大豆煮汁からのニコチアミンの単離と加熱処理による変動

竹中哲夫[§], 村山崇志, 竹中陽子*

玉川大学農学部

* T & T 食品研究所

Isolation of Nicotianamine from Soybean Broth and Changes in Its Content in the Soybean Steaming Process

Tetsuo Takenaka[§], Takashi Murayama and Yoko Takenaka*

Faculty of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1, Tamagawa Gakuen, Machida-shi, Tokyo 194-8610

* T&T Food Institute, 555-20, Aina, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0038

Soybean broth (SB), a by-product of miso, soy sauce and natto manufacturing, is discarded as an industrial waste. The change in the inhibitory activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) in the soybean steaming process was investigated to evaluate the use of SB as a functional food material. An ACE inhibitor was isolated from SB by ion-exchange and gel chromatography. The results of the chemical identification by TOF-mass, IR, and NMR spectra analysis corresponded to those of Kristensen *et al.* for nicotianamine. The yield of pure nicotianamine from SB was 0.037% (dry matter). In the soybean steaming process at 121°C for 30 min, the ACE inhibitory activity was the same in both raw and soaked soybeans, but decreased to 30% of raw soybeans in steamed soybeans and 10% in SB. The same changes were found for the nicotianamine content as for the ACE inhibitory activity in the soybean steaming process. As the content of lipids and water-soluble high-molecular-weight proteins is low in SB, nicotianamine can be easily isolated. Therefore, SB may be a suitable source of nicotianamine.

(Received May 15, 2008 ; Accepted Oct. 1, 2008)

Keywords : angiotensin I-converting enzyme (ACE), nicotianamine, soybean broth

キーワード : アンジオテンシン I 変換酵素, 大豆煮汁, ニコチアミン

味噌、醤油や納豆などの大豆加工食品の製造工程において排出する蒸煮廃液（以下大豆煮汁と略す）には、食物繊維やオリゴ糖などの有用成分が含まれているが、海や河川の水質汚染の原因となるため、その排水処理にかなりのコストが費やされている。これまでに大豆煮汁に含まれている有用成分を食品素材として利用する試み^{1)~3)}がなされてきた。

鈴木ら⁴⁾は、日常摂取する食品についてアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を系統的に調べ、大豆食品、茶、貝、果実、蕎麦など 50 品目について強い ACE 阻害活性を報告している。Cheung ら⁵⁾の報告以来、タンパク質の加水分解によって生じるペプチドの ACE 阻害活性が注目され、特にイワシ由来ペプチド⁶⁾、鰹節由来ペプチド⁷⁾、乳タンパク質由来ペプチド⁸⁾などは現在特定保健用食品の成分として利用されている。

さらに、ペプチド以外の食品由来 ACE 阻害物質として、フィチン酸⁹⁾、カテキン、テアフラビン¹⁰⁾、ニコチアミン¹¹⁾などが報告されている。

本研究では、味噌、醤油および納豆の製造時に排出する大豆煮汁を機能性食品素材として利用することを目的として、大豆煮汁中の ACE 阻害物質を分離し、原料大豆から大豆煮汁に至る大豆蒸煮工程における ACE 阻害活性と ACE 阻害物質の挙動について調べ、ACE 阻害物質の給源として、大豆煮汁の可能性が得られたので報告する。

実験材料および方法

1. 納豆、醤油、味噌製造時に蒸煮大豆から排出した大豆煮汁

納豆、醤油、味噌の製造時に高圧蒸煮釜より排出する大豆煮汁を釜のドレンより直接採取した。下記に示す各種大豆煮汁は採取後、直ちに凍結乾燥し、随時実験に用いた。各種大豆煮汁の製造所および原料大豆を以下に示した。

納豆煮汁：製造所は大山豆腐、原料大豆はカナダ産大山

〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1

* 〒243-0038 神奈川県厚木市愛名 555-20

[§] 連絡先 (Corresponding author), takenaka@agr.tamagawa.ac.jp

2 号.

醤油煮汁：製造所は岡直三郎商店，原料大豆は茨城県産タチナガハ.

米味噌煮汁：製造所はマルサンアイ，原料大豆はアメリカ産白目大豆 S20F8.

豆味噌煮汁：製造所はマルサンアイ，原料大豆はアメリカ産白目大豆 S20F8.

