

氏 名(本籍) お 小 ばた 幡 あき 明 お 雄

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 6 9 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 17 年 3 月 3 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 大 豆 加 工 に お け る 酵 素 反 応 と 品 質 に 関 す る 食 品 化 学 的 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 藤 本 健 四 郎
(副 査) 教 授 村 本 光 二
教 授 山 下 ま り

論文内容要旨

序論

大豆は我国の伝統食品の豆腐、味噌、醤油、納豆、および湯葉などの原料であり、優れた加工食品素材である。これは、大豆蛋白質が、栄養的、経済的にも優れていることに加えて、溶解性、気泡性、乳化性、ゲル化性などの機能特性を備えていることに起因している。しかし、伝統食品の製造においては、経験とカンに頼るところが多く、この優れた加工素材である大豆の機能特性を十分に活かした新しい大豆食品を開発するには、大豆及びその加工に関する実用性の伴った基礎的研究が必要である。

そこで本研究では、大豆の加工時、特に豆腐製造における大豆の磨砕工程の品質変化に焦点をあてて検討した。まず、豆腐及び豆腐関連製品の品質において重要な役割を果たしている大豆蛋白質の「ゲル形成性」に関し、その重要因子であるスルフィドリル (SH) 基に着目して研究を進めた。その結果、大豆磨砕時に酵素作用によって SH 基が減少するとともにゲル強度が低下することを見出した。そして、その原因酵素を特定するとともに、モデル系における酵素反応において SH 基の反応生成物を調べた。さらに、豆腐製造において重要な品質の一つである「色調」に関する変化を調べたところ、大豆磨砕温度の上昇に伴って豆乳の色調の変化が観察されたため、その原因とメカニズムについて研究した。そして、これらの研究成果をもとに、大豆加工時における酵素の実用的制御方法について検討して、大豆磨砕時の酵素制御を目的とした豆腐製造システムを開発し、強固なゲル強度が要求されるレトルト式の無菌豆腐の製造に成功した。以下これらの成果について説明する。

第1章 豆乳中の SH 基含量測定法の確立

大豆蛋白質のゲル形成性の重要因子の一つは SH 基含量である。大豆加工中の SH 基含量の変化を調べるには、大豆から調製される豆乳中の SH 基量を直接測定することが必要である。しかし、豆乳は懸濁溶液であるため DTNB (2,2'-dithiobis-(5-nitrobenzoic acid)) などの比色法を直接用いることはできない。そこで、懸濁溶液である豆乳中の SH 基含量を簡便に直接測定する方法について検討した。

1) 2,2'-dithiobis-(5-nitropyridine) (DTNP) と 5-nitro-2-thiopyridone (NTP) の過塩素酸酸性下での挙動

ピリジン誘導体の SH 基測定試薬である DTNP は pH5.8-8.9 の間で SH 基と反応し、その結果 386nm に吸収を持つ NTP が生成する (Fig. 1)。過塩素酸による除蛋白の前後でその両者が安定であれば、試薬と反応後除蛋白し、透明にしてから吸光度測定を行うことができるはずである (除蛋白法)。そこで、中性及び過塩素酸酸性下での DTNP と NTP の吸収スペクトルを測定した (Fig. 2)。その結果、両者とも経時的には安定であったが、NTP は酸性下で最大吸収波長が 376nm へシフトした。しか

し、実際の測定波長は未反応の DTNP の影響を考慮し、386nm で測定することにした。

2) 除蛋白操作の影響

除蛋白法では NTP の吸収スペクトルに変化が生じたので、システインで検量線を作成した。その結果から分子吸光係数を求めると $\epsilon=17,400$ となり、DTNB 法に比べ 28% 感度が上昇した。また、透明な蛋白質溶液である大豆グロブリン溶液を用いて除蛋白前後の SH 基含量を測定したところ、相関係数 $r=0.9993$ が得られ、過塩素酸による除蛋白操作は SH 基の定量性に影響を及ぼさないことがわかった。

3) 豆乳の SH 基測定及び精度

実際に豆乳を用いて測定してみたところ、0–0.4% の範囲で非常に良い直線関係が得られた。この方法を用いて豆乳の加熱による SH 基の変化を調べると、100℃ で 3 分以上加熱しても SH 基の変化はみられず (Fig. 3)、従来経験的に行われてきた呉加熱条件の妥当性を裏づける結果になるものと考えられた。

第 2 章 大豆磨砕時における豆乳中の SH 基の変化

豆腐製造における大豆磨砕工程に焦点を絞って、ゲル形成性と SH 基の関係について調べた。

1) 大豆磨砕温度とゲル形成性

大豆の磨砕温度と豆腐のゲル強度の関係を調べたところ、磨砕温度が上昇するに従い、ゲル強度は低下していった (Fig. 4)。同時に、磨砕直後の豆乳の疎水領域を測定したところ、50℃ 以下ではほとんど変化していないことから、磨砕時に蛋白質の立体的な構造変化ではない何らかの変化が起こっているものと推察した。そこで、加熱した豆乳の SH 基含量を測定してみたところ、SH 基含量は豆腐のゲル強度の低下と良く相関したため (Fig. 5)、この SH 基の減少がゲル強度低下の原因の一つと考えられた。

