食品に対する食用色素の染着性 (第3報)

卵白に対する染着性

中 林 敏 郎*・竹 内 弘 明*

鶏卵卵白は約 10% の蛋白質を含むが、その大部分をしめるアルブミンは比較的容易に純粋な結晶として得られ、他の蛋白質に比べてその性質はかなり明確にされている。

したがって食品に対する食用色素の染着性をその構成蛋白質の性状から検討するには、卵白はもっとも適した材料のひとつである。

そこで鶏卵卵白およびこれから調製したアルブミンとグロブリンに対する食用色素の染着性を前報¹⁾²⁾の方法に準じて検討することにした。

実験方法

1. 供試卵蛋白

後述のように卵の鮮度が色素の染着性に影響を及ぼすので、実験はすべて当日産卵された新鮮卵の卵白 (平均蛋白量 10.2%) を分離し、その一定量を水で適宜希釈し、ワーリングブレンダーで 1 分間 1,000 rpm で攪拌して用いた。

アルブミンの調製は常法³⁾にしたがい、卵白に無水ボウ硝を加えて生ずるグロブリンを除き、pH 4.7 で脱水ボウ硝を加えて生ずるアルブミンの結晶をさらに 2 回再結し、透析脱塩後これを一定濃度に希釈して使用した。

グロブリンとしては初めのボウ硝添加で生じた沈殿を十分水洗、脱塩後、真空乾燥して得た粉末の一定量を、水とともにブレンダーで 1 分間 1,000 rpm で磨砕して使用した。

なお試料中の蛋白量はケルダール法で定量した窒素量から算出した。

2. 除蛋白

pH の調節には McILVAIN 緩衝液を用いたが、前報¹⁾で明かにしたように塩類の影響を避けるとともにリンタングステン酸による除蛋白を完全に行なうためには緩衝

液の濃度を極力低くすることが必要であるが、一方卵白や蛋白質の緩衝能にうち勝って pH を定めるためには、緩衝液の濃度はある程度高くなくてはならない。この両条件を満足させるために種々の濃度の緩衝液について検討した結果、M/100 リン酸ニナトリウムと M/200 ケン酸とを用いることにした。

この場合除蛋白が完全か否かを確かめたところ、2% の卵白液 2.5 cc に pH 3.5~7.2 までの上記濃度の緩衝液 2.5 cc と水 2.5 cc を加えた液に対して、1% リンタングステン酸の添加が 2.5 cc では除蛋白は不完全であったが、3 cc 加えれば完全であることを知った。この際リンタングステン酸を加える前に 80°C で 5 分間加熱すると除蛋白はさらに容易となる。

3. 測定法

それぞれの濃度の蛋白液 2.5 cc に緩衝液 2.5 cc と色素液 2.5 cc を加えて振とう、1 時間室温に放置後 80°C に 5 分間加熱 (加熱処理を行なわない場合もある)、水冷後 1% リンタングステン酸を 3 cc 加えて振とう、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上澄液中の残存色素量を測定、別に蛋白液の代りに水を用いて同様に処理、測定した添加色素量との差から吸着色素量を求めた。

4. その他

使用した食用色素の種類、色素の比色定量法、色素の染着性測定における溶液法と寒天柱法などの諸条件は前報¹⁾²⁾と同様である。

実験結果

1. 卵白に対する吸着

(1) ローズベンガル

卵白蛋白 50 mg にローズベンガル 0.5 mg を反応させたときの各 pH における色素吸着量は第 1 図に示すと

* 静岡大学農学部農芸化学教室 (静岡県磐田市見付 4300)

Studies on the Dyeing Capacity of Food-Color-Stuff to Food. Part III. Dyeing capacity to the white of egg. By TOSHIO NAKABAYASHI and HIROAKI TAKEUCHI.

第1図 卵白に対する吸着 pH 曲線 (添加色素 0.5 mg)

おりで、pH 4.8より酸性側では吸着が著しく強くなる。このとき pH 3.5と4.0では加熱したり、リンタングステン酸を加える前に、既に色素と蛋白質の結合物が沈殿するのが認められた。

つぎに pH 3.5において色素量をかえた場合の吸着曲線は第2図に示すとおりで、この際色素濃度が1 mg まではリンタングステン酸を加える前に、色素-蛋白質結合物の沈殿が生成したが、それ以上の濃度では明確な沈殿は認められなくなり、さらに色素量が2 mg をこすと、リンタングステン酸を加えても沈殿を生じなかった。

第2図に基いて第3図の吸着等温線が得られて飽和吸着量は8.9 mg となる。これらの結果から卵白蛋白に対

第2図 卵白への吸着曲線 (pH 3.5)

第3図 卵白への吸着等温線

するローズベンガルの吸着が LANGMUIR の理論に従う平衡吸着であることがわかる。

(2) ボンソー3R とニューコクシン

第2表の各色素の卵白に対する染色性の検討結果から、染色性が中程度のボンソー3R と染色性のもっとも悪いニューコクシンとを選らんでその吸着能を検討した。

ボンソー3R の吸着 pH 曲線、吸着曲線ならびに吸着等温線はそれぞれ第1, 2, 3図に示すとおりで、ローズベンガルと同様に pH 4.7 以下でよく吸着され平衡吸着を行なう。

これに対してニューコキシンの吸着は pH の変化によってほとんど影響されず (第1図)、その吸着曲線は第2図に示すとおりで、吸着等温線が得られなかった。

2. アルブミンに対する吸着

(1) ローズベンガル

結晶アルブミンの色素吸着能は、卵白に比べて約10倍ほど強いので5 mg のアルブミンを使用した。

2.5 mg の色素を添加したときの各 pH における吸着量の変化は第4図に示すとおりで、アルブミンの等電点である pH 4.7 附近で最低となり、それより酸性側でもアルカリ側でも吸着量は増加するが、とくに酸性側で著しい。このとき加熱処理をしないと吸着量は多少低下するが、その場合でも吸着 pH 曲線の形状は、加熱した場合のそれとほとんど等しいので、以後の実験では加熱処理を省略した。また卵白の場合と同様に pH 3.5と4.0ではリンタングステン酸の添加前に色素-蛋白質結合物の沈殿生成が認められた。

第4図 ローゼンベングルのアルブミンおよびグロブリンへの吸着 pH 曲線

つぎに pH 4.0 と 6.0 において色素濃度をかえたときの吸着曲線は第5図に示すとおりで、pH 4.0 の場合は第6図に示すように LANGMUIR の理論に従う吸着等温線が得られて、飽和吸着量は 9.8 mg となり、平衡吸着を行なうことがわかるが、pH 6.0 では吸着等温線が得られなかった。

(2) その他の色素

第2表でアルブミンに対する吸着能のもっとも悪いナフトールイエローについて各 pH での吸着をしらべたところ、第7図に示したように吸着量は少ないが、ローゼンベングルと同様な pH 曲線を示した。

そこで構造上5群に大別される色素の各群から選らん

第5図 アルブミンおよびグロブリンへのローゼンベングルの吸着曲線

第6図 アルブミンおよびグロブリンへのローゼンベングルの吸着等温線

第7図 アルブミンへのナフトールイエローの吸着 pH 曲線

だ各色素の pH 4.0 と 6.0 における吸着量を測定したところ、第1表にみられるようにいずれも pH 4 での吸着が強いが、pH 6 でもかなり吸着されており、タートラジンを除けば両吸着量の比はほぼ近似している。

3. グロブリンに対するローゼンベングルの吸着

5 mg のグロブリンに 2.5 mg の色素を添加したときの吸着 pH 曲線は第4図にみられるように、アルブミンの場合と異なりグロブリンの等電点である pH 5 附近を境として、それより酸性側では吸着は増加するがアルカリ側では低下する。pH 4.0 における吸着曲線と吸着等温線はそれぞれ第5、6図に示すとおりで、飽和吸着量は 8.3 mg となり平衡吸着を行なうことがわかる。

