



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	多獲性多脂魚タンパク質の高度利用：VI. マイワシ筋肉の直接サクシニル化物の調製とサクシニル化タンパク質の微生物による利用
Author(s)	川合, 祐史; KAWAI, Yuji; 野俣, 洋 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 39(1), 62-69
Issue Date	1988-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23988
Type	departmental bulletin paper
File Information	39(1)_P62-69.pdf



多獲性多脂魚タンパク質の高度利用
VI. マイワシ筋肉の直接サクシニル化物の調製と
サクシニル化タンパク質の微生物による利用

川合 祐史*¹・野俣 洋*²・羽田野六男*¹

Developments in the Protein Utilization
of Abundantly Caught Fatty Fish
VI. Preparation of succinylated total protein from sardine
muscle and utilization of the modified
protein by microorganisms

Yuji KAWAI*¹, Hiroshi NOMATA*², and Mutsuo HATANO*¹

Abstract

The total protein in a 5% NaCl homogenate of sardine muscle was succinylated. Whether the succinylated protein (SP) is utilized by the microorganisms, *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*, *Penicillium camemberti*, *P. caseicolum* and *P. roqueforti* was investigated for purposes of application in cheese analog foods.

Amino acid composition of sardine muscle protein and the associated SP showed high nutritional values. *Streptococcus* sp. did not produce much acid from SP until defatted milk was added to the medium. *Penicillium* sp. satisfactorily digested SP in the presence of 2.0% glucose and 0.5% KH_2PO_4 . Curds made of SP by glucono- δ -lactone acidification were decomposed by *P. camemberti* and *P. caseicolum*, and water-soluble nitrogen content of the SP curds increased linearly with the incubation period.

It was found that *Streptococcus* sp. was not a satisfactory starter for SP curd formation but *Penicillium* sp. was applicable as a starter for the SP curd ripening during the cheese analog manufacturing. Therefore, it was suggested that SP is available as an ingredient in fermented foods like cheeses.

緒 言

マイワシ筋原繊維タンパク質は、サクシニル化をすると、熱安定性が向上するので加熱殺菌が可能となり、また、乳化力も高くなることから低脂肪から高脂肪含有の広範な食品素材となり得ることが知られている。^{1,2)} このような特性を有効に活用すれば、サクシニル化タンパク質は比較的高脂肪含有の発酵食品であるチーズ様形態の食品の素材となる可能性も予想される。

乳タンパク質以外を利用した Cheese analog (チーズ様形態食品) については、今までに大豆乳タンパク質をベースとしたものが多く試作、研究されている。例えば、大豆乳を素材として、Hang

*¹ 北海道大学水産学部食品化学第一講座
(Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

*² 北海道立釧路水産試験場
(Hokkaido Kushiro Fisheries Experimental Station)

and Jackson³⁾は乳酸菌スターターとして *Streptococcus thermophilus* を用い、松岡ら⁴⁾はスターターに *S. thermophilus* と *Penicillium caseicolum* を用い、川口ら⁵⁾は *S. thermophilus* と *Saccharomyces fragilis* の併用によって、チーズ様食品を調製することを試みている。また、Chen ら⁶⁾は落花生タンパク質とカゼイネートをベースとしたチーズ様物性を持つ乳化食品を試作している。魚肉を素材とした Cheese analog については最近著者ら⁷⁾がサケで試みているが、化学修飾して機能特性を向上させた魚肉タンパク質を素材としたものは例がない。

本報では、マイワシの食用化と有効利用を目的に、マイワシ肉から抽出した筋原繊維タンパク質ではなく、肉のホモジネートを直接サクシニル化し、それがチーズ様の発酵食品の素材として適用可能かどうかを調べることにした。すなわち、マイワシ・サクシニル化タンパク質の微生物、特にナチュラルチーズ製造に使用される *Streptococcus* 属 2 種と *Penicillium* 属 3 種による利用性について検討を行ったので報告する。

試料および実験方法

供試魚 北海道上磯町沿岸の定置網で漁獲された硬直中のマイワシ *Sardinops melanostictus* を用いた。

供試菌種 *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus* を 10% 脱脂乳 (雪印乳業 K.K.) 培地に培養したものを乳酸菌スターターとした。また、*Penicillium camemberti*, *P. caseicolum*, *P. roqueforti* をポテトデキストロース寒天培地に培養し、カビスターターとした。

