

加熱誘導卵白アルブミンゲルの形成に及ぼす乳 - カゼインおよびカプリン酸ナトリウム添加の影響

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	太田,尚子 遠藤,菜里 澤木,心美 岸川,めぐみ
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	61巻5号
掲載ページ	p. 183-191
発行年月	2014年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

加熱誘導卵白アルブミンゲルの形成に及ぼす乳 α -カゼイン およびカプリン酸ナトリウム添加の影響

太田尚子*, 遠藤茉莉, 澤木心美, 岸川めぐみ

日本大学短期大学部専攻科食物栄養専攻

Effects of α -casein and Sodium Caprate on the Formation of Heat-induced Ovalbumin Gels

Naoko Yuno-Ohta*, Mari Endo, Motomi Sawaki and Megumi Kishikawa

Advanced Course of Food and Nutrition, Nihon University Junior College,
2-31-145 Bunkyo-cho, Mishima, Shizuoka 411-8555

We investigated the effects of α -casein (α -CN) and sodium caprate ($\text{NaC}_{10:0}$) on the formation of mixed gels with ovalbumin (OVA) using rheological measurement, ultrasound spectroscopy, fourier transform-infrared (FT-IR) analysis and scanning electron microscopy (SEM) observation. Although α -CN shows quite heat-stable rheological properties during the heating process, the mixture formed a soft gel with or without $\text{NaC}_{10:0}$. In the presence of $\text{NaC}_{10:0}$, the mixture shows a clear sol-gel transition, which is different from those in the absence of $\text{NaC}_{10:0}$. The ultrasonic gradient velocity between α -CN/OVA + $\text{NaC}_{10:0}$ and OVA + $\text{NaC}_{10:0}$ mixed systems indicated that the effects of α -CN addition began at around 46°C for the formation of a unique gel from the mixed protein system. FT-IR analysis indicated a decrease of 3_{10} -helices, α -helices, and β -sheets by the addition of $\text{NaC}_{10:0}$, and α -CN/OVA + $\text{NaC}_{10:0}$ showed a characteristic spectrum which is different from that of the OVA + $\text{NaC}_{10:0}$ system. The results imply that the mixed protein system containing milk casein is an interesting material for creating processed foods with novel texture and appearance.

(Received Dec. 10, 2013; Accepted Feb. 12, 2014)

Keywords : ovalbumin, α -casein, fatty acid salt, gelation, ultrasound spectroscopy
キーワード : 卵白アルブミン, 乳カゼイン, 脂肪酸塩, ゲル化, 超音波分光分析

卵白中の主要タンパク質であるオボアルブミン (OVA) は、その高い食品学的機能特性 (ゲル化性, 乳化性および気泡性など) により多種多様な加工食品に添加利用されている。一方で、 α -カゼイン (α -CN) は乳カゼイン中で最も熱安定性の高いタンパク質として知られている¹⁾。既に Matsudomi らは、乾燥卵白の加熱誘導ゲル特性に及ぼす α -CN の添加効果を調べ、ある比率の α -CN の添加で、乾燥卵白単独ゲルに比べ、透明性が高く、且つ軟らかく保水性の優れたゲルが調製できることを、ゲル状凝集体の評価を中心に報告している²⁾。本研究では、より精製度の高い OVA に α -CN を共存させた場合に OVA の加熱誘導ゲル化特性がどのように変化するかを解明することを主たる目的とした。更に、著者らがこれまでに幾つかのタイプの異なる食品タンパク質のゲル化特性改変に有効であることを報告³⁾⁻⁵⁾してきた脂肪酸塩の一つであるカプリン酸ナトリウム ($\text{NaC}_{10:0}$) 添加の効果について調べた。本研究の遂行に際しては、従来から広く用いられている動的粘弾性測定に加えて、比較的新しい手法である超音波分光分析法を

併用し、特にゲル形成過程に焦点をあてて解析した。加えて、ゲル形成の際のタンパク質二次構造変化とゲルの微細構造についてフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) および走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察によりそれぞれ考察した。

ところで本研究の主要ツールの1つである超音波分光分析の技法は古くからあるが、食品学研究に適用されたのは1990年代に入ってからであり、その主要な研究はエマルションを対象としたものが多い⁶⁾。しかしながら、その後小型で高感度な装置の開発と相まってゲル化現象もとらえる事ができるようになり、乳タンパク質の凝集に関する興味深い報告がなされた⁷⁾。本研究で用いた装置では、系のマイクロな弾性率を反映する超音波速度⁸⁾と、種々の要因 (物質固有の損失, 構造損失, 熱的・粘性的損失) によって引き起こされる超音波減衰⁹⁾の2つのパラメーターを測定できる。著者らは先に、乳カゼイン中の β -カゼイン (β -CN) 画分が $\text{NaC}_{10:0}$ 存在下で常温下において β -ラクトグロブリンと相互作用し、ゲル形成に至る事を本超音波分光分析にレオロジー測定を組み合わせることで明らかにした¹⁰⁾。

¹⁾ 〒411-8555 静岡県三島市文教町 2-31-145

*連絡先 (Corresponding author), naokohta@bitcat.net または NaokoOHTA@aol.com

本研究ではこのような背景に基づき、 β -CN に比べてより熱安定性の高い α -CN 画分を用いて、上記のような数種の機器分析を駆使して OVA と α -CN との相互作用を調べ、その相互作用の結果どのようなゲルが形成されるのか一連の流れを把握することを研究の目的とした。

実験方法

1. ゲルの調製

α -CN (C-6780 タイプ, シグマ・アルドリッチジャパン, 東京) および OVA (A-5503 タイプ, 同社製) を 0.2 M NaCl 並びに 2% NaC₁₀:₀ を含む蒸留水に溶解した。併せて 2% NaC₁₀:₀ を含まない試料も調製した。尚, NaC₁₀:₀ は貯蔵液として予め約 20% 水溶液を調製し, 必要量分取しタンパク質溶液と混和した。溶液の最終 pH は 1 N 又は 0.5 N NaOH を用いて 7.0~7.5 とした。また, α -CN 標品は Na 塩になっていないことがその一因と考えられるが, 水に難溶であったため, まず所定の NaCl 水溶液の半量を加えてガラス棒で十分に混和し, その後残りの NaCl, 蒸留水を添加し pH 調整後最後に OVA 標品を加えた。再度 pH が 7.0~7.5 以内にある事を確認後, これを試料溶液として使用した。ガラス管を用いた加熱誘導ゲルの調製は, 試料溶液 150 μ L を底をポリ塩化ビニリデンで蓋をした内径 5 mm のガラス管にマイクロディスペンサーを用いて注入し, 上端をアルミ箔でカバー後ウォーターバスを用いて 80°C 30 分加熱処理した後, 10°C にて 1 時間冷却することにより行った。

