カルシウム塩とグルコノデルタラクトンで 凝固させた豆腐の差異について

橋 詰 和 宗*・何 銀 蘭**

Difference between Tofus Coagulated with Glucono-delta-lacton and Calcium Salts

KAZUMOTO HASHIZUME* and GINRAN KA*

Kinu-tofu coagulated with GDL (glucono-delta-lacton) is harder than that coagulated with calcium sulfate, but it is more fragile. In order to study these cause, effect of NEM on hardness of the tofu-gels and effects of urea, mercaptoethanol and EDTA on solubility were investigated. The effect of NEM on hardness of the tofu-gels shows that disulfide bond has important role on gel formation of GDL-tofu-gel as well as Ca-tofu-gel. The effects of urea, mercaptoethanol and EDTA on solubility of the tofu-gels indicate that GDL-tofu-gel and Ca-tofu-gel are formed by disulfide, hydrogen and hydrophobic bond, and that Ca-bridge has also an important role on Ca-tofu-gel.

(Received Oct. 31, 1977)

豆腐の凝固剤として近年グルコノデルタラクトン（以下 GDL と略）が開発¹⁾され、従来の凝固剤より使いやすいたることから広く利用されるようになった。GDL による凝固はカルシウムやマグネシウム塩のような 2 価塩による蛋白質凝固作用²⁾とは異なり、GDL の加水分解物であるグルコン酸による酸凝固作用¹⁾によって起こるものである。このような 2 価塩と GDL ではその凝固作用が異なることからできた豆腐の性質はいく分異なっている。これについては斉尾らがテクスチュロメーター³⁾と電子顕微鏡⁴⁾により検討しているが、食品化学的検討はなされていない。著者らはこれら性質の異なる凝固剤で固めた豆腐の食品化学的性質の差異を明らかにすることを目的に、以下の実験を行なった。

試料と実験方法

1. 試料の調製

試料は豆乳と酸沈澱蛋白質溶液を用いた。豆乳の調製は、1 夜水に浸漬した大豆（農林 2 号）を水とともに家庭用ミキサーで磨砕し、これを濾過して得た豆乳を試験

管に入れ、アルミホイルで蓋をしたのち 100℃湯浴に 10 分間浸して加熱し直ちに氷水で冷却した。

酸沈澱蛋白質溶液の製法は、市販の低変性脱脂大豆（吉原製油 KK 製、ゴールドンプロトン）を水で抽出し、残渣を除いた抽出液に pH 4.5 になるまで 1N HCl を加えて蛋白質を沈澱させ、3 回水洗したのち原料の 5 倍重量の水にけんだくさせながら pH 7.0 になるまで 1N NaOH を加えて蛋白質を溶解させた（蛋白質濃度 3.5%）。これを試験管に入れ、アルミホイルで蓋をしたのち 80℃湯浴に 10 分間浸して加熱し、直ちに氷水で冷却した。

2. 豆腐ゲルの調製

カルシウムゲル（以下 Ca ゲルと略）と GDL ゲルの調製は、内径 15 mm、長さ 130 mm の試験管の中で行なった。

豆腐の堅さにおよぼすカルシウムと GDL の濃度の影響を比較する場合は、7.5 倍加水豆乳を 10 ml ずつ試験管に入れ、冷却したのち GDL を最終濃度 0.0083～0.073 M (0.15～1.3%) あるいは CaCl₂ を最終濃度

**, * 農林省食品総合研究所（東京都江東区塩浜 1-4-12）

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Shiohama-1 Koto-ku Tokyo

* 現在、農林省畜産試験場（千葉市青葉町 959）

Present address: National Institute of Animal Industry, Aoba-cho, Chiba-shi

0.005~0.02 M (無水物換算 0.056~0.22%) 加え、70℃の湯浴に60分間保ちゲル化させた。

NEM (*N*-ethyl maleimide) を加える場合は、試験管に入れた加熱後の豆乳 10 ml に最終濃度 10^{-2} ~ 10^{-4} M の NEM を加えてから 1M CaCl_2 溶液を 0.1 および 0.08 ml (最終濃度 0.01M および 0.008M) あるいは調整直後の 10% (w/v) GDL 溶液を 0.25 および 0.20 ml (最終濃度 0.0136M および 0.0110M) 加えて 70℃ の湯浴で凝固反応を行なわせた。

