

## 9037 加熱にともなう食品タンパクの粘稠化とゲル化に対する塩の影響

北島 直文(京都大学)

【研究目的】 タンパク質は毎日の食事において摂取せねばならない必須の栄養成分である。その一方で、食品には食品として受け入れられるための物性や構造が必要であり、タンパク質はそれを形成する成分でもある。食品は調理や加工の段階で加熱を受ける。熱処理を受けたタンパク質液は、タンパク質濃度が低い場合には粘稠なゾルとなり、タンパク質濃度が高い場合にはゲルを形成する。塩の存在はこのゾル、ゲルの性状に著しい影響を与える。本研究では食品タンパク質の加熱前後における物性、性状の変化に対し、塩がどのような機構で作用し、影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

【研究方法】 乳清タンパク質は新鮮牛乳より酸沈澱法により調製した。 $\beta$ -ラクトグロブリンはシグマ社のものを用いた。濁度の測定は96穴マイクロプレートの各ウエル(穴)に250 $\mu$ lの標品を入れ、各ウエルの590nmにおける吸収をイミュノリーダーで測定した。この吸光度を濁度の値として用いた。ゲルの硬さ、付着性、凝集性の測定は、16穴(8穴 $\times$ 2連)のチャンバースライドの各ウエル(穴)に250 $\mu$ lの標品を入れ、濁度測定と同様にして加熱ゲルを調製する。生成したゲルを穴から抜き取り、レオナー(Rheoner RE3340, 山電)を用いてゲルの硬さ、付着性、凝集性をテクスチュアモードにて測定した。

【研究結果】 乳清タンパク質の主要成分である $\beta$ -ラクトグロブリンの場合、加熱に伴う濁度やゲル化能はpHと塩濃度に強く依存し、塩濃度の上昇に従って、透明液、透明ゲル、白濁ゲルの順に変化することが判明した。乳清タンパク質も、加熱時の溶媒のpH、塩濃度によって、ゾル状からゲル状まで様々な形態を取り、 $\beta$ -ラクトグロブリンの場合と同様に塩濃度が上昇するにつれ、透明液(ゾル)、透明ゲル、白濁ゲル、白濁液の順に変化し、pHの場合も同様に、乳清タンパク質の主要タンパク質 $\beta$ -ラクトグロブリンの等電点に近づくに連れ、透明液(ゾル)、透明ゲル、白濁ゲル、白濁液の順に変化した。

【考察】 乳清タンパク質分子は加熱を受けると変性する。変性タンパク質分子は互いに会合し、凝集体を形成する。この凝集体がゲルのネットワークや白濁塊を構成する。すなわち熱変性に伴い、本来分子内部に存在していた疎水領域が分子外部に露出し、互いの疎水的相互作用で分子間に親和力が与えられる。しかし分子間には親和力だけでなく、分子の表面電荷による静電的な反発力も作用し、この二つの力のバランスにより分子凝集体の大きさや形状が決まる。塩の存在は、分子表面電荷の被覆を意味し、静電的反発力を抑えることになる。したがって加熱時の塩濃度を調整することにより、二つの力にバランスを制御することが可能であり、低塩濃度では粘稠なゾルや透明なゲルが形成され、高塩濃度では白濁ゲルが形成される。透明ゲルの方がゲルネットワークに関わるタンパク質分子が大いため、より強固なゲル構造を形成するものと考えられる。ゲルに至らぬタンパク質濃度の場合は、塩の存在は液の粘稠性や透明性に影響を与えた。



## 9037 加熱にともなう食品タンパクの粘稠化とゲル化に対する塩の影響

北島 直文(京都大学)

## 1. 研究目的

タンパク質は毎日の食事において摂取せねばならない必須の栄養成分である。その一方で、食品には食品として受け入れられるための物性や構造が必要であり、タンパク質はそれを形成する成分でもある。例えばスープに代表される液状食品や、肉やゼリーなどの咀嚼感のある組織状食品の構造形成に食品タンパク質が係わっている。食品タンパク質は、通常、調理や食品加工の段階で、殺菌、消化性の向上、風味の付与などを目的として、加熱を受ける。この加熱にともなうタンパク質は変性し、先のように食品固有の物性や構造をもたらす。

