

氏名(本籍)	はし 橋	づめ 詰	かず 和	とも 宗
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	第	158	号
学位授与年月日	昭和52年	9月	8日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			

学位論文題目 大豆利用食品製造における蛋白質  
の変性に関する研究

論文審査委員 (主査)

教授 柴崎一雄 教授 辻村克良

教授 金田尚志

# 論文内容要旨

## 序論

豆腐、油揚、凍豆腐等の伝統食品は大豆蛋白質の性質を巧みに利用して作られている。これらの食品の製造には蛋白質の変性が重要な役割を果たしているが、その変性機構についてはほとんど解明されていない。これらの食品を製造する際の蛋白質の変性機構とその役割を明らかにすることは、食品化学的に非常に有意義と考えられる。またその結果を伝統食品製造法の改良と新しい食品の開発に役立てることができると思われる。そこで凍豆腐製造における蛋白質の凍結変性と、豆腐、油揚製造の際の蛋白質の加熱変性について研究した。大豆蛋白質の新しい加工手段として酸、アルカリ処理があるが、これの蛋白質におよぼす影響について若干の検討を加えた。

## 第1章 大豆蛋白質の凍結変性

豆腐を凍結して2～3週間保存すると海綿状の組織ができ、解凍後容易に脱水、乾燥ができる。これは蛋白質の凍結変性によるものであり、このような蛋白質の凍結変性を利用した食品加工法は凍豆腐を除いて他に類を見ない。

### 1. 凍結変性とSH基、S-S結合交換反応

大豆酸沈澱蛋白質をカードのまま、あるいはアルカリで水に溶解してから凍結保存すると、解凍した場合カード状の蛋白質が海綿状に変化してアルカリに溶解しなくなったり、溶解していた蛋白質が沈澱した。これらの不溶化した蛋白質は1.5 M尿素と $10^{-2}$  Mメルカプトエタノールに容易に溶解した。

11S蛋白質溶液を凍結すると一部の蛋白質が不溶化した。その上澄の超速心沈降図は11Sの会合体である15Sが新たに認められた。ところが解凍したのち $10^{-2}$  Mメルカプトエタノールを加えると白濁していた蛋白質は完全に溶解し、その沈降図はもとと同じ11Sになった(Fig・1)。また

NEM でSH基をブロックした場合、凍結しても変化は起こらなかった。

これらのことから大豆蛋白質の凍結変性の主原因は、凍結中にS-S結合ができるためであることが明らかになった。さらに $10^{-4} \sim 10^{-3}$ Mの微量のS-S還元剤の添加、あるいは窒素吹込みによって酸素を除いた方が凍結による不溶化が促進されたこと、酸化あるいは還元した蛋白質を個別に凍結するより、両者を混合して凍結した方が不溶化する蛋白質量が多くなったことなどから、凍結中に起こる蛋白質のS-S結合生成は、SH基による分子内S-S結合から分子間S-S結合への交換反応であることが明らかになった。

## 2. 凍結変性におよぼす氷結晶の影響

大豆蛋白質の凍結変性は $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の低温より $-5^{\circ}\text{C}$ 以上で起こりやすい。これは氷結晶の間に存在する未凍結水の中に蛋白質が濃縮され、これが原因となりSH基とS-S結合の交換反応が起こることを示していると思われる。そこで蛋白質溶液を凍結と濃縮状態でそれぞれ保存し、両者の蛋白質の変化を溶解度とディスク電気泳動で比較したところまったく同じであった (Fig・2)。

この結果から、凍結による氷晶生成のため溶液あるいはゲルが濃縮作用を受け、蛋白質分子間の距離が縮まるため、分子間にSH基とS-S結合交換反応が起こり、さらに水素結合や疎水結合ができ分子間結合を安定化し、これらが蛋白質溶液の不溶化や凍豆腐に見られるゲル状組織から海綿状組織への変化を起こす原因、すなわち蛋白質の凍結変性の原因であると結論できた。

## 3. 凍豆腐の凍結期間の短縮

凍豆腐の製造では、凍結によって海綿状組織を作らせるため、凍結した豆腐を2~3週間凍結状態で保存しなければならない。

凍結変性は微量のS-S還元剤の添加、あるいはSH基を減少させないための窒素の吹込みなどにより促進されることを見い出した。これらの結果を凍豆腐の長期間の凍結熟成工程を短縮するために応用したところ効果が認められた。

