乾燥卵白のゲル化及びフィルム化への
エタノール水溶液処理乳ホエー添加の影響と活用

日本大学短期大学部食物栄養学科・教授　太田　尚子

■　緒　言

申請者はこれまで起源を異にする食品タンパク質間やタンパク質と他成分との相互作用について調べてきた。本研究では、乾燥卵白の食品加工におけるより高度な利用を図る為、乾燥卵白並びに乳清タンパク質のゲル化に及ぼすエタノール水溶液前処理の影響について、主に超音波分光分析、動的粘弾性測定およびフーリエ変換赤外分光分析を用いて調べた。更に、これら 2 種のタンパク質相互作用について考察した。

■方　法

1．試料の調製

市販乳清タンパク質は、Alacen895(Fonterra 社製、ニュージーランド、以下 WP)、市販乾燥卵白タンパク質(以下 DEW)は(キユーピー(株)中性またはアルカリ性未熱蔵製品)を使用し、蒸留水(0.025％アジ化ナトリウム(防腐剤)を含む)を用いて所定の濃度に調整した。即ち、各種濃度のエタノール水溶液にタンパク質粉末を分散させ、室温で約 20 時間を緩やかに撹拌・インキュベーション後、エタノールを蒸発除去・密度計を用いたエタノール残留濃度測定を行い、溶媒の除去が確認されたタンパク質溶液中のタンパク質濃度をローリー法にて決定し、種々の濃度の試料溶液を調製した。

2．動的粘弾性測定

動的粘弾性測定は、歪み制御型レオメーター(レオメトリックサイエンス社製、現 TA インスツルメント社、ニューキャッスル、デラウェア州)を用いて行った。25℃，試料厚(Gap)1.0mm とし、角速度 6.28rad/s の条件下でまず動的弾性率の歪み依存性測定を行い、試料の線形範囲を求めた。得られた線形範囲の最大値を用いて、動的弾性率の温度依存性測定を行った。

3．超音波分光分析 [1)]

超音波分光分析は、ウルトラサイエンフィック社製 HRUS1021 タイプ(ダブリン、アイルランド)を用いて行った。装置は、解析ソフトウェアー(ver.4-50-25-0)を搭載していた。本装置では音波が試料側と対照の 2 つの試料室を通過し、その速度と減衰が測定でき、それぞれ別個に記録される。装置内試料室の温度は装置に連結したウォーターバス(Hakke F8 タイプ、サーモハッケ、カナダ)を用いて制御した。グラジエントは相対速度の値を微分し、超音波速度の変化率として表した。

4．フーリエ変換赤外分光分析

フーリエ変換赤外(FT-IR)分光分析は、FT-IR 8300 型(島津製作所製、京都)を用い、ZnSe プリズムを使用した。ATR 法(全反射法)を用いて 2000cm^{-1} ～ 1000cm^{-1} 間で測定した。測定の分解能は 4cm^{-1} 毎とした。干渉波を 40 回繰り返し測定し、その平均をとり、アポダイズ関数(Happ-Genzel 関数を使用)によりその干渉波からパワースペクトルを得た。測定後 ATR 補正した。次に 1550cm^{-1} ～ 1750cm^{-1} 範囲(アミド I'領域)を選択しデコンボリューション処理に供した。デコンボリューションでは吸収ピークの半値幅 25cm^{-1}、光路長 0.104mm、アポダイズ関数にはトライアングル[2] を用いた。

■　結　果

1．WP 及び乾燥卵白タンパク質に及ぼすアルコール水溶液処理の影響

1)市販乳清タンパク質に対するエタノール水溶液処理の効果

これまでの予備実験並びに先行研究 [2)]を基に、タンパク質濃度 10 ～ 15％(w/v)をエタノール濃度 10 ～ 50％(v/v)の水溶液中に分散させ、室温(25℃付近)にておよそ 20 時間、400 ～ 100rpm にて撹拌し、その性状を観察した。その結果、エタノール濃度 30％ までは室温での 20 時間の撹拌に伴いやや濁りのあるスムースな懸濁物が得られた。そこで、外見上、顕著な変化は観察されないものの 30％エタノール処理により市販乳清タンパク質に何らかの変化が生じている可能性を確認する為、

超音波分光分析に供した(図 1)。超音波分光分析は、非破壊で且つ試料の濁りなどが分析の障害とならず、コロイド分散系を研究する上で有利な方法である。本法を使用した非加熱での相転移現象の研究では、酸による乳カゼインの凝集[3]、脂肪酸塩添加により誘導される数種のタンパク質のゲル化[4]などがあるが、一般に、非加熱での相転移の場合には速度や減衰の変化量が加熱を伴う場合に比べ非常に小さい(およそ 1/10)という特徴がある。

