大豆の吸水におけるある問題(1)

長期保存大豆の内容物漏出, 吸水不良及び膨潤不良の解決

大豆の吸水は納豆, 味噌, 丸大豆醤油の製造において, 適正な蒸煮を行うための重要な前工程である。今回は浸漬障害を核磁気共鳴法 (NMR) や磁気共鳴画像法 (MRI), SPI 法, 走査型電子顕微鏡 (SEM) などの最新の機器分析により解析している。さらに, 長期保存した大豆の吸水不良や膨潤不良を解決するために, 大豆の水分含量を調べて, 大豆が乾燥しないように保蔵庫を改善し, 浸漬前に大豆を湿った場所で保持したり, 湿った場所を通過させる前処理などが有効であることを解説して頂いた。

小泉美香・五十部誠一郎・内藤成弘
石田信昭・菊地 郁*・狩野広美**

1. はじめに

豆は主要な穀物の一つである。世界の中には中南米やインドのように豆なしでは食糧を確保することが困難な地方が広く存在している。わが国では古い時代には不足気味なタンパク資源として大豆が重要視され, 豆腐, 味噌, 納豆など日頃馴染みが深い食品が工夫されている。しかし, その食糧としての重要性とは裏腹に, 多くの豆類は保存が難しいという問題を抱えている。中でも大豆は収穫から播種まで種子を良好な状態で保存することが難しかったので, 播種期が梅雨に当たるわが国では, 播種後雨が降ると芽が出なくなって収穫が大幅に減るといった事態が起きた。これは, 海外でも soaking effect (浸漬障害) として大きな問題となった時期がある。また, 煮豆や豆腐, 味噌, 納豆への加工の過程で, 古くなった大豆は吸水不良が起こり易いことはしばしば耳にするとところである。このように大豆の保存が困難なことは大豆加工産業にとっては非常に大きな懸案である。本稿は, 納豆製造業に関与する研究者に持ち込まれた問題に対する回答であると同時に, 大豆の保存及び吸水技術に関する物理化学的,

生理学的な考察である。

納豆の原料大豆は海外の農場で契約栽培され収穫時に買い付けられた後, 船で運ばれる。輸送の過程において, 過湿になって貯蔵物質を消耗したり, 極度の乾燥を通して種皮に亀裂が目立ったりと品質低下の問題が出ると考えられるが, 納豆の研究者からそれについては問題提起されなかったので輸送中は管理が良く行き届いているのであろうと思われる。荷揚げされた大豆は, 工場の倉庫で貯蔵管理され, 次の年まで順次加工されて製品を作るために使用される。次の年の収穫までの間に前の年の大豆は吸水が不良になったり, 浸漬液が白濁したり, 納豆菌の発育不良が起こるなどという原材料としての品質劣化を起こす。これは, 結果として, 製品の品質が変化したり, 製品への歩留まりが低下したりというコストの問題へと跳ね返る。このような大豆の品質劣化はどうして起こるのかということが納豆研究者の疑問であった。原因は乾燥した豆の浸漬障害と種皮の硬化及び変質の複合した現象である。

2. 浸漬障害

大豆の吸水と浸漬障害についての生化学的解析は,

A Solution for the Imbibitional Problems of Leguminous Seeds ; the Leakage of Accumulated Substances, Inadequate Water Uptake and Reduced Swelling of Long Stored Soybeans

Mika KOIZUMI, Seichiro ISOBE, Shigehiro NAITO, Nobuaki ISHIDA, Kaori KIKUCHI* and Hiromi KANO**
(National Food Research Institute, *National Institute of Vegetable and Tea Science, **Oak-Hill Georgic Patch- Work Laboratory)

1970～1980年代を通じて行われた¹⁻¹³⁾。浸漬障害というのは豆を水に入れた時に、液が白濁したり、豆が割れたり、膨潤が十分に進行しなかったりすることである。農作業上で言われる時には播種後発芽しなかったり、発芽しても子葉が割れていたり、欠損していたりすることを指している。上記の研究のうち、飽和塩平衡法により大豆種子に空中から緩慢に水分を吸収させて豆の初期水分含量を調節した後、豆を水に浸漬して初期水分含量と子葉裂壊の関係を調べた研究は興味ある結果をもたらした¹¹⁾。ここで使われた飽和塩平衡法^{8,14)}は、ある水分条件における物質の性質、または、内部の状態を知る目的でしばしば採用される水分含量調節法である。具体的には、飽和水蒸気圧の分かっている飽和塩溶液と一緒に密閉した容器で豆をインキュベートして、一定の水蒸気圧に達した空気中から吸着によって豆に水を吸収させて水分含量調節を行う。数種の飽和塩溶液により初期水分含量を調節した豆を、それぞれ2時間ほど水に浸漬した後に激しく振盪し、取り出した豆の子葉裂壊(第1図)を調査するとともに、白濁した浸漬液の濁度を分光器によって測定した(第2図)。

大豆は初期水分含量が10%以下に低下した場合は、浸漬によって激しい子葉の裂壊を起こし、多量の子葉内容物の漏出を伴った。初期水分含量を20%まで高

めると、子葉の裂壊はほとんど認められなくなる(第1図)と同時に子葉内容物の漏出も認められなくなった(第2図)^{8,11)}。このように浸漬障害は種子の吸水前

第2図 大豆の初期水分含量と浸漬液の吸光度の関係
浸漬液に溶出した漏出物の量を吸光度により測定した。280 nm (○) はタンパク質、260 nm (●) は核酸の吸収波長であり、550 nm (▲) の吸光度は漏出物による濁度を示す。豆の初期水分含量は、飽和塩平衡法によって調節した。(Ishida *et al.*¹¹⁾ より作図)

第1図 大豆の初期水分含量と浸漬による子葉裂壊の関係

初期水分含量を飽和塩平衡法で調節した後、2時間浸漬して振盪した大豆の写真。水分含量は、既知の水蒸気圧を持つ飽和塩溶液と大豆を密閉容器中で平衡させて空中より水を吸収させた後、常圧乾燥法で測定した。図中の数値は新鮮重当たりの水分%である。(財)日本農芸化学会の許可を得て Ishida *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2771-2775, 1988 より転載)

