

不凍たん白質を用いた大豆たん白質加工冷凍食品の品質改善

河原秀久*・田中瑠奈・小幡 斉

関西大学工学部

Antifreeze Protein Improves the Quality of Soy Protein Processed Frozen Food

Hidehisa KAWAHARA, Runa TANAKA and Hitoshi OBATA

Faculty of Engineering, Kansai University, Osaka 564-8680

ABSTRACT

We examined the effect of antifreeze protein (AFP) on the solubilization of soy protein, which is used as food material, under freezing conditions. The soy protein suspension (8 mg protein/mL) was prepared and mixed with AFP to yield its final concentration of 0-100 μ g/mL. This mixture was frozen at -20°C for 24 h, and then thawed at room temperature. When AFP was added at 5 and 100 μ g/mL, their solubilization rates were 45% and 48%, respectively. Also, this high level of solubilizing effect was achieved with only one freezing treatment. Furthermore, this solubilizing effect could improve the manufacture of bean curd with different protein contents. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 34-37, 2003.

Key words : antifreeze protein, bean curd, soyprotein

この氷結晶の形成や形態を変化させる化合物として、南極魚などの血液内に存在するとして初めて発見された不凍たん白質が挙げられる¹⁻³⁾。不凍たん白質は、寒い地域に棲息する魚や植物⁴⁾、さらには甲虫の幼虫⁵⁾などから発見されている。また、低温性細菌のいくつかもまた、不凍たん白質を生産することが報告されている^{6,7)}。これらの不凍たん白質は同一機能、つまり、凍結温度を低下させるとともに、氷結晶の形態を変化し、氷の再結晶化を抑制する能力を持っている。この機能面から、様々な冷凍食品への応用が期待され

ている⁸⁾。

そこで、本研究では、我々の研究室で開発したワカサギ由来の不凍たん白質⁹⁾を用いて、不溶性大豆たん白質の冷凍保存への影響および大豆たん白質加工食品の代表である豆腐への影響について検討を行った。

方 法

不凍たん白質の調製

ワカサギの頭、骨および内臓を除いた筋肉を用意し、その等量の超純水を添加し、ミキサーによって粉碎後、そのペレットを15,000×gで、15分間遠心分離した。

*〒564-8680 大阪府吹田市山手町3-3-35

得られた上清は60℃で7分間熱処理し、沈殿物を同様の条件で遠心分離した。その上清は、30%飽和硫酸アンモニウムによって分画し、蒸留水に対して透析し、不凍たん白質サンプルとして使用した。なお、活性は、リンカム社製の温度調節機（LK-600PM）付きの位相差顕微鏡を用いて、氷結晶の形態および熱ヒステシスを測定することによって確認した。

大豆たん白質の調製

アジプロンSU（味の素製）を8 mg protein/mLとなるように蒸留水に懸濁し、室温にて、120 rpmで1時間撹拌した。

凍結融解時における不凍たん白質の影響

不凍たん白質含有大豆たん白質液は、不凍たん白質を最終濃度 0, 1, 2, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、同様に1時間撹拌した。さらに、遠心分離（15,000 $\times g$, 45分間）して得られた上清は、フィルターろ過（0.45 μm ）して、未凍結サンプルとした。撹拌後、 -20°C で24時間凍結融解し、同様の調製によって凍結サンプルとした。なお、未凍結サンプルと凍結サンプルの差を算出した。ブランクとしてBSAを用いて比較した。なお、 $n=5$ で測定して得られた結果の平均で比較した。得られた未凍結、凍結サンプルのたん白質量を測定して、可溶化率を算出した。さらに、同様の条件で凍結融解を繰り返し、その上清はたん白質量を測定することによって、凍結回数の影響の検討を行った。

豆腐製造方法

一晚浸漬した大豆3,400 gに水350 gを添加し、ミキサーで1分間粉砕した。得られた呉汁に400 mLの水を入れた。不凍たん白質無添加で、未凍結の場合には、24時間冷蔵保存後、そのまま、豆腐製造を行った（Fig. 3, 4条件1）。不凍たん白質無添加で、凍結する場合、得られた呉汁は -20°C で24時間凍結融解した（Fig. 3, 4条件2）。不凍たん白質添加（最終濃度5および100 $\mu\text{g/mL}$ ）の場合には、不凍たん白質添加後、 -20°C で24時間凍結処理を行った（Fig. 3, 4条件3；5 $\mu\text{g/mL}$, 条件4；100 $\mu\text{g/mL}$ ）。冷蔵および冷凍保存後の各呉汁は、同条件下で、豆腐を作成した。

豆腐中のたん白質含量の測定（ケルダール分析）

サンプル（1 mg）は50 mL容ケルダールフラスコに入れ、分解補助剤（硫酸カリウム：硫酸銅＝3：1）2 gと濃硫酸2 mLを添加した。混合物が青緑の透明になるまで、約4時間、窒素分解装置で加熱した。その後、通常のケルダール分析方法に従って蒸留し、ホウ酸溶液を0.02 N塩酸で滴定し、なお、0.02 N塩酸1 mLは0.28 mgのNに相当する。これにより試料中のたん白

