

2017年度

修士論文

乾燥卵白水溶液の低温ゲル化挙動に関する研究

佐藤かな子

酪農学園大学大学院酪農学研究科

食品栄養科学専攻

食品物性学研究室

目次

1. 諸言	1
2. 実験材料及び方法	7
2-1. 材料	
2-2. レオロジー測定	
2-2-1. 定常流粘度の時間発展	
2-2-2. 動的弾性率の時間発展	
2-2-3. 動的弾性率の周波数分散	
2-3. SDS-PAGE 分析	
2-4. 走査型電子顕微鏡観察 (SEM)	
3. 結果	13
3-1. 各温度における定常流粘度の時間発展	
3-2. レオロジー特性値から決定した各温度でのゲル化時間	
3-3. 各温度で形成したゲルの強度	
3-4. 50℃及び 55℃でのゲル化の時間発展	
3-5. SDS-PAGE 分析	
3-6. 走査型電子顕微鏡 (SEM)	
4. 考察	19
5. 結論	21

1. 緒言

卵は大きく分けて卵黄と卵白からなり、卵黄部は、卵黄膜、胚盤ならびに卵黄から構成されている。卵白部は、水様卵白（外水様、内水様）、濃厚卵白、カラザ及びカラザ層からなる。各栄養成分は、全卵のとき、水分 76.1%、タンパク質 12.3%、脂質 10.3%、炭水化物 0.3%、灰分 1.0%である。卵黄部は、水分 48.2%、タンパク質 16.5%、脂質 33.5%、炭水化物 0.1%、灰分 1.7%であるのに対し、卵白部は水分 88.4%、タンパク質 10.5%、脂質 Tr、炭水化物 0.4%、灰分 0.7%と、脂質はほとんど含まれない。なお、これらの構成比は、卵の大きさ、ニワトリの品種、飼育条件、産卵率、貯蔵などによって異なる¹⁾。

卵の国内生産量は、平成 5 年に 260 万 t 近くに達しピークを迎え、その後横ばいないし、やや減で、近年の年間生産量は 250 万 t 前後で推移している。世界的に見るとこの生産量は、中国、米国、インドに次ぐ 4 位である。自給率は、昭和 40 年代から平成 3 年までは 97%以上の水準で推移し、ほぼ完全に国内自給を堅持してきた。しかし、平成 4 年以降は、やや低下傾向で推移してきており、平成 17 年の鶏卵の自給率は 94.3%となっている。自給率低下の最大の要因は凍結卵、粉卵等の加工卵の輸入増加である。一方、世界における鶏卵の生産は、先進諸国ではやや減少傾向であるのに対し、アジ

ア各国では飛躍的な増加が続いている。FAO(国際連合食糧農業機関)の統計によると、平成17年の世界の鶏卵生産量は5,943万tで、そのうちアジアが約60%を占める。また、各国の国民1人1日あたりの消費量が最も多い国は、デンマークで55.05g、次いで51.16gで日本となっている¹⁾。

卵の加工食品として、液卵、凍結卵、乾燥卵及び卵の酵素処理があげられる。液卵には、全卵と、卵黄と卵白に分離したものがある。このような液卵は、割卵にかかる労力や発生する卵殻の処理費を削減できることから需要が伸びている。凍結卵の中には、茶碗蒸し、スクランブルエッグやプリンなどが手軽に簡便に作ることが出来るように、あらかじめ卵に調味料や牛乳などを配合した加工凍結卵がある。解凍するだけで誰でも簡単に調理できることから、料飲店、コンビニエンスストアおよび事業所給食などの広い分野に普及している。乾燥卵は、液卵中の水分を蒸発させて得られる。乾燥卵の利点を液卵と比較すると、常温保存が可能であることや、輸送・保管の省略化、使用期限の長期化などがあげられる。近年では卵の研究開発が進み、液卵ではみられなかった卵の機能や物性が乾燥卵で見出されてきている。卵の酵素処理では、卵が持つ起泡性、熱凝固性あるいは乳化性等の機能特性と、栄養価や風味等の特性がある。これらの性質を強化あるいは低減する目的で、様々な酵素処理が検

討されてきた¹⁾。

卵黄タンパク質は、低密度リポタンパク質(LDL)(65.0%)、高密度リポタンパク(リポビリテン)(16.0%)、リベチン(10.0%)、ホスビチン(4.0%)、リポフラビン結合タンパク質(0.4%)と、5種類程のタンパク質の存在が知られているが、構造が複雑なりポタンパク質が主要成分であるために、それぞれの性質については後述の卵白タンパク質ほどよく研究されていない。卵白タンパク質は、少なくとも13種類以上のタンパク質からなる。それらは、オボアルブミン(54%)、オボトランスフェリン(12~13%)、オボムコイド(11%)、オボムチン(1.5~3.5%)、リゾチーム(3.4~3.5%)、G₂グロブリン(4.0%)、G₃グロブリン(4.0%)、オボインヒビター(0.1~1.5%)、オボグリコプロテイン(0.5~1.0%)、オボフラボプロテイン(0.8%)、オボマクログロブリン(0.5%)、シスタチン(0.05%)、アビジン(0.05%)からなる²⁾。これらのタンパク質は、気液界面での変性(起泡性)、pH変化による変性、熱変性といった性質を持つ。

タンパク質の溶液を強く攪拌すると、気液界面が増加するために、タンパク質分子は表面張力の作用を強く受け、部分的に変性を起こすことを、気液界面での変性即ち起泡性という。一般的に、液体が泡立ち、形成された泡が安定するためには、①溶液の表面張力が小さいこと、②泡の膜が空気で変性することによって丈夫な泡を形成

すること，③泡同士が合体しないこと，といった条件が揃っている必要がある．特に卵白が優れた起泡性や安定性を示すのは，この①～③の条件を満たしているためである．中でもアルブミンやグロブリンといった卵白タンパク質が，卵白と空気が接する表面張力を小さくし，攪拌によって多量の空気を抱き込む性質をもっているために，卵白が泡立つことができる．この起泡性を利用して，スポンジケーキ，カステラ，メレンゲ，マシュマロ，マカロン，ムース，スフレ等，様々な食品が製菓を中心につくられている^{1, 2)}．

pH 変化による変性によって作られる代表的な料理には，中国料理の皮蛋(ピータン)があげられる．これは，卵を殻のまま食塩を含む強アルカリ性のペーストで覆い，卵内容物に徐々にアルカリを侵入させて凝固させることで作られる．アルカリにより卵白タンパク質は変性してゼリー化し，黒褐色を呈し，卵黄も変性して青黒色の凝固体となる．青黒色はタンパク質により発生した硫化水素と卵黄中の鉄との化合に生じた色である．³⁾また，卵白は pH 2.2 以下，あるいは pH 12.0 以上でゲル化する．卵白のアルカリゲルは半透明で一定時間後自己液化する．一方酸性ゲルは，見かけ上乳濁しており自己液化しない．少量の水を混ぜると液状になるが，放置しておくとも再び固化していく⁴⁾．

熱変性を利用して作られるものは，ゆで卵，卵焼き，オムレツ，

スクランブルエッグ，茶碗蒸し，カスタードプディング等，多岐に渡る．卵黄は，65～70℃でほとんど完全に凝固する．卵白は最後に不溶解性の凝固が起こるのに対し，卵黄は完全に熱凝固すると光沢のない粒状性を呈し，ほぐれやすくなる．これは卵黄顆粒が熱凝固により，形と大きさが固定されて粒状性を示すためといわれている．卵白は約 60℃で凝固し始め，62～65℃で流動性を失い，70℃ではほぼ完全に凝固するが，かたく固まるのは 80℃以上であるとされている．これは，I.Nicorescu ら⁵⁾の，示差走査熱量計(DSC)を用い，オボトランスフェリン(OT)と卵白タンパク質の半分以上を占めるオボアルブミン(OA)の熱変性温度を調べた結果が，それぞれ 61℃と 77℃ということとほぼ一致している(図 1)．熱変性によるゲル化の概念図を図 2 に示す．変性前のタンパク質の立体構造は，水素結合によって保持され，球状タンパク質として分散している．熱を加えると水素結合が分散され，立体構造が崩壊し，球状の内部にあった SH 基や疎水性部が外部に析出するため，S-S 結合や疎水性相互作用によって凝集が始まる．更に凝集が進行し，網目構造が形成するとゲル化する．また，卵白タンパク質は加熱後も球状のタンパク質分子構造を保ちつつ，分子間で互いに連結もしくは凝集することによって網目状の構造を形成することが明らかになってきた^{2, 3)}．

C.Vega ら⁶⁾は，低温調理で用いられる卵黄に着目した．卵黄の

低温調理の場合は、60-70℃程度の温度帯で、最低でも1 hr以上の調理を要する。しかし、詳細な加熱温度や加熱時間は調理人によって様々であるため、彼らは、この比較的低温で調理された卵を“6X℃卵”と名づけた。この6X℃卵の中で、①有意差のあるテクスチャーは存在するか、②異なる温度と時間の組み合わせで同様のレオロジー特性値が得られるか、という点について研究が行われた。卵黄は、これまで65℃でゲル化が始まり70℃で凝固する⁷⁾といわれてきた。この論文では、ゲル化点を $G''/G' = \tan \delta = 1$ となる点に定めているが、変性温度以下でも加熱とともに粘度は直線的に増加し、60℃でも約260分加熱すれば、ゲル化することが明らかになった(図3)。また、図4では、求めているテクスチャーの数値がわかれば、異なる温度と時間の組み合わせでも、同じテクスチャーの卵黄を再現することが出来ることを示した。66℃以上の比較的高温度帯では、テクスチャー変化が急激であるため、多少の調理技術を要すると考えられたが、それ以下の温度帯では、科学者、プロの料理人、主婦の誰もが、温度と時間の組み合わせにより、同じテクスチャーを持つ卵黄を作ることが出来ることが示唆された。著者は、この研究をもとに、卵白の低温でのゲル化挙動について研究をした。

タンパク質のfolded formは熱的に揺らいでいることから、これらの変性温度の近傍では、部分的にun-folded formに変化する確

率が高くなることが予想され、充分長い時間観察すれば凝集体(ゲル構造)を形成するのではないかという仮説を立てた。概念図を図 5 に示す。この仮説が正しければ、報告されている熱変性温度未満の温度であっても、充分な時間処理することで、卵白タンパク質はゲル化することが期待される。本研究では、乾燥卵白水溶液を用いて、卵白タンパク質の熱変性温度近傍でのゲル化挙動について明らかにすることを本論文の目的とした。

2. 材料及び方法

2-1 材料

乾燥卵白としてアルブミン、卵由来(和光純薬工業株式会社)を使用した。溶媒は蒸留水を用いた。

ビーカーに蒸留水と乾燥卵白を入れ、冷温下(0℃)でスターラーバーを用い、24hr 攪拌し、溶質を十分に溶解、分散させた。その後、PP250 ボトルにいれ、アングルロータ(日立工機株式会社 R14A, No.29)を用いて 10000 rpm, 60 min, 10℃の条件で遠心分離して、不溶成分を沈殿させ、上清(可溶成分)をスポイトで注意深く抽出し、乾燥卵白水溶液とした。その後、ブラッドフォード法によりタンパク質濃度を定量し、卵白タンパク質濃度を求めた。すなわち、0.1,

0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 mg/ml の BSA (SIGMA 社) 水溶液を調製し, 試験管にそれぞれの水溶液を 0.05 ml と 5 倍希釈した Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad 社) を 2.5 ml ずつ入れ, これらをボルテックスミキサーで攪拌後 15 min 静置した. その後, レシオビーム分光光度計 (株式会社 日立ハイテクサイエンス U-5100) を用いて, 595nm で吸光度を測定し, 各 BSA 濃度の吸光度から検量線を作成し, 回帰式を導いた. また, 乾燥卵白水溶液のタンパク質濃度は, 400 倍希釈したサンプル水溶液 0.05 ml と, 5 倍希釈した Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad 社) を用い, 上記と同様の方法で吸光度を求め, 回帰式に代入し, 乾燥卵白水溶液のタンパク質濃度を求めた. その後, タンパク質濃度が 100 mg/ml になるように蒸留水で希釈して, タンパク質濃度を調整した.

2-2 レオロジー測定

ONRH-1 型回転式レオメータ (大塚技研) を用いて, 一定温度における卵白タンパク質の定常流粘度, 動的弾性率及び動的弾性率の周波数分散を経時的に測定した. 使用したフィクスチャーを図 6 に示す. サンプル部分は密閉されているため乾燥しにくく, 長時間の測定も可能な二重円筒のものを用い, 内筒の直径は 19.36 mm, 長さ 29.04 mm, 外筒の直径は 21.34 mm のものを使用した.