2) SH 基の減少と酵素反応

磨砕温度 50℃ 以下で SH 基の減少が起こることから酵素反応と推察されたので、未加熱豆乳をインキュベーションしてみた。明らかに SH 基の減少が観察され、酵素反応と考えられた。SH 基の減少と同時に酸化臭の増加も観察されたのでリポキシゲナーゼとの関係を調べてみた。磨砕温度の上昇に伴い、過酸化物質は増加し、逆に SH 基は減少した (Fig. 6)。リポキシゲナーゼの SH 基の減少への関与を明らかにするため、加熱豆乳 (酵素失活) にリポキシゲナーゼを添加したところ確かに SH 基の減少が観察された。

第 3 章 リポキシゲナーゼと SH 基酸化

リポキシゲナーゼが豆乳中の SH 基の減少に関与することから、リポキシゲナーゼ欠失大豆を用いて 3 種 (L-1、L-2、L-3) のアイソザイムの影響を調べた。

1) 常温磨砕での各アイソザイムの SH 酸化能

まず、通常の豆腐製造と同様に、常温磨砕における各リポキシゲナーゼアイソザイムの SH 基酸化能を調べた (Fig. 7)。その結果、3 種のアイソザイム全てを欠失している大豆では SH 基の減少がほとんどなく、リポキシゲナーゼの関与が再確認された。また、一種欠失した大豆での SH 基酸化能は L-2 欠失大豆が一番弱く、二種欠失した大豆では L-1、-3 欠失大豆 (L-2 残存) が一番強いことから、3 種のアイソザイムの中で L-2 が一番強い SH 基酸化能を有していると考えられた。

2) 大豆磨砕時の SH 基酸化の抑制

大豆磨砕時の SH 基の減少を抑制するために、1) 低温下 (2°C)、2) 窒素雰囲気下、3) 低温下+窒素雰囲気下で磨砕して SH 基量の変化を調べた (Fig. 8)。その結果、低温かつ窒素雰囲気下で磨砕するとほぼ SH 基の減少を抑制できることがわかった。また、L-1、L-2、は低温において抑制されやすく、L-3 は窒素雰囲気下で抑制されやすかった。3 種のアイソザイムを内在するスズユタカは窒素雰囲気下で抑制されやすいため、L-2 だけではなく L-3 も SH 基の酸化に対して重要な役割を果たしていると考えられた。市販の大豆 5 種について同様の実験を行ったところ、低温かつ窒素雰囲気下で磨砕すると SH 含量が一番高く、次いで窒素雰囲気下の磨砕に効果があった (Fig. 9)。しかし、低温下でもかなり SH 基の酸化が抑制される品種もあり、品種によってアイソザイムの活性に違いがあることが示唆された。

第 4 章 モデル系における SH 基酸化生成物

リポキシゲナーゼの脂質酸化反応によって酸化された SH 基が、どのような形に変化するかを調べた。

1) SH 基減少 (50°C 磨砕) 豆乳のアミノ酸分析

50°C で磨砕して SH 基が減少した豆乳をモノヨード酢酸で SH 基をカルボキシメチル (CM) 化したのち加水分解し、誘導体化して HPLC で分析した。その結果、50°C 磨砕では明らかに CM システインの量が減少していた (Fig. 10)。このことは、豆乳中の SH 基の減少が蛋白質のシステイン残基の SH 基に由来していることを示している。しかし、システイン酸などの酸化生成物は検出されなかった。

2) モデル系 (システイン) による酸化生成物の検索

豆乳のアミノ酸分析による SH 基の酸化生成物の特定は困難であったため、システインを SH 基のモデル化合物に使い、リノール酸とリポキシゲナーゼの酵素反応系を使って酸化生成物を検索した。なお、誘導体化試薬に NBDF (4-Fluoro-7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole) を用いることで酸化生成物の SH 基の有無も同時に調

べた。システインとリノール酸だけでは何の変化もなかったが、それにリポキシゲナーゼを加えると、システインは減少し複数のピークが出現した (Fig. 11)。その主要ピークの一つはシスチンであり、もう一つは未知成分で、NBDF 誘導体の吸収スペクトルから SH 基を持たない化合物であった。シスチン及びその未知成分は反応時間とともに増加することから、明らかに酵素反応によって生成していた (Fig. 12)。この未知成分を明らかにするために、システインの酸化物であるシステイン酸とシステインスルフィン酸について HPLC で比較したが、それらとは異なっていた (Fig. 14)。そこで、シスチンの酸化物であるシスチンジスルフォキサイド (Fig. 13) と比較したところ、HPLC のリテンションタイムが一致したことから、この化合物はシスチンジスルフォキサイドであると推定された (Fig. 14)。

第5章 大豆磨砕時の豆乳の色調変化

豆腐製造や分離蛋白質の製造において、それらの色調も重要な品質の一つである。大豆の磨砕工程での豆乳の色調変化を調べたところ、磨砕温度の上昇に伴って色調が著しく変化することを見出した。そこで大豆磨砕時に起こる豆乳の色調変化の原因とそのメカニズムについて調べた。

1) 大豆磨砕温度と豆乳の色調

磨砕温度が 0℃から 50℃の間では、磨砕温度の上昇に伴って黄色→白→ピンクへと変化し、測色値では L 値、b 値は減少し、a 値は上昇した (Fig. 15)。この変化は過酸化物質価の変化とよく似ており、リポキシゲナーゼの関与が推察された (Fig. 16)。

2) リポキシゲナーゼ欠失大豆による豆乳の色調変化

リポキシゲナーゼの関与を調べるために、リポキシゲナーゼ欠失大豆を用いて同様の試験を実施したところ、色調は黄色のままで変化せず、リポキシゲナーゼが色調を変化させる原因酵素であることがわかった (Fig. 15)。リポキシゲナーゼが若干働いた方が、黄色色素が酸化退色し豆乳が白くなった。

