オリゴ糖による凍結乾燥中の筋原繊維タンパク質 の変性防止効果

松本行司*, 中野俊作*, 中久喜輝夫*

Preventive Effect of Oligosaccharides against Denaturation of Carp Myofibrillar Protein Caused by Freeze-Drying

Ikushi MATSUMOTO,* Shunsaku NAKANO* and Teruo NAKAKUKI*

* Research Institute, Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.
(30, Tajima, Fuji 417, Japan)

The preventive effect of oligosaccharides against denaturation of carp myofibrillar protein during freeze-drying was studied by measuring the inactivation of Ca^{2+} -ATPase.

In the presence of oligosaccharides, the activity of Ca^{2+} -ATPase decreased fast at the stage of initial several hours and then remained the same level during subsequent freeze-drying period. The preventive effect was estimated by the following equation: $e = \Delta \log k_D/a$, where k_D is the first order rate constant for inactivation of Ca^{2+} -ATPase at the early stage, and a is the concentration (% g/100 ml) of oligosaccharide. The e values of various oligosaccharide-containing syrups examined were observed to become lower in the order of #360, #470, #350, #450. It was also found that e values were high when syrups containing large amounts of maltotetraose or oligosaccharides of higher polymerization degree and only small amounts of glucose and maltose were used.

Another preventive effect was investigated for the minimum concentration (% g/100 ml) of oligosaccharide to keep the full activity of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase. The concentration was estimated by extrapolation of the linear relation between the logarithm of remaining myofibrillar Ca^{2+} -ATPase activity and oligosaccharide concentration. The minimum concentrations of every oligosaccharide-containing syrup to prevent perfectly the activity of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase from the inactivation during freeze-drying were within the limits of 5-9%.

ショ糖やソルビトールなどの糖類が、タンパク質の変性や酵素の失活を抑制することはよく知られている¹⁻³⁾。大泉ら⁴⁾や著者ら^{5,6)}は、糖類の魚肉タンパク質の変性に対する防止効果を筋原繊維の有する Ca^{2+} -ATPase (Myosin ATPase phosphohydrolase (actin-translocating) [EC 3.6.1.32]) 活性を指標としてその失活速度に及ぼす影響から研究し、糖分子中の水酸基 (OH 基) 数とその変性防止効果は強く相関することを見出した。一方、三浦らは、タンパク質の熱変性に対するオリゴ糖の防止効果や冷凍すり身への利用を検討した研究結果を報告している^{7,8)}。

最近、微生物に由来する各種酵素の開発や糖の分画技術の進歩により、ある重合度のオリゴ糖を工業的に大量にかつ安価に製造できるようになった。重合度 3 以上のオリゴ糖は、分子中の OH 基数がショ糖やソルビトールより多いことからタンパク質の変性に対する防止効果も強いと期待される。

本研究では、凍結乾燥過程に起こるコイ筋原繊維タンパク質の変性に対するオリゴ糖の防止効果について検討した。

実験方法

1. コイ筋原繊維懸濁液の調製

筋原繊維は加藤の方法⁹⁾に従い、養殖コイの背筋より

* 日本食品化工(株)研究所 (417 富士市田島 30)

調整し、タンパク質濃度が10 mg/mlになるように0.16 M KCl-40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁させた。

2. オリゴ糖共存下における筋原繊維懸濁液の凍結乾燥

筋原繊維懸濁液に対して種々の濃度 (0~3.7%, 0~3.7 g/100 ml) になるようにオリゴ糖を添加し, 4 ml ずつを試験管に分注して-20℃で凍結後, 東京理化 (株) 製 FD-5 型凍結乾燥機で真空乾燥した。絶対圧力0.1~0.2 Torr, 室温で凍結乾燥し, 経時的にその一部を取り出した。これに適当量の0.6 M KCl-40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) と水を加え, 小型ガラス製ハンドホモジナイザーを用いて全体を均質な一定容量の溶液とした後, 筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase 活性の測定に供した。なお, 本実験に用いた日本食品化工 (株) 製の4種類のオリゴ糖 (商品名: フジオリゴ #350, #360, #450 および #470) の糖組成を Table 1 に示す。

