

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660108

研究課題名(和文)食品高分子のゾル・ゲル転移に及ぼす高分子水和状態の影響の解析

研究課題名(英文)Effect of hydration state of macromolecules on sol-gel transition of food macromolecules

研究代表者

宮脇 長人(Miyawaki, Osato)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：80012053

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):食品高分子などのゾル・ゲル転移においては、ゲル状態における高分子の分子間水素結合が、ゾル状態では開裂・水和する。この水和反応においては、バルク水分状態の指標である水分活性がゾル・ゲル転移に強く影響するはずである。本研究では、このような視点からゼラチンなどのゾル・ゲル転移現象を解析し、水分活性の役割の重要性を示すことができた。このようなゾル・ゲル転移における水分活性の役割については、従来の研究では全く無視されてきており、今後、食品物性研究において、これまでにない全く新しい視点を提供するものである。

研究成果の概要(英文):In the sol-gel transition of food macromolecules, the intermolecular hydrogen-bonding among macromolecules are broken down to bring about the hydration of macromolecules so that the water activity, as an index of the bulk state of water, is expected to affect the transition process strongly. From this standpoint of view, the sol-gel transition of food macromolecules, such as gelatin, was analyzed to show an important role of water activity in such phenomena. This result will provide an entirely new approach in the study of physical properties of food macromolecules.

研究分野：農学

キーワード：食品高分子 ゾル・ゲル転移 水分活性 高分子水和 水素結合 ゼラチン

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の着想に至った背景にはこれまでのわれわれのタンパク質安定性に関する水和の影響の研究がある<sup>1-3)</sup>。タンパク質安定性と水和の関係の研究の出発点は、Pauling による水素結合の概念の提唱にあり、水は水素結合ネットワークを形成し、液体状態が大きく安定化することが示され、これを踏まえて、Eisenberg と Kauzmann は X 線回折による動径分布関数測定により、‘水の構造’の概念を確立し、これ以降は、水溶液中における溶質による水溶液構造論が中心的課題となった。

一方、Tanford は疎水性水和の概念を提唱し、種々のアミノ酸の水および有機溶媒への溶解度から、アミノ酸の水系から非水溶媒系への移行エネルギーを求めて、アミノ酸残基間の疎水性相互作用の定量化を行い、タンパク質安定性における疎水性相互作用の重要性を立証した。

タンパク質構造安定化のもう一つの大きな要因は分子内水素結合であるが、奇妙なことに、このことはこれまでに殆ど定量的に取り扱われてきていない。タンパク質は未変性状態では分子内水素結合し、これが変性状態になると、分子内水素結合が開裂して水和するため、バルク水分状態の指標である水分活性がタンパク質安定性に強く影響するはずである。このような着想のもと、われわれは、種々のタンパク質の水溶液中での熱安定性と水分活性とを比較した結果、両者の間に極めて良好な相関を得、タンパク質分子安定性に及ぼす分子内水素結合の影響を証明することができた<sup>1-3)</sup>。本研究は、この水分活性による高分子内水素結合に及ぼす影響を、高分子間水素結合に拡張して、食品高分子のゾル・ゲル転移現象（集合安定性）を解析しようとするものである。生体高分子の分子安定性と集合安定性の比較概念図を図 1 に示す。

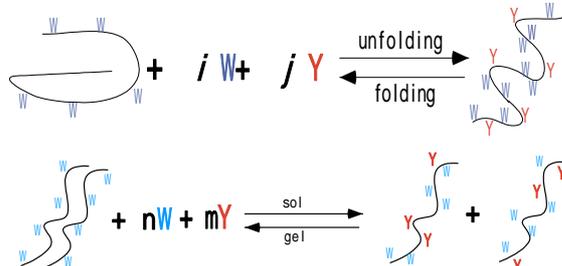


図 1 生体高分子の分子安定性と集合安定性

### 2. 研究の目的

本研究においては水分活性の視点から食品高分子のゾル・ゲル転移を解析し、食品高分子に対する水和状態の影響を解析することによって、高分子の分子間水素結合の影響を定量化し、ゾル・ゲル転移に及ぼす溶媒効果の適正な評価を行うことを目的とする。このことは、ゾル・ゲル転移制御による食品物性制御のみならず、食品・生体高分子の種々の機能、すなわち、タンパク質サブユニット相互作用、DNA-DNA 相互作用、酵素基質複合体形成、などに及ぼす溶媒効果のより一般的な解析手法を確立するものである。