4. 卵白、アルブミンならびにグロブリンに対する各色素の染着性の検定

前報²⁾に従い、溶液法と寒天柱法とを用いて18種の食用色素の染着性を検定した。ただし溶液法において卵白の場合は蛋白質 5 mg に pH 3.5 で色素 1 mg を、アルブミンとグロブリンではその 5 mg に pH 4.0 で色素 2 mg を反応させた。また寒天柱法では、いずれも

第1表 pH 4 と 6 でのアルブミンへの吸着
(アルブミン 5 mg, 色素 2 mg)

色 素	系 統	吸 着 率 (%)		A/B
		A (pH 4)	B (pH 6)	
ローズベンガル	トリフェニールメタン系	95.0	80.4	1.18
ギニアグリーン B	"	92.0	65.3	1.40
エリスロシン	キサントン系	90.0	78.2	1.15
ナフトールイエロー S	ニトロ系	4.8	3.8	1.26
タートラジン	アゾ系	9.1	4.0	2.27
インジゴカルミン	インジゴイド系	12.5	9.9	1.26

第2表 卵白とその構成蛋白への色素の染着能
(T: トリフェニールメタン系, X: キサンテン系, A: アゾ系, I: インジゴイド系, N: ニトロ系)

色 素	系 統	卵 白		アルブミン		グロブリン	
		溶 液 法 (%)	寒天柱法	溶 液 法 (%)	寒天柱法	溶 液 法 (%)	寒天柱法
ローズベンガル*	赤色 105 号	T 85.5	3.28	97.5	3.90	94.5	1.85
アシドバイオレット 6B*	紫色 1 号	T 80.6	2.25	92.5	2.50	82.4	1.43
ギニアグリーン B*	緑色 1 号	T 79.7	2.75	75.6	2.62	78.6	1.43
フロキシ*	赤色 104 号	X 78.8	2.44	91.5	2.27	79.7	1.44
エリスロシン*	" 3 号	X 72.1	2.40	91.0	2.18	91.0	1.41
エオシン*	" 103 号	X 66.6	1.33	93.4	1.31	82.8	1.50
アマランス	" 1 号	A 25.0	1.26	24.7	1.39	18.0	1.25
インジゴカルミン	青色 2 号	I 12.7	1.42	12.4	1.29	19.2	1.30
ボンソー R	赤色 101 号	A 31.8	1.26	24.5	1.14	15.0	1.15
アマランス	" 2 号	A 25.0	1.26	24.7	1.39	18.0	1.25
アシッドレッド	" 106 号	X 35.2	1.08	33.1	1.09	28.6	1.09
ブリリアントブルー FCF	青色 1 号	T 14.8	1.26	19.5	1.14	7.8	1.20
オレンジ I	橙色 1 号	A 15.0	1.17	18.8	1.09	10.9	1.04
ボンソー SX	赤色 4 号	A 8.4	1.09	6.8	1.09	13.2	1.14
ニューコクシン	" 102 号	A 7.6	1.30	4.7	1.14	5.6	1.04
タートラジン	黄色 4 号	A 7.9	1.04	9.1	1.16	8.9	1.04
サンセットイエロー FCF	" 5 号	A 7.6	1.00	5.1	1.08	13.2	1.04
ナフトールイエロー S	" 1 号	N 8.5	1.08	4.8	1.03	3.9	1.03

0.5% 寒天中に 1% の蛋白質を固定し 2 mg の色素を作
用させた。その結果は第 2 表に掲げたように、ゼラチン
の場合²⁾と異なって溶液法と寒天柱法との値はよく比例
しており、各色素に対する卵白、アルブミンおよびグロ
ブリンの吸着能も同じ傾向を示している。なおこの表で
* 印の色素は溶液法においてリンタングステン酸の添加
前に色素-蛋白質結合物の沈殿を生じたもので、とくに
強い染着性を示しており、1, 2 の例外を除けばいずれ
もトリフェニールメタン系およびキサントン系の色素が
強い染着性を有することがわかる。