熱処理を受けたタンパク質液は、タンパク質濃度が低い場合には粘稠なゾルとなり、タンパク質濃度が高い場合にはゲルを形成する。塩の存在はこのゾル、ゲルの性状に著しい影響を与える。本研究は食品タンパク質の加熱前後における物性、性状の変化に対し、塩がどのように影響するか、そしてどのような機構で作用するのかを知ろうとするものである。卵白および卵白アルブミンの場合、加熱後の状態がタンパク質液の塩濃度とpHに著しく依存することが明らかになっている。すなわち中性領域の緩衝液に溶かした卵白アルブミン溶液を加熱すると、白濁ゲルが形成する。しかし極めて低い塩濃度においては透明ゲルや透明溶液を形成する。透明ゲルの方が白濁ゲルよりもゲル自体の強度が強く、硬いゲルとなる<sup>(1-6)</sup>。このような現象が乳清タンパク質についても適用されるのか否かを本研究において検討した。

乳清タンパク質は牛乳からカゼイン成分を除いて生じる上清画分やチーズ等の製造によって生じる副産物であり、その量は欧米を中心に膨大なものになっている。その利用は乳清タンパク質の物性改良や制御法の開発によってより進むものと思われる。

## 2. 研究方法

材料 以下の方法で乳清タンパク質を精製した。新鮮牛乳のpHを4.5に調整し、沈

澱部分を除いた上清を濃縮したものを入手し、これを希釈した後、再度 pH を 1 N HCl を用いて 4.5 に調整し、遠心分離 (8000 rpm, 日立9-2ローター) により上清を得た。この上清を No. 2 の濾紙で濾過した後、硫酸アンモニウムを 75% 飽和になるように加え、乳清タンパク質を沈澱させた。この沈澱を遠心分離 (8000 rpm, 日立9-2ローター) により回収し、蒸留水に対して十分透析した。透析により生じた微かな濁りは同様に、遠心分離 (8000 rpm, 日立9-2ローター) により除去し、透明な乳清タンパク質溶液を得た。この乳清タンパク質溶液の pH を 2 N NaOH によって 7.0 に調整し、以下の実験に供した。タンパク質濃度は 70 mg/ml に調整した。

$\beta$ -ラクトグロブリンはシグマ社のものを用いた。

濁度測定 96穴マイクロプレートの各ウエル（穴）に 250  $\mu$ l の標品を入れ、各ウエルの 590 nm における吸収をイミュノリーダーで測定した。この吸光度を濁度の値として用いた。加熱後の標品の濁度は以下のようにして測定した。250  $\mu$ l の標品の入った96穴マイクロプレートを粘着テープで覆った後、80℃の乾熱器の中に入れ、1時間加熱した。室温にて冷却後テープを除き、先と同じように各ウエルの 590 nm における吸収をイミュノリーダーで測定し、この吸光度を濁度の値として用いた。

ゲルの硬さ、付着性、凝集性の測定 16穴（8穴 x 2連）のチャンバースライドの各ウエル（穴）に 250  $\mu$ l の標品を入れ、濁度測定と同様にして加熱ゲルを調製する。生成したゲルを穴から抜き取り、レオナー（Rheoner RE3340, 山電）を用いてゲルの硬さ、付着性、凝集性をテクスチュアモードにて測定した。

### 3. 研究結果

$\beta$ -ラクトグロブリン 乳清タンパクの主要成分は  $\beta$ -ラクトグロブリンである。乳清タンパク質そのものを検討する前に、まず精製  $\beta$ -ラクトグロブリンについて検討した。

図1に示すのが本実験で用いた96穴マイクロプレートであり、各ウエル（穴）に 250  $\mu$ l の標品を添加した。タンパク質濃度はいずれも 70 mg/ml である。pH を 2 から 10 まで取り、その各々の pH の標品について NaCl 濃度を 0 から 175 mM になるように加えた。加熱前においては pH 4 の 50 mM から 175 mM において、また pH 5 においては全ての塩濃度において白濁していることがわかる。それ以外の条件下では透明な状態を保持している。各 pH の 8 標品（NaCl 濃度 0 から 175 mM）は 96 穴マイクロプレートのフレームから一体にして取り外すことができる。pH 2、pH 5、pH 7、pH 10 のものを取り外し、斜めに立て掛けたのが図1の右図である。pH 5 の標品が白

