研究ノート

牛乳タンパク質の加熱変性に対する抗酸化成分の作用

新本洋士*, 門分彰子, 八代朋美, 長縄康範

玉川大学農学部

The Effect of Antioxidants on Milk Protein Glycation

Hiroshi Shinmoto*, Shoko Kadowake, Tomomi Yashiro and Yasunori Naganawa

Tamagawa University, School of Agriculture, Tamagawa-gakuen, Machida-shi, Tokyo 194-8610

In the previous paper, we found that milk heated at dry condition at 120°C had modified milk proteins having higher molecular weights as the results of glycation by SDS-PAGE analysis. In contrast, milk specimens heated at 140°C showed no visible protein bands suggesting formation of protein aggregations with larger molecular weights. While high concentrations of chlorogenic acid and epicatechin slightly suppressed glycation of milk proteins at 120°C, ascorbic acid enhanced glycation of milk proteins. (Received Sep. 11, 2014; Accepted Nov. 6, 2014)

Keywords : milk proteins, glycation, SDS-PAGE, antioxidants

キーワード : 牛乳タンパク質, メイラード反応, グリケーション, 抗酸化成分, 電気泳動

牛乳を高温で加熱すると乳タンパク質どうしが重合して高分子化するのに加え, 乳タンパク質と乳糖との間にメイラード反応を生じ, 乳タンパク質に糖付加 (グリケーション) を引き起こす^{1)~3)}. 筆者らは前報において, ステンレストレー上に風乾固着させた牛乳をモデル実験系とし, 120°Cで1時間加熱後, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分子量変化を解析した. その結果, カゼインおよび乳清タンパク質に糖が付加され, 分子量が増加すること, 主要な牛乳アレルギーである β -ラクトグロブリンは重合体を生じながらも抗原性を維持していることを見いだした⁴⁾. 風乾した牛乳を乾熱加熱するモデル系は, 牛乳を液体状態でオートクレーブするような加熱条件に比べてタンパク質どうしの重合が生じにくく, グリケーションの観察に適している.

牛乳の加熱時に乳タンパク質に結合する糖は牛乳中の乳糖と考えられた. 乳糖は還元末端を持ち, 加熱によりタンパク質のアミノ基とメイラード反応による結合を生じると考えられる¹⁾. しかし前報ではより高い温度における加熱による乳タンパク質の変性状態は明らかではなかった. また, このような加熱条件下での乳タンパク質のグリケーションを防ぐ方法についての検討は行われていない.

生体内でタンパク質のグリケーションによって生成したアマトリ化合物は, 酸化的な開裂反応等を経て糖化最終産物が生成すると考えられている^{1)~3)}. 抗酸化能とグリケーション抑制作用 (抗糖化能) は異なる性質であるが, 抗酸

化能を持つ化合物にはグリケーションを抑制する可能性が考えられる. そこで本研究では, より高温での加熱による牛乳タンパク質の分子量変化を検討するとともに, 抗酸化性を有するポリフェノール等の存在下で牛乳タンパク質のグリケーションが抑制されるか否かについて予備的な検討を行った.

1. 実験方法

(1) 材料および試薬

牛乳は市販の高温殺菌乳 (殺菌温度 130°C 2 秒, 無脂乳固形分 8.3% 以上, 乳脂肪 3.5% 以上) を購入し, マイクロチューブに分注し, 使用まで -25°C に冷凍保存した. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)⁵⁾ はアクリルアミドゲル濃度 10–20% のリニアグラジエントゲル (オリエンタルインスツルメンツ株式会社) を用いて行い, クイック CBB (和光純薬株式会社) によってタンパク質を検出した.

(2) ステンレストレー上での牛乳タンパク質の加熱試験

牛乳タンパク質の加熱試験には前報と同様に SUS430 ステンレス製⁶⁾ トレーを用いた. 市販牛乳 5 μ L をマイクロピペットでステンレストレー上に滴下し, 室温で 1–2 時間風乾後, 乾熱恒温機を用い, 120–150°C で 60 分間加熱した. 加熱後の固着試料に 2-メルカプトエタノールを含む SDS 試料処理液 (和光純薬株式会社) 50 μ L を加えて溶解し, マイクロ遠心チューブに回収した. これを沸騰水浴中で 5 分間加熱後, SDS-PAGE の試料とした.

