

凍結融解プロセスに基づく  
豆乳タンパク質の新規分画技術開発

2016年1月

守田和弘

凍結融解プロセスに基づく  
豆乳タンパク質の新規分画技術開発

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
国際地縁技術開発科学専攻  
博士（農学）学位論文

守田和弘

# 目 次

第 1 章 緒言 .....	1
1.1 研究の背景 .....	1
1.2 大豆タンパク質分画に関する従来の研究 .....	2
1.3 豆乳の凍結融解処理 .....	3
1.4 研究の目的 .....	3
第 2 章 凍結融解処理による豆乳中タンパク質の分離技術の開発 .....	5
2.1 材料および方法 .....	5
2.1.1 豆乳の調製 .....	5
2.1.2 凍結融解処理による豆乳の分離方法 .....	5
2.1.3 豆乳の化学成分分析 .....	6
2.1.4 豆腐の調製 .....	6
2.1.5 豆腐調製における適正 $\text{CaCl}_2$ 濃度の検討 .....	6
2.1.6 豆腐の破断応力の測定 .....	7
2.2 結果および考察 .....	8
2.2.1 凍結融解処理により 2 層分離した生豆乳の性状および タンパク質組成 .....	8
2.2.2 凍結融解後生豆乳より分離した上層および下層（分離生豆乳）を 用いて調製した豆腐の物性評価 .....	10
2.3 小括 .....	11

<b>第 3 章 凍結融解処理による豆乳中タンパク質の分離メカニズムの 解明</b> .....	19
3.1 材料および方法 .....	19
3.1.1 豆乳の調製 .....	19
3.1.2 豆乳の凍結融解処理 .....	19
3.1.3 豆乳の粒度分布の測定 .....	20
3.1.4 タンパク質の分析 .....	20
3.1.5 脱脂豆乳の調製 .....	20
3.1.6 豆乳の凍結融解分離における S-S 結合および疎水性相互作用の 評価 .....	20
3.2 結果および考察 .....	21
3.2.1 生豆乳および凍結融解後生豆乳より分離した上層、下層の 粒度分布 .....	21
3.2.2 豆乳の凍結融解分離における脂質の影響 .....	21
3.2.3 凍結融解分離における豆乳中の 11S/7S 比の影響 .....	22
3.2.4 豆乳の凍結融解分離における亜硫酸ナトリウムと SDS の 影響 .....	23
3.2.5 凍結融解による豆乳中 7S、11S の分離メカニズム .....	23
3.3 小括 .....	25
<b>第 4 章 凍結融解分離豆乳の食品への応用</b> .....	34
4.1 材料および方法 .....	34
4.1.1 豆乳の調製 .....	34
4.1.2 凍結融解処理による豆乳の分離方法 .....	34

4.1.3	新規デザート様製品の開発	34
4.1.4	上層凝固における適正ユズ果汁濃度の検討	35
4.1.5	新規デザート様製品の官能評価	35
4.1.6	新規デザート様製品の破断応力の測定	35
4.2	結果および考察	37
4.2.1	凍結融解分離技術によって得られた上層を用いた 新規デザート様製品の開発	37
4.2.2	上層を用いた新規デザート様製品の官能評価および テクスチャー特性	38
4.3	小括	39

## 第5章 凍結融解処理が豆乳の物理化学特性と豆腐品質に及ぼす 影響

5.1	材料および方法	44
5.1.1	豆乳の調製	44
5.1.2	豆乳の凍結融解処理	45
5.1.3	豆乳の物理化学特性の評価	45
5.1.4	豆腐の調製と物性評価	45
5.1.5	豆腐の官能評価	46
5.1.6	微生物検査	46
5.1.7	統計処理	46
5.2	結果および考察	47
5.2.1	凍結融解した豆乳の物理化学特性	47
5.2.2	豆腐の破断応力と官能評価	48

5.2.3 凍結保存が豆乳中の生菌数に及ぼす影響 .....	49
5.3 小括 .....	49
第 6 章 総括 .....	56
参考文献 .....	60
謝辞 .....	66
付記 .....	67

# 第 1 章 緒言

## 1.1 研究の背景

大豆は我が国において、主食の米を補完する重要な食物として利用されてきた。大豆は植物でありながらタンパク質を多量に含むばかりでなく、米の制限アミノ酸であるリジンを豊富に含むことから、健康との関わりにおいて重要な食品として定着してきた。近年においては、食生活の多様化から健康食品への関心が高まっており、大豆はイソフラボン（更年期障害改善、骨粗鬆症予防効果）、サポニン（肝臓障害抑制、抗高脂血症）、レシチン（脂質代謝調節機能、認知症予防効果）など機能性成分を豊富に含むことから（谷坂ら, 2010）、健康食品としても注目されている。最近の研究では、大豆タンパク質に血清コレステロール低下作用が認められており（菅野, 1998）、さらに貯蔵タンパク質を構成する主要成分 $\beta$ -コングリシニンには血液中の中性脂肪を低減する効果が認められている（Kohno *et al.*, 2006; 河野・廣塚, 2008）。

一方、我が国の平成 25 年度における大豆需要量は約 301 万 t となっており（表 1-1）、油糧用に約 190 万 t（63%）、食品用に約 94 万 t（31%）、その他（飼料、種子等）に約 17 万 t（6%）利用されている（農林水産省, 2015）。このうち、国産大豆は約 19 万 t（自給率 7%）で、国産大豆はほぼ全量が食品用に利用されている。近年の需要は、油糧用、食品用ともに減少傾向となっており、油糧用については、大豆の国際価格の高騰により菜種油に移行したこと、食品用については、用途が豆腐や煮豆などに限定されていることが要因として挙げられる。このような背景を受け、農林水産省では、大豆の需要拡大、自給率向上を目的とした加工面における課題として、国産大豆の特

徴を引き出した製品開発等による需要開拓を挙げている（農林水産省，2010）。

大豆は約 35%のタンパク質を含有し、そのうち約 70%は主要な種子貯蔵タンパク質である 7S グロブリン（主成分； $\beta$ -コングリシニン、以下 7S）および 11S グロブリン（主成分；グリシニン、以下 11S）によって占められている（渡辺ら，1971）。この両タンパク質は、粘性、凝固特性、界面活性等の物理化学的性質が異なることが多くの研究から知られており（小野，2008；谷坂ら，2010）、例えば 7S を多く含む豆乳は凝固させると柔らかく、11S を多く含む豆乳は硬くなる性質があるとされている（Saio *et al.*, 1969；Kohyama *et al.*, 1995；Ji *et al.*, 1999；Yagasaki *et al.*, 2000；Guo and Ono, 2005）。そのため、これら 7S、11S を分離して食品加工に利用することができれば、原材料の配合のみで機能性成分や食品の物性をある程度制御できる可能性があり、新製品の開発等につながることを期待される。

## 1.2 大豆タンパク質分画に関する従来の研究

これまで、7S、11S の分離に関して、両タンパク質の等電点、pH、イオン強度、温度による溶解性の違い等を利用した分離法が報告されている。pH 調整と遠心操作による分離法（Thanh and Shibasaki, 1976；Iwabuchi and Yamauchi, 1987；Samoto *et al.*, 2007）、還元剤の添加と冷却操作による分離法（Nagano *et al.*, 1992；Wu *et al.*, 1999；Wu *et al.*, 2000）、フィターゼの添加による分離法（Saito *et al.*, 2001）などである。しかしながら、これらの方法は、いずれも操作が複雑で生産コストも高価であることから、食品製造現場への応用においては設備費や運転コストが大きな問題となり、依然実用化は困難な状況となっている。



### 1.3 豆乳の凍結融解処理

タンパク質は加熱した場合と同様に、冷却や凍結によっても変性することが知られている（後藤, 2002）。これまで、豆乳の凍結融解処理に関する研究では、加熱した豆乳は、凍結融解すると白いもやもやした塊状の沈殿物を生成し、豆乳全体が緩く凝固することが報告されている（下山田, 2003）。この凝固物は、凍結時にタンパク質が濃縮され、タンパク質同士が相互作用することによって生成すると考えられている。また、この凝固物は、豆腐とは異なるソフトで独特なテクスチャーを有することから、食品への利用用途としてハムなどに添加する可能性について議論されている（橋詰, 1979）。

一方、豆乳は通常、あらかじめ加熱した（加熱変性した）後、飲用あるいは豆腐製造等に使用されるため、加熱されていない生豆乳を扱った研究例は極めて少ない。そのため、生豆乳の凍結融解に関する知見は皆無であり、生豆乳の凍結融解について検討することは、大豆の新素材や新規用途の開発につながることを期待される。

### 1.4 研究の目的

以上の背景より、本研究では大豆の機能性成分を活かした新素材、新規加工用途の開発による需要拡大を目指し、凍結融解処理に基づく豆乳中タンパク質の簡易分離技術の開発とその分離メカニズムの解明を目的とした。さらに、凍結融解処理によって得られる分離豆乳の食品への応用、凍結融解処理が豆乳および豆腐の品質に及ぼす影響についての解析を行い、生豆乳の凍結融解処理による大豆の新規用途開発に関わる総合的考察を行い、関連する諸特性の解明を図った。

表 1-1 我が国における大豆の需要状況（農林水産省，2015）.

（単位：千t）

	需要量			自給率
		うち食品用	うち国産	
平成20年度	4,034	1,037	255	6%
平成21年度	3,668	993	223	6%
平成22年度	3,642	976	216	6%
平成23年度	3,187	949	212	7%
平成24年度	3,037	932	229	8%
平成25年度	3,012	936	194	7%

## 第 2 章 凍結融解処理による豆乳中タンパク質の分離技術の開発

筆者は、大豆の新素材開発を目的として、豆乳に対して種々の凍結融解処理を試みたところ、生豆乳を凍結融解することにより豆乳が 2 層に分離することを見出した。この 2 層について成分分析を行い、その詳細を明らかにした。

### 2.1 材料および方法

#### 2.1.1 豆乳の調製

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill、エンレイ) に 5 倍量の蒸留水を加え、20℃で 16 時間浸漬後、浸漬水を捨て、蒸留水を大豆の乾燥重量の 6 倍量加えた。これをミキサー (KM-230、愛工舎製、設定メモリ 5) で 2 分間磨砕した後、ガーゼで濾過し生豆乳とした。

#### 2.1.2 凍結融解処理による豆乳の分離方法

生豆乳約 250 mL を密封袋 (ヒストパック、フアルマ製) に移して -30℃で 7 日間凍結し、10℃で 24 時間融解した。ここで 2 層に分離している豆乳の上清部分を上層、沈殿部分を下層とし、デカンテーションにより分離を行った。なお、凍結時には豆乳の中央部に温度センサー (おんどとり Jr. TR-52S、T and D 製) を設置し、温度のモニタリングを行った。

### 2.1.3 豆乳の化学成分分析

豆乳中のタンパク質は、試料の全窒素量をケルダール法（財団法人日本食品分析センター編，2001）を用いて定量し、窒素-タンパク質換算係数 6.25 を乗じて算出した。脂質は、クロロホルム-メタノール混液抽出法（財団法人日本食品分析センター編，2001）により定量した。タンパク質組成は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）（Laemmli, 1970）によってタンパク質を分離し、クマシーブリリアントブルー R250（CBB-R250）を用いて染色した。染色したゲルについて、画像解析ソフト（Scion image, Scion Co.）を用いて解析を行った（Onodera *et al.*, 2009）。なお、7S は  $\alpha'$ 、 $\alpha$  および  $\beta$ 、11S については acidic および basic の各バンドを数値化して相対値を求めた。

### 2.1.4 豆腐の調製

生豆乳に消泡剤（KM-72F、信越シリコーン製）を 1～2 滴加え、タンパク質濃度 3.8% となるよう蒸留水で調整した。これをオイルバス中（99% グリセリン）で 95℃ まで昇温させ、さらに 95℃ で 2 分間保持した（加熱豆乳）。その後冷水中に 30 分間保ち、所定濃度の塩化カルシウム（CaCl<sub>2</sub>）を加えて攪拌後 30 mL ビーカーに分注し、80℃ の水槽で 1 時間加熱した後、20℃ で 2 時間冷却した。

### 2.1.5 豆腐調製における適正 CaCl<sub>2</sub> 濃度の検討

加熱豆乳 4.5 mL を 10 mL 容試験管に分注し、所定濃度の CaCl<sub>2</sub> 溶液 0.5 mL を加えて混和後、70℃ で 30 分間加熱し、20℃ で 30 分間冷却した。これ

