

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：42686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00838

研究課題名(和文)超音波分析を用いた種々のカゼイン混合タンパク質ゲルの物性制御と伸展性フィルム創出

研究課題名(英文)Preparation of mix protein gel and film using sodium caseinate and the analysis with ultrasound spectroscopy and some instrumental analysis

研究代表者

太田 尚子 (Yuno-Ohta, Naoko)

日本大学短期大学部・その他部局等・教授

研究者番号：00203795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：熱安定性を異にするタンパク質混合系のゲル形成時の加熱処理に伴う物性変化とこれを基盤として得られたフィルムの性質を解明する事を目的とした。熱安定性の高い乳カゼインナトリウム(SC)と、熱凝固性の乳清または分離大豆タンパク質製品を混合し、ゾルからゲル状態に至る過程を超音波分光分析にて、又、得られたゲル状素材から調製したフィルムの物性を調べた。その結果、SCが、フィルム調製溶液中の乳清の初期の変性を促進するものの、それに引き続く凝集を抑制する事が判った。更に、SC混合型フィルムは、熱凝固性タンパク質単独に比べ、水溶解性、ガラス転移温度が高いにも関わらず、曲げ特性に優れた新規素材である事が判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脱プラスチック社会に対応する一つの試みであり、且つ未利用又は利用度の低い食品タンパク質資源の高度利用を目指すための基礎研究である。数種の熱凝固性タンパク質を材料としてカゼインナトリウムとの混合システムからフィルム調製を試みたところ、乳清タンパク質は乾燥卵白や分離大豆タンパク質と比べフィルム調製しやすく且つ均質な性質を有していることが示唆された。本研究の成果は国内特許出願し、現在その審査請求を行っている段階である。

研究成果の概要(英文)：The changes of rheological properties of mixed protein using sodium caseinate and milk whey or soy protein isolate which have different heat stabilities were investigated during gelation. Furthermore, the properties of film produced by drying treatment were also investigated. Ultrasound spectroscopy revealed that sodium caseinate facilitated the gelation of whey protein in the early stages, on the other hand, it suppressed the gelation of whey protein in the late stage. The mixed protein film containing whey has good mechanical properties such as strength, extensibility in spite of the higher glass transition temperature.

研究分野：食品タンパク質の有効利用

キーワード：食品タンパク質 熱凝固性 熱安定性 超音波分光分析 ゲル フィルム ガラス転移温度 水分活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、食品タンパク質のゲル化現象について種々の機器分析を用いて研究してきた。ゾルからゲルへの過程を詳細に調べる為に、動的粘弾性測定に加え、超音波分光分析を併用することは、加熱の処理の有無に関わらず高感度にその情報を得ることが出来るうえで有用と考えられていた。

2. 研究の目的

混合タンパク質のもつユニークな物性を活かして、これまでにないテクスチャーや性能を有するゲル状又はフィルム状の素材を創出することを目的とした。はじめに、熱安定性の異なる2種類のタンパク質を混合し、その物性を制御する為の方途を温度、混合比、終濃度などを変化させ、最適条件を見出すこと、次に超音波分光分析により、その混合系が時間経過や温度変化と伴にどのような物性変化を呈するかをモニターし、最後に、創出できたフィルム状素材の性質を、その機械特性などを調べることにより客観的に評価することを通して、ゲル状ならびにフィルム状素材の性質を制御するための基盤を確立し、その実用性を明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 超音波分光分析

フィルム調製溶液は、それぞれ終濃度 3% グリセロール、10% タンパク質 (乳ホエー (Alacen895 (Fonterra 社製、ニュージーランド)) または大豆タンパク質 (フジプロ-F (不二製油株式会社製)) およびカゼインナトリウム (SC) (Alanate180 (Fonterra 社製、ニュージーランド))、0.025% アジ化ナトリウム (防腐剤) となるように、蒸留水を用いて調製した。混合系の比率は 1: 1 とし、各タンパク質濃度を 5% (w/v) とした。

超音波分光分析は、ウルトラサイエンティフィックス社製 HR-US102 型を用い、超音波速度並びに減衰の温度依存性を調べた。試料側セルに可塑剤であるグリセロールを含む混合タンパク質、対照側セルにグリセロールを含む単独タンパク質 (カゼインナトリウムを含まない) を注入し、2.5, 5, 8 MHz の周波数にて測定した。

