

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02321

研究課題名（和文）不凍タンパク質の食品への添加効果の定量的評価による凍結食品の高品質化

研究課題名（英文）Quantitative evaluation of the effect of adding antifreeze proteins to foods to improve the quality of frozen foods.

研究代表者

萩原 知明（Hagiwara, Tomoaki）

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：20293095

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、不凍タンパク質(AFP)の食品への添加効果を定量的に評価し、最適な使用条件を確立することを目的とし、AFPの添加効果の最適な条件に関連した以下の知見を得た。

- ・タマネギの薄皮組織と小麦ドウ製品を用いてAFPの再結晶化抑制効果を観察し、小麦ドウ自体の再結晶化能と型AFPとの協同効果を明らかにした。
- ・AFPの種類・濃度、加熱処理温度、共存する塩化ナトリウム、アルギン酸およびローカストビーンガムの影響、複数種のAFPの共存による協同効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：不凍タンパク質(AFP)の食品への添加効果を様々な条件下において定量的に明らかにした。この結果、不凍タンパク質の再結晶化抑制メカニズムについての理解が進化した。

社会的意義：食品産業において、高品質な凍結保存実現の一助となり、食品の品質向上や保存期間延長をもたらす、ひいては食糧の有効利用にもつながり、生物資源の持続的な利用に寄与するものと考えられる。医療分野においては、生物学的試料や製品の冷凍保存技術の向上につながり、医療の進歩と効率化に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to quantitatively evaluate the effect of adding antifreeze protein (AFP) to food products and to establish the optimal conditions for its use.

The recrystallization inhibitory effect of AFP was observed using thin onion skin tissue and wheat dough products, and the cooperative effect of type III AFP and the recrystallization ability of the wheat dough itself was clarified. The effects of type and concentration of AFP, heat treatment temperature, coexisting sodium chloride, alginate, and locust bean gum, and the cooperative effect of coexistence of multiple types of AFP were clarified.

研究分野：食品工学

キーワード：冷凍食品 凍結保存 氷結晶 再結晶化 不凍タンパク質

1. 研究開始当初の背景

凍結保存中の食品内部の氷結晶は、時間経過とともに周囲の水分子を取り込んで成長と粗大化を繰り返し、そのサイズが際限なく大きくなる。これを、再結晶化と呼ぶ。再結晶化は表面自由エネルギー最小原理により自発的に進行する過程であり、停止することがない。この現象が食品中で進行し組織が破壊され、品質低下が生じる。再結晶化を実用上問題ない程度まで抑制するためには、一般的な冷凍庫 (-18℃) では不十分であり、現状はデューフ freezer (-80℃) や液体窒素 (-196℃) 等のエネルギー消費量の大きい技術を使わざるを得ない。

この現状を一変させる手法として、不凍タンパク質 (Antifreeze protein; 以下 AFP と略記) の利用が近年注目されている。AFP は寒冷地に生息している特定の生物に凍結保護物質として含まれるタンパク質である。1969 年に DeVries らによって南極の魚から最初の AFP が発見された。AFP は氷結晶表面に結合し、その再結晶化を強く抑制する。しかもこの抑制効果は、0℃ 近傍のマイナス温度域でも十分発揮され、デューフ freezer や液体窒素を必要としない。このため、AFP を食品に添加することで、再結晶化が抑制され、長期間にわたって品質保持が可能な食品凍結保存技術が省エネルギーで実現できると謳われている。しかしながら、既存の AFP に関する研究の多くは、新規 AFP の探索に重点が置かれており、再結晶化に関する知見の蓄積は少なく、AFP の再結晶化抑制効果を実際の食品に添加して比較検証可能な手法で調べた例は殆どない。特に、製品化を前提とした場合、AFP 添加による再結晶化抑制効果を定量的に評価し、AFP 添加濃度などの使用条件の最適化を行う必要があるが、このような試みが皆無である。つまり、AFP の効果を食品において最大限発揮させるための使用条件の解明につながる検討例が極めて少ない。

