日本食品保蔵科学会誌

VOL. 42 NO. 2

会 長	高井:	陸雄	副 会 長	太田 英明	小宮山美弘	早坂	薫
編集委員長	大田 太田	英明					
編集委員	稲熊	隆博	井上 茂孝	今堀 義洋	恩田 匠	竹永	章生
	古庄	律	松田 茂樹	宮本 敬久			

<報 文>

<技術報告>

<技術報告> (英文)

イヨカン果実における組織内ガス拡散抵抗測定法の改良とガス拡散抵抗値の特性…………………………(71) /ディルパン アンディ・疋田慶夫・森松和也

<総 説>

果実由来の機能性成分によるメタボリックシンドローム予防および改善に関する研究……………(79) /岸田邦博

<文献抄	▶録>	(87)
<本会記]事>	(88)
<会	告>	(89)

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 42 NO. 2 (2016)

<Article> (Japanese)

Effect of Temperature and Pressure Intensity on the Formation Mechanism and Microstructure of Pressure-induced Hen Egg Yolk Gel KOIZUMI Ryosuke, IRISAWA Tomohiro, TADA Kotaro and SUZUKI Toshiro	51)
Moisture Content Prediction of Dried Cooked Rice during Drying, Preservation, and Water Sorption KOIDE Shoji, ORIKASA Takahiro, KOIDE Fuyuna, MURAMATSU Yoshiki and TAGAWA Akio	on 59)
<technical report=""> (Japanese)</technical>	
Effect of High-Pressure Processing on β-lactoglobulin Gel Formation at Low to Medium Temperatures KOIZUMI Ryosuke, IRISAWA Tomohiro, TADA Kotaro and SUZUKI Toshiro	35)
<technical report=""> (English)</technical>	
Improving the Measurement of Resistance to Gas Diffusion and the Resistance Characteristics in Citrus Iyo Fruit (<i>Citrus iyo Hort. ex Tanaka</i>) DIRPAN Andi, HIKIDA Yoshio and MORIMATSU Kazuya	71)
< Review> (Japanese)	
Studies on Prevention and Improvement of Metabolic Syndrome with Functional Compounds in Fruits KISHIDA Kunihiro	79)

卵黄加圧ゲルの形成機構と微細構造に与える 温度と圧力強度の影響

小泉亮輔*[§]·入澤友啓*·多田耕太郎*·鈴木敏郎*

* 東京農業大学農学部

Effect of Temperature and Pressure Intensity on the Formation Mechanism and Microstructure of Pressure-induced Hen Egg Yolk Gel

KOIZUMI Ryosuke, IRISAWA Tomohiro, TADA Kotaro and SUZUKI Toshiro

* Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, 1737 Funako, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0034

The purpose of this study was to examine the mechanism of pressure-induced gel (PG) formation of hen egg yolk. Egg yolk forms gels by high-pressure processing (over 450MPa) at temperatures above 15°C. PG (20°C, 650MPa) showed the highest "Gel Strength" and "Work Done values". Furthermore, these parameters increased with increasing protein concentration. N-ethylmaleimide was used to inhibit formation of PG and heat-induced gels (HG). Result of non-reducing SDS-PAGE showed that apo-LDL from plasma and granule fractions and apo-HDL from granule fraction were the main proteins that form PG and HG. In addition, disulfide bonds play an important role in gel formation; however, there were no significant differences between PG and HG in disulfide bond formation. The structure of PG and HG consisted of a network of fine strands and the surface structure was different between PG and HG as observed by scanning electron microscopy. PG showed a thick and smooth surface, whereas HG showed a thin and rough surface. These results suggested that PG formation of hen egg yolk occurred via disulfide bond formation. Therefore, the physicochemical characteristics of PG were much different from those of HG.

(Received Aug. 26, 2015; Accepted Dec. 22, 2015)

Key words: yolk, high-pressure processing, gelation, microstructure 卵黄,高圧処理,ゲル, 微細構造

鶏卵はほぼすべての栄養素をバランスよく含んだ完全 栄養食品と言われ¹⁾,世界で広く食され,日本において も6世紀頃にはすでに食されており²⁾,高い栄養を摂取 できる食品として知られている。特に卵黄はタンパク質 を16.5%,脂肪を33.5%含み³⁾,アミノ酸スコアが100を 示す⁴⁾栄養価の高い食品である。また,脂質の大部分は タンパク質と結合したリポタンパク質を形成している³⁾。 リポタンパク質は高密度リポタンパク質 (HDL),低密 度リポタンパク質 (LDL)および超低密度リポタンパ ク質 (VLDL) に分類される⁵⁾。これらのリポタンパク 質は高いゲル形成能⁶⁰と乳化性を有する³¹ことから,鶏卵 黄は加工食品などに広く利用されている。

一方,食品に加圧処理を行うと加熱処理と異なるメカ ニズムでゲルの特性や物性に変化が生じることが明らか そこで、本報告では卵黄に加圧処理を行い形成される 卵黄ゲルの形成条件、ゲル形成に関与するタンパク質間 相互作用およびゲルの微細構造を明らかにすることを目 的として試験を行った。

にされ、特にタンパク質食品への加圧処理ではタンパク 質の立体構造を維持する非共有結合の開裂や生成が起こ り、加熱処理とは異なった変化を示す"。実際に加圧処 理された卵黄は生の状態の色を保持しつつ、破断しづら く、伸展性に富んだゲルを形成する^{8),9)}。また、官能評 価では光沢、弾力性および味などで加熱したものより高 い評価を得ている¹⁰⁾。しかし、卵黄の加圧処理によるゲ ル形成の至適条件や形成機構などの報告はほとんどみら れない。

^{* 〒243-0034} 神奈川県厚木市船子1737

[§] Corresponding author, E-mail: rk203116@nodai.ac.jp

試料および実験方法

1. 試料の調製

(1)卵黄試料の調製 市販鶏卵を割卵し,卵黄部と 卵白部に分離した後,ろ紙を用いて卵黄膜についた卵白 およびカラザを除去した。卵黄膜をメスで破り,卵黄の みを回収し,攪拌したものを試料とした。卵黄のタンパ ク質濃度はマクロ改良ケルダール法¹¹¹を用いて測定し, タンパク質濃度が100,125および150mg/gになるように 純水を用いて調整した。

(2)加圧処理および加熱処理 卵黄はプラスチック 容器(内径14mm,高さ31mm)に気泡が入らないよう充填, 密封した後,食品用高圧処理装置(Dr.CHEF,神戸製 鋼所)を用い,加圧処理を行った。すなわち,加圧処理 時の温度を0,5,10,15および20℃に設定し,圧力強 度は50MPa間隔で200~650MPaまで設定した後,卵黄 に15分間の加圧処理を行った試料を試験区(加圧ゲル) とした。また,卵黄をプラスチック容器ごと80℃の恒温 水槽中で30分間加熱処理を行った¹²⁾試料を対照区(加熱 ゲル)とした。加圧処理および加熱処理後の試料は流水 中で15分間冷却し,さらに保冷庫(4℃)で8時間静置 した後に各試験に供した。

2. ゲル強度およびワークダン値の測定

試料はプラスチック容器に入れたまま試料温度を室温 (約25℃)に戻した後,物性測定機(5543型, Instron) を用いてゲル強度(GS)およびワークダン値(WD)の 測定を行った。すなわち,±50Nのロードセルを使用し, 直径6.5mmのプランジャーを用いて圧縮速度50mm/min, 挿入率50%の条件で測定した。なお,GSとWDの解析は 解析ソフト(Bluehill2, Instron)を用いて行った。

3. 卵黄加圧ゲルの形成条件の検討

(1) 加圧処理時の温度の影響 加圧処理時の温度の 影響を調べるために、タンパク質濃度を150mg/gに調整 した卵黄を用いて、加圧処理時の温度を0、5、10、15 および20℃に設定し、圧力強度600MPaにて加圧処理を 行い、得られたゲルのGSおよびWDを測定した。

(2) 圧力強度とタンパク質濃度の影響
 加圧ゲルの
 至適形成条件を調べるために、タンパク質濃度を100,
 125および150mg/gに調整した卵黄を用いて、20℃で200
 ~650MPa(50MPa間隔)の圧力強度で加圧処理を行い、
 得られたゲルのGSおよびWDを測定した。

4. N-ethylmaleimide添加の影響

タンパク質濃度を125mg/gに調整した卵黄に対し、ス ルフヒドリル基(SH基)保護剤であるN-ethylmaleimide (NEM)を2~10および20mM(10mMまで2mM間隔 で添加)添加し、攪拌混合後、一晩保冷庫で静置し、20 ℃で650MPaの加圧処理を行い、得られたゲルのGSおよ びWDを測定した。また、対照区として同様にNEMを 添加した加熱ゲルも調製した。

5. 卵黄加圧ゲルの構成タンパク質の検出

加圧ゲルの形成に関与するタンパク質の検出を行うた め卵黄、プラズマおよびグラニュールを試料とし、還元 (ME+) および非還元 (ME-) 状態でSDS-ポリアクリ ルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) による分析¹³⁾を行った。 すなわち,各試料に0,5,10,15および20℃で600MPa の加圧処理または80℃の加熱処理を行った後、2%ドデ シル硫酸ナトリウム (SDS) および6M尿素を含む0.1 Mトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)-塩酸 (pH6.8) 溶液に溶解したものを非還元試料とし、2% SDS, 6 M尿素および2% 2-Mercaptoethanol (2-ME) を含む0.1M Tris-塩酸 (pH6.8) 溶液に溶解したものを 還元試料とした。ゲルはポリアクリルアミド濃度5~ 20%のグラジエントゲル(E-T520L, アトー)を用い, 分子量マーカー (Precision Plus ProteinUnstained Standards, BIO-RAD) と各試料をゲル1枚あたり20mA で泳動した。染色はクーマーシーブリリアントブルー (CBB) 染色液(高感度CBB染色キット,アプロサイエ ンス)を用いて行った。ゲルの撮影はゲル撮影装置(E-Graph AE-9000, アトー)を用い, 分子量および染色強 度の解析は解析ソフト (CS Analyzer3.0, アトー)を 用いて行った。また、プラズマとグラニュールはRAJU らの方法¹⁴に従い,分画した。すなわち,卵黄に等量の 純水を加え攪拌後,遠心分離(27,000×g,60分,4 ℃)し、上清をプラズマ、沈殿をグラニュールとした。

6. 卵黄加圧ゲルの溶解試験

加圧ゲルの溶解性を調べるために0.6M塩化ナトリウ ム (NaCl) 溶液 (S1), 0.6M NaClおよび1.5M尿素溶 液 (S2), 0.6M NaClおよび 8 M尿素溶液 (S3), 0.6M NaCl, 8 M尿素および0.5M 2-ME溶液 (S4) の4 種類 のゲル溶解液¹⁵⁾を調製した(Table 1)。なお,それぞれ の溶液は0.1M塩酸溶液あるいは水酸化ナトリウム溶液 を用いてpH7.0に調整した。溶解試験にはタンパク質濃 度150mg/gに調整した加圧ゲル(20℃, 650MPa)およ び加熱ゲルを用いた。すなわち、Pérez-MATEOSらの方 法¹⁶に従い,まずゲル3gに純水を10ml加え,ホモジナ イズ (9,000rpm, 1分) (T18 ULTRA-TURRAX, IKA) した。次に4℃で1時間振盪攪拌した後,遠心分離 (34,780×g,15分,4℃)を行い,上清を回収し,こ れを一連の操作とした。さらに沈殿物に対しS1を加え て上記の一連の操作を行い、上清を回収した。以後、得 られる沈殿物に対し同様の操作をS2,S3およびS4を 加えて行い、最終的な沈殿物を不溶性画分とした。ただ し、S3とS4は同様の操作を2回繰り返し行った。各 段階で得られた上清は純水を外液とし、48時間透析した 後、タンパク質濃度をマクロ改良ケルダール法心により 測定した。各溶液に溶解した卵黄ゲルのタンパク質量を 算出し、各ゲル溶解液への溶解率を求めた。

〔胡

		Protein-protein interaction					
	Gel dissolving solution	Ionic bond	Hydrogen bond	Hydrophobic interaction	Disulfide bond		
S1	0.6M NaCl	×					
S2	0.6M NaCl+1.5M Urea	×	×				
S3	0.6M NaCl+8.0M Urea	×	×	×			
S4	0.6M NaCl+8.0M Urea+0.5M 2-ME	×	×	×	×		

Table 1 Effect of each solution on protein-protein interaction

× : protein-protein interaction cleavage

2-ME: 2-Mercaptoethnol

7. 走査電子顕微鏡による卵黄加圧ゲルの微細構造の観 察

卵黄ゲルの微細構造観察には森口ら¹⁷⁾の方法に従って 調製した加圧ゲル(150mg/g, 20℃, 650MPa)および 加熱ゲル(150mg/g, 80℃, 0.1MPa)の試料を用いた。 試料の割断面を観察面とし,白金コーティングを行い, 超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)(SU 8010,日立ハイテクノロジーズ)により卵黄ゲルの微細 構造を観察した。

8. 統計処理

統計処理は統計ソフト(エクセル統計2015,社会情報 サービス)を用いてGSおよびWDについてはTukeyの多 重比較検定(有意水準:p < 0.05)を行った。また,ゲ ルの溶解性についてはWELCHのt-検定(有意水準:p < 0.05)を行った。

実験結果および考察

1. 加圧処理時の温度が卵黄加圧ゲルの形成に与える影響

加圧処理時の温度が卵黄加圧ゲルの形成に与える影響 をTable 2 に示した。加圧処理時の温度 5 ℃以下では加 圧処理を行っても卵黄はゲルを形成せず,粘性が増す程 度であり,GSおよびWDは他の温度より有意に低かった。 しかし,加圧処理時の温度10℃において卵黄のGSおよ びWDは5 ℃以下に比べ有意に増加し,脆弱ではあるが ゲルを形成した。さらに加圧処理時の温度の上昇ととも にGSおよびWDは有意に高くなる傾向を示し,強固なゲ ルを形成した。

同じ圧力強度での加圧処理においても加圧処理時の温 度が異なれば試料に与えるエネルギー量は変化すること が知られており、これに伴い、タンパク質の変性は圧力 と温度の双方が関係することが報告されている^{18),19)}。ま た、同じ圧力強度において加圧処理時の温度が10~50℃ の各温度では温度の上昇に伴い、ゲルの硬さが増加する ことも報告されている⁹⁾。本報告の卵黄の加圧ゲル形成 試験においても、加圧ゲルの形成には圧力強度だけでは なく、加圧処理時の温度が大きく寄与することが明らか となったため、本報告では以降の試験での加圧処理時の 温度は20℃に設定することとした。

2. 圧力強度とタンパク質濃度が卵黄加圧ゲルの形成に 与える影響

20℃での加圧処理における圧力強度とタンパク質濃度 が卵黄加圧ゲルの形成に与える影響をFig.1 a, bに示し た。

タンパク質濃度100mg/gでは450MPa以下の

加圧処 理においてはGSおよびWDの増加はみられず(GS:1.2 ~2.0×10⁻²N, WD: $0.4 \sim 1.6 \times 10^{-3}$ mJ), 500MPaから わずかではあるが値の増加がみられたが(GS:7.0×10⁻² N, WD:7.5×10⁻³mJ), ゲルは形成せず, 650MPaにお いて脆弱なゲルを形成した (GS:0.2N, WD:2.3mJ)。 一方、タンパク質濃度125mg/gでは450MPaからGSおよ びWDは増加し始め (GS:0.1N, WD:1.5mJ), 流動性 を失い、650MPaにおいて自重に耐えうる自立可能なゲ ル(自立ゲル)を形成した(GS:1.1N, WD:11.7mJ)。 タンパク質濃度150mg/gでは、400MPaにおいてGSおよ びWDが増加し始め(GS:0.3N, WD:3.0mJ), 450MPa で自立ゲルを形成した。さらに450から550MPaまで急 激にGSおよびWDは増加し (GS:0.9~6.6N, WD:9.4 ~53.6mJ), 強固な自立ゲルを形成した。その後, 550 から650MPaにかけてもGSおよびWDは増加する傾向を 示し、より強固な自立ゲルを形成した。650MPaでのGS

 Table 2
 Effect of temperature on high-pressure processing (600MPa, 15min) of egg yolk

	Temperature (°C)								
	0	5	10	15	20				
Gel Strength (N)	$0.01\pm0.00^{\rm d}$	$0.03\pm0.00^{\rm d}$	$1.67\pm0.09^{\circ}$	$5.09\pm0.20^{\rm b}$	$6.34 \pm 0.40^{\circ}$				
Work Done (mJ)	$0.10\pm0.00^{\rm d}$	$0.21\pm0.01^{\rm d}$	$14.67\pm0.88^\circ$	$45.15\pm3.05^{\rm b}$	$56.00\pm3.67^{\scriptscriptstyle a}$				

Protein concentration of egg yolk was 150 mg/g.

Value in the same row that are followed by different letters were significant at $p \le 0.05$.



Fig. 1 Effect of pressure intensity and protein concentration on gel strength (a) and work done values (b) of egg yolk

Temperature during high-pressure processing: 20°C; broken line: yolk protein 100mg/g; dotted line: yolk protein 125mg /g; solid line: yolk protein 150mg/g.

