

ゼラチンゲルのレオロジー的特性と分子量分布におよぼす pH の影響

加藤 和子

(平成9年10月2日受理)

The Effect of pH on the Rheological Properties and Molecular Weight Distribution of Gelatin Gels

Kazuko KATO

(Received on October 2, 1997)

緒 言

ゼラチンの語源は、ラテン語の *Gelate*(煮こごり)である。この語源どおり、ゼラチンは、動物の骨や皮など結合組織の主体となるタンパク質コラーゲンから主として抽出される誘導タンパク質であり、その特性はコラーゲンの特性と同様であることは明らかである。コラーゲンの基本単位となる分子は、アミノ酸が特異な配列順序により連結した鎖長10万のポリペプチド3本が螺旋状によじれ合うことにより、細長い棒状構造を保っている。しかし、ゼラチンは製法や原料などによって分子量は約1.5~30万という広範囲に不均質に分布する物質であり、ペプチド鎖が折り重なって球状分子、またはランダムコイル状となり親水性が大であり、その分散媒と分散質の境界が明確でない¹⁾。つまり、溶媒和の形をとることが他のタンパクゾルと異なり、加熱により急速に低分子化するといわれ、調理上注意すべき点である。ビーフシチュー、カレーなど硬い肉を柔らかくなるまで長時間煮込む調理では、コラーゲンのゼラチン化が起り、煮魚においても、煮汁が冷えてゼリー状になった煮こごりを得ることができる。これらの調理においては pH の異なる調味料が使用されており、各種調味料の pH によりゼラチンの分子構造の低分子化への影響が考えられる。ゼラチンゾルの加熱に伴う分子量の変化とレモン汁添加¹⁾、酸の加え方について²⁾の報告はあるが、ゼラチンの加熱に伴う低分子化におよぼす各 pH レベルで加熱した際の分子構造についての報告はあまり見られないと思われる。

る。

そこで、本研究はそのモデル実験として、常法によりゼラチンを調製し、pH を3, 5, 7, 9とし、加熱0分、沸騰直前、沸騰後の10, 20, 40, 60分加熱した場合のゼラチンゲルのテクスチャーと分子量を高速液体クロマトグラフィー(以下HPLCと記す)と電気泳動装置を用いて測定し、分子量分布におよぼす pH の影響について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料調製

ゼラチンは、原料、前処理、抽出条件などが明確な高分子アルカリ処理ゼラチン(新田ゼラチンK.K製)を使用し、2%ゾルとなるように調製した。500ml容のビーカーに粒状ゼラチン10gを4組秤量し、それぞれに蒸留水(以下水と記す)を200mlを加えて20分膨潤させた後、水を200mlずつ加えて湯煎にかけ、試料を40℃に保持し、定速で5分間攪拌し、pH 無調整(pH 6)と pH を3, 5, 7, 9に調整後、全量が500gとなるようにメスアップして、100mlのビーカー6組に分け、ビーカーごと300Wの電熱器にかけて、加熱0分、沸騰直前(90℃)、加熱10, 20, 40, 60分の各ゾルとし、次の3種の試料として調製した。

テクスチャー測定用試料: 2%濃度の各ゾルを直径3cmのペトリ皿に、高さが15mmになるように分注して、5℃の恒温水槽中に試料の高さの上端まで冷水が浸るように並べ、2時間冷却しゲル化させて用いた。

HPLC用試料: ゼラチン濃度が0.05%になるように各ゾルを希釈し、30℃に保持して用いた。

電気泳動用試料: 2%濃度の各ゾルを用いた。

2. テクスチャーの測定

レオロメーター(山電製, RE-3305)を用いて, 測定条件は, プランジャー: 11φ 感度電圧; 1.0V 測定歪率: 試料の高さをサンプル厚さ計(山電製, HC2-3305)を用いて測定し, その測定値の80% 運動回数: 2回試料台速度: 5mm/secとした. テクスチャー曲線の記録および解析は, 解析装置(山電製, CA-3305-16)を用いて, ベトリ皿に入れたままで硬さ, 凝集性, 付着性を測定した.

