



種々の溶媒中での卵白アルブミンの熱的特性

桐山雅史*, 高田晃彦**, 占部美子**, 根本紀夫**

(平成9年1月12日受理)

Thermal Properties of Ovalbumin and Ovalbumin Gels in Various Solvents

Masafumi Kiriya*, Akihiko Takada**, Yoshiko Urabe** and Norio Nemoto**

(Received January 12, 1997)

In this study, we investigated thermal properties of native ovalbumin (OVA) solutions as well as gels prepared by high temperature heat treatment using differential scanning calorimetry (DSC). The denaturation temperature, t_d , and the heat of denaturation, ΔH , of native OVA in water were found to take a constant value of 75.0 °C and 890 kJ mol⁻¹ for OVA concentration C ranging from 5 to 58 wt %, respectively, whereas rising of t_d and a decrease in ΔH occurred with a further increase in C . Assumption of the closest packing for OVA with bound water at $C=58$ wt % gives that the amount of bound water on the OVA surface is 0.36 g per g of OVA with $C < 58$ wt % and decreases with increasing C . The thickness of the surface layer is then estimated as 0.36 nm for OVA sphere with the diameter of 5.6 nm. Aqueous OVA solutions with $C \geq 10$ wt % showed three exothermic peaks at around 140 °C, 170 °C and 220 °C, which may be related to transformation from the randomly aggregated state of OVA to stable gel network, to breakage of the S-S bond and to degradation of the protein itself, respectively. Circular dichroism measurement revealed that a decrease in α -helix content at around 80 °C was followed by decreases in the β -sheet and the β -turn contents at higher temperature, which indicate that changes in the secondary structure of OVA play a deterministic role for gel formation in the temperature range of 100–140 °C and for subsequent transformation to the random coil form before degradation starts at 200 °C. Two organic solvents, glycerin and ethylene glycol, and their water mixtures were used as solvent to study the effect of hydrophobicity on thermal behaviour of OVA. Quite complicated changes in t_d and ΔH with mixing ratio were observed, and ethylene glycol was found to interact more strongly with native OVA than glycerin did.

1. はじめに

生きている動植物の組織中に存在するタンパク質は酵素機能などさまざまな生理活性を有し、天然タンパク質 (na-

tive protein) とよばれる。天然タンパク質分子は周囲の環境の変化に敏感に対応し安定化をはかろうとするため、pH変化、熱、圧力また変性剤により生理活性を失うことが知られている¹⁻³⁾。この過程を総称して、タンパク質の変性と

* 九州大学大学院総合理工学研究科：〒816 福岡県春日市春日公園6-1

** 九州大学工学部応用理学教室：〒812-81 福岡市東区箱崎6-10-1

* Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University, Kasugakoen, Kasuga 816, Japan

** Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-81, Japan

いい、この変性過程により固有の高次構造が破壊されたタンパク質を変性タンパク質 (denatured protein) という⁴⁾。周囲の環境を変化させる1つの方法としてタンパク質を加熱すると、水溶液中では40～80℃で変性し、 α -helixの1部分がほどけることが報告されている⁵⁾。

ゲルが形成されるような高濃度において、変性後のタンパク質の会合挙動はタンパク質の形態によって大きく2種類に分類することができる。一方はcollagenやmyosinのような繊維状タンパク質であり、他方はlysozymeやcereal proteinのような球状タンパク質である。前者の繊維状タンパク質は変性させた後、冷却することによってゲルを形成することが知られている。いわゆる、cold-set gelとよばれるものである。前者とは対照的に、後者の球状タンパク質は変性後直ちにゲルを形成する、heat-set gelである。変性タンパク質は1つの分子としての構造変化の後、分子間相互作用により会合を進行する。繊維状タンパク質の場合、水素結合により3次元網目構造を形成しゲル形成を生じさせることが解明されている⁶⁾。一方球状タンパク質のゲル形成機構は、変性の際に球状を維持したまま露出した疎水部位同士の会合によりゲルが形成されるといわれているが⁷⁾、変性タンパク質がどのように、かつなぜゲルを形成するのかということについて確固たる結論は得られていない。

近年、土井らは球状タンパク質を高温熱変性させ、成形加工技術を用いることにより均一透明なゲルを得ることに成功し注目を浴びている^{8, 9)}。例えば、卵白アルブミンは385のアミノ酸残基から構成されている、分子量が46,000、直径が5.6 nmの球状タンパク質であるが¹⁰⁻¹²⁾、この卵白アルブミンを水に溶解させ80℃で加熱すると白濁ゲルが生じ、一方160℃ 5分間熱処理を施すと、均一透明なゲルとなることを報告している。現在ではこの高温熱変性処理により形成された卵白アルブミンゲルのゲル構造がレオロジー的な手段等を用いて明らかとなってきた¹³⁾。中村らはさらに、15～45 wt %の卵白アルブミン濃度範囲で160℃ 5分間熱処理し得られたゲル試料の直接観察を試みており、卵白アルブミンの直径が5.6 nmにもかかわらず、直径が20～40 nm程度の球状会合体が更に会合した2段階会合によるゲル構造が形成されている可能性を示した結果を得ている¹⁴⁾。彼らの結果は160℃ 5分間という特殊な条件下で作製された試料のゲル構造についての知見を報告するものであり、昇温過程時におけるゲル形成温度以上のゲルの構造ならびに卵白アルブミン分子の構造の変化についての知見は皆無に等しい。

一般に、多糖および繊維状タンパク質などの生体高分子のゲル形成は分子配列秩序性が無秩序であるゾルから秩序性が生み出されることにより生じる1次の相転移を通じて進行するとみなされている¹⁵⁾。ゲル融解も同様に1次の相