#### 4. 凍結による蛋白質の不溶化を応用した新食品素材の製造法

大豆蛋白質の水溶液を凍結すると蛋白質が氷の間でゲル化して氷の存在した場所が多数の穴となった海綿状の組織を持つ蛋白質に変化する。このものは無色、半透明、無味無臭で保水性があり、テクスチャーも良好であるので食品素材として利用することを考え、製造条件と食品としての適性を検討した。

加熱した蛋白質溶液を冷却して塩化カルシウムを蛋白質 g 当り  $2 \sim 2.5 \times 10^{-4}$  mol 加えてから凍結すると 95% 以上の収率で海綿状の組織蛋白質が得られた。またこのものはソーセージに添加した場合すぐれた加工適性を示した。

## 第2章 大豆蛋白質の酸およびアルカリ処理による性状変化

繊維状蛋白質の製造において大豆蛋白質の特性を引き出すために、アルカリ処理が使われている。酸あるいはアルカリ処理をした 7 S, 11 S および酸沈澱蛋白質をディスク電気泳動、超遠心分析により検討した。アルカリ処理によって 7 S と 11 S の両者が、酸処理では 11 S が消失した。これらの成分の消失に伴ない会合成分と解離成分が増加した。

これらの処理をした酸沈澱蛋白質を GDL (グルコノデルタラクトン) にてゲル化させた場合、無処理あるいは電気泳動図に変化の見られない程度の処理ではゲルの堅さは低い値であったが、解離が見られた蛋白質からは堅いゲルができた。7 S と 11 S をゲル化させた場合、7 S は無処理でもゲル形成能はあったが、処理してもゲルの堅さの増加は少なかった。11 S は無処理ではまったくゲルを形成する機能はなく、処理した場合には強いゲル形成能が出現しゲルが堅くなった (Fig. 3)。

### 第3章 大豆蛋白質の加熱変性

大豆食品の製造において加熱処理は最も基本的な加工手段である。たとえば豆腐の保水性のあるゲルは加熱した豆乳を凝固させたものであり、豆腐を膨化させた油揚げも豆乳の加熱と揚げの際の加熱処理が重要である。

#### 1. ゲル形成能におよぼす蛋白質分子の加熱による構造変化

大豆蛋白質溶液を加熱する場合、7Sと11Sの構造変化は加熱時のイオン強度に影響され、イオン強度が低い条件において11Sは80℃で解離体と会合体に変化して11Sとして存在しなくなった。一方7Sはこの条件では安定で、100℃の加熱ののちにも一部が存在した。豆乳などのイオン強度の比較的高い溶液では7Sは70℃以下の温度で会合して著しく減少したが、11Sは安定であり80℃以下ではほとんど変化せずに存在し、85～90℃の加熱で解離体と会合体に変化した(Fig. 4)。

酸沈澱蛋白質溶液を60～100℃加熱ののちGDLでゲル化させた場合、加熱時のイオン強度が低いときには60℃以上の加熱で強いゲルができ、イオン強度の高い場合には70℃以下の加熱は無加熱と同じであり、ゲルの堅さを増加させる効果はなかった(Fig. 5)。この場合のゲル強度の増加に必要な処理温度は11Sの加熱による構造変化、すなわちサブユニットへの解離と会合の起こる温度と一致することから、加熱による強いゲル形成能の出現は11Sの機能によることが明らかになった。7S単独では無加熱でもゲルは形成したが、11Sの場合は構造変化しない場合にはゲル形成能はなかった。このような11Sの構造変化と強いゲル形成能の出現は、酸およびアルカリ処理で見られた結果と一致した。

蛋白質溶液を60～100℃で加熱した場合、超速心分析により観察できる蛋白質の各成分の消長は、加熱時のイオン強度に影響されるが80～90℃以下で起こり、さらに温度が増加してもそれ以上の変化がないように見えた。

しかしSH基含量、分子表面の測定可能なHalf Cystine含量、濁度、

紫外線吸収差スペクトルなどの測定結果は、超遠心図形に変化が認められなくなった80～90℃以上でも引続き構造変化が起こっていることを示した。すなわち大豆蛋白質の加工特性に影響をおよぼす11Sの構造変化は、80～90℃以下でサブユニットに解離し、それ以上の温度でunfoldingが起こるものと推定された。

