

非対称FFFとMALSによるグルテンの特性評価

一般情報

ID0064

アプリケーション： タンパク質, 食品

テクノロジー： AF4-MALS-RI

機器構成： Postnova AF2000 AF4, PN3621 MALS, PN3211 UV/Vis, PN3150 RI

キーワード： Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, MALS, グルテン, タンパク質

はじめに

世界人口の最大5%に影響を与えるセリアック病[1]とグルテンフリーダイエットの増加に伴い、グルテンは近年重要なタンパク質となっています。グルテン分析における課題の1つは、分子量/サイズが比較的大きいことです。グルテンの1種であるグルテニンの分子量は1,000万Daになる可能性があり[2]、サイズ排除クロマトグラフィーなどのカラムベースのクロマトグラフィー技術による分離と特性評価が困難となります。多くの場合、グルテンサンプルはクロマトグラフィーにかける前に超音波処理され、得られたフラグメントを分析します。このアプリケーションでは、分子量および慣性半径(R_g)の分布がより直接的に測定できる、サンプル前処理を必要としない、非対称フローフィールド・フロー・フラクショネーション(AF4)によるグルテンの分離に関するデータを示します。AF4チャネルの概略図を図1に示します。クロスフローとチャネルフローの組み合わせにより、サンプルのサイズ分離を行い、小さな粒子が凝集体や凝集体を含む大きな粒子より早く溶出されます。

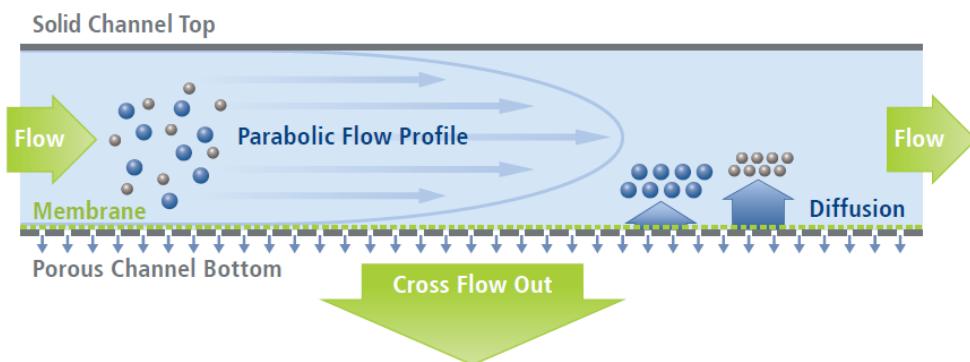


図1: AF4 分離原理の概略図

測定詳細と結果

グルテンをサイズで分離して特性評価を行うために、2つの検出器を備えたAF4システムを使用しました。まず、グルテンとその凝集体および凝集体のRgを測定するためのMALS、そしてMALSと組み合わせて分子量測定ができるRI検出器を接続しました。溶離液は70mM酢酸を使用しました。測定したグルテンサンプルは、分子量が約30kDaから100MDaの範囲に分布していることがわかります（図2）。3つのサンプルは、分子量が異なることが分かります。この分子量値の下限は、グリアジンと呼ばれるモノマーであると考えられます[2]。分子量の上限は通常約10MDaであると予想されましたが、ここではより大きな値である約100MDaを測定しました。これは、カラムクロマトグラフィーでは分離できない非常に大きなタンパク質凝集体をAF4は分離する能力がある事を示しております。

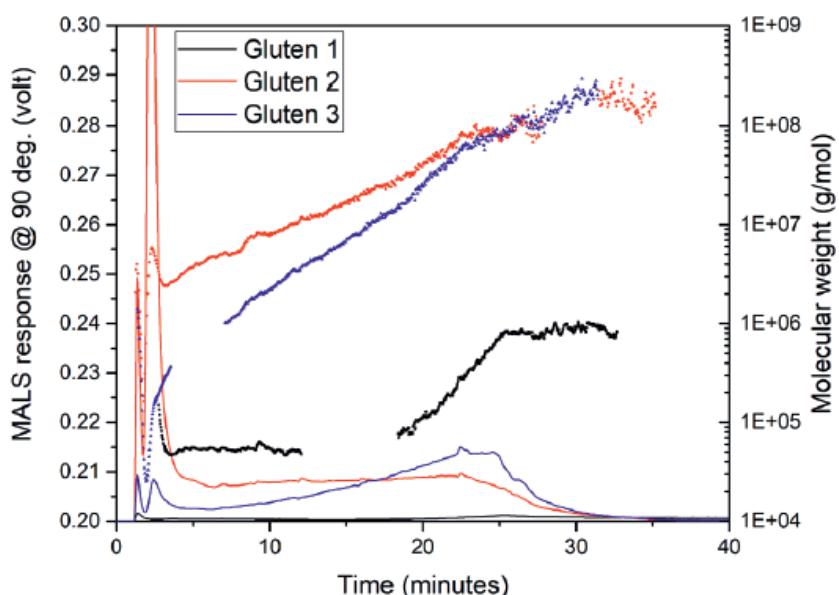


図2. MALS90° の分子量フラクトグラム

図3では、MALS信号が線で、慣性半径Rgは点でプロットしています。分子量の場合と同様に、3つのサンプルを慣性半径Rgで区別することができます。特にGluten3では、サイズ分布に約50 nmから500 nmの範囲の多分散性が観察されました。

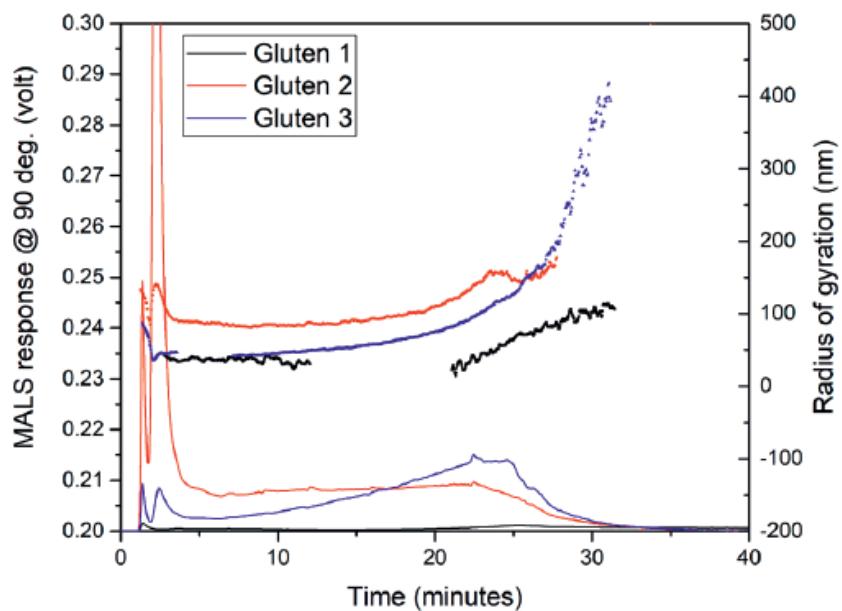


図 3. AF4 -MALS によるグルテンサンプルのフラクトグラム(線)、慣性半径(点)

まとめ

このアプリケーションにより、AF4-MALS-RIは大きなグルテンを分離し、分子量と分子サイズ (R_g) 値を測定できることができました。分析した2つのサンプルに関しては、分子量の上限は、一般的と見なされている上限 (~ 10 MDa) よりも1桁高い値でした。これは、ほとんどのクロマトグラフィーカラムでは、この大きさのグルテンの一部もしくは全てがフィルターで除去され、グルテン全体のサイズと分子量分布が正しく測定されていない事を示しています。

参考文献

- [1] J. Henrotin, M. Planque, A.C. Huet, R. Marega, A. Lamote, N. Gillard. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 2019, 102(5), 1286-1302.
- [2] H. Wieser, Food Microbiology, 2007, 24(2), 115-119.