

9861 卵白アルブミンに脂肪酸塩を添加しただけでなぜゲル化するのか —その機構と応用的側面—

助成研究者：太田 尚子 (日本大学短期大学部 生活文化学科)

食品タンパク質の保水性や透明感は食物の二次機能を向上させるうえで重要な要因の1つである。これまで私たちは、種々の食品タンパク質の加熱ゲル形成時における脂肪酸塩の添加が、安全性が高く、且つ今までにない食感を有するゲル状素材を調製できることを明らかにしてきた。更に卵白アルブミンについては加熱処理は必須ではなく、脂肪酸塩を添加するだけで常温でもゲル化が起ることを見出した。

まず、脂肪酸塩添加加熱誘導ゲルの形成で効果の認められたカプリン酸ナトリウムやオレイン酸ナトリウムを用いて形成した脂肪酸塩誘導ゲルの物性は、各々の脂肪酸塩の最適条件下で形成したゲルの硬さを比較すると、カプリル酸ナトリウム誘導ゲルの硬さが、オレイン酸誘導ゲルの2倍の値を示した。走査型電子顕微鏡を用いた微細構造観察により、いずれのゲルも均質なネットワークが形成されているが、オレイン酸ナトリウムの方が、ネットワークを形成するポアー(間隙)のサイズが大きいことが判った。即ち、より緻密なネットワークが観察されたカプリン酸ナトリウムでより高いG'が示されたことから、ネットワークの細かさやゲルの硬さに高い相関性があることが判った。

次に、このような脂肪酸塩を直接タンパク質溶液に加えるのではなく、中性脂質分解物でも脂肪酸塩添加同様の効果が認められるかどうかを調べるため、オリーブオイルを基質とし、リパーゼ処理を施し得られた脂肪酸、グリセロール混合物添加の効果について検討した。(リパーゼ処理後食品添加物用水酸化ナトリウムを用いて脂肪酸塩のかたちにした。)その結果、中性脂質分解物を用いた実験では、添加濃度3.5%で脂肪酸塩添加ゲル同様、常温で透明なゲルを形成することが判った。オリーブオイル分解物の添加によるゲル形成は、脂肪酸塩に加えて共存するグリセロールの影響を受けることが判った。

次に、脂肪酸塩を添加しただけで常温でゲルを形成するメカニズムについて、CD及びFTIRを用いてタンパク質高次構造の解析を行った。CDの結果、タンパク質の二次構造はほぼ保持されているものの、タンパク質の三次構造が顕著に崩壊しているいわゆるモルテングロビュール構造が構築されていることが判った。そこで、更にFTIRを用いてタンパク質の二次構造を詳細に調べた。時間経過に伴って次第に α -ヘリックス量が減少し、 β -構造が増加していた事から、脂肪酸塩誘導ゲル形成時にも、基本的には卵白アルブミンの加熱誘導ゲル形成時と同様の二次構造の変化が起っていることが判った。しかしながら、その変化量を比較して見ると、脂肪酸塩誘導ゲルでは約1/2の小さな変化量であることから、加熱ゲルに比べてよりマイルドな構造変化であることが判った。以上のことから、脂肪酸塩誘導ゲルの形成機構は、脂肪酸塩添加によって卵白アルブミンがモルテングロビュール構造を構築し、更にわずかな二次構造の変化により生じるものと考えられた。