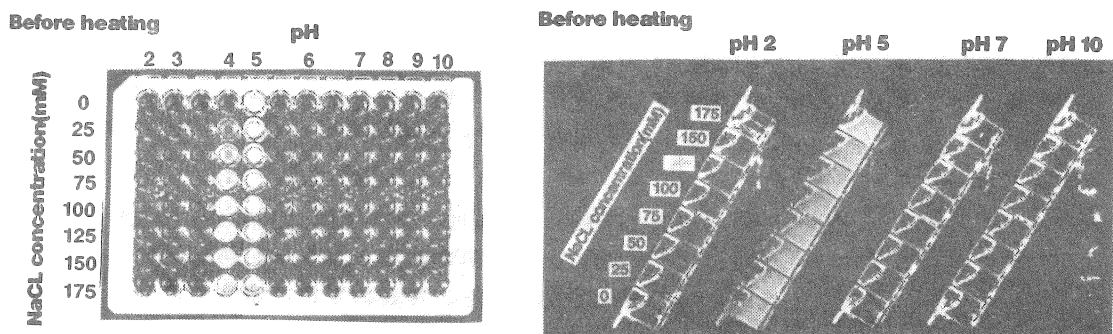


Fig. 1. Effects of pH and NaCl concentration on the turbidity of  $\beta$ -lactoglobulin.

濁し、標品が白濁し、高塩濃度になるに連れ、白濁の度合いが高くなるのが判る。しかしながらいずれも液状を保っており、白濁下に伴うゲル化は生じていない。またそれ以外のpHについては、どの塩濃度の場合も透明な液状のままであった。

次にこの標品を加熱すると、図2に示すような結果となった。pH 4、5、5.5ではいずれの塩濃度の場合にも白濁化した。さらにpH 6の場合には塩化ナトリウム25 mM以上で白濁化が生じ、pH 3.5およびpH 6.5の場合には75 mM以上の塩濃度で白濁化した。つまり $\beta$ -ラクトグロブリンの等電点であるpH 5.2付近で最も白濁化し易く、溶媒のpHがこの等電点より離れると、低塩濃度下では加熱後も透明性を維持していた。すなわちpHがより高くなるか、低くなると白濁化はより高い塩濃度で認められた。

図1右図と同様にpH 2、pH 5、pH 7、pH 10の標品ラックを取り外し、斜めに立て掛けたのが図2の右図である。pH 2においては塩化ナトリウム無添加の標品(一番下の標品)は透明液であるが、塩の添加によって液の粘稠性が上昇し、さらに塩濃度を上げると透明ゲルが形成され、150 mM以上の塩濃度においては白濁ゲルを形成した。pH 5の場合にはいずれの塩濃度においても白濁ゲルを形成し、pH 7、10においてはpH 2の場合と同様に塩濃度の上昇に連れて、透明液、透明ゲル、白濁ゲルを形成した。

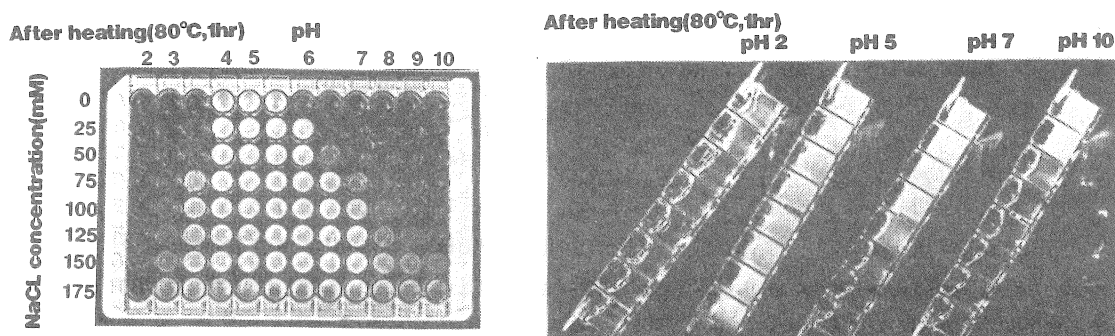


Fig. 2. Effects of pH and NaCl concentration on the turbidity of  $\beta$ -lactoglobulin heated at 80°C for 1 hr.

