

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350107

研究課題名(和文) 抗酸化能を有し低塩条件下でも畜・魚肉練り製品を形成する肉タンパク質素材の開発

研究課題名(英文) Development of the meat protein material which forms meat and fish meat paste under the low salt condition, having antioxidant ability

研究代表者

西村 公雄(Kimio, Nishimura)

同志社女子大学・生活科学部・教授

研究者番号：60167567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ランダムセントロイド最適化法を用いて低イオン強度溶液への可溶性を保持し、かつ、最大限のヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)消去活性能(HORAC)を発揮する麦芽糖修飾鶏筋原線維タンパク質(最適糖化Mfs)の調製条件を検索した。温度、相対湿度(RH)、反応時間、筋原線維に対する麦芽糖の重量比の四つの因子につき検討し、各条件 57.4°C 、 37.3% 、 37.2 時間、 5.43 の最適調製条件を得た。そのHORAC値は、没食子酸当量に換算してタンパク質 1g あたり $7.8 \pm 1.0 \mu\text{mol}$ であった。また、 90°C で30分間加熱することでゲルを形成し、このゲルも $4.4 \pm 1.7 \mu\text{mol}$ のHORAC値を示した。

研究成果の概要(英文)：We performed random centroid optimization to determine the optimum preparative method for glycated chicken myofibrillar proteins (Mfs) with the strongest antioxidative ability against hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) and with more than 60% solubility in low ion strength medium. Four factors of temperature, relative humidity (RH), reaction time, and quantity of maltose were selected and 13 vertices were obtained. The examination was carried out according to each vertex and the optimum condition was sought, resulting in 57.4°C , 37.3% RH, 37.2 h of reaction time, and a maltose mixing ratio of 5.43 for Mfs (w/w). The $\cdot\text{OH}$ -averting capacity (HORAC) was also measured as $7.8 \pm 1.0 \mu\text{mol}$ of gallic acid (GA) equivalent/g of protein. Moreover, the optimum glycated chicken Mfs could form a gel by a 30-min heating at 90°C , and this gel held the antioxidant ability. Its HORAC was $4.4 \pm 1.7 \mu\text{mol}$ of GA equivalent/g of protein.

研究分野：食品加工学

キーワード：筋原線維タンパク質 麦芽糖 メイラード反応 糖化 ゲル形成性 抗酸化能 溶解性

1. 研究開始当初の背景

タンパク質にメイラード反応を用いて糖修飾させることにより機能改変が生じる。この方法は、食品成分以外の特別な化学試薬を使用しないため安全性に優れており、食品タンパク質への応用が期待されている。

申請者らは、すでに鶏筋原線維(Mf)タンパク質にマルトースを修飾させると低イオン強度溶液への溶解性と抗酸化能を獲得することを認めている^{1,2)}。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ランダムセントロイド最適化(RCO)法³⁻⁶⁾を用いて、0.1M NaCl 溶液に60%以上可溶で、最大のヒドロキシラジカル(\cdot OH)消去活性(HORAC)値を与える調製条件を突き止める。そして、その最適条件で調製したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の加熱ゲル化能を見極め、ゲル自身が抗酸化能を保持しているか否かも検討する。これにより、高血圧症の誘因となる食塩量を減らし、さらに、練り製品の酸化防止剤添加量も減少できるような食素材を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1. ランダムセントロイド最適化法による調製条件の検索

RCO 法を用いて \cdot OH への最大消去能を発揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の最適調製条件を検索した。調製条件の各因子と実験範囲は、温度 40-70℃、相対湿度(RH)25-45%、時間 24-48h、マルトース/Mf 重量比 2-8 の範囲とした。この条件設定により、first cycle では、9 つの調製条件が提示された。この条件に従ってマルトース修飾鶏 Mf タンパク質を調製した。各調製条件の評価は、0.1M NaCl を含む 15mM リン酸 Buffer 溶液(pH7.5)への溶解度が約 60%以上であることを第一義とし、蛍光法⁷⁾にて \cdot OH の残存率を測定し、それを抗酸化能とした。よって評価の低いほうが抗酸化能は強いことになる。なお、溶解度が約 60%に満たないものについては評価を 100%とした。9 つの実験条件から得られた評価値を用いて、re-centroid を行い、さらに4つの調製条件を得て、同様に評価を求めた。以上合計 13 の調製条件から得られた評価をもとに、マッピングにより最小の評価値を示すマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の調製条件を求めた。

