

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06233

研究課題名（和文）小型カタクチイワシからの魚肉ゲルの開発

研究課題名（英文）Development of kamaboko gel from small anchovy

研究代表者

大迫 一史（Kazufumi, Osako）

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：00452045

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小型カタクチイワシをかまぼこ原料として利用することを目的に、タンパク質回収法の検討、回収タンパク質のゲル形成能、内在性プロテアーゼの検討を行った。タンパク質は塩水利用回収法で機能性を保持したまま回収可能であることが明らかとなった。主にセリン型のプロテアーゼが塩水利用回収タンパク質の脱水工程でタンパク質を分解することにより、カタクチイワシ肉のゲル形成を阻害することが示唆された。また、回収タンパク質のゲル形成能はセリンプロテアーゼを阻害することにより向上することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

来たる食糧難の時代に備え、カタクチイワシを既存のスケットウダラなどの冷凍すり身原料と代替せしめることにより、特定魚種への漁獲強度の集中による資源量の低下を緩和できるものと考えた。研究の結果、小型のカタクチイワシからタンパク質のみを得る方法を開発した。また、このタンパク質はから、一般に出回っている蒲鉾よりは若干弾力が無いが、蒲鉾をつくることに成功した。一方で、セリンプロテアーゼがこの蒲鉾の弾力を弱めていることが明らかになり、これはセリンプロテアーゼインヒビターを加えることで解消できた。今後、天然物由来のプロテアーゼインヒビターを添加することで産業界への実用化への目途がつくと考えられた。

研究成果の概要（英文）：With the aim of utilizing small-sized Japanese anchovy as a raw material for kamaboko, a protein recovery method, the gel-forming ability of the recovered protein, and endogenous protease of the anchovy were investigated. It was found that proteins could be recovered by the salt-water recovery method with retaining their functionalities. It was suggested that serine-type proteases mainly deteriorate gel formation of the recovered protein by degrading the proteins during the dehydration process. The gel-forming ability of the recovered proteins was also found to be enhanced by inhibition of serine proteases.

研究分野：水産加工学

キーワード：かまぼこ

1. 研究開始当初の背景

カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) は、西部太平洋に生息し、樺太南部から本州の日本海・太平洋岸、台湾・広東省まで分布する。カタクチイワシは日本で最も漁獲量の多い魚で、日本各地で巻き網や地引き網などで漁獲される。一方で、用途としては煮干しや素干し等に限定されている。この理由として、魚体が他の魚種と比較して非常に小さいために、通常の方法では魚肉のみを得ることが難しく、肉質が脆弱で、鮮度低下が非常に速いことが挙げられる。

そこで、来たる食糧難の時代に備え、カタクチイワシから効率的に可食部(筋肉)を得る方法を開発し、これまで研究を行って来た「かまぼこ」の原料として用いることが出来ないかと考えた。さらに、カタクチイワシを既存のスケトウダラなどの底魚に替わる食糧として普及せしめることにより、特定魚種への漁獲強度の集中による資源量の低下を緩和できるものと考えた。

魚肉ゲルは「かにかまぼこ」などとして世界に普及し、その需要は未だ伸びつつある。しかしこれら魚肉ゲルの原料はいずれも枯渇状態にある。一方、本研究で取り上げるカタクチイワシは魚体が非常に小さいため、現状では原料として用いられていないが、資源量は高位で安定している。バイオマスの有効利用といった観点から、これまで原料として用いられていなかった極端に小さい魚から付加価値の高いかまぼこを調製しようとする試みが、学術的に独自性および創造性を有する点である。

2. 研究の目的

本研究を行う前にそれまで行って来た予備試験においては、通常の方法では魚体が小さすぎるために採肉が不可能なため、以下の方法でタンパク質を回収し、そのタンパク質からゲルを得ることに成功していた。

「カタクチイワシを骨や内臓等を除去しないままミートチョッパーで均一化する。(Minced meat)」→「これを終濃度 4%の塩化ナトリウム溶液と一緒に攪拌して筋原繊維タンパク質を可溶化させる」→「遠心分離を行い、骨や皮などの不溶成分を沈殿させて除去する」→「上清に 10 倍量の蒸留水を加えて攪拌後、再び遠心分離を行い、筋原繊維タンパク質を含む魚肉を回収する」→「得られた魚肉を脱水シートで一晩脱水する」→「通常の魚肉と同様に、塩化ナトリウムを加えて播漬し、その後加熱する」

以上の方法で得られた肉 (Salt water) を、他の方法で回収したもの (Acid-aided、pH を等電点以下の酸性にして Minced meat を溶解し、遠心分離後、等電点に調整して再び遠心分離して回収したタンパク質; Alkaline-aided、pH を等電点以上のアルカリ性にして Minced meat を溶解し、遠心分離後、等電点に調整して再び遠心分離して回収したタンパク質) と比較すると、色素量が多く、他の回収法から得られたものに比較して、黒っぽいタンパク質が得られたが、高い Ca-ATPase 活性を維持しており、高い機能性が維持された状態でタンパク質が回収できることがわかっていった。

一方で、予備実験の結果においては、小型のカタクチイワシの「かまぼこ」原料としての有用性については高い可能性が見出されたものの、クリアされるべき最大の難点はかまぼこ原料適性が高いタンパク質を得ることである。予備実験では、魚肉ゲルは得られたものの、ゲルは脆弱で黒く、食品としては不適當なものであった。

本研究は、以上の大きな問題点をクリアすることにより、カタクチイワシを来たる食糧難の時代の有用な栄養源として担保すべく、本研究により得られる知見を世界に広く普及しようとするものである。

カタクチイワシのような小魚について、骨や頭ごと「かまぼこ」にすることはされているが、よりタンパク質の純度が高い「かまぼこ」の開発に関する試みは、世界で初めてであった。

3. 研究の方法

(1) Salt water 法で回収したタンパク質の性状

タンパク質の回収率(歩留まり)について上記 3 者を比較検討し、得られたタンパク質については最も基本的な情報である一般成分を分析ののち、全色素量、ミオグロビン量などの色素成分を測定し、これらが、タンパク質回収工程で、何らかの試薬(エタノールなどの食品添加物として使用可能なものを)を用いることによって、除去可能かを検討した。また、タンパク質ゲル形成時に、ゲルの強弱を決定づける、タンパク質の分子量分布を Minced meat と検討し、回収工程中に重合や分解が起こっていないかを確認した。これらに加え、ゲル調製時に重要なジスルフィド結合のもととなる SH 基量、疎水結合のもととなる表面疎水性について検討した。

(2) Salt water 法で回収したタンパク質のゲル形成能

タンパク質の機能性(ゲル形成能)を保持したまま、高収率でタンパク質を回収する方法を開発し、ゲル形成特性を明らかにした。具体的には、Salt water 法で得られたタンパク質を Acid-aided 法と Alkaline-aided 法で得られたタンパク質とゲル形成特性を比較した。

次に、Salt water 法で得られたタンパク質と、落とし身 (Unwashed meat)、清水晒肉 (Washed

meat)の3者のゲル形成能の比較を行った。落とし身は小型のカタクチイワシから採肉することが困難であるため、魚体の大きいものを用い、手指で採肉し、これを破碎した。また、清水晒は蒸留水と落とし身を混ぜ合わせ、これを遠心分離して沈殿を用いた。このようにして得られたものを、一般のかまぼこゲルと同様に調製した。すなわち、タンパク質および肉に、蒸留水を加えて水分を一手にし、一定量の塩化ナトリウムを添加し、擂潰後、加熱温度および時間を変えて加熱し、ゲルを比較した。項目としては、最も基本的なものとして破断試験による物性、実際に流通させる段階で見栄えとして重要な色調を測定した。これに加えて、保水性、加熱時のプロテアーゼによる影響を確認するために TCA-可溶性ペプチド、およびタンパク質の分子量分布を確認するための SDS-PAGE を行った。

(3) Salt water 法で回収したタンパク質のプロテアーゼ特性

カタクチイワシについてはこれまでの知見が無いが、漁獲時から速やかに死後硬直、その後すぐに解硬することが経験的に知られている。このことからカタクチイワシの内在酵素活性が非常に高いことが想定された。また、予備実験においては非常に脆いゲルが得られたが、これは、内在酵素活性によるものと考えられた。内在性酵素によるタンパク質の分解は、タンパク質回収工程、ゲルの加熱時のいずれかで生じている可能性が高いため、これらについて検討した。

については、タンパク質回収の各工程で SDS-PAGE および TCA-可溶性ペプチド量を測定した。すなわち、Minced meat と、食塩水で可溶化したタンパク質、遠心分離を行い、沈殿させたタンパク質、および脱水シートで一晩脱水したタンパク質を比較した。また、については、Minced meat と、擂潰前のタンパク質、および加熱後のゲルのタンパク質について比較した。

