

固定化トランスグルタミナーゼを用いた おから乳含有豆乳からの豆腐の調製

岑 友里恵, 吉原志保, 村上海織, 東 敬子, 那須さやか,
田中友恵, 福永公寿[§], 佐伯 隆, 澤野悦雄*

山口大学工学部応用化学工学科

* 澤産業株式会社

Preparations of Tofu from Soymilk Containing Okara hydrolysates Treated with Immobilized Transglutaminase

Yurie Mine, Shiho Yoshihara, Kaori Murakami, Keiko Azuma, Sayaka Nasu,
Tomoe Tanaka, Kimitoshi Fukunaga[§], Takashi Saeki and Etsuo Sawano**

Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering,
Yamaguchi University, 2-16-1 Tokiwadai, Ube 755-8611

** Sawa Sangyou Co. Ltd., 170, Funaki, Ube 757-0216

In a reusing process of waste okara by the incorporation into tofu, the treatment of the okara hydrolysate (okara milk) and original soymilk mixture with transglutaminase (TGase) is required for the complete gelation of whole soymilk. To perform this enzymatic treatment economically, several immobilized microbial TGases were prepared with three support types and bioselective complexation between avidin (A) and biotin (B). The enzymatic activity of the immobilized TGase was either determined by benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-glycine and hydroxylamine or the whole soymilk as a substrate (50°C, 30 min). Of the prepared enzymes, the TGase immobilized on Lewatit VP OC 1065 resin, Lew-B-A-B-TGase, was selected as a practical biocatalyst given that it exhibited the highest specific enzyme activity. A breaking test of tofu prepared from the whole soymilk treated by Lew-B-A-B-TGase, with conventional coagulants such as glucono- δ -lactone showed an increase in breaking strength compared to untreated samples. In addition, the same immobilized TGase exhibited good operational stability, maintaining 100% of its initial activity even after 10 cycles of cross-linking of the soy proteins in the whole soymilk.

(Received Jul. 27, 2005 ; Accepted Oct. 16, 2005)

豆腐, 油揚げ, 湯葉や大豆タンパク質などの製造工程で排出される「おから(豆乳粕)」の量は, 1992年の時点で既に, 全国で年間70~80万トンにも達している¹⁾²⁾. おからには搾りきれない豆乳が大量に残存していて, 栄養に富んだ食品素材であるにも拘わらず, 昔に比べると食卓へのぼるのとはぐくわずかで, その他の一部は家畜の飼料, 肥料として用いられるものの, 大部分は産業廃棄物として処分されている. そこで, 現在, おからの資源化利用が強く求められており, 酵素処理改質³⁾及び乾燥による⁴⁾食品素材としての利用, 乳酸発酵培地としての利用⁵⁾, 酸加水分解後の水溶性多糖類(WSP)の乳化剤としての利用, 及び水溶性抗酸化物質原料としての利用⁶⁾などが行われている. 最近,

著者の一人はおからを酵素加水分解して「おから乳」とした後, 元の豆乳と混合して豆腐として回収するおからの利用法を開発した⁷⁾. このおからの資源化法では, 全豆乳と呼んでいるおから乳と豆乳の混合物の豆腐への凝固促進のためにトランスグルタミナーゼ(EC 2.3.2.13, R-glutaminyL-peptide : amine γ -glutamyl-transferase, TGase)処理が必要であり, 現在のところTGaseを固定化して用いた例はない. 固定化TGaseを用いると, 繰り返し使用することにより結果的に高価な酵素の使用量が少なくなる, 製品に酵素タンパク質が入らない, などの利点があり, 本研究では固定化TGaseを調製して全豆乳のTGase処理を行い, 処理可能な全豆乳量や得られた豆腐の凝固特性について通常の豆腐との相違などに関する知見を得た.

〒755-8611 山口県宇部市常盤台 2-16-1

* 〒757-0216 山口県宇部市大字船木 170

[§] 連絡先 (Corresponding author), fukun@yamaguchi-u.ac.jp

実験材料および方法

1. 実験材料

Streptovercillium sp. 由来の TGase は (株)味の素の食品タンパク質修飾用に TGase 入り酵素製剤 (アクティバシリーズ) として市販されているものから濃縮液として分離して用いた. 本研究で用いた TGase 製剤はアクティバ TG-K (TGase 1.0%, 乳酸カルシウム 75.0%, デキストラン他 24.0%), アクティバ TG-S (TGase 1.0%, ポリリン酸ナトリウム 5.0%, ピロリン酸ナトリウム (無水) 5.0%, L-アスコルビン酸ナトリウム 0.5%, 乳糖他 88.5%), ニューアクティバ TG (TGase 1.0%, 乳酸他 99.0%) 及びソイラーゼ B (TGase 0.7%, デンプン 69.3%, トレハロース 30.0%) である.

ブラッドフォード法に用いた色素 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) は Fulka Chemie 製で, ウシ血清アルブミン (BSA) は (株)伊藤ハム製 (組織培養用) である. ハイドロキサメート法で用いた試薬はベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンイルグリシン (Z-Gln-Gly), 還元型グルタチオン, ヒドロキシルアミン水溶液, 塩酸ヒドロキシルアミン, トリクロロ酢酸, 塩化第二鉄, ジメチルスルホキシド (DMSO), 及び ϵ -カプロラクタムでそれぞれ, (株)国産化学 (ペプチド用), 和光純薬工業 (株) (和光特級), 和光純薬工業 (株) (一級試薬), 和光純薬工業 (株) (一級試薬), 片山化学工業 (株) (生化学用), 片山化学工業 (株) (特級試薬, 六水和物), 和光純薬工業 (株) (化学用), 及び和光純薬工業 (株) (特級試薬) である.

TGase のビオチン化には (株)同仁化学研究所製の疎水性ビオチン化剤, 5-(N-Succinimidylloxycarbonyl)pentyl D-biotinamide (Biotin OSu) 及び親水性ビオチン化剤, Sulfo-succinimidyl N-(D-biotinyl)-6-aminohexanoate (Biotin Sulfo-OSu) を, またアビジンにはナカライテスク (株) の卵白アビジン (66,000 Da) を用いた.

