牛肉の調理方法の違いによるACE阻害活性について

山岸　美穂　（指導：辻　雅子）

Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in various cooking method on the beef

By Miho Yamagishi

１．はじめに

アンジオテンシン変換酵素（Angiotensin Converting Enzyme）（以下ACEと略す）阻害活性については、これまでに魚[1),2)]、ミルク[3)]、貝[4)]、チーズ[5)]、わかめ[6)]など食品からの多くのペプチド類を主体とする報告がある。ペプチド類以外にも米糠のフィチン[7)]、茶のカテキン類、テアフラビン類[8)]なども報告されており、これら食品由来のACE阻害成分は、薬剤のもつ抑制効果よりは弱いものの、温和な効果を示すことで副作用の軽減が期待されている。

食事におけるだしは、動物性・植物性の素材から旨味成分を中心とした呈味成分を抽出した液体である。しかし、洋だしであるブイヨン中の機能性についてはあまり解明されていない。ブイヨンは食肉や野菜そのものを使用し長時間かけて作るものであるため、調理工程は大きく異なるが、和だしと同様の機能をもっていると考えられる。また近年ではブイヨンの主材料である食肉に、ACE阻害活性による高血圧予防の期待がある[9)]ことが報告されており、これらの効果は、主にペプチドに由来するものと考えられている。とくに食肉のACE阻害活性については、タンパク質分解酵素で消化したペプチド混合物を用いた血圧上昇抑制効果等に関する検討は行われている[10)]が、調理操作を行った上での研究は見当たらない。

そこで本研究では、まず和だしおよび洋だしのACE阻害活性の違いについて研究を行い、さらに様々な調理操作と牛肉のACE阻害活性へ及ぼす影響について研究することを目的とした。

２．実験方法

2-1. 各種だし汁のACE阻害活性の検討

2-1-1. 和だしにおけるACE阻害活性について

和だしは5種類用いた。手作りの混合一番だしは、かつお節2%、昆布1%の割合で調製した。市販だしは4種類とし、市販かつおだしは「日本のだし」（ちきり清水商店(株)）、市販3種混合だしは「厳選素材 千代の一番」((株)千代の一番)、市販調合だしAは「まるさん ふりだし」（丸三食品(株)）、市販調合だしBは「味の素 ほんだし」（味の素(株)）を使用した。これら市販だしの調製方法は、各メーカーの推奨する方法で各々調製した。

ACE阻害活性の測定はACE-Kit（同人化学研究所）を用い、マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド・ラボラトリーズ(株)）で450nmの吸光度を測定した。阻害率(%)は反応液に試料を加えて反応させ、試料を含まないコントロールに対する阻害活性を求め次式により求めた。

阻害率(%)＝{E(C)-E(S)}/E(C)×100

E(C): 試料の代わりに純水を加えたもの：Control

E(S): 試料を加えたもの：Sample

ただしE(C)、E(S)はあらかじめ反応停止液を加えて反応させたBlankの値を各々差し引いた値である。また、各試料間の阻害活性の比較は上式により求められる阻害活性が50%を示す反応液中の試料量を1unitとした。

統計処理はStat Flax Ver.6.0（(株)アーテック）を使用し、一元配置分散分析を行った後、独立多群全2群間比較と独立多群多重比較（Tukeyの多重比較検定）を行った。

2-1-2. 洋だしにおけるACE阻害活性について

手作りのブイヨンは、常圧加熱と加圧加熱で調製した。市販ブイヨンは2種類とし、市販ブイヨンAは「マギーブイヨン」(ネスレ日本(株))、市販ブイヨンBは「味の素KKコンソメ」(味の素(株))を使用した。これら市販ブイヨンの調製方法は、各メーカーの推奨する方法で各々調製した。

試料溶液中のACE阻害活性の測定および統計処理方法は2-1-1.に示した方法で行った。

2-2. 牛肉の調理方法とACE阻害活性の検討

2-2-1. 湿式加熱におけるACE阻害活性について

湿式加熱としてゆで調理と蒸し調理を実施した。実験材料は、牛ランプ肉(岩手県産黒毛和牛)を用いた。標準とする未加熱肉に純水を加え、得られた上澄液を試料溶液とした。また取り出した肉は刻み純水を加え冷却しながら撹拌後ろ過し、試料溶液とした。