3. HPLCによる測定

HPLC装置(島津製作所製, LC-6A)を用い, 大野らの分析条件^{3), 4)}を参照して, 試料量: 0.05%ゾルを20μl注入 カラム: Asahipak GS-620M+GS-620H(7.6φ×350mm) 移動相; 0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.8) 流速: 1.0ml/min 検出: UV220nmで測定した. クロマトグラムの記録およびピーク面積の計算は, データ処理装置(日立製, D-2000)を用い, 標準物質を用いて, 標準物質による校正曲線より分子量を求めた河村らの方法⁵⁾を参照して行った.

4. 電気泳動による分析

スラブ型電気泳動装置(アト-K.K製, AE-6400)を用いて, Laemmli法⁶⁾に従って, 泳動試料3μlをプレート上に添加し分析した. ゲル濃度10.0%とし, 染色はクマジーブリアントブルーで行った.

5. pHの測定

pHメーター(堀場製作所製, F-22)を用いた.

結果および考察

1. pHの変化と加熱時間がおよぼすゼラチンゲルのテクスチャー特性値への影響

pH無調整, 3, 5, 7, 9に調製し, 加熱0分, 沸騰直前(90°C), 加熱10, 20, 40, 60分の各ゼラチンゾルを2時間冷却したゲルの硬さと凝集性, 付着性を図1~3に示した.

図1より, pH無調整, 5, 7, 9は, 加熱0分より, 沸騰直前の方がわずかに硬さを増した. これは, ゼラチン分子が加熱0分ではミセル状態が残っており, 沸騰直前では完全にゼラチン分子が水和化し, 分子間で密な架橋が形成されやすくなったためと考えられる. さらに, 加

