

タンパク質ゲルの食感を改変する食品接着剤の開発

宮城大学 食産業学群
赤澤 隆志*

1. 研究の背景と目的

高タンパク質ゲル状食品はソーセージ、蒲鉾、プリンなど多岐にわたる。これらの食品のおいしさには、物理的な味である食感の寄与が大きい。食感はゲル内のタンパク質ネットワークに架橋を挿入することで改質することができる (Kaewdang & Benjakul 2015)。これまでに、ゲニピン (Geni)、グルタルアルデヒド (Glu)、トランスグルタミナーゼなどのタンパク質架橋剤がタンパク質ゲルの物性改変に有用であることが報告されている。また、近年、植物の二次代謝産物であるポリフェノール (PP) がタンパク質ゲルの破断強度を向上することが報告されている。我々はこれまでに、植物の中でもモクセイ科オリーブ (*Olea europaea*) の葉から作製した水抽出物 (Olive leaf extract, OLEx) は、タンパク質ゲルの物性を劇的に改変することを見出した。1.0% (w/v) OLEx の添加で卵白ゲルの破断応力が 1.4 倍増加する (Akazawa *et al.* 2021)。また、ゼラチンゲルにおいても、OLEx は破断強度を最大 11 倍増加させた。OLEx の物性改変効果には、タンパク質間を接着する作用が関与している。OLEx の主要 PP である oleacein (Ole) は Glu 様の構造を有しているため、タンパク質間の架橋に関与することが考えられるが、Ole がタンパク質ゲルの物性に及ぼす影響は明らかとなっていない。本研究では、Ole とタンパク質ゲルの反応性を分子レベルで解析した。また、Ole の物性改変作用を既存の架橋剤と比較することで、Ole の食品接着剤としての有用性を検証した。

2. 材料・方法

2-1. 材料

OLEx は既報の通り作製した (Akazawa *et al.* 2021)。Ole は Paiva-Martins らの方法を用いて OLEx から精製した (Paiva-Martins & Gordon 2001)。Geni 及び Glu は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。卵白タンパク質オボアルブミン (OVA) は、硫酸アンモニウム飽和溶液を用いた塩析法 (Sun & Hayakawa 2001) によって鶏卵白から結晶化し、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で平衡化した陰イオン交換樹脂 (カルボキシメチルセルロース) に通すことで精製した。ゼラチン (GELA) は牛由来ゼラチン (森永製菓株式会社製) を使

用した。畜肉タンパク質アクトミオシン (AM) は藤田らの方法を用いて豚腿肉から精製した (藤田 *et al.* 2006)。

2-2. ゲルの作製

OVA ゲルは、OVA を 135 mg/ml、各架橋剤を 0.05、0.5、5.0 mM 含む溶液 (pH 8.0) を円柱状ケーシング (直径 8 mm) に入れ、90°C で 30 分間加熱することで作製した。GELA ゲルは、ゼラチンを 5.0% (w/v)、各架橋剤を 0.05、0.5、5.0 mM 含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を円柱状ケーシングに入れ、4°C で一晩静置することで作製した。AM ゲルは、AM を 40 mg/ml、各架橋剤を 0.05、0.5、1.0 mM、NaCl を 0.6 M 含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を円柱状ケーシングに入れ、75°C で 30 分間加熱することで作製した。

2-3. 物性評価

ゲルを高さ 6 mm (直径 8 mm) となるようにメスで切り出し、20 N のロードセルを接続したクリープメーター (RE2-3305C、株式会社 山電、東京) を用いた破断強度試験及びクリープ試験に供した。破断強度測定には直径 3 mm の円柱状プランジャーを使用し、速度 1 mm/秒で歪率 95% まで圧縮した。応力-歪率曲線のピークを破断点とし、破断点における応力を破断応力 (Pa)、歪率を破断歪率 (%) とした。クリープ試験には直径 40 mm の円柱状プランジャーを使用し、圧縮歪率 30% 程度となるように荷重を加え、1 分間保持し、その後、除重し合計 2 分間の歪率を測定した。得られた曲線からクリープ粘弾性解析ソフト (株式会社 山電) を用いて弾性率 (E_0) 及び粘性率 (η_N) を算出した。

