魚類筋原繊維タンパク質の熱変性と冷凍変性に対する 糖類の保護効果の比較

松本行司, 新井健一

(1986年5月12日受理)

Comparison of Protective Effects of Several Sugars on Thermal and Freeze Denaturations of Fish Myofibrillar Protein

Ikushi Matsumoto* and Ken-ichi Arai*

The protective effect of several kinds of sugars on freeze denaturation of carp myofibrillar protein was studied by measuring the rate constant (k_D) for inactivation of its Ca-ATPase.

As the inactivation of Ca-ATPase proceeded in two first order steps, the rate of an early fast step was employed to make a linear relation as a function of sugar concentration (M). The protective effect of sugar on freeze denaturation of myofibrillar protein was estimated from the slope of $\log k_D$ versus sugar (M). The protective effect (E) was thus found to become lower in the order of lactitol, glucose, maltitol=sucrose, sorbitol, and maltose. This rank of sugars coincided with that of the same sugars against thermal denaturation of fish myofibrillar protein, which has been previously reported.

It was also found that a relatively lower concentration (0.1–0.3 M) of sugar was enough to protect freeze denaturation of myofibrillar protein than that of sugar required to protect thermal denaturation of the same protein.

冷凍貯蔵は、水産魚介類の貯蔵と流通のため、産業上最も広く利用されている技術である。しかし、一般に、魚介類の変性が速く起るため、冷凍および貯蔵の温度や冷凍貯蔵に供する前の前処理が大切であると言われている。¹⁾ たとえば、スケトウダラ肉質中のタンパク質は、本来極めて不安定であり、そのままでは冷凍貯蔵が不可能である。しかし、水晒し後の魚肉に5%以上の糖類を添加することによって少なくとも数年間に及ぶ貯蔵が可能となる。この製品がいわゆる冷凍すり身である。したがって、水産魚介類筋肉タンパク質の冷凍貯蔵中に起る変性を最少に止め、食品原料として利用を計る条件を明らかにする研究は、現在なお極めて重要であると考えられる。

著者らは、先に、魚類の筋原繊維タンパク質の冷凍変性に対するソルビトールとシュクロースの保護効果を、Ca-ATPaseの変性速度の抑制の割合として数量的に比較検討し、報告した。²⁾ 本研究では、数種類の糖類を用いて同じ方法によって、保護効果を測定し、糖類の構造との関係やその作用機序について検討することを目的とした。また、魚類の筋原繊維タンパク質の熱変性に対する糖類の保護効果については、既に大泉らが研究を行

い、その結果を報じているので、³⁾ その結果と本実験の結果を比較し、冷凍変性に対する糖類の効果の特徴を明らかにしようと試みた。

実験方法

筋原繊維懸濁液の調製 魚類の筋原繊維（以下Mfと略す）は、前報²⁾と同様に、加藤らが報じた方法⁴⁾に従って、養殖コイ *Carp Cyprinus carpio* の背筋より調製し、タンパク濃度が10 mg/mlになるように0.16 M KCl-0.3 M NaHCO₃, pH 7.5あるいは、0.16 M KCl-Tris-maleate, pH 7.5溶液に懸濁させた。

各種糖類共存下における筋原繊維懸濁液の冷凍貯蔵 Mf懸濁液に対して種々のモル濃度になるように糖類を添加した後、pHが7.5、6.5または5.8になるようにTris-maleate緩衝液を加え、その4.5 mlずつを試験管に分注し、-20°Cで冷凍貯蔵した。経時的にその一部を取り出して流水によって解凍し、0.16 M KCl-40 mM Tris-HCl, pH 7.5溶液を加え、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(20 ml)の懸濁液にした。なお、pHが5.8および6.5において冷凍貯蔵したMfの場合も、この操作によって懸濁液を

* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

中性に調節した。なお、本実験で供試した糖類は、ソルビトール、シュクロース（サッカロース）、ラクチトール、マンニトール、マルトース、マルチトール、およびグルコースである。

