魚類筋原繊維タンパク質の高温加熱処理による分解

國領 裕・関 伸夫

(1979 年 11 月 26 日受理)

Degradation of Fish Myofibrillar Proteins by Heating at High Temperatures

Hiro KOKURYO*¹ and Nobuo SEKI*²

Isolated carp myofibrils, actin, and myosin were heated at high temperatures, and the products after heating were analyzed with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration.

When myosin was heated at 100°C or 120°C, myosin heavy chain was degraded to many fragments having different molecular weights. The amount of smaller fragments increased with an increase of heating time. Heated for 60 min at 120°C, myosin heavy chain band on the electrophoretogram disappeared, but myosin light chains still remained.

The intensity of actin band decreased while heating at 100°C and concurrently new protein bands having lower and higher molecular weights appeared. Heating of actin at 120°C accelerated these changes.

The electrophoretic patterns of the proteins solubilized from heat-sterilized fish sausage and canned fish with urea-SDS-2-mercaptoethanol solution were similar to that of the heated myosin.

水産食品の製造において、加熱処理は最も普通に用いられている加工手段の一つである。加熱処理によつて魚肉タンパク質は変性不溶化するが、一般にはタンパク質の分解（一次構造の破壊）はおこらないものとみなされている。

先に報告¹⁾したように、加熱処理した魚肉タンパク質、特に筋原繊維タンパク質と筋形質タンパク質は尿素を含む SDS*³ 溶液で可溶化でき、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でその組成を分析することが可能であった。ねり製品などからこの方法で得た SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図は、原料魚肉の泳動図と良く似ており、加熱処理によつて魚肉タンパク質がほとんど分解されていないことを認めた。またこの結果から LC (ミオシン light chains) の魚種差に基づいて、生鮮肉だけでなく加工品の魚種鑑別が可能なことを知った^{1,2)}。

一方、アクトミオシンを 100°C で数十分間加熱すると HC (ミオシン heavy chain) の分解がおこることが示唆されている³⁾が、その詳細については十分な検討がされていない。魚肉加工品の中で、常温流通を目的とする特殊包装かまぼこと、魚肉ハム・ソーセージにあつては、120°C、4 分間の加熱殺菌*⁴がおこなわれている。また魚肉缶詰では 110°C 以上で長時間の加熱殺菌がお

こなわれている。このような高温加熱殺菌時におこる筋原繊維タンパク質の挙動についてはほとんど調べられていない。

そこで本報告では、100°C 以上で加熱処理をおこなった際の筋原繊維タンパク質の変化を、主として SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図から検討し、あわせて加熱殺菌した加工品の原料魚種の鑑別の可能性について調べた。

材料と実験方法

材料 コイおよびマイワシは鮮魚を使用し、背側の普通肉を用いた。マイワシの油漬と水煮缶詰、シロサケ水煮缶詰および魚肉ソーセージ（スケトウダラ製。120°C、4 分間加熱製品）は市販品を用いた。

筋原繊維タンパク質の調製 アクチンはコイ肉のアセトン粉末から調製し³⁾、SPUDICH-WATT の方法⁴⁾で精製したのち、0.1 M NaCl または 0.6 M NaCl に透析した。

ミオシンはコイ肉より次の方法によつて調製した。コイの細碎肉を 0.1 M KCl (pH 7.0) で洗浄した後、3 倍量の 0.45 M KCl-5 mm ATP-1 mm MgCl₂-17.6 mm Na₂HPO₄-25 mm NaH₂PO₄ (pH 6.4) を加えて 30 分

*¹ 函館短期大学食物栄養学科 (Course of Nutritional Science, Hakodate Junior College, Hakodate 042).

*² 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041).

*³ 略号: SDS, Sodium dodecylsulfate; HC, ミオシン heavy chain; LC, ミオシン light chain.

*⁴ 厚生省告示 (昭和 49 年 9 月 30 日).

