

ソルビトール処理スルメイカ筋肉の乾燥過程中的の
たんぱく質凝集に及ぼす水和水の影響

藤田真由美・川合祐史・猪上徳雄

**Influence of Hydrated Water on Protein Coagulation of
Sorbitol-treated Squid Muscle under Drying Process**

Mayumi FUJITA, Yuji KAWAI and Norio INOUE

函館短期大学紀要

第49号

2022年3月

【原著論文】

ソルビトール処理スルメイカ筋肉の乾燥過程中的 たんぱく質凝集に及ぼす水和水の影響

藤田真由美¹・川合祐史¹・猪上徳雄²

Influence of Hydrated Water on Protein Coagulation of Sorbitol-treated Squid Muscle under Drying Process

Mayumi FUJITA¹, Yuji KAWAI¹ and Norio INOUE²

¹北海道大学大学院水産科学院, ²函館短期大学

¹Fisheries Science of Graduate School of Hokkaido University

²Hakodate Junior College

ソルビトールで処理したスルメイカ外套筋を用いて、乾燥過程中的タンパク質の変性抑制を水和水の存在状態から説明することを目的とした。試料は1.5Mソルビトール溶液に浸漬した後、25℃および40℃で送風乾燥を行って調整した。水分量、誘電緩和時間、疎水性相互作用、タンパク質の可溶化率、乾燥速度を指標とした。(1) 乾燥初期の第一段減率乾燥期間の水分域を含む毛管凝縮水域では、可溶化率および蛍光強度からソルビトールによりタンパク質の変性が抑制されていることを確認した。多分子層収着水領域に達する乾燥過程でソルビトールに配位する水和水により乾燥中の脱水効率は高まり、水分子の再分布（再配位）が起こり、易動性の高い水分が効率よく除かれた。(2) 続く第二段減率乾燥期間を含む多分子層収着水域では、乾燥限界（水分量約24%）に達するまで蛍光強度の増加を伴い、律速状態の内部拡散によりタンパク質周囲の水分子は効率よく除かれて多孔質の疎水性領域の形成が進行した。そして、(3) 乾燥限界域（水分量約24%）においては多孔質の疎水性領域における易動性の高い水分子が存在していた。これらの事実から、毛管凝縮水域から多分子層収着水領域をとおして水分子がソルビトールの水和水として配位することでタンパク質の不規則な凝集を制御しながら乾燥過程中的タンパク質変性を抑制していることを明らかにした。

キーワード：スルメイカ, ソルビトール, 誘電緩和時間, 疎水性相互作用, 水和水

1. はじめに

前報では、生の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、含水率の低下過程で τ の不連続な現象が認められた¹⁾。また、乾燥前に熱処理を行うことで不連続現象とは異なる変化を示した²⁾。前者は乾燥過程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、後者は熱凝固した多孔質の疎水性領

域が強く関わっていることを明らかにした。このように乾燥過程中的 τ の変動には、いずれにおいてもタンパク質の構造変化の関与が大きく影響していると考えられた。

本研究においては、スルメイカ外套筋をあらかじめタンパク質の生化学的活性の変性防止剤として広く用いられているソルビトールにより処理を行い、外套筋の変性を抑制しながら乾燥を行うことで、水分子の誘電緩和時間 (τ) の変化から多

分子層収着水領域で効率的な脱水が行われること、それ以前の毛管凝縮水域～第一段減率乾燥期間の前半では τ 変動は起こるがタンパク質の凝集に伴う疎水性の変化は最小限に抑えられていることが明らかになったので報告する。

2. 試料と方法

1. 試料の調製

(1) スルメイカ外套筋のソルビトール処理

試料には、船上で急速凍結したスルメイカ (*Todarodes pacificus*) を用いた。さい割して剥皮したスルメイカの外套筋を5.5×6.0 cmに切りそろえ、ソルビトール溶液 (1.5 Mソルビトール-20 mM Tis-HCl緩衝液、pH 7.0) に4℃で24時間浸漬した。一夜あん蒸した後、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%で最長50時間まで送風乾燥を行った (Fig. 1)。乾燥後、試料を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 (あん蒸) した (それぞれの試料をS-25およびS-40とする。)

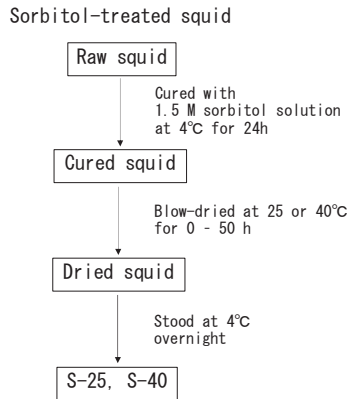


Fig. 1. Preparation of sorbitol-treated dried squid samples.

