

## 豆乳凝固酵素を利用した新規大豆蛋白質利用食品の開発

奥村幸広・川上 誠・宇野豊子・山木 携・本堂正明

### A Study of Soybean Milk Curds Formed from Soy-Milk Treated with a Coagulation Enzyme from *Bacillus licheniformis*

Yukihiro OKUMURA, Makoto KAWAKAMI, Toyoko UNO, Tazusa YAMAKI and Masaaki HONDO

An experiment measuring the coagulation of soybean milk was carried out using protease from *Bacillus licheniformis* B-6-4J. To coagulate soybean milk (10% total solids), it was found that an addition of more than 1%(w/v) of dry enzyme was needed. Excess additions of enzyme did not yield any significant changes in gel strength. Where high amounts of Glucono- $\delta$ -lactone (GDL) were present, progressively larger enzyme quantities resulted in progressively softer gels. In samples with GDL concentrations of 0.1% or less, the enzyme addition resulted in a hard gel. Ice cream produced from soybean milk and soy-milk curds was also evaluated. Compared to non-treated soy milk, an ice mix containing soy-milk curds showed high viscosity and was found to be suited to ice cream production. By examining the effects of milk homogenization and the addition of fat to soy-milk curds, it was possible to produce soy-milk ice cream with a slight soybean flavor and good texture.

大豆は高栄養でかつ豊富な食品加工特性を有しており、食品加工素材として優れた資質を有している。我が国を含む東アジア地域では、この性質を生かして大豆を食品として伝統的に利用してきた。しかしながら、我が国における大豆の利用の実情は、その約8割が製油用であり、食品・食品素材としての利用は全体の2割弱にとどまっている。このような背景から、大豆蛋白質の利用を目的とした食品および食品素材の開発が期待されている。特に豆乳を原料とした研究は、ゲル形成能や起泡性などの食品加工特性やハンドリングに優れることから、様々な研究が行われている。

酵素を利用して豆乳を凝固させるという試みは、大豆を原料とした植物性チーズの開発という観点から検討されており、豆乳凝固活性のあるプロテアーゼの検索が行われてきた<sup>1)~5)</sup>。大庭らは、土壌より分離した微生物 *Bacillus licheniformis* の生産するプロテアーゼに、豆乳凝固活性があることを見だし、この酵素を利用した豆乳チーズの開発を行った<sup>6)</sup>。この酵素は分子量3万のセリンプロテアーゼで、その至適pHは6.1~6.5、至適温度は55~65°Cであることが明らかになっている。

本研究では、この *B. licheniformis* の生産する酵素を利用した新規食品の開発を目的とし、酵素反応物の基本的性状の把握、および豆乳凝固物を使った植物性アイスクリームの試作を行ったので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 原料

豆乳は(株)のうきょう興産より提供していただいた豆腐製造用の豆乳を使用し、固形分を調整して実験に供した。分離大豆蛋白質(以下SPI)は「アジプロンHP」(旭油脂)を使用した。

##### 2. 豆乳凝固酵素の生産

酵素生産菌 *Bacillus licheniformis* B-6-4 J株の培養には、可溶性でんぷん0.5%、コーンスティープリカー0.5%、リン酸二水素ナトリウム0.5%、水酸化ナトリウム0.1%を含む液体培地を使用した。培養は5L容3連のジャーファーメンターを使用し、各3Lで37°C、200rpm、通気量3L/minで72時間培養した。消泡剤として食品添加用のシリコン(信越シリコン)を使用した。遠心分離によって培養液中の菌体を除去し、80%硫酸で塩

析後、得られた沈殿物を透析して粗酵素液（酵素A）とした。

また、上記と同様の条件で培養した培養液を、膜処理（0.22  $\mu\text{m}$ ）で除菌後に噴霧乾燥したものを、北海道日清(株)より提供していただいた。この乾燥物は、噴霧乾燥に際して食塩を添加している。そのため、酵素反応に先立って、10% (w/v) 水溶液を調製し電気透析による脱塩処理を行った。電気透析装置は Micro Acilyzer G 3（旭化成）、透析用カートリッジは AC 220-400 を使用し、約99%まで脱塩処理したものを実験に供した（酵素B）。

