

9362 食品タンパク質のゲル物性に及ぼす塩の役割

助成研究者:村田 道代(華頂短期大学 家政学科)

(研究目的) 卵白や豆腐に代表されるように、一般の球状タンパク質溶液は、通常の条件下で加熱すると白濁ゲルとなる。これに対し、寒天やゼラチンのゲルは透明である。その意味ではゲル化材としての利用範囲は広い。しかし、ゼラチンゲルは再加熱すると溶解するという不安定な一面を合わせ持っているため、用途は限られる。卵白アルブミン

(OVA) は、卵白タンパク質の50%以上を占め、卵白の重要な加工特性である加熱ゲル形成能に大きく貢献している。また血清アルブミン (BSA) も、食品素材としては未利用のタンパク質であるが、優れたゲル化特性を有している。そこで、OVAおよびBSAを、透明ゲルを作成するための食品素材として有効利用するため、これらタンパク質のゲル化に及ぼす塩の役割を検討した。

(研究方法) OVAは産卵直後の卵を入手し、硫酸沈殿法で調製した。BSAはフラクションV (Sigma)を用いた。タンパク質溶液は十分量の水で透析した後、濃度およびpHを調整し、実験に供した。ゲルの作成には、1段階加熱法と2段階加熱法を用いた。すなわち、前者の場合は、タンパク質溶液を試験管またはガラス管に入れ、0-500mMのNaClを添加して、85°Cにて20分間加熱した。後者の場合は、1回目の加熱を少量の塩、または塩なしで行い、溶液の冷却後、種々の濃度の塩を添加し、再加熱した。ゲルの固さはレオナーRE3305 (山電) でゲル強度として、濁度は600nmの吸光度を測定した。タンパク質加熱溶液中の分子の会合状態は透過型電子顕微鏡 (TEM) で、加熱ゲルの微細構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

(研究結果) OVA、BSAおよび両者の混合溶液を、1段階加熱法により加熱した場合には、透明ゲルは非常に狭い範囲の低塩濃度域でしか得られなかった。しかしながら、単独ゲル、混合ゲルいずれの場合も、2段階加熱法を用いることにより、高塩濃度領域まで透明ゲルを作成し得る事が明らかとなった。また、2段階加熱法で得た透明ゲルは、固さにおいても良好な結果を示した。球状タンパク質の加熱ゲル形成機構を調べるため、OVAおよびBSの加熱溶液を用いてTEM観察を行ったところ、透明ゲルを形成する条件下では加熱変性分子が線上に会合したlinear polymerが、白濁ゲルの場合には、分子がランダムに会合した凝集体が認められ、球状タンパク質のゲル形成のためのメカニズムには普遍性が認められることが示唆された。SEMによるゲルの微細構造においても、透明ゲルの場合、線上の分子の会合体が網目状のゲル構造を構築しているのに対し、白濁ゲルでは、凝集体の集まりが単位となっているのが観察され、TEM観察の結果とも合致した。

9362 食品タンパク質のゲル物性に及ぼす塩の役割

助成研究者:村田 道代(華頂短期大学 家政学科)

1. 研究目的

食品タンパク質のゲル化特性は、食品加工や調理の分野において非常に重要な位置を占め、幅広く利用されている。卵白や豆腐に代表されるように、一般の球状タンパク質は生理的食塩濃度下で加熱すると白濁凝固する。これらのゲルは一旦固まってしまうと、冷やしても、また再加熱しても溶けることはなく、安定な状態を続ける。一方、寒天やゼラチンの場合は、透明なゲルを形成するため、ゲル化材としての利用範囲は広いが、栄養性においては優れているとは言い難い。しかも、ゼラチンゲルの場合は冷却すると固まるが、再加熱すると溶解するという不安定な側面を持ち合わせている。理想的な食品ゲル化材としては安定で、かつ栄養性に富む食品タンパク質であることが望ましい。