なお、鶏 Mf タンパク質は、Saeki の方法⁸⁾に準じて調製した。

2. 最適条件下で得られたマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の加熱ゲル形成性とゲルの性状および抗酸化能

マルトース修飾 Mf タンパク質溶液(15mg/ml)を、90℃で240分まで加熱した。加熱中のタンパク質の変化は、SDS-PAGE 法⁹⁾にて、また、そのゲルの微細構造は、Cryo 走査電子顕微鏡(SEM)観察にて行った。加熱ゲルの HORAC 値は、没食子酸を標準物質として

算出した。

4. 研究成果

1. ランダムセントロイド最適化法で得られた調製条件と評価

低イオン強度溶液への溶解性を保持しながら最大の \cdot OH 消去能を発揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の最適調製条件を RCO 法⁸⁻¹¹⁾を用いて検討したところ、first cycle として9つの調製条件(Table1 No. 1-9)が得られ、re-centroid により条件範囲を絞ってさらに4つの実験条件 (Table1 No. 10-13) が示された。以上でそれぞれ合計 13 の調製条件に従ってマルトース修飾鶏 Mf タンパク質を調製し、 \cdot OH 消去能測定を行い、各活性酸素種の残存率を評価した (Table1)。なお、 \cdot OH 残存率の低いものほど各消去能が強いことを示している。

Table 1 Summary data for random-centroid optimization of HORAC.

Ver- tex No.	Tem- pera- ture (°C)	RH (%)	Re- action Time (h)	Weight ratio of protein- maltose (w/w)	Evaluation (Residual ratio of \cdot OH) ^{a)} (%)
1	46.2	42.4	47.9	4.77	100.0
2	57.0	36.6	28.7	6.79	66.8
3	68.6	38.0	38.4	5.16	100.0
4	49.7	36.7	44.6	5.63	68.8
5	46.4	40.0	38.7	2.62	100.0
6	40.3	33.3	32.4	5.66	100.0
7	58.6	35.0	44.9	6.95	68.6
8	63.8	39.2	31.3	6.25	100.0
9	64.1	40.7	30.7	2.36	100.0
10 ^{b)}	57.4	37.3	37.2	5.43	66.0
11 ^{b)}	57.3	36.9	37.4	6.4	71.1
12 ^{b)}	60.9	37.9	33.9	5.59	76.0
13 ^{b)}	58.7	38.3	33.8	5.26	76.8

a) When solubility of glycosylated myofibrillar protein did not exceed about 60% ,the evaluation (residual ratio of \cdot OH) of this vertex was regarded as 100%.

b) Re-centroid points of first cycle.

2. マッピング結果

次に上記の結果より、 \cdot OH に対して最も抗酸化能を発揮する調製条件を見つけるために、各因子の対する評価をプロット(マッピング)した (Fig.1)。最初に入力した制御因子は反応温度, RH, 反応時間, マルトース/Mf

