

東京電機大学

博 士 論 文

(論文題目) 大豆粉成分の食品及び食品加工への応用に関する研究

(英文) Studies on application of constituents of soybean powder to food  
and food processing

2018年3月18日

蓑島 良一

## 目次

背景	1
緒論	4
第1章 大豆粉成分トリプシンインヒビターの加工食品への品質改良効果	
1-1 背景	
1-1-1 冷凍すり身について	5
1-1-2 冷凍エビについて	6
1-1-3 トリプシンインヒビター (TI) について	7
1-1-4 $\beta$ -アミラーゼについて	8
1-1-5 アルギン酸ゲルについて ( $\beta$ -アミラーゼ, TI の精製方法)	8
1-1-6 K 値について (鮮度判定恒数)	9
1-2 実験方法	
1-2-1 大豆トリプシンインヒビター (TI) の冷凍すり身への品質改良効果実験方法	
1-2-1-1 実験材料	9
1-2-1-2 すり身ゲルの調製	10
1-2-1-3 すり身ゲル物性評価	10
1-2-1-4 K 値測定方法 (鮮度判定恒数測定)	10
1-2-1-5 プロテアーゼ活性測定方法	11
1-2-1-6 すり身の走査型電子顕微鏡写真	11
1-2-2 トリプシンインヒビター (TI) 精製方法, $\beta$ -アミラーゼ精製の検討	
1-2-2-1 実験材料	12
1-2-2-2 TI 活性測定法	12
1-2-2-3 $\beta$ -アミラーゼ活性測定法	12
1-2-2-4 TI, $\beta$ -アミラーゼの精製方法 (アルギン酸ゲル)	12
1-2-2-5 粗精製 TI の SDS-PAGE	13

1-2-2-6	すり身作成方法	13
1-2-3 大豆トリプシンインヒビターのエビ加工食品の品質改良実験方法		
1-2-3-1	実験材料	14
1-2-3-2	バナメイエビの浸漬・加熱方法と歩留まり率	14
1-2-3-3	レーザー体積測定方法	15
1-2-3-4	官能評価方法	15
1-2-3-5	テクスチャーアナライザー分析方法	15
1-2-3-6	エビ筋原線維の走査型電子顕微鏡観察	15
1-2-3-7	バナメイエビ筋原線維の SDS-PAGE	16
1-2-3-8	プロテアーゼ阻害剤の検討方法 (浸漬液)	16
1-2-3-9	エビフライ作成方法	16
1-2-3-10	エビフライ風味評価 (エビの風味, エビと衣の食感評価)	17
1-2-3-11	食感音響評価システムによるエビフライ衣の破砕音測定方法	17
1-2-4 大豆ホエー添加による冷凍すり身ゲルの物性低下のメカニズムの検討		
1-2-4-1	実験材料	18
1-2-4-2	テクスチャーアナライザー測定方法	19
1-2-4-3	ミオシン重鎖 (MHC) の SDS-PAGE	19
1-2-4-4	筋原線維結合型プロテアーゼ抽出方法	19
1-2-4-5	プロテアーゼの活性染色	19
1-2-4-6	内在型プロテアーゼ活性に対する阻害剤の影響	20
1-2-4-7	統計解析	20
1-2-5 大豆粉のエビ加工食品への品質改良効果のメカニズムの検証実験方法		
1-2-5-1	プロテアーゼ阻害剤の検討 (エビペースト)	20
1-3 実験結果		
1-3-1 大豆トリプシンインヒビター (TI) の冷凍すり身に対する品質改良効果		
1-3-1-1	魚種別冷凍すり身ゲル物性と歩留まり	21
1-3-1-2	すり身ゲルのゼリー強度, 歩留まり率, 鮮度 (K 値)	21

1-3-1-3	大豆ホエーのイトヨリすり身に対する「戻り」抑制効果	21
1-3-1-4	すり身ゲルの走査電子顕微鏡観察	21
1-3-2	トリプシンインヒビター (TI), $\beta$ -アミラーゼ精製の検討	
1-3-2-1	TI の精製結果	25
1-3-2-2	精製 TI サンプルの SDS-PAGE	25
1-3-2-3	粗精製 TI サンプルのすり身への添加効果	25
1-3-3	大豆トリプシンインヒビターのエビ加工食品に対する品質改良効果	
1-3-3-1	ボイルエビ重量と体積	27
1-3-3-2	浸漬エビ, ボイルエビ	27
1-3-3-3	ボイルエビの歩留まり向上試験	27
1-3-3-4	エビの種類による歩留まり向上効果の違い	27
1-3-3-5	ボイルエビの風味評価	27
1-3-3-6	テクスチャーアナライザー分析	28
1-3-3-7	バナマイエビ筋原線維の SDS-PAGE	28
1-3-3-8	走査型電子顕微鏡観察	28
1-3-3-9	各 pH でのエビ浸漬液の遊離アミノ酸含量	28
1-3-3-10	プロテアーゼ阻害剤の効果 (浸漬液)	28
1-3-3-11	エビフライの品質評価 (エビ歩留まり率, エビフライ官能評価, 食感音響評価)	29
1-4.	考察	
1-4-1	大豆ホエー添加による冷凍すり身ゲル物性低下メカニズム についての検証	38
1-4-2	大豆 TI のエビ加工食品の品質改良効果のメカニズムの検証	41
1-4-3	大豆粉の TI, $\beta$ -アミラーゼの精製と冷凍すり身への品質改良効果	43
1-5.	まとめ	43

## 第2章 大豆粉成分による冷凍製パン食品加工への品質改良効果・・・・・・・・・・ 45

### 2-1 背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45

### 2-2 実験方法

2-2-1	実験材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	47
2-2-2	冷凍パンの調製法・・・・・・・・・・・・・・・・	47
2-2-3	小麦粉生地の走査型電子顕微鏡観察・・・・・・・・	49
2-2-4	物性測定・・・・・・・・・・・・・・・・	50
2-2-5	製パン性の評価・・・・・・・・・・・・・・・・	50
2-2-6	示差走査熱量 (DSC) 測定解析・・・・・・・・	50
2-2-7	オズボーン分画・・・・・・・・・・・・・・・・	50
2-2-8	タンパク質の定量・・・・・・・・・・・・・・・・	50
2-2-9	リポキシゲナーゼ活性測定法・・・・・・・・	50
2-2-10	$\beta$ -アミラーゼ活性測定法・・・・・・・・	51
2-2-11	SDS-PAGE・・・・・・・・・・・・・・・・	51
2-2-12	製パン性試験方法・・・・・・・・・・・・・・・・	51
2-2-13	製パン評価方法・・・・・・・・・・・・・・・・	52
2-2-14	統計解析・・・・・・・・・・・・・・・・	52

### 2-3 結果

2-3-1	生全脂大豆粉 (RSF) とグリシンベタイン (GB) の添加による冷凍 耐性付与効果・・・・・・・・・・・・・・・・	52
2-3-2	物性測定・・・・・・・・・・・・・・・・	53
2-3-3	小麦粉生地の走査型電子顕微鏡観察・・・・・・・・	56
2-3-4	DSC 分析・・・・・・・・・・・・・・・・	56
2-3-5	SDS-PAGE・・・・・・・・・・・・・・・・	56
2-3-6	パン風味評価・・・・・・・・・・・・・・・・	56
2-3-7	冷凍生地焼成パンの物性 (レオメーター：最大荷重の経時変化)・・・・・・・・	57
2-3-8	レーザー体積計による冷凍生地焼成パン体積測定結果・・・・・・・・	57
2-3-9	生全脂大豆粉 $\beta$ -アミラーゼ活性・・・・・・・・	57

2-3-10	生全脂大豆粉リポキシゲナーゼ活性	57
2-4	考察	64
2-5	まとめ	65
第3章 大豆成分 GABA の生成と加工食品への応用		68
3-1	背景	68
3-2	実験方法	
3-2-1	実験材料	70
3-2-2	遊離アミノ酸含量の分析方法	70
3-2-3	大豆の発芽方法	71
3-2-4	大豆の土壌栽培方法	71
3-2-5	呉 (呉汁) の作成方法 (GABA 生成酵素の粗酵素液抽出)	71
3-2-6	最適 pH, 最適温度の反応条件	71
3-2-7	嫌気, 好気条件下の GABA 生成酵素反応条件	72
3-2-8	凍結融解方法	72
3-2-9	莢呉 GAD 反応液へのグルタミン酸の添加方法	72
3-2-10	莢呉 GAD 反応液へグルタミン酸の回分添加方法	72
3-2-11	GABA 高含有粉末の製造方法 (パイロットスケール)	72
3-2-12	GABA 高含有乾燥枝豆作成方法	73
3-2-13	統計解析	73
3-3	実験結果	
3-3-1	大豆種類と GABA 含量	74
3-3-2	大豆生育時期による GABA 含量の変化	74
3-3-3	登熟期大豆の莢, 豆の GABA 含量の変化	74
3-3-4	発芽大豆呉と登熟大豆呉の GABA 生成条件 (温度, pH) の比較	74
3-3-5	GABA 生成反応条件 (嫌気条件・好気条件)	74

3-3-6	凍結融解処理による枝豆 (登熟大豆) 莢, 豆中の GABA 含量	75
3-3-7	莢呉 GAD 反応液へのグルタミン酸添加量	75
3-3-8	莢呉 GAD 反応液へのグルタミン酸回分添加	75
3-3-9	GABA 高含有粉末の製造 (パイロットスケール)	75
3-3-10	GABA 高含有粉末の精製	75
3-3-11	GABA 高含有乾燥枝豆の試作	76
3-4	考察	84
3-5	まとめ	88
	総論	89
	文献	93
	謝辞	100

## 背景

わが国では、世界の大豆生産量の約 5%にあたる年間 500 万 t の大豆を消費している。そのうちの約 80%の 400 万 t は食用大豆油製造用として利用され、豆腐や納豆のように直接食品用として利用されるのは約 80 万 t に過ぎない。

日本での大豆の利用方法は大豆油加工製品およびその生産プロセスの副産物（日本植物油協会編）に示されているように、食用油が中心で、食用油の製造工程の副産物として出る脱脂大豆が肥料、飼料として利用され、また低変性脱脂大豆から分離大豆タンパク質や濃縮大豆タンパク質を製造し、分離大豆タンパク質を加工食品の物性改良剤として利用している。最近になり、大豆を粉碎した大豆粉の用途開発が検討されているが、黄粉臭や青臭みなど大豆特有の風味があり、また、加熱工程での大豆成分の加熱変性により食品加工への物性改良効果がほとんどなかった。

消費者の嗜好性は変化しており、食品は美味しく、かつ健康に良い食品が求められている。そのため、加工を施した食品の美味しさ追及の研究が積極的に行われている。以前の加工食品の商品パッケージには、タンパク質量、油脂量、その他ビタミン類などの有用物質の含量やカロリーなどが表示されていることが主で、成分の健康面での差別化が主であった。近年、美味しさが求められ、食品のパッケージには“やわらか”、“ふんわり”、“なめらか”、“プリッと”などの食感の差別化や、“ジューシー”、“うま味たっぷり”、“この味に自信あり”などの風味の差別化、“焼き立て”、“簡単調理”、“膨らむ”などの表現が示されている。

人がおいしいと感じる五感（視覚・味覚・触覚・聴覚・臭覚）を分析機器で数値化する分析方法の研究が多くなされており、その数値を用いた加工食品の開発も行われている。五感の中でも、味覚、触覚は重要な要素であり、“サクサク”とした食感のフライ食品、“もちもち”として”しっとり”とした食感のパンや水産物素材本来の風味を持つ水産加工食品などの特徴を持った食感や風味のある食品が消費者に受け入れられている。

現代社会は少子高齢化、核家族化がさらに進んでおり、消費者の嗜好も中食や外食中心の食生活へ変わりつつある。消費者は、スーパー等で冷凍食品や総菜などの調理済み食品を購入し、コンビニエンスストアで焼き立ての菓子パン、から揚げ、おでんなどを購入する機会が増えてきている。ところが、外で購入した総菜は購入してから食べるまでに時間がかかり、出来立ての美味しさがなくなる傾向がある。

また、スーパーやコンビニなどで販売されている多種類の冷凍食品は、調理済み食品を冷凍しているため、食品成分の冷凍障害が大きな課題になっている。コンビニなどの店頭で焼き立てパンとして販売しているパンは、一次発酵後に冷凍した冷凍パン生地を店頭で



二次発酵（ホイロ）後、焼成している場合が多い。この方法では、店頭での調理の時間がかかり、調理するスペースも必要であるなどの問題点があり、販売できる店舗は限られているのが現状である。二次発酵後の冷凍パン生地を店頭で焼成するだけで焼き立てパンが販売できれば、店頭での出来立てパンの販売が加速すると考えられる。

冷凍パン生地の冷凍障害抑制の研究は盛んに行われ、化学品の臭素酸カリウムが最も抑制効果が高いとされ、最近まで使用されていた。しかし、現在は安全性の問題で使用されておらず、酸化剤の代替として微生物のグルコースオキシダーゼ酵素製剤が利用されているが、比較的高価であり、安全性の高いさらなる機能を持った食品素材が求められている。

蒲鉾など水産練り製品の原料である冷凍すり身は、製造工程中の加熱加工時の「戻り」現象（加熱後の水練り製品の物性低下）による物性劣化の課題がある。現状は食品素材の卵白等を添加して品質劣化抑制を行っているが、特有の動物臭があり、比較的高価で、品質が安定しないなどの問題点がある。

また、冷凍エビの加熱加工時の歩留まり低下、風味や食感の低下に対しては、リン酸塩製剤や卵白が利用されているが、やはり特有の臭いや食感の悪さなどの問題点があり、代替品が求められている。

大豆中の有用物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸（以降 GABA と略す）は、大豆中でグルタミン酸からグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）により生成される。GABA は抗ストレス効果や血圧上昇抑制作用があるとされ、生理活性機能が研究され、GABA 入りチョコレートなど色々な加工食品が開発されている。

大豆では、完熟大豆で少量の GABA を蓄積しており、生育時期や部位の違いによる GABA 含量の推移を研究することにより、GABA 高含有の大豆加工食品が開発できれば、利用価値が高いと考えられる。



## 緒 論

本論文は、これまであまり利用されてこなかった生全脂大豆粉の新しい食品加工への利用を最終的な研究目的としている。

本論文は、水練り加工や製パン加工中の食品の物性劣化機構を検証し、生全脂大豆粉や加熱全脂大豆粉の内在酵素を用いて、加工食品へ物性劣化の抑制機能を付与する研究に関する。また、大豆製品加工工程から出る副産物に内在する酵素を用いて、新たな加工食品への健康機能付与の研究を行っている。具体的には、大豆内在トリプシンインヒビター、リポキシゲナーゼ、 $\beta$ -アミラーゼの食品加工への品質劣化抑制効果について検討を行い、生全脂大豆粉内在酵素を用いて、加工食品へ新たな劣化抑制機能を付与する研究となっている。また、大豆に内在する有用物質である GABA の大豆生育時期や部位による蓄積量の推移を検討し、登熟大豆（枝豆）加工工程の副産物である枝豆莢の内在酵素を利用し、加工食品へ新たな健康機能を付与する研究となっている。

第 1 章は、魚肉すり身の加工中の品質劣化機構を検証し、大豆粉中の内在性酵素トリプシンインヒビター（以降 TI と略す）のプロテアーゼ阻害活性を利用して、加工食品への品質劣化抑制機能付与とその効果の評価に関する研究について論述する。

特に、すり身とエビの加熱加工中の物性劣化や風味劣化の機構について検証を行い、生全脂大豆粉内在酵素の加工食品への劣化抑制効果とその機構について論述する。さらに、エビ加工食品であるエビフライの衣のサクサク感を食感音響評価システムで評価を行い、大豆粉の水産加工食品への品質劣化抑制機能付与についての研究について論述する。

第 2 章では、冷凍パンの冷凍処理によるパン生地物性劣化や風味劣化の機構を検証し、生全脂大豆粉内在酵素リポキシゲナーゼや  $\beta$ -アミラーゼの酵素活性を利用して物性劣化抑制機能とその評価に関する研究について論述する。また、冷凍パン生地中のグロブリンタンパク質を分析し、その抑制効果についても論述する。

特に、冷凍障害抑制技術が確立されていない食パン、フランスパンなどのリーンな組成の冷凍生地パンに対する生全脂大豆粉の添加効果とその機構についての研究を論述する。

第 3 章では、大豆内在酵素である GABA 生成酵素（グルタミン酸脱炭酸酵素）を用い、有用物質 GABA の産生機構を検証し、高濃度生成に関する研究を行い、加工食品への健康機能付与の研究について論述する。

具体的には、大豆の生育時期と部位の違いによる GABA 含量の推移を検討し、GABA 生成酵素の発現の時期や部位を特定し、登熟大豆である枝豆を用いた GABA 高含有乾燥枝豆の試作や副産物である枝豆莢を用いた GABA 高含有粉末の試作検討を行った。

## 第1章 大豆粉成分トリプシンインヒビター (TI) の加工食品への品質劣化抑制効果

### 1-1 背景

#### 1-1-1 冷凍すり身について

竹輪、蒲鉾などに代表される水産練り製品の原料魚種は、主にスケソウダラ、ホッケが利用されてきた。しかし、近年の乱獲、自然環境の変化などにより漁獲量が激減したため、その代替としてイトヨリダイ、エソ、タチウオ、パシフィックホワイティングなどの南方系の多種類の魚が用いられるようになった。しかし、異なった種類、異なった地域（温暖差）で水揚げされた魚を用いたすり身は品質が安定せず、身が柔らかく、加熱加工時の物性低下が問題になることが多くある (Fig. 1)。

すり身ゲルの物性低下の原因は、すり身内在プロテアーゼによる加熱加工時の「戻り」現象であることが知られている (Tanimoto et al. 2004)。「戻り」は、原料すり身を蒲鉾などに加工する際の加熱工程で起こる。加熱工程時に 40~60℃の温度帯を通過する際に、魚肉中の筋原線維結合プロテアーゼにより筋原線維のミオシンなどが分解され、蒲鉾などの水産加工製品の物性が劣化する現象であり、さまざまな魚種で報告されている。

「戻り」を抑制する方法についてはいくつかの報告がある。加藤らは、ホッケ、スケソウダラ、パシフィックホワイティングの冷凍すり身の加熱処理において、牛血漿粉末、豚血漿、卵白粉末を添加することで、「戻り」を抑制できるとしている (加藤ら 2005; 加藤ら 2010)。特にパシフィックホワイティングは、魚の身に寄生している寄生虫が出すプロテアーゼにより「戻り」現象が起こるとされ、牛血漿タンパク質に物性劣化抑制効果があるとされている (小関ら 2006)。しかし、2001年に海外で狂牛病 (BSE) が発生した影響により、牛血漿粉末の使用が不安視され、食品へはほとんど利用されていない。

一方、卵白粉末は特有の動物臭があり、加工食品へ添加することで風味を劣化させるなどの問題点があり、代替品として、植物由来の原料が求められている。

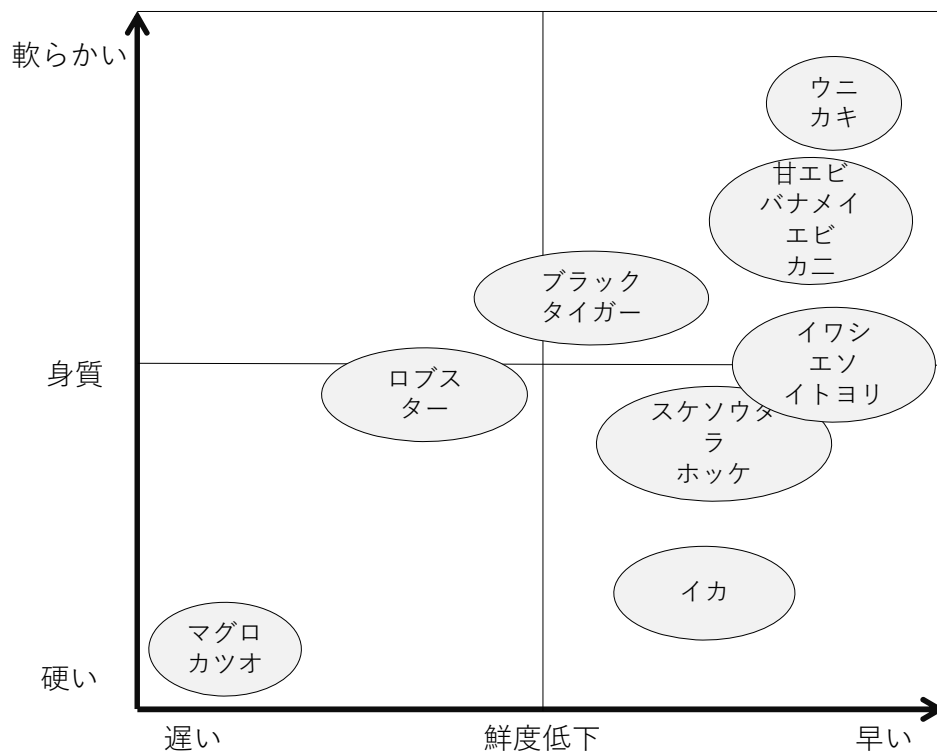


Fig. 1 Difference between meat quality and freshness by various kinds of fish

### 1-1-2 冷凍エビについて

日本では、エビとして、主にブラックタイガー (学名: *Penaeus monodon*) が食されていたが、近年、病気に強くて比較的養殖しやすいバナメイエビ (学名: *Litopenaeus vannamei*) が使用され始めた。バナメイエビはインドネシア、タイなどで養殖されている。

エビの輸入金額は 1,854 億円 (財務省「貿易統計」2011 年) で、日本の代表的な輸入 3 品目の 1 つに数えられている。現在は、ベトナム、インドネシア、タイ、インド、中国、ミャンマーでの養殖が主流になりつつある。エビはクルマエビ (学名: *Marsupenaeus japonicus*) のように泳ぐ“遊泳性”と、イセエビ (学名: *Panulirus japonicus*) のように歩く“歩行性”の大きく 2 つに分けられ、輸入の多くを占めるブラックタイガーは“遊泳性”でクルマエビ科に属し、他にブラウンエビ (学名: *Penaeus californiensis*)、ホワイトエビ (学名: *Penaeus indicus*)、ピンクエビ (学名: *Penaeus brevistris*) などが属している。エビの種類の中でも、甘エビ (学名: *Pandalus eous*)、バナメイエビなどは、ブラックタイガー、アメリカンロブスター (学名: *Homarus americanus*) と比較して、身が柔らかく、鮮度の低下が早いといわれている。輸入エビのほとんどが冷凍した状態で輸入されており、エビは冷凍障害により、加熱時の歩留

まり低下や風味, 食感の劣化が問題点となっている. 以前は, エビをリン酸塩で浸漬処理して, 身が大きく, 透明感があり, プリプリした食感に製造していた. しかし, 近年は, 比較的硬い食感を保持しつつも柔らかさがあり, かつ加熱歩留まりが高いエビが好まれるようになってきている.

加熱処理エビの物性劣化は, エビ内在プロテアーゼによるエビ筋原線維の分解が原因と考えられている. エビ内在プロテアーゼの研究は多くの品種で行われており, たとえば, ホッコクアカエビ (学名: *Pandalus eous*) 中にはシステインプロテアーゼと金属プロテアーゼなど複数のプロテアーゼが内在していると報告している (高橋 2014). また, Sriket らは, 豆類の TI が Freshwater prawn (学名: *Palaemon paucideus*) の冷蔵保存中のエビ軟化を抑制すると報告している (Sriket et al. 2011b).

### 1-1-3 トリプシンインヒビター (TI) について

プロテアーゼは, タンパク質などのペプチド結合の加水分解反応を触媒する酵素の総称であり, 生物中のあらゆる部位に存在して, 生命現象と密接に関係している. その機能は単にタンパク質を分解することだけではなく, タンパク質の機能変換や修飾にも関与する. そして, 生体内の消化, 生殖, 分化, 成長, 細胞内シグナリング, 生体防御等幅広い生理機能を制御していると言われている. このプロテアーゼは活性中心の触媒残基の種類により, 主にセリンプロテアーゼ, システインプロテアーゼ, アスパラギン酸プロテアーゼ, 金属プロテアーゼの 4 種類に分類される.

穀類は, 主に虫の食害などから種子を保護するために, 種々なプロテアーゼ阻害物質を含有していると言われている. たとえば, TI や米のオリザシスタチン (システインプロテアーゼ阻害物質), トウモロコシや小麦のシスタチンなどがあげられる. 黒緑豆はトリプシン, キモトリプシンインヒビターを含有し (四十九院ら 1979), なんきん豆の TI は 5 種類のボーマンバーク型 TI が存在しトリプシン, キモトリプシンを阻害するなどの報告がある.

大豆は主要なプロテアーゼインヒビターとして TI を含んでいる. TI はセリンプロテアーゼのトリプシン活性を阻害するインヒビターで, 自己分解を抑制し, 昆虫などの食害から種子を守るために存在すると考えられている. その機能は, 動物が摂取した場合に分泌される消化酵素トリプシンに特異的に結合して失活させると考えられている.

大豆由来の TI は, クニッツ型 (Kunits Trypsin Inhibitor; 以降 KTI と示す) (Kunitz 1945) とボーマンバーク型 (Bowman-Birk Inhibitor; 以降 BBI と示す) (Bowman 1946; Birk 1961) の 2 種類が報告されている. 分子量はそれぞれ, KTI が 21,500 (Wu 1962), BBI が M.W. 6,800~

8,600 (Frattali 1968) あり, BBI はトリプシンとキモトリプシンに対しての阻害物質である. 大豆の BBI には最大 12 種類の形が存在し, この多形成分の種類は品種によって異なることが報告されている (Losso 2008). 2 種類のインヒビターの生理機能に関しては, KTI ががん細胞の浸潤を抑制するという報告がある (Kennedy 1993).

一方, KTI や BBI の熱安定性は非常に高く, 加熱処理された大豆最終製品中に, KTI と BBI のプロテアーゼインヒビター活性が最大 20% 残存している (Friedman 2001).

しかし, この TI の食品加工工程における効果や機能に関する報告は少ない. 本研究は, 大豆粉内在プロテアーゼインヒビターについて機能や機構の検討を行い, 大豆粉の加工食品中への新たな品質劣化抑制機能の付与について研究を行っている.

#### 1-1-4 $\beta$ -アミラーゼについて

$\beta$ -アミラーゼは, でん粉の非還元性末端よりマルトース単位で切断するエキソ型の加水分解酵素である.  $\beta$ -アミラーゼ酵素はマルトースの製造やお団子などの餅の品質改良剤 (老化防止剤) として利用されているが, 大麦, 小麦, 大豆などの食糧植物内在酵素の利用に限られ, 微生物由来の  $\beta$ -アミラーゼは利用されていない. 微生物由来の  $\beta$ -アミラーゼは植物由来と比較して耐熱性が弱く, たとえば, 餅菓子の製造で餅を 60°C に加温する工程で酵素が失活する. 大豆由来  $\beta$ -アミラーゼの耐熱性が最も高く 65°C まで熱安定性があり, 他の植物や微生物由来酵素よりも耐熱性が高いのが特徴である. 近年, 市場では柔らかい食感の加工食品が好まれており, 大豆由来の  $\beta$ -アミラーゼに対するニーズが高まっているが, 現状は安定供給できていない.

$\beta$ -アミラーゼを製造するための原料となる生全脂大豆粉を製造できるメーカーは限られており, 酵素の安定供給を行うため, 原料メーカーは優位性を持つと考えられる.

本研究は, その原料メーカーである自社で生全脂大豆粉から TI, リポキシゲナーゼ,  $\beta$ -アミラーゼの食品加工工程への効果や機能を研究し, 大豆粉の加工食品への新たな物性劣化抑制機能付与の研究を行っている.

#### 1-1-5 アルギン酸ゲルについて ( $\beta$ -アミラーゼ, TI の精製方法)

一般的に, 酵素の精製は硫酸分画, イオン交換クロマトグラフィー, ゲルろ過クロマトグラフィーを中心に研究されてきた. しかし, 近年, 酵素-基質の親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーで, 精製度を上げる方法が検討されている.

アミラーゼなどの糖質加水分解酵素の精製に関して, 基質となる多糖類と酵素の親和性

を利用して酵素と基質の複合体を分離し、精製度を高めた報告がある (中村ら 1898; Imai ら 1977; Misuishi ら 1979). 荒木らは糖質関連酵素の多糖質ゲルへの吸着量を検討し、 $\alpha$ -アミラーゼはでん粉ゲルに約 88%, アルギン酸ゲルに約 90%が吸着したと報告している (荒木ら 2010).

荒木らは、この吸着原理は硫酸添加により酵素タンパク質表面に疎水的な構造の変化をもたらし、疎水性クロマトグラフィーの作用とアフィニティークロマトグラフィーの作用とが相まって酵素が吸着された可能性があるとしている (荒木ら 2010).

大豆内在  $\beta$ -アミラーゼ, TI を精製する方法として、アルギン酸ゲルによる吸脱着方法を検討することで、酵素-基質親和力で  $\beta$ -アミラーゼの吸着精製を行い, TI 精製液を等電点付近の pH4 に調整し、酵素表面を疎水性にシフトさせ、アルギン酸ゲルを疎水性クロマトグラフィーとして利用し、両方の酵素を一度に精製できる可能性があると考えられる.

#### 1-1-6 K 値について (鮮度判定恒数)

魚の鮮度の生化学的指標として K 値が利用されている. 動物は、死後に筋肉中の ATP を再生産する機能を失い、それが引き金となり、生鮮食品および加工食品原料としての適性が影響を受ける. 魚の死後、冷蔵保存中に筋肉内在酵素による ATP の分解が起こり、アデノシン三リン酸 (ATP)  $\rightarrow$  アデノシン二リン酸 (ADP)  $\rightarrow$  アデニル酸 (AMP)  $\rightarrow$  イノシン酸 (IMP)  $\rightarrow$  イノシン (HxR)  $\rightarrow$  ヒポキサンチン (Hx) と分解が進む. IMP と HxR の分解速度が比較的遅く, HxR と Hx の量から下記の計算式で K 値を算出している (榎本ら 1985; 臼井ら 2012).

$$K \text{ 値 } (\%) = (\text{HxR} + \text{Hx}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}) \times 100$$

### 1-2 実験方法

#### 1-2-1 大豆トリプシンインヒビター (TI) の冷凍すり身への品質劣化抑制効果

##### 1-2-1-1 実験材料

冷凍すり身: スケソウ 2 級 (学名: *Theragra chalogramma*), スケソウ KA (学名: *Theragra chalogramma*), イトヨリ A (学名: *Nemipterus virgatus*), イトヨリ KA (学名: *Nemipterus virgatus*), キグチ (学名: *Pseudosciaena polyactis*), エソ (学名: *Synodontidae*) を (株) 丸共水産, 広瀬水産 (株), (株) 笹谷商店から入手した.

ケーシングはクレハロンシーム A08 55mm  $\times$  300mm No.4 (クレハ社製) を使用した.

プロテアーゼ阻害剤: KTI (Kunitz 型インヒビター), BBI (Bowman-Birk 型インヒビター),



phenylmethanesulfonyl fluoride (以下 PMSF と略す), o-phenanthroline の 4 種類の阻害剤は Sigma-Aldrich 社製, EDTA は同仁化学研究所社製, pepstatin A はペプチド研究所社製, N-ethylmaleimide (以下 NEMI と略す) は Thermo Fisher 社製を用いた.

大豆ホエー粉末: 脱脂大豆 (ソヤフラワーA : 日清オイリオグループ社製) 100g に 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を 1,000ml 加え, 30 分間攪拌後, 3,500rpm, 30 分間遠心分離を行い, 上澄み液を回収した. 上澄み液が pH4.0 になるように 5N HCl を用いて pH 調整し, 30 分間攪拌後, 3,500rpm, 30 分間遠心分離を行った. 遠心後の上澄み液を回収し, 5N NaOH で pH6.5 に調整を行い, 大豆ホエー液とした.

この大豆ホエー液は $-60^{\circ}\text{C}$ で凍結し, 凍結乾燥機 (凍結乾燥機 FDU-1110 型 : 東京理化機器社製) に入れて凍結乾燥を行い, 大豆ホエー粉末を作成した.

### 1-2-1-2 すり身ゲルの調製

冷凍すり身を流水下で解凍後, 荒播り (あらずり : 魚の身をミンチにする), 塩播り (ミンチを播り潰す), 本播り (さらに細かく播り潰す) を行い, ケーシングに充填した.

