ゲル形成 卵白

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 水産練り製品は日本の水産加工品の生産量で約30%を占め、重要な位置を占めている。しかしながら、日本の冷凍すり身の生産量は減少し、冷凍すり身の調達は輸入に頼っているのが現状である。水産練り製品に使用される主な魚種はスケトウダラであるが、スケトウダラの資源量減少に伴い、それ以外の魚種のすり身も多く製造されている。特に、東南アジアでのすり身の生産は活発化しており、東南アジアからの冷凍すり身の輸入が着実に増えている。

冷凍すり身は冷凍状態で輸送され保管されることが前提となっている。日本ではコールドチェーンが発達していることから、日本の水産練り製品または冷凍すり身製造業者は輸送中に冷凍すり身が解凍されることを想定していない。しかし、2014年に大手の運送会社がチルド商品を配送途中で解凍させる事故が発生するなど、日本のコールドチェーンにはまだ不十分な部分がある。冷凍すり身は冷凍庫で保存されているものの予期せぬ温度上昇によって、一度解凍され再び冷凍される可能性が考えられる(再凍結)。冷凍すり身が再凍結されると、ゲル形成能が劣化することが知られているものの、その知見は少なく、再凍結された冷凍すり身のゲル形成能劣化機構は明確になっておらず、再凍結された冷凍すり身の処理方法(加工条件を含む)はわかっておらず、再凍結された冷凍すり身の有効利用に関する情報が少ない。

冷凍すり身には凍結保護物質としてショ糖やソルビトールなどの糖類が添加されている。これらの糖類は凍結あるいは冷凍保存中の魚肉タンパク質の変性を抑制し、冷凍すり身のゲル形成能を維持することに寄与している。また凍結によるタンパク質変性の抑制に対して糖類がどのように寄与しているか、そのメカニズムは十分明らかにはなっていないが、糖類の持つOH基が多いほど、タンパク質の熱安定性が高くなり、タンパク質の凍結変性の抑制に対しても糖類のOH基の数が重要であることが報告されている(新井健一、水産食品と糖アルコール、pp60, 2000)。そこで、糖1分子あたり11個のOH基を有するマルトトリオースを冷凍すり身に添加することで、冷凍すり身の再凍結によるゲル形成能劣化を抑えることができないかと考えた。マルトトリオースはグルコースが $\alpha$ 1-4結合した三糖であり、吸水性が低く、保湿性が高いという性質を有する。しかし、通常はアモルファスの状態で存在し、結晶化が難しい。また、その物性に関する知見も十分ではない。そのため、マルトトリオースは現状、産業的に扱いづらい糖であることから、製造量も限られており、価格も非常に高くなっている(約40,000円/10g)。以上のことから、マルトトリオースに関する基礎的知見とその応用の知見が産業的に求められている。

## 2. 研究の目的

以上の産業的背景から、本研究では(a)再凍結による冷凍すり身のゲル形成能劣化機構に関する基礎的知見の構築、(b)再凍結されゲル形成能が劣化した冷凍すり身の有効利用(食品添加物を添加することによる物性改良効果)(c)マルトトリオースを60%以上含有する糖素材(以下、MTCSと略す)の冷凍すり身に対する凍結保護効果の検討、以上の3点を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 再凍結した冷凍すりみの調製

再凍結による冷凍すり身のゲル形成能劣化機構を明らかにする研究においては、異なる3つの等級の冷凍すり身(SA級2ブランド、A級2ブランド、陸上2級1ブランド)を試料とした。なお、一般的にこれらの等級においてはSA級>A級>陸上2級の順に品質が高いとされている。これら3つの等級のすり身を再凍結前(コントロール)、コントロールを一晩冷蔵庫で解凍し、再び冷凍庫に保存した試料(再凍結試料)、さらに再凍結を繰り返した試料(再々凍結試料)を調製した。

