

## 食品タンパク質中の水の挙動に対する塩の影響

中川 洋

日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門

**概要** 1. 研究目的 タンパク質中の水の動的挙動に対して塩がどのように作用するのかを明らかにするため、食品の保存性の指標となっている水分活性と水の動的挙動の関係や、それらが塩添加により制御される仕組みを調べ、塩による食品保存の分子メカニズムを解明することを目的とした。

2. 研究方法 水溶性の球状タンパク質(スタフィロコッカルスクレアーゼ, リゾチーム)を用いて、中性子散乱実験、分子動力学計算、水分活性測定によって研究を行った。

3. 研究結果 自由水が現われるには、タンパク質表面に水和水のネットワークが形成されることが必要であることが分かった<sup>[1]</sup>。またタンパク質の水分活性値が0.8以上の値になると自由水が現われることが分かった。このことは、運動性の高い自由水が高い水分活性値を与えていることを示す。塩の添加によって、タンパク質の水和量が増加しても水の運動性は変化せず、その結果として水分活性値も変化しないことを示した。

4. 考察 水和水したタンパク質への塩の添加によって、塩に多数の水分子が水和水し、結果としてタンパク質表面に広がっている動きの活発な水のネットワークが破壊され、それにより水分活性値が低く抑えられるのかもしれない。また通常的环境下の微生物が生育できる水分活性値の限界値は0.8以上であるが、好塩菌などの極限环境下に生育する微生物は、その値が0.8を下回る。好塩菌の棲息環境は塩によって水分活性値が低くなっていると考えられる。水分活性値が、0.8以下でも棲息できるのは、このような環境に適応するように進化してきた結果であると考えられ、本研究結果は生物学的にも興味深い。

5. 今後の課題 タンパク質-水-塩の3成分系で、添加する塩の量、水分量を様々に変化させることでさらに調査することが、タンパク質の水和状態や水分活性値への塩の影響を理解するために必要であり、今後の課題になる。本研究を通じて、タンパク質のガラス転移も水和水と深く関係していることを見出した。塩がこれらにどのように関連するのかを明らかにすることも、食品の品質管理において重要な研究テーマになると考えている。

文献等 [1] Nakagawa H. *et al.* (2004) *J. Phys. Soc. J.* 73. 2. 491-495.

### 1. 研究目的

水は食品の保存において微生物の増殖による腐敗を引き起こすが、伝統的な塩漬け保存では、水分が多くても腐敗しない。これは塩添加により、微生物の増殖に必要な「自由水」の割合が抑えられるからだと考えられている。しかしながら、食品中の水に対して塩がどのように作用しているかの分子メカニズムはよく分かっていない。そこで本研究では、中性子散乱法を利用して、タンパク質中の水の動的挙動に対して塩がどのように作用するのかを明らか

かにすることを目的とした。

これまで助成研究者は、タンパク質の水和水とガラス転移の関係の解明を目的とし、中性子散乱によってタンパク質の構造緩和や水和水の動的挙動を明らかにしてきた<sup>[1,2]</sup>。本研究ではこの手法を、食品科学に応用した。まずはタンパク質表面に吸着する水の動的挙動と水分活性値との関連性を調べた。次に、タンパク質への塩添加による水の動的挙動の変化を調べた。食品の保存性の指標となっている水分活性と水の動的挙動の関係や、それらが塩添加に

より制御される仕組みを明らかにし、塩による食品保存の分子メカニズムを解明することを目的とした。

## 2. 研究方法

本研究では、タンパク質の水和研究のモデルタンパク質であるスタフィロコッカススクレアーゼ (SNase) と食品タンパク質のモデルであるニワトリ卵白リゾチーム (Lys) を用いて研究を行った。中性子散乱実験は助成研究者が所属する日本原子力機構保有の装置を利用した。タンパク質の水和構造を可視化するため分子動力学計算を行ったが、これは既に保有しているクラスターマシンを用いた。食品の水分活性測定のための水分活性計は本助成金によって購入した。

### 2.1 試料調製方法

中性子散乱実験および水分活性測定に用いたタンパク質は、凍結乾燥後に適当な水蒸気圧にさらすことでタンパク質の水和量を制御したものを準備した。また NaCl を添加したタンパク質は、水溶液状態のタンパク質に NaCl を混ぜた後に凍結乾燥処理を行うことによって得た。Fig. 1 は、水和タンパク質の作成作業の模式図と、25°C における様々な塩溶液の相対湿度である。水和タンパク質は密閉容器の中に、塩溶液と凍結乾燥後の粉末タンパク質を入れて静置することで作成した。水蒸気圧に応じてタンパク質の水和量を制御することができる<sup>[3,4,5]</sup>。

### 2.2 中性子散乱実験

中性子散乱実験は、茨城県東海村の日本原子力研究開発機構が保有する JRR-3 研究用原子炉に設置されている LTAS 分光器を用いて行った。下記に、中性子線の特性と中性子散乱実験とデータ解析法などについて記述

する。

### 2.2.1 中性子線の特性<sup>[7]</sup>

中性子は通常、原子炉や加速器で発生させることで得られる。実験的に利用される中性子は、波長が数 Å でエネルギーは meV 程度である。この波長とエネルギーは物質中の原子間隔や原子の揺らぎのエネルギーと一致するため、対象物質からの散乱による中性子のエネルギー変化 (非弾性散乱) を解析することで、ピコ秒からナノ秒の時間スケールと Å オーダーの空間スケールでの分子ダイナミクスの情報が得られる。

