

## 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 6 月 20 日現在

機関番号：42686

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500747

研究課題名（和文）乳タンパク質の自己会合及びゲル形成機構解明への高感度超音波分光分析の活用

研究課題名（英文）Use of ultrasound spectroscopy to examine the effect of fatty acid sodium salt on the self assembly and gel formation of milk proteins at ambient temperature

研究代表者

太田 尚子 (Ohta Naoko)

日本大学・短期大学部・教授

研究者番号：00203795

研究成果の概要（和文）：

本研究では、乳タンパク質の $\beta$ -カゼインと $\beta$ -ラクトグロブリンの脂肪酸塩存在下及び非存在下における相互作用について、超音波分光分析並びに動的粘弾性測定により調べた。 $\beta$ -カゼイン単独または $\beta$ -カゼインと $\beta$ -ラクトグロブリン混合系は脂肪酸塩非存在下では一過的な超音波減衰の増加が観察されたものの、動的弾性率の増加は認められず、三次元的ネットワークの構築は起こっていないことが判った。一方、この混合タンパク質系に脂肪酸塩の一種であるカプリン酸ナトリウムを添加した際には、 $\beta$ -ラクトグロブリン単独タンパク質に比べ超音波減衰の増加や弾性率の増加は少ないもののゲル化現象が認められた。このことから $\beta$ -カゼインが脂肪酸塩存在下でテクスチャーモディファイヤーとして役立つことを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Although  $\beta$ -CN micelle formations are quite different from  $\beta$ -LG gel formation in the presence of fatty acid salts,  $\beta$ -CN can participate in the gel formation in the mixed protein system by the addition of fatty acid salt with suppressing own micelle formation. FT-IR analysis showed that although the amount of intermolecular  $\beta$ -sheet ( $1623\text{ cm}^{-1}$ ) of the protein was temporarily increased concomitantly with casein micelle formation, and then the  $\beta$ -sheet decreased. In the case of it, ultrasonic spectroscopy has some advantages to know transient structural changes such as self assembly of casein protein not only gelation, if we use some other tools together like FT-IR spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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： $\beta$ -ラクトブロブリンのゲル化、カゼインの自己会合、超音波分光分析

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、脂肪酸塩添加による種々の食品タンパク質のゲル形成機構の改変について報告してきた。更に、超音波分光分析法でゲル化現象を解明することの可能性について検討を加えてきた (Colloid and Polymer Science, Vol. 287, 1487-1491, (2009))。本研究では容易に自発的会合 (ゲルネットワーク形成とは異なる) をする性質をもつカゼインについて超音波分光分析法の有用性を検証した。

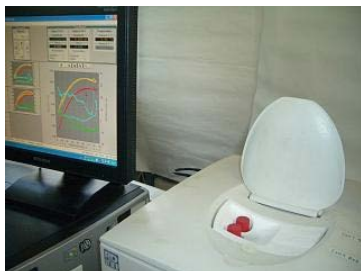
### 2. 研究の目的

乳カゼインは自己会合し易い興味深いタンパク質であるが、元来、自己会合はある限られたタンパク質に見られる現象であり、かつこの現象を捉えることのできる機器分析法が確立されていないことに着目し、比較的新しい手法である超音波分光分析法を試すこととした。即ち、乳タンパク質の自己会合及びゲル形成機構解明への高感度超音波分光分析の活用を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

動的粘弾性測定は TA インストルメント社製動的粘弾性測定装置 RFS-III、超音波分光分析は Ultrasonic Scientific 製 HR-US102 (Dublin, Ireland)、フーリエ変換赤外分光分析は島津製作所 8300 型を用いた。

本研究の主要ツールである超音波分光分析装置 (写真参照) は、丁度汎用型の熱分析装置のように、試料セルとリファレンスセルを有している。本装置の校正は、予め純水の物性値を基準に行い、超音波速度と超音波減衰の2つのパラメーター値を求めることができる。また、本分析法は従来の光散乱法などとは異なり、試料濃度や外観の違い (濁度など) により測定が制限されないという長所を有している。本実験では、脂肪酸塩を含むタンパク質溶液を試料セルに、また脂肪酸塩無添加のタンパク質溶液をリファレンスセル (赤い部分) に注入した。



### 4. 研究成果

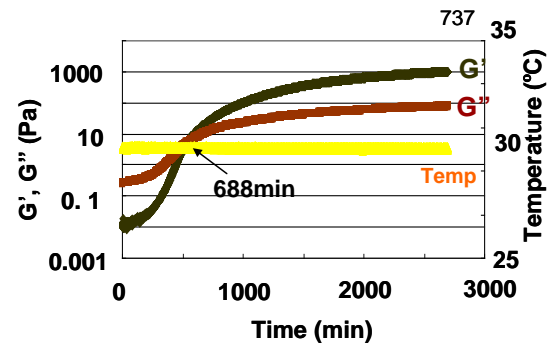


図1  $\beta$ -ラクトブロブリン・ $\beta$ -カゼイン混合系の弾性率の変化 (脂肪酸塩存在下)

