

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450177

研究課題名(和文) タンパク質凝集ナノ粒子の食品機能性を凍結によって創製する研究

研究課題名(英文) Study on the microstructure control for aggregated protein nanoparticles by using freezing

研究代表者

中川 究也 (NAKAGAWA, Kyuya)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90433325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カゼイン凝集ナノ粒子のミクロ構造を凍結を利用して制御し、脂溶性物質の包含特性や消化性の異なるナノ・マイクロカプセルを作製する新規プロセス技術を開発した。凍結濃縮相内においてカゼイン凝集体の構造変化が進行すること、この構造変化にはこれは初期溶液のpHと強く関連していること、凍結時の構造変化またこの構造変化は凝集体のフラクタルな構造変化に関わるのみならず、粒子の疎水性度を上昇させるような構造変化だということを明らかにした。凍結を経て形成する凝集構造変化が凝集粒子の疎水性度の変化と関わっており、模擬消化過程において分解する過程の粒子構造に大きな影響を与えていることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Sodium caseinate is known to form aggregated clusters (nanoparticle) under low pH conditions. Freezing potentially has effects on the nano-scale structural change of the clusters because of the formation of the freeze-concentrated phase. Sodium caseinate particles associated with β -carotene were prepared in this study via freeze-aging. Resultant properties were analyzed in terms of β -carotene encapsulation efficiency, surface hydrophobicity, small angle X-ray scattering, and digestively in a simulated gastric solution. The β -carotenes were found to distribute between the surface and interior of the freeze-dried specimens depending on the aging conditions. The surface hydrophobicity of the clusters also indicated a change in the particle microstructures due to the aging. Detail of this structural change in the freeze-concentrate was investigated by SAXS analyses. Interestingly, the freeze-aging also affect the microstructures of the casein clusters during digestion reaction.

研究分野：農学

キーワード：食品工学 凍結濃縮 マイクロカプセル

1. 研究開始当初の背景

近年、適切に設計されたキャリア物質を用いて、薬理活性物質を生体内へと運搬・放出させる技術が広く研究されている。ターゲットとする特定の器官に、できるだけ特異的にナノ粒子を取り込ませ（もしくは付着させ）、その部位にて継続的な薬剤放出を実現させることが大きな命題となる。近年、これら技術を食品分野へも応用するべく、ナノ粒子を利用した食品栄養素や機能性物質の送達を試みる研究が広く実施されるようになってきた。食品用途としての利用を実現するにあたり、医薬用途とは異なるいくつかの技術課題が生じる。A) 経口摂取されることを前提としたカプセルの設計、B) 食品として認可された物質に原料が限定される、C) 製品の貯蔵安定性が長期であること（乾燥粉末であることが望ましい）、D) 生産プロセスが安価かつ簡易であること。などが挙げられる。従って、研究課題として、口胃腸という消化経路内の適切な場所にてナノ粒子（もしくは内包された機能性物質）を取り込ませるために必要な粒子構造の理解、可食性の限られた物質のみからその構造体を創り出す方法論、製品の品質（機能性、貯蔵安定性など）を確保するためのプロセス工学的な最適化技術などが重要課題と目される。

近年、医薬食の用途を問わず、ナノ粒子の生産のエンジニアリングに関わる研究の出遅れが指摘されている。すなわち、目的品質を満たす製品の恒常的な生産のために必要な、生産現場へと実装可能な知見が整備されていないかと思う。研究代表者は、粒子を作製する方法論に、品質の最適化を実施し易くする操作因子が組み込まれていないことを課題として挙げる。すなわち、ナノ粒子の機能性の最適化には、その機能性の作り分けが可能な単位操作がプロセスに組み込まれているべきであると考えている。今回の研究はこれに対するひとつの答えを与え

ることを目指して開始した。

2. 研究の目的

タンパク質や多糖といった天然高分子からナノ粒子を作製できる。これは食品栄養素や機能性物質を体内へ適切に送達・放出するカプセルとして利用でき、食品に機能性を付加する技術として有望である。本研究では、タンパク質や多糖といった天然高分子から作製できるナノ粒子を対象とし、特性の設計を可能とする新しい操作手法を開発したい。そこで本研究では、食品機能性物質をカプセル化したタンパク質凝集ナノ粒子（ナノカプセル）を、凍結操作によって作り分ける手法の研究を目的とした。研究代表者はこれまでに、凍結を利用したナノ・マイクロカプセル製造法を提案してきた。凍結過程で生じる氷晶は、溶質や分散質を排斥し、凍結濃縮相と呼ばれる高濃度液相を形成する。この凍結濃縮相内部における濃度上昇を利用し、pH やイオン強度の変化に起因するナノ粒子形成を引き起こさせるのが本技術である。凍結濃縮相内にてナノ粒子形成を進行させれば、粒子形成は凍結条件に応じた速度にて進行する。粒子特性がその構造形成速度に依存する場合、凍結によってその特性が制御できる。これはナノ粒子の特性制御を組成の変更によらず実現する新しい手法であるが、その現象の基礎や理論の究明のために本研究を実施した。

3. 研究の方法

ナトリウム塩により可溶化させたカゼインナトリウムは、pH に依存してナノサイズの自己凝集体を形成する。疎水性相互作用を利用して脂溶性物質をタンパク鎖に吸着させた後に凝集構造を形成させることで、ナノカプセルを作製することができる。

カゼインナトリウムの粉末を蒸留水に溶解させた分散液を作製した。ここに、モデル脂溶性物質（カロテン）を少量のアセトン

に溶解させた溶液を加え、水溶液中に カロテンを溶解・分散させた。この溶液に 1%酢酸水溶液を加え、各 pH 7.0 (酢酸無添加), 6.0, 5.5 に調整し、1.5 mL サイズのマイクロチューブに分注した。溶液調製から 1 時間以内に -15, -25, -40 の各温度に設定した恒温槽中に投入し、一定時間凍結環境下に保持した後、30 の恒温槽中で速やかに融解させ、分析に供した。乾燥試料の作製に際しては、凍結環境に保持した後、そのまま減圧下において凍結乾燥を実施し乾燥試料を得た。

乾燥試料に対しては、内包させた カロテンの包含率を、粒子表面、粒子内部とそれぞれについて分析した。また、乾燥試料の疎水性度を、一定量の水で再水和させた試料に対して ANS プローブを用いた分析手法により計測した。

作製した凍結融解溶液を石英製キャピラリーチューブ (2 mm 径) に分注し、放射光 X 線を用いて小角散乱像を測定した。使用 X 線波長は 0.1 nm, 試料からディテクターまでの距離は計測する構造サイズに応じて 3 m から 40 m の範囲で選択した。

模擬消化液を用いた消化反応特性についての測定も実施した。カゼインナトリウム溶液に 1% (w/v) 酢酸水溶液を適量加え、pH 5.5 に調整し 2.0 mL の試料溶液を凍結乾燥した。昇華過程の前に、-20°C で 12 時間のエージングを行い、その後減圧下で凍結乾燥して乾燥試料を得た。得られた乾燥粉末を塩酸で pH 2.0 に調整した水溶液中に溶解させ、37°C でペプシンを作用させた。一定の時間間隔で試料をサンプリングし、速やかに pH を 6.0 に調整し酵素反応を停止させた。この反応過程の反応速度、および溶液に分散しているカゼイン凝集体の構造を小角 X 線散乱測定によって分析した。

4. 研究成果

カゼインナトリウムの溶液は、pH 6.0 より低い領域にて視認可能な自己凝集体 (白濁) が形成し、pH 4.0 以下で沈殿が形成する。この自己凝集体物は、約 100-300 nm 程度の粒子径を持つナノ粒子であり、脂溶性物質を疎水性相互作用によって吸着させることができる。すなわちナノカプセル微粒子としての利用を期待するものである。Fig.1 上写真に示す様に、カゼインナトリウムの溶液は、pH 5.5 以下から顕著に自己凝集体が形成し、pH 5.0 以下で沈殿が形成する。これらの溶液を凍結解凍したところ pH 値が 5.5 の系において、明確な沈殿の形成を視認できた (Fig.1 下)。このことより凍結によって誘発された凝集を確認した。

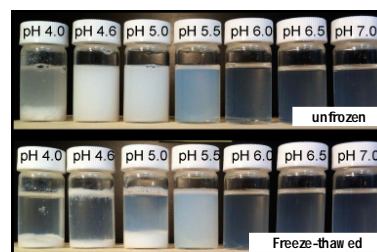


Fig.1 カゼインナトリウム溶液凍結前 (上) 凍結後 (下)

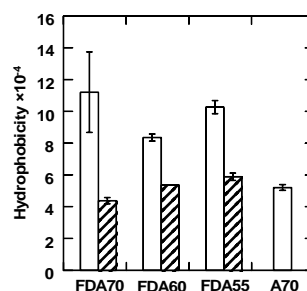


Fig.2 再水和後の凍結乾燥カゼインの表面疎水度; 白: エージング時間 0 h, 斜線: エージング時間 12 h (図中の数値は溶液の設定 pH)

カゼインナトリウム水溶液に カロテンを溶解させ (水中に カロテンは溶解しないが、カゼイン共存下で可溶化する。微量のアセトンに カロテンを溶解させ、カゼインナトリウム水溶液に混合させる), pH を 5.5, 6.0, 7.0 に調整した。この溶液を -40°C にて