を  $3\,000\times g$  で 10 分間遠心分離し、上清を回収して湿重量を測定し、全体の重量に対する上清の割合を液体率とした。この液体率が最小となる  $\text{CaCl}_2$  濃度を、適正  $\text{CaCl}_2$  濃度とした。

#### 2.1.6 豆腐の破断応力の測定

豆腐を円柱型ステンレス容器（直径 23 mm、高さ 25 mm）に凝固させ、高さ 20 mm に調整して測定に供試した。一軸圧縮試験機（レオナー RE-33005、山電製）を用い、測定には直径 30 mm のプランジャーを装着し、圧縮速度 1.0 mm/s で一軸圧縮を行い、試料の高さの 70%（w/w）まで圧縮した。

## 2.2 結果および考察

### 2.2.1 凍結融解処理により 2 層分離した生豆乳の性状およびタンパク質組成

図 2-1 に、生豆乳約 250 mL を密封袋に移して $-30^{\circ}\text{C}$ に保持した場合の時間に対する温度の曲線を示した。その結果、最大氷結晶生成帯 ( $0\sim-5^{\circ}\text{C}$ ) を約 3 時間半で通過した。図 2-2 に、凍結前に  $95^{\circ}\text{C}$  で 2 分間加熱した豆乳 (以下、加熱豆乳) と生豆乳の凍結融解後の様子を示した。加熱豆乳では白いもやもやした塊状の沈殿物を生成し、明瞭な境界を伴う分離が認められなかった一方、生豆乳では、明確に 2 層 (以下、上層および下層) に分離した。凍結融解後の生豆乳は、2 層の境界が明瞭であることから、デカンテーションにより容易に分別が可能であった。その分離重量比は、上層 : 下層 = 62 : 38 で、およそ 3 : 2 であった (表 2-1)。タンパク質濃度は、上層 3.8%、下層 10.1% と下層が上層の約 2.5 倍高かった。また、脂質は上層 0.3%、下層 9.9% とそのほとんどが下層に含まれていた。なお、凍結融解処理を行わない生豆乳では、 $10^{\circ}\text{C}$  で 24 時間静置しても 2 層分離は認められなかった。

図 2-3 に、凍結融解後生豆乳より分離した上層、下層の SDS-PAGE パターンを示した。大豆タンパク質は 7S、11S とともに数種のサブユニットが多種の多量体を構成するため、多様な分子種が存在することが分子生物学的解析を含めた最近の研究から明らかとなっている (谷坂ら, 2010)。SDS-PAGE 解析では、7S は  $\alpha'$  (Mr, 72,000)、 $\alpha$  (Mr, 68,000)、 $\beta$  (Mr, 52,000) の 3 種のサブユニットに分離し、11S はそれぞれ複数のサブユニットから成る酸性ポリペプチド (acidic; Mr, 37,000) と塩基性ポリペプチド (basic; Mr, 20,000) に分かれることが知られている (Fontes *et al.*, 1984; Guo *et al.*, 1997)。生豆乳タンパク質の分離パターンは、これらの報告にほぼ一致した

(図 2-3、レーン 2)。分離した生豆乳の SDS-PAGE パターンを比較すると、上層では 7S のバンド、下層では 11S のバンドが濃くあらわれた。7S ( $\alpha'$ 、 $\alpha$  および  $\beta$ ) と 11S (acidic および basic) のバンドを対象に、相対強度をデンストグラム解析により定量化し、11S/7S 比を算出したところ、上層は 0.14 で 11S に比べ著しく 7S が多かったが、下層は 1.70 で逆に 11S が多いことが明らかとなった(表 2-2)。生豆乳の 11S/7S 比は 0.92 であったことから、凍結融解処理により豆乳中の 7S、11S が上層と下層に粗く分画できることが明らかとなった。

これまで、豆乳の凍結融解処理に関して、加熱豆乳では凍結融解後に不溶性成分が顕著に増加し、豆乳全体が緩く凝固することが報じられている(渡辺ら, 1963; Shimoyamada *et al.*, 1999)。この不溶性成分の増加は、豆乳タンパク質中の SH 基が凍結の進行により不凍水中に濃縮され、新たな S-S 結合が生成することが要因の一つとして挙げられている(橋詰, 1979; 下山田, 2003)。本研究においても、加熱豆乳では凍結融解後に全体が緩く凝固することを確認した。一方、生豆乳では凍結融解処理により 2 層分離現象が確認された。生豆乳中では、タンパク質や脂質がタンパク質-脂質複合体(Ono *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1997)として粒子を形成して存在し、この粒子には 11S が多く含まれることが報じられている(Ono *et al.*, 1991)。本研究において形成された下層部分は、凍結融解処理によりこの複合体が多数集合、凝集して形成された可能性や、複合体のサイズが増大した可能性が考えられる。また、11S は 7S に比べシスチン含量が多く(橋詰, 1979)、凍結濃縮により分子間 S-S 結合が増大しやすいものと推定される。これに対し、7S は糖鎖を持ったタンパク質であり(森田, 2000; 谷坂ら, 2010)、11S に比べ親水性が高

いため、凍結時に不凍水に守られることでタンパク質間の距離が 11S よりも接近しにくく、凍結融解後も不溶化し難いと考えられる。さらに、7S は 11S に比べシスチン含量が少ないことや、11S に比べ豆乳中での粒子形成が少なく、多くが可溶性分画に存在している（小野，2008）ことも不溶化し難い要因と推察される。

### 2.2.2 凍結融解後生豆乳より分離した上層および下層（分離生豆乳）を用いて調製した豆腐の物性評価

分離生豆乳の性質を評価するため、絹ごし豆腐様の豆腐を試作し、破断応力を指標としてその物性を評価した。タンパク質濃度 3.8% に調整した分離生豆乳の凝固のための適正  $\text{CaCl}_2$  濃度は、上層では 13 mM、下層では 6 mM であり、調製した豆腐の破断応力は、上層は 1.4 kPa、下層は 3.8 kPa であった。上層から調製した豆腐のテクスチャーは柔らかく滑らかであり、下層から調製した豆腐は硬く弾力があつた（図 2-4）。さらに、上層と下層をそれぞれタンパク質濃度 3.8% に調整した上で、重量比 6 : 0、5 : 1、4 : 2、3 : 3、2 : 4、1 : 5、0 : 6 の 7 段階で混合したものについて、適正  $\text{CaCl}_2$  濃度を検討して豆腐を調製し、破断応力を測定した（図 2-5）。その結果、下層が多くなるほど適正  $\text{CaCl}_2$  濃度は低くなり、破断応力は高くなることが示された。この結果は、7S、11S の特徴、すなわち 7S を多く含む豆乳は凝固が緩慢で柔らかく、11S を多く含む豆乳は低濃度の凝固剤で凝固しやすく、硬くなる（Saio *et al.*, 1969; Kohyama *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1999; Yagasaki *et al.*, 2000; Guo and Ono, 2005）との報告に一致していた。

これらの結果、生豆乳の凍結融解処理後の上層には 7S、下層には 11S が



多量に含まれ、凝固性・物性面においてもそれぞれの特徴を示すことが明らかとなった。また、上層と下層を適当な比率で混合することにより、豆腐の物性を調整できる可能性が示された。なお、豆乳加工業者が製造した生豆乳についても、凍結融解処理により 2 層分離現象が確認されたことから、本法による 7S と 11S の分離は、製造現場において十分に実用性を有すると考えられた。

### 2.3 小括

凍結融解を用いて豆乳中の 7S と 11S を簡易に粗分画する技術を開発した。生豆乳を  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結し、 $10^{\circ}\text{C}$  で 24 時間融解した。凍結融解処理した豆乳は 2 層に分かれ、その分離重量比は上層：下層 = 3：2 であった。SDS-PAGE 解析の結果、11S/7S 比は上層では 0.14 であったが、下層では 1.70 であった。上層と下層を種々の割合で混合し、豆腐を試作して破断応力を調べたところ、下層の割合が増えるにつれ、破断応力は高まった。これらの結果、簡易で実用的な凍結融解処理により、豆乳中の 7S と 11S が粗分画でき、この方法が大豆の新規用途開発につながることを示唆された。

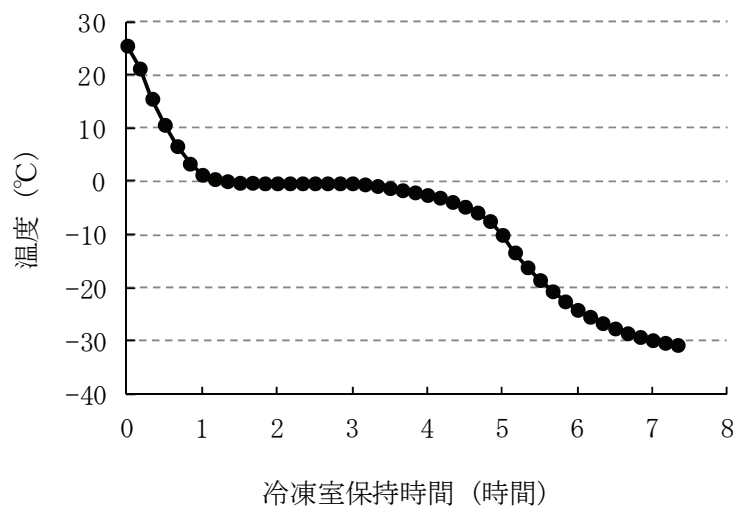


図 2-1 生豆乳の凍結曲線.

生豆乳約 250 mL を密封袋に移し冷凍室 (-30°C) に保持.



図 2-2 加熱豆乳と生豆乳の凍結融解後の写真.

左：加熱豆乳，右：生豆乳.

表 2-1 凍結融解処理により生豆乳より分離した上層，下層の重量比，タンパク質および脂質濃度.

	重量比 (%)	タンパク質 (%)	脂質 (%)
上層	62.3 ± 0.1	3.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0
下層	37.7 ± 0.1	10.1 ± 0.0	9.9 ± 0.1

重量比は凍結前の生豆乳に対する分離後の比率. 平均値±標準誤差 ( $n=3$ ).

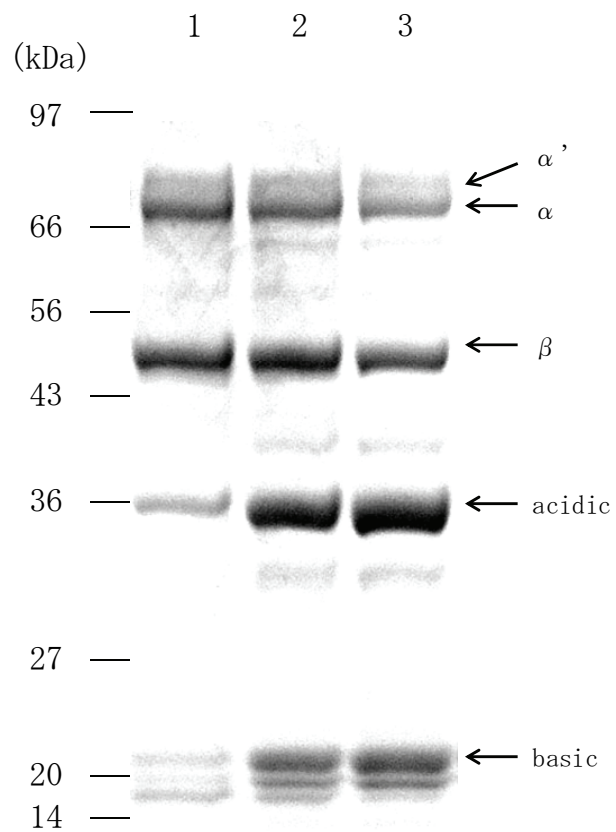


図 2-3 凍結融解処理により生豆乳より分離した上層および下層の SDS-PAGE パターン.

レーン 1: 上層, 2: 生豆乳, 3: 下層.  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  は  $\beta$ -コングリシニンのサブユニット, acidic, basic はグリシニンの構成ポリペプチドを示す.

表 2-2 凍結融解処理により生豆乳より分離した上層，下層の 7S，11S タンパク質相対比.

