

平成 22 年 1 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500670  
 研究課題名（和文）：システイン等の低分子化合物添加による乳タンパク質ゲル形成のリアルタイム解析  
 研究課題名（英文）：Real Time Analysis of the Gel Formation of Milk Protein by the Addition of Low Molecular Compounds such as Cysteine  
 研究代表者  
 太田 尚子（OHTA NAOKO）  
 日本大学短期大学部・食物栄養学科・教授  
 研究者番号：00203795

研究成果の概要： $\alpha$ -ラクトグロブリンの相互作用に及ぼすシステインの影響を超音波分光分析、レオロジー測定及び示差走査熱量分析により調べた。超音波速度及び減衰の変化を超音波分光分析を用いてモニターし、他の手法で得られた結果と併せてゲル形成に及ぼすシステインの効果を考察した。その結果、超音波速度は 54 付近から減少し、システイン添加により 54 付近で系の圧縮率が増加していることが示唆された。また、超音波減衰の程度もおよそこの温度付近で増加した。この 54 という温度は一般的な  $\alpha$ -ラクトグロブリンの加熱変性温度である 75～80 よりも著しく低く、この温度は示差走査熱量分析における相転移開始温度や動的粘弾性測定による動的弾性率の増加開始温度にほぼ一致していることがわかった。以上の結果から、システインはゲル化の初期段階における変性タンパク質の重合を促進していると結論付けた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品タンパク質ゲル

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：タンパク質のゲル化、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、システイン、超音波分光分析、示差走査熱量分析

## 1. 研究開始当初の背景

従来、エマルションなどのコロイド分散系の高感度分析法の一つとして超音波分光分析法が適用されてきた。さらに最近装置の進化とあいまって、本法はこれまでの光散乱法などでは測定困難な系（濃厚コロイド分散系な

ど）にも適用され始めている。申請者は Corredig 氏との共同研究で、 $\alpha$ -ラクトグロブリン（ $\beta$ -LG）A タイプを試料としその脂肪酸塩誘導ゲル形成過程を超音波分光分析法と透過型電子顕微鏡観察を用いて研究した。加熱処理を必須としない脂肪酸塩添加によ

るゲル化現象は、省エネルギーの観点からも、またその加熱ゲルとは異なる物性（タンパク質二次構造の変化量が無添加加熱誘導ゲルの約半分程度の柔軟な構造を持ち、且つ均質で微細なネットワークを有するため、透明な外観と高い保水性をもつ）を発現するというユニーク性からもその活用が期待されるが、その為には更にこれを合目的的に制御することが重要である。従前の物性解析法（例えば熱分析法や粘弾性測定）に加えて、超音波分光分析法はより感度良く分子間相互作用をモニターするための一つの有効な手段と考えられる。

## 2. 研究の目的

-LGは脂肪酸塩などのイオン性界面活性剤の添加でモノマー化し、その後のモノマー間の相互作用の結果、常温でゲル形成されること、更にこのモノマー間の相互作用の際にはSH基の関与が重要であるというこれまでの研究基盤に立脚し、本研究では -LG AB type を試料とし、システイン (L-Cys) 添加による熱変性挙動を超音波分光分析、示差走査熱量分析 (DSC) および動的粘弾性測定を用いて多面的に明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

タンパク質濃度 10~12%、0.2M 食塩存在下での L-Cys (60mM) 添加の影響を pH 7~8 にて、タンパク質溶液から熱変性、ゲル化に至る過程を上記の機器分析を通して解析した。

### (1) レオロジー測定

$\beta$ -LG を 0.2M 食塩水に溶解し 60mM L-Cys 存在下及び非存在下 (pH 7.0-7.5) で、25 ~ 70 の温和な加熱条件下での弾性率の変化を、歪制御型動的粘弾性測定装置 (TA インストルメント社製 RFS III) を用いて測定した。

