

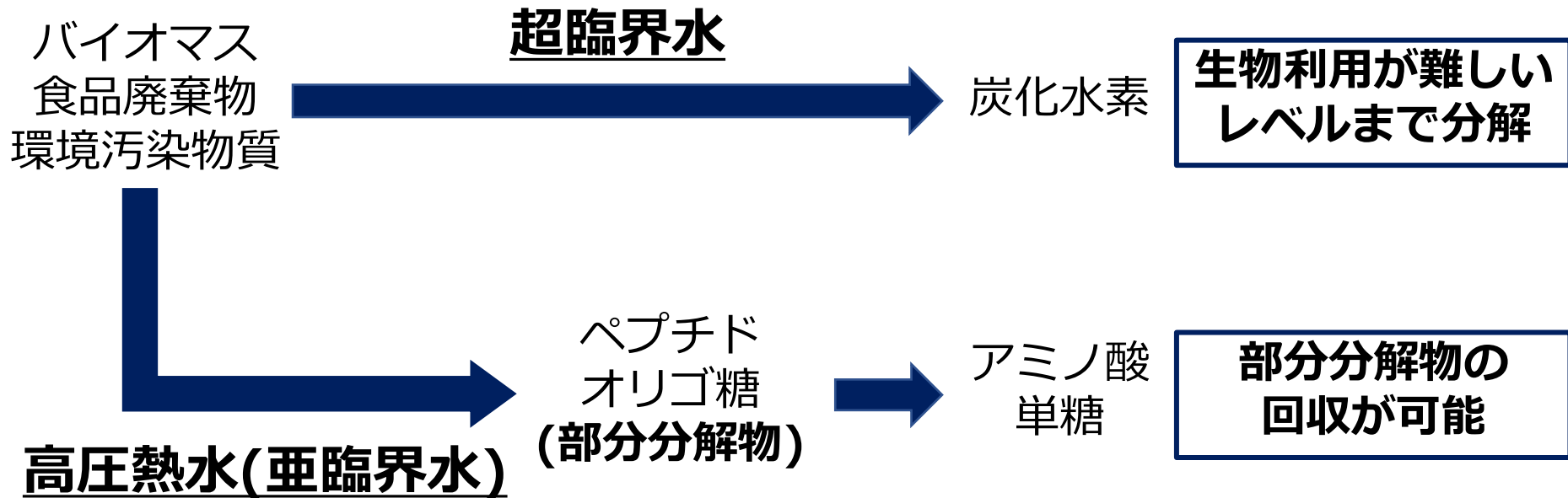
超臨界流体部会 2022年度基礎セミナー  
超臨界CO<sub>2</sub>および亜臨界水・超臨界水の基礎と応用技術  
化学工学会 超臨界流体部会

# 水熱技術による食品素材の変換

東北大学大学院農学研究科  
藤井智幸

# 研究背景

## 水熱処理の特徴



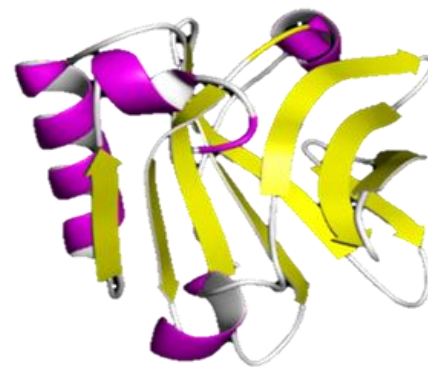
- 高圧熱水処理によるタンパク質や糖類の分解機構の詳細は未だ明らかとなっていない