ゆで調理の肉は、純水を加え、15分、30分、45分、60分と電磁調理器で加熱調理した。各ゆで肉は刻み純水を加え冷却しながら撹拌後ろ過し、試料溶液とした。ゆで汁は冷却後ろ過し、試料溶液とした。

蒸し調理は、常圧加熱と加圧加熱について行った。常圧加熱は蒸し器で30分加熱後冷却した。加圧加熱は圧力鍋を使用し、加圧状態になってから、それぞれ5分、15分と加熱をした後、常圧まで減圧した後冷却した。各蒸し肉はゆで調理と同様に試料溶液を調製した。溶出肉汁は、湯煎しながら撹拌し純水を加え遠心分離を行った後ろ過し、試料溶液とした。

試料溶液中のACE阻害活性の測定および統計処理方法は2-1-1.に示した方法で行った。

2-2-2. 乾式加熱におけるACE阻害活性について

乾式加熱として焼き調理を実施した。200℃に熱したオーブンで肉の内部温度がレアは50～55℃、ミディアムは65～70℃、ウェルダンは80～90℃になるまで調理した。肉はゆで調理と同様に試料溶液を調製した。溶出肉汁は蒸しの溶出肉汁と同様に試料溶液を調製した。

試料溶液中のACE阻害活性の測定および統計処理方法は2-1-1.に示した方法で行った。

2-3. 牛肉の未加熱および加熱調理のACE阻害活性に及ぼす構造の検討

2-3-1. 限外ろ過分画における検討について

各調理法の違いにおけるACE阻害活性の作用画分解明のために限外ろ過フィルター(アミコンウルトラ15 10kDa, 3kDa)にて分子量分画を行い、各種画分試料中のACE阻害活性およびスペクトル波長の測定を行うこととした。試料には乾式加熱(ウェルダン)と未加熱を用いた。各画分試料溶液中のACE阻害活性の測定は、2-1-1.に示した方法で行った。各試料溶液中のスペクトル測定は、吸光分光分析器UV mini 1240(島津製作所)およびダイオードアレー分光分析装置DU 7500(BECKMAN)を使用した。

タンパク質定量は、BCA Protein Assay Kit(タカラバイオ(株))を使用した。

2-3-2. Sep-Pak Cartridges C18カラム分離における検討について

2-3-1.で得られたスペクトル波長の詳細な検討を行うために、Sep-Pak Cartridges C18カラム(Waters)を使用し、エタノール溶出およびメタノール溶出を行い、疎水性吸着成分のスペクトル測定を行った。さらにメタノール溶離液については含有成分の分子構造の推定を行うため、フーリエ変換近赤外分光光度計であるFT/IR-6200(JASCO)を用いて分子構造の推定を行った。

3. 結果および考察

3-1. 各種だし汁のACE阻害活性の検討

和だし、洋だしともに手作りと市販品におけるACE阻害活性の値は、どちらも手作りで高値を示した。特に混合一番だしと市販調合だしBとの間に1%以下の危険率で有意差が認められた。また、ブイヨン(常圧)と市販ブイヨンBとの間にも1%以下の危険率で有意差が認められ、ブイヨン(加圧)と市販ブイヨンBとの間にも5%以下の危険率で有意差が認められた。手作りだしは原材料に素材そのものを使用している。また市販だしでも原材料にかつお節、昆布、椎茸等の加工度の低いものを使用した和だしは、比較的高いACE阻

害活性が認められた。しかし洋だしの市販だしは原材料に野菜エキス、ビーフエキスといった加工度が高い材料を用いているため、ACE 阻害活性が低値であったと考えられた。以上のことから、和だしだけではなく、このような食肉等を用いたブイヨンにも ACE 阻害活性があることが今回明らかとなったため、ブイヨンの主材料である肉の調理方法の違いと ACE 阻害活性へ及ぼす影響について比較検討を行った。

