

# 豆乳クリーム生成とその安定性

(09660125)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 小 野 伴 忠  
(岩手大学農学部教授)

# は し が き

## 研究組織

研究代表者： 小野伴忠 (岩手大学農学部教授)

研究協力者： 郭 順堂

## 研究経費

平成 9 年度 2, 9 0 0 千円

平成 1 0 年度 5 0 0 千円

---

計 3, 4 0 0 千円

## 研究発表

### (1)学会誌等

S.T. Guo, T. Ono and M. Mikami, Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature.

*J. Agric. Food Chem.* **45**: 4601-4605. (1997)

S.T. Guo, T. Ono and M. Mikami, Intcorporation of soy milk lipid into protein coagulation by addition of calcium chloride.

*J. Agric. Food Chem.* **47**: in press (1999).

### (2)口頭発表

小野伴忠, 豆乳の凝集機構, 不二製油タンパク質セミナー, (つくば), 10 月 (1997)

小野伴忠, 牛乳と豆乳におけるタンパク質会合体, 第 24 回食品の物性に関するシンポジウム講演要旨集: 37-40, (広島), 11 月 (1997)

郭 順堂, 小野伴忠, 豆乳中脂質の  $\text{CaCl}_2$  添加による凝集物への移行機構, 農化 72(臨)(講演要旨):287, (名古屋), 4 月 (1998)

小野伴忠, 小島千佳子, 郭 順堂, 豆乳中の脂質結合性タンパク質について, 日本食品科学工学会第 45 回大会講演要旨集:64, (札幌), 8 月 (1998)

## 目 次

第一章 序 論	1
第二章 豆乳の加熱調製過程における脂質とタンパク質との相互作用	3
1 序	3
2 材料および方法	4
3 結 果	
豆乳の調製過程での加熱による脂質の解離機構	10
加熱によるタンパク質粒子の再構成と脂質解離との関係	12
豆乳中の脂質—タンパク質会合体	19
4 考 察	22
5 要 約	27
第三章 豆乳の凝集加工における脂質の凝集物への移行	29
1 序	29
2 材料と方法	30
3 結 果	
塩化カルシウム添加による豆乳中脂質の凝集物への移行	33
pH 低下による豆乳中脂質の凝集物への移行	40
豆乳中浮上画分と粒子タンパク質との結合	47
4 考 察	54
5 要 約	59
第四章 総合考察	61
第五章 総 括	64
引用文献	70

## 第一章 序 論

大豆はタンパク質・脂質に富む作物で、日本では味噌・醤油、豆腐、納豆等に加工し、古来から利用されてきた。味噌・醤油は調味料であるが、豆腐はさらに多様な加工が可能であり、正に「畑の肉」として食卓を豊かにし、タンパク質・脂質の重要な供給源であった。豆腐の前段階である豆乳には繊維等を除いた豆のほとんどすべての成分が含まれていて、そのタンパク質と脂質のほとんどはそのまま豆腐に移行する。脂質はタンパク質に次ぐ主要な成分で豆腐固形物中約40%含まれているが、我々は豆腐を食して油の感じをほとんど抱かない。また、豆腐を煮たり焼いたりしても油が遊離してくることはない。脂質は豆腐中で加熱等によって容易には遊離しない形で豆腐組織と結合しているものと考えられる。一方、豆乳中の脂質は数日放置しても分離する事のない安定な乳濁質として分散している。我々はこの分散している脂質を高速遠心によりクリームとして分離し、再度水に分散すると再び安定な乳濁液が形成されることを見いだした。水中で油を安定な乳濁質として分散できる構造になっているものと考えられる。

そこで、大豆中の油が如何にして水中で安定な乳濁質を作るのか、また、豆腐中で強固な固定が起こるのかを明らかにしたい。この研究を発展させることによって、従来難しいとされて来た油脂の食物や薬品への封入が可能になる。例えば、DHAや必須脂肪酸を含む油や油可溶のビタミン、生理活性物質、薬物等を水溶液中に安定に分散させることを可能にし、ジュース、ドリンク、ドレッシング等の液状食品や医療での輸液や流動食への利用が期待できる。さらに、これらの栄養素や薬物を含む油脂を安定な形で固定できれば油脂添加による嗜好性の低下を回避しつつ栄養豊かな機能性食品等の開発が可能である。さらには食品中の油の酸化等も防止することが可能となる。

豆乳は、膨潤させた豆を磨砕後加熱し、おからを除き調製する。豆腐は、その豆乳にカルシウムやマグネシウム塩を添加するかpHを下げることによって形成する。大豆の脂質やタンパク質それぞれの成

分については多くの研究があり、特に加熱によるタンパク質会合体の解離とタンパク質間再結合については多くの報告 (Mori *et al.*, 1981, Utsumi *et al.*, 1984, Wolf *et al.*, 1961, Yamauchi *et al.*, 1982) がなされている。しかし、豆乳や豆腐中で脂質およびタンパク質がどのような形態で存在するかについての研究は少なく、ほとんど判っていない。豆乳や豆腐の研究はアジアが中心で、その研究のほとんどはいかによい豆腐を作るかについてである。我々は安定な脂質粒子の生成機構とその豆腐への固定について解明するために、豆乳構成成分の生成や性質について基礎的研究を行って来た。加熱前の豆乳にはタンパク質脂質複合体が存在し、加熱後それが脂質粒子とタンパク質粒子に分離する事を明らかにした (Ono *et al.*, 1996)。さらに、この脂質粒子には特異なタンパク質が含まれていることを報告した (Guo *et al.*, 1997)。また、タンパク質粒子が豆腐形成時にゲルの骨格形成に関与する事を示した (Ono *et al.*, 1993)。しかし、脂質粒子の組成や形態、豆腐中で何とどのように結合しているのかはまだ判っていない。

そこで、第一に、加熱前に存在するタンパク質脂質複合体の組成と脂質タンパク質間結合の解析、加熱による脂質粒子生成の機構、加熱後生成した脂質粒子の組成と形態およびその安定性について解析した。次に、カルシウム・マグネシウムイオン添加あるいはpH低下による豆腐形成の行程で、脂質粒子の挙動を追跡するとともに、そのタンパク質との結合を解析した。

## 第二章 豆乳加熱調製過程におけるクリーム画分の生成

### 1 序

食品加工における加熱は殺菌目的だけではなく、食品の消化性、乳化性、ゲル化性などを改善する。豆乳においても加熱はさらに栄養障害物質を失活させ栄養性を向上させとともに豆腐のゲル形成にも重要な役割を果たしている。

タンパク質と脂質の抽出過程において大豆に含まれるリポキシゲナーゼ (Lipoxygenase)、トリプシンインヒビター (Trypsin inhibitor, TI)、ヘマグルチニン (Haemagglutinin) なども抽出されてくる。とくにトリプシンインヒビターは熱安定性の高い生理障害物質である。これには分子量20,000で、二つジスルフィド結合を持つ、181アミノ残基のKuniz型および分子量8000、七個のジスルフィド結合を持つ、71残基のBowman-Birk型がある (Kassell, 1970; Rackis, 1981; Birk, 1985; Di Pietro and Liner, 1989; Werner and Wemmer, 1992)。トリプシンインヒビターはトリプシンと1:1(モル比)で結合し、酵素-インヒビター複合体を形成し、酵素を失活させ、タンパク質の消化吸收を妨害する。そして内分泌細胞の増殖と膵臓の肥大を起こす (Rackis, 1974; Yanatori and Fujita, 1976; Bau *et al.*, 1997)。加熱はこれら栄養障害因子の失活手段としても重要である (Kwok and Niranjana, 1995)。

トリプシンインヒビターは高温で長時間処理しても完全には失活しない (Kwok and Niranjana, 1995)。そのため活性を栄養障害にならない程度に低下させ、しかも豆乳タンパク質の栄養性を劣化させない加熱条件として、豆乳の伝統的な方法である93~100℃、10~30分間が良いとされている (Johnson *et al.*, 1981)。

大豆中のリポキシゲナーゼは豆乳調製工程で不飽和脂肪酸を分解し、不快臭を生成させる (Wilkins *et al.*, 1967; Mattick and Hand, 1969)が、Wilkins *et al.* (1967)は80~100℃ 10分間加熱で豆乳中のリポキシゲナーゼは失活すると報告している。豆乳の加熱処理工程でリポキシゲナー

ぜは失活するものと考えられる。

加熱処理は酵素を失活させるだけでなく、タンパク質を変性させ、その分子表面の疎水性を増加させる。 $\beta$ -コングリシニンとグリシニンの表面疎水性はそれぞれ77℃と90℃で最大になることが知られている (Petruccelli *et al.*, 1996)。タンパク質の疎水性の増加は脂質—タンパク質会合体の形成を (Kamat *et al.*, 1978) 促進し、乳化性、泡立ち性などを改善する (Kato *et al.*, 1980; Kato *et al.*, 1983)。しかし、生豆乳中の脂質は加熱しなくても既にタンパク質と会合体を形成し粒子で存在することが知られている (Ono *et al.*, 1996)。生豆乳では、脂質と変性タンパク質の会合体が形成されているとは考えにくく、脂質の安定化に変性タンパク質との結合とは異なった機構があることが推定される。また、生豆乳では粒子中に含まれる脂質が、加熱により遊離することが指摘されている (Ono *et al.*, 1996)。そこで豆乳調製における加熱過程で脂質がどのように遊離し、またタンパク質とどのような結合を作るか明らかにしようとした。そのため、生豆乳を室温から95℃まで5℃間隔で順次加熱し、各加熱温度における脂質の分布および脂質—タンパク質会合体中タンパク質の組成を分析した。

## 2 材料および方法

### 1) 材 料

実験材料として岩手大学農場にて栽培した大豆スズユタカ (Species *Glycine max* var. *Suzuyutaka*) およびタチコガネ (Species *Glycine max* var. *tatikogane*) を用いた。

### 2) 生豆乳の調製および加熱処理

豆乳は Ono *et al.* (1991) の方法に従い調製した。大豆を 4℃で脱

イオン水に一晩浸漬し、これに乾燥重 10%になるように脱イオン水を加え、オースターブレンダーで 4 分間磨砕した。磨砕物（呉）は脱脂綿で吸引濾過し、濾液を遠心分離機（KOKUSAN）で  $800\times g$ , 10 分間遠心分離して得た上澄を生豆乳とした。生豆乳(100~150 ml)を三角フラスコ（容量 300 ml）に入れ、沸騰水中で豆乳温度  $90\sim 95^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保持し、次に氷水で冷却したものを豆乳とした。生豆乳の温度が所定の温度に達するのに 2 分間前後かった。

豆乳調製過程における加熱による脂質の遊離を詳細に検討するために生豆乳を 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 および  $95^{\circ}\text{C}$  で 5 分間以下のように加熱処理した。30ml の生豆乳を 100ml の三角フラスコに入れ、沸騰水中で加熱し規定温度に達したら速やかに規定温度のウォタバスに移し、5 分間保持する。その後氷水で室温（ $20^{\circ}\text{C}$ ）まで冷却した。このような加熱処理豆乳を以後加熱豆乳と記述する。

### 3) 超遠心分離による加熱豆乳の分画

豆乳のタンパク質は粒子および複合体として豆乳中に存在し、その大きさは粒径で  $30\sim 210\text{nm}$  に分布している(Ono *et al.*, 1991)。分画遠心分離法により豆乳粒子を粒径ごとに分画した。粒子の沈殿に要する時間は粒子の大きさに関係し、それは遠心機による遠心力場と溶媒の密度と粘度によって決定される。単位力場当たりの粒子の沈降速度は沈降定数  $S$  として定義され(1)式で表される。

$$S = \frac{\ln r_2 - \ln r_1}{\omega^2(t_2 - t_1)} \quad \text{..... (1)}$$

$\omega$  は角速度で  $\omega = 2\pi \cdot \text{rpm} / 60$ ,  $t_2 - t_1$  は粒子が位置  $r_1$  から  $r_2$  まで移動するに要する時間( $T_s$ )である。球状粒子の場合沈降定数と粒子の大きさとの関係は、溶媒中沈降する粒子に作用する力と摩擦との関係から Stokes の法則が適用され、次式が得られる。



$$d^2 = \frac{18\mu S}{(\sigma - \rho)} \quad \text{.....} \quad (2)$$

ここで  $d$  は粒子の直径,  $\mu$  は溶媒の粘度,  $\rho$  は溶媒の密度,  $\sigma$  は溶質粒子の密度である。直径  $d$  の粒子が沈降するに要する時間  $T_s$  (second) は (1) と (2) 式より (3) 式のように書ける。

$$\begin{aligned} T_s &= \frac{18\mu}{d^2(\sigma - \rho)} \cdot \frac{\ln R_{\max} - \ln R_{\min}}{\omega^2} \\ &= \frac{18\mu}{d^2(\sigma - \rho)} \cdot \frac{(\ln R_{\max} - \ln R_{\min}) \cdot (60)^2}{(2\pi \cdot \text{rpm})^2} \quad \text{.....} \quad (3) \end{aligned}$$

ここで  $R_{\max}$  は回転軸からチューブの底までの距離,  $R_{\min}$  は回転軸から溶液の表面までの距離である。

ロータと遠心機の設定から決まる値を performance Index,  $pi$  としてまとめると (4) 式となり,

$$Pi = \frac{\text{rpm}^2}{\ln R_{\max} - \ln R_{\min}} \quad \text{.....} \quad (4)$$

粒子の沈降時間  $T_m$  (min) はこの  $Pi$  を用いると次式のように書ける。

$$\begin{aligned} T_m &= \frac{60}{4\pi^2} \cdot \frac{1}{Pi} \cdot \frac{18\mu}{(\sigma - \rho)d^2} \\ &= 27.4 \cdot \frac{\mu}{Pi (\sigma - \rho)d^2} \quad \text{.....} \quad (5) \end{aligned}$$

そこで超遠心機 (HITACHI 85P-72, Automatic Preparative Ultracentrifuge) および RP-65 ローターを使用し、(5) 式をもとにして分画する粒径 ( $d$ ) を  $Pi$  と  $T_m$  から決定し、豆乳の粒径による分画を行った。

生豆乳あるいは豆乳を室温で  $156,500 \times g$ , 30 分間遠心して得られる

沈澱画分は 40~200nm の粒子画分、その上澄は 40nm 以下の小粒子画分である。さらに、これらの遠心によりチューブの液面に浮上するクリーム状のものを浮上画分とした。このようにして得られた各画分はポッター型ホモジナイザーで脱イオン水に分散し液体窒素で凍結後、凍結乾燥した。

#### 4)大豆全タンパク質の調製および試料タンパク質含量の測定

乾燥した大豆をフードミルで粉碎して得たミールに 10 倍容のヘキサンを加え室温で攪拌後ろ過した。それを 3 回繰り返して脱脂した。残ったヘキサンは室温で減圧しながら除去した。この脱脂ミールから大豆全タンパク質を調製した。大豆全タンパク質はタンパク質含量測定等の標準として使用した。

豆乳各画分タンパク質含量の測定は Smith *et al.*(1985)のビシコニン酸(bicinchonimic acid)法によって行った。すなわち 100 $\mu$ l サンプル溶液に 2ml ビシコニン酸試薬を添加し、37°C, 30 分間インキュベートしてから室温まで冷却し、526nm の波長で吸光度を測定した。検量線は大豆全タンパク質を用いて作成した。

#### 5)各画分中脂質含量の測定

豆乳全脂質は Folch *et al.*(1957)の方法により抽出した。凍結乾燥した豆乳に 10 倍容のクロロホルム：メタノール=2:1 を加え、室温で 3 時間振とう後濾過した。残渣を同様に抽出し、抽出液を合した。その抽出液に 0.2 容の 0.9 %塩化カリウムを添加し、非脂質を含む上層を捨て、クロロホルム層を得た。この溶液中の脂質を全脂質とした。

全脂質はシリカゲルカラムで溶出し、中性脂質、糖脂質およびリン脂質の各グループに分画した(Rouser *et al.*, 1967)。カラムは Silica gel 60 (Merk 製, 100 メッシュ)のクロロホルム懸濁液をコックつき、内径(1.25cm)ガラス管に高さ 25cm になるように注入し(カラムの径と高

さの比が 1:20)、溶媒を 2~3ml/min の流速で流下し調製した。溶媒がカラムの上面近くまで流下したら、さらにカラムのやく 2 倍容のクロロホルムを流下しカラムを調製した。次、150~200mg の試料をクロロホルム 5ml に溶かしカラムに注入し、200ml クロロホルム、400ml アセトン、400ml メタノールの順で溶出した。クロロホルム溶出画分を中性脂質、アセトン溶出画分を糖脂質、メタノール溶出画分をリン脂質とした。

#### 6) 豆乳粒子分散液の調製と加熱処理

生豆乳 90 ml を用いて 156,500×g 30 分間で超遠心分離を行い、得た粒子画分を豆乳の限外ろ液に分散し、90 ml 生豆乳粒子分散液を調製した。この分散液を 75℃ で 5 分間加熱し、室温に冷却後さらに超遠心分離により沈殿、上澄および浮上画分を分画した。ほかの画分と区別するためここで得た三つ画分をそれぞれ 75℃ 粒子画分、75℃ 可溶性画分および 75℃ 浮上画分とした。

豆乳限外ろ液は本章 3) 記述に従って超遠心分離により得た可溶性画分を用いて限界分子量 10000 の UK-10 膜 (Advantec Toyo Ltd) で調製した。

#### 7) 豆乳浮上画分に含まれる可溶性成分の除去

豆乳の浮上画分は遠心分離によって豆乳から浮上するクリーム状のものである。この中にタンパク質、糖質など水溶性成分が混在している。柴崎ら (1972) は豆乳から分離したクリーム状物質中の可溶性成分が三回の水洗で除かれると報告している。そこで豆乳から超遠心分離 (156,500×g 30 分間) によって分離した浮上画分を 20 倍の水に分散後さらに遠心し、浮上画分を洗った。この操作を 3 回行い、得た浮上画分を凍結乾燥した。この浮上画分をヘキサンで脱脂後、SDS-PAGE でタンパク質組成を分析した。

## 8) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質組成を調べるため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) は高木の記述に従い Laemmli 法により、BIO CRAFT MODEL BE-210 スラブ型電気泳動装置 (10x10cm、ゲル厚さ 1mm) を用い、SDS-Tris Glycine 緩衝液系で行った。分離ゲルはゲル濃度 12.5%、架橋度 2.7% で、0.1% SDS, 0.375M Tris-HCl (pH 8.8) を含み、濃縮ゲルは、ゲル濃度 4%、架橋度 2.7% で 0.1% SDS, 0.125M Tris-HCl (pH 6.8) を含んでいた。泳動用試料はタンパク質サンプルに脱イオン水と試料処理液 (0.063M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 20% Glycerol) を同量加え溶解させた後、終濃度が 2% になるように 2-ME を添加し、60°C で 1 時間あるいは室温で一晩放置後、適当量のブロモフェノールブルー (Bromophenol Blue, BPB) 溶液を添加し調製した。泳動用緩衝液は 0.1% SDS を含む 25 mM Tris, 0.192 M Glycine 溶液を 5 倍に希釈し、泳動毎に新しいものを使用した。泳動は濃縮層で 15mA、分離層では 25mA で行った。泳動後の染色および脱色は、Blakesley and Boezi (1977) の方法で行った。33% メタノールを含む 12% トリクロロ酢酸 (Trichloroacetic Acid, TCA) 溶液でゲルを洗浄後、12% TCA を含む 0.2% クマシーブリリアントブルー (Coomassie Brilliant Blue, CBB) G-250 溶液を用いて一晩染色後、水道水で一晩振盪する拡散法で脱色した。泳動マーカーとして Bovine serum albumin (MW 66,000), ovalbumin (MW 45,000),  $\beta$ -casein (MW 24,000) および lysozyme (MW 13,000) を用いた。染色した電気泳動ゲルはスキャナー (HEWLETT PACKARD Scanjet 4C) で走査しコンピューターに画像を取り込み、Scion image ソフト (Scion Corporation) で泳動バンドの濃度を分析し、各バンドの割合を計算した。

## 9) SDS-ポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動

脂質-タンパク質複合体のタンパク質サブユニット間S-S結合を検討するため、Utsumi *et al.* (1984)の方法を参考にして還元剤の有無でSDS-ポリアクリルアミド二次元電気泳動を行った。

泳動用試料はヘキサンで脱脂し、試料処理液(0.063 M Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 20% Glycerol)を2倍に希釈し加え、さらに尿素を6 M添加後、室温で一晩放置した。この試料を本章6)の記述にしたがいSDS電気泳動を行った。泳動したレーン(Lane)は切り出して、0.2 M 2-MEを含む62.5 mM Tris-HCl buffer (pH6.8, 1% SDS, 20% sucrose)に55℃30分間浸漬した後、電気泳動分離ゲル上に載せ、二次元目の泳動を行った。一次元、二次元両分離ゲルともT=12.5%、架橋度C=2.7%を用いた。

### 3 結果

#### 豆乳調製過程での加熱による脂質の解離機構

浸漬大豆から調製した生豆乳中脂質の大部分はタンパク質粒子に存在しているが、95℃まで加熱するとほとんどの脂質は粒子から遊離することが知られている(T. Ono *et al.*, 1996)。そこでこの脂質の解離がどの加熱段階で発生し、それが粒子中タンパク質の熱変性と関与するのかどうか研究を行った。50℃から95℃まで5℃ずつ温度を増加させ生豆乳を加熱し、粒子画分(粒径40nm以上)、可溶性画分、浮上画分を分画した。Figure 1に加熱温度に対する各画分量の変化を示す。65℃まで各画分量に変化は見られなかった。65℃から75℃で粒子画分量が急激に減少し、75℃以上で緩やかになり、それは95℃まで続いた。これに対して可溶性画分は65℃から75℃までは増加し、80℃まで減少後、一定の値になった。この値は最初の未変化の値よりも少し高かった。一方、浮上画分は70℃から温度の増加に伴って急激に増加し、90℃以上でこの増加は緩やかになった。この結果は未加熱(生)豆乳粒子が65℃以上の加熱で破壊され、一部が可溶性画分に移行し、さらにその移行

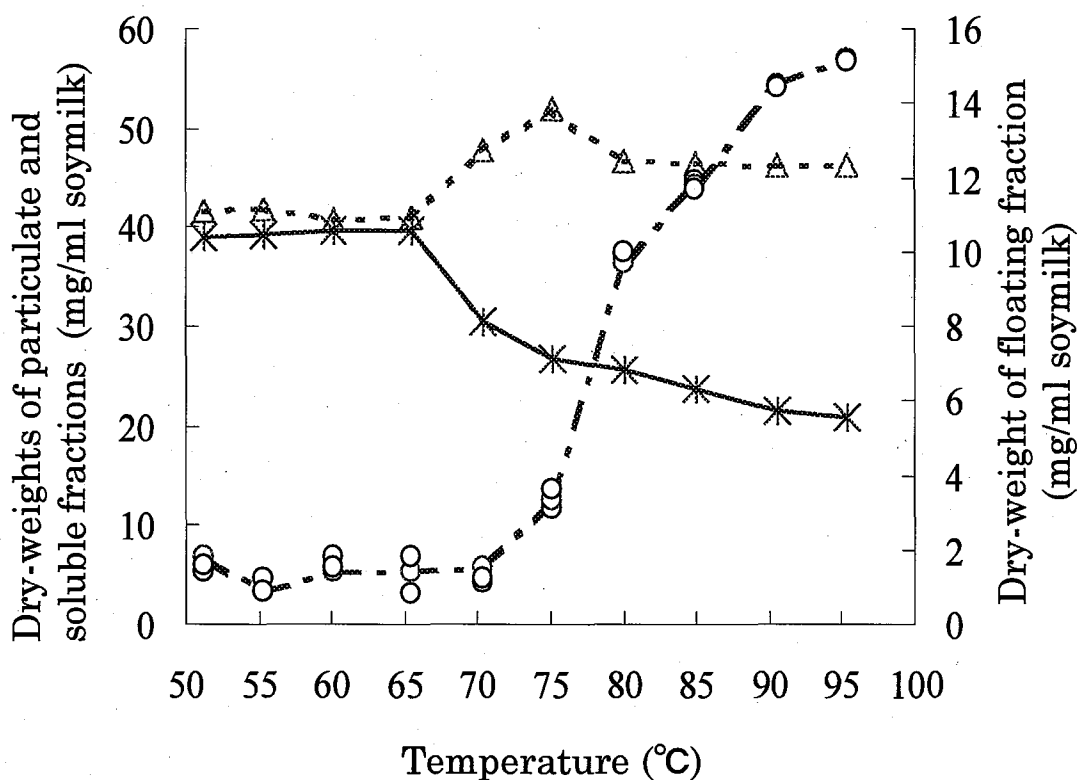


Figure 1 Dry-weight of each fraction obtained from unheated soymilk at elevated temperature. The soymilk was heated at a specific temperature for 5 min, cooled to 20 °C, and fractionated to particulate (×), soluble (Δ), and floating (○) fractions by centrifugation at 156,500 × g for 30 min.