### (2) マルトトリオースを含む糖素材を添加した冷凍すり身の調製

常法によって製造されたすり身にMTCSを添加した後、凍結し、試料を調製した。なお、MTCSの冷凍すり身に対する凍結保護効果の検討に際しては、後述する再凍結された冷凍すり身の結果から、Ca-ATPase活性がゲル形成能に影響することがわかったため、本実験はCa-ATPase活性の測定の面から検討を行った。Ca-ATPase活性の測定方法については後述する。

### (3) ゲルの調製および物性の測定

試料を解凍後、攪拌し(空摺り)、試料に対して3%の塩化ナトリウムを添加して攪拌(塩摺り)し、肉糊を調製した。調製した肉糊をポリ塩化ビニルデンチューブに充填し、予備加熱(坐り)を20で0~24時間行って坐りゲルを調製し、その後坐りゲルを90で30分加熱し、ゲルを調製した。なお、坐り0時間で加熱したゲルを直加熱ゲルとし、坐りを経て加熱したゲルを二段加熱ゲルとした。また、再凍結された冷凍すり身のゲル形成能の向上を目的としてデンプン、卵白およびトランスグルタミナーゼ製剤を添加した場合は、塩摺りの後にそれぞれの添加物を所定の量を添加して肉糊を得て、前述の加熱条件に準じて加熱ゲルを調製した。

調製した坐りゲル、直加熱ゲルおよび二段加熱ゲルについて、レオメーターを用いて破断強度(BS)および破断凹み(bs)を求めた。

### (4) ゲルを形成するタンパク質間の結合種の推定

調製した坐りゲル、直加熱ゲルおよび二段加熱ゲルを形成するタンパク質間の結合種を國本らの方法に準じて推定した(國本ら、

日本食品科学工学会誌, 61, 19-26, 2014)。すなわち、20mM Tris-HCl (pH7.5)を加えた 0.6M NaCl 溶液 (S1), 0.6M NaCl+1.5M Urea 溶液 (S2), 0.6M NaCl + 8.0M Urea 溶液 (S3), 0.6M NaCl + 8.0M Urea + 2% 2-mercaptoethanol 溶液 (S4), 2% SDS + 8.0M Urea + 2% 2-mercaptoethanol 溶液 (S5) に対して溶解させた。それぞれの可溶性溶媒に対する可溶性率を求め、S1 に対する可溶性率はイオン結合、S2 と S1 の可溶性率の差は水素結合、S3-S2 の可溶性率の差は疎水性相互作用、S4-S3 の可溶性率の差は S-S 結合、S5-S4 の可溶性率の差はこれらの結合より強固な結合とし、5 種類の結合種の割合を推定した。

#### (5) SDS-PAGE

調製した加熱ゲルを 2% 2-mercaptoethanol + 2% SDS + 8M Urea + 20mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解し、これを Laemmli の方法に準じて (Laemmli UK, Nature, 15, 680-685, 1970) SDS-PAGE に供した。その後、得られた SDS-PAGE パターンをスキャナーで読み取り、ImageJ を用いてミオシン重鎖の濃度を光学濃度に変換し、坐りによるミオシン重鎖の多量化の速度を推定した。

#### (6) 冷凍すり身に含まれる筋原繊維タンパク質の Ca-ATPase 活性

試料の筋原繊維タンパク質(Mf)の抽出は加藤らの方法に準じて行った (加藤ら, 日本水産学会誌, 43, 857-867, 1977)。得られた Mf 1mL (タンパク質濃 2.5 ~ 3.5mg/mL) を 0.1M CaCl<sub>2</sub> 0.5mL, 0.5M Tris-maleate (pH7.0) 0.5mL, 0.12M KCl 20mM Tris-HCl buffer (pH7.0) 7.5mL, 20mM ATP 0.5mL の反応混液 (25 ) に加えた。その後、酵素反応によって遊離したリン酸の量を測定し、Ca-ATPase 活性を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 再凍結した冷凍すり身のゲル形成

