九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Studies on enzymatic deamidation of milk proteins

三輪, 典子

https://hdl.handle.net/2324/1398419

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏　　名　：　三輪（横山）典子

論文題名　：　Studies on enzymatic deamidation of milk proteins
（乳タンパク質の脱アミド化に関する研究）

区　　分　：　甲

論　文　内　容　の　要　旨

食品分野におけるタンパク質研究への期待として、酵素を利用した新しい加工技術の開発やタンパク質食品の高付加価値化等が挙げられる。脱アミド化処理は、タンパク質分子の負電荷の増大をもたらし食品物性向上に寄与することが報告されているが、酵素的脱アミド化に関する研究例は少ない。本研究では、タンパク質脱アミド酵素（プロテイングルタミナーゼ、PG）による脱アミド化が、乳タンパク質の物性、機能に及ぼす影響について検討した。

まず、脱脂粉乳の物理化学的及び機能特性に及ぼす PG による脱アミド化の効果について検討した。PG 処理の度合いに応じて、脱脂粉乳溶液のカゼインミセル溶解度、相対粘度は増加し、濁度は減少した。カゼインミセルのサイズは、脱アミド処理の度合いが増すにしたがって減少した。粒度分布の分析と透過型電子顕微鏡観察により、より小さいサブミセル粒子の生成が高度に脱アミド処理した脱脂粉乳で確認された。これは、PG による脱アミド化によって脱脂粉乳溶液中のタンパク質（主にカゼイン）のカルボキシル基が増加してミセル間の静電反発力が強まり、その結果、ミセル会合性を低下したためと推察された。脱アミド化処理は脱脂粉乳の機能特性にも影響を及ぼした。例えば、PG 処理した脱脂粉乳を大豆油と混合して調製した水中油型乳化物は、より小さな液滴径を有する傾向を示した。脱アミド化によるカゼインのサブミセル化に伴い、油滴粒子に吸着するカゼイン量が増加するためと考察された。

次に、PG 処理が、ホエータンパク質分離物（WPI）の加熱による構造変化や、WPI の重要な機能特性のひとつ、加熱ゲル化にどのような影響を及ぼすかも調べた。蛍光プローブを用いたタンパク質の疎水性評価の結果、PG 処理 WPI では、後の加熱処理に伴う疎水性の増加が顕著に抑制されることがわかった。また、WPI の分子量分布の測定結果から、PG 処理 WPI は加熱処理後でも重合化しにくいことが判明した。以上の結果は、脱アミド化に伴うカルボキシル基の増加が WPI 分子の加熱変性・凝集を抑制したためと考えられた。実際に、PG 処理 WPI では、加熱後の S-S 結合の形成が減少していることを明らかにした。塩存在下における加熱 WPI ゲルの特性は、PG 処理により大きく影響を受けた。ゲル強度は脱アミド化により低下し、逆に保水力は増加することがわかった。これは、脱アミド化によるカルボキシル基の増加がゲルの親水性を高めたこと、分子間の静電的反発の強まりにより加熱しても疎水的凝集が起こりにくいことに起因すると推察された。

さらに、代表的な乳製品のひとつであるヨーグルトへの PG 処理の効果について調べた。具体的には、静置型ヨーグルトの物性やゲルの微細構造特性に対する PG 処理の影響を脂肪含量の異なる原料乳を用いて検討した。テクスチャー解析から、PG 処理は無脂肪及び低脂肪ヨーグルトの硬さを減少させた。その一方、ヨーグルトの付着性は脂肪含有量に関わらず PG 処理により増加した。PG 処理度の増加に伴い、無脂肪及び低脂肪ヨーグルトの表面離水は減少し、滑らかで光沢のある外観へと変化した。ゲルの微細構造を共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、脂肪含量の増加に伴い、間隙の大きいゲル構造がその間隙に脂肪球が埋めこまれたより緻密な構造に変化する様子が観察された。さらに PG 処理により、脂肪含量に関わらずゲルの微細構造がより緻密さを増す傾向が確認された。そのため、PG 処理低脂肪ヨーグルトは、未処理の全脂肪ヨーグルトの微細構造に近づくことが観察画像から判明した。

一方、PG の酵素自身の機能、特に基質特異性について詳細に検討した。α-ラクトアルブミン（α-LA）を用いて、アンモニウムイオン（NH_4^+）存在下での PG の新しい反応機構を提示した。 本来 PG はタンパク質結合グルタミン残基の脱アミド化反応を触媒する酵素であるが、本研究では PG により窒素安定同位体で標識された NH_4^+が基質に取り込まれることを NMR により明らかにした。この現象を活用して PG の α-LA のグルタミン残基に対する反応性を検討した。同時に、NH_4^+非存在下での PG 反応性をペプチドマップ法により分析したところ、反応グルタミン残基数は NH_4^+存在下で NMR により検出されたときよりも多かったことから、NH_4^+が PG 反応の阻害剤として働いていることが示唆された。

本研究により、酵素的脱アミド化が乳タンパク質の物理化学的特性、種々の機能特性に著しい変化をもたらすことが初めて明らかとなった。本研究では、食品業界で頻繁に使用される脱脂粉乳や WPI を用いていることから実用的にも有用な知見と言える。さらに、PG の反応機構及び基質特異性に関する新しい知見がもたらされた。今後の脱アミド化酵素の研究及び開発に大いに役立つことが期待される。