固定化酵素担体のレパチット VP OC 1065 樹脂 (平均粒径 0.5 mm) はバイエルケミカルジャパン (株) 製, セルロースビーズは (株)レンゴー製のビスコパール AZ-4100 (平均粒径 4 mm), 寒天は和光純薬工業 (株) 製 (試薬特級) を用いた. 担体の活性化に用いた試薬は (3-アミノプロピル) エトキシシラン (APTES), グリシドール及び過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) でそれぞれ, 信越化学工業 (株), 和光純薬工業 (株) (分析級) 及び和光純薬工業 (株) (試薬特級) 製である. 担体中のアミノ基含量の定量に用いた試薬は O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート (TBTU), N-Fmoc-L-アラニン, 1-メチル-2-ピロリジノン, N-メチルイミダゾール, ピペリジン, 及び N, N'-ジメチルホルムアミド (DMF) でそれぞれ, 東京化成工業 (株), (株)ペプチド研究所, シグマアルドリッチケミカル

(株), 東京化成工業 (株) (一級試薬), 和光純薬工業 (株) (特級試薬), 及び関東化学 (株) 製 (有機合成用脱水試薬) である.

本研究で用いた全豆乳はおから乳と元の豆乳との体積比 1:2 で混合したもので, 固形分量とタンパク質量は全豆乳 100 g あたりそれぞれ, 11.9 g 及び 4.8 g であった. ソイラーゼ B で TGase 処理したものと未処理のものがあるが両者とも, 澤産業 (株) で調製された. 凝固剤には藤沢薬品工業 (株) 製のグルコノ- δ -ラクトン (GDL) 及び GDL と関東化学 (株) 製 塩化マグネシウム (MgCl_2 , 食品添加物) との混合物を用いた.

2. 実験方法

2-1. 市販酵素製剤からの TGase の分離

市販製剤のうちニューアクティバ TG は TGase 以外の主成分が低分子化合物の乳糖であるので, この製剤の水溶液を Na_2CO_3 緩衝液 (pH 11.0) によって pH を 7.0 に調整した後, セントリコンプラス 20 (ミリポア (株)), 分画分子量 10,000) を用いて 4°C で限外濾過濃縮を行い, TGase 濃縮液を得た.

2-2. TGase 水溶液の特性

2-2-1. タンパク質濃度の測定

酵素タンパク質濃度の測定はブラッドフォード法⁸⁾ により色素に CBB G-250, そして標準タンパク質として BSA を用いて行った.

2-2-2. 酵素活性の測定

TGase 活性測定にはハイドロキサメート法⁹⁾¹⁰⁾ を用いた. この方法は Z-Gln-Gly とヒドロキシルアミンを基質とし, 生成物の N-Z- γ -グルタモヒドロキサム酸の量を赤紫色の鉄錯体の量として 525 nm で分光光度定量するもので, 基質液の試薬 A (0.6 M Z-Gln-Gly, 0.2 M 還元型グルタチオン, 3.08 mM ヒドロキシルアミンのトリス塩酸緩衝液溶液) 及び, 反応停止と発色のための試薬 B (12% トリクロロ酢酸水溶液, 5% FeCl_3 の 0.1 M 塩酸水溶液及び 3 M 塩酸水溶液の 1:1:1 (v:v:v) 混合液) を用いるが, 本研究では Z-Gln-Gly が水不溶性のため水の代わりに 50% (v/v) DMSO 水溶液で試薬 A を調製して用いた. また原法⁹⁾¹⁰⁾ では γ -グルタモヒドロキサム酸で検量線を作成しているが, 本研究では ϵ -カプロラクタムと塩酸ヒドロキシルアミンとから合成した ϵ -アミノカプロヒドロキサム酸塩¹¹⁾ を標準物質として作成した検量線を用いた. 反応液 1 ml あたり, 毎分, 1 μmol の基質を変化させる酵素量を 1 ユニットと定義した⁹⁾¹⁰⁾.

2-3. 固定化 TGase の調製

2-3-1. TGase のビオチン化

栓付試験管中で Biotin Sulfo-OSu 13 mg (29.3 μmol) を脱気した水 0.1 ml に溶解させた. この溶液に 2-1. で得た TGase 濃縮液 1 ml と NaHCO_3 緩衝液 (0.02 M, pH 8.5) 0.5 ml を添加し, 25°C で 2 時間振とうさせた (130 strokes 毎

分). 反応後, セントリコンプラス 20 を用いて遠心限外濾過を行い (4°C, 4000 rpm), 未反応の Biotin Sulfo-OSu を除去した.

2-3-2. 固定化酵素担体の調製

(1) アミノ基を含有する固定化酵素用担体

I. レバチット VP OC 1065¹²⁾¹³⁾

レバチット樹脂を順次 50% (v/v) アセトン-水混合液, アセトン, 50% (v/v) アセトン-水混合液, 炭酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.5), そして水を用いて十分に洗浄した後, 減圧乾燥して固定化に供した.

II. アミノプロピルシラン化セルロースビーズ

セルロースビーズを無水トルエン中, 種々の濃度の APTES と反応させ¹⁴⁾¹⁵⁾, 反応物をアセトン, エタノール, 水の順で洗浄して減圧乾燥させた. 次いで, アミノプロピル基として担体に導入されたアミノ基の量を, TBTU 及び *N*-メチルイミダゾール触媒存在下に 1-メチル-2-ピロリジノン中で *N*-Fmoc-L-アラニンと反応させた後, 無水 DMF 中, ピペリジンで脱 Fmoc して生成したジベンゾフルベンピペリジン付加物の量を, そのモル吸光係数を波長 302 nm で 8100 として分光光度定量する方法^{16)~18)} により測定後, 酵素固定化に供した.

(2) アルデヒド基を含有する固定化酵素用担体

I. 寒天ゲルのアルデヒド活性化

寒天粉末 0.9 g を水 15 ml 中に懸濁させ, 加熱溶解後, シャーレ (φ8.5 cm) 中に 2 mm の厚さに入れ, 室温にまで放冷してゲル化させたものを金属製メッシュ (格子サイズ 2 mm) を使って 2 mm 角の立方体に分割した. この寒天ゲル 1 g をナス型フラスコに入れ, 0.16 M NaOH 水溶液 (6 mg/ml NaBH₄ を含む) とグリシドール 3.0 ml (45.6 mmol) を加え, 25°C で 18 時間振とうした. 濾取して水で洗浄した寒天ゲルをナス型フラスコに移し, 35 mM NaIO₄ 水溶液 10 ml を加えて 1 時間振とうし, ゲルを濾過して十分に水で洗浄した後, 酵素固定化に供した¹⁹⁾.