サクシニル化物の調製 図 1 に示す方法によってサクシニル化物を調製した。すなわち、マイワシ細碎肉に 15 倍容の冷 5% NaCl 水溶液 (pH 7.0) を加え、氷冷下で 2 分間ホモジナイズした。このマイワシ肉ホモジネートを羽田野ら¹⁾の報告に従って無水コハク酸を加えてサクシニル化し、NaOH で中和後にパイレンネット (PO) で不溶物を除去したものを、マイワシ肉サクシニル化タンパク質 (以下 SP と略記) とした。SP は -20℃ に凍結保存し、使用する際には 4℃ に一夜放置して解凍を行った。タンパク質濃度は二波長 Biuret 法⁸⁾、サクシニル化反応率は TNBS (2, 4, 6-Trinitrobenzene sulfonic acid) による方法¹⁾で測定した。

タンパク質のアミノ酸組成の分析と栄養評価 羽田野ら⁹⁾の方法に従い、エタノール処理とジエチルエーテル処理を行ってエキス分と脂質を除去した試料について、4N メタンサルホン酸加水分解 (115℃, 24 時間) を行い、日立 835 アミノ酸自動分析計に供してアミノ酸組成を求めた。このアミノ酸組成から、常法によって必須アミノ酸指数 (EAA index)、アミノ酸スコア (AA score) を算出し、また、タンパク質効率 (PER) は Alsmeyer ら¹⁰⁾の計算式、

$$\text{PER} = -1.816 + 0.435 (\text{Met}) + 0.780 (\text{Leu}) + 0.211 (\text{His}) - 0.944 (\text{Tyr})$$

に従って求めた。ただし、(Met), (Leu), (His), (Tyr) は、全アミノ酸残基 100 g 当たりの残基 g 数である。

***Streptococcus* 属による生成酸量の測定** 3% SP 水溶液と 10% 脱脂乳水溶液で混合培地を作成し、100℃, 15 分間の殺菌後、乳酸菌スターターを 2% 量接種して 40℃ で培養し、経時的に酸度を測定した。酸度は、培地に等量の水を加え、フェノールフタレインを指示薬として N/10 NaOH で滴定した。

***Penicillium* 属による SP の分解量の測定** (a) 3% SP 水溶液, (b) 3% SP-2% ラクトース水溶液, (c) 3% SP-2% グルコース-0.5% KH₂PO₄ 水溶液の 3 種の培地に *Penicillium* 属を接種し、30℃ で培養を行った。SP の分解量は、培養後に 2.5% あるいは 5% トリクロロ酢酸 (TCA) で沈澱するタンパク質を二波長 Biuret 法で測定することによって求めた。

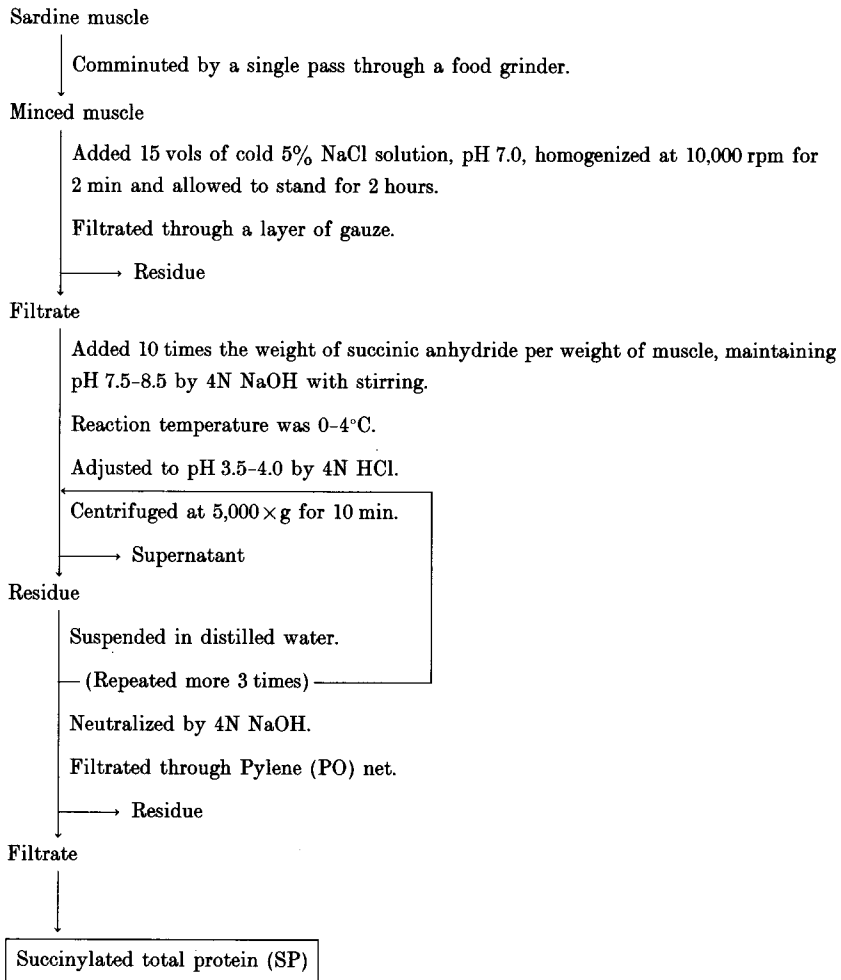


Fig. 1. Preparation of succinylated total protein (SP) from sardine muscle.

Penicillium 属による SP カードの分解量の測定 100℃, 15 分間の加熱殺菌をした 3% SP 水溶液にグルコース 2%, KH_2PO_4 0.5%, グルコノ- δ -ラクトン (GDL) 1.5% を加え (SP の終濃度 2.4%, pH 4.5), カードを形成させた。これを内径 30 mm の円筒形の型に入れ, 14 g/cm² で 4℃, 約 20 時間加圧し, ケーキとした。このケーキに *P. camemberti*, *P. caseicolum* を接種し, 相対湿度 86% のデシケーター中, 20℃ で培養し, 経時的に水溶性タンパク質量, 水溶性窒素量を測定した。水溶性区分はチーズ分析法¹¹⁾ に準じて抽出し, 窒素はケルダール法により定量し, タンパク質は二波長 Biuret 法による定量値から係数 6.25 を用いて窒素量に換算した。

結果および考察

本報では魚肉の有効利用の観点からマイワシ肉のホモジネートを直接サクシニル化することに

より SP を調製した。マイワシ挽肉から 15 倍容 5% NaCl によるホモジナイズで肉量の 13.8% のタンパク質が抽出され、その後の操作により抽出タンパク質量の 69.0% の SP が得られた。これは、肉量の 9.5% に相当し、主に筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質のサクシニル化物が含まれていると考えられる。サクシニル化反応率は 91~95% と計算された。

表 1 に示すように、マイワシ筋肉タンパク質と SP には、構成アミノ酸として、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、ロイシンなどが多く含まれているが、サクシニル化によって窒素 16 g 当たりのアミノ酸の総量の減少が認められた。EAA index はサクシニル化によってやや減少したが、PER は変化せず、AA score は両者とも 100 を示した。マイワシの筋原繊維タンパク質とそのサクシニル化物のアミノ酸組成¹²⁾ と比べると、本試料ではグリシン、チロシン、ヒスチジンの量が若干多いほか全体的にアミノ酸量は少なく、特にグルタミン酸量の低いことが見られた。

Streptococcus 属による酸の生成は、図 2 に示すように、概して SP のみから成る培地では少な

Table 1. Amino acid composition and nutritional evaluation of muscle total protein and the succinylated product from sardine.

Amino acid	Muscle total protein (g/16 g of N)	Succinylated protein* ¹ (g/16 g of N)
Methionine sulfoxide	0.06	0.14
Aspartic acid	11.19	10.83
Threonine	5.03	4.96
Serine	4.36	4.30
Glutamic acid	15.87	16.13
Proline	3.66	3.43
Glycine	5.00	4.57
Alanine	6.84	6.51
Cystine/2	0.20	0.31
Valine	6.06	6.44
Methionine	3.46	3.25
Isoleucine	5.37	5.16
Leucine	9.34	9.19
Tyrosine	4.25	4.19
Phenylalanine	4.87	4.57
Lysine	10.48	9.76
Histidine	3.01	2.78
Tryptophan	1.36	1.36
Arginine	6.69	6.77
EAA index* ²	84	83
AA score* ³	100	100
PER* ⁴	3.1	3.1

*¹ Succinylation degree of protein was 90.9%.

*² Less arginine and histidine.

*³ Values compared with the FAO/WHO (1973) pattern.

