

## 魚肉のゲル化と疎水結合について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	丹羽, 栄二
巻/号	41巻8号
掲載ページ	p. 907-910
発行年月	1975年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



魚肉のゲル化と疎水結合について<sup>\*1</sup>

丹 羽・ 栄 二

(1975年5月21日受理)

## Role of Hydrophobic Bonding in Gelation of Fish Flesh Paste

Eiji Niwa<sup>\*2</sup>

The binding capacity of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) for actomyosin (AM) extracted from flatfish was studied in order to clarify the role of hydrophobic bonding in the gelation of fish flesh paste with the following results.

AM-ANS complex showed a maximum at 470 nm in the fluorescence spectrum when the excitation wavelength was 365 nm. An enhancement in fluorescence intensity at 470 nm was observed upon heating AM solution at 40°, 60° and 90°C respectively prior to the addition of ANS, and it was most significant at 60°C. The enhancement upon heating at 40°C was depressed by the addition of saccharides, glycerol and ethylene glycol to the AM solution.

魚肉すり身のゲル化、すなわちすわりや足形成には魚肉のアクトミオシン（以下 AM）の種々の様式による結合の形成が想定されており、疎水結合もその一つにあげられている。<sup>1)</sup>

疎水領域をゲル内部のすべてにわたって定量的に論議することは現在では不可能に近いが、半定量的にたん白の表面近くに存在するものだけをとりあげて検討することはさほど困難ではなく、この目的のために蛍光プローブが用いられる。

蛍光プローブはその分子内に疎水性の部分とアニオン性の部分を合わせ持つ、いわば一種の界面活性剤でたん白の疎水領域に吸着して蛍光強度を増加させる性質がある。

ただし、一時ではあるがこの試薬の性質が拡大解釈された時期があつて、あたかもこの方法が疎水領域の探索に万能であるというイメージを与えたこともあつたが、少くとも現在では次のように考えられている。すなわち、蛍光プローブがたん白に吸着すれば、プローブの構造から考えてそのたん白の表面には正の電荷とそれにつづく内部に疎水領域あるいはそれに近いものが存在する。<sup>2)</sup>

この方法によつてたん白の熱変性と疎水領域との関連を検討した例は数報にのぼり、<sup>3-6)</sup> 筋肉たん白関係ではウサギ・ミオシンをその ATP アーゼ活性の失活点まで加熱すると蛍光プローブの一つである 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸（以下 ANS）の吸着量が急増することが知られている。<sup>5)</sup>

筆者は魚肉 AM 溶液の加熱による ANS の吸着量の変化を調べてゲル形成と疎水結合との関連性を明らかにしようとした。

## 実験方法

**AM および ANS 溶液** AM は新井らの方法<sup>7)</sup>によつてインガレイ、*Kareius bicoloratus* から抽出した。AM の溶媒としては ANS との反応およびそれにつづく蛍光強度の測定の場合には 0.6 M KCl+5 mM トリス-マレイン酸緩衝液、pH 6.8 を用いたが、ビウレット法<sup>8)</sup>によるたん白濃度測定の場合には、トリスの共存が吸光度におよぼす影響を考慮して 0.6 M KCl を用いた。使用した ANS-ナトリウム塩は東京化成

\*1 本研究は昭和 47 年 10 月 10 日日本水産学会秋季大会（高知）において発表した。

\*2 三重大学水産学部 (Fac. of Fish., Mie Univ., Tsu, Japan)

血清ヘモグロビン測定用のもので 0.6 M KCl に 0.04% (w/v) になるように溶かした。

**AM と ANS の反応および蛍光強度の測定** 4°C の低温室内で 10 ml AM 溶液と 1 ml ANS 溶液を試験管に加え、10 分間放置した。この反応液を室温に 15 分間放置した後、日立 139 蛍光光度計 (励起波長 365 nm) でその蛍光強度を測定した。光度計の感度は 0.0025% (w/v) レゾルシノールフタレインナトリウムを 510 nm で測定した時、蛍光強度が 100% を指示するように調節した。また加熱した AM 溶液を検討する場合には 10 ml の AM 溶液を試験管内で、あらかじめ所定温度で加熱した後、15 分間 4°C の水で冷却して ANS 溶液を加えた。

