

|             |  |
|-------------|--|
| 氏名          | 小暮更紗   |
| 学位(専攻分野の名称) | 博士(環境共生学)  |
| 学位記番号       | 甲第864号   |
| 学位授与の日付     | 令和4年3月20日  |
| 学位論文題目      | <b>動水圧処理した食品が生体調節機能に及ぼす影響</b>  |
| 論文審査委員      | 主査 教授・博士(学術) 亀山慶晃<br>教授・博士(農芸化学) 古庄律<br>教授・博士(農芸化学) 山内淳<br>准教授・博士(応用生命科学) 谷岡由梨 |

## 論文内容の要旨

### 第1章

ホモジナイザーは1900年頃に牛乳の均質化を目的として開発された装置である。液体の試料を狭隘な流路にポンプで送液することで一時的に動水圧(Dynamic high pressure, DHP)が上昇し、その際にせん断力、衝撃力、キャビテーション効果などの物理的な力が作用することで試料が乳化・分散する。近年、ホモジナイザーは100MPa以上の超高压下で乳化・分散が行える高压ホモジナイザーへと発展を遂げた。超高压下ではDHPによる物理力が強く作用することで試料の粒子がナノ化することが報告されている。DHP処理によるナノ粒子化には、皮膚への浸透性向上やドラッグキャリアとしての効果が認められており、すでに医薬・化粧品分野で利用されているが、食品への応用は数少ないのが現状である。DHP処理をした試料中のタンパク質は、強力なせん断力によって切断されることで変性し、二次構造や遊離SHが変化することが明らかになっている。したがって、静水圧によるタンパク質構造の変性とは異なり、動水圧はタンパク質の高次構造を崩壊させ、低分子化を起こす可能性が高いことが考えられる。このことから、食品へのDHP処理は低分子化による吸収性向上や機能性ペプチドの出現などが期待されている。

本研究では、圧力技術のひとつであるDHPを利用した「超高压処理微粒化装置」を使用し、動物性タンパク質と植物性タンパク質を簡易的にペプチド化することを試みた。第2章では動物性タンパク質として鶏ささみ肉にDHP処理を行い、体タンパク質への利用について検討した。第3章では植物性タンパク質として大豆にDHP処理を行い、メタボリックシンドロームへの効果について検討した。

### 第2章 動水圧処理による動物性タンパク質の改質に関する研究

日本人の食事摂取基準は、厚生労働省より健康な個人または集団を対象として、健康障害

の予防を目的にエネルギーおよび各栄養素の摂取基準量が示されている。5年ごとに改定が加えられ、2020年版は高齢者の低栄養問題に着目した内容となっている。65歳以上におけるタンパク質の摂取目標量は、2015年版では13～20%エネルギー比であったのに対し、2020年版では15～20%エネルギー比となり、高齢者はタンパク質を多く摂取することが推奨されている。しかし、加齢に伴い①不適当な摂取（食欲不振）、②体内のタンパク質活性低下、③体タンパク質の異化亢進、などにより高齢者の2割は低栄養状態であることが報告されている。低栄養は体タンパク質の分解を起こし、それによって骨格筋量が減少したサルコペニアやフレイルの状態に陥る。サルコペニアやフレイルは筋肉量・筋力・身体機能の低下が認められ、病状回復の遅延や転倒による寝たきりへつながるリスクファクターである。この状況を受け、タンパク質を効率的に摂取する食品がいくつか開発されている。しかし、原材料が乳由来かつ粉体の商品を料理に添加する形式が主流であり、原材料や摂取形状において選択肢が限られているという問題点がある。本章では、DHP処理によって改質した動物性タンパク質の吸収性の評価を行い、高齢者の低栄養問題の一助となる食品素材を創生することを目的とした。

## **1. 動水圧処理が鶏ささみ肉の低分子化に与える影響**

**目的：**DHP処理によって食肉中の筋肉タンパク質が低分子化するのかを、OPAタンパク質定量法などから評価した。

**方法：**高タンパク質・低脂質である鶏ささみ肉に対し、コントロール(CTL)、加圧処理(DHP)、酵素処理(Ezm)、酵素＋加圧処理(Ezm+DHP)を行ったものを試料とした。DHP処理条件は150MPaで15回、酵素条件は肉重量に対して0.06%(w/w)のプロテアーゼを30分間反応させた。試料は真空凍結乾燥後に粉末化した。試料粉末は電気泳動やタンパク質溶解性試験によって高次構造の変性を確認し、さらに限外ろ過フィルターで分画した1kDa以下の低分子画分についてOPA蛍光誘導体化法を利用して低分子化したタンパク質の定量を行った。