Table 1 はいくつかの原子の干渉性散乱と非干渉性散乱の中性子散乱長を示している。干渉性散乱は原子の相互関連の情報を与えるため、物質の構造解析によく用いられるが、非干渉性散乱は各原子の自己相関関数、すなわち分子ダイナミクスの情報を与える。この中で特徴的なのが、水素原子の非干渉性原子散乱長が他の原子と比べ大きいことである。従って、水の動的挙動を観測するのに中性子は非常に有効となる。

Table 1. Neutron coherent and incoherent scattering length

	$b_{\text{coh}} (10^{-15} \text{ m})$	$b_{\text{inc}} (10^{-15} \text{ m})$
H <sup>1</sup>	-3.7423	25.217
D <sup>2</sup>	6.674	4.033
C <sup>12</sup>	6.6535	0
N <sup>14</sup>	9.37	1.98
O <sup>16</sup>	5.805	0
P <sup>31</sup>	5.13	0.22
S <sup>32</sup>	2.804	0

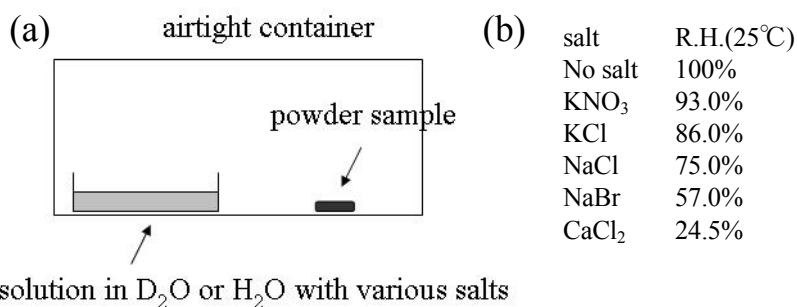


Fig. 1. Preparation of hydrated protein; (a) schematic figure in procedure, (b) relative humidities (R.H.) of various salt solutions<sup>[6]</sup>

## 2. 2. 2 中性子散乱測定および解析

Fig. 2 にタンパク質の典型的な中性子散乱スペクトルの模式図を示す<sup>[8]</sup>。非弾性散乱 (inelastic scattering) からは、数 100 meV までの広いエネルギー領域において分子振動の振動数分布が分かる。準弾性散乱 (quasi-elastic scattering) からは、構造緩和や拡散的な運動を解析することができる (第2, 3式参照)。また弾性散乱 (elastic scattering) では、散乱強度の散乱角度依存性からは揺らぎの平均自乗変位を見積もることができる (第1式参照)。

中性子の非干渉性弾性散乱は散乱ベクトルが小さい領域では、第1式のようなガウス近似で表すことができる<sup>[9]</sup>。

$$I_{el}(q) = A \exp\left(-\frac{\langle u^2 \rangle q^2}{3}\right) \quad \text{第1式}$$

ここで、A は定数、 $\langle u^2 \rangle$  は原子の平均自乗変位、 $q$  は散乱ベクトル ( $q = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}$ :  $\theta$  は散乱角、 $\lambda$  は入射中性子の波長) を表す。

Fig. 3 はスタフィロコッカルヌクレアーゼの非干渉性弾性散乱プロファイルである。散乱ベクトル  $q$  に対して、各温度のデータは直線近似することができ、第1式によって原子の平均自乗変位を求めることができる。

単純な拡散方程式からは、下記のような準弾性散乱関数を導ける<sup>[7]</sup>。

$$S(q, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{Dq^2}{\omega^2 + (Dq^2)^2} \quad \text{第2式}$$

これはローレンツ関数で、半値幅  $\Gamma$  は、

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{第3式}$$

となる。ここで  $D$  は拡散定数である。従って、準弾性散乱データからは分子の拡散現象を解析することができる。

タンパク質を構成する原子の約半数は水素原子である。タンパク質表面に吸着する水和水を測定する場合、タンパク質からの散乱が大きなバックグラウンドとなる。そこで本研究では、Fig. 4 のように軽水素原子と重水素原子の散乱能の違いを利用しタンパク質から水分子の中性子散乱シグナルを分離することにした<sup>[10,11]</sup>。すなわち、軽水で水化したタンパク質は水のシグナルが大きいのにに対し、重

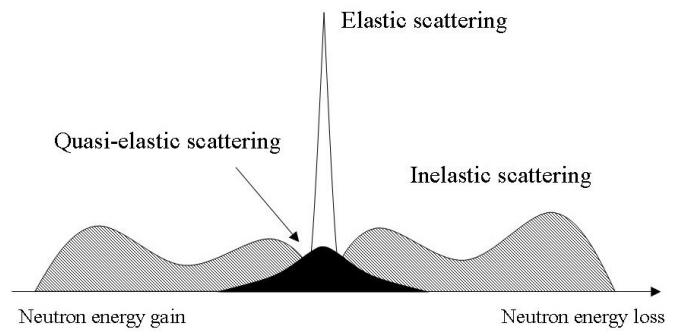


Fig. 2. Schematic profile of neutron scattering

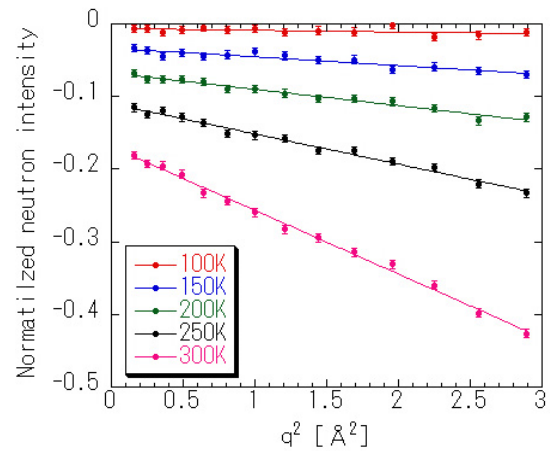


Fig. 3. Incoherent elastic neutron scattering profiles of Protein Staphylococcal nuclease at various temperatures

