◇◇◇◇ 技術論文 ◇◇◇◇

再生絹フィブロインの溶液物性に及ぼす塩の影響

藤井恵子[†], 佐藤美和子

山形大学教育学部

Effect of Salts on Solution Properties of Silk Fibroin Regenerated

Keiko FUJII[†] and Miwako SATO

Faculty of Education, Yamagata University, Kojirakawa-machi, Yamagata-shi 990-8560, Japan

The effects of added salts on the solution properties of silk fibroin in water were investigated by the static light scattering method. Silk fibroin was extracted from sericin-removed yarn by 35% calcium chloride at 98°C for 6 h. Fibroin solution was obtained by dialysis of the resultant extract against distilled water at 4°C. All the experiments were done using 6% fibroin solutions at 25°C. Monovalent salts such as NaCl and KCl induced the formation of disorderly structure via the aggregation of fibroin molecules. On the other hand, the phase separation was observed in the presence of divalent salts such as CaCl₂ and MgCl₂. This phase separation may be attributed to the intermolecular interaction of fibroin strengthened by the bridging effects of divalent salts. The relative viscosity of fibroin solution depended on the salts, but did not correspond to the difference in the valence of salts and the solution properties of fibroin. These results indicated that the divalent salts-induced phase separation of fibroin solution occurred in the micro-region within colloidal particles thereby not affecting viscosity strongly.

Key words: silk fibroin, solution structure, phase separation, light scattering

1. 緒 言

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一つとして据えられ、2000年12月には、「物質循環をできる限り確保することによって、環境への負荷をできる限り少なくし、循環を基調とする社会システムを実現すること」が長期目標として掲げられた。我々は、環境から食糧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一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産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」ということができる。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[1-3]。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[4,5]、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[6]。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、 α -ヘリックスがなく β 構造が多いモデルタンパク

(受付 2000 年 9 月 4 日, 受理 2001 年 2 月 19 日)

[†] 〒 990-8560 山形市小白川町 1-4-12

Fax: 023-628-4353, E-mail: ep250@kdw.kj.yamagata-u.ac.jp

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 β 構造が多いタンパク質であり、 β 構造が規則的に配向しやすいという特徴がある[7]。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[8]。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[9]。

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[10]。絹フィブロインの分子形態には3種類知られており[11-13]、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 α 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 β 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 β 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[14]。

再生絹フィブロインを食品素材として利用する場合には、透析後の溶液が原材料となる。タンパク質や多糖類のような高分子が相互作用するとコロイド粒子が生成し、溶液内でのコロイド状態が反映された溶液構造は加工性に大きな影響を与えと考えられる。コロイドの溶液構造を把握する方法には、電子顕微鏡観察、各種散乱法などが知られている。電子顕微鏡観察では直接的な状態観察が可能な方法であるが、溶液試料を溶液状態で観察することは不可能である。一方、散乱法は溶液試料の非破壊測定が可能である。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 （光散乱の場合は、 $Q = 4\pi n \sin(\theta/2)/\lambda$ ； n ：溶媒の屈折率、 θ ：散乱角、 λ ：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（Fig. 1）。したがって、食品素材の溶液構造を検討する手段として散乱実験は有用と考えられる。本研究では、再生絹フィブロイン溶液の溶液構造に及ぼす塩添加の影響を、光散乱法を用いて検討した。

2. 実 験

2.1 再生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ンを除去したのち、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。散乱角は10°刻みで10°から150°までとした。

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。

3. 結果および考察

3.1 再生絹フィブロイン溶液の光散乱

絹フィブロイン溶液の光散乱測定の結果をFig. 2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 [15]による希薄溶液（0.177–0.386 g/Lの濃度範囲）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[16-20]、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[21]。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

Fig.1 Diagram of light scattering experiment.

Fig. 2 Light scattering intensity of silk fibroin solution.

Fig. 3 Schematic illustration of phase separation structure.

である[22] ことを考えあわせると、絹フィブロインの分子間相互作用の結果生じた会合体がラメラ状に集合した溶液構造をとり、これが干渉を起こしていることが可能性として考えられた (Fig. 3). d は $0.32 \mu\text{m}$ となり、DMSO/ H_2O 系での PVA のゲル化の初期過程での相分離での $0.57 \mu\text{m}$ [18] 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、塩共存下での溶液構造について知見を得るために、NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 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 200 mM) を添加すると、Fig. 2 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 (Figure not shown). このことから、NaCl, KCl 共存下では純水中で形成される配向構造が消失していることが示された。NaCl を添加したフィブロイン溶液の散乱光強度の結果を Guinier plot ($\ln I(Q)$ vs. Q^2) したグラフを Fig. 4(A) に、Debye-Bueche plot ($I(Q)^{-1/2}$ vs. Q^2) したグラフを Fig. 4(B) に示す。いずれのプロットにおいても Q の小さい領域

Fig. 4 Guinier plot (A) and Debye-Bueche plot (B) of silk fibroin in 200 mM NaCl solution.

には直線性は認められなかった。したがって、分散粒子の大きさに関して解析するためには、粒子の多分散性を仮定して逐次差分を行いサイズ分布を求める方法[23]を用いる必要があると思われる。KCl 添加の系においても同様であった。

単調減少する散乱カーブにおいては、系内にフラクタル構造を有する散乱体が存在するとき、そのスケール (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 のべき乗則：

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

に従う。フラクタルの概念は Peleg & Normand [24] によって食品分野に持ち込まれ、日本においては鈴木 & 矢野[25] から研究が始まった。散乱実験の結果は、マルチフラクタルの概念で解析される[26-29]。すなわち、式(2)における指数 a が 1 ~ 3 の値をとるとき「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 の値をとるとき「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。Suzuki *et al.* [30] は、デンプンの小角 X 線散乱を測定し、表面フラクタル次元と質量フラクタル次元の観点か

Fig.5 Light scattering intensity of silk fibroin in 200 mM NaCl (A) and KCl (B) solutions.

ら膨潤や糊化による変化について検討している。Fig. 5は、NaClおよびKClを添加した絹フィブロイン溶液における散乱カーブの両対数プロットである。両対数プロットの傾きが $-1 \sim -3$ あるいは $-3 \sim -4$ となる直線性を示す波数領域を探索したところ、そのような領域は認められなかった。これらの結果から、1価の塩の存在によって不規則な凝集構造が形成されているが、 $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ のスケール領域ではフラクタル様構造は生じていないことが示唆された。また、NaClとKClの影響の差はそれほど認められなかった。

次に、2価の塩である CaCl_2 および MgCl_2 （濃度はともに200 mM）を添加すると、無添加の結果と同様に散乱カーブに極大が認められた（Fig. 6）。式(1)を用いて相分離の特徴的な大きさを求めると、 CaCl_2 を添加した系では $0.36 \mu\text{m}$ 、 MgCl_2 を添加した系では $0.53 \mu\text{m}$ 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_2 と MgCl_2 は相分離構造を破壊しないことが明らかとなった。これらの結果から、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、結果として相分離構

Fig.6 Light scattering intensity of silk fibroin in 200 mM CaCl_2 (A) and MgCl_2 (B) solutions.

造が維持されたと考えられた。そして、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。また、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 [31]により

$$I(X) = I\left(\frac{Q}{Q_m}\right) \propto \frac{X\delta}{\frac{\gamma}{\delta} + X(\gamma + \delta)} \quad (3)$$

が得られている。ここで、 X は規格化された波数である（ $X = Q/Q_m$ ）。二成分混合系の臨界点に近い条件では、 $\delta = 2$ 、 $\gamma = 6$ と予想されており、このとき Q が大きい（すなわち、 X が大きい）領域では散乱カーブが波数の -6 乗となる。 CaCl_2 あるいは MgCl_2 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。

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（Table 1）。相対粘度は添加塩の種類に依存し、

Table 1 Relative viscosity of 6% silk fibroin solution.