図 1A は未処理 10%WP の 25℃における超音波減衰の時間依存性を示した。およそ 13 時間の変化を観察した。また、図 1B は 30%エタノール前処理した 10%WP の場合である。その結果、エタノール処理を施した試料では、実験開始直後の減衰値が未処理に比べ、約 $10_{1/m}$ 大きい値を示し、且つ、その後次第に減衰が増加した。その結果、およそ 13 時間(780 分)後超音波減衰の変化量は未処理の約 10 倍($0.7_{1/m}$)に相当することが判った。本実験により、WP に対する 30%エタノール処理は可溶性凝集体の膨潤を引き起こし、更にインキュベーション時間の増加に伴い更に大きな凝集体が形成され、結果的に超音波減衰が増加したことが示唆された。

2)WP の相転移に及ぼすエタノール水溶液前処理の影響

次に、動的粘弾性測定を用いて、加熱処理に伴う WP の相転移に及ぼすエタノール水溶液前処理の影響を調べた。試料は予め 25%エタノール前処理した WP(8%)と未処理の同 WP である。ここでは複素弾性率(G*)の立ち上がり温度をゾル・ゲル転移温度とした。その結果、エタノールによる前処理を行った場合、その温度が 69.4℃、一方、未処理で、72.6℃となり、エタノール処理によりおよそ 3℃相転移温度が低温側にシフトしていることが判った(図 2)。

3)DEW・WP 混合系の相転移に及ぼすエタノール水溶液前処理の影響

表 1 に加熱冷却後(500 分時点)の平衡複素弾性率を示した。エタノール処理 WP の混合により、およそ 2 倍の平衡複素弾性率となることが判った(表 1)。

2. 混合タンパク質にアルコール水溶液前処理を施した際の変化

これまでの予備実験で、中性 pH をもつ DEW 製品(10%(w/v))に 25%エタノール水溶液を加え室温で攪拌すると速やかに沈殿することを観察した。そこで本研究では中性 pH をもつ DEW 製品を用いた実験に加え、比較的溶媒への親和性の高いアルカリ性 pH の DEW 製品も使用し、以下の実験(乳清タンパク質の一部を DEW に置換)を行う事とした。図 3 に 5%(w/v)アルカリ性 pH DEW 製品及び 5%(w/v)WP を 40%エタノールに分散させ、室温(25℃付近)にておよそ 20 時間、攪拌(400 ～ 100rpm)した後の外観を示す。先にも述べたように、DEW 単独では溶媒への分散性が低く沈殿しやすかったが、先に WP のみを蒸留水に分散させた後、後に極少量ずつ DEW を添加・分散させた後、エタノールを加え終濃度 40%に調整したところ、室温でゾルからゲルへ変化することが観察された。図 3 は 24 時間後の外観を示した。DEW(5%)と WP(5%)の混合系は、10%乳清タンパク質単独(図示せず)に比べ、黄色味を帯びた白濁ゲルとなり、感覚的にも著しく硬いテクスチャーを有していた。

市販 DEW は合目的的に使用可能なように、数種の pH や熱蔵処理の製品が製造されており、Mine は先に DEW 試料の pH がアルカリ性側に近づくにつれてゲル強度が増加するが、その際に水に対する溶解性は低下しないことを報告している[5]。本研究で観察された DEW 製品の pH の違いによる分散性の差は、各々の DEW のエタノール水溶液との相互作用の程度(エタノールとの親和性)の違いに関係していることが示唆された。

3. エタノール水溶液前処理の市販 DEW タンパク質二次構造への影響

はじめに、アルカリ性 pH を有する DEW で 30℃でのアミド I'領域を解析したところ、25%エタノール処理では速やかにゲル化し所定のタンパク質濃度(8%)の試料調製が困難であった。そこで、より低濃度条件下での分析(15%、20%処理)を行った。0%(水処理)、10%、15%、20%までのエタノール処理では、分子間 β-シートが $1625cm^{-1}$ に観察され、25%エタノール処理の沈殿画分では $1625cm^{-1}$ のバンドは観察されず、代わって 1622 と $1612cm^{-1}$ に小さなショルダーが出現していた(図 4)。次に同様の方法で、エタノール水溶液を用いて乳清タンパク質を前処理した際のタンパク質二次構造変化を調べた。エタノール未処理、10%、25%処理タンパク質の分子間 β-シートを表す $1622cm^{-1}$ に現れた(図示せず)。そこで、DEW と WP についてそれぞれのタンパク質が元々有している二次構造を比較した。その結果、DEW では WP に比べ全体的に高波数側に規則構造が観察された(図 5)。

