

氏 名 (本籍)	うめ 梅	や 屋	じゆんいちろう 潤 一 郎
学位の種類	農	学	博 士
学位記番号	農 博 第	2 9 2	号
学位授与年月日	昭和 5 7 年	3 月 2 5 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻		
学位論文題目	大豆蛋白質加熱ゲル生成と流動に関する 研究		

論文審査委員 (主 査)

助教授 山 内 文 男      教授 目 黒      照

教授 金 田 尚 志

# 論文内容要旨

大豆蛋白質は、加熱・塩凝固・凍結・尿素等の変性によってゲルを形成することが知られている。また、このような大豆蛋白質のゲル形成能を活かして、食品にテクスチャー改善、増量、増粘、水分調整を目的として混入、利用されてきた。特に最近の傾向として、テクスチャー改善剤としての用途が多く、加熱によるゲル化は重要な研究課題である。

しかし、大豆蛋白質は化学的に非常に複雑な分子であり、ゲル形成のメカニズムは未だ十分に解明されていない。生成したゲルについても、レオロジー解析を行なった報告は稀で、単にあるずり速度の粘度を測定したにすぎない。これは大豆蛋白質の挙動が鋭敏なため、取り扱いが難しく、ゲル化現象を経時的に捕える測定法が確立していないためと考えられる。

従って、本研究では大豆蛋白質ゲル化の機構の解明を目的として、ゲル化現象を経時的に検討した。この目的を達するために次の諸点についても検討を加えた。

- ゲル構造生成過程の測定法。
- ゲル構造生成の瞬間を捕える測定法。
- 以上を測定できる測定機の作成。

これらによって、蛋白質ゲル化のメカニズム、ゲル構造を支えている結合、ゲルの性質の表現が可能となり、大豆蛋白質の性質のコントロールへの知見が得られ、食品への利用の道が拓ける。

試料としては、酸沈殿蛋白質 (APP\*)、グリシニン (11S グロブリン)、 $\beta$ -コングリシニン (7S グロブリン) の各大豆蛋白質を主に用いた。

## 第1章 大豆蛋白質—水分散系硬軟化特性測定装置・測定プログラム

大豆蛋白質の加熱ゲル生成の測定のために、レオロジーを手段として検討した。ゲル化の濃度依存性を検討した結果、10%以上の濃度で通常ゲル化することが認められた。静置時間、ずり速度勾配・範囲、加熱温度勾配についても検討を加え、モデル・プログラムを作成した。このプログラムを基本として、以降の各プログラムを作成した。(Fig.1)

本プログラム及び応用プログラムの実行のために、粘度計本体に改造を加え、試

料の少量化、測定の高感度化と併せて、コンピューターによる連続測定装置を作成し接続した。(Fig.2)

本測定法による結果と従来法との関連を調べるために、本測定資料、各種市販大豆蛋白質及び各種蛋白質について測定を行なった。この結果本測定法による結果と従来法の結果は良く説明が付き、本測定法による結果の方がゲル生成過程に関してより多くの情報量を持つことがわかった。

## 第2章 ゲル化の蛋白質濃度依存性

測定にあたって、大豆蛋白質分散系及び加熱ゲルの流動特性を測定、分散形態及び加熱ゲルの準構造を検討した。分散系はニュートンを示す濃度、非ニュートンに移る濃度、非ニュートンを示す濃度に分類され、分散形態に差が見られた。生成したゲルは、7Sグロブリンは粘度の高い比較的透明なゲルであり、一方11Sグロブリンはより歴の大きい、白濁したゲルであった。定常ずり試験の結果より、ゲルは三次元ネットワーク構造を持ち時間依存性の流動特性を示すことが知られた。(Fig.3,4)

## 第3章 7Sグロブリン・11Sグロブリンの 加熱ゲル生成挙動の相違について

7S, 11Sグロブリンの性状の違いが何に起因するかを検討するために、イオン強度を変えて測定した。高イオン強度で7Sグロブリンが最も大きい硬化を示し、11Sグロブリンは粘度増加を示さず熱可逆なカーブを示した。(Fig.5) 蛋白質分散系の分散状態はイオン強度に関連し、特に11Sグロブリンは大きな歴を示した。生成したゲルは、強固なゲル程大きな歴を示した。ゲル化のためには11Sグロブリンが7Sグロブリンより大きな凝集体を形成する必要があるが、攪拌により凝集が阻害された。