水で水化したタンパク質は水からの散乱はほとんどないため、両者のコントラストを見ることで、水和水からのシグナルを得た。Fig. 5 は軽水水とタンパク質と重水水とタンパク質、および両者の差分を取ることで求めた水和水の散乱シグナルである。タンパク質の解析は重水水と試料のデータを、水和水の解析には差分を取ったデータを用いた。

## 2. 3 分子動力学計算

本研究では、タンパク質の水和構造を可視化するため分子動力学計算を行った。計算には生体分子の分子動力学計算のソフトウェア Amber8 を用いて行った<sup>[12]</sup>。力場は Amber ff99、水のモデルは TIP3P を用いて計算を行った。計算する系は水分量を変えた実験に対応させるため、系に入れる水の量を  $h=0.1 \sim 0.5$  (g  $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$  protein) の範囲で段階的に変化させた計算を実行した。

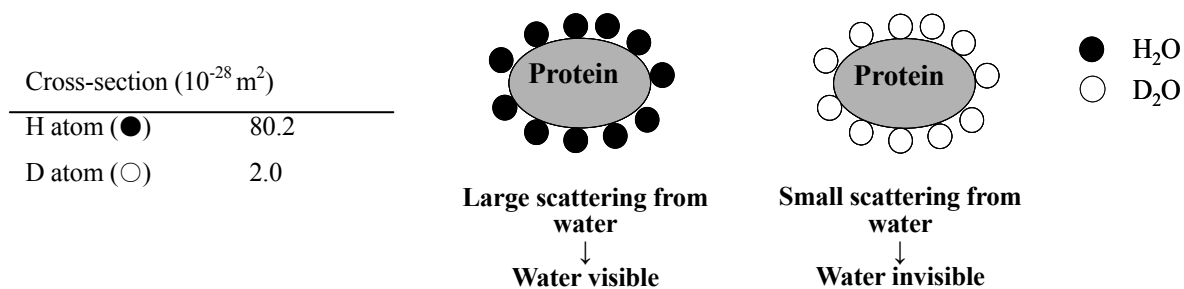


Fig. 4. Observation of protein hydration water by isotope contrast

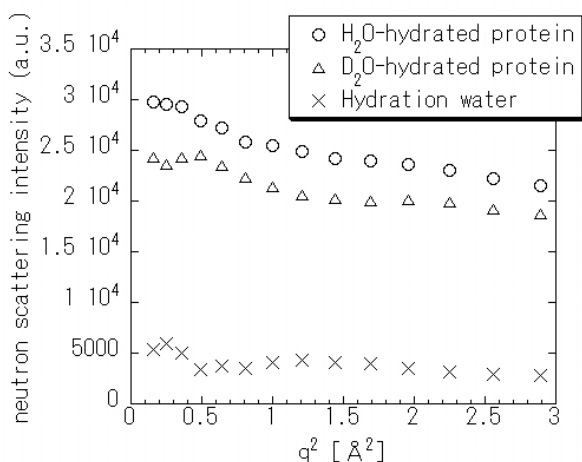


Fig. 5. Neutron scattering profiles of H<sub>2</sub>O- and D<sub>2</sub>O-hydrated proteins, and hydration water estimated by subtraction of D<sub>2</sub>O-hydrated from H<sub>2</sub>O-hydrated. The hydration level of protein is  $h=0.45$ .

## 2. 4 水分活性測定

一般的に食品に含まれる水は、その存在状態によって結合水と自由水の2つに分類される。結合水は食品と水素結合により結びつき、分子運動が束縛されている。一方、自由水はタンパク質表面である程度自由に動くことができる水と考えられており、食品の腐敗などで増殖する微生物はこの自由水を使っていると考えられている。水分活性は、食品中における微生物の育成に影響を及ぼす要因として、1950年代に食品学分野に導入された<sup>[13]</sup>。水分活性( $A_w$ )は、食品を入れた密閉容器の水蒸気圧( $P$ )とその温度における純水の蒸気圧( $P_0$ )の比として、次の第4式のように定義される。

$$A_w = \frac{P}{P_0} \quad \text{第4式}$$

この水分活性値は、食品中の自由水の割合を示すと考えられており、食品中の微生物の生育に大きな影響を及ぼすため、食品の腐敗のし易さの指標として用いられる。例えば、同じ水分量の食品でも、水分活性値が大きければ微生物が増殖しやすい環境といえる。本研究では、水分活性測定には、水分活性装置 LabSwift-aw (DKSH ジャパン製)を用いた。測定は 25°C の温度で行った。