およびWD (GS:7.2N, WD:67.5mJ) をタンパク質濃 度間でみると,両値ともに100mg/gに比べ,125mg/gは 約5倍,150mg/gは約35倍高い値を示した。

以上の結果, 圧力強度とタンパク質濃度の増加に伴い GSおよびWDの増加がみられ, 卵黄の加圧ゲル形成には 450MPa以上の圧力強度と125mg/g以上のタンパク質濃 度が必要であることが明らかになった。タンパク質は圧 力強度やタンパク質量の増加に伴い変性が促進するこ と²⁰⁾,410MPaの加圧処理で三次元的網目構造の形成や 示差走査熱量測定による吸熱ピークの消失,500MPaの 加圧処理により卵黄の流動性が失われること^{21),22)}が報告 されている。網目構造の形成や流動性および吸熱ピーク の消失はタンパク質変性によるゲルや凝集体の形成と考 えられることから,本報告においても450MPa以上の圧 力強度でゲルの形成が起こることが示唆された。

3. NEM添加が卵黄加圧ゲルの形成に与える影響

SH基の架橋を阻害するNEMの添加が卵黄加圧ゲルの 形成に与える影響をFig.2 a, bに示した。加圧ゲルは NEM濃度6mMまで添加量の増加に伴いGSおよびWD は減少し,著しくゲルの形成が阻害された。NEM濃度 8mM以上では6mM添加時のGSおよびWDとほとんど



Fig. 2 Effect of N-Ethylmaleimide concentration on gel strength (a) and work done values (b) of pressureinduced and heat-induced egg yolk gels

Protein concentration: 125mg/g; solid line: 20°C, 650MPa, 15 min; broken line: 80°C, 0.1MPa, 30min.

変化はみられなかった。また、対照区の加熱ゲルはNEM 無添加では加圧ゲルを約3倍上回るGSおよびWDを示し たが、加圧ゲルと同様にNEM濃度の増加に伴い、GSお よびWDは急激に減少した。しかし、NEM濃度10mM以 上の添加でも加熱ゲルは加圧ゲルを上回るGSおよびWD を示した。

以上の結果,卵黄にNEMを添加すると,加圧処理お よび加熱処理ともにゲルの形成が著しく阻害されたこと から,卵黄の加圧ゲルおよび加熱ゲルの形成にはジスル フィド(S-S)結合が大きく関与していることが示唆さ れた。これはYANら²³⁾およびLAIら²⁴⁾の鶏卵およびアヒル 卵の卵黄の加圧処理による不溶化がS-S結合による凝集 であるとの推察を支持するものであった。

4. 卵黄加圧ゲルの主要タンパク質の構成

卵黄加圧ゲルの形成にはS-S結合が大きく関与してい ることが推察されたため,S-S結合によって架橋する加 圧ゲルおよび加熱ゲルの構成タンパク質の検出を行った。 Fig. 3に 卵 黄 のSDS-PAGE (ME+, ME-) の 結 果 を Fig. 4にプラズマおよびグラニュールのSDS-PAGE (ME



Fig. 3 SDS-PAGE analysis of egg yolk in reducing (a) and non-reducing (b) gels

M: molecular-weight marker;1:4°C, 0.1MPa;2: 0°C, 600MPa; 3:5°C, 600MPa;4:10°C, 600MPa;5:15°C, 600MPa;6:20°C, 600 MPa;7:80°C, 0.1MPa.



Fig. 4 SDS-PAGE analysis of egg yolk plasma and granule in reducing (c) and non-reducing (d) gels

M : molecular-weight marker; 1 : Plasma, 4℃, 0.1MPa; 2 : Plasma, 20℃, 600MPa; 3 : Plasma, 80℃, 0.1MPa; 4 : Granule, 4℃, 0.1MPa; 5 : Granule, 20℃, 600MPa; 6 : Granule, 80℃, 0.1 MPa.

+, ME-)の結果を示した。還元状態での卵黄は未処理(4℃,0.1MPa),加圧処理(0~20℃,600MPa)および加熱処理(80℃,0.1MPa)の条件の違いにかかわらず、すべての卵黄で同様の泳動結果を示した(Fig.3 1a~7a)。一方、非還元状態では、未処理の試料(Fig.3 1b)は還元状態とほぼ同様な泳動結果を示した

が、0℃,600MPaの処理を行った試料(Fig.3 2b)は 200kDa付近のバンドおよび100kDa付近のバンドの染色 強度の低下が観察された。加圧処理時の温度を上昇させ ることにより、20℃, 600MPaの処理(Fig.3 6b)では 200kDa付近のバンドは消失し、100kDa付近のバンドは 未処理の試料に比べ染色強度が80%程度低下した。ま た、75kDa付近のバンドも染色強度の低下が認められた。 次に, プラズマおよびグラニュール (Fig.4) において はプラズマにみられる75および200kDa付近のバンドは それぞれapo-LDL70およびapo-LDL175と推定され²⁵⁾,グ ラニュールにみられる100kDa付近のバンド (Fig.4) は apo-LDL137とapo-HDL105と推定される²⁵⁾。加熱処理し た卵黄, プラズマおよびグラニュールは (Fig.3 7b; Fig. 4 3d, 6d) 20℃, 600MPaの加圧処理 (Fig. 3 6b; Fig.4 2d, 5d)と同様な泳動結果を示し、上記のapo-LDL やapo-HDLのバンドの染色強度の低下が観察された。

卵黄加熱ゲルの形成にはapo-LDLが関与していること がこれまでに報告されており^{26),27)},プラズマ由来のapo-LDLとグラニュール由来のapo-HDLとapo-LDLが卵黄の ゲル形成の主要なタンパク質とされている。また,SDS -PAGE (ME-)の結果 (Fig.3 1b~7b)から,加圧ゲ ルは加熱ゲルと同様にこれらのタンパク質による分子内 または分子間S-S結合が起こり,高分子量の凝集体とな ったため,バンドの染色強度の低下またはバンドの消失 が起こったと考えられた。apo-LDLやapo-HDLの会合に は15℃以上で高い圧力強度による加圧処理 (Fig.3 5b, 6b)を必要とし,それらによって加圧ゲルの形成が起 きているものと推察された。さらに,強固な加熱ゲルを 形成するにはプラズマとグラニュール間の相互作用が重 要とされており⁶⁰加圧ゲルにおいても加熱ゲルと同様の ことが起こっている可能性が示唆された。

5. 卵黄加圧ゲルの溶解性

各ゲル溶解液への卵黄加圧ゲルの溶解率をFig.5に示 した。加圧ゲルおよび加熱ゲルはS4への溶解率が最も 高く,いずれも約80%を示し,両ゲルの間に有意な差は みられなかった。次にS3への溶解率が高くそれぞれ約 10%程度を示し,有意な差は認められなかった。また, 水溶性画分はそれぞれ3%程度,S2への溶解率は1% 程度を示し,有意な差は認められなかった。一方,S1 への溶解率は加圧ゲルが約9%,加熱ゲルが約5%とな り,有意に高くなっていた。不溶性画分は加圧ゲルが1% 未満,加熱ゲルが約2%となり,有意に低い結果を示し た。以上の結果から,各ゲル溶解液に対する卵黄ゲルの 溶解性は加圧ゲルと加熱ゲルでほぼ同じ傾向を示したが, S1への溶解性などが異なっていた。

各ゲル溶解液はTable 1 に示したとおり,各タンパク 質問相互作用を切断および脆弱化させることから,ゲル の溶解率は各タンパク質問相互作用の割合と推定するこ とができる。このことから卵黄加圧ゲルは加熱ゲルと同 様にS-S結合がゲル形成に大きく寄与していることが明 らかとなった。以上のことは、前述のNEM添加の影響 (Fig.2 a, b) やSDS-PAGE (Fig.3, 4) からも支持され る結果であった。加圧ゲルと加熱ゲルの間にS1への溶 解率 (イオン結合の割合) と不溶性画分の割合で有意な 差が認められたことは、加圧処理と加熱処理による処理 方法の大きな違いと考えられる。加圧処理は加熱処理に 比べ比較的穏やかな反応が起こると考えられており、非 共有結合であるイオン結合の切断や、共有結合の生成が 少ない²⁸⁾ことに起因すると考えられた。また,NEMを 20mM添加しても加熱ゲルのGSおよびWDは加圧処理の 値ほど減少せずに(Fig.2 a, b), 脆弱なゲルを形成し ていたことはタンパク質間相互作用の構成割合が加圧ゲ ルと加熱ゲルで異なることやS-S結合以外の共有結合が 加熱ゲルの形成に関与していることが推察された。

6. 卵黄加圧ゲルの微細構造

Fig.6 a~fに加圧ゲルおよび加熱ゲルの微細構造を示





Protein concentration: 150mg/g; ■: 20°C, 650MPa, 15min; □: 80°C, 0.1MPa, 30min.

^{*:} correlations were significant at p < 0.05



Fig.6 Comparison of microstructures of pressure-induced (20°C, 650MPa, 15min) (a-c) and heat-induced (80°C, 0.1MPa, 30min) (d-f) egg yolk gels

a, d: magnified 10,000 \times ; b, e: magnified 50,000 \times ; c, f: magnified 100,000 \times

した。加圧ゲルおよび加熱ゲルともに非常に密で細かな 線維状のネットワーク構造が観察され,加圧ゲルは加熱 ゲルに比べ滑らかな表面構造を呈していた。また,加圧 ゲルは大きな凝集体による太い架橋部を有し,不均一な 空孔を形成していた。一方,加熱ゲルは細かな凝集体に よる細い架橋部を有し,均一な空孔を形成した。これは 加圧処理と加熱処理によるリポタンパク質の分散や変性 の差異が影響したためと推察された。

以上の結果から,加圧ゲルは加熱ゲルと同様にプラズ マ由来のapo-LDLとグラニュール由来のapo-HDLとapo-LDLがS-S結合し、タンパク質同士が架橋することによ ってゲルを形成することが示唆されたが、ゲルの強度や 構造などの物理化学的特性が大きく異なっていることが 微細構造の観察結果からも明らかとなった。卵黄を加圧 処理して得られたゲルはS-S結合以外の共有結合をほと んど生成せず、栄養素の破壊や毒性因子の発生リスクが 少ない安全性の高い²⁰⁾食品になることが期待される。

要 約

加圧処理によって形成する卵黄ゲルの形成機構を明ら かにするため、ゲルの形成条件、ゲルの構成タンパク質 の検出、ゲル形成に寄与するタンパク質間相互作用およ びゲルの微細構造について検討を行った。卵黄は15℃以 上の温度で450MPa以上の加圧処理を行うことによって 加圧ゲルを形成した。特に20℃,650MPaの加圧処理で 形成されたゲルは高いGSおよびWDを示し、強固なゲル となった。加圧ゲルおよび加熱ゲルはいずれも卵黄中の 主要構成タンパク質であるプラズマ由来のapo-LDL,グ ラニュール由来のapo-HDLとapo-LDLがS-S結合によっ て会合し、ゲルを形成することが示唆された。このS-S 結合は加圧ゲルおよび加熱ゲルを維持するタンパク質間 相互作用の約80%を構成していた。ゲルの微細構造は加 圧ゲルでは架橋部が太く、表面は滑らかであったのに対 し、加熱ゲルでは架橋部は細く表面は粗かった。以上の 結果より、加圧ゲルの形成には加熱ゲルと同様にapo-LDLやapo-HDLのS-S結合が重要な役割を果たしている ことが示唆されたが、その他のタンパク質間相互作用の 構成割合やゲルの強度および構造などの物理化学的特性 は加熱ゲルと比較すると大きく異なっていた。

謝辞本研究の遂行にあたり、電子顕微鏡の使用 に際してご協力頂いた東京農業大学農学部電子顕微鏡室 室長長島孝行教授に感謝申し上げます。

本研究の一部は東京農業大学総合研究所の平成24年度 大学院博士後期課程研究支援制度により実施した。関係 の方にここに感謝申し上げます。

文 献

1)加藤丈雄:卵の構造(中村 良:卵の科学)(朝倉 書店,東京), p.1 (1998)

- 2)農業技術大系畜産編5採卵鶏・ブロイラー(水間 豊:日本養鶏の歴史)(農山漁村文化協会,東京),p. 基4~5(追録2015年版迄)
- 3) 峯木真知子:卵の構造と成分(渡邊乾二:食卵の科 学と機能)(アイ・ケイコーポレーション,東京), p.41 (2008)
- 4)科学技術庁資源調査会編:食品のタンパク質とアミノ酸一改訂アミノ酸組成表(資源調査会報告第102号)関係資料一,(大蔵省印刷局,東京),(1986)
- 5)石川伸一:卵の構造と成分(渡邊乾二:食卵の科学 と機能)(アイ・ケイコーポレーション,東京), p.52 (2008)
- 6) KIOSSEOGLOU, V. and PARESKEVPOULOU, A. : Molecular interactions in gels prepared with egg yolk and its fractions, *Food Hydrocolloid*., 19, 527~ 532 (2005)
- 7)林 力丸:食品への圧力利用一加圧食品の物性,熱 物性,5,284~290,(1991)
- 本間一男・芳賀紀之:鶏卵の物性に与える高圧処理の影響(林力丸編:生物と食品の高圧科学)(さんえい出版,京都), p.325 (1993)
- 9) DUMOULIN, M., OZAWA, S. and HAYASHI, R.: Textural properties of food proteins obtained under different temperatures including subzero, J. Food Sci., 63, 92~95 (1998)
- 10) 岡本巳恵子・出内智子・林 力丸:高圧加工食品の 物性および官能評価(林 力丸編:食品への高圧利 用)(さんえい出版,京都), pp.89~102 (1989)
- 11) 安本教傳・竹内昌昭・安井明美・渡邊智子:五訂増 補日本食品標準成分表分析マニュアル(建帛社,東 京), p.22 (2006)
- 12) 西楽慈子・田村咲江:卵黄の加熱によるテクスチャ ーと微細構造の変化,日本家政学会誌,49,353~362 (1998)
- 13) LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, *Nature*, 227, 680~685 (1970)
- 14) RAJU, K, S. and MAHADEVAN, S.: Isolation of hen's egg yolk very low density lipoproteins by DEAEcellulose chromatography, *Anal. Biochem.*, **61**, 538~ 547 (1974)
- 15) MATSUMOTO, J.J.: ACS symposium series 123 (ACS, Washington, DC) p. 96 (1980)
- 16) PÉREZ-MATEOS, M., LOURENCO, H., MONTERO, P. and BORDERIAS, A. J.: Rheological and biochemical characteristic of high-pressure - and heat-induced gels from Blue whiting (*Micromestistius poutassou*) muscle proteins, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 44~49 (1997)
- 17) 森口奈津美・中村 卓:卵白・寒天の共存ゲルにお

ける両連続相構造の形成と破断特性,日本食品科学工 学会誌,**60**,225~232 (2013)

- 18)月向邦彦:生体高分子の水和と圧力効果(林 力丸 編:加圧食品―研究と開発―)(さんえい出版,京都), p.23 (1990)
- 19) 大井龍夫:タンパク質の熱変性に及ぼす圧力の影響 (功刀 滋・嶋田昇二・鈴木敦士・林 力丸編:高圧 バイオサイエンス)(さんえい出版京都), p.16 (1994)
- 20) BALNY, C. and MASSON, P.: Effect of high pressure on proteins, *Food Rev. Int.*, 9, 611~628 (1993)
- 21) AGUILAR, J. M., CORDOBÉS, F., JEREZ, A. and GUERRERO, A. : Influence of high pressure processing on the linear viscoelastic properties of egg yolk dispersions, *Rheol. Acta*, **46**, 731~740 (2007)
- 22) 小谷スミ子・宮本 勲・香西みどり・畑江敬子・島
 田淳子:高圧処理した卵黄の流動性,日本家政学会誌,
 51,905~912 (2000)
- 23) YAN, W., QIAO, L., LI, J., XU, R., WANG, M. and YAN, Y.: Effect of high pressure treatment on the physicochemical and functional properties od egg yolk, *Eur. Food Res. Technol.*, 231, 371~377 (2010)
- 24) Lai, K. M., Chuang, Y. S., Chou, Y. C., Hsu, Y.

C., CHENG, Y. C., SHI, C. Y., CHI, H. Y. and HSU, K. C.: Changes in physicochemical properties of egg white and yolk proteins from duck shell eggs due to hydrostatic pressure treatment, *Poultry Sci.*, **89**, 729~737 (2010)

- 25) LACA, A., PAREDES, B. and DÍAZ, M.: A method of egg yolk fraction. Characterization of fractions, *Food Hydrocolloid.*, 24, 434~443 (2010)
- 26) NAKAMURA, R., FUKANO, T. and TANIGUCHI, M.: Heat-induced gelation of hen's egg yolk low density lipoprotein (LDL) dispersion, *J. Food Sci.*, 47, 1449~1453 (1982)
- 27) ANTON, M., LE, D. M., BEAUMAL, V. and PILET, P.: Filler effects of oil droplets on the rheology of heat-set gels prepared with egg yolk and egg yolk fractions, *Colloid Surface B.*, **21**, 137 ~ 147 (2001)
- 28)林 力丸:高圧下現象の食品分野への利用(林 力 丸編:食品への高圧利用)(さんえい出版,京都), p.1 (1989)
- 29)山崎 彬:超高圧処理による食品物性の改質と圧力 殺菌の展望,日本調理科学会誌,35,209~216 (2002)

(平成27年8月26日受付,平成27年12月22日受理)

乾燥米飯の乾燥・保存・吸水における含水率予測

小出章二*^{1§}·折笠貴寛^{*1}·小出冬菜^{*1} 村松良樹^{*2}·田川彰男^{*3}

*1 岩手大学農学部
 *2 東京農業大学地域環境科学部
 *3 鹿児島県大隅加工技術研究センター

Moisture Content Prediction of Dried Cooked Rice during Drying, Preservation, and Water Sorption

KOIDE Shoji^{*1§}, ORIKASA Takahiro^{*1}, KOIDE Fuyuna^{*1}, MURAMATSU Yoshiki^{*2} and TAGAWA Akio^{*3}

 * 1 Faculty of Agriculture, Iwate University, 3–18–8, Ueda, Morioka 020–8550
 * 2 Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture, 1–1–1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156–8502
 * 3 Kagoshima-Osumi Food Technology Development Center, 4938, Hosoyamada, Kushira-cho, Kanoya 893–1601

In this study, moisture content changes in cooked rice during hot air drying, equilibrium moisture contents (EMCs) of dried cooked rice at various temperature and relative humidity conditions, and moisture content changes in dried cooked rice during water sorption were investigated and predictions were made for each course of moisture content. Results showed that the exponential model was applicable in describing the moisture content changes in cooked rice during hot air drying, and the calculated drying rate constant had Arrhenius type temperature dependency. The EMC of dried cooked rice, which is considered an important index for preservation, fitted the GAB model with high accuracy. It was also found that the moisture content changes in dried cooked rice during water sorption could be predicted by Page's equation. In addition, sensory test of cooked rice that is made from dried cooked rice (dried cooked rice was rehydrated by water sorption at 40°C for 30 min, followed by microwave heating at 500W for 1min) indicated no significant difference (p > 0.05) in taste compared to that of the reference.

(Received Dec. 3, 2015; Accepted Mar. 4, 2016)

Key words: dried cooked rice, hot air drying, water sorption, equilibrium moisture contents, sensory test 乾燥米飯, 熱風乾燥, 吸水, 平衡含水率, 官能試験

近年,国内では自然災害や新型インフルエンザ対応の 非常用備蓄食の開発が進められている¹⁾。平成25年4月 から施行された東京都帰宅困難者対策条例²⁾には,事業 者の取り組みの一つに従業員向けの3日分の水,食料等 の備蓄をする旨が記されており,このなかで備蓄品の例 として炊飯米を乾燥させたアルファ化米が記述されてい る。また,農林水産省は家庭備蓄を推奨しており,この なかで,電気,ガス,水道といったライフラインが停止 した場合に備え,最低限の飲料水と缶詰または調理せず に食べられる備蓄食料品(アルファ化米,乾パン等)を 3食分備えることを提案している³³。このようにアルフ ァ化米(以後,乾燥米飯と称する)は保存食・非常食と して注目を集めており¹⁰,さらに近年はカップライスと しての販路拡大も著しい。

この乾燥米飯は,原料精白米を洗米,浸漬した後,炊 飯や蒸煮によってアルファ化し,単粒化させ乾燥させた

^{*1 〒020-8550} 盛岡市上田 3-18-8

[§] Corresponding author, E-mail:shojides@iwate-u.ac.jp

^{*2 〒156-8502} 東京都世田谷区桜丘1-1-1

^{*3 〒893-1601} 鹿児島県鹿屋市串良町細山田4938

ものであり、その後復水・調理することで簡便に食すこ とができる^{40.50}。よって炊飯米の乾燥特性や、乾燥米飯 の平衡含水率、さらには吸水特性の把握は、乾燥米飯の 製造や保存、調理プロセスにおける水分(含水率)制御 を行う際に有益な知見を与えると考えるが、上記に関す る学術的研究はインディカ米の乾燥特性の研究^{60.70}を除 いて、報告例はほとんど見当たらない。

そこで本研究では、炊飯米の熱風乾燥における含水率 の経時変化や乾燥米飯の吸水中の含水率の経時変化を測 定し、それら含水率変化のモデル化および温度依存性の 検討を行うとともに、種々の温湿度条件のもと乾燥米飯 の平衡含水率を計測し水分吸着等温線を作成した。併せ て本研究では作成した乾燥米飯を電子レンジを用いて加 熱・調理し、その官能試験も行った。

本研究より得られる知見は,乾燥米飯の製造における 乾燥工程や保存条件の最適化,および乾燥米飯の吸水や 調理方法を検討するうえで資する情報を与えると考える。

実験方法

1. 供試材料

供試材料には市販の精白米(品種:あきたこまち)を 用いた。精白米の初期水分は14.8(%wb)であった。

炊飯は稲育種マニュアル⁸に準じて行った。すなわち, 精白米150gを洗米し水切りを行った後,蒸留水を200ml 加水し,60分間浸漬した。炊飯には電気釜(JBG-Y,タ イガー魔法瓶社製)を用い,電気釜のスイッチが切れた ら,約20分間蒸らしを行った。この炊飯米を後述の方法 で単粒化させた米飯を乾燥試験に用いた。平衡含水率と 吸水特性の測定および官能試験には,炊飯直後の炊飯米 を単粒化させ,これを後述する乾燥器で3時間熱風乾燥 (乾燥温度80℃)させた後にシリカゲルを入れたデシケ ータ内に30日から60日程度保存し,水分活性が約0.07と なるように調整した乾燥米飯を用いた。水分調整後の乾 燥米飯の水分は約5%であった。

2. 炊飯米の乾燥中の含水率変化の測定

熱風乾燥は60,70,80℃と3段階の温度条件下で行っ た。その概要は以下のとおりである。炊飯米を約80℃の 水道水に約3秒間浸漬した後,炊飯米をポリエチレン製 のネット(PRS-61,ジャパックス社製)上に移動させ, ピンセットを用いて炊飯米約8gを単粒状態に広げた。 その後,定温送風乾燥器(FC-610,アドバンテック東 洋社製)内に設置した乾燥部に炊飯米が載ったネットを 静置して熱風乾燥(風速0.15m/s)を開始した。ネット 上の試料は,一定時間毎に秤量缶に取り出し,電子天秤 (FZ-300iWP,エー・アンド・デイ社製)を用いてすば やく0.01gの精度で秤量の上,乾燥器内に戻し,乾燥を 継続した。乾燥時間は3時間とし,測定終了後の試料を 135℃-24時間法で絶乾し,含水率(%db)を換算した。

3. 乾燥米飯の平衡含水率の測定

測定は、既往の報告⁹⁾と同様の8種類の飽和塩溶液を

入れたガラス製デシケータ各々に、乾燥米飯約3g(薄 層)を入れ、これらを一定温度(5,15,25℃)に設定 したインキュベータ内に置き、乾燥米飯の質量の履歴を 計測した。質量の測定は各温湿度条件下の乾燥米飯を取 り出し、電子天秤を用いて計測し、1日当たりの質量変 化が0.1mg/day以下となったときを水分平衡とみなした。 平衡に達した試料は135℃-24時間法により含水率(% db)を算出し、この値を平衡含水率(% db)とした。 今回、水分平衡に要した日数は測定開始日から21日から 28日間であり、測定中に乾燥米飯表面にカビ発生等の異 変はみられなかった。なお本研究では、平衡含水率と水 分活性(-)との関係を論じるが、この水分活性はサン プルが置かれていたデシケータ内の平衡相対湿度(%)

4. 乾燥米飯の吸水中の含水率変化の測定

吸水測定は20, 30, 40℃の3つの温度条件下で行った。 恒温槽はウォーターバスを用いた。槽内に水道水を満た し, 蒸留水40mlを入れた50mlプラスチックチューブ (Centrifuge tube, Iwaki製) 8本を静置後,水温を調整 した。次に乾燥米飯2gをプラスチックチューブ内に入 れ測定を開始し、一定時間経過後に、吸水した乾燥米飯 を網カゴ(上述したポリエチレン製ネットを用いて自 作)に取り出し卓上遠心機(H-103N,コクサン製)を 用いて水切りを行った。水切りは既往の報告¹⁰に準じ、 回転数を1,000rpmに設定し1分間運転した後,遠心を 停止し, 試料質量を計測した。 質量計測後の試料を135℃ -24時間法で絶乾し、含水率(%db)を換算した。吸 水測定は3反復行った。なおすべての吸水温度(水温 20, 30, 40℃)において,吸水中の米飯は時間とともに 膨潤し、測定時間40分を超えると吸水中の米飯から固形 分の溶出がみられたため、今回は吸水時間40分をもって 測定を終了した。

5. 官能試験

乾燥米飯を吸水させ、電子レンジを用いて加熱・調理 した炊飯米の官能試験を行った。パネルは岩手大学農学 部の学生(男子学生4名,女子学生6名:平均年齢21.3 才)10名とした。官能試験は基準米と比較して食べ比べ る相対法により評価した。基準米は、本測定に用いた精 白米(品種:あきたこまち)を用い,稲育種マニュア ル⁸に準じて炊飯した炊飯米を用いた。対象米として, 水温40℃に保った水道水の入ったポリプロピレン製のタ ッパ (DS-50, ASVEL社製) に乾燥米飯100gを30分吸 水(吸水後の含水率約170(%db))させた後,吸水し た米飯を電子レンジ用タッパに移し替え、電子レンジ (NE-TH211, パナソニック社製)を用いて500Wで1分 加熱した炊飯米(以後, Soaked/500Wと称する), およ び水道水100mlを満たした2つの電子レンジ用タッパに それぞれ乾燥米飯を50g入れた直後,電子レンジを用い て500Wで3分加熱(1分を目安とし、様子をみながら 30秒単位で加熱を進めた)し、水切りを行った炊飯米

(以後, Not-Soaked/500Wと称する)を用意した。電子 レンジ加熱はタッパに蓋(エアー弁は空けた状態)をし て行った。なお, 官能試験では対象米の炊飯米の温度が, 基準米と同じとなるように、電子レンジで加熱後の炊飯 米に一定の蒸らしの時間を設けた。

評価項目は、香り、外観、味、粘り、硬さ、総合評価 の6項目とし、基準米と同じを0、基準米より良・不良 の度合いにより「わずかに」、「少し」、「かなり」の3段 階に区分して±1・±2・±3の尺度で評価し、基準米 と対象米との有意差をt検定により判定した¹¹⁾。

結果および考察

1. 炊飯米の乾燥特性

炊飯米を熱風乾燥した際の含水率の変化をFig.1に示 す。図より炊飯米の含水率は時間の経過とともに指数関 数的に減少しており, 乾燥温度が高いほど炊飯米の乾燥 は速く進んだ。また乾燥速度(単位時間当たりの含水率 の減少速度)は含水率の減少とともに直線的に減少した。 よって本研究では、各温度条件で得られた測定値は、減 率乾燥期間にあるものとみなし,以下に示す指数モデ ル12)~14)に当てはめた。

$M - M_e = \exp(-k_e t)$		(1)
$\overline{M_0-M_e}=\exp\left(-\kappa_1 \iota\right)$,	(1)

ここで、*M*は乾燥時間*t*(h)のときの含水率(%db)、 M_0 は初期含水率 (% db), M_e は乾燥過程における平衡 含水率(%db), k1は乾燥速度定数(h-1)である。非 線形最小自乗法で得られたパラメータをTable1に示す。 また,得られたパラメータを式(1)に代入し得られた計算 値を図中に実線で示す(Fig.1)。これを見ると炊飯米の 乾燥曲線は各温度条件下にて指数モデルで精度よく表現 でき,平均二乗誤差 (RMSE) は1.12~2.78 (% db) となった。また,指数モデルにより得られた乾燥速度定 数 k は乾燥温度が高いほど大きくなり、温度依存性が あることが伺える。一般に,乾燥速度定数と絶対温度の 関係には以下に示すArrhenius型の式が成り立つことが 多い12),15)。

$$k_1 = A \cdot \exp\left(-\frac{E}{RT}\right)$$
(2)

ここで, Aは定数 (h-1), Eはみかけの活性化エネルギ (J·mol⁻¹), *R*は気体定数 (J·mol⁻¹·K⁻¹), *T*は乾燥温 度(K)である。Fig.2には乾燥速度定数 k₁のArrhenius プロットを示す。また図中実線は、各乾燥温度での乾燥 速度定数をArrhenius型の式に当てはめ、得られたパラ メータを式(2)に代入し得られた計算値である。測定値と 計算値がよく一致していることより,熱風乾燥時の炊飯 米の乾燥速度定数はArrhenius型の温度依存性を有する



Fig2 Arrhenius plot of the drying constant k_1 vs. the reciprocal of absolute temperature 1/T for cooked rice



Drying temperature	Para	ameter		
(°C)	k_{1} (h ⁻¹)	$M_e~(\%~{ m db})$	RMSE(% db)	\mathbb{R}^2
60	2.89	11.58	2.04	0.998
70	3.20	9.56	1.12	0.999
80	4.67	9.48	2.78	0.997



Fig.1 Moisture content changes for cooked rice

Drying temperature: \Box , 60°C; \triangle , 70°C; \bigcirc , 80°C. -, values were calculated by the exponential model.

during hot air drying



ことが示された。

2. 乾燥米飯の水分吸着等温線

温度5,15,25℃で保存した乾燥米飯の吸着過程の平 衡含水率をFig.3に示す。図より、5、15、25℃ともに、 水分活性の上昇に伴い平衡含水率は増加することがわか る。筆者らは、穀物の平衡含水率は温度依存性を有する こと, また得られる水分吸着等温線は温度と湿度を変数 とするChen-Clayton式を用いて表現できることを報 告ッ,16,17したが、乾燥米飯の平衡含水率は、低水分活性 および高水分活性では温度の影響がみられるものの、中 間領域の水分活性では温度の影響がみられない。これは, 穀物の水分吸着等温線ではみられなかった現象である。 よって本研究では, 乾燥米飯の平衡含水率を食品の水分 収着の予測に用いられる以下のGAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) 式¹⁸⁾に当てはめた。この式(3)は, 水分活性のみを変数として平衡含水率を表現できるもの で、Chen-Clayton式と較べてフィッティングはより容 易となり、低水分活性および高水分活性領域での平衡含 水率をより正確に表現できる。

ここで、Wは吸着過程の平衡含水率(%db)、 W_m (%db)、c(-)およびK(-)はパラメータで $0 < K \leq 1$ 、



Fig.3 Equilibrium moisture isotherms for dried cooked rice in adsorption process

*a*_wは水分活性(-)である。

各保存条件における測定値を式(3)に当てはめ、非線形 最小自乗法によりパラメータc, KおよびWmを決定した。 得られたパラメータをTable 2 に示す。保存温度 5,15 および25℃の乾燥米飯の水分吸着等温線は、GAB式と 精度よく一致しRMSEは0.74(%db)以下であった。 以上より、乾燥米飯の水分吸着等温線はGAB式を用い て表現できることが示され、乾燥米飯の保存工程におけ る水分の予測が可能となった。一般に乾燥米飯の水分は 品質保持の観点から10~13(%wb)(含水率では11.1 ~14.9 (% db)) がよいとされる⁴。このこととFig.3の 結果から、保存中の乾燥米飯の水分活性はおよそ0.4~ 0.6の範囲とすることが望ましいことがわかる。また水 分活性0.4~0.6の範囲では、平衡含水率の温度依存性は 本測定範囲では、ほとんどみられない。したがって、乾 燥米飯を包装容器や包材を用いて密閉保存する際は、容 器内の平衡湿度や包材の水蒸気透過率に留意することが 肝要となる。

3. 乾燥米飯の吸水中の含水率変化

乾燥米飯を蒸留水に浸漬した際の含水率の変化を Fig.4に示す。図より吸水中の乾燥米飯の含水率は時間 の経過とともに指数関数的に上昇し,吸水温度が高いほ ど含水率の増加は顕著であることがわかる。また本測定



Fig.4 Moisture content changes for dried cooked rice during water sorption

Rehydration temperature: \bigcirc , 20°C; \triangle , 30°C; \square , 40°C. -, values were calculated by Page's equation.

Temperature		Parameter			
(°C)	W_m c		K	RMSE	\mathbb{R}^2
	(% db)	(-)	(-)	(% db)	
5	8.060	55.59	0.770	0.740	0.979
15	8.237	37.85	0.732	0.172	0.986
25	9.769	23.75	0.601	0.161	0.984

Equilibrium moisture content: \Box , 5°C; \triangle , 15°C; \bigcirc , 25°C. –, values were calculated by the GAB equation.

