様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　４　月　１９　日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４５０１７９

研究課題名（和文）高品質加圧ゲル状食品の製造条件とその体系化

研究課題名（英文）Study of processing condition and systematization for high-quality pressurized gel foods

研究代表者
井倉　則之（Igura, Noriyuki）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：３０２６０７２２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：　香気成分添加によるオボアルブミン加圧ゲルのテクスチャー変化は、オボアルブミン分子間の疎水性相互作用およびジスルフィド結合の増加に起因することが明らかとなった。特にオボアルブミン分子間ジスルフィド結合がテクスチャー変化に大きく寄与していた。また、ジスルフィド結合の増加は香気成分がオボアルブミン分子のSH基の露出を促進することによるものだと示唆された。
　また、香気成分添加によるテクスチャー変化の体系化を目指したところ、かたさの増加はlogP、分子量、炭素数と高い相関を示すことが明らかとなった。このことから、添加する香気成分の化学特性によって、かたさの推定が可能となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We revealed that the textural changes of pressurized ovalbumin gel by addition of flavor compounds were associated with increase in hydrophobic interaction and disulfide bonds between ovalbumin molecules. Especially, the disulfide bonds between ovalbumin molecules more affected the texture changes rather than the hydrophobic interaction. It was proposed that the flavor compounds promote the exposure of SH groups in ovalbumin molecules, causing the increase in disulfide bonds.
In the systematization of the change in texture by addition of flavor compounds, there are high correlations between increase in hardness of pressurized gel and logP, molecular weight, and the number of carbon. From these results, it is proposed that the hardness of pressurized gel can be estimated by the chemical properties of flavor compounds added.

研究分野：食品工学

キーワード：ゲル　高静水圧処理

１．研究開始当初の背景

近年、高齢者人口の増加に伴い特別用途食品の内、えん下困難者用食品の需要が高まっている。この特別用途食品の基準は、従来は硬さのみが対象となっていたが、2009 年の厚生労働省の指針により、硬さだけでなく付着性、凝集性にも基準が設けられるようになった。

一方、加圧処理によるタンパク質の変性やゲル化に関する研究で、加圧処理により得られたタンパク質ゲル（加圧ゲル）は加熱処理によるゲル（加熱ゲル）よりも「軟らかい」との報告がなされている。そこで、申請者はオボアルブミン（OVA）を用いて同程度の硬さとなるように調製した加熱ゲル（70℃・20 分間）と加圧ゲル（600MPa・5 分間）の付着性および凝集性を測定した。その結果、加圧ゲルの付着性および凝集性は加熱ゲルよりも低い値を示し、えん下困難者用食品として適した物性を有していた。このことから、加圧処理はえん下困難者用食品の製造に適した処理だと考え、申請者は数種のタンパク質の加圧ゲル物性、ならびに添加物の影響について検討を行ってきた。

これまでの検討において、加圧処理は、非加熱殺菌が可能なため熱に敏感な成分の保持が可能であるだけでなく、加圧処理によるタンパク質ゲルは加熱処理によるゲルとは異なる物性を有しており、新規食品の製造が期待される。また、タンパク質溶液中への塩類、多糖類、香気成分の添加は形成されるゲルの品質（物性、構造等）に影響を与え、その影響は加圧ゲルと加熱ゲルとでは異なることを明らかにしてきた。

２．研究の目的

そこで本研究では、先ず、より詳細にオボアルブミンのテクスチャー変化について検討するために、示差走査熱量測定（DSC）、分子表面の疎水度、還元および非還元下での SDS-PAGE、SH 基ブロックゲルのテクスチャー測定、SH 基の定量を行なうことで、香気成分が加圧ゲルのテクスチャーを変化させる機構の検討を試みた。

次に、添加物の化学的性質が加圧ゲルの品質に及ぼす影響について詳細な基礎的データを収集し、その基礎的データを用いた統計解析により、組成や処理条件とゲルの品質との体系化を図ることを目的とした。

