ウサギ筋原繊維の凍結変性に対する界面活性剤の保護効果

渡辺孝博*, 北畠直文**, 土井悦四郎**

Protective Effects of Surfactants against Freezing
Denaturation of Rabbit Myofibrils

WATANABE Takahiro, KITABATAKE Naofumi, Doi Etsusiro

*Agricultural Research Institute of Hokuren,

Kita 6, Higashi 7, Higashiku, Sapporo, Hokkaido 065

**Research Institute for Food Science, Kyoto University,

Gokasyo, Uji, Kyoto 611

The denaturation of rabbit skeletal myofibrils caused by freezing and thawing was measured by the change of Ca^{2+} -ATPase activity. The changes in activity were high at concentrations of myofibrils less than 0.2mg/ml. The rate of denaturation was increased by the repetition of freezing and thawing, or by prolonged freezing time. The denaturation caused by freezing and thawing was protected in the presence of non-ionic surfactants such as Tween 20. The addition of 0.3 % Tween 20 was effective for the protection against denaturation. The effective concentration for non-ionic surfactants were lower than for sugars. The addition of Tween 20 and glycerol showed a synergistic effect for the protection of freezing-thawing denaturation.

(Received Jul. 18, 1993)

我々は、これまでにウサギ筋肉タンパク質ミオシン¹⁾、ミオシンB²⁾の凍結変性について検討し、凍結変性にタンパク質濃度依存性があることを報告した。また、この変性が他の球状タンパク質のオボアルブミン³⁾、カルボキシペプチターゼY³⁾と同様の挙動を示すことを見いだした。さらに、この変性に対して非イオン性界面活性剤が防止効果を有することを見いだし、その変性防止機構が糖・ポリオールのそれと異なっていると推察した。

本報告では、筋肉収縮の構造をもつ筋原繊維の凍結変性とそれに対する界面活性剤の保護効果について検討を行った。

実験材料および方法

1. 試 薬

凍結保護剤として以下の試薬を用いた。まず、非イオン性界面活性剤として、和光純薬工業(株)の化学用

Tween 20 (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)を用いた。また、食品添加物であるSYglyster (ポリグリセリン脂肪酸エステル)は阪本薬品工業(株)、Ryoto (ショ糖脂肪酸エステル)は三菱化成食品(株)から供与されたものを使用した。その他の試薬は特級のものを使用した。

2. 筋原繊維の調整

筋原繊維はウサギ *Oryctolagus cuniculus* 骨格筋を用い、PERRYの方法³⁾に準じて次のように調整した。挽肉に3倍量の0.1M KCl, 5mM EDTA, 39mM borate buffer (pH 7.1)を加えホモジナイズした後、ガーゼで濾過する。濾液を遠心分離(600×g)にかけ沈澱を得る。さらに同溶液で洗浄を繰り返す。さらに0.1M KCl, 20mM potassium phosphate (pH 7.0)で洗浄して、筋原繊維懸濁液を得た。

*ホクレン農業総合研究所 (〒065 札幌市東区北6条東7丁目)

**京都大学食糧科学研究所 (〒611 京都府宇治市五ヶ庄)

3. 凍結融解

凍結融解は前報¹⁾に準じて行った。標準方法は以下の通りである。筋原繊維サスペンション (0.1mg/ml of protein, 0.1M KCl, 4mM potassium phosphate, pH 7.0) 3 ml をポリプロピレンの試験管 (φ10mm) に分注する。これを液体窒素素に3分間浸漬し、その後-3℃で1時間インキュベートする。融解は25℃で行い、融解後測定まで水水中で保存する。

4. Ca^{2+} -ATPase 活性の測定

筋原繊維の Ca^{2+} -ATPase 活性は前報²⁾と同様にpH-stat 法により行った。反応液は、0.03mg/ml of protein, 0.5M KCl, 1.3mM potassium phosphate, 5mM CaCl_2 , 1mM ATP (pH 8.0) の溶液 3 ml で行った。滴定液は10mM NaOHを用いた。

5. タンパク質の定量

タンパク質の定量はビウレット法⁵⁾により行い、標準として牛血清アルブミンを用いた。

実験結果および考察

1. タンパク質濃度の影響

Fig. 1 に筋原繊維の濃度を変えて凍結融解を行った時の Ca^{2+} -ATPase 活性を測定した結果を示した。筋原繊維懸濁液のタンパク質濃度が0.2mg/ml 以上では、80%以上の残存活性があった。しかし0.2mg/ml 以下では、タンパク質濃度が低くなるほど失活が著しくなった。このことから、凍結変性に対してタンパク質濃度依存性があることが示された。また、筋原繊維の凍結変性による活性の低下が著しくなる濃度は、これまで報告したミオシン、ミオシンBの結果 (0.5mg/ml) よりも低くなっていた。

