

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K02213

研究課題名(和文) 不凍タンパク質を利用した生鮮野菜類の新規冷凍保存法の開発

研究課題名(英文) Development of a New Cryopreservation Method for Fresh Vegetables Using Antifreeze Proteins

研究代表者

安藤 真美 (Ando, Mami)

摂南大学・農学部・教授

研究者番号：50234183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では氷結晶の成長を抑制する不凍タンパク質を利用し、生鮮野菜類の新しい凍結保存方法の開発をめざす事を目的とした。重量残存率は、レタスの場合AFP区は蒸留水区よりも浸漬6時間以外は有意に高く、特に浸漬24時間冷凍の場合は顕著だった。SEM観察の結果から、浸漬24時間でも生と同等の細胞の大きさであった。これは、AFPが氷結晶に結合し粗大化が抑えられ、細胞のダメージを防ぐことができたと考えられた。タンパク質構成アミノ酸分析の結果から、AFP標品にAlaが最も多く含まれていることが分かり、AFP区では、浸漬時間の延長と共に経時的にAlaの含有量が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生鮮野菜類の安全の観点から防腐処理のリスクのある輸入品と比べると国内産生鮮品には安心という重要な長所がある。本研究の成果により、国内産の生鮮品を安価で確実な方法により凍結保存することができれば、より幅広い食材を通年にわたり提供することが可能となる。さらに食品産業においてもこのメリットは大きな意義をもつ。和食食材は海外でも調達可能ではあるが、和食の材料としてだけでなく、テクスチャーなどの高い付加価値を有する点においても国内産野菜の品質は優れており、大きな輸出品としても期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop a new cryopreservation method for fresh vegetables using antifreeze proteins that inhibit the growth of ice crystals. The weight residuals of lettuce in the AFP condition were significantly higher than those in the distilled water condition except for 6 hours of immersion, which was especially noticeable in the case of 24 hours of immersion freezing. This was thought to be due to the binding of AFP to the ice crystals, which suppressed coarsening and prevented cell damage. The results of protein constituent amino acid analysis showed that the AFP specimen contained the highest amount of Ala, and the Ala content increased over time in the AFP section as the immersion time was extended.

研究分野：調理科学

キーワード：野菜 冷凍 不凍タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

冷凍保存技術は目覚ましい進歩を遂げており、急速冷凍や急速解凍技術の進歩により、大きな氷結晶の生成を防ぎ、主たるデメリットであるドリップ(冷凍した食品を解凍する際に細胞内の氷が溶けて出てくる水)の発生やタンパク質変性によるテクスチャーの変化を幅広い食材において抑制できるようになってきた。しかしながら、これらの技術はそれぞれ特殊な機能を有する機器を必要とするものであるとともに、食材によってはその効果が認められないものもある。

近年、凍結のデメリットを解消するツールとして、研究用不凍タンパク質の市販が開始された。不凍タンパク質は、元々は南極海という極低温環境においても“凍結しない魚”の血液から初めて発見されたタンパク質である(Vries & Wohlschlag, 1969)。このタンパク質は氷結晶に密着すると、氷結晶の拡大を防ぐことができる。また、微細な氷結晶が結合して大きな結晶となることを防ぐこともできる。つまり、“凍結を防ぐ”というよりも、“氷結晶が大きくなることを防ぐ”機能を有するタンパク質である。この機能を用いることで、大きな氷結晶による組織破壊という重大な障害を防ぐことができる。そこで、この機能を利用して、一部の食材において凍結耐性をもたせる試みが始まっており、これまでに食肉(Yeh et al., 2009)やイチゴ(Velickova et al., 2013)に関する報告がなされている。しかしながら、大きな将来性が期待されるツールであるにも関わらず、現時点では食品関連の研究・開発例は少ない。

## 2. 研究の目的

生鮮野菜類は水分が多いため、そのまま冷凍すれば氷結晶により組織が破壊され、ドリップによる栄養素の流出やテクスチャーの変化が生じる。そのためほうれん草などはブランチング処理がなされている。ブランチング処理は加熱調理が前提であるため現時点では解凍後も生野菜と同様の品質を保つ冷凍技術はほとんどないのが現状である。

そこで、本研究ではこれらのデメリットを克服するため、氷結晶の成長を抑制する不凍タンパク質を利用し、生鮮野菜類の新しい冷凍保存法の開発を目指す。

以上の理由から、今回の実験では、生鮮野菜として使用頻度の高い野菜のうち、水分含量が多く、冷凍の前後で変化が大きいと予想されるきゅうりとレタスを選定した。不凍タンパク質の効果を、各種機器測定により明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 高度精製 魚類 型不凍タンパク質(Anti-Freeze Protein : AFP)

