

## 魚介類の煮沸処理による蛋白質の挙動

出来三男, 佐藤宗衛

### 1. 緒言

食品を煮沸又は加熱乾燥などの熱処理を行なったときの物理化学的諸変化については、食品の調理加工の領域から種々検討されている。なかでも炭水化物に富む食品の熱処理に対する挙動は香氣成分の確認を中心として、コーヒー、紅茶、でん粉焙焼などの熱処理による香氣成分の生成機構について数多くの研究がみられる。しかし、蛋白質系食品の熱処理による食品化学的な考察は少なく、窒素溶解率の測定及び酵素に対する反応性の変化などから熱処理による蛋白質の変性との関係について検討されているにすぎない。

食品の加熱処理の有無は輸入食品の関税率表上の分類を決めるうえから重要であり、とくに魚介類などのように外観上加熱処理の判別が困難なものが多く、これまで組織化学的な領域において細胞内の化学物質の挙動を染色という手段を用いて顕微鏡観察することによって判別の基準としてきた。<sup>1), 2), 3)</sup>しかし、この方法は組織切片の作成に熟練と長時間を要するなどの難がある。

蛋白質に富む食品を加熱処理すると食品中の蛋白質は熱変性をうけ未変性のときとは異なった挙動を示すようになる。この熱変性現象については単離した蛋白質を用いて種々検討されているが<sup>4)</sup>、生体組織を直接熱処理した場合の内部蛋白質の挙動についてはほとんど報告がない。生体内の蛋白質の加熱による変性も蛋白質の立体構造の変化により、水に対する溶解性の減少、SH基の出現、溶液粘度の増加などの現象が期待される。しかし、生体内における蛋白質は他の生体成分となんらかの関係をもっているため遊離した蛋白質の熱に対する挙動と必ずしも一致するものではないと考えられる。ここでは対照品目として、いか、えび及び貝の熱処理による生体内蛋白質の挙動をORD及びCDを中心に検討したことを報告する。

### 2. 実験方法

#### 2・1 試料の調製

冷凍えび、冷凍いか及び生鮮貝を用い、所定の温度で沸とう浴中又は恒温水浴中で加熱したのち48時間天日乾燥したものをFig.1に従って調製し、ORD、CD及びその他の化学分析のための試料とした。加熱処理をしない対照試料は生鮮品をそのまま48時間天日乾燥したものである。試料の粉碎はガラスホモゲナイザーを用い冷却下で行なった。殻付き又は表皮膜のある試料はこれらを除去して粉碎した。

#### 2・2 分析操作と装置

蛋白質の定量：キエルダール法により窒素含有量を求め、これに6.25を乗じて蛋白質の量とした。

DNP蛋白質の調製と赤外吸収スペクトルの測定：<sup>5)</sup>

試料を10%炭酸水素ナトリウム溶液1mlに懸濁させ、これにDNFB0.1ml、エタノール2mlを加え室温暗所で2時間ときどき振とうして放置し、黄色沈殿を集め水、エタノール、エーテルで洗浄し、減圧乾燥したものをKBrを用いて錠剤を作り赤外吸収スペクトルを測定した。測定波数はDNP-NO基にもとづく1330~1335 $\text{cm}^{-1}$ の吸収とペプチド結合にもとづく1635~1645 $\text{cm}^{-1}$ のアミドバンドである。

アミノ酸の分析：

天日乾燥した試料約500mgをアンプルに入れ、6規定塩酸5mlを加え、管を封じ140℃で48時間加水分解した。分解液は湯浴上で蒸発乾固を繰返して塩酸を除去したのち、活性炭で脱色したものをアミノ酸分析用の試料とした。アミノ酸の定量は自動アミノ酸分析計を用い次の条件で行なった。

装置：KLA-3B. カラム：Hitachi Customs resin 782~2612, 53.5cm×0.9cm, Eluent：0.2M Na-Citrate buffer pH3.25, pH4.25, 60ml/hr., Reagent：30ml/hr., Reaction temp., 115℃.