4. 乾燥卵白に対するアルコール水溶液前処理乳清タンパク質添加の影響

次に、水に分散させた乾燥卵白に対するアルコール水溶液前処理 WP 添加の影響を調べた。即ち、25%(v/v)エタノール水溶液を用いて室温で約 20 時間 WP をインキュベーション後、エタノールを蒸発除去し、これが加熱条件下において未処理の中性 pH の DEW とどのような相互作用をするかについて調べた。

まず本実験の前提として、DEW 及び WP(共にエタノール処理無しの条件下で)の超音波速度の温度依存性を比較した(図 6)。その結果、いずれのタンパク質においても超音波速度は温度上昇と共に減少し、系の圧縮率の増加を示していた[1)]。即ち、温度上昇に伴いゲル化(変性)が進行していると判断されたが、DEW に比べ乳清タンパク質の方がその傾きが大きい(進行の程度が大きい)事が判った。次に両者の差を明瞭にする為、一定の温度上昇あたりの変化量(グラジエント)をグラフ化したものが図 6 の下図である。DEW では縦軸を超音波速度のグラジエントの温度依存性で、顕著に 2 つの負のピークが観察され、それぞれオボトランスフェリン(59℃付近)およびオボアルブミン(74℃付近)を主成分とするタンパク質の状態変化に基づく信号であることが示唆された。一方、乳清タンパク質は、およそ 69℃に 1 つの信号が観察され、これは β-ラクトグロブリンを主成分とするタンパク質の信号と考えられた。

次に、図 7 は WP 単独と混合タンパク質系(5% DEW+15% WP)を同様の方法で比較した。本混合システムでは乳清タンパク質が乾燥卵白の 3 倍量存在していることから、この高温側のピークに関しては更なる研究が必要である。また、先の図 6 では DEW と WP の谷の深さ(変化量)に顕著な差は認められなかったにも関わらず、本図では谷の深さが約 0.2m/s 大きいことがわかり、エタノール前処理 WP を混合(ピンク色)することによって得られた両タンパク質の相乗効果の表れと示唆された。

5. 乾燥卵白並びに乳タンパク質を基盤としたフィルム調製とその性質

著者らはこれまで、熱安定の異なるタンパク質を混合して得られる可食性フィルムの創出を行い、その活用の一つとして食教育の為の皿型容器の試作を行っている。図 8 は 10%乳清タンパク質フィルムの外観を示す。本研究で得られたエタノール水溶液前処理タンパク質も将来的にはこのような方面に活用することができれば、タンパク質フィルムの持つ水蒸気バリヤー性やエタノールの持つ抗菌性などを考慮すると非常に興味深く付加価値が期待される。

■ 考 察

本研究では、タンパク質の温和な変性を誘導するべく、濃度の異なるエタノール水溶液に数種の食品タンパク質を分散、室温で懸濁物を調製し、未処理のタンパク質とどのような物性の違いを発現するかを超音波分光分析、動的粘弾性測定、赤外分光分析を主なツールとして調べた。その結果、タンパク質の種類、エタノール濃度依存的に個々のタンパク質の物性が異なることが明らかになった。タンパク質のエタノール処理に関する基礎研究は古くから着手され多くの知見が得られているが、実際に食品学的機能特性(ゲル形成など)を発現するような系での測定手法はほとんど利用されておらず、今回使用した超音波分光分析によるデータはそれを補完、発展させる意義ある成果である。乾燥卵白は乳清タンパク質との混合により系の圧縮率の顕著な増加が観察され、ゲル化が進行していく事が判った。乾燥卵白のより高度な利用を図る一つの手段として、混合タンパク質系やエタノール水溶液処理の有効性が示唆された。

■ 要 約

本研究を通して以下の事項が示唆された。

1. WP に対する 30%エタノール前処理は常温下において可溶性凝集体の粒子径の増加が引き起こされたことを示した。
2. DEW・WP 混合ゲルは、WP 単独ゲルに比べ、黄色味を帯びた白濁ゲルとなり、感覚的にも著しく硬いテクスチャーを有していた。
3. 25%エタノール処理によりおよそ 3℃相転移温度が低温側にシフトしたことから、エタノール処理が WP の相転移を促進する効果を有することが判った。
4. エタノール前処理 WP を DEW に添加することによりゲル化に対する両タンパク質の相乗効果が観察され、結果的にゲル形成性の向上が認められた。

