

高濃度塩水中における食品電解質多糖類の物性と構造

湯口 宜明

大阪電気通信大学工学部環境科学科

概要 海藻由来の電解質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。海藻よりカラギーナンは硫酸基を有するイオン性多糖類を抽出することができる。カラゲナンはその抽出プロセスで、カリウムイオンでゲルとなる κ -カラゲナン、カルシウムイオンでゲルになる ι -カラゲナン、ゲル化しない λ -カラゲナンなどに分類できる。カラギーナンの水溶液は冷却によってゲル化する。カラゲナンは冷やすと分子鎖が 2 重らせん構造を形成、またさらにそれらが凝集することで、架橋領域が形成され、系全体がネットワーク構造をとるというメカニズムが知られている。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 κ -カラゲナンについて、塩化ナトリウム(食塩)の添加濃度を高濃度域までの広い範囲を調査し、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。

κ -カラゲナン 0.25% について、NaCl を 0 から 5,000 mM 添加し、溶液の様子を確認したところ塩添加により NaCl 無添加の 0 mM ではゲルには至らない。50 mM, 100 mM の NaCl 塩を添加すると、ゲルを形成している様子が確認できた。ところがさらに塩濃度を上げると、500 mM と 1,000 mM では白濁し、ゲルにならずにゾル化していた。さらに塩濃度を上げ、2,500 mM は再びゲルを形成していた。

小角 X 線散乱による結果によると、NaCl を 50 mM, 100 mM の濃度で添加した場合、棒状構造がみられ、2 重らせん構造形成が示唆された。塩濃度を上げ、500 mM と 1,000 mM のレベルになると、小角領域で散乱曲線に立ち上がりと広角領域で回折ピークが認められ、高度な凝集が生じていることが分かった。さらに 2,500 mM 添加すると、大きな凝集体由来の小角での立ち上がりがなくなった。つまり 500 mM-1,000 mM の領域では凝集力が高くなり、コンパクトに分子鎖の凝集体が形成されたために系全体にはネットワーク構造が構築できなかったと考えられた。さらに高濃度塩になると、それらの凝集体の会合力が抑えられ、再びネットワーク構造を形成することを見出した。

1. 研究目的

カラゲナンは海藻の細胞壁を構成する粘性多糖類の一種で、主に紅藻類のスギノ科、スギノ属、ツノマタ属、イリデア属などの海藻の細胞間物質である。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基のカルシウム、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。また、カラゲナンの化学構造は Fig.1 に示すようにガラクトース 2 個が単位となっ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、これに硫酸基が付いたガラクタ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しないものがあり、ゲル化するものを κ -カラゲナン、ゲル化しないものを λ -カラゲナンという。また、 κ カラゲナンと異なり、カルシウムイオンと反応するものを ι カラゲナンという。最近では分析技術の進歩に伴ってさまざまな構造のものが発見されており、その数は 10 種類以上にのぼる。この内でゲル形成に関わるカラゲナンは κ および ι タイプであり、 λ タイプはゲルを形成しない。日本では 1960 年代になってカラゲナンが輸入されるようになり、当初は主としてアイスクリームの安定剤として用いられた。それからほぼ半世紀を経過

