

摂動相関二次元近赤外相関分光法による 大豆たん白質凝固過程の水和構造の解析

源川拓磨*

筑波大学生命環境系

Analysis of Soy Protein Hydration Structure during Coagulation by Perturbation-Correlation Two-Dimensional Near-Infrared Correlation Spectroscopy

Takuma GENKAWA*

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572

ABSTRACT

In the present study, the hydration structure of soy protein during coagulation was analyzed by using near-infrared (NIR) spectroscopy combined with two-dimensional correlation spectroscopy (2DCOS). Commercial plain soymilk was heated from 20°C to 80°C at 10°C intervals, and cooled to 20°C. During this heating-cooling process, diffuse reflectance NIR spectra and viscosity of the soymilk were acquired every 30 seconds for 30 minutes with a FT-NIR spectrometer and a rotational viscometer. Correlation between the viscosity and the NIR spectrum was explored with 2DCOS. The viscosity of soymilk decreased with heating and increased with cooling, and viscosity at 20°C increased 1.4 times before and after the heating-cooling process. In the NIR spectra, bands arising from the OH group showed blue shift. These shifts mean that hydrogen bonding was broken by heating. In the 2D correlation spectra, bands at 5,290 cm⁻¹ (1,890 nm) and 4,900 cm⁻¹ (2,070 nm) were detected, and these bands were assigned to the weakly hydrogen-bonded OH group of water and the NH group of hydrated protein, respectively. Moreover, from the perturbation correlation 2D correlation spectra, it was shown that in the cooling process after heating the band of hydrated protein changed drastically between 50 and 40°C, at which point the viscosity also increased significantly. These results suggest that change in hydration of soybean protein induced change in the viscosity of soymilk. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 177-181, 2013.

Key words : near-infrared spectroscopy, two-dimensional correlation spectroscopy, hydration structure, viscosity, coagulation

*〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

近赤外分光法は透過性が高い波長800～2,500 nmの光を利用する分光分析法であり、この波長帯の光がC-H基やO-H基に吸収されることを利用して、食品に含まれる内部成分の定量分析に用いられている。既に米や小麦等の穀物の検査において、主要成分であるデンプン、たん白質、脂質の定量分析法として採用されているが、近年、近赤外分光法の応用例として定量分析をさらに発展させたプロセス分析技術(Process Analytical Technology, PAT)に関する研究が製薬分野において盛んに行われている¹⁻⁵⁾。PATを導入することによって、製造プロセス中の成分変化をオンラインで計測するだけでなく、プロセス中に起こっている物理化学的な変化を詳細に把握し、デザインによる品質保証(QOD)の実現を図ることが可能となる。

著者は、このPATの概念を食品加工プロセスに導入することを提唱し、本助成研究では近赤外分光法と二次元相関分光法⁶⁻⁹⁾を用いて凝固過程における大豆たん白質の水和構造を解析することを試みた。豆腐の硬さはその加工適性を判断するための重要な指標であり、加工に適した硬さが得られるような品種の育成や凝固剤の開発が行われている。しかし、新しい品種や凝固剤の評価は硬さの比較のみで行われており、硬さが変化する科学的根拠については殆ど検討されていない。本研究は、豆乳を加熱・冷却した際の粘度変化について、水和たん白質が寄与しているという仮説を立て、この仮説を検証するために近赤外スペクトルと粘度を同時に計測し、解析を行った。

近赤外分光法は、赤外分光法やラマン分光法と同じく、分子の振動に基づく分光分析法であり、これまでに近赤外分光法を用いてたん白質の構造研究が行われてきている。その特徴は水和を研究できることにあり、村山ら¹⁰⁾は一般化二次元近赤外相関分光法を用いて卵白アルブミンの熱および酸変性過程を明らかにした。二次元相関分光法を近赤外スペクトルの解析に適用することにより、一次元のスペクトルでは捉えにくい変化を明らかにすることができる。本研究では一般化二次元相関分光解析に加え、摂動(本研究では温度)に対するスペクトル変化、つまり摂動相関二次元近赤外相関分光法⁹⁾を適用することで、加熱および冷却に伴う水和たん白質の変化を検討した。

方 法

実験装置

豆乳の近赤外スペクトルと粘度を同時に計測するた

めに、粘度計の試料容器の底部に石英ガラス板を設置した。この石英ガラス板を通して下方より近赤外光を照射し、拡散反射光を捉えることで近赤外スペクトルを得た。近赤外スペクトルの測定にはフーリエ変換型近赤外分析計(NIRFlex-N500, Buchi)を使用し、10,000～4,000 cm⁻¹(1,000～2,500 nm)の波数領域のスペクトルを4 cm⁻¹間隔、32スキャンの条件で30秒毎に取得した。粘度の測定には回転式粘度計(DV-II+Pro, Brookfield)に低粘度測定用アダプターを取り付けたものを使用し、スピンドルの回転数60 rpmの条件で30秒毎に粘度を測定した。