■ 文 献
1) V. Buckin(2018)High-resolution ultrasonic spectroscopy, *J. Sens. Sens. Syst.*,7, 207-217.
2) M. G. Corradini, M. Demol, J. Boeve. R. D. Ludescher1 and I. J. Joye, DOI 10.1007/s11483-017-9477-4, Fluorescence Spectroscopy as a Tool to Unravel the Dynamics of Protein Nanoparticle Formation by Liquid Antisolvent Precipitation, *Food Biophysics.*
3) C. Dwyer, L. Donnelly and V. Buckin,(2005)Ultrasonic analysis of rennet-induced pre-gelation and gelation processes in milk, *J. Dairy Research,* 72, 302-310
4) N. Yuno-Ohta and M. Corredig(2007)Characterization of β-Lactoglobulin A Gelation in the Presence of Sodium Caprate by Ultrasound Spectroscopy and Electron Microscopy, *Biomacromolecules,* 8, 2542-2548.
5) Y. Mine(1996)Effect of pH during the dry heating on the gelling properties of egg white proteins, *Food Research International* 29, 155-161.

5% DEW+10% Alacen (with 25% ET-OH pre-treatment)	5% DEW+10% Alacen (native)
156000 Pa	75624 Pa

表1　中性 DEW・WP 混合加熱誘導ゲルの平衡複素弾性率 (G*) に及ぼすエタノール水溶液前処理の影響
加熱冷却後の G* を示す。

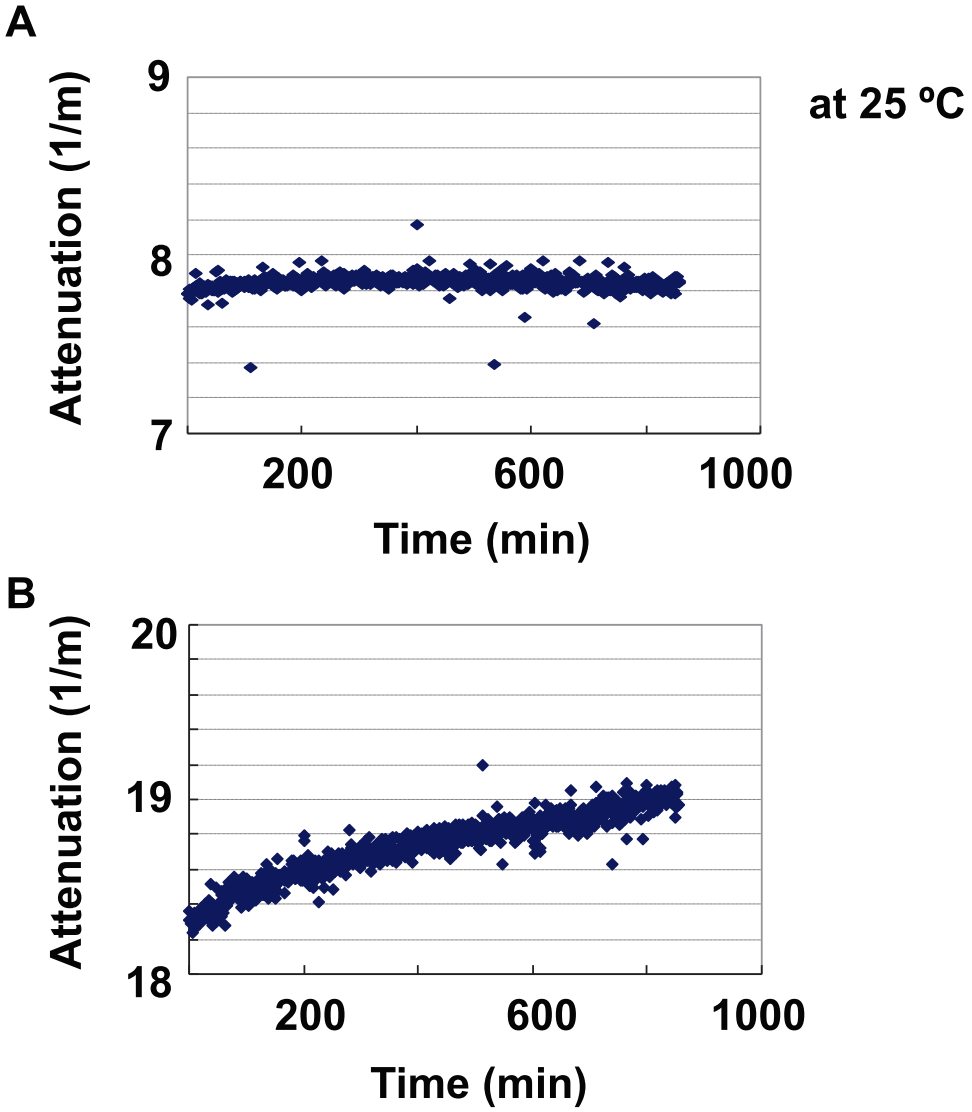

図 1　WP の超音波減衰に及ぼすエタノール水溶液前処理の影響 (25℃一定)
A，エタノール未処理 10% WP；B，30%エタノール水溶液前処理済 10% WP