2. 研究の目的

AFP の効果を食品において最大限発揮させるための使用条件の解明を目指して、以下の達成することを目的とした。

現実の食品に近いモデル食品 (小麦ドウ、タマネギ表皮組織) を用いて、氷結晶の再結晶化におよび AFP の添加効果を現実の凍結保存条件下で定量的に解明する。

で開発した手法に基づいて、AFP の最適な使用条件に関する知見を得る。

3. 研究の方法

を達成するために、具体的に以下の項目を実施した。

- A. モデル食品中での氷結晶の再結晶化進行速度の定量的評価方法の確立
- B. モデル食品中への AFP 添加が氷結晶の再結晶化進行速度に及ぼす影響の把握
- C. モデル食品中での AFP 使用条件の最適化の試み

以下、詳細を説明する。

A. モデル食品中での氷結晶の再結晶化進行速度の定量的評価方法の確立

モデル食品としてタマネギ表皮組織、40% スクロース溶液ならびにそれに小麦粉を含んだものを用いた。再結晶化進行速度の定量的評価方法としては、氷結晶の顕微鏡観察とその画像解析に基づいた方法を試みた。試料を温度制御装置付き光学顕微鏡観察システムにセットして急速凍結し、凍結貯蔵しながら、顕微鏡で観察し、氷結晶の平均サイズの貯蔵時間依存性を Ostwald ripening 則に基づく式で解析することで、氷結晶の再結晶化の速さを反映した再結晶化速度定数を求めた。この値が大きければ再結晶化の進行が速いことを意味する。

B. モデル食品中への AFP 添加が氷結晶の再結晶化進行速度に及ぼす影響の把握

A で確立した手法を用いて、モデル食品に AFP を添加し、-10℃ 凍結貯蔵中の氷結晶の再結晶化速度定数を求め、再結晶化抑制効果を検証した。40% スクロース水溶液をモデル食品として、AFP (I 型 AFP、III 型 AFP、AFGP) の種類・濃度の影響、AFP 加熱処理温度の影響、塩化ナトリウムの影響、小麦粉、アルギン酸およびローカストビーンガムの影響について検討を行った。

C. モデル食品中での AFP 使用条件の最適化の試み

AFP 濃度依存性を定量的に評価し、AFP の使用濃度の最適化を試みるため、再結晶化速度定数の濃度依存性をシグモイド型関数でフィッティングし、再結晶化の速度を半減させる不凍タンパク質濃度 (C_{50}) ならびに協同化指数 の算出を実施した。また、異なる AFP を同時に使用することで、再結晶化抑制能の協同的な向上が観察されるかについても検討を行った。

4. 研究成果

A. モデル食品中での氷結晶の再結晶化進行速度の定量的評価方法の確立

タマネギ表皮組織では、Ⅰ型不凍タンパク質を含むリン酸溶液に浸漬することで、細胞内に生じた氷結晶の再結晶化が抑制されていると思われる様子を観察することができた。スクロース溶液および小麦粉を含んだスクロース溶液では、小麦粉を添加することで氷結晶の再結晶化が抑制される様子が観察された。いずれも試料でも、氷結晶の再結晶化の様子を観測可能であった。スクロース溶液および小麦粉を組んだ試料では、画像解析により氷結晶の平均サイズを求めることができ、再結晶化速度定数を算出できた。このことから、再結晶化進行速度を定量的に評価できた。

B. モデル食品中への AFP 添加が氷結晶の再結晶化進行速度に及ぼす影響の把握

Ⅰ型 AFP、Ⅱ型 AFP、AFGP を比較すると、AFGP が最も再結晶化抑制能が大きかった。95℃、10 分間の熱処理により、Ⅱ型 AFP は再結晶化抑制能を最も失った。Ⅰ型 AFP はあまり影響を受けず、AFGP はほとんど影響を受けなかった。AFP の濃度および加熱処理の影響については、ある濃度以上であれば、加熱凝集せずに残っている AFP が相当量あるため、また低濃度であれば、AFP 分子同士が接触する機会が減少して加熱凝集が生じにくいため、いずれの場合も再結晶化抑制能の損失が少なくなることが示唆された。