2. 各温度における大豆煮汁の調製

原料大豆は鶴の子大豆（2006 年，北海道産）を用いた．大豆に 5 倍量の水を加え，室温で 20 時間浸漬・膨潤し，50，65，80 および 95℃ にて 30 分間ビーカー中で水煮した後，ろ過して大豆煮汁を採取した．大豆加工食品の製造における大豆煮汁調製モデルとして，高圧釜の温度を 121℃ と設定し，水切りした浸漬大豆を金網カゴに入れ，その下にガラス漏斗さらにビーカーを設置し，オートクレーブを用いて 121℃ で 30 分間蒸煮した．蒸煮中に大豆からビーカーに溶出した液を大豆煮汁とした．このとき得られた蒸煮大豆と大豆煮汁はそれぞれ凍結乾燥し，以下の実験に用いた．

3. ACE 阻害活性測定用試料の調製

生大豆は直接粉碎，浸漬大豆（5 倍量の水に 20 時間浸漬）と浸漬後 121℃ で蒸煮処理した蒸煮大豆は凍結乾燥後粉碎した．それぞれの粉碎試料に 10 倍量の蒸留水を加え 6 時間攪拌しながら抽出し，30 000×g で 10 分間遠心分離後，上清を ACE 阻害率および ACE 阻害物質の定量に用いた．

4. ACE 阻害物質の精製

ACE 阻害物質の精製にはイオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いた．

(1) Amberlite IR-120 によるイオン交換クロマトグラフィー

Amberlite IR-120B (H⁺ 型，5×40 cm) を用いて，試料溶液（納豆製造工程で排出される大豆煮汁 30 g を 300 mL の蒸留水で溶解し，1 500×g で 10 分間遠心分離後の上清）を負荷した後，カラムを約 5 L の蒸留水で洗浄し，続いて 2.7 mol/L NH₄OH 溶液で吸着部を溶出した．

(2) Sephadex G-15 によるゲルろ過クロマトグラフィー
Sephadex G-15 カラム (2.5×70 cm) を用い，50 mmol/L CH₃COOH 溶液で平衡化後，50 mmol/L CH₃COOH 溶液にて，流速 0.4 mL/min の条件で分画した．

5. ニコチアナミン標品

ニコチアナミン標品は，キッコーマン研究所より恵与された．本標品は，醤油より分離したもので，純度は既報¹¹⁾の通りである．

6. ニコチアナミンの定量

ニコチアナミンは，日本電子全自動アミノ酸分析機 JLC-500/v を用い，生体系アミノ酸分析法にて測定した．

7. 機器分析

(1) 質量分析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量

分析計 (TOF-MS) (BRUKER DALTONICS auto flex II M) により測定した．

(2) 核磁気共鳴スペクトル (NMR)

溶媒に重水，内部標準物質に Sodium 3-trimethylsilyl propionate d₄ (TMSP) を用い，日本電子 JNM-EX270 により ¹H-NMR と ¹³C-NMR スペクトルを測定した．

(3) 赤外吸収スペクトル (IR)

島津 IR-470 赤外分光光度計を用い，KBr 法にて測定した．

(4) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC は Silica gel 60F₂₅₄ (MERCK 社製) を使用し，各展開溶媒 1-プロパノール：アンモニア=7：3 (V/V)，1-プロパノール：ピリジン：酢酸：水=2：1：1：1 (V/V)，ブタノール：メタノール：水=2：1：1 (V/V) で展開後，ニンヒドリン試薬で発色した¹²⁾．

8. ACE 阻害率測定法

ACE 阻害率は Cheung ら⁵⁾ の方法を一部改良して測定した．

酵素 ACE は，ウサギ肺由来の凍結乾燥品 (Sigma 社製) および基質としてヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン (ペプチド研究所製) を用いた．ACE 阻害率 50% を示すときの反応液中の試料濃度 (試料量/mL) を IC₅₀ とし，このときの試料量/mL を 1 unit とし，乾燥大豆 1g あたりの unit (試料の水分量を考慮に入れて換算) を ACE 阻害総活性 (units/1g・乾燥大豆) とした．

実験結果

1. 大豆煮汁の成分

納豆製造時に排出された大豆煮汁を使用し，その成分組成を表 1 に示した．データは示していないが，タンパク質は分子量 3.5 万以下のものおよび遊離アミノ酸が主成分であり，炭水化物は細胞壁熱水可溶多糖類とオリゴ糖が主成分であった．

