

高周波パルスの印加が豆乳のACE(アンジオテンシン
変換酵素)阻害活性に与える 影響

農研機構 食品研究部門

長屋 美玖

大豆に水を添加して破碎したものを生呉と呼び、生呉を加熱処理した呉は、豆乳の原料となるだけでなく、豆腐や油揚げ等の様々な大豆加工食品の基本素材となる。大豆を破碎すると、大豆に含まれる酵素の一種であるリポキシゲナーゼの働きで、大豆特有の不快感が発生する¹⁾ため、生呉は破碎後速やかに加熱し、酵素を失活させ不快臭の低減を図る必要があるが、長時間の加熱は加熱臭生成の原因となる。このように、大豆加工食品にとって、不快臭の低減は製品の品質向上のための重要な課題となっている²⁾。報告者らはこれまでに、高周波パルス加熱 (High Frequency Pulse) と呼ばれる電氣的加熱技術を用い、スラリー状の液状素材である呉を約 1 秒間で 100 °C以上に加熱することを実現している。高周波パルスの印加による電氣的な急速加熱により作製した呉が、大豆加工食品中の機能性成分に及ぼす影響についての検討は十分に行われていない。大豆由来のペプチドは、血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の働きを阻害し、降圧作用を発揮することが報告されており³⁾大豆の機能性関与成分として注目されている。報告者は、生呉に高周波パルスを印加する工程で、大豆タンパク質が効率良くペプチドに分解し、ACE 阻害活性の高い豆乳を製造できると考えた。そこで本研究では、HFP を用い作製した呉が、豆乳の品質および ACE 阻害活性に及ぼす影響を明らかにする。

実験方法

1. 試料の作製

乾燥ダイズ (熊本県産フクユタカ) に 6 倍量の蒸留水を加え、4 °C で 14 時間浸漬した。浸漬液を流した後、6 倍量の蒸留水を加えスーパーマスコロイダー (MKZA, 益幸産業株式会社) で摩砕し生呉を作製した。生呉は速やかに高周波パルス加熱 (HFP) または通常加熱 (CH) した。高周波パルス加熱装置の概略を図 1 に示す。HFP は、ホップ、モノポンプ、電極ユニット、高周波パルス電源、温度保持管 1 m、冷却管 2 m、背圧バルブで構成された。ホップに供給した生呉を、モノポンプにより 120 L/h の一定流速で搬送し、電極ユニットを通過する約 1 秒間で 80 °C ~ 110 °C の目的温度まで加熱した。電極ユニットの構成を図 2 に示す。高周波パルス電源は、高電圧直流電源で作られた直流をパルス生成器でスイッチングすることで図 3 に示す波形の双極高周波パルス (電圧 ~ 700 V, 周波数 25 kHz) を生成した。呉は、温度保持管で約 3 秒間温度保持し、冷却管で約 50 °C まで冷却した。装置出口で呉を回収後、直ちに氷冷し、搾汁器 (エンジェルジャー Angelia7500, ANGEL 株式会社) で搾汁した。

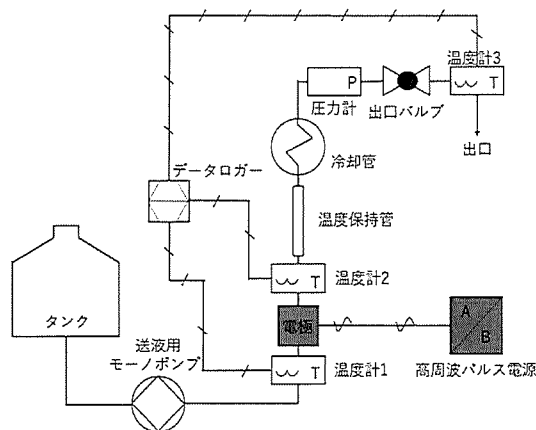


図 1 高周波パルス装置の概略図

加熱方法の比較として、従来加熱（CH）は生呉を直径 21 cm の鍋で、中心温度が 90 °C になるまで約 12 分間加熱した。焦げ付きを防ぐため、攪拌機（MINISTAR 20 control, 300rpm, IKA）で攪拌しながら加熱を行った。呉は加熱処理後、直ちに氷冷し、搾汁器で搾汁した。