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 , sec) 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。

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、分光蛍光光度形 (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。

5. 試料の可溶化率の測定

調製した各試料 (S-25およびS-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 Tis-HCl緩衝液 (pH 7.5)、②0.6 M KCl-1.5 M尿素-20 mM Tis-HCl緩衝液 (pH 7.5)、③0.6 M KCl-8 M尿素-20 mM Tis-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 (ビシコンニン酸) 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/g /h) を前報¹⁾と同様の方法で算出した。

3. 結果と考察

(1) 乾燥過程におけるソルビトール処理試料の誘電緩和時間の変化

ソルビトール浸漬処理後のイカ筋肉中のソルビトール濃度は、0.73 mol/kg (約13%に相当) であった。その後乾燥に供したところ、乾燥に伴って試料の厚みは減少していったが、乾燥が進んでもあ

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

	Texture	Color	Thickness
	raw, not swollen	milk white	6.2 mm
S-25, 40	↓	↓	↓
	soft	yellowish brown	3.1 mm

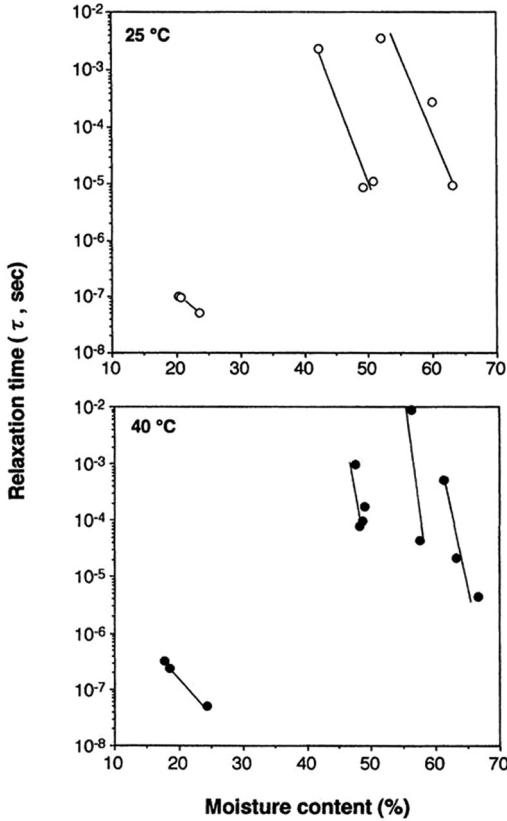


Fig. 2. Relationship between moisture content (%) and apparent relaxation time (τ) for sorbitol-treated squid dried at 25 and 40°C.

まり硬くならず引つ張ると伸びるくらいのソフト感があった。色の変化も未処理試料とは違い、徐々に黄色に近い茶色へと変化していった (Table 1)。ソルビトール濃度は、2.3 mol/kg (約42%に相当) まで濃縮された。ソルビトール浸漬後の水分量は66.5%であり、前報¹⁾の未処理試料の74%より低下していた。

乾燥過程におけるイカ肉の水分と $\log \tau$ の関係を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。乾燥前の未処理イカ肉の τ が 3.5×10^{-7} 秒 (0.35 μ sec)¹⁾ であったのに対し、ソルビトール処理した試料では 4.5×10^{-6} 秒 (4.5 μ sec) であった。このことは、ソルビトールによって組織中の水分子の易動性が抑制されたことを示唆している。25°C と 40°C の両乾燥温度条件においても、未処理乾燥試料¹⁾ と同様に、水分 - $\log \tau$ の関係は不連続なものであった。