*⁴ Calculated according to Alsmeyer et al.¹⁰⁾

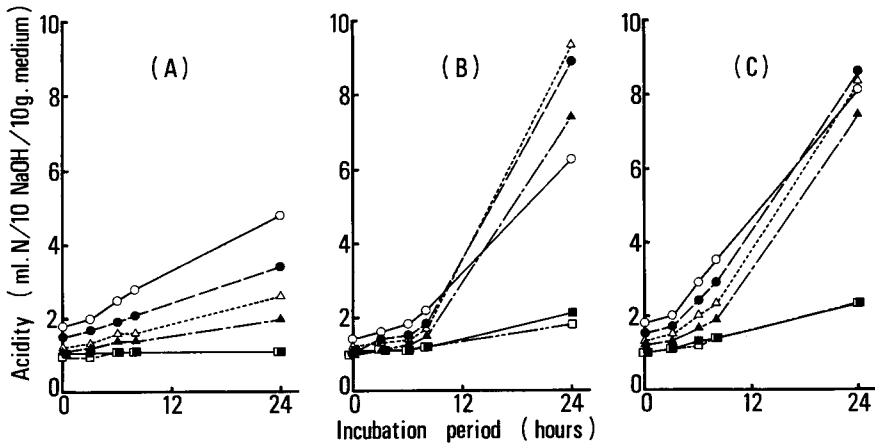


Fig. 2. Acid production from SP at 40°C by *Streptococcus lactis* (A), *S. thermophilus* (B) and *S. lactis* and *S. thermophilus* (1:1) (C).
 Medium: 10% defatted milk (DFM) solution, ○—; 1% SP-6.7% DFM solution, ●—; 1.5% SP-5% DFM solution, △—; 2% SP-3.3% DFM solution, ▲—; 3% SP solution, □—; 3% SP-2% lactose solution, ■—.
 Protein succinylation was 95%.

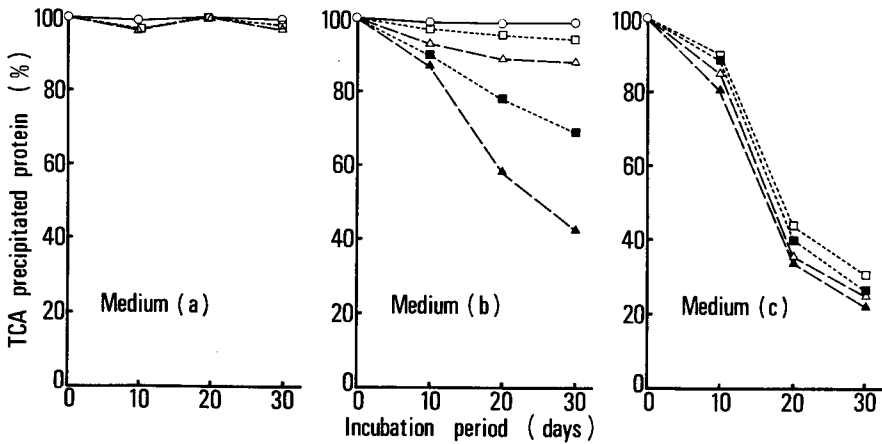


Fig. 3. Digestion of SP by *Penicillium* sp. at 30°C.
 Medium: (a), 3% SP solution; (b), 3% SP-2% lactose solution; (c), 3% SP-2% glucose-0.5% KH_2PO_4 solution.
 Symbols: ○—, 5% Trichloroacetic acid (TCA)-precipitated protein for *P. roqueforti*; △—, 5% TCA-precipitated protein for *P. camemberti*; ▲—, 2.5% TCA-precipitated protein for *P. camemberti*; □—, 5% TCA-precipitated protein for *P. caseicolum*; ■—, 2.5% TCA-precipitated protein for *P. caseicolum*.
 Protein succinylation was 95%.