9861 卵白アルブミンに脂肪酸塩を添加しただけでなぜゲル化するのか —その機構と応用的側面—

助成研究者：太田 尚子（日本大学短期大学部 生活文化学科）

1. 研究目的

食品タンパク質ゲルの保水性や透明感は、食物の二次機能（主としてテクスチャーや嗜好性）を満足させる上で重要な要因の一つである。とりわけ、その広範な食品学的機能特性を自由自在にコントロールすることができれば、新規食品素材を創造し、これを既存の食品とうまく調和させ利用するために非常に有利であることはいうまでもない。申請者らはこれまで、未利用食品タンパク質（ゴマタンパク質、米糠タンパク質）を用いて、安全性が高く、且つ、今までにない食感を有するゲル状素材を、炭素鎖長10以上の脂肪酸塩（脂肪酸ナトリウム）を添加して加熱する事により調製することに成功し、そのメカニズムの解析を行ってきた^{1, 2)}。また、広く利用されている代表的な食品タンパク質である卵白アルブミンや大豆タンパク質についても脂肪酸塩添加によりゲルの物性が改変される事を見出し、本法の普遍性を確認した³⁾。更に、これに加えて最近、透明な卵白アルブミンゲルの形成には加熱操作を必要とせず、オレイン酸塩などの脂肪酸塩を添加するだけで常温でもゲル化が起こる事を見出した（以下、脂肪酸塩誘導ゲルと示す）。そこで本研究においては、脂肪酸塩誘導ゲルの物性の発現とその形成機構を明らかにすることを目的として研究を進めた。即ち、まず卵白アルブミンに様々な脂質（脂肪酸塩、リパーゼ処理を施した中性脂質など）を混合したゲルがもつ食品学的機能特性を調べ、脂肪酸塩誘導ゲルが、共存する塩の種類や濃度によってどのように影響を受けるかを明らかにした。更に、卵白アルブミンに脂肪酸塩を添加しただけでなぜゲル化するのかを、タンパク質の高次構造変化を解析することにより明らかにした。

2. 研究方法

2. 1 試料の調製

卵白アルブミン（OVA）は太陽化学（株）より購入し、カプリン酸ナトリウム及びオレイン酸ナトリウムはシグマ社より購入した。また、リパーゼ処理中性脂質の調製は、これまでの研究でゲルの保水性や透明度の向上に有効であることが既に明らかになっているオレイン酸を主要な含有脂肪酸とするオリーブオイルを基質とし、豚の膵臓リパーゼを用いて38℃にて24時間加水分解した。得られた加水分解物に食品添加物用水酸化ナトリウムを加えてグリセロールとオレイン酸ナトリウム混合物を調製した（図1）。

2. 2 タンパク質-脂肪酸塩混合物の動的粘弾性測定

粘弾性測定は、東洋精機製レオグラフゾルを用いて動的手法により行った。測定条件は周波数 3 Hz、歪率は 5 %とした。

2. 3 電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡観察は、試料をグルタルアルデヒド・オスmium酸二重固定、アルコールによる脱水処理を行ったものを、臨界点乾燥、蒸着後、日立製電界放射型走査型電子顕微鏡 (4500型) を用いて行った。

2. 4 円偏光二色性分光分析

円偏光二色性分光分析は日本分光Jasco J-720型を用いて、種々の濃度のカプリン酸ナトリウム存在下での0.1%OVA溶液 (50mM リン酸緩衝液でpH7.0とする) の25℃における紫外外部および遠紫外部のCDスペクトルを測定した。

2. 5 フーリエ変換赤外分光分析

フーリエ変換赤外分光分析は、2枚のフッ化カルシウム製窓材の間に厚さ15 μm のテフロンスペーサーをセットし、その間隙に試料を挿入して組み立てセルに取り付けたものを、島津FTIR-4300型を用いて20℃における1500 cm^{-1} ~1700 cm^{-1} の時間経過に伴うスペクトル変化を測定した。

3. 研究結果

3. 1 脂肪酸塩誘導ゲルの物性と微細構造

これまで明らかにしてきた脂肪酸塩添加加熱誘導ゲルの形成で、保水性の高い透明ゲルの形成が可能であった炭素鎖長10の飽和脂肪酸であるカプリル酸ナトリウム及び炭素鎖長18の不飽和脂肪酸であるオレイン酸ナトリウムを用いて、卵白アルブミンの粘弾性に及ぼす添加効果について調べた。ここでは加熱処理を施さず25℃一定温度での動的弾性率の変化を調べた。カプリン酸ナトリウム及びオレイン酸ナトリウムとも1%添加では時間経過に伴う貯蔵弾性率 G' の増加は認められなかった。しかしながら2%または3%添加では混合後30分以降に次第に G' の増加が観察された (図示せず)。脂肪酸塩添加濃度依存性を調べたところ、カプリン酸ナトリウムでは2%、オレイン酸ナトリウムでは3%で最も高い G' が観察された。そこで各々の脂肪酸塩濃度を10%卵白アルブミンを用いた脂肪酸誘導ゲル形成の為に最適ゲル化条件とした。このことはタンパク質に対する脂肪酸塩の添加濃度よりもむしろタンパク質に対するモル比が重要であることを示唆するものであり、卵白アルブミン1モルに対して、45モル比の脂肪酸塩の添加が適当であることが判った。

