

魚類筋原繊維の水の状態と温度安定性に及ぼす L-グルタミン酸ナトリウムの影響

野 崎 征 宣, 田 端 義 明

Influence of Sodium L-Glutamate on the State of Hydrated Water and the Thermal Stability of Fish Myofibrils

Yukinori NOZAKI and Yoshiaki TABATA

Carp myofibrils (Mf) were added with various concentrations of sodium L-glutamate (Na-Glu), and examinations were made of the relationship between added concentrations of Na-Glu and bound water content in Mf or thermal stability with the rate constant (k_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase as an index of the Mf in quality.

At the concentration range used in this study, bound water content in Mf showed higher values for the addition of Na-Glu than no-additive Mf (control); it was gradually increased with an increase in concentration of Na-Glu, and reached the peak at the concentration of 2.0 mol, being slowly decreased at higher concentrations. Log k_D for Mf was always smaller for the addition of Na-Glu than control; it was gradually decreased with an increase in concentration of Na-Glu, and reached the peak (highest thermal stability) at the concentration of 2.0 mol, being slowly increased at higher concentrations. Some correlation was recognized to exist between bound water content in Mf and its thermal stability.

Key words : グルタミン酸ナトリウム sodium L-glutamate; 熱安定性 thermal stability; 結合水 bound water; 魚類筋原繊維 fish myofibrils; 筋原繊維 Ca-ATPase 活性 myofibrillar Ca-ATPase activity

加熱における魚類筋原繊維タンパク質の変性抑制にアミノ酸が有効であることが報告¹⁻³⁾ されている。それらの結果から、アミノ酸の効果並びにアミノ酸と糖あるいは有機酸との共同効果が明らかにされ、さらに変性抑制効果を定量的に表示することが提唱されている。また、アミノ酸の変性抑制機構は、アミノ酸が魚肉タンパク質を懸濁あるいは溶解している水の状態を変化させ、その結果として、魚肉タンパク質の変性抑制に影響を及ぼすことに原因していることが推察されている。

著者らは、先に、コイ筋原繊維タンパク質 (以下、本文中 Mf と略記) に種々のアミノ酸 (23種, Mf 1kg に対し 0.2mol 量) を添加し、Mf 中の水の状態

を熱分析によって結合水量を調べ、Mf の温度安定性との関連性で検討した。その結果、Mf の温度安定性が高いものほど結合水量が多く、Mf の加熱による変性抑制には、アミノ酸による Mf タンパク質周囲の水の構造化 (water structure making) が重要な因子になっていることが示唆された。⁴⁾

本研究では、前報⁴⁾ で、Mf の結合水量の増大並びに加熱における変性抑制に最も大きな効果がみられた L-グルタミン酸ナトリウム (sodium L-glutamate, 以下、本文中 Na-Glu と略記) を選定し、Na-Glu の添加濃度と Mf 中の結合水量との関係を調べると同時に、Mf の温度安定性 (Mf Ca-ATPase の変性速度を指標) との関連性についても検討した。

実験方法

筋原繊維の調製 Mf の調製は, 供試魚にコイ (Carp, *Cyprinus carpio*) を用い, 加藤らの方法⁵⁾ に準じた方法で行った。即ち, 活魚を即殺して筋肉を採取し, 細切したのち, 5 倍量の 0.1M KCl-0.02 M Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) で 3 回攪拌洗浄した。次に 3 倍容の同緩衝液を加え泡止式ブレンダーでホモジナイズ (10,000rpm, 90秒間) を行ったのち, ナイロンネット (#16) を通過させて結合組織を除去した。次に 20% Triton X-100 溶液を終濃度が 1% となるように加え, 30 分間放置後遠心分離 (750×g, 10分間) を行った。得られた沈殿に 5 倍容の同緩衝液を加えて攪拌したのち, 遠心分離 (750×g, 10分間) を行った。この操作 (攪拌洗浄及び遠心分離) をさらに 3 回繰返した。沈殿を 5 倍容の冷蒸留水を加えて攪拌洗浄したのち遠心分離 (5,000×g, 10分間) を行い, さらに過剰の水を除去する目的で遠心分離 (12,000×g, 20分間) し, 得られた沈殿を Mf 試料とした。Mf の一般成分は, 水分 90.4%, 粗タンパク質 9.1%, 粗脂肪 0.1%, 粗灰分 0.4% であった。