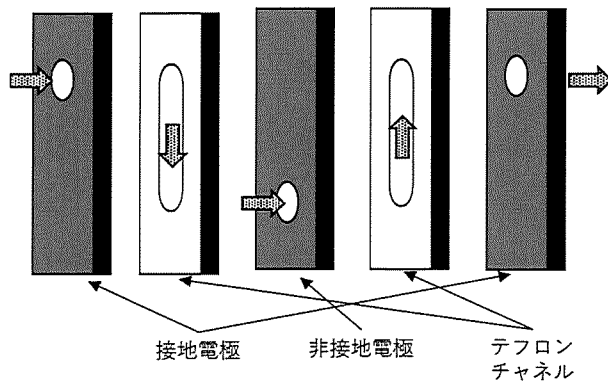


図 2 電極ユニットの構成

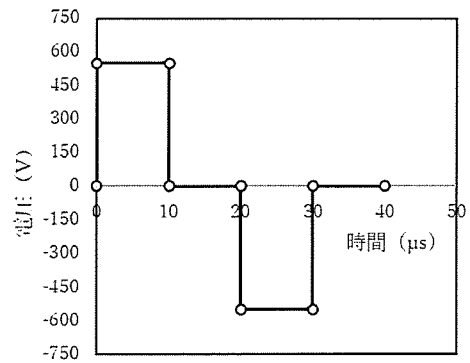


図 3 高周波パルス波形

2. タンパク質含有量の測定

呉を搾汁して得られた豆乳のタンパク質含有量を bradford 法⁴⁾で測定した。

3. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

高周波パルスの印加が大豆タンパク質の分子量に及ぼす影響を観察するため、SDS-PAGE を行った。20 倍希釈した豆乳を、0.45 μm メンブレンフィルター (25CS080AN, ADVANTEC) でろ過し、Laemmli 法⁵⁾に従い SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 用のゲルは、電気泳動用ポリアクリルアミドゲル (スーパーセップ TM エース, 15 %, WAKO) を使い、固定液で固定した後、染色液 (Quick-CBB, WAKO) で CBB 染色を行った。

4. リポキシゲナーゼ (Lox) 活性の測定

Lox 活性の測定はクメン法により行った⁶⁾。すなわち、豆乳を 0.1M 酢酸緩衝液で 10 倍希釈し、室温で 10 分間攪拌抽出した後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を粗酵素液として Lox 活性測定に供した。粗酵素液のタンパク質含有量は bradford 法で測定した。粗酵素抽出液とリノール酸基質溶液を室温 (25°C) で反応させ、メタノールを加えて反応停止させた後、遠心分離して得られた上清と FOX 試薬の混合し、波長 540 nm における吸光度を測定した。活性値はクメンヒドロペルオキシド検量線より求めた。

5. 豆乳の香気成分の測定

GCMS (QP2010 Ultra, Shimadzu) とオートサンプラー (AOC-5000, Shimadzu) を用いて豆乳の香気成分を分析した。分析条件は Yang ら⁷⁾の方法を一部改変し、香気成

分の抽出には SPME ファイバ (DVB-CAR-PDMS, Gray, 50/30 μm , Supelco) を用いた。カラムは rtx-WAX (ジーエルサイエンス) を用いた。

6. 枯草菌芽胞

枯草菌芽胞の測定は植村ら⁸⁾の文献に従って行った。

7. ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性は ACE Kit-WST (同人化学) を用いて測定した。

8. ペプチド分析

ペプチドの定量は Made ら⁹⁾の方法に従い、OPA 法を用いた。検量線の作成にはトリプトン (日本 BD) を用い、340 nm の吸光度を測定した。

ペプチドの定性は以下の手順で行った。1) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC): NAKAHARA ら¹⁰⁾の方法を一部改変して行った。すなわち、豆乳にエタノールを加え 7,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を 0.1% TFA バッファーで希釈しフィルター (DISMIC-25CS 0.45 μm) でろ過した後、HPLC で分離した。フラクションは 10 分ごとに回収し、ACE 阻害活性の測定とペプチド定性に供した。2) ペプチド定性: 農研機構高度分析研究センターの分析支援を受け、MALDI-TOFMS で同定を行った。ペプチド標品は Peptide Calibration Standard (Bruker) を用いた。