2. 走査型電子顕微鏡観察

ゲルの表面の微細構造を, 島津製作所製走査型電子顕微鏡 (SSX-500 型) を使用して観察した。加熱誘導ゲルの一部を 1 mm \times 1 mm \times 3 mm の小片にかみそりの刃を用いてスライスし, 化学固定とそれに続く導電染色により前処理した。即ち, まず前固定として, 1% グルタルアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 処理後, 0.5% タンニン酸-1.5% グルタルアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 処理した。更に 1% タンニン酸-1.5% グルタルアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 処理に供した後, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) にて十分洗浄後, 0.4% オスミウム酸-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) にて後固定を行った。次に蒸留水を用いて十分洗浄した。試料は更に, 試料内部の固定を完全に行うため, 再度上述の導電染色 (0.5% タンニン酸-1.5% グルタルアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 処理し, 更に 1% タンニン酸-1.5% グルタルアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 処理) に供した後, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) にて十分洗浄した。次に, 1% オスミウム酸-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) にて後固定を行った。その後水洗し, 固定後の試料を順次濃度を上げたエタノール溶液 (50, 70, 80, 90, 95, 100 (I), 100 (II)) を用いて, 脱水を行った。次に *t*-ブタノール凍結乾燥により試料を乾燥した。即ち, *t*-ブタノール:エタノールの比率

を 2:8, 4:6, 7:3, 10:0 (I), 10:0 (II) と順次変化させ *t*-ブタノールへの移行を完全に行った。真空デバイス (株) 製乾燥機 (VFD-21S 型) を用いて 1 時間乾燥後, 試料片はデシケータ内で保管した。SEM 観察の前に試料の割面が上になるようにアルミニウム製台材にカーボンテープで固定, オスミウムコーティング (15 nm 厚, サンコー電子社製) を施し観察試料とした。

3. 動的粘弾性測定

動的粘弾性測定は, 歪み制御型レオメーター (レオメトリックサイエンス社製, 現 TA インストルメント社, ニューキャッスル, デラウェア州) を用いて行った。直径 25 mm の平行プレートを用い, 25°C, 試料厚 (Gap) 0.5 mm とし, 角速度 6.28 rad/s の条件下でまず動的弾性率の歪み依存性測定を行い, 試料の線形範囲を求めた。得られた線形範囲の最大値を用いて, 動的弾性率の温度依存性測定を行った。ただし, 本実験では温度に依存してゲル化が進行し, 試料の線形範囲が変化するため, 自動歪み調整機能を採用し, 試料の線形範囲の変化に応じて自動的に歪み量も変化させながら測定した。尚, 結果の再現性を保証するため, 混合タンパク質の測定ではカプリン酸ナトリウム存在下および非存在下につきそれぞれ 4 回独立した実験を行い, そのうちで典型的なプロファイルを選択しマイクロソフトエクセル用いて解析した。

4. 超音波分光分析

超音波分光分析はウルトラサイエンフィティク社製 HR-US 1021 タイプ (ダブリン, アイルランド) を用いて行った。装置は解析ソフトウェア (ver. 4-50-25-0) を搭載していた。本装置では音波が試料側と対照の 2 つの試料室を通過し, 音波の速度と減衰が測定でき, それぞれ別個に記録される。上述 1 の通り調製した試料溶液 (1000 μ L) を, 重力加速度 50*g で 2 min 遠心分離に供し脱気後, 試料室に注入した。最大 8 種類の周波数で測定できるが, 解析には最も安定したデータが得られた 5 MHz のデータを用いた。尚, 装置は予め, 超音波速度と減衰係数が既知の蒸留水を用い校正を行った。装置内試料室の温度は装置に連結したウォーターバス (Hakke F8 タイプ, サーモハック, カナダ) を用いて制御した。少なくとも個別の実験を 3 回以上行い, 得られたデータをマイクロソフトのエクセルにて解析した。グラジエントは各速度差 (relative velocity) の値の前後各 5 つのデータを別個に合計し, 後の合計値から前の合計値を差し引き, これを同様の計算で求めた時間で除して各ポイントの単位温度上昇当たりの変化率として算出した¹¹⁾。

5. フーリエ変換赤外分光分析

フーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光分析は, FT-IR 8300 型 (島津製作所製, 京都) を用い, スペクトル測定は 7000 cm^{-1} ~400 cm^{-1} 間で行い, 分解能 4 cm^{-1} 毎とした。干渉波を 40 回繰り返して測定しその平均をとり, アポダイズ関数