の初期水分含量と密接な関係を持ち、13%から17%程度の間に浸漬障害が起こるか起こらないかのクリティカルポイントがあるという結果が得られている^{2,5)}。結果としてではあるが、豆を2時間ほど水に漬け激しく振盪した後に浸漬液の濁度測定と豆の形態的破壊を調査する方法は、浸漬障害の程度を知り、貯蔵大豆の品質を調査するために簡便で有効な方法である。

このような先達の研究を踏まえ、本稿では吸水前の初期水分含量の差異が子葉内部の状態にどのような変化を与えるかということ、子葉の生物活性と、核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance, NMR) によって測定した水の物理性という二つの側面から考察し、大豆の浸漬障害の鍵となる因子について考察する。

3. 生物活性の変化

(1) 大豆の水分含量の違いによる ^{13}C -NMR 及び ^{31}P -NMR スペクトルの変化

Vertucci and Leopold⁹⁾ は、大豆の浸漬障害が豆の生理活動と密接な関係にあることを示した。大豆では水分含量10%程度からわずかな呼吸活性が認められるが、25%を越えると呼吸活性は急激に上昇する。すなわち、大豆の種子は水分含量を20数%まで高めると活発に生命活動を開始するようになる。豆の生物活性(呼吸、発芽及び生長など全生理活動を含めて生物活性とする)の開始と細胞の状況を、NMRが細胞液に溶けている化合物を検出するという性質を使って ^{13}C -NMR スペクトル及び ^{31}P -NMR スペクトルによって知ることが可能である^{11,15)}。

まず ^{13}C -NMR スペクトルの変化(第3図)を調べると水分含量が10%以下においては貯蔵油脂のメチル及びメチレンクラスターが主要なピークであり、その他に油脂のトリグリセリドのグリセリンのピークが認められた。水分含量を20%以上(24.3%)に高めるとグリセリンの左のピークのさらに左側に小さいが明瞭な糖の肩が認められるようになり、細胞内の糖代謝に重要な役割を果たすグルコース及びショ糖が観測される。ショ糖は液胞に蓄積される^{16~18)}ので、ショ糖のシグナルの出現は液胞の活性化を示している¹¹⁾。従って、 ^{13}C -NMR スペクトルの変化は、水分量が20%を超すと細胞質と液胞に自由水が存在して、物質を貯蔵する液胞からエネルギー代謝を行う細胞質へ代謝基質を輸送できる状態になったことを示している。

第3図 大豆の水分含量と ^{13}C -NMR スペクトルの変化

飽和塩平衡法により水分含量を調節した大豆のスペクトル。図中の数値は新鮮重当たりの水分%である。fatty acids は油脂のメチレンクラスター, glycerol は油脂のグリセリン, sucrose は少量のグルコースが混在するショ糖のシグナルである。(註)日本農芸化学会の許可を得て Ishida *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2771-2775, 1988 より転載)

一方、 ^{31}P -NMR スペクトルでは糖及び脂質代謝と密接な関係を持つリン酸化合物の状態を知ることができ、細胞質の状態をより鋭敏に検出することが可能である(第4図)。水分含量10%では、 ^{31}P -NMR シグナルの線幅は非常に広くアクティブな代謝を示す事実が認められないが、17%まで水分含量を高めると、無機リン酸シグナルが明瞭に認められ、細胞はアクティブな代謝に対して準備が整った状態となることを示す。しかし、この水分含量では ^{13}C -NMR スペクトル(第3図)に糖のシグナルが認められないので、ショ糖が存在する液胞にはまだ代謝に関与する水が存在しないこと、及び、リン酸のシグナルは細胞質に由来することが分かる。

リン酸は、細胞質で糖類の異化代謝及び脂質の分解と合成、発芽に必要な物質の生合成に関係する化合物

第4図 大豆の水分含量と ^{31}P -NMR スペクトルの変化

飽和塩平衡法により水分含量を調節した大豆のスペクトル。図中の数値は新鮮重当たりの水分%である。シグナルは0 ppmの無機リン酸と左に隣接する糖リン酸との複合シグナルである。細胞液の粘度が高いためにスペクトル線幅が広く各々の成分を分離できない。(財)日本農芸化学会の許可を得て Ishida *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2771-2775, 1988 より転載)

をリン酸化するのに用いられるものと考えられる。無機リン酸シグナルのケミカルシフトによれば、この段階では細胞質のpHは通常の細胞の状態 (pH 6.5程度)^{19,20)}よりも低く、細胞の代謝はまだ活発にならない状態にあることが推測できる。 ^{31}P -NMRに高エネルギーリン酸化合物のピークが認められないのは、子葉内部への酸素の供給が制限を受けているためであると考えられる。

リン酸シグナルをもとに得られるもう一つの情報は線幅からの情報である¹⁵⁾。一般に植物組織の無機リン酸スペクトルは線幅が2~3 ppm以下であるのに、この場合はその3倍の約10 ppmの線幅を持ち、 ^{13}C -NMRスペクトル (第3図) でショ糖のシグナルが認められる水分含量39.9%においても無機リン酸に隣接する糖リン酸化合物のシグナルを分離することができない。シグナルの線幅はリン酸の分子運動速度 (ス

第5図 大豆の水分含量と呼吸活性

飽和塩平衡法により水分含量を調節した大豆の呼吸活性。呼吸活性は、酸素電極法で測定した。(Ishida *et al.*¹²⁾より作図)

ピンスピン緩和時間; T_2)と相関を持っており、線幅が狭いことは分子運動が高いことを、線幅が広いことは分子運動が抑制されていることを示している²¹⁾。リン酸シグナルの線幅が広いのは、細胞液には高濃度で貯蔵物質の分解物質が溶けており粘性が高く細胞液の運動が妨害されているためと推定される。