実験方法

実験には市販の無調整豆乳を供試した。豆乳試料の温度を20℃から80℃まで10℃ごとに上昇させ、その後、再び20℃まで10℃ごとに低下させ、それぞれの温度ごとに30分間保持し、この間に豆乳の近赤外スペクトルおよび粘度の計測を行った。なお、温度の調節は粘度計の試料容器の周囲に温度制御された水を循環させることで行った。

データ解析

得られた近赤外スペクトルの解析は多変量解析ソフト(The Unscrambler, CAMO)および二次元相関分光解析ソフト(2DShige, 関西学院大学)を用いて行った。二次元相関分光解析には、5,556～4,760 cm⁻¹(1,800～2,100 nm)の領域のスペクトルについてベースライン補正(MSC処理)を行ったものを用いた。二次元相関スペクトルの表示においては、正の相関を赤色、負の相関を青色で示した。また、粘度の値は30分間の平均値を用いた。

結果と考察

豆乳の温度および粘度変化

豆乳の粘度は加熱によって5.3 mPa・sから2.1 mPa・sまで低下し、冷却によって9.5 mPa・sまで増加した(Fig. 1)。また、冷却における粘度上昇は50℃以下で急激に起こっていた。加熱・冷却の前後の豆乳の変化は視覚的にも明らかで、加熱前に豆乳は液状であるのに対し、冷却後はゲル状になっていた。温度変化に伴う粘度の変化は様々な液体で一般的に観察されるが、豆乳においては加熱および冷却によるヒステリシス効果が認められた。

温度変化させた豆乳の近赤外スペクトル

温度を変化させた豆乳の近赤外スペクトル ($5,500 \sim 4,700 \text{ cm}^{-1}$) およびその2次微分スペクトルをFig. 2に示す。この領域では豆乳の殆どを占める水のOH基に帰属されるバンドが支配的であり、豆乳に含まれるたん白質のNH基のバンドや脂質のC=O基のバンドを観測するのは困難である。2次微分スペクトルを求めることで重複しているこれらのバンドを分離したところ、 $5,270 \text{ cm}^{-1}$ の水のOH基バンドの他に $4,860 \text{ cm}^{-1}$ 付近にバンドが存在することが確かめられた (Fig. 2)。波数の位置から¹¹⁾、この $4,860 \text{ cm}^{-1}$ のバンドをNH基 (NH伸縮振動とamide IIの結合音) に帰属した。

水の近赤外スペクトルにおいて、加熱により水素結合が切断されることによりOH基バンドが短波長側にシフトすることが知られている¹²⁾。豆乳の近赤外スペ

クトルにおいても加熱によってOH基バンドが短波長側にシフトしており、豆乳の殆どを占める水の水素結合が切断されている様子が観測された。また、OH基バンドは冷却によって再び長波長側にシフトしたが、吸光度は全体的に低下した。これは、豆乳の可溶物質が凝集することにより散乱光強度の低下と拡散反射光強度の増大が起こったためと推察された。

二次元相関分光解析

一般化二次元相関解析の結果 (Fig. 3)、加熱および冷却のいずれにおいても $5,290 \text{ cm}^{-1}$ ($1,890 \text{ nm}$) および $4,900 \text{ cm}^{-1}$ ($2,040 \text{ nm}$) に温度変化と相関を示すバンドの存在が示された。すなわち、二次元相関スペクトルの対角線上に自己相関ピークが $5,290 \text{ cm}^{-1}$ と $4,900 \text{ cm}^{-1}$ に観測され、さらに、 $(4,900, 5,290) \text{ cm}^{-1}$ の交差相

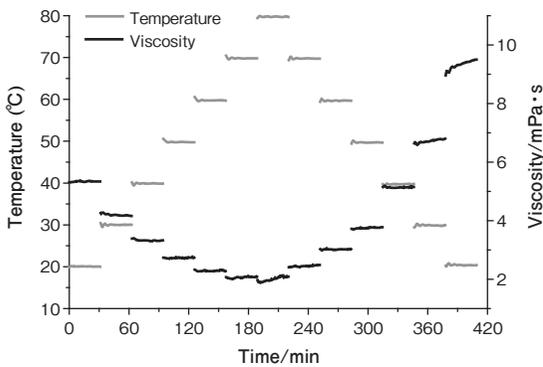


Fig. 1. Changes in temperature and viscosity of soymilk.