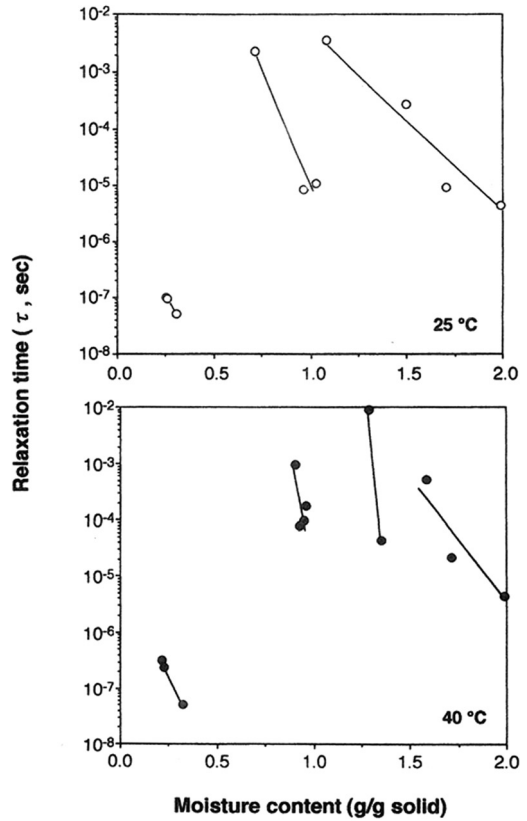


Fig. 3. Relationship between moisture content (g/g solid) and apparent relaxation time (τ) for sorbitol-treated squid dried at 25 and 40°C.

25°C 乾燥試料 (S-25) では、乾燥が進むにつれて τ の値が 4.5×10^{-6} 秒 (4.5 μ sec) から 3.5×10^{-3} 秒 (3.5 msec) まで上昇した。水分量が 51~53% (1.03~1.08 g/g solid) のとき τ の値は急激に低下し、 1.1×10^{-5} 秒 (11 μ sec) になった。さらに乾燥が進むと τ は 2.4×10^{-3} 秒 (2.4 msec) まで増加し、水分量 24% (0.31 g/g solid) のとき 0.5×10^{-7} 秒 (0.05 μ sec) まで低下した。その後 τ はわずかに上昇した。ソルビトール処理試料 (S-25) では、水分量 24~42% の範囲で τ が検出されなかった。しかし、前報¹⁾の未処理試料 (N-25) ではこのような τ の未検出範囲は認められておらず、ソルビトール処理の影響と考えられた。

40°C 乾燥試料 (S-40) では、乾燥によって τ の値が 4.5×10^{-6} 秒 (4.5 μ sec) から 5.2×10^{-4} (520 μ sec) 秒まで増加した。その後未処理試料お

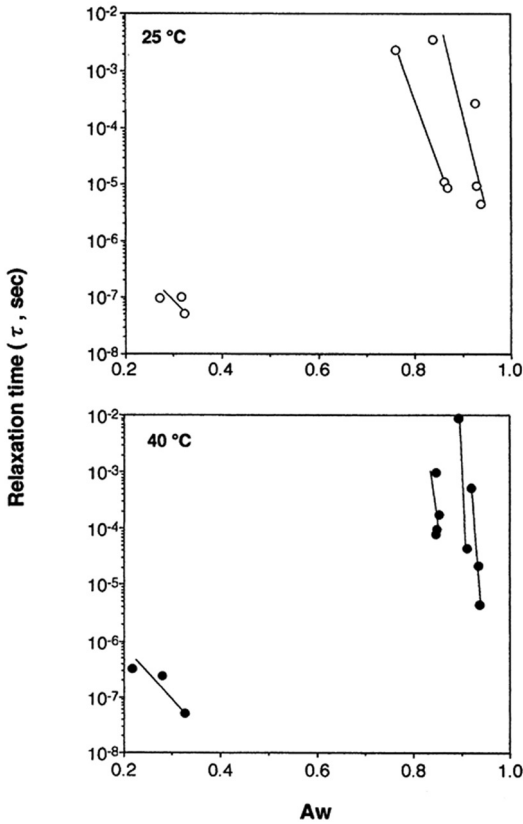


Fig. 4. Relationship between water activity (A_w) and apparent relaxation time (τ) for sorbitol-treated squid dried at 25 and 40°C.