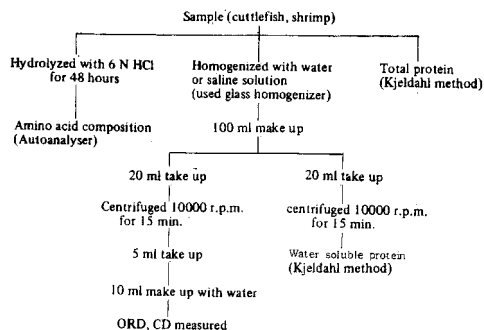


Fig.1 Preparation method of samples

ORD 及び CD スペクトルの測定：

1 mm セルを用い 200nm から 350nm の範囲で測定した。ORD は比旋光度〔 〕<sub>232</sub> で、CD は比だ円率〔 〕<sub>222</sub> で表わした。装置は日本分光 ORD・UV - 5 型 (CD 付属) である。

### 3. 結果と考察

#### 3・1 煮沸処理による水溶性蛋白質の消長

いか及び貝を煮沸処理すると比較的短時間の熱処理でも組織化学的には蛋白質の凝固像が観察され、その剖見は筋肉組織にまで及んでいる。このことは煮沸による熱変性は蛋白質の立体構造の変化を起していることを示している。そこで、これら魚介類の熱処理の指標として蛋白質の変性にもとづく溶解性について検討した。

Fig.2 は生鮮冷凍いかを沸とう浴中で 3 分、5 分、10 分、15 分と加熱したものと、無処理天日乾燥したもの、及び無処理生鮮品の水可溶性蛋白質の挙動を示したものである。Fig.2 からわかるようにいかの生鮮品とそれを直接天日乾燥したものとは水溶性蛋白質の量はほとんど差がみられない。これを 3 分間加熱したものと比較すると水溶性蛋白質は 15% となり、生鮮品の 56% にまで減少している。さらに加熱時間を長くすると水溶性蛋白質の量は減少していくがその減少率は低下し、10 分間の煮沸処理で水溶性蛋白質の量は定常状態になる。また、Fig.3 に示したようにこの現象はえびの場合でも同様に認められ、煮沸処理による熱の組織内への浸透は極めて短時間に行なわれていることを示している。

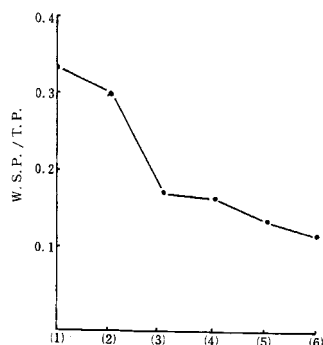


Fig.2 Effect of heat treatments on water soluble protein of cuttle - fish

(1):Non - Treated cuttlefish(2):Sun dried  
(3):Boiled for 3min. (4):Boiled for 5min.  
(5):Boiled for 10min. (6): Boiled for 15min.

W.S.P.:Water Soluble Protein. T.P.: Total Protein

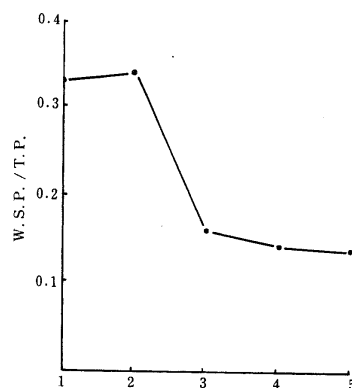


Fig.3 Effect of heat treatments on water soluble protein of shrimp

(1):Non - treated shrimp(2):Sun dried (3):  
Boiled for 3min.(4):Boiled for 10min.  
(5):Boiled for 15min.

W.S.P.:Water Soluble Protein T.P.: Total Protein

#### 3・2 煮沸処理による蛋白質のORD曲線及びCDスペクトルの変化

蛋白質の変性の程度を測定する他の方法として蛋白質の空間構造にもとづく旋光性の変化を 220nm ~ 230nm におけるコットン効果及び変曲点として測定する方法が一般的である。すなわち、未変性蛋白質は規則性の

ある立体構造をしており、変性によりこの構造が破かいされると左旋性が増大するので蛋白質の変性度は蛋白質のなかの右巻きのヘリックス含量を求めることによって知ることができる。<sup>6), 7)</sup>

Fig.4 及び Fig.5 にいか及びえびを沸とう浴中で種々の時間加熱したときの ORD 曲線を示した。

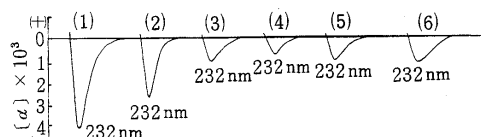


Fig.4 ORD spectra of water soluble protein in cuttle - fish

(1):Non - treated (2):Sun dried (3):Boiled for 3min. (4):Boiled for 5min. (5):Boiled for 10min. (6):Boiled for 15min.

