

## 酵素を利用した大豆加工技術

馬場紀子\*・堤 智博

大豆加工工程中に発生するオカラを低減させるため、酵素を利用した新しい加工方法を検討した。

丸大豆にセルラーゼおよびペクチナーゼの2種類の酵素を反応させた結果、pH6.5、23℃、6時間の反応条件下では約5%のオカラが削減された。また、pH4.5、40℃の反応条件下では約11%のオカラが削減されたが、いずれの場合も、酵素による大豆の分解効果は十分でなかった。

セルラーゼ、ペクチナーゼおよびプロテアーゼの3種類の酵素を用い、加熱処理した大豆をpH4.5、40℃の条件下で攪拌反応させた場合、3時間で95%の大豆が溶解した。また、この反応液はアグリコン型イソフラボンやACE活性阻害能の増加などの機能が付加され、新しい食品素材として期待できる。

[キーワード 大豆, 酵素, オカラ, イソフラボン ACE 阻害活性]

Soybean Processing Using Enzymatic Treatment. BABA Noriko and Tomohiro TSUTSUMI (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 26:13-17 (2007)

We examined a new processing method using enzymatic treatment to reduce residual substances, such as Okara, that remain after processing soybeans into tofu.

As a result of forcing a reaction of two kinds of enzymes (cellulase and pectinase) in the soybeans for six hours, the amount of Okara that resulted after processing was reduced by about 5% under a reaction condition of pH 6.5 at 23 °C. In addition, Okara was reduced by about 11% under a reaction condition of pH 4.5 at 40 °C. However, in both cases, the resolution effect was insufficient.

When we used soybeans heated for about 15 min at 120°C and three kinds of enzymes (cellulase, pectinase and protease), 95% of the total quantity of soybeans was liquefied in three hours under conditions of pH 4.5 at 40°C. This reaction liquid was found to contain a larger amount of functional ingredients such as isoflavone aglycons and the ACE obstruction ability, which is expected to be used as a new food material in the future.

[Keywords: soybean, enzyme, isoflavone, ACE obstruction ability]

### 緒 言

豆腐など大豆加工工程中に発生するオカラは、産業廃棄物として環境に負荷を与えるだけでなく、オカラ中に含まれるイソフラボンなど有用成分を有効利用する点からも、オカラを排出しない大豆加工法や利用法の開発が望まれている<sup>7)</sup>。

これまで、オカラを排出しない豆腐の製造方法として、マスコロイダー等を用いた微粉碎化技術<sup>8) 9)</sup>が開発され、豆乳や豆腐へ利用されている。しかし、大豆は脂質が約20%と多く、粉碎工程中の発熱によりタンパク質が変性したり風味が変化するため少量ずつしか粉碎できない。そのため、粉碎機械が高額であるにもかかわらず、生産性が低いのが問題である。

また、酵素を用いたオカラの利用技術についても開発が進み、澤産業株式会社は、オカラにペクチナーゼ等酵素を加え、機械的粉碎処理を加えながら液状化する技術を開発した<sup>12)</sup>。液状化されたオカラは豆腐原料として用いられ、食物繊維が豊富な「オカラ入り豆腐」が販売されている。

筆者らは、さらに簡易な加工技術として、丸大豆に直接酵素処理を行い、微粉碎処理を行うことなくオカラを低減させる技術を検討した。

また、イソフラボンなどの有効成分の酵素処理に伴う

変化について明らかにした。

### 試験方法

#### 1 供試原料

大豆は、タンパク質含量が高く加工用原料として評価が高い品種「フクユタカ」を用いた。

#### 2 供試酵素

酵素は全て市販の食品用酵素製剤を用いた。セルラーゼは、セルラーゼA「アマノ」3 (ASPERGILLUS NIGAR 起源, 天野エンザイム株式会社)、ペクチナーゼはマセロチム2A (RHIZOPUS 属起源, ヤクルト薬品工業株式会社)、プロテアーゼは、プロテアーゼMアマノG (ASPERGILLUS ORYZAE 起源, 天野エンザイム株式会社)を用いた。