転移とされ、ゲル形成およびゾル-ゲル転移点近傍ではそれぞれゲル形成およびゲル融解エンタルピーが観測されるとされている。したがって、昇温過程時におけるゲル形成およびゲルからゾルへの変化を示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry) (DSC) を用いて熱量変化として観測することは有効な手段であると思われる。

本研究では、ゲル形成物性を示す球状タンパク質の1種である卵白アルブミン高純度試料を用い、昇温過程時における温度変化に伴うゲルの性質、卵白アルブミン分子の構造の変化を明らかにすることを目的とした。室温で蒸留水に混合させた卵白アルブミン試料および熱処理により形成したゲルについて、示差走査熱量測定 (DSC) を用いて室温から225℃まで広い温度範囲にわたり熱的特性を評価し、温度上昇とともに変化する卵白アルブミンのゲル構造および卵白アルブミン分子の2次構造を粘弾性測定、円偏光二色性測定 (CD) をそれぞれ用いて評価した。また、現在まで大部分の研究は水溶媒を用いてなされているが、heat-set gel においては熱変性に伴う疎水性部位の会合が本質である点に着目すると、有機溶媒を用いることにより熱的性質が大きく変化することが予想される。卵白アルブミン濃度を一定とし、グリセリンおよびエチレングリコールと水との混合溶媒の混合比を変化させ作製した試料の熱的特性をDSCを用いて評価した。

2. 実 験

2.1 試料

実験で用いた卵白アルブミン (以下OVAと略記) は、新鮮な鶏卵白からアンモニウム結晶化を繰り返す方法を用いて精製した白色ペースト状結晶を、0.02% Na₂CO₃ および0.1 mM EDTAを含む蒸留水中で透析後、凍結乾燥して得られた白色パウダー状結晶である¹⁶⁾。この白色パウダー状OVA結晶を溶媒に混合した試料を未変性OVA試料、また未変性OVA試料を高温熱処理して得られた試料を変性OVA試料として用いた。溶媒には蒸留水、および水とエチレングリコール (キシダ化学製特級、純度99.5%以上)、水とグリセリン (キシダ化学製特級、純度99%以上)の混合溶媒を用いた。溶媒に水を用いた場合、OVA濃度50 wt %以上の試料は水溶媒に完全には溶解しなかったため、OVA濃度55 wt %以上の高濃度試料はOVA濃度45 wt %の水溶液試料を放置し、自然乾燥させることにより得た (放置自然乾燥時間は55 wt %試料では約30分、75 wt %試料では約2時間、91 wt %試料では約半日)。水と有機溶媒の混合溶媒を用いて試料調製をおこなった場合、OVA濃度が15 wt %のとき、混合溶媒の水含率が約20%以下では未変性OVA未変性試料は懸濁液となり、それ以上では溶液となった。

変性OVA試料は、真鍮製の直径1 cm、高さ2 cmの円筒

型成形金型に未変性OVA試料を注入した後、金型の両端をシリコンゴムで栓をし、一定の温度に保ったオイルバス中で加熱後直ちに水道水で1分間急冷する方法を用いることにより作製した。

2.2 測定方法

DSC測定には熱流束型示差走査熱量計DSC8240B（理学電機製）を制御・記録装置TAS-100と組み合わせて使用した。温度および熱量較正は標準試料In（99.999%以上）を用いておこなった。試料をステンレス製密閉試料容器（セイコー電子工業製）に入れ測定をおこなった。昇温速度として $2\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ を採用し、温度範囲 $40\sim 225^\circ\text{C}$ で測定した。試料を測定して得られたDSC曲線から溶媒のみを測定したDSC曲線を減算し処理することにより、溶媒の蒸発および溶媒と試料容器の反応の影響を消去した。

動的粘弾性測定には、ストレス制御式レオメーターCSL100（Carri-MED製）を用いた。測定温度は $25.0\pm 0.1^\circ\text{C}$ で、加えたずり歪みは0.01とした。本実験では、OVA濃度を15 wt %に固定し、直径1 cm、高さ約0.6 cmの円筒形熱変性ゲル試料を用いた。角周波数 $\omega = 0.07\sim 68.2\text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ の領域で、貯蔵ずり弾性率 $G'(\omega)$ 、損失ずり弾性率 $G''(\omega)$ を測定した。

CD測定には、J-700（Jasco製）を用い、雰囲気 N_2 下で測定をおこなった。構成アミノ酸残基数385と分子量46,000より計算した、平均残基分子量119を用いて平均残基楕円率 $[\theta]$ を求めた。試料にはOVA濃度が0.01 wt %である未変性試料を用いた。試料厚みは1 mmを採用した。測定は 25°C でおこなった。

3. 結果ならびに考察

3.1 OVA/水系

3.1.1 OVA/水試料のDSC測定

溶媒に水を用い、OVA濃度を5～99 wt %に変化させ作製した未変性OVA試料の昇温過程でのDSC曲線をFig. 1 (a), (b)に示す。また、OVA濃度15 wt %の未変性OVA試料のDSC曲線の5倍拡大図とベースラインをFig. 2に示す。 80°C 付近に吸熱が、 $115\sim 180^\circ\text{C}$ に複雑な熱挙動が、 200°C 付近には発熱が存在した。 $2\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ の昇温過程において、OVA濃度が10 wt %以上の試料では、約 80°C 以上でゾルからゲルに、さらに 180°C 付近以上でゲルからゾルに変化することを確認した。それぞれの熱挙動についての詳細は3.1.3項以下で述べる。種々の熱挙動の可逆性を確認するために、Fig. 3にOVA濃度45 wt %の水溶液を熱処理して作製した試料のDSC曲線を示す。それぞれの熱挙動がみられる温度より高温で熱処理をおこなった試料には、その熱挙動が消失している。したがって、DSC測定で観測された全熱挙動は不可逆であることが確認された。