### 3. プロテアーゼ活性の測定

基質として Azocasein (Sigma, 以下 AC) と、*N*-Glutamic acid 1-*p*-nitroanilide (Merck, 以下 Glu-NA) を使用した。AC は 1/30 M リン酸緩衝液 (pH 6.1) に溶解させ、0.1% 溶液とした。この基質溶液 0.5 ml に、酵素液 0.1 ml を加え、60°C で 10 分間反応させた。5% トリクロロ酢酸溶液を 0.1 ml 加え、9000 rpm で 5 分遠心分離し、上清を 0.5 ml とり 1 N 水酸化ナトリウムを 0.1 ml 加えて吸光度 (440 nm) を測定した。Glu-NA は 0.03 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させ、1 mM 溶液とした。この基質溶液 1 ml に酵素液を 25~200  $\mu\text{l}$  添加し、60°C で 30~180 分間反応させ、生成した *p*-Nitroaniline の吸光度 (410 nm) を測定した。

### 4. 豆乳凝固物の調製と物性測定

7.5% (w/v) の SPI 水溶液を調製し、これを 20 ml 容のポリビーカーに 10 ml 入れ、温度、pH、酵素添加量を変化させて反応させた。ゲル強度の測定にはレオメーター (CR-200 D, サン科学) を使用した。貫入速度は 60 mm/min、感圧軸は直径 20 mm のものを使用し、貫入時の荷重を測定した。検体は容器に入れたままで実験に供した。

固形分 10% に調整した豆乳を 50 ml 容遠心管に 40 ml 入れ、酵素あるいはグルコノ- $\delta$ -ラクトン（以下 GDL）を所定の濃度添加し 60°C で 1 時間反応させた。GDL は 10% 水溶液とし、使用する直前に調製した。凝固反応後は冷蔵庫で 30 分冷却し、物性測定に供した。物性測定は上記と同様の条件で行い、20 mm の感圧軸を 15 mm の深さまで貫入させた時の最大荷重を測定した。

### 5. 植物性アイスクリームの調製

固形分 10% に調製した豆乳に、酵素 B を 1% (1.7  $\times$  10<sup>6</sup> AC unit) 添加し、37°C で 4 時間反応させた。生クリームはミルクセパレーター (29 SE 型, 三和工業) を用いて市販の加工用原料乳から分離し、乳脂肪分 40% に調整した。乳脂肪分の測定はマジョニア管を用いるレーゼゴッ

トリーフ法<sup>7)</sup>で行った。豆乳アイスの製造は以下の工程によって行った。豆乳およびその酵素反応物に、糖およびクリームを所定の分量添加し、60°C で加熱しながら溶解させ、アイスミックスとした。その後、ミルクホモジナイザー (15 MR 型, APV) で均質化し、80°C 15 分の加熱殺菌を行った。その後 5°C に冷却し、アイスクリーマー (G-50 型, FMI) でフリージングして豆乳アイスとした。

### 8. 豆乳アイスの評価

豆乳アイスの成分測定は乳製品試験法<sup>7)</sup>に準じて行った。粘度は B 型粘度計を用いて測定した。オーバーラン (OR) は、次式のとおりアイスミックス体積に対するできあがり製品の体積増加量から算出した。

$$\text{OR} = (\text{ICE} - \text{MIX}) / \text{MIX} \times 100$$

OR : アイスクリームのオーバーラン (%)

ICE : アイスクリームの容量 (ml)

MIX : アイスミックスの容量 (ml)

