ホエータンパク質の塩によるゲル化

中村道子*・佐藤 薫*・小泉詔一*・河内公恵*
西谷紹明*・中島一郎*

Preparation and Properties of Salt-Induced Gel of Whey Protein

Michiko NAKAMURA*, Kaoru SATO*, Shoichi KOIZUMI*, Kimie KAWACHI*,
Tsuguaki NISHIYA* and Ichiro NAKAJIMA*

* Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co.,
1-1-2 Minamidai, Kawagoe, Saitama 350-11

Salt-induced gelation of partially heat-denatured whey protein isolate (WPI) solution and the rheological properties of the resultant gels were investigated. A 10% WPI solution, pH 7.0, was heated at 80°C for 30 min, and then cooled to 5°C for obtaining the partially heat-denatured WPI solution. The solution was incubated at 20°C in the presence of salts such as NaCl and CaCl₂. During incubation, the solution turned to homogeneous gel with increasing viscosity. Gel strength was dependent on heating temperature of the WPI solution and salt concentration. Electron microscopy showed the presence of short-chained soluble aggregates in the partially heat-denatured WPI solution, and the gelation of the aggregates initiated by the addition of NaCl at 20°C. The network structure of salt-induced gel was to some extent coarser than that of acid-induced gel. It was indicated that the formation of the soluble aggregates by heating and the interaction between the soluble aggregates by salt were related to salt-induced gelation. (Received Feb. 7, 1994)

ホエータンパク質溶液を加熱によらず、室温でゲル化させる方法としては、尿素、塩酸グアニンによる方法¹⁾、トランスグルタミナーゼによる方法²⁾、さらに予め加熱処理したホエータンパク質溶液を室温下でグルコノデルタラクトン (GDL) を添加して酸性化しゲル化する方法³⁾、あるいは塩類^{4) 5)} を添加してゲル化する方法が報告されている。この中で、酸性化によるゲル化方法では、加熱処理により生じる高分子の可溶性凝集体の存在がゲル化に直接関与していることが明らかになっている³⁾。

そこで著者らは、予め加熱処理した分離ホエータンパク質 (WPI) 溶液を用い、これに室温で塩類を添加してゲルを調製し、ゲル化するまでの過程について検討した。すなわち、10% (w/w) WPI 溶液を 80°C 30 分間加熱した後、室温で 0.3~1.2% (w/w) の塩化ナトリウムを添加してゲルを調製し、ゲルに至るまでの経時的な粘度変化、ゲル強度におよぼす塩化ナトリウムの濃度およ

び WPI 溶液の加熱処理の影響、さらには電子顕微鏡を用い、ゲル化にともなう可溶性凝集体の会合の様子について、酸性化によるゲル化の場合と比較しながら検討したので報告する。

実験方法

1. 材料

WPI 粉末はサンラクト I-1 (タンパク質含量 90.0%, 太陽化学 (株)) を使用した。

2. WPI 溶液の加熱処理

WPI を 6% (w/w)、または 10% (w/w) になるように脱イオン水に溶解した後、60~100°C まで加熱昇温させ、10~30 分間保持した。加熱終了後、ただちに氷水中で 5°C まで冷却し、pH 7.0 の加熱処理 WPI 溶液とした。

3. 加熱処理 WPI 溶液の粘度変化の測定

動粘度モニタリングシステム⁶⁾ (レオキャッチ: SM-

* 雪印乳業(株)技術研究所 (〒350-11 埼玉県川越市南台 1-1-2)

100型、雪印乳業(株))を用いて、加熱処理 WPI 溶液のゲルに至るまでの経時的な粘度変化を測定した。測定値は、2つの温度センサー間の温度差を粘度の指標とした。各加熱条件で処理した濃度 10% (w/w) の WPI 溶液 300 g を、胴径 78 mm × 高さ 103 mm のビーカーに入れ、恒温槽内で 20°C に保温した。2つのセンサーの間隔が 20 mm になるように調整し、試料液中に 50 mm の深さまで挿入した。試料の温度が 20°C になった時点で、塩化ナトリウムを 0.3, 0.8, 1.2% (w/w)、および塩化カルシウムを 0.1% (w/w) となるように添加した後、測定を開始した。

