

## 大豆蛋白質の高度利用に関する試験研究 — 超高压処理による大豆蛋白質の変性試験 —

奥村幸広・宇野豊子・山木 携・本堂正明

### Effect of High-hydrostatic Pressure on the Denaturation of Soybean Protein

Yukihiro OKUMURA, Toyoko UNO, Tazusa YAMAKI and Masaaki HONDO

Soybeans and soybean milk were subjected to a high-pressure treatment to examine resultant changes in the functional properties of the soy protein. The total solids and nitrogen contents of the treated soybean milk were found to be less than those of non-treated soybean milk. The trypsin inhibitor contained in soybeans proved highly resistant to pressurization, with half of the normal inhibitory activity remaining after a 30-minute treatment at 700 MPa. Lipoxigenase, which was more sensitive than the trypsin inhibitor, was rendered inactive by both a 30-minute treatment at 500 MPa and a 15-minute treatment at 600 MPa. Calcium and glucono- $\delta$ -lactone (GDL)-based gel formation and foaming, both functional properties of soy protein, were also tested. Compared to heat treatment, which activated many of the functional properties of soy protein, high-pressure treatment resulted in softer calcium and GDL gels and in reduced foaming.

大豆は、蛋白質を約35%、脂質を約20%含んでおり、栄養成分に富んでいる。また、大豆蛋白質は、乳化性、ゲル形成能、起泡性などの食品加工特性を有しており、食品加工素材として高い資質を持っている。反面、トリプシン・インヒビターやヘマグルチニンといった生理活性蛋白質が存在し、脂質とリポキシゲナーゼの反応による特有の不快臭、サポニンやフラボノイドによるDMF (Dry Mouth Feel) といわれる不快味なども有している。そのため、大豆の利用の約8割は製油用であり、食品・食品素材としての利用は、全体の2割弱にとどまっている。

これら生理活性蛋白質の不活性化やリポキシゲナーゼの失活による不快臭の除去のため、有効な手段として一般に加熱処理が用いられる。また、加熱処理によって組織の軟化、蛋白質の加熱変性による消化効率の向上などがおこり、上述した蛋白質の食品加工特性が加熱処理によって誘引あるいは助長される。このように、一般に大豆を食品・食品素材として利用するには、加熱処理が必要とされてきた。

近年、超高压処理を食品加工に利用する研究が報告されている。超高压処理は、加熱処理にかわる食品加工・

調理、殺菌・保蔵技術として注目されており、食品素材本来の味や風味を有し、ビタミンなど熱に弱い成分を損なわないという特性を有している<sup>1),2)</sup>。食品に数千気圧の圧力を作用させると、食品中の蛋白質が変性して物性が変化する。大豆食品に対して超高压処理を行うことにより、加熱処理とは異なった変性が起こり、食品加工特性が変化すると考えられる。

超高压処理による大豆蛋白質の物性改変はいくつか報告されている。松本らは、大豆粉や種々の大豆蛋白質を使って蛋白質濃度18%の懸濁液を調製し、超高压処理によるゲル形成試験を行った<sup>3)</sup>。山崎らは蛋白質濃度6%の豆乳が500 MPa、15分以上の超高压処理でゲル化することを明らかにし、また7.5%豆乳を600 MPa、15分処理して絹ごし豆腐と同等の強度のゲルを得ている<sup>4)</sup>。飲料としての豆乳が蛋白質3.8% (固形分8%)、豆腐原料の豆乳が固形分7%程度であることを考えると、超高压処理単独で大豆蛋白質をゲル化させるためには、非常に高濃度の豆乳 (あるいは蛋白質懸濁液) が必要といえる。

本研究では、豆乳あるいは大豆に超高压処理を施し、大豆蛋白質の食品加工特性の改変を目的としている。今回は超高压処理による生理活性蛋白質の活性変化、およ

び大豆蛋白質のゲル形成性能の変化について検討した。

## 実験方法

### 1. 材料

大豆は、中国産の中粒を使用した。豆乳は、大豆を5°Cで一晩浸漬し、エクセルオートホモゲナイザー（日本精機製作所）で5,000 rpm, 5分処理し、ガーゼろ過して調製した。超高压処理した大豆も、同様の方法で豆乳に調製した。