卵白は加熱ゲル形成能をはじめ、種々の加工特性を有しており、また、優れたタンパク質食品素材でもある。中でも、卵白アルブミン(OVA)は、全タンパク質の50%以上を占め、卵白のゲル化特性に大きな役割を果たしている。加えてOVAの加熱ゲルに関しては、多くの研究がなされてきている¹⁾。また、血清アルブミン(BSA)は、牛の屠殺時、副産物として多量に出てくる血液の成分であるが、日本では血液を食する習慣がないため、食品分野への利用は、ごく限られた分野へ、しかも限られた目的でのみ用いられているのみであるが、食品タンパク質としては高い栄養価を備えている。そのうえ、ゲル化特性も優れている。食の欧米化により肉の消費は急増したが、それと同時に排出される血液の量大である。その意味においても、これらのタンパク質を、食品素材として有効に利用する方法を見出すことは急務である。そこで本研究は、食品タンパク質が加熱によりゲル化する際、物性と構造にどのような影響を及ぼすかを調べようとするものである。OVAやBSAなどの球状タンパク質のゲル化には、添加する塩の濃度が多大な影響を及ぼすことが報告されている^{2,3)}。塩濃度、pH、イオン強度、加熱方法などを変えることにより、透明で、利用範囲の広いゲルや、より強固なゲルを得ることができる⁴⁾。これらのタンパク質を食品加工素材として利用し、ゲルのみならず、透明溶液や透明ゾルを作成することにより、用途に応じた物性を有する新規食品の開発、創製につながるものと思われる。本研究ではOVAおよびBSAの加熱ゲルの物性と構造に及ぼす塩の効果を調べるとともに、実際の食品が多成分から構成されていることを鑑み、両者の混合溶液を用いた場合のゲル形成についても検討した。

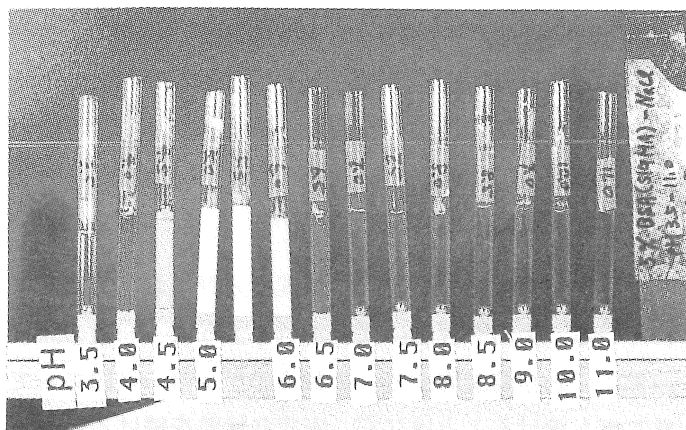


Fig. 1. Effects of pH on heat-induced gel formation in 5% BSA solution in the absence of NaCl by the one-step heating method. BSA solutions were adjusted to various pHs by the addition of 1N NaOH or 1N HCl and heated at 85°C for 20 min. A steel ball in each tube indicates whether BSA gelled or not.

ゲル形成に及ぼす塩濃度の影響 BSAが透明ゲルを形成したpH6.5での塩の添加効果を6%溶液を用いて調べたところ透明ゲルが得られたのは塩の存在しない場合のみで、20mMの添加では半透明、40mM添加では白濁ゲルとなった(Fig. 2)。次に、透明溶液の得られたpH7.5のBSA溶液のゲル化に対する塩の影響を調べたところ、NaCl濃度が低い場合にはゲル化せず、25mM添加で透明ゲルが得られた。しかしこの場合ゲル形成を確認するためのステンレスボールはやや沈み、非常に柔らかいゲルであることを示していた。透明ゲルは比較的狭い範囲の低塩濃度域で形成され、その後は白濁ゲルへと移っていった(Fig. 3)。この場合も6%で検討した結果と同じであるが、透明ゲルの得られた範囲はやや狭いように思われた。OVAの場合にもBSAと同様に、塩濃度の低いところでは透明溶液、適した塩濃度域では透明ゲル、過剰な塩濃度域では白濁ゲルとなった。OVAとBSAの混合タンパク質溶液の場合は、単一のタンパク質を用いた場合に比べ、ゲル化に達する塩濃度は高い値となったが、透明溶液、透明ゲル、白濁ゲルと塩濃度の上昇と共に変わる傾向は同じであった(Fig. 4)。ゲル化に要する塩濃度が個々のタンパク質の場合に比べ高かったのは、混合溶液中の全タンパク質濃度は5%であるが、個々のタンパク濃度は2.5%と、単一ではゲル化しない濃度のためと考えられる。

