

ヌクレオシド-5' -リン酸が豚肉からの筋原線維タンパク質の抽出とその加熱ゲル形成に及ぼす影響

(Effects of nucleoside-5'-monophosphate on the extraction of myofibrillar proteins from porcine meat and the formation of heat-induced gels from those proteins)

学位論文の内容の要約

中村 幸信

序

ソーセージの国内生産重量および1世帯当たりの購入数量は、他の食肉製品に比べ多い。したがって、生産者や消費者は、高品質のソーセージを製造することに関心が高い。高品質なソーセージは、適度な保水性および結着性を有している。それらの発現には、主原料となる食肉に存在する筋原線維タンパク質(Mf-p)、特にミオシンが必須である。Mf-pは、製造の塩漬工程で食肉から抽出され、続く加熱工程で3次元の網目構造を形成し、最終的にソーセージの保水性および結着性を発現させる。日本のソーセージ製造の主流である低塩濃度下(1.5%)における塩漬工程では、Mf-pを抽出するためにピロリン酸塩を使用している。このピロリン酸塩の役割は、食肉において死後硬直時に形成されたアクチン-ミオシンの硬直結合体(アクトミオシン)をアクチンとミオシンに解離させ、これらタンパク質の抽出を容易にすることである。

他方、アデノシン-5'-リン酸(AMP)やイノシン-5'-リン酸(IMP)がアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させることが明らかにされている。これは上述のピロリン酸塩の作用と同様である。しかしながら、AMPやIMPによるアクトミオシン解離機構は明らかになっていなかった。そこで、本研究では塩基部分の異なるヌクレオシド-5'-リン酸(NMP)を用いてアクトミオシン解離機構を調べ、この解離作用がグアノシン-5'-リン酸(GMP)を含めたプリンヌクレオシド-5'-リン酸(PrMP)によって生じることを明らかにした。

次に、PrMPの中から、ソーセージ製造においてうま味を付与する食品添加物として使用されているIMPとGMPを選択し、これらのMf-pの抽出作用について検討した結果、IMPとGMPがMf-pの抽出を高めることを明らかにした。

さらに、IMPをMf-pの抽出を高めるために添加した加熱ゲルを作製した。その結果、IMPが加熱ゲルの保水性、物性および官能特性を高めることを明らかにした。

#### I、NMPによるアクトミオシンの解離作用

精製アクトミオシンとGMP、シチジン-5'-リン酸(CMP)、デオキシチミジン-5'-リン酸(dTMP)およびウリジン-5'-リン酸(UMP)を0.2 M KCl下、pH 7.2、0°Cで16時間インキュベートした。各種NMPの濃度は8 mMとした。この結果、GMPはAMPやIMPと同様にアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させたが、CMP、dTMPおよびUMPはアクトミオシンを解離させなかった。したがって、プリン骨格を有

する AMP、IMP および GMP はアクトミオシンを解離できるが、ピリミジン骨格を有する CMP、dTMP および UMP はアクトミオシンを解離できないことが明らかとなった。PrMP は、ピリミジンヌクレオシド-5'-リン酸(PyMP)よりもアクトミオシンに対して強く結合することができるためにアクトミオシンの解離作用を示したと推定した。

## II、PrMP による Mf-p の抽出～ピロリン酸塩との比較～

食肉に 9-36 mM IMP あるいは GMP を含む 0.3-0.5 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、Mf-p を抽出した。この抽出に対する NaCl 濃度、IMP あるいは GMP 濃度および抽出時間の影響を調べた。そして、1.5-9 mM のピロリン酸四カリウム(KPP)の作用と比較した。その結果、IMP および GMP が、Mf-p の抽出を高めることが明らかになった。これは IMP および GMP が有するアクトミオシンの解離作用に起因するものと考えられた。IMP による Mf-p 抽出の増加は、NaCl 濃度と IMP 濃度の増加および抽出時間の延長によってさらに高められた。GMP による Mf-p 抽出の増加は、NaCl 濃度と GMP 濃度の増加によってさらに高められたが、抽出時間の延長による抽出率の低下が生じた。他方、KPP によっても Mf-p の抽出は増加したが、NaCl 濃度の増加や抽出時間の延長によって高められなかった。IMP、GMP および KPP はいずれもアクトミオシンの解離作用を有しているが、これらの Mf-p の抽出性については異なることが明らかになった。KPP は比較的低い NaCl 濃度および短時間で Mf-p を抽出することが可能であった。GMP 抽出における抽出時間の延長による抽出率の低下は、アクトミオシンを解離させていた GMP が 4 量体の G カルテットを形成することで、食肉から抽出され解離状態にあったアクチンおよびミオシンが再びアクトミオシンを形成することに起因するものと推定した。