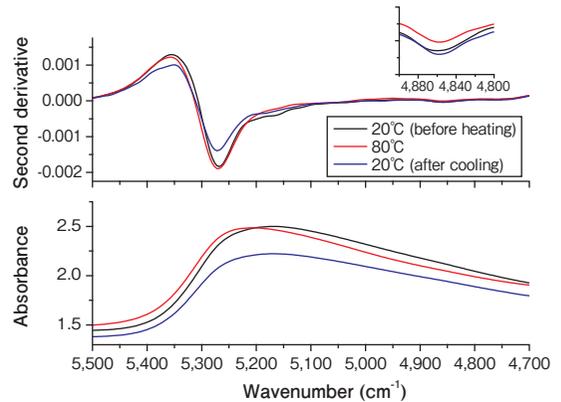


Fig. 2. NIR spectra of soymilk (bottom) and its second-derivative spectra (top).

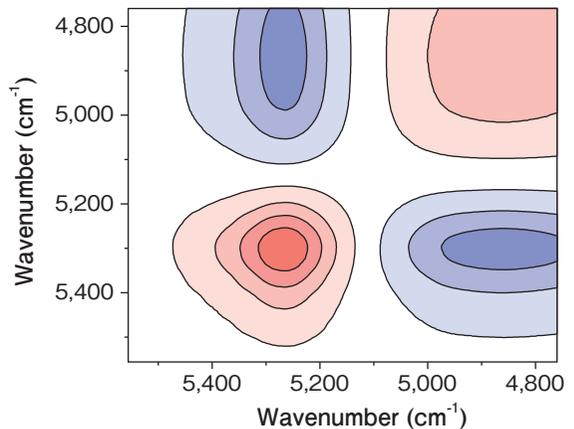
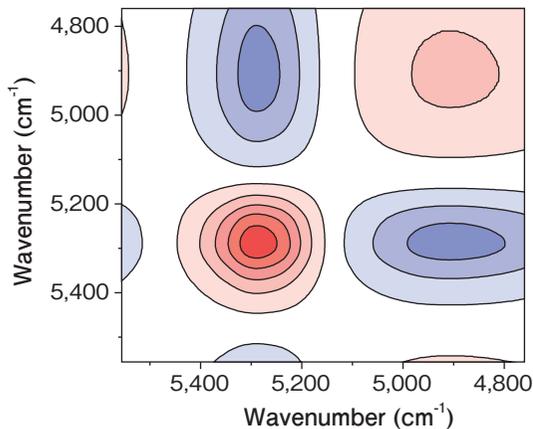


Fig. 3. Two-dimensional correlation spectra, generated from NIR spectra in heating (left) and cooling (right) processes.

関ピークは負の値を示した。これは、それぞれのバンドが温度変化に対して高い相関を示し、さらに互いに反対の反応を示したことを意味している。別途行った水の温度変化スペクトルの解析結果から、 $5,290\text{ cm}^{-1}$ のバンドは弱い水素結合をしている水のOH基に帰属された。一方、水の温度変化スペクトルにおいて、強く水素結合をしている水のバンドは $5,040\text{ cm}^{-1}$ 付近にあり、弱い水素結合をしている水とは反対の挙動を示すことから、 $4,900\text{ cm}^{-1}$ のバンドを水和たん白質のNH基に帰属した。

冷却における一般化2次元相関スペクトルにおいて、水和たん白質のバンドがよりブロードになっているものの、加熱と冷却の差異を確認することは困難である。そこで、摂動相関2次元近赤外相関解析を行ったところ、水和たん白質のバンドが $50\sim 40^\circ\text{C}$ で急激に変化することが示された。これは、粘度が急激に上昇した温度と一致しており、豆乳の粘度の変化には水和たん白質の寄与していることが推察された。