5. 卵の鮮度の影響

本実験を行なうに当たって卵が異なると吸着量がか
なり変動することを経験したので、その原因を追求したと
ころ、卵の鮮度が影響していることを知った。そこで同
日に産卵された新鮮卵を 30°C に保ち、毎日 3 コずつと
って卵白の pH および pH 3.5 におけるローズベンガル
の吸着量 (蛋白質 50 mg, 色素量 1 mg) を測定した。
その結果は第 3 表にみられるように、鮮度の低下につれ
て pH は上昇し吸着量も増加した。

しかし当日産卵された 6 コの新鮮卵を用いた場合は、

第3表 鮮度低下に伴う卵白へのローズベンガルの吸着率の変化

貯蔵日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
卵白の pH	7.4	7.6	8.4	8.8	8.8	9.1	9.0	9.0	9.0	9.0
吸着率(%)	84.5	85.0	85.7	86.9	88.0	89.2	90.8	93.0	95.2	96.0

第4表 6個の卵の吸着率(%)の変動

色 素	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
ロ ー ズ ベ ン ガ ル	80.2	81.6	84.1	82.8	83.6	81.5
ニ ュ ー コ ク シ ン	7.7	6.1	7.0	7.4	6.4	7.7
タ ー ト ラ ジ ン	3.5	4.5	3.2	4.5	4.1	3.0
ブリリアントブルー FCF	33.2	33.0	35.5	37.5	33.9	34.3
ギニアグリーン B	78.6	75.6	79.1	77.6	79.3	78.0

第4表に示すように各色素の吸着量はほぼ一定値となることを確かめた。

6. 乾燥卵白への吸着

真空乾燥でつくられたフレーク状のもの（蛋白含量66.4%）およびスプレードライヤーを用いてつくられたパウダー状（蛋白含量65.4%）の2種の市販乾燥卵白の吸着能を測定した。

10 mg の蛋白質を含む乾燥卵白に 3 mg のローズベンガルを添加したときの両卵白の吸着 pH 曲線は、第8図にみられるように新鮮卵白の場合（第1図）と同様な形状で、pH 4.7 以下で強い吸着を行なう。しかし pH 3.5 における吸着曲線は、第9図にみられるように新鮮卵白の場合（第2図）と異なって直線となり吸着等温線を与

第8図 乾燥卵白へのローズベンガルの吸着 pH 曲線

えないが、数種の色素に対する両卵白の吸着率は第5表にみられるように第2表の新鮮卵白の場合とほぼ一致した値を与える。

第9図 乾燥卵白へのローズベンガルの吸着曲線 (pH 3.5)

第5表 乾燥卵白への色素の吸着率(%)
(蛋白質 10 mg, 色素 2 mg, pH 3.5)

色 素	フレーク状	パウダー状
ボ ソ ー 3 R	25.4	22.4
ロ ー ズ ベ ン ガ ル	86.0	85.0
ナフトールイエロー S	12.1	9.7
タ ー ト ラ ジ ン	13.4	11.8
ギニアグリーン B	82.6	80.1
インジゴカルミン	18.3	13.3

第6表 吸着に及ぼす変性の影響

変性法	新鮮卵白	攪拌	凍結融解	加熱凝固	乾燥	アルコール変性
吸着率(%)	71.2	71.3	79.2	88.9	96.0	97.6

7. 吸着に及ぼす変性の影響

新鮮卵白をつぎにのべる方法で変性させ、その蛋白量 10 mg に pH 3.5 でローズベンガル 2.5 mg を添加したときの吸着量を測定した。

攪拌: 2%卵白液をワーリングブレンダーで15分間、1,000 rpm で攪拌泡立てた。凍結: 卵白を -18°C で1夜凍結後解凍。加熱: 卵白を沸騰水中で5分間加熱凝固させたのちワーリングブレンダーで磨砕。アルコール変性: 卵白液に等量の無水エタノールを添加、遠心分離、水洗後ワーリングブレンダーで磨砕した。なお比較のために前述の乾燥卵白(パウダー)を使用した。

それらの結果は第6表にみられるように変性の程度が進むにつれて吸着量は増加した。

考 察

一般に蛋白質もアミノ酸と同様に溶液中では、等電点よりも酸性側ではアミノ基が、アルカリ側ではカルボキシル基が解離して、等電点ではそのほとんどが双極イオン状態で存在するといわれている⁴⁾。

一方食用色素はすべて酸性染料に属するから、蛋白質との結合はまず解離したアミノ基との間におこると考えられ、このことは多くの色素が酸性側で LANGMUIR の理論に従う平衡吸着を行なう事実をよく説明する。したがって pH の上昇に伴うアミノ基の解離の低下につれて色素の吸着量も減少し、等電点よりも酸性側ではアミノ基の解離の増加に伴って色素吸着量の急激な増加をもたらす結果、第1, 8図および第4図のグロブリンの場合のような吸着 pH 曲線が画かれたものと解される。

しかし第4, 7図にみられるアルブミンの吸着 pH 曲線は等電点において最低となり、それよりアルカリ側においてもかなりの吸着量の増加があり、この現象は第1表に示したように多くの色素について認められる。このアルカリ側での吸着がなにに起因するかは明かでないが、このような吸着がグロブリンやゼラチンの場合には認められないことから、アルブミンに特有な性質で、アルカリ側で平衡吸着以外の特殊な吸着が行なわれることが推定される。したがって酸性およびアルカリ側での両吸着曲線が、等電点で交又する結果として吸着の最低点が形成されたのであろう。

しかし第1図の卵白の吸着 pH 曲線が、卵白蛋白の大部分を占めるアルブミンのそれよりもグロブリンのそれ(第4図)に類似しているが、これは卵白内でアルブミンの吸着能、とくにアルカリ側でのそれをグロブリンやその他の卵白成分がなんらかの形で阻害しているためと推定される。

つぎに酸性側において色素-蛋白質結合物の沈殿が生成したのも、色素と結合することによって解離状態のアミノ基が減少する結果、蛋白質が未解離の中性分子型の等電状態⁴⁾となったためであろう。

しかしこのとき色素量をさらに増加してゆくと、かえって色素-蛋白結合物の沈殿が消失する。この原因は明かでないが、同様な現象は蛋白質と適当な濃度比にあるときにのみ沈殿を生ずるところの sodium dodecyl sulfate のような陰イオン detergent の場合にも認められており⁶⁾、過剰色素の結合によって蛋白質の性質が大きく変化したことが推定される。

このような場合リンタングステン酸を添加しても、もはや沈殿を生じない現象は既にゼラチンの場合¹⁾にも認められており、蛋白質への色素やリンタングステン酸の結合個所が共通していることを示している。

つぎにアルブミンに対する染色性のもっとも弱いナフトールイエローの吸着 pH 曲線(第7図)と、もっとも染色性の強いローズベンガルのそれ(第4図)とを比較すると、両者の形状はよく類似しているが、等電点においてナフトールイエローはほとんど吸着されないのに、ローズベンガルは大きな吸着量を示し、これがローズベンガルの強い染色性を特徴づけている。

この等電点における吸着は他の蛋白質の場合にも認められる現象で、さきにゼラチンの場合²⁾にのべたように、おもに蛋白質に対する色素分子や色素のイオンミセルの直接染料的な吸着によって行なわれるものと推定される。

したがって卵白やその構成蛋白質に対する色素の吸着は単に解離したアミノ基に対する結合ばかりではなく、直接染料的な吸着もまた大きな役割を演じており、この2種類の吸着力の強弱が、第2表にみられるような各色素の染色性の相違となってあらわれたのであろう。

