ミオシン B, 大豆蛋白質 CIF 共存物のゲル形成に 及ぼす Ca^{2+} , Mg^{2+} の影響†

芳 賀 聖 一*・大 橋 登 美 男*

Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} on Gel Formation of the Mixture of Myosin B with Soybean Protein CIF

SEIICHI HAGA and TOMIO ÔHASHI

Under five optimum conditions for gel formation, the effects of added Ca^{2+} or Mg^{2+} on the heat-induced gelformability were examined using a mixture of myosin B with soybean protein CIF (Cold Insoluble Fraction). The following results were obtained. 1) Rheologically, irregular networks were formed in the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} below 100°C which resulted in the formation of a short gel. Generally, the toughness and firmness of the gel increased with the increase of Ca^{2+} concentration, but Mg^{2+} was not as effective as Ca^{2+} . 2) By a high-temperature treatment (135°C), the gel became firmer, tougher and shorter in the presence of Ca^{2+} . When the gel was subjected to three-step heating, the properties of the gel were different from that subjected to the single-step heating, which was also observed in the gel formation with Mg^{2+} added. 3) When EDTA was added to the protein solution, the gel formation at 100°C or below was different from that at 135°C , i. e., gel formation was accelerated at 100°C and below by the addition of EDTA to the system, while at 135°C , it was suppressed. It was suggested from these results that a Ca^{2+} or Mg^{2+} -linkage contributed to the gel formation at a high temperature (135°C), but induced the formation of irregular networks of the gel at 100°C or below.

(Received Nov. 24, 1978)

筋肉中で2価金属イオンは、筋肉蛋白質と交鎖結合をなし立体構造形成の一端になっている。加熱による2価金属イオンの蛋白質からの遊離が保水性を向上させるとHAMM¹⁾は述べているが、これは鎖体の崩壊に伴う立体構造のゆるみと、それに伴う極性基の増加が水分子との結合を誘発する結果と考えられている。又、NAKAMURA²⁾はアクトミオシンに Ca^{2+} を添加すると粒子重量に変化はみられないが粒子半径の平均平方根値は増加すると述べている。

一方、大豆蛋白質についても、多くの研究^{3)~8)}がなされ、隣との結合も含めてpH或いは、金属イオン濃度変化による金属イオン結合性が述べられ、中性附近での蛋白質の解離、会合が誘発されないことを確認すると同時に熱に対する挙動についても述べられている。

筆者らは、これ迄畜肉製品、特に、エマルジョンタイプの畜肉製品の結着性、保水性に重要な筋肉構造蛋白質ミオシンBと特異的にゲル形成を助長する11S成分より主に構成される大豆蛋白質CIF (Cold Insoluble Fraction) についてゲル形成能を検討してきた。その結果、各々の蛋白質のゲル形成至適条件を効果的に利用することにより、両蛋白質の共存によるゲル形成能の向上がみられることを確認した⁹⁾。又、そのゲル形成の向上は加熱前の両蛋白質間の相互作用が大きく関与することが示された¹⁰⁾。

本報告は、これら異種蛋白質の共存によるゲル形成に Ca^{2+} 及び Mg^{2+} の結合性がどのような加熱ゲルの物性変化をもたらすか、特に、レトルトパウチにみられるような高温処理と 100°C 以下での加熱との違いを検討し、

† 筋肉蛋白質と大豆蛋白質の相互作用 (第7報) (前報 文献10) 参照
Interaction of Muscle Protein and Soybean Protein (Part 7)

* 宮崎大学農学部 (宮崎市船塚)

Faculty of Agriculture, Miyazaki University. Funatsuka, Miyazaki-shi

今後の食品工業の技術向上に資することを目的としたものである。

実験方法

1. 材料

屠殺直後の家兎骨格筋よりミオシンBを脱脂大豆粉体(吉原製油, GP-SL)より大豆蛋白質CIFを調製し¹¹⁾, 両蛋白質共存後の所定終濃度, すなわち, ミオシンBについては15 mg/ml, CIFについては50 mg/mlになるよう0.6M塩化カリウム-50mM トリスマレイト緩衝液(pH 7.0)で希釈, 供試した。尚, 希釈蛋白質溶液には予め0.5 μM, 50 μM, 500 μM/g蛋白質のCa²⁺, Mg²⁺と100 μM/g蛋白質のEDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)をそれぞれ溶解しておいた。