### (2) DSC 測定

試料調製は上述のレオロジー測定同様に行い、DSC 測定は、試料溶液を煮沸処理したアルミ製 pan に入れ密封後、セイコーインストルメント社製 120 型を用い、昇温速度毎分 1 にて温度上昇に伴う吸熱現象を (対照セルには蒸留水を使用として) を観察した。

### (3) 超音波分光分析

ウルトラサイエンティフィックス社製 HR-US 102 型を用いてレオロジー測定用試料と同様に調製した試料 1 mL を用いて、温度上昇に伴う超音波速度及び超音波減衰の変化を周波数 5 MHz にてモニターした。さらにエクセル処理にて超音波速度及び超音波減衰の時間当たりの変化率をそれぞれのグラジエントとして算出した。

## 4. 研究成果

(1) 温和な加熱処理に伴う L-Cys 添加 -LG の動的弾性率の変化

Fig.1 に示したように、L-Cys 添加 -LG は温度上昇(破線)に伴い貯蔵弾性率( $G'$ 、太線)と損失弾性率( $G''$ 、細線)は上昇し、およそ 54 でクロスオーバーポイント(ゾル-ゲル転移)を示した。

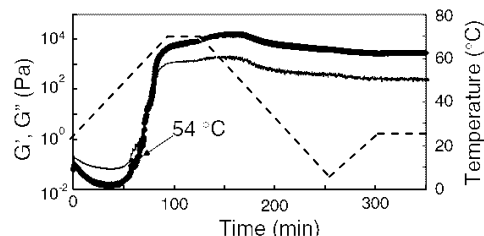
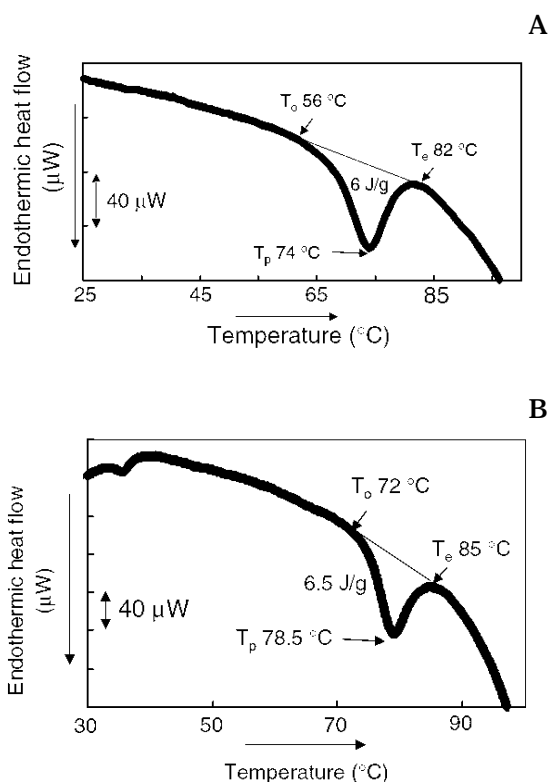


Fig.1 Changes in dynamic modulus of 12%  $\beta$ -LG (pH 7.0) with 60 mM cysteine and 0.2 M NaCl with a temperature sweep.

(2) 温和な加熱処理に伴う L-Cys 添加及び無添加 -LG の DSC プロファイル

次に、L-Cys 添加 -LG の昇温プログラム下での相転移温度を DSC 分析により調べた。その結果、転移開始温度 56、ピーク温度 74、転移終了温度 82 となり (Fig.2-A)、Fig. 1 のレオロジー測定で観察されたゾル-ゲル転移温度はこの転移開始温度とほぼ一致していることがわかった。また、この温度は -LG コントロール (無添加, Fig. 2-B) のそれと比べ約 16 低い値であり、L-Cys の添加が -LG のゲル化に先立つ変性を促進していることが確認できた。