間抽出した。これを $20,000\times g$, 10 分間遠心分離し、上清を 14 倍量の H_2O に入れ希釈沈殿した。得られた沈殿を 0.5 M KCl - 10 mM ATP - 5 mM MgCl_2 - 10 mM 2-メルカプトエタノール- 0.5 mM EGTA - $20\text{ mM Tris-maleate}$ 緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。これに飽和硫酸を加えて 35~50% 飽和で沈殿する画分を得た。これを 0.5 M NaCl - $20\text{ mM Tris-maleate}$ 緩衝液 (pH 7.5) に透析してミオシンを得た。

筋原繊維はコイとマイワシ普通筋から 0.1 M KCl - 39 mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて洗浄、ホモジナイズした後、さらに同緩衝液中で洗浄して得た³⁾。得られた筋原繊維を 2 mM NaHCO_3 - 15 mM 2-メルカプトエタノール中で洗浄し、多量の同液に透析した。透析後、 NaCl を終濃度 0.1 M になるように添加し、 $20,000\times g$, 20 分間遠心分離し筋原繊維懸濁液を得た。この操作はミオシン LC とサブユニットの分子量が似ているトロポニンとトロポミオシンを除去するためにおこなった。

筋原繊維タンパク質の加熱処理 コイとマイワシの筋原繊維 3 ml (30 mg) を 0.1 M NaCl 中で 100°C または 120°C で封管中で加熱した。加熱冷却後 1 ml の 20% 過塩素酸 (終濃度 5%) を加えたのち、遠心分離 ($3,000\text{ rpm}$, 5 分間) し、上清の酸可溶ペプチドの量を 280 nm で測定した。アクチンとミオシンの加熱は次のようにおこなった。 0.1 M または 0.6 M NaCl 中のアクチンまたはミオシンの 1 ml (2 mg/ml) を封管中で 100°C あるいは 120°C で加熱した。

加熱処理タンパク質の可溶化 筋原繊維、アクチンおよびミオシンは、加熱冷却後、試料と等量の尿素-SDS 溶液²⁾ (8 M 尿素- 2% SDS- 2% 2-メルカプトエタノール- 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.2) を加えて可溶化した。

缶詰および魚肉ソーセージは前報²⁾の方法により脱水・脱脂後、尿素-SDS 溶液で可溶化した。

ゲル濾過および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ゲル濾過は SDS 存在下で Sephadex G-200 ゲルカラム ($\phi 2.5\times 90\text{ cm}$) を用いて上昇式でおこなった³⁾。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は前報²⁾と同様におこなった。

結 果

先に報告²⁾したように、ねり製品のような加工品を尿素-SDS 溶液で可溶化し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付して得られる泳動図は原料魚肉のそれと良く似ていた。一方、常温流通を目的とする特殊包装かまぼこと、魚肉ハム・ソーセージでは、 120°C , 4 分間の加熱殺菌がおこなわれている。このような製品の他に缶詰にした魚肉も、尿素-SDS 溶液で可溶化することがで

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of solubilized proteins from heat-sterilized fish products.

The dehydrated and defatted products were stirred into a 8 M urea- 1% SDS- 1% 2-mercaptoethanol- 10 mM phosphate buffer (pH 7.2). The mixture was allowed to stand for 20 hr at 30°C . Insoluble materials were removed by centrifugation and the supernatant was retained for electrophoresis. Approximately $50\text{ }\mu\text{g}$ protein was loaded on 10% acrylamide- 0.1% SDS gel. A, myosin B from sardine; B, canned sardine in oil; C, canned boiled sardine; D, myofibrils from chum salmon; E, canned boiled chum salmon; F, heat-sterilized fish sausage (Alaska pollack).

き、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付することが可能であつた。しかしその泳動図は原料肉のパターンとは全く異なつていた。その一例を Fig. 1 に示した。図は市販のマイワシの油漬と水煮缶詰、シロサケ水煮缶詰および魚肉ソーセージ (120°C , 4 分間加熱製品) の電気泳動図である。いずれもゲル全体が濃く染色されており、明瞭なタンパク質バンドが検出されなかつた。また魚種鑑別の指標となる LC の位置の識別はほとんど不可能であつた。

これは加熱殺菌時に魚肉タンパク質が加熱分解を受けたためと推測された。そこでコイとマイワシの筋原繊維について 100°C または 120°C で加熱して、その分解を調べてみた。Fig. 2 に示すように、 100°C 加熱では両魚種とも酸可溶ペプチドの増加は、5 時間までは徐々に増加し、5 時間を過ぎると急激な増加が見られた。この結果は筋原繊維タンパク質が加熱処理によつて徐々に低分子量の生成物を生じていくことを示している。一方、コイ筋原繊維を 120°C , 60 分間加熱した時の酸可溶ペプチドの増加は、 100°C , 5 時間以上に相当し、マイワ

Fig. 2. Changes in the amount of 5% perchloric acid-soluble materials from myofibrils during heating.

Myofibrils (30 mg/3 ml) were heated in 0.1 M NaCl at 100°C (○, ●) and 120°C (△, ▲). After heating, 3 ml of myofibrils was mixed with 1 ml of 20% perchloric acid, and the mixture was centrifuged. The supernatant obtained was measured at 280 nm. ○, △, carp myofibrils; ●, ▲, sardine myofibrils.

Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of heated carp myofibrils at 100°C.

Approximately 50 μ g protein was loaded on 10% acrylamide -0.1% SDS gel. Ac, actin; LC₁~LC₃, myosin light chains.

シでは 120°C, 20 分間の加熱が 100°C, 5 時間の加熱に相当していた。

次に筋原繊維のタンパク質組成の変化を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べて Fig. 3 に示した。

Fig. 4. Gel filtration of heated carp myofibrils at 120°C for 20 min.

Five milliliters (26 mg) of myofibrils were applied to a column (ϕ 2.5 $\times$ 90 cm) of Sephadex G-200 equilibrating with 0.1% SDS -5 mM phosphate buffer (pH 7.2). Each 4.8 ml fraction was collected. Vo=void volume. ---, fresh myofibrils; ●—●, heated myofibrils at 120°C for 20 min.

アクチンは 100°C の加熱に伴なつて量的に次第に減少していくことが認められた。3 本の LC は、100°C, 5 時間までの加熱では次第に減少するが、そのパターンは 5 時間後も識別することができた。しかし、6 時間後には LC のバンドは失われた。これは酸可溶ペプチドが急増する時間と一致していた。

コイ筋原繊維を 0.1 M NaCl 中で 120°C, 20 分間加熱した後、SDS 溶液で可溶化して、SDS 存在下で Sephadex G-200 によるゲル濾過に付した (Fig. 4)。Vo に溶出されるピークは HC に相当するが⁶⁾、このものは加熱によつて減少し、しかもピークに肩を生じた。これは HC が分解し、低分子量の分解物を生じたことを示唆している。

以上のように筋原繊維の加熱分解の様子が明らかとなったが、さらに筋原繊維の主要構成タンパク質であるアクチンとミオシンについて加熱処理による SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図の変化を調べた。

アクチンを 100°C で 8 時間まで加熱した場合の変化を Fig. 5 に示した。0.1 M および 0.6 M NaCl 中のいずれの条件下でも、アクチンは加熱を始めると極めて速やかに白濁凝固した。いずれの NaCl 濃度下でも加熱による電気泳動図の変化は良く似ており、加熱 30 分後にはアクチンより分子量の大きい生成物が認められた。このものは尿素-SDS 溶液中ではサブユニットの状態に解離しなかつた。また同時に、アクチン分子より低分子量の分解物の増大もみられた。4 時間以上の加熱になると、この高分子量の生成物はもはや 10% アクリル

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of heated carp actin at 100°C.

Actin was heated in 0.1 M NaCl (A), 0.6 M NaCl (B), and 0.1 M NaCl-0.001 M HCl (C), respectively. Numbers indicate the heating time in hr. Approximately 50 μ g protein was loaded on 10% acrylamide-0.1% SDS gel.

アミドゲルの中には移動できなくなり、ゲルの上端に停まっていることが示された。酸性の条件下 (0.1 M NaCl-0.001 M HCl 中) で加熱すると、アクチンの変化は加速された。

次にアクチンを 0.1 M または 0.6 M NaCl 中で 120°C で 2 時間まで加熱した (Fig. 6)。この場合、加熱中の電気泳動図の変化は 100°C 加熱の場合と酷似していたが、

Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of heated carp actin at 120°C.

Actin was heated in 0.1 M NaCl (A) and 0.6 M NaCl (B) at 120°C. Numbers indicate the heating time in min. Approximately 50 μ g protein was loaded on 10% acrylamide-0.1% SDS gel.

極めて速やかに変化した。泳動図の比較から、120°C, 30 分間の加熱は 100°C, 4~6 時間の加熱に相当していた。

次にミオシンについて同様の実験をおこなった。ミオシンを 0.1 M または 0.6 M NaCl 中で 100°C または 120°C で加熱した。NaCl 濃度の違いによるミオシンの加熱変化の差はほとんど見られなかつたので、0.1 M NaCl 中で加熱処理をおこなつた場合を Fig. 7 に示した。Fig. 7 上図は 10%, 下図は 5% アクリルアミドゲルを用いて分析したものである。10% ゲルは LC を、5% ゲルは HC の変化を調べるのに適している。120°C でミオシンを加熱すると、2.5 分後には明らかに HC の分解が検出され、また同時に HC より高分子量の生成物も認められた。30 分後には HC の分解物が LC のバンドと重なつてきた。120°C, 60 分間の加熱後には HC のバンドはほとんど検出されず消失した。HC の分解物の中には加熱に対して抵抗性を示すバンドも存在しているが、多くの加熱生成物は加熱時間とともに低分子化していくので、HC は非常に多くの分子量を異にする断片

Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of heated carp myosin.