2. 方法

第5報¹²⁾と同様に, 加熱は1段, 2段, 3段階の方法で行ない, 得られたゲルについて弾性率, 破断エネルギー, 破断弾性率及びゲル内部安定性を求め¹⁰⁾, 又, 別に加熱ゲルを遠心分離(34,880×g, 10分間)して上澄液中の蛋白質濃度より溶解度を求めた。一部のゲルについて

は保水性¹³⁾も求めた。Ca²⁺, Mg²⁺のゲルへの移行率は, 島津610S原子吸光/フレイム分光光度計を用い両金属イオン濃度を定量し, (全金属イオン濃度-加熱上澄液中金属イオン濃度)×100/全金属イオン濃度より算出した。

結果と考察

1. ミオシンB, CIF共存物の1段加熱によるゲル形成能に及ぼすCa²⁺, Mg²⁺添加の影響

ミオシンB, CIF共存物に所定濃度のCa²⁺, Mg²⁺を添加した後, 70°C (30分間), 100°C (30分間) 及び135°C (瞬間)で加熱して得られたゲルについてゲル形成能, 溶解度, 両金属イオンのゲル移行率を検討した (Table 1, 2, 3)。

ミオシンBのゲル形成至適温度である70°C加熱では (Table 1) 添加するCa²⁺濃度が増加するに従って破断時迄は高いレオロジー値を有するゲルを形成したが, 1度破断するとゲル内部の脆さがみられゲル内部安定性は低下の傾向を示した。ここでの溶解度の減少はCa²⁺による錯体形成がより多くの蛋白質をゲル形成に関与させることを意味するものであり, 均質なゲルを形成するた

Table 1. Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on gel formation of the mixture of myosin B with soybean protein CIF after heat treatment (70°C, 30 min)

Ca ²⁺ /Mg ²⁺ μmole/g·prot.	E.M.* ×10 ⁵	B.E.** ×10 ⁴	M.B.E.*** ×10 ⁵	S.I.G.**** ×10 ⁵	Solubility %	C.R.Ca ²⁺ &Mg ²⁺ ***** %
0	2.58	0.42	2.36	0.35	68.8	26.9/10.0
0.5	4.80/3.38	0.53/0.53	2.96/2.33	0.34/0.20	65.9/69.8	41.3/-1.7
50	5.28/2.60	0.86/0.62	3.58/2.44	0.19/0.62	63.5/67.6	40.0/10.4
500	6.20/3.78	1.35/1.29	5.54/3.23	-0.80/0.14	62.9/66.4	19.4/10.6
EDTA 100	4.60	1.58	3.52	2.37	64.9	-3.2/-1.7

The final concentration of myosin B and CIF were adjusted at 15 mg/ml and 50 mg/ml by 0.6 M KCl-50 mM phosphate buffer. The rheological units were showed dyn/cm².

*: Elastic Modulus, **: Breaking Energy, ***: Modulus of Breaking Elasticity, ****: Stability of Inner Gel, *****: Conversion Rate of Ca²⁺ and Mg²⁺.

Table 2. Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on gel formation of the mixture of myosin B with soybean protein CIF after heat treatment (100°C, 30 min)

Ca ²⁺ /Mg ²⁺ μmole/g·prot.	E.M.** ×10 ⁵	B.E.** ×10 ⁴	M.B.E.*** ×10 ⁵	S.I.G.**** ×10 ⁵	Solubility %	C.R.Ca ²⁺ &Mg ²⁺ ***** %
0	3.22	0.43	3.83	0.87	35.1	45.4/18.8
0.5	5.64/3.80	0.66/0.34	6.45/3.69	0.79/0.95	31.9/35.1	51.2/26.8
50	6.07/3.55	0.87/0.56	7.79/3.07	0.71/0.93	30.8/33.0	54.2/29.6
500	5.64/3.68	0.84/0.90	8.11/4.24	0.36/0.80	45.4/45.2	14.5/14.5
EDTA 100	8.99	1.58	8.63	4.03	26.6	-16.1/-2.5

All abbreviations, the final concentration of protein solution and the rheological units were the same as in Table 1.

