

各種サメ筋原繊維タンパク質の変性に及ぼす熱,尿素およびpHの促進効果

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	西, 範久 尾崎, 弘忠 野中, 道夫 新井, 健一
巻/号	52巻12号
掲載ページ	p. 2115-2120
発行年月	1986年12月

各種サメ筋原繊維タンパク質の変性に及ぼす熱、尿素
および pH の促進効果

西 範久, 尾崎 弘忠, 野中 道夫, 新井 健一

(1986 年 4 月 17 日受理)

Accelerating Effect of Heat, Urea, and pH on Denaturation
of Myofibrillar Protein from Various SharksNori-hisa Nishi,*¹ Hiro-tada Ozaki,*¹ Michio Nonaka,*¹
and Ken-ichi Arai*²

The myofibrils from six species of shark were prepared and suspended in a medium of 0.16 M KCl-40 mM Tris buffer (pH 7.5 or 5.8) containing various concentrations (0-1.0 M) of Urea. The suspension was then heated at a fixed temperature in the range of 25-45°C and measured for its Ca-ATPase activity with the lapse of time. The first order rate constant for inactivation was thus calculated.

By adopting an increasing ratio of K_D as a measure of accelerating effect on denaturation of myofibrillar protein, multiplying effect by the presence of Urea (0.3 M), the fall in pH (from 7.5 to 5.8), and the elevation of temperature (from 25°C to 35°C) was observed for all shark myofibrils. Among the three factors examined, heat showed the largest effect.

From the above data thus obtained, a discussion followed to obtain favourable conditions needed for the preservation and processing of raw muscle from shark.

サメ類の筋肉を食品として有効利用するため、著者らは先に、イタチザメとヨシキリザメの筋原繊維（以下、Mf と略す）タンパク質の変性に対する熱、尿素および pH の影響を、Mf Ca-ATPase 活性の失活速度を指標として研究した。すなわち、一般にサメ類の筋肉には 0.3 M 前後の尿素が含まれており、また、その pH は死後 5.8 前後に低下するが、¹⁾ これらの要因はいずれも Mf タンパク質の変性を速めることが示された。²⁾ さらに、筋肉の保管温度の影響を検討し、尿素や pH の相互作用について論じた。²⁾ その結果 Mf タンパク質の変性速度に対しては上記した要因はいずれも促進するように働き、その協同効果は速度の増加倍率としては相乗値となることを示した。さらに、上記のサメ類が水揚げされた後の筋肉の保管条件を推定して、Mf タンパク質の変性を抑制し、有効利用を計るためには、筋肉の温度を出来るだけ速やかにまた、長期間低く保つことが大切であることを明らかにした。しかしながら、日本近海で漁獲されるサメ類は種類も多く、かつ、その生息水域も熱帯

から寒帯に及んでいるので、これらのサメ類の筋原繊維タンパク質についても同じように、熱、尿素および pH の影響を研究する必要があると考えた。そこで、本研究では新たにメジロザメ、アオザメ、ヤジブカ、ホンザメおよびガンギエイ（エゾカスベ）について検討し、先に報じたイタチザメおよびヨシキリザメの場合と比較することを目的とした。

実験方法

Mf 懸濁液の調製と pH の調節 メジロザメ *Carcharhinus japonicus*, アオザメ *Isurus glaucus*, およびヤジブカ *Carcharhinus plumbeus* の Mf は、それぞれの冷凍すり身から、また、ホンザメ *Mustelus marazo* とガンギエイ *Raja kenoeji* の Mf は函館近海で漁獲された生鮮肉から、また、対照として新鮮なコイの筋肉から Mf を加藤らの方法³⁾に従って調製し、0.16M KCl-40 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に懸濁させた。なお、Mf 懸濁液の pH を変えるには、遠心分離によって

*¹ 大洋漁業株式会社, 大洋研究所 (Taiyo Central Research and Development Institute, Taiyo Fishery Co., Ltd., Tsukishima-3, Chuo, Tokyo 104, Japan).

