

短波帯交流電界処理による大豆酵素の効率的失活方法の開発

植村邦彦*

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Inactivation of Enzymes in Soybean Milk by Radio-Frequency Alternating Current

Kunihiko UEMURA *

National Food Research Institute (NFRI),
National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Ibaraki 305-8642

ABSTRACT

Heat-resistant microorganisms such as *Bacillus subtilis* spores derived from soil may exist in soybean milk and can reduce the shelf life of tofu produced from conventional processing of soybean milk. Conventional high-temperature, long-time heat processing of soybean milk sufficiently inactivates spores of this organism but negatively impacts the gel strength of the resultant tofu due to protein denaturation. An apparatus to pasteurize soybean milk using radio-frequency flash heating (RF-FH) was developed. An electrode surface was covered with 50 μm -thick Teflon film, and 27 MHz RF-FH was applied to soybean milk flowing through the electrode unit. A four-logarithm-order reduction of *B. subtilis* spores was realized in the soybean milk by RF-FH at up to 107°C for 0.4 s. When the electrode surface was covered with a Teflon film, there was no fouling. RF-FH treated soybean milk at 100°C and 107°C, and conventionally heated soybean milk at 100°C for 5 min and 10 min. The breaking strength of the tofu decreased as the conventional heating period of the soybean milk increased from 5 min to 10 min, but the RF-heated sample exhibited a smaller decrease in breaking strength than the conventionally heated sample because of the reduced heating time. 48% and 90% of trypsin inhibitor in raw soybean milk was inactivated by RF-FH at 107°C for 4 s and by conventional heating at 100°C for 10 min respectively. 90% of lipoxygenase in soybean milk was inactivated by RF-FH at 94°C for 2 s. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 22-26, 2011.

Key words : radio frequency, flash heating, high electric field AC, *Bacillus subtilis* spore, trypsin inhibitor, lipoxygenase

* 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

大豆に含まれる可能性がある枯草菌芽胞は、耐熱性が高いため食品加工中の加熱処理で十分に失活できない。また、大豆の酵素の中で、消化機能を阻害するトリプシンインヒビターや不快臭の主因とされるリポキシゲナーゼは、食品加工中の加熱処理により失活させることが一般的である。ただし、食品加工の加熱処理はたん白質の熱変成やビタミン等の栄養成分の熱劣化が生じ品質を低下させることが有る。そこで、本研究では豆乳中の耐熱性微生物や酵素を失活することを目的として開発した短波帯交流電界 (RF-FH) 処理を用いて、枯草菌芽胞および大豆に含まれるトリプシンインヒビターならびにリポキシゲナーゼを効率的に失活させることを検討した。

方 法

モデル液

20℃の温度における電気伝導率が豆乳のそれに近い値を示す0.1%食塩水を滅菌したものをモデル液として用いた。

豆乳

原料の大豆は、近くのスーパーマーケットで購入した十勝産のゆきひかりを用いた。大豆を水洗し、大豆と同量のSQ水を加え、5℃で20時間浸漬した。膨潤した大豆を金属製メッシュで水を切り、3倍量のSQ水とともに家庭用ジューサーで搾汁し、生豆乳を得た。

枯草菌芽胞

枯草菌*Bacillus subtilis* (PCI219) を標準寒天平面培地に塗布し、37℃、10日間インキュベート後、形成された芽胞を顕微鏡で確認した。芽胞をかき取って、リング液に懸濁し、80℃の恒温槽で20分の加熱処理を行って栄養細胞を殺菌した。遠心分離とすすぎを3回繰り返し、10%グリセリンを添加したリング液に懸濁した芽胞液を実験に供するまで-80℃で保存した。

短波帯交流電界処理用電極ユニット

電極は、幅6.0 mm長さ80 mmのチタニウム製電極を5.0 mm離して対向させて配置した。電極間を豆乳が流れるように、テフロン製のブロックで流路を形成した。電極ユニットは、電極表面を50 μm厚のテフロンフィルムで覆い、電極と材料が接触しないような構造とした (Fig. 1)。

短波帯交流電界装置

短波帯交流電界 (RF-FH) 装置は、果汁等の液状食品の殺菌の目的で開発した交流高電界 (HEF-AC)^{1, 2)} と同じ構成であり、テフロン被膜で覆った電極ユニットと交流電源の周波数が短波帯と高いことが異なる。

