

食品多糖類ゲルの分子凝集構造に及ぼす塩添加効果

湯口 宜明

大阪電気通信大学工学部環境科学科

概要 多糖類は食品の増粘剤やゲル化剤として広く使用されている。例えば海藻にはアルギン酸やカラギーナンのようにカルボキシル基や硫酸基などの電荷を有するイオン性多糖類が含まれている。アルギン酸はカルシウムイオン添加によってゼリー状のゲル状態に転移することが知られている。硫酸基を有するカラギーナンの水溶液は冷却によってゲル化する。これらのゲル化挙動は対イオンの種類や共存する金属塩に強く影響を受ける。本研究では塩化ナトリウム(食塩)の添加濃度の範囲における電解質多糖類のゲル化の物性と分子鎖の凝集構造について、小角 X 線散乱法によりナノ構造を観察し、そのメカニズムや影響を調べた。カルシウムイオン添加によるアルギン酸ゲルの塩添加効果については、ゲルの強度測定の結果によると塩濃度が増すとともにゲル強度は低くなり、もろくなった。小角 X 線散乱による結果によると塩を添加していない場合、アルギン鎖がバンドル状に会合した棒状構造が示唆された。塩を添加すると大きな凝集体の形成が示唆された。小角 X 線散乱で観測される領域を超えたサイズのもので形成されていることを示している。つまり、塩の添加はアルギン酸鎖やアルギン酸会合体間での凝集をすすめる作用があることを示している。塩の添加はアルギン酸鎖の会合を促進すると考えられ、結果としてゲルを強化すると予想したが、そうではなく凝集が進むことによりネットワーク構造を崩しゲルの強度が低くなったと結論付けられた。一方カップカラギーナゲルの塩添加効果についてみると、塩を添加すると小角領域で立ち上がりが見られ、大きな凝集体形成が示唆された。また 500 mM, 1,000 mM の NaCl 添加系において広角領域で回折ピークが観測された。カラギーナン鎖のらせん構造が並ぶことで出現する、周期的な回折ピークと考えられる。この場合、塩は多糖類の配列構造を促進している作用があると推測される。イオタカラギーナンの場合はそのような立ち上がりは見られなかった。

1. 研究目的

多糖類は食品の増粘剤やゲル化剤として広く使用されている。例えば海藻にはアルギン酸やカラギーナンのようにカルボキシル基や硫酸基などの電荷を有するイオン性多糖類が含まれている。アルギン酸は Ca イオン添加によってゼリー状のゲル状態に転移することが知られているが、食塩の添加によってゲルの物性は大きく影響される。硫酸基を有するカラギーナンの水溶液は加熱すると溶けるが、冷却によってゲル化する。これはゾル状態では分子鎖はコイル状で分散しており、冷やすことで二重らせん構造を形成し、それが架橋領域となって、系全体がネットワーク構造をとりゲル化すると考えられている (Fig. 1 参照)。このゲル化挙動は対イオンの種類や共存する金属塩に

強く影響を受ける。例えば塩化ナトリウムの存在下ではゲル強度は、その濃度にも影響を受ける¹⁾。これは食品加工にとって重要なファクターであり、その物性は分子鎖の凝集構造に相関している。本研究では塩化ナトリウム(食塩)の立場からの検討を行い、広い添加食塩濃度の範囲における電解質多糖類のゲル化の物性と分子鎖の凝集構造について、小角 X 線散乱法によりナノ構造を観察し、そのメカニズムや影響を解明する。ナノレベルでの食品加工時の食塩の利用指針を提供することを目的とする。対象とするイオン性多糖類は食品添加物として使用されているカラギーナン、アルギン酸である。

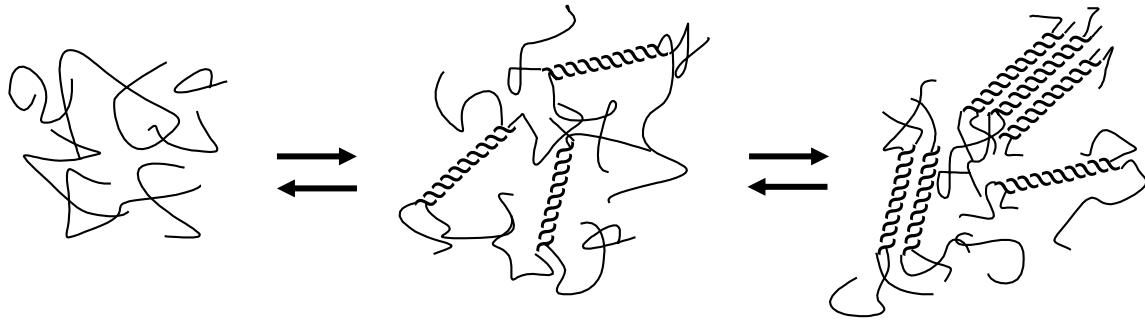


Fig. 1. Gelation mechanism of carrageenan polysaccharides

2. 研究方法

2. 1 アルギン酸ゲル試料

アルギン酸ナトリウムは、昆布やわかめなどの褐藻類に含まれる電解質多糖類であり、その水溶液は高い粘生を持ち、食品分野では、甘だれやソースなどの製品をとろみのある食感にするための増粘剤、アイスクリームなどの食品の品質と物性を維持する安定剤などに利用されている。またゲル形成能を持つためにゲル化剤としても利用されている。化学構造は、Fig. 2 のような、 β -1,4-D-マンヌロン酸(M)と α -1,4-L-グルロン酸(G)の2種類のウロン酸が直鎖状に重合したもので、鎖状構造の中でMとGはランダムに存在しており、M-M結合から成るMブロック、G-G結合から成るGブロック、MとGが混ぜ合わさったランダムブロックの3種で構成されている。アルギン酸ナトリウムがゲル化する条件としてよく知られているのは、カルシウムイオンの添加である。カルシウムイオンを添加すると、Gブロック間でキレート結合しエッグボックスモデル(Fig. 3)を形成する。この部分が架橋領域となりゲルを形成する。本研究においては、キミカ製のアルギン酸ナトリウムを用い、G成分を多く含むHigh G(HG)及びM成分を多く含むHigh M(HM)試料を用いた。

アルギン酸ナトリウムのゲル化の方法として、アルギン酸水溶液にCaCl₂水溶液を直接加えると不均一なゲルになる。ここに塩(NaCl)を添加してもより不均一となり、正確な分析は困難となる。均質なゲルを調製するために、キレート剤による錯体CaEGTAを用い、分子レベルのケージからカルシウムイオンをリリースする手法を使った。これは、グルコノ- δ -ラクトン(GDL)を加えることで、カルシウムイオンをゆっくりと放出させる。これにより、アルギン酸ナトリウム、CaEGTA、NaClを均質に混合することができ、その混