2. 研究方法

材料 OVAは産卵直後のものを入手し、硫酸沈澱法を用いて調製した。BSAはフラクションV（Sigma）を用いた。これらのタンパク質は十分量の蒸留水（0.02%（w/V）のNaN₃および0.1mMEDTAを含む）に透析した後、不溶物を除去し、タンパク質濃度およびpHを調整した。OVAおよびBSAの混合溶液は5%のOVAおよびBSAを混合（1：1）し、pHを目的の値に調整した後実験に用いた。

ゲルの作成 ゲルの作成は、特筆しない限り5%タンパク質溶液を用いて、1段階加熱法と2段階加熱法で調製した。1段階加熱法はタンパク質溶液を0～500mMのNaClを添加して85℃にて20分間加熱した。2段階加熱法はタンパク質溶液を塩の存在下、または非存在下で85℃、20分加熱し、冷却後これに種々の濃度の塩を加えて再加熱した。

透過型電子顕微鏡（TEM） 加熱溶液中のタンパク質分子の会合状態を観察するため、OVAおよびBSA溶液を加熱し、Bufferで希釈後、酢酸ウラニルまたは燐タンゲステン酸でネガティブ染色し、TEM（日立H-700H）観察に供した。

走査型電子顕微鏡（SEM） OVA、BSAおよび両タンパク質の混合溶液を用いて調製した透明ゲルの切片を2%グルタルアルデヒド、0.5%タンニン酸を含む2%グルタルアルデヒド、1%オスミウム酸で導電染色し、臨界点乾燥して白金蒸着後、SEM（日立S-4500）にて観察した。

3. 研究結果

ゲル形成に及ぼすpHの影響 塩を含まない条件でOVAおよびBSA溶液を加熱した場合のゲル化に及ぼすpHの影響を調べた。Fig. 1にBSAについて1段階加熱法で調べた結果を示す。ゲル化はpH4.0～6.5の範囲で起こり、透明ゲルはpH4.0と6.5の2点で得られた。白濁ゲルは5.0～6.0の等電点（5.2）近辺で形成され、等電点から遠ざかるpH3.5以下および7.0以上では透明溶液となった。これらの結果は6%のBSAを用いた場合に得られた結果とほぼ同じで、タンパク濃度としては5%あれば良好なゲルが生成することを示している⁵⁾。OVAの場合も等電点（pH4.5-4.7）近辺ほ白濁ゲルになるという傾向が認められたが、Hattara²⁾が報告しているpH6.5～7.0でのゲル化は認められなかった。これは、80℃で1時間加熱という加熱方法の違いというよりはむしろ、Hattara²⁾は20mMの食塩水で透析したものをを用いたのに対し、今回は水透析した溶液を使用したため、塩濃度が十分でなくゲル化しなかったものと考えられる。これらの結果は、ゲル化およびゲルが透明か白濁かというのは、タンパク質の種類や溶液のイオン強度によることはもちろんであるが、pHにも大きく左右されることを示している。

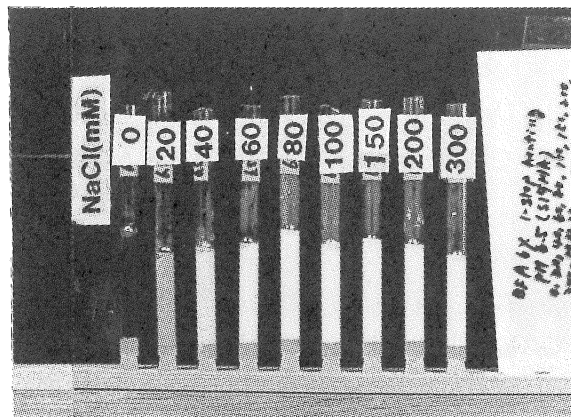


Fig. 2. Effects of NaCl concentration on heat-induced gel formation of 6% BSA solution, pH 6.5, by one-step heating method. BSA solutions containing various concentrations of NaCl were heated at 85°C for 20 min. A steel ball in each tube indicates whether BSA gelled or not.