2-4. タンパク質の化学分析

架橋剤の添加によるタンパク質の化学的変化を調べた。タンパク質と架橋剤の濃度をそれぞれのゲルの 1/10 にした混合液をゲルの作製法に従って加熱又は冷却した。4 倍量の体積のタンパク質溶解液 (8 M 尿素, 1.25% (w/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)、0.6 M NaCl を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.0)) を加えたサンプルを SDS-PAGE、アミノ基及び SH 基定量分析に供した。SDS-PAGE には 5 ~ 20% グラジエントゲルを使用し、 β -メルカプトエタノールで還元したサンプルを泳動した。アミノ基定量には *o*-フタルアルデヒド、SH 基定量には

*現 新潟大学 農学部

5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を使用し、それぞれグリシン及びL-システインで作成した検量線から濃度を算出した。

2-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

AMゲルを2.5%グルタルアルデヒド及び1%オスミウムで固定し、エタノール上昇系列で脱水後、t-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した。乾燥したサンプルの微細構造をSEM (FE-SEM/EDX、株式会社 日立ハイテク、東京) を用いて観察した。

3. 結果・考察

3-1. 架橋剤添加ゲルの外観

食品としてプリン、グミ、ソーセージを想定し、それぞれの主要タンパク質 OVA、GELA、AM のゲル物性に及ぼす架橋剤の影響を調べた。Fig. 1 に架橋剤を添加したゲルの外観を示す。Ole はゲルを僅かに褐変させたが、他の2つの架橋剤よりも色への影響が少なかった。Geni 添加ゲルは青色に呈色した。これは、Geni とタンパク質の一级アミノ基が反応し青色色素が生成したためと考えられる (Cho *et al.* 2006)。ゲル化に加熱を伴う OVA ゲル及び AM ゲルでは、濃い青色を示したことから、加熱によって Geni とアミノ基の反応が促進したことが考えられる。Glu 添加ゲルは黄色に呈色した。これは Glu とタンパク質のアミノ基との間のシッフ塩基の形成が関与していると考えられる (Hopwood 1967)。



Fig. 1 架橋剤添加ゲルの外観

(A)に OVA ゲル、(B)に GELA ゲル、(C)に AM ゲルの外観を示す。

3-2. 架橋剤添加によるゲルの機械強度の変化

架橋剤が OVA ゲルの破断強度及び粘弾性に及ぼす影響を Fig. 2 に示した。Fig. 2A に 5 mM の架橋剤を添加した OVA ゲルの応力-歪率曲線を示した。5 mM Geni-OVA ゲルと 5 mM Glu-OVA ゲルは Ct-OVA ゲルと同様の傾きを示した。一方で、5 mM Ole-OVA ゲルは他

のゲルと比べて高い傾きを示したことから、弾力が強いことが示唆された。破断応力及び破断歪率は、全ての 5 mM 架橋剤添加ゲルで Ct-OVA ゲルよりも高く、破断応力の増加率は Ole、Geni、Glu の順番で高かった (Fig. 2B, C)。クリープ測定による粘弾性解析の結果、弾性率 E_0 は 5 mM Ole-OVA ゲルで高くなり (Fig. 2D)、応力-歪率曲線の傾きが高かった結果と一致している。粘性率 η_N は Ole と Geni 添加ゲルで高くなった (Fig. 2E)。以上の結果から、Ole は加熱誘導 OVA ゲルの破断強度及び粘弾性を向上し、その効果は Geni 及び Glu よりも強いことが示された。

