

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 1 月 27 日現在

機関番号：34305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650175

研究課題名（和文） グアー起泡性アルブミンの卵白代替タンパク質としての機能特性

研究課題名（英文） Functional properties of guar foaming albumin, an alternative protein for egg white

研究代表者

土居 幸雄 (DOI YUKIO)

京都女子大学家政学部・教授

研究者番号：40172233

研究成果の概要（和文）：主要な食物アレルギーである卵白に替わり得る機能性タンパク質として、グアーミールに存在する起泡性アルブミン GFA (guar foaming albumin) の食素材としての利用を検討した。GFA の起泡性、泡沫安定性、泡沫サイズについて、添加物の影響を詳細に調べたところ、いずれの場合も卵白と同程度以上の利用特性を示した。GFA の乳化特性については、牛血清アルブミンと同程度の乳化活性と許容量が示された。

研究成果の概要（英文）：Functional properties of guar foaming albumin isolated from guar meal were examined for a possible replacement as a food additive to the egg white that is a major food allergen. Foaming ability and stability and foam smoothness of GFA was examined in detail in the presence and absence of sugar and salt. GFA showed better functional qualities than the egg white in many cases. The emulsifying ability of GFA was as good as bovine serum albumin

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	0	2,400,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	210,000	3,310,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食素材、卵白アレルギー、タンパク質機能、グアー豆、起泡性、泡沫安定性

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質の種々の機能特性は、食品の物性・テクスチャーに大きく影響する。例えば、起泡性を持つタンパク質はカゼインを始めとして多数知られているが、泡沫安定性となると、卵白に勝るものは知られておらず、ボリューム感を持たせる洋菓子などで、卵白は必須の原材料となっている。

(2) 最近我々は、食物添加物として用いられる増粘性多糖であるグアーガム調整後に残るグアーミールの水抽出画分に、高い起

泡性と泡沫安定性を示すタンパク質の存在を明らかにし、GFA (guar foaming albumin) と命名した。GFAの主成分はSS結合を持つ比較的 low molecular weight のタンパク質で、卵白の 10 倍の起泡性を示すと共に、高い泡沫安定性を持つ。また、GFA は卵白・小麦アレルギー患者の抗血清に対しても交差を示さず、食品としての安全性も示唆された。

(3) 一般に“柔らかい”分子構造を持つタンパク質の起泡性は大きい、泡沫安定性は低い。逆に“硬い”タンパク質は泡立ち

にくいが、一度泡立つと安定性は大きい。GFAはSS結合を持つ比較的分子量のタンパク質であることから、“硬い”タンパク質に属するにもかかわらず、高い起泡性と泡沫安定性を併せ持っためずらしいタンパク質といえる。

2. 研究の目的

卵白は、泡沫安定性を持つ優良な食品タンパク質であるが、同時に最も頻繁に見られる食物アレルギーの原因食品である。本研究では、泡沫安定性を持つ優良な卵白代替タンパク質の見あたらないことから、GFAの機能特性に注目し、その食素材としての利用を考えることとした。

3. 研究の方法

(1) 試料の調製

グアーミールの水抽出画分から等電点沈澱により沈殿画分を単離し、少量の0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.8~7.0)を用いて溶かした後、0.1 M NaOHでpH 7.0に調製し、測定に使用する緩衝液を用いて、低温室で一晩透析を行なった。遠心分離後に得られた上清液をGFAとして使用した。タンパク質濃度による比容積の変化の実験および砂糖を添加した場合の試料の希釈には、0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.8~7.0)を用いた。食塩を添加した場合は、5 mM リン酸緩衝液(pH 6.8~7.0)で透析し、試料の希釈にも同じ濃度の緩衝液を用いた。また比較対象として、水溶性卵白溶液は、卵白部分をガーゼで濾し、濃厚卵白を除き、GFAと同様に緩衝液に透析して調製した。