## 3. 研究結果

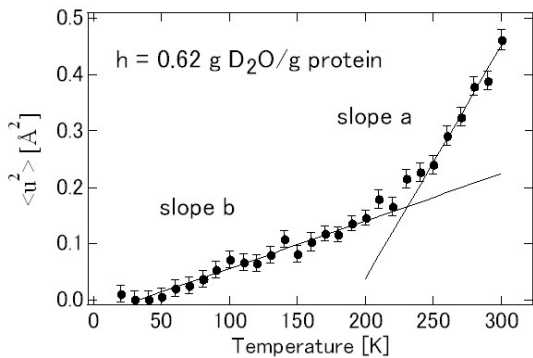
本研究では、(A)タンパク質表面に吸着する水の動的挙動と水分活性値との関連性の解明と、(B)タンパク質への塩添加による水の動的挙動の変化の解明、の2つを具体的な研究目的として研究を進めた。

### 3. 1 タンパク質の水と水の分子運動と水分活性値の関係 [研究目的 A]

水分活性値は、食品中の水がどの程度束縛されているかを示すため、食品中の水の分子運動がその値に関わるとされている。しかしながら、実際の食品中の水分子の動的挙動と水分活性値の対応関係は不明な点が多い。そこでまず、水分量を段階的に変えたときのタンパク質の水和状態の変化を分子レベルで明らかにするため、様々な水分量でタンパク質表面の水と水の構造と動的挙動を調べることにした。次に、タンパク質に吸着した水分子の分子運動と水分活性値の関係性を調べ、水分活性値に及ぼす塩の影響を調べるための研究基盤を作った。

#### 3. 1. 1 水分量増加に伴うタンパク質の水和構造と水の動的挙動の変化<sup>[11]</sup>

スタフィロコッカススクレアーズを用いて、様々な水和量のタンパク質の非干渉性中性子弾性散乱実験を行った。Fig. 6 は、水分量  $h=0.62$  (g D<sub>2</sub>O/g protein) での平均自乗



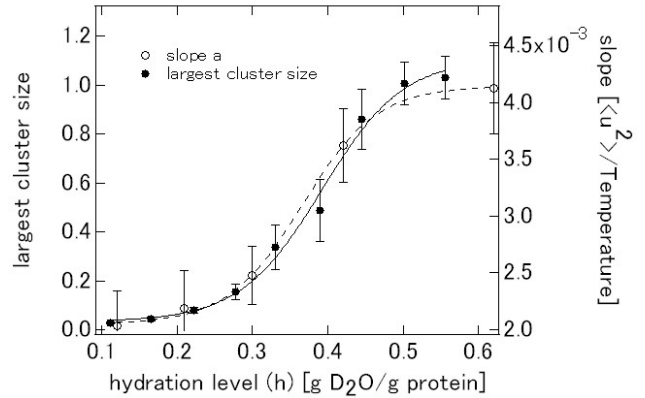
**Fig. 6.** Mean-square displacements as a function of temperature at  $h=0.62$  (g  $D_2O/g$  protein)

変位の温度変化である。なおここでは重水 ( $D_2O$ ) で水和しているため、水は見え、見えているのはタンパク質である。約 240 K 付近以上の温度で揺らぎの大きさが急激に大きくなる。これはタンパク質のガラス転移と言われるもので、タンパク質が十分に水和することでより顕著に見られることが分かっており、自由水の存在と関係があることが推察される<sup>[2]</sup>。ここでは、約 240 K を境に2つの温度領域を直線近似し、その傾きを求めた (Fig. 6 中の slope a と b)。この傾きは、

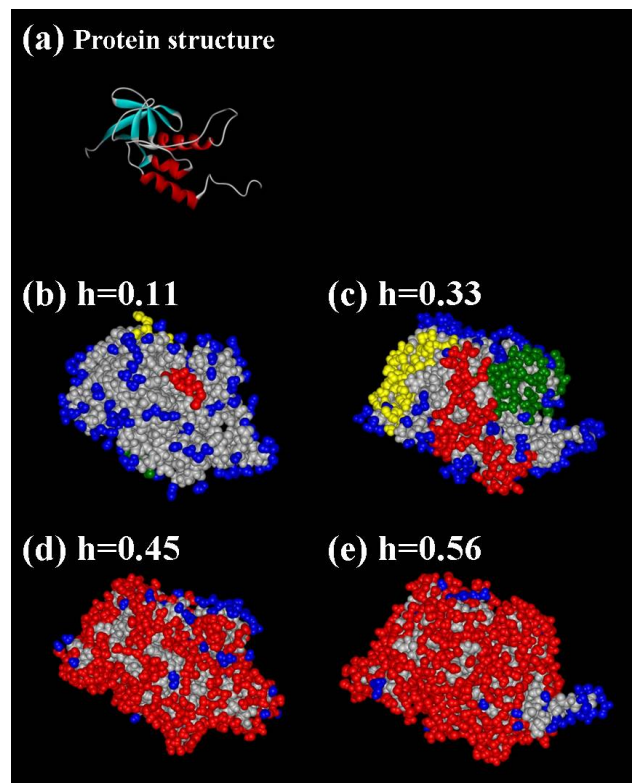
$$\frac{\langle u^2 \rangle}{T} \propto \frac{1}{k} \quad \text{第5式}$$

のように、バネ定数  $k$  と関係があり、タンパク質構造の柔らかさの指標となる<sup>[13]</sup>。Fig. 7 に様々な水分量での slope a の値を示す。このプロットはシグモイド型の振る舞いを示し、シグモイド関数を用いたデータフィッティングよりその変曲点が  $h=0.37$  にあることが分かった。この結果から、タンパク質のガラス転移が顕著になる (タンパク質の構造が柔らかくなる) 水分量には閾値が存在することが分かった。