Mf Ca-ATPase 活性の測定 Mf Ca-ATPase 活性 (EC 3. 6. 1. 3) は、0.1 M KCl, 5 mm CaCl_2 , 25 mm Tris-maleate (pH 7.0), および 1 mm ATP の組成液を 25°C において反応させ、遊離する無機リン酸を Gomori の方法によって比色定量し、⁵⁾ 比活性 ($\mu\text{mol} \cdot \text{Pi} / \text{min} \cdot \text{mg}$ タンパク質) を求めた。なお、糖類が共存すると、Ca-ATPase 活性が見かけ上阻害されるため、対照試料にも同濃度の糖類を添加し、測定した冷凍前の比活性を基準とした。

Mf Ca-ATPase の変性速度定数の算出 Mf Ca-ATPase の失活を一次反応式に従って解析し、見かけの変性速度定数 (k_D) を次式によって計算した。 $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$, ここで、 C_0 および C_t は t 日間貯蔵前および後における Ca-ATPase 活性 (相対値) である。なお、失活の反応が二段階から成る時は、初期の速い段階の速度は k_{Df} , 後期の遅い段階のそれは k_{Ds} として表わした。

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。⁶⁾

結 果

冷凍による Mf Ca-ATPase の変性反応様式と糖およ

び pH の影響 著者らは既に、冷凍貯蔵中に起る Mf Ca-ATPase の変性反応の様式に対するソルビトールとシュクロースの影響を異なる pH において検討した。すなわち、pH を 7.5, 6.5 または 5.8 の Mf 懸濁液に、0~1.0 M の間の種々の濃度のソルビトール、またはシュクロースを添加して、-20°C における Mf Ca-ATPase の経時変化を測定し、一次反応式によって解析した。²⁾ その際得た結果によると、まず、糖が共存しない時の Mf Ca-ATPase の失活は pH 7.5 で遅く、6.5, 5.8 の順に速くなる傾向を示したが、失活の反応様式は pH とは係わりなく、初期に速く、後期は遅い二段階の反応で進むことを示した。一方、0~0.3 M のソルビトール、またはシュクロースが共存すると、いずれの場合も ATPase の失活は極めて遅くなり、冷凍貯蔵 80 日後に至るまで一段階の反応で進むことを示した。ただし、pH 5.8 における Mf Ca-ATPase の失活は、0.1~0.25 M の糖が存在しても、なお著しく速いため、初期に速く後期は遅い二段階の反応で進行した。しかし、共存する糖濃度が 0.5 から 1.0 M まで増加すると、Ca-ATPase の失活は極めて遅くなり、一段階の反応で進行するようになった。本研究では、さらにラクチトール、マルトース、マルチトール、グルコース、およびマンニトール存在下における Mf Ca-ATPase の冷凍変性の反応様式を検討した。また、ラクチトールの場合だけは、pH 7.5, 6.5 および 5.8 における変性反応について検討した。その中、pH 7.5 における一例を Fig. 1 に示したが、Mf Ca-ATPase

Fig. 1. Effect of lactitol on change in Ca-ATPase activity of carp myofibrils during frozen storage.

Carp myofibrils were suspended in a medium containing 0.16 M KCl, 40 mm Tris-maleate (pH 7.5) with and without 0.05 M lactitol. During storage at -20°C for 90 days, a portion of myofibrils suspension was thawed, homogenized, and diluted to a fixed volume with 0.16 M KCl, 40 mm Tris-maleate (pH 7.5) at various time intervals. The Ca-ATPase activity was assayed at 25°C in a reaction medium containing 5 mm CaCl_2 , 0.1 M KCl, 25 mm Tris-maleate (pH 7.0), 1 mm ATP, and 0.2-0.3 mg/ml of myofibrillar protein.

(Δ) none (=control), (○) 0.05 M lactitol.