(2) メレンゲの調製

上記に従い調製した試料を0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で透析した後、5~70 mg/mlのタンパク質濃度になるように緩衝液を用いて希釈した。その試料8 g(pH6.41~6.62)を、直径14.5 cm、高さ9.5 cmのプラスチック製のボールに入れ、ハンドミキサー(株式会社テスコム、5段切替)スピード1で2分間攪拌後、スピード5で2分30秒、最後にスピード1で30秒間攪拌を行った。砂糖添加、食塩添加およびメルカプトエタノール(ME)添加のものについては、攪拌を10分間(スピード1で2分間攪拌後、スピード5で7分30秒、最後にスピード1で30秒間)行った。GFAと卵白、1:1混合試料についても、上記の攪拌条件でメレンゲを調製した。砂糖は飽和砂糖溶液を使用し、0~15%の範囲で砂糖を添加した。食塩は0~0.5 Mの濃度範囲で、MEは0~100 mMの濃度範囲で試料に添加した。またこれらの添加物は、試料を泡立てる前に加えた。比較対象に用いた水溶性卵白は、10 g(pH8.51~8.97)を用いGFAと同様の方法で調製した。GFAは8 g未満では、

ハンドミキサーの羽根の部分に試料溶液がうまく絡みつかず、泡立てにくいため、うまく泡立てられる最低量の8 gを使用した。卵白は、低濃度の試料を泡立てた時に、秤量皿で測定できる十分量の泡が8 g泡立てた時では不十分で、10gの時に秤量皿で測定できる十分量の泡が泡立てられたので、10gを試料として使用した。

(3) 焼きメレンゲの調製

上記条件で泡立てたメレンゲの泡立て直後の泡を、クッキングシート上でプラスチック製の型(直径2.5 cm×高さ2 cm)を用いて成形し、オーブンレンジ(三洋電機株式会社、品番EMO-VA4)を用い、100°Cで20分間の焼成を行なった。

(4) メレンゲの比容積の測定

メレンゲ調製後に、ボールのまわりに散らばった泡をゴムべら(シリコン樹脂製)を用いて、泡をつぶさないようにしてボールの中心部に集め、ステンレス製のバターナイフを用いて、秤量皿(内径2.7 cm、高さ2 cm)にすばやく泡立てた泡を移した。そして、泡の重量を測定し、泡の重量から比容積(同体積の水の重量(g)/メレンゲの重量(g))を求めた。

(5) 焼きメレンゲの体積の測定

方法3で調製した焼きメレンゲは、菜種法により体積を測定して求めた(焼きメレンゲの体積(ml)/焼く前のメレンゲの体積(9.74 ml))。なお、焼く前のメレンゲの体積9.74 mlは、メレンゲの成形に用いた、直径2.5 cm・高さ2 cmの型の体積である。

(6) 泡サイズの測定

泡立てた試料の一部(0.5 cm³くらいの大きさ)を、慎重にスライドガラスの上のせ、デジタルカメラ(オリンパス製)に備えつけられている顕微鏡を通して観察した。泡のサイズ分布の測定による画像分析は、ExcelのImageJ(version1.43b, NIH)と統計解析により分析した。

(7) 化学的および免疫学的解析

GFAの精製はDEAEイオン交換クロマトグラフィーを用いた。精製したGFAを還元カルボキシル化後、ODSカラムを用いてサブユニットの分離を行った。各サブユニットのN-末端のアミノ酸配列分析は、自動分析機で常法どおりおこなった。免疫学的解析はELISAによった。

(8) 乳化特性の測定

落花生油を用いて、タンパク質濃度1~15mg/mlにおいてエマルションを作成した。タンパク質濃度とエマルション濁度、および油容量比により乳化活性をもとめた。

4. 研究成果

(1) タンパク質濃度による比容積の変化

タンパク質濃度による比容積の変化を調

べた結果、GFA の比容積はタンパク質濃度が 20mg/ml までは増加し、それ以降はなだらかなカーブを描いた。また GFA の比容積は、同じタンパク質濃度の卵白よりも 1.2~1.9 倍高かった。興味深いことに、GFA と卵白 (1:1) を等量混合した試料の比容積は、タンパク質濃度が 20mg/ml 以下では卵白の比容積に近く、タンパク質濃度が高くなるほど、GFA の比容積に近い値を示した。そして、混合試料の比容積は、高タンパク質濃度 (40mg/ml 以上) では GFA を超え、タンパク質濃度の高い所では GFA の相乗効果により起泡性が上がることを示した。

