

熱処理スルメイカ筋肉の乾燥過程中的誘電特性に及ぼす疎水性水和構造について

藤田真由美*・川合祐史*・猪上徳雄

Dielectric Properties on Hydrophobic and Porous Area of Heat-treated Squid Muscle under Drying Process

Mayumi FUJITA*, Yuji KAWAI* and Norio INOUE

はじめに

前報¹⁾では、スルメイカ外套筋の乾燥過程中的誘電緩和時間 (τ) の測定により水分子の易動性 (動き易さ) を検討した結果、 τ の不連続な現象が認められ、この現象には乾燥過程中的に起こるタンパク質分子の変性と接近 (凝集) が大きく関わっていることを明らかにした。

本研究においては、スルメイカ外套筋をあらかじめ熱処理を行いほぼ完全に变性させた試料を用いることにより、タンパク質の变性による組織構造の違いが乾燥過程中的の水分子の易動性と強く関わっていることが示唆されたのでその結果を報告する。

試料と方法

1. 試料の調製

(1) 熱処理スルメイカ乾燥試料

船上で急速凍結したスルメイカ (*Todarodes pacificus*) を試料とした。さい割して剥皮したスルメイカの胴肉外套筋をラップで密閉し、電気定温乾燥器 (DV41、ヤマト科学) を用いてイカ肉の中心部が80℃に達するまで90℃で予備加熱を行い、さらに80℃で30分間加熱して筋原繊維タンパク質を变性させた²⁾。再度ラップで密閉して試料内部の水分を内部拡散させて均一化するために4℃で一晩静置した後 (あん蒸)、恒温恒湿器 (IG-42M、ヤマト科学) を使用して25および40℃、相対湿度60%で50時間まで送風乾燥を行った (それぞれの試料をH-25およびH-40とする)。乾燥後ラップで密閉しさらに一晩あん蒸した (Fig. 1)。

Heat - treated squid

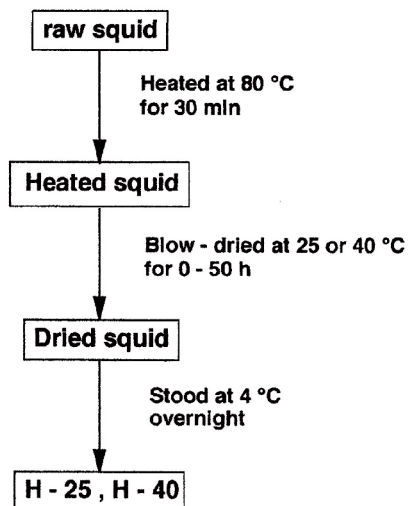


Fig. 1. Preparation of heat-treated dried squid samples.

2. 誘電特性の測定³⁾

調製した各乾燥試料は直径30 mmの円状に切り取り、誘電体損測定器 (TR-10C、安藤電気) を使用して、30 Hz~3 MHzの周波数 (f) で誘電率 (ϵ') と誘電損失 (ϵ'') をそれぞれ測定した。 $\log f - \epsilon''$ 曲線から緩和周波数 (f_r) を求め、誘電緩和時間 (τ) を算出した。

3. 水分量の測定¹⁾

各試料の水分量 (%) は105℃常圧加熱乾燥法によって測定し、同時に乾量基準 (無水物当たり) の含水率 (g/g solid) も算出した。

*北海道大学大学院水産科学研究院

4. タンパク質の自然蛍光の測定¹⁾

調製した各試料を3.5×1.8 cmの大きさに切り取って固体試料ホルダーにセットし分光蛍光光度計 (F-2000、日立) を用いて、励起波長288 nm、蛍光波長332 nmで試料表面のタンパク質に由来する蛍光強度を測定した。また、試料の高さの半分からスライスした断面 (切断面) の蛍光強度も測定した。