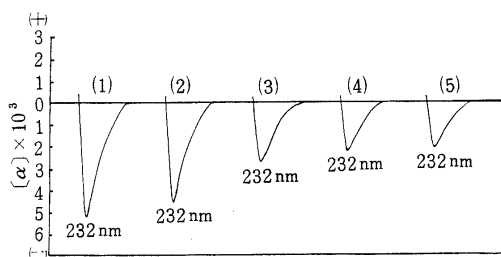


Fig.5 ORD spectra of water soluble protein in shrimp

(1):Non - treated (2):Sun dried (3):Boiled for 3 min. (4):Boiled for 10 min. (5):Boiled for 15 min.

Fig.4 からわかるように煮沸処理をしない生鮮いかでは 232nm に深い谷を持つ負のコットン効果を示しており、規則的な立体構造を持つ蛋白質の存在を示している。この ORD 曲線は 220nm に変曲点を持ち、負のコットン効果は  $n^*$  遷移によるものと考えるが、210nm に山を持つ正のコットン効果を示すことからこれらの蛋白質は 構造をした蛋白質が主成分となつて

いるものと推定される。

天日乾燥及び煮沸処理したものでは 232nm の負のコットン効果による谷が浅くなり、Table 1 に示したように天日乾燥したものの比旋光度は生鮮品の約 50% にまで減少している。煮沸処理 3 分間のものでは負のコットン効果の谷の深さはさらに浅くなり、5 分間の煮沸処理では生鮮品の約 20% にまで比旋光度は減少している。しかし、10 分間以上煮沸処理したものでは比旋光度の値がやや増加しているが、このことについてはランダムコイルの寄与と関連して今後検討したい。

えびを煮沸処理した場合の ORD 曲線もいかの場合とほぼ同様な傾向を示しており (Fig.5) 比旋光度は煮沸処理 15 分間のもので最も低い値を示している。

かいについての結果は Fig.6 に示したように、天日乾燥程度では 232nm の負のコットン効果による谷の深さは生鮮品のものと差がみられないが、1 分間煮沸処理すると 232nm の谷の深さは減少し、煮沸処理の時間を長くしたものではコットン効果の谷の深さは著しく浅くなっていることがわかる。

これらの ORD 曲線は煮沸処理による波長シフトは観察されなかった。

一方煮沸処理による CD スペクトルの変化も ORD 曲線と全く同様な傾向を示している。すなわち、いか及びえびは生鮮状態では 222nm に負の CD 帯が観察され、天日乾燥したいかでは 222nm の極小値は生鮮状態のものに比較して約 40% ほど減少している。えびの場合も類似した傾向を示し、生鮮状態に対して比だ円率が約 15% 減少している。

加熱処理の時間を長くとするとさらに 222nm の CD 帯の極小値は減少していくが、10 分間以上の加熱処理では比だ円率の値が増加してくる。この CD 帯の回復現象は ORD 曲線の場合と類似しているが、これが立体構造の回復に関係があるかどうかについてはさらに検討を要する (Fig.7, 8)。

Table1 Specific rotation of water soluble protein in cuttle-fish and shrimp treated in boiling water at 232nm

(Cuttle-fish)						
	Fresh	Sun dried	3min.boiled	5min.boiled	10min.boiled	15min.boiled
$[\alpha]_{232}$	-4481	-2803	-1150	-857	-1147	-1266

(Shrimp)					
	Fresh	Sun dried	3min.boiled	10min.boiled	15min.boiled
$[\alpha]_{232}$	-5263	-4625	-2837	-2183	-2113