一般的に、塩基性タンパク質 (リゾチームやクルペインなど) が、泡沫表面の静電的な相互作用を強めることにより、酸性タンパク質 (ウシ血清アルブミンやβラクトグロブリンなど) の起泡特性をよくすることは知られている。これらの場合、酸性および塩基性タンパク質の中間の pH で、高い起泡性を生じるために相互作用が強く働く。そのため、酸性タンパク質と塩基性タンパク質の等電点の差が、十分に大きくなければならない。GFA の場合は、等電点の 4 で酸沈殿させて調製し、また卵白のほとんどのタンパク質は、酸性領域に等電点を持っている。従って、ここで見られた相乗効果は、GFA と卵白の等電点がともに酸性領域であるため、等電点の差がない。よって、静電的な相互作用により混合試料の起泡性が増加したというのは説明がつかない。相乗効果の正確な性質をさらに調べるべきであるが、高いタンパク質濃度のときにだけ弱い相互作用が働いているのかもしれない。

泡に対するタンパク質の過程は、以下のように説明できる。泡に対するタンパク質はまず液相に充分溶解しているべきであり、それが気泡の表面に達し界面付近のタンパク質濃度が高まって膜を形成し、界面活性的な働きによって液相の表面張力を低下させる。膜の形成にはタンパク質が容易に会合するためにアンフォールディングと変性によるコンフォーメーションの変化を起さなくてはならない。このような粘着性の強い膜によって、泡の破壊や融合を防ぎ安定な膜を形成させる。実際、タンパク質濃度が高くなるほど、ハンドミキサーを使用して泡立てた場合、濃度が低いものに比べて泡の立ち方もはやく、泡自体も濃度が低いものはウェット感があり、ぬれた感じの泡 (メレンゲ) であったが、濃度が高いものはそういったウェット感もなくしっとりとして、しっかりとした泡 (メレンゲ) であった。

泡を安定化させるタンパク質の能力は、タンパク質吸着層の流動学的性質つまり圧縮と膨張の過程で、粘性と弾性をあわせ持つ作用、逆行不可能な構造、レオロジーの変化な

どによって主に決定される。例えば焼きメレンゲの場合、極端な泡の広がり加熱をすることによって起こることが考えられる。

GFA は卵白よりも泡沫安定性が良いことを示したが、焼いた後も泡の容量は残っていた。GFA と卵白と等量混合試料のすべての試料で、焼いた後の泡容量がタンパク質濃度に依りして、15%から 65%まで減った。このように焼くことにより、GFA の吸着層の安定性は、卵白層の安定性と匹敵している。この実験で焼いた後の実際の泡容量は、タンパク質濃度 60mg/ml の時、等量混合試料で最大であった。焼いた後も GFA 吸着層の強度が残っていたということは、例えばβ-カゼインの泡は焼くことにより簡単に破壊することとは対照的であった。

GFA は、タンパク質濃度 20mg/ml~30mg/ml 以下では焼き上がり後、焼きメレンゲの底に空洞が見られた。卵白は 10mg/ml でも空洞ができず焼き上げることができたが、タンパク質濃度に関わらず、焼きメレンゲの表面には凹凸がみられた。それに対し、GFA はタンパク質濃度が高いものには空洞が見られず、表面も滑らかであった。混合したものは、GFA と卵白の両方のよい面を兼ね備えていた。

(2) 砂糖濃度による比容積の変化

卵白は、砂糖濃度 13%まで加えても、起泡性の変化はほとんどなかった。GFA は、砂糖を 2~3%わずかに加えることで、比容積が増したが、砂糖の添加量が増えるほど起泡性が減少した。混合試料では、2~6%の間で砂糖添加の影響がプラスに働いたが、砂糖添加量が増える程、比容積が減少した。

実際、砂糖を 45%まで添加することで、GFA の比容積は、卵白の比容積の半分よりも少なくなり、GFA の起泡性の方が、卵白よりも砂糖の影響を受けやすいことが言える。