9. 統計解析

データは土標準偏差で示した。統計解析は Turkey-Kramer 法による多重比較検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果および考察

1. 高周波パルス加熱が豆乳のタンパク質に与える影響

豆乳のタンパク質含有量は、生乳の加熱方法の違いによる有意な差が無かった。しかし、豆乳中のタンパク質組成を SDS-PAGE で観察したところ、HFP の試験区は CH よりも濃いバンドが観察できた (図 4)。そこで、豆乳を蒸留水で 10 倍希釈して遠心分離し、得られた上清のタンパク質含有量を測定したところ、CH はタンパク質含有量が有意に低くなった。豆乳中の水溶性タンパク質で多くの割合を占めるグリシニン¹¹⁾は、加熱により変性し不溶性の凝集体を形成することが知られている。CH は加熱時間が長いため、水溶性タンパク質が変性し凝集が起きたと考えられる。一方、HFP は加熱時間が短いため、タンパク質の凝集が抑えられた可能性がある。

2. 豆乳の Lox 活性

豆乳の Lox 活性を図 5 に示す。HFP を用いて呉を 90 °C 以上に加熱することで、短時間の加熱で CH と同程度まで Lox を失活することができた。

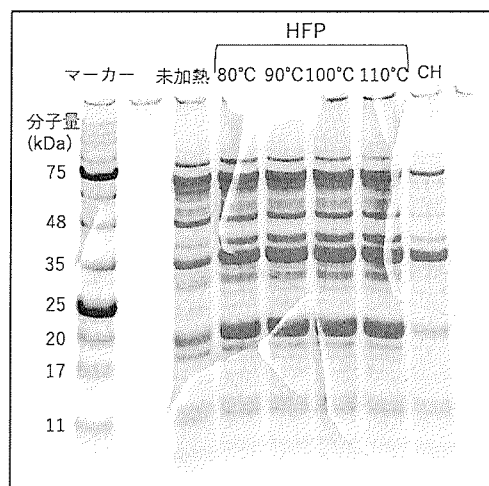


図 4 タンパク質の組成

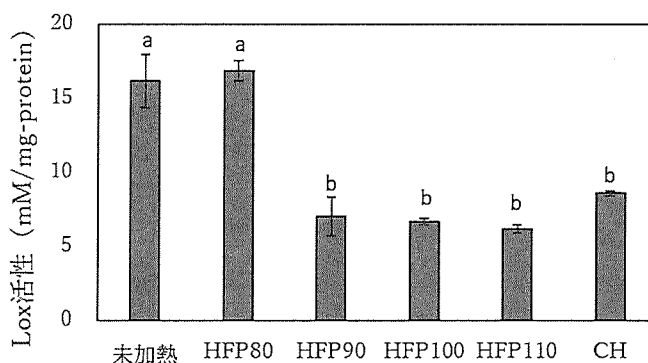


図 5 加熱方法と HFP の加熱温度が豆乳の Lox 活性に及ぼす影響

データは平均±標準偏差で示した (n=3)。

3. 豆乳の香り成分

大豆の青臭さの原因であるヘキサナールは、生呉を搾汁して得られた未加熱豆乳で最も多く検出され、HFP と CH でヘキサナール含有量に差は見られなかった。一方、油脂の酸化臭の原因である 2-ペンチルフランは、加熱により増加することが知られており¹²⁾、本研究では CH で最も多く検出された。HFP で 90 °C まで加熱した豆乳から検出された 2-ペンチルフランは、CH で 90 °C まで加熱した豆乳の 3 分の 1 以下であり、HFP は CH と同程度まで青臭さの生成を抑えながらも、加熱臭の生成を CH よりも抑えられた。

