

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660101

研究課題名(和文) 高圧処理による食品素材の機能性富化とその分子機構の解明

研究課題名(英文) High pressure transformation of agriproduct

研究代表者

藤井 智幸 (Fujii, Tomoyuki)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：40228953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高圧処理による農作物の新規二次代謝反応の誘導は、遺伝子組換えを介さない農作物の高付加価値化手法であり、これは食品素材の内部組織が破壊されて酵素と基質との会合が容易となることによりみかけ上反応が促進すること起因する。スプラウト試料に対して高圧処理を施し、除圧後保存すると、遊離アミノ酸が増加することを確認した。また、高圧処理を施した緑豆スプラウトを4℃で保存すると青色色素が生成することを見出した。このように、植物の生理的狀態に応じて適切な生育段階で高圧処理を施すことによって潜在的な二次代謝反応をactiveになる現象が一般的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The induction of novel secondary metabolic reactions in agricultural products by high pressure treatment is a high value added method for agricultural products that does not involve genetically modified technology, and this is because the internal tissues of agricultural products are destroyed and the association between the enzyme and the substrate is easy as a result. At this time, an enzyme reaction is apparently accelerated. It was confirmed that when the sprout sample was subjected to high pressure treatment and preserved after decompression, free amino acids increased. In addition, it was found that blue pigment is produced when the green bean sprout subjected to high pressure treatment is stored at 4 °C. Thus, it was shown that the phenomenon that a potential secondary metabolic reaction becomes active by applying high pressure treatment at an appropriate physiological stage of a plant.

研究分野：農芸化学

キーワード：高圧加工

### 1. 研究開始当初の背景

高圧処理は非加熱加工のひとつである。故に、新鮮な食品素材をその素材に内在する栄養特性や嗜好特性を損なうことなく加工あるいは殺菌する技術として、あるいは、高付加価値食品の研究開発において熱に弱い成分を残存させる工夫のひとつとして注目されている。加えて、高圧処理には、圧力の伝播が瞬時であるという長所がある。130 Lのタンクに高圧をかける場合でもほぼ一瞬にしてタンク内全体が所定圧力に達するため、タンクに仕込んだ食材料内の位置による圧力の偏りが少なく、ほぼ均一な質的变化が実現できる。例えば、マグロを解凍あるいは加熱するとき、中心部と外表面との質的变化を均一にしようとするのが困難を伴う。「加熱」では殺菌が完了するまでに中心部と表面部に温度差が生じて調理にむらが出てしまうのに対し、「加圧」では圧力は極めて速やかに伝わるため調理むらがほとんど生じない。高圧処理のこのような特徴は、特に固体食品を対象にした場合には有利である。

一方で、食品素材である農産物に高圧処理を施すと内部組織構造や膜構造が破壊され、結果として内部での物質移動が促進されたり、新たな生化学反応が進行したりする可能性があることが認識されるようになった。例えば、カブを室温で高圧処理(600 MPa, 5 min)を施した後4日保存し、保存中の色相変化を観察したところ、未処理試料は保存期間中、白色のままであったのに対し、高圧処理を施したカブは保存4日目に深青色を呈し、11日後ではさらに濃くなったという結果も得られている。これは、高圧処理によって、カブの青色色素の産生に関わる酵素系が活性化されたと示唆された。

このような2つの特徴を活かすことができれば、高圧利用の幅が広がり、新たな高圧利用食品の開発、あるいは高圧利用プロセスの確立につながると考えられた。しかし、圧力をかけることによって細胞内で生じる変化の詳細については充分には解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

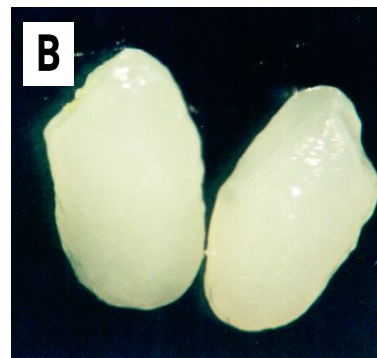
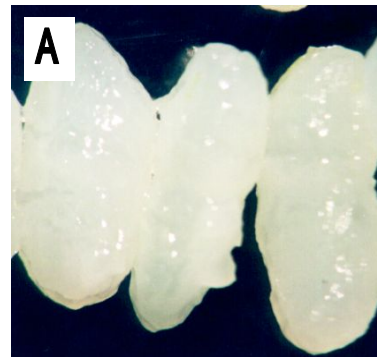
申請者の藤井は、次世代型の高圧利用の考え方として、種々の食品加工操作の前処理として高圧加工を利用することの利点に気づき、「High-Pressure Induced Transformation (Hi-Pit)」のコンセプトを構想するに至った。200~400 MPa程度の圧力領域では、生物素材の細胞構造・膜構造は破壊されるが、酵素などの高分子や低分子の生体成分にはそれほど大きな影響は生じない。従って、2次的効果として内部での物質移動が速くなったり、酵素反応が促進されたりする。この様相は、食品・農産物が高圧によって形質が変わったとみなすことができる。高圧処理という簡便で実用性の高い技術で植物の持つ顕在化していない二次代謝反応系を活性