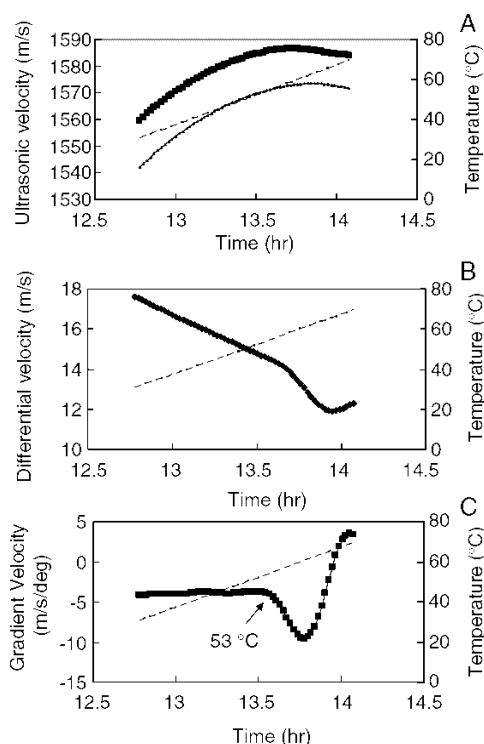


**Fig.2** Differential scanning calorimetry profile of 12%  $\beta$ -LG (pH 7.5) and 0.2M NaCl in the presence (A) or absence (B) of cysteine with increasing temperature.

(3) 温かな加熱処理に伴う L-Cys 添加 -LG の超音波パラメーターの変化

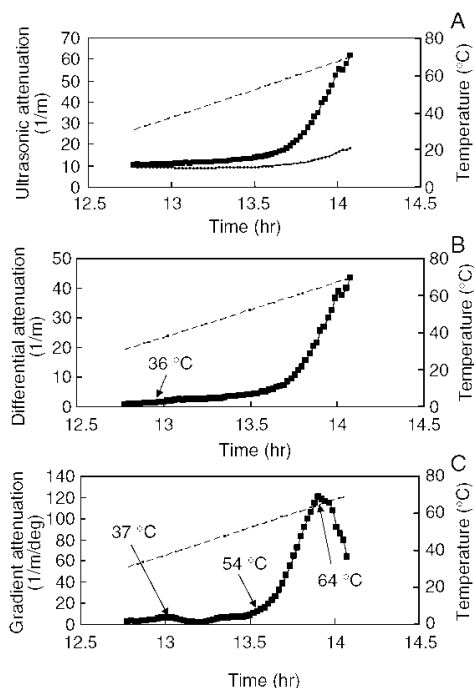
Fig.3-A ~ C は L-Cys 添加 -LG (太線) と無添加 -LG の温かな加熱処理条件下での超音波速度の変化の挙動を示し (Fig.3-A) 更に両者の差 (L-Cys 添加物 - L-Cys 無添加) (Fig.3-B) 及び変化率を表したものである (Fig.3-C)。

Fig.3 から、およそ 53 付近より L-Cys 添加による超音波速度の減少が生じていることが明らかになった。このことは、L-Cys 添加により 53 付近で系の圧縮率が増加し始めたことを示唆している。また、L-Cys 添加 -LG の超音波減衰の変化は、この超音波速度の減少温度にほぼ相当する 54 付近で顕著な増加を示した (Fig.4)。更にこの温度に先立つ 36~37 度でも僅かながら超音波減衰の増加が観察され、この温度付近からゲル化に先立つ系中の変化 (例えば可溶性凝集体の出現や系中の物質移動など) が起こっていることが示唆された。( Fig.4-C )



**Fig.3** Time dependence of ultrasonic velocity (A), differential velocity (B), and gradient velocity (C) of 12%  $\beta$ -LG (pH 7.6) and 0.2M NaCl with or without 60 mM L-Cys. bold line with square,  $\beta$ -LG with L-Cys; thin line with triangles,  $\beta$ -LG (no L-Cys); dashed line represents the

changing temperature.