2-2-1 定常流粘度の時間発展

ずり速度 10/s, 処理温度 40°C, 45°C, 50°C, 55°C 及び 60°C における定常流粘度を測定した。測定は約 300s 毎に行い, ゲル化し, 測定限界となったサンプルはその時点で測定を終了し, 最大でも 24 hr (86400s) の測定時間とした。

2-2-2 動的弾性率の時間発展

歪 0.01, 周波数 1 Hz で, 処理温度 50°C, 55°C, 60°C, 80°C における動的弾性率を測定した。測定は, 50°C のときは 1800s 毎に 50 hr, 55°C のときは 1200s 毎に 30 hr, 60°C のときは 600s 毎に 24 hr, 80°C のときは 70s 毎に 1 hr 測定した。

2-2-3 動的弾性率の周波数分散

周波数範囲を 0.13-50 rad/s として歪 0.05 で, 処理温度 50°C 及び 55°C における動的弾性率の周波数分散を測定した。測定は, 50°C のときは 3 hr 毎に 24 hr, 55°C では 15 min, 30 min, 1 hr, 1 hr 30 min, 2 hr, のときに測定し, その後 1 hr 毎に 5 hr まで測定した。

2-3 SDS-PAGE 分析

卵白タンパク質の加熱変性ゲルを形成するタンパク質の種類及びその量を評価するために、以下の方法で SDS-PAGE 分析を行った。処理温度は 40～80℃の範囲で、処理時間は、卵白が完全に凝固すると言われている 80℃のみ 30 min とし、その他の温度は 24 hr とした。

乾燥卵白水溶液を 2 ml のエッペンドルフチューブに 1 ml 入れ、パラフィルムで密閉し、一定温度に保持したウォーターバス(英弘精機株式会社)内で加熱処理した。その後、SONIFIER 450(BRANSON 社)を用い、Duty Cycle 50%, Output Control 2 の条件で超音波を 2 min 照射した。それをアングルロータ(日立工機株式会社 T15A39)を用いて 14000 rpm, 30 min, 10℃で遠心分離機にかけ、加熱凝集したとされるタンパク質を沈殿させた。これらの処理によって、凝集体を形成したタンパク質は沈殿部に回収され、SDS-PAGE 後のゲルのバンドに現れなくなると考えた。即ち、電気泳動後に消失、もしくは薄くなったバンドにあたるタンパク質が、凝集体の形成に関与しているタンパク質と考え、実験を行った(図 7)。

その後 上清をマイクロチューブ内において 100 倍希釈し、それぞれのサンプルを 2×Sample buffer(0.12 M Tris(pH 6.7) , SDS 3.85%, 2-ME 9.61%, Glycerol 19.2%, BPB 0.0096%を含む)で更に 2

倍希釈した。その後、ドライバス (Sybron 社) を用い、100°C で 1 min 加熱し、タンパク質を SDS 化させた。プレキャストゲル (SuperSep™Ace, 12.5%, 13 well, 199-14971 和光純薬工業株式会社) を泳動装置にセットし、5 倍希釈した 5×Running buffer (Tris 1.5%, Glycine 7.2%, SDS 0.5% を含む) で満たした後、分子量マーカーは 8 µl, 各サンプルは 10 µl ずつアプライし、ゲルが 1 枚のときは 23 mA, 2 枚のときは 46 mA の定電流で、分子量マーカー (Mark12™ Unstained Standard, Invitrogen 社) がゲル底部に達するまで泳動した (約 75 min)。その後、ゲルをタッパーに移し出し、ゲルが浸かる程度に蒸留水を入れ、電子レンジを用い 500 w で 30s の条件で加熱し、5 min 震盪させた後、蒸留水を捨てるという作業を 2 回繰り返した。その後、Quick-CBB 染色液 (和光純薬工業株式会社) を 50 ml 程度入れ、電子レンジを用い 500 w で 10s 加熱した後、一晩震盪させゲルを染色した。その後、数回蒸留水を入れ替え、一晩震盪させながらバックグラウンドの脱色を行った。作成した泳動ゲルはガラス板に乗せ、カメラで撮影を行った。バンドの濃淡は ImageJ を用い定量化した。

2-4 走査型電子顕微鏡観察 (SEM)

乾燥卵白ゲルの微細構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

サンプル調製は以下の手順で作製した。乾燥卵白水溶液を試験管に入れ、パラフィルムで密閉し、各一定温度(50~80℃)に保持したウォーターバス(英弘精機株式会社)内で24 hr加熱処理した。ゲルを蒸留水で満たしたシャーレ内に取り出し、剃刀で1 mm角程度の大きさに切り、活性炭素で濾過した2.5%グルタルアルデヒド(GA)と0.1 M NaPO₄(pH7.2~7.4)を加えて、室温で1 hr震盪させた後、4℃で一晩静置した。GA固定液を捨て、エタノール系列で脱水し、その後、t-ブチルアルコール・100%エタノール(1:1)混合液で1 hr、t-ブチルアルコールで1 hrを2回繰り返した。最後の震盪後はt-ブチルアルコールを捨てずに、アルミホイルで蓋をし、そこに爪楊枝で4箇所穴をあけた。これを-30℃で凍結した。その後、凍結乾燥機(ES-2030, 日立ハイテクノロジーズ)を用いて、乾燥させた。乾燥させた試料を、試料観察面を上にしてSEM用カーボンテープ(応研商事)を貼り付けた試料台に乗せ、その周りをグラファイトペースト(応研商事)で接着した。グラファイトペーストの水分を十分に乾燥させるため、デシケータ内で一晩静置した。イオンスタップ装置(E-102, 日立ハイテクノロジーズ)で4分間の白金-バナジウム蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡(S-2460, 日立ハイテクノロジーズ)を用い、付加電圧10kV、倍率5000倍で各試料の微細構造を観察した。

3. 結果

3-1 各温度における定常流粘度の時間発展

これまで卵白が凝固しないとされてきた 40～60℃で定常流粘度の時間発展を測定した。測定結果を図 8 に示す。50～60℃での測定では、一定の induction time を経てから定常流粘度が急上昇し、すなわち凝集が開始したと考えられた。しかし、40℃及び 45℃での測定では、24 hr 処理した後も定常流粘度の上昇はほとんど見られなかった。この 40℃及び 45℃での測定で定常流粘度の上昇が見られなかった理由として、卵を産むニワトリの体温が 41℃程度である⁸⁾ことが関係しているのではないかと考えられた。すなわち、このニワトリの体温よりも低い 40℃及び近傍の 45℃では卵白タンパク質の熱変性が起こらなかったことが考えられた。また、定常流粘度の上昇が観察された 50℃以上では、粘度上昇が開始する臨界時間を t_c とし、図 9 のように直線を引き、その交点の時間とした。測定温度と t_c を表 1 に示す。以降は、この定常流粘度の上昇が観察された 50～60℃及び卵白が完全に凝固するといわれている 80℃の温度域に着目して実験を進めた。

3-2 レオロジー特性値から決定した各温度でのゲル化時間

周波数 1 Hz で測定した貯蔵弾性率(G')と損失弾性率(G'')から各温度でのゲル化時間(t_g)を決定した。60℃、55℃及び50℃のグラフを図 10～図 12 に示す。これらのグラフを用いて、貯蔵弾性率及び損失弾性率を外装し、その交点、すなわち $G'/G'' = \tan \delta = 1$ となる点を t_g とした。これにより決定した t_g と処理温度を表 2 に示す。また、図 13 に処理温度と t_g 及び前述の t_c をプロットしたグラフを示す。この 2 つのパラメータは処理温度に対し類似した傾向を示し、処理温度が高くなると、どちらも短くなることが観察された。

3-3 各温度で形成したゲルの強度

各温度で形成したゲルの強度を比較するため、歪 0.01、周波数 1 Hz で測定した貯蔵弾性率 G' 及び損失弾性率 G'' を用い(1)式で複素弾性率 G^* を算出した。

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad \text{--- (1)}$$

各温度における G^* の 24 hr の経時変化のグラフを図 14 に示す。24 hr での各温度の達した G^* の数値は、1000 Pa@60℃、200 Pa@55℃、10 Pa@50℃となった。また、卵白が確実にゲル化するといわれている 80℃での測定は 30 min とし、このときの G^* の値を卵白が完全に

ゲル化した状態の数値と考えた。その G^* の値は 10000 Pa となった。その 80°C での数値 (10000 Pa) と比べると、60°C 以下で形成されたゲルの G^* の数値は低く (10~1000 Pa)、また、処理温度の低下とともに G^* も低下することが観察された (図 15)。

3-4 50 及び 55°C でのゲル化の時間発展

卵白水溶液は、50~55°C という低温でもゲル化することが明らかになったが、そのゲルの構造に関する情報を得るために、 G^* の周波数分散の時間発展を測定した。50°C 及び 55°C での測定結果を図 16 と図 17 に示す。対数プロットしたときに、50°C では 12 hr 以降、55°C では 1 hr 以降の測定で周波数依存的に右肩上がりの結果となり、この結果は、(2) 式の weak-gel model^{9, 10)} で解析可能である。

$$G^* = A_f \omega^{\frac{1}{z}} \quad \text{--- (2)}$$

G^* が複素弾性率、 A_f がゲル強度 (力学的相互作用の強さ)、 ω が周波数、 z が配位数を示す。weak-gel model^{9, 10)} とは、流体が仮想的な流動単位格子からなるという協同性流動理論に基づいている。概念図¹⁰⁾ を図 18 に示す。流動単位格子は、ストレスのかかった状態とのかかっていない状態という 2 つの状態を取ると仮定する。配位数 z というパラメータは、隣接する流動単位格子の中で、どれくらいの

数がストレスのかかった状態で存在しているかを示し、「弱いゲル」中のネットワーク構造の立体構造を数値化したパラメータであると考えられる。一方で A_f は、その立体構造の強度を定量的に示している。この配位数 z 及びゲル強度 A_f は、ゲルの構造を考察する際の有力な手がかりとなる。

解析したフィッティングの一例を図 19 (50°C) 及び図 20 (55°C) に、解析結果を表 2 (50°C) 及び表 4 (55°C) に示す。

z の経時変化のグラフを図 21 に、 A_f の経時変化のグラフを図 22 に示す。50°C では、 z 及び A_f 共に、時間と共に緩やかに上昇し、この後も上昇を続けることが考えられた。即ち、50°C で形成されたゲルは 24 hr 以上処理すると、 z 及び A_f が上昇し、ゲルの強度が大きく、また、構造も密になることが予想された。一方 55°C では、 z 及び A_f は、時間と共に急激に上昇し、 A_f は 50°C と同様に今後も上昇を続けることが考えられた。一方、 z は 4~5 hr の時点の 23 程度から、ほとんど上昇が見られなくなった。このことから、これ以降のゲル強度の発展は、 A_f の上昇、即ち分子同士の相互作用の強さによるものだと考えられた。

3-5 SDS-PAGE 分析

これまで述べてきた卵白タンパク質の低温ゲル化についての分子

論的レオロジー特性を明らかにするためのタンパク質化学的検討として、SDS-PAGE 分析を行った。図 23 は未処理、40～60℃で 24 hr 及び 80℃で 30 min 処理し、超音波を照射して遠心分離後の上清、即ち加熱凝集していない卵白タンパク質水溶液を SDS-PAGE に供した結果を示す。また、OA 及び OT のバンドの濃淡に着目し、解析を行った。すなわち、OA にあたる 45kDa のバンド及び OT にあたる 77kDa のバンドの濃淡を ImageJ で数値化し、(3)式及び(4)式で OAcontent 及び OTcontent をそれぞれ算出した。

$$OAcontent = \frac{\text{サンプルの45kDaのバンドのdensity}}{\text{未加熱の45kDaのバンドのdensity}} \quad \text{--- (3)}$$

$$OTcontent = \frac{\text{サンプルの77kDaのバンドのdensity}}{\text{未加熱の77kDaのバンドのdensity}} \quad \text{--- (4)}$$

45kDa にあたる OA のバンドは、先行研究⁵⁾の DSC によって測定された熱変性温度 77℃と対応するように、60℃までの処理では濃淡の差が観察されず、80℃で顕著な減少が観察された。(3)式で算出した OAcontent のグラフを図 24 に示す。ゲルでの観察と同様、60℃までの処理では未処理のサンプルと比べても変化はなかったが、

80℃で完全に消失したことから、0Aは80℃で処理したゲルの形成に関与しているが、60℃以下で処理したゲルの形成には関与していないことが示唆された。しかし、先行研究⁵⁾での熱変性温度が61℃と報告されていた77kDaにあたる0Tのバンドは、55℃から僅かに減少が見られ、60℃以降では急激に減少した。(4)式で算出した0Tcontentを図25に示す。55℃での0Tcontentは、約3割程度まで減少していたため、55℃で24hr処理したゲルには、0Tの約7割がゲルの形成に関与していることが示唆された。なお、60℃以降では完全に消失しているため、60℃及び80℃では、含有される0Tの全てがゲルの形成に関与していることが示唆された。

本研究では、CBB染色による結果のみから各温度で形成されたゲルを形成しているタンパク質について議論したが、今後の課題としては、免疫染色等を行い、ゲル形成に関与しているタンパク質の、より正確な同定が必要であると考えられる。

3-6 走査型電子顕微鏡(SEM)

最後に、ゲルの構造を実空間像として観察したSEM観察の結果を述べる。まず、完全に凝固するといわれる80℃で24hr処理したSEM画像を図19に示す。卵白タンパク質は加熱後も球状のタンパク質分子構造を保ちつつ、分子間で互いに連結もしくは凝集するこ

とによって網目状の構造を形成する²⁾とされており，観察されたゲルの微細構造は，球状のタンパク質分子構造を保ちつつ，ゲル化していた．図 26～図 29 に，それぞれ 60℃，55℃，50℃で処理した SEM 画像を示す．80℃と同様に，球状のタンパク質分子同士が網目構造を形成していることは変わらないが，処理温度が低くなるとともに，そのゲルを形成する凝集体の大きさが小さくなり，網目構造が密から疎に変化することが観察された．

4. 考察

卵白タンパク質は，これまでの DSC を用いて調べられた熱変性温度の 61℃⁵⁾を下回る 50℃及び 55℃でも，十分な時間処理した結果，複素弾性率 G^* が上昇し，SDS-PAGE 分析，走査型電子顕微鏡観察の結果から，仮説の通り，オボトランスフェリン (OT) が長時間処理することにより unfold 状態になり，凝集体を形成することが示唆された．このとき，見かけ上の粘度は，直線的に粘度が上昇した卵黄⁶⁾とは異なり，一定の induction time (潜伏時間)を経てから急上昇し，ゲルの形成が始まった．しかし，この induction time 中も粘度の変化が全くないわけではなく，僅かではあるが粘度の上昇が観察された．図 30 に，図 8 の 55℃のプロットの短時間領域を拡大したグラフを示す，この僅かな粘度上昇は，熱運動によりごく一部

の分子が凝集したことによるものだと考えられた。

このような比較的低温で形成されたゲルの G^* は処理温度が低くなると低下し、また、

微細構造も処理温度の低下と共に、網目構造が疎になった。80℃で

形成されたゲルと低温で形成されたゲルの概念図を図 31 に示す。

これらは、SDS-PAGE 分析の結果から、凝集に関与しているタンパク

質の量が異なることが原因だと考えられた。すなわち、ゲルの

形成に関与する卵白タンパク質は、主として OA と OT があげられ

る。80℃で形成されるゲルには OA と OT どちらも関与するが、60℃

で形成されるゲルには OA の関与はなく OT のみゲル形成に関与す

る。55℃で形成されるゲルにおいては、OA の関与はなく、80℃で

形成されるゲルに比べ、7割程の OT の関与が示唆された。

厚生労働省が定める殺菌液卵の加熱基準は、卵白の場合、56℃で 3 min 30s 以上(連続式加熱)もしくは 54℃で 10 min 以上(バッチ式

加熱)となっている¹¹⁾。本研究の加熱温度でも、この条件を満たす

加熱条件ならば卵料理への応用が期待できる。例えば、半熟卵と一

概に言っても、そのテクスチャーは様々であり、個々人によって求

めるテクスチャーは異なるだろう。その様々なテクスチャーを処理

温度と処理時間の関係によって、定量的に作り出すことが可能な手

がかりとなると考えられた。また、他の食品でも応用することが出

来る。肉料理や魚料理など、プロの料理人が勘と経験により作り出す料理を素人が実践する場合、材料や分量だけではなく、温度と時間の情報があれば、より近いものを作ることが出来るだろう。調理温度が高温度帯よりも、低温度帯の方がレオロジー特性の変化が緩やかであるため、目的とする硬さに近づけるのが比較的容易になる。先行研究では卵黄⁶⁾、本研究では卵白について、温度と時間に着目して実験を行ったが、今後は、卵黄と卵白を合わせた全卵での検討や、実際の調理で添加される砂糖や塩、牛乳等の添加による影響についても検討していく必要があると考えられた。

