

54

助成番号 0054

周波数分散同時測定による加熱過程でのホエイタンパク質ゲルのゾル～ゲル転移点の定量化とゲル物性に及ぼす食塩添加の影響

助成研究者：勝田 啓子 (奈良女子大学 生活環境学部)

ホエイタンパク質に限らず、タンパク質は加熱によりゲル化/凝固する。近年、高分子科学の領域では力学的ゲル化点は明確に決定できるが、加熱によるゲル化ではゲル化点は必ずしも明確にされていない。そこで、高分子科学で提唱されている力学的ゲル化点の決定ができるか否かを検討した。

力学的ゲル化点では Winter と Chambon によれば、以下のことが成立する；

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n \quad \dots (1)$$

$$\tan \delta = \tan (n\pi/2) \quad \dots (2)$$

つまり、動的粘弾性パラメータである貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の周波数依存性にはべき乗則が成立し、その指数が一致する。同時に G''/G' である $\tan \delta$ は式 (2) を満足するというものである。

しかし、加熱過程では反応が進行しており、周波数を変え依存性を測定するのに時間を要し、時間が経過したことによる影響を周波数スイープの中から分離することが難しい。そこで偶数次数の高次高調波を重ね合わせるフーリエ合成波 (Fig.1) を印加することによって、非線形性を排除しながら、ゲル化進行中の系で粘弾性パラメータの周波数分散同時測定を行うことに成功し (Fig.2)、力学的ゲル化の決定と、べき指数の算出を可能とした。そして、NaCl 存在下と非存在下ではゲル点である温度とべき指数が異なり、架橋領域に参画しているタンパク質分子の会合力に差があることを明らかに出来た。

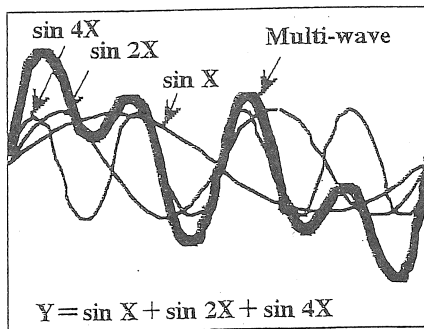


Fig.1

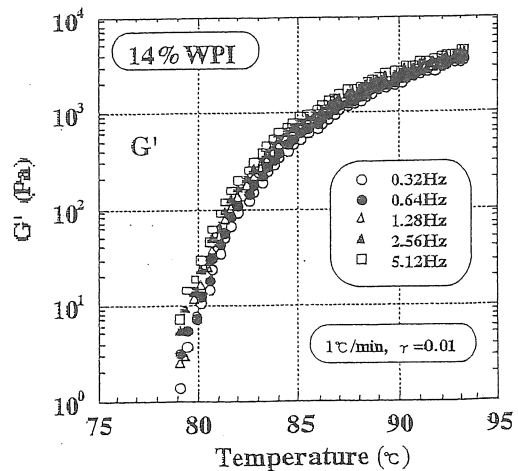


Fig.2

19

助成番号 0054

周波数分散同時測定による加熱過程でのホエイタンパク質ゲルのゾル～ゲル転移点の定量化とゲル物性に及ぼす食塩添加の影響

助成研究者：勝田 啓子（奈良女子大学 生活環境学部）

1. 研究目的

近年高分子科学の領域でゲル化に関する研究は急速な展開を見せている。高分子のゲル化は、高分子鎖が連結し始め、そのサイズが増大し、最大クラスターが系全体に広がり、パーコレートする臨界点を経て無限の大きさのクラスターが形成されるというパーコレーション理論¹⁾で説明される。このパーコレーションの転移点（臨界点）が、化学ゲルではゲル化点になる。パーコレーションの定義では、このゲル化点で定常粘度は無窮大になっているが、平衡弾性率はゼロである（Fig.1）。そして、臨界点近傍の転移点以下での定常粘度と転移点以上での平衡弾性率にはべき乗則が成立するというのがスケーリングの概念である。これだけでは、ゲル化点前後の情報は得られても、ゲル化点そのものの決定は出来なかった。何故なら、Fig.1 に示したごとく、一定応力もしくは一定歪での静的測定では粘度は無窮大に発散し、弾性率はゼロである故にゲル化点の定量は不可能であった。方や無窮大、方やゼロでは転移点の明確な臨界点は決定出来ない。