再凍結した冷凍すり身から調製した坐りゲルの破断強度の結果を Fig.1 に示し、破断凹みの結果を Fig.2 にそれぞれ示す。なお、本報告では誌面の都合上、SA 級冷凍すり身から調製した坐りゲルの結果のみを示す。

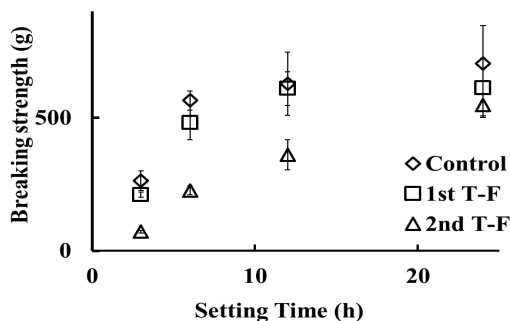


Fig.1 Effect of setting time on the breaking strength of setting gel prepared from SA grade frozen surimi at 20°C. T-F means thawing-freezing cycle.

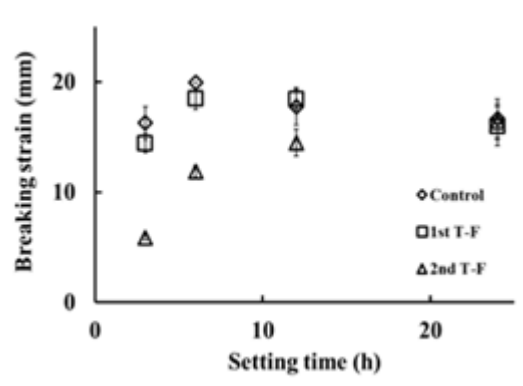


Fig.2 Effect of setting time on the breaking strain of setting gel prepared from SA grade frozen surimi at 20°C. T-F means thawing-freezing cycle.

Fig.1 および Fig.2 に示すように、再凍結された冷凍すり身の坐りゲルの物性はコントロールに比べて、劣化する傾向にあった。次にこれらの坐りゲルを加熱したゲルの破断強度および破断凹みの結果を Fig.3 および Fig.4 にそれぞれ示す。

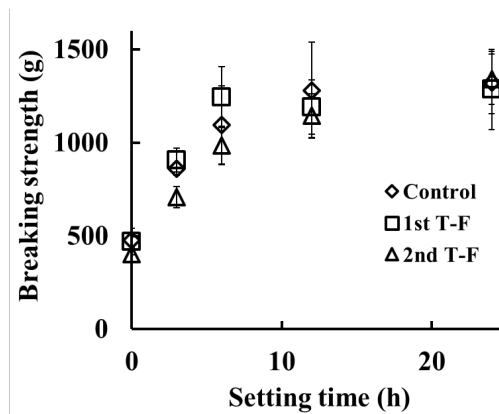


Fig.3 Effect of setting time on the breaking strength of double heated gel prepared from SA grade frozen surimi at 20°C. T-F means thawing-freezing cycle.

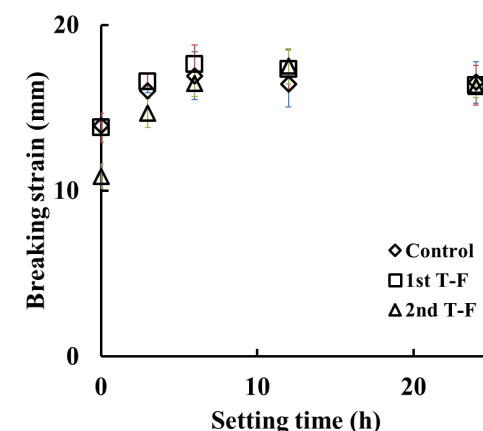


Fig.4 Effect of setting time on the breaking strain of double heated gel prepared from SA grade frozen surimi at 20°C. T-F means thawing-freezing cycle.

freezing cycle.