3) 黄色色素成分に関する解析

リポキシゲナーゼが酸化退色する黄色色素について調べたところ、限外濾過による挙動から、水溶性の蛋白質非結合性の低分子色素と考えられ、酵素反応前後の差スペクトルでは 420nm 付近に吸収極大が観察された (Fig. 17)。HPLC による分析では、酵素反応の前後で多数のピークが消失しており、複数の色素がランダムに酸化され退色していた (Fig. 18)。この中の最大ピーク成分の吸収スペクトルを測定したところ、415nm に吸収極大を有しており、よく知られているカロテノイド系の色素とは明らかに異なっており (Fig. 19)、フラボノイド成分ではなかないと推測した。

第6章 レトルト式無菌豆腐の開発

伝統的手法で作られる豆腐は、微生物汚染に対して極めて弱い欠点があるため、微生物による品質劣化を防いだ長期保存豆腐に関して、幾つの技術が提案されている。レトルト方式の無菌豆腐もその一つで、この方式は凝固剤添加後の豆乳を容器に充填し、凝固と滅菌を同時に行う方法である。しかし、レトルト方式は滅菌の際にゲルが脆くなることが重大な問題点の一つになっていた。そこで、上述の研究成果を活かして、大豆磨砕時の酵素制御を目的とした連続式豆乳製造システムを開発し、レトルト式の無菌豆腐の製造に成功した。

総 括

大豆蛋白質は、栄養的、経済的にも優れていることに加えて、溶解性、気泡性、乳化性、ゲル化性などの有用な機能特性を備えていることから、日本では昔から種々の食品に利用されてきた。この優れた加工素材である大豆の機能特性を十分に活かした食品を開発するために、大豆の加工、特に磨砕工程に焦点をあてて研究を進めた。

まず、ゲル形成性に関して、その重要因子である豆乳中のスルフィドリル (SH) 基に着目して検討した。新しく開発した DTNP 法を用いて豆腐製造工程の磨砕工程とゲル形成性の関係について調べたところ、大豆の磨砕温度の上昇に伴い豆腐のゲル強度は低下し、このゲル強度の低下は豆乳中の SH 基含量の低下が原因の一つと考えられた。この SH 基の低下はリポキシゲナーゼによる脂質酸化反応に起因していた。リポキシゲナーゼ欠失大豆を用いてアイソザイムの影響を調べたところ、L-2 に一番強い SH 基酸化能がみられた。しかし、3 種のアイソザイムを含んでいる市販の大豆では、L-2 だけではなく L-3 も SH 基の分解に対して重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、SH 基の酸化生成物について調べるために、システインによるモデル系で実験したところ、リポキシゲナーゼの脂質酸化反応に伴い複数の反応生成物が検出された。主要な成分の一つはシスチンであり、もう一つは、シスチンの酸化物であるシスチンジスルフォキサイドであると推定した。

次に、豆腐製造において重要な品質の一つである色調に関して大豆磨砕時での変化について調べ、リポキシゲナーゼが色調を変化させる原因酵素であることをつきとめた。また、リポキシゲナーゼが酸化する黄色色素は複数の水溶性の低分子色素と考えられ、その中の主要成分はカロテノイド系の色素とは異なり、415nm に吸収極大を有していた。

これらの研究成果をもとに、大豆磨砕時の酵素制御を目的とした連続式豆乳製造システムを開発し、レトルト式の無菌豆腐の製造に成功した。本論文は、大豆製品の機能性の改良による用途拡大など、高付加価値の商品をデザインし得る利用価値の高い実用的な製造方法を提供するものである。

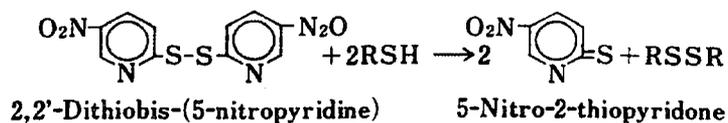


Fig. 1 The reaction of 2, 2'-dithiobis-(5-nitropyridine) with thiols

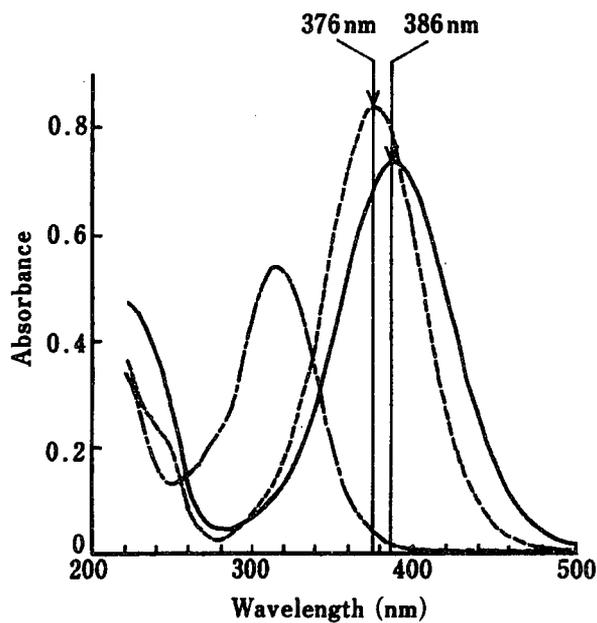


Fig. 2 Absorbance spectra of DTNP and NTP

- 5.0×10^{-5} M DTNP in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) or 5% HClO_4
- 5.0×10^{-5} M NTP in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)
- 5.0×10^{-5} M NTP in 5% HClO_4