したものが75℃以上の温度で浮上画分に移動したことが分かった。

次に、タンパク質粒子の破壊に伴う脂質の移行を明らかにするため、各加熱温度における各画分の脂質含量を測定した。Figure 2に示すように粒子中の脂質は65℃から75℃まで急激に減少し、それ以上で緩やかになった。可溶性画分の脂質は65℃から75℃まで増加後80℃まで減少し、それ以上で緩やかに減少した。75℃で、粒子中脂質の75%が遊離し、その三分の二は可溶性画分、三分の一は浮上画分へ移行した。浮上画分脂質の増加は粒子画分脂質の低下より5℃高い、70℃から始まり、90℃～95℃粒子画分脂質の量とほぼ同じになった。これらのことから粒子中脂質は加熱による粒子の破壊に伴い (Figure 1)、75℃でその脂質の半分が浮上画分に移行し、残りの半分は可溶性画分にいったん移行した後、さらなる加熱で浮上画分へ移行することが分かった。

#### 加熱によるタンパク質粒子の再構成と脂質解離との関係

大豆タンパク質は加熱により変性し、サブユニットに解離後会合体を形成することが知られている (Hermansson, 1986)。前節で粒子が65℃～75℃で解離し、その一部が可溶性画分へ移行することを示した (Figure 1)。そこで生豆乳の粒子を75℃で加熱後、生成する75℃の各画分のタンパク質組成をSDS-PAGEにより分析した。

Figure 3に大豆タンパク質、生豆乳粒子とともに泳動パターンを示す。このパターンをデンストメーターで解析したところ、生豆乳粒子 (lane c) はグリシニンのA、Bサブユニットを1:1の割合で含み、全タンパク質の70%を占めていた。75℃粒子画分 (lane d) ではβ-コングリシニンのα'、αサブユニットがβ-サブユニットに比して少なく、α'、αサブユニットが粒子から解離したことを示唆している。75℃可溶性画分 (lane e) はβ-コングリシニンのα'、αサブユニットを多く含むとともにグリシニンを多量に含んでいた。β-コングリシニンとグリシニンはそれぞれ36%と47%で含まれていた。75℃浮上画分 (lane f) はβ-コングリシニンのバンドが薄く、グリシニンおよびLiII basic 7Sが多く現れ、さらにbasic近傍に二つのはっきりしたバンドが現れた。こ

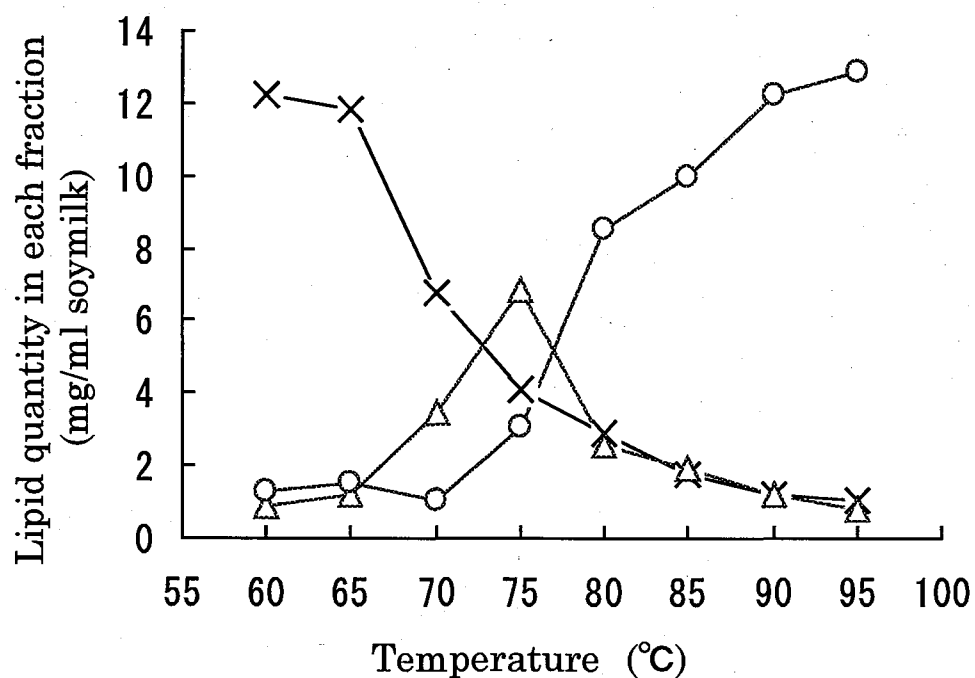


Figure 2. Lipid quantity in the particulate, soluble and floating fractions of unheated soymilk at elevated temperature. The unheated soymilk was heated at a specific temperature for 5 min and cooled to 20 °C. Particulate (×), soluble (Δ), and floating (○) fractions were obtained by centrifugation at 156,000 × g for 30 min.



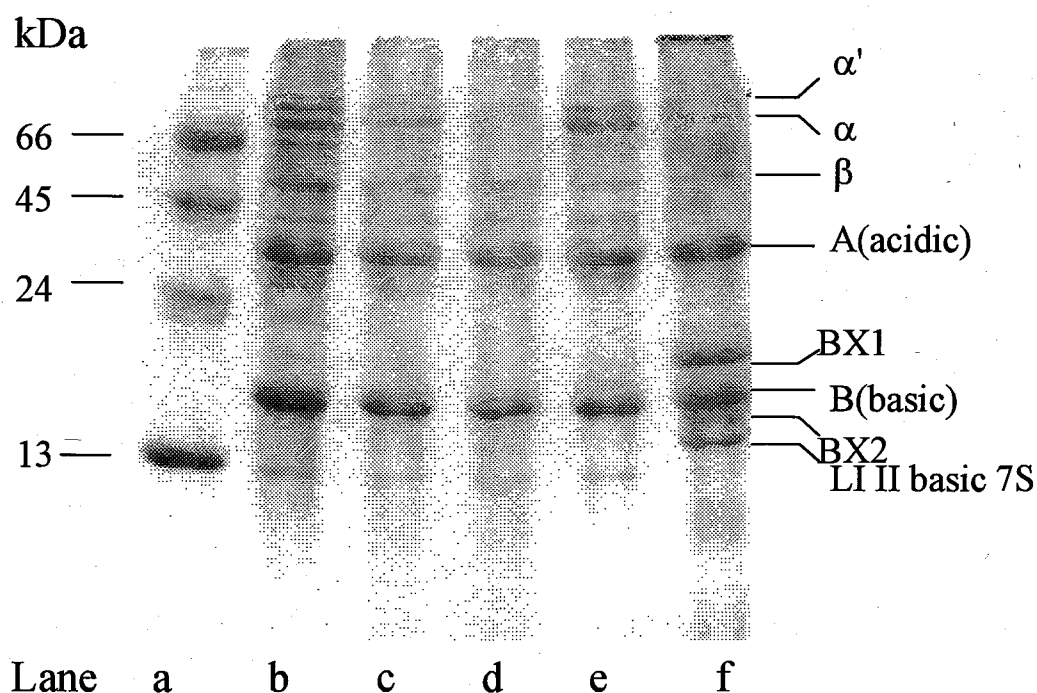


Figure 3. SDS-PAGE patterns of each fraction obtained from heated dispersion of unheated particulate fraction of soymilk. The dispersion was heated at 75 °C for 5 min and cooled to 20 °C, and then fractionated particulate, d, soluble, e, and floating, f, fractions by centrifugation at 156,000 × g for 30 min. a, molecular weight standard; b, soybean protein; c, unheated particulate fraction; α', α and β, subunits of β-conglycinin; A and B, acidic and basic subunits of glycinin.

れら二つのバンドは以後BX1、BX2とした。この画分中のタンパク質の組成割合は $\beta$ -コングリシニン、グリシニン、BX1、BX2およびLiII basic 7Sがそれぞれ18%、34%、18%、8%、11%であった。この結果は75℃加熱で粒子タンパク質が解離し、とくに粒子中 $\beta$ -コングリシニンの $\alpha$ 、 $\alpha'$ サブユニットはほとんどが解離したことを示している。

Ono *et al.* (1991)は豆乳可溶性画分を95℃で加熱した場合粒子が生成されることを指摘した。そこで豆乳の加熱に伴う可溶性画分タンパク質の濃度変化と脂質の遊離を検討した。60℃～95℃まで漸次加熱した場合の可溶性画分タンパク質濃度の変化をFigure 4に示す。70℃以上の加熱でタンパク質濃度は増加し、この濃度増加の温度は脂質の遊離温度 (Figure 2) とほぼ一致した。脂質は75℃で最大値になるが、タンパク質は80℃で最大になった。85℃以上に加熱するとタンパク質濃度は低下し、90℃～95℃では60℃での濃度に戻った。これは85℃以上の加熱で可溶性画分中タンパク質の一部が他の画分に移行したことを示唆している。

つぎに加熱により可溶性画分中に移行したタンパク質組成を明らかにするため、各加熱温度での可溶性画分タンパク質のSDS-PAGEを行った。Figure 5に示すように70℃から温度の増加につれて $\beta$ -コングリシニンの $\beta$ サブユニットバンドの濃さが減少し、グリシニンのAおよびBサブユニットのバンドが大きくなった。デンスitomーターにより各サブユニットの割合を分析し、Figure 6に示す。60℃から95℃で $\beta$ サブユニットは18%から10%に減少し、Aサブユニットは9%から20%へ増加した。Bサブユニットは11%から85℃で22%に増加したが、95℃では13%に減少した。 $\beta$ -コングリシニンの $\alpha'$ と $\alpha$ サブユニットは65℃～70℃で増加したが、75℃以上ではほぼ一定の値を示した。 $\beta$ -コングリシニンは75℃で、 $\alpha'$ 、 $\alpha$ サブユニットが解離し可溶性画分に移行する (Iwabuchi *et al.*, 1991)。しかし豆乳可溶性画分中の $\alpha'$ 、 $\alpha$ サブユニットの割合は75℃で低下した (Figure 6)。これはグリシニンの可溶性画分への移行によるもので、 $\alpha'$ 、 $\alpha$ サブユニットの割合が相対的に減少したものではないかと考えられる。

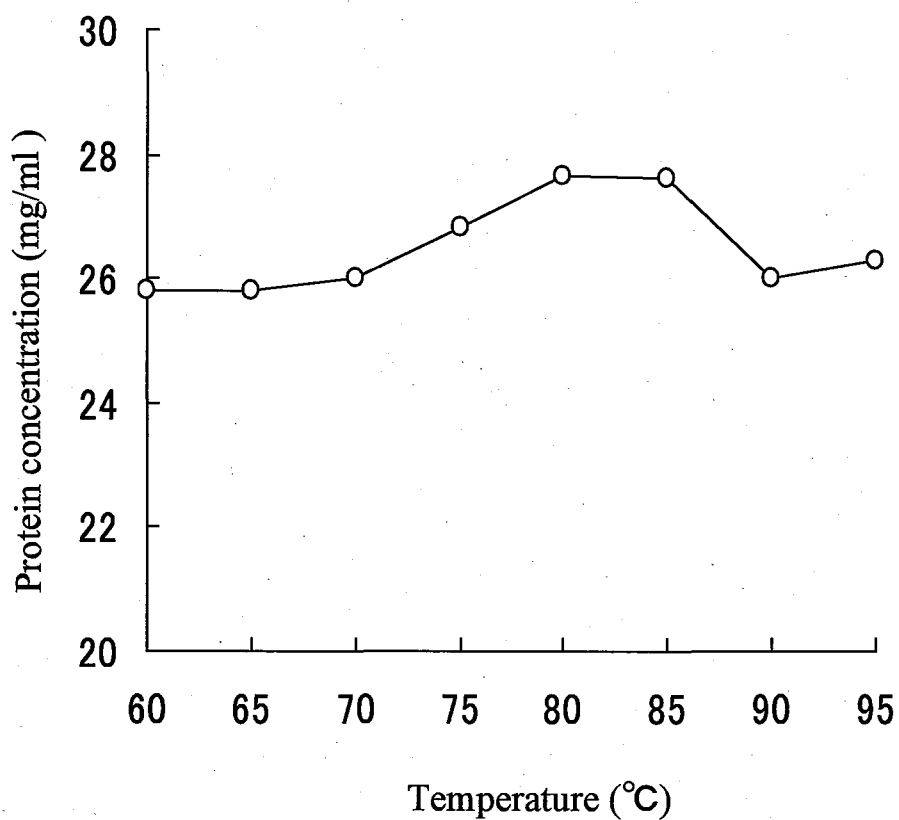


Figure 4. Changes in the protein concentration of the soluble fraction of soymilk by heating. The unheated soymilk was heated at a specific temperature for 5 min and cooled to 20°C. The soluble fractions were obtained from these soymilk by centrifugation at  $156,000 \times g$  for 30 min.

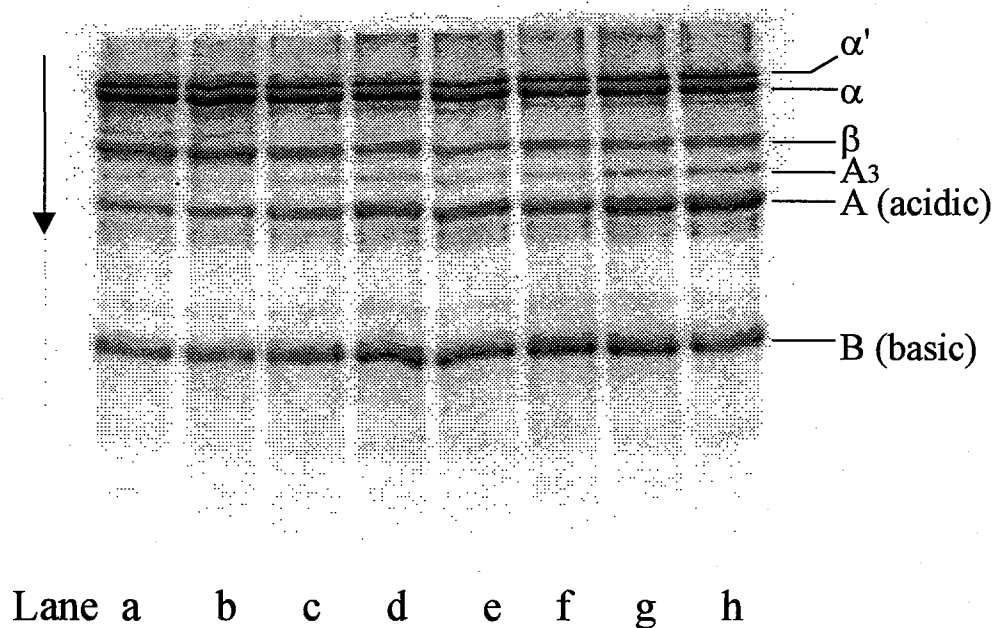


Figure 5. SDS-PAGE patterns of the proteins in soluble fraction of soymilk obtained at various temperatures. The sample was obtained from heated soymilk by centrifugation at  $156,000 \times g$  for 30min. a, 60 °C; b, 65 °C; c, 70 °C; d, 75 °C; e, 80 °C; f, 85 °C; g, 90 °C; h, 95 °C.

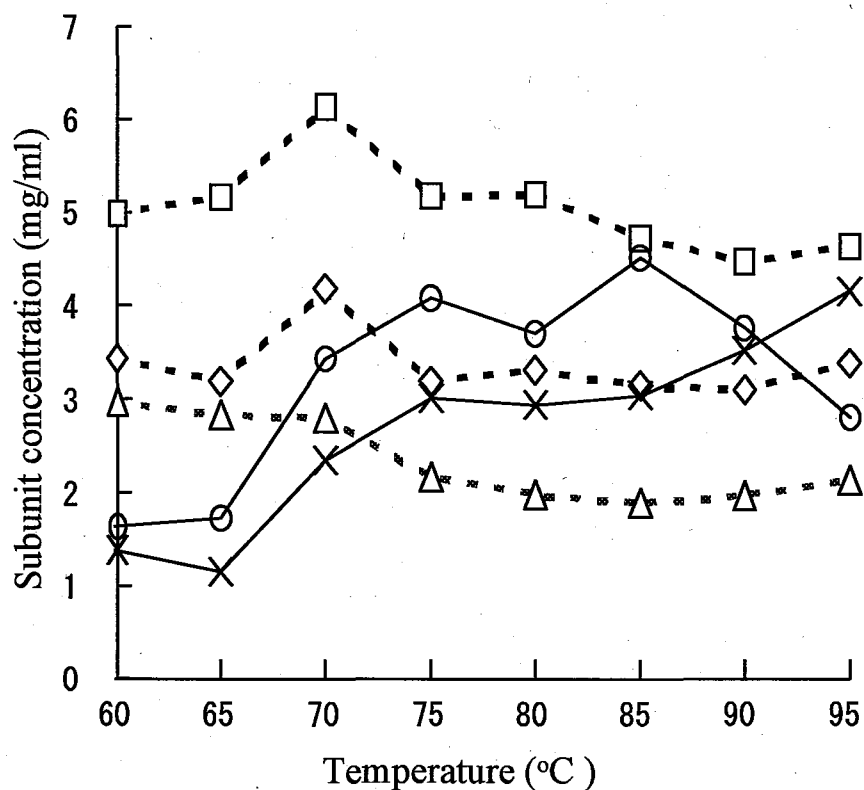


Figure 6. Changes in subunit concentration of glycinin and  $\beta$ -conglycinin in the soluble fraction of soymilk by heating from 60 °C to 95 °C.  $\beta$ -conglycinin:  $\alpha'$  subunit (◇);  $\alpha$  subunit (□);  $\beta$  subunit (△); glycinin: acidic subunit (×); basic subunit (○). The subunit concentration was obtained by estimating from both of the relative ratio of each subunit and the protein concentration in the soluble fraction.

## 豆乳中の脂質—タンパク質会合体

脂質は生豆乳ではその大部分が粒子画分に含まれるが、豆乳の加熱調製過程で粒子から遊離し、遠心分離によって浮上する。この浮上画分は大量の脂質と少量のタンパク質からなり、 $\beta$ -コングリシニン、グリシニン以外にBX1とBX2と名付けたタンパク質を含んでいた。そこで豆乳から浮上画分を分離精製し、その構成タンパク質について検討した。

豆乳の浮上画分は遠心分離によって浮上するクリーム状のものである。柴崎ら（1972）の方法に従い可溶性成分を三回の水洗で除き、浮上画分を調製し、その組成を分析した。脂質85.5%、タンパク質14.5%であり、脂質には中性脂質が82.3%、リン脂質が3.1%含まれていた。

豆乳浮上画分中タンパク質を異なる大豆品種で確認するため、大豆スズユタカ及びタチコガネを用いて調製した。これらの浮上画分をヘキサンで脱脂し、そのタンパク質組成をSDS-PAGEで分析した。大豆タンパク質と豆乳のタンパク質の泳動パターンをFigure 7に示す。未加熱豆乳の浮上画分タンパク質はスズユタカ、タチコガネとも主なバンドがグリシニン、A3およびLI II basic 7sである（Lane d とf）。これに対して豆乳から分離した浮上画分タンパク質の主なバンドはBX1とBX2およびLI II basic 7Sで（Lane e とg）、少量のグリシニンと $\beta$ -コングリシニンを含んでいる。この結果は未加熱豆乳および加熱調製した豆乳の浮上画分がそれぞれ異なるタンパク質から構成されることを示している。

次にデシトメーターを用いてスズユタカ大豆の生豆乳と豆乳から得た浮上画分中タンパク質のサブユニットの割合を各タンパク質の染色率を同一であるとして計算し、Table 1に示す。未加熱豆乳から得た浮上画分タンパク質はBX1とBX2がそれぞれ3%と13%であった。一方、豆乳から得た浮上画分のタンパク質はBX1、BX2をそれぞれ28%、27%含み、両者合わせて浮上画分タンパク質の55%を占めた。しかし、豆乳浮上画分に含まれるBX1、BX2の量は豆乳タンパク質全体のわずか

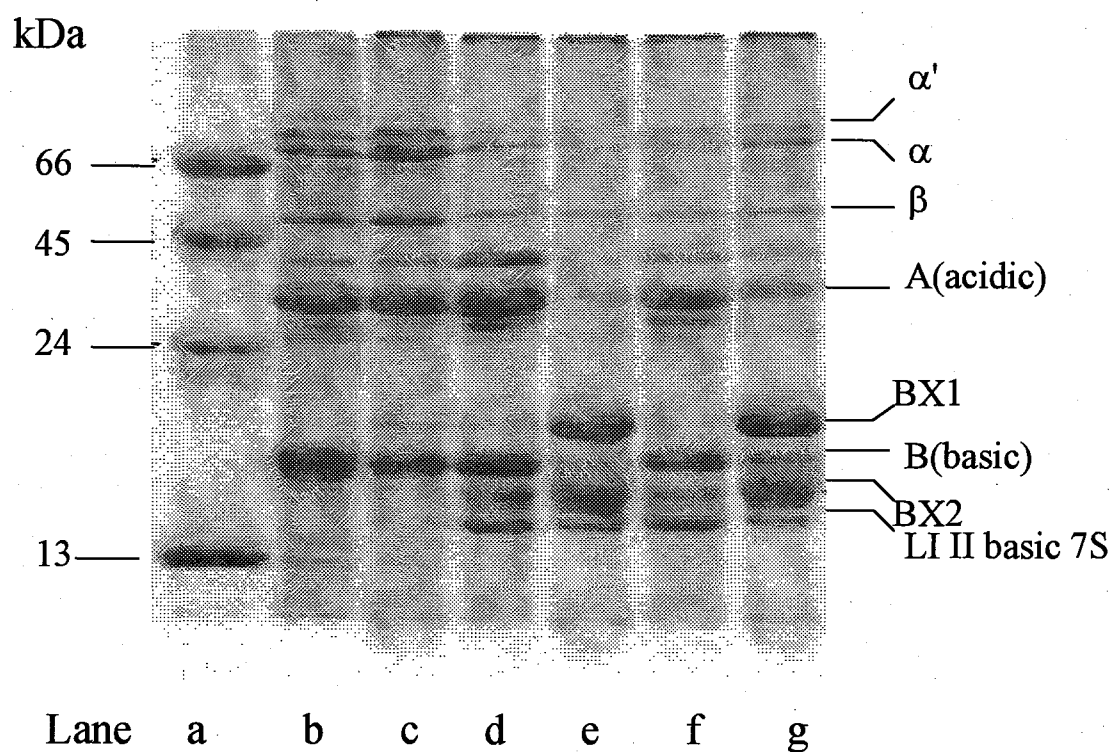


Figure 7. SDS-PAGE patterns of protein in floating fraction obtained from soymilk (95 °C). a, molecular weight standards; b and c are proteins of soybean and soymilk, respectively; d and e are proteins in floating fractions from unheated and heated soymilk for tatikogane, respectively; f and g are proteins in floating fraction from unheated and heated soymilk for suzuyutaka, respectively.