製品の官能検査は「アイスクリームの製造」<sup>8)</sup>中の採点表にしたがい、パネラー 12 人で実施した。

## 実験結果および考察

### 1. 豆乳凝固酵素の酵素力価

*B. licheniformis* B-6-4 J 株由来の豆乳凝固酵素は、ポリグルタミン酸を分解するエンドペプチダーゼであることがわかっている。そこで、基質として AC を使用したプロテアーゼ活性の測定を行った。その結果、反応液 0.5 ml に対して、酵素 A の添加量が 0.05~0.5  $\mu\text{l}$  (0.01~0.1% v/v) の範囲で比例関係が見られ、吸光度が 0.5 以上で吸光度の上昇は頭打ちとなった (図 1)。

つぎに、人工基質である Glu-NA を使用した酵素活性の測定を試みた。1 mM の基質溶液 1 ml に対して、反応時間を 180 分とした場合、酵素 A の添加量が 25~200  $\mu\text{l}$  (2.5~20% v/v) の範囲で比例関係がみられた (図 2)。また、反応時間が 90 分の場合には酵素添加量を 100  $\mu\text{l}$  以上にする必要があり、30 分では酵素添加量を増加しても吸光度はほとんど変化しなかった。

AC および Glu-NA を基質とした活性試験の反応条件を表 1 にまとめた。対照として、豆乳凝固実験 (後述) の条件も併記した。その結果、AC を基質として使用した場合は、豆乳凝固反応よりも少ない酵素量 (1/100~1/10)、および短い反応時間 (1/3) で活性測定が可能であった。これに対し、Glu-NA を基質とした場合には酵素量で 2.5~20 倍、反応時間で 3~6 倍が必要であった。このことは、酵素と Glu-NA の親和性が酵素と AC のそれよりも低いことを示唆しており、以上の結果から、酵素

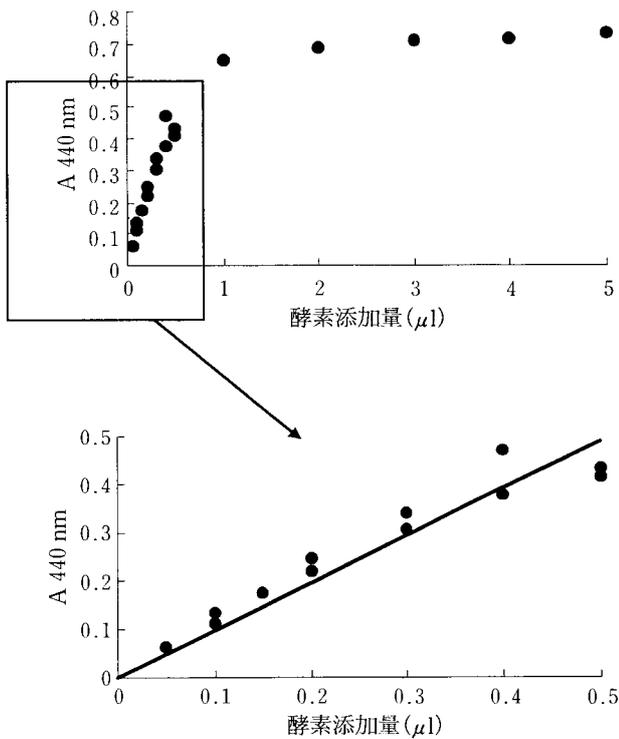


図1 ACを基質とした酵素活性試験

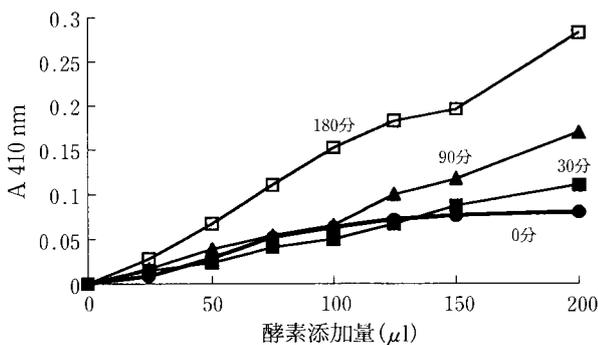


図2 Glu-NAを基質とした酵素活性試験  
反応開始から0分(●), 30分(■), 90分(▲), 180分(□)経過時の吸光度を測定した。

表1 各種酵素活性試験の反応条件の比較

基質	反応液 (ml)	反応時間 (分)	酵素添加量* (μl)	活性の指標
10%豆乳	0.5	30	5**	カード形成***
AC	0.5	10	0.05~0.5	A <sub>440nm</sub>
Glu-NA	1	180	25~250	A <sub>410nm</sub>