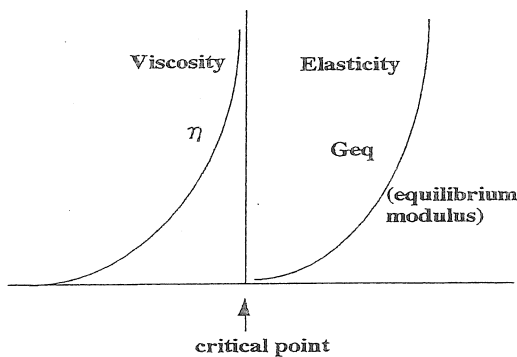


Fig. 1. Sol~Gel transition.

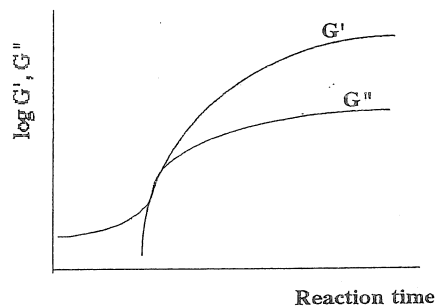


Fig.2. Changes in dynamic viscoelastic moduli with time.

しかし、1985年のChambonとWinter²⁾の研究以後、周期的な応力または歪みを印加する動的測定によりゾル～ゲル転移点の正確な決定が出来るようになった。ChambonとWinterの最初の研究²⁾では線状高分子のジメチルシロキサン（シリコン）の貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' がクロスオーバーし（Fig.2）、かつ G' と G'' の周波数依存性が等しくなる（依存性指数 $n=0.5$ ）点をゲル化点（力学的ゲル化点）としていたが、その後の研究

で力学的ゲル化点の定義は以下のように一般化されている³⁾。

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n \quad (1)$$

$$\tan \delta = \tan (n\pi/2) \quad (2)$$

この定義は、 G' と G'' がクロスオーバーせずとも(つまり値は同じでなくとも)、ゲル化点では貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の周波数依存性はべき乗則が成り立ち、それらの周波数依存性指数 n は等しい、同時に G''/G' で表される $\tan \delta$ に(2)式が成立するというものである。化学ゲルだけでなく、物理ゲルである食用ゲルにもこの法則が当てはまる。ところがゲル化の過程で反応を完全に停止できる場合、あるいは反応が非常にゆっくりしている場合は周波数依存性の測定は可能であるが、反応を停止できない場合は、周波数を変化させて測定する間に時間が経過するために正確な値を求めることは出来ない。このような系には周波数分散同時測定が有効な方法となる。そこで本研究では、周波数分散同時測定を応用し、加熱過程でのホエイタンパク質のゾルからゲルへの転移過程の定量化を試みた。

2. 研究方法

2.1. 動的粘弾性測定の原理と使用装置

粘弾性測定は一定の応力あるいは歪を与える静的測定と、周期的な応力あるいは歪を与える動的測定に大別できる。周期的な応力あるいは歪みを印加する場合、現在最も広く利用されているのが正弦振動を利用する方法である(機械的制御の容易さと計算の便による)。

正弦歪を与えた場合、理想弾性体では応力 σ と歪 γ は同位相で(振幅は変化する)あるため、 σ と γ の関係は直線となり、純粘性体では位相が 90° ずれるので σ と γ は円軌道を描く。粘弾性体では位相のずれが 0 から 90° の範囲であり、リサージュ(単振動の合成)図形が楕円となる(Fig3)。

このリサージュ図形は、測定中の試料の線形性の確認に利用できる。

線形性が無くなると、応答の余弦波が滑らかでは無くなり、リサージュが菱形に近くな

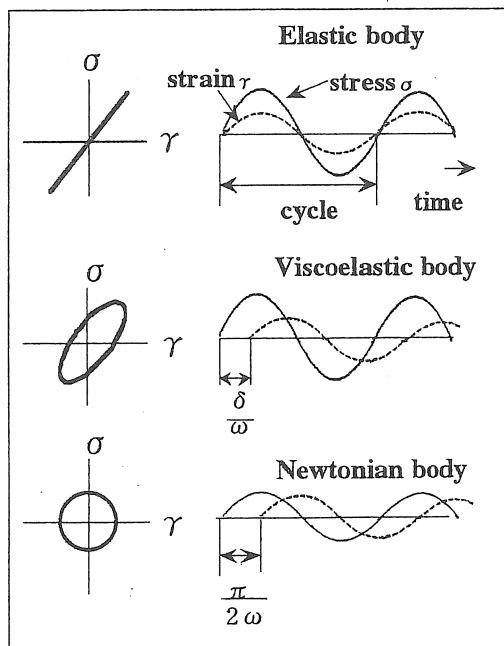


Fig.3 Relationship between stress and strain on the dynamic viscoelastic measurement.

ったり、楕円軌道が収束しなかったりするからである⁴⁾。当研究室で使用している試作装置(現在 UBM 社制作の Rheosol G-3000 と同等機種)は歪印加型であるが、データを取り込むコンピュータのディスプレイ上に、測定中の計算結果だけでなく、与えた正弦歪の波形と応答力波形(余弦波)そしてリサージュ図形を表示するようになっている。さらにアナログ信号を X-Y プロッターに落とし図形を記録することも行っている。

2.2. 周波数分散同時測定の原理

周波数分散同時測定法として目下知られているのは、RCP (raised cosine pulse : レイズド・コサイン・パルス) 法と FT-RM (Fourier transform rheometry : フーリエ変換レオロジー測定) 法である。数術に互って周波数依存性をとることは、これらの方法でも難しく、信頼できるのは 1 桁余りではあるが、反応の早い系に適用する場合有効な方法である。

FT-RM 法は、上田⁵⁾によって開発された方法で、基本周波数に偶数次数の高調波を重ね合わせた合成(正弦)波歪を与えるものである。高調波成分を重ね合わせると言うことは RCP 法とは逆に基本周波数より高周波側の周波数分散を求めることになる。

線形範囲内では複素剛性率は応力と歪のフーリエ変換の比として以下のように表すことができる。

$$\begin{aligned} G^*(i\omega) &= i \omega \Phi(i\omega) \\ &= \Sigma(i\omega) / \Gamma(i\omega) \end{aligned} \quad \dots (3)$$

従って、歪を以下のようなフーリエ合成波とすれば、多周波数の粘弾性の同時測定ができる。

$$\gamma(t) = \sum_{n=0}^m \gamma^n \sin(2\pi 2^n \omega t) \quad \dots (4)$$

これが、基本周波数歪 ;

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(2\pi \omega t)$$

に高次(偶数次)の周波数歪を重ね合わせると言う FT-RM 法の測定原理である。

Fig.4 には、例として $\sin X + \sin 2X + \sin 4X$ の合成波⁶⁾を示している。偶数次の高調波のみを重ね合わせる理由は、非線形性の影響を避けるためである。何故なら、松本ら^{7,8)}の報告で、非線形性は奇数次高調波の影響が大だからである。

2.3. 試料の調製

日本 NZMP 製の分離ホエイタンパク質(WPI: タンパク質 95%)を蒸留水(塩添加の影響を検討するために、buffer でなく敢えて)および所定モル濃度の NaCl (もしくは KCl)

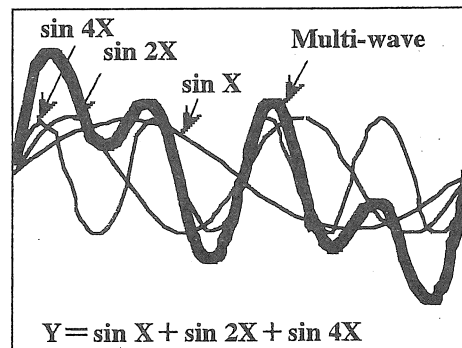


Fig. 4 An Example of Multi-wave.

溶液に15分間 500rpm で攪拌し分散させ、その後脱泡・脱気の為に陰圧下で攪拌し(200rpm, 45分)、測定試料とした。加熱という操作が施される場合、タンパク質を分散媒中で攪拌することにより生じる気泡として分散媒中の溶存気体の存在は、特にレオロジー測定の場合大きな問題になる。何故なら、加熱により気泡は大きく成長し、しかもそれがランダムに起るために系の不均一さを引き起こすからである。

3. 研究結果および考察

3.1. WPI～水系の温度依存性

Fig.5 に、一例として14Wt%WPI を1°C/min の昇温速度で基本周波数を0.32Hz(角周波数 $\omega=2$)、印加歪を1% ($\gamma=0.01$)とした時の応答トルク(M)と貯蔵弾性率G'および損失弾性率G''の基本周波数成分の温度依存性を示す。

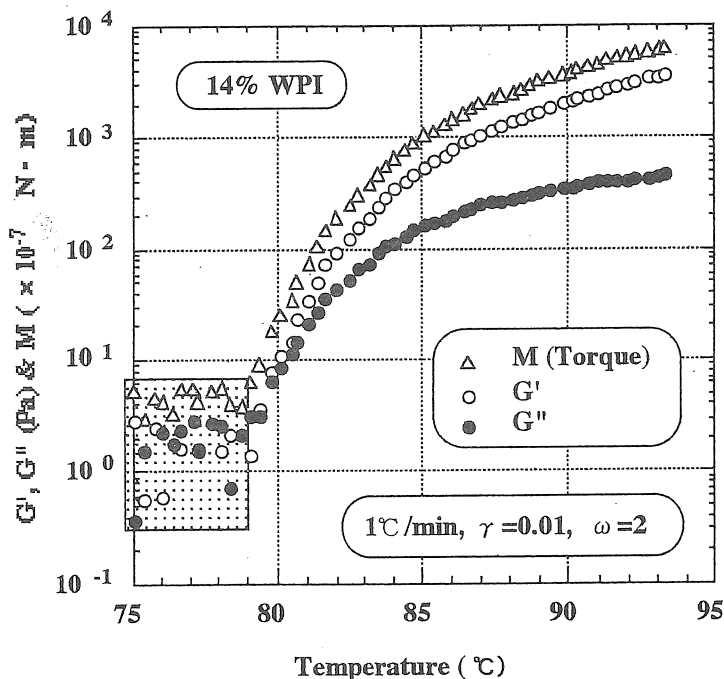


Fig.4. Temperature dependence of G', G'' and Torque for 14% WPI at 1°C/min.

Fig.4 中の網かけした四角で囲った範囲はトルクの値が一定していないことで判断されるように、本測定の場合のトルクの検出限界であり(2Kg ロードセル使用)、コンピュータに組み込んだ自動計算プログラムによりG'とG''が算出されるものの、ロードセルの感度を考慮して捨てるべき値である。このことを踏まえた上で、Fig.4の結果が示している現象を捕らえると、WPIが重合することにより粘性を増し、またクロスリンクに

より弾性率が温度と共に上昇していることを示している。そして G' と G'' のクロスオーバーは明確には観察されない。従ってこのような場合、ゾルからゲルへの転移は G' と G'' の周波数依存性での確認が必要となってくる。

3.2. WPI～水系の周波数分散同時測定

FTRM での周波数分散同時測定の結果を Fig.5 に示す。Fig.5 は Fig.4 の基本周波数成分に 16 次までの高調波歪を重ね合わせた合成波歪を印加した結果で、図面の煩雑さをさけるため G' を左に G'' を右に示している。ある温度でのシンボル間の間隔が広いと言うことは周波数依存性が大きいわち液体的であり、間隔が狭ければ周波数依存性は小つまり固体的であることを示している。温度の上昇に伴い WPI 分散液の G' の周波数依存性が小さくなっており、液体であるゾルからゲルへの転換が起っていることは Fig.4 より明瞭に読み取れる。一方、 G'' は温度上昇に伴って値は大きくなるものの、周波数依存性はあまり大きな変化がなく、95℃ 近くになっても周波数の違いによるシンボル間隔は広いままである。