4. ゲル化方法、およびゲル強度測定法

塩化ナトリウムを 0.3, 0.6, 0.8, 1.2% (w/w)、塩化カルシウムを 0.1% (w/w)、および GDL を 0.6% (w/w) となるように各々添加した 10% (w/w) 加熱処理 WPI 溶液を、直径 25 mm、高さ 15 mm の円筒形のセルに充填し、20°C で 24 時間静置してゲル化させた。得られたゲル化物のゲル強度はレオメーターを用いて測定した。直径 50 mm の円形平板型プランジャーを用い、圧縮率 67%、圧縮速度 20 mm/min の条件で測定した。20°C における最大圧縮時の荷重をゲル強度 (g) として表した。

5. 電子顕微鏡観察

(1) ホエータンパク質可溶性凝集体の観察

6% (w/w) 未加熱 WPI 溶液、およびこれを 90°C 10 分間加熱処理し、20°C まで冷却したもの、さらにこの 90°C 10 分間加熱処理物に塩化ナトリウムを各々 0.3, 0.5, 0.7% (w/w) となるように添加し、20°C で 1 時間静置したものについて電子顕微鏡観察をおこなった。また、比較対照として 90°C 10 分間の加熱処理物に GDL を 0.8% (w/w) となるように添加し、経時的に採取した試料についても同様の観察を行った。電子顕微鏡は透過型電子顕微鏡 (JEM-2000 FX-II, 日本電子(株))を用い、TYLER らの方法⁷⁾によって試料を調製した。すなわち、試料溶液をグルタルアルデヒド固定、さらに四酸化オスミウム固定した後、70% グリセリン溶液と蒸留水を用いて 50 倍に希釈した。希釈液はグリセリン濃度が 50% となるように調整した。得られた固定試料液をマイカに塗布し、真空乾燥を行った後、固定試料に対して白金カーボンを 60°, カーボンを 90° の角度から回転蒸着を行った。蒸留水面でカーボンをマイカより剝離させ、剝離した試料をメッシュ上にすくい取り、検視体とした。

(2) ゲルの構造観察

20°C に保温した 6% (w/w) 加熱処理 WPI 溶液に、

塩化ナトリウムを 2% (w/w) となるように添加しゲル化させた。クライオ-SEM 法⁸⁾によりゲルを固定化し走査型電子顕微鏡 (HITACHI S-800, 日立製作所(株))を用い観察した。すなわち、得られたゲルを 50% エタノールに浸漬して水とアルコールを置換した後、-210°C の液体窒素中で凍結固定し、SEM 顕微鏡内で切断し、エッチング処理をした。これに金を蒸着し、検視体とした。

実験結果および考察

1. 塩化ナトリウム添加による加熱処理 WPI 溶液の粘度変化

10% WPI 溶液を 80°C まで昇温し、30 分間保持した後 5°C に冷却した試料は、溶液の状態を呈していた。この加熱処理 WPI 溶液に塩化ナトリウムを各々 0.3, 0.8, 1.2% および塩化カルシウムを 0.1% となるように添加した場合の粘度変化を Fig. 1 に示した。塩化ナトリウムおよび塩化カルシウムを添加した場合、溶液の粘度は経時的に増加することを確認した。また、塩化ナトリウムの濃度が高くなるにつれて、加熱 WPI 溶液の粘度上昇は急速に進んだ。粘度上昇が平衡に達しゲル化するまで

Fig. 1 Changes in temperature difference between hot wire and sample solution after the addition of salts

Conditions: □, NaCl 0.3%; △, NaCl 0.8%; ○, NaCl 1.2%; ▼, CaCl₂ 0.1%.

WPI concentration: 10% (w/w)

Each WPI solution was heated preliminarily at 80°C for 30 min.