Fig.3 および Fig.4 に示すように、二段加熱ゲルでは再々凍結試料のみ坐り時間に伴う物性増強効果がコントロールに比べて抑制されたが、最終的な値はコントロールと同様の値であった。なお、A 級および陸上2 級についても、同様の傾向が見られ、陸上2 級では加熱後の値はコントロールを下回る結果となった。つまり、これらの結果から、再凍結が冷凍すり身の物性に及ぼす影響として坐りの抑制が考えられた。

なお、図示はしないが、再凍結された冷凍すり身にデンプン、卵白およびトランスグルタミナーゼ製剤を添加することで、加熱ゲルの物性が向上し、再凍結された冷凍すり身に対して、デンプン、卵白およびトランスグルタミナーゼ製剤といった弾力補強材は一定の効果があることが確認された。

### (2)ゲルを形成するタンパク質間の結合種の推定

再凍結された冷凍すり身から調製したゲル形成能の劣化について、ゲルを形成するタンパク質間の相互作用の変化が考えられる。そこで、Fig.5 に陸上2 級の冷凍すり身から調製した加熱ゲルを各種溶媒に溶解させたときの溶解率の変化を示す。

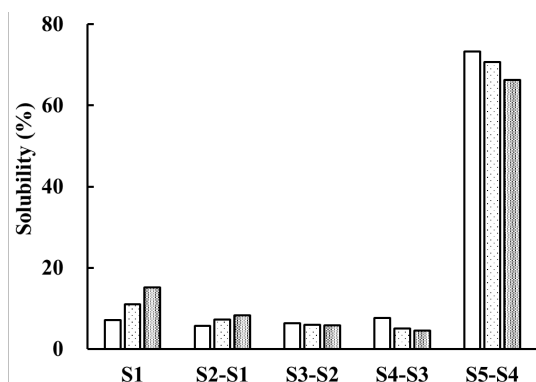


Fig.5 Changes in possible binding types involved in two-step heated gel (20 , 24hours 90 , 30min) protein structure formed from frozen surimi. S1, (S2-S1), (S3-S2), (S4-S3) and (S5-S4) are showed ionic bond, hydrogen bond, hydrophobic interaction, disulfide bond, and more intensive interaction /bond. Error bars mean standard deviation. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ). □:Control, ▨:1 freeze-thaw cycle, ▩: 2 freeze-thaw cycles.

Fig.5 に示すように、再凍結された冷凍すり身のゲル形成能の劣化要因の一つとして、ゲルを形成するタンパク質間の結合種の割合が変化していることが考えられた。すなわち、再凍結された冷凍すり身から加熱したゲルの結合様式はコントロールと比較して、比較的弱い結合であるイオン結合および水素結合の割合が増え、S-S 結合やより強い結合の割合が減った。特に強い結合は坐りによ

って形成される物理的な絡み合いやトランスグルタミナーゼによるイソペプチド結合等の共有結合であることが推定されており、そのような結合割合が再凍結により減少するものと考えられた。

### (3)再凍結した冷凍すり身の坐り工程におけるミオシン重鎖の多量化

これまでの結果から再凍結された冷凍すり身からゲルを調製した場合、坐りの進行が抑制されることがわかった。すなわち、坐り工程によって生じる、タンパク質間の強固な結合の割合が減少することが示唆された。そこで、坐りはミオシン重鎖の多量化反応であるため、SDS-PAGE によりミオシン重鎖の多量化反応速度の違いを確認した。SA 級のコントロール試料および再々凍結した試料から調製した坐りゲルの SDS-PAGE の結果を Fig.6 および Fig.7 にそれぞれ示す。

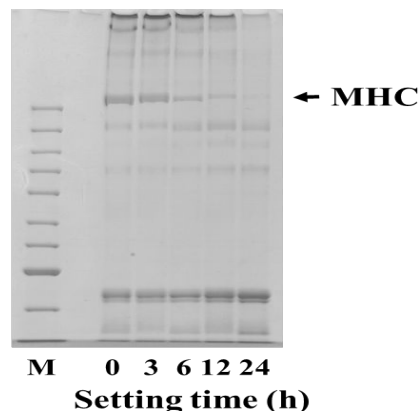


Fig.6 SDS-PAGE pattern of setting gel prepared from control SA grade frozen surimi. MHC means myosin heavy chain.

