

9650 高圧力によるタンパク質の変性と微生物の失活に対する食塩効果

助成研究者：林 力丸(京都大学 大学院農学研究科)
共同研究者：植野 洋志(京都大学 大学院農学研究科)
小澤 省吾(京都大学 大学院農学研究科)

加熱によるタンパク質の立体構造変化(変性)や微生物の死滅(失活)に対する食塩や塩類の添加効果は、通常、抑制的である。すなわち、食塩濃度が濃いときには、うすいときにくらべ、タンパク質の加熱凝固や食品の殺菌は起こりにくい。一方、食品の加工や殺菌に高圧処理を利用する場合、食塩はタンパク質の変性や微生物の失活にどのような影響を与えるのであろうか。食塩はタンパク質の高圧変性や微生物の加圧殺菌に抑制的に働く場合と促進的に働く場合が報告されており、統一の見解が得られていない現状である。

食品の高圧処理の研究が進展する中で、高圧処理に対する食塩の添加効果に関する基礎的かつ系統的解析が重要な課題となっている。本研究目的は、高圧食品加工の分野のこの課題に焦点を絞り、基礎と応用の研究を遂行しようとするところにある。

そのため、タンパク質としてカルボキシペプチダーゼ Y を選び解析した。また、酵母の加圧失活速度を -20°C までの低温下で測定し、低温加圧殺菌の有効性について検討を行なった。圧力効果に与える食塩などの影響を低温加圧失活について観察した。面白いことに塩化ナトリウム添加の場合、 25°C では 0.5 M 以上の添加でほとんど生残菌数の減少がみられなくなるが、 -20°C では逆に添加によって失活が促進された。

本研究の成果は食品処理にはふさわしい低温加工への道を拓き、通常の加熱加工によって起きる風味や香りの劣化を抑え、素材の新鮮さを保つ食品作りを可能にする。

参照

- 1) 林 力丸編、「食品への高圧利用」、さんえい出版(1989)
- 2) 林 力丸編、「加圧食品—研究と開発」、さんえい出版(1990)
- 3) 林 力丸編、「高圧科学と加圧食品」、さんえい出版(1991)
- 4) C. BALNY, R. HAYASHI, K. HEREMANS, and P. MASSON編、「High Pressure and Biotechnology», Colloques INSERM, John Libbey Eurotext, Ltd., France, 1992
- 5) 林 力丸編、「生物と食品の高圧科学」、さんえい出版(1993)
- 6) 功刀 滋、嶋田昇二、鈴木敦士、林 力丸編、「高圧バイオサイエンス」、さんえい出版(1994)
- 7) C. HASHIZUME, K. KIMURA, and R. HAYASHI, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1455-1458 (1995)
- 8) R. Hayashi and C. Balny編、「High Pressure Bioscience and Biotechnology», Elsevier, The Netherland, 1996
- 10) 鈴木敦士、林 力丸編、「高圧バイオサイエンスとテクノロジー」、さんえい出版(1997)

9650 高圧力によるタンパク質の変性と微生物の失活に対する食塩効果

助成研究者：林 力丸(京都大学 大学院農学研究科)
共同研究者：植野 洋志(京都大学 大学院農学研究科)
小澤 省吾(京都大学 大学院農学研究科)

1. 研究目的

加熱によるタンパク質の立体構造変化(変性)や微生物の死滅(失活)に対する食塩や塩類の添加効果は、通常、抑制的である。すなわち、食塩濃度が濃いときには、うすいときにくらべ、タンパク質の加熱凝固や食品の殺菌は起こりにくくなる。一方、食品の加工や殺菌に高圧処理を利用する場合、食塩はタンパク質の変性や微生物の失活にどのような影響を与えるのであろうか。実は、食塩はタンパク質の高圧変性や微生物の加圧殺菌に抑制的に働く場合と促進的に働く場合が報告されており、統一の見解が得られていない現状である。

