HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	コイ筋肉ミオシンの加熱処理による性状変化
Author(s)	川合, 祐史; 羽田野, 六男; 座間, 宏一
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 34(2), 131-139
Issue Date	1983-06
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23821
Type	bulletin (article)
File Information	34(2)_P131-139.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
34(2), 131–139. 1983.

コイ筋肉ミオシンの加熱処理による性状変化

川合　祐史*・羽田野六男*・座間　宏一*

Effect of Heat Treatment on Some Physico-chemical Properties of Carp Myosin

Yūji KAWAI*, Mutsuo HATANO* and Kōichi ZAMA*

Abstract

Myosin solutions were prepared and heated at 20°, 40°, 60°, 80°, and 100°C for 15 minutes at neutral pH and changes in the nature of chemical bonding (hydrophobic, electrostatic and covalent bonds) were investigated.

Hydrophobicity of myosin remarkably increased in temperature range of 20°–60°C, but no changes were observed in electrostaticity. Changs in covalent bonds were first observed at temperature higher than 80°C. Therefore, it was considered that the heat denaturation of myosin was mainly contributed by comparatively weak interactions such as hydrophobic bond rather than stronger interactions such as electrostatic and covalent bonds.

Thermodynamic parameters for the heat denaturation of myosin were also calculated from the changes in hydrophobicity. The Arrhenius plot of hydrophobicity showed 2 lines with different slope. The transition temperature was found at 45°C and it was concluded that the structural changes in myosin molecules are completed even at temperature lower than this.

It was also concluded that the hydrophobic interaction between myosin molecules has considerable influence on the interfacial phenomena of myosin such as emulsification and adsorption properties.

緒　　言

近年，水産資源の有効利用として魚肉タンパク濃縮物 (FPC)，機能性魚肉タンパク (FFP)，組織状魚肉タンパク (TFP) のほか，マリンビーフと称する魚肉濃縮タンパク質食品素材などが注目されてきている。

一般にタンパク質を食品素材として利用するにあたって，Briskey[1] は水和性，分散性，溶解性，乳化性，起泡性，結着性，ゲル形成能などの機能特性を考慮しなければならないと述べている。上記の FPC, FFP, TFP などは製造中に加熱あるいは有機溶剤処理などの工程があるためタンパク質はすでに変性し，ある種の機能特性は未変性の状態に比べて変化し，そのため利用される食品形態にも制約を受けることが多い。しかし，Sen ら[2] は加熱処理は魚肉中の自己消化酵素などを失活させるため流通上の利点ともなるとし，さらに加熱処理後の低温貯蔵は脂質酸化抑制にも効果があると述べている。

魚肉タンパク質の低温における変性についての食品生化学的研究は数多くみられるが，調理，加工を対象とした高温における変性の研究は少なく，志水ら[3] のマアジ・アクトミオシンと筋形質タンパク質の加熱による相互作用，田口ら[4] の深海性魚類の水溶性タンパク質の熱凝固性について熱力学的

* 北海道大学水産学部食品化学第一講座
(*Laboratory of Food Chemistry I, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

な考察，また国領ら[5] の魚類筋原繊維タンパク質の高温加熱処理による分解などの報告があるにすぎない。

著者らは魚肉タンパク濃縮物が組立食品 (Fabricated food) の素材となることを期待し，その基礎的知見を得るため，まずコイ筋肉から調製したミオシンを用い，加熱処理によるミオシンの性状変化について検討を行なった。

試料および実験方法

試料 養鯉用飼料 No. 5P（日本配合飼料 KK）を与えて飼育した平均体長 23 cm，平均体重 224 g のコイ (*Cyprinus carpio*) を使用した。

ミオシンの調製と加熱処理 背肉から碇谷ら[6] の硫安分画法によって得られたミオシンを 0.5M KCl-20mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶解，透析したものを用いた。このミオシン溶液 (pH 7.0) を水浴中に 20°, 40°, 60°, 80°, 100°C の各温度で一定時間（15 分間）加熱後，氷水中で急冷し以下の実験に供した。