一般的に砂糖を添加したタンパク質溶液は、しばしば起泡性は減るけれども、粘性が増加し泡沫安定性が改善されてタンパク質構造の安定性は増す。

飽和砂糖溶液は、メレンゲの保水性を高めることで、卵白タンパク質の表面変化を遅らせ、泡沫と安定性を高めることが報告されている。このことから飽和砂糖溶液を使うことで試料と均一に混ざり、泡が立てやすいと考えられる。GFA と混合物は砂糖の添加量が少ないところでは比容積が増加したが、それ以降は砂糖の添加量を増やしていくと比容積が減少した。卵白は、砂糖の添加量による比容積の変化は見られなかった。GFA は砂糖の添加量が増えるほど、砂糖無添加の場合よりもツヤとコシがあり、しっとりしていて、弾力のある触感であった。卵白は、GFA に比べて泡立ちが悪く、焼く前のメレンゲはウェットな感じだが、触感はハリとコシがあった。

混合したものは、GFA のみのものよりも泡立ちがよく表面もなめらかな泡であった。

様々な砂糖濃度で泡を焼いた時、砂糖の安定効果が現れた。GFA の泡は卵白と同様に安定で、砂糖添加 5%付近で最大の泡沫安定性を示した。等量混合試料でも砂糖の安定性傾向は、GFA や卵白と似ているけれども、より明白なことは GFA と卵白間の相乗効果は、砂糖により効果的に保護されたことを示している。

GFA と混合物は、焼成後の焼きメレンゲが無添加のものよりも、表面にツヤがあり、サクッとした質感で、形が崩れにくかった（膨張はしなかったが、縮小もしなかった）。卵白は、表面に凹凸があったが、無添加の場合よりは仕上がりの形が整っていた。砂糖を入れることでタンパクの膜に対して泡が安定化される。泡沫の層状構造を形成する GFA や卵白タンパク質は、ショ糖により保護され、変性をうけにくい状態にあるものと考えられる。また水分子の多くがショ糖分子と親和するため保水性が高まり、膜からの排液が少なくなるので、泡沫の合一が起こりにくくなる。その結果、泡沫の持続性が高まる。それが特に混合物では顕著に現れたと考えられる。

(3) 食塩濃度による比容積の変化

卵白の比容積は、食塩を加えることでわずかに減少する。それとは反対に、GFA や混合試料の起泡性は、食塩を加えることでわずかに増加したが、食塩の添加量の違い (0.1~0.5M 食塩濃度範囲) による比容積の変化はほとんど見られなかった。GFA と卵白の相乗効果は、塩イオンの添加における電荷の中和によっては影響されないと考えられる。

焼くことで食塩添加の効果が、泡沫安定性に影響を与えた。焼いた場合、GFA と混合物に対しては、食塩を添加することで、泡容量の減少は抑えられた。しかし卵白は食塩の添加量が増えるほど著しく安定性が減少した。砂糖を添加した場合は、かたさがあり、しっかりとして表面がなめらかな焼きメレンゲに仕上がったが、食塩を添加した場合、それに比べ柔らかく、もろいメレンゲに仕上げり表面のなめらかさも劣る。卵白の場合、食塩の添加によって泡立ち性(起泡性)に大きな影響を受けないが、焼成することで、食塩を添加した卵白液の泡の安定性が、食塩の量によって著しい影響を受ける。これは、存在する塩の量によってタンパクの水和に顕著な違いを生じるためである可能性がある。つまり食塩添加の泡の安定性が $<0.1M$ の低濃度において大きいのは、低濃度における塩の作用が主として静電的なもので、タンパクの電荷を中和するように働くため、卵白液が等電点に近づくとタンパクの水和は減少し、タ

ンパク分子が表面に集まり、凝集を起こしやすくなり保護膜ができるようになるためと思われる。0.3M以上の中濃度において安定性が悪くなるのは、中濃度の塩の作用が界面化学的なものでアニオンが卵白のタンパク質分子に吸着され、そのアニオンが自分のもつ水和力で水を引きつけるので間接的にタンパクの水和が増加し、結果表面膜ができにくくなり、泡の安定性が悪くなるものと考えられる。卵白の場合は、上記のような結果と同様のことがすでに報告されている。しかし GFA や混合物の場合は、卵白とは逆に塩の量が増える程、泡の安定性が増した。これは塩イオンが増えるほど、それによって GFA タンパク質の表面電荷が中和されるためと考えられる。GFA の界面変性とそれに伴う分子間相互作用には、表面電荷が大きく影響するものと思われる。