II. セルロースビーズのアルデヒド活性化

セルロースビーズ 1 g をナス型フラスコに入れ, 0.16 M NaOH 水溶液 (6 mg/ml NaBH₄ を含む) 20 ml とグリシドール 3.0 ml (45.6 mmol) を加え, 25°C で 18 時間振とうした. 濾取して水で洗浄したセルロースビーズをナス型フラスコに移し, 35 mM NaIO₄ 水溶液 10 ml を加えて 1 時間浸とうし, アルデヒド基を含むセルロースビーズを濾過して十分に水で洗浄した後, 酵素固定化に供した¹⁹⁾.

2-3-3. 固定化酵素担体への TGase の固定化

(1) アミノ基を含有する固定化酵素担体

Biotin-OSu 10 mg (29.3 μmol) を DMSO 0.6 ml に溶解させ, NaHCO₃ 緩衝液 (0.02 M, pH 8.5) 3 ml を加えた. この溶液にレバチット担体 14.7 mg (29.3 μmol のアミノ基含有) を加え, 25°C で 24 時間振とうさせた. このビオチン化レバチット担体を濾取し, リン酸緩衝液 (0.05 M, pH 6.0)

3 ml を用いて洗浄した. この樹脂の全量をアビジン 10 mg のリン酸緩衝液 (0.05 M, pH 6.0) 3 ml 中に加えて 25°C で 24 時間振とうした. アビジン結合樹脂を分離し, リン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) で十分に洗浄後, Biotin Sulfo-OSu でビオチン化した TGase の所定量及びリン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) 3 ml と混合し, 25°C で 2 時間振とうした. 固定化酵素 (Lew-B-A-B-TGase) を濾取し, リン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) で十分に洗浄した. アミノプロピル化セルロースビーズの場合も 10 粒 (48.5 μmol のアミノ基含有) の担体を用いて同様に固定化酵素 (Cell-B-A-B-TGase) を得た.

(2) アルデヒド基を含有する固定化酵素用担体

アビジン 10 mg をホウ酸緩衝液 (0.1 M, pH 6.0) 3 ml に溶解させ, アルデヒド活性化寒天担体 10 粒を入れ, 25°C で 24 時間振とうした後, NaBH₄ 1.0 mg を添加して, 更に 30 分振とうした. アビジン結合寒天ゲルを濾取し, リン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) で, 次いで水で洗浄した. このゲルの全量を Biotin Sulfo-OSu でビオチン化した TGase の所定量及びリン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) 3 ml と混合し, 25°C で 2 時間振とうした. 固定化酵素 (Agar-A-B-TGase) を濾取し, リン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) 次いで水で洗浄した後, 水の中で保存した. アルデヒド活性化セルロースビーズの場合も 10 粒 (48.5 μmol のアルデヒド基含有) の担体を用いて同様に固定化酵素 (Cell-A-B-TGase) を得た.

また, アルデヒド活性化寒天担体 10 粒を 2-1. で得た TGase 濃縮液 1 ml 及びリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) 3 ml の溶液に入れ, 25°C で 24 時間振とうした後, NaBH₄ 1.0 mg を添加し, 更に 30 分間振とうして固定化酵素 (Agar-TGase) を得た. アルデヒド活性化セルロースビーズの場合も 10 粒 (48.5 μmol のアルデヒド基含有) の担体を用いて同様に固定化酵素 (Cell-TGase) を得た.

2-4. 固定化酵素の TGase 活性の測定

2-2-2. の遊離 TGase に対しての場合と同様にハイドロキサマート法¹⁹⁾ で固定化 TGase の酵素活性を測定して, 固定化酵素の単位重量あたりの酵素活性 (比活性) で表示した.

2-5. 濁度法を用いた全豆乳に対する TGase 処理効果の評価法の検討

2-5-1. TGase 未処理全豆乳を凝固させない GDL 添加量の決定

50 ml の遠心管に全豆乳を 1 ml を入れ, 湯浴中で 70°C にまで加熱し, 水 20 ml を添加した. 0.1 g/ml 濃度の GDL 水溶液の量を 0~0.1 ml の範囲内で 8 種類変えて添加し, その後 8 分間凝析させた. 室温まで放冷後, 内容物を 10 分間遠心分離した (4°C, 2500 rpm). 上清液の波長 600, 660 及び 760 nm に対する透過率の変化を島津 UV1200 分光光度計で測定した.

2-5-2. 遊離 TGase 処理全豆乳を凝固させる GDL 添加量の決定

50 ml の遠心管に全豆乳を 1 ml 入れ、各 TGase 製剤 (アクティバ TG-K, アクティバ TG-S, ニューアクティバ TG 及びソイラーゼ B) の一定量 (遊離 TGase として 14 µg を含む量) を添加し、50°C で 30 分振とうした。水 20 ml を加えて、湯浴中で 70°C になるまで加熱した。そこで 0.1 g/ml の GDL を 40 µl 又は 50 µl 添加し、70°C のまま 5 分間凝析させた。室温まで放冷後、内容物を 10 分間遠心分離した (4°C, 2500 rpm)。上清液の波長 600, 660 及び 760 nm に対する透過率を分光光度計で測定した。

2-6. 固定化酵素を用いた全豆乳の繰り返し TGase 処理実験

50 ml の遠心管にそれぞれ、Lew-B-A-B-TGase 1.0 mg (3 粒), Cell-B-A-B-TGase 1 粒, Agar-A-B-TGase 1 粒、と全豆乳 1 ml とを加え、50°C で 30 分振とうした。固定化酵素を取り出した全豆乳液に水 20 ml を添加し、湯浴中で 70°C になるまで加熱した。そして、0.1 g/ml の GDL を 50 µl 添加して、70°C のまま 5 分間凝析させた。室温まで放冷後、内容物を 10 分間遠心分離した (4°C, 2500 rpm)。上清液の波長 600, 660 及び 760 nm に対する透過率を分光光度計で測定した。回収した固定化 TGase を水で洗浄し、再び新しい全豆乳の反応に用いる実験操作を 10 回繰り返し行った。