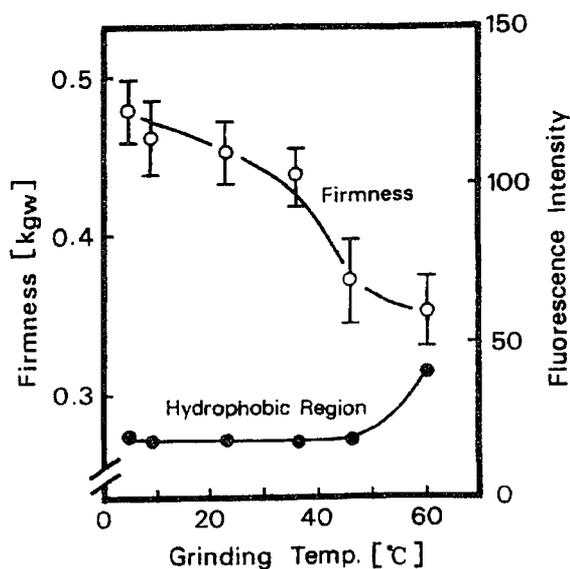


Fig. 4 Effect of soybean grinding temperature on the firmness of tofu and hydrophobic region in unheated soymilk.

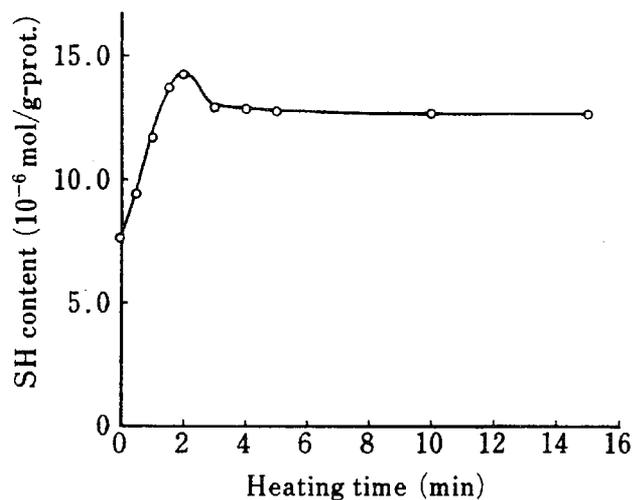


Fig. 3 Change of SH content in heated soymilk by heating at 100°C .

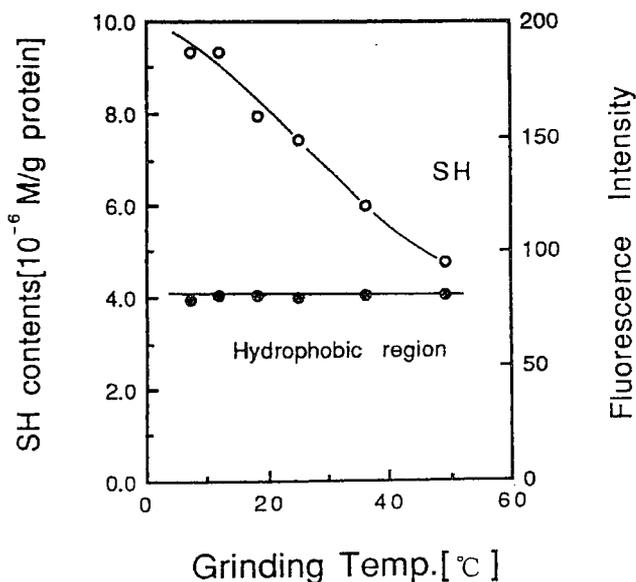


Fig. 5 Effect of soybean grinding temperature on the SH content and hydrophobic region in heated soymilk.

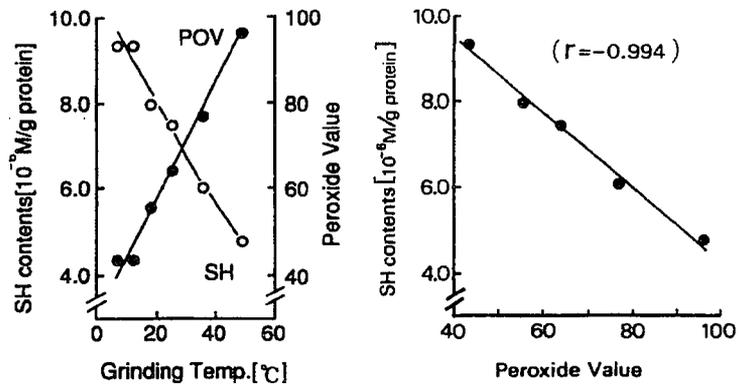


Fig. 6 Effect of soybean grinding temperature on the peroxide value in soymilk and relationship between the peroxide value and SH content.

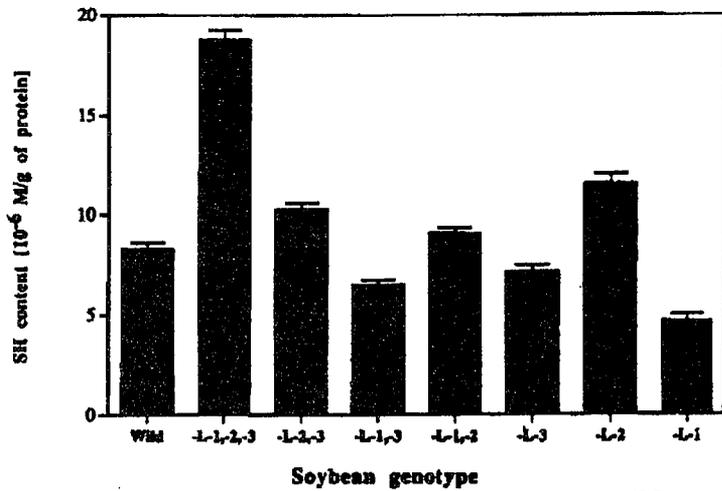


Fig. 7 SH content in soymilk from the wild-type seed (Suzuyutaka) and lipoxygenase(s)-null mutants.