次に図2にカプリン酸ナトリウム2%、オレイン酸ナトリウム3%の場合の貯蔵弾性率 G' を比較した。カプリン酸ナトリウム2%添加の方が高い G' を示していることが判る。そこでこれらのゲルの粘弾性がどのような要因によるものかを走査型電子顕微鏡観察により調べた(図3)。いずれのゲルも均質なネットワークを構築しているが、ポア(空隙)サイズが異なっていることが判った。オレイン酸ナトリウム誘導ゲルのネットワークのポアサイズはカプリン酸ナトリウム誘導ゲルのそれよりも顕著に大きく、ネットワークを形成する繊維の太さが細いことが判った。このことから、カプリン酸ナトリウム誘導ゲルの高い貯蔵弾性率 G' が、ゲルのより緻密な微細構造に由来していることが明らかになった。またいずれのゲルのネットワークも無添加のコントロールゲル(白濁ゲル)のそれに比べて非常に均質であり、透明ゲルがネットワークの高い均質性に基づくものであることが示唆された。

3. 2 リパーゼ処理脂質誘導ゲルの形成

次にこのような脂肪酸塩を直接タンパク質溶液に加えるのではなく、中性脂質分解物でも脂肪酸塩添加同様のゲルが形成されるかどうかを調べるため、オレイン酸を80%程度含有脂肪酸とするオリーブオイルを基質とし、リパーゼ処理を施して得られた脂肪酸、グリセロール混合物添加の効果について検討した(図4)。(ここでもリパーゼ処理後の遊離脂肪酸とグリセロールの混合物に食品添加物用水酸化ナトリウムを加えて、脂肪酸塩のかたちにした。)その結果、中性脂質分解物を用いた実験では添加濃度3.5%で脂肪酸塩添加ゲル同様、常温で透明なゲルを形成することが判った。オリーブオイル分解物の添加によるゲル形成における G' の増加は、オレイン酸ナトリウム単独の場合に比べて緩慢で、分解物を用いたゲルでは脂肪酸塩に加えて共存するグリセロールの影響を受けることが判った(図5)。更に、グリセロール添加の影響を詳細に調べたところ、低濃度(3.5%混合物中に共存する35mMグリセロールの1/2の18mM)ではゲル化を促進し、高濃度(3.5%)ではゲル化を遅らせる作用があることが判った(図示せず)。

3. 3 脂肪酸塩誘導ゲルの形成機構

次に、脂肪酸塩や脂肪酸を含む脂質の加水分解物を添加しただけで常温でゲルを形成するという事は、卵白アルブミンに脂肪酸塩を加えただけで卵白アルブミンに何らかの構造変化が起っていることを示唆するものであり、CD及びFTIRを用いてタンパク質の高次構造変化を解析した。CDの結果、タンパク質の二次構造はほぼ保持されているものの、タンパク質の三次構造が顕著に崩壊しているいわゆるモルテングロビュール構造が構築されていることが判った。そこで、更にFTIRを用いてタンパク質の二次構造を詳細に調べた。時間経過に伴って次第に α -ヘリックス量が減少し、 β -構造が増加していた事から、脂肪酸塩誘導ゲル形成時にも、基本的には卵白アルブミンの加熱誘導ゲル形成時と同様の

二次構造の変化が起っていることが判った。しかしながら、その変化量を比較して見ると、脂肪酸塩誘導ゲルでは約1/2の小さな変化量であることから、加熱ゲルに比べてよりマイルドな構造変化であることが判った。以上のことから、脂肪酸塩誘導ゲルの形成機構は、脂肪酸塩添加によって卵白アルブミンがモルテングロビュール構造を構築し、更にわずかな二次構造の変化により生じるものと考えられた。(図6)。