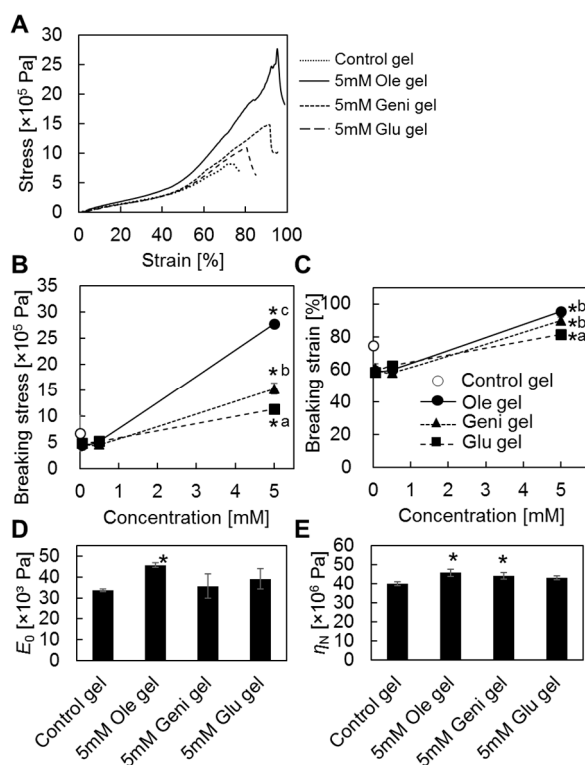


Fig. 2 架橋剤が OVA ゲルの破断強度及び粘弾性に及ぼす影響

(A)に応力-歪率曲線、(B)に破断応力、(C)に破断歪率、(D)に弾性率 E_0 、(E)に粘性率 η_N を示す。[*] は Control gel との有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey test, $n=4$)。 (B)及び(C)中の異なるアルファベットは、5 mM 架橋剤添加ゲル間の有意差を示す (Tukey test, $n=4$)。

架橋剤と反応させた OVA の分子量を SDS-PAGE で解析した (Fig. 3A)。架橋剤を添加していない OVA 溶液では、46 kDa が主要なバンド、120 kDa 付近に薄いバンドが検出された。これらはそれぞれ単量体と 2 ~ 3 量体の OVA であると考えられる。0.5 mM Ole 添加サンプルでは、新たに 190 kDa 付近に 3 つのバンドが検出された。分子量からこれらのバンドは 4 ~ 6 量体の OVA であることが考えられる。β-メルカプトエタノールで還元処理

しているため、OVA の多量体は OVA 分子間の SS 結合以外の結合で共有結合している。よって、Ole は非 SS 型の共有結合を介して OVA 分子間を架橋していることが示された。0.5 mM Ole 添加サンプルの OVA の架橋体のバンドは、Geni 及び Glu 添加サンプルのものより濃かった。このことから、Ole は他の架橋剤よりも OVA を架橋する作用が強いことが示された。

Geni 及び Glu はタンパク質の求核性アミノ酸側鎖を介して架橋を挿入することが知られている。そこで、架橋剤と反応させた OVA のアミノ基および SH 基を定量した。アミノ基は架橋剤添加によって減少し、架橋剤無添加の OVA 溶液と比べ、0.5 mM Ole 添加では 48% 減少、0.5 mM Geni 添加では 48% 減少、0.5 mM Glu 添加では 31% 減少した (Fig. 3B)。SH 基も同様に架橋剤の添加によって減少し、0.5 mM Ole 添加で最も低くなった (Fig. 3C)。以上の結果から、Ole、Geni 及び Glu は OVA のアミノ基及び SH 基と非 SS 型の共有結合を形成することで、OVA を架橋していることが示唆された。本実験で使用した架橋剤の中で、Ole は最も OVA のアミノ基及び SH 基との反応性が高く、OVA を架橋する作用が強いことが示された。Ole は架橋作用が強いいため、OVA ゲルの機械強度の向上作用が強いことが考えられる。