### 実験結果

**AM-ANS 溶液の蛍光スペクトルとその加熱による変化** AM 溶液に ANS 溶液を加えた溶液、あらかじめ AM 溶液を 90°C で 10 分間加熱した後、ANS 溶液を加えた溶液およびコントロールとして 10 ml AM 溶液に ANS 溶液のかわり 1 ml の 0.6 M KCl 溶液を加えたもののそれぞれの蛍光スペクトルを Fig. 1 に示した。コントロールは 430 nm に弱い極大 (蛍光強度 4%) を持つが波長が長くなると蛍光強度はまったくゼロとなった。また、この場合、AM 溶液を 90°C で 15 分間加熱してもスペクトルには変化がなかった。しかし、AM 溶液に ANS 溶液を加えるとパターンはまったく変り、470 nm に強い極大が現われた。さらに、あらかじめ AM が加熱されているものでは、極大の現われる波長にはシフトが認められなかったが、蛍光強度が増加した。なお、ANS 溶液のみの蛍光強度はこの波長領域ではすべてゼロであった。

**AM 溶液の加熱温度と蛍光強度の関係** AM 溶液を塩すり身のすわる温度である 40°C、もどりやすい温度である 60°C、および足形成の温度である 90°C にそれぞれ加熱し、これに ANS を作用させた溶液の 470 nm における蛍光強度の経時変化を検討した。Fig. 2 に示した結果から明らかなように各温度とも蛍光

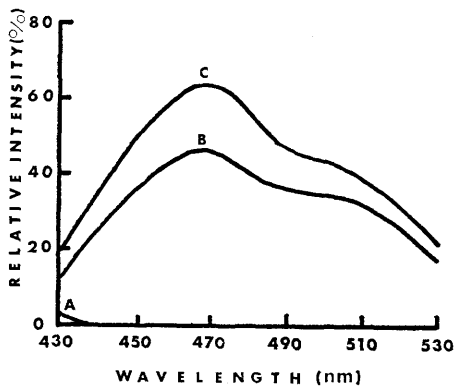


Fig. 1. Fluorescence spectra of AM, AM-ANS complex, and the complex, in which AM was preheated at 90°C for 15 min. Concentrations of AM and ANS were 0.07 mgN/ml and 0.0036 mg/ml respectively.

The sensitivity of photomultiplier was adjusted so that fluorescence intensity registered 100% at the measurement of 0.0025% (w/v) resorcinolphthalein sodium at the emission wavelength of 510 nm. (A) AM, (B) AM-ANS complex, (C) the complex, in which AM was previously heated.

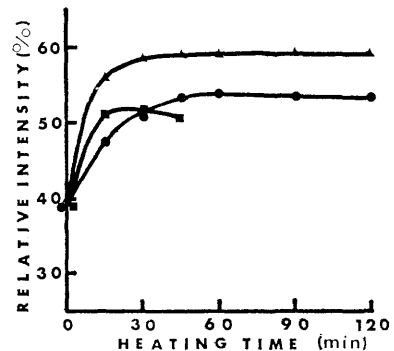


Fig. 2. Change in the fluorescence intensity of AM-ANS complex at 470 nm upon preheating AM solution at 40°, 60° and 90°.

Conditions for fluorescence measurements were same as in Fig. 1 except AM concentration was 0.19 mgN/ml. —●— 40°C, —▲— 60°C, —■— 90°C.

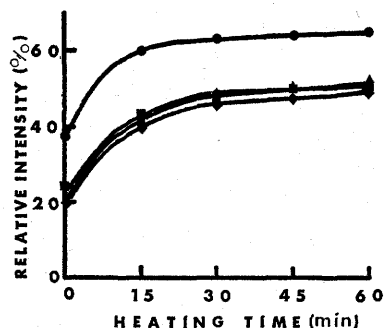


Fig. 3. Change in the fluorescence intensity of AM-ANS complex at 470 nm upon pre-heating AM solution at 40°C in the presence of 10% (w/v) saccharides. Conditions for fluorescence measurements were same as in Fig. 1 except AM concentration was 0.19 mgN/ml. —●— Control; Saccharide was not added, —▲— Sucrose, —■— Glucose, —▼— Fructose.

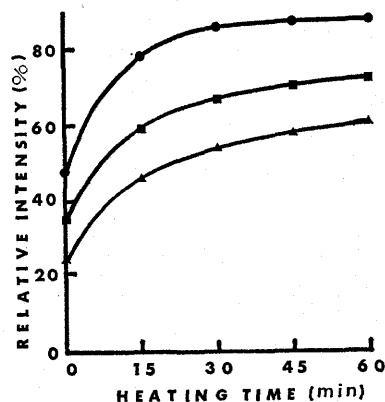


Fig. 4. Change in the fluorescence intensity of AM-ANS complex at 470 nm upon pre-heating AM solution at 40°C in the presence of 10% (v/v) glycerol and ethylene glycol. Conditions for fluorescence measurements were same as in Fig. 1 except AM concentration was 0.22 mgN/ml. —●— Control; No reagent was added. —▲— Glycerol, —■— Ethylene glycol.