Fig. 2 Effect of the addition of salts on gel strength

WPI concentration : 10% (w/w)

Each WPI solution was heated preliminarily at 80°C for 30 min.

Fig. 3 Effect of heating temperature on gel strength

Conditions : $\triangle$, NaCl 0.6% ; $\square$, GDL 0.6%.

WPI concentration : 10% (w/w)

Each WPI solution was heated at various temperatures for 10 min.

に要した時間は塩化ナトリウム 0.3, 0.8, 1.2% で、各々 525 分, 71 分, 23 分であった。一方、塩化カルシウムを 0.1% 添加したものについても、塩化ナトリウムと同様に粘度上昇がみられ、104 分で平衡に達した。

2. ゲル強度におよぼす塩化ナトリウム濃度および WPI 溶液の加熱処理の影響

1. で得られたゲルについてゲル強度を測定したところ、塩化ナトリウム 0.3% の場合は軟らかいゲルとなった。これに対し、塩化ナトリウム 0.8% ではゲル強度約 1500 g, 1.2% では約 2000 g の硬いゲルとなった。このことから、塩化ナトリウムの濃度に応じて、ゲル強度は高くなることがわかった (Fig. 2)。一方、塩化カルシウム 0.1% の場合は、塩化ナトリウム 0.8% とほぼ同程度のゲル強度を示し、低濃度でも硬いゲルとなることがわかった。

つぎに、60, 70, 80, 90, 100°C の各温度で 10 分間加熱処理した 10% WPI 溶液を用い、これに塩化ナトリウムを 0.6% 添加してゲルを調製し、WPI 溶液加熱処理温度とゲル強度の関係について調べた。なお、比較対照として GDL を 0.6% 添加し、酸性化して調製したゲルについても同様の測定を行い、これらの結果を Fig. 3 に示した。加熱処理温度 60°C では、塩化ナトリウム、GDL 添加の両者ともゲル化は起きなかった。70°C 以上で両者

ともゲル化し始め、その後、加熱温度が高くなるにしたがってゲル強度は上昇する傾向を示した。特に 70°C から 80°C までの間のゲル強度の上昇は顕著であった。すなわち、ホエータンパク質が熱変性し、高分子化しはじめる温度領域³⁾でゲル強度の急激な上昇がみられることがわかった。また、80°C 以上において塩化ナトリウムによるゲルは、GDL 添加のものと比較して約 1/2 のゲル強度となった。これらの結果より、塩化ナトリウム添加によるゲルでは、Fig. 2 に示した塩化ナトリウムの濃度のみならず、ホエータンパク質溶液の加熱処理条件もゲル強度に直接関与していることがわかった。したがって、GDL を用いた酸性化によるゲル化³⁾と同様に、塩化ナトリウムによるゲル化も、ホエータンパク質の熱変性がゲル化に直接関与している可能性があると考えた。そこで、加熱処理および、その後の塩化ナトリウム添加により、ホエータンパク質の形態がどのように変化しているかを調べるため、電子顕微鏡による観察を行った。

3. 電子顕微鏡観察

6% の未加熱 WPI 溶液、およびこれを 90°C 10 分間加熱処理したものについて、透過型電子顕微鏡によりタンパク質の形態を観察した。Fig. 4 に示したように未加熱 WPI 溶液では、ホエータンパク質は直径約 15 nm の球

状の粒子の形で存在していた。一方、加熱処理 WPI 溶液では、ホエータンパク質は、幅 25~30 nm、長さ 50~80 nm の短い線状の凝集体を形成して存在することが確認された。すなわち、球状のホエータンパク質分子は加熱処理により高分子化し、可溶性凝集体を形成することが明らかとなった。同じ球状タンパク質である大豆タンパク質⁹⁾¹⁰⁾ および卵白アルブミン¹¹⁾¹²⁾ では、加熱により細い線状の可溶性凝集体を形成することが知られてい