#### 3 酵素活性評価方法

各pHに調製したMcIlvaine Bufferを用い、セルラーゼ活性はCMセルロースを基質とし、還元糖増加量をソモギネルソン法で測定した。ペクチナーゼ活性はペクチンを基質とし、遊離ガラクトサミンの増加量をカルバザール法で測定した。プロテアーゼはカゼインを基質とし、生成された水溶性タンパク質の増加量を比色定量法(ビュレット反応による還元Cu(+)とビスニコニン酸の発色反応。PIERCE社製BCA Protein Assay Kit使用)で測定した。

各試験の結果は、最も高い活性を示した区を100とし、

\*連絡責任者 (食品流通部)

その相対値で各区を比較した。

4 豆腐製造を想定した酵素処理方法

通常の豆腐製造では、大豆の浸漬、粉碎、蒸煮、オカラ分離の工程を経て豆乳や豆腐の製造を行っている。筆者らは、大豆の浸漬時間が6~18時間前後と長時間であることに着目し、大豆の浸漬中に酵素を作用させることで大豆の外皮などを膨軟化し、オカラの排出率を簡易に低減させることを検討した。

まず、試験1では、既存の豆腐製造装置をそのまま利用した場合の酵素処理効果を検討し、試験2では若干の機材の追加は必要となるが、既存の豆腐製造工程を改変して利用した場合の酵素処理効果を検討した。

試験1：セルラーゼおよびペクチナーゼを大豆乾物あたり1%加え、23℃6時間静置反応させた。反応後の大豆をホモジナイザーで90秒間粉碎し、鍋で10分間蒸煮後に搾汁し、豆乳とオカラに分けた。手絞りによる誤差を少なくするため、オカラは水道水で洗浄後乾燥し、重量を測定した。

試験2：セルラーゼおよびペクチナーゼを大豆乾物あたり1%加え、pH4.5のMcllvaine Bufferを用い、45℃、8時間振とう反応させた。大豆の前処理方法として無処理（水浸漬のみ）と120℃20分加熱処理した区を設定した。2時間毎に反応液を採取し、還元糖（ソモギネルソン法）および水溶性タンパク質（PIERCE社製BCA Protein Assay Kit）を測定した。

5 新規食品素材開発のための酵素処理方法

反応槽は2000ml容攪拌式ファーメンター（サクラ精機製TBR-2）を用いて約1000mL規模で試験を行った。大豆の前処理条件および酵素添加量は第3表のとおりで、大豆溶解率は残渣固形物を乾燥、秤量し、原料大豆量から換算して求めた。

6 イソフラボンの測定

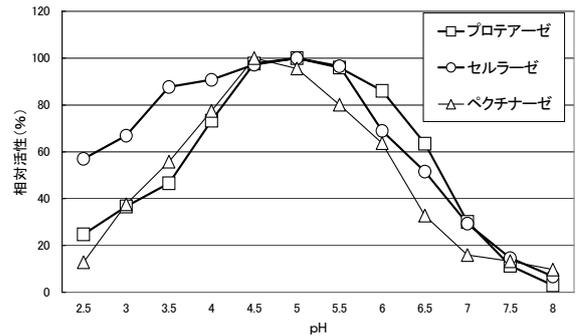
イソフラボン含量は、Kudouら<sup>6)</sup>の方法に準じて高速液体クロマトグラフで測定した。カラムはYMC-Pack ODS-AM-303(4.6×250mm)、移動層は15%および35%アセトニトリル溶液を流速1.0mL/分で50分間の直線グラジエントを行い、UV254nmで検出した。標準試薬は（株）フジッコ製の12種類の大豆イソフラボンを用いた。

7 アンジオテンシンI変換酵素阻害能

セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼの3種類の酵素をそれぞれ1%加え、45℃pH4.5の条件で大豆と反応させ、反応直後（0時間）、2時間後および5時間後の反応液を採取した。各反応液は10倍に希釈し、アンジオテンシンI変換酵素およびその酵素基質を添加し、37℃で30分反応後、OPA試薬で発色させ、蛍光検出器で測定した。