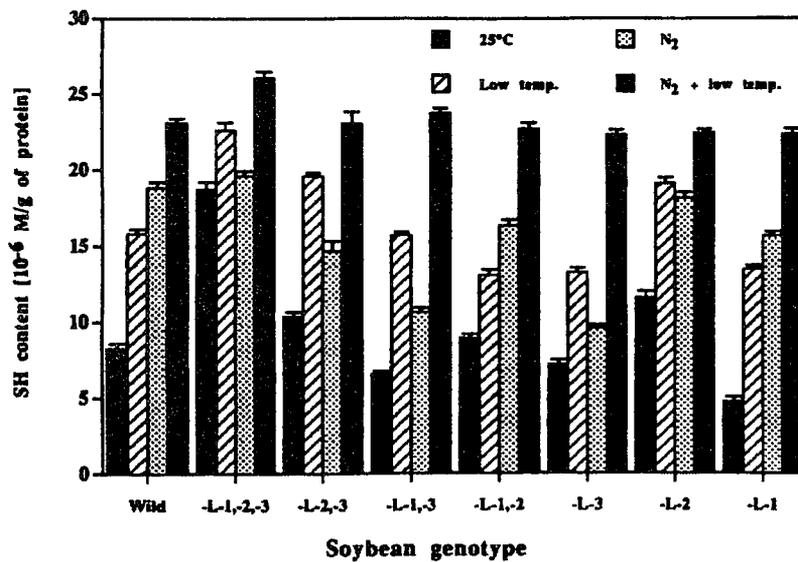


Fig. 8 Effect of soybean grinding conditions on the SH content in soymilk from the wild-type seed (Suzuyutaka) and lipoxygenase(s)-null mutants.

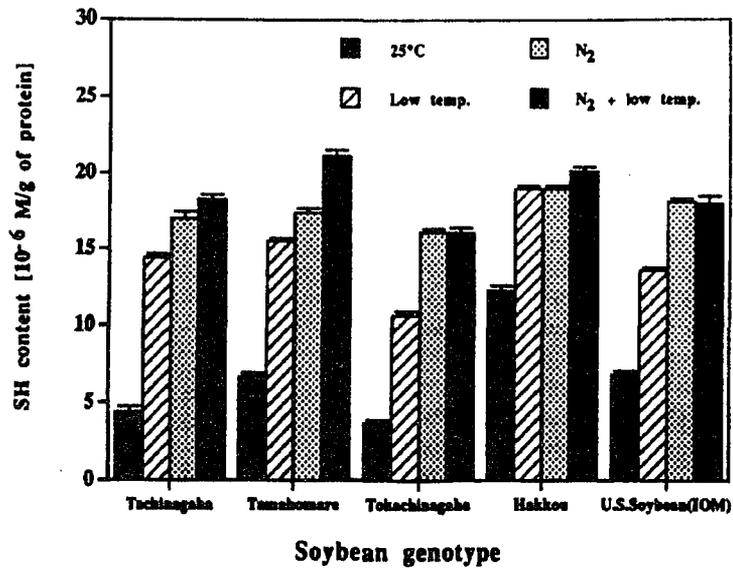


Fig. 9 Effect of soybean grinding conditions on the SH content in soymilk from commercially available varieties.

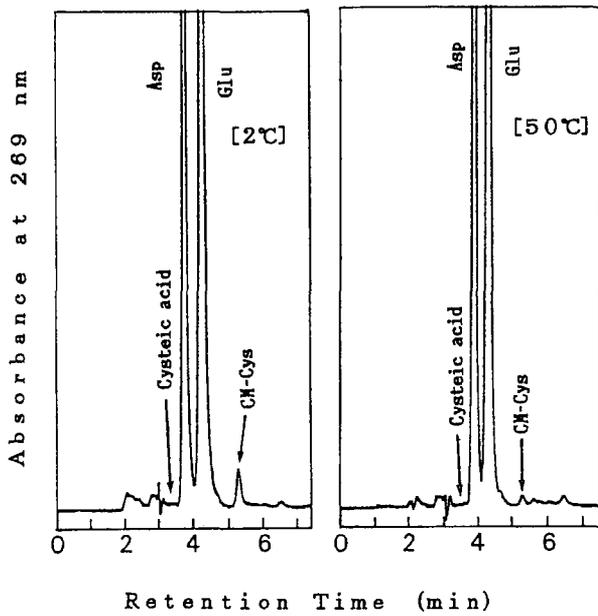


Fig. 10 Chromatograms of cysteine and cysteic acid in soymilk ground at 2°C and 50°C.