このように、卵白タンパク質において見出されていたのと同様に、 $\beta$ -ラクトグロブリンの場合においても濁度やゲル化能はpHと塩濃度に強く依存し、塩濃度の上昇に従って、透明液、透明ゲル、白濁ゲルの順に変化することが判明した。つぎに $\beta$ -ラクトグロブリンが主成分である乳清タンパク質について実験を行なった。

乳清タンパク質 pHを2から10まで取り、その各々のpHの標品について塩化ナトリウムを0から175 mMになるように添加した。図3に示すように加熱前においてはpH3.5の150 mM、175 mMにおいて白濁した。写真の下に(図3の下図)、濁度の値を等高線でpH、および塩濃度に対して示してある。図1の $\beta$ -ラクトグロブリンの場合と比べると、白濁域ははるかに小さい。これは全乳清タンパク質の濃度を、 $\beta$ -ラクトグロブリンの場合と同じになるように調整してあるため、この乳清タンパク質中には他のタンパク質成分が含まれるため $\beta$ -ラクトグロブリンの含量が先の場合より少なく、このような結果になったと思われる。つまり $\alpha$ -ラクトアルブミンなどのタンパク質も低濃度下においてはこの領域において白濁しないものと思われる。

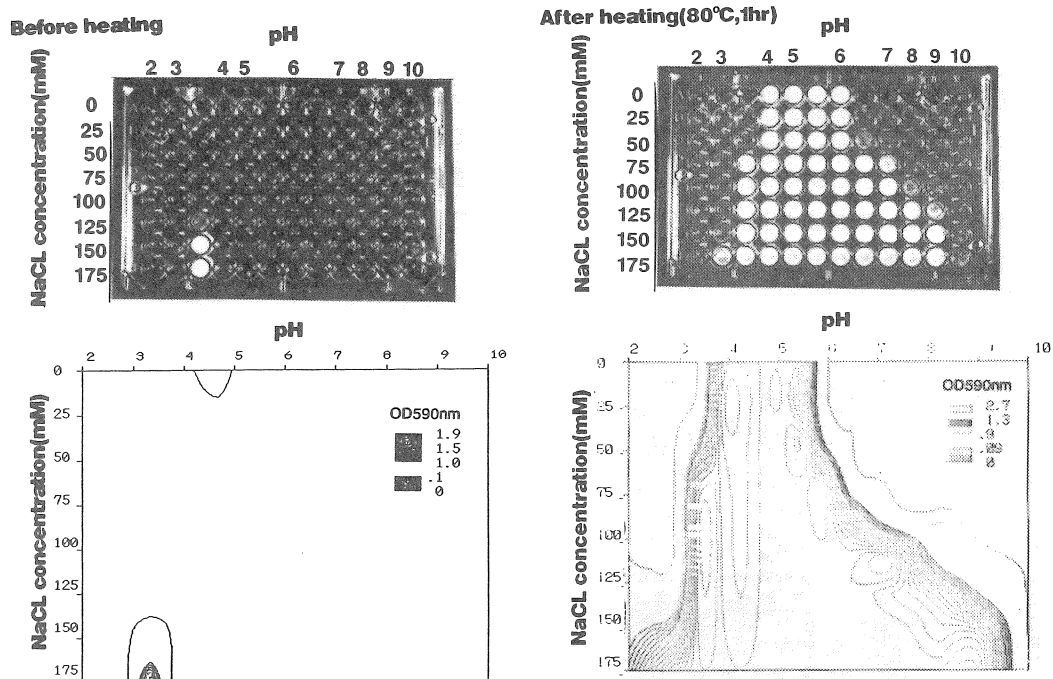


Fig. 3. Effects of pH and NaCl concentration on the turbidity of whey protein. Whey protein solution was not heated (left) and was heated (right).

つぎにこの標品を加熱すると図4に示すように白濁域は広がり、塩化ナトリウム0mM、すなわち塩無添加の場合、pH4から6までは白濁し、塩化ナトリウム175mMの場合にはpH3からpH9まで白濁することがわかる。写真の下に、濁度の値をpH、および塩濃度に対して等高線表示を用いて示してある。この白濁域は図2に示した $\beta$ -ラクトグロブリンの場合とほぼ同様の傾向を示した。加熱後の透明性は主要成分の $\beta$ -ラクトグロブリンの影響が強いものと思われる。図3および図4の下図に示した等高線図をさらに三次元に描いたのが図5である。濁度を縦軸に取っている。したがって山の部分が白濁域を示す。濁度はpHと塩濃度に強く依存し、しかも極めて僅かな変化によって劇的に状態が変化することが読み取れる。とりわけ中性付近においては、塩濃度の影響が顕著であり、わずかな塩濃度の違いが透明と白濁を分けることを示している。