(2) 大豆の水分含量の違いによる呼吸活性と細胞活性の変化

植物組織の生物活性はVertucci and Leopold⁸⁾が行ったように、組織の呼吸量によって表わされることが多い²²⁾。大豆の水分含量に対する呼吸量の変化を調べた結果が第5図である。7%以下の水分含量では呼吸活性は検出されず、10%から20%までの範囲で緩い上昇を示した。さらに20%を超えると呼吸は5倍以上の率で急激に増加する¹²⁾。呼吸速度の増加率が著しく異なることは体内の生理状態が変化したことを示す指標であり、第5図の結果は、水分含量20数%を境に呼吸によって生成される生体エネルギーの需要が高まる、言い換えると、活発な生合成過程が開始されることを示している。

^{13}C -NMR, ^{31}P -NMR及び呼吸活性の結果から得られる生物活性と組織の水分含量の関係をまとめると

第1表 水分含量と細胞内器官の生物活性及び呼吸との関係

水分含量	10%	15%	20%以上
細胞質	—	+	+
液胞	—	—	+
呼吸	—	+	+++++

細胞質の活性は ^{31}P -NMR の無機リン酸スペクトル、液胞の活性は ^{13}C -NMR のショ糖のスペクトルをもとに推定した。呼吸は水分含量 15% の状態の呼吸増加率を基準とした相対的倍率で示した。

第1表のようになる。水分含量が 10% 以下ではリン酸シグナルと呼吸活性が検出されないことから細胞がアクティブではないものと考えられる。水分含量が約 15% を超えると生体化合物の合成や膜の生成を示す ^{31}P -NMR スペクトルのシグナルが検出されるので細胞質がアクティブになったことが分かる。しかし、 ^{13}C -NMR スペクトルで液胞に存在するショ糖のシグナルは、まだ認められない。20% 以上になると ^{13}C -NMR スペクトルにショ糖のシグナルがわずかではあるが認められるようになるので細胞は液胞まで活性化されたことが分かる。20% を超えると呼吸活性が急激に上昇を始めることからガス交換、物質輸送が起り豆全体が統一のとれた有機的組織として活動を始めることが分かる。そのためには液胞の活性化が必要であることを示している。

豆の水分含量と浸漬障害（第2図）及び呼吸（第5図）の関係を考察すると、障害が激しく出る 10% 以下では生物活性が認められず、障害が軽減され始める水分状態 13% では呼吸活性が出現し、ほとんど障害を受けなくなる 17% では明らかに細胞質が活動しているから、乾燥した豆の組織が吸水によって生命活動のための潜在的機能を回復することと浸漬障害回避が密接な関係にあることが推定できる。

(3) NMR 及び MRI 信号を与える組織中の自由水と呼吸の関係

吸水過程の大豆の呼吸は、貯蔵物質の異化代謝とエネルギー生産及びそのエネルギーを利用して生長に必要な生体物質合成を進める過程を総合した活性の指標である。呼吸が起るためには基質となる液胞の貯蔵物質の輸送、酵素反応、代謝によって生成された代謝熱の細胞外への放出が不可欠である。生体では代謝、物質輸送及び熱伝達は水分子を媒体にして行われ、運

動（回転運動と並進運動）ができる水（自由水）の量と運動の程度（速度）によって制御、律速されている。自由水の量と水の分子運動の速度を単に水の量と運動性という言葉で表現し、水の物理性という。水の物理性は、水分子とその分子周辺の状態との相互作用で決定されるが、運動性というファクターを包含した形で表される水の活量を自由水量と仮定すると、次式のよう自由水という運動ができる水の性質を定義することが可能である。

$$A = \sum_{i=1}^n (a_i \times f_i)$$

ただし、 A は自由水量、 a_i は成分 i の水の量、 f_i は成分 i の水の運動性と相関する活量ファクター。

一方、生物組織を扱う場合に、自由水に対立する概念に結合水という言葉がある。生物反応への寄与がない動かない水であり、上の式で活量ファクター $f=0$ の水と考えることができる。これは、分子構造を保つために欠くことができない水分子であり、高分子化合物の分子内水と分子表面の一層、または、二層の水である。

さらに、生体の水に関して自由水を、運動を制限された程度によって強い束縛水、緩い束縛水及び自由水に区別することが多い。後で議論の中心となるが、強い束縛水は、生体二重膜の脂質と脂質の間を充填する水分子、タンパク質が他の分子と結合した時にできる空間を埋める水分子、構造を形成する巨大生体化合物分子の表面から数層～十数層の水分子がこれに当たる。緩い束縛水は、密度の高い細胞内器官に挟まれた水や貯蔵物質と貯蔵物質の間に挟まれた水である。本稿でも、一部それに従って説明するが、これらの水分子に運動性があるかないか、また、高いか低いかは自由水の活量ファクターの差異を考慮しながら水の運動性及び分子回転の相関時間という概念を用いて議論する。

自由水量と運動性は NMR によって各々独立の要素として測定することが可能である。また自由水は、NMR の原理によりプロトン（水素原子核）の分布地図を作る磁気共鳴画像法（magnetic resonance imaging, MRI）によって組織の解剖学的形態イメージとして捉えることができる²³⁻²⁵⁾。

生体反応が水の物理性によって制御を受けるのは、生体反応は基質、酵素、ガスなどの分子衝突によって進行されることによる。これに対して、分子衝突の速

度が一定水準を超えると物質、ガス及び熱を細胞及び組織構造を通して輸送する速度が生体反応の制限要因として働く。従って、細胞の呼吸速度は、基質やガス分子の運動に相関する貯蔵物質の異化と生体物質合成の速度及び細胞外へ代謝熱を排出する速度で決められていると考えられる。基質、ガスと酵素の接触、ガスと熱の放出は水を媒介に行われ、それらを担うのが自由運動と長距離移行ができる自由水である。故に、生体内の代謝活動や合成反応は自由水の状態（水の物理性）に統合して表されているものと考えられている。