5. 結論

- ・卵白タンパク質は比較的低温(50℃, 60℃)でも長時間(10⁴s程度)加熱処理すれば、ゲルを形成する。
- ・OTはこれまでの変性温度以下でも長時間処理することにより、凝集を開始する。
- ・卵白タンパク質ゲルは処理温度によってレオロジー特性及び微細構造は異なる。

引用文献

- 1) 渡邊 乾二, 食卵の科学と機能 - 発展的利用とその課題 -, アイ・ケイコーポレーション(2009)
- 2) 中村 良, 卵の科学, 朝倉書店(1998)
- 3) 下田 吉人 他, 肉・卵の調理, 朝倉書店(1976)
- 4) 中江 利孝, 乳・肉・卵の科学 - 特性と機能 -, 弘学出版(1986)
- 5) I. Nicorescu, C. Vial, E. Talansier, V. Lechevalier, C. Loisel, D. Della Valle, A. Riaublanc, G. Djelveh, J. Legrand, Food Hydrocolloids, 25, 797-808(2011)
- 6) C. Vega, R. Mercade-Prieto, Food Biophysics, 6:152-159(2011)
- 7) 鮫島 邦彦 他, ニューフードサイエンス, 三共出版(2005)
- 8) 岡本 新, アニマルサイエンス⑤ ニワトリの動物学, 東京大学出版会(2001)
- 9) D. Gabriele, B. de Cindio, P. D'Antona, Rheol Acta, 40:120-127(2001)
- 10) L. Bohlin, JCIS, 7, 2, 423-434(1980)
- 11) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)

表 1 図 8 から図 9 の方法によって求めた各温度での粘度上昇が開始する臨界時間 t_c

τ [°C]	t_c [s]
50	7000
55	800
60	200

表 2 図 10~12 の方法によって求められた各温度でのゲル化時間

t_g

$T[^\circ\text{C}]$	$t_g[\text{s}]$
50	20000
55	2000
60	200

表 3 50°Cにおける周波数分散測定で得られたデータを(2)式の weak-gel model⁹⁾でフィッティングして求めた各パラメータ.

Time[s]	$A_f[\text{Pa} \cdot \text{s}^{1/z}]$	Z[-]
43200	0.242 ± 0.0165	3.48 ± 0.625
54000	0.477 ± 0.107	4.32 ± 0.175
64800	0.935 ± 0.293	6.56 ± 0.858
75600	1.42 ± 0.458	7.32 ± 1.01
86400	2.37 ± 0.580	10.5 ± 1.01

各パラメータは平均±標準偏差(n=3)で表示した.

表 4 55°Cにおける周波数分散測定で得られたデータを(2)式の weak-gel model⁹⁾でフィッティングして求めた各パラメータ.

Time[s]	A_f [Pa \cdot s ^{1/z}]	Z[-]
3600	0.500 \pm 0.136	4.91 \pm 1.45
5400	1.58 \pm 0.284	10.3 \pm 1.26
7200	3.19 \pm 0.522	15.9 \pm 2.53
10800	7.22 \pm 1.20	19.2 \pm 0.755
14400	12.4 \pm 2.22	22.8 \pm 0.571
18000	18.3 \pm 3.88	23.2 \pm 0.958

各パラメータは平均 \pm 標準偏差 (n=3) で表示した.

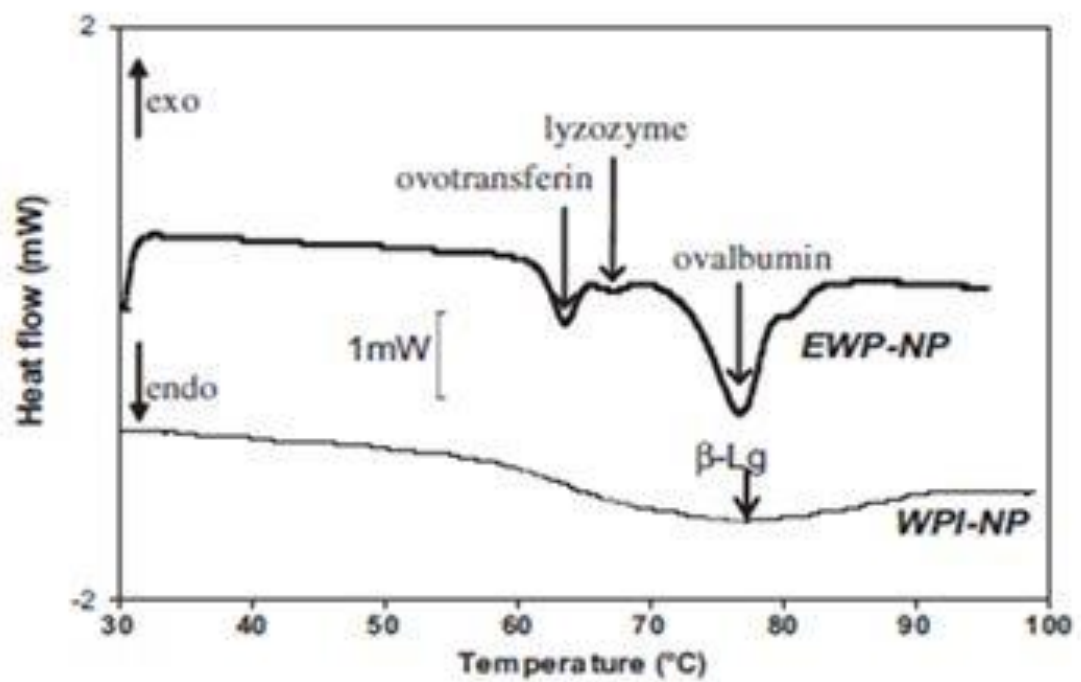


図 1 I.Nicorescu et al , Food Hydrocolloids, 25, 797-808(2011)より引用. 太線は 9.8 w/v の EWP(卵白タンパク質)水溶液の熱流を示す. 図の吸熱ピークはオボトランスフェリンとオボアルブミンの熱変性温度、それぞれ 61°Cと 77°Cを示す.

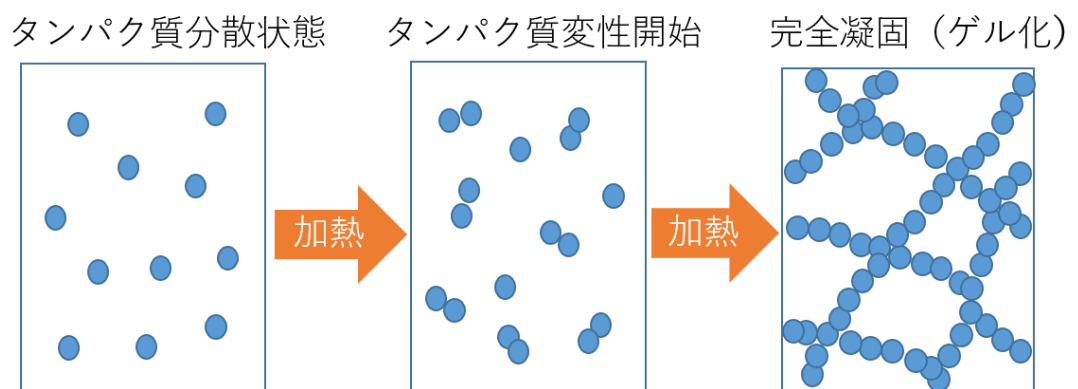


図2 卵白タンパク質のゲル化（概念図）。左図が未変性状態のタンパク質，加熱するとタンパク質分子同士が凝集を起こし（中図），やがて右図のような網目構造を形成する。

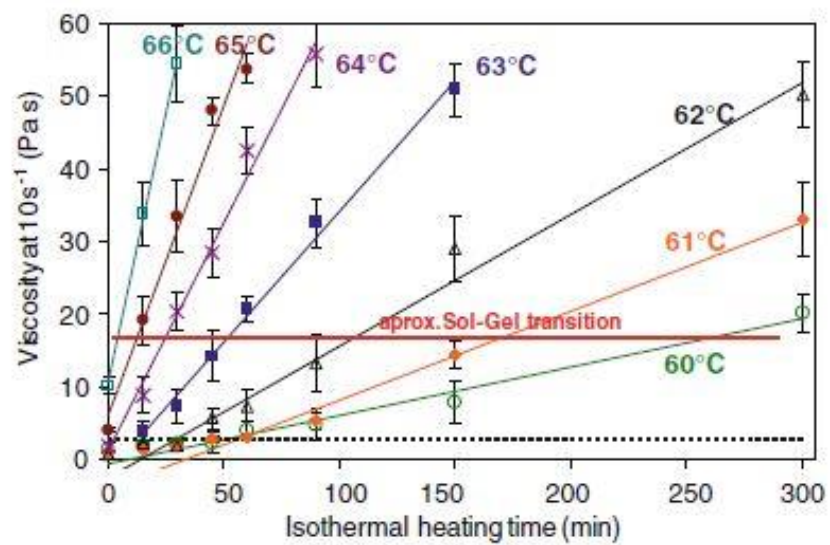


図 3 C.Vega et al , Food Biophysics 6:152-159(2011)より引用. 卵黄の各温度における一定時間加熱後の 10/s での粘度. X 軸が保持時間, Y 軸が粘度を示す. グラフ中の赤線はゲル化点を示し, $\tan \delta = 1$ となる点に定めている. 点線は未加熱時の卵黄の粘度を示す.

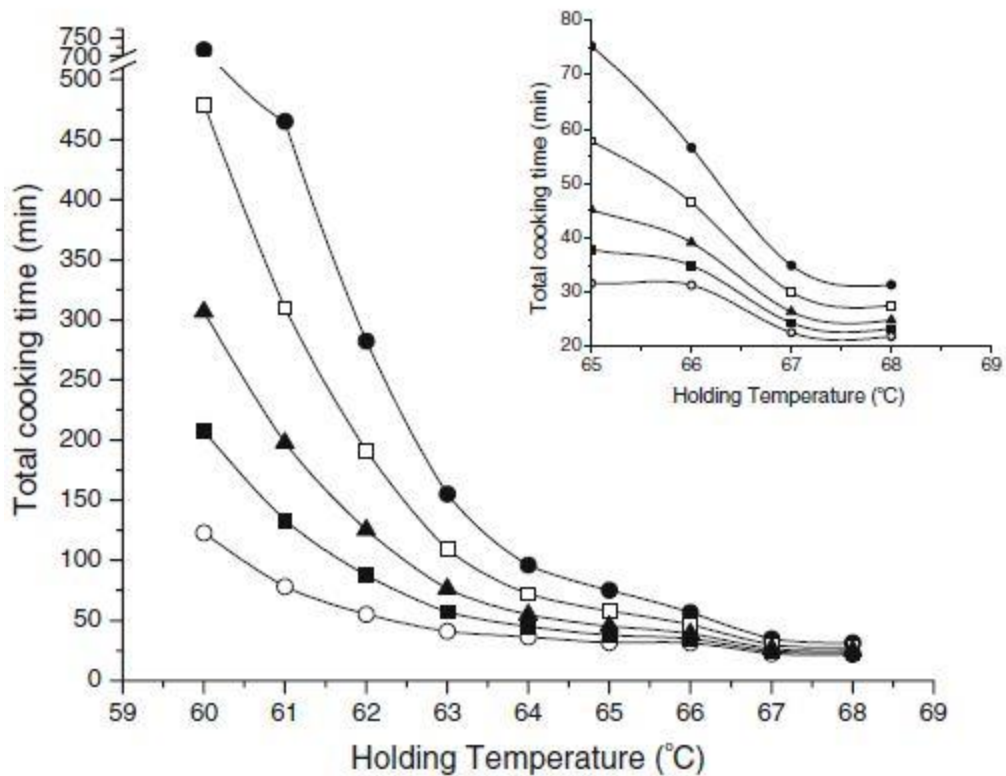


図4 C.Vega et al, Food Biophysics 6:152-159(2011)より引用. 卵黄を他の各食品と同等の粘度にするために必要な保持温度と加熱時間の関係. X軸が保持温度, Y軸が加熱時間を表し, 同一のプロット及び線は同等の粘度を示す. 各食品はそれぞれ, 加糖練乳(○), マヨネーズ(■), ハチミツ(▲), クッキーアイシング(□), マーマイト(●)を示す. 挿入図は粘度の上昇が急激な個所を拡大したグラフを示す.