の変性反応の様式とこれに及ぼす糖濃度の影響, および pH の影響は, 上記したソルビトール, およびシュクロースの存在下で得た結果とほとんど同じ傾向になった。

以上述べたように, Mf Ca-ATPase の冷凍変性は, その速度がゆっくりと進行するときは, 一次反応に従う一段階として示される。一方, 冷凍変性が速やかに進行するときは一次反応により二段階となることが示された。また, この二段階の反応が, 初期の速い段階から後期の遅い段階に移る時点は, Mf Ca-ATPase 活性値としてその約 60~70% が変性した後に相当していた。それ故, 以下に行った実験で冷凍変性が二段階の反応で進行するときは, 初期の変性反応に注目し, その速度を指標として主に用いることにした。

Mf Ca-ATPase の冷凍変性速度に対する糖類の保護効果
pH 7.5 における Mf に対して 0~1.0 M の間の種々の濃度のラクチトールを添加し, また, pH は 7.5, 6.5, または 5.8 にして, 冷凍貯蔵し, 糖類共存下の Mf Ca-ATPase の経時的な変化から, 冷凍変性速度 (k_{Df}) を算出した。そして, k_{Df} の対数値と糖濃度の関係を Fig. 2 に示した。また, k_{Df} 値からその条件下に

おいて Mf Ca-ATPase 活性が 50% 減少するのに要する貯蔵日数 (Half Life) を算出し, 同図, 縦軸 (右) に示した。なお, 同図中には, 比較のためソルビトール, およびシュクロース共存下の結果も示した。

この結果によると, pH 7.5 および 6.5 における Mf の場合は, $\log k_{Df}$ と糖濃度の関係はいずれも単純な比例関係となったが, pH 5.8 の Mf の場合は, $\log k_{Df}$ と糖濃度が 0.1 M 以下では急な勾配で, また, 0.1 M 以上 1.0 M の間では緩い勾配の二段の比例関係となることを示した。なお, この $\log k_{Df}$ と糖濃度 (0.1 M 以上) との比例関係の勾配を比較すると, 先ず, 同じ糖による場合でもその勾配は pH により異なり, pH 7.5 において最も急で, pH 6.5 の場合がそれに次ぎ, また, pH 5.8 における場合が最も緩い勾配であった。これは糖による Mf Ca-ATPase の冷凍変性に対する保護効果が酸性条件下におけるよりも中性条件下において大きいことを示すものである。これはどのような糖の場合も同じであった。次に, 糖の種類の間で比べると, その勾配は小さい方からソルビトール<シュクロース<ラクチトールの順序となり, いずれの pH においても, 同一のモル

Fig. 2. Effect of lactitol concentration on rate constant for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase activity at three different pHs.

The frozen storage of carp myofibrils suspension was made as in Fig. 1, except that the myofibrils were suspended in media containing 40 mM Tris-buffer of pH 7.5, 6.5, or 5.8, and various concentrations of lactitol (0~1.0 M). The Ca-ATPase assay was conducted also as in Fig. 1. The first order rate constant at an early step (k_{Df}) was calculated by the following relation, $k_{Df} = (\log C_0 - \log C_t) / t$, where C_0 and C_t are the Ca-ATPase activities before and after frozen storage at -20°C for t days. For the sake of comparison, the k_{Df} values in the presence of sorbitol and sucrose were also plotted against the molar concentration of sugar.

(○) sorbitol, (△) sucrose, and (□) lactitol.

Fig. 3. Effects of maltose, maltitol, and mannitol on rate constant for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase at neutral condition.

The frozen storage of carp myofibrils suspension (pH 7.5) in the presence of several sugars and the Ca-ATPase assay were conducted as in Fig. 1. The first order rate constant (k_{df}) at an early step was plotted against the molar concentration of sugar as in Fig. 2. For the sake of comparison, the k_{df} values in the presence of sorbitol were also plotted in this figure.

(Δ) maltose, (□) maltitol, (▲) mannitol, (○) sorbitol.