8 一般生菌数測定

各酵素反応液中に含まれる一般生菌数は、標準寒天培地を用いた平板培養法で、37℃48時間培養後に生じたコロニー数をカウントし、測定した。



第1図 pHの違いによる酵素活性の変化

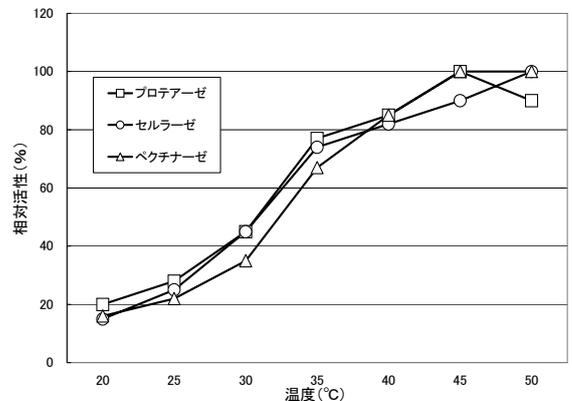
1) 40℃、1時間振とう反応

結果および考察

1 酵素活性に及ぼすpHおよび温度の影響

供試した3種類の酵素活性について、pHの影響を第1図に示した。いずれの酵素もpH4.5~5.0に至適pHを有した。通常、豆乳や豆腐の製造工程では、水浸漬時を含めpH6.5付近で推移するが、pH6.5での相対活性はセルラーゼ51.5%、ペクチナーゼ32.7%、プロテアーゼ63.5%といずれも低かった。

酵素活性に及ぼす反応温度の影響を第2図に示した。各酵素とも45℃までは温度が高くなるほど活性は高くなったが、50℃ではプロテアーゼ、ペクチナーゼは活性が低下または横ばいし、酵素タンパク質の熱変性による活性低下の危険性が示唆された。



第2図 反応温度の違いによる酵素活性の変化

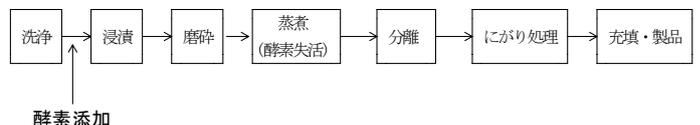
1) pH4.5Mcllvaine Buffer、1時間振とう反応

2 豆腐製造工程における酵素処理

1) 豆腐製造工程における酵素処理技術

試験1

酵素反応フローを第3図に示した。添加した酵素は蒸煮時の加熱で失活するので、既存の豆腐製造工程以外の機械・施設等は必要ないことが利点であると考えられた。



第3図 豆腐製造工程における酵素処理フロー

第1表 23℃ 6時間静置反応によるオカラ削減効果

試験区	豆乳量 (ml)	オカラ重量 (g)	一般生菌数 (cfu/ml)
無処理	419.0(100.0)	35.8(100.0)	3.3×10 <sup>3</sup>
セルラーゼ1%	443.2(106.0)	35.0(97.8)	4.4×10 <sup>3</sup>
ペクチナーゼ1%	404.2(96.7)	36.9(103.2)	5.2×10 <sup>3</sup>
セルラーゼ1% +ペクチナーゼ1%	438.6(104.8)	33.9(94.6)	—

- 1) 酵素量：大豆乾物あたり
- 2) 豆乳量：大豆 100 g あたり。Brix13 に換算
- 3) オカラ：大豆 100 g あたりの乾物重
- 4) カッコ内は無処理を 100 とした場合の比率
- 5) 一般生菌数：—は未測定

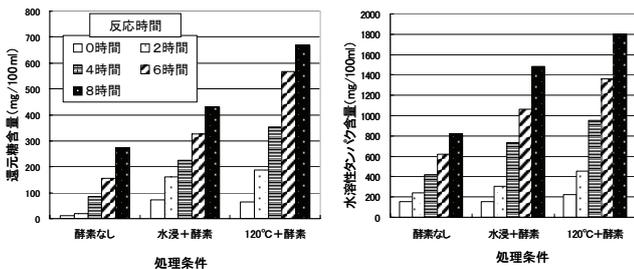
本試験は豆腐の製造方法として適用できるよう、タンパク質分解に関与するプロテアーゼ酵素は用いず、セルラーゼとペクチナーゼのみを供試した。なお、酵素濃度はオカラの液状化の事例<sup>12)</sup>に準じ、1%濃度とした。