**結果：**電気泳動の結果ではEzm、Ezm+DHPにおいて、筋肉の主要タンパク質であるアクチンとミオシンのバンドの減少が見られた。OPAで誘導体化した低分子画分のタンパク質定量結果は、CTL、DHP、Ezm、Ezm+DHPの順に値が高くなったことから、Ezm+DHPが最も低分子化していることが明らかとなった。

**結論：**DHP処理のみよりも、酵素との併用条件において飛躍的に低分子化が進むことが考えられた。タンパク質の高次構造は、酵素によってランダムに切断されたことで、DHPの特徴である物理力が作用しやすくなり、より低分子化が進んだものと推察された。

## **2. 動水圧処理した鶏ささみ肉が消化・吸収に与える影響**

**目的：**生体内におけるタンパク質の吸収速度はアミノ酸よりもペプチドの方が速く、窒素保持率はアミノ酸、タンパク質、ペプチドの順に高くなるとの報告が多く挙げられている。最も低分子化したEzm+DHPにおいて、体内での消化・吸収が向上するのかを*in vitro*、*in vivo*から評価した。

**方法：***in vitro*の実験として人工消化試験，*in vivo*の実験としてラットを用いた窒素出納試験を実施した。人工消化試験ではペプシンとトリプシンによる分解を行い，遊離アミノ酸量を測定した。窒素出納試験では，ラットに試料粉末添加食を10日間摂餌させ，採取した糞尿中の窒素量を測定した。

**結果：**人工消化試験では CTL，DHP，Ezm，Ezm+DHP の順に遊離アミノ酸量が増加していた。窒素出納試験では，ラットの体重・摂餌量に群間での差はなく，正味タンパク質利用率は Ezm，CTL，DHP，Ezm+DHP の順となった。Ezm+DHP は CTL や Ezm に対して有意に高値となった。

**結論：**人工消化試験と窒素出納試験によって Ezm+DHP は消化性が高く，体内での利用率が向上することが示された。体内への消化・吸収は単独処理よりも酵素処理と DHP 処理の併用が効果的であると示唆された。

### **3. 酵素・動水圧処理した鶏ささみ肉が骨格筋に与える影響**

**目的：**窒素出納試験において最も利用率の高かった Ezm+DHP をサルコペニアモデルマウスに長期間摂餌させ，同時に持久トレーニングを行うことで骨格筋への影響を評価した。

**方法：**被験動物は老化促進・短寿命・学習障害・サルコペニアを示す SAMP8 の10週齢雄性を20匹用いた。飼育期間は39週齢までの約7か月とし，2か月間の馴化飼育後に，CTL 添加食と Ezm+DHP 添加食の10匹ずつ2群に分けた。持久トレーニングはトレッドミルを使用して週に2回，10m/min で15分間の有酸素運動を行った。正常にトレーニングができた各群8匹について，解剖時に骨格筋であるヒラメ筋，長趾伸筋を摘出して湿重量の測定をし，-80℃で保管した。その後 RT-qPCR とウエスタンブロッティングによる解析を行った。

**結果：**筋湿重量は，ヒラメ筋では2群間に有意差はなかったものの，Ezm+DHP 群が増加傾向を示し，長趾伸筋では CTL 群に対して Ezm+DHP 群が有意に増加した。Ezm+DHP 群の長趾伸筋は，RT-qPCR においても mTOR や体タンパク質合成に関与する p70S6K の遺伝子発現量が CTL に比較して有意に増加し，ウエスタンブロッティングにおいても p70S6K のリン酸化率の増加が見られた。

**結論：**Ezm+DHP を給餌した群では，長趾伸筋の湿重量が有意に増加し，RT-qPCR の結果から mTOR，p70S6K の遺伝子発現量の増加も見られた。筋肉量の増加を目的とする食品の先行研究の結果と同様に，Ezm+DHP 処理した食肉試料の摂取は mTOR を介して体タンパク質の合成を促進させた。また，この結果は p70S6K のリン酸化によるタンパク質の発現レベルにおける筋湿重量の増加に反映されているものと考えられる。窒素出納試験において，低分子した Ezm+DHP は体内で吸収・保持されやすいことが示され，本結果において，保持された窒素は骨格筋の合成に利用されることが示された。