タンパク質濃度の測定 Gornall ら[7] のビュレット法により，牛血清アルブミン画分 V（和光純薬 KK）を標準として測定を行なった。

ANS 蛍光強度の測定 丹羽[8] および高木ら[9] の方法に準じて行なった。すなわちミオシン溶液に 8- アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム (ANS) を終濃度が 1.0×10^{-4} M になるように加えた後，日立 650-60 分光蛍光光度計（励起波長 385 nm，蛍光波長 470 nm）によって蛍光強度を測定し，蛍光強度のタンパク質濃度に対する初期勾配をもって疎水性度 (S_0)[10] とした。

紫外部吸収スペクトルの測定 日立 556 二波長自記分光光度計によって測定したが，その際ミオシン溶液 (1 mg/ml) は加熱すると白濁するため，一波長 (300 nm) 固定・一波長走査 (60 nm/min) 法[11] によって濁りを消去し測定した。

コロイド滴定[12] ミオシン溶液を 0.1N HCl または 0.1N KOH で各 pH に調整後，等電点 (pH 4.5-5.0) より酸性側では N/400 ポリビニル硫酸カリウム (PVS-K) 溶液で滴定，また塩基性側ではあらかじめ N/200 メチルグリコールキトサン (MGCh) 溶液を過剰量加えた後，N/400 PVS-K で逆滴定を行った。滴定の終点はトルイジンブルー指示薬の青色から赤紫色への変色点とした。

SH 基の定量 Buttkus[13] の方法に準じて行なったが，総 SH 基は 8M 尿素を加えてミオシンを unfold させた後に定量し，また尿素を加えずに定量したものを反応 SH 性基とした。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) Weber-Osborn の方法[14] により，ミオシンを 8M 尿素を含む 1% SDS-1% 2-メルカプトエタノール・リン酸塩緩衝液に 30°C, 20 時間保ち[5]，サブユニットに完全に解離させた後，0.1% SDS-10%ポリアルアミドゲルを用いて泳動を行なった。

粘性および流動特性の測定[15] BL 型回転粘度計（東京計器 KK）に HM-1 ローターを装着，20°C で測定した。なおミオシン溶液は非ニュートン性流体のため粘度は見掛けの粘度（ズリ速度 79.2 s^{-1}）として表示した。

表面張力の測定 Du Noüy の表面張力計を使用し，円環法[16] により水を基準として測定を行なった。

濁度の測定 日立 556 分光光度計を用い，350 nm における吸光度とした。

ATPase 活性の測定 ミオシンを 0.5M KCl-トリスマレエート緩衝液 (pH 7.0) に透析し，高士ら[17] の方法によって高塩濃度溶液中における Ca^{2+}ATPase 比活性を測定した。

ミオシン変性の熱力学的解析[18] ミオシンの変性過程は未変性状態 (N) と変性状態 (D) の二状態のみが存在するものとし，なお変性の途中においても N と D のみが平衡 ($N \rightleftharpoons D$) にある二状態転移として解析した。状態 N の変性度を y_N，状態 D の変性度 y_D，任意の点における変性度を y とすると，変性タンパク質の割合 f_D は，

$$f_D = \frac{y - y_D}{y_D - y_N} \tag{1}$$

となり，$N \rightleftharpoons D$ の平衡に対する平衡定数 K は

$$K = \frac{f_D}{1 - f_D} = \frac{y - y_N}{y_D - y} \tag{2}$$

となる。これから熱力学的パラメーターの Gibbs の自由エネルギー変化 ΔG^0，エンタルピー変化 ΔH^0，エントロピー変化 ΔS^0 は次のように表わされる。

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \tag{3}$$

$$\Delta H^0 = -R \frac{d \ln K}{d(1/T)} \tag{4}$$

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^\circ}{T} \tag{5}$$

R = 気体定数，T = 絶対温度 ^0K

結果および考察

ミオシンの疎水性度 S_0 は Fig. 1 に示すように 20°C で 20 分間処理後もその変化量はわずかであるが，40°C 以上の処理では加熱開始後 5 分までに急激に増大し，15 分間でほぼ平衡状態に達した。この結果から本実験ではミオシンの加熱処理時間を 15 分と規定した。