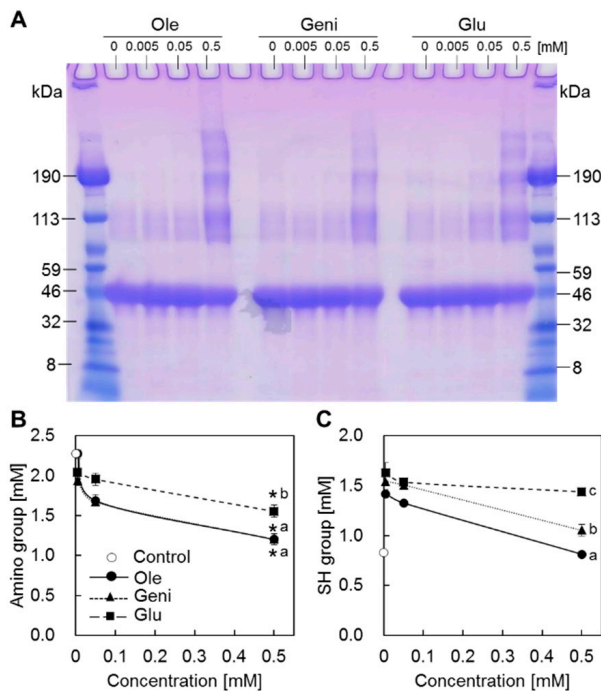


Fig. 3 架橋剤による OVA の分子量、アミノ基量、SH 基量の変化

(A)に SDS-PAGE のバンドパターン、(B)にアミノ基量、(C)に SH 基量を示す。OVA の濃度は 1.35% (w/v)、架橋剤は 0.05 ~ 0.5 mM 添加した。[*] は Control との有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey test, $n = 3$)。 (B) 及び (C) 中の異なるアルファベットは、0.5 mM 架橋剤添加サンプル間の有意差を示す (Tukey test, $n = 3$)。

架橋剤を添加した GELA ゲルの破断強度及び粘弾性を Fig. 4 に示した。架橋剤を添加した GELA ゲルの応力-歪率曲線の傾きは、Ct-GELA ゲルよりも高かった。架橋剤添加ゲルの中でも 5 mM Geni-GELA ゲルは最も高い傾きを示し、弾力が強いことを示している (Fig. 4A)。大変形領域を比較すると、5 mM Geni-GELA ゲルは歪率 60% 付近において破断した一方で、5 mM Ole-及び 5 mM Glu-GELA ゲルは歪率 90% 付近で破断し、伸びの良いゲルであった。破断応力は 5 mM Geni-GELA ゲルでは Ct-GELA ゲルと差がなかった一方で、5 mM Ole-GELA ゲル及び 5 mM Glu-GELA ゲルではそれぞれ 6.6 倍、6.9 倍であった (Fig. 4B)。破断歪率も同様に、Ole 及び Glu 添加ゲルにおいて高くなった (Fig. 4C)。弾性率 E_0 は 5 mM Geni-GELA ゲルにおいてのみ増加した (Fig. 4D)。よって、Geni は GELA ゲルの弾性率を増加させるが、破断強度を強化しない。一方で、Ole 及び Glu は弾性率には影響しないが、破断強度を増加させた。このように、Geni は GELA ゲルの物性に対し、Ole 及び Glu とは異なる影響を与えることが示された。Ole 及び Glu は GELA ゲルの物性に対し同様の作用をもつことが破断強度及び粘弾性の結果から示された。

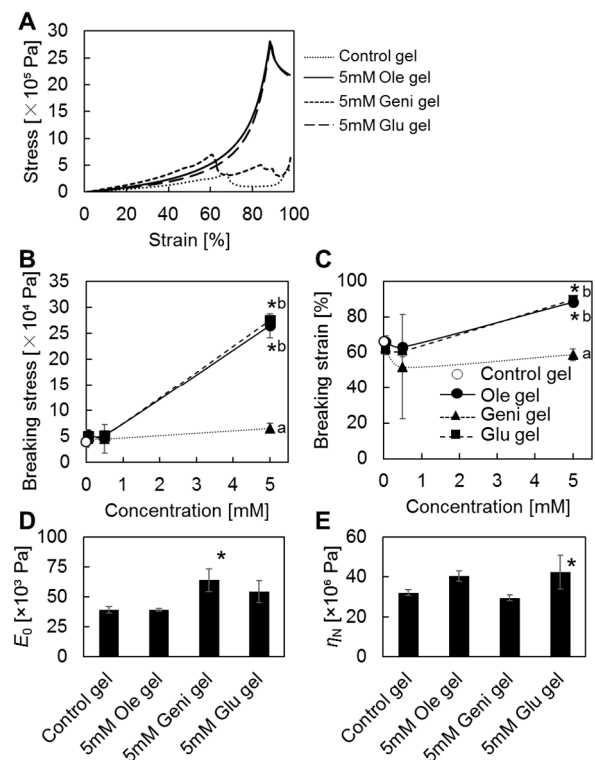


Fig. 4 架橋剤が GELA ゲルの破断強度及び粘弾性に及ぼす影響

(A)に応力-歪率曲線、(B)に破断応力、(C)に破断歪率、(D)に弾性率 E_0 、(E)に粘性率 η_N を示す。[*] は Control gel との有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey test, $n = 4$)。 (B) 及び (C) 中の異なるアルファベットは、5 mM 架橋剤添加ゲル間の有意差を示す (Tukey test, $n = 4$)。