(2) フィルム調製方法

懸濁したフィルム調製溶液をクッキー型 (底面の直径約 3.5 cm の円柱型を用い、調製溶液総体積 2 000 μ l、あるいは底面の直径約 4cm の円柱型を用い、調製溶液総体積 3 000 μ l とした) の底を食品保存用ポリ塩化ビニリデン製フィルムでシールし、加熱した。次に 30 分間 0 の水中で氷水冷した。冷却後クッキー型の容器に入ったままの状態、フィルム化するまで (約 3 日間) 室温 (25-26) かつ湿度約 50% 条件下のウェットキャビ内で放置した。約 3 日後、型からフィルムを外し、いずれも厚さがほぼ 1mm であることを確認したのち、各種分析に供するまでプラスチック製ファイルに挟んでウェットキャビ内で保存した。

(3) フィルムの曲げ強度及び伸展性評価

歪み制御型レオメーター (RFS- 型、TA インストルメント社製) のパラレルプレートにオプションで作成した 3 点支持型治具を装着し、フィルムの曲げ強度および伸展性を測定した。曲げ試験に使用するフィルムは幅約 0.6-0.9mm、長さ約 20mm に、はさみを用いて整形し、マイクロスコープ (PEAK No. 2054、東海産業 (株)) とノギスを用いて長さ、幅および厚さを測定しテストセットアップに条件入力した。フィルムの試料片を、瞬間接着剤を用いて治具先端に接着した。測定モードは、幾何学タイプ Torsion Rectangular Geometry、テストセットアップ Multiple extension mode とし測定した。n=12 とし、有意差検定はノンパラメトリ

ック検定を用いた。

(4) フィルムの物理化学特性(水分活性(Aw)、溶解性(WS)、熱安定性)の評価

Awは、水分活性測定装置(アイネクス(株) Pawkit Awメーター)を用いた。フィルム試料片のAw測定に先立ち、0.760Aw(6M NaCl)標準液(アイネクス(株)社製)を用いて室温約26℃、湿度約70%の環境下で校正を行った。次に直径約4cmの円型に切断した試料を装置に挿入し測定した。

フィルムのWCおよびWSは、Rhimらの方法¹⁾に準じて行った。

ガラス転移温度(Tg)測定は、示差走査熱量分析装置(セイコーインスツルメント社製120型)を用いて行った。即ち、ステンレス製密封型容器を用いて、DSCサーモグラム(温度の関数としての熱流)を記録した。

(5) フィルムの微細構造観察

フィルムを切片にカットし、常法に従い、化学固定、脱水及びt-ブタノール乾燥後、日本電子社製JSM-6390型を用いて観察した。SEM観察の前に試料の表面および断面が上になるようにアルミニウム製台材にカーボンテープで固定し、白金蒸着(日本電子社製JFC-1600型)およそ5nm厚を施して観察試料とした。

4. 研究成果

(1) フィルム調製溶液の超音波特性

フィルム調製溶液の室温から95℃までの昇温過程で、超音波速度の低下、即ち系の圧縮率の増加が観察された。これは溶液が温度上昇に伴いゾルからゲルへ転移する傾向にあることを示す。混合タンパク質系と乳ホエー単独系とは同様の傾向、即ち、いずれも変性していくことが確認できた。次に、系の質的变化を反映すると考えられる超音波減衰の変化を調べた。一般にタンパク質のゲル化は、まずはじめに分子のアンフォールディングが起り、引き続き変性分子間の相互作用の増加、というように段階的に進行すると考えられている。

また、KennedyとMounsey²⁾はカゼインミセルの添加は共存するタンパク質の変性を促進するものの、その後の凝集体形成は抑制されると報告しているが、本結果はそれを支持するものであった。そもそも超音波減衰はいくつかの要因で起こることが知られているが、そのうちのひとつとして、系の不均質化があり、系に可溶性凝集体が出現すると超音波が照射された際、衝突により散乱し超音波が減衰することが知られている。SCはそのアミノ酸組成などの特徴(プロリンに富むなど)から元来ランダム化した構造を持ち、熱凝固性タンパク質が共存する際、の変性温度以下ではSCが系全体の変性の駆動力となり、その後加熱凝固性タンパク質の変性開始温度以上では、熱凝固性タンパク質単独系と比較すると、むしろ超音波減衰の増加を抑制したことが示唆された。

(2) フィルムの曲げ強度および伸展性

フィルムの曲げ測定では、曲げ強度および伸展性について有意差検定を行い評価した。SC混合型フィルムは乳ホエー単独型フィルムに比べて有意に、フィルムの硬さおよび伸展性が上昇した(それぞれの有意差 $P=0.03$ および $P=0.15 \times 10^{-4}$)。また、大豆の場合もSC混合型フィルムが単独型フィルムに比べて有意に、フィルムの硬さおよび伸展性が上昇した(有意差共に $P=0.02 \times 10^{-1}$)。すなわち、動物性タンパク質の乳ホエーおよび植物性タンパク質の大豆といった起源の異なるタンパク質間で、同様の傾向が得られた。これらのことから、グリセロール共存下において、SC混合型フィルムは単独型フィルムに比べ、硬さと伸展性を兼ね備えたフィルム形成が促されることが示唆された。