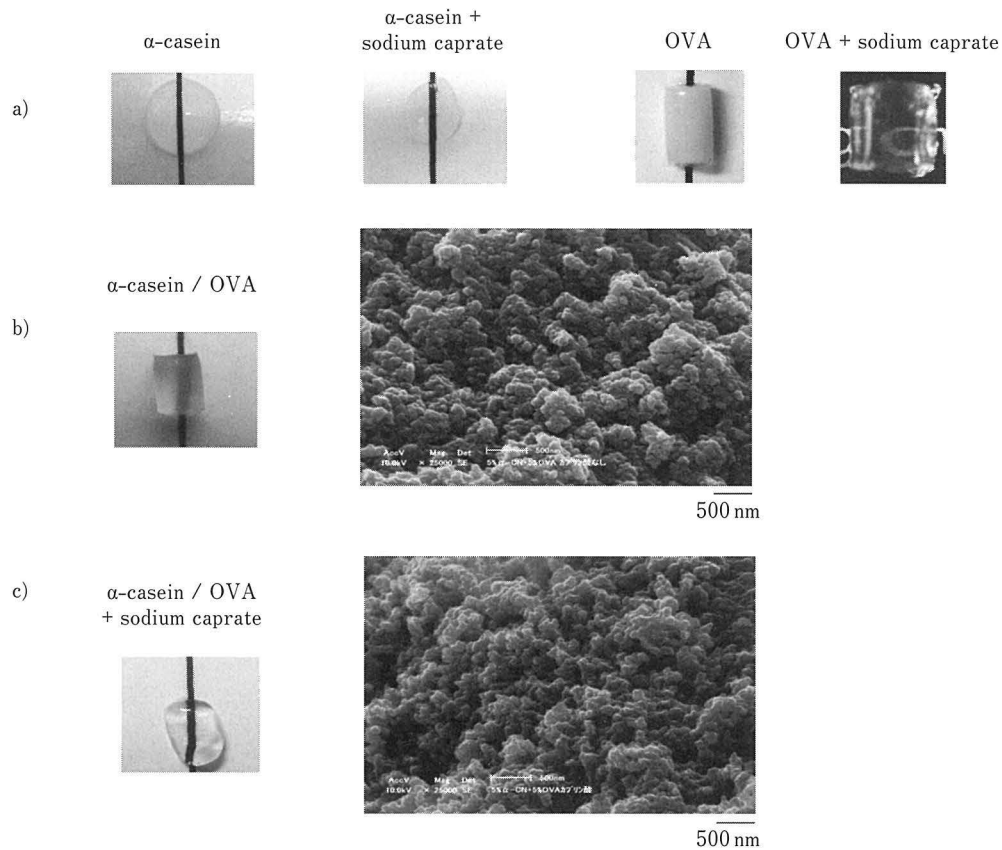


Fig. 1 Appearances and scanning electron micrographs of protein gels with or without sodium caprate

(Happ-Genzel 関数を使用)によりその干渉波からパワースペクトルを得た¹²⁾。ZnSeを用い水平型全反射プリズムを装置に挿入し全反射(ATR)測定を行った。FT-IR分光分析には 1650 cm^{-1} 付近の水の吸収を除くため、上述1で記した試料調製を、蒸留水の代わりに重水を使用して行った。試料溶液およそ $20\text{ }\mu\text{L}$ をプリズム上に約 5 mm 幅に広げてセットした。試料溶液の測定に先立って、バックグラウンド測定を行った。即ち、プリズム上に重水のみをセットしATR測定し、引き続き試料溶液を測定した。自動的にバックグラウンドが差し引かれ試料溶液のスペクトルを得ることができた。また、結果の再現性を保証するため、各試料溶液の測定は、加熱前と加熱後にそれぞれ2回ずつ上記の波数範囲で測定し、再現性のある事を確認してスペクトル全体にATR補正をかけた。次に $1550\text{ cm}^{-1}\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ 範囲(アミドI領域)を選択しデコンボリューション処理に供した。デコンボリューションでは吸収ピークの半値幅 25 cm^{-1} 、光路長 0.104 mm 、アポダイズ関数にトライアングルの2乗を用いた¹²⁾。

実験結果

1. α -CN, α -CN/OVA 混合ゲルの外観に及ぼす $\text{NaC}_{10:0}$ 添加の影響

Fig. 1 は $\text{NaC}_{10:0}$ 存在下および非存在下での α -CN,

OVA および α -CN/OVA 混合ゲルの外観を示した。 α -CN 単独では $\text{NaC}_{10:0}$ の有無にかかわらず、透明溶液のままであった(上段左から2つ)。一方、 α -CN/OVA (1:1) 混合ゲル ($\text{NaC}_{10:0}$ 非存在下)では半透明ゲルを形成した(中段)。更に、 $\text{NaC}_{10:0}$ 添加では保形性の弱い透明ゲルを形成した(下段)。著者らは既に $\text{NaC}_{10:0}$ 添加 OVA ゲルの形成に関して詳細な報告をしており⁴⁾、その結果と比較すると、ここで形成した $\text{NaC}_{10:0}$ 添加 α -CN/OVA (1:1) 混合ゲルはこれに匹敵する透明度の高い外観を有していた(Fig. 1)。 $\text{NaC}_{10:0}$ の有無により α -CN/OVA 混合ゲルの外観に違いが認められたので、それぞれの微細構造をSEM観察した。その結果、 $\text{NaC}_{10:0}$ 存在下および非存在下共に平均粒径 90 nm の変性タンパク質の凝集体からなる緻密な微細構造が観察された。

2. 種々のタンパク質溶液の加熱処理に伴う動的粘弾性特性の変化

Fig. 2 に種々のタンパク質溶液の加熱処理に伴う貯蔵弾性率 (G') ならびに損失弾性率 (G'') の変化を示した。これらのパラメーターはそれぞれ後述する超音波分光分析で得られる超音波特性値に密接な関係をもつ。まず、はじめに $\text{NaC}_{10:0}$ 非存在下の5% OVA/5% α -CN 混合タンパク質系の加熱過程における動的弾性率の変化を示した(Fig. 2a)。本実験で使用した α -CN は上述したように難溶で

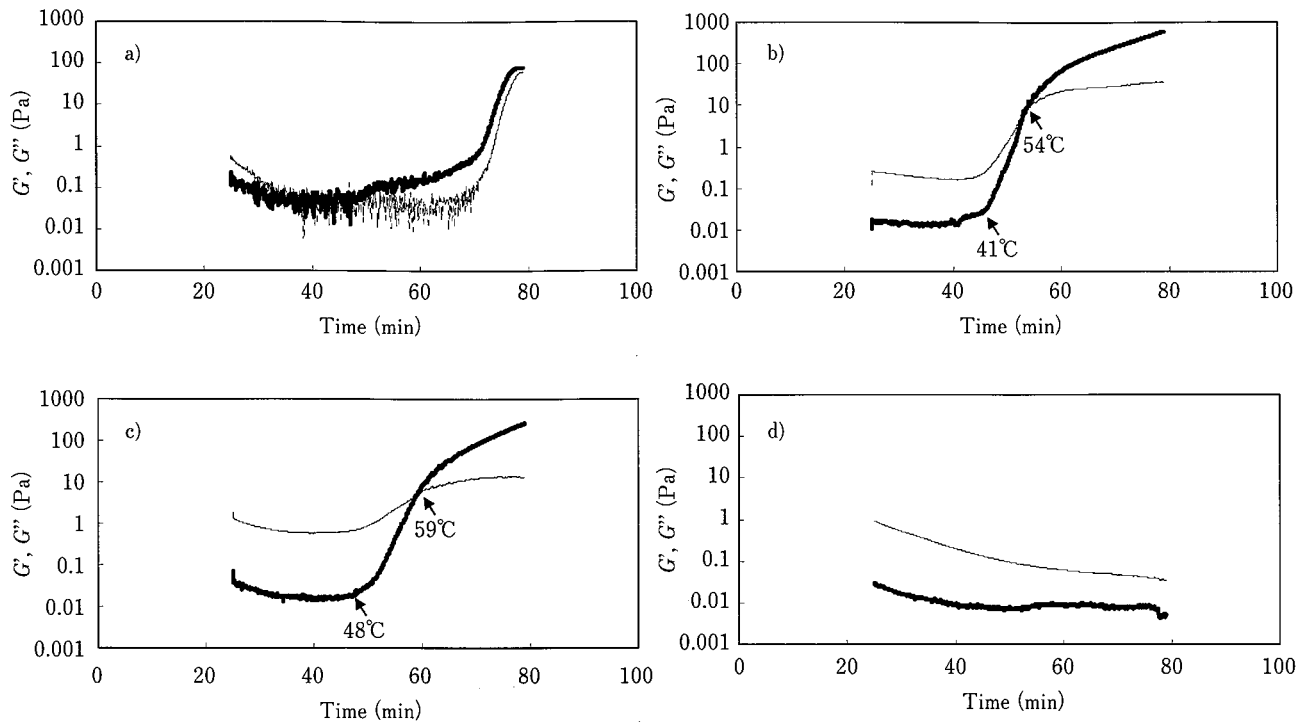


Fig. 2 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 10% protein from different amount of ovalbumin (OVA) and α -casein (α -CN) in the presence of sodium caprate under heat treatment

Measurements were performed at 6.28 rad/s. Thick line, G' ; thin line, G'' ;

a) 5% α -CN/5% OVA, b) 10% OVA + 2% sodium caprate, c) 5% α -CN/5% OVA + 2% sodium caprate, d) 10% α -CN + 2% sodium caprate.

NaC_{10:0}非存在では、存在下に比べ分散溶液を調製するのが困難であったため、正確な弾性率を求めることができず参考値ではあるが、それによると、既に室温付近の33°C~48°Cにおいて G' と G'' が重なった状態で明白なゾル-ゲル転移温度が求められなかった。また、10% α -CN+2%NaC_{10:0}混合系 (Fig. 2d) は終始 G'' が G' を上まわるいわゆるゾル状の挙動を示し¹⁴⁾、極めて熱安定性が高いことが確認できた。一方、10%OVA+2%NaC_{10:0}混合系ではゾル-ゲル転移点が54°C (Fig. 2b)、5%OVA/5% α -CN+2%NaC_{10:0}混合系では59°C (Fig. 2c)と明白なゾル-ゲル転移温度が観察された。また、5%OVA/5% α -CN+2%NaC_{10:0}混合系における G' の立ち上がり温度は48°C付近であり、10%OVA+2%NaC_{10:0}混合系 (41°C) に比べ約7°C高温側に観察された。これらの結果から、 α -CNはそれ単独では加熱に対して極めて安定であるが、OVAに α -CNを添加するとOVAのゲル化に協働的に参加し、シネルジスト (共力剤または相乗剤) として働いていることが示唆された。このOVAと α -CNの相互作用は、乾燥卵白を用いて行ったMatsudomiらの実験で得られた知見と基本的に共通していた²⁾。尚、図には示していないが、OVA/ α -CN混合系中でのOVA濃度である5%に対するNaC_{10:0}濃度として、1%NaC_{10:0}を添加し同様の測定を行った。加熱過程で G' はおよそ0.01 Pa、 G'' はおよそ0.1 Paでやはり

G'' が G' を上回っていた。以上のことから、OVA/ α -CN混合系中において α -CNが確かにゲル化に寄与していることを確認した。

3. 超音波速度

超音波速度はこのパラメーター自身、温度依存性があるため、一般に2つのセル中の試料の超音波速度の差をもって議論される⁷⁾。ここではセル1 (試料側セル) には5%OVA/5% α -CN+2%NaC_{10:0}を、また、セル2 (対照側セル) には5%OVA+2%NaC_{10:0}をセットした。Fig. 3aは各試料溶液の超音波速度の温度依存性を示している。80°Cまでの温度上昇に伴い、いずれの試料も超音波速度が次第に増加した。この事は α -CNの有無に関わらずいずれの混合タンパク質系も次第に水和していつていることを示している¹⁵⁾。Fig. 3bは、5%OVA/5% α -CN+2%NaC_{10:0}の超音波速度から5%OVA+2%NaC_{10:0}の超音波速度を差し引いたものである。その結果、速度差は昇温開始直後から次第に低下し、屈曲点 (図中の矢印) を示した後さらに緩やかに低下した。超音波速度の低下は系全体の圧縮率の増加を意味することから、 α -CNの添加によって系の圧縮率の増加が起きていることを示唆している。実際、超音波分光分析後の試料は、混合タンパク質系ではFig. 1の写真のような透明なゲル、OVA単独タンパク質系では透明な溶液状態であった。既報⁹⁾の通り、NaC_{10:0}添加OVAは