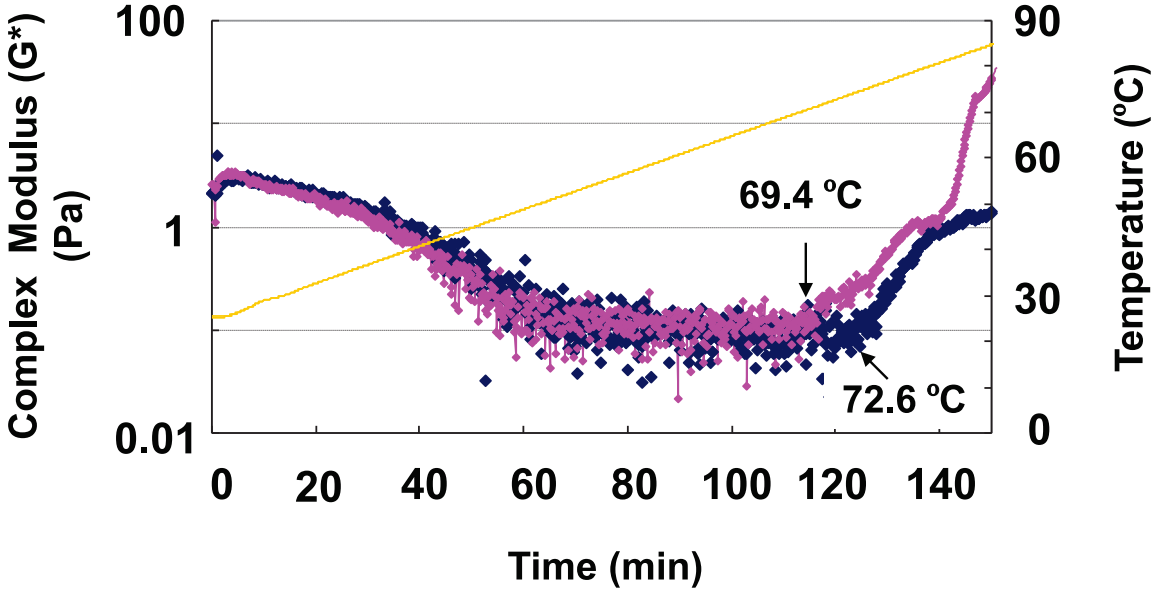

図 2　WP の昇温に伴う複素弾性率の変化
赤，25%エタノール前処理 WP（タンパク質濃度，8%（w/v））
青，未処理 WP（タンパク質濃度，8%（w/v））