*² 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

Mf を集め 0.16 M KCl に懸濁させて洗浄した後, 0.16 M KCl-40 mM Tris-maleate (pH 5.8) 緩衝液に懸濁させて調整した。

尿素共存下における Mf の熱変性²⁾ 種々の濃度の尿素を含む 0.16 M KCl (pH 7.5 または 5.8) に懸濁した Mf を, 所定の温度の恒温槽中に保存し, 経時的に一定量を取り出し, 高濃度の pH 7.0 の緩衝液を添加混合すると同時に氷冷して熱変性を停止させた。

Mf Ca-ATPase 活性の測定および熱変性速度恒数の算出 Mf Ca-ATPase (EC 3.6.1.3) は, 5 mM CaCl₂, 100 mM KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP と適量の Mf タンパク質の混合液を, 25°C において反応させ, 遊離した無機リン酸を Gomori の方法⁴⁾ で比色定量し, 比活性 (μ mol Pi/min·mg Mf タンパク質) を算出した。タンパク質は牛血清アルブミン分画 V を標準として, ビウレット法により比色定量した。⁵⁾ また, Ca-ATPase の熱変性の初期における速度恒数 (K_D)²⁾ は次式によって求めた。 $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$, ここで C_0 および C_t は加熱時間 (t 秒間) 前と後の Ca-ATPase 活性値 (相対値) である。⁶⁾ なお, 活性測定に際しては混合液中の尿素濃度は必ず 0.25 M 以下になるように希釈し, 結果に影響しないように調節した。²⁾

実験結果

サメ類 Mf-ATPase の熱変性に及ぼす pH と尿素の影響 初めにヤジブカの Mf を代表例として, Mf Ca-ATPase の失活に対する熱と pH および尿素の影響を検討した。すなわち, 0~1.0 M に至る尿素を含んでいる 0.16 M KCl (pH 7.5 または 5.8) 溶液に懸濁した Mf を 35°C または 40°C で加熱し, Ca-ATPase の失活を経時的に測定し, その結果から変性速度恒数 (K_D) を求めた。次に, K_D の対数値と尿素濃度の関係を Fig. 1 に示した。この結果によると, ヤジブカの Mf Ca-ATPase の失活は尿素濃度が高い程, また, pH が 7.5 よりも 5.8 の場合の方が, そして, 加熱温度が高い場合の方が速やかに進行することが示されている。

なお, $\log K_D$ と尿素濃度 (M) との間には, pH や温度に係わりなく, 直線関係が成り立つことが示された。それ故, この図から任意の尿素濃度における K_D を推測することが可能である。同じような結果は, 他のサメ類の Mf についても得られたが, これはイタチザメとヨシキリザメを用いて先に報じた結果²⁾ と同傾向的に良く類似している。なお, 魚種間に認められる Mf Ca-ATPase の失活速度の相違に関しては, 後で詳述する。

K_D の対数値と尿素濃度 (M) の関係直線の勾配は, その魚種の Mf タンパク質の尿素による変性の起り易さを反映するため, 尿素感受性 (D 値)²⁾ と呼んだ。そこ

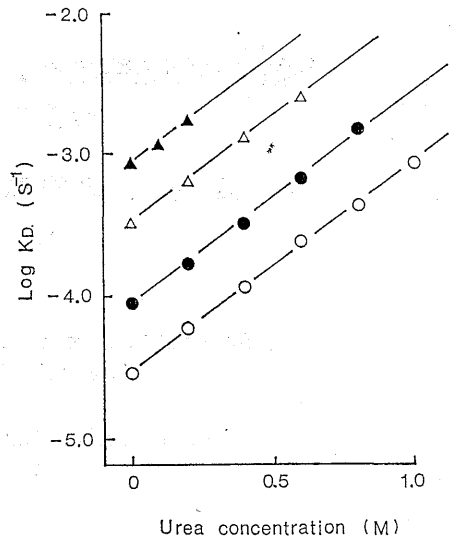


Fig. 1. Logarithmic plot of the rate constant for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase of Brown shark as a function of Urea concentration.

The myofibrils suspension was incubated at 35°C or 45°C in a medium of 0.16 M KCl, 40 mM Tris-buffer (pH 7.5 or pH 5.8) and various concentrations of Urea.

The inactivation was stopped by cooling in ice-water, followed by reduction of Urea concentration to less than 0.25 M, and subjected to assay Ca-ATPase.

The Ca-ATPase activity was assayed at 25°C in a medium containing 0.1 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP, and 0.2-0.4 mg/ml of myofibrillar protein.

The first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was then calculated (Ref. 2).

○ 35°C, pH 7.5; ● 35°C, pH 5.8; △ 40°C, pH 7.5; and ▲ 40°C, pH 5.8.