高圧熱水処理を用いた再資源化技術の確立を目指す

# タンパク質の水熱部分分解

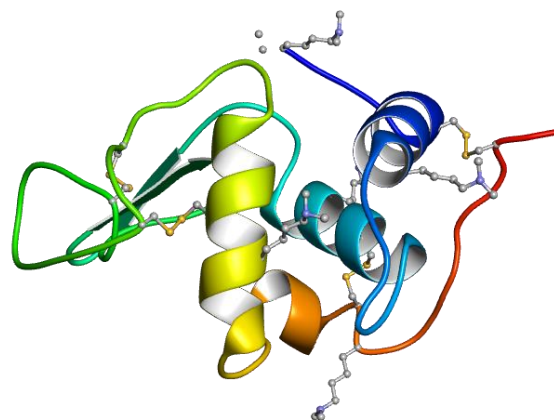
## β-ラクトグロブリン

- アミノ酸：162残基
- 分子量：18.4kDa
- イオン性アミノ酸：29%

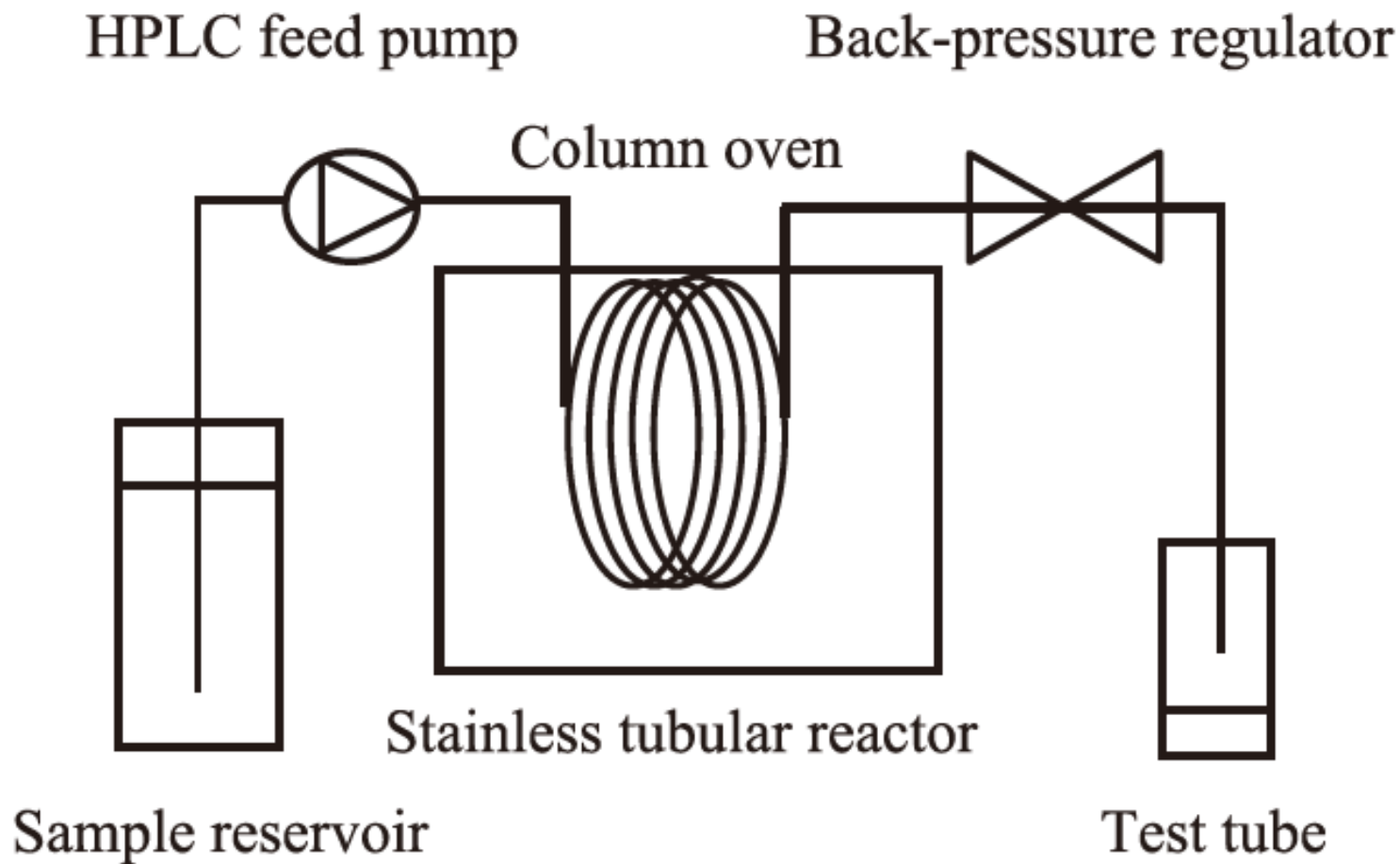


## リゾチーム

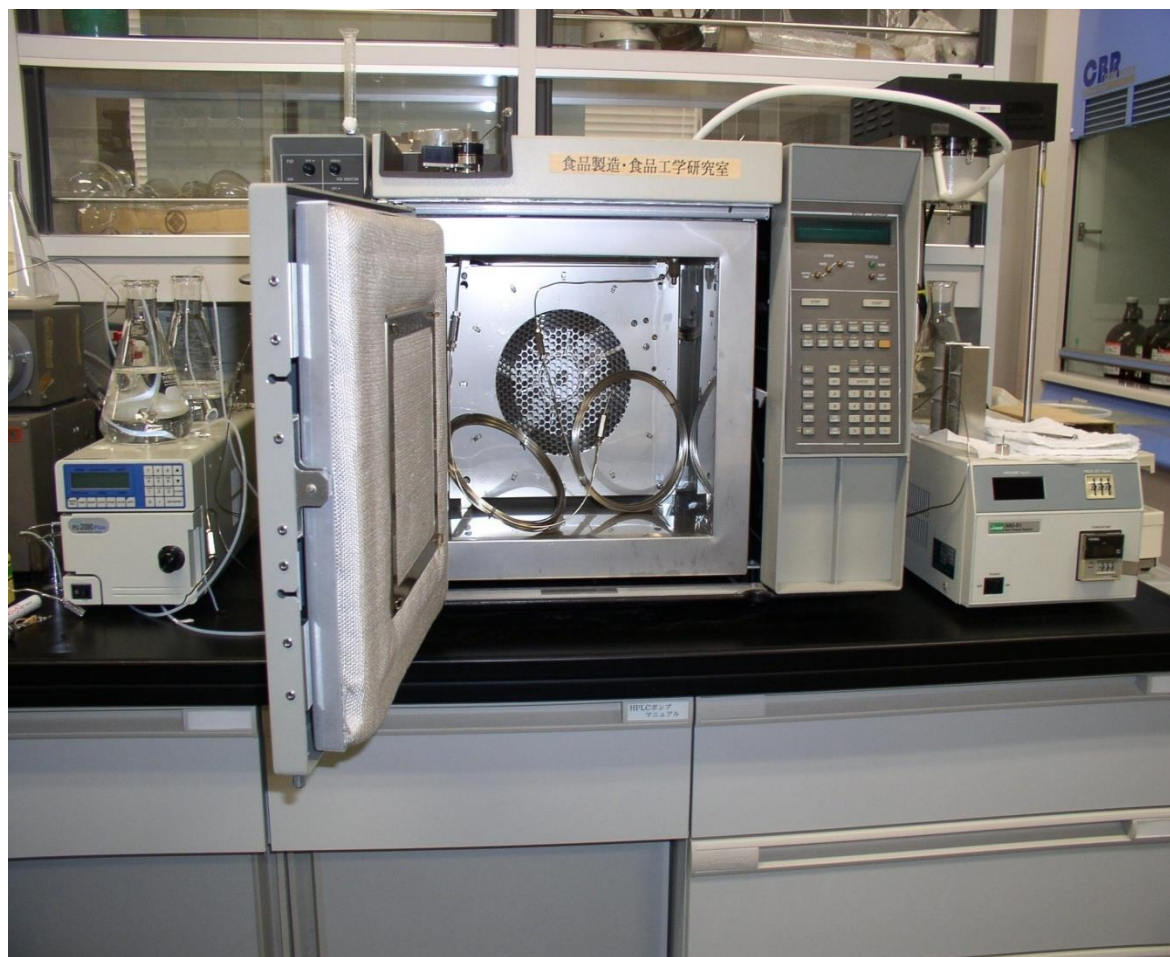
- アミノ酸：129残基
- 分子量：14.3kDa
- イオン性アミノ酸：21%