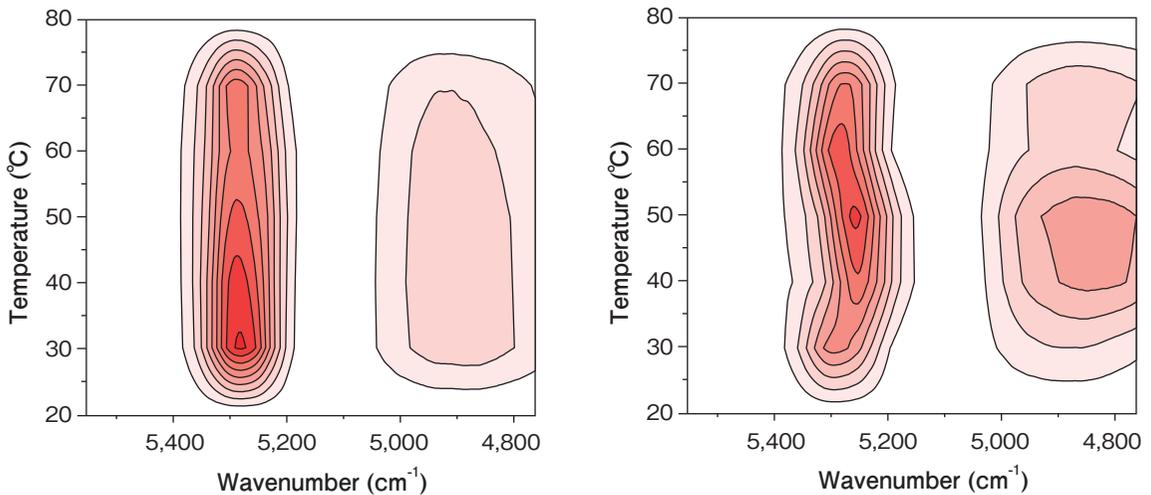


Fig. 4. Perturbation correlation 2D correlation spectra, generated from NIR spectra in heating (left) and cooling (right) processes.

要 約

本研究は、近赤外分光法を利用して凝固過程における大豆たん白質の水和構造を解析することを目的とした。市販の無調製豆乳を 20°C から 80°C まで 10°C ごとに30分加熱し、その後、同様にして 20°C まで冷却した。この間の近赤外スペクトルと粘度を同時に測定し、得られたスペクトルについて二次元相関分光解析を行った。豆乳の粘度は加熱によって低下、冷却によって増加した。また、冷却後の粘度は加熱前よりも高い値を示し、 50°C 以下で粘度の増加は顕著であった。豆乳の近赤外スペクトルにおいて、加熱に伴ってOH基に帰属されるバンドが短波長側へシフトし、このことから水素結合が切断されていることが示された。二次元相関分光解析を行った結果、加熱および冷却のいずれにおいても $5,290\text{ cm}^{-1}$ ($1,890\text{ nm}$) および $4,900\text{ cm}^{-1}$ ($2,040\text{ nm}$) に温度変化と相関を示すバンドの存在が示され、それぞれ、弱い水素結合をしている水のOH基、水和たん白質のNH基に帰属された。また、摂動相関二次元相関分光解析の結果、加熱後の冷却において、水和たん白質のバンドが $50\sim 40^\circ\text{C}$ で急激に変化することが示され、粘度が急激に上昇した結果と一致した。これら結果から、豆乳の粘度の変化には水和たん白質の寄与していることが推察された。

文 献

- 1) Ozaki Y and Amari T (2000): Near-Infrared Spectroscopy in Chemical Process Analysis. In: *Spectroscopy in Process Analysis*. Chalmers JM, ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 53-95.
- 2) Siesler HW (2002): Application to Industrial Process Control. In: *Near-Infrared Spectroscopy -Principles, Instruments, Applications*. Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S and Heise HM, eds., Wiley-VCH, Weinheim, pp. 247-268.
- 3) Lee KA (2007): On-line Analysis in Food Engineering. In: *Near-infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. Ozaki Y, McClure WF and Christy AA, eds., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, pp. 361-378.
- 4) Doherty SJ and Ketteler CN (2005): *On-line Applications in the Pharmaceutical Industry*. In: *Process Analytical Technology (1st ed.)*. Bakeev KA, ed., Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 329-361.
- 5) Genkawa T, Watari M, Nishii T and Ozaki Y (2012): Development of a Near-Infrared/Mid-Infrared Dual-Region Spectrometer for Online Process Analysis. *Appl Spectrosc*, **66**, 773-781.
- 6) Noda I (1993): Generalized Two-dimensional Correlation Method Applicable to Infrared, Raman, and Other Types of Spectroscopy. *Appl Spectrosc*, **47**, 1329-1336.
- 7) Noda I, Dowrey AE, Marcoli C, Story GM and Ozaki Y (2000): Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. *Appl Spectrosc*, **54**, 236A-248A.
- 8) Noda I and Ozaki Y (2004): Introduction. In: *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy -Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy-*. Noda I and Ozaki Y, eds., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp.1-14.
- 9) Thomas M and Richardson HH (2000): Two-dimensional FT-IR correlation analysis of the phase transitions in a liquid crystal, 4'-n-octyl-4-cyanobiphenyl (8CB). *Vib Spectrosc*, **24**, 137-146.
- 10) 村山幸市, 王 岩, Roumiana Tsenkova, 尾崎幸洋 (1999): 二次元近赤外相関分光法によるたん白質の変性の研究. 日本化学会誌, 1999, 637-647.
- 11) 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住 純 (1994): 近赤外分光法の理論. 近赤外分光法入門 (第3版). 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住 純編, 幸書房, 東京, pp. 40-61.
- 12) Ozaki Y (2002): Application in Chemistry. In: *Near-Infrared Spectroscopy*, Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S and Heise HM, eds., Wiley-VCH, pp. 179-211.