3-2. 牛肉の調理方法と ACE 阻害活性について

3-2-1. 湿式加熱における ACE 阻害活性について

ゆで調理肉の ACE 阻害活性は、未加熱と比較して、調理時間が増すにつれ有意に低下した。一方、ゆで汁は、未加熱と比較して 15 分、30 分までは有意に増加していき、沸騰してからはほぼ一定に保たれていた。肉とゆで汁の総活性は未加熱と比較し、ほぼ変わらない値を示した。長時間の調理でも ACE 阻害活性は肉からゆで汁に移行し、総活性は維持されることが明らかとなった。

蒸し調理では、蒸すことで肉より肉汁が溶出したため、肉中の ACE 阻害活性は未加熱と比較すると有意に低値を示した。また溶出肉汁にもそれぞれ ACE 阻害活性が認められた。肉と溶出肉汁の総活性は、未加熱と比較し、ほぼ変わらない値を示した。常圧加熱と加圧加熱の間には有意差は認められなかった。食肉をプロテアーゼ処理で遊離するペプチドには、ACE 阻害活性が認められる。さらに 20 ～ 100℃までの広い範囲で高い ACE 阻害活性がみられ、加工肉製造の熱処理でも ACE 阻害活性が残存することが認められた[11]との報告もある。以上の事から加圧加熱は 100℃以上になるが、ACE 阻害活性は残存していることから、ACE 阻害活性の耐熱性は高いことが示唆された。

3-2-2. 乾式加熱における ACE 阻害活性について

焼き調理の ACE 阻害活性は、レア、ミディアム、ウェルダンとも有意差は認められず、似たような値を示した。また肉汁中にも ACE 阻害活性が認められたが、有意差は認められなかった。肉と肉汁の総活性ではレア、ミディアムでほぼ同じ値を示した。有意差は認められなかったものの、ウェルダンだけはレア、ミディアムと比べてやや高い値を示した。肉に ACE 阻害活性が維持されている結果を示したのは、ゆで調理とは異なる傾向であった。焼き調理は焦げ色と特有の風味がつき嗜好性は向上するが、他の調理操作に比べて調理温度が高いといった特徴があり、ウェルダンの ACE 阻害活性が高くなったのは、このことが関連しているのではないかと考えられた。

3-3. 牛肉の未加熱および加熱調理の ACE 阻害活性に及ぼす構造の検討

3-3-1. 限外ろ過分画における検討について

ウェルダンの肉および未加熱の各種画分試料溶液の ACE 阻害活性は、未加熱、ウェルダンともに、高分子画分が高いことが明らかとなった。しかし、タンパク質 1μg あたりで示すと、どちらも低分子画分が高い結果となった。加熱調理による大豆の ACE 阻害活性は分子量 1 万以下の低分子画分に認められている[12]ことが報告されており、肉も同様に、加熱することでタンパク質、ペプチド、アミノ酸へと低分子化しているため、低分子画分はタンパク質由来のペプチドが多いものと考えられた。一方、高分子画分で認められた ACE 阻害活性は、タンパク質以外のものの関与も考えられるため、これらの画分のスペクトル測定を行った結果、未加熱、ウェルダンの原液では、400nm 付近にピークが確認できた。しかし、低分子画分のスペクトルでは、どちらも 400nm のピークは認められなかった。すべての試料において、260nm 付近は、溶液の濃度が高値であったため、ダイオードアレー分光分析装置を使用してスペクトルの吸収の確認を行った結果、260nm 付近と 400nm 付近にピークを確認することができた。400nm 付近に現れた未加熱の吸収は血液成分によるものと推察され、分子量の小さい赤血球でも、10kDa の限外ろ過フィルターで分画することによって除去されたものと考えられる。