### 3. 研究の方法

研究目的達成のため、まず、水分活性データベースの構築および水溶液中での溶質活量、溶液構造を解析する。次に、種々の溶液において食品高分子のゾル・ゲル転移を測定し、その二状態モデルによる解析から、ゾル・ゲル転移に及ぼす水分活性の影響を解析する。そして、その結果に対してWyman-Tanford解析を適用することによって、ゾル・ゲル転移に伴う高分子の水和分子数および溶質結合分子数を解析する。

(1) 水溶液の水分活性データベースの充実  
各種糖類、糖アルコール類、中性塩類などの溶液の水分活性を測定しデータベース化してゆく。われわれがこれまでに得た知見によると、水分活性( $a_w$ )はほとんどの場合、以下の式により記述できることがわかっている<sup>4)</sup>。

$$a_w = (1 - X_Y) \exp(-X_Y^2 - X_Y^3) \quad (1)$$

従って、水分活性のデータベース化は、この式のパラメータ、 $X_Y$  の値を種々の系で求めてゆくことになる。われわれはこのデータを現在までに既にかなり蓄積をしてきている。実際の水分活性測定は、露点法による水分活性測定装置あるいは精密融点測定装置による。

### (2) 食品高分子のゾル・ゲル転移の測定

種々の溶液環境において温度を変化させて、まず、ゼラチンのゾル・ゲル転移を測定する。測定法は、円偏光二色分析(CD)および高感度示差走査熱量分析(DSC)を用いる。これらの測定値から、次式により定義される高分子のゾル状態([Sol])とゲル状態([Gel])の比、すなわちゾル・ゲル状態平衡  $K$  の温度依存性および水分活性依存性を算出する。

$$K = [\text{Sol}]/[\text{Gel}] \quad (2)$$

-カラギーナンや寒天などの他の食品高分子についても同様のゾル-ゲル転移解析を

行う。

(3) ゼル・ゲル転移現象の二状態モデルによる解析

上記ゼル・ゲル状態平衡 $K$ に対して、以下の van't Hoff 式を適用する。

$$d \ln K / dT = \Delta H_0 / RT^2 \quad (3)$$

ここに  $\Delta H_0$  はゼル・ゲル転移エンタルピー、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度である。この式の積分形は以下ようになる。

$$\ln K = -(\Delta H_0 / R)(1/T - 1/T_m) \quad (4)$$

ここに  $T_m$  はゼル・ゲル転移中点温度である。

(4) ゼル・ゲル転移現象に及ぼす水分活性の影響の解析

ゼル・ゲル転移現象を以下に示す、ゲル状態の高分子に対する水和と溶質の多点結合反応によりゲル状態に移行する反応として取り扱う。



ここに  $W$  は水分子、 $Y$  は溶質分子、また  $i$ 、 $j$  はそれぞれ、ゼル・ゲル転移に伴う、水和数および溶質結合数の変化である。van't Hoff 式における  $\Delta H_0$  および  $T_m$  を種々の溶液において求めることにより、式(4)を用いて、一定温度におけるゼル・ゲル状態平衡 $K$ の水分活性 $a_w$ に対する依存性を算出することができる。この結果に対して、次式の改変 Wyman-Tanford 式を適用する。

$$d \ln K / d \ln a_w = i - (X_W / X_Y) j \quad (6)$$

ここに  $a_w$  は水分活性、 $X_W$  および  $X_Y$  は、それぞれ、系における水および溶質のモル分率である。

#### 4. 研究成果

(1) 水溶液の水分活性データベースの充実  
本研究におけるタンパク質集合安定性の解析に必要な基礎データとしての単一成分系の水分活性について、式(1)に基づいて、水分活性パラメータを求めた。その典型的な例を表1に示す。

