

魚肉由来タンパク質ゲルに対するポリフェノールの影響

山本 彩起子、高橋 徹

Effect of Polyphenols on Gel Strength of Alaska Pollock Surimi

Sakiko Ymamoto and Toru Takahashi

The effects of polyphenols on the texture of gels prepared from Alaskan pollock (*Gadus chalcogrammus*) surimi were investigated. The breaking force and strain of the polyphenol-containing gels were dependent on the type and amount of added polyphenol. Gels with 0.1% tannic acid, 0.1% gallic acid, 0.1% ellagic acid, 0.05% catechin, and 1.0% naringenin showed increased breaking forces compared with gels lacking added polyphenols. In contrast, supplementation with polyphenols decreases gel breaking force and strain. A comparison of catechins with different structures showed that the strength of reactivity was not proportional to breaking force. The number of free sulfhydryl groups in gels with gallic acid or catechins suggests that these polyphenols induce binding through sulfhydryl groups. Mass spectrometry imaging of the gel with gallic acid suggested the formation of protein-gallic acid complexes. The increase in the breaking force was inferred to be related to formation of cross-links and complexes between polyphenols and proteins through sulfhydryl groups. To control protein gel texture, selection of appropriate polyphenol and protein concentrations is important.

1. 序論

ポリフェノールは野菜や果実、茶類といった植物性の食品に含まれ、これまでに約 8,000 種類が同定されている。肥満やがん、動脈硬化等の疾患に対して予防的に働くことが疫学研究で示され、ポリフェノールの健康への寄与が注目されている (波多野 2019)。一方、食品のテクスチャーへの影響に関して、単独ではゲル化しないキシログルカン溶液にエピガロカテキンを添加すると粘弾性が増加し、ゲル化することが報告されている (西成 2005)。このように、ポリフェノールは生理機能だけではなく、食品素材のテクスチャーを変化させる効果が期待されるが、機能性と比較して研究は少なく明らかになっていない部分が多い。

蒲鉾や竹輪等の水産練り製品は、魚肉を主原料として食塩やデンプン等の副原料を加えて練り混ぜた後、加熱によってゲル化させた独特の弾力が特徴的な食品である。室町時代の料理本にも記載されており、古くから日本各地で消費されている。この独特の食感の大部分は魚肉のアクトミオシンによる網目構造由来であると考えられ、水産練り製品の品質を決める上で重要な要素となっている。弾力を補強する手法として、タンパク質の濃縮、ゲルや粒子による機械強度の付与、タンパク質間の結合や架橋重合化、プロテアーゼ阻害作用の効果を持つ副原料や添加物が用いられている (山澤ら 2003)。

本研究では、タンパク質との相互作用が知られているポ

リフェノールはタンパク質との結合や架橋構造を形成するのではないかと考え、魚肉由来のタンパク質ゲルに添加した際の硬さや弾力の変化を測定し、弾力補強効果について評価した。

2. 材料と方法

2-1. 魚肉ゲル調製

スケトウダラすり身 FA 級 (ニチレイ・ロジスティクス) または、無添加スケトウダラすり身 (ヤマイチ水産) に対し 3%(w/w) の NaCl (富士フィルム和光純薬) および 50%(w/w) の超純水を加えて石川式播潰攪拌機 D20SL (石川工場) にて 30 rpm で 15 分間播潰し、直径 30 mm の円柱状に成型した。5℃で 20 時間静置し、90℃のウォーターバスで 30 分間加熱後、直ちに氷冷した。ポリフェノールは NaCl と同時に添加した。

2-2. ポリフェノール

タンニン酸、没食子酸、カテキン混合物、緑茶由来 (富士フィルム和光純薬)、エピカテキン、エピガロカテキン、エピガロカテキンガレート、ダイゼイン、アピゲニン (Combi-Blocks)、リグニン、ケルセチン (東京化成工業)、ナリンゲニン (LKT Laboratories) を用いた。