4. 大豆の水分含量と水の性質

(1) ^1H -NMR シグナルによる自由水量の変化の測定

上の考えに従えば、大豆の自由水の量と呼吸速度は定性的に一致する関係にあると考えられる。第6図は、乾燥大豆の ^1H -NMR スペクトル (a) と ^{13}C -NMR スペクトル (b) である。 ^1H -NMR スペクトル (第6a図) で1ppmをピークとして左に不規則な裾を引いているのがオイルのシグナル、5ppmにあるピークは水のシグナルである。4ppmは糖の共鳴周波数であるが、 ^{13}C -NMR スペクトル (第6b図) では糖は検出されていないから、 ^1H -NMR スペクトルの4ppmの肩は糖ではなく水もしくは油脂のグリセリンに由来するスペクトルである。水のシグナルのケミカルシフト（ピーク先端の位置）は周囲の細胞内構造との相互作用で左右に移動する²⁶⁾ので、水のピークであると考

えても不合理ではないが、大豆には油脂が多く含まれているのでグリセリンのピークとするのが妥当と考えられる。

第6a図の ^1H -NMR スペクトルは、豆の水分含量を一定にするような前処理をして測定すると、水との相対的シグナル強度によってオイル含量を求めることが可能であり、簡便な油脂の定量法として使われている。ここでは反対に、同一品種のサンプル母集団では貯蔵オイル含量は一定であると仮定して、 ^1H -NMR スペクトルのオイルのシグナルを規準にして水のシグナルの相対強度によって、飽和塩に平衡させて空中より吸水させた豆の自由水（NMRで検出できる運動性がある水）の量の変化を測定した（第7図）。

自由水（●）は水分含量10%を超えたあたりから検出でき、20%まではゆっくりと増加し、25%を超えると水分含量が増すに従って急激に増加した。自由水量の変化のグラフに呼吸量の変化（△）を加えると、その傾向は非常に良く一致したので、呼吸速度は自由水（水の量に運動性の活量を加味した概念）によって決められていると推定される。一方、乾燥した豆を多量の水に急激に浸漬した場合（○）は水分含量が20%を超えても自由水の増加が緩慢であり、給水方法が異なると吸収された水が異なった状態（物理性）になることが分かる。多量の水に浸漬して自由水が増加しない豆を取り出して発芽させたところ、軽い浸漬障害を受けていた。

第6図 乾燥大豆の ^1H -NMRスペクトル及び ^{13}C -NMRスペクトル

乾燥大豆の水分含量は12%程度である。(a) ^1H -NMRスペクトル。4ppm付近の肩はグリセリンである可能性が高い。(b) ^{13}C -NMRスペクトル。 $\text{C}=\text{O}$ は油脂のカルボニル基、 $\text{C}=\text{C}$ は二重結合、 CH_2 はメチレンクラスター、 CH_3 は炭素鎖末端メチル基に由来するシグナルである。

第7図 大豆の水分含量と自由水量及び呼吸の関係

飽和塩平衡法で空中より吸水させて水分含量を調節した大豆(●)と、急激に水に浸漬した大豆(○)の自由水量変化を示す。浸漬吸水させた豆の水分含量は、浸漬時間を調節することにより変え、常圧乾燥法により測定した。

自由水量は試料としたエンレイ品種の油脂含量を一定であると仮定して第6a図における¹H-NMRスペクトルの水シグナルと油脂シグナルの高さの比をもとに求めた。呼吸活性(△)は第5図のスケールを調節した図である。(Ishida *et al.*¹²⁾より作図)

健全な大豆では25%程度の水分領域までNMRで検出できない水の成分が増加して、それより高い水分領域ではNMRで検出できる水が増加する(第7図)。浸漬障害を受けると、さらに高い水分領域においてもNMRで検出できる水の量が高くなり、大部分はNMRで検出できない水となる。これらの水分子は、運動性と移行性がある水分子ではなく、細胞内構造や貯蔵物質に吸着して自由水との間の交換性は有するが交換のために吸着エネルギー障壁を越えなければならない束縛された水分子である。これを結合水及び強い束縛水という。

束縛水は、豆の吸水初期過程のように水分含量が低い領域において重要な意味を持っていて、それらが生物活性の基礎となる膜系、酵素系、電子伝達系など生体構造の形成と機能の発現に重要な役割を果たす。そこで、次に生体高分子化合物で構成される組織、細胞構造と貯蔵物質を担体と考えた時に水分含量と水分子の束縛状態がどのような関係にあるかという研究について述べる。結果は、水分子の平均的な状態として

捉えることができる。

(2) 水分吸着等温線を用いた低水分領域の水の物理性の解析

非常に低い水分領域の水の研究には、吸着平衡のカイネティックスの解析が利用される¹⁴⁾。大豆の水分含量の変化に伴う組織の水の物理性の変化を測定した。水分含量は前の測定と同様に飽和塩平衡法によって変化させた。平衡温度を5°Cと25°Cの二段階に設定して水を吸着させ平衡に達した後、常圧乾燥法(乾燥重量法)によって吸収水分量を求めて水分吸着等温線を描き、二本の曲線の差異を基に差エンタルピー及び差エントロピーを求め、各水分含量における水分子の結合自由エネルギーを計算したのが第8図(縦軸は負の方向)である^{8,12)}。

4%以下の水は分子内結合水であり、この手法では計測できない。差エンタルピーの変化は分子の内部エネルギーを示し、高い(負の値が大きい)ほど分子の状態は安定である。エントロピーは系の状態を表し、高い(負の値が大きい)ほど構造化(オーダー)され

第8図 大豆の水分含量と差エンタルピー、差エントロピー及び自由エネルギーの変化
差エンタルピー(●), 差エントロピー(○)及び自由エネルギー(△)は、温度を変えて(25°C及び5°C)飽和塩と平衡にして作成した水分収着等温線より計算した。グラフのスケールは負(-kcal/mol H₂O または -cal/deg·mol H₂O)である。(Ishida *et al.*¹²⁾より作図)