\* : 酵素Aを使用。  
 \*\* : 豆乳凝固に要する最小添加量を示す。  
 \*\*\* : 反応液を9,000 rpmで10分遠心し、清澄な上清が得られたものを活性ありとする。

活性測定法としては、ACを基質とした方法が適当であった。

豆乳凝固酵素の酵素力価を決定するため、市販トリプシン(ブタ膵臓, 15,600 BAEE unit/mg, 和光純薬)を使用し、ACを基質とした活性試験を行った。その結果、トリプシン1 BAEE unitで0.0136の吸光度変化が見られた。これを酵素力価の基準とし、A 440 nmを0.0136変化させる量を1 AC unitと定義した。その結果、酵素Aの活性は7,200 AC unit/ml, また豆乳凝固反応に要する酵素量は、豆乳1 mlに対し72 AC unitとなった。同様に北海道日清製の酵素粉末の活性を測定したところ、 $1.72 \times 10^5$  AC unit/gであった。この酵素粉末より10%水溶液を調製して脱塩処理を行い、その前後での酵素活性の変化を調べたが、脱塩処理による活性の低下は認められなかった。

2. 酵素反応による豆乳凝固物の物性

7.5% (w/v) SPI溶液10 mlに対する酵素の添加量と凝固物の物性を表2に示した。酵素Aを使用したところ、SPIの凝固には1% (72 AC unit/ml)以上の酵素添加が必要であり、酵素添加量を増やしても物性への影響はほとんど認められなかった。

SPI溶液のpHと凝固物の物性の関係を表3に示した。本酵素の至適pHは6.1~6.5であるが、これより低いpHにすることでより強度の高いゲルが形成された。

本酵素とGDLとの併用効果について検討した(図3)。豆乳は固形分を10%に調整して使用した。酵素添加量を0~1% (0~ $1.8 \times 10^3$  AC unit/ml), GDL添加量は0~0.3%とした。それぞれ単独で処理した場合、GDLは添加量0.1%以下、酵素は添加量0.1% ( $1.8 \times 10^2$  AC unit/ml)以下では、豆乳を凝固させることはできなかった。しかし、GDLと酵素をそれぞれ0.1%ずつ同時に添加した場合には豆乳の凝固が観測され、酵素0.2~0.6%添加に相当する強度のゲルが形成した。GDLは豆乳中で