塩化ナトリウム単体では、氷結晶の再結晶化を促進した。しかし、Ⅰ型 AFP と Ⅱ型 AFP を添加すると、塩化ナトリウムが AFP の再結晶化抑制能を高めた。AFGP に関しては、塩化ナトリウムの添加は氷結晶再結晶の抑制を向上させなかった。

小麦粉を含んだスクロース溶液では、小麦ドウを添加すると、氷結晶の再結晶化が有意に抑制され、ここにさらに Ⅰ型 AFP を添加することで、-10℃での氷結晶の再結晶化抑制効果が有意に増強された。デンプンそのものはむしろ氷結晶の再結晶化を促進するという既往の結果より、小麦ドウに含まれるタンパク質には再結晶化を抑制する効果があること、そして、これらのタンパク質と Ⅰ型 AFP が相乗効果により氷結晶の再結晶化を効果的に抑制していることが示唆された。

アルギン酸濃度の増加とともに再結晶化速度定数は減少する傾向を見出した。さらに、氷結晶のサイズ分布を解析することにより、アルギン酸濃度の増加により、氷結晶のサイズ分布が狭くなる傾向があることを明らかにした。また、誘電緩和スペクトル観察により、アルギン酸を含む試料では水分子の移動度が低くなることが観察された。これらの結果から、氷の再結晶化遅延に対するアルギン酸効果のメカニズムとして、凍結濃縮マトリックス中の水の移動度低下、氷結晶サイズ分布が狭くなることによる移動性氷結晶再結晶化過程の抑制の 2 点が示唆された。

ローカストビーンガム共存下では、AFP は氷結晶の再結晶化を抑制するとともに、氷結晶の不均一な再結晶化進行を抑制した。

C. モデル食品中での AFP 使用条件の最適化の試み

Ⅰ型 AFP、Ⅱ型 AFP、AFGP の再結晶化速度定数の濃度依存性は、以下のシグモイド型関数で良好にフィッティングできた。

$$k(C) = k_{\infty} + \frac{k_0 - k_{\infty}}{1 + \left(\frac{C}{C_{50}}\right)^{\alpha}}$$

k : 再結晶化速度定数 C : AFP 濃度 k_0 : $C=0$ の時の再結晶化速度定数

k_{∞} : 飽和最小再結晶化速度定数(AFP 濃度を増しても k の値が小さくならない限界値)

C_{50} : 再結晶化速度定数が k_0 と k_{∞} の中間の値となる AFP 濃度

α : 協同指数。値が大きいほど、AFP 濃度増加に伴い、 C_{50} 付近で再結晶化速度定数は急激に小さくなる。

このことは、氷結晶の再結晶化を有意に抑えるために必要な AFP 濃度の第一選択値として、 C_{50} を利用できること、また α の値により実効性のある AFP 濃度範囲が決まることを示唆しているものと考えられ、最適な AFP 濃度の選択の際に有用であると思われる。