る。特に卵白アルブミンの線状可溶性凝集体の幅は 5~7 nm¹²⁾ と非常に細いのに対し、WPI の場合はややランダムに結合した、幅が太く短い凝集体となった。

つぎに、6% 加熱処理 WPI 溶液に塩化ナトリウムを 0.3, 0.5, 0.7% となるように添加し、1 時間静置したものについて電子顕微鏡観察を行った。Fig. 5 に示したように、0.3, 0.5% 添加ではやや太く短い線状の可溶性凝集体同士が会合している様子が観察された。0.7% 添加ではさらに大きな凝集体を形成していることを確認した。一方、GDL を 0.8% 添加し、添加直後 (pH 6.8)、30 分後 (pH 6.3)、80 分後 (pH 5.9) の状態について電子顕微鏡観察を行ったところ、pH が低下するにしたがい凝集体同士がやはり会合していく様子が観察された (Fig. 6)。また、Fig. 5 と Fig. 6 を比較すると、塩化ナトリウム添加の場合の方が GDL 添加の場合よりも、よりランダムに会合していくことがわかった。

これらのことから、WPI 溶液を加熱することによって得られる可溶性凝集体は、塩の添加、あるいは酸性化により徐々に高分子化し、Fig. 1 に示したように粘度上昇をとめないながら 3 次元ネットワークを形成してゲルに至るものと考えた。

つぎに塩化ナトリウムを添加して得られたゲルの構造を走査型電子顕微鏡で観察した。Fig. 7 に示したとおり、塩化ナトリウム添加によるゲルの構造は細かい網目状を呈しており、ゲルの網目状構造を形成している凝集

Fig. 4 Transmission electron micrographs of WPI solution

(A), without heating ; (B), heated at 90°C for 10 min.

WPI concentration : 6% (w/w)

Fig. 5 Transmission electron micrographs of salt-induced gelation of WPI soluble aggregates

NaCl concentration : (A), 0.3% ; (B), 0.5% ; (C), 0.7%.

WPI concentration : 6% (w/w)

Each WPI solution was heated preliminarily at 90°C for 10 min.

Each sample was allowed to stand at 20°C for 60 min after the addition of NaCl.

Fig. 6 Transmission electron micrographs of acid-induced gelation of WPI soluble aggregates

Incubation time : (A), 0 min ; (B), 30 min ; (C), 80 min.

Glucono- δ -lactone (GDL) concentration : 0.8% (w/w)

WPI concentration : 6% (w/w)

Each WPI solution was heated preliminarily at 90°C for 10 min.

Fig. 7 Micro-structure of salt-induced gel by scanning electron microscopy

6% (w/w) WPI solution heated preliminarily at 90°C for 10 min was incubated at 20°C after the addition of NaCl.

NaCl concentration : 2% (w/w)

体の太さは30～150 nmであった。この太さは、SONEら¹³⁾の報告によるWPC加熱ゲルの約1/10であり、GDL添加による酸性ゲル³⁾の約2倍となることがわかった。したがって、Fig. 3でGDL添加の場合の方が塩化ナトリウム添加の場合よりも高いゲル強度を示したのは、ゲルの網目状構造を形成している凝集体の太さがGDL添加の場合の方が塩化ナトリウム添加の場合よりも細く、より緻密な網目状構造を形成していることによると推定した。

以上の結果から、70°C以上で予め加熱処理したWPI溶液に、塩化ナトリウムを添加することにより室温でゲル化することがわかった。電子顕微鏡観察の結果より、WPI溶液中のホエータンパク質が加熱変性を受け可溶性凝集体を形成すること、さらに室温で塩化ナトリウムの添加により可溶性凝集体同士が会合し、細かい網目状構造のゲルが形成されるものと推察した。このような塩によって誘導されるホエータンパク質のゲル化は、塩添加前において可溶性凝集体間の静電的反発力により互いに会合することなく溶液状態を呈しているものと思われる。しかし、塩化ナトリウムあるいは塩化カルシウムを添加することにより可溶性凝集体間の静電的反発力が低下し、互いに会合するようになりゲルに至ると考えた。また、塩化ナトリウムの添加量が増すに従い、短時間でゲル化し、さらにそのゲル強度が増すことから、塩濃度の増加とともに可溶性凝集体間の静電的反発力の低下も著しいと考察した。ただし、可溶性凝集体の形成、およ