以下の方法で生豆乳の処理を行った。原液タンクからプランジャーポンプを用いて240 mL/minの一定速度で搬送し、電極ユニットに送った。電極ユニットでは短波帯の周波数28 MHz, 最大電力1 kWの交流を、整合回路を経て、電極ユニットの平行平板電極に印加した。電極間を通過する豆乳は、電極表面を覆った50 μm膜厚のテフロンフィルムを介して、印加された短波帯電力により自己発熱する。電極の出口側の端から20 mmのパイプ中央部に挿入した光ファイバー温度計により、材料の最高到達温度を連続的に計測した。電極ユニットと冷却ユニットまでの配管部で温度を保持した後、直ちに冷却ユニットで25℃に冷却した。処理された試料液体は出口の圧力調整弁で系内の圧力を0.5 MPaに保つように減圧しながら排出した (Fig. 2)。

菌数検査

RF-FH処理および加熱処理した豆乳50 mLを試料とした。試料を適宜希釈し、1 mLを標準寒天培地とともに混釈培養 (37℃, 48 hours) し、コロニー数をカウントした。

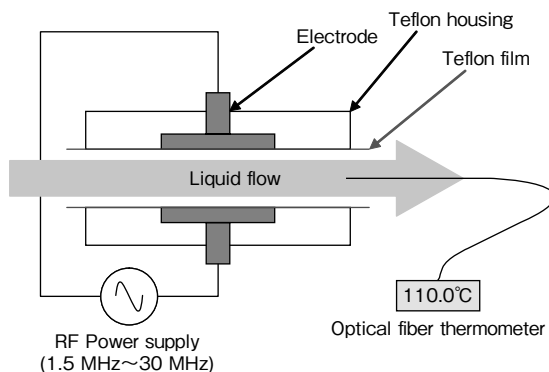


Fig. 1. Electrode unit.

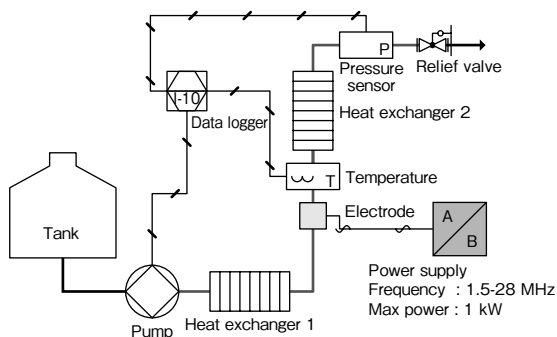


Fig. 2. RF-FH setup.

トリプシンインヒビター活性測定 (BAPA法)

200倍に希釈した豆乳サンプルとトリプシン溶液 (50 ups units/mL) を混合し、基質溶液 (BAPA溶液, 10 mMリン酸緩衝液 (pH7.6), 20 mM塩化カルシウム +50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.2) を加え、37℃で10分間反応させ、30%酢酸溶液で反応を停止後、410 nmの吸光度を測定した。基準活性値の吸光度を0.01低下させる力価を1 inhibitor unitとした。

リボキシゲナーゼ活性測定

1 mLのサンプルを10 mLの酢酸緩衝液に加え攪拌したものを氷浴中で急冷し、4℃, 3,000 rpm, 15分間遠心した。上清を0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過した。500 μ Lのろ液に1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を67 μ L添加した。0.1 Mデオキシコール酸水溶液を67 μ L加え、25℃の恒温槽に浸し、10秒後40 mM基質液を33 μ L添加し30分間反応させた。メタノールを668 μ L加え反応を停止させ、氷浴中で20分間静置した。4℃, 3,000 rpm, 15分間遠心した。100 μ Lの上清にFOX試薬を1 mL加え、室温で30分間放置したのち、540 nmの吸光度を測定した。

結果と考察

豆乳中の枯草菌芽胞の殺菌効果

テフロンフィルムの絶縁膜を通過し、材料の発熱に寄与するエネルギー変換効率および殺菌効率の結果より、本研究では周波数として27 MHzの短波帯交流

を用いることとした。豆乳中に枯草菌芽胞を添加し、100℃の温浴中に10分間浸した従来法加熱処理または、27 MHzの周波数の交流を印加して電極出口温度が107℃となる条件でRF-FH処理を行った。処理した豆乳中の枯草菌芽胞数を計測したところ、RF-FH処理した豆乳中の枯草菌芽胞は初期菌数に比べて4対数オーダー、加熱処理のものは3対数オーダー失活した (Fig. 3)³⁾。食塩水中の枯草菌芽胞の失活速度は豆乳中の枯草菌芽胞に比べて、6倍から10倍速く失活した。