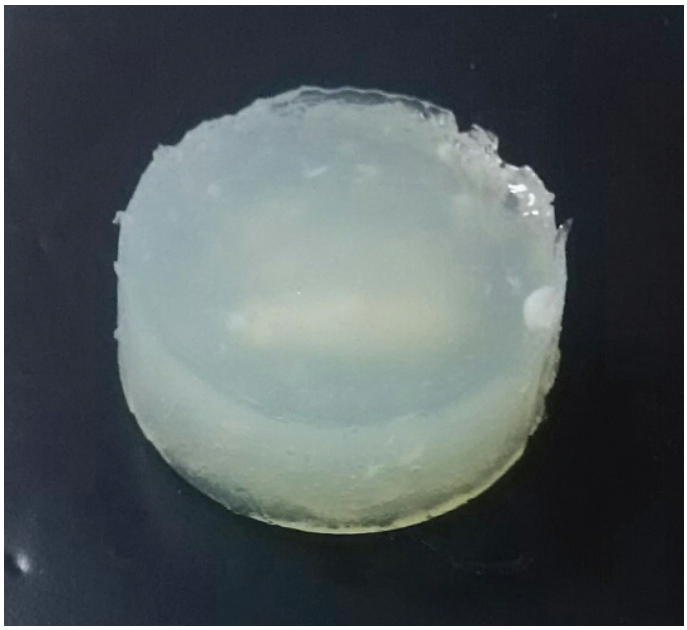

図 3　40%エタノール水溶液前処理 WP を混合した DEW ゲルの外観
5%（w/v）DEW ＋ 5%（w/v）WP 混合ゲル、常温下にて調製

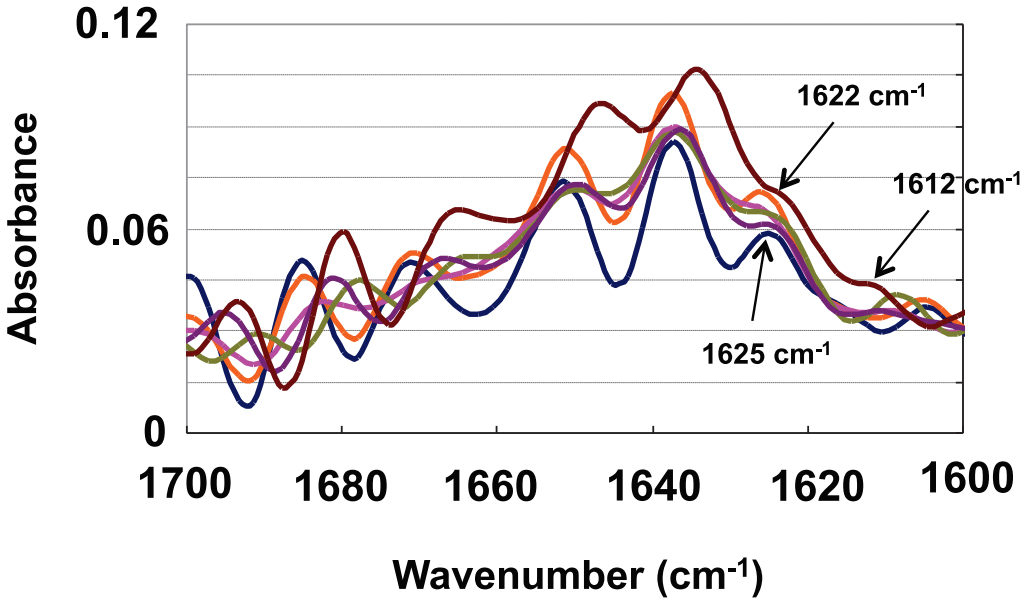

図 4　エタノール水溶液前処理によるアルカリ性未熱蔵 DEW の二次構造変化
青，未処理；オレンジ，10%エタノール処理；ピンク，15%エタノール処理；
黄緑，20%エタノール処理；茶，25%エタノール処理；タンパク質濃度，8.4%