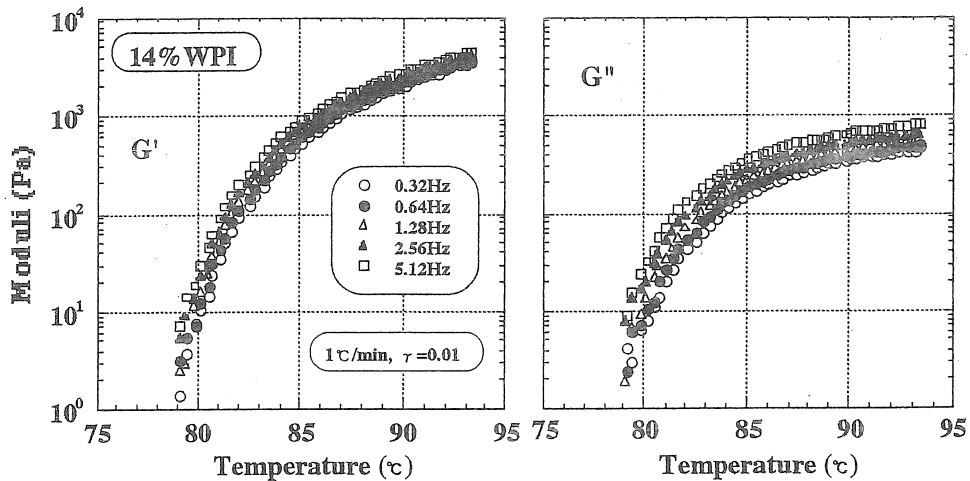


Fig. 5. Temperature dependences of G' and G'' with FT-RM.

3.3. WPI～水系の力学的ゲル化点の見極め

各温度での周波数依存性を分かりやすく示すために、周波数に対して G' と G'' の値をプロットしたのが Fig.6 である。Fig.6 は Fig.5 の値を周波数にプロットし直したものであり、中の右肩シンボル注釈の数値が温度を示している。動的粘弾性値が明瞭に発現する 79.4℃ では G' の周波数依存性指数は 0.5 程度であるが次第に依存性が小さくなり、90.3℃ では 0.1 程度になる。 G'' の周波数依存性は Fig.5 から推測されるように、 G' ほどドラ

ティックな変化は見られない。

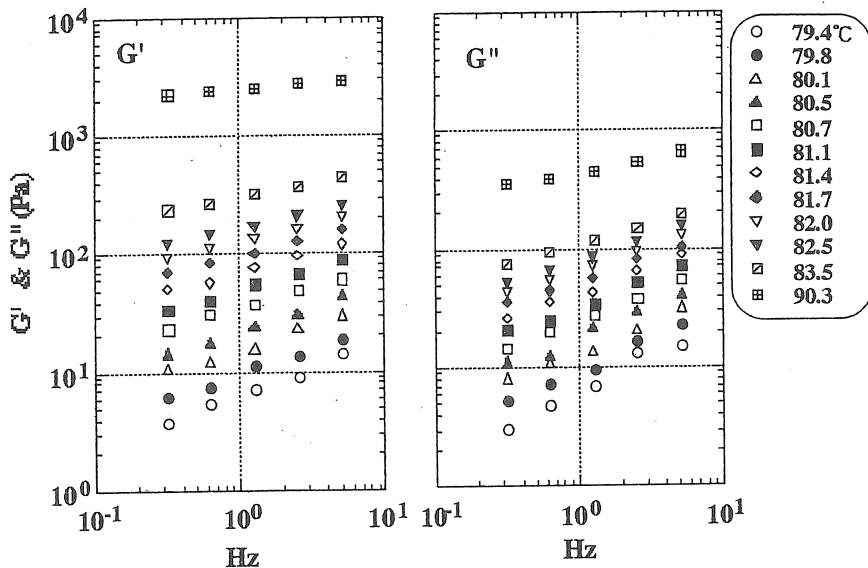


Fig. 6. Frequency dependences of G' and G'' for 14% WPI at various temperature.