RF-FH処理によるトリプシンインヒビター活性の変化

枯草菌芽胞の試験と同様に、従来法加熱処理 (100℃) またはRF-FH処理の前後で、生絞豆乳中のTI活性を測定した (Fig. 4)。図より、10分間の従来加熱で90%の酵素を失活したのに対し、RF-FH処理 (104℃, 4 s) では、48%の失活に留まった。この結果より、豆乳中のTIはRF-FH処理による失活効果が大きくないことが分かった。

RF-FH処理によるリボキシゲナーゼ活性の変化

RF-FHの温度保持時間を2 sとしたときのRF-FH処理の電極出口温度変化に対するTIおよびLOXの活性変化を測定した (Fig. 5)。図より、TI活性はFig. 4の4 s間の温度保持を行ったRF-FHよりも失活率が低下した。LOXはRF-FHの出口温度上昇とともに大きく活性が低下し、電極出口温度が94℃時に90%以上失活した。つまり、LOXはオレンジ果汁中のトリプシンインヒビター⁴⁾と同様に短時間の交流電界処理で従来の加熱処理よりも早く失活可能なことが分かった。

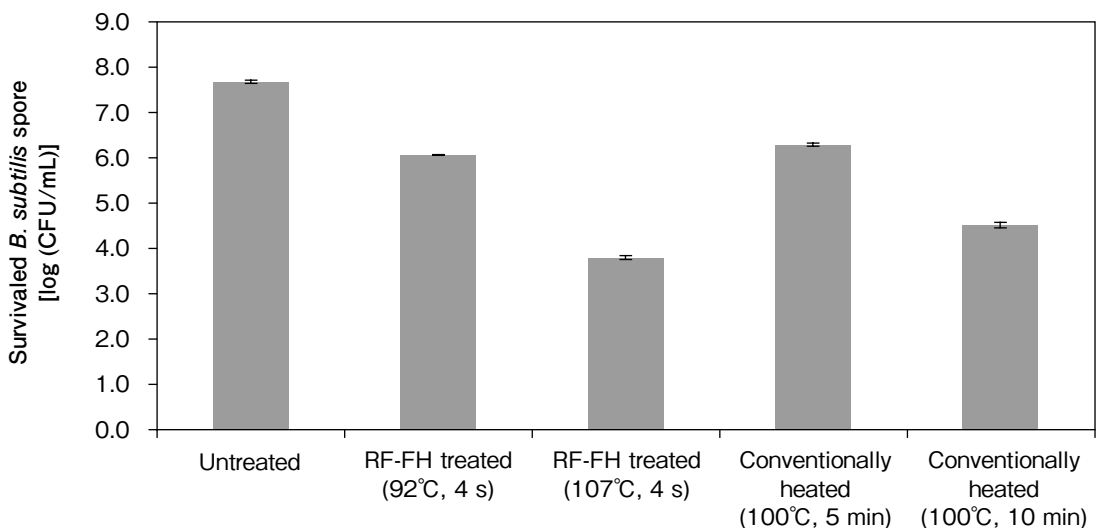


Fig. 3. Survived *B. subtilis* spore in soybean milk by RF-FH treatment and Conventional heating.

