

農学研究院若手支援事業成果報告書

平成20年12月19日

支援対象研究分野：食科学

研究課題名：マイクロ波触媒メイラード反応を用いたパパインの機能改変に関する研究

支援期間：平成19年10月～平成20年9月

所属部門・研究分野：生物機能科学部門・食品製造工学分野

研究代表者氏名：野間誠司

研究の背景と目的

メイラード反応とは、タンパク質やアミノ酸のアミノ基が還元糖のカルボニル基とシッフ塩基を形成した後、多段階を経てメラノイジンを形成する一連の反応を指す。本反応は食品の調理や加熱殺菌の過程でごく一般的に見られる反応であるため、安全性が高く、コスト、簡便性に優れている。現在までに、リジンの ϵ -アミノ基のような第1級アミンが高い反応性を示すこと、メイラード反応によってタンパク質中のアミノ酸に糖を付加させると、タンパク質の水溶性、乳化性、熱などに対する安定性等の向上や、抗体反応性の低下などの有用な効果が得られること等が報告されている。しかしこれらは総じて伝導伝熱加熱を用いた検討結果である。

近年食品分野において加熱対象分子を直接振動させて発熱させるという特性を有するマイクロ波加熱の利用が急速に拡大している。現在使用されている周波数(2.45 GHz)のマイクロ波は水に吸収され易い性質を有する。したがって、水存在下では水分子が優先的に振動して発熱するため、水を介して間接的に対象物を加熱することになり、マイクロ波と伝導伝熱加熱の加熱機構は類似のものとなると推察される。申請者はこれまでに、試料としてオボアルブミンを用い、無溶媒系においてマイクロ波処理を行ったところ、伝導伝熱加熱処理と異なる速度で、異なる部位に糖を付加することを示唆する結果を得ている。本知見を酵素等の機能性タンパク質の修飾に適用した場合、伝導伝熱加熱処理と比較して活性や性質が異なってくるなど、興味深い現象が得られる可能性がある。また、無溶媒下での加熱処理は、水溶液中での処理と比較してタンパク質の立体構造の変化を引き起こしにくいという利点もある。これは、立体構造の変化によって機能が低下するタンパク質の糖修飾に有用であることを示唆している。さらに、プロテアーゼなど水溶液中では自己分解が懸念されるタンパク質の修飾に有用であると考えられる。

パパイン (EC 3.4.22.2) は *Carica papaya* 由来のエンド型システインプロテアーゼであり、肉の軟化、製菓・製パン等に広く使用されている。パパインの活性部位は Asn、His、Cys から構成されており、リジン残基は関与していない。したがって、無溶媒下

でのメイラード反応は、パパインの活性を低下させずに糖修飾できる可能性がある。マイクロ波触媒メイラード反応を用いてパパインを糖修飾し、物理化学的諸性質の改変、とりわけ活性や機能の向上を図ることは新たな食品産業用酵素の製造を可能にする技術として期待できる。

本研究では、無溶媒条件下において、マイクロ波加熱がパパインに対する糖付加に及ぼす影響ならびに生成した糖付加パパインの機能を調べた。

研究成果の概要（活動内容、成果）

1. マイクロ波加熱（microwave heating, MH）および伝導伝熱加熱（conductive heating, CH）処理によるグルコース付加

<第1級アミンに対するグルコース付加速度>

パパインとグルコースを同時に 50 mM Tris/HCl 緩衝液（pH 8.0）に溶解後、凍結乾燥した。この粉体を 60°C、1、3、5 時間の MH（300W）および CH に供した。

メイラード反応においてリジンの ε-アミノ基が最も高い反応性を示すこと、*o*-phthalaldehyde（OPA）は第1級アミンと反応することが明らかとなっている。そこで OPA を用いて MH と CH がパパインの糖付加に及ぼす影響を調べた（図 1）。1 時間処理においては両加熱処理間に有意差は認められず、共に第1級アミンの約 11%がグルコース付加されていた。3 時間処理においては CH、MH でそれぞれ約 21、27%の付加率が認められ、MH が有意に高い付加率を示した。5 時間処理においては CH、MH でそれぞれ約 25、41%のグルコース付加が認められ、MH が有意に高い付加率を示した。これらの結果から MH は CH と比較して高い糖付加速度を示すことが明らかになった。また、CH においては、5 時間で糖付加率が平衡に達する傾向が認められた。