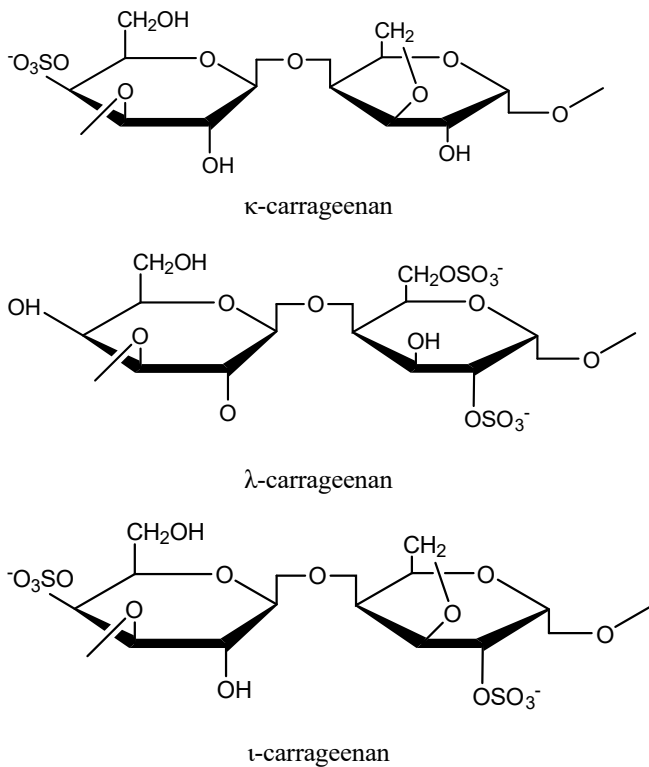


Fig.1. Chemical structure of carrageenan family.

したが、寒天とは異なったゲルの特性に加えてほかの多糖類には見られないたんぱく反応性等の性質があることから、これらの特徴を利用した様々な食品が開発されている¹⁾。本実験にて使用した κ-カラゲナンは硬くてもろいゲルを形成する。ゲル化はカチオン類によって促進される。カリウムによって最も強いゲルを形成し、次いで強いのはカルシウムによってである。これらのカチオン類は κ カラゲナンの 2 重らせんの集合を促進し、3 次元のゲルネットワークを形成する。ゲル化作用は、溶液中でハイドロコロイドが完全溶解して巨大分子鎖が広がり、その分子鎖同士が結合して立体的な網目構造を作ることによって生じる。ゲル化特性は、架橋ゾーンの形状・量・強さ等によって変化する。カラゲナンのコイル状構造が冷却によって、水素結合が生じ 2 重らせんを形成することでゲル化する (Fig.2)。このゲル

は熱可逆性の性質をもつ。カラゲナンは分子鎖中にある硫酸基の対カチオンの種類によってもゲル化挙動を異にする。またこれらのカラゲナン水溶液に塩を添加するとゲルの強度や性質に大きな影響を与える。本研究では、カラゲナンのゲル化性がユニークであることから、κ カラゲナン水溶液に高濃度な領域を含む様々な濃度の塩を添加してその影響についてゲル化挙動を観察すること及び、小角X線散乱法 (Small angle X-ray scattering: SAXS) によりナノスケールの構造^{2), 3), 4)}を解析し物性との関係を調べることである。

2. 研究方法

2.1 カラゲナンゲル試料

本研究ではシグマ社製の κ-カラゲナンをそのまま用いた。0.5%の κ-カラゲナン水溶液と 5 M NaCl 水溶液をストック溶液として作成し、濃度調製用の超純水を加えながら NaCl ストック水溶液を添加し攪拌し、85°C程度まで加熱することによってゾル化させて溶液を均質化し、0.25% κカラゲナンの様々な塩濃度の水溶液を作成した。5,000 mM (5 M) NaCl については 5 M NaCl に直接 κカラゲナン試料を入れた。Table 1 はカラゲナン濃度と NaCl の添加量をまとめたものである。

2.2 小角 X 線散乱法

小角 X 線散乱法 (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。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、原子の配列を観測する手法である。結晶構造解析の場合、対象は固体であるが、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における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有効である。



Fig. 2. Network formation of carrageenan polysaccharides

Table 1. Sample conditions for κ -carrageenan in saline solutions

κ カラゲナン 濃度(%)	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%	0.25%
NaClの添 加量(mM)	0	50	100	500	1,000	2,500	5,000

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可能となることが予想できる。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、この原理を使って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 を使い、検出器には PILATUS 2M を用いた。カメラ距離は約 1.5 m とした。SAXS の原理図を Fig.3 に示す。試料溶液は薄く剥がした雲母板を窓剤とした平面型セルを用いた。セルホルダーは 25°C で温度コントロールした。