た状態にあり秩序立っていることを示す。ここで使われている差エントロピーは、温度上昇に対する熱容量変化量であり、低い(正に近い)ほど系の状態は変化しやすく水分子はランダムに分布している。また、差エンタルピーが高い水分領域で差エントロピーが高い値を示すことから、差エンタルピーの高い領域では水分子は構造化され安定で系は変化しにくいと考えられる。

差エンタルピーは水分含量が6~7%になるまで増加した。その後、10%まで急激に減少して、13%を超えると緩やかな低下を示し、15~20%辺りで非常に小さくなった。差エンタルピー及び差エントロピーの変化は水分子の次のような状態変化を表している(具体的モデルは第10図で説明する)。4%から6%までの差エンタルピーの増大は、乾燥した組織の巨大構造分子の表面にまばらに吸着し、隣り合う水分子同士のコンタクトができないためにぐらぐらして不安定であった水分子の間に、吸収された水分子が入ってきて均一にコンタクトが回復する過程である。水分子の増加にしたがって水分子同士がコンタクトするため、各々の水分子はぐらぐらした状態を脱して安定性を増す。組

織を構成している固体分子表面が一層、もしくは、重なった二層目の水分子で覆われた時、個々の水分子の内部エネルギーは最大となり最も安定した状態となる。それが6~7%の位置である。それ以上になると、固体構造分子との相互作用をしないで水分子同士の結合だけしか持たない水分子が出現し、水分子の一部が可動性を得る結果、水分子全体の平均的安定性は急激に低下する。そして、水分含量が13~17%では不安定な状態の水、言い換えると、水分子同士が隣接していて運動性のある水が顕著に増加する。それらの水分子は、まだ固体構造から強く束縛を受ける状態にあるが、交換と回転運動性ばかりでなく空間的にもわずかに移動性を確保できるようになる。25%程度までは、少しずつ低下して水分子は不安定性を増すが、25%を超えると差エンタルピーは非常に低くなり、増加する水分子は大部分が固体構造からの束縛が緩い、自由度の高い(結合の自由エネルギーが低い)運動性がある分子、すなわち、長距離移動が可能なエネルギー的に不安定な状態の水分子となる。

水の交換及び移動の難易を表すのが、組織の固体表面から水分子を剥ぎ取るために必要なギブスの平均自

第9図 大豆の水分含量と緩和時間 (T_1) の変化
 空中より吸水させた豆 (○, ●) の水分含量は、飽和塩平衡法で調節した。浸漬吸水 (△, ▲) は、浸漬時間を調節して吸水させ、常圧乾燥法により水分含量を測定した。緩和時間は $^1\text{H-NMR}$ によって測定した。いずれの大豆にも、 T_1 の長い成分 (○, △) と短い成分 (●, ▲) の水が観測される。(Ishida *et al.*¹²⁾ より作図)

由エネルギー、もしくは、結合エネルギーと言われるものである。水分子の結合エネルギーは、水分含量が4%から20数%まで増加する過程でほとんど0にまで低下する(第8図, ΔG)。4%までの水分子は固体構造分子から分離できない。4~6%は組織表面の一、ないし、二層の吸着水、7~10%は数層から十数層までの吸着水であり結合エネルギーは著しく高く、運動の相関時間が 10^{-6}s 程度と長い結合水である。運動の相関時間は、水分子がある物理的状态に止まっている時間の長さである。10%辺りまでに水分子の平均的な結合エネルギーは低くなり、13%では一部の自由度が高い水の成分が NMR で検出できる。さらに、結合エネルギーは20%程度まで水分子の層厚が厚くなるとともに低下する。20%を超えると結合エネルギーは0に近くなり、かなりの割合の水分子が自由に組織表面付近を接触したり離れたりするようになる。しかし、自由水と呼吸速度の変化(第7図)を参照すると、水が固体構造からの束縛を受けなくなるのは25%を超えてからである。その後、水分子は共存する可溶性物

質との相互作用で運動を制限される。

(3) $^1\text{H-NMR}$ の緩和時間による低水分領域の水の物理性の解析

$^1\text{H-NMR}$ によって水分子の運動性を観測することが可能である。運動性は緩和時間 (T_1 及び T_2) で表される²¹⁾。 T_1 (スピン-格子緩和時間) は、主として分子のブラウン運動(実際には、回転運動とランダムな並進運動の他に原形質流動や長距離輸送が含まれる)に伴う分子間衝突によって NMR の共鳴エネルギーを損失する速度の指標とされる。 T_2 (スピン-スピン緩和時間) は、分子間衝突に加えて NMR 装置の静磁場強度の揺動によってエネルギーを損失する性質を持っている。その結果、生物組織や細胞においては T_1 は細胞液の運動性、もしくは、粘度を、 T_2 は細胞内の磁化率の凹凸、もしくは、細胞内器官の複雑性や細胞間の孔隙など組織のテクスチャーを表すと考えられている。ここでは、細胞の水分子の物理性と生理活性を課題とするので、生理反応の速度を制御する分子間衝突を表す T_1 を運動性の指標として水分子の状態を考察する。

大豆の水分含量と T_1 の関係を測定したのが第9図である。実線で示されているのは、飽和塩平衡法によりゆっくりと水を与えた(以下では、空中から吸水させた、と表現する)もの、破線は急激に水の中に浸漬したものである。水を吸収させると豆に二つの水の成分が現れるので、差エンタルピーや結合エネルギー変化にはそれらの平均した値が反映しているものと考えられる。空中から吸水させた実線の結果では、40%程度の水分領域では緩和時間 T_1 が長い成分は200ms、短い成分は100msであった。20%以下まで水分量を低下させると長い成分は不連続に途切れ、シグナルが検出できないほど少なくなった。第1表を参照すると長い成分は液胞の水、短い成分は細胞質の水と考えることができる。

一方、短い成分は水分含量15%より低い領域で T_1 測定における特徴的な折り返しが認められた (T_1 の計測では、分子運動の相関時間と磁場の周波数が一致する前後で折り返しが現れる²¹⁾)。これは、第8図に示した水分含量が10~13%に減少すると結合の自由エネルギーが急激に強くなる変化と一致する。交換可能な水分子が急速に減少して、強く束縛されて運動性が非常に低い成分のみが残る状態へと変化するものと