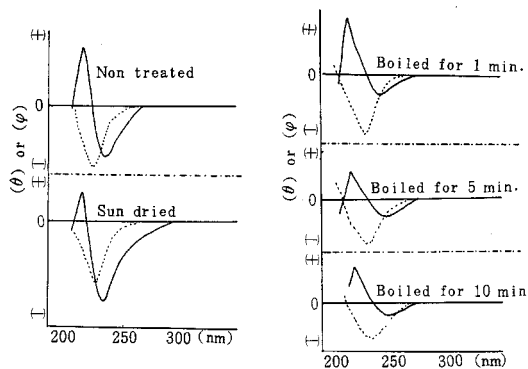


Fig.6 ORD and CD spectra of water soluble protein in clam - :ORD spectra( ),.....:CD spectra( )

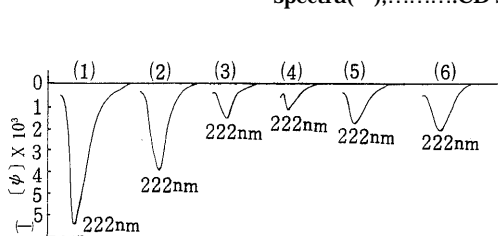


Fig.7 CD spectra of water soluble protein in cuttle - fish

(1):Non - treated (2):Sun dried (3):Boiled for 3 min. (4):Boiled for 5 min. (5):Boiled for 10 min. (6):Boiled for 15min.

これらの結果から明らかなように、えび及びいかなどを煮沸処理すると極めて短時間にORD曲線及びCDスペクトルに著しい変化が起ることがわかる。したがって煮沸処理の指標としてORD曲線及びCDスペクトルは重要な意味を持つものと云える。

3・3 煮沸処理による蛋白質構成アミノ酸の消長

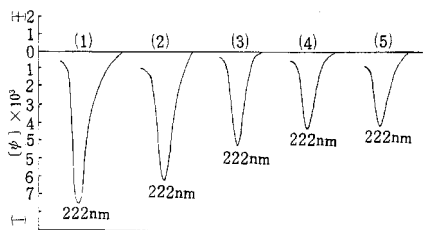


Fig.8 CD spectra of water soluble protein in shrimp

(1):Non - treated (2):Sun dried (3):Boiled for 3 min. (4):Boiled for 10 min. (5):Boiled for 15 min.

蛋白質の変性現象は蛋白質の空間構造の破かいとして示され、一次構造にまで及ばないとされている。しかし、岡本<sup>5)</sup>は大豆蛋白質を 120 ~ 90 の温度で湿熱変性させると側鎖の遊離アミノ基が脱離し蛋白質の変性と同時に化学的分解が起っていると推論している。

いか及びえびを煮沸処理したときの蛋白質の構成アミノ酸の変化を検討した結果を Table3 , 4 に示した。

Table2 Specific ellipticity of water soluble protein in cuttle - fish and shrimp treated in boiling water at 222nm

(Cuttle-fish)						
	Fresh	Sun dried	3min.boiled	5min.boiled	10min.boiled	15min.boiled
$[\psi]_{222}$	-6496	-4008	-1536	-1225	-1893	-2219
(Shrimp)						
	Fresh	Sun dried	3min.boiled	10min.boiled	15min.boiled	
$[\psi]_{222}$	-8565	-7166	-5266	-4277	-4183	

Table 3 Amino acids composition of cuttle-fish protein treated in boiling water

	Lys.	His.	NH <sub>3</sub> .	Arg.	Asp.	Thr.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Val.	Met.	Ileu.	Leu.
Fresh	7.87	2.02	11.91	4.42	10.73	0.76	11.06	7.39	9.96	11.27	6.27	2.33	4.93	9.36
Sun dried	6.46	1.74	9.99	3.27	11.59	0.89	11.78	7.45	10.47	11.86	6.70	2.45	5.25	11.09
3 min. boiled	8.15	2.00	10.83	3.92	11.75	0.95	10.86	6.77	11.05	11.86	6.80	1.65	4.26	9.17
5 min. boiled	6.74	1.89	8.37	3.94	12.14	0.77	11.43	7.66	11.25	12.27	7.19	1.79	4.85	9.72
10min. boiled	6.40	1.46	7.74	3.32	12.62	0.90	12.23	7.20	10.86	12.03	7.21	2.28	5.42	10.33

