

助成番号 9957

## 絹フィブロインの調理特性に及ぼす添加塩の影響

助成研究者：藤井 恵子（山形大学 教育学部）

絹フィブロインは、セリシンとともに絹繊維の成分であり、繊維学の観点から構造化学的な研究がなされ、また、 $\alpha$ -ヘリックスがなく $\beta$ 構造が多いモデルタンパク質としてタンパク質化学的に研究が進んできた。絹織物産業における残糸から絹フィブロインを精製し、これを食品素材として利用することは原材料費が安価であるばかりでなく資源循環の観点からも「地球環境にやさしい」と言うことができる。本研究では、原材料となる絹フィブロイン溶液の溶液構造および調理特性のひとつであるゲル特性に及ぼす添加塩の影響について検討した。

廃絹糸を1%炭酸水素ナトリウム中で煮沸洗浄する操作を数回繰り返してセリシンを除去した後、35%塩化カルシウム溶液に移し、98℃で6時間加熱溶解させた。この溶液を4℃、蒸留水中にて透析・脱塩し、濾過することにより絹フィブロイン溶液を得た。

絹フィブロイン分子の溶液中での存在状態に関する知見を得るために、NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>の4種の塩を選び光散乱測定を行った。絹フィブロイン分子の溶液中での存在状態は、共存する塩の種類によって異なり、1価の塩が共存している場合には、凝集によってフラクタルな微細構造が形成されているがさらに大きなサイズで見ると均一に分布している溶液構造をとっていた。質量フラクタルが観測された波数領域からフラクタル凝集を起こしている微細構造の大きさはおよそ0.3 $\mu$ m程度と推算された。これに対し2価の塩が共存している場合には、1価の塩の場合に観測されたフラクタルな微細構造はなく、相分離が起こっていた。塩の存在は分子間の静電的相互作用を弱めるが、2価の塩によるブリッジ効果が分子間相互作用を促し、結果として卓越した相分離構造が形成されたと考えられた。相分離ドメインの特徴的な大きさは、0.3~0.6 $\mu$ m程度と推算された。

6%絹フィブロイン溶液の相対粘度に関しては溶液構造に対応した依存性は認められなかった。粘度はコロイド粒子の流体力学的半径に強く依存することを考え合わせると、CaCl<sub>2</sub>とMgCl<sub>2</sub>添加系において認められた相分離構造はコロイド粒子内の微小な領域での相分離であることが示唆された。調理において通常利用されているNaClとMgCl<sub>2</sub>を添加した絹フィブロインゲルについて、25℃および40℃でゲル化させた試料の破断応力を測定したところ、いずれの温度条件の場合でもNaClの添加により破断応力が大きくなり、MgCl<sub>2</sub>を添加すると小さくなった。本研究で絹フィブロイン溶液の溶液物性がNaClの場合とMgCl<sub>2</sub>の場合とでかなり異なった構造であることが示された。この溶液状態における構造の違いが最終的なゲル構造に影響を与えている可能性が考えられた。



助成番号 9957

## 絹フィブロインの調理特性に及ぼす添加塩の影響

助成研究者：藤井 恵子（山形大学 教育学部）

## 1. はじめに

1994年12月にわが国政府によって環境基本計画が決定され、「日常生活一般による環境への負荷を認識し、現在の経済社会システムや生活様式を根本から見直すこと」が今後の環境保全の基本理念のひとつとして据えられた。我々は、環境から食料や原料などの資源を採取して、社会生活を営み、その過程で出る多くの不用物を廃棄物として環境に排出している。この不用物の排出が環境復元能力の範囲を越え、地球環境に甚大な悪影響を及ぼすことが懸念され、資源を有効に利用するとともに廃棄物をできる限り減らす努力が求められている。