2. 各種大豆煮汁の ACE 阻害活性

代表的な大豆加工食品である納豆，醤油，味噌の製造時に排出した各種大豆煮汁の ACE 阻害率と IC₅₀ 値を調べた (表 2)．醤油大豆煮汁の ACE 阻害率が最も高かった．

3. ACE 阻害物質の分離と同定

大豆煮汁中の ACE 阻害物質を明らかにするために，本研究では納豆製造時の大豆煮汁を使用し，ACE 阻害物質の分離を行った．大豆煮汁を Amberlite IR-120 を用いて分画したところ，2.7 mol/L NH₄OH 溶液溶出画分のみ ACE 阻害活性を検出した．この溶出部を減圧濃縮しアンモニアを除いた後，IC₅₀ を調べたところ 39.5 μg/mL で，分画前の大豆煮汁より約 14 倍高い ACE 阻害活性を示した．次に，この画分の一部を用い，調製薄層クロマトグラフィー (PTLC) にて ACE 阻害物質と ACE 阻害率を調べた．図 1 に示すように，1-プロパノール：アンモニア=7：3 (V/V) の溶媒を用いて展開後，ニンヒドリン発色させた

表 1 納豆製造時に排出した大豆煮汁の成分組成

成分	大豆煮汁	原料大豆	分析法
水分	87.7	12.5	常圧加熱乾燥法
タンパク質	8.9*	40.4*	ケルダール法 (窒素・タンパク質換算係数: 5.71)
脂質	3.3*	21.7*	エーテル抽出法
炭水化物	77.2*	32.2*	100-(水分+タンパク質+脂質+灰分)
灰分	10.6*	5.7*	直接灰化法

*無水物に換算して示した。

納豆煮汁：製造所は大山豆腐，原料大豆はカナダ産大山 2 号を使用。

表 2 各種大豆煮汁の ACE 阻害活性

煮 汁	蒸煮条件			ACE 阻害率*	IC ₅₀
	温度 (°C)	時間 (min)	圧力 (kg/cm ²)	(%)	(μg/mL)
納豆煮汁	128	27	1.4	70.6±1.6	560
醤油煮汁	115	30	1.0	83.0±4.0	480
米味噌煮汁	115	14	1.3	49.7±2.4	790
豆味噌煮汁					
試料 A (0~30 分)	110	20	0.7	56.4±3.3	700
試料 B (31~60 分)	110	60	0.7	50.3±2.0	780

*平均値±標準偏差 (n=3) で表示。

豆味噌煮汁：試料 A (0~30 分) は大豆蒸煮開始から 30 分間に溶出した煮汁を採取，

試料 B (31~60 分) は大豆蒸煮開始後 31 分から 60 分間に溶出した煮汁を採取。

図 1 大豆煮汁 Amberlite IR-120 分画物の TLC と ACE 阻害活性

図 (a) は Amberlite IR-120 分画物の TLC，図 (b) は各抽出物 (A~J) の ACE 阻害率

TLC プレートに基づき，未発色プレートを A~J の 10 区分に分け，それぞれの区分をかき取った後，少量の水で抽出後，ACE 阻害率を測定したところ，B 区分 (Rf 値 0.08) に ACE 阻害活性が検出された。

さらに，ACE 阻害物質を精製するために，Amberlite IR-120 分画物を SephadexG-15 カラムクロマトグラフィーで分画した。SephadexG-15 カラムクロマトグラフィーの各画分を TLC にて 1-プロパノール：アンモニア=7:3 (V/V) の溶媒を用いて展開後，ニンヒドリン発色にてスポットを検出したところ，溶出画分 No. 27 から 32 に Rf 値 0.08，画分 No. 34~42 に Rf 値 0.20，画分 No. 47~48 に Rf 値 0.25 を示すニンヒドリン陽性の成分が検出された (図 2)。

さらに，これら溶出画分 No. 22~48 を用いて酢酸を除去後，蒸留水に再溶解し ACE 阻害率を測定したところ，単一のスポットを示した画分 27~32 に ACE 阻害活性が検出され，特に画分 29 が最も強い ACE 阻害率を示した。

