

学 位 論 文 題 名

各種添加物によるコイ筋原繊維タンパク質の
冷凍及び凍結乾燥変性の制御に関する研究

学位論文内容の要旨

水産動物の筋肉タンパク質は極めて変性しやすいため、その貯蔵や加工及び流通を図るうえで多くの問題が生じている。そのため従来から様々な工夫がなされてきた。例えば、スケトウダラを原料とした冷凍すり身は、元来極めて変性しやすい性質であるためそのままでは長期の貯蔵が不可能であるが、水晒しと糖類及びリン酸塩の添加という手段により数年間に及ぶ冷凍貯蔵を可能としたものである。この例に見られるように魚肉タンパク質の変性に対して糖類などの化合物が保護効果を示すことはよく知られている。そこで、著者は、冷凍すり身の場合と同様に魚肉タンパク質の品質をよく反映する $\text{Ca} - \text{ATPase}$ 活性を指標として用い、冷凍及び凍結乾燥によるコイ筋原繊維（Mf）タンパク質の変性の様式と変性に対する糖類などの添加物の保護効果を、定量的に検討することを目的として本研究を行なった。

本論文は二部から成っているが、第1部では、冷凍によるコイ Mf タンパク質の変性の様式と変性に対する糖類及びカルボン酸類の保護効果を検討した。そのため、Mf タンパク質を約3ヶ月にわたって冷凍貯蔵して MfCa - ATPase 活性の経時変化を測定し、一次反応式に従って解析した。その結果、(1)添加物が共存しない時のように MfCa - ATPase の失活が速い場合は、初期に速く後期には遅い二段階の反応からなるが、添加物が共存する時のように Ca - ATPase の失活が極めて遅くなる場合は、見かけ上一段階の反応として進むことを認めた。そこで、(2)冷凍貯蔵中の MfCa - ATPase の経時的失活から変性速度定数 (k_d) を算出すると、この k_d の対数値 ($\log k_d$) と添加物のモル濃度 (M) の間には比例関係が成立することが見出された。この $\log k_d$ と添加物濃度との関係直線の勾配から Mf タンパク質の冷凍変性に対する添加物の保護効果 (E 値) を定量的に表すことが可能となった。そして、(3)E 値を求めて以下の事実を明らかにした。

① E 値を用いて Mf タンパク質の冷凍変性に対する糖類の保護効果を異なる pH の下で比べると、pH7.5付近において最も強く、pH6.5ではその65%、また pH5.8ではそのわずか30%の効

果しか発揮せず、その効果は中性付近で最大であり、酸性域ではより高濃度の糖が共存しなければ冷凍変性を抑制することが困難であることを認めた。② Mf タンパク質の冷凍変性に対する各種添加物の E 値とその化学構造式との関係をみると、糖類では一般にその分子中に OH 基数が多いものほど変性に対する保護効果が強い傾向があり、またカルボン酸類ではモノカルボン酸の効果はジカルボン酸のそれよりも弱い傾向があることが示された。③ Mf タンパク質の冷凍変性に対して、糖類などの添加物が単独ではなく、混合して添加された際の保護効果について検討した結果、糖類及びカルボン酸類などの添加物は相互に協調的に作用し、各種添加物によってもたらされる k_d の減少倍率の相乗値に近似する値の k_d となることを示した。④ Mf タンパク質の冷凍変性に対する添加物の保護効果は、タンパク質と添加物の濃度比率が同じでも同一ではなく、また共存するタンパク質濃度の高低にも係わりなく、添加物のモル濃度が高いほど強い事実を認めた。⑤仮に MfCa - ATPase の失活を700日後に50%に留めるために必要な糖の濃度を計算すると、ソルビトールでは0.35_M、スクロースで0.30_Mとなる。一方、実際に冷凍すり身中には水分が約80%、糖が5～8%含まれているので、換算すれば糖濃度は0.3～0.4_Mに相当し、これはすり身中にある Mf タンパク質の冷凍変性を抑制するのに十分な濃度であった。⑥ Mf タンパク質の冷凍における k_d は先に報じられた熱変性の場合の k_d に比べれば極めて低い値であり、日数の単位で測定されるのに対して熱変性は秒単位で求められる。しかし、いずれの変性に対する糖類及びカルボン酸類の保護効果も、その強さの順位はほとんど同じであった。また、Mf タンパク質の冷凍変性に対して同じ添加物が示す E 値は、熱変性に対する値の数倍から十倍に達し、MfCa - ATPase の冷凍変性の速度を、熱変性の場合と同程度に抑制するためには、数分の一から十分の一程度のモル濃度の添加で充分であることが示された。