GELA の SDS-PAGE の結果、190 kDa 付近にコラーゲン β 鎖が、113 kDa 付近にコラーゲン α 鎖のバンドが検出された (Fig. 5A)。0.5 mM Ole 及び 0.5 mM Glu 添加サンプルでは、 α 鎖のバンドが薄くなったことから、 α 鎖が架橋されていることが示された。一方で、Geni はバンドの濃さに影響しなかった。よって、Ole 及び Glu は Geni よりも、GELA 分子鎖の架橋活性が強いことが示された。GELA のアミノ基の定量より、Ole 及び Glu は Geni よりもアミノ基との反応性が高いことが示された (Fig. 5B)。以上の結果から、Ole 及び Glu は GELA のアミノ基との反応性が高く、破断強度の増強作用も強いことが示された。

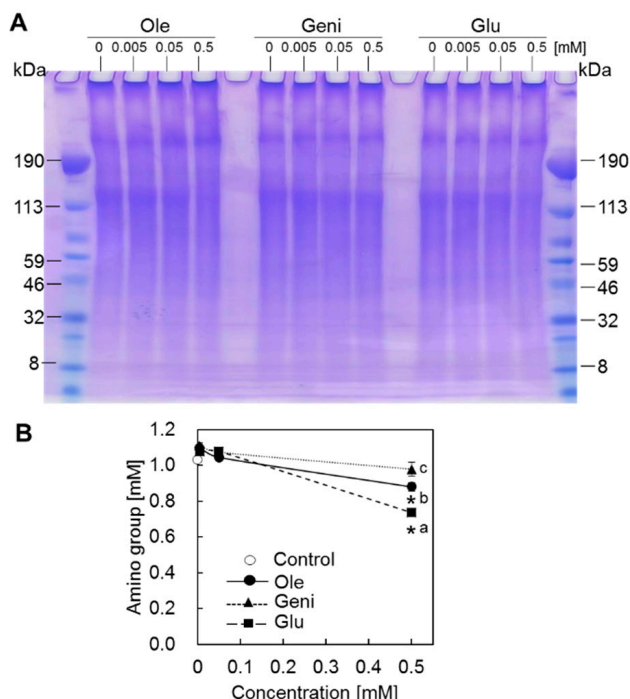


Fig. 5 架橋剤による GELA の分子量及びアミノ基量の変化

(A) に SDS-PAGE のバンドパターン、(B) にアミノ基量を示す。GELA の濃度は 0.5% (w/v)、架橋剤は 0.05 ~ 0.5 mM 添加した。[*] は Control との有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey test, $n=3$)。 (B) 中の異なるアルファベットは、0.5 mM 架橋剤添加サンプル間の有意差を示す (Tukey test, $n=3$)。

AM ゲルの破断強度及び粘弾性を Fig. 6 に示した。1 mM Ole-AM ゲルの応力-歪率曲線は、他のゲルよりも高い傾きを示した (Fig. 6A)。破断応力は、Ole 添加ゲルのみで増加し、1 mM Ole の添加で 5.2 倍増加した。破断歪率に差はなかった。粘弾性は 5 mM Ole 添加のみで変化し、弾性率 E_0 は増加傾向、粘性率 η_N は 1.5 倍増加した。よって、AM ゲルの破断強度及び粘弾性は Ole のみで増加することが示された。

