

(別紙様式博第 3 号)

## 論文要旨 (和文)

十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

学位申請者：20DA501 鈴木歩美

### 各種家禽オボトランスフェリンの加熱安定性に関する比較研究

鶏卵は、加熱凝固性、泡立ち性、乳化性など、優れた機能・特性を有しており、食生活・食品産業上きわめて重要な食材である。これらの機能・特性には卵タンパク質が大きく関与しており、用途に合わせ様々な形で利用されている。オボトランスフェリン (OTrf) はニワトリ (chicken : Chi) 卵白タンパク質の約 12% を占める主要タンパク質の一つであり、加熱安定性が主要卵白タンパク質中最も低いことが知られている。そのため、Chi OTrf の加熱変性を考慮して液卵の殺菌温度が決定される場合が多く、従来 Chi OTrf の加熱安定性には大きな関心が払われてきた。一方、食糧生産、食品開発の発展には、生物多様性の有効利用、未利用遺伝資源の有効利用も重要である。鶏卵の有用性は言うまでもないが、その他の家禽卵にも、鶏卵に匹敵あるいは凌駕する機能・特性が潜在する可能性があり、その有効利用が期待される。しかし、Chi 以外の家禽卵の諸特性に関する研究は極めて限定的である。とくに、OTrf が殺菌や加熱調理・加工において加熱温度条件を左右すると推察されることから、他の家禽卵の利用にあたっては、OTrf の加熱安定性に関する知見は必須である。従って本研究では、Chi 以外の 5 種類の家禽、アヒル (duck : Duk), ホロホロチョウ (guinea fowl : Gui), 日本ウズラ (Japanese quail : Jpq), ダチョウ (ostrich : Ost), シチメンチョウ (turkey : Tky) OTrf の加熱安定性に関して、Chi OTrf の従来知見を検証しつつ家禽間の比較研究を行い、各家禽に適した加熱加工条件の決定に資する知見を得ることを目的とした。

第 1 章では、OTrf について、データベース情報から得られる分子的特徴をまとめるとともに、家禽間で比較した。その結果、各種家禽 OTrf は同じトランスフェリンファミリーとして、およそその骨格は同様であった。しかし、アミノ酸配列の差から、分子内イオン結合、水素結合、疎水結合などの諸結合には若干の差異が生じており、二次構造における差異も推測された。これらの異同と差異は、変性という構造変化や凝集・不溶化という分子間相互作用を比較研究する上で重要な基本情報となった。また、本研究では高純度の OTrf をグラム単位で消費するため、OTrf の高純度・大量調製法を各種家禽卵に最適化させ必要な各種家禽 OTrf を十分量得た。

第 2 章では、各種家禽 OTrf の加熱安定性を、加熱変性温度及び加熱凝集性から比較解析した。また、加熱凝集に伴う OTrf の分子間相互作用についても解析した。その結果、示差走査熱量分析 (differential scanning calorimetry : DSC) による pH 4, 7 及び 9 における加熱変性温度は、Chi OTrf とその他の家禽 OTrf に大きな差はなく、その差は 3°C 前後であ