2-3. 破断応力

魚肉ゲルを直径 30 mm、高さ 20 mm の円柱状に切り

出し、テクスチャーアナライザー TA.XTplusC（英弘精機）にて測定した。直径7 mm 球状治具を60 mm/min の速度で貫入させ、破断時の応力および歪率を硬さと弾力の指標とした。

2-4. 魚肉ゲル内の没食子酸分布

魚肉に対し、1.0%(w/w) の没食子酸を添加した魚肉ゲルを10 μm 厚の切片に調製し、JMS-S3000 SpiralTOFTM-plus2.0 (JEOL) にて測定した。負イオンのマスイメージング測定はレーザー離脱イオン法にて実施した。測定条件は、測定モード：2D Scan Spiral-NEG、設定空間分解能：150 μm、レーザー周波数：250 kHz mode：Fast、測定質量範囲： m/z 100-500 とした。データ解析は msMicroImagerTM (JEOL) を用いた。

2-5. 遊離 SH 基量

DTNB 法 (Ellman 1959) を用いて遊離 SH 基量を測定した。DTNB (5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid、富士フィルム和光純薬) 39.6 mg をリン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 ml に溶解し DTNB 溶液とした。0.2 mM に調整した L-システイン (東京化成工業) 溶液に 0.1% 没食子酸または 0.05% カテキン混合物、緑茶由来を加え、これらの L-システイン溶液 300 μl に対しリン酸緩衝液 (pH 8.0) 200 μl と超純水 500 μl を加えて試料溶液とした。試料溶液 300 μl と DTNB 溶液 2 μl を混合し、室温で1時間反応させた後、412 nm の吸光度を測定した。

3. 結果および考察

3-1. 破断応力

(1) タンニン類

タンニン酸を魚肉重量の 0.05、0.1、0.5 および 1.0%(w/w) 添加した魚肉ゲルでは、添加していないゲルと比較して、破断応力および歪率が増加し、1.0% で最も高い値となった (Fig. 1)。

タンニン酸の構成アシル基である没食子酸およびエラグ酸についても調査した。それぞれ 0.05、0.1、0.5 および

1.0%(w/w) を添加した魚肉ゲルでは、0.1% で最も高い値になり、それ以上の濃度では低下した。また、歪率は没食子酸およびエラグ酸の量が多い程低下する傾向があった (Fig. 2)。没食子酸とエラグ酸は同様の傾向を示した。没食子酸を添加したゲルの pH は添加量の増加に伴い低下し、1.0% では pH 6.3 を下回った (Table 1)。蒲鉾の弾力は pH 6.3-7.5 で最も高くなる (岡田 2008) ことから、1.0% 没食子酸添加の破断応力の低下は pH による影響と考えられた。以上から、没食子酸およびエラグ酸は魚肉ゲルに対して 0.1% 以下で添加した場合に弾力を増加させる効果があると推察された。

(2) その他のポリフェノール

酸化重合によって縮合型タンニンを生成するカテキンの効果を検証した。カテキン混合物、緑茶由来を 0.05、0.1、0.5 および 1.0%(w/w) 添加した魚肉ゲルでは、0.05 および 0.1% で破断応力が増加したが、それ以上では低下した (Fig. 3)。また、歪率も 0.5% 以上で低下した。以上から、カテキンは適切な濃度で添加した場合に魚肉ゲルの弾力を増加させると考えられた。

カテキン類の構造の違いによって効果が変化するのかわを確認するため、構造の異なる 3 種類のカテキン (エピカテキン：EC、エピガロカテキン：EGC、エピガロカテキンガレート：EGCg) について、魚肉 100 g あたりそれぞれ 0.017 mol (0.05% カテキン相当) を添加した。いずれも破断応力が増加し、歪率に変化は見られなかった (Fig. 3)。また、破断応力は EC > EGC > EGCg の順になった。この結果から、カテキン類はいずれも破断応力を増加させるが、構造の違いによって効果に差があると推察された。また、過剰な添加でなければ歪率への影響も少ないため、弾力の増強効果が期待できると考えられた。

