大豆乳を利用したチーズよう食品の製造に関する研究

(第2報) 大豆乳の加熱処理およびカード製造時における
トリプシンインヒビター活性の変化

松岡博厚*・笹子謙治**

Manufacturing of a Cheese-like Product from Soybean Milk

Part II. Changes of trypsin inhibitor activity during heat treatment and curd formation from soybean milk

HIROATSU MATSUOKA* and KENJI SASAGO**

Changes of trypsin inhibitor (TI) activity existing in soybean milk, whey and curd were investigated to improve the ripening condition of cheese-like product.

1) The degree of residual TI activity in soybean milk samples after heat treatment are as follows: 100°C for 10 min., 32.8-33.9%; 100°C for 20 min., 27.4-31.3%; 120°C for 10 min., 10.8-15.1% and 120°C for 20 min., 3.5-8.1%.

2) Trypsin inhibitor activity units per mg of solid matter were 0.31 and 0.05 in whey samples treated at 100°C for 10 min. and 120°C for 20 min., respectively. In curd samples, they showed 0.19 and 0.09, respectively. Total TI activity existing in curd samples showed higher than that in whey samples.

4) Protease activities, produced by *Pen. caseicolum*, under the condition at pH 6.7 and 7.6 were little inhibited by the addition of unheated soybean milk sample and curd made from heat treated soybean milk (120°C for 20 min.).

(Receive Jan. 8, 1972)

前報¹⁾において著者らは、乳酸菌スターターとして、*Streptococcus thermophilus*、かびスターターとして *Penicillium caseicolum* を用いた大豆乳を利用したチーズよう食品の製造方法を設定し、検討を加えた。その結果、*Pen. caseicolum* の生育に伴うカードの熟成が、牛乳を用いたチーズの場合のように順調に進行しなかった。著者らはこのおもな原因のひとつが大豆乳の中に存在する各種阻害物質、とくにトリプシンインヒビター(以下 TI と略) よう物質によるものではないか、またこれらの阻害物質の存在が製品の消化性に影響するのではないかと考え、本実験においては大豆乳の加熱処理およびカード製造時における TI 活性の変化について検討した。

実験方法

1. 加熱大豆乳の調製

脱脂大豆粉体(日本タンパク社製のプロトンA)を約60°Cの温水に5%、10%および15%濃度になるよう溶解し、各濃度の大豆乳をそれぞれ100°C・10分間、100°C・20分間、120°C・10分間ならびに120°C・20分間加熱処理したものを試料とし、対照として加熱未処理試料を用いた。

2. カードの調製

チーズよう食品の製造方法¹⁾に従って、各条件下で加熱処理した15%濃度の大豆乳からカードを作製した。

* 東京都立立川短期大学(東京都昭島市東町 3-6-33)
Tachikawa College of Tokyo. (Akishima, Tokyo)

** 東京大学農学部(東京都文京区弥生 1-1-1)
Faculty of Agriculture, University of Tokyo. (Bunkyo-ku, Tokyo)

すなわち各 15% 大豆乳 200 g に塩化カルシウムを 1 g (10 ml の水に溶解) 50°C に冷却後添加し, 10 分間放置しカードを形成させる。次いでカードを切断し, 50°C にさらに 10 分間放置後フープに移し 400 g の重量でプレスし 1 晩放置する。得られたカードをガラス製ホモゲナイザーを用いて均質に磨砕し, 水に懸濁せしめ 25 ml 容にしたものをカードの TI 活性測定用試料とした。

また得られたホエーは回収し, TI 活性測定用試料として用いた。なお, カードおよびホエー中の全固形分量を常圧乾燥法により求めた。

3. TI 活性の測定

(1) トリプシン溶液

トリプシンの結晶 (NBC Trypsin 2×cryst (salt free) 5.7 mg を蒸留水に溶解し, 冷蔵したものをトリプシン溶液として用いた。

(2) カゼイン基質

メルク社製カゼイン M/15 をりん酸緩衝液 (pH 7.6) に 1% 濃度になるよう溶解し, 冷蔵したものを酵素反応基質として用いた。

(3) TI 活性の測定法

試料の添加によるトリプシン活性の変化を FOLIN 呈色法²⁾によって測定することにより TI 活性を求めた。

上記トリプシン溶液 1 ml に TI 活性を測定する試料溶液 (場合によって希釈) を 0~4 ml 加え, 4 ml 以下の場合には蒸留水を加え全量 4 ml とし, さらに 1% カゼイン溶液を 5 ml 加え 35°C で 1 時間反応させる。反応後 25% トリクロル酢酸溶液 5 ml を加え, 生成した沈でんを東洋濾紙 No. 5C を用いて濾過する。濾液 2 ml にアルカリ液 (0.55 M 炭酸ナトリウム溶液) を 5 ml, さらに FOLIN 試薬 1 ml を加え 35°C で 30 分間放置, 発色させ, 660 nm で比色し, あらかじめ作製した検量線より遊離チロシン量を算出した。

トリプシン活性は, 上記の条件においてカゼインより毎分 1 μ mole のチロシンを遊離する活性を 1 単位とした。

TI 活性は, 上記のトリプシン活性 0.01 単位を阻害するものを 1 単位として表わした。

4. *Pen. caseicolum* の酵素液

市販の食パンの白色部分 100 g を細断し, 5% グルコース溶液を 100 ml 加え, 加圧滅菌してパン培地を作製する。ツァベック氏斜面培地より滅菌生理食塩水に移し懸濁させた *Pen. caseicolum* の胞子をパン培地に接種し, 25°C で 12 日間培養する。培養後菌蓋をとりおのぞき, 2 倍量の蒸留水を加え十分混和する。低温に 3 時間

放置後, 濾過し, その濾液を酵素液とした³⁾。

TI 試料による酵素活性阻害試験は, トリプシンの場合に準じて行なったが, pH 7.6 のほかに pH 6.5 (*Pen. caseicolum* の産生する中性プロテアーゼの最適作用 pH⁴⁾) の条件においても阻害の影響を調べた。

結果および考察

1. 加熱未処理試料の TI 活性

未加熱処理試料に存在する TI 活性を知るために, 0.1% および 0.5% 大豆乳を調製し, トリプシン活性の阻害の程度を調べた。

その結果を第 1 図に示す。第 1 図にみられるように大豆乳の固形分量が 1.5 mg ぐらいまではトリプシン活性は直線的に阻害される。固形分量が 5.0 mg ではトリプシン活性 (28.7 μ g/ml) はほぼ完全に阻害されている。KUNITZ の報告⁵⁾によると, ほぼ同量のトリプシンと TI とが結合するとされている。これに基いて換算してみると, 大豆粉体中には約 1% 前後の TI が含まれていることになる。

2. 大豆乳の加熱処理による TI 活性への影響

加熱未処理試料においては, 5% 濃度の試料 0.1 ml の添加でも本実験条件下ではトリプシン活性は完全に阻害されている (第 2 図)。5% 大豆乳 0.1 ml 中の固形分量は 5 mg であり, 第 1 図の加熱未処理試料の結果にもみられるようにトリプシン活性がほぼ完全に阻害されるのは当然のことである。

10% および 15% 大豆乳試料は, 加熱処理後, TI 活性の測定時にはそれぞれ蒸留水で 2 倍および 3 倍希釈し, 5% 大豆乳と同固形分量とした。

100°C, 10 分間加熱の大豆乳 (前報¹⁾におけるチーズよう食品の製造工程にて設定した条件) では, 固形分量の

第 1 図 加熱未処理試料によるトリプシン活性の阻害

第2図 大豆乳の加熱処理による TI 活性の変化
(固形分量 5 mg の場合)

第3図 大豆乳の加熱処理による TI 活性の変化
(固形分量 25 mg の場合)

低い場合 (0.1 ml 添加, 固形分量 5 mg) には, 大豆乳の濃度にかかわらずトリプシン活性は完全には阻害されていないが (第2図), 固形分量の高い場合 (0.5 ml 添加, 固形分量 25 mg) にはほぼ完全に阻害をうけている (第3図)。100°C, 20 分間加熱した大豆乳においては, 100°C, 10 分間加熱処理した試料の結果にほぼ類似し, 濃度の影響は認められないが, TI 活性はより低下している。

120°C, 10 分間および 20 分間の加熱処理条件では, 100°C の加熱条件に比し TI 活性がかなり低下している。また大豆乳濃度の影響も幾分認められ, 固形分量 5 mg の場合には, 10% および 15% 濃度の試料が, 5% 濃度の試料に比し TI 活性の残存割合が高い傾向にある。ま

第1表 大豆乳の固形分 mg 当りの TI 単位および加熱による残存割合

大豆乳濃度(%)	5	10	15
加熱条件			
未加熱	—	—	—
100°C, 10 分間	0.88 (33.9)*	0.88 (33.9)	0.85 (32.8)
100°C, 20 分間	0.81 (31.3)	0.73 (28.2)	0.70 (27.4)
120°C, 10 分間	0.23 (10.8)	0.29 (11.2)	0.39 (15.1)
120°C, 20 分間	0.09 (3.5)	0.12 (4.6)	0.21 (8.1)

* () 内の数値は未加熱試料 1 mg 当りの TI 活性単位を 2.59 (第1図参照) として計算した TI 活性の残存割合 (%) を示す。

た固形分量を多く添加した場合でも, トリプシン活性を完全に阻害するには至っていない。

固形分 1 mg 当りの TI 活性単位をみても第1表のとおりである。加熱処理による TI 活性の残存率 (加熱未処理試料に存在する TI 活性を 100% とする) をみると, 100°C, 10 分間では 33~34%, 100°C, 20 分間では 27~31% であり, 上述のように大豆乳濃度による影響は認められない。しかし, 120°C, 10 分間の加熱処理では, 大豆乳濃度が 5% の場合の TI 活性の残存率は 10.8% であるが, 大豆乳濃度が 15% では 15.1% と高く, また 120°C, 20 分間の加熱においても 5% 濃度のさいの残存率は 3.5% であるのに対し, 15% 濃度の試料では 8.1% と TI 活性の残存割合は, 固形分当りの結果においても大豆乳濃度が濃いほど高い傾向にある。

3. カード製造時における TI 活性の移行割合

著者らがチーズよう食品の製造にさいし用いた大豆乳濃度 15% の試料において, 加熱処理後の TI 活性の残存率は, 120°C, 20 分間の条件ですら約 10% にも達していた。著者らが適用した 100°C, 10 分間の加熱処理条件ではその残存率は 30% 以上であった。残存する TI 活性がカードにどの程度移行し, またホエーに移る割合はどのくらいかを知るために, 各熱処理をした 15% 大豆乳を用いてカードを製造し, TI 活性の測定を試みた。

第2表に各熱処理条件におけるカードの収量, 固形分量, ホエー量などを示した。収量をみると, 加熱未処理試料から得たカードが最も高く (55.0%), 加熱条件が厳しいほど低い傾向にあり, 120°C, 20 分間処理した大豆乳からのカード収量が最も低い。(45.5%)。この傾向は, カードの固形分の収量においても認められる。

ホエーへの活性の移行をみると, 第4図に示したようにホエー 0.1 ml 中の TI 活性単位は, 100°C, 10 分間加熱処理した試料においては 2.6, 100°C, 20 分間: 1.17, 120°C, 10 分間: 0.70 ならびに 120°C, 20 分間:

第4図 各大豆乳から得られたホエーの TI 活性

第5図 各大豆乳から得られたカードの TI 活性

第2表 大豆乳の加熱処理条件がカードの収量、固形分量ならびにホエー量におよぼす影響

加熱条件	収 量		固形分の収量		カード中の ホエー量 (g)	ホエー量 (g)	ホエー中の固形分	
	重量(g)	(%)	重量(g)	(%)			重量(g)	(%)
未加熱	110	55.0	22.7	78.8	87.3	90	7.3	8.1
100°C, 10分間	96	48.0	21.2	73.6	74.8	104	8.8	8.5
100°C, 20分間	93	46.5	21.0	72.9	72.0	107	9.0	8.4
120°C, 10分間	97	48.5	21.4	74.4	75.6	103	9.6	8.3
120°C, 20分間	91	45.5	20.7	71.7	70.4	109	9.3	8.5

第3表 ホエーおよびカード中に存在する TI 活性の割合

加熱条件	ホエーの固形分 mg 当りの TI 活性単位	ホエー全量中の TI 活性単位	カードの固形分 mg 当りの TI 活性単位	カード全量中の TI 活性単位
未加熱	—	—	—	—
100°C, 10分間	0.31	2,704	0.19	3,965
100°C, 20分間	0.14	1,177	0.18	3,553
120°C, 10分間	0.08	721	0.12	2,503
120°C, 20分間	0.05	436	0.09	1,765

0.43 と加熱条件のきびしいほど当然であるが低い傾向にある。

ホエー中の固形分 mg 当りの TI 活性は、100°C, 10 分間の加熱処理の場合には 0.31 であるが、120°C, 20 分間では 0.05 単位と近く、前者の約 1/6 になっている（第3表）。これは 15% 大豆乳を加熱処理したさいの TI 活性単位の減少割合（100°C, 10 分間：0.85, 120°C, 20 分間：0.21）よりもさらに低い傾向にある。

各加熱条件にて処理した大豆乳より作製したカード中に残存する TI 活性測定の結果、カード溶液 0.5 ml（カード 100 mg に相当）における TI 活性単位は、100°C, 10 分間：4.13, 100°C, 20 分間：3.82, 120°C, 10 分間：

2.58 ならびに、120°C, 20 分間：1.94 である（第5図）。

カードの固形分 mg 当りの TI 活性単位は、100°C, 10 分間加熱処理した大豆乳からのカードの場合には 0.19 であるが、120°C, 20 分間処理の試料では 0.09 と約 1/2 に低下しているが、大豆乳およびホエーに比べ加熱による TI 活性単位の減少割合が小さいことが認められる。

ホエーおよびカードの固形分 mg 当りの TI 活性単位を全体的に比較してみると、100°C, 10 分間の加熱処理の場合を除いてカードの方が幾分高い傾向にある。100°C, 10 分間の条件においてはホエーが固形分 mg 当りの TI 活性が高いのは、熱に弱い TI がホエーに移行しやすいためではないかと思われる。条件は異なるが、

RACKIS⁶⁾ は大豆の水抽出液に酸を加え、蛋白質を等電沈殿させて得たホエー区分について TI の測定を行ない、ホエー区分には熱安定性の高い TI はわずかしかな存在しないのではないかと推定している。

ホエー中に移行した TI 全活性とカード中に残存する TI 全活性とを比較してみると、各加熱処理条件においてカードに残存する TI 活性が高い。ホエー中の TI 活性：カード中の TI 活性の比率は、100°C, 10 分間；1：1.4, 100°C, 20 分間；1：3.0, 120°C, 10 分間；1：3.5, 120°C, 20 分間；1：4.0 となり、加熱条件がきびしいほどカードに含まれる TI 活性の比率が高くなっている。BIRK ら⁷⁾ は、大豆中に熱安定性の高い TI を分離しているが、前述のように本実験においてもホエー区分には耐熱性 TI の存在がわずかであると考えられることなどから、上記の結果は、カードに残存する TI はホエーに移行した TI よりも耐熱性があるためと思われる。すなわち耐熱性 TI はカード生成時に蛋白質に吸着あるいは蛋白質と結合してカード中に残存する可能性が考えられる。

トリプシンの阻害反応に用いたホエーの添加量の影響をみると、0.1 ml 添加と 0.5 ml 添加における TI 活性単位は 100°C, 10 分間の加熱処理の場合にはホエーの添加量に比例していないが、これは第4図にみられるように 0.1 ml の TI 活性単位がすでに高く、0.5 ml 以下でトリプシン活性が完全に阻害されるため、その他の試料では添加量とほぼ比例している。しかし、カード試料の場合には、添加量と TI 活性単位とは 120°C 加熱処理したものに関しては必ずしも比例していない。これは耐熱性 TI によるトリプシン活性の阻害が、TI が蛋白質に吸着あるいは蛋白質と結合しているために円滑に起りにくいことに原因しているものと思われる。

カード中に活性が残存し、製品の消化性に影響するとも考えられ、 δ グルコノラクトンのような凝固剤を用いたさいの製造中における TI 活性の変化、またカード熟成中の TI 活性の消長を検討する予定である。

4. *Pen. caseicolum* の産生するプロテアーゼに対する影響

半硬質白かびチーズおよび大豆乳からのチーズよう食品の製造¹⁾にかびスターターとして用いた *Pen. caseicolum* は酸性、中性およびアルカリ性プロテアーゼを産生する⁴⁾。パン培地に培養して得た粗酵素液を用い、加熱未処理試料の添加による酵素活性の影響を調べた結果、チーズよう食品の熟成に最も関与すると思われる中性プロテアーゼの最適作用 pH 6.5 においては、ほとん

第6図 *Pen. caseicolum* の産生するプロテアーゼ活性におよぼす大豆乳およびカードの影響

どプロテアーゼ活性阻害が認められない。また中性プロテアーゼとアルカリ性プロテアーゼ活性の重なる pH 7.6 においても活性阻害の傾向が認められない(第6図)。

120°C, 10 分間加熱処理した大豆乳から得たカード試料を添加した場合にも、pH 6.5 の条件ではトリプシンのように著しい活性の低下は認められない。前報¹⁾において著者らは大豆乳に *Pen. caseicolum* を接種し蛋白分解傾向を調べたが、10~15 日間の培養でトリクロル酢酸可溶性窒素が増加を示したことが、またチーズよう食品の熟成において可溶性窒素が増加していることから、*Pen. caseicolum* の産生するプロテアーゼは大豆乳あるいはカード中に存在する物質によって阻害をうけにくいといえよう。この意味では *Pen. caseicolum* は確かにチーズよう食品のかびスターターとして適しているといえるが、大豆乳あるいはカードにおける *Pen. caseicolum* のプロテアーゼ生産性を調べ、さらに検討するつもりである。

要 約

大豆乳の加熱処理による TI 活性の変化、カード製造時における TI 活性の移行割合および *Pen. caseicolum* の産生するプロテアーゼ活性への阻害の影響について調べた。

(1) 100°C, 10 分間の加熱処理した大豆乳には加熱未処理試料の TI 活性の約 34% が残存し、また 100°C, 20 分間では約 30%, 120°C, 10 分間では約 10%, 120°C, 20 分間でも約 5% の TI 活性が残存した。

(2) ホエーでは固形分 mg 当りの TI 活性単位は、100°C, 10 分間加熱処理の試料では 0.31 だが、120°C, 20 分間の試料では 0.05 で、約 1/6 に低下している。一方、カードにおいては、固形分 mg 当りの TI 活性単

位は、100°C, 10 分間の試料では、0.19, 120°C, 20 分間では 0.09 で約 1/2 の低下のみである。TI 活性の残存割合は、カードにおける方が高い傾向にある。

(3) 加熱未処理試料および加熱処理した大豆乳から得たカード試料を用い、*Pen. caseicolum* の産生するプロテアーゼの活性に対する阻害の影響について調べたが、pH 6.5 および pH 7.6 における蛋白分解酵素活性に対しては著しい阻害は認められなかった。

文 献

- 1) 松岡博厚・笹子謙治・関口正勝：食品工誌，15，(3)，103 (1968)。

- 2) 赤堀四郎編：酵素研究法，第2巻，（朝倉書店），p. 242 (1964)。
- 3) 津郷友吉・松岡博厚：日畜会報，33，(6)，480 (1963)。
- 4) 松岡博厚・津郷友吉：農化誌，37，(8)，444 (1963)。
- 5) KUNITZ, M.: *J. Gen. Physiol.*, 30, 291 (1947)。
- 6) RACKIS, J. J.: *Food Technol.*, 20, 1482 (1966)。
- 7) BIRK, Y. and GERTLER, A.: *J. Nutr.*, 75, 379 (1961)。
- 8) 津郷友吉・林 俊雄・松岡博厚：日畜会報，29，345 (1959)。

（昭和47年1月8日受理）