表2 酵素添加量と豆乳凝固物の物性

酵素添加量 (%) (AC unit/ml)	0.5	1.0	1.5	2.0
	36	72	108	144
ゲル強度 (g)	—*	14	15	15

\* : ゲルを形成しなかった。

表3 酵素反応時のpHと豆乳凝固物の物性

pH	5.5	6.0	6.5	7.0
ゲル強度 (g)	49	28	23	—*

\* : ゲルを形成しなかった。

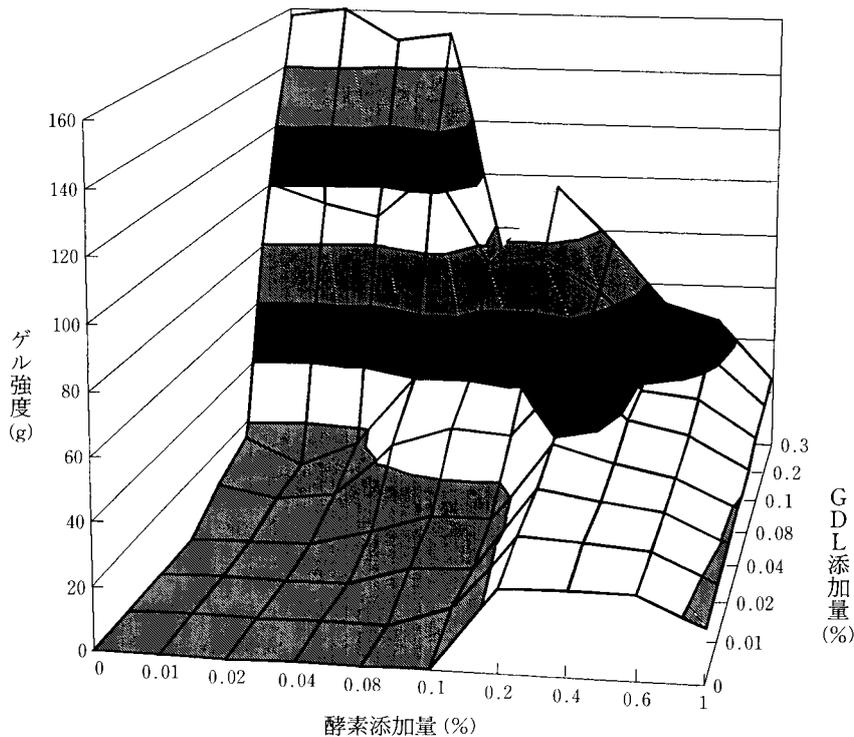


図3 GDLと酵素の併用による凝固物の物性

グルコン酸に分解することにより徐々にpHを低下させ、豆乳全体を凝固させる作用がある。この結果は、GDLによるpHの低下と酵素反応の併用が相補的に作用した結果であると考えられる。これに対し、GDL添加量を0.2%以上にした場合、酵素添加量を増加させることによりゲル強度は低下した。これは、酵素反応による大豆蛋白質の断片化が、GDLの作る強固なゲル形成作用を相殺した結果と考えられる。また、GDL添加量が0.1%の場合には、酵素添加によりゲル強度が徐々に上昇し、0.2%添加 ( $3.6 \times 10^2$  AC unit/ml) を境にしてゲル強度は徐々に低下した。この結果から、酵素とGDLの併用は、GDLのゲル形成能の弱い領域では相補的に働き、GDLのゲル形成能の強い領域では相殺しあうことが明らかとなった。

### 3. 豆乳凝固物を利用したアイスクリームの製造

乳脂肪分10%、糖分10%に調節したアイスミックスを用いて、豆乳と豆乳凝固物の比較を行った。アイスミックスの粘度はアイスクリームの組織やオーバーランに大きく影響する要因のひとつで、通常100~500 mPa・sの粘度が要求されている。豆乳ではアイスミックスの粘度が27 mPa・sと低く、オーバーランが十分にかからなかったのに対し、豆乳凝固物では240 mPa・sと適度な粘度が得られ、オーバーランも約30%と良好であった(表

表4 原料、均質化処理によるアイスクリーム物性の変化

原料	均質化圧 (kg/cm <sup>2</sup> )	粘度 (mPa・s)	オーバーラン (%)
豆乳	—	27	2
豆乳凝固物	—	240	29
↓	50	290	28
↓	100	270	27
↓	150	310	30
↓	200	260	22

糖分10%、クリーム10%に調製した

4)。また、多少組織のざらつきがあったものの、大豆フレーバーが残り風味の良好な製品であった。アイスクリームの製造では糖類や脱脂粉乳などを添加することでアイスミックスの全固形分を増加させ、適正な粘度に上昇させる方法がとられるが、この場合、風味の調整が難しくなることがある。この点、豆乳凝固物を利用した場合、余分な添加物を使用せずに良好な粘度が得られたため、豆乳の風味を活かした製品作りが可能と考えられた。

豆乳凝固物を用いて調合したアイスミックスは粘性が高く、ざらつき感があり、均質性を欠く性状であった。この点を改善するために、ミルクホモゲナイザーによる均質化条件を検討した。アイスミックスをミルクホモゲ