Table 1. Relative ratio of each subunit in protein of floating fraction and in soymilk protein

Subunit	Relative ratio of each subunit (%)			
	from unheated soymilk		from heated soymilk(95°C)	
	in floating fraction	in soymilk	in floating fraction	in soymilk
$\alpha'$	2.6	0.03	4.5	0.22
$\alpha$	4.6	0.06	7.1	0.35
$\beta$	3.4	0.04	4.9	0.24
A <sub>3</sub>	6.3	0.08	2.3	0.11
A	21.4	0.26	8.7	0.43
BX <sub>1</sub>	2.8	0.03	27.7	1.53
B	18.2	0.22	10.6	0.52
BX <sub>2</sub>	13.1	0.16	27.0	1.32
Others	26.9	0.33	7.3	0.34
Sum	100.0	1.21	100.0	4.88

the soymilk was prepared from soybean suzuyutaka variety.



2.8%を占めるだけである。

豆乳浮上画分中タンパク質の分子量をSDS-PAGEにより分析した。分子量既知のBovine serum albumin (MW66,000), ovalbumin (45,000),  $\beta$ -casein (24,000), lysozyme (13,000) (Figure 3.3.7 lane a)と比較して分子量を求めたところ、Figure 8に示すようにBX1とBX2の分子量はそれぞれ21,000と16,000であった。

大豆タンパク質は含硫アミノ酸を含んでいて、スルフヒドリル基(SH基)により加熱やpH変化などでジスルフィド結合(S-S)を形成することが知られている (Utsumi *et al.*, 1984; Petruccelli and Añón, 1995a)。そこで電気泳動を用いて浮上画分タンパク質間にジスルフィド結合(S-S)があるかどうかについて検討した。豆乳浮上画分から得たタンパク質はヘキサンで脱脂後、還元剤を含まない試料処理液で処理し一次元目の用電気泳動試料とした。これをSDS-PAGEで泳動後、ゲルから切り取り、2-メルカプトエタノールで処理後、ふたたび泳動した。タンパク質を二次元に泳動すると還元剤の有無で同じ分子量であれば同じ移動度を持つので、対角線上にバンドが現れる。2-メルカプトエタノールがタンパク質中のS-S結合を切断し、タンパク質会合体を解離させると、泳動バンドは対角線上の位置から外れる。Figure 9の分析結果ではBX1とBX2バンドとも対角線上に現れ、豆乳中の脂質—タンパク質会合体中のタンパク質サブユニット間にS-S結合による会合体は存在しないことが分かった。

#### 4 考 察

豆乳の調製過程において大豆から抽出された脂質の大部分は粒子中に含まれ、脂質—タンパク質会合体を形成している。この会合体中のほとんど脂質(中性脂質)は加熱により遊離した。そこで加熱による脂質遊離とタンパク質変性との関係を検討した。

生豆乳粒子は30%の $\beta$ -コングリシニンと70%のグリシニンを含んでいるが (Ono *et al.*, 1991)、65℃以上の加熱で解離し、可溶性画分の

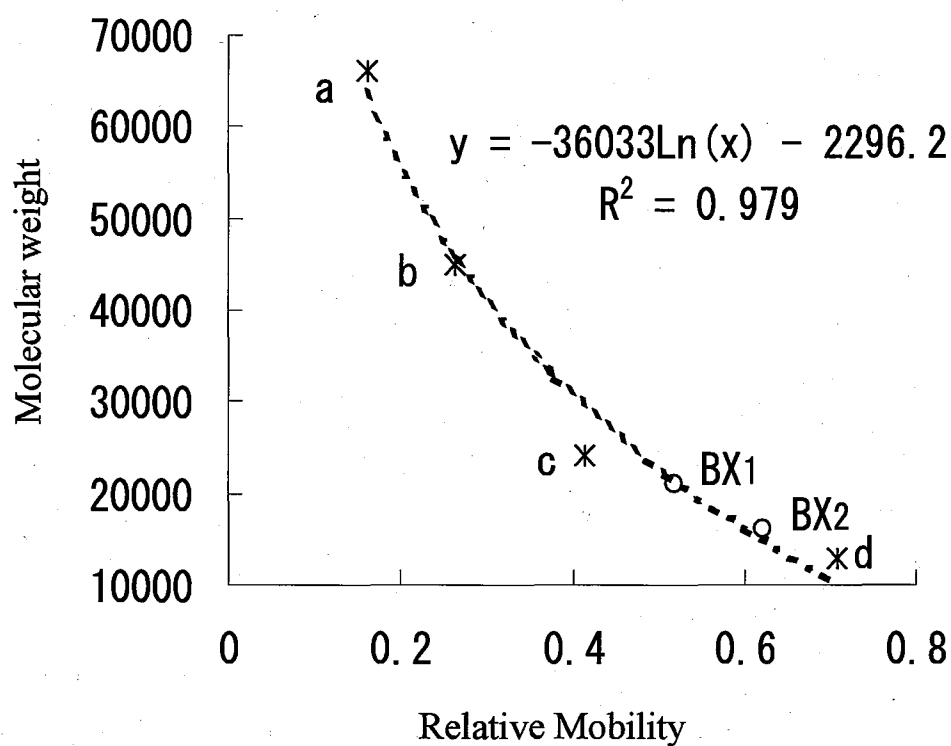


Figure 8. Molecular weight calibration curve obtained by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Standard proteins: a, bovine serum albumin; b, ovalbumin; c,  $\beta$ -casein; d, lysozyme.

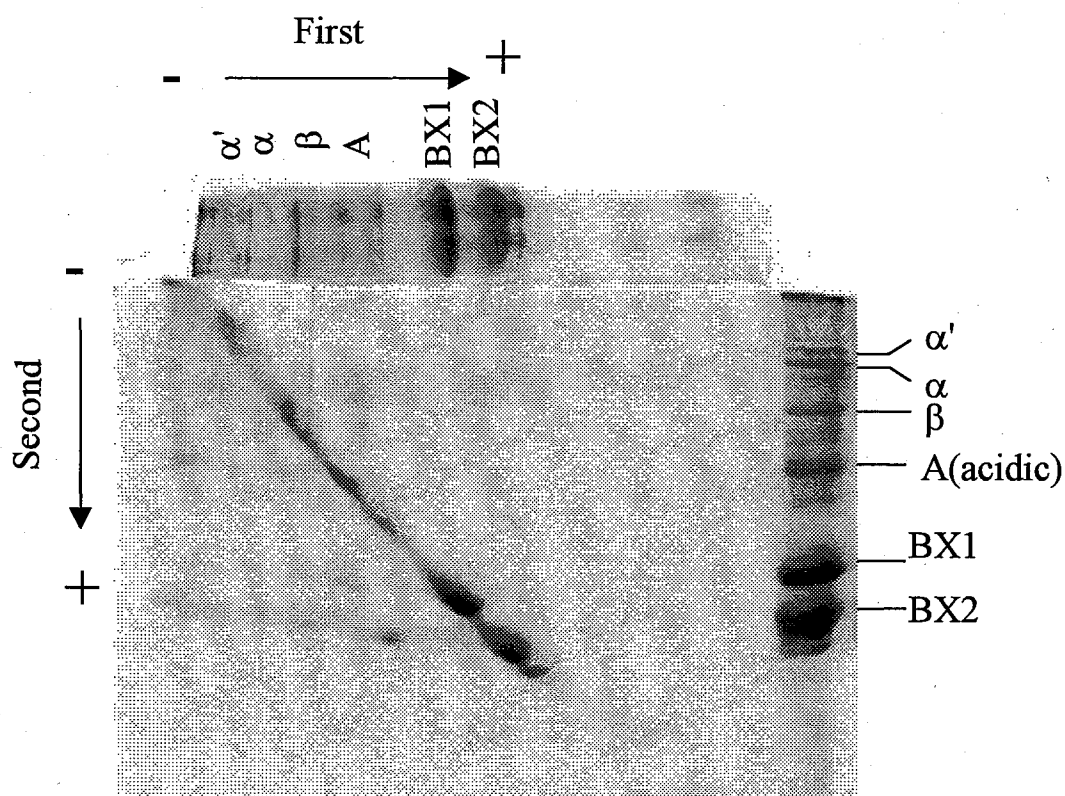


Figure 9. Two-dimensional electrophoresis of the protein in floating fraction from soymilk. First -dimension SDS-PAGE was carried out using the sample without 2-ME. The lane in first -dimension was treated with 0.2 M 2-ME at 55 °C for 30 min, and then it was used for the second-dimension SDS-PAGE.

増加が始まり、75℃で最大となった (Figure 1)。β-コングリシニンの変性温度は65℃～80℃で、β-シート構造が減少し、ランダム構造が増加することが知られている (Nagano *et al.*, 1995; Morita *et al.*, 1996)。親水ドメインの反発力によってα'、αサブユニットが解離するためとされている (Iwabuti *et al.*, 1991a, b)。豆乳粒子の解離が始まる温度はβ-コングリシニンの変性温度と一致した。粒子画分中β-コングリシニンのα'、αサブユニットが減少し、可溶性画分に移行し、さらにグリシニンの移行も見られることから、粒子の崩壊が起こったことが分かった (Figure 3、Figure 5およびFigure 6)。β-コングリシニンおよびグリシニンの変性温度範囲は67～76℃および80～91℃である。この変性温度はイオン強度の影響を受け、0.05M NaClでβ-コングリシニンは70～77℃に、グリシニンでは84.5～92.5℃になることが知られている (Hermansson, 1986; Ker *et al.*, 1990)。豆乳のイオン強度は0.05～0.1であり (山内, 1994)、65℃～75℃加熱での豆乳粒子の破壊および可溶性画分へのタンパク質の移行はβ-コングリシニンの変性が関与していると考えられる。変性しないグリシニンが可溶性画分に増加するのは粒子にβ-コングリシニンによって結合しているためと考えられる。

豆乳のイオン強度を0.05とするとグリシニンの変性温度は80～91℃であり、AサブユニットとBサブユニットに解離する。85℃以上では解離したサブユニットが新たな会合体を形成することが知られている (Mori *et al.*, 1981; Watanabe, 1986)。加熱により解離したグリシニンのBサブユニットとβ-コングリシニンのβ-サブユニットは疎水結合とS-S結合により会合体を形成し、α'、αおよびグリシニンのBサブユニットは可溶性画分に残される (Yamagishi *et al.*, 1983; Petrucci and Añón, 1995b)。豆乳を用いた本研究においても同様結果が得られた。80℃以上の加熱で可溶性画分にグリシニンが増加し (Figure 5)、85℃以上ではBサブユニットの減少が見られた (Figure 6)。可溶性画分中にBサブユニットの減少は新しい粒子が形成したためと考えられる。

未加熱豆乳中の粒子は豆乳脂質の80%を含んでいる。これら脂質の半分は75℃加熱で可溶性画分に、その三分の一は浮上画分へ移行した。80℃加熱でさらに遊離は進行し、95℃ではほとんどの脂質が浮上画分に移行した(Figure 2)。脂質の浮上画分への移行温度はグリシニンの熱変性温度と一致する。グリシニンの疎水性残基は65℃から露出を開始し、90℃で最大になると報告されている(Watanabe 1986; Matsudomi *et al.*, 1985)。このことは脂質の遊離が生豆乳中粒子のグリシニン熱変性と関係していることを示唆している。したがって、豆乳調製時の加熱による脂質の遊離は二段階で起こると考えられる。第一段階は75℃までの加熱で、 $\beta$ -コングリシニンの解離による粒子の解離で、脂質の半分がグリシニンと結合したまま可溶性画分に移行する。第二段階は80℃以上の加熱で、粒子および可溶性画分中のグリシニンが変性し脂質が遊離する。

生豆乳と豆乳の浮上画分を較べると、豆乳の方がタンパク質を多く含んでいる(T. Ono *et al.*, 1996)。豆乳浮上画分にはグリシニン、 $\beta$ -コングリシニンおよびBX1、BX2タンパク質が含まれていた。しかし浮上画分を水へ分散し洗浄すると浮上画分中のグリシニン、 $\beta$ -コングリシニンの大部分は除かれ、残ったタンパク質は主にBX1、BX2であった(Figure 7)。生豆乳粒子の75℃加熱で生成した浮上画分にはBX1、BX2が明確なバンドとして現れた(Figure 3)。これらのことから豆乳浮上画分のBX1、BX2は加熱により脂質と一緒に粒子から解離して来たことが分かった。しかし、同じ洗浄法を用いても生豆乳浮上画分のタンパク質はグリシニンが主で、BX1、BX2は少なかった(Figure 7)。BX1、BX2はグリシニンと近い等電点を持ち、大豆磨砕によるタンパク質の抽出過程でBX1、BX2がグリシニンと結合しやすいことが報告されている(小野ら、1998)。したがって、生豆乳浮上画分が洗浄してもグリシニンを多く含むのは未加熱でBX1、BX2とグリシニンが結合しているためと考えられる。

SDS-PAGE分析によりBX1、BX2間、およびBX1、BX2とほかのタンパク質間にS-S結合は存在しなかった(Figure 9)。またSDS電気泳動

法によるBX1、BX2の相対分子量はそれぞれ21,000と16,000であった(Figure 8)。Tzen *et al.* (1990)はさまざまな植物種子中に含まれるオイルボディの構造を研究し、オイルボディが疎水性タンパク質、オレオシンを含むこと、大豆種子のオレオシンの分子量が24,000と18,000であることを報告している。大豆オレオシン24,000のタンパク質の一次構造が明らかにされていて、C、N末端は両親媒性ドメインを形成し、中間部分は疎水ドメインを形成している。しかもこのタンパク質が含硫アミノ酸を含んでいなかった(Tzen *et al.*, 1992)。分子量、S-S結合について、BX1、BX2と大豆オレオシンを比較するとこれらは極めて類似している。豆乳の浮上画分から得たBX1、BX2はグリシニン、 $\beta$ -コングリシニンなどのプロテインボディタンパク質由来ではなく、オイルボディが豆乳調製過程でグリシニン、 $\beta$ -コングリシニンと結合し粒子に取り込まれ、加熱により結合が切れ遊離した。オイルボディに含まれるオレオシンがBX1、BX2として確認されたのではないかと考えられる。しかしBX1、BX2の帰属にはタンパク質の一次構造、性質などの研究が必要である。

## 5 要 約

生豆乳から豆乳への加熱過程で各画分のタンパク質と脂質がどのように変化するかを明らかにするため、生豆乳を室温から95℃まで漸次加熱し、各画分の脂質含量とタンパク質組成を分析し、以下の知見を得た。

1. 生豆乳粒子は65℃以上の加熱で解離が始まり、65℃～75℃で脂質の約半量が可溶性画分へ移行した。75～90℃でこの脂質のほとんどは浮上画分に移行した。
2. グリシニンはその変性温度である80～90℃でサブユニットに解離

した。グリシニンの変性温度は浮上画分が大量増加する温度と一致し、脂質の遊離とグリシニンの熱変性が密接な関係を持っていると考えられる。

3.加熱により生豆乳粒子から生成した浮上画分のBX1とBX2は含まれるタンパク質の55%以上を占めたが、豆乳中では全タンパク質の3%でありマイナーな成分であった。BX1とBX2は加熱により脂質と一緒に遊離することから脂質と複合体を形成していると考えられる。

4. BX1、BX2の分子量はSDS-PAGEで21000と16000であり、BX1とBX2、およびBX1、BX2とほかのタンパク質間にS-S結合は存在しないことが分かった。

### 第三章 豆乳脂質の凝集物への移行機構

#### 1. 序

豆乳は直接に飲用する飲料としてのみでなく、さらに加工によって様々な製品が造られている。われわれが日常よく食べる伝統食品—豆腐は、豆乳に凝集剤を添加してタンパク質を凝集させ造ったタンパク質ゲル製品である。中国、東南アジアで作られている豆花もその伝統食品の一つである。古来このような製品製造にはにがり、すましこなどカルシウム、マグネシウム塩を豆乳に添加してタンパク質を凝集させている。今日では GDL (glucono- $\delta$ -lactone) のような新しい凝集剤や酵素、乳酸発酵を利用する凝集手法も開発され、新しいタイプの大豆タンパク質ゲル食品が造られている。

豆乳の凝集はタンパク質だけではなく、多量に含まれる脂質、さらには添加した脂質もタンパク質ゲルに結合することが知られている (Yamano *et al.*, 1981)。タンパク質ゲル製品のテクスチャ、食感などの物性はゲルに取り込まれた脂質の種類と量に影響される (Catsimpoolas and Meyr, 1971; Shimada and Matsushita, 1981)。飽和脂質はゲルの硬さを増加させる。硫酸カルシウム、GDL により調製したゲルはどちらの場合も添加脂質量が多いほどゲルの硬さの値が大きく、一般に GDL ゲルの方が大きい。山野ら (1990) は、大豆タンパク質の凝集において添加脂質の取り込みに及ぼす温度の影響を調べ、飽和脂質の場合温度が高いほど硬いゲルが得られ、添加量が多いほどゲルの凝固が遅くなると報告している。一方、不飽和脂質では添加量が増大すると、ゲルの硬さは低下した (中山・山野, 1983)。山野ら (1987) は電子顕微鏡を用いて粉末油脂を添加したゲルを観察し、脂質がタンパク質の網状構造中に取り込まれていることを示した。さらに Miura and Yamauchi (1984) は大豆油とリン脂質を添加するとタンパク質ゲルにスポンジ状および網状ネットワーク構造が発達することを示した。斎尾・渡辺 (1968) は豆腐を電顕で観察し、タンパク質粒子は互いに繋がってネットワークを形成し、脂質は油滴になってネット



ワークに取り込まれていることを示した。

凝集剤の添加による豆乳タンパク質の凝集について大豆成分との関係が研究されているが成分相互の関係は明らかにされていない(柴崎ら 1966; Saio *et al.*, 1969)。Ono ら(1991, 1993)は、豆乳のタンパク質の約 50%が粒子 (粒径 40~200 nm)、残り 50%が可溶性タンパク質 (粒径 40 nm 以下) からなり、凝集剤によりタンパク質粒子は可溶性タンパク質より低い塩化カルシウム濃度で凝集することを明らかにした。Kohyama ら (1995)は塩化カルシウムと GDL 凝集剤により調製した豆腐ゲルのレオロジー特性を比較し、豆乳タンパク質の凝集機構を推測している。しかし、豆乳の凝集過程で脂質がどのようにタンパク質と結合し、タンパク質ゲルに取り込まれて行くかは全く分かっていない。豆乳中の脂質は遠心分離により浮上画分として分離できる(Ono *et al.*, 1996)。そこで豆乳に塩化カルシウムや酸を添加しタンパク質を凝集させた場合の浮上画分を未結合脂質の指標として分析すると共に、さらに凝集タンパク質の組成変化を調べることにより豆乳凝集過程における脂質の取り込みメカニズムについて検討した。

## 2 材料と方法

### 1) 材 料

岩手大学農場にて栽培した大豆スズユタカ (Species *Glycine max* var. Suzuyutaka)を実験材料とした。大豆は低温(4℃)で保存しておき、一年以内のものを必要に応じて使用した。

### 2) 豆 乳

豆乳の調製は第二章 2 の 2)の記述に従って行った。

### 3) 豆乳の粒子、可溶性、浮上面分の分画

第二章 2 の 3) の記述に従って豆乳を粒径 40 nm 以上の粒子画分、粒径 40 nm 以下の可溶性画分および浮上したクリーム状の浮上面分に分画した。

### 4) 豆乳限外ろ液

本章 2 の 3) で調製した可溶性画分から限界分子量 10,000 の UK-10 膜 (Advantec Toyo Ltd.) を用いて豆乳の限外ろ液を調製した。

### 5) 豆乳各画分分散液

超遠心分離により得た浮上面分を豆乳の脂質含量と同じになるようポッター型ホモジナイザーを用いて豆乳限外ろ液に分散した。この分散液を浮上面分分散液とした。同様の方法で浮上面分を豆乳の可溶性画分に分散し、得た分散液を浮上・可溶性画分分散液とした。さらに、豆乳の粒子画分を浮上面分分散液に分散し、脂質含量とタンパク質濃度が可溶性画分分散液のものと同一になるようにし調整し、浮上・粒子画分分散液を調製した。

### 6) 豆乳および各画分分散液中タンパク質の凝集

豆乳あるいは各画分分散液へ塩化カルシウムの最終濃度が 0~18mM になるように 200mM 塩化カルシウムを攪拌しながら添加した後、室温に 30 分間放置しタンパク質を凝集させた。塩化カルシウムによる豆乳あるいは各画分分散液の pH 低下を防ぐため、pH7.0 の 750 mM Bis-tris 緩衝液を豆乳あるいは各画分分散液に最終濃度が 50 mM になるよう添加した。

pH 低下による豆乳あるいは各画分分散液の凝集は 0.1N HCl を順に添加し試料の最終 pH が 6.6~5.6 になるよう調整後、室温に 30 分間放置しタンパク質を凝集させた。