わが国の伝統産業のひとつである絹織物業界では、製造工程で生じる屑絹・屑糸の廃棄物処理が大きな問題となっている。そのため、絹織・蚕糸業界から屑絹・屑糸から精製した絹フィブロインの食品素材としての利用を図る動きが始まっている。絹フィブロインは絹織物業における残糸から精製するため、これを食品素材として利用することは原材料費が安価であるばかりでなく資源循環の観点からも「地球環境にやさしい」と言うことができる。また、絹フィブロインは18種類のアミノ酸から構成され、主なものはグリシン、アラニン、セリン、チロシンである。グリシン、セリンには血中コレステロール濃度を低下させる作用が、アラニンには肝臓のアルコール代謝を促進させる作用が、またチロシンは痴呆症予防、パーキンソン病に効果があることが明らかにされている<sup>1-3)</sup>。このように、絹フィブロインの食品への応用技術は、環境保全と食品機能、おいしさの3つの観点からの要請をすべて満たす食品を創製する技術と言える。このような絹フィブロインの食品への応用は、東京農工大学の平林らによって提案され<sup>4-6)</sup>、絹入りうどんや絹プロテイン入りドリンクヨーグルトなどとして商品化されている<sup>7)</sup>。しかし、これまでの応用例は、既存の食品に粉末化した絹フィブロインを単に添加したものにすぎず、絹のイメージを商品に付加することを目的としたものばかりである。

絹フィブロインは、セリシンとともに絹繊維の成分であり、繊維学の観点から構造化学的な研究がなされ、また、 $\alpha$ -ヘリックスがなく $\beta$ 構造が多いモデルタンパク質としてタンパク質化学的に研究が進んできた。しかし、現在のところ絹フィブロインは食品素材として認識されていないため、その食品化学的、調理科学的研究は少ない。絹フィブロインが食品素材として認識されるためには、絹フィブロインの調理特性を最大限に生かした高度な利用法を開発して食品素材としての利用分野をさらに拡大することが必要である。絹フィブロインは $\beta$ 構造が多いタンパク質であり、 $\beta$ 構造が規則的に配向しやすいという特徴がある<sup>8)</sup>。濃度、温度を適当に選ぶことによってゲル化するとともに、優れた泡沫特性を

有していることが示された<sup>9)</sup>。そして、絹フィブロインの泡沫安定化機能を利用して、小麦粉を用いない米粉のスポンジケーキが開発された<sup>10)</sup>。

絹フィブロインは、その一次構造が主に-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-の繰り返し構造を有するタンパク質である<sup>11)</sup>。絹フィブロインの分子形態には3種類知られており<sup>12-14)</sup>、その一つはらせん構造と考えられ、シルクⅠまたはフィブロイン $\alpha$ 型と呼ばれる結晶形態をとる。第二は分子が伸びた形で、タンパク質分子は逆平行 $\beta$ シート構造をとっていると考えられ、この形をとるシルクはシルクⅡ型またはフィブロイン $\beta$ 型と呼ばれる結晶形態をとる。第三が特定の形をとらないランダムコイルである。これは非結晶性である。最近になって、気液界面において疎水性のアラニン残基と親水性のセリン残基が配向して三重らせん構造をとっていると考えられるシルクⅢという新しい形態が見つかった<sup>15)</sup>。

多くの食品は純粋な溶液の状態というよりは、むしろコロイド状態である場合が多い。泡やエマルション、ゾル、ゲルなどは調理上特に重要なコロイド状態である。コロイド粒子は、タンパク質や多糖類のような高分子が集合したものであり、その大きさは1~100 nm程度である。指摘するまでもなく、コロイド状態の安定性や表面特性、溶液構造などの特性は塩の存在によって大きく変化する。本研究では、原材料となる絹フィブロイン溶液の溶液構造および調理特性のひとつであるゲル特性に及ぼす添加塩の影響について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 絹フィブロイン溶液の調製

廃絹糸（松岡機業（株）、鶴岡市）を1%炭酸水素ナトリウム中で煮沸洗浄する操作を数回繰り返してセリシンを除去した後、35%塩化カルシウム溶液に移し、98℃で6時間加熱溶解させた。この溶液を4℃、蒸留水中にて透析・脱塩し、濾過することにより絹フィブロイン溶液を得た。絹フィブロイン溶液の濃度は6%に調整し、実験に供した。