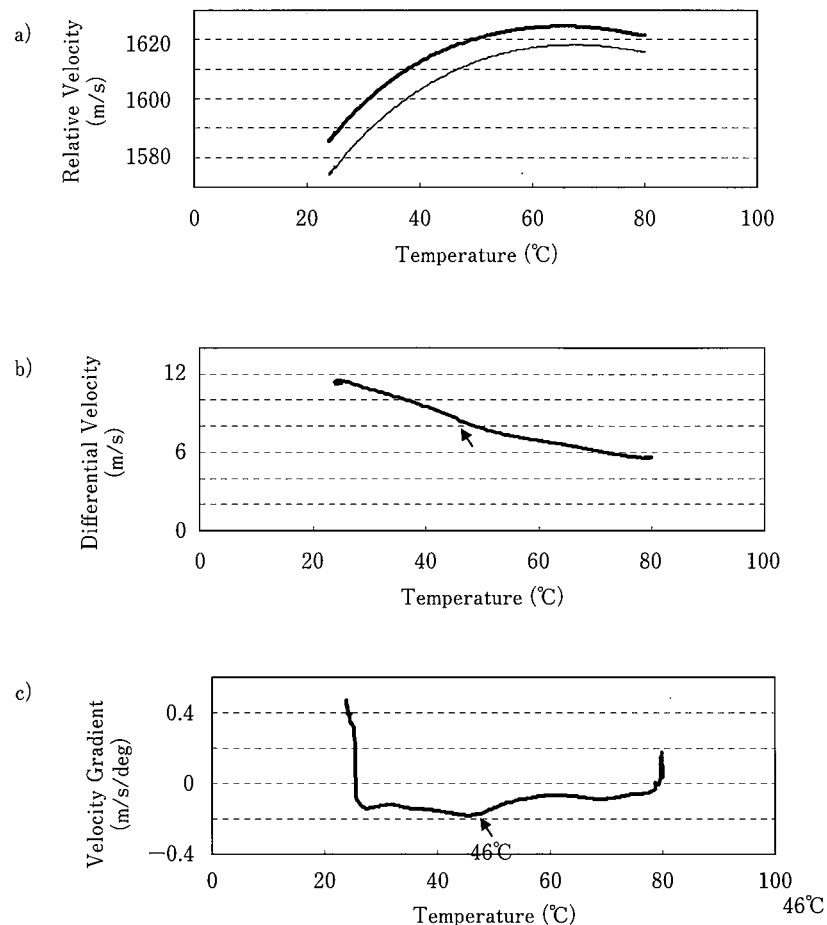


Fig. 3 The temperature dependence of ultrasonic velocity (a), differential velocity (b) and gradient velocity (c) of the protein (pH7.1-7.5) in the presence of 2% sodium caprate

bold line, 5% α -CN/5% OVA; thin line, 5% OVA. Differential velocity curve was obtained by subtracting the ultrasonic velocity of 5% OVA from the ultrasonic velocity of 5% α -CN/5% OVA (b). Gradient velocity was presented as a function of temperature (c). Gradient changes were calculated by separately summing five points before and five points after a given point, determining the difference, and dividing the result by the time gradient in the same data range. Measurement was performed at 5 MHz. Three independent experiments were carried out, and typical result is represented.

透明なゲルをつくるが、ここでは低タンパク質濃度（5%）であり、2% $\text{NaC}_{10:0}$ を添加してもゲル化には至らなかったためだと考えられる。また、Fig. 3b で観察された屈曲点（図中の矢印）は、グラジエントを算出することにより更に明確におよそ46°Cと捉えることができた（Fig. 3c）。先に示した混合タンパク質系の動的粘弾性測定における G' の立ち上がり温度（約48°C）にほぼ一致していたことから、混合タンパク質系における相転移開始温度をほぼ反映していると考察される。

尚、本装置では超音波速度に加えて超音波減衰も測定できるが、既に報告した常温下での脂肪酸塩の挙動とは異なり、昇温により $\text{NaC}_{10:0}$ 単独を溶解した水溶液でも超音波減衰が顕著に増加することがわかった（図示せず）。先に述べたように、超音波減衰は種々のファクター（物質固有の損失、構造損失、粘性損失や熱的損失など）による影響を受けそのトータルが検出されるためと考えられるた

め、本研究では超音波減衰の挙動の考察は行わないこととした。

4. フーリエ変換赤外分光分析

次に、混合タンパク質系における α -CN の寄与をタンパク質二次構造レベルで検討するため、FT-IR を用いてアミド I 領域の解析を試みた。ここでは、Jackson と Mantsch¹⁶⁾ が示している一般的なタンパク質の構造とアミド I 振動数の関係を参考に考察した。それによると、逆平衡 β -シート並びに凝集ストランドは $1675\sim 1695\text{ cm}^{-1}$ 付近（Fig. 4b における a 領域）、 3_{10} -ヘリックスは $1660\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ 付近（b 領域）、 α -ヘリックスは $1648\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ 付近（c 領域）、不規則構造は $1640\sim 1648\text{ cm}^{-1}$ 付近（d 領域）、 β -シートは $1625\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ 付近（e 領域）、そして凝集ストランドは $1610\sim 1628\text{ cm}^{-1}$ 付近（f 領域）に帰属されている。

Fig. 4 は混合タンパク質系が $\text{NaC}_{10:0}$ 添加によりどのよ

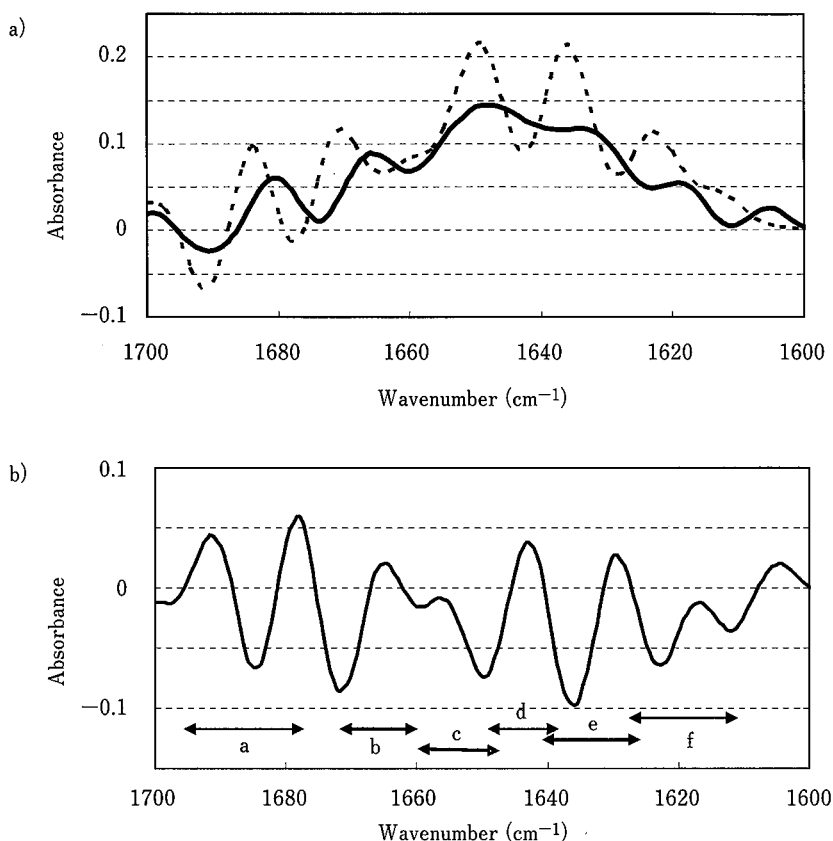


Fig. 4 Deconvoluted spectra in the amide I' region of heated proteins with or without sodium caprate

a) bold line, 5% α -CN/5% OVA containing 2% sodium caprate; dotted line, 5% α -CN/5% OVA without sodium caprate; b) Differential spectrum obtained by subtraction of 5% α -CN/5% OVA from 5% α -CN/5% OVA containing sodium caprate. a, b, c, d, e and f region show Antiparallel β -sheet/aggregated strands, 3_{10} -Helix, α -Helix, Unordered, β -Sheet, Aggregated strands, respectively¹⁶⁾.

