

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14553

研究課題名（和文）食品凍結濃縮層における脂質-タンパク質相互作用の解明

研究課題名（英文）A study about the effect of lipid on the protein aggregation in food under sub-zero temperature

研究代表者

小林 りか（KOBAYASHI, Rika）

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50780326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではタンパク質と油脂を含む食品内において、冷凍貯蔵下で起こるタンパク質の凝集形成に対する油脂の役割を理解することを目的とし、モデル食品として豆腐と小麦ドウを使って実験検討を行った。その結果、豆腐中では凍結貯蔵時に生ずるタンパク質の凝集に対する油脂の役割は、凝集を単純に促進または抑制するというよりも相互補完関係にあるのではないかと予想された。一方で小麦ドウ内では油自体のタンパク質との相溶性が凝集量形成を決定しているのではないかと予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品冷凍に伴う品質劣化防止に対するアプローチは、氷結晶の生成挙動の理解および制御に多くの力が注がれてきた。その一方で、水は溶質を排除しながら結晶を形成するため、食品成分は濃縮を受ける。凍結濃縮層内の諸反応は低温貯蔵下もしくは解凍過程で進行するためにその場観察が難しいことから、濃縮層内での諸反応に関する知見は少ないが、食品冷凍技術の向上に対して、食品の凍結濃縮層で起こる諸変化を体系的に理解する必要がある。本研究の学術的意義は冷凍食品の濃縮層内の成分同士の影響に着目し、その機構解明を目指した点にある。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the effect of lipids on protein aggregation and texture change, in frozen foods. A soybean curd and a wheat dough were used as model foods. The result of the soybean curds suggested lipid and protein were influenced each other to protein aggregation, since relative huge protein-lipid association were formed by aggregation of proteins adsorbed on the surface of lipid. On the other hand, the result of the wheat dough indicated the compatibility between lipid and protein might determine the protein aggregated behavior in frozen dough.

研究分野：農業工学

キーワード：食品冷凍 低温貯蔵

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食品冷凍技術は、食品の特性を最大限保持しながらシェルフライフを飛躍的に延長できる唯一の食品保存方法である。しかし食品冷凍操作には、多量の離水や食感の悪化、色調劣化、といった品質劣化が必ず伴う。食品冷凍に伴う品質劣化防止に対するアプローチは、氷結晶の生成挙動の理解および制御に多くの力が注がれてきた。その一方で、水リッチな多くの食品を濃厚水溶液であると見ると、水は溶質を排除しながら結晶を形成するため、食品を冷凍する場合、氷以外の食品成分は濃縮を受ける。この濃縮層内部では、通常存在し得ない近接距離に食品成分同士が共存するため、低温にも関わらず物理化学反応が進行し、冷凍食品の品質劣化を引き起こすと考えられている。しかしながら、凍結濃縮層内の諸反応は低温貯蔵下もしくは解凍過程で進行するためにその場観察が難しいことから、濃縮層内での諸反応に関する知見は少なく、メカニズムの理解が遅れている。そのため食品冷凍技術の向上に対して、食品の凍結濃縮層で起こる諸変化を体系的に理解する必要がある。

課題実施者は本課題開始時まで、タンパク質を主骨格とし油を含むゲルである豆腐の冷凍貯蔵下でのイメージング実験を放射光 X 線 CT を用いて行った際に、冷凍下での貯蔵を経ることによって、豆腐の断層像は主要な構成成分であるタンパク質由来の X 線線吸収係数のピークだけでなく、油脂由来の X 線線吸収係数のピークが得られるようになることを確認した。この現象は、豆腐の冷凍貯蔵中に何らかの理由で油脂が会合し、CT の空間分解能で捉えられるようになったためであると考えられるが、その詳細は不明である。また、冷凍貯蔵中に豆腐中のタンパク質は凝集していくが、この挙動に油脂がどのように関わるのか不明である。

冷凍食品のうち、特に肉や魚の調理加工された製品の多くは、タンパク質と油脂を含む。また産業的に多く利用されている冷凍パンの生地である小麦ドウも、タンパク質と油脂を含んだ食品である。これらの冷凍食品の品質劣化メカニズムの根本を理解するため、冷凍食品内での油の存在がどのようにタンパク質の凝集を代表とする冷凍時の変化と関わり、最終的に喫食される際の品質に影響を及ぼすのか、把握する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質を主成分とし、油脂を含む豆腐と小麦ドウをモデル食品試料とし、以下ふたつの疑問点を検討することによって、冷凍貯蔵中の食品内で進むタンパク質の凝集とそれらに起因する品質の変化に対する油の影響を理解することを目的に研究を行った。

- ・冷凍貯蔵を経ることによってモデル食品内で油脂の分布は変化するのか、また冷凍貯蔵前の油脂の分散状態が冷凍貯蔵後のタンパク質の凝集やタンパク質の凝集に起因する食感等の変化に影響を及ぼすのか
- ・油脂に含まれるトリアシルグリセロール (TAG) 中の脂肪酸種の存在比率によって、モデル食品中に含まれる冷凍貯蔵後のタンパク質の凝集やタンパク質の凝集に起因する食感等の変化は影響を受けるのか

### 3. 研究の方法

本研究では、タンパク質を主成分とし、油脂を含むモデル食品を豆腐と小麦ドウとした。

まず豆腐を用いて、冷凍貯蔵し解凍した食品内で油脂は局在化するのか、また冷凍貯蔵前の油脂の分散状態が冷凍貯蔵後のタンパク質の凝集やタンパク質の凝集に起因する食感等の変化に影響を及ぼすのか、実験的に検討を行った。冷凍貯蔵前の油脂の分布状態を変えるため、単一品種の大豆を用い一定濃度の加熱豆乳を調製したのち、豆腐調整前の豆乳を遠心分離し再度簡易的に懸濁、分散することで、油脂の局在状態が不均質である豆腐を調整した。また対照試料として、通常通りに加熱豆乳から豆腐を調整した (Control)。これらを凍結後-5℃で任意の期間凍結貯蔵させ、タンパク質の凝集量を簡易的に求めると共に、モデル食品中の油脂の分布の観察、凝集量と関連する品質としてテクスチャーの測定を行った。タンパク質の凝集量は、試料のフリーズドライ粉末を尿素溶液に溶かし遠心分離後、上清の可溶性タンパク質量を求め、簡易的に評価した。また溶出してくるタンパク質の組成を SDS-PAGE で確認した。豆腐中の油脂の分布の観察は、凍結ミクロトームによって組織切片を作成し、オイルレッド O 染色した後に光学顕微鏡で観察した。テクスチャーの測定はクリープメーターによる圧縮試験にて行った。

加えて、豆腐の骨格を司るとされている大豆タンパク質と脂質会合体の存在が、どのように冷凍貯蔵時に動くか把握するため、3種類の大豆から調整した豆乳を凍結貯蔵後解凍し、沈殿してきた画分と上清画分をそれぞれフリーズドライ後、FT-IR 測定と SDS-PAGE に供した。また1品種については、それぞれの画分を大豆重量に対して 2 %w/w で添加して調整した豆腐を冷凍貯蔵し、テクスチャーの測定を行なうことでタンパク質の凝集に起因する硬さの変化に対して油脂の存在がどのように働くか検討した。

更に小麦ドウを用いて、食品中に含まれる油脂の TAG 中構成脂肪酸種の違いが、冷凍操作によってドウ中で生ずるタンパク質の凝集とその後と与える影響を検討した。小麦ドウは、菜種油、大豆油、ブドウ種子油、ヒマワリ油の 4 種類の油を添加し、ホームベーカリー (Panasonic 社 SD-RBM1001) を用いて調整した。これらの 4 種の植物油に主に含まれる TAG 中の脂肪酸種の

存在比は、各種油を誘導体化した後、ガスクロマトグラフィーを用いて測定した。調整したドウは、 $-25^{\circ}\text{C}$ 下の静止空気中で24時間凍結し、同条件下で1週間貯蔵した後に、 $4^{\circ}\text{C}$ の静止空気下で一晩解凍したのちに、ドウ内の油の分布測定と、グルテン凝集量の測定、およびドウの伸展性の測定を行った。なお、ドウ中の油脂の分布の観察はあらかじめ添加する油脂にナイルレッドもしくは **Lipi-Green** を混ぜておき、染色した油を使ってドウを調整したものから切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察を行った。画像観察の際、澱粉の影響を避けるために小麦を試薬のグルテンに置き換えたものでも観察を行った。

#### 4. 研究成果

豆腐をモデル食品として冷凍貯蔵中の油の分布の変化を観察していったところ、貯蔵を経るほど氷の界面にオイルレッドで強く染まる領域が増加した。また、冷凍貯蔵前に油脂の分布をより不均一にした試料では、貯蔵の早い段階で氷の界面にオイルレッドで強く染まる領域が増加して確認できた。オイルレッドは無極性で脂溶性の染料であるため油脂をはじめとする疎水性領域が強く染まると考えられる。**Control** 試料でのタンパク質の凝集量の増加や硬さの増加は、油の分布の時間的な変化と対応していた。その一方で、意図的に油脂の分布を不均一にして調整した豆腐では、冷凍貯蔵を経ることによってタンパク質の凝集量が **Control** 試料よりもより進む一方で、硬さの増加が抑制されるという現象が見られた。以上の結果より豆腐の冷凍貯蔵内で生ずる油脂を主とする疎水性物質の氷界面への局在とタンパク質の凝集量とは対応があることが確認できた。その一方で、豆腐の油脂の分布の変化やタンパク質の凝集量と硬さの増加とは単純な相関関係にはおらず、豆腐の基本骨格を司るオイルボディとタンパク質のコロイド状の会合体のサイズ分布や、オイルボディとタンパク質のコロイド状の会合体のどの部分に新たな結合が生じているのかというマクロな構造情報を明らかにする必要があることが分かった。

