酸-アセトン法によって調製されたグロビンならびに グロビン加水分解物のゲル形成性

劉 新旗*・米倉政実*・堤 将和*

Gel Formation of Globin Prepared by Acid-acetone Method and Globin Hydrolyzates

Shinki Ryu*, Masami YONEKURA* and Masakazu TSUTSUMI*

* Faculty of Agriculture, Ibaraki University, 3-21-1,
Amimachi-chuo, Inashikigun, Ibaraki 300-03

The gel formation of porcine globin prepared by the acid-acetone method and the acid hydrolyzates of the resulting globin were investigated. (1) Globin dissolved in acidic solution below pH 4.0 and in alkaline solution above pH 10.0, and was almost insoluble in the pH 7.0 to 8.0 region. (2) Globin gel was formed in the pH range 2.0~4.0 and 10.0~11.0, and at a globin concentration above 7%. (3) Though globin formed the gel when citric acid was added in the range of 0.02 M to 0.2 M, the further addition of the acid, 0.4 M to 2.0 M, inhibited the gel formation. However, the transparent gel was formed when the solutions whose gel formation was inhibited were allowed to stand at 30°C for 10 days. In the case of acetic acid and phosphoric acid, the effects of these acids on gel formation was similar to that of citric acid though acid concentration and the values of gel strength of the gel formed were different from those of citric acid, respectively. The hydrolysis of globin in these acids and SDS-PAGE of the resulting hydrolyzates were carried out. When the hydrolysis was done by these concentrated acids, the protein band of about 15 kDa which is thought to be globin was pale and the bands below 15 kDa, on the contrary, were dark. From the results, it is thought that the hydrolyzates produce a marked effect on the gel formation of globin. In addition, it was suggested that the proportion of globin to the hydrolyzates was closely correlated with the gel strength of the gel formed.

(Received July 5, 1993)

グロビンは、と畜血液の血球画分から容易に、かつ大量に得ることができるタンパク質であるが、特に優れた加工特性が見出されないために、ほとんど利用されていないのが実情である。そこで著者らは、グロビンの有効利用を目指して本研究を行った。特にグロビンのゲル形成性に着目し、ゲル形成条件ならびにゲル特性について研究を行った。

まず、豚血液の血球画分からグロビンを調製する方法として、過酸化水素法¹⁾、カルボキシルメチルセルロース (CMC) 法²⁾ などの方法が報告されているが、本報告では、調製法が簡便で、特別な装置を必要とせず、かつ大量処理が可能な酸-アセトン法³⁾ によってグロビンを

調製し、得られたグロビンのゲル形成性について検討した。従来、本法で調製されたグロビンはゲルを形成しにくいと言われていた⁴⁾ が、本報に述べられたように、本グロビンも、ある条件下で強いゲルを形成することを明らかにした。しかし、このグロビンゲルは不透明ゲルであるため、食品加工材料として若干問題が残った。そこで著者らはこの点を解決するため、酸によるグロビンの部分加水分解を行ったところ、より透明で高いゲル強度を示すゲルが形成された。本報告はこれらの結果をまとめたものである。

* 茨城大学農学部 (〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1)

実験方法

1. グロビンの調製

グロビンは TYBOR らの酸-アセトン法⁵⁾を一部改変して調製した³⁾。

2. グロビンの溶解性

各 pH の緩衝液 (pH 2.0~7.0 は McIlvain 緩衝液, pH 8.0~11.0 は Atkins & Pantine 緩衝液) 4 ml にグロビン 4 mg を加えてよく攪拌した後, 5℃ で 1 日放置した。その後これらを遠心分離 (3000×g, 15 分) し, 得られた上清のタンパク質量を色素結合法⁶⁾で定量した。