次に，画分 29 を凍結乾燥処理して，IR，NMR と TOF-MS 分析を行った。

赤外吸収スペクトルでは IR (KBr) cm⁻¹: 3443, 3045, 2867, 2621, 1627, 1579, 1473, 1413, 1374, 1301, 1246, 1218, 1134, 1076, 1022, 763, 688, 567, 418 に吸収が見られ，これは Kristensen ら¹³⁾ の報告によるニコチアナミンのスペクトルと一致した (図 3)。

¹³C-NMR 分析では，¹³C-NMR (D₂O) δ: 21.9 (C-3, CH₂)，25.6 (C-2'', CH₂)，27.9 (C-2', CH₂)，44.9 (C-1'', CH₂)，51.3 (C-4, CH₂)，51.9 (C-1', CH₂)，53.5 (C-3'', CH)，60.3 (C-3', CH)，67.7 (C-2, CH)，172.8 (C-4'', C=O)，174 (C-

図 2 大豆煮汁 Amberlite IR-120 分画物の Sephadex G-15 クロマトグラフィー

図 (a) は Sephadex G-15 クロマトグラフィーによる大豆煮汁 Amberlite IR-120 分画物の TLC, 図 (b) は分画物の ACE 阻害率

図 3 Sephadex G-15 画分 (画分 29) の赤外吸収スペクトル

4', C=O), 174.1 (C-1, C=O) のシグナルが示された。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS) 分析では, $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS) δ : 2.07~2.34 (4H, m, H-2'', H-2'), 2.48~2.79 (2H, m, H-3), 3.18~3.50 (4H, m, H-1'', H-1'), 3.81 (1H, dd, J = 7.5, 3.5 Hz, H-3'), 3.86~3.92 (2H, m, H-4), 3.98 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-3''), 4.88 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-2) のシグ

ナルが示され, Kristensen ら¹³⁾ の報告と一致した。

TOF-MS 分析ではニコチアミンの分子量 303 に相当するピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ が m/z 304 に認められ, ナトリウム付加イオン $[\text{M}+\text{Na}]^+$ と $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ に相当するピークが, それぞれ m/z 326 と m/z 348 に認められた。

以上の結果より画分 29 から得られた ACE 阻害物質が

図 4 画分 29 のアミノ酸分析
ニコチアナミンの保持時間: 51.1 分

ニコチアナミン (*N*-[*N*-(3-amino-3-carboxypropyl)-3-amino-3-carboxypropyl]-azetidine-2-carboxylic acid) であると推測した。

さらに、画分 29 のアミノ酸分析における保持時間は 51.1 分で、ニコチアナミン標品と比較したところ、本物質はニコチアナミンの保持時間と完全に一致した (図 4)。また、TLC の R_f 値を各展開溶媒を用いて、ニコチアナミン標品と比較したところ、展開溶媒 1-プロパノール:アンモニア=7:3 (V/V) では R_f 値 0.08, 1-プロパノール:ピリジン:酢酸:水=2:1:1:1 (V/V) では R_f 値 0.11, プタノール:メタノール:水=2:1:1 (V/V) では R_f 値 0.12 であり、本物質はニコチアナミンの R_f 値と完全に一致した。さらに画分 No. 22~48 に対してアミノ酸分析を行ったところ、ACE 阻害活性を示した画分にニコチアナミンの存在を確認した。また本研究で同定したニコチアナミンの IC_{50} は $0.68 \mu\text{mol/L}$ であり、ニコチアナミン標品では $0.26 \mu\text{mol/L}$ (文献値)¹¹⁾であった。

上記の方法、すなわち陽イオン交換クロマトグラフィー法とゲルろ過クロマトグラフィー法により、ニコチアナミン精製物を大豆煮汁 (乾物) 100 g より凍結乾燥物量として 37.0 mg 得ることができた。

4. 大豆浸漬・蒸煮工程における ACE 阻害活性とニコチアナミン量の変化

大豆の浸漬・蒸煮工程における各生大豆、浸漬大豆、蒸煮大豆と蒸煮大豆より溶出する大豆煮汁の大豆 1 g 当りの ACE 阻害総活性を調べた (図 5)。生大豆と浸漬大豆 (水浸漬: 室温で 20 時間) の ACE 阻害総活性は、ほぼ同程度であったが、蒸煮大豆 (蒸煮: 121°C で 30 分) の ACE 阻害総活性は生大豆の約 30% に、このとき溶出した大豆煮汁では約 10% に減少した。