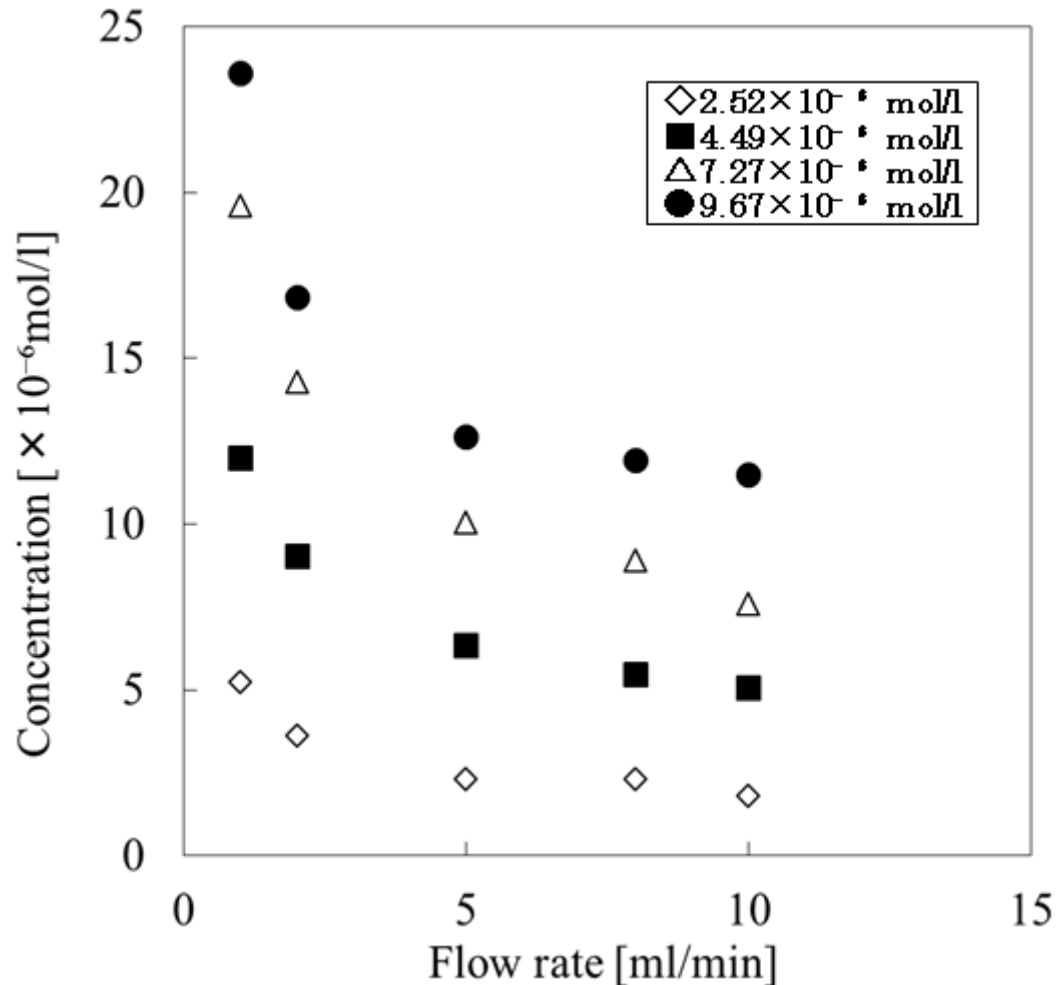
# 水熱部分分解のための管型リアクター



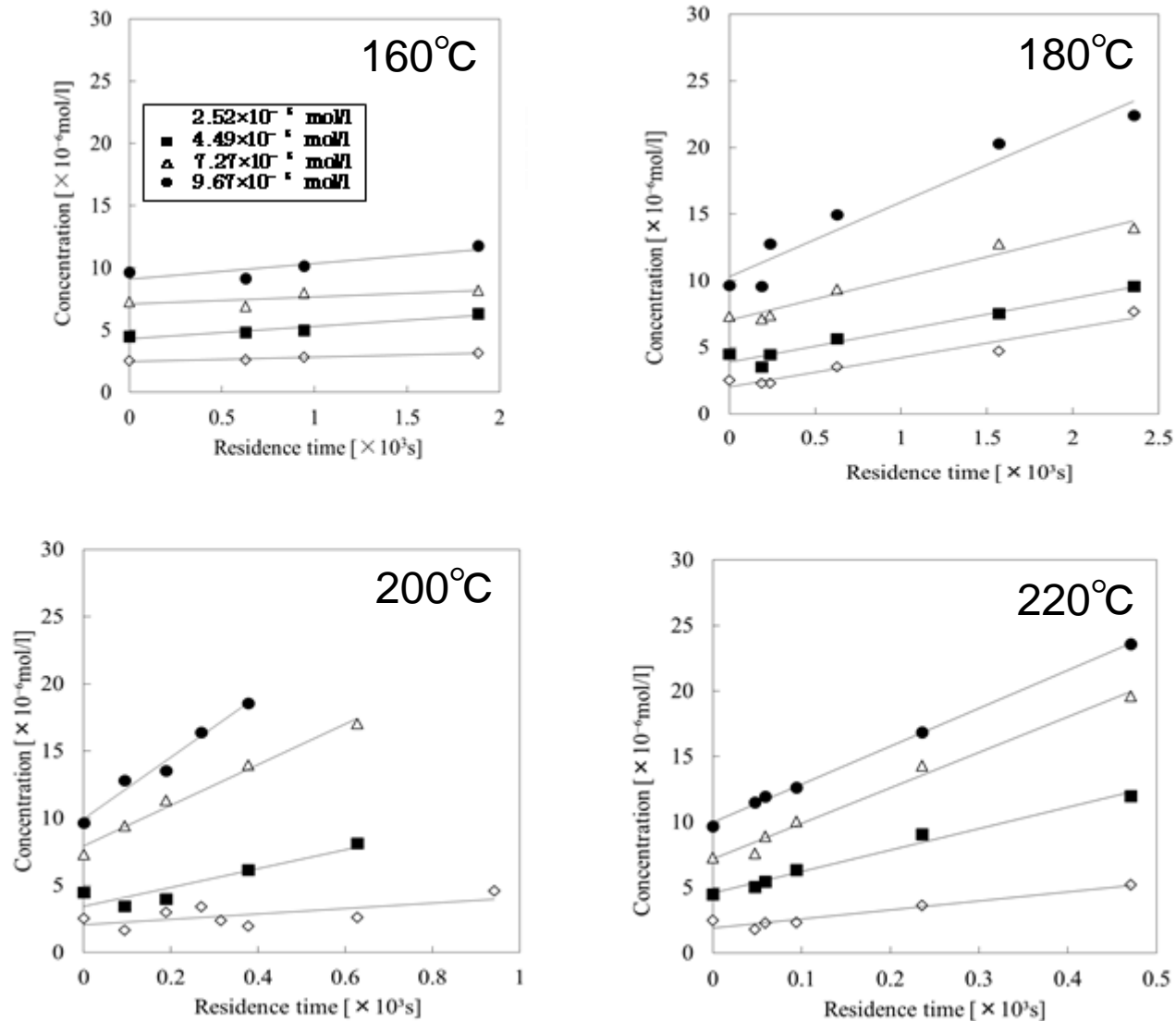
# 管型リアクター



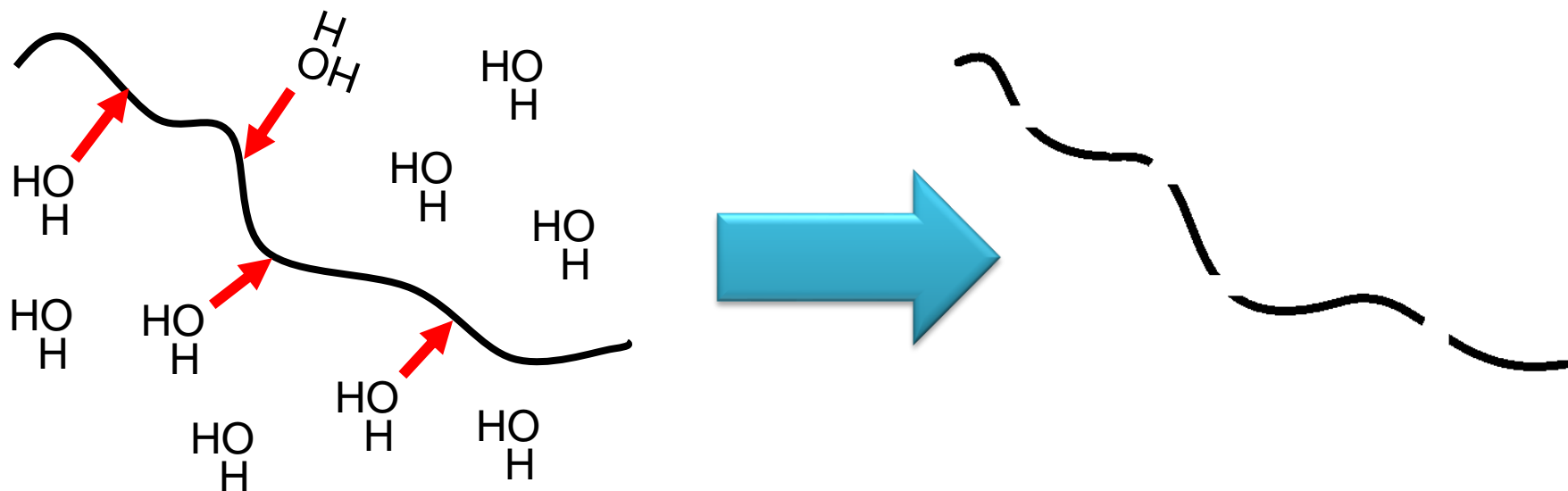
# 管型リアクターによる $\beta$ -ラクトグロブリンの部分分解の例 (5MPa、220°C)



# 部分分解物濃度の滞留時間依存性



# イオン化した水が充分量存在していると仮定した反応モデル



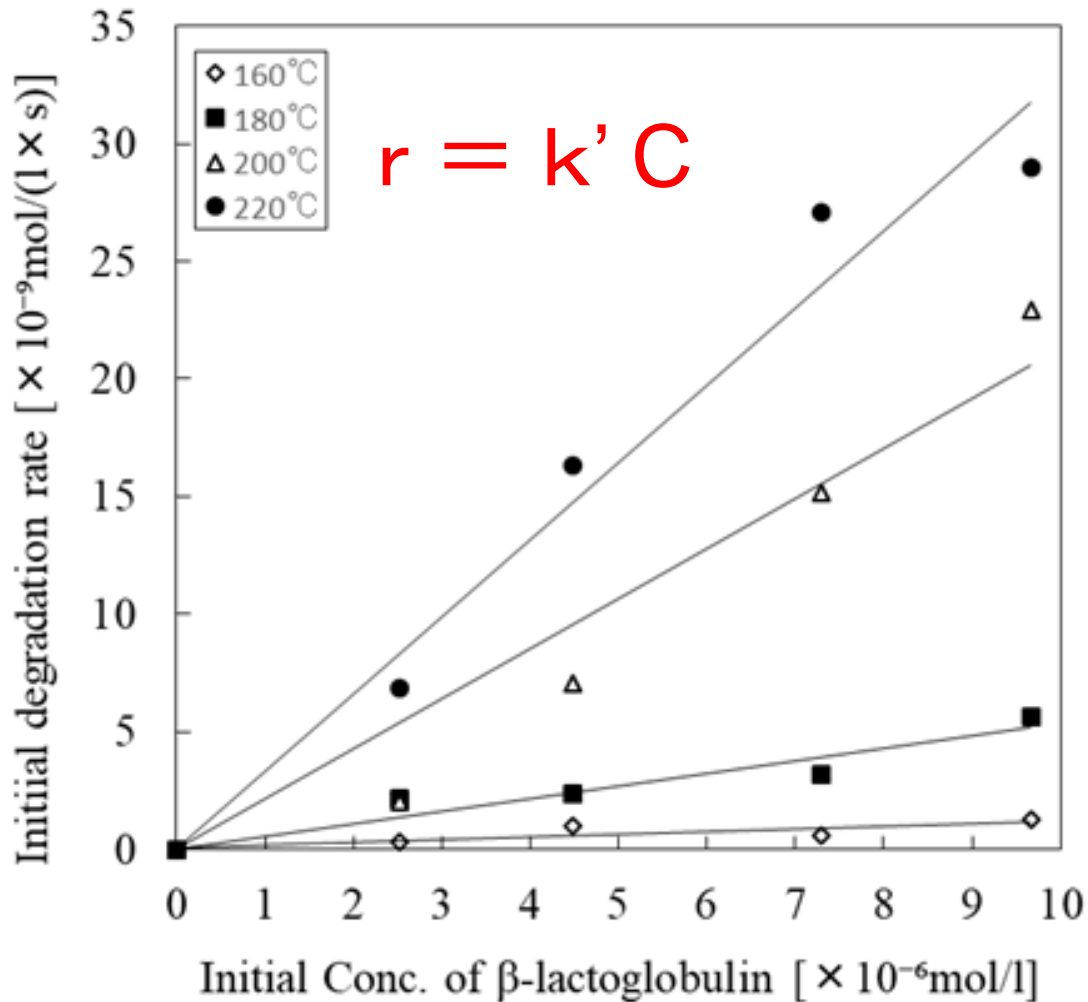
水分子が加水分解で消費されても総濃度の減少はわずか。

$$r = k' \times C$$

$r$  [mol/l $\times$ s], 反応初速度  
 $k'$  [s $^{-1}$ ], 反応速度定数  
 $C$  [mol/l], タンパク質濃度