第2部では、凍結乾燥中のコイ Mf タンパク質の変性様式と変性に対する糖類の保護効果を検討した。すなわち、各種の糖類共存下における凍結乾燥中の MfCa - ATPase 活性の経時変化を測定した。その結果、(1) MfCa - ATPase の失活様式は、熱変性や冷凍変性の場合とは異なり、凍結乾燥の初期の2時間位の間は一次反応に従う速い失活が起こるが、それ以後の失活は起こらずほぼ一定の値を維持した。そして、(2)糖濃度が高いほど初期の失活の速度とその度合いが小さくなる傾向を示したので、MfCa - ATPase の凍結乾燥初期の k_d の対数値と失活が最大に達した時の残存活性値を求め、これらの値と糖のモル濃度(M)との関係を検討した。その結果、(3)いずれの糖が共存する場合も凍結乾燥初期の $\log k_d$ と糖濃度の間には単純な直線関係が成立することを見出したので、その直線の勾配から変性に対する保護効果(E値)を求めた。また、(4) MfCa - ATPase の残存活性(A)の対数値($\log A$)と糖濃度の間にも単純な直線関係が成立し

たので、直線の勾配から糖の保護効果を表すもう一つの指標（R 値）を考案した。これらの指標によって凍結乾燥による変性に対する糖類の保護効果を定量的に比較し、さらに以下の事実を明らかにした。

① Mf の凍結乾燥変性に対する糖類の E 値及び R 値とその化学構造式との関係をみると、一般にその分子中に OH 基数が多いほど変性に対する保護効果が強いことが示された。② E 値を x 、R 値を y とすれば、両値には $y = 0.34x - 1.0$ の式で表され、相関係数が $r = 0.99$ の強い相関関係が認められた。③ MfCa - ATPase の冷凍変性と凍結乾燥変性において糖類が示す保護効果の強さを比較すると、両変性に対する E 値はかなり近似した値であり、かつ糖の種類による保護効果の強さの順位もほぼ同じであった。それゆえ、冷凍変性を抑制する場合と同程度の濃度の糖類の添加により、凍結乾燥による初期の変性をも抑制できることが示された。ただし、冷凍と凍結乾燥とでは MfCa - ATPase の失活の反応様式と速度が異なり、凍結乾燥の場合はその後期の段階では失活が事実上阻止されるが、冷凍変性の場合はその後期の段階においても、失活は進行してゆく。それゆえ、A を指標とすれば、凍結乾燥の方がより低濃度の糖によってその変性を抑制できることが示された。 $\log A$ と糖濃度 (M) との関係から凍結乾燥による MfCa - ATPase の失活を完全に阻止する ($\log A$ の値が 0 となる) ために必要とする理論的な糖濃度を外挿して求め (ソルビトールの場合は $0.22M$ となった)、実際にその濃度を添加すると MfCa - ATPase の失活が起こらないことを認めた。④ 2 種類の糖が共存する時の凍結乾燥による MfCa - ATPase の失活に対する保護効果を k_d 及び残存活性の変化から検討すると、2 種類の糖が共存する時の k_d と残存活性は個々の糖の添加によってもたらされる k_d 及び残存活性の変化倍率の相乗値に近似し、協調的に作用することを認めた。⑤ Mf タンパク質とソルビトールの濃度比率を変えて、凍結乾燥変性に対する保護効果に及ぼす影響を検討した結果、保護効果の強さはソルビトール濃度にのみ依存して定まり、タンパク質濃度には無関係であることが示された。

本研究の第 1 部及び第 2 部の結果より、糖類などの添加物は Mf タンパク質の冷凍変性および凍結乾燥による変性のいずれに対しても、従来報じられた熱変性の場合と同様な作用機構で、強い保護効果を発揮することが明らかとなった。すなわち、これらの添加物は混合液中の水の構造を安定化させ、その結果として Mf タンパク質の変性を保護するものと考えられており、本研究の成果はこの推論を支持するものであった。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	新 井 健 一
副 査	教 授	信 濃 晴 雄
副 査	教 授	関 伸 夫
副 査	助教授	沼 倉 忠 弘
副 査	助教授	猪 上 徳 雄
副 査	助教授	今 野 久仁彦

水産動物の筋肉タンパク質は極めて変性しやすいため、その貯蔵や加工に際して従来から様々な工夫がなされてきた。例えば、スケトウダラを原料とした冷凍すり身は、元来極めて変質しやすいため、そのままでは長期貯蔵が不可能であるが、糖類リン酸塩の添加という手段により数年に及ぶ冷凍貯蔵を可能としたものである。この例のように魚肉タンパク質の変性に対して糖類などの化合物が保護効果を示すことはよく知られてる。本論文は、魚肉タンパク質の品質をよく反映する Ca - ATPase 活性を指標として、冷凍および凍結乾燥による筋原繊維 (Mf) タンパク質の変性の様式と変性に対する糖類などの添加物の保護効果を、定量的に検討することを目的としたものである。