とくに直接染料的な吸着は、溶液の理化学的な性質や

それに伴って起こる蛋白分子表面の物理的状態の変化によって大きな影響をうけるから、第3表に示した卵の鮮度の低下や、第4図のアルブミンの加熱処理ならびに第6表にみられる変性度の進行などに伴う吸着量の増加は、その一部は自己消化あるいは変性による蛋白質構造の変化によって、色素との結合個所が新たに生成されたことに起因すると思われるが、さらにこの変化によって蛋白分子表面の物理的状態が、直接染料的な吸着に有利にかわったためと考えられ、とくに純粋に分離されたアルブミンやグロブリンの示す強い吸着能は、これらの効果がもっとも強くあらわれたためと考えられる。

要 約

鶏卵の卵白およびその構成蛋白質に対する食用色素の染着性を検討した結果

1. 卵白に対しローズベンガルやボンソー3RはpH 4.8以下でよく吸着されて平衡吸着を行なうが、ニューコクシンはどのpHでもほとんど吸着されない。
2. アルブミンの吸着pH曲線はその等電点(pH 4.7)で最低となり、これより酸性側でもアルカリ側でも上昇する。酸性側では平衡吸着を行なうが、アルカリ側では不明の特異な吸着が行なわれる。
3. グロブリンに対しローズベンガルはその等電点(pH 5)より酸性側で強く吸着されて平衡吸着を行なう。

4. 溶液法と寒天柱法とで測定した卵白、アルブミンならびにグロブリンに対する色素の染着性はいずれもほぼ比例しており、トリフェニールメタン系およびキサンテン系色素がとくに強い染着性を示した。

5. 卵の鮮度が低下するにつれ、また変性の程度がすすむにつれて色素の吸着量は増加し、とくに純粋に分離したアルブミンやグロブリンは新鮮卵白の約10倍の吸着能を示した。

6. 蛋白質に対する色素の吸着は解離したアミノ基との結合ばかりでなく、直接染料的な吸着も大きな役割を演じており、また色素とリンタングステン酸とは蛋白の同じ個所に結合するものと考えられる。

本実験を行なうにあたって試料を提供して頂いた清水食品株式会社およびキュービー株式会社に感謝する。

文 献

1. 中林敏郎・川崎貞夫：食品工誌，9，331 (1962)。
2. 中林敏郎・川崎貞夫：食品工誌，9，336 (1962)。
3. 江上不二夫他編：標準生化学実験，（文光堂），p. 580 (1953)。
4. 志村憲助他共著：蛋白質生化学（朝倉書店），p. 96 (1960)。
5. 水島三一郎・赤堀四郎編：蛋白質化学，2，（共立出版），p. 339 (1954)。

(1963年6月24日受理)

水 飴 の 水 分 定 量 法 (第2報)

砂法とプラスチック・フィルム法の比較

堤 忠 一*・永 原 太 郎*

水飴の水分定量法については、第1報¹⁾でプラスチック・フィルムを用い、70°C 減圧乾燥法によって得た定量値を基準とする場合は、A.O.A.C. 法の70°C 減圧乾燥による砂法²⁾では、0.4% 低く、またわが国でもっぱら行なわれている常圧105°C 乾燥による砂法³⁾では、0.3~0.5%高いことをのべた。

Method of A.O.A.C. (第9版)においては、澱粉分解物の水分定量法⁴⁾として EVANS⁵⁾ らの考案した濾紙法、および CLELAND ら⁶⁾ の filter-cell 法が、first action として採用され、corn sirup では、100°C で、粗製 corn sugar では70°C でいずれも減圧乾燥することが規定されている。この2法は、乾燥助剤として濾紙、

* 農林省食糧研究所（東京都江都区深川浜園町2）

Determination of Moisture in Starch Sirup. Part II. A comparison of sand method and plastics film method. By CHUICHI TSUTSUMI and TARO NAGAHARA.