濃度で比べる限り、ソルビトールの効力が小さく、ラクトイトールのそれが強いことを示した。

次に、マルトース、マルチトール、およびマンニトールを用いて、pH 7.5において、0~0.3 Mの間の種々の濃度の存在下における Mf Ca-ATPase の冷凍変性速度を算出し、 $\log k_{df}$ と糖濃度の関係を検討し、結果を Fig. 3 に示した。なお、図には示さないが、グルコースについても同様な検討を行なった。その結果によると、いずれの糖の場合も $\log k_{df}$ と糖濃度の間には、直線関係が成立したが、その直線の勾配は、大きい方からグルコース>マルチトール>マルトース=ソルビトール>マンニトールの順位となった。ただし、マンニトールは Mf Ca-ATPase の冷凍変性に対して保護効果を全く示さなかった。すなわち、この場合の $\log k_{df}$ と糖濃度の関係は勾配をもたない直線となっている。

以上の結果から、マンニトールを除く6種の糖類についてそのモル濃度と $\log k_{df}$ の関係直線の勾配を次式によって算出し、結果を Table 1 に総括した、 $E = (\log k_{d0} - \log k_{da}) \times 1/a = (\Delta \log k_d / M)$ 、ここで、 k_{d0} および k_{da} は、 a モル濃度 (M) の糖が存在しないとき、および、存在するときの Mf Ca-ATPase 活性である。保護効果 (E 値と表わす) は、Mf Ca-ATPase の冷凍変性速度に対する単位濃度の糖が示す抑制の強さを表わしている (A)。なお、保護効果の強さを示す別な表わし方として、ATPase 活性が 50% 変性するのに要する日数、すなわち、半減期 (Half Life) が 700 日となるために添加する必要がある糖のモル濃度を算出した (B)。

この結果によると、糖の保護効果 (E) は、pH 7.5 において最も大きい、pH が低下するに従って小さくな

Table 1. Protective effects of various sugars on inactivation of Ca-ATPase at different pHs

(A) From the data shown in Figs. 1 and 2, the protective effect (E) of various sugars on the inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was determined by the relation, $E = (\log k_{d0} - \log k_{da}) / a$, where k_{d0} and k_{da} are the first order rate constants for the inactivation of myofibrillar Ca-ATPase in the absence and presence of a M of sugar.

(B) Sugar concentration (M) required for the half-maximal inactivation of myofibrillar Ca-ATPase after the frozen storage for 700 days was calculated from the corresponding k_{df} values.

(A)						
pH	Protective Effect (E)					
	Sorbitol	Sucrose	Lactitol	Glucose	Maltose	Maltitol
7.5	5.3	6.2	10.8	6.7	5.3	6.2
6.5	3.5	3.9	8.0	—	—	—
5.8	1.6	1.9	3.3	2.0	—	—
(B)						
pH	Sugar (M/l) required for the half life of 700 days					
	Sorbitol	Sucrose	Lactitol	Glucose	Maltose	Maltitol
7.5	0.35	0.30	0.18	0.27	0.35	0.30
6.5	0.75	0.67	0.33	—	—	—
5.8	1.61	1.43	0.71	—	—	—

り、pH 6.5 では pH 7.5 の効果の 60~70%, また pH 5.8 では pH 7.5 の効果の僅か 30% 程度に低下すること、また、いずれの pH においても、効果の大きい方からラクチトール>シュクロース>ソルビトールの順位になることが示されている。なお、グルコース、マンニトール、マルトース、マルチトールについては、pH 6.5, および pH 5.8 における保護効果は検討しなかったが、pH 7.5 における効果を比べると、糖類の効果の順位は、強い方からラクチトール>グルコース>シュクロース=マルチトール>ソルビトール=マルトース>マンニトールようになる。なお、保護効果の強さの度合は pH で異なるが、糖類間の強さの順位は pH の影響を受けないことが Fig. 2 の結果に示されているので、おそらく、上記した糖類の効果の強さの順位は pH 7.5 以外の pH においても成立するものと考えられる。

次に、もう一つの指標として、Ca-ATPase 活性の半減期を 700 日とするために添加する必要がある糖類の濃度を比べると、pH 7.5 の場合は、ソルビトールまたはマルトースは 0.35 M, シュクロース, またはマルチトールは 0.30 M, グルコースは 0.27 M, マルチトールは 0.17 M であり、一方、pH 5.8 の Mf の場合は、ソルビトールは 1.61 M, シュクロースは 1.43 M, ラクチトールは 0.77 M を加える必要があることが示されている。言い換えれば、中性条件下においては、0.3 M 前後の低い濃度の糖によって Mf タンパク質の変性が効果的に抑制できるが、酸性条件下では 1.5 M に及ぶ高濃度の糖が必要であることを示している。

