

Study on the Effect of Shrimp Chitin and Shrimp Chitin Hydrolysate on the State of Water and Denaturation of Lizardfish (*Saurida wanieso*) Myofibrillar Protein during Dehydration and Frozen Storage.

エソ筋原繊維タンパク質の脱水および冷凍変性に及ぼす甲殻類エビキチンおよびエビキチン加水分解物の影響

ソムジット キンデュアン

エビ残滓の有効利用として、ブラックタイガーエビ (*Penaeus monodon*)、エンデバーエビ (*Metapenaeus endeavouri*)、オニテナガエビ (*Macrobrachium rosenbergii*)から、酸-アルカリ処理を行ってキチン (SC) およびキチン加水分解物 (SCH) を調製し、その機能特性を検討した。SC の構成成分は糖分が多くを占め (99%)、粗タンパク質、粗脂肪、灰分は、それぞれ 0.004%、0.05~0.18%、0.23~0.58%であった。SC の平均分子量は 5.41×10^5 から 7.59×10^5 であった。重合度はブラックタイガーエビが最も低い値を示し (4.93×10^2)、ついでオニテナガエビ (6.05×10^2)、エンデバーエビ (7.23×10^2) であった。SC のアセチル化度は、82.22 から 85.70% であった。SCH の構成成分は、主に糖が占め、粗タンパク質、粗脂肪、灰分はそれぞれ 1%以下であった。塩分は 0.002%以下であった。全ての SCH の主成分はモノマーであり、ブラックタイガーエビ、エンデバーエビ、およびオニテナガエビで、それぞれ 76.07%、69.55%、および 62.14%を占めていた。ブラックタイガーエビ SCH はモノマーからトリマーまでで構成され、エンデバーエビ SCH ではモノマーからテトラマー、オニテナガエビではモノマーからペンタマーで構成されていた。従って、ブラックタイガーエビ SCH は最も低い平均分子量を示し、オニテナガエビ SCH は三種類の SCH の中で最も高い平均分子量を示した。SCH の重合度の平均は 1.59 から 1.90 であった。(Chapter 1)

エソ (*Saurida wanieso*) 筋原繊維タンパク質 (Mf) に SC および SCH を重量 (湿重量) に対して 2.5~10% (乾重量) 添加し、Mf の変性と水の状態に及ぼす、SC および SCH の影響を、脱水過程における水分活性 (A_w) と Mf Ca-ATPase 活性の変化から評価した。SC、SCH の影響は、無添加 Mf (コントロール) と糖類 (グルコースおよびスクロース) 添加 Mf と比較した。全ての種類の SCH 添加 Mf と、グルコース添加 Mf の A_w は SC 添加 Mf、スクロース添加 Mf およびコントロールと比較すると、著しく低い値を示した。SCH 添加 Mf の Ca-ATPase 活性は、スクロース添加 Mf、SC 添加 Mf、コントロールと比較するとかなり高い値を示した。グルコース添加 Mf の Ca-ATPase 活性は、 A_w が 0.65 までは SCH 添加 Mf よりもわずかに高かったが、その後急速に減少した。Mf 中の不凍水量は、SC および SCH 添加 Mf において著しく増加した。これらの結果から、SCH は Mf 周囲の水分子と水和して Mf を安定させ、脱水によって引き起こされる Mf の変性に対して阻害効果を持つことが示唆された。(Chapter 2)

エソ (*Saurida wanieso*) 筋原繊維タンパク質 (Mf) に SC および SCH を重量 (湿重量) に対

して 2.5~10% (乾重量) 添加して-25 で冷凍し、Mf の変性と水の状態に及ぼす SC および SCH の影響を、Mf Ca-ATPase 活性と不凍水量の変化から評価した。SC、SCH の影響は、無添加 Mf (コントロール) とグルコース添加 Mf と比較した。コントロールと SC 添加 Mf の Ca-ATPase 活性の変化は、2 段階で進行し、SCH 添加 Mf およびグルコース添加 Mf のそれは 1 段階で進行した。SC 添加 Mf の不凍水量はコントロールよりも低く、凍蔵 120 日目まで減少した。SCH 添加 Mf とグルコース添加 Mf の不凍水量は増加し、凍蔵中緩やかに減少した。これらの結果から、SCH は Mf 周囲の水分子と水和して安定させ、冷凍によって引き起こされる Mf の変性に対して阻害効果を持つことが示唆された。(Chapter 3)