で, 検討を加えた 6 種のサメ類とガンギエイおよびコイの Mf について D 値を比較したところ, 魚種とは関係がなくいずれも 1.50~1.83/尿素 (M) の範囲の値となった。これは加熱温度 (25°C と 35°C) および pH (7.5 と 5.8) でやや変動したが, 一定の規則性のある変化ではなかった。すなわち, 供試された Mf タンパク質は温度安定性⁶⁾ が魚種によってかなり相違しており (Table 3 参照), また, コイのように本来筋肉中に尿素を含まないような魚種の Mf も検討されたが, それにも拘らず尿素感受性はほとんど同じであるという結果となった。

次に, 参考のために, Fig. 1 の実験データを用いて, K_D の対数値と加熱温度 (絶対温度) の逆数値 ($1/T$) との関係を作図し, Fig. 2 とした。この結果によると,

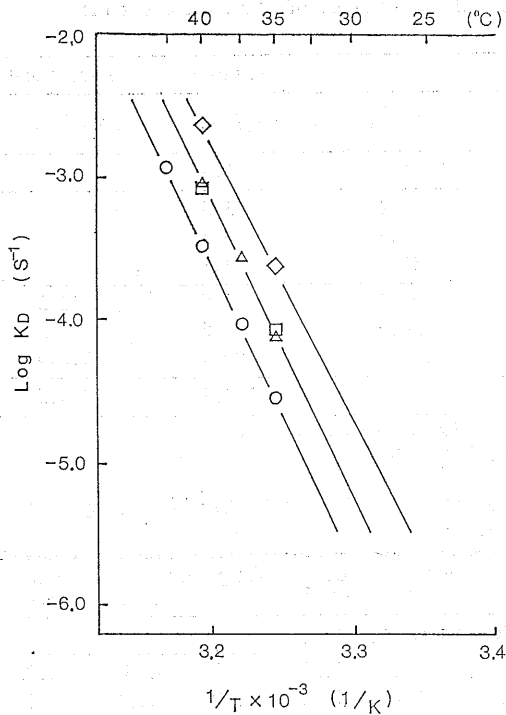


Fig. 2. Arrhenius plot of the rate constant for the inactivation of myofibrillar Ca-ATPase in the presence of 0.3 M Urea.

The data shown in Fig. 1 was used to illustrate this figure.

○ pH 7.5; △ pH 7.5, 0.3 M Urea; □ pH 5.8; and ◇ pH 5.8, 0.3 M Urea.

$\log K_D$ と $1/T$ の関係は直線となり、また、pH が 7.5 よりも 5.8 の場合の方が、さらに、尿素が存在しないときよりも存在するときの方が、直線の位置は図中右側

(低温度域側)に移動していることが示されている。これらの結果は、先にイタチザメとヨシキリザメの Mf について示した結果と、傾向的に良く一致しており、²⁾ また、ここには図示しないが、 K_D の絶対値が異なるだけで、他のサメ類、コイ、ガンキエイなどの Mf についても同傾向の結果が得られている。したがって、このようにして任意の加熱温度における K_D を推測することが可能である。

サメ筋原繊維タンパク質の変性速度に及ぼす熱, pH および尿素の協同作用 Mf Ca-ATPase 活性の変性速度に対する熱 (温度上昇), pH 低下および尿素の存在による影響の大きさを数量的に比較検討する試みを行った。すなわち、まず、Fig. 1 に示したヤジブカの Mf Ca-ATPase の K_D の中から、温度は 25°C と 35°C、尿素が共存するときとしないとき、そして pH が 7.5 と 5.8 とのときの値を抜粋して、Table 1 に示した。すなわち、ヤジブカ Mf Ca-ATPase の pH 7.5, 25°C (尿素は共存しない) における変性速度を標準とみなし K_{D0} とする。次に、尿素が 0.3 M 共存するとき、pH が 5.8 に低下したとき、あるいは、温度が 35°C のときの変性速度をそれぞれ K_{D1} , K_{D2} および K_{D3} とした。続いて、上記の要因の中 2 つが同時に変化した場合として、尿素が 0.3 M 共存し pH が 5.8 のとき、温度が 35°C で尿素が 0.3 M 共存するとき、あるいは、温度が 35°C で pH が 5.8 のときの変性速度をそれぞれ K_{D4} , K_{D5} , K_{D6} とした。そして最後に、温度が 35°C で、0.3 M の尿素が共存し、pH が 5.8 のとき (3 種の要因が全て同時に変化している) の変性速度を K_{D7} として表わした。

