

平成27年度秋葉区産学官連携「地域交流講座」
(2015年5月30日 新潟薬科大学)

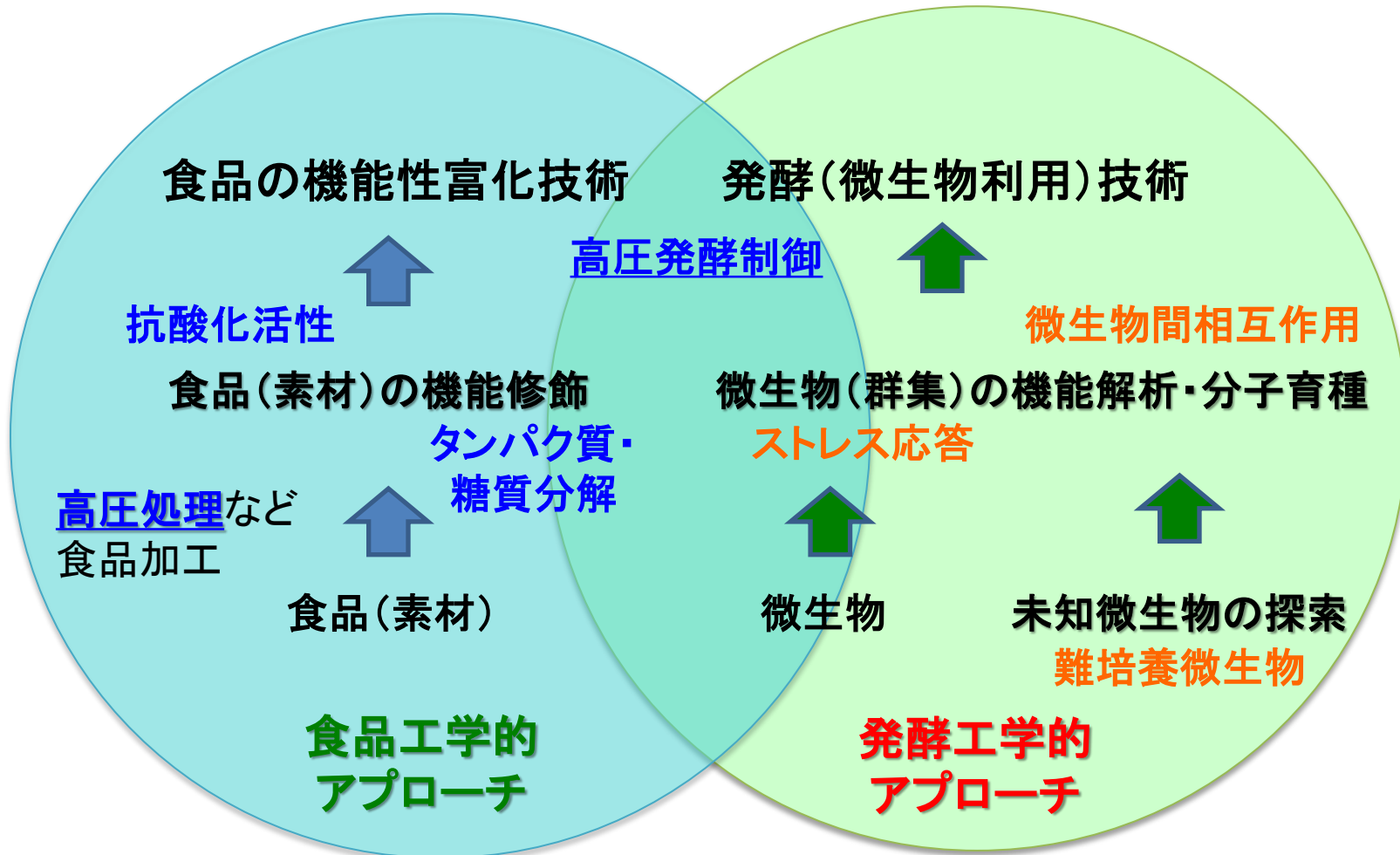
第1回 「超高压技術でからだに良い食品を！」

新潟薬科大学 応用生命科学部
食品・発酵工学研究室
教授 重松 亨

食品・発酵工学研究室

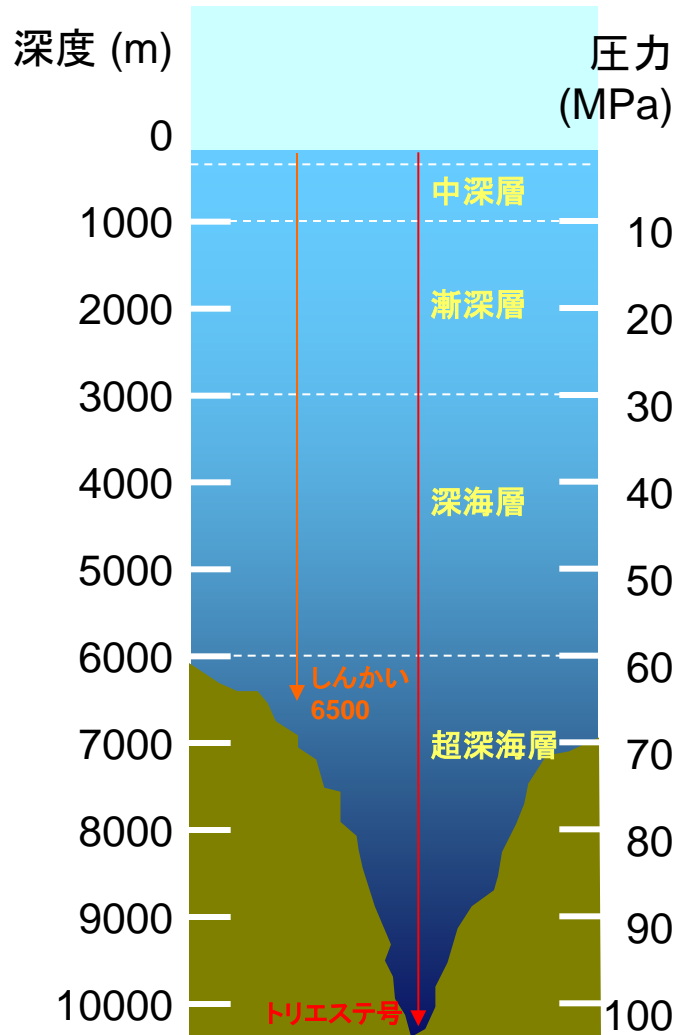
超高压と発酵技術で人と地球の健康を守ります。

高压処理・発酵微生物を研究軸として“地球に優しい”グリーンプロセスを開発します



超高压技術による新しい食品加工

深度と水圧



高压処理装置



食品に、100 MPa (1000気圧)以上の高圧力を静水圧として施す

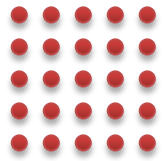
- 非加熱殺菌
- 細胞・組織の物性の変化
- 生体成分の特性の変化

温度と圧力

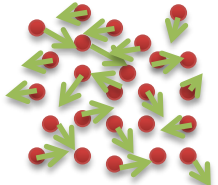
温度と圧力=全ての物質の三相(固体-液体-気体)を支配する2つしかない環境因子

低 温度 高

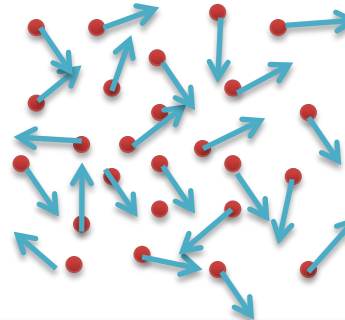
分子の運動
ほとんどない
体積小さい



固体



液体

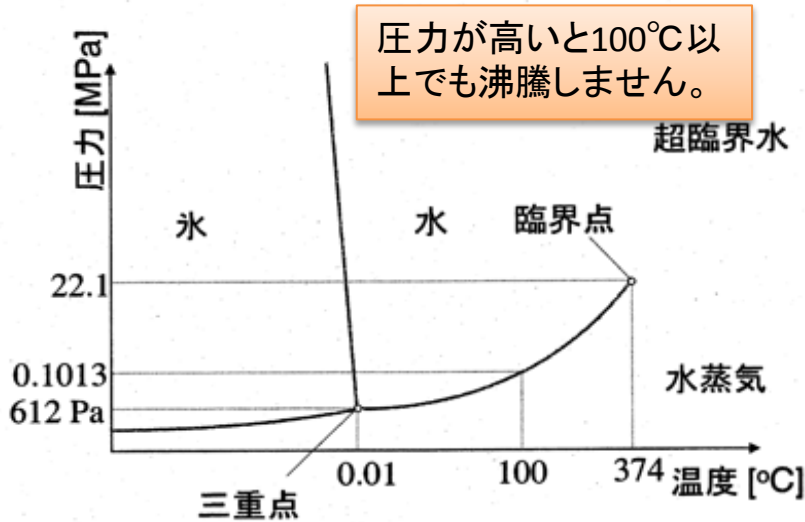


気体

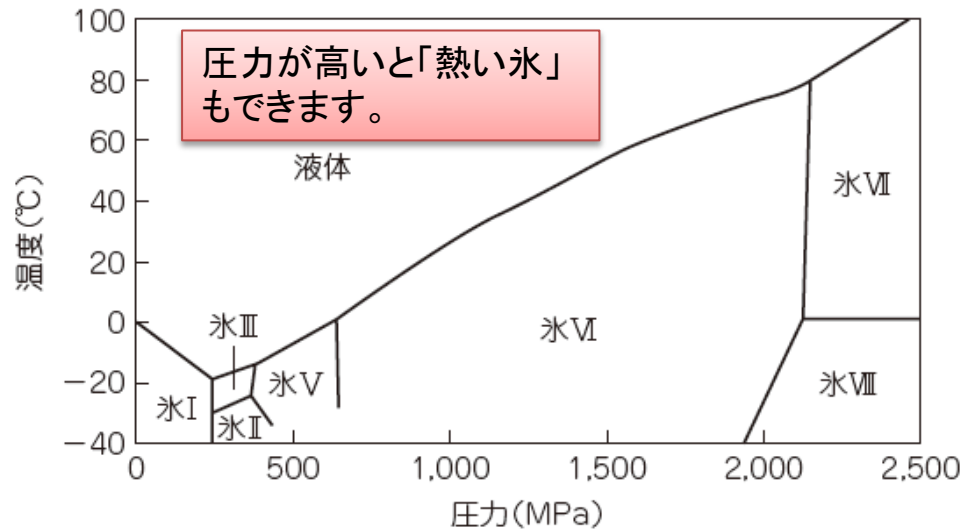
分子の運動
激しい

体積大きい

高 圧力 低




水の相図



水と氷の状態図

圧力が低いと100°C以下でも沸騰します。

圧力と化学反応(変化)

- 温度上昇⇒常に反応速度を増加させる【アレニウスの式】
 - 
 - 圧力上昇⇒体積が小さくなる方向に反応が進む【ルシャトリエの原理】
- ◆ 体積が大きくなる反応・・・圧力により抑制
 - ◆ 体積が小さくなる反応・・・圧力により促進

ある系のギブスエネルギー: $G = H - TS = U + PV - TS$

(H , エンタルピー; T , 温度; S , エントロピー; U , 内部エネルギー; P , 圧力; V , 体積)

圧力および温度を変数としたときのギブスエネルギーの微小変化

$$dG = dU + (PdV + VdP) - (TdS + SdT)$$

$$= (TdS - PdV) + (PdV + VdP) - (TdS + SdT) = VdP - SdT$$

◆ 温度 $T = \text{一定}$ ($dT = 0$) ならば, $dG = VdP$

$$(\partial G / \partial P)_T = V$$

可逆反応を仮定すると, ギブスエネルギー変化の圧力微分

$$(\partial \Delta G / \partial P)_T = \Delta V$$

圧力上昇⇒体積が最小となる状態に向かって化学平衡がシフトする
“圧力変化は、体積変化にのみ影響する”

実際に超高压処理をした食品素材を 観察してみましょう

生卵



超高压処理
400 MPa, 5分間(室温)

殻を割って、プラスチック製の皿(バランス
ディッシュ)に中身をあけてみましょう。

ニンジン
(真空シール)

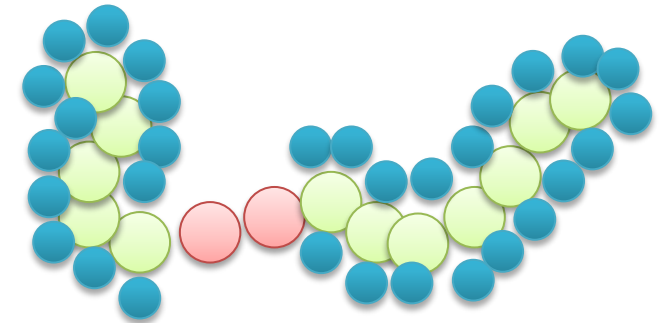
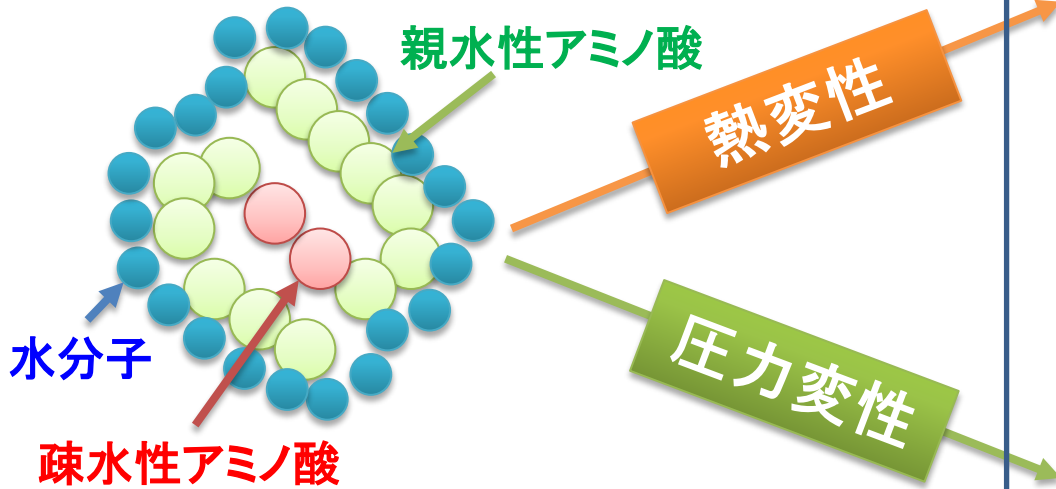


- ◆ 超高压処理
400 MPa, 5分間(室温)
- ◆ 超高压処理していないもの

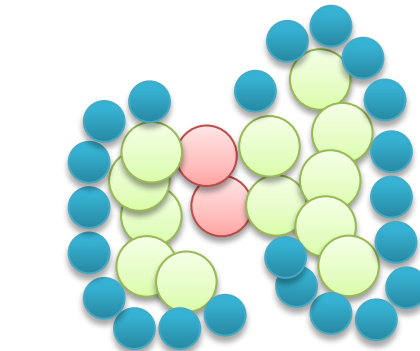
袋を破って、中身を出して触ってみましょう。

タンパク質の熱変性・圧力変性

タンパク質は通常、水になじんでいる
(なじみにくい部分は内側に位置)