フラボノイド類の効果を検証するため、ダイゼイン、ナリンゲニン、ケルセチン、アピゲニンを 0.1 および 1.0%(w/w) を添加したところ、1.0% ナリンゲニンでのみ破断応力が増加した (Fig. 4)。フラボノイド類は歪率がわずかに低下するが、硬さや弾力といったテクスチャーにはあまり影響を与えないと考えられた。

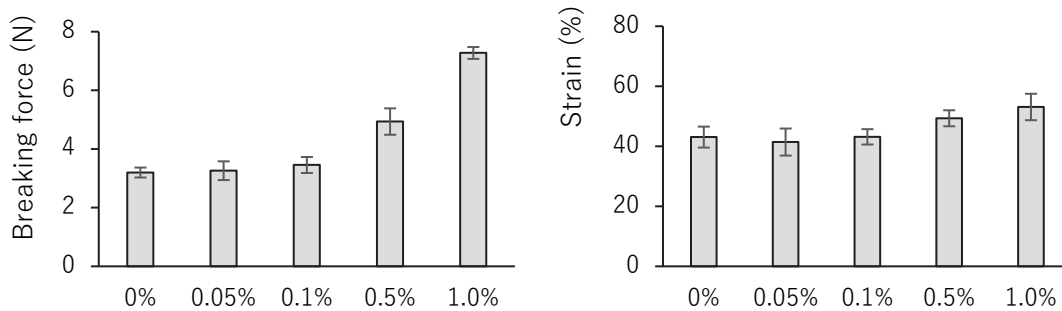


Fig. 1 タンニン酸添加魚肉ゲルの破断応力 (左) および歪率 (右)

各試験区において6回測定の平均値で示した (エラーバーは標準偏差)

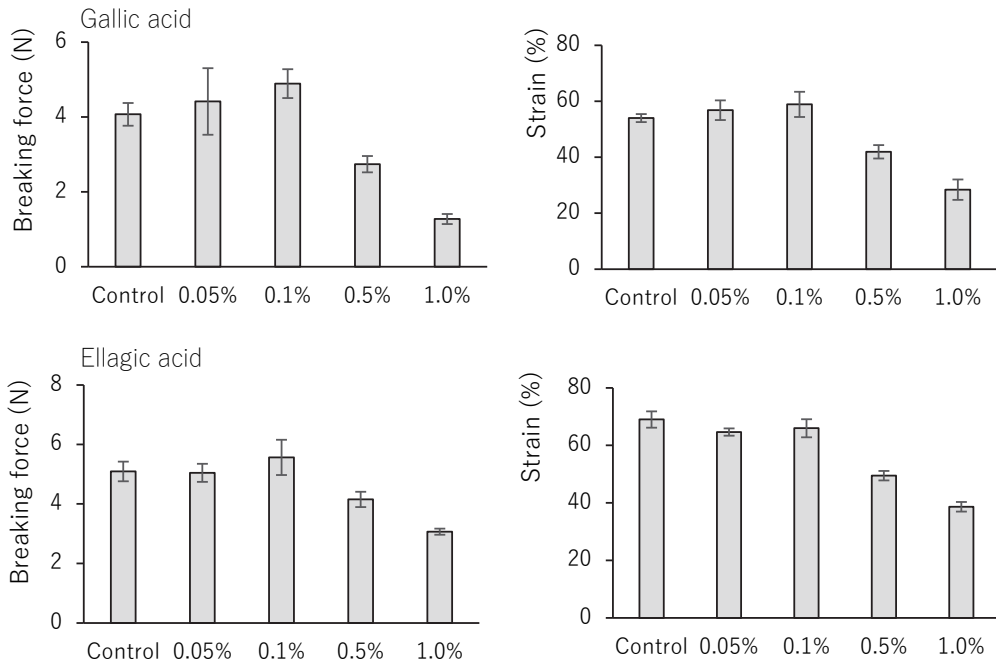


Fig. 2 没食子酸およびエラグ酸添加魚肉ゲルの破断応力 (左) および歪率 (右)