3. 筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase 活性の測定

筋原繊維の Ca^{2+} -ATPase 活性は, まず, 1 mM ATP-0.1 M KCl-5 mM CaCl_2 -25 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) に, 筋原繊維タンパク質を0.2~0.3 mg/mlの濃度になるように添加混合し, 25℃において一定時間反応させた。その後, 終濃度5%の HClO_4 で反応を停止させた後, 遊離する無機リン酸を Gomori の方法¹⁰⁾ によって比色定量し, 比活性 ($\mu\text{mol Pi}/\text{mg}$ -タンパク質/min) を求めた。なお, オリゴ糖が共存すると Ca^{2+} -ATPase 活性が見かけ上阻害されるので, 対照にも同濃

度のオリゴ糖を添加して同様に測定し, その測定値を基準とした。

4. 筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase 活性の変性速度定数の算出

筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活を一次反応式に従って解析し, 変性速度 (k_D) を, $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \times 1/t$ によって計算した。ここで, C_0 および C_t は凍結前および t 秒間凍結乾燥後における Ca^{2+} -ATPase 活性の相対値である。

なお, タンパク質濃度はビウレット法によって比色定量し, 標準として牛血清アルブミン画分Vを用いた¹¹⁾。

実験結果

1. 凍結乾燥中におけるオリゴ糖共存下の筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活様式

まず, 凍結乾燥中に起こるフジオリゴ #360 共存下のコイ筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活の反応様式を検討した。すなわち, 筋原繊維懸濁液を凍結乾燥する間の Ca^{2+} -ATPase 活性の経時変化を測定し, 凍結前の活性値を基準としてその残存率 ($\%, C_t/C_0 \times 100$) を表し, 結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 にみられるように, 筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase は, 凍結乾燥の初期の数時間位の間に速やかに失活し, それ以後は一定の値を維持した。このとき共存するフジオリゴ #360 の濃度が高いほど初期の失活は遅くなり, 失活の度合も小さくなる傾向を示した。この傾向は, 他のオリゴ糖の場合でも同様であった。

2. 凍結乾燥中の筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活に及ぼすオリゴ糖の効果

次に, 凍結乾燥による筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活に及ぼすオリゴ糖の防止効果を検討した。つまり, 凍結乾燥初期 (数時間以内) に起こる Ca^{2+} -ATPase の失活の一次反応速度定数 (k_D) を算出し, その対数値 ($\log k_D$) と添加したオリゴ糖の濃度との関係をプロットした。Fig. 2 に示した結果によると, いずれのオリゴ糖の場合も $\log k_D$ と濃度との間には単純な直線関係が成立することが示された。これらの直線の勾配は大きい方からフジオリゴ #450 > 同 #350 > 同 #470 > 同 #360 の順となった。この直線の勾配から, そのオリゴ糖の添加によってもたらされる $\log k_D$ の減少値 ($e = (\log k_{D_0} - \log k_{D_a}) \times 1/a$) を求め, e 値とした。ここで, k_{D_0} および k_{D_a} は, オリゴ糖非存在下および $a\%$ のオリゴ糖存在下における変性速度定数である。いいかえると, e 値は凍結乾燥の初期における筋原繊維タンパク質の変性に対して単位濃

Table 1. Saccharide composition of Fuji-oligo®.
(%)

Components	Fuji-oligo®			
	#350	#360	#450	#470
Glucose	3	4	2	2
Maltose	17	22	8	8
Maltotriose	50	60	8	10
Maltotetraose	9	8	50	70
Others (DP ^{a)} ≥ 5)	21	6	32	10

^{a)} Degree of polymerization. The components were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a differential refractometer (L-3300 RI monitor, HITACHI), Aminex HPX-42A column (300×7.8 mm, Bio-Rad Co.) and deionized-degassed water as the eluent, at a flow rate of 0.6 ml/min at 70℃.