### 7) 凝集剤添加試料のタンパク質溶解度と浮上面分量の測定

凝集反応を行った豆乳あるいは各画分の分散液は 1,800×g, 5 分間の遠心分離を行い、得た上澄のタンパク質含量を第二章 2 の 4) の記述に従って Smith *et al.* (1985) のビシコニン酸法で分析した。凝集剤無添加試料のタンパク質濃度を 100 としてそれに対する割合をタンパク質溶解度とした。

凝集反応を行った豆乳あるいは各画分の分散液を 156,000×g, 30 分間の超遠心分離し浮上した画分を凍結乾燥 (EYELA FD-1 型凍結乾燥機) 後、重量を測定した。凝集剤を添加しなかった浮上画分の値を 100 として各試料から得た浮上画分の割合を相対浮上画分量とした。

#### 8) 生成粒子画分の測定

浮上・可溶性画分分散液に凝集剤を添加後、1,800×g, 5 分間の遠心により凝集沈殿物を除いた後、さらに 156,000×g, 30 分間の超遠心分離を行い、沈澱を得た。この沈澱を生成粒子画分とした。遠心分画後の上澄タンパク質濃度を第二章 2 の 4) の記述に従い Smith ら (1985) のビシコニン酸法で分析した。生成粒子の割合は

$$\text{生成粒子割合 (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

として求めた。

ここで A は凝集剤無添加での可溶性画分タンパク質濃度 ; B は凝集剤添加後の可溶性画分タンパク質濃度 (mg/ml) である。

#### 9) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質組成を分析するために SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を第二章 2 の 8) の記述に従って行った。

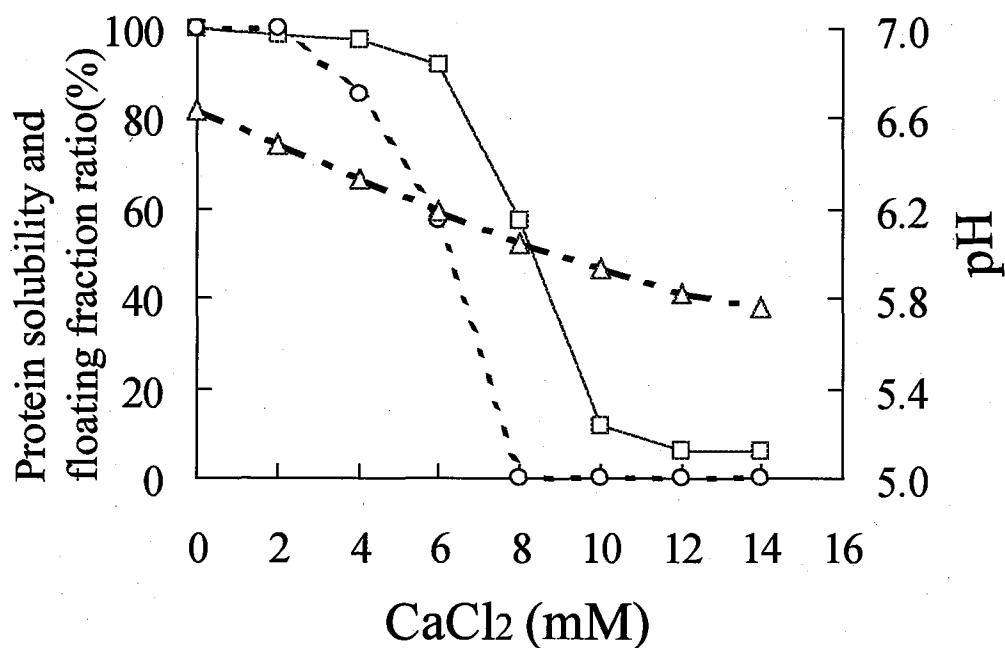
### 3. 結 果

#### 塩化カルシウム添加による豆乳中脂質の凝集物への移行

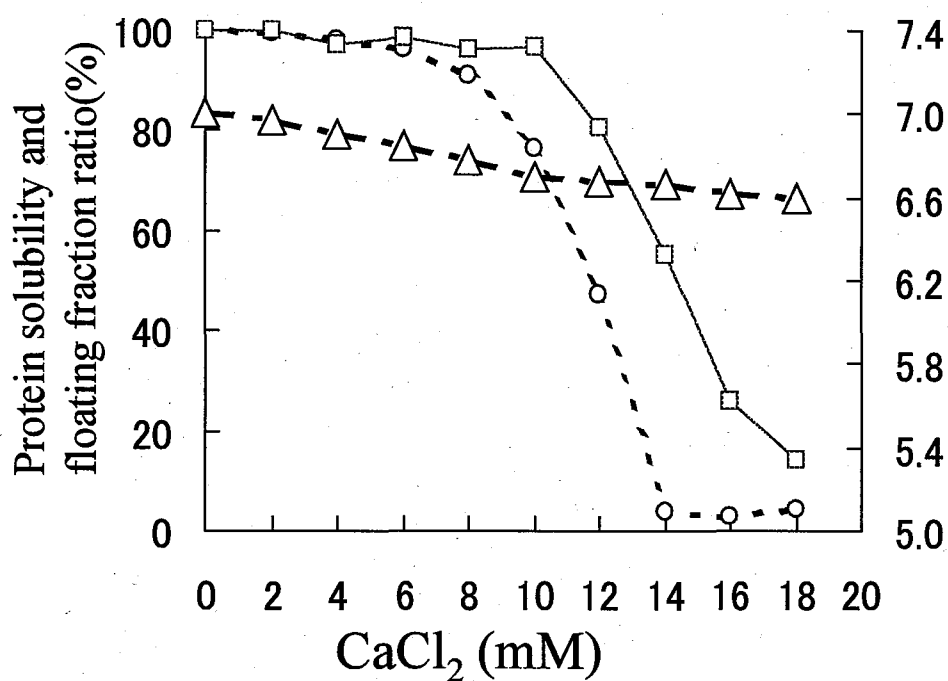
豆乳の調製において、大豆から水抽出した時の脂質は生豆乳粒子に含まれているが、加熱（90℃以上）によって遊離し、遠心分離により浮上画分として分離される(Ono *et al.*, 1996)。そこで豆乳に塩化カルシウムを添加した際の浮上画分の変化を超遠心分離によって追跡した。Figure 10 は塩化カルシウムを漸次添加した場合の豆乳タンパク質の溶解度と浮上画分割合を示している。豆乳タンパク質の溶解度は塩化カルシウム濃度 6 から 10 mM の間で急激に低下した。すなわち豆乳タンパク質は 6 mM 塩化カルシウムから凝集、沈降が始まり、10 mM で殆どのタンパク質が凝集した。一方、浮上画分は 2 mM 塩化カルシウムで減少が始まり、8 mM の豆乳タンパク質のやく半分が凝集したところで浮上画分のほとんどが消失した。

豆乳の pH は pH6.6~6.8 であるが塩化カルシウム添加により低下し、ほとんどのタンパク質が凝集した 10mM 塩化カルシウムでは pH5.8 であった。塩化カルシウム添加による豆乳タンパク質の凝集は  $\text{Ca}^{++}$ イオンと pH 低下の二つ作用によることが知られている(Ono *et al.*, 1993)。そこで pH 低下の作用を除くため Bis-tris bufer (50 mM pH7.0)を用いて豆乳 pH の変化を抑制後、塩化カルシウムを添加し、豆乳浮上画分の変化を調べた。Figure 11 に示すように Bis-tris bufer (50 mM pH7.0)を含む豆乳は塩化カルシウム 18 mM 添加でも pH6.6 であった。この条件では 10 mM 塩化カルシウム添加でタンパク質溶解度の低下が始まり 18 mM でほとんどが凝集した。pH 変化を抑制しない場合と比べ、タンパク質を凝集させる塩化カルシウム濃度が 2 倍必要であった。これは Ono *et al.* (1993) の塩化カルシウム添加による豆乳タンパク質の凝集についての報告と一致した。また浮上画分の低下も塩化カルシウム濃度 8~14 mM と 2 倍必要であった。pH 抑制および未抑制のいずれの場合でも、浮上画分の減少はタンパク質の凝集より低い塩化カルシウム濃度で起こった。

塩化カルシウムに対する浮上画分の感受性を明らかにするため、Bis-tris buffer (50mM pH7.0)を含むものと含まない豆乳限外濾液(豆乳と同じ体積なるよう)を



**Figure 10.** Changes in protein solubility and separable floating fraction ratio in soymilk by addition of calcium chloride. After the coagulum was removed from calcium chloride-added soymilk by centrifugation at  $2000 \times g$  for 10 min, the protein concentration of supernatant was measured and the value without calcium chloride was calculated as 100% for protein solubility. The floating fraction from calcium chloride-added soymilk by centrifugation at  $156,000 \times g$  for 30min was lyophilized, and weighed. The weight value in the absence of calcium chloride is defined as 100% for floating fraction ratio. Protein solubility (□); Floating fraction ratio (○); pH (△).

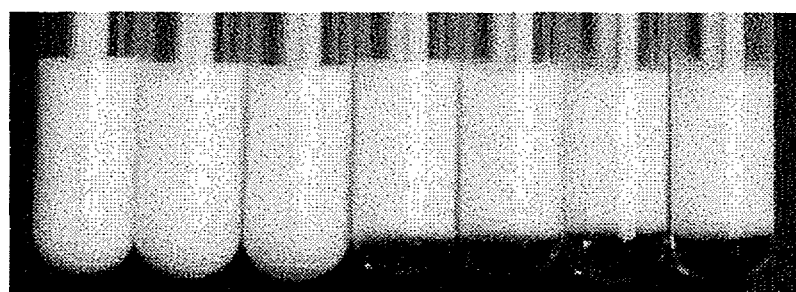


**Figure 11.** Changes in protein solubility and separable floating fraction ratio in soymilks containing 50 mM Bis-tris buffer (pH7) by addition of calcium chloride. Protein solubility (□); Floating fraction ratio (○); pH (△), Protein solubility and Floating fraction ratio was obtained by the same method as described in Figure 4.3.1.

用いて、浮上画分分散液を調製した。この二つ分散液に塩化カルシウムを添加し、室温で 30 分間反応後、4℃の冷蔵庫に 12 時間を静置し、分散液の相変化を観察した。Figure 4.3.3 に示すように浮上画分は塩化カルシウム無添加では 12 時間後も相変化が見られなかった。しかし、4 mM 以上の塩化カルシウム添加で相分離が観察された (Figure 12a、写真では 4 mM 塩化カルシウムでの変化がはっきり写っていない)。8 mM 塩化カルシウム以上で浮上画分は完全に分離した。Bis-tris buffer を含む場合 (Figure 12b)、相分離に要する塩化カルシウム濃度は 8~16 mM で Bis-tris 無しの場合の約 2 倍であった。これらの結果を Figure 10 および Figure 11 の豆乳中浮上画分の減少と浮上画分分散液の相分離と較べると同じ塩化カルシウム濃度で起こることが分かった。これは豆乳中の脂質がタンパク質存在下では塩化カルシウム添加によりタンパク質と結合し遊離ができなくなるが、非存在下では互いに結合し浮上することを示している。

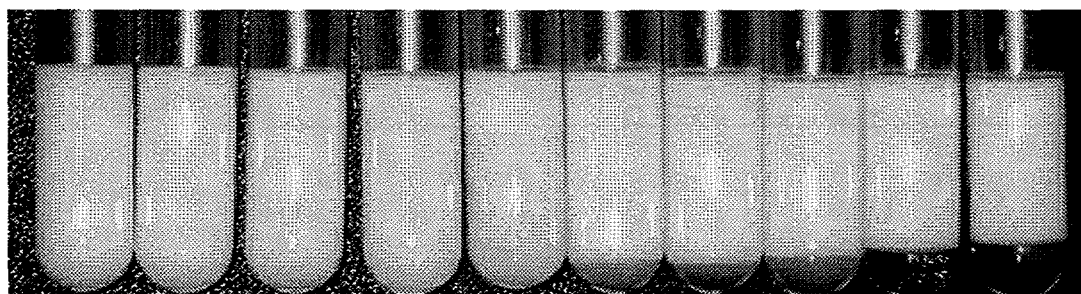
豆乳中のタンパク質の 50%は粒子画分 (40nm 以上粒子) で、残り 50%は可溶性画分 (40nm 以下) を形成していることが知られている (Ono *et al.*, 1991)。そこで粒子タンパク質と可溶性タンパク質を用いて塩化カルシウム添加による豆乳脂質の取り込みについて調べた。浮上画分を豆乳と同体積の可溶性画分に分散し浮上・可溶性画分分散液を、粒子画分と浮上画分を限外濾液に分散し浮上・粒子画分分散液を調製した。この二つ分散液に塩化カルシウムを添加し、分散液のタンパク質溶解度と浮上画分量を調べた。Figure 13 に示すように浮上・粒子画分分散液のタンパク質溶解度は 2~6mM 塩化カルシウム添加で低下し、それと平行して浮上画分の減少も起こった。

一方、浮上・可溶性画分分散液のタンパク質溶解度は (Figure 14) に示すように浮上・粒子画分分散液の場合と違い 2~6mM 塩化カルシウム濃度では低下しなかった。浮上・可溶性画分分散液はタンパク質粒子を含んでいないが、塩化カルシウムの添加につれて粒子画分が生成した。この生成粒子画分は塩化カルシウム濃度 2mM から増加し、6 mM 以上でタンパク質の溶解度の低下と共に減少した。これは可溶性画分の約半分が塩化カルシウム添加により粒子形成した後でタンパク質の凝集が起こったことを示している。浮上画分は塩化カルシウムの添加につれてやや増加したが、生成粒子画分の減少が起こる 6mM 以上で急激に低下した。これらのことから塩化カルシウム添加による浮上画分の



a

0 2 4 6 8 10 12  $\text{CaCl}_2$  (mM)

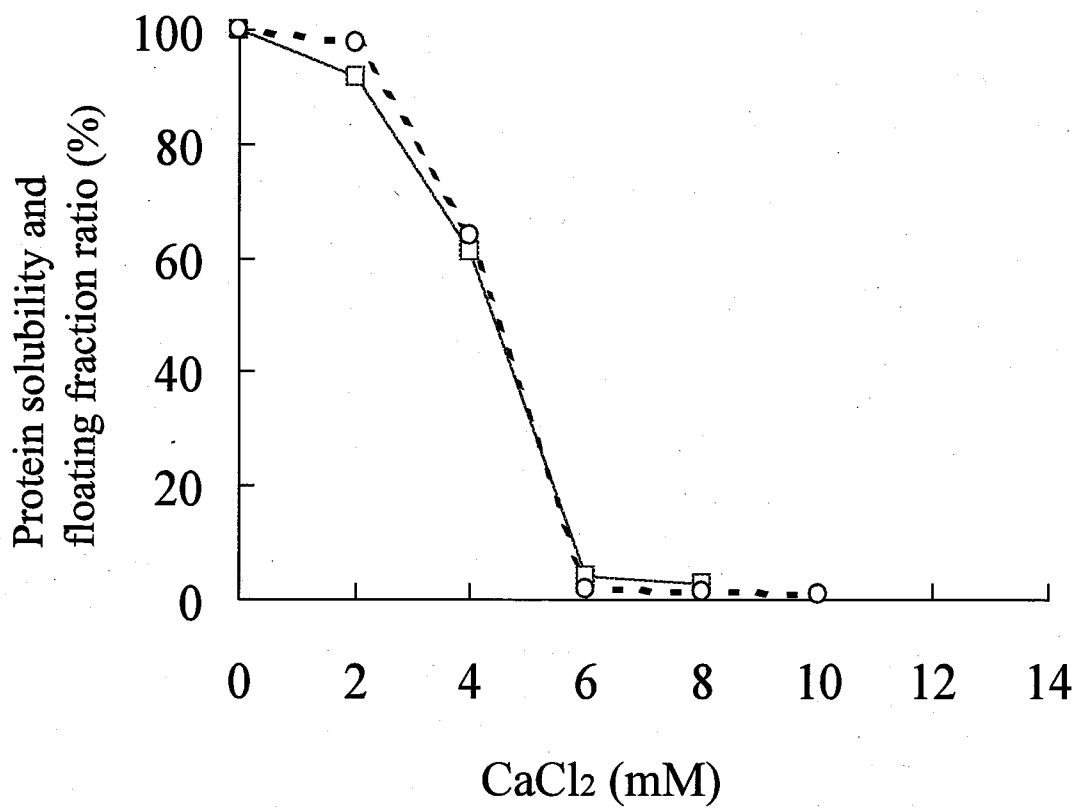


b

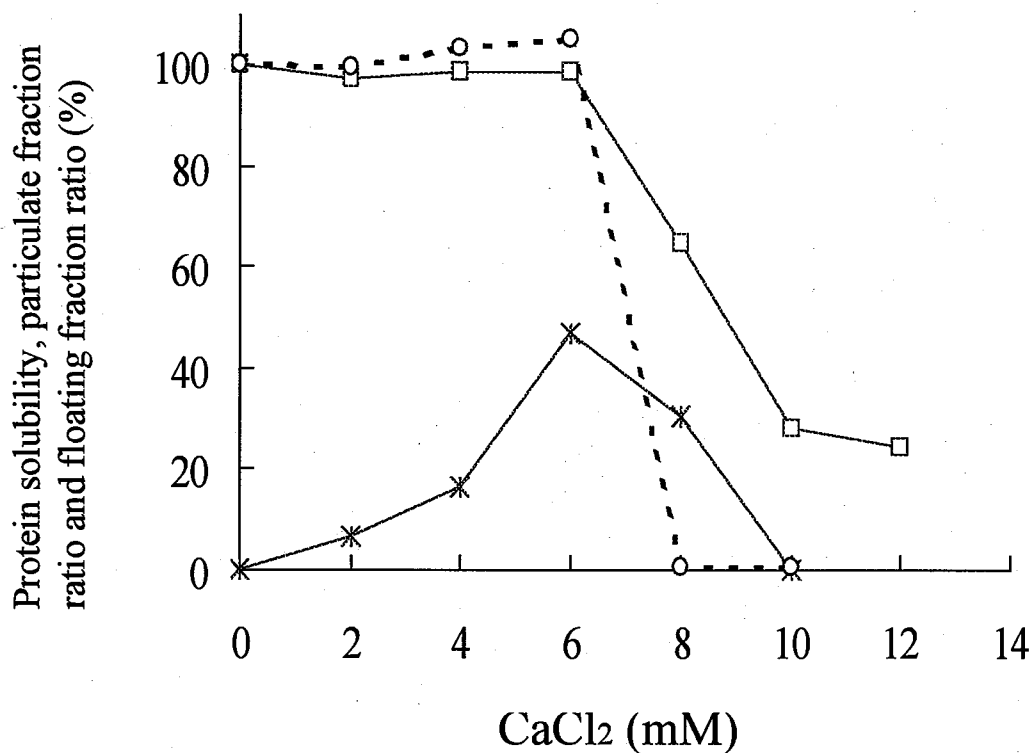
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18  
 $\text{CaCl}_2$  (mM)

**Figure 12.** Phase changes in the floating fraction dispersion in ultrafiltrate by addition of calcium chloride. The floating fraction of soymilk was dispersed into ultrafiltrate of soymilk with and without 50 mM Bis-tris (pH7). After calcium chloride was added to the dispersion from 0 to 18 mM, a series of the dispersions were kept at room temperature for 30 min, and then stored in a refrigerator (4 °C). Photographs were taken after standing for 12 hours. a, dispersion without buffer; b, dispersion with 50 mM Bis-tris buffer (pH7.0).





**Figure 13.** Changes in protein solubility and floating fraction ratio in the dispersion of particulate and floating fractions by addition of calcium chloride. Protein solubility ( $\square$ ); Floating fraction ratio ( $\circ$ ); Protein solubility and floating fraction ratio were obtained by the method described in Figure 4.3.1.



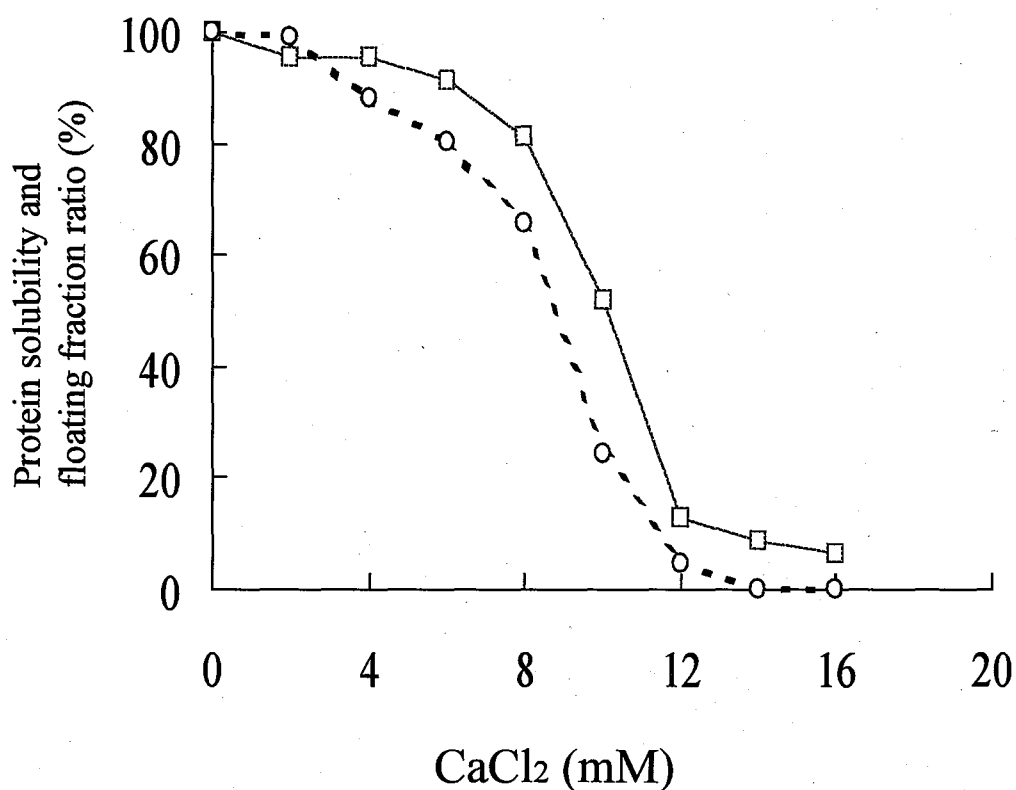
**Figure 14.** Changes in protein solubility and floating fraction ratio in both dispersions of soluble and floating fractions by addition of calcium chloride. Protein solubility (□); Floating fraction ratio (○); Newly-formed particulate fraction ratio (×). Protein solubility and floating fraction ratio were obtained by the method described in Figure 4.3.1. The newly-formed particulate fraction was obtained by adding calcium chloride to the dispersion of soluble and floating fractions and then centrifuging at  $156,000 \times g$  for 30 min. The newly-formed particulate fraction ratio is percentage of protein quantity of the newly-formed particulate fraction versus that of the dispersion soluble and floating fractions.

