

分離大豆たん白質を用いた「とうふよう」の製造に関する研究

——熟成過程における大豆たん白質の分解——

STUDIES ON PRODUCTION OF TOFUYO USING SOY PROTEIN ISOLATE— DECOMPOSITION OF SOY PROTEIN DURING RIPENING PERIOD

安田正昭・長松九一郎・森川誠司（琉球大学農学部）

Masaaki YASUDA, Kyuichiro NAGAMATSU and Seizi MORIKAWA
College of Agriculture, University of the Ryukyus, Okinawa 903-01

ABSTRACT

Tofuyo is a unique fermented soybean food in Okinawa prefecture, Japan, and is made from tofu (soybean curd) with koji, salt and awamori (distilled liquor). It is difficult to obtain uniform quality of tofu as the raw material of tofuyo for the preparation of tofu is complicated, and accordingly not easy is to produce uniform quality of tofuyo. Soy protein gel (SP-Gel) was used instead of tofu itself in order to develop a simple and new method leading to stable production of uniform quality of tofuyo. In this study, changes in pH, acidity and protease activity in the soak, and hardness and digestion of soy protein during tofuyo fermentation were investigated. pH value of the soak was found to be 5.9 at first, and decreased with ripening time (60 days) to 5.5. The acidity of the soak raised upon ripening period. Protease originated from the koji was considered to be a key-enzyme for tofuyo fermentation. Although protease activity decreased markedly to 37% for initial 15 days of ripening under the presence of ethylalcohol of awamori, its value was almost maintained at 34% until the end of 60 day ripening. Hardness of SP-Gel of tofuyo was found to be 23.0×10^4 dyne/cm² at first, and decreased with 60 day ripening time to 8.8×10^4 dyne/cm². Pure protein content of the product decreased during ripening period. It was observed by the method of slab SDS-polyacrylamide gel electrophoresis that some polypeptide bands of high molecular weight were disappeared during ripening period (0-60 days). After ripening for 60 days, only two bands of low molecular weight (M. W.; 12.4K-24.4K) remained. Any other polypeptide bands of high molecular weight were not detected. The ratio of water soluble nitrogen to total nitrogen (called as protein solubility ratio, or ripening ratio) reached to 43% after the 60 day ripening. The ratio of 4% trichloroacetic acid soluble nitrogen to water soluble nitrogen reached to 52% after the 60 day ripening. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 9, 19-24, 1988.

「とうふよう」は木綿豆腐を乾燥したのち、麴と泡盛（蒸留酒）を含む諸味に漬け込んで熟成させた貯蔵性に富む大豆の発酵食品である。この食品は琉球王朝時代の

上流社会で中国の紅腐乳を改良し、発達させたものであるが、その製造法については長い間秘伝であったために、今日まで一般的な食品として普及するには至

らなかった。「とうふよう」は一般に塩味がうすく甘味があり、組織がなめらかで適度な粘弾性とチーズ様の風味をもち、現代人の嗜好に合う食品として今後発展する可能性が極めて大きい。

しかし、「とうふよう」を一般的な食品として発展させるためには、原料豆腐の調製法が煩雑でしかも均質な製品が得られ難いことがネックとなり、その新しい製造技術の確立が必要とされている。そこで著者らは分離大豆たん白質(SPI)の有するゲル形成能に着目し、とうふようの製造に適した大豆たん白ゲルの調製条件について検討した²⁾。

本報告においては、SPI から調製したゲルを用いて「とうふよう」の製造を試みたところ、良好な製品を得ることが出来たので、熟成過程における大豆たん白質の分離傾向及び窒素成分の変化等について検討を行った。

実験方法

「とうふよう」の製造

(1) 大豆たん白質ゲルの調製

大豆たん白ゲル調製は既法²⁾に従って行った。すなわち SPI (ニューフジプロ SE) 54.3 g, 植物油脂 37.2 g, 蒸留水 208.5 g 及び凝固剤(硫酸カルシウム) 2.0 g を加えたものをスピードカッター(松下電気社製, National, MK-3 型)を用いて 3 分間混練後脱気した。その混練物をチューブ(クレハフィルム, A 08 型, 巾 4 cm) にケーシングしたのち, 80 °C で 60 分間加熱した。得られたゲルは流水冷却し, さらに 4 °C で 12 時間放置した。

(2) 紅麴の製麹

紅麴菌 (*Monascus* sp. No. 3403) を蒸米に生育させた米麴の調製は既報³⁾の方法に従って行った。

(3) 「とうふよう」の調製

「とうふよう」の調製は既報⁴⁾の方法に従い, 紅麴による諸味に乾燥豆腐の代わりに(1)で得た大豆たん白ゲルを漬け込み 30 °C で 60 日間熟成させることにより行った。なお, 今回使用した泡盛はアルコール濃度が 30 % であった。

分析試料の調製

成分分析に供する試料の調製は, 「とうふよう」と諸味とを分離し, 各々凍結乾燥を行った後で粉碎, 篩別 (20/30 メッシュ) することにより行った。なお, 大豆たん白ゲルの物性や諸味の pH, 滴定酸度及びプロテアーゼ活性の測定に用いる試料は凍結乾燥を行う前のものとした。

分析

(1) 諸味の pH 及び滴定酸度

水素イオン濃度は試料 10 g に水 20 ml を加えてよく攪拌, ろ過したろ液の pH を pH メーター(堀場 pH メーター, F-8)で測定することにより求めた。滴定酸度は基準味噌分析法⁵⁾に従った。

(2) 諸味中のプロテアーゼ活性

酵素液の調製は, 諸味 10 g に 0.01 M クエン酸-0.02 M リン酸塩緩衝液 (pH 5.0) 10 ml を加えて室温 (25 °C) で 60 分抽出を行い, それを同上緩衝液にて一夜透析して行った。プロテアーゼ活性の測定は既報⁶⁾の方法に従った。

(3) 窒素成分

(i) 総窒素

試料中の総窒素量の測定は食品分析法⁷⁾に準じて, セミマイクロケルダール法により行った。

(ii) 純たん白質

純たん白質量の測定は次のように行った。試料 0.5 g に 70 ml の水を加え, 3 分間煮沸, 放冷後に 12 % トリクロル酢酸 (TCA) 溶液 25 ml を加え, 生ずる沈殿物を東洋ろ紙 No. 5B にてろ過して集めた。残留物を 2.5 % TCA 溶液でよく洗浄したのち総窒素量と同様の方法で窒素量を測定した。

(iii) 水溶性窒素

水溶性窒素量の測定は基準味噌分析法⁵⁾に準じて行った。即ち, 試料 2.0 g を採取し, 20 ml の熱水を加えて懸濁させ, 穏やかに煮沸 (1 分間) したのち東洋ろ紙 No. 5B にてろ過した。ろ紙上の残留物を熱水でよく洗浄し, ろ液を冷却したのち 250 ml に定容した。その一部 (50 ml) をとりセミマイクロケルダール法にて窒素量を測定した。

(iv) 4 % トリクロル酢酸 (TCA) 可溶性窒素

(ii) で得られた抽出液 15 ml に 24 % TCA 溶液 3.0 ml を加えたのち, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) により上澄み液を得た。その一部 (10 ml) をとり, ミクロケルダール法により窒素量を測定した。

(4) 「とうふよう」の硬さ

「とうふよう」の硬さは飯尾⁸⁾の方法でネオカードメーター(飯尾電気製, M-302 型)を用いて試料の破断力から求めた。

(5) スラブ電気泳動

電気泳動に用いる試料の調製は, Weber と Osborn⁹⁾の方法に従い, 「とうふよう」の各熟成期間 (0, 1, 5, 30, 60 日間) における水不溶性画分を SDS, 2-メルカプトエタノール存在下, 室温で 1 液放置することにより行った。

スラブ電気泳動は、Laemmli¹⁰⁾の方法に準じて行った。ゲルは、ポリアクリルアミドのグラジエントゲル(濃度、3～15%)、厚さ2mmとし、泳動はSDS 0.1%を含むトリス-グリシン緩衝液(pH 8.3)を使用し、8mAで20時間行った。なお、標準たん白質にはウマ心筋チトクロームの単量体(M. W. 12,400)、2量体(M. W. 24,800)、3量体(M. W. 37,200)、4量体(M. W. 49,600)、6量体(M. W. 74,400)、アルドラーゼ(M. W. 158,000)及びカタラーゼ(M. W. 240,000)を使用した。染色には0.25%クマシーブリリアントブルーR(50%メタノール-10%酢酸溶液)を用いた。

結果と考察

「とうふよう」の熟成過程における諸味のpH及び滴定酸度の変化

「とうふよう」の熟成機構を明らかにするために、まず熟成過程における諸味のpH及び滴定酸度の変化を調べ、その結果をFig. 1及びFig. 2にそれぞれ示

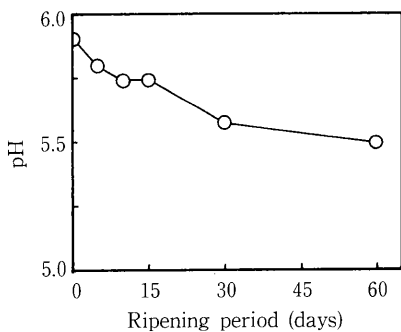


Fig. 1. Changes in pH of soak during ripening period.

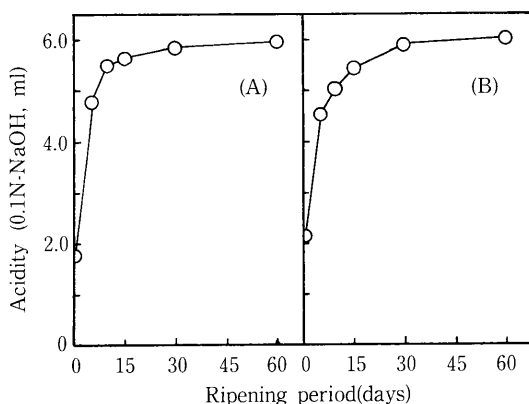


Fig. 2. Changes in acidity of soak during ripening period.

A; Acidity I, B; Acidity II

した。

諸味のpHは熟成の進行に従い、わずかながら低下する傾向が見られ、熟成0日目でpH 5.9、60日目でpH 5.5を示した。このように「とうふよう」の熟成はpH 5.9～5.5の微酸性下で進行することがわかった。

諸味の滴定酸度を調べてみると、酸度I及びIIの値はいずれも熟成の進行に伴い増大した。酸度Iは0日目で1.7、60日目で3.3、酸度IIは0日目で2.2、60日目で4.4であった。一般には味噌の場合には、酸度Iは有機酸とリン酸の大部分を、酸度IIはリン酸の一部とアミノ酸やペプチドのようなたん白分解物の大部分を表すことが知られている⁵⁾。

従って、「とうふよう」の場合にもその熟成過程でSPIがプロテアーゼにより分解を受け、ペプチドや各種のアミノ酸、特にグルタミン酸やアスパラギン酸等のような酸性アミノ酸が生成されたこと、及び諸味中に乳酸、酢酸その他の有機酸が生成されたことにより、諸味のpHの低下並びに滴定酸度の上昇がもたらされたものと思われる。

熟成過程におけるプロテアーゼ活性の変化

「とうふよう」の熟成に最も重要な役割を演じている

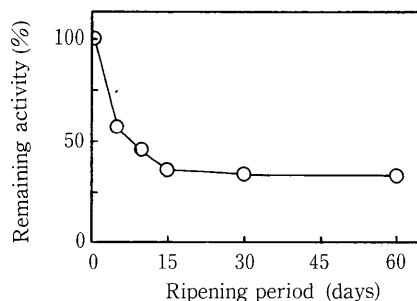


Fig. 3. Changes in protease activity of soak during ripening period.

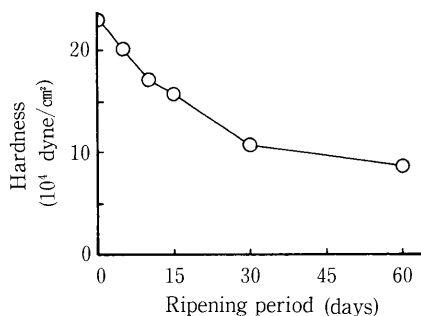


Fig. 4. Changes in hardness of tofuyo during ripening period.

プロテアーゼ活性の変化を熟成期間を通して観察し、その結果を Fig. 3 に示した。諸味のプロテアーゼ活性は熟成15日までに急激に低下（残存活性、約37%）したが、それ以降60日目まではほぼ同程度の値（残存活性、約34%）を維持した。Fig. 3 に示されるように、諸味のプロテアーゼ活性は泡盛のアルコール存在下で抑制され³⁾、その結果、SPI のおだやかな分解を行い、「とうふよう」に必要な硬さ、粘弾性、組織のなめらかさなどの物性形成に寄与しているものと思われる。

熟成過程における「とうふよう」の物性変化

熟成過程における「とうふよう」の物性変化を調べ、その結果を Fig. 4 に示した。熟成0日目におけるたん白ゲルの硬さは 23.0×10^4 dyne/cm²、15日目で 20.0×10^4 dyne/cm²、30日目で 10.8×10^4 dyne/cm²、60日目で 8.8×10^4 dyne/cm² の値を示し、熟成の進行に伴いたん白ゲルの硬さがゆるやかに低下し、熟成30日から60日間にかけてほぼ同程度の硬さを有していることがわかった。

熟成過程における大豆たん白質の分解

熟成過程における「とうふよう」区と諸味区の純たん白質量の変化を調べ、その結果を Fig. 5 に示した。

「とうふよう」区の純たん白質量は熟成0日目で 47.2%、15日目で 27.6%、30日目で 23.4%、60日目で 20.0% の値を示し、熟成の進行に伴い SPI が分解を受け、純たん白質量が低下した。一方、諸味区においては、熟成過程における純たん白質量の変化はほとんどみられなかった。

そこで、熟成過程における SPI の分解の様子をスラブ電気泳動法により観察し、その結果を Fig. 6 に示した。熟成0日におけるポリペプチドのバンドの数は分

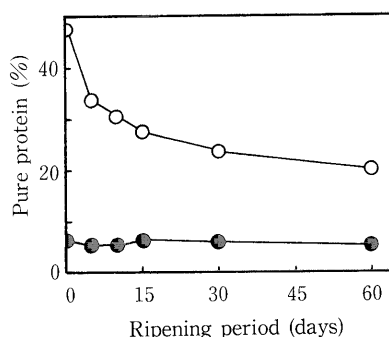


Fig. 5. Decrease of tofuyo-protein during ripening period.

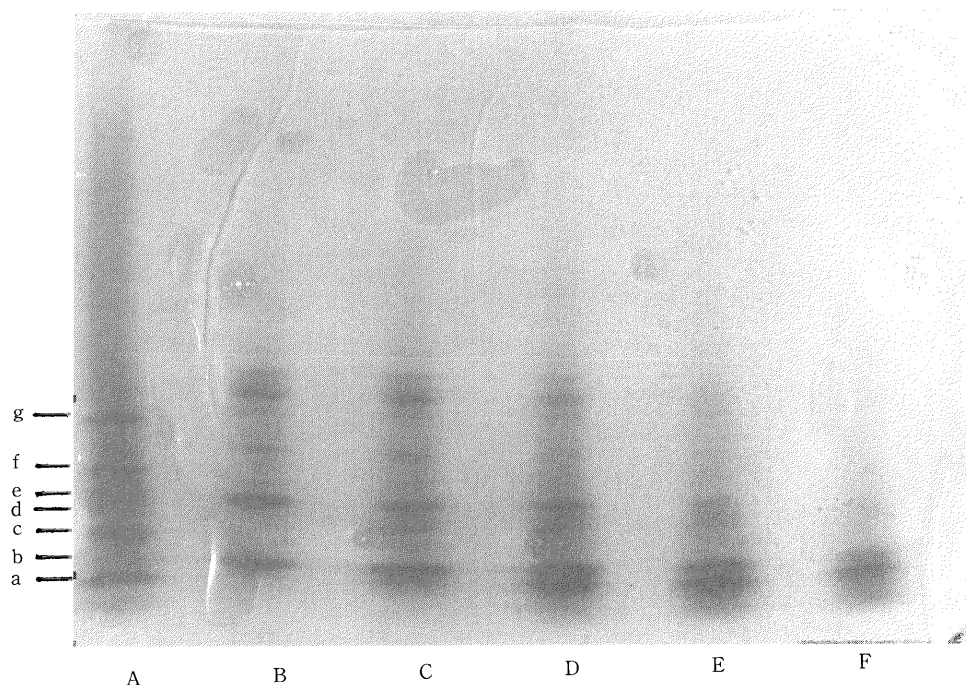


Fig. 6. Slab SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of water-insoluble fraction of tofuyo at various ripening stages. Molecular weights were estimated by the mobilities of cytochrome c from horse heart and cross-linked cytochrome c (a: cytochrome c monomer, b: dimer, c: trimer, d: tetramer, e: hexamer), aldolase (f) and catalase (g). A: Standard proteins described above, B: 0 day, C: 1 day, D: 5 days, E: 30 days, F: 60 days.

分子量 240 K 以上のもの 4 本, 158 K~240 K のもの 1 本, 74.4 K~158 K のもの 1 本, 分子量 74.4 K, 49.6 K, 24.4 K のものが各々 1 本で合計 9 本のポリペプチドバンドが検出された。製品の熟成が進行するに伴い, 高分子量のポリペプチドのバンドの消失が見られた。即ち, 熟成 1 日目で, すでに, 240 K 以上の高分子ポリペプチドバンドの消失の傾向がみられ, 分子量 49.6 K, 37.2 K 及び 10.2 K 付近のポリペプチドバンドが新たに出現した。熟成 30 日及び 60 日目に分子量が 150 K 以上及び, 50 K 以上のポリペプチドバンドがそれぞれ消失した。熟成 60 日目におけるポリペプチドは分子量が 12.4 K~24.4 K の範囲にある二本の成分から成っていると考えられる。

熟成過程における窒素成分の変化

水溶性窒素量と総窒素量で表わされる数値は味噌やチーズの熟成を知る上で重要な指標とされ, 製品の溶化率あるいは熟成率とも呼ばれている^{11,12)}。「とうふよう」においてもこの考え方が適用されるが, この場合には水溶性窒素成分は「とうふよう」区から諸味区へ移行するので両者の値を加算する必要がある。以上の点を踏まえて「とうふよう」の熟成過程における熟成率の変化を調べ, その結果を Fig. 7 に示した。製品の熟成率は, 熟成 15 日目まで急激に増大したが, 15 日以降は徐々に増大した。即ち, 熟成 15, 30, 60 日目における製品の熟成率はそれぞれ 34%, 38%, 43% であった。なお, 豆乳から得られたチーズ様食品の第 3 週目における熟成率は約 70%¹¹⁾と報告され, 「とうふよう」はそれに比べると 27% 低い値を示した。また, 熟成 40 日目における味噌の熟成率は約 55%¹²⁾と報告され, 「とうふよう」のそれは味噌に比べると約 10% 低い値を示した。

4% TCA 可溶性窒素の水溶性窒素に対する比率は非たん白態窒素量の指標として重要である。そこで「とうふよう」区の TCA 可溶性窒素量の水溶性窒素量に対する比率を調べ, その結果を Fig. 8 に示した。その比率は, 熟成 15 日目で 44%, 30 日目で 49%, 60 日目で 52% の値を示した。従って, 熟成 60 日目における水溶性窒素中, 低分子のペプチドやアミノ酸等が 52% 生成されているものの, 比較的高分子のポリペプチドが 48% も含まれていることが判明した。なお, 豆乳から調製したチーズ様食品の TCA 可溶性窒素量の水溶性窒素量に対する比率は約 35%¹¹⁾, と報告されている。従って, 水溶性窒素中, ペプチドやアミノ酸の占める割合は「とうふよう」の方が, 豆乳から調製したチーズ様食品に比べて高いことがわかった。なお, 4% TCA 可溶性窒素中アミノ酸やペプチドの占める割合, 呈味

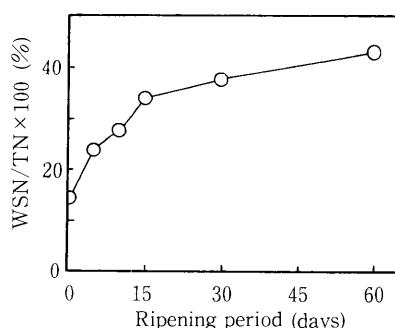


Fig. 7. Changes in the ratio of water soluble nitrogen to total nitrogen of tofuyo during ripening period.

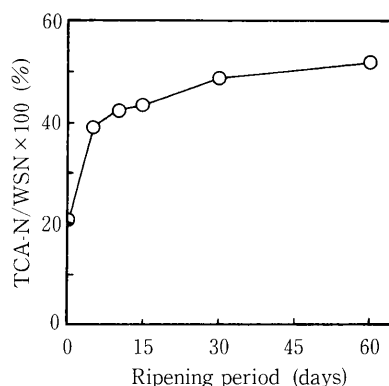


Fig. 8. Changes in the ratio of 4% TCA soluble nitrogen to water soluble nitrogen of tofuyo during ripening period.

性アミノ酸の含有量等を明らかにすることは「とうふよう」の味成分を解明する手がかりを得るために重要であり, 今後の検討課題である。

また, 「とうふよう」の熟成機構を明らかにするためには, これらの窒素成分の変化のほか, 製品のなめらかさを指標とする物性変化, 並びに電子顕微鏡による組織の微細構造変化等を検討する必要がある。

本研究を伝統的な「とうふよう」のモデル実験として位置づけ, 今後, 両者を比較検討することにより「とうふよう」の熟成機構及びその食品化学的特性を明らかにしたい。

文 献

- 1) 安田正昭 (1983) : 豆腐ようと紅麴, 日本醸造協会雑誌, **78**, 839-842.
- 2) 安田正昭, 長松九一郎 (1987) : 大豆たん白ゲル調製条件の検討, 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 12-16.

- 3) 安田正昭, 上地玄作, 宮里興信 (1983): 豆腐よう製造に用いる紅麴の製造. 日本食品工業学会誌, **30**, 63-67.
- 4) 宮里興信, 安田正昭, 上地玄作 (1980): 紅麴菌を用いた豆腐よう熟成過程における一般成分の変化について. 琉球大学農学部学術報告, **27**, 103-108.
- 5) 改訂基準味噌分析法編集委員会 (1968): 基準味噌分析法 (改訂) p. 16, p. 23.
- 6) Yasuda M., Soeishi K. and Miyahira M. (1984): Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3403, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1637-1639.
- 7) 日本食品工業学会・食品分析法編集委員会編 (1982): 食品分析法, p. 102, 光琳.
- 8) 飯尾尚子 (1969): カードメーターによる測定記録曲線の解析. 調理科学, **2**, 54-60.
- 9) Weber K. and Osborn M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
- 10) Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 11) 福家洋子, 松岡博厚 (1987): *Penicillium caseicolum* を用いた大豆乳からのチーズよう食品の熟成中における蛋白質とプロテアーゼ活性の変化. 日本食品工業学会誌, **34**, 826-833.
- 12) Nikkuni S., Itoh H., Tanaka M. and Ohta T. (1984): Changes in SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of water-insoluble fraction during miso fermentation. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, **31**, 502-510.