加熱前の乳清はpH、塩濃度によらず全て液状である。しかし加熱後の標品は加熱時の溶媒のpH、塩濃度によって、ゾル状からゲル状まで様々な形態を取る。 $\beta$ -ラクトグロブリンの場合と同様に塩濃度が上昇するに連れ、透明液(ゾル)、透明ゲル、白濁ゲル、白濁液の順に変化し、pHの場合も同様に、乳清タンパク質の主要タンパク質 $\beta$ -ラクトグロブリンの等電点に近づくに連れ、透明液(ゾル)、透明ゲル、白濁ゲル、白濁液の順に変化する。

食品ゲルの性質は、硬さ、付着性、凝集性に代表されるパラメータで表わすことができる。これらの値はテクスチュロメータを用いて測定しうる。図6に各pH、塩濃度において調製した加熱ゲルの硬さ、付着性、凝集性を示している。濁度についても表示してある。この4つのグラフを比較して検討することにより、ゲルの性質がわかる。凝集性の高い標品はゲル状態のものである。濁度の図と比べると、pH8、9の低塩濃度域では高い凝集性を示すが濁度はない。したがって、これらの標品は透明ゲルである。一方pH3.5からpH6.5の全ての領域、およびpH7からpH11の高塩濃度域においては、高い濁度でしかも凝集性も高い値を示している。したがってこの領域では白濁ゲルである。また同じゲルでも、その性質は非常に異なる。pH8、塩化ナトリウム50mM存在下で生成するゲルは硬く透明であり、同じpH8であっても塩化ナトリウム125mM存在下で生成するゲルは白濁し、付着性が低く、柔らかい状態である。このように、同じタンパク質

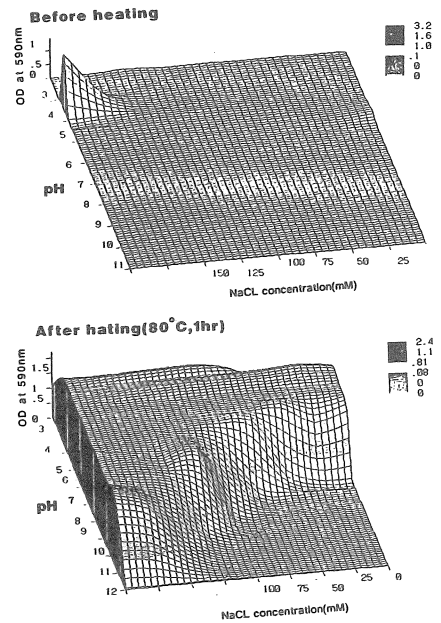


Fig. 4. Effects of pH and NaCl concentration on the turbidity of heated whey protein.

で、同じタンパク質濃度であっても、pH、塩濃度によって加熱タンパク質ゲルの状態は著しく変わり、しかも極めて微細な変化によって、大きく変化することが判る。

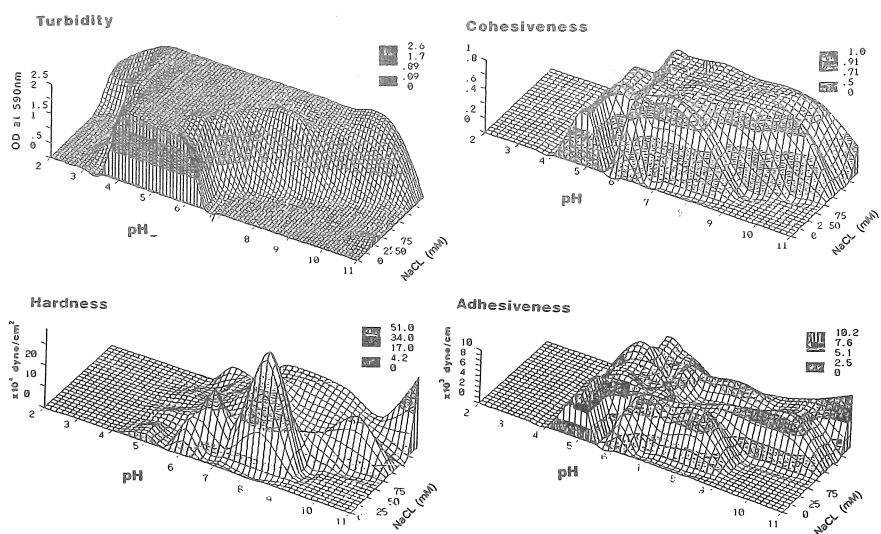


Fig. 5. Effects of pH and NaCl concentration on the turbidity, hardness, cohesiveness and adhesiveness of heated whey protein.