酵素を 23℃6 時間反応させた場合のオカラ削減効果を第1表に示した。セルラーゼまたはペクチナーゼを単独で反応させるよりも2つの酵素を併用した場合の方がオカラの削減率は高く、豆乳収量も増加した。この場合のオカラ削減率は約5%であった。

Stomabaugh ら<sup>14)</sup>は、大豆の細胞壁を構成する多糖について、種皮は主にセルロースとヘミセルロース、子葉は主にペクチンであると報告している。このことから、ペクチナーゼ単独では種皮の分解が困難であり、また、セルラーゼ単独では種皮の分解は可能でも子葉の分解までは至らなかったため、オカラの削減効果が低かったものと考えられた。したがって、オカラの削減効果を高めるためには、種皮と子葉の多糖類を分解できるよう、ペクチナーゼとセルラーゼを併用する必要があると考えられた。また、酵素はタンパク質の一種であり、加熱により失活しやすいため殺菌ができない。酵素製剤中に含まれる微生物の影響を明らかにするため、反応後の一般生菌数について調査し、結果を第1表に示した。酵素を添加した場合の生菌数は、無処理区よりもやや多い傾向を示したが、いずれも 104 以下で、食品製造上問題ないと考えられた。必要であると考えられた。

試験2

試験1の結果より、現行の豆腐製造条件内で酵素を利用すると、酵素の最適条件から離れるため、約5%のオ



①還元糖含量の変化 ②タンパク含量の変化

第4図 酵素処理条件が浸漬液の成分に及ぼす影響

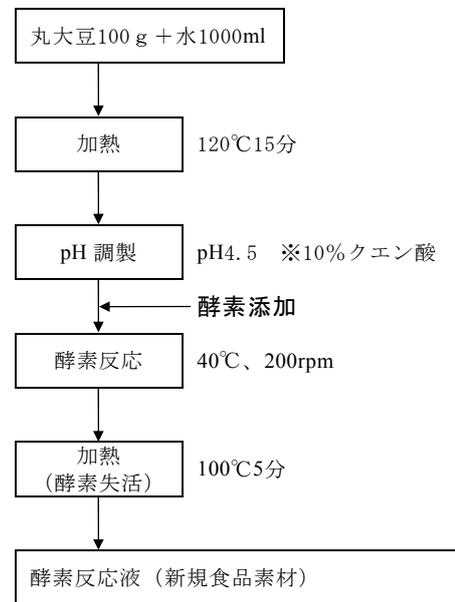
第2表 酵素最適条件下におけるオカラ削減効果

大豆前処理方法	酵素反応の有無	オカラ重量 (g)
水浸漬	無	30.2 (100.0)
水浸漬	有	27.8 (92.0)
加熱処理	有	26.7 (89.0)

- 1) 酵素：セルラーゼとペクチナーゼをそれぞれ1%添加
- 2) オカラ：大豆 100 g あたりの乾物重
- 3) カッコ内は無処理を 100 とした場合の比率
- 4) pH4.5、45℃、8時間振とう反応

カラ削減効果しか期待できない。そこで、pH、温度等を酵素反応の最適条件に設定し、また、大豆を加熱前処理することで組織を膨軟化し、酵素反応の効率化およびオカラ削減率の向上効果を検討した。なお、反応は、セルラーゼおよびペクチナーゼの相対活性がいずれも97%以上を示す pH4.5 (第1図) と、酵素の熱変性の危険性が低い 45℃ (第2図) の条件下で行った。

第4図のとおり、反応時間が長いほど浸漬液中の還元糖および水溶性タンパク質含量は増加し、酵素反応が進んでいることが示された。反応8時間後のオカラ削減率を第2表に示した。酵素処理区は約8%で、大豆の加熱処理を併用すると11%のオカラが削減された。また、酵素処理後は、大豆の外皮の多くは溶解していたが子葉のほとんどは形状を保ったままであり、子葉内部の分解効果はほとんど認められなかった。