構成原子が運動しやすくなる変化



体積が小さく・・・
分子内の隙間 (V_{cav}) が小さくなる変化

タンパク質の体積 (固有体積 \bar{V}°)

構成原子の van der Waals 体積の総和 (V_c)
+ 分子内の隙間 (V_{cav})
+ 水和による体積変化 (ΔV_{sol})

水となじみやすい部分が外側に露出
⇒ 水に溶けなくなり、タンパク質同士が凝集

酵素反応に及ぼす圧力の影響

Agric. Biol. Chem., 55 (9), 2439–2440, 1991

Short Communication

Activation of Polyphenoloxidase in Pear Fruits by High Pressure Treatment[†]

Masashi ASAKA* and Rikimaru HAYASHI

*The Research Institute for Food Science,
Kyoto University, Uji,
Kyoto 611, Japan*

**Toyo Institute of Food Technology, 4-23-2,
Minami-Hanayashiki, Kawanishi,
Hyogo 666, Japan*

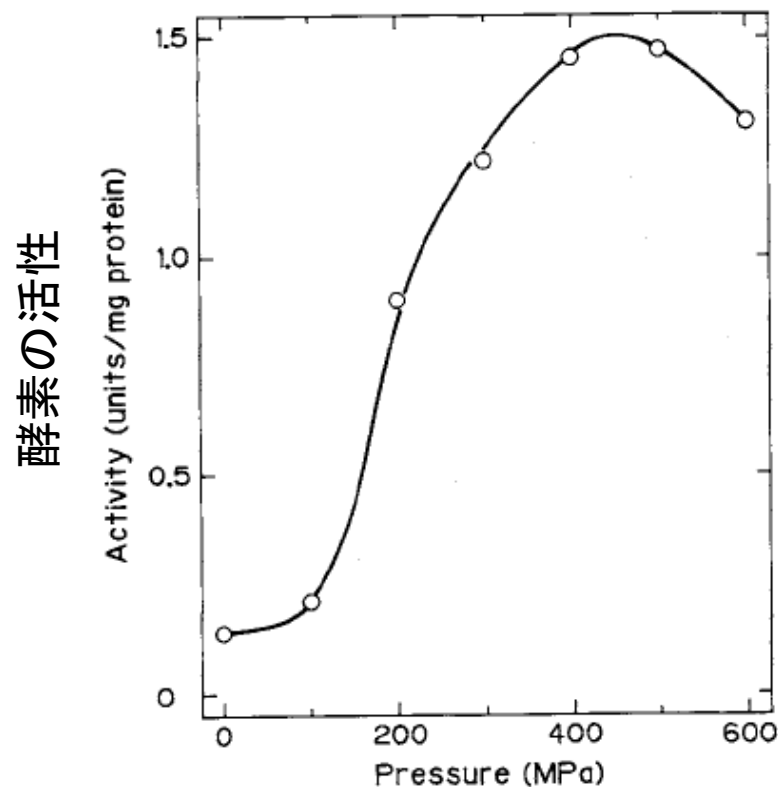
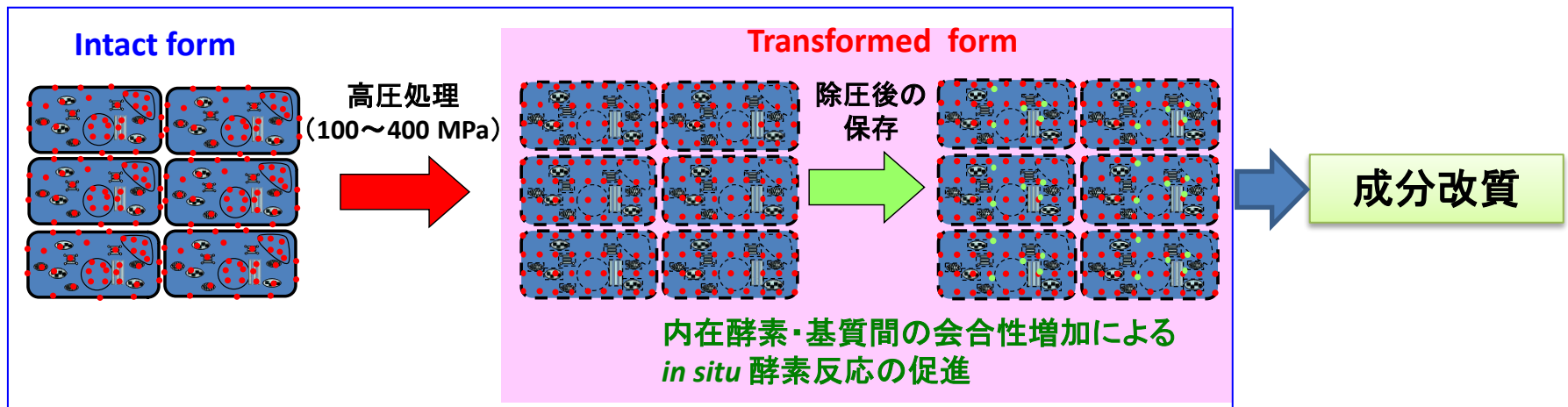
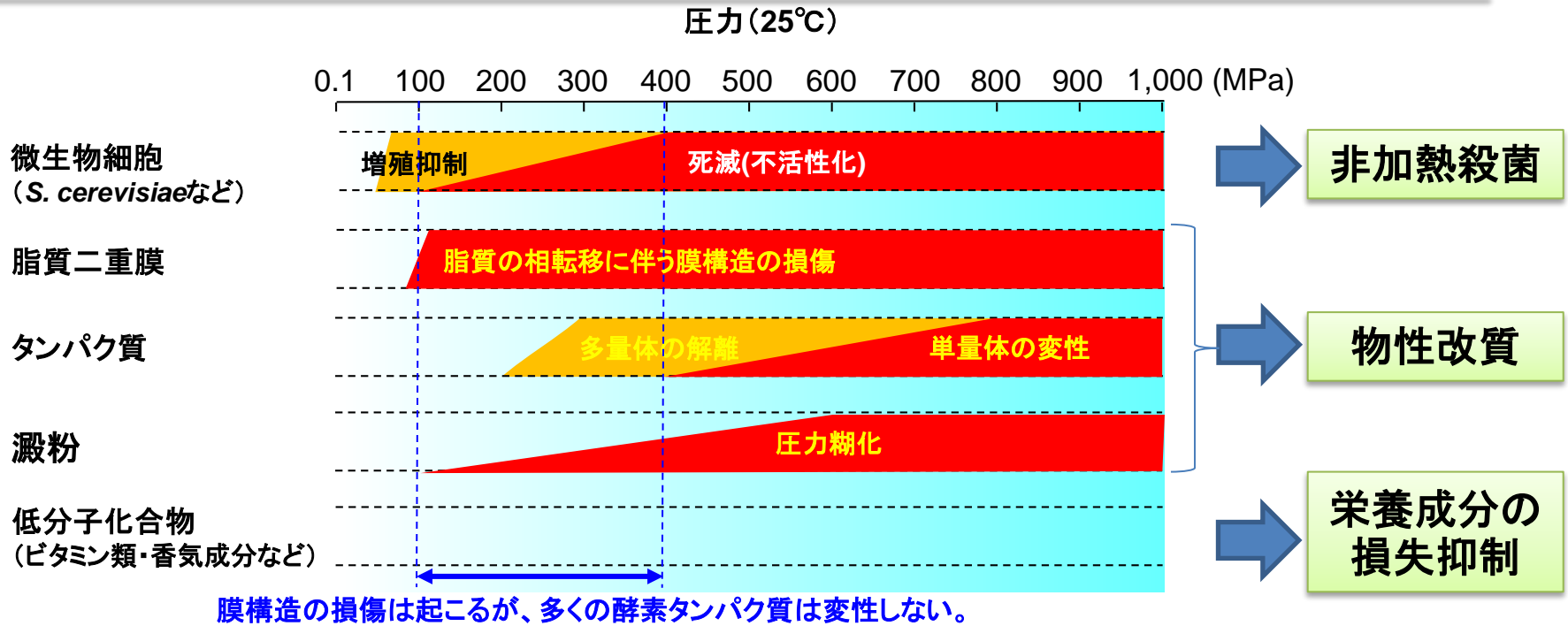


Fig. 1. Activation of Polyphenoloxidase from Bartlett Pears by a High Pressure Treatment.

The extract of pears was treated with various pressures at 25°C for 10 min. The enzyme assay was done in 3.0 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.5, containing 25 mM pyrocatechol at 30°C. One unit of the activity was defined as a change in one absorbance unit per min at 410 nm.

西洋梨の抽出液に圧力をかけると、ポリフェノールオキシダーゼ活性が増加した。

高圧 (静水圧)による食品加工の特徴



High pressure induced transformation (Hi-Pit)

超高压処理による食品の機能性の増強

野菜(タマネギ、パセリ他)の抗酸化活性を高圧処理により増加させる

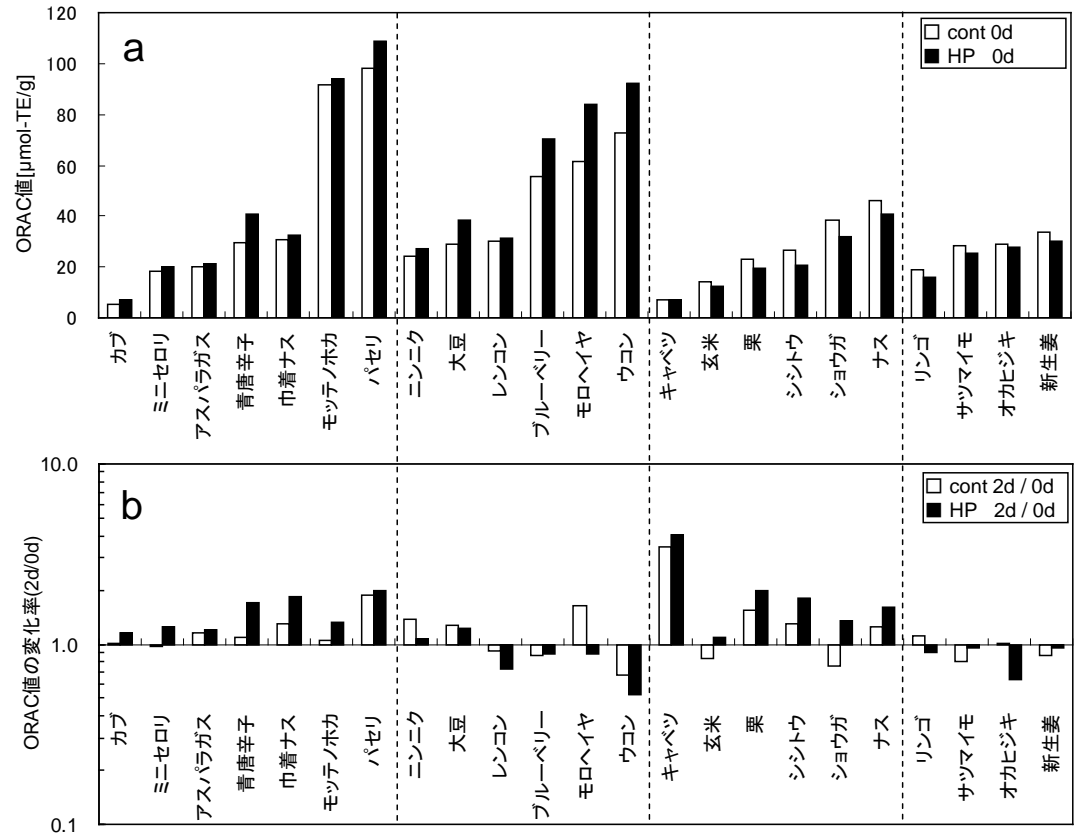
◆上野ほか, 日本食品工学会誌(2009)

◆Shigematsu et al. The 5th International Niigata Symposium on Diet and Health (2010)

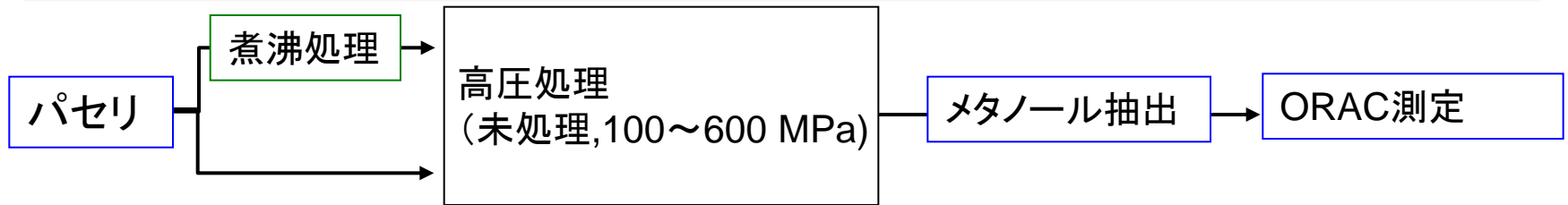
◆中島ほか第17回生物関連高圧研究会(2011)

◆Shigematsu et al. HPBB (2012)

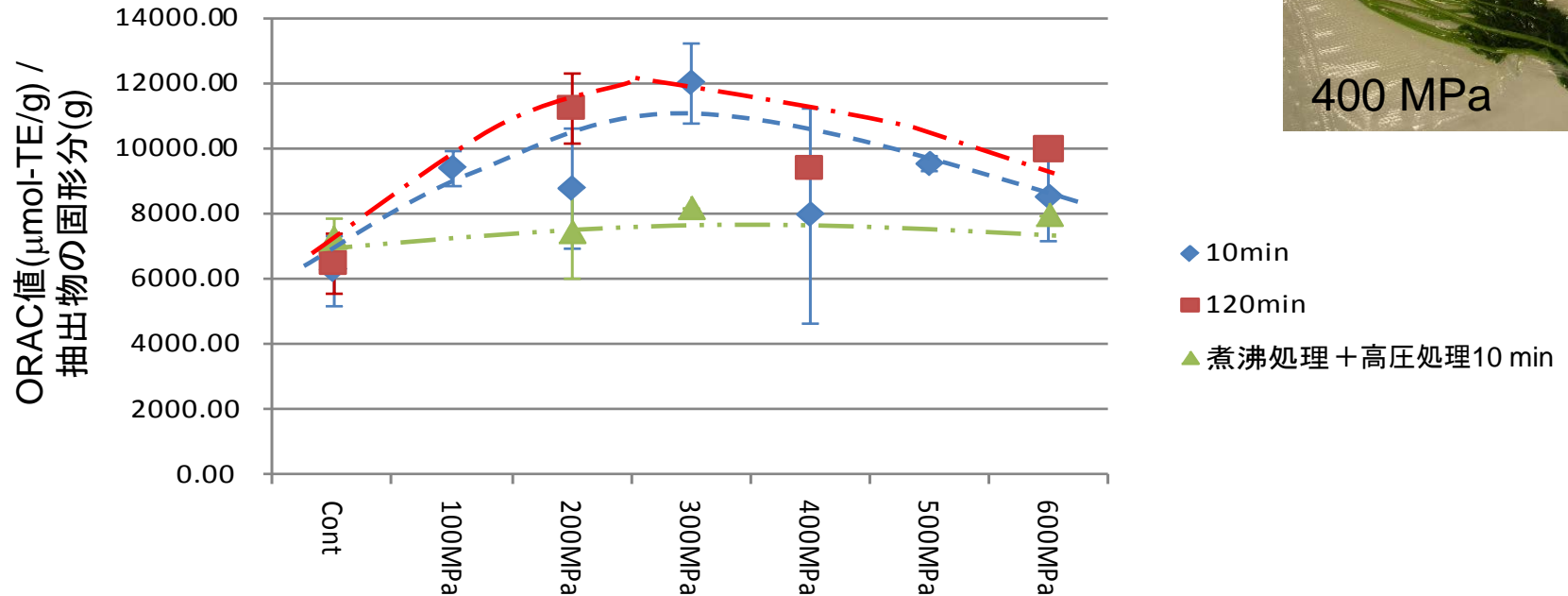
◆重松 冷凍4月号(2013)



パセリの抗酸化活性に及ぼす高圧処理の効果



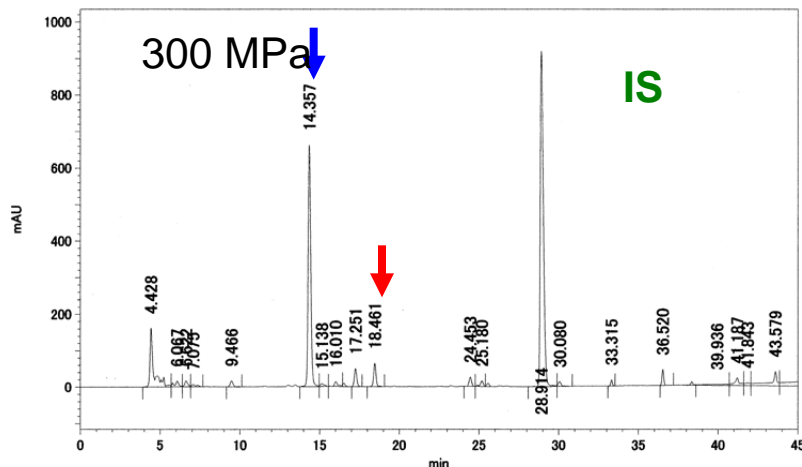
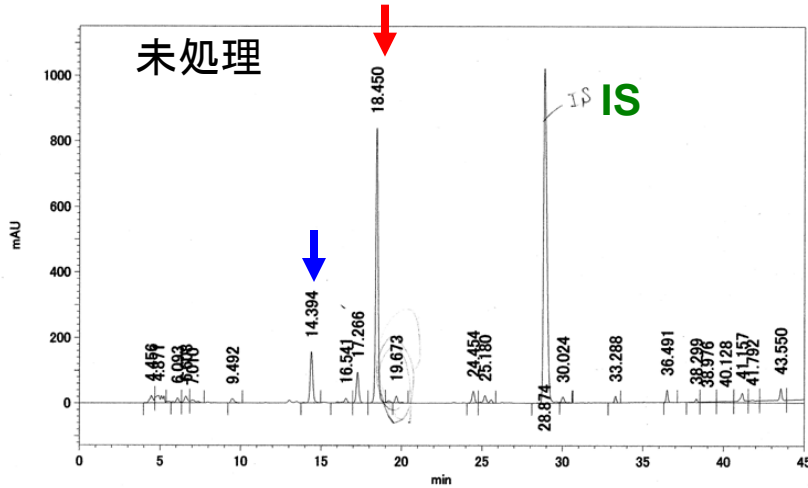
各圧力条件でのパセリのORAC値



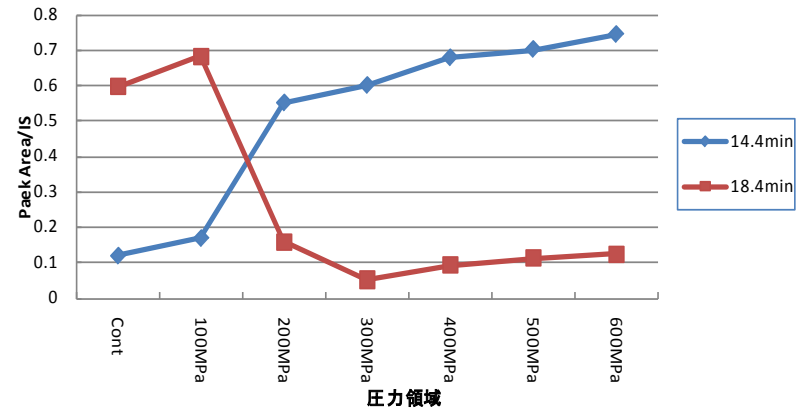
- ・100 MPa~400 MPaの高圧処理で、酵素の反応による抗酸化活性の増加。
- ・予め煮沸処理を行った場合には、高圧処理による増加は見られず。

パセリのポリフェノール分析(HPLC)

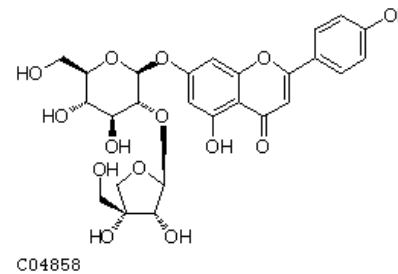
流速: 0.7 ml/min 注入量: 10 μ l
 グラジエント: 0 min \rightarrow 2 % MeOH 0.1 % TFA
 40 min \rightarrow 97 % MeOH 0.1 % TFA
 カラム: ODS-18



254 nm における Peak Area/IS

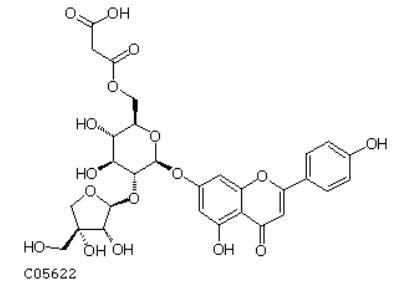


LC/MS分析による主要ピーク成分の同定



Apigenin 7-apiosylglucoside
(Apiin)

$C_{26}H_{28}O_{14}$
MW: 564.1479

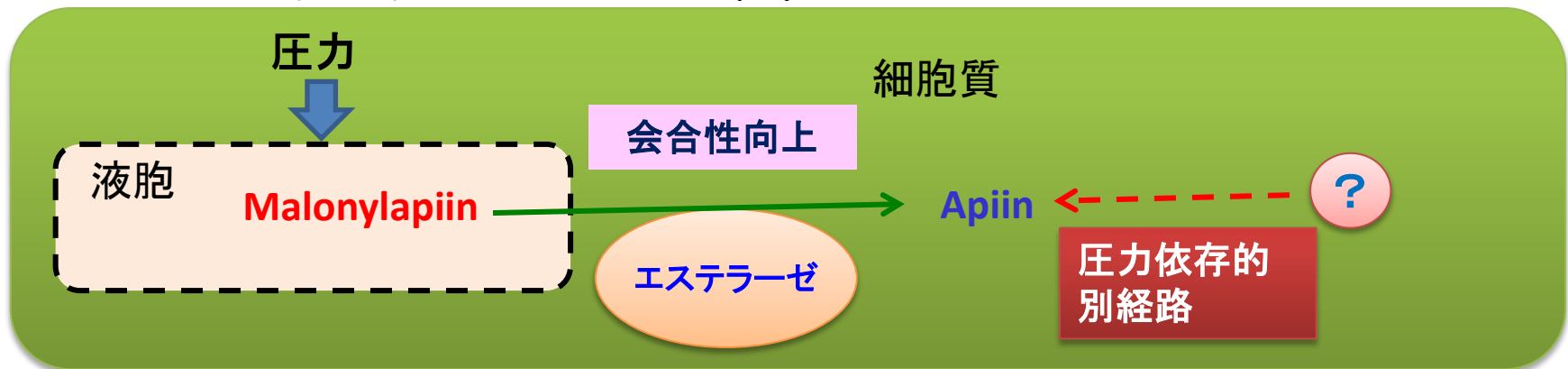


Apigenin 7-O-[β -D-apiosyl-(1->2)-(6-malonyl-beta-D-glucoside)]
(Malonylapiin)

$C_{29}H_{30}O_{17}$
MW: 650.1483

考察とまとめ

- Malonylapiinの大部分は液胞に局在 (Matern (1983) Eur. J. Biochem.)
- パセリのアピゲニン配糖体の脱マロニル化を行うエステラーゼは細胞質に局在 (Matern (1982) Arch Biochem. Biophys.)



- 超高压処理により、パセリなど農産物の抗酸化活性を増加させることが可能
- 超高压処理を用いたHi-Pit法により、パセリのフラボノイド成分(アピゲニン配糖体)の量および構成を制御することが可能

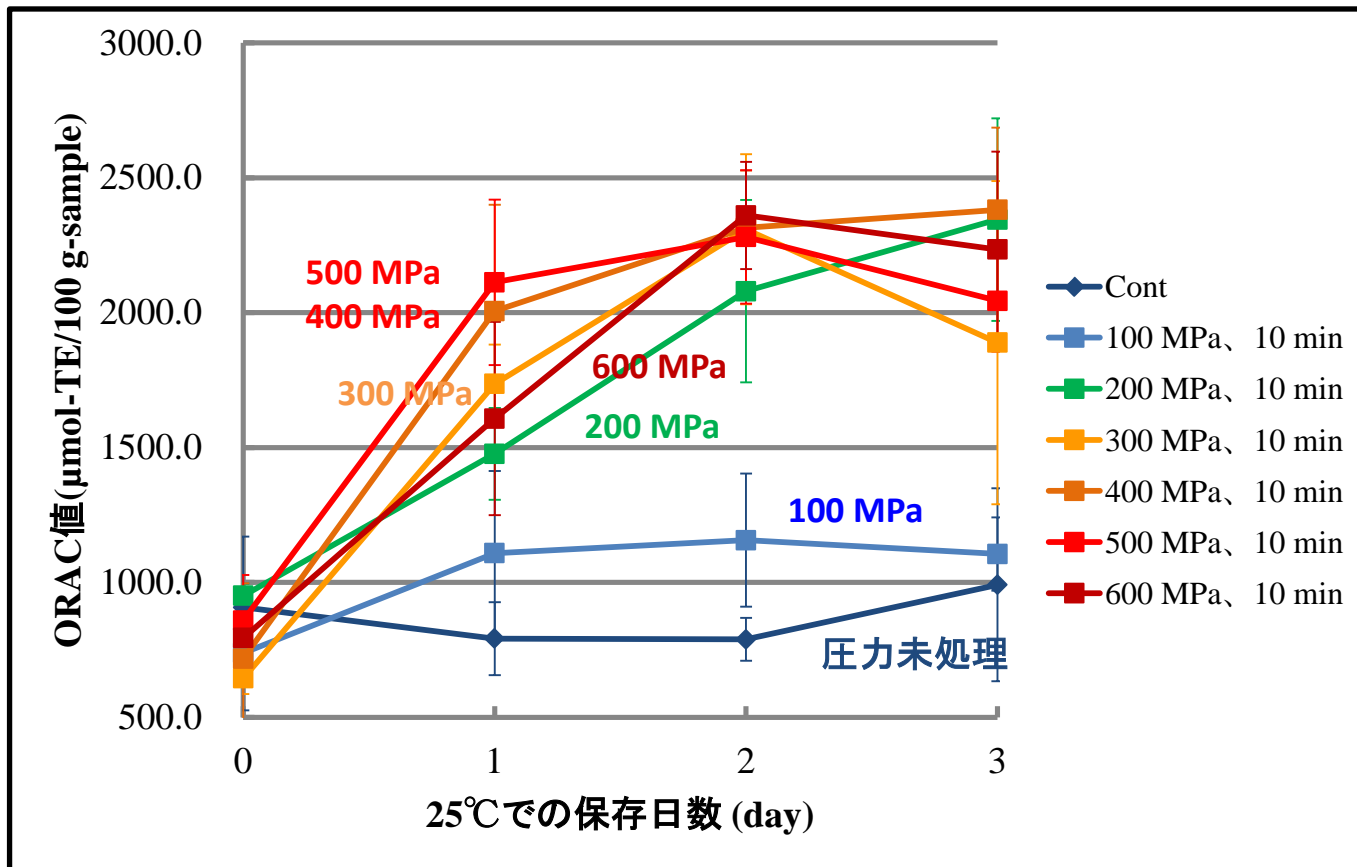
バナナの抗酸化活性に及ぼす高圧処理の影響



高圧処理
10 min (室温)



除圧後25°C
にて保存



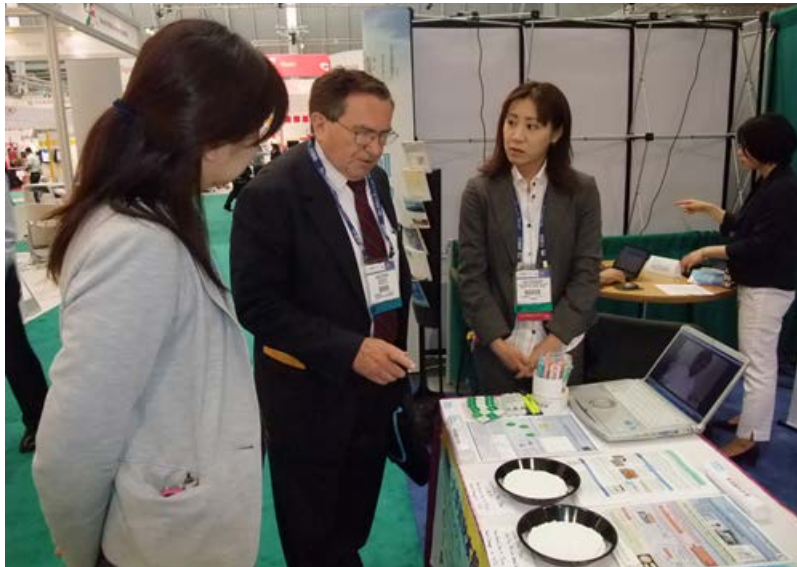
井上裕太 平成26年度卒業論文(新潟薬科大学)

500 MPa, 10 min (室温)の高圧処理で、除圧後のバナナの抗酸化活性が**2.8倍に!!!**

超高压技術を用いた超微細米粉 (スーパー米粉)の製造



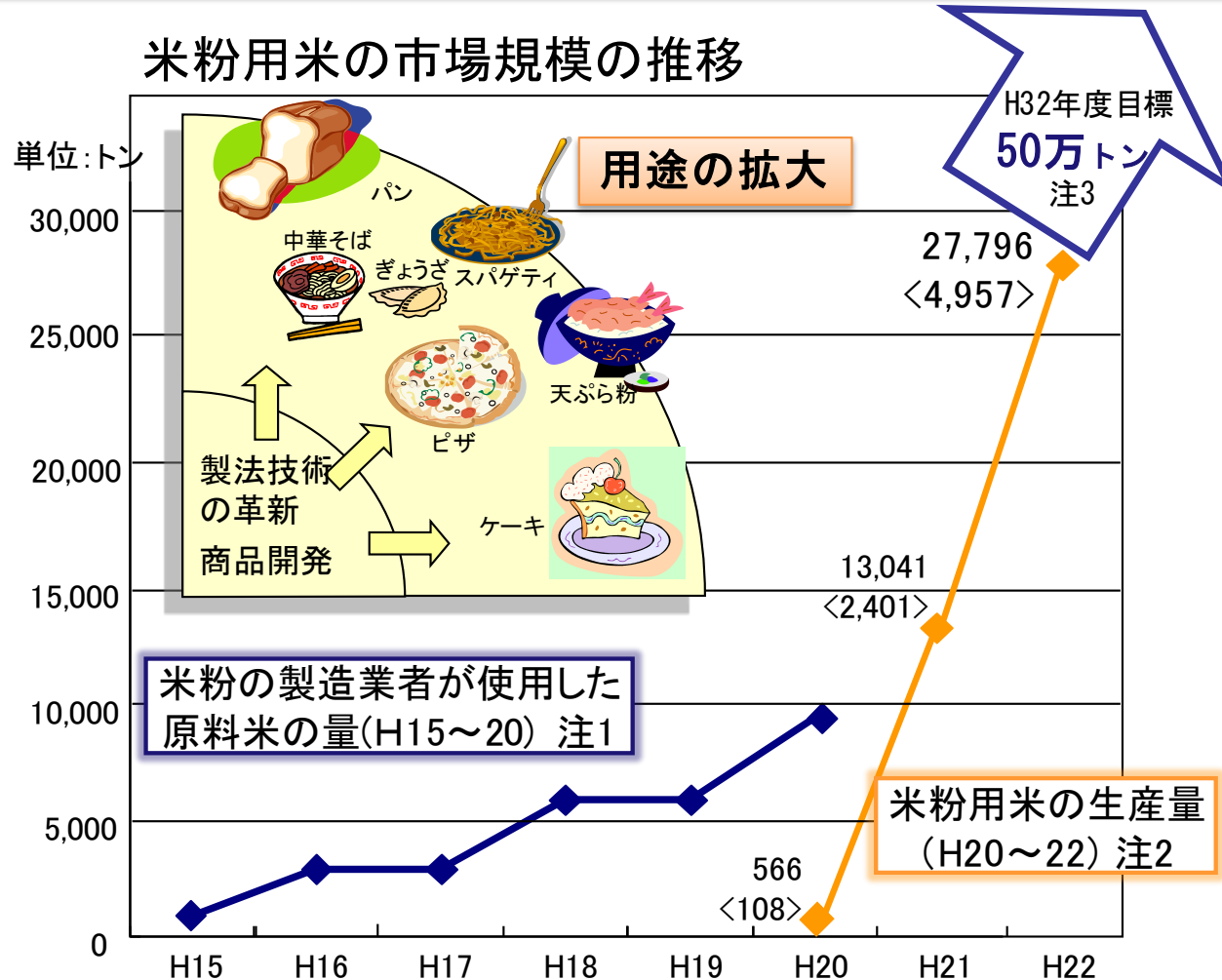
June 18-21, 2012
Boston Convention &
Exhibition Center
Boston, MA



バイオ国際コンベンション
(2012年6/18~6/21, 米国, ボストン)

論文発表 Kido et al. High Pressure Res. (2013)
特許 特許5326174号 (2013)

米粉市場の拡大と米粉用途の拡大



< >内の数字は米粉用米の作付面積(単位: ha)

注1: 地方農政事務所等による製粉業者等からの聞き取り

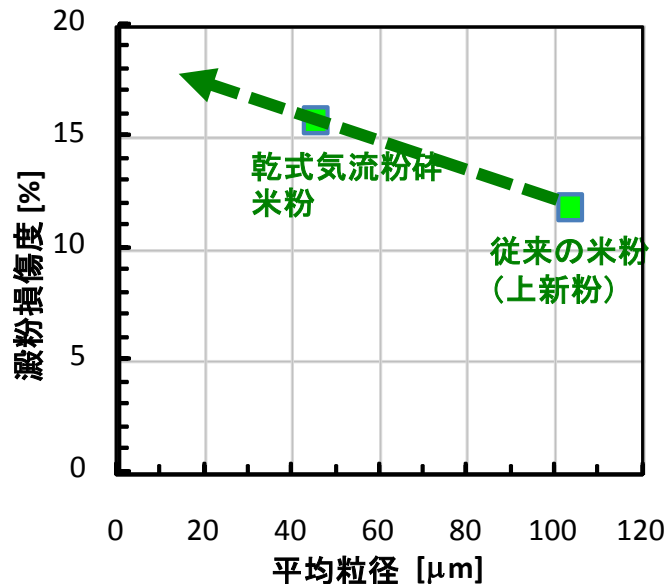
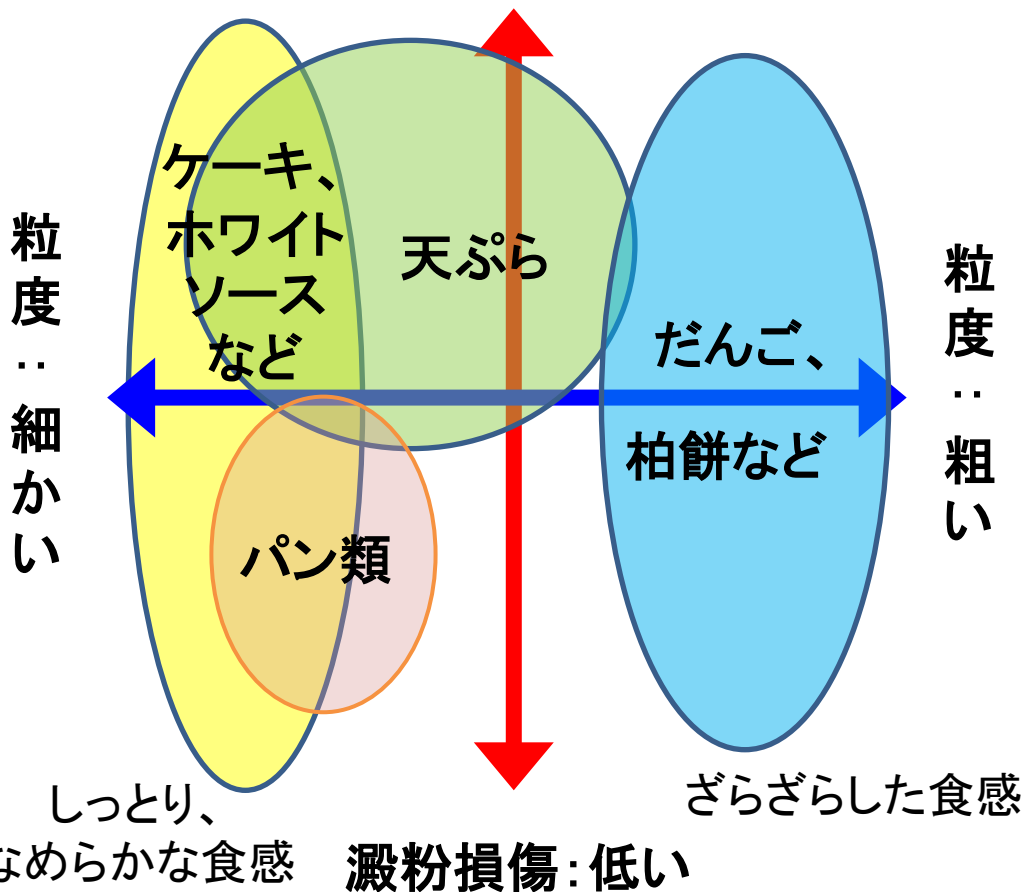
注2: 農林水産省調べ(新規需要米取組計画認定結果から抜粋)

注3: 食料・農業・農村基本計画(H22年3月閣議決定)

出典: 農林水産省資料「米粉利用の推進について(H23.8)」

米粉の特性と米粉製品

澱粉損傷: 高い



粉碎条件による米粉の微細化



微細 ⇔ 澱粉損傷

なめらかな食感

べとつき

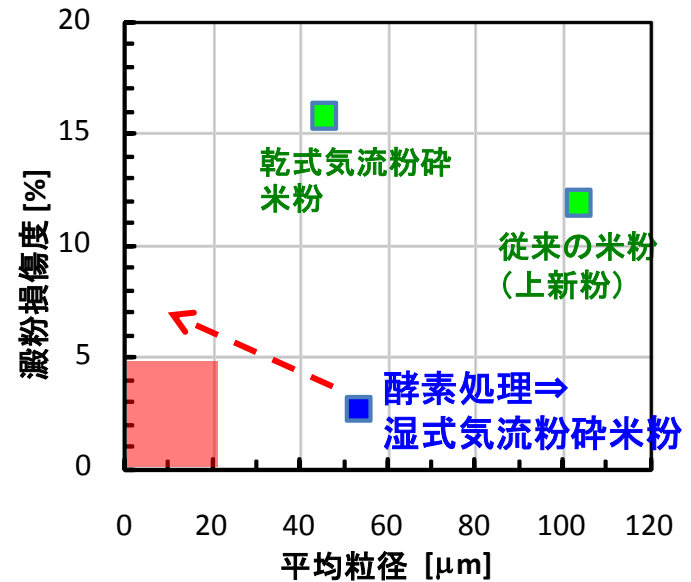
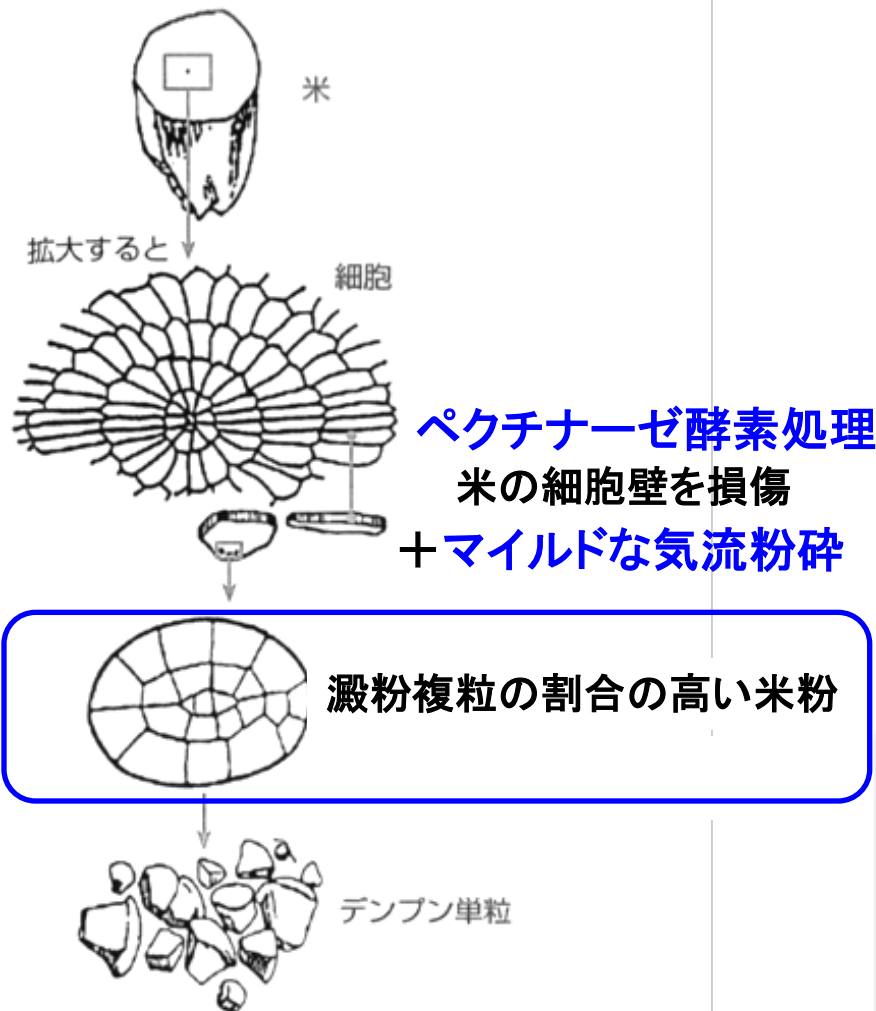
大坪研一(編)「米粉BOOK」(幸書房)より

酵素処理製粉法

(新潟県 特許第3076552号 (1998))

小さい粒径40~60 μm
粒子が丸みをおび平滑
低い澱粉損傷

小麦粉を使用しない
米粉パン



さらなる微細化のため、粉碎条件を強めると、やはり澱粉粒の損傷が生じてしま

【本研究の目標】

澱粉損傷度を抑えつつさらなる微細化

ペクチナーゼ酵素処理

+

高圧処理技術

江川和徳「米粉百科」グレイン・エス・ビー (2009)

本研究開発における実験方法

酵素処理製粉法



- ・ペクチナーゼ製剤 スミチームPTE(新日本化学工業)
- ・クエン酸ナトリウム

高(静水)圧処理

- ・ **酵素反応促進**^[2]
- ・ **吸水性の向上**^[3,4]

高圧酵素処理製粉法の開発

超微細米粉の製造を目的とした

平均粒径20 μm以下、
澱粉損傷度5%以下

[2] Aakasaka et al. 2008. *Biophysics* [3] Fujii et al. 2006. *Soy Protein Res.*
[4] Yamazaki et al. 1996. *The review of high pressure sci. and technol.*

試験区

酵素溶液区

(0.038%(w/w) ペクチナーゼ,
0.5%(w/w) クエン酸ナトリウム)

無添加区

(超純水)

有機酸塩区

(0.5%(w/w) クエン酸ナトリウム)

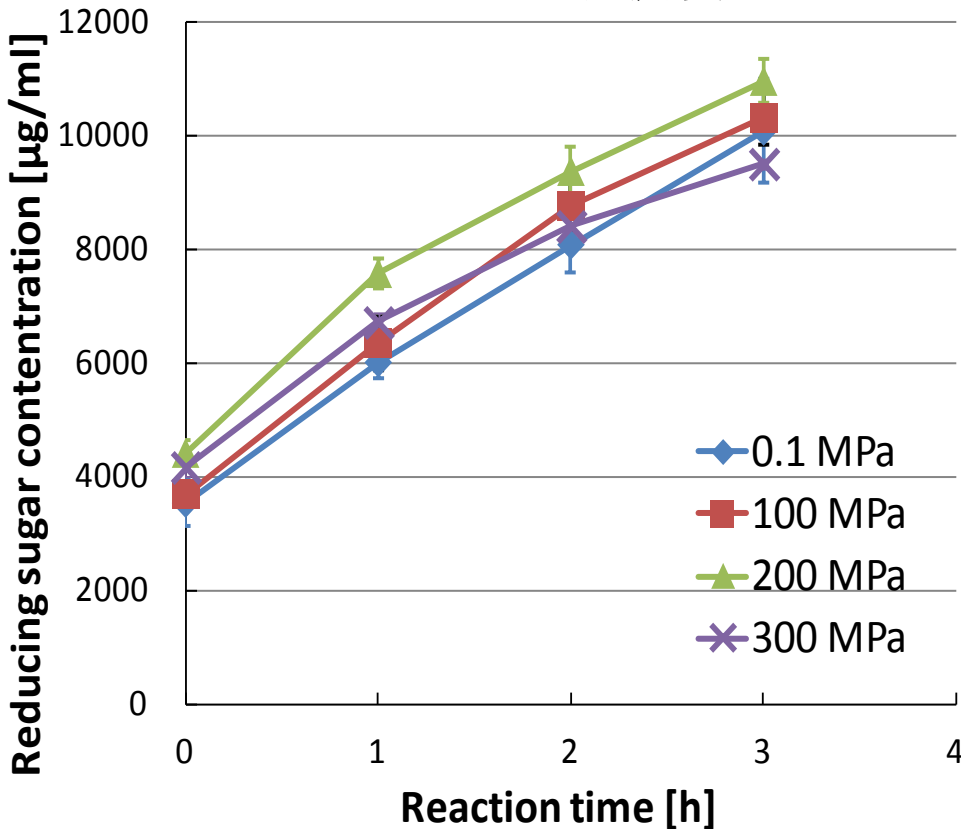
ペクチナーゼ活性に及ぼす圧力の影響

反応液組成 [0.1% ペクチン水溶液
ペクチナーゼ水溶液 0.3 mg-protein/ml
反応温度40°C 1/150 M リン酸Naバッファー (pH 6.0)
超純水]

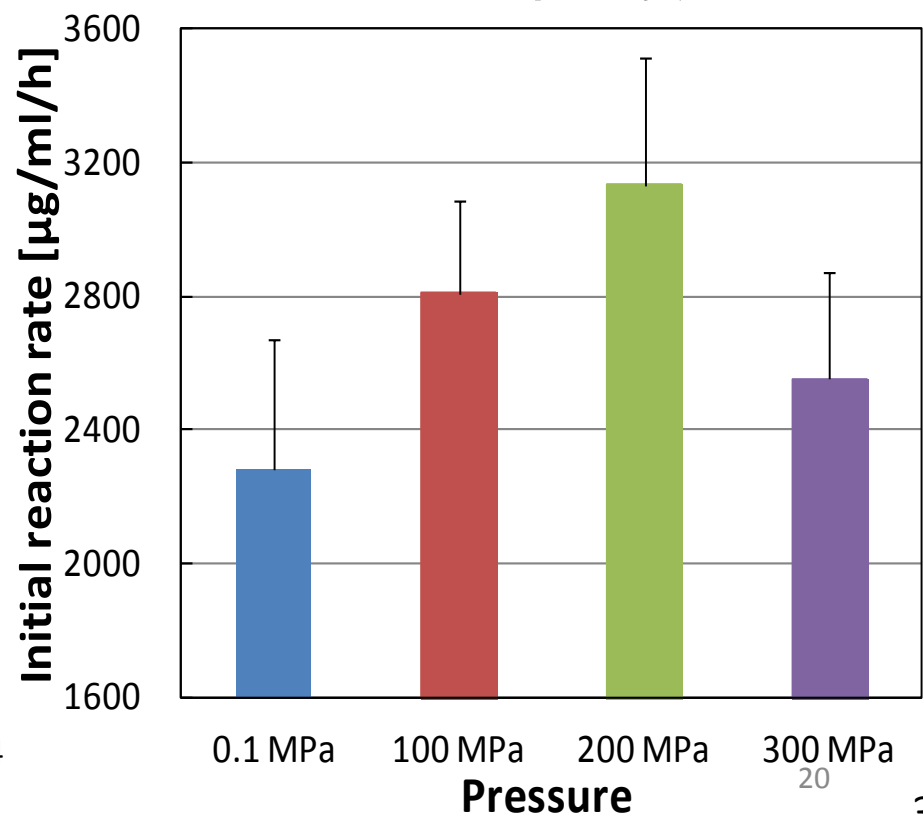
圧力で酵素が活性化
200 MPaで最大

Somogyi-Nelson法により、還元糖濃度を測定

還元糖濃度

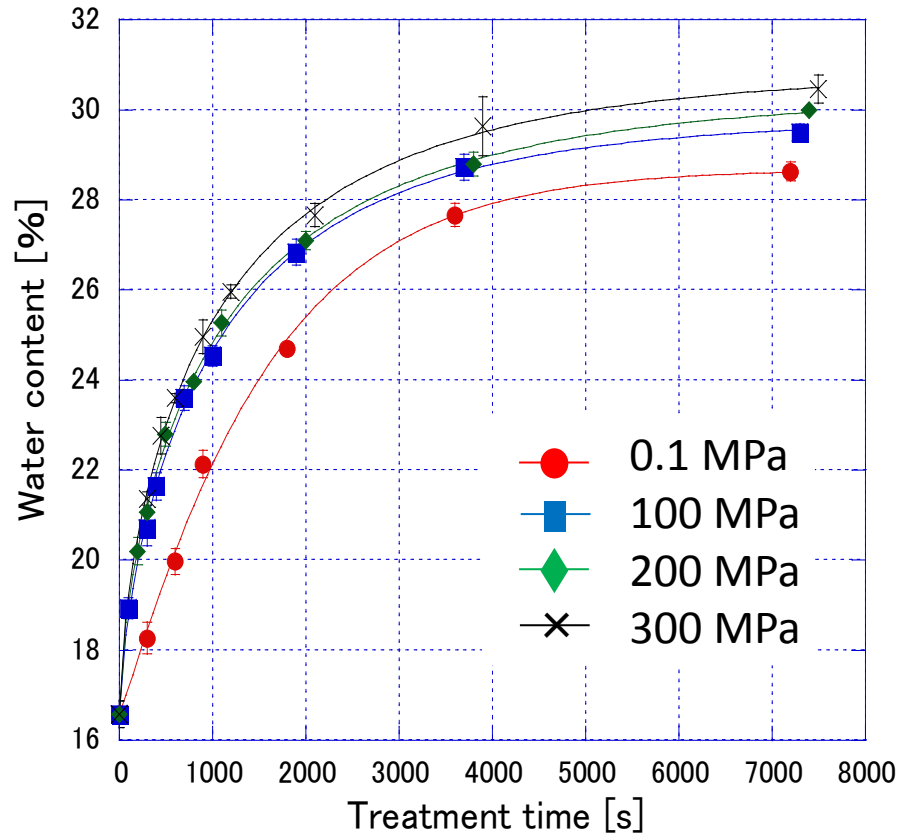


反応初速度



白米粒の吸水性能に及ぼす圧力の影響①

酵素溶液区 吸水曲線



吸水モデル式 [5,6]

$$W_t = (W_0 - W_e) \cdot \exp\{- (K \cdot t)^N\} + W_e$$

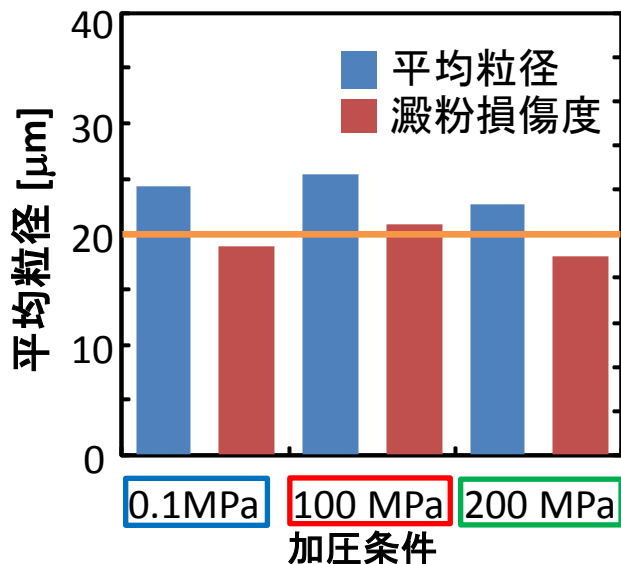
W_t : 時間 t における含水率[%]、
 W_0 : 初期含水率[%], W_e : 飽和含水率[%],
 K : 吸水速度定数 $[s^{-1}]$, t : 吸水時間[s], N : 定数

[5] Nagasuna et al. 2005. *Jpn. J. Food Sci. Technol.*

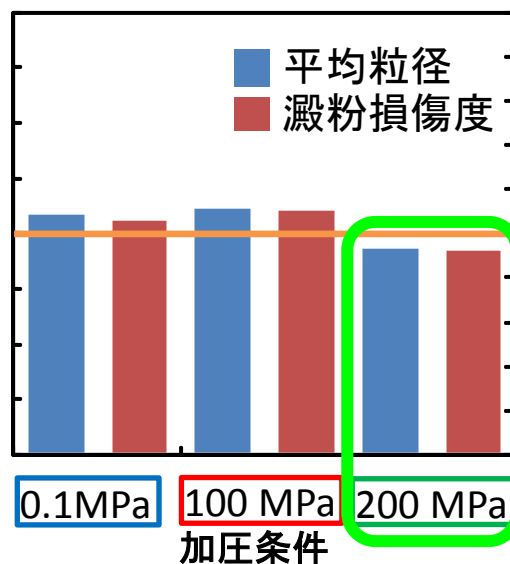
[6] Fujii et al. 2012. *Jpn. J. Food Sci. Technol.*

超微細米粉製造方法の確立

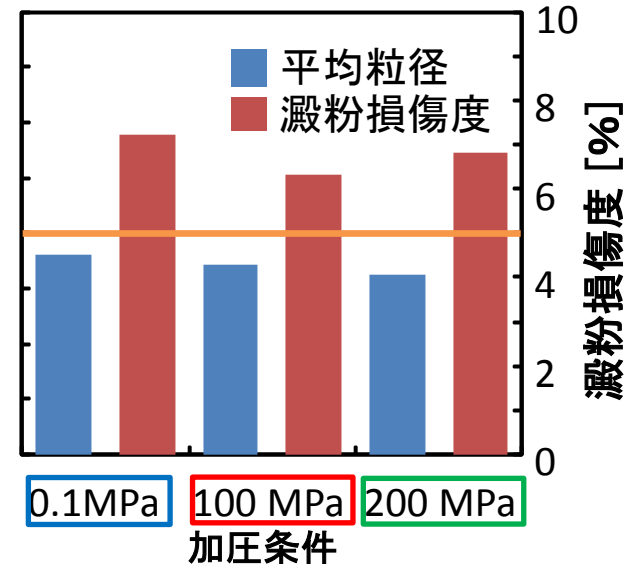
高压酵素60 min処理
回転数10,000 rpm



高压酵素60 min処理
回転数11,000 rpm



高压酵素60 min処理
回転数12,000 rpm



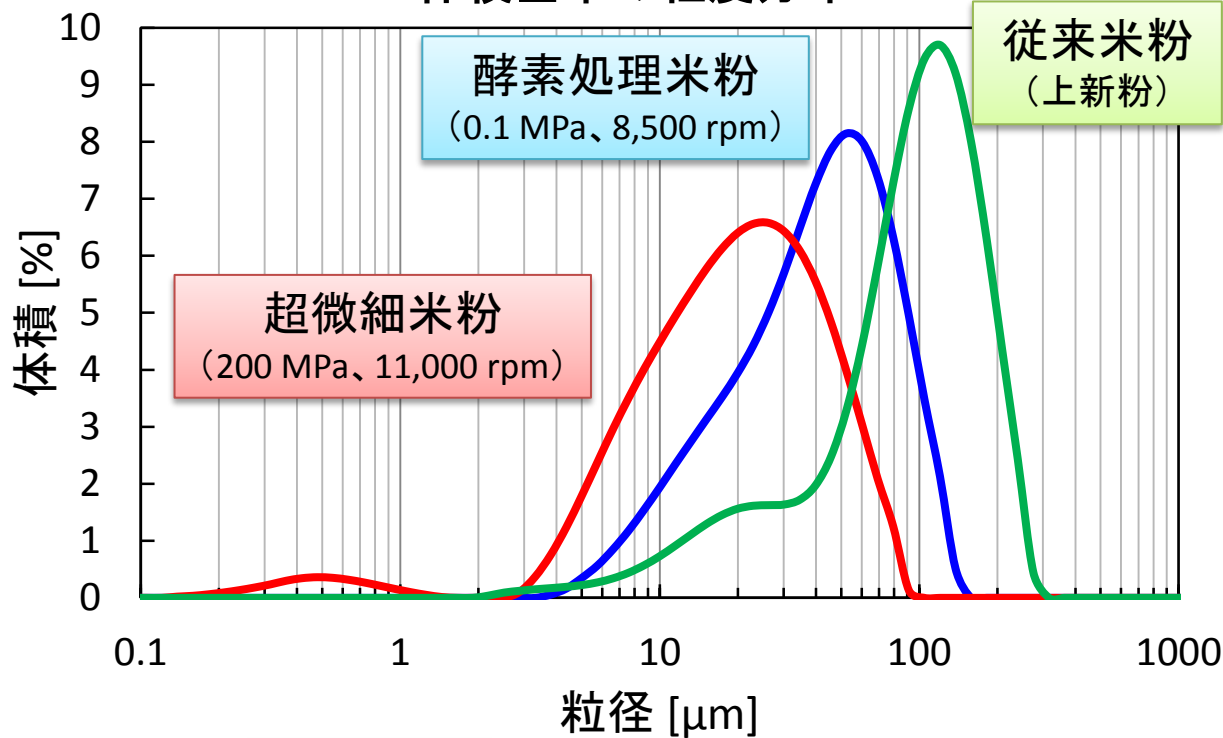
200 MPa、40°C、60 min高压酵素処理
⇒11,000 rpm气流粉碎

超微細米粉(スーパー米粉)を製造することができた

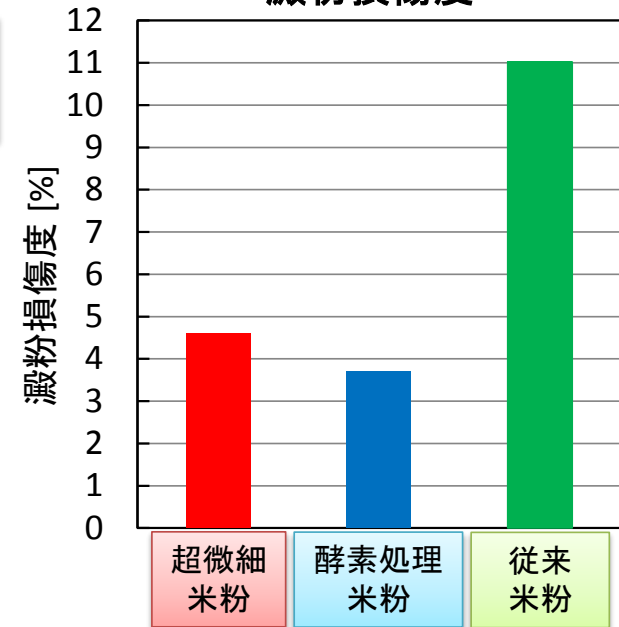
(平均粒径20 μm 澱粉損傷度5%未満) 【特許5326174号 (2013)】

超微細米粉(スーパー米粉)の性質

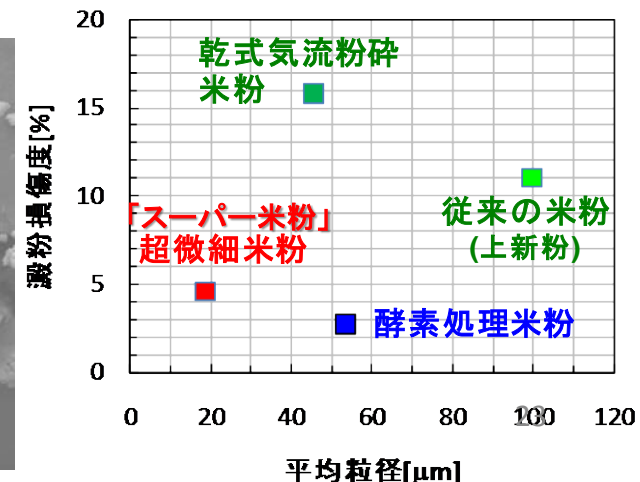
体積基準の粒度分布



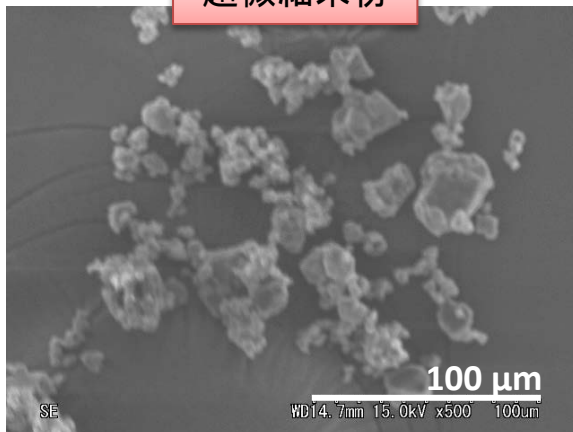
澱粉損傷度



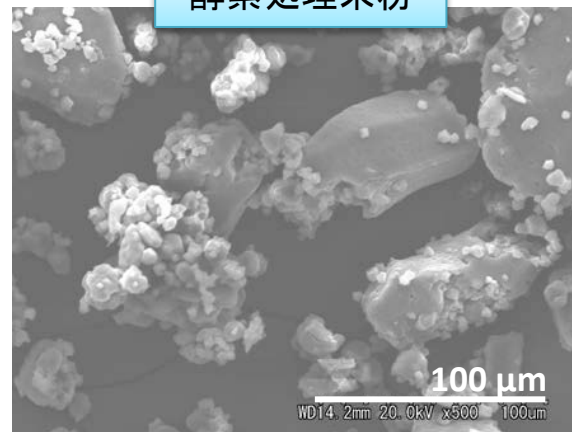
各種米粉の平均粒径・澱粉損傷度



超微細米粉



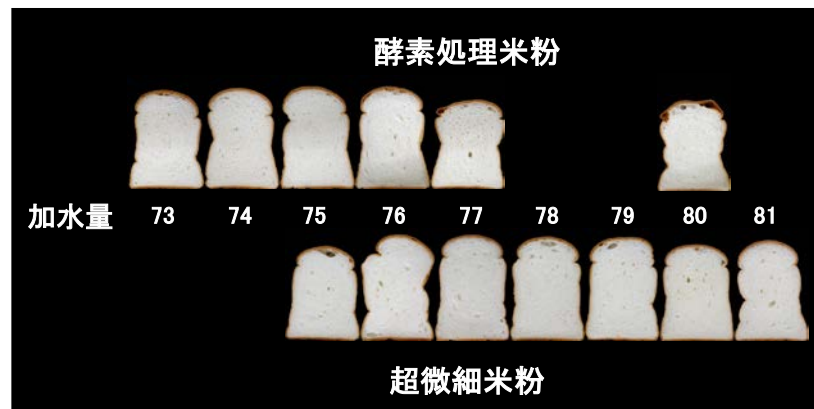
酵素処理米粉



超微細米粉(スーパー米粉)の加工特性・ 利用適性評価

超微細米粉(スーパー米粉)パン

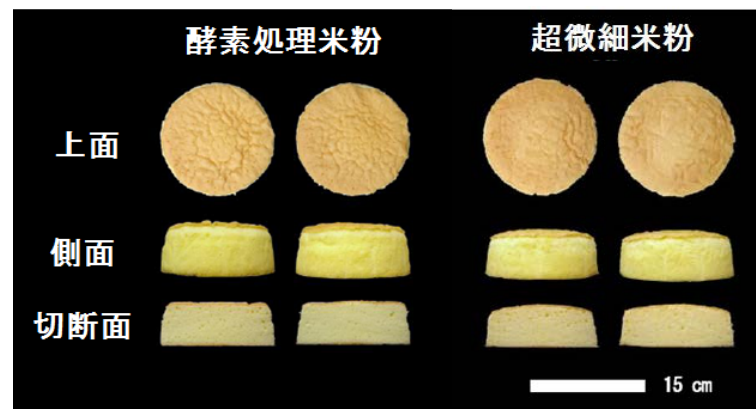
焼成後1日目の米粉パンの切断面



- ・最適加水量・・・78(膨らみ)～80(食感)
- ・かたさ・・・硬くなりにくい
- ・食感・・・しっとり

超微細米粉(スーパー米粉) スポンジケーキ

米粉スポンジケーキの外観および切断面



- ・食感・・・なめらか・しっとり

知野秀次ほか, 日本食品科学工学会(2012)

- ◆ 米粉を利用する各種加工食品(麺類、パン、米菓、洋菓子など)において、しっとり感、なめらかな食感を持たせたいものに応用可能
- ◆ 食品以外(例えば化粧品基材など)で、しっとり感、なめらかな触感を持たせたいものにも展開可能



長期保存
過発酵

炭酸ガス・酸味
の産生による
品質低下

発酵制御

→ 過発酵の防止・貯蔵期間の延長

従来技術: 塩の添加, 加熱処理など

圧力発酵制御技術 (Pressure Regulated Fermentation; PReF)

Nomura *et al.* HPBB2012 (2012)

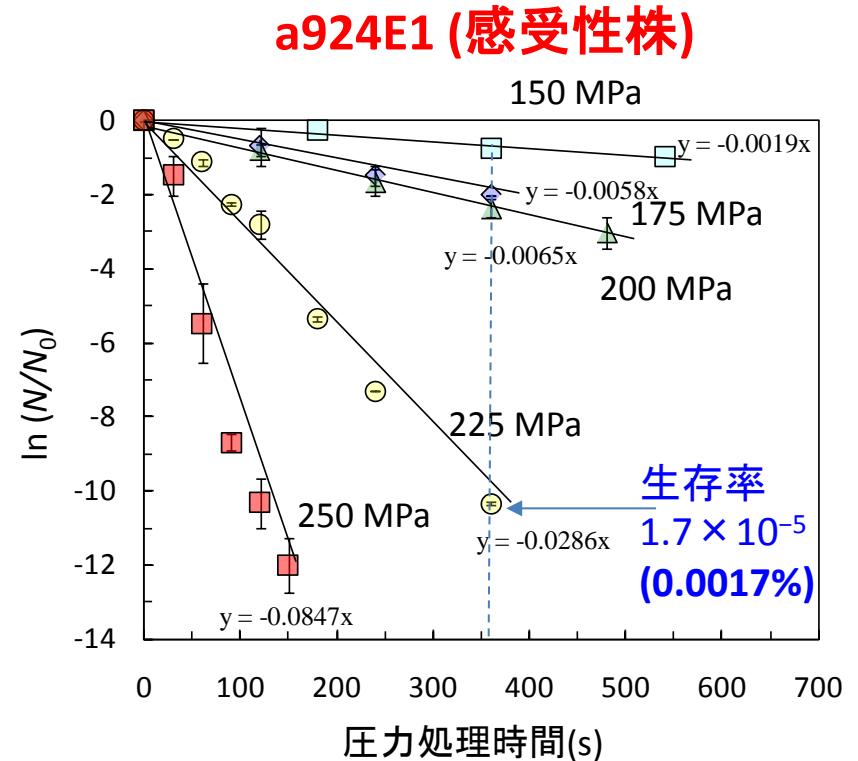
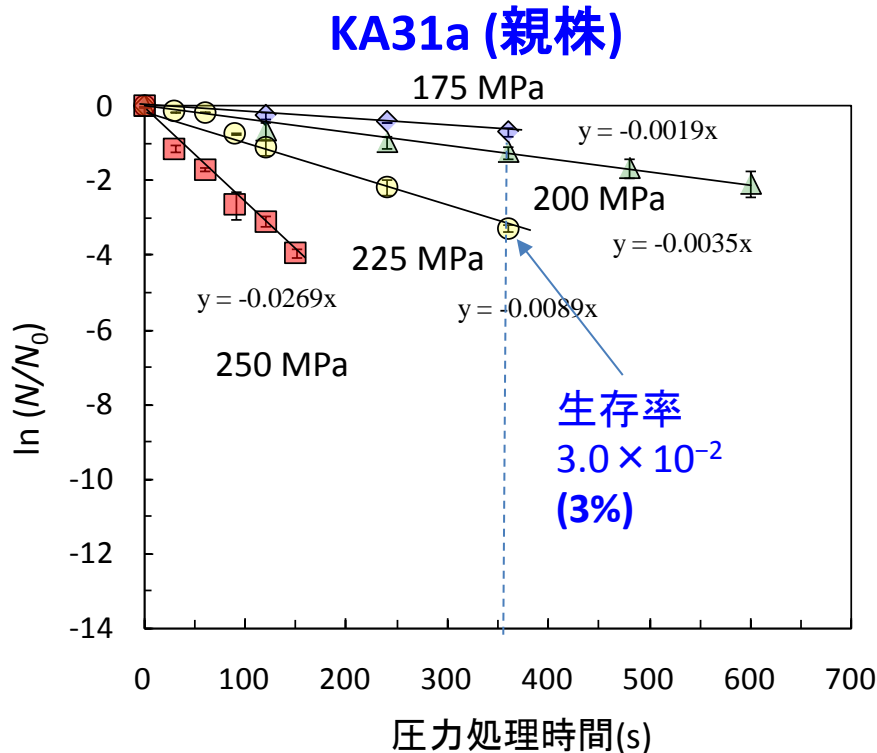
PReFの利点

- 添加物を使用しない
- 加熱処理でない: 食品素材の熱による変質を防止できる
- 高压処理により誘引される成分変化により機能性成分を増加できる場合がある: High Pressure induced transformation (Hi-Pit) 効果
(Ueno *et al.* J. Agric. Food Chem. (2009); Shigematsu *et al.* Jpn. J. Food Eng. (2010))

圧力感受性変異株の取得

S. cerevisiae KA31株 → 紫外線処理 → a924E1株

⇒両株を48時間培養(定常期細胞) → 20°Cでの高圧処理



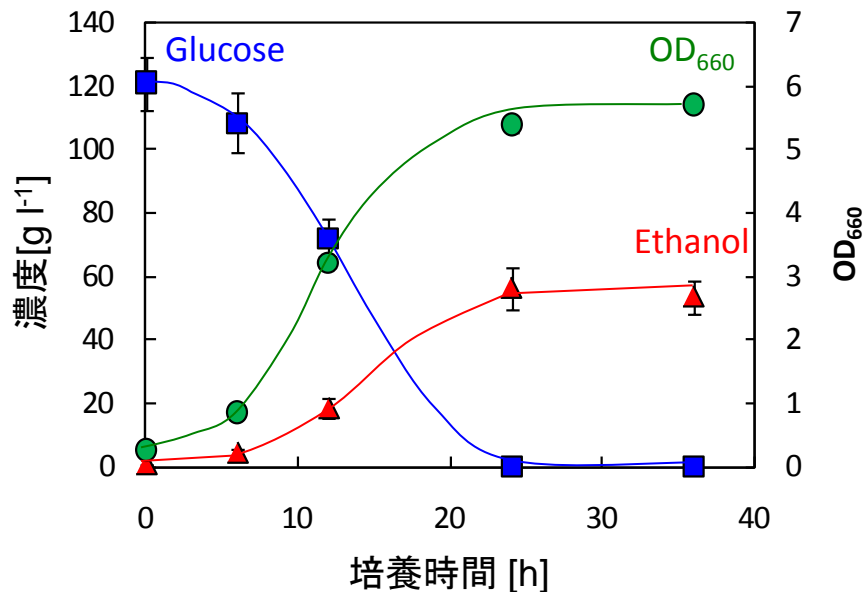
◆各圧力レベル×処理時間で、感受性株の生存率が親株よりも低下している。

◆生存率(N / N_0)の低下: 一次反応に従う $\ln \frac{N}{N_0} = -kt$ (k : 不活性化速度定数)

エタノール発酵能の評価

培養条件: 30°C, 15% YPD 培地

KA31a (親株)



a924E1(感受性株)

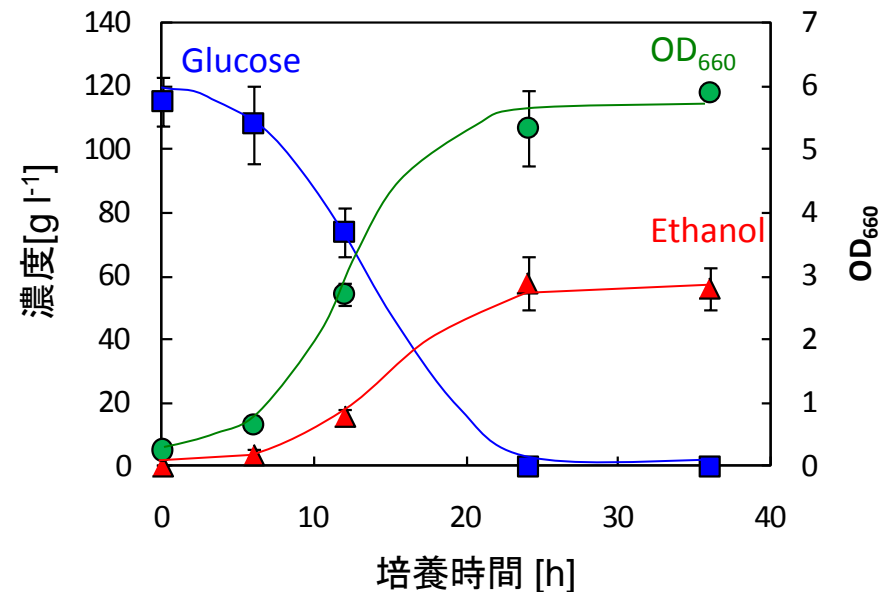


Table エタノール収率 (36 h培養)

Strain	Ethanol yield [%]
KA31a (Wild type)	85.5
a924E1 (Mutant)	95.3

Calculated using ethanol produced and glucose consumed based on $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$

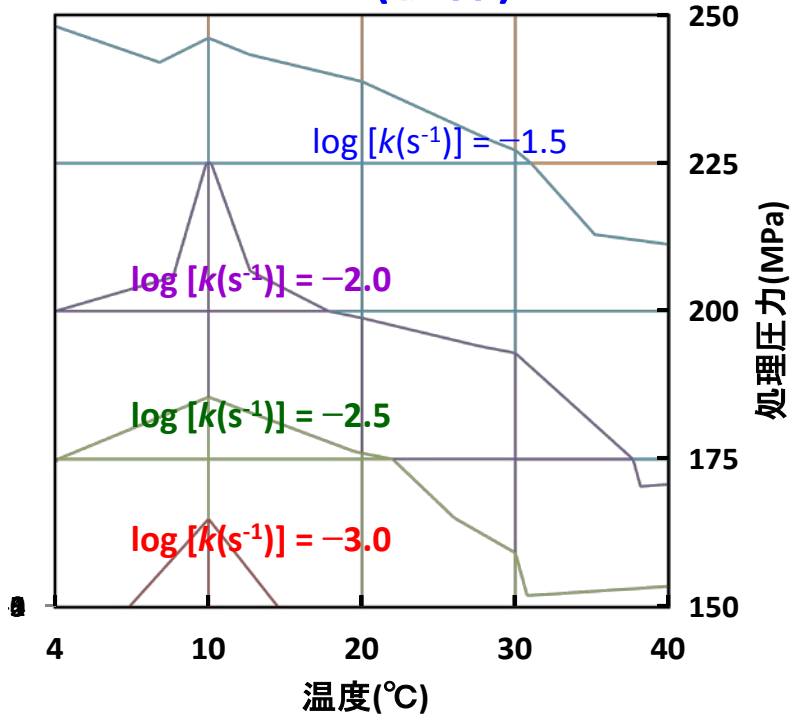
感受性株a924E1は親株と同等のエタノール発酵能を示した。

Shigematsu et al. Journal of Food Science (2010)

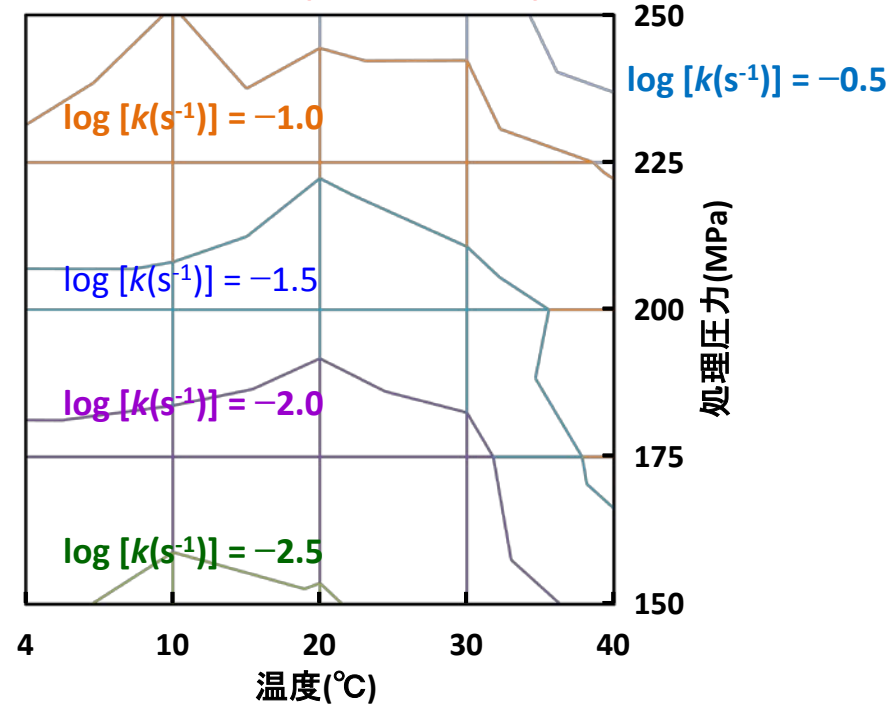
不活性化速度定数の温度－圧力diagram

4～40℃, 150～250 MPaの高圧処理 → 不活性化速度定数 k (s^{-1})算出

KA31a (親株)



a924E1 (感受性株)



- 全ての温度・圧力条件において感受性株の不活性化速度定数が大きい
- 150 MPa, 10～20℃中心として円弧を描くように不活性化速度定数が増加
⇒ 酵素の失活を記述するHawley式と同様の挙動

ミトコンドリアDNAの確認

Mitochondrial DNAをターゲットとしたPCR

プライマー	ターゲット遺伝子
mt05	15S rRNA
mt20	COX1
mt36	COB
mt59	21S rRNA
mt80	COX3

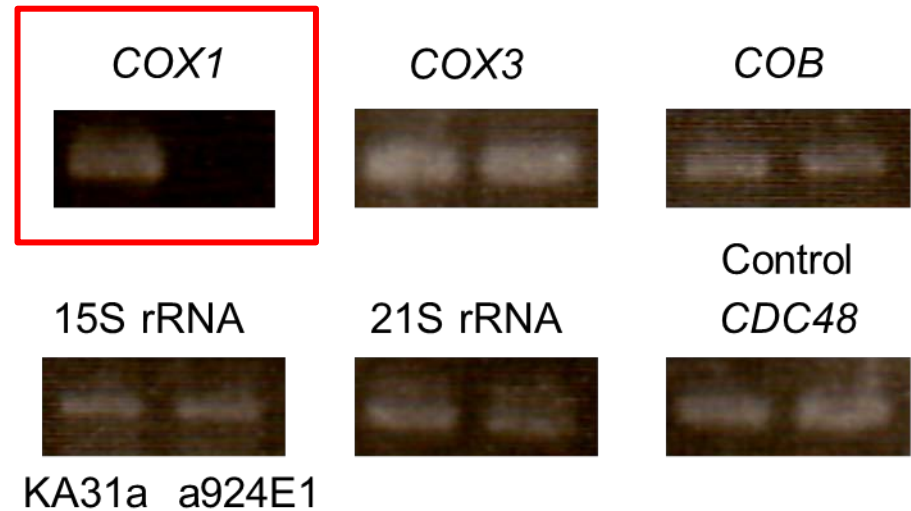
PCR条件

変性: 95°C, 30秒
アニーリング: 57°C, 60秒
伸長反応: 72°C, 60秒
25サイクル

電気泳動条件

マーカー: 100 bp ladder
泳動: 100 V, 30分
染色: EtBr, 20分
1%アガロースゲル

親株KA31aと感受性株a924E1



Nomura et al. Journal of Food Science (2015)

COX1はミトコンドリアの内膜に存在するcytochrome c oxidaseのサブユニット1をコードする遺伝子

キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)を用いたメタボローム解析

KA31a (親株), a924E1 (感受性株)

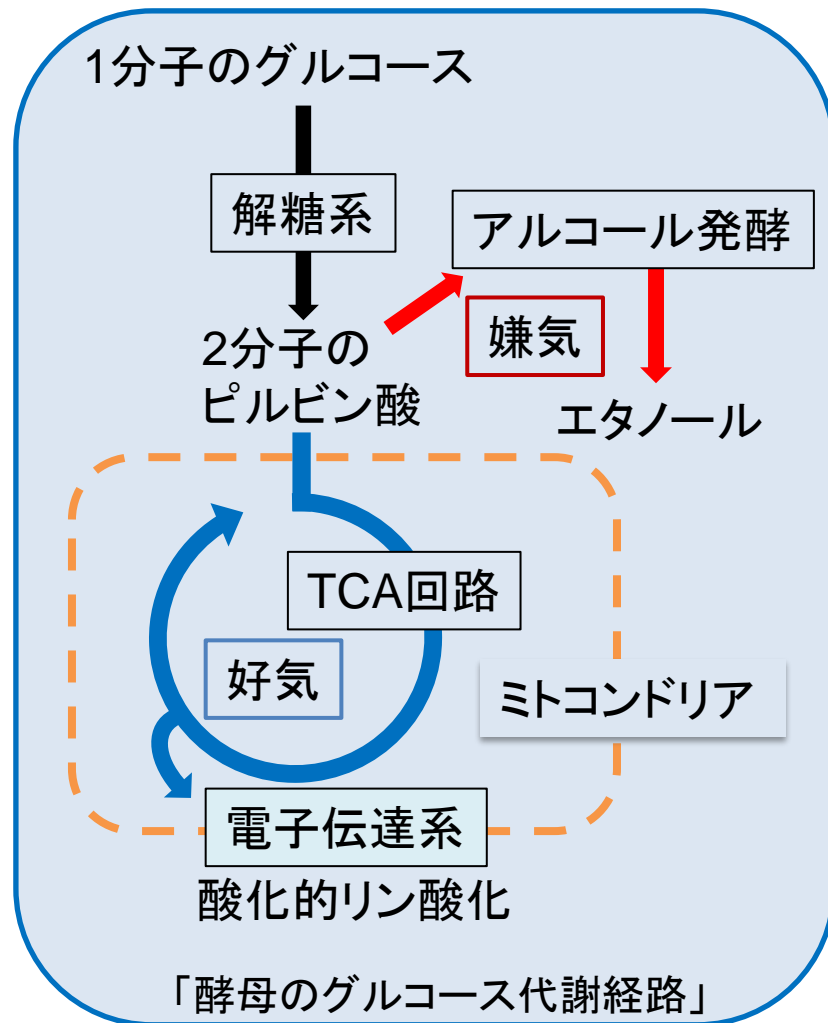
YPD培地(グルコース濃度2%)
6 h, 12 h, 24 h, 48 h 振盪培養(30°C)

沸騰75%エタノールで代謝産物抽出

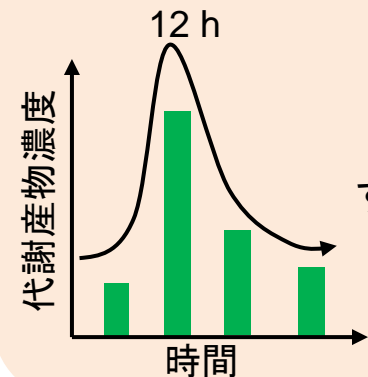
解糖系・TCA回路関連代謝産物の分析



- ・CE(Beckman Coulter P/Ace MDQ Capillary Electrophoresis System)
- ・MS(Applied Biosystems 3200 Q TRAP LC/MS/MS System)

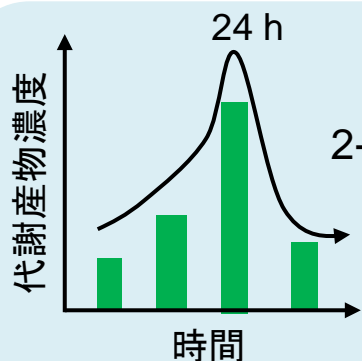


親株, 感受性株の代謝フラックス

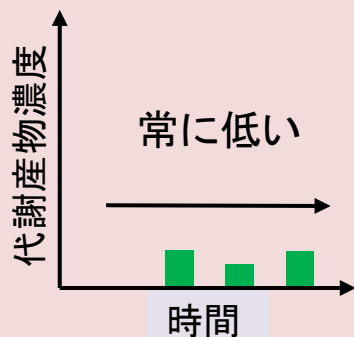


12 hにかけて増加
その後減少傾向

■ KA31a株
検出された
すべての代謝産物
■ a924E1株
クエン酸
リンゴ酸



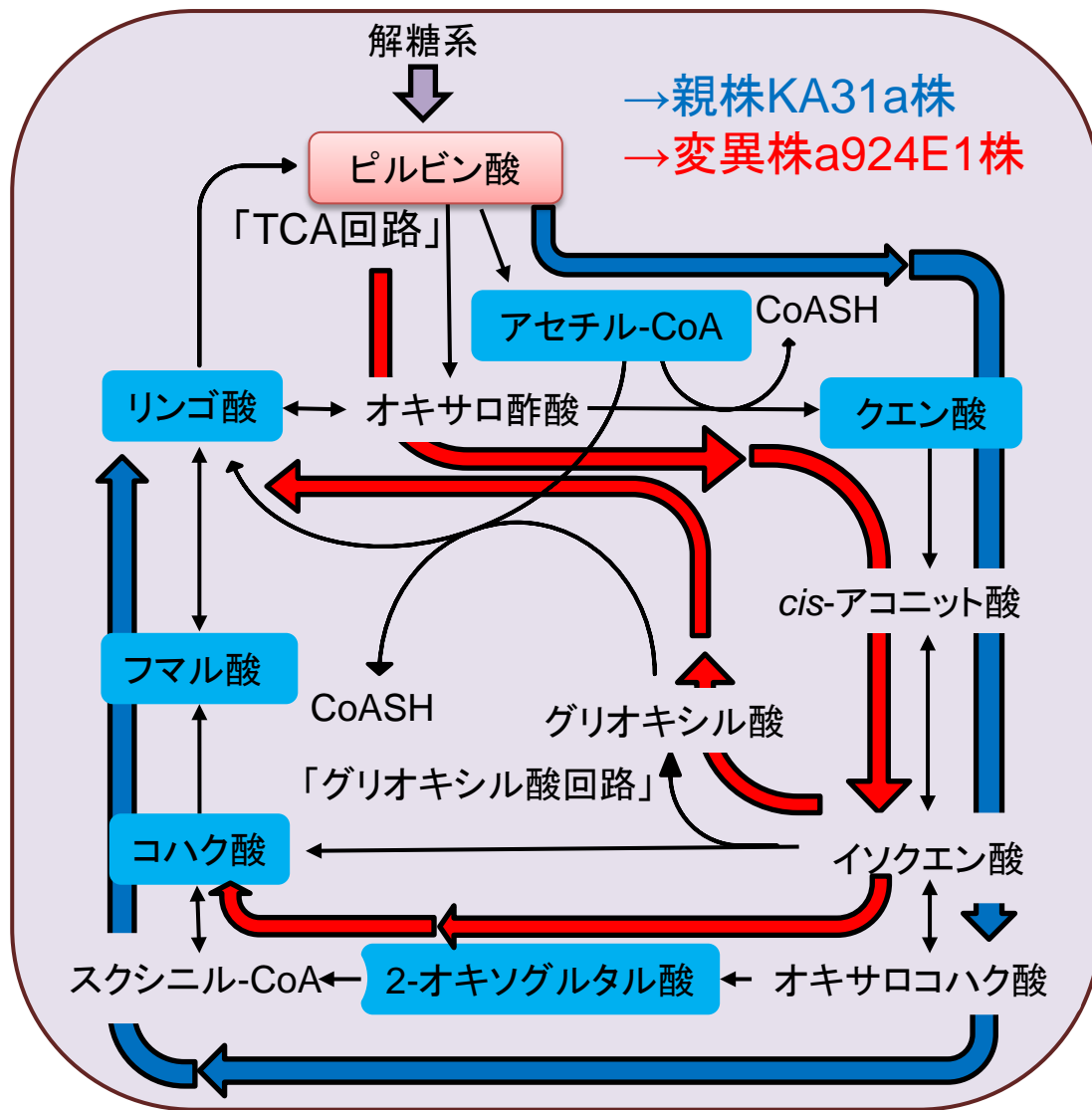
■ a924E1株
2-オキソグルタル酸
コハク酸
NADH
NAD⁺



常に低い

■ a924E1株
アセチル-CoA
フマル酸

結果より予想される代謝経路
炭素源(グルコース)の枯渇した12 h以降の
TCA回路に、差が出てくる

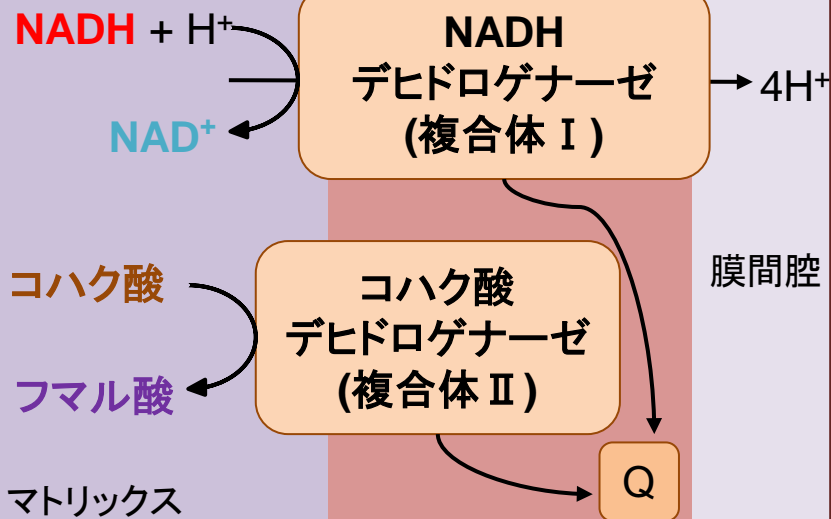


a924E1株・・・親株KA31a株に比べフマル酸, NADH, NAD⁺の濃度が低い

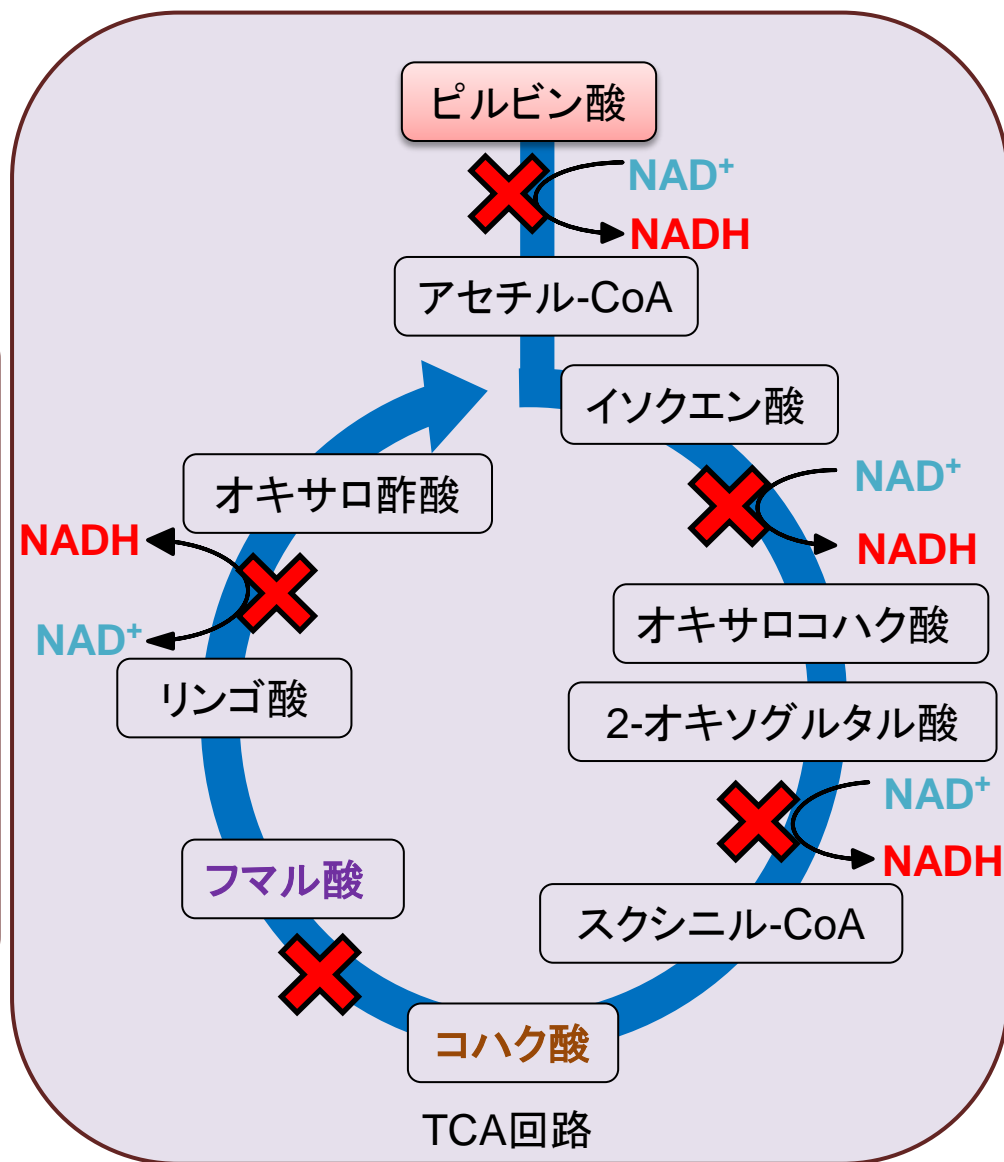


NADHデヒドロゲナーゼの機能の低下

コハク酸デヒドロゲナーゼの機能の低下



ミトコンドリア内膜 電子伝達系



重松亨ほか
日本食品工学会第15回(2014年度)年次大会

まとめ

紫外線変異

温度・圧力感受性変異株 a924E1



S. cerevisiae KA31a株

- 解糖系の代謝は親株と同等
- TCA回路、電子伝達系の機能不全



対数増殖期 → 減速期 → 定常期

培地中のグルコース濃度の低下

クラブトリー効果によるエタノール発酵 → 好気呼吸にシフト

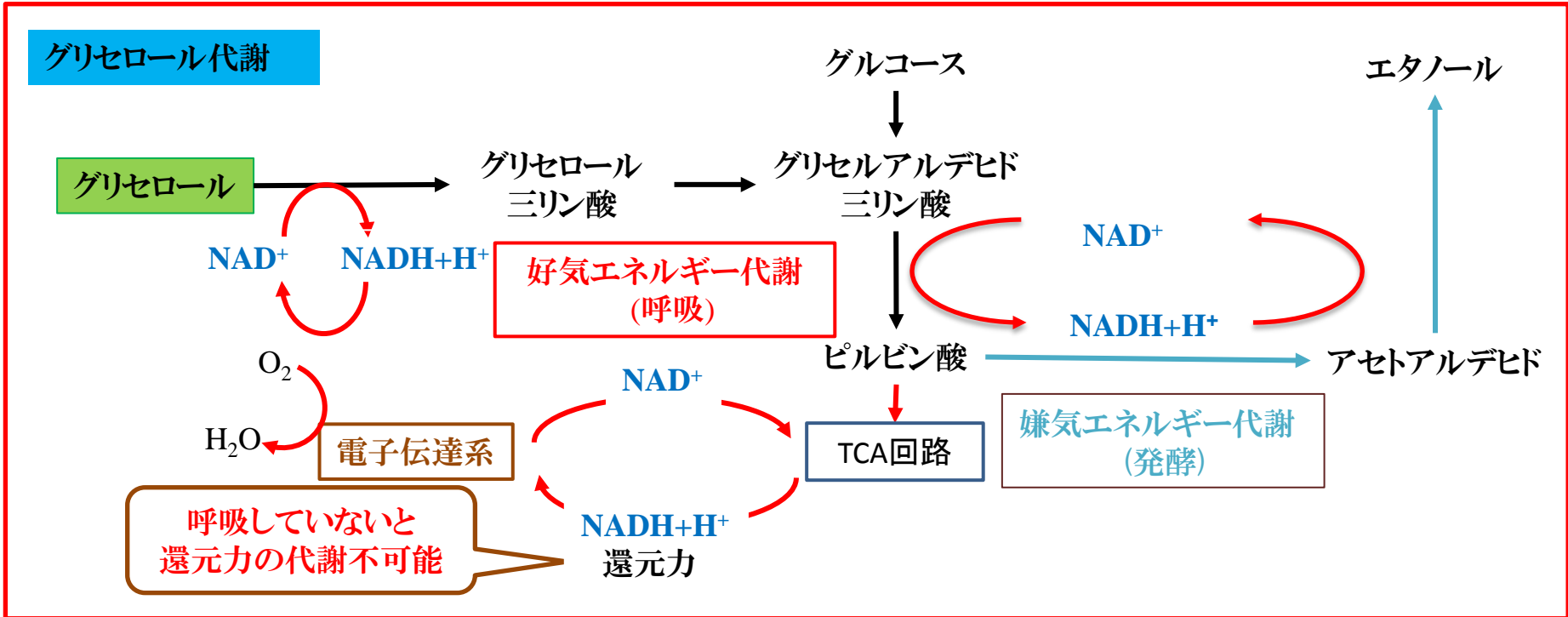
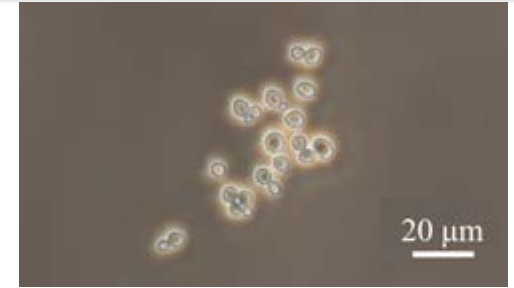
感受性株：エネルギー不足



感受性株： 定常期細胞の圧力・温度処理に対する抵抗性低下

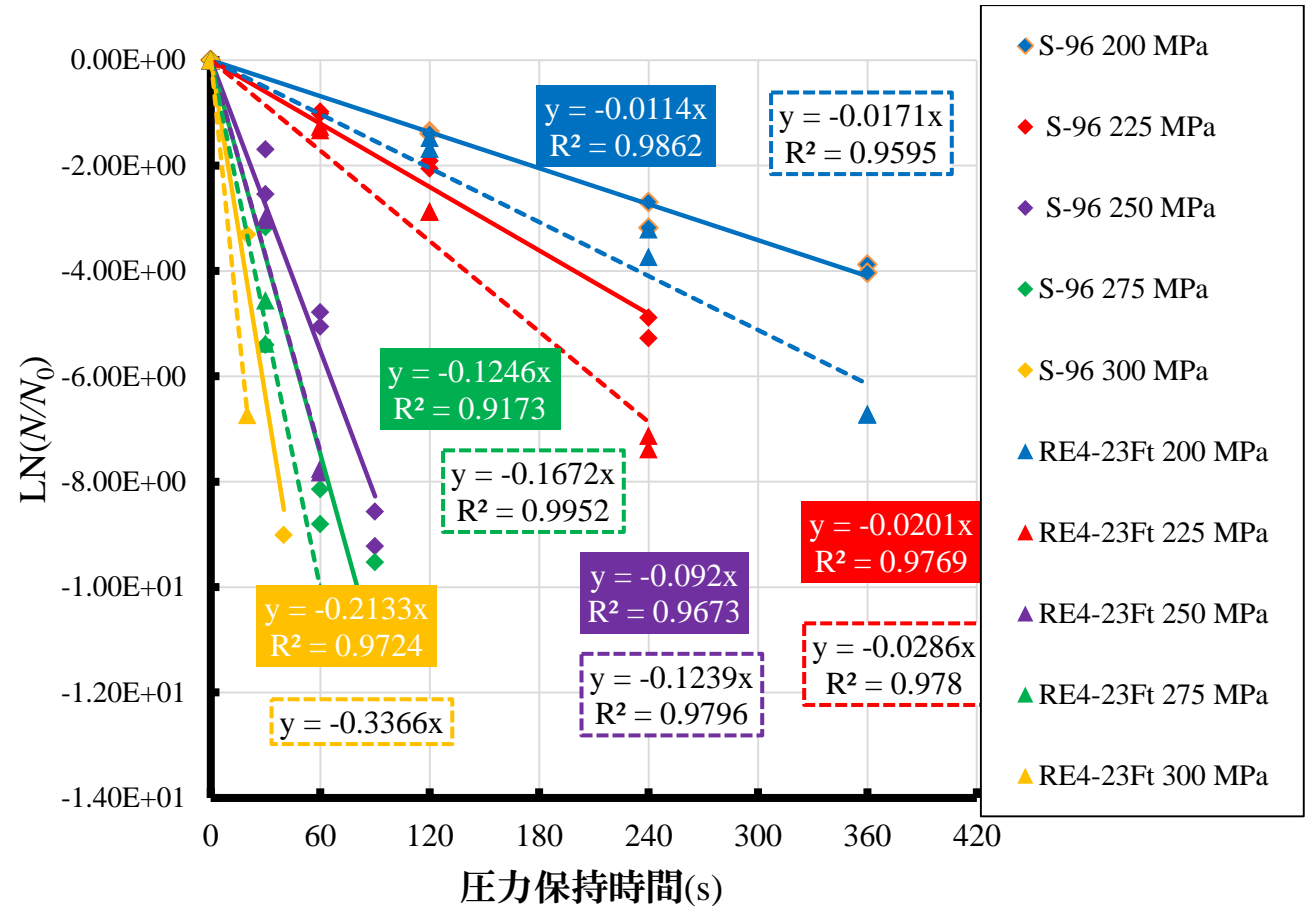
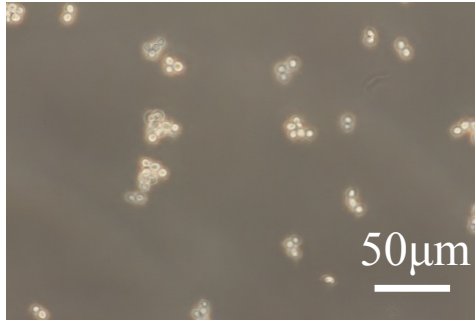
味噌用耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 圧力感受性株の探索

- ◆ 使用菌株: *Zygosaccharomyces rouxii* S-96株
新潟県の味噌・醤油メーカー約30社が標準株として使用。
(新潟県食品研究センター渡辺聡先生提供)



グリセロールを単一炭素源として増殖能の低下した株 = 呼吸機能低下株

味噌用耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 圧力感受性株 RE4-23Ft 株の取得



棚木智弘 平成26年度卒業論文(新潟薬科大学)

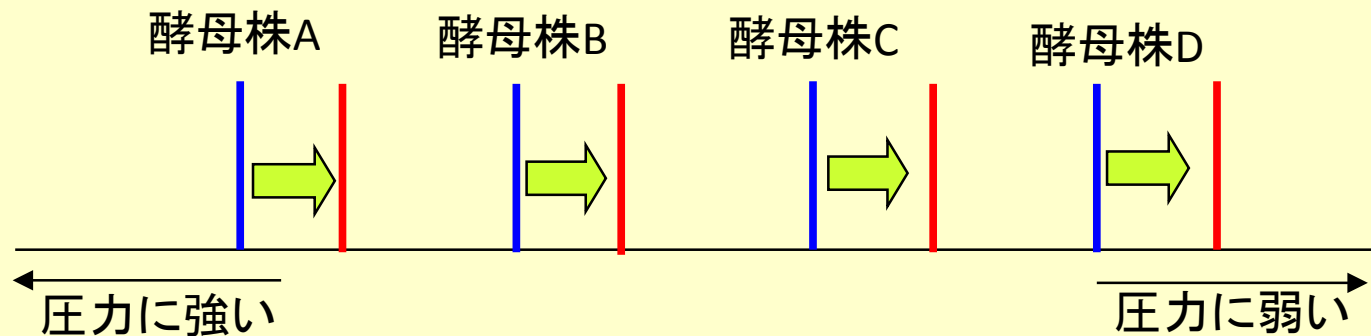
好気呼吸機能の低下を指標に圧力感受性変異株を取得

まとめ

- ◆ 清酒酵母から、圧力・温度に弱く、しかし発酵能は減少していない優良酵母株の作出に成功。
→より低い圧力・温度条件での発酵制御が可能
- ◆ 味噌用酵母からも、圧力に弱い優良株の作出に成功。

常温流通可能な生酒・生味噌への超高压技術の応用に期待

発酵・醸造用酵母株の圧力耐性・感受性の制御技術



生命は熱水から始まった

高圧力=35億年前に生命をつくりだした環境条件の一つ。

微生物=35億年前に登場し、地球の生態系を維持し続けてきた。

圧力の持つ潜在力

微生物の持つ潜在力

従来なかった
新しい現象の発見
そのメカニズムの
科学的説明

新しい技術の開発



平成27年2月24日、
卒論発表会直後の研究室メンバー