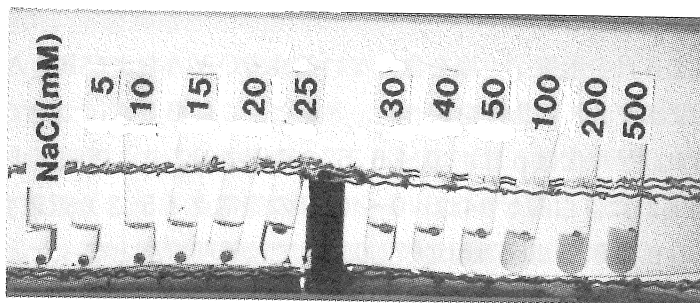


Fig. 3. Effects of NaCl concentration on heat-induced gel formation of 5% BSA solution, pH 7.5, by one-step heating method. BSA solutions containing various concentrations of NaCl were heated at 85°C for 20min. A steel ball in each tube indicates whether BSA gelled or not.

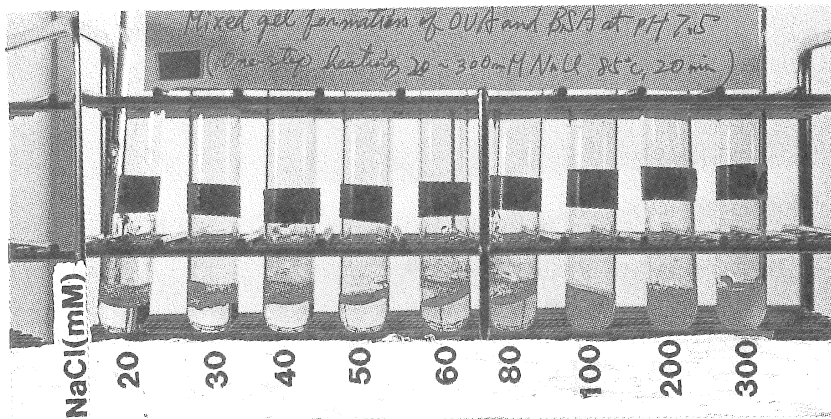


Fig. 4 Effects of NaCl concentration on heat-induced gel formation of 5% mixed solution of OVA and BSA, pH 7.5, by one-step heating method. Mixed solutions of OVA and BSA containing various concentrations of NaCl were heated at 85°C for 20 min. A steel ball in each tube indicates whether mixed solution gelled or not.

1段階加熱と2段階加熱 先に我々はOVA、BSAおよびリゾチームについては2段階加熱法を用いることにより、広範囲の塩濃度で透明性において優れたゲルを形成し得ることを報告した⁴⁻⁶⁾。しかしながら、OVAの場合はBuffer中で1連の操作を行っているため、食品ゲルという観点からすると、実際分野への応用はできない。その意味においても水溶液中でのゲル化に関する研究が必要である。また、BSAも前回は6%という比較的高い濃度の水溶液を用いたが、Fig. 1および3に示したように5%でもゲル化の様相は十分検討できるものと考えられる。そこで両タンパク質の濃度を5%とし、十分量の水透析したものを試料溶液として用いることとした。前回BSAは2段階加熱法として、1回目の加熱を少量の塩(10 mM)を添加して行う場合と、添加せず無塩で行う場合との2種類の加熱法を用いた⁵⁾。そして、1回目の加熱時に少量の塩を添加して行ったものの方が透明性において優れていること、またゲル強度も1段階加熱で得たゲルと同じくらい固いことを明らかにした。そこで今回は用いるタンパク質濃度を単独、混合いずれの場合も5%とし、先のBSAの場合と同様1段階加熱法と2段階加熱法(1回目の加熱を塩あり塩なしの両方で行う)を用いて加熱ゲルを作成し⁵⁾、透明ゲル作成のための2段階加熱法の効果を調べることにした。結果をFig. 5-7に示す。BSA加熱ゲルは1段階加熱法では塩濃度の上昇と共に急速に濁度の上昇がみられたが、2段階加熱法、特に1回目の加熱時に塩を含む場合は高塩濃度まで透明性において優れた値を示した。しかし、6%溶液を用いた場合に比べ、全体的にやや白濁化が低塩濃度側にずれていた。OVA溶液および混合タンパク質溶液の場合も2段階加熱法を用いることにより高塩濃度まで透明ゲルを作成できることが明らかとなった。