## III、PrMP と KPP の併用による Mf-p の抽出

食肉に 9-36 mM IMP あるいは GMP と 1.5-3.0 mM KPP を併用した 0.3 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、Mf-p を抽出した。この抽出に対する PrMP と KPP の併用効果を調べた。この結果、PrMP と 1.5 mM KPP の併用が、Mf-p の抽出を著しく高めることが明らかになった。特にミオシン抽出に関しては、相乗効果が示された。PrMP と 1.5 mM KPP の併用による Mf-p の抽出の著しい増加は、PrMP と KPP による Mf-p の抽出様式が異なっており、PrMP による抽出の律速段階を KPP が除去する補完作用に

よってもたらされたと推定した。IMPとKPPを併用した場合、抽出時間の延長によってアクチン抽出は増加したが、ミオシン抽出は増加しなかった。この結果は、両タンパク質の筋原線維における存在状態の違い、すなわちアクチンは細いフィラメント、ミオシンは太いフィラメントとして存在することに起因するものと推定した。

#### IV、生理的イオン強度下での IMP および KPP による Mf-p の抽出様式

精製アクチンと 8 mM IMP を 0.06-0.2 M KCl、pH 7.2、0°C で最大 4 時間までインキュベートして、アクチンの解離に要する時間と KCl 濃度の影響を調べた。この結果、IMP によるアクチンの解離は 10 分以内に完了することおよび KCl 濃度が 0.19 M 以上で起こることを明らかにした。他方、KPP によるアクチンの解離は、KCl 濃度が 0.06 M 以上で起こった。IMP がアクチンの解離に要する時間が、KPP とほぼ同等であることから、高イオン強度下での筋原線維からのアクチンとミオシンの抽出に IMP が KPP より時間を要する原因は、アクチン解離作用そのものにはないと考えられた。IMP によるアクチンの解離に要する KCl 濃度が KPP のそれより高いことは、IMP のアクチンに対する親和性が KPP のそれより低いことを示唆し、両者の抽出様式の違いの原因の 1 つと考えられた。

精製した筋原線維と 8 mM IMP または KPP を 0.2 M KCl、pH 7.2、0°C でインキュベートした。その結果、IMP により Mf-p は抽出されなかったが、KPP により抽出された。さらに、IMP (8 mM) と KPP (1 mM) を併用した場合、Mf-p は抽出された。これらの結果から、次のことを推定した。生理的イオン強度下での抽出において、IMP は細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解離させるが、細いフィラメント-Z 線間の結合および太いフィラメント-コネクチン-Z 線間の結合を解除しないために、アクチンおよびミオシンは筋原線維内に拘束され抽出されなかったと推定した。他方、KPP は細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解離させるばかりでなく、細いフィラメントと Z 線間および太いフィラメントとコネクチン-Z 線間の結合を解除する能力を有していると推定した。このような IMP と KPP の性質の違いが、高イオン強度下で認められた両者の抽出様式の違いの原因であると考えられた。この推定は、高イオン強度下での IMP によるアクチンおよびミオシン抽出の増加に伴って、 $\alpha$ アクチニンおよびコネクチンの抽出も増加したことにより支持された。

## V、IMP を添加した加熱ゲルの保水性、物性および官能特性～ピロリン酸塩との比較～

IMP を添加した加熱ゲルを作製した。保水性測定のためのゲルは、食肉に 9-36 mM IMP を含む 0.3-0.5 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、0 および 12 時間抽出して得られたホモジネートを加熱して得られた。物性測定および官能試験のためのゲルは、食肉に 0.5 倍量の IMP を含む NaCl 溶液を加えて得られたホモジネートを加熱して得られた。この加熱ゲルの塩濃度 (NaCl および KCl) は 0.3 M、IMP 濃度は 9-36 mM とした。この結果、IMP の添加が、加熱ゲルの保水性、物性および官能特性を高めることが明らかになった。IMP 添加ゲルが有するこれらの性質は、KPP 添加加熱ゲルに匹敵した。この原因は、IMP による Mf-p 抽出の増加によるものと推定した。さらに、IMP によって生じる細いフィラメントと太いフィラメントの間の結合が解離された筋原線維も、保水性および物性を高めるものと推定した。