5. 試料の可溶化率の測定

調製した各試料 (H-25およびH-40) の可溶化率 (%) を前報¹⁾と同様の方法で算出した。可溶化溶液としては、①0.6 M KCl - 20 mM Tris - HCl緩衝液 (pH 7.5)、②0.6 M KCl - 1.5 M 尿素 - 20 mM Tris - HCl緩衝液 (pH 7.5)、③0.6 M KCl - 8 M 尿素 - 20 mM Tris - HCl緩衝液 (pH 7.5) を用いた。0.6 M KCl、1.5 M 尿素および8 M 尿素はそれぞれイオン (静電) 結合、水素結合および水素結合と非極性 (疎水性) 結合

を切断する¹⁾。なお、タンパク質濃度は牛血清アルブミン (画分V、A-4503、Sigma) を標準としてBCA (ビシニコニン酸) 法⁴⁾により測定した。

6. 乾燥速度の測定

調製した各試料 (H-25およびH-40) の各時間における含水率 (g/g solid) および乾燥速度 (g/h) を前報¹⁾と同様の方法で算出した。

結果と考察

(1) 熱処理試料の乾燥過程における物性変化および誘電緩和時間の変化

熱処理試料は、乾燥が進むにしたがい黄色に近い茶色へと変化し、透明感は消失した (Table 1)。乾燥による厚みの減少程度は前報¹⁾の試料 (非熱処理試料) よりも小さく、非常に硬くなり、筋繊維の走方向に沿って非常に砕けやすく、脆い性質を示した。

Table 1 Changes in appearance and texture of heat-treated squid during the drying process.

| | Texture | Color | Thickness |
|-----------|---------|-----------------|-----------|
| H- 25, 40 | boiled | white | 6.8 mm |
| | ↓ | ↓ | ↓ |
| | hard | yellowish brown | 5.3 mm |

H-25およびH-40は、乾燥前に十分な加熱処理を行っていることから、タンパク質はほとんどが変性状態にあると考えられる⁵⁾。この外套筋の厚みは熱処理と乾燥によって22.1%減少した。これに対して同様の乾燥による非熱処理試料の厚み減少は61.3%であった¹⁾。熱処理 (80℃、30分) により、試料に存在する細胞間隙その他の網状構造や小さな孔を構成⁶⁾するタンパク質は熱凝固し、その後の乾燥時の収縮率も小さく、脆いことから組織全体が多孔質 (porous) となっていることが推定された。また、乾燥過程における試料の収縮程度が小さいことは、タンパク質の密度の上昇が抑えられたことを意味し、タンパ

ク質凝集すなわち、タンパク質分子の接近が生じにくいことを示している。

送風乾燥過程中の水分量 (%) および含水率 (g/g solid) に対する誘電緩和時間 (τ) の変化をそれぞれ Fig. 2および Fig. 3に示した。

乾燥前の熱処理を施した試料の水分量は70% (含水率2.33 g/g solid) であり、 τ は 1.79×10^{-6} 秒であった。前報¹⁾の非熱処理試料の τ は 3.5×10^{-7} 秒 (水分量74%、2.85 g/g solid) であったことから、熱処理変性によってスルメイカ肉中のタンパク質の保水能が低下し、自由水が相対的に増えて³⁾流失した分、わずかに易動性の低下が認められた。

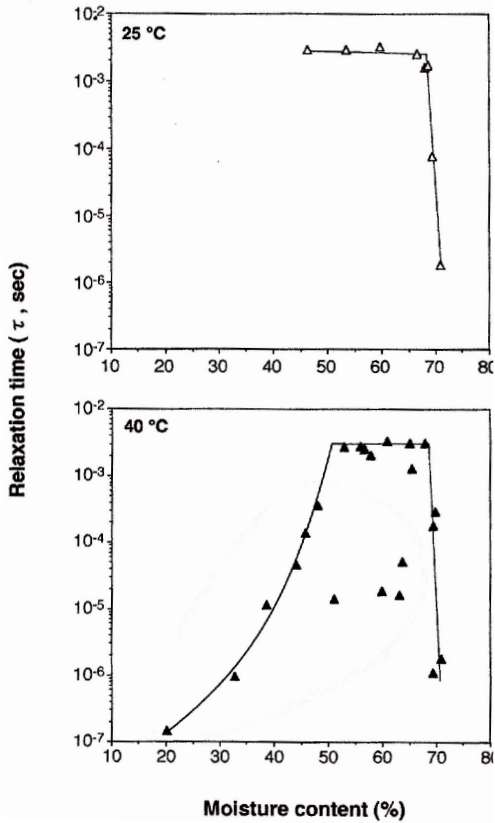


Fig.2. Relationship between moisture content (%) and apparent relaxation time (τ) for heat-treated squid dried at 25 and 40°C.