びソルビトール処理試料の25°C乾燥と同様に、水分量約57、49、24~45% (1.35、0.95、0.32~0.80 g/g solid) で τ の値が大幅に低下した。ソルビトール処理試料 (S-40) では、水分量24~45%の範囲で τ が検出されなかったが、未処理試料 (N-40)¹⁾の τ 未検出範囲は水分量24~30%であり、未検出範囲の広がったことが認められた。

Fig. 2およびFig. 3において直線の傾きがS-40の方がS-25に比べて急であるのは、高い乾燥温度による水分の変動が τ の変化に大きく影響していることを示している。両乾燥温度において水分子がソルビトールに配位することで水分子の易動性が抑制されたことが推察された。

水分活性 (A_w) - $\log \tau$ の関係を見ると、 A_w 0.33~0.74 (S-25) および0.35~0.82 (S-40) の A_w 域では緩和周波数 (f_r) が検出されなかつ

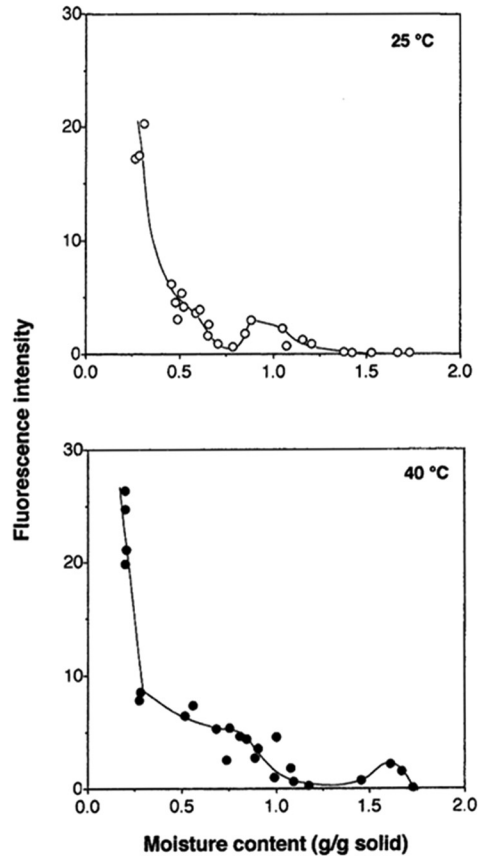


Fig. 5. Intrinsic fluorescence intensity of hydrophobic amino acid residue on surface and inside of sorbitol-treated squid during the dehydration at 25 and 40°C.

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

たため、 τ は算出できなかった (Fig. 4)。これらの範囲は一般的な乾燥過程の多分子層収着水に相当する範囲と一致していた⁵⁾。

このように、ソルビトールによるタンパク質の変性を抑制した試料においては、未処理試料と同様に τ の不連続化現象を認め、 τ の未検出範囲に広がりを示したことが特徴であり、ソルビトールがタンパク質の変性・凝集に影響を及ぼした結果であると考えられた。

(2) 乾燥過程におけるソルビトール処理試料表面タンパク質の疎水性変化

ソルビトール処理試料の乾燥過程における試料表面のタンパク質の固有蛍光強度の変化は、未乾燥状態のソルビトール処理試料表面の疎水性アミノ酸残基に由来する蛍光強度は微小で、25°C送風乾燥試料 (S-25) および40°C送風乾燥試料 (S-40) は、既報¹⁾の未処理試料 (N-25およびN-40) と比較して乾燥過程全体として蛍光強度の値が大幅に低かった (Fig. 5)。

含水率0.4 g/g solid以上の範囲ではS-25の値がS-40の値より小さい傾向にあった。しかし、S-25は含水率が0.9~1.05 g/g solid付近で蛍光強度の一時的な増大が認められ、さらに含水率が約0.7 g/g solid以下で0.5~0.6 g/g solidにシヨルダーを伴って増大し始め、乾燥限界の0.25 g/g近くでさらに急激に増大し、最大に達した。S-40は乾燥過程で含水率が約1.6 g/g solid付近で小さなピークが認められ、1.1 g/g solid付近から蛍光強度は0.7~0.8 g/g solidにシヨルダーを伴って徐々に増大する傾向を示し、乾燥限界 (含水率0.24 g/g solid) 近くではさらに大幅に増大して最大になった。すなわち、両乾燥試料ともソルビトールの作用によって表面タンパク質の疎水性の増大が全体的に抑制された状態であることが確認できた。このことは、 τ の不連続が起こる含水率付近で疎水性の増大が起こっており、両者の関連性が示唆された。