第5図 酵素処理フロー

3 新規食品素材開発のための酵素処理技術

1) 酵素による大豆溶解性

大豆の子葉は、2~10μのプロテインボディと中性脂肪で主に構成され<sup>16)</sup>、ペクチン等多糖で細胞組織化されている<sup>14)</sup>ものと考えられる。2の結果より、セルラー

ゼとペクチナーゼ酵素だけの処理では、子葉中のタンパク質が邪魔で、子葉内部まで酵素が浸透せず、溶解率が低かったものと予想される。そこで、子葉を構成しているプロテインボディを溶解し、子葉の溶解率を高めるため、プロテアーゼ酵素の併用を検討した。

酵素処理フローを第5図に示した。反応は各酵素の至適域である pH4.5, 40°Cで行った。試験区は酵素濃度、大豆の加熱処理、反応時間を組み合わせたもので、結果を第3表、反応の様子を写真1に示した。

使用したファーメンターの攪拌効果により、酵素を使用しない場合でも12% (加熱なし)、または22% (120°C処理) の大豆溶解率を示した。セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼの3種類の酵素を大豆乾物あたりそれぞれ1%使用した場合、大豆の加熱処理を行わなかった場合は、溶解率15%と低いが、同量の酵素でも97°Cまたは120°Cの加熱処理を行うと66%または95%と溶解率は大幅に向上した。また、120°Cの加熱処理では、3時間の反応で大豆の95%が溶解し、さらに、酵素添加量をそれぞれ0.5%まで減じて同様の効果が得られることが明らかになった。

第3表 酵素処理条件と大豆溶解率

試験区	反応条件			大豆溶解率 (%)	反応後の一般生菌数 (cfu/ml)
	酵素濃度 (%)	大豆前処理温度 (°C)	反応時間 (h)		
対照区	—	—	6	12	102~104
	—	120	6	22	30 未満
酵素処理区	1	—	6	15	102~104
	1	97	6	66	30 未満~102
	1	120	6	95	30 未満
	1	120	3	95	30 未満
	0.5	120	3	95	30 未満

- 1) 酵素：セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼを併用
- 2) 酵素濃度：各酵素のそれぞれの添加量 (乾物大豆あたり)
- 3) 大豆の加熱処理は各温度に到達後、15分間行った。
- 4) 反応はすべて pH4.5 (クエン酸調整) 条件下



写真1 フェーメンターによる反応の様子(左)および残渣(右)  
1)それぞれ、左がコントロール、右が酵素反応 (120°C加熱処理)

大豆にはプロテアーゼ酵素の働きを阻害するトリプシンインヒビター (以下、「TI」) が多量に含まれており、盛永10は、丸大豆「スズヌタカ」のTI活性 (67.7TIU/大豆mg) は、100°C20分加熱した場合で2.8% (1.87TIU/大豆mg)、120°C30分加熱した場合は0.9% (0.63TIU/大豆mg) まで低下することを報告している。このことから、加熱前処理を行わないと、大豆中TIの阻害作用でプロテアーゼ酵素の効果は期待できないため、本試験でも非加熱の大豆の溶解率が低く、大豆の加熱処理により溶解率が大幅に向上したものと推測できる。