荒播り : すり身 1kg を入れ, カッターL で  $1\sim 3^{\circ}\text{C}$ , 5 分間, 常圧で荒播りを行った. すり身がミンチ状になった後, 製剤を投入し, 270ml の加水を行った.

塩播り : 加水後, 食塩 30g 投入し, カッターL で  $3\sim 8^{\circ}\text{C}$ , 1 分間, 減圧条件で塩播りを行った. さらに, 270ml の氷水を添加し, カッターH で 1 分間,  $8\sim 10^{\circ}\text{C}$ , 減圧条件で塩播りを行った.

本播り : 塩播り後, 氷水 270ml, でん粉 100g を添加し, カッターH で  $10\sim 14^{\circ}\text{C}$ , 10 分間, 減圧条件で本播りを行った.

これをケーシング (塩化ビニリデン製) に充填し,  $92^{\circ}\text{C}$ で 40 分間加熱したもの (コントロール) と  $60^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱後,  $92^{\circ}\text{C}$ で 40 分間加熱 したものの(戻り条件) を調製した.

### 1-2-1-3 すり身ゲル物性評価

無添加のすり身ゼリー強度を 100%として相対値で示した.

物性測定器は Texture Analyser TA XT plus (Stable Micro Systems 社製) を用い, プランジャーは  $\phi 8$  球形シリンダーを用い, Rupture Strength 測定 1mm/秒進入で行った.

### 1-2-1-4 K 値測定方法 (鮮度判定恒数測定)

K 値は槌本らの方法に従って算出した.

サンプルを 2 g 秤量し, 10% PCA (過塩素酸) 4 ml 添加し, ホモジナイザーで 10,000 rpm, 1 分間粉碎を行った. その後, 4,500 rpm, 10°C, 5 分間遠心分離を行い, 上澄みを回収した. 沈殿物に 5% PCA を 4ml 添加し, 同様な操作を 2 回繰り返した. 回収した上澄み液を 5N KOH で pH6.8 に調整した後, 20 ml にメスアップして分析試料とした.

核酸関連化合物の測定は HPLC (LC-2010A: 島津製作所社製) で行った. 分析条件は, カラム: Asahipak GS-320HQ, 検出: 260nm, 移動相: 200mM リン酸緩衝液 (pH 2.7), 流速: 1ml/min, カラム温度: 30°C で行った.

$$K \text{ 値 } (\%) = (\text{HxR} + \text{Hx}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{HxR} + \text{Hx}) \times 100$$

#### 1-2-1-5 プロテアーゼ活性測定法

すり身を 20 g 精秤し, 2.5% NaCl-20mM トリス緩衝液 (pH7.0) を加えて, 全量を 150g にフィルアップし, 4°C, 30 分間スターラー攪拌を行い, 溶解した.

この上澄み液を 12,000rpm, 4°C, 15 分間遠心分離を行い, 遠心分離後の上澄み液 10ml を 30°C の恒温槽中で 60 分間反応を行った. 氷水中で速やかに冷 10% トリクロロ酢酸溶液 (TCA 溶液) 10ml を添加し, ボルテックスミキサーで攪拌した. 氷水中で 15 分間静置後に 7,500rpm, 4°C, 10 分間遠心分離を行った上澄み液のペプチド濃度を Lowry 法 (プロテインアッセイ LOWRY キット: ナカライテスク社製) で測定し, 得られたペプチド量をもとにプロテアーゼ活性を測定した.

#### 1-2-1-6 すり身ゲルの物性測定法

イトヨリ KA すり身を 1-2-1-2 の方法に従って作成した. 戻り加熱を 60°C, 30 分間行った後, 92°C, 40 分間加熱を行った. 大豆ホエーは冷凍すり身重量に対し 4% (w/w) 添加し, 無添加と比較した. すり身ゲルのゼリー強度はテクスチャーアナライザーで測定した. 機器は Texture Analyser TX. XT. Plus (Stable Micro Systems 社製) を用いて行った.

プランジャーは前歯型プランジャーを用い, 押し込み速度 1mm/sec. で行った.

#### 1-2-1-7 すり身の走査型電子顕微鏡観察

3D リアルサーフェイスビュー顕微鏡 VE-8800 (キーエンス社製) を用いて, イトヨリ KA すり身ゲルの走査型電子顕微鏡観察を行った ( $\times 500$ ). ボイル後のすり身ゲルを用いて, 手術用メスで 0.5mm の切片を作成し, シャーレ上で凍結乾燥機 (プログラム棚式凍結乾燥 FD-550P: 東京理化学器械社製) を用いて乾燥を行い, サンプルを作成した.

## 1-2-2 大豆トリプシンインヒビター (TI) の精製方法

### 1-2-2-1 実験材料

冷凍すり身は、イトヨリ KA を使用した。

### 1-2-2-2 TI 活性測定法

各サンプル 0.5g を 300ml 三角フラスコに入れ、純水を 50ml 添加した。ホモジナイザーで 10,000rpm, 6°C, 1 分間粉砕を行った後、37°C ウォーターバス中で 120rpm, 30 分間振とうし、TI を抽出した。TI 抽出液 5ml に CaCl<sub>2</sub> 添加 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を 5ml 添加した。次にろ紙 A を用いて吸引ろ過を行い、ろ液を測定試料とした。

試料を希釈液で 10 倍～20 倍に希釈し、1ml をキャピラリーピペットで試験管に入れ、Benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide (BAPA) 液 2ml を加えた。37°C ウォーターバス中で試験管にトリプシン液 0.5ml 添加し、10 分間反応後に 30% 酢酸 0.5ml を添加して酵素反応を停止した。分光光度計 (UV-2600: 島津製作所社製) で 410nm の吸光度を測定した。なお、TI 活性は試料 (mg) 当たりの活性で、以下のような計算式で表した。

$$\text{TIU/mg} = (\text{空試験 OD} - \text{試料 OD}) \times \text{希釈倍数} \times 100 \times \text{加水量 (ml)} \times 2 \div \text{試料重量 (mg)}$$

### 1-2-2-3 β-アミラーゼ活性測定法

2% 可溶性でん粉を基質として、200mM 酢酸緩衝液 (pH4.8) を用いて、30°C, 30 分間反応した。反応液中の生成マルトース含量から β-アミラーゼの力価を算出した。酵素量は反応液 1ml 中 1 分間に 1μmol のマルトースを遊離する酵素量を 1 単位とした。

### 1-2-2-4 アルギン酸ゲルを用いた TI, β-アミラーゼ精製方法

脱脂大豆粉 (ソヤフラワー A: 日清オイリオグループ社製) 1kg に水道水 8,000ml 添加し、2N NaOH を用いて pH8.0 に調整し、300rpm, 30 分間攪拌して溶解を行った後、バケット式遠心分離機 CT 型 (タナベヴェルテック社製) で 3,500rpm, 常温, 30 分間遠心分離を行った上澄み液を回収した。上澄み液を 2N HCl で pH4.5 に調整し、1 時間静置後、バケット式遠心分離機で 3,500rpm, 30 分間遠心分離を行い、上澄み液を回収した。この上澄み液を 2N NaOH で pH6.0 に調整した液を大豆ホエー液 (酸沈殿液) とした。

大豆ホエー液にアルギン酸を 300ppm 添加し、攪拌後、乳酸を添加して pH4.0 に調整してゲルを作成した。このゲルを 10,000rpm, 15°C, 15 分間遠心分離を行った。沈殿物を 10ml の

50mM リン酸緩衝液 pH6.0 で溶解後, 透析を行った (50mM リン酸緩衝液 pH6.0, 3,000ml).

透析後の溶液は, 10,000rpm, 6°C, 15 分間遠心分離を行い, 上澄み液を回収した. 回収した上澄み液を凍結乾燥 (凍結乾燥機 FDU-1110 型: 東京理化工機社製) した. 工程を Fig. 2 に示す.

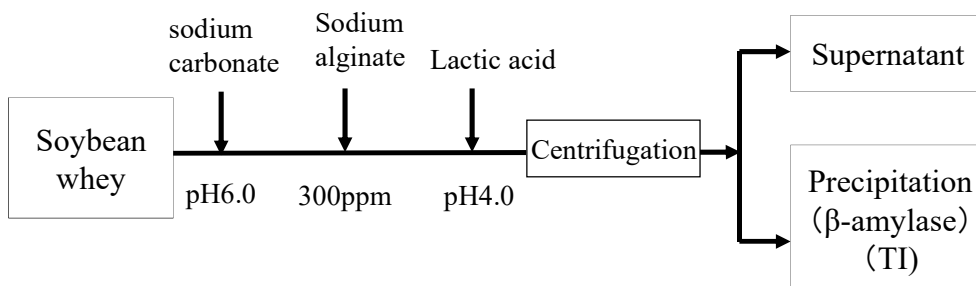


Fig. 2 Purification methods of TI and  $\beta$ -amylase.

#### 1-2-2-5 粗精製 TI の SDS-PAGE

1-2-2-4 の方法で粗精製した TI 粉末の SDS-PAGE を行った. 電気泳動は XCell SureLock Mini-Cell 電気泳動装置 (インビトロジェン製) を用いて行った.

1well あたりのサンプル溶液のタンパク質濃度が 50 $\mu$ g になるように LDS Sample buffer pH7.3 (インビトロジェン社製) で希釈を行い, ホモジナイザーで 10,000rpm, 6°C, 2 分間粉碎を行った後, 10,000rpm, 6°C, 10 分間遠心分離を行った上澄み液を回収した. 回収した上澄み液を 1ml の遠心機用容器に入れ, 12,000rpm, 6°C, 15 分間遠心分離を行った. 2 回遠心後の上澄み液を SDS-PAGE 用サンプルとした.

泳動液は MOPS SDS Running Buffer, ゲルは NuPAGE 4-12%Bis-Tris Gel, 染色液は Simply Blue Stain (インビトロジェン社製) を用い, 100~120mA/枚, 電圧 200V で通電して行った.

#### 1-2-2-6 すり身ゲル作成方法

各粗精製 TI サンプル添加すり身の組成を Table 1 に示す.

Table 1 Raw material composition of surimi

	①		②		③		④		⑤		⑥	
	cont		大豆粉(HT-SF)		SBTI		沈澱濃縮物		上清濃縮物		上清無濃縮	
イトヨリすり身KA	1000	57.80%	1000	57.65%	1000	57.80%	1000	57.80%	1000	57.79%	1000	57.78%
加水	600	34.68%	600	34.59%	600	34.68%	600	34.68%	600	34.67%	600	34.67%
大豆粉		0%	4.5	0.26%		0%		0%		0%		0%
TI製剤		0%		0%	0.215	0.01%		0%		0%		0%
沈澱濃縮物		0%		0%		0%	0.254	0.01%		0%		0%
上清濃縮物		0%		0%		0%		0%	0.471	0.03%		0%
上清無濃縮		0%		0%		0%		0%		0%	0.768	0.04%
食塩	30	1.74%	30	1.73%	30	1.73%	30	1.73%	30	1.73%	30	1.73%
澱粉	100	5.78%	100	5.77%	100	5.78%	100	5.78%	100	5.78%	100	5.78%
Total	1730	100.00%	1734.5	100.00%	1730.215	100.00%	1730.254	100.00%	1730.471	100.00%	1730.768	100.00%

活性 [TIU/mg]	-	33.8	708	600	323	198
総活性	-			152.1		

冷凍すり身を解凍後、すり身 1kg に TI を 150 TIU 添加し、前述の 1-2-1-2 の方法ですり身ゲルを作成した。

### 1-2-3 大豆粉 TI のエビ加工食品への品質劣化抑制効果

#### 1-2-3-1 実験材料

バナメイエビ 41/60<sup>\*</sup> (タイ産, インドネシア産), ホワイト・ピンク (インドネシア産, ブラジル産), ブラックタイガー41/60 (インドネシア産) の冷凍品は日本水産 (株), (株) ニチレイより入手した。

阻害剤 E-64 (Hemihydrate), TI 製剤, SBTI は Sigma-Aldrich 社製, EDTA は同仁化学研究所社製, pepstatin A はペプチド研究所社製を使用した。

大豆粉は加熱全脂大豆粉 (アルファプラス HS-600: 日清オイリオグループ社製) を使用した。

\*41/60: 1 ポンドの氷板中にエビ 41~60 尾入っている意味で、エビのサイズを示す。

#### 1-2-3-2 冷凍エビの浸漬・加熱方法と歩留まり率

冷凍バナメイエビを流水下で 1 時間解凍を行い、解凍後のバナメイエビの殻を剥いた後、約 100g 取り、エビ重量を測定した (W1)。浸漬液 400ml とエビ 100g をビニール袋に入れ、6°C で 16 時間浸漬を行った。大豆粉はエビ重量に対して 2.5% (w/w) 添加した。また、浸漬後、エビを 1 回水洗し、キムワイプ (日本製紙製) で拭いた後、エビ重量を測定した (W2)。その後、2,000ml 沸騰水中で 3 分間加熱後のエビ重量を測定した (W3)。エビの歩留まり率は

ボイル前後のエビ重量を比較し、浸漬歩留まり率と加熱歩留まり率を算出した。

$$\text{Yield (\%)} = (W2 / W1) \times 100 \text{ (浸漬歩留まり率)}$$

$$\text{Yield (\%)} = (W3 / W1) \times 100 \text{ (加熱歩留まり率)}$$

### 1-2-3-3 エビの体積、重量測定方法

機器は 3D LASER VOLUME MEASUREMENT SELNAC WIN VM 2100 (ASTEX 社製)を用いた。ボイルエビの重量を測定後、測定器の中央部分にエビを載せ、レーザーのワイヤフレームで体積を測定した。ボイルエビ体積と重量を比較した。

### 1-2-3-4 官能評価方法

中央研究所職員 20 名 (男:女=1:1, 25 歳~40 歳) による官能評価 (評価方法は 5 段階評価法で行った) を行った。エビの硬さを 1~5 の 5 段階評価, エビの風味を 5 段階評価した (Table 2)。また, 食感, 風味に対するコメント欄を作成した。

Table 2 Taste evaluation of boiled shrimp

段階	風味	食感(硬さ)
1	エビの風味がない。	エビが硬く, パサパサしている。
2	エビの風味が弱い, 水っぽい。	エビが硬く, ややパサパサしている。
3	エビの風味がある。	エビがやや硬い。ややパサパサしている。
4	エビの風味がやや強い。	エビがやや硬く, やや弾力性がある。
5	エビの風味が強い。	エビがやや硬く, 弾力性がある。

### 1-2-3-5 エビ物性測定方法

1-2-1-6 の方法に準じて, Texture Analyser TA. XT. Plus (Stable Micro Systems 社製) を用いて測定を行った。プランジャーは前歯型プランジャーを用い, 押込み速度 1mm/sec.で行った。

### 1-2-3-6 エビ筋原線維の走査型電子顕微鏡観察

1-2-1-6 の方法に準じて走査型電子顕微鏡を用いて, ボイルエビ筋原線維の観察を行った (×500)。バナメイエビは 1-2-3-2 の方法に準じて浸漬処理を行ったエビを用い, 手術用メスで 0.5mm のエビ切片を作成して, シャーレ上に固定して凍結乾燥を行い, サンプルとした。

### 1-2-3-7 エビ筋原線維の SDS-PAGE

1-2-2-5 の SDS-PAGE の方法に準じて行った.

冷凍バナメイエビを流水下で 1 時間解凍を行った. 解凍後のエビ 10g に対して 40ml の 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を加え, ホモジナイザーで 6~10°C, 3 分間粉碎を行い, ペーストを作成した. このペーストにエビ重量に対して 2.5% (w/w) の加熱全脂大豆粉 (以降 HT-SF と略す) を添加し, 200ml 三角フラスコで, 15°C, 16 時間反応を行った.

1well あたりのタンパク質濃度が 50 $\mu$ g になるように LDS Sample buffer pH7.3 (インビトロジェン社製) で希釈を行い, ホモジナイザーで 8,000rpm, 6°C, 2 分間粉碎を行った後, 10,000rpm, 6°C, 10 分間遠心分離を行った上澄み液を回収した. 回収した上澄み液を 1ml の遠心機用容器に入れ, 12,000rpm, 6°C, 15 分間遠心分離を行った. 2 回遠心後の上澄み液を SDS-PAGE 用サンプルとした.

### 1-2-3-8 プロテアーゼ阻害剤の検討方法 (浸漬液)

殻をむいたバナメイエビ 100g に対して 200ml の浸漬液を加え, 6°C, 16 時間静置して浸漬を行った. 阻害剤は, エビ重量に対して E-64 を 1mmol/kg, pepstatin A を 1mmol/kg, EDTA を 1mmol/kg, SBTI を 1mmol/kg, HT-SF を 2.5%添加した.

浸漬液 1ml に 5%TCA を 1ml 添加し, 試験管ミキサーで 1 分間攪拌後, 10,000rpm, 6°C, 10 分間遠心分離を行った. 遠心分離後の上澄み液を 1.0 $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過した後, アミノ酸分析装置 (日立高速アミノ酸分析計 L-8800: 日立ハイテクサイエンス社製) を用いて, 遊離アミノ酸含量の測定を行った.

### 1-2-3-9 エビフライ作成

#### One-time frozen 法

バナメイエビ 300g に対して, HT-SF を 2.5%添加した浸漬液 (600ml) で 6°C, 16 時間浸漬後, 水洗い 1 回を行った. エビ表面の水気をキムワイプ (日本製紙製) でふき取り, 打ち粉ミックス粉 (打ち粉ミックス:日清製粉社製) に付け, バターミックス粉 (パン粉がよくつく粉:日清製粉社製) を氷冷した水道水 (粉:水=1:2)で溶解した液に漬けた. パン粉 (フライスター7: フライスター社製) を付着させた後, -60°Cで急速冷凍を行った. -20°Cで 1 週間冷凍保存後, 大豆白絞油 (日清オイリオグループ社製) で 175°C~180°C, 1.5 分間油ちょうを行った. 油ちょう後, 常温で 3 時間静置して測定を行った.

## Two-times frozen 法

上記 one-time frozen 法と同様の方法で打ち粉を付着させた後、氷水で冷やしたバター (粉:水=1:2) に漬け、さらにパン粉をつけた後、175~180℃で 1.5 分間油ちょうを行った。常温で 3 時間冷却後、-60℃で急速冷凍を行い、-20℃で 1 週間冷凍保存を行った。保存後の冷凍エビフライはレンジ加熱 (電子レンジ: 600W, 1 分間) を行った。常温で 3 時間冷却後に測定を行った。

### 1-2-3-10 エビフライ官能評価方法 (エビの風味, エビと衣の食感評価)

エビフライの風味評価は、中央研究所の職員 20 名により評価した。食感は 1~5 までの 5 段階評価でエビの硬さと衣のサクサク感を評価、風味は 1~5 までの 5 段階評価で評価を行った。評価法は Table 3 に示す。

Table 3 Taste evaluation of deep-fried shrimp

段階	風味	食感
1	エビの風味がない。 水っぽい	衣の食感が弱く、べちゃべちゃした食感。 エビは硬く、パサパサな食感。
2	エビの風味が弱い。 やや水っぽい	衣の食感がやや弱い。 エビは硬く、水っぽい。
3	エビの風味がある。	衣にサクサク感が残っている。 エビはやや硬い、
4	エビの風味がやや強い。	衣のサクサク感がやや強い エビはやや硬さがあり、やや弾力性がある。
5	エビの風味が強い。	衣が比較的硬く、サクミ感が強い。 エビはやや硬く、弾力性がある。

### 1-2-3-11 食感音響評価システムによるエビフライ衣の評価方法

食感音響評価システム (自社製作品) によるエビフライ衣のサクサク感の測定を行った (Fig. 3)。食感音響評価システムは、食品破碎装置、精密騒音計 (リオン社製 NL-15)、サウンドオーディオプロセッサー (SE-U55 オンキヨー社製)、音響信号録音再生解析ソフト (Cool



Edit 2000 Syntrillium Software 社製)で構成されている。

食品破碎装置は、エアースリンダーにより一定速度 (5~8mm/s)で上下する試料台にエビフライを乗せ、破碎部 (歯) に試料を押し当てることで破碎する。歯は縦格子状 (リブ状) になっている。

音響評価は、食品破碎 → 音響測定 → 音波型データ → デジタル解析の順に行った。エビフライの破碎条件は、試料台に 30g のエビフライを乗せ、エアースリンダーで試料に約 10kg の力が加わるように歯に押し当ててエビフライを破碎した。測定に用いたマイクは騒音計 (リオン社製 NL-15) を用い、音響解析ソフト (Cool Edit2000: Syntrillium 社製) を使用してパーソナルコンピュータ内蔵ハードディスク内に音圧信号を収集した。データを 1/3 オクターブ解析し、特定周波数帯域 (500~7,500Hz) の音圧 (dB) を測定した。



Fig. 3 Acoustic evaluation of deep-fried shrimp

#### 1-2-4 大豆ホエー、阻害剤の冷凍すり身ゲルへの物性劣化抑制メカニズム

##### 1-2-4-1 実験材料

冷凍すり身はイトヨリ KA を使用した。

プロテアーゼ阻害剤は、PMSF (セリンプロテアーゼ阻害剤), EDTA (金属プロテアーゼ阻害

剤), o-phenanthroline (金属プロテアーゼ阻害剤), NEMI (システインプロテアーゼ阻害剤), pepstatin A (アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤) を使用した. 大豆ホエーは, 前述の 1-2-2-4 の TI,  $\beta$ -アミラーゼ精製方法に準じて作成した.

#### 1-2-4-2 すり身ゲル物性の測定方法

すり身ゲルの物性はレオメーター (RE-3305-I 型, 山電社製) を用いて測定した.

直径 5mm の球形プランジャーを用いて, 荷台上昇速度は 1mm/sec. で各試料について 5 点測定し, 破断強度, および破断凹み (mm) を算出した.

#### 1-2-4-3 ミオシン重鎖 (MHC) の SDS-PAGE

冷凍すり身 5g に 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0, 3%塩化ナトリウム) 20ml 添加し, ワーリングブレンダー (ワーリングブレンダー7012S 型: WARING 社製) で 4°C, 3 分間粉碎を行った. このすり身溶液 3ml を試験管に移し, 恒温槽中で 30°C~80°C の各温度で 2 時間, 加温してゲルを調製した.

ゲル 1g に 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5, 8M 尿素, 10% 2-メルカプトエタノール, 2%SDS) 5ml 添加し, 一晚静置したサンプルを電気泳動に供した.

#### 1-2-4-4 筋原線維結合型プロテアーゼ抽出方法

冷凍すり身 10g に 25mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を 40ml 添加し, ワーリングブレンダーで 4°C, 10 分間粉碎を行った後, 10,000rpm, 4°C, 10 分間遠心分離して沈殿物を回収した. この沈殿物に上記と同じ操作を 4 回繰り返して洗浄した後, 25mM リン酸緩衝液 (pH6.4, 50mM 塩化カリウム, 1mM 塩化マグネシウム, 5mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) 80ml を添加し, ワーリングブレンダーで粉碎 (4°C, 10 分間) した. さらに, 0.5% (w/w) になるようにツイーン 80 を加え攪拌 (4°C, 1 時間), 溶解後, 10,000rpm, 4°C, 10 分間遠心分離を行い, 上澄み液を得た. この上澄み液を硫酸塩析 (40%飽和) し, 10,000rpm, 4°C, 10 分間遠心分離した上澄み液を回収した. この上澄み液に対して, 硫酸塩析 (80%飽和) を行い, 16,000rpm, 4°C, 10 分間遠心分離を行い, 沈殿物を回収した. 沈殿物は 10mM リン酸緩衝液 (pH7.5) で溶解後, 一晚透析 (4°C) を行った.

透析後, 16,000rpm, 4°C, 10 分間遠心分離を行った上澄み液をプロテアーゼ粗酵素液とした.

#### 1-2-4-5 プロテアーゼの活性染色

##### ザイモグラフィ法による検出

ゼラチン (0.3mg/mL) を含む分離ゲルを用いて SDS-PAGE (T=10%) を Leammli 法で行った。マーカーは XL-Ladder Broad (ATTO 社製) を用いた。電気泳動後のゲルは 2.5% トライトリン X 溶液による置換 (室温, 30 分間) を 2 回行い、タンパク質をリフォールディングした。

ゲルを 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) にて平衡化した後, 200mM 塩化ナトリウムを含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0, 5mM 塩化カルシウム, 0.02% アジ化ナトリウム) に浸透し, ゲル上で酵素反応 (37°C, 18 時間) を行った。

反応後のゲルは 50%メタノール-10%酢酸溶液とイオン交換水の順で振とうした後, CBB 液で染色を行った後, 脱色した。

#### 1-2-4-6 内在型プロテアーゼ活性に対する阻害剤の抑制効果

1-2-4-5 のザイモグラフィ法の反応液に PMSF, EDTA, o-phenanthroline, NEMI および pepstatin A を各最終濃度 1mM になるように添加した後, 50°C で酵素反応を行った。また, トリプシン阻害剤の TI (大豆) である Kunitz 型 TI (KTI) と Bowman-Birk 型 TI (BBI) をそれぞれ 0.01mg/ml, 0.1mg/ml 添加して, 同様に試験を行った。

#### 1-2-4-7 統計解析

データは標準偏差 (Mean ± SE) で示した。検定は Tukey-kramer's 多重比較検定法で, SSRI (version 1.03 for windows: 社会情報サービス社製) を用いて行った。

### 1-2-5 大豆粉のエビ加工食品への品質劣化抑制メカニズム

#### 1-2-5-1 エビのプロテアーゼ阻害剤の検討 (エビペースト)

殻をむいたバナメイエビ 100g に対して 50mM 緩衝液を 400ml 加え, ホモジナイザーで 6 ~ 10°C, 3 分間粉碎を行い, ペーストを作成した。ペーストに阻害剤の E-64, pepstatin A, SBTI, EDTA をそれぞれ 1mmol/kg 添加し, 50°C で 16 時間反応を行った。その後, 試験管に反応したペースト 1g を取り, 5%TCA を 1ml 添加し, 試験管ミキサーで 1 分間攪拌後, 10,000rpm, 6°C, 10 分間遠心分離を行い, 上澄み液を回収した。その後, 1-2-3-8 の方法で遊離アミノ酸含量を測定した。

各 pH 溶液は, pH3.0 は 50mM リン酸緩衝液, pH7.0 は 50mM リン酸緩衝液, pH9.0 は 50mM ホウ酸緩衝液で作成した。

### 1-3 実験結果

#### 1-3-1 大豆トリプシンインヒビター (TI) の冷凍すり身への品質劣化抑制効果

##### 1-3-1-1 魚種別冷凍すり身ゲルの物性と加熱歩留まり

魚種別すり身のゼリー強度をテクスチャーアナライザーで測定した結果を Fig. 4 に示す。スケソウ 2 級 (学名: *Theragra chalogramma*), スケソウ KA (学名: *Theragra chalogramma*), イトヨリ A (学名: *Nemipterus virgatus*) のゼリー強度は高かったが, イトヨリ KA (学名: *Nemipterus virgatus*), キグチ (学名: *Pseudosciaena polyactis*), エソ (学名: *Synodontidae*), ホッケ (学名: *Pleurogrammus azounis*) は低い値であった。逆に, 歩留まり率は無添加と比較して, イトヨリ KA, エソが高く, スケソウ KA, ホッケ, イトヨリ A は低い値であった。ゼリー強度が低い魚種は歩留まり率が高く, ゼリー強度が高い魚種は歩留まり率が低い傾向が見られた (Fig. 5)。

以降の実験ではイトヨリ KA を使用する。

##### 1-3-1-2 すり身ゲルの物性, 歩留まり率, K 値

K 値とゼリー強度, すり身ゲルの歩留まり率 (%) の比較を Fig. 6 に示す。K 値が高い (鮮度が低い) すり身ゲルのゼリー強度は低く, 無処理と比較して歩留まり率が向上する傾向があった。また, K 値が低い (鮮度が高い) すり身ゲルのゼリー強度は高く, 歩留まり率が低い傾向にあった。ゼリー強度と歩留まり率, プロテアーゼ活性については Fig. 7 に示す。ゼリー強度が高いゲルのプロテアーゼ活性は低い傾向であった。即ち, 硬い物性のすり身ゲルは, 内在プロテアーゼ活性が低く, 無処理と比較して加熱歩留まり率の差が出にくい。

##### 1-3-1-3 大豆ホエーのイトヨリすり身「戻り」への物性劣化抑制効果

イトヨリ KA のすり身に対して 4% の大豆ホエーを添加し, 60°C, 30 分間「戻り」加熱後, 92°C, 40 分間の加熱を行い, ゲルを作成し, ゼリー強度を測定した。大豆ホエー添加すり身ゲルは 1,796g・mm で, 無添加 (626g・mm) の 2.85 倍にゼリー強度の数値が高くなり, 物性劣化抑制効果が認められた。

##### 1-3-1-4 すり身ゲルの走査型電子顕微鏡観察

加熱すり身ゲル (蒲鉾) の走査型電子顕微鏡写真を Fig. 8 に示す。

大豆ホエーを添加したすり身ゲルは, 気泡がきれいに残っており, 表面が滑らかであったが, 無添加のすり身ゲルは気泡が壊れ, ザラザラした表面になっている。

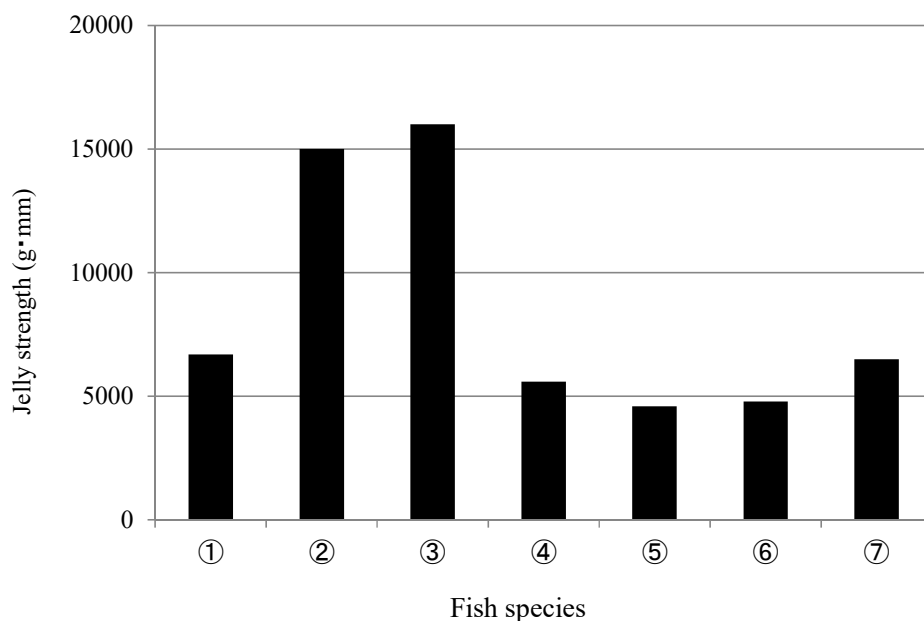


Fig. 4 Jelly strength on surimi by different species of fish .

①: *Theragra chalogramma* second grade, ②: *Theragra chalcogramma* KA, ③: *Nemipterus virgatus* A, ④: *Nemipterus virgatus* KA, ⑤: *Pseudosciaena polyactis*, ⑥: *Synodontidae*, ⑦: *Pleurogrammus azouns*

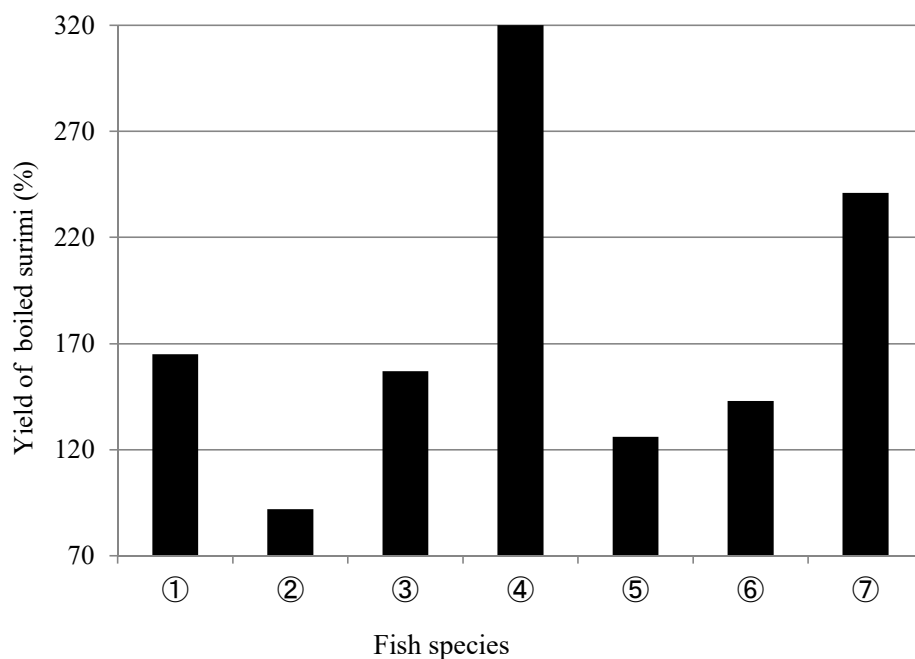


Fig. 5 Yield of boiled surimi prepared with different species of fish.