#### **4. 動水圧処理した鶏ささみ肉の調理性に関する実験**

**目的：** 試料粉末を加工食品とする際の調理学的特性を調べた。

**方法：** 粉末試料に 2 倍量の水と NaCl を 1%(w/w) を加えて混和し、2.5×3.0×高さ 1.5cm に成形後、180°C で 15 分間焼成した。焼成前後の水分損失率を測定した後に、テクスチャー解析(TPA)を行った。TPA は焼成物を半分に取り、切断面に対してテンシプレッサーを使用して、硬さ、凝集性、付着性の 3 項目を測定した。また、焼成後の試料を樹脂切断法によって処理し、走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

**結果：** 水分損失率は CTL, DHP, Ezm, Ezm+DHP の順に高くなった。TPA は硬さ、凝集性、付着性の全ての項目で CTL, DHP, Ezm, Ezm+DHP の順に低くなった。SEM による表面組織の観察では CTL に対して DHP, Ezm+DHP では表面組織の粒子が小さく、均一な大きさになっていた。さらに Ezm+DHP では粒子同士の間隙が最も大きくなっていた。

**結論：** 水分損失率と TPA の結果から Ezm+DHP は軟らかい一方で、パサついてまとまりにくい状態であることが示された。SEM の結果においても、CTL や Ezm と比較して DHP や Ezm+DHP は表面の小粒子化が見られ、間隙が大きいことが観察された。通常、肉は加塩によってアクチンとミオシンが架橋するが、Ezm+DHP はタンパク質の変性によって従来の架橋形成ができなかった可能性がある。このことから、Ezm+DHP を食品素材として利用するには、結着剤の利用が不可欠であることが示唆された。

#### **5. 第 2 章の小括**

食品分野における DHP 処理は易吸収性や低アレルギー性、低粒子化による機能性向上が期待されている。しかし、安全性や技術開発の研究が多く、実際に複合物である食品素材を使用し、食品を作り、食することを目的とする研究はほとんど見られない。また、高齢者の栄養問題であるサルコペニアやフレイルはタンパク質を摂取し、筋肉の減少を防ぐことが求められているものの、現在商品化されているタンパク質補助食品はサプリメント形状が主である。これらの問題を踏まえて、第 2 章では高齢者をターゲットに、DHP 処理した鶏ささみ肉の体内での吸収性や利用効率を評価した。その結果、DHP や酵素の単独処理よりも酵素と DHP の併用処理において、低分子化に起因する体内でのタンパク質利用効率向上が見られた。さらにサルコペニアモデルマウスに長期間給餌したところ、骨格筋量が増加する結果が得られた。DHP 処理によって低分子化した食品について、体内での機能性を詳細に追った研究は例を見ない。本研究によって DHP 処理は、サプリメント形状以外の新たなタンパク質補助食品を創生する可能性を示すことができた。

### **第 3 章 動水圧処理による植物性タンパク質の改質に関する研究**

第 3 章では植物性タンパク質である大豆を対象とし、さらなる DHP 処理の可能性を探っ

た。植物性食品の中でも大豆は、良質なタンパク質と脂質に加え、イソフラボンやサポニンを豊富に含んでいる。これらの成分は、抗酸化作用や脂質代謝改善、更年期障害の緩和、癌細胞の増殖抑制など多岐にわたる生体調節機能をもつことが分かっている。また、酵素加水分解によって低分子化した大豆ペプチドには、抗肥満、血圧上昇抑制、糖・脂質代謝改善の効果が報告されている。一方で、食品廃棄物中の大豆やふすまなどの有価物は 830 万トンに上ることが環境省の推計で報告されている。こうした未利用資源を DHP 処理によって利用することは、廃棄物削減による環境への負荷軽減や、機能性成分獲得によるヒトへの健康維持が期待できる。

本章においては、DHP 処理によって改質した植物タンパク質の機能性成分を見出し、廃棄物削減や二次利用の一助となる食品素材を創生することを目的とした。

### **1. 動水圧処理が大豆の低分子化に与える影響**

**目的：**DHP 処理によって大豆タンパク質が低分子化するのかを、OPA タンパク質定量法などから評価した。

**方法：**大豆粉末（外皮を含む）に対し、第 2 章と同様の処理を行った。酵素条件は大豆重量に対して 100ppm のプロテアーゼと 200ppm のセルラーゼを 30 分間反応させた。試料は真空凍結乾燥後に粉末化した。試料粉末は電気泳動によって高次構造の変性を確認し、さらに限外ろ過フィルターで分画した 30kDa と 1kDa 以下の低分子画分について OPA 蛍光誘導体化法を利用して低分子化したタンパク質の定量を行った。