化させることができれば、高品質な食品素材を取得する技術の確立につながる。この技術によって機能性成分を増強させることができるようになれば、サプリメントの利用により過剰摂取や偏った栄養成分摂取のリスクを高めている例も報告されているなかで、こうしたリスクを低減しながら生活習慣病の発症を予防することが可能となり、一層の増大が予想される医療費の軽減にも貢献できると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高圧処理玄米における成分変化

高圧処理米を炊飯した場合、通常の米飯では組織構造が一種の「籠」のような役割を果たすために短軸方向への膨潤が抑制され、結果的に長軸方向にのみ膨潤して細長くなるのに対し、高圧処理した米では組織構造が破壊されたため、白米と同じ形状を保ったまま等方的に膨潤することが知られていた。



A: 無処理の浸漬米で炊いた米飯

B: 400MPa, 10min処理の浸漬米で炊いた

高圧によってこのような組織破壊が起こる一方で、高圧処理後の玄米において酵素が失活していなければ高圧処理を施した後適度な条件で保持すると酵素反応が進行すると予想された。このような予測のもとにグルタミン脱炭酸酵素によってγ-アミノ酪酸(GABA)が生成する反応に着目して実験を行った。

試料としてコシヒカリの玄米を用い、特に精米することなく実験に供した。圧力処理は25分に行い、圧力保持時間は設定圧力に達してから時間とした。玄米20gを0.01ま

たは 0.05、0.1g/mL のグルタミン酸水溶液 30 mL とともにポリエチレンバックに入れ真空包装し、25℃にて22時間浸漬・吸水させた。吸水後、200MPaで10分間高圧処理を施した。高圧処理後、玄米試料を純水で軽く洗い水切りしてからポリエチレンバックに入れ、真空包装し、25℃にて1日あるいは2日保存した。

## (2) 緑豆スプラウトに対する高圧処理

高圧処理による農作物の新規二次代謝反応の誘導は、遺伝子組換えを介さない農作物の高付加価値化手法であり、これは食品素材の内部組織が破壊されて酵素と基質との会合が容易となることによりみかけ上反応が促進することに起因する。植物は種子から生長し成体となる。故に、発芽直後のスプラウトにおいては酵素活性が高く、かつ内部組織が脆弱と考えられる。従って、本研究で検討しようとしている高圧効果を応用するに適した試料と思われた。そこで、緑豆もやしを栽培し、酵素活性が高いと考えられる栽培中期のもやしを収穫し、収穫直後の試料に対して高圧処理を施し、遊離アミノ酸の生成挙動等についてその圧力依存性を検討した。

緑豆は 38℃に予備加熱したピーカーに 400 粒入れ、豆が十分に浸るくらいの MilliQ 水に浸漬した。その後 38℃の恒温槽内に 5 時間保持し、浸漬終了後、水切りしキムワイプで表面の水滴をふき取り、発芽の有無を確認した。発芽した種子を選抜し、寒天培地に 2 cm 間隔で播種した。この時、種留が培地に触れるようにピンセットで向きを整え、恒温培養器内で、70 時間栽培した。暗室で栽培し、室内温度条件は 24℃とした。栽培中は異物混入を防ぐため、バットに数カ所穴をあけたラップをかかけた。



70 時間後、発芽したもやしを収穫し、皮を取り除き収量を測定した。未処理、200MPa、400MPa と保存期間 0 日目、1 日目、2 日目、3 日目、4 日日用に試料を分け、低酸素透過性包材に試料を詰め吸引し実験試料とした。その後 200MPa、400MPa の高圧処理を施し、処理直後を保存期間 0 日目とし、0 日目のサンプル以外は 4℃で冷蔵保存した。そして、試