	7S		11S		11S/7S比
上層	88.0	± 1.6	12.0	± 1.6	0.14
下層	37.0	± 0.8	63.0	± 0.8	1.70
生豆乳	52.2	± 2.6	47.8	± 2.6	0.92

タンパク質組成は SDS-PAGE によるゲルをデンシトグラム解析し，7S については  $\alpha'$ ， $\alpha$  および  $\beta$ ，11S については **acidic** および **basic** の各タンパク質ピークの積算値により定量したパーセントを示す．平均値 ± 標準誤差 ( $n=3$ )．

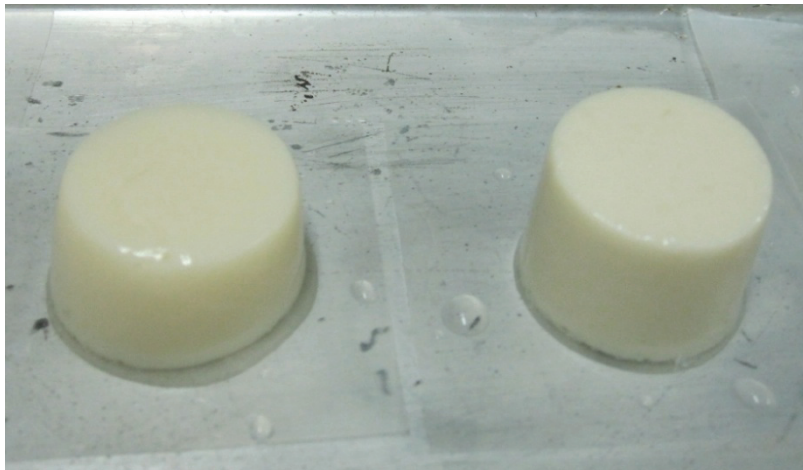


図 2-4 分離生豆乳から調製した豆腐の写真.

左：上層から調製した豆腐，右：下層から調製した豆腐.

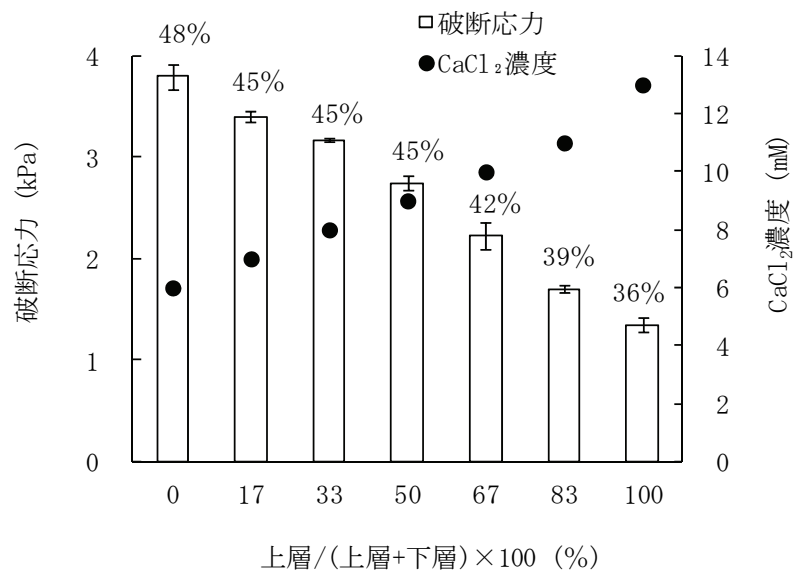


図 2-5 凍結融解処理により生豆乳より分離した上層と下層の混合比を変えて適正 CaCl<sub>2</sub>濃度で調製した豆腐の破断応力.

図中の数値 (%) は破断ひずみ. 縦棒は標準誤差 (n=3).

CaCl<sub>2</sub>濃度は各上層下層混合豆乳の適正 CaCl<sub>2</sub>濃度.



## 第 3 章 凍結融解処理による豆乳中タンパク質の分離メカニズムの解明

第 2 章では、生豆乳に凍結融解処理を行うことで、豆乳中の 7S、11S を簡易に分離する技術を開発した。本章では、これらタンパク質の凍結融解による分離メカニズムの解明を試みた。

### 3.1 材料および方法

#### 3.1.1 豆乳の調製

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill、エンレイ) に 5 倍量の蒸留水を加え、20℃ で 16 時間浸漬後、浸漬水を捨て、蒸留水を大豆の乾燥重量の 6 倍量加えた。これをミキサーで磨砕した後、脱脂綿で濾過し生豆乳とした。

さらに、11S/7S 比の異なる豆乳を調製するため、グリシニンの全サブユニットを欠損した大豆品種「ななほまれ」(矢ヶ崎ら, 2010)、および  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ 、 $\alpha'$ サブユニットを欠損した大豆品種「東山 226 号」を供試し(両品種とも長野県野菜花き試験場より供与)、それぞれ同様の操作で生豆乳を調製した。

#### 3.1.2 豆乳の凍結融解処理

生豆乳 40 mL を 50 mL 容プラスチックチューブに分注し、-30℃ で 7 日間凍結後、10℃ で 24 時間融解した。

### 3.1.3 豆乳の粒度分布の測定

豆乳の粒度分布は、レーザー回折式粒度分布測定装置（SALD-2100、島津製作所製）を用いて測定した。

### 3.1.4 タンパク質の分析

豆乳中のタンパク質組成は、SDS-PAGE（Laemmli, 1970）によってタンパク質を分離し、CBB-R250を用いて染色した。染色したゲルについて、画像解析ソフト（CS Analyser 3.0、ATTO製）を用いて解析を行った。

### 3.1.5 脱脂豆乳の調製

大豆を遠心粉碎機（ $\phi$  0.5 mm スクリーン）で粉碎し、ジエチルエーテルに 20℃で 16 時間浸漬した。浸漬後濾過し、残渣を蒸留水で洗浄し、乾燥を行った。この脱脂操作により大豆粉の脂質含量は 3.6 g/100g となった（脱脂前の大豆脂質含量; 23.6 g/100g)。この脱脂大豆粉について、乾燥重量の 6 倍量の蒸留水を加えて 20℃で 16 時間浸漬し、ミキサーで磨砕した後、脱脂綿で濾過し脱脂生豆乳とした。

### 3.1.6 豆乳の凍結融解分離における S-S 結合および疎水性相互作用の評価

豆乳の凍結融解分離における S-S 結合および疎水性相互作用の影響を評価するため、亜硫酸ナトリウムまたはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を凍結前の生豆乳に添加し、凍結融解処理を行った。添加濃度は、豆乳中の終濃度で 0%（対照）、0.1%、0.5%、1%、2%とした。

## 3.2 結果および考察

### 3.2.1 生豆乳および凍結融解後生豆乳より分離した上層、下層の粒度分布

生豆乳および凍結融解後生豆乳より分離した上層、下層の粒度分布を測定した（図 3-1）。生豆乳中の粒子は 0.3~20  $\mu\text{m}$  に分布し、最頻値は 3  $\mu\text{m}$  であった。上層の粒子は 0.3~20  $\mu\text{m}$  に分布し、最頻値は 2  $\mu\text{m}$  で凍結前の生豆乳に近い値を示した一方、下層の粒子は 0.3~200  $\mu\text{m}$  に広く分布し、最頻値は 10  $\mu\text{m}$  であった。この結果、凍結融解により生豆乳中の粒子サイズが増大することで、沈殿（下層）を形成したものと推察された。

加熱豆乳では、凍結融解により豆乳全体が凝固することが知られており（橋詰, 1979; Shimoyamada *et al.*, 1999）、その要因として凍結濃縮によるタンパク質間 S-S 結合や疎水性相互作用の影響が指摘されている（Shimoyamada *et al.*, 2000）。すなわち、生豆乳中でも加熱豆乳と同様に凍結濃縮によってタンパク質間相互作用が促進された可能性が考えられる。また、生豆乳中では、タンパク質と脂質がタンパク質-脂質複合体としてエマルジョンを形成して存在していることから（Ono *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1997）、凍結濃縮によってエマルジョン表面のタンパク質同士の結合が促進された結果、粒子サイズが増大したものと考えられた。

### 3.2.2 豆乳の凍結融解分離における脂質の影響

本分離現象における、生豆乳中のエマルジョン形成の影響を明らかにするため、脱脂生豆乳を用いて凍結融解処理を行った。その結果、脱脂生豆乳を用いた場合でも、生豆乳と同様に 2 層分離が確認された（図 3-2）。SDS-PAGE 解析の結果、11S/7S 比は上層で 0.18、下層で 1.91 であった（図 3-3）。すな

わち、これらの値は凍結融解後生豆乳から分離した上層、下層の 11S/7S 比と同等であった（表 2-2）。この結果、脂質（エマルジョン形成）は凍結融解処理による沈殿形成に必ずしも必要ではなく、沈殿形成は主にタンパク質間における相互作用の影響によるものと推察された。

生豆乳中におけるタンパク質-脂質複合体の主な構成タンパク質は 11S であることが報告されている（Saio and Watanabe, 1966; Ono *et al.*, 1991）。また、第 2 章では、凍結融解した生豆乳中のほぼすべての脂質は下層に含まれていたことを報告した（表 2-1）。すなわち、沈殿を形成する主な構成要素は 11S あるいは 11S に覆われたタンパク質-脂質複合体（エマルジョン）であると推察された。

### 3.2.3 凍結融解分離における豆乳中の 11S/7S 比の影響

大豆の 11S/7S 比は品種によって異なることが知られている（Toda *et al.*, 2008）。11S が沈殿形成の主な要因であることを確認するため、11S/7S 比の異なる品種を用いて生豆乳を調製し、凍結融解を試みた。大豆は、7S リッチの「ななほまれ」および 11S リッチの「東山 226 号」を供試した。その結果、「ななほまれ」から調製した 11S の少ない生豆乳では、分離が認められなかった（図 3-4A）。一方、「東山 226 号」から調製した 11S を多く含む生豆乳では、「エンレイ」（対照；11S/7S 比=0.99）と同様の分離が確認された（図 3-4B）。この結果、沈殿形成には 11S の存在が大きく影響していることが明らかとなった。

さらに、凍結融解分離が生じる豆乳中 11S/7S 比の閾値を明らかにするため、「ななほまれ」と「エンレイ」から調製した生豆乳を様々な比率で混合し、

凍結融解処理を行った（表 3-1）。その結果、11S/7S 比が 0.53 以上で沈殿を形成し、分離を生じることが明らかとなった。

#### 3.2.4 豆乳の凍結融解分離における亜硫酸ナトリウムと SDS の影響

生豆乳の凍結融解分離における S-S 結合の影響を明らかにするため、亜硫酸ナトリウムを添加した生豆乳を凍結融解した（図 3-5A）。その結果、亜硫酸ナトリウム 0.1% 以上の添加で豆乳の分離が完全に阻害された。

また、疎水性相互作用の影響を明らかにするため、SDS を添加した生豆乳を凍結融解した（図 3-5B）。その結果、SDS の添加量が多くなるほど上層の割合が減少し、1% 以上の添加で分離が完全に阻害された。

これらの結果、凍結融解による生豆乳の沈殿形成は、凍結濃縮を介した 11S 間の S-S 結合や疎水性相互作用によって生じているものと考えられた。11S は 7S に比べてシスチン含量が多いこと（橋詰, 1979）、また、7S は糖鎖を持ったタンパク質であり、高い親水性を持つことから（森田, 2000; 谷坂ら, 2010）、11S は 7S に比べてタンパク質間相互作用を生じやすく、沈殿を形成しやすいものと推察された。

#### 3.2.5 凍結融解による豆乳中 7S、11S の分離メカニズム

これまでの実験結果から、凍結融解による生豆乳の分離メカニズムのイメージを図 3-6 に示した。生豆乳中には 7S、11S タンパク質と、これらタンパク質と脂質が結合したタンパク質-脂質複合体が分散している（小野, 2008）。この生豆乳を凍結融解することにより、凍結工程（Step I）で、タンパク質とタンパク質-脂質複合体が非凍結部に濃縮され、11S 同士または 11S を主体

としたタンパク質-脂質複合体同士が凝集(タンパク質間相互作用)を起こす。そして、融解工程 (Step II) で、11S を主体とした凝集体は沈殿を形成し、親水性が高い 7S は上清に移行する。すなわち、融解後には、ほとんどの 11S は下層に移行し、ほとんどの 7S は上層に維持されるものと考えられる。

また、脱脂生豆乳を用いて凍結融解した場合における分離メカニズムのイメージを図 3-7 に示した。脱脂生豆乳中では、脂質の除去によりタンパク質-脂質複合体が存在せず、7S、11S タンパク質が分散している。この脱脂生豆乳を凍結融解することにより、凍結工程 (Step I) でタンパク質が非凍結部に濃縮され、この際タンパク質間相互作用を生じやすい 11S 同士が相互作用し凝集を起こす。そして、融解工程 (Step II) で、凝集により粒子サイズが増大した 11S は沈殿を形成し、7S は上清に移行するものと考えられる。