３．研究の方法

（1）試料

粗精製オボアルブミン（ゲルの主成分として使用）

添加物として、以下の 33 種類の香気成分を、オボアルブミン水溶液中の香気成分終濃度が 0.8mM となるようにエタノールに溶解させた。

・アルデヒド類９種（ヘキサナール、オクタナール、ノナナール、デカナール、ベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド、シンナムアルデヒド、ピペロナール、trans-2-ヘキセナール）
・アルコール類８種（1-ヘキサノール、1-オクタノール、1-デカノール、R-2-オクタノール、S-2-オクタノール、オイゲノール、リナロール、フィトール）
・ケトン類７種（3-ヘキサノン、2-オクタノン、3-オクタノン、3-デカノン、α-イオノン、β-イオノン、アセトフェノン）
・カルボン酸類５種（ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、リノール酸、リノレン酸）
・エステル類３種（ブタン酸エチル、ヘキサン酸エチル、オクタン酸エチル）
・アルカン類１種（オクタン）

（2）サンプル調製

終濃度 15%（w/w）のオボアルブミン（OVA）溶液を調製し、ガーゼろ過して溶け残ったものを取り除いた。この OVA 溶液に香気成分エタノール溶液を加えたものをサンプル溶液とした。

（3）各種処理試験

調製したサンプル溶液をポリエチレンバッグに 30 g ずつ分注し、ヒートシールしたものを以下の条件で処理した。加圧処理：600 MPa，7 分間の加圧処理を行った。処理前の圧力媒体温度は 20 ℃とした。加熱処理：70 ℃,10 分間の加熱処理を行った。なお、本条件は多糖類および香気成分のいずれも添加していない OVA ゲルのかたさがほぼ同程度となるように設定した。

（4）テクスチャー測定

レオメーターを用いた等速の２回圧縮試験（テクスチャー試験）により測定した。ゲル化した処理サンプルをゲルの高さが 10 ㎜となるように切断、採取した。測定にはクリープメーターRHEONER RE-3305（山電製）を用い、各ゲル化サンプルのかたさ、凝集性、及び付着性を測定した。

（5）示差走査熱量（DSC）測定

処理したサンプル（未添加、オクタナール添加、オクタノール添加）を Ag 製容量 70 μg のパンに充填した。リファレンスとして脱イオン水も同様に充填した。その後、サンプルとリファレンスを DSC120（セイコー電子工業製）に供した。昇温速度を 1℃/min とし、30℃から 110℃まで DSC 測定を行った。

（6）表面疎水性測定

8-Anilino-1-naphthalenesulfonate（ANS）を 8 mM となるように、30 mM リン酸バッファー（pH 7）に溶解させたものを ANS 溶液とし、加熱あるいは加圧処理したサンプルを脱イオン水で 100 倍に希釈した処理液 3 mL に ANS 溶液 15 μL を添加し、撹拌した後、15 分間暗所で静置した。その後、RF-5300

（Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan）を用いて、励起波長 390 nm、蛍光波長 470 nm で蛍光強度を測定し、その値を疎水度とした。

（7）SH 基量測定

Ellman 法に基づいて、加熱あるいは加圧処理したサンプル中の総 SH 基量及び分子表面に露出した SH 基量を測定した。加熱あるいは加圧処理したサンプルを脱イオン水で 10 倍希釈し、SH 基総量用バッファーあるいは SH 基露出部用バッファーと 1:1 で混合した。それらに DTNB 溶液を添加し、40℃、15 分間、恒温槽で加温した。その後、19,900 ×g、15 分間遠心分離を行い、上清を UV-1700（島津製作所製）を用いて 412 nm で吸光度測定して SH 基量を算出した。

## ４．研究成果

（1）加圧及び加熱処理によるオボアルブミンの変性に及ぼす香気成分添加の影響

示差走査熱量計（DSC）は、温度を一定速度で変化させ、分子の温度変性に伴う熱の出入りを測定する解析方法である。タンパク質分子に用いた場合、未変性状態のタンパク質分子は、DSC による温度上昇に伴い変性状態に遷移する。この際に、タンパク質分子は吸熱反応を起こす。したがって、加圧処理および加熱処理後の未変性タンパク質量は吸熱反応のピーク面積と比例する。これにより加圧処理および加熱処理により形成したオボアルブミンゲルの変性の程度を検討することが可能となる。DSC 解析の結果を図１に示した。加圧処理、加熱処理により、未処理と比較した場合に吸熱ピーク面積が減少した。また、加圧処理は加熱処理よりも吸熱ピーク面積が減少していた。しかし、いずれの処理においてもオクタナール、オクタノール添加と未添加を比較した場合に、吸熱ピークに変化はなかった。