酸沈澱蛋白質溶液からゲルを作る場合、加熱後の溶液に NaCl を最終濃度 0.1M 加え、10 ml 当り 1M CaCl_2 を 0.125 ml (最終濃度 0.0125M), 10% GDL を 0.2 ml (最終濃度 0.0110M) 加え、70℃湯浴に60分間保ちゲル化させた。この場合ゲルの pH はそれぞれ 6.2 と 5.4 であった。

3. ゲルの堅さの測定

ゲルの堅さはカードメーター (飯尾電機製) を用いて測定した。直径 5.6 mm の円柱形プランジャーを用い、試験管中のゲルが破れるときの荷重を堅さとして g で表わした。

4. ゲルの溶解度の測定

酸沈澱蛋白質溶液 (3.5%濃度) から得たゲルをホモジナイザー (日本精機 HD 型) で十分に細かくしたのち、3 g を水 30 ml にけんだくさせ、1 N NaOH を加えて pH を 8.0~12.0 に調整、あるいは 3 g を尿素 0~6.0M, メルカプトエタノールおよび EDTA を 0~0.01 M を含むリン酸緩衝液 (イオン強度 0.5, 0.0325 M K_2HPO_4 , 0.0026 M KH_2PO_4 , 0.4M NaCl) 30 ml にけんだくさせ、2 時間スターラーで攪拌した。pH を調整したものは全部 pH 8.0 に再調整したのち 50 ml にし、緩衝液に溶解したものはそのまま、それぞれを 18,000 G にて 20 分間遠心分離をした。緩衝液に溶解したもので上澄にわずかな濁りのある場合は、1 N NaOH を 1/50 量加えたのち、それぞれを水にて 1/5 に希釈して 280 nm の吸光度を測定し、溶解度で表わした。なお緩衝液に溶解させたものは、同じ緩衝液を対照とした。

実験結果と考察

1. 凝固剤の濃度とゲルの堅さの関係

CaCl_2 と GDL の濃度を変えてゲルを作り、その堅さと pH を測定すると Fig. 1 に示すようになった。

GDL ゲルの場合、0.011M 以下では Ca ゲルより堅さは低い値を示したが、濃度が増加するにつれ pH が低下し、これに伴い堅さは増加し、0.025~0.038M で最

Fig. 1. Effect of concentration of coagulants on hardness of tofu-gels and on decrease of pH

高になった。このときの pH は 5.1~4.7 であり大豆蛋白質の等電点⁵⁾ (pH 4.3) に近い値を示した。濃度が 0.05M 以上になると pH は 4.4 以下になり堅さは低下した。このように等電点近い pH になると堅いゲルができたが、等電点以下になると低下した。

Ca ゲルの場合、 CaCl_2 0.01M 濃度で堅さは最高になり、その時の pH は 6.0 であった。またそれ以上の濃度では離水を起こしてゲルの堅さは低下した。

このように GDL と CaCl_2 で凝固させたゲルを比較した場合、ゲルの堅さが 25 g 以上になる範囲は CaCl_2 は狭く、GDL は広がった。またゲルの堅さの最高値は pH を考慮に入れなければ、GDL ゲルは Ca ゲルの 2.5 倍であった。 CaCl_2 の場合、凝固剤が多くなると全体をゲル状に保つことができなくなり離水するが、GDL の場合は等電点を越すまで保水性のあるゲルを形成した。

2. ゲル強度におよぼす NEM の影響

豆腐ゲルの形成には S-S 結合が重要な役割⁶⁾を果しているため、GDL ゲルと Ca ゲルの性質の違いを考えるとき、まず両者のゲルにおける S-S 結合の役割を比較することが重要と思われる。そこで SH 基ブロック剤である NEM⁷⁾を豆乳に加え、GDL と CaCl_2 によりゲルを作り、その堅さをカードメーターにより測定すると Fig. 2 に示すようになった。

いずれの豆乳濃度でも NEM の存在しない場合、GDL ゲルの堅さは Ca ゲルより高い値を示した。NEM の添加量が増加するにつれ Ca ゲルと GDL ゲルの堅さは減少したが、9 倍加水の豆乳から作ったゲルは 10^{-3} M で減少し、7.5 倍加水の豆乳から作ったゲルは 10^{-3} M では大きな変化はなく、 10^{-2} M になると減少した。このように NEM によるゲルの堅さの減少は CaCl_2 凝固と GDL 凝固の間で大きな差は認められなかったが、NEM