条件では,吸水中の乾燥米飯の含水率は平衡に達してい ないことが明らかである。このことは上述したように吸 水時間40分をもって測定終了としたことに起因する。

さて,穀物を対象とした乾燥・吸水時の含水率変化は, 指数モデルやPage式などのモデル式を用いて近似され ることが多い^{71,12~15)}。今回,乾燥米飯の吸水中の含水率 を,式(1)で示す指数モデルを用いてフィッティングした ところ,測定値との適合性がよくなかった(R²=0.962 ~0.965, RMSE=10.2~15.5(%db))。よって本研究 では吸水時のモデル式として以下のPage式を用いて測 定値を当てはめた。

ここに, M'は吸水時間 t (h) のときの含水率 (% db), M_0' は初期含水率 (% db), M_e' は平衡含水率 (% db) でここではパラメータ, k_2 は吸水速度定数 (h[×]), N は パラメータ (-) である。測定値を式(4)に代入し,非線 形最小自乗法で得られたパラメータをTable 3 に示す。 また,得られたパラメータを式(4)に代入し得られた計算 値を図中に実線で示す (Fig. 4)。これをみると吸水中の 乾燥米飯の含水率は各温度条件下にてPage式で精度よ く表現でき,RMSEは2.17 (% db) 以下となった。今 後は,高い吸水温度における乾燥米飯の含水率変化のデ ータを増やし,Page式に当てはめて各パラメータを整 理することで,乾燥米飯を一定の水分に調整するために 要する時間や吸水温度に関する関係図表を提案したい。

4. 官能試験結果

Table 4 に官能試験の平均値を示す。基準米と炊飯米 Soaked/500Wとの間には有意差 (*p*<0.05) は認められ なかった。このSoaked/500Wは総合評価で0.50を呈し, 外観を除いて基準米より低いスコアは得られなかった。 一方,基準米と炊飯米Not-Soaked/500Wとの間には, 総合評価,味,粘り,硬さにおいて有意な差 (p<0.01) が認められた。このことより、電子レンジ調理前の吸水 は乾燥試験のスコア値に与える影響が大きいと考える。 また今回供試した炊飯米Soaked/500Wは,乾燥米飯を 飯米と同程度に吸水させた後、電子レンジを用いて調理 したものであり、飯粒の表面には基準米より多くの水分 が残っていた。一方, 炊飯米Not-Soaked/500Wは, 吸 水を十分に行っておらず芯が残る飯粒となった。本研究 では、基準米と炊飯米の米飯の粘弾性、色調、味度値な どの理化学的測定を行っていないため、官能試験の結果 から調理後の乾燥米飯の食味を論ずることは控えるが, 今後、乾燥米飯に適した吸水や加熱方法を科学的に検討 すれば、通常の炊飯法で炊飯した飯米と同程度の食味を 有する飯米を提供できる可能性は高い。今後は、調理 (例えば,吸水・電子レンジ加熱)後の乾燥米飯の理化 学的測定を行い、定量的なデータを用いて食味について 考察する予定である。

要 約

本研究では、炊飯米の熱風乾燥中の含水率の変化、お よび乾燥米飯の平衡含水率、乾燥米飯の吸水中の含水率 変化を測定するとともに、その含水率変化のモデル化を 行った。併せて、乾燥米飯を電子レンジで調理した炊飯 米の官能試験を行い基準米(精白米を用いて炊飯した炊 飯米)と比較した。その結果、以下の知見を得た。

 炊飯米の乾燥中の含水率変化は指数モデル式で精 度良く表された。また指数モデル式より得られた乾 燥速度定数はArrhenius型の温度依存性を有するこ

Rehydration		Parameter			
temperature $(^{\circ}C)$	N (-)	k_2 (h^{-1})	<i>M</i> _e (% db)	RMSE (% db)	\mathbb{R}^2
20	0.464	1.98×10^{-3}	91.43×10^{3}	1.68	0.999
30	0.481	2.22×10^{-3}	104.41×10^{3}	2.17	0.999
40	0.470	2.38×10^{-3}	114.55×10^{3}	1.35	0.999

Table 3 Parameter values of Page's equation during water sorption of driedcooked rice and R² fitted distribution values

Table 4 Sensory scores of cooked rice

Cooking method	Overall judgment	Appearance	Flavor	Taste	Stickiness	Hardness
Soaked/500W*	0.50	-0.90	0.30 - 1.00	0.40	0.00	0.00
Not-Soaked/500W**	- 2.20***	-0.80		- 1.00***	- 2.20***	- 2.80***

* Soaked/500W was made from dried cooked rice (In the process, dried cooked rice was rehydrated by water sorption at 40°C for 30min, followed by microwave heating at 500W for 1min).

** Not-Soaked/500W was made from dried cooked rice (In the process, dried cooked rice was subjected to microwave heating at 500W for 3min in a Tupperware container filled with tap water).

*** Significantly different (p < 0.01) between control and the sample.

とが示された。

- 2 乾燥米飯の吸着過程の平衡含水率はGAB (Guggenheim-Anderson-de Boer)式で精度よく表現できた。
- ③ 乾燥米飯の吸水工程における含水率変化は, Page 式で精度よく表現できることが示された。
- ④ 乾燥米飯を吸水(水温40℃,30分吸水)後,電子 レンジで加熱(500W,1分加熱)した炊飯米と基 準米の官能試験を行った結果,炊飯米と基準米との 間に有意な差(p<0.05)はみられなかった。

以上,本研究より得られた結果は実際の乾燥米飯の製 造における乾燥工程,保存工程,吸水工程や調理プロセ スの最適化を検討するうえで資する知見を与えると考え る。

文 献

- 木島豊希:災害リスク対策としての加工食品の製品 戦略に関する考察,流通情報,499,30~37 (2012)
- 2)東京都:東京都帰宅困難者対策条例(東京都,東 京)(2014)
- 3) 農林水産省:緊急時に備えた家庭用食料品備蓄ガイド(農林水産省,東京)(2014)
- 4) 江川和徳:米の科学(竹生新治郎監修)(朝倉書店, 東京), pp.156~158 (1995)
- 5)田淵満幸:加工米飯類とその製造技術,澱粉科学,40 (2),169~175 (1993)
- 6) LUANGMALAWAT, P., PRACHAYAWARAKORN, S., NATHAKARANAKULE, A. and SOPONRONNARIT, S. : Effect of temperature on drying characteristics and quality of cooked rice, *LWT*, **41**, 716 \sim 723 (2008)
- 7) JIAO, A., XU, X. and JIN, Z.: Modelling of dehydration-rehydration of instant rice in combined microwave-hot air drying, *Food and Bioproducts Proc.*, **92**, 259~265 (2014)

- 8)福井清美・小林 陽:稲育種マニュアル(山本隆一・堀末 登・池田良一監修)(養賢堂,東京), pp.74 ~76 (1996)
- 9)小出章二・福士祥代:低温貯蔵におけるソバの水分 収着等温線,日食保蔵誌,33(3),127~130(2007)
- 10) 村田 敏・田中史彦・徳永淳一・小出章二・K.S.P. アマラトゥンガ:穀物の吸水に関する研究,農機誌,58 (2),19~24 (1996)
- 11) KOIDE, S.: Cooked rice evaluation as affected by polished rice with cracked surface, J. JSAM, 72 (1), 93~95 (2010)
- 12) 小出章二:農産食品プロセス工学(豊田淨彦・内野 敏剛・北村 豊編)(文永堂,東京), pp.179~193 (2015)
- 13) KOIDE, S., NISHIYAMA, Y., MURATA, S. and SUGAWARA, Y.: Ventilation drying of a packed wheat bed – Modified heat and mass transfer models considering shrinkage during drying –, J. JSAM, 60 (6), 53~61 (1998)
- 14) 村松良樹・田川彰男・坂口栄一郎・笠井孝正:乾燥時におけるインゲン豆の含水率変化の予測,日食保蔵誌,33(6),295~302(2007)
- 15)田川彰男・村松良樹・北村 豊・村田 敏:大豆の 吸水特性,農機誌, 59 (2), 21~27 (1997)
- 16) KOIDE, S., KOISHI, M. and ATUNGULU, G.G.: Study on the storability of grain amaranth at low temperature, *Food Preserv. Sci.*, **38**(2), 93~99 (2012)
- 17)小出章二・伊藤 萌・折笠貴寛:精米後の酒米の水 分吸着等温線,日食保蔵誌,39 (2),83~86 (2013)
- 18) 熊谷 仁・熊谷日登美・高田昌子:食品工学-食品
 製造・保存の考え方-(アイ・ケイコーポレーション、
 東京), pp.45~62 (2009)

(平成27年12月3日受付,平成28年3月4日受理)

中低温での加圧処理がβ-ラクトグロブリンの ゲル形成に与える影響

小泉亮輔*^{\$}·入澤友啓*·多田耕太郎*·鈴木敏郎*

* 東京農業大学農学部

Effect of High-Pressure Processing on β-lactoglobulin Gel Formation at Low to Medium Temperatures

KOIZUMI Ryosuke*[§], IRISAWA Tomohiro*, TADA Kotaro* and SUZUKI Toshiro*

* Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, 1737 Funako, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0034

The purpose of this study was to investigate the mechanism of β -lactoglobulin (β -lg) pressureinduced gel (PG) formation at low to medium temperatures ($0 \sim 20$ °C). β -lactogrobulin formed gels by high-pressure processing (HPP) at 20°C. The protein concentration required for PG formation was 125 mg/ml or greater. The PG at 20°C and 650MPa showed the greatest gel strength and work done values. PG and heat-induced gel (HG) formation was inhibited by *N*-ethylmaleimide. Free sulfhydryl (SH) groups of β -lg increased with increasing processing temperature. The number of free SH groups after HPP at a medium temperature (20°C, 600MPa) was significantly higher than after HPP at a low temperature ($0 \sim 10$ °C, 600 MPa). However, SH content after HPP at medium temperature was approximately half of the SH content after heat processing (90°C, 0.1MPa). Non-reducing SDS-PAGE showed that β -lg oligomers were formed by HPP. In this investigation, formation of oligomers and increased coomassie brilliant blue dye staining intensity were temperature-dependent. These results suggest that free SH groups of β -lg increased in a temperature-dependent manner. Therefore, formation of β -lg PG is caused by the formation of high molecular weight oligomers by intermolecular disulfide bonds.

(Received Sep. 3, 2015; Accepted Jan. 14, 2016)

Key words: β -lactoglobulin, low temperature, high-pressure processing, gelation β -ラクトグロブリン, 低温, 高圧処理, ゲル

乳清は牛乳を原料としたチーズ製造時に副生され、タ ンパク質、乳糖およびミネラルなどの栄養素が含まれる。 乳清は近年、膜処理や噴霧乾燥などの技術の向上によっ て、国内ではその多くが乳清タンパク質濃縮物 (WPC)や乳清タンパク質単離物(WPI)に加工されて いる。これら乳清タンパク質の加工品は結着補助剤や食 感改良剤などの食品素材として広く利用されており、輸 入量も増加している¹⁰。WPCやWPIによる食品タンパク 質との結着は乳清タンパク質の約50%を占めるβ-ラクト グロブリン(β-lg)²⁰に起因している。β-lgは分子内に2 つのジスルフィド(S-S)結合と1つの遊離のスルフヒ ドリル(SH)基を有している²⁰ことから反応性に富み、 乳清タンパク質ゲルの主要構成タンパク質とされてい る³⁰。 食品に加圧処理を行うと加熱処理と異なるメカニズム で物性や特性に変化が生じることが明らかにされてい る⁴⁾。 β -lgに与える加圧処理の影響に関する先行研究で は,加圧処理によりSH/S-S交換反応が凝集体やゲルの 形成に関与している^{5),6)}ことが報告されており,25℃,450 MPaで加圧処理すると β -lgは最もSH/S-S交換反応が起き る⁷⁾とされている。一方,温度を上げずに低温で加圧処 理した場合は原料中のビタミン,色素やフレーバーなど の保持,共有結合を開裂させず毒性物質の生成リスクが 低いことなど,食品加工において有用な効果を得ること ができる⁴⁾。このことから食品加工へ加圧処理の利用を 進めるうえで,様々な温度での加圧処理が食品に与える 影響に関する知見を得ることは重要であるため,本報告 では β -lgに0~20℃(中低温域)で加圧処理を行い,ゲ

^{* 〒243-0034} 神奈川県厚木市船子1737

[§] Corresponding author, E-mail: rk203116@nodai.ac.jp

ル形成の条件およびβ-lgへの影響について明らかにする ことを試みた。

試料および実験方法

1. 試料の調製

(1) β-lg試料の調製 β-lgは井門ら⁸⁰の方法に従って WPC80(森永乳業㈱)から抽出を行った。抽出したβ-lg 溶液はビューレット法³⁰を用いてタンパク質濃度を測定 し、純水でタンパク質濃度が100,125および150mg/mlに なるように調整した。pHは1Mの水酸化ナトリウム水 溶液を用いて7.0に調整した。

 (2)加圧処理および加熱処理 β-lg溶液はプラスチック容器(内径14mm,高さ31mm)に気泡が入らないよう 充填,密封した後,食品用高圧処理装置(Dr.CHEF,

神戸製鋼所)を用い,加圧処理を行った。すなわち,加 圧処理時の温度は0,5,10,15および20℃,圧力強度 は300MPaから50MPa間隔で650MPaまでの条件で,βlg 溶液に15分間の加圧処理を行い試験区とした。また,無 加圧下(0.1MPaの大気圧下),90℃の恒温水槽中で30 分間加熱処理を行い対照区とした。加圧処理および加熱 処理後の試料は流水中で15分間冷却し,さらに保冷庫 (4℃)で8時間静置した後に各試験に供した。

2. ゲル強度およびワークダン値の測定

保冷後の試料はプラスチック容器に入れたまま室温 (約25℃)に戻した後,物性測定機(5543型, Instron) を用いてゲル強度(GS)およびワークダン値(WD)の 測定を行った。すなわち,±50Nのロードセルを使用し, 直径6.5mmのプランジャーを用いて圧縮速度50mm/min, 挿入率50%の条件で測定した。なお,GSとWDの解析は 解析ソフト(Bluehill 2, Instron)を用いて行った。

3. β-Ig加圧ゲルの形成条件の検討

(1) タンパク質濃度および加圧処理時の温度の影響

タンパク質濃度および加圧処理時の温度の違いが加圧ゲル形成に与える影響を調べるため,β-lg溶液のタンパク 質濃度を前述の3種,加圧処理時の温度を前述の5点に 設定し,それぞれ600MPa,15分間の加圧処理を行った。 また,対照区として加熱ゲルも調製し,加圧ゲルととも にGSおよびWDの測定を行った。

 (2) 圧力強度の影響 圧力強度の違いが加圧ゲルの 形成に与える影響を調べるため、β-lg溶液のタンパク質 濃度を150mg/mlに調整し、20℃で300~650MPa (50MPa 間隔)の圧力強度で加圧処理を行い、得られたゲルのGS およびWDを測定した。

4. N-ethylmaleimide添加の影響

タンパク質濃度を150mg/mlに調整した β -lg溶液に対し, SH基保護剤である*N*-ethylmaleimide (NEM) を終濃度 が 2 ~10, 20, 30mM (10mMまでは 2 mM間隔) にな るように添加し, 攪拌混合後,一晩保冷庫で静置した。 その後, 20℃で650MPaの加圧処理を行い,得られたゲ ルのGSおよびWDを測定した。また,対照区として同様 にNEMを添加した加熱ゲルも調製した。

5. 遊離SH基量の測定

加圧処理が β -lgの遊離SH基量に与える影響を調べるた め、タンパク質濃度 4 mg/ml、pH7.0に調整した β -lg溶液 に前述の 5 点の温度でそれぞれ600MPa、15分間の加圧 処理を行った後、遊離SH基量を小幡ら¹⁰⁰の方法に従い 測定した。また、無加圧無加熱(4 °C, 0.1MPa)の未 処理 β -lg溶液および90°C, 0.1MPa, 30分間の加熱処理 をした溶液の遊離SH基量も測定した。

6. SDS-PAGE

加圧処理による β -lgの重合体の形成を調べるために非 還元SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE) をLAEMMLIの方法¹⁰に従い行った。すなわち,方法5と 同様に調製した7種の β -lg溶液を2%ドデシル硫酸ナト リウム(SDS),0.1Mトリスヒドロキシメチルアミノメ タン-塩酸(pH6.8)溶液に溶解し、検体とした。ゲル はポリアクリルアミド濃度5~20%のグラジエントゲル (E-T520L,アトー)を用い、分子量マーカー(Precision Plus ProteinUnstained Standards, BIO-RAD)と各試 料をゲル板1枚あたり20mAで泳動を行った。染色はク ーマーシーブリリアントブルー(CBB)染色液(アプ ロサイエンス)を用いて行った。ゲルの撮影は撮影装置 (E-Graph AE-9000,アトー)を用い、分子量および 染色強度の解析は解析ソフト(CS Analyzer3.0,アト ー)を用いて行った。

7. 統計処理

 統計処理は統計ソフト(エクセル統計2015,社会情報 サービス)を用いてGS,WDおよび遊離SH基量について
 Tukeyの多重比較検定(有意水準:p<0.05)を行った。