(3) 抗酸化物質存在下での加熱試験

抗酸化化合物（クロロゲン酸、エピカテキン、アスコルビン酸）は超純水に 10 mg/mL になるように溶解した。冷水に難溶の化合物は 60℃ に加温して溶解した。牛乳 10 μ L に抗酸化化合物溶液を 5, 20, 30 μ L を加え、超純水で総容量を 40 μ L に調整して混和した（抗酸化化合物の終濃度：1.25, 5.0, 7.5 mg/mL）。混合後、不溶物が生じた場合は試験管ミキサーでよく混和して用いた。この混合溶液 10 μ L をステンレストレー上に滴下風乾し、120℃ で 1 時間加熱し、上記 (2) と同様の処理をして SDS-PAGE の試料とした。

2. 実験結果および考察

牛乳をステンレストレー上に風乾固着させた後、120～150℃ で乾熱加熱した試料を SDS-PAGE で分離した結果を図 1 に示す。未処理試料では 30 kDa 前後にカゼインの複数の染色バンド、16～17 kDa 付近に β -ラクトグロブリンのバンド、14 kDa 付近に α -ラクトアルブミンのバンドが見られた。これに対して 120℃ 加熱では前報と同様に、グリケーションによってカゼインのバンドが高分子側にシフトするとともに、 β -ラクトグロブリンは 18-20 kDa 付近にブロードなバンドとして検出された。 α -ラクトアルブミンは 16 kDa 付近に薄いバンドとして見られた。130℃ 加熱ではタンパク質バンドの位置は 120℃ と同様であったが、全体に薄い染色像であった。さらに 100 kDa 以上の高分子側にスミアな染色像が 120℃ より濃くみられ、タンパク質全体が重合して高分子化したと推測された。より高温の 140℃ および 150℃ 加熱では、高分子の重合物と考えられる染色像もなく、SDS-PAGE によって検出できるタンパク質は見られなかった。

牛乳の 120～130℃ における加熱時の牛乳タンパク質の高分子化は、乳糖と牛乳タンパク質のメイラード反応によるグリケーションによると考えられる。140℃ 以上での加熱では、SDS-PAGE ゲル内に CBB 染色で検出できるタンパク質は存在しなかった。アクリルアミドゲル上部の試料溝に若干のタンパク質が染色されたことから、高温長時間加熱により牛乳タンパク質の重合が進み、SDS 試料処理液とともに加熱しても、タンパク質がアクリルアミドゲル中に入れない大きさになってしまったのかもしれない。

Schamberger らは⁷⁾ 牛乳の加熱による褐変をエピカテキンとエピガロカテキンガラート添加が抑制することを報告している。また Yin ら⁸⁾ は、リジン/グルコース加熱時の中間体生成のエピカテキンおよびエピガロカテキンガラートによる阻害を報告している。しかし牛乳タンパク質のグリケーションによる高分子化抑制作用については明らかではなかった。そこで本研究では抗酸化能を持つ 3 種類の化合物が 120℃ 加熱時の牛乳タンパク質のグリケーションを防ぐか否かについて検討した。

野菜類やコーヒーに含まれるクロロゲン酸⁹⁾、茶のカテキン成分のひとつであるエピカテキン¹⁰⁾、およびアスコルビ

図 1 乾熱加熱した牛乳タンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

牛乳 5 μ L をマイクロピペットでステンレストレー上に滴下風乾し、120～150℃ で 60 分間加熱した。加熱後の試料に 2-メルカプトエタノールを含む SDS 試料処理液 50 μ L を加えて溶解し、マイクロ遠心チューブに回収し試料とした。図中の (－) は加熱処理していない牛乳を示す。 β -Lg は β ラクトグロブリン、 α -La は α ラクトアルブミンを示す。

ン酸を試料として用いた。Schamberger ら⁷⁾ の牛乳褐変抑制試験時のエピカテキン添加濃度は 0.29 mg/mL であるが、本研究ではこの濃度ではグリケーションを抑制できなかったため、より高濃度の試料を添加した。なお、最大濃度において、クロロゲン酸添加では混合試料の PH は 4.18、エピカテキンでは 6.30、アスコルビン酸では 3.98 であり、クロロゲン酸およびアスコルビン酸添加ではカゼインが沈殿したため、よく混和した後、乾熱加熱試験を行った。

図 2A はクロロゲン酸とともに 120℃ で加熱した牛乳のカゼイン付近のタンパク質染色像である。加熱によるグリケーションによって分子量が増加したタンパク質バンドは、クロロゲン酸濃度が増すにつれ右肩下がりになり、分子量が減少した。図 2B はエピカテキンとともに加熱した牛乳の結果である。クロロゲン酸同様に、エピカテキン濃度が増すにつれ、分子量が減少した。これらの結果から、クロロゲン酸やエピカテキンには牛乳タンパク質の高温での加熱によるグリケーションを抑制する作用があると考えられる。しかしながら、添加したクロロゲン酸、エピカテキンの濃度は終濃度 5.0～7.5 mg/mL（それぞれ 21 mmol/L および 26 mmol/L）と高濃度であり、牛乳タンパク質のグリケーションを防ぐ目的であっても、このような高濃度のポリフェノール類の添加は実用的ではないと考えられる。より効率よく牛乳タンパク質のグリケーションを防ぐ食品

