

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：42686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350116

研究課題名(和文)超音波分光分析による卵及び乳タンパク質のゲル化機構解析とそのフィルム化への応用

研究課題名(英文)The mechanism of gelation and the film formation from the mixed protein of egg and milk using ultrasound spectroscopy

研究代表者

太田 尚子(Naoko, OHTA)

日本大学短期大学部・その他部局等・教授

研究者番号：00203795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では主要食品タンパク質の一つである卵や乳を起源とする数種のタンパク質を材料とし、それぞれ単独または混合系を用いて加熱誘導ゲルの形成性を動的粘弾性測定、SDS-PAGE及び超音波分光分析法を用いて調べた。更に研究期間の後半において、いくつかのケースを選択しフィルム化を試みた。その結果、卵タンパク質の一つである、熱安定性の高いオボムコイドが乳-ラクトグロブリンとジスルフィド結合を介した凝集体を形成する事を見出した。また、市販の乾燥卵白がシャペロン活性を有する乳カゼインとの混合システム下で、可塑剤として多用されているグリセロール量を低減した伸展性のあるフィルムを創出することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have studied on the gel formation from egg and milk proteins using dynamic viscoelasticity measurement, ultrasound spectroscopy and SDS-PAGE analysis. Furthermore, based on the gelation study, we tried to make the film from the mixture of dried egg white and sodium caseinate. We evaluated the film properties (normal stress, extensibility, glass transition temperature, the secondary structure of the protein film). We found that addition of OM caused a 5% -LG solution to form a softer gel. OM interacted with -LG via disulfide bonds, which resulted in aggregates intermediate in size between those of the 5 and 10% -LG gels. Given our results, we expect that OM will be able to interact with other types of proteins. Furthermore, we found that the mixed protein film made from dried egg white and sodium caseinate is an interesting film which has softness and high extensibility.

研究分野：食品物性

キーワード：食品タンパク質 熱凝固性 超音波分光分析 粘弾性測定 ゲル フィルム

1. 研究開始当初の背景

従来、食品分野での超音波分光分析法の活用はエマルション研究に関するものが多く、ゲル化挙動解析のために利用されることはまだ少ない現状にあった。また、当該研究者は、個々の食品タンパク質の加熱誘導ゲル化現象に興味をもち、動的粘弾性測定やタンパク質二次構造解析を用いて、ゲルネットワークの構築に関して研究を行っていた。しかしながら、食品タンパク質は異なる化学的性質を有する種々のタンパク質の混合物で、その全体の発現する物性にも興味を有していたがそれを上手く測定するツールが少ない現状にあった。

2. 研究の目的

食品中の混合タンパク質系のモデルとして、熱安定の異なるタンパク質を混合しそのタンパク質間の相互作用を比較的まだ新しい手法である超音波分光分析法を用いて可視化できるか否かというテーマに取り組むこととした。即ち、まず、熱安定性の著しく異なる2種類のタンパク質(β-ラクトグロブリン及び卵オボムコイド)を用いて、その相互作用の有無を超音波分光分析を主要ツールとして調べる事、次に、ゲル化に関する研究成果を社会に還元する一つのアプローチとして、混合タンパク質(市販乾燥卵白と市販カゼインナトリウム)ゲルを基盤としたフィルムを創出するという2つのテーマを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動的粘弾性測定

TA インストルメント社製 RFS III 型動的粘度測定装置を、ゲル化研究における動的弾性率の温度依存性測定に用いた。

(2) 超音波分光分析

ウルトラサイエンティフィックス社製 HR-US102 型を用い、超音波速度並びに減衰の温度依存性を調べた。2.5, 5, 8 MHz の周波数にて測定した。

(3) 走査型電子顕微鏡観察ゲル並びにフィルムを切片にカットし、常法に従い、

化学固定、脱水及び t-ブタノール乾燥後、日本電子社製 JSM-6010LA 型を用いて観察した。

(4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ゲルから溶出した離水とゲルの一部を試料とし、ローリー法のピーターソンによる改良法を用いてタンパク質量をしたのち、5~20% SDS-グラジエントゲルを使用し ATTO 社製 ミニスラブ型電気泳動装

置を用いて行った。

(5) フィルムの曲げ試験

上記(1)の動的粘弾性装置を用いて、そのパラレルプレートにくさび型治具(特注)を装着し、多点引っ張り試験モードで静的試験を行った。

(6) 示差走査熱量分析

EXSTAR 6000 ソフトウェアを搭載したセイコーインスツルメント社製示差走査熱量分析を用い、密封型ステンレスパンを用いて加熱に伴うフィルムの状態変化(ガラス転移点)を測定した。