表1 種々の水溶液における水分活性パラメータ

classification	solute			r
sugar	Trehalose	3.031	-571	0.9981
	Sucrose	-7.405	-	0.9999
amino acid	myo-Inositol	66.09	-2955	0.9998
	Glycine	10.164	-276	0.9994
	Sarcosine	-2.743	-	0.9998
	N,N-Dimethylglycine	-16.81	127.3	0.9999
trimethylamine	Betaine	-8.592	-	0.9999
	Proline	-0.5199	-99.1	0.9998
	Taurine	47.747	-3333	0.9997
	TMAO	-13.421	-	0.9999
others	Urea	0.8309	-	0.9999

さらに、二成分以上の混合溶液系についても水分活性の測定を行い、結果を、溶質成分間相互作用を無視した理論式である、下記の Ross 式との比較を行った。

$$a_{w,mix} = a_{w1} a_{w2} a_{w3} \dots \quad (7)$$

ここに、 $a_{w,mix}$  は混合溶液の水分活性、 $a_{w1}$ 、 $a_{w2}$  等は、それぞれの同濃度の単一成分溶液の水分活性である。図2にスクロースとグリシンの当モル混合系における結果を示す。この系においては実験結果は Ross 式による予測とほぼ一致しており、溶質成分間相互作用はほとんど見られないことがわかる。

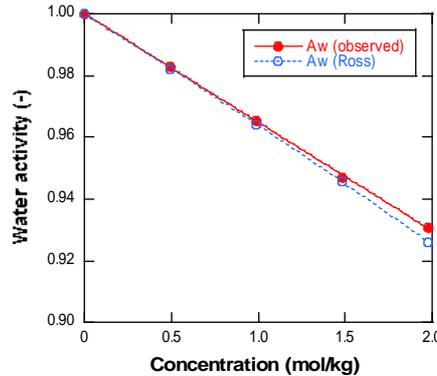


図2 スクロース/グリシン当モル混合水溶液系における水分活性

(2) ゼラチンのゼル・ゲル転移の測定およびその二状態モデルによる解析

ゼラチンのゼル・ゲル転移を CD 測定により行った。その結果、ゲル状態に対する糖類の安定化効果などを観察できたものの、ゼル・ゲル転移が時間依存的な速度過程であるため、平衡状態を前提とする二状態モデルが適用できないことがわかった。そこで、改めて高感度 DSC を用いて、(4)式における、ゼル・ゲル転移中点温度  $T_m$  およびゼル・ゲル転移エンタルピー  $\Delta H_0$  を求め、van't Hoff 式から、ゼル・ゲル平衡を計算する方法を用いた。図3にスクロース水溶液中におけるゼラチンのゼル・ゲル転移曲線を示す。スクロースによるゲル状態の安定化効果が見られる。

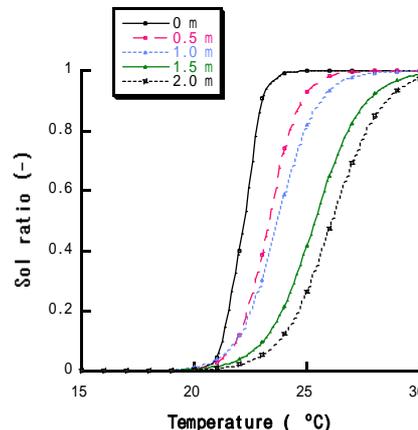


図3 スクロース溶液中におけるゼラチンのゼル・ゲル転移曲線

(3) ゼル・ゲル転移現象に及ぼす水分活性の影響の解析

種々の水溶液中における一定温度 (23 )

でのゾル・ゲル比  $K$  を求め、これを式(6)の改変 Wyman-Tanford に従ってプロットした結果を図 4 に示す。良好な直線関係が得られており、このことは、ゼラチンのゾル・ゲル転移、すなわち生体高分子の集合安定性における水分活性の重要性を明瞭に示している。