食品の高圧処理の研究が進展する中で、高圧処理に対する食塩の添加効果に関する基礎的かつ系統的解析が重要な課題となっている。本研究目的は、高圧食品加工の分野のこの課題に焦点を絞り、基礎と応用の研究を遂行しようとするところにある。

第一にタンパク質として、カルボキシペプチダーゼ Y を選び解析した。このタンパク質が $-20\sim 10^{\circ}\text{C}$ の低温での加圧(50~500 MPa)処理によりいかに失活するかを解析し、高圧処理によるタンパク質の変性機構を考察しようとした。カルボキシペプチダーゼ Y の低温での加圧変性は、溶媒である水の構造変化あるいは状態変化がタンパク質の天然の構造の安定化因子である非共有結合性相互作用を弱めることによって現れる現象と考えられるので塩類の添加効果を検討した。本研究の成果は食品処理にはふさわしい低温加工への道を拓くものであり、通常の高熱加工によって起きる風味や香りの劣化を抑え、素材の新鮮さを保つ食品作りを可能にするものである。

高い静水圧を加えることによって微生物の死滅が起きることは古くから知られている。この現象を食品加工に応用した場合、通常の高熱殺菌によって起きる風味や香り等の劣化が防げ、素材の持つ新鮮な風味をそのまま残すため、近年さまざまな食品について加圧処理の応用が検討されている。現在では、ジャムをはじめ数種の加圧処理食品が市販されるに至っている。加圧処理により、菌体の生体膜やタンパク質の生体高分子が圧力変性を受け、殺菌が起こると考えられるが、圧力による殺菌の効果をより高めるために、さまざまな加圧処理の条件が検討されている。その1つとして、 60°C 以上の高温下での加圧処理が

報告されているが、素材の風味や香りがそのまま残るという加圧殺菌の特徴を生かしたい場合、加温を避けたいところである。一方 0℃以下あるいは 0～10℃の低温下での加圧処理の効果については、2、3の研究が主として殺菌について行なわれ、加圧殺菌の低温での促進効果が観察されている。特に園池らの細菌に関する10～70℃での加圧失活の速度論的解析は詳しく行なわれている。

本論文は従来詳しい報告のない酵母の加圧失活速度を -20℃までの低温下で測定し、低温加圧殺菌の有効性について検討を行なった。また、食品成分が圧力効果に与える影響を調べるために、食塩（塩化ナトリウム）などを添加した系についても低温加圧失活を観察した。

2. 研究方法

2.1 試料の調製と勤怠の計数

カルボキシペプチダーゼ Y はオリエンタル酵母社製あるいは研究室の精製品を用いた。*Saccharomyces cerevisiae* (IF00234) を供試菌株とし、YM培地中 30℃で 0. D. 610nm が 20前後になるまで約 2昼夜振盪培養し、定常期の菌体を集菌し、あらかじめ滅菌した 0.85% NaCl 溶液により洗浄して菌体を得た。

失活速度の測定には、菌数が約 $8.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個/ml に調整した 0.85% NaCl 菌体懸濁液を試料とした。また、糖や塩類の添加による効果を検討するときには、ショ糖、塩化ナトリウム、グリセリン、クエン酸三ナトリウムそれぞれの所定濃度の水溶液に、菌数が約 $8.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個/ml の菌体懸濁液を試料とした。

2.2 加圧処理

加圧処理には手動式加圧装置（光高圧機器製 KP5B型）を使用した。圧力媒体には灯油を精製したケロシンを用いた。温度制御は加圧容器を充分恒温になるまで恒温槽に浸漬し、加圧操作も恒温槽中に行なうことによって調節し、恒温槽の温度を反応温度とした。

試料のタンパク質あるいは菌体懸濁液を滅菌ポリエチレン袋に入れ、空気が入らないようにヒートシールしたものを、さらに蒸留水を満たしたポリエチレン袋に入れてヒートシールして加圧処理した。