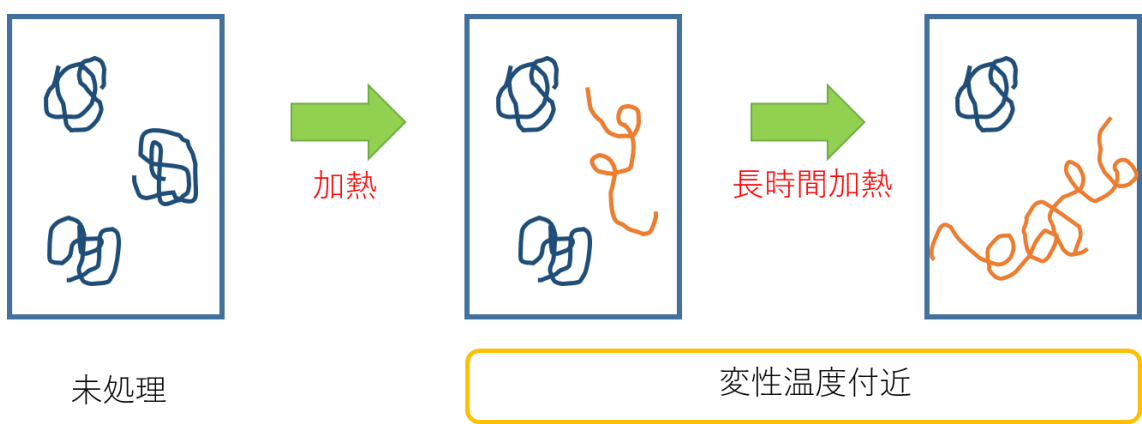


図5 長時間の加熱により部分的に unfolded-form に変化する (概念図). 青色が folded-form, 橙色が unfolded-form を示す

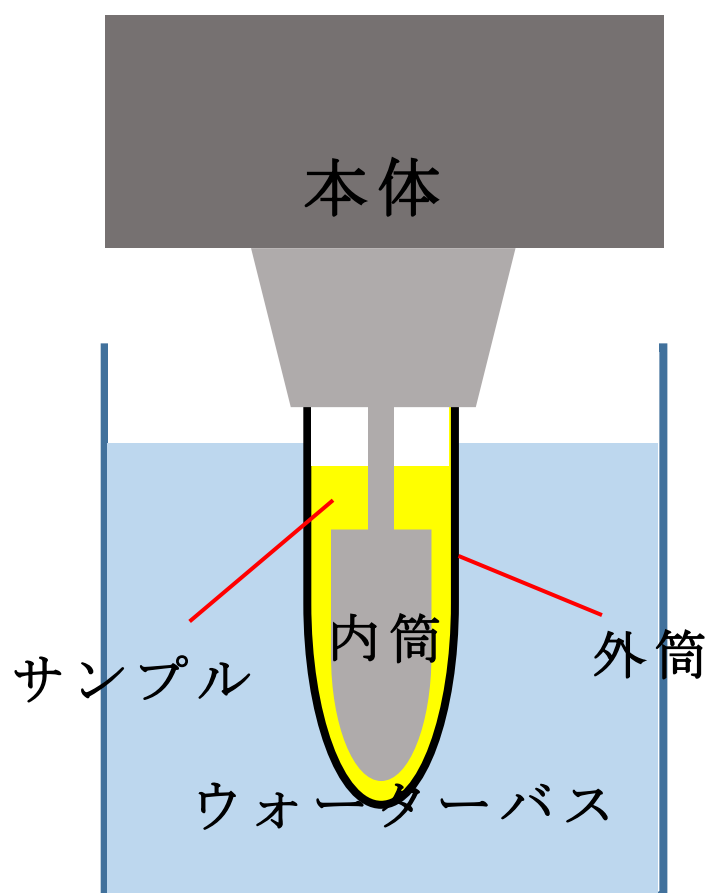


図 6 ONRH-1 型回転式レオメータ(大葉技研)及び使用したフィクチャーの模式図. ガラスでできた外筒の内側に内筒とサンプルが入り, サンプルは密閉された状態で測定される.

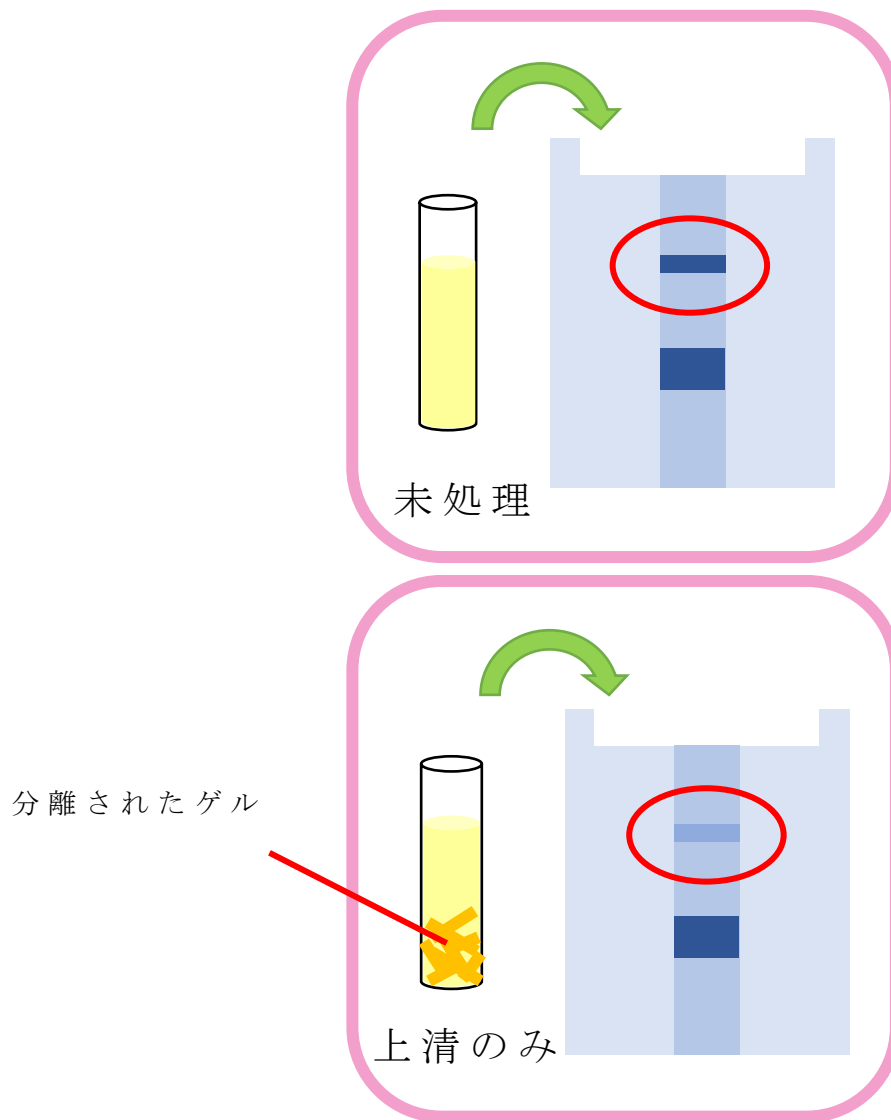


図 7 加熱後のゲルにおける残留タンパク質の観察方法．未処理のサンプルを泳動すると，上図のようなバンドが現れるとし，ゲルを形成したサンプルを遠心後，上清のみを泳動すると，下図のようなバンドが現れるとする．図の薄くなったバンドが，ゲルの形成に関与しているタンパク質と考えた．

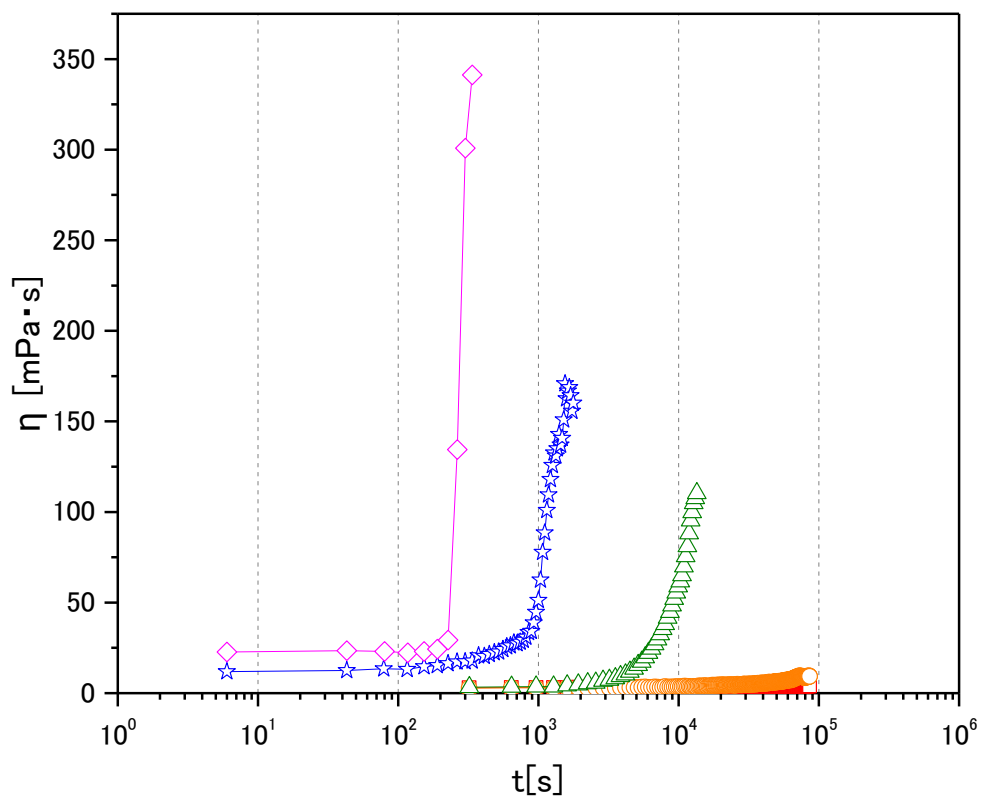


図 8 40℃，45℃，50℃，55℃及び60℃での定常流粘度の経時変化の．X軸が処理温度，Y軸が定常流粘度 η を示す．各プロットはそれぞれ40℃(□)，45℃(○)，50℃(△)，55℃(☆)及び60℃(◇)を表す．

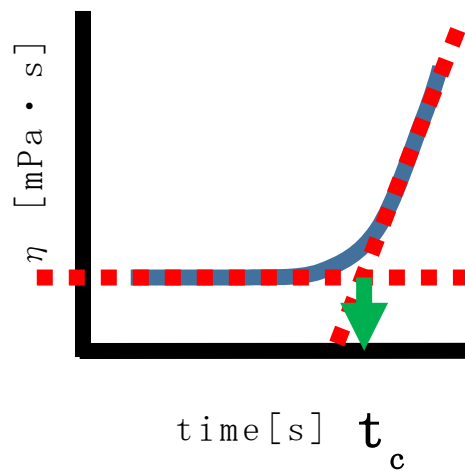


図 9 粘度上昇が開始する臨界時間 t_c の決定方法．矢印が t_c を示す．

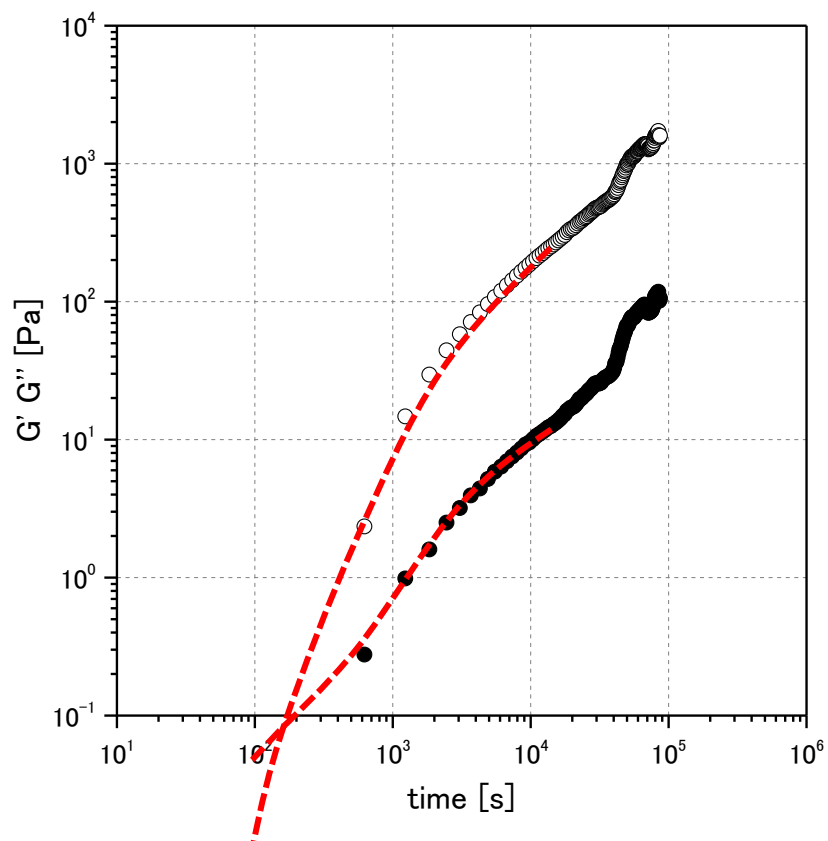


図 10 ゲル化時間の決定方法 (60°C). X 軸は処理温度, Y 軸は動的弾性率 (G' ; ○, G'' ; ●) を示す. 赤点線は外装線を示し, その交点をゲル化時間とした.

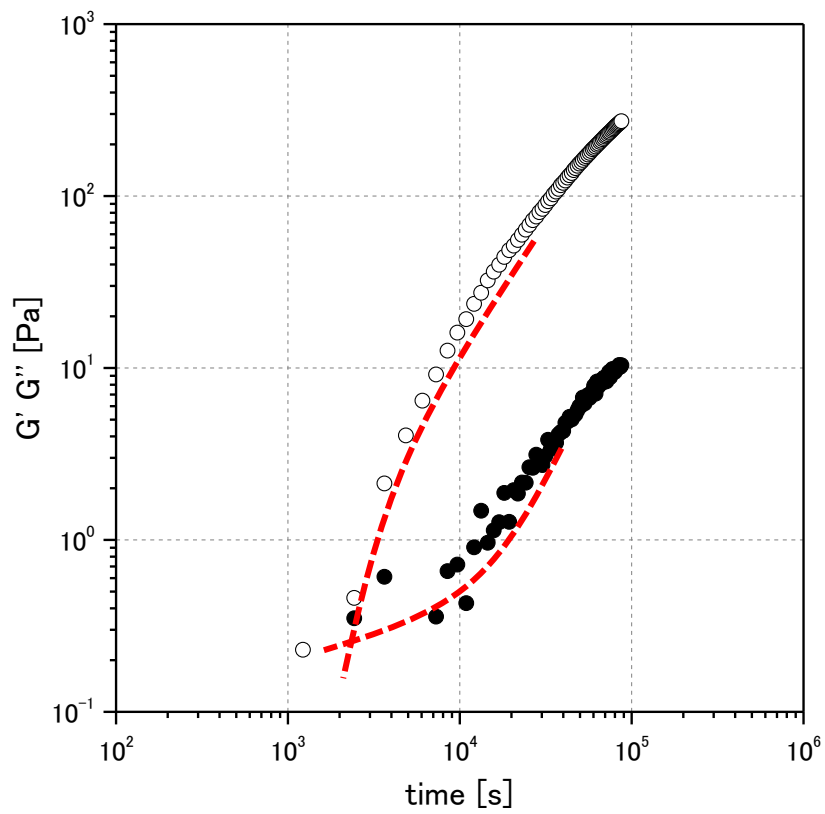


図 11 ゲル化時間の決定方法 (55°C). X 軸は処理温度, Y 軸は動的弾性率 (G' ; ○, G'' ; ●) を示す. 赤点線は外装線を示し, その交点をゲル化時間とした.