### 2. 豆乳の成分分析

豆乳の固形分は、豆乳濃度計（アタゴ SM-20 型屈折計）を使用した。全窒素はケルダール法によった。

### 3. 超高压処理

超高压処理装置は、神戸製鋼所の小型試験機（WIP）で、処理室寸法 D 60 mm × L 200 mm, 最大圧力 700 MPa のピストン直圧式、飲料水を圧力媒体として使用した。大豆は、5°Cで一晩浸漬したあと、浸漬水とともにポリ袋中に密封した。豆乳および大豆蛋白質水溶液は、柔軟なポリプロピレン製スポイトに入れて密封した。これらの試料を処理室に入れ、設定圧力に達した後一定時間圧力を保持し、減圧した後に試料を取り出した。処理室の温度制御は行わなかった。

### 4. トリプシンインヒビター（TI）活性の測定

TI 活性の測定は KAKADE ら<sup>9)</sup>の方法に従った。すなわち、豆乳を 0.1 N HCl で酸沈殿させ、遠心分離によって得た上清に、トリプシン（和光純薬製）およびその基質である *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide を加えて反応（pH 8.0, 37°C, 5分）させ、生成した *p*-Nitroaniline の吸光度（410 nm）を測定した。上清（TI）を添加しなかった場合の吸光度を対照として、上清（TI）添加による吸光度の低下の程度を TI 活性とした。

### 5. リポキシゲナーゼ活性の測定

リポキシゲナーゼ活性はリノール酸を基質とした比色法による測定した<sup>9)</sup>。すなわち、豆乳を TI 活性試験と同様に酸沈殿させ、上清と基質溶液を pH 9.0, 25°C で反応させ、吸光度（234 nm）の変化から反応速度を測定し、リポキシゲナーゼ活性とした。

### 6. 大豆たんぱく質の起泡性

固形分を 4% に調製した豆乳を密栓つきメスシリンダーにいれ、1分間振とう攪拌した後さらに1分間静置させ、生成した気泡の量を測定した。元の豆乳の体積に対する気泡の体積の割合を起泡性とし、三反復した平均値を使用した。

### 7. カルシウムゲルの調製

豆乳（固形分 5%）30 ml を 85°C で 10 分加熱し、0.3 M CaCl<sub>2</sub> 1 ml を加えて攪拌した。75°C で 10 分凝固反応させた後、これを内径 29 mm の円筒型成型器（ディスプレインジを切断して作成）に移した。円筒型成型器の底にはガーゼをあて、直径 29 mm のろ紙を敷いた。豆乳の上から直径 29 mm のろ紙をのせ、200 g の重りをのせたピストンで 20 分圧搾した。成型した生地は、湿ったろ紙の入ったシャーレに入れて、物性測定まで冷蔵庫で保管した。

### 8. GDL ゲルの調製

豆乳（固形分 5%）10 ml を沸騰水中で 3 分間加熱し、10% Glucono- $\delta$ -lactone (GDL) 0.3 ml の入った 20 ml 容ポリビーカー（D 35 mm）に注ぎこみ、ガラス棒ですばやく攪拌し、75°C の水浴中で 1 時間ゲル化させた。成型したゲルは冷蔵庫で保管し、ポリビーカーにいれたまま物性測定に供した。

### 9. カルシウムおよび GDL ゲルの物性測定

ゲルの物性測定はレオメーター（サン科学 CR-200 D）を使用した。試料台の上昇速度は 60 mm/min とした。カルシウムゲルに対しては貫入強度と圧縮弾性を測定した。貫入強度は、感圧軸が生地へ貫入するのに要した荷重とし、圧縮弾性は、感圧軸によって試料片を 2 mm 歪ませるのに要した荷重とした。感圧軸の選択は神山らの報告<sup>7)</sup>を参考とした。すなわち、カルシウムゲルの大きさは直径 29 mm なので、貫入試験には直径 5 mm の円形感圧軸を、圧縮試験には直径 40 mm の円形感圧軸を使用した。GDL ゲルの貫入試験は直径 10 mm の円形感圧軸を使用した。