質濃度（%）は、次式で算定した。

$$0.28 \times \text{滴定量 (mL)} \times \text{大豆の窒素係数 (5.71)}$$

$$\div \text{分解に使用した試料の重量 (mg)}$$

豆腐の固さの測定

上記に示した通り豆腐製造後、一定時間後、レオメーター（山電製）測定を行った。（急速冷凍・冷蔵前サンプル）また、豆腐成型後、急速冷凍を用いて冷凍後、2時間融解（ 30°C ）したものは急速冷凍後のサンプルとした。なお、その固さは破断波形と最大荷重で比較した。

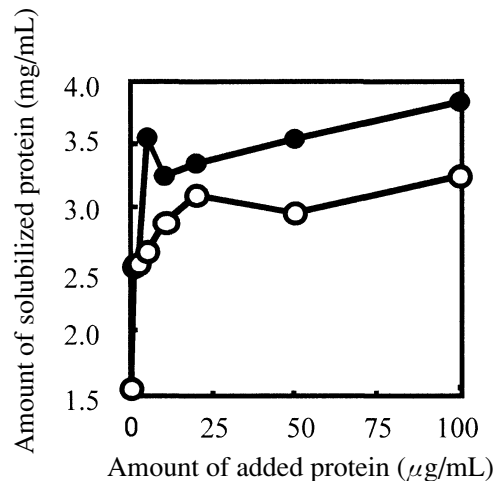


Fig. 1. Effect of antifreeze protein on the solubilization of soy protein after freezing. The graph shows the antifreeze protein (closed circles) and bovine serum albumin (open circle).

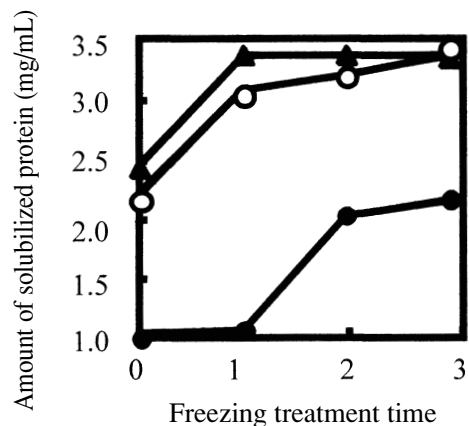


Fig. 2. Effect of freezing treatment time on the solubilization. The graph shows the addition of bovine serum albumin (closed circles), antifreeze protein at 5 $\mu\text{g/mL}$ (open circle) and 100 $\mu\text{g/mL}$ (closed triangles).

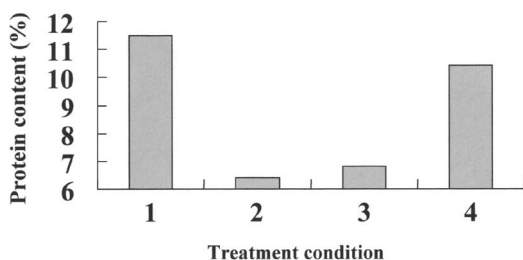


Fig. 3. Effect of antifreeze protein on the protein content of bean curd. Each treatment condition was done by the method described in the method section.

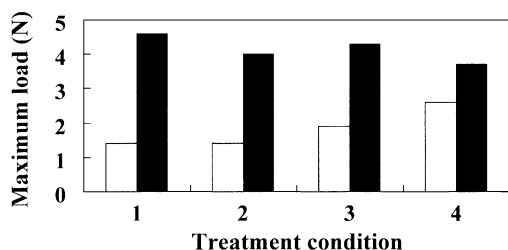


Fig. 4. The maximum loads of each bean curd before and after freezing and thawing treatments. The graph shows the maximum loads of each bean curd before (open squares) and after (closed squares) freezing and thawing treatments.

結果と考察

不溶性大豆たん白質の可溶化

不凍たん白質を最終濃度 0, 1, 2, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加して、大豆たん白質 (AFP) が可溶化した量を Fig. 1 に示した。牛血清アルブミン (BSA) と比較しても、添加濃度の増大とともに、可溶化できることが明らかになった。特に、5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で、3.6 mg/mL, 100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で、3.9 mg/mL の可溶化量となった。この値は、元の 45, 48% である。BSA の 5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で、31%, 100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で、40% であることから、不凍たん白質が低濃度で、可溶化能力が高いことが明らかになった。この作用は、不凍たん白質が、親水性部分と疎水性の部分とを有しているからであると予測している。つまり、不凍たん白質の親水性部分は一定の間隔でアミノ酸が並んでおり、その水酸基が氷結晶と結合することが証明されている⁹⁾。氷と結合した面の反対側は、疎水性に富んでおり、これによって、再結晶化抑制を発揮していると考えられている。この疎水性部分は、生体系では、膜

リン脂質層と相互作用を持ち、低温下での膜の安定化に寄与しているとリポソーム実験によって証明されている¹⁰⁾。また、この可溶化されたたん白質は、特定のたん白質ではなく、濃度によって関係なく、同一なたん白質であることが電気泳動によって判明した。

次に、この凍結耐性の回数の影響について検討を行った。その結果、Fig. 2 に示したように、未凍結でも不凍たん白質を添加することによって、32~36% が可溶化した。さらに、凍結を繰り返したところ、両濃度ともほぼ 1 回で平衡に達した。一方、ブランクとして比較した BSA は、1 回の凍結処理では可溶化たん白質量は増大せず、2 回ないし 3 回の処理によって、30% の可溶化となった。5 $\mu\text{g/mL}$ と 100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度と比較して、それらの可溶化たん白質量は大きな差は認められなかったので、添加量の少ない 5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度が効果的であると判断できた。

豆腐製造における応用性とその豆腐の特性

一般に、呉汁を調製後、直ちに加熱して豆乳を調製する。この豆乳の加熱温度を 40℃ 付近で処理して作成する豆腐は、生絞り豆腐として販売されている。この過程において、不凍たん白質の可溶化能を利用することによって、より効率的に生絞り豆腐を製造できると判断し、呉汁に不凍たん白質を添加し、未凍結、凍結処理した。その結果 (Fig. 3)、通常の製造方法では、たん白質量は 11.7% であったが、不凍たん白質無添加で凍結処理した場合、たん白質量が 6.5% まで低下した。ところが、100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の不凍たん白質を添加した場合、そのたん白質量は 10.4% まで回復した。凍結処理によって、呉汁中のたん白質が変性して沈殿したためにたん白質量の変化が起きたと考えられた。一方、100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の不凍たん白質添加の場合、その変性を妨げる作用が起きていると判断できた。

この処理によって、凍結に弱いたん白質が除かれている可能性が考えられたので、次に、製造した豆腐は、-30℃ に急速冷凍する処理を行った。冷凍前および解凍後のテクスチャーは、Fig. 4 に示した。通常の製造方法では、凍結保存によって、そのテクスチャーがかなり変化し、固くなっている結果 (最大荷重差; 3.2 N) が得られた。一方、100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の不凍たん白質を添加した場合、そのテクスチャーは差 (最大荷重差; 1.4 N) が少ないことが明らかになった。

これらの結果から、不凍たん白質を利用することによって、たん白質量の異なる豆腐が製造できることが判明し、冷凍豆腐の新しい製造方法の可能性を提示することができた。

要 約

不凍たん白質の大豆たん白質自身やその食品の冷凍保存時への効果についての検討を行った。まず初めに、実際に増量剤として使用されている大豆たん白質に対する影響について検討を行った。大豆たん白質懸濁液 (8 mg/mL) に不凍たん白質を 0 ~ 100 μ g/mL になるように添加し、-20℃で 24 時間凍結融解後、遠心分離して、可溶化した大豆たん白質量を測定した。その結果、無添加の場合では 18% の可溶化率であったが、不凍たん白質を 5, 100 μ g/mL となるように添加した場合には各々 45 と 48% の可溶化となった。容易に約 2 倍ほどの大豆たん白質が可溶化できることが明らかになった。さらに、不凍たん白質を用いた豆腐製造方法として、呉に不凍たん白質 5 と 100 μ g/mL となるように添加した後、-20℃で 24 時間急速冷凍機を用いて冷凍保存して、解凍した。作成した豆腐は、-20℃で冷凍保存した前後の固さを測定した。その結果、呉の冷凍処理によって、たん白質含量が低下 (11.6% → 6.2%) したが、不凍たん白質の添加によって、その含量は増大した (10.2%)。また、凍結の有無の違いによる豆腐の固さ (最大荷重) は、その添加によって変化した。豆腐の新しい製造方法の提示をすることができた。

文 献

- 1) Yeh Y and Freeney RE (1996): Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function. *Chem Rev*, **96**, 601-618.
- 2) Sicheri F and Yang DSC (1995): Ice binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature*, **375**, 427-431.
- 3) Sonnichsen FD, Skyes BD and Davies PL (1995): Comparative modeling of the three-dimensional structure of type II antifreeze protein. *Protein Science*, **4**, 460-471.
- 4) Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC and Yang DS (1995): Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol*, **109**, 879-889.
- 5) Graham LA, Liou YC, Walker VK and Davies PL (1997): Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, **388**, 727-728.
- 6) Xu H, Griffith M, Patten CL and Glick BR (1998): Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol*, **44**, 64-73.
- 7) Yamashita Y, Nakamura N, Omiya K, Nishikawa J, Kawahara H and Obata H (2002): Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 239-247.
- 8) Yamashita Y, Miura R, Takemoto Y, Tsuda S, Kawahara H and Obata H (2003): Type II Antifreeze protein from a mid-latitude freshwater fish, Japanese Smelt (*Hypomesus nipponensis*). *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 461-466.
- 9) Graether SP, Kuiper MJ, Gagne SM, Walker VK, Jia Z, Sykes BD and Davies PL (2000): Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, **406**, 325-328.
- 10) Tomczak MM, Hinch DK, Estrada SD, Wolters WF, Crowe LM, Feeney RE, Tablin F and Crowe JH (2002): A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophys J*, **82**, 874-881.