一旦凍結させたのち、 -20°C まで加温、一定時間のエージングを適用、その後すみやかに凍結乾燥させた。対象としてエージングを経していない試料も作製した。得られた乾燥試料のカロテンの包含状態、疎水性度を評価した。その結果、凍結プロセスの適用は凝集タンパク質微粒子の疎水性度と関わる特性が制御できることが確認できた (Fig. 2)。

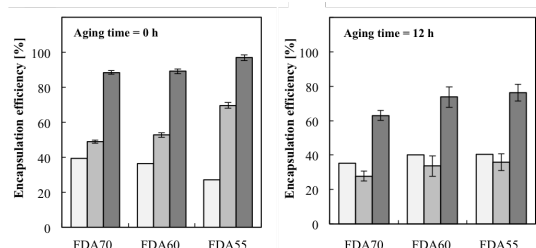


Fig.3 凍結乾燥試料中へのカロテンの包含率；(□)表面包含率，(■)内部包含率，(▣)包含率総和

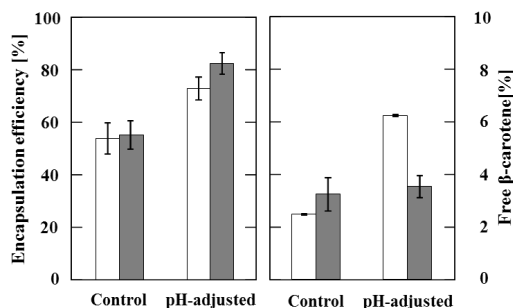


Fig.4 凍結エージングを経て作製した噴霧乾燥試料へのカロテンの包含率；(□)凍結エージング無し，(■)凍結エージング有り (pH=6.0)

乾燥試料中へのカロテンの包含率を測定した。Fig. 3に示すように、凍結を経ることで微粒子表面に暴露されるカロテン量は増加した。一方、同様の検討を凍結エージングを経て作製した噴霧乾燥試料に対して実施したところ、表面に暴露されるカロテン量 (free β -carotene) は減少することが確認できた。

脂溶性物質を固体分散させた乾燥試料を作製するにあたり、凍結エージングを経ることはこれらの物質を微粒子表面に暴露するような形態の構造変化が起こることが予測される。この構造を保持したまま乾燥させる

凍結乾燥を経る場合、貯蔵性の向上には不利かもしれない。ただし、噴霧乾燥試料に見られるように、表面に暴露された疎水的な表面は、粒子同士の凝集によってキャンセルすることが考えられる。凍結乾燥試料を水中に再分散させて得た試料の疎水性度を評価すると、エージングを経た試料の方がより低い疎水性度を示した。これは再水和する際に不利な疎水的表面を粒子同士が凝集することでキャンセルさせたためと考察している。すなわち、食品として経口摂取される過程においては脂溶性物質を粒子内部に格納するようになるため、消化過程における物質の放出、もしくは生体取り込み能が変化することが期待できる。

pH 調整したカゼインナトリウム水溶液を凍結・エージングを経た後に融解し、放射光を用いた小角 X 線散乱によって凝集微粒子のナノ構造解析を行った。カゼインナトリウムの自己凝集体はフラクタル構造を持つクラスターと考えられ、数十 nm の一次凝集体が複数凝集し、数 μm に及ぶ凝集構造を有していることが小角 X 線散乱パターンから予測できた (Fig. 5)。

フラクタルな凝集クラスターの形成メカニズムは、拡散律速凝集と反応律速凝集モデルによって説明できる。凍結濃縮相内でクラスター形成が進行するとなれば、これら双方のメカニズムによるクラスター形成が同時に進行し、凍結条件に依存した異なる構造を有するクラスター形成を導くことが予測される。そこでまず、エージングを経たものと経ていない乾燥試料を作製し小角 X 線散乱パターンの分析結果を比較し、凍結直後に融解させた試料では凝集体は一旦大きく凝集し、比較的粗な構造 (慣性半径が小さく密度が低い構造) を有することが予測された。ここで一次凝集体の構造はさほど変化せず、数百 nm から数 μm の大きさの凝集構造に変化が生じていた。凍結下においてエージングを