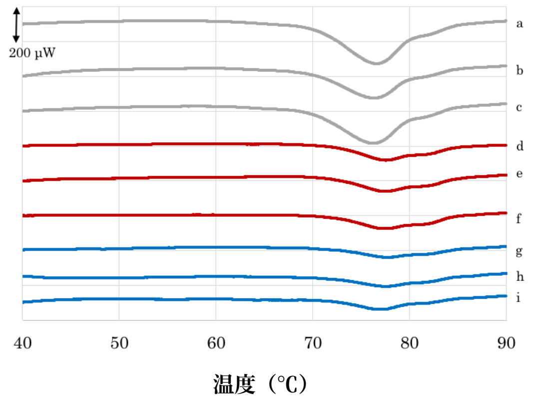



図１　オボアルブミン水溶液の未処理（a、b、c）、加熱処理（d、e、f）、加圧処理（g、h、i）サンプルの DSC 曲線。香気成分未添加（a、d、g）、オクタナール添加（b、e、h）、オクタノール添加（c、f、i）

加圧処理、加熱処理による吸熱ピーク面積の減少は、タンパク質の変性が進行したことを示している。加圧処理が加熱処理よりも吸熱ピーク面積が減少していたことから、加圧処理の方がより変性が進行していることが示された。つまり、熱変性と圧力変性が同程度進行している場合においては、熱変性のタンパク質がより強固なゲルを形成するということである。また、オクタナール、オクタノールの添加による吸熱ピーク面積が減少していなかったことから、香気成分による変性は認められなかった。したがって、香気成分添加によるテクスチャー変化は疎水性相互作用、ジスルフィド結合などの別の要因に起因することが示された。この結果を受け、以降は疎水性相互作用、ジスルフィド結合に関する検討を行った。

（2）加圧及び加熱処理によるオボアルブミンの表面疎水度の変化

疎水性相互作用は、タンパク質の疎水性アミノ酸残基同士の相互作用であると考えられている。水溶液では表面に親水性アミノ酸残基、内部に疎水性アミノ酸残基が埋没しているが、加熱処理や加圧処理などの構造の変化に伴って、疎水性アミノ酸残基が表面に露出することが知られている。この表面に露出した疎水性アミノ酸残基同士が分子間の疎水性相互作用を増強することで、タンパク質の凝集が促進されると考えられている。

図２に加圧及び加熱処理を行ったオボアルブミンの表面疎水度の変化を示した。加熱処理、加圧処理において、未処理と比較した場合に大幅に疎水度が増加した。未処理、加熱処理においては、香気成分添加による変化は認められなかったが、加圧処理においてはオクタナール、オクタノール添加により疎水度が有意に増加した。

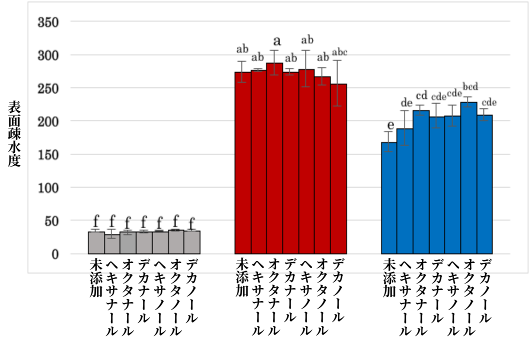


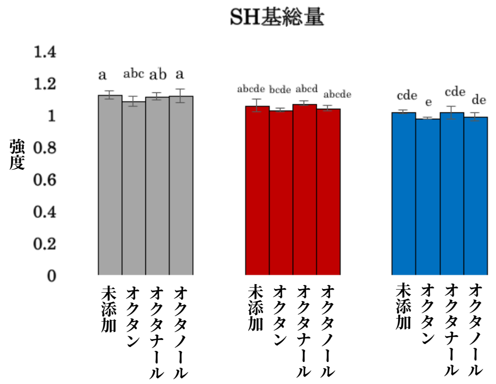

図 2　■未処理、■加熱処理、■加圧処理した場合の香気成分添加オボアルブミン分子の表面疎水度。異なる記号は有意差（$p<0.01$）を表す。

加熱処理、加圧処理による疎水度の増加は、オボアルブミン分子内部に存在する疎水性アミノ酸残基の露出によるものである。また、加圧処理における疎水度の増加についても、疎水性アミノ酸残基の露出に起因していると考えられる。このことから、加圧処理における香気成分添加は、疎水性アミノ酸残基の露出を促進するということが推察された。オボアルブミンにおいて加圧処理中にタンパク質コア中の疎水性相互作用が弱まり、結果

として疎水性アミノ酸残基が露出するという報告がある。これは、体積が増加した場合に疎水性相互作用が生じるので圧力による体積減少が疎水性相互作用を弱めることによる。今回の検討において、香気成分が疎水性相互作用を弱めている可能性がある。その結果として、疎水性アミノ酸残基の露出が生じている可能性が高い。タンパク質の圧力変性はそのタンパク質が有するキャビティに依存することが報告されている。香気成分が疎水性相互作用により疎水性コアに結合していることはβラクトグロブリンと香気成分の結合に関する報告から推測するに間違いないであろう。したがって、香気成分はオボアルブミン分子の疎水性コアに侵入し、周囲の疎水性アミノ酸残基に働きかけ、露出を促進していると考えられる。

（3）加圧及び加熱処理が SH 基量に及ぼす影響

タンパク質は加熱処理、加圧処理することにより SH 基が分子表面に露出することが一般に知られている。また、タンパク質のジスルフィド結合について、立体構造を取り、2つの SH 基が溶媒に露出した状態で接近すると形成されやすいこと、立体構造形成の結果、SH 基が分子内部に埋まっている場合はきわめて形成されにくいことが報告されている。また、加熱処理、加圧処理によりジスルフィド結合が形成し、SH 基総量が減少することが報告されている。



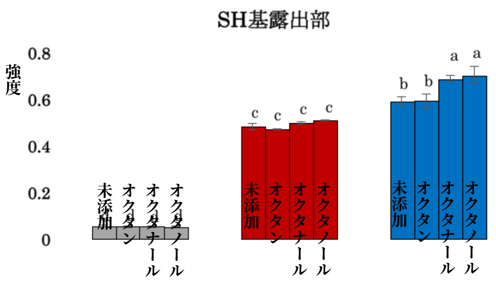




図 3　■未処理、■加熱処理、■加圧処理した場合のオボアルブミン分子の SH 基量。異なる記号は有意差（p<0.01）を表す。

SH 基の定量の結果を図 3 に示した。SH 基総量の結果について、未処理、加熱処理、加圧処理のいずれの処理においても香気成分添加による SH 基量の変化は認められなかった。SH 基露出部の結果について、加熱処理、加圧処理により未処理と比較して SH 基量が増加した。未処理、加熱処理において香気成分添加による変化は認められなかった一方で加圧処理においてオクタナール、オクタノールの添加により、未添加、オクタンと比較して SH 基量が有意に増加した。

まず、加熱処理、加圧処理により SH 基露出部が増加したのは、未変性状態ではオボアルブミン分子内部に存在している SH 基が各処理によって表面に露出したためと考えられる。加圧処理におけるオクタナール、オクタノールの添加により SH 基量が増加したことから、オクタナール、オクタノールはオボアルブミン分子内に存在している SH 基の露出を促進することを示している。２つの SH 基が溶媒に露出した状態で接近するとジスルフィド結合が形成されやすいという報告があることから、露出を促進することでジスルフィド結合の形成を促進することが示唆された。

（4）香気成分の化学特性とかたさとの相関

香気成分の添加によって、加圧ゲルのかたさは増加するが、増加の程度は香気成分の種類によって様々であった。(1.0 倍～2.0 倍) 特に官能基や鎖長によってかたさに及ぼす影響は大きく異なっており、オクタナール、α-イオノン、β-イオノン、リノール酸、リノレン酸等はかたさの増加が特に大きく、1－ヘキサノール、フィトール、3－ヘキサノン、ヘキサン酸、オクタン等はかたさの増加が特に小さかった。一方、加熱ゲルにおいては、香気成分の添加によってかたさに大きな変化は認められなかった。これらの結果を基に、各香気成分の化学特性とかたさの相関を調査した。

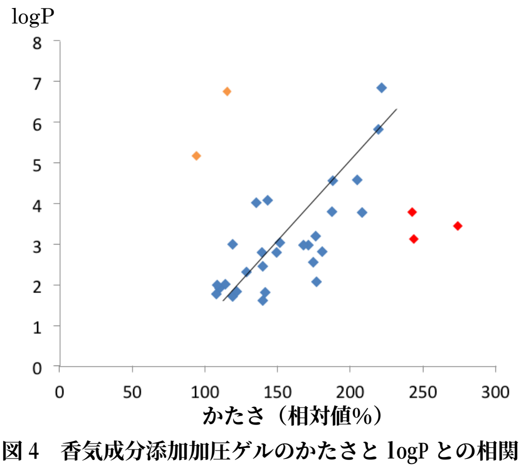



図 4　香気成分添加加圧ゲルのかたさと logP との相関

先ず、logP とかたさとの相関をとった結果（図 4）、オクタナール、フィトール、α-イオノン、β-イオノン、オクタンが相関から

外れた。またこれらの香気成分を除外して $R^2$ 値（決定係数）を算出したところ、$R^2$=0.6047 の相関を示した。

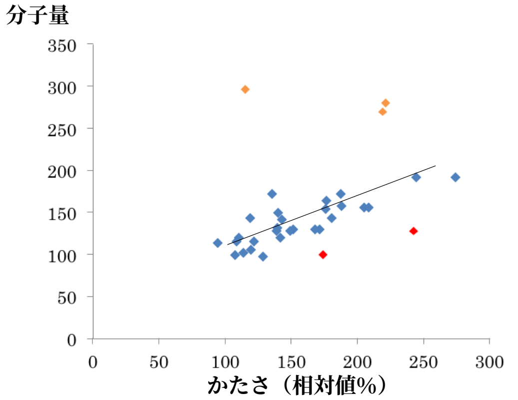



図 5　香気成分添加加圧ゲルのかたさと分子量との相関

次に、分子量とかたさとの相関をとった結果、リノール酸、リノレン酸、ヘキサナール、オクタノール、オクタンが相関から外れた。（図 5）またこれらの香気成分を除外して $R^2$ 値を算出したところ、$R^2$=0.6735 の相関を示した。

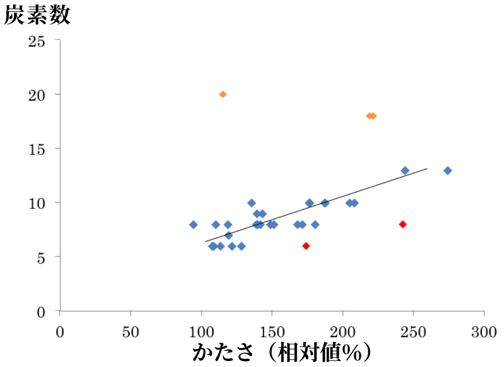



図 6　香気成分添加加圧ゲルのかたさと炭素数との相関

炭素数とかたさとの相関をとった結果、オクタナール、フィトール、α-イオノン、β-イオノン、オクタンが相関から外れた。(図 6) またこれらの香気成分を除外して $R^2$ 値を算出したところ、$R^2$=0.7252 の相関を示した。

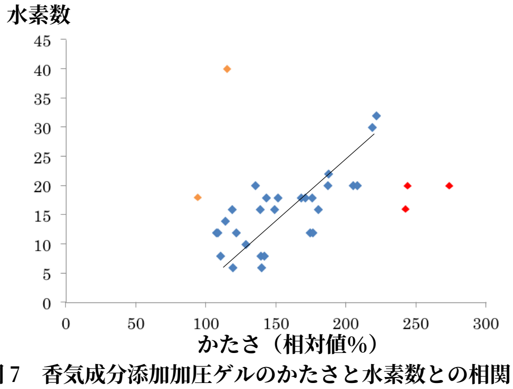



図 7　香気成分添加加圧ゲルのかたさと水素数との相関

水素数とかたさとの相関をとった結果、リノール酸、リノレン酸、ヘキサナール、オクタノール、オクタンが相関から外れた。(図 7) またこれらの香気成分を除外して $R^2$ 値を算出したところ、$R^2$=0.4615 の相関を示した。