の重量比の4つなので、そのすべてに対しそれぞれマッピングを行い、ソフトが最適値はどちらの方向にあるかを判断し、引いた線を参考に、最適値を求めた。

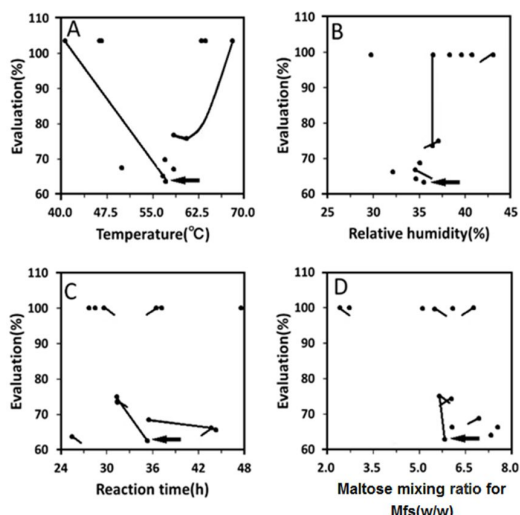


Fig. 1 Mapping results of experiments submitted by RCO for scavenging $\cdot\text{OH}$. Evaluation: When the solubility in a low ionic strength medium of glycated Mf did not exceeded about 60%, the evaluation of this vertex was estimated as 100%. The emitting intensity of $\cdot\text{OH}$ occurred by the Fenton reaction detected with fluorescence method spectroscopy was regarded as 100%. The comparative emitting intensity of $\cdot\text{OH}$ occurred by the Fenton reaction at the presence of glycated Mf was used for the evaluation (residual ratio of $\cdot\text{OH}$) of antioxidative activity. The vertex that provided the smallest evaluation was sought. (A) temperature. (B) relative humidity. (C) reaction time. (D) maltose mixing ratio for Mf (w/w). () was each vertex. Lines indicate probable trends.

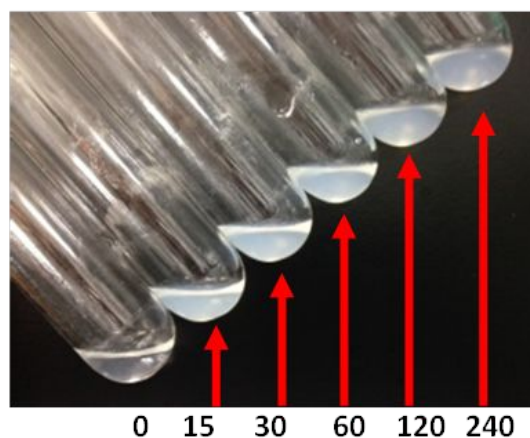
本研究では、評価がより低いものを最適条件としたため、 $\cdot\text{OH}$ の最大消去能を發揮する最適調製条件は条件 10 (Table1, No. 10) であることが判明した。すなわち、反応温度 57.4 °C, RH 37.3%, 反応時間 37.2 時間, マルトース/Mf 重量比 5.43 であった。以上により、 $\cdot\text{OH}$ への最大消去能を發揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質が調製されるうことが示された。

以下、この最適条件で調製したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質を用いて、検討した。

3. マルトース修飾及び未修飾鶏筋原線維タンパク質溶液に対する加熱の影響

最適条件で調製したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質及びマルトース未修飾鶏 Mf タンパク質を 90 °C で 0, 15, 30, 60, 120, 240 分加熱し、観察結果を Fig.2 に示した。

A



B

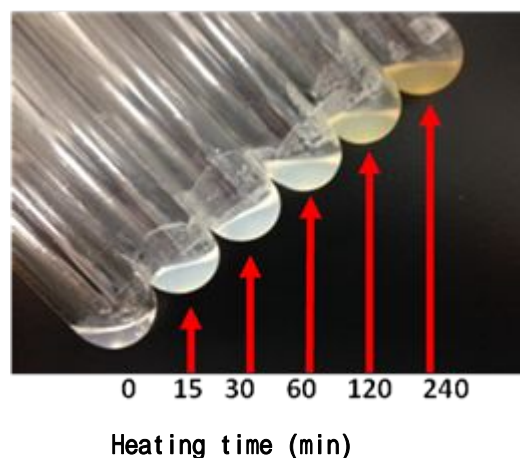


Fig. 2 Effect of heating on both Mf solutions. Chicken Mf without or with maltose were incubated at 57.4 °C, 37.3% RH for 37.2 h, and then unmodified Mf (A) and the optimum glycated chicken Mf (B) were prepared. Half milliliter of both chicken Mf solutions containing 15 mg of protein/mL was placed in a test tube (diameter 16mm) and heated at 90 °C in water bath for 240 min. The change of each chicken Mf solution was followed. The status of Mf solutions was checked by tilting the test tubes at an angle.