①: *Theragra chalogramma* second grade, ②: *Theragra chalcogramma* KA, ③: *Nemipterus virgatus* A, ④: *Nemipterus virgatus* KA, ⑤: *Pseudosciaena polyactis*, ⑥: *Synodontidae*, ⑦: *Pleurogrammus azouns*

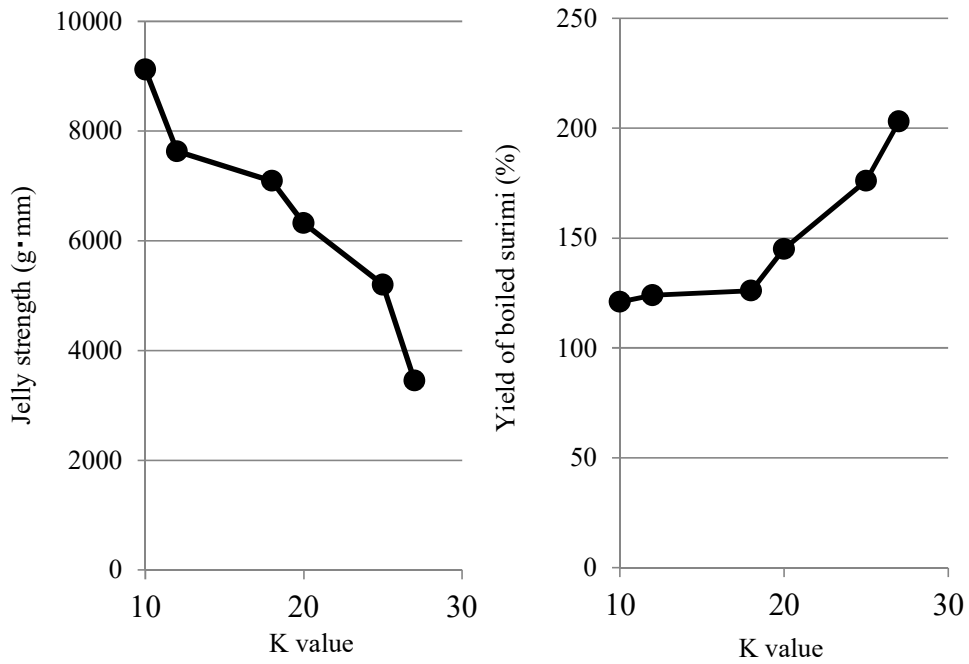


Fig. 6 Effect of K value on surimi jelly strength and yield of boiled surimi. Left: jelly strength of boiled surimi, Right: yield of boiled surimi

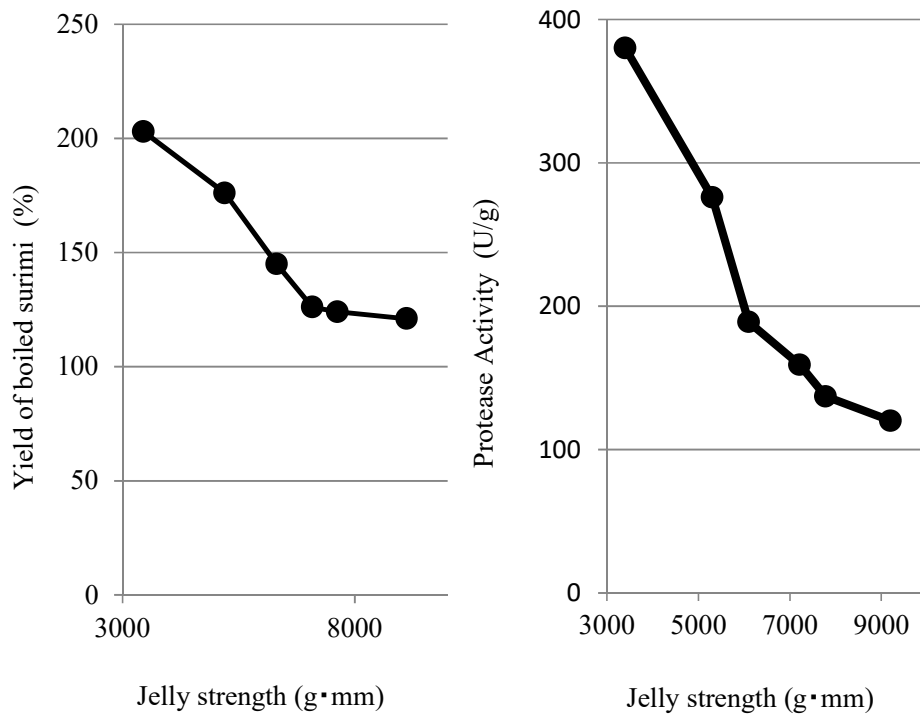


Fig. 7 Effect of K value on surimi jelly strength . Left: yield of boiled surimi, Right: protease activity

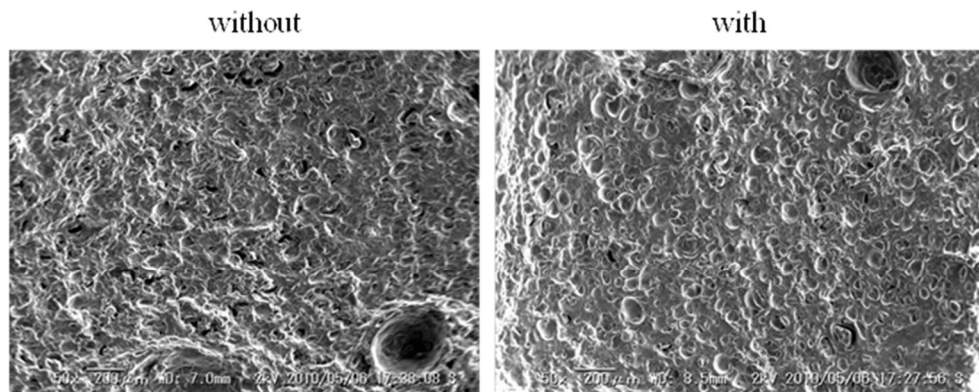


Fig. 8 SEM images of surimi gel with or without soybean whey.  
Left photo: without soybean whey. Right photo: with soybean whey.  
The scale bar represents 200 $\mu$ m ( $\times$ 500)

## 1-3-2 トリプシンインヒビター (TI), $\beta$ -アミラーゼの精製

### 1-3-2-1 TI の精製

TI の精製表を Table 4 に示す. 酸沈殿処理後の上澄み液の TI 比活性が若干高くなった. アルギン酸ゲル包括処理後の回収率は 17.8%, 比活性は 11.4 倍に向上したが, 非包括区分にも TI 活性が残存しており, 回収率が低下した.

$\beta$ -アミラーゼは, 酸沈殿工程で 3.5 倍に精製され, アルギン酸ゲル処理で比活性は 26.7 倍に向上し, 回収率は 41.7%であった.  $\beta$ -アミラーゼの精製にアルギン酸ゲルが適している可能性が示唆された.

Table 4 Purification table of soybean TI and  $\beta$ -amylase

	Protein (mg)	TI (TIU/mg)				$\beta$ -amylase (U/g)			
		Activity (TIU)	Specific activity (TIU/mg)	Recovery (%)	Fold	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
Soybean powder	334	4946.1	14.8	100.0	1	31258.4	93.6	100.0	1
Acid precipitation whey	85	1696.5	20.1	34.3	1.4	27913.8	328.4	89.3	3.5
Alginate gel Supernatant	5.1	222.6	43.6	4.5	2.9	5694.6	1095.1	18.2	11.7
Precipitation	5.2	880.4	169.3	17.8	11.4	13034.7	2506.7	41.7	26.7

### 1-3-2-2 粗精製 TI の SDS-PAGE

粗精製 TI サンプルの SDS-PAGE を Fig. 9 に示す.

電気泳動を行った結果, アルギン酸ゲル吸脱着処理を行うことで, 主に, 沈殿物に KTI バンドが見られ, 上澄み液に BBI バンドが見られた.

### 1-3-2-3 粗精製 TI のすり身への添加効果

TI を抽出, 部分精製した素材について, TI 活性を 152 TIU/mg に調製し, すり身の「戻り」加熱によるゼリー強度の違いについて検討を行った. ゼリー強度は HT-SF 添加すり身ゲルが最も高く, 精製度が上がった沈殿物や濃縮上澄み液が低い値であった. 試料とした TI 粗精製物は, すり身に添加することで, すべてゼリー強度を向上させた (Fig. 10).



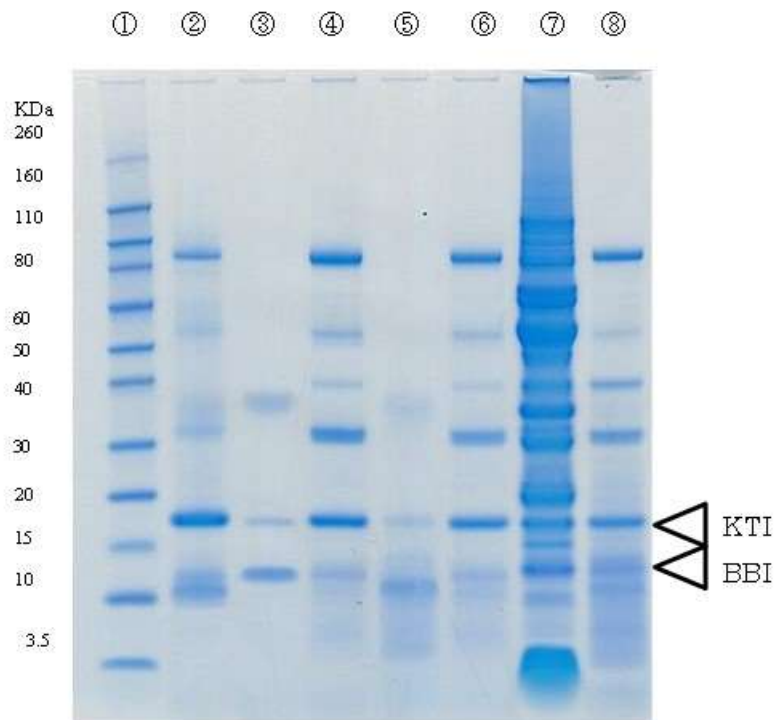


Fig. 9 SDS-PAGE on TI purification from soybean powder.  
 ①: molecular weight marker, ②: KTI, ③: BBI, ④: concentrated precipitate,  
 ⑤: supernatant, ⑥: precipitate, ⑦: soybean flour, ⑧: soybean whey.  
 Triangular shapes indicate KTI and BBI.

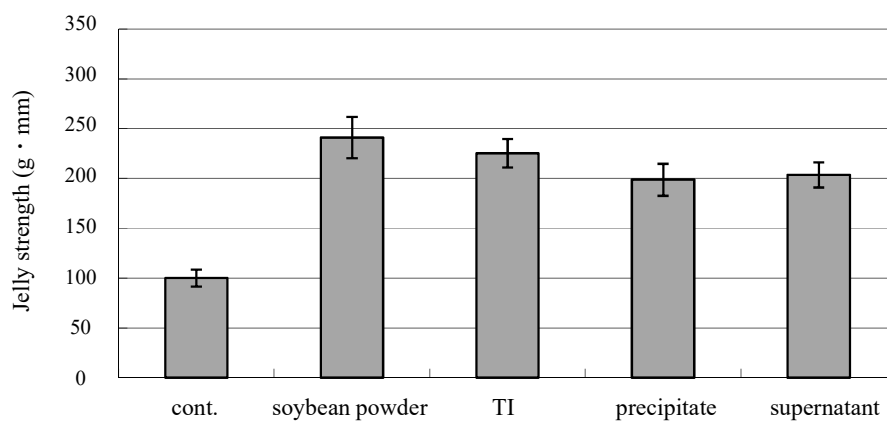


Fig. 10 Jelly strength on surimi by different purified TI.  
 Mean  $\pm$  SE, n=7

### 1-3-3 大豆 TI のボイルエビへの品質劣化抑制効果

#### 1-3-3-1 ボイルエビ重量と体積

レーザー体積測定装置により、ボイルエビの体積と重量を測定した結果を Fig. 11 に示す。殻を剥いたエビ重量が 1 尾あたり 4.5～7.0g の範囲では、エビの体積と重量に関して比例関係にあることが確認できた。以降の実験は 41/60 サイズのバナメイエビを用いて、ボイルエビ重量で加熱歩留まり(%)を算出することとした。

\*41/60: 1 ポンドの氷板中にエビ 41～60 尾入っている意味で、エビのサイズを示す。

#### 1-3-3-2 浸漬エビ、ボイルエビの歩留まり率

HT-SF を添加して浸漬を行ったエビ、浸漬後ボイルを行ったエビの歩留まり率の結果は Fig. 12 に示す。また、ボイルエビの写真を Fig. 13 に示す。

HT-SF を添加して浸漬処理を行ったエビは浸漬処理後、ボイル処理後ともに、エビ歩留まり率は向上した。特にボイル後のエビの歩留まり率は 58.2% (無添加 46%) になり、有意に向上した。

#### 1-3-3-3 大豆成分のボイルエビへの歩留まり率向上効果

無添加のボイルエビの歩留まり率が 46% に対して、ラフィノース添加が 53.1%、大豆ホエー粉末が 59.3%、HT-SF が 58.2% であった。三糖類のラフィノース、TI 製剤にも向上効果が認められた (Fig. 14)。

#### 1-3-3-4 エビの種類による加熱歩留まり率

バナメイエビ、ホワイトエビ、ピンクエビは、ブラックタイガー (学名: *Penaeus monodon*), クルマエビ (学名: *Marsupenaeus japonicus*) と比較して、加熱歩留まり率が高く、有意性が認められた (Fig. 15)。

#### 1-3-3-5 ボイルエビの風味評価

風味評価の結果、無添加のボイルエビは食感が硬く、パサパサ感があり、エビの風味が弱かった。一方、HT-SF 添加のボイルエビの食感は弾力性があり、かつ硬さが残っており、エビの風味が感じられた。風味評価の点数は無添加が風味 2.5、食感 2.1、HT-SF 添加がそれぞれ 4.7、4.1 であった (Table 5)。

### 1-3-3-6 ボイルエビの物性評価

ボイルエビのテクスチャーアナライザーによる物性評価の結果、無添加と比較して HT-SF 添加で破断強度がほぼ同じで、破断歪みが高い数値であった。すなわち、HT-SF を添加して浸漬処理したボイルエビの食感は無添加のボイルエビの硬さを維持しつつ、弾力性が増しており、官能評価と同様な傾向を示した (Fig. 16)。

### 1-3-3-7 エビミオシン重鎖の SDS-PAGE

エビスラリー液を 6°C, 16 時間反応後、SDS-PAGE を行った結果を Fig. 17 に示す。無添加区では反応前と比較して、ミオシン重鎖 (MHC)、軽鎖バンドが消失しているが、HT-SF を添加することでバンドの消失が抑制された。HT-SF が内在プロテアーゼによるエビ筋原線維分解を抑制している可能性が示唆された。

### 1-3-3-8 走査型電子顕微鏡観察

6°C, 16 時間浸漬した後のエビを縦に 0.5mm の厚さで切断した断面の電顕写真 (×500) を Fig. 18 に示す。無添加のエビは筋原線維の輪郭がはっきりせず、溶けたような状態であった。また、HT-SF 添加エビはエビの表面が滑らかであり、筋原繊維にまとまりが見られた。無添加エビは筋原繊維が分解されている可能性が示唆された。

### 1-3-3-9 各 pH のエビ浸漬処理による遊離アミノ酸含量

エビを各 pH に調整した浸漬液で 6°C, 16 時間浸漬後、浸漬液中の遊離アミノ酸含量を測定した結果を Fig. 19 に示す。浸漬液中のエビ主要構成アミノ酸であるタウリン、アルギニン、グリシン、ロイシン含量は、pH3~pH4, pH9~pH10 の 2 つの pH 領域で増加する傾向にあった。すなわち、バナメイエビの内在プロテアーゼは酸性プロテアーゼとアルカリ性プロテアーゼが存在する可能性が示唆された。

### 1-3-3-10 プロテアーゼ阻害剤の添加効果 (浸漬液)

エビ内在プロテアーゼに対する阻害剤の添加効果について検討した結果を Fig. 20 に示す。pH7.0 で、SBTI や HT-SF 添加により、浸漬液中の遊離アミノ酸の生成が有意に抑制された。また、E-64 の添加でも生成が抑制された。

HT-SF, SBTI 添加の結果から、セリンプロテアーゼの存在が示唆された。E-64 はシステイ

ンプロテアーゼ阻害剤であることから筋原線維の分解反応を触媒している酵素はシステインプロテアーゼである可能性も示唆された。

#### 1-3-3-11 エビフライの品質評価 (エビ歩留まり率, 官能評価, 食感音響評価)

エビフライのエビ歩留まり率は、油ちょう後に衣を剥がしたエビの重量を測定した。HT-SF 添加エビの歩留まり率は、無添加より有意に高い数値であった (Fig. 21)。

エビフライの官能評価を行った結果を Table 6 に示す。HT-SF で浸漬したエビを使用したエビフライ中のエビの食感は、無添加エビと同等の硬さがあるとともに、しなやかさを保持して良好であった (風味 4.7, 食感 4.3)。また、HT-SF 添加エビを使用したエビフライの衣はサクサク感があった。しかし、無添加の場合は衣がべちゃべちゃして、エビの食感は硬く、パサパサしていた (風味 4.0, 食感 3.5)。

エビフライ衣の食感音響評価の結果を Fig. 22, Fig. 23 示した。HT-SF を添加したエビフライは、Two-times frozen 法では、700～1,500Hz, 2,500～4,500Hz の音圧 (dB) が高くなり、サクサク感が増す傾向であった。これに対して、one-time frozen 法のエビフライ衣は、700～1,500Hz で若干音圧が高くなる傾向があったが、2,500～4,500Hz では無添加の方が大きい数値になり、HT-SF 添加の有無による有意差が見られなかった。

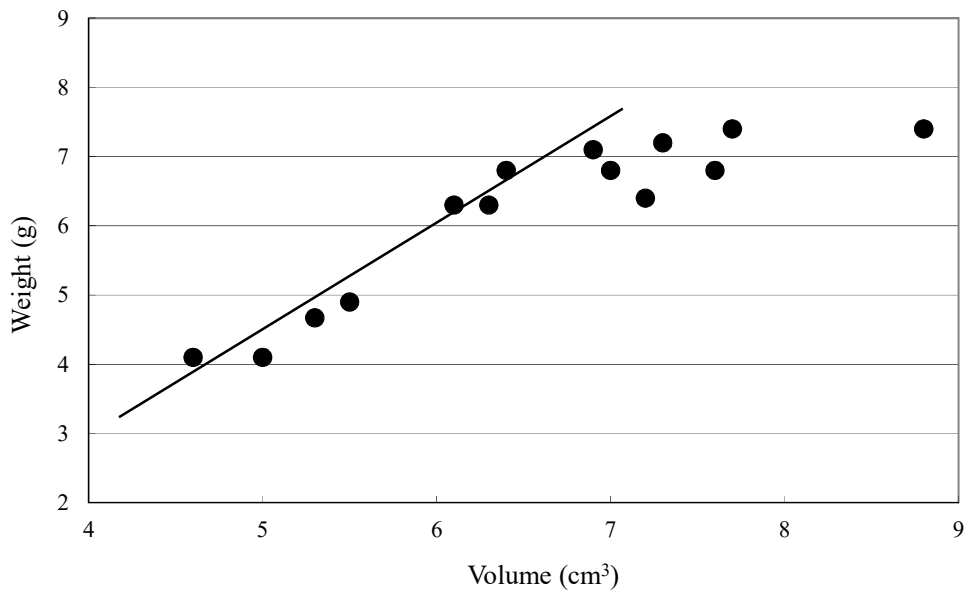


Fig. 11 Weight and volume of boiled shrimp

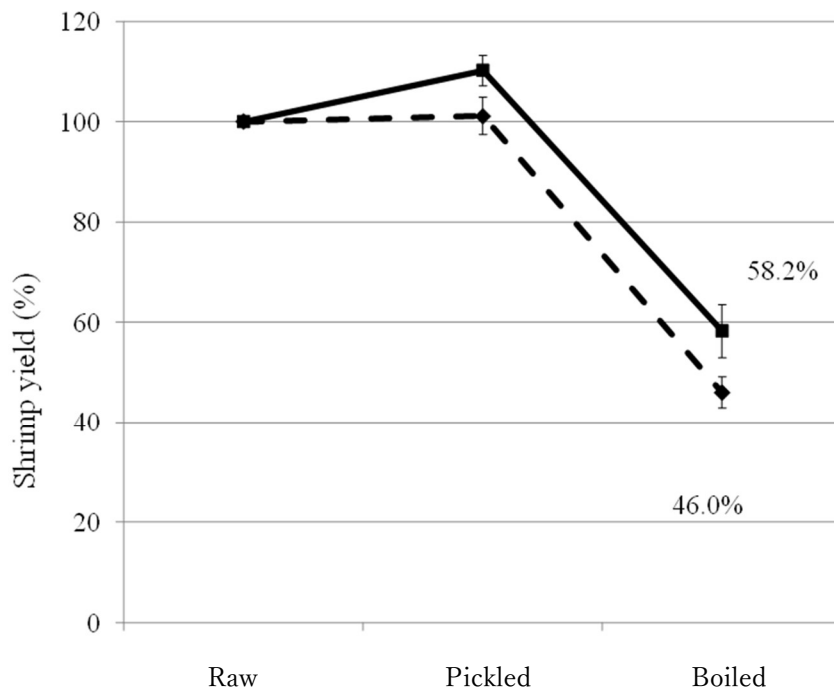


Fig. 12 Yield of boiled shrimp weight (%)  
 Dotted line: control, Straight line: with soybean powder  
 Mean  $\pm$  SE, n=7

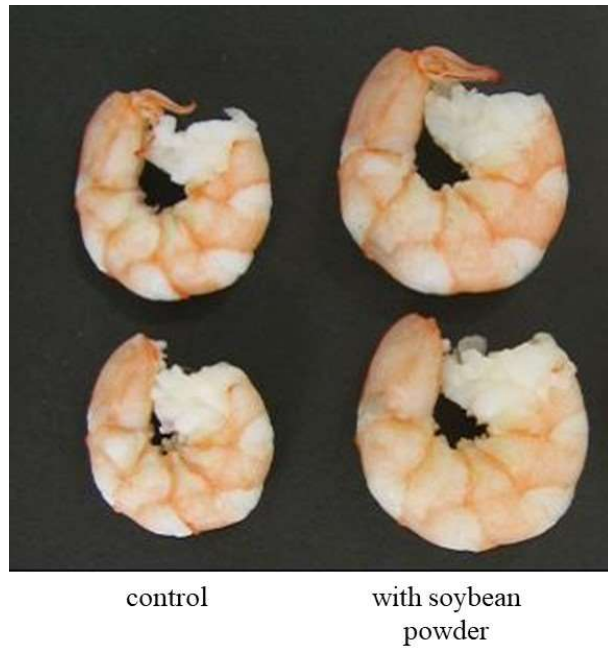


Fig. 13 Boiled shrimps

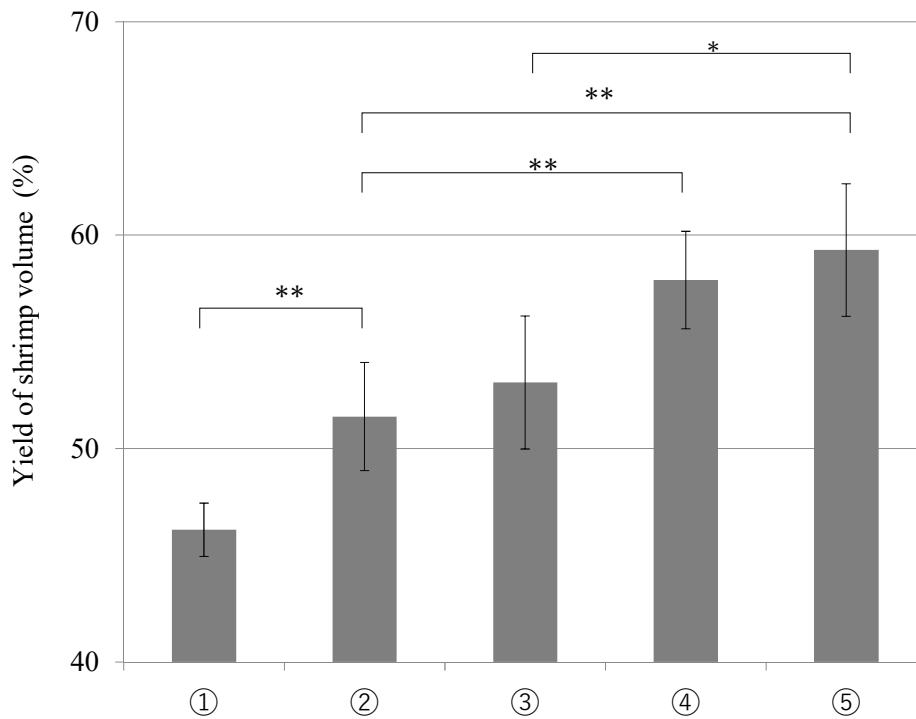


Fig. 14 Yield of boiled *L. vannamei* after soaking process  
 ①: control, ②: raffinose, ③: trypsin inhibitor, ④: soybean powder, ⑤: soybean whey  
 Mean  $\pm$  SE, n=5    \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

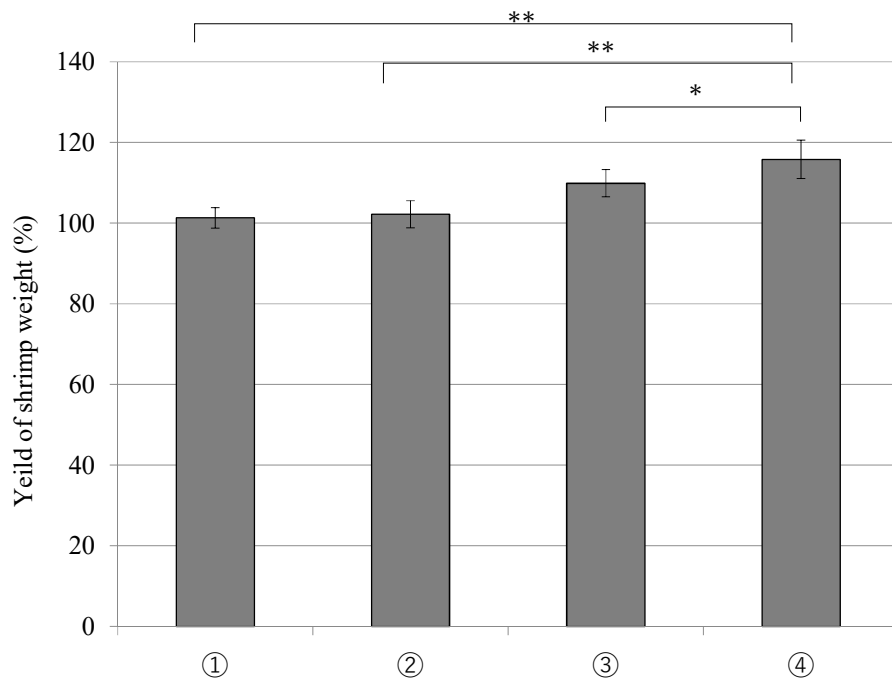


Fig. 15 Yield of boiled shrimps after soaking process

①: *Penaeus mondon*, ②: *Marsupenaeus japonicus*, ③: *Pleorics uellerir*, ④: *Litopenases*,  
 Mean  $\pm$  SE, n=5    \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

Table 5 Flavor evaluation of boiled *L. vannamei* immersed in soybean powder added with dipping solution

	風味		食感	
	官能評価	5段階評価	官能評価	5段階評価
無添加	エビの風味がない 水っぽい	2.5	硬い パサパサしている	2.1
大豆粉添加	エビの風味が強い ジューシー	4.7	硬く、弾力性がある	4.1

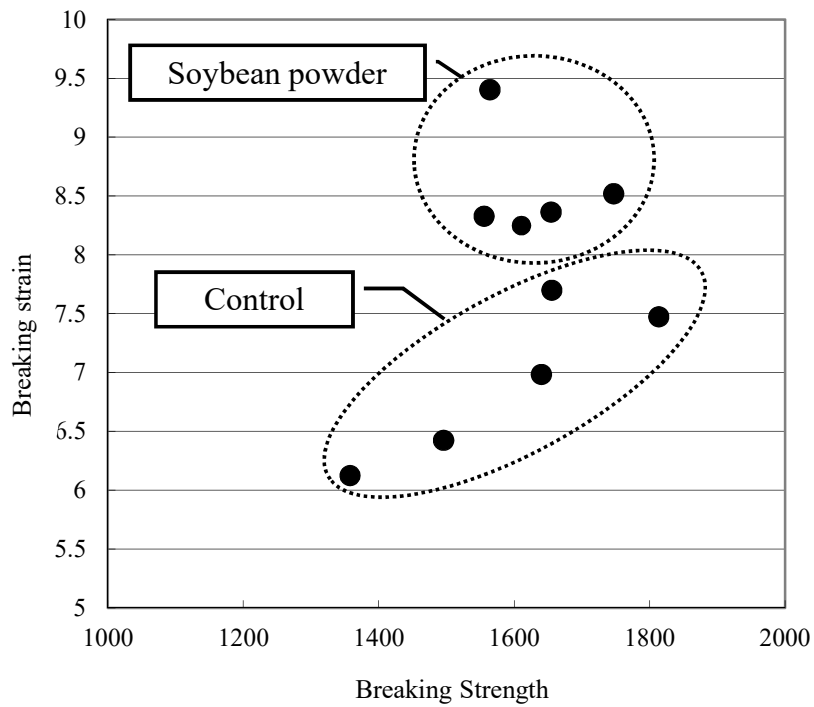


Fig. 16 Effect of soybean powder on texture of *L. vannamei*

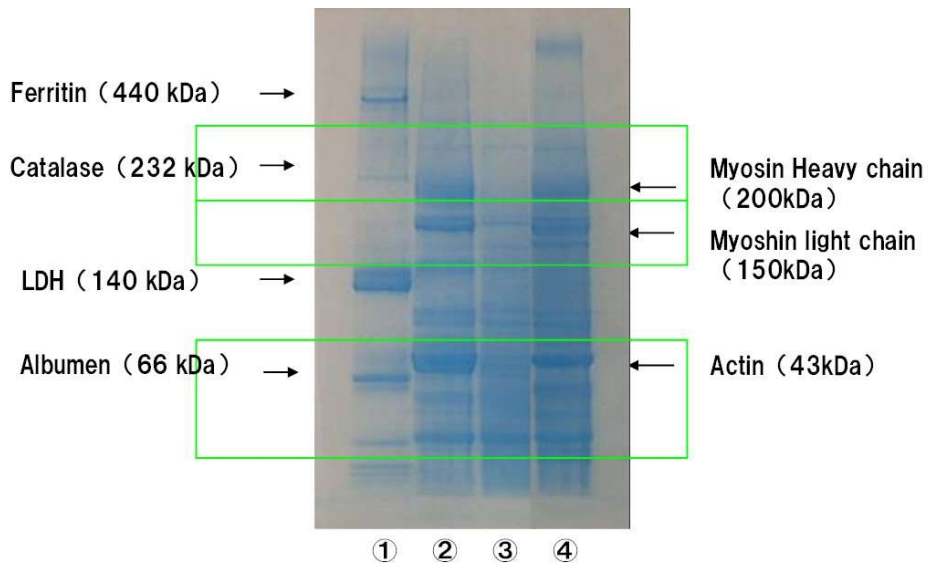


Fig. 17 SDS-PAGE of *L. vannamei* slurry  
 ①: molecular weight marker, ②: control, ③: no addition, ④: soybean powder (HT-SF)