く、培地中に脱脂乳を添加することによって比較的多量の酸が生成した。

すなわち、*S. lactis* では、SP のみの培地ではほとんど酸の生成はなく、脱脂乳の存在比が大きくなるほど酸生成量が増加する傾向が見られた。*S. thermophilus* では、*S. lactis* と同様に脱脂乳の存在によって酸生成量は増加し、特に培養 8 時間目以降急激に酸生成が見られたが、24 時間目では脱脂乳のみの培地よりも SP と脱脂乳の混合培地で酸生成量が大きくなる傾向を示した。また、SP のみの培地でも 24 時間の培養でわずかに酸生成が認められた。*S. lactis* と *S. thermophilus* の 1:1 混合スターターによる酸生成は、*S. lactis* あるいは *S. thermophilus* のそれぞれ単独の場合のほぼ中間的傾向であり、SP のみの培地では、本 3 種類のスターターの中では最も酸生成は大きかったが、脱脂乳の存在する培地に比べるとやはり 20% 以下のレベルであった。いずれのスターターを用いた場合にもラクトースの添加による酸生成量の増加効果はほとんど見られず、また、SP のみから成る培地では凝固は観察されなかった。

大豆乳では、牛乳と同様に乳酸菌は増殖して乳酸を生成し、酸度が 3.0 近くに達すると凝固が始まり、カードを形成することが知られている¹³⁾ が、魚肉タンパク質、特に SP の場合は炭素源など栄養素の不足によって乳酸菌の増殖が抑えられ酸の生成が少ないものと考えられる。なお、本 3 種類の乳酸菌スターターでは SP の分解性はほとんど認められなかった。

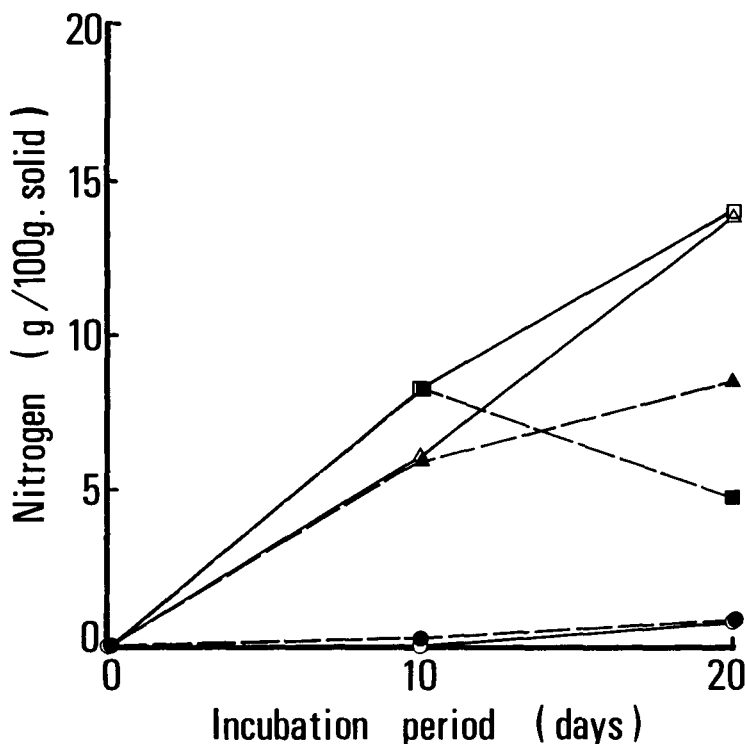


Fig. 4. Changes in water-soluble nitrogen (WS-N) and water-soluble proteinic nitrogen (WP-N) content of SP curds during the incubation with *Penicillium* sp. at 20°C.

Symbols: ○—, WS-N for control; ●—, WP-N for control; △—, WS-N for *P. camemberti*; ▲—, WP-N for *P. camemberti*; □—, WS-N for *P. caseicola*; ■—, WP-N for *P. caseicola*.

Protein succinylation was 95%.

Penicillium 属による SP の分解は、図 3 に示すように、SP 水溶液の培地では各菌ともほとんど認められなかった。SP 水溶液にラクトースを 2% 添加した培地では分解性が認められ、その分解率は、*P. camemberti* > *P. caseicolum* > *P. roqueforti* の順であった。すなわち、30℃、30 日間の培養によって、5% TCA 沈澱タンパク質量は、菌を接種していない Control に対して、*P. camemberti* で 88%、*P. caseicolum* で 94% となり、2.5% TCA 沈澱タンパク質量は、それぞれ 42%、69% となった。また、SP 水溶液にグルコースを 2%、 KH_2PO_4 を 0.5% 加えた培地では、*P. camemberti* と *P. caseicolum* による SP の分解はかなり進み、30℃、30 日間の培養で、5% TCA 沈澱タンパク質量は *P. camemberti* で 25%、*P. caseicolum* で 30%、2.5% TCA 沈澱タンパク質はそれぞれ 22%、27% まで減少し、分解されたタンパク質の大部分がすでに低分子化されていることが認められた。この場合の分解率は *P. camemberti* > *P. caseicolum* であった。