また、大豆を120°C処理すると酵素反応後の生菌数は

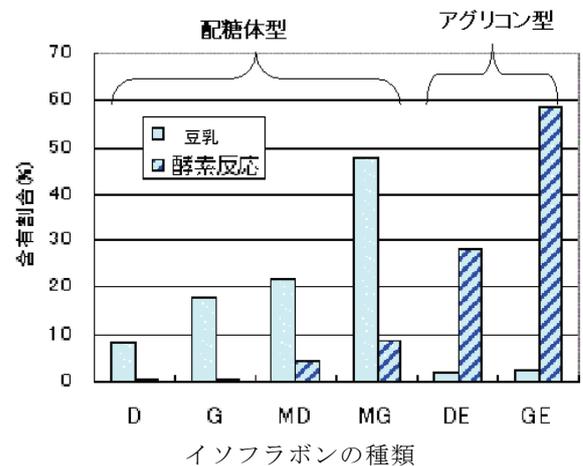
30cfu/ml以下に抑えられ、食品製造上良好な結果となった。

2) 内容成分の変化

(1) イソフラボン

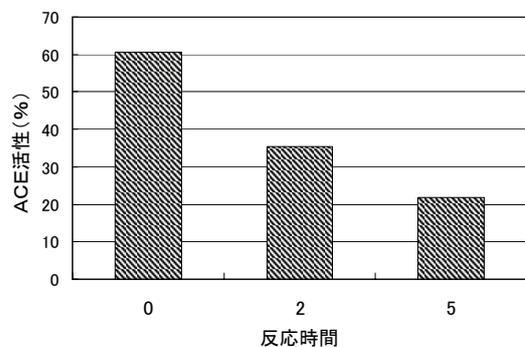
同じ原料から調製した豆乳と、酵素処理後の反応液のイソフラボン組成を調査し、主な6種類のイソフラボンについて、含量の合計値に対する相対割合を第6図に示した。豆乳中のイソフラボンはマロニル配糖体タイプのマロニルゲニスチンとマロニルダイズインが最も多く、次に配糖体タイプのゲニスチンとダイズインが多かった。このように、豆乳中におけるイソフラボンの多くは配糖体型であることは、遠藤<sup>1)</sup>や扇谷<sup>11)</sup>の大豆のイソフラボンについての調査結果と一致する。

一方、酵素反応液は、アグリコン型であるゲニスチン、ダイゼインがほとんどであり、酵素反応の過程で配糖体型イソフラボンからアグリコン型イソフラボンへ変化していることが明らかになった。



第6図 酵素処理によるイソフラボンの変化 (平成16年)

- 1) D:ダイズイン, G:ゲニスチン, MD:マロニルダイズイン, MG:マロニルゲニスチン, DE:ダイゼイン, GE:ゲニスチン
- 2) イソフラボン総含量 (大豆100gから最終液量700mlとした場合) 豆乳: 24.1mg/100ml、酵素反応液: 30.0mg/100ml
- 3) 豆乳は常法により調製



第7図 酵素反応液のACE活性阻害

イソフラボンは、大豆中では多くが配糖体の形で存在しているが、味噌などの大豆発酵食品においてはその発酵微生物の $\beta$ -グルコシターゼによりイソフラボン配糖体が加水分解され、アグリコンの含有量が高くなっている<sup>2) 4)</sup>。しかし、同じ大豆発酵物である納豆では、アグリコン型イソフラボンへの変化はほとんどなく<sup>13)</sup>、微生物の種類で $\beta$ -グルコシターゼの活性の有無に差がある。本研究に供試した食品用酵素製剤は、発酵微生物 *ASPERGILLUS NIGAR* および *ASPERGILLUS ORYZAE* を起源としており、いずれも $\beta$ -グルコシターゼを有している<sup>2) 4) 5)</sup>。これらの酵素製剤はセルラーゼやプロテアーゼ酵素を主目的として精製されたものであるが、精製工程の際、 $\beta$ -グルコシターゼ酵素が分離されず、実際の酵素反応過程で活性を示したため、本試験結果に示されるアグリコン型イソフラボンの増加につながったものと推察される。

なお、本報告は、3種類の酵素を同じ濃度で添加した場合の結果であり、今後コスト削減のためには、各酵素毎の最低必要量を明らかにする必要がある。

#### (2) ACE 活性阻害能

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) は、血圧制御にかかわる酵素であり、ACE 活性阻害能の高いペプチドを含む食品のいくつかはすでに特定保健用食品として販売され、血圧上昇抑制効果が期待されている<sup>13)</sup>。米倉らは、大豆ホエイタンパク質をプロテアーゼ処理し、ACE 阻害ペプチドを単離したことを報告している<sup>14)</sup>。本研究においても、大豆にプロテアーゼ処理することでこのような ACE 活性を示す大豆ペプチドが増加することが予想されたので、酵素反応中の ACE 活性阻害能について調査し、第7図に結果を示した。

反応時間が長くなるほど ACE 活性は阻害され、プロテアーゼ処理による有用大豆ペプチドの増加が示唆された。

#### (3) 酵素反応液の食品素材としての特徴

本試験による酵素反応条件下では、加熱、酸、プロテアーゼ処理により大豆タンパク質は変性と分解が進み、タンパク質関連成分は分離・沈殿しやすい性質がある。また、pH 調整のために添加したクエン酸等のため反応液の酸味が強い。このことから、反応液は豆腐などへは利用できないが、ムースなどへの利用は十分可能である。