図 5 蒸煮工程における生大豆、浸漬大豆、蒸煮大豆と大豆煮汁の ACE 阻害活性とニコチアナミン量の変化

平均値±標準偏差 (n=3) で表示

□: ACE 阻害総活性 (U/1g・乾燥大豆), ●: ニコチアナミン量 (μg/1g・乾燥大豆)

また、蒸煮大豆と大豆煮汁の ACE 阻害総活性の合計値が $140 \text{ units/1g} \cdot \text{乾燥大豆}$ で、浸漬大豆の ACE 阻害総活性の約 40% に減少した。

データは示していないが、水浸漬液 (水浸漬: 室温, 20 時間) を集めて、ACE 阻害活性を調べたが活性は認められなかった。

次に、生大豆、浸漬大豆、蒸煮大豆、大豆煮汁中のニコチアナミン含量を生体系アミノ酸分析法で定量した。大豆の浸漬・蒸煮工程における各大豆および大豆煮汁の ACE 阻害総活性とニコチアナミン含量の変化は、ほぼ同様の傾向を示した。

図 6 大豆煮汁の ACE 阻害活性に及ぼす水煮温度の影響

平均値±標準偏差 (n=3) で表示

●: ACE 阻害率 (%), ○: ニコチアナミン量 (μg/1g・煮汁乾燥物)

5. 大豆煮汁の ACE 阻害活性に対する水煮温度の影響

各水煮温度 (50, 65, 80 および 95°C) で得た大豆煮汁の ACE 阻害率とニコチアナミン量を測定した (図 6)。水煮温度 50°C では大豆煮汁の ACE 阻害率は約 25%, ニコチアナミン含量は約 1.0 mg/1g・煮汁乾燥物であったが, 水煮温度が高くなるにつれ, 両者の値も増加し, 水煮温度 95°C では ACE 阻害率が約 80%, ニコチアナミン含量が約 2.4 mg/1g・煮汁乾燥物となり, ACE 阻害率とニコチアナミン含量が同様の挙動を示した。したがって, ニコチアナミンの水煮大豆から大豆煮汁への溶出量は, 水煮温度 50~95°C の範囲では, 水煮温度に依存して増加した。

考 察

大豆加工食品の製造工程において排出する大豆煮汁は, 通称“アメ”と呼ばれ, 味噌, 醤油, 納豆の製造時に排出する大豆煮汁は, いずれも大豆の香ばしい風味とほのかな甘味を有する。また大豆煮汁を低温に放置するとゲル化が起こる。これは大豆煮汁に多く含まれる細胞壁熱水可溶性多糖類による¹⁾。表 1 に示したように大豆煮汁と原料大豆の成分を較べると, 大豆に対して大豆煮汁ではタンパク質含量は約 1/5, 脂質は約 1/7 と少なく, 炭水化物は約 2.4 倍, 灰分は約 1.9 倍と多く両者には著しい含量の差異があり, 食品素材として利用するには上記の成分組成の特徴を生かした利用が求められる。

代表的な大豆加工食品の大豆煮汁の ACE 阻害活性を調べたところ, いずれの大豆煮汁においても ACE 阻害活性が示された。ACE 阻害活性はそれぞれ使用している大豆の品種および蒸煮条件の差異によるものと推測した。

大豆加工食品の製造工程において大豆は必ず加熱処理される。そこで, 大豆の浸漬・蒸煮工程における各生大豆,

浸漬大豆, 蒸煮大豆と蒸煮大豆より排出する大豆煮汁の ACE 阻害活性を調べた。蒸煮大豆と大豆煮汁の ACE 阻害総活性の合計が浸漬大豆の ACE 阻害総活性の約 40% に減少していたことから, 大豆中の ACE 阻害物質は加熱処理 (121°C で 30 分) の影響を受けて活性が低下したと推測した。伊部ら¹⁴⁾は生大豆を浸漬すると, 浸漬大豆の ACE 阻害活性は 1.6 倍に増加したと報告しているが, 本結果では生大豆と浸漬大豆の ACE 阻害総活性は, ほぼ等しかった。また, 水浸漬液 (水浸漬: 室温, 20 時間) の ACE 阻害活性を調べたが活性は認められなかったことから, ACE 阻害物質は室温付近における水浸漬工程では大豆中に留まり, 水浸漬液への溶出はないものと推測した。大豆の浸漬・蒸煮工程における各大豆および大豆煮汁の ACE 阻害総活性の変化とニコチアナミン含量は, ほぼ同様の変化傾向を示したことから, 大豆煮汁の ACE 阻害物質は, 主に原料の大豆に本来含まれているニコチアナミンに起因していると推測した。