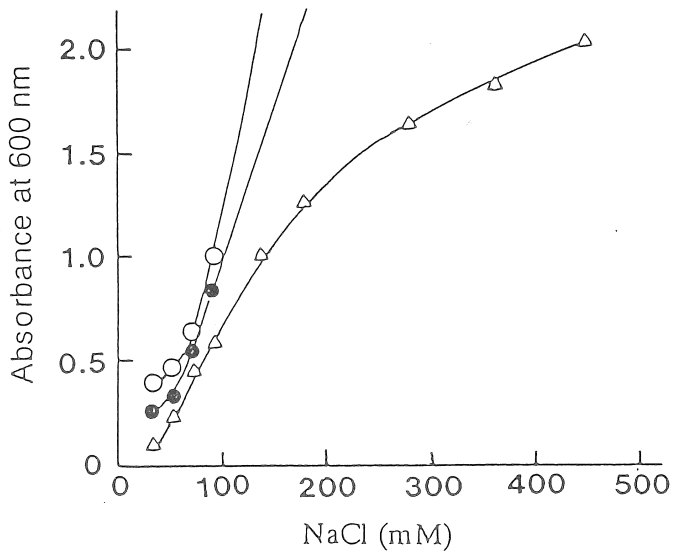


Fig. 5. Turbidity of BSA gels prepared by one-step heating method and two-step heating methods.

○—○, one-step heating method: ●—●, two-step heating method 1: △—△, two-step heating method II

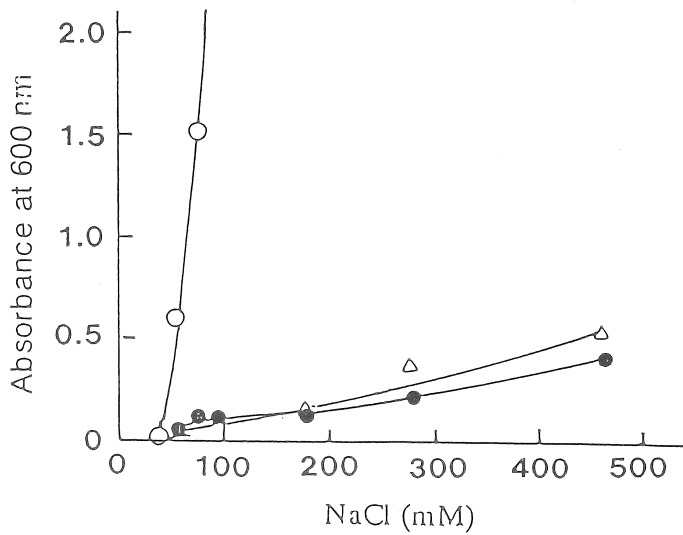


Fig. 6. Turbidity of OVA gels prepared by one-step heating method and two-step heating methods.