表 2 に改変 Wyman-Tanford プロットの勾配を示す。この値が正の場合、溶質はゲル状態を安定化、負の場合不安定化する。

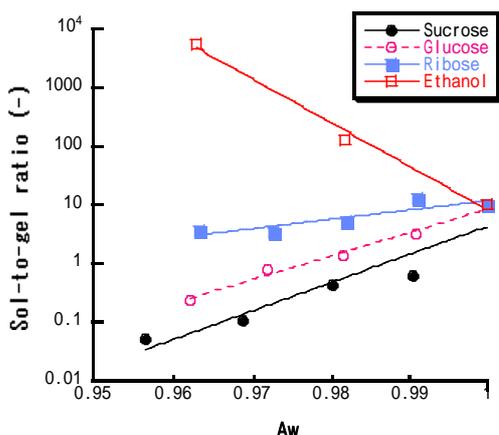


図 4 種々の水溶液中におけるゼラチンのゾル・ゲル転移の改変 Wyman-Tanford 式による解析

表 2 種々の溶液系でのゼラチンのゾル・ゲル転移における改変 Wyman-Tanford プロットの勾配

Solute	WT-slope	$T_{ref}^*$ (°C)
Sucrose	108.8	23
Glucose	90.6	23
Ribose	35.6	23
Urea	-268.5	16
Ethanol	-168.0	23

\*) Reference temperature

以上の結果はタンパク質の分子安定性の場合<sup>1-3)</sup>と同様に、高分子の集合安定性としてのゼラチンのゾル・ゲル転移における水分活性の役割の重要性を示しており、同様な結果を多糖類である - カラギーナンのゾル・ゲル転移についても得ることができた。

ここで示したような生体高分子の分子安定性や集合安定性において、水分活性の役割は、これまでの研究においては全く無視されてきた。これは、通常の水溶液系においては図 4 からわかるように、水分活性の変化はそれほど大きくないため、これをほぼ一定と見なしてきたためと思われる。しかしながら図 1 から明らかなように、このような反応に参与する水分子数は大きな値が予測され<sup>1)</sup>、これを原因とする協同的水和効果による増幅効果が重要な役割を果たしているものと思われる。本研究成果は、今後、タンパク質安定性や食品物性制御などの研究において、これまでとは全く異なる水分活性からの新

しい視点を提供できたものと確信する。

#### <引用文献>

O. Miyawaki, Hydration state change of proteins upon unfolding in sugar solutions., *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 928-935 (2007).

O. Miyawaki, Thermodynamic analysis of protein unfolding in aqueous solutions as a multisite reaction of protein with water and solute molecules., *Biophys. Chem.*, **144**, 46-52 (2009).

O. Miyawaki et al., Thermodynamic analysis of osmolyte effect on thermal stability of ribonuclease A in terms of water activity., *Biophys. Chem.*, **185**, 19-24 (2014).

O. Miyawaki et al., Activity and activity coefficient of water in aqueous solutions and their relationship with solution structure parameters., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 466-469 (1997).

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

H. Sone, C. Omote, and O. Miyawaki, Effect of intermolecular interactions on water activity of multicomponent aqueous solutions., *Japan J. Food Eng.*, 査読有, **16**, 55-59 (2015).

O. Miyawaki, M. Dozen, and K. Nomura Thermodynamic analysis of osmolyte effect on thermal stability of ribonuclease A in terms of water activity., *Biophysical Chemistry*, 査読有, **185**, 19-24 (2014).

[学会発表](計 3 件)

宮脇長人・表千晶・松平景子, 水溶液中におけるゼラチンのゾル・ゲル転移における協同的水和効果の解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 3/26 ~ 29, 岡山 (2014).

宮脇長人・松平景子, 水溶液中の生体高分子の分子安定性および集合安定性に及ぼす協同的水和効果, 第 60 回低温生物工学会年会, 東京工科大学, 5/30-30 (2015).

O. Miyawaki, Thermodynamic analysis of protein stability in terms of water activity in aqueous solutions., 8<sup>th</sup> Annual World Protein & Peptide Conference 2015, Nanjing, China, April 25-28 (2015).

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇長人 (MIYAWAKI, Osato)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授  
研究者番号: 80012053