(7) 全反射型(UATR)赤外分光分析

フィルム試料を用いて、ユニバーサル全反射型搭載パーキンエルマー社製赤外分光分析装置によるアミド I 領域(タンパク質二次構造)解析を行った。

4. 研究成果

(1) 動的粘弾性測定

β-ラクトグロブリンの加熱誘導ゲル化性に及ぼすオボムコイド添加の影響を調べるため、β-ラクトグロブリン単独タンパク質(5%, 10%)およびβ-ラクトグロブリン・オボムコイド混合タンパク質(5%+5%)溶液の常温から80℃までの加熱過程、80℃保持、引き続き室温までの冷却過程での弾性率の変化を解析した。その結果、混合タンパク質系の貯蔵弾性率は、5%β-ラクトグロブリンのそれに比べ大きく、単独では弾性率増加の認められないオボムコイドがβ-ラクトグロブリンのゲル化に協働的に寄与していることが示唆された。

(2) 超音波分光分析

本研究で使用した超音波分光分析計では超音波速度と減衰の2つのパラメータ変化を観察する事ができる。まず、超音波速度は系中の圧縮率変化をモニターすることによりそれと反比例する超音波速度を求めることが出来る。通常、超音波は金属のような固体中は液体中よりも速く進むが、タンパク質溶液がゲル化しゲル状凝集体を形成する際、タンパク質ネットワーク間に水分子の入り込めないような隙間を多数形成しながら三次元ネットワークの構築が進行するため、系の圧縮率は増加すると考えられる。実際にその変化を観察したところβ-ラクトグロブリン・オボムコイド混合タンパク質溶液の加熱に伴う圧縮率増加が観察され、またその変化速度は5%β-ラクトグロブリンに比べ大きいことが判った。

更に、超音波速度と相補的に、系中に現れる凝集体の大きさや系中の存在状態

(偏りの有無)などを反映する超音波減衰の変化をモニターしたところ、混合タンパク質は5%及び10% -ラクトグロブリン単独系の丁度中間的な値をしめし、混合タンパク質が単独タンパク質とは異なる大きさの粒子からなるゲル状凝集体を形成していることが示唆された。

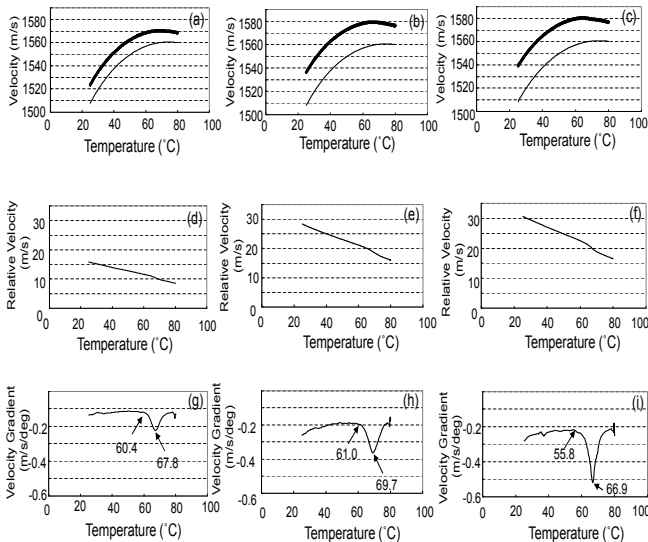


図1 5% β-LG (左), 混合タンパク質 (中), 10% β-LG (右)の超音波速度(上段) 相対速度(中段)及び速度変化率(下段)の温度依存性
上段の図中の太ラインはタンパク質溶液の速度変化、また、細線は緩衝液(対照)の速度変化を表す。また、下段の図中の矢印と数値は超音波速度の変化率で示したカーブの屈曲点とその温度を示した。

(3) 走査型電子顕微鏡観察

本研究では走査型電子顕微鏡を用いて、ゲルとフィルム(後述)の表面構造を観察した。まず、オボムコイド・ -ラクトグロブリン混合ゲルの微細構造は5% -ラクトグロブリンの構造より粗く、より10% -ラクトグロブリンゲルのそれに近い大きさからなる像が観察された。

(4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

電気泳動では、得られたゲル状凝集体から次第に排出される液体(離水)と残渣(固形物)をSDS化しグラジエントゲル電気泳動に供した。その結果、興味深いことに混合タンパク質ゲルや離水中にメルカプトエタノール存在下で開裂する、即ち、ジスルフィド結合により会合している凝集体が見出され、かつその成分がオボムコイドや -ラクトグロブリンモノマーであることが判った。

(5) フィルムの曲げ試験

これまでの研究により、熱安定性の顕著に異なるタンパク質間でも加熱冷却中に相互作用が起こり、両者が協働的にゲルを形成する事が可能であることを見出した。

そこで、このようなゲル状凝集体をベースにして、より保存性が高く、汎用性の期待されるフィルムの調製を試みた。ここでは熱凝固性タンパク質として市販の乾燥卵白を用い、熱非凝固性タンパク質としては乳カゼインを用いた。