各試験区において6回測定の平均値で示した (エラーバーは標準偏差) 上段を没食子酸、下段をエラグ酸添加魚肉ゲルとした

Table 1 没食子酸添加魚肉ゲルの pH

没食子酸濃度 (%)	0	0.05	0.1	0.5	1.0
pH	6.725	6.742	6.716	6.525	6.252

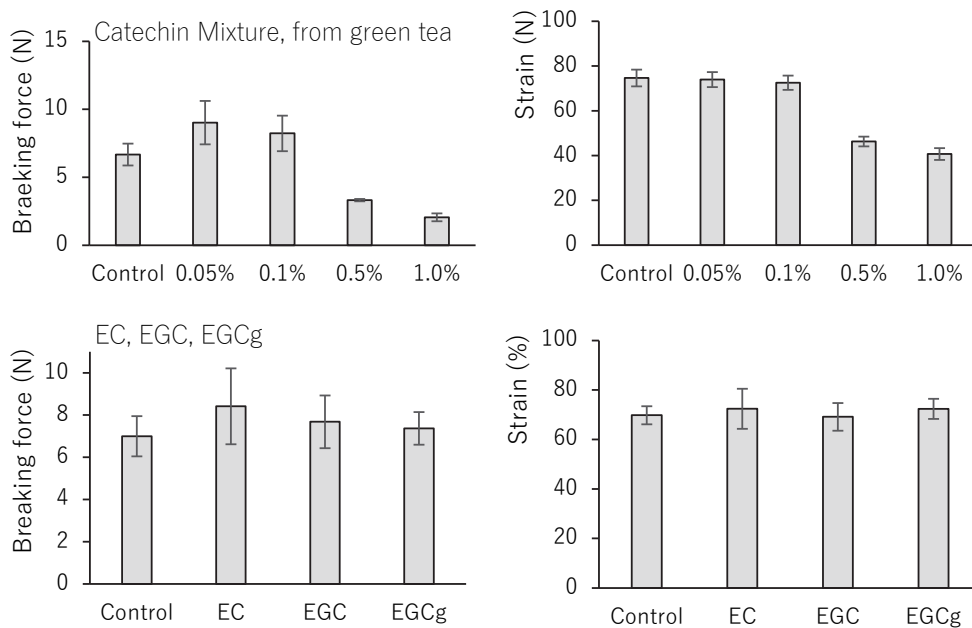


Fig. 3 カテキン類添加魚肉ゲルの破断応力 (左) および歪率 (右)