グルタミン酸ナトリウムの添加 Mf を乳鉢にとり, Mf 1kg に対して 0.1~3.0mol 量の Na-Glu (和光純薬工業製特級) を添加し, 0.01N NaOH あるいは 0.01N HCl で pH 7.0 に調整したのち, 冷却しながら 5 分間混合した。なお, アミノ酸無添加の Mf を対照とし, 同様の処理を行った。

筋原繊維の加熱並びに筋原繊維 Ca-ATPase 活性の測定 対照の Mf あるいは Na-Glu を添加した Mf 1g を試験管に分取し, 種々の温度の恒温槽中に保持し, 経時的に取り出し氷冷して加熱を停止した。次に, この試料を 0.1M KCl-0.02M Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) 20ml に懸濁させたのち, 遠心分離 (750×g, 10分間) を行った。得られた沈殿はテフロン製の Potter 型ホモジナイザーでホモジナイズし同じ緩衝液に懸濁させ, 以後の実験に供した。

Mf Ca-ATPase 活性は, 100mM KCl, 5mM CaCl₂, 25mM Tris-maleate (pH 7.0), 1mM ATP, Mf タンパク質 0.3~0.4mg を含む溶液組成で反応 (25℃) させたのち, 終濃度が 5% となるようにトリクロル酢酸を加えて反応を停止させ, 遊離する無機リン酸量を比色定量⁶⁾ して求めた。また, Mf タンパク質濃度は, 牛血清アルブミン (フラクション V) を標準

としてビュレット法⁷⁾ によって比色定量して求めた。なお, 用いた牛血清アルブミンの純度は Kjeldahl 法によって補正した。

筋原繊維 Ca-ATPase の変性速度恒数の算出 一定温度における Mf Ca-ATPase の失活は, 一次反応式に従うので次式によって変性速度恒数 (以下 k_D と略記) を算出した。¹⁾

$$k_D (S^{-1}) = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$$

ここで, C_0 と C_t は加熱前後における Ca-ATPase 活性の相対値であり, t は加熱時間 (秒) である。

示差熱分析による結合水量の測定 Mf 試料 (約 10mg) を開放型アルミニウム製セルにつめて精秤し, Al₂O₃ を熱的基準物質として, 示差走査熱量計 (理学電気製サーモフレックス低温型) を用いて転移熱量を測定した。蒸留水についても同様に行った。測定温度範囲は 15~150℃, 昇温速度は 5℃/分である。Mf 試料の転移熱量は, サーモグラムの開始点と終了点を結んで得られる面積を重量法で測定し, 標準試料インジウム (和光純薬工業製) を基準熱量とし, その面積との比より求めた。これより Mf 試料の結合水量を算出した。なお, 標準試料の基準熱量は, 各試料の測定ごとに行った。

実験結果

筋原繊維タンパク質の加熱変性に及ぼすグルタミン酸ナトリウム濃度の影響 Mf に Na-Glu を 0.1~3.0mol の濃度範囲で添加し, 種々の温度で加熱して Mf Ca-ATPase の失活を経時的に測定して求めた k_D を, 絶対温度の逆数 (1/T) に対してプロット (ARRHENIUS plot) した結果を, Fig. 1 に示した。この結果をみると, k_D に対する 1/T の関係は対照及び Na-Glu を添加したいずれの系においても直線となった (以下, この直線を関係直線と記す)。しかも, それらの関係直線は対照より高温側 (安定な側) に位置したが, その程度は Na-Glu 濃度により相違がみられた。即ち, Na-Glu 濃度の増加に伴って関係直線は高温側に移行するものの, 2.0mol 添加系の関係直線が最も高温側に位置し, さらに Na-Glu 濃度が増加すると低温側へ移行した。本実験における Na-Glu の濃度範囲では, 2.0mol 添加系が最も温度安定性が高かった。

