



Title	イワシ筋原繊維の有機溶剤処理
Author(s)	國本, 正彦; KUNIMOTO, Masahiko; 前田, 裕之 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 36(2), 78-82
Issue Date	1985-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23877
Type	departmental bulletin paper
File Information	36(2)_P78-82.pdf



イワシ筋原繊維の有機溶剤処理

國本 正彦・前田 裕之・座間 宏一*

Treatment of Sardine Myofibrils with Organic Solvents

Masahiko KUNIMOTO, Hiroyuki MAEDA and Kōichi ZAMA*

Abstract

The effect of organic solvents on Ca-ATPase activity and lipid content of freeze-dried myofibrils prepared from sardine dorsal muscle was investigated.

The results showed that Ca-ATPase activity of myofibrils, freeze-dried in the presence of saccharose and sodium L-ascorbate, was unchanged when treated with acetone, n-butanol, chloroform, diethylether, iso-propanol, hexane, toluene and carbon tetrachloride, but when treated with ethanol and methanol this activity ceased. Removal of lipids with chloroform-methanol (2:1) caused a decrease in Ca-ATPase activity, but this decrease was less for myofibrils treated with Triton X-100 than for untreated ones. The combination of Triton X-100 and chloroform-methanol treatment removed 95% of lipids from sardine myofibrils, though 55% of Ca-ATPase activity was unaffected.

緒 言

魚肉より調製した筋原繊維タンパク質は脂質を含んでおり、この脂質が筋原繊維タンパク質の性質に影響を及ぼしていると報告されている¹⁾²⁾。また、魚肉の冷凍の際に、脂質含量の多い魚肉は筋原繊維タンパク質の変性が少ないという報告もみられる³⁾⁴⁾。しかしながら、筋原繊維タンパク質に及ぼす脂質の影響を検討するためには、脱脂した筋原繊維タンパク質を調製することが必要であり、調製法については、いくつかの試みがなされているが、まだ十分な成果は得られていない¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾。

著者らは、凍結乾燥した筋原繊維を有機溶剤処理して筋原繊維の脂質含量と筋原繊維Ca-ATPase活性の変化を検討した結果、凍結乾燥した筋原繊維では有機溶剤処理を行なって脂質を除去しても、なお、Ca-ATPase活性を保持していることを見いだしたので、その結果を報告する。

試料および実験方法

筋原繊維の調製

筋原繊維(以下Mfと略す)は函館湾で漁獲されたマイワシ(*Sardinops melanosticta*)を氷蔵して研究室に運び、ただちに背肉を分離して加藤らの方法⁷⁾に準じて調製した。すなわち、背肉を挽き肉とし、0.1 M KCl-40 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)に懸濁後、上澄液を捨てる操作を上澄液が透明になるまで繰り返した後、トリトン処理を行わない場合には0.1 M KCl-40 mM Tris-HCl緩

* 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)

衝液 (pH 7.0), トリトン処理を行なう場合は 0.1 M KCl-40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0)-1% Triton X-100 溶液とともに, 冷却しながら, 30 秒ホモジナイズ, 30 秒休止の処理で計 3 分間ホモジナイズした後, 3000 r.p.m. 15 分間遠心分離した。沈殿は, さらに, 0.1 M KCl-40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に懸濁, 遠心分離して上澄液を捨てる操作を上澄液が透明になるまで繰り返し, 最後の一層のガーゼで濾過した。得られた Mf は, さらに, 10 倍容の水に懸濁, 8000 r.p.m. 20 分間遠心分離し, Mf を得た。この Mf に対し, 次のような組成になるように添加物を加えて凍結乾燥を行った。1) 5% サッカロース 2) 5% サッカロース+0.3% L-アスコルビン酸ナトリウム 3) 5% サッカロース+0.2% 2-メルカプトエタノール 4) 5% ソルビトール 5) 5% ソルビトール+0.3% L-アスコルビン酸ナトリウム 6) 5% ソルビトール+0.2% 2-メルカプトエタノール。

凍結乾燥した Mf は -18°C に冷却した 20 倍容の有機溶剤(アセトン, クロロホルム, ブタノール, ジエチルエーテル, エタノール, イソプロパノール, ヘキサン, トルエン, 四塩化炭素およびクロロホルム-メタノール (2:1) に浸漬して -18°C で処理した後, 濾過して溶剤を除去し, 次にアセトンで洗浄後, 真空デシケーター中, 減圧下で溶剤を完全に除去した。

Mf Ca-ATPase 活性の測定

Mf Ca-ATPase 活性は 0.5 M KCl, 5 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.15 ~0.20 mg/ml protein の反応混液で 25°C における生成無機リンを Fiske-Subbarow 変法で測定し, $\Delta \text{Pi } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. で表示した。