3-3-2. Sep-Pak Cartridges C18 カラム分離における検討について

乾式加熱の焼き調理のウェルダンと湿式加熱で

あるゆで調理について検討した結果、エタノール溶離液のスペクトル測定結果では、すべての試料で260nm付近の吸光ピークが認められた。またメタノール溶離液のスペクトル測定結果では、すべての溶液で260nm付近の吸光ピークが認められたが、400nm付近の吸光ピークはウェルダンにのみ認められた。260nm付近の吸光ピークはペプチドの吸収の関与が考えられ、焼き調理では、アミノカルボニル反応によるメラノイジンの生成が特徴としてあり、メラノイジンは疎水性が高いものが多く350～400nmに吸収をもつものがあることから、ウェルダンにのみ示された400nmの吸収は、メラノイジンの可能性が考えられた。

そこで、さらにFT/IRで測定を行った結果、500～4000カイザーの間に特徴的なシグナルが2つ確認でき、1つはペプチドの構造をしたもので、ACE阻害活性関連構造と考えられた。一方は、メラノイジンに含まれるイミダゾール構造が確認できた。味噌や醤油の研究において、アミノカルボニル反応生成物のACE阻害活性の可能性を示唆する[13]報告もあることから、乾式加熱である焼き調理のウェルダンでは、アミノカルボニル反応によりメラノイジンが生成し、それがACE阻害活性に何らかの影響を及ぼしたものと示唆された。

4．まとめ

本研究結果から、湿式加熱や乾式加熱におけるどの調理方法の加熱においても肉および溶出肉汁中のACE阻害の総活性は損なわれないことが明らかとなった。またゆで調理と焼き調理のウェルダンのACE阻害活性の活性成分を詳細に検討したところ、260nm付近の吸収を示す成分はどちらも見られたが、400nm付近の吸収を示す成分は、特にウェルダンに強く認められた。FT/IR測定により、ペプチドの構造だけでなく、メラノイジンに含まれるイミダゾール構造も確認できたことから、アミノカルボニル反応によるメラノイジン生成が、ACE阻害活性に何らかの影響を及ぼしたと考えられた。今後の展望として、調理方法の違いによって生成するACE阻害活性の関係性や詳細な同定を行い検討していきたい。

5．引用・参考文献

1）H. Fujita and M. Yoshikawa, *Immunopharmacology*, 44, 123-7, 1999.

2）T. Ichimura, J. Hu, D. Q. Aita and S. Maruyama, *J. Biosci. Bioeng.*, 96, 496-9, 2003.

3）A. Geerlings, I. C. Villar, F. Hidalgo Zarco, M. Sanchez, R. Vera, A. Zafra Gomez, J. Boza and J. Duarte, *J. Dairy. Sci.*, 89, 3326-35, 2006.

4）J. Y. Je, P. J. Park, H. G. Byun, W. K. Jung and S. K. Kim, *Bioresour. Technol.*, 96, 1624-9, 2005.

5）T. Saito, T. Nakamura, H. Kitazawa, Y. Kawai and T. Itoh, *J. Dairy. Sci.*, 83, 1434-40, 2000.

6）K. Suetsuna and T. Nakano, *J. Nutr. Biochem.*, 11, 450-4, 2000.

7）斉藤義幸，中村圭子，川戸章嗣，今安聰，日本農芸化学会誌，66, 1081-7, 1992.

8）原征彦，松崎妙子，鈴木建夫，日本農芸化学会誌，61, 803-8, 1987.

9）久保田大樹，アブドラティフ アーメド，河原聡，六車三治男，食肉の血圧上昇抑制効果の畜種別差異について，宮崎大学農学部研究報告，58, 43-50, 2012.

10）六車三治男，難波靖，丸山眞杉，中村豊郎，食肉由来生理活性ペプチドの生活習慣病予防効果について，財団法人　日本食肉消費総合センター，食肉に関する機能成分等の調査研究事業　委託研究報告書，16-35, 2009.

11）泉本勝利，食肉の品質特性の解析と応用，岡山大学農学部学術報告，99, 85-95, 2010.

12）四十九院成子，吉田恵子，永野衣絵，福場博保，大豆の加熱調理によるアンジオテンシン変換酵素活性の増加，日本家政学会誌，48, 443-7, 1997.

13）Akiko Okamoto, Hiroshi Hanagata, Eiko Matumoto, Yukio Kawamura, Yukimichi Koizumi, and Fujiharu Yanagida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1147-9, 1995.