Added salt	Relative viscosity
none	2.60
NaCl	2.76
KCl	2.90
CaCl ₂	2.96
MgCl ₂	2.88

CaCl₂ > KCl > MgCl₂ > 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、CaCl₂ と MgCl₂ 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。

再生絹フィブロインは適当な条件でゲル化することが知られている。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、結果として弾性率や破断応力に大きな影響を及ぼすと考えられる。本研究で絹フィブロイン溶液の溶液構造が 1 価の塩の場合と 2 価の塩の場合とでかなり異なった構造であることが示された。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[32-34]。例えば、酸性大豆タン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[34]。ゲル化前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。今後、絹フィブロインのゲルを調製し、溶液構造の観点からレオロジー特性を検討していく予定である。また、加工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、さらに塩の種類や pH を変化させて体系的にとらえることも重要であると思われる。

4. 結 論

食品素材の溶液構造に関する知見を得る一つの方法として光散乱実験に注目し、絹フィブロイン溶液に適用した。

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、凝集によって不規則な溶液構造をとっていた。これは、塩の存在によって静電的相互作用が弱まった結

果と考えられた。この凝集構造はフラクタルではなかった。これに対し 2 価の塩が共存している場合には、1 価の塩の場合と異なり相分離が起っていた。

6% 絹フィブロイン溶液について粘度を測定したところ、1 価の塩と 2 価の塩では溶液構造については顕著な差が見られたにもかかわらず、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、CaCl₂ と MgCl₂ 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。

謝 辞

本研究の一部は、平成 11 年度 (財) ソルト・サイエンス研究財団研究助成によって行ったものである。

引 用 文 献

- 1) 平林潔, 陳開利, 勢簾毅; 絹フィブロインの食品素材としての応用, *New Food Industry*, **33** (11), 1-4 (1991).
- 2) 平林潔; 絹を食べる 機能性食品に変身, *化学*, **47** (8), 530-533 (1992).
- 3) 平林潔, 平岩陽一; 絹を食べる, *New Food Industry*, **35** (1), 17-21 (1993).
- 4) 平林潔, 渡辺誠, 鈴木誠; 絹のゲル化とその応用 (食品), *繊維学会誌*, **45** (6), 263-267 (1989).
- 5) 平林潔; 絹の食品化, *月刊フードケミカル*, **1**, 41-45 (1990).
- 6) 平林潔; 「シルクを食べる」, 高輪出版社, 1996, p. 14.
- 7) 濱口浩三; 「改訂蛋白質機能の分子論」, 学会出版センター, 1990, p. 31.
- 8) 平尾和子, 木村由里子, 五十嵐喜治; 絹糸から調製したフィブロイン溶液の起泡特性とスポンジケーキへの応用, *食科工誌*, **45**, 692-699 (1998).
- 9) 藤井恵子, 高橋貞幸, 木内瑠美子; 絹フィブロインと複合化した米粉のスポンジケーキ 調製とその物性, *食科工誌*, **47**, 363-368 (2000).
- 10) F. Lucas, J. T. B. Shaw, S. G. Smith; The silk fibroins, *Adv. Protein Chem.*, **13**, 107-242 (1958).
- 11) O. Kratky, E. Schauenstein, A. Sekora; An unstable lattice in silk fibroin, *Nature*, **165**, 319-320 (1950).
- 12) O. Kratky; An x-ray investigation of silk fibroin, *Trans. Faraday Soc.*, **52**, 558-570 (1956).
- 13) T. Asakura, A. Kuzuhara, R. Tabata, H. Saito; Conformation characterization of *Bombyx mori* silk fibroin in the solid state by high-frequency ¹³C cross polarization-magic angle spinning NMR, x-ray diffraction, and infrared spectroscopy, *Macromolecules*, **18**, 1841-1845 (1985).
- 14) R. Valluzzi, S. P. Gido, W. Zhang, W. Muller, D. L. Kaplan;