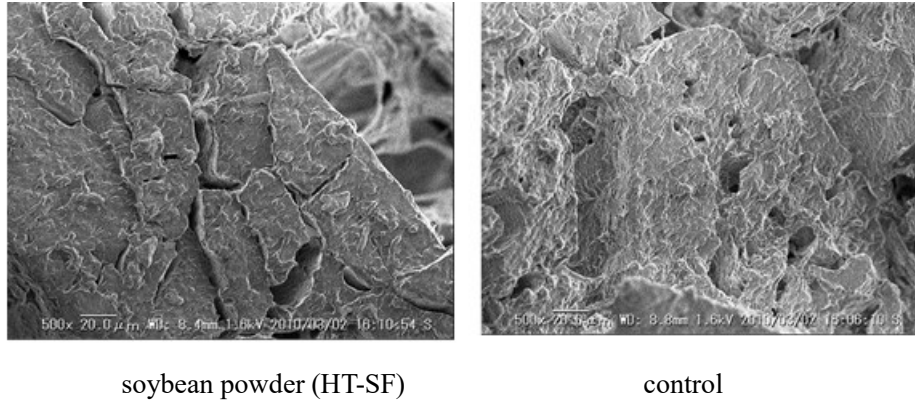


Fig. 18 SEM micrographs of *L. vannamei* muscle fiber standing for 6h at 6°C (×500)  
 Left photo: with soybean powder (HT-SF), Right photo: control

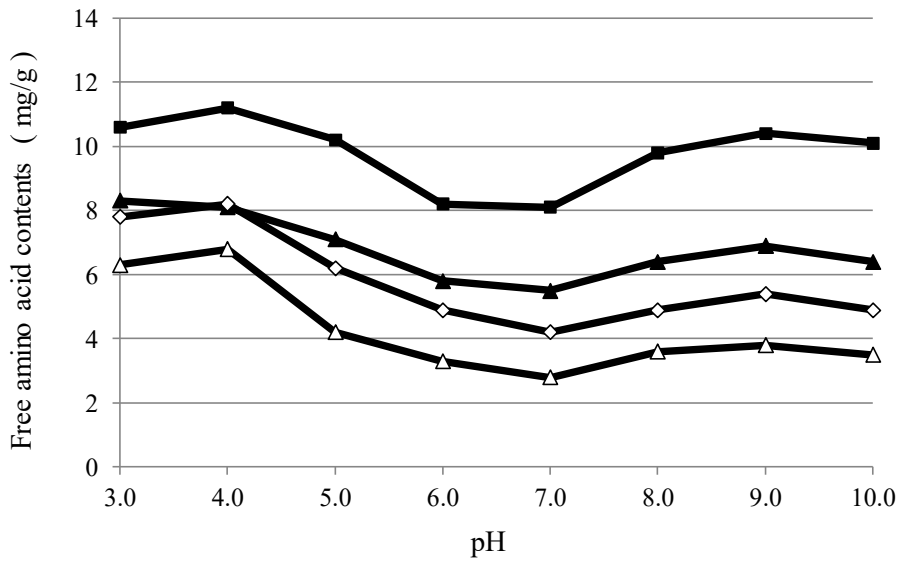


Fig. 19 Free amino acids contents in pickling liquid after soaking shrimp for 16h at 6°C  
 ■: arginine, ▲: glycine, ◇: taurine, △: leucine

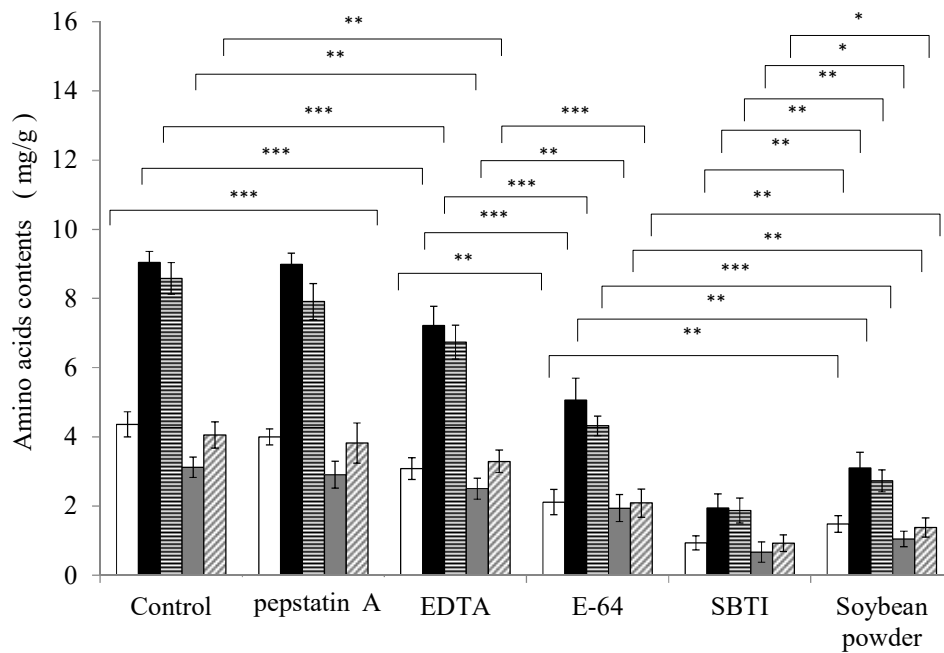


Fig. 20 Amino acid contents solubilized from *L. vannamei* after dipping for 16h at 6°C in the solution containing pepstatin A, EDTA, hemihydrate (E-64) , soybean trypsin inhibitor (SBTI), and soybean powder (HT-SF).

White bar: taurine, Black bar: arginine, Horizontal striped bar: glycine, Vertical striped bar: leucine, Left hatched bar: lysine.

Mean  $\pm$  SE, n=5 \*\*\* $P$  < 0.001, \*\* $P$  < 0.01, \* $P$  < 0.05

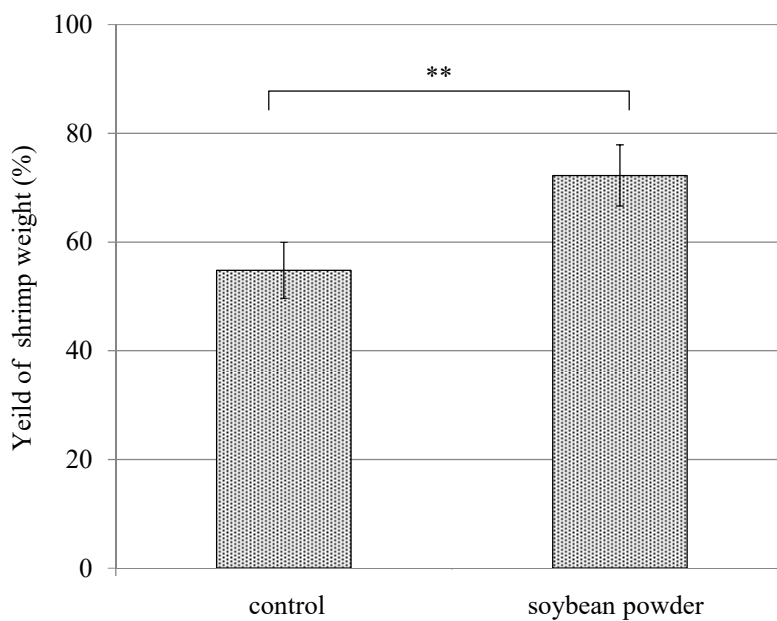


Fig. 21 Yield of *L. vannamei* weight (%)

Mean  $\pm$  SE, n=20 \*\* $P$  < 0.01

Table 6 Flavor evaluation of deep-fried *L. vannamei*, immersed in dipping solution with soybean powder (n=10)

One-time frozen	風味	点数	食感	点数
無添加	エビの風味がややある うま味が感じられない	4	エビが硬い, パサパサしている 衣にサクサク感が残っている	3.5
大豆粉添加	エビの風味が強い 魚介類の風味あり美味しい	4.7	弾力性があり, ジューシー 衣にサクサク感がある	4.3
Two-times frozen	風味	点数	食感	点数
無添加	風味が無い	3.5	エビが硬い 衣がぐちゃぐちゃ, 食感がない	2.8
大豆粉添加	エビの風味がある	4.3	エビに弾力性が残っている 衣にサクサク感が残っている	4

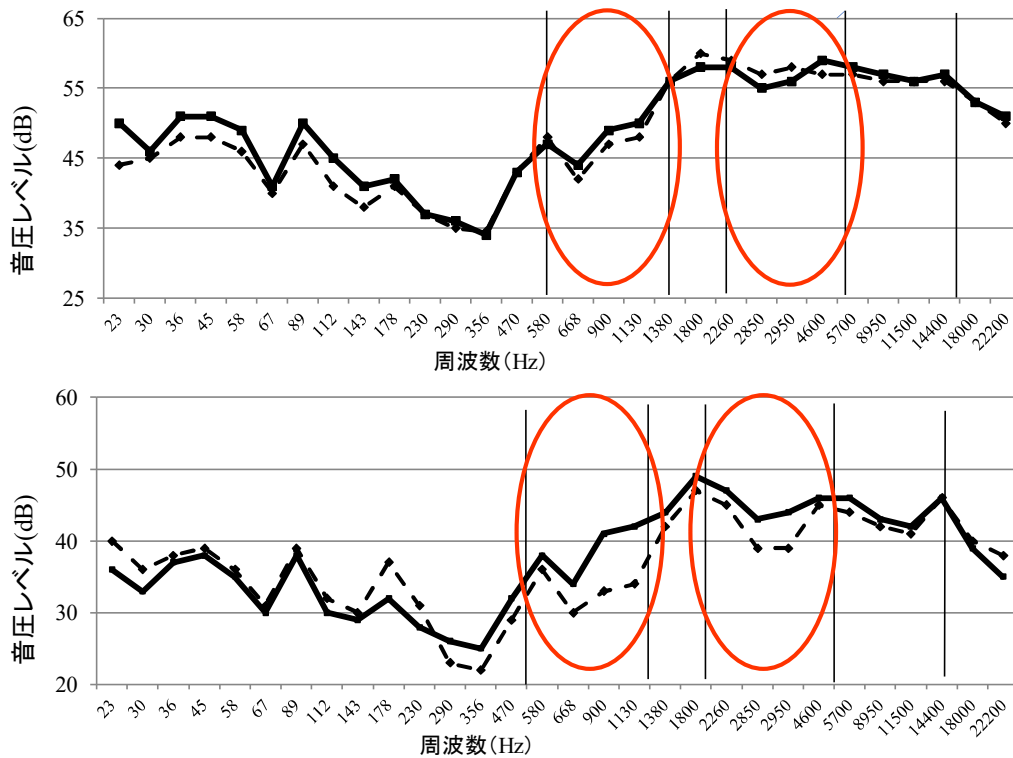


Fig. 22 Effect of soyben powder on sound pressure of deep-fried shrimp. Upper figure: one-time deep-fry, Lower figure: two-times frozen deep-fry. Dotted line: control, Straight line: with soybean powder (HT-SF)

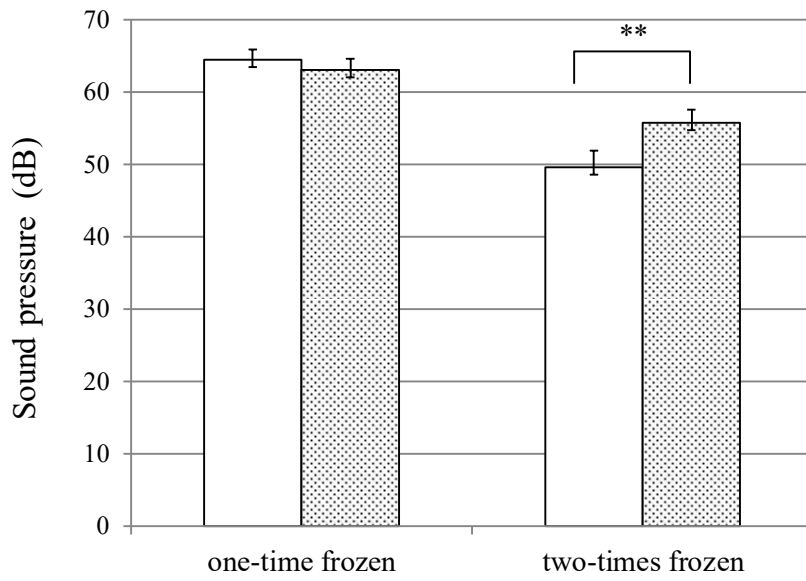


Fig. 23 Sound pressure of deep-fried shrimps with (hatched bar) or without (white bar) 2.5% soybean powder (HT-SF).  
Mean  $\pm$  SE, n=10 \*\* $P < 0.01$

## 1-4 考察

### 1-4-1 大豆ホエーの冷凍すり身ゲル品質劣化抑制メカニズムについて

すり身ゲルの物性低下のメカニズム検証のため、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°Cの各温度で加温したすり身ゲルの SDS-PAGE を行った。スケソウ KA (学名: *Theragra chalcogramma*) は、各温度でタンパク質バンドに変化が見られなかった (Fig. 24-A)。イトヨリ KA (学名: *Nemiperus virgatus*) は、40°C~60°Cでタンパク質バンドに変化が見られ、200kDa 付近のミオシン重鎖 (以下 MHC と略す) のバンドが消失し、低分子領域に新たなバンドが検出された。スケソウ KA では消失が見られなかったことより、魚種により内在プロテアーゼ活性が異なっている可能性が示唆された (Fig. 24-B)。

また、セリンプロテアーゼ阻害剤である TI を含有する大豆ホエーをすり身に添加し、MHC の分解の有無を SDS-PAGE で検討した。イトヨリ KA に大豆ホエー (4% w/w, TI 活性  $2.3 \times 10^3$  U/g) を添加し、50°C加熱した加温ゲルは、KTI と同様に MHC の分解が抑制されていた (Fig. 25)。すなわち、イトヨリ KA の MHC 分解は、主にトリプシン様セリンプロテアーゼの作用であることが示唆された。

さらに、各種プロテアーゼ阻害剤を添加し、40°C「戻り」加熱処理を行ったすり身ゲルを作成した。スケソウ KA で MHC の分解は起こらなかったが、イトヨリ KA は 200kDa 付近の MHC が分解された。PMSF, EDTA 添加で MHC の分解は抑制されたが、NEMI, pepstatin A, o-phenanthroline では抑制されなかった。PMSF はセリンプロテアーゼ阻害剤、また EDTA は金属プロテアーゼ阻害剤であることから、イトヨリ KA の内在型プロテアーゼはセリンプロテアーゼと金属プロテアーゼである可能性が示唆された (Fig. 26)。

すり身の内在プロテアーゼのザイモグラフィーを行った結果、イトヨリ KA は、60kDa, 70kDa, 80kDa 付近に 3 本の活性バンドが検出された (Fig. 27)。また、イトヨリダイ (鮮魚) から抽出した内在プロテアーゼにおいても同様な位置に活性バンドが検出された。KTI 添加で 70kDa 付近の活性バンドが消失し、EDTA 添加で 60kDa, 70kDa 付近の活性バンドが消失した。このことより、イトヨリすり身中にセリンプロテアーゼ 1 種類、金属プロテアーゼが 2 種類存在している可能性が示唆された (Fig.27)。

TI を含有する大豆ホエーの添加で、70kDa のプロテアーゼ活性が阻害され、MHC の分解は抑制されたことより、イトヨリすり身の主なプロテアーゼ活性がセリンプロテアーゼである可能性が示唆された。

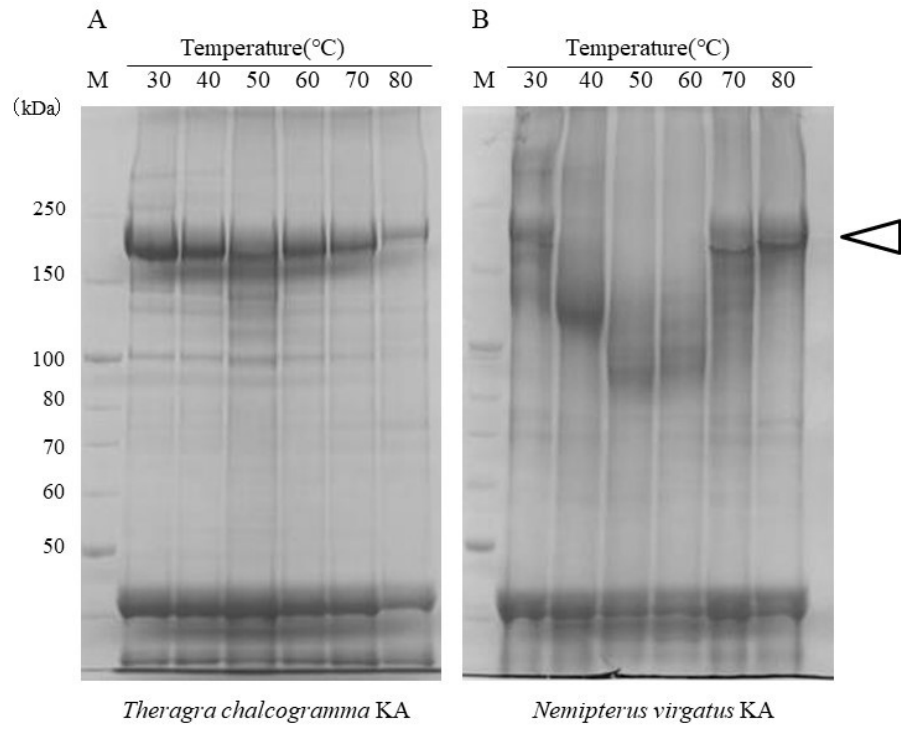


Fig. 24 Effect of heating on actomyosin of surimi.  
M: molecular marker.  
Symbol of triangle indicates myosin heavy chain (MHC).

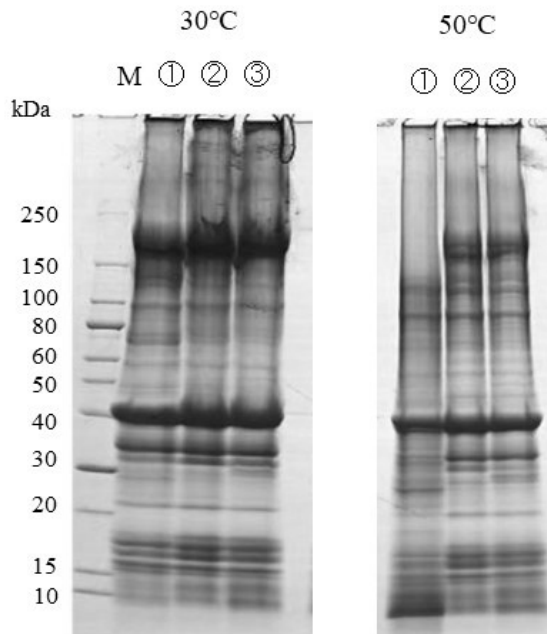


Fig. 25 Effect of soybean whey on surimi MHC degradation  
①: non-additive, ②: KTI, ③: soybean whey.  
TI activity of soybean whey was equal to that of 1mM KTI.

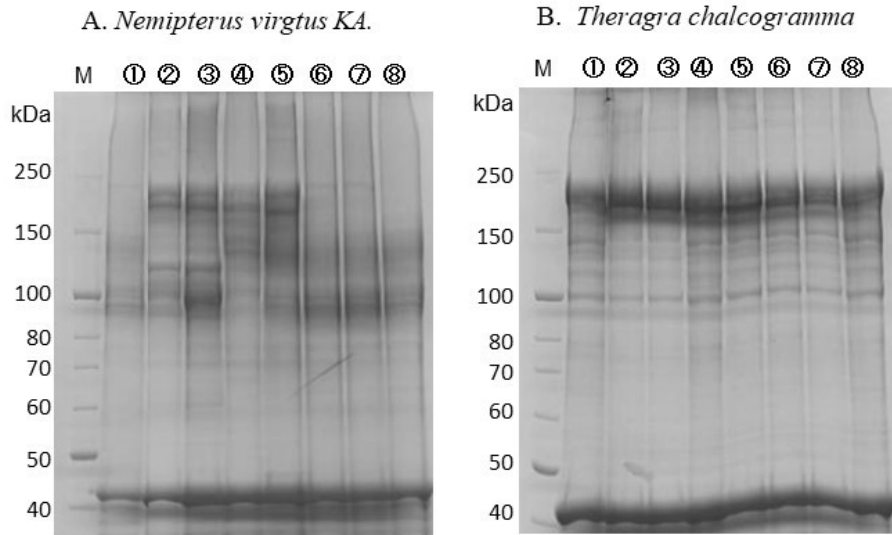


Fig. 26 Effect of various inhibitor on surimi MHC degradation.  
 ①: non-additive, ②: KTI, ③: BBI, ④: PMSF, ⑤: EDTA, ⑥: pepstatin A,  
 ⑦: o-phenanthroline, ⑧: NEMI

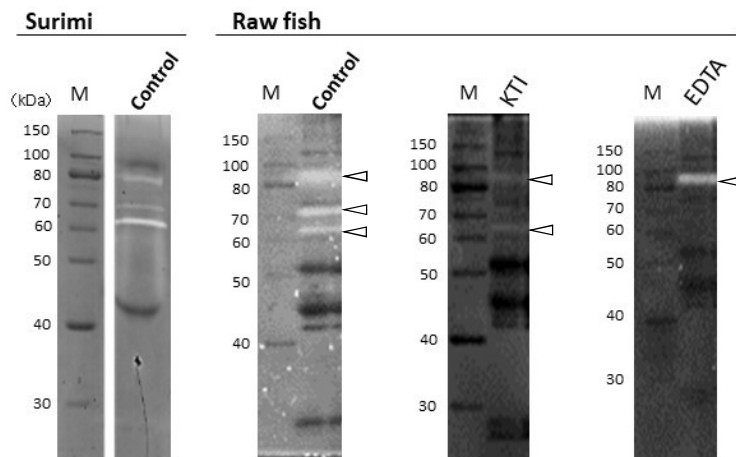


Fig. 27 Effect of inhibitors on protease activity from surimi and raw fish meat of golden threadfin bream.  
 M: molecular marker. Control contained no inhibitor.  
 Triangular shapes indicate an activation band of protease.

#### 1-4-2 大豆 TI のエビ加工食品への品質劣化抑制メカニズムについて

大豆粉 (HT-SF), 大豆ホエーはボイルエビの歩留まり向上効果, 食感改良効果を示した。HT-SF, 大豆ホエーは, エビ内在プロテアーゼによるエビ筋原繊維の分解を阻害していることが示唆された。

各 pH に調整したエビスラリーを用いて, 各 pH での阻害活性%を測定した結果を Table 7 に示す。中性からアルカリ性で, 1mM SBTI の阻害活性が 76.3% (pH7.0) および 72.8% (pH9.0) と最も高い数値を示した。同 pH 条件において, 1mM E-64 はそれぞれ 48.6%および 44.1%であった。酸性域は 1mM pepstatin A が 52.1% (pH3.0)であったが, 中性～アルカリ性では阻害活性は低かった。これらの結果より, バナマイエビ内在プロテアーゼはセリンプロテアーゼ, システインプロテアーゼ, アスパラギン酸プロテアーゼが内在している可能性が示唆された。

エビ内在プロテアーゼについてはいくつかの報告がある。オニテナガエビ筋肉中にはシステインプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼが存在し (Sriket et al. 2011a; Sriket et al. 2011b), アメリカザリガニはシステインプロテアーゼ (Chen et al. 2008), *Katsuwonus pelamis* はセリンプロテアーゼ (Klomklao et al. 2007), バナマイエビはセリンプロテアーゼのキモトリプシン (Whitaker et al. 1997) が存在するという報告がある。これらの報告より, エビの種類により, 内在プロテアーゼの種類が異なると考えられる。

Sriket ら, Klomklao ら, Larsen ら, Hughes ら, Cameli らは, 各種エビ内在プロテアーゼの最適 pH を検討している。活性中心のアミノ酸残基で分類した 4 種類のプロテアーゼの内, セリンプロテアーゼであるトリプシンの最適 pH はアルカリ性 pH7～pH11, システインプロテアーゼである Calpain は弱酸性から中性の pH5～pH7.5, アスパラギン酸プロテアーゼであるペプシンは酸性の pH2～pH4, 金属プロテアーゼは中性の pH6～pH8 としている (Sriket et al. 2014; Klomklao et al. 2008; Larsen et al. 2004; Hughes et al. 2003; Cameli et al. 2004)。

Eakpetch らは, バナマイエビ内在プロテアーゼは酸性プロテアーゼが主で, アルカリ性プロテアーゼ活性は低いとしている (Eakpetch et al. 2008)。また, 内在プロテアーゼは酸性域のアスパラギン酸プロテアーゼと中性からアルカリ性のセリンプロテアーゼの 2 種類が存在し, pH7.0 においては SBTI が最も阻害効果が大きいとしている。

本研究では, バナマイエビ内在プロテアーゼとして, 主に pH8～10 付近に最適 pH があるアルカリ性セリンプロテアーゼが存在している可能性が示唆された。それ以外に酸性プロテアーゼとして pH3 が最適 pH のシステインプロテアーゼ, pH3～5 付近に最適 pH があるアスパラギン酸プロテアーゼが内在する可能性も示唆された。



HT-SF 中のプロテアーゼ阻害物質は TI が主であると考えられるが、大豆等の植物は発芽時に多種のプロテアーゼを生成し、生体内で制御されている。小寺は、大豆発芽時に  $\beta$ -コングリシニンの限定分解が播種 5~7 日目に特異的に起こることを確認しており、限られた期間中に存在するカテプシン様システインプロテアーゼの存在を明らかにした (小寺 2006)。このように大豆発芽等の生育時期により種々のプロテアーゼが特異的、限られた時期に存在している可能性があり、これらプロテアーゼ活性を制御する新たなプロテアーゼインヒビターの存在の可能性も考えられた。

エビ加工食品であるエビフライへの HT-SF の品質劣化抑制効果を検討した結果、HT-SF 添加エビフライの物性は硬さとしなやかさを保持し、衣にはサクサクした食感があった。特に、two-times frozen 法で作成したエビフライは風味が 4.3 (無添加 3.5)、食感 4.0 (無添加 2.8) で、無添加と比較して有意な品質劣化抑制効果が認められた。エビフライ衣について食感音響評価システムの破碎音による測定を行った結果、700~1,200Hz と 2,500~4,500Hz で、HT-SF 添加エビフライ衣の音圧 (dB) に有意な差があり、官能評価と同様な結果が得られた。無添加のエビフライは衣にサクサク感がなく、ベチャッとしていた。これはエビフライの油ちょう工程中のエビ加熱歩留まり低下により、エビからの水分溶出量 (ドリップ量) が増加し、衣へ移行する水分量が増えることにより起こると考えられる。HT-SF 添加エビフライは、エビの加熱歩留まり低下が抑制されることでドリップ溶出量が抑えられ、衣のサクサク感が維持された可能性が示唆された。

Table 7 Effect of various protease inhibitors on autolysis of White shrimp (*L. vannamei*) homogenate\*<sup>1)</sup>

inhibitors	concentrations	Inhibition (%)		
		pH3	pH7	pH9
SBTI	1mM	7.4±0.8	76.3±3.7	73.8±1.2
E-64	1mM	5.1±1.1	48.6±1.2	44.1±1.1
Pepstatin A	1mM	52.1±2.2	4.9±1.9	3.5±2.1
EDTA	1mM	6.6±1.4	18.9±1.5	22.1±0.9

Crude extract (200 $\mu$ l) was mixed with 200 $\mu$ l single protease inhibitor.  
To obtain the designated final concentration at pH7.0 at 60°C for 3h.

\*<sup>1)</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation (n=5)

#### 4-1-3 生全脂大豆粉 TI, $\beta$ -アミラーゼの精製と冷凍すり身への品質劣化抑制効果

TI 部分精製サンプルの SDS-PAGE を行った。アルギン酸ゲル包括上澄み濃縮液は、主なタンパク質バンドが BBI の 1 本であり、精製度が向上した。また、アルギン酸ゲル包括沈殿物は BBI 等の一部の低分子タンパク質バンドが消失する傾向があるが、精製度は低かった (Fig. 9)。さらに TI の吸脱着条件を検討することで、有効な TI 精製法になる可能性が示唆された。

粗精製サンプルを用いて、精製度の違いによるすり身ゲル物性への添加効果を検討した結果、アルギン酸ゲル未吸着液添加すり身ゲルのゼリー強度は低く、HT-SF 添加のゼリー強度が比較的高いことから、HT-SF のすり身ゲルへの品質劣化抑制効果は TI 単独の効果ではなく、ラフィノースなどの三糖類や他の成分も関与している可能性が示唆された (Fig. 10)。

$\beta$ -アミラーゼ精製方法を検討した結果、酸沈殿処理では比活性が向上しないが、アルギン酸ゲルを用いた精製工程では、ゲル中に 64.9%の活性が吸着され、比活性も 17.8 倍に増加した。アルギン酸ゲルは、基質-酵素の親和力を用いたアフィニティークロマトグラフィーの作用でアミラーゼを吸着した可能性がある。荒木らは糖質関連酵素の多糖質ゲルへの吸着量を検討し、 $\alpha$ -アミラーゼはでん粉ゲルに約 88%、アルギン酸ゲルに約 90%が吸着したとしている (荒木ら 2010)。本研究では、 $\beta$ -アミラーゼのゲルへの吸着量が 64.9%と低い値であったが、ゲルへ吸着する傾向は見られた。

#### 1-5 まとめ

脱脂大豆粉の酸沈殿上澄み液である大豆ホエーは、イトヨリすり身の加熱工程時の「戻り」現象を抑制する効果を示した。大豆ホエー粉末の SDS-PAGE やザイモグラフィー法によるプロテアーゼ活性染色の結果、イトヨリすり身の内在プロテアーゼはセリンプロテアーゼ 1 種と金属プロテアーゼ 2 種類である可能性が示唆された。

大豆ホエーは TI を含有しており、主に TI がセリンプロテアーゼ活性を阻害することにより「戻り」現象抑制効果を示していると考えられる。

HT-SF を 2.5%添加して浸漬した冷凍バナメイエビは、加熱歩留まり向上効果や食感改良効果が認められた。各種プロテアーゼ阻害剤の抑制効果を検討した結果、大豆 TI がセリンプロテアーゼ活性を阻害することで品質劣化抑制効果を示した可能性が示唆された。また、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼが内在している可能性も示唆された。

HT-SF はエビ加工食品であるエビフライに対しても同様な効果を示し、さらにエビフライ衣のサクサク感が維持されていた。食感音響評価システムでの測定の結果、HT-SF 添加のエビフライ衣は 700~1,200Hz と 2,500~4,500Hz で音圧 (dB) に有意な差があり、サクサク感の官能評価の差が数値で確認できた。この音圧差は、HT-SF がエビの加熱歩留まり低下を抑制し、エビ中の水分溶出量 (ドリップ量) が抑制されたためと推測している。

大豆 TI,  $\beta$ -アミラーゼの精製方法を検討した結果、アルギン酸ゲル包括処理により大豆  $\beta$ -アミラーゼは約 17 倍に精製度が向上し、活性歩留まり 65%と良好であった。大豆 TI はアルギン酸ゲル処理工程後、11.4 倍に向上したが、活性歩留まりが 18%に低下した。TI の等電点に近い pH4 に pH を調整して行ったが、TI 表面の疎水度が上がらず、アルギン酸ゲルに吸着しなかった可能性が考えられる。

大豆 TI の冷凍すり身や冷凍エビへの冷凍障害抑制メカニズムについて検証を行った。

イトヨリ KA すり身やバナメイエビ中にセリンプロテアーゼが内在し、筋原線維の分解による物性低下は、主にセリンプロテアーゼ阻害物質である TI を含有する大豆ホエー、HT-SF を添加することで抑制され、水産加工食品の品質劣化抑制効果を示したと考えられる。

最終的に、これらの結果をもとに大豆粉 (HF-SF) を主成分とした水産物の品質改良剤 3 種類 (水練り製品用品質改良剤プラスメート BL-S, エビ用品質改良剤プラスメート SF20, 水産珍味類品質改良剤プラスメート SF30) を上市した。

## 第2章 大豆粉成分の冷凍製パン食品加工への品質劣化抑制効果

### 2-1 背景

リポキシゲナーゼの加工食品への添加効果についてはいくつかの報告がある。製パン性については、小麦リポキシゲナーゼ添加でパンの容積が増加し、リポキシゲナーゼのアイソザイム L-1, L-2, L-3 のうちの L-3 のみがパン容積を 108% に増加した報告がある (Shiiba et al. 1990)。風味への影響に関して、的場らは大豆リポキシゲナーゼ L-2 が最も強く青臭みの発生に関与していると報告している (Matoba et al. 1985)。また、喜多村らはリポキシゲナーゼ L-2, L-3 欠損大豆で作成した豆腐は青臭みの発生がほとんどないと報告している (Kitamura et al. 1992)。また、小麦由来のリポキシゲナーゼ L-1, L-2, L-3 と大豆由来の L-1, L-2, L-3 は構造と酵素化学的性質が異なっており、大豆リポキシゲナーゼの酵素活性が数倍高いと言われている。

以前より、生全脂大豆粉が漂白剤として餃子の皮に少量添加されている。大豆リポキシゲナーゼによる油脂の酸化反応により生成するフリーラジカルが小麦中のカロチン色素を酸化分解し、餃子の皮の漂白作用を示すとされている。小麦粉に対して 0.05% 添加で効果があり、少量添加で使用されている。

しかし、餃子の皮への利用だけでは大豆粉の使用量は少なく、それ以外に大豆リポキシゲナーゼによる油脂酸化反応の食品加工への利用開発は進んでない。

製パンに用いられるパン酵母を冷凍生地パンへ利用した場合、冷凍処理での菌体組織の破壊による菌の死滅や冷凍障害による発酵能の低下および還元型グルタチオンの菌体外への漏出が起こる。還元型グルタチオンがパン生地中に漏出するとグルテンの酸化反応により形成された網目構造を還元して、生地の軟弱化を引き起こす (河合弘康ら 1993)。また、パン生地中の組織内で氷結晶が成長することでグルテン膜が損傷する。現在では冷凍耐性酵母が開発され、また冷凍パン改良剤の開発も進み (Varriano et al. 1980 ; Vania et al. 2007 ; 伊賀大八ら 2014)、冷凍パン製法が普及しつつある。しかし、冷凍パンの製造方法は一次発酵後のパン生地を冷凍保存し、解凍後二次発酵して焼成する方法が確立されているのみで、二次発酵終了後の生地を冷凍保存し、焼成する冷凍パン製造法は、糖や油脂の少ない (リーンな) 配合パンでは未だ確立されていない。現状の冷凍パン製造法は、糖や油脂などの成分を多く含む (リッチな) ペストリーパンに限られている。今後、二次発酵後の冷凍パン製造法が、食パンやフランスパンに代表される (リーンな) パン生地に適用できれば、ニーズが高まっている焼き立てパンの普及につながる可能性がある。

生全脂大豆粉が、リポキシゲナーゼ、 $\beta$ -アミラーゼなどの酵素を含有していることはすで

に報告されている (Kitamura et al. 1985 ; Totsuka et al. 1998) . このリポキシゲナーゼは油脂二重結合を酸化して過酸化物を生成する酸化剤の機能を有する (Shimada et al. 1998) . リポキシゲナーゼ酸化反応の機能については Fig. 28 に示す . 大豆粉中のリポキシゲナーゼによる大豆中のリノール酸酸化反応で生成するフリーラジカルにより , グルタチオンなどの還元物質を酸化することで冷凍パンの物性改良に繋がると考えられている .

大豆粉の製パン性に関して , これまでに冷凍障害を抑制する効果を有するという報告がある (Kitagawa et al. 2008 ; 大羽和子ら 1996) . しかし , あくまでも一次発酵後に冷凍する冷凍パン製造法についてであり , 二次発酵後の冷凍障害抑制に関する報告はない . また , グリシンベタイン (以降 GB と略す) はグリシン分子中の窒素に 3 つのメチル基が結合した有機化合物で , 両親媒性であり , 両イオン性の特徴を有している . 特に甜菜に多く含まれており , 化粧品原料の保湿剤として多く利用されている . この GB に , 線虫の冷凍保存時の冷凍障害を抑制する効果があることはすでに報告されている (林正和ら 2015) . しかし , 冷凍パンへの添加効果や大豆粉との併用効果の報告はない .

国内製パン市場では , 一昨年まで臭素酸カリウムをパンの酸化剤 , 防腐剤として利用していたが , ラット腎臓における発がん性も指摘され , 現在は使用が中止されている . 市場では臭素酸カリウムのような安価で強力な酸化剤に代わる , 安全性が高く , 酸化力が高い食品素材が求められている .

本論文は , 生全脂大豆粉と GB のパン生地への冷凍障害抑制効果について , その機能を検証するとともに , その機構について研究を行っている .

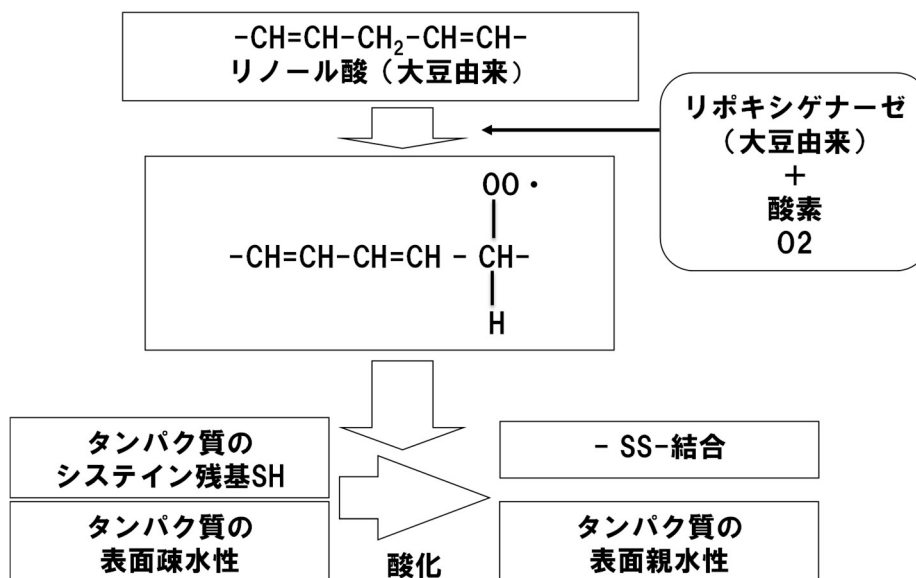


Fig. 28 Oxidative reaction scheme by soybean lipoxygenase .

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験材料

小麦粉：カメリア (日清製粉社製, 水分量 13.8%)

脱脂粉乳：スキムミルク (明治社製)

砂糖：白砂糖 (日新製糖社製)

食塩：食塩 (塩事業センター製)

バター：雪印北海道バター (雪印メグミルク社製)

ドライイースト：スーパーカメリア (日清製粉社製)

生全脂大豆粉：モチフレッシュ (以降 RSF と略す) (日清オイリオグループ社製)

生全脂大豆粉：NSA (対照として) (日清オイリオグループ社製)

グリシンベタイン：ニッテンベタイン (日本甜菜糖社製)

### 2-2-2 冷凍パンの調製法

冷凍パン生地組成は Table 8 に示す。

Table 8 Recipe for bread-making test

	Bakers%	Weight(g)
Wheat flour “camellia”	100	3,000
White sugar	6	180
Salt	2	60
Non-fat dry milk	2	60
Margarine	6	180
Fresh yeast (Oriental Yeast Co. Ltd.)	2	60
Raw soybean powder (The Nisshin OilliO Group, Ltd.)	1	30
Water	68	2,040

生地は直捏法 (ストレート法) で調製した。生全脂大豆粉, GB は小麦粉に対してそれぞれ 1 (%w/w), 0.5 (%w/w) 添加した。

まず、油脂以外の材料をミキサー (Micro-Mixer, National MFG 社製) で 4 分間捏ねた。添加する水は 20°C に設定し、発酵最終温度が 29°C になるようにコントロールした。油脂を添加した後、さらに 1 分間捏ね、油脂を塗ったボールに生地を丸めて、オーブンで 30°C, 90 分間一次発酵を行った。

一次発酵終了後、生地のガス抜きを行い、軽く丸めて、30°C, 10 分間ベンチ発酵を行った。ベンチ発酵終了後、生地をまとめ直して容器に入れ、35°C, 40 分間二次発酵を行った。二次発酵終了後、急速冷凍 (-60°C) を行い、冷凍保存 (-20°C) を 1 週間行い、常温解凍後、オーブンで 200°C, 20 分間焼成を行った。

製パン方法 (工程)

ミキシング (混合機はパンミキサーを使用)

↓ L4M4H2 ↓ L1M3H2 (TD27)

一次発酵

↓ 80 分間 (フロアタイム: 恒温槽 27°C, 75%湿度)

分割・成形

↓ 205g×18 個, 340g×5 個に分割し, 成形した.

ベンチ発酵

↓ 30 分間 (恒温槽 27°C, 75%湿度)

成形

↓ モルダ―使用

二次発酵

↓ ホイロ (恒温槽 38°C, 85%湿度), プルマン: 40 分間, ワンローフ: 30 分間

冷凍

↓

焼成

↓ 焼成機: 上段 200°C, 下段: 220°C, プルマン 35 分間, ワンローフ: 60 分間

冷却 (常温)

↓ プルマン 90 分間, ワンローフ 60 分間

袋詰め

### 2-2-3 小麦粉生地 of 走査型電子顕微鏡観察

3D リアルサーフェスビュー顕微鏡 VE-8800 (キーエンス社製) を用いて観察を行った。生地サンプルはシャーレ上に伸ばし、 $-60^{\circ}\text{C}$  で急速冷凍を行った後、1 週間、冷凍保存 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) を行った。その後、凍結乾燥機 (棚式凍結乾燥機 FD-551 型: 東京理化器機社製) の棚に入れ、凍結乾燥 (棚温度  $30^{\circ}\text{C}$ , 18 時間) を行った。凍結乾燥したサンプルは手術用メスで厚さ  $0.5\text{mm}$  程度の切片にして、カーボン両面テープ上に載せ、試料台に接着して、電顕での観察を行った。



#### 2-2-4 物性測定

冷凍生地の物性は引き伸ばしテストで評価を行った。また、焼成後のパンの物性測定は、レオメーター SUM RHEO METER CR-500DX (サン科学社製) を用い、円板型プランジヤー (φ30mm) で、サンプルの高さ 20mm に対して 50%まで圧縮して行った。なお、圧縮速度は 60mm/分、最大荷重 20N の条件で行った。

#### 2-2-5 製パン性の評価

パンの比容積はレーザー体積計を用いて測定した。

#### 2-2-6 示差走査熱量 (DSC) 測定解析

DSC 測定装置は PYRIS1 (PERKIN ELMER 社製) を用いた。生地サンプルを 10mg 取り、耐圧アルミニウムパンに封入した。冷却は初発温度 30°C、降温速度 10°C/min.、昇温は初発温度-70°C、昇温速度 12°C/min.で走査を行った。

#### 2-2-7 オズボーン分画

タンパク質のオズボーン分画は、Bietz らの方法 (Bietz et al. 1975) に準じて行った。

二次発酵後の生地 100mg に脱イオン水 500μl を添加し、ミキサーで 1 分間攪拌後、10,000rpm で 6°C、1 分間遠心分離を行った上澄み液をアルブミン分画とした。この沈殿物に 5N NaCl 400μl を添加し、ミキサーで 1 分間攪拌後、10,000rpm、6°C、1 分間遠心分離を行った上澄み液をグロブリン画分とした。この沈殿物を回収し、脱イオン水 400μl を添加、ミキサーで 1 分間攪拌後、10,000rpm、1 分間遠心分離し、沈殿物を回収した。この沈殿物に 70%エタノール溶液 400 μl を添加し、ミキサーで 1 分間攪拌後、10,000rpm、1 分間遠心分離を行った上澄み液をグリアジン画分とした。この沈殿物を回収し、50 %プロパノール (1% ジオスレイトール含有) 溶液 400 μl を添加し、ミキサーで 1 分間攪拌後、10,000rpm で 1 分間遠心分離を行った上澄み液をグルテニン画分とした。抽出した各画分中のタンパク質量および SDS-PAGE によりポリペプチドの分子量分布を測定した。

#### 2-2-8 タンパク質の定量

タンパク質量は Lowry らの方法に基づいて、前述の 1-2-1-5 の方法により測定した。

#### 2-2-9 リポキシゲナーゼ活性測定法

リポキシゲナーゼの基質は, Surrey らの方法 (Surrey 1964) に基づいて調製した. 基質は窒素通気下で, Tween20 を 0.12ml, 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を 2.5ml 及び 1.0M 水酸化ナトリウムを 0.32ml 混合し, この混合物にリノール酸 100 $\mu$ l を溶解させ調製した. リノール酸を溶解した後, 混合物を 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で 50ml まで希釈を行った. 基質は窒素封入下で密封し, 使用するまで 4°Cの暗所で保存した.

反応混合物は 2.5ml の 50mM 酢酸緩衝液 (pH5.5), 90 $\mu$ l の基質, および 5 $\mu$ l のリポキシゲナーゼで構成される. リポキシゲナーゼ活性は Zimmerman らの方法に従い, 分光光度計 (UV-2600 島津製作所社製) で 234nm の吸光度により分析を行った (Zimmerman et al. 1970). 1 単位はリノール酸を基質とし, 25°C, pH5.5 において 1 分間に 1 $\mu$ mol の基質が反応する酵素量とした.

#### 2-2-10 $\beta$ -アミラーゼ活性測定法

Megazyme 社製の  $\beta$ -アミラーゼ測定キットの方法に準じて行った. 粉末サンプルを 0.5g 試験管に取り, 抽出用緩衝液 5ml 添加し, 室温で 1 時間放置して酵素を抽出した. 抽出液 1ml を取り, 3,000rpm, 6°C, 15 分間遠心分離を行った. 遠心上澄み液を 0.2ml 取り, 希釈用緩衝液で 4.0ml に希釈した.

基質 0.2ml を試験管に取り, 抽出酵素液を 0.2ml を加えて, 40°C, 10 分間反応を行った. Trizma base (Megazyme 社製) を添加し反応を停止し, 400nm の吸光度を測定した.

1 単位は 1 分間に p-ニトロフェニルマルトトリオースから 1 $\mu$ mol の p-ニトロフェノールを解離する酵素量とした.

#### 2-2-11 SDS-PAGE

パン生地を -20°C で 1 週間, 冷凍保存後, 常温解凍し, 0.5M リン酸緩衝液 (pH7.0) でタンパク質抽出を行った. この抽出サンプルの 12% SDS-PAGE (XCell SureLock ミニセル電気泳動システム ThermoFisher 社製) を行った. タンパク質サンプルは 1 well あたりタンパク質量 50  $\mu$ g 添加し, 通電条件はゲル 1 枚あたり 120mA, 2.5 時間, 200V で行った (前述 1-2-2-7).

#### 2-2-12 製パン性試験方法

製パン生地作成はストレート法で行った. 成形はプルマン法, ワンルーフ法の 2 種類で行った. なお, 生全脂大豆粉の RSF, NSA は小麦粉に対して各 1% 添加して行った.

### 2-2-13 製パン評価方法

#### ① 物性 (プルマン)

物性はレオメーター SUM RHEO METER CR-500DX (サン科学社製) で測定した。

圧縮荷重 50%で 30mm 円柱型プランジャーを用いて、圧縮速度 60mm/s で行った。歯切れは、歯切れ専用プランジャーを用いて、圧縮速度 60mm/s で行った。

#### ② 体積 (ワンローフ)

ワンローフの体積は、レーザー体積計 3D LASER VOLUME MEASUREMENT SELNAC WIN VM 2100 (ASTEX 社製) で測定した (前述 1-2-2-3)。

#### ③ 官能評価

冷凍パン焼成後、20°C恒温槽で 3 日間保存を行い、24 時間後、48 時間後、72 時間後のパンの官能評価を行った。評価は 25mm の厚さに切った食パンで行った。評価方法は触感、食感、口どけ、味・香りの各項目について、良い 5、やや良い 4、普通 3、やや劣る 2、劣る 1 の 5 段階評価を行った。パネラーは中央研究所研究員 20 名 (25 歳～40 歳で男女比 1:1) で行った。

### 2-2-14 統計解析

データは標準偏差 (Mean ± SE) で示した。検定は Tukey-kramer's 多重比較検定で、SSRI (version 1.03 for windows: 社会情報サービス社製) を用いて行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 生全脂大豆粉 (RSF) と GB の添加による冷凍耐性付与効果

RSF, GB, 加熱全脂大豆粉 (HT-SF) を各 1% (対小麦粉)、生地添加到し、冷凍保存後の焼成パンの比容積を比較した結果、無添加パン (コントロール) と RSF 添加パンの容積がそれぞれ 2.8ml/g, 3.0ml/g となり、RSF 添加パンの相対容積は 107%であった。また、GB 添加パンでも同比 104%となった。一方、HT-SF 添加パンは同比 98%となり耐性付与効果がなかった。このことから、RSF 中の熱により失活する成分が、冷凍パン容積の増加に有効であることが示唆された。さらに、RSF 1.0%と GB 0.5%添加生地では 115%と最も高い容積比を示した (Fig. 29)。以降の冷凍耐性付与の評価では、この比率で検討を行った。また、焼成後のパンの写真を Fig. 30 に示す。1.0% RSF + 0.5% GB 添加パンは相対容積が向上したが、パン容積比は非冷凍パンの約 90%であり、RSF と GB 添加パンは冷凍障害が残存している可能性が示唆された。

### 2-3-2 物性測定

−20°Cで1週間、冷凍保存後、常温解凍したパン生地伸びを検討した結果、RSFとGBを添加した生地は、冷凍保存後も生地伸びが良好であったが、無添加生地は硬く、伸びが悪かった (Fig. 31).

−20°Cで1週間、冷凍保存後焼成したパンの物性をレオメーターで測定した結果、RSF+GB添加パンの最大荷重値は284.9 (gf)で、無添加パン445.3 (gf)より数値が低く、柔らかさが保持されていた。しかし、非冷凍生地の添加パン220 (gf) や無添加パン219.8 (gf) と比較して数値が高く、冷凍障害が残存していた (Fig. 32).

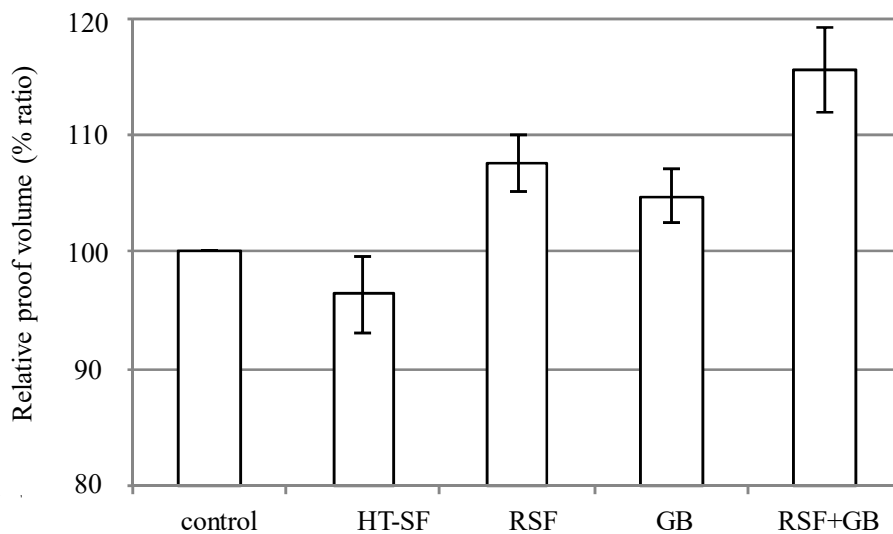


Fig. 29 Bread volumes made from frozen dough with 1% heat-treated soybean powder (HT-SF), 1% raw soybean powder (RSF), 1% glycinebetaine (GB), 1% RSF + 0.5% GB, respectively, or without (control). Mean  $\pm$  SE, n=5

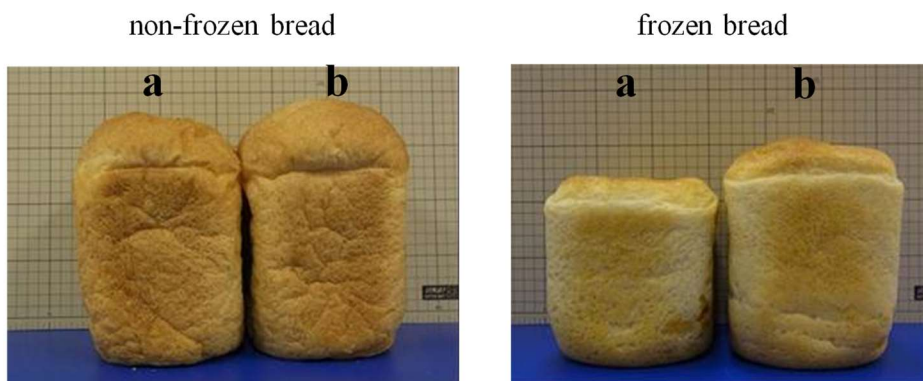


Fig. 30 Comparison of photos between volumes of bread made from non-frozen (left) or frozen dough (right) with or without 1% RSF and 0.5% GB. A: no additive (control), b: with RSF + GB



Fig. 31 Appearance of thawed dough after freezing storage with (right) or without (left) 1% RSF and 0.5% GB.

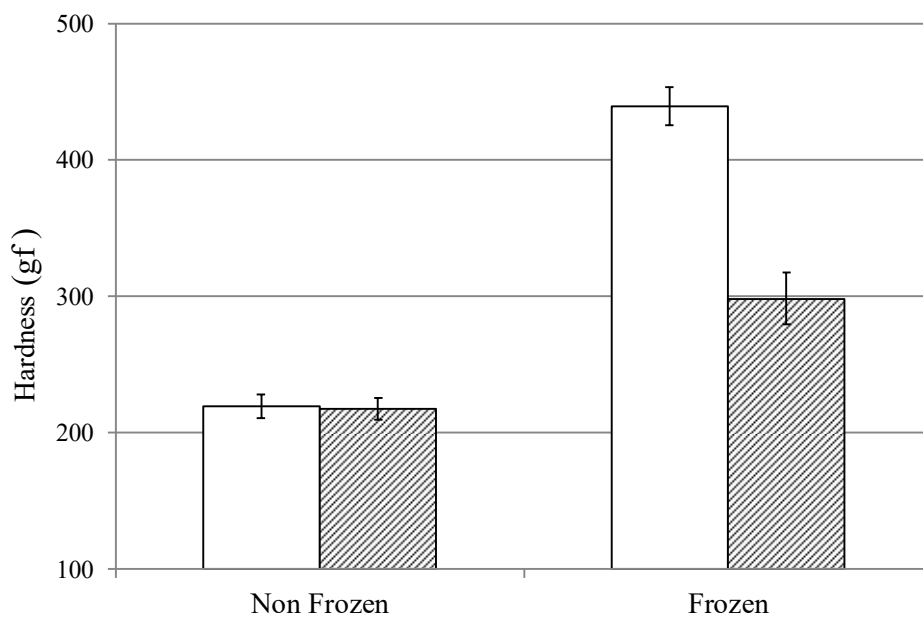


Fig. 32 Comparison of rheological properties between non-frozen (left) or frozen dough (right) with (hatched bar) or without (white bar) 1% RSF + 0.5% GB. Mean  $\pm$  SE, n=5

### 2-3-3 小麦粉生地の走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡 (×500)で冷凍パン生地を観察した。

RSF + GB 添加生地は、グルテン膜が広がった状態が観察された。無添加生地はグルテン膜が切れた状態で、グルテンネットワークの形成が阻害されていた (Fig. 33)。

### 2-3-4 DSC 分析

パン生地を 30°Cから冷却した場合、氷結晶の生成に伴う DSC 曲線の発熱ピークは RSF と GB を添加した生地が -4.9°C, RSF 添加生地 (-4.9°C) で、無添加生地 (-4.5°C) より低い温度にシフトしていた。その時の発熱量は、コントロールと比較して、RSF と GB 添加区では約 9%減少していた。また、氷結晶の融解に伴うパン生地の吸熱量は、無添加生地と比較して 81%で、吸熱エネルギーが低下した (Fig. 34)。GB または RSF 中の成分が生地成分中の凍結水量を減少させている可能性が示唆された。

### 2-3-5 SDS-PAGE

冷凍保存した生地、非冷凍生地からそれぞれ抽出したタンパク質の SDS-PAGE を行った。冷凍保存、非冷凍保存ともに RSF + GB を添加した生地から抽出したグロブリン画分タンパク質中に、MW69,000 の分子量領域に新たなポリペプチドのバンドが現れた (Fig. 35 中に矢印で示す)。しかし、他の区分では大きな差はなかった。

このグロブリンは、熱変性することが知られており、HT-SF は冷凍耐性付与の性質がなかったことから、冷凍耐性付与の効果は RSF グロブリン由来である可能性が示唆された。

### 2-3-6 パン風味評価

保存 1 日目の風味評価を Table 9 に示す。

無添加パンと比較して、風味に大きな差が見られなかった。RSF 添加パン、NSA 添加パンともにボリュームがあり、食感に弾力性があり、生地が漂白され白色であった。RSF 添加パンは大豆粉の青臭みが少なく、豆乳の風味があった。NSA 添加パンの内相はきめ細やかで、黄粉臭、青臭みが残っていた。

2 日目、3 日目の風味評価を Table 10 に示す。

無添加パンはパサつきがあり、口どけが悪く、風味が悪かった。RSF 添加パンはしっとり感が残り、歯切れや口どけが良く、比較的良好であった。NSA 添加パンは RSF 添加パンよりしっとり感や口どけが悪く、青臭みが強く感じられた。RSF 添加パンの物性、風味は、ともに

NSA 添加パンより良好であった。

5 段階評価結果を Table 11 に示す。

### 2-3-7 冷凍生地パンの物性 (レオメーター: 最大荷重の経時的変化)

無添加パンは、焼成後の保存期間が長くなるとともに最大荷重が増加していくが、RSF 添加パン、NSA 添加パンは、無添加に比較して最大荷重の増加が抑えられていた。すなわち、20°C 保存中に食感が硬くなりにくい傾向があった (Fig. 36)。

### 2-3-8 冷凍生地パンの体積

ワンローフで作成したパンの体積は、1% RSF が 1,681cm<sup>3</sup>、1% NSA が 1,584.6cm<sup>3</sup>、無添加が 1,600cm<sup>3</sup> であった。RSF 添加により、パンの体積が 106% に増加する傾向があった (Fig. 37)。実際のパンの写真を Fig. 38 に示す。

### 2-3-9 生全脂大豆粉の $\beta$ -アミラーゼ活性

RSF の  $\beta$ -アミラーゼ活性は 3,000 IU/g で、NSA (2,405TU/g) と比較して 1.25 倍強い活性であった (Fig.39)。

$\beta$ -アミラーゼ活性は RSF の方が NSA より高く、小麦粉中のでん粉を  $\beta$ -アミラーゼが部分分解することにより、パン生地中のでん粉の冷凍障害 (老化) の抑制が起こっている可能性が示唆された。

### 2-3-10 生全脂大豆粉のリポキシゲナーゼ活性

RSF のリポキシゲナーゼ活性は 166 U/g で、NSA (121 U/g) の 1.37 倍高かった (Fig.40)。



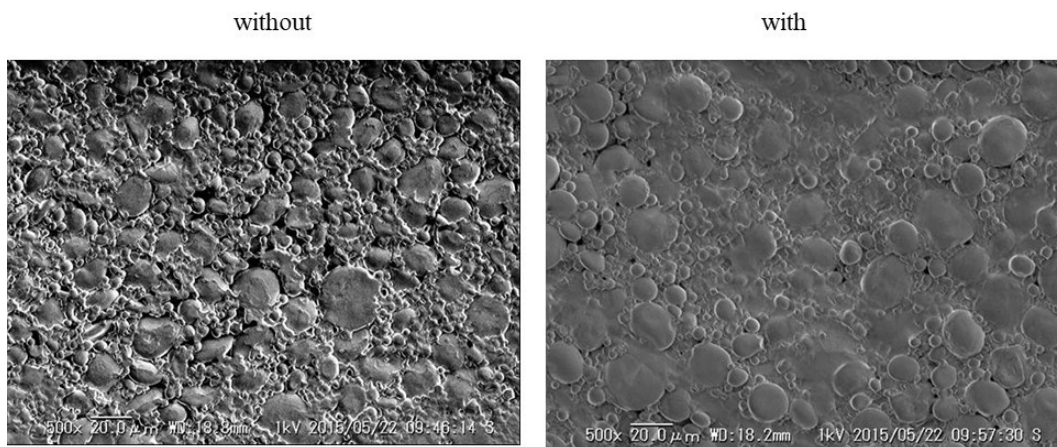


Fig. 33 SEM images of frozen dough made with or without 1% RSF + 0.5% GB. Left photo: frozen dough without RSF + GB, Right photo: frozen dough with RSF + GB. The scale bar represents 20 $\mu$ m

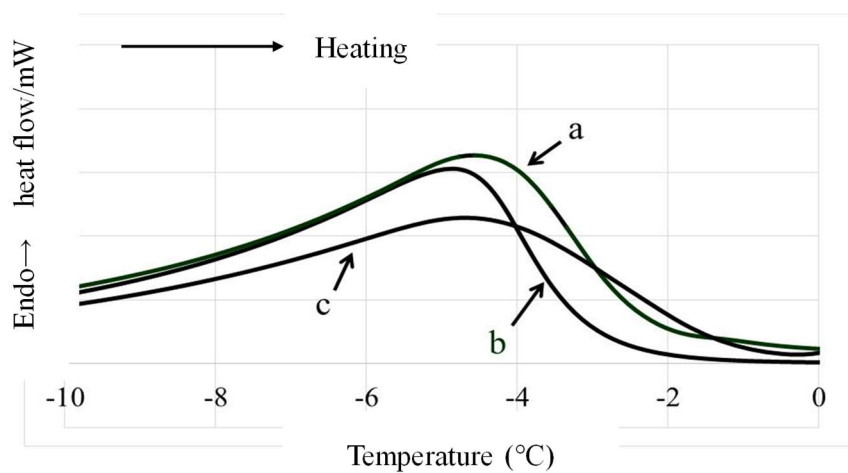


Fig. 34 Comparison of DSC heating profiles of doughs with / without 1% RSF + 0.5% GB. Profile a: no additive (control), b: with RSF, profile c: RSF + GB

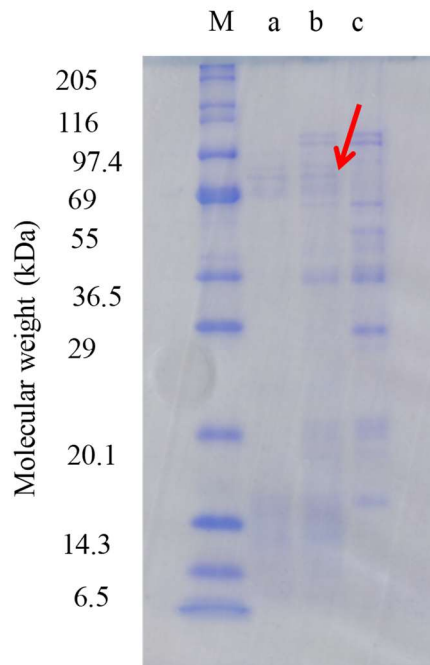


Fig. 35 SDS-PAGE analysis of polypeptide in globulin fractionated from frozen dough.

Lane M: molecular weight marker, Lane a: polypeptides from non-frozen dough with RSF + GB, Lane b: frozen dough with RSF + GB, Lane c: globulin fractionated from RSF.

Red arrow: new polypeptides band.

Table 9 Evaluation tests of bread after one day stock.