マルトース未修飾鶏 Mf タンパク質溶液 (Fig.2A) では、加熱によって白濁が見られたものの、それ以外の色の変化は見られなかった。一方、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液 (Fig.2B) では、加熱による白濁だけではなく、120 分加熱以降から褐変が時間とともに進行する様子が観察された。このことは、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液ではメイラード反応による着色が時間とともに進行することが考えられた。

また、ゲル形成性については、マルトース未修飾鶏 Mf タンパク質溶液では、240 分の加熱でややゲル化の傾向が見られたものの、締まったゲルはできなかった。一方、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液においては、30 分加熱時のみ一時的にゲル化が見られたが、60 分加熱以降のものはゲル化しなかった。このことは、加熱中にもメイラード反応が進行し、その過程でゲル構造が崩壊するためではないかと推測した。また、長時間の加熱によりゲル構造が収縮し、保水性が減少することもゲルを形成しなかった原因の一つではないかと考えた。

さらに、得られた加熱ゲルの抗酸化能を測定したところ没食子酸当量に換算して $4.4 \pm 1.7 \mu\text{mol} / \text{g}$ of protein の HORAC 値を示した。加熱前の溶液の HORAC 値が、 7.8 ± 1.0 であったことから、約半分の抗酸化能を加熱ゲル形成後も保持していることが判明した。

4. 90 加熱後のマルトース修飾及び未修飾鶏筋原繊維タンパク質溶液の SDS-PAGE による観察

90 で 0, 15, 30, 60, 120, 240 分加熱したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質及びマルトース未修飾鶏 Mf タンパク質を、SDS-PAGE 法によって観察した結果を Fig.3 に示した。

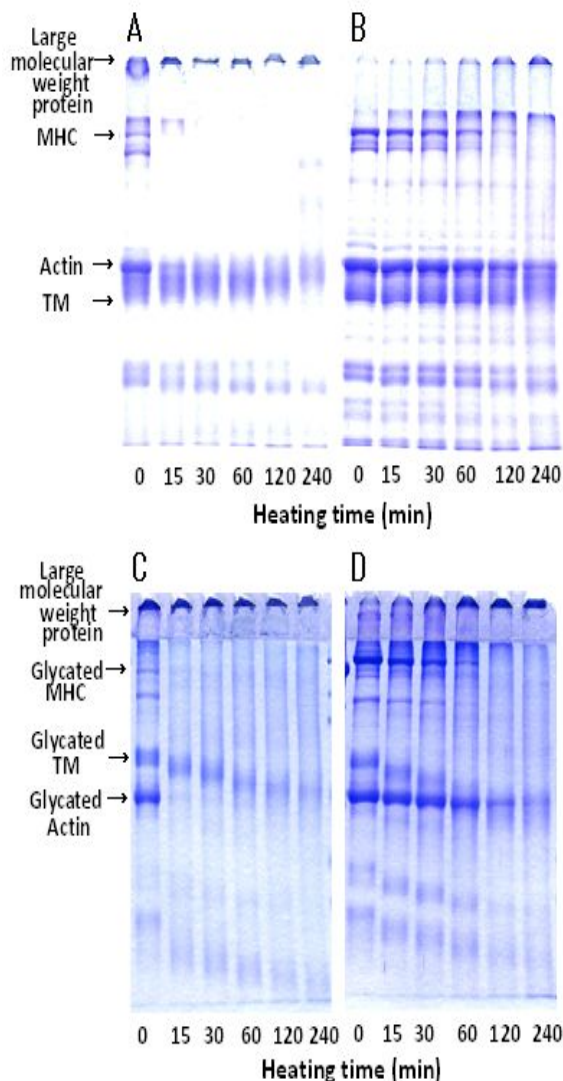


Fig.3 Changes in unmodified and optimum glycosylated chicken Mf during the heating process.