これまでの研究で、タンパク質と水和水の動的挙動は強くカップルしていると考えられている<sup>[14]</sup>。従って、上記の結果は、 $h=0.37$  の閾値を境に、水和構造やその動的特性などが変化すると推察される。そこで次にこの閾値付近でタンパク質の水和構造がどのように変化するかを、分子動力学計算によって調べた。Fig. 8 はスタフィロコッカスクレアーゼの分子構造と、様々な水分量における水和構造を示している。低い水分量の際は、多くの水和水はタン



**Fig. 7.** Slope a and largest water cluster size as a function of hydration level



**Fig. 8.** Images of hydration water molecules on the SNase surface obtained by MD simulation. (a) MD structure of SNase presented as a ribbon model, (b)  $h=0.11$ , (c)  $h=0.33$ , (d)  $h=0.45$ , (e)  $h=0.56$ . The protein moiety is shown in gray. Red denotes the hydration water molecules that belong to the largest cluster, and green and yellow show those belonging to the second and third largest clusters, respectively. Blue shows either isolated hydration water molecules or molecules belonging to small clusters.

パク質表面に孤立した状態、あるいはタンパク質表面の一部を覆う小さな水のクラスターとして存在する。しかし、 $h=0.37$  の閾値を越えると、クラスター同士が接触し、一つの大きな水のネットワークがタンパク質表面全体を覆うようになる。タンパク質表面を覆う最大のクラスターのサイズを計算し、それがタンパク質の表面積に占める割合を計算した (Fig. 7)。これを見るとタンパク質のガラス転移とタンパク質を覆う水和水のネットワーク形成に相関があることが分かった。

そこで次に、このようなネットワークを形成したときに、水分子の動的挙動がどのように変化するかを中性子散乱実験によって調べた。Fig. 4 で示した方法で、 $h=0.30$  と  $0.44$  の水分量のときの、タンパク質と水和水の平均自乗変位の温度変化を求めた (Fig. 9)。 $h=0.30$  では、300 K の室温までタンパク質と水和水の揺らぎの大きさはほとんど同じであった。これは、測定温度領域では、水和水はタンパク質表面に吸着していることを示唆する。一方、 $h=0.44$  では、低温では両者はほとんど同じであるが、約 240 K 以上のガラス転移温度で、水和水の揺らぎが急激に大きくなり、タンパク質に対してより大きく動いていることが分かる。これらの結果は、水和水のネットワークがタンパク質表面に形成される  $h=0.37$  の水和量以上で、運動性の大きな自由水が現われることを示している。

Fig. 10 は、様々な湿度下でのタンパク質の水分量の変化を示した図である。この図をみると湿度が約 80% 以上になると、水和量が急激に多くなるのが分かる。ここで化学ポテンシャルの概念を導入する<sup>[15]</sup>。一般に化学ポテンシャルとは、物質 1 モル当たりのギブスの自由エネルギー

で、ある物質が潜在的に仕事のできる能力を表す。水の化学ポテンシャルは、温度  $T$ 、水蒸気圧  $P$  の 1 モルの水蒸気を等温可逆的に圧縮して、その温度における飽和水蒸気圧  $P_s$  にいたるまでに行われる仕事  $W$  に等しく、次の式で表される。

$$W = -\int_P^{P_s} V dp = RT \int_{P_s}^P dp/p = RT \ln\left(\frac{P}{P_s}\right) = \Delta\mu_g$$

第6式

ここで  $R$  は気体定数、 $P/P_s$  は相対湿度を表す。平衡状態では、各相の化学ポテンシャルは等しいので、相対湿度から気相水分の化学ポテンシャルを知れば、平衡状態にあるタンパク質表面の水和水の化学ポテンシャルも分かる。相対湿度に応じて決まるタンパク質の水和量は、タンパク質の水和量とその水分が有するエネルギーの関係を示す

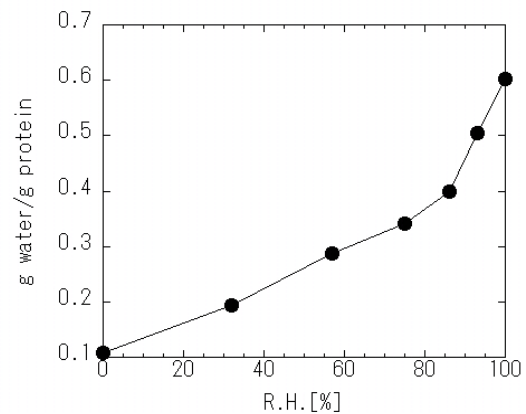


Fig. 10. Hydration water contents as a function of relative humidity with Staphylococcal nuclease