結果と考察

1. タンパク質濃度および加圧処理時の温度がβ-lgの加 圧ゲル形成に与える影響

異なるタンパク質濃度と加圧処理時の温度を変えて処 理したβ-lgのGSおよびWDの結果をTable 1 に示した。β -lgは600MPaの加圧処理においてタンパク質濃度100mg/ mlではゲルを形成せず,125および150mg/mlでは加圧処 理時の温度が20℃で自立するゲルを形成した。加圧ゲル はタンパク質濃度の増加および加圧処理時の温度の上昇 に伴い,有意にGSおよびWDが増加し,強固なゲルを形 成した。一方,加熱処理ではすべてのタンパク質濃度で 加熱ゲルを形成した。加熱ゲルはタンパク質濃度で増加 に伴い,GSおよびWDが有意に増加し,加圧ゲルよりも より強固なゲルを形成した。150mg/ml,20℃の加圧ゲル のGSおよびWDは125および150mg/mlの加熱ゲルの値よ り有意に低かったが,100mg/mlの加熱ゲルよりは値が有 意に高いゲルを形成した。

2. 圧力強度がβ-lgの加圧ゲル形成に与える影響

異なる圧力強度で加圧処理(加圧処理時の温度20℃) したβ-lg(タンパク質濃度150mg/mℓ)のGSおよびWDの

Pressure (MPa)				0.1				
Processing temperature (°C)		0	5	10	15	20	90
*'Gel strength (N)	Protein (mg∕mℓ)	100 125 150	0.01 ± 0^{f} 0.02 ± 0^{f} 0.01 ± 0^{f}	$\begin{array}{c} 0.01 \pm 0^{\rm f} \\ 0.01 \pm 0^{\rm f} \\ 0.06 \pm 0.04^{\rm f} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.01 \pm 0^{\rm f} \\ 0.02 \pm 0.01^{\rm f} \\ 0.48 \pm 0.32^{\rm f} \end{array}$	$\begin{array}{l} 0.02\pm0^{\rm f}\\ 0.84\pm0.59^{\rm ef}\\ 1.58\pm0.50^{\rm ef} \end{array}$	$0.01 \pm 0^{\rm f}$ $4.01 \pm 1.00^{\rm d}$ $6.59 \pm 0.68^{\rm c}$	2.82 ± 0.08^{de} 9.51 ± 0.63 ^b 14.56 ± 0.52 ^a
*2Work done (mJ)	Protein (mg∕mℓ)	100 125 150	$\begin{array}{c} 0.07 \pm 0.01^{\rm f} \\ 0.07 \pm 0.01^{\rm f} \\ 0.05 \pm 0.01^{\rm f} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.07 \pm 0.01^{\rm f} \\ 0.08 \pm 0.01^{\rm f} \\ 0.31 \pm 0.16^{\rm f} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.07 \pm 0.01^{\rm f} \\ 0.14 \pm 0.06^{\rm f} \\ 3.95 \pm 2.15^{\rm f} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.09 \pm 0.01^{\rm f} \\ 8.72 \pm 6.67^{\rm ef} \\ 14.76 \pm 4.19^{\rm ef} \end{array}$	0.07 ± 0.01^{f} 39.97 ± 8.99^{d} 64.07 ± 5.10^{c}	$\begin{array}{c} 22.71 \pm 0.94^{\rm de} \\ 89.21 \pm 5.32^{\rm b} \\ 148.59 \pm 5.43^{\rm a} \end{array}$

Table 1Effect of temperature on gel strength and work done values during high-pressure processing of
 β -lactoglobulin

Mean \pm SE (n = 6)

Values in the same group (*1, 2) that are followed by different letters are significant at p < 0.05.

High-pressure processing: $0{\sim}20\,{\rm °C}$, 600MPa, 15min

Table 2 Effect of pressure intensity on gel strength and work done values of β -lactoglobulin

Tressure (wir a)	300	350 40	0 450	500	550	600	650
Gel strength (N) 0.0	$01 \pm 0^{\circ}$ 0.02	$1 \pm 0^{\circ}$ 0.09 ±	$0.03^{\rm e}$ $0.45 \pm 0.$	19^{de} 2.33 ± 0.3	$3.96 \pm 0.41^{\circ}$	$6.80\pm0.88^{\rm b}$	$12.05\pm0.69^{\rm a}$
Work done (mJ) 0.0	$0.000 \pm 0.01^{\circ}$ 0.00	$7 \pm 0.01^{\circ}$ 0.97 ±	$0.27^{\rm e}$ $4.18 \pm 1.$	50^{de} 24.69 ± 3.6	$40.27 \pm 4.68^{\circ}$	$67.22 \pm 8.54^{\circ}$	$118.57 \pm 6.13^{\circ}$

Mean \pm SE (n = 6)

Values in the same row that are followed by different letters are significant at p < 0.05.

Protein concentration: 150mg/mℓ; processing temperature: 20℃.

結果をTable 2 に示した。β-lgは300~450MPaの加圧処 理ではゲルを形成せず,GSおよびWDは圧力強度の違い による有意な差は認められなかった。500MPaの加圧処 理において脆弱なゲルを形成したが,GSおよびWDは450 MPaまでとの間に有意な差はみられなかった。一方,550 MPa以上では自立ゲルを形成し,GSおよびWDは圧力 強度の増加に伴い有意に増加した。特に,650MPaでは 最も高いGS(12.05N)およびWD(118.57mJ)を示し, Table 1 に示した加熱処理したもの(GS:14.56N, WD:148.59mJ)と遜色のないゲルを形成した。

タンパク質濃度や圧力強度の増加に伴いタンパク質の 変性は促進することが報告さている¹²⁾。また,同じ圧力 強度での加圧処理においても処理時の温度が異なれば試 料に与えるエネルギー量は変化することから、タンパク 質の変性は圧力と温度の双方が関係するとされてい る^{13),14)}。また,前述のタンパク質濃度と加圧処理時の温 度の影響(Table 1)では、今回の試験においては10℃ 以下の温度のGSおよびWDとは明確な有意差はみられな かったが、タンパク質濃度125および150mg/mlで加圧処 理時の温度が15℃のGSおよびWDは増加し、タンパク質 の変性が温度上昇とともに始まる兆候を示した。以上の 結果から、中低温域での加圧処理によるβ-lgのゲル形成 には圧力因子だけでなく温度因子も重要であることが明 らかになった。本報告においてはタンパク質濃度150mg/ ml, 20℃, 500MPa以上の圧力強度でβ-lgを加圧処理す ることにより、良好な加圧ゲルを形成した。

3. NEM添加がβ-Igの加圧ゲル形成に与える影響

SH基の架橋を阻害するNEMを添加し加圧処理した β-lgのGSおよびWDの結果をFig.1 a, bに示した。加圧 ゲルはNEM添加量の増加に伴いゲルの形成が著しく阻 害され、GSおよびWDは急激に減少した。6 mMではβ-lg は加圧処理を行ってもゲルを形成せず、半固体状であっ たのに対し、8 mM以上では液状のままであり、ゲルの 形成は認められなかった。一方、加熱ゲルは20mMまで のNEMの添加によりGSおよびWDの減少が認められた が、30mM添加においても脆弱ながらゲルを形成し、常 に加圧ゲルのGSおよびWDを上回っていた。

β-lgの加圧ゲルの形成にジスルフィド結合が関与して いることはこれまでに報告されている^{5)~7)}。また,これ はβ-lgが分子内に遊離のSH基を1つ有していることに起 因すると考えられている²⁾。本報告の20℃,650MPaの 加圧処理により形成したゲルにおいてもNEM添加によ りゲル形成が著しく阻害されたことからS-S結合が寄与 していることが示唆され,これまでの報告を支持するも のとなった。

4. 加圧処理がβ-Igの遊離SH基量に与える影響

NEM添加試験の結果より加圧ゲルの形成にS-S結合の 関与が示唆されたことから、 β -lgを異なる温度で加圧処 理し、それぞれの遊離SH基量を測定し、その結果をTable 3に示した。 β -lgは0℃、600MPaの加圧処理によって 未処理(4℃、0.1MPa)より遊離SH基量が増える傾向 を示したが、有意な差は認めらなかった。しか し、5℃、600MPaでの加圧処理において遊離SH基量は 未処理と比べ有意に高くなり,さらに加圧処理の温度の 上昇に伴い増加する傾向を示した。20℃,600MPaでの 遊離SH基量は未処理および0,5,10℃での加圧処理 より有意に高く,未処理と比べると5倍以上の値を示し た。一方,加熱処理したβ-lgの遊離SH基量は未処理およ び加圧処理より有意に高く,20℃,600MPaでの加圧処







理に比べ約2倍の値を示した。

以上の結果, β-lgは加圧処理時の温度の上昇に伴い, 遊離SH基量が増加した。これは加圧処理時の温度の上 昇に伴うタンパク質の変性¹³⁾に起因すると考えられた。 タンパク質は圧力因子と温度因子により高次構造が壊れ, 分子構造が変化すると考えられている^{14),15)}。この構造変 化によってβ-lg分子内部に埋没していた反応性SH基が分 子表面に露出する^{16),17)}ために,0~20℃の中低温域にお いても同じ圧力強度で処理した場合の遊離SH基量は温 度依存的に増えることが示唆された。これらのことから β-lgは0~10℃での加圧処理では遊離SH基量は温度依存 的に増加する傾向を示したが, 遊離SH基量が少なく, ゲルを形成するに至らず、20℃での加圧処理では、0~ 10℃での加圧処理に比べさらに遊離SH基量が増加し、 分子間SH/S-SおよびS-S/S-S交換反応^{7),18)}によってS-S結 合によるβ-lg分子間での架橋がより多く起こるため加圧 ゲルを形成するものと推察された。

5. 加圧処理がβ-Igの重合体形成に与える影響

加圧ゲルの形成にS-S結合の関与が示唆されたため, 加圧処理時の温度の違いがβ-lgの重合体形成に与える影 響を調べるために非還元SDS-PAGEを行い,その結果を Fig.2 A, Bに示した。β-lgは600MPa,15分間の加圧処 理時の温度の上昇に伴い,単量体と推定されるバンド (i)の染色強度が減少し,二量体から四量体と推定され る複数の重合体のスメアバンド(ii~iv)が検出された。 さらに15℃以上の加圧処理では五量体以上と推定される スメアバンド(v)が検出され,20℃の加圧処理ではv の染色強度がさらに増加した。加熱処理ではi~ivは20℃ での加圧処理とほぼ同様な染色強度を示したが,vの染 色強度が加圧処理より増加する傾向を示した。

重合体の形成,特に五量体以上の重合体の形成条件は GSおよびWD(Table 1)や遊離SH基量(Table 3)が 増加傾向を示す条件と一致した。いずれの増加も加圧処 理時の温度の上昇に依存する結果となった。β-lgは加熱 処理により重合体を形成し,加熱保持時間の伸長により, 重合体の量とその分子量は増え,それにはS-S結合が関 与することが報告されている¹⁹。本報告においても加圧 処理時の温度の上昇に依存して,重合体の量と分子量は 増えており,NEM添加試験(Fig. 1)および遊離SH基 量(Table 3)の結果から,加圧処理による重合体の形

Table 3 Effect of temperature at the high-pressure processing on SH content of β -lactoglobulin

Pressure (MPa)			600			().1
Processing temperature $(^{\circ}C)$	0	5	10	15	20	4	90
SH content (mol/mol protein)	0.18 ± 0.01^{cd}	$0.23 \pm 0.02^{\circ}$	$0.26 \pm 0.02^{\circ}$	$0.30\pm0.02^{\rm bc}$	$0.38\pm0.02^{\rm b}$	$0.07\pm0.01^{\rm d}$	0.72 ± 0.02^{a}

Mean $\pm SE (n=6)$

Values in the same row that are followed by different letters are significant at p < 0.05. High-pressure processing: $0 \sim 20$ °C, 600MPa, 15min



Fig. 2 Non-reducing SDS-PAGE analysis of β -lactoglobulin after different processing conditions

Representative blots (A) and their quantification (B) are shown. M: molecular-weight marker; a: 4°C, 0.1MPa; b: 0°C, 600MPa; c: 5°C, 600MPa; d: 10°C, 600 MPa; e: 15°C, 600MPa; f: 20°C, 600MPa; g: 90°C, 0.1MPa. i: monomer; ii: dimer; iii: trimer; iv: tetramer; v: pentamer and up.

成やゲルの形成においても分子間のSH/S-SおよびS-S/S-S交換反応によって形成するS-S結合の架橋が関与してい ることが示唆された。一方,加熱処理では五量体以上と 推定されるスメアバンドの染色強度が増加し,加熱ゲル は加圧ゲルに比べ,高いGSおよびWDを示したこと (Table 1),ゲル形成の阻害に多量のNEM量を要したこ と(Fig. 1a, b)および遊離SH基量が多かったこと(Table 3)からβ-lgの加熱ゲルは加圧ゲルよりも多量の分子間 S-S結合が関与しているものと推察された。加圧処理は 加熱処理より穏やかな変化を試料に与えるとされてい る³⁾ことから,加熱処理は加圧処理に比べ,タンパク質 の高次構造をより崩壊させることにより,β-lgの分子間 S-S結合を促進させたものと考えられた。

以上のことから、β-lgは加圧時温度の上昇に伴って、 遊離SH基量が増加し、分子間のSH/S-SおよびS-S/S-S交 換反応によりS-S結合が架橋することにより高分子量の 重合体が形成され、ゲル化が促進されることが推察され た。加圧処理時の温度は低いほど原料の味,香り,色お よびビタミンなどを保持したまま加工できることが加圧 処理の有用な点である³³ため,β-lgの中低温域での加圧 処理によるゲルの形成機構が明らかになったことは,今 後の加圧処理による乳清タンパク質などを用いたゲル状 食品の開発への一助となることが期待される。

要 約

中低温域での加圧処理によって形成されるβ-lgゲルの 形成機構を明らかにするため、ゲルの形成条件および形 成機構の検討を行った。β-lgはタンパク質濃度の増加と 加圧処理時の温度の上昇に伴いGSおよびWDが増加 し、20℃で自立するゲルを形成した。特にβ-lg濃度150 mg/mℓ, 20℃, 650MPaの加圧処理で強固なゲルを形成 した。加圧ゲルおよび加熱ゲルはNEMの添加によりゲ ルの形成が著しく阻害されたことから、S-S結合がゲル 形成に寄与していることが示唆された。β-lgの遊離SH基 量の測定と非還元SDS-PAGE分析を行ったところ,加圧 時温度の上昇に伴い,遊離SH基量は増加し,分子間のSH /S-SおよびS-S/S-S交換反応によってS-S結合した高分子 量の重合体の形成が認められた。この高分子量の重合体 の形成が中低温での加圧処理によるβ-lgのゲル形成に重 要な役割を果たしていることが示唆された。

謝辞本研究の一部は東京農業大学総合研究の平成 25年度大学院博士後期課程研究支援制度により実施した。 関係の方にここに感謝申し上げます。

文 献

1)財務省貿易統計:国別品別表・輸入・ホエイ2012~
 2014

http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm

- 2)川上浩:畜産物利用学(齋藤忠夫編,文永堂出版, 東京), pp.24~25 (2011)
- 3)上野川修一・清水 誠: 食品タンパク質の科学-化
 学性質と食品特性-(山内文男編,食品資材研究会, 東京), p.162 (1983)
- 4)林 力丸:食品への圧力利用-加圧食品の物性,熱 物性,5,284~290,(1991)
- 5) TANAKA, N., TSURUI, Y., KOBAYASHI, I. and KUNUGI, S.: Modification of the single unpaired sulfhydryl group of β -lactoglobulin under high pressure and the role of intermolecular S-S exchange in the pressure denaturation [Single SH of β -lactoglobulin and pressure denaturation], *Int. J. Biol. Macromoles.*, **19**, 63~68 (1996)
- 6) CONSIDINE, T., SINGH, H., PATEL, H. A. and CREAMER, L. K.: Influence of binding of sodium dodecyl sulfate, all-trans-retinol, and 8-amino-1-naphthalenesulfonate on the high-pressure induced unfolding and aggregation of β -lactoglobulin B, J. Agric. Food Chem., 53, 8010~8018 (2005)
- 7) FUNTENBERGER, S., DUMAY, E. and CHEFTEL, J. C.: High pressure promotes β-lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions, J. Agric. Food Chem., 45, 912~921 (1997)
- 8)井門和夫・井上茂孝・高野克己・西谷紹明・巽 清・鴨居郁三:レンネットカゼインの組織化におよぼ

すα-ラクトアルブミンおよびβ-ラクトグロブリンの影響,日食工誌, 4, 272~274 (1993)

- 9) 菅原 潔・副島正美: 生物化学実験法7 蛋白質の 定量法 第3版, (学会出版センター, 東京), p.69 (1990)
- 10) 小幡明雄・松浦 勝・福島男児:2,2'-Dithiobis-(5nitropyridine) を用いる豆乳中のSH基の吸光度定量, 日食工誌, **36**, 707~711 (1989)
- 11) LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, *Nature*, 227, 680~685 (1970)
- 12) BALNY, C. and MASSON, P. : Effect of high pressure on proteins, *Food Rev. Int.*, 9, 611~628 (1993)
- 13) 月向邦彦:加圧食品 研究と開発 (林 力丸編, さんえい出版,京都) p.23 (1990)
- 14) 大井龍夫:高圧バイオサイエンス(功刀 滋・嶋田 昇二・鈴木敦士・林 力丸編,さんえい出版,京都)
 p.16 (1994)
- 15) WALKER, K. M., FARKAS, F. D., ANDERSON, R. S. and MEUNIER-GODDIK, L.: Effects of high-pressure processing at low temperature on the molecular structure and surface properties of β-lactoglobulin, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 8230~8235 (2004)
- 16)多田耕太郎・鈴木敏郎:加圧処理がα-ラクトアルブ ミンおよびβ-ラクトグロブリンの加熱ゲル形成に与え る影響,日畜会報,68,970~976 (1997)
- 17) IAMTTI, S., TRANSIDICO, P., BONOMI, F., VECCHIO, G., PITTIA, P., ROVERE, P. and DALL'AGLIO, G. : Molecular modifications of β -lactoglobulin upon exposure to high pressure. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 23~29 (1997)
- 18) 今堀和友・山川民夫:生化学辞典 第4版, (東京 化学同人,東京), p.609 (2007)
- 19) ZúÑIGA, R.N., TALKACH, A., KULOZIK, U. and Aguilera, J. M. : Kinetics of formation and physicochemical characterization of thermallyinduced β-lactoglobulin aggregates, J. Food Sci., 75, E261~E268 (2010)

(平成27年9月3日受付,平成28年1月14日受理)

Improving the Measurement of Resistance to Gas Diffusion and the Resistance Characteristics in Citrus Iyo Fruit (*Citrus iyo Hort. ex Tanaka*)

DIRPAN Andi^{*1,*2}, HIKIDA Yoshio^{*1§} and MORIMATSU Kazuya^{*1}

* 1 Faculty of Agriculture, Ehime Universit, 3–5–7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790–8566

* 2 Department of Food Science and Technology, Hasanuddin University, Makassar 90245, Indonesia

We proposed an improved method based on the ethane efflux method of CAMERON and YANG for measuring the resistance to gas diffusion in plant tissues. The effect of temperature and fruit size on the resistance and the conversion from the resistance to ethane diffusion to that to gaseous O_2 and CO_2 diffusion were also investigated using citrus Iyo fruit (*Citrus iyo hort. Ex Tanaka*). The results were in good agreement with those of the original method, and were obtained in a shorter amount of the time. The resistance to ethane diffusion depended on both the temperature and fruit size; specifically, the higher the temperature, the lower the resistance and the larger the fruit size, the higher the resistance. Finally, we presented equations to predict the resistance to O_2 and CO_2 diffusion using values measured with the ethane efflux method.