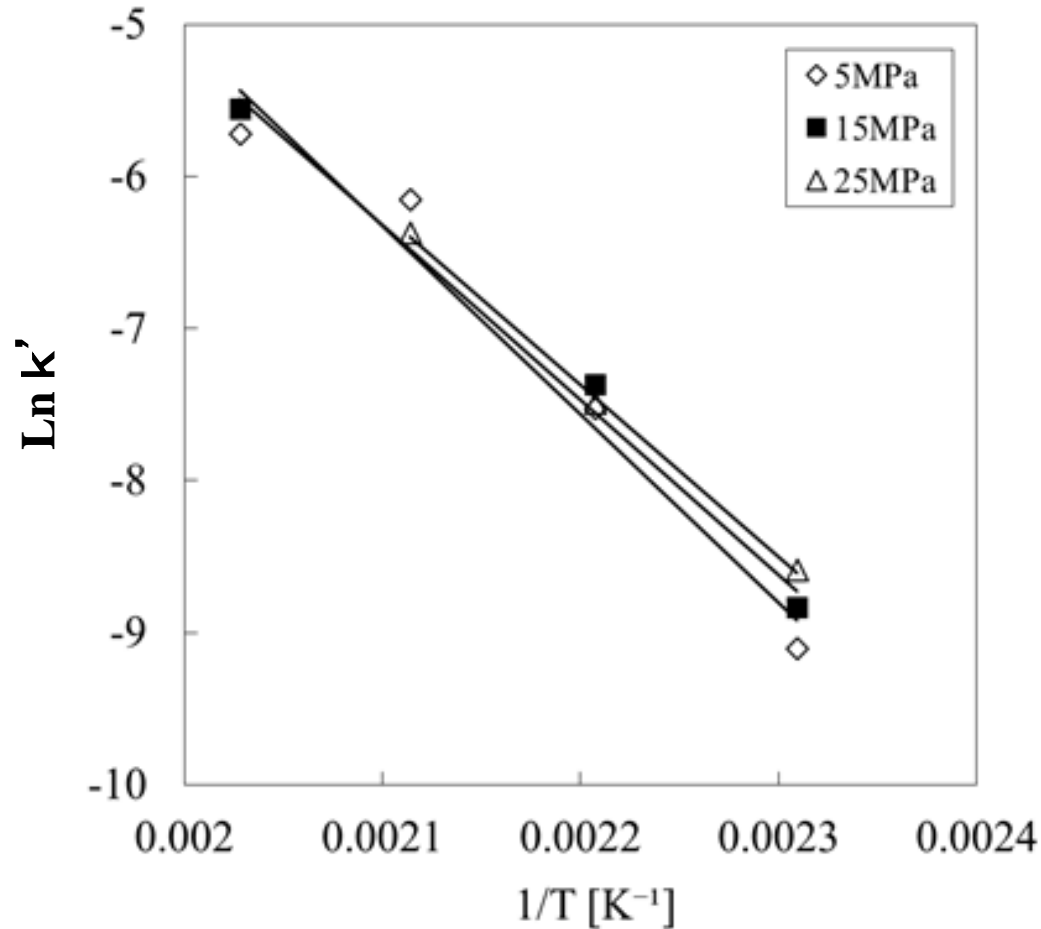


# β-ラクトグロブリン部分分解反応の 初期濃度依存性



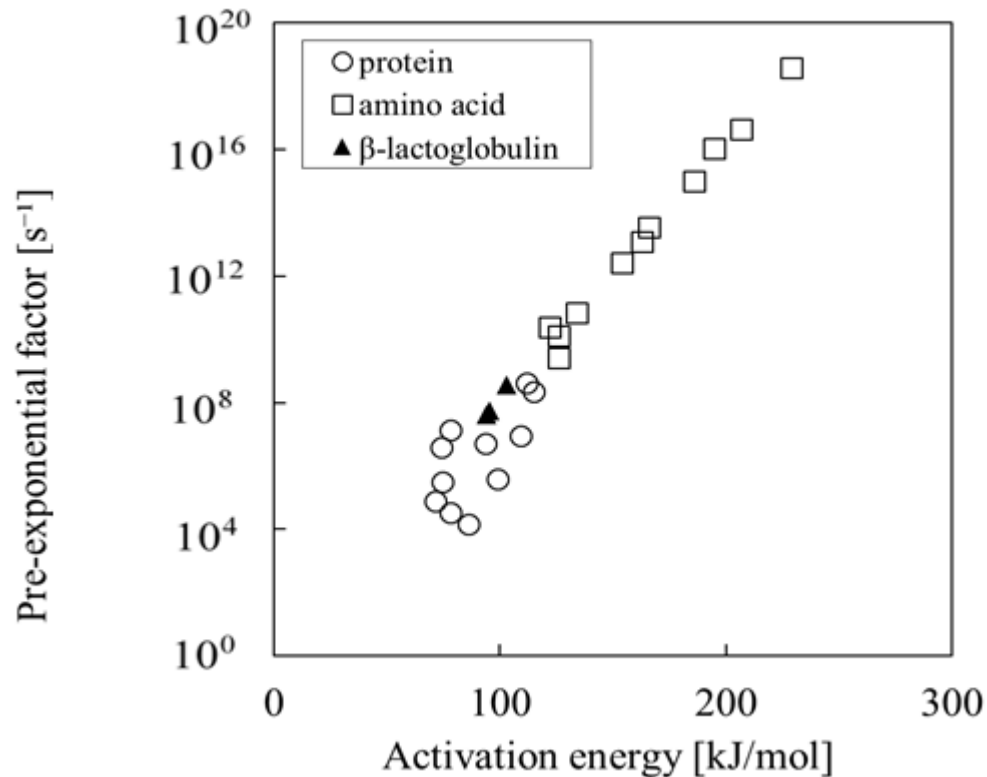
# 反応速度定数の温度依存性 アレニウスプロット

$$k' = A \exp(E/RT)$$

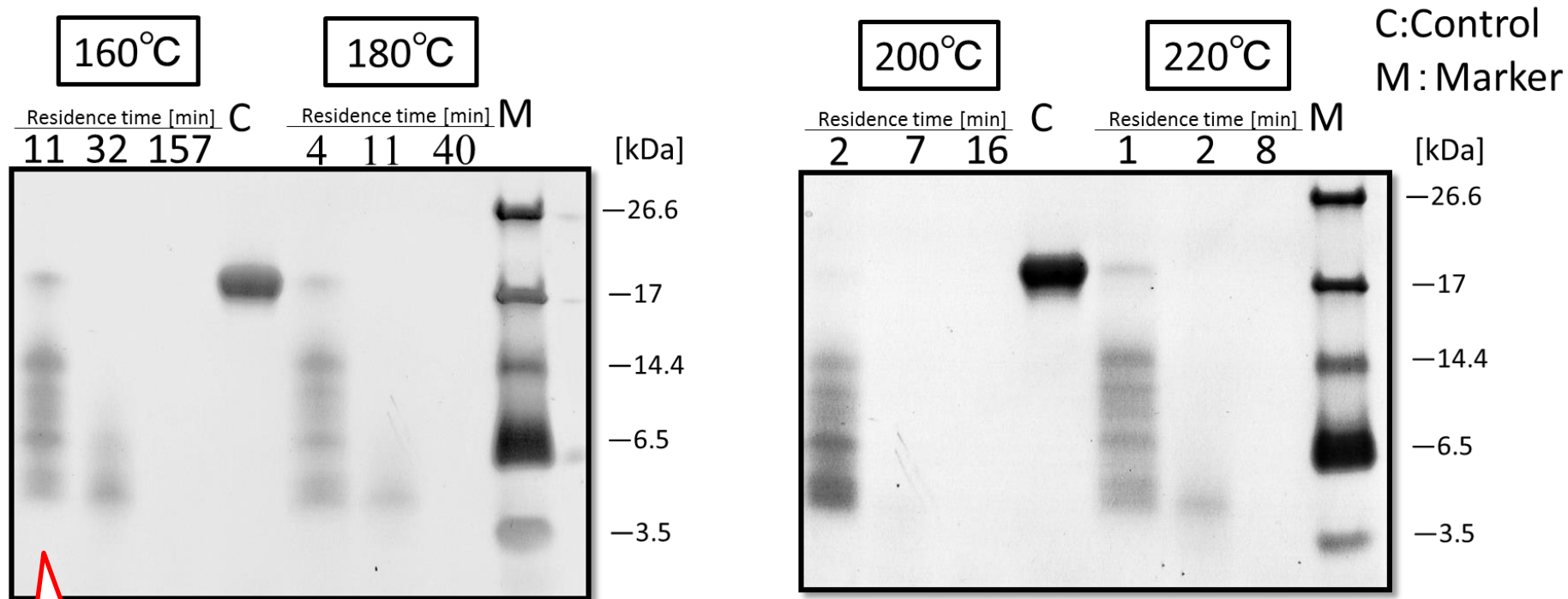


# エンタルピー・エントロピー補償則が 成立している

$$\ln A \propto E$$



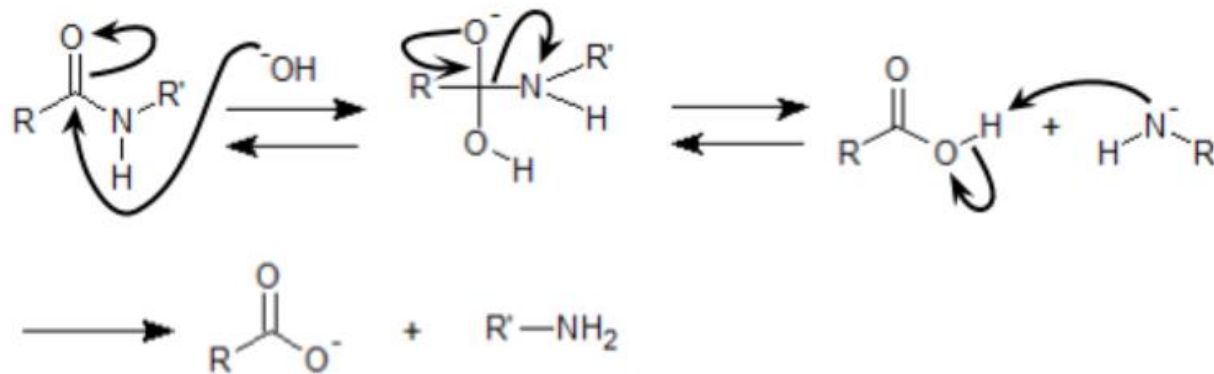
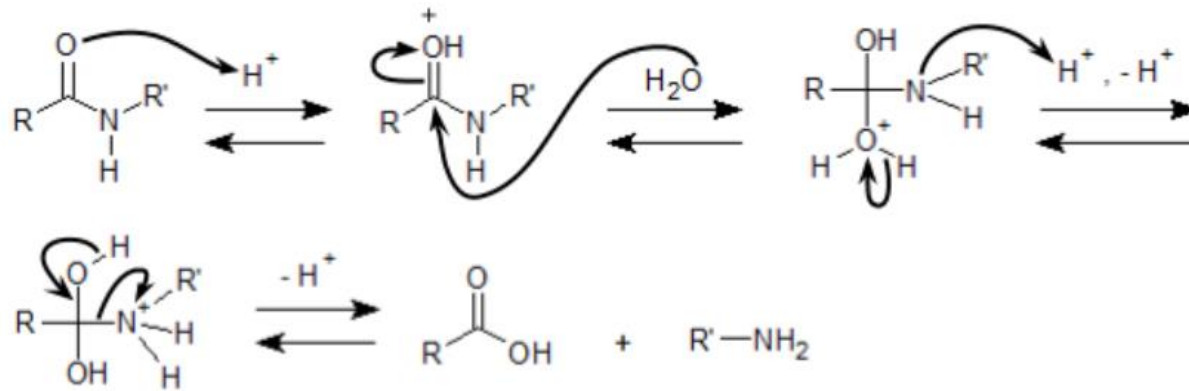
# β-ラクトグロブリンの水熱部分分解物