## 第4章 アルカリ塩のゲル化に及ぼす影響

塩の存在がゲル化に大きな影響を与えることが知られたので、塩の種類を変えて

測定を行なった。加熱ゲルは Hofmeister 順列に一致した硬化を示し、各ゲルに流動特性の差は見られず、同一傾向のゲルを生成した。(Fig.6) アニオンは硬化に大きな影響を与え、カチオンはそれに比べて小さな差を示した。この結果、加熱ゲル生成には疎水相互作用、イオン性結合の寄与が大であることが知られた。

## 第5章 アセチル化のゲル化に及ぼす影響

分子構造とゲル化の関係を知るために、アセチル化によって分子全体のチャージを変えて、分子構造変化を起こした蛋白質について測定を行なった。加熱ゲルはアセチル化の程度に従って硬化を示した。高アセチル化蛋白質は高い粘性と大きなり歴を示し、ほとんどゲル形成の見られなかった11Sグロブリンもアセチル化により高いゲル化能を示した。(Fig.7) アセチル化によるチャージの変化により、蛋白質の凝集、架橋能が高くなったものと考えられる。

## 第6章 還元剤のゲル化に及ぼす影響

アセチル化によるチャージの変化により、蛋白質の構造をほぐすことでゲル化能に改善が見られたので、蛋白質構造を安定化させているもう一つの要因であるS-S結合の寄与について検討を加えた。還元剤として2-Mercaptoethanol, Cysを用いて測定を行なった。

ゲル化は分子間S-S結合を還元する濃度までは低下をし、分子内S-S結合を還元する濃度に達すると著しい上昇を示した。(Fig.8) このことより分子内S-S結合は他の結合と共に分子を安定化させている要因であることが知られた。

## 第7章 RCAM化のゲル化に及ぼす影響

S-S結合のゲル構造への寄与が確認されたので、RCAM化\*\*によりS-S結合を開裂ブロックした蛋白質について測定を行なった。

11Sグロブリンでは低RCAM化蛋白質が高い粘度を示した。一方、7Sグロブリンは高RCAM化蛋白質が高い値を示した。全体として7Sグロブリンが高い値を示し

た (Fig.9) のに対して11Sグロブリンが低い値を示した。S-S結合の分子構造を安定化させる働きについては次のように要約できる。S-S結合の役割は分子構造を安定化させる点にある。S-S結合を切ることにより、蛋白質分子の構造がルーズになるが、この場合他の結合、相互作用により、かなりの割合で構造は残っている。この結果ゲル化能は高められる。一方、S-S結合を切った後加熱・冷却処理を経ると、蛋白質分子の構造が過度にフレキシブルになり、凝集体形成能が劣る。この結果ゲル化能は低下する。

## 第8章 加熱・冷却過程の各温度における流動曲線解析

ゲル性状には蛋白質の凝集力、架橋能が寄与しており、これらには疎水相互作用、イオン性結合、S-S結合の寄与が大であった。そこで、これが加熱・冷却によってどのように関連してゲル化が起こるのかを検討した。各温度における流動特性を測定できるように粘度計を改良して測定した。ゲル化が顕著なAPP, 7Sグロブリンは加熱過程70, 80℃でレオペキシーを示し、これはゲル生成中の挙動を捕えた点で、重要な流動特性である。これを境に、分散系の流動が三次元ネットワークの存在を示す流動となる。(Fig.9)

## 第9章 加熱・冷却過程の各温度におけるC<sup>\*\*\*</sup>Dによる 蛋白質の構造解析

蛋白質のゲル化の過程で70, 80℃が重要な温度であることが知られたが、この温度における蛋白質挙動を検討するために、各温度においてCDを測定した。7Sグロブリンは冷却に伴って不規則構造が減少した。一方11Sグロブリンは加熱に伴って不規則構造が増加した。側鎖の強度は7Sグロブリンでは冷却中に低下した。

(Fig.10, 11)