った。示差走査蛍光分析 (differential scanning fluorimetry : DSF) でも同様な結果が得られた。次いで、各種家禽 OTrf の加熱凝集性を、加熱温度及び加熱時間を変えて比較試験した。その結果、酸性、中性及びアルカリ性の各種 pH での各種家禽 OTrf の加熱凝集に至る、加熱温度と加熱時間の組み合わせ条件が詳細にわかり、家禽間における加熱凝集性の差異が明らかになった。これらの各種家禽 OTrf の加熱凝集における分子間相互作用の性質を SDS-PAGE 分析及び SH 基の定量により解析した。その結果、pH 2 では、全家禽 OTrf は、低分子化により加熱凝集しなかった可能性が示唆された。pH 4 では、加熱凝集した家禽 OTrf の加熱凝集物の還元下 SDS-PAGE 分析で、モノマーのみが検出されたことから、凝集物形成には分子間 S-S 結合は関与せず疎水結合の寄与が大きいものと推察された。pH 7~9 における家禽 OTrf 凝集物の場合、還元下 SDS-PAGE 分析で初めてモノマーとして検出されたことからポリマー形成には、疎水結合に加えて分子間 S-S 結合が関与することが明らかになった。高温・長時間加熱でも凝集に至らなかった、pH 4 での Ost OTrf では、pH 4 での Ost OTrf では、他の家禽よりも高い等電点による強い静電的反発が可溶性の主因と推察され、pH 8 における Ost、pH 9 の Duk、Jpq 及び Tky OTrf では、疎水結合に加えて分子間 S-S 結合が関与するポリマーが溶液中でも生じていることが明らかになった。加熱処理溶液中の SH 基量の追跡では、SDS-PAGE 分析で明らかにされた分子間 S-S 結合の形成を支持する結果が得られた。以上、各種家禽 OTrf の加熱安定性を、加熱変性温度及び加熱凝集性から比較解析した結果、DSC 分析による pH 4、7 及び 9 における加熱変性温度は、Chi OTrf とその他の家禽 OTrf に大きな差はなく、その差は 3°C 前後であった。DSF 分析でも同様な結果が得られ、DSF 法が OTrf の加熱変性のモニターに利用可能であることが明らかになった。このような OTrf の加熱変性温度における家禽間の類似性から、鶏卵に用いられる加熱殺菌処理方法が、他の家禽卵にも適用できる可能性が示唆された。さらに、酸性、中性及びアルカリ性の各種 pH において、各種家禽 OTrf の加熱凝集条件：加熱温度と加熱時間の組み合わせの詳細がわかり、加熱変性温度の類似性とは対照的に、OTrf の加熱凝集性における家禽間の差異が明らかになった。このことは、目的に応じて、それぞれの家禽に適した加熱加工処理条件の設定が必要なことを示唆していた。

第 3 章では、各種家禽 OTrf の加熱安定性に及ぼす各種共存金属イオンの影響について比較した。また、加熱に伴う OTrf の分子間相互作用についても解析した。DSF 分析により各種家禽 OTrf の  $T_{mDSF}$  に及ぼす共存  $Fe^{3+}$  イオンの影響を比較した結果、すべての家禽で  $T_{mDSF}$  上昇効果は 20°C 以上となり家禽間で顕著な差は認められなかった。この温度上昇は、Chi で報告されている二原子の Fe が OTrf に結合した効果と同様であったことから、他の家禽 OTrf でも、二原子の Fe が結合したものと推察された。また、DSF 分析と同様の実験条件で DSC 分析した結果、ほぼ同様の値が得られ、 $Fe^{3+}$  イオン共存下でも DSF 分析の妥当性が確認された。これを受け、 $Fe^{3+}$  イオンに加え  $Mn^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、及び  $Zn^{2+}$  イオン共存下でも DSF 分析を行い、加熱変性温度上昇効果を明らかにした。Chi を含むすべての家禽 OTrf で、 $Mn^{2+}$  イオン共存下では 14°C 以上、 $Al^{3+}$  イオン共存下では 10°C

程度、 $\text{Co}^{2+}$ 及び $\text{Zn}^{2+}$ イオン共存下では3~5°C程度上昇した。一方、その他の金属イオンでは家禽種によっては加熱変性温度の上昇は認められなかった。次いで、共存 $\text{Fe}^{3+}$ イオン及び $\text{Al}^{3+}$ イオンがOTrfの加熱凝集(95°C)に及ぼす影響について比較した。pH 8またはpH 9における $\text{Fe}^{3+}$ イオン共存OTrfでは、どの家禽でも $\text{Fe}^{3+}$ イオンフリーOTrfより凝集・不溶化が進みにくく、加熱凝集抑制効果が認められた。とくにpH 9のGui及びTky OTrfは $\text{Fe}^{3+}$ イオンフリーのときと比べて、約70%溶解性が向上しており顕著な加熱凝集抑制効果を示した。pH 9における $\text{Al}^{3+}$ イオン共存下では、とくにGui及びTky OTrfが $\text{Al}^{3+}$ イオンフリーのときに比べて若干加熱凝集抑制効果が認められた。なお、各種家禽OTrfの加熱凝集物及び加熱可溶性溶液中のOTrfポリマーの形成には、ともに疎水結合に加えて分子間S-S結合が関与していることがわかった。以上、 $\text{Fe}^{3+}$ イオンはじめ各種金属イオン共存下における各種家禽OTrfの加熱変性温度と加熱変性温度上昇効果を明らかにし、効果の高い金属イオン添加による効率的な殺菌処理が可能であることが示された。加熱変性温度上昇効果の高い $\text{Fe}^{3+}$ 及び $\text{Al}^{3+}$ イオン共存下、各種加熱条件下で加熱凝集性を調べた結果、家禽OTrfによって異なったが、 $\text{Fe}^{3+}$ 及び $\text{Al}^{3+}$ イオン共存により加熱凝集抑制効果が認められた。このことは、家禽卵にFeやAl塩を添加することで加熱凝集を制御した加熱処理が可能になることを示唆しており、この特性を利用した新たな加工食品の開発が期待された。