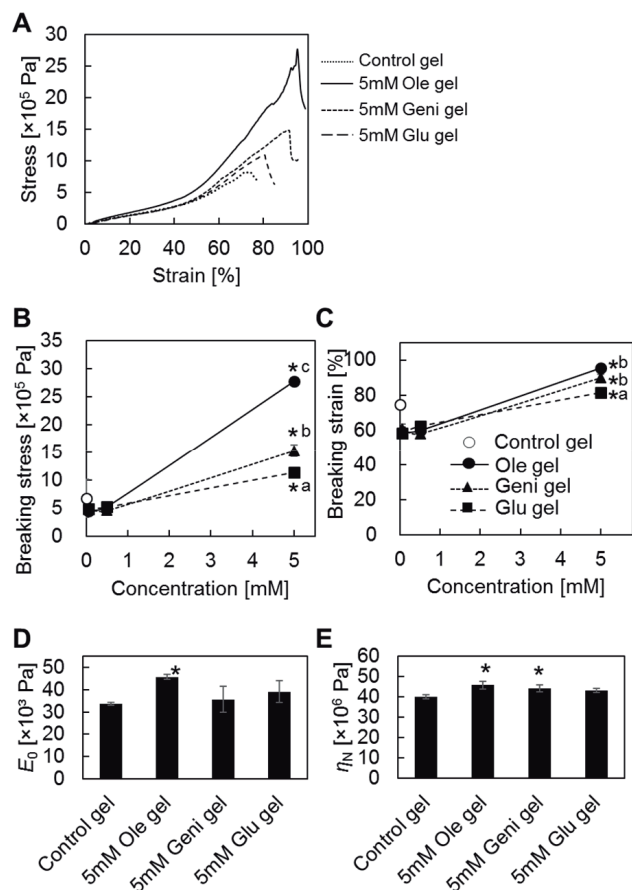


Fig. 6 架橋剤が AM ゲルの強度及び粘弾性に及ぼす影響

(A) に応力-歪率曲線、(B) に破断応力、(C) に破断歪率、(D) に弾性率 E_0 、(E) に粘性率 η_N を示す。(A) 中の矢印は 5 mM Ole-AM ゲルの破断点を示す。[*] は Control ゲルとの有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey test, $n=4$)。 (B) 中の異なるアルファベットは、1 mM 添加架橋剤ゲル間の有意差を示す (Tukey test, $n=4$)。

AM の SDS-PAGE の結果、190 kDa 付近にミオシン重鎖、46 kDa にアクチンのバンドが検出された (Fig. 7A)。Ole と反応させた AM では、0.05 mM 以上の Ole の添加でミオシン重鎖のバンドが消失し、架橋されたタンパク質のバンドが SDS-PAGE ゲルの上端に検出された。よって、Ole は AM のミオシン重鎖と反応し、架橋することが示された。Geni では 0.1 mM 添加時にミオシン重鎖のバンドが薄くなったが、消失はしなかった。また、Glu では 0.1 mM の添加時にミオシン重鎖のバンドが消失した。よって、Ole は他の架橋剤よりも薄い濃度でミオシン重鎖を架橋したことから、Ole が最も AM を架橋する活性が強いことが示された。AM のアミノ基は全ての架橋剤で同程度減少した (Fig. 7B)。SH 基は Ole 添加で最も減少した (Fig. 7C)。以上のことから、Ole は他の架橋剤よりも AM の SH 基との反応性が高いため、AM の架橋活性が強く、ゲルの物性の改変効果が強いことが示された。

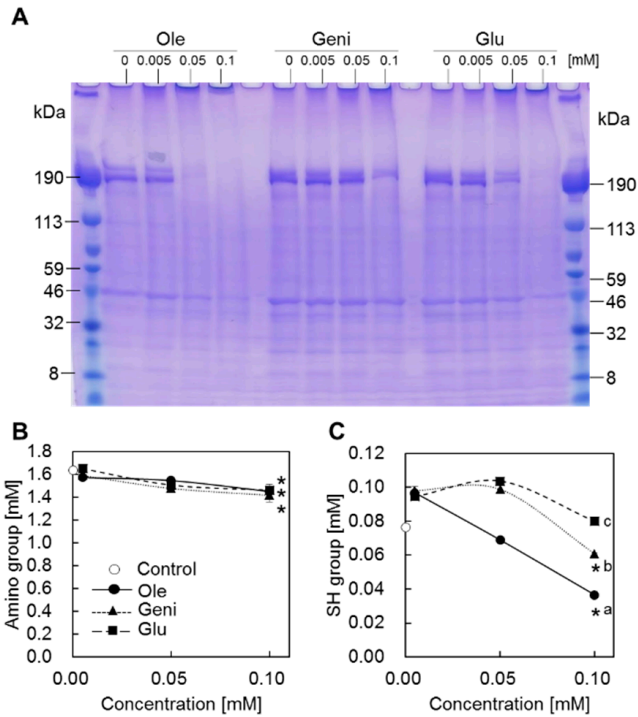


Fig. 7 架橋剤によるAMの分子量、アミノ基量、SH基量の変化

(A)にSDS-PAGEのバンドパターン、(B)にアミノ基量、(C)にSH基量を示す。AMの濃度は4 mg/ml、架橋剤は0.05 ~ 0.1 mM添加した。[*]はControlとの有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey test, $n = 3$)。 (C)中の異なるアルファベットは、0.5 mM架橋剤添加サンプル間の有意差を示す (Tukey test, $n = 3$)。

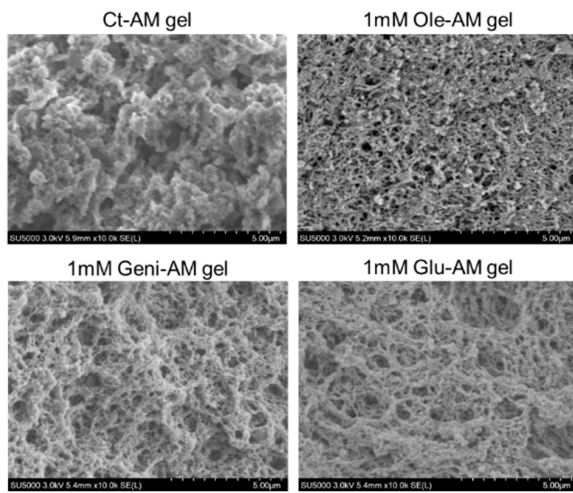


Fig. 8 架橋剤がAMゲルの微細構造に及ぼす影響

タンパク質ゲルの物性に直接的に関係するタンパク質ネットワークをSEMで観察した。**Fig. 8**にAMゲルのSEM画像を示した。1 mM Ole-AMゲルは、Ct-AMゲル、1 mM Geni-AMゲル及び1 mM Glu-AMゲルと比べて緻密な構造をしていた。トランスグルタミナーゼによって

ミオシンゲルに非SS型の共有結合を挿入することで、緻密な構造に改変されることが報告されており (Juanjuan *et al.* 2022)、本研究においても同様に Ole による非SS型の共有結合の形成によって緻密な構造に変化したことが考えられる。

Oleの構造内にはGlu様部位が含まれており、OleはGluと同様に2つのホルミル基がタンパク質の架橋に関与していることが考えられる。そのためOleのタンパク質架橋活性はGluと同程度と予測していたが、加熱によってゲル化するOVAとAMでは、Oleの方がGluよりも架橋活性が強かった。Gluは加熱条件下でタンパク質の架橋作用が弱まることが報告されている (Matei *et al.* 2020)。そのため、OVAゲル及びAMゲルの作製時の加熱によってGluのタンパク質架橋活性が弱まったことが推察された。Gluと比べ、Oleのタンパク質架橋活性及び物性改変効果は熱に影響されにくいことから、加熱操作を伴う加工に適していると言える。

4. 結論

OleはOVAゲル、GELAゲル、AMゲルの破断応力を向上した。Oleの効果が最も強く現れたのはAMゲルで、1 mM Oleの添加で5.2倍増加した (**Fig. 9**)。OVAゲルとGELAゲルでは5 mM Ole添加時に高くなり、それぞれ4.1倍、6.7倍増加した。これらのことから、Oleは球状タンパク質ゲル (OVAゲル) よりも繊維状タンパク質ゲル (AMゲル, GELAゲル) の強度の増強作用が強いことが示された。また、繊維状タンパク質ゲル間では、冷却ゲルであるGELAゲルよりも、加熱ゲルであるAMゲルへの効果が強かった。