## 第10章 総括

大豆蛋白質分散系は加熱・冷却に伴って、凝集・架橋・補強の順でゲル化した。

従来言われてきたように、ゲル構造の安定化にはS-S結合の寄与が大であった。しかし、S-S結合の寄与の形態は複雑で、「S-S架橋によりゲル化する」という従来の表現ではこの寄与の形態を十分に表現できない、正負の二極性があった。

また、ゲル構造が冷却過程で急激に補強されることにより、イオン性結合の寄与が大と考えられる。特に、ゲル化がイオンに対して鋭敏で、アニオン・カチオン種、あるいはイオン強度に関してゲル化能が著しく異なった。ゲル化に際してHofmeister系列が重要な意味を持っていることから、ゲル化には蛋白質の水和現象、換言すると疎水性相互作用、イオン性結合の寄与が大であることがわかった。

ゲルの生成開始時の流動がレオペキシーとして、過熱過程70~80℃で観測された。レオペキシーは、ゆるい攪拌によって構造が生成するアクティブな系の特性を反映した挙動である。食品系でレオペキシーを捕えた例は他になく、重要な知見であった。

11Sグロブリンはゲル化を示さず、7Sグロブリンはゲル化を示した。CDによる構造解析では、加熱・冷却処理の経歴を示さないが、7Sグロブリンは処理によって規則構造が増加した。

- \* APP : acid precipitated protein
- \*\* RCAM : reduced S-carboxyamid<sub>e</sub>methylated (protein)
- \*\*\* CD : circular dichroism

- J.Umeya, F.Yamauchi, K.Shibasaki,  
"Hardening and Softening Properties of Soybean Protein-water Suspending System"  
*Agric. Biol. Chem.*, **44** (6), 1321~1326, 1980
- 梅屋潤一郎, 山内文男, 柴崎一雄  
大豆蛋白質-水懸濁系硬軟化特性測定法、  
日本食品工業学会誌, **27**(9), 459~463, 1980

○ J.Umeya, F.Yamauchi, K.Shibasaki,

“Hardening and Softening Properties of Soybean Protein-water Suspending Systems,

*Agric. Biol. Chem.*, **45**(1), 233~237, 1981

○ J.Umeya, N.Mitsuishi, F.Yamauchi, K.Shibasaki,

“Effect of Acetylation on Hardening and Softening Properties of Soybean Protein-water Suspending Systems”

*Agric. Biol. Chem.*, **45**(7), 1577~1581, 1981

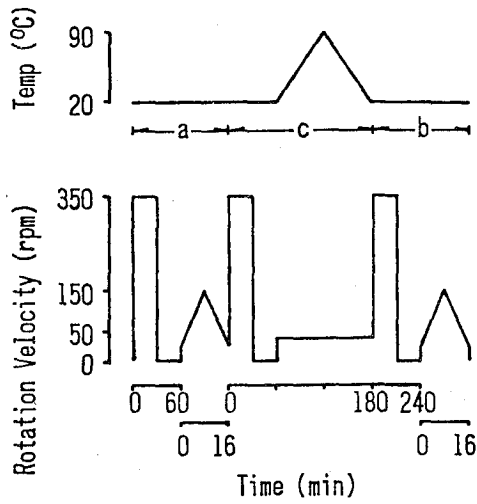


Fig. 1 Measuring programs for testing mechanical and thermal hysteresis response.

Cyclic shearing test under isothermal condition (a,b) and cyclic temperature test under constant rate of shear (c).