### 総括

以上の本研究での知見は、PrMP による加熱ゲル (モデルソーセージ) の保水性および物性の向上効果を示したものであり、良質な食肉製品の製造に大いに貢献するものであろう。PrMP とピロリン酸塩の Mf-p 抽出に対する相乗効果は、少ないピロリン酸塩で高品質のソーセージを製造することにつながり、その産業的意義は大きい。また、NMP によるアクトミオシンの解離作用にプリン骨格が必要であることや、PrMP と KPP の筋原線維からアクチンおよびミオシンを抽出する様式が異なることなどの知見はアクトミオシンや筋原線維の構造の詳細を明らかにすることに貢献するであろう。

Effects of nucleoside-5'-monophosphate on the extraction of myofibrillar proteins from porcine meat and the formation of heat-induced gels from those proteins

Summary of doctor thesis

Yukinobu Nakamura

## Introduction

Japanese manufacturers and consumers for meat products share a common interest in production of high-quality sausages since domestic production weight of sausages and quantity of purchase per household of sausages are higher than those of the other meat products. The high-quality sausages bear an adequate level of the water-holding capacity and binding property. An expression of the water-holding capacity and binding property is essential for myofibrillar proteins (Mf-ps) in meat being a major ingredient. During the process for sausages, Mf-ps are extracted from meat in curing process and then a three-dimensional network of Mf-ps is formed in heating process. The formation of the network produces the good water-holding capacity and binding property. Curing process at low salt concentration (1.5%) prevailing in Japanese sausage production has used pyrophosphates to extract Mf-ps. The pyrophosphates dissociate a rigor complex (actomyosin) which is formed by an association between actin and myosin in rigor mortis. Dissociated actomyosin is extracted easily from myofibrils.

Actomyosin was found to be dissociated to actin and myosin by nucleoside-5'-monophosphates (NMPs) (*e.g.*, adenosine-5'-monophosphate (AMP) or inosine-5'-monophosphate (IMP)). This effect of NMPs is similar to that of pyrophosphates described above. However, this dissociation mechanism of actomyosin by NMPs was unrevealed. In this study, the mechanism was examined by the use of NMPs containing different bases. It was found that actomyosin was dissociated by purine-nucleoside-5'-monophosphates (PrMPs) such as guanosine-5'-monophosphate (GMP) containing purine as bases.

An extraction of Mf-ps by PrMPs was examined. PrMPs such as IMP and GMP are used as food additives of umami in the production of sausages. It was found that the extraction of Mf-ps was enhanced by IMP and GMP.

Heat-induced gels were prepared by an addition of IMP in order to enhance the extraction of Mf-ps. It was found that the water-holding capacity, physical and sensory properties of heat-induced gels was enhanced by IMP.

## I, Effect on dissociation of actomyosin by NMPs

Actomyosin was incubated with GMP, CMP, dTMP or UMP in the presence of 0.2 M KCl at pH 7.2 and 0°C for 16 hours. The various NMPs' concentrations were 8 mM. Actomyosin was dissociated by GMP similarly to AMP and IMP, but not by CMP, dTMP and UMP. Thus, it was found that actomyosin was dissociated by the PrMPs containing purine as bases, but not by the pyrimidine-nucleoside-5'-monophosphates (PyMPs) containing pyrimidine as bases. It is assumed that the dissociation of actomyosin by PrMPs was brought about by their tighter binding to actomyosin than PyMPs because of differences in the structure of both bases.

## II, Extraction of Mf-ps by PrMPs: a comparison with pyrophosphates

In order to extract Mf-ps, minced meat was mixed with 9 volumes of 0.3-0.5 M NaCl solutions containing 9-36 mM IMP or GMP. Effects of NaCl, IMP or GMP concentrations and extraction time on the extraction were examined and compared with effects of 1.5-9 mM tetrapotassium pyrophosphate (KPP). The extraction of Mf-ps was found to be enhanced by IMP and GMP. This effect was attributable to the dissociation of actomyosin by IMP and GMP. In the case of IMP, the amounts of the Mf-ps were increased by the rise of NaCl and IMP concentrations and the elongation of the extraction time. In the case of GMP, the amounts of the extracted proteins increased by the rise of NaCl and GMP concentrations. But the amounts were lowered by the elongation of the extraction time. In the case of KPP, there was the same increase of the amounts of the extracted proteins, but this increment was not raised by the elevation of NaCl concentration and the elongation of the extraction time. Thus, it was found that IMP, GMP and KPP, which have a common ability to dissociate actomyosin, differ in an ability of the extraction of Mf-ps. KPP was able to extract Mf-ps at relatively lower NaCl concentrations and for a shorter time than PrMPs. The decrease of the extractability by GMP may be attributed to the re-association of dissociated actin and myosin free from meat induced by the formation of a G-quartet which is a tetramer of GMP.