○—○, one-step heating method: ●—●, two-step heating method 1: △—△, two-step heating method II

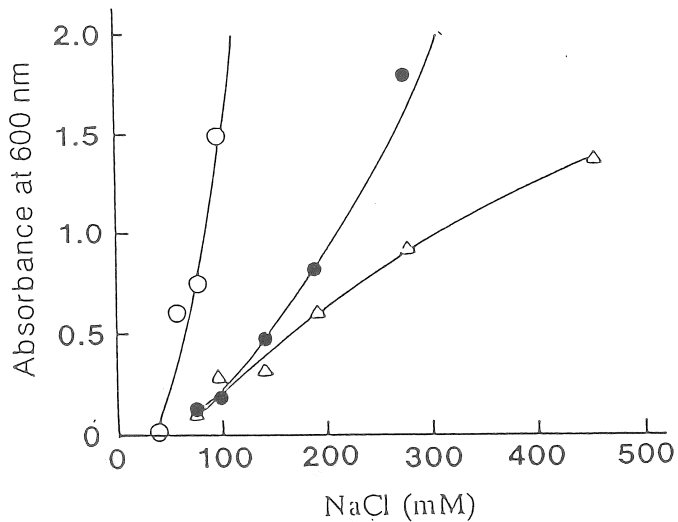


Fig. 7. Turbidity of mixed gels prepared by one-step heating method and two-step heating methods.

○—○, one-step heating method; ●—●, two-step heating method I; △—△, two-step heating method II

加熱溶液中のOVAおよびBSA分子の会合状態 OVAおよびBSA溶液の加熱透明溶液をTEM観察した結果をFig. 8に示す。aは50 mMのNaCl存在下で0.5% OVA溶液 (pH 7.5) を加熱したものである。bはFig. 1のpH 6.5のBSA溶液の濃度を1%に下げて加熱したもの、cは2.0 mMの塩を含むpH 7.5のBSA溶液を加熱したものである。OVAは0.5%ではゲル化しないが、5%溶液を50 mMの塩存在下で加熱すると透明ゲルを形成する。タンパク質濃度が低い場合でも、分子が線状につながり、それらが絡まっているのが観察された。bのBSAも、タンパク濃度をかなり下げたものであるが、長く伸びた線状の会合体が観察され、pH 6.5は塩なしでも分子が線上に会合しやすいことを示している。cのBSAは、透明ゲルを構築する直前で、加熱後の溶液はかなり粘性を帯びたゾルであった。TEM写真でも、鎖状につながった分子が部分的にはゲルかと思われるほどに網目状の構造を形成しているのが観察された。