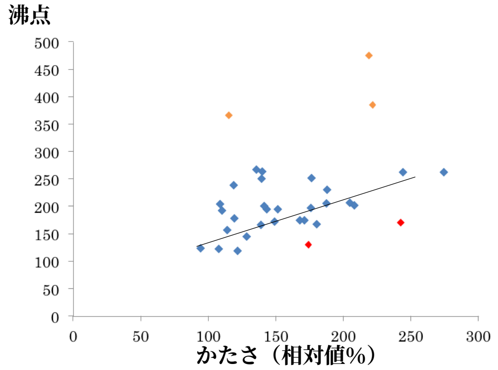



図 8　香気成分添加加圧ゲルのかたさと沸点との相関

最後に、沸点とかたさとの相関をとった結果、リノール酸、リノレン酸、ヘキサナール、オクタノール、オクタンが相関から外れた。（図 8）またこれらの香気成分を除外して $R^2$ 値を算出したところ、$R^2$=0.2549 の相関を示した。

今回検討を行った香気成分においては、そのほとんどで加圧ゲルのかたさを増加させる傾向が見られた。しかしオクタンにおいては、かたさがほとんど増加しなかった。今回用いた 33 種類の香気成分のうちオクタンだけが親水基を持たないことから、親水基の有無がかたさの増加に影響すると示唆された。また、ヘキサナール、オクタナール、α-イオノン、β-イオノンにおいてかたさの増加が大きかったことから、アルデヒド基および六員環構造を持つ香気成分においてかたさの増加の程度が大きくなると示唆された。1－ヘキサノール、3－ヘキサノン、ヘキサン酸など炭素鎖が短い香気成分ほど、かたさの増加の程度が小さいという傾向があり、官能基だけでなく炭素鎖の影響も受けるということが考えられた。

かたさの増加と香気成分の化学特性とを比較したとき、logP、分子量、炭素数において高い $R^2$ 値を示した。これらの化学特性が相関を示した理由として、加圧ゲルの変性に疎水性、親水性が関係していること、分子量や炭素数が炭素鎖に関係した値であることが考えられた。また、相関がとれなかった香気成分について、フィトール、リノレン酸、リノール酸、α-イオノン、β-イオノンにおいては、炭素数が 13 以上であり、炭素数が多いためと考えられた。次に、オクタンについては、親水基を持っておらず、かたさが変化しなかったため相関から外れたと考えられた。ヘキサナール、オクタナールは今回用いた化学特性の値の小ささに比べ、かたさの増加幅が極めて大きいため相関から外れたと考えられた。

以上示してきたように、香気成分添加によるオボアルブミン加圧ゲルのテクスチャー変化は、オボアルブミン分子間の疎水性相互作用およびジスルフィド結合の増加に起因

することが明らかとなった。特にオボアルブミン分子間ジスルフィド結合がテクスチャー変化に大きく寄与していることが明らかとなった。また、ジスルフィド結合の増加は香気成分がオボアルブミン分子の SH 基の露出を促進することによるものだと示唆された。

また、香気成分添加によるテクスチャー変化の体系化を目指したところ、かたさの増加は logP、分子量、炭素数と高い相関を示すことが明らかとなった。このことから、添加する香気成分の化学特性によって、かたさの増加の推定が可能となることが示唆された。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 5 件）

①石井 智大，稲葉 裕貴，野間誠司，井倉 則之，下田 満哉，香気成分および界面活性剤がオボアルブミン加圧ゲルの品質に及ぼす影響，第 63 回日本食品科学工学会全国大会，2016.08.26.名城大学（愛知・名古屋）

②稲葉 裕貴，井倉 則之，下田 満哉，香気成分の鎖長および官能基がオボアルブミン加圧ゲルのテクスチャーに及ぼす影響，平成 27 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会，2015.10.31.ネストホテル那覇（沖縄・那覇）

③石井 智大，稲葉 裕貴，井倉 則之，下田 満哉，香気成分およびエマルションがオボアルブミン加圧ゲルのテクスチャーに及ぼす影響，第 33 回九州分析化学若手の会夏季セミナー，2015.07.24.亀屋ホテル（熊本・上天草）

④稲葉 裕貴，川畑 翔太，野間 誠司，井倉 則之，下田 満哉，香気成分添加によるオボアルブミン加圧ゲルのテクスチャー変化，第 51 回化学関連支部合同九州大会，2014.06.28. 北九州市国際会議場（福岡・北九州）

６．研究組織

(1)研究代表者

井倉　則之（IGURA NORIYUKI）
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：３０２６０７２２

(2)研究協力者

①稲葉 裕貴（INABA YUKI）
九州大学・大学院生物資源環境科学府・修士課程

②石井 智大（ISHII TOMOHIRO）
九州大学・大学院生物資源環境科学府・修士課程