タンパク質は加熱した場合と同様に、冷却や凍結することでも変性することが知られている(後藤, 2002)。タンパク質の低温変性については多くの研究がなされており、例えば冷却沈殿に関するもの(Saha *et al.*, 1970; Bentley *et al.*, 1985; Privalov, 1990)、凍結融解による安定性や凝集性に関するもの(Carpenter and Crowe, 1988; Eckhardt *et al.*, 1991; Hamada *et al.*, 2009) などである。しかしながら、これらの報告のほとんどはタンパク質の低温変性の防止を目的としたものであり、低温変性のメカニズムの詳細については依然明らかにされていない。低温変性は、低温による疎水性相互作用の低下や親水性基の水和の促進などが関与するとされている(Privalov and Khechinashvili, 1974)。本研究では、凍結変性によるタンパク質の凝集は、凍結濃縮を介したタンパク質間の S-S 結合および疎水性相互作用が関与することを明らかにした。なお、本研究におけるタンパク質の分離法は、タンパ

ク質の冷却沈殿を選択的に利用していることから、低温変性の防止を目的としたこれまでの研究とは視点が異なるものである。

### 3.3 小括

凍結融解処理による豆乳中タンパク質の分離メカニズムの解明を試みた。凍結融解によって分離した下層の粒子サイズは、凍結前の生豆乳に比べて増大していた。また、脱脂大豆から調製した脱脂生豆乳を凍結融解した場合でも、生豆乳と同様に 2 層分離が確認された。11S/7S 比の異なる生豆乳を用いて凍結融解処理を行ったところ、11S を含まない豆乳では分離が生じなかった。亜硫酸ナトリウム、SDS を凍結前の生豆乳に添加し、凍結融解を行ったところ、沈殿形成が阻害され、分離が認められなかった。これらの結果、凍結融解処理による生豆乳の分離は、11S 同士あるいは 11S を主体としたタンパク質-脂質複合体同士が凍結濃縮を介してタンパク質間 S-S 結合あるいは疎水性相互作用によって凝集し、沈殿を形成することで生じるものと判断された。

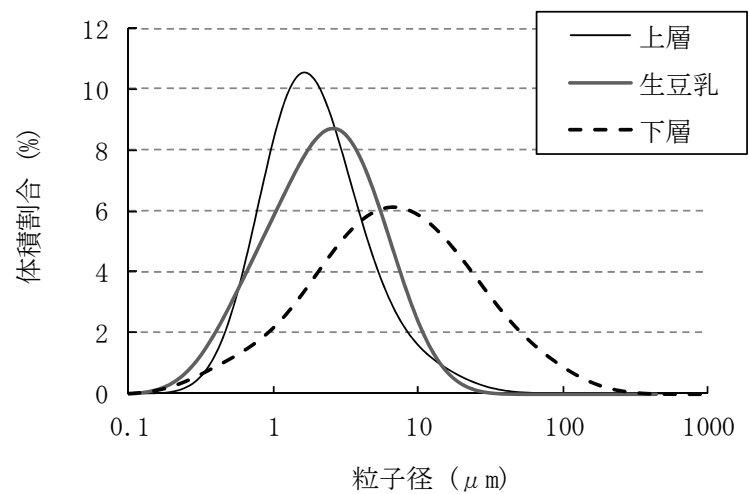


図 3-1 生豆乳および凍結融解後生豆乳より分離した上層，下層の粒度分布.



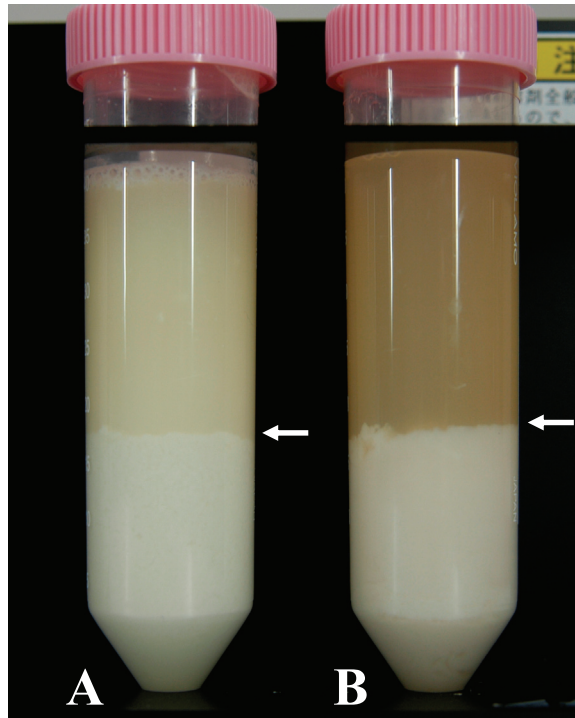


図 3-2 脂質が生豆乳の凍結融解分離に及ぼす影響.

A : 生豆乳 (対照), B : 脱脂生豆乳.

図中の矢印は上層と下層の分離境界を示す.

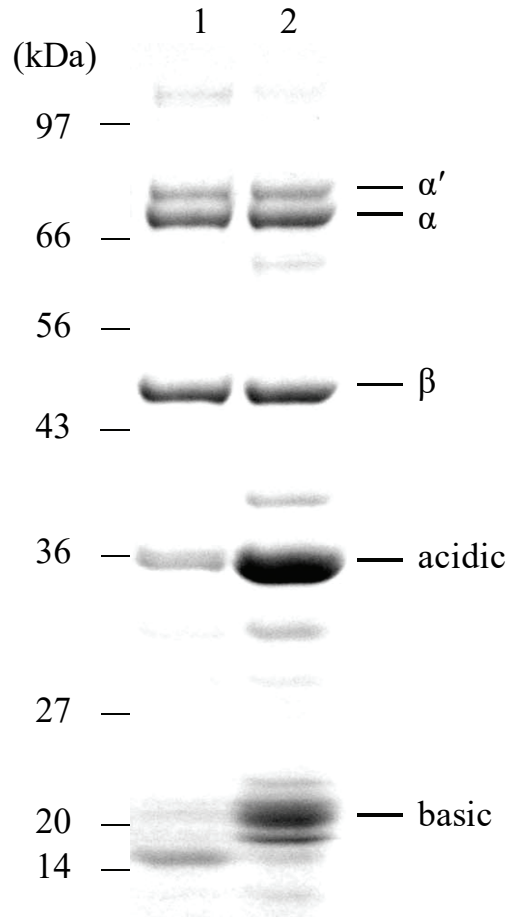


図 3-3 凍結融解処理で脱脂生豆乳より分離した上層および下層の SDS-PAGE パターン.

レーン 1: 上層, 2: 下層.  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  は  $\beta$ -コングリシニンのサブユニット, acidic, basic はグリシニンの構成ポリペプチドを示す.

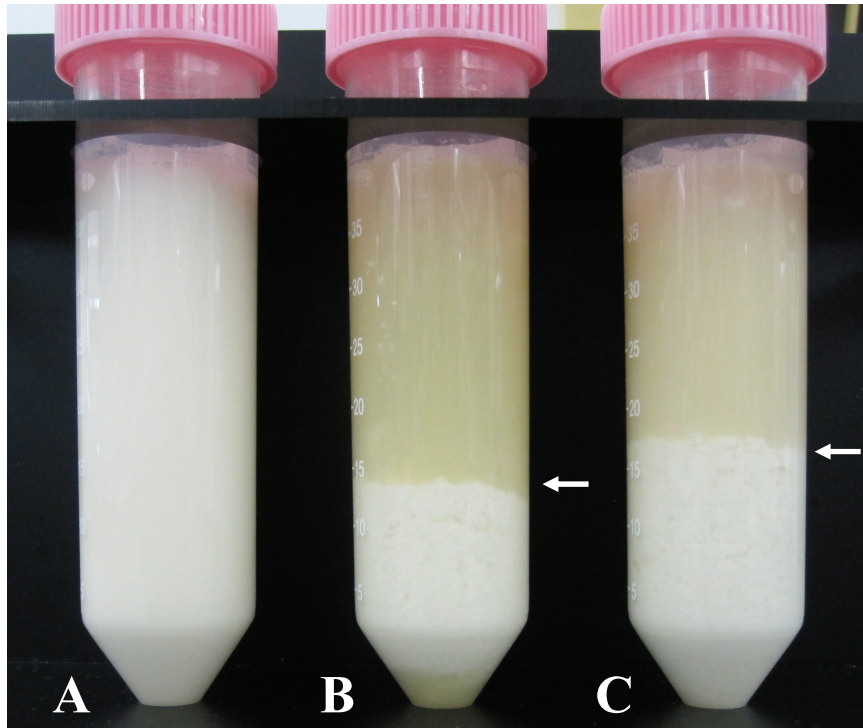


図 3-4 大豆品種が生豆乳の凍結融解分離に及ぼす影響.

A: ななほまれ (7S リッチ), B: 東山 226 号 (11S リッチ), C: エンレイ  
(11S/7S 比=0.99). 図中の矢印は上層と下層の分離境界を示す.

表 3-1 「ななほまれ」および「エンレイ」から調製した生豆乳の混合による 11S/7S 比の異なる生豆乳における凍結融解処理が分離に及ぼす影響.

ななほまれ：エンレイ	8:0	7:1	6:2	5:3	4:4	3:5	2:6	1:7	0:8
11S/7S比	0.05	0.10	0.18	0.35	0.45	0.53	0.74	0.89	0.99
上層比 <sup>a</sup>	-*	-	-	-	-	30.1	41.1	47.0	53.6

<sup>a</sup> : 上層比は凍結前の生豆乳に対する分離後の比率.

\* : 分離認めず.

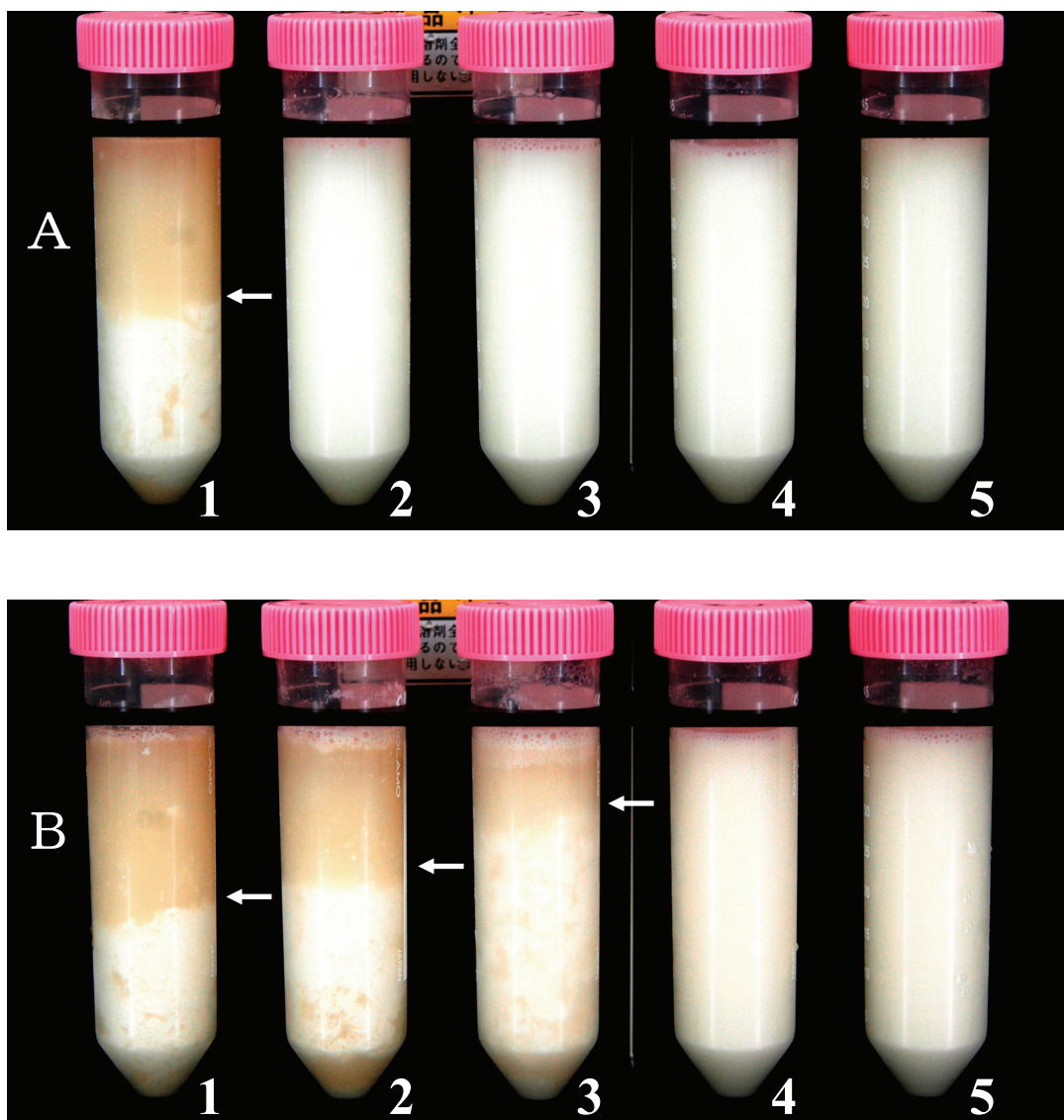


図 3-5 亜硫酸ナトリウムおよび SDS の添加が生豆乳の凍結融解分離に及ぼす影響.