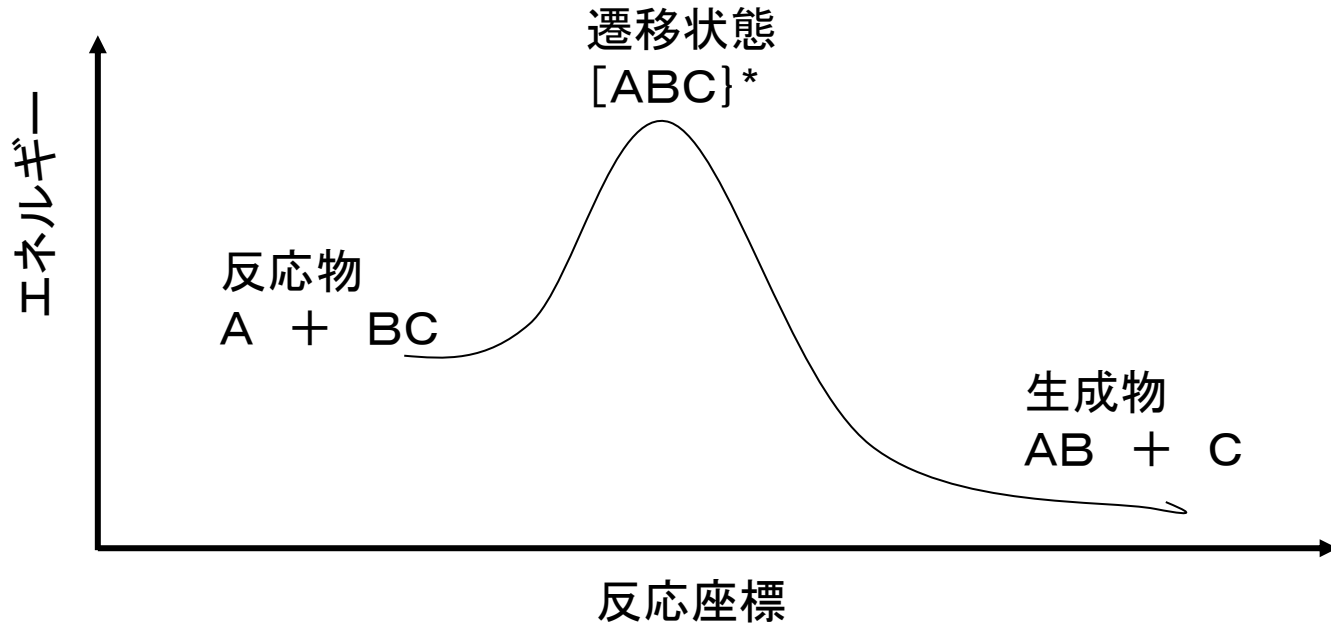
ペプチド  
断片の  
出現

水熱処理によって切断されやすい特異的な結合がある  
≈トリプシン消化と同じような利用があり得る

# ペプチド結合の加水分解



# 遷移状態理論



## 反応速度定数k

温度依存性:  $k = A e^{-\frac{E}{RT}}$  活性化エネルギー

圧力依存性:  $k = k_0 e^{-\frac{P\Delta V^*}{RT}}$  活性化体積

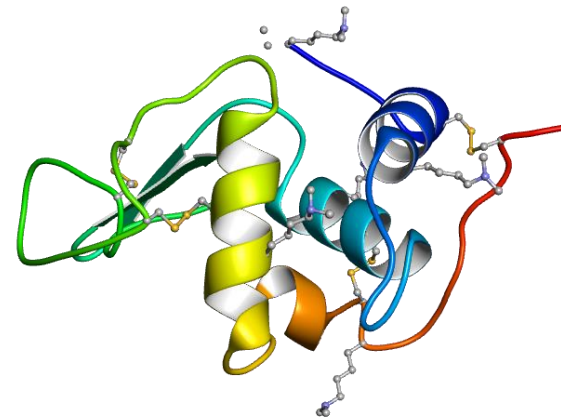
# タンパク質の水熱部分分解

β-ラクトグロブリン



MW 18329.2  
部分比容 0.751 cm<sup>3</sup>/g  
13765 cm<sup>3</sup>/mol

リゾチーム



MW 18660.4  
部分比容 0.712 cm<sup>3</sup>/g  
13286 cm<sup>3</sup>/mol

# タンパク質の水熱部分分解

	圧力[MPa]	活性化エネルギー [kJ/mol]	温度前指数因子A[s <sup>-1</sup> ]
βラクトグロブリン	5	103	3.54*10 <sup>8</sup>
	15	95.6	5.53*10 <sup>7</sup>
	25	94.2	4.24*10 <sup>7</sup>
リゾチーム	5	106.7	3.01*10 <sup>9</sup>
	15	100.6	7.27*10 <sup>8</sup>
	25	97.2	3.17*10 <sup>8</sup>

	温度[°C]	活性化体積[cm <sup>3</sup> /mol]	圧力前指数因子k <sub>0</sub> [s <sup>-1</sup> ]
βラクトグロブリン	160	-58.0	2.13*10 <sup>-7</sup>
	180	-40.3	7.65*10 <sup>-7</sup>
	200	-22.8	2.46*10 <sup>-6</sup>
	220	-4.92	7.22*10 <sup>-6</sup>
リゾチーム	160	-69.8	6.50*10 <sup>-7</sup>
	180	-51.2	2.45*10 <sup>-6</sup>
	200	-32.2	8.30*10 <sup>-6</sup>
	220	-13.5	2.54*10 <sup>-6</sup>



# 水の分子体積

**Table 1** Assumed values of molar volume ( $V_w$ ) and adiabatic compressibility ( $\beta_{s,w}$ ) of water of hydration.

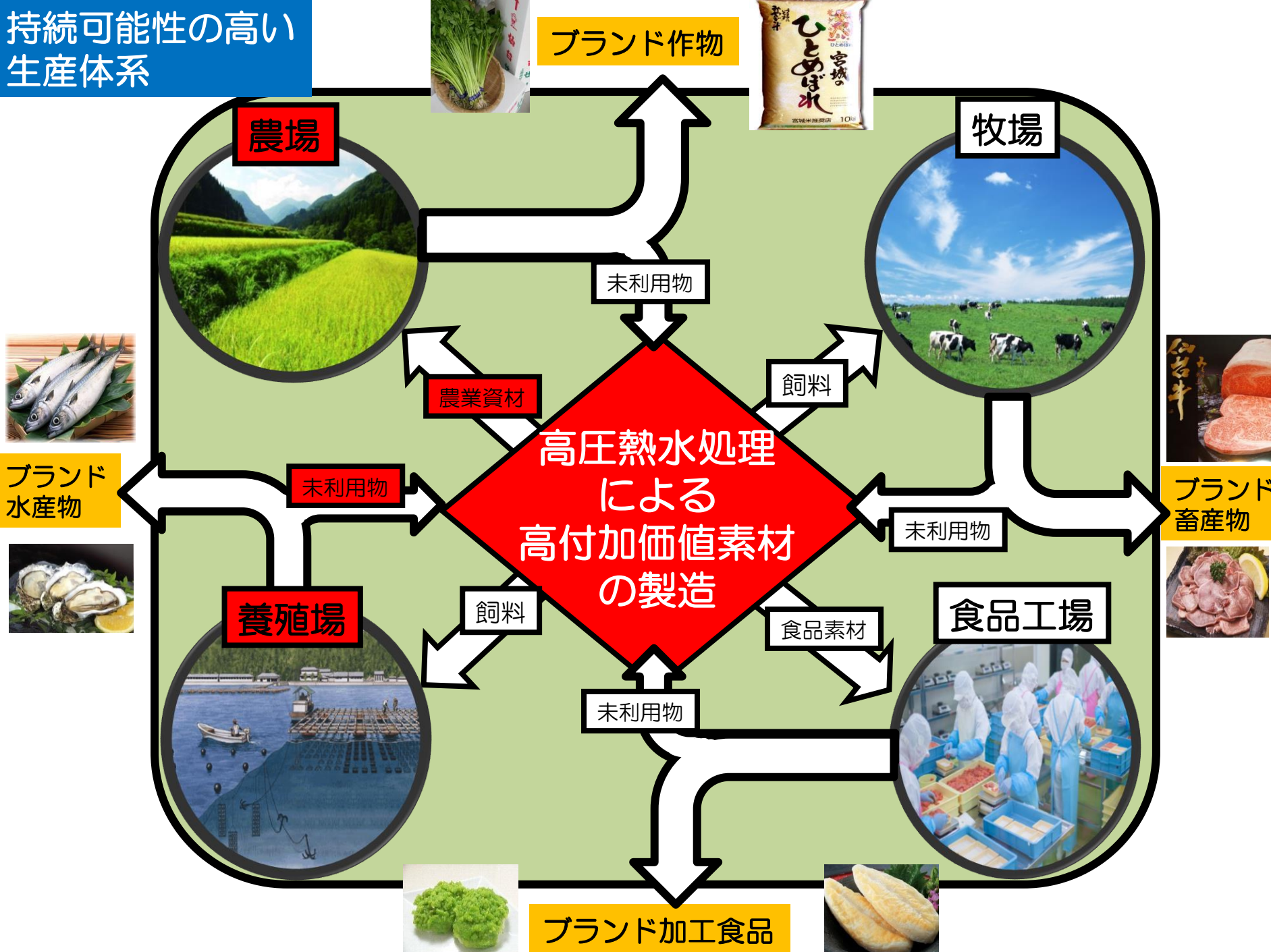
State of water	$V_w$ ( $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ )	$\beta_{s,w}$ ( $\text{Mbar}^{-1}$ )
Free water	18	45
Ice	19.6	18
Water around ionic group	15 ~ 15.3	~0
Water around polar group	16 ~ 17	~18
Water around nonpolar group	~17.5	35 ~ 40

# 反応中間体（遷移状態）

- タンパク質の部分モル体積はペプチド結合部の部分モル体積の数百倍もあるため、タンパク質の小さな構造変化でも活性化体積が大きく変化する可能性がある。
- 活性化体積の減少は、反応中間体形成に伴う変化と水和構造の変化が反映されている。
- 反応温度が低いほど活性化体積の絶対値は大きくなる。
- 遷移状態では、基底状態では水和していなかった水分子が水和していて、低温条件ほど水和分子数が多い。