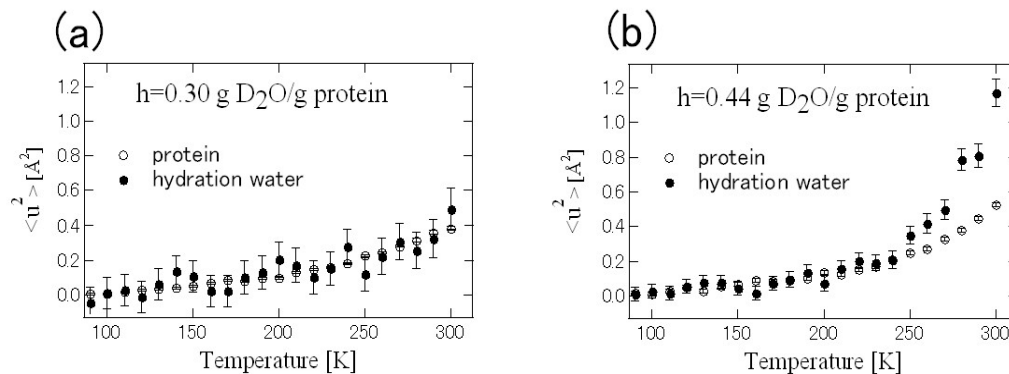


Fig. 9. Mean-square displacements of the hydration water (filled circle) and protein (open circle) at two hydration levels of (a)  $h=0.30$  and (b)  $h=0.44$ .

ことになる。湿度約 80% 以上で、急激に水分量が増加するという結果は、化学ポテンシャルの高い水が急激に増加することを意味する。また Fig. 10 からは、湿度約 80% 以上で、 $h=0.37$  の閾値を越えることが分かる。このことから、化学ポテンシャルの高い水和水が現われたときに、動きの活発な水、すなわち、自由水が現われることが分かる。

### 3. 1. 2 タンパク質に吸着した水分子の運動と水分活性の関係性

Fig. 11 は、様々な湿度下でのリゾチームの水分量の変化を示した図である。結果は Fig. 10 と同様、湿度約 80% 以上で急激に水分量が増加している。このことは、上記の議論より、湿度約 80% 以上で化学ポテンシャルの高い自由水が現われることを意味する。リゾチームの場合、自由水が現われるのは水分量が約  $h=0.25$  (g H<sub>2</sub>O/g protein) である。Fig. 12 はリゾチームの水分活性値の水和量依存性を示した図である。水分量が高いときには水分活性値は  $a_w=0.8$  以上であるが、およそ  $h=0.25$  を下回ると急激に水分活性値が小さくなることが分かる。これは実際にタンパク質表面の自由水が高い水分活性値を与えていることを示している。

### 3. 2 塩添加に伴うタンパク質の水和水の動的挙動と水分活性の変化[研究目的 B]

0-2 重量% で NaCl を添加したリゾチームを 100% 湿度雰囲気下で静置し水和させた。Fig. 13 に示すように、NaCl の量の増加に伴い水分量が増加した。一方で、これらの水分活性値は約 0.9 程度でほぼ同じであった。このことから、同じ水分活性値であっても、NaCl を添加したほうが、より多くの水分量を保持できるといえる。水和量に変化しても、水分活性値が同じであれば、吸着している水の動的挙動はあまり変わらないはずである。そこで、リゾチームに NaCl を添加した際の水分子の動的挙動を中性子散乱実験によって調べた。Fig. 14 は、1 重量% の NaCl に H<sub>2</sub>O と D<sub>2</sub>O で水和させた中性子散乱スペクトル、および Fig. 4 の方法によって水和水だけの散乱を抽出した中性子散乱スペクトルである。水和水からの散乱スペクトルを第2式のローレンツ関数を用いて解析し、その半値幅 ( $\Gamma$ ) を求めた結果が、Fig. 15 である。半値幅の NaCl 添加量の依存性は、解析誤差範囲内で同じである。半値幅は、第3式より拡散定数に関連付けられる。この結果から、保持している水の量が増加したとしても、NaCl が添加されること

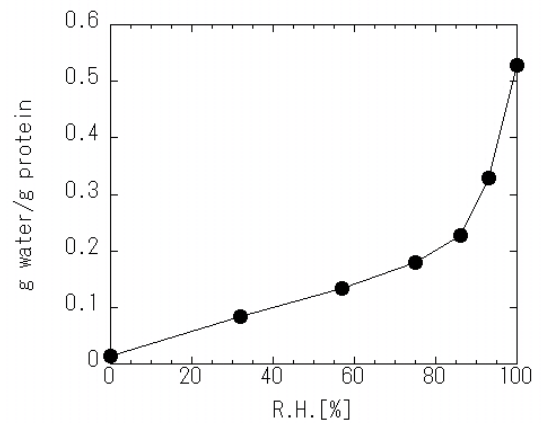


Fig. 11. Hydration water contents as a function of relative humidity with Lysozyme