第 10 図 水分含量と自由エネルギー変化及び構造高分子化合物表面の水分子の配置のモデル
水分含量と自由エネルギー (ΔG) 及び高分子化合物表面の水分子の相互作用と層厚を表す概念図。太線グレーの円は一〜二層の水、グレーの円は数層の水、白抜きは自由水である。自由エネルギーは、第 8 図の最初の値を α と仮定して概算値を示した。

(a) 4%以下の水は生体高分子化合物の分子内水である。4%では高分子化合物の分子表面水は殆ど除去されている。

(b) 4~6%では、生体高分子化合物表面に吸着した水分子は一点で水素結合し、それを支点にコマのように回転し、ぐらぐらしている。表面の水分子が増加するに従い水分子同士が相互に接触するようになり動きにくくなる。

(c) 6~7%において生体高分子化合物の表面に水が一層吸着した時、水分子は一番動きにくくなる。一層のカバーで埋まりきらない表面は二層にまたがる水分子が変則的ジオメトリーで埋める。7%では、それ以上の層の出現も考えられる。

(d) 7~15%では、生体高分子化合物表面を水分子がカバーし、高分子化合物と接点がなく水分子同士で相互作用する水分子が出現する。これらの水分子は相互に位置の交換が可能である。ただし、固体表面から数層は固体からの強い運動の制約を受けるとされている。

推定される。 T_1 の折り返し点である水分量 15%における水分子の運動の相関時間は理論的に NMR の共鳴周波数と一致するので 10^{-8} s 程度である。NMR によって運動性がある水のシグナルが検出できるのは 13%であり (第 7 図)、 T_1 の折り返し点に近い水分含量であることから、相関時間が 10^{-8} s 程度の運動性を獲得すると水分子は交換、移動ができるようになると推定できる。完全な自由水になると運動の相関時間は 10^{-12} s 程度にまで小さくなる。

豆を急激に水に浸漬した時にも、長い水の成分は、空中から吸水させた場合と類似した変化を示した (第 9 図)。おそらく、高分子貯蔵物質の間に取り込まれた水と同程度の緩和時間を持つフリースペースといわれる部位に入った水分子であると推定される。しかし、短い成分は空中から吸水させたものとは異なる変化となった。 T_1 は水分含量 20%において 100 ms に達し、空中から吸水させた場合 ($T_1 = 40$ ms) とは水分子の

存在状態が異なることを示した。

生体の水を扱う研究者の間では、強く束縛された水、緩く束縛された水など bound water (束縛水) という概念がある。これは、極めて曖昧な概念であるが、移動不可能な水分子は結合水、遅い交換ができる水を強く束縛された水、細胞器官内、もしくは、細胞器官相互の間の移動ができる水は緩く束縛された水、原形質流動する水と細胞間の移動ができる水は自由水 (free water)、さらに、アクティブに組織の間、維管束から柔組織へと移動するマスフロー水は生物反応 (蒸散など) が生じる物理的な力によって自由水以上の移動性を有する水である。このような概念を加えて大豆の水分含量と水の性質を考察すると第 2 表のようにまとめられる。

5. 大豆の水分含量と生体機能回復

豆の浸漬障害は水を吸収させる前の初期水分含量に

第2表 大豆の水分含量と水の状態

水分含量	裂壊	内容物 漏出	存在状態	運動性	分子回転の相 関時間(s)	細胞・組織内存在 部位と細胞の状態	概念的 水の呼称
4%>	++	++	分子内水	ナシ		—	分子内水
4~6%	++	++	表面吸着水 (一, 二層)	束縛的振動		—	結合水
					10^{-6}		
6~7%	+	+	吸着水	束縛的回転		—	結合水
7~10%	+	+	吸着水 (数層~十数層)	束縛的回転			
10~15%	±	±	毛管水 孔隙水	交換		脂質膜水和	強い束縛水
			膜間水	交換少	10^{-8}	脂質膜機能回復	
15%<	±	±	細胞水	交換増加 自由回転		細胞質出現	
20%<			細胞水 液胞水	移動	10^{-9}	液胞出現 貯蔵物質膨潤	緩い束縛水
55%<			細胞水 液胞水	移動		液胞増加 維管束活性化 貯蔵物減少	
	—	—	液胞水 バルクの水	長距離 輸送		組織活動の活性化	自由水
80%<			バルクの水		10^{-12}	急速な生長	アクティブな水

空中より吸水した大豆の結果をもとに推定した水の状態であり、平均的な水の主成分を示している。自由水は free water の訳で、定性的にフリーな水を指す。別に、強い結合水、緩い結合水に自由度のファクターを掛けて活量という概念で自由水として捉えることが可能である。分子回転の相関時間は上平恒、逢坂昭²⁷⁾を参考にした。

大きく依存している。水分を浸漬障害が出ない領域(20%以上)まで高めると、豆の組織は活発な生理活動を開始する。一方、20%以下の水分含量の領域においては、かなりの割合の水が結合水として存在している。そこで、この項では吸水にともなって結合水となる水分子が、乾燥した組織を水和して休止した生命活動を回復する過程を前述の結果と生化学的な知識を基にモデル化する。そして、細胞が生理的にどのような状態になると浸漬障害を回避できるか、また、その理由は何かということを考察する。考察は第2表に従って進め、第7~9図で得られた結果を第10図のような概念的なモデルとした。

(1) 水分含量 4~6%では巨大構造分子表面の水は互いに接触していないこと

4%以下の水分領域の水は、高分子化合物の分子内の水とされる。例えば、タンパク質分子のポリペプチドホールディングの間にできた活性部位や歪みによってできた分子内空間を埋めたり、澱粉の糖の鎖と鎖