2-7. 固定化酵素単位量あたりの全豆乳処理限界量を求める実験

50 ml の遠心管に Lew-B-A-B-TGase 1.0 mg (3 粒) と体積量を種々変えた全豆乳 (5, 7, 10, 30, 50 ml) を加え、50°C で 30 分振とうした。反応後、固定化酵素を取り除いた全豆乳液から 1 ml を取り出し、それに水 20 ml を添加し、湯浴中で 70°C になるまで加熱した。そして 0.1 g/ml の GDL を 50 µl 添加して 70°C のまま 5 分間凝析させた。この後の上清液の透過率の測定は 2-5-2 及び 2-6 の実験における操作と同様にして行った。

2-8. 全豆乳から得られる TGase 処理豆腐と無処理豆腐との貫入試験に基づく凝固特性の比較

2-8-1. 全豆乳から GDL を凝固剤に用いて調製した豆腐

300 ml コニカルビーカーに TGase 処理したもの又は無処理の全豆乳 250 ml を入れ、85°C の恒温浴中で 80°C になったとき、所定量の GDL を添加してガラス棒でよく攪拌した。80°C に保温していた貫入試験用ガラス円筒 (直径 50 mm, 高さ 50 mm, 容積 100 ml) にその 70 ml を注ぎ入れ、キャップした。85°C の恒温浴中で 10 分間保持した後、その後、室温で 2 時間静置して貫入試験に供した²⁰⁾。

2-8-2. TGase 処理全豆乳から GDL-MgCl₂ 混合凝固剤を用いて調製した豆腐

80°C に保温しておいた貫入試験用ガラス円筒に 0.6% (w/v) で所定組成比の GDL-MgCl₂ 混合凝固剤を添加し、

それに 80°C に温めた TGase 処理全豆乳を 70 ml 注ぎ入れ、ただちにガラス棒で攪拌してキャップした。85°C の恒温浴中で 10 分間保持した後、室温で 2 時間静置して貫入試験に供した²⁰⁾。

2-8-3. レバチット担体固定化 TGase 処理全豆乳から GDL を凝固剤に用いて調製した豆腐

200 ml ナス型フラスコに全豆乳 150 ml と所定量のレバチット固定化 TGase を入れ、50°C で 30 分振とう後、固定化酵素を取り出した。この固定化 TGase 処理全豆乳を豆腐の調製に用いた。以後の実験操作は 2-8-1. と同様で GDL 濃度は 0.8% (w/v) とした。

実験結果および考案

1. 分離 TGase の酵素活性

ニューアクティバ TG から限外濾過法により単離した TGase 濃厚水溶液のタンパク質濃度 (BSA 基準) は 1 ml あたり 1.0 mg で、ハイドロキサメート法¹⁹⁾で測定した比酵素活性は 1 ml あたり 2.65 ユニットであった。この TGase 水溶液を以降の固定化酵素実験に用いた。

2. アミノプロピルシラン化セルロースビーズ中のアミノ基含量の定量

セルロースビーズ 1 g (170 個) に対して APTES を 1 ml, 2 ml, 5 ml, そして 10 ml 用いてアミノプロピル化した。定量結果から^{16)~18)} APTES 試薬を 2 ml (8.54 mmol) 用いて調製した場合のアミノ基含量が 10 粒あたり 48.5 nmol で最大であったので、セルロース担体にはこのアミノ基含量の調製物を固定化酵素実験に供した。

3. 調製した各種固定化 TGase の酵素活性

図 1 及び 2 に模式的に示した各種の固定化法で調製した固定化 TGase の酵素活性をハイドロキサメート法¹⁹⁾で測定した結果を表 1 にまとめた。ハイドロキサメート活性測定における 2 基質はどちらも低分子であるが、担体と酵素との間にスペーサー (ここでは -B- : -(CH₂)₅ -) があり、かつその長さが長いもの (-B-A-B-) ほど比酵素活性が大きい固定化 TGase が得られた。次のおから乳の TGase 処理には活性の大きい Lew-B-A-B-TGase, Cell-B-A-B-TGase 及び Agar-A-B-TGase の 3 種類の固定化酵素を用いた。

4. 濁度法を用いた全豆乳に対する TGase 処理効果の評価

TGase 処理効果を定量化するには処理試料中の生成した ε- (γ-glutamyl) lysine (ε-(γ-Glu) Lys) 結合量を直接測定する方法²¹⁾がある。しかし、この方法は試料を 4 種の酵素で ε-(γ-Glu) Lys の部分だけが残るように加水分解後、その量を HPLC で分離定量するものであり、複雑で時間もかかるため、本研究では武者ら²²⁾が大豆タンパク質に微量金属を捕集するための豆乳の凝固剤の GDL の添加量を最適化する際に用いた濁度法を応用することにした。

そのためにはまず、TGase 処理した全豆乳は凝析する

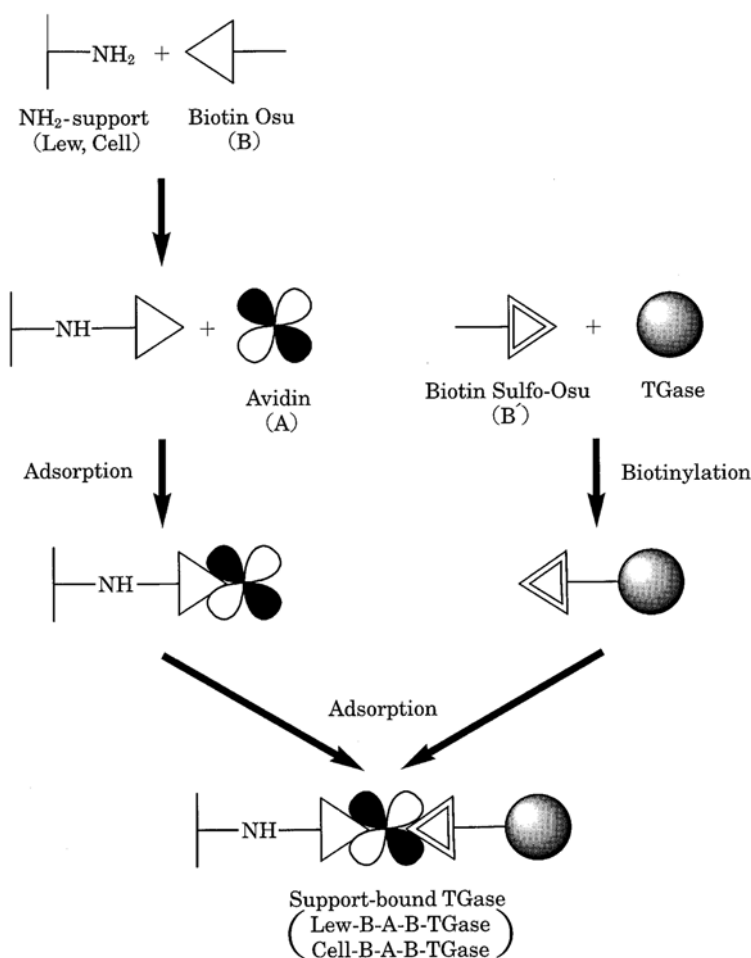


図 1 アミノ担体へのアビジン (A)-ビオチン (B) 結合を用いた固定化 TGase の調製スキーム

が、無処理のものは凝析しない GDL 添加量を求める必要がある。後者に関しては無処理全豆乳 1 ml の水 20 ml 懸濁液に 70℃ で種々の量の 0.1 g/ml GDL 溶液を添加した実験 2-5-1 の結果 (図 3) から 40 μl または 50 μl と判断し、今度は現行の処方⁷⁾に従って 3 種類の TGase 製剤 (アクティバ TG-K, アクティバ TG-S, ソイラーゼ B) の同一量の TGase で酵素処理した全豆乳 1 ml の水 70 ml 懸濁液に 70℃ で 0.1 g/ml GDL 溶液を 40 μl 又は 50 μl 添加して、前者に関する実験 2-5-2 を行った (図 4)。透過率を 3 つの波長で測定したのは種々の物質の濁度の測定にはこれら 3 つの可視部の波長が用いられているためで、3 つの波長での測定結果はマージン的に変化しているため、どの波長での結果も一致しているとみなせる (武者ら²²⁾ の大豆タンパク質の凝析では 760 nm が用いられている)。図 4 (a) の GDL 40 μl 添加では TGase 処理した全豆乳でも凝析できないが、同図 (b) の 50 μl 添加では凝析できることを示しており、この後の全豆乳の固定化 TGase 処理効果を定量化する全豆乳の凝析実験 2-6 における全豆乳 1 ml に対する 0.1 g/ml の GDL 溶液の添加量は 50 μl に定めた。

5. 固定化酵素を用いた全豆乳の繰り返し TGase 処理実験

全豆乳 1 ml を先に調製した固定化 TGase のうち、比酵素活性の大きい Lew-B-A-B-TGase 1.0 mg (3 粒), Cell-B-A-B-TGase 1 粒, Agar-A-B-TGase 1 粒を用いて 50℃ で 30 分間処理した。固定化酵素を除去後、4 で確立した濁度法によって TGase 処理効果を評価した。回収した同じ固定化 TGase を新しい全豆乳に作用させる繰り返し使用を合計 10 回行った結果を図 5 にまとめた。

図 5 から前 2 者は 10 回使用後も酵素活性は全く低下しないが (図 5 (a), (b)), 3 mm 角の寒天固定化 TGase は 4 回目まで 2 個, 6 回目まで 3 個, そして 10 回目では十数個に粉砕されてしまい、脆弱であることがわかった (図 5 (c))。そこで前 2 者のうち比活性が大きく、重くて全豆乳からの分離が容易な Lew-B-A-B-TGase を実用に適した固定化 TGase として選定した。

6. Lew-B-A-B-TGase の全豆乳処理量

図 6 に示した実験結果から本固定化 TGase 1.0 mg (3 粒 : TGase 68 μg 含有) は 50℃, 30 分で全豆乳 30 ml まで完全に処理できることがわかった。

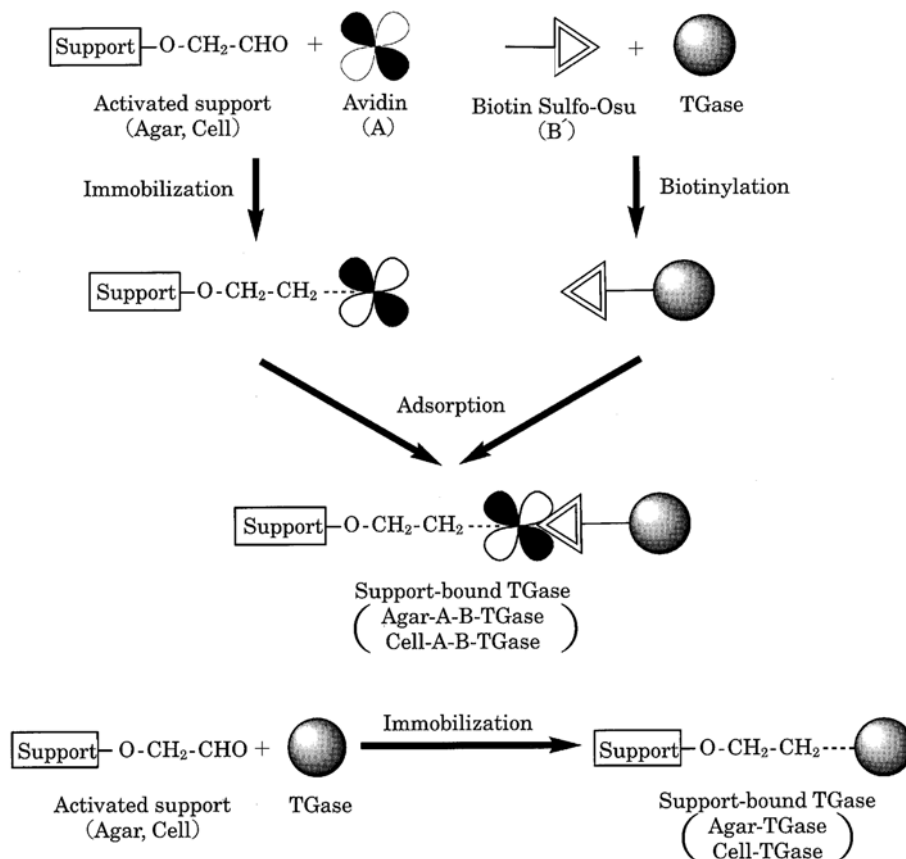


図 2 アルデヒド活性化担体へのアビジン (A)-ビオチン (B) 結合を用いた、及び直接結合による固定化 TGase の調製スキーム

表 1 調製した固定化 TGase の酵素活性

固定化酵素	量 (mg)	TGase 酵素活性 (ユニット)	比酵素活性 (ユニット/g-固定化酵素)
Lew-B-A-B-TGase	14.8	4.00	270
Cell-B-A-B-TGase	57	5.92	104
Agar-A-B-TGase	65.7	1.80	27.4
Cell-A-B-TGase	57	0.52	9.2
Agar-TGase	65.7	0	0
Cell-TGase	57	0.25	4.4

7. 貫入試験による全豆乳の TGase 処理効果の測定

7-1. GDL 凝固剤の場合

全豆乳の豆腐への凝固促進に TGase 処理が寄与していれば、同一凝固剤濃度でも TGase 処理全豆乳は破断強度の大きな豆腐を与えるものと考えられ、前報²⁰⁾ で用いた貫入試験装置により TGase 処理及び無処理全豆乳を種々の濃度 GDL で凝固させて得た豆腐の破断強度を測定した (図 7)。

図 7 の結果から、酵素処理全豆乳からの豆腐は無処理のそれからのものよりも破断強度が約 1.2 倍大きくなり、おから乳を含まない通常の豆腐の GDL に対する凝固挙動²⁰⁾ と異なり、最大強度の GDL 濃度を越えても急激に強度が低下しないことがわかった。添田ら²³⁾ も通常の豆乳 (固形分

1.6%, タンパク質 5.3%) に GDL 0.4% (w/w) 及び TGase を豆乳タンパク質 1g あたり 0~9.6mg 添加し、55°C で 30 分処理して凝固させた豆腐の貫入試験を行って破断強度を測定した結果、酵素量に比例して強度が増加し、1.9mg の添加量で最大に達することを報告している。このような TGase 処理効果はタンパク質間で ϵ -(γ -Glu) Lys 結合が形成されるためであり、そのため TGase はタンパク質加工食品の弾性強化に利用されることが多い²⁴⁾²⁵⁾。本研究でのおから乳の主成分はオリゴ糖、ペクチン質、糖類などの TGase の非基質なので、全豆乳の TGase による凝固促進も大豆タンパク質あるいはオリゴ糖とタンパク質の間の架橋生成に基づくものであろう。

7-2. GDL-MgCl₂混合凝固剤の場合

TGase 処理全豆乳に対して現在実用されているのは GDL-MgCl₂混合凝固剤であるので、その 0.6% (w/v) の総使用量での凝固剤組成と豆腐の破断強度との関係を調べた。図 8 の結果から通常の豆乳と TGase 処理全豆乳との大きな相違点は、前者では MgCl₂ 含量が 20~40% (w/w)

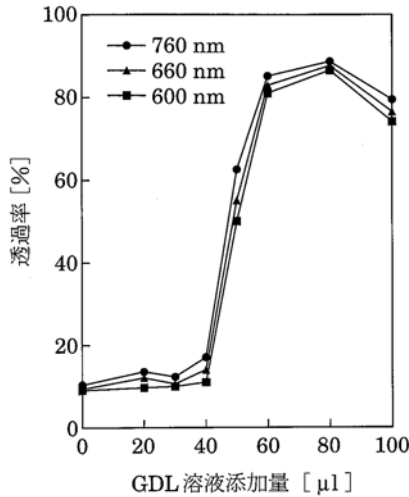


図 3 全豆乳 1 ml の水 20 ml 懸濁液の凝析に対する 0.1 g/ml の GDL 溶液添加量の影響

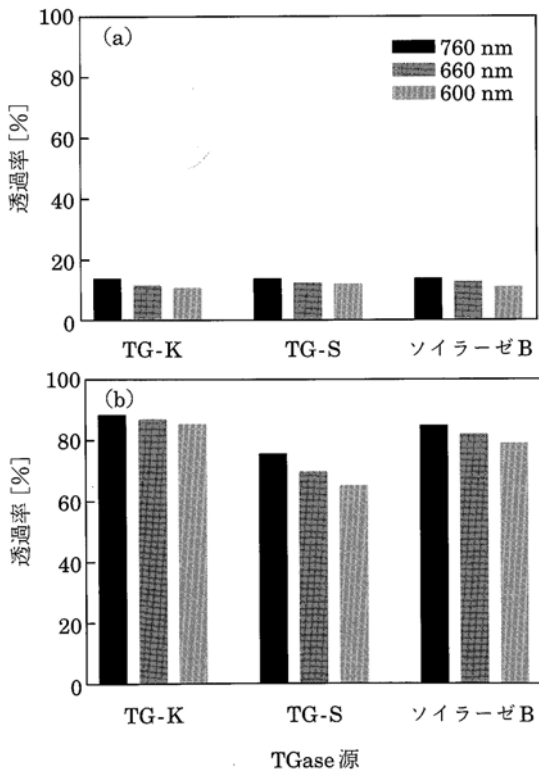


図 4 遊離 TGase (14 μg) 処理した全豆乳 1 ml の水 20 ml 懸濁液の凝析に対する 0.1 g/ml GDL 溶液の添加量の影響 (a) 40 μl, (b) 50 μl

の間でしか両凝固剤の寄与が加成的でない²⁰⁾のに対し、後者では全域で加成的である点で、TGase 処理全豆乳は通常の豆乳と異なり、酸凝固剤 (GDL) と塩凝固剤 (MgCl₂) の特性が量比に応じて反映される特性を有することがわ