### 10. 分離大豆蛋白質の調製

分離大豆蛋白質の調製は、THANH らの方法<sup>9)</sup>によった。すなわち、洗浄後によく乾燥させた大豆をミルで粉碎し、10 倍量のヘキサン中で脱脂した。ろ過および減圧処理によってヘキサンを除去した後、20 倍量の 60 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）中で 1 時間抽出した。ガーゼろ過、遠心分離（8,000 rpm, 20分）の後、上清を pH 6.4 に調整し、さらに遠心分離（8,000 rpm, 20分）によってグリシニン分画を得た。この上清を pH 4.2 に調整し、遠心分離（8,000 rpm, 20分）によって  $\beta$ -コングリシニン分画を得た。グリシニン分画と  $\beta$ -コングリシニン分画は、それぞれ 60 mM トリス塩酸緩衝液（pH 6.4）に懸濁し、1 N NaOH を滴下して可溶化させ、pH を 7.8 に調整した後透析し、凍結乾燥した。大豆の脱脂から蛋白質の抽出までの工程は、蛋白質の変性を抑えるため、冷所で行っ

た。

### 11. 分離大豆蛋白質の溶解性

凍結乾燥した蛋白質を60mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)に溶解させた(0.05%程度)。溶液を超高压処理し、1N および0.1N HClでpHを徐々に変化させながら、溶液の濁度を600nmで測定し、溶解性の指標とした。

### 実験結果および考察

#### 1. 大豆の超高压処理による豆乳成分の変化

浸漬した大豆を、200~600MPaで10~30分間超高压処理し、その後に調製した豆乳の固形分および全窒素を表1に示した。超高压処理によって、豆乳中に抽出される成分は、固形分、全窒素ともに低下した。大豆の浸漬液は色素の溶出によって通常黄色みを帯びているが、超高压処理によってこの黄色みが強くなった。また、浸漬液のBRIXを測定したが、各処理の間に差は見られなかった。(データ省略)

#### 2. 超高压処理による生理活性蛋白質の活性変化

##### (1) トリプシン・インヒビター(TI)の活性変化

TIは超高压処理に対する耐性が非常に高く、700MPa、30分の処理でも1/2強の活性を有しており、超高压処理のみでTIを完全失活することは困難であった(表2)。TIは耐熱性も高く、100°C、60分の処理でも50%程度の残存活性があった(データ省略)。これらの結果は

表1 超高压処理による豆乳の溶出成分

処理	固形分(%)	全窒素(%)
無処理	8	0.622
200MPa/10min	7	0.500
200MPa/30min	7	0.469
400MPa/10min	6	0.472
400MPa/30min	5.5	0.447
600MPa/10min	5	0.384
600MPa/30min	5	0.382

表2 トリプシン・インヒビター(TI)の高压耐性

処理圧力(MPa)	TI活性(%)*	
	15分	30分
400	100	100
500	100	100
600	100	100
700	65.7	55.7

\*無処理の豆乳のTI活性を100%とした。

松本らの報告<sup>3)</sup>と一致しており、大豆TIの高温耐性および高压耐性が非常に高いことが確認された。

##### (2) リポキシゲナーゼの活性変化

リポキシゲナーゼはTIと比較して超高压処理に対する耐性が低く、500MPa処理から活性の低下がみられ、500MPa、30分または600MPa、15分の処理で、ほぼ失活させることが可能だった(表3)。

大豆に対して超高压処理を行った場合には、豆乳の場合よりも超高压処理の影響は小さく、リポキシゲナーゼの失活には600MPa、30分あるいは700MPa、15分処理が必要だった(図1)。