		無添加	NSA	RSF
外観	ボリューム	標準	若干ボリュームが少ない	ボリュームが増す
	色調	標準的な艶のある焼成色	標準的な艶のある焼成色	標準的な艶のある焼成色
	触感	適度なしっとり感	適度なしっとり感	適度なしっとり感
内相	網目立ち	巻き目にそった気泡の伸び	きめ細かく。気泡膜が薄い	巻き目にそった気泡の伸び
	色	黄色みのある色調	漂白されている	漂白されている
	触感	均一で滑らかな触感	弾力性がある	弾力性がある
食感	食感	やや引きのある噛み応えのある食感	無添加と大差なし	無添加と大差なし
	口溶け	クチャつきなし	無添加と大差なし	無添加と大差なし
	味、香り	良好な発酵臭	大豆の青草み、きな粉臭	豆乳パンの風味

Table 10 Evaluation tests of bread after two and three days stock

		無添加	NSA	RSF
2 days	触感	パサつき、ザラツキがある	復元力が優れている。しっとり感	しっとり感
	食感	多少パサつきがある	多少パサつきがある	しっとり感
	口溶け	あまり老化を感じず、良好な口溶け	あまり老化を感じず、良好な口溶け	やや口溶け
	味、香り	良好な発酵臭	強い青臭み	豆乳パンの風味、やや青臭み
3 days	触感	パサつきあり	ややしっとりしている	しっとりしている
	食感	パサパサ	ややしっとりしている	しっとりしている、歯切れ良い
	口溶け	口溶け良い	やや口溶け良い	口溶け良い
	味、香り		強い青臭み	豆乳パンの風味

Table 11 Comparison of flavor evaluation of bread made with RSF or with NSA

日数	評価項目	点数		
		無添加	NSA	RSF
2days	触感	3.1	4.3	4.4
	食感	3.3	3.6	4.5
	口溶け	4	4.3	3.8
	味, 香り	3.3	2.8	4.5
3days	触感	2.4	2.9	3.7
	食感	1.8	3.3	4.2
	口溶け	3.7	3.1	3.9
	味, 香り	1.5	2.1	4.1

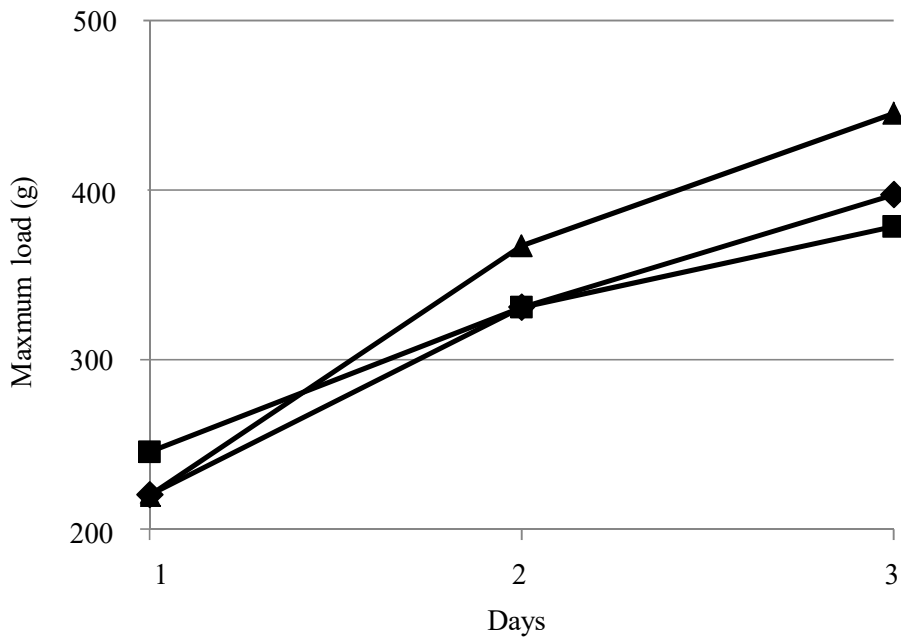


Fig. 36 Effect of raw soybean powder on bread load.  
 ▲: control, ■: RSF, ◆: NSA

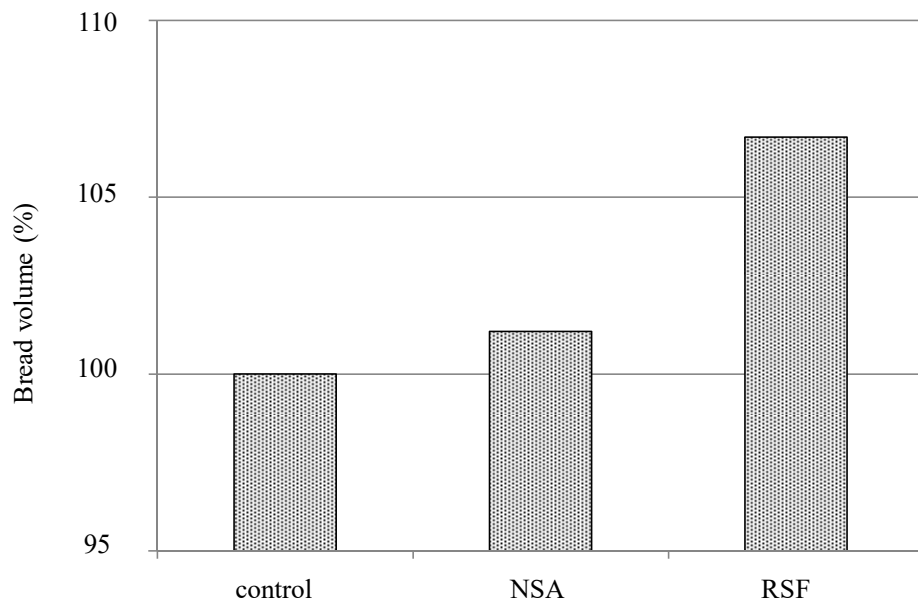


Fig. 37 Comparison of bread volume made with 1% RSF or 1% NSA.

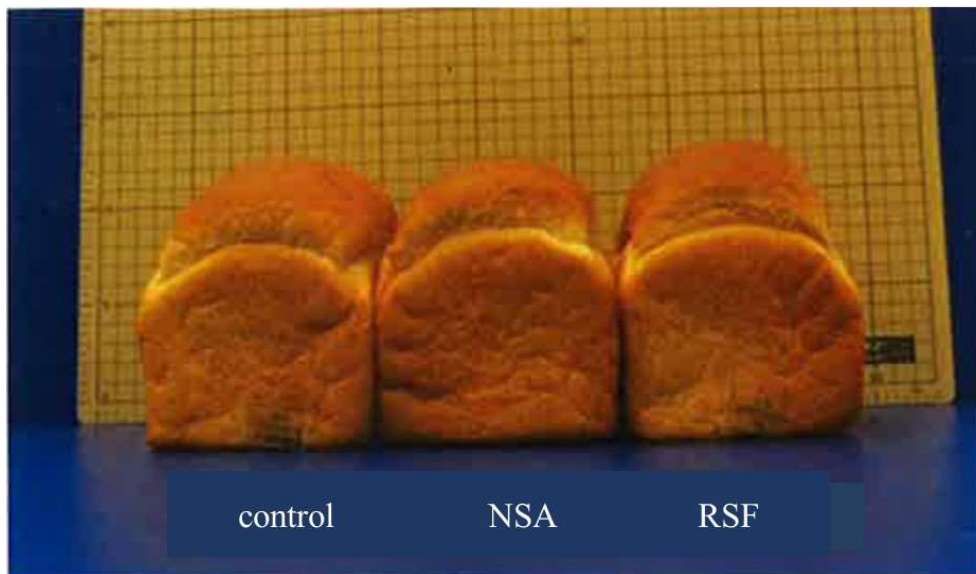


Fig. 38 Images of bread made with 1% RSF or 1% NSA.

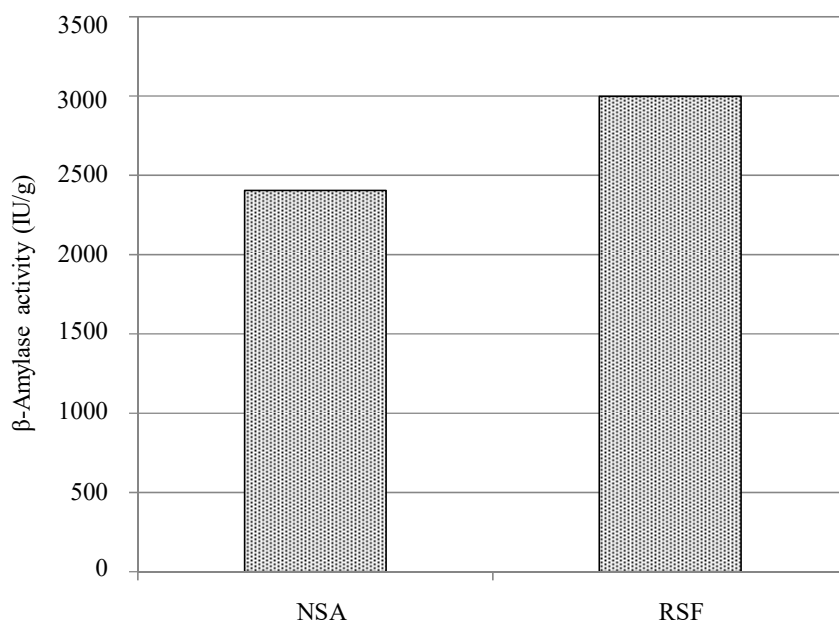


Fig. 39  $\beta$ -Amylase activity of RSF and NSA.

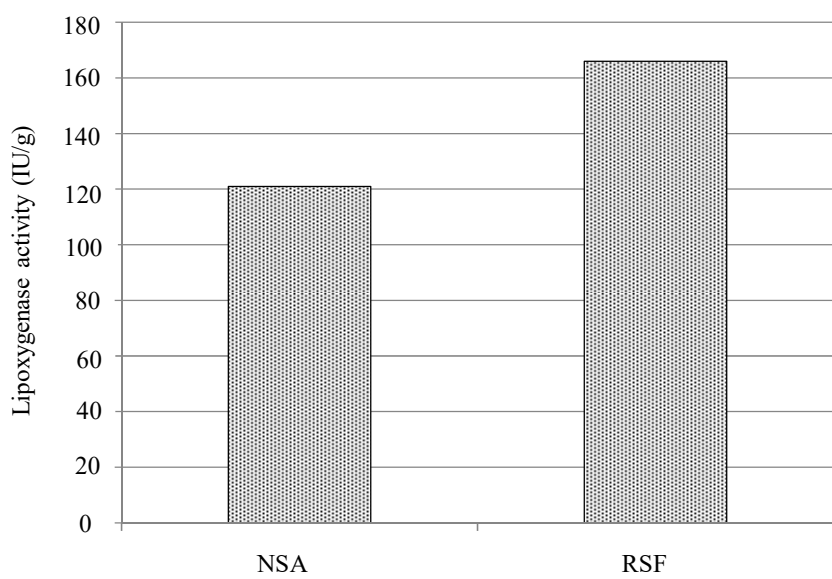


Fig. 40 Lipoxygenase activity of RSF and NSA.

## 2-4 考察

### 冷凍耐性を付与する要因について

本研究では、RSF と GB を生地添加到することで、パンの冷凍耐性を付与し、また、RSF 中の非熱変性成分が冷凍耐性を付与する可能性が示唆された。これらの結果から、冷凍耐性を付与する要因として以下の2点が考えられた。

- (1) 凍結水の減少: GB (または RSF 中の成分) の保水力は糖類のグルコースより強く、GB が水分子を引き寄せ、生地中の凍結水を少なくするという報告 (Komai et al. 2006) がある。この生地中の凍結水の減少による氷結晶成長抑制により、グルテンネットワークの損傷を防止したと推測している。比較として、2M の GB 水溶液の DSC プロファイルを示す Fig. 41 に示す。明らかに凍結水量の減少と発熱ピークの減少が認められ、冷凍生地組織中でも同様の現象が生じている可能性が高い。村勢らは、GB が水分子を引き寄せる現象は GB 分子内の両親媒性および両イオン性官能基間の距離と周辺水分子との相互関係によるものとしている (Komai et al. 2006)。

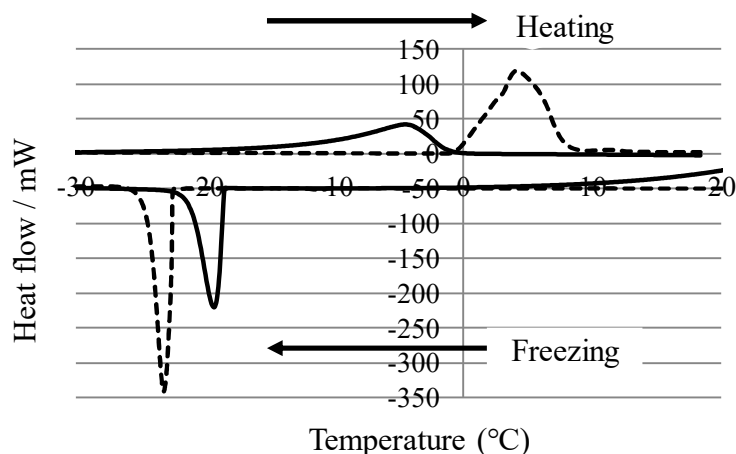


Fig. 41 Comparison of DSC heating profiles of water with (solid line) or without (dotted line) 2M GB.

- (2) パンの物性維持効果: RSF 中の成分が冷凍後もパンの柔らかさを維持する効果を示した。この原因として冷凍耐性生地中のグロブリン分画区分の増加が考えられ、グロブリン分画区分中の一部のポリペプチドの増加も認められた。このグロブリンタンパク質は、熱変性することが知られており、加熱全脂大豆粉 (HF-SF) には、冷凍耐性付与の効果がないことから、冷凍耐性付与の効果は、RSF グロブリン由来である可能性が示唆された。

大豆粉に関しては、大豆中に含まれるグロブリンや大豆ペプチドを含む培地で培養した

パン酵母は冷凍耐性を付与されるという報告 (Kitagawa ら 2008), 冷蔵保存中の焼成パンは生大豆粉添加で劣化を抑制するという報告 (大羽ら 1996), グロブリン画分のポリペプチドが増加することによりパン酵母の冷凍耐性が向上するという報告 (井沢 2008) などがあるが, 大豆ポリペプチドのパン生地への冷凍耐性効果を示した報告はない。

また, 小麦粉中のグルテンが大豆リポキシゲナーゼによる油脂の酸化で生成するフリーラジカルにより, 物性改良されている可能性が示唆された. Rooke らは, 小麦のリポキシゲナーゼ反応で生成した過酸化物質が, 小麦グルテンタンパクの-SH 基を酸化させて-S-S-結合を形成させ, パンのドウの物性を改良していると報告している (Rooke et al. 1999). Shiiba らは, SS 基の生成以外に, 脂質と結合している蛋白質の表面疎水性や水素結合が変化することで, 製パン性に影響を与える可能性を示唆している (Shiiba 1991).

### 1% RSF + 0.5% GB の相乗的な冷凍障害抑制メカニズムについて

1% RSF + 0.5% GB の冷凍障害抑制メカニズムは, 以下のように推測している。

- (1) GB は両親媒性, 両イオン性であり, 官能基が周辺の水分子と親和性を示し, パン生地中の凍結水を減少させる. 凍結水が減少することで針状結晶の成長を抑制されることで, グルテンネットワークの損傷を防ぎ, 冷凍耐性効果を示す.
- (2) GB により生地中の凍結水が減少することで, 生地中の RSF が濃縮される. RSF の濃度が上がることで, RSF 中のリポキシゲナーゼや  $\beta$ -アミラーゼなどの酵素類や MW69,000 のポリペプチドの濃度が上がる. 酵素濃度が上がることで酵素反応速度が速くなり, リポキシゲナーゼの酸化反応で生成するフリーラジカルの生成速度も上昇し, グルテンの酸化が促進, グルテンネットワークが強化され, さらに冷凍耐性効果が向上する.

1% RSF と 0.5% GB を同時に添加した場合, RSF, GB 単独に添加した場合と比較して, パン容積率が高くなっており, 相乗的な効果を示すと考えられる. 林らは GB 濃度が 0.2~1M の範囲で線虫の冷凍耐性があったと報告しており (林ら 2015), 添加する GB 濃度を 1%~10%まで上げることで, パン生地の冷凍耐性効果がさらに向上する可能性も示唆された.

### 2-5 まとめ

本研究より, 加熱全脂大豆粉 (HF-SF) は, 冷凍生地パン, 非冷凍生地パンに対する製パン性効果はなかったが, 生全脂大豆粉, 特に RSF は冷凍生地パンと非冷凍生地パンの両方でパン容積増加, パンの柔らかさが保持され食感改良効果などの製パン性向上効果を示した.



このことより、加熱により失活、変性して効果が無くなる成分が効果に参与している可能性が示唆された。

(1) MW69,000 領域の新しく生成したポリペプチドの関与

SDS-PAGE の結果、冷凍パン生地、非冷凍パン生地ともに、RSF と GB を添加した生地ですべて新たに MW69,000 分子量領域に新たにポリペプチドバンドが現れ、このポリペプチドが効果に参与している可能性が示唆された。

(2) 大豆リポキシゲナーゼの小麦グルテン酸化によるグルテンネットワークの強化

HT-SF は冷凍耐性効果がないことから、加熱により失活、変性して効果が無くなる成分が参与している可能性が示唆された。生全脂大豆粉の中で、RSF が冷凍生地パンの製パン性の向上効果（物性改良、内相の漂白作用）が高く、また、RSF の  $\beta$ -アミラーゼ、リポキシゲナーゼ活性が高いことより、リポキシゲナーゼ、 $\beta$ -アミラーゼなどの加熱失活するタンパク質が冷凍耐性効果に参与している可能性が示唆された。大豆中のリポキシゲナーゼの酵素による大豆中のオレイン酸、リノール酸などの不飽和脂肪酸の酸化によりフリーラジカルが生成する。このフリーラジカルが小麦粉グルテンを酸化し、グルテン表面の親水性が増加し、グルテンネットワークの強化が起こっている可能性がある。

(3) 大豆  $\beta$ -アミラーゼによる小麦でん粉の部分分解によるでん粉の老化防止

RSF の成分である  $\beta$ -アミラーゼにより、小麦粉中のでん粉の部分分解が起こり、小麦粉でん粉の冷凍障害（老化）を抑制することで、パンの硬化を防止している可能性が示唆された。

(4) グリシンベタイン (GB) などの糖類添加による凍結水量の減少

RSF + GB をパン生地に添加することで、冷凍生地パン焼成後のパン容積増加と生地の柔らかさ保持し、食感向上効果を示した。DSC 分析の結果、GB 中の水素結合がパン生地中の凍結水を水和結合で引き寄せ、生地中の凍結水を減少させることでグルテンネットワークの崩壊を防ぐ可能性が示唆された。また、大豆粉に約 1%含まれるラフィノースなどの三糖類も保水性があることから、生地の柔らかさを維持している可能性も考えられた。

本論文は、大豆粉の食品加工への新しい品質劣化抑制機能を付与する研究を行うことで、生全脂大豆粉の加工食品への新たな利用を最終目的として研究を行った。そのため、特に食品素材中の内在性酵素に注目して、第二章では冷凍生地製パン加工中の冷凍障害機構を検討し、大豆粉内在酵素を利用して、パン生地の冷凍障害を抑制する研究を行った。

その結果、RSF 中の成分であるリポキシゲナーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グロブリン画分タンパク質 (M.W.69,000 ポリペプチド) などが冷凍製パンの冷凍障害抑制効果がある可能性が示唆

された。これら成分のパンへの冷凍障害抑制は、パン生地の冷凍によるグルテンネットワークの崩壊やでん粉老化を抑制することにより、効果を示した可能性が示唆された。

この研究成果について、「パン生地、パン及びパンの製造方法」(特開 2016-158540)の特許を学校法人東京電機大学と日清オイリオグループ(株)と共同出願を行った。

### 第3章 大豆成分 GABA の生成と加工食品への利用

#### 3-1 背景

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は、1950 年に哺乳類の脳から発見されたタンパク質を構成しないアミノ酸の一種であり、中枢神経系における代表的な抑制系の神経伝達物質であることが明らかになっている (Hefft et al. 2002). また、GABA は脊椎動物に存在するだけでなく、古くから植物にも広く分布していることが知られており、漢方でも GABA を多く含む棕櫚 (シュロ) などが高血圧症の改善薬としても用いられてきた。人間においては、脳の大脳皮質、海馬、小脳、脊髄後角、線条体から黒質にかけて存在し、抗痙攣作用、抗不安作用、脳の代謝機能亢進などの神経伝達物質として重要視されている。

GABA は、脳内でグルタミン酸からグルタミン酸脱炭酸酵素 (以降 GAD と略す) の作用により生合成され、アミノ基転移酵素 (GABA-T) によって分解され、コハク酸セミアルデヒドまたは、コハク酸を経てクエン酸回路 (TCA cycle) に戻る (Fig. 42)。

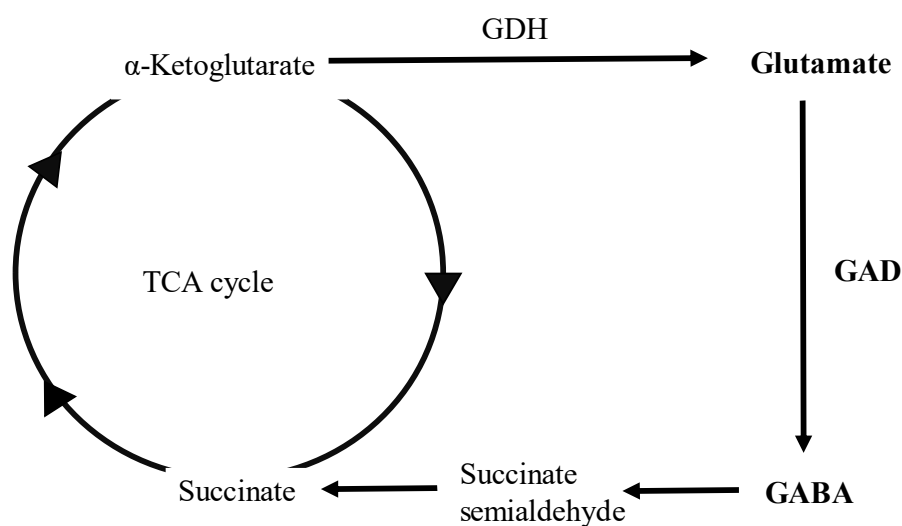


Fig. 42 GABA shunt

GABA の生理作用は、脳機能作用 (茅原ら 2001)、記憶改善作用 (茅原ら 2001)、ストレス低減 (Abdon et al. 2006)、鎮痛作用 (岡田ら 2000)、高めの血圧の改善 (Hayakawa et al. 2004; Matubara et al. 2002)、内臓機能活性化 (藤原ら 1998) や抗がん作用があるとされている。

GABA の微生物生体内での役割に関して、酵母において抗酸化機構に関与しているという報告がある (Coleman et al. 2001)。また、大腸菌、乳酸菌では、高酸性下での耐酸性メカニズムの重要な要素であることが報告されている (Tramonti et al. 2006; Stewart et al. 2005; Capitani et al. 2003)。しかしながら、植物に関しては、たとえば、食害および病原菌などからの防御 (Seifi et al. 2013)、花粉管伸長の抑制 (Shelp et al. 1999; Palanivelu et al. 2003)、細胞伸長の抑制 (Renault et al. 2011) などの効果があるという報告はあるが、GABA の植物内の生理機構に関して明確には解明されていない。

GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素 (以降 GAD と略す) によりグルタミン酸から生合成されるが、植物以外に乳酸菌の発酵によっても生産され、玄米 (Kinefychi, et al. 1999)、漬物 (Ueno et al. 2007)、キムチ (Cho et al. 2007)、発酵乳製品 (Nomura et al. 1998) などから GABA を生成する乳酸菌が発見されている。一方、植物の GAD を用いた GABA の富化に関しては、お茶の嫌気処理 (Tsushida et al. 1987)、玄米の発芽処理 (Ohisa et al. 2003)、玄米の高圧処理 (Kinefychi et al. 1999) などの報告があり、嫌気条件で水濁法やマイクロ波加熱などの処理による GABA の高蓄積化についても検討されている。

豆類の GABA については、大豆もやしの二酸化炭素ガス処理 (Katagiri et al. 1989) や浸漬大豆の高圧処理 (Ueno et al. 2013) による GABA 含量増加や、黄大豆、青大豆、黒大豆、枝豆、きな粉など大豆製品の GABA 量を測定した文献 (水野ら 2004) などがある。また、登熟大豆である枝豆で早生白山が 68.9mg/100g の GABA を豆中に蓄積し、特に、胚軸部に多く蓄積するという報告がある (Abe et al. 2005)。しかし、大豆の生育時期による GABA 含量の変化や大豆の部位による GABA 量の変化を比較した報告はない。

一方、登熟大豆の莢は、登熟大豆 (枝豆) を食品加工する際、枝豆の副産物として約 40% (w/w) 排出するが、肥料・飼料原料として利用される程度で、殆どは廃棄されている。この莢を GABA 生成酵素素材として利用できれば、副産物の有効利用で環境負荷低減にも繋がる可能性がある。

高濃度 GABA 粉末の製造方法については、乳酸菌、酵母、クロレラ、麴などを利用した高濃度 GABA 粉末が検討されており、特に麴を用いて 5% 高濃度塩分下でグルタミン酸を回分添加して 5 日以上発酵することで 500mg/100g 以上の高濃度 GABA 味噌を作成したという報告がある (宮間ら 2000)。また、市販試薬の精製 GAD 粉末を用い、グルタミン酸から

GABA を生成することも可能であるが、反応中に試薬の精製 GAD を安定化するため、ピリドキサルリン酸やメルカプトエタノールを添加する必要がある、安全性の問題で食品に使用することは難しい。植物素材を利用した例として、かぼちゃにグルタミン酸を添加して 17 時間反応を行うことで、かぼちゃ粉末中に 36.3% (w/w) の GABA を含有したという報告がある (Uzawa et al. 2002)。しかし、大豆を酵素原料素材とした GABA 高含有粉末試作の検討を行った例はない。

本論文では、大豆の生育時期の違いや部位による GABA 生成の変化を検討した。GABA が大豆生育期間のどの時期にどの部位に高濃度に蓄積するのかを検討するとともに、GABA 生成反応酵素である GAD の酵素化学的性質の比較研究を行っている。

さらに、GABA 高含有食品への応用研究として、最も GABA 含有量が高かった登熟大豆を用いた GABA 高含有乾燥枝豆の試作と副産物として廃棄される枝豆莢を用いた GABA 高含有粉末の試作検討を行っている。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 実験試料

豆類: 完熟豆の大豆 (Soybean; 学名 *Glycine max*), 青大豆 (Green soybean; 学名 *Glycine max*), 黒大豆 (Black soybean; 学名 *Glycine max*), 緑豆 (Mung bean; 学名 *Vigna radiata*), 小豆 (Red bean; 学名 *Vigna angularis*), ひよこ豆 (Chick pea; 学名 *Cicer arietinum*), インゲン豆 (Kidney bean; 学名 *Phaseolus vulgaris*), レンズ豆 (Lentil; 学名 *Lens culinaris*) を使用した。

枝豆: 枝豆 (中札内産; 学名 *Glycine max*), しろね茶豆 (学名: *Glycine max*), 晩酌豆 (学名: *Glycine max*), 香味豆 (学名: *Glycine max*)

完熟大豆: タチナガハ (2009 年度産; 学名: *Glycine max*)

### 3-2-2 遊離アミノ酸含量の分析方法

遊離アミノ酸の分析方法は、以下の方法で行った。まず、試料 50g に 500mM リン酸緩衝液 (pH6.0) を 450ml 添加し、10 倍希釈を行った。希釈液に 500mM リン酸緩衝液 (pH6.0) を 1:4 (w/w) の割合で添加し、高速ホモジナイザーで 6,500rpm, 2 分間, 6°C で破碎を行った。

試験管に 5%TCA 溶液 5ml と粉碎液 5g を入れ、試験管ミキサーで混合後、高速冷却遠心機により 10,000rpm, 6°C, 10 分間遠心分離を行った。遠心分離後の上澄み液をスポイドで分取し、1.0 $\mu$ m メンブレンフィルターでろ過したろ液を分析試料とした。測定は日立高速アミ

ノ酸分析計 L-8800A (日立ハイテクサイエンス社製) を用いて行った。

### 3-2-3 大豆の発芽方法

大豆は蒸留水で 2 回洗浄した後, 70%エタノールで 1 回殺菌, 洗浄を行った。洗浄サンプル 100g を 1,000ml の蒸留水に入れ, 25°C温水を入れて 6 時間浸漬後, 空気中で 3 時間放置し, 豆に水を浸み込ませたガーゼを被せて 25°C, 24 時間静置することで発芽を行った。

根長が 0.5mm 以上に成長した豆が全体の 80%以上になった時点で発芽終了とした。大豆もやしは発芽後 25°C恒温槽に 7 日間入れて作成した (根長が 60mm 以上)。

### 3-2-4 大豆の土壌栽培方法

大豆品種タチナガハ (2009 年度産) の豆を 25°C, 6 時間浸漬した後, 3 時間空気中に放置した。その後, 土をかけて苗床を作成して, 25°C, 1 週間, 恒温槽に入れ発芽させた。発芽率は 85% (根長が 0.5mm 以上を発芽とした) であった。次に苗床で発芽させた大豆の苗を圃場 (横須賀事業場内) に定植した。生育が悪い株を間引きし, 3 週間後に 1 回目の土寄せ, さらに 2 週間後に 2 回目の土寄せを行った。開花後 20 日目で登熟前期の収穫, 35 日目で登熟後期の収穫を行い, 90 日目で完熟大豆の収穫を行った。

発芽は, 25°Cの温水に 6 時間浸漬後, 3 時間空気中で水切りを行い, 水に湿らせた医療用ガーゼを豆の上に被せて, 25°C恒温槽で 15 時間静置して行った。

なお, 発芽率は, 以下の式で算出した。発芽は 0.5mm 以上発根した豆を発芽とした。

$$\text{発芽率 (\%)} = \text{発芽した大豆の個数} / \text{大豆の個数}$$

### 3-2-5 呉 (豆汁) の作成方法 (GABA 生成酵素の粗酵素液作成方法)

呉 (発芽大豆呉, 登熟大豆呉) は, 豆: 50mM リン酸緩衝液 (pH6) = 1:4 (w/w) の割合で混合し, ホモジナイザーで 10,000rpm, 6°C, 3 分間破碎を行い, 作成した。莢は豆から外した後, 同様な方法で破碎を行い, 莢呉を作成した。

### 3-2-6 最適 pH, 最適温度の反応条件

最適 pH は, 各 pH の 50mM 緩衝液, pH4.5 はクエン酸緩衝液, pH5.0 は酢酸緩衝液, pH6.0 はリン酸緩衝液, pH7.0 はリン酸緩衝液, pH7.5 はトリス塩酸緩衝液, pH8.0 はトリス塩酸緩衝液, pH8.5 はトリス塩酸緩衝液を用いて, 3-2-5 の方法で呉を作成し, 100ml 三角フラスコに 30g 添加し, 40°C, 1 時間で反応を行った。5%TCA を 1:1 (w/w) で添加して反応を止めた。

最適温度の測定は、50mM リン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて 3-2-5 の方法に準じて呉を作成した。恒温水槽の温度を各温度になるように調整し、100ml 三角フラスコに呉を 30g 添加し、1 時間後、2 時間後、3 時間後に各 5g サンプルングを行った。反応は 5%TCA を 1:1 (w/w) 添加して停止した。

### 3-2-7 嫌気、好気条件下の GABA 生成酵素反応条件

300 ml 三角フラスコに 100g の呉を添加し、40°C恒温槽に入れた。嫌気条件の反応は、三角フラスコの開口部にゴム栓 (ガラス管 2 本を貫通させた) で蓋をして、片方のガラス管から窒素ガスを流入して行った。好気条件の反応は、片方のガラス管にエアーポンプ (ニッソー NPS-003; マルカン社製) を接続し、エアーポンプで空気を通気して行った。

### 3-2-8 凍結融解方法

枝豆 (中札内産)、晩酌豆、しろね茶豆、香味豆の 4 種類の登熟大豆を用いた。各種枝豆を莢がついたまま、-60°Cで急速冷凍を行った。その後、-20°Cで冷凍保存を 48 日間行った。冷凍保存後、1 時間流水中で解凍を行った。サンプルングした冷凍保存枝豆莢は 3-2-2 の方法で遊離アミノ酸を抽出し、GABA 含量を高速アミノ酸分析装置 (日立ハイテクサイエンス社製) で測定した。

### 3-2-9 莢呉 GAD 反応液へのグルタミン酸の添加方法

晩酌豆莢呉 150g に対して、グルタミン酸を 0.5g, 1.0g, 1.5g, 2.0g, 2.5g, 5.0g それぞれ添加し、5N NaOH で pH を pH6.0 に調整した。反応は 35°C, 3 時間行った。反応中は pH5.5~pH6.0 に調整した。反応終了後、呉中の遊離アミノ酸含量を 3-2-2 の方法で測定した。

### 3-2-10 莢呉反応液へのグルタミン酸の回分添加方法

晩酌豆莢呉 300g に対して 30g を 48 時間内に 1 回, 3 回, 5 回, 7 回, 10 回, 20 回に分けて添加して反応を行った。5N NaOH 溶液で pH5.5~pH6.0 に pH 調整し、20°Cで反応を行った。反応開始後、6 時間, 12 時間, 36 時間, 48 時間にサンプルングを行った。

### 3-2-11 GABA 高含有粉末の製造方法 (パイロットスケール)

晩酌豆莢 10kg に対して、氷冷水 10kg を添加しながら、超微粉碎機 (スーパーマスコロイダーIV: 増幸産業社製) で砥石のクリアランスを 500 $\mu$ m, 回転数 1,500rpm に設定して粉碎

を行った後、クリアランスを 200 $\mu$ m に調整して、氷冷水 10kg を添加しながら 2 回目の粉碎を行い、莢呉を作成した。呉液中にグルタミン酸を 300g 添加した後、2N NaOH により pH5.5～6.0 に調整し、攪拌羽根 300rpm で攪拌して、15°C で反応を開始した。反応開始後 10 時間まで 1 時間おきにグルタミン酸を添加し、pH は pH5.5～6.0 に調整した。反応開始後 12 時間以降は、pH スタットで 2N HCl 溶液添加により、pH5.2～5.5 に調整して行った。反応開始後 12 時間、24 時間、36 時間、48 時間で 2kg ずつサンプリングを行い、5%TCA を 1:1 で添加して反応を止めて回収した。

回収した反応液は、65°C 達温後、5 分間加熱を行った後、氷冷中で冷却を行った。冷却後、バスケット式遠心機 CT-20 (タナベウィルテック社製) を用いて、8°C、3,500rpm、30 分間遠心分離を行い、上澄み液を回収した。

熱処理後、回収した上澄み液は、ろ布 (通気性 260cm<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>・s) によるフィルタープレス (手動式フィルタープレス SQ: 栗田機械社製) でろ過を行った。圧力 0.6MPa～1.0MPa で、定圧ポンプを用いてろ過を行った。

フィルタープレス後のろ液をステンレス容器に入れ、60°C で 1 時間凍結を行った。凍結したサンプルを棚段式凍結乾燥機 (プログラム式棚段凍結乾燥機 FD-551: 東京理化学器械社製) に入れ、棚段温度 40°C で凍結乾燥を行い、GABA 高含有粉末を得た。

### 3-2-12 GABA 高含有乾燥枝豆試作方法

30kg のしろね茶豆から枝豆莢剥き機 P-78 (ホクエツ社製) により莢を除去し、18kg の豆を -60°C で 3 時間急速冷凍した後、-20°C で冷凍保存を 30 日間行った。その後、しろね茶豆をビニール袋に入れて 30°C、12 時間静置して融解を行った。さらに、95～100°C のスチームで 7 分間直接加熱して殺菌を行った。殺菌後の晩酌豆をプログラム式棚段式凍結乾燥機 FD-551 (東京理化学器械社製) に入れて、棚段温度を 40°C で凍結乾燥を行い、乾燥枝豆を得た。

### 3-2-13 統計解析

データは標準誤差 (Mean  $\pm$  SE) で示した。検定は Tukey-kramer's 多重比較検定法で、SSRI (version 1.03 for windows: 社会情報サービス社製) を用いて行った。

## 3-3 実験結果

### 3-3-1 大豆種類と GABA 含量

完熟豆の GABA 含量は、緑豆が 16.8mg/100g、青大豆 14.6mg/100g が比較的高い数値であ



ったが、完熟大豆は4mg/100gと低かった (Fig. 43).