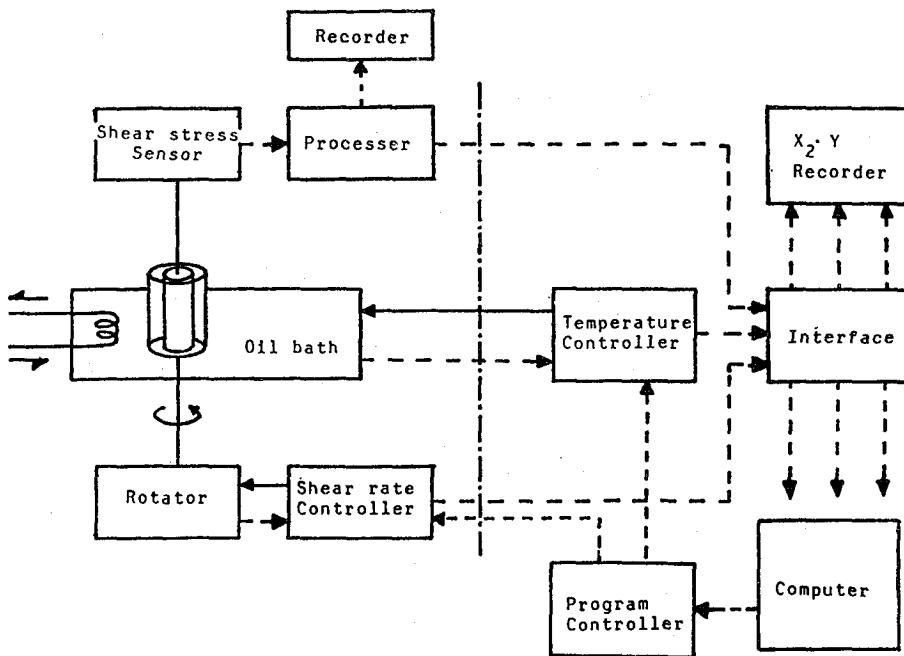


Fig. 2 Block diagram of apparatus, modified coaxial cylinder viscometer with temperature and shear rate controller and interface to computer.



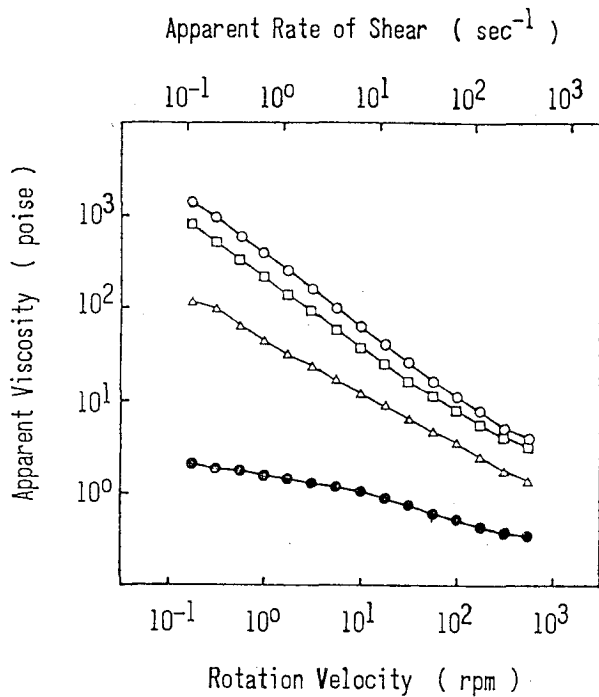


Fig. 3 Effect of concentration on relations of apparent viscosity and apparent rate of shear of 7S globulin heated gels.

14 % (wt/vol);  $\circ$ — $\circ$  , 12 %;  $\square$ — $\square$  , 10 %;  $\triangle$ — $\triangle$  , 8 %;  $\bullet$ — $\bullet$  .

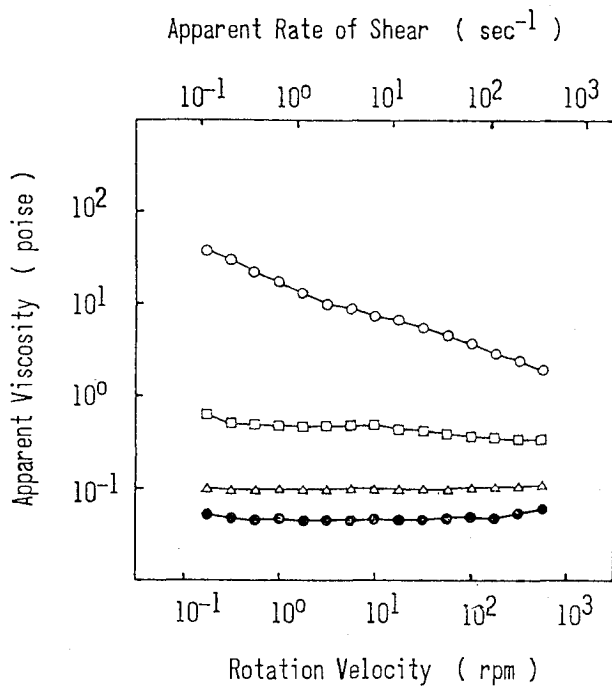


Fig. 4 Effect of concentration on relations of apparent viscosity and apparent rate of shear of 11S globulin heated gels.