- Trigonal crystal structure of *Bombyx mori* silk incorporating a threefold helical chain conformation found at the air-water interface, *Macromolecules*, **29**, 8606-8614 (1996).
- 15) K. S. Hossain, N. Nemoto; Dynamic and static light scattering of dilute aqueous solutions of silk fibroin collected from *Bombyx mori* silkworms, *Langmuir*, **15**, 4114-4119 (1999).
 - 16) B. S. Kim, T. Chiba, T. Inoue; Phase separation and apparent phase dissolution during cure process of thermoset/thermoplastic blend, *Polymer*, **36**, 67-71 (1995).
 - 17) F. Mallamace, N. Micali, S. H. Chen; Spinodal decomposition in systems containing surfactant molecules, *Physica A*, **236**, 149-161 (1997).
 - 18) T. Kanaya, H. Takeshita, Y. Nishikoji, M. Ohkura, K. Nishida, K. Kaji; Micro- and mesoscopic structure of poly(vinyl alcohol) gels determined by neutron and light scattering, *Supramol. Sci.*, **5**, 215-221 (1998).
 - 19) G. D. Merfeld, D. R. Paul; Light scattering characterization of tetramethyl polycarbonate blends with polystyrene and with styrene-pentabromobenzyl acrylate copolymers, *Polymer*, **41**, 649-661 (2000).
 - 20) A. Ramanujam, K. J. Kim, T. Kyu; Phase diagram, morphology development and vulcanization induced phase separation in blends of syndiotactic polypropylene and ethylene-propylene diene terpolymer, *Polymer*, **41**, 5375-5383 (2000).
 - 21) T. Hashimoto, "Progress in Pacific Polymer Science," vol. 2, Y. Imanishi ed., Springer, Berlin, 1992, p. 175.
 - 22) R. Valluzzi, S. P. Gido, W. Muller, D. L. Kaplan; Orientation of silk III at the air-water interface, *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 237-242 (1999).
 - 23) L. E. Alexander; "X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science," Wiley-Interscience, New York (1969).
 - 24) M. Peleg, M. D. Normand; Characterization of the reggedness of instant coffee particle shape by natural fractals, *J. Food Sci.*, **50**, 829-831 (1985).
 - 25) 鈴木徹, 矢野俊正; フラクタル概念に基づく粉碎エネルギー則の統一的考察, *粉体工学会誌*, **26**, 99-102 (1989).
 - 26) G. L. Squires; "Introduction to the Theory of Thermal Neutron Scattering," Cambridge University Press, London (1978).
 - 27) D. W. Schaefer, J. E. Martin; P. Wiltzius, D. S. Cannell; Fractal geometry of colloidal aggregates, *Phys. Rev. Lett.*, **52**, 2371-2374 (1984).
 - 28) D. W. Schaefer, K. D. Keefer; Fractal geometry of silica condensation polymers, *Phys. Rev. Lett.*, **53**, 1383-1386 (1984).
 - 29) A. J. Hurd, D. W. Schaefer, J. E. Martin; Surface and mass fractals in vapor-phase aggregates, *Phys. Rev. A: Gen. Phys.*, **35**, 2361-2364 (1987).
 - 30) T. Suzuki, A. Chiba, T. Yano; Interpretation of small angle X-ray scattering from starch on the basis of fractals, *Carbohydr. Polymers*, **34**, 357-363 (1997).
 - 31) H. Furukawa; A dynamic scaling assumption for phase separation, *Adv. Phys.*, **34**, 703-750 (1985).
 - 32) A. Visser, A. Thomas; Soya protein products-their processing, functionality and application aspects, *Food Rev. Int.*, **3**, 1-32 (1987).
 - 33) M. K. McMIndes; Applications of isolated soy protein in low-fat meat products, *Food Technol.*, **45** (12), 61-64 (1991).
 - 34) M. C. Puppo, M. C. Anon; Rheological properties of acidic soybean protein gels: Salt addition effect, *Food Hydrocoll.*, **13**, 167-176 (1999).