経ると、この粗な構造は継時的に密な構造へと変化していると考えられた。この時の凝集構造変化が凝集体の疎水性度の変化と関わっていると考察できた。

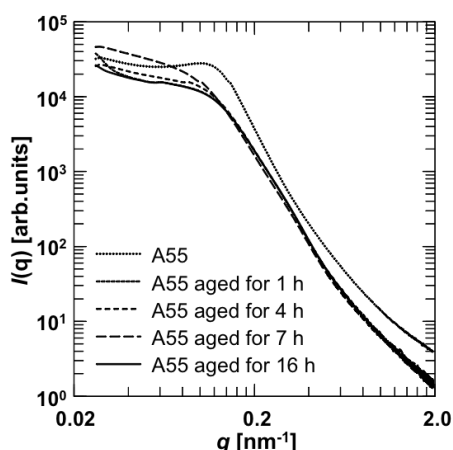


Fig.5 凍結エージングを経たカゼインナトリウム溶液の小角X線散乱パターン

乾燥試料を模擬消化液中で加水分解反応を進行させ、消化反応の進行に伴う凝集構造の変化を追跡した。まず、反応の進行速度の比較を行った。模擬消化過程における消化反応（カゼインの加水分解）の進行をニンヒドリン法によって測定し、凍結エージングを経た試料と経ていない試料の反応履歴を比較した（Fig. 6）。これより明らかなように、反応の進行に明確な差異は見出すことはできない。すなわち、凍結エージングによってナノスケールの構造変化は生じているものの、反応速度に影響をおよぼすものではないことが伺える。

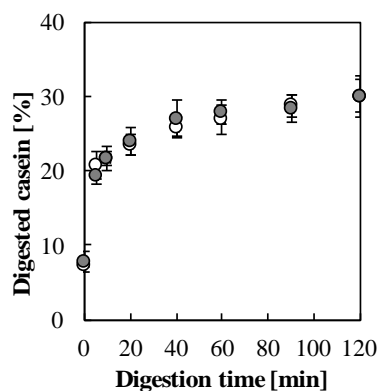


Fig.6 ニンヒドリン法によって測定した消化反応の進行；(□)凍結エージング無し，(■)凍結エージング有り（pH=6.0）

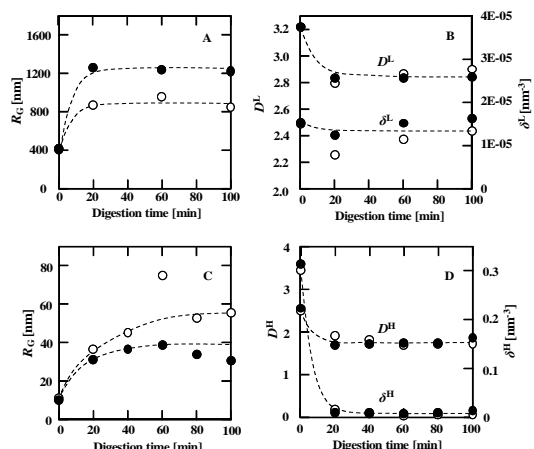


Fig.7 小角X線散乱測定結果より分析した模擬消化での構造変化の進行；(○)凍結エージング無し，(●)凍結エージング有り

模擬消化過程におけるクラスター構造の変化を小角X線散乱によって追跡した。消化環境における加水分解の進行によって、凝集タンパク質のクラスターは複数に分かれるが、別れたクラスター同士が再度凝集することにより、クラスターはそのサイズと構造を複雑に変化させていくことが報告されている。今回のケースでは、凍結下においてエージングを経た試料、経ていない試料いずれについても、数十 nm の一次凝集体と考えられる構造体の大きさの増加が認められた。エージングを経た乾燥試料は、数 μm レベルの凝集体はさらにその大きさを増し、慣性半径の大きな粗な凝集体が形成することが確認された。一方、エージングを経ていない乾燥試料は、数 μm レベルの凝集体の大きさは逆に減少し、消化の過程でより密な凝集体が形成することが示唆された（Fig. 7）。消化性に関わるこれら粒子の特性は、生体内における粒子の挙動やバイオアベイラビリティと強く関わると期待できるため非常に興味深い。

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 3件)

T. Jarunglumlert, K. Nakagawa, S. Adachi, Digestibility and structural parameters of spray-dried casein clusters under simulated gastric conditions, *Food Research International*, 75, 2015, 166-173.
査読あり
doi:10.1016/j.foodres.2015.05.049

T. Jarunglumlert, K. Nakagawa, S. Adachi, Influence of aggregate structure of casein on the encapsulation efficiency of β -carotene entrapped via hydrophobic interaction, *Food Structure*, 5, 2015, 42-50.
doi:10.1016/j.foodstr.2015.05.001

K. Nakagawa, T. Jarunglumlert, S. Adachi,, Structural Changes in Casein Aggregates under Frozen Conditions Affect the Entrapment of Hydrophobic Materials and the Digestibility of Aggregates, *Chemical Engineering Science*, 143, 2016, 287-296.
doi:10.1016/j.ces.2016.01.001

〔学会発表〕(計 6件)

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 究也 (NAKAGAWA, Kyuya)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号： 9 0 4 3 3 3 2 5