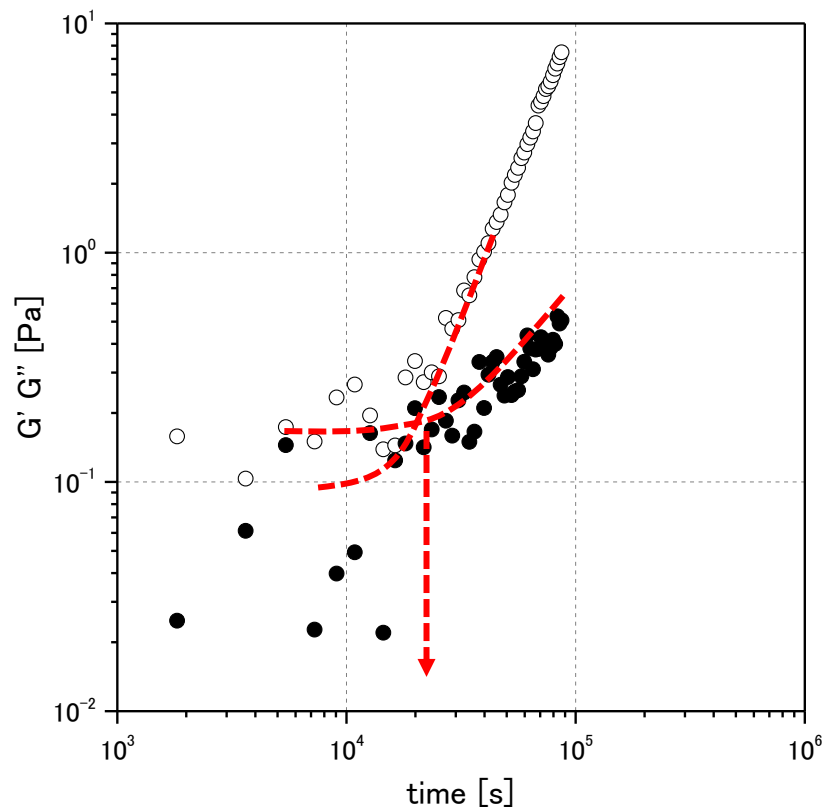


図 12 ゲル化時間の決定方法 (50°C). X 軸は処理温度, Y 軸は動的弾性率 (G' ; ○, G'' ; ●) を示す. 赤点線は外装線を示し, その交点をゲル化時間とした.

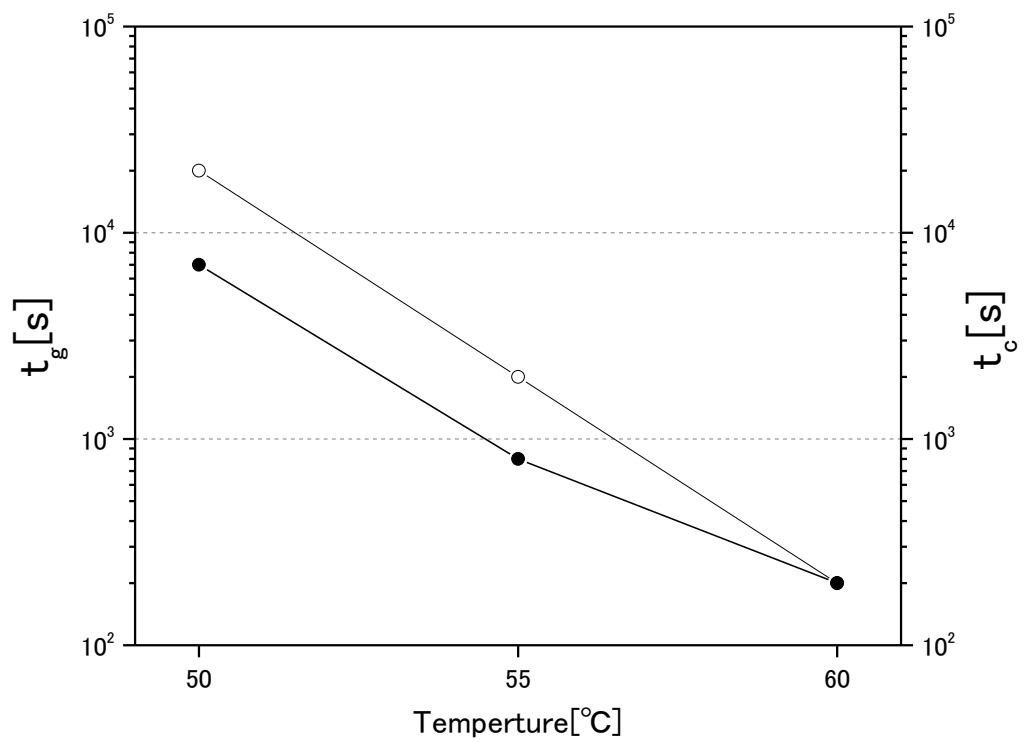


図 13 各温度における図 8~9 によって決定した t_c と図 10~12 によって決定した t_g の関係. X 軸は処理温度, Y 軸は t_c 及び t_g を示す. 各プロットは t_c (●), t_g (○) を示す.

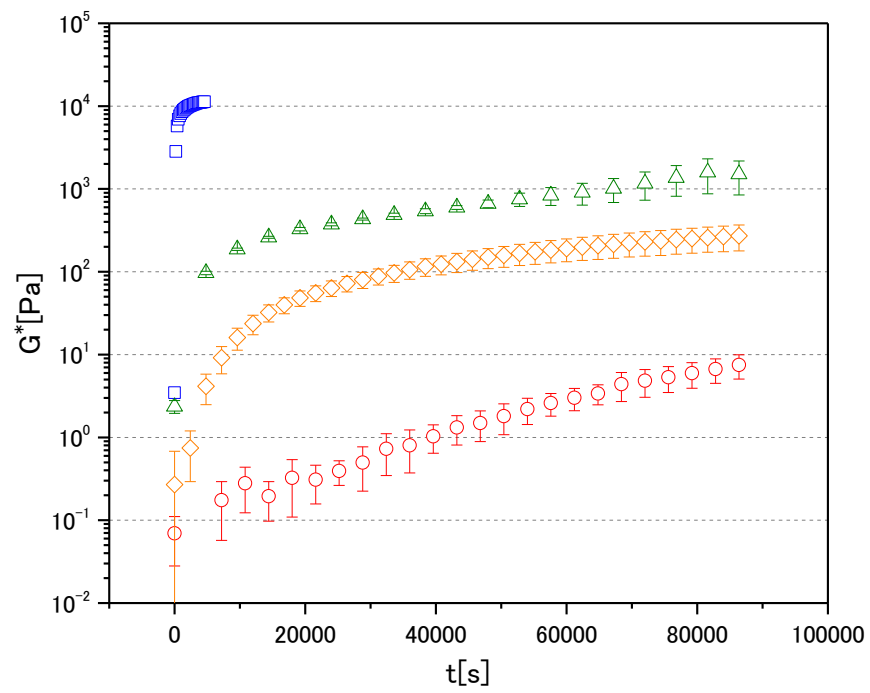
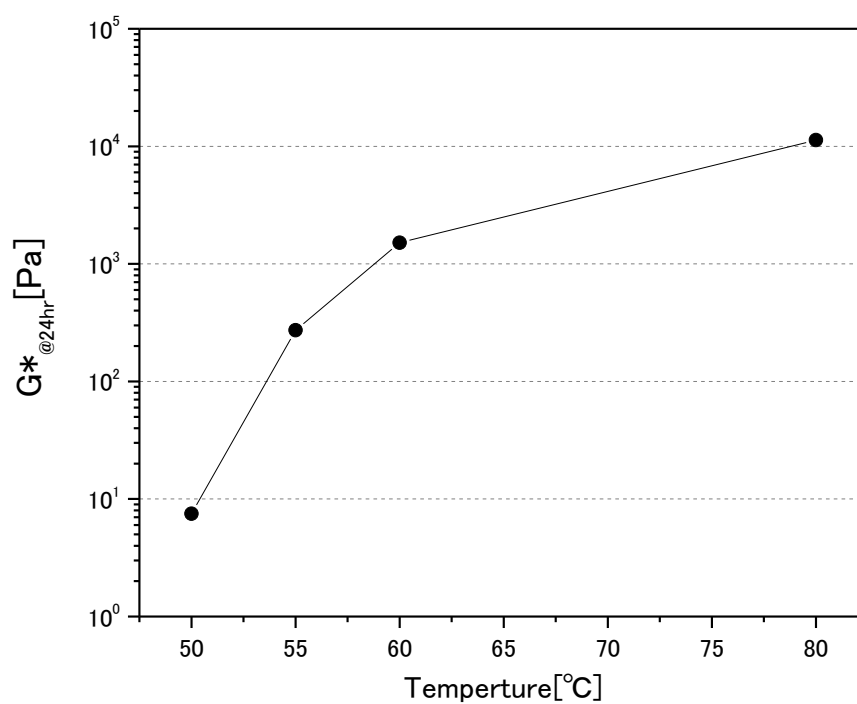


図 14 50°C (○), 55°C (◇), 60°C (△)及び 80°C (□)での複素弾性率 (G^*)の経時変化. X軸が処理時間, Y軸が G^* を示す, 測定回数は3回でデータは平均値で表示し, バーは標準偏差を示す.

図 15 24hr 経過時の複素弾性率 (G^*). X 軸が処理温度, Y 軸が



24 hr 経過時の G^* を示すが, 卵白が確実にゲル化するといわれる
80°Cのみ 30 min 経過時の値を示す.

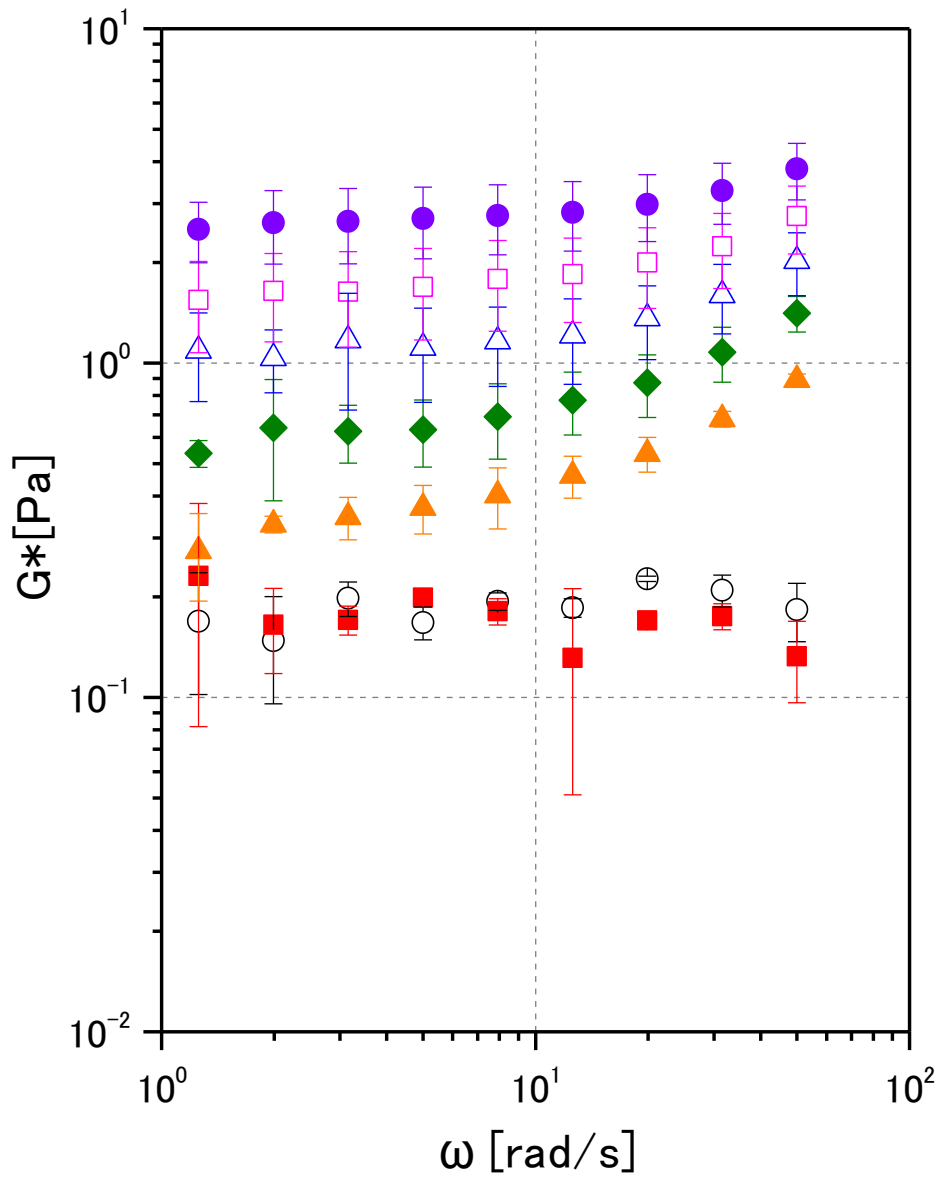


図 16 50°Cでの複素弾性率 G^* の周波数分散の時間発展. X軸が周波数, Y軸が G^* を示す. 各プロットは未処理(○), 3 hr(■), 12 hr(▲), 15 hr(◆), 18 hr(△), 21 hr(□), 24 hr(●)経過時