表3 リポキシゲナーゼの高压耐性

処理圧力(MPa)	リポキシゲナーゼ活性(%)*	
	15分	30分
400	100	100
500	22.1	5
600	1.4	0
700	0	0

\*無処理の豆乳の酵素活性を100%とした。

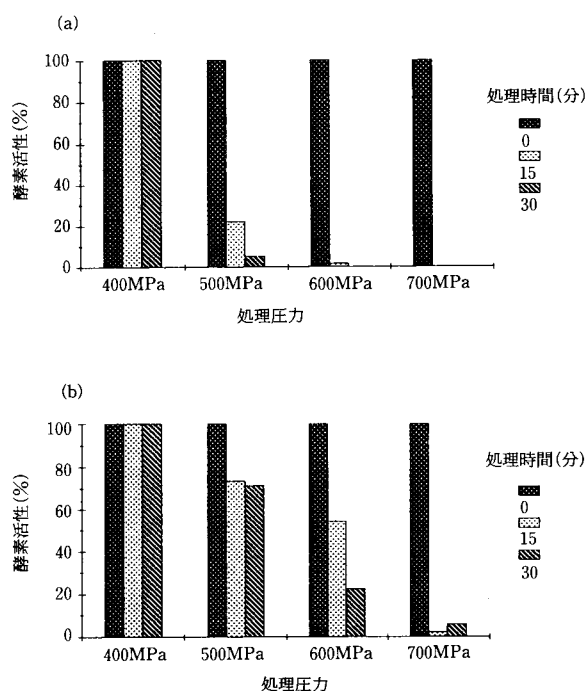


図1 超高压処理によるリポキシゲナーゼの活性変化

(a): 豆乳を超高压処理し、酵素活性を測定した。  
 (b): 大豆を超高压処理し、豆乳を調製した後、酵素活性を測定した。  
 酵素活性は、無処理を100%として表記した。

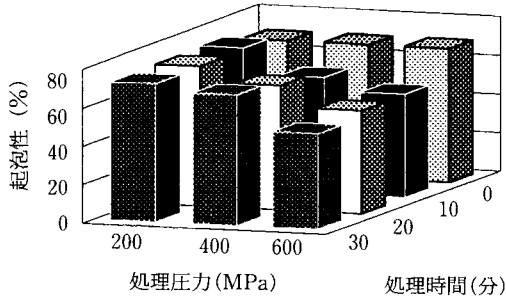


図2 超高压処理による起泡性の変化

起泡性 (%) =  
(生成した気泡の体積) / (元の豆乳の体積) × 100

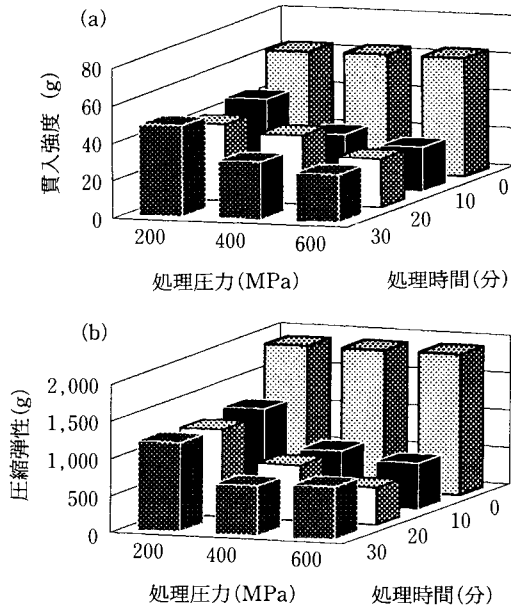


図3 超高压処理とカルシウムゲルの強度

直径 29 mm の試料片に対して、(a)貫入は直径 5 mm の感圧軸を、(b)圧縮は直径 40 mm の感圧軸を使用した。(b)圧縮弾性は、試料片を 2 mm 歪ませるのに要した荷重で示した。

### 3. 大豆蛋白質の機能特性

#### (1) 起泡性

超高压処理によって、豆乳(固形分 4%)の起泡性は低下し、600 MPa、30 分処理では、無処理の約 1/2 まで低下した(図 2)。分離大豆蛋白質の場合、湿潤加熱やアルコールによる変性によって、起泡性が増大することが知られている。これは、加熱やアルコールによって変性した蛋白質が、気液界面において濃縮され、膜状の網目構造を形成するためと考えられている<sup>9)</sup>。超高压による起泡性の低下は、超高压変性が加熱やアルコール処理とは異なった変性機構であることを示唆している。