**Fig.4** Time dependence of ultrasonic attenuation (A), differential attenuation (B) and gradient attenuation (C) of 12%  $\beta$ -LG (pH 7.6) and 0.2M NaCl with or without 60mM L-Cys. bold line with square,  $\beta$ -LG with L-Cys; thin line with triangles,  $\beta$ -LG (no L-Cys); dashed line represents the changing temperature.

(4) L-Cys 存在下及び非存在下 -LG の動的粘弾性特性の比較

上記の様に、温かな加熱処理条件下で L-Cys を添加することによる -LG の超音波速度と超音波減衰の変化を調べ、L-Cys 添加系では無添加の場合に比べてより早い段階で系の圧縮率が増加し、より大きな超音波減衰が起こる事を明らかにした。また、DSC およびレオロジー測定は -LG に対する L-Cys の添加が相転移開始温度を低下させたが、L-Cys 存在下と非存在下の -LG 間に、動的弾性率の平衡値 (Fig. 5) や相転移に要する熱容量間にほとんど差がなかった事を示した (Fig. 2)。

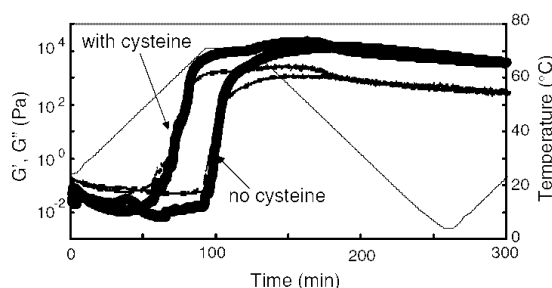


Fig.5 Changes in dynamic modulus of 12% b-LG (pH 7.0) with 0.2M NaCl in the absence or presence of 60 mM cysteine with a temperature sweep. bold curve, G'; thin curve, G''; kinked line, temperature program.

これらの現象と他の関連する研究報告から、ゲル形成の後期段階では SH-SS 交換反応に代わって疎水結合のような非共有結合がゲル化の推進力になっていることが示唆された。

以上、-LG に対する L-Cys 添加の影響を調べ、L-Cys がゲル化の初期段階、即ちタンパク質の変性の開始を促すことを見出した。元来 -LG は分子内に 2 分子のジスルフィド結合と 1 分子の遊離の SH 基を有している。また本タンパク質のゲル形成機構は、Native 状態でダイマーとして存在しており、何らかの変性要因で容易にモノマー化し、分子の unfolding とともに遊離の SH 基の反応性が高まり、その結果モノマー間の分子間相互作用が生じゲル化に至る事が知られているが、本研究では -LG に対する L-Cys の添加がタンパク質の変性を促進したことを超音波分光分析と DSC 分析により見出した。

このように超音波分光分析を用いて明らかにした超音波速度と減衰の変化の解析は、-LG の相転移をより詳細に高感度で把握するために有効であることが判った。同時に、本データと DSC やレオロジー測定データなどを併用することの有用性が明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Naoko Yuno-Ohta, Use of ultrasound spectroscopy to examine the effect of cysteine on  $\beta$ -lactoglobulin interactions. Colloid and Polymer Science, 査読有 Vol.287, 2009, 1487-1491.

[学会発表](計3件)

太田尚子、超音波分光分析、DSC および動的粘弾性測定を用いたシステイン添加  $\beta$ -ラクトグロブリンの相転移挙動の解析、第 57 回レオロジー討論会、2009 年 10 月 7 日、山口(宇部)

太田尚子、Studies on interaction of whey proteins and cysteine using of ultrasound spectroscopy、23<sup>rd</sup> Conference of the European Colloid and Interface Society、2009 年 9 月 8 日、

トルコ(アンタルヤ)

太田尚子、超音波分光分析を用いた乳タンパク質のゲル形成挙動の解析、日本農芸化学会平成 21 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡。

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

太田 尚子(OHTA NAKO)

日本大学短期大学部・食物栄養学科・教授  
研究者番号：00203795

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし