

グルコースオキシダーゼを用いた低 pH 誘導かまぼこ加工技術に関する研究

東京海洋大学 学術研究院 食品生産科学部門
高橋 希元

1. 研究の目的と背景

一般的に、水産練り製品の製造には加熱工程が存在し、コスト面および環境面から問題となっている。そこで本研究では、グルコースオキシダーゼ (GOD) を利用した、低 pH 誘導非加熱かまぼこの開発を試みた。GOD は、グルコースがグルコノデルタラクトン、最終的にはグルコン酸へと変化する酸化反応を触媒する酵素で、食品添加物として利用可能である (Wong *et al.*, 2008)。すり身は冷凍中のタンパク質変性を防止する目的でグルコースを含んでいる。したがって、GOD をすり身に添加することで、グルコースの酸化および pH の低下を引き起こし、ゲル化を誘発するものと考えられた。

以上より本研究では、簡便な非加熱かまぼこ製造方法の確立を目的とし、GOD の添加がスケトウダラ *Theragra chalcogramma* すり身のゲル形成能に及ぼす影響を検討した。

2. 研究の方法

2-1. 実験材料

実験材料にはスケトウダラ冷凍すり身 (FA 級, Coastal Villages Pollock 社製) を用いた。

2-2. 水晒し

すり身に含まれる未知の糖を取り除くため、水晒しを行った。すなわち、スケトウダラすり身 30 g を 0.3% NaCl 140 mL と攪拌後、遠心分離 (10000 × g, 15 分, 4°C) を行って上清を除去した。上記作業を 3 回繰り返した後、沈殿物をさらに 3 回遠心分離 (20000 × g, 15 分, 4°C) し、脱水を行った。

2-3. ホモジネートの調製

上記水晒し後のすり身 1 g を、NaCl を含む GOD-グルコース溶液 9 mL とホモジナイズした (終濃度: 1.0% GOD, 5.0% グルコース, 3% NaCl)。ホモジネートを 4°C で 0-24 時間インキュベートし、pH の経時的変化を検討した。

2-4. すり身ゲルの調製および破断試験

上記水晒し後のすり身を、石川式攪拌播漬機 (20 号型, 石川工業株式会社製) を用いて 15 分間空摺りした。その際に、最終水分含量、最終スクロース含量および最終

GOD 含量がそれぞれ 80%, 5%, および 0-3.0% となるよう、冷イオン交換水、スクロース、および GOD を添加した。空摺り後、3% NaCl を加えてさらに 15 分間塩摺りした。播漬後試料をステンレス容器 (直径 32.0 mm, 高さ 30 mm, 厚さ 1 mm) に充填し、4°C に設定した恒温槽内で 15 時間インキュベートしたのち、ただちに水中で冷却した。

得られたゲルを用いて、5 mm 球型プランジャーを装着したクリープメーター (RE-3305-I, 株式会社山電製) による押込み試験を行い、破断強度 (N) および破断歪率 (%) を算出した。

2-5. 表面疎水性の検討

水晒し後のすり身 1 g を、0-3.0% GOD を含む 3% NaCl-5% グルコース溶液 10 mL とホモジナイズした後、遠心分離 (15000 × g, 20 分, 4°C) した。上清を恒温槽内でインキュベート (4°C, 15 時間) し、3% NaCl-50 mM Hepes-NaOH (pH 7.0) を用いてタンパク質濃度が 0-1.0 mg/mL となるよう調整した。

希釈後の上清 2 mL に対して 30 μL の 8 mM ANS-50 mM Hepes-NaOH (pH 7.0) を添加し、蛍光分光光度計 (FP-8600, 日本分光株式会社製) により、励起波長 374 nm および蛍光波長 485 nm で蛍光強度を測定した。タンパク質濃度に対して得られた蛍光強度をプロットし、近似直線の傾きを表面疎水性として算出した。

2-6. 遊離チオール基含量およびジスルフィド結合量の定量

すり身ゲル 0.25 g を 10 mL の 2% SDS-8 M 尿素-10 mM EDTA-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中でホモジナイズし、遠心分離 (12000 × g, 4°C, 20 分) した。得られた上清を、2% SDS-8 M 尿素-10 mM EDTA-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いてタンパク質濃度が 0.4 mg/mL および 1.0 mg/mL となるよう調整した。

上記の 0.4 mg/mL タンパク質溶液 3 mL に対し、0.1% DTNB-0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) 300 μL を加えてインキュベート (40°C, 25 分) した。同様に、1.0 mg/mL タンパク質溶液 0.5 mL に対し、NTSB 反応液 3 mL を加え、遮光状態でインキュベート (25°C, 25 分) した。なお、NTSB 反応液の調製は Vanderhooft *et al.* (2009) の方法に従った。インキュベート後の反応液を、分光光度計 (V-630 BIO, 日本分光株式会社製) を用いて 412 nm における吸光度を測定し、モル吸光係数を $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ として、すり身タンパク質 1 g あたりの遊離チオール基含

量およびジスルフィド結合量を算出した。

3. 研究から得た結論・考察

3-1. GOD 添加すり身の pH 変化

1.0% GOD 添加すり身ホモジネートの pH は、0-15 時間のインキュベートにより時間依存的に減少し、15 時間以上では一定となった (pH7.1 → 3.4)。GOD は、グルコースを、グルコノデルタラクトンを経てグルコン酸へと変化させ、pH の低下を引き起こす (Wong *et al.*, 2008)。したがって、本結果から、GOD の添加がすり身の pH 低下を引き起こしたことが示唆された。以上より、以降はインキュベート時間を 15 時間に固定して実験を行った。