## III, Extraction of Mf-ps by a combination of PrMPs and KPP



In order to examine a combinational effect between PrMPs and KPP on the extraction of Mf-ps, minced meat was mixed with 9 volumes of 0.3-0.5 M NaCl solutions containing 9-36 mM IMP or GMP and 1.5-3 mM KPP. The extraction of Mf-ps was markedly enhanced by the combination of PrMPs and 1.5 mM KPP. The synergy effect was indicated in particular in the extraction of myosin. It was assumed that this marked increase was induced by a complementary effect between PrMPs and KPP. It means that KPP may remove a rate-limiting step in the extraction by PrMPs because of the difference between PrMP and KPP in a mode of extraction. The elongation of the extraction time enhanced the extraction of actin but not that of myosin. This result was attributed to be the difference in an existence form of both proteins in myofibrils. Thus, actin and myosin exist as thin and thick filaments in myofibrils, respectively.

#### IV, Mode of extraction of Mf-ps by IMP and KPP at the physiological ionic strength

In order to examine time and KCl concentration required for the dissociation of actomyosin by IMP, purified actomyosin was incubated with 8 mM IMP at 0.06-0.2 M KCl, pH 7.2 and 0°C up to 4 hours. It was found that the dissociation of actomyosin by IMP finished within 10 minutes and occurred in the KCl concentration above 0.19 M. On the other hand, the dissociation of actomyosin by KPP occurred in the KCl concentration of above 0.06 M. Since time required for the dissociation of actomyosin was similar between IMP and KPP, the dissociation of actomyosin itself was unlikely to be responsible for the time-consuming extraction of actin and myosin from myofibrils by IMP at the high ionic strength. The KCl concentration required for the dissociation of actomyosin of IMP was higher than that of KPP, suggesting that an affinity of IMP on actomyosin is lower than that of KPP. Thus, this may be a possible cause of the difference in the extraction mode between IMP and KPP.

Purified myofibrils were incubated with 8 mM IMP or KPP at 0.2 M KCl, pH 7.2 and 0°C. Mf-ps were not extracted by IMP but were by KPP and by the combination of 8 mM IMP and 1 mM KPP. These results lead the following assumption. At the physiological ionic strength, IMP dissociates a binding between thin and thick filaments but does not dissociate those between thin filaments and Z-lines or between thick

filaments and connectin-Z-lines. Thus, IMP may be unable to extract actin and myosin restrained within myofibrils. KPP may have an ability to dissociate not only the bindings between thin and thick filaments but also between thin filaments and Z-lines or between thick filaments and connectin-Z-lines. This assumption was supported by the enhancement of the extraction of  $\alpha$ -actinin and connectin accompanying that of actin and myosin at the high ionic strength.

V, Water-holding capacity, physical and sensory properties of IMP-added heat-induced gels, a comparison with KPP

Heat-induced gels containing IMP were prepared. For the determination of water-holding capacity, minced meat was mixed with 9 volumes of 0.3-0.5 M NaCl solutions containing 9-36 mM IMP or 9 mM KPP. The heat-induced gels were obtained by the incubation of the homogenate for 0 or 12 h and the subsequent heating of that. For the determination of physical and sensory properties, minced meat was mixed with 0.5 volumes of NaCl solutions containing IMP. The homogenate was heated to obtain heat-induced gels which contained the salt (NaCl and KCl) concentration of 0.3 M and the IMP concentration of 9-36 mM or the KPP concentration of 9 mM KPP. It was found that the addition of IMP enhanced the water-holding capacity, physical and sensory properties of heat-induced gels. These features of IMP-added gels were comparable to those of KPP-added gels. This improvement of the features appears to be a result of the increase in the extraction of Mf-ps. Furthermore, it was assumed that water-holding capacity and physical properties of heat-induced gels were also enhanced by myofibrils where IMP dissociated the binding between thin and thick filaments.

## Conclusions

The findings in this study indicate that PrMP brought about the improvement of the water-holding capacity, physical and sensory properties of heat-induced gels (model sausages), markedly contributing to the manufacture of good meat products.

The synergistic effects of PrMPs and pyrophosphates on the extraction of Mf-ps would enable the production of high-quality sausages using a little amount of

pyrophosphates, leading to large industrial merits. The findings that PrMPs are necessary for the dissociation of actomyosin and modes of the extraction of actin and myosin by PrMPs and KPP are different appear to contribute to the clarification of the structures of actomyosin and myofibrils.