Table 3. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on gel formation of the mixture of myosin B with soybean protein CIF after heat treatment (135°C , a few min)

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ μmole/g-prot.	E.M.* $\times 10^6$	B.E.** $\times 10^4$	M.B.E.*** $\times 10^5$	S.I.G.**** $\times 10^6$	Solubility %	C.R. Ca^{2+} & Mg^{2+} ***** %
0	0.63	0.73	5.36	-0.13	37.6	28.6/19.5
0.5	1.19/0.66	0.63/0.74	8.54/5.96	-1.86/-0.18	35.2/35.8	51.8/21.4
50	1.40/0.68	1.25/0.61	11.6 /6.19	-2.06/-0.14	31.3/36.2	50.0/ 7.8
500	2.61/0.77	2.37/1.32	13.4/11. 6	-0.48/-1.06	33.3/34.7	20.2/ 2.5
EDTA 100	0.39	0.21	3.64	2.54	32.0	- 9.7/-2.8

All abbreviations, the final concentration of protein solution and the rheological units were the same as in Table 1.

めには、規則性を持ったゲルネットワークの存在が重要と推察される。金属キレート剤である EDTA 添加では、いずれのレオロジー値も無添加試料より高い値を示し、特にゲル内部安定性では著しかった。 Ca^{2+} のゲル移行率は、絶対量を示していないので他のパラメーターと関連づけるのは無理があるが、一般に遠心分離後上澄液中の Ca^{2+} 濃度の低いものはゲル内部の不安定なものであった。又、相対値ではあるが、 Ca^{2+} のゲル移行率は $500\mu\text{M}$ 添加で減少しており Ca^{2+} のゲル内への取り込みにも限界があることが示された。

Mg^{2+} 添加については、 Ca^{2+} 添加の結果と類似するものと考えられたが、 Ca^{2+} 添加程明瞭な傾向は得られなかった。すなわち、破断エネルギーは Mg^{2+} 濃度増加に伴い増加の傾向が認められたが、他のレオロジー値では明瞭な傾向は得られなかった。

次に、大豆蛋白質 CIF のゲル形成至適温度である 100°C で 30 分間加熱して得られたゲルについて 70°C 加熱ゲルと同様の実験を行なった (Table 2)。その結果、 Ca^{2+} 添加量 $50\mu\text{M}$ 迄は弾性率、破断エネルギー、 Ca^{2+} のゲル移行率は増加、溶解度は減少の傾向を示した。 Mg^{2+} 添加によるゲルは更に不明瞭な結果を示した。 70°C では、ミオシン B が主に熱変性を受けるのに対し、 100°C では、CIF 及びこの温度がゲル形成至適温度でないミオシン B まで構造変化が起っていると思われ、その結果、加熱による両蛋白質間の相互作用が著しく、 Mg^{2+} との結合による濃度依存効果を弱めたものと思われる。これは Ca^{2+} についても同様である。EDTA 添加の加熱ゲルは、 70°C 加熱で得られた傾向を更に遡り、より高いレオロジー値を有したゲルを形成した。よって異種蛋白質共存下でのゲル形成には、 Ca^{2+} , Mg^{2+} による錯体形成は高い弾性率とエネルギー値を有するゲル、すなわち firm & tough なゲルを形成するが、反面、不規則なネットワークを形成することがレオロジー的に示唆された。

近年、畜肉製品においても、レトルト製品の経済面、衛生面を考慮して高温で瞬間クッキングを行なって製造される傾向がみられる。そこで、Table 3 に 135°C (油温 150°C , 4.5 分間) で加熱を行ない得られた結果を示した。

両金属イオン添加による影響は、 70°C 加熱の傾向と類似していたが、ゲルは一般により高いレオロジー値を有するものであった。しかし、ゲル内部安定性の低い脆いものであった。 135°C という高温加熱条件でのゲル形成と 100°C 以下でのゲル形成とで最も異なった点は、EDTA 添加により高温加熱によるゲル形成が低下することである。このことは、 100°C 以下でのゲル形成は、蛋白質分子間或いは分子内である程度規則性をもったネットワークが、金属イオンによる架橋が存在しなくても形成されるのに対し、分子構造を完全に組み変えてしまうと考えられるような高温加熱では、金属イオンによる架橋が必要であることを示唆するものである。

