

大豆たん白質の凍結変性の解析とその制御

Analysis of Freeze-Denaturation of Soy Protein and Its Control

宮脇長人(東京大学大学院応用生命化学専攻)

Osato MIYAWAKI

Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo,
Tokyo 113

ABSTRACT

Freezing denaturation of soy protein was investigated through the behavior of water in freezing. Mean ice structure size formed in the protein gel was proved to be inversely proportional to the moving speed of freezing front. For the analysis of freezing denaturation of soy protein, the effect of freezing itself was separately analyzed from the rate process of denaturation in the storage. As for the effect of freezing itself, rapid freezing was favorable for the less denaturation as measured from the increase in gel elasticity. Frozen soy protein gel was stored at the three different temperature levels and the change in elasticity was compared. The higher temperature below the freezing point gave the higher change in gel elasticity. The addition of glucose in the gel substantially inhibited the denaturation. For the estimation of the protein concentration in the frozen gel, the ice fraction was measured by using differential scanning calorimetry (DSC). Ice fraction for the soy protein gel containing 10% glucose was much lower than that for the sample not containing glucose, which seemed to explain the slower denaturation rate for the frozen gel containing glucose. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 100-103, 1995.

たん白質の凍結変性はこれまでに数多くの研究があり、氷結晶生成に引き続いて起こる凍結濃縮が原因となっており、塩濃縮、浸透圧変化、pH変化、水と水の脱離、SS-SH交換反応、分子内疎水性相互作用の低下など様々なメカニズムが論じられている¹⁾。しかしながら、これら多くの研究においてはいずれも、凍結変性の最初の引き金である氷結晶構造の定量的解析がなされておらず、かつ、それに引き続いて起こる凍結濃縮についても、その定量的取扱いがなされないままたん白質変性機構が論じられている。

本研究においては大豆たん白質凍結変性過程を水の相変化を中心とした観点から解釈することを目的として、最初に伝熱工学的手法によりたん白質ゲルの凍結過程を定量的に解析し、その結果を踏まえて凍結に伴う氷結晶構造解析を行う。次に、大豆たん白質凍結変

性を、凍結自体による影響と凍結保存中の速度過程とに分離して凍結変性を現象論的・定性的に考察し、最後に凍結濃縮度を氷結率温度依存性に基づき定量的に把握したうえで、凍結変性の速度過程の定量化についての手がかりを得ようとするものである。

実験方法

SPI (ニューフジプロ-SE) ゲル、全脂大豆たん白質ゲルまたは他のたん白質ゲルなどを凍結条件を制御して凍結し、氷結晶構造をグルタルアルデヒドで固定しつつ解凍し、写真測定法または凍結乾燥後の水銀ボロシメーター法により、氷結晶構造を解析した。たん白質ゲル変性速度過程の解析は主として圧縮弾性率の解析により行った。氷結率の温度依存性は示差走査熱

量計 (DSC) によった。

結 果 と 考 察

凍結条件と氷結晶構造

たん白質の場合に限らず一般に食品の凍結において最初に生ずる現象は氷結晶の生成である。しかしながら、凍結条件と生成氷結晶構造との関連については、古典的な最大氷結晶生成帯通過時間を基準として緩慢凍結、急速凍結を区別し、前者では微細な氷結晶が、後者では粗大な氷結晶が生成するという定性的理論²⁾がこれまでに存在するのみで、氷結晶構造の定量的解析を目的とする研究は、これまでにほとんど存在しない。

この問題に対して、我々は伝熱工学的アプローチを先ず採用することとした。これは、凍結条件の定量的記述はこの方法を抜きにしては考えられないからである。食品凍結の伝熱工学的解析にはいくつかの問題点が存在する。その一つは凍結状態における食品の伝熱物性値がほとんど整理体系化されていないことであり、もう一つは温度によって物性値が刻々に変化する食品の凍結現象を正しく記述することのできる伝熱理論が存在しないことである。

そこで食品の凍結状態における伝熱物性、ことに有効熱伝導度について詳細な解析を加えた結果、凍結食品の有効熱伝導度は氷結晶の分散構造を仮定するMaxwell-Euckenモデルが最も適合性が高いことを知った³⁾。また、凍結・解凍など相変化を伴う伝熱現象に対する汎用性の高い理論モデルとして三段階凍結モデルを提案した⁴⁾。

以上のような伝熱理論からのアプローチを踏まえたうえで、氷結晶生成現象に対して、凍結界面における

水の物質移動と伝熱のエネルギーバランスを考慮した次元解析の方法により、平均氷結晶径 d_p は次式によって、凍結界面進行速度 U と関係づけられることが明らかとなった^{5,6)}。

$$ud_p/D_w \sim 1 \quad (1)$$

ここに D_w は水の拡散係数である。種々の食品試料を凍結して生成氷結晶の大きさを測定し、式(1)を用いて解析し ud_p の値をまとめた結果をTable 1に示す。式(1)によれば ud_p は水の拡散係数のオーダーであることが予想され、実際、実測値はいずれも 0°C の水の拡散係数の値の $1/3 \sim 1/5$ とあまりオーダー的に異なっておらず、濃厚ゲル中における水の束縛状態を考慮すれば、このことは、氷結晶の成長過程が凍結界面への水の分子拡散によって律速されていることを示しているものと思われる。