うに変化するかを示したものである。前述 Fig. 1 にも示したように、いずれも加熱処理によりゲル状凝集体を形成しているが、その濁度や保形性（硬さ）に違いがあった。Fig. 4a は、 $\text{NaC}_{10:0}$ 存在下および非存在下のデコンボリューション処理後のスペクトルを重ね書きしたものであるが、 $\text{NaC}_{10:0}$ 添加では無添加に比べ各ピークがブロード化し更にスペクトル全体がやや低波数側にシフトしており、より変性が進んでいることが判る¹²⁾。更に、 α -ヘリックス並びに β -シートのいわゆる規則構造が顕著に減少していることが一見して読み取れる。そこで確認のため Fig. 4b では、 $\text{NaC}_{10:0}$ 存在下から非存在下を差し引いたスペクトル（差スペクトル）を求めた。縦軸のゼロの位置から負の方向へのピークに注目すると $\text{NaC}_{10:0}$ 添加により 3_{10} -ヘリックス、 α -ヘリックス、 β -シート (b, c, e 領域) の顕著な減少が明瞭に観察できた。

次に、Fig. 5 では二次構造に及ぼす α -CN の影響を調べる為、加熱後の試料は共に半透明のゲル状凝集体を形成していたが、その硬さに差が認められた 5% OVA + 1% $\text{NaC}_{10:0}$ 、10% OVA + 2% $\text{NaC}_{10:0}$ 、5% OVA/5% α -CN + 2% $\text{NaC}_{10:0}$ の 3 つのスペクトルを重ね書きした。オリジ

ナルのスペクトルをデコンボリューション処理したもので、混合タンパク質系ではその主要ピークが 1647 cm^{-1} 付近であることが判る。これに対して、OVA 単独タンパク質系では 1651 cm^{-1} 付近および 1634 cm^{-1} 付近が主要ピークとして観察された。このことから、混合タンパク質系のスペクトルは OVA 単独系とは顕著に異なる二次構造スペクトルを呈し、 α -CN が明らかに OVA の二次構造に影響を与えていること、更に、 α -CN の添加は α -ヘリックス並びに不規則構造の増加を導いた事が判る。また、Susi らの総説¹³⁾ によると α -CN は不規則構造が多い特徴があると述べられている。本稿の FT-IR 解析においてはデコンボリューションを行ったが、今後は、このようなアポダイゼーション関数を用いて検出したピークを更に、ガウス/ローレンツ関数による解析に供するなどしてより定量的な情報を得ることが望まれる。

考 察

著者らはこれまで、主として未利用植物性タンパク質の高度利用を図る事を目的とした基礎研究を行ってきた。その過程でゲル状食品素材の利用の難易には素材タンパク質

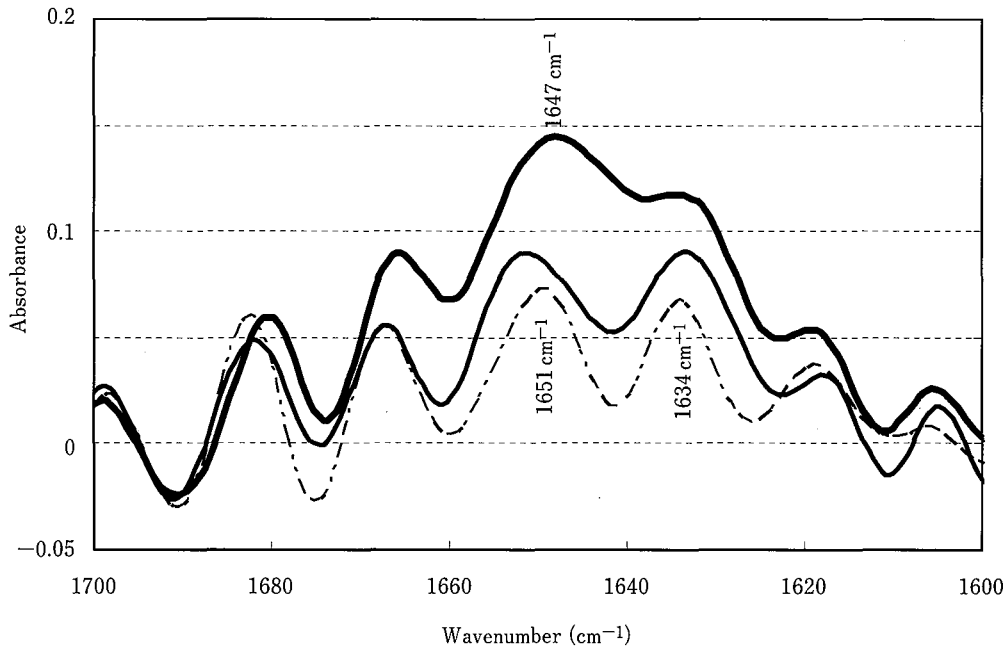


Fig. 5 Deconvoluted spectra of heat-induced gels containing sodium caprate

bold line, 5% α -CN/5% OVA+2% sodium caprate; thin line, 10% OVA+2% sodium caprate; short dashed line, 5% OVA+1% sodium caprate

の保水性の良し悪しが深く関わっている事を示唆した。タンパク質の疎水性は、一般に疎水性アミノ酸含量の多さに起因すると予想されるが、アミノ酸組成よりもむしろタンパク質の高次構造と関わり、結果的にタンパク質の表面疎水性度に左右されることを示唆した¹⁷⁾。

前述のように OVA は広範な加工食品に添加物（例えばハムや水産練り製品などの加工食品におけるつなぎ成分）として用いられており、これは OVA 自身のもつ良質な食品学的機能特性に基づいていると考えられる。しかしながら、例えばハムなどの場合には混和した OVA が加熱時に白濁することが品質評価を下げる要因にもなっている。一方、乳タンパク質は、熱に対しては安定で、逆に酸変性しやすいカゼイン画分と、カゼイン以外の主要タンパク質である熱凝固性の乳清タンパク質画分に大別されるが、本研究で用いた α -CN はその中でも最も熱安定性が高く、シャペロン活性を有することが知られている¹⁾。例えば、上述した Matsudomi らの先行研究²⁾でも示されたような、ゲル状試料の透明感や保水性の付与などはシャペロン活性の高いタンパク質のもたらす効果の一つと考えられる。