次に、 G' と G'' の粘弾性挙動から力学的ゲル化点を見極めるため、ゲル化点と考えられる近傍でのいくつかの温度での G' と G'' の周波数依存性をプロットした例をFig.7に示した。

2Kgのロードセルを使用した本測定では完全に G' と G'' との周波数依存性が等しくなる点は見出せなかったが、これらの温度での粘弾性挙動から、14%WPIの力学的ゲル化点は81.5°C前後と推察できた。データの図示は省略するが、200gのロードセルを使用したの測定結果から、周波数依存性指数 $n=0.32$ で、この n から式(2)により算出される $\tan \delta$ は約0.55であり、実測の $\tan \delta$ の値0.56に近似しており、妥当な値と考えられた。

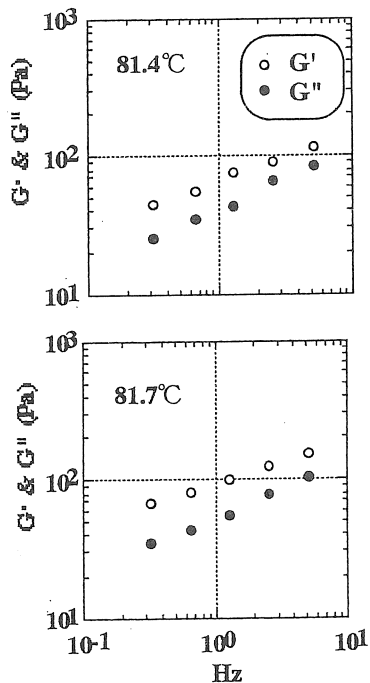


Fig. 7. Frequency dependences of G' and G'' for 14% WPI at near sol-gel transition.

ゲル化点は当然ながら、タンパク質濃度、分散媒の種類（特にタンパク質の場合は pH、イオン強度）、昇温速度などに左右される。ここまでの実験では、次節の塩添加との比較の為に敢えて蒸留水を分散媒としたが、濃度依存性を検討する際には緩衝液を使用する必要があることはいうまでもない。

3.4. WPI～水～NaCl 系の挙動

上記までと同様 WPI 濃度を 14% とし、分散媒を 0.1M NaCl とした場合の基本周波数 0.32Hz の G' と G'' の温度依存性を比較の為に WPI～水系に重ねてプロットし、Fig.8 に図示した。

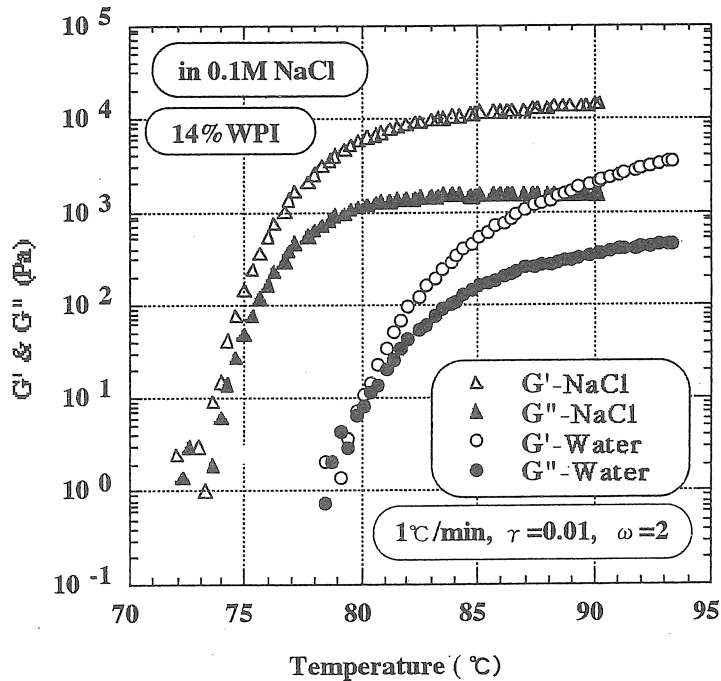


Fig. 8. Temperature dependences of G' and G'' for 14% WPI in water and in 0.1M NaCl.