# 水熱部分分解を中核とした生物生産 システムの構築

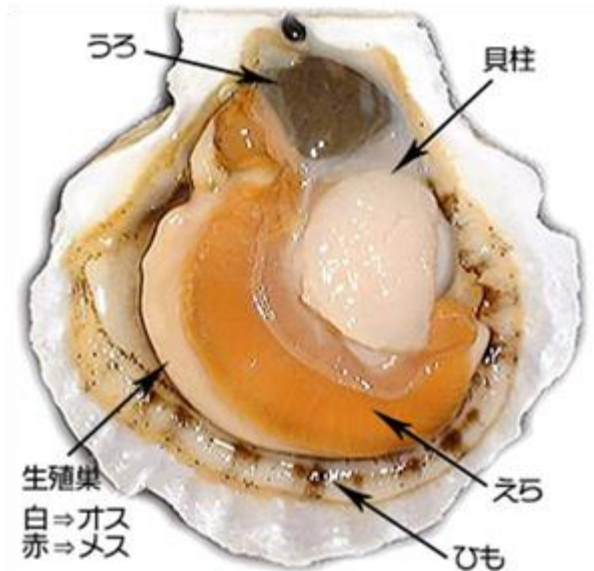
# 持続可能性の高い 生産体系



# 実験方法

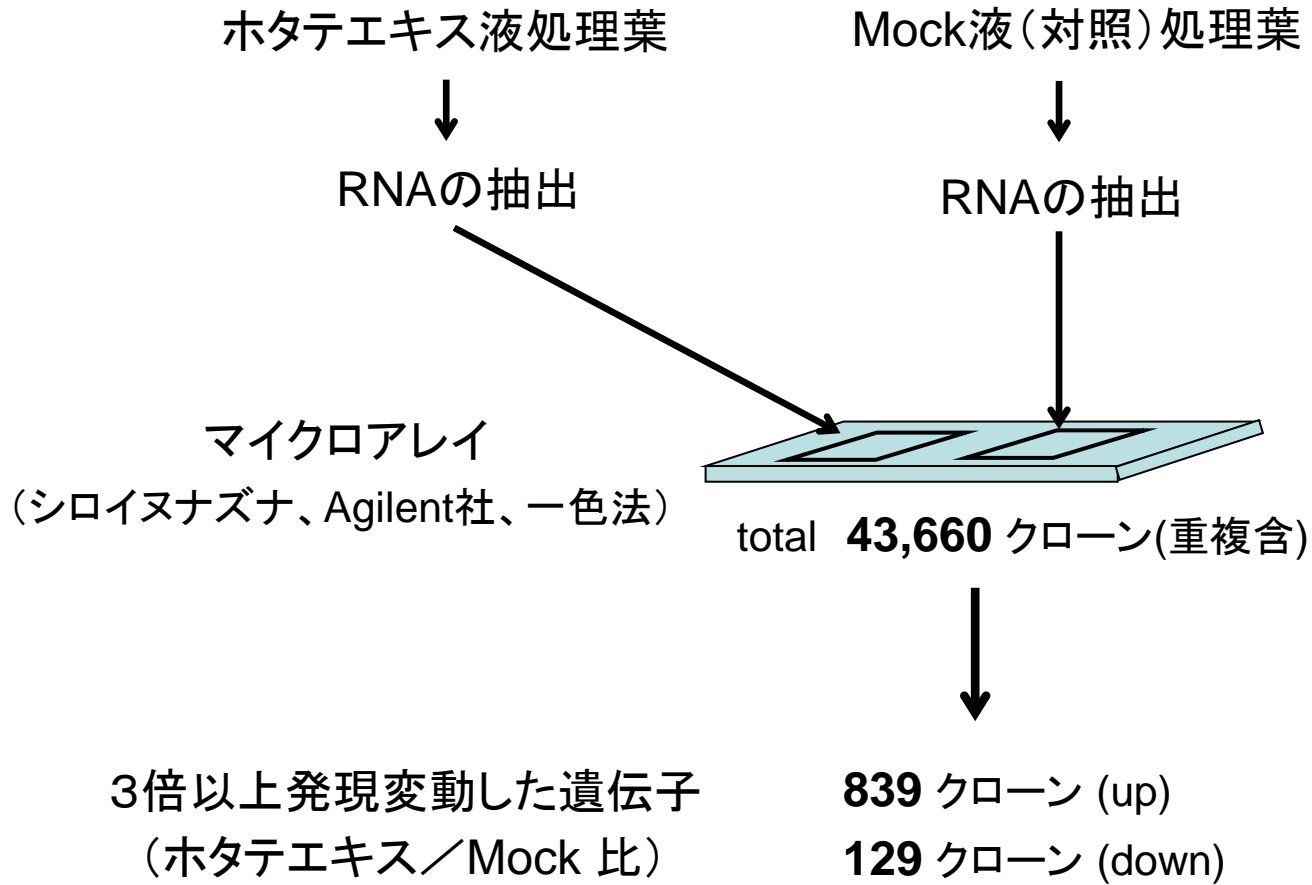
ホタテ貝加工残渣は、宮城県南三陸町志津川、女川町などのホタテガイ加工業者より2010年10～12月に、冷凍状態で入手、保存していたものを用いた。一般的な加工残渣(廃棄部)は、貝柱部分を除いた残りの軟体部で、カドミウムを含有するウロと呼ばれる部分を含む中腸線に加え、生殖腺やえら、さらにはひもと呼ばれる部分からなる。

本研究では、ウロを水熱処理して得たエキスについて、植物活性化剤としての有用性を検討した。



マイクロアレイ解析により・・・

シロイヌナズナの全ての遺伝子の中から、ホタテエキスによって影響を受ける(発現変動する)遺伝子が見つかる!!!



# 40倍以上発現変動した遺伝子

ProbeName	GeneName	発現変動量	発現変動量	発現変動量	平均値	標準偏差
A_84_P15361	AT2G45220	56.57465199	251.8242662	95.09965485	134.499524	84.4388
A_84_P23919	YLS9	67.83153332	147.3266078	71.08593339	95.4146915	36.7313
A_84_P103016	AT4G12500	54.83919164	107.6379418	98.94960205	87.1422452	23.11547
A_84_P17268	PR1	33.69019421	108.3999063	68.28777677	70.1259591	30.5278
A_84_P156615	AT4G12490	41.22730068	106.7358268	61.34485309	69.7693269	27.39916
A_84_P12725	AT3G28510	12.24949017	117.2060231	61.00607886	63.4871974	42.88423
A_84_P16138	AT1G30700	52.20210362	40.90844234	93.75609651	62.2888808	22.72335
A_84_P21001	AT1G44130	41.51391392	97.66492999	40.43723927	59.8720277	26.72723
A_84_P563250	ATARD3	32.63347462	57.52111754	74.22728523	54.7939591	17.08975
A_84_P21916	FMO1	44.8272347	96.52840932	20.90503958	54.0868945	31.55978
A_84_P50790	AT3G22620	36.93139748	15.87210863	107.4996439	53.4343833	39.18471
A_84_P15734	XTR6	41.95131416	85.83955548	21.55052783	49.7804658	26.82339
A_84_P818622	AT3G22600	22.27692965	82.03150545	34.70413824	46.3375244	25.74431
A_84_P16493	AT3G22600	23.04500858	73.9177122	35.17081253	44.0445111	21.69585
A_84_P18416	AT3G46080	25.02111716	83.45460187	22.78719435	43.7543045	28.08716
A_84_P23754	AIG1	16.21881601	82.75216777	31.86176759	43.6109171	28.40427
A_84_P11446	PDR12	44.48831956	70.54383488	15.09700222	43.3763856	22.64973

# 葉面散布によって高発現が認められた遺伝子

- PR1, PR4, PR5, BGL2: サリチル酸シグナル伝達系により発現制御されている防御応答のマーカー。BGL2は  $\beta$ -1,3-glucanase。
- EDS5: サリチル酸の生合成に関わるトランスポータータンパク質をコード
- PDF1.4, PDF1.3, PDF1.2c, PDF1.2b, PDF1.2, ATHCHIB: ジャスモン酸シグナル伝達系により発現制御されている防御応答のマーカー(多くはDefensinの仲間)。ATHCHIBは塩基性キチナーゼ。
- PAD4, PAD3: ファイトアレキシン合成を制御するシグナル伝達に関わる遺伝子と考えられている。PAD3はファイトアレキシンのカマレキシンの生合成酵素(生合成の最終ステップを触媒する酵素)。



- 病原体の防御応答に関わる遺伝子発現制御に関わっている転写因子として知られているWRKY8, WRKY75, WRKY60, WRKY6, WRKY58, WRKY55, WRKY53, WRKY51, WRKY50, WRKY48, WRKY46, WRKY41, WRKY40, WRKY38, WRKY36, WRKY18および、病原体の防御応答に関わる遺伝子発現制御への関与について報告例の多いMYB51, MYB42, MYB15, MYB15, MYB112, ATMYB50, ATMYB13が高発現していた。

本植物活性化剤は、植物免疫応答の主要シグナル伝達経路であるサリチル酸シグナルとジャスモン酸シグナルを同時に活性化し、様々な防御関連遺伝子の発現を誘導することにより、多様な病原菌（絶対寄生菌、条件的腐生菌、条件的寄生菌、殺生菌など）の感染を抑制することが期待できる。

# 次世代型植物活性化剤

# アグリスケット

## 枝豆栽培比較

対照区(水道水) 試験区(アグリスケット)



収穫量 412g

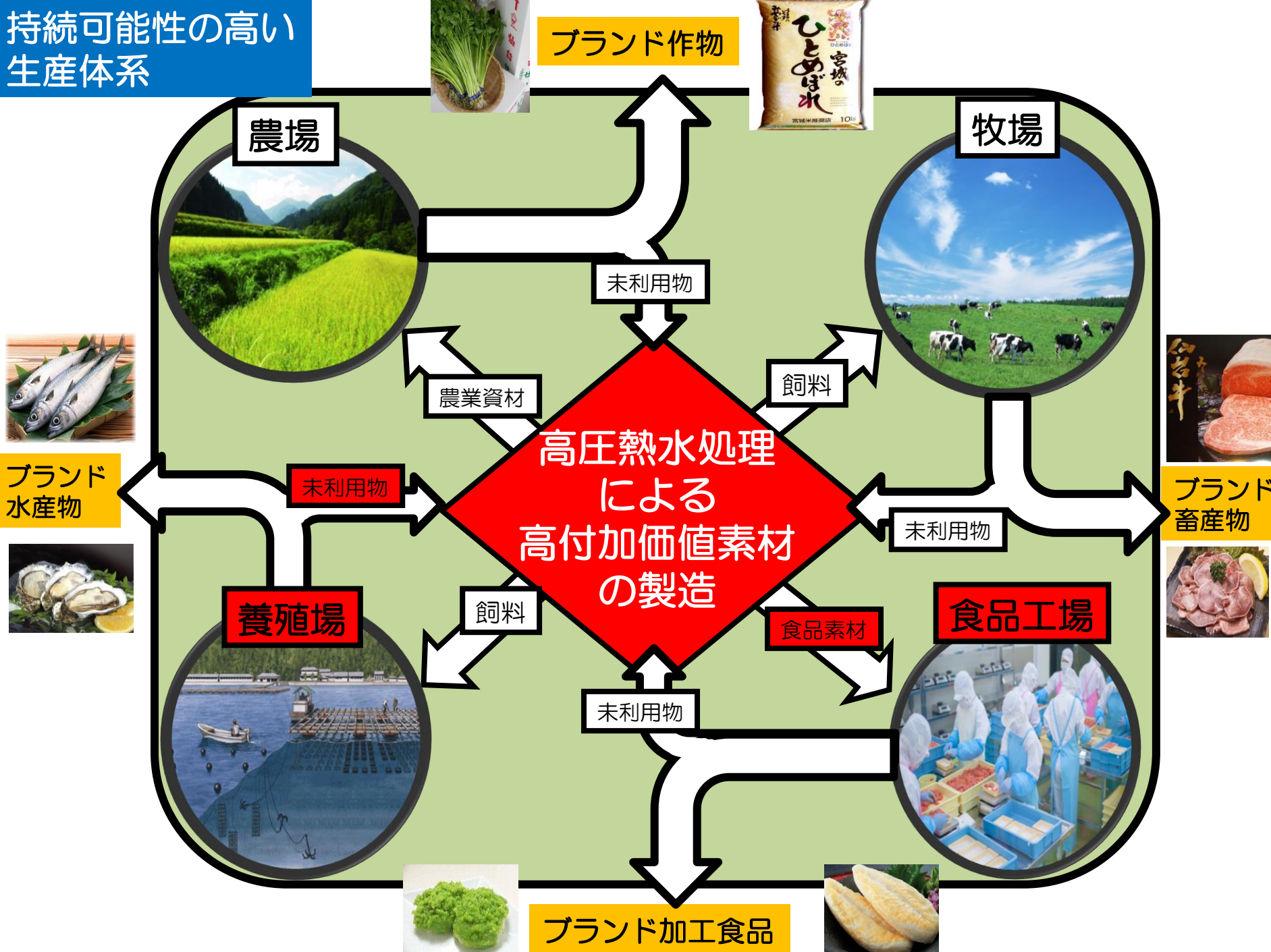


収穫量 889g

コミュニケーション・リンク株式会社

<http://www.agri-suketo.com/>

# 持続可能性の高い 生産体系



# 実験方法

## 試料溶液調製

0.2~1% (w/v)