2. ミオシン B, CIF 共存物の 2 段加熱によるゲル形成能に及ぼす Ca^{2+} , Mg^{2+} 添加の影響

両蛋白質のゲル形成至適温度、すなわち、 70°C , 100°C でそれぞれ 4 分、30 分と 2 段階で加熱処理した場合のゲル形成能を検討し、その結果を Table 4, Fig. 1 に示した。

Ca^{2+} を添加したものは、漸次、ゲルは高い弾性率とエネルギー値を示す傾向にあり、同時にゲル内部安定性の低い脆いゲルになった。 Mg^{2+} 添加については、ゲル強度は余り大きな変化を示さなかったが、ゲル内部は不安定で脆くなっていた。又、第 5 報¹²⁾ でも述べたように、このゲル形成条件での蛋白質量は、ゲル形成能とは関係の小さいことが溶解度の値から示された。しかし、金属イオンの架橋によるネットワークでは、保水容量値と溶解度の値とが大きく関係し、保水容量増大において蛋白質増量の不必要性を説いた第 5 報¹²⁾ とは異なる結果を示し

Table 4. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on gel formation of the mixture of myosin B with soybean protein CIF after heat treatment (70°C , 4 min $\rightarrow$ 100°C , 30 min)

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ $\mu\text{mole/g. prot.}$	E.M.* $\times 10^6$	B.E.** $\times 10^4$	M.B.E.*** $\times 10^5$	S.I.G.**** $\times 10^5$	Solubility %	C.R. Ca^{2+} & Mg^{2+} ***** %
0	0.64	0.71	5.12	1.51	34.7	- 5.7/17.3
0.5	0.97/0.55	0.83/0.69	8.64/5.03	1.14/1.39	32.5/35.0	56.9/26.7
50	1.19/0.61	2.70/0.79	10.5 /6.25	0.67/1.22	33.9/31.8	48.6/35.1
500	1.23/0.62	3.46/0.83	12.0 /6.45	-0.73/0.78	43.6/40.1	6.3/ 0.5
EDTA 100	1.45	4.34	17.1	1.85	26.1	-12.9/-14.7

All abbreviations, the final concentration of protein solution and the rheological units were the same as in Table 1.

Fig. 1. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} on water holding capacity of the gel.

The mixture of 15 mg/ml (final conc.) myosin B with 50 mg/ml (final conc.) CIF was heated at (70°C (4 min) $\rightarrow$ 100°C (30 min)).

— Ca^{2+} , Mg^{2+}

た (Fig. 1)。すなわち、溶解度が低く、いわゆるゲル内へ蛋白質をより多く取り込んだゲル程保水容量が多く、弾性率やゲル内部安定性等のレオロジー値で示されるゲルネットワーク構造の物理的要素の影響は保水容量値の傾向と一致しなかった。従って、金属イオン介入による不規則なネットワークにおいて、保水容量に関係してくる要素は、ゲル物性を示すレオロジー値でなくより多くの水を抱き込むことのできる蛋白質分子間或いは分子内のスペースを作り得る蛋白質量にあると推察される。

3. ミオシン B, CIF 共存物の 3 段加熱によるゲル形成能に及ぼす Ca^{2+} , Mg^{2+} 添加の影響

第 5 報¹²⁾の結果に基づき、 70°C (4 分) $\rightarrow$ 100°C (4 分) $\rightarrow$ 135°C (瞬間) の 3 段加熱を行い、 Ca^{2+} , Mg^{2+} 添加によるゲル形成能の影響を検討した (Table 5)。

その結果、いきなり 135°C で加熱したものに比べ、3 段加熱ではより高い弾性率を示すゲルを形成した。 Mg^{2+} 添加のゲルにおいては、添加量増大に伴い弾性率、エネルギー値は増加し、ゲル内部安定性は低下した。しかし、 Ca^{2+} を 500 μM 添加すると 50 μM 添加と比べ、破断時の仕事量が 1.8 倍増加し、弾性率は低下、ゲル内部安定性は増加した。EDTA 添加のゲルにおいては、 135°C 加熱と同様の傾向を示し、分子間架橋の役目を果たす金属イ