The changes in both chicken Mf during the heating were examined by SDS-PAGE. Unmodified and optimum glycosylated chicken Mf were dissolved in 0.5M(A) and 0.1M(C) NaCl solution (pH 7.5) respectively and heated at 90 °C for up to 240min. (B) and (D) were obtained with the addition of 2-ME to (A) and (C) at final concentration of 10%. MHC: myosin heavy chain. TM: Tropomyosin.

マルトース未修飾鶏 Mf タンパク質溶液における、2-メルカプトエタノール(ME)無添加 (Fig.3A)は、加熱前では濃縮ゲルに入ることができない分子量の大きなタンパク質の存在はほとんど見られなかったが、加熱に伴い観察された。一方、2-ME 添加 (Fig.3B)では加熱 15 から 60 分において、濃縮ゲルに入ることができない分子量の大きなタンパク質はほとんど見られなかったが、120 分以降から徐々に観察された。また、ミオシン重鎖(MHC)およびアクチンは 2-ME 無添加、添加どちらの場合も加熱とともにバンドが薄くなった。2-ME はジスルフィド(SS)結合を開裂させる試薬であるため、マルトース未修飾鶏 Mf タンパク質溶液では加熱初期段階で SS 結合が生じ、長時間の加熱によって、SS 結合以外の他の共有結合が若干生じていることがわかった。

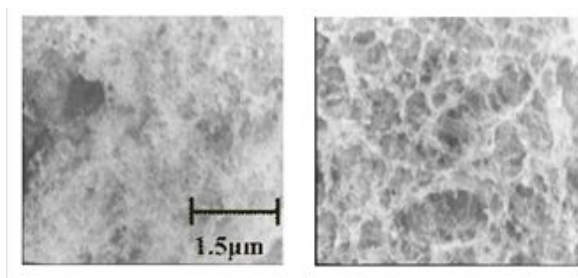
マルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液においては、2-ME 無添加 (Fig.3C)でも添加 (Fig.3D)でも濃縮ゲル部分にタンパク質の存在が認められた。2-ME 添加時のもののミオシン重鎖およびアクチンは加熱とともに徐々にバンドが薄くなった。このことから、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液では、加熱中に SS 結合を除く他の共有結合が生じていることがわかった。また、60 分以降、泳動の先端部分が色濃くなっている。このことは加熱 60 分後以降に低分子量の物質が増えていることを示している。60 分以降、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液がゲルを形成しなかったのは、なんらかの原因によりタンパク質の分解が生じ、ゲル構造が崩壊したものと考えられる。低分子量の物質はその際の断片でないかと推察される。

5. Cryo-走査電子顕微鏡観察

90 , 30 分加熱時のマルトース未修飾鶏 Mf タンパク質 (Fig. 4A)とマルトース修飾鶏 Mf タンパク質 (Fig.4B)を加速電圧 5kV , 20,000 倍で観察した。

マルトース未修飾鶏 Mf タンパク質溶液の写真ではタンパク質が凝集し、密な部分と粗い部分が見られ、ムラのある不均一な構造が見られた。加熱によってタンパク質が凝集したため、ネットワークが形成されずゲルを形

A **B**
Fig.4 Microstructure of both Mf after a 30min-heating at 90 °C.



Unmodified (A) and optimum glycosylated chicken Mfs (B) were dissolved 0.5M and 0.1 M NaCl in solution (pH 7.5) respectively and heated at 90 °C for 30 min. The microstructure of each Mfs was observed under cryo-SEM. Magnification, ×5,000; Scale bar = 1.5 μm.

