

熱分析と近赤外分光法による食品蛋白質の水和と ガラス転移に対する塩の影響の解析

中川 洋

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構物質科学研究センター

概要

1. 研究目的

蛋白質中の水の動的挙動に対して塩がどのように作用するのかを明らかにするため、食品の保存性の指標となっている水分活性と水の動的挙動の関係や、それらが塩添加により制御される仕組みを熱分析と近赤外分光によって調べ、塩による食品保存の分子メカニズムを解明することを目的とした。

2. 研究方法

水溶性の球状蛋白質(ニワトリ卵白リゾチーム)を用いて、熱分析、近赤外分光によって研究を行った。

3. 研究結果

水溶性蛋白質の水分量変化に対する水和構造の変化や分子運動性の変化は、これまで中性子散乱や分子動力学計算などで確認されていて、その変化には水分量の閾値が存在することも知られていたが、本研究では、このような水分量に対する変化や、それに対する塩の影響を、熱分析や近赤外分光法で十分な精度で捉えることはできなかった。若干の変化をデータに確認することもできるため、今後も引き続き検討が必要である。

4. 考察

熱分析と近赤外分光について、共に試料のセッティングや測定条件を検討したが、現在のところ期待していたような結果は得られていない。測定のパックグラウンドの取り方や、解析方法など、今後検討する必要がある。

5. 今後の課題

前回の助成で使用した中性子散乱実験は分子ダイナミクスを捉える優れた手法ではあるが、中性子源は研究用原子炉や加速器といった大型研究施設が必要となり、通常、実験申請をして採択されなければ利用することはできない。そのため、同様の議論ができるのであれば、熱分析や近赤外分光のような一般的な実験室規模の計測技術で測定できると便利であり、相補的な情報にもなるため中性子実験の予備実験としての位置付けとしても重要であると考えた。しかしながら、現在のところ、これら手法では大きな変化はまだ捉えられていない状況である。詳細に見れば水分量や塩の量で若干の変化も確認はできるため、今後も測定条件や解析方法などの工夫を検討して研究を継続したいと考えている。

6. 文献等

[1] Nakagawa H. *et al.* (2004) *J.Phys.Soc.J.*73.2.491-495.

1. 研究目的

水は食品の保存において微生物の増殖による腐敗を引き起こすが、伝統的な塩漬け保存では、水分が多くても腐敗しない。これは塩添加により、微生物の増殖に必要な

「自由水」の割合が減少するからだと考えられている。また一般的に、水分量の低下に伴う「ガラス化」で、食品の安定性が向上すると考えられている。しかし、自由水の減少とガラス化との関係性、およびそれに対する塩添加の効

果は不明な点が多い。

これまでに、蛋白質周りの自由水が形成する水素結合ネットワークは塩添加により破壊され、その結果として水分活性値が低下することを示している。本研究では、この結果を手掛かりに、熱分析(熱重量示差熱分析装置(TG-DTA)と示差走査熱量計(DSC))と近赤外分光法(NIR)により、塩添加に伴う水和蛋白質の物理化学的な状態変化を解明することを目的とした。これまでに明らかにした食品中の水のマイクロ構造に着目することで、塩による食品安定性の分子メカニズムを解明することを目的とした。

2. 研究方法

本研究では、食品蛋白質のモデルであるニワトリ卵白リゾチーム(Lys)を用いて研究を行った。熱分析測定(TG-DTA および DSC)と赤外分光測定(FT-IR)などは助成研究者が既に保有している装置を利用した。FT-IR の試料環境として、粉末測定に適した拡散反射測定装置を本助成金によって購入した。

2.1 試料調製方法

中性子散乱実験および水分活性測定に用いた蛋白質は、凍結乾燥後に適当な水蒸気圧にさらすことで蛋白質の水和量を制御したものを準備した。また NaCl を添加した蛋白質は、水溶液状態の蛋白質に NaCl を混ぜた後に凍結乾燥処理を行うことによって得た。Fig. 1 は、水和蛋白質の作成作業の模式図と、25°Cにおける様々な塩溶液の相対湿度である。水和蛋白質は密閉容器の中に、塩溶液と凍結乾燥後の粉末蛋白質を入れて静置することで作

成した。水蒸気圧に応じて蛋白質の水和量を制御することができる^[1,2]。

2.2 熱分析(熱重量示差熱分析測定(TG-DTA)・示差走査熱量計測定(DSC))