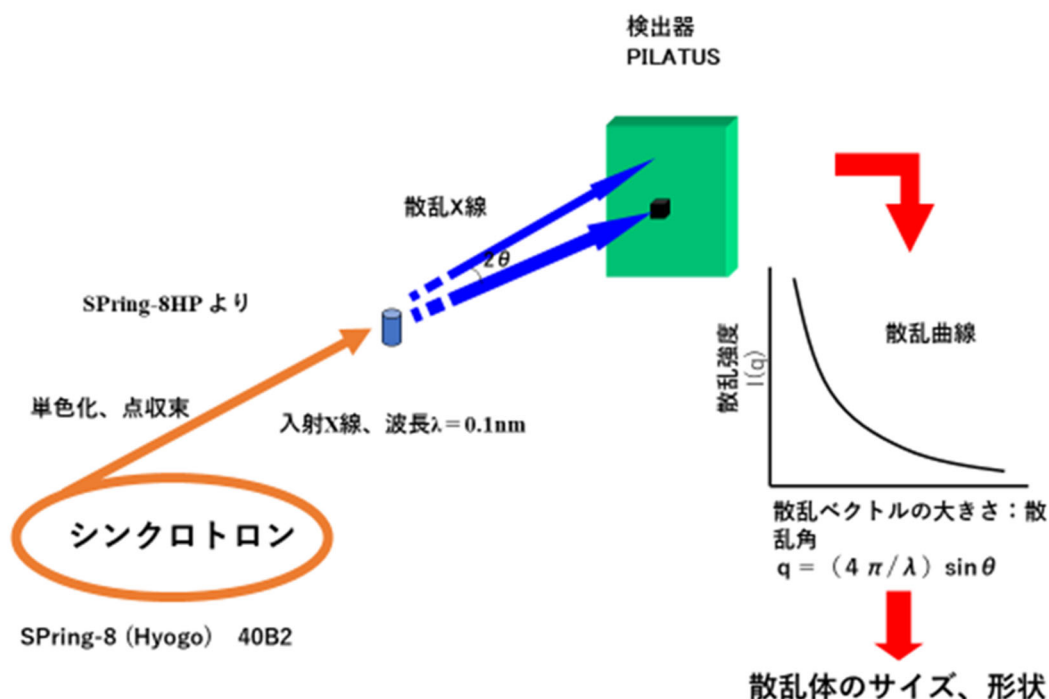


Fig.3. SAXS experimental scheme.

SAXS で得られる 2 次元データは円平均化し 1 次元化し、溶液からの散乱データから溶媒の散乱データを差し引くことで溶質の散乱を算出した。この際入射 X 線の強度およびサンプル溶液の X 線の吸収を考慮し補正を行った。結果として得られる散乱曲線データは、縦軸に散乱強度 $I(q)$ で、横軸には散乱ベクトルの大きさ $q = (4\pi/\lambda)\sin \theta$ によって得られる散乱強度の角度依存性である。 λ は入射 X 線の波長、 θ は散乱角である。この散乱曲線を解析することによってナノスケールの構造情報を得ることができる。散乱曲線は通常単調現象関数である場合は多いので、散乱曲線の特徴を見極めるために、得られたデータを散乱強度 $I(q)$ に q^2 をかけたものを q に対してプロットする Kratky プロット⁵⁾により表す。高分子鎖の解析などに用いられており、高分子鎖の剛直性を表す量として持続長である。ガウス鎖（鎖状分子の両端間の距離の確率分布がガウス分布（正規分布）に従う場合、その分子鎖をガウス鎖と呼ぶ）からの散乱関数は近似的に $I(q) \sim 1/q^2$ で近似的に示され、この式を Kratky プロットすると、 $I(q) \cdot q^2 \sim$ 定数となり、 q に対して一定となる。他方棒状体（線状）からの散乱関数は $I(q) \sim 1/q$ で表される。つまり Kratky プロットすれば $I(q)q^2 \sim q$ となり、グラフでは比例関数的なプロフィールをとることになる。このように散乱強度が q に対して、どのようなべき乗則に比例するかを検討することで、分子鎖の挙動を推察することができる。

