

大豆たん白質と多糖類（ジェランガム）の共存系における 新規なCa誘導複合ゲルの形成とそのメカニズムの解析

中村 卓*・渡部幸一郎

明治大学農学部農芸化学科食品工学研究室

Analysis of Ca²⁺-induced Co-gelation of Soy Protein Isolate and Gellan Gum

Takashi NAKAMURA and Kouichiro WATABE

Food Engineering Laboratory Department of Agricultural Chemistry School of Agriculture
Meiji University, Kawasaki 214-8571

ABSTRACT

The Ca²⁺-induced co-gelation of Soy Protein Isolate (SPI) and Gellan Gum (Gellan) by heating-cooling process was investigated. The structural and mechanical properties of gels were analyzed by rheological instruments and some kind of microscope. In a large deformation test, the stress rupture strength of the co-gel was higher than that of the gel formed from SPI alone or Gellan alone. The fracture strain ratio of the co-gel was lower than that of the Gellan-gel. The structural features of gels at different length scales by using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM) were observed. Results obtained with CLSM, at the macro-scale, indicated the bicontinuous SPI and Gellan phases of the co-gel. Results obtained with SEM, at the meso-scale, indicated the interaction between SPI aggregates and Gellan strands at the phase boundaries of bicontinuous SPI/Gellan. The structural and viscoelastic properties of the coexistence solution of SPI and Gellan by heating-cooling in the gelling process were analyzed. After the first heating, the phase separation to SPI-rich and Gellan-rich occurred already. At low temperature with cooling, the separated Gellan phase was coarser. The viscosity of the coexistence solution after Ca²⁺-addition increased over the sum of SPI alone and Gellan alone. The Ca²⁺-induced co-gelation of SPI and Gellan induces the phase separation process that leads to the bicontinuous structure formation at both macro and meso level. Consequently, the co-gel shows novel properties which are different from the single component gel. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 63-69, 2009.

Key words :

* 〒214-8571 川崎市多摩区東三田1-1-1

食品の構造を形成するたん白質と多糖類はその高い機能特性からゲル状食品を始め、レトルト食品やインスタント食品など幅広い食品に用いられている^{1,2)}。これら食品の食感を予測・設計するためには両成分の構造形成と構造破壊の制御が不可欠となる。たん白質、多糖類は実際の食品において単独で用いられることはほとんどなく、併用されている場合が多い。そのためたん白質と多糖類の共存系については近年多くの研究がなされている³⁻⁵⁾。しかし、たん白質と多糖類の共存系において両成分の多くは熱力学的に相溶性がないことや、枯渴効果などで相分離を形成する⁶⁾。そのためたん白質と多糖類の単独ゲルの性質がそれぞれ足しあわされただけの性質を示すことや、両者のネットワークが阻害し合って単独ゲルより弱いゲルが形成されることもある^{7,8)}。よって成分間の相互作用や相乗効果は食品業界において興味を持たれている⁹⁾。また、これらの成分において新規なゲル構造が形成されれば新食感や望まれる食感の創造につながる可能性がある。そこで本研究ではたん白質-多糖類の相互作用による新たなゲルの形成を目指した。具体的な成分として、大豆たん白質とジェランガムによる注目した。

大豆たん白質は加熱変性後にCa²⁺やMg²⁺などの2価のカチオンもしくはグルコノデルタラクトン (GDL) などの酸を添加すると熱不可逆性のゲルを形成する¹⁰⁻¹⁵⁾。一方ジェランガムはPseudomonas elodeaが菌体外に産生する直鎖状多糖類の一種で²³⁾、単独でもゲル化するが、特にCa²⁺などの2価のカチオン存在下では強固で脆い熱不可逆性のゲルを形成する^{17,18)}。

このように大豆たん白質とジェランガムはCa²⁺などの2価のカチオンの存在下で熱不可逆性のゲルを形成する共通性質を有している。そこで、本研究では両者の共存系でCa²⁺を添加し、大豆たん白質とジェランガム間の相互作用による新規な複合構造を持つゲルの形成とその複合化メカニズムの解明を目的とした。