3. 4 まとめ

OVAにFASを添加しただけでゲル化するという現象は、球状構造を持つOVA分子がFASを添加した際に、適度な分子のunfoldingを起こすことによって導かれることが判った。このタンパク質における微小な構造変化の実態は、FASを添加する事によるOVA分子のモルテングロビュール状態への転移であると考えられる。FASを添加した際にモルテングロビュール状態を形成するか否かは、タンパク質の種類により元来含有する二次構造(α -ヘリックスや β -構造)の量にも差があることから、タンパク質の種類によって左右されると考えられる。しかしながら、FASにより誘導されるこのゲル形成は急激な加熱を伴わないゆっくりとした相転移であり、且つゲル形成の過程で、溶液の透明度をほとんど損失しないことから、ゲル化を起こし得る高タンパク質濃度での分光光学的手法を用いた状態変化の解析を可能にすることが期待でき、タンパク質のゲル形成機構解明の為に役立つ極めて興味深い方法と考えられる。

引用文献

- 1) Yuno-Ohta, N., Maeda H., Okada, M. and Hasegawa, K. Formation of transparent gels of sesame 13S globulin: Effects of fatty acid salts. *J. Food Sci.* 1992, 57, 86-90.
- 2) Yuno-Ohta, N., Ohta, H., Maeda H., Okada, M. and Hasegawa, K. Relationship between the functional properties and microstructure of food protein gel: Effects of fatty acid salts. In *Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions*, Nishinari, K. and Doi, E. (Ed.) 1994, p.371-374. Plenum Press, New York.
- 3) Yuno-Ohta, N., Toryu, H., Higasa, T., Maeda, H., Okada, M. and Ohta, H. Gelation properties of ovalbumin as affected by fatty acid salts. *J. Food Sci.* 1996, 61, 906-910, 920.