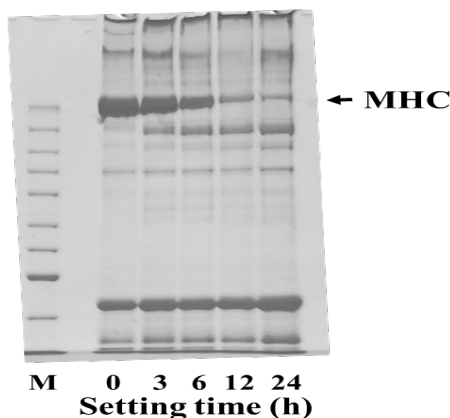


Fig.7 SDS-PAGE pattern of setting gel prepared from 2nd re-frozen SA grade frozen surimi. MHC means myosin heavy chain

Fig.6 および Fig.7 の結果から再凍結を行うことで、坐り時間に伴うミオシン重鎖(MHC)の減少、すなわち、ミオシン重鎖の多量化が遅れていることがわかった。Fig.8 にSA 級すり身で調製した坐りゲルの経時変化に伴うミオシン重鎖の減少量を光学濃度によって



算出した結果を示す。

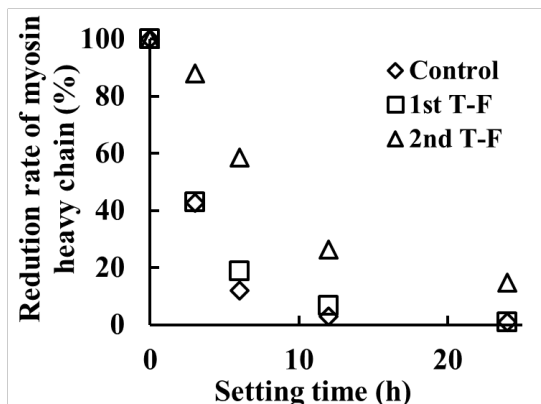


Fig.8 Reduction rate of myosin heavy chain during setting time in setting gel prepared from SA grade frozen surimi.

Fig.8 に示すように、冷凍すり身を再凍結することで、ミオシン重鎖の減少速度が遅くなる、すなわち、多量化の速度がおそくなることがわかった。これはどの等級のすり身においても同様の傾向を示した。坐りはすり身に含まれるタンパク質（特にミオシン）の変性状態に関与しているため、すり身中の筋原繊維タンパク質を抽出し、Ca-ATPase 活性を測定した。Fig.9 に SA 級冷凍すり身から抽出した筋原繊維タンパク質の Ca-ATPase 活性に対する再凍結の影響の結果を示す。

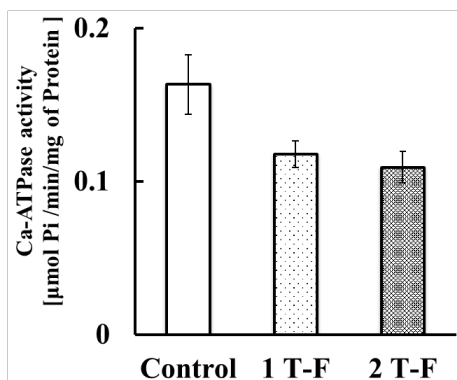


Fig.9 Change in Ca-ATPase activity of SA grade frozen surimi. T-F means thawing-freezing cycle. :Control, □ :1 freeze-thaw cycle, ■ : 2 freeze-thaw cycles.