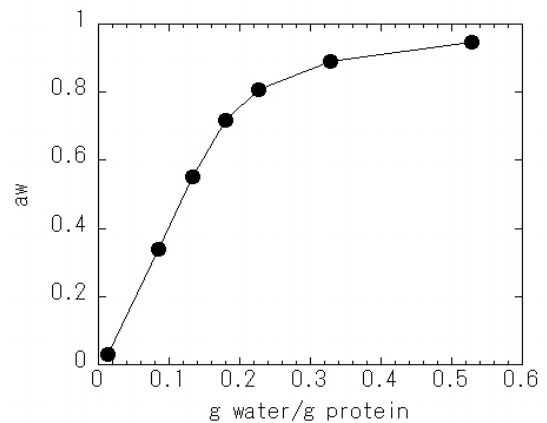


Fig. 12. Water activity as a function of hydration level with Lysozyme

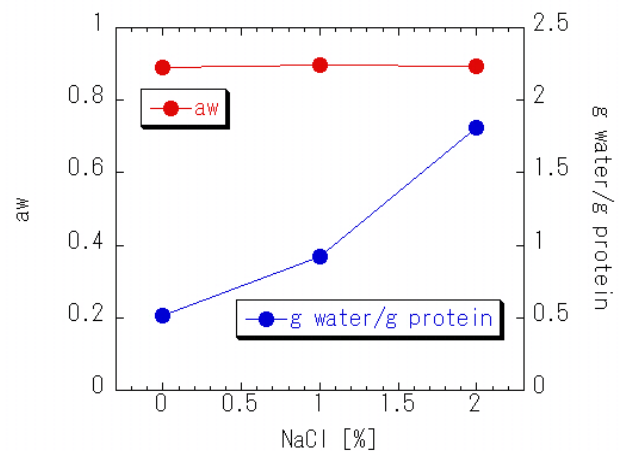
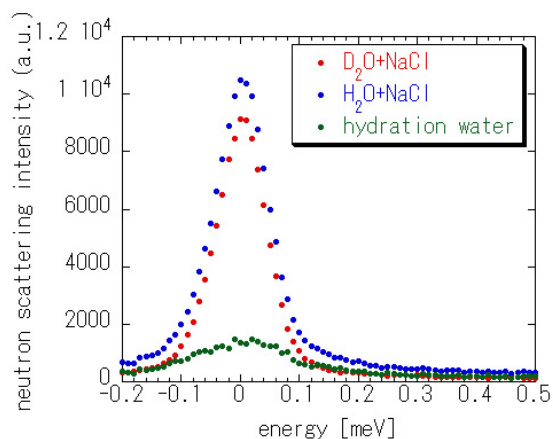


Fig. 13. Water activity and hydration level as a function of NaCl content



**Fig. 14.** Quesielastic scattering of Lysozymes with NaCl with D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O-hydrated at  $q=1.3 \text{ \AA}^{-1}$ . And that of hydration water estimated as in Fig. 4.

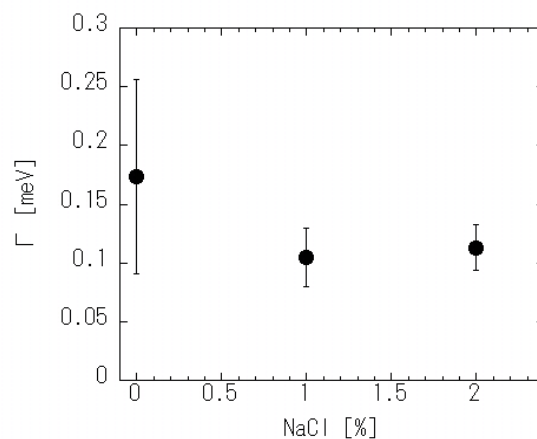
で、その水の拡散的な動的挙動はほとんど変わらず、またその結果として水分活性値もほとんど変化しないと考えられる。

#### 4. 考察

##### 4.1 水分活性値が意味する水の分子メカニズム

3. 1の結果より、タンパク質の水和構造に関しては、この閾値以下では水分子はタンパク質表面に孤立した状態、あるいは小さな水のクラスターを形成して存在していることが分かった。一方で、この閾値以上では、水和している水分子はタンパク質表面で水同士の水素結合を介した大きなネットワークを形成するようになる。またタンパク質の周りの比較的動きやすい水分子は、このような水のネットワークが形成したときに現われる。このような状況では、水和したタンパク質の水分活性値は、およそ0.80以上となっている。しかし、水分量が低下し、水のネットワークが消失し、水分子の動きが抑制され、タンパク質表面に強く吸着するようになると、水分活性値は低下することが分かった。従って、水分活性値は実際に水分子の動的挙動と相関があると考えられる。

**Table 2** は微生物が生育できる水分活性値の限界値を示したものである。興味深いことに、通常的环境下で生育する細菌・酵母・カビなどが必要とする水分活性値は 0.8 以上であるが、極限环境下で生育する微生物のその値は 0.8 を下回る。これは通常的环境下で生育する微生物が



**Fig. 15.** Half width at half maximum ( $\Gamma$ ) of lorentzian a function of NaCl content

**Table 2.** Limiting water activity ( $A_w$ ) for microbes<sup>[16]</sup>

Class	$A_w$
Regular bacteria	0.90
Regular yeasts	0.88
Regular moulds	0.80
Halophilic bacteria	<0.75
Xerophilic moulds	0.65
Osmophilic yeasts	0.61

生育するためには、タンパク質表面で良く動く水、言い換えれば、化学ポテンシャルの高い、比較的タンパク質表面から脱離し易い水が必要であることを示唆する。一方で、極限环境下の微生物は水分活性値が 0.8 を下回っても生きることができる。本研究からは、水分活性値が 0.8 以下になると水分子がタンパク質に強く吸着することを示した。これは、これら微生物が、タンパク質に強く吸着している化学ポテンシャルの低い水をもその育成に利用可能であることを示している。また、好塩菌の棲息環境は塩によって水分活性値が低くなっていると考えられる。水分活性値が 0.80 以下でも棲息できるのは、このような環境に適応するように進化してきた結果であるとも考えられる。