試薬として、ニチレイにて販売されている高度精製 魚類 型不凍タンパク質を使用した。本実験では、0.5%濃度(推奨濃度0.5~1.0%)に調整したものとした。

### (2) 試料および調製

試料として、市内スーパーで購入した茨城県産のレタスを使用した。レタスは、外側を除いても十分に葉の部分が取れるよう大きめのもので、新鮮で張りのあるものを選び、冷蔵庫(4℃)で保存した。実験の際には、レタスは一枚をとり、葉と茎との中央部分を縦1.5cm×横1.2cmに切った。試験区は、生、コントロール(生を冷凍)、サンプル(0.5%AFPまたは蒸留水に浸漬後冷凍)とした。浸漬時間は1・3・6・24時間とした。

### (3) 測定項目

#### 重量残存率

解凍後(g)÷カット後(g)×100の式に代入して重量残存率(%)を求めた。

#### ドリップ量

#### 色差

色差計(NIPPON DENSHOKU IND.CO, LTD, Z 300A)

#### 外観(写真記録)

#### 走査型電子顕微鏡 観察

走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope : SEM) TM-3000 HITACHI

タンパク質構成アミノ酸

HPLC (L2000 , HITACHI )

( 4 ) 有意差検定

実験結果の有意差検定は、フィッシャーの最小有意差法を用い、5%有意水準において一元配置分散分析を行った。ソフトはエクセル統計を使用した。

4 . 研究成果

( 1 ) 重量残存率

AFP 区は蒸留水区と比較すると浸漬 6 時間以外は有意に高く、特に浸漬 24 時間は顕著だった。

( 2 ) ドリップ量

AFP 区と蒸留水区共に、コントロールと比較すると高値であった。AFP 区では蒸留水区より浸漬 1,6,24 時間でドリップ量が低値であった。レタスは浸漬時間によるドリップ量の増減があまりなかったと考えられた。

( 3 ) SEM(走査型電子顕微鏡)

結果を図 1 に示した。生の断面は細胞一つ一つがしっかりしているのに対し、コントロールの断面は細胞の破壊が見られた。蒸留水区の浸漬 1,3 時間の断面は所々細胞の破壊が見られた。浸漬 6 時間の断面はあまり細胞の破壊が見られなかったが、浸漬 24 時間は細胞の破壊が著しく見られた。AFP 区の浸漬 3,6,24 時間の断面は細胞の破壊がほとんど見られなかった。蒸留水に浸漬したレタスの細胞が破壊されていた理由として、冷凍による氷結晶の生成とその成長が考えられた。

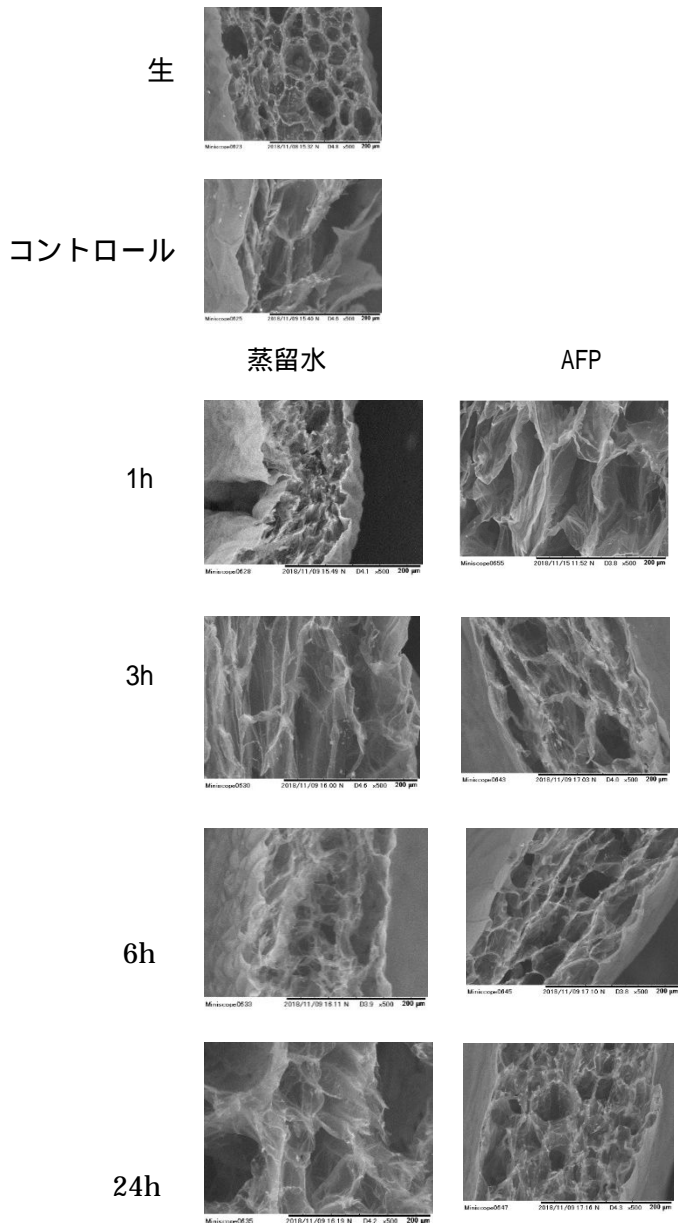


図1 SEM画像 ×500

#### (4) タンパク質構成アミノ酸

重量残存率の結果から、レタスのみ蒸留水区とAFP区のAla(アラニン)含有量と、AFP浸透量を求め、その結果を図2に示した。また、AFP標品1mg中にAla 469.5 μgと分かり、アラニン浸透量の式を示すと {●時間Ala含有量(μg) - 0時間Ala含有量(μg)} ÷ 469.5 となった。