まず第 1 部では、冷凍によるコイ Mf タンパク質の変性の様式と変性に対する糖類及びカルボン酸類の保護効果を検討し、(1) MfCa - ATPase の失活が速い場合は初期は速く後期は遅い二段階の一次反応に従うが、失活が極めて遅い場合は見かけ上一段階の一次反応で進むことを認めた。(2) 冷凍貯蔵中の MfCa - ATPase の変性速度定数 (k_d) の対数値と添加物のモル濃度 (M) の間には比例関数が成立するので、この関係直線の勾配から Mf タンパク質の冷凍変性に対する添加物の保護効果 (E 値) を表した。(3) E 値を求めて、① Mf タンパク質の冷凍変性に対する糖類の保護効果は、pH7.5 付近において最も強く、微酸性及び微アルカリでは弱まることを認めた。② 糖類では一般にその分子中に OH 基数が多いものほど保護効果が強い傾向にあり、またカルボン酸類では -COOH 基数の多い方が強い傾向にあることを認めた。③ 糖類などの添加物が、混合して添加された場合の k_d は、それぞれが協調的に作用し、各添加物によってもたらされる k_d の減少倍率の相乗値に近似する値となった。④ 添加物の保護効果は、Mf タンパク質と添加物の濃度比率や、またタンパク質濃度の高低にも係わりなく、添加物のモル濃度によって定まる事実を認めた。⑤ MfCa - ATPase の失活を700日後に50%に留めるために必要な糖の濃度を求

めると、ソルビトールでは 0.35_M 、スクロースで 0.30_M となるが、一方、冷凍すり身中の糖濃度は $0.3\sim 0.4_M$ に相当している。⑥ Mf タンパク質の冷凍変性における k_d は熱変性の場合の k_d に比べれば極めて低い値であるが、いずれの変性に対する糖類及びカルボン酸類の保護効果もその強さの順位はほとんど同じであった。

第2部では、凍結乾燥中のコイ Mf タンパク質の変性様式と変性に対する糖類に保護効果を検討し、(1) MfCa - ATPase の失活は凍結乾燥の初期の間は一次反応に従って進むが、それ以後はその活性値を維持した。(2)糖濃度が高いほど初期の失活の速度とその度合いが小さくなる傾向を示すので、 $\log k_d$ と失活が最大に達した時の残存活性値(A)の対数値を求め、これらの値と糖のモル濃度(M)の関係を検討した。(3) $\log k_d$ と糖濃度の間には単純な直線関係が成立するので、直線の勾配から変性に対する保護効果(E 値)を求めた。また $\log A$ と糖濃度の間にも直線関係が成立するので、直線の勾配から糖の保護効果を表すもう一つの指標(R 値)を考案した。(4)これらの指標によって、①糖類の化学構造式との関係を見ると、一般にその分子中に OH 基数が多いほど変性に対する保護効果が強いことが示された。②E 値と、R 値との間には、相関係数 $r = 0.99$ の強い相関関係が認められた。③冷凍変性と凍結乾燥変性に対する糖類が示す E 値はかなり近似した値であり、また糖の種類による保護効果の強さの順位もほぼ同じであった。ただし凍結乾燥の場合はその後期の段階で失活が事実上阻止されるが、冷凍変性の場合はその後期においても失活は進行してゆく点が異なっている。なお $\log A$ と糖濃度(M)との関係から、凍結乾燥による MfCa - ATPase 失活を完全に阻止する理論的な糖濃度を求めるとソルビトールの場合 0.22_M となった。④2 種類の糖が共存する時の k_d 及び(A)の値は、個々の糖によってもたらされる k_d 及び(A)の変化倍率の相乗値に近似し、協調的に作用することを認めた。⑤保護効果の強さは糖の濃度にも依存して定まり、Mf タンパク質濃度には無関係であることが示された。

以上の結果より、糖類などの添加物は、Mf タンパク質の冷凍変性および凍結乾燥変性のいずれに対しても、熱変性の場合と同様な作用機構で強い保護効果を発揮することが示された。すなわちこれらの添加物は混合液中の水の構造を安定化させ、その結果として Mf タンパク質の変性を保護するものと考えられる。本論文は、魚肉の冷凍、及び凍結乾燥に際して起こる品質低下に対する糖類などの添加物による保護効果を定量的に表わし、論ずることが可能であることを示したが、これらの成果は本来不安定な魚肉を貯蔵及び加工するための技術を改良、開発するのに極めて有益である。以上の点を評価して、審査員一同は申請者が博士(水産学)の学位を授与される十分な資格があると判定した。