<パパイン-グルコース混合物の色>

メイラード反応の後期には褐色物質であるメラノイジンが生成される。したがって、両加熱処理に供したパパイン-グルコース混合物の色の変化はメイラード反応の進行程度のひとつの指標になる。そこで、両処理後の混合物について黄色の指標となる *b**値を測定した（表 1）。その結果、MH、CH 処理両方において処理時間の経過に伴って *b**値の増加が認められた。また、1 時間処理を含むいずれの処理時間においても MH は CH と比較して有意に *b**値を増加させた。しかし、グルコース付加率（図 1）で有意差が認められなかった MH の 3 時間と CH の 5 時間の間には有意差は認められなかった。したがって、MH は必ずしもメイラード反応の進行を促進するわけではないことが示唆

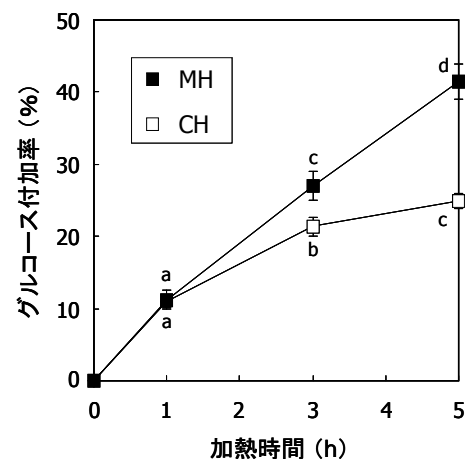


図1. 加熱時間が第1級アミンに対するグルコース付加率に及ぼす影響。異なる英文字は有意差 ($p < 0.05$)を示す。

された。

表1 パパイン-グルコース混合物の b* 値

Time (h)	MH	CH
0	11.2 ^a	
1	12.3 ^c	11.8 ^b
3	13.5 ^d	12.7 ^c
5	14.0 ^e	13.4 ^{de}

異なる英文字は有意差 ($p < 0.05$) を示す。

2. MH、CH によるグルコース付加がパパインの諸性質に及ぼす影響

<活性>

グルコースの付加がパパインの活性に及ぼす影響を調べるために、グルコースを付加していない(未修飾)パパイン、MH と CH で同程度グルコースが付加したパパイン(それぞれ 3、5 時間処理)、グルコース付加率が最も高いパパイン (MH 5 時間処理) の活性をカゼインを基質として測定した (図 2)。活性は未修飾パパインに対する相対活性で表した。MH、CH のいずれの場合でも未修飾パパインと比較して有意に活性が上昇した。この結果は、メイラード反応を用いたグルコースの付加はパパインの活性を低下させない修飾法であることを示している。しかし、加熱方法の違いおよび MH におけるグルコース付加率の違いは活性の変化に影響を及ぼさなかった。一方、至適 pH および至適温度に変化は認められなかったものの、アルカリ pH 域および高温域における活性に向上が認められた (図 3)。

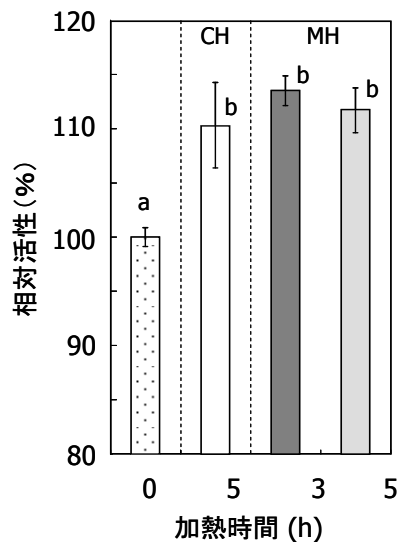


図2. 加熱時間がパパインの活性に及ぼす影響。異なる英文字は有意差 ($p < 0.05$) を示す。

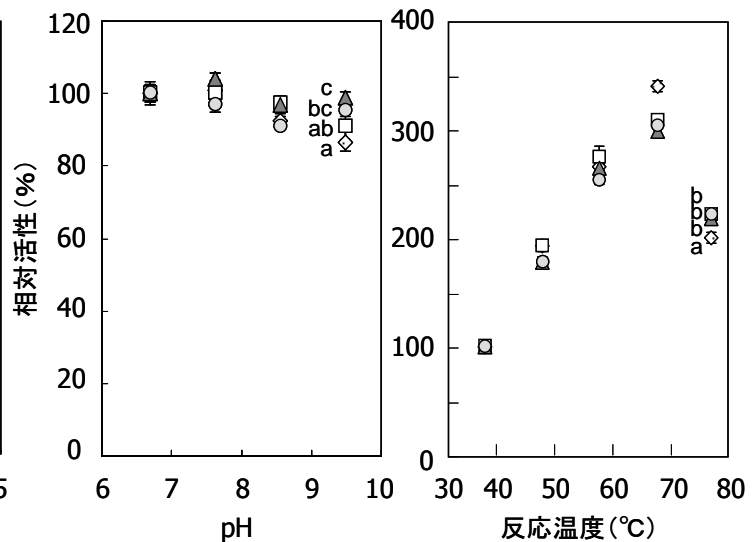


図3. MH、CH によってグルコース付加したパパイン反応に及ぼす pH および温度の影響。未修飾 (◇)、CH 5 時間 (□)、MH 3 時間 (△)、MH 5 時間 (○)。異なる英文字は有意差 ($p < 0.05$) を示す。