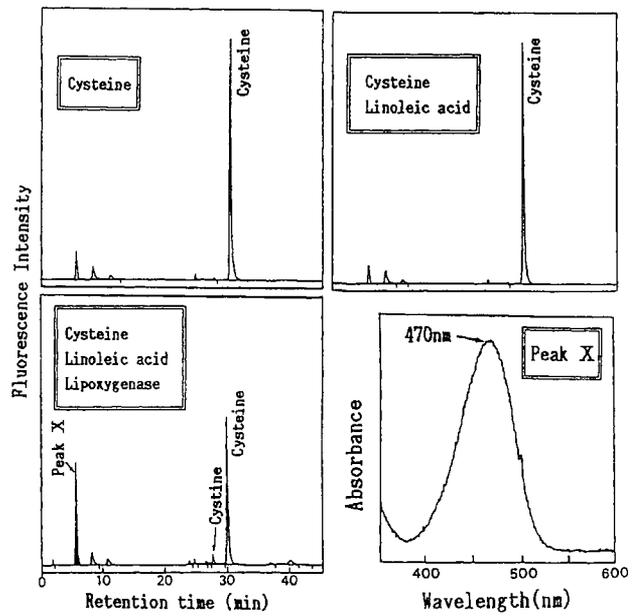


Fig. 11 Chromatograms of oxidation products of cysteine under the lipoxygenase reaction.

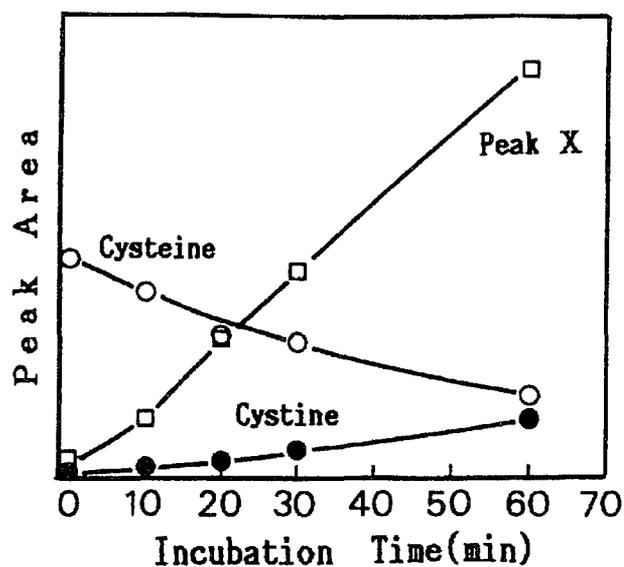


Fig. 12 Course of production of the oxidation compounds of cysteine under the lipoxygenase reaction.

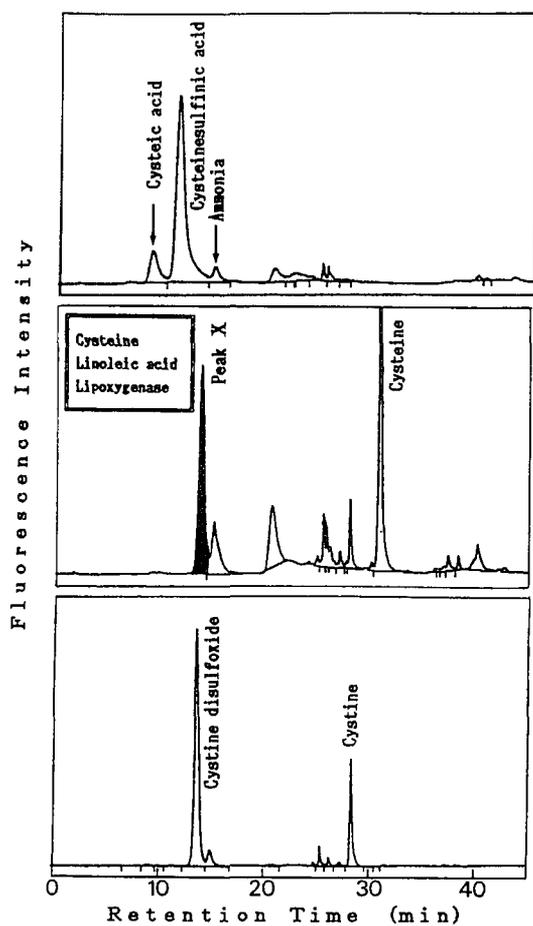


Fig. 13 Chromatograms of oxidation products of cysteine and its related compounds.

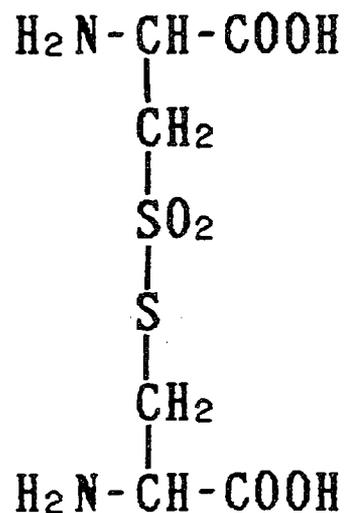


Fig. 14 Chemical structure of cystine disulfoxide.