減少は脂質が粒子タンパク質と結合するために起こると考えられる。

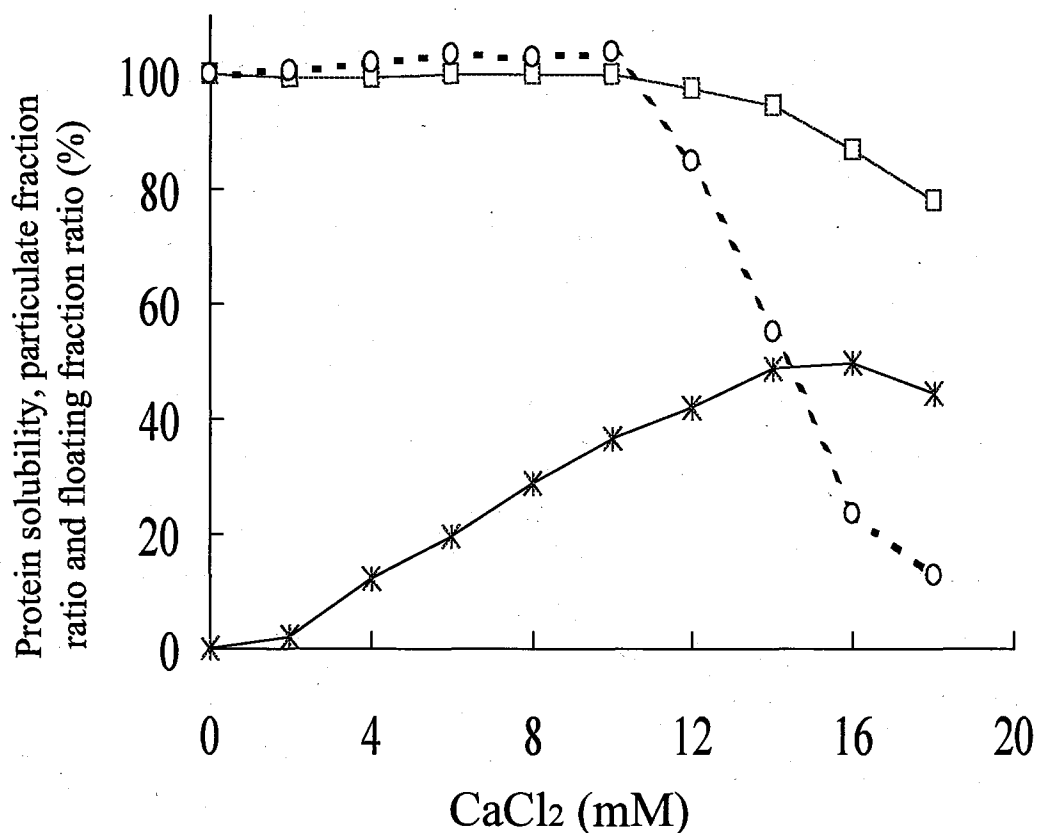
塩化カルシウム添加による pH 低下を抑制するため 50mM Bis-tris (pH7.0) を含む浮上・粒子画分分散液および浮上・可溶性画分分散液を調製し、塩化カルシウム添加による脂質の取り込みを分析した。Figure 15 に 50mM Bis-tris を含む浮上・粒子画分分散液のタンパク質溶解度と浮上画分の塩化カルシウムを添加による変化を示す。タンパク質溶解度は塩化カルシウム濃度 4 mM から減少し、12 mM でほとんどの粒子タンパク質が凝集した。タンパク質溶解度を低下させるのに要する塩化カルシウム濃度は Bis-tris を含んでない場合 (Figure 13) と比べ、二倍量必要であった。浮上画分の減少は Bis-tris を含んでない場合と同様にタンパク質溶解度の低下と平行して起こった。Bis-tris を含む浮上・可溶性画分の場合は Figure 16 に示すように 10 mM 塩化カルシウム添加までタンパク質の溶解度減少は見られないが、塩化カルシウムの添加につれて生成粒子画分の増加が見られた。タンパク質は 10 mM 以上の塩化カルシウム濃度で溶解度が低下し、凝集した。浮上画分は Bis-tris を含んでない場合 (Figure 14) と同様に塩化カルシウムの添加につれわずかに増加し生成粒子が 40% 近くなった 10 mM 以上カルシウムで減少した。これは浮上画分が粒子タンパク質と結合し遊離ができなくなったためと考えられる。増加した浮上画分に含まれるタンパク質組成を調べるため、これらの分散液から得た浮上画分をヘキサンで脱脂後、SDS-PAGE を行った。Figure 17 は各塩化カルシウム濃度下で得られた浮上画分中のタンパク質の泳動パターンである。豆乳の浮上画分には主に BX1, BX2 およびグリシニンが含まれているが、8 mM 以上のカルシウム添加により  $\beta$ -コングリシニン ( $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  バンド) がはっきり現れた。この結果は分散液中の浮上画分がカルシウムの添加により可溶性タンパク質と結合したことを示唆している。したがって Figure 14 および Figure 16 での浮上画分割合の増加は一部の可溶性タンパク質が結合し浮上画分と一緒に分離されるためと考えられる。

#### pH 低下による豆乳中脂質の凝集物への移行

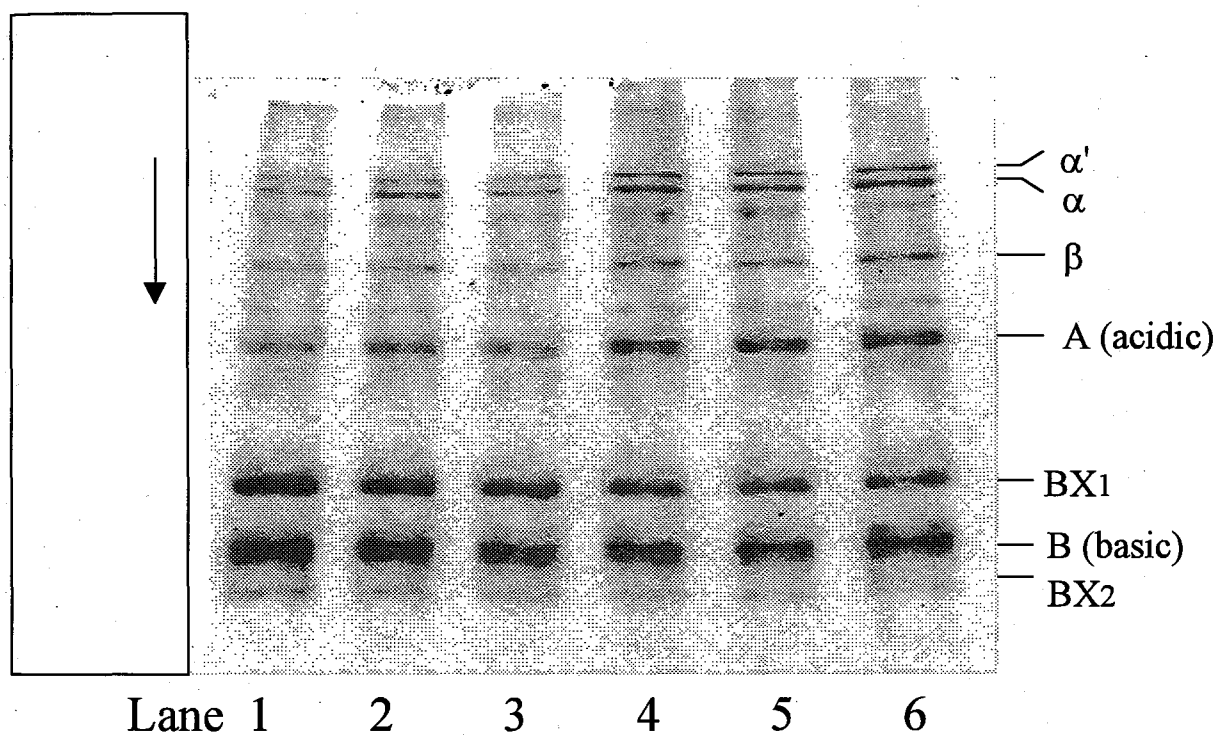
豆乳ゲル化製品の製造にカルシウム、マグネシウム塩凝集剤の使用以外に pH



**Figure 15.** Changes in protein solubility and floating fraction ratio in both dispersions (containing 50 mM Bis-tris buffer, pH7) of particulate and floating fractions by addition of calcium chloride. Protein solubility ( $\square$ ); Floating fraction ratio ( $\circ$ ); Protein solubility, floating fraction ratio were obtained by the method described in Figure 4.3.4.



**Figure 16.** Changes in protein solubility and floating fraction ratio in both dispersions (containing 50 mM Bis-tris buffer, pH7) of soluble and floating fractions by addition of calcium chloride. Protein solubility (□); Floating fraction ratio (○); Newly-formed particulate fraction ratio (×). Protein solubility, floating fraction ratio and new-formed particulate fraction ratio were obtained by the method described in Figure 4.3.1.



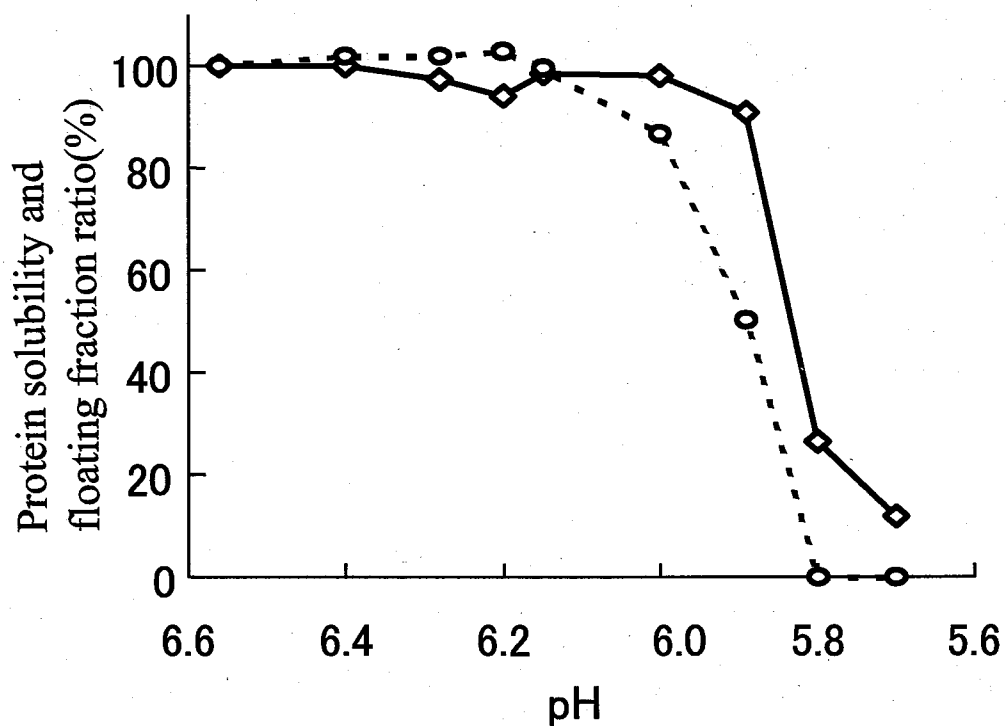
**Figure 17.** SDS-PAGE patterns of the protein in the floating fractions. The floating fractions were obtained from the dispersion (with Bis-tris buffer (pH7) of soluble and floating fractions at various concentrations of calcium chloride. Lane 1, 2, 3, 4, 5, and 6 were obtained at calcium chloride concentrations of 2, 4, 6, 8, 10, and 12 mM, respectively.

低下による凝集もよく用いられている。たとえば絹ごし豆腐、大豆ヨーグルト製品などは pH 低下を用いて作られたものである。実際にはカルシウム、マグネシウム塩凝集剤添加による豆乳の凝集にも pH 低下が重要な役割を果たしている(Ono *et al.*, 1993)。すでに Figure 10 に示したように、塩化カルシウムを添加した場合も豆乳の pH が低下することが分かる。そこで、pH 低下により豆乳凝集を行った場合脂質がどのように凝集物に取り込まれるのかを研究した。

豆乳の pH 低下には、0.1 N HCl を用い、室温で 30 分間放置後、タンパク質溶解度および浮上画分を測定した。Figure 18 に示すように豆乳タンパク質の溶解度は pH6.0 から低下が始まり、pH5.9 から 5.7 の間で急激に減少した。これは豆乳タンパク質が pH5.8 前後で凝集、沈殿することを示している。一方、豆乳の浮上画分は pH6.1 から減少が始まり、pH6.0 から 5.8 の間で急激に減少した。タンパク質溶解度が 5%減少したところ(pH5.9)で浮上画分は 50%減少し、pH5.8 では豆乳タンパク質の 25%がまだ凝集していないが、浮上画分はすでに分離できなくなった。この結果は塩化カルシウムを添加した豆乳の場合(Figure 1)と類似した結果で、浮上画分がタンパク質凝集より高い pH で減少した。これらのことから pH 低下による豆乳脂質のタンパク質への結合はタンパク質の凝集前に始まったと考えられる。

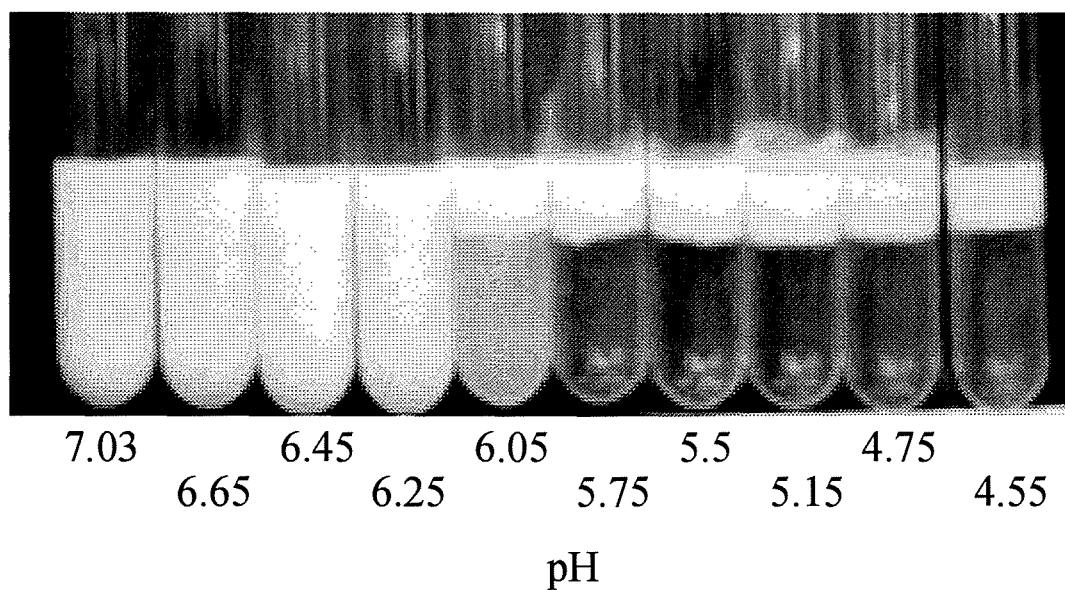
第二章の結果に示すように豆乳の浮上画分は中性脂質、リン脂質およびタンパク質からなる複合体である。この複合体の pH に対する感受性を明らかにするため各 pH での浮上画分散液の変化を調べた。Figure 19 は浮上画分散液の pH を調整し、12 時間後に写真を撮影したものである。浮上画分散液は pH6.05 で相分離が始まり、pH5.75 以下では下部の透明溶液層と白い浮上層に分離した。豆乳浮上画分は pH6.1~5.8 で互いに凝集することが分かった。この pH 範囲は Figure 4.3.9 に示した豆乳浮上画分が減少した pH と一致している。このことから豆乳中での浮上画分の減少は pH 低下による浮上画分どうしの結合よりもタンパク質との結合の方がより起こりやすいためと考えられる。

そこで pH 低下による豆乳の凝集過程を脂質と粒子および可溶性タンパク質との関係から解析した。まず豆乳粒子画分と浮上画分で分散液を調製し、pH 低下によるタンパク質溶解度と浮上画分の変化を調べた。Figure 20 に示すよ



**Figure 18.** Changes in protein solubility and separable floating fraction ratio in soymilks with pH falling by addition 0.1 N HCl. Protein solubility (◇); Floating fraction ratio (○). Protein solubility and Floating fraction ratio was obtained by the same method as described in Figure 4.3.1.





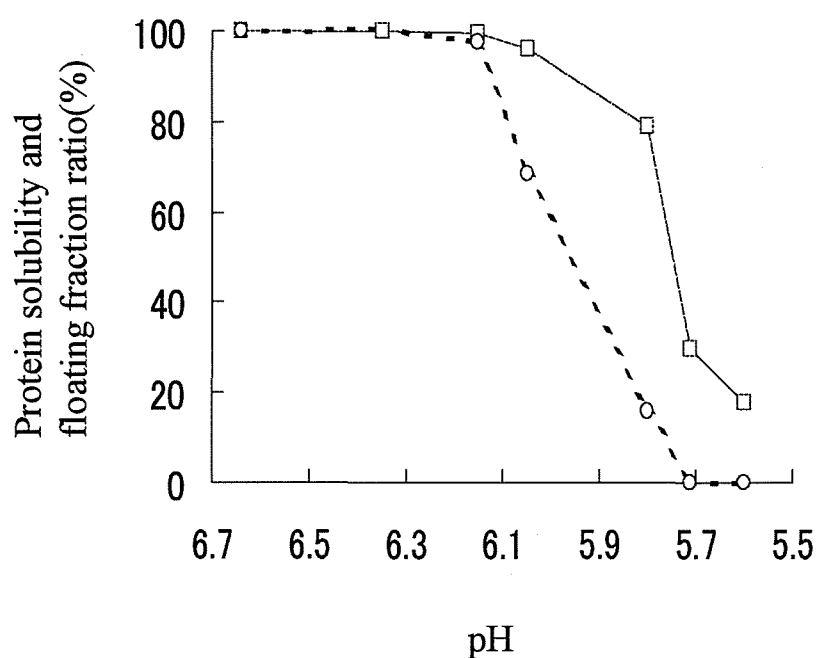
**Figure 19.** Phase changes in the floating fraction dispersion in ultrafiltrate with pH falling by addition of 0.1 N HCl. The floating fraction of soymilk was dispersed into ultrafiltrate of soymilk. After pH was fell by 0.1 N HCl added to the dispersion, a series of the dispersions were kept at room temperature for 30 min, and then stored in a refrigerator (4 °C). Photographs were taken after standing for 12 hour.

うに pH6.1 よりタンパク質溶解度の減少が始まり、浮上画分も減少した。タンパク質溶解度が 75%低下した pH5.7 で浮上画分のほとんどが分画できなくなった。このことは、浮上画分がタンパク質粒子に結合し浮上できなくなり、粒子の凝集により凝集すると考えられる。

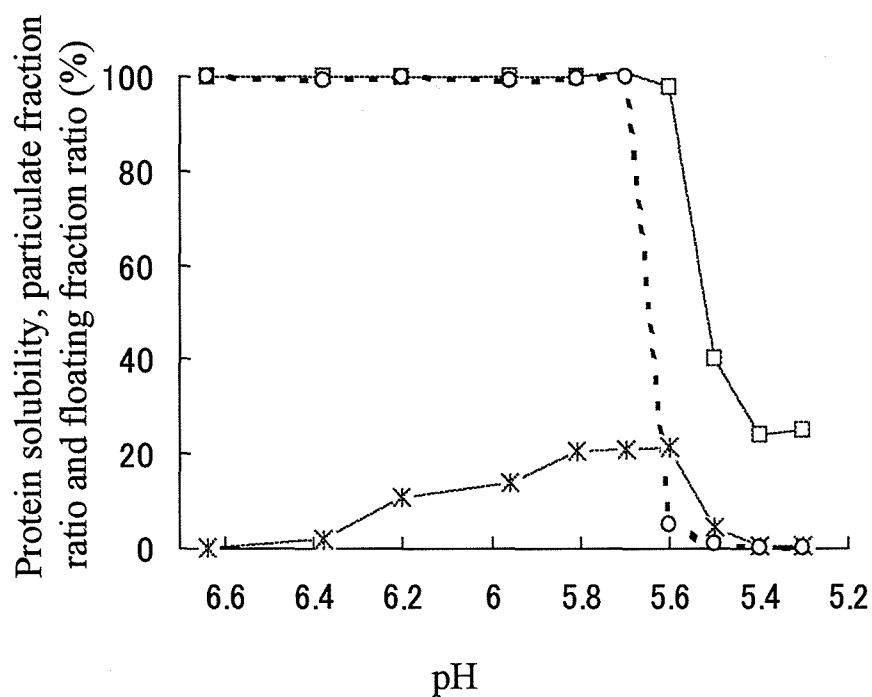
次に、可溶性画分と浮上画分の分散液を用いて pH 低下によるタンパク質溶解度と浮上画分の変化を調べた。また可溶性タンパク質から形成する生成粒子画分の割合についても分析した。Figure 21 に示すようにタンパク質溶解度は pH5.6 から減少が始まり、pH5.4 まで急激に低下した。粒子分散液の場合と比べると、タンパク質の凝集がかなり低い pH で起こっていることが分かる。pH5.6 までにタンパク質溶解度の減少は見られないが、粒子画分の生成が見られた。可溶性タンパク質の 20%が粒子を形成したところで、生成粒子の減少が見られ(pH5.6) 浮上画分が急激に減少した。Figure 19 に示したように浮上画分は pH6.1~5.8 で凝集するが、この分散液では pH5.6 で減少が始まった。これは浮上画分がその画分のみで凝集するのではなく、生成タンパク質粒子との結合が脂質の取り込みに重要であることを示唆している。

#### 豆乳中浮上画分と粒子タンパク質との結合

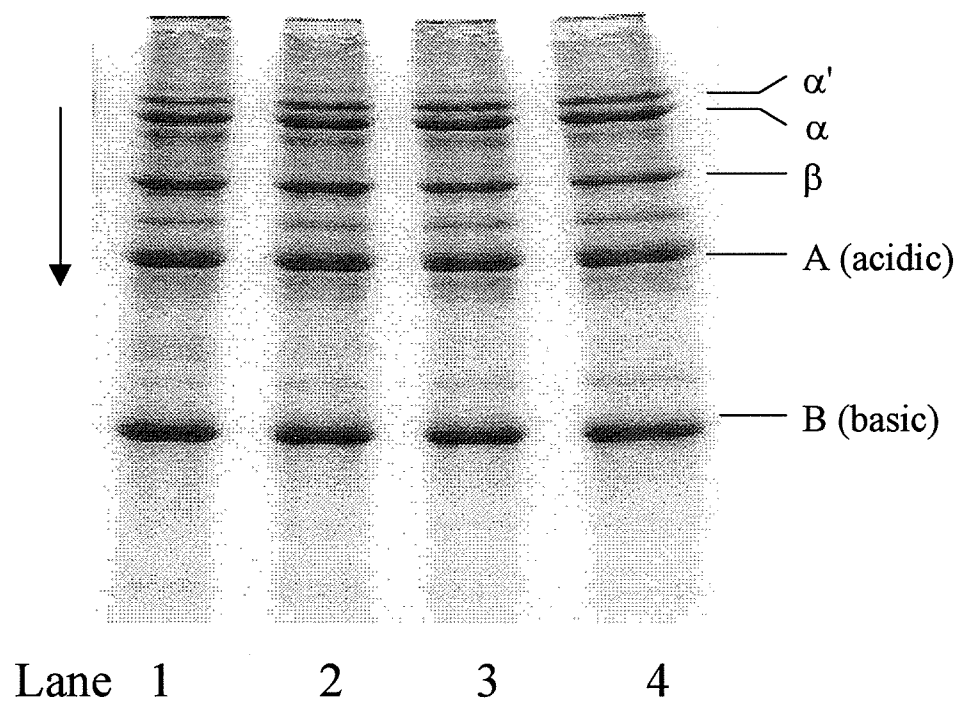
これまでの結果により豆乳脂質が凝集物に取り込まれるのは浮上画分(脂質-タンパク質複合体)が粒子タンパク質と結合し、凝集することが分かった。脂質複合体は可溶性タンパク質のみの場合には粒子が生成しても豆乳中に元から存在する粒子と共存した場合よりも高い塩化カルシウム濃度(Figure 13、Figure 14、Figure 15 および Figure 16)あるいは低い pH(Figure 20 および Figure 21)でないと凝集しなかった。そこでこの差異を検討するため可溶性画分から生成した粒子と豆乳中に元からある粒子のタンパク質組成を分析した。Figure 22 は塩化カルシウムを添加した豆乳より分画した粒子タンパク質の SDS-PAGE パターンである。大豆タンパク質は 80%~90%がグリシニンと  $\beta$ -コングリシニンで、そのグリシニンと  $\beta$ -コングリシニンの割合が 1:1 であることが知られている。Lane 1 に示す豆乳粒子のタンパク質(塩化カルシウム未添加)は  $\beta$ -コングリシニン( $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  subunit)とグリシニン(acidic, basic subunit)から構成され、デンストメーターで求めたそれらの比は  $\beta$ -コングリ



**Figure 20.** Changes in protein solubility and floating fraction ratio in both dispersions of particulate and floating fractions with pH falling by addition of 0.1 N HCl. Protein solubility (□); Floating fraction ratio (○); Protein solubility and floating fraction ratio were obtained by the method described in Figure 4.3.1.