特徴的なのは、S-25およびS-40の両者とも乾燥限界直前で疎水性が増大した時に τ の値が 10^{-7} 秒 (約0.1 μ sec) となったことである。同様の現象は無処理試料 (N-25およびN-40) においても認められている¹⁾。また、これらの現象は熱処理試料の40°C乾燥過程においては、疎水性領域の疎水性水和構造が τ の易動性に大きく影響していることから裏付けられる²⁾。

(3) 乾燥過程におけるソルビトール処理試料中タンパク質の可溶性率の変化

イカ肉を1.5 Mのソルビトール溶液に24時間浸漬した後乾燥すると、乾燥限界近くまでは試料表面の疎水性の増大は全体的に抑えられるが、乾燥限界近くで増大した。そこで、試料表面だけでなく組織内部のタンパク質の変性度合を知るため、各種可溶性溶液を用いて、乾燥過程におけるソルビトール処理試料の可溶性率の変化を測定した。未処理試料の乾燥においては、尿素を含まない可

溶性溶液①に対する溶解度の変化が最も大きく、変性に伴う水素結合および疎水結合の増加の指標となったことから、ここでは、溶液①に対する可溶性率について記述する。

Fig. 6に示すように、未乾燥のソルビトール処理試料の可溶性率は76%であった。その後25°C (S-25) および40°C (S-40) での送風乾燥により乾燥限界の可溶性率は、それぞれ72%および63%であった。これは未乾燥時の可溶性率を100%とするとS-25およびS-40の可溶性率は、それぞれ95%および83%となる。ソルビトール処理をしなかった場合¹⁾の25°C (N-25) および40°C (N-40) の乾燥限界では、それぞれ83%および71%であったことから、ソルビトール処理試料の乾燥による変性は10%程度抑制されていることが認められた。疎水性の指標変化 (Fig. 5) も併せて考察すると、両試料とも乾燥過程の大部分において乾燥による変性が抑制されると考えられるが、乾燥限界に達する段階になると変性が進行することが示唆された。

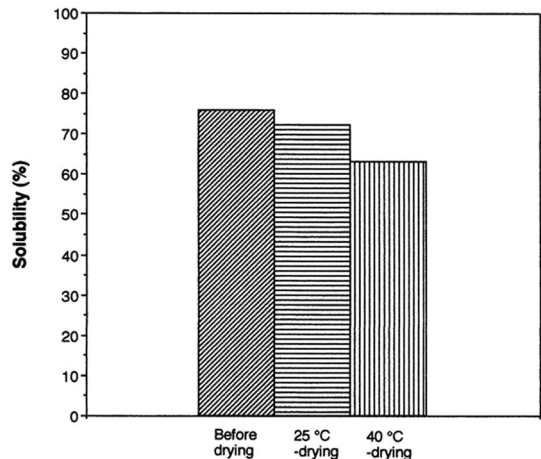


Fig. 6. Protein solubility of sorbitol-treated squid meat against buffer 1 before and after the drying process at 25 and 40°C.

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

(4) 乾燥過程におけるソルビトール処理試料の乾燥特性

S-25およびS-40の含水率と乾燥速度の関係をみると (Fig. 7)、両者ともに未処理試料の乾燥過程でみられた恒率乾燥期間をほとんど欠く状

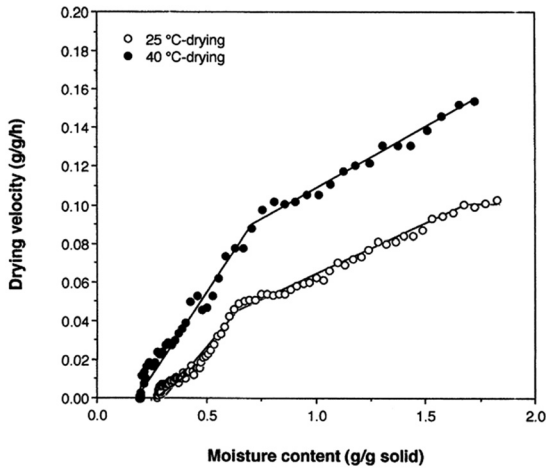


Fig. 7. Drying characteristic curves of sorbitol-treated squid meat during the drying process at 25 and 40°C.

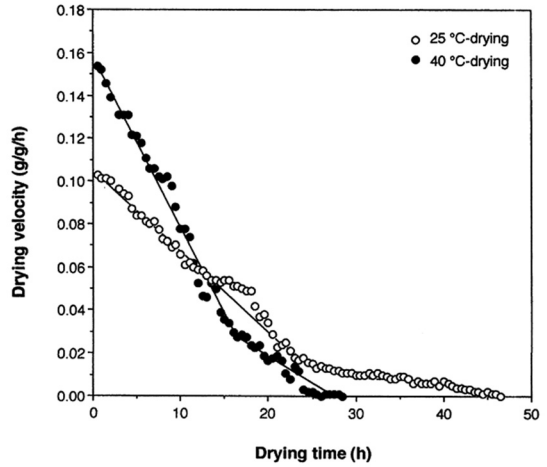


Fig. 8. Time course of drying velocity of sorbitol-treated squid meat during the drying process at 25 and 40°C.

態で、二段階の減率乾燥期間が存在していた。同じ含水率で比較すると、乾燥温度の高いS-40がS-25より常に大きい乾燥速度を維持しており、平衡含水率もS-25より小さく、S-25で0.28 g/g solid、S-40で0.2 g/g solidであった。S-25は乾燥開始時(1.88 g/g solid)から含水率が0.65 g/g solidになるまで緩やかに乾燥速度が落ち(第一段減率乾燥期間)、その後さらに急激な乾燥速度の低下がみられた(第二段減率乾燥期間)。

S-40はS-25と同じく乾燥開始時から速度は低下し、S-25より急激に低下した。第一段減率乾燥期間は0.68 g/g solidを境に第二段減率乾燥期間に入り、その後さらに急激に低下した。

これを前報¹⁾の未処理試料の含水率-乾燥速度の関係(N-25およびN-40)と比較すると、ソルビトール処理試料はソルビトールが浸透したことにより、相対的に乾燥開始時の水分量および限界含水率が未処理試料より低くなっていた。それぞれ74% (2.85 g/g solid) および66.5% (1.99 g/g solid) であった。第二段減率乾燥期間に移行する含水率を未処理試料(N-25、N-40)と比較すると、25°C乾燥ではソルビトール処理によって0.73 g/g solid (N-25) から0.65 g/g solid (S-25) に小さくなり、40°C乾燥では0.41 g/g solid (N-40) から0.68 g/g solid (S-40) へと大きくなった。このようにソルビトール処理を行うことで乾燥温

度によって第二段減率乾燥期間に移行する含水率(境界含水率)が逆の方向に作用した理由をタンパク質の周囲にあるソルビトールに配位した水和水(水-ソルビトール)が乾燥過程で影響したことは以下のように説明できる。低温(25°C)では緩慢な乾燥過程であるので、タンパク質内部から水分がスムーズに移動することにより境界含水率が小さくなった。また、より高温(40°C)の乾燥過程では内部からの水分移動が律速となるため境界含水率が大きくなったと考えられる。

ソルビトール処理試料(S-25とS-40)の乾燥時間に対する乾燥速度(Fig. 8)は未処理試料(N-25とN-40)¹⁾のものよりも全体的に小さい傾向であったが、短時間で乾燥限界に達した。Iseya et al.⁶⁾はソルビトールでホッケおよびスルメイカを処理することによって、30°C、相対湿度60%の送風乾燥でその試料表面から効率的に水分を除去できることを確認しており、本実験においても全体として同様の見解が得られた。

また、誘電緩和時間(τ)が乾燥に伴って急激に低下する水分領域は(Fig. 3)、第一段減率乾燥期間から第二段減率乾燥期間に移行する水分領域とは一致性がなく関連が認められなかった。しかし、第二段減率乾燥期間に疎水性強度が増大するショルダーが形成されること(Fig. 5)、および τ の未検出範囲と一致していることは疎水性結合