強度は増加するが、とくに 60°C においてその傾向がいちじるしい。

なお 90°C で加熱したものは 30 分後に白濁し、沈殿を生ずるのが認められた。

**糖類の添加が蛍光強度の増加におよぼす影響** 糖類はすわりのさいのたん白の網状構造の形成を抑制すると考えられている。<sup>9)</sup>

ANS の AM に対する吸着能に糖類がおよぼす影響を知るため、AM 溶液に糖類を 10% (w/v) 加えて 40°C に加熱し、その蛍光強度の変化を測定した。

また、グリセリン、エチレングリコールなどはたん白の疎水結合、水素結合の安定化、あるいは不安定化に関与すると考えられている<sup>10)</sup>ので、これらについても上と同様の検討を行った。それぞれの結果を Fig. 3 および 4 に示したが、いずれの試薬を加えても蛍光強度は減少し、かつ加熱による増加が抑制された。なお、これら試薬を添加した場合でも、蛍光スペクトルで極大値における波長のシフトは認められなかった。

## 考 察

以上述べたように魚肉 AM を加熱すると、その ANS 吸着量は増加する傾向にあり、これはウサギ・ミオシンの結果<sup>9)</sup>と一致する。

この事実と先に述べた蛍光プローブの性質を考慮すれば、加熱によつて AM 分子の表面近くで疎水基相互の集合が起つたものと考えらるべきであろう。

ただ、これらの検討は溶液内で行われたため、疎水基の集合は分子内で起つたものが大部分かも知れない。しかし、塩すり身のようにたん白の高濃度な条件下では分子間にわたつて疎水基が集合し、これが分子間結合、ひいては網状構造形成の要因となる可能性は十分考えられる。

さきに筆者は塩すり身をすわりの温度で加熱した場合、その X 線回折強度の増加がしよ糖を加えることによつて抑制されると報告した。<sup>9)</sup> また、ここで AM の ANS 吸着能の増加が糖類によつて抑制されることが判明した。

これらの関係から類推して糖類が疎水結合の形成に対して抑制的に働くと考えるならば、すわりにおける網状構造の要因の一つとして疎水結合の可能性を否定することは出来ないように思われる。

また、糖類と関連して、グリセリン、エチレングリコールなどは AM の ANS 吸着量を減ずることから、これらは少なくとも疎水結合に対しては糖類と同じように作用すると推察される。

一方、60°C というもどりの起りやすい温度で ANS 吸着量の増加がはげしいことは注目に値する。このことから、もどりでは後の本加熱によつてかまぼこ特有な網状構造——たとえば部分的に  $\beta$  構造がみられるといったような——に転換し得ないような疎水結合の過剰な構造が予備加熱の段階で形成されるとも想像される。

最後に、糖類、グリセリン、エチレングリコールなど AM の凍結変性防止に効力のある一連の化合物のすべてに ANS 吸着量を減少させる効果がある点は興味深い。このことから、凍結変性における AM 分子間の凝集力の一つとして疎水結合を類推することが出来る。

## 文 献

- 1) たとえば、志水 寛：魚肉ねり製品—理論と応用（岡田稔ら編），恒星社恒星閣，東京，1974，p. 26.
- 2) 高木俊夫：蛍光測定 の原理と生体系への応用（金岡裕一ら編），南江堂，東京，1974，p. 148.
- 3) R. F. L. CLARKE and S. NAKAI: *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 61-69 (1972).
- 4) J. A. GALLY and G. M. EDELMAN: *ibid.*, **94**, 175-182 (1965).
- 5) S. T. LIM and J. BOTTS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 153-156 (1967).
- 6) A. C. GOSE: *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **52**, 240-245 (1973).
- 7) 新井健一・高橋英明・齋藤恒行：本誌，**36**，232-236 (1970).
- 8) 梅本 滋：同誌，**32**，427-435 (1966).
- 9) 丹羽栄二・三宅正人：同誌，**37**，877-883 (1971).
- 10) 青木 宏：食工誌，**17**，14-21 (1970).