次に SAXS における観測領域のスケールについて考えると、 q は散乱ベクトルの大きさで、小角領域では散乱角に比例したパラメーターである。 q の小さな方向は実空間ではスケールの大きな空間構造を反映する。逆に q の大きな方向はスケールの小さな微細構造を反映する。実際

の高分子鎖からの散乱はこのことを考慮すると、局所的に、棒状構造をとしてみる領域が存在することが予測される。さらに q の大きな方向つまり微細構造へと観測領域をみていくと、棒の断面の効果が表れ、プロファイルはその効果により下がる傾向を示す。つまり、Kratky プロットにおいて極大を示すことになる (Fig.4 参照)。

3. 研究結果

Fig.5 は κ -カラゲナン水溶液サンプルの写真で、カラゲナン濃度 0.25% の様々な NaCl 濃度のものである。これはサンプルを加熱攪拌し均質化を確認した後、冷蔵庫に 2 日保存したあとの様子（室温）であり、ゲル化状態を確認するためにバイアル瓶をひっくり返した様子の写真を示している。

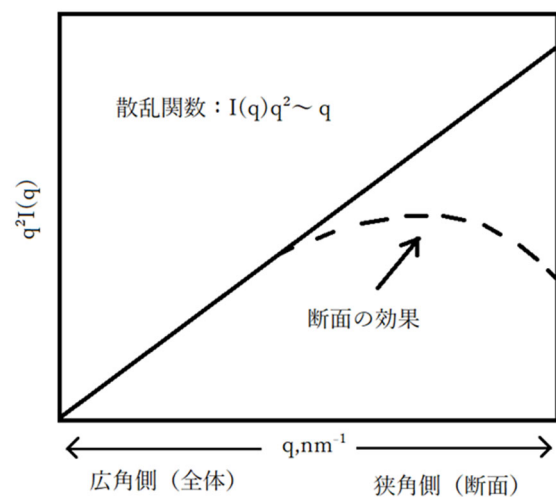


Figure 4. Demonstration of Kratky plot for SAXS

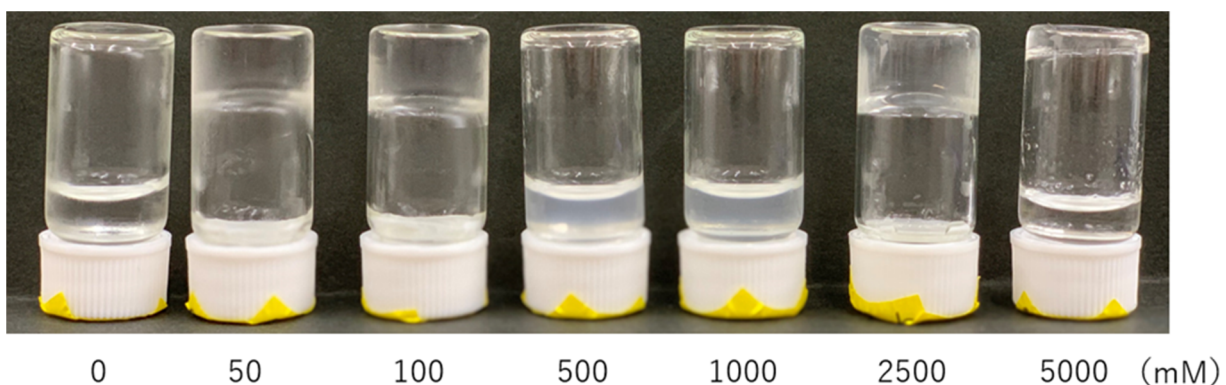


Figure 5. The appearance of 0.25% κ -carrageenan aqueous solutions with various saline concentrations (0-5,000 mM).

NaCl 無添加の 0 mM では液は下に流れ落ちて、ゾル状態であることがわかる。このカラゲナンの濃度が低く、ゲルには至らない。カラゲナンの濃度を上げればゲルを形成することができることはわかっている。しかしこのカラゲナン濃度で、50 mM の NaCl 塩を添加すると、溶液は流れ落ちず、ゲルを形成している様子が確認できた。100 mM も同様にゲル状態を示した。ところがさらに塩濃度を上げると、500 mM と 1,000 mM では白濁し、ゲルにならずにゾル化していた。さらに塩濃度を上げ、2,500 mM は再びゲルを形成していた。さらに塩濃度 5,000 mM ではゲルが脆弱でひっくり返すと一部が落ち、もろもろとした状態となった。

4. 考察

Fig.6 は様々な塩溶液における 0.25% κ -カラゲナン水溶液からの小角 X 線散乱である。

塩を添加していないサンプルでは $q=0.25$ 付近にショルダーがみられた。これはカラゲナンの有する硫酸基由来の電荷間の反発相互作用の影響と考えられる。このため塩を添加すると、反発相互作用は遮蔽されショルダーは見られなくなった。また NaCl 100 mM 程度までは小角度で強度が増加し、500 mM になると急激に増加した。このとき同時に $q=2.9$ あたりの広角領域でピークを観測した。さらに塩濃度を上げると強度自体は減少傾向を示し、やはり $q=2.9$ あたりでもピークを観測した。

次に散乱曲線の特徴を捉えるために Kratky プロットを Fig. 7 のように行った。NaCl が 100 mM 程度まででは、 q の小さなところで比例関数的な挙動がみられ、カラゲナン鎖がおそらく 2 重らせん構造をとり、棒状構造を見かけ上とり、それが散乱挙動に表れているものと考えられた。500 mM の NaCl 添加系をみると、 q の小さな領域でプロファイルは立ち上がり、凝集体構造形成が示唆された。見かけ上、系が白濁していることを考慮すると、相当大きな凝集体が形成されており、カラゲナンの 2 重らせんがさらに凝集し、大きな塊を形成していると推察される。 $q=2.9$ あたりにやはりピークがみられるが、これは回折性のもので、何らかの周期構造の形成が示唆される。ブラッグ距離を計算すると $d=2.17\text{nm}$ であった。つまり結晶構造にちかい状態で会合凝集が生じ、その会合力が大きいために、高度に凝集し、部分的に塊になってしまったために系全体がネットワーク構造にまで至らず、ゾル状態となったと考えられる。

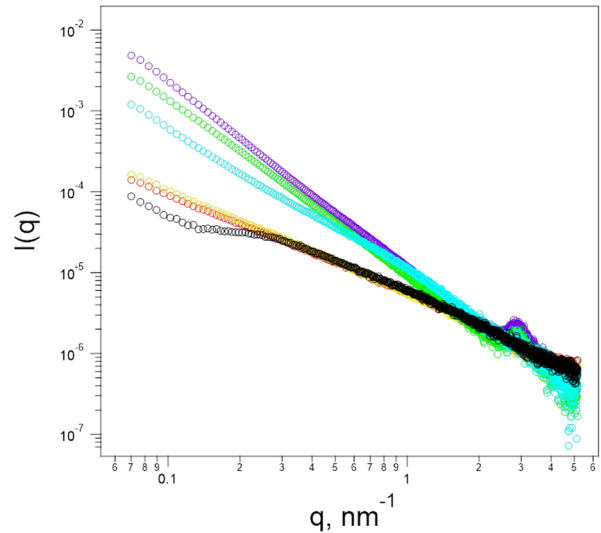


Figure 6. SAXS from 0.25% κ -carrageenan aqueous solutions with various saline concentrations (0-5,000 mM)

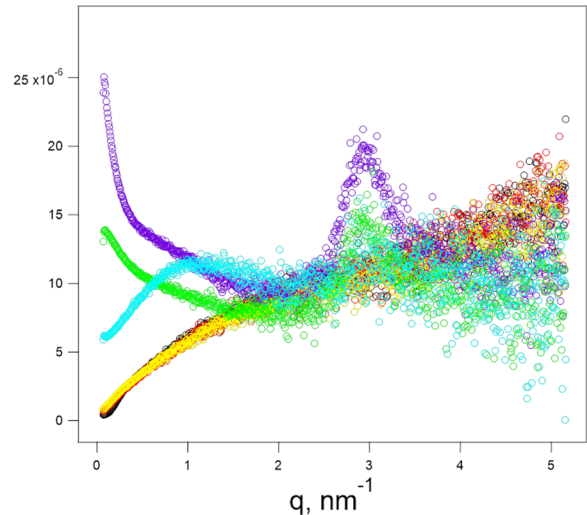


Figure 7. Kratky plots for SAXS from 0.25% κ -carrageenan aqueous solutions with various saline concentrations (0-5,000 mM)

さらに塩濃度が上がると、2,500 mM では凝集体由来の q の小さなところの立ち上がりはなくなり、 $q=2.9$ のピークもかなり小さくなった。これは塊の形成が抑えられ、より適度なサイズの架橋領域の形成によって系全体にネットワークができ、ゲルを再び生じたものと考えられる。

5. 今後の課題

塩の添加によりイオン性多糖類 κ -カラゲナンのゲル化挙動は特徴的なものであることが分かった。さらにそれらのナノスケールでの凝集体形成の詳細が SAXS 測定により明らかになった。 κ -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がこれはある特定の塩濃度の領域である。この領域がなぜ生じるのかをより詳細に考察すれば、塩濃度をコントロールすることによって、よ

り精密な会合構造を制御が可能となることが示唆された。今後はより詳細なメカニズムの解明とさらにそれを実際の食品に応用することが検討できると考えられた。

6. 文献

- 1) 山田信夫, 新訂増補版 海藻利用の化学, 成山堂書店, 2013
- 2) Y. Yuguchi, T. T. T. Thanh, H. Urakawa, and K. Kajiwara, Structural Characteristics of Carrageenan Gels: Temperature and Concentration Dependence. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16, 515-522
- 3) Y. Yuguchi, H. Urakawa, and K. Kajiwara, Structural Characteristics of Carrageenan Gels: Various Types of Counter Ions. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, 481-485
- 4) T. T. T. Thuy, Y. Yuguchi, M. Mimura, H. Yasunaga, R. Takano, H. Urakawa, and K. Kajiwara, Structure and Gelling Properties of Carrageenan Family Studied by Scattering Techniques. *Asian Journal of Chemistry*, 2010, 22 No.5, 3989-4002
- 5) O. Glatter and O. Kratky ed., *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, 1982

Structure and Property of Electrolyte Food Polysaccharide in Aqueous Solution with High Concentration of Salt

Yoshiaki Yuguchi

Faculty of Engineering, Osaka Electro-Communication University

Summary

Polysaccharides are widely applied for food additives as thickener or gelling agent. Carrageenan extracted from seaweeds is one of useful ionic polysaccharides with sulfate groups. The carrageenan aqueous solution forms gel by cooling. The gelation mechanism is explained by formation of double helix structure of carrageenan molecular chains and subsequent association to build cross-linking zone. In this process the gelation behavior is influenced by the counter cation and added salt. In this study k-carrageenan aqueous solutions with different concentrations of salt, especially very high, are examined. The gelation behavior is found to be very characteristic, as around 50-100 mM of NaCl the 0.25% k-carrageenan solution takes place gelation, while around 500-1,000 mM it shows turbid solution state, and higher concentration around 2,500 mM gives gelation again. These gels and solutions were observed by means of small angle X-ray scattering (SAXS) at nano-scale level. The SAXS behavior of around 50-100 mM of NaCl suggests the rod-like structure from double helix of k-carrageenan, while the SAXS from samples around 500-1,000 mM indicated the upturn in smaller angle region, to form large aggregation. It was noted that the diffraction peak appeared, suggesting that carrageenan helices can be arranged to some ordered structure. Around much higher concentration of NaCl, 2,500 mM, the upturn deducing from the large aggregation disappeared according SAXS profile.