**Figure 21.** Changes in protein solubility and floating fraction ratio in dispersion of soluble and floating fractions with pH falling by addition 0.1 N HCl. Protein solubility (□); Floating fraction ratio (○); Newly-formed particulate fraction ratio (×). Protein solubility, floating fraction ratio and new-formed particulate fraction ratio were obtained by the method described in Figure 4.3.1.



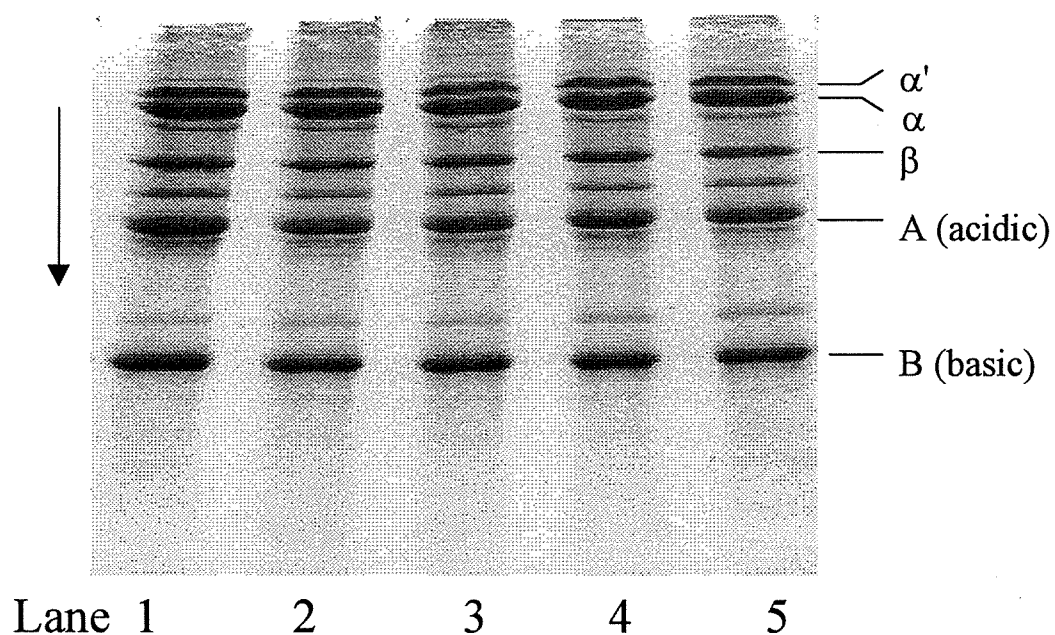
**Figure 22.** SDS-PAGE patterns of the protein in particulate fraction. Lanes 1, 2, 3 and 4 particulate fractions were obtained from soymilk at calcium chloride concentrations of 0, 4, 6 and 8 mM, respectively.

シニンが 41%、グリシニン 58%であった。塩化カルシウム添加 6 mM まで類似の比を示すが、8 mM 添加 (lane 4) では  $\beta$ -コングリシニンの割合が 45%となり少し増加した。一方、可溶性画分に塩化カルシウムを添加し生成した粒子タンパク質の組成を Figure 23 に示す。Bis-tris buffer の有無にかかわらず  $\beta$ -コングリシニン 47%、グリシニン 53%であった。豆乳に元から存在した粒子 (Figure 22) と較べて、生成粒子は  $\beta$ -コングリシニンを多く含んでいることが分かった。

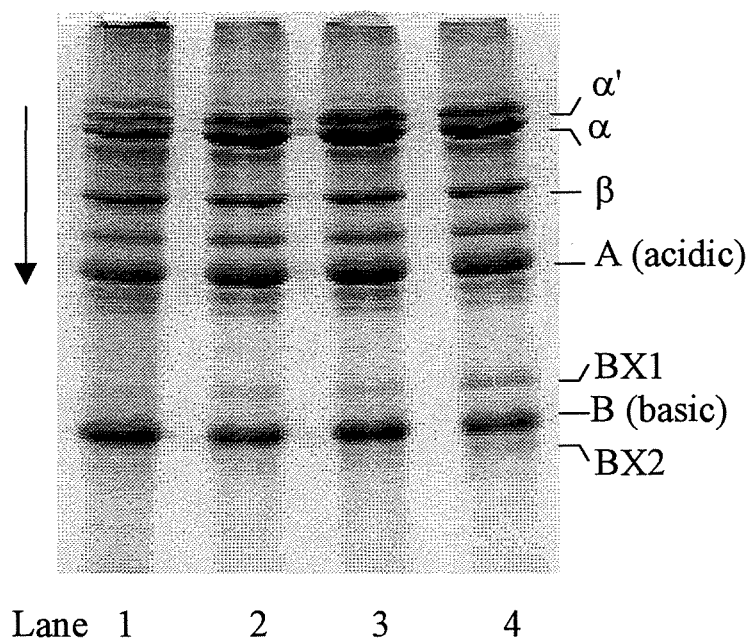
pH 低下により豆乳可溶性画分から生成した粒子のタンパク質組成を豆乳に元からあった粒子と較べた。Figure 24 は豆乳粒子 (lane 1) および pH 5.8~5.6 で可溶性画分から生成した粒子タンパク質 (lane 2~4) の SDS-PAGE パターンである。生成粒子には  $\beta$ -コングリシニン、特に  $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit が豆乳粒子より多く含まれていることが分かった。可溶性画分から生成した粒子は塩化カルシウム添加、pH 低下いずれの場合も類似のタンパク質組成を持ち、豆乳の粒子より  $\beta$ -コングリシニンを多く含むことが分かった。

豆乳の浮上画分タンパク質は主に BX1, BX2 が主体で少量グリシニンを含んでいるが、豆乳粒子および可溶性画分はほとんど BX1, BX2 を含んでいない (第二章)。しかし、可溶性タンパク質から形成した粒子組成を調べたところ、BX1, BX2 がこれらの画分に含まれていた。Figure 24 に示すように pH 5.6 (lane 4) で形成した粒子は元の豆乳粒子 (lane 1) と較べ、BX1, BX2 バンドがはっきり現れた。この結果は浮上画分が可溶性タンパク質から形成した粒子と結合していることを示している。

浮上画分 (脂質複合体) と粒子の結合に粒子タンパク質の組成とくに  $\beta$ -コングリシニンとグリシニンの割合が影響を与えるかを明らかにするため、 $\beta$ -コングリシニンとグリシニンの割合が異なる豆乳粒子を調製し、塩化カルシウム添加による粒子と脂質複合体との結合を調べた。未加熱豆乳粒子は  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit の大部分を 75°C 加熱により解離することがわかっている (第二章 Figure 3)。そこで、 $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit の少ない粒子を調製するため、豆乳限外濾液に未加熱豆乳粒子を分散し、75°C で 5 分間加熱後、超遠心分離 (156,000 $\times$ g, 30 分間) で粒子画分を得た。この画分をふたたび限外濾液に分散し、豆乳粒子と同じ加熱処理をするため 95°C で 5 分間加熱後超



**Figure 23.** SDS-PAGE patterns of newly-formed particles from soluble fraction with 50 mM Bis-tris buffer (pH7) (lanes 3, 4 and 5) and without buffer (lanes 1 and 2) at various concentrations of calcium chloride. Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 were obtained at calcium chloride concentrations of 6, 8, 10, 12, and 14 mM, respectively.



**Figure 24.** SDS-PAGE patterns of the protein in newly formed particulate fractions obtained from the dispersion of floating and soluble fractions at various pH. Lane 1 was particulate fraction obtained from soymilk. Lanes 2, 3 and 4 were newly-formed particulate fractions from the dispersion of floating and soluble fractions at pH 5.8, 5.7 and 5.6, respectively.

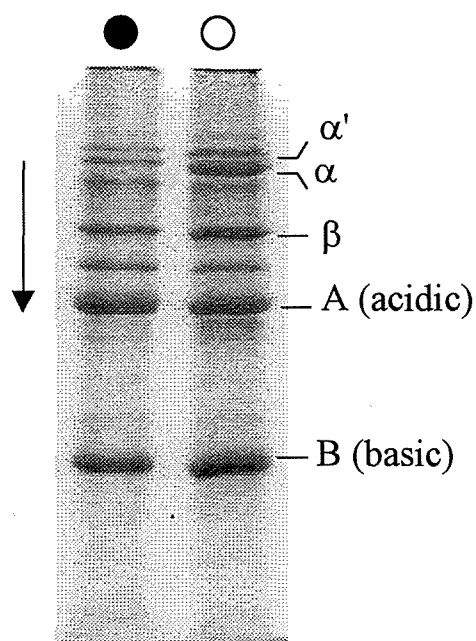


遠心分離により沈殿を得、調整粒子画分とした。この調整粒子のタンパク質組成は Figure 25 の SDS-PAGE でに示すように  $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit バンドが豆乳粒子より薄い。デンストメーターにから算出した  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit/グリシンの割合は 0.27 で、豆乳に元の粒子の 0.45 より低かった。また豆乳粒子の  $\beta$ -コングリシニン 42%、グリシニン 58%に対して調整粒子では  $\beta$ -コングリシニン 33%、グリシニン 67%であった。このようにタンパク質組成が異なる粒子画分が調製できた。このタンパク質組成の異なる粒子がカルシウム添加による脂質の取り込み作用への影響そこでを明らかにするため、豆乳粒子分散液と同様に浮上画分と調整粒子の分散液を調製した。分散液に塩化カルシウムを添加後、浮上画分の変化を分析したところ、Figure 26 に示すように 2~5 mM で浮上画分は減少した。豆乳粒子の場合その減少は 2 から 6 mM 塩化カルシウムで起こることから、調整豆乳粒子では豆乳粒子より低い濃度で起こることが分かった。この結果は浮上画分（脂質複合体）は凝集剤添加によりタンパク質粒子と結合するとき、 $\beta$ -コングリシニンの割合が少ないあるいはグリシニンが多い粒子と優先的に結合することを示唆している。

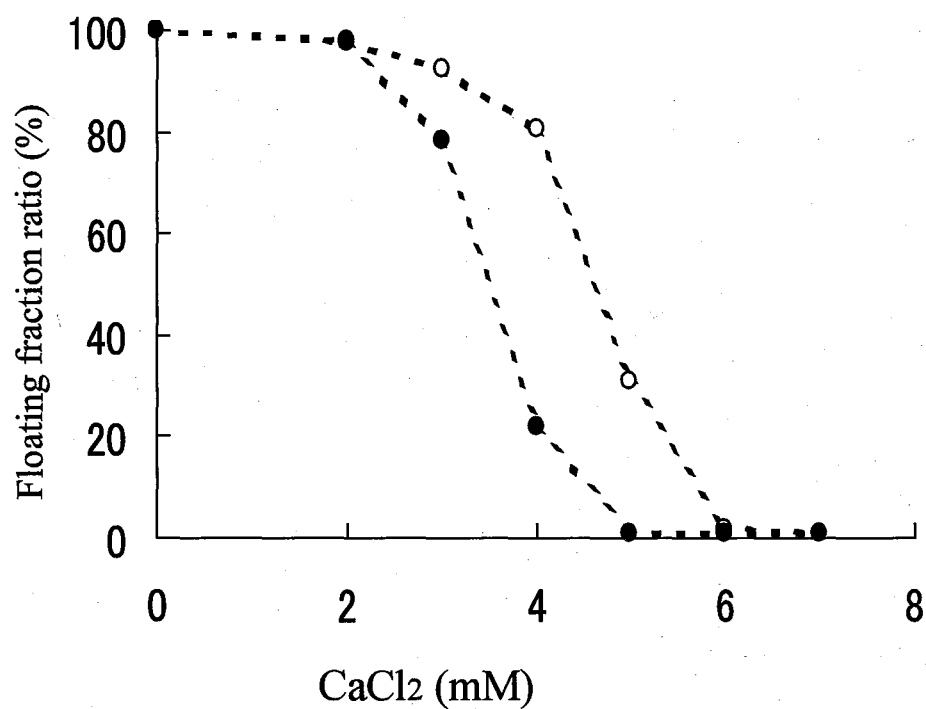
### 3. 考 察

豆乳の脂質は磨砕後生じた粒子から加熱により遊離し浮上画分を生成する。豆乳にカルシウム、マグネシウム塩類などの凝集剤を添加すると豆腐ができるが、脂質はこのとき生成するタンパク質凝集物に取り込まれる。この脂質は加熱(煮る、焼く、油揚げ)調理、乾燥しても遊離しない。そしてタンパク質ゲルの滑らかさ、製品のうまさを与える。そこで脂質がタンパク質凝集物に取り込まれる機構について研究した。

豆乳の脂質は遠心分離により浮上画分として分離できる。しかし、豆乳に塩化カルシウム添加したり、pH を低下させると、浮上画分はタンパク質の凝集まえに分離できなくなった(Figure 10、Figure 11、Figure 18)。浮上画分を水に分散したものにカルシウムを添加、あるいは pH を低下させると凝集、浮上しする。それと同じカルシウム濃度および pH で豆乳中浮上画分は減少を開始する(Figure 12、Figure 19)。一方タンパク質は脂質がすべて分離不能にな



**Figure 25.** SDS-PAGE patterns of the protein in the particulate fraction from soymilk and the newly-prepared particles by the addition of calcium chloride. Particles from soymilk (○); Newly-prepared particles (●). The newly-prepared particulate fraction was prepared as follows. The particulate fraction from unheated soymilk was dispersed in the ultrafiltrate (w/w=1:7), and then heated at 75°C for 5 min and cooled to 20°C. The dispersion was centrifuged ( $156,000 \times g$  for 30 min at 20°C), and the newly-prepared particles were separated. Generally, soymilk is prepared by heat treatment at 95°C. To compare them with the particles in soymilk under the same conditions, the new particles in the ultrafiltrate were heated at 95°C for 5 min, and were prepared again by centrifugation ( $156,000 \times g$  for 30 min).



**Figure 26.** Changes in floating fraction ratio in dispersions containing the particles from soymilk and the newly-prepared particles by the addition of calcium chloride. Particles from soymilk (○); newly-prepared particles (●). Floating fraction ratio was obtained by the method described in Figure 4.3.1.

ってもそのすべては凝集しなかった。このことからカルシウム添加、pH 低下で豆乳中の脂質はすべてのタンパク質が凝集する前にタンパク質と結合し分離不能になったと考えられる。

浮上画分は豆乳中のほとんどの中性脂質と全リン脂質の三分の一および少量のタンパク質を含んだ脂質-タンパク質複合体である(第二章)。凝集剤の添加により豆乳が凝集するとき、この複合体がタンパク質と結合し脂質が取り込まれたと考えられる。そこで、浮上画分の塩化カルシウム、pH 低下に対する感受性を分析した。浮上画分を豆乳の限外ろ液に分散したものは 12 時間静置しても凝集、浮上などの相分離は起こらず、極めて安定であった(Figure 12、Figure 19)。中性 pH 領域ではリン脂質のリン酸基やカルボキシル基および大豆タンパク質のカルボキシル基は解離して負荷電を持つ。そのため溶液中の粒子間には静電的反発力が発生する。豆乳中における脂質-タンパク質複合体の分散安定性は複合体のリン脂質、タンパク質などの解離基による静電反発力によって維持されているのではないかと考えられる。浮上画分の水分散液中の複合体は塩化カルシウム添加、pH 低下で凝集、浮上した(Figure 12、Figure 19)。これは脂質複合体が持っている電荷が中和され、静電反発力がなくなったことによると考えられる。

大豆タンパク質の加熱変化や凝集剤添加によるタンパク質の凝集、ゲル化については多くの研究がなされている。青木 (1970a)はゲルの強さを支える力に S-S 結合、水素結合あるいは疎水結合がと関与すると報告している。一方、Kohyama *et al.* (1995)は  $\text{CaSO}_4$ 、GDL の添加による大豆タンパク質のゲル形成について、まずタンパク質が加熱で変性し疎水基が表面に露出し、次に  $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{++}$  の添加でタンパク質が凝集し、結合する。この結合は主に疎水作用によると報告した。豆乳浮上画分中のタンパク質は主に BX1、BX2 で、その組成は大部分が疎水性アミノ酸より構成され(小野ら, 1998)、S-S 結合が含まれていないことが知られている(Figure 9)。したがって、豆乳中脂質複合体とタンパク質の結合は S-S 結合以外の結合、特に疎水相互作用によるものと推測される。

一方、電子顕微鏡観察によると豆腐のゲル構造において油滴はタンパク質のネットワークに沿って複数寄り集まって保持されている(斎尾・渡辺, 1968; 種

谷ら, 1991)。本研究で豆乳浮上画分が低下始めた塩化カルシウム濃度、pH はそれぞれ 4 mM(Buffer 含む場合 8 mM)、pH6.1 であった (Figure 10、Figure 11、Figure 18)。浮上画分を水に分散した場合、この条件で脂質複合体が既に凝集浮上している(Figure 12, Figure 19)。浮上画分を可溶性画分に分散したものでは浮上画分が減少しなかった。しかし、SDS-PAGE によりこの場合の浮上画分が可溶性タンパク質と結合していたことが分かった(Figure 17)。したがって、豆乳中の可溶性タンパク質と脂質複合体との結合は豆乳浮上画分の減少と関与していないと考えられる。

豆乳のタンパク質は粒子サイズに応じて 40 nm 以上を粒子画分、40 nm 以下を可溶性画分として分けている(Ono *et al.*, 1991)。塩化カルシウムに対する感受性は粒子画分の方が可溶性画分より高い(Ono *et al.*, 1993)。本研究においても豆乳粒子画分、可溶性画分を用いて塩化カルシウム添加、pH 低下による脂質の取り込みを調べた。粒子タンパク質は可溶性画分タンパク質より低カルシウム、高 pH で脂質が分離できなくなることが分かった。可溶性画分では塩化カルシウム添加または pH 低下につれて粒子が形成され、さらなる塩化カルシウム添加、pH 低下によりこの生成粒子が脂質(浮上画分)と結合して(Figure 23 および Figure 24)、浮上画分の減少を起こった(Figure 14、Figure 16、Figure 21)。これらのことから豆乳脂質はカルシウム添加、pH 低下により粒子タンパク質と結合して浮上できなくなり、さらにタンパク質の凝集と共に凝集物へ移行すると考えられる。

可溶性画分の場合、生成粒子が存在し、浮上画分単独で凝集する塩化カルシウム濃度あるいは pH になっても浮上画分は減少しなかった(Figure 14、Figure 16、Figure 21)。これは元の豆乳粒子と生成粒子のタンパク質組成が異なるためと考え、SDS-PAGE 分析を行った。豆乳粒子ではグリシニンが多く含まれるが、生成粒子では  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit が多く含まれることが分かった。豆乳に塩化カルシウムを添加後分離した粒子画分では無添加のものから得られた豆乳粒子と比べ  $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit の割合がやや増加していた (Figure 22 の 2-4 lane)。これは可溶性画分から形成した生成粒子が粒子画分に加えたためと考えられる。大豆グリシニンは等電点  $PI=4.2-4.8$  の acidic subunit (As) と  $PI=8.0-8.5$  basic subunit (Bs) から構成される(Utsumi

*et al.*, 1981)。 $\beta$ -コングリシニン  $\beta$  subunit の等電点は 5.8-6.2 で、 $\alpha'$ 、 $\alpha$  subunit の等電点はそれぞれ 5.2 と 5.3 である (Sykes and Gayler., 1981)。柴崎ら (1966)、Saio *et al.* (1973) はグリシニンが  $\beta$ -コングリシニンより低い塩化カルシウム濃度で凝集することを報告した。したがって、豆乳に脂質と結合したタンパク質粒子の凝集は粒子画分中の  $\beta$ -コングリシニン割合の増加により高いカルシウム濃度あるいは低い pH へシフトすると推測した。