Mf Ca-ATPase の冷凍変性および熱変性に対する糖類の保護効果の比較 大泉らは、先に魚類 Mf タンパク質の加熱変性に対する糖類の保護効果について検討し、その効果には、糖の化学構造の中 OH 基数が強く係わっていること、すなわち、糖分子中の OH 基が多いほど一般に加熱変性に対する E が大きいことを示した。そこで、本実験で得た結果についても、大泉らと同じ視点に立って整理する試みをした。^{3,7)} すなわち、検討を加えた糖類の化学構造の中に含まれる OH 基数と、その糖類が Mf Ca-ATPase の冷凍変性、および加熱変性に対して示した保護効果 (E 値) を Table 2 に総括した。また、同表中には、ソルビトールの効果 (E_s とする) を基準として他の糖類の効果の倍率 (E/E_s とする) をも示し、両変性に対する効果の大きさを比較検討した。

これによると、まず、加熱変性に対する糖の効果は、強い方から、ラクチトール>シュクロース>グルコース=ソルビトール>マルトース>マンニトールの順序に弱くなったが、冷凍変性に対する効果もラクチトール>シュクロース=マルチトール=グルコース>ソルビトール=マルトース>マンニトールの順位であった。僅かな例

Table 2. Comparison of the protective effects of several sugars on thermal and freeze denaturations of myofibrillar protein at neutral condition

According to the data shown in Table 1, the relative protective effect (E/E_s) of sugar on freeze denaturation was calculated, taking the effect of sorbitol (E_s) as 1.00.

The protective effect of sugar on thermal denaturation of myofibrillar Ca-ATPase, which has been reported by T. Oozumi *et al.* (1981), was referred and the (E/E_s) value was calculated. Figures in parenthesis indicated the numbers of OH groups in sugar molecule.

Sugar		Thermal denaturation		Freeze denaturation	
		E	(E/E_s)	E	(E/E_s)
Lactitol	(9)	1.04	1.49	10.8	2.04
Sucrose	(8)	0.77	1.10	6.2	1.17
Maltitol	(9)	—	—	6.2	1.17
Sorbitol	(6)	0.70	1.00	5.3	1.00
Glucose	(5)	0.67	0.96	6.7	1.26
Maltose	(8)	0.63	0.90	5.3	1.00
Mannitol	(6)	0.51	0.73	0	0

外として、グルコースが冷凍変性に対して相対的に強い効果を示すこと、また、マンニトールは、熱変性に対しては強い保護効果を示すのに対して、冷凍変性に対しては全く効果を示さない事実が見出された。したがって、冷凍変性に対する上記糖類の作用は、おそらく加熱変性に対する場合と同じ原理によって発揮されているものと推定される。

Mf Ca-ATPase の冷凍変性の速度は、加熱変性の速度に比べれば、極めて遅く、冷凍変性が日数の単位で測定されるのに対し、熱変性の速度は秒数の単位で求められている。しかし、いずれの変性速度に対する糖類の保護効果も同じ次元の値 ($\Delta \log k_D/M$) として表わされているので、比較が可能である。そこで、E 値を比べてみると、冷凍変性に対して同じ糖が示す値は、加熱変性に対して示す値より、少なくとも数倍から 10 倍に達することが明らかであり、これは糖の種類を問わず認められる事実である。言い換えれば、この事実は、Mf Ca-ATPase の冷凍変性の速度を同程度に抑制するためには、同活性の加熱変性を抑制する場合よりも数分の 1 から十分の 1 程度のモル濃度の糖を添加すれば充分であることを意味している。