Fig. 1. Inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase during freeze-drying in the presence of oligosaccharides.

Carp myofibrils were suspended in 0.16 M KCl-40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing various concentrations of Fuji-oligo #360 with the protein concentration of 10 mg/ml. After freeze-drying for the prescribed time, a certain amount of myofibrils suspension was fully dissolved with 0.5 M KCl-40 mM Tris-HCl (pH 7.5), and made up to the fixed volume. The loss of myofibrillar Ca-ATPase activity was investigated with the lapse of freeze-drying time (hr). The reaction mixture for the Ca^{2+} -ATPase assay at 25°C consisted of 1 mM ATP-5 mM CaCl_2 -0.1 M KCl-25 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 0.2-0.3 mg/ml of myofibrillar protein. Fuji-oligo #360: ○, none; △, 0.68; □, 1.35; ▽, 2.70 (% g/100 ml).

度のオリゴ糖が示す防止効果の強さを表している。

次に, Fig. 1 における凍結乾燥数時間以後の Ca^{2+} -ATPase の残存活性値 (C_t/C_0) の対数値と添加したオリゴ糖の濃度との関係をプロットした。Fig. 3 に示されるように, オリゴ糖の濃度と凍結乾燥後の Ca^{2+} -ATPase の残存活性の対数値との間には単純な直線関係が成立した。そこで, この図から凍結乾燥による筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活を完全に阻止するために必要なオリゴ糖の最小濃度の理論値 (残存活性の対数値が 0 となるオリゴ糖の濃度) を外挿して求め, e 値とともに Table 2 に示した。この結果から, 検討した 4 種類のオリゴ糖はいずれも 5~9% の添加で, 凍結乾燥中に起こる筋原繊維タンパク質の変性を完全に防止することが示唆された。また, e 値が高いほどその濃度は低くなる傾向がみられた。

Fig. 2. Relation between oligosaccharide concentration and logarithm of rate constant for inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase activity at the initial stage of freeze-drying.

The carp myofibrils suspension was freeze-dried in the presence of various oligosaccharides-containing syrups, and Ca^{2+} -ATPase assay was conducted as described in Fig. 1. The first order rate constant (k_D) for inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase activity at the early stage (initial several hours) during freeze-drying was calculated in the following equation; $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \times 1/t$, where C_0 and C_t are the Ca^{2+} -ATPase activities before and after freeze-drying for t second. Fuji-oligo: ○, #350; △, #360; ◇, #450; □, #470.

考 察

著者らは, 先に, 凍結乾燥中に起こる筋原繊維タンパク質の変性に対するソルビトールなど 9 種類の糖の防止効果を検討した。その結果, いずれの糖についても同タンパク質の Ca^{2+} -ATPase の失活様式は凍結乾燥の初期の数時間の間に速やかに起こり, その後はほぼ一定の値を維持する。また, 添加された糖濃度が高いほど失活速度は遅くなり, 失活の度合いも小さくなる結果を示した⁶⁾。これは, 今回検討したオリゴ糖の場合も同様であった。しかし, 凍結乾燥中に起こる筋原繊維タンパク質の変性に対する糖類の防止効果は, 糖のモル濃度に依存しており, 筋原繊維タンパク質の濃度には無関係であること, つまり筋原繊維タンパク質の濃度が異なってもその混合液中に共存するソルビトールのモル濃度が同じであれば, その Ca^{2+} -ATPase の失活速度と残存活性値は同じであった¹²⁾。また, 一般に, 糖分子中の OH 基の数

Fig. 3. Relation between oligosaccharide concentration and logarithm of remaining myofibrillar Ca^{2+} -ATPase activity at the later stage of freeze-drying.

The extent of inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase at the later stage (after several hours) during freeze-drying was measured as described in Fig. 1, and expressed as the relative remaining activity of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase, taking the activity before freeze-drying as 1.0. Symbols are the same as in Fig. 2.