3. グロビンゲルの調製と透明度, ゲル強度の測定

グロビンゲルは, 指定濃度のグロビンを, 塩酸と水酸化ナトリウムで pH 1.0~11.0 に調整した後シリコン栓で封じ, 90℃, 15 分, オートクレーブで加熱した後, 室温で 60 分以上放置して調製した (このゲルを“加熱直後のゲル”と略す)。ゲルを形成しているものについては, 光電比色計を用いて 700 nm の透過率 (T%) を測定し, ゲルの透明度を, 0~39 T% は不透明, 40~69 T% は半透明, 70~100 T% は透明として表した。グロビンのゲル形成に対する酸類の影響を検討するために, 次のような実験を行った。まず, 7% グロビン液に指定濃度になるように酸を添加して pH を測定した後, 上記の条件で加熱した。ゲルを形成したものについては, 透明度とゲル強度を測定した。ゲルを形成しないものについては, そのまま 30℃ で 10 日間放置し, この時点でゲルを形成したものについては, 同様に透明度とゲル強度を測定した。ゲル強度は前報⁷⁾に準じ, レオメーター (NRM 2003 J 型, 不動工業) を用いて 3 回以上測定し, レオプロッター (FR 801 型, 不動工業) による演算値の平均値で示した。なお, 本報告ではゲル強度を破断応力 (Breaking stress) で示した。

4. 電気泳動

LAEMMLI の方法⁸⁾に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。ポリアクリルアミドの濃度を 15% とし, クーマシーブリリアントブルー R-250 で染色した。装置はマイクロスラブ電気泳動装置 (KS-8010 MARYSOL) を用いた。

実験結果

1. グロビンの溶解性

各 pH でのグロビンの溶解性を検討し, その結果を Fig. 1 に示した。

グロビンの溶解性は pH 4.0 以下の酸性域で高く, pH

Fig. 1 Effect of pH on solubility of globin

5.0~9.0 の範囲で低く, pH 7.0~8.0 で最低値となった。このことはグロビンの等電点 (pH 7.6~7.8) を考えると, 妥当な結果と言える。なお, 多くの食品タンパク質と同様に, グロビンも pH 10.0 以上の pH 域ではよく溶解した。

2. グロビンのゲル形成性に対するグロビン濃度と pH の影響

グロビンのゲル形成性に対するグロビン濃度と pH の影響について検討し, その結果を Table 1 に示した。

Table 1 から明らかなように, グロビンは 5% 以下の濃度でゲルを形成しなかったが, 7% 以上の濃度でゲルを形成した。また, グロビンは pH 2.0~4.0 (塩酸による調整) の酸性域, および pH 10.0~11.0 (水酸化ナトリウムによる調整) のアルカリ性域でゲルを形成した。なお, pH 11.0 では透明なゲルを, pH 2.0~3.0 では半透明なゲルを形成したが, pH 4.0 と pH 10.0 では不透明ゲルであった。ゲル強度は pH 10.0 で最も高い値を示し, 酸性域では pH 3.0 で高いゲル強度を示した。

3. グロビンのゲル形成性に対する酸類の影響

グロビンのゲル形成性に対するクエン酸, 酢酸, リン酸の影響について検討し, その結果を Table 2, Table 3, Table 4 に示した。

まず, クエン酸の場合 (Table 2), 添加濃度が 0.2 M (pH 2.6) までゲルを形成し, 0.4 M (pH 2.2) 以上になるとゲルを形成しなかった。形成したゲルのゲル強度は, クエン酸の添加濃度が高くなるにしたがって弱くなった。ゲルの透明度はクエン酸の添加濃度が高くなるほど

Table 1 Gel properties of globin

	pH										
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
Gel formation											
5% globin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7% globin	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+
9% globin	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+
Gel properties (7% globin)											
700 nm (T%)		60	40	15						5	74
Transparence		TL	TL	OP						OP	TP
Breaking stress (g)		1.3	2.1	2.0						6.8	0.9

+ : Gel was formed. — : Gel was not formed.

Transparence : OP, Opaque TL, Translucent TP, Transparent

Table 2 Effect of citric acid on the gel strength of globin gel

	Citric acid concentration (M)										
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.4	0.8	1.4	2.0	2.4
pH	3.6	3.2	3.0	3.0	2.9	2.6	2.2	1.9	1.6	1.3	1.1
700 nm (T%)	37	47	58	60	65	80	84	85	88	93	94
Transparence ¹⁾	OP	TL	TL	TL	TL	TP	TP	TP	TP	TP	TP
Breaking stress (g)											
after heating-cooling ²⁾	4.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.0	—	—	—	—	—
after 10 days ³⁾	7.0	5.0	3.3	3.0	3.6	6.8	9.5	20.0	16.0	8.8	—

¹⁾ See Table 1.²⁾ The gel was formed immediately after heating-cooling.³⁾ The gel was formed after allowing to stand at 30°C for 10 days.