加圧処理は圧力 120～300 MPa、温度 -20～50℃、処理時間 2分～40分の範囲で行なった。

2.3 失活速度の測定

種々の圧力と温度の条件で加圧処理時間を変えて何点かの試料を取り出し、加圧処理後の酵素活性あるいは生残菌数を Y M 寒天培地を用いた希釈平板法により測定した。菌体測定値の対数値について処理時間に対する一次回帰を行ない、1分間当りの生残菌数の減少値（対数）を算出し、失活速度とした。失活速度 1.0 は、菌数が 1分間で 1/10 に減少す

ることを意味する。速度を算出する際、圧力の昇降時に起る菌数の減少を考慮し、初発菌数（0分）は計算に含めなかった。

2.4 糖、塩類の添加の影響

ショ糖（0～1.0M）、塩化ナトリウム（0～1.0M）、グリセリン（0～40%（v/v）、クエン酸三ナトリウム（0～0.2M）を所定濃度含んだ試料溶液に25℃で260 MPaの圧力を20分間あるいは-20℃で150 MPaの圧力を20分間加え、加圧処理を行なった後の活性あるいは生残菌数を測定した。

3. 研究結果

3.1 カルボキシペプチダーゼ Y の低温変性

タンパク質は熱変性と圧力変性をする。圧力変性の研究は、1914年にP. W. Bridgmanが卵の白身が圧力処理によって凝固することを発見したときに始まった。高圧によるタンパク質の可逆的変性の研究は1970年以後 Brandts、Hawley、Kauzmannらにより進められ、体積変化を入れたタンパク質変性の熱力学的記述が可能になった。その結果、2状態転移として扱われた可逆変性曲線は圧力-温度平面上に楕円形として描かれることが明らかにされた。これは、タンパク質の変性は高温でも低温でも一般的に見られる現象であり、両変性とも高圧下で起こりやすいことを示したもので、食品加工の分野にも重要な示唆を与えることとなった。

カルボキシペプチダーゼ Y は常圧では凍結によって変性しにくい酵素であるが、-20～10℃の低温加圧（200と400 MPa）で変性が観察できた。特に400 MPaでは低温変性が2状態転移の挙動を示した。このことは大気圧の下では観察されにくいタンパク質の低温変性が高圧の下では容易に観察されることを示し、低温加圧変性と表現できる。また、この低温変性は低温領域での圧力変性であると解釈できる。換言すれば、カルボキシペプチダーゼ Y の変性は高温高圧ばかりでなく、低温と高圧の組み合わせで増強されるということになる。

カルボキシペプチダーゼ Y は尿素や塩酸グアニジンに耐性が強いが、-10℃の下で200 MPaの加圧をすると低濃度の変性剤で失活した。オボアルブミンの尿素存在下の圧力変性は0℃では起こりやすいが40℃ではほとんどおこらないのに対し、カルボキシペプチダーゼ Y の変性は低温、高圧、変性剤の3者が増強的に作用すると考えられる。

尿素や塩酸グアニジンと疎水性残基の親和性は純水と疎水性残基の親和性よりも強く、これらはタンパク質分子内の疎水性相互作用を弱める。また、これらは結合水の外側にある束縛水の構造を破壊し、結合水を自由水の氷様秩序構造に変化させる傾向がある。常温や常圧の場合より低濃度の変性剤で低温・加圧変性するのは、低温・高圧・変性剤の3者が疎水性相互作用の弱体化や水素結合の攪乱を協同的に起こす結果と考えられる。

グリセリンとショ糖は熱変性の保護物質として知られているが、カルボキシペプチダーゼ Y の低温・加圧変性に対しても保護効果を示し、1分子当りのヒドロキシル基の数が多し、ショ糖の方が保護効果は大きかった。グリセリンやショ糖は強い水素結合能を持ち、分極性の高い分子である。これらは低温・高圧下で氷様の秩序構造を形成しようとする水分子同士の水素結合形成と拮抗的し、秩序構造の形成を妨げたり、双極子・双極子相互作用によって水分子を配向させて、保護効果を示すと考えられる。

塩化ナトリウム濃度が高いほどカルボキシペプチダーゼ Y の低温・加圧変性が抑制され、塩化ナトリウムも保護効果を示した。種々の1価のアルカリ金属イオンを試料に添加し加圧した際のカルボキシペプチダーゼ Y の残存活性をイオン半径の逆数に対してプロットすると、リチウムイオン以外の他の4種類のイオンはイオン半径が小さいほど保護効果が大きくなる傾向があった。これは半径の小さいイオンほど表面電荷密度が大きいため、水和水が静電的相互作用によって強く、量的にも多く結合すること、さらに、その結合力が高圧下で増強されこと、などが原因と考えられる。

陰イオン性界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウムの低温・高圧変性に対する効果をみると、低濃度では保護効果を示し、高濃度では変性剤として作用した。これはドデシル硫酸ナトリウムは低濃度では解離したイオンが自由水の氷様構造を破壊し、高濃度では界面活性剤として疎水性残基を水側に露出させる効果があるためと考えられる。

3.2 低温での加圧処理による酵母の不活性化

S. cerevisiae を 25℃ で 210~270 MPa、あるいは、-20~40℃ で 180 MPa の加圧処理をした後の生残菌数を加圧処理時間についてプロットすると、測定した範囲ではいずれも失活速度はほぼ直線に近似された。失活速度は繰り返しの実験でも良い再現性が見られた。

温度を変えて、各種の圧力で加圧した場合の酵母の失活速度をみると、温度によって圧力効果が大きく変わった。0℃~40℃の範囲では、180 MPa 以下の圧力では失活が見られないが、-10℃以下および50℃以上の温度領域では180 MPa 以下でも大きな失活が見られた。

圧力を変えて各種の温度で加圧した場合の失活速度を見ると、圧力失活は高温と同様低温でも起こることが分かる。例えば、180 MPa の加圧のとき、50℃以上でみられる大きな失活は-10℃以下でもみられる。

以上の実験の測定値を重回帰分析した結果、測定回数(n = 43)における相関係数(R)は0.927であった。酵母の失活速度は温度と圧力に依存して指数関数的に増大するため、温度や圧力を僅かに変化させることで失活効果も大きく変化することが明らかとなった。

以上の結果をまとめて、温度-圧力平面上に等しい失活速度を与える点を結んだグラフをから、失活速度1.0を得るためには-20℃では190 MPa程度の加圧で充分だが、20℃では320 MPa必要となることが読み取れる。これは-20℃で行なう加圧殺菌は室温以上の高

温での殺菌より低圧ですむことを示す。

酵母の菌体懸濁液に、塩化ナトリウム、ショ糖、グリセリンあるいはクエン酸三ナトリウムを添加して加圧処理を行なった結果をFig. 1に示す。塩化ナトリウム添加の場合、25℃では0.5 M以上の添加でほとんど生残菌数の減少がみられなくなるが、-20℃では逆に添加によって失活が促進された。ショ糖についても、25℃では添加濃度が増加するに従い生残菌数は低下し、-20℃では1.0 Mの添加でわずかに失活が促進された。グリセリンについては、25℃、-20℃共に添加濃度が増加するに従い生残菌数の低下がみられた。クエン酸三ナトリウムについても、25℃と-20℃の両方共に添加濃度が増加するに従い、わずかに生残菌数の低下がみられた。

3. 考察

タンパク質の水和モデルによると、タンパク質表面には極性基と水素結合や静電的相互作用あるいは疎水性水和によって強く結合している水分子の層がある。これを結合水の層と表現する。これは1分子の水層からなっていて、並進緩和時間が 10^{-7} 秒程度であり、大気圧下では-190℃でも凍らない。その外側には結合水の層の配向した水分子の影響を受けて分子の熱運動がある程度束縛され、緩和時間が 10^{-9} 秒程度の水層がある。これは数分子層の厚さを持ち束縛水の層という。その外側には緩和時間が 10^{-12} 程度のバルクの水と運動性が変わらない自由水の層がある。このようにタンパク質を取り巻く表面水をここでは結合水の層、束縛水の層、自由水の層の3層に別けて考察を進める。

自由水の水分子は低温で水素結合によるクラスターを優勢的に形成し、氷様の4面体配位の格子構造をとる。このような自由水の秩序化はタンパク質の表面水との間で水素結合の組み替えをおこし、疎水性相互作用を弱めることになる。この2要因が低温変性の原動力となる。一方、高圧下では系全体の体積収縮に伴う疎水性水和の形成が促進される。それに即応する原理であるルシャトリエの平衡移動の原理はタンパク質の疎水性相互作用を弱めらう結果を招く。

イオン水和モデルを念頭に置いてイオン周囲の水の状態をみると、 Na^+ と Li^+ などの「構造形成イオン」では結合水の層の水分子はイオン・双極子相互作用によってイオンに強く引き付けられ配向している。また、束縛水の層の水分子は、結合水の層とバルクの自由水の層の間で自由水よりも動きやすくなっている。一方、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 NH_4^+ などの「構造破壊イオン」は結合水の層構造を持たずに束縛水の層のみを持っており、その水和水は低温・高圧下での自由水の氷様秩序構造形成を阻害する。

Na^+ の変性の保護効果が特に高いのは、 Na^+ が構造形成イオンであり、水分子は第一水和圏である結合水の層で強く配向されることを反映していると考えられる。 Li^+ が特殊な傾向を示すのは、このイオンの周りの水分子が4面体配位を取り、これが同様に4面体配位を取る氷様秩序構造とうまくフィットするためと考えられる。この考えは4面体型の配

位構造を取る NH_4^+ が Li^+ と同じ程度の保護効果を示すことから頷ける。

したがって、カルボキシペプチダーゼ Y の低温加圧変性は溶媒である水の構造変化あるいは状態変化がタンパク質の天然の構造の安定化因子である非共有結合性相互作用を弱めることによって現れる現象であると説明できる。

本実験で用いた温度と圧力の範囲内では、水は液体もしくは I 型の水の状態で存在している。本実験のように低温下で加圧する際、試料は凍結や融解を経るので、この相変化が酵母の失活にどのように影響を与えるかも結果の解釈に考慮しなければならない。しかし、0.1 MPa (大気圧) において、室温の試料を -20°C で凍結し、最大 180 分後に室温で融解させても生残菌数はほとんど減少しなかったことから、凍結することによる失活への影響は、本実験では考慮しなくてもよいと考えた。

S. cerevisiae の場合、加圧による失活速度は常温、高温、低温いずれにおいても生残菌数の対数値の減少が加圧時間に対し直線的になり、一次反応に従うことが観察された。*Lactobacillus casei* と *Escherichia coli* の場合も生残菌数の対数値の減少が加圧時間に対し直線であるという報告がある。一方、*Bacillus coagulans* の場合、生残菌数と加圧時間の両方を対数表示した場合に直線関係が得られると報告されている。

一般に加温による微生物の失活速度は一次反応に従うが、この結果を見ると加圧の場合は菌種によって失活速度のパターンが異なるのではないかと考えられる。

酵母の加圧失活の温度依存性が楕円形のグラフを描くということは、球状タンパク質の圧力変性の温度依存性のグラフとよく似ている。同様の現象はバクテリアについても確かめられている。タンパク質の変性曲線と微生物の失活速度曲線が同じようなカーブを描くことの意味を一義的に説明するのは難しいが、ひとつの説明として、微生物の失活は生命活動にとって重要な一つの酵素反応が破壊されることによりもたらされる、という仮説は興味深い。

Fig. 1 でみられるように、添加する物質によっては、温度により異なる影響を与える場合がある。特にマイナスの低温領域では添加物質によって菌の失活が促進されるケースがみられ、低温領域において有効な殺菌を行なえる可能性があるといえる。また、酵母については上記の結果となったが、添加物質の種類や対象とする微生物の種類によって、加圧失活に対する添加物効果が大きく異なるという報告があるので、この現象を食品の加圧殺菌に利用するときにはこれを考慮した十分な検討が必要であろう。