(Received Jul. 2, 2015; Accepted Feb. 1, 2016)

Key words: resistance to gas diffusion, citrus Iyo fruit, temperature, fruit size ガス拡散抵抗, イヨカン, 温度, 果実サイズ

Modified atmosphere packaging (MAP) and controlled atmosphere (CA) storage are used to create an optimum gas composition in the atmosphere around fruit and vegetables. However, the internal atmosphere of produce that is separated by a gas barrier such as skin differs from the external atmosphere $^{1),2)}$. We can expect to control the internal atmosphere directly by establishing a prediction and control method for the internal and thereby improve MAP and CA storage techniques and develop the other storage techniques by using individual packaging, surface coating, and other methods that directly cover the surface of the produce. Because the internal O_2 and CO_2 concentrations of produce can be predicted through knowledge of their gas exchange rates and resistances to gas diffusion in plant tissues³ (hereafter, simply referred to as "resistance" or "resistance to gas diffusion"), knowledge of the resistance is essential.

Previous studies on measuring the resistance by BANKS⁴⁰ (apple and potato), KNEE⁵⁰ (apple), and PEPPELENBOS and JEKSRUD²⁰ (apple), are all essentially

based on the ethane efflux method of CAMERON and YANG⁶. In the method, a sample is placed inside a closed box, and the concentration of ethane (which is released from the sample) is measured at a later time. This method is time consuming, because the equilibrium concentration in the box must be measured. To further develop MAP or directly surface covering storage techniques specifically designed for citrus fruit, we measured the resistance to ethane diffusion of citrus Iyo fruit (Citrus iyo hort. Ex Tanaka) by modifying the ethane efflux method. Iyo is one of the twenty major citrus varieties cultivated in Ehime Prefecture, and falls in the middle in terms of size. It is generally harvested in December, stored on farms for about three months, after which it is distributed through March.

In this study, we propose an improved method for measuring resistance that is faster and the effect of temperature and fruit size on resistance; additionally, we predict the resistances to gaseous O_2 and CO_2 diffusion.

Materials and methods

1. Materials

The Iyo used in the measurements were obtained from the Ehime University farm on December 28, 2013 and January 27, 2014, and were stored in polyethylene film bags (80cm in height and 65cm in width, 0.03mm thickness) at 5°C for one month and three days, respectively, before beginning the experiments.

2. Mass and total volume

All of the samples were weighed with an electric balance accurate to 0.1 g. In the case of the 2013 samples, which were used in the resistance measurements, the total volume of each sample was measured using Archimedes' principle⁷⁾.

3. Measurement of resistance and effect of temperature and fruit size on resistance

Size M (7.6cm average diameter \pm 0.2cm standard deviation), L (8.3 \pm 0.1), and 3L (10.1 \pm 0.2) fruit obtained on December 28, 2013 were used for the measurements. The resistance to gas diffusion was determined using a modified ethane efflux method⁶). For each measurement, a single fruit sample was placed in an closed acrylic box (13cm diameter \times 15 cm height; volume: 2×10^{-3} m³) with a constant air flow containing $1,800 \sim 2,000$ ppm ethane for five hours (Fig. 1, step A). This duration was selected based on the results of preliminary experiments conducted over three, five, and seven hours, which showed that the equilibrium concentrations (C_{out}°)

measured after five and seven hours were nearly the same and larger by about 3 ppm than that measured after three hours. The ethane concentration in the box was measured every hour with a gas chromatograph (model GC-2014; Shimadzu, Japan) coupled with a flame ionization detector (FID) and a 200×0.3cm I.D. stainless steel column containing activated alumina 80/100 mesh. The temperatures of the injector, column, and detector were 80, 70, and 90℃ respectively, and nitrogen was used as the carrier gas. The total mean concentration (C_{in}^0) was calculated from the values. Next, the fruit was quickly hourly transferred to an ethane-free second acrylic box (29. $5 \times 29.5 \times 12.0$ cm; volume: 1.0443×10^{-2} m³), which was immediately closed (Fig. 1, step B); the moment the box was closed was defined as time zero of the next measurement. At the time of sealing, a small AC fan $(2.0 \times 10^{-5} \text{ m}^{3} \text{ volume})$ attached to the box was turned on to ensure rapid gas mixing for the next measurements. To determine the concentration of ethane, $0.5 \,\mathrm{m}\ell$ gas samples were extracted through a septum and measured with the gas chromatograph every five minutes for one hour, and every ten minutes for an additional hour ; these values from these measurements are denoted with C_{out}. After these measurements, the fan was turned off and adequate time (24h) was allowed for the gas to reach equilibrium. The equilibrium concentration (C_{out}^{∞}) of ethane in the box was then measured.





Step A and B represent the ethane pre-loading and evolution processes respectively.

According to CAMERON and YANG⁶⁰, the resistance can be determined from the following equations:

$$R=A/(kV_{in}) \cdots (1)$$

$$V_{in} = \frac{V_{out}}{C_{in}^{0}} \times C_{out}^{\infty} \cdots (2)$$

- R : Resistance (s/m)
- A : Surface area of fruit sample (m²)
- k : First-order efflux rate constant (1/s)
- V_{in} : Volume of intercellular space in fruit sample (m^3)
- V_{out} : Free volume of closed box (m³)
- $\label{eq:cin} C^{\scriptscriptstyle 0}_{in} ~:~ \text{Internal ethane concentration of fruit} \\ sample at time zero~(ppm)$
- C_{out}^{∞} : Equilibrium ethane concentration in closed box (ppm)

The constant k is determined by taking the absolute value of the negative slope of a plot of ln $(1 - C_{out}^t/C_{out}^{\infty})$ versus time.

However, this method is time consuming, because measurement of C_{out}^{∞} is required. The value of V_{in} for citrus fruit can be determined using our previous model equation:

$$V_{in} = V_t - \frac{m}{1.0647}$$
 (3)

- V_{in} : Volume of intercellular space of fruit sample (cm^3)
- V_t : Total volume of fruit sample (cm³)
- m : Mass of fruit sample (g)

The value of C_{out}^{∞} used in Equation (2) is obtained from Equation (4) below, and k can be determined by taking the absolute value of the negative slope of a plot of ln $(1 - C_{out}^t/C_{out}^{\infty})$ versus time:

$$C_{out}^{\infty} = \frac{C_{in}^{0}}{V_{in} + V_{out}} \times V_{in} \quad \cdots \qquad (4)$$

where V_{out} in Equation (2) was replaced by $(V_{in} + V_{out})$ to improve the precision. Therefore, we can calculate the resistance using Equations (1), (3), and (4) without having to conduct a time-consuming measurement. This modified method was compared with that of CAMERON and YANG⁶⁾ for twelve data sets of size M, L, and 3L samples measured at 5 and 20°C.

The effect of temperature on the resistance was examined for a single sample of size L fruit at 5, 10, and 20°C. Additionally, the effect of fruit size on the resistance was examined for one sample each of size M, L, and 3L fruit at 5 and 20°C. All of the measurements were repeated three times.

4. Porosity

The porosity of the samples for the resistance

measurements was calculated as the ratio of the intercellular space volume, which can be determined with Equation (3), to the total volume.

5. Sample surface area and skin thickness

To obtain surface area of the samples for the resistance measurements, the relationship between and surface area was experimentally mass determined. The mass and the surface area of fruit of size M $(7.5 \pm 0.2 \text{ cm})$, L (8.3 ± 0.3) , 2L (9.0 ± 0.2) , and 3L (9.5 ± 0.3) obtained on January 27, 2014 (ten samples each) were measured. To measure the surface area, the peel of each sample was carefully removed with a knife and then it was projected by a copy machine, and the projected area cut out by a scissors was weighed with an electric balance accurate to 0.001g. Surface area (projected area) was calculated using mas ratio of the cut out projected area and the paper used (B4, $257 \text{ mm} \times 364$ mm). Then surface area was regressed as a function of mass by a least square method using all experimental data^{:8)}

- A = $4.2058 \text{m}^{0.7238}$, R² = 0.97(5)
- A: Surface area (cm²)
- m: Mass (g)

Equation (5) was used to calculate the surface area of the samples used for the measurement of resistance by substituting the mass.

Another five samples each of size M $(7.6 \pm 0.2 \text{cm})$, L (8.3 ± 0.2) , and 3L (9.8 ± 0.3) obtained on January 27, 2014 were used for the measurement of skin thickness. The skin consisted of flavedo and albedo, and the thickness was measured at four locations on the equatorial plane using digital calipers.

6. Statistical analysis

A paired *t*-test at P<0.05 was used to compare the measured equilibrium concentrations (C_{out}^{∞}) with those calculated using Equation (4). The resistances determined using the proposed method and the ethane efflux method by CAMERON and YANG were also compared using a paired *t*-test at P<0.05 and a confidence interval approach. Values for the skin thickness, porosity, and resistance based on size and temperature were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), where the significance of differences among means was determined using Tukey's test with a P<0.05 level of significance. The SPSS software for Windows version 16.0 (SPSS Inc., IL, USA) and Microsoft Excel 2010 were used to analyze the data.

Results and discussion

1. Measuring method of resistance

Fig. 2 shows a typical efflux curve and a plot of ln $(1 - C_{out}^{t}/C_{out}^{\infty})$ versus time. For the latter, a linear slope was obtained for every sample size measured in this study. BANKS⁴⁾ reported a non-linear slope for potato and a linear slope for apple. This difference was attributed to the smaller porosity of potato (1 ~2%) compared with apple (20~30%); hence, the decline (falling gradient) in the concentration of ethane in potato tissue was not negligible. According to our previous study⁷⁾, the porosity of Iyo is 23~29%. Therefore, the linear slope observed here is reasonable, and we believe that there was no decline in the ethane concentration in the Iyo tissue.

To confirm the applicability of Equation (4), the experimentally measured values of C_{out}^{∞} were compared to those calculated by Equation (4) for twelve data sets of size M, L and 3L samples measured at 5 and 20°C. The measured and calculated average values were very close: 14.58 ± 0.3 ppm (average \pm standard deviation) and 14.61 ± 0.6 ppm, respectively. The paired *t*-test value of 0.622 showed that the measured and the calculated values of C_{out}^{∞} were not statistically different at the



Fig.2 Typical (A) efflux curve and (B) plot of ln $(1 - C_{out}^t/C_{out}^{\infty})$ versus time for size 3L sample at 5°C

Pre-loading time was five hours.

5% level (P < 0.05); therefore, Equation (4) provided precise results for C_{out}^{∞} .

The proposed method of calculating resistance using Equations (1), (3), and (4) was compared with the method of CAMERON and YANG⁶⁰ using a paired t-test for twelve data sets of size M, L, and 3L samples measured at 5 and 20°C. The obtained paired t-test values of 0.776 at 5°C and 0.887 at 20°C showed that the resistance values measured by the two methods were not statistically different at the 5% level (P<0.05). The standard error of the mean of these data sets $(1.13 \times 10^3 \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{C} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{C} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ s/m} \text{ s/m} \text{ at } 5^{\circ} \text{ c} \text{ and } 1.29 \times 10^{\circ} \text{ s/m} \text{ s/m}$ 10^3 s/m at 20° C) stayed between the upper and lower levels of 95% confidence. Therefore, there is close agreement between the two methods. demonstrating that the resistance of porous citrus fruit such as Iyo to ethane can be measured using the proposed method.

2. Effect of temperature on resistance

Fig. 3 shows the resistances of the size L sample at 5, 10, and 20°C. The results are similar to those of EBRAHIM *et al.*⁹⁾, who reported that the skin resistance of Japanese pear decreased with increasing temperature. This behavior is thought to be due to the fact that gas diffusivity along the diffusion route from the intercellular space to the stomata or lenticels of fruit increases with temperature¹⁰⁾. The difference in resistance between 5 and 20°C was significant at the 5% level (P<0.05), as determined using Tukey's test.

The average resistance values were 5.03×10^5 , 4.34×10^5 and 3.50×10^5 s/m at 5, 10, and 20° C, respectively. The average values correlated linearly



Fig. 3 Changes in resistance for citrus Iyo fruit at different temperatures

All measurements were performed three times for one citrus fruit of size L. Data are expressed as the mean. Bars labeled by different letters are significantly different as determined by the Tukey's test at P < 0.05. Vertical bars represent standard deviation (n = 3).

with temperature $(R^2 = 0.67)$ and decreased about $1.00 \times 10^5 s/m$ with a 10°C increase in temperature.

3. Effect of fruit size on resistance

The resistance to ethane diffusion at 5 and 20° C is shown in Fig. 4 for three different fruit sizes. The resistances measured at the two temperatures vary similarly with fruit size, with the highest value observed for size 3L, followed by L and M, in both cases. The difference in resistance among the three sizes was significant at the 5% level (P<0.05), as determined by Tukey's test.

The average resistances were 6.96×10^5 , 4.56×10^5 , and 3.21×10^5 s/m at 5°C and 5.74×10^5 , 3.50×10^5 , and 2.13×10^5 s/m at 20°C for size 3 L, L, and M, respectively.

Differences in the resistance could be due to anatomical differences such as intercellular space volume^{11), 12)}, which is associated with porosity and is a property of cultivars that depends on the growing season^{9),12)~14)}. Tissue with large porosity is generally assumed to provide an efficient means of aerating that could produce high gas diffusivity and low resistance within the tissue. In the present study, the porosity did not significantly differ between the three fruit sizes (P<0.05): 31.4, 32.1, and 33.7% for sizes M, L, and 3L, respectively. Most studies on gas exchange in fruit and other bulky plant organs indicate that the skin is the most significant barrier to gas exchange between the produce and the surrounding atmosphere^{11)~13),15)~19}. Consequently, we believe that the observed differences in resistance caused differences were by in their skin



Fig.4 Resistance of citrus Iyo fruit of different sizes at two temperatures

All measurements were performed three times. Data are expressed as the mean. Bars labeled by different letters are significantly different as determined by the Tukey's test at P <0.05. Vertical bars represent standard deviation (n=3).

characteristics such as thickness, size of the individual stoma, and lenticel and density of the stoma and lenticel.

Fig. 5 shows the average skin thickness of size 3 L, L, and M samples. The average values were 6.72 ± 0.3 mm, 5.40 ± 0.3 mm, and 4.37 ± 0.2 mm, respectively, and significant differences in thickness, resulting from albedo thickness, were determined by Tukey's test. The same relationship between skin thickness and fruit size was observed in Hamlin orange by MORGAN *et al.*²⁰⁾ Although the differences in individual size and density of the stoma and lenticel must be considered, skin thickness is generally the most influential characteristic of skin. Therefore, in this study as well, the effect of fruit size on resistance was considered to be primarily caused by the skin thickness.