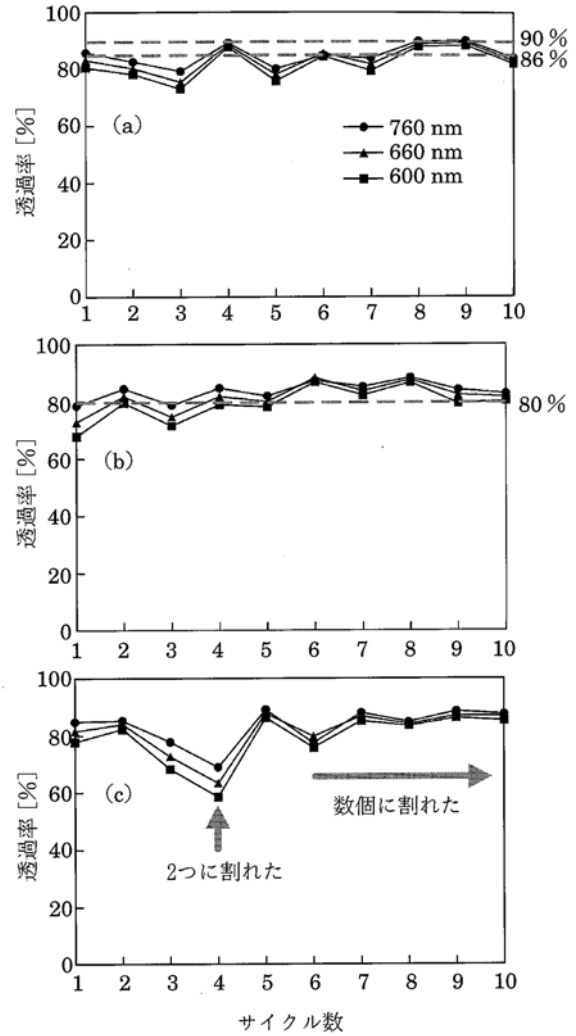


図 5 全豆乳に対する固定化 TGase の繰り返し使用 (a) Lew-B-A-B-TGase, (b) Cell-B-A-B-TGase, (c) Agar-A-B-TGase

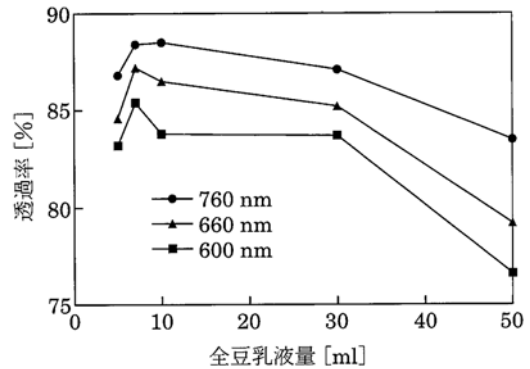


図 6 Lew-B-A-B-TGase 1.0 mg (3 粒) の全豆乳処理量限界

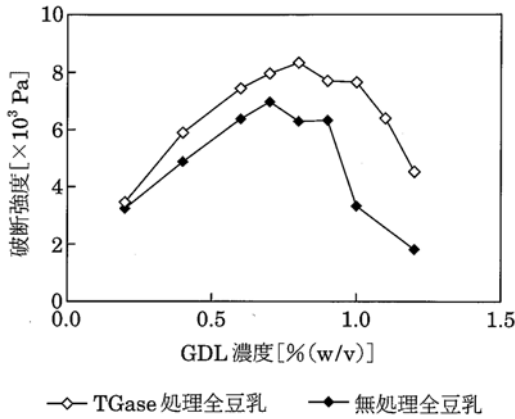


図 7 全豆乳と 0.3% (w/v) 以上の濃度の GDL とを用いて調製した豆腐に対する GDL 濃度と破断強度との関係

かった。これは、GDL が酸凝固剤で豆乳液の 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、一方、MgCl₂ は塩凝固剤で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てタンパク質サブユニットを会合させ、三次元ネットワーク構造を作ることにより豆腐ゲルを形成させるが、TGase 処理全豆乳ではすでにある程度のタンパク質が三次元架橋されているため、通常の豆腐の GDL-MgCl₂ 混合凝固剤による凝固では MgCl₂ の方の寄与が大きいのに反し、MgCl₂ の寄与が軽減された結果と考えられる。

7-3. Lew-B-A-B-TGase の全豆乳処理量

6. と同様に固定化 TGase 1.0 mg (3 粒) で種々の液量の全豆乳を酵素処理し、GDL 0.8% (w/v) で凝固させた豆腐の破断強度を貫入試験で測定した結果を図 9 に示した。

全豆乳液が 50 ml を越えると豆腐の強度が一定値に低下して酵素処理効果がなくなり、効果があるのは 30 ml 以下に対してであることがわかった。この結果は 6. の濁度法による測定結果とよく一致している。従って、5. の繰り返し実験の結果と合わせると、本固定化 TGase 1.0 mg で少なくとも 10×30=300 ml の全豆乳を豆腐にすることができ、TGase を固定化することにより現行のおからの豆腐としての資源化法における酵素コストを低減できることがわかった。

要 約

おからを酵素分解処理しておから乳と原豆乳と混合した全豆乳を豆腐にして資源化する方法において、全豆乳に作用させる TGase の固定化について検討を行い、以下の結果を得た。

(1) レバチット VP OC 1065 樹脂 (Lew)、セルロースビーズ (Cell) 及び寒天ゲル (Agar) の 3 種の担体にアビジン (A)-ビオチン (B) 間の特異的結合を利用した外部担体結合法により調製した 6 種の固定化 TGase のうちでハ

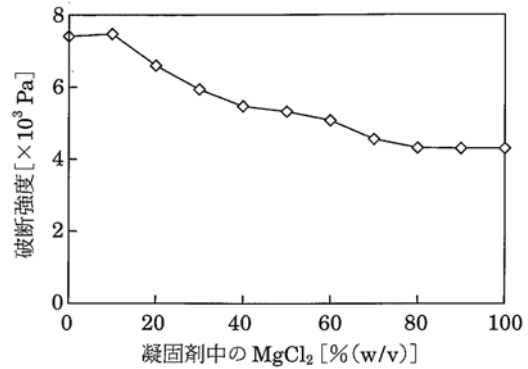


図 8 TGase 処理全豆乳と 0.6% (w/v) 濃度の種々の組成の混合凝固剤 GDL-MgCl₂ とを用いて調製した豆腐に対する凝固剤組成と破断強度との関係

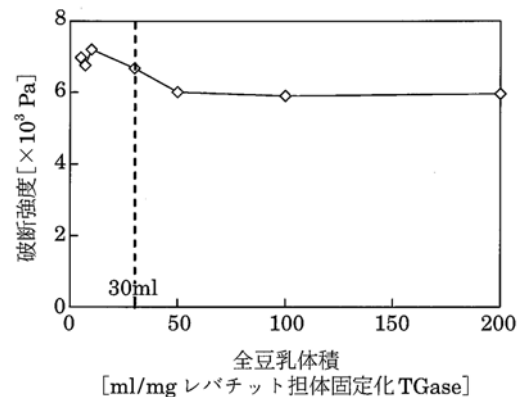


図 9 試料の表面破断時の荷重と単位レバチット担体固定化 TGase に対する全豆乳量との関係

イドロキサメート法による活性が大きかった、Lew-B-A-B-TGase、Cell-B-A-B-TGase 及び Agar-A-B-TGase を全豆乳の酵素処理 (50°C, 30 分) に用いた。それらの中で Lew-B-A-B-TGase 1.0 mg は 3 粒で TGase 68 μg を含有し、1 回分で 30 ml の全豆乳液の TGase 処理を少なくとも 10 回は全く活性低下なく行え、高活性かつ安定で、実用的な固定化酵素であることがわかった。

(2) 全豆乳の TGase 処理効果は GDL 添加による凝析度を濁度測定により、また GDL で凝固させて得られた豆腐の貫入試験による破断強度測定により定量化することができた。実際に得られた豆腐の貫入試験の結果から TGase 処理全豆乳に対する凝固剤 GDL 及び混合凝固剤 GDL-MgCl₂ の凝固特性は通常の豆乳に対するものと異なることが明らかになった。

文 献

- 1) 財団法人食品産業センター編、おからの産出と利用の現状・問題点、平成 3 年度大豆加工食品副産物高度利用研究開発事業報告書 (1992)。
- 2) 小出昭悟、豆腐おからをめぐる諸問題と有効利用に関する最近の傾向 (1) 一豆腐おからの排出現状と利用等の概要

- 一, PPM, 74-80 (1996).
- 3) 福島正子, 亀田郁子, 佐藤肇子, 白石由美子, 神保真理, 鈴木昌子, 平星直子, 岡本 奨, おからの酵素処理による改質 (I), 学苑, **490**, 66-75 (1980).
 - 4) 竹中哲夫, 竹中陽子, オカラ由来成分と抗酸化機能, 「食品素材と機能」, 普及版, シーエムシー出版編, (シーエムシー出版, 東京), pp. 79-93 (2005).
 - 5) 加藤丈雄, 志賀一三, 寺沢和弘, 乳酸発酵を利用したおからの保存性の改善, 日食工誌, **33**, 837-841 (1986).
 - 6) Yoshii, H., Furuta, T., Maeda, H. and Mori, H., Hydrolysis kinetics of okara and characterization of its water-soluble polysaccharides, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1406-1409 (1996).
 - 7) 澤野悦雄, 澤野 弘, 機能性豆腐の製造方法, 特願平 11-40482 (1999).
 - 8) Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
 - 9) 本木正雄, 沖山 敦, タンパク質ゲル化剤およびそれを用いるタンパクのゲル化方法, 特公平 6-65280 (1994).
 - 10) Folk, J.E. and Cole, P.W., Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase, *J. Biol. Chem.*, **241**, 5518-5525 (1966).
 - 11) Merten, R. and Weber, C., Pentamethylene-diisocyanat aus ϵ -Eaprolactan, *Synthesis*, 590 (1970).
 - 12) Chae, H.J., In, M.-J., Kim, E.Y., Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutalaldehyde, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **73**, 195-204 (1998).
 - 13) Chae, H.J. and Kim, E.Y., In, M.-J., Improved immobilization yields by addition of protecting agents in glutalaldehyde-induced immobilization of protease, *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 377-379 (2000).
 - 14) Chen, L. and Tsao, G.T., Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1463-1473 (1977).
 - 15) Sakurai, A., Nishida, Y., Saitou, H. and Sakakibara, M., Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 526-529 (2000).
 - 16) Engert, R.V., Hoffman, B. and Mergener, J.S., Stable attachment of the HMB-linker to continuous cellulose membranes for parallel solid phase spot synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 1029-1032 (1997).
 - 17) Ast, T., Heine, N., Germeroth, L., Mergener, J.S. and Wenschuh, H., Efficient assembly of peptomers on continuous surfaces, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 4317-4318 (1999).
 - 18) Scharn, D., Wenschuh, H., Reineke, U., Merger, J.S. and Germeroth, L., Spatially addressed synthesis of amino and amino-oxy-substituted 1,3,5-triazine arrays on polymeric membranes, *J. Comb. Chem.*, **2**, 361-369 (2000).
 - 19) Ichikawa, S., Takano, K., Kuroiwa, T., Hiruta, O., Sato, S. and Mukataka, S., Immobilization and stabilization of chitosanase by multipoint attachment to agar gel support, *J. Bioeng.*, **93**, 201-206 (2002).
 - 20) 岑 友里恵, 村上香織, 東 敬子, 吉原志保, 福永公寿, 佐伯 隆, 澤野悦雄, 豆腐製造における各種凝固剤の特性の比較, 日食工誌, **52**, 114-119 (2005).
 - 21) Kumazawa, Y., Seguro, K., Takamura, M. and Motoki, M., Formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross link in cured horse mackerel induced by drying, *J. Food Sci.*, **58**, 1086-1089 (1993).
 - 22) 武者宗一郎, 高橋芳久, 大豆タンパク質の凝固過程を利用する水中の微量金属の捕集, 分析化学, **24**, 365-370 (1975).
 - 23) 添田孝彦, 石井智穂, 山崎勝利, 村瀬知良, 豆腐物性に及ぼすトランスグルタミナーゼの影響, 日食工誌, **42**, 254-261 (1995).
 - 24) 添田孝彦, 外園亜紀子, 小澤貴彦, 藤原 尚, トランスグルタミナーゼ処理による食肉素材の接着機構, 日食工誌, **51**, 13-17 (2004).
 - 25) 添田孝彦, 金子智子, 外園亜紀子, 辻本久美子, 村上陽香, ゼラチンゲルの融点および物性に及ぼすトランスグルタミナーゼの作用, 日食工誌, **52**, 251-256 (2005).
- (平成 17 年 7 月 27 日受付, 平成 17 年 10 月 16 日受理)