既に、イタチザメおよびヨシキリザメの Mf について同様な実験をした結果から、上記した 3 種の変性を促進

Table 1. The rate constants for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase of Brown shark under the various conditions for incubation

Index	Temp. (°C)	Urea (M)	pH	$K_D \times 10^{-6} \cdot s^{-1}$	Measured K_{Dn}/K_{D0}	Theoretical K_{Dn}/K_{D0}
K_{D0}	25	0	7.5	0.2	1.0	
K_{D1}	25	0.3	7.5	0.5	3.0	
K_{D2}	25	0	5.8	0.8	5.0	
K_{D3}	35	0	7.5	26.9	183.1	
K_{D4}	25	0.3	5.8	2.1	13.9	15.0
K_{D5}	35	0.3	7.5	75.8	516.0	549.0
K_{D6}	35	0	5.8	85.1	579.0	915.0
K_{D7}	35	0.3	5.8	239.9	1631.8	2745.0

The data shown in Fig. 1 were cited in this table.

The theoretical values of (K_{Dn}/K_{D0}) were calculated using the following relation:

$$\log K_{D4} = \log (K_{D1} \times K_{D2}) / K_{D0}$$

$$\log K_{D5} = \log (K_{D1} \times K_{D3}) / K_{D0}$$

$$\log K_{D6} = \log (K_{D2} \times K_{D3}) / K_{D0}$$

$$\log K_{D7} = \log (K_{D1} \times K_{D2} \times K_{D3}) / (K_{D0})^2$$

Table 2. The rate constants for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase of Flat back under the various conditions for inactivation

Index	Conditions for incubation			K_D $\times 10^{-5} \cdot s^{-1}$	Measured	Theoretical
	Temp. (°C)	Urea (M)	pH		K_{Dn}/K_{D0}	K_{Dn}/K_{D0}
K_{D0}	25	0	7.5	1.8	1.0	
K_{D1}	25	0.3	7.5	6.2	3.5	
K_{D2}	25	0	5.8	6.2	3.5	
K_{D3}	35	0	7.5	57.6	33.1	
K_{D4}	25	0.3	5.8	23.5	13.5	12.3
K_{D5}	35	0.3	7.5	190.6	190.5	115.9
K_{D6}	35	0	5.8	190.6	109.5	115.9
K_{D7}	35	0.3	5.8	588.9	338.4	405.5

The myofibrils suspension of Flat back was incubated and its Ca-ATPase activity was assayed as in Fig. 1. Theoretical values of (K_{Dn}/K_{D0}) were calculated using the same relations as in Table 1.

Table 3. Increase in the rate constant for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase induced by changing the condition for incubation of myofibrils

Temp. (°C)	Urea (M)	pH	Tiger shark	Mako shark	Brown shark	Estuary shark	Blue shark	Carp	Gummy shark	Flat back
Condition for incubation			First order rate constant (K_D)							
25	0	7.5	0.013	0.014	0.015	0.081	0.100	0.184	0.437	1.739
30	0	7.5	0.150	0.199	0.218	0.794	1.000	1.600	3.090	10.47
35	0	7.5	1.584	1.995	2.691	7.244	9.700	12.80	22.39	57.54
Change in conditions			Increase in (K_{Dn}/K_{D0}) measured							
25→35	0	7.5	118	107	183	89	97	70	51	33
25	0	7.5→5.8	7	5	2	2	5	6	4	4
25	0→0.3	7.5	3	3	3	3	3	4	4	4

The myofibrils suspension of 8 species of fish (including 6 species of shark) was incubated under various conditions as described in Fig. 1. The first order rate constants for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase were calculated also as in Fig. 1.

The value for (K_{Dn}/K_{D0}) was obtained from the increase in the rate constant induced by changing the conditions as like temperature, Urea concentration or pH for incubation.