大豆蛋白質溶液を加熱した場合に会合する成分と会合しない成分をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により検討した結果、会合する成分は主として11Sの分子量の小さなサブユニット成分であり、会合しない成分は11Sの分子量の大きなサブユニット成分と7S成分であることが明らかになった。

### 2. 豆腐製造における豆乳の加熱条件の検討

加熱時の豆乳濃度とこれをカルシウムで凝固させて得たゲルの堅さの関係を検討した結果、加熱時濃度の高い豆乳ほどゲルが堅くなった。これは加熱時の蛋白質濃度とイオン強度が高い条件ほど会合が進むことが原因であることが明らかになった。

豆乳あるいは大豆蛋白質溶液を長時間加熱すると、SH基が酸化されるため、これより作ったGDLゲルの堅さは減少した。加熱前の豆乳に窒素を吹込むか、あるいは加熱後すみやかに70℃以下に冷却してSH基の減少を防ぐことにより強いゲルができることが明らかになった。

### 3. 油揚の伸展に關係する大豆蛋白質の構造変化とSH基、S-S結合交換反応

油揚はひかえ目に加熱した豆乳から豆腐を作り、これを120℃と180℃の油で揚げ、もとの面積の3倍程度に伸ばしたものである。

豆乳を長時間加熱すると、これより作った豆腐を油で揚げても伸びなくなる。この主な原因は豆乳中の溶存空気量が減少して、油揚が伸びる際に水蒸気を溜めるために必要な気泡が生地中にできなくなるためであり、長時間加熱した豆乳でも空気を吹込むことにより伸び率はある程度回復した。

蛋白質のSH基を酸化あるいは還元したのちこれよりGDLゲルと油揚を作ると、それぞれの蛋白質単独では油揚はまったく伸びず、またゲルは非常に弱かったが、両者を混合した場合には良く伸び、また堅いゲルができた(Fig. 6)。SH基をブロックしたものはまったく伸びなかった。これらのことから、油揚の伸びと、ゲルの形成には蛋白質のSH基とS-S結合交換反応が重要な役割を果していることが明らかになった。

油揚の伸びに必要な最低温度を検討するため、減圧下70~100℃の油温で油揚を揚げたところ、伸びは80~90℃から始まり、100℃では常法で揚げたものと同程度まで伸びた(Fig. 7)。この結果から油揚の伸びに必要な温度は、蛋白質の構造変化が起こる温度と一致することが明らかになった。これより油揚の伸びの機構を推定すると、発生した水蒸気が膨張するにつれ、変性温度以上に加熱されて分子間結合がゆるんだ蛋白質分子の間で、SH基とS-S結合交換反応が起こり、蛋白質分子間にずれが起こるためと結論できた。

## 結 論

大豆利用食品の製造において、蛋白質の構造変化とSH基、S-S結合交換反応が重要な役割を果していることが明らかになった。

7Sは未変性でもゲル形成能があったが、11Sは未変性ではゲル形成能はなく、酸およびアルカリ処理、あるいは加熱処理により構造変化を起こした場合に強いゲル形成能が出現した。

凍豆腐における海綿状組織形成の際の蛋白質分子の新らたな結合、あるいは油揚が伸びる際の蛋白質分子間のずれにはSH基、S-S結合交換反応が不可欠であることが明らかになった。

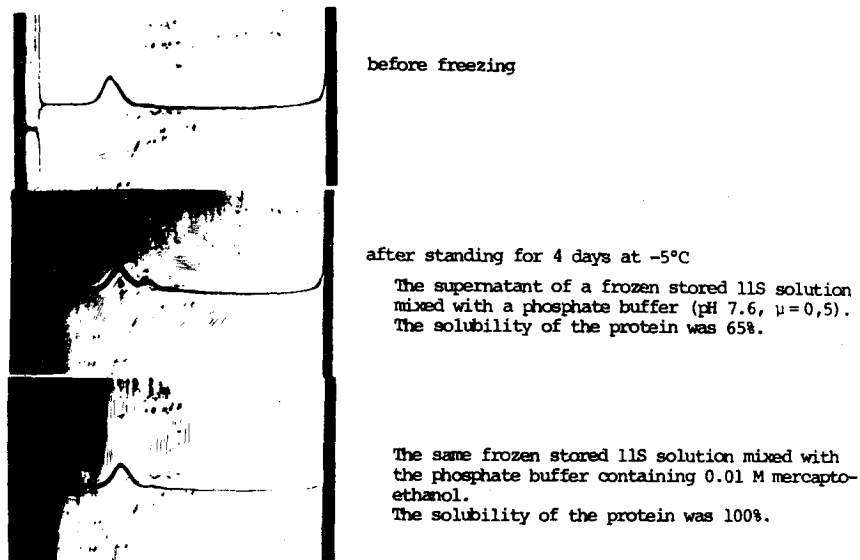


Fig. 1. Effect of Frozen Storage on Ultracentrifugal Patterns of 11S protein.