各試験区において6回測定の平均値で示した (エラーバーは標準偏差) 上段をカテキン混合物、下段をカテキン類添加魚肉ゲルとした

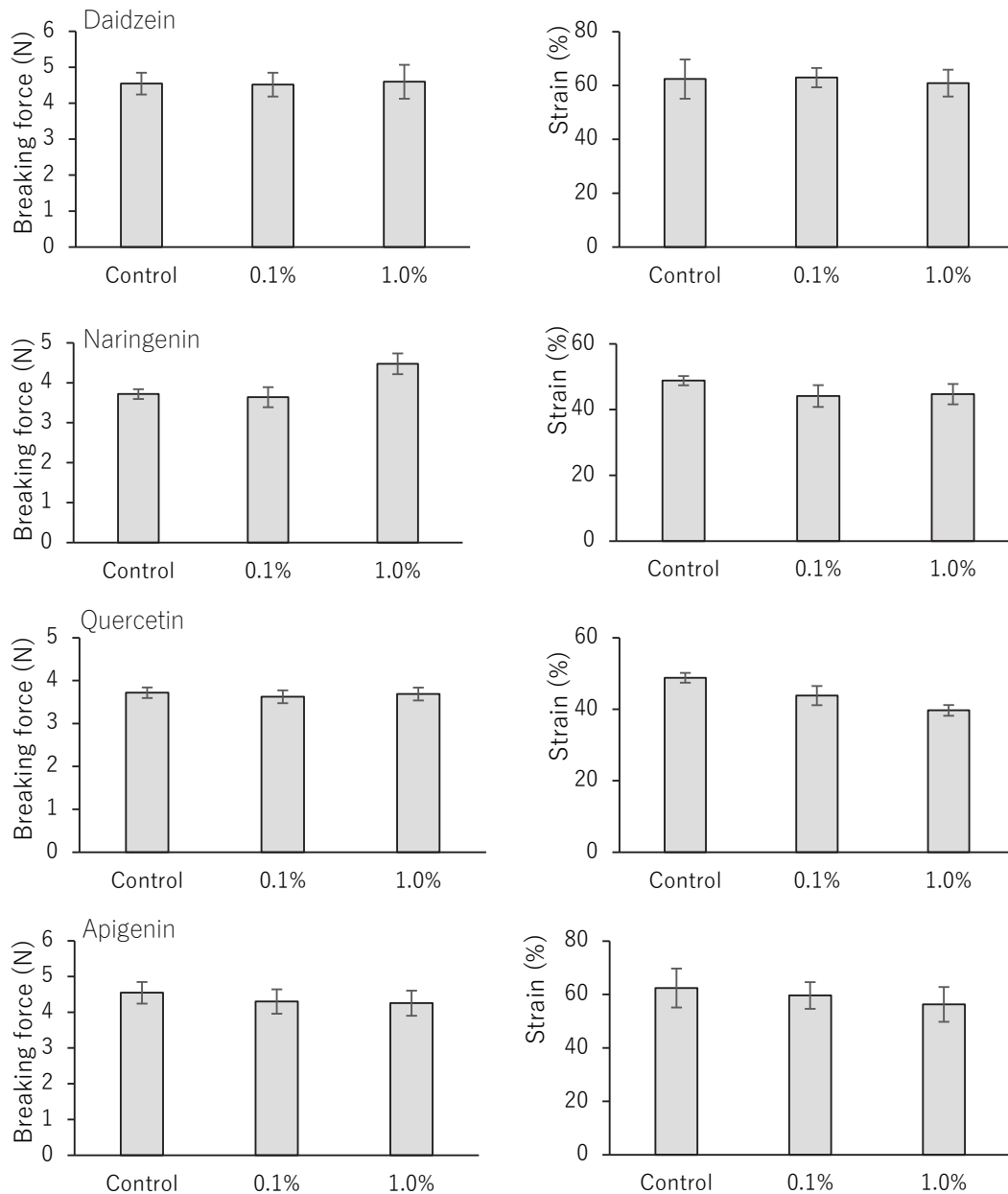


Fig. 4 フラボノイド類添加魚肉ゲルの破断応力 (左) および歪率 (右)

各試験区において6回測定の実験値を示した (エラーバーは標準偏差)
上からダイゼイン、ナリンゲニン、ケルセチン、アピゲニン添加ゲルとした

ヒドロキシケイ皮アルコール類が重合した高分子であるリグニンを0.05、0.1、0.5および1.0%(w/w)添加した魚肉ゲルでは、破断応力および歪率がわずかに低下し (Fig. 5)、リグニンは弾力には寄与しないと推察された。

3-2. 魚肉ゲル内の没食子酸分布

1.0% 没食子酸添加魚肉ゲルからは没食子酸の分子イオン ($[M-H]^-$) である m/z 169.014 のシグナルは観測されなかった。また、添加していないゲルとのマススペクトル

の比較から、没食子酸添加ゲルでのみ m/z 352.796 のシグナルが観測された (Fig. 6 a および Fig. 6 b)。没食子酸添加ゲルの画像と m/z 352.796 のマスマイメージ画像を重ね合わせると m/z 352.796 はゲル全体から観測された (Fig. 6 e)。以上から、 m/z 352.796 は没食子酸添加によって新たに生じた没食子酸由来の成分と推察され、ゲル全体に分布していたことから、没食子酸が均一に混合されていることが示された。