##### 4.2 タンパク質に吸着した水に対する塩の影響

同じ水分活性値でも NaCl を添加したほうが、より多くの水を保持することができた。またこれらの水の動的挙動を調べた結果からは、水分量が多くても水の動きやすさは



ほとんど変わらなかった。これは水分量が多くなったとしても、NaCl によって水の動きがある程度抑えられるためであると考えられる。例えば 1 重量% の場合、リゾチームと NaCl のモル比はおおよそ 2.5 である。つまりリゾチーム1分子に対して、塩が 2.5 分子存在することになる。NaCl 添加によって、NaCl 分子に多数の水分子が水和し、結果としてタンパク質表面に広がっている動きの活発な水のネットワークが破壊され、それにより水分活性値が低く抑えられるのかもしれない。

## 5. 今後の課題

研究前半部分の、タンパク質の水和構造と水和水の動的挙動の関係については、ある程度十分に結果を残すことができたと考えている。これら結果によって、水分活性値と水分子の構造や動的挙動との関係や、それに対する塩の影響を調査し議論するための研究基盤ができた。特に、中性子散乱実験を用いた食品タンパク質の水分活性値の分子メカニズムの解析は、助成研究者の知る限りこれまで国内外ともない。水の動的挙動と水分活性値に対する塩の影響についての研究では、タンパク質の水和状態に対して塩が影響し、水の動的挙動が抑制されることを示唆する結果を得ることができた。タンパク質-水-塩の3成分系で、添加する塩の量、水分量を様々に変化させることで調査することが、タンパク質の水和状態や水分活性値への塩の影響を理解するために必要であり、今後の課題になる。

本研究を通じて、タンパク質のガラス転移も水和量と深く関係していることを見出した。食品のガラス化は食感とも関わり、食品の品質を決める重要な要因となっている。従

って、今後、水が食品の水分活性や食感を決定付ける分子メカニズムを解明し、食品保存や食感などの食品の機能発現における水の役割を明らかにし、また塩がこれらにどのように関連するのかを明らかにすることも、食品の品質管理において重要な研究テーマになると考えている。

## 文献等

- [1] Nakagawa H. *et al.* (2006) *Physica B*. 385-386, 871-873.
- [2] Nakagawa H. *et al.* (2008) *Biophys. J.* 95. 2916-2913.
- [3] Scott. W.J. (1954) *Aus. J. Biol. Sci.* 6. 549-564.
- [4] Lenert U. *et al.* (1998) *Biophys. J.* 75. 1945-1952.
- [5] Roh J.H. *et al.* (2005) *Phys. Rev. Lett.* 95. 038101.
- [6] O'Brien F.E.M. (1948) *J. Sci. Instr.* 25. 73-76.
- [7] Bee M. (1988) *Quasielastic Neutron Scattering*, Adam Hilger, Bristol, PA, 194-197.
- [8] Smith J.C. (1991) *Q. Rev. Biophys.* 24. 227-291.
- [9] Nakagawa H. *et al.* (2004) *J. Phys. Soc. J.* 73. 2. 491-495.
- [10] Chen S.H. *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103. 9012-9016.
- [11] Nakagawa H. *et al.* (2010) *J. Phys. Soc. Jpn.* 79. 083801.
- [12] Case D.A. *et al.* (2004) *Amber8*, University of California, San Francisco.
- [13] Zaccai G. (2000) *Science*, 288. 1604-1607.
- [14] Kitao A. *et al.* (1991) *Chem. Phys.* 158. 447-472.
- [15] 建築材料と水分の基礎、多田眞作、[http://www.texte.co.jp/heat\\_moisture/moisture\\_basics.pdf](http://www.texte.co.jp/heat_moisture/moisture_basics.pdf)
- [16] Mossel. D.A.A. *et al.* (1955) *J. Food. Sci.* 20. 415-423.

## Effect of Salt on Water Dynamics in Food Protein

Hiroshi Nakagawa

Japan Atomic Energy Agency • Quantum Beam Science Directorate

### Summary

**1. Purpose** The purpose of this study is elucidation of molecular mechanism about food preservation by salt. In order to effect of salt on dynamics of protein hydration water, the relationship between water activity and hydration water dynamics, and how salt regulates them were examined.

**2. Methods** The samples were globular soluble protein, Staphylococcal nuclease and hen egg lysozyme. The research methods were neutron scattering experiment, molecular dynamics simulation and water activity measurement.

**3. Results** It was found that, for hydration water molecules to exist as free water, they need to form network on protein surface<sup>[1]</sup>. The free water appears above water activity value of 0.8. This suggests that high value of water activity is due to free water with higher mobility. Even when hydration content increases in the protein with salt, dynamics of hydration water was not changed due to salt effect. As a result, water activity was not changed.

**4. Discussions** By addition of salt to hydrated protein, salt would be hydrated, and, as a result, salt would destroy water network on protein surface, which is high mobility free water. This would lead to lower water activity. The microbes under usual circumstance can inhabit only above water activity of 0.8. On the other hand, the microbes under the extreme circumstances, such as halophilic bacteria, can inhabit under water activity of 0.8. The water activity in the environment where halophilic bacteria inhabits would be lower due to salt. The bacteria would evolve to adapt the environment of the low water activity. This result is also biologically interesting.

**5. Future subjects** It is necessary to study the protein hydration and water activity with different salt and hydration water contents in order to understand effect of salt on protein hydration and water activity. In this study, it was also found that protein glass transition is closely related with hydration. It should be also important to examine the effect of salt on the glass transition.

**Reference** [1] Nakagawa H. *et al.* (2004) *J. Phys. Soc. J.* 73. 2. 491-495.