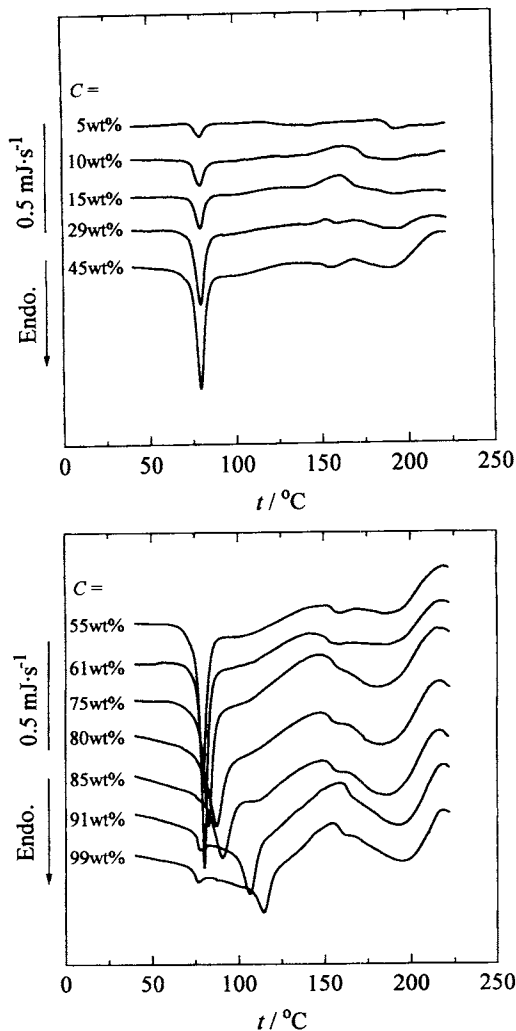


Fig. 1 (a) DSC heating curves for OVA/water solutions. OVA concentration $C = 5\sim 45\text{ wt}\%$.
(b) DSC heating curves for OVA/water solutions. OVA concentration $C = 55\sim 99\text{ wt}\%$.

3.1.2 試料作製熱処理温度に対するOVA分子の2次構造の変化

80°C 付近においてOVA分子の α -helixの1部分がほどけることは知られているが、さらに高温でOVA分子の2次構造がどのように変化するか知られていないため、昇温過程時においてどのようなゲル構造の変化が存在するのか考察する以前に、OVA分子の構造変化について観測する必要がある。ゾルからゲルへの変化の際だけではなくゲルからゾルへの変化の際にも、OVA分子の2次構造が変化しているのではないかと予想される。OVA分子の2次構造の割合の

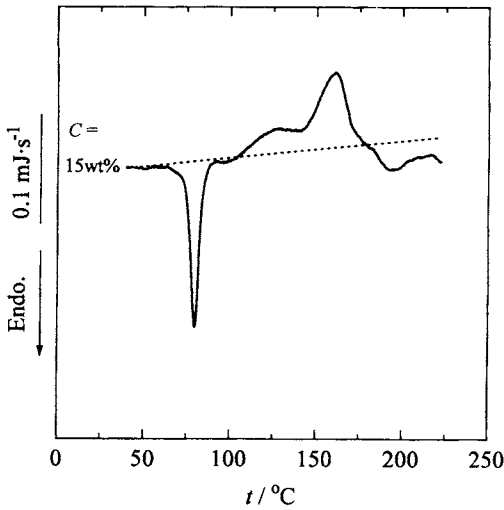


Fig.2 Enlarged DSC curve for the 15 wt % OVA/water solution. A dotted line is one drawn as the base line for an estimate of ΔH .

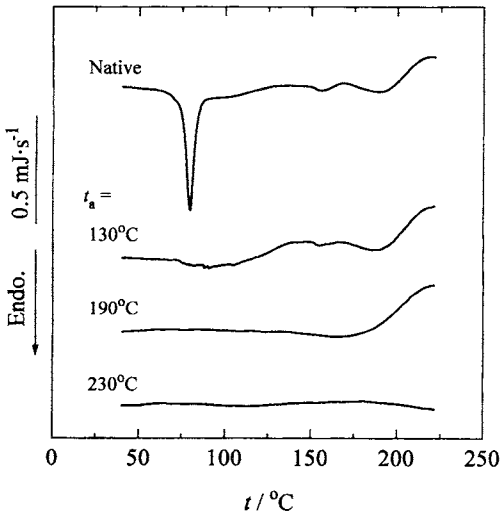


Fig.3 DSC heating curves for 45 wt % OVA/water solutions and gel prepared at various temperatures t_a as indicated in the figure. Heating time = 10 min.