(疎水性相互作用) と多分子層収着水における水和水の存在状態が強く影響していることを示唆するものである。

(5) 乾燥過程におけるソルビトール処理試料の水分子の存在形態の変化

糖類は筋原繊維タンパク質の熱変性に対して保護効果があることが知られており、糖の分子構造中の水酸基数が多いものほどその効果は強い傾向にあるということが大泉⁷⁾によって報告されている。また、ソルビトールのタンパク質の変性を抑制する作用は、タンパク質濃度の多少には関係なく溶液中の糖のモル濃度にだけ依存している⁸⁾。

本実験では乾燥によるタンパク質の変性を防止するために、ソルビトール浸漬処理を施した後に乾燥を行った。未処理乾燥試料では¹⁾、乾燥によってタンパク質濃度が高まり、タンパク質分子同士が接近すると同時に、タンパク質表面の水分子が取り除かれてタンパク質分子間に水素結合が増加することや、疎水領域が露出(変性)して疎水結合が増加することによる分子間凝集が、水分 $\log \tau$ の関係において不連続な直線が得られる要因と推測した。

しかし、変性を抑制しながら乾燥したソルビトール処理試料においても同様の現象が見られたということは、この不連続化現象に対してタンパク質変性は必須ではない可能性を示唆している。変性防止剤として糖類を添加したとき、糖類がタンパク質分子の結合水と置き換わって結合してその効果を発揮するのではなく、溶液中の水分子を構造化することによってその効果を発揮すると考えられている⁹⁾ことから、水-タンパク質間の相互作用だけではなく、水を介したタンパク質-ソルビトール間の相互関係が τ の不連続化に関係している可能性も考えられる。

また、ソルビトール未処理試料の40℃乾燥(N-40)では、含水率2.0 g/g solid付近で蛍光強度の増大が認められたが、S-40ではほとんど確認できず、タンパク質の変性が強く抑制されていた。25℃乾燥(S-25)においても同様の傾向を認めた。

乾燥に伴って増大する誘電緩和時間 τ が急激に変動した水分領域は(Fig. 3)、S-25では1.03~1.08 g/g solidおよび0.31~0.65 g/g solidであり、S-

40は1.35~1.60、0.95~1.25、0.32~0.8 g/g solidであった。この変動は蛍光強度の変化が現れる水分領域とほぼ一致していた。

これまでのソルビトール処理試料の特徴を(1)第一段減率乾燥期間の水分域を含む毛管凝縮水域、(2)第二段減率乾燥期間を含む多分子層収着水域および(3)乾燥限界域の3区分から以下のように説明できた。

乾燥初期の第1段減率乾燥期間の水分域を含む毛管凝縮水域では、ソルビトールによりタンパク質の変性が抑制されていることが可溶化率および蛍光強度の変化から明らかであった。このため多分子層収着水領域に達する過程でソルビトールに配位する水和水により乾燥中の脱水効率は高まり、水分子の再分布(再配位)が起こり、易動性の高い水分が効率よく除かれて水分量42~45%付近に至り、水和水の易動性が使用機器の測定範囲外となった。これにより未処理試料¹⁾に比較して τ の未検出水分域が拡大した。

続く第二段減率乾燥期間を含む多分子層収着水域では、乾燥限界(水分量約24%)に達するまでシヨルダーを伴う(Fig. 5)蛍光強度の増加(疎水性領域の形成進行)を伴い、ソルビトールに配位した水和水を介しながら律速状態の内部拡散によりタンパク質周囲の水分子は効率よく除かれて多孔質の疎水性領域の形成されることが示唆された。この過程は、ソルビトールに再分布(再配位)した運動性の高い水和水のモデルを考えることができる(Fig. 9)。

そして、乾燥限界(水分量約24%)においては、多孔質の疎水性領域における易動性の高い τ ²⁾が検出されたことが推定できた。

このような事実から、上記(1)および(2)の区分を通して、ソルビトールの水和水として水分子が制御されることでタンパク質の変性抑制に寄与していることが確認できた。

引用文献

- 1) 藤田真由美, 川合祐史, 猪上徳雄. 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. 2020, **47**, 27-36.
- 2) 藤田真由美, 川合祐史, 猪上徳雄. 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と構造について. 函館短期大学紀