特に、混合試料によって作られた泡は、砂糖添加の場合と同じように、静電的な相互作用と水素結合の両方が相乗効果によって関係するかもしれないことを暗示している。つまり食塩添加により安定化した。食塩はしばしば、ここで見られた卵白の安定性のように、起泡性を増加させ、泡沫安定性を減少させる効果がある。GFA は、食塩添加により泡特性が改善された。一般に球状タンパク質は、食塩の添加量が増える程、起泡性と泡沫安定性の両方が増えることが観察された。

(4) 還元剤による比容積の変化

次に還元剤の比容積に与える影響を見た。いずれの場合も還元剤であるメルカプトエタノール (ME) の添加量が増えてもほとんど起泡性が増加しなかった。これは前報の低濃度で起泡性を調べた結果と類似していた。つまり GFA は、分子間および分子内ジスルフィド結合の解裂による自由度の増加よりも、疎水性/親水性のバランスが適切に保たれているかが重要であることを示している。

(5) 泡沫サイズ分布

GFA により作られた泡は、卵白の泡よりも滑らかで、かさが高いことを前報で示した。GFA の泡のサイズ分布は顕微鏡によって観察された。GFA は卵白よりも1つ1つの気泡が小さく、小泡沫が多数存在することが分かった。この結果からも、GFA の方が卵白よりもなめらかで柔軟な質感の泡であることが言える。タンパク質濃度 0.5mg/ml の時、GFA の泡サイズの平均は $0.025mm^2$ で卵白は $0.052mm^2$ であった。サイズ分布における同様な差は、40mg/ml の時に観察された。つまり GFA と卵白と混合試料はそれぞれ $0.023mm^2$ 、 $0.013mm^2$ 、 $0.14mm^2$ であった。GFA の相乗効果は、泡のサイズ分布において反映された。

(6) GFA の化学的および免疫学的解析

GFA をイオン交換クロマトグラフィーで精製し、還元カルボキシル化後、ODS カラムで 6 kDa と 11 kDa サブユニットに分離した。各サブユニットの N-末端のアミノ酸配列を調べ、発現遺伝子配列断片のデータベースで検索した結果、いずれもグアー豆の発芽時に発現する 2S アルブミンと高い相同性を示し、GFA は 2S アルブミンファミリーに属するタンパク質であると結論した。2S アルブミンが食物アレルギーとして知られているため、GFA の免疫学的解析を行なったところ、小麦および大豆アレルギー患者の抗血清に対して交差を示さなかった。また、厚生労働省の通知法に基づく酵素免疫測定法により、落花生タンパク質に対する抗体とはほとんど交差性を示さず、落花生アレルギー患者に対しても安全に使用できる可能性を示した。

(7) GFA の乳化特性

タンパク質濃度と濁度、および油容量比と濁度の関係から評価したとき、GFA の乳化容量は BSA のそれに比べてやや低かった。また GFA 乳化活性値は、タンパク質濃度 1～15mg/ml において BSA の方が高い値を示し、GFA の乳化活性は BSA に比べ低い事が判明した。また、平均脂肪球サイズの経時変化から乳化安定性を評価すると、GFA の脂肪球サイズは BSA のそれより小さく、時間的变化が少ないことから、比較的良い乳化剤であると思われた。

結論として、植物由来の高起泡性タンパク質である GFA は、高い起泡性および泡沫安定性をあわせ持つめずらしいタンパク質であり、アレルギー性の高い卵白の代替タンパク質として、泡を必要とする食品で使用できることを確認した。

5. 主な発表論文等

[図書] (計 1 件)

- ① A. Shimoyama and Y. Doi “Guar Foaming Albumin – A Foam Stabilizer” in *Food Additive* (ISBN 978-953-51-0067-6) INTECH (www.intechopen.com) 2012 年

[その他]

ホームページ等

<http://www.intechopen.com/books/food-additive/guar-foaming-albumin-a-foam-stabilizer>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 幸雄 (DOI YUKIO)

京都女子大学・家政学部・教授

研究者番号：40172233

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

下山 亜美 (SHIMOYAMA AMI)

京都女子大学・家政学部・非常勤講師

研究者番号：40461967