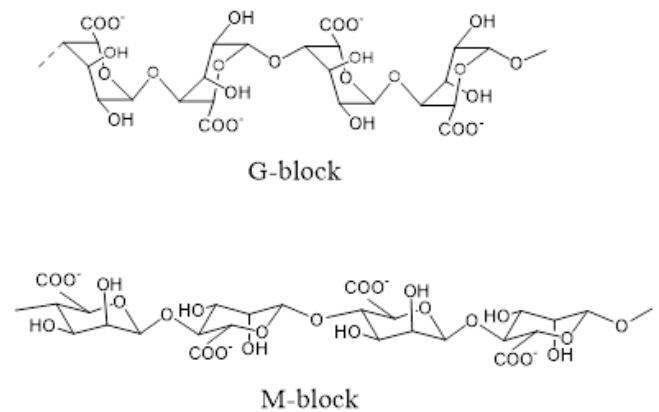


Fig. 2. Chemical structure of alginate polysaccharides

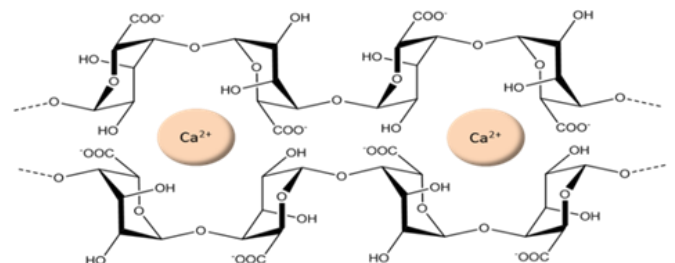


Fig. 3. Egg box model of crosslinking zone of alginate gels

合水溶液にGDLを添加することにより、ゆっくりとカルシウムイオンがリリースし、数十分の時間をかけて均質なゲルを得ることができる^{2,3)}。

2. 2 カラギーナンゲル試料

カラギーナンは、海藻の細胞壁を構成する粘性多糖類の1つで、紅藻類のスギノリ科、スギノリ属、ツノマタ属、イリデア属などの海藻の細胞間物質で、ガラクトースおよびアンヒドロガラクトースを成分とする多糖類の硫酸エステルのカルシウム、カリウム、ナトリウム、アンモニウム、マグネシウム塩を主成分とするものである。また、カラギーナンの

化学構造は Fig. 4 に示すようにガラクトース 2 個が単位となつて多数結合したもので、D-ガラクトース、3,6-アンヒドロガラクトース、これに硫酸エステルが付いたガラクトナンなどの混合物である。これらには、塩化カリウム 0.125 M でゲル化するものとしなないものがあり、ゲル化するものをカッパカラギーナン、ゲル化しないものをラムダカラギーナンという。また、カッパカラギーナンと異なり、カルシウムイオンと反応するものをイオタカラギーナンという。カラギーナンは広く食品多糖類として用いられている。

本研究ではシグマ社製のカッパおよびイオタカラギーナンを用いた。3%カラギーナンと 5 M NaCl をストック溶液として作成し、濃度調整用の純水を加えながら NaCl を添加し 78°C から 95°C 程度まで上げ均質溶解したのち、温度を下げてゲルを作成した。

2. 3 ゲル強度の測定

ゲル強度の測定には食感試験機(日本計測システム株式会社製 TEX-100N)を用いて行った。軽量カップにゲルを作成し、プランジャを用いてゲルを押し付けることでその硬さ(強度)を測定した。

2. 4 小角 X 線散乱

X線小角散乱法(Small Angle X-ray Scattering; SAXS)はその名前の通り、サンプルにX線ビームを照射して、数度以下の小角領域の散乱X線をとらえることによりコロイドレベルの構造解析をする手法である。一方より汎用的に使われている結晶構造の解析に使われるX線回折法は広い角度領域を観測して、原子配置を観測する手法である。この場合対象も固体であるが、X線小角散乱の場合、角度の小さな領域を観測することによって、より大きなナノスケールレベル、分子集合構造のレベルを観測することができる。したがって生体高分子の溶液構造やゲルの不均一構造を観測する手段として威力を発揮する。

いま面間隔 d の結晶構造を考える。これに波長 λ のX線を照射したときの回折は、回折角 θ において、ブラッグの式 $2d\sin\theta=\lambda$ が成立するとき強めあう。実験的には得られた回折ピークの角度から面間隔を求める。この式を考えると、例えばX線波長が 0.154 nm の場合、10 nm の間隔は回折角 0.45 度に対応する。さらに大きな間隔 100 nm は 0.045 度に対応する。このように数十から数百 nm のスケールの情報は数度以内のかなり小角度領域に現れる。この部分を解析すればX線を用いてナノレベルの構造解析が

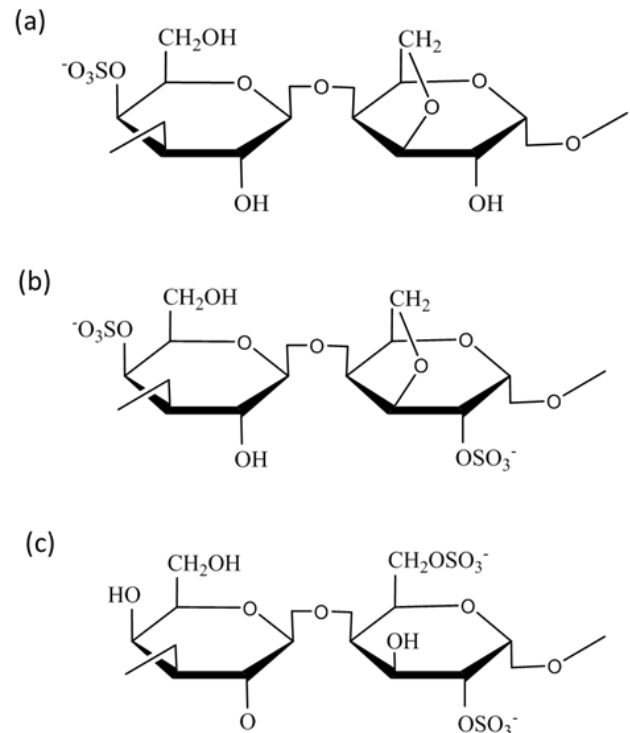


Fig. 4. Chemical structure of carrageenan family, where kappa-type is shown in (a), iota-type (b), and lambda-type (c)

可能となる⁴⁾。

光源の波長の方を変更して数百 nm の波長をもつレーザーを用いることで測定する光散乱法があるが、これでも対応する領域の観察が可能である。しかし、光散乱法の場合は可視光であるため白濁や色の付いた試料を測ることが困難である。X線を使うメリットは透過力が強いいため、ゲル状のものや不透明なサンプルも精密な測定が可能となる点にある。

多糖類は主としてナノスケールにおいて特徴的な会合構造をとり、架橋領域を形成することによって系全体が網目構造となり、ゲル化する。まずそれらの凝集構造を把握して、整理することが重要となる。通常水溶液やゲルの散乱強度は微弱である。このため強力なX線を発生することのできるシンクロトロン放射光を利用する。本研究では兵庫県にある SPring-8 のビームライン 40B2 を用いて実験を行った。波長は 0.1 nm を用い、検出器には PILATUS を用いた。カメラ距離は約 1 m とした。

3. 研究結果

3.1 アルギン酸ゲルの塩添加効果

Fig. 5 はアルギン酸(1%)に0~500 mM の様々な濃度の NaCl を添加して得られるゲルを食感試験機でゲル強度を測定したものである。NaCl の添加濃度が増加すると HG(High G), HM(High M)ともにゲルの硬さが減少していく様子が観察できた。また HG のゲルのほうが HM より強度が高いことがわかった。

Fig. 6 は HG および HM のアルギン酸ゲルからの小角 X 線散乱(SAXS)の塩濃度依存性である。ここで縦軸は散乱強度 $I(q)$ で、横軸は散乱ベクトルの大きさ $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ を示している。 λ は入射 X 線の波長, θ は散乱角である。この曲線を散乱曲線と呼んでいる。どの曲線も単調減少関数を示している。両方のサンプルで塩濃度依存性が観測された。

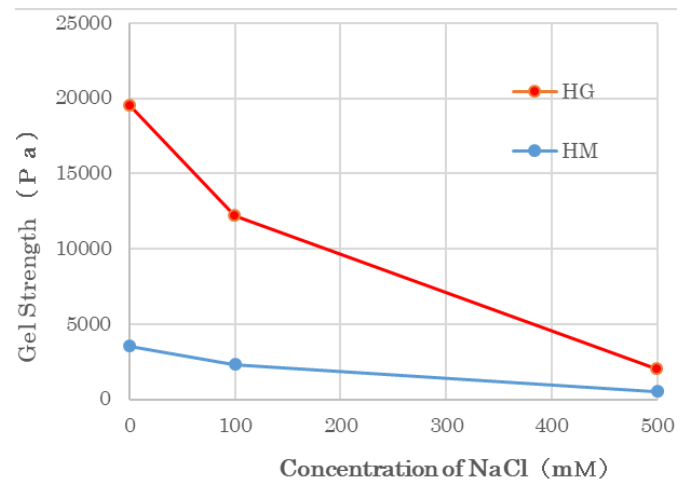


Fig. 5. The dependence of gel strength of alginate (HG and HM) gels on the concentration of NaCl. Here the concentration of Ca ions are 15 mM.

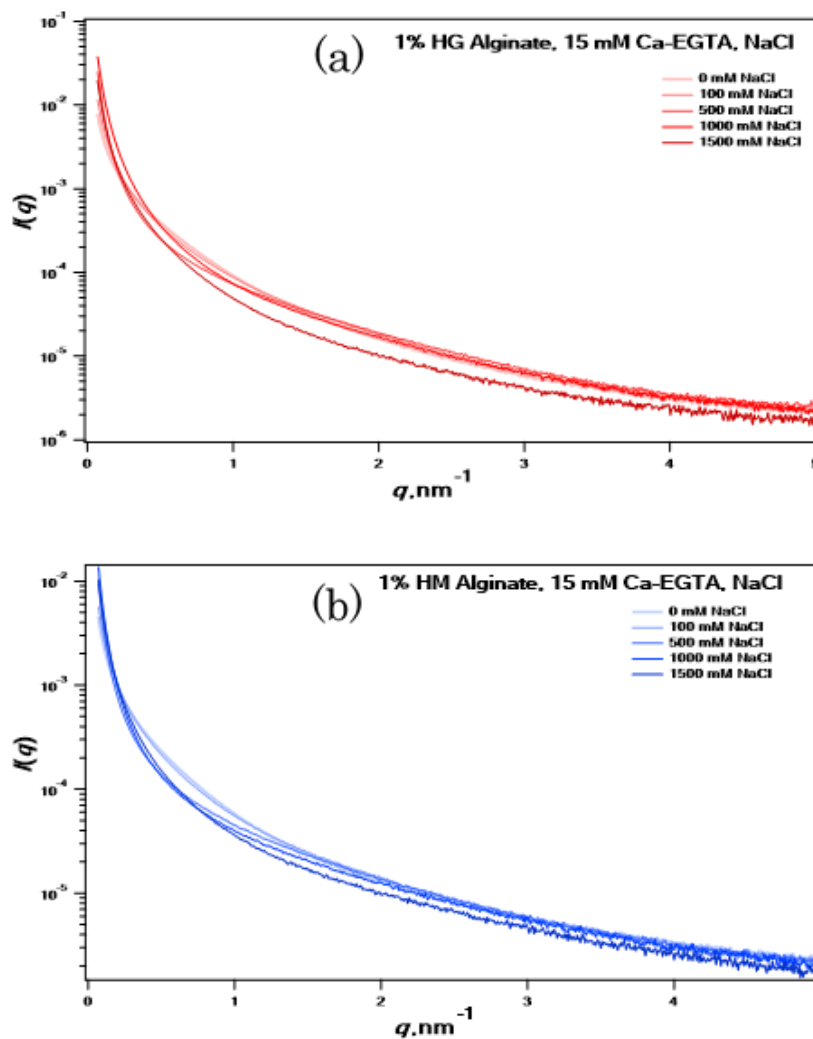


Fig. 6. The dependence of SAXS from alginate gels (HG (a) and HM (b)) on the concentration of NaCl

Fig. 7 は散乱曲線を Kratky プロットに変換したものである。縦軸に q^2 をかけたもので、散乱曲線の特徴をとらえるのに使用される。HG, HM で強度の差はみられるが、それぞれの塩濃度依存性は同様の傾向をとった。無塩系では $q=0.6 \text{ nm}^{-1}$ あたりでピークがみられ、塩添加によってそのピークは消失傾向に向かい、塩濃度が高くなるとピークは消えて、 q の小さな領域で立ち上がる挙動を示した。

3. 2 カラギーナンゲルの塩添加効果

Fig. 8 は 1.5% カップおよびイオタカラギーナンゲルから

の小角 X 線散乱の塩濃度依存性である。カップの場合、塩を添加していないサンプルではピークのない単調な減少関数であり、塩を添加すると q の小さい領域で強度が高くなった。500 mM, 1,000 mM 添加系では $q=3$ あたりでピークが出現した。一方イオタの場合、塩を添加していないサンプルでは $q=0.4$ 付近にショルダーがみられた。

Fig. 9 は Fig. 8 に対する Kratky プロットである。カップでは q が 0.5 以下のところで、塩添加により立ち上がりが見られた。イオタでは $q=2$ あたりで極大をもった曲線を示した。