塩化ナトリウム存在下で WPI はゲル化が促進され、WPI～水系より約 5°C 低い温度で G' 、 G'' とも増加を始め、かつゲル化速度も早くなる。両者とも水系であるため 100°C 以上の高温には加熱するのは不可能で、本実験では 95°C 以下迄しか測定を行っていないが（WPI～水～NaCl 系のデータが 90°C 当たりまでしかないのは、1 測定当たりのデータ格納容量に制限があるためである）、95°C 程度の加熱で形成されるゲルの弾性率は塩添加系の方が高いと推定される。測定後の裸眼観察であるが、WPI～水系のゲルは若干透明性を残しているのに対し、塩添加ゲルはほぼ完全に白濁している。NaCl 存在下で WPI は

より早く凝集し、かたいゲルを形成するといえる。

周波数分散の温度依存性重ね合せ図は省略し、 G' の周波数依存性の温度変化のみを示すと Fig.9 のようになる。WPI~水系同様、温度が高くなるに従って G' の値が大きくなるだけでなく、周波数依存性は小さくなり、固体化(ゲル化)が進行していることが確認できる。しかし周波数依存性は WPI~水系よりもかなり小さく、NaCl 存在下では早い段階から架橋あるいは凝集が起ると考えられた。

また、力学的ゲル化点近傍と考えられる温度は NaCl 系では明瞭に観測され、74.6°C 付近と考えられたが、その G' と G'' を Fig.10 に示した。NaCl 存在下でのゾル~ゲル点移点近傍の周波数依存性べき指数は $n \approx 0.22$ であった。WPI~水系の 0.32 より小さくなっていた。

卵白アルブミンの加熱ゲルのゲル形成性を追跡した根本ら^{9,10)}は一段加熱のゲルの周波数依存性指数は約 0.2 であったと報告している。

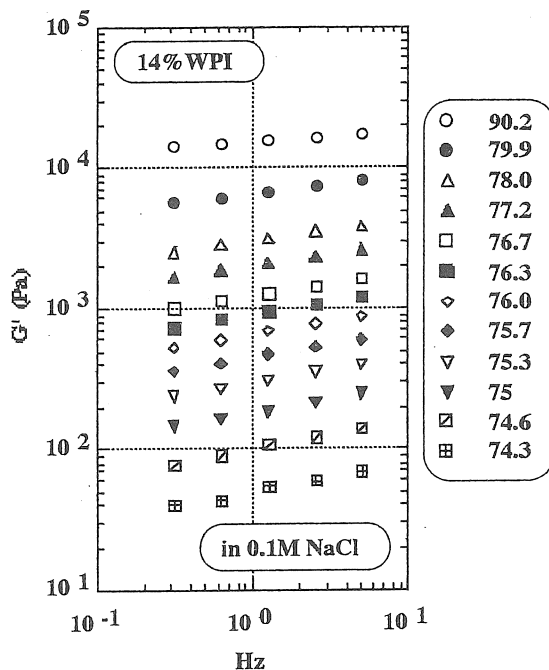


Fig.9. Frequency dependences of G' for 14% WPI in 0.1M NaCl at various temperatures.

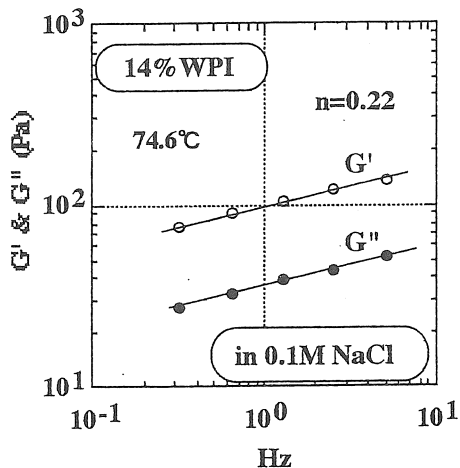


Fig.10. Frequency dependences of G' and G'' for 14% WPI in the presence of 0.1M NaCl.