Fig.9 に示すように再凍結された冷凍すり身の Ca-ATPase 活性は再凍結により低下した。つまり、再凍結によってミオシン頭部の変性が生じることがわかった。なお、この現象はどの等級のすり身でも確認された。

以上の結果から、再凍結された冷凍すり身のゲル形成能劣化要因の一つとして、再凍結によってミオシン頭部が変性し、それが引き金となって、坐りが抑制されるということが考えられた。このようにゲル形成能劣化した冷凍すり身に対して、これまで使用されてきている弾力補強材はゲル形成能を向上させ

ることが確認され、再凍結された冷凍すり身に対しても弾力補強材の使用は有効であることがわかった。また、この現象を逆手に取ると、坐り工程を経ない水産練り製品に対しては再凍結によるゲル形成能劣化の影響は小さいと考えられた。

再凍結による冷凍すり身のゲル形成能劣化を抑えることを目的として、MTCS を添加した冷凍すり身を調製して、その冷凍すり身から抽出した Mf の Ca-ATPase 活性を測定した。その結果を Fig.10 に示す。なお、本実験では対照区としてソルビトールのみを添加した冷凍すり身を調製し、比較した。

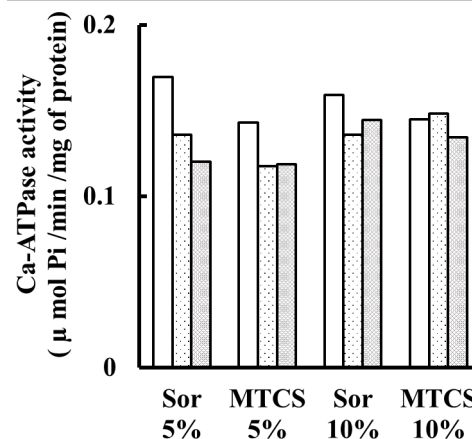


Fig.10 Change in Ca-ATPase activity of frozen surimi. Sor and MTCS mean sorbitol and maltotriose contained sugar. □ :Control, □ :1 freeze-thaw cycle, ■ : 2 freeze-thaw cycles.

Fig.10 に示すように、ソルビトールあるいは MTCS を添加した冷凍すり身ともに再凍結によってすり身中の Ca-ATPase 活性が低下する傾向を示したが、若干ではあるが MTCS を添加することにより、再凍結による Ca-ATPase 活性の減少率を抑えることができた。しかしながらマルトトリオースの純品は非常に高価であり、また MTCS であっても一般的に冷凍すり身に使用される糖類に比べてコストがかかることから、本研究で示された程度の効果ではそのコストに見合った効果は得られないと考えられた。ただし、マルトトリオースは通常アモルファス状態で存在することから MTCS は酵素製剤など単価の高い素材に対するタンパク質保護材としての効果はある程度見込めるため、今後はそのような用途に対する検討が必要である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

西牧 竜哉、浅田 拓真、阿部 周司、梶原 一人、再凍結した冷凍すり身の坐りに及ぼす乾

乾燥卵白の効果．第 62 回低温生物工学会セミナー及び年会（2017 年 5 月）

浅田 拓真、阿部 周司、梶原 一人．再凍結による冷凍すり身のゲル形成能の劣化機構について．平成 29 年度日本水産学会春季大会（2017 年 3 月）

浅田 拓真、阿部 周司、梶原 一人．再凍結された冷凍すり身のゲル形成能劣化機構の検討．第 61 回低温生物工学会セミナー及び年会（2016 年 6 月）

寺尾 優希、阿部 周司、梶原 一人．再凍結した冷凍すり身の加熱ゲル形成能に対する澱粉および乾燥卵白の効果．第 60 回低温生物工学会セミナー及び年会（2015 年 5 月）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

阿部 周司 （ ABE, Shuji ）  
東京工科大学.応用生物学部.助教

研究者番号：60733657

### (4)研究協力者

梶原 一人 （ KAJIWARA, Kazuhito ）  
東京工科大学.応用生物学部.教授

浅田 拓真 （ ASADA, Takuma ）  
西牧 竜也 （ NISHIMAKI, Tatsuya ）