び可溶性凝集体の塩添加による会合がどのような相互作用で起きるのかについては不明であり、この点を明らかにするためには今後タンパク質表面の疎水性度、および SH 基の変化について詳しく検討しなければならない。このゲル化方法では、WPI 溶液の加熱処理条件、および塩の種類、濃度を変えることにより、ゲル化までに要する時間、ゲル強度を制御することが可能である。また、ゲル化に二次的な加熱を必要としない特徴を有しており、ホエータンパク質の食品素材としての用途がより一層広がることが期待される。

要 約

WPI 溶液を予め加熱処理し、室温で塩化ナトリウムを添加することによりゲル化する現象について検討し、以下のことが明らかとなった。

(1) 80℃ 30 分加熱処理した 10% (w/w) WPI 溶液に塩化ナトリウムを 0.3~1.2% (w/w) 添加すると、20℃において溶液は粘度の上昇をともないながら徐々にゲル化した。塩化ナトリウムの濃度が高くなるにしたがい粘度上昇は速く進み、ゲル化時間は短くなる傾向を示した。さらに、WPI 溶液の加熱処理温度、塩化ナトリウムの濃度が高くなるにしたがい、ゲル強度は高くなることがわかった。

(2) 電子顕微鏡観察の結果、WPI 溶液を加熱処理することによりやや太く短い線状の可溶性凝集体が形成されることを確認した。さらに塩化ナトリウムの添加により、可溶性凝集体同士の会合が始まり、高分子化してゲルに至ることがわかった。塩化ナトリウム添加により得られたゲルは、GDL 添加による酸性ゲルとよく似た網目状構造を呈していることがわかった。また、ゲルの網目状構造を形成している凝集体の太さは、塩化ナトリウム添加により得られたゲルの方が GDL 添加による酸性

ゲルよりもややランダムな構造をとることがわかった。

本研究の電子顕微鏡撮影にあたり御協力してくださった、当社技術研究所の木村利昭氏、相良康重氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 勝田啓子：日食工誌, 37, 73 (1990).
- 2) 添田孝彦・渡井口清一郎・野中雅彦：第 19 回食品の物性に関するシンポジウム講演要旨集, p. 100, 名古屋 (1992).
- 3) 河村フジ子・黛 明美・中村道子・小泉詔一・木村利昭・西谷紹明：日食工誌, 40, 776 (1993).
- 4) KAWACHI, K., TAKEUCHI, M. and NISHIYA, T.: United States Patent No. 5,217,741 (1993).
- 5) BARBUT, S. and FOEGEDING, E.A.: *J. Food Sci.*, 58, 867 (1993).
- 6) HORI T.: *J. Food Sci.*, 50, 911 (1985).
- 7) TYLER, J.M. and BRANTON, D.: *J. Ultrastruct. Res.*, 71, 95 (1980).
- 8) 木村利昭：食品の物性, 第 13 集, 松本幸雄・山野善正編 (株式会社食品資材研究会, 東京) p. 63 (1987).
- 9) NAKAMURA, T., UTSUMI, S. and MORI, T.: *J. Agric. Food Chem.*, 32, 349 (1984).
- 10) MORI, T., NAKAMURA, T. and UTSUMI, S.: *J. Agric. Food Chem.*, 34, 33 (1986).
- 11) KOSEKI, T., KITABATAKE, N. and DOI, E.: *Food Hydrocolloids*, 3, 123 (1989).
- 12) 土井悦四郎：第 19 回食品の物性に関するシンポジウム講演要旨集, p. 91, 名古屋 (1992).
- 13) SONE, T., DOSAKO, S. and KIMURA, T.: *Instrumental Analysis of Foods*, volume 2 (Academic Press, New York) p. 209 (1983).

(平成 6 年 2 月 7 日受理)