図 2 抗酸化成分とともに乾熱加熱した牛乳タンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

牛乳と 3 種類の抗酸化化合物（終濃度：1.25, 5.0, 7.5 mg/mL）を混合後、混合溶液 10 μ L をステンレストレー上に滴下風乾し、120℃で 1 時間加熱後、SDS-PAGE の試料とした。染色像は 20-40 kDa のカゼインの分子量範囲のみを示した。図中の（-）は加熱処理していない牛乳を示す。

成分の探索が期待される。

図 2C にアスコルビン酸とともに加熱した牛乳の結果を示す。添加濃度とともに、カゼインのバンドは右肩上がりになり、クロロゲン酸等のポリフェノール類とは逆に、アスコルビン酸はタンパク質の高分子化を促進した。アスコルビン酸の分解生成物である 2,3-ジケトグルコン酸、あるいはトレオースは、タンパク質とアミノカルボニル反応生成物を生じることが知られており¹¹⁾、図 2C に示した結果は、牛乳タンパク質と乳糖との反応に加え、アスコルビン酸によるさらなるタンパク質のグリケーションが生じた結果と推測される。

Kim らは ABTS ラジカルアニオンおよびの DPPH ラジカルに対する還元力を指標として種々の化合物の重量あたりの抗酸化能を検討した¹²⁾。2 種のラジカルに対する抗酸化能をアスコルビン酸を 1.0 として概算すると、クロロゲン酸は 0.6 および 0.5、エピカテキンは 2.9 および 1.3 であり、エピカテキン>アスコルビン酸>クロロゲン酸の順であった。しかしながら本研究では、これらの化合物の抗酸化能と牛乳タンパク質の加熱によるグリケーションの抑制作用との関係は明らかにできなかった。

3. 要 約

ステンレストレー上に風乾した牛乳を加熱することによって乳糖と乳タンパク質のメイラード反応による乳タンパク質のグリケーションが生じる。風乾した牛乳を 140℃以上で 1 時間加熱すると SDS-PAGE によって検出されるタンパク質は消失した。120℃加熱による牛乳タンパク質のグリケーションは高濃度のクロロゲン酸およびエピカテキンで抑制することができたが、アスコルビン酸は逆にグリケーションを促進した。

文 献

- 1) Oliver, C.M., Insight into the glycation of milk proteins : An ESI- and MALDI-MS perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **51**, 410-431 (2011).
- 2) ter Haar, R., Schols, H.A. and Gruppen, H., Effect of saccharide structure and size on the degree of substitution and product dispersity of β -lactalbumin glycosylated via the maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 9378-9385 (2011).
- 3) Morgan, F., Vénien, A., Bouhallab, S., Mollé, D., Léonil, J., Peltre, G. and Levieux, D., Modification of bovine beta-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution : immunochemical characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4543-4548, (1999).
- 4) 新本洋士, 市川由佳里, 永田紗織, 三浦愛美, 長縄康範, 石川祐子, 牛乳アレルギータンパク質のステンレストレー上での加熱反応生成物, 日本食品科学工学会誌, **60**, 233-236 (2013).
- 5) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 6) 本間俊文, 食品関連産業と特殊鋼 II 食品関連産業に用いられる特殊鋼材料 3 洋食器, 器物類 新潟県燕地区におけるステンレス鋼, 特殊鋼, **51**, 23-25 (2002).
- 7) Schamberger, G.P. and Labuza, T.P., Effect of green tea flavonoids on maillard browning in UHT milk. *LWT-Food Science and Technology*, **40**, 1410-1417 (2007).
- 8) Yin, J., Hedegaard, R.V., Skibsted, L.H. and Andersen, M.L., Epicatechin and epigallocatechin gallate inhibit formation of intermediary radicals during heating of lysine and glucose. *Food Chemistry*, **146**, 48-55 (2014).
- 9) Yen, W.J., Wang, B.S., Chang, L.W. and Duh, P.D., Anti-oxidant properties of roasted coffee residues. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2658-2663 (2005).
- 10) Dou, Q.P., Landis-Piwowar, K.R., Chen, D., Huo, C., Wan, S.B. and Chan, T.H., Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology*, **16**, 208-212 (2008).
- 11) Nemet, I. and Monnier, V.M., Vitamin C degradation products and pathways in the human lens. *J. Biol. Chem.*, **286**, 37128-37136 (2011).
- 12) Kim, D.-O., Lee, K.W., Lee, H.J. and Lee, C.Y., Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3713-3717 (2002).

(平成 26 年 9 月 11 日受付, 平成 26 年 11 月 6 日受理)