成しなかったと考えられる。一方、ゲルを形成したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液の写真ではゲル化しなかったマルトース未修飾鶏 Mf タンパク質溶液のもの比べて、網目構造が発達し、均一なネットワークを形成していることがわかった。このネットワーク構造がゲル形成につながったと考えた。

結論

以上のことから、高血圧症の誘因となる食塩量を減らし(この糖化鶏 Mf タンパク質は低イオン溶液に可溶)、さらに、練り製品の酸化防止剤添加量も減少できうる(加熱ゲルも抗酸化能を保持)練り製品食素材開発の可能性を示唆できた。

参考文献

- 1) Nishimura, K., Murakoshi, M., Katayama, S., and Saeki, H. (2011). Changes in solubility and thermal stability of chicken myofibrillar protein by glycosylation. *Food Sci. Technol. Res.*, 17, 69-75.
- 2) Nishimura, K., Murakoshi, M., Katayama, S., and Saeki, H. (2011b) Antioxidative ability of chicken myofibrillar protein developed by glycosylation and changes in the solubility and thermal stability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 247-254.
- 3) Nishimura, K., Goto, M., Imazuya, N., and Nakai, S. (1997). Optimum cooking conditions for *Indica* type rice by using random centroid optimization. *Nippon Cyouri Kagaku Kaishi*, 30, 9-16 (in Japanese).
- 4) Nishimura, K. Imazuya, M., and Nakai, S. (1998). Optimum preparative method for storing cream puff paste without

deterioration. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 4, 18-24

5) Nishimura, K., Goto, M., Nakai, S., Kawase, S., and Matsumura, Y. (2001). Preventing sauce separation by proteins released from chicken during heating. *J. Home Econ. Jpn.*, 52, 699-708.

6) Nakai, S., Horimoto, Y., Dou, J., and Verdini, R. A. (2009). Random-centroid optimization. In "Optimization in Food Engineering" ed. By Erdogdu, F. CRC Press, New York, pp.141-152.

7) Yildiz, G., and Demiryürek, A. T. (1998). Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 39, 179-184.

8) Saeki, H. (1997). Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein by Maillard reaction with glucose: Biochemical properties and emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 680-684.

9) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

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)

Kimio Nishimura, Mai Isono and Hiroki Saeki, Gel-Forming Ability of Glycosylated Chicken Myofibrillar Proteins with Enhanced Antioxidant Properties, *J. Home Econ. Jpn.*, 66, (5), 213-221 (2015/5), 査読有り

[学会発表](計6件)

Kimio Nishimura, Applications of Random-Centroid Optimization, The 6th Pacific Rim Food Protein Symposium, Gakushi Kaikan, Tokyo, Japan May 17th, 2013.

西村 公雄, 糖修飾による鶏肉タンパク質の機能改変と抗酸化機能付与による新食品素材の開発 - ランダムセントロイド最適化法を用いて -, 第23回日本メイロード学会学術集会, グランフロント大阪北館 ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター, 2013年11月

梅本 保奈美, 佐伯 宏樹, 真部真里子, 西村 公雄, 抗酸化能を有するマルトース修飾鶏筋原線維タンパク質のランダムセントロイド最適化法を用いた調製条件の検索, (公社)日本食品科学工学会 第61回大会, 中村学園大学 福岡,

2014年8月

梅本 保奈美, 佐伯 宏樹, 西村 公雄, ヒドロキシラジカル消去能を有するマルトース修飾鶏筋原線維タンパク質の最適化法を用いた調製条件の検索, (一社)日本家政学会関西支部 第36回(通算92回)研究発表会, 京都聖母女学院短期大学 京都, 2014年10月

梅本 保奈美, 佐伯 宏樹, 西村 公雄, メイラード反応を用いて得られたマルトースおよびリボース修飾鶏筋原線維タンパク質の機能改変, 日本農芸化学会2015年度大会, 岡山大学, 2015年3月

西村 公雄, 佐伯 宏樹, 抗酸化能を有するリボース修飾鶏筋原線維タンパク質のランダムセントロイド最適化法を用いた最適調製条件の検索, 第70回日本栄養・食糧学会大会, 武庫川女子大学 兵庫, 2016年5月

〔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

http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/1979/1979_Researcher.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 公雄 (NISHIMURA KIMIO)
同志社女子大学・生活科学部・教授
研究者番号: 60167567

(2) 研究分担者

佐伯 宏樹 (SAEKI HIROKI)
北海道大学・水産科学研究科・教授
研究者番号: 90250505

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号: