

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658104

研究課題名(和文) 生物素材における潜在的二次代謝反応の発現機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Induction of potential secondary metabolic reactions in biological and food materials with high pressure

研究代表者

藤井 智幸 (FUJII, Tomoyuki)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40228953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：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。生物素材である農産物を用い、高圧処理を施し、処理後の試料を25℃で4日間保存した。高圧処理を施したタマネギ試料においては保存中にケルセチンが増加し、ラジカル消去活性が増加することが示された。高圧処理はまず細胞性生物素材の組織構造に損傷を与え、細胞構造の損傷により組織構造内における物質移動が促進されることで、局在化していたケルセチン生成に関与する酵素群と基質の会合性が上がった結果として、ケルセチン濃度が増大したものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：High pressure treatment, being able to activate secondary metabolic reactions in the plants, will lead to establishment of a technique for obtaining the food material of high quality. In this study, an agricultural material was selected and treated with high pressure. And the processed sample was stored for 4 days at 25°C. In onion samples, its radical scavenging activity increases have been shown, because quercetin inside increased during storage after the high-pressure treatment. The high-pressure treatment damaged the tissue structure of cellular biological material first, and mass transfer in the material was promoted. Therefore, the association of substrate and enzymes involved in quercetin generation was considered to be raised, and quercetin concentration was increased as a result.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：高圧処理 農産加工

1. 研究開始当初の背景

食べ物はすべて、もともとは生物だったものである。従って、食材料の品質は一定であるとは限らない。同じ食材料でも、品種や種類によって味や成分値などが異なり、同じ品種であっても産地によってその品質が異なることが多い(産地に依存したブランド化が可能な理由がこれである)。また、同じ産地であっても、収穫時期や保蔵時間によって品質変化が生じる。同じ時期に収穫されたとしても大きさや形がそろっているわけではなく、個体差に由来するばらつきがある。

このような食材料が宿命的に持っている品質のばらつきに起因する問題を解決しながら食品加工技術は発展してきた。一定の品質を保ちながら安定的に食品を製造するためには、長年の経験と高度な技術が必要であった。現代では、その技術を補うためにマニュアルが作られ、製造工程は機械化されている。

また、食品加工工程では、必ず組成的・構造的変化が併発し、これらの併発変化が最終製品の品質を左右する。殺菌は完全に行いたい、脂質の酸化やビタミン類の破壊はできるだけ抑制し、デンプンの糊化や褐変反応は適度に進行させたい、というのが食品加熱操作の多目的性であり、殺菌だけを考慮して加熱操作条件を決めると品質の高い製品はできない。つまり、相反する目的と微妙な制約条件とを満足させながら最適条件が選択されなければならない。

高圧の加工技術としての良さは、圧力の伝播が瞬時であることである。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部が所定圧力に達するため、タンク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。しかし、圧力の場合比較的容易に均一な質的变化を実現できる。「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。

生物素材内では、高圧処理によって細胞組織の損傷と酵素タンパク質の状態変化が起こる。細胞組織の損傷は、生物組織内部の物質移動を促進するとともに、生体内代謝系の調節を司っていた細胞内小器官の機能破壊を併発する。従って、細胞組織は損傷するが酵素タンパク質はそれほど変性しない圧力処理条件を選べば、圧力に比較的弱い一部の酵素が失活する影響も加わって、通常とは異なる酵素反応経路が働き始め、新しい有益な二次代謝産物が生成することが期待できる。これが、「潜在的二次代謝反応」の発現である。食品素材中に内在する酵素を積極的に活

用しようというアプローチは、これまでの高圧利用食品には無かった考え方であり、新たな方法論の展開につながると考えられる。

2. 研究の目的

食品分野において高圧利用技術は、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注目され、高圧を利用したジャムが商品化されるに至った。しかし、その後芽胞菌胞子は殺菌できないなど限界も示され、圧力のみではなく圧力と温度とを併用する方法が提案された。圧力と温度の併用は、確かに温度のみの操作に比べ、より低い温度で食品加工あるいは殺菌が可能となるが、品質劣化の問題を解決する理想的な食品加工技術からはほど遠いと言わざるを得ない。このような背景から日本では食品への高圧利用の研究は低迷期に入った。近年、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。このような2つの現象を活かすことのできる前処理として高圧利用をとらえなおすと、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ことが期待される。このような食品素材の変化を「High-Pressure Induced Transformation (Hi-Pit)」と呼び、例えば、玄米に高圧処理を施した後適度な温度条件で保持すると酵素反応が進行してγ-アミノ酪酸(GABA)が増えるという結果も報告されている¹⁾。本研究では、高圧処理による米の改質に関して内部構造及び化学反応の観点から解析し、「Hi-Pit」の特性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料

試料として平成16年新潟県産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。市販のタマネギ(北海道産)およびカブ(新潟産)を高圧処理試料として用いた。

(2) 圧力処理

圧力処理には、ピストン式高圧処理装置(神戸製鋼所)を用いた。実験は25℃にて行い、圧力保持時間は設定圧力に達してからの時間とした。

(3) 炊飯米のアスペクト比の測定

玄米100gを80mLの純水とともにポリエチレンバックに入れ、減圧シールした。シール直後、またはシールして22時間後に、600MPaで10分間高圧処理を施した。高圧処理後、試料を取り出し水切りし、試料重量の1.5倍量の純水を加え電気炊飯器(National, SR-CJ05)を用いて炊飯した。炊飯後、得られた米飯粒の長軸長と短軸長をノギスを用いて測定しアスペクト比(長軸長/短軸長)

を算出した。

(4) GABA 富化玄米の作製

玄米 20 g を 0.01 または 0.05, 0.1 g/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シールし、25 °C にて 22 時間浸漬・吸水させた。吸水後、400 MPa 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、減圧シールした。これを、25 °C にて 1 日あるいは 2 日保存したものを GABA 富化玄米とした。

(5) タマネギ及びカブの高圧処理

保護葉を除いたタマネギ、葉および外皮を除いたカブを分割し、半分は高圧処理用の試料、他方を未処理用の試料とし、ポリエチレン・ポリアミドナイロン製包材 (Magic Vac、フレイムノバ社) を用いて減圧包装した。ピストン式高圧処理装置 (試験機、神戸製鋼所) のシリンダー内に圧力媒体である水を注入し、そこに減圧包装した試料を入れ、25 °C で 5 分間の高圧処理 50 ~ 400 MPa を施した。処理時間は、設定圧力に到達してからの圧力保持時間である。高圧処理後の試料は 25 °C の恒温器 (Bio Shaker BR-23FP、TAITEC) で 4 日間保存し分析に供した。

(6) アミノ酸分析

玄米試料を 2 g 量り取り、乳鉢で軽く破碎し、そこに純水 18 mL を加え、粉碎・混合した。得られた試料を 1.5 mL エッペンチューブに入れ 10000 rpm で 3 分間遠心し、上清を分析用試料とした。遊離アミノ酸分析は、アミノ酸分析キット EZ: faast (Phenomenex, CA, USA) を用いて、GC-FID (島津製作所, GC-14A) にて行った。

(7) DPPH ラジカルの消去率の測定

試料 10 g にメタノール (特級、和光純薬工業) を 50 mL 加え、ホモジナイザー (EXCEL AUTO、ED-12、日本精機製作所) を用いて 12000 rpm で 10 分間、氷冷条件のもと試料を破碎した。吸引ろ過した試料破碎液を 4 °C にて 3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄液を適宜希釈しラジカル消去活性測定用の試料とした。メタノール、pH 6.0 に調製した 0.2 M MES 緩衝溶液 (和光純薬工業) および 0.4 mM DPPH 溶液 (和光純薬工業) を等量ずつ混合した DPPH 混合液 2 mL に、種々の濃度に調製した試料溶液 1 mL を加えすばやく混合・攪拌し、室温にて 10 分間静置した。静置した試料は分光光度計 (V-650、日本分光) を用いて 520 nm の吸光度を測定した。ブランクにはメタノールを用いた。測定した試料およびブランクの吸光度を用いて DPPH ラジカルの消去率を算出した。

DPPH ラジカル消去率 (%)

$$= (1 - (\text{試料吸光度} / \text{ブランク吸光度})) \times 100$$

算出した消去率および Trolox を用いて作成した検量線から、試料のラジカル消去活性を Trolox 等量 ($\mu\text{mol-Trolox/g-F.W.}$) で算出した。

(8) HPLC 分析

ラジカル消去活性の測定に用いた試料破

碎液 30 mL に、内部標準試薬ジオスメチン (EXTRATHYNTHESE 社) を 2 mL 添加し、さらに 3N 塩酸を 12 mL 加え攪拌した。攪拌後の試料破碎液は試験管に分注のうえ、80 °C の湯浴中で 30 分間の酸加水分解を施した。酸加水分解後の試料は氷冷によって反応を停止したのち、酸加水分解物を 3000 rpm で 10 分間遠心分離した。適宜希釈した上澄液をセルロースアセテートメンブレン (0.20 μm 、DISMIC-13CP、Advantec) でろ過し、HPLC 分析用の試料とした。HPLC 分析は以下の条件でグラジエント溶出法を用いた。高速液体クロマトグラフ; 日本分光製 PU-2080、カラム; 東ソー社製 TSK-ODS-80TM (4.6 mm I.D. x 150 mm)、カラム温度; 室温、注入量; 20 μL 、検出器; 日本分光製 875UV、検出波長; 243 nm、溶離液 (A) 0.01 M リン酸緩衝液 / 5 mM ヘプタンスルホン酸、pH 2.5、溶離液 (B) 0.01 M リン酸緩衝液 / アセトニトリル、pH 2.5、0% (B) 100% (B) (30 分直線的濃度勾配)、流速 1.0 mL/min。

4. 研究成果

(1) 炊飯米に及ぼす高圧処理の影響

本研究で用いた玄米の吸水特性を調べ、玄米に充分吸水させる条件として浸漬時間を 22 時間とした。生玄米は炊飯によって膨潤し、高圧処理を施さない場合でもアスペクト比が大きくなったが、これは玄米が固有に持つ内部構造に異方性があり、その方向に依存して膨潤するためと考えられた。従って、玄米の内部構造が異なると、炊飯に伴う膨潤の程度も異なると予想される。浸漬直後に高圧処理を施した玄米試料を炊飯したところ、未処理玄米の炊飯米に比べ、アスペクト比が大きくなった。この結果から、玄米の内部構造が持っている異方性が高圧処理によって何らかの変化を受けたことによって、膨潤による伸長の程度に差が生じたものと考えられた。このように、炊飯米の最終形状から炊飯前の構造破壊の程度が評価できることが示された。

さらに、22 時間浸漬した場合、高圧処理を施した玄米試料のアスペクト比は未処理の試料より大きくなる傾向を示した。圧力は水を介して伝わるため、充分に吸水した領域では高圧効果が顕著に現れると考えられる。従って、吸水時間を充分にとった浸漬時間 22 時間の試料では、充分吸水しているため、中心部まで高圧の作用を受け易く、アスペクト比がより大きな値となったと考えられた。

(2) 水浸漬した玄米中での GABA 生成

22 時間浸漬した玄米中に含まれる主要なアミノ酸について、分析した。400 MPa、10 分の高圧処理では、グルタミン酸が検出されなかったことを除けば、遊離アミノ酸濃度にそれほどの相違は認められなかった。GABA に関しては玄米を水に 22 時間浸漬したのみでも GABA の生成が認められ、2 $\mu\text{mol/g}$ (およそ

20 mg/100g) 程度となった。この結果は、脱脂後に水浸漬することによってコメ胚芽中に GABA が蓄積されるという報告と同様の現象と考えられた。本研究にて、高圧処理を施した試料中の GABA は未処理の場合と同程度であり、GABA の生成に関しては、高圧処理による促進効果は認められなかった。玄米を発芽させ GABA 含量を高めた製品が商品化されているが、22 時間浸漬した玄米中の GABA 含量はこれと同程度であった。

グルタミン酸脱炭酸酵素によって、玄米の内部においてグルタミン酸から GABA が生成されることが示唆されたため、グルタミン酸脱炭酸酵素の基質となっているグルタミン酸を供給・増強し、GABA 富化玄米を得る可能性が示唆された。従って、玄米をグルタミン酸水溶液に浸漬して前駆体としてのグルタミン酸を供給することによってさらに GABA 含量を増やすことが可能かどうか、実験的に検討した。浸漬するグルタミン酸水溶液の濃度を 0.01, 0.05, 0.1g/mL の 3 段階とし、1 ~ 2 日保存した玄米試料の GABA 含量を測定した。0.01, 0.05, 及び 0.1g/mL のグルタミン酸水溶液に浸漬した場合、浸漬するグルタミン酸水溶液の濃度が高くなるにつれて玄米中のグルタミン酸濃度が高くなり、数十 $\mu\text{mol/g}$ 程度にまで達した。また、25 での保存中にグルタミン酸が代謝され、経時的に濃度が減少していく挙動が認められた。グルタミン酸の代謝過程の反応中間体であるグルタミンに関しては保存中ほぼ一定の濃度であった。これらの結果から、保存中玄米の内部では生理的な安定性が保たれていることが示唆された。また、GABA についてもグルタミンと同様に保存期間中に濃度変化は認められなかった。

水浸漬した玄米では高圧処理を施さないと、前駆体であるグルタミン酸を供給しても GABA は顕著には生成しないことが示された。

(3) 代謝経路を利用して GABA を富化させた玄米の作製

200 ~ 400 MPa 程度の高圧で細胞や組織構造が破壊された結果、酵素的物質変換作用が生じる現象は、言い換えれば、生体内の代謝経路を利用し、高圧作用で制御しつつ有効な二次代謝産物を生成させようというアイデアにつながる。このような代謝反応利用型物質変換システムを、「高圧メタボリック・リアクター」と呼ぶことができるであろう。高圧処理することによって、生物素材内部に有効成分を生成させようという試みである。

グルタミン酸水溶液に浸漬した玄米を高圧処理を施した後、25 での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。0.01, 0.05, 及び 0.1g/mL のグルタミン酸水溶液に浸漬した場合、グルタミン酸濃度が減少するにつれて、GABA が増加する傾向が認められた。高圧処理後に保存することによって、GABA 含量が $20 \mu\text{mol/g}$ (およそ 200 mg/100g) 程度にまで達した。高圧処理によ

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。

(4) タマネギ及びカブのラジカル消去活性
高圧処理と保存期間がラジカル消去活性に及ぼす影響について、タマネギでは、200 MPa 以上の高圧処理を施し 25 での保存することにより、ラジカル消去活性は顕著に増加した。また 400 MPa の高圧処理後に 25 での 3~4 日間保存することで、未処理試料の約 4 倍のラジカル消去活性を示した。本研究において測定された未処理タマネギの保存 0 日目のラジカル消去活性は約 $0.7 \mu\text{mol-Trolox/g-F.W.}$ であったのに対し、高圧処理を施し保存した試料では、 $2.54 - 3.98 \mu\text{mol-Trolox/g-F.W.}$ の値を取ったことから、タマネギに高圧処理を施し保存することで抗酸化活性を顕著に増強させることが可能であることが示された。

高圧処理を施したカブは、200 MPa 以上において処理圧力の増加と共にラジカル消去活性が経時的に低下する傾向を示した。以上の結果より、高圧処理によって抗酸化活性が高まる農産物もあれば変わらない農産物もあることが分かった。

(5) タマネギの HPLC 分析

ラジカル消去活性が顕著に増強された高圧処理タマネギに関して、25 での保存中の成分について、主要な抗酸化物質であるフラボノイドをターゲットとして HPLC 分析を行った。

多成分かつ未同定成分の中から、高圧処理により増減した成分を明瞭に識別し抽出するために、HPLC 分析で検出された主要ピークに関して、未処理試料の分析値を横軸に、高圧処理試料の分析値を縦軸にプロットすることにより相関プロットを作成し解析を行った。タマネギのメタノール抽出液の HPLC 分析結果を用いて、クロマトグラムにおけるピーク面積比を、
$$\text{面積比} = (\text{試料のピーク面積}) / (\text{内部標準のピーク面積})$$

で表し、各成分の濃度の指標として用いた。同一試料における未処理試料の面積比を横軸に、高圧処理試料における面積比を縦軸にとり、異なる 5 つのタマネギについて 2 次元空間上にプロットすることにより相関プロットを作成した。

相関プロットにおいて、 $y = x$ すなわち傾き 1 で表される近似直線は、未処理試料および高圧処理試料中での成分濃度が等しく高圧効果がない領域を表す。また、この近似曲線よりも上側の領域すなわち傾きが 1 より大きい領域にプロットがある場合は、高圧処理により増加した成分を表す。他方、傾き 1 未満にプロットがある場合は高圧処理により減少した成分であることを表す。

二次元相関プロットを用いてクロマトグ

ラムを解析することにより、すべてのタマネギについて溶出時間 27.3 分の成分が高圧処理により顕著に増加し、溶出時間 23.8 分の成分が高圧処理により顕著に減少することが分かった。

また、多くの成分が傾き 1 の近似曲線の近傍にプロットされたことから、これらの成分は高圧処理による影響が顕著でないことが示唆された。ここでタマネギの成分濃度（面積比）は試料間ではばらつきが認められたものの、同一成分に関しては近似曲線の傾きは試料によらずほぼ同等であることから、成分濃度の変化に対する高圧効果は試料間のばらつきの影響が小さいことが示唆された。さらに、本研究で示した相関プロットを用いて、その近似曲線の傾きによって高圧効果を解析する手法は、試料間のばらつきがある場合でも高圧効果のある成分を抽出可能であることが分かった。

高圧効果により顕著に増加した溶出時間 27.3 分におけるピークを同定したところ、タマネギの主要かつ強い抗酸化活性を示すケルセチンであることが分かった。高圧処理はまず細胞性生物素材の組織構造に損傷を与え、細胞構造の損傷により組織構造内における物質移動が促進されることで、局在化しているケルセチン生成に関与する酵素群と基質の会合性を上げた結果として、ケルセチン生成速度を増加させたことによりケルセチン濃度が増大したものと考えられた。また抗酸化活性物質であるケルセチンが増加したために、高圧処理を施したタマネギでは抗酸化活性が顕著に増強されたものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

S. Ueno, T. Katayama, T. Watanabe, K. Nakajima, M. Hayashi, T. Shigematsu, and T. Fujii, Enzymatic Production of γ -Aminobutyric Acid in Soybeans Using High Hydrostatic Pressure and Precursor Feeding, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(4), 706-713 (2013). 査読有

T. Hasegawa, M. Hayashi, K. Nomura, M. Hayashi, M. Kido, T. Ohmori, M. Fukuda, A. Iguchi, S. Ueno, T. Shigematsu, M. Hirayama, and T. Fujii, High-throughput Method for a Kinetics Analysis of the High-pressure Inactivation of Microorganisms Using Microplates, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(6), 788-791 (2012). 査読有

S. Ueno, T. Shigematsu, T. Hasegawa, J. Higashi, M. Anzai, M. Hayashi, and T. Fujii, Kinetic Analysis of *Escherichia coli* Inactivation by High Hydrostatic Pressure with Salts, *Journal of Food Science*, 76(1), M47-M53 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

大山結香、上野茂昭、藤井智幸、伊藤淑恵、毛利哲、齋藤静香、井戸川詩織、岩元靖、塚田義弘、菌体内プロテアーゼを利用する高圧食品加工、日本農芸化学会、2014 年 3 月 29 日、東京

伊藤淑恵、石川潤一、毛利哲、中村茂雄、池戸重信、齋藤静香、井戸川詩織、岩元靖、塚田義弘、上野茂昭、藤井智幸、豆乳を原料とした効率的発酵製造技術の開発、2013 年 3 月 26 日、仙台市

片山拓巳、重松亨、上野茂昭、藤井智幸、高圧処理によるダイズ GABA 生成の反応工学的解析、2012 年 3 月 24 日、京都市

〔図書〕(計 2 件)

藤井智幸、NTS、「進化する食品高圧加工技術第 2 編第 1 章第 6 節食品成分を操る高圧技術」、2013、163-175 ページ

藤井智幸、NTS、「進化するテクスチャー研究第 8 章第 3 節高圧処理」、2011、447-455 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：微生物を利用して加工する固体食品の製造方法

発明者：齋藤静香、井戸川詩織、岩元靖、塚田義弘、伊藤淑恵、石川潤一、毛利哲、上野茂昭、藤井智幸

権利者：東北大学、宮城県、太子食品工業株式会社

種類：特許

番号：特願 2012-282132

出願年月日：2012 年 12 月 26 日

国内外の別：国内

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