方 法

材料および試薬

分離大豆たん白質 (SPI) は不二製油株式会社より入手した。脱アシル型ジェランガム (Gellan) はケルコゲルを大日本住友製薬株式会社より入手した。試薬は、塩化カルシウム二水塩 (1級国産化学株式会社製)、ローダミンB (特級ナカライテスク製) を用いた。

ゲルの調整

ゲル形成時の加熱冷却の温度履歴とCa²⁺添加のタイミングをFig. 1に示した。最終濃度が6%大豆分離た

ん白質 (以下SPIと略記)、0.1%ジェランガム (以下Gellanと略記) 0.08%Ca²⁺濃度になるように調整した。

ゲルの破断試験測定

ゲルの破断試験はクリープメーター (RE2-33005S, 株式会社山電) と破断強度解析ソフトwindows Ver1.2を用いて行った。

ゲルの共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) 観察

加熱・冷却過程中的Ca²⁺添加直前にローダミンBを添加し、CLSM (LSM510, Carl Zeiss) で観察した。この際、ローダミンBの添加により破断試験結果に変化がないことを確認した。

フラクタル解析

CLSM画像におけるフラクタル次元の算出はボックスカウント法を応用したソフトfractal analysis system for windows Ver.3.4を用いた (<http://cse.naro.affrc.go.jp/sasaki/fractal/fractal.html>)。

ゲルの走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

ゲルをグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで2重固定した。エタノールで脱水後、臨界点乾燥装置 (JCPD-5 JEOL) を用いて乾燥させた。オスミウムプラズマオスミウムコーター (NL-OPC80N, 日本レーザ電子株式会社) を用い厚さ5 nmになるようにオスミウムを蒸着させた。電界放射走査型電子顕微鏡FE-SEM (JSM6700F, JEOL) により加速電圧3 kvで観察した。

加熱・冷却中の粘度測定

加熱・冷却中の粘度変化をRapid Visco Analyser (RVA) (RVA-4, Newport scientific) で測定した。RVAは攪拌しながら、加熱・冷却でき、同時に粘度測定をおこなう。RVAに溶液添加用チューブを取り付け、測定中にCaCl₂水溶液を添加した。攪拌速度は400 rpmで、温度変化はFig. 1に従った。

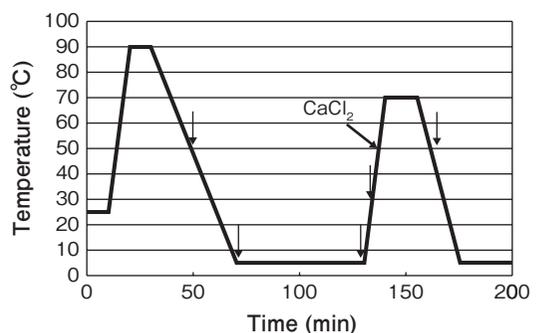


Fig. 1. Schematic diagram showing time/temperature processing protocol during gel formation.

加熱・冷却中のCLSM観察

高温溶液状態でのCLSM観察時には加熱直後の溶液をあらかじめ90温めておいたスライドガラス上に滴下し直ちに観察した。その他のCLSM観察条件はゲルと同様に行った。

加熱・冷却中の動的粘弾性測定

加熱・冷却中の動的粘弾性測定はレオメーター（AR-G2, TA instrument）と解析ソフト、レオロジーアドバンテージデータ分析Ver5.5.0を用いた。測定はひずみ1%、周波数1 Hzで、加熱冷却はFig. 1に従った。

結果と考察

共存（Mix）ゲルの形成とそのゲルの破断特性

加熱冷却の温度履歴はSPIの変性、Gellanの溶解を目的とした1段階目の加熱と、主にCa²⁺によるゲル化を目的とした2段階目の加熱からなる（Fig. 1）。2段階目の加熱後の冷却過程ではGellanがCa²⁺によりゲル化すると考えられる。Ca²⁺の添加タイミングはFig. 1中の矢印で示した計6点で添加したものを比較した。その中で均質なゲルが形成されたのは太い矢印で示した二回目の加熱時50℃で添加した場合だった。そのためCa²⁺の添加タイミングは二回目の加熱50℃の時点とした。また、Ca²⁺濃度0.04%未満ではゲルが形成されなかった。0.04%から0.12%までのCa²⁺濃度範囲で0.08%がもっともしっかりしたゲルを形成した。よってゲルのCa²⁺濃度は0.08%にすることとした。また、この濃度においてSPI、Gellanの単独ゲルでも均質なゲルが形成されたことを確認した。