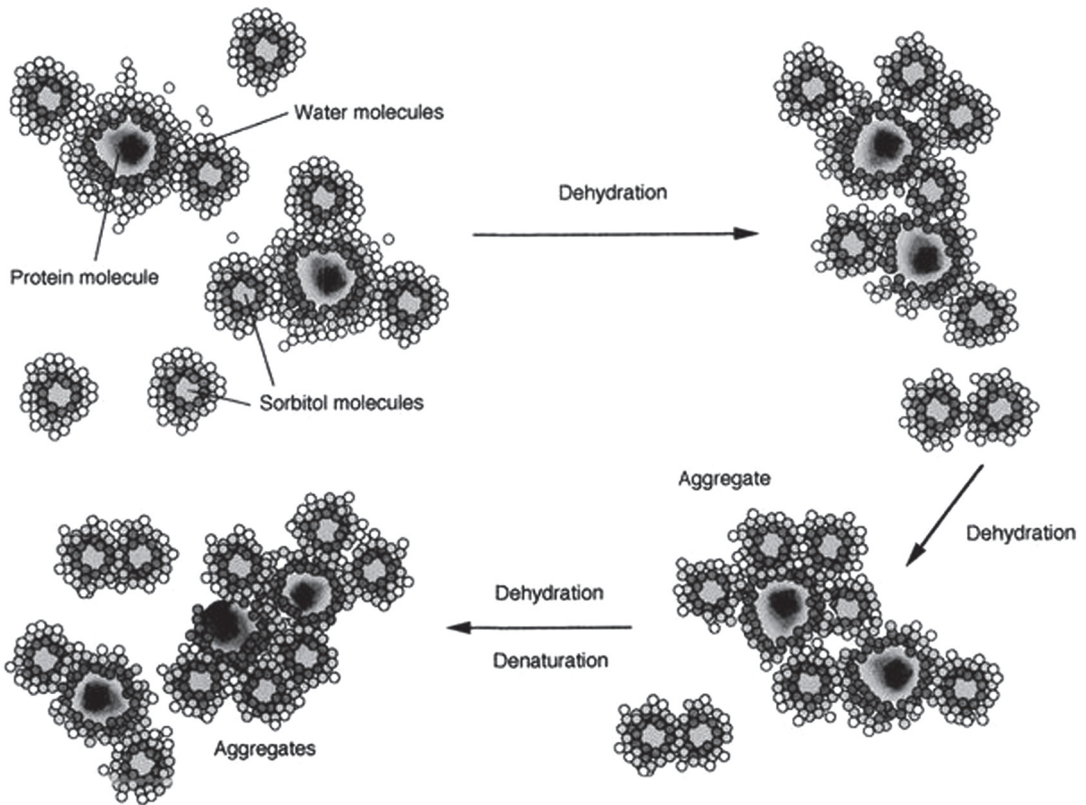


Fig. 9. Predicted models of rearrangement of water molecules surrounding protein and sorbitol during the dehydration.

要. 2021, **48**, 41-48

- 3) 椎谷美佳, 川合祐史, 猪上徳雄. 加圧脱水すり身の水和水の誘電特性. 函館短期大学紀要. 2020, **47**, 19-25.
- 4) Smith, P. K., Krohn, R. I., Henmanson, G. T., Mallia, A. K., Bartner, F. H., Prevezano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, **150**, 76-85.
- 5) 小辻一幸, 猪上徳雄, 川合祐史. イカ胴肉乾燥過程中的の水和水の挙動 (1) あん蒸操作について. 函館短期大学紀要. 2017, **43**, 9-16.
- 6) Iseya, Z., Kubo, T., Saeki, H. Effect of Sorbitol on Moisture Transportation and Textural Change of Fish and Squid Meats during

Curing and Drying Processes. *Fisheries Sci.*, 2000, **66**, 1144-1149.

- 7) 大泉徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一. 魚類筋原繊維の加熱変性に対する糖および糖アルコールの保護効果の定量的考察. 日本水産学会誌. 1981, **47**, 901-908.
- 8) 新井健一. “水産加工食品と糖アルコール”. 水産食品と糖アルコール. 食材開発研究センター編. 静岡, 東和化成工業株式会社, 2000, 56-63.
- 9) 大泉徹. “添加物による制御”. 水産加工とタンパク質の変性制御. 東京, 恒星社厚生閣, 1991, 47-55.