食品の加圧殺菌を -10°C 以下の低い温度域で行なえば、加圧殺菌の特徴である天然に近い風味を残した殺菌が、より低い圧力で可能になる。また、温度と圧力をわずかに加減することによって、殺菌速度が指数関数的に大きく増減することを念頭において殺菌条件を探っていけば、経済的な加圧殺菌条件を設定することができると思われる。

4. 今後の課題

応用を進めるための基礎がためとして考えた場合、タンパク質の変性と微生物の失活に

対する食塩効果を塩類効果に拡張し、各種の塩類の性質と圧力効果との相関関係を解析するような系統的な研究が必要である。

このような当面の課題とは別に、「一体、各種の塩類の溶解度は圧力の下でいかに変化するのだろうか」といった本当に基礎的な物理定数の測定が必要である。これがないと新の理解が得られないからである。しかし、このような根気のいる、苦痛を伴う仕事を手掛けるのは誰であろうか。現在の社会では難も喜ばない。大学で学生の実験訓練に充てる方法があるが、まず敬遠される。そこで、データ収集を大学院学生のアルバイトとしてやってもらおうと一挙両得と思われる。そこで、研究費用として、人件費の計上が許されることが望まれる。

5. 参照

- 1) 林 力丸編、「食品への高圧利用」、さんえい出版 (1989)
- 2) 林 力丸編、「加圧食品—研究と開発」、さんえい出版 (1990)
- 3) 林 力丸編、「高圧科学と加圧食品」、さんえい出版 (1991)
- 4) C. BALNY, R. HAYASHI, K. HEREMANS, and P. MASSON編、「High Pressure and Biotechnology», Colloques INSERM, John Libbey Eurotext, Ltd., France, 1992
- 5) 林 力丸編、「生物と食品の高圧科学」、さんえい出版 (1993)
- 6) 功刀 滋、嶋田昇二、鈴木敦士、林 力丸編、「高圧バイオサイエンス」、さんえい出版 (1994)
- 7) C. HASHIZUME, K. KIMURA, and R. HAYASHI, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1455-1458 (1995)
- 8) T. KINSHO, and R. HAYASHI, in preparation.
- 9) R. Hayashi and C. Balny編、「High Pressure Bioscience and Biotechnology», Elsevier, The Netherland, 1996
- 10) 鈴木敦士、林 力丸編、「高圧バイオサイエンスとテクノロジー」、さんえい出版、(1997)