各温度で 15 分間処理をしたミオシンの S_0 の変化は Fig. 2 に示すように，40°C 処理で著しく増大し，とくに 60°C 以上では処理温度の上昇につれて疎水性は徐々に増大する傾向を示した。

紫外部吸収スペクトルは Fig. 3 に示すように 40°C 以上の処理で混濁の影響が著しいため，一波長 (λ_1) を 300 nm に固定し，他の波長 (λ_2) を走査させると Fig. 4 に示すようになり混濁の影響が大部分無視された。285 nm 以下の波長域では 40°C 以上の加熱処理でも吸光度の増大がみられ，このことは疎水性クロモホアが分子表面に露出したためと考えられた。

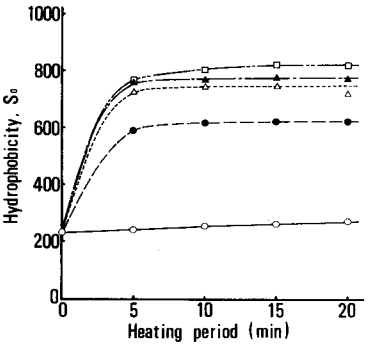

Fig. 1. Effect of heating period on the hydrophobicity of myosin
S_0: Fluorescence intensity/Myosin concentration (Initial slope calculated from the fluorescence intensity vs. myosin concn. plot)
○——: Heating temp., 20°C
●---: 40°C, △----: 60°C
▲—·—·: 80°C, □—··—: 100°C

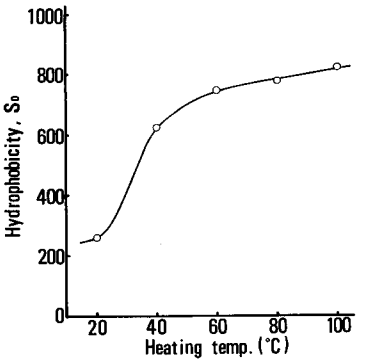

Fig. 2. Effect of heating temperature on the hydrophobicity of myosin Heating treatment: 15 min.

静電的性状はコロイド滴定の結果 (Fig. 5) からミオシンは中性域では解離度が非常に小さく，pH 5 以下の酸性域ではアミノ基などの塩基性基が解離し，pH 8 以上の塩基性域ではカルボキシル基などの酸性基が解離することがみられた。40°C 以上の処理における塩基性基の解離は 20°C 処理の約 1/2 に減少したが，一方酸性基の解離には著しい変化は認められなかった。コロイド滴定で求めたミオシンの見掛けの等電点は 20°C 処理では pH 4.8 であり，一般に処理温度の増大にともない酸性側に移動する傾向がみられた。しかし pH 7.0 では加熱処理によるミオシンの荷電状態の変化は認められなかった。

共有結合性は総 SH 基量 (Fig. 6) および SDS-PAGE パターン (Fig. 7) から，60°C までの処理では両者とも変化は認められないが，80°C 以上の処理で SH 基が酸化して S-S 結合となり，これに起因する総 SH 基量が減少した。これは主に Heavy chain とその分解生成物が共有結合 (SH → S-S) し，Heavy chain の分子量より大きい高分子の重合

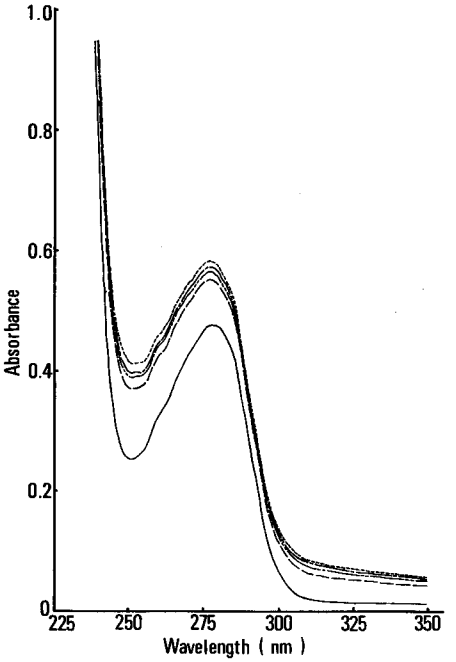

Fig. 3. Effect of heat-treatment on the UV spectra of myosin
Myosin concentration: 1 mg/ml.
——: Heating temp., 20°C
– – –: 40°C, ----: 60°C, —·—: 80°C
—··—: 100°C