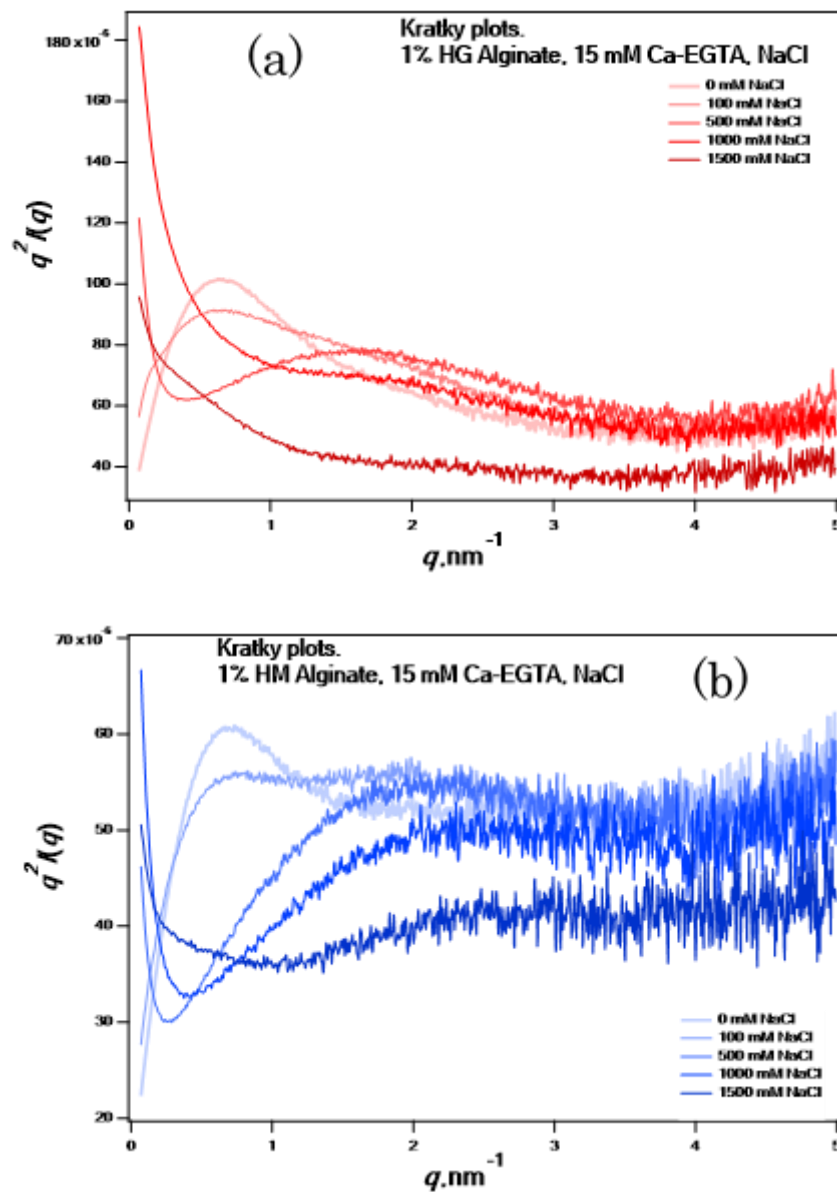


Fig. 7. The dependence of SAXS from alginate gels (HG (a) and HM (b)) on the concentration of NaCl in terms of Kratky plots