筋原繊維タンパク質中の結合水量に及ぼすグルタミン酸ナトリウム濃度の影響 Mf に Na-Glu の濃

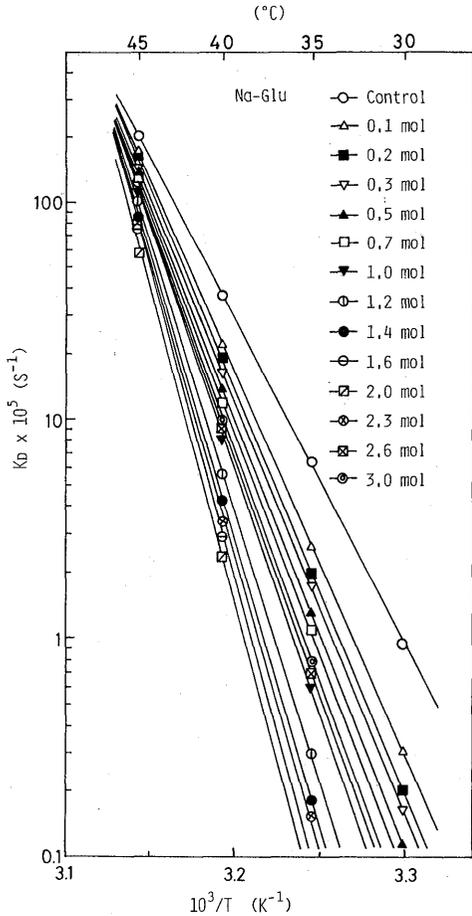


Fig. 1. ARRHENIUS plot for the inactivation rate constant (k_D) of myofibrillar Ca-ATPase in the presence of various concentrations of sodium L-glutamate.

Carp myofibrils (state of *Surimi*, pH 7.0) was heated at various temperatures in the presence of various concentrations of sodium L-glutamate (0.1–3.0mol to 1kg of myofibrils; the amount of water in myofibrils is 90.4 per cent). The heat treatment was stopped by cooling in ice-water and the loss of ATPase activity during heat treatment was measured. ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 100mM KCl, 5mM CaCl₂, 25mM Tris-maleate (pH 7.0), 1mM ATP and 0.3–0.4mg/ml of protein. The rate constant (k_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was calculated using the relation, $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$, where C_0 and C_t are the ATPase activities before and after t second of heat treatment.

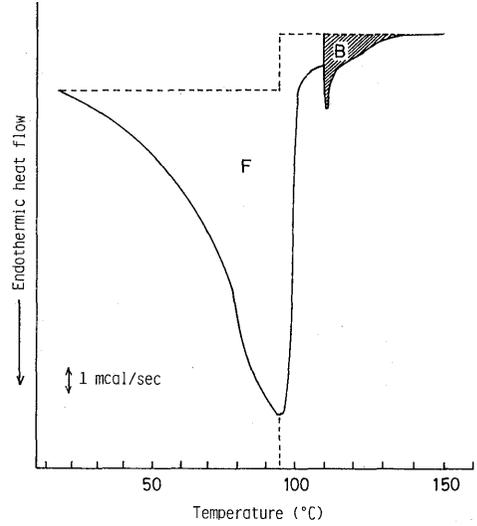


Fig. 2. Analysis of differential scanning calorimetry pattern. F, area corresponding to the evaporation of the free water; B, area corresponding to the evaporation of the bound water.

度を変えて (0.1–3.0mol) 添加し、それらの Mf 試料を示差熱分析 (15–150°C) に供した。得られたサーモグラムは前報⁴⁾ で示した結果とほぼ同様であった。Fig. 2 にその模式図を示したが、第 1 ピークの頂点を示す温度を境として、それ以下の温度域では吸熱開始点 (15°C) をベースラインとして、それ以上の温度域では第 2 ピークが終了した点をベースラインとした。また、第 2 ピークの立上りを境界線として、それより低温側を自由水 (F)、高温側を結合水 (B) とした。B の面積からそれぞれの試料の結合水量を求め、その結果を Table 1 に示した。なお、この表には、前述の 35°C 加熱における Mf Ca-ATPase の失活を、経時的に測定して求めた k_D も併せて示した。さらに、Na-Glu 濃度の変化に伴う結合水量と $\log k_D$ をプロットし、Fig. 3 に示した。この結果 (Fig. 3) をみると、本実験で用いた濃度範囲では、いずれの系の結合水量も対照より高い値を示し、濃度の増大に伴って増加するが、2.0mol 添加で最大値を示し、さらに濃度が増大すると結合水量は徐々に減少した。一方、Na-Glu を添加した系の $\log k_D$ はいずれも対照より小さいが、濃度変化に伴う $\log k_D$ の変化をみると、Na-Glu の濃度増大に伴って減少し、2.0mol 添加で最少値 (最も温度安定性が高い) を示した。Fig. 3 に示した結合水量と $\log k_D$ との間には、1% の危険率で高い相関関係 ($r = -0.969$, $n = 14$) が認められた。

Table 1. Effect of sodium L-glutamate on the amount of bound water and the rate constant (k_D) for inactivation of Ca-ATPase of carp myofibrils

System	Bound water (g/100g of myofibrils)	$k_D \times 10^6$ (sec^{-1} , at 35°C)
Control	2.7	64.0
0.1 mol	7.6	27.0
0.2 mol	7.9	20.0
0.3 mol	8.1	17.0
0.5 mol	9.0	13.0
0.7 mol	9.8	11.0
1.0 mol	12.5	6.0
1.2 mol	15.1	3.0
1.4 mol	17.9	1.8
1.6 mol	18.4	1.0
2.0 mol	18.5	0.7
2.3 mol	13.9	1.5
2.6 mol	12.8	7.0
3.0 mol	10.4	8.0

The added amount of sodium L-glutamate was 0.1–3.0 mol to 1 kg of myofibrils (the amount of water in myofibrils was 90.4 per cent).