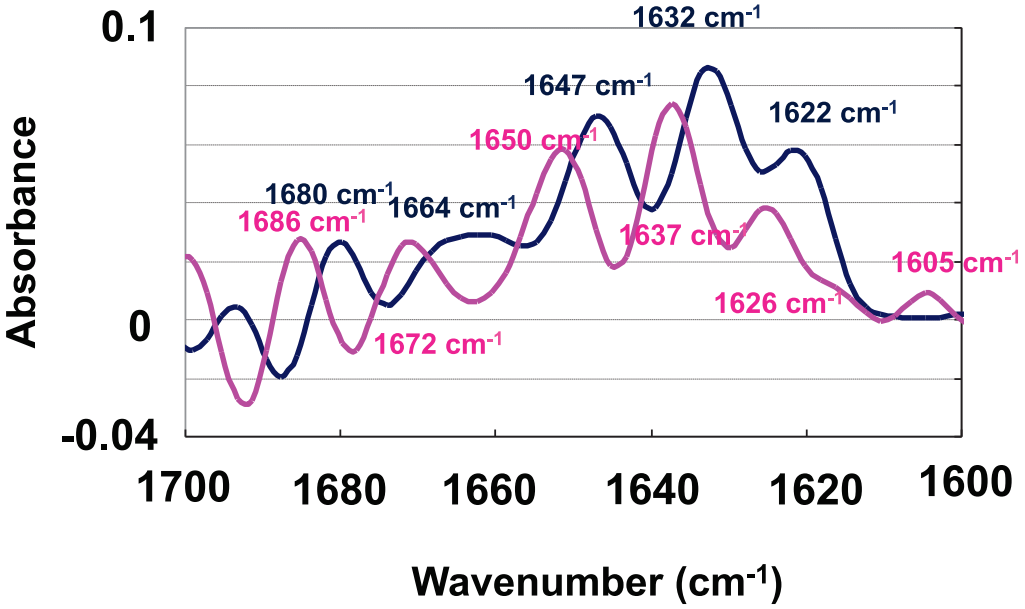

図 5　アルカリ性未熱蔵 DEW および未処理 WP のタンパク質二次構造の比較
ピンク , DEW；青 , WP

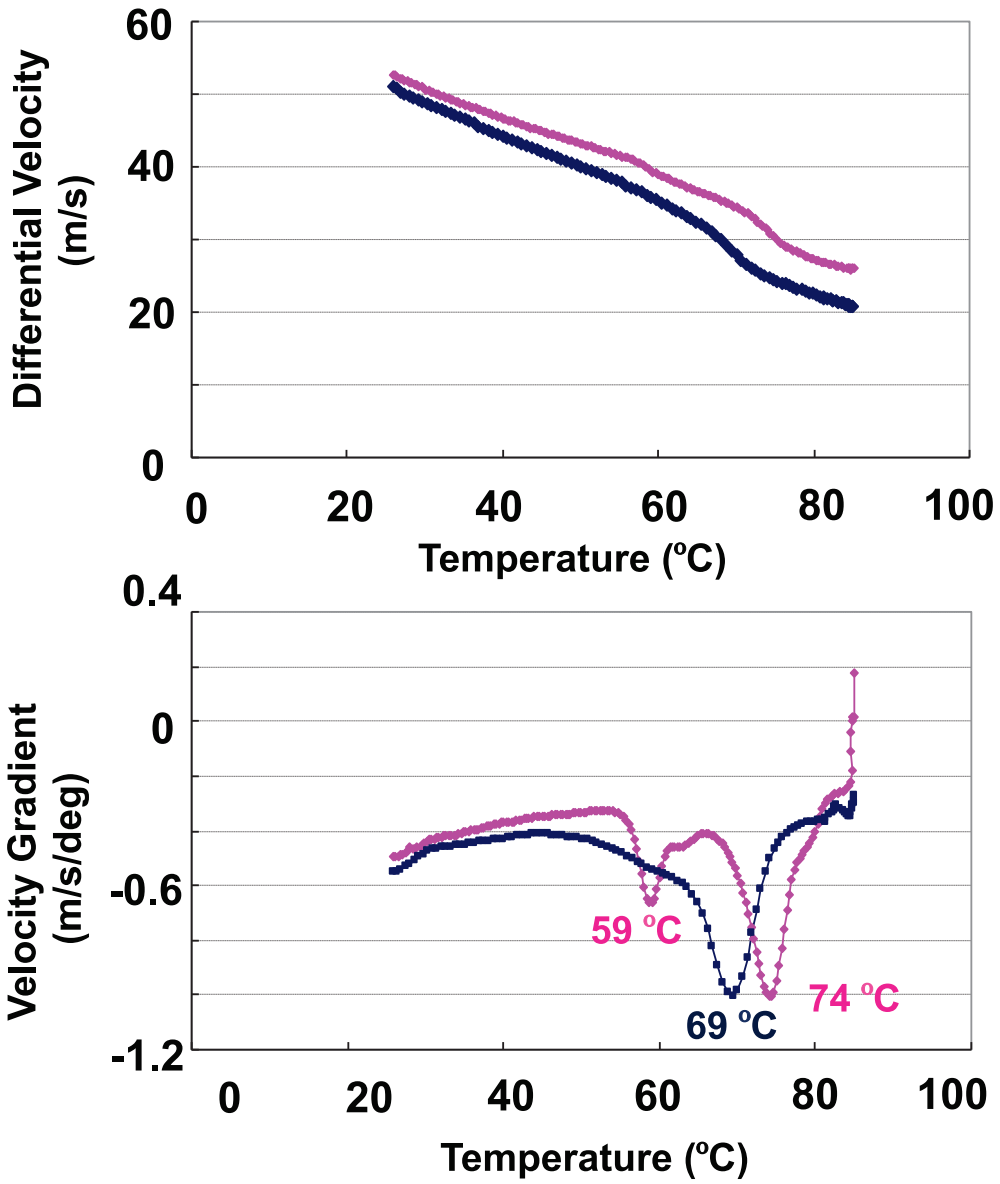

図 6　中性 DEW と WP の温度上昇に伴う超音波速度の変化
ピンク , DEW；青 , WP；タンパク質濃度 , 8.4%