水煮温度 50~95°C の範囲では, 水煮温度に依存してニコチアナミン量は増加したが, 高压釜では蒸煮温度が 100°C 以上になるために, 生大豆中のニコチアナミンは熱処理の影響により, 蒸煮大豆では減少すると推測した。よって, 市販納豆でも, ニコチアナミン量は同様の減少傾向を示すと推測されるが, 納豆は強い ACE 阻害活性を有する。この要因として, 納豆は製造工程で醗酵されることから, 蒸煮大豆中の前駆物質から新たに生成された ACE 阻害物質の存在が推測される¹⁴⁾¹⁵⁾。

大豆煮汁は食品素材として利用されることは少なく, 経費をかけて排水処理されているのが現状である。何故ならば, 大豆煮汁の化学的酸素要求量 (COD) 値は 15 000~20 000 ppm で排水処理施設への負荷率は約 36% である。ACE 阻害活性の低かった味噌煮汁では負荷率 70% にも達する¹⁶⁾。

Kinoshita ら¹¹⁾は, 醤油エタノール処理分画物が高血圧自然発症ラット (SHR) に対し, 経口投与で顕著な血圧降下作用を示すことを見出し, ACE 阻害活性を指標として, ACE 阻害物質が大豆中に存在するニコチアナミンが主体であることを明らかにした。

このニコチアナミンは, すでに Noma ら¹⁷⁾により, タバコ葉中より発見されたタンパク質を構成しないアミノ酸である。その後, 多くの植物から単離され, 広く植物界に分布していることが確認されている。植物生理活性としては, キレーターとして働き, 細胞内の鉄の移動あるいは代謝に重要な役割を演じていることが報告されている¹⁸⁾。

最近, モロヘイヤ¹⁹⁾やハヤトウリ²⁰⁾の ACE 阻害物質が SHR に対する血圧降下作用を示し, それがニコチアナミンによるものであることが報告され, さらにセロリ, クレソン, ニンジンの芽, ニガウリ, 各種豆類²¹⁾にもニコチアナミンが見出されている。伊澤ら²²⁾はキノコ類で, シメジ

モドキにニコチアナミンを見出し、多くの野菜が ACE 阻害活性を有することも明らかにされている。

本研究では味噌、醤油と納豆の製造工程で排出し、廃液として捨てられていた各種大豆煮汁中にニコチアナミンが含有されていることが明らかとなり、さらに、大豆煮汁よりイオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いてニコチアナミンを簡便に得ることが可能となった。

この要因としては、大豆煮汁には脂質や大豆由来の水溶性タンパク質等の夾雑物質が少ないこと、さらに多量に含まれる細胞壁熱水可溶性多糖類が室温では水に不溶であることから、遠心分離 (1500×g で 10 分間) により、大豆煮汁より沈殿物として容易に分別されることが、ニコチアナミンの分離操作を容易にしていると推測された。一方、大豆煮汁中のニコチアナミン含量は生大豆より少ないが、ニコチアナミンを前述した植物などから抽出法によって調製する場合、大量の植物材料を確保する必要がある。しかし、大豆煮汁は大豆加工食品の製造工程より安定して原料の供給が受けられるため、ニコチアナミンの製造原料として適する材料である。

今後、大豆煮汁がニコチアナミンを含有する各種飲食品に利用され、軽度高血圧者に対する機能性食品等の開発に寄与できる可能性が示された。

現在、我々はニコチアナミンの大量調製法および高血圧自然発症ラットに対する血圧降下作用について検討を続けている。

要 約

味噌、醤油および納豆の製造時に排出する大豆煮汁を機能性食品素材として利用することを目的として、大豆煮汁中のアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害物質を分離し、原料大豆から大豆煮汁に至る大豆蒸煮工程における ACE 阻害活性と ACE 阻害物質の変化について調べた。大豆煮汁からイオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いてニンヒドリン反応を示す ACE 阻害物質を分離した。ACE 阻害物質は赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計解析より、ニコチアナミンであると同定した。大豆煮汁 (乾物) 100 g より精製ニコチアナミン 37 mg を得た。