する要因は協調して働き、その変性速度が、個々の要因によって引き起される変性速度の増加倍率 (K_{Dn}/K_{D0}) の相乗値になるような影響を及ぼすことが示された。²⁾ すなわち、一般に、 n 種の要因が協調して作用するとき、変性速度は次式によって表わされる。²⁾ $K_D = (K_{D1} \times K_{D2} \times K_{D3} \cdots \cdots K_{Dn}) / (K_{D0})^{n-1}$ 。

それぞれ、1 種の要因を変えたときの K_D から、2 種および 3 種の要因が重複して作用したときの変性速度の理論値を、上式によって求め (K_D/K_{D0})_{theor.} とした。一方、実際に複数の要因を同時に変えたときの K_D を測定し、変性速度の実測値の意味で (K_D/K_{D0})_{meas.} と表わした。上記のサメ Mf では、両値はかなり良く近似することが示されている。²⁾

次に、比較対照するために、筋肉中に同じく尿素を含むガンギエイ Mf を用いて、Fig. 1 の場合と同じ実験を行い、結果を Table 2 に示した。ガンギエイの Mf Ca-ATPase の pH 7.5, 25°C (尿素は含まない) における変性速度 (K_{D0}) は、前記したヤジブカの Mf に比

べれば約 116 倍大きく、その温度安定性は劣っている。しかし、変性を促進する要因の中、尿素が 0.3 M 共存するとき (K_{D1})、pH が 5.8 のとき (K_{D2})、温度が 35°C のとき (K_{D3}) の変性速度、次に、尿素 0.3 M pH 5.8 のとき (K_{D4})、35°C、尿素 0.3 M のとき (K_{D5})、35°C、pH 5.8 のとき (K_{D6})、さらに 35°C、尿素 0.3 M、pH 5.8 のとき (K_{D7}) の変性速度を測定したところ、変性を促す要因が 2 種および 3 種同時に作用したとき、Mf の変性速度の実測値 (K_D/K_{D0})_{meas.} と理論値 (K_D/K_{D0})_{theor.} はやはり良く近似することが示された。

これらの結果は、ヤジブカの Mf について得た結果と同じであり、熱、尿素および pH など、複数の変性要因は協同的に作用して変性速度を相乗的に倍加させることを示している。なお、その他のサメ類およびコイの Mf を用いた場合も同じ結果が得られた。

魚種間の比較 6 種のサメおよびガンギエイ、コイの Mf について、温度 (25°C と 35°C)、尿素 (0 または 0.3 M) および pH (5.8 と 7.5) を変化させた種々の

条件下の K_D , およびこの条件変化 (25 → 35°C, 0 → 0.3 M, および pH 7.5 → 5.8) に伴って起る K_D の変化率 (K_D/K_{D0}) を求め, 結果を Table 3 に一括して示した。まず, pH 7.5 で温度が一定 (25, 30 または 35°C) の条件で Mf の K_D を比較し, 温度安定性⁹⁾の優れた (いいかえれば, 熱に対して耐性の高い) 順位で並べると, 最も安定な方からイタチザメ, アオザメ, ヤジブカ, メジロザメ, ヨシキリザメ, コイ, ホンザメ, ガンギエイとなり, 函館近海で水揚げされたホンザメ, ガンギエイの 2 種は相対的にかなり安定性が劣ることを示した。次に, もし温度が 25°C から 35°C に上昇する場合を考えると, 安定性の高いイタチザメ, およびアオイザメの Mf の K_D はいずれも約 100 倍以上に増加するが, 反対に安定性が低いホンザメ, ガンギエイの Mf の K_D は 50, 30 倍程度の増加にとどまり, 一般に安定性の低い Mf の場合程 K_D の増加倍率が小さくなる傾向を示した。

一方, pH と尿素による K_D の増加倍率は魚種間で余り差異がなく, Mf タンパク質の温度安定性の相違とは係わりがないように思われた。すなわち, pH が 7.5 から 5.8 に低下するとき, また, 0.3 M の尿素が共存することによって起る K_D の増加倍率は小さく, せいぜい数倍内 (前者で 4-7 倍, 後者でほぼ 3 倍) にとどまった。この値は 25 から 35°C までの温度上昇によって起る K_D の増加倍率に比べればかなり小さいので, Mf タンパク質の変性度に及ぼす寄与は相対的に小さいということが出来る。