以上のことは種々に物性の異なる試料に対し、異なる温度条件で凍結がなされ、しかも試料内部においても異なる凍結条件が、凍結界面進行速度をパラメーターとすることですべて一元化され、しかもこれによって氷結晶の大きさをある程度定量的に記述できることを意味しており、凍結条件のパラメーターとしての凍結界面進行速度は最大氷結晶生成帯通過時間よりもはるかにその意味が明確、有用かつ汎用性が高いことは明らかである。

凍結条件と大豆たん白質ゲル凍結変性

以上によって凍結条件と生成氷結晶の関係が明らかになったので、次に凍結条件と大豆たん白質ゲル凍結変性の関係について検討を加えた。そのためには、凍結変性を凍結自体による影響と、凍結保存時の速度過程とに区別して考察する必要がある。そこで先ず前者による影響を検討するために、SPIゲルを凍結温度を変えて凍結し、凍結後直ちに解凍して物性変化を測定し

Table 1. Comparison of ud_p among various frozen samples

Sample	Additive	Method	ud_p ($10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$)
Soy protein (6.2%)	non	photographic	3.6
Soy protein (6.2%)	ultrasound	photographic	3.65
Soy protein (6.2%)	AgI	photographic	2.0
Soy protein (6.2%)	CaCO_3	photographic	3.65
Egg albumin (8%)	non	photographic	2.92
Agar (3%)	non	mercury porosimetry	2.71

cf. water diffusivity at 0°C ; $D_w = 1.0 \times 10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$
 $ud_p/D_w \approx 1$

た。結果をFig. 1に示す。図の二本の曲線は凍結部位（冷却板からの距離）による違いを示す。冷却板から遠いほど凍結速度は遅くなるため、凍結温度、凍結部位いずれを変化させても、凍結変性に対する凍結自体による影響に関しては、急速凍結のほうが緩慢凍結よりも大豆たん白質物性変化に与える影響が小さいことがわかる。

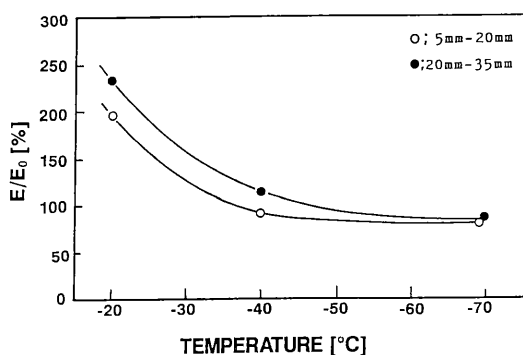


Fig. 1. Change in elasticity of soy protein gel after freezing at various temperatures.

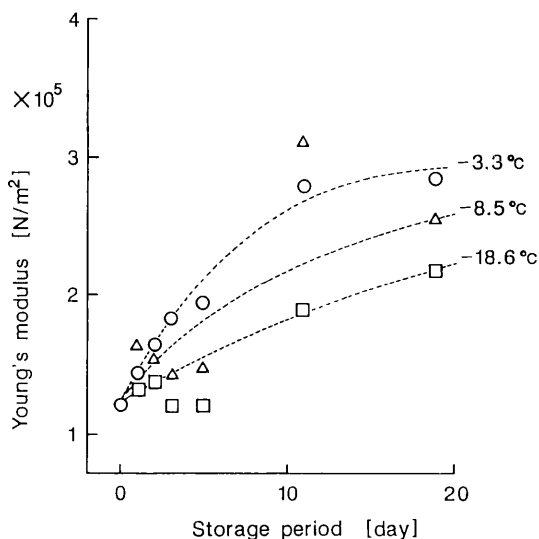


Fig. 2. Relationship between storage period and Young's modulus of soy protein gel.

大豆たん白質ゲル凍結変性の速度過程

次に、大豆たん白質ゲルをいったん同一条件（-18°C）で凍結させたのち、種々の異なる条件で凍結保存し、その後の弾性率変化を指標とする物性変化について検討を加えた。結果をFig. 2に示す。この図より、大豆たん白質の凍結変性は時間とともに進行する速度過程であり、その反応速度は凍結温度以下では温度が高いほど大きいことがわかる。以上の結果は大豆

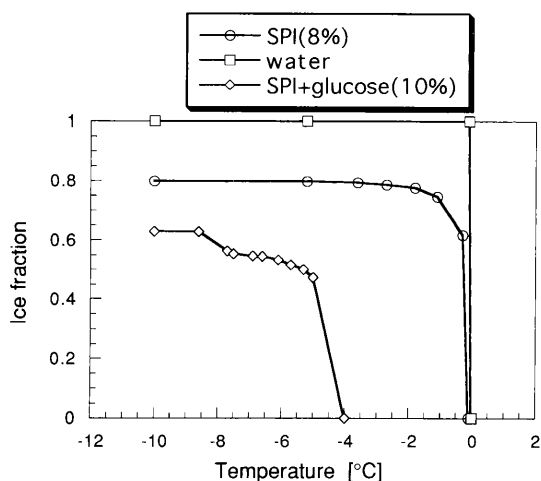


Fig. 3. Temperature dependency of ice fraction for SPI (8%) and SPI mixed with glucose (10%).