魚由来ゼラチン溶液



## 水熱処理

圧力 2.0~25.0 MPa

温度 160~240°C

流速 0.1~10 ml/min



部分分解物

## 部分分解物の分析

分子量分布の測定

ゲル浸透クロマト

グラフィ (GPC)

タンパク質の定量

ニンヒドリン比色法

アンジオテンシン変換

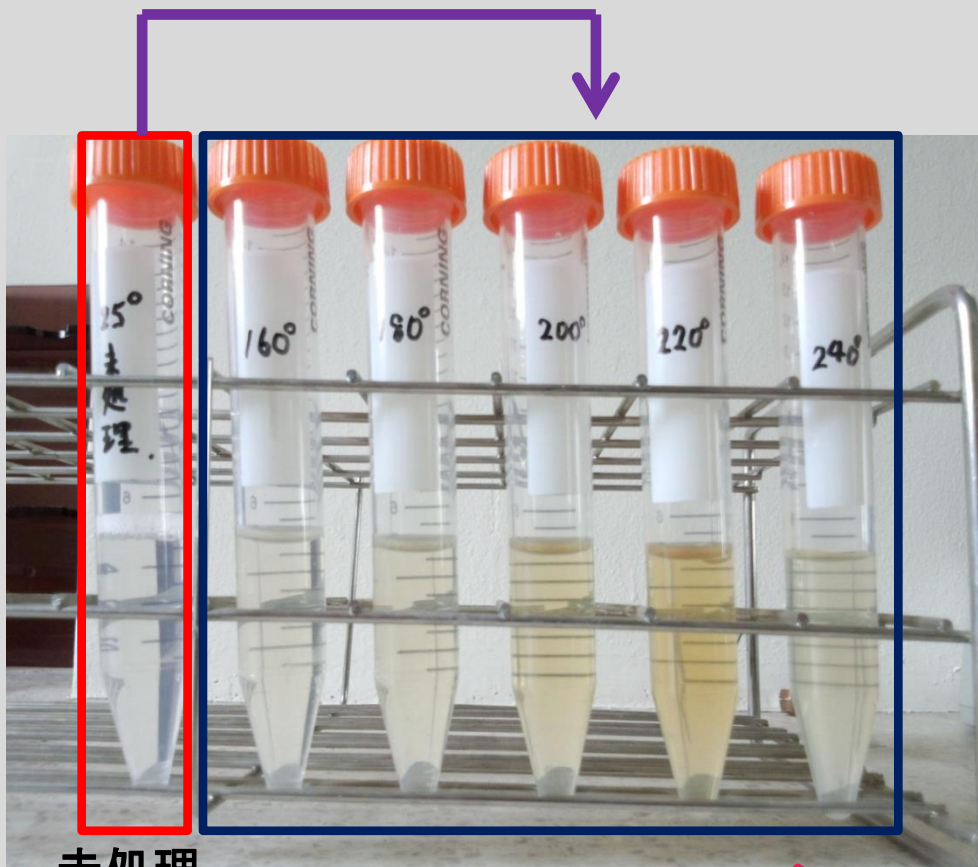
酵素 (ACE) 阻害活性の評価

価

# タンパク質の部分分解物

水熱処理

(2MPa, 160, 180, 200, 220, 240°C)



220°C処理のとき  
褐変している

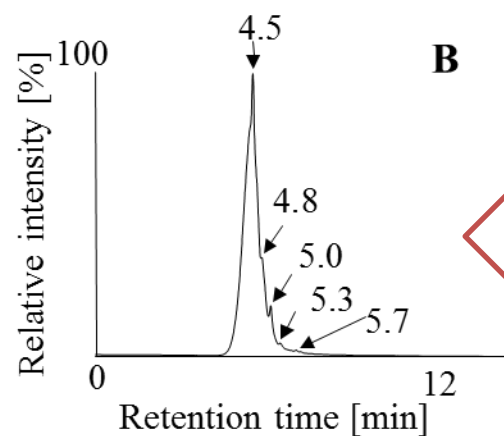
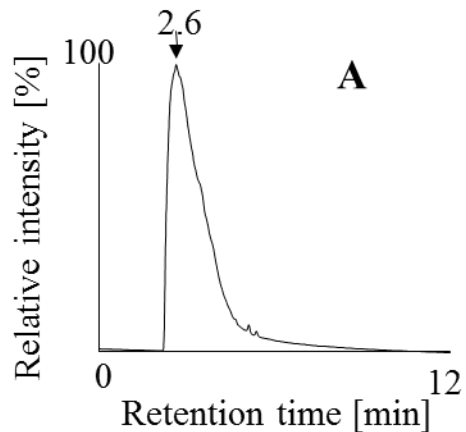
未処理