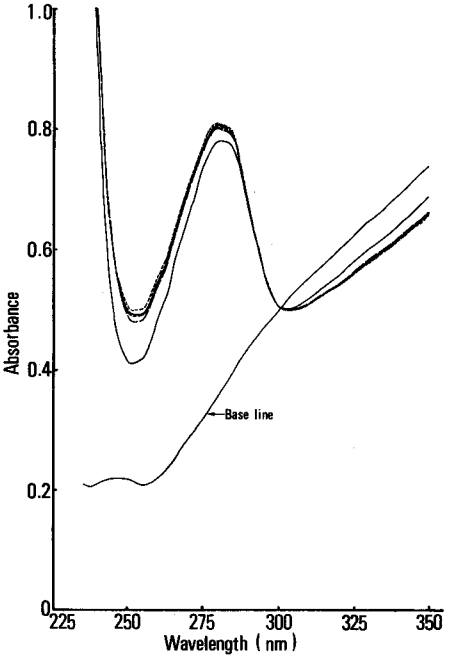

Fig. 4. Effect of heat-treatment on the UV spectra of myosin
Myosin concentration: 1 mg/ml.
λ_1 wavelength is fixed at 300 nm and λ_2 is scanned. Lines are the same as Fig. 3.

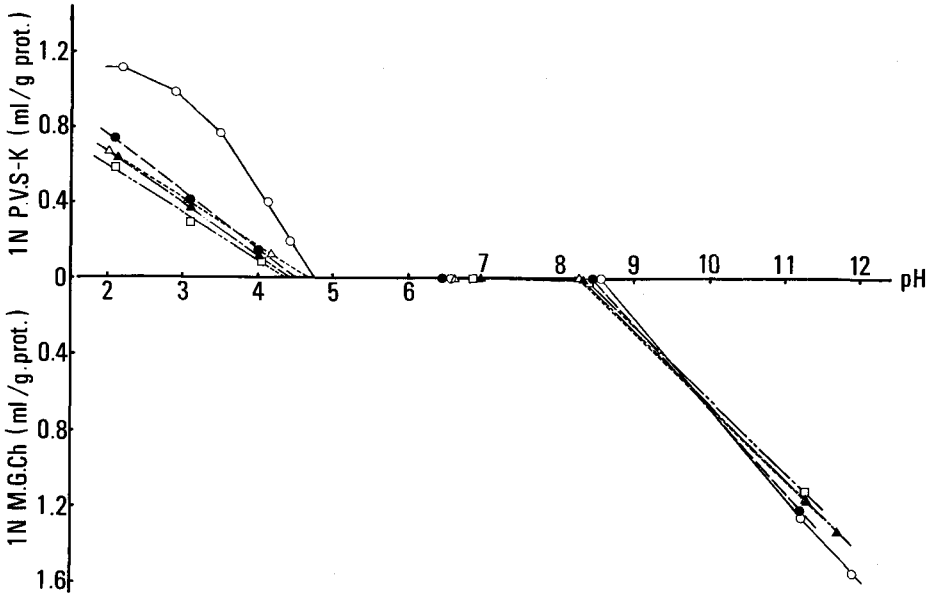

Fig. 5. Effect of heat-treatment on the colloidal titration value of myosin
Symbols are the same as Fig. 1.