4. Resistance to O_2 and CO_2 diffusion

After measuring resistances to ethane diffusion, it is important to know the resistances to O_2 and CO_2 diffusion, which are important in respiratory gas exchange. BANKS⁴⁾ suggested that ethane diffusion is probably similar to O2 and ethylene diffusion, because its movement is thought to be restricted to the gas phase, i.e., through stomata or lenticels. However, it has been suggested that CO₂ diffusion is not necessarily the same because some CO₂ may also diffuse through the cuticle of the fruit⁴⁾. JEKSRUD²⁾ determined Peppelenbos and the relationship between the diffusion of various gases by using a Graham's Law prediction, even though they described the difference in diffusion routes



Fig.5 Skin thickness of citrus Iyo fruit of three different sizes

All measurements were performed once for five fruit of each size. Data are expressed as the mean. Bars labeled by different letters are significantly different as determined by the Tukey's test at P < 0.05. Vertical bars represent standard deviation (n = 5).

using only Graham's Law suspect. On the other hand, BEN - YEHOSHUA et al.¹⁶⁾ showed that the resistance to ethylene, CO2, and O2 diffusion in Valencia oranges is similar, whereas that to water is 60-fold lower. Therefore, they suggested that the mass transport of ethylene, CO2, and O2 occurs via the same mechanism, which is different from that of water. These results assume that the mass transport of ethane, O2, and CO2 in citrus fruit, which have comparatively larger porosity, occurs through the same diffusion route and that the resistances to the diffusion of these gases are similar. Therefore, we used Graham's Law as suggested by Peppelenbos and JEKSRUD²⁾ and SCHOTSMANS et al.²¹⁾ to propose the equations below, which are used to predict the resistances to O2 and CO₂ diffusion using the measured values determined with the ethane efflux method. Graham's Law states that the ratio of the diffusion coefficients of gases 2 and 3 into a reference gas 1 is equal to the square root of the ratio of the molecular weights of 3 and 2, i.e., $D_{12}/D_{13} = (M_3/M_2)^{1/2}$. The resistance is correlated with the diffusion coefficient (R = $\Delta x/D$, where Δx is the distance), so that the resistances can be introduced to the law.

$$\begin{split} R_{\rm O2} &= R_{\rm E} / 0.968 \qquad (6) \\ R_{\rm CO2} &= R_{\rm E} / 0.826 \qquad (7) \\ R_{\rm O2}, \ R_{\rm CO2} : {\rm Resistance \ to \ O_2 \ and \ CO_2 \ diffusion} \\ &\qquad ({\rm s/m}) \end{split}$$

 $R_{\scriptscriptstyle E}$: Resistance to ethane diffusion (s/m)

Conclusion

We have proposed an improved method for measuring the resistance to gas diffusion based on CAMERON and YANG'S ethane efflux method, and investigated the effect of temperature and fruit size on the resistance using samples of citrus Iyo fruit. Predicted values of the resistances to O_2 and CO_2 diffusion were also presented. The results were in good agreement with those of the original method and required less time to measure. Further analysis showed that resistance depends on temperature and fruit size. Specifically, the higher the temperature, the lower the resistance, and the larger the fruit, the larger the resistance. Finally, equations to predict the resistances to O2 and CO2 diffusion using the measured values determined with the ethane efflux method were also proposed.

References

- DADZIE, B. K., BANKS, N. H., CLELAND, D. J. and HEWETT, E. W.: Role of skin resistance to gas diffusion in the response of fruits to modified atmospheres, *Acta Hortic.*, 343, 129~134 (1993)
- 2) PEPPELENBOS, H. W. and JEKSRUD, W. K.: A method for the simultaneous measurement of gas exchange and diffusion resistance under various gas conditions, *Acta Hortic.*, **464**, 333~338 (1996)
- 3) DE WILD, H. P., and PEPPELENBOS, H. W.: Improving the measurement of gas exchange in closed systems, *Postharvest Biol. Technol.*, **22**, 111~ 119 (2001)
- 4) BANKS, N. H.: Estimating skin resistance to gas diffusion in apples and potatoes, J. Exp. Bot., 36, 1842~1850 (1985)
- 5) KNEE, M.: Rapid measurement of diffusion of gas through the skin of apple fruits, *Hort Sci.*, 26, 885~887 (1991)
- 6) CAMERON, A. C. and YANG, S. F.: A simple method for the determination of resistance to gas diffusion in plant organs., *Plant Physiol.*, **70**, 21~23 (1982)
- 7) DIRPAN, A., HIKIDA, Y., CHIBA, H. and OGAWA, Y.: Mathematical modeling of intercellular space volume of citrus fruits, *Food Preserv. Sci.*, 41, 103~ 110 (2015)
- 8) CLAYTON, M., AMOS, N. D., BANKS, N. H. and MORTON, R. H.: Estimation of apple fruit surface area, *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.*, 23, 345~349 (1995)
- 9) EBRAHIM, R. M., ISHIDA, S., TANAKA, F., UCHINO, T., HAMANAKA, D. and HIKIDA, Y.: Temperature dependency of gas diffusity and skin resistance of japanese pear ('oushuu') based on the fruit's true 3 D geometry, *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 247~253 (2014)
- 10) CHENG, Q., BANKS, N. H., NICHOLSON, S. E., KINGSLEY, A. M. and MACKAY, B. R.: Effects of temperature on gas exchange of 'Braeburn' apples, *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.*, **26**, 299~306 (1998)
- RAJAPAKSE, N. C., BANKS, N. H., HEWETT, E. W. and CLELAND, D. J.: Development of oxygen concentration gradients in flesh tissues of bulky plant organs, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 115, 793~797 (1990)
- 12) SCHOTSMANS, W., VERLINDEN, B. E., LAMMERTYN, J., PEIRS, A., JANCSOK, P. T., SCHEERLINCK, N. and NICOLAÏ, B. M.: Factors affecting skin resistance measurements in pipfruit, *Postharvest Biol. Technol.*,

25, 169~179 (2002)

- RAJAPAKSE, N. C., BANKS, N. H., HEWETT, E. W., CLELAND, D. J. and AUSTIN, P. C. : Oxygen concentration diffrences in apple fruit flesh, *Proc.* 4 th Aust. Conf. Heat Mass Transf., 368~374 (1989)
- 14) EBRAHIM, R. M., ISHIDA, S., TANAKA, F., UCHINO, T., HAMANAKA, D. and HIKIDA, Y.: Determination of gas diffusivity and skin resistance for three cultivars of japanese pear using their actual 3D geometry, *Environ. Control Biol.*, **51**, 193~200 (2013)
- 15) ABDUL-BAKI, A. A. and SOLOMOS, T.: Diffusivity of carbon-dioxide through the skin and flesh of russet burbank potato-tubers, J. Am. Soc. Hortic. Sci., 119, 742~746 (1994)
- 16) BEN-YEHOSHUA, S., BURG, S. P. and YOUNG, R.: Resistance of citrus fruit to mass transport of water vapor and other gases, *Plant Physiol.*, **79**, 1048~1053 (1985)
- 17) HAGENMAIER, R. D.: A comparison of ethane, ethylene and CO₂ peel permeance for fruit with different coatings, *Postharvest Biol. Technol.*, **37**, 56 \sim 64 (2005)
- 18) HAGENMAIER, R. D. and BAKER, R. A.: Reduction in gas exchange of citrus fruit by wax coatings, J. Agric. Food Chem., 41, 283~287 (1993)
- 19) KAYS, S. J.: Postharvest physiology of perishable plant products, (Van Nostrand Reinhold, Newyork), p. 420 (1991)
- 20) MORGAN, K. T., ROUSE, R. E., ROKA, F. M., FUTCH, S. H. and ZEKRI, M.: Leaf and fruit mineral content and peel thickness of 'Hamlin' orange, *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **118**, 19~21 (2005)
- 21) SCHOTSMANS, W., VERLINDEN, B. E., LAMMERTYN, J. and NICOLAÏ, B. M.: The relationship between gas transport properties and the histology of apple, *J. Sci. Food Agric.*, **84**, 1131~1140 (2004)

イヨカン果実における組織内ガス拡散抵抗 測定法の改良とガス拡散抵抗値の特性

ディルパン アンディ*1.*2
疋田慶夫*1・森松和也*1
*1 愛媛大学農学部
(〒790-8566 愛媛県松山市樽味3丁目5-7)
*2 ハサヌディン大学食品科学工学科 (Makassar 90245, Indonesia)

青果物の組織内間隙におけるガス組成を予測し、制御 する技術の確立によって、個包装やコーティングなど青 果物の表面を直接被覆する貯蔵技術を開発し、従来の MAPやCA貯蔵技術を改善できるものと期待される。そ れには、組織内ガス拡散抵抗(レジスタンス)にかかわ る情報が必須である。本研究では、イヨカン果実を利用 して, CAMERON and YANGのエタン流出法によるレジ スタンスの測定法を改善し、温度および果実サイズのレ ジスタンス値への影響、およびエタンガスによる測定値 を利用してO₂とCO₂ガスのレジスタンス値を予測するた めの計算式を示した。改善した測定法による結果は CAMERON and YANGによる測定結果と良好に一致し、 測定時間を短縮することができた。レジスタンス値は温 度と果実サイズに依存し,温度の上昇により減少し,果 実サイズの増大により増加した。これらの結果と、O2と CO₂ガスのレジスタンス値を予測する計算式により、呼 吸作用に伴うガス交換におけるレジスタンス値の特性を 把握することができた。

(平成27年7月2日受付,平成28年2月1日受理)

果実由来の機能性成分によるメタボリックシンドローム予防 および改善に関する研究

平成27年度日本食品保蔵科学会奨励賞

岸田邦博*§

* 近畿大学生物理工学部食品安全工学科

Studies on Prevention and Improvement of Metabolic Syndrome with Functional Compounds in Fruits

KISHIDA Kunihiro*§

* Department of Science and Technology on Food Safety, Kinki University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649–6493

Key words: functional compounds, phenolics, citrus limonoids, metabolic syndrome 機能性成分, フェノール性化合物, カンキツリモノイド, メタボリックシンドローム

1. はじめに

メタボリックシンドロームは、今や先進国のみならず 途上国においても拡大しており、世界がかかえる社会的 問題のひとつである。メタボリックシンドロームの発症 には、食事、運動、喫煙、ストレスといった生活習慣が 大きく影響することは周知の事実であるが、栄養の過剰 摂取が根源にあることから、とりわけ食事を通じたメタ ボリックシンドロームの予防や改善が重要である。野菜 や果物の摂取が心血管疾患リスクと逆相関を示すことは、 多くの疫学研究で支持されており,野菜や果物由来の難 消化性糖質,植物ステロール、カリウム、ポリフェノー ル等の二次代謝産物が複合的に作用しているものと考え られている¹⁾。これらのうち、二次代謝産物は、膨大な 化合物群であることから、ヒトに対する生理機能につい て未知な部分が多い。本研究は、果実由来の二次代謝産 物を対象とし、ラットを用いた試験により糖代謝および 脂質代謝に与える影響を中心に検討した。

2. ウメ由来ポリフェノール抽出物による 二糖類水解酵素阻害

ウメ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) に含まれるフェ ノール性化合物は,カフェ酸,*p*-クマル酸,フェルラ酸 などのヒドロキシ桂皮酸と糖や有機酸とのエステルから おもに構成される²⁰。梅酢より調製したウメ由来ポリフ

ェノール抽出物 (JAPE) を用いて、ラット小腸二糖類 水解酵素への阻害活性ならびに食後血糖上昇抑制作用を 検討した³⁾。ラット小腸からの粗酵素液の調製はKESSLER らの方法に準じて行い,二糖類水解酵素活性の測定は DAHLQVISTの方法を参考にして実施した^{4),5)}。IAPEは、 マルターゼ、グルコアミラーゼ、ラクターゼに対して阻 害作用を示し,阻害様式はそれぞれ混合型非拮抗阻害, 不拮抗阻害, 拮抗阻害であった。スクラーゼ, イソマル ターゼ、トレハラーゼに対しては阻害作用を示さなかっ た(図1)。ラットへの経口糖負荷試験では、マルトー ス、スクロース、デンプン投与時にJAPEによる有意な 血糖上昇抑制作用が認められ、 グルコース投与時には、 有意な影響は認められなかったことから、JAPEはグル コース吸収には影響せず、血糖上昇抑制作用は二糖類水 解酵素阻害によることが示唆された(図2)。AUC_{0-120min} には差が認められなかったことから, JAPEは消化管か ら吸収されるグルコースの総量には影響せず、消化を阻 害することにより吸収を遅延させるものと考えられた (データ省略)。JAPEに含まれる多様なヒドロキシ桂皮 酸エステルが二糖類水解酵素阻害に関与しているものと 考えられる。

3. p-クマル酸による脂質代謝改善作用

ヒドロキシ桂皮酸は,植物界に広く分布するフェノー ル性二次代謝産物であり,様々な穀類,野菜類,果実類

^{* 〒649-6493} 和歌山県紀の川市西三谷930

[§] E-mail: kishida@waka.kindai.ac.jp





[S], 基質濃度, mM or mg/ml; V, 1分間にタンパク1mgあたり加水分解した基質量 (µmol・min⁻¹・mg⁻¹) または1分間にタンパク1mgあたり遊離したグルコース量 (µmol· min⁻¹・mg⁻¹);, コントロール;□, JAPE1mg/ml添加;△, JAPE2mg/ml添加

に含まれることから、私たちが日常的に摂取している化 合物であるといえる。ヒドロキシ桂皮酸の一種であるp-クマル酸は、非栄養素であるにもかかわらず、消化管か らの吸収率が非常に高い特徴がある⁶。また,吸収され たp-クマル酸は、「薬物代謝」を比較的受けにくいこと が複数の研究で示されており、投与量の24%がインタク トの状態で尿中から回収されたという報告がある^{6)~8)}。 したがって、*p*-クマル酸は、bioavailableであり、生体 内での生理活性が期待できることから、ラットを用いた 投与試験を実施し,脂質代謝を中心に影響を検討した。 6週齢のSD系雄性ラットにウエスタンダイエット(高 脂肪,高Chol,高スクロース食)を5週間給餌し,p-ク マル酸群にはp-クマル酸を0.2%(w/w)含んだ同様の 飼料を与えた。総摂餌量、体重、肝臓重量、内臓脂肪重 量(副睾丸周囲脂肪,腎周囲脂肪,腸間膜脂肪),血糖 値,血清中脂質(TG,総Chol, HDL-Chol, リン脂質, 遊離脂肪酸)にはp-クマル酸群およびコントール群の間 に差は認められなかった。肝臓中脂質については、TG およびChol濃度がp-クマル酸群で低い傾向が認められた。 リン脂質濃度は、両群に差は認められなかった(表1)。 肝臓での脂質代謝に関連する遺伝子およびタンパクの発 現解析結果をそれぞれ図3~5,図6,7に示す。脂肪 酸生合成については、律速酵素であるACC1およびFAS, MEのmRNA発現がいずれもp-クマル酸群で有意に上昇 していた。SCDやリポジェニック酵素の転写因子である ChREBP, SREBP1c, LXRαについては, いずれもmRNA 発現量に差は認められなかった(図3)。Chol代謝につ いては、LDLrおよびその転写因子であるSREBP2の mRNA発現がp-クマル酸群で有意に上昇していた。Chol 生合成の律速酵素であるHMGCR, Cholトランスポータ ーであるABCG5, ABCG8, ABCA1, Cholエステル合 成に関与するACAT2のmRNA発現量は、両群に有意な 差は認められなかった(図4)。胆汁酸生合成について は、律速酵素であるCYP7A1のmRNA発現量がp-クマル 酸群で有意に低下していた。CYP27A1については、差 は認められなかった。CYP7A1の発現調節に関与する核



平均値±標準誤差 (n = 6). ――◇――, コントロール;---- ■----, JAPE1000mg/kgBW; -··▲··-, JAPE500mg/kgBW; ……×……, JAPE250mg/kgBW

	Control	p-Coumaric acid	P value
Total food intake (g)	901 ± 30	905 ± 25	NS
Body weight			
Initial (g)	124.9 ± 1.2	123.8 ± 1.3	NS
Final (g)	499.4 ± 10	484.5 ± 8.4	NS
Liver weight (g)	37.7 ± 1.5	39.8 ± 1.3	NS
Visceral fat weight (g)			
Epididymal	11.4 ± 0.71	11.5 ± 0.76	NS
Perinephric	17.5 ± 1.3	$19.0~\pm~0.86$	NS
Mesenteric	7.17 ± 0.51	7.21 ± 0.49	NS
Total	37.7 ± 2.0	37.7 ± 2.0	NS
Serum lipid concentrations			
Triacylglycerol $(mg/d\ell)$	145 ± 19	127 ± 7.8	NS
Total Cholesterol $(mg/d\ell)$	160 ± 9.0	174 ± 16	NS
HDL Cholesterol $(mg/d\ell)$	53.5 ± 6.2	58.8 ± 4.1	NS
Phospholipid $(mg/d\ell)$	154 ± 13	163 ± 11	NS
NEFA $(\mu Eq/\ell)$	444 ± 22	$485~\pm~37$	NS
Serum glucose concentrations $(mg/d\ell)$	172 ± 15	166 ± 9.5	NS
Liver lipid concentrations (mg/g)			
Triacylglycerol	112 ± 6.6	98.1 ± 3.9	0.09
Cholesterol	92.0 ± 2.5	85.5 ± 2.5	0.09
Phospholipid	13.8 ± 0.34	13.5 ± 0.20	NS