### 2.2 光散乱測定

6%絹フィブロイン溶液の光散乱測定は、光源としてアルゴンレーザー（ $\lambda = 488 \text{ nm}$ ）を備えた光散乱光度計（DLS-7000, 大塚電子）を用いて25℃で行った。

### 2.3 粘度測定

6%絹フィブロイン溶液の粘度は、オストワルド粘度計を用いて25℃で測定した。

### 2.4 絹フィブロインゲルの調製

6%絹フィブロイン溶液を25℃あるいは40℃の条件でゲル化させた。

### 2.5 破断応力の測定

絹フィブロインゲルを直径1 cm、高さ1 cmの円筒状に切り出し、直径4 cmの円盤形プランジャー（アクリル樹脂製）を装着したクリープメーター（RE-3305, 山電）を用い、25℃で測定した。プランジャーの圧縮速度は6.0 cm/minとした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 絹フィブロイン溶液の光散乱

散乱法によって得られる結果は、散乱体の空間分布に関するフーリエ空間での情報の反映であるので、波数 $Q$  ( $Q = 4 \pi n \sin(\theta/2) / \lambda$ ;  $n$ : 溶媒の屈折率、 $\theta$ : 散乱角、 $\lambda$  入射光の波長) が小さい領域の結果は長距離空間構造に関する情報を、 $Q$  が大きい領域の結果は短距離空間構造に関する情報を与える。絹フィブロイン溶液の光散乱測定の結果を図1に示す。縦軸が散乱光強度  $I(Q)$ 、横軸が波数 $Q$ である。グラフには、散乱体間干渉によるピーク  $Q_m$  が認められた。Hossain & Nemoto<sup>16)</sup> による希薄溶液での光散乱測定ではこのようなピークは観測されていない。この結果から、脱塩後の6%絹フィブロイン溶液中においては、濃度が高いため絹フィブロイン同士の相互作用によって規則的な空間構造が形成されていることが明らかとなった。このようなピークは、相分離系で広く観測されており<sup>17-21)</sup>、一般的にはラメラ状相分離構造の面間隔  $d$  と、

$$d = 2 \pi / Q_m \quad (1)$$

と関係づけられる<sup>22)</sup>。絹フィブロインは、疎水性のアラニン残基、親水性のセリン残基とからなる界面活性剤である<sup>23)</sup> ことを考えあわせると、絹フィブロインミセルが存在していて、これが粒子間干渉を起こしていることが示唆された。 $d$  は  $0.32 \mu\text{m}$  となり、DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ 系でのPVAのゲル化の初期過程での相分離での  $0.57 \mu\text{m}$ <sup>19)</sup> という値と近いことがわかった。

#### 3.2 絹フィブロイン溶液の溶液構造に及ぼす添加塩の影響

絹フィブロインは、溶液中である配向構造をとっていることがわかったので、塩共存下

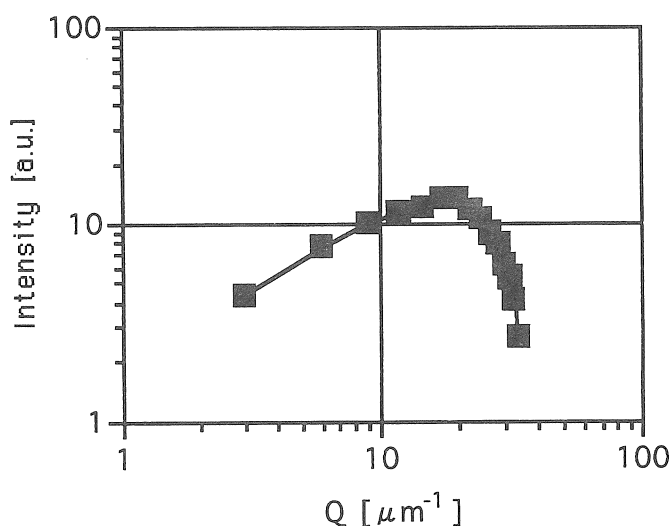


Fig. 1 Light scattering intensity of silk fibroin solution.