#### (2) カルシウムゲルの強度

超高压処理した大豆よりカルシウムゲルを調製しレオメーターによって物性を測定した。カルシウムゲルの強

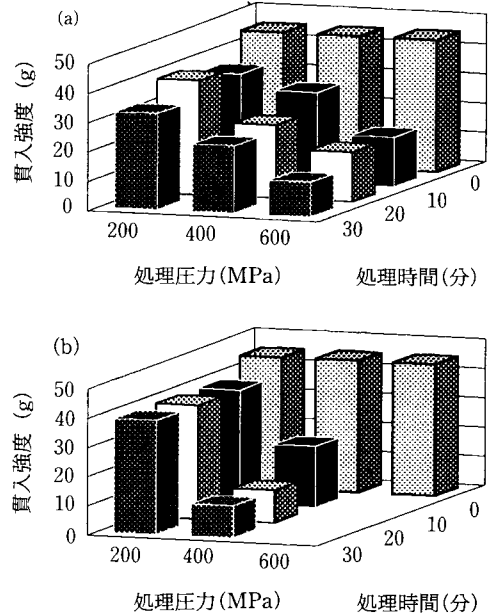


図4 超高压処理と GDL ゲル強度

(a): 豆乳を超高压処理し、ゲル化させて物性を測定した。

(b): 大豆を超高压処理した後に豆乳を調製し、ゲル化させて物性を測定した。

直径 35 mm のポリビーカーに入った試料に対して、直径 10 mm の感圧軸を使用した。

度は、貫入、圧縮ともに超高压処理によって低下した(図 3)。200 MPa 処理でゲル強度は無処理の約 2/3 程度となり、処理圧力の上昇によってさらにゲル強度は低下した。これに対し、処理時間の及ぼす影響は少なく、10~30 分の間でゲル強度の変化は少なかった。

加熱した豆乳にカルシウムイオンを添加すると、大豆蛋白質が凝集していくのが見える。超高压処理した豆乳を加熱処理し、カルシウムイオンを添加すると、同様に蛋白質の凝集が見られるが、無処理区に比べて凝集体が細かいものであった。このため、超高压処理したカルシウムゲルのネットワークが無処理に比べて小さくなり、ゲル強度の低下の要因となっていると考えられる。

#### (3) GDL ゲルの強度

GDL ゲルの強度も、カルシウムゲルと同様に、超高压処理によって低下した(図 4)。また、大豆に対して超高压処理した場合は、豆乳の場合よりも超高压の影響が大きく、400 MPa では約 1/2 の強度まで低下し、600 MPa ではほとんどゲル化しなかった。

GDL は水によく溶けて微酸性を示し、加熱することによってグルコン酸に変化してさらに pH が低下する。GDL ゲルは、大豆蛋白質が酸性で沈殿する性質を利用したもので、pH の低下に伴い蛋白質が順次凝固して、豆乳全体が均一にゲル化する。そこで、大豆蛋白質の主成分

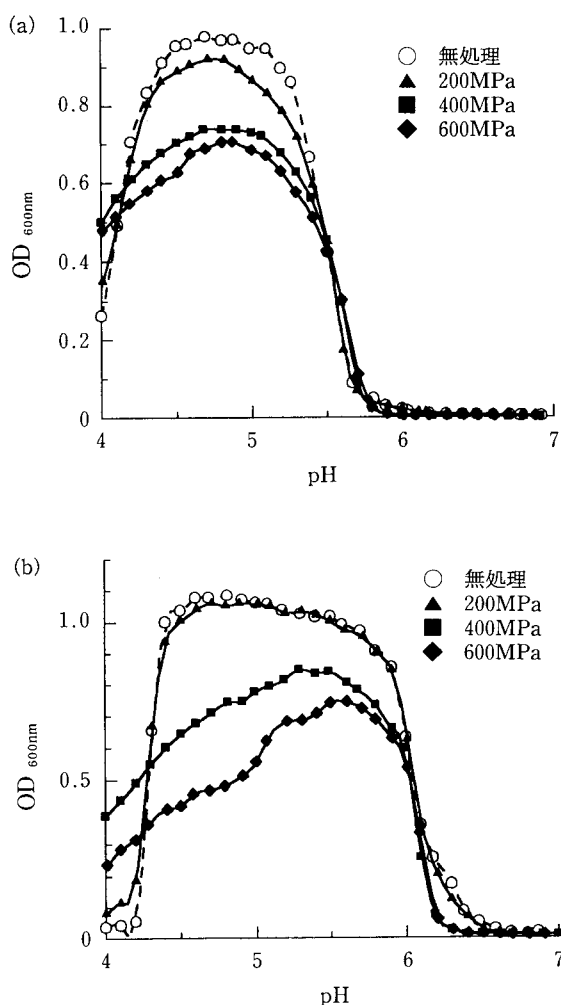


図5 超高压処理による大豆蛋白質の溶解性の変化  
(a):  $\beta$ -コングリシニン, (b): グリシニン  
蛋白質は 60 mM トリス塩酸緩衝液に、約 0.05% によるように溶解させた。超高压の処理時間は 30 分とした。