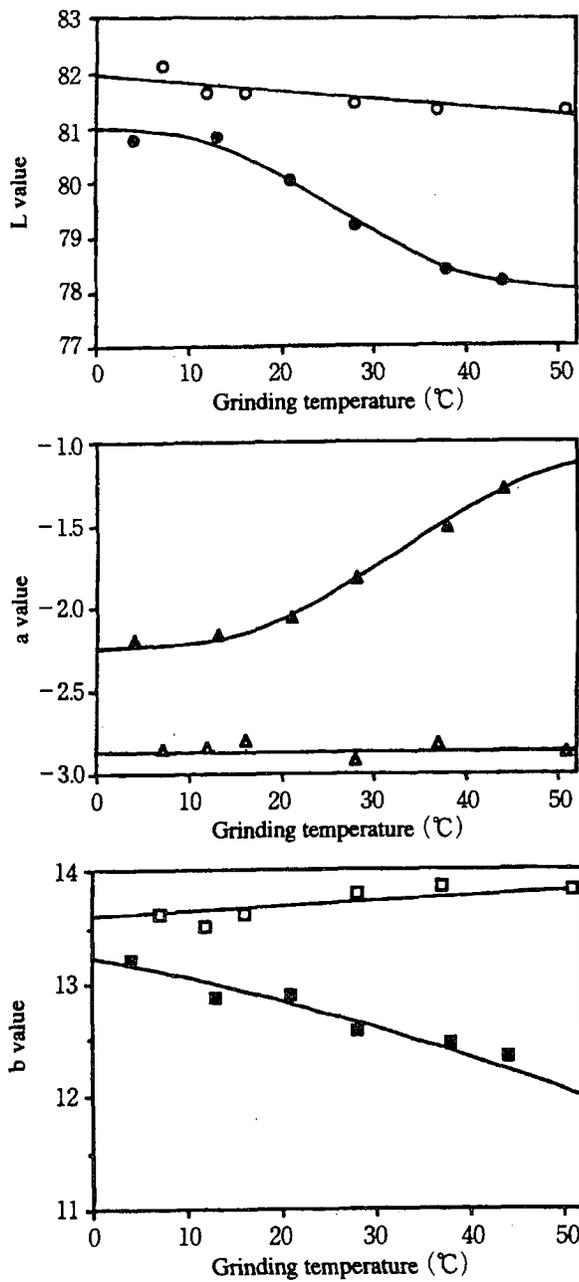


Fig. 15 Effect of soybean grinding temperature on color of soymilk prepared from Fukuyutaka seeds and L-1-, L-2-, L-3-lacking soybeans (Kyushu 111)
 ○, △, □, Kyushu 111 ; ●, ▲, ■, Fukuyutaka

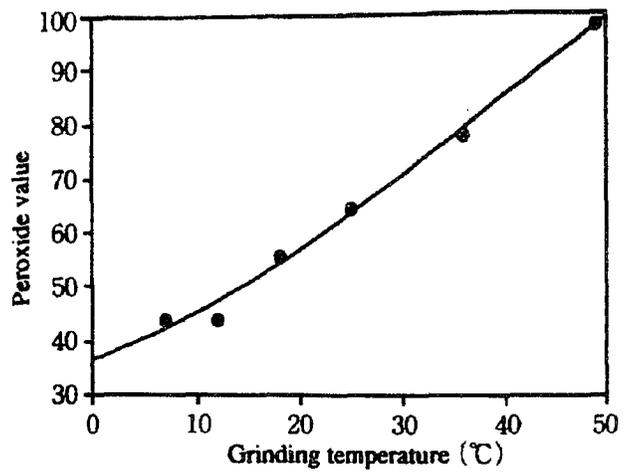


Fig. 16 Effect of soybean grinding temperature on peroxide value in soymilk prepared from Fukuyutaka seeds

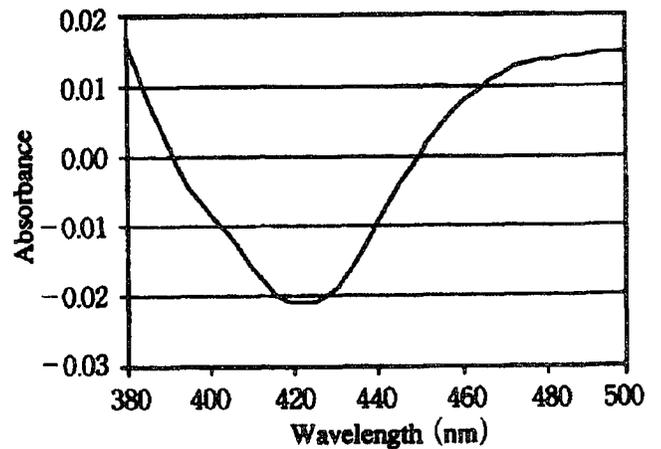


Fig. 17 Difference absorption spectrum of soymilk whey from Fukuyutaka seeds after incubation at 50°C

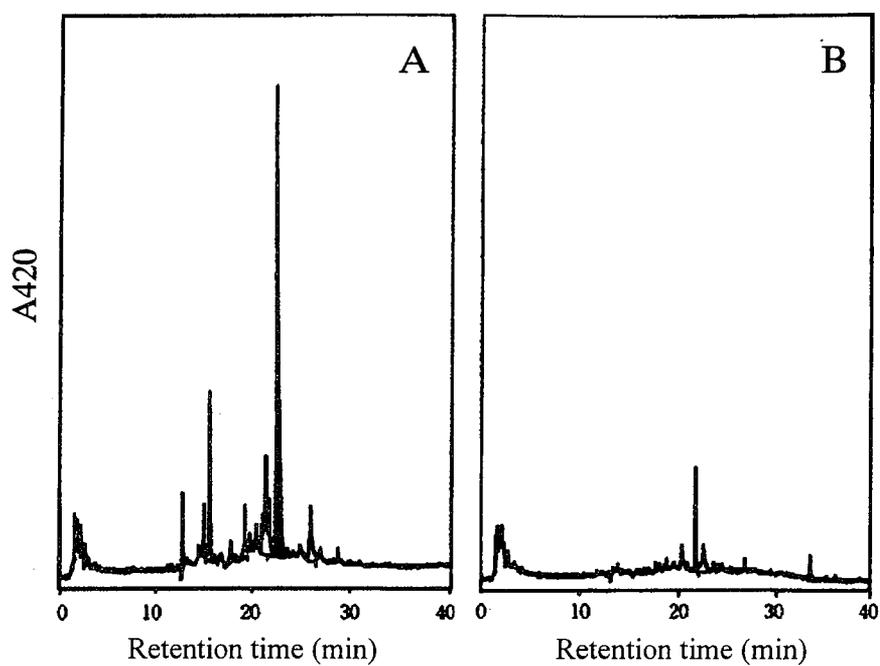


Fig. 18 HPLC chromatograms of soymilk whey from Fukuyutaka seeds before (A) and after (B) incubation at 50°C.