物となるためである[5]。また反応性 SH 基は 40°C, 10 分間の加熱で増加するが，これ以上の処理温度では増加しなかった。これは 40°C, 10 分間の処理でミオシンの反応性 SH 基が分子表面に露出したためであり，これ以上の温度ではむしろ酸化して S-S 結合が生ずるためと考えられる。60 分間の加熱処理では，反応性 SH 基は処理温度の上昇にともない減少する傾向を示し，とくに 40-60°C における減少量は大きく，この温度域でミオシンの変性状態の転移あるいは高次構造の変化が起ることが推察された。

Ca^{2+}ATPase 比活性は 40°C 以上の処理では消失し，活性に関与するサブユニット構造が損傷することが認められた。

ミオシン溶液の濁度は ANS 螢光強度（疎水性度）の変化と同様，20-60°C の処理によって著しく増大し (Fig. 8)，この温度の範囲内でミオシン分子相互の凝集はほぼ完結されるものと考えられた。

このことから，40° ないし 60°C までの比較的低温域においては疎水性の変化が著しく，静電的あるいは共有結合的性質はそれほど変化が起らないことが認められ，ミオシンの加熱変性はミオシン分子間の疎水的相互作用が主体となるものと考えられた。また，未処理のミオシンの疎水性を N, 100°C までの処理のミオシ

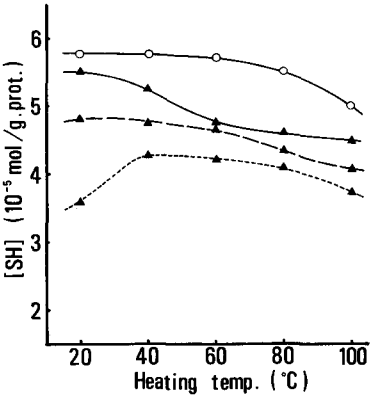

Fig. 6. Effect of heat-treatment on the total and reactive SH content of myosin
Heat treatment: 15 min.
○——: Total SH
▲----: Reactive SH, incubation period, 10 min
▲---: 20 min
▲——: 60 min

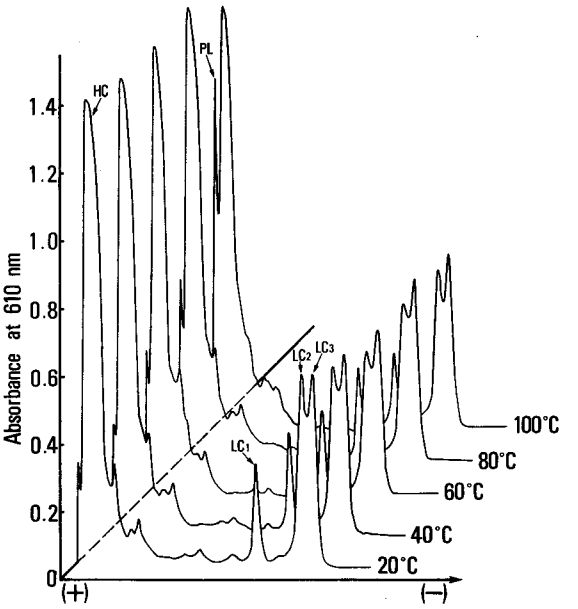

Fig. 7. Effect of heat-treatment on the SDS-PAGE pattern of myosin
HC: Heavy chain, LC: Light chain, PL: Polymer

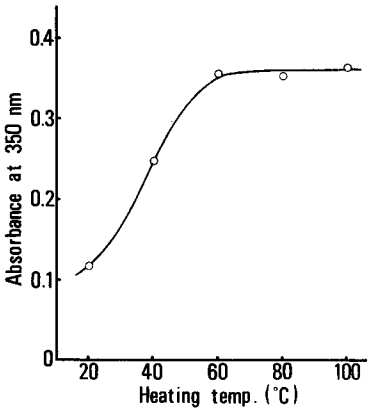

Fig. 8. Effect of heating temperature on the turbidity of myosin solution
Myosin concentration: 10 mg/ml.