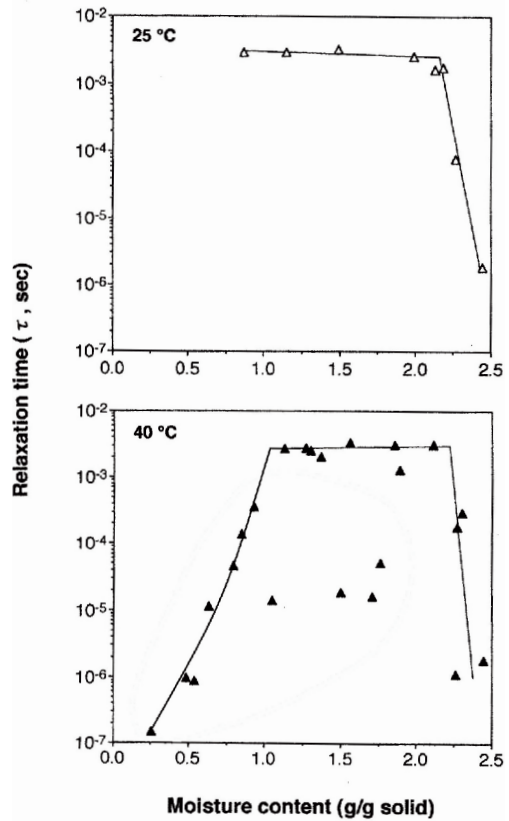


Fig.3. Relationship between moisture content (g/g solid) and apparent relaxation time (τ) for heat-treated squid dried at 25 and 40°C.

H-25は乾燥初期に急激に τ の値が増大した。これはタンパク質の熱変性による変性やそれに伴う保水能の低下に起因して結合水領域の水分の減少に伴い自由水領域の水分の増加したためである⁷⁾。水分量が68.6% (2.19 g/g solid) まで低下すると τ は 1.71×10^{-3} 秒になり、その後 τ の値は乾燥が進んでもほぼ一定であった。水分量47% (0.89 g/g solid) 以下になると $\log f - \varepsilon''$ 曲線で f_r の極大が検出できず τ は算出できなかった。すなわち、H-25では非熱処理試料 (N-25)¹⁾ と異なり、水分 $\cdot \log \tau$ の関係が不連続な直線ではなく、 τ が 1.71×10^{-3} 秒 (水分量68.6%、2.19 g/g solid) を屈曲点とする2本の直線で示された。

また、H-40においても非熱処理試料 (N-40)¹⁾ とは異なり、H-25と似た屈曲点を持つ2本の直線

を含む台形に類似した τ 値の分布を示した (Fig. 2およびFig. 3)。H-25と同様に水分量が70% (2.33 g/g solid) から68% (2.13 g/g solid) まで減少したとき、 τ の値は 1.79×10^{-6} 秒から 3.03×10^{-3} 秒に急激に増大した。そして水分量68~51%の範囲の τ は、ほぼ 3.03×10^{-3} 秒を推移したが、他に 2.00×10^{-5} 秒付近の水分子が検出された。このように、ある水分量範囲で易動性の異なる複数の水分子が同時に検出されることは既に報告した⁸⁾。水分量50% (1.00 g/g solid) 以下の範囲では τ の値が徐々に小さく (動き易く) なった。また、乾燥限界 (水分量20%、0.25 g/g solid) では、 τ の値が乾燥前の試料よりも小さくなり、易動性の大きい (動き易い) 水が検出された。低水分量範囲の食品は自由水がほとんど存在しない