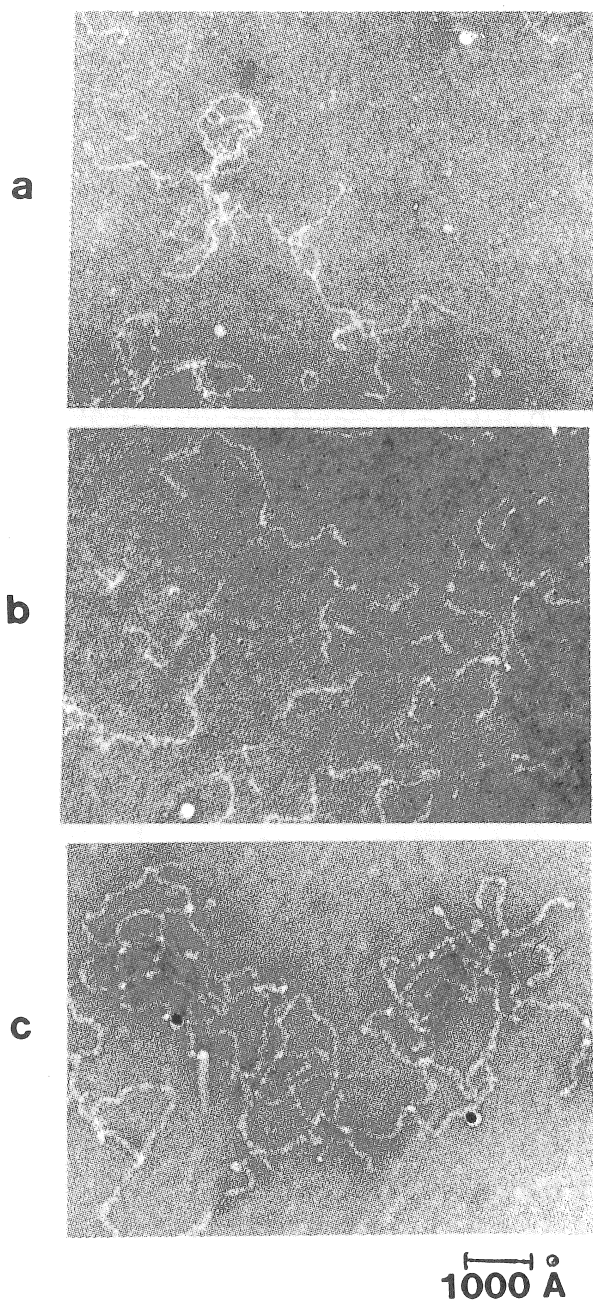


Fig. 8. Transmission electron micrographs of heated BSA and OVA solutions. a, heated 0.5 % OVA solution with 50 mM NaCl, pH 7.5: b, heated 1% BSA solution without NaCl, pH 6.5: c, heated 5% BSA solution with 20 mM NaCl.

ゲル構造の観察 Fig. 9にOVA、BSAおよび混合タンパク質から調製した透明ゲルのSEM写真を示す。aはOVA、bはBSA、cは混合タンパク質のゲルでいずれも50 mMの塩存在下で1段階加熱法により得た透明ゲルである。これら3種類のゲルは、鎖状に繋がった分子の会合体が、3次元的に絡まって網目構造を構築しているように観察された。混合タンパク質の場合は、構成タンパク質が単一でないため、熱変性した分子が会合してできる鎖状の会合体の様子やゲル構造もOVAおよびBSA単独ゲルとは少し異なっていたが、いずれにしても骨格は線上の会合体から成った網目構造で、これが透明ゲルを形成するための基本構造となっていることがSEM写真からも推察された。

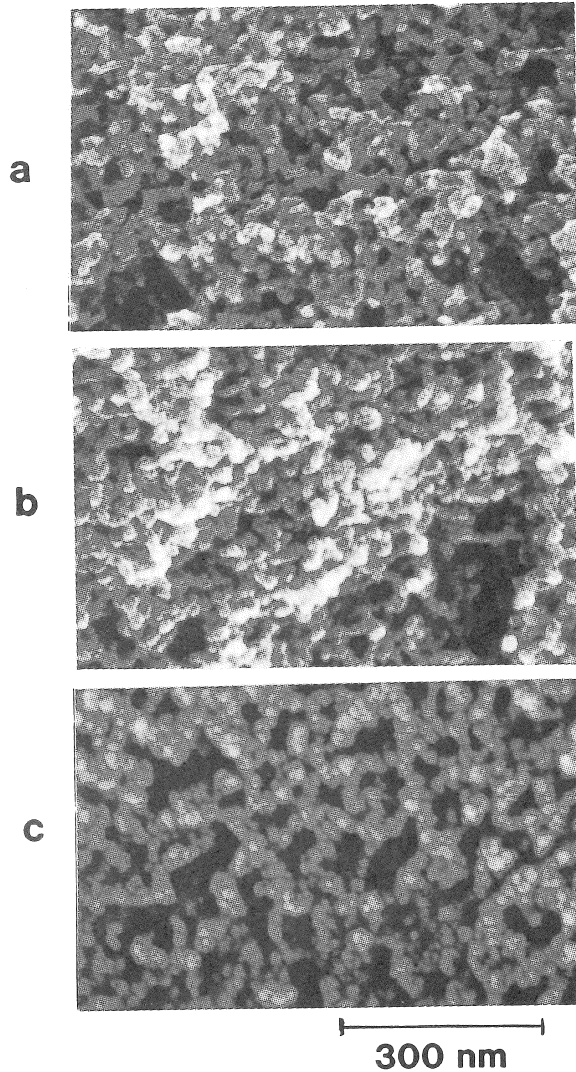


Fig. 9. Scanning electron micrographs of OVA BSA and mixed protein gels prepared by one-step heating method, containing 50 mM NaCl: a, OVA; b, BSA; c, mixed gel of OVA and BSA