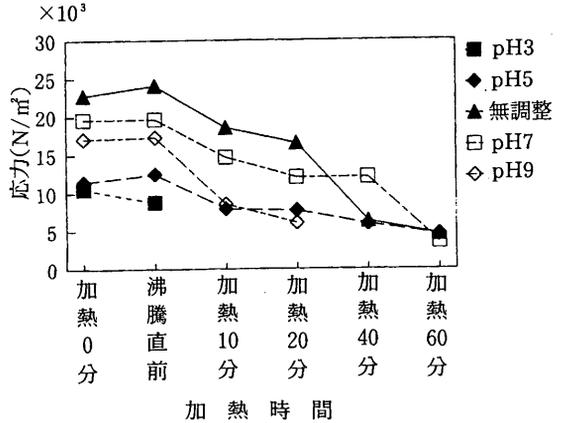


図1 pHの変化と加熱時間がおよぼす硬さの変化

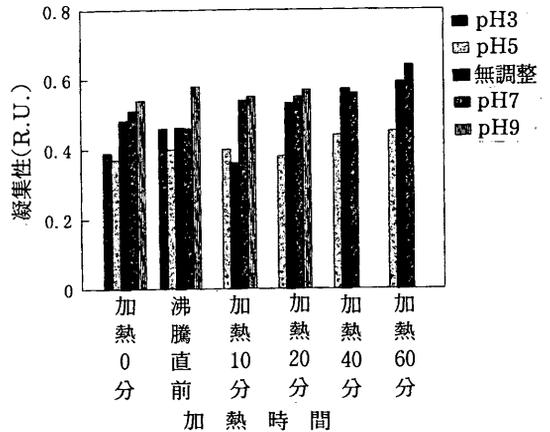


図2 pHの変化と加熱時間がおよぼす凝集性の変化

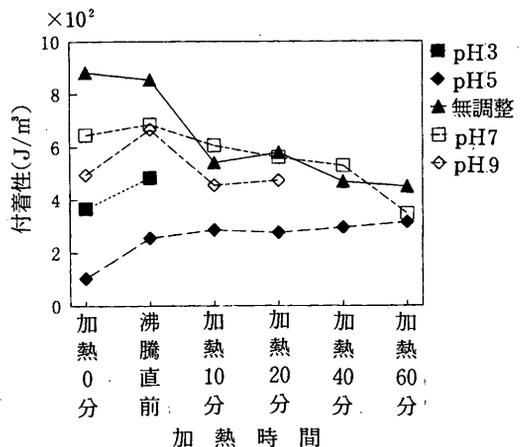


図3 pHの変化と加熱時間がおよぼす付着性の変化

熱時間の経過に伴い、沸騰直前以後いずれの pH においても硬さは減少した。pH 3 の試料は、沸騰直前ですでに硬さの値が低下し、加熱10分において測定不能となり、ゲル形成がみられなかった。これは、今回用いたゼラチンがアルカリ処理法ゼラチンであったために、pH が等電点より酸性側に移動し、分子の電荷が分子間の架橋を妨げたためと、酸による低分子化が原因⁵⁾であると考えられる。pH 9 も加熱20分で測定不能となり、ゲル形成がみられなかった。アルカリ側でも、アルカリによるゼラチン分子の低分子化が起こったと思われる。いずれの pH、加熱時間においても、無調整より硬さの値が低く、アルカリ性側より酸性側で沸騰直前までにその傾向は顕著にみられる。以上の結果より、硬さにおいて pH が変化することにより、硬さの値は低下し、さらに、加熱時間が長くなるほど、やわらかいゲルになることがわかった。

図2より、ゼラチンゲルの pH 5, 無調整, pH 7, 9 において、凝集性は加熱時間とともに上昇し、その後低下傾向を示し、その後さらに加熱を続けることにより値が上昇した。これは、沸騰直前までは分子間の水和が進み硬さが増し硬いゲルとなり凝集性は低下するが、加熱時間が進むにつれ、本実験ではペトリ皿に入れたままテクスチャーを測定したため、ゲル形成の低くなったゲルは割れることがなく、凝集性は再び高くなったと考えられる。また、アルカリ性側より酸性側の方が凝集性の値が低くなる傾向がみられた。

図3より、付着性は pH 無調整, pH 7, 9 のゲルにおいて、沸騰直前以後減少し、硬さの変化と同様の傾向を示し、pH 5 ではその値は低くなった。また、いずれの pH においても無調整より低い値となる傾向がみられた。

以上のレオロジー的特性値から、いずれの pH のゼラチンゲルにおいても、沸騰直前から加熱10分にゼラチンのゲル形成性の低下が著しく起こることが分かり、ゼラチンの分子構造が大きく変化したことが推察される。そこで、HPLCを用いてゼラチンゾルの分子量分布を測定した。

2. pH の変化と加熱時間による分子量の変化

HPLCを用いて、テクスチャーにおいて変化の大きくみられた pH 3, 5, 無調整, pH 7, 9 の沸騰直前, 加熱10分, 60分と無調整+加熱0分のゼラチンゾルの各クロマトグラムを図4に示した。