筋原繊維に1% Tween 20を添加すると0.05mg/ml 以上でほとんど失活がみられなかった。しかし0.05mg/ml 以下では失活がみられるようになった。

2. 凍結温度の影響

筋原繊維懸濁液 (0.1mg/ml, pH 7.0) を凍結するときの温度の影響について検討した (Fig. 2)。いちど液体窒素素で急速に凍結したのち Fig. 2 に示した各温度で1時間インキュベーションした筋原繊維では、残存活性はおよそ55%で一定の値を示した。しかし、直接各温度に1時間インキュベーションしたサンプルでは、インキュベーション温度が-15℃まで低くなるほど失活が著しくなった。-15℃、-20℃でインキュベーションしたものの残存活性は、液体窒素素で急速に凍結したものと同じ値を示していた。しかし-3℃、-5℃では失活がほとんどみられず、氷晶も完全に凍った状態ではなく氷水

Fig. 1 Effects of Protein Concentration on the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils after Freezing and Thawing.

○ without Tween 20 (Control)
● with Tween 20

Fig. 2 Effects of Freezing Temperatures on the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils after Freezing and Thawing.

△ incubation without Tween 20
○ incubation without Tween 20 after freezing at -196°C
▲ incubation with Tween 20
● incubation with Tween 20 after freezing at -196°C

の状態であった。この結果は、ミオシン、ミオシンBと同様の結果であった。このことから、凍結によるタンパク質の変性は、氷晶の生成が重要な要因であると思われる。

一方、Tween 20を1%添加した筋原繊維では活性の失活はみられず、界面活性剤による保護効果が示された。Tween 20を添加した筋原繊維では、低温側でわずかな残存活性の上昇がみられた。

3. 凍結融解の繰り返しによる影響

筋原繊維懸濁液 (0.1mg/ml, pH 7.0) を繰り返し凍結 (-196℃, 3 min) 融解したときの Ca^{2+} -ATP

Fig. 3 Changes in the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils During Repeated Freezing and Thawing.

○ without Tween 20 (Control) ● with 2 % Tween 20

Fig. 4 Changes in the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils During Incubation at -3°C .

○ without Tween 20 (Control) ● with 2 % Tween 20

ase 活性の変化を Fig. 3 に示した。凍結融解の回数を繰り返していくと、活性は次第に低下した。5 回の繰り返しにおける残存活性は約 15% であった。

しかし、1 % Tween 20 を添加したものでは 5 回の繰り返しにおいても活性の失活はほとんど見られなかった。

4. 凍結時間の影響

Fig. 4 の筋原繊維懸濁液 (0.1mg/ml , $\text{pH } 7.0$) を液体窒素で凍結した後、 -3°C でインキュベートした時の経時変化を示した。筋原繊維の Ca^{2+} -ATPase 活性はインキュベーション開始から 1 時間の間に 65% から 50% へと低下がみられたが、これ以後 48 時間まで変化はみられなかった。このとき筋原繊維懸濁液は、液体窒素で凍結したものが、 -3°C に 1 時間浸漬する間に水と氷が共存している状態になっており、以後その状態が続いた。このことは、凍結変性が氷晶の生成と、それが融解する

Fig. 5 Effects of Tween 20 and Glycerol Concentration on the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils after Freezing and Thawing.

○ Tween 20 △ Glycerol

Table 1 Effects of Additives on the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils After Freezing and Thawing.

Additive	Ca^{2+} -ATPase (%)	
	1% added	20% added
None		52.8
Tween20	102.3	—
Glycerol	69.6	98.8
Glucose	66.3	92.1
Sucrose	65.9	93.6
Sorbitol	69.4	98.1
DMSO	70.6	93.2

a : Polyoxyethylene (20) sorbitan fatty acid ester

b : Dimethylsulfoxide

ことによって起こるのではないかと推察される。

一方、1 % Tween 20 を添加した時の氷晶の生成は、Tween 20 を添加していないものと同様であったにもかかわらず、失活はまったくみられなかった。

5. Tween 20 の保護効果

これまでの実験結果より、1 % の Tween 20 を添加した筋原繊維懸濁液では、凍結融解による活性の低下がみられず保護効果を示すことがわかった。Fig. 5 に筋原繊維に添加した Tween 20 の量と凍結融解後の Ca^{2+} -ATPase 活性の関係を示した。その結果、Tween 20 の添加量が増していくと残存活性も増加してゆくことがわかった。この傾向は低濃度で著しく、Tween 20 が 0.02 % 添加されたときに残存活性がおよそ 30% 上昇し 80% までになった。さらに 0.3 % の添加でほぼ完全に失活が抑制された。これからミオシン、ミオシン B で得られた結果よりもさらに薄い濃度で効果を示すことがわかった。

Table 2 Effects of Food Additives on the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils After Freezing and Thawing.