Table 3 Effect of acetic acid on the gel strength of globin gel

	Acetic acid concentration (M)									
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.4	0.8	1.4	
pH	4.3	4.1	4.0	3.9	3.9	3.7	3.5	3.2	3.0	
700 nm (T%)	31	37	40	42	43	66	70	70	71	
Transparence	OP	OP	TL	TL	TL	TL	TP	TP	TP	
Breaking stress (g)										
after heating-cooling	2.8	4.5	4.2	4.0	3.5	—	—	—	—	
after 10 days	7.5	9.5	9.7	9.4	7.7	3.5	2.0	7.5	25.0	

Abbreviations etc. : See Table 2.

高くなる傾向を示した。なお、形成された加熱直後のゲルを、30°Cで10日間放置したところ、ゲル強度が全体的に上昇した。一方、クエン酸の添加濃度が0.4M以上になると、加熱直後では、ゲルの形成が認められなかったが、これらを30°Cで10日間放置したところ、より透明で高いゲル強度を示すゲルが形成された。すなわち、

クエン酸の添加濃度0.2Mから急激にゲル強度が高くなり、0.8M (pH 1.9)で最大値を示した。しかし、クエン酸の添加濃度がこれ以上高くなると、ゲル強度は徐々に低下する傾向を示し、2.4M (pH 1.1)添加でゲルの形成は完全に阻害された。また、クエン酸の添加濃度が高くなるにしたがって、ゲルの透明度も上昇し、0.2M以上

Table 4 Effect of phosphoric acid on the gel strength of globin gel

	Phosphoric acid concentration (M)							
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.4	0.8
pH	3.2	2.6	2.2	2.1	2.0	1.7	1.3	1.1
700 nm (T%)	45	70	70	74	80	84	90	97
Transparence	TL	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP
Breaking stress (g)								
after heating-cooling	1.0	0.7	—	—	—	—	—	—
after 10 days	1.7	1.9	3.5	5.5	5.5	5.0	1.0	—

Abbreviations etc. : See Table 2.

添加すると透明ゲルが形成された。

酢酸の場合 (Table 3), 酢酸の添加濃度が 0.1 M (pH 3.9) までゲルの形成が認められた。ゲル強度は 0.04 M (pH 4.1) 添加で最大値を示し、それ以上の濃度では徐々に低下し、0.2 M (pH 3.7) 添加でゲル形成は完全に阻害された。ゲルの透明度は酢酸の添加濃度が高くなるにしたがって高くなる傾向を示した。なお、加熱直後のゲルを、30℃で10日間放置したところ、クエン酸の場合と同様、全体的にゲル強度が上昇し、また 0.2 M 酢酸添加のものも透明なゲルを形成した。特に酢酸の場合は、添加濃度が 0.8 M 以上からゲル強度は高くなる傾向を示し、1.4 M (pH 3.1) 添加まではほぼ直線的に上昇した。今回はこれ以上の濃度で実験を行っていないので、最大のゲル強度を示す酢酸添加量を求めることはできなかった。

リン酸添加の影響 (Table 4) は、ゲルの形成性ならびにゲル強度に影響する濃度の違いはあるものの、クエン酸添加の場合と同じような傾向であった。

4. グロビン加水分解物の電気泳動

グロビンにクエン酸などの酸を添加して、ゲル形成に対するこれらの酸の影響を検討したところ、興味ある現象が見いだされた (Table 2~Table 4)。この場合、原因の一つとしてグロビンの酸による加水分解が考えられる。そこで、これらの酸を用いて、90℃で15分間、グロビンの酸加水分解を行い、得られた加水分解物の電気泳動を行った。その結果を Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 に示した。

まず、クエン酸によるグロビン加水分解物の電気泳動図を Fig. 2 に示した。Fig. 2 から明らかなように、クエン酸の濃度が高くなるにしたがって、グロビンに相当するバンド部分 (15 kDa) が薄くなり、逆に加水分解物に相当するバンドの部分 (15 kDa 以下) が濃くなった。酢酸の場合は、濃度が高くなっても pH がそれ程低下しな