#### 4. 考察

上記の結果は、従来卵白アルブミンなどによって見出されて来た現象と同じ傾向であり、その機構は本質的には同じものと思われる。すなわち乳清タンパク質分子は加熱を受けると変性する。変性タンパク質分子は互いに会合し、凝集体を形成する。この凝集体がゲルのネットワークや白濁塊を構成する。すなわち熱変性に伴い、本来分子内部に存在していた疎水領域が分子外部に露出し、互いの疎水的相互作用で分子間に親和力が与えられる。しかし分子間には親和力だけでなく、分子の表面電荷による静電的な反発力も作用し、この二つの力のバランスにより分子凝集体の大きさと形状が決まる。塩の存在は、分子表面電荷の被覆を意味し、静電的反発力を抑えることになる。したがって加熱時の塩濃度を調整することにより、二つの力にバランスを制御することが可能であり、低塩濃度では粘稠なゾルや透明なゲルが形成され、高塩濃度では白濁ゲルが形成される。透明ゲルの方がゲルネットワークに関わるタンパク質分子が大いため、より強固なゲル構造を形成するものと考えられる。ゲルに至らぬタンパク質濃度の場合は、塩の存在は液の粘稠性や透明性に影響を与える。



## 5. 今後の課題

ゲルについては最も基本的なパラメータである硬さ、凝集性、付着性について測定し、ゲル物性の概要を示したが、ゲル構造や特性をより詳細に検討し、それらと塩濃度、pH変化との対応を調べる必要がある。例えばクリーブ解析や応力緩和解析によるゲルの粘弾性の測定、さらに動的粘弾性の測定による解析が考えられる。

図1および図2で示したように、ゲル形成に至らぬ塩濃度やpH条件下では透明液を与え、また極端に高塩濃度では白濁液を与える。この液体の性状も塩濃度、pHに依存して変化するものと思われるが、これについての定量的知見はない。またゲル化に至らぬタンパク質濃度においても粘稠な液となる。これらについては粘度計を用いて、様々な塩濃度、pH、タンパク質濃度下での粘度、および粘性挙動に対するせん断速度の効果など検討し、塩濃度、pH、タンパク質濃度の影響を系統的に調べる必要がある。

ゲルの場合も、また液(ゾル)の場合も、物性発現はタンパク質分子の凝集体形成による。したがってそのタンパク質分子の凝集体を電子顕微鏡を用いて観察し、その実体を明らかにすることも重要な今後の課題であると思われる。

## 引用文献

- 1) N. Kitabatake and E. Doi: Agric. Biol. Chem., 49, 2457 (1985).
- 2) H. Hatta, N. Kitabatake and E. Doi: Agric. Biol. Chem., 50, 2083 (1986).
- 3) N. Kitabatake, H. Hatta and E. Doi: Agric. Biol. Chem., 51, 771 (1987).
- 4) N. Kitabatake, A. Shimizu and E. Doi: J. Food Sci. 53, 292 (1988).
- 5) N. Kitabatake, A. Shimizu and E. Doi: J. Food Sci. 54, 292 (1989).
- 6) N. Kitabatake, Y. Tani, and E. Doi: J. Food Sci. 54, 1632 (1989).

Effects of pH and Salt Concentration on the Heat-induced  
Gelation and Increase in Viscosity of Food Protein Solution

Naofumi KITABATAKE (Research Institute for Food  
Science, Kyoto University)

S u m m a r y

Effects of pH and salt concentration on the turbidity (transparency) and the gel properties of the  $\beta$ -lactoglobulin and milk whey protein were examined. Turbidity was measured using a 96 well-microplate and immunoreader. In this method many samples (>100 samples) with small quantity (c.a. 250  $\mu$ L) could be treated at a time. Without heating protein solution did not gel, but became turbid suspension at around the isoelectric point of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of salt. By heating turbidity increased and gel was formed. At low ionic strength and in neutral and alkaline pH region, the samples were transparent and gelled with a slight amount of NaCl from both  $\beta$ -lactoglobulin and whey protein. This means that transparent gel can be prepared by the regulation of salt concentration and pH when heated. Hardness, cohesiveness, and adhesiveness of the gel prepared under varying pH and salt concentration were measured.