Table 4 Amino acids composition of shrimp protein treated in boiling water

	Lys.	His.	NH <sub>3</sub> .	Arg.	Asp.	Thr.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Val.	Met.	Ileu.	Leu.
Fresh	9.00	1.48	14.91	4.00	10.81	0.99	12.06	4.72	13.85	11.06	5.82	0.56	3.29	7.26
Sun dried	8.57	1.42	12.50	3.85	10.57	0.72	9.29	10.36	12.24	10.67	5.78	1.42	4.07	8.54
3 min. boiled	8.00	1.56	10.16	3.79	11.70	0.83	14.57	5.03	11.13	11.27	6.32	1.64	4.50	9.41
5 min. boiled	9.50	1.88	12.39	5.24	10.92	0.74	13.17	4.57	11.91	10.28	5.93	1.21	3.96	8.07
10min. boiled	9.54	1.84	13.29	4.82	10.88	0.49	13.60	4.44	11.64	10.29	5.84	1.25	4.69	8.22

Table3, 4 からわかるようにアミノ酸の含有比率は煮沸処理によって極端に変化していないが、えびで僅かにスレオニン、グリシン及びアラニンの減少が認められる程度であり、10 分間程度の煮沸処理では一次構造の化学的分解は起っていないと考える。

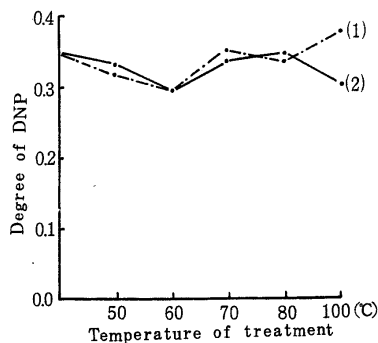


Fig. 9 Degrees of DNP-protein in cuttle-fish

(1):Treated for 10 min. (2):Treated for 5 min.

また、DNP と結合する蛋白質中のアミノ基は煮沸処理によってほとんど増加していない (Fig.9)。このことは ORD 曲線及び CD 曲線の結果と矛盾するが、魚介類の組織蛋白質の立体構造が一義的に説明できないことを示している。

#### 4. 総 括

いか、えび及び貝を煮沸処理したとき組織内蛋白質に対する水溶性蛋白質、ORD 曲線、CD スペクトル、DNP-蛋白質及び構成アミノ酸の挙動を検討した。

これらの魚介類はいずれも生鮮状態では ORD 曲線は 232nm に負の強いコットン効果を示し、CD スペクトルは 222nm に負の強い極小値を示すが、3 分間煮沸処理すると ORD 曲線及び CD スペクトルの谷の深さは著しく減少し、煮沸処理による蛋白質の立体構造の変化が起っていることを示している。またこれらの挙動は水溶性蛋白質の挙動によく対応している。しかしこのような熱処理条件では蛋白質の一次構造の分解は起らなかった。

これらの結果から魚介類の煮沸処理程度の判別に水溶性蛋白質，ORD 曲線およびCD スペクトルは重要な手がかりを与えるものとする。

## 文 献

- 1) 広川裕，水谷清美：本誌 No. 7，63(1968).
- 2) 水谷清美：本誌 No. 9，67(1969).
- 3) 水谷清美：本誌 No.10，43(1970).
- 4) 伊勢村寿造：“ 大有機化学，21 ” P69～75，朝倉(1965).
- 5) 岡本 奨：日本食品工業学会誌，16，27(1968).
- 6) N.S.Simmons，C.Cohen A.G.Szent Gorgyi，D.B.Wetlaufer，E.R.Blout：  
E.R.boiled：J.Am.Chem.Soc.，83，4766(1961)
- 7) 今堀和友：化学と生物，4.491(1966).

## Behavior of Protein in Fish and ShellTreated in Boiling Water

Mitsuo DEKI，Soei SATO

Central Customs Laboratory, Ministry of Finance  
531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken

Received Oct. 1, 1971