図1は $\beta$ -ラクトブロブリンと $\beta$ -カゼインとの混合系に及ぼす脂肪酸塩添加の影響を示している。約11時間後にゾル-ゲル転移を示した。一方、図2の脂肪酸塩非存在下では30度でのインキュベーションによる転移現象は認められなかった。

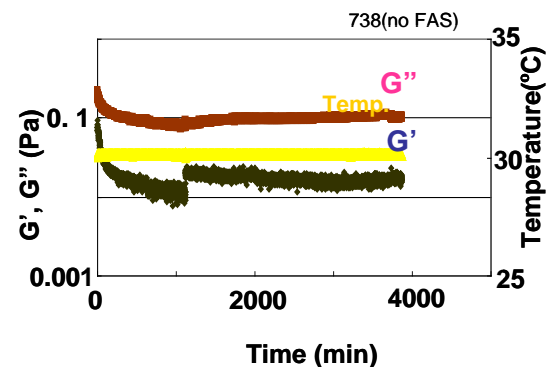


図2  $\beta$ -ラクトブロブリン・ $\beta$ -カゼイン混合系の弾性率の変化 (脂肪酸塩非存在下)

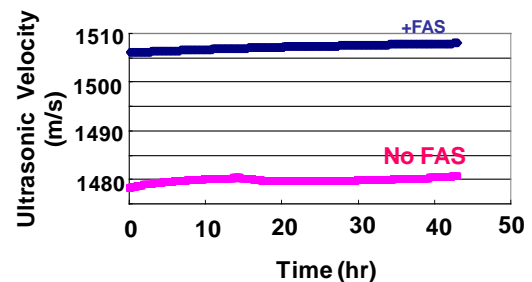


図3 脂肪酸塩存在下及び非存在下における $\beta$ -ラクトブロブリン・ $\beta$ -カゼイン混合系の超音波速度変化

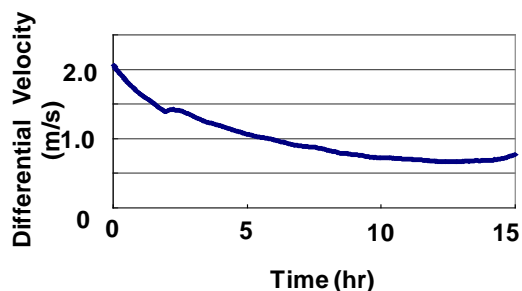


図4 脂肪酸塩存在下と非存在下の $\beta$ -ラクトグロブリン・ $\beta$ -カゼイン混合系の超音波速度変化の差 (脂肪酸塩存在下-非存在下を示す)

図3及び4は超音波速度の経時的変化を示した。脂肪酸塩の有無にかかわらず時間の経過とともに僅かに超音波速度が増加し、タンパク質が水和が進行していることが判る(図3)。しかしながら、脂肪酸塩存在下と非存在下の差をとると、図4に示すように、時間経過とともに超音波速度は低下し、脂肪酸塩の添加により、系の圧縮率が増加し、水の入りこめない隙間が形成されていっている(ゲル化に向かっている)ことが判った。

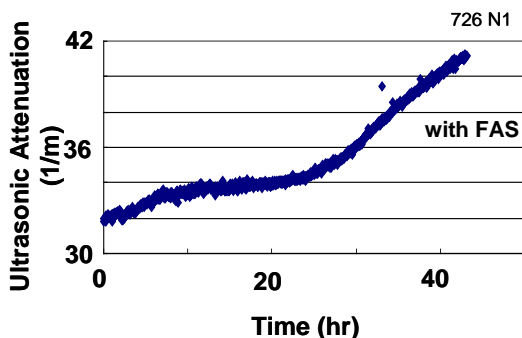


図5 脂肪酸塩添加 $\beta$ -ラクトグロブリンと $\beta$ -カゼイン混合系の超音波減衰変化

図5にタンパク質混合系の超音波減衰の変化を示した。脂肪酸塩存在下では経時的な緩やかな超音波減衰の増加が観察された。

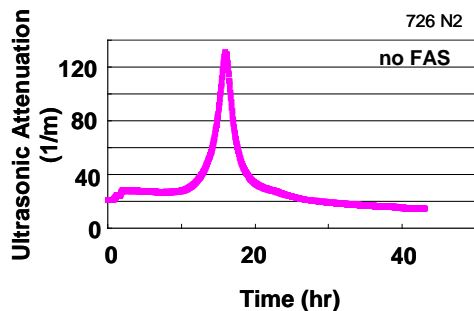


図6  $\beta$ -ラクトグロブリンと $\beta$ -カゼイン混合系の超音波減衰変化(脂肪酸塩非存在

下)