3-2. すり身ゲルの pH および物性

すり身ゲルの pH は GOD 濃度に伴って減少し、1.0-3.0% GOD 添加時は、4.7 から 4.5 であった。この値は、これまでに報告された低 pH すり身ゲルの場合と同等であった (Riebroy *et al.*, 2009)。

また、すり身ゲルの破断強度および破断歪率は、0-1.0% GOD の添加により濃度依存的に増加し、1.0% GOD 添加時には 247 g および 47.8% を示した。一般的な加熱すり身ゲルの破断強度および破断歪率はそれぞれ 200 g および 30% 程度である (Matsuoka *et al.*, 2013)。したがって、本研究で得られた低 pH 誘導すり身ゲルは、既存の加熱すり身ゲルと同等の物性を有することが示された。pH の低下は、タンパク質のアンフォールディングを引き起こし、タンパク質間の結合の形成を促進する (Totosaus *et al.*, 2002)。したがって、本研究の結果は、スケトウダラすり身の低 pH 誘導によるゲル化には、1.0 % GOD 添加が最適であることを示唆した。

3-3. 表面疎水性

すり身の表面疎水性は 0-3.0% GOD の添加により濃度依存的に増加した。表面疎水性の増加は、タンパク質のアンフォールディングや疎水性アミノ酸の露出、およびそれに伴うタンパク質の凝集を示唆する。Ptitsyn (1995) は、低 pH 条件下において、タンパク質のアンフォールディングが促進されたことを報告している。したがって、グルコースの酸化により生じた pH の低下が、タンパク質のアンフォールディングを引き起こし、表面疎水性を増加させたものと示唆された。以上の結果より、すり身タンパク質の表面疎水性が増加し、その結果、疎水性相互作用を促進したことが GOD 添加すり身ゲルの物性向上に関与したと考えられた。

3-4. 遊離チオール基含量およびジスルフィド結合量

GOD 添加により、遊離チオール基含量は減少し、ジスルフィド結合量は増加した。遊離チオール基含量の低下

は、pH の低下により促進され、これはジスルフィド結合の形成を示唆する (Riebroy *et al.*, 2009)。

したがって、グルコースの酸化によって引き起こされるグルコノデルタラクトンおよびグルコン酸の生成が、すり身 pH の低下をもたらす。遊離チオール基の酸化およびそれに伴うジスルフィド結合の形成を促進したものと示唆された。また、過酸化水素はグルコースの酸化によって生成され、遊離チオール基をジスルフィド結合へと変化させることが報告されている (Guo & Xiong, 2019)。したがって、GOD 添加によるすり身ゲルの物性向上には、ジスルフィド結合の形成促進も関与していることが示唆された (Riebroy *et al.*, 2009)。

4. 総括

4°C、15 時間インキュベート後のすり身ゲルの pH は、GOD 添加によって低下した。また、0-1.0% GOD 添加時では、GOD 濃度の増加に伴って破断強度および破断歪率が増加し、1.0% GOD の添加が最も効果的であった。さらに、GOD 添加により、濃度依存的に表面疎水性およびジスルフィド結合量が増加した。これらの結果より、GOD 添加によるすり身タンパク質の立体構造変化が、ゲル物性を向上させたものと示唆された。

以上より、GOD の利用が、低 pH 誘導非加熱かまぼこの製造に有効であることが明らかとなった。

5. 追記

本報告書は Food Chemistry に掲載された論文 Omura *et al.* (2020) “A novel and simple non-thermal procedure for preparing low-pH-induced surimi gel from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) using glucose oxidase.” を抄訳したものである。詳細は当該論文 (doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126722) を参照のこと。

6. 謝辞

本研究は 2018 年度東洋食品研究所食品研究助成金制度の協力の下、遂行された。関係者の皆様に、深く御礼申し上げます。

7. 文献

Guo, A., & Xiong, Y. L., Glucose oxidase promotes gallic acid-myofibrillar protein interaction and thermal gelation., *Food Chemistry*, **293**, 529-536 (2019)
Matsuoka, Y., Wan, J.R., Ushio, H. & Watabe, S., Thermal gelation properties of white croaker, walleye pollack and deepsea bonefish surimi after suwari treatment at various temperatures., *Fish. Sci.*,

- 79, 715-724 (2013)
- Omura, F., Takahashi, K., Okazaki, E., & Osako, K. (2020). A novel and simple non-thermal procedure for preparing low-pH-induced surimi gel from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) using glucose oxidase. *Food Chem.*, 126722.
- Ptitsyn, O. B., Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.*, **47**, 83-229 (1995)
- Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Erikson, U. & Rustad, T., Acid-induced gelation of natural actomyosin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and bubot (*Lota lota*)., *Food Hydrocoll.*, **23**, 26-39 (2009)
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A. & Guerrero, I., A review of physical and chemical protein-gel induction., *Int. J. Food Sci. Technol.*, **37**, 589-601 (2002)
- Vanderhooft, L. J., Alcoutlabi, M., Magd, J. J. & Prestwich, D. G., Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelation hydrogels for tissue engineering., *Macromol. Biosci.*, **9**, 20-28 (2009)
- Wong, C. M., Wong, K. H. & Chen, X. D., Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 927-938 (2008)