料の遊離アミノ酸を分析した。

アミノ酸分析は、以下のように行った。-58℃で冷凍保存したもやしのアミノ酸試料は 4℃の冷蔵庫で解凍させた。解凍したアミノ酸試料 1g を 15ml 遠心チューブにとり、MilliQ 水 4ml を加えてミクロスパーテルでよく粉碎した。ボルテックスを使用し粉碎した試料を均一化した。均一になった懸濁液 1.8ml を 2ml マイクロチューブに入れ、5000rpm、15 分、4℃で遠心分離した。遠心分離をした後の上澄み 0.5ml を Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices の目盛付きチューブに入れ、それを 2ml マイクロチューブに差し込み、限外濾過(12500rpm、10 分、4℃)によりさらに高分子成分を除去した。2ml マイクロチューブの方に限外濾過された液体試料を MilliQ 水で適当に希釈した。前処理で希釈した液体試料 100 μL、50mM NaHCO<sub>3</sub> (pH9.0) 400 μL、ダブシル試薬(1mg/ml アセトン...和光純薬工業、特級) 500 μL をマイクロチューブに取りボルテックスで混合した。混合後ただちに 67℃の湯浴中で 10 分間反応させ、直ちに氷冷した。HPLC 条件は、カラム：SHISEIDO CAPCELLPAK C18 UG120 5 μm 4.6mm I.D. × 250mm、カラム温度：40℃、検出波長：436nm、溶出条件：A 液...25mM 酢酸ナトリウム pH6.5/4%ジメチルホルムアミド (DMF)、B 液...アセトニトリル。流量：1mL/min。

グラジエント条件：

Step	TIME(min)	A 液(%)	B 液(%)
1	0	85	15
2	2	85	15
3	15	70	30
4	30	65	35
5	35	55	45
6	39	45	55
7	42	40	60
8	45	0	100
9	46	85	15
10	60	85	15

## 4. 研究成果

### (1) 高圧処理玄米における成分変化

玄米の場合、内在するグルタミン酸脱炭酸酵素によってグルタミン酸から GABA が生成されることが知られている。従って、酵素の基質であるグルタミン酸を供給・増強することにより、GABA 富化玄米が得られる可能性がある。吸水した玄米に高圧処理を施した後保存中のグルタミン酸、グルタミン及び GABA の濃度を測定した結果を図 1 に示す。



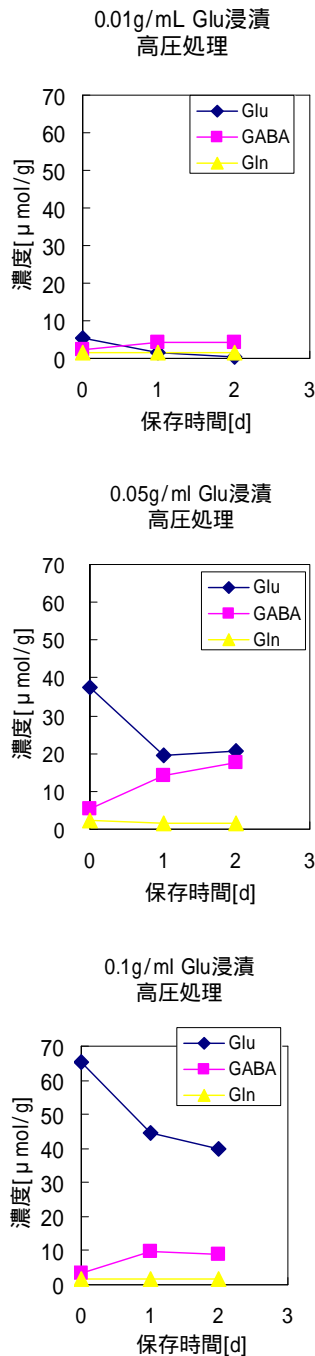


図1 グルタミン酸水溶液浸漬高压処理玄米の保存中でのGABA生成挙動

上図及び中図、下図はそれぞれ0.01及び0.05、0.1g/mLのグルタミン酸水溶液に浸漬した場合の結果である。グルタミン酸濃度が減少する一方、GABA濃度が増加する傾向が認められた。

0.05 g/mL グルタミン酸水溶液に浸漬した玄米においては高压処理後に保存することによって、GABA濃度が20  $\mu\text{mol/g}$ 程度にまで達した。高压処理により玄米粒の内部構造や細胞組織などの生理的に必須な構造が破壊され生物活性が失われたことによって、酵素反応が容易に進行するようになった結果、急