(3) フィルム水分量および水溶解性の測定

Table 1 にフィルムの水分量 (Water Content : WC)、水への溶解性 (%) (Water Solubility : WS)、水分活性 (Activity of Water : Aw)、ガラス転移温度 (Glass Transition Temperature () : Tg) の平均値および標準偏差を示した。

Table 1 Water content (%) (WC), Water Solubility (%) (WS), Activity of water (Aw) and Glass-transition temperature (Tg) of films

Composition	WC (%)	WS (%)	Aw	Tg (°C)
Whey	24.9±0.78 ^a	12.2±1.77 ^a	0.64±0.01 ^a	163.2±2.19 ^a
Whey/SC	24.7±0.83 ^a	14.7±1.14 ^b	0.66±0.01 ^a	169.0±2.70 ^b
Soy	20.5±3.13 ^a	15.7±2.73 ^a	0.62±0.02 ^a	164.1±2.09 ^a
Soy/SC	21.8±1.80 ^a	16.6±1.72 ^b	0.61±0.01 ^a	170.0±2.31 ^b

Different letters shows significant differences ($P < 0.05$).

(4) SEM による微細構造観察

乳ホエーフィルムは SC の有無に関わらず、変性タンパク質からなる球状粒子の集合体からなる像が観察された。その凝集体の直径サイズを測定したところ、単独系はおよそ $0.5 \mu\text{m}$ 、SC 混合系はおよそ $0.15 \mu\text{m}$ であった。大豆タンパク質の場合は、球状の変性タンパク質凝集体は明瞭には観察されなかったが、上述の先行研究²⁾や、我々のこれまでの卵白アルブミンおよび -CN 混合ゲルの微細構造³⁾を考え合わせると乳ホエーおよび大豆タンパク質いずれのフィルムも、CN 混合系は単独系に比べ、その塊のサイズがやや小さくなる事が観察された。

(5) 結論

熱安定性の異なる 2 種類の混合タンパク質 (熱凝固性タンパク質として市販の乳ホエータンパク質または大豆タンパク質、熱安定性タンパク質としてカゼインナトリウム) およびグリセロールからなる複合型フィルムの調製を試みた。まず、フィルム調製溶液の性質を超音波分光分析の温度依存性測定により解析したところ、カゼインナトリウム添加は熱凝固性タンパク質の初期の変性を促すもののそれに引き続く凝集を抑制する効果を示した。更に、フィルムの数種の物理化学的性質を調べた結果、混合タンパク質フィルムは熱凝固性タンパク質のみからなるフィルムに比べ、強度・伸展性ともにより高く、且つ、より親水的な性質を有していた。以上の結果から、カゼインナトリウム添加は、共存する熱凝固性タンパク質および可塑剤である多価アルコールと相乗的に相互作用し、新規なテクスチャーを有するフィルムの創出を誘導することが判った。

¹⁾ Rhim, J.W., Wu, Y., Weller, C.L., and Schnept, M. (1999). J. Food Sci., **64**, 149-152.

²⁾ ODKennedy, B.T. and Mounsey, J.S. (2006). J. Agric Food Chem., **54**, 5637-5642.

³⁾ Yuno-Ohta N, Endo M, Sawaki M, Kishikawa M (2014) Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi **61**: 183-191.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 高橋美帆、鈴木麻友、加藤つばさ、荻野健次、大竹恵美、太田尚子	4. 巻 65
2. 論文標題 熱安定性の異なるタンパク質を用いた混合タンパク質フィルムの調製とその性質	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi	6. 最初と最後の頁 508-517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/nskkk.65.508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoko Yuno-Ohta
2. 発表標題 The formation and mechanism of flexible film based on the mixed protein gel using dried egg white and sodium caseinate
3. 学会等名 Institute of Food Technology (IFT) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoko Yuno-Ohta, Mayu Suzuki, Miho Takahashi and Tsubasa Kato
2. 発表標題 Formation of soft sheet from heat-induced mixed protein gel using sodium caseinate
3. 学会等名 The XVIIth International Congress on Rheology (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質シート及びタンパク質シートの製造方法	発明者 太田尚子、荻野健次、高橋美帆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2016-36390	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名称：イノベーションジャパン2019出典
「未利用乳タンパク質を主成分とする食べられる生分解性トレー」
発表者：太田尚子他
期間：2019/8/29～30（東京ビッグサイト・青海展示棟）

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----