### 3-3-2 大豆生育時期による GABA 含量の変化

大豆生育時期の違いによる GABA 含量の変化を Fig. 44 に示す. 大豆は発芽期, 登熟期に GABA 含量が増加し, 登熟後期の豆中に 63.8mg/100g 蓄積し, GABA を高含量した.

発芽期の発芽1日目から5日目まで GABA が増加したが, 大豆もやし (発芽7日目) では GABA 含量が減少した. 豆中の GABA 含量は登熟期で増加し, その後完熟期に減少する傾向であった.

### 3-3-3 登熟期大豆の莢, 豆の GABA 含量の変化

大豆品種タチナガハの登熟前期 (開花後 20 日目) の莢, 豆と登熟後期 (開花後 35 日目) の莢, 豆中の GABA 含量を測定した結果, 登熟前期の莢中の GABA 含量が 81.1mg/100g で大豆生育期間中最も高い値を示し, 登熟後期に 27.9mg/100g に減少した. 豆中の GABA 含量は登熟前期に 50.9mg/100g, 登熟後期に 68.3mg/100g になり, 登熟後期に GABA 含量が増加した. GABA は登熟前期に莢に蓄積した後, 登熟後期に豆中に移行した可能性が示唆された (Fig.45).

### 3-3-4 発芽大豆と登熟大豆の GABA 生成条件 (温度, pH) の比較

反応の最適温度を検討した結果, 登熟大豆は 35°C, 1 時間反応で GABA 含量が 3.9 倍に増加し, 3 時間反応で 4.4 倍, 55°C, 1 時間反応では 2.6 倍であった. また, 発芽大豆は 65°C, 1 時間で 3.9 倍に増加した (Fig. 46). 登熟大豆の最適温度は 35°C, 発芽大豆は 65°C で, 最適温度に 30°C の差が生じていた.

反応の最適 pH を検討した結果, 登熟大豆の pH は 5~8 の範囲で最適条件であり, 比較的広範囲で良好であった. 発芽大豆は pH6 が最適 pH であった (Fig. 47). 登熟大豆と発芽大豆で最適 pH も異なっていた.

### 3-3-5 GABA 生成反応条件 (嫌気条件・好気条件)

発芽大豆を嫌気条件下 40°C で 120 分間反応した結果を Fig.48-A, 好気条件下の結果は Fig.48-B に示す. 嫌気条件下 2 時間反応で GABA 含量が約 3 倍に増加し, グルタミン酸が約 1/2 に減少した. その他アラニンが微増し, アスパラギン酸が微減した. 好気条件下の GABA の生成は約 2 倍の増加に留まった. グルタミン酸の減少が少なく, また, アラニン

が微減し、アスパラギン酸は微増した。発芽大豆臭反応では、嫌気条件で GABA 量が最も増加したが、好気条件でも GABA が生成した。

### 3-3-6 凍結融解処理による登熟大豆 (枝豆) 莢, 豆中の GABA 含量

凍結融解処理を行った枝豆は、豆と莢ともに無処理より GABA 含量が増加した。特に莢の GABA 含量は、無添加の約 3.5 倍～5 倍に増加した。また、豆中の GABA 含量は約 1.5 倍～3 倍に増加した (Fig. 49)。

凍結融解処理枝豆のブランド別 GABA 含量を検討した結果、晩酌豆莢中の GABA 量が最も高く 519.7mg/100g、枝豆 (中札内産) 莢が 499.1mg/100g、しろね茶豆莢が 482.3mg/100g と高い数値を示した。香味豆莢の GABA 含量は低かった (Fig. 49)。

豆中の GABA は、しろね茶豆が 338.2mg/100g で最も高い値を示した (Fig. 49)。

### 3-3-7 莢臭 GAD 反応液へのグルタミン酸添加量

晩酌豆莢臭 150g に添加するグルタミン酸量を検討した結果、1 回の添加量が 1.5g で GABA 含量が 389.3mg/100g (粉末 w/w) に増加したが、2g 以上の添加では GABA 含量の低下が見られた (Fig. 50)。

### 3-3-8 莢臭 GAD 反応液へのグルタミン酸回分添加

晩酌豆莢臭中の GABA 含量は 1 回 1.5g 添加を 10 回繰り返すことで、560mg/100g に増加した。20 回添加は 560.2mg/100g であり、20 回添加と 10 回添加で GABA 含量に大きな違いがなかった (Fig. 51)。

### 3-3-9 GABA 高含有粉末の試作 (パイロットスケール)

晩酌豆莢臭 30kg を pH6 に調整し、グルタミン酸を 300g ずつ 10 回添加した GABA 生成反応の経時変化を Fig. 52 に示す。48 時間反応で 519.5mg/100g の GABA を含有する凍結乾燥粉末が 8.6kg 得られた。

### 3-3-10 GABA 高含有粉末の精製

48 時間反応後の反応液を、65°C 達温後 5 分間加熱処理を行った結果、GABA 含量は 1.1 倍に向上した (Table 12)。

加熱後にフィルタープレスろ過を行った結果, GABA 含量は 843.2mg/100g (粉末 w/w) で, 1.5 倍に増加した (Table 12). 最終的に 3.6kg の GABA 高含有粉末が作成できた. GABA 粉末の写真を Fig. 53 に示す.

### **3-3-11 GABA 高含有乾燥枝豆の試作**

しろね茶豆 18kg を凍結融解処理を行い, スチームで加熱殺菌後, 凍結乾燥を行った. しろね茶豆の凍結乾燥品の GABA 量は 329mg/100g であった. しろね茶豆凍結乾燥品は 2.9kg 回収できた. GABA 高含有乾燥枝豆の写真を Fig. 54 に示す.

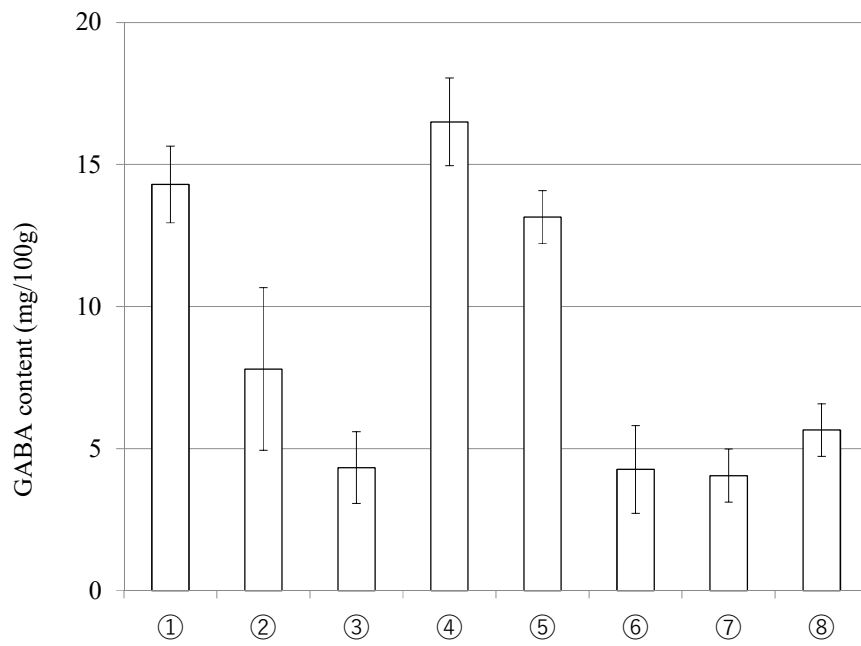


Fig. 43 GABA content in fully matured legumes.

①: green soybean, ②: black soybean, ③: soybean, ④: mung bean, ⑤: red bean, ⑥: chick pea, ⑦: kidney bean, ⑧: lentil.

Mean  $\pm$  SE, n=7

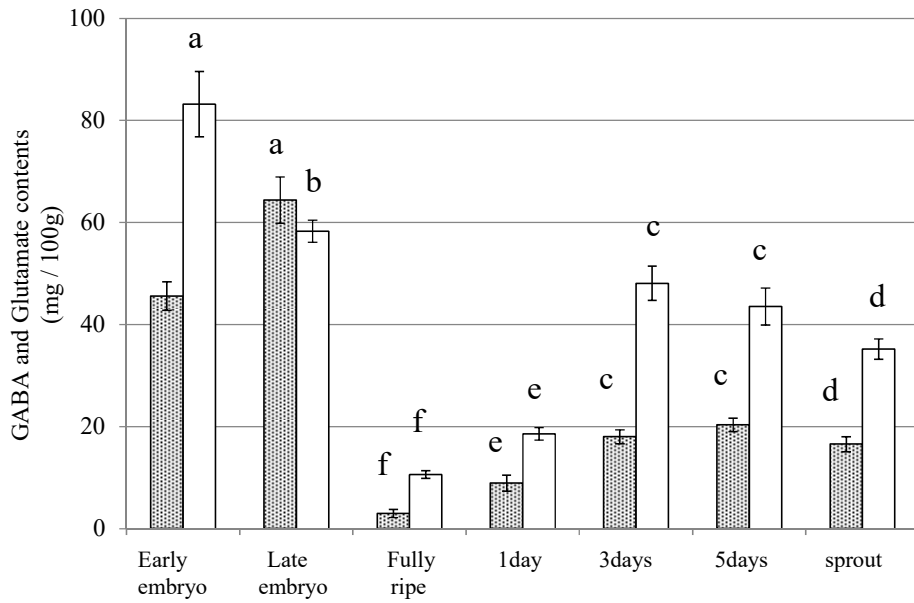


Fig. 44 GABA and glutamate contents in soybean cultivar Tachinagaha growth stages. Filled bar: GABA, white bar: glutamate. The days indicated are days after germination. Early embryo: 20<sup>th</sup> day after flowering, Late embryo: 35<sup>th</sup> day after flowering. Fully ripe: 80<sup>th</sup> day after flowering. Sprout: 7 days after germination. Different superscript letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ . Mean  $\pm$  SE,  $n=5$

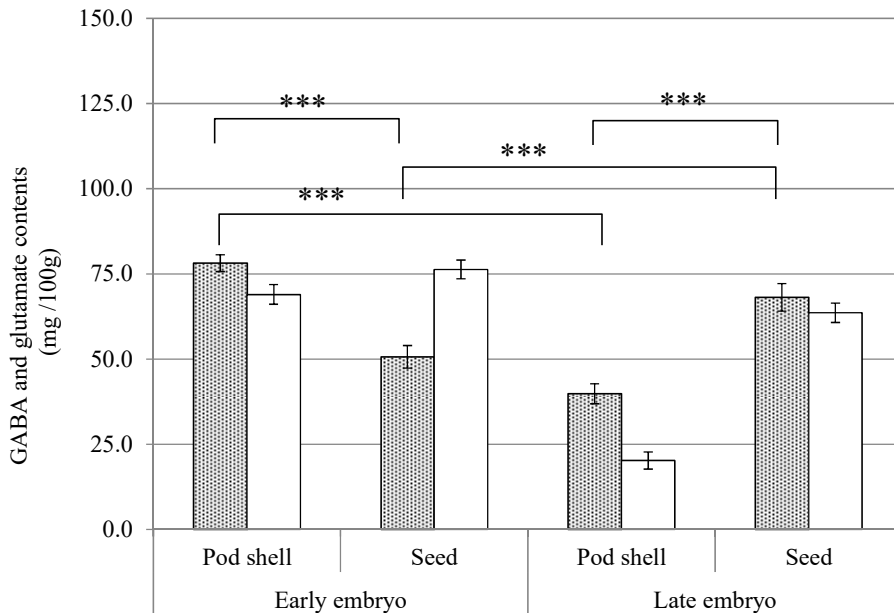


Fig. 45 GABA and glutamate contents in soybean pod shells and seeds in the early embryo stages and in late embryo stages at 25°C. Filled bar: GABA, White bar: glutamate. Mean  $\pm$  SE,  $n=5$  \*\*\* $P < 0.001$

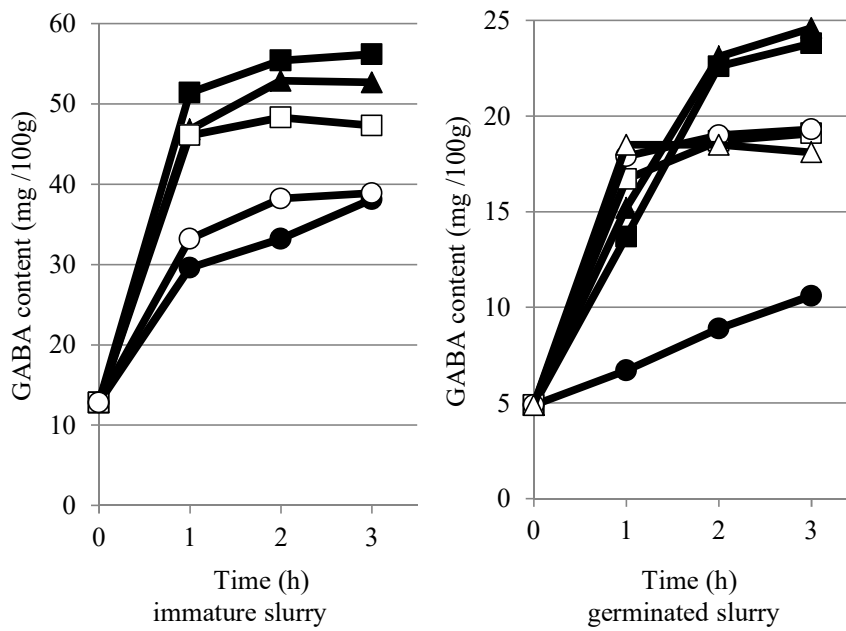


Fig. 46 Thermal stability of GABA production in soybean slurries.  
 ●: 20°C, ■: 35°C, ▲: 40°C, □: 45°C, ○: 55°C, △: 65°C.  
 Left: in bean of immature soybean slurry, Right: in germinated soybean slurry.

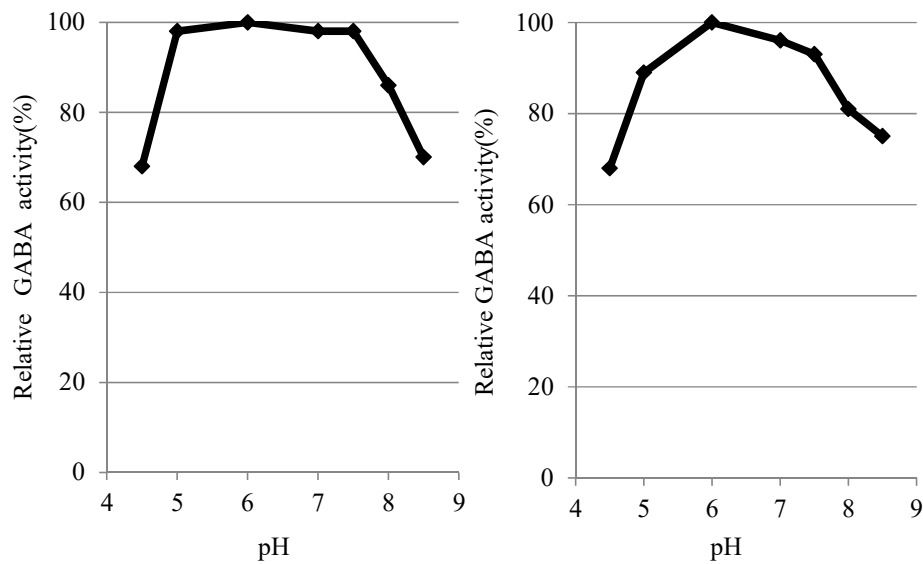


Fig. 47 Optimum pH for GABA production in soybean slurries.  
 Left: in bean of immature soybean slurry, Right: in germinated soybean slurry.

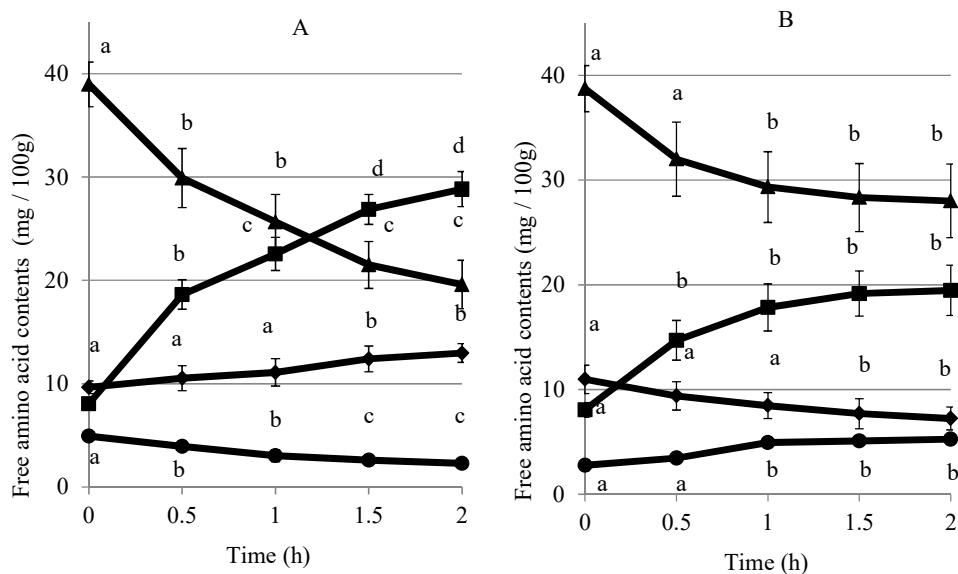


Fig. 48 Free amino contents in a germinated soybean slurry.  
 ■: GABA, ▲: glutamate, ◆: alanine, ●: aspartate  
 Left: Under anaerobic conditions, Right: Under aerobic conditions.  
 Different superscript letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ .  
 Mean  $\pm$  SE, n=5

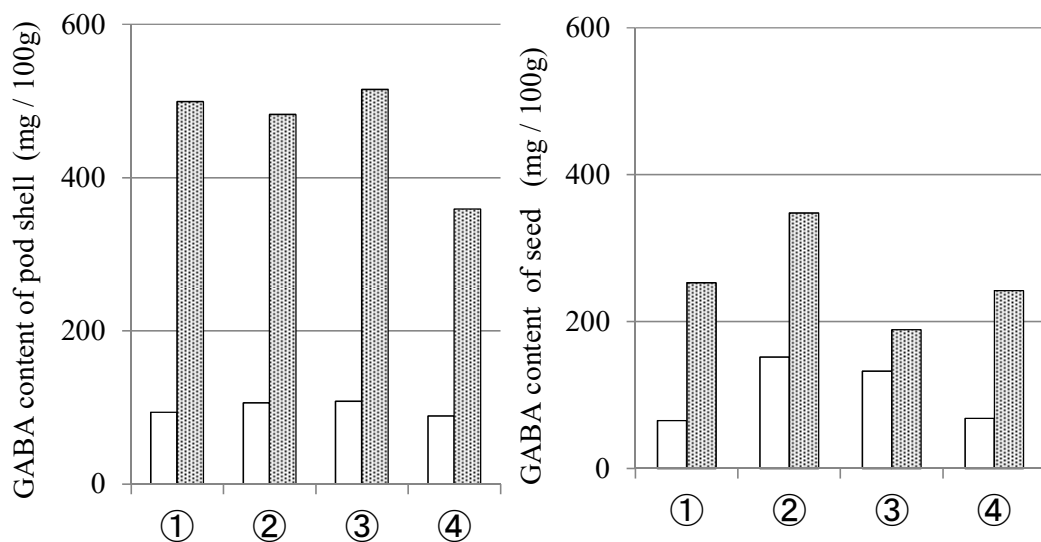


Fig. 49 Effect of freezing treatment on immature soybean.  
 White bar: blank, Filled bar: freezing treatment  
 Left: pod shell slurry, Right: seed slurry.  
 ①: edamame (district: nakasatunai), ②: shrone-cyamame, ③: bansyakumame,  
 ④: koumimame

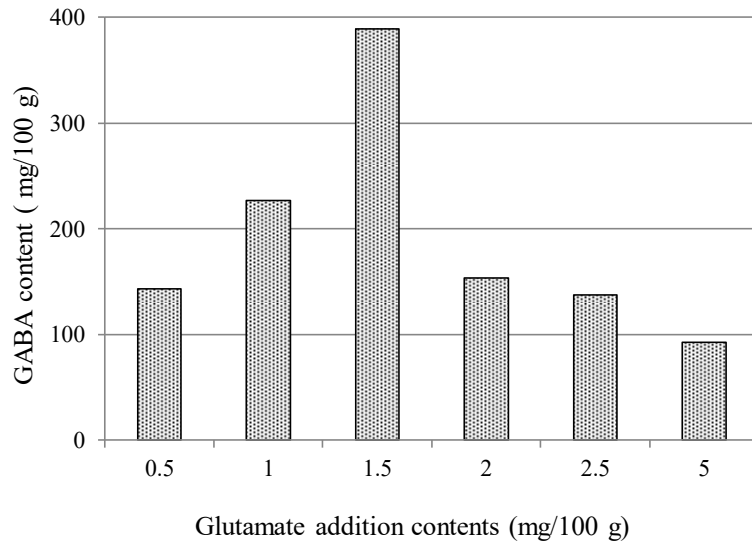


Fig. 50 Effect of glutamate addition content on GABA content of immature soybean slurry at 35°C.

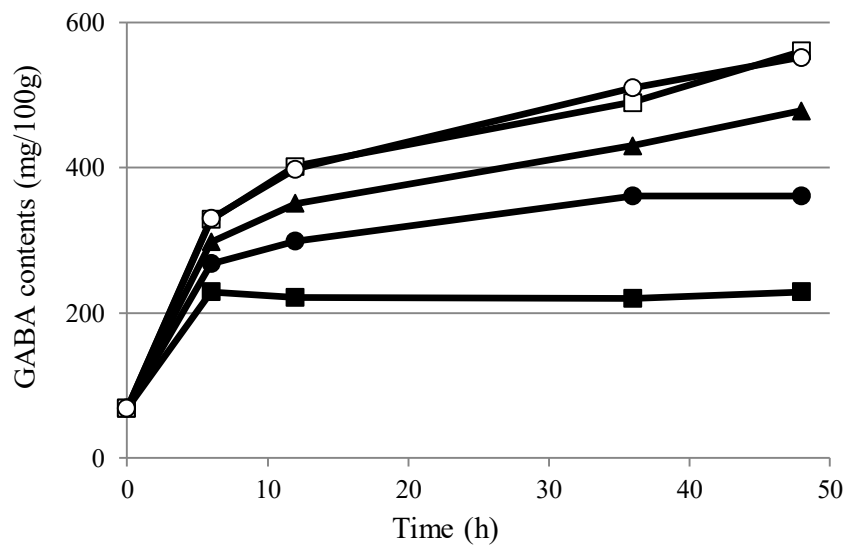


Fig. 51 Effect of glutamate addition times on immature pod shell slurries ■: Once, ●: Three times, ▲: Five times, ○: Ten times, ◻: Twenty times.



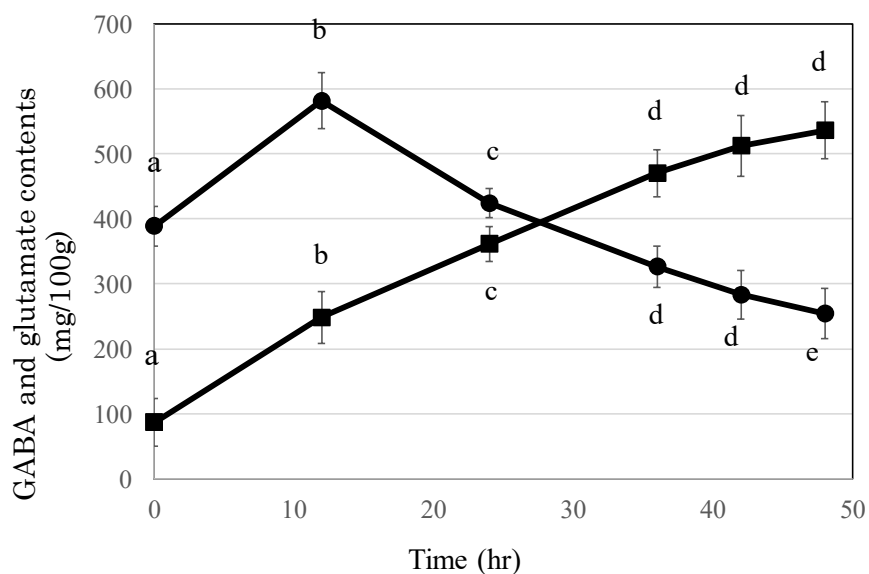


Fig. 52 GABA and glutamate contents on immature pod shell slurries.  
 ■: GABA, ●: glutamate  
 Different superscript letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ .  
 Mean  $\pm$  SE, n=5

Table 12 GABA content of immature soybean pod shell slurries.