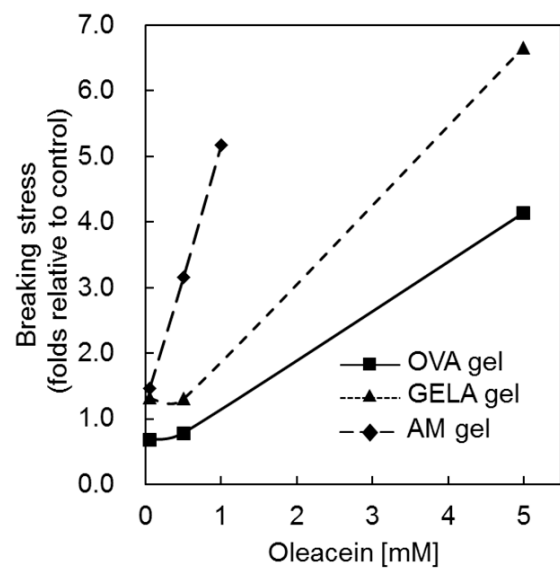


Fig. 9 Ole添加ゲルの破断強度の比較

Ole は既存の架橋剤である Geni 及び Glu よりも破断強度の向上作用が強かった。また、Ole は加熱ゲル及び冷却ゲル共に破断強度を向上したことから、Ole の物性改変効果は温度に影響されにくいことが示された。Ole はオリーブオイルにも含まれており、抗がん作用 (Polini *et al.* 2018) や抗炎症作用 (Costa *et al.* 2022) などの健康機能性に関する多数の報告があることを踏まえ、食品グレードの接着剤として有用であると言える。

5. 今後の課題

Ole はアミノ基及び SH 基を介してタンパク質と共有結合することが明らかとなった。Ole がもつ2つのホルミル基がタンパク質との共有結合の形成に関与していることが推測されるが明確ではない。酸化された PP は、そのカテコール構造が酸化されて生じたキノンのカルボニル基を介してタンパク質のアミノ基と共有結合することが知られている。ゲル作製中に Ole のカテコール構造がキノン体に変化するのかを解析することは、Ole による架橋のメカニズムを明らかにするために重要である。また、Ole による架橋がどのようにしてタンパク質ゲルネットワークを緻密な構造へと変化させたのかを明らかにすることは重要な課題であり、タンパク質の架橋状態とゲルの微細構造の関係性を明らかにすることで、新たな食感制御法の確立に繋がると考えられる。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびにご関係の皆さまに厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- Akazawa, Takashi *et al.*, 2021, Impact of an Olive Leaf Polyphenol 3, 4-DHPEA-EDA on Physical Properties of Food Protein Gels. *J. Agric. Food Chem.*, **69**(47), p. 14250-14258. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c04661.
- Cho, Y. J. *et al.*, 2006, One-step enzymatic synthesis of blue pigments from geniposide for fabric dyeing. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **11**, p. 230-234. DOI: 10.1007/BF02932035.
- Costa, Vânia *et al.*, 2022, Anti-Inflammatory Activity of Olive Oil Polyphenols—The Role of Oleacein and Its Metabolites. *Biomedicines*, **10**(11), 2990. DOI: 10.3390/biomedicines10112990.
- 藤田 利宗 *et al.*, 2006, レトルト加熱によるアクトミオシンの物性変化に関する研究. *日本食品科学工学会誌*, **53**(8), p. 423-429. DOI: 10.3136/nskkk.53.423.
- Hopwood, D., 1967, Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on various enzymes and glycogen, with a note on penetration of glutaraldehyde into liver. *J. Anat.*, **101**, p. 83-92. PMID: PMC1270860.
- Juanjuan, Du *et al.*, 2022, Insight into the mechanism of myosin-fibrin gelation induced by non-disulfide covalent cross-linking. *Food Res. Int.*, **156**, 111168. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111168.
- Kaewdang, Onouma; Benjakul, Soottawat., 2015, Effect of ethanolic extract of coconut husk on gel properties of gelatin from swim bladder of yellowfin tuna. *LWT*, **62**(2), p. 955-961. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.02.006.
- Matei, Alina *et al.*, 2020, Stability of Glutaraldehyde in Biocide Compositions. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(9), 3372. DOI: 10.3390/ijms21093372.
- Paiva-Martins, Fátima; Gordon, Michael H., 2001, Isolation and characterization of the antioxidant component 3, 4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **49**(9), p. 4214-4219. DOI: 10.1021/jf010373z.
- Polini, Beatrice *et al.*, 2018, Oleocanthal and oleacein contribute to the in vitro therapeutic potential of extra virgin oil-derived extracts in non-melanoma skin cancer. *Toxicol. In Vitro*, **52**, p. 243-250. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.06.021.
- Sun, Yuanxia; Hayakawa, Shigeru, 2001, Thermally induced aggregates in mixtures of α -lactalbumin with ovalbumins from different avian species. *J. Agric. Food Chem.*, **49**(5), p. 2511-2517. DOI: 10.1021/jf001086i.