ため、一般に水分子は動き難く（束縛度が大きくなる）なるので^{9, 10}、この現象は極めて特異である。

このように乾燥温度に違いによって τ 値の分布に差異が生じる理由として、H-25では低温で組織表面からの緩慢な蒸発（表面蒸発）が、組織内部の水分の内部拡散とバランスの取れた状態で脱水が進行したこと、そしてH-40では組織表面からの急激な蒸発に伴い組織内部からの水分の移動が乾燥の律速段階になっていること⁶が考えられた。

(2) 乾燥過程における熱処理試料表面タンパク質の疎水性の変化

熱処理により多孔質の組織に変化した試料について前報に準じて¹、乾燥過程における試料表面およびスライス断面（切断面）の疎水性を調べた。

H-25の表面蛍光強度は乾燥過程において徐々に増大した（Fig. 4）。同水分量のときのH-25切断面の蛍光強度は表面より著しく強く、水分の減少に伴って蛍光強度の値はわずかに低下した。H-40についてもH-25と同様の傾向がみられた（Fig. 4）。このように表面で比較的疎水性が小さく切断面で疎水性が大きい理由は、熱処理中の表面では水和水（結合水）が多い状態であり変性に抑制的に働くのに対して、組織内部ではタンパク質の熱変性に加えて微細孔に密閉された vapor に急激に晒されることで強い圧力によるタンパク質の変性と凝集が促進されるためと考えられる。

Fig. 2およびFig. 3における τ の変化は乾燥温度で明らかに違いが認められたが、疎水性変化は試料表面および切断面では乾燥温度による違いはほとんど認められなかった（Fig. 4）。すなわち、蛍光強度に影響を及ぼすタンパク質の変性・凝集は熱処理段階でほとんど完結していることを示している。乾燥過程での厚み減少程度の小さいことから（Table 1）、急速な熱処理をすることで、生に近い規則的で緻密な組織構造を維持したままタンパク質が固定化（凝固）し、全体に多孔質で内部は疎水性の強い構造となったと考えられる。これは乾燥過程での内部からの水分移動がスムーズであることを示唆している。

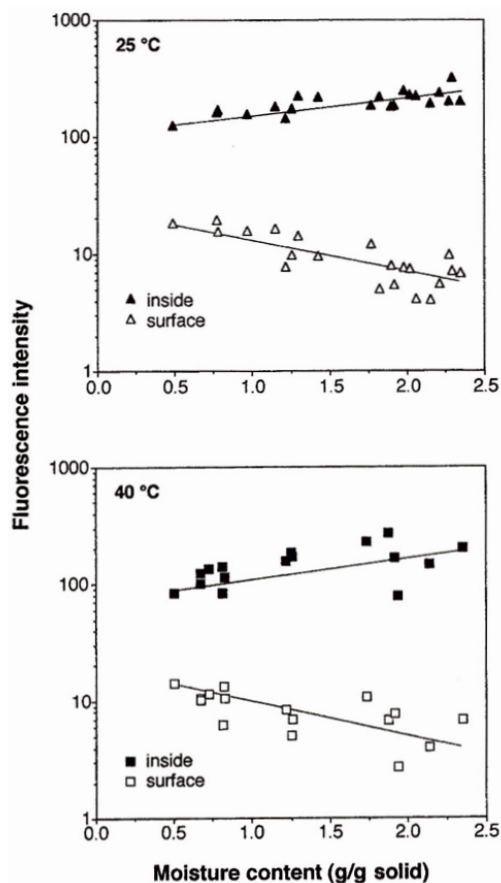


Fig.4. Intrinsic fluorescence intensity of hydrophobic amino acid residue on surface and inside of heat-treated squid during the dehydration at 25 and 40°C.

Fluorescence intensity per 1% solid was represented with arbitrary unit.