**結果：**電気泳動では CTL に対して Ezm+DHP は、バンド面積が減少するものと増加するものが混在した。OPA タンパク質定量では、1kDa 画分において CTL と Ezm に対して DHP と Ezm+DHP が減少し、1~30kDa 画分において CTL に対して Ezm+DHP は増加した。

**結論：**CTL と比較して Ezm+DHP は、顕著な低分子化を示さなかった。OPA タンパク質定量の 1kDa 画分における DHP と Ezm+DHP の減少は、DHP 処理による凝集に起因することが推察された。また、鶏ささみ肉と異なり、細胞壁や食物繊維が豊富であるため、DHP が加わりにくかったことも考えられた。1~30kDa 画分においては Ezm+DHP が増加しており、オリゴペプチドの存在が示唆された。したがって、植物性タンパク質に対して DHP 処理を行う場合は、高濃度でのセルラーゼの使用など、前処理が重要であると示唆された。

### **2. 酵素・動水圧処理した大豆がメタボリックシンドロームへ与える影響**

**目的：**大豆タンパク質由来ペプチドは、コレステロール代謝改善や脂質代謝改善、抗肥満効果など、多くの機能が知られている。そこで、Ezm+DHP 処理した大豆が、*in vivo*においてどのような機能性を発現するのかを明らかにすることを目的とした。

**方法：**肥満・高血圧自然発症ラット(SHR/NDmcr-cp)の 7 週齢雄性、15 匹を被験動物とし、カゼイン食(Cas)、CTL 添加食(CTL)、Ezm+DHP 添加食(Ezm+DHP)の 3 種類の飼料を

給餌して3か月飼育し、定期的に体重と血圧の測定を行った。飼育終了時、全血採取した後に肝臓を摘出し、血清および肝臓中の脂質代謝に関連するパラメーターの解析を行った。

**結果：** Ezm+DHP 群の血圧上昇は Cas 群や CTL 群に対して有意に抑制された。また、肝臓中の脂質重量、中性脂肪も Ezm+DHP において有意に低下していた。このことから、脂肪蓄積に関連する脂質代謝改善が、血圧の上昇抑制を惹起したものと推察された。

## 第4章 総括

動水圧を利用した高圧ホモジナイザー処理は、フードナノテクノロジー分野において様々な期待をされている一方、国内では安全性評価や免疫応答性などの研究にとどまっている。ナノ粒子化した特定成分のみの摂取は、体内への吸収性が高まり、機能性成分がかえって悪影響を及ぼしてしまうことも考えられる。しかし、食品全体をナノ粒子化し、複合物として摂取する場合には、改質によるメリットがあるのではないかと考え、本研究を開始した。高圧ホモジナイザー処理を行う対象として、第2章では動物性タンパク質を、第3章では植物性タンパク質を取り扱った。動物性タンパク質である鶏ささみ肉については、筋肉タンパク質の低分子化が顕著に認められ、摂取した場合の体内利用の向上が明らかとなった。植物性タンパク質である大豆については、低分子化の決定的な結果は得られなかったものの、*in vivo* における実験では肝臓を中心とした脂質代謝改善・血圧上昇抑制効果を示した。

本研究により、高圧ホモジナイザーは酵素と併用することで、タンパク質の低分子化の促進、あるいはタンパク質を改質させ、摂取した際に食品の3次機能である生体調節機能を発揮することが明らかとなった。高圧ホモジナイザーの食品への利用は、世界が抱えるサルコペニアやメタボリックシンドロームなどの問題の一助となることが示された。

## 審査報告概要

本研究は、動水圧を利用した超高圧ホモジナイザーによりタンパク質を微粒化または低分子化させた食品の生体調節機能について実験動物により検討したものである。研究成果として、低濃度のプロテアーゼ処理と150MPaの動水圧を併用することで食肉タンパク質および大豆タンパク質がペプチドあるいはアミノ酸にまで低分子化されることを明らかとした。酵素+動水圧処理した食肉を運動負荷したサルコペニアモデル動物に摂取させた結果、筋肉重量の増加、筋タンパク質合成に関与するmTORおよびp70S6Kの遺伝子発現の上昇が認められた。また、生活習慣病モデル動物に酵素+動水圧処理した大豆粉末を摂取させた結果、血圧上昇抑制、脂肪蓄積に関与する脂質代謝の改善が認められた。以上の結果より、酵素処理を併用した動水圧処理は、食品中のタンパク質の微粒化および低分子化を促進させ、食品の3

次機能である生体調節機能を付与することを明らかにした。よって審査委員一同は博士（環境共生学）の学位を授与に値すると判断した。