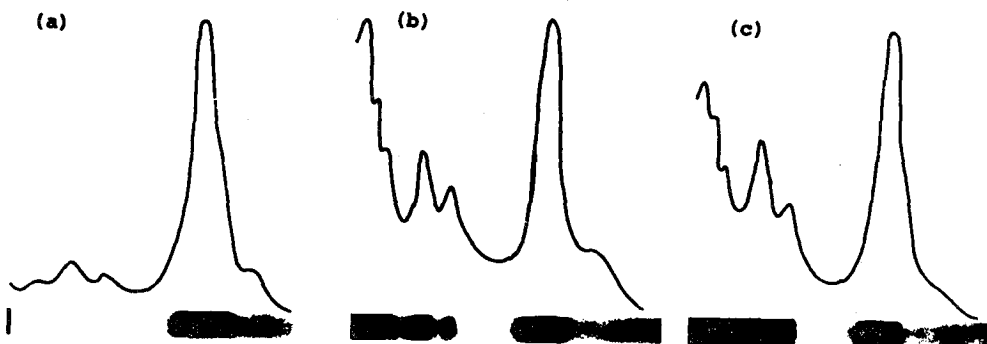


Fig. 2. Effects of Frozen Storage and Concentrated Storage on Disc Electrophoretic Patterns of 11S Protein.

- (a) before storage (control)  
 (b) after standing for 2 days at  $-5^{\circ}\text{C}$  (soluble 60%)  
 (c) after standing for 2 days at  $+5^{\circ}\text{C}$  (concentrated storage) (soluble 73%)  
 All samples were dissolved in standard buffer.



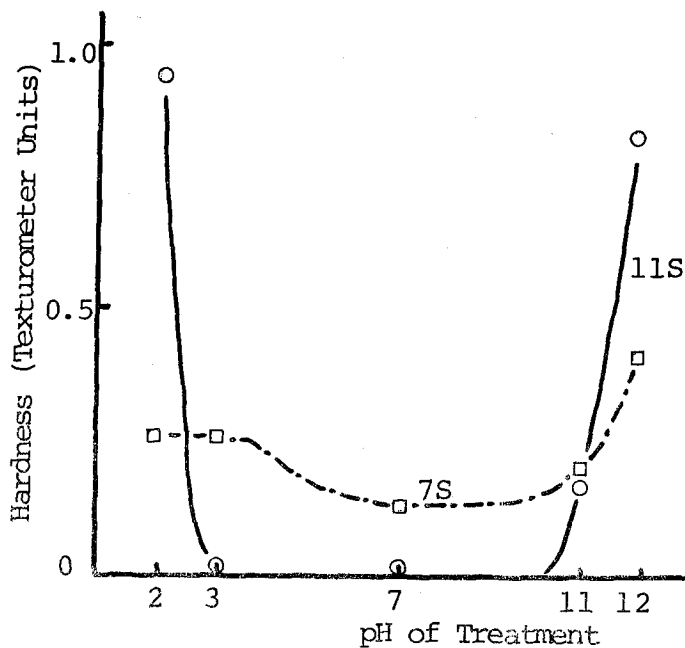


Fig. 3. Changes in Hardness of Gels Prepared from 7S and 11S Protein Treated with Acid and Alkaline.