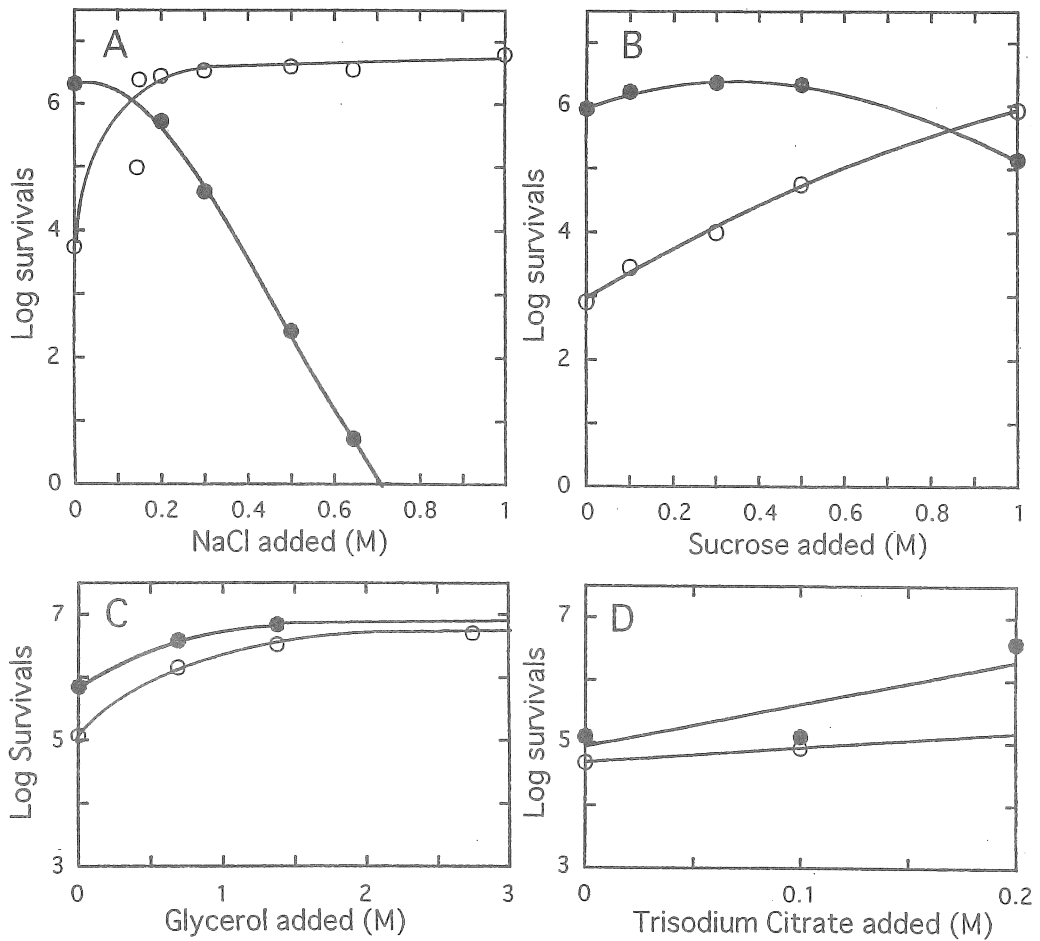


Fig. 1. Effect of sodium chloride (A), sucrose (B), glycerine (C), sodium citrate (D) on the inactivation rate of *Saccharomyces cerevisiae*. Pressurization at 260 MPa for 20 min at 25°C (○) and at 180 MPa for 20 min at -20°C (●).

Effect of Salts on the High Pressure Inactivations of Protein and Microorganism

Rikimaru Hayashi, Hiroshi Ueno, and Shogo Ozawa
Laboratory of Biomacromolecular Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyou-ku, Kyoto 606-01, Japan

SUMMARY

The effects of high hydrostatic pressure at sub-zero temperatures were studied on carboxypeptidase Y (CPY). When CPY was treated with pressure up to 400 MPa at room temperature, the enzymic activity decreased progressively; the maximum effect reached to 40% inactivation at 400 MPa. The effects of pressure and temperature were drastically enhanced when temperature was lowered below -10°C and pressure was maintained at or above 300 MPa, which led to near complete inactivation of CPY. The inactivation of CPY was due to the combination of high pressure and sub-zero temperature. Although the pressure- and sub-zero temperature-dependent inactivation was irreversible at 300 MPa or above, it appeared to be reversible at 100 or 200 MPa. The protective effects of glycerol, sucrose and monovalent cations were also examined. The present study implicates that the changes in interaction between protein and water molecules play the central role in the pressure-induced inactivation of CPY at sub-zero temperature.

Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure treatment from 120 to 300 MPa in the range of -20 to 50°C followed pseudo first order reaction kinetics. The regression analysis of 43 inactivation rates showed that pressurization at sub-zero temperatures (-20 and -10°C) enhanced the effects of pressure as pressurization at higher temperatures: *i. e.*, pressurization at 190 MPa and -20°C gave the same effects as pressurization at 320 MPa and room temperature. The results imply that high pressure treatment applied to food sterilization at lower temperatures has a greater effect with smaller pressure without destroying the original taste and flavor. Additional effects of sugars and salts on inactivation of yeast are also described.