保持時間(min)ではAsp(アスパラギン酸)が10分程度と最も早く検出された。次いで、Thr(スレオニン)と16分程度で早く検出された。信号強度(AU)ではAla(アラニン)が0.6AU程度と最も多く分析された。次いで、Thr(スレオニン)、Asp(アスパラギン酸)であった。AFP標品の信号強度からAla(アラニン)が最も多く含まれていることが分かった。このことから、AFP溶液に浸漬した試料にもAla(アラニン)の含有量が多くなったと考えられた。

保持時間(min)では、P-Ser(フォスフォセリン)が1分程度と最も早く検出された。次いで、アスパラギン酸(Asp)が早く検出された。信号強度(AU)では、アスパラギン酸(Asp)0.01AU程度と最も多く分析された。次いで、Glu(グルタミン酸)であった。信号強度からアスパラギン酸(Asp)が最も多く含ま

れていた。AFP 標品に多い Ala (アラニン) は低値だったため、蒸留水浸漬だけでは Ala (アラニン) は増加しないことが考えられた。

AFP 区では、浸漬時間の延長と共に経時的に Ala (アラニン) の含有量が増加した。しかし、蒸留水区では浸漬時間に関わらず、ほぼ一定であった。AFP 区では、AFP 標品に Ala (アラニン) 含有量が多いため、浸漬時間の延長と共にレタスに Ala (アラニン) が浸透したと考えられた。蒸留水区では、Ala (アラニン) 含有量が多い AFP 標品が含まれていないため、浸漬時間に関わらず、変化が見られなかったと考えられた。

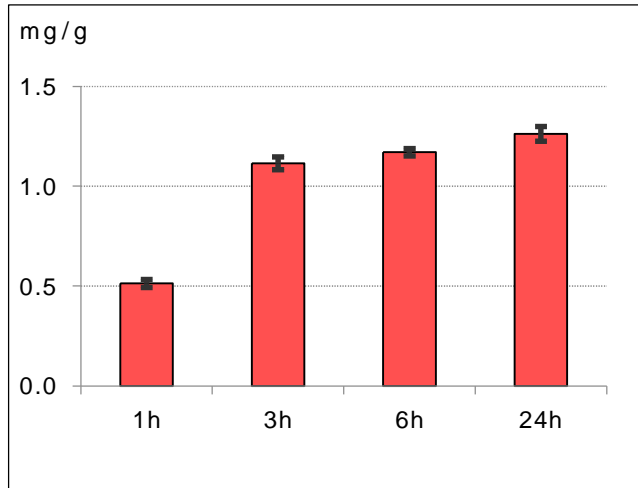


図2 AFP 標品のアラニン含有量からレタスへの AFP 浸透量

浸透量は式に当てはめた結果、浸漬1時間は、0.5mg/g、浸漬3時間で1.11 mg/g、浸漬6時間で1.17 mg/g、浸漬24時間で1.26 mg/gとなった。アラニン浸透量は浸漬3時間以降増加したことが分かった。アラニン量が経時的に増加したことがみられたことから、試料中に浸透した AFP 量が増加したと考えられた。

#### 参考文献

L. DEVRIES AND DONALD E. WOHLSCHLAG, Freezing Resistance in Some Antarctic Fishes, SCIENCE, 7 Mar 1969, Vol 163, Issue 3871, 1073-1075

DOI: 10.1126/science.163.3871.1073

Chuan-Mei Yeh 1, Bi-Yu Kao, Hsuan-Jung Peng, Production of a recombinant type 1 antifreeze protein analogue by *L. lactis* and its applications on frozen meat and frozen dough, J Agric Food Chem., 2009 Jul 22;57(14):6216-23.

doi: 10.1021/jf900924f.

Velickova, Elena, Winkelhausen, Eleonora, Kuzmanova, Slobodanka, Delgado Alves, Vitor Moldao-Martins, Margarida, Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions, Food Science and Technology, 52 (2013) 80-92

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤真美, 北尾悟
2. 発表標題 不凍タンパク質を利用した生鮮野菜類の冷凍保存法の検討
3. 学会等名 日本調理科学会近畿支部第46回研究発表会
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
---------	---------