での溶液構造について知見を得るために、NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>の4種の塩を選び光散乱測定を行った。1価の塩であるNaCl、KCl (濃度はともに200mM) を添加すると、図1の結果と異なり、散乱光強度の波数依存性は単調減少するカーブとなり、ピークは認められなかった (図2)。このことから、NaCl、KCl共存下では純水中で形成されていた配向構造が消失していることが示された。このような単調減少する散乱カーブにおいては、Qの小さい領域では散乱体全体の平均としての大きさを反映しており、Qが中間の領域では形状による情報を含み、そしてQの大きい領域はさらに小さな界面構造、粗さに関する効果を反映している。Qが中間の領域では、フラクタル構造を有するスケール (物体全体の大きさより充分小さく、構成単位よりは大きなスケール) に対応して、散乱光強度が波数Qの

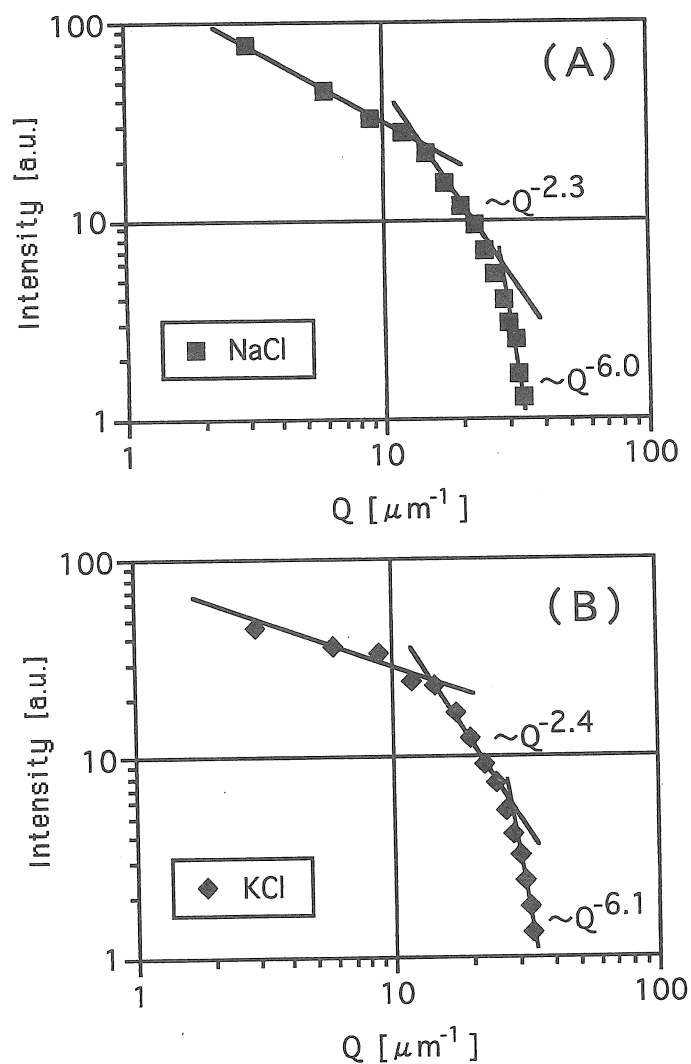


Fig. 2 Light scattering intensity of silk fibroin in 200 mM NaCl (A) and KCl (B) solutions.

べき乗則：

$$I(Q) \propto Q^{-a} \quad (2)$$

に従うことが多い ( $a$ が2~3の値をとる時質量フラクタルと呼ばれ、そのフラクタル次元は $D_M = a$ となる。 $a$ が3~4の値をとる時表面フラクタルと呼ばれ、そのフラクタル次元は $D_S = 6 - a$ となる)<sup>24)</sup>。図2の結果から、 $Q$ が中間の領域でべき乗則が成立しており質量フラクタル次元が2.3~2.4となり、拡散律速凝集体のフラクタル次元の予測値2.5<sup>25)</sup>と近い値となった。また、NaClとKClの効果にそれほど差は認められなかった。 $Q$ が大きい領域では、 $a$ が6程度の値となったことから、散乱体の表面が明瞭でないことが示唆された。