が多いほど変性防止効果は強い傾向であった⁶⁾。これに対し、上平らは熱によるタンパク質の変性と糖の変性防止効果の関係について検討し、タンパク質の立体構造の安定化は水の構造によって大きな影響を受ける。そして、一般に、糖分子中のエクアトリアル水酸基 ($e\text{-OH}$ 基) の数が多いほど水の構造を安定化する作用が大きいことを見出した^{13,14)}。そこで、糖の変性防止効果を検討する場合は、 $\log k_D$ や残存活性値の対数値と添加した糖類のモル濃度との関係をプロットし、その直線の勾配から、その糖類の添加によってもたらされる $\log k_D$ の減少値 ($E = (\log k_{D_0} - \log k_{D_b}) \times 1/b$) を求め、 E 値として表してきた。ここで、 k_{D_0} および k_{D_b} は、糖類非存在下および b モルの糖類存在下における変性速度である。すなわち、 e 値は糖 1% (g/100 ml) すなわち単位重量当りの、 E 値は糖 1 M つまり分子量当りの変性防止効果の強さを表している。そして、今回検討したオリゴ糖についてその平均分子量から E 値を計算し、Table 2 に示した。また、Table 2 には比較のため高純度のグルコースおよびオリゴ糖の E 値も併せて示した。それによると、 E 値は、大きい方からフジオリゴ #450 > マルト

Table 2. Preventive effects of various saccharides against inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase by freeze-drying.

Saccharide	e	Min. conc. (%) of oligosaccharide syrup to keep full activity	E
Fuji-oligo #350	0.18	5.4	12.6
#360	0.08	8.5	7.8
#450	0.24	4.9	25.0
#470	0.16	5.9	13.6
Glucose			1.9
Maltose			5.4
Maltotriose			9.5
Maltotetraose			21.1

The preventive effect (e) of oligosaccharides against the inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase was determined by the equation: $e = (\log k_{D_0} - \log k_{D_a}) \times 1/a$, where k_{D_0} and k_{D_a} are the first order rate constants for the inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase in the absence and presence of a % oligosaccharide, respectively. Minimum concentrations (% g/100 ml) of oligosaccharide-containing syrups to keep the full activity of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase were obtained from the linear relation between the logarithm of remaining myofibrillar Ca^{2+} -ATPase activity and oligosaccharide concentration by extrapolating the former curve to zero ($\log(C_0/C_t) = 0$.) The E values of saccharides against freeze-drying inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase were referred to the data reported in the previous paper.⁶⁾ $E = (\log k_{D_0} - \log k_{D_b}) \times 1/b$, where k_{D_0} and k_{D_b} are the first order rate constants for the inactivation of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase in the absence and presence of b M of the saccharide. In case of oligosaccharide-containing syrups, b was calculated from their own average molecular weight.

テトラオース > フジオリゴ #470 > フジオリゴ #350 > マルトトリオース > フジオリゴ #360 > マルトース > グルコースの順となり、検討した直鎖オリゴ糖は強い変性防止効果を有していることが示された。Table 2 と 1 をあわせて考えると、フジオリゴは、数種類の糖が混合しているが、その糖組成中に保護効果の強いマルトテトラオース、あるいはそれ以上の重合度を有するオリゴ糖が多く含まれるもの、さらに防止効果の弱いグルコース、マルトースの含量が少ないものほど E 値は大きく変性防止効果は強いと思われる。2種類の糖を添加した場合の防止効果は、 Ca^{2+} -ATPase の変性速度の減少倍率としてあ

らわすと個々の糖の示す減少倍率の相乗値となるので¹²⁾, おそらくこの場合も複数の糖が協調的に防止効果を発揮するものと推定される. なお, 本研究において, 筋原繊維タンパク質の変性速度の指標として Ca^{2+} -ATPase を用いたが, これは, タンパク質中のミオシンの質の優劣を表し, 魚肉の品質をよく表していると考えられているからである^{15,16)}.