4. 呉の枯草菌生菌数

HFP で呉を 110 °C まで加熱すると枯草菌数が 1 対数オーダー減少した。未加熱の呉と CH で枯草菌の生菌数に差は見られなかった。

5. 豆乳の ACE 阻害活性

IC50 (ACE 活性を 50% 阻害する試料濃度) は未加熱豆乳で 11.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、HFP80 °C で 19.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、HFP90 °C で 23.9 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、HFP100 °C で 22.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、HFP110 °C で 22.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ であった。ACE 阻害活性は未加熱豆乳が有意に高く、加熱することで阻害活性は減少した。また、HFP の加熱温度の違いによる差は見られなかった。ペプチド含有量は未加熱豆乳が有意に高く、ACE 阻害活性の傾向と一致していた。

HPLC で分画して得られた各フラクションの ACE 阻害活性の測定結果の一例を表 1 に示す。未加熱豆乳は F1, F5, F6 に高い ACE 阻害活性が見られた。各フラクションに含まれるペプチドを MALDI-TOFMS で定性した結果、未加熱豆乳からは Gly-Phe がわずかに検出されたものの、表 1 との相関を示す成分は認められなかった。今後、加熱条件が大豆ペプチドに与える影響をより詳細に調べるため、LCMS や NMR スペクトル解析による分析を検討する。

表 1 HPLC で分画した各フラクションの ACE 阻害活性 (%)

フラクション	未加熱	HFP80	HFP90	HFP100	HFP110	CH
F1	44.3	20.8	4.3	17.9	42.0	49.1
F2	11.7	28.7	43.4	22.1	18.9	14.5
F3	11.4	48.9	36.3	27.9	27.9	27.5
F4	27.1	34.4	33.7	32.3	21.0	32.5
F5	57.8	34.0	44.7	32.4	42.3	45.1
F6	58.1	47.5	51.2	46.7	39.3	42.0

要約

高周波パルス加熱 (HFP) を用いて、多くの大豆加工食品の原料である生呉の加熱を行った。HFP はタンパク質の変性に伴う不溶化を抑え、不快臭生成の原因となる Lox を短時間で効率的に失活できた。さらに、HFP を用いることで、加熱臭が従来加熱の 3 分の 1 にまで減少したことから、HFP を用いた呉の加熱は大豆加工食品の品質向上に貢献できると考えられる。一方、ACE 阻害活性は従来加熱と同様、HFP 加熱でも低下し、加熱方法と加熱温度による差は見られなかった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) 下山田 真, 2017. 豆乳の製造工程. 日本調理科学会誌, 50 (6), 277-279.
- 2) 熊沢賢二, 2020. 大豆加工食品の香気成分とその特性 —魅力的な食品開発のための香り成分研究—. 日本食品科学工学会誌, 67(10), 395-402.
- 3) 松井利郎, 2003. 7S グロブリンからの血圧低下ペプチド SVY の高度生成とその生理機能評価大豆たんぱく質研究, 6, 73-77.
- 4) M. M. Bradford, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- 5) U. K. Laemmli. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 6) サッポロビール株式会社. 廣田直彦. 大麦リポキシゲナーゼー1 遺伝子, 大麦の選抜方法, 麦芽アルコール飲料用 原料及び麦芽アルコール飲料の製造方法. 特開 2008-43348.
- 7) Yang, A. et al. , (2015). Sensory quality of soymilk and tofu from soybeans lacking lipooxygenases. *Food science & nutrition*, 4(2), 207-215.
- 8) 植村邦彦, 高橋 千栄子, 金房純代, 小林 功. 2016. 連続通電加熱による味噌の殺菌. 日本食品科学工学会誌, 63(11), 516-519.
- 9) Made et al. , 2020. In vitro gastrointestinal simulation of tempe prepared from koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) as an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Food Science and Technol*, 57(5), 1847-1855.
- 10) Nakahara et al. , 2010. Antihypertensive Effect of Peptide-Enriched Soy Sauce-Like Seasoning and Identification of Its Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Substances. *Agricultural and Food Chemistry*, 58, 821-827.
- 11) Damodaran et al. , 1982. The effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin. *Agricultural and Food Chemistry*, 30, 812-817.
- 12) Zhang et al. , 2012. Off-Flavor Related Volatiles in Soymilk As Affected by Soybean Variety, Grinding, and Heat-Processing Methods. *Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7457-7462.