次に、2価の塩である $\text{CaCl}_2$ および $\text{MgCl}_2$  (濃度はともに200mM) を添加すると、無添加

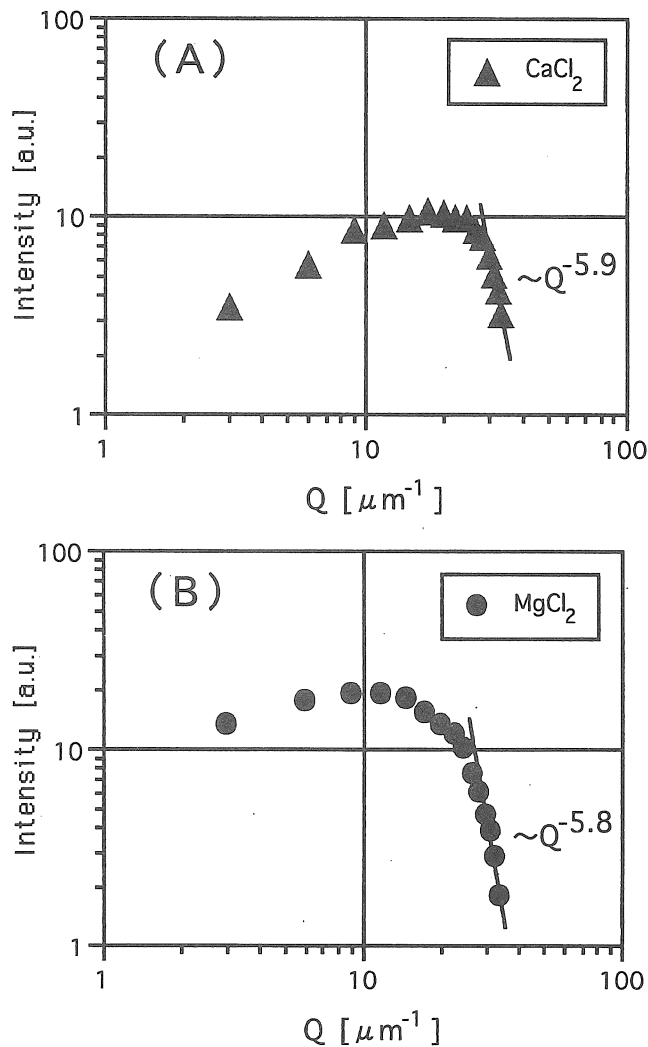


Fig. 3 Light scattering intensity of silk fibroin in 200 mM  $\text{CaCl}_2$  (A) and  $\text{MgCl}_2$  (B) solutions.

の結果と同様に散乱カーブに極大が認められた(図3)。式(1)を用いて相分離の特徴的な大きさを求めると、CaCl<sub>2</sub>を添加した系では0.36 μm、MgCl<sub>2</sub>を添加した系では0.53 μmであった。以上の結果から、NaClとKClは、透析後の純水中で形成されていた相分離構造を破壊するのに対して、CaCl<sub>2</sub>とMgCl<sub>2</sub>は相分離構造を破壊しないことが明らかとなった。いずれの塩の場合も、散乱カーブは波数Qが大きい領域において式(2)のべき乗則が成り立ち、指数aは6に近い値となった。相分離構造に由来する散乱カーブは、Furukawa<sup>26)</sup>により

$$I(X) = I(Q/Q_m) \propto X^\delta / (\gamma/\delta + X^{(\gamma+\delta)}) \quad (3)$$

が得られている。ここで、Xは規格化された波数である( $X = Q/Q_m$ )。臨界点に近い条件での相分離構造では $\delta = 2$ 、 $\gamma = 6$ と予想されており、この時Qが大きい(即ちXが大きい)領域では散乱カーブが波数の-6乗となる。CaCl<sub>2</sub>あるいはMgCl<sub>2</sub>共存下の絹フィブロイン溶液の相分離構造は、Furukawaの予測と近い結果であった。