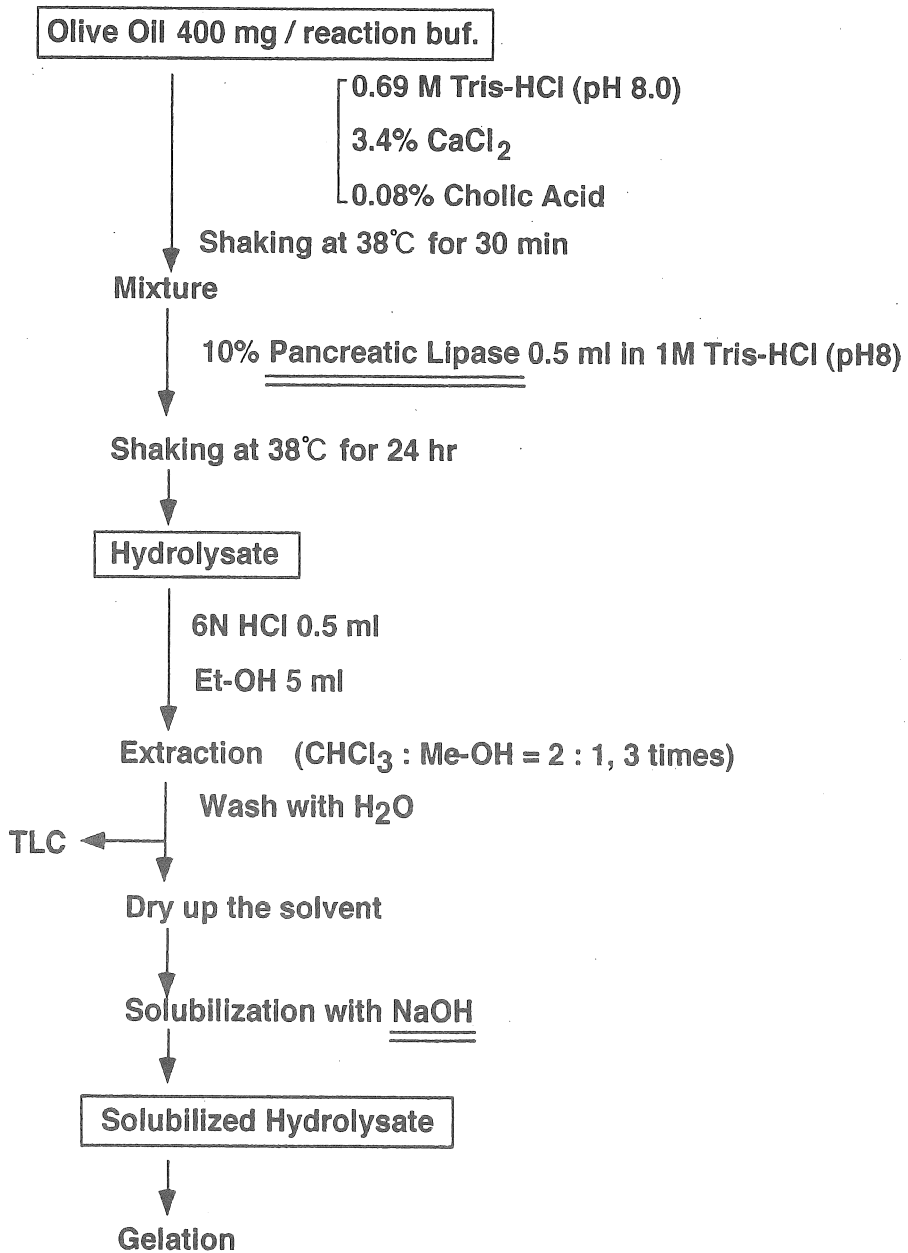


Fig.1 Procedure of Lipid Hydrolysis by Lipase

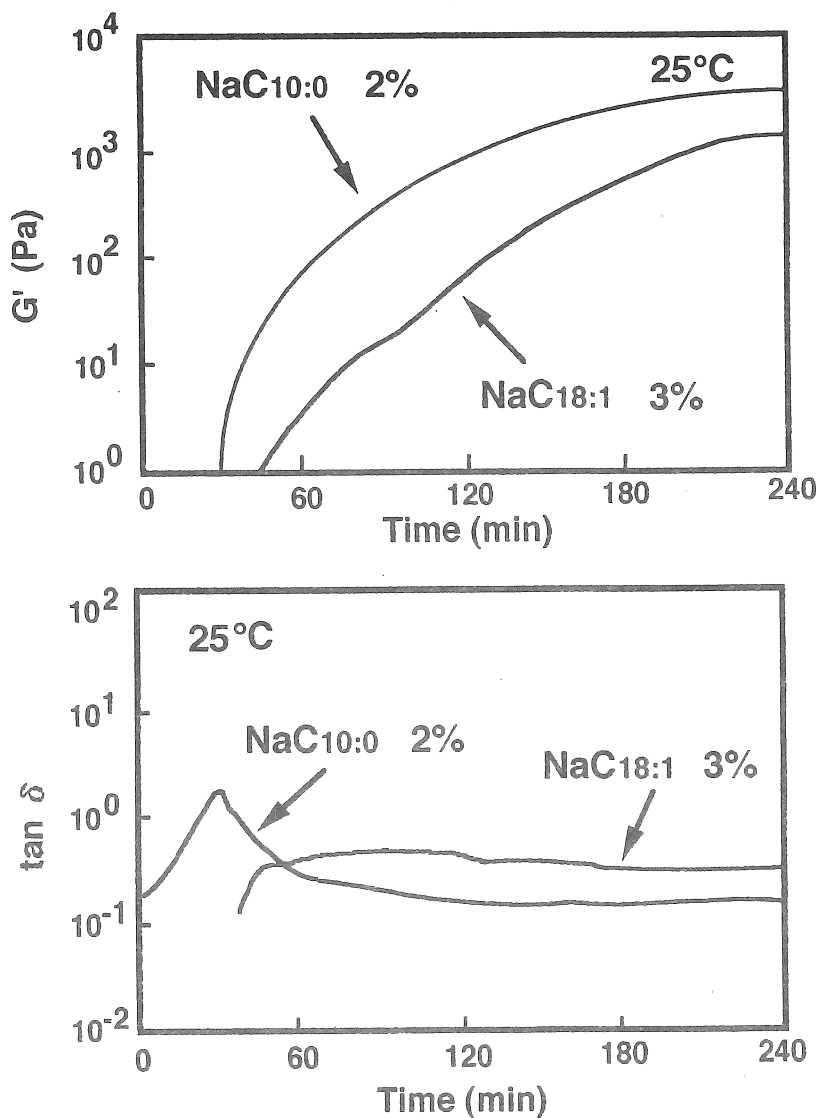
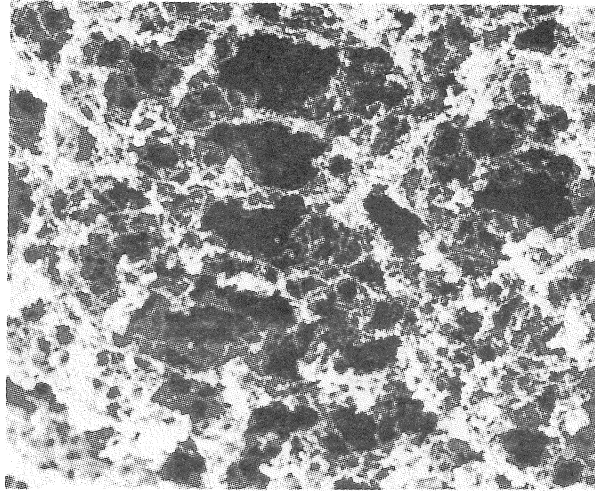