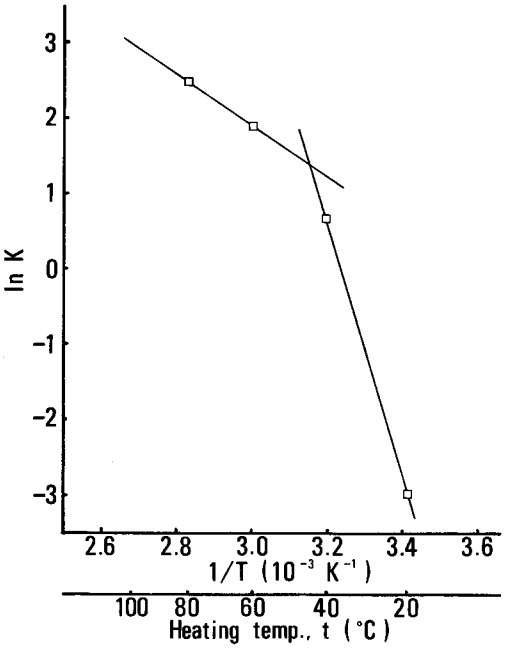

Fig. 9. The Arrhenius plot for the heat denaturation of myosin from the hydrophobicity

ンの疎水性を D として，(2) 式より平衡定数 K を求め，ミオシンの変性を熱力学的に解析すると，Arrhenius プロット (Fig. 9) は 45°C 付近に屈折点を有する二直線となり，この温度付近でミオシンの状態に転移が生ずるものと考えられる。また，熱力学的パラメーター (Table 1) のうち，ΔS^0 は 45°C を境にして低温側が高温側よりも高い値を示し，ミオシンの構造の変化の大部分は 45°C より低温の範囲内で完結されることが示唆された。ΔG^0 は 40°C 以上の温度域で負の値を示し，$N \rightleftharpoons D$ の反応において $N \rightarrow D$ の変性方向へ自発的に進行することを示した。

粘性は非ニュートン性流動の挙動を示し，また見掛けの粘度は 40°C 処理で最大，60-80°C 処理で最小となった (Table 2)。これらはミオシンの構造変化とも関連し，それぞれかまぼこ形成における「坐り」と「火戻り」に相当する性質と考えられる。

Table 1. Thermodynamic parameter for the heat denaturation of myosin from the hydrophobicity

Heating temp. (°C)	K	ΔG° (J·mol^{-1})	ΔH° (J·mol^{-1})	ΔS° (J·K^{-1}·mol^{-1})
20	0.05	413	7930	25.6
40	1.96	−100	7930	25.6
60	6.69	−301	1600	5.7
80	11.90	−415	1600	5.7

Table 2. Flow equation, apparent viscosity and surface tention of heat-treated myosin solution

Heating temp. (°C)	Flow equation $S=\mu D^n$	Apparent viscosity* (mPa·s)	Surface tension (dyn·cm^{-2})
20	$0.07D^{1.04}$	8.7	55.3
40	$0.41D^{0.81}$	18.3	53.6
60	$0.25D^{0.83}$	12.0	54.2
80	$0.15D^{0.91}$	10.3	54.3
100	$0.47D^{0.71}$	13.3	54.6

Myosin concentration: 10 mg/ml with 0.5 M KCl phosphate buffer, pH 7.0
Measurement temperature: 20°C
* Rotor: HM-1, Shear rate: 79.2 s^{-1}

表面張力は表面の単位面積当りの自由エネルギーに等しく，この値が大きいことは表面に結合力が余っている状態であり，これが吸着や粒子の凝集，ヌレなどの現象と密接な関係がある[19]。ミオシン溶液の表面張力は 20°C 処理で最大で 40°C 以上の処理で低下しが (Table 2)，このことから，その差に相当する分だけミオシン分子相互の吸着，凝集に表面自由エネルギーが使用されたものと解釈される。さらに植物タンパク質の表面張力と疎水性度とは負の相関があることが Keshavarz ら[20] によって明らかにされているが，著者らもミオシンについてこの関係を支持する結果を得た。