図4 均質化処理によるアイスミックスの組成

ナイザーで均質化 (100 kg/cm<sup>2</sup>) することにより、タンパク質や脂肪球の粒子を微細化し、なめらかな性状にすることができた(図4)。均質化の圧力を50~200 kg/cm<sup>2</sup>で変化させてもアイスミックスの粘度、オーバーランには大きな差は認められなかった(表4)。このことから、豆乳凝固物を用いたアイスクリーム作りには均質化工程が必要で、均質化の圧力は50~200 kg/cm<sup>2</sup>の任意でよいと考えられた。

乳脂肪分がアイスクリームの組織、風味にどのように影響するかを検討するために、糖分10%に調節し、乳脂肪分を変化させたアイスクリームの試作を行った。乳脂肪分を増加させることはアイスクリームの全固形分を増加させることになり、アイスクリームのオーバーランを増加させる効果があった(表5)。乳脂肪分0%、5%で

表5 乳脂肪分添加によるアイスクリームの性状変化

乳脂肪分 (%)	全固形分 (%)	オーバーラン (%)
0	21.6	12
5	25.9	13
10	30.4	29

はオーバーランも不十分で、氷結晶を生成した icy な組織であり、大豆臭も強かった(表6)。これに対し、脂肪分10%ではオーバーランも29%となり、組織が均一でなめらかな製品となり、風味も歩留まりも良好であった(表5, 6)。

要 約

固形分10%の豆乳に対して *Bacillus licheniformis* B-6-4 J 株の生産する豆乳凝固酵素を作用させ、得られた凝固物について検討を行い、以下の結果を得た。

豆乳凝固酵素の活性測定法には Azocasein を基質とした方法が適当であり、酵素力価既知のトリプシンを基準として酵素活性を定義することができた。

豆乳の凝固反応には 72 AC unit/ml 以上の酵素添加が必要で、酵素を過剰に加えて反応させても、凝固物の物性は変わらなかった。また、酵素の最適 pH よりも pH を低くすると、より強度の高いゲルが得られた。

機構の異なるゲル化剤であるグルコノ-δ-ラクトン (GDL) との併用試験を行ったところ、GDL 添加量の多い領域では酵素添加によりゲル強度の低下が見られたが、GDL 添加量の少ない領域では酵素添加によってゲル強度は上昇した。

豆乳凝固物を原料として豆乳アイスの製造を行ったところ、豆乳を原料とした場合と比べて、アイスミックスの粘度が高く、オーバーランも良好であった。均質化処理、乳脂肪の添加量を検討することにより、適度に大豆の風味を残した豆乳アイスの製造が可能であった。

本研究は中小企業庁の技術開発研究費補助事業による共同研究として実施したものである。

文 献

1) 福家洋子・松岡博厚：日食工誌, 27, 275 (1980).

表6 アイスクリームの官能試験

乳脂肪分 (%)	採点	ボディと組織 (30点満点)		採点	風味 (45点満点)	
		coarse, icy	crumbly		too high flavor	cooked
0	5	*****	*****	26	*****	***
5	24	****		35	*	
10	28			40		

\* : 欠陥として指摘したパネラー数  
 coarse : 粗い  
 icy : 氷っぽい  
 crumbly : 砕けやすい  
 too high flavor : 過剰なフレーバー  
 cooked : 加熱臭

- 2) Fuke, Y., Sekiguchi, M., Matsuoka, H.: *J. Food Sci.*, **49**, 312, (1984).
- 3) 松岡博厚・関口正勝：日食工誌, **39**, 316 (1992).
- 4) 鎌田慶朗ら：日食工誌, **38**, 1143 (1991).
- 5) 松岡博厚：日食工誌, **42**, 945 (1995).
- 6) 大庭潔ら：日本農芸化学会 昭和 61 年度大会要旨集, 518 (1986).
- 7) 日本薬学会編, 乳製品試験法・注解, 金原書版.
- 8) 湯山荘平監修：アイスクリームの製造, 光琳.