これらの結果から, 単純な推定をすると, 安定性の高い魚種の Mf の方が熱, pH および尿素などの変性要因の影響を受け易いというように考えられがちである。しかし, 実際には魚種による Mf の温度安定性の相違は著しく大きいものであり,⁹⁾たとえば, pH 7.5, 25°C (尿素は存在しない) における Mf の K_D を比べると, イタチザメはガンギエイの K_D のほぼ 1/134 倍の値であり, いいかえると約 75 倍安定である。さらに, 35°C におけるイタチザメ Mf の K_D と 25°C におけるガンギエイ Mf の K_D を比べても (pH 7.5, 尿素は存在), なおかつイタチザメ Mf の方がわずかに安定なほどである。すなわち, 25°C から 35°C への温度上昇に伴って起る K_D の増加倍率は, 確かにイタチザメ Mf の方が大きい, その変性速度の絶対値が著しく小さいために Mf タンパク質の受ける変性はむしろ小さい。

これらの事実は, サメ類の Mf タンパク質の変性の速さを予想したり, 制御するときには, 変性速度の増加倍率だけにとどまらず, その魚種が保有している Mf タンパク質の固有の温度安定性をも併せて考慮しなければならないことを強く示唆している。

考 察

本研究では暖海産の魚種としてヤジブカなど 5 種, 寒海産の種としてホンザメ, さらに同水域で水揚げされたガンギエイの Mf について, その Ca-ATPase の変性速度 (K_D) を指標として, 変性に及ぼす熱, 尿素および pH の影響を検討したが, いずれの Mf に対してもこれらの変性要因は協調的に働き K_D の増加倍率の相乗値に相当する変性速度を与えることが示された。すなわち, これら 3 種の要因が重複して作用するとき, Mf タンパク質の変性は著しく促進される結果となる。また, 実際に, 水揚げされたサメの肉温が 25°C から 35°C まで上昇し, 肉中の pH が 5.8 前後まで低下し, さらに, 筋肉に約 0.3 M の尿素が含有されているとすると, これら 3 種の要因の中, 変性を速める最も大きな要因は熱の効果であり, これは尿素や pH の効果よりはるかに大きいことが示された。ただし, 寒海産のサメ (およびエイ) の Mf の場合は, K_D の増加倍率だけで比べる限り, むしろ暖海産のサメの Mf よりも熱の効果が小さいように見える。しかし, その Mf が本来極めて不安定であるため, K_D は暖海産のサメの Mf のそれよりも実際はかなり大きい値になっている。それ故, 両海域産のサメ Mf のいずれの場合も, 変性を速める主要因は, 温度の上昇にある点に変わりはない。しかし, 寒海産のサメの場合は Mf タンパク質が本来不安定であるため, 尿素の存在や pH の低下も変性要因として無視出来ない大きなことになるといえる。

以上述べた実験結果は, あくまでも試験管内のモデルの結果に過ぎないが, 仮にサメ類の Mf タンパク質をすり身原料として利用する場合に対応させて考えてみると, Mf タンパク質の変性を効果的に抑制するには水揚げ後の魚肉を可及的速やかに氷冷することが重要であることが示唆される。また, 魚肉を冷却する効果に比べると, 尿素を除く試みや pH を中性に保持する処置は, 変性を抑制する効果としては余り大きな期待はできないと予想される。ただし, 寒海産のサメの場合は暖海産のそれとは異なり, 魚肉の冷却による効果だけでは変性の抑制が十分に達成されないため, 尿素の除去処理や中性域への pH の調整処置を併せて行うことが好ましいように考えられる。なお, サメ肉から尿素を除去し, かつ, 肉質の pH 調節を行う目的は水晒またはアルカリ晒しによってある程度達成されることが既に報じられている。¹⁾

本研究は, 水産物利用加工技術研究開発委託事業 (水産庁) の一環として行なわれた。

文 献

- 1) 茂野邦彦, 石神次男, 藤田 薫, 是枝登: 昭和 53-55 年度鹿児島県水産試験場研究報告化学部編未利用サメ類の利用加工に関する研究, 1-52 (1980).
- 2) 橋本浩二, 錦織孝史, 新井健一: 日水誌, **50**, 1431-1438 (1984).
- 3) 加藤 登, 内山 均, 塚本志郎, 新井健一: 日水誌, **43**, 857-867 (1977).
- 4) G. Gomori: *J. Lab. and Clin. Med.*, **27**, 955-960 (1942).
- 5) A. G. Gornall, C. T. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1946).
- 6) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一: 日水誌, **48**, 671-684 (1982).