変化を調べるため、熱処理温度を変化させ作製した試料を用いて得られたCD曲線をFig.4に示す。CD曲線の解析法は、Changら^{17,18)}が15種類のタンパク質から計算した α -helix, β -sheet, β -turn, unordered formがそれぞれ100%の場合のCD曲線を用い、測定で得られた曲線に最も近くな

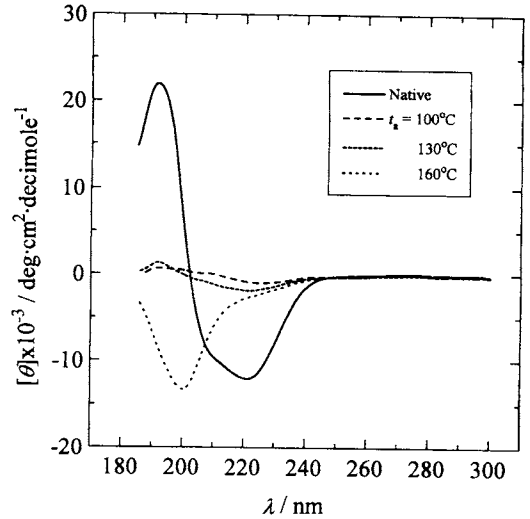


Fig.4 CD spectra of 0.01 wt % OVA/water solutions after heat treatment at various temperatures t_a as indicated in the figure. Heating time = 30 min. λ is the wave length.

Table 1 Changes in secondary structure by heat treatment calculated from CD spectra.

	fractions of secondary structure			
	α -helix	β -sheet	β -turn	unordered
native	0.45	0.15	0.15	0.25
heated at 100°C ^a	0.15	0.25	0.15	0.45
heated at 130°C ^a	0.15	0.25	0.15	0.45
heated at 160°C ^a	0.1	0.1	0.1	0.7

^a CD spectrum was measured in a cell holder at 25°C after aqueous OVA solution was heated for 30 min at each temperature.

るように合成、その係数の比により2次構造の割合を概算する方法を採択した。CD曲線は2次構造の割合以外の種々の因子にも依存することが知られており、また2次構造を上記4種類に限定区分して計算をおこなうこと自体、問題点が含まれていると思われる。実際、計算曲線と実験で得られた曲線の間にはよい一致はみられなかった。しかしながら、あらいフィッティングであるにもかかわらず、熱処理温度の変化に対する2次構造の変化の傾向が現れた。得られた2次構造の割合をTable 1に示す。

100°C 30分間熱処理したOVA分子は未変性OVA分子に比べ α -helix含量が約45%から約15%まで減少し、さらに160°C 30分間熱処理したOVA分子では β -sheet, β -turn含量も減少しunordered form含量が増加することが明らかに

Table 2 Values of onset temperature t_d and the enthalpy of thermal denaturation ΔH for OVA in water.

OVA concentration / wt%	t_d / °C	ΔH / kJ·mol ⁻¹
5	75.0±0.1	890±10
10	74.9±0.1	870±10
15	74.9±0.1	880±10
29	74.9±0.1	900±10
45	75.0±0.1	890±10
55	75.1±0.1	910±10
61	76.4±0.1	830±10
75	77.7±0.1	690±10
80	79.1±0.2	620±20
85	82.0±0.3	580±20
91	95.0±0.5	540±30
99	106.3±1.2	460±40

なった。CD測定には加熱後、25℃に冷却した試料を用いておこなっているため、加熱時にはunordered formは得られた結果以上に存在すると思われる、160℃ 30分間熱処理した直後ではOVA分子はランダムコイル形態に近い構造に変化していると思われる。これらの結果より、ゲル形成にはOVA分子の熱変性が必要であることが確認され、屈曲性鎖形態とはならず球状構造をほぼ維持したままゲル化が進行することが確認された。予備実験として、ゲルが形成される高濃度試料において、160℃ 30分間熱処理をおこなうとゲルからゾルへと変化する結果をすでに得ており、この結果を付け合わせると、ゲルが形成される高濃度試料でゲルからゾルへ変化する熱処理温度、時間に対応する試料作製法では、OVA分子が屈曲性鎖形態に近い形態に変化することが明らかとなった。

3.1.3 80℃付近での吸熱挙動

Fig.1で観測された80℃付近の吸熱に着目する。この吸熱の立ち上がり温度 t_d とエンタルピー ΔH をOVA濃度に対してFig.5にプロットし、数値をTable 2に示す。OVA濃度58%以下では、 ΔH と t_d は、それぞれ890 kJ·mol⁻¹、75.0℃の一定値を示した。一方、OVA濃度58 wt %以上では、OVA濃度の増加に伴い ΔH の減少と t_d の上昇がみられた。この結果を水和状態でのOVAの最密充填の効果と考え、水和状態においてOVA濃度が58 wt %のとき最密充填状態になるように結合水量を計算した。結合水量は0.36 g·OVA·g⁻¹となり他の測定法の結果とほぼ一致した¹⁹⁻²²⁾。OVAを直径5.6 nmの球とすると、この状態における水和層の厚さは0.36 nmと見積もられ、OVA濃度が58 wt %以下の状態では、変性の際に0.36 nmの厚さをもつOVA表面の水（結合水）とOVAの相互作用しか寄与していないと考

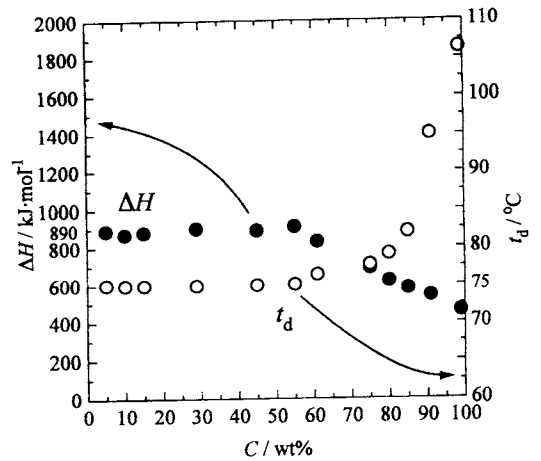


Fig.5 The denaturation temperature of OVA, t_d (○) and the corresponding enthalpy change, ΔH (●) as a function of the OVA concentration C .