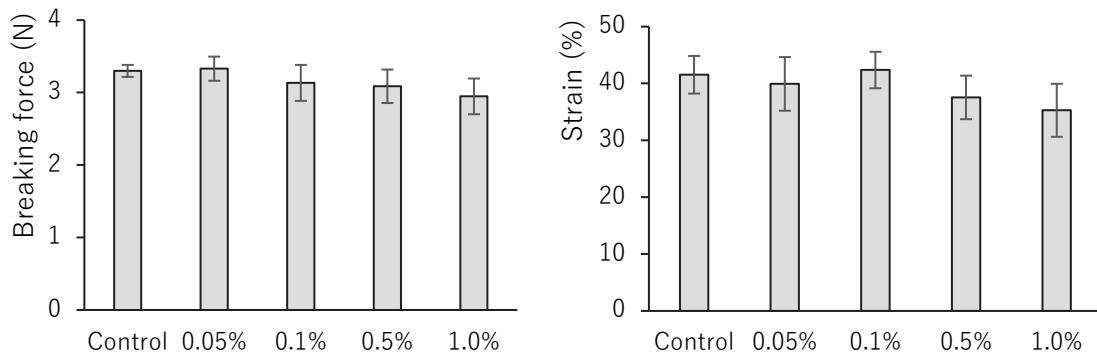


Fig. 5 リグニン添加魚肉ゲルの破断応力 (左) および歪率 (右)
各試験区において6回測定の実験値を示した (エラーバーは標準偏差)