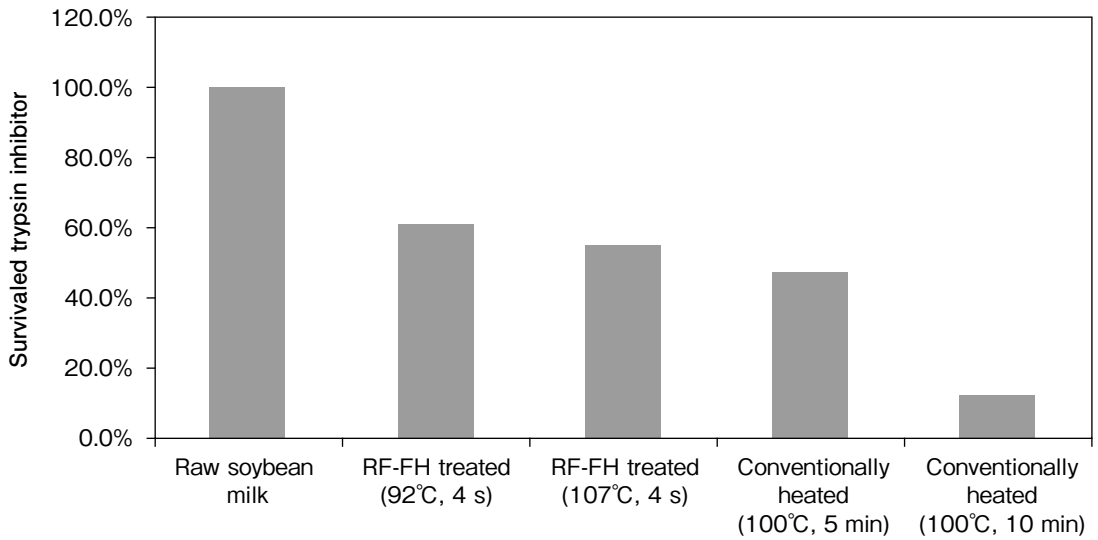


Fig. 4. Inactivation of trypsin inhibitor by RF-FH and conventional heating.

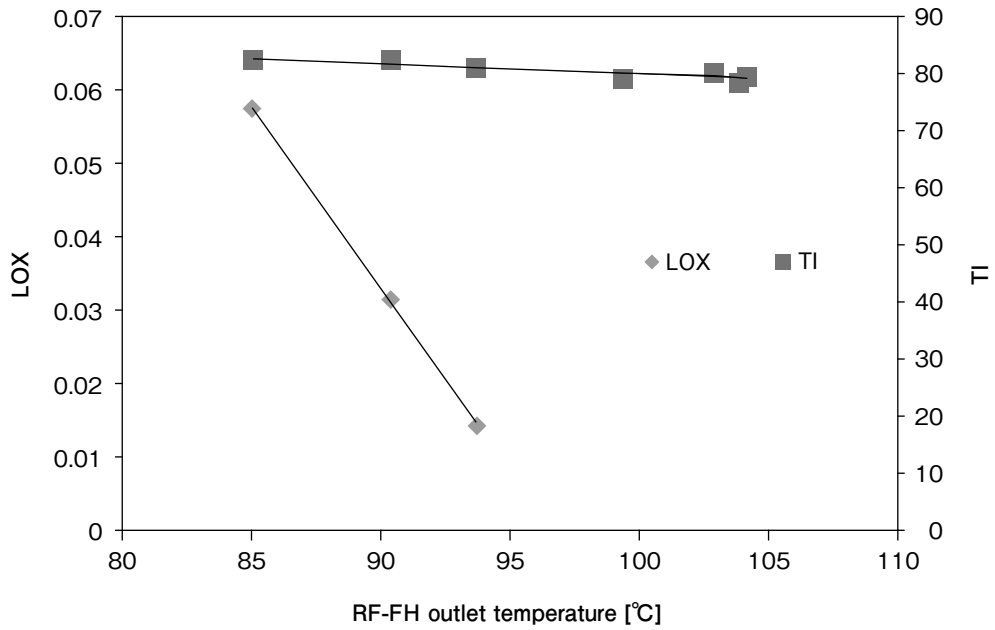


Fig. 5. Temperature effect of inactivation of TI and LOX by RF-FH.

要 約

電極表面をテフロンフィルムで覆い、短波帯の交流を用いることにより、大豆たん白質が電極表面へ付着することなく、豆乳を連続的にRF-FH処理可能となった。豆乳中に添加した枯草菌芽胞はRF-AC処理により、4対数オーダー失活させることができた。また、豆乳中のたん白質のうち、トリプシンインヒビターはRF-FH処理の短時間加熱で十分な失活効果が得られなかったのに比べ、リポキシゲナーゼは低温短時間（94℃，2 s）で効率的に失活できることが分かった。

文 献

- 1) Uemura K and Isobe S (2002): Developing a new apparatus for inactivating *Escherichia coli* in saline water with high electric field AC. *J Food Engineering*, **53**, 203-207.
- 2) Uemura K and Isobe S (2003): Developing a new apparatus for inactivating *Bacillus subtilis* spore in orange juice with a high electric field AC under pressurized conditions. *J Food Engineering*, **56**, 325-329.
- 3) Uemura K and Kobayashi I (2010): Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in soybean milk by radio-frequency flash heating. *J Food Engineering*, **100**, 622-626.
- 4) 井上孝司, 河原優美子, 池田成一郎, 五十部誠一郎, 植村邦彦 (2007): 交流高電界処理による柑橘果汁ペクチンエステラーゼの失活, 日本食品科学工学会誌, **54**, 195-199.