一方、脂肪酸塩非存在下(図6)では一過的な増加が観察された。この事は両組成間(脂肪酸塩の存在下及び非存在下)では顕著に異なり、後者では一端形成した会合体が非常に不安定であることを示唆している。

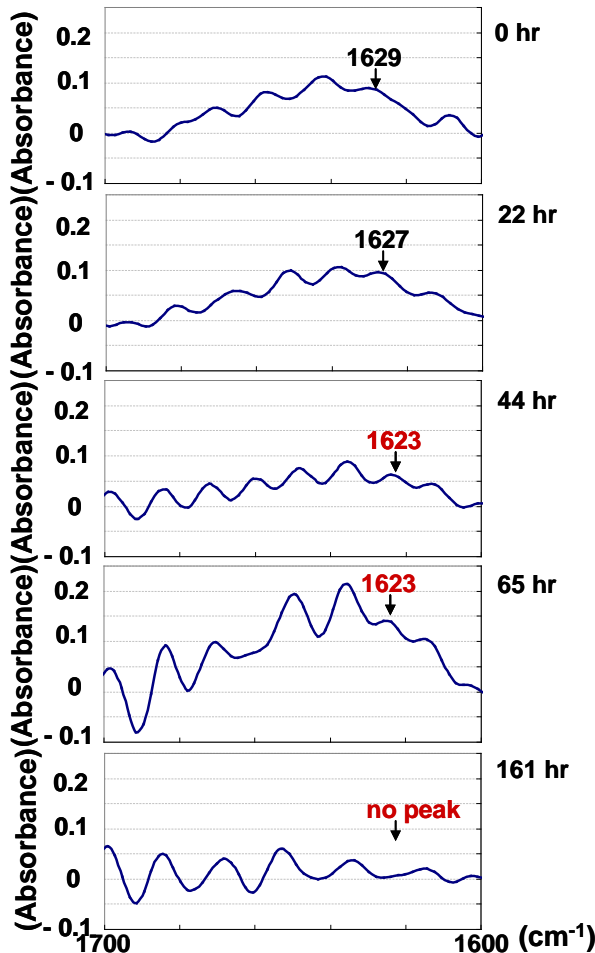


図7  $\beta$ -ラクトグロブリン・ $\beta$ -カゼイン混合タンパク質の二次構造変化

図7は、図6で一過的な超音波減衰の増加を示した事に着目し、 $\beta$ -カゼインを試料として時間経過に伴うタンパク質二次構造の変化をFT-IR分析により調べた。

その結果、インキュベーション初期には $\beta$ -シートが $1627\text{ cm}^{-1}$ にみられたが、その後低波数側( $1623\text{ cm}^{-1}$ )にシフトし $\beta$ -シートが強められる事が判った。しかしながら、更にインキュベーションを続けると(65時間以降)、分子間 $\beta$ -シート( $1623\text{ cm}^{-1}$ )が減少していっていることが判った。このことは図6の一過性の超音波減衰の増加を裏付ける興味深いデータである。

#### 今後の展開

以上の研究により、超音波分光分析と他の機器分析を組み合わせた手法は、これまでのレオロジー分析に比べて豊富な情報を得ることができる点で、今後益々期待される分析法であることが明らかになった。

現在、他のタンパク質系（よりシャペロン活性の高い $\alpha$ -カゼイン系など）にも本分析法が利用可能か詳細に検討中である。

#### 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 and Milena Corredig,  $\beta$ -casein aids in the formation of a sodium caprate-induced  $\beta$ -lactoglobulin B gel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (査読あり) 84 (2011) 442-446.

〔学会発表〕（計2件）

- ① Naoko Yuno-Ohta and Milena Corredig, Use of ultrasound spectroscopy to examine on the effect of fatty acid sodium salt on the gel formation of milk proteins at ambient temperature. 101<sup>st</sup> AOCS Annual Meeting & Expo, 2010年5月18日, アメリカ。
- ② Naoko Yuno-Ohta et al., Studies on interaction of milk casein and ovalbumin in the presence of fatty acid salts. 101<sup>st</sup> AOCS Annual Meeting & Expo, 2011年5月2日, アメリカ

〔図書〕（計1件）

太田尚子、(株)技術情報協会、*ゲルの作製・評価と高機能化 検討例集（仮題）*の中の10節 超音波分光分析法を用いた乳タンパク質のゲル形成挙動の解析を執筆、2013年8月末発行予定

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

太田 尚子 (Ohta Naoko)

日本大学・短期大学部・教授

研究者番号：00203795