速にGABAが生成したものと考えられた。また、0.1g/mLグルタミン酸水溶液に浸漬した玄米においては、0.05g/mLグルタミン酸水溶液に浸漬した場合と比べてGABA生成量が小さくなった。これは、グルタミン酸脱炭酸酵素の基質阻害の影響と考えられた。

このような、高压処理によって生物素材に新しい特性が顕在化する様子は、まさに「形質転換」と言える。

## (2) 高压処理緑豆スプラウト(もやし)の状態変化

酵素活性が高いと考えられる栽培段階にもやし試料に対して高压処理を施し、除圧後保存すると、遊離アミノ酸が増加することを確認した。高压処理条件200MPa、400MPaによる遊離アミノ酸濃度については顕著な差は認められなかった。さらに実験を進め、400MPaの高压処理を施した緑豆スプラウトを4日保存した場合、4日後スプラウトの種子の部分に青色色素が生成することを見出した。200MPaの高压処理を施した試料及び未処理の試料では4日、4日間保存しても青色色素の生成が認められなかった。

青色色素の生成に関しては、生成した個体もあれば生成しない個体もあった。そこで、青色色素が生成した個体、生成しなかった個体、未処理の個体のそれぞれについて遊離アミノ酸の生成挙動と比較した。代表的なアミノ酸として、グルタミン酸、アルギニン、グリシン、プロリン、メチオニン、フェニルアラニン、リジンの結果を図2に示す。グルタミン酸濃度については、未処理試料では1日後に増加しその後次第に減少する傾向が認められたのに対し、高压処理試料においては青色色素が生成した個体も生成しなかった個体も経時的に増加した。アルギニン濃度については、未処理試料では経時的な変化が無かったのに対して、高压処理試料においては高压処理直後で顕著に濃度が増加しその後経時的に増加した。グリシン濃度については、高压処理直後では変化が無かったが、その後未処理試料では顕著な増加が認められなかったのに対し、高压処理試料では単調に増加する傾向が認められた。プロリンについては、高压処理によって濃度が減少するが経時変化については3試料とも増加する傾向が認められた。メチオニン、フェニルアラニン、リジンについては、高压処理によって濃度増加があり、未処理試料においては微増し高压処理試料に関しては顕著に増加する傾向が認められた。いずれのアミノ酸についても、高压処理試料において青色色素が生成した個体も生成しなかった個体もほぼ同様の挙動を示した。つまり、アミノ酸の動態と青色色素の生成は連動しないことが示された。