14 % (wt/vol);  $\circ$ — $\circ$  , 12 %;  $\square$ — $\square$  , 10 %;  $\triangle$ — $\triangle$  , 8 %;  $\bullet$ — $\bullet$  .

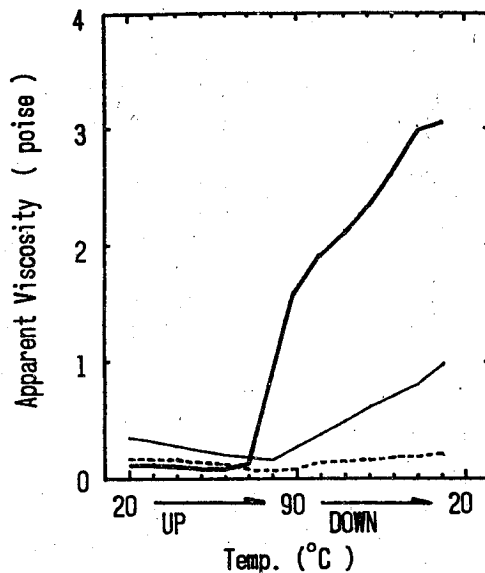


Fig. 5 Temperature effect on apparent viscosity of protein-water suspending systems (12 %, wt/vol) under the shear rate of  $81.2 \text{ sec}^{-1}$  during constant rate ( $\pm 70^\circ\text{C} / 1 \text{ hr}$ ) of heating and cooling process at ionic strength 0.5, 7S globulin:—, 11S globulin;-----, Acid precipitated protein;—.

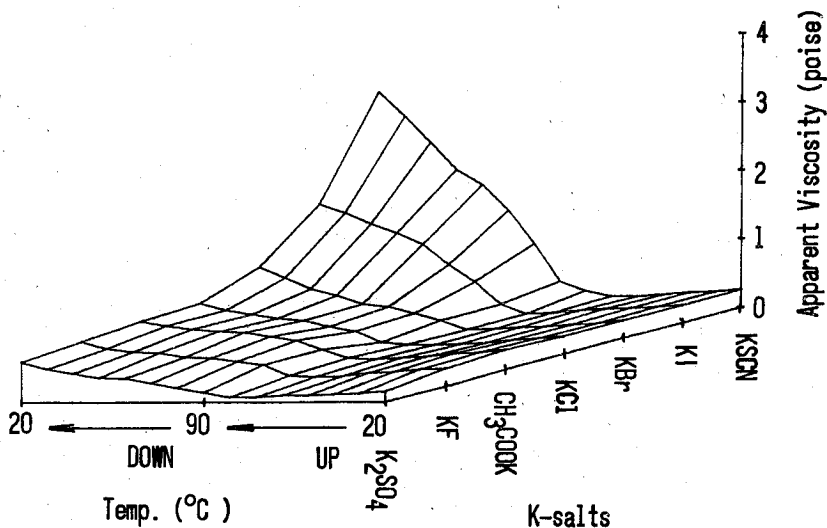


Fig. 6 Temperature effect on apparent viscosity of protein-water suspending systems (12 %, wt/vol) under the shear rate of  $81.2 \text{ sec}^{-1}$  during constant rate ( $\pm 70^\circ\text{C} / 1 \text{ hr}$ ) of heating and cooling period. Concentration of salts were 0.4 M except  $\text{K}_2\text{SO}_4$  which is 0.2 M.