の値を示す。測定回数は3回でデータは平均値で表示し、バーは標準偏差を示す。

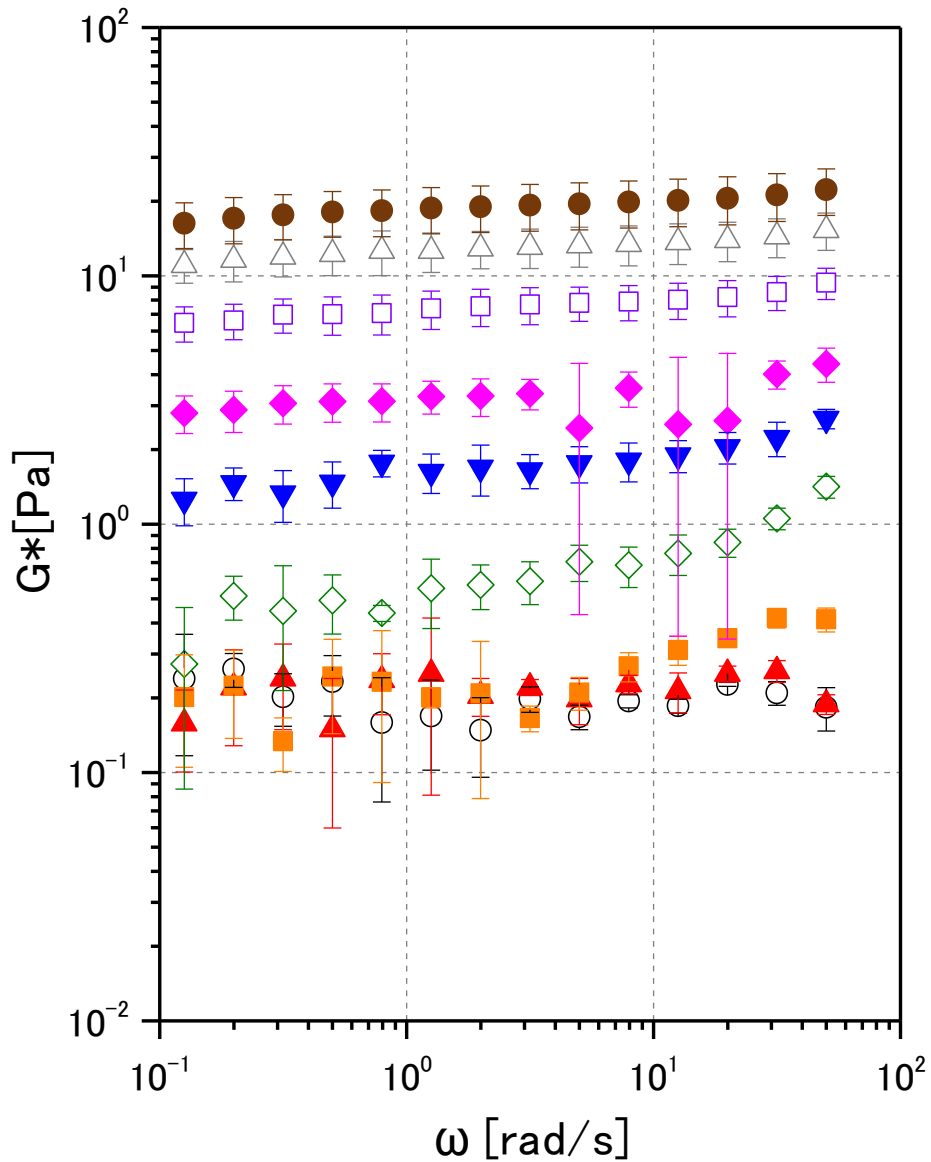


図 17 55°Cでの複素弾性率 G^* の周波数分散の時間発展. X 軸が周波数, Y 軸が G^* を示す. 各プロットは未処理 (○), 15 min (▲), 30 min (■), 1 hr (◇), 1.5 hr (▼), 2 hr (◆), 3 hr (□), 4 hr (△), 5 hr (●) 経過時の値を示す. 測定回数は 3 回でデータは平均値で表

示し、バーは標準偏差を示す。

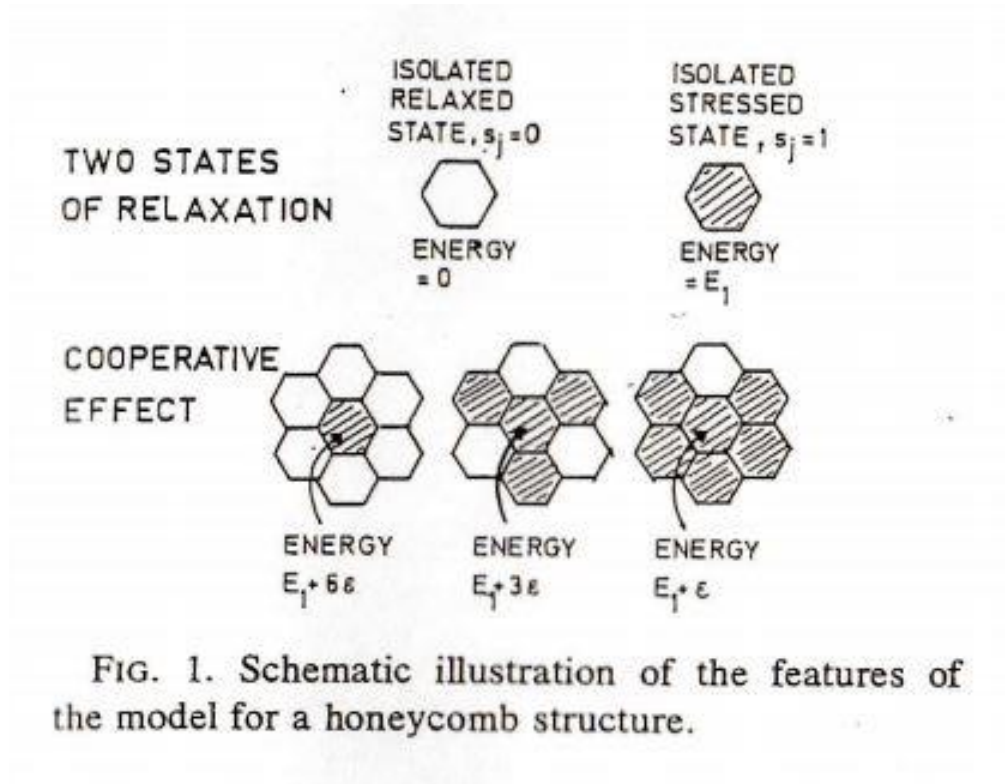


FIG. 1. Schematic illustration of the features of the model for a honeycomb structure.

図 18 L. Bohlin, JCIS, 7, 2, 423-434(1980)より引用. weak-gel model の概念図. 中央の 1 つの流動単位格子に注目したとき, ストレスのかかっている流動単位格子の数が配位数 (z) の値となる.

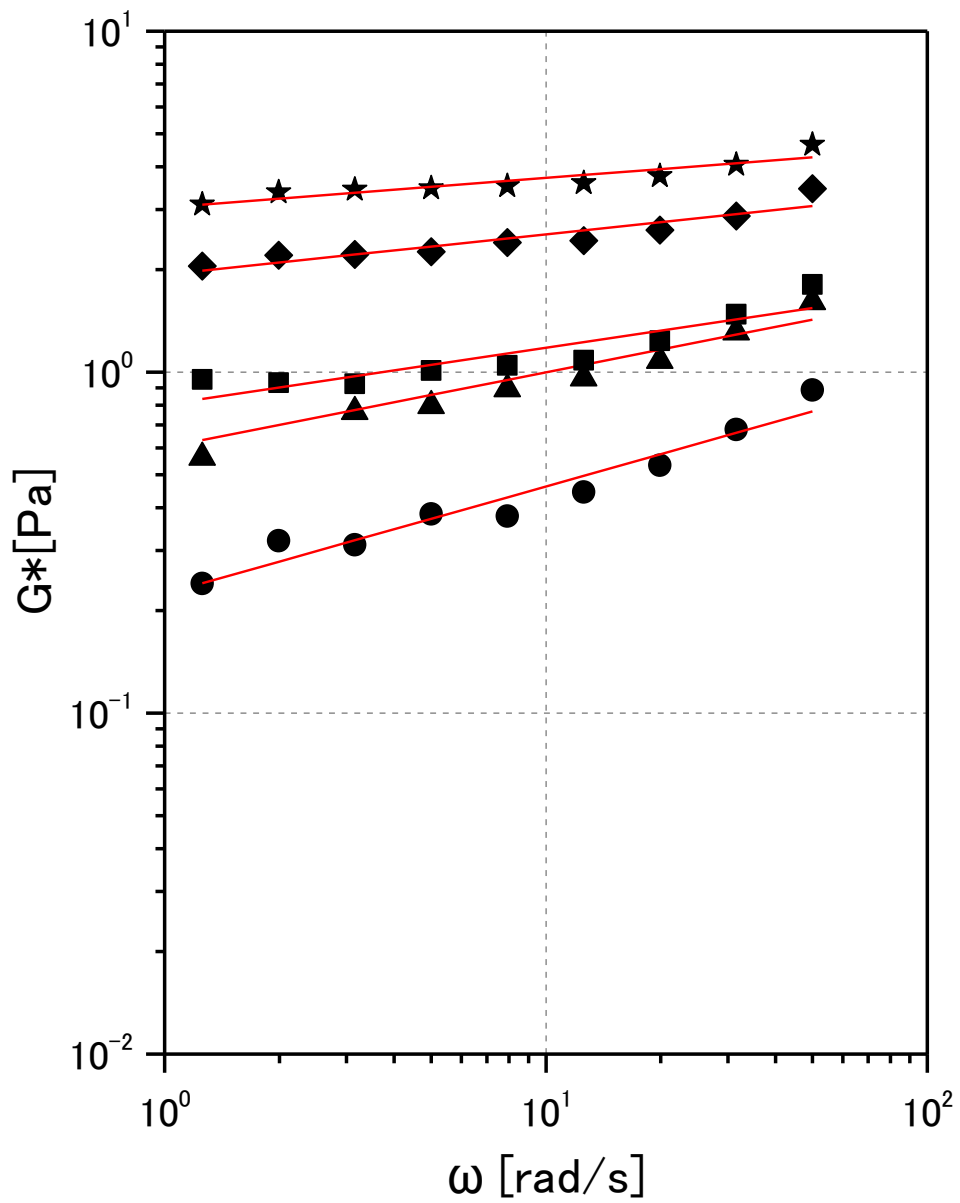


図 19 50°Cにおける周波数分散測定の結果と(2)式の weak-gel model⁹⁾によるフィッティング結果. 各プロットは 12 hr(●),

15 hr(▲), 18 hr(■), 21 hr(◆), 24 hr(★)時点での測定データ
を示し, 実線はフィッティング結果を示す.