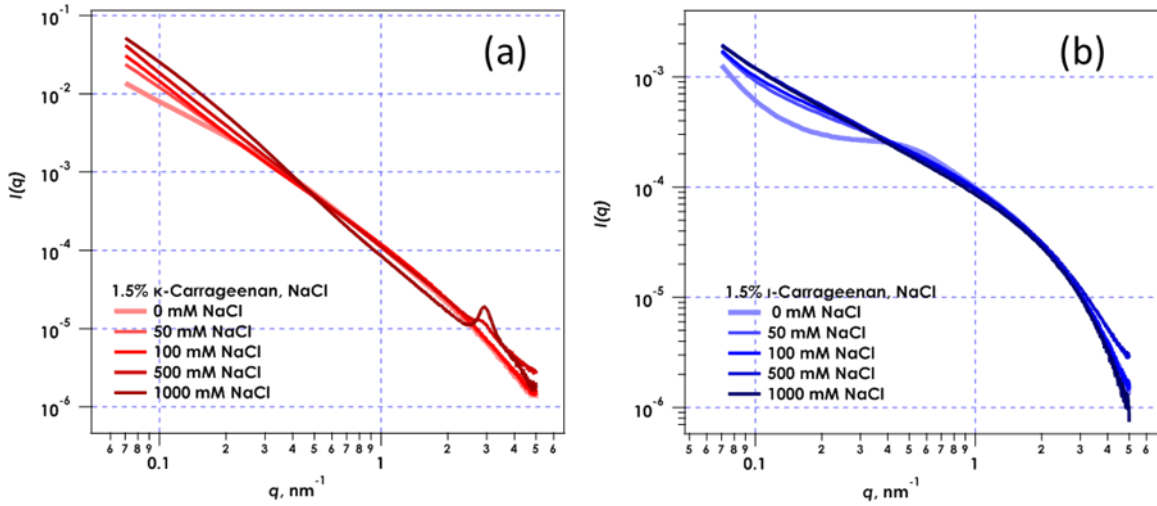


Fig. 8. The dependence of SAXS from carrageenan gels (kappa (a) and iota (b)) on the concentration of NaCl

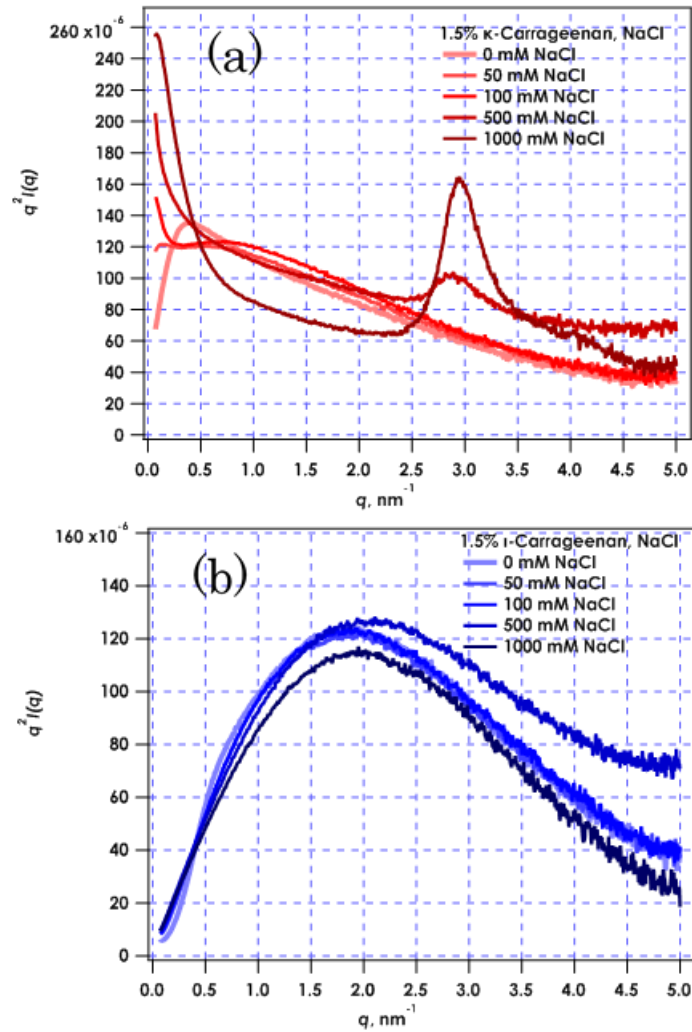


Fig. 9. The dependence of SAXS from carrageenan gels (kappa (a) and iota (b)) on the concentration of NaCl in terms of Kratky plots

4. 考 察

アルギン酸ゲルの塩添加効果について、みかけのゲルの様子を確認するためにゲルの強度測定を行った。その結果によると塩濃度が増すとともにゲル強度は低くなり、もろくなった。また G 成分の多い HG サンプルのほうがどの塩濃度においても強度は強くなった。これは G 成分がカルシウムイオンとの結合サイトとなっていることから理解できる。

小角 X 線散乱結果によりマイクロ構造を議論することができる。Fig. 7 の結果をみると、HG、HM は定性的に同様の塩濃度依存性を示している。無塩系では、 $q=0.6$ あたりで極大を示すような散乱プロファイルを示した。これは、アルギン酸が、カルシウムイオンによって会合しバンドル状構造を有して、棒状構造を反映しているものと考えられる。塩の濃度を挙げていくと q の小さな領域で立ち上がる傾向を示している。これはより大きな凝集体が形成され、小角 X 線散乱で観測される領域を超えたサイズのもの形成されていることを示している。つまり、塩の添加はアルギン酸鎖やアルギン酸会合体間での凝集をすすめる作用があることを示している。塩の添加はアルギン酸鎖の会合を促進すると考えられ、結果としてゲルを強化すると予想したが、そうではなく凝集が進むことによりネットワーク構造を崩しゲルの強度が低くなったと結論付けられた。