これに対して前報¹の非熱処理試料の場合には、外側から徐々に熱が加わることで、乾燥過程でタンパク質分子の変性・凝集が促進され、不規則な組織構造（親水基と疎水基の入り混じったランダム構造）を形成し、この時水分子が配置される表面積の急激な減少が起きることで乾燥過程での内部からの水分移動が凝集に伴い複雑となることが考えられ、これが τ の不連続現象発現の要因となることが強く示唆された。

(3) 乾燥過程における熱処理試料中タンパク質の可溶化率の変化

熱処理試料の蛍光強度は表面よりも切断面の方が大幅に強く、必ずしも試料全体の疎水性変化を反映していないと考えられる。本項では試料内部を含めた試料全体の変性程度を調べるため、熱処理試料の乾燥過程においてイオン結合、水素結合および疎水性結合等の分子間の結合を切断する各種可溶化液に対する溶解度を測定した。

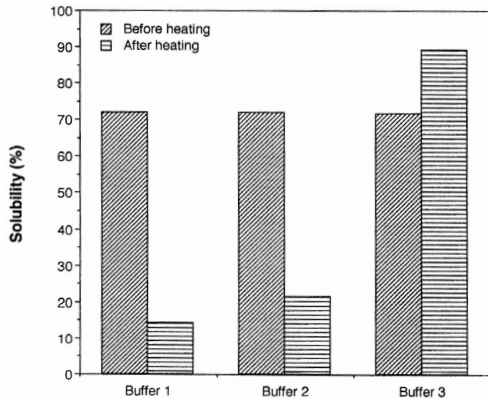


Fig.5. Solubility of proteins against various buffer solutions before and after heat-treated at 80°C for 30 minutes.

Buffer 1: 0.6 M KCl – 20 mM Tris – HCl (pH 7.5)

Buffer 2: 0.6 M KCl – 1.5 M Urea – 20 mM Tris – HCl (pH 7.5)

Buffer 3: 0.6 M KCl – 8 M Urea – 20 mM Tris – HCl (pH 7.5)

Fig. 5に示すように、未乾燥の熱処理試料（水分量69%、2.23 g/g solid）の溶解度は、可溶化液①（Buffer 1）、②（Buffer 2）、③（Buffer 3）に対してそれぞれ14%、22%、89%であった。加熱処理することにより①および②に対する溶解度は著しく低下し、疎水結合を切断する8 M尿素を含む③に対しては高い溶解度を示していた。すなわち、加熱によりタンパク質分子間の疎水結合が大幅に増加した。③に対する熱処理試料の溶解度は、非熱処理試料よりも高かったが、これは加熱処理したことによりスルメイカ筋肉中のコラーゲンが変性し溶出しやすくなったためと考えられる。

乾燥過程においては、H-25の乾燥限界（水分量19%、0.23 g/g solid）における可溶化率は①11%、②12%、③73%であった（Fig. 6）。H-40

が乾燥限界にまで達すると（水分量20%、0.25 g/g solid）、可溶化率は①12%、②10%、③80%であった（Fig. 7）。このように、乾燥過程においてH-40、H-25とも各種可溶化溶液に対するタンパク質の溶解度の変化は小さかった。しかしながら、乾燥限界においてはわずかに存在した水素結合の消失と③に対しても溶解しにくい結合がわずかに増加する傾向が認められた。このことは、乾燥前の加熱処理により疎水結合でタンパク質が変性・凝集し、乾燥過程では疎水結合の形成はさほど進行しないが、さらに強固な結合が形成され、より緻密な多孔質となる可能性が示唆された。

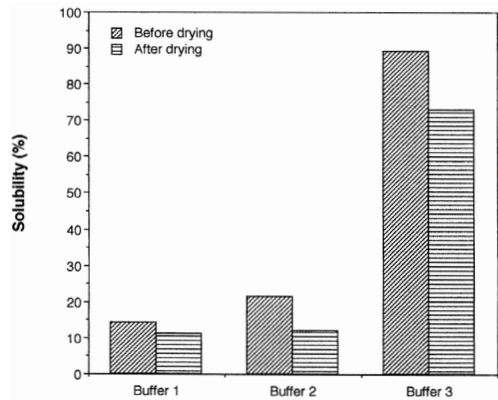


Fig.6. Solubility of proteins against various buffer solutions before and after the drying process at 25°C for 37 h.

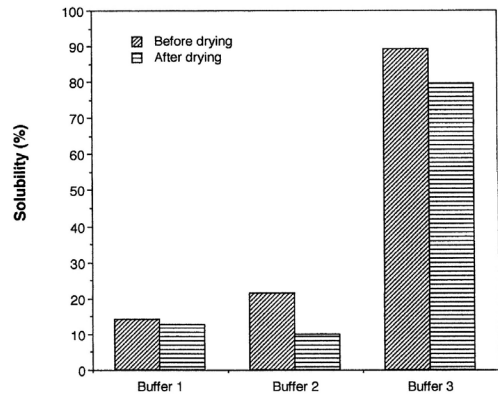


Fig.7. Solubility of proteins against various buffer solutions before and after the drying process at 40°C for 30 h.

(4) 乾燥過程における熱処理試料の乾燥特性

熱処理によって試料の外観およびテクスチャーが前報¹⁾の試料とは異なり、疎水性の多孔質であることが明らかになったことから、次に、これがどのように乾燥過程へ影響しているかを検討した。

H-25およびH-40の含水率と乾燥速度および乾燥時間と乾燥速度の関係をそれぞれFig. 8およびFig. 9に示した。

H-25では含水率が1.99 g/g solidから1.54 g/g solidに減少するまでは恒率乾燥期がみられ、それ以降0.45 g/g solidに至るまではほぼ直線的に乾燥速度が低下した(減率第1段乾燥期)。その後急激に速度が低下(減率第2段乾燥期)し平衡となった。一方、H-40は恒率乾燥期を欠いており、2.1~0.58 g/g solid(減率第1段乾燥期)とそれ以下の水分域においてはほぼ直線的に乾燥速度は低下した(減率第2段乾燥期)(Fig. 8)。

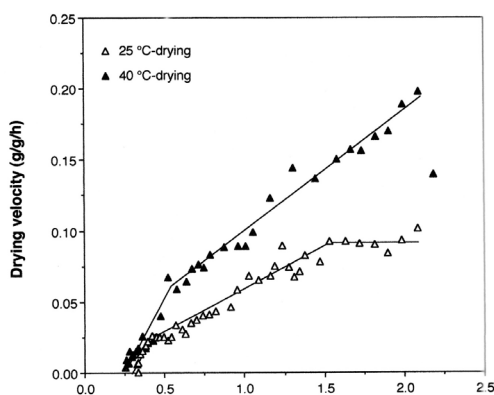


Fig.8. Drying characteristic curves of heat-treated squid during the drying process at 25 and 40°C.

Fig. 3においてH-25では2.19 g/g solid、H-40では2.13 g/g solidに屈曲点が認められたが、乾燥速度との関連性はみられなかった。また、前述したようにH-40の含水率2.13~1.04 g/g solid(水分量68~51%)の範囲では2種類の τ 値(3.03×10^{-3} 秒および 2.00×10^{-5} 秒付近)が認められ、さらに含水率1.00 g/g solid(水分量50%)以下では水分子の易動性が徐々に小さくなった。前者の含水率範囲は、減率第1段乾燥期の前半に相

当し、後者の含水率範囲はその後半に相当していた⁸⁾

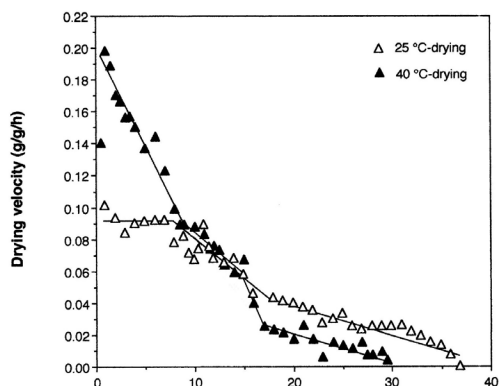


Fig.9. Time course of drying velocity of heat-treated squid during the drying process at 25 and 40°C.

乾燥時間から検討すると(Fig. 9)、最終的な平衡含水率に至るまでに非熱処理試料(N-25)¹⁾では50時間を要したが、H-25では37時間であり大幅な時間短縮が認められた。これはあらかじめ熱処理を行ったことによりタンパク質が疎水性の多孔質組織に変化したことが反映されたためである。H-40では、乾燥時間が15時間以降の減率第2段乾燥期の経過に時間を要し、平衡含水率達したのは30時間後であり、非熱処理試料(N-40)¹⁾とほぼ同様の乾燥時間を要した。この現象には急速な乾燥過程による親水性領域におけるうわ乾き(表面硬化)が関係していると思われる⁸⁾。すなわち、H-40の減率第2段乾燥期では疎水性の多孔質組織からの水分の内部拡散が表層のうわ乾きの影響を受けて強い律速段階^{6, 8)}にあることが強く示唆された。

(5) 多孔質の疎水性領域および親水性領域の水分子の易動性と存在状態

H-40の水分量68~51%(減率第1段乾燥期の前半⁸⁾)では、水分移動が比較的スムーズであると考えられ、疎水性領域からの蒸発(ガス状水分子、vapor)と親水性領域での凝縮を繰り返して乾燥が進行する。しかし、測定試料毎にその状況が異なり水分子の τ が一定の値を検出できる状態ではなく 10^{-3} 秒~ 10^{-5} 秒の値を示した。そして、

水分量50%以下では徐々に τ の値が小さくなり水分子の易動性が大きくなる現象を確認した。その理由を親水性領域と疎水性領域の水分子の状態から以下のように考察した。

誘電体損測定器で検出される水分子情報は定量的ではなく、相対的に多い水分子の状態を検出していることから、水分量68~51%の範囲では多孔質の疎水性領域に存在する水分子が相対的に多い時(試料)では易動性が大きい(動き易い)水分子(τ が約 10^{-5} 秒)が検出され、親水性領域の水分が相対的に多い場合(試料)では易動性の小さい(動きにくい)水分子(約 10^{-3} 秒)が検出されたと考えることができる。

水分が51%付近では、親水性領域の40℃で蒸発可能な水分(τ が約 10^{-3} 秒)はほとんどない状態となる。また、25℃乾燥より高温であるため、より単分子収着水に近い多分子層収着水に近接する τ が約 10^{-3} 秒より強く結合している結合水が蒸発している可能性が高い。ここで残存する水分は測定機器の検出外の動きにくい水分子である。さらに、タンパク質の可溶化率の項で示唆されたように乾燥によって、より緻密な多孔質となったことで、蒸発しにくくなるため⁸⁾水分移動が難しくなり、疎水性領域に留まる水分子が多くなる。

次に、水分量50% (1.00g/g solid) 以下の減率第1段乾燥期の後半⁸⁾では、親水性領域の水分は検出されないことから疎水性領域の疎水性水和水およびそのvaporが動き易い(易動性の大きい) τ として検出される。疎水性水和水に関する結合は水分子同士の結合に比べてあまり強くないことが知られているので¹¹⁾、 τ は 10^{-4} 秒以下と推定できる。この場合、水分量(含水率)の減少に伴い水分子が動き易くなった理由は、疎水性領域の疎水性水和水がvaporとして蒸発して減少することによる水分子密度の減少が要因と考えている。

これらの考えに基づいてH-25の状態を考えると、表面での蒸発は比較的緩やかであり、ほとんどうわ焼きも生じていないことから疎水性領域より移動してきた水分子は親水性領域の凝縮水(τ が約 10^{-3} 秒)となり、乾燥が継続する(水分量86.8~47%の範囲)。水分量47%以下では τ が約 10^{-3} 秒の水分は蒸発してなくなっているが、緩慢な蒸発条件であるので、多分子層収着水に

近接する τ が約 10^{-3} 秒より強く結合している結合水は親水性領域に確保されていると推定される。したがって、水分量は疎水性水和水より相対的に多く存在したが、測定器で検出できない運動性(10^{-2} 秒以上)であるために測定できなかったと考えられる。このような条件により、疎水性の多孔質からの水分移動がスムーズに進行し、大幅な乾燥時間の短縮につながったといえる。

この熱処理試料の疎水性で多孔質な組織における水分移動に基づき、前報¹⁾で水分子の易動性の不連続な変動が認められた理由を考察すると、非熱処理試料では外側から徐々に熱が加わることで、乾燥過程での試料の収縮も大きく(試料厚みが61.3%減少)、タンパク質分子の変性・凝集が促進されることから、不規則な組織構造(親水基と疎水基の入り混じったランダム構造)を形成して水分子が配置される表面積の急激な減少が繰り返されることが τ の不連続現象発現の要因となっていることが裏付けられた。