4. 今後の課題

FT-RM 法により加熱過程でのタンパク質のゲル化を力学的に定量化することができ、力学的ゲル化点のべき指数を算出することが可能となった。WPI～水系においてNaClの存在下と非存在下とでべき指数が異なるということは、架橋領域の分子論的な構造に違いがあるということであり、特に架橋形成に参画したタンパク質分子鎖の会合力が異なるということを示している。残念ながらレオロジー測定は架橋領域を形成しているタンパク質分子の会合に関する“時間”の情報は得られても、その距離に関する情報は得られない。目下の段階での当研究室の設備では望むべくもないが、X線の小角散乱などの測定の組み合わせにより、架橋領域の形態がより明確になるであろう。

5. 文献

- 1) 根本紀夫：高分子、47, 566 (1998).
- 2) Chambon, F. and Winter, H.H.: *Polymer Bulletin*, 13 499 (1985).
- 3) Chambon, F. and Winter, H.H.: *J. Rheology*, 31, 683 (1987).
- 4) 勝田啓子：*New Food Industry*, 38(5), 27 (1996).
- 5) 上田隆宣：日本レオロジー学会誌、21, 181 (1993).
- 6) Katsuta, K., Tanaka, K., Maruyama, E., Kubo, M. and Ueda, T.:
in “*Hydrocolloids, Part I*”, pp.307-312 (2000).
- 7) Onogi, S., Masuda, T. and Matsumoto, T.: *Trans. Soc. Rheol.* 14, 275 (1970).
- 8) Matsumoto, T., Segaya, Y., Warashina, Y. and Onogi, S.: *Trans. Soc. Rheol.*
14, 47 (1973).
- 9) Koike, A., Nemoto, N. and Doi, E.: *Polymer*, 37, 587 (1996).
- 10) Nakamura, K., Kiriya, M., Takada, A., Maeda, H. and Nemoto, N.: *Rheol. Acta.*, 36, 252 (1997).

Quantitative Characteristics of Sol~Gel Transition Point during Heating Process using a Simultaneous Measurement of Frequency Dependence of Viscoelastic Properties for Whey Protein and Influence of Salts on their Physical Properties.

Keiko Katsuta

Nara Women's University, Department of Food Science

Summary

In the field of polymer science, recently, the mechanical sol-gel transition point had been clearly defined, but thermally induced gelling process of proteins was not yet known. Hence, the determination of critical gelling point of whey proteins was investigated.

Winter and Chambon define the critical point of sol-gel transition as follows;

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n \quad (1)$$

$$\tan \delta = \tan (n \pi / 2) . \quad (2)$$

It means that the frequency dependencies of storage modulus G' and loss modulus G'' obey the power law and both moduli are given by a straight line with coincident slope in log-log plot of moduli versus frequency. At the same time, loss tangent, $\tan \delta$ is independent from frequency dependence and obeys Eq.(2).

However, on the thermal process the gelling reaction of proteins is drastically progresses. The lapse of the time of the gelling reaction can not be separated from the frequency sweep measurement. To avoid this, a simultaneous measurement of frequency dependence is applied to the whey protein isolates (WPI)~water system during heating. The simultaneous method is so-called FT-RM (Fourier Transform Rheometry), and the multi-frequency by Fourier transform composed by only even harmonics is used.

By the simultaneous measurements, the sol-gel transition points of thermal induced protein gels were successfully detected and the power index on the critical point of WPI~water systems in the presence and absence of NaCl. From the estimating results of the critical points and the indices on that for both systems, it was strongly suggested that there are differences between the gels with and without NaCl for the structure of junction zone and the associating strength of protein molecules which participate the formation of their junction zones.