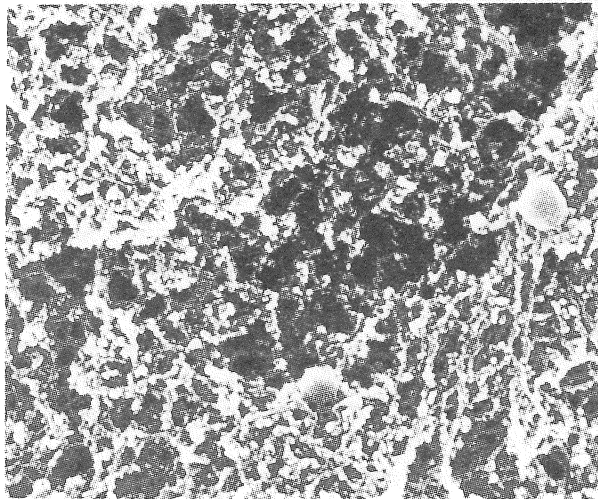
Fig. 2 Storage modulus and Loss tangent of 10% OVA over time by the addition of NaC10:0 or NaC18:1

NaC10:0, Sodium Caprate; NaC18:1, Sodium Oleate.

NaC18:1-IG



NaC10:0-IG



0.5 μ

Fig. 3 Scanning Electron Micrographs of Fatty Acid Salts-Induced Gels

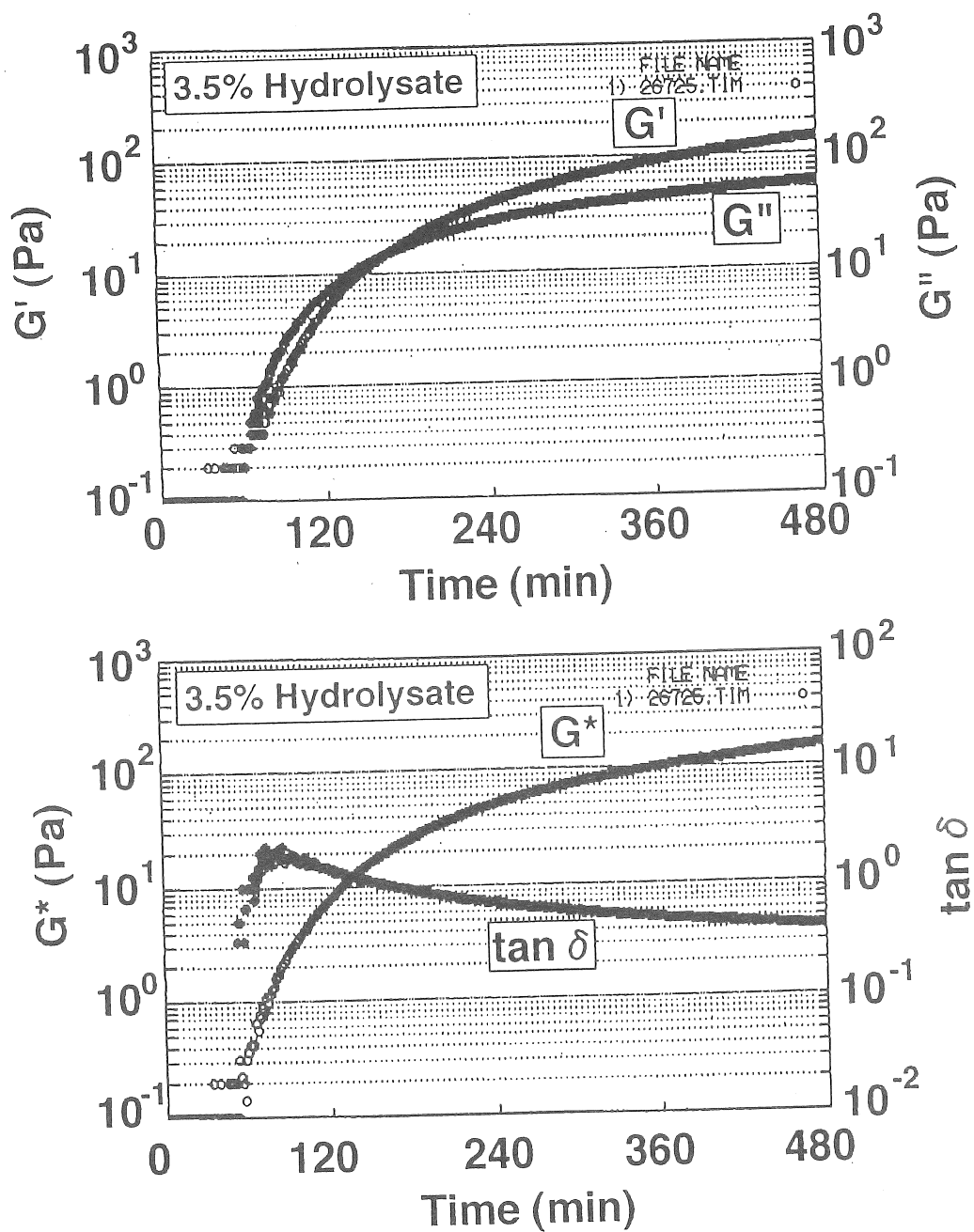


Fig. 4 Change in Dynamic Viscoelasticity of OVA by the Addition of Hydrolysate

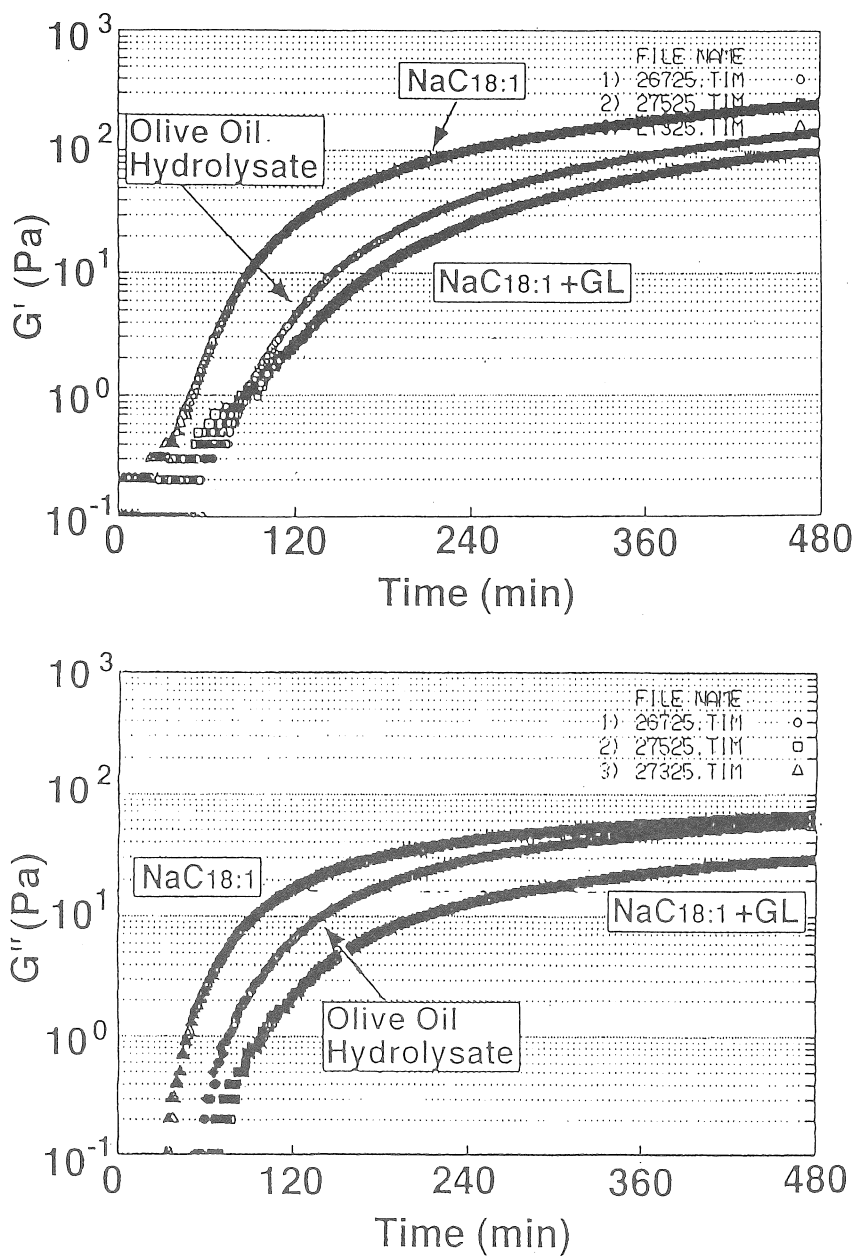


Fig. 5 Change in Dynamic Viscoelasticity of the Gels

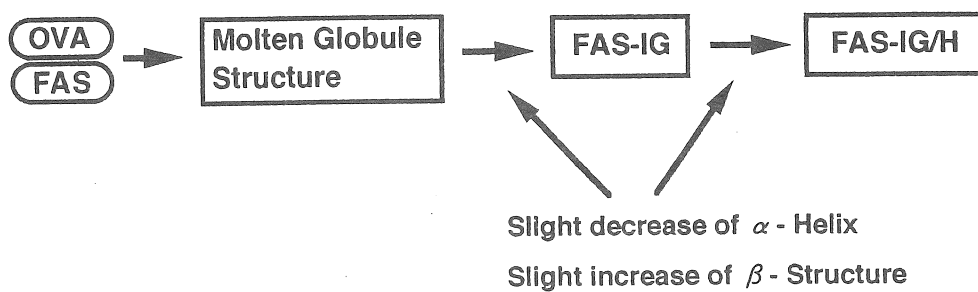


Fig. 6 Schematic Model of Gelation of Ovalbumin by the addition of Fatty Acid Salts

Why do Fatty Acid Salts Induce Gelation of Ovalbumin? -The Mechanism for Fatty Acid Salts-Induced Gelation and the Application-

Naoko Yuno-Ohta

Junior College at Mishima, Nihon University,
Bunkyo-Cho, Mishima City, Shizuoka 411-8555, Japan

Summary