ゲルの破断試験結果をFig. 2に示した。SPIゲルは歪

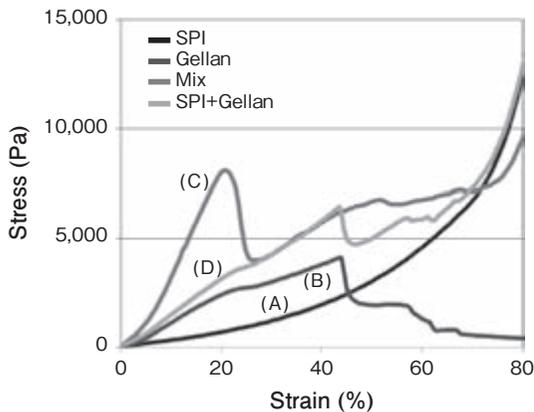


Fig. 2. Strain-Stress curves of gels. (A) SPI, (B) Gellan, (C) Mix, (D) SPI+Gellan on the graph.

率80%まで変形しても破断せず、歪を加えていくと応力が上昇した。また、Gellanゲルは歪率45%、応力4,000 Pa程度で破断し、破断後はさらに歪を与えても応力は上昇しなかった。一方、両者のMixゲルでは歪率10%以下の低歪領域で各単独ゲルの和よりも応力の傾きが大きく、歪率約20%、応力約8,000 Paで破断した。また、破断後もGellanゲルとは異なり応力の低下は見られなかった。

以上の様に破断試験測定において、両者の共存ゲルは各単独にはない新たな物性が得られたことが明らかとなった。Mixゲルの新規な物性はSPIとGellanの成分間相互作用や、ネットワーク密度の増加によって生じた可能性がある。

共存ゲルの構造

CLSMによるゲルの観察画像をFig. 3に示した。ローダミンで染色された部分を白で（赤）表示して、たん白質の存在を示している。

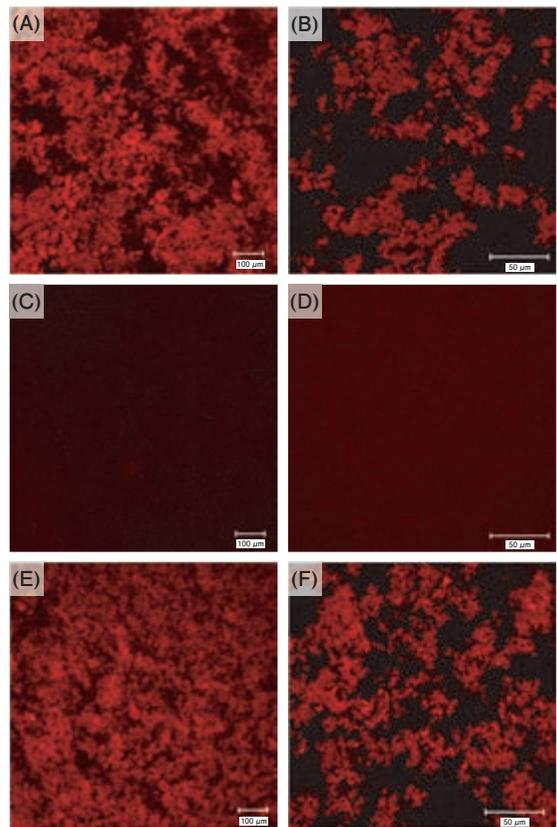


Fig. 3. CLSM images of gel. (A) SPI gel × 100, (B) SPI gel × 400, (C) Gellan gel × 100, (D) Gellan gel × 400, (E) Mix gel × 100, (F) Mix gel × 400. Scale bar = 100 μm (× 100), 50 μm (× 400)