えることができる。OVA濃度が58 wt %以上の状態では、OVA分子が十分に水和されていない状態にあると考えられ、脱水和量の減少により ΔH の減少が、結晶構造に近い構造を取らざるをえないことにより t_d の上昇が観測されたと思われる。OVA濃度58 wt %以上の状態において、さらにOVA濃度が増加するにつれ各OVA分子に結合している結合水量の分布は広くなると考えられ、その結果OVA濃度が増加するにつれ吸熱ピークは相対的にブロードとなっている。91 wt %, 99 wt %のような極めて高いOVA濃度試料では2つの吸熱ピークが存在し、低温側での小さな吸熱ピークの t_d は低濃度における水系OVAの t_d とほぼ等しく、高温側でのピークは30℃以上もシフトする結果となった。

3.1.4 200℃付近での発熱挙動

200℃付近の発熱は200℃を越えて熱処理した試料が茶褐色で強い異臭を放つことより、OVAタンパク質自身の分解により生じたものであることがわかった。生体高分子系が200℃付近で熱分解するというよく知られている結果とは矛盾しない。

3.1.5 115～180℃付近での熱挙動

115～180℃に存在する熱挙動は非常に複雑にみえ、またOVA濃度の変化に対して熱挙動が低温もしくは高温側にシフトしているような傾向がみうけられる。定性的には、まず115℃付近から立ち上がりをみせ、140℃付近にピークをもつブロードな発熱が存在する。この発熱の高温側には、140℃付近から立ち上がり、170℃付近にピークをもつ発熱が存在し、さらに高温側に吸熱挙動が存在した。したがってこの部分の複雑な熱挙動は、2つの発熱挙動と1つの吸熱挙動が組み合わさったものであると考えられる。

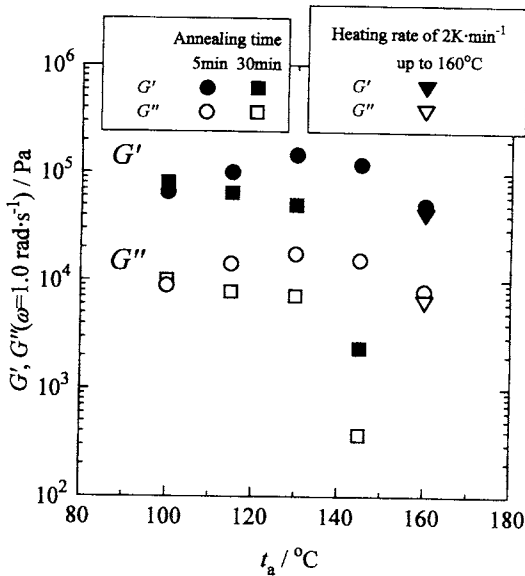


Fig.6 Changes in the storage and loss shear moduli, G' (●, ■, ▼) and G'' (○, □, ▽) at $\omega = 1.0 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ with temperature t_a at which gel samples were prepared. Symbols are (●, ○): annealed for = 5 min, (■, □): annealed for = 30 min, (▼, ▽): with heated up to 160 °C with heating rate of $2 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$.

115 °C付近から立ち上がりを見せ、140 °C付近にピークをもつブロードな発熱は、OVA 濃度 5 wt % の試料には存在せず、ゲルが形成される OVA 濃度 10 wt % 以上の試料で観測されるものであった。したがって、低温側に存在するこの発熱挙動は OVA のゲル化の過程と関係づけられると思われる。OVA 濃度が 15 wt % の試料について限定し、熱処理温度を変化させて得られた試料についての動的粘弾性測定結果とあわせてさらに検討を試みた。全試料について G' 、 G'' の周波数に対する変化は同傾向にあり、測定温度は 25 °C と一定であるので、各々の試料について $\omega = 1.0 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ の値を用いて比較することができる。昇温速度 $2 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ で室温から 160 °C まで加熱しその後急冷した試料と 160 °C 5 分間熱処理した試料では、ゲルを特徴づける巨視的物性である G' 、 G'' いずれもほぼ同程度の値を示す結果が得られた。巨視的な物性の観点においては、熱処理時間 5 分間の試料の熱処理温度は DSC の測定温度に対応すると仮定してもそれほど誤りではないであろう。熱処理時間を 5 分間ならびに 30 分間に固定し、熱処理温度を変化させて作製した試料の G' 、 G'' を Fig.6 に示す。

熱処理時間が 5 分間の試料の G' 、 G'' は 130 °C 付近で極大

をとる傾向を示しており、DSC 測定により観測された 115 ~ 140 °C 付近の発熱が弾性率の上昇に対応していることがわかる。すなわち、ゲル形成の初期段階の構造からエネルギー的に安定な状態へ変化していく過程における発熱と思われる。

OVA 濃度 45 wt % の未変性 OVA 試料を 100 °C 5 分間熱処理して作製した試料は白濁ゲルであったが、さらに同白濁ゲル試料を 130 °C で熱処理すると透明なゲルに変化した。土井らは、球状タンパク質の不透明ゲルは、塊状の凝集体が形成されこの塊が寄り集まって隙間の多い網目構造を形成した random-aggregate モデル状のゲル構造からなると説明している²³⁾。random-aggregate モデル状のゲル構造をゲル形成初期段階として、さらに安定な状態へ OVA 分子が再配列し、新たな何らかの構造に変化することにより生じる発熱が 115 ~ 140 °C 付近に存在すると考えられる。