	GABA contents (mg / 100g)	Weight (g)	GABA yield (%)
Crude extract	519.5	630	100
Heat treatment	603.9	534	96.4
Filtration	843.2	207	52.2



Fig. 53 Immature soybean pod shell powder enriched with GABA



Fig. 54 Dried immature soybean enriched with GABA

### 3-4 考察

#### 大豆生育時期、部位による GABA 含量の変化について

GABA 含量は完熟豆類の種類により異なっており、完熟大豆は 4mg/100g で他の豆類より低い値であった。大豆は生育時期により GABA 含量が大きく異なり、発芽期と登熟期で GABA 含量が増加した。特に登熟期で GABA が生成し、登熟前期に莢中に 81.1mg/100g 蓄積し、登熟後期で 27.9mg/100g に減少した。豆中は、登熟後期に最も GABA 含量が蓄積し、68.3mg/100g であった。GABA は登熟前期に莢に蓄積し、豆中に移行し、蓄積している可能性が示唆された。さらに生育が進んだ完熟大豆は 4mg/100g になり、登熟後期から完熟期へ豆中の GABA 含量が急激に減少した。

このように登熟前期に GABA 含量が最も高く、登熟が進むと減少する現象はトマトでも報告されている。一般的な栽培品種のトマトでは、果実内 GABA 含量は果実肥大が止まる緑熟期に最大に達し、果実が赤色に着色し始まるブレイカーステージを境に、完熟期に急激に減少すると報告している (Rolin et al. 2000)。

植物中の GABA 生理機能についてはいくつか報告があり、細胞内 pH の調節、浸透圧の調節、花粉管伸長の制御 (Shelp et al. 1999; Palanivelu et al. 2003)、食害および病原菌に対する防御 (Seifi et al. 2013)、細胞伸長の抑制 (Renault et al. 2011) などの多様な生理反応への関与が示唆されている。本研究では登熟前期の莢に最も GABA が蓄積し、登熟後期は豆中に蓄積したことより、登熟大豆中の GABA の生理機能は食害および病原菌に対する防御である可能性が考えられる。しかし、その機構については未だに解明されていない。

登熟大豆の GABA 生成反応の最適温度は 35°C であったが、発芽大豆は 65°C で、最適温度に約 30°C の差が生じていた。この GABA 生成反応が GAD の反応であると仮定し、この結果より、以下の 2 つの仮説を設定した。

- (1) GABA 生成酵素 (GAD) 自体の最適温度帯が広範囲で、1 種類の酵素で幅広い温度帯で酵素反応が進む。
- (2) 発芽大豆、登熟大豆で生体中の GABA 生成酵素 (GAD) の酵素化学的性質が異なり、大豆生育時期により 2 種類の異なった GABA 生成酵素 (GAD) が存在する。

GABA 生成反応の最適 pH を検討した結果、発芽大豆の最適 pH は pH6 であったが、登熟大豆の最適 pH は pH5~pH8 と比較的広範囲であり、異なった最適 pH であった。

この結果、発芽大豆、登熟大豆で最適温度、最適 pH の数値に違いがあり、発芽大豆と登熟大豆中の GAD の酵素化学的性質が異なると考えられることから、大豆は生育時期により 2 つの異なった GAD が存在している可能性が示唆された。

大豆ゲノムデータベースにより、GAD 遺伝子の検索を行った結果、大豆中に配列が少し異なった 2 種類の GAD 遺伝子が存在していることが確認できた。

現在までに、動物や微生物中の GAD についてはいくつか報告がある。動物中には 2 つの異なる GAD が発現し、1 つは神経系で神経伝達系の制御に関わっており、もう 1 つは肝臓、心臓、血液中に存在するとしている (Ueno 2015)。また、微生物については、大腸菌が 2 種類の GAD、麹菌が 8 種類、マッシュルームが 2 種類の GAD が発現するという報告がある (Ueno 2015)。しかしながら、植物での GAD の種類についての報告は少なく、新たな知見の可能性があると考えられた。

### 嫌気条件・好気条件での GABA 含量

発芽大豆を嫌気条件、好気条件下で各 3 時間反応して GABA 量を比較した結果、嫌気条件で GABA が大きく増加、アラニンが微増し、グルタミン酸、アスパラギン酸が減少するが、好気条件では GABA の増加量が少なく、アスパラギン酸が微増、アラニンが減少する傾向があった。澤井らは、茶葉を嫌気条件下で反応することでグルタミン酸、アスパラギン酸が減少し、GABA、アラニンが増加する傾向があるが、好気条件ではグルタミン酸、アスパラギン酸が増加し、アラニンが減少する傾向があるが GABA 量には変化がないと報告している (澤井ら 2002)。すなわち、嫌気条件では主にアスパラギン酸からグルタミン酸を経由して GABA が生成し、アラニンも増加するが、好気条件では逆にアラニンから主にグルタミン酸とアスパラギン酸が生成すると報告している (Fig. 55) (澤井ら 2002)。本研究の結果も同じ傾向であった。

### 凍結融解による GABA 含量増加のメカニズムについて

GABA 高含有乾燥枝豆試作方法として、凍結融解処理 (−20℃で 48 日冷凍保存後、30℃で 12 時間解凍) を行った結果、GABA 含量は無処理と比較して莢が約 3.5~5 倍、豆が約 1.5~3 倍に増加した。凍結融解処理による GABA 含量増加のメカニズムは、(1) 細胞膜損傷、(2) 凍結濃縮 (基質や酵素が濃縮) の 2 つが考えられる。

- (1) 食品の凍結により、枝豆細胞中の凍結水が結晶化し、冷凍保存中に氷結晶が成長し、枝豆細胞膜に物理的ダメージ (損傷) を与える。損傷した細胞膜を GAD やグルタミン酸が通り抜けやすくなり、融解後に酵素と基質が反応する機会が増加し、GABA 含量が増加する。
- (2) 食品の凍結により、細胞中の凍結水が結晶化し、氷結晶相と凍結濃縮相に相分離した

状態になる。食品の冷凍保存中にさらに氷結晶率が増加し、濃縮相での凍結濃縮が進行する (川合 2016)。枝豆細胞中の濃縮相で濃縮された GAD やグルタミン酸による脱炭酸酵素反応は、反応速度が速くなり、GABA 生成速度が速くなる。

### **GABA 高含有粉末、乾燥枝豆試作について**

大豆生育時期で最も GABA 含量が高かった登熟前期莢の呉を用いて、GABA 高含有粉末を試作する検討を行った。呉にグルタミン酸を添加することで GABA 含量が増加するが、1 回のグルタミン酸の添加量が 2mg/100g 以上になると、GABA 生成量が低下する傾向があった。また、グルタミン酸を回分添加する回数は 10 回を超えると GABA 含量が低下した。グルタミン酸の水への溶解度が 1%程度で、それ以上は加温しないと溶解しないことや GAD の基質濃度阻害や生成物濃度阻害などの阻害が起きている可能性が考えられる。

パイロットスケールで晩酌豆の莢呉にグルタミン酸を 10 回に分けて回分添加し、15°C、48 時間反応を行い、凍結乾燥した粉末の GABA 含量は 560mg/100g であった。宮間らは、麴を用いて 5%高濃度塩分下でのグルタミン酸回分添加を行い、5 日以上発酵させ、500mg/100g 以上の GABA 高含有味噌を作成した (宮間ら 2000)。本研究においても同等以上の GABA を含有した枝豆莢粉末の試作が可能であった。

さらに、晩酌豆莢呉を加熱処理、フィルタープレスろ過して莢残渣 (不溶性食物繊維) を除去し、843.2 mg/100g の GABA を含有した乾燥粉末を試作することが可能であった。

他の報告では、緑黄色野菜のカボチャを用いた GABA 高含有粉末作成の検討を行った結果、反応液を pH5~pH6 に調整し、グルタミン酸を回分添加することで 363.0mg/100g の粉末が得られたとしている (Uzawa et al. 2002)。また、米胚芽は 250~500mg/100g まで高めることができたと報告している (Saikusa et al. 1994)。これらの報告と比較して、本研究で試作した枝豆莢粉末が最も GABA 含量が高かった。

枝豆莢の成分を分析した結果、約 70%が食物繊維で、他に炭水化物、蛋白質と灰分を含有していた (Table 13)。このことより食物繊維を除去することで、粉末中の GABA 含量が飛躍的に高くなると考えられ、枝豆莢は優れた GABA 生成酵素素材である可能性が示唆された。

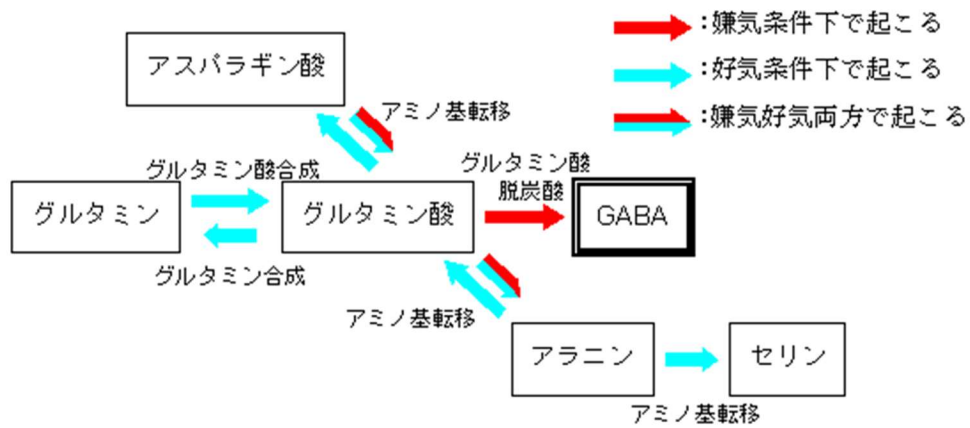


Fig. 55 Heavy nitrogen metabolic pathways\*)

\*) Sawai (2002)

Table 13 Composition of dried pod shell and seed

	Contents (%)					
	Water	Protein	Lipid	Carbo hydrate	Ash	Diatary fibers
Dried pod shell	3.1	7.8	2.1	12.7	5.1	70.1
Dried seed	3.6	23.6	12.8	18.2	3.3	10.3

### 3-5 まとめ

第3章では大豆生育時期や部位による GABA 含量の変化を研究し、GABA 生成機構を検証するとともに、最も GABA 含量が高かった登熟前期の枝豆莢を GABA 生成酵素素材として利用し、食品への健康機能付与の研究を行った。具体的には、枝豆莢を用いた GABA 高含有乾燥粉末の試作と GABA 高含有乾燥枝豆の試作を行った。

大豆は生育時期で GABA 含量が大きく変化し、発芽期と登熟期に GABA 含量が高くなる傾向があった。この時期に GAD の発現が起こっている可能性が示唆された。また、2つの時期で、GAD の酵素化学的性質が異なっており（最適温度、最適 pH）、性質が異なった2種類の GAD が発現している可能性が示唆された。

大豆ゲノムデータベースにより、GAD 遺伝子の検索を行った結果、大豆中には配列が少し異なった2種類の GAD 遺伝子が存在していることが確認された。

最終的に晩酌豆莢を用いることで、GABA 高含有粉末 (843.2mg/100g) を試作した。また、しろね茶豆を凍結融解処理することで、329mg/100g の GABA 含有の乾燥枝豆を試作した。

## 総論

本論文は、これまであまり利用されてこなかった生全脂大豆粉の新たな食品加工への利用を最終目的として、食品加工中の品質劣化や有価物生成の機構について検証し、その機構に対しての生全脂大豆粉中の酵素の効果、機能について研究を行い、大豆粉の加工食品への新たな品質劣化抑制機能の付与について用途開発を行った。

また、大豆加工工程で出る副産物を酵素素材として利用して、有用物質の生成、蓄積の研究を行い、大豆粉の食品加工への健康機能の付与について用途開発を行った。その結果、本論文では以下の知見が得られた。

### 大豆粉成分トリプシンインヒビター (TI) の水産加工食品への品質劣化抑制効果

大豆ホエー粉末をすり身に添加することにより、すり身の加熱工程で起こる「戻り」現象による物性低下、加熱歩留まりの低下を抑制した。SDS-PAGE の結果より、大豆ホエーの冷凍すり身加熱工程の「戻り」現象抑制効果は、大豆ホエーがイトヨリ内在プロテアーゼの活性を阻害し、すり身の 200kDa 付近のミオシン重鎖 (MHC) の分解を抑制したことによる可能性が示唆された。TI 製剤が MHC の分解を抑制したことから、主に大豆ホエー中の TI が内在セリンプロテアーゼの MHC 分解を抑制している可能性が示唆された。

すり身原料の魚種により加熱歩留まりの向上効果に差があり、イトヨリやエソに対しては加熱歩留まり向上効果が高いが、スケソウやホッケの効果は低かった。

ザイモグラフィ法によるプロテアーゼ阻害剤の検討の結果、イトヨリの内在プロテアーゼはセリンプロテアーゼ 1 種と金属プロテアーゼ 2 種類である可能性が示唆された。

大豆粉の冷凍エビに対する加熱歩留まり向上効果を検討した結果、加熱全脂大豆粉 (HT-SF) をバナメイエビ重量あたり 2.5% (w/w) 添加して 16 時間浸漬を行うことで、エビの加熱歩留まりは 46% から 58.2% に 1.25 倍向上した。また、エビの食感は硬さを維持しつつ弾力性 (しなやかさ) があり、食感改良効果が認められた。エビの種類により、加熱歩留まり向上効果に差がありバナメイエビ、ホワイトエビ、ピンクエビで効果が高かった。

SDS-PAGE を行った結果、HT-SF 添加で、200kDa 付近の MHC タンパクバンドの消失が抑制された。SBTI 製剤添加の検討を行った結果、バナメイエビの歩留まり向上効果は、大豆中 TI のセリンプロテアーゼ阻害剤効果である可能性が示唆された。エビ加工食品のエビフライを試作して物性評価、官能評価した結果、HT-SF 添加でエビの加熱歩留まりが 63% から 79% へ向上し、食感改良効果も認められた。

エビフライ衣のサクサク感の食感音響評価を行った結果、HT-SF 添加で 700~1,500Hz,



2,500~4,500Hz の音圧 (db) が増加し、官能評価と同様に衣のサクサク感が改良したことが確認できた。HT-SF 添加でエビの加熱歩留まりが向上し、加熱によるエビからの水分溶出量 (ドリップ量) が抑えられ、衣への水分移行が抑制された可能性が示唆された。

エビ浸漬後の浸漬液の遊離アミノ酸含量を検討した結果、SBTI, HT-SF, E-64, pepstatin A 添加により浸漬液中の遊離アミノ酸量の増加が抑制され、エビはセリンプロテアーゼのほか、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼを内在する可能性が示唆された。

この知見を基に、大豆粉を用いて、水産物用品質改良剤 3 種類 (すり身品質改良剤プラスメート BL, エビ品質改良剤プラスメート SF20, 水産珍味品質改良剤プラスメート SF30 ;日清オイリオグループ社製) を製品化し、上市した。

### 大豆粉成分の冷凍製パン食品加工への品質劣化抑制効果

大豆粉の糖や油脂の含量が少ないリーンな組成の食パンでの二次発酵後の冷凍障害抑制効果について検討を行った。加熱全脂大豆粉 (HT-SF) には添加効果がなかったが、生全脂大豆粉は抑制効果があり、特にリポキシゲナーゼや  $\beta$ -アミラーゼ活性が高い RSF が最も効果が高かった。

RSF 1.0%とグリシンベタイン (GB) 0.5%をパン生地に添加することで、リーンな組成の冷凍生地パンの焼き縮みが抑制され、パンの容積は無添加の 115%に増加した。また食感改良 (硬さを保持しつつ、弾力性を保持) 効果も認められた。すなわち、RSF と GB をリーンな組成のパン生地に添加することで、相乗的に二次発酵後の生地冷凍障害の抑制効果が認められた。生全脂大豆粉が、二次発酵後の冷凍生地に対して冷凍耐性効果を示したのは新たな知見である。

冷凍生地パンへの品質劣化抑制効果のメカニズムについて、以下のように推定した。

- (1) GB が凍結水を引き寄せることで、生地中の凍結水量が減少し、氷結晶の成長が抑制され、パンの冷凍障害が抑制した。
- (2) リポキシゲナーゼ活性や  $\beta$ -アミラーゼ活性が高い RSF を添加した冷凍生地パンの容積増加、食感改良効果が高いことから、2 種類の酵素がパンの冷凍障害抑制に関与している可能性が示唆された。
- (3) 生全脂大豆粉添加生地中に新たに生成した大豆グロブリン中のペプチド MW69,000 がパンの冷凍耐性に関与している可能性が示唆された。

RSF + GB 添加によるパンの相乗的な冷凍障害抑制メカニズムについては、下記の 2 つが考えられた。

- (1) GB の水素結合と凍結水の親和性による凍結水量の減少で、氷結晶成長が抑制されることによるグルテンネットワーク構造の維持
- (2) GB と凍結水の親和性による凍結水量の減少により、濃縮相での RSF の濃縮が起こり、RSF 中のリポキシゲナーゼ等の酵素濃度が上昇することで酵素反応速度が上がり、グルテンの酸化が促進し、グルテンネットワークが強化。

### 大豆成分 GABA の生成条件と加工食品への利用

大豆の生育時期による GABA 含量の変化を検討した結果、発芽期と登熟期で GABA 含量の増加がみられ、特に登熟後期の豆が 63.8mg/100g であった。その後、完熟大豆では GABA 含量が 4.0mg/100g に減少した。大豆は生育時期により GABA 含量が大きく異なっていた。

登熟前期は莢中に 81.1mg/100g、豆中に 50.9mg/100g、登熟後期は莢中に 27.9mg/100g、豆中に 68.3 mg/100g の GABA を蓄積していた。大豆は登熟前期の莢中で GABA 量を増やし、登熟後期の豆中に移行して蓄積している可能性が示唆された。

発芽大豆と登熟大豆とで GABA 生成条件を検討した結果、生成最適温度は発芽大豆が 65°C、登熟大豆が 35°C で 30°C の差があった。最適 pH は発芽大豆が pH6.0 で登熟大豆が pH5~pH8 で幅広く最適であった。このことより、生育時期で 2 種類の性質が異なる GAD が存在している可能性が示唆された。大豆ゲノムデータベースによる、GAD の検索により、大豆中に塩基配列が少し異なった 2 種類の GAD 遺伝子が存在していることが確認できた。

最も GABA を蓄積していた登熟前期莢を用いて、GABA 高含有粉末試作の検討を行った。莢 30kg にグルタミン酸を 300g ずつ 10 回、回分添加し、15°C、48 時間の反応を行い、GABA を 519.5mg/100g 含有した粉末を得た。さらに、加熱処理、フィルタープレスろ過による不溶性食物繊維除去工程を行うことで、843mg/100g の GABA を高含有した粉末が得られた。このように、生育時期による GABA 含有量の変化を検討した結果、登熟期大豆である枝豆副産物の莢が GABA 生成酵素剤として利用価値が高いことが分かり、莢を GAD 酵素剤として利用することにより、GABA 高濃度粉末を作成することが可能であった。枝豆莢を利用することで、枝豆製造時の副産物による環境負荷を軽減できる GABA 高含有粉末試作方法を確立できた。

また、有用物質である GABA の健康機能を加工食品に付与する目的で、凍結融解処理を

行い, 乾燥枝豆の試作を行った. 登熟大豆のしろね茶豆を $-20^{\circ}\text{C}$ で48日間冷凍保存後, $30^{\circ}\text{C}$ で12時間融解処理を行い, 殺菌工程をスチーム加熱で行うことで,  $329\text{mg}/100\text{g}$ のGABAを含有する乾燥枝豆を試作できた. 乾燥枝豆中のGABA含量は無処理の約2.5倍に増加した.

## 文献

- Abdou, AM., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., and Yokogoshi, H.: Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors*, **26**: 201-208 (2006)
- Abe, T., and Takeya, K.: Difference in  $\gamma$ -aminobutyric acid content in vegetable soybean seeds. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **52**: 545-549 (2005) (in Japanese)
- Bowman, D.E.: Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **63**: 547-550 (1946)
- Birk, Y.: Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and o-chymotrypsin from soybean. *Biochem. Biophys. Acta.*, **54**: 378-381 (1961)
- Cameli, E., Moas, M., Reznick, AZ., and Coleman, R.: Matrix metalloproteinases and skeletal muscle. *A brief review. Muscle and Nerve*, **9**: 191-197 (2004)
- Capitani, G., Biase, DDe., Aurizi, C., Gut, H., Bossa, F. and Grutter, MG.: Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase, *EMBO J.*, **22**:4027-4037 (2003).
- Cho, YR., Ji, YC., and Hae, CC.: Production of  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its Neuroprotective Effect on Neuronal Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**: 104-109 (2007)
- Coleman, ST., Fang, T.K., Rovinsky, SA., Turano, FJ., and Moye- Rowley, WS.: Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **276**: 244-50 (2001)
- Eakpetch, P., benjakul, S., Visessanguan, W., and Kijroongrojana, K.: Autolysis of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Meat: Characterization and the effect of protein additives. *Journal of Food Science*, **73**: 95-103 (2008)
- Frattali, V.: Soybean inhibitors. *J.Biol. Chem.*, **244**: 274-280 (1968)
- Friedman, M. and Brandon, D.: Nutritional and nealth benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 1069-1086 (2001)
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, HH., and Yamori, Y. : Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched diary product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wister-Kyoto rats. *J. Nutr.*, **92** :411-417 (2004)
- Hefft, S., Kraushaar, U., Geiger, JR., and Jonas, P.: Presynaptic short-term depression is maintained during regulation of transmitter release at a GABAergic synapse in rat hippocampus.

- J. Physiol.*, **539**: 201-208 (2002)
- Hughes, AL., Green, JA., Piontkivska, H., and Roberts, RM.: Aspartic proteinase phylogeny and the origin of pregnancy-associated glycoproteins. *Molecular Biology and Evolution*, **20**: 1940-1945 (2003)
  - Imai, K., Kikuta, T., Kobayashi, M. and Matsuda, K.: An  $\alpha$ -1,3-glucanase from *Streptomyces* sp. KI-8: Production and purification. *Agric. Biol. Chem.*, **41**: 1339-1346 (1977)
  - Katagiri, M., and Shimizu, S.: GAMMA-Amino butyric acid accumulation in bean sprouts (Soybean, black gram, green gram) treated with carbon dioxide. *Japanese Society for Food Science and Technology*, **36**: 916-919 (1989) (in Japanese).
  - Kennedy, A.R.: Troll W, Kennedy AR eds. Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents, 9-64 Plenum Publishing Corp. New York (1993)
  - Kitamura, K., Kumagai, T., and Kikuchi, A.: Inheritance of lipoxygenase-2 and -3 isozymes in soybean seeds. *Jpn. J. Breed*, **35**: 413-420 (1985)
  - Kitamura, R., Robnson, J.P., Golob, T.F., Bradley, M.A., Leonard, J., Van der Hoorn, T.: A comparative analysis of time use in the Netherlands and California. in *Proceedings of the 20<sup>th</sup> PTRC Summer Annual Meetings Seminar E* (PTRC, London) :127-138 (1992)
  - Kinefuchi, M., Sekiya, M., Yamazaki, A., and Yamamoto, K.: Accumulation of GABA in Brown Rice by High Pressure Treatment. *Nippon Shokuhin Kagaku kogaku kaishi*, **46**: 323-328 (1999) (in Japanese)
  - Kitagawa, N., Mazon, H., Heck, AJ., and Wilkens, S.: Stoichiometry of the peripheral stalk Subunits E and G of yeast V1-ATPase determined by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **283**: 3329-3337 (2008)
  - Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., and Simpson, BK.: Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelmis*). *Food Chemistry*, **100**: 1580-1589 (2007)
  - Klomklao, S.: idestive proteases from marine organisms and their applications. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **30**: 37-46 (2008).
  - Komai, K., and Murase, N.: Water sorption behavior of glycine betaine and the state diagram of its aqueous system. *Water Properties of Food, Pharmaceutical and Biological Materials*: 647-654 CRC Press, Taylor & Francis, Group. Florida (2006)
  - Kunitz, M.: Crystallization of trypsin inhibitor from soybean. *Science*, **101**: 668-669 (1945)

- Larsen, A., Veyra, TD., Jia, Z., Wells, A., Dutt, P., and Elce, JS.: Expression of human, mouse, and rat m-calpains in *Escherichia coli* and in murine fibroblasts. *Protein Expression and Purification*, **33**: 246-255 (2004)
- Losso, J. N.: The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.*, **48**: 94-118 (2008)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*: 265-275 (1951)
- Matoba, T., Hidaka, H., Narita, H., Kitamura, K., Kaizuma, N. and Kito, M.: Lipoyxygenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean Homogenate. *J. Agric. Food Chem.*, **33**:852-855 (1985)
- Matubara, F., Ueno, H., Tadano, K., Suyama, T., Imaizumi, K., and Suzuki, K.: Effect of GABA supplementation on blood pressure and safety in adults with mild hypertention. *Pharmacol. Ther.*, **30**: 963-972 (2002)
- Mitsuishi, Y., Kobayashi, M. and Matsuda, K.: Dextran  $\alpha$ -1,2-debranching enzyme from *Flavobacterium* sp. M-73: Its production and purification. *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 2283-2290 (1979)
- Nomura, M., Kimoto, H., Soneya, Y., Furukawa, S. and Suzuki, I.: Production of  $\gamma$ -Aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, **81**: 1486-1491 (1998)
- Ohisa, N., Ohno, T., and Mori, K.: Free Amino Acid and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid contents of germinated rice. *Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi*, **50**: 316-318 (2003) (in Japanese)
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., and Preuss, D.: Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, and ArabGidopsis gene that controls GABA levels. *Cell*, **114**: 47-59 (2003)
- Renault, H., Amrani, AE., Palanivelu, R., Updegraff, YuA., and Renou, JP.: GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in cell wall-related proteins in arabidopsis thaliana. *Plant and cell physiol.*, **52**: 894-908 (2011)
- Rolin, D., Baldet, P., Just, D., Chevalier, C., Biran, M., and Raymond, P.: NMR study of low subcellular pH during the development of cherry tomato fruit. *Aust. J. Plant. Physiol.*, **27**: 61-69 (2000)
- Rooke, L., Bekes, F., Fido, R., Barro, F., Gras, P., Tatham, A., Barcelo, P., Lazzeri, P., and Shewry, P.: Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J. Cereal Sci.*, **30**: 115-120 (1999b)

- Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y.: Distribution of free amino acids in the rice kernel and Kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1122-1125 (1994).
- Seifi, HS., Curvers, K., Vleesschuwer, DD., Delaere, I., Aziz, A., and Hofte, M.: Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. *New Phytologist.*, **199**: 490-504 (2013)
- Shelp, BJ., Bown, AW., and McLean, MD.: Metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.*, **4**: 446-452 (1999)
- Shiiba, K., Negishi, Y., Okada, K., and Nagao, S.: Purification and characterization of lipoxygenase isozyme wheat germ. *Cereal Chem.* **68**:115-122 (1991)
- Shimada, K., Nomura, H., Hara, Y., Fujimoto, F., and Kitamura, K.: Effect of soybean lipoxygenase on sensory taste of Tofu. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **45**: (chium rosenbergii) 122-128 (1998) (in Japanese)
- Sriket, C., Benjakul, S., and Visessanguam, W.: Characterisation of proteolytic enzymes from muscle and hepatopancreas of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Science of Food and Agriculture*, **91**: 52-59 (2011a)
- Sriket, C., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Hara, K.: Effect of legume seed extracts on the inhibition of proteolytic activity and muscle degradation of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): *Food Chemistry*, **129**: 1093-1099 (2011b)
- Sriket, C.: Proteases in fish and shellfish Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal*, **21**:433-445 (2014)
- Stewart, N., Feng, J., Liu, X., Chaudhuri, D., Foster, JW. and Drolet, M.: Loss of topoisomerase I function affects the RpoS-dependent and GAD systems of acid resistance in *Escherichia coli* *Microbiology*, **151** : 2783-2791 (2005)
- Surrey, K.: Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, **94**: 1225-1232 (1964)
- Tanimoto, S., Yamashita, T. and Seki, N.: Effect of pig plasma components on the modori of walleye Pollack surimi gel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **70**: 194-199 (2004) (in Japanese)
- Totsuka, Y., Hada N., Matsumoto K., Kawahara, N., Murakami, Y., Yokoyama, Y., Sugimura, T., and Wakabayashi, K.: Structural determination of a mutagenic amino phenylnorharman produced by the

- co-mutagen norharma with aniline, *Carcinogenesis*, **19**: 1995-2000 (1998)
- Tsushida, T., and Murai, T.: Conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 2865-2871 (1987)
  - Tramonti, A., Canio, MDe., Delany, I., Scarlato, V. and Biase, DDe.: Mechanisms of transcription activation exerted by GadX and GadW at the gadA and gadBC genepromoters of the glutamate-based acid resistance system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **188**: 8118-27 (2006)
  - Ueno, H.: Role of GABA-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, at the expression sites. *Journal of Japanese Biochemical Society*, **87**: 333-336 (2015) (in Japanese)
  - Ueno, S., Katayama, T., Watanabe, T., Nakajima, K., Hayashi, M., Shigematsu, T., and Fujii, T.: Enzymatic production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in soybean using high hydrostatics pressure and precursor feeding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**: 706-713 (2013)
  - Ueno, Y., Hiraga, K., Mori, Y., and Oda, K.: Isolation and utilization of lactic acid bacterium, producing a high level of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *Seibutsu-kogaku kaishi*, **85**: 109-114 (2007) (in Japanese)
  - Uzawa, M., Okuyama, S., Murata, M., Sato, R., and Omori, M.: Development of manufacturing process of squash products rich in  $\gamma$ -aminobutyric acid, and an effect of the products on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **49**: 573-582 (2002) (in Japanese)
  - Uzawa, M., Okuyama, S., Murata, M., Sato, R. and Omori, M.: Development of manufacturing process of squash produces rich in  $\gamma$ -aminobutyric acid, and an effect of the products on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Nippon Shokuhin kagaku Kogaku Kaishi*, **49**, 573-582 (2002) (in Japanese)
  - Vania OS., and Welbiao Z.: Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers. *J. Cereal Science*, **45**: 1-17 (2007)
  - Varriano-Marston, E., Huang, G., and Ponte, JG.: Comparison of methods to determine starch gelatinization in bakery foods. *Cereal Chem.*, **69**: 495-501(1980).
  - Whitaker, JR.: Protease and  $\alpha$ -amylase inhibitors of higher plants. *Antinutrients and Phytochemicals in Food*, **662**: 10-30 (1997)
  - Zimmerman DC., and Vick BA.: Specificity of flaxseed lipoxidase. *Lipids*, **5**: 392-397 (1970)
  - 荒木紀美, 田中奈穂美, 萩原歩美, 波多野智子, 小林幹彦: 多糖ゲルによる糖質加水分解酵素のアフィニティークロマトグラフィー, 実践女子大学 生活科学部紀要, **47**: 71-77



(2010)

- ・伊賀大八: 冷凍生地に使用される生地改良成分について: 第6回「冷凍生地アドバンスコース」 「冷凍生地に使用される生地改良成分について」 日本パン技術研究所, 2014 (東京)
- ・井沢真吾: 大豆ペプチドの利用による食品有用微生物の品質改善とその分子機構の解析. 大豆たん白研究, **11**: 61-66 (2008)
- ・臼井一茂, 渡辺悦生: 冷凍及び生鮮クロカジキの K 値による鮮度の変化. 神水セ研報, **5**: 11-14 (2012)
- ・茅原紘, 杉浦友美: 近年の GABA 生理機能研究—脳機能改善作用, 高血圧作用を中心に—. 食品と開発, **36**: 4-6 (2001)
- ・大羽和子, 中野純子: 大豆素材添加食パンの製パン性, 物性および食味特性: 日本家政学会誌, **47**: 21-27 (1996)
- ・岡田忠司, 杉下朋子, 村上太郎, 村井弘, 三枝喜代, 堀野俊郎, 小野田明彦, 梶本修身, 高橋励, 高橋丈夫:  $\gamma$ -アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期神経障害に対する効果. 日本食品科学工学会誌, **47**: 596-603 (2000)
- ・小関聡美, 藤井陽介, 加藤登, 安永廣作, 北上誠一, 新井健一, スケトウダラとパシフィック・ホワイトニングの混合肉糊から調製した坐りを伴った加熱ゲルと坐りを伴わない加熱ゲルの品質に対する牛血漿粉末の効果: 東海大紀要海洋学部「海-自然と文化」, **4**: 21-29 (2006).
- ・小寺智博: ダイズ由来新規プロテアーゼの効率的調整法確立と, 新規プロテアーゼで調整したタンパク質加水分解物の機能特性評価. 京都大学学位論文 (2006)
- ・片桐充昭, 清水純夫: 大豆もやし生育中の二酸化炭酸ガス処理による  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 生成と低温保存中における GABA の消失. 日本食品低温保蔵学会誌, **20**: 181-185 (1994)
- ・勝部昭明: 味と匂いセンサの研究・開発動向. 電学論 E, **122**: 296-299 (2002)
- ・加藤登, 北上誠一, 及川寛, 安永廣作, 矢野豊, 小関聡美, 新井健一: 二魚種混合肉糊のゲル化に伴う筋原線維タンパク質の変化と牛血漿粉末の影響. 東海大紀要海洋学「海-自然と文化」, **3**: 41-50 (2005)
- ・加藤登, 鈴木康宏, 國本弥衣, 北上誠一, 村上由里子, 新井健一: 三種の魚肉すり身製加熱ゲルの物性及ばす豚血漿と卵白粉末の添加効果の比較. 食科工, **57**: 26-31 (2010)
- ・川井清司: 凍結濃縮による食品のガラス転移と浸透圧脱水. 伝熱, **55**: 18-28 (2016)
- ・河合弘康, パン酵母の冷凍障害と冷凍耐性公酵母. 化学と生物, **31**: 374-381 (1993)

- ・ 宜寿次盛生, 澤井祐典, 許斐健一, 小高保喜, 吉富均, 山口優一, 深山大介, 竹内敦子: 嫌気-好気交互処理による茶葉の  $\gamma$ -アミノ酪酸量の増加. 日本食品科学工学会誌, **46**: 462-466 (1999)
- ・ 澤井祐典. 茶葉中  $\gamma$ -アミノ酪酸の生成経路の解明と血圧降下作用の評価: 2002 年野菜茶業研究所報告. 農研機構 (2002)
- ・ 杉田亜希子, 岡田正道, 谷明代, 箕田正史, 山口庄太郎: *Bacillus flexus* 由来の耐熱性  $\beta$ -アミラーゼについて. 日本応用糖質科学会誌, **9**: 194-200 (2011)
- ・ 四十九院成子, 吉田恵子, 福場博保: 黒緑豆プロテアーゼインヒビターの諸性質について. 栄養と食糧, **32**: 321-327 (1979)
- ・ 高橋希元, 雨宮弘和, 田中宗彦: ホッコクアカエビ *Pandalus eous* に含まれる内在性プロテアーゼが加熱ゲル形成能に及ぼす影響. 日本水産学会誌, **80**: 979-988 (2014)
- ・ 槌本六郎, 三島敏夫, 宇津木照洋, 北島俊一, 矢田殉朗, 保田正人: 動揺の激しい船内で ATP 関連化合物の分離定量: 日本水産学会誌, **51**: 1363-1359 (1985)
- ・ 中村道徳, 貝沼圭二: 澱粉・関連糖質酵素実験法 (生物化学実験法 25), 3-8 (1989)
- ・ 林正和, 田中大介, 村勢則郎: 線虫におけるグリシンベタインの凍結防御効果. 低温生物工学会誌, **61**: 139-143 (2015)
- ・ 藤原元始, 大森義仁, 吉利和, 高木敬次郎, 上條一也監訳: 腎臓の水分保持機構に作用する薬物. グッドマン・ギルマン薬理書 第7版, 1117-1131 (1998)
- ・ 水野時子, 山田幸二: 大豆製品の  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA). 郡山女子大学紀要, **40**: 141-147 (2004)
- ・ 宮間浩一, 岡本竹己:  $\gamma$ -アミノ酪酸含有量を高めた味噌の開発. 栃木県食品工業指導所研究報告, **14**: 10 (2000)

## 謝辞

本研究を行うにあたり、共同研究者として多くのご助言やご指導を頂くとともに、本論文の作成にあたり、終始懇切丁寧な御教示を賜るとともに御校閲の労を賜った東京電機大学大学院 先端科学技術研究科 教授 椎葉究博士に対し、感謝の意を表します。また、東京電機大学名誉教授 村勢則郎博士には、本論文や報文の作成にあたり、いろいろとご教示、ご助言いただきました。こころより御礼申し上げます。

本研究は、日清オイリオグループ株式会社の業務の一部として行われたものであり、本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご協力を頂きました日清オイリオグループ株式会社社員に深く感謝致します。また、学位論文執筆の機会を下さいました、日清オイリオグループ株式会社上田理事 (中央研究所長) に厚く御礼申し上げます。

本研究の1部の共同研究者として、多くのご助言、ご指導を頂いた東京農業大学の皆様に心から感謝を致します。