いため (Table 3) 加水分解力も弱く、結果的に 15 kDa の部分はそれ程薄くならず、また 15 kDa 以下の部分もクエン酸の場合程濃くはならなかった (Fig. 3)。リン酸の場合、加水分解力はクエン酸よりも強力であったが、リン酸の濃度と加水分解物の生成量との関係は、クエン酸の場合と同じような傾向を示した (Fig. 4)。

考 察

食品加工においてタンパク質は、栄養素としてのみならず、食品に固有な構造や物性を与える要素として、大きな役割を担っている。本研究で用いられたグロビンも、栄養学的には必須アミノ酸 (バリン、ロイシン、リジンなど) が多く、食材として注目されているものの、加工特性に関する研究が少ないため、その利用は殆ど進展していないのが実情である。そこで著者らは、グロビンの加工特性、特にグロビンのゲル形成性に着目して、本研究を行った。

グロビンのゲル形成性は、グロビンの調製法の違いにより異なる⁹⁾。例えば、CMC 法で調製されたグロビンは、ゲルを形成すると言われているが、本法で調製されたグロビンは、ゲルを形成しにくいと言われてきた⁴⁾。従って著者らは、まずグロビンのゲル形成性について詳細に検討した。その結果、グロビンのゲル形成はグロビン濃度と pH に強く依存することが明らかとなった (Table 1)。すなわち、ゲルの形成には 7% 以上のグロビン濃度を必要とすることがわかった。この点は、代表的なタンパク質系のゲル化剤であるゼラチンのゲル形成濃度 (通常 4~5% で十分ゲルを形成する) に比べても、高い濃度である。従って、本グロビンを食品加工におけるゲル化剤として使用する場合、高濃度グロビンによる好ましくない風味の付与等も考えられる。今後より低濃度でゲルを形成するようグロビンを改変することが重要な課題である。

Fig. 2 SDS-PAGE patterns of globin hydrolyzates by citric acid

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of globin hydrolyzates by acetic acid

Fig. 4 SDS-PAGE patterns of globin hydrolyzates by phosphoric acid

グロビンのゲル形成は pH の影響を受けた。すなわち、グロビンの等電点付近 (pH 7.6~7.8) からより離れた pH でゲルを形成した。等電点から離れた pH 域では、グロビンの分子間の疎水結合や水素結合は、静電的反発力より大きくなるので、分子間の凝集力も強くなり、結果的に巨大な凝集体を生じ、ゲルを形成しやすくなるものと思われる¹⁰⁾¹¹⁾。また、等電点に近い pH でゲルを形成したグロビンゲルは、等電点から離れた pH で形成したゲルに比べ、不透明であった。このことは、グロビンの溶解性 (Fig. 1) と関連しているものと思われる。つまり、等電点に近い pH では、不溶性のグロビン

粒子が網目構造の中により多く分散しているため、透明度が低くなるものと思われる¹²⁾。

グロビンのゲル形成に対するクエン酸、酢酸、リン酸の影響を検討したところ、興味ある現象が見いだされた (Table 2~Table 4)。特に、加熱直後にゲルを形成しなかった濃度範囲のものを、30℃で10日間放置したところ、加熱直後のゲルよりも透明で、高いゲル強度を示すゲルが形成された。この現象は、これらの酸によるグロビンの部分的加水分解によるものと考えられた。そこで、この点を明らかにするために、酸加水分解物の電気泳動を行った (Fig. 2~Fig. 4)。電気泳動の結果、本法で

調製されたグロビンは、15 kDa 付近に濃いバンドが認められ、これはグロビンの α -鎖と β -鎖の単量体（いずれも分子量は約 16 kDa）と推定された。なお、このバンドはより濃い酸の添加によって徐々に薄くなり、同時に 15 kDa 以下のバンドが徐々に濃くなった。このことは、グロビンが酸によって加水分解を受け、より低分子化したことを示す。しかし、酸の添加量が多くなると、グロビンの分解が進み、低分子部分が相対的に過剰になると同時に、pH も 1.0 近くになり、ゲルの形成は逆に阻害された（Table 2 と Fig. 2, Table 4 と Fig. 4）。すなわち、酸加水分解物によるゲルの形成には、約 15 kDa のポリペプチドと 15 kDa 以下のポリペプチドの適当な量比が重要であると思われる。