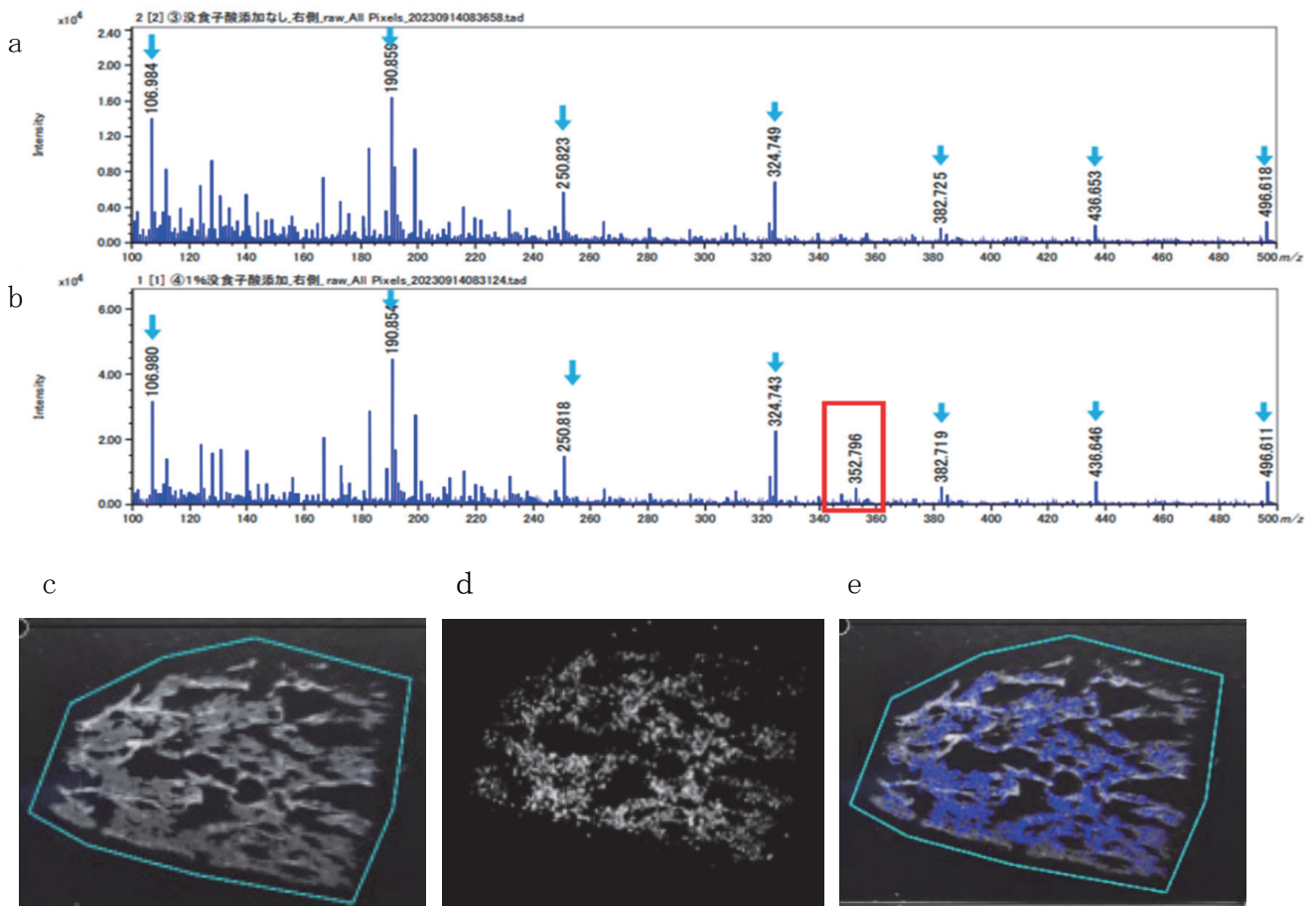


Fig. 6 没食子酸添加魚肉すり身ゲルのマスイメージング測定
a: 魚肉ゲルマススペクトル b: 1.0% 没食子酸添加ゲルマススペクトル
c: ゲル画像 d: m/Z352.796 マスイメージ e: マスイメージとゲルを重ねた画像

3-3. 遊離 SH 基量

没食子酸およびカテキン（カテキン混合物、緑茶由来）を添加した L-システイン溶液で遊離 SH 基量が減少した (Fig. 7)。また、添加量が多いほど減少し、1.0% カテキンで最も少なくなった。以上から、没食子酸とカテキンは SH 基との結合が推定され、カテキン類でより結合力があると示唆された。

4. まとめ

本研究では、ポリフェノールとタンパク質との相互作用に着目し、魚肉ゲル物性への影響を調査した。タンニン酸をはじめとして没食子酸およびエラグ酸、カテキン類で魚肉ゲルの破断応力および歪率の増加が示された。また、フラバノンの 1 種であるナリンゲニンも破断応力を増加させた。これらの結果から、一部のポリフェノールはタンパク質を主成分とした食品の硬さや弾力といったテクスチャーを向上させる効果があると考えられた。マスイメージング測定では、没食子酸は魚肉ゲルに添加した場合に単体のピークが見られなくなり、魚肉ゲルにはない新たなピークが現れたことから、ゲルの中でタンパク質と複合体を形成していることが示唆された。さらに遊離 SH 基量測定から SH 基を介した結合に関与していることが示された。以上から、タンパク質間の SS 結合の誘導、ポリフェノールとタンパク質との結合による架橋や複合体の形成によってゲルの弾力を増加させると推察された。

没食子酸やカテキン類にはそれぞれ異なる最適濃度があり、添加量とゲルの弾力は単純に比例しているわけではないことも明らかとなった。タンパク質に対するタンニンの収斂性の研究 (Bate-Smith 1973) やポリフェノールとタンパク質の複合体形成に関する研究 (Beart *et al.* 1985) では、フェノール性水酸基の数や分子量が増大するとともに結合力も増すことが報告されている。実際に遊

離 SH 基量測定からもポリフェノールの量が多いほど SH 基との結合は増加していると考えられる。しかしながら、カテキン類を添加した魚肉ゲルの比較から、水酸基が多く分子量の大きい EGC および EGCg よりも EC で破断応力が高くなったことから、ゲルの硬さや弾力といった物性を向上させるためには結合が多すぎても好ましくないと考えられた。また、リグニンのような巨大な分子では硬さや弾力にあまり影響がなかったことから、分子量や分子サイズが大きいだけでは効果はないと推察された。

Balange & Benjakul (2009) の研究では、bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) すり身から調製したゲルに対して 0.05% のカテキンおよびタンニン酸添加で破断応力と歪率が増加したと報告しており、本研究のタンニン酸での結果はこれとは異なった。本研究ではスケトウダラを用いたことから、魚種に由来するタンパク質の違いによってポリフェノールの効果も変化すると考えられ、テクスチャーの制御では適切なポリフェノールの選択が効果的であると推察された。一方、低分子ポリフェノールと血清アルブミンの相互作用の研究 (Nozaki *et al.* 2009) では、特異的な親和性を示すポリフェノールと特定部位への親和性を示さないポリフェノールがあり、没食子酸は非特異的な結合が優位であると報告されている。この性質から、没食子酸は様々なタンパク質ゲルのテクスチャー制御に応用できるのではないかと考えられた。