以上の結果から、絹フィブロイン分子の溶液中での存在状態は、共存する塩の種類によって異なり、1価の塩が共存している場合には、凝集によってフラクタルな微細構造が形成されているがさらに大きなサイズで見ると均一に分布している溶液構造をとっていた(図4(A))。塩の存在によって静電的相互作用が弱まった結果凝集が拡散律速になりフラクタルな微細構造が形成されたと考えられた。光散乱実験で質量フラクタルが観測された波数領域からフラクタル凝集を起こしている微細構造の大きさはおよそ0.3 μm程度と推算

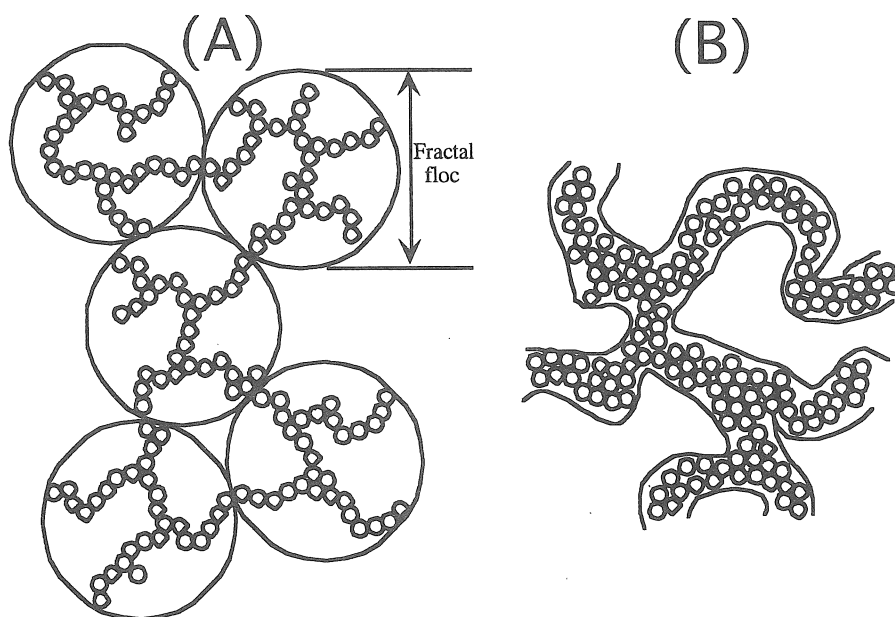


Fig. 4 Schematic illustrations of colloidal aggregate network.



された。これに対し2価の塩が共存している場合には、1価の塩の場合に観測されたフラクタルな微細構造はなく、相分離が起こっていた（図4（B））。塩の存在は分子間の静電的相互作用を弱めるが、2価の塩によるブリッジ効果が分子間相互作用を促し、結果として卓越した相分離構造が形成されたと考えられた。相分離ドメインの特徴的な大きさは、 $0.3\sim 0.6\mu\text{m}$ 程度と推算された。

### 3.3 絹フィブロイン溶液の相対粘度に及ぼす添加塩の影響

6%絹フィブロイン溶液について粘度を測定した（表1）。相対粘度は添加塩の種類に依存し、 $\text{CaCl}_2 > \text{KCl} > \text{MgCl}_2 > \text{NaCl}$ の順となった。光散乱の結果から、1価の塩と2価の塩では溶液特性については顕著な差が見られたが、相対粘度に関しては溶液特性に対応した依存性は認められなかった。粘度はコロイド粒子の流体力学的半径に強く依存することを考え合わせると、 $\text{CaCl}_2$ と $\text{MgCl}_2$ 添加系において認められた相分離構造はコロイド粒子内の微小な領域での相分離であることが示唆された。