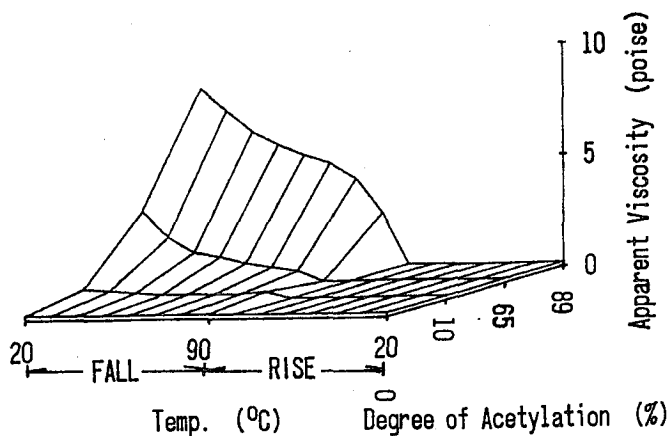


Fig. 7 Temperature effect on apparent viscosity of 11S globulin-water suspending systems (12 %, wt/vol) under the shear rate of  $81.2 \text{ sec}^{-1}$  at constant rates ( $\pm 70^\circ\text{C} / 1 \text{ hr}$ ) of heating and cooling periods.

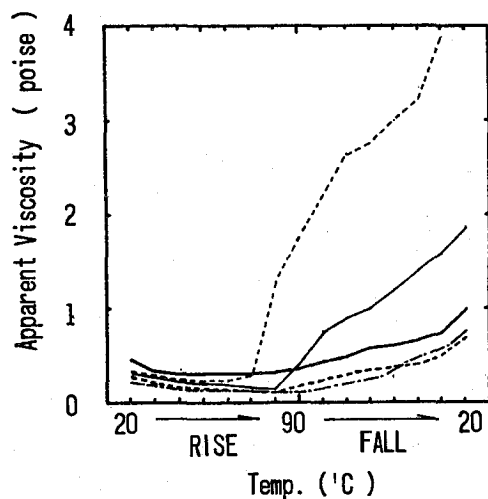


Fig. 8 Temperature effect on apparent viscosity of protein-water suspending systems (12 %, wt/vol) under the shear rate of  $81.2 \text{ sec}^{-1}$  during constant rate ( $\pm 70^\circ\text{C} / 1 \text{ hr}$ ) of heating and cooling process at different concentration of 2-ME.

0 M; ———, 0.01 M; - - - - - , 0.02 M; - · - · - · , 0.03 M; ———, 0.1 M - - - - - .

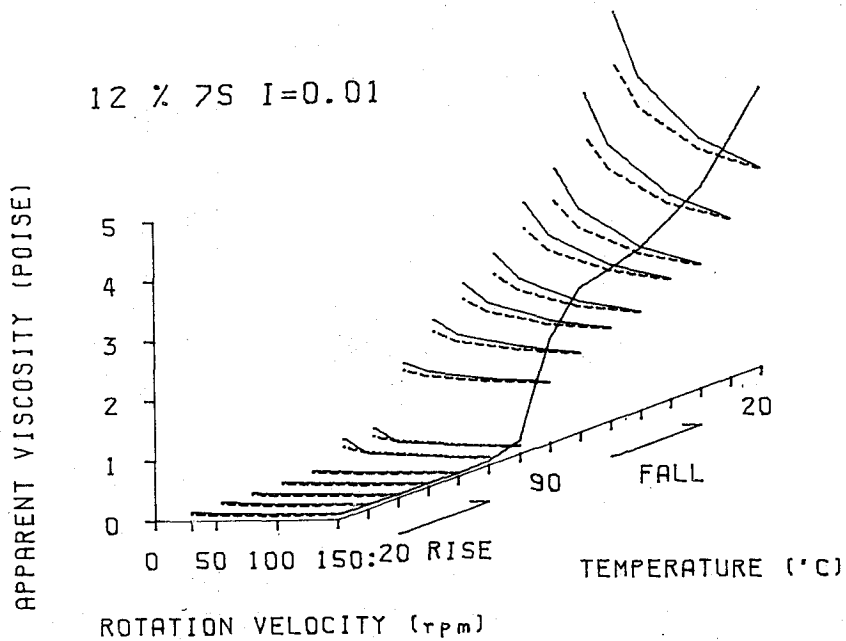


Fig. 9 Effect of temperature on hysteresis relations between apparent viscosity and rotation velocity at actual temperature in rising and falling temperature and temperature effect on apparent viscosity, of 7S globulin-water suspending systems (12 %, wt/vol) at ionic strength 0.01.