次に、タンパク質回収工程中、あるいはゲルの加熱時のいずれでタンパク質が分解されるかが明らかになった時点で、試薬の各種プロテアーゼインヒビターを用いてプロテアーゼのタイプを特定を行った。

4. 研究成果

(1) Salt water 法で回収したタンパク質の性状

タンパク質回収効率は Acid-aided 法が最も高く、次いで Salt water 法、Alkaline-aided 法であった。Salt water 法で回収したタンパク質の Ca-ATPase 活性は、回収前のラウンドの活性と変わらなかった。Salt water 法と Acid-aided 法で回収したタンパク質中の筋原線維タンパク質は、Alkaline-aided 法で回収したタンパク質よりも低い表面疎水性を示した。SDS-PAGE の結果から、Salt water 法で回収したタンパク質は、Acid-aided 法および Alkaline-aided 法で回収タンパク質よりも高濃度のミオシン重鎖およびアクチンを含んでいることが明らかになった。

(2) Salt water 法で回収したタンパク質のゲル形成能

Salt water 法で得られたタンパク質を、Acid-aided 法、および Alkaline-aided 法で得られたタンパク質と比較したところ、Acid-aided 法と Alkaline-aided 法で得られたタンパク質についてはゲルを形成しなかった。これは、Acid-aided 法と Alkaline-aided 法で得られたタンパク質は、回収工程中にタンパク質が変性していることが原因であると思われる。次に、未処理肉(カタクチイワシから直接手指で魚肉を回収)、水晒肉(アルカリ塩水晒)、Salt water 法で得られたタンパク質の3者を比較したところ、Salt water 法で得られたタンパク質は最も高いゲル形成能を示した。また、Ca-ATPase 活性は、未処理肉と同程度で、水晒肉よりも高い傾向を示した。SDS-PAGE および TCA 可溶ペプチドの結果から、いずれの肉もゲル形成のための加熱の段階で、内在性のプロテアーゼにより、とくにミオシンヘビーチェーンがかなりの程度分解されていることが明らかになった。

(3) Salt water 法で回収したタンパク質のプロテアーゼ特性

小型カタクチイワシからタンパク質を Salt water 法で回収したタンパク質を分解するプロテアーゼのタイプ特定を行った。タンパク質回収前の細切肉、塩水中で 4°C で 10 分間溶解後のタンパク質、遠心分離後の上清タンパク質、真水中で析出させ、遠心分離後の沈殿タンパク質、脱水シートで脱水後のタンパク質、7.5%のスクロースを添加後のタンパク質、-30°C で凍結保存後のタンパク質について、それぞれを SDS-PAGE を用いてタンパク質の分子量分布の確認を行ったところ、脱水シートで脱水中にタンパク質の分解が顕著に生じていることが確認できた。次に、この原因を特定するため、メタロプロテアーゼインヒビターである EDTA およびオルトフェナントロリン、セリンプロテアーゼインヒビターであるベンズアミジンおよび SBTI、システインプロテアーゼインヒビターである E-64 および NEM、アスパラギン酸プロテアーゼインヒビターであるペプスタチン A を用いてタンパク質の分解を調べたところ、セリンプロテアーゼが脱水中にタンパク質を分解していることが示唆された。以上の結果よりカタクチイワシから回収したタンパク質から調製したかまぼこゲルの物性が低い理由として脱水中のタンパク質の分解が考えられた。そこで、実際に回収タンパク質に、プロテアーゼインヒビターとして効果が高かった SBTI を添加してかまぼこゲルを調製したところ、最も高い破断強度を有するかまぼこを得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nonthacha Thanathornvarakul, Asada Jiarpinijnun, Emiko Okazaki, Jie-Ting Geng, Kigen Takahashi, Kazufumi Osako	4. 巻 27
2. 論文標題 A comparative study of physicochemical properties of recovered protein from Japanese anchovy (Engraulis japonicus) isolated by various recovery methods	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 121-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.27.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nonthacha Thanathornvarakul, Kigen Takahashi, Kazufumi Osako*
2. 発表標題 Classification of residual protease in recovered protein from Japanese anchovy (Engraulis japonicus) using salt water treatment
3. 学会等名 2020 FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	タナソーンバラクル ノンタチャー (THANATHORNVARAKUL NONTHACHA)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------