(別紙様式博第 3 号)

論文要旨 (英文)

十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

学位申請者：20DA501 鈴木歩美

### **Comparative studies on thermal stability of poultry ovotransferrins**

Chicken (Chi) eggs have excellent functions and characteristics such as thermal coagulability, foaming, and emulsification, and are an extremely important food ingredient in the diet and food industry. Egg protein plays a major role in these functions and characteristics, and is used in various ways depending on the application. Ovotransferrin (OTrf) is one of the major egg white proteins of chicken, accounting for about 12% of egg white protein, and is known to have the lowest thermal stability among major egg white proteins. Therefore, the thermal stability of Chi OTrf has been a major concern in the past, since the pasteurization temperature of liquid eggs is often determined by taking into account the thermal denaturation of Chi OTrf. On the other hand, effective utilization of biodiversity and unutilized genetic resources are also important for the development of food production and food development. The usefulness of chicken eggs goes without saying, but other poultry eggs may also have functions and characteristics comparable to or superior to chicken eggs, and their effective use is expected. However, studies on the properties of poultry eggs other than Chi are very limited. In particular, it is assumed that OTrf influences the thermal conditions for sterilization and cooking/processing, so knowledge on the thermal stability of OTrf is essential for the use of other poultry eggs. Therefore, the purpose of this study was to compare the thermal stability of five types of poultry other than Chi; duck (Duk), guinea fowl (Gui), Japanese quail (Jpq), ostrich (Ost), and turkey (Tky) OTrfs, while verifying the conventional knowledge of Chi OTrf, in order to obtain knowledge that will contribute to the determination of appropriate thermal processing conditions for each type of poultry.

In Chapter 1, the molecular characteristics of OTrfs obtained from database information were summarized and compared among poultry. The results showed that the poultry OTrfs were roughly similar in their structure as the same transferrin family. However, the differences in amino acid sequences suggest some differences in intramolecular ionic bonds, hydrogen bonds, hydrophobic bonds, and other bonds, as well as differences in secondary structure. These differences and similarities provided important basic information for comparative studies of structural changes such as aggregation and insolubilization due to denaturation and intermolecular interactions. In

addition, preparation method of large quantities of highly purified OTrf was optimized for poultry eggs to obtain sufficient amounts of the poultry OTrfs needed since this study consumes purified OTrfs on a gram-by-gram basis.

In Chapter 2, the thermal stability of poultry OTrfs was comparatively analyzed in terms of thermal denaturation temperature and thermal aggregation. The intermolecular interactions of OTrfs during thermal aggregation were also analyzed. The thermal denaturation temperatures shown as  $T_{mDSC}$  at pH 4, 7, and 9 by differential scanning calorimetry (DSC) were not significantly different between Chi OTrf and other poultry OTrfs, and the difference was around 3°C. Similar results shown as  $T_{mDSF}$  were obtained by differential scanning fluorimetry (DSF). Next, the thermal aggregation properties of poultry OTrfs were compared under various conditions. As a result, varied combinations of heating temperatures and heating times leading to thermal aggregation of poultry OTrfs at acidic, neutral, and alkaline pH were clarified in detail, and the differences in thermal aggregation properties among the poultry were thus revealed. The nature of intermolecular interactions in the thermal aggregation of poultry OTrfs was analyzed by SDS-PAGE analysis and determination of SH groups. The results suggested that at the poultry OTrfs may not have been thermal-aggregated at pH 2 due to the hydrolysis into low molecular weight components. SDS-PAGE analysis of thermal-aggregated poultry OTrfs under non-reducing conditions revealed only monomers, suggesting that intermolecular S-S bonds were not involved in the aggregate formation and that hydrophobic bonds contributed significantly to the aggregate formation. In the case of poultry OTrfs aggregates at pH 7, 8 and 9, they were detected as monomers by SDS-PAGE analysis only under reduction, indicating that intermolecular S-S bonds are involved in polymer formation in addition to hydrophobic bonds. In the case of Ost OTrf at pH 4, which did not aggregate even at high temperatures and long heating times, strong electrostatic repulsion due to a higher isoelectric point than other fowl is assumed to be the main cause of solubility, while in the case of Ost at pH 8 and Duk, Jpq and Tky OTrfs at pH 9, polymers involving intermolecular S-S bonds in addition to hydrophobic bonds were found to be generated even in solution. Tracing the amount of SH groups in the thermal-treated solution yielded results that supported the formation of intermolecular S-S bonds as revealed by SDS-PAGE analysis. In conclusion, comparative analysis of the thermal stability of poultry OTrfs were performed in terms of thermal denaturation temperature and thermal aggregation. The results showed that the thermal denaturation temperatures at pH 4, 7, and 9 by DSC analysis were not significantly different between Chi OTrf and other poultry OTrfs. Similar results were obtained in the DSF analysis, indicating that the DSF method can be used to monitor the thermal denaturation of OTrfs.