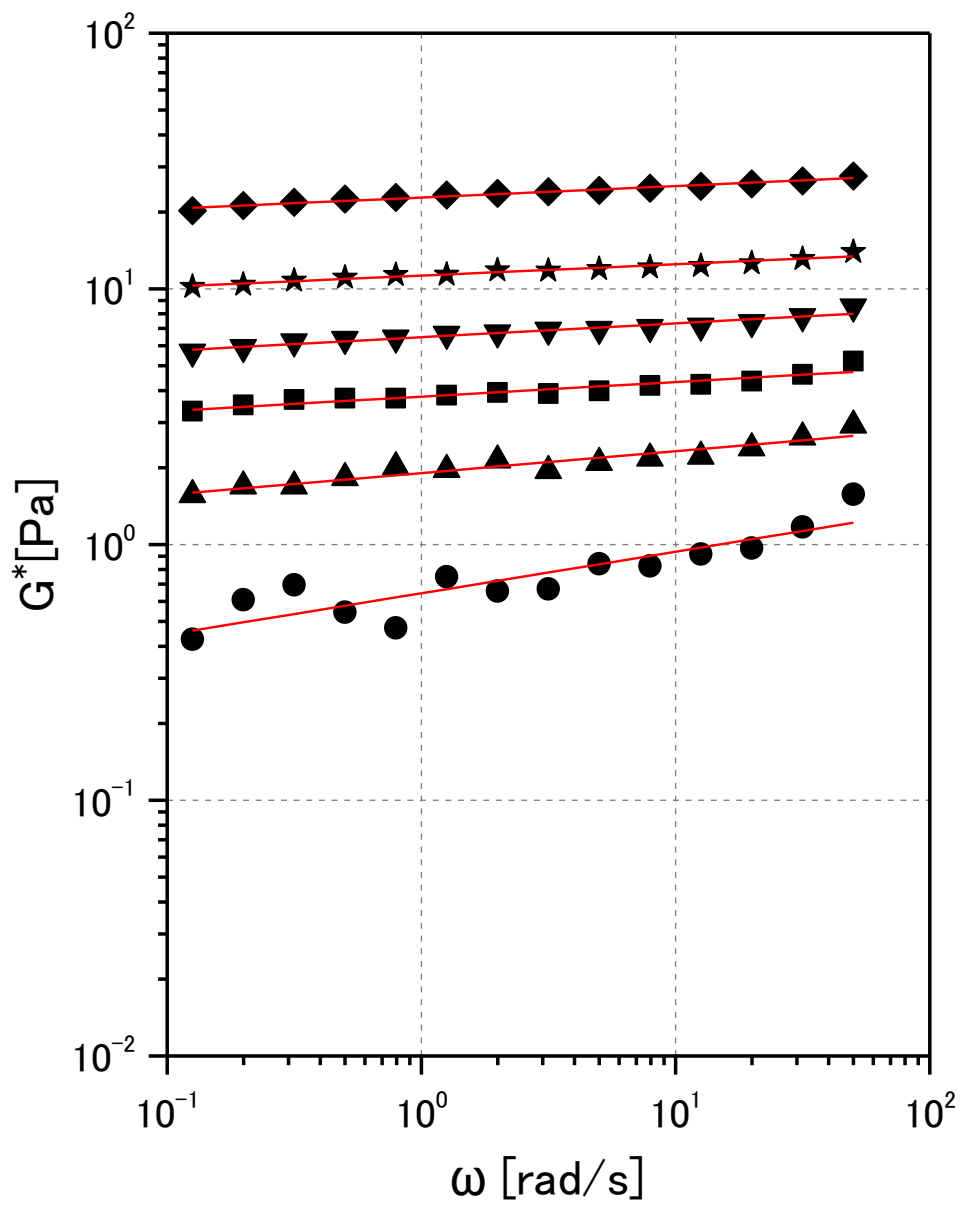


図 20 55°Cにおける周波数分散測定の結果と(2)式の weak-gel model⁹⁾によるフィッティング結果. 各プロットは 1 hr(●),

1.5 hr(▲), 2 hr(■), 3 hr(▼), 4 hr(★), 5 hr(◆)時点での測定データを示し、実線はフィッティング結果を示す。

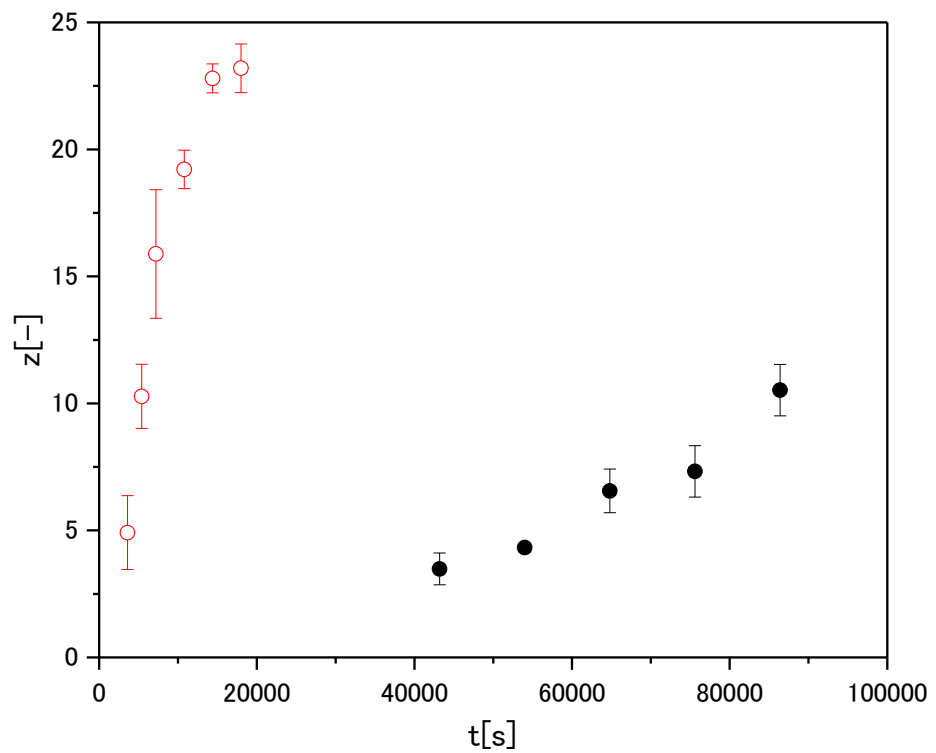


図 21 50°C (●)及び 55°C (○)の z 値の時間発展. X 軸が処理時間, Y 軸が z 値を示す. 測定回数は 3 回でデータは平均値で表示し, バーは標準偏差を示す.

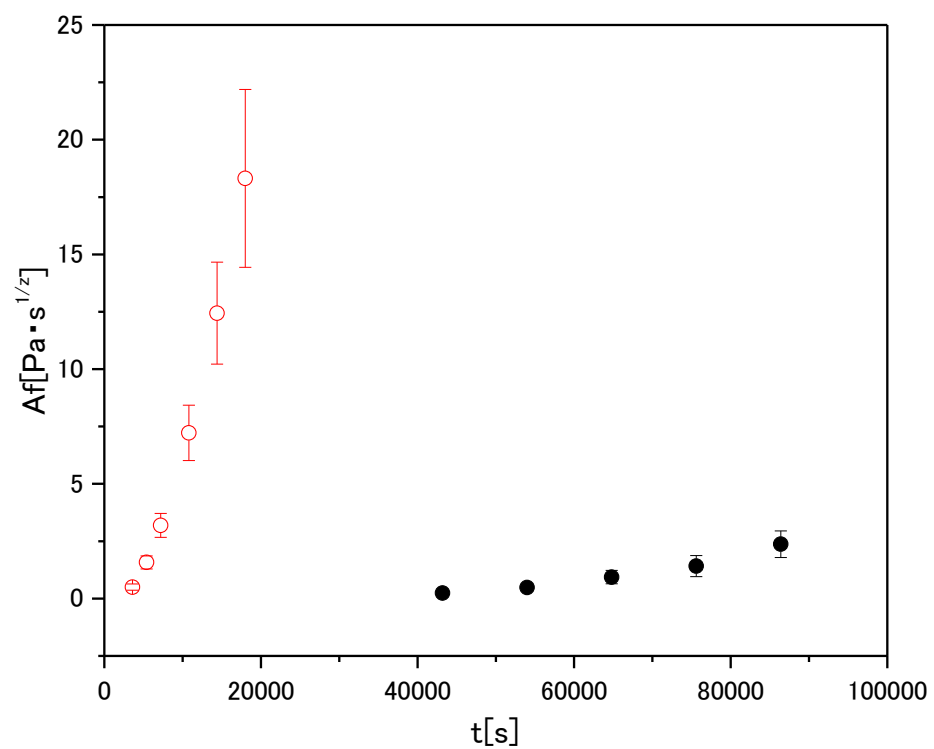


図 22 50°C (●) 及び 55°C (○) の A_f 値の時間発展. X 軸が処理時間, Y 軸が A_f 値を示す. 測定回数は 3 回でデータは平均値で表示し, バーは標準偏差を示す.

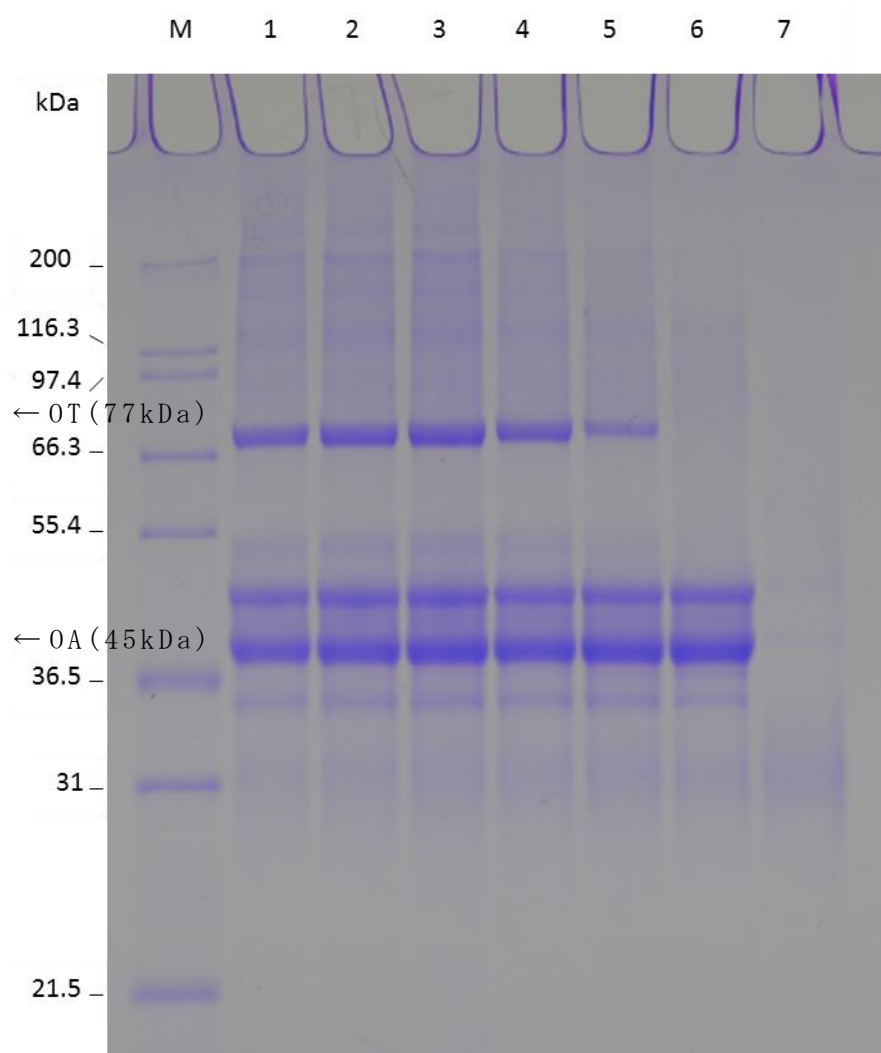
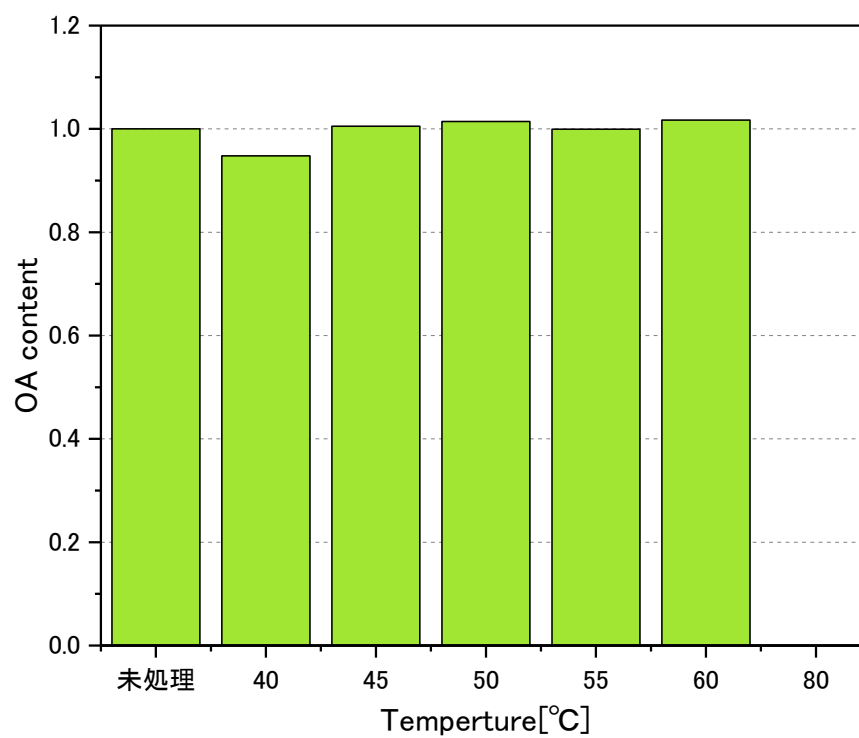


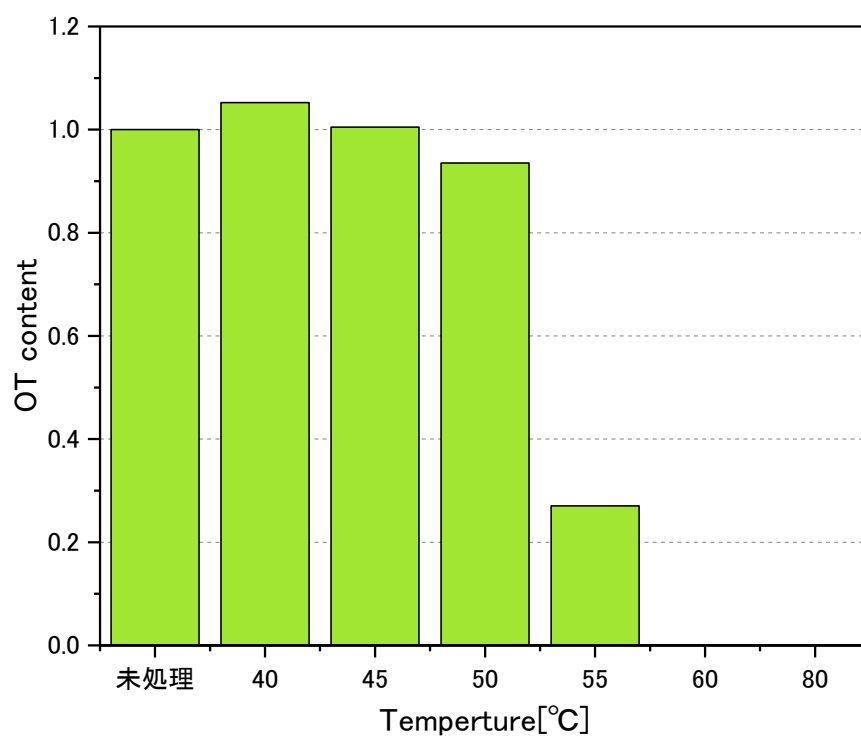
図 23 加熱ゲルの SDS-PAGE 分析の結果. 各レーンは, M;分子量マーカー, 1;未処理, 2;40°C, 3;45°C, 4;50°C, 5;55°C, 6;60°C及び7;80°Cで, 処理時間は, 40~60°Cでは 24 hr, 80°Cのみ 30 min.

図 24 (3)式によって算出した OA content の加熱温度による変化.



横軸が処理温度，縦軸が OA content を示す．未処理の値を基準 (OA content=1.0) とし，各温度での数値はその相対値を示す．

図 25 (4)式によって算出した OT content の加熱温度による変化.