Myosin was heated at 120°C and 100°C in 0.1 M NaCl. Approximately 100 μ g protein was loaded on 10% acrylamide-0.1% SDS gel (upper gels) and 5% acrylamide-0.1% SDS gel (lower gels). HC, myosin heavy chain; LC₁~LC₃, myosin light chains.

に分解されることがわかった。100°C, 15 分間の加熱と 120°C, 2.5 分間加熱の泳動図は良く似ており, 120°Cの方が変化が著しく速いことが明らかとなった。

一方 LC は加熱によって減少していったが, 120°C, 60 分間の加熱後もなお残存しており, その位置を識別できた。100°C の場合は 2 時間の加熱後も LC の位置は明瞭に識別できた。

考 察

筋原繊維タンパク質, 特に主成分のアクチンとミオシ

ンは加熱により減少し, 同時に加熱生成物の増加がみられる。加熱生成物は種々の分子量レベルのものから成っているが, 加熱時間が長い程, あるいは加熱温度が高い程, より低分子化していく。100°C では酸可溶ペプチドのレベルに到達するのに 5 時間以上の加熱を必要としたが, 120°C では数十分の加熱で充分であった。

加熱殺菌した魚肉ソーセージあるいは缶詰から得られた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (Fig. 1) はミオシンの加熱処理で得られた泳動図 (Fig. 7) と良く似ていた。すなわち Fig. 1 に現われる不特定の不明

瞭なタンパク質バンドの本体は、HC の加熱による非特異的分解によつて生じた多数の分子量を異にする断片であると推測される。

もちろんアクチンも加熱処理によつてこのようなバンドを生成するので、この一因となつていゝと考えられる。また筋肉の筋形質タンパク質あるいはコラーゲンも恐らく加熱分解を受けるであろう。コラーゲンは比較的低温の加熱でゼラチン化し、長時間の加熱で分解することが知られている⁷⁾。しかし筋肉中のミオシン量に比較すれば、これらのタンパク質量は少なく、主因がミオシンの加熱分解であることを否定できない。

アクチンやミオシンの加熱生成物の中には、アクチンモノマーあるいは HC より分子量の大きいものもみられる (Fig. 5~7)。この高分子量の加熱生成物は、アクチン、ミオシンまたはそれらの分解生成物から共有結合により生成した重合体であると推定される。このような重合体は缶詰肉などにも見出される (Fig. 1) が、その実体については不明であるので、今後の検討が必要である。

ミオシンは魚肉の主要タンパク質であり、筋原繊維の 50% を占め、魚肉加工品の品質を支配していると考えられている。したがつてミオシンの加熱分解は製品の品質にも影響を与えると思われる。缶詰肉では粘弾性が低く、固くてもろい感じを与え、ねり製品の場合も 110°C

以上で加熱すると粘弾性が低下して品質が劣化することが知られている⁸⁾。これらの原因の一端がミオシンの加熱分解によることは本実験の結果から推測できる。

筋原繊維タンパク質の加熱生成物によつて、魚種の鑑別指標である LC の位置の識別は困難となるが、LC 自体は 120°C、60 分間の加熱後もなお未分解のものが存在していた。このことは筋原繊維タンパク質の加熱生成物、特に量的に多い HC の分解物を除去できれば、LC の位置の識別ができるので、魚種の鑑別は可能になると思われる。この点については次報で述べる予定である。

文 献

- 1) 関 伸夫: 日水誌, **42**, 1169-1176 (1976).
- 2) 國領 裕・関 伸夫: 日水誌, **44**, 67-70 (1978).
- 3) 関 伸夫・北尾 勝・今野久仁彦・新井健一: 日水誌, **39**, 1211-1219 (1973).
- 4) J.A. SPUDICH and S. WATT: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 5) 関 伸夫・池田 優・成田憲弘: 日水誌, **45**, 791-799 (1979).
- 6) 関 伸夫・新井健一: 日水誌, **40**, 1187-1194 (1974).
- 7) 杉田浩一・白井邦郎・和田敬三・川村 亮: 食品工誌, **24**, 311-315 (1977).
- 8) 山沢正勝・村瀬 誠・志賀一三: 日水誌, **45**, 187-192 (1979).