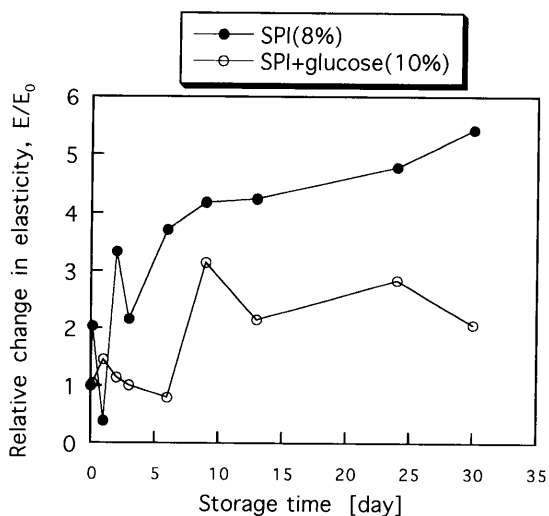


Fig. 4. Relative change in elasticity of SPI gel during the freezing storage at -20°C.

たん白質凍結変性を速度過程として解析することの重要性を示している。

凍結濃縮とたん白質凍結変性

氷結率の温度依存性

大豆たん白質凍結変性を速度過程として解析する場合、たん白質分子間相互作用を考える必要があり、そのためには先ず、凍結変性時のたん白質濃度を知ることが重要である。そこで凍結濃縮度を定量化するため、DSCを用いて氷結率の温度依存性を測定した。結果をFig. 3に示す。SPI (8%) のみの場合凍結開始温度は0℃よりわずかに低いみで、凍結は温度の低下とともに急速に進行し、-2℃程度でほとんど凍結は完了している。これに対して、同じ試料に10%グルコースを加えると凍結開始温度は-4℃付近に低下し、また氷結率も大きく低下して、しかも-4~-9℃の間では温度依存性が顕著になっている。このように氷結率を測定することによって凍結濃縮度から、たん白質濃度を推定することができる。

凍結濃縮度と大豆たん白質変性度

前項の結果より、大豆たん白質のみの凍結の場合、凍結は-2℃程度で完了しこれ以下の温度においては、凍結濃縮度はほとんど変化しないことがわかった。このことは、この温度以下においては凍結濃縮相におけるたん白質濃度はそれほど変化せず、従って、凍結変性速度はこの範囲における限り、反応速度論的には温度が高いほうが大きいことを予想させ、これはFig. 2の実験事実をよく説明するとともに、凍豆腐製造工程における大豆たん白質の変性を目的とする熟成工程の温度 (-3℃)⁷⁾ にも合理的説明を与えるものである。さらに、あらためてSPIゲル (8%) およびこれに10%グルコースを添加した試料について凍結変性実験を-20℃で行ったところ、ゲル弾性率の経時変化はFig. 4に示すように、グルコース添加により凍結変性速度が

抑制されている。これはグルコースの存在により不凍化した水の割合が増えたため、凍結濃縮相でのたん白質濃度が低下し、そのため凍結変性速度が低下したものとみなすことができる。以上の結果は、水分状態の制御による凍結変性の速度論的制御の可能性を示唆するものと思われる。

文 献

- 1) 土井悦四郎(1986)：食品たん白質の界面変性と凍結変性. 食品の物性, 第12集, 食品資材研究会, pp.135-149.
- 2) 加藤舜郎(1960)：食品冷凍の理論と応用. 光琳書院, 東京.
- 3) Miyawaki O and Pongsawatmanit R (1994) : Mathematical analysis of the effective thermal conductivity of food materials in the frozen state. *Biosci Biotech Biochem*, **58**, 1222-1225.
- 4) Miyawaki O, Abe T and Yano T (1989) : A numerical model to describe freezing of foods when supercooling occurs. *J Food Eng*, **9**, 143-151.
- 5) Miyawaki O, Abe T and Yano T (1992) : Freezing and ice structure formed in protein gels. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 953-957.
- 6) Bae SK, Miyawaki O and Yano T (1993) : Ice structure size in frozen agar gels analyzed by mercury porosimetry. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1624-1627.
- 7) 橋詰和宗(1979)：大豆たん白質の凍結変性による新食品素材の開発に関する研究. 日食工誌, **26**, 450-459.