横軸が処理温度，縦軸が OT content を示す．未処理の値を基準 (OT content=1.0) とし，各温度での数値はその相対値を示す．

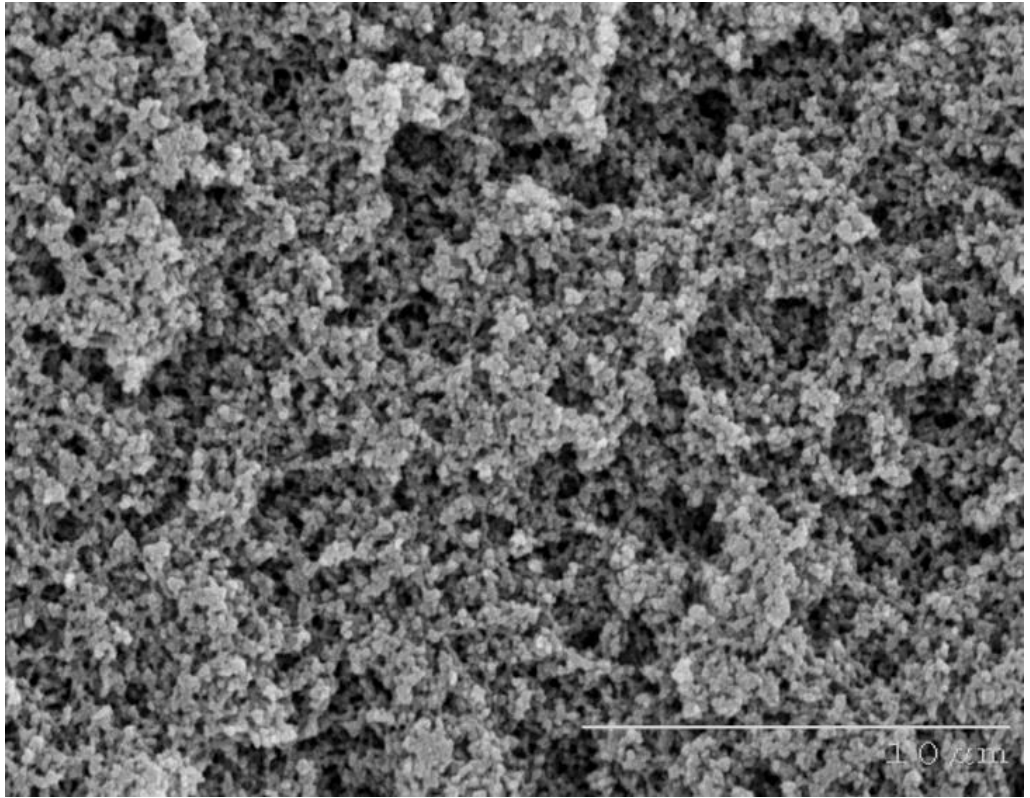


図 26 SEM 画像．80℃で 24 hr 処理した後，グルタルアルデヒド (GA) 固定によって得られたサンプル．

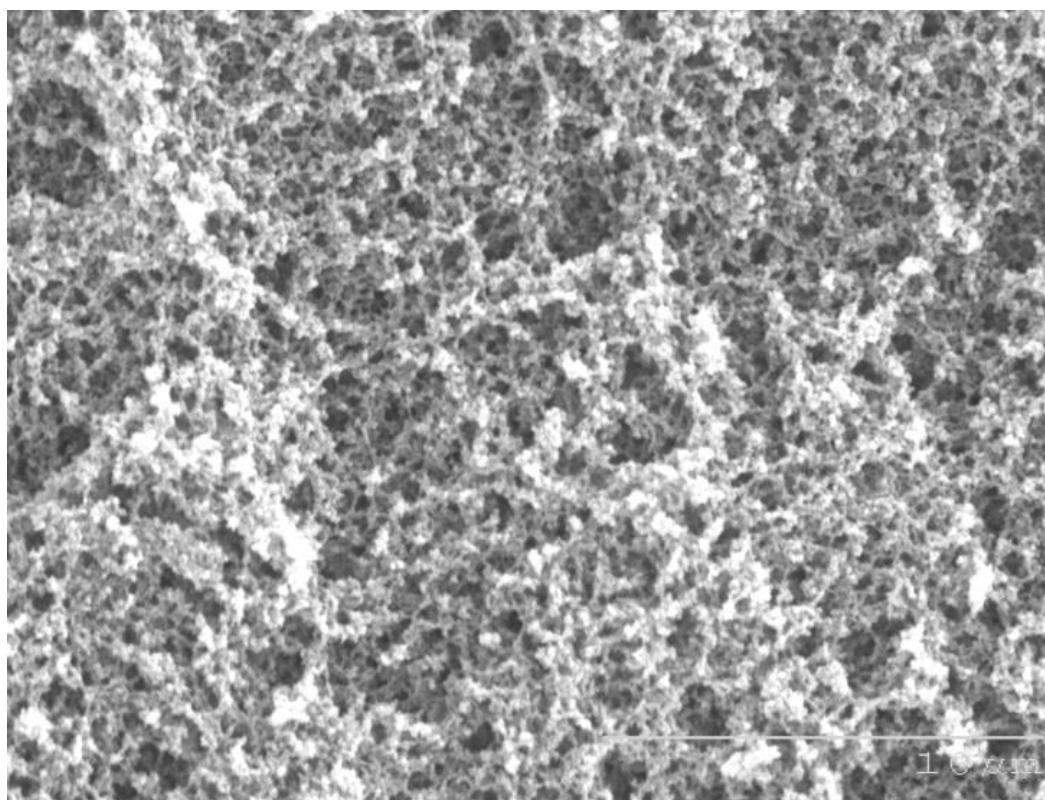


図 27 SEM 画像. 60°C で 24 hr 処理した後, GA 固定によって得られたサンプル.

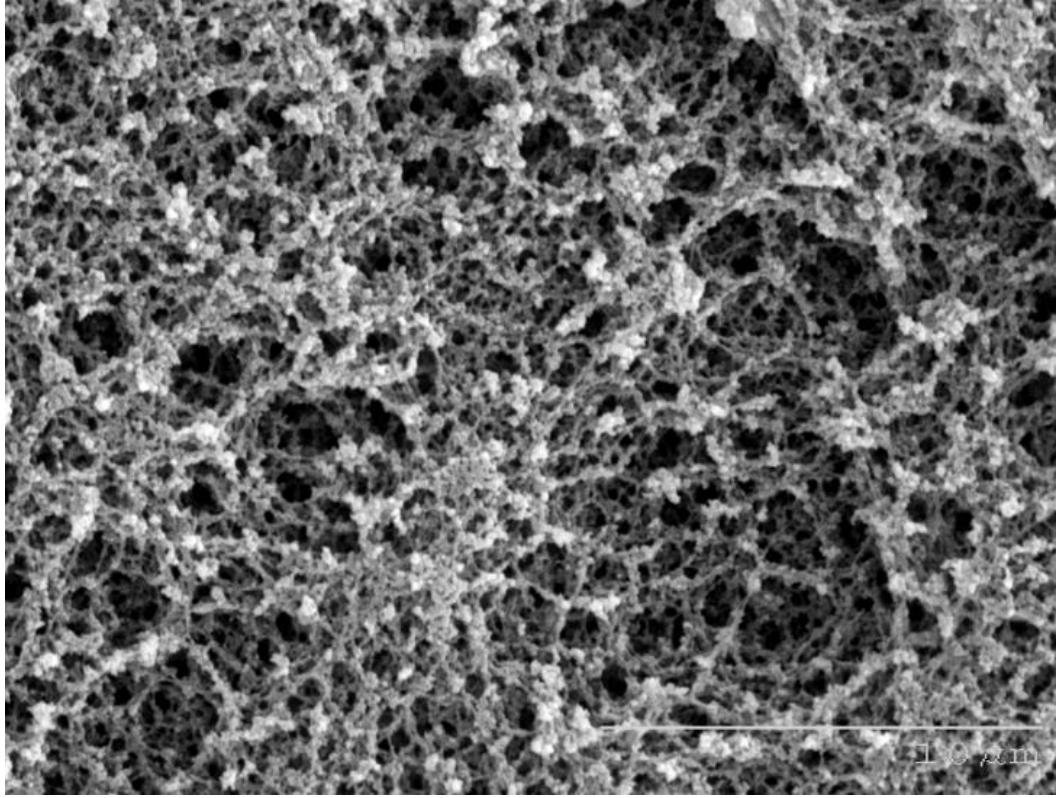


図 28 SEM 画像. 55°C で 24 hr 処理した後, GA 固定によって得られたサンプル.

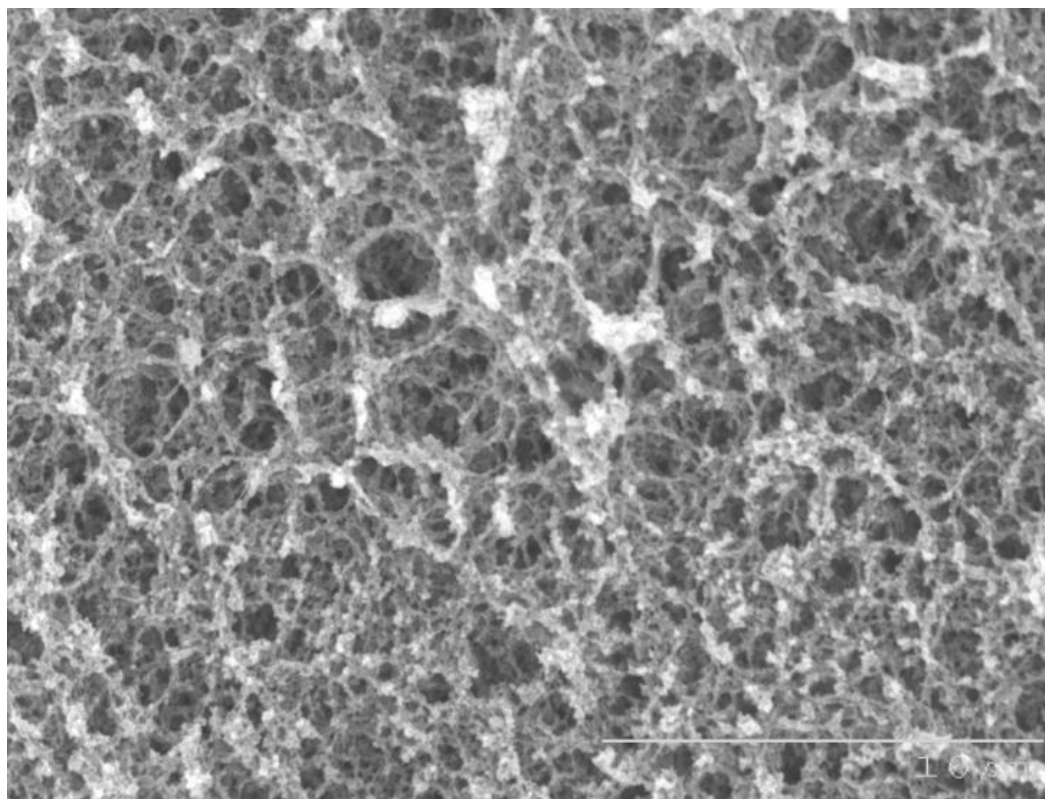


図 29 SEM 画像. 50°C で 24 hr 処理した後, GA 固定によって得られたサンプル.

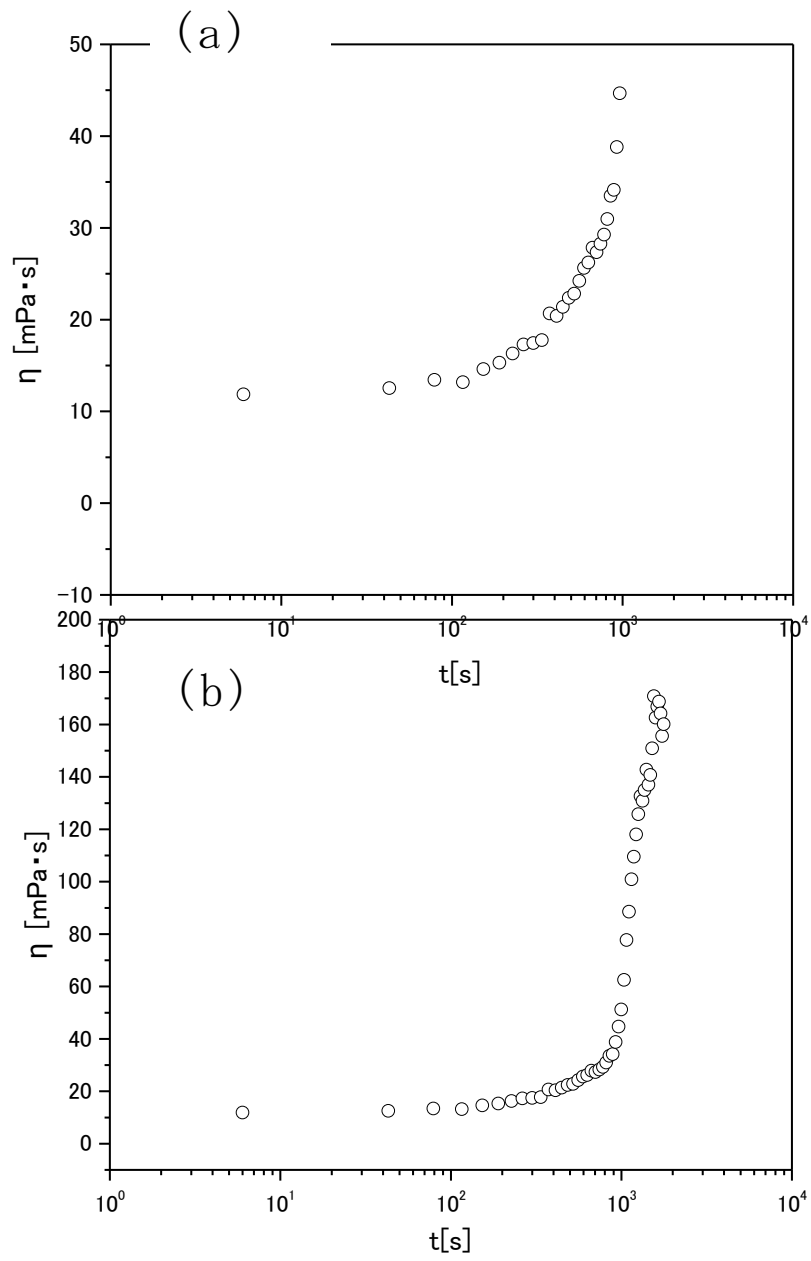


図 30 短時間領域での定常流粘度の上昇の様子．(a)が図 8 の 55℃のみのグラフ．(b)は粘度 50 mPa・s 未満のデータを拡大したグラフ．

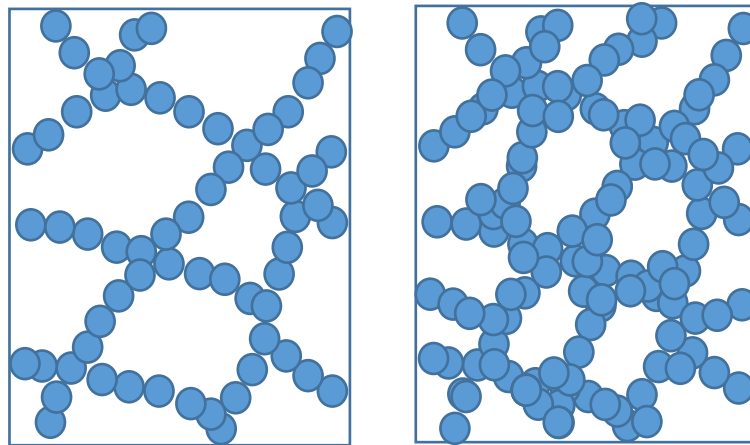


図 31 低温 (50~60°C) で形成されたゲル (左図) と 80°C で形成されたゲル (右図) の概念図. 右図の一般的な卵白ゲルに比べ, 左図の低温で形成されたゲルでは, 凝集に取り込まれた卵白タンパク質が少なく, 網目構造に隙間が多い.