<安定性>

MH と CH で異なるリジン残基にグルコースが付加した場合、パパインの性質にも違いが出る可能性がある。そこで、活性測定に用いた各グルコース付加パパイソについて自己分解性、SDS および加熱に対する安定性を比較した (図 4)。

まず、グルコースを付加したパパイソを基質 (カゼイン) 未添加の緩衝液中で 18 時間インキュベートした後の活性を調べるにより自己分解性を評価した。その結果、MH、CH いずれの処理でグルコースを付加した場合でも残存活性が高い傾向が得られた。残存活性は MH 3 時間と CH 5 時間の間で同程度であったが、MH 5 時間において、MH 3 時間および CH 5 時間と比較して有意に高かった。

グルコースを付加したパパイソの SDS 存在下における活性を調べた。その結果 MH、CH いずれの処理でグルコースを付加した場合でも有意に高い活性を示した。しかし MH と CH の間には有意差は認められなかった。MH における処理時間も SDS に対する安定性の向上の程度に影響を及ぼさなかった。

グルコースを付加したパパイソを加熱処理後、活性を測定した。MH、CH いずれの処理でグルコースを付加した場合でも残存活性が向上する傾向が得られた。しかし MH と CH の間には有意差は認められなかった。MH 5 時間は CH 5 時間と比較して有意に高い残存活性を示した。

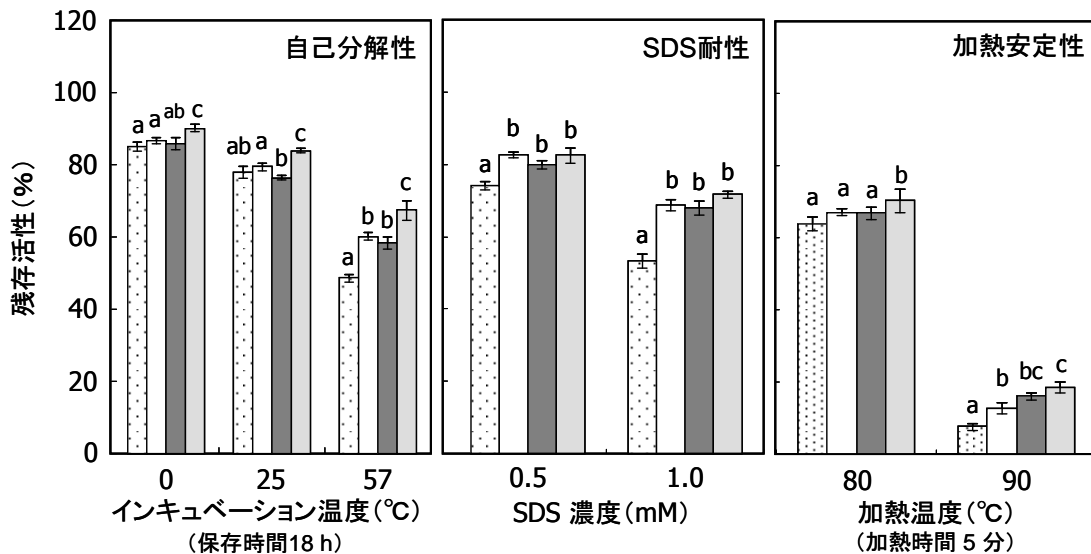


図4. MH、CH によるグルコース付加がパパイソの自己分解性、SDS 耐性、加熱安定性に及ぼす影響。結果は未処理の各未修飾・修飾パパイソの活性を100%として表した。未修飾 (点線)、CH 5 時間 (白)、MH 3 時間 (黒)、MH 5 時間 (灰)。異なる英文字は有意差 ($p < 0.05$) を示す。

まとめ

無溶媒条件下において、マイクロ波加熱 (MH) がパパイソに対するグルコース付加に及ぼす影響、および生成したグルコース付加パパイソの機能を、伝導伝熱加熱 (CH)

と比較した。MH は CH と比較して有意に高いグルコース付加速度を示し、MH は CH よりも効率よくパパインにグルコースを付加できることが明らかとなった。このときパパインの活性低下は認められなかった。MH と CH によって同程度グルコース付加した場合、MH による特徴的な機能変化は認められなかった。しかし、MH で得られた最も高いグルコース付加率のパパインで有用な機能向上が認められた。したがって、MH はパパインの機能向上に有効であると考えられた。