### まとめ

農産物の加工処理における残渣は、産業廃棄物として環境に負荷を与えるだけでなく、有用なバイオマス資源の損失の面からも、減少させる必要がある。

本研究では、オカラの削減や大豆の液状化を目標に、簡易な工程での酵素処理方法を検討したが、セルラーゼとペクチナーゼの組み合わせではオカラの削減率は11%までが限界であった。しかし、セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼを用い、pH4.5、40°C、攪拌反応の条件下で加熱前処理した大豆を酵素処理すれば、わずか3時間で95%の大豆が溶解し、液状化できることを明らかにした。

なお、本技術のコスト削減をさらに図るためには、酵素の添加量や pH など、各製造条件と反応速度の関係を明らかにする必要がある。しかし、本処理方法はマスコ

ロイダーなどによる微粉碎処理を伴わないため、従来の技術と比較して初期投資が少なく、簡易に取り組める加工法であると考えられる。さらに、原料大豆にある程度の粗い粉碎処理工程をあらかじめ加えることで、より一層の効率化が図れるものと予想される。

得られた反応液は消化吸収の良いアグリコン型イソフラボンの増加や、ACE 活性阻害能の増加など新たな機能性が増加しており、新規食品素材として期待できると考えられる。

### 引用文献

- 1) 遠藤浩志・大野正博・丹治克男・島田信二・金子健太郎 (2003) 品種および産地の異なる大豆のイソフラボン含量および豆腐加工適性. 日本食品保蔵学会誌. 29(4): 221-228
- 2) 江崎秀夫・渡部綾子・増田均・大澤俊彦・川岸舜朗 (2001) 豆味噌醸造中のオルトヒドロキシイソフラボンの生成と挙動. 日食工誌 48(3): 189-195
- 3) 伊部さちえ・熊田薫・吉和美稔子・恩賀勉 (2001) イソフラボンアグリコン含有量の高い納豆の製造. 日食工誌 48(1): 27~34
- 4) 池田稜子・太田直一・渡辺忠雄 (1995) 大豆発酵過程における抗酸化性物質イソフラボンの変化. 日食工誌. 42(5): 322-327
- 5) 酵素ハンドブック (1995) 朝倉書店: 500
- 6) Kudou,S Fleury ,Y Welti,D (1991) Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds. Agric. Biol.Chem. 55(9): 2227-2233.
- 7) 松本 仁・森川謙二・荒又陽子・金井好男・古川勇次・駒井三千夫・伊藤道子・磯部明彦 (2000) オカラの食品への有効利用. New Food Industry. 42: 36-48
- 8) ミナミ産業株式会社 (特許出願 2001-179047) 豆乳の製造方法および豆腐の製造方法.
- 9) 溝淵信明 (特許出願 2003-98171) 豆腐の製造過程におから等の残粒物をださない豆腐の製造方法を得る.
- 10) 盛永宏太郎 (2001) 大豆種子の組織破壊が加水加熱時のトリプシンインヒビター失活に及ぼす影響. 日食工誌 48(6): 416-421
- 11) 扇谷陽子・相澤博・大谷倫子・藤田晃三 (2002) 大豆のイソフラボン量について、産地による比較. 札幌市衛研年報 29: 83-89
- 12) 澤産業株式会社 (特許出願 2006-19674) 機能性オカラ乳の製造方法
- 13) 篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一・食品機能研究法 (光琳): 109
- 14) S.K.Stomabaugh, J.H.Orf, H.G.Jung, and D.A.Somers (2003). Relationship between Soybean Seed Cell Wall Polysaccharides, Yield, and Seed Traits.Crop Sci. 43: 571-576.
- 15) 米倉政実・山本亜弥 (2004) 大豆ホエイおよびオカラたん白からの生理機能性ペプチドの単離と応用. 大豆たん白研究 7: 79-84
- 16) 渡辺篤二・海老根英雄・太田輝夫 (1999) 大豆食品. 光琳: 5-8, 20-32