低温

処理温度

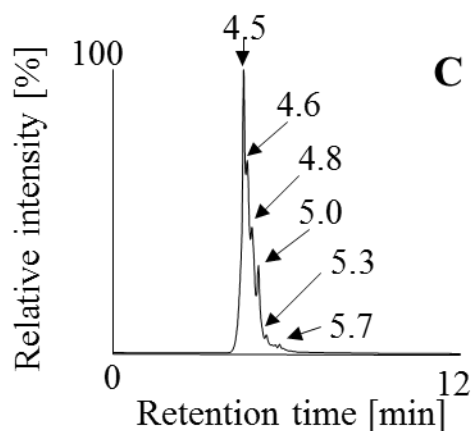
高温

未処理のゼラチンのGPCカーブ

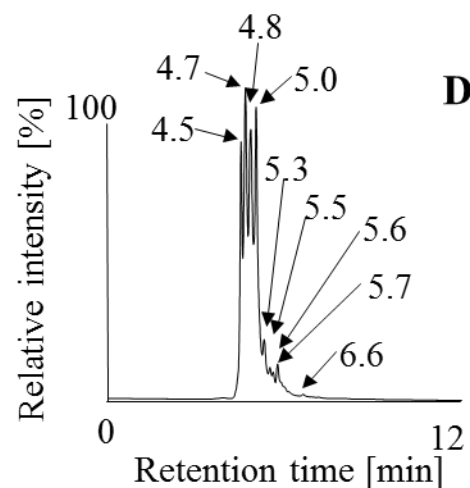


160°C処理

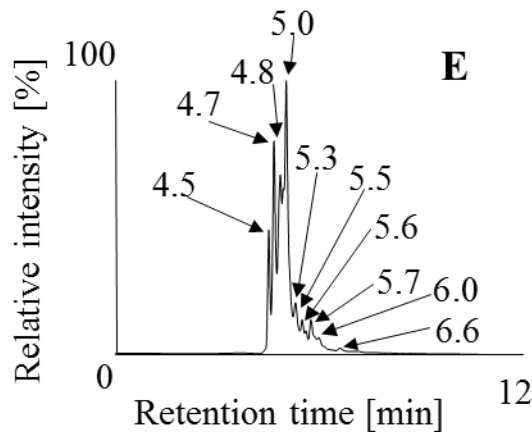
高分子量 ← → 低分子量



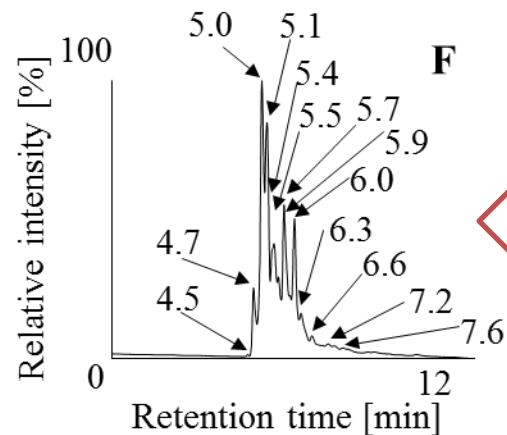
180°C処理



200°C処理

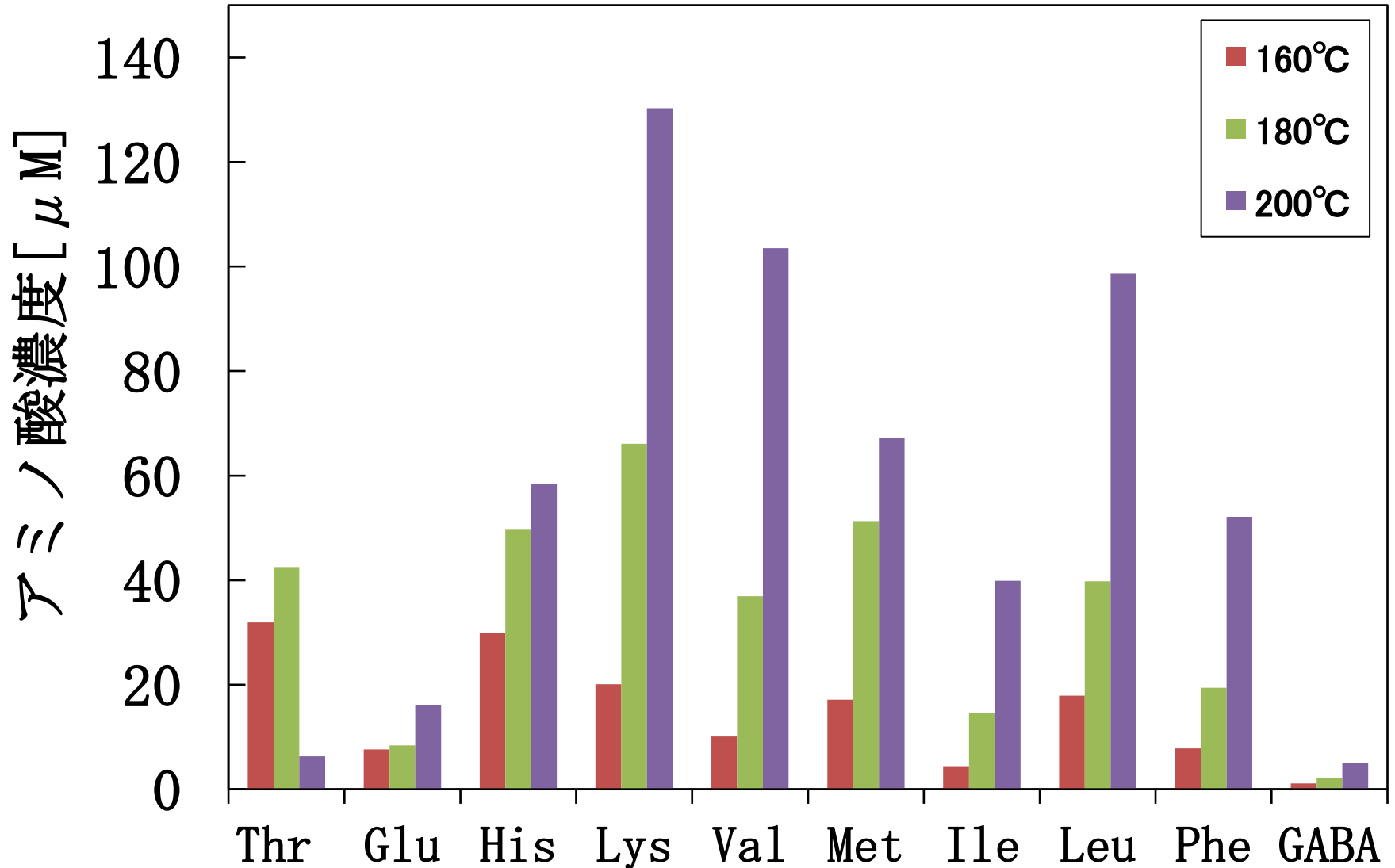


220°C処理



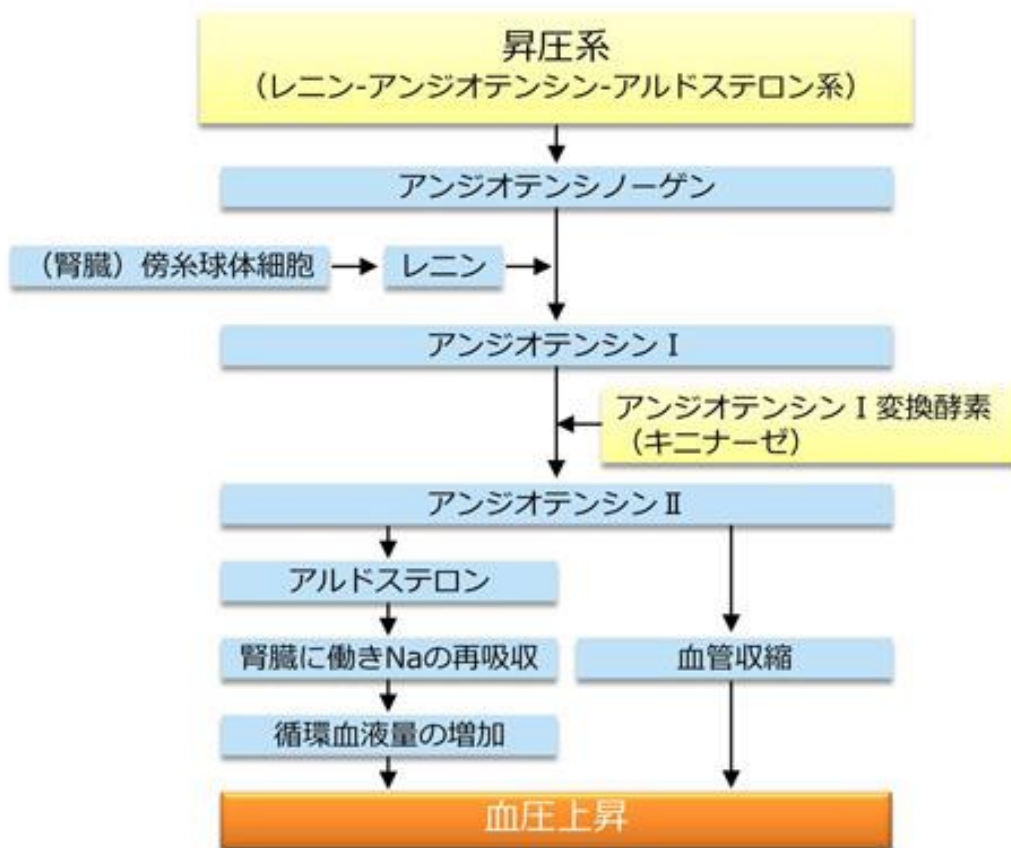
240°C処理

# 水熱処理による 遊離アミノ酸の生成



# アンジオテンシン変換酵素阻害活性

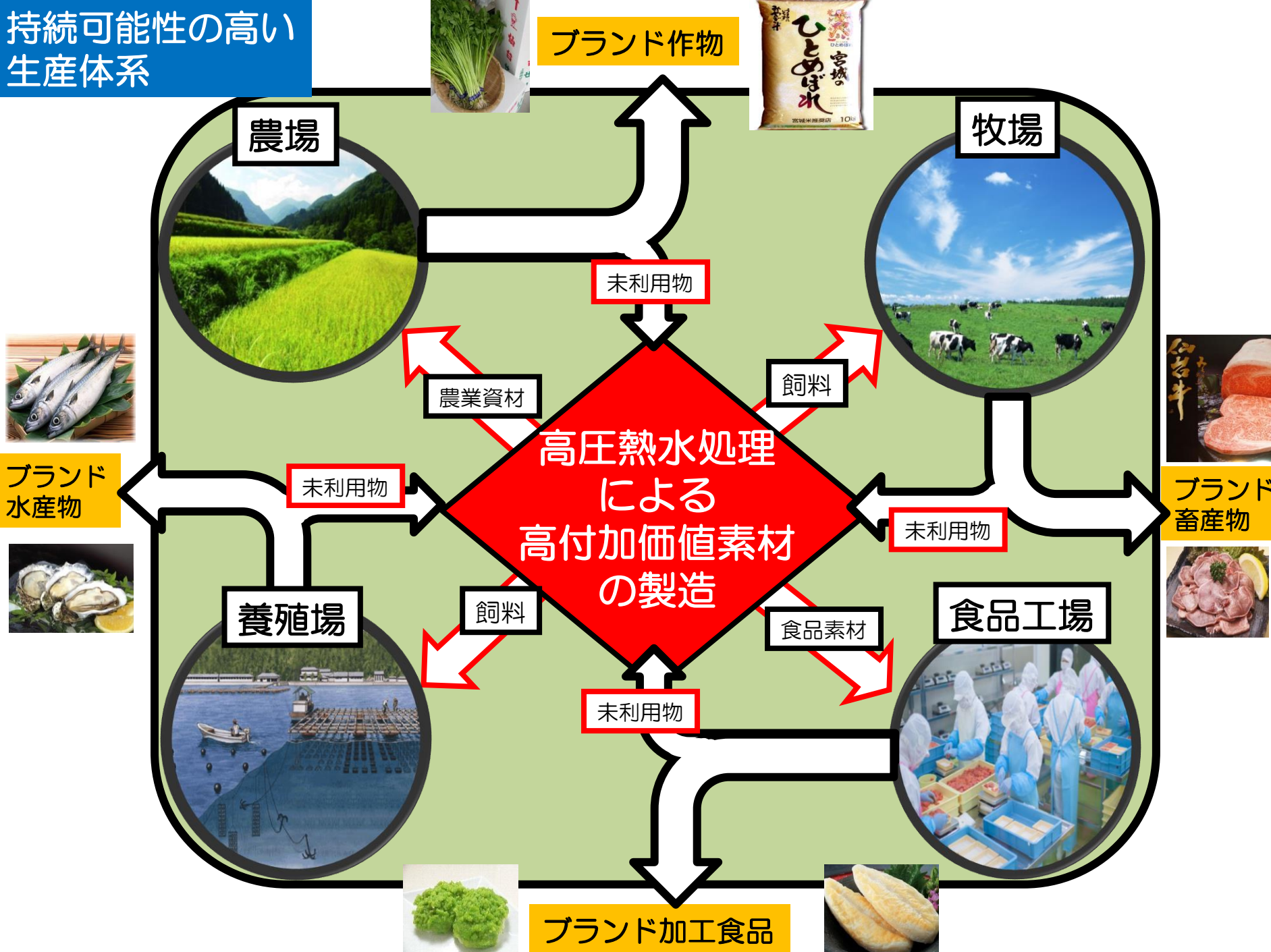
Temperature (°C)	Untreated	25	160	180	200	220	240
ACE inhibitory (%)	0	3.5	37.2	46.6	40.9	14.6	1.9



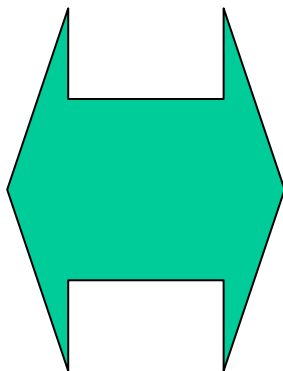
アンジオテンシン変換酵素はアンジオテンシンを活性体へ変換する酵素。  
活性体であるアンジオテンシンIIには血圧上昇作用がある。



# 持続可能性の高い 生産体系



# 発酵による分解



# 水熱部分分解



御清聴ありがとうございました