The similarity in the thermal denaturation temperature of OTrfs among poultry suggested that the pasteurization method used for chicken eggs may be applicable to other poultry eggs. Furthermore, the details of the thermal aggregation conditions of poultry OTrfs: the combinations of heating temperatures and heating times at various acidic, neutral and alkaline pH, revealed differences among poultry OTrfs in the thermal aggregation properties, in contrast to the similarity of the thermal denaturation temperature. This suggested that it was necessary to set the appropriate thermal processing treatment conditions for each poultry according to its purpose.

In Chapter 3, the effects of various metal ions on the thermal stability of poultry OTrfs were compared. The intermolecular interactions of OTrf upon heating were also analyzed. The effect of  $\text{Fe}^{3+}$  ions on  $T_{m\text{DSF}}$  of various poultry OTrfs was compared by DSF analysis. The results showed that the effect of  $T_{m\text{DSF}}$  increase was greater than  $20^\circ\text{C}$  in all poultry, and there were no significant differences among poultry. The temperature increase in OTrfs was similar to the effect of diatomic Fe binding to OTrf reported for Chi, suggesting that diatomic Fe binding occurred in other poultry OTrfs as well. The results of DSC analysis under the same experimental conditions as those of DSF analysis showed almost the same values, confirming the validity of DSF analysis even in the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  ions. DSF analysis was performed in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  ions in addition to  $\text{Fe}^{3+}$  ions to clarify the rise effect of metal ions on the denaturation temperatures of poultry OTrfs. In all poultry OTrfs, including Chi, the rise effect was more than  $14^\circ\text{C}$  in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$  ions, about  $10^\circ\text{C}$  in the presence of  $\text{Al}^{3+}$  ions, and about  $3\text{-}5^\circ\text{C}$  in the presence of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions. On the other hand, other metal ions did not increase the thermal denaturation temperature in some poultry species. Next, the effects of  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  ions on thermal aggregation ( $95^\circ\text{C}$ ) of OTrfs were examined. OTrf with  $\text{Fe}^{3+}$  ions at pH 8 or pH 9 showed less aggregation and insolubilization than  $\text{Fe}^{3+}$ -free OTrf in all poultry, indicating the inhibitory effect on thermal aggregation. In particular, the solubility of Gui and Tky OTrfs at pH 9 was about 70% higher than that in the  $\text{Fe}^{3+}$  ion free condition, indicating a remarkable inhibitory effect on thermal aggregation. In the presence of  $\text{Al}^{3+}$  ions at pH 9, a slight inhibitory effect on thermal aggregation was shown in the case of Gui and Tky OTrfs. The intermolecular S-S bonds in addition to hydrophobic bonds were found to be involved in the formation of OTrf polymers in the thermal aggregates of poultry OTrfs and in the solutions after heating. In conclusion, the thermal denaturation temperature of poultry OTrfs in the presence of various metal ions including  $\text{Fe}^{3+}$  ions and the rise effect of metal ions on the thermal denaturation temperature were clarified, indicating that efficient sterilization treatment is possible by the addition of highly effective metal ions. The aggregation properties of

poultry OTrfs were examined under various thermal conditions in the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  ions, which are highly effective in increasing the thermal denaturation temperature, and the results showed that the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  ions inhibited thermal aggregation although the effects differed depending on the poultry OTrfs. This suggests that the addition of Fe and Al salts to poultry eggs enables thermal processing with controlled thermal aggregation, and the development of new processed foods utilizing this property is expected.