表1	摂餌量,	体重,	臓器重量,	血清および	肝臓中脂	訂賀濃度	に与	える	らp-ク	マル	レ酸摂取	の影響	響
----	------	-----	-------	-------	------	------	----	----	------	----	------	-----	---

HDL, high density lipoprotein; NEFA, non-esterified fatty acid; NS, not significant





図4 コレステロール代謝に関連する遺伝子発現に与える p-クマル酸摂取の影響



p-クマル酸摂取の影響

内受容体であるLXRα, FXR, SHP, LRH-1, HNF-4α や胆汁酸トランスポーターであるABCB11のmRNA発現 量に差は認められなかった(図5)。AMPKのリン酸化 率は, *p*-クマル酸群で大きな個体差が観察されたが, 両 群に有意な差は認められなかった(図6)。CYP7A1タ ンパク発現量は, *p*-クマル酸群で有意に上昇していた (図7)。脂肪酸代謝については, ACC1, FAS, MEの mRNA発現がいずれも*p*-クマル酸群で有意に上昇してお り, これは, 肝臓中TGが低下傾向にあった*p*-クマル酸 群で,むしろ脂肪酸の合成は亢進していることを示唆す るものである。AMPKのリン酸化率について, 有意な



図6 AMPKのリン酸化に与えるp-クマル酸摂取の影響



図7 CYP7A1発現量に与えるp-クマル酸摂取の影響

差は認められなかったものの, p-クマル酸群では, リン 酸化の明らかな亢進が認められた個体が観察された(図 6)。KIMらの報告では、ヒト肝癌由来細胞株であるHepG 2細胞において、10µMのp-クマル酸添加によりACCのリ ン酸化率の有意な上昇が観察されており、AMPKのリ ン酸化亢進は、40µMのp-クマル酸添加により認められ ている⁹。これは、AMPKのリン酸化率が統計学的に有 意なレベルに至らずとも、その基質となるACCのリン 酸化率が有意な差として現れたことを示唆している。本 研究では、ACCのリン酸化については検討していない が、上述のACC1, FAS, MEのmRNA発現上昇は、ACC のリン酸化に伴う脂肪酸生合成の低下に対する代償反応 として観察された可能性がある。これらの結果から、摂 取したp-クマル酸が肝臓でAMPKを介した脂質代謝改善 を有する可能性が示唆された。Chol・胆汁酸代謝につい ては、*p*-クマル酸群でLDLrおよびSREBP2のmRNA発 現の上昇, CYP7A1のタンパク発現の上昇が認められた (図4,図7)。したがって、Cholから胆汁酸への代謝亢 進が肝臓中Chol低下メカニズムとして考えられる。しか しながら、血漿中Chol濃度には差が認められなかったこ

と, CYP7A1のmRNA発現は*p*-クマル酸群でむしろ低下 していたこと等,不明な点も多く,さらなる検討が必要 である。

カンキツリモノイドによる 脂質代謝関連遺伝子の変動

リモノイドは、ミカン科およびセンダン科の植物に含 まれるトリテルペン誘導体の一群である。カンキツリモ ノイドの生理機能として、抗菌、抗ウイルス、発ガン予 防作用に加え、脂質代謝改善作用が報告されている¹⁰⁾。 そこで、主要なカンキツリモノイドであるリモニンおよ びノミリンを用いて、ラット肝臓での脂質代謝関連遺伝 子の発現に及ぼす影響を中心に検討した¹¹⁾。6週齢のSD 系の雄性ラットを用い、高脂肪・高コレステロール食給 餌下でリモニンまたはノミリンを50mg/kgBWとなるよ う毎日経口投与し、5週間飼育した。1群4匹としてリ モニン(HF+L)群、ノミリン(HF+N)群、コントロ ール(HF)群、標準食コントロール(NC)群の4群に 分けた。総摂餌量、体重、肝臓重量、内臓脂肪重量、血 築中脂質, 肝臓中脂質について, カンキツリモノイド摂 取の影響は認められなかった(表2)。肝臓での脂質代 謝関連遺伝子の発現に与える影響としては, HF + N群 がHF群と比較してChREBP, PPAR α , FXR, LXR α の mRNA発現量が有意に低く, SREBP1c, ABCA1の発現 量も低い傾向が示された(それぞれp=0.064, p=0.058, 表3)。したがってノミリンは以下の代謝変動を引き起 こす可能性がある。

- 脂肪酸生合成の抑制(ChREBP, SREBP1c, LXRα の発現低下または低下傾向より)
- ② 脂肪酸酸化の抑制 (PPARαの発現低下より)
- ③ 胆汁酸生合成の亢進および抑制(それぞれFXR, LXRαの発現低下より)
- ④ HDL産生の抑制(ABCA1の発現低下より)

これらの代謝変動は、メタボリックシンドロームの予 防や改善に対して必ずしも好ましいものばかりではない ことから、動物種および系統、給餌飼料などの実験条件 を詳細に設定し、さらに検討を進める必要がある。

表2 摂餌量,体重,臓器重量,血漿および肝臓中脂質濃度に与えるカンキツリモノイド摂取の影響

	HF+ limonin	HF + nomilin	HF	NC
Total food intake (g)	858 ± 32	860 ± 61	906 ± 5.7	806 ± 15
Body weight				
Initial (g)	213 ± 5.5	215 ± 6.1	$209~\pm~2.9$	202 ± 1.4
Final (g)	501 ± 14	$495~\pm~44$	505 ± 19	430 ± 14
Liver weight (g)	$26.2 \pm 1.4^{\rm ab}$	29.9 ± 4.5^{ab}	29.3 ± 2.1^{ab}	$15.3 \pm 1.0^{\rm b}$
Visceral fat weight (g)				
Epididymal	8.18 ± 0.67	8.36 ± 1.4	8.61 ± 0.47	9.12 ± 0.75
Perinephric	14.1 ± 1.4	15.5 ± 2.7	14.1 ± 1.6	12.6 ± 0.74
Mesenteric	7.24 ± 0.84	8.37 ± 1.16	7.51 ± 0.55	7.55 ± 0.11
Total	29.5 ± 2.7	32.2 ± 5.1	30.2 ± 1.6	29.3 ± 1.4
Plasma lipid concentrations				
Triacylglycerol (mg/dL)				
CM	5.78 ± 1.4^{ab}	3.04 ± 0.43^{ab}	6.67 ± 2.6^{ab}	$13.0 \pm 2.2^{\text{b}}$
VLDL	34.6 ± 8.4^{ab}	24.1 ± 4.8^{ab}	41.3 ± 13^{ab}	$102.7 \pm 19^{\text{b}}$
LDL	3.51 ± 0.25^{ab}	2.98 ± 0.51^{ab}	3.12 ± 0.60^{ab}	$7.02 \pm 0.98^{\text{b}}$
HDL	1.98 ± 0.60	1.81 ± 0.15	2.08 ± 0.44	2.68 ± 0.40
Total	45.8 ± 9.3^{ab}	32.0 ± 5.7^{ab}	53.2 ± 16^{ab}	$125 \pm 22^{\text{b}}$
Cholesterol (mg/dL)				
CM	4.45 ± 1.3	3.18 ± 1.3	5.89 ± 1.9	0.64 ± 0.089
VLDL	75.2 ± 20^{ab}	58.9 ± 7.5^{ab}	64.6 ± 6.6^{ab}	$7.03 \pm 1.4^{\text{b}}$
LDL	19.7 ± 1.5^{ab}	22.8 ± 3.2^{ab}	$13.4 \pm 1.6^{\rm bc}$	$8.10 \pm 0.69^{\circ}$
HDL	$21.9 \pm 0.67^{\text{ab}}$	25.8 ± 3.6^{ab}	26.5 ± 2.3^{ab}	$35.9 \pm 3.0^{\circ}$
Total	121 ± 24^{ab}	111 ± 8.8^{ab}	110 ± 6.1^{ab}	$51.7 \pm 2.7^{\text{b}}$
Liver lipid concentrations (mg/g)				
Triacylglycerol	77.1 ± 4.6^{a}	93.5 ± 4.5^{a}	101 ± 10^{a}	$12.6 \pm 2.7^{\circ}$
Cholesterol	96.8 ± 9.4^{a}	$110 \pm 3.2^{\circ}$	109 ± 3.0^{a}	$1.78 \pm 0.048^{\text{b}}$
Phospholipid	15.9 ± 0.95^{a}	17.1 ± 0.49^{a}	$16.7 \pm 0.47^{\circ}$	$21.7 \pm 0.19^{\text{b}}$

平均値 ± 標準誤差(n=4) HF, 高脂肪高コレステロール食NC, 標準食

CM, chylomicron; VLDL, very low density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein 異なる文字間に有意差あり (p<0.05)

Gene Symbol	HF+ limonin	HF + nomilin	HF	NC
ACC1	63.8 ± 5.6^{a}	$68.2 \pm 2.0^{\circ}$	$100 \pm 24^{\text{ab}}$	$169 \pm 32^{\rm b}$
FAS	56.1 ± 20^{ab}	$36.5 \pm 4.6^{\circ}$	$100 \pm 45^{\text{ab}}$	$284 \pm 92^{\text{b}}$
SCD1	92.3 ± 12	68.3 ± 8.0	100 ± 8.9	68.1 ± 20
ME1	$80.4 \pm 10^{\circ}$	$92.4 \pm 6.3^{\circ}$	100 ± 10^{a}	$316 \pm 42^{\text{b}}$
SREBP1c	$95.8 \pm 17^{\circ}$	55.2 ± 8.0^{ab}	100 ± 15^{a}	$33 \pm 2.0^{\circ}$
ChREBP	85.7 ± 2.0^{ab}	$69.9 \pm 4.1^{\circ}$	$100 \pm 2.6^{\circ}$	$132 \pm 10^{\circ}$
HMGCR	$98.4 \pm 5.5^{\circ}$	$90.7 \pm 4.4^{\circ}$	100 ± 11^{a}	$453 \pm 20^{\text{b}}$
LDLr	$103 \pm 5.0^{\circ}$	$59.1 \pm 7.7^{\circ}$	100 ± 20^{a}	$184 \pm 15^{\text{b}}$
SREBP2	$86.2 \pm 5.7^{\circ}$	$80.6 \pm 3.2^{\circ}$	100 ± 8.7^{ab}	130 ± 16^{b}
PPARα	78.5 ± 7.4^{ab}	$61.8 \pm 9.5^{\circ}$	100 ± 9.4^{b}	$60.4 \pm 8.0^{\circ}$
CPT1a	82.7 ± 15	75.2 ± 5.0	100 ± 12	107 ± 15
FXR	85.9 ± 7.6^{ab}	$70.1 \pm 7.4^{\circ}$	100 ± 3.4^{b}	96.2 ± 8.8^{ab}
$LXR\alpha$	83.1 ± 3.1^{ab}	$65.8 \pm 3.4^{\circ}$	$100 \pm 2.8^{\text{b}}$	82.4 ± 10^{ab}
SHP	65.3 ± 7.8	66.8 ± 32	100 ± 18	30.4 ± 9.0
LRH-1	105 ± 6.2	107 ± 11	100 ± 7.6	133 ± 18
$HNF4\alpha$	117 ± 6.1	80.1 ± 12	100 ± 10	87.3 ± 7.0
CYP7A1	97.7 ± 18	72.0 ± 20	100 ± 32	86.9 ± 37
CYP27A1	87.0 ± 4.6	92.8 ± 14	100 ± 7.0	124 ± 13
ABCA1	96.5 ± 4.7^{ab}	76.9 ± 6.4^{ab}	$100 \pm 4.6^{\circ}$	$75.8 \pm 6.4^{\circ}$
ABCG5	$128 \pm 35^{\circ}$	57.2 ± 2.7^{ab}	100 ± 21^{a}	$19.1 \pm 6.2^{\text{b}}$
ABCG8	$146~\pm~43$	64.7 ± 12	100 ± 30	94.8 ± 36
ABCB11	115 ± 10	89.3 ± 1.4	100 ± 7.3	116 ± 15
MTTP	98.7 ± 8.4^{ab}	$87.7 \pm 4.4^{\circ}$	100 ± 2.4^{ab}	$131 \pm 12^{\text{b}}$
DGAT1	113 ± 8.9	98.2 ± 4.2	100 ± 3.6	94.6 ± 12
DGAT2	95.3 ± 16^{ab}	$72.2 \pm 4.8^{\circ}$	100 ± 5.1^{ab}	$115 \pm 9.9^{\text{b}}$
ACAT2	117 ± 8.6^{a}	102 ± 10^{a}	100 ± 4.6^{a}	$560 \pm 100^{\text{b}}$
CD36	90.9 ± 30	121 ± 25	100 ± 7.5	58.2 ± 4.8

表3 カンキツリモノイド摂取が肝臓での脂質代謝関連遺伝子の発現に与える影響

平均値±標準誤差(n=4) HF,高脂肪高コレステロール食;NC,標準食 mRNA 発現量は RPS18の発現量に対して標準化

異なる文字間に有意差あり(p<0.05)

5. おわりに

医食同源といわれるように食事と健康には密接なつな がりがある。果実の摂取が健康増進に一定の役割を果た していることは、多くの疫学研究から支持されている。 しかし、果実に含まれる多様な成分、特に二次代謝産物 の生理機能については、まだまだ解明されるべき点が多 く残されている。メタボリックシンドロームの予防・改 善のための食品選択に根拠を与える研究を目指したいと 考えている。

謝 辞 本研究の遂行にあたり、多くの方々よりご指 導を賜りました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

略語一覧

ABCA1 : ATP-Binding Cassette, Subfamily A Member1 ABCB11 : ATP-Binding Cassette, Sub-family B Member11 ABCG5 : ATP-Binding Cassette, Subfamily G Member5 ABCG8 : ATP-Binding Cassette, Subfamily G Member8 ACAT2: Acetyl-CoaAcetyltransferase2

ACC1: Acetyl-CoA Carboxylase1

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

CD36: Cluster of Differentiation36

- CPT1a: Carnitine Palmitoyltransferase1a
- CYP27A1 : Cytochrome P450 27A1

CYP7A1 : Cytochrome P450 7A1

ChREBP : Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein

Chol: Cholesterol

- DGAT : Diglyceride Acyltransferase
- FAS: Fatty Acid Synthase
- FXR: Farnesoid X Receptor

HMGCR: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase

- HNF-4 α : Hepatocyte Nuclear Factor-4 α
- JAPE : Japanese Apricot Phenolic Extracts
- LDLr: Low Density Lipoprotein Receptor
- LRH-1: Liver Receptor Homolog-1
- LXR α : Liver X Receptor α

ME: Malic Enzyme

MTP: Microsomal Triglyceride Transfer Protein

 $\label{eq:ppara} \begin{array}{l} \mbox{PPAR}\alpha:\mbox{Peroxisome Proliferator-activated Receptor }\alpha\\ \mbox{SCD}:\mbox{Stearoyl-CoA Desaturase} \end{array}$

SHP: Small Heterodimer Partner

SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein1c SREBP2 : Sterol Regulatory Element Binding Protein2 TG : Triglyceride

文 献

- WHO: Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, World Health Organ Tech Rep Ser, 916, i-viii, 1~149 (2003)
- 2) MITANI, T. *et al.*: Phenolics profile of mume, Japanese apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc.) fruit, *Biosci Biotechnol Biochem*, **77**, 1623 ~ 1627 (2013)
- 3) KISHIDA, K. *et al.*: Phenolic extract from Japanese apricot fruit (Prunus mume Sieb Et Zucc.) inhibits disaccharidase activity in the small intestine and suppresses the postprandial elevation of glucose levels in rats, *Food preservation science*, 40, 119~125 (2014)
- 4) KESSLER, M. *et al.*: A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport

systems, Biochim Biophys Acta, 506, $136 \sim 154$ (1978)

- 5) DAHLQVIST, A.: Method for assay of intestinal disaccharidases, *Anal Biochem*, **7**, 18~25 (1964)
- 6) GARRAIT, G. et al.: Gastrointestinal absorption and urinary excretion of trans-cinnamic and pcoumaric acids in rats, J Agric Food Chem, 54, 2944 ~2950 (2006)
- 7) KONISHI, Y., HITOMI, Y. and YOSHIOKA, E.: Intestinal absorption of *p*-coumaric and gallic acids in rats after oral administration, *J Agric Food Chem*, 52, 2527~2532 (2004)
- 8) KONISHI, Y., ZHAO, Z. and SHIMIZU, M.: Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates, *J Agric Food Chem*, 54, 7539~7543 (2006)
- 9) KIM, J. H. et al.: Sasa quelpaertensis and pcoumaric acid attenuate oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells, Biosci Biotechnol Biochem, 77, 1595~1598 (2013)
- MANNERS, G. D.: Citrus limonoids : analysis, bioactivity, and biomedical prospects, *J Agric Food Chem*, 55, 8285~8294 (2007)
- 11) 岸田邦博・鈴木雅也・井原勇人・尾崎嘉彦:ラット 肝臓脂質代謝関連遺伝子発現に与えるカンキツリモ ノイドの影響,日本食品保蔵科学会誌,41,51~58 (2015)