### 3.4 絹フィブロインゲルの破断応力に及ぼす添加塩の影響

絹フィブロインゲルを調製し、そのレオロジー特性に及ぼす添加塩の影響について検討した。添加する塩については、調理において通常利用されている $\text{NaCl}$ と $\text{MgCl}_2$ を用いることとした。25℃および40℃でゲル化させた絹フィブロインゲルの破断応力の結果を図5に示す。いずれの温度条件の場合でも $\text{NaCl}$ の添加により破断応力が大きくなり、 $\text{MgCl}_2$ を添加すると小さくなった。ゲルのレオロジー特性はその内部構造に依存するので、塩の種類が異なると形成されるゲル内部構造に差が生じ、結果として破断応力に及ぼす影響が対照的になったと考えられる。本研究で絹フィブロイン溶液の溶液物性が $\text{NaCl}$ の場合と $\text{MgCl}_2$ の場合とでかなり異なった構造であることが示された。この溶液状態における構造の違いが最終的なゲル構造に影響を与えている可能性は十分に考えられる。タンパク質ゲルのレオロジー特性に及ぼす添加塩の影響は単純でないことが知られている<sup>27-29)</sup>。例えば、酸性大豆タン

Table 1 Relative viscosity of 6% silk fibroin solution.

| Added salt      | Relative viscosity |
|-----------------|--------------------|
| none            | 2.60               |
| NaCl            | 2.76               |
| KCl             | 2.90               |
| $\text{CaCl}_2$ | 2.96               |
| $\text{MgCl}_2$ | 2.88               |

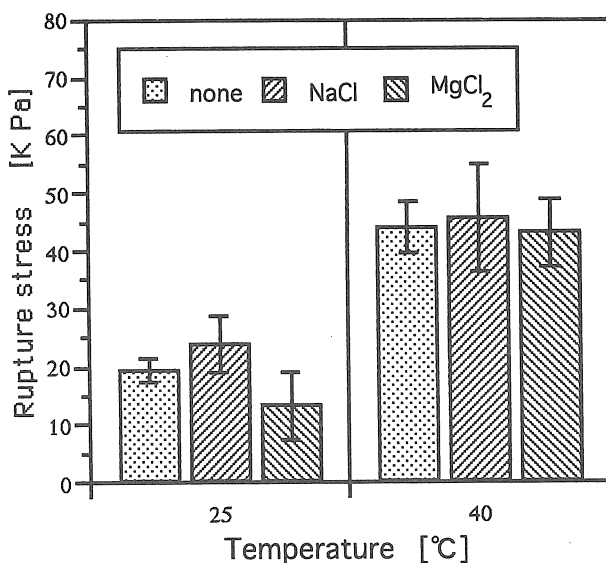


Fig. 5 Rupture stress of silk fibroin gels.

パク質ゲルではその破断応力に及ぼすNaClの効果はpHに依存しており、NaClの添加によって破断応力が大きくなることもあれば小さくなることもある<sup>29)</sup>。調理の過程においては調味料や不純物として様々な塩が共存することが想定されるため、今後さらに塩の種類やpHを変化させて破断応力に及ぼす影響を体系的にとらえることが重要であるが、このとき、相分離構造からの視点を加える必要があると思われる。

#### 4. おわりに

環境基本計画が決定され、地球環境の保全に対する関心が高まっているにもかかわらず、生活者ひとりひとりのレベルで生活様式を見直すにはまだ至っていない。絹フィブロインが食品素材として実用化され利用され始めたとしても、地球環境問題解決の決め手にはならない。しかし、地球環境との関わりの中で生活様式が変化しつつあることを食領域から示すことの社会的インパクトは極めて大きいと考えている。

#### 引用文献

- 1) 平林潔, 陳開利, 勢籙毅: *New Food Industry*, 33, 1 (1991) .
- 2) 平林潔: *化学*, 47, 530 (1992) .
- 3) 平林潔, 平岩陽一: *New Food Industry*, 35, 17 (1993) .
- 4) 平林潔, 渡辺誠, 鈴木誠: *繊維学会誌*, 45, 263 (1989) .
- 5) 平林潔: *バイオインダストリー*, 6, 749 (1989) .
- 6) 平林潔: *月刊フードケミカル*, 1, 41 (1990) .