SPIゲルはおよそ10 μm の粒子が50 μm 程度に凝集している構造が観察された。染色されていない部分はゲルネットワークの空隙であり、ネットワークに保持された水が存在していると考えられる。Gellanゲルにはたん白質が存在しないためローダミンで染色されず、CLSMでは構造が観察できなかった。一方、MixゲルはSPIゲルとほぼ同様のたん白質による凝集構造が観察された。そこで、SPIゲル、MixゲルのそれぞれのCLSM画像のフラクタル次元を求めた。CLSMの100倍観察画像におけるSPIゲルのフラクタル次元は2.60、Mixゲルでは2.61とほぼ同様の値を示した。このことよりSPIゲル、MixゲルではSPIの凝集の様子に違いはないと考えられる。ゲルのSEM観察の結果をFig. 4に示した。低倍率観察 (Fig. 4AB) ではSPIの凝集体によるネットワークとGellanと思われる構造の両方が観察され、それらは相分離していた。しかし、どちらの相とも連続的に繋がり、連続相となっていた。それぞれの相をメソスケールで観察するとGellan相ではGellanゲルと同様に繊維状のストランドからなるネットワークが観察された (Fig. 4E)。またGellan相にはSPIのたん白凝集体は確認されなかった。一方SPI相をメソスケールで観察するとSPIゲルと同様の凝集体ネットワークが観察されたが、SPI相には必ずGellan分子と思われる繊維状のストランドが観察され、SPIだけの単独のネットワークは観察されなかった (Fig. 4D)。SPI相に存在するGellanのストランドはSPIの100 nmの凝集体の間に入り込むように存在していた。また、Gellan相、SPI相の境界面でも互いのネットワークが相互に侵入していた (Fig. 4C)。このように、SPI

相や両相の境界面のようにネットワークが相互に侵入し、接している点において Ca^{2+} による架橋が形成されている可能性が考えられる。カゼイン-カラギーナン系では静電的相互作用で成分が複合化することが知られているが、SEMによる構造観察ではたん白質と多糖類が接している様子が観察され、本研究で観察された

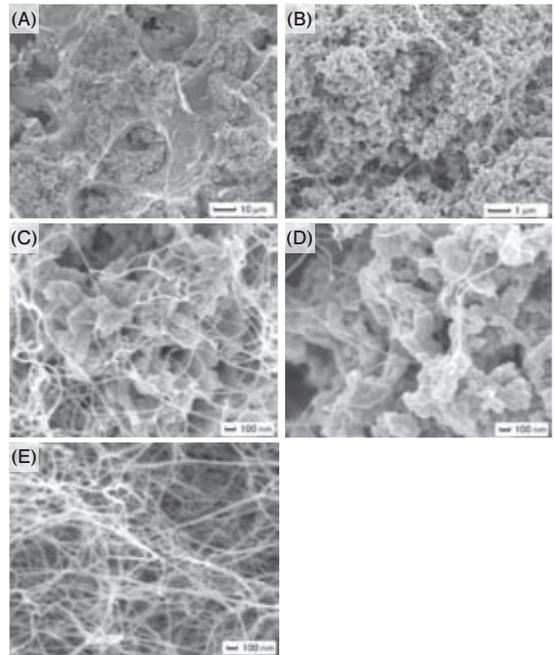


Fig. 4. Scanning electron micrographs of Mix gel. (A) $\times 1$ k, (B) $\times 10$ k, (C) Phase boundary $\times 50$ k, (D) SPI phase, $\times 50$ k, (E) Gellan phase $\times 50$ k.