実際に、乳酸菌スターターの代わりに GDL を用いて調製した SP カードに *Penicillium* 属を接種して熟成させた場合の水溶性タンパク質態窒素量、水溶性窒素量の変化を図 4 に示す。Control では 20 日間の培養においても水溶性窒素量はほんのわずかな増加しか認められなかったが、*P. camemberti*、*P. caseicolum* を接種したものでは貯蔵期間中、直線的に著しい増加を示し、20 日目では両者とも無水物当たり約 14 g/100 g の高値を示した。両者とも 10 日目では水溶性窒素のうちほぼ 100% を水溶性タンパク質態窒素が占めていたが、20 日目では非タンパク質態窒素成分の生成が認められ、特に *P. caseicolum* では水溶性タンパク質の減少も見られた。このことは、10 日目以降、*P. caseicolum* では水溶性タンパク質からペプチド、アミノ酸などへの分解速度がタンパク質の水溶化速度よりも大きいことを示唆している。なお、カードは熟成日数の増加とともにチーズ様の風味が発現したが、当初の形態が崩れて液化し、褐変も著しく進行することが観察された。

結論として、*Penicillium* 属は、SP を十分に分解する能力を有しているので、Cheese analog の熟成のためのスターターとして使用可能であり、また、SP は Cheese analog の素材となり得ることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり御教示をいただいた北海道大学水産学部信濃晴雄教授、座間宏一名誉教授、ならびに試料魚を提供していただいた北海道上磯町坂見佐一郎氏に感謝する。

文 献

- 1) 羽田野六男・高野秀明・高間浩蔵・Cabling, F.・座間宏一 (1979). 多獲性多脂魚タンパク質の高度利用-II. マイワシ・サクシニル化筋原繊維タンパク質の化学的性質と機能特性, 日本誌 45, 861-865.
- 2) 羽田野六男・高野秀明・高間浩蔵・座間宏一 (1979). 多獲性多脂魚タンパク質の高度利用-III. マイワシ・サクシニル化筋原繊維タンパク質の乳化性と可溶性性. 同誌 45, 951-954.
- 3) Hang, Y.D. and Jackson, H. (1967). Preparation of soybean cheese using lactic starter organisms. I. General characteristics of the finished cheese. *Food Technol.* 21, 1033-1034.
- 4) 松岡博厚・笹子謙治・関口正勝 (1968). 大豆乳を利用したチーズよう食品の製造に関する研究 (第 1 報). 日食工誌 15, 103-108.
- 5) 川口 豊・松岡博厚 (1981). *Saccharomyces fragilis* によるチーズよう大豆蛋白食品の製造, 同誌 28, 1-7.
- 6) Chen, S., Wan, P.J., Lusas, E.W. and Rhee, K. (1979). Utilization of peanut protein and oil in cheese analogs. *Food Technol.* 33(7), 88-93.
- 7) 川合祐史・辻 浩司・麻生真悟・大堀忠志・一杉哲郎・相沢 悟・加藤健仁・北川雅彦 (1986). ブナサケの利用試験. 北海道立網走水産試験場事業報告書 昭和 60 年度, 252-279.

川合ら：多獲性多脂魚タンパク質の高度利用 VI

- 8) 高間浩蔵・羽田野六男・座間宏一 (1979). 多獲性多脂魚タンパク質の高度利用-I. マイワシの死後硬直と抽出タンパク質の性状, 日水誌 **45**, 857-859.
- 9) 羽田野六男・安藤清一・座間宏一 (1985). アキサケの高度利用に関する研究-II. 産卵回帰シロサケ筋肉タンパク質の栄養評価. 北大水産彙報 **36**, 267-280.
- 10) Alsmeyer, R.H., Cunningham, A.E. and Happich, M.L. (1974). Equations predict PER from amino acid analysis. *Food Technol.* **28**(7), 34-40.
- 11) 東京大学農学部農芸化学教室 (1960). 実験農芸化学, 改訂新版, p. 657-659, 朝倉書店, 東京.
- 12) Cabling, Jr. F., Hatano, M. and Zama, K. (1985). Some chemical and functional properties of acetylated myofibrillar protein from sardine. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **51**, 1875-1882.
- 13) 松岡博厚・福家洋子 (1977). 乳酸発酵による大豆乳カードの形成とその熟成. 日食工誌 **24**, 553-558.