160 °C で 5 分間加熱した試料は依然として透明なゲルの状態であったが、180 °C で 5 分間加熱した試料は独特の硫黄誘導体のおいをもつ黄色ゾル状に変化していたことより、140 °C 付近から立ち上がりを見せ 170 °C 付近にピークをもつ発熱は S-S 結合が切断されて S が遊離したことにより生じたと考えられる。その後ゲルからゾルへ変化することおよび β -sheet の崩壊等により吸熱が観測されたと思われる。

以上の結果は DSC の昇温速度が $2 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ のときの結果である。例えば Fig.6 に示すように熱処理時間を 30 分間で試料作製をおこなうと、熱処理温度 100 °C の試料は熱処理時間が增加するにつれ G' 、 G'' は増加するが、熱処理温度 115 °C 以上ではすべて、熱処理時間の増加とともに G' 、 G'' は減少する結果が得られた。この結果は、115 ~ 160 °C の温度範囲ではゲル形成変化とゲルからゾルへの変化の競合がおこっていることを示唆するものであり、DSC 曲線が DSC の昇温時間に依存することをも示していることに注意しなければならない。

3.2 OVA/混合溶媒系 (溶媒効果)

予備実験として、水以外の種々の有機溶媒を用い加熱をおこなったところ、エチレングリコールとグリセリンを溶媒に用いたときのみゲルが得られたため、水とエチレングリコール、水とグリセリンの混合溶媒を用い溶媒効果について検討をおこなった。上記混合溶媒を用い 160 °C 5 分間加熱処理により得られたゲルの粘弾性挙動がすでにわかっている OVA 濃度 15 wt % で¹⁴⁾、混合溶媒中の水と有機溶媒の混合比を変化させて作製した未変性 OVA 試料の DSC 測定をおこなった。

水とグリセリンとの混合溶媒を用いた未変性試料の DSC 測定の結果を Fig.7 に示す。140 ~ 180 °C 付近の熱挙動が水含量の増加に伴い高温側にシフトした。80 °C 付近の吸熱の立ち上がり温度 t_d とエンタルピー ΔH を混合溶媒中の水含

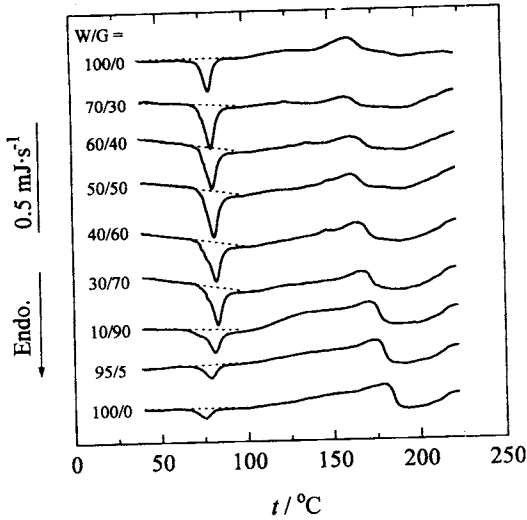


Fig.7 DSC heating curves for solutions and suspensions of OVA in mixed solvents of water (W) and glycerin (G) with various mixing ratios as indicated in the figure. ΔH is estimated using a dotted line as base line drawn in each curve.

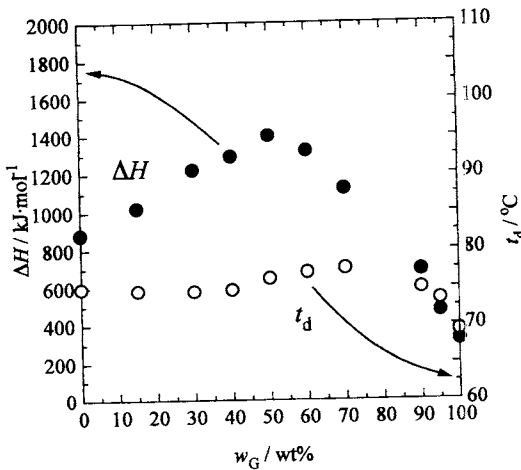


Fig.8 The denaturation temperature of OVA, t_d (○) and the corresponding enthalpy change, ΔH (●) as a function of glycerin content in mixed solvents w_G by wt %.

量に対して Fig.8 にプロットし、Table 3 (a) に数値を示す。低グリセリン含率の試料においては t_d はほぼ一定であったが、グリセリン含率 70 wt % までグリセリン含率が増加するにつれ t_d は緩やかに上昇した。さらに高いグリセリン含率

Table 3 Values of onset temperature t_d and the enthalpy of thermal denaturation ΔH for OVA in mixed solvents.

(a) 15 wt% OVA in water and glycerin mixtures.

water / glycerin	$t_d / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
100 / 0	74.9 ± 0.1	880 ± 10
85 / 15	74.6 ± 0.1	1020 ± 10
70 / 30	74.5 ± 0.1	1220 ± 10
60 / 40	74.7 ± 0.1	1290 ± 10
50 / 50	76.2 ± 0.1	1400 ± 10
40 / 60	77.0 ± 0.1	1320 ± 10
30 / 70	77.5 ± 0.2	1120 ± 10
10 / 90	74.9 ± 0.2	690 ± 10
5 / 95	73.4 ± 0.1	470 ± 10
0 / 100	69.2 ± 0.1	320 ± 10

(b) 15 wt% OVA in water and ethylene glycol mixtures.