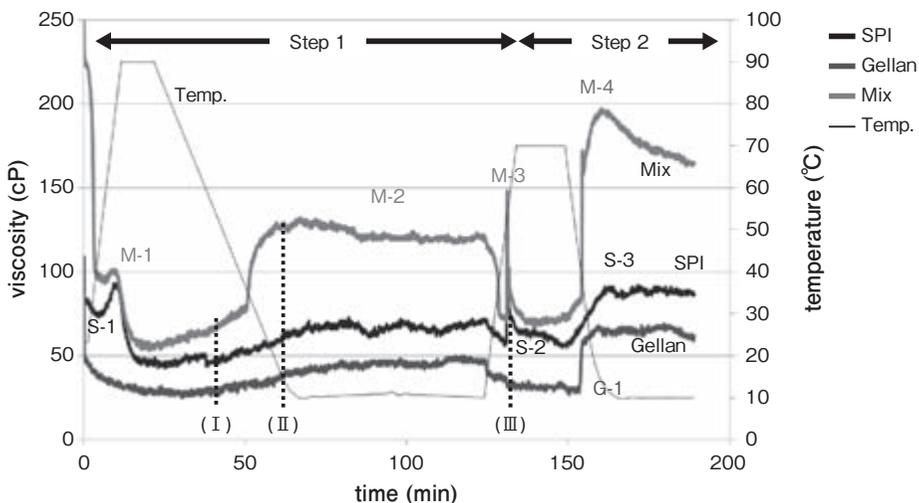


Fig. 5. Viscosity of SPI, Gellan and Mix in time-temperature history.

Mixゲルの界面構造と類似していた¹²⁻²¹⁾.

以上のように、MixゲルはSPI、Gellanゲルよりも強固なゲルを形成していることが明らかとなった。これはMixゲルにおいてSPI、Gellanがともに連続相を形成し、ゲル全体のネットワーク密度が増加したためだと考えられる。また、両相の界面やSPI相のメソスケールレベルにおいてSPIの100 nmの凝集体とGellanストランドが相互侵入構造を形成し、その点でのCa²⁺による成分間架橋がゲル強度に寄与した可能性もある。また、共存ゲルの破断歪率はGellanゲルよりも低下していた。共存ゲルはSPI相、Gellan相がマクロスケールレベルで相分離を生じるため、その界面が均質な単独相よりも破壊されやすく、より低歪率でゲルが破断したと考えられる。以上のように、連続相の形成、相分離、相互侵入構造といった構造面の変化が共存ゲルの物性に大きく寄与しているものと考えられる。

ゲル形成過程の粘度変化

Fig. 5にはゲル形成時の加熱・冷却中におけるゾル／ゲルの粘度変化を示した。Ca²⁺を添加するまでをStep 1、Ca²⁺添加後をStep 2とした。Fig. 5中のS-1などの表記は粘度増加が生じたときのサンプル名とピーク番号を示している。各ピークの数値化したものをTable 1に示した。Mixではゲル形成過程で4つの粘度増加が観測された(M-1～M-4)。M-2の粘度増加は1段階目の加熱後の冷却過程35℃で生じ、その後の冷却中は高粘度状態を保持していた。この温度での粘度変化はSPI、Gellanそれぞれ単独ではみられなかったものであり、成分を共存させることで生じた粘度増加である。M-4は2段階目の加熱後の冷却中に生じた。これはSPIとGellanそれぞれ単独で観測された粘度増加を足し合わせたような粘度増加であった。すなわち、SPIの緩やかな粘度増加とGellanの急激な粘度増加が同時に生じていた。しかし各単独成分の場合、粘度増加量はそれぞれSPIが34cP、Gellanが40cPであったのに対してMixでは123cPであった。各単独での粘度上昇を足し合わせた量よりも大きな粘度増加が生じているため、Ca²⁺を添加した後の冷却段階で両成分の相互作用が生じている可能性が示唆される。

共存溶液中の粘度変化と相分離の関係

Fig. 6はSPI、Mixの溶液状態でのCLSM画像を示している。SPI単独ではいずれの温度帯でも相分離していなかった。しかし、Mixでは相分離を形成していた。Mixでは温度が高い状態において、SPIに対して相分離したGellan相の大きさは約10μm程度であった(Fig. 6B, F)。低温では相分離構造は大きくなっていった(Fig. 6D)。Gellan単独の動的粘弾性変化を測定したところ、

冷却の31℃付近からG'、G''ともに上昇し、その後の冷却中は高い値を維持していた。Gellan分子は高温ではランダムコイルの状態で存在し、低温ではダブルヘリックス構造をとる²²⁾。またコイルからヘリックスに転移することでG'が増加することが知られてい

Table 1. RVA viscosity properties of SPI, Gellan and Mix

	Peak No.	To(°C)	Tp(°C)	Tc(°C)	ΔV(cP)
SPI	S-1	45.7	75.4	90.0	20
	S-2	51.5	52.5	70.0	76
	S-3	58.9	11.7	-	34
Gellan	G-1	43.4	16.1	-	40
	M-1	58.5	71.2	90.0	8
Mix	M-2	35.1	10.0	40.2	51
	M-3	52.2	53.0	70.0	74
	M-4	65.8	14.2	-	123

To: onset temperature, Tp: peak temperature, Tc: conclusion temperature, ΔV: (peak viscosity) - (onset viscosity).