大豆の浸漬・蒸煮工程における各生大豆、浸漬大豆、蒸煮大豆と蒸煮大豆より溶出する大豆煮汁の ACE 阻害活性とニコチアナミン含量の変化を調べたところ、生大豆と浸漬大豆ではほぼ同程度の ACE 阻害活性を示した。さらに蒸煮大豆では ACE 阻害活性が生大豆の 30%、大豆煮汁では 10% に低下し、ニコチアナミン含量も同様の挙動を示した。

大豆煮汁には脂質や大豆由来の水溶性タンパク質等の夾

雑物質が少ないために、大豆煮汁からのニコチアナミンの分離を容易にしている。よって大豆煮汁はニコチアナミンの供給源として適する材料である。

文 献

- 1) 木村 功, 松原保仁, 柴崎博行, 大豆煮汁の有効利用, 醸協, **92**, 478-485 (1997).
- 2) 森村 茂, 稲垣一郎, 梅崎宗規, 重松 亨, 木田健次, 大豆煮汁からの醸造酢の製造とその機能性, 食科工, **52**, 578-583 (2005).
- 3) 古田正範, 黒田理恵子, 塚谷忠之, 桶口智子, 廣藤祐史, 宮川 浩, 牟田誠一, 州崎 収, 大豆煮汁の乳酸菌による γ -アミノ酪酸の生産, 食科工, **55**, 299-303 (2008).
- 4) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒 熙, 食品中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について, 農化, **57**, 1143-1146 (1983).
- 5) Cheung, H.S. and Cushman, D.W., Inhibition of homogenous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Botheop jararaca*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **293**, 451-463 (1973).
- 6) Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y., Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 922-925 (1993).
- 7) Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M., Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1541-1545 (1992).
- 8) Yamamoto, N. and Takano, T., Antihypertensive peptides from milk protein. *Nahrung*, **43**, 159-164 (1999).
- 9) 齊藤義幸, 中村桂子, 川戸章嗣, 今安孝聰, 清酒および副産物中のアンジオテンシン変換酵素阻害物質, 農化, **66**, 1081-1087 (1992).
- 10) 原 征彦, 松崎妙子, 鈴木建夫, 茶成分のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について, 農化, **61**, 803-808 (1987).
- 11) Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuchi, M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1107-1110 (1993).
- 12) Shimizu, E., Hayashi, A., Takahashi, R., Aoyagi, Y., Murakami, T. and Kimoto, K., Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from ashitaba (*Angelica keiskei*) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **45**, 375-383 (1999).
- 13) Kristensen, I. and Larsen, P.O., Azetidine-2-carboxylic acid derivatives from seeds of *fagus silvatica* L. and a revised structure for nicotianamine. *Phytochemistry*, **13**, 2791-2798 (1974).
- 14) 伊部さちえ, 吉田恵子, 熊田 薫, 納豆のアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性, 食科工, **53**, 189-192 (2006).
- 15) Okamoto, A., Hanagata, H., Kawamura, Y. and Yanagida, F., Anti-hypertensive substances in fermented soybeans, natto. *Plant Foods for Human Nutrition*, **47**, 39-47 (1995).
- 16) 松田茂樹, 上田誠之助, 大豆煮汁の乳酸菌による有効利用と大豆成分の変化, 醸協, **90**, 592-596 (1995).
- 17) Noma, M., Noguchi, M. and Tamaki, E., A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. *Tetrahedron Letters*, **22**, 2017-2020 (1971).
- 18) Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K., The role of

- nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, **15**, 1263-1280 (2003).
- 19) Kimoto, K., Kuroda, Y., Saito, Y., Yamamoto, J., Murakami, T. and Aoyagi, Y., Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from moroheiya (*Corchorus olitorius*). *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **4**, 223-226 (1998).
- 20) 林あつみ, 中山知子, 青柳康夫, 木元幸一, ハヤトリから
のニコチアミン単離精製とその定量法の確立, 食科工,
52, 154-159 (2005).
- 21) 伊澤華子, 吉田 望, 白貝紀江, 青柳康夫, 豆類のニコチア
ミン含量とアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性, 食科
工, **55**, 253-257 (2008).
- 22) 伊澤華子, 青柳康夫, キノコのアンジオテンシン I 変換酵
素 (ACE) 阻害活性, 食科工, **53**, 459-465 (2006).
(平成 20 年 5 月 15 日受付, 平成 20 年 10 月 1 日受理)
-