以上の結果，ミオシンの加熱変性は 20-60°C の温度域で起こる疎水結合など比較的弱い相互作用が関係し，静電的結合，共有結合，共有結合など強い相互作用はあまり関与しないことが明らかとなった。また，この疎水的相互作用はミオシンの乳化，吸着などの界面現象にも多大な影響を及ぼすものと考えられた。

要　　約

コイの筋肉ミオシンを 20°, 40°, 60°, 80°, 100°C の各温度で 15 分間加熱処理を行ない，ミオシンの性状変化を検討した。

ミオシンの疎水的性状は 20–60°C の温度域で急激に増大し，静電的性状は中性状態では各温度処理でもほとんど変化せず，また共有結合的性状は 80°C 以上の高温処理によって初めて変化が生じた。これらはミオシンの加熱変性には静電的結合，共有結合など比較的強い相互作用が関与しにくく，むしろ疎水結合などの弱い相互作用が重要な役割をなすものと考えられた。

ミオシンの疎水性の変化量よりミオシンの加熱変性を熱力学的に解析した結果，変性の転移点が約 45°C でこの温度より低温の範囲内でミオシンの高次構造の変化がほぼ完結されることが明らかとなった.

ミオシンの疎水的相互作用は，乳化・吸着などの界面現象にも多大な影響を及ぼすことが予想された。

文　　献

1) Briskey, E.J. (1970). Functional Evaluation of Protein in Food Systems. p. 303–312. In Bender, A.E., Lofqvist, B., Kehlberg, R. and Munck. L. (eds.), *Evaluation of Novel Protein Products*. Pergamon Press, New York.

2) Sen, D.P. and Bhandary, C.S. (1978). Lipid oxidation in raw and cooked oil sardine (*Sardinella longiceps*) fish during refrigerated storage. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **11**, 124–127.

3) 志水　寛・西岡不二男 (1974). マアジ・アクトミオシンと筋形質たん白の熱凝固の際の相互作用. 日水誌 **40**, 231–234.

4) Taguchi, T., Tanaka, M. and Suzuki, K. (1981). Heat coagulation of water soluble proteins from deep sea fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **47**, 551–554.

5) 国領　裕・関　伸夫 (1980). 魚類筋原繊維タンパク質の高温加熱処理による分解. 日水誌 **46**, 493–498.

6) 碇谷敏紀・木村郁夫・新井健一 (1981). コイ背肉ミオシンからサブフラグメント -1 の調製とその生化学的性質について. 日水誌 **47**, 947–955.

7) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **117**, 751–766.

8) 丹羽栄二 (1975). 魚肉のゲル化と疎水結合について. 日水誌 **41**, 907–910.

9) 高木誠司・明石基敬・安松克治 (1979). 大豆グロブリンの疎水領域の測定. 日食工誌 **26**, 133–138.

10) Nakai, S., Ho, L., Helbig, H., Kato, A. and Tung, M.A. (1980). Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant proteins. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **13**, 23–27.

11) 黒石忠文・小森律夫・柴田正三・本川　忠 (1979). 二波長分光光度計と測定法の実際. p. 26–99. 柴田正三編　二波長分光光度法とその応用. 講談社, 東京.

12) 千手諒一 (1969). コロイド滴定法　104 p. 南江堂, 東京.

13) Buttkus, H. (1971). The sulfhydryl content of rabbit and trout myosins in relation to protein stability. *Can. J. Biochem.* **49**, 97–107.

14) Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406–4412.

15) 川崎種一 (1980). 回転粘度計による粘性測定の実際 (1). *New Food Industry.* **22**(4), 57–63.

16) 小野達一・佐々木恒孝 (1956). 表面張力および界面張力の測定. p. 1–33. 実験化学講座 7, 界面化学. 丸善, 東京.

17) 高士令士・新井健一・斉藤恒行 (1970). コイ背肉からのミオシンの調製について. 日水誌 **36**, 165–168.

18) 浜口浩三 (1976). 蛋白質機能の分子論. 271 p. 学会出版センター, 東京.
19) 北原文雄 (1971). 界面化学 I. 油化学 **20**, 360–365.
20) Keshavarz, E. and Nakai, S. (1979). The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. **576**, 269–279.