また、酸の添加濃度が高くなると、ゲルの透明度は高くなる傾向を示した。これはグロビンが酸によって部分的に分解されて低分子化したため、巨大な塊状凝集体ではなく、線状凝集体のような網目構造が形成されやすくなったためと思われる。このような現象は、ペプシンによるオボアルブミンの部分分解物でも観察されており¹³⁾¹⁴⁾、透明ゲルを形成させる一つの条件として注目される。

本研究では、酸としてクエン酸、酢酸、リン酸を用いたが、加水分解だけを目的とするのであれば、塩酸でも可能であった。著者らは、グロビン溶液を塩酸で pH 2.0 として、90～100℃で 15 分間、加熱したところ、本研究における電気泳動図とほぼ同じ結果を得ている。今後、本研究の成果を実用化する場合、酸として塩酸を用いることができれば、経済性の面でも大きな進展が期待できると思われる。

なお、現在著者らはグロビンの酸加水分解物を調製し、分解物のゲル形成性ならびに形成されたゲルの特性について詳細に検討している。

要 約

酸-アセトン法によって調製されたグロビンならびにグロビン酸加水分解物のゲル形成性について検討し、次のような結果を得た。

(1) 本法で調製したグロビンの溶解性は、pH 4.0 以下の酸性、pH 10.0 以上のアルカリ性で高い値を示し、等電点（pH 7.6～7.8）付近で最低となった。

(2) グロビンは、pH 2.0～4.0 と pH 10.0～11.0 の範囲で、グロビン濃度 7% 以上の場合、ゲルを形成した。グロビンゲルはグロビンの等電点に近くなる程不透明となった。

(3) グロビンのゲル形成性に対するクエン酸、酢酸、リン酸の影響について検討した。クエン酸の場合、添加濃度が 0.2 M (pH 2.6) までは加熱直後にゲルを形成したが、それ以上の濃度ではゲルを形成しなかった。しかし、これを 30℃で 10 日間放置したところ、加熱直後のゲルよりも、より透明で高いゲル強度を示すゲルが形成された。しかし、2.4 M 添加（pH 1.1）でゲルの形成は完全に阻害された。酢酸やリン酸の場合、ゲル形成に影響する酸濃度（pH）は異なるが、クエン酸の場合とほぼ同じような現象が観察された。

(4) これらの酸を用いてグロビンの加水分解を行い、得られた加水分解物の SDS-PAGE を行った。その結果、酸の濃度が高くなるにしたがって、約 15 kDa のバンドは薄くなり、逆に 15 kDa 以下のバンドが濃くなった。また、15 kDa 部分と 15 kDa 以下の部分の量比とゲル強度との間の密接な関連が示唆された。

本研究の一部は、伊藤ハム株式会社中央研究所ならびに伊藤記念財団の研究助成を受けて行われたものであり、深謝致します。

文 献

- 1) WISMER-PEDERSEN, J.: *J. Fleischwirtschaft*, **60**, 231 (1980).
- 2) SATO, Y., HAYAKAWA, S. and HAYAKAWA, M.: *J. Food Technol.*, **16**, 81 (1981).
- 3) 宮口右二・境久美子・米倉政実・堤 将和：日食工誌, **36**, 720 (1989).
- 4) AUTIO, K., LYYTIKAINEN, H., MALKKI, Y. and KANKO, S.: *J. Food Sci.*, **50**, 615 (1985).
- 5) TYBOR, P.T., DILL, C.W. and LANDMANN, W.A.: *J. Food Sci.*, **40**, 155 (1975).
- 6) 菅原 潔・副島正美：蛋白質の定量法（第3版）（学会出版センター），p. 155 (1990).
- 7) 宮口右二・米倉政実・堤 将和：日食工誌, **39**, 271 (1992).
- 8) LAEMMLI, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 9) 佐藤 泰：と畜血液利用開発推進事業報告書（と畜血液利用委員会）p. 142 (1984).
- 10) 北畠直文：農化, **65**, 147 (1991).
- 11) 広瀬正明：化学と生物, **30**, 280 (1992).
- 12) DOI, E. and KITABATAKE, N.: *Food Hydrocolloids*, **3**, 327 (1989).
- 13) KITABATAKE, N. and DOI, E.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2457 (1989).
- 14) KITABATAKE, N. and DOI, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 417 (1988).

（平成5年7月5日受理）