フィルムをキャスト法により調製し、ウェットキャビネット(50~60%相対湿度、25 付近の環境下)でほぼ13%水分を保持するフィルム状試料を調製した。

得られたフィルムは幅約1mm、厚み100 μ程度にカット後フィルム断片のサイズを厳密に測定した。特注の治具を搭載したレオメーターに試料を固定し、多点引っ張り試験モードにてフィルムのノーマルストレス、破断までの時間、総仕事量を解析した。

その結果、乾燥卵白及びカゼインからなる混合タンパク質フィルムは、乾燥卵白単独フィルムに比べ、柔らかく、且つ伸展性の高いフィルムであり、従前の硬く脆いタンパク質フィルムの欠点を補完する性質を有するフィルムであることを見いだした。

また、フィルムの走査型電子顕微鏡観察を行ったところ、混合タンパク質系ではフィルムの凹凸が単独系に比べ多いことが判った。単独タンパク質フィルムに比べ規則的なネットワークの構築が困難となりその結果、柔らかなテクスチャーを有するフィルムが形成されたことを推察した。

(6) 示差走査熱量分析

ここでは試料フィルムの安定性を熱分析により評価するために、フィルムが熱によりラバー化する温度、いわゆるガラス転移温度を調べた。カゼインナトリウムはそれ単独でのフィルム調製は他のケースに比べ顕著に長い時間を要したため、詳細な研究を行わなかったが、ガラス転移温度の測定は行った。その結果、ガラス転移温度は約200 となり、乾燥卵白単独より約30 、また、混合タンパク質系より約25 高いことがわかった。ここでも非常に興味深いことに混合タンパク質フィルムは乾燥卵白単独フィルムにより近いガラス転移温度を有する事が明らかになった。

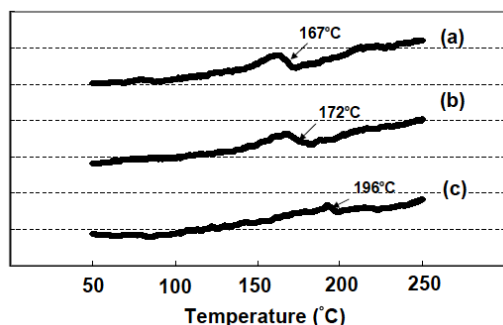


図2 乾燥卵白単独 (a), 混合タンパク質 (b) 及びカゼインナトリウム単独 (c) フィルムのガラス転移温度

(7) 全反射型赤外分光分析

最後に、タンパク質二次構造レベルで混合タンパク質フィルムの特徴を解析した。乾燥卵白単独タンパク質フィルムに比べ、混合タンパク質フィルムは α -ヘリックス量が多いことが示唆された。厳密に考えると、ここで共存しているグリセロールも α -ヘリックスに寄与する事が知られているが、カゼインナトリウムは α -ヘリックスの振動数を変化させる効果が観察された。

(7) 結論

以上、超音波分光分析をはじめとし数種の機器分析を通して、熱凝固性の異なるタンパク質が分子間で相互作用し、新規なテクスチャーを有する混合ゲルやフィルムの形成が創出されることが判った。今後更にその複合体の大きさ(分子量など)が明らかになるような基礎研究を継続する必要がある。

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)

1. Naoko YunO-Ohta, Tsubasa Kato, Shiho Ashizawa, Yoko Kimura, Nami Maruyama and Takahisa Nishizu, Role of ovomucoid in the gelation of a β -lactoglobulin-ovomucoid mixture Colloid Polym Sci, 294, 1065-1073 (2016) (査読あり)

[学会発表](計3件)

1. 太田尚子, 加藤つばさ, β -ラクトグロブリン・オボムコイド混合タンパク質ゲルにおけるオボムコイドの寄与, 第62回食品科学工学会(2015/8/15~2015/8/29, 京都大学)(京都府京都市)
2. 太田尚子, 鈴木麻友, 高橋美帆, 加藤つばさ, 乳カゼイン添加による混合タンパク質フィルムの調製とその特性, 第63回食品

科学工学会(2015/8/25~2015/8/27, 名城大学)(愛知県名古屋市)

3. Naoko YunO-Ohta, Mayu Suzuki, Miho Takahashi and Tsubasa Kato, Formation of soft sheet from heat-induced mixed protein gel using sodium caseinate, The XVIIth International Congress on Rheology (ICR 2016) (2016/8/8~2016/8/13, at Kyoto Terrsa) (京都府京都市)

[図書](計1件)

「ゲルの安定化と機能性付与・次世代への応用開発」(分担執筆:太田尚子) 第8節 超音波分光分析を用いた乳タンパク質のゲル形成挙動の解析 p.269~274) (株)技術情報協会 2013年12月13日発行

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: タンパク質シート及びタンパク質シートの製造方法

発明者: 太田尚子, 荻野健次, 高橋美帆

権利者: 学校法人 日本大学

種類: 特許

番号: 2016-36390

出願年月日: 2016/2/26

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 尚子 (YUNO-OHTA, Naoko)

日本大学短期大学部・教授

研究者番号: 00203795