の間を充填したりしている水分子である。この領域の水を熱を加えて強制的に除去すると、分子は立体的構造を維持できなくなり、不定形の塊となるか炭化する(第10a図)。

4%以上で6%までの間の水は、タンパク粒、澱粉粒や脂質膜の表面をカバーするのに必要な水である。4%を過ぎると構造分子表面に吸着している水分子が出てくる。水分子は、一部分で固形の構造分子と結合しているが、分子全体は気相に曝されている部分があり、一点を中心に結合され、回転の自由性を持つ不安定な状態にある(第10b図)。水分含量が増えたと不連続に存在する水分子の間に水分子が入り込み、各々の水分子同士が横方向に接触するために回転の自由度は低下するが、水分子の状態は動けなくなる分だけ安定し差エンタルピーが増加する(第8図)。

6~7%に達すると固体構造表面の水分子によるカバーができて、水分子の安定性が最大となり、差エンタルピーは極大を示す(第8図)。これが構造分子表面

の一層あるいは水分子相互のジオメトリーによっては二層にまたがる結合水である（第10c図）。差エントロピーの値が高い（第8図で大きな負の値となっている）ことは、水分子はランダムではないことを表している。7%以下まで乾燥すると、すなわち、構造分子表面の一層、あるいは、二層の吸着水を除去すると種子は生命力を失う。

(2) 7%から20%の水分領域の水和によって生体機能を回復すること

7%を超えると構造分子表面への吸着に対し余剰の水分子が生じる（第10c図）。これらわずかに生じた余剰の水分子は自由に回転することができるだけでなく表面をカバーしている水分子と交換（交代）をすることが可能である。しかし、交代する相手の水分子は構造表面に結合されているので引き剥がすためには強い結合エネルギーを越える力が必要で、交換確率は低く交換速度は遅い。さらに、水分子が増加して構造表面から数層を形成するようになると、水分子同士で結合する分子が多くなり水分子全体の平均的結合エネルギーが低下する。その分、構造表面から離れた水分子同士の間での交換は容易となる。また、水分子全体の差エンタルピーが低下して平均的水分子の安定性が低下する（第8図）。動き得る水分子が多くなるということである。10%までの領域は、固体構造表面における数層から十数層までの水であるとされる。

水分子の状態は、水分含量が約10%になると存在の様子を変える。固体構造表面の影響を受けないタイプの水が出始める。従って、結合の平均エネルギーは非常に低くなる。まだ、空間的な存在部位は強く制約されているが、かなり高い交換性や移動性を獲得する。例えば、毛管水やタイトに結合した巨大分子相互間にできた孔を充填する水分子であり自由水の一部として捉えることが可能である（第10d図）。この領域の水分子は生体の二重膜構造の脂質分子の間を充填し、脂質膜と埋め込まれたタンパク質を繋ぎ、空間的移動性は持たないが位置の微小な変更が可能である。従って、生体膜や生体構造に局所的変形や運動に耐えられる能力と生理機能を賦与する役割を果たす²⁷⁾。

含水量が増加して15%程度に達すると、¹H-NMRの緩和時間に折り返しが出て T_1 がゆっくりと長くなる（第9図）。水分子の分子交換が起こること、すなわち、水分子が、微小ではあるが移動性を持ち、生体

反応を行うことができる状態となることを示す。この事実は³¹P-NMRスペクトルが明瞭になること（第4図）や水の細胞内及び細胞間移動が不可欠である呼吸活性が発現すること（第5図）によっても知ることができる。

15%を超えた領域での水分子は壁間を充填し、澱粉やタンパク粒間に取り込まれ高分子化合物を膨潤させ、一部が運動性を有する水の成分になる。しかし、全体としてはまだ強く束縛された水となる部分が大部分を占める。呼吸活性の変化（第5図）を基に考察すると、水分含量が20%までは細胞間の物質、ガス及び熱の輸送を必要とする細胞の生物活性の発現は抑制されている。差エントロピーは低くはなっているが、まだ、減少する状態にあり完全に水がランダムな状態になるためには構造分子は水和する方向へ向かうこと、そして、構造分子の水和は20%以上になって完成されることが分かる（第8図）。

20数%に達すると¹³C-NMRスペクトルに糖のシグナルが認められることで、液胞に自由水が出現したことが分かる（第3図、第1表）。液胞の水の出現は、液胞や小胞などに貯蔵された高分子化合物の水和、膨潤が完了したことを示す。水分子は多量の障害物によって運動性を制限されているが細胞内及び細胞間で長距離移動することが可能になり、物質輸送とガス交換を仲介できるようになるので、組織はつながりがある有機体として活動を始め呼吸活性が急速に高まる（第5図）。

(3) 豆の浸漬前の水分含量と浸漬障害の関係

乾燥種子では、7%から20%までの水分領域は、生体膜及び構造タンパク質などが水和して細胞構造と機能を回復する過程である。その過程は、さらに10%以下と10%以上に区別して考察できる。これを種子が登熟して乾燥する方向から考察する。

種子の最大肥大期における水分含量は55%程度である²⁵⁾。55%から20%強までは、子葉の貯蔵物質に保持された水と細胞の水の排出過程であり、差エントロピーは小さいので反応の方向性は不定で、母樹からの水の供給が絶たれると自動的に乾燥するように思える。20%から10%の間の水は細胞の構造体を構成する水であり、差エントロピーは相対的に低い（第8図）が負の値を取り水分子が構造化されるため、水の除去にエネルギーが必要である。この領域に当たる水

を生物学的エネルギーによって能動的に排除して種子は生命活動を停止する。反対に、乾燥した種子は、その失われた分を緩やかに水和することによって細胞膜及び各細胞器官膜などの生体構造と機能を回復して、再び生命活動を開始する。

種子の生命活動は15%程度で停止して(第1表)生物学的エネルギーの供給が無くなるために、余程強い乾燥にあわなければ種子は差エントロピーが急激に増大する10%までは乾燥しないと推定される。10%以下の領域では、差エントロピーは急激に大きくなり(第8図)、乾燥し難くなることが分かる。結合の自由エネルギーが強い複合生体分子表面に強固に吸着した水分子を排除しなければならないからである。

以上の考察と浸漬障害との関係は、次のように考えられる。浸漬障害は浸水前の水分含量が13~17%を超えると殆ど認められなくなる(第1図、第2図)^{2,5,8,11)}。これは、水に浸漬する前に10~20%領域の水分子が構造体を水和していると、酵素などのタンパク質や膜の機能が回復して細胞が生命活動を開始する用意ができており、水の移動や物質の流れを制御できる状態にあるために浸漬障害は起こらなくなることを示している。貯蔵中に乾燥しすぎた豆は、穏やかに水分含量を高めれば浸漬障害を回避できることは農業上は経験的に知られていたことである。例えば、播種期が梅雨に当たるわが国では、貯蔵中に種子が強く乾燥した場合や、播種後に雨が降りそうに思えた場合に、一晚濡れた雑巾でくるんで播種前に豆の水分含量を高めてから播くと浸漬障害を回避できるということが農業技術として伝えられている。

一般に、大豆を扱う農家や組合では、大豆の種子としての活性を保持するために適した水分含量を経験的に15%程度としているようで、豆の収穫量は水分含量15%に換算して計算されることになっている。加工用貯蔵大豆では、種子の活性を1年保持するよりも貯蔵物質の消耗を防がなければならないので、低温にして生命活動を抑制した上で長期保存に適した10~15%と低めにはしているが、極度の乾燥は避けている²⁸⁾。これは、水分含量10~15%においては豆の生理活性は非常に低く抑えられているが、種皮や細胞膜が重大な損傷を受けない状態であること、そしてまた、理由は何処にも記されていないが、豆の強い乾燥が、その後の食品としての利用において吸水不良などを招

き実際的利用価値を低下させることを認識した上で決められた値であると考えられる。

ここまで、浸漬障害について生化学的解析研究を基に貯蔵大豆の水分含量の違いによって、①水の物理的状态がどのように変わるか、②それにともなって組織の生命活動がどのように活性化されるか、ということ考察した。後編においては、新たな研究を加えながら、浸漬障害が起こるメカニズムについて、①'ゆっくりした生体膜の水和と機能回復、②'障害回避のために種皮が果たす役割、③'貯蔵中に起こる種皮の劣化に対する対策を考察する。

<独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 *独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 **くぬぎ山蛭雪研究所>

参 考 文 献

- 1) Obendorf, R.L. and Hobbs, P.R. : *Crop Sci.*, **10**, 563-566 (1970)
- 2) Hobbs, P.R. and Obendorf, R.L. : *Crop Sci.*, **12**, 664-667 (1972)
- 3) Parrish, D.J. and Leopold, A.C. : *Plant Physiol.*, **59**, 1111-1115 (1977)
- 4) Webster, B.D. and Leopold, A.C. : *Amer. J. Bot.*, **64**, 1286-1293 (1977)
- 5) Ashworth, E.N. and Obendorf, R.L. : *Agronomy J.*, **72**, 923-928 (1980)
- 6) Leopold, A.C. : *Plant Physiol.*, **65**, 1096-1098 (1980)
- 7) Duke, S.H. and Kakefuda, G. : *Plant Physiol.*, **67**, 449-456 (1981)
- 8) Vertucci, C.W. and Leopold, A.C. : *Plant Physiol.*, **75**, 114-117 (1984)
- 9) McDonald, M.B., Vertucci, C.W. and Roos, E. E. : *Crop Sci.*, **28**, 987-992 (1988)
- 10) McDonald, M.B., Vertucci, C.W. and Roos, E. E. : *Crop Sci.*, **28**, 993-997 (1988)
- 11) Ishida, N., Kano, H., Kobayashi, T., Hamaguchi, H. and Yoshida, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2771-2775 (1988)
- 12) Ishida, N., Kano, H., Kobayashi, T. and Yoshida, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2777-2781 (1988)

- 13) Ishida, N., Kobayashi, T., Masuda, R., Kano, H., Yoshida, T. and Ogawa, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1359-1365 (1990)
- 14) 柴崎一雄 : 食品の水-水分活性と水の挙動, pp. 49-62, 恒星社厚生閣, 東京 (1973)
- 15) Takagishi, H., Shirata, K., Ishida, N., Kobayashi, T., Koizumi, M. and Kano, H. : *J. Plant Physiol.*, **138**, 511-515 (1991)
- 16) Koch, K. : *Current Opinion Plant Biol.*, **7**, 235-246 (2004)
- 17) Roitsch, T. and González, M.C. : *Trends Plant Sci.*, **9**, 606-613 (2004)
- 18) Rae, A.L., Grof, C.P.L., Casu, R.E. and Bonnett, G.D. : *Field Crops Res.*, **92**, 159-168 (2005)
- 19) Roberts, J.K.M. : The biochemistry of plants : a comprehensive treatise, Vol. 13, pp. 181-227, Academic Press (1987)
- 20) Pfeffer, P.E. and Gerasimowicz, W.V. : Nuclear magnetic resonance in agriculture, CRC Press (1989)
- 21) Farrar, T.C. and Becker, E.D. : Pulse and Fourier transform NMR : introduction to theory and methods. Academic Press (1971)
- 22) 狩野広美 : 稻学大成第二巻生理編, pp. 231-244, 農山漁村文化協会, 東京 (1990)
- 23) Callaghan, P.T. : Principles of nuclear magnetic resonance microscopy, Clarendon Press (1991)
- 24) Kano, H., Ishida, N. and Koizumi, M. : *Recent Res. Devel. Agric. Biol. Chem.*, **1**, 125-145 (1997)
- 25) Ishida, N., Koizumi, M. and Kano, H. : *Annals Bot.*, **86**, 259-278 (2000)
- 26) McCain, D.C. : Modern Methods of Plant Analysis, New Series Vol. 1, Nuclear Magnetic Resonance, pp. 127-147, Springer-Verlag (1986)
- 27) 上平恒, 逢坂昭 : 生体系の水, 講談社サイエンスティフィク, 東京 (1989).
- 28) 社団法人全国農業改良普及協会, 大豆乾燥調製マニュアル, <http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/daizu/kanso/index.html>, (2000)