加えて冷凍貯蔵中に生ずるタンパク質の凝集と豆乳中に存在するオイルボディとタンパク質のコロイド状の会合体がどのように関わるのか検討するため、3品種の大豆を用いて豆腐調整前の豆乳を用いて冷凍貯蔵したのち、解凍を経ることで得られる沈殿物と水溶液に遊離してくる固形分を回収して **FT-IR** 測定に供したところ、どの品種から得た豆乳を冷凍貯蔵しても、タンパク質が凝集する結果得られる沈殿物には油脂由来のピークとタンパク質由来のピークが観察されるが、油脂の存在比が圧倒的に大きく、遊離してくる成分では、タンパク質と油脂の比率でみると油脂の存在比が少なくなることが確認できた。また沈殿物と遊離物で確認できるタンパク質と油脂のピーク比率は豆乳調整に供した大豆の品種によって若干異なっていた。また、それぞれの沈殿物と遊離物を **SDS-PAGE** に供して組成を確認したところ、沈殿物と遊離物に分配されるタンパク質のサブユニットは異なるが、これらは大きく豆乳調整に使用した大豆の品種の影響を受けることが分かった。

以上の結果を総合すると、冷凍貯蔵を経ることで豆腐内では、油-タンパク質会合体を形成しているタンパク質同士の結合が生ずると、油すなわちリピットボディ自体はお互いに合一することなく表面吸着しているタンパク質を介してみかけ上高分子化することが分かった。この豆腐内で生ずる油-タンパク質会合体のみかけの高分子化が、豆腐切片内で観察された氷界面の疎水性物質の局在の一因ではないかと考えられる。また凍結貯蔵時に生ずるタンパク質の凝集に対する油脂の役割は、凝集を単純に促進または抑制するというよりも相互補完関係にあるのではないかと予想される。すなわち、油脂（リピットボディ）の表面に吸着しているとされるタンパク質が凝集していく結果として油も高分子化する一方で、冷凍貯蔵前の油脂（リピットボディ）へのタンパク質の吸着の状態によってどのようなタンパク質が凝集していくのかを制御しうる可能性が考えられる。今後、この詳細な機構を検討する必要がある。

次に、別の食品モデルとして小麦ドウを用いて検討を行った。小麦ドウには、**TAG** の構成脂肪酸種の異なる4種類の植物油を添加して検討を行った。その結果、**TAG** 中の不飽和脂肪酸量が多いほど、グルテンタンパク質との凝集形成が促進される傾向が見られ、豆腐や豆乳のように冷凍貯蔵前の段階で油脂とタンパク質が規則的な構造を持っていない場合でも、油とタンパク質になんらかの相互作用があることが確認できた。その一方で小麦ドウ内での油の分布は、豆腐と異なり変化しない様子が確認できた。この現象は小麦ドウだけでなく、グルテンと油の混合物の状態観察からも確認できた。さらに、**TAG** 中の不飽和脂肪酸量が多い小麦ドウほど冷凍貯蔵後の伸展性が乏しく、そこから焼成されるパン生地の内層は厚さを増すことが明らかとなり、油の存在が、低温貯蔵下でのタンパク質の凝集形成を通じて、解凍物のテクスチャーを変え、さらにはドウの最終品質にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

以上の結果を総合すると、やはり先の豆腐内で観察された油脂の局在化は、もともと冷凍前の状態でタンパク質と油脂が会合体を形成し、規則的な構造を有していたところに、油脂表面吸着タンパク質の凝集がすすむことで油脂同士の近接を生じさせたためであると考えられる。その一方で今回の結果からは油脂が分布を変化させなくとも、間接的にタンパク質の凝集に影響を及ぼすことが分かった。加えて、解凍小麦ドウのテクスチャーにも影響を及ぼすことが分かった。豆腐をモデルとした結果と小麦ドウの結果からも、タンパク質の凝集形成に対する油脂の役割と、マクロなテクスチャーに対する油脂の役割を分けて体系的に整理する必要があることが分かった。加えて、冷凍貯蔵前の食品内でのタンパク質と油脂の構造と相互作用を把握しておくこ

とが、冷凍貯蔵時のタンパク質の凝集やテクスチャーの変化といった品質変化への理解につながる事が分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林りか
2. 発表標題 豆腐の低温エージングにおける油脂の役割
3. 学会等名 第30回食品ハイドロコロイドシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 りか, 永井 友梨, 尾関 亜海, 川井 清司, 石黒 貴寛, 竹永 章生, 鈴木 徹
2. 発表標題 冷凍貯蔵過程におけるゲル状食品のテクスチャー変化に寄与する緒因子の検討
3. 学会等名 日本冷凍空調学会2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 りか
2. 発表標題 冷凍貯蔵下でのパン生地劣化挙動に対する添加油の役割の検討
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第68回大会 研究小集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------