Food additive	Ca^{2+} -ATPase (%)
None	52.8
Tween20	102.3
Ryoto CT-1695	92.4
L-1695	97.0
M-1695	82.7
SY glyster ML-750	97.6
MO-750	68.0
MSW-750	84.2

a : Each additive was added to the concentration of 1% in the myofibrils suspension (0.05mg/ml).

b : Sucrose fatty acid ester.

c : Polyglycerol fatty acid ester.

これに対し、グリセリンは添加濃度とともに残存活性が緩やかに増加してゆくが、Tween 20と同様の濃度加えても顕著な効果は示さなかった。このことから、Tween 20の変性防止効果は、グリセリンのそれとは異なる作用によるものと思われる。

6. 種々添加物の効果

筋原繊維の凍結変性に対する添加物の効果を Table 1 に示した。一定の添加量での残存活性を比較した結果、グリセリン、グルコース、シュクロース、ソルビトール、DMSO では 1% 添加による効果が 65~70% である。

Tween 20 が 100% であることからすると、効果が小さいことがわかる。これらの添加物においても 20% 添加することにより高い効果が示された。ここで示された糖・ポリオール類の変性防止効果や機構については種々の総説により報告されている。

次に食品添加物とされている脂肪酸エステルについてその添加効果を 1% の添加量で比較検討した (Table 2)。その結果、Ryoto L-1695 と SYglyster ML-750 が 97% と高い値を示した。また SYglyster MO-750 が 68% と低い値であったが、そのほかでは 80% 以上の残存活性を示していた。このように、同じ脂肪酸エステルにおいてもその効果は異なっていることが示された。ここで用いた脂肪酸エステルは、Ryoto はシュガーエステル、SYglyster はポリグリセリンエステルである。親水基の構造や疎水性である脂肪酸の鎖長が凍結変性の防止効果に影響があると考えられるが、詳細についてはまだ検討段階である。

7. 添加物の相乗効果

Tween 20 とグリセリンを同時に使用した場合の効果について検討した。その結果 (Fig. 6)、グリセリンを

0, 0.2, 0.5, 1.0% 添加した筋原繊維懸濁液の残存活性は添加濃度とともに上昇した。また、この懸濁液に Tween 20 を添加していくと失活はさらに抑制され、併用したものでは Tween 20 濃度が 0.01% でも残存活性が 93, 96, 98% であった。両者を併用して完全に失活を抑制したときの Tween 20 の濃度は 0.1% (グリセリン 0.2~1.0% 添加時) であった。このことから、凍結変性防止に対して界面活性剤 Tween 20 とグリセリンとによる相乗効果が示された。この結果は、ミオシン、ミオシン B の場合と同様の傾向にあり、より低い濃度においても高い変性防止効果が得られることがわかった。

要 約

ウサギ骨格筋原繊維筋原繊維の凍結変性とそれに対する界面活性剤の保護効果について研究した。筋原繊維は凍結-融解により Ca^{2+} -ATPase 活性が低下した。この活性低下は、筋原繊維懸濁液が 0.2mg/ml 以下の濃度で著しくなることがわかった。また、凍結-融解を繰り返すほど、凍結時間が長くなるほど失活が大きくなった。この凍結変性に対して非イオン性界面活性剤 Tween 20 が防止効果を示すことがわかった。筋原繊維 (0.05mg/ml) の失活を Tween 20 0.3% の添加で完全に抑制した。この濃度は、変性防止作用を持つ糖・ポリオール類に比べて低い濃度であった。さらに、Tween 20 とグリセリンを同時に添加することによって凍結変性の防止に相乗効果を示すことがわかった。

Fig. 6 Synergistic Effects of Tween 20 and Glycerol on the Ca^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils after Freezing and Thawing.

○ no glycerol △ with 0.5% glycerol
 ▽ with 0.2% glycerol □ with 1.0% glycerol

文 献

- 1) WATANABE, T., KITABATAKE, N. and DOI, E. : Agric. Biol. Chem., **52**, 10, 2517 (1988).
- 2) 渡辺孝博・北畠直文・土井悦四郎：凍結および乾燥研究会会誌, **37**, 116 (1991)
- 3) 土井悦四郎：食品の物性 12集, p135 (1986)
- 4) PERRY, S. V., GREY, T. C. : Biochem. J., **64**, 184 (1956)
- 5) GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. S., and DAVID, M. M. : J. Biol. Chem., **177**, 751 (1949)

(平成5年6月18日受理)