水産練り製品では、内在性のプロテアーゼによってタンパク質が分解し、弾力が失われる現象が知られている。ポリフェノールは消化酵素への修飾作用による阻害機構が検討されており (寺尾 & 下位 2023)、内在性プロテアーゼによる劣化の抑制という観点からも効果が期待できると考えられた。

今後は、スケトウダラ由来のタンパク質ゲルの硬さや弾力等のテクスチャーに対して有用なポリフェノールの探索および作用機作について検証を進める。

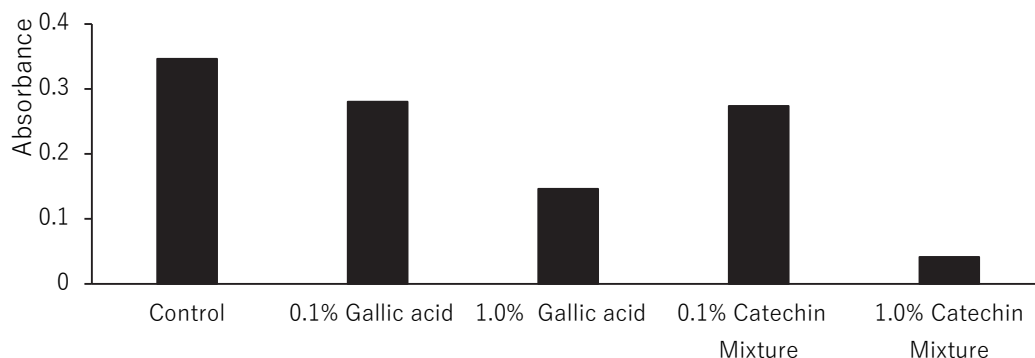


Fig. 7 没食子酸およびカテキン添加 L-システイン溶液の遊離 SH 基量

5. 参考文献

- Balange, A.; Benjakul, S., 2009, Enhancement of gel strength of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi using oxidised phenolic compounds., *Food Chemistry*, **113**(1), p.61-70. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.039.
- Bate-Smith, E. C., 1973, Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency., *Phytochemistry*, **12**(4), p.907-912. DOI: 10.1016/0031-9422(73)80701-0.
- Beart, Jill E. *et al.*, 1985, Plant polyphenols—secondary metabolism and chemical defence: Some observations., *Phytochemistry*, **24**(1), p.33-38. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80802-X.
- Ellman, George L., 1959, Tissue Sulfhydryl Groups., *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**(1), p.70-77. DOI: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- 波多野 力(監修), 2019, ポリフェノール：薬用植物および食品の機能性成分〈普及版〉, シーエムシー出版, p.264-276. ISBN: 978-4-7813-1377-1.
- 西成 勝好, 2005, 食感の創出素材-テクスチャーモディファイヤーの現状と課題., *日本調理科学会誌*, **38**(5), p.397-403. DOI: 10.11402/cookeryscience1995.38.5_397.
- Nozaki, A. *et al.*, 2009, Interaction of Polyphenolic Metabolites with Human Serum Albumin: A Circular Dichroism Study., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**(9), p.1019-1023. DOI: 10.1248/cpb.57.1019.
- 岡田 稔, 2008, 新訂 かまぼこの科学, 成山堂書店, p.67-68. ISBN: 978-4-425-82723-7.
- 寺尾 順二; 下位 香代子(監修), 2023, ポリフェノールの科学—基礎科学から健康機能まで—, 朝倉書店, p.36-37. ISBN: 978-4-254-10303-8.
- 山澤 正勝ほか, 2003, かまぼこ その科学と技術, 恒星社厚生閣, p.235-295. ISBN: 978-4-7699-0985-9.