タンパク質の定量

タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準として, ビューレット法によって行った。

筋原繊維残存脂質の定量

脂質の抽出は試料に 2 倍容の水を添加して吸湿させた後, Bligh-Dyer 法⁹⁾ により行い, 重量法によって定量し, mg/g. protein で表示した。

実験結果および考察

タンパク質は有機溶剤と接触することにより変性を起こすことが知られているが, 溶剤処理でも比較的温和なアセトン処理は酵素の調製の一操作として使用され, また, アクチンの調製にも用いられている。それ故, まず凍結乾燥 Mf を作り, アセトン処理による Ca-ATPase 活性の変化を検討したが, Mf Ca-ATPase は凍結乾燥により失活するため, 保護作用を有する添加物を加えて 6 種の試料を調製してアセトン処理を行った結果は図 1 に示すように, いずれの場合にも Ca-ATPase 活性の低下はみられなかった。このことから, 適切な添加物を加えて凍結乾燥した Mf は他の有機溶剤処理によっても Ca-ATPase 活性を保持するものと考え, 10 種類の有機溶剤について検討を行った。結果は図 2 に示すように, エタノール, メタノールによる処理では活性は消失したが, クロロホルム, ブタノール, ジエチルエーテル, イソプロパノール, ヘキサン, トルエンおよび四塩化炭素では有機溶剤処理前に比べて Ca-ATPase 活性の低下はみられなかった。

次に, 有機溶剤処理した Mf の脂質含量と Mf Ca-ATPase 活性の変化を検討するため, アセトンおよびクロロホルム-メタノール (2:1) (以下 CM と略す) で各 3 回ずつ処理を行った。図 3-1) にトリトン無処理の試料, 図 3-2) にトリトン処理試料の溶剤処理後の残存脂質量と Ca-ATPase 活性を示す。CM 処理の場合, 図 3-1) に示すように, トリトン無処理の試料では脂質量の減少にともなって活性が低くなっており, 3 回の CM 処理を行った試料では脂質の残存量は 9.7 mg/g.

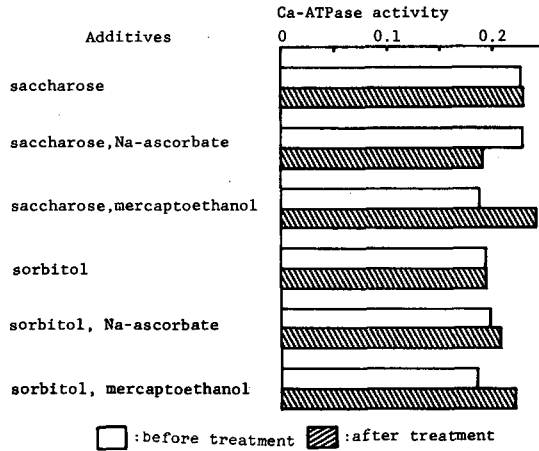


Fig. 1. Effect of acetone treatment on Ca-ATPase activity of freeze-dried myofibrils in the presence of some additives.

Myofibrils were freeze-dried with the following compounds: 1) 5% saccharose; 2) 5% saccharose and 0.3% sodium L-ascorbate; 3) 5% saccharose and 0.2% 2-mercaptoethanol; 4) 5% sorbitol; 5) 5% sorbitol and 0.3% sodium L-ascorbate; 6) 5% sorbitol and 0.2% 2-mercaptoethanol. Freeze-dried myofibrils were treated with acetone at -18°C for 2 days. After treatment, acetone was removed by filtration and then by evaporation *in vacuo*. ATPase activity was measured in the solution containing 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 , 0.5 M KCl, 0.15~0.2 mg/ml protein. The ATPase activities were expressed as ΔPi $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ at 25°C .

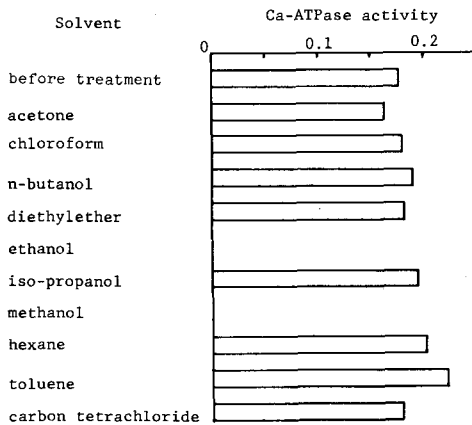


Fig. 2. Effect of organic solvents on freeze-dried myofibrillar Ca-ATPase activity. Myofibrils were freeze-dried with 5% saccharose and 0.3% sodium L-ascorbate and treated with various organic solvents for 30 days. After treatment, solvents were removed by filtration and washing with acetone and then by evaporation *in vacuo*. ATPase activities were measured in the same manner as in Fig. 1.