We have reported that the mixture of ovalbumin (OVA) and fatty acid salts (FAS) such as sodium caplate or sodium oleate was able to form a transparent gel at room temperature without heating. In this study, we investigated that the relationship between the physicochemical properties and microstructure of the gels, and we studied on the effect of the hydrolysate of neutral lipid on the gelation of OVA. Furthermore, we analyzed the structural changes of OVA by the addition of FAS using circular dichroism (CD) spectrum and Fourier transform infrared (FTIR).

When the suitable amount of FAS with different carbon chain lengths was added to OVA, the sodium caplate-induced gel was harder than the sodium-oleate induced gel. When we compared the microstructure, the sodium caplate-induced gel showed finer network but thicker filaments than the sodium oleate-induced gel. That is, sodium oleate-induced gel has larger pores in the network. It is obvious that physicochemical properties of the gel are closely associated with the microstructure. Furthermore the mixture of sodium oleate and glycerol which is hydrolysate of olive oil also induced gelation of OVA and improved the water-holding ability and transparency of the gel similar to FAS.

The spectrum of OVA in far-UV area was slightly changed by the addition of 2% FAS. The data in the far-UV indicates that secondary structure of OVA is basically maintained even after the addition of 2% FAS. However, in the near-UV area, the spectra showed great differences by the addition of 2% FAS, indicating that the tertiary structure was completely collapsed under the condition. It suggests that the protein by the addition of FAS changed into molten-globule state.

Although FTIR showed that a decrease of α -helix and an increase of β -sheet were also observed on the formation of FAS-induced gel, the amounts of their changes were less than those of heat induced gel containing FAS. It suggested that although the mechanism for formation of FAS-induced gel is similar to that of heat-induced gel containing FAS, formation of FAS-induced gel is induced by milder denaturation of the protein.