Ⅰ型 AFP と Ⅱ型 AFP が共存している場合、再結晶化速度定数各 AFP の比率に応じた平均的な値となり、再結晶化抑制能の協同的な向上は観察されなかった。

以上、様々な条件下における AFP の添加効果を明らかにし、AFP の最適な使用条件確立の一助となる知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ma Qingbao、Shibata Mario、Hagiwara Tomoaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Ice crystal recrystallization inhibition of type I antifreeze protein, type III antifreeze protein, and antifreeze glycoprotein: effects of AF(G)Ps concentration and heat treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 635 ~ 645
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chuangdong FANG, Mario SHIBATA, Tomoaki HAGIWARA	4. 巻 38
2. 論文標題 Recrystallization of Ice Crystals in Sucrose Solution Containing Sodium Alginate and Its Relationship to Dynamic State of Freeze-concentrated Matrix Evaluated by Dielectric Relaxation Measurement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本冷凍空調学会論文集	6. 最初と最後の頁 277 ~ 286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Monalisa K., Shibata Mario、Hagiwara Tomoaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Ice Recrystallization Behavior of Corn Starch/Sucrose Solutions: Effects of Addition of Corn Starch and Antifreeze Protein III	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Biophysics	6. 最初と最後の頁 229 ~ 236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11483-020-09664-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Monalisa K., Shibata Mario、Hagiwara Tomoaki	4. 巻 143
2. 論文標題 Ice recrystallization inhibition behavior by wheat flour and its synergy effect with antifreeze protein III	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Hydrocolloids	6. 最初と最後の頁 108882 ~ 108882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodhyd.2023.108882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1．発表者名 河毛知之，柴田真理朗，萩原知明
2．発表標題 2型不凍タンパク質の氷結晶再結晶化抑制能に及ぼす加熱処理及び塩添加の影響
3．学会等名 日本食品工学会第23回（2022年度）年次大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 中村雄斗、ファトラニットクリンマライ、柴田真理朗、萩原知明
2．発表標題 ローカストビーンガム含有スクロース溶液中の氷結晶再結晶化挙動に及ぼす3型不凍タンパク質添加の影響
3．学会等名 日本食品工学会第23回（2022年度）年次大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 孫兆暉，柴田真理朗、萩原知明
2．発表標題 異種不凍タンパク質共存系における氷結晶の再結晶化挙動に関する研究
3．学会等名 日本食品工学会第24回（2023年度）年次大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 中村雄斗、ファトラニットクリンマライ、柴田真理朗、萩原知明
2．発表標題 凍結ローカストビーンガム含有スクロース溶液の不均一な氷結晶生成メカニズムに関する研究
3．学会等名 日本食品工学会第24回（2023年度）年次大会
4．発表年 2023年

1. 発表者名 河毛知之, 柴田真理朗, 萩原知明
2. 発表標題 スクロース溶液中での2型不凍タンパク質の氷結晶再結晶化抑制能に関する研究
3. 学会等名 日本食品工学会第24回(2023年度)年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuto Nakamura
2. 発表標題 Effect of type III antifreeze protein on ice recrystallization behavior in sucrose solution containing locust bean gum
3. 学会等名 Inter-Cold seminar in Japan 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoyuki Gamou
2. 発表標題 Ice recrystallization supression ability of type II antifreeze protein: Effects of salt addition and heat treatment
3. 学会等名 Inter-Cold seminar in Japan 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zhaohui Sun
2. 発表標題 Ice recrystallization behavior in sucrose solutions containing mixtures of different types of antifreeze proteins.
3. 学会等名 Inter-Cold seminar in Japan 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 Fang Chuandong, 柴田真理朗, 萩原知明
2 . 発表標題 Ice recrystallization in sucrose solution containing alginate
3 . 学会等名 第66回低温生物工学会大会
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Kamrunnaher Monalisa, Mario Shibata, Tomoaki Hagiwara
2 . 発表標題 Ice recrystallization behavior of wheat flour and synergy with antifreeze protein III
3 . 学会等名 Cryopreservation Conference 2021
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Kamrunnaher Monalisa , Mario Shibata , Tomoaki Hagiwara
2 . 発表標題 Ice recrystallization behavior of corn starch/sucrose solution at isothermal condition and effect of addition of antifreeze protein type III
3 . 学会等名 農業施設学会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Kamrunnaher Monalisa, Mario Shibata and Tomoaki Hagiwara
2 . 発表標題 Ice recrystallization behavior of corn starch/sucrose solutions: Effects of addition of corn starch and antifreeze protein III
3 . 学会等名 日本食品工学会第21回（2020年度）年次大会
4 . 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------