まとめ

本研究においては、スルメイカ外套筋をあらかじめ熱処理(80℃、30分)を行うことでタンパク質をほぼ完全に変性させた試料を使用し、送風乾燥(25℃および40℃)を行い、熱処理によるタンパク質の構造変化が水分子の誘電緩和時間(τ)に及ぼす影響について検討した。

1. 熱処理によって疎水性で緻密な多孔質の構造となることで、非熱処理試料とは異なり不連続な直線で表される τ の現象が認められなかった。
2. 送風乾燥温度40℃の乾燥過程中に τ は特異的なパターンを示し、水分量50%以下の範囲で τ が徐々に短くなり、水分子が動き易くなる結果が得られた。これは従来の考え方では説明できない特異的な現象であった。
3. この特異な現象を熱処理試料の物性、疎水性の検討、タンパク質の可溶化率の変化、乾燥特性により総合的に検討した結果、あらかじめ行った熱処理によりスルメイカ外套筋組織が疎水性で緻密な多孔質の構造となったことが強く関わると判断された。
4. 25℃送風乾燥では水分蒸発が緩慢であり、水分量が47%以上の範囲において表面の親水性領域からの水分蒸発と多孔質の疎水性領

域からの内部拡散による疎水性水和水の蒸気 (vapor) 移動のバランスが取れた状態で乾燥が進行したことにより、単純な2直線で表せる τ で説明が可能であった。

5. 40℃送風の急速な乾燥では、水分量が68～51%の範囲において内部拡散による水分移動がスムーズであり、親水性領域の水和水と疎水性領域の水和水の存在量が試料毎に状況が異なるため相対的に多い方が τ として検出されるので2種類の τ が検出されたこと、また、水分量50%以下になると、疎水性領域の水和水が検出され、vaporの密度の減少に伴い水分子が動き易くなり、これが検出されたと推察された。

引用文献

- 1) 藤田真由美, 川合祐史, 猪上徳雄 (2020) : 乾燥過程中的スルメイカ筋肉中の水和水の挙動に及ぼすタンパク質特性の変化, 函館短期大学紀要, **47**, 27-36.
- 2) Y. Mochizuki, H. Mizuno, H. Ogawa, K. Ishimura, H. Tsuchiya, and N. Iso (1995) : Changes of rheological properties of cuttlefish and squid meat by heat treatment. *Fisheries Sci.*, **61**, 680-683.
- 3) 椎谷美佳, 川合祐史, 猪上徳雄 (2020) : 加圧脱水すり身の水和水の誘電特性, 函館短期大学紀要, **47**, 19-25.
- 4) P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Henmanson, A. K. Mallia, F. H. Bartner, M. D. Prevezano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk (1985) : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- 5) 菅原龍幸, 福澤美喜男 (2008) : 第7章 食品成分の変化.「Nブックス 食品学 I (第2版)」(菅原龍幸, 福澤美喜男編著), 建帛社, 東京, pp.150-186.
- 6) 野口 駿 (1992) : 8.吸湿と乾燥「食品と水の科学」(野口 駿著), 幸書房, 東京, pp.169-211.
- 7) 鈴木たね子 (1973) : 水産食品中の水-核磁気共鳴 (NMR) による測定-。「食品の水-水分活性と水の挙動」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京, pp25-37.
- 8) 小辻一幸, 猪上徳雄, 川合祐史 (2018) : イカ胴肉乾燥品中の水和水の挙動 (2) 煮熟とあん蒸処理の影響について, 函館短期大学紀要, **44**, 1-7.
- 9) N. Inoue, R. Hamahata, Y. Minegishi, and H. Shinano (1993) : The dielectric properties and mobility of hydrated water in dehydrated kamaboko. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1381-1388.
- 10) 猪上徳雄, 水上統太 (2014) : 乾製品中に存在する水の運動性について, 函館短期大学紀要, **40**, 13-19.
- 11) 野口 駿 (1992) : 10.結合水と自由水.「食品と水の科学」(野口 駿著), 幸書房, 東京, pp.227-263.