であるグリシニンおよび  $\beta$ -コングリシニンを精製し、超高压処理によるこれらの蛋白質の pH に対する溶解性の変化を調べた(図5)。溶解性の指標として、600 nm における溶液の濁度を測定した。pH 変化によって生成する蛋白質は、その形状(形体や大きさ)が均一でないため、これらの溶液は正確には Lambert-Beer の法則には従わない。よって、濁度を直接「溶解度」として捉えることはできない。しかしながら、超高压変性により蛋白質が変性し、pH による凝集性が変化した場合には、溶液の濁度にも何らかの変化があると考えられる。

無処理の蛋白質の場合、グリシニンは pH 6 から pH 4.5 付近まで、 $\beta$ -コングリシニンでは、pH 5.7 付近から pH 4.2 付近まで蛋白質の不溶化が観察された。二

つの蛋白質とも、低 pH 領域において急激な濁度の低下がみられ、蛋白質が再溶解していることが確認できた。この時の濁度の変化は、グリシニンの方が急激であった。

中山ら<sup>10)</sup>によると、GDL を豆乳に添加した直後の pH は 6.3、加熱してゲル化させた凝固物は pH 5.7~5.5 であった。図5によると、グリシニンはこの領域ですでに不溶化している(濁度が高い)が、 $\beta$ -コングリシニンはまだ不溶化していないことから、GDL ゲルの形成にはグリシニンの関与が大きいと考えられる。また、HASHIZUME ら<sup>11)</sup>によると、グリシニンのゲル強度が  $\beta$ -コングリシニンのゲルよりも強いことから、GDL ゲルの強度にはグリシニンの関与が大きいと考えられる。

超高压処理を施すと、二つの蛋白質の濁度は全体的に低下した。グリシニンに関しては、無処理の場合には pH 4.7 をピークに pH 6~4.4 までの広い範囲で高濁度を維持しているが、超高压処理すると pH 5.5 をピークにして濁度は徐々に低下した。この pH 領域は GDL ゲルの pH 領域と一致する。また、無処理の時に観察された pH 4 付近の急激な濁度の低下すなわち蛋白質の再溶解は、超高压処理の場合には観察されなかった。これは、超高压処理によって蛋白質が変性した結果、低 pH において不可逆的な凝集反応がおこったことを示唆している。

## 要 約

新規食品加工技術として注目されている超高压処理技術を使って、大豆蛋白質の変性試験を行った。大豆を超高压処理し豆乳を調製すると、無処理豆乳(同等の加水量)と比べて固形分など溶出成分の少ない豆乳が得られた。生理活性蛋白質であるトリプシン・インヒビターは非常に高压耐性が高く、700 MPa、30 分処理で 50% の残存活性を示したが、リポキシゲナーゼは 500 MPa、30 分または 600 MPa、15 分の処理でほぼ失活した。カルシウムおよび Glucono- $\delta$ -lactone (GDL) を使った大豆蛋白質のゲル形成能は、ともに超高压処理によって低下し、破断強度の低いゲルが得られた。また、蛋白質の起泡性も超高压処理によって低下し、超高压処理による蛋白質の変性は、加熱などの従来法とは異なったものであることが示唆された。

## 文 献

- 1) 林 力丸編：食品への高压利用，さんえい出版。
- 2) 林 力丸編：加圧食品——研究と開発——，さんえい出版。

- 3) 松本 正・林 力丸：日農化誌, **64**, 1455(1990).
- 4) 山崎邦雄・熊林義晃・清水英樹・渡辺 治・清水 條資：北海道食加研報告, **1**, 3 (1994).
- 5) KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., MCGHEE, J.E., and PUSKI, G.: *Cereal Chem.*, **51**, 376 (1974).
- 6) *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. **71**, 441.
- 7) 神山かおる・西成勝好：日食工誌, **39**, 715(1992).
- 8) THANH, V.H., SHISBASAKI, K.: *J. Agric. Food. Chem.*, **24**, 1117 (1976).
- 9) 渡辺篤二・斎尾恭子・橋詰和宗：大豆とその加工, 建帛社.
- 10) 中山 修・寺町ヤヨイ・渡辺篤二：日食工誌, **12**, 81 (1965).
- 11) HASHIZUME, K., NAKAMURA, N., WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1339 (1975).