松浦ら^{17,18)}は, 乾燥肉のテクスチャーが添加された糖類の濃度と種類に影響されることを見出したが, オリゴ糖には変性防止効果だけでなく, 他にも, たとえば, 低甘味, 腸内有用細菌増殖といったような機能特性の面からも利用方法を検討する必要がある.

本研究においては, 凍結乾燥中に起こるタンパク質の変性に対するオリゴ糖の防止効果を検討したが, 凍結乾燥後に保存した状態でオリゴ糖の変性防止効果を検討することも重要であると考えられる.

要 約

0~3.7%の間の濃度のオリゴ糖共存下でコイ筋原繊維懸濁液を凍結乾燥すると, 筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase は, 初期の数時間後まで速やかに失活して最小値に達し, 後期はその値を維持した. そこで初期の筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活の一次反応速度 (k_D) を求めると, $\log k_D$ と濃度は反比例するので, その勾配 (e) を防止効果として表した. また, 後期における筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の残存活性の対数値と濃度の間には比例関係が成立するので, 凍結乾燥による筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活を完全に阻止するために必要なオリゴ糖の濃度の理論値を外挿して求めた. その結果, e 値の高いオリゴ糖ほど凍結乾燥による筋原繊維 Ca^{2+} -ATPase の失活を阻止する最小濃度は低いこと, またいずれのオリゴ糖も 5~9%の添加で十分効果をあげることができることが示された.

これに対して, $\log k_D$ とモル濃度も反比例するのでその直線の勾配を別の防止効果 (E 値) として平均分子量当りの変性防止効果の強さを表し, 高純度のグルコースおよびオリゴ糖と比較した. その結果, フジオリゴは,

数種類の糖が混合しているが, その糖組成中に保護効果の強いマルトテトラオース, あるいはそれ以上の重合度を有するオリゴ糖が多く含まれるもの, さらに防止効果の弱いグルコース, マルトースの含量が少ないものほど変性防止効果は強いと思われた.

本実験を行うにあたり, 北海道大学新井健一教授に有益な御助言を戴き, ここに深く感謝いたします.

文 献

- 1) 安井 勉: *New Food Ind.*, **13**, 36-47 (1971).
- 2) 花房尚史: 「食品の水」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 9-24 (1973).
- 3) 新井健一: 「水産食品学」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 171-184 (1987).
- 4) 大泉 徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一: 日水誌, **47**, 901-908 (1981).
- 5) 松本行司, 新井健一: 日水誌, **52**, 2033-2038 (1986).
- 6) 松本行司, 中久喜輝夫, 伊藤義之, 新井健一: 日水誌, **58**, 1913-1918 (1992).
- 7) 三浦 靖, 西村影夫, 高柳敏紀: 日水誌, **57**, 1957-1963 (1991).
- 8) 三浦 靖, 西村影夫, 高柳敏紀: 日水誌, **58**, 1163-1169 (1992).
- 9) 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一: 日水誌, **43**, 857-867 (1977).
- 10) G. GOMORI: *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955-960 (1942).
- 11) A. G. GORNALL, C. T. BARDWILL and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 12) 松本行司, 中久喜輝夫, 新井健一: 日水誌, 投稿中.
- 13) 上平初穂: 繊維と工業, **37**, 436-443 (1981).
- 14) 上平 恒: 化学総説, No. 11, pp. 191 (1976).
- 15) 新井健一: 冷凍, **62**, 6-13 (1987).
- 16) 木村 進: 「乾燥食品」, 光琳書院, 東京, pp. 168 (1960).
- 17) 松浦 基, 根岸晴夫, 吉川純夫: 日食工誌, **37**, 363-368 (1990).
- 18) 松浦 基, 根岸晴夫, 吉川純夫: 日食工誌, **38**, 804-810 (1991).

(平成4年8月28日受付, 平成4年10月29日受理)