proteinにまで減っているが、Ca-ATPase活性もCM処理前の24%に低下しており、脂質量と活性に相関性が存在するような結果が得られたが、図3-2)のトリトン処理を行った試料ではCM処理を繰り返すことにより、脂質残存量は2.9 mg/g. proteinにまで減少しても、Ca-ATPase活性はCM処理前の55%を維持しており、脂質残存量と活性の保持には相関はなかった。このことから、

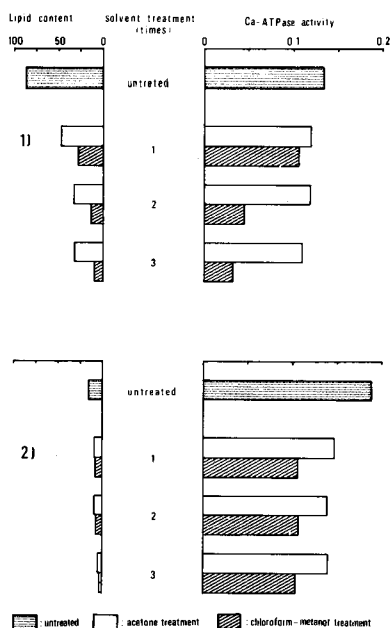


Fig. 3. Changes of Ca-ATPase activity and remaining lipid contents of freeze-dried myofibrils after acetone and chloroform-methanol treatment. The following 2 samples were used: 1) freeze-dried with 5% saccharose and 0.3% sodium L-ascorbate; 2) treated with Triton X-100 and freeze-dried with 5% saccharose and 0.3% sodium L-ascorbate. These samples were treated with acetone and chloroform-methanol (2:1) respectively at -18°C for one week, and this treatment was repeated 3 times. After treatment, solvents were removed in the same manner as in Fig. 2. ATPase activities were measured in the same manner as in Fig. 1. Lipids were extracted according to Bligh and Dyer's method after wetting with water. Lipid contents were expressed in mg/g. protein.

脂質はCa-ATPaseを安定化するが、活性化はしないものと考えられる。しかし、本研究で用いたCM処理したMfは、なお2.9 mg/g. proteinの脂質を含んでおり、この脂質がCa-ATPaseの活性化に影響している可能性も否定できないので、さらに、脂質を除去したMfを調製して確認する必要があると考えられる。一方、アセトン処理の場合、Ca-ATPase活性は保持しているが、脂質の除去はCM処理に比べ劣っていた。

要 約

筋原繊維を有機溶剤処理して、筋原繊維Ca-ATPase活性の変化および筋原繊維の脂質含量の変化を検討した結果、サッカロースとL-アスコルビン酸ナトリウムを添加して凍結乾燥した筋原繊維Ca-ATPaseはメタノール、エタノール処理により失活するが、アセトン、クロロホルム、ブタノール、ジエチルエーテル、イソプロパノール、ヘキサン、トルエン、四塩化炭素、クロロホルム-メタノール(2:1)処理では活性を保持していた。また、クロロホルム-メタノール(2:1)処理により脂質含量2.9 mg/g. proteinのCa-ATPase活性を持つ筋原繊維を調製し得た。

謝 辞

本研究にあたり、種々有益な御助言をいただいた本学部新井健一助教授ならびに本講座羽田野六男助教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Taguchi, T. and Ikeda, S. (1968). Studies on the properties of fish actomyosin-IV. *Bull.*

- Japan. Soc. Sci. Fish.*, **34**, 411-414.
- 2) Hamada, I., Yabuno, F., Furumatsu, K. and Niwa, E. (1982). The effect of lipid on the heat denaturation of actomyosin. *Ibid.*, **48**, 189-193.
 - 3) Dyer, W.J. and Morton, M.L. (1965). Storage of frozen plaice fillets. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **13**, 129-134.
 - 4) Dyer, W.J., Morton, M.L., Fraser, D.I. and Bligh, E.G. (1956). Storage of frozen rosefish fillets. *Ibid.*, **13**, 569-579.
 - 5) Taguchi, T. (1973). Lecithin residues in carp muscle myosin B and its ATPase activity. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 969-972.
 - 6) Ando, S. (1983). Removal of lipid from myosin B preparation by Triton X-100 treatment. *Ibid.*, **49**, 927-932.
 - 7) 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一(1977). 魚類筋原纖維 ATPase の生化学的研究. 日本誌, **43**, 857-867.
 - 8) Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.