TG-DTA 測定は、リガク製・差動型示差熱天秤(TG8120)を用いて実験を行った。昇温速度 10°C/min で測定し、測定試料はそれぞれ約 5 mg を用いた。リファレンスには同量のアルミナを用いた。

DSC 測定は、リガク製・高感度示差走査熱量計(DSC8231)を用いて実験を行った。昇温速度 10°C/min で測定し、測定試料はそれぞれ約 5 mg を用いた。試料はアルミニウムパンに詰め、試料とセルとの接触を良くするためにセルクリンパによってシールした。リファレンスには同量のアルミを用いた。

2.3 近赤外分光測定(NIR)

日本分光製・フーリエ変換赤外分光光度計(FT/IR-6600ARV)を用いて実験を行った。試料環境に拡散反射装置(DR-81)を用いた。本研究では、全反射吸収法の測定も検討したが、十分な吸収強度を得ることができず、本研究で用いる試料に対しては拡散反射法が適していると考えられる。

2.4 水分活性測定

一般的に食品に含まれる水は、その存在状態によって結合水と自由水の2つに分類される。結合水は食品と水素結合により結びつき、分子運動が束縛されている。一方、自由水は蛋白質表面である程度自由に動くことができる水と考えられており、食品の腐敗などで増殖する微生物はこの自由水を使っていると考えられている。水分活性

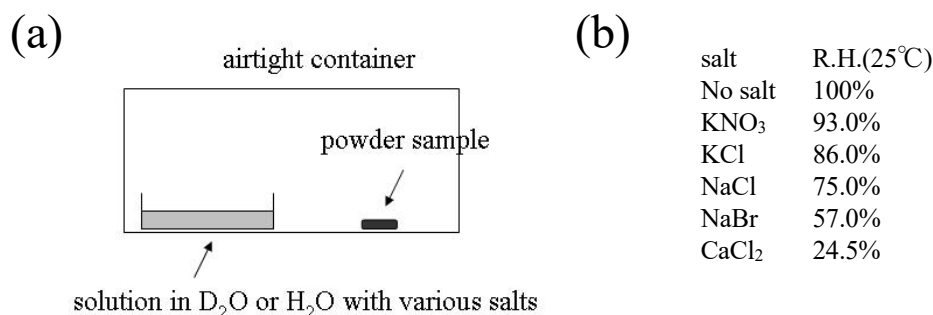


Fig.1. Preparation of hydrated protein; (a) schematic figure in procedure, (b) relative humidities (R.H.) of various salt solutions [6]

は、食品中における微生物の育成に影響を及ぼす要因として、1950年代に食品学分野に導入された^[3]。水分活性 (A_w) は、食品を入れた密閉容器の水蒸気圧 (P) とその温度における純水の蒸気圧 (P_0) の比として、次の第1式のように定義される。

$$A_w = \frac{P}{P_0} \quad \text{第1式}$$

この水分活性値は、食品中の自由水の割合を示すと考えられており、食品中の微生物の生育に大きな影響を及ぼすため、食品の腐敗のし易さの指標として用いられる。例えば、同じ水分量の食品でも、水分活性値が大きければ微生物が増殖しやすい環境といえる。本研究では、水分活性測定には、水分活性装置 LabSwift-aw (DKSH ジャパン製) を用いた。測定は 25°C の温度で行った。

3. 研究結果

3.1 試料の水分収着挙動の解析

まず、Lys に含まれる塩の量を段階的に変えながら、水分収着挙動を調べた。Fig. 2 は水分収着等温線である。水分活性が 0.8 あたりまでは塩の量にあまり依存しない。約 0.8 を超えると、急激に水分量が増加することが分かった。また、塩の量が多いほど、この水分の増加量は多い。これを見やすくするために塩の濃度に対して水分量をプロットしたのが Fig. 3 である。これを見ると水分活性が 0.8 以下では、塩の量に対して水分量の変化がほとんどないのに対して、水分活性が 0.8 以上では、塩の量が増加するほど水分量が多くなること分かる。