- 7) 平林潔：「シルクを食べる」，高輪出版社，p.14 (1996) .
- 8) 濱口浩三：「改訂蛋白質機能の分子論」，学会出版センター，p.31 (1990) .
- 9) 平尾和子，木村由里子，五十嵐喜治：食科工誌，45，692 (1998) .
- 10) 藤井恵子，高橋貞幸，木内瑠美子：食科工誌，47，363 (2000) .
- 11) F. Lucas, J. T. B. Shaw and S. G. Smith, *Adv. Protein Chem.*, 13, 107 (1958) .
- 12) O. Kratky, E. Schauenstein and A. Sekora, *Nature*, 165, 319 (1950) .
- 13) O. Kratky, *Trans. Faraday Soc.*, 52, 558 (1955) .
- 14) T. Asakura, A. Kuzuhara, R. Tabata and H. Saito, *Macromolecules*, 18, 1841 (1985) .
- 15) R. Valluzzi, S. P. Gido, W. Zhang, W. Muller and D. L. Kaplan, *Macromolecules*, 29, 8606 (1996) .
- 16) K. S. Hossain and N. Nemoto, *Langmuir*, 15, 4114 (1999) .
- 17) B. S. Kim, T. Chiba and T. Inoue, *Polymer*, 36, 67 (1995) .
- 18) F. Mallamace, N. Micali and S. H. Chen, *Physica A*, 236, 149 (1997) .
- 19) T. Kanaya, H. Takeshita, Y. Nishikoji, M. Ohkura, K. Nishida and K. Kaji, *Supermol. Sci.*, 5, 215 (1998) .
- 20) G. D. Merfeld and D. R. Paul, *Polymer*, 41, 649 (2000) .
- 21) A. Ramanujam, K. J. Kim and T. Kyu, *Polymer*, 41, 5375 (2000) .
- 22) T. Hashimoto, "Progress in Pacific Polymer Science," vol. 2, ed. by Y. Imanishi, Springer, Berlin, p. 175 (1992) .
- 23) R. Valluzzi, S. P. Gido, W. Muller and D. L. Kaplan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 24, 237 (1999) .
- 24) G. L. Squires, "Introduction to the Theory of Thermal Neutron Scattering," Cambridge University Press, London (1978) .
- 25) タマス・ヴィチェック：「フラクタル成長現象」，朝倉書店，p.110 (1990) .
- 26) H. Furukawa, *Adv. Phys.*, 34, 703 (1985).
- 27) A. Visser and A. Thomas, *Food Rev. Int.*, 3, 1 (1987) .
- 28) M. K. McMIndes, *Food Technol.*, 45, 61 (1991).
- 29) M. C. Puppo and M. C. Anon, *Food Hydrocoll.*, 13, 167 (1999) .

## Effect of added salts on the food-processing properties of silk fibroin

Keiko Fujii

Faculty of Education, Yamagata University

### Summary

We investigated the effect of added salts on the solution properties of silk fibroin solution and on the mechanical properties of silk fibroin gel. A silk fibroin was extracted from sericin-removed yarn in 35 % calcium chloride at 98 °C for 6 hrs, and then the filtered silk fibroin solution was dialyzed.

The present state in the solution of the silk fibroin depends on the valence of the ion. In case of the ion of a valence such as NaCl and KCl, a fractal structure has been formed by the aggregation. On the other hand, a phase separation structure has been formed in case of the ion of the divalence. Salts weaken the electrostatic interaction between molecules. The phase separation seemed to occur, since the bridge effect by the salt of the divalence stimulates the intermolecular interaction.

The relative viscosity of 6 % silk fibroin solution did not depend on the valence of the ion. From this result, it was indicated that both the fractal structure in the solution of the ion of a valence and the phase separation structure in the solution of the ion of the divalence were the structure in the micro-region in colloidal particle. The rupture stress of silk fibroin gel added NaCl was higher than that of salt-free silk fibroin gel. On the contrary, the rupture stress of silk fibroin gel added MgCl<sub>2</sub> was lower than that of salt-free silk fibroin gel.