4、考察

OVAやBSAのような球状タンパク質の加熱ゲル形成には、タンパク質分子間の疎水性総合作用と静電的反発力とのバランスが大きく影響し、両者を調整することにより、透明溶液や透明ゾル、透明ゲル、或いは白濁ゲルなどが得られる。透明ゲルを得るためには特にこのバランスが重要である。BSAのpH 6.5で得られた透明、ゲルはFig. 8bのように、塩無しの状態がむしろ1番バランスがとれた状態であることを示している。今回OVAおよびBSAがpH 7.5で2段階加熱法を用いることにより高塩濃度まで透明なゲルを形成できたのも、透明ゲルの基本構造である鎖状の会合体が、1回目の加熱で形成されたためと考えられる。OVAの場合は1回目の加熱時に塩を必要としなかったのに対し、BSAは少量の塩を必要としたが、これは加熱変性した分子が、鎖状に伸びるためには前者は塩無しの方が良く、後者は塩を必要としたためである。なお、両タンパク質は等電点も4.8、と5.2と比較的近く、従って等電点近辺の白濁ゲルや等電点の両側での透明ゲルなどもかなり近いpHで得られており、このことが両者を混合した場合にも、2段階加熱法により高塩濃度まで透明で固いゲルを形成した1因になっているものと考えられる。

5、今後の課題

OVAおよびBSAが単独の場合だけでなく、混合状態でも2段階加熱法を用いることにより、高塩濃度まで透明で、かつ固いゲルを形成することが明らかになったが、透明ゲル形成のための鎖状の会合体が混合系(多成分系)ではどのように繋がっているかをTEM観察し、異種分子間での会合のメカニズムを明らかにする必要がある。

6、引用文献

- 1) P. O. Hegg, H. Martens, and B. Lofqvist: J. Sci. Food Agric., 30, 981 (1979).
- 2) H. Hatta, N. Kitabatake, and E. Doi: Agric. Biol. Chem., 50, 2083 (1986).
- 3) B. Egelanddal: L. Food Sci., 45, 570 (1980).
- 4) N. Kitabatake, H. Hatta, and E. Doi: Agric. Biol. Chem., 51, 771 (1987).
- 5) M. Murata, F. Tani, T. Higasa, N. Kitabatake, and E. Doi: Biosci. Biotech. Biochem., 57, 43 (1993).
- 6) F. Tani, M. Murata, T. Higasa, M. Goto, N. Kitabatake, and E. Doi: Biosci. Biotech. Biochem., 57, 209 (1993).

Effects of salt on physical properties of food protein gels

Michiyo MURATA (Kacho Junior College)

The effects of sodium salt on turbidity, hardness, and microstructure of gels from two food proteins, ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA) were examined. Two heating procedures were used; one-step heating method and two-step heating method. In the former a protein solution was heated at 85°C for 20 min in the presence of salt ranging in its concentration from 0 to 500 mM. In the latter a protein solution was first heated under the salt-free, or at a quite low concentration of salt and then the transparent sol obtained was heated again after mixing with various amounts of salt. Gel turbidity was evaluated by measuring the absorbance at 600 nm. A transparent gel was usually produced only at a low concentration of salt in the medium when the one-step heating method was used. However, using the two-step heating procedure markedly broadened the range of salt concentration to produce a transparent gel. On gel hardness, a BSA transparent gel was much harder than an OVA transparent gel. The hardness of a transparent gel produced by the one-step heating method was comparable with that by the two-step heating method. Molecular association involved in the heat processing was examined by transmission electron microscopy (TEM). TEM observation for the OVA and BSA transparent sols showed that protein molecules were heat-denatured to polymerize into a linear orientation. Furthermore, the scanning electron microscopy revealed directly that the OVA and BSA transparent gels were composed of three-dimensional networks of those linear polymers. Gel formation was also examined for the mixture of OVA and BSA.