Table 5. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on gel formation of the mixture of myosin B with soybean protein CIF after heat treatment (70°C , 4 min $\rightarrow$ 100°C , 4 min $\rightarrow$ 135°C , a few min)

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ $\mu\text{mole/g. prot.}$	E.M.* $\times 10^6$	B.E.** $\times 10^4$	M.B.E.*** $\times 10^5$	S.I.G.**** $\times 10^5$	Solubility %	C.R. Ca^{2+} & Mg^{2+} ***** %
0	0.64	1.30	5.94	-1.29	37.0	20.7/ 11.3
0.5	1.35/0.62	1.32/1.51	8.62/7.56	0.77/-1.48	33.1/36.6	47.2/-5.5
50	2.48/1.42	3.70/1.64	30.0/17.0	-5.55/-2.07	35.9/33.3	56.7/-7.5
500	3.21/2.98	6.76/2.37	24.2/23.3	-2.86/-3.98	33.6/32.2	20.7/19.0
EDTA 100	0.34	0.44	4.56	4.30	35.9	-16.1/-3.9

All abbreviations, the final concentration of protein solution and the rheological units were the same as in Table 1.

オンの存在の必要性を示すものであった。

要 約

筋肉蛋白質ミオシン B と大豆蛋白質 CIF が共存する系の加熱ゲル形成能に及ぼす Ca^{2+} と Mg^{2+} 添加の影響を 5 種類のゲル形成至適条件で検討した結果、次のことが明らかとなった。

1) 100°C 以下の温度域での加熱は、 Ca^{2+} , Mg^{2+} の存在によりレオロジー的に不規則なネットワークを構成していると思われる脆いゲルを形成した。一般に、 Ca^{2+} 添加ゲルは Ca^{2+} 濃度増加に伴い、強固なものとなり、 Mg^{2+} 添加ゲルではそれ程顕著な差異は認められなかった。

2) 135°C 加熱 (高温加熱) により Ca^{2+} 添加ゲルはより強固で、そして脆いものであったが、3 段加熱においては、更にその傾向は強く Mg^{2+} 添加のゲルにおいてもそれが認められた。

3) EDTA を添加した加熱ゲルは、 100°C 以下と高温加熱とではレオロジー的に異なる挙動を示した。すなわち、EDTA 添加は 100°C 以下ではゲル形成能を促進し、高温加熱では抑制した。このことは両加熱条件が全く異ったゲル形成過程をたどることを意味し、特に高温加熱においては蛋白質間に架橋の役目を果す金属イオンが必要であることを示すものであり、又、 100°C 以下の加熱

条件ではそれはむしろゲルネットワークの不規則性を誘発する原因となることが示唆された。

文 献

- 1) HAMM, R.: *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, **117**, 113 (1962).
- 2) NAKAMURA, R.: *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 472 (1976).
- 3) SAIO, N., KOYAMA, E. and WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.* **31**, 1195 (1967).
- 4) SAIO, K., KOYAMA, E. and WATANABE, T.: *Ibid.*, **32**, 448 (1968).
- 5) SAKAKIBARA, M. and NOGUCHI, H.: *Ibid.*, **41**, 1575 (1977).
- 6) APPU RAO, A.G. and NARASINGA RAO, M.S.: *Cereal Chem.*, **52**, 21 (1975).
- 7) APPU RAO, A.G. and NARASINGA RAO, M.S.: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 657 (1975).
- 8) APPU RAO, A.G. and NARASINGA RAO, M.S.: *Ibid.*, **24**, 487 (1976).
- 9) 芳賀聖一・大橋登美男: 食品工誌., **25**, 226 (1978).
- 10) 芳賀聖一・大橋登美男: 食品工誌., **26**, 6 (1979).
- 11) 芳賀聖一・大橋登美男: 食品工誌, **24**, 243 (1977).
- 12) 芳賀聖一・大橋登美男: 食品工誌, **25**, 231 (1978).
- 13) 大橋登美男・菅野 米: 米養と食糧, **26**, 497 (1973).

(昭和 53 年 11 月 24 日受理)