著者らは従前より、種々の食品タンパク質ゲルの微細構造を SEM 観察してきた。その結果、一般に白濁ゲルでは変性タンパク質分子間の疎水性相互作用により巨大球状凝集体を形成し、それがユニットとなり三次元的に広がった粗いネットワーク構造を構築すると考えられている。即ち、疎水性の強いタンパク質として知られるゴマ 13S グロブリンからつくられる加熱誘導ゲルでは、およそ 1500~

2000 nm の粒径をもつ凝集体が観察されたのに対し¹⁸⁾、比較的親水性に富む酸沈大豆タンパク質からつくられるゲルではその粒径は 90 nm 程度であった¹⁸⁾。今回の α -CN/OVA 混合ゲルは 60~90 nm 程度であり、親水性のゲルに近い微細な構造を有していることが示唆された。更に、今回の実験では脂肪酸塩の有無に関わらず、およそ 60~90 nm 程度であり、外観的には透明度に違いが観察されたにも関わらず、脂肪酸塩添加による微細構造への影響はほとんどなかった。この事は α -CN の添加のみでも有意に微細な構造が形成され得ることを示唆している。また、OVA のゲル化にはアミロイド線維形成が関与していることが知られている^{19)~21)}。著者らは既に脂肪酸塩添加ゲルの微細構造について明らかにしており、脂肪酸塩添加では OVA のみならずゴマ種子 13S グロブリンなど種類の異なるタンパク質ゲルでも繊維状凝集体構造を含んでいることを報告した。著者らが数種のタンパク質を用いて行った脂肪酸塩添加による繊維状凝集体を含むゲルネットワークの構築の機構は、Kawachi ら²¹⁾によって報告された OVA における N 末端の両親媒性領域という特定の領域の寄与とは考察しておらず、タンパク質の疎水性領域と脂肪酸塩の炭素鎖間の疎水性相互作用と、脂肪酸塩由来のカルボキシル基の導入によるマイナスチャージ間の反発の結果生じた両親媒性を有する三次元ネットワーク形成によるものと考えた。しかしながら、今回行った α -CN とカプリン酸塩共存下の OVA ゲルでは Fig. 1c) に示したように、粒径 100 nm 以下の微細な構造をもつものの目立った繊維状構造は観察されず、透明

Table 1 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of the protein in cooling process after heat-treatment

	G' at 342 min	G'' at 342 min	G''/G' ($\tan \delta$)	G^* at 342 min
10% OVA +2% sodium caprate	4518	199	0.044	4522
5% OVA/5% α -casein +2% sodium caprate	1145	206	0.180	1163

度の高い外観を持つ点でこれまでの脂肪酸塩誘導ゲルと共通していたものの、微細構造観察では相違点が見出された。今後は線状凝集体形成に関わる詳細な先行研究の知見を踏まえ、カゼイン混合型ゲルの微細構造に及ぼす脂肪酸塩添加の影響について更に研究を進めたい。

著者らは本研究において動的粘弾性測定を行い、OVA単独タンパク質系と混合タンパク質系での脂肪酸塩添加ゲルの弾性率を比較したが (Fig. 2)、加熱過程で相転移したタンパク質が、引き続き冷却過程で分子間相互作用しゲルネットワークの構築へと進むと考えられるため、Table 1では80℃における加熱処理後の冷却後、弾性率が平衡に達した時 (約6時間後) の値を示している。一般に G' と G'' の値に一桁以上の差がある場合に真のゲルと評価されることから¹⁴⁾、OVA単独タンパク質系は真のゲルと評価されるのに対して、混合タンパク質系では流動性の高い弱いゲルと評価することができる。

また、ゲル化の際タンパク質は水分子の入り込めない隙間をつくりつつネットワークを構築していくため一般に系の圧縮率は増加すると考えられている。超音波速度と系の密度や圧縮率は反比例する⁷⁸⁾ ことから温度変化に伴う超音波速度の差 (α -CN/OVA混合系の速度からOVA単独系の速度を差し引いたもの) の変化を解析することにより、 α -CNの添加が系の圧縮率にどのような効果をもたらしているかを直接的に知ることができる。更に単位温度上昇当たりの超音波速度の減少率 (変化率である gradient velocity) を求めることによりその形がよりシャープとなり、今回の系では α -CNの添加効果が46℃付近で現れていることがわかった (Fig. 3c)。

尚、動的粘弾性測定の貯蔵弾性率や損失弾性率の立ち上がり温度は示差走査熱量分析 (DSC) による相転移開始温度にも相当すると考えられる。そこで、著者らはDSC分析を用いて吸熱ピークおよびその熱容量を求めるを試みたが、得られた吸熱ピークが非常にブロードであったことから、転移のピーク温度を考察することは困難であった (図示せず)。Farrellら²²⁾ は先に、カゼインの構造は完全に動的な状態 (天然状態で既にモルテングロビュール状態) にあり、DSC分析でその相転移を捉えることは困難であることを示唆しており、今回の α -CN添加系での分析も彼らの結果と同様の結果となったものと考えられる。

更に、著者らは混合タンパク質の超音波分光分析中、装置の片側の試料室から経時的に凝集体の一部を採取し、ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) に供した²¹⁾。その結果、80℃加熱中およびそれに引き続く冷却過程において、4~16%ポリアクリルアミド濃度のグラジエントゲル中に入ることのできないほどの高分子量会合体が形成されていることが判った (図示せず)。また、Matsudomiら²⁾ は希薄 α -CN溶液とOVA溶液の加熱混合物を還元剤存在下のSDS-PAGEに供し、 α -CNが乾燥卵白中の主要タンパク質成分と複合体を形成していたこと、即ち、それらのタンパク質間でジスルフィド結合による会合体の形成が観察された事を推察した。

FT-IR分析では、アミドI領域 (1600~1700 cm^{-1}) にあられるタンパク質二次構造解析を行った。Farrellらは α -CNの構造は完全に動的な状態にあるにも関わらず、FT-IRでのアミドI領域のスペクトルは一般的な球状タンパク質のそれと類似していることを論じている²²⁾。本研究では、試料の濁りによる測定への影響を防ぐため、試料を全反射法により測定後、デコンボリューション処理後のスペクトルを解析した。OVA/ α -CN混合タンパク質系に対する $\text{NaC}_{10:0}$ 添加の影響を調べたところ、 $\text{NaC}_{10:0}$ 添加はタンパク質の変性を促進していることが明らかになった。また、OVA/ α -CN混合タンパク質系とOVA単独タンパク質系での $\text{NaC}_{10:0}$ 存在下でのスペクトル比較により、 α -CNが明らかにOVAの二次構造に影響を与えていることがわかり、 α -CNはそれ自身熱に対して安定であるが、OVAとの混合型加熱誘導ゲル形成においてそのテクスチャーモディファイヤーとしての役割を果たしていることがタンパク質二次構造レベルで確認できた。