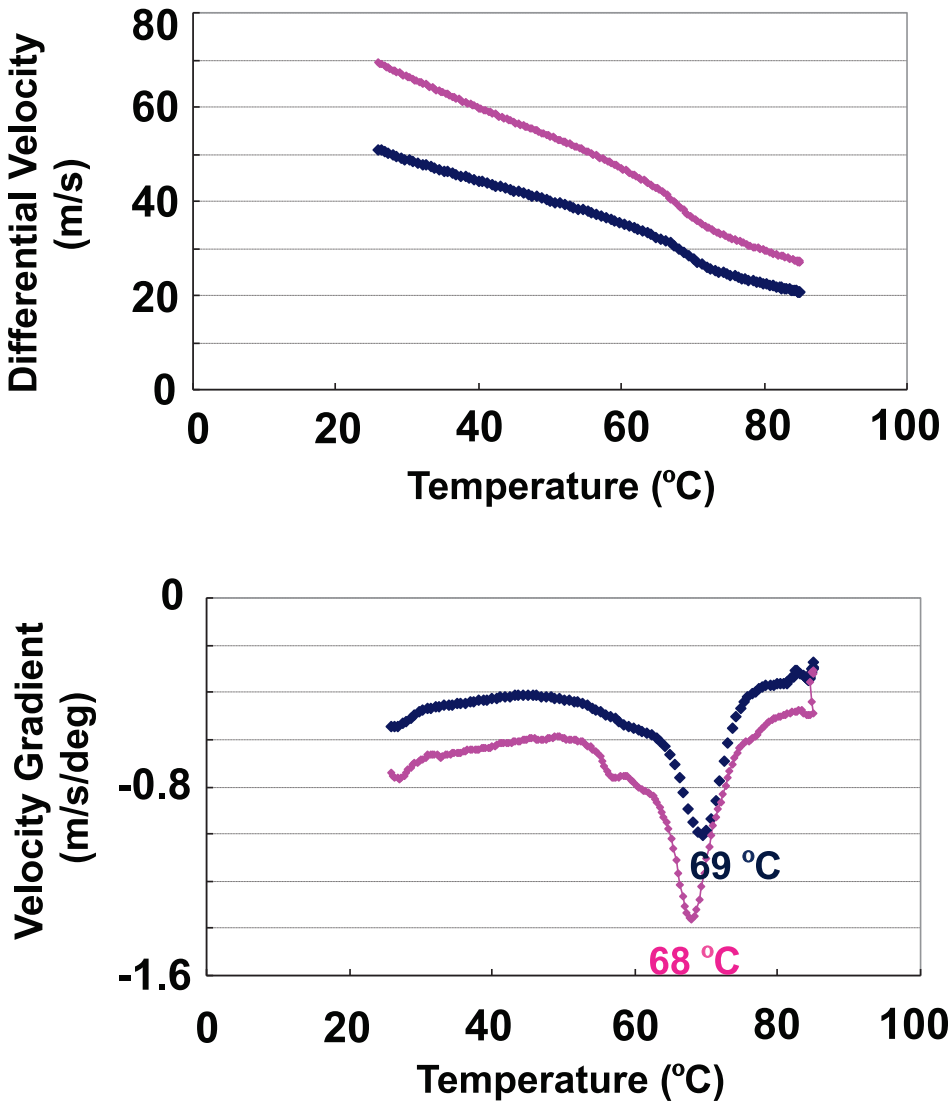

図７　25％エタノール前処理 WP 添加の中性 DEW ゲル形成性に及ぼす影響
ピンク，5％ DEW ＋ 15％エタノール前処理 WP；青，20％未処理 WP

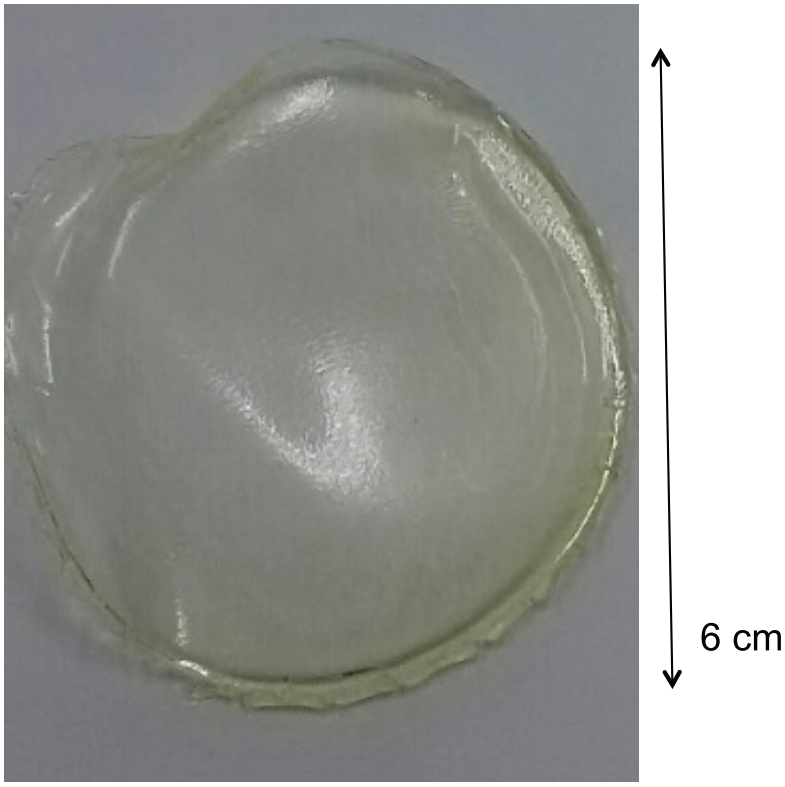

図 8　WP フィルムの外観
試料調製水溶液の組成，未処理 WP，10％ (w/v) 及びグリセロール，3％ (w/v)