A : 亜硫酸ナトリウム, B : SDS.

1 : 0% (対照), 2 : 0.1%, 3 : 0.5%, 4 : 1%, 5 : 2%.

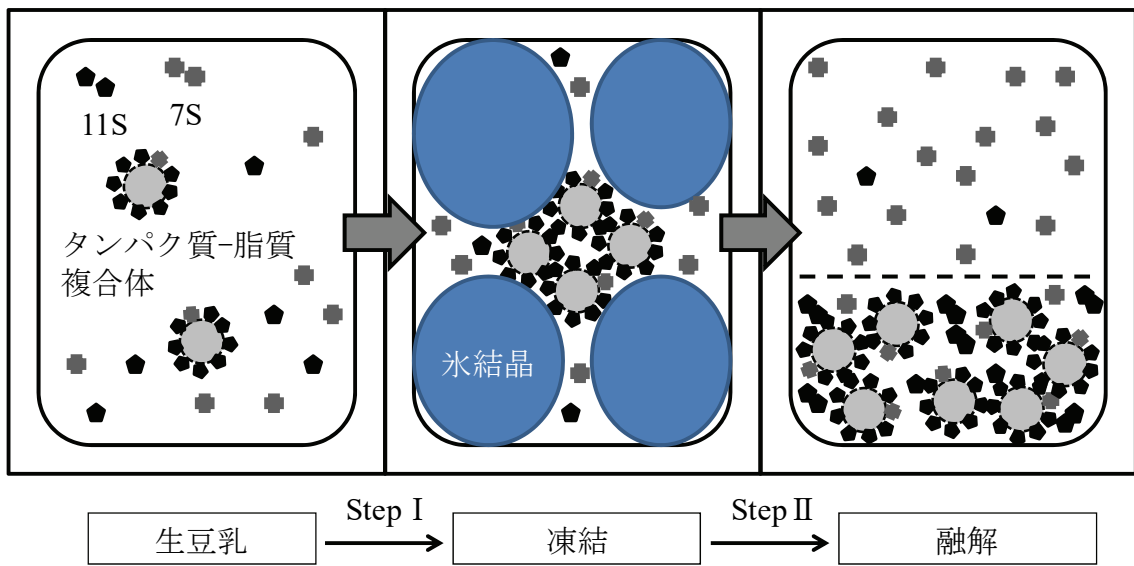


図 3-6 凍結融解処理による生豆乳の分離イメージ。

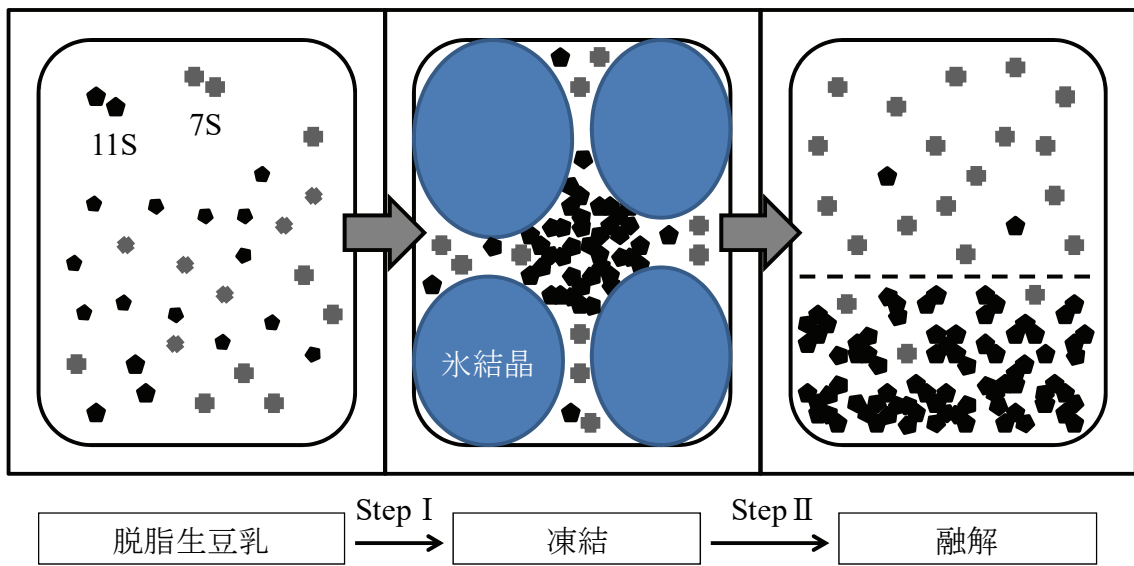


図 3-7 凍結融解処理による脱脂生豆乳の分離イメージ。

## 第 4 章 凍結融解分離豆乳の食品への応用

凍結融解処理によって得られた分離豆乳の食品への応用について検討した。第 2 章において、分離豆乳から調製した豆腐のテクスチャー特性を評価したところ、上層から調製した豆腐は柔らかく滑らかであり、下層から調製した豆腐は硬く弾力があつた。このテクスチャー特性から、上層は柔らかく滑らかな食品、下層は硬く弾力性のある食品に適すると考えられた。これらの特徴を踏まえ、本章では分離豆乳を利用した食品への応用として、上層を用いた新規デザート様製品の開発を試みた。

### 4.1 材料および方法

#### 4.1.1 豆乳の調製

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill、エンレイ) に 5 倍量の蒸留水を加え、20℃で 16 時間浸漬後、浸漬水を捨て、蒸留水を大豆の乾燥重量の 6 倍量加えた。これをミキサーで磨砕した後、脱脂綿で濾過し生豆乳とした。

#### 4.1.2 凍結融解処理による豆乳の分離方法

生豆乳約 200 mL を密封袋 (ヒストパック、フアルマ製) に移して -30℃で 7 日間凍結し、10℃で 24 時間融解した。ここで 2 層分離している豆乳について、デカンテーションにより上層と下層に分離した。

#### 4.1.3 新規デザート様製品の開発

タンパク質濃度 4% に調整した上層 180 mL を 95℃で 2 分間加熱した後、



5℃で2時間冷却し、ハチミツ（純粋蜂蜜、明治屋製）12 gを加え、予め5℃に冷却しておいた所定濃度のユズ果汁（pH 2.8）20 mLを添加して軽く攪拌後、約60 mLずつ小容器に分注して80℃で30分間加熱し、5℃で2時間冷却した。

#### 4.1.4 上層凝固における適正ユズ果汁濃度の検討

95℃で2分間加熱後、氷水中で冷却した上層4.5 mLを10 mL容試験管に分注し、所定濃度のユズ果汁0.5 mLを加えて混和後、80℃で30分間加熱し、20℃で30分間冷却した。これを3 000×*g*で10分間遠心分離し、上清を回収して湿重量を測定し、全体の重量に対する上清の割合を液体率とした。この液体率が最小となるユズ果汁濃度を、適正ユズ果汁濃度とした。

#### 4.1.5 新規デザート様製品の官能評価

上層を用いて調製した新規デザート様製品について、生豆乳を用いて同様に調製した製品を対照として、一対比較法（野中・山口，1986）により官能評価を行った。項目および尺度は、川端（1995）のゲル状食品に対する分析型官能検査法に基づき、8項目について両極7段階（-3～+3）の尺度で評価した。パネルは、富山県農林水産総合技術センター食品研究所の職員13名（構成員；30代2名，40代4名，50代7名，男女比9:4）とした。

#### 4.1.6 新規デザート様製品の破断応力の測定

上層から調製した新規デザート様製品および市販のデザート製品（ヨーグルト2点、プリン2点）について、破断応力を測定した。試料は直径23 mm、

高さ 20 mm に調製して測定に供試した。一軸圧縮試験機(レオナー RE-33005、山電製)を用い、測定には直径 30 mm のプランジャーを装着し、圧縮速度 1.0 mm/s で一軸圧縮を行い、試料の高さの 70% (w/w) まで圧縮した。

## 4.2 結果および考察

### 4.2.1 凍結融解分離技術によって得られた上層を用いた新規デザート様製品の開発

凍結融解分離技術によって得られた分離豆乳の食品への応用として、上層を用いた新規デザート様製品の開発を試みた。豆腐は加熱した豆乳に凝固剤を加えて調製されるが、豆乳中タンパク質の凝固反応の違いにより、凝固剤の種類は塩凝固剤と酸凝固剤の2種類に大別される。塩凝固剤(CaSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、にがり)は陽イオンを放出して大豆タンパク質のアミノ酸残基の側鎖の負の電荷を中和し、タンパク質同士の接触を起こしてサブユニットを会合させることにより、また、酸凝固剤(グルコノデルタラクトン(GDL))はH<sub>3</sub>O<sup>+</sup>の放出により豆乳のpHを低下させて大豆タンパク質を等電点沈殿させることにより、豆乳を凝固させる(岑ら, 2005)。この酸凝固剤添加による酸凝固反応を応用し、加熱した上層にユズ果汁(pH 2.8)を加えることにより新たなデザート様製品の開発を試みた。

上層の凝固に及ぼすユズ果汁の最適添加濃度について、液体率を指標として評価した(図 4-1)。液体率は、加熱した上層にユズ果汁を添加し、3 000 ×gで10分間遠心分離後、上清を回収して湿重量を測定し、全体の重量に対する上清の割合を示したものである。その結果、ユズ果汁の添加濃度が高くなるほど液体率が減少し、1.6%の添加で液体率が0%となった。その後さらに添加濃度を高めると、液体率は再び上昇した。これは、ユズ果汁の添加濃度が高くなるに従い、豆乳のpHが低下することでタンパク質の等電点沈殿により全体が凝固し、さらに添加濃度を高めることで、やがて離水を起こすことが要因として挙げられる。すなわち、上層に対して1.6~1.8%のユズ果

汁の添加で酸凝固反応により良好なヨーグルト状を形成することが明らかとなった（図 4-2：上層製品）。

#### 4.2.2 上層を用いた新規デザート様製品の官能評価およびテクスチャー特性

上層製品および凍結しない生豆乳を用いて同様に調製したデザート様製品（生豆乳製品）を対照として、富山県農林水産総合技術センター食品研究所内 13 名のパネラーにより官能評価を実施した。その結果、上層製品は生豆乳製品に比べて「なめらか」で「口溶け」「のどごし」が良く、「弾力性」を除いた全ての項目で有意に高い値を示した（図 4-3）。さらに、上層製品のテクスチャー特性を評価するため、破断応力を指標として市販ヨーグルトおよびプリンと硬さを比較した。その結果、上層製品の硬さはヨーグルトやプリンに近い値を示し、特にヨーグルトに似た硬さであることが明らかとなった（表 4-1）。これらの結果、上層製品は生豆乳製品に比べて明らかに異なる食感を呈することが示され、分離豆乳を用いることにより、従来大豆製品とは異なるテクスチャーを持つ新たな食品の開発が可能になるものと考えられた。

本分離技術によって得られた上層には、機能性成分として中性脂肪を低減する効果のある  $\beta$ -コングリシニン（7S の主成分）が多く含まれる。また、前章までに、7S は糖鎖を持ったタンパク質であり親水性が高いことから、凍結時に不凍水に守られることで相互作用を起こしにくく、結果として上層に多く含まれることを示した。すなわち、同様にオリゴ糖（腸内環境改善効果）や配糖体であるイソフラボン（更年期障害改善、骨粗鬆症予防効果）、サポニン（肝臓障害抑制、抗高脂血症）なども親水性が高く、分離した上層に多く

含まれることが予想される。一方、下層にはコレステロール低下作用のあるグリシニン（11Sの主成分）が多く含まれる。また、多くの脂質が下層に移行していることから（表 2-1）、リン脂質の一種であるレシチン（脂質代謝調節機能、認知症予防効果）も下層に多く含まれることが想定される。