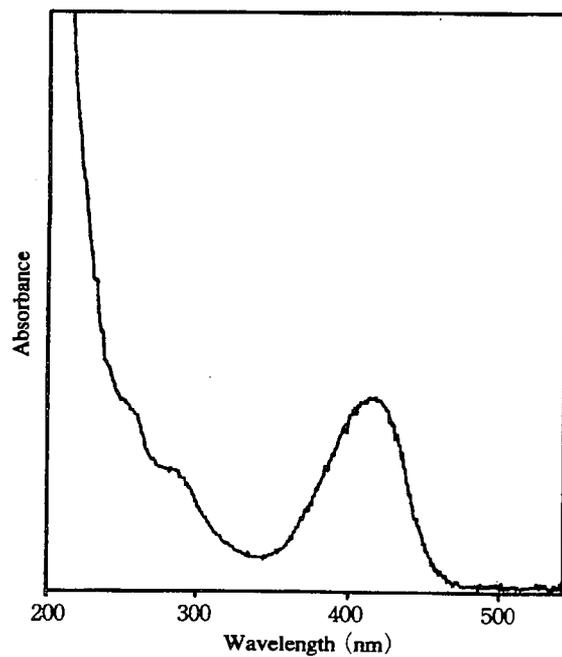


Fig. 19 Absorption spectrum of the highest peak in fig. 18-A HPLC chromatogram.

論文審査結果要旨

豆腐は大豆タンパク質のゲル形成能を活用した伝統的食品であり、栄養学的だけでなく経済的にも優れている。しかし、伝統的食品の製造においては、経験と勘に頼るところが多く、食品素材としての大豆の機能性を十分に発揮するには、加工に関する実用性を伴った基礎的知見が必要である。本研究では、豆腐製造時の大豆磨砕工程の品質変化に及ぼす酵素作用の影響に焦点を当て、研究を進めた。第1章では、大豆タンパク質のゲル形成能の重要な因子である豆乳のSH基含量定量法について検討し、2,2'-dithiobis-(5-nitopyridine)とSH基の反応によって生成する5-nitro-2-thiopyridoneを386nmで比色する方法を確立した。第2章では、大豆磨砕時のSH基の変化機構について上記の方法を用いて検討した。すなわち、大豆磨砕温度と豆腐ゲル強度の関係を調べたところ、磨砕温度の上昇に伴いゲル強度は低下した。しかし、磨砕温度が上昇してもタンパク質の立体構造には変化がないが、SH基は減少した。SH基の減少は、豆乳脂質の過酸化と平行し、標品酵素の添加実験から酵素リポキシゲナーゼによるものと推定した。第3章においては、大豆に含まれる3種のリポキシゲナーゼアイソザイムの役割について、各アイソザイム欠失品種を使用して検討し、L-2が最も強いSH基酸化活性を有すが、L-3も重要であり、大豆品種により各アイソザイムの活性に違いが見られることを明らかにした。磨砕中のリポキシゲナーゼの作用を抑制するには、低温下の窒素雰囲気中で行うことが有効だったが、どちらか一方では十分に抑制することができなかった。第4章においては、リポキシゲナーゼ反応によるSH基酸化機構を検討した。すなわち、SH基の減少はタンパク質中のシスチン残基のSH基の酸化に由来していた。酸化生成物の構造を解析するため、システイン、リノール酸、大豆リポキシゲナーゼからなるモデル系を作成し、反応生成物をHPLCで分析したところ、シスチンと共に新たな未知ピークが検出された。本物質は、標品とのクロマト上の挙動から、シスチンジスルフォキサイドと推定された。第5章においては、大豆磨砕工程における豆乳の色調変化について調べ、その機構を推定した。磨砕温度0℃から50℃の間では、温度の上昇に伴い黄色→白（退色）→ピンクへと色調が変化し、測色値ではL値、b値が減少し、a値が上昇した。この変化は、脂質の過酸化物価の変化とよく一致しており、リポキシゲナーゼの関与が示唆された。リポキシゲナーゼ欠失品種では、全く色調が変化せず、リポキシゲナーゼが原因であった。黄色色素は水溶性低分子化合物で、吸収スペクトルからカロテノイドではなく、フラボノイド化合物と推定された。第6章においては、長期間保存豆腐の製造上の問題点だった滅菌の際のゲルが脆くなる現象について、本研究の成果を活用して酵素反応を制御することにより、レトルト式無菌豆腐に適した連続式豆乳製造システムを開発した。

以上の本研究の成果は、とかく経験に頼るところが多かった豆腐製造において、豆乳の機能性および品質を向上させるために酵素反応を制御することの重要性を明らかにし、新しい豆乳製造方法の開発につながったことは、著者に博士（農学）を授与するに値すると判断した。