即ち、 α -CNはOVAと以下のような相互作用のもとでゲル状凝集体を形成していくことを示唆した。 α -CNはOVA分子が共存する際には、ジスルフィド結合や疎水性相互作用などを介しOVAと相互作用するが、結果的にOVA分子同士の強い凝集性を低減させる為、白濁ゲルではなく半透明ゲルとなり、更に脂肪酸塩が共存する際には既に著者らが報告³⁾ しているように、アンフォールディングしたタンパク質の表面に露出した疎水性領域と脂肪酸塩の炭素鎖間で疎水性相互作用が生じ、変性タンパク質間の強い凝集性が抑制され、より広がった三次元的ネットワークが形成される結果、透明度の高いゲルが形成されるのだろう。

今回の乳 α -CN混合ゲルの調製を通して、熱安定性の高いタンパク質が条件によっては共存するタンパク質のゲル形成能に影響を与え、OVAの食品素材としての加工適性を、より合目的なものに発展、向上させ得る可能性を示唆する点で興味深い系である事が示唆された。また、脂肪酸塩の添加は、分散性の乏しい α -CNのようなタンパク質に対し、OVAとの混合システムの均質化を促し、調製し

易くする上で有効であることが判った。今後は更に、他の界面活性剤（食品添加物など）の利用も試みたい。

要 約

α -カゼイン (α -CN) は非常に熱に対する安定性の高いタンパク質として知られているが、オボアルブミン (OVA) との共存下で特徴ある物性を有するゲル状凝集体をつくり得ることが判った。また、この混合タンパク質の試料溶液を調製するにあたり、脂肪酸塩の添加がより均質なサスペンションを調製する上で効果的であった。カプリン酸ナトリウム添加の α -CN/OVA 混合システムは、OVA に比べ加熱処理の過程でより緩やかな相転移現象を経てゲル化に至り、結果的にこれまでの OVA ゲルとは異なる新規なテクスチャーをもつことが示唆された。

文 献

- Bhattacharyya, J. and Das, K.P., Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein, α_s -casein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15505-15509 (1999).
- Matsudomi, N., Kannda, Y. and Moriwaki, H. α -Casein improves the gel properties of dried egg white. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7140-7145 (2003).
- Yuno-Ohta, N., Maeda, H., Okada, M. and Hasegawa, K., Formation of transparent gels of sesame 13S globulin : Effects of fatty acid salts. *J. Food Sci.*, **57**, 86-90 (1992).
- Yuno-Ohta, N., Toriyu, H., Higasa, T., Okada, M. and Ohta, H., Gelation properties of ovalbumin as affected by fatty acid salts. *J. Food Sci.*, **61**, 906-910 & 920 (1996).
- Yuno-Ohta, N., Higasa, T., Tatsumi, E., Sakurai, H., Asano, R. and Hirose, M., Formation of fatty acid salt-induced gel of ovalbumin and the mechanism for gelation. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4518-4523 (1998).
- McClements, D.J., Ultrasonic characterization of emulsion and suspensions. *Adv. Coll. Int. Sci.*, **37**, 33-72 (1991).
- Buckin, V. and Smyth, C., High-resolution ultrasonic resonator measurements for analysis of liquids. *Seminars Food Analysis*, **4**, 113-130 (1999).
- Gekko, K. and Noguchi, H., Compressibility of globular proteins in water at 25°C. *J. Phys. Chem.*, **83**, 2706-2713 (1979).
- Dukhin, A.S., Goetz, P.J., Wines, T.H. and Somasundaran, P., Acoustic and electroacoustic spectroscopy. *Colloids Surf., A*, **173**, 127-158 (2000).
- Yuno-Ohta, N. and Corredig, M., β -casein aids in the formation of sodium caprate-induced β -lactoglobulin B gel. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **84**, 442-446 (2011).
- Corredig, M., Verespej, E. and Dalgleish, D.G., *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4465-4471 (2004).
- Surewicz, W.K. and Mantsch, H.H., New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, **952**, 115-130 (1988).
- Susi, H. and Byler, D.M., Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods in Enzymology*, **130**, 290-311 (1986).
- 西成勝好, 食感の創出素材—テクスチャーモディファイヤーの現状と課題. *日本調理科学会誌*, **38**, 397-403 (2005).
- Buckin, V.A., Hydration of nucleic bases in dilute aqueous solutions. Apparent molar volumes and their temperature slopes at 25°C. *Biophys. Chem.*, **29**, 283-292 (1988).
- Jackson, M. and Mantsch, H.H., The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Molecular Biol.*, **30**, 95-120 (1995).
- Yuno-Ohta, N., Matoba, T. and Hasegawa, K., Emulsifying properties of native and citraconylated sesame 13S globulins. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 685-692 (1988).
- Yuno-Ohta, N., Maeda, Okada, M. and Ohta, H., Heat-induced gels of rice globulin : Comparison of gel properties with soybean and sesame globulins. *J. Food Sci.*, **59**, 366-370 (1994).
- Weijers, M., Sagis, L.M.C., Veeman, C., Sperber, B. and van der Linden, E., Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, **16**, 269-276 (2001).
- Azakami, H., Mukai, A. and Kato, A., Role of amyloid type cross β -structure in the formation of soluble aggregate and gel in heat-induced ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1254-1257 (2005).
- Kawachi, Y., Kameyama, R., Takahashi, N. and Tanaka, N., Role of the N-terminal amphiphilic region of ovalbumin during heat-induced aggregation and gelatin. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 8668-8675 (2013).
- Farrell, Jr. H.M., Qi, P.X. and Uversky, V.N., New views of protein structure : Applications to the casein : Protein structure and functionality In *Advances in Biopolymers-ACS Symposium Series (ACS publication)*, Chapter 4 "Advanced daily chemistry : proteins; eds. Fishman, M.L., Qi, P.X., Wicker, L., 935, pp. 52-70 (2006).
- Schgger, H., Blue native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Meth. Cell Biol.*, **65**, 231-244 (2001).

(平成 25 年 12 月 10 日受付, 平成 26 年 2 月 12 日受理)