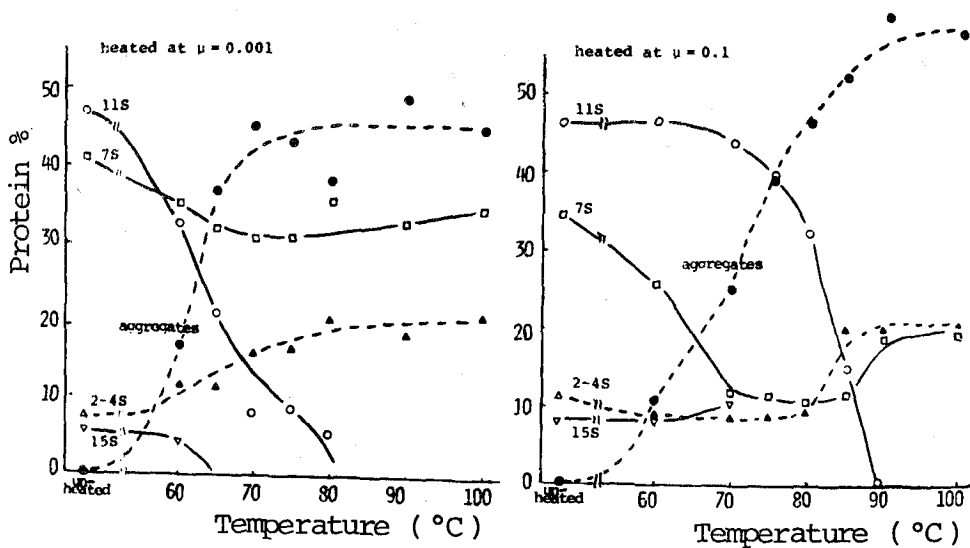


Fig. 4. Effect of Heating Temperature on Ultracentrifugal Compositions of Acid Precipitated Protein.

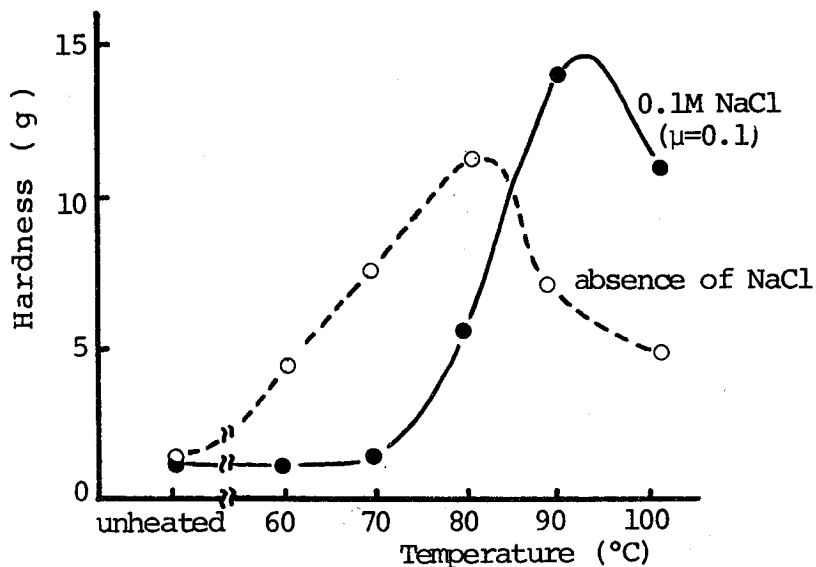


Fig. 5. Effect of Heating Temperature on Hardness of Gels Prepared from Acid Precipitated Protein When Heated in the Presence and Absence of NaCl.

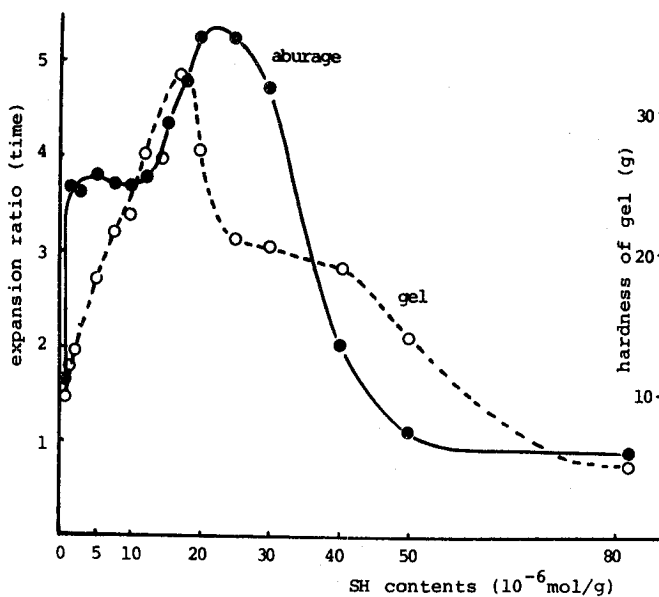


Fig. 6. Effect of Sulphydryl Contents on Expansion of ABURAGE and Hardness of Gels Prepared from Acid Precipitated Protein.