以上の結果から、遊離アミノ酸の生成に関わる酵素反応系と青色色素の生成に関わる酵素反応系が異なることが示された。

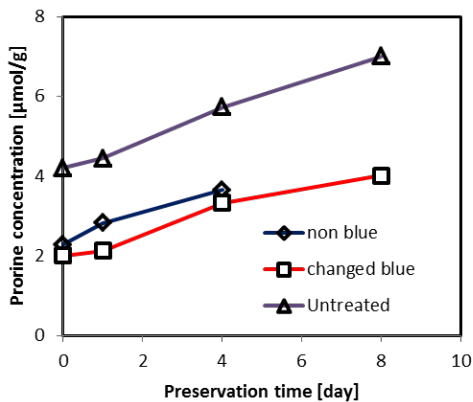
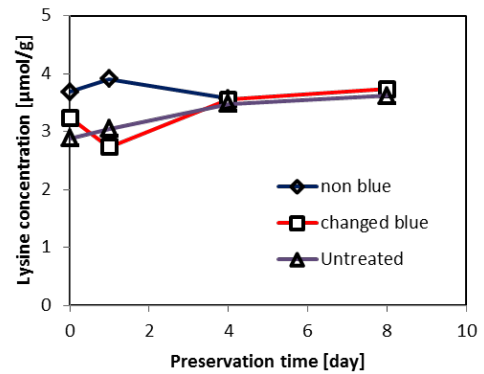
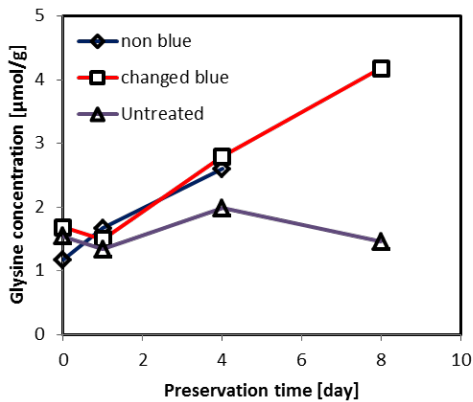
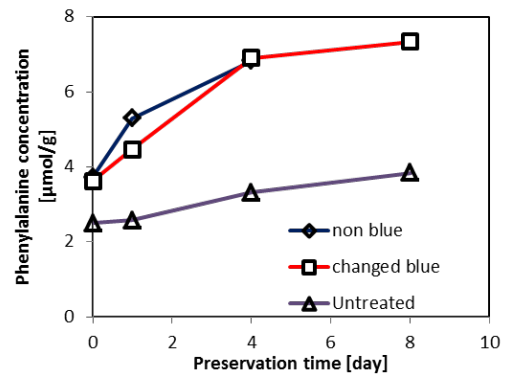
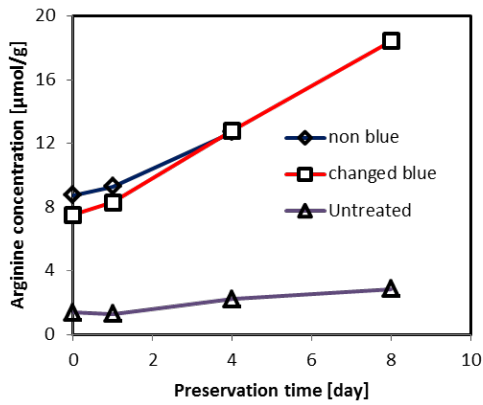
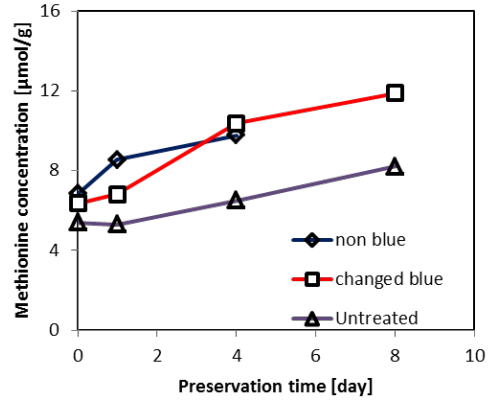
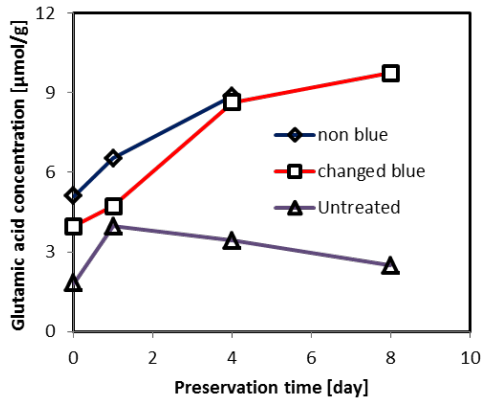


図2 緑豆スプラウトにおける遊離アミノ酸の生成挙動（グルタミン酸、アルギニン、グリシン、プロリン、メチオニン、フェニルアラニン、リジン）

高圧処理による農作物の新規二次代謝反応の誘導は、遺伝子組換えを介さない農作物の高付加価値化手法といえることができる。近年、我が国においても様々な植物がスプラウトの状態で食されることが多くなった。スプラウト（発芽野菜）は酵素活性が高く、かつ内部組織が脆弱と考えられるため、内部組織を破壊することによってユニークな二次代謝反応を誘導する対象として適していると考えられる。本研究において、様々な二次代

謝反応が高圧処理によって誘導され、潜在的な酵素反応系が利用できるようになる方法論が確立されたたものと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tamate, R. Nakai, Y. Nakamori, M. Esashi, Y. Iwamoto, Y. Tsukada, M. Saito, D. Ishikawa and T. Fujii, Engineering Analysis of the High Density Heterotrophic Cultivation of Mung Bean Sprouts, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 80(8), 1602-1608 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計1件)

玉手晴香、中居藍、井戸川詩織、岩元靖、塚田義弘、藤井智幸、緑豆発芽野菜の高密度栽培システムに関する反応工学的解析、日本食品工学会 2014 年度大会、2014 年 8 月 9 日、つくば国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：恒暗型栽培システム、および従属栄養栽培作物栽培方法

発明者：玉手晴香、中居藍、中森康幸、江刺雅大、塚田義弘、遠藤孝広、高橋佳男、石川大太郎、藤井智幸

権利者：太子食品工業、東北大学

種類：特許

番号：特願 2015-005804

出願年月日：平成 27 年 1 月 15 日

国内外の別：国内

〔その他〕

特になし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 智幸 (FUJII, Tomoyuki)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40228953