Fig. 4 のように、水分活性が 0.8 以下では水和水は蛋白質表面で小さなクラスター状態にあるが、0.8 を超えると水

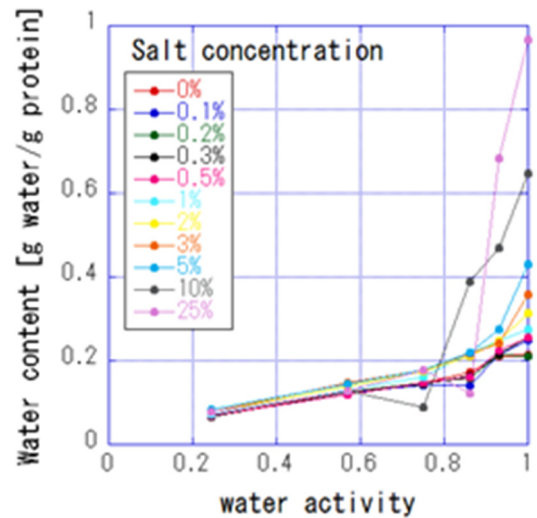


Fig.2. Water adsorption isotherm of lysozyme with different NaCl concentration at room temperature

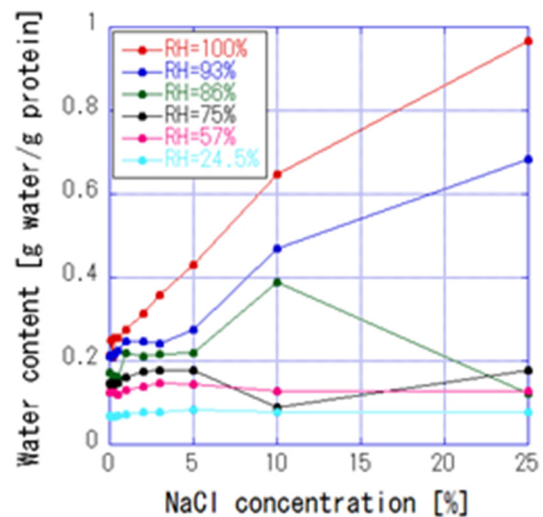


Fig.3. Hydration water contents as a function of NaCl concentration

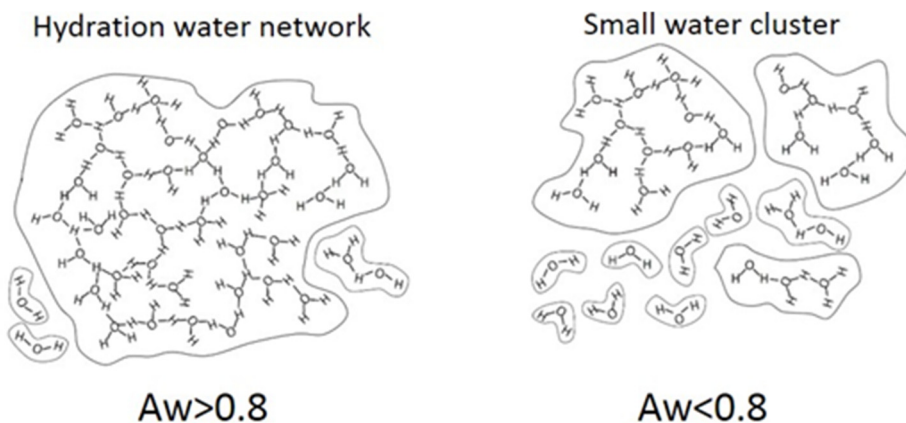


Fig.4. Hydration water structure on protein surface

和水ネットワークになり蛋白質表面全体を覆うようになると考えられる。また、小さなクラスター状態では水和水は蛋白質に強く吸着しているが、ネットワークを形成することで水和水の分子運動性は増すと考えられる^[1]。塩の量の増加に対する水分量の変化は、このような水和構造や水和水の分子運動性と関連性があるかもしれないが、これはさらに詳細な解析が必要と思われる。

3. 2 熱分析

・熱重量示差熱分析測定(TG-DTA)

Fig. 5 は水和リゾチームの典型的な TG-DTA データである。TG-DTA から、温度変化に伴う TG により重量変化、DTA により熱の出入りが分かる。昇温に伴い TG は減少し、この減少量は脱水によるものと考えられる。また、DTA の負のピークはそれに伴う吸熱を示していると考えられる。

Fig. 6 と **7** は、水分活性や塩の量に対する DTA ピーク温度のデータである。これを見ると DTA ピーク温度、すなわち脱水温度は水分活性や塩の量による系統的な変化は確認できず、またほとんど温度に違いはないと考えられる。まだ多少データにばらつきもあるため、今後も再測定など含めて検討を継続する予定である。