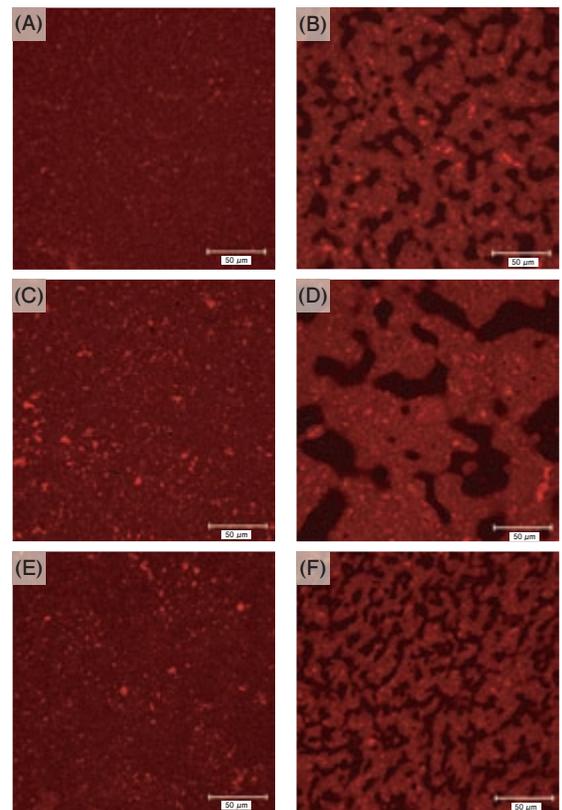


Fig. 6. CLSM images of SPI, Mix solution during thermal history. (A) SPI at (I) on Fig. 6, (B) Mix at (I), (C) SPI at (II), (D) Mix at (II), (E) SPI at (III), (F) Mix at (III). Scale bar=50 μm.

る^{23, 24)}。よって本実験でも冷却中の31℃でGellanのコイル／ヘリックス転移が生じたと考えられる。たん白質-多糖類共存系では多糖類のコイル／ヘリックス転移により多糖類の荷電密度が増加し、たん白質との相互作用や相の状態が変化することがある²⁵⁾。本研究で用いたSPI-Gellan共存系においても、Gellan分子がランダムコイル状態からダブルヘリックス状態になることによって、マイナスの荷電密度が増加すると考えられる。また、大豆たん白質の等電点は約4.8であるので溶液中ではたん白質もマイナス荷電を帯びていると考えられる²⁶⁾。そのため、静電的反発により枯渇効果が進行し、SPI相とGellan相の相分離がより進行したと考えられる。また、それにより各相の成分濃度が増加したため粘度が上昇したのではないかと推測される。

Mixでは2段階目の加熱後に再び相分離が細かい状

態へと戻った (Fig. 6F)。Gellanの動的粘弾性温度による変化の挙動から、これはGellan分子が再びランダムコイル状態に転移したため相分離が再び細かい状態に戻ったと考えられる。このとき、SPIに対して相分離を起こしたGellan相の大きさは10 μm 程度であった。一方、Fig. 3Fで示したMixゲルではSPI相、Gellan相ともに50 μm 程度で、溶液状態での相分離構造よりも大きかった。これは、Ca添加後、溶液状態のSPI連続相中でSPI加熱凝集体がさらに50 μm 程度にCa²⁺凝集し、高温でもGellanとの相分離がさらに進行したためと考えられる。またGellan相はSPIの連続的な凝集体が形成されてからSPI相の隙間にネットワークを形成し、どちらも連続相を形成し、結果としてより硬い物性を示すゲルとなったと考えられる。