## 5 要 約

豆乳に凝集剤を添加しタンパク質を凝集させ豆腐、豆花などの伝統的な大豆食品が造られる。豆乳の凝集過程で脂質がどのようにタンパク質ゲルに取り込まれて行くかを研究した。そのため豆乳に塩化カルシウムや酸を添加し凝集させ、そのタンパク質組成を調べると共に浮上画分を未結合脂質の指標として分析した。

1. 豆乳を塩化カルシウム添加あるいは pH により凝集させた場合、豆乳浮上画分はタンパク質の凝集に先立って減少した。すなわち豆乳中の脂質は、すべてのタンパク質が凝集する前にタンパク質と結合し分離不能になったことが分かった。
2. 浮上画分の分散液は 12 時間経過後も相分離などの変化は観察されなかった。しかし塩化カルシウム添加または pH 低下により浮上画分は凝集し浮上した。このことから豆乳浮上画分の減少は脂肪球が密度の高いタンパク質と結合することによると考えられる。
3. 豆乳タンパク質を粒子画分と可溶性画分に分け、脂質とタンパク質の結合を調べたところ、浮上画分は粒子画分の減少と平行して減少したが、可溶性画分では同様の塩化カルシウム濃度、pH で減少しなかった。可溶性画分では塩化カルシウム添加、pH 低下により新たな粒子が生成

し、その粒子の減少につれて浮上画分が減少した。このことは凝集物への脂質の取り込みがタンパク質粒子と浮上画分の結合によることを示唆している。

4. 新たに生成した粒子は元の豆乳粒子より  $\beta$ -コングリシニンを多く含んでいた。可溶性画分で新たな粒子が生成しても、浮上画分の減少は元の粒子より高いカルシウム濃度、より低い pH で起こった。粒子中  $\beta$ -コングリシニンの割合が脂質との結合に影響を与えられられる。

## 第四章 総合考察

豆乳は大豆を原料とし水で抽出したものである。この水抽出物には大豆タンパク質だけではなく、脂質も大量に含まれる。豆乳調製にはいろいろな方法があるが(Wilkens *et al.*, 1967; Nelson *et al.*, 1976; Johnson *et al.*, 1981)、伝統的な豆乳は浸漬大豆を磨砕し、加熱、ろ過して調製される。古来豆乳は飲料として利用するだけでなく、凝集などの加工によって豆腐等の伝統食品も造られている。今まで豆乳加工プロセスでのタンパク質の熱変性やゲル化のメカニズムについて多くの研究がなされている(青木, 1970a, b; 渡辺・斎尾, 1972; Ono *et al.*, 1991; Kohyama *et al.*, 1995)。そして豆乳および豆乳製品の物性に対して脂質が重要な役割を果たしていることが知られている(Miura and Yamauchi, 1984)。しかし、豆乳中での脂質とタンパク質の相互作用および加工による変化については不明点が多い。そこで豆乳を超遠心分離により幾つかの画分にわけ、タンパク質と脂質の分布を調べ、豆乳の加熱および凝集における脂質とタンパク質の結合を研究した。

大豆タンパク質と脂質および脂質-タンパク質複合体の形成について乳化との関連で研究し、脂質と結合するタンパク質は変性し疎水表面が露出していることが必須であると報告している(青木, 1981; 山内, 1994; Utsumi and Kito, 1991; Nir *et al.*, 1994)。化学試薬で変性させた大豆タンパク質は、リン脂質の存在で中性脂質と結合し安定な脂質-タンパク質複合体を形成し、遠心分離により浮上することが知られている(Kamat *et al.*, 1978)。しかし、これまで豆乳中における脂質、タンパク質複合体についての報告は少ない。我々は遠心分離法により豆乳を分画し、各画分への脂質の分布を調べたところ、脂質のほとんどは浮上画分に分布していた(第二章)。この画分は多量の中性脂質の他にリン脂質と少量のタンパク質を含んでいる。この画分に含まれるタンパク質はグリシニン、 $\beta$ -コングリシニンは少なく、主成分は分子量 21,000(BX1)と 16,000(BX2)のタンパク質であり、豆乳中ではマイナーな成分であった(第三章)。この結果、豆乳中にできた脂質複合体は大豆タンパク質と脂質の乳化によって調製された脂質複合体と組成が違うことが分かった。

植物種子の脂質は発芽および成長のためのエネルギーとしてスフェロゾーム



(Spherosome)に保存され、オイルボディ(Oil body)、リピッドボディ(Lipid body)、オレオゾーム(Oleosome)などと呼ばれている(Yatsu *et al.*, 1972; Huang, 1992)。オイルボディは粒径が  $0.2-2.5\mu\text{m}$  で、その内部には中性脂質(Triacylglycerols TAGs)があり、外側を単層のリン脂質とタンパク質が取り囲んだ構造をとるとされている。このタンパク質はオレオシンと名づけられ(Tzen *et al.*, 1993)、中性域に等電点を持つタンパク質で、少なくとも二つ異構体があることが知られている(kalinski *et al.*, 1991; Tzen *et al.*, 1990)。Tzen らは大豆を含む複数の油糧種子からオイルボディを分離し、大豆のオレオシンには分子量 24,000 と 18,000 のものがあることを明らかにした(Tzen *et al.*, 1990; Tzen *et al.*, 1997)。さらにいくつかの植物種子由来(大豆も含む)オレオシンのアミノ酸配列も明らかになっている(Tzen *et al.*, 1992)。豆乳中の脂質は遠心分離により浮上画分として分画することができた。この浮上画分に含まれていたタンパク質 BX1、BX2 は分子量がオレオシンに近く、タンパク質間に S-S 結合は見つからなかった(Figure 7 と Figure 9)。最近の研究によると BX1、BX2 の等電点は  $7\sim 7.5$ ,  $6.4\sim 6.8$  であり、疎水性アミノ酸を多く含み、BX1 のアミノ酸組成が大豆オイルボディ中の分子量 24,000 のオレオシン(24K)とよく一致することが報告された(小野ら 1998)。これらのことから、豆乳脂質複合体中のタンパク質 BX1、BX2 はオレオシンと同一のものであると考えられている。

精製した浮上画分には BX1、BX2 以外に LIIbasic 7S などのタンパク質も含まれている(Figure 3、Figure 7)。これは豆乳中の脂肪球が大豆種子中のオイルボディとは異なる組成や構造を持つ可能性を示唆している。LIIbasic 7S は塩基性 7S のサブユニットで、沈降定数が  $\beta$ -コングリシニンとほぼ同じ 7S であり、S-S 結合によって中間サブユニットを形成している点でグリシニンと似ている。このタンパク質は等電点が  $9.06\sim 9.26$  で塩基性を示す(Yamauchi *et al.*, 1984; Sato *et al.*, 1987)。また熱ショック性があり、大豆から加熱抽出により多量に抽出される(平野ら, 1989)。したがって、LIIbasic 7S は豆乳調製時のタンパク質、脂質の抽出、加熱処理によりオイルボディと複合し、オレオシンとともに豆乳脂肪球を構成するのではないかと考えられる。

Tzen and Huang (1992)はオレオシン、リン脂質がオイルボディの安定に対

して不可欠因子であり、鋏状のオレオシンがリン脂質単層膜に包まれた TAGs 球状体に差し込まれたオイルボディのモデルを提案した。オレオシンは二次構造について研究され、N末端の両親媒性ドメイン、中央部の疎水性の逆平行  $\beta$ -strand ドメインおよび C末端の両親媒性  $\alpha$ -helix ドメインの三つのドメインからなる“T”形構造が考えられている。 $\beta$ -strand ドメインが TAGs マトリクスの内部に伸び、両親媒性の N末端と C末端ドメインの正電荷残基は負電荷を持つ脂質側に、負電荷残基を外側に露出させ、オイルボディを安定に維持している (Tzen *et al.*, 1992)。オイルボディはカルシウム塩添加または pH 低下で凝集、浮上するが、表面に存在するオレオシンにより互いに合一化しない。電子顕微鏡により豆腐中に集合した脂質の球状体が観察される(斎尾・渡辺, 1968)ことから、豆乳中の脂質もオイルボディ様の球状で存在していることが推測される。本研究における浮上画分は、これら脂肪球が浮上したものと考えられる。脂質のコロイド安定性は豆乳の品質にとって極めて重要である。豆乳の浮上画分は水と安定な乳濁液を形成する (Figure 12、Figure 18)。豆乳の浮上画分は中性脂質以外にリン脂質を含んでいる。その画分散液は凝集剤の添加、pH 低下によって凝集、浮上した (Figure 12、Figure 18)。したがって豆乳中脂肪球の分散安定にはオイルボディと同様にリン脂質がタンパク質などと共に静電反発力として重要であると考えられる。

トウモロコシのオイルボディでトリプシンで処理した場合、オイルボディの合一化が起こり、粒径が増加し浮上した (Tzen *et al.*, 1992; Tzen and Huang, 1992)。大豆のスフェロゾーム(オイルボディ)は粒径が  $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$  であるが、ホスホリーパゼで処理すると Phosphatidylcholine と phosphatidylethanolamine が分解され、スフェロゾームの粒径が増大した (Nakayama and Kito, 1981)。脂肪球表面電荷の中和やタンパク質、リン脂質など膜成分の破壊は豆乳中の脂質分散安定性を破壊する因子であると考えられる。豆乳の場合、塩化カルシウムの添加あるいは pH 低下により豆乳の脂肪球はそれ自身で凝集し浮上するではなく、電荷の中和によって反発力が低下し、優先的に豆乳タンパク質と結合した(第四章)。

本研究では豆乳調製過程における脂質の豆乳各画分への分布およびタンパク質との相互作用について研究した。脂質の存在形態であるオイルボディの性質

や加熱変化などについての研究は行わなかった。大豆中のオイルボディは 115℃で 30 分間の煮沸処理で破壊され、大きな油滴となって、細胞内外に点在すると報告されている(斎尾・渡辺, 1968)。しかし豆乳調製時の加熱でオイルボディ中のオレオシンが熱変性するのか、およびオイルボディ構造、形態などがどの程度破壊され、再構成するのか、まだ分かっていない。これらの究明にはさらなる研究が必要である。

## 第五章 総 括

豆乳は大豆を原料とし水で抽出したものである。古来飲料として利用するだけではなく、濃縮、凝集などの加工によって湯葉、豆腐、豆花などの大豆製品が造られている。豆乳および豆乳製品にはタンパク質以外に脂質が大量に含まれる。製品の品質向上や新製品開発のため、豆乳の物性に及ぼす豆乳成分および成分間相互の結合等について研究されてきた。脂質は豆乳製品にテクスチャー、美味しさなどを付与し、そして製品を調理しても脂質の遊離がないことが知られている。しかし、豆乳の調製、加工過程における脂質とタンパク質の変化および相互作用は分かっていない。本研究は伝統的な加工法である加熱、凝集剤添加等の加工過程で脂質とタンパク質がどのような相互作用をするのか明らかにすることを目的とした。

豆乳の調製において、浸漬した大豆を磨砕、濾過して得たものを生豆乳とし、95℃ 5 分間加熱処理したものを豆乳とした。生豆乳および豆乳中の脂質分布を明らかにするため、超遠心により粒子分画法を用いて、生豆乳、豆乳を粒子画分(100nm 以上大粒子、40~100nm 中粒子)と可溶性画分(40nm 以下)に分画し、さらに上澄の上に現れたクリーム状層を浮上画分とした。脂質、タンパク質含量およびそれらの分布とタンパク質の組成について分析し、以下の知見を得た。

超遠心分画法を用いると生豆乳は 34%大粒子、7.6%中粒子および 55%の可溶性画分よりなっていた。豆乳では生豆乳と比べ大粒子が大

幅に減少し、中粒子が 22%に増加し、可溶性画分は若干減少した。生豆乳の浮上画分は豆乳固形分の 4%であったが、豆乳では 21%に増加した。

生豆乳の粒子画分は 35%の脂質を含み、この脂質は豆乳脂質の 80%を占めた。加熱し豆乳になると、粒子画分中の中性脂質はほとんどなくなり、豆乳浮上画分の脂質が 90%以上となった。この結果から生豆乳脂質の大部分は粒子画分に存在し、加熱によってほとんどが遊離し浮上画分に移行したことが分かった

生豆乳、豆乳各画分の脂質の構成を明らかにするため、脂質を抽出、精製し、ケイ酸カラム法で脂質の組成分析した。リン脂質は生豆乳、豆乳両粒子画分に 2.5%前後含まれ、浮上画分では 3.2%であった。生豆乳粒子のリン脂質は豆乳の 50%を占めたが、豆乳粒子では生豆乳粒子より 17%減少し、浮上画分へ移行した。生豆乳および豆乳可溶性画分のリン脂質含量とその分布割合は変わらなかった。各画分リン脂質を薄相クロマトグラフィにより分析したところ粒子、可溶性、浮上画分とも類似のリン脂質組成を示した。以上のことからリン脂質は粒子および可溶性タンパク質の安定に寄与すると共に遊離脂質の分散性と安定性に寄与していると考えられる。

生豆乳、豆乳各画分のタンパク質組成を明らかにするため、SDS-PAGE を行った。生豆乳の粒子は主にグリシニンよりなり、可溶性画分は  $\beta$ -コングリシニンよりなっていた。豆乳では粒子、可溶性画分ともグリシニンと  $\beta$ -コングリシニンを同じ割合含有していた。この結果は脂質の大部分が、生豆乳では脂質—グリシニン会合体の粒子を形成し、加熱によりその脂質が遊離し、粒子のタンパク質は再構成されることが示された。

次に生豆乳粒子中の脂質がどんな加熱条件で遊離するのか、その遊離に伴って脂質とタンパク質の結合がどのように変化するのか明らかにするため、室温から 95℃まで加熱し、各画分含量およびその組成変化を測定した。65℃までは各画分の変化はなく、65℃以上で粒子画分は温度の増加につれ減少し、可溶性画分は増加した。可溶性画分が 75℃

で最大値を示した。浮上面分は 80℃以上の温度増加で増加した。生豆乳粒子は 65℃以上で破壊され、可溶性画分と浮上面分に移行することが示された。また各画分の脂質含量の分布から、粒子中のやく半量の脂質はいったん可溶性画分に移行し、75℃以上でさらに浮上面分へ移行することが分かった。75℃加熱で生豆乳粒子中の $\beta$ -コングリシニン $\alpha'$ 、 $\alpha$ サブユニットが解離し可溶性画分へ移行した。グリシニンの変性温度である 80℃以上で、可溶性画分中のグリシニン A サブユニットが増加し B サブユニットは減少した。グリシニンの変性温度は浮上面分が大量増加する温度と一致し、脂質の遊離はグリシニンの熱変性と関係していると考えられる。

加熱により豆乳浮上面分のタンパク質含量は増加し、とくにグリシニンのベーシックサブユニット近傍に大豆タンパク質ではマイナーなバンドである BX1, BX2 が現れた。生豆乳粒子を加熱し生成した浮上面分に BX1, BX2 が現れることから BX1, BX2 は脂質と共に粒子から解離したことが分かった。浮上面分にはグリシニン、 $\beta$ -コングリシニンも含まれるが、水で洗浄すると浮上面分タンパク質の 50%以上は BX1, BX2 となった。BX1, BX2 の豆乳全タンパク質中の割合はわずか 2.8%であり、マイナーなタンパク質であった。2-メルカプトエタノールの有無による二次元 SDS 電気泳動を用いて分析した結果 BX1, BX2 間および BX1, BX2 とほかのタンパク質間の S-S 結合は存在しないことが示された。また SDS-PAGE による BX1, BX2 の相対分子量は 21,000 と 16,000 であった。

豆腐、豆花などの伝統的な大豆食品は豆乳に凝集剤を添加しタンパク質を凝集させ造ったものである。凝集に伴い脂質もタンパク質ゲルに取り込まれると考えられる。豆乳凝集過程で脂質がどのようにタンパク質ゲル中に取り込まれて行くのか全く分かっていない。そこで豆乳に塩化カルシウムや酸を添加しタンパク質を凝集させ、その組成を調べると共に浮上面分を未結合脂質の指標として分析し、豆乳凝集過程における脂質の取り込みメカニズムを検討した。

4 mM 以上の塩化カルシウム, 6.1 以下の pH で豆乳の浮上面分は減

少した。この減少はタンパク質の溶解度が低下する 6 mM 塩化カルシウムおよび pH5.9 より低い塩化カルシウム濃度および高い pH で起こった。このことから豆乳中の脂質は、すべてのタンパク質が凝集する前にタンパク質と結合して分離不能になったことが分かった。

豆乳中脂質画分の塩化カルシウムおよび pH 低下に対する感受性を明らかにするためその分散液について安定性を検討した。豆乳限外濾過液に豆乳から分画した浮上画分を分散し浮上画分散液を調製した。浮上画分散液は 12 時間経過後も相分離などの変化は観察されなかった。しかし塩化カルシウム添加または pH 低下により脂質画分は凝集し浮上した。これは脂質複合体中のタンパク質、リン脂質などの電荷が中和され、脂肪球間の静電反発力がなくなったためと考えられる。この凝集・浮上は 4 mM 以上の塩化カルシウムあるいは 6.0 以下の pH で起こり、豆乳中浮上画分の割合の減少と一致した。このことから豆乳の浮上画分の減少は脂肪球が密度の高いタンパク質と結合したことによると考えられる。

脂質と結合するタンパク質について明らかにするため、豆乳タンパク質を粒子と可溶性画分に分け、粒子・浮上画分および可溶性・浮上画分散液を調製し、塩化カルシウム添加、pH 低下による浮上画分の減少を分析した。粒子画分との分散液の場合、浮上画分の割合はほぼタンパク質溶解度の低下と平行して減少した。可溶性画分の場合は同じ塩化カルシウム添加量、pH でも浮上画分の減少は見られなかった。浮上・可溶性画分散液では、塩化カルシウム添加あるいは pH 低下により新たな粒子画分の生成が起こった。さらなる塩化カルシウムの添加、および pH 低下により生成粒子は減少し、浮上画分も減少した。凝集前の生成粒子画分には SDS-PAGE で BX1、BX2 タンパク質バンドが現れた。これらの結果からすべてのタンパク質が凝集する前に浮上画分が分離不能になるのは、脂肪球が粒子タンパク質と結合することによると考えられる。

新たに生成した粒子は元の豆乳粒子より高い塩化カルシウム濃度あるいは低い pH で凝集した。生成粒子のタンパク質は SDS-PAGE 分析

で元の豆乳粒子より  $\beta$ -コングリシニンを 8%多く含んでいた。したがって粒子中の  $\beta$ -コングリシニンの割合が粒子の脂質結合や凝集の塩化カルシウム濃度および pH と関係するのではないかと考えられる。

大豆の脂質は豆乳調製過程でタンパク質の溶出と共に抽出され、タンパク質と粒子画分を形成した。加熱によるタンパク質の変性と共に粒子は崩壊し脂質は遊離した。遊離した脂質は凝集剤(例えば塩化カルシウム)や pH 低下によりふたたびタンパク質と結合し、凝集する。豆乳脂質の加熱遊離および凝集剤による凝集の過程を Figure 27 にまとめた。

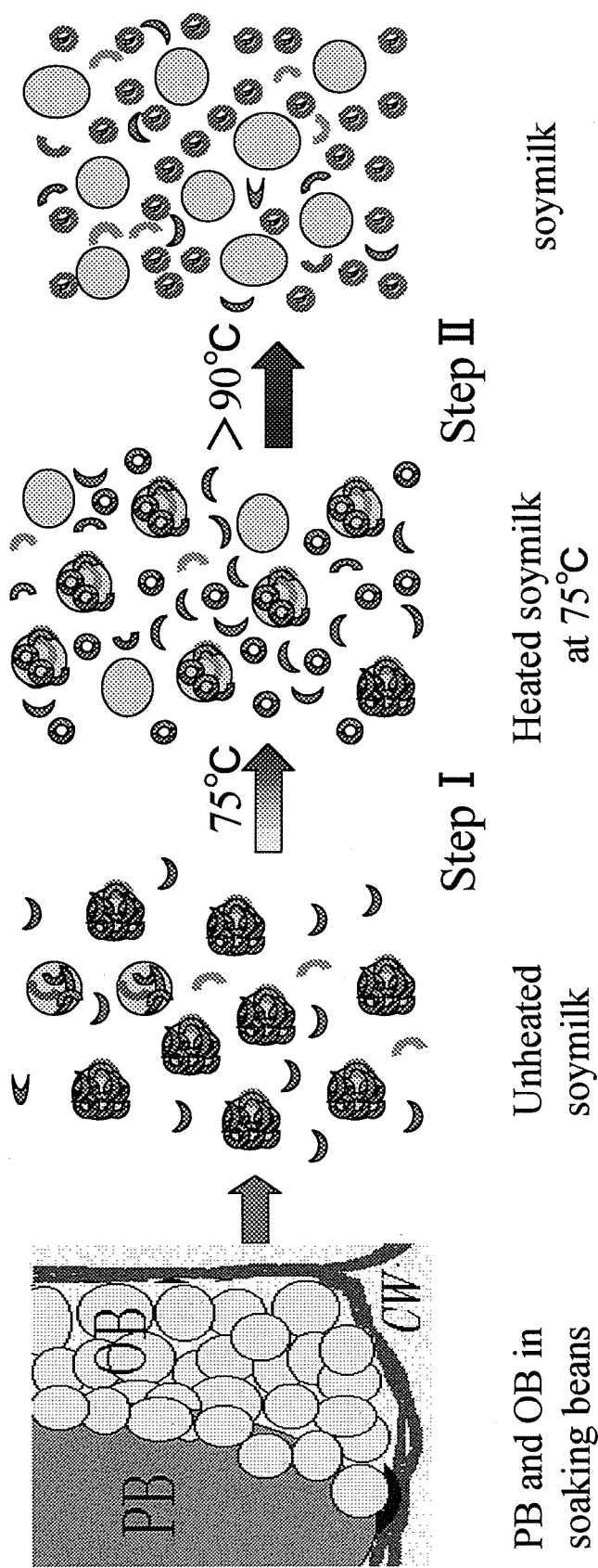


Figure 27.1 Liberation mechanism of lipid from protein particles during soy milk processing at elevated temperature.