・示差走査熱量計測定(DSC)

湿度 100% で水和させた Lys について、塩の量を変えて DSC 測定を行った (**Fig. 8**)。80-90°C 付近に見られる負のピークに着目し、ピーク位置の温度を塩の濃度に対してプロットしたのが **Fig. 9** である。塩の濃度が約 5% までは、塩の濃度に対してピーク温度は減少し、それ以上の塩の濃度ではあまり変化がないか、若干減少するという結果になった。塩の濃度が増加すると水分量も増加するため (**Fig. 3**)、これらの結果から塩や水分が DSC の挙動に与える結果を結論付けることは難しいが、約 5% の塩の濃度は、水和状態や蛋白質の熱物性に対してなんらかの定性的な変化の境目になっている可能性もある。今後は、この点に着目しながら検討を進めることを考えている。

3. 3 近赤外分光測定(NIR)

Fig. 10 は、拡散反射法による水分活性の異なる Lys の NIR スペクトルである。全反射吸収法での測定も行ったが、十分な吸収を観測することができず、本研究のような粉末状の試料の NIR 測定では拡散反射法が適していると考えられる。しかし、水分活性によってスペクトルピークのシフト

などはほとんど観測されなかった。また **Fig. 11** は塩の量を変えた時の NIR スペクトルであるが、微小なピークシフトな

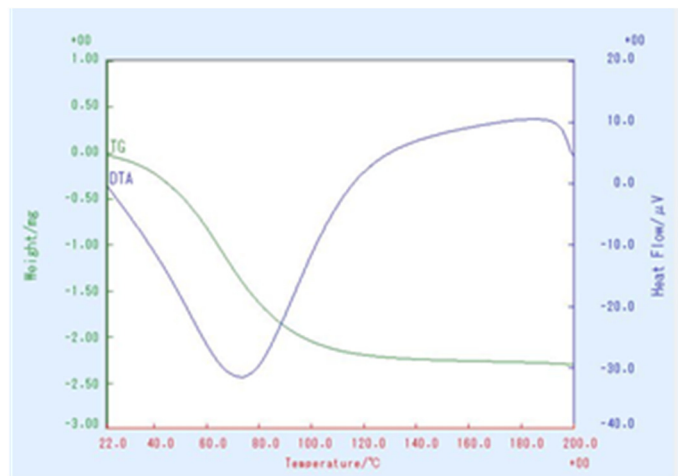


Fig. 5. TG-DTA data of hydrated lysozyme

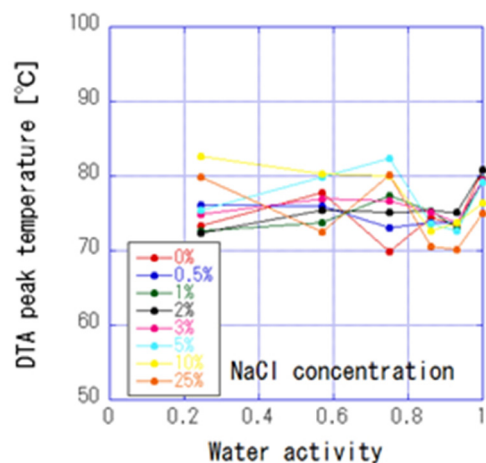


Fig.6. DTA peak temperature as a function of water activity

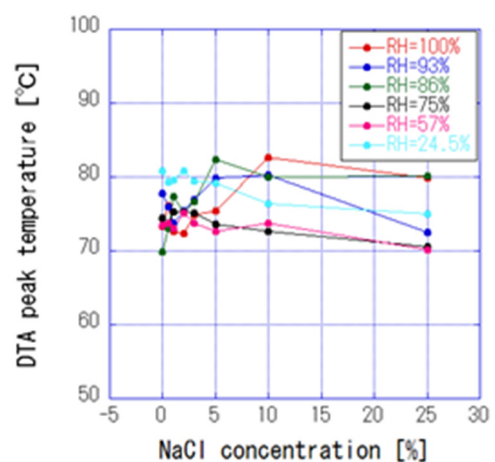


Fig.7. DTA peak temperature as a function of NaCl concentration

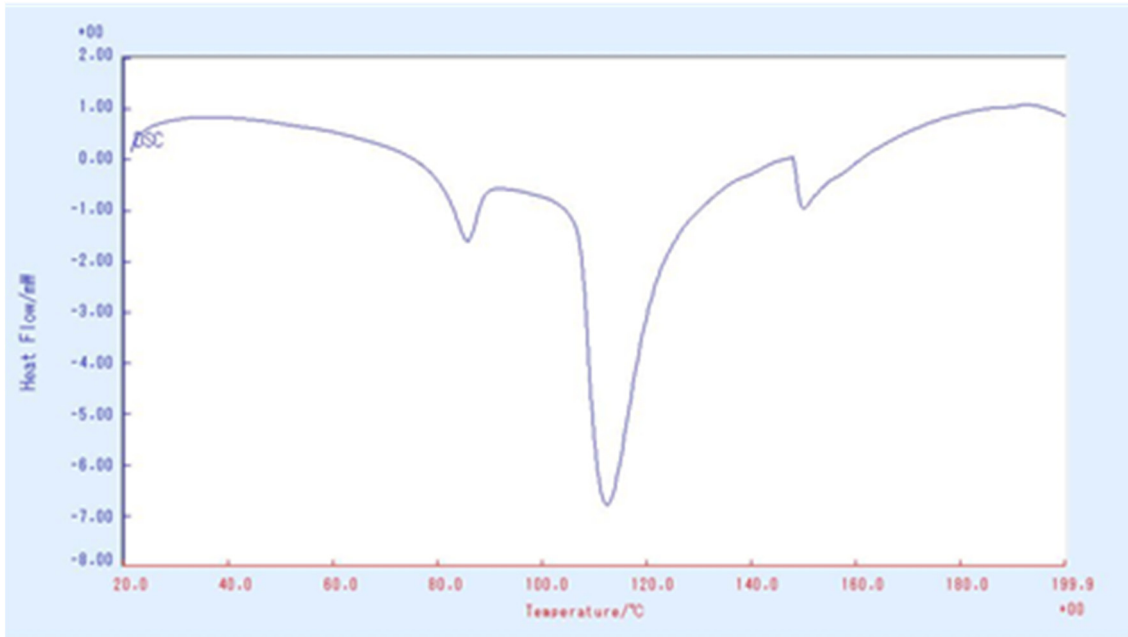


Fig. 8. TG-DTA data of hydrated lysozyme

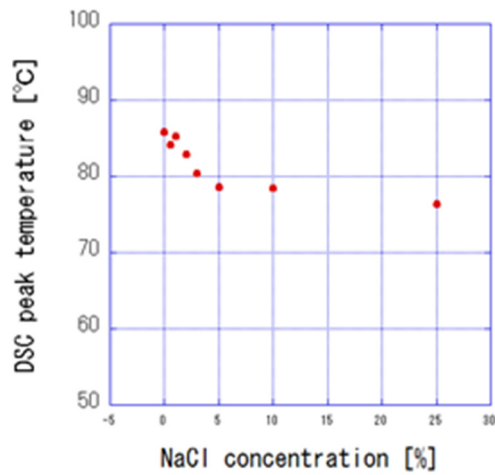


Fig. 9. DSC peak temperature as a function of NaCl concentration

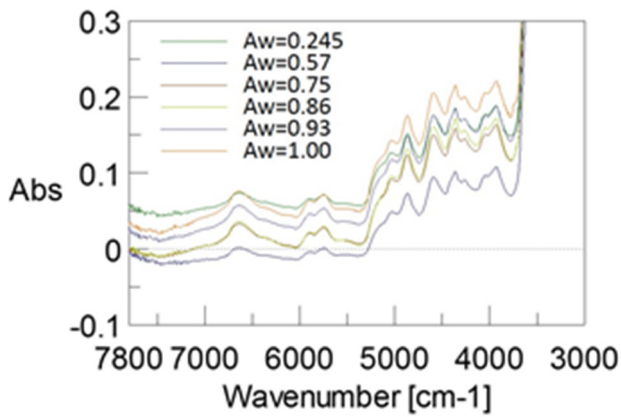


Fig.10. NIR spectra at different water activity of hydrated lysozyme

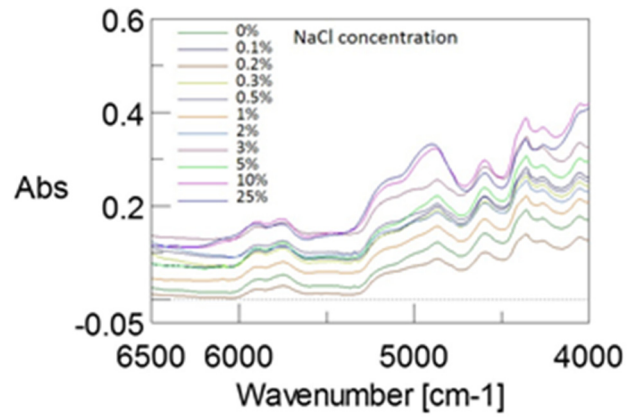


Fig.11. NIR spectra at different NaCl concentration

どが確認されるものの、ここでも塩の濃度に対して大きなスペクトルの変化は観測されなかった。これまでの研究で、水分活性の変化に対しては Fig. 4 のような水和構造の変化があると考えられるため、このような水和水ネットワークの違いを反映した NIR スペクトルの変化が観測されれば、水和水の分子運動性に関する情報が得られると期待したが、現在段階での測定、解析では大きな変化は確認できなかった。