要 約

共にCa²⁺でゲルを形成するSPIとGellanの共存ゲルを作成し、物性測定、構造観察を行った。破断試験では、MixゲルはSPIゲル、Gellanゲルよりもかたくなっていたがより低歪率で破断していた。CLSM (マクロレベル) およびSEM (メソレベル) による構造観察ではMixゲルではSPIのたん白質凝集体によるネットワーク、Gellanの多糖類繊維状ネットワークがともに連続相を形成し、マクロおよびメソレベル全体としての連続体ネットワーク量が増加していた。また、SPI相と両相の界面で両成分のネットワークが相互に侵入していた。この接している点において相互作用している可能性が示唆された。SPI、Gellan各単独および共存中の加熱冷却過程を解析した結果、共存では温度により相分離のサイズが変化し、更に各単独以上の粘度増加が生じた。つまり、Ca²⁺によるSPI-Gellan間の相互作用が形成されたと考えられる。以上の様に、SPI-Gellanの共存系で加熱冷却条件を選びCa²⁺を添加することで新規な物性をもつゲルが形成できた。マクロからメソレベルにおいて両成分の連続相の形成、相互侵入構造の形成、ネットワーク界面でのCa²⁺によるSPIとGellanの複合化といった構造的特徴が共存ゲルの物性に大きく寄与したと考えられる。

文 献

- 1) Utsumi S, Matsumura Y and Mori T, *Food Proteins and Their Applications* (1997): 257-291.
- 2) Dickinson E, *Food Hydrocolloids*, **17** (2003): 25-39.
- 3) Nishinari K, Zhang H and Ikeda S, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **5** (2000): 195-201.
- 4) Turgeon SL, Beaulieu M, Schmitt C and Sanchez C, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **8** (2003): 401-414.
- 5) Tolstoguzov V, *Food Hydrocolloids*, **17** (2003): 1-23.
- 6) Asakura S and Oosawa F, *Journal of Chemical Physics*, **22** (1954): 1255-1256.
- 7) Tuinier R, Rieger J and de Kruif CG, *Advances in Colloid and Interface Science*, **103** (2003): 1-31.
- 8) Gogelein C and Tuinier R, *European Physil Journal E*, **27** (2008): 171-184.
- 9) 三好恵真子, 吉村美紀 日本食品科学工学会誌, **45** (1998) : 73-82.
- 10) 森田雄平, 大豆たん白質, 光琳 (2000) : 1-11.
- 11) 吉村美紀, 内藤成弘, 長野隆男, 日本食品科学工学会誌, **54** (2007) : 143-151.
- 12) Hermansson AM, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **63** (1986): 658-666.

- 13) Utsumi S, Damodaran S and Kinsella JE, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32** (1984): 1406-1412.
- 14) Kohyama K and Nishinari K, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41** (1993): 8-14.
- 15) Kohyama K, Sano Y and Doi E, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43** (1995): 1808-1812.
- 16) 國崎直道, 佐野征夫, 食品多糖類, 幸書房 (2001): 154-167.
- 17) Tang JM, Tung MA and Zeng YY, *Journal of Food Science*, **60** (1995): 748-752.
- 18) Yuguchi Y, Urakawa H and Kajiwara K, *Food Hydrocolloids*, **16** (2002): 191-195.
- 19) Ji S, Corredig M and Goff HD, *Food Hydrocolloids*, **22** (2008): 56-64.
- 20) Martin AH, Goff HD, Smith A and Dalgleish DG, *Food Hydrocolloids*, **20** (2006): 817-824.
- 21) Spagnuolo PA, Dalgleish DG, Goff HD and Morris ER, *Food Hydrocolloids*, **19** (2005): 371-377.
- 22) Milas M and Rinaudo M, *Carbohydrate Polymers*, **30** (1996): 177-184.
- 23) Ikeda S, Nitta Y, Temsiripong T, Pongsawatmanit R and Nishinari K, *Food Hydrocolloids*, **18** (2004): 727-735.
- 24) Miyoshi E, Takaya T and Nishinari K, *Carbohydrate Polymers*, **30** (1996): 109-119.
- 25) Tolstoguzov VB, *Functional properties of food macromolecules*, Aspen publishers, Inc, (1998): 252-277.
- 26) Shen JL, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **24** (1976): 784-788.