このように、分離豆乳の利用は、テクスチャー特性のみならず、機能性成分の特徴を活かした用途開発も可能と考えられ、今後、これらの性質の差を利用した新たな加工品の開発が期待される。

### 4.3 小括

凍結融解処理によって得られた分離豆乳の食品への応用について検討した。上層から調製した豆腐のテクスチャーは柔らかく滑らかであったことから、上層を用いた新規デザート様製品の開発を試みた。加熱した上層にユズ果汁を添加したところ、酸凝固反応により良好なヨーグルト状を形成した。生豆乳を用いて同様に調製したデザート様製品を対照として官能評価を行ったところ、上層製品は滑らかで口溶けが良いと判断された。この結果、凍結融解分離豆乳を用いることで、従来までの豆乳加工品とは異なるテクスチャーや機能性を有した、新たな加工品の開発が可能となることが示された。

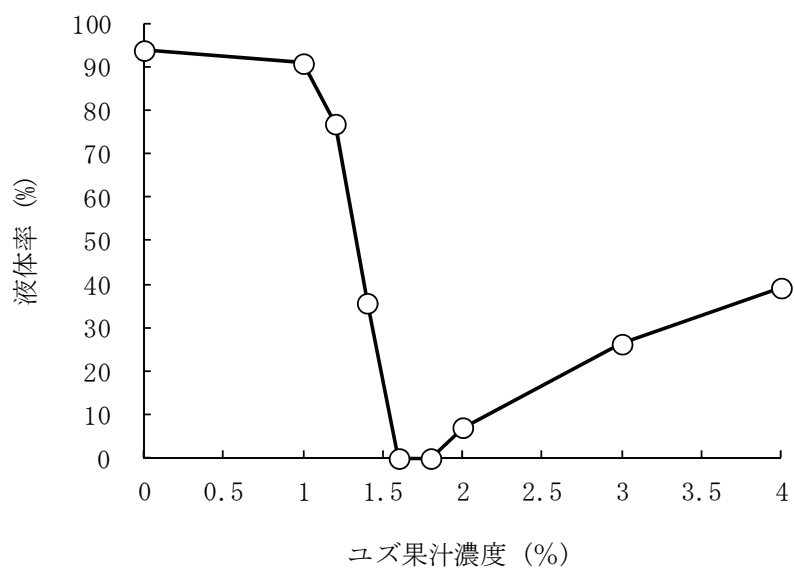


図 4-1 ユズ果汁濃度が上層の液体率に及ぼす影響.

液体率は加熱した上層にユズ果汁を添加し、 $3\ 000\times g$ で10分間遠心分離後の全体に対する上清の割合を示す。



図 4-2 上層から試作したデザート様製品.

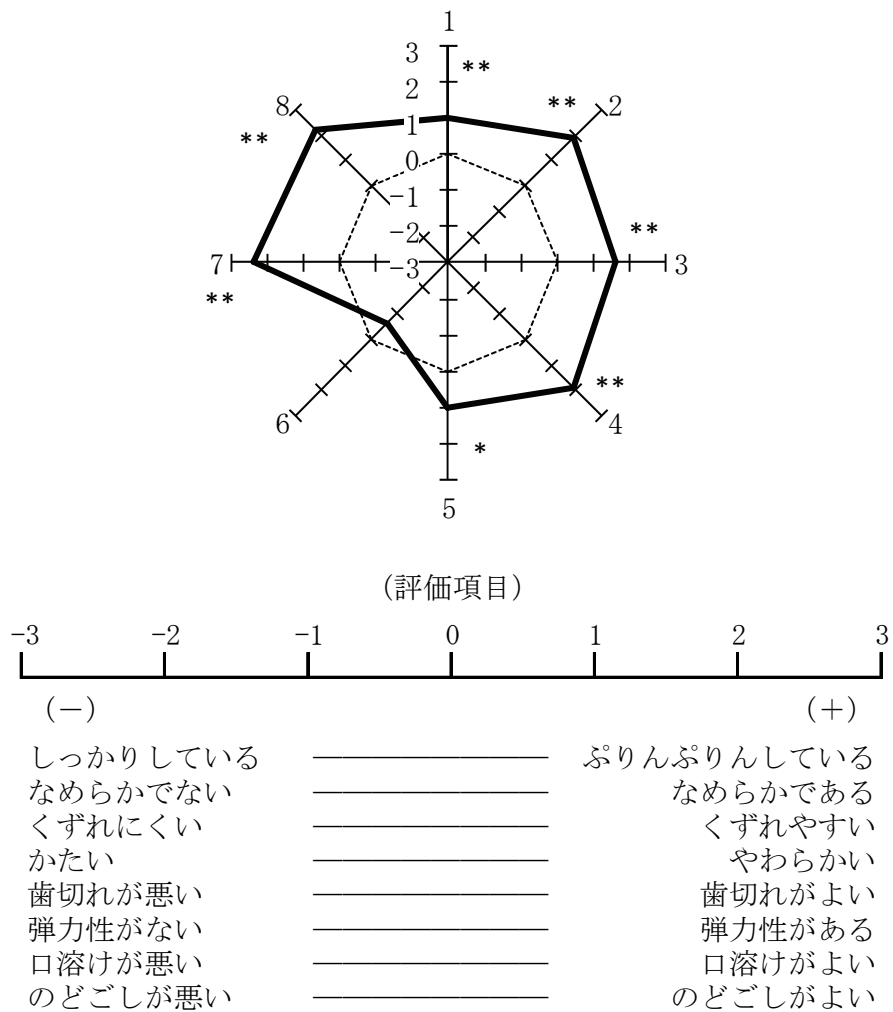


図 4-3 上層から試作したデザート様製品の官能評価.

対照 (点線) は生豆乳から同様に調製したデザート様製品.

対応のある t 検定の結果, 上層製品と生豆乳製品の平均値間において\*\*は 1%水準, \*は 5%水準で有意差があることを示す.



表 4-1 上層から試作したデザート様製品と市販デザート製品の破断応力.

製品名	破断応力 (Pa)
上層デザート	$4.9 \times 10^2$
A社ヨーグルト	$4.0 \times 10^2$
B社ヨーグルト	$8.5 \times 10^2$
C社プリン	$9.0 \times 10^2$
D社プリン	$1.8 \times 10^3$

## 第 5 章 凍結融解処理が豆乳の物理化学特性と豆腐品質に及ぼす影響

豆乳の凝固には豆乳中タンパク質の加熱変性が必要である (Guo *et al.*, 1997; 小野, 2008)。そのため、豆腐製造に使用される豆乳は通常加熱されたものである。しかしながら、一旦加熱した豆乳は凍結融解すると豆乳全体が凝固し (橋詰, 1979; Shimoyamada *et al.*, 1999)、この凝固物を再び均質化しても豆腐を製造することが困難であることから、豆腐製造において豆乳は凍結保存できないものとされている。そのため、豆腐製造現場においては、豆乳調製から豆腐製造までを一事業所において一連の作業で製造されるのが現状となっている。

前章までに、生豆乳を凍結融解することにより豆乳中の 7S、11S を簡易に分離する技術を開発し、分離した豆乳を加熱することによって、それぞれ豆腐製造が可能であったことを報告した。すなわち、これらの結果は、加熱しない生豆乳であれば凍結融解後も豆腐製造が可能であり、凍結保存できる可能性を示唆している。

本章では、分離豆乳製造のための凍結融解処理が豆乳の性質および調製した豆腐の品質に及ぼす影響について検討するとともに、豆乳の凍結保存の可能性について評価した。

### 5.1 材料および方法

#### 5.1.1 豆乳の調製

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill、エンレイ) に 5 倍量の蒸留水を加え、20℃

で 16 時間浸漬後、浸漬水を捨て、蒸留水を大豆の乾燥重量の 6 倍量加えた。これをミキサーで磨砕した後、脱脂綿で濾過し生豆乳とした。生豆乳を 95℃で 2 分間加熱し、氷水で冷却したものを加熱豆乳（生-加熱豆乳）とした。

### 5.1.2 豆乳の凍結融解処理

生豆乳と加熱豆乳を-20℃で 7 日間凍結後、10℃で 24 時間融解した。これら凍結融解したサンプルを、それぞれ生-凍結豆乳、加熱-凍結豆乳とした。凍結融解したサンプルを攪拌後、95℃で 2 分間加熱し、氷水で冷却したものをそれぞれ生-凍結-加熱豆乳、加熱-凍結-加熱豆乳とした。

### 5.1.3 豆乳の物理化学特性の評価

豆乳の粒度分布はレーザー回折式粒度分布測定装置（SALD-2100、島津製作所製）を用いて測定した。豆乳を  $3\,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し、沈殿を回収して湿重量を測定し、全体の重量に対する沈殿の割合を沈殿率とした。上清のタンパク質濃度は、上清の全窒素量をケルダール法（財団法人日本食品分析センター編，2001）で定量し、窒素-タンパク質換算係数 6.25 を乗じて算出した。

### 5.1.4 豆腐の調製と物性評価

加熱後氷水で冷却した豆乳に、0.3%グルコノデルタラクトン（GDL）を添加して混和後、混合物を円柱型ステンレス容器（直径 23 mm、高さ 25 mm）に分注し、80℃で 1 時間加熱後、20℃で冷却した。調製した豆腐は容器から慎重に取り出し、高さ 20 mm に調整して物性評価用のサンプルとした。豆

腐の破断応力は、一軸圧縮試験機（レオナーRE-33005、山電製）を用い、測定には直径 30 mm のプランジャーを装着し、圧縮速度 1.0 mm/s で一軸圧縮を行い、試料の高さの 70%（w/w）まで圧縮した。

#### 5.1.5 豆腐の官能評価

豆腐の官能評価は、外観、味、なめらかさ、かたさ、弾力性、総合評価の 6 項目について、富山県農林水産総合技術センター内 15 名（構成員；20 代 3 名，30 代 1 名，40 代 8 名，50 代 3 名，男女比 9:6）のパネラーにより両極 7 段階（-3～+3）の尺度で評価した。

#### 5.1.6 微生物検査

豆乳中の生菌数は標準寒天培地（日水製薬製）を用いて培養し測定した。豆乳を培地上に塗抹し、37℃で 48 時間培養した。培養後、培地上のコロニー数をカウントし生菌数とした。

#### 5.1.7 統計処理

得られたデータについて、一元配置の分散分析を行い、有意差のあったものについて Tukey 法による多重比較を行った。

## 5.2 結果および考察

### 5.2.1 凍結融解した豆乳の物理化学特性

凍結融解後、生豆乳は2層に分離し、加熱豆乳は全体が緩く凝固した。これら凍結融解した豆乳と凍結融解しない生豆乳をそれぞれ加熱し、粒度分布を測定した(図 5-1)。生-加熱豆乳および生-凍結-加熱豆乳中の粒子は0.3~1  $\mu\text{m}$  に分布し、最頻値は0.45  $\mu\text{m}$  であったが、加熱-凍結-加熱豆乳中の粒子は10~100  $\mu\text{m}$  に分布し、最頻値は20  $\mu\text{m}$  であった。すなわち、加熱豆乳では、凍結融解処理によって粒子サイズの増大が認められた。一方、生-凍結-加熱豆乳中の粒子サイズは生-加熱豆乳と同等であり、生豆乳では凍結融解による粒子サイズへの影響は小さいことが明らかとなった。

これらの豆乳について、3 000  $\times g$  で10分間遠心分離後、豆乳全体に対する沈殿量の割合(沈殿率)と上清のタンパク質濃度を測定した(表 5-1)。沈殿率は、生-加熱豆乳および生-凍結-加熱豆乳に比べて加熱-凍結-加熱豆乳で著しく高かった。また、生-凍結-加熱豆乳の上清タンパク質濃度は、加熱-凍結-加熱豆乳に比べて高く、生-加熱豆乳と同等であった。これら豆乳の遠心分離前のタンパク質含量は6.6 g/100 gであったことから、生-加熱豆乳および生-凍結-加熱豆乳では、ほぼすべてのタンパク質が可溶化し、上清に含まれていることが明らかとなった。

加熱豆乳は凍結融解すると豆乳全体が緩く凝固することが知られており、その要因は凍結濃縮によるタンパク質間 S-S 結合あるいは疎水性相互作用であることが報告されている(Shimoyamada *et al.*, 2000; 下山田, 2003)。一方、生豆乳では、凍結融解によって同様に凍結濃縮が起こるにも関わらず、凝固が生じず2層分離することが認められている(図 2-2)。本章ではさらに、