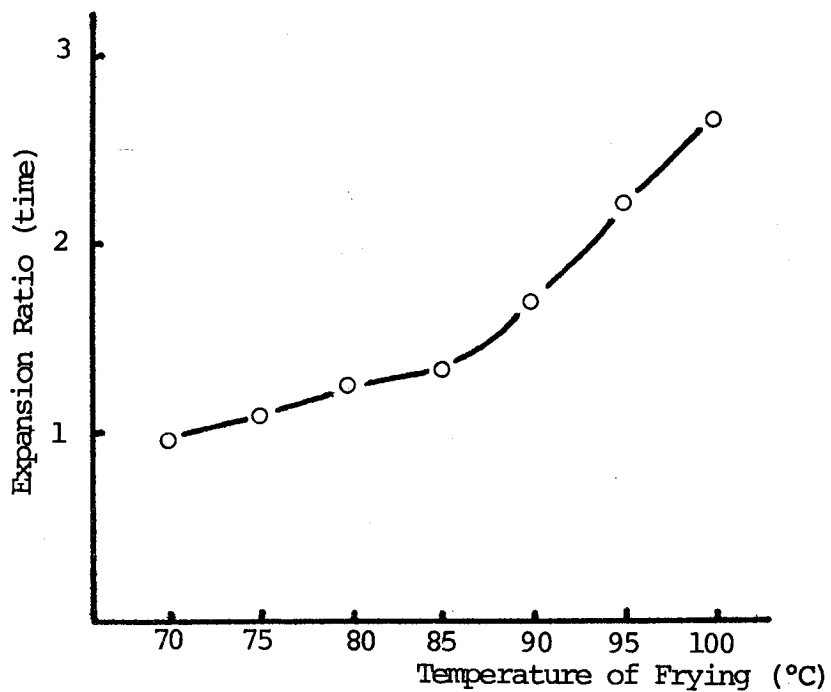


Fig. 7. Expansion of ABURAAGE Effected by Temperature of Frying When Fried under Reduced Pressure.

## 審査結果の要旨

豆腐、油揚、凍豆腐等の伝統的食品の製造は古くからの長い経験が伝修され、原料大豆蛋白質の性質を巧くみに、利用して作られている。蛋白質の変性が重要な役割を果たしているが、蛋白質科学の長足な進歩にも拘らず、今日迄この変性の機構は殆ど解明されていない。本論文はこの機構を明らかにすると共に製造法の改良と新製品の開発に応用することに就て研究したものである。

凍豆腐の出来る大豆蛋白質の凍結変性の主原因は、凍結、凍蔵中にS-S結合が形成されるためであることを多くの実験結果から明らかにした。このS-S結合はSH基による分子内S-S結合から分子間S-S結合への交換反応であった。凍結変性は $-20^{\circ}\text{C}$ のような低温より $-5^{\circ}\text{C}$ 以上で未凍結水が存在する比較的高い温度で起り易い。これは氷結晶の間に存在する未凍結水の中に蛋白質が濃縮されて、これが原因でSH、S-S交換反応が起ることを始めて明らかにした。他方微量のS-S還元剤の添加、或はSH基を減少させないように窒素の吹込等により変性を促進させ、凍結熟成期間の短縮に成功した。

次に加熱変性であるが、豆乳或は酸沈でん蛋白質を $60^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ に加熱した後GDLでゲル化させると、無加熱および $70^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ 以下では弱いゲルが、 $80^{\circ}\text{C}\sim 90^{\circ}\text{C}$ で初めて強いゲルが出来る。種々実験の結果主成分の11Sの構造変化は $80^{\circ}\text{C}\sim 90^{\circ}\text{C}$ 以下でサブユニットに解離しまた解離が起った後に強いゲル化がみられた。この温度以上で unfolding が起るものと推定された。次に濃度との関係を調べると濃度の高い豆乳ほど硬いゲルが形成されるが、濃度とイオン強度により加熱時の会合が進むためであることが明らかにされた。ついで油揚の場合にも豆腐が伸びるのにSH、S-S交換反応が重要な役割を果たすことを証明した。

以上のような成果は食品化学および実際の製造にも多大の貢献があり、農学博士の学位を授与する十分な資格があるものと審査員一同は判断した。