考 察

コイ Mf の冷凍変性に対するソルビトールとシュクロースの保護効果を変性速度の抑制割合として表わす方法

は、既に報じられているが、²⁾ 本研究では、同じ方法に従ってソルビトールとシュクロースの外に5種の糖類が示す保護効果を検討した。すなわち、Mf Ca-ATPase の $\log k_D$ と糖濃度 (M) との関係はいずれも直線性を示すので、その勾配を算出した。この勾配の大きさは、溶媒中の糖のモル濃度に依存している一定値であり、溶媒中の Mf タンパク質の多少 (濃度の高低) には係わりのないことを別に確かめた。この詳細については次報において述べる。

Mf の冷凍変性に対する糖類の保護効果 (E) の大きさとその化学構造との関係を考察してみると、一般に糖分子中の OH 基が多いほど変性に対する保護効果が高いことが示された。しかし、OH 基数6コをもつソルビトールと8コのマルトース、または、OH 基数8コのシュクロースと9コのマルチトールの保護効果がほとんど同じであること、さらに、OH 基数を5コしかもたないが、その立体配座が水分子と極めて結合し易い状態にあると言われるグルコースの効果がソルビトールよりもむしろ高いことなどの事実を考えると、その効果は単に OH 基数だけでなく、その立体配座にも関連があることは確実である。なお、冷凍変性に対してマンニトールが保護効果を全く示さない理由は、試料の凍結の際にそれが折出してしまうことが原因であると思われた。すなわち、いったん冷凍した試料液を融解すると、マンニトールは結晶としてそのまま残存するのに対して、他の糖類の場合には、それが認められなかった。

冷凍変性に対する糖の作用は加熱変性に対する場合と似ているが、これはタンパク質の変性と糖の関係について述べた上平や⁸⁻¹⁰⁾ 月向ら^{11,12)} の説を支持するものである。すなわち、上平や月向らによると、各種タンパク質の変性に対して、糖類は単にタンパク質分子表面の結合水と置き代わって結合してその効力を現わすのではなく、自由水をも含め溶媒中の全ての水分子の構造を安定化することによってその保護効力を発揮すると説明されている。なお、このような考え方は、加熱の場合とは異なり、凍結によって溶媒中の水分子の構造に大きな変化が生ずること、さらに、凍結に伴って、溶媒中の糖濃度が高まることを考えると、熱変性におけるよりも、むしろ

冷凍変性においてより良く適用出来るように思われる。また、糖の濃縮が起るために、冷凍変性を抑制するために必要とする糖濃度が、熱変性に対する場合よりも低いと推定される。

なお、本研究の内容は、Mf タンパク質を用いたモデル実験にすぎないが、中性の条件において Mf タンパク質の冷凍変性を抑制するために必要とされる糖濃度は約 0.3 M 程度であり、重量パーセントでは約 5% に相当している。これは冷凍すり身の製造に用いられている値に近似している。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究補助金によって行なわれた。ここに記して感謝します。

本研究に用いた糖類は、東和化成工業 (株) の御好意により御分与いただいたものであり、併記して謝意を表します。

文 献

- 1) 福田 裕, 柞木田善治, 新井健一: 日本誌, **50**, 845-852 (1984).
- 2) 松本行司, 大泉 徹, 新井健一: 日本誌, **51**, 833-839 (1985).
- 3) 大泉 徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一: 日本誌, **47**, 901-908 (1981).
- 4) 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一: 日本誌, **43**, 857-867 (1977).
- 5) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法, 各論 2 (関根隆光編), 南光堂, 東京, 1962, pp. 13-14.
- 6) A. G. Gornall, C. T. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 7) 大泉 徹: 昭和 59 年度, 北海道大学博士論文 (水産学), 1984, pp. 38-44.
- 8) 上平 恒: 蛋白質・核酸・酵素, **21**, 575-582 (1976).
- 9) 上平 恒: 化学総説, **11**, 191-206 (1976).
- 10) H. Uedaira and H. Uedaira: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 2451-2455 (1980).
- 11) K. Gekko and S. Koga: *J. Biochem.*, **94**, 199-205 (1983).
- 12) 月向邦彦: 蛋白質・核酸・酵素, **30**, 115-1126 (1985).