これら凍結融解した豆乳を加熱することによって、生豆乳と加熱豆乳では異なる溶解性を示すことが明らかとなった。これは、生豆乳は加熱豆乳に比べて表面SH基量が少なく、表面疎水性度も低いことから(Shimoyamada *et al.*, 2000)、凍結濃縮によるタンパク質間相互作用が促進されにくいためであると推察される。その結果、生豆乳では凍結融解後の加熱処理によってタンパク質が可溶化しやすく、生・凍結・加熱豆乳の物理化学特性は生・加熱豆乳に類似したものと考えられた。

### 5.2.2 豆腐の破断応力と官能評価

生・加熱豆乳、生・凍結・加熱豆乳、加熱・凍結・加熱豆乳から調製した豆腐の物理特性を明らかにするため、豆腐の破断応力を測定した(図 5-2)。その結果、生・凍結・加熱豆乳から調製した豆腐の破断応力は、生・加熱豆乳から調製した豆腐と同等であった。一方、加熱・凍結・加熱豆乳から調製した豆腐の破断応力は、生・加熱豆乳および生・凍結・加熱豆乳から調製した豆腐に比べて著しく弱かった。

さらに、生・加熱豆乳および生・凍結・加熱豆乳から調製した豆腐の官能評価を行った(図 5-3)。その結果、すべての評価項目において有意な差は認められなかった。なお、加熱・凍結・加熱豆乳から調製した豆腐は凝固が著しく脆く、官能評価により生・加熱豆乳および生・凍結・加熱豆乳から調製した豆腐と比較することが困難であった。

豆腐の物理特性は、豆乳の物理化学特性に依存することが知られている(Toda *et al.*, 2007)。それゆえ、豆乳の物理化学特性が類似していた生・加熱豆乳と生・凍結・加熱豆乳では、豆腐の物理特性も類似したものと考えられ

た。

### 5.2.3 凍結保存が豆乳中の生菌数に及ぼす影響

本研究における豆乳の分離技術は、非加熱である生豆乳を扱うため、凍結保存中における微生物の動態を把握することは重要なことである。そこで、凍結保存中における生豆乳中の微生物動態を明らかにするため、 $-20^{\circ}\text{C}$ で1、7、28日間凍結保存した生豆乳について、融解後の生菌数を調査した(図5-4)。生豆乳調製直後の生菌数は $5.3 \log \text{CFU/mL}$ であり、また、28日間凍結保存した生豆乳中の生菌数も $5.3 \log \text{CFU/mL}$ であった。すなわち、凍結保存中における生菌数の増加は認められなかった。さらに、凍結保存した生豆乳( $-20^{\circ}\text{C}$ で1、7、28日間)は、凍結保存後に $10^{\circ}\text{C}$ で24時間融解処理を行ったにも関わらず、生菌数の増加は認められなかった。この結果、本研究の分離技術における一連の凍結融解操作では、微生物の増加は認められないことが明らかとなった。なお、これらの生豆乳を加熱処理( $95^{\circ}\text{C}$ 、2分間)することにより、すべての試験区において生菌数は劇的に減少した( $< 100 \text{CFU/mL}$ )。

## 5.3 小括

分離豆乳製造のための凍結融解処理が、豆乳および調製した豆腐の品質に及ぼす影響について検討した。生豆乳と加熱豆乳を凍結融解後加熱した場合と通常の加熱豆乳の物理化学特性と調製した豆腐の品質を調査した。その結果、凍結融解した加熱豆乳では粒子サイズや沈殿量が増加し、凍結前の品質を保持することができなかった。一方、凍結融解した生豆乳では凍結しない

通常の加熱豆乳と同等の物理化学特性および豆腐物性を示した。また、凍結保存中における生豆乳中の生菌数に変化は認められなかった。これらの結果、加熱前の生豆乳であれば、凍結融解による豆乳および豆腐の品質に及ぼす影響は小さく、分離豆乳の製造のみならず、豆乳の凍結保存も可能であることが示された。



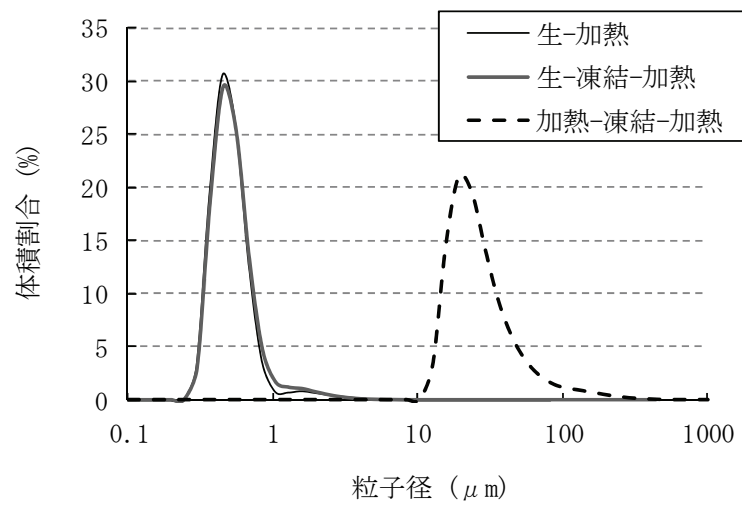


図 5-1 生-加熱豆乳，生-凍結-加熱豆乳および加熱-凍結-加熱豆乳の粒度分布。

表 5-1 生-加熱豆乳，生-凍結-加熱豆乳および加熱-凍結-加熱豆乳の遠心分離後の沈殿率と上清タンパク質濃度．

	生-加熱豆乳	生-凍結-加熱豆乳	加熱-凍結-加熱豆乳
沈殿率 (%)	5.0 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	58.1 <sup>b</sup>
上清タンパク質濃度 (%)	6.6 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	3.7 <sup>b</sup>

沈殿率は豆乳全体に対する沈殿量の割合．

a,b 異英文字間は，処理区間に 5%水準の有意差あり (Tukey 法,  $n=3$ )．

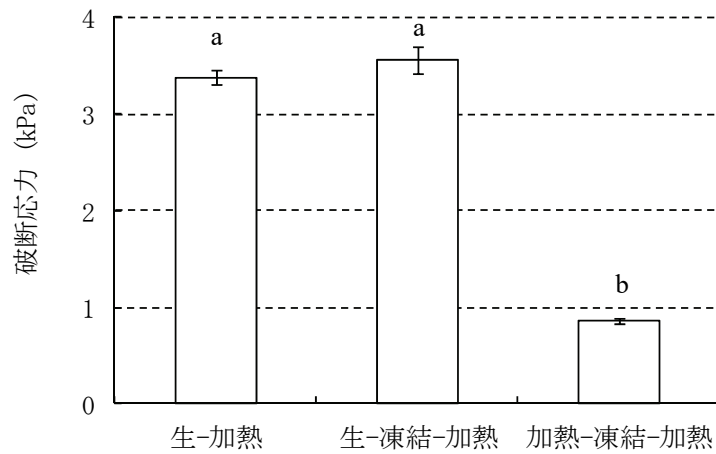


図 5-2 生-加熱豆乳，生-凍結-加熱豆乳および加熱-凍結-加熱豆乳から調製した豆腐の破断応力。

凝固剤は 0.3% グルコノデルタラクトン (GDL) を使用。a,b 異英文字間は，処理区間に 5% 水準の有意差あり (Tukey 法)。縦棒は標準誤差 ( $n=3$ )。

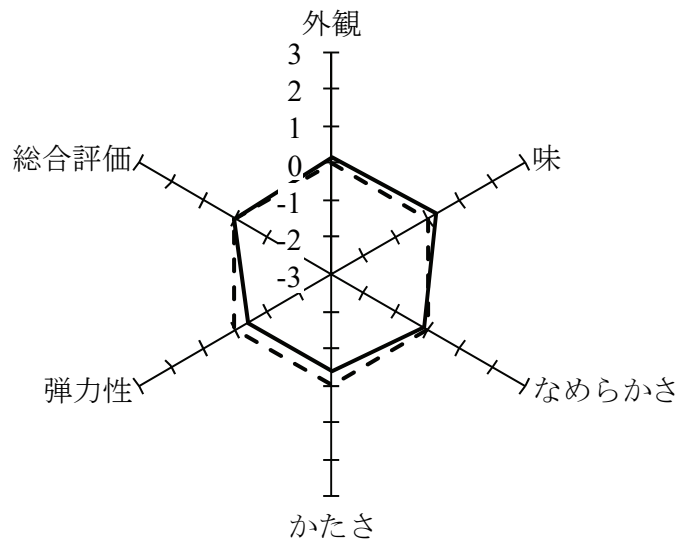


図 5-3 生・加熱豆乳（点線）および生・凍結・加熱豆乳（実線）から調製した豆腐の官能評価。

凝固剤は 0.3%グルコノデルタラクトン（GDL）を使用。

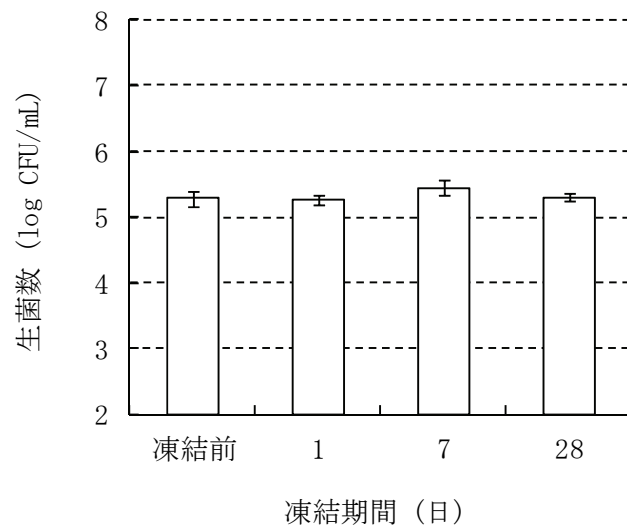


図 5-4 凍結期間が生豆乳中の生菌数に及ぼす影響.

凍結前：生豆乳調製直後に測定．縦棒は標準誤差 ( $n=3$ )．

## 第 6 章 総括

本研究は、近年低迷する我が国の大豆の需要拡大、自給率向上を目指し、大豆の機能性成分を活かした新たな用途開発について検討した。機能性成分として大豆タンパク質に着目し、豆乳中に含まれる機能性や凝固性の異なる 2 種類の主要タンパク質である 7S および 11S を、凍結融解処理により簡易に分離する技術を開発するとともに、それを利用した食品への応用、ならびに凍結融解処理が豆乳および調製した豆腐の品質に及ぼす影響について検討を行った。

第 1 章では、本研究の背景と目的、大豆タンパク質の分画技術および豆乳の凍結融解処理に関する従来の研究について述べた。

第 2 章では、凍結融解処理を用いて豆乳中の 7S と 11S を簡易に分離する技術を開発した。生豆乳を凍結融解することにより、豆乳は 2 層に分離し、分離した上層には 7S、下層には 11S が多く含まれていた。上層と下層を種々の割合で混合し、豆腐を調製して破断応力を調べたところ、下層の割合が増えるにつれ、低濃度の凝固剤で凝固し、破断応力が高まった。また、上層から調製した豆腐のテクスチャーは柔らかく滑らかであり、下層から調製した豆腐は硬く弾力があった。これらの結果、簡易で実用的な凍結融解処理により、豆乳中の 7S と 11S が粗分画でき、この方法が大豆の新規用途開発につながることを示唆された。

第 3 章では、凍結融解処理による豆乳中タンパク質の分離メカニズムの解明を試みた。凍結融解によって分離した下層の粒子サイズは、凍結前の生豆乳に比べて増大していた。また、脱脂大豆から調製した脱脂生豆乳を凍結融

解した場合でも、生豆乳と同様に 2 層分離し、7S、11S の分離が認められた。

11S/7S 比が異なる生豆乳を用いて凍結融解処理を行ったところ、11S を含まない豆乳では分離が生じなかった。亜硫酸ナトリウム、SDS を凍結前の生豆乳に添加し、凍結融解を行ったところ、沈殿形成が阻害され、分離が認められなかった。これらの結果、凍結融解処理による生豆乳の分離は、11S 同士あるいは 11S を主体としたタンパク質-脂質複合体同士が凍結濃縮を介してタンパク質間 S-S 結合あるいは疎水性相互作用によって凝集し、沈殿を形成することで生じるものと判断された。