SC および SCH をエソすり身に乾重量で 5% 添加して、-25 で 6 ヶ月間冷凍保存を行い、冷凍保存期間中におけるタンパク質の変性について検討を行った。試料中の Ca-ATPase 全活性と不凍水量を凍蔵期間中に経日的に測定を行った。SC 添加すり身の変性速度恒数(K_D)は、冷凍変性抑制剤を添加していないすり身 (コントロール) と同じ進行状態を示し、不凍水量ではコントロールよりも低い値を示した。一方、SCH 添加すり身は、スクロースおよびグルコース添加すり身と等しい K_D 値を示したが、コントロールよりも低く、不凍水量ではコントロールよりも増加した。このことから、SCH はタンパク質を取り囲む水分子を水和して Mf を安定化し、冷凍によって引き起こされる変性に対して阻害効果を持つことが示唆された。(Chapter4)

SC および SCH 添加すり身のゲル形成能と特性を検討するため、-25 で 6 ヶ月間冷凍保存を行い、冷凍保存期間中におけるタンパク質の変性について評価を行った。SC および SCH 添加すり身のゲル強度は、コントロールよりも低かった。一方、コントロールと SC 添加すり身のゲル強度は、凍蔵期間中に著しく減少した。SC 添加すり身の冷凍保存期間中におけるゲル強度の相対値はコントロールよりも高く、コントロールの変性は SC 添加すり身のそれより早く進行することが示唆された。SCH 添加すり身のゲル強度は、スクロースおよびグルコース添加すり身と同じように、凍結後に 10~14% 減少し、凍蔵 180 日目まで徐々に減少した。SC 添加すり身の保水力は、凍蔵期間中に著しく減少したのに対し、SCH 添加すり身と糖類添加すり身は徐々に低下した。すべての試料の白色度と pH は、SC および SCH 添加による影響はみられなかった。このことから、SCH は冷凍すり身に添加する凍結防止剤として有効であることが示唆された。(Chapter5)

以上の結果から、タンパク質の水和層でエビキチン加水分解物が結合水を構成することにより、タンパク質の三次構造を安定化させ、それによって脱水および冷凍によるエソタンパク質の変性を抑制させることがわかった。従って、エビ残滓から調製されたキチン加水分解物は、残滓の有効利用や甘味とカロリーの減少に効果があるだけでなく、食品加工および貯蔵における筋原繊維タンパク質の変性に対する高機能性添加物 (変性抑制剤および冷凍変性抑制剤) としての応用が可能である。

Summary

Study on the Effect of Shrimp Chitin and Shrimp Chitin Hydrolysate on the State of Water and Denaturation of Lizardfish (*Saurida wanieso*) Myofibrillar Protein during Dehydration and Frozen Storage.

In view of potential utilization of shrimp wastes, shrimp chitin (SC) and shrimp chitin hydrolysates (SCH) were prepared from black tiger (*Penaeus monodon*), endeavour (*Metapenaeus endeavouri*) and giant freshwater (*Macrobrachium rosenbergii*) prawns by acid-alkaline treatment and their functional properties were determined. Sugar substrate was the major component, accounting for over 99% in all SC. Crude protein, crude lipid and crude ash were found less than 0.004%, 0.05-0.18% and 0.23-0.58%, respectively. The average molecular weight of SC ranged from 5.41×10^5 to 7.59×10^5 . The degree of polymerization was shown lowest value in black tiger prawn (4.93×10^2) followed by giant freshwater prawn (6.05×10^2) and endeavour prawn (7.23×10^2). The degree of *N*-acetylation of SC was ranged from 82.22 to 85.70%. The oligosaccharides were the main component of SCH. The total amount of crude protein, crude lipid and crude ash contents were less than 1% in all SCH. Sodium chloride was less than 0.002%. The monomer was the major component of all SCH, accounting for 76.07%, 69.55%, and 62.14% in the SCH of black tiger prawn, endeavour prawn and giant freshwater prawn, respectively. The SCH of black tiger prawn exhibited monomer to trimer, the SCH of endeavour prawn exhibited monomer to tetramer and the SCH of giant freshwater prawn exhibited monomer to pentamer. Thus, SCH of black tiger prawn showed the lowest average molecular weight, while giant freshwater prawn showed the highest average molecular weight among the shrimp species. The average degree of polymerization of SCH was 1.59 to 1.90.