(●) oil body; (⊙) protein particle; (⊗) glycinin; (⊘) and (⊙) glycinin acidic and basic subunits in soluble fraction; (⊘)  $\beta$ -conglycinin in soluble fraction; (PB) protein body; (OB) oil body; (CW) cell wall



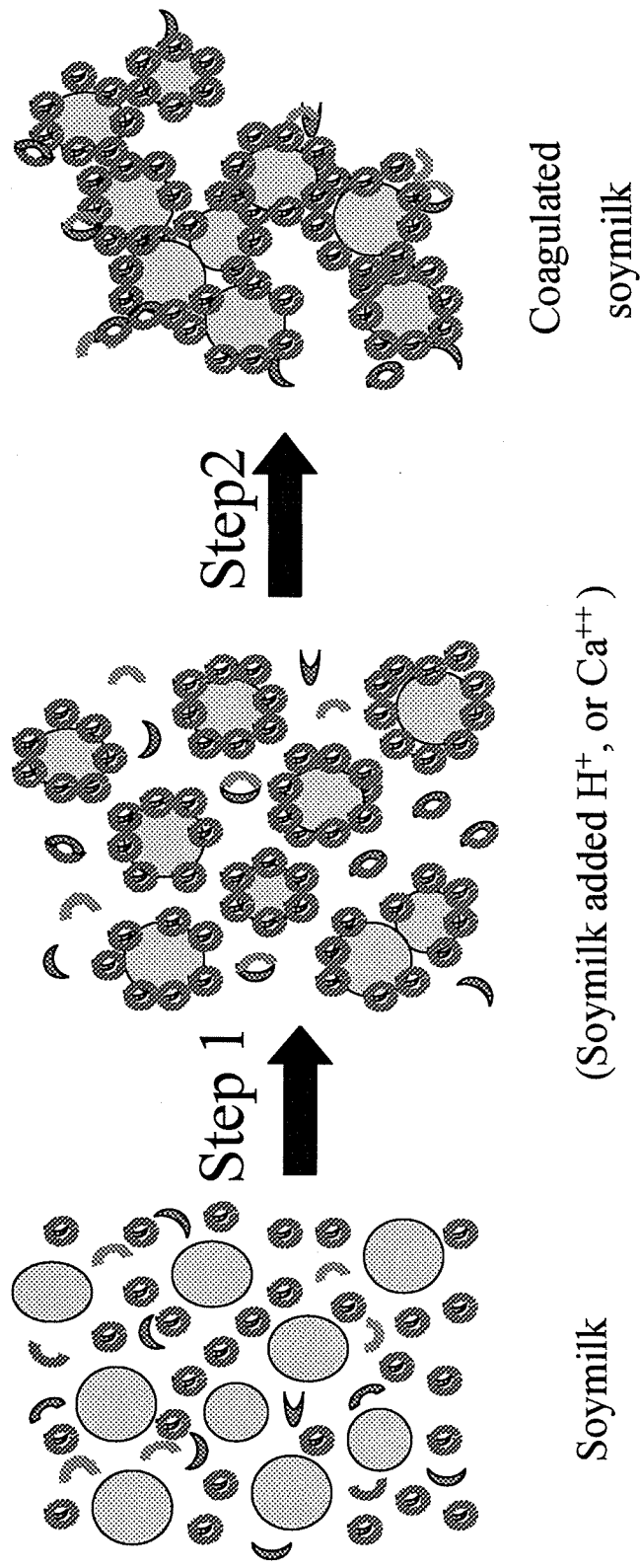


Figure 27.2 Incorporation mechanism of soy milk lipid into protein coagulum by addition of Calcium chloride or decreasing pH. (●) oil body; (⊗) protein particle; (◐) and (◑) glycinin acidic and basic subunits in soluble fraction; (◒)  $\beta$ -conglycinin in soluble fraction

## 引用文献

1. Aoki, H.; Taneyama, O.; Inami, M. Emulsifying properties of soy protein: Characteristics of 7S and 11S proteins. *J. Food. Sci.* 1980, 45, 534-546.
2. Bau, H. M.; Villaume, C.; Nicolas, J. P. Mejean, L. Effect of Germination on chemical Composition, Biochemical Constituents and Antinutritional Factors of Soy Bean (*Glycine max* Seed). *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73, 1-9.
3. Beckwith, A. C. Interaction of Phosphatidylcholine Vesicles with Soybean 7S and 11S Globulin Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32, 1397-1402.
4. Birk, Y. The Bowman-Birk inhibitor. *J. Peptide Protein Res.* 1985, 25, 113-131.
5. Blakesley, R. W.; Boezi, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 1977, 82, 580-582.
6. Blank, M. L.; Schmit, T. A.; Privett, O. S. quantitative Analysis of Lipid by Thin-Layer Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1964, 41, 371-376.
7. Catsimpoolas, N.; Meyer, W. E. Gelation phenomena of soybean globulins. III. Protein - lipid interactions. *Cereal Chemistry.* 1971, 48, 159-67.
8. Chen, W. S.; Soucie, W. G. Modification of Surface charges of Soy protein by phospholipids. *J. Am, Oil chem, Soc.* 1985, 62(12), 1686-1689.
9. Dipietro, C. M.; Liener, I. E. Heat inactivation of the kunitz and Bowman-Birk Soybean protease inhibitor. *J. Agric. Food Chem.* 1989, 37, 39-44.

10. Erdahl, W. L.; Stolyhwo, A.; Privett, O. S. Analysis of Soybean Lecithin by Thin Layer and Analytical Liquid Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1973, 50, 513-515.
11. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A Simple Method For the Isolation and Purification of total Lipids from Animal Tissues. *The Journal of Biological chemistry.* 1957, 226, 49-509.
12. Guo, S. T.; Ono, T.; Mikami, M. Interaction between Protein and Lipid in Soybean Milk at Elevated Temperature. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45(12), 4601-4605.
13. Hermansson, A.-M. Soy Protein gelation. *J. Am. Oil chem. Soc.* 1986, 63, 658-666.
14. Hirano, H.; Kagawa, Y.; Kamata, Y.; Yamauchi, F. Structural Homology among the Major 7S Globulin Subunits of Soybean seed Storage Proteins. *Phytochemistry.* 1987, 26, 41-45.
15. Huang, A. H. C. Oil bodies and Oleosins in Seed. *Annu. Rev, Plant Physiol.* 1992, 43, 177-200.
16. Iwabuchi, S.; Watanabe, H.; Yamauchi, F. Observations on the dissociation of  $\beta$ -conglycinin into subunits by heat treatment. *J. Agric. Food Chem.* 1991a, 39, 34-40.
17. Iwabuchi, S.; Watanabe, H.; Yamauchi, F. Thermal denaturation of  $\beta$ -conglycinin. Kinetic resolution of reaction mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 1991b, 39, 27-33.
18. Jacks, T. J.; Yatsu, L.Y.; Altschul, A. M. Isolation and Characterization of Peanut Spherosome. *Plant Physiol.* 1967, 42, 585-597.
19. Johnson, L. A.; Deyoe, C. W.; Hoover, W. J. Yield and Quality of Soymilk processed by Stem-infusion Cooking. *J. Food Sci.* 1981, 46, 239-243.
20. Kalinski, A.; Loer, D. S.; Weisemanm, J. M; Matthews, B. F.; Herman, E. M. Isoforms of Soybean Seed Oil Body Membrane Protein

- 24 Kda Oleosin are encoded by closely related cDNAs. *Plant Molecular Biology*. 1991, 17, 1095-1098.
21. Kamat, V. B.; Graham, G. E.; Davis, M. A. F. Vegetable protein: lipid interactions. *Cereal Chem*. 1978, 55, 295-307.
22. Kanamoto, R.; Ohtsuru, M.; Kito M. Diversity of the soybean protein- phosphatidylcholine complex. *Agric. Biol. Chem.* 1977, 41, 2021-2026.
23. Kassell, B. Trypsin and Chymotrypsin inhibitors from Soybean. *Meth Enzymol*. 1970, 19, 853-862.
24. Kato, A.; Nakai, S. Hydrophobicity determined by Fluorescence probe method and its Correlation with Surface properties of proteins. *Biochem. Biophys. Acta*. 1980, 624(1), 13-20.
25. Kato, A.; Osako, Y.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agric. Biol. Chem*. 1983, 47, 33-38.
26. Ker, Y. C.; Chen, R. H.; Wu, C. S. A simple, Semiquantitative Purification method for Soybean Glycinin by Selective Thermal Stability. *Agric. Biol. Chem*. 1990, 54(5), 1301-1302.
27. Kohyama, K.; Sano, Y.; Doi, E. Rheological Characteristics and Gelation Mechanism of Tofu (Soybean Curd). - *J. Agric. Food Chem*. 1995, 43, 1808-1812.
28. Kwok K. C.; Niranjana, K. Review: Effect of thermal processing on Soymilk. *International Journal of Food Science and technology* 1995, 30, 263-295.
29. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227, 680-685.
30. Matsudomi, N.; Mori, H.; Kato, A. Emulsifying and Foaming properties of Heat-denatured Soybean 11S Globulin in Relation to Their Surface Hydrophobicity. *Agric. Biol. Chem*. 1985, 49(4), 915-919.
31. Mattick, L. R.; Hand, D. B. Identification of a Volatile Component

- in Soybeans that Contributes to the raw bean flavor. *J. Agric. Food Chem.* 1969, 17(1), 15-17.
32. Miura, M.; Yamuchi, F. Rheological Behavior of soybean Protein-lipid-water Gel, from a small Distortion to Rupture. *Agric. Biol. Chem.*, 1984, 48(10), 2449-2455.
33. Miura, M.; Yamauchi, F.; Ogawa, Y.; Isolation and characterization of a proteolipid in Defatted Soybean meals. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46(6), 1631-1637.
34. Monma, M.; Sugimoto, T.; Haahizume, K.; Saio, K. Ultrastructure of protein Bodies in Embryonic Axes of Soybean Seeds (*Glycine max* CV. *Enrei*). *Agric. Biol. Chem.* 1990, 54(7), 1847-1848.
35. Mori, T.; Nakamura, T.; Utsumi, S. Gelation Mechanism of Soybean 11S Globulin: Formation of Soluble Aggregates as Transient Intermediates. *J. Food Sci.* 1981, 47, 26-30.
36. Morita, S.; Fukase, M.; Morita, Y. Thermal Stability of Individual Molecular Species of Soybean  $\beta$ -conglycinin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60(11), 1870-1871.
37. Nagano, T.; Akasaka, T.; Nishinari, K. Study on the heat-induced conformational changes of  $\beta$ -conglycinin by FTIR and CD analysis. *Food Hydrocolloids*. 1995, 9, 83-89.
38. Nakayama, K.; Kito, M. Decomposition of Soybean Spherosomes by Soybean Phospholipase D. *Agric. Biol. Chem.* 1981, 45(9), 2155-2156.
39. Nelson, A. I.; Steinberg, M. D.; Wei, L. S. Illinois Process for Preparation of Soymilk. *J. Food Sci.* 1976, 41, 57-61.
40. Nir, I.; Feldman, Y.; Aserin, A.; Garti, N. Surface properties and Emulsification Behavior of Denatured Soy proteins. *J. Food. Sci.* 1994, 59(3), 606-610.
41. Ohtsuru, M.; Kito, M. Association of phosphatidylcholine with Soybean 11S Globulin. *Agric. Biol. Chem.* 1983, 47(8), 1907-1908.
42. Ohtsuru, M.; Kito, M.; Takeuchi, T.; Ohnishi, S. Association of

- phosphatidylcholine with soybean protein. *Agric. Biol. Chem.* 1976, 40, 2261-2266.
43. Ohtsuru, M.; Yamashita, Y.; Kanamoto, R.; Kito, M. Association of phosphatidylcholine with soybean 7S globulin and its effect on the protein conformation. *Agric. Biol. Chem.* 1979, 43, 765-770.
  44. Ono, T.; Choi, M. R.; Ikeda, A.; and Odagiri, S. Changes in the composition and size distribution of soymilk protein particles by heating. *Agric. Biol. Chem.* 1991, 55, 2291-2297.
  45. Ono, T.; Katho, S.; Mothizuki, K. Influence of Calcium and pH on Protein Solubility in Soybean Milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993, 57(1), 24-28.
  46. Ono, T.; Takeda, M.; Guo, S. T. Interaction of protein particles with lipids in soybean milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60, 1165-1169.
  47. Petruccelli, S.; Añón, M. C. Soy Protein Isolate Components and Their Interactions. *J. Agric. Food chem.* 1995a, 43, 1762-1767.
  48. Petruccelli, S.; Añón, M. C. Thermal Aggregation of Soy protein Isolates. *J. Agric. Food Chem.* 1995 b, 43, 3035-3041.
  49. Petruccelli, S. and Añón, M. C. pH-Induced Modifications in the Thermal Stability of Soybean Protein Isolates. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 3005-3009.
  50. Rackis, J. J. Biological and Physiological factors in Soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1974, 51, 161-174.
  51. Rackis, J. J. Significance of soya trypsin inhibitors in nutrition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1981, 58, 495-501.
  52. Rohrllich, M., Niede rauer, T., Fette, Seifen. *Anstrichmy.* 1967, 69, 226.
  53. Rouser, G.; Kritchevsky, G.; Yamamoto, A. Lipid Chromatographic Analysis, ed. By Marinetti, G.V., 1967, 1, p99. Dekker, New York.
  54. Saio, K. Microstructure of Traditional Japanese Soybean Foods.

Scanning Electron Microscopy. III, SEM Inc., AMF O'Hare (Chicago), 1981, 553-559.

55. Saio, K.; Kamiya, M.; Watanabe, T. Food Processing characteristics of Soybean 11S and 7S proteins. Part I. Effect of Difference of protein Components among Soybean Varieties on formation of Tofu-gel. *Agric. Biol. Chem.* 1969, 33(9), 1301-1308.
56. Saio, K.; Watanabe, T. Food Use of Soybean 7S and 11S proteins Extraction and Functional properties of Their Fractions. *J. Food Science.* 1973, 38, 1139-1144.
57. Sato, K.; Yamagishi, T.; Kamata, Y.; Yamauchi, F. Subunit Structure and Immunological Properties of a Basic 7S Globulin from Soybean Seeds. *Phytochemistry.* 1987, 26(4), 903-908.
58. Shimada, K.; Matsushita, S. Effects of Oils on Thermal of Soybean protein. *Agric. Biol. Chem.* 1981, 45(12), 2877-2881.
59. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olsen, B. J.; Klenk, D. L. Measurement of protein using bicinchonimic acid. *Anal. Biochem.* 1985, 150, 76-85.
60. Sorgentini, D. A.; Wagner, J. R.; Añón, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2471- 2479.
61. Sykes, G. E.; Gayler, K. R. Detection and Characterization of a new  $\beta$ -conglycinin from Soybean Seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981, 210, 525-530.
62. Thanh, V. H.; Shibasaki, K. Major proteins of soybean seeds. A Straightforward Fractionation and Their Characterization. *J. Agric. Food chem.* 1976, 24, 1117-1121.
63. Tzen, J. T. C.; Lai, Y. K.; Chan, K. L.; Huang, A. H. C. Oleosin Isoforms of High and Low Molecular Weights are present in the Oil

- bodies of Diverse Seed Species. *Plant Physiol.* 1990, 94, 1282-1289.
64. Tzen, J. T. C.; Lie, G. C.; Chan, K. L.; Huang, A. H. C. Characterization of the Charged Components and Their Topology on the Surface of Plant Seed oil Bodies. *The Journal of Biological Chemistry.* 1992, 267(22), 15626-15634.
65. Tzen, J. T. C.; Peng, U. C.; Cheng, D. J.; Chen, E. C. F.; Chiu, J. M. H. A new Method for Seed Oil Body Purification and Examination of Oil Body Integrity Following Germination. *J. Biochem.* 1997, 121, 762-768.
66. Tzen, J. T.C.; Cao, Y. Z.; Laurent, P.; Ratnayake, C.; Huang, A. H. C. Lipids Proteins, and Structure of Seed oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physical.* 1993, 101, 267-276.
67. Tzen, J. T.C.; Huang, A. H. C. Surface Structure and Properties of Plant Seed Oil Bodies. *The Journal of Cell Biology.* 1992, 117(2), 327-335.
68. Utsumi, S.; Damodaran, S.; Kinsella, J. E. Heat-induced Interactions between soybean protein: Preferential Association of 11s Basic subunits and  $\beta$  - subunit of 7s. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32, 1406-1412.
69. Utsumi, S.; Inaba, H.; Mori, T. Heterogeneity of Soybeans glycinin. *Phytochemistry.* 1981, 20, 585-589.
70. Utsumi, S.; Kito, M. Improvement of Food protein Functions by chemical, physical, and Biological modifications. *Comments Agric, & Food chemistry.* 1991, 2(4), 261-278.
71. Watanabe, K. Kinetics of Thermal Changes in Absorbance of a Solution System of Soybean 11S protein. *Agric. Biol. Chem.* 1986, 50(8), 2121-2122.
72. Werner, M. H.; Wemmer, D. E. Three-dimensional Structure of Soybean Trypsin/Chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in Solution. *Biochemistry.* 1992, 31, 999-1010.



73. Wilkens, W. F.; Mattick, L. R.; Hand, D. B. Effect of processing method on oxidative off- flavors of Soybean milk. *Food Technology*. 1967, 21, 1630-1633.
74. Wolf, W. J., Thomas, B. W. *Cereal Chem.* 1973, 50, 580.
75. Wolf, W. J.; Babcock, G. E.; Smith, A. K. Ultracentrifugal differences in soybean protein composition. *Nature*. 1961, 191, 1395-1396.
76. Wolf, W. J.; Nelsen, T. Partial purification and Characterization of the 15S Globulin of Soybeans, a Dimer of Glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 785-791.
77. Yamagishi, T.; Miyakawa, A.; Noda, N. Isolation and Electrophoretic Analysis of Heat-induced products of Mixed Soybean 7S and 11S Globulins. *Agric. Biol. Chem.* 1983. 47(6), 1229-1237.
78. Yamano, Y.; Miki, E.; Fukui, Y. Incorporation of lipid into soybean protein gel and the role of 11S and 7S protein. *Nippon shoyokuhin kogyo gakkaiishi*. 1981, 28, 136-141.
79. Yamauchi, F.; Ogawa, Y.; Kamata.; Shibasaki, K. Emulsifying properties of Soybean  $\beta$  -conglycinin and Glycinin: Evaluation by Turbidimetry. *Agric. Biol. Chem.* 1982, 46(3), 615-621.
80. Yamauchi, F.; Sato, K.; Yamagishi, T. Isolation and Partial Characterization of a Salt-extractable Globulin from Soybean Seeds. *Agric. Biol. Chem.* 1984, 48(3), 645-650.
81. Yanatori, Y.; Fujita, T. Hypertrophy and hyperplasia in the endocrine and exocrine pancreas of rats fed Soybean trypsin inhibitor or repeatedly injected with pancreozymin. *Archivum Histologicum japonicum*. 1976, 39, 67-78.
82. Yatsu, L. Y.; Tacks, T. J. Spherosome membranes. Half Unit-membranes. *Plant Physiol.* 1972, 49, 937-943.
83. Yazici, F.; Alvarez, V. B.; Hanser, P. M. T. Fermentation and Properties of Calcium fortified Soy milk yogunt. *J. Food Sci.*

1997,63(3), 457-461.

84. Smith, A. K.; Circle, S. J. Soybeans: Chemistry and Technology; AVI Publishing: Westport, CT, 1972; Vol.1. 渡辺篤二 柴崎一雄 翻訳 監修 大豆タンパク質 —その化学と加工技術— 建帛社 1979, 40-99,181-225。
85. 青木 宏 大豆タンパク質の乳化機能 食品の物性 第8集 松本幸雄 編. 食品資材研究会刊 1981, 107-121。
86. 大久保一良 大豆の科学 山内文男 大久保一良 編 朝倉書店 1992, 57-74。
87. 小野伴忠 小島千佳子 郭順堂 豆乳中の脂質結合性タンパク質について 日本食品科学工学会 第45回大会講演要旨集 p64。
88. 喜多村啓介 ダイズの栄養性及び加工適性の改良育種 日本醸造協会誌 1994,12, 926-931。
89. 佐々木正治、本木正雄、山内文男、柴崎一雄 大豆の複合体 (第三報) 大豆食品中のプロテオリピドについて 日本食品工業学会誌 1975,22(7). 309-313。
90. 斎尾恭子 渡辺篤二 大豆食品の微細構造 日本食品工業学会誌 1968, 15(7), 290-296。
91. 斎尾恭子 馬場啓子 食品の組織構造 —大豆貯蔵中の変化— 日本食品工業学会誌 1980, 27(7), 343-347。
92. 柴崎一雄 大久保一良 佐々木宏三 大豆蛋白質の食品化学的研究 (第2報) 抽出大豆蛋白質の塩化カルシウム凝集について 日本食品工業学会誌 1966, 13(10), 429-434。
93. 柴崎一雄 浅野三夫 大豆および大豆利用食品の組織化学的研究 日本食品工業学会誌 1968, 15(1), 1-7。
94. 柴崎一雄 大久保一良 佐藤隆夫 大豆蛋白質の食品化学的研究 (第10報) 豆乳クリーム層への蛋白質の移行と乳化能について 日本食品工業学会誌 1972, 19(12), 5802-584。
95. 高木俊夫 編著 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 廣川書店 1990, p8-12, p41-61。

96. 高松清治 分離大豆タン白質の生理機能と食品への利用 月刊フードケミカル.1994, 10, 29-33。
97. 種谷真一, 木村利昭, 相良康重 食品・そのミクロの世界 ー電子顕微鏡による立体写真集ー 槇書店 1991, 30-31.
98. 日本四訂食品標準成分表 科学技術庁資源調査会編 1982, P102。
99. 平野 久 香川裕之 大久保一良 ダイズ塩基性 7S グロブリン 化学と生物 1989,27(12), 760。
100. 星 祐二 大豆の科学 山内文男 大久保一良 編 朝倉書店 1992, 135-177。
101. 山内文男;本木正雄;柴崎一雄. 大豆の複合体(第一報) プロテオリビドの分離 日本食品工業学会誌 1975,22(6), 154-158。
102. 山内文男 大豆タンパク質の構造と機能性 食品の物性 第8集 松本幸雄 編. 食品資材研究会刊 1982, 145-160。
103. 山内文男 大豆蛋白質の構造と食品特性 日本食品工業学会誌 1994, 41(3), 233-240。
104. 山野善正 三木英三 福井義明 大豆タンパク質一油一水系ゲルのテクスチャーとゲル形成 日本食品工業学会誌 1981, 28(3), 131-135。
105. 山野善正 田村成正 三木英三 日本食品工業学会誌 1987, 34, 507。
106. 山野善正 大豆タンパク質一油一水系のゲル形成と物性. 松本幸雄 山野善正編 食品の物性 食品資材研究会. 1990, 第15集, P203-222。
107. 吉城由美子 大久保一良 大豆サポニンの新しい機能 化学と生物 1997, 35(12), 839-844。
108. 渡辺 研; 渡辺知紀; 岡本 奨. 湯葉の膜質に対する脂質の関与について. 日本食品工業学会誌. 1975, 22(4), 143-147.
109. 渡辺篤二 斎尾恭子 豆腐を考える 化学と生物 1971, 11(10), 631-640.
110. 渡辺篤二 大久保一良 翻訳監修 FAO 豆類の栄養と加工 建帛社 1993, 19-41.