第 4 章では、凍結融解処理によって得られた分離豆乳の食品への応用について検討した。第 2 章において、上層から調製した豆腐のテクスチャーは柔らかく滑らかであったことから、上層を用いた新規デザート様製品の開発を試みた。加熱した上層にユズ果汁を添加したところ、酸凝固反応により良好なヨーグルト状を形成した。分離前の生豆乳を用いて同様に調製したデザート様製品を対照として官能評価を行ったところ、上層製品は生豆乳製品に比べて滑らかで口当たりが良いと判断された。この結果、凍結融解分離豆乳を用いることで、従来までの豆乳加工品とは異なるテクスチャーや機能性を有した、新たな加工品の開発が可能となることが示された。

第 5 章では、分離豆乳製造のための凍結融解処理が、豆乳および調製した豆腐の品質に及ぼす影響について検討した。生豆乳と加熱豆乳を凍結融解後加熱した場合と通常の加熱豆乳の物理化学特性と調製した豆腐の品質を調査した。その結果、凍結融解した加熱豆乳では粒子サイズや沈殿量が増加し、凍結前の品質を保持することができなかった。一方、凍結融解した生豆乳では凍結しない通常の加熱豆乳と同等の物理化学特性および豆腐物性を示した。

また、凍結保存中における生豆乳中の生菌数に変化は認められなかった。これらの結果、加熱前の生豆乳であれば、凍結融解による豆乳および豆腐の品質に及ぼす影響は小さく、分離豆乳の製造のみならず、豆乳の凍結保存も可能であることが示された。

本研究は、豆乳に凍結融解という新たな処理を適用することで、大豆の新素材・新規用途開発を試みたものである。タンパク質は凍結融解によって凝集することがよく知られている。そのため、加熱豆乳では凍結融解によって豆乳全体が凝固することから、これまで豆乳の凍結融解処理に関する研究はあまり行われてこなかった。本研究では、加熱変性を経ない非加熱状態の生豆乳に凍結融解処理を適用することで、これまで困難とされていた豆乳の凍結保存を可能とするばかりでなく、豆乳中の主要タンパク質（7S、11S）を分離する技術を開発することができた。

これまで報告されている7S、11Sの分離法は、いずれも操作が複雑で生産コストも高価であることから、実際の食品製造現場に直接応用することは困難であった。一方、本研究における分離法は、凍結用の冷凍庫、融解用の冷蔵庫があれば、小規模店等においても新たな設備投資なしに実用化が可能な技術である。7S、11Sの両グロブリンを製造現場レベルで簡易分画可能にした本研究の成果は、意義が大きいと考える。今後、凍結融解によって分離した2種類の豆乳の性質の差を利用した新規用途開発が期待される。

また、豆乳の凍結保存が可能であることを示せたことは、コールドチェーンが発達した現代においては、豆乳を凍結したまま流通させることが容易であることから、凍結融解による豆乳の分離技術と組み合わせることで、豆乳加工業者のみならず、菓子業者や総菜業者などでの活用も期待される。



本研究成果が、大豆の新規加工用途開発を通して、国産大豆の需要拡大の一助となることを期待する次第である。

## 参考文献

- Bentley, K. L., Klebe, R. J., Hurst, R. E., and Horowitz, P. M. (1985). Heparin binding is necessary, but not sufficient, for fibronectin aggregation. A fluorescence polarization study. *J. Biol. Chem.*, 260, 7250-7256.
- Carpenter, J. F., and Crowe, J. H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 25, 244-255.
- Eckhardt, B. M., Oeswein, J. Q., and Bewley, T. A. (1991). Effect of freezing on aggregation of human growth hormone. *AAPS*, 8, 1360-1364.
- Fontes, E. P. B., Moreira, M. A., Davies, C. S., and Nielsen, N. C. (1984). Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and  $\beta$ -conglycinin subunits. *Plant Physiol.*, 76, 840-842.
- 後藤祐児 (2002). タンパク質の低温変性. バイオサイエンスとインダストリー, 60, 235-238.
- Guo, S.T., Ono, T., and Mikami, M. (1997). Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4601-4605.
- Guo, S. T., and Ono, T. (2005). The role of composition and content of protein particles in soymilk on tofu curding by glucono- $\delta$ -lactone or calcium sulphate. *J. Food Sci.*, 70, C258-262.
- Hamada, H., Arakawa, T., and Shiraki, K. (2009). Effect of additives on protein aggregation. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10, 400-407.

- 橋詰和宗 (1979). 大豆蛋白質の凍結変性による新食品素材の開発に関する研究. 日食工誌, 26, 450-459.
- Iwabuchi, S., and Yamauchi, F. (1987). Determination of glycinin and  $\beta$ -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 200-205.
- Ji, M. P., Cai, T. D., and Chang, K. C. (1999). Tofu yield and textural properties from three soybean cultivars as affected by ratios of 7S and 11S proteins. *J. Food Sci.*, 64, 763-767.
- 川端晶子 (1995). テクスチャー・アナライザーによる物性測定. *New Food Ind.*, 37, 63-74.
- Kohno, M., Hirotsuka, M., Kito, M., and Matsuzawa, Y. (2006). Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean  $\beta$ -conglycinin. *J. Atheroscler. Thromb.*, 13, 247-255.
- 河野光登, 廣塚元彦 (2008). 大豆  $\beta$ -コングリシニンによるメタボリックシンドローム予防・改善効果. *New Food Ind.*, 49, 9-20.
- Kohyama, K., Murata, M., Tani, F., Sano, Y., and Doi, E. (1995). Effects of protein composition on gelation of mixtures containing soybean 7S and 11S globulins. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 240-245.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 岑友里恵, 村上空織, 東敬子, 吉原志保, 福永公寿, 佐伯隆, 澤野悦雄 (2005). 豆腐製造における各種凝固剤の特性の比較. 食科工, 52, 114-119.
- 森田雄平 (2000). ダイズ種子蛋白質の構造, 「大豆蛋白質」, (光琳, 東京), pp.

13-64.

Nagano, T., Hirotsuka, M., Mori, H., Kohyama, K., and Nishinari, K. (1992). Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 941-944.

野中敏夫, 山口静子 (1986). 一対比較法, 「調理科学ハンドブック品質管理」, 福場博保, 宮川金二郎編, (建帛社, 東京), pp. 351-358.

農林水産省 (2010). 平成 22 年 食料・農業・農村基本計画.  
[http://www.maff.go.jp/j/keikaku/k\\_aratana/pdf/kihon\\_keikaku\\_22.pdf](http://www.maff.go.jp/j/keikaku/k_aratana/pdf/kihon_keikaku_22.pdf)

農林水産省 (2015). 大豆をめぐる事情, 平成 27 年 10 月版.  
[http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/pdf/daizu\\_meguji\\_h2710.pdf](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/pdf/daizu_meguji_h2710.pdf)

Ono, T., Choi, M. R., Ikeda, A., and Odagiri, S. (1991). Changes in the composition and size distribution of soymilk protein particles by heating. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2291-2297.

小野伴忠 (2008). 大豆から豆乳・豆腐が生成する機構とそれに影響を与える諸因子. 食科工, 55, 39-48.

Onodera, Y., Ono, T., Nakasato, K., and Toda, K. (2009). Homogeneity and microstructure of tofu depends on 11S/7S globulin ratio in soymilk and coagulant concentration. *Food Sci. Technol. Res.*, 15, 265-274.

Privalov, P. L. (1990). Cold denaturation of protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 25, 281-306.

Privalov, P.L., and Khechinashvili, N.N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, 86, 665-684.

- Saha, A., Chowdhury, P., Sambury, S., Smart, K., and Rose, B. (1970). Studies on cryoprecipitation. IV. Enzymic fragments of a human cryoglobulin. *J. Biol. Chem.*, 245, 2730-2736.
- Saio, K., and Watanabe, T. (1966). Preliminary investigation on protein bodies of soybean seeds. *Agric. Biol. Chem.*, 30, 1133-1138.
- Saio, K., Kamiya, M., and Watanabe, T. (1969). Food processing characteristics of soybean 11S and 7S proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 33, 1301-1308.
- Saito, T., Kohno, M., Tsumura, K., Kugimiya, W., and Kito, M. (2001). Novel method using phytase for separating soybean  $\beta$ -conglycinin and glycinin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 65, 884-887.
- Samoto, M., Maebuchi, M., Miyazaki, C., Kugitani, H., Kohno, M., Hirotsuka, M., and Kito, M. (2007). Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chem.*, 102, 317-322.
- Shimoyamada, M., Tomatsu, K., and Watanabe, K. (1999). Insolubilisation and gelation of heat-frozen soymilk. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 253-256.
- Shimoyamada, M., Tomatsu, K., Oku, S., and Watanabe, K. (2000). Interactions among protein molecules in freeze-gel of soymilk and protein structures in heated soymilk during cooling. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2775-2779.
- 下山田真 (2003). 大豆成分の複合相互作用による食品機能発現に関する基礎・応用研究. 食科工, 50, 445-450.

- 菅野道廣 (1998). ダイズタンパク質の血漿コレステロール低下作用とリノール酸代謝調節効果, 「ダイズのヘルシーテクノロジー」, 河村幸雄, 大久保一良編, (光琳, 東京), pp. 59-72.
- 谷坂隆俊ら (2010). 大豆の化学・大豆の機能性, 「大豆の全て」, 喜多村啓介ら編, (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 96-326.
- Thanh, V. H., and Shibasaki, K. (1976). Major proteins of soybean seeds, A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1117-1121.
- Toda, K., Chiba, K., and Ono, T. (2007). Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. *J. Food Sci.*, 72, C108-113.
- Toda, K., Yagasaki, K., and Takahashi, K. (2008). Relationship between protein composition and coagulation reactivity, particulate formation, and incorporation of lipids in soymilk. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72, 2824-2830.
- 渡辺篤二, 中山修, 岩崎典子 (1963). 大豆タンパク質の低温処理による性状変化 (第1報). 日食工誌, 10, 163-166.
- 渡辺篤二, 海老根英雄, 太田輝夫 (1971). 大豆の化学的性質, 「大豆食品」, 渡辺篤二, 海老根英雄, 太田輝夫編, (光琳, 東京), pp. 9-46.
- Wu, S., Murphy, P. A., Johnson, L. A., Fratzke, A. R., and Reuber, M. A. (1999). Pilot-plant fractionation of soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 285-293.
- Wu, S., Murphy, P. A., Johnson, L. A., Reuber, M. A., and Fratzke, A. R.

(2000). Simplified process for soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin fractionation. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2702-2708.

Yagasaki, K., Kousaka, F., and Kitamura, K. (2000). Potential improvement of soymilk gelation properties by using soybeans with modified protein subunit compositions. *Breed. sci.*, 50, 101-107.

矢ヶ崎和弘, 坂元秀彦, 関功介, 山田直弘, 高松光生, 谷口岳志, 高橋浩司 (2010). ダイズ新品種「ななほまれ」の育成. 北陸作物学会報, 45, 61-64.

財団法人日本食品分析センター編 (2001). たんぱく質・脂質, 「分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説」, (中央法規, 東京), pp. 29-61.

## 謝 辞

本研究のとりまとめにあたり、終始懇切丁寧なご指導を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科国際地縁技術開発科学専攻 中嶋光敏教授に心より感謝申し上げます。

また、本論文をご校閲いただき、ご指導を賜りました同専攻 北村豊教授、同専攻 Marcos Antonio das Neves 助教、生物機能科学専攻 市川創作教授に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、当初よりご指導、ご助言をいただきました静岡県立大学食品栄養科学部 下山田真教授に深く感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、ご支援、ご協力を戴きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後に、いつも明るい笑顔で筆者を支えてくれた 2 人の息子 遥葵と稜捺、そして、妻 真希に感謝します。



## 付 記

本学位論文は以下の論文をもとにまとめたものである。

- 1) Morita, K. and Shimoyamada, M. (2013). Proposal of mechanism of the freeze-thaw fractionation of 7S and 11S globulins in soymilk. *Food Chem.*, 140(1-2), 39-43.
  
- 2) 守田和弘 (2013). 凍結解凍処理による豆乳中タンパク質の簡易分画技術. *食科工*, 60(5), 199-203.
  
- 3) Morita, K., Shimoyamada, M. and Nakajima, M. (2015). Effects of freeze-thaw treatment on the characteristics of soymilk and formulated tofu curd. *Food Sci. Technol. Res.*, 21(1), 125-128.
  
- 4) Morita, K., Shimoyamada, M. and Nakajima, M. (2015). Effects of freezing temperature on the freeze-thaw fractionation of soymilk. *Food Sci. Technol. Res.*, 21(6), 863-867.