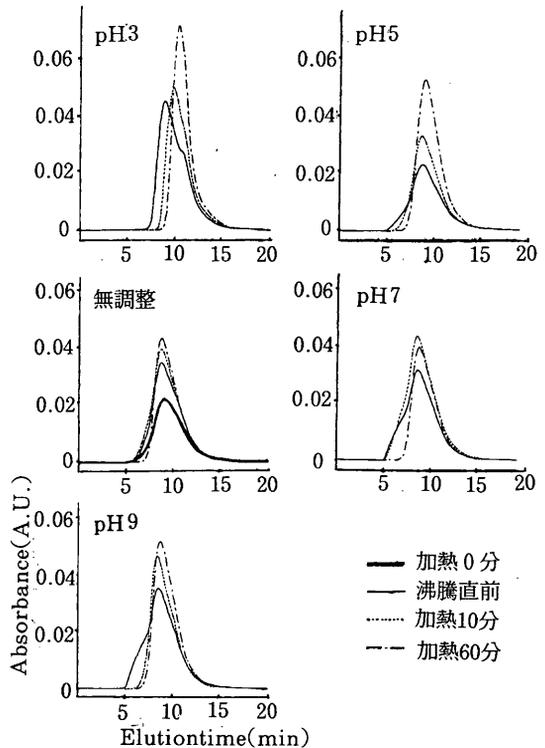


図4 pH における加熱に伴うゼラチンゾルの液体クロマトグラム

図4より、いずれの pH においても底辺の広い山形のピークで、加熱時間が進むにつれ溶出時間がわずかに遅れており、また、同量の試料を用いて検出したにもかかわらず、ピークの高さが異なって現れている。これは、本実験で用いたカラムでは排除限界に値する高分子が検出されず、流出時間約8分に低分子層が現れ、低分子化が進んだ試料ほど高いピークを示し、些少ではあるが溶出時間が遅れる結果になったといえる。HPLCによる分子量の分析の結果を標準物質(プルラン)による較正曲線より、分子量を求めるとメインピークの示す分子量は無調整+加熱0分(常法による調製)では約65,000であったが、溶出時間の差がはっきりとみられた pH 3は、沸騰直前には約55,000と低分子化され、さらに、加熱60分では約9,000となり、他の pH に比べ特に低分子化がみられる。

pH 3以外のピークはクロマトグラム上では接近しており、はっきりとした分子量分布の比較が困難であるため、さらに詳細に比較するために、電気泳動による分析を行った。

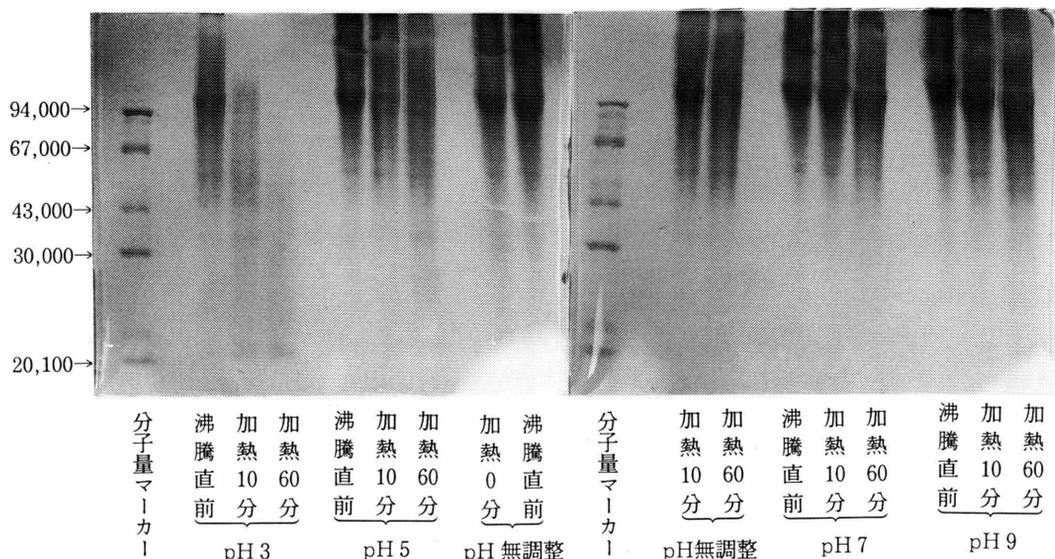


図5 pH と加熱時間の変化によるゼラチンゾルの電気泳動図

3. pH と加熱時間の変化によるゼラチンゾルの電気泳動分析

図5より、pH 無調整の試料区では、加熱0分、沸騰直前の加熱0分、沸騰直前の試料間では泳動バンドに差は見られないが、本実験での泳動ゾル中では泳動しない高分子が認められ、さらに分子量約94,000にバンドが1つ目視できた。しかし、加熱時間が長くなるほど高分子側のバンドがブロードに広がりを持ち、わずかに分子量約21,000まで認められる。pH 7, 9の試料区では、pH 無調整と同様に、分子量約94,000付近にバンドがひとつ見られ、加熱時間が長くなるほど泳動バンドが低分子側へとブロードに広がりを持ち、分子量約43,000以下においては泳動バンドがはっきり目視できない。しかし、pH 9-加熱60分では希薄ではあるが、分子量約21,000まで認められる。pH 5の試料区では、沸騰直前の試料においては、pH 無調整、pH 7, 9とほぼ変わらない泳動パターンを示すが、加熱時間が長くなるほど低分子側への広がりが比較的大きくなり、加熱60分においては高分子側の泳動バンドが減少していることがわかった。pH 3の試料区では、pH 3に調整して加熱をすることにより、他のpHとは異なった泳動パターンを示すことがわかった。つまり、沸騰直前の試料において分子量約94,000付