Effect of SC and SCH (2.5-10% dry weight/ wet weight) on the state of water and denaturation of lizardfish (*Saurida wanieso*) myofibrillar protein (Mf) were assessed based on water activity (A_w) and changes in Mf Ca-ATPase activity during dehydration. The effect was compared with those of Mf without additives (control) and those of Mf containing sugars (glucose and sucrose). The A_w of Mf with each kind of SCH and glucose exhibited remarkably lower values than those of Mf with SC, sucrose and control. The Mf with SCH showed a remarkably high level of inactivated Ca-ATPase activity followed by those with sucrose, SC and control. Mf with glucose showed slightly higher inactivated Ca-ATPase activity than Mf with SCH until the A_w levels of 0.65 and then rapidly decreased. The unfrozen water in Mf increased markedly after being addition of SC and SCH. The finding revealed that SCH attributed to the retardation effect on dehydration-induced denaturation of Mf by stabilizing hydrated water molecule surrounding the Mf. [Chapter 3]

The effect of SC and SCH (2.5-10% dry weight/ wet weight) on the state of water and denaturation of lizardfish (*Saurida wanieso*) myofibrillar protein (Mf) during frozen storage at

-25°C were assessed based on changes in Mf Ca - ATPase activity and the amount of unfrozen water. The effects were compared with those of Mf without additives (control) and Mf with glucose. The changes of Ca - ATPase activity in control and Mf with SC were exhibited biphasic pattern while those of SCH and glucose exhibited monophasic pattern. The amount of unfrozen water of Mf with SC was lower than that of control and gradually decreased up to 120 days of storage. The unfrozen water of Mf with SCH and glucose were increased and reduced moderately during frozen storage. The finding revealed that SCH attributed to the retardation effect on freeze-induced denaturation of Mf by stabilizing hydrated water molecule surrounding the Mf. **[Chapter 4]**

The SC and SCH (5.0% dry weight/ wet weight) were added to lizardfish surimi, and it was frozen and stored at -25°C for 6 months to evaluate freeze-induced protein denaturation. Changes in total Ca-ATPase activity and the amount of unfrozen water in samples were periodically determined during frozen storage. The surimi containing SC showed the same freeze-denaturation rate (K_D) as the surimi without cryoprotectants (control), and the amount of unfrozen water was lower than that of control. However, surimi containing SCH showed K_D values equal to surimi containing sucrose or glucose and greatly lower than the control, and the amount of unfrozen water was increased compared to control. The results revealed that SCH retarded the effects on freeze-induced denaturation by stabilizing the hydrated water molecules that surround the protein. **[Chapter 5]**

The effect of SC and SCH on the surimi properties was assessed base on gel forming ability and characteristic during frozen storage at -25°C for 6 months to evaluate freeze-induced protein denaturation. The gel strength values of surimi containing SC and SCH lower than that of the control. However, the gel strength of the control and surimi containing SC decreased markedly after freezing and storage. The surimi containing SC exhibited relative gel strength values to its initial value higher than that of the control throughout the storage period, indicating that the control had denaturation rate faster than surimi containing SC. The gel strength values of surimi containing SCH decreased 10-14% of its initial value after freezing, similar as sugars (glucose and sucrose), and then gradually decreased up to 180 days of storage. The water holding capacity in surimi containing SC significantly decreased up on the storage period, whereas surimi containing SCH and sugars gradually decreased. The whiteness and pH of all samples were not effect by adding both SC and SCH. The finding revealed that SCH could be used as cryoprotective in frozen surimi. **[Chapter 6]**

The present finding, it is concluded that shrimp chitin hydrolysate stabilize the three-dimensional structure of protein through bound water construction in the hydration sphere of protein and thereby suppress the dehydration and freezing-induced denaturation of lizardfish protein. Therefore, the chitin hydrolysates derived from shrimp waste offer advantages in reduction of sweetness, calorie and have potential applications as highly functional additives (denaturant and cryoprotectant substance) against the myofibrillar protein denaturation in food processing and preservation.