water / ethylene glycol	$t_d / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
100 / 0	74.9 ± 0.1	880 ± 10
85 / 15	71.5 ± 0.1	980 ± 10
70 / 30	66.8 ± 0.1	960 ± 10
60 / 40	62.8 ± 0.1	960 ± 10
50 / 50	57.6 ± 0.1	850 ± 10
40 / 60	53.5 ± 0.1	660 ± 10
30 / 70	46.2 ± 0.1	490 ± 10
20 / 80	36.2 ± 0.1	100 ± 10
0 / 100	-	-

の試料では、グリセリン含率の増加とともに t_d の減少が観測された。グリセリン 100 wt % 試料の t_d は 69.2°C まで減少している。また、グリセリン含率が 50 wt % 以下ではグリセリン含率が増加するにつれ ΔH は増加し、グリセリン含率が 50 wt % 以上では ΔH は減少する傾向を示した。純粋グリセリン溶媒を用いた試料は、水溶媒を用いたときと比較すると t_d , ΔH いずれも減少していることがわかる。

一方、水とエチレングリコールの混合溶媒を用いた未変性試料の DSC 測定の結果を Fig.9 に示す。115 $^\circ\text{C}$ 以上の熱挙動については水含量が変化してもほぼ一定であったが、水含量の変化に伴い 80 $^\circ\text{C}$ 付近の吸熱に変化が観測された。この吸熱の立ち上がり温度 t_d とエンタルピー ΔH を混合溶媒中の水含量に対して Fig.10 にプロットし、値を Table 3 (b) に示す。エチレングリコール含量の増加とともに t_d は単調減少し、エチレングリコール含量が 100 wt % のとき測定温

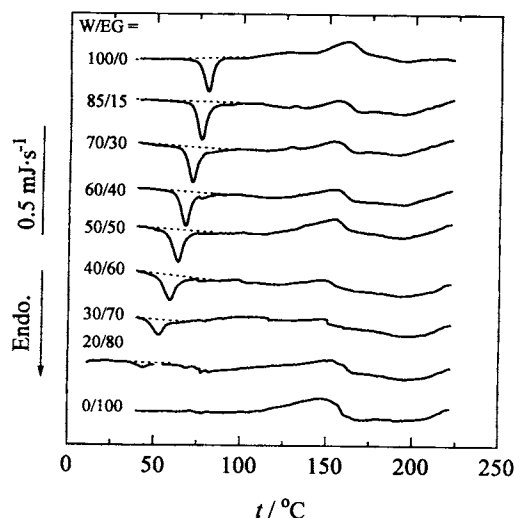


Fig.9 DSC heating curves for solutions and suspensions of OVA in mixed solvent of water (W) and ethylene glycol (EG) with various mixing ratios as indicated in the figure. ΔH is estimated using a dotted line as base line drawn in each curve.

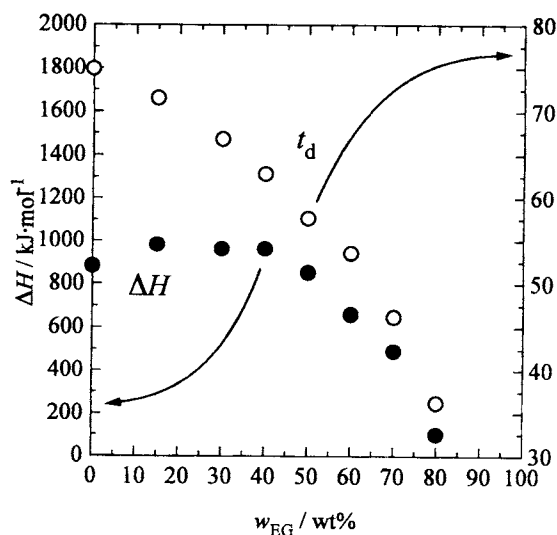


Fig.10 The denaturation temperature of OVA, t_d (○) and the corresponding enthalpy change, ΔH (●) as a function of ethylene glycol content in mixed solvent w_{EG} by wt%.

度範囲では吸熱は観測されなかった。この結果は、エチレングリコールはグリセリンに比べて未変性OVA分子と強く相互作用がはたらくことを示しており、エチレングリコー

ル含率100 wt %のとき室温ですでにOVA分子が溶媒の疎水性のため変性していると考えられる。

水溶媒を用いた系においてはOVA濃度58 wt %以下では存在する水和水が $0.36 \text{ g} \cdot \text{OVA} \cdot \text{g}^{-1}$ であることをすでに見積もった。水と有機溶媒の混合溶媒を用いたOVA濃度15 wt %の試料において水とOVAの重量比が $0.36 \text{ g} \cdot \text{OVA} \cdot \text{g}^{-1}$ になる状態は水とエチレングリコールやグリセリンの有機溶媒の混合比が6/94の状態に対応する。もし混合溶媒中に存在するすべての水が選択的にOVA分子表面に水化したとすると、OVA濃度15 wt %の試料において水含率が6 wt %以上であれば、OVA分子表面に存在する水和水は満たされるという結果になる。確かにエチレングリコール、グリセリン有機溶媒は水に対しどのような混合比であっても容易に溶解するため、実際問題としては水和水の1部分は有機溶媒に置換された状態で存在すると考えるべきであろう。しかしながらグリセリンは水およびエチレングリコールに比べて未変性OVA分子との相互作用が弱く、水とグリセリンの混合溶媒を用いた場合、水が優先的にOVA分子表面に水化する傾向を表しているものと思われる。