近に泳動バンドが確認されたものの、他のpHの沸騰直前と比較するとすでに低分子側への広がりが大きく見られた。さらに、加熱10分においては、全体的に泳動バンドが希薄となり、分子量約20,100付近にも泳動バンドが確認された。また、加熱60分では分子量約20,100付近にバンドが確認できるものの、泳動バンドがさらに希薄となり、ゼラチン分子のほとんどが低分子となり、泳動ゲル外へと流出したものと考えられる。

電気泳動による分子量分布の分析の結果からも、pHによる分子量の低分子化の影響が認められ、アルカリ性側より酸性側に低分子化が大きく認められた。さらに、それぞれpHにおいて、加熱時間に伴って分子量の低分子化が認められた。

以上の結果、各種のpH、特に酸性側でのゼラチンの分子構造の低分子化が確認され、調理上の実用上煮込み料理などによく用いる醤油(pH 4.8)、みりん(pH 5.2)、酒(pH 4.3)、ワイン(pH 3.0)、また食酢(pH 2.5)など酸性の調味料により、肉や魚のゼラチン成分は大きく影響を受け、長時間煮込むことにより低分子化が進み、シチューなどの肉がやわらかく、魚ではにこごりができやすくなる場合の、ゼラチン成分の分子構造をある程度確認できた。

要 約

pH によるゼラチンのレオロジー的特性と分子量分布への影響について検討した結果を要約すると次のようになる。

1. ゼラチンゲルの硬さは、pH 無調整、pH 5, 7, 9のいずれの場合も、沸騰直前以降漸時やわらかくなり、また、pH 3では加熱10分、pH 9では加熱20分でゲル化しなくなり、ゲル形成能は消失する。硬さの値は、pH を変化させると pH 無調整より低く、酸性側の方が顕著に低くなり、ゼラチン分子の低分子化が起りやすい。
2. ゼラチンゲルの凝集性は、いずれの pH においても加熱時間による硬さに伴い減少するが、本実験ではペトリ皿に入れたまま測定したため、ゲルが割れることがないために再び増加した。
3. ゼラチンゲルの付着性は、いずれの pH においても硬さと同様な傾向を示し、pH 無調整より低い値となる傾向がみられた。
4. HPLCによる分子量分布を比較すると、いずれの pH においても、加熱時間の経過に伴い低分子化した。さらに、pH はアルカリ性側より酸性側の方が顕著で、特に pH 3では大きくゼラチン分子の低分子化が起こった。
5. 電気泳動による分子量分布を比較すると、pH 無調整では泳動しない高分子と分子量約94,000にバンドが目視され、加熱時間とともに高分子側のバンドが広がりを持っていた。アルカリ側ではあまり差が認められなかったが、pH 9-加熱60分では希薄ではあるが、分子量約21,000まで認められた。しかし、酸性側特に pH 3では沸騰直前で他に比べ、すでに低分子側へ大きく広がりが見られた。加熱60分では分子量約20,100付近にバンドが確認され、泳動バンドが希薄となり、ゼラチン分子のほとんどが低分子化したと考えられる。

引用文献

- 1) 河村フジ子：東京家政大学研究紀要 29 145 (1989)
- 2) 河村フジ子, 高柳茂代, 森清美：家政学雑誌 27 329 (1976)
- 3) 大野隆司, 水沢伸也, 高井信治：千葉大学工学部研究報告 31 257 (1980)
- 4) 大野隆司, 小林裕幸, 水沢伸也：日本写真学会誌 47 237 (1984)
- 5) 河村フジ子, 高柳茂代：家政誌 41 825 (1990)
- 6) Laemmli, U. K. : Nature, 277, 680 (1970)