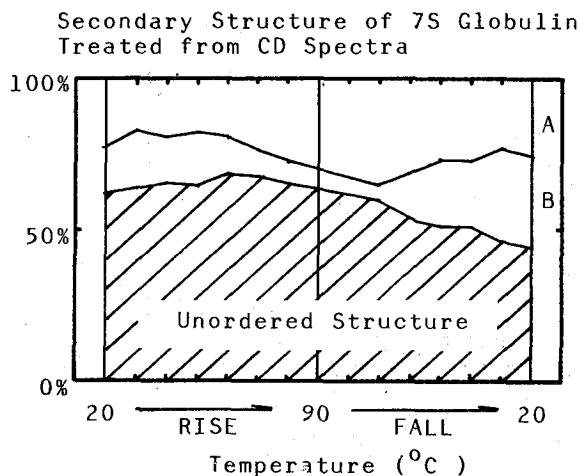


Fig. 10 Secondary structure composition of 7S globulin treated from circular dichroism spectra at actual temperature by the method of Chen et. al.

Secondary Structure of 11S Globulin  
Treated from CD Spectra

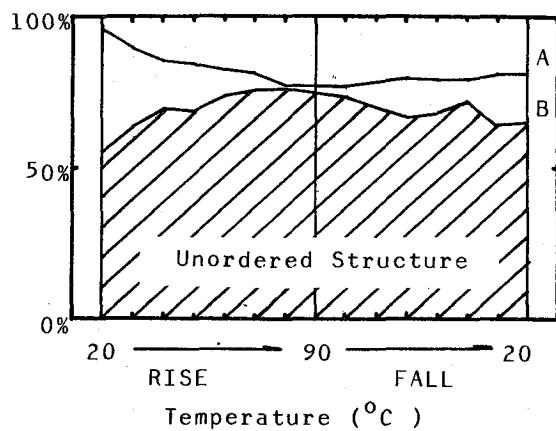


Fig. 11 Secondary structure composition of 11S globulin treated from circular dichroism spectra at actual temperature by the method of Chen et. al.

## 審査結果の要旨

大豆蛋白質の加熱ゲル化についての研究は、これまでは加熱後冷却したゲルについての性質の研究が主であったが、著者は加熱および冷却の過程における粘度変化を測定できる方法を開発した。これは回転二重円筒粘度計および剪断力（回転力）の制御および記録システムを自作したもので、これによって大豆蛋白質ゲル形成機構の解明と、ゲル性状のコントロールへの応用についての途をひらくことを目的とした。S-S結合含有量の多い大豆11Sグロブリンはその強固な構造のためにゲル化しにくく、S-S結合含有量の少ない大豆7Sグロブリンはそのルーズな構造のために凝集、架橋能が高く、ゲル化した。分子構造をアセチル化によりルーズにすると11Sグロブリンも高いゲル化能を示した。S-S結合を開裂すると、一般にゲル化能を向上するが、過度にフレキブルになるとゲル化能が低下すると推定された。加熱・冷却過程の蛋白質分子の二次構造をCDにより測定する方法を新たに開発し、7Sグロブリンについて測定すると加熱過程後半より不規則構造が減少したが、11Sグロブリンの不規則構造は加熱に伴って増加し、冷却に伴って加熱前の割合に復元することが明らかになった。以上のように、蛋白質分子は加熱過程後半に分子のunfoldingが起こり、凝集体を生成した。この凝集体が架橋してゲルの三次元ネットワーク構造を生成する。そして冷却過程でこの構造が補強されて強固なゲル構造となることが示された。加熱過程の70~80℃でゲル生成の瞬間を捕えた流動としてレオペキシーがあらゆる蛋白質ではじめて証明された。これは活性化した、つまり機械的攪拌によってゲル構造生成が促進される状態の系を反映した流動である。

以上のようにゲル形成過程とコンピューターによる粘度の精密な測定法を開発したことによってゲル生成機構に新たな知見を見出した。特にレオペキシーの証明はゲル生成の瞬間とみられ、レオロジー的にも貴重な発見である。この機構の解明によって温度の攪拌速度を選ぶことによって目的とする任意のゲル性状の制御が可能となる途を拓いたことは、食品工業的にも大きな意義があり、農学博士の学位を授与するに十分な価値があるものと判定する。