OVAの熱変性に及ぼす糖の影響についての研究結果によれば、OVAに結合しない糖のエクタリアルOH (e-OH) 基の平均数が増加するにつれ、直線的に t_d は上昇する相関関係があることが示されている^{24, 25)}。すなわち、OVAに結合しない糖のe-OH基は結合水を安定化させる作用がある。40～70 wt %, 0～50 wt %グリセリンが含まれる混合溶媒の場合において、グリセリン含率が増加するにつれ t_d , ΔH 各々が上昇する現象は、OVA表面に存在しないグリセリンのOH基が結合水の安定化を強める作用によるものであると考えられ、この考察は水が優先的に未変性OVA分子表面に水合し、グリセリンが水に比べて未変性OVA分子との相互作用が弱いという考察の結果とは矛盾しない。しかしながら、溶媒分子の立体障害ならびに疎水性の相違が変性OVA分子の構造自体に影響を及ぼすことが考えられる。もしそうであるならば、溶媒分子の種類により t_d , ΔH が変化する可能性がある。

文 献

- 1) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167 (1979).
- 2) B. Egeland, *J. Food Sci.* **49**, 1099 (1984).
- 3) F. Ahmad and A. Salahuddin, *Biochemistry* **15**, 5168 (1976).
- 4) 藤巻正生, 金田尚志, 秦忠夫, 柴崎一雄, 不破英次, 稲垣長典, 坂村貞雄, 門田元, 松本博, "食品化学", 朝倉書店, 東京 (1976) 第2章, p.6.
- 5) A. Kato and T. Takagi, *J. Agric. Food Chem.* **36**, 1156 (1988).

- 6) A. H. Clark and S. B. Ross-Murphy, *Adv. Polym. Sci.* **83**, 60 (1987).
- 7) T. Koseki, N. Kitabatake and E. Doi, *Food Hydrocoll.* **3**, 123 (1989).
- 8) H. Hatta, N. Kitabatake and E. Doi, *Agri. Biol. Chem.* **50**, 2083 (1986).
- 9) N. Kitabatake, H. Hatta and E. Doi, *Agri. Biol. Chem.* **51**, 771 (1987).
- 10) P. E. Stein, A. G. W. Leslie, J. T. Finch, W. G. Turnell, P. J. McLaughlin and R. W. Carrell, *Nature* **347**, 99 (1990).
- 11) N. Nemoto, A. Koike, K. Osaki, T. Koseki and E. Doi, *Biopolymers* **33**, 551 (1993).
- 12) L. McReynolds, B. W. O'Malley, A. D. Nisbet, J. E. Fothergill, D. Givol, S. Field, M. Robertson and G. G. Brownlee, *Nature* **273**, 723 (1978).
- 13) A. Koike, N. Nemoto and E. Doi, *Polymer* **37**, 587 (1996).
- 14) K. Nakamura, M. Kiriya, A. Takada, H. Maeda and N. Nemoto, *Rheol. Acta*, in press.
- 15) J-M. Guenet, "Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers", Academic Press, London (1992).
- 16) S. P. L. Sørensen, M. Høyrup, *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **12**, 12 (1915).
- 17) C. T. Chang, C. -S. C. Wu and J. T. Yang, *Anal. Biochem.* **91**, 13 (1978).
- 18) Y. H. Chen, J. T. Yang and K. H. Chau, *Biochemistry* **13**, 3350 (1974).
- 19) I. D. Kuntz, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 514 (1971).
- 20) P. L. Privalov and G. M. Mrevlishvili, *Biofizika* **12**, 22 (1967).
- 21) 上平 恒, 逢坂 昭, "生体系の水", 講談社サイエンス・エッセイ, 東京 (1989), 第4章 第5章, p.63.
- 22) H. B. Bull and K. Breese, *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 488 (1968).
- 23) E. Doi, *Trends Food Sci. Tech.* **4**, 1 (1993).
- 24) 上平初穂, 繊維学会誌 **37**, 436 (1981).
- 25) J. F. Back, D. Oakenfull and M. B. Smith, *Biochemistry* **18**, 5191 (1979).

要 旨

本研究では、未変性卵白アルブミン (OVA) 溶液および高温熱処理により作製したゲルについて示差走査熱量測定法 (DSC) を用いて熱的特性を評価した。水溶液中での未変性OVA 試料において、OVA 濃度Cの範囲が5～58 wt % のとき変性温度 t_d 、エンタルピー ΔH は各々、75.0℃, 890 kJ·mol⁻¹の一定値を示した。一方、C>58 wt %ではOVA 濃度の増加に伴い ΔH の減少と t_d の上昇がみられた。C=58 wt %のとき水和された状態において最密充填状態になると仮定すると、OVA 表面にOVA 1 gあたり0.36 gの結合水が存在することがわかり、OVA 分子を直径5.6 nmの球とすると、このときの水和層の厚さは0.36 nmと見積もられた。C≥10 wt %以上のOVA 水溶液では140℃付近、170℃付近、220℃付近に発熱ピークが存在し、それぞれrandom-aggregate状から安定なゲル構造への形態変化、S-S結合の切断、OVA 自身の分解に対応するものであると思われる。また、円偏光二色性測定により約80℃で α -helixの含量が減少し、さらに高温で β -sheet, β -turn含量も減少したことを明らかにした。この結果はOVAの2次構造の変化が100～140℃の温度範囲におけるゲル形成およびその後200℃で始まる分解以前にランダムコイル形態への形態変化に決定的な役割を果たしていることを示している。OVAの熱的挙動に対する溶媒の疎水性の効果を研究するため、グリセリンおよびエチレングリコールの2有機溶媒とこれらと水との混合溶媒を溶媒として用いた。混合溶媒の混合比に対する t_d , ΔH の複雑な変化が観測され、エチレングリコールはグリセリンと比較して、未変性OVAに強く相互作用を及ぼすことがわかった。