The amount of bound water in myofibrils was obtained from differential scanning calorimetry shown as in Fig. 2. The data shown Fig. 1 was used to calculate the k_D values for myofibrillar Ca-ATPase at 35°C.

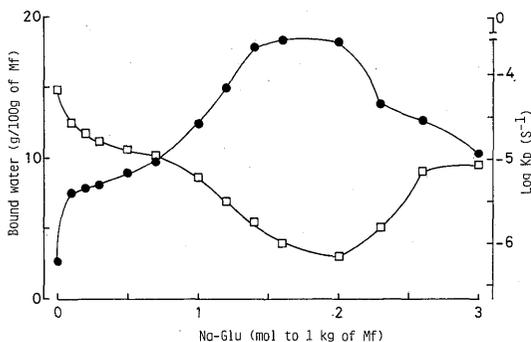


Fig. 3. Effect of sodium L-glutamate on the amount of bound water and the logarithm constant (k_D) for inactivation of Ca-ATPase of carp myofibrils.

(●), bound water; (□), k_D at 35°C.

考 察

Na-Glu 添加濃度の変化に伴う Mf の温度安定性に関する研究は、大泉ら^{1, 3)} がマサバ Mf の懸濁液の状態を検討を行っている。これによると、マサバ Mf の $\log k_D$ と Na-Glu モル濃度 (M) との関係は、0.75M 付近に屈曲点があり、これを境とし低濃度では急な、高い濃度では緩い勾配の二段階の直線を示すことが報告されている。本実験における屈曲点

は約 1.6M (2.0mol 添加濃度を Mf 中の水分含量 90.4% として換算) と高く、しかも屈曲点より高濃度域の $\log k_D$ は徐々に大きくなる (温度安定性が低くなる) ことが示された。この原因の一つとしては、Mf の加熱の状態 (懸濁液とすり身の状態) の相違が考えられる。また、大泉³⁾ は、Mf の加熱変性に対するアミノ酸の変性抑制効果について水和説を挙げているが、以下に述べるように、本研究結果はこのことを実験的に支持するものであった。また、本実験結果が示すように、加熱 (高温域) における Mf に対する Na-Glu の変性抑制効果が最大を示す濃度 2.0mol は、脱水並びに冷凍における添加濃度 0.2mol に比べてかなり高く (未発表)、高温域では水分子の熱運動が激しいことなどから水の構造化のためには高濃度の添加を必要とすることが認められた。このことは、同じ k_D 値を保つためには温度が高くなるほど高濃度の Na-Glu を必要とする (0~2.0mol 範囲) ことから理解できる。

タンパク質分子の機能の発現と維持は、分子内水素結合と共に、アミノ酸残基の疎水結合や極性基の種々の型の水和水が重要な役割を果たし、⁸⁻¹³⁾ 通常タンパク質は最も安定状態を保ち易い折りたたみ構造 (folding structure) をとっている。また、疎水結合は 18°C で最も安定であることが知られてい

文 献

る。¹⁴⁾ 加熱によるタンパク質の変性は、タンパク質が高温にさらされることによって疎水結合並びに水素結合が不安定となることにより、タンパク質の高次構造が変化するためと考えられている。¹⁵⁾ また、逢坂ら^{16, 17)} は、ラット皮肉の浮腫組織あるいは豚の異常肉(ふけ肉)中の水の状態を高温域における熱分析(15~140℃)によって検討し、これらの組織では正常肉に比べて結合水量が少ないことを報告している。このことは、タンパク質周囲の水、即ち結合水がタンパク質の安定に深く関与していることをうかがわせるものである。