4. 今後の課題

水溶性蛋白質の水分量変化に対する水和構造の変化や分子運動性の変化は、これまで中性子散乱や分子シミュレーションなどで確認されていた^[1,2,4]。またその変化には水分量の閾値が存在することも知られていた^[1,4]。本研究では、このような水分量に対する変化や、それに対する塩の影響を、熱分析や近赤外分光法で捉えることを試みた。中性子散乱実験は分子ダイナミクスを捉える優れた手法ではあるが、中性子源は研究用原子炉や加速器といった大型研究施設が必要となり、通常、実験申請をして採

択されなければ利用することはできない。そのため、同様の議論ができるのであれば、熱分析や近赤外分光のような一般的な実験室規模の計測技術で測定できると便利であり、相補的な情報にもなるため中性子実験の予備実験としての位置付けとしても重要であると考えた。しかしながら、現在のところ、これら手法では大きな変化はまだ捉えられていない状況である。詳細に見れば水分量や塩の量で若干の変化も確認はできるため、今後も測定条件や解析方法などの工夫を検討して研究を継続したいと考えている。将来的には、熱分析・近赤外分光法と中性子散乱とを相補的・相乗的に活用することで、水和水やガラス転移に着目した食品物性研究を展開していきたいと考えている。

5. 文献

- [1] Nakagawa H. *et al.* (2010) *J.Phys.Soc.Jpn.*79.083801.
- [2] Nakagawa H. *et al.* (2008) *Biophys. J.* 95. 2916-2913.
- [3] Scott.W.J. (1954) *Aus.J.Biol.Sci.*6. 549-564.
- [4] Roh J.H. *et al.* (2005) *Phy.Rev.Lett.*95.038101.

Effect of Salt on Hydration and Glass Transition of Food Protein Analyzed by Thermal Analysis and Near-Infrared Spectroscopy

Hiroshi Nakagawa

Japan Atomic Energy Agency, Materials Science Research Center

Summary

1. Purpose

In order to clarify how salt works on the dynamic behavior of water in the protein, the relationship between the water activity and the dynamic behavior of water was investigated by the addition by thermal analysis and near infrared spectroscopy. The aim of this work is to elucidate the molecular mechanism of food preservation by salt.

2. Methods

The thermal analysis and near infrared spectroscopy was used, chicken egg white lysozyme was used as protein sample.

3. Results

Changes in hydration structure and molecular mobility as a function of water content have been confirmed by neutron scattering, molecular dynamics calculation. In this study, we could not grasp such change with sufficient accuracy by thermal analysis and near infrared spectroscopy so far. The further study will be required in the future.

4. Discussions

Regarding thermal analysis and near infrared spectroscopy, both the sample setting and the measurement conditions were examined, but the results expected at present are not obtained. It is necessary to investigate in the future how to measure the background and how to analyze it.

5. Future subjects

Neutron scattering experiments used in the previous subsidy are excellent methods to capture molecular dynamics, but large neutron sources require large research facilities such as research nuclear reactors and accelerators. Therefore, it is convenient to study with general laboratory-scale measurement technology such as thermal analysis or near-infrared spectroscopy, and they can also give complementary information. However, at the present time, major changes are not yet grasped by these methods. In detail, we can confirm small changes in the data, so we plan to continue our research by considering the measurement conditions and analytical methods, and so on.

6. Reference

[1] Nakagawa H. *et al.* (2004) *J.Phys.Soc.J.*73.2.491-495.