一方、カラギーナンの塩添加効果についてみると、Fig. 8 のカッパカラギーナンの散乱曲線において 500 mM、1,000 mM の NaCl 添加系において $q=3$ あたりにピークが出現した。この領域はわりと広角領域で、カラギーナン鎖のらせん構造が並ぶことで出現する、周期的な回折ピークと考えられる。カラギーナンは二重らせん構造の形成とそれらの会合によることで架橋領域を形成するモデルで説明されており⁹⁾、この回折ピークは、例えばこれらのらせん構造が並んだときの規則構造から出てくるものと推測される。この場合、塩は多糖類の配列構造を促進している作用があると思われる。またイオタカラギーナンは塩を添加していないサンプルでは $q=0.4$ 付近にシヨルダーがみられた。カラギーナンは電解質多糖類であり、イオタカラギ

ーナンは比較的硫酸基が多くあるため、電荷間の反発相互作用が観測されたと考えられる。塩を添加すると、反発相互作用は遮蔽され消失した。

5. 今後の課題

塩の添加はイオン性多糖類のゲルの架橋領域の構造に大きく影響することが分かった。さらに温度や溶媒の種類などの条件を変えて、塩の添加の影響を調べれば、さらに様々なことが分かってくる可能性がある。特にカッパカラゲナンの回折ピークの出現は塩添加による分子鎖配列を促進する条件を見出した。この構造の詳細を調べることは今後の課題となると考えられる。これらのデータを蓄積し、実際の食品への応用の検討もしていければよいと考えられる。

6. 文 献

- 1) Y. Yuguchi, H. Urakawa, K. Kajiwara, The effect of potassium salt on the structural characteristics of gellan gum gel. *Food hydr.* 2002, 16, 191-195
- 2) B. T. Stokke, K. I. Draget, O. Smidsrød, Y. Yuguchi. H. Urakawa, and K. Kajiwara, Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Alginate Gels. 1. Ca-Alginate Gels. *Macromolecules*, 2000, 33, No.5, 1853-1863
- 3) Y. Yuguchi, A. Hasegawa, A. M. Padoł, K. I. Draget, and B. T. Stokke, Local structure of Ca^{2+} induced hydrogels of alginate-oligoguluronate blends determined by small-angle-X-ray scattering. *Carbohydr. Polym.* 2016, 152, 532-540
- 4) O. Glatter and O. Kratky ed., Small Angle X-ray Scattering, Academic Press, London, 1982
- 5) Y. Yuguchi, T. T. T. Thanh, H. Urakawa, and K. Kajiwara, Structural Characteristics of Carrageenan Gels: Temperature and Concentration Dependence. *Food Hydr.*, 2002, 16, 515-522

Effect of Addition of Salt for Molecular Aggregates in Food Polysaccharide Gels

Yoshiaki Yuguchi

Faculty of Engineering, Osaka Electro-Communication University

Summary

Polysaccharides are widely applied for food additives as thickener or gelling agent. For example seaweed contains ionic polysaccharides with carboxylic groups or sulfate as alginate or carrageenan. Alginates yield gel by adding with calcium ions, and carrageenan forms gel by cooling. These gelation properties are influenced by type or concentration of metal ions. In this study effect of addition of sodium chloride (NaCl) for molecular aggregation in food polysaccharide gels were examined by means of small angle X-ray scattering (SAXS). For alginate gel with calcium ions the gel strength decreased with concentration of NaCl increasing. Alginate gel without adding NaCl indicated the rod like structure of bundle of alginate chains from SAXS results. The large aggregation in alginate gel at higher concentration of NaCl was observed. So the addition of salt promotes the aggregation of alginate molecular chain, as a result the network structure tends to be broken by this effect. For kappa-carrageenan gel large aggregation was also observed at higher concentration of NaCl. It was noted that the diffraction peak appeared at 500mM and 1000mM NaCl conditions. It suggests that carrageenan helices can be arranged to some ordered structure. For iota-carrageenan such kind of phenomena could not be found at present experimental conditions.