次に、Na-Glu濃度の変化に伴う変性抑制効果を水の状態の面から考察すると、変性抑制効果(log κ)と結合水との間には相関関係が認められたことから、Mf周囲の水が構造化しているほどMfは安定化を高めていることがうかがえる。しかし、Na-Gluの添加濃度が1.6~2.0mol以上になると水の構造化に変化が生じ、Mfに対するNa-Gluの変性抑制効果の程度が小さくなることが示唆された。即ち、Na-Gluは水素結合を作り易い物質であるので、Na-Glu添加の増大に伴って結合水量が増加することは首肯できる。このことは、Na-GluとMfタンパク質表面の極性基ならびに極性基についている水との結合がおこり、その結果、結合水量の増大をもたらすものとする(水の構造化の度合が増大する)。このことが、Na-Glu添加Mf系から水を離脱させるのに大きなエネルギー(Fig. 2に示したB領域の吸熱エネルギー)を必要とするのであろう。このような水の構造化の度合の増大に伴って、加熱に対するMfの温度安定性が増す要因と思われる。Na-Gluの添加濃度2.0molで結合水量が最大値をとることは、この濃度で最大限の結合がおこなわれた状態であり、タンパク質-水-Na-Gluの三者の水素結合の相互作用のネットワークが強固に形成され、このことがタンパク質の高次構造を最も安定化していると思われる。さらに、Na-Glu濃度が増加すると、この水和層と過剰なNa-Gluとの相互作用がおこり、この結果、水和層の縮小、即ち結合水量の減少となり、水和構造を歪ませ、タンパク質の変性が徐々に進行するものと推察される。

本研究を遂行するにあたり御指導、御討議を頂いた北海道大学水産学部信濃晴雄教授、新井健一教授、猪上徳雄助教授、木村昇氏、並びに故秋場稔博士に謝意を表します。

- 1) 大泉 徹, 山村寛仁, 新井健一 (1982): サバ筋原繊維の加熱変性に対するアミノ酸類および糖類の協同保護効果, 日水誌, **48**, 219-226.
- 2) 大泉 徹, 奈良泰信, 新井健一 (1984): サバ筋原繊維の熱変性に対するカルボン酸, ソルビトール及びグルタミン酸ナトリウムの保護効果, 日水誌, **50**, 875-882.
- 3) 大泉 徹, 黒田哲弘, 新井健一 (1985): サバ筋原繊維の熱変性に及ぼす魚肉の水抽出液中に含まれる各種成分の影響, 日水誌, **51**, 1717-1722.
- 4) 野崎征宣, 田端義明 (1987): アミノ酸添加魚類筋原繊維の水の状態と温度安定性との関連性, 長大水研報, No. 61, 15-22.
- 5) 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一 (1977): 魚類筋原繊維 ATPase の生化学的研究, 日水誌, **43**, 857-867.
- 6) 新井健一 (1974): 魚類筋肉タンパク質の特性の測定, 水産生物化学・食品学実験書(斎藤恒行, 内山均, 梅本滋, 川端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.189-202.
- 7) A. G. Gornall, C. T. Bardwill, and M. M. David (1949): Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
- 8) W. Kauzman (1959): Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation, *Advances in Protein Chemistry* (ed. by C. B. Anfinsen, M. L. Anson, K. Bailey, and J. J. Edsall), Vol. **14**, Academic Press, New York, pp.1-63.
- 9) I. M. Klotz (1958): Protein Hydration and Behavior, *Science*, **128**, 815-822.
- 10) 浜口浩三, 黒野朝子, 後藤幸男 (1961): 蛋白質及び核酸の構造における水の役割, 生物物理, **1**, 176-180.
- 11) G. Nemethy and H. A. Scheraga (1962): The Structure of Water and Hydrophobic Bonding in Proteins. III. The Thermodynamic Properties of Hydrophobic Bonds in Proteins, *J. Phys. Chem.*, **66**, 1773-1789.
- 12) K. Shikama (1965): Some Aspects of Protein Denaturation by Freezing and Thawing, *Sci.*

- Rep. Tohoku Univ. Ser. IV (Biol.)*, **31**, 67–73 (1965) .
- 13) J. L. Kavanau (1965) : *Water, Structure and Function in Biological Membranes*, Vol. 1, Holden-Day, San Francisco, pp.171–248.
- 14) R. H. Haschemeyer and A. E. V. Haschemeyer (1973) : *VI Three-Dimensional Structure of Proteins, Proteins—A Guide to Study by Physical and Chemical Methods*, Willy, New York, pp. 109–129.
- 15) J. F. Brandts (1967) : *Heat Effects on Proteins and Enzyme*, *Thermobiology* (ed. A. H. Rose), Academic Press, New York, pp. 25–72.
- 16) 逢坂 昭 (1981) : 生体組織中の水 (熱分析による病態組織の研究), *理学電気ジャーナル*, **12**, 14–20.
- 17) 逢坂 昭, 上平 恒 (1982) : 生体と水, *食の科学*, No. 64, 6–13.