Fig. 2. Effect of NEM on hardness of tofu-gel

影響下ではいずれの豆乳濃度でも GDL ゲルの堅さの値は低く、GDL ゲルの方がいく分 NEM の影響を受けやすいことが示された。

3. Ca ゲルと GDL ゲルの溶解度

酸沈澱蛋白質溶液より Ca ゲル、GDL ゲル、pH 4.5 で沈澱させた蛋白質を調製し、それぞれをアルカリ溶液で溶解してその溶解度を測定すると Fig. 3 のようになった。

ゲル化させず酸で沈澱した蛋白質の溶解度は、水にけんだくした場合には 4% 以下であったが、NaOH を加え

Fig. 3. Effect of pH on solubility of acid precipitated protein, GDL-tofu-gel and Ca-tofu-gel

て pH 8.0 以上に調整すると 100% であった。Ca ゲルの場合、水にけんだくしただけで溶解度は 25% であり高い値を示したが、pH 8.0 でもほぼ同じであり、pH 11.0 まで溶解度の増加の程度は少なかった。pH 12.0 では溶解度は著しく増加したが、95% であり、高い pH においても蛋白質は完全に溶解しなかった。GDL ゲルは水にけんだくさせた場合の溶解度は 13% であったが、pH 8.0 では 31% になり、pH 11.0 以上では 100% になった。

このように pH 4.5 で酸沈澱させた蛋白質は再び pH を高めると容易に溶解したが、GDL によりゲル化させた場合、ゲルの pH は 5.4 であったにもかかわらず、pH 10.0 のアルカリ溶液ではほとんど溶解しなかった。この結果から GDL ゲルを形成する蛋白質分子間の結合は、酸沈澱した蛋白質のように実効荷電の減少によって会合したものとは異なり、S-S 結合による安定な結合が関与していることが考えられる。これはすでに示した NEM 添加の効果からも裏付けられる。すなわち酸凝固であっても GDL による凝固反応は等電沈澱のように短時間に起こるものではなく、時間をかけて徐々に進行することから、実効荷電が減少することによって接近した蛋白質分子間に S-S 結合を始めその他の結合が生成する反応時間が十分にあり、このような結合でできた蛋白質ゲルは、単なる実効荷電の減少で会合した酸沈澱蛋白質とは異なる性状を示すものと思われる。

pH 7.6 のリン酸緩衝液に対する Ca ゲルと GDL ゲルの溶解度は Fig. 4, 5 のようになった。緩衝液に溶解した場合、GDL と Ca ゲルの溶解度はそれぞれ 30% と 25% であった。緩衝液に尿素を加えた場合、尿素濃度が増加するにつれ、それぞれのゲルの溶解度は増加し、6

Fig. 4. Effect of urea, mercaptoethanol and EDTA on solubility of Ca-tofu-gel

Fig. 5. Effect of urea and mercaptoethanol on solubility of GDL-tofu-gel

M 尿素では Ca ゲルの溶解度は 54% になり, GDL ゲルは 95% になった。GDL ゲルは Ca ゲルに比較して, 尿素の作用により著しく溶解しやすくなった。緩衝液に 0.01M のメルカプトエタノールを加えた場合, GDL ゲルの溶解度は 30%, Ca ゲルは 41% になり, メルカプトエタノールの作用で溶解度は増加した。さらに尿素を加えた場合濃度が増すにつれ溶解度は著しく増加し, GDL ゲルは 4M で完全に溶解した。また Ca ゲルは 6M 尿素で 95% の溶解度を示した。このように同じ尿素濃度でも 0.01M のメルカプトエタノールが存在したときに溶解度が増加するのは S-S 結合の解裂^{8,9)}によることを示している。GDL ゲルは尿素とメルカプトエタノールにより完全に溶解することから, 水素結合, 疎水結合, S-S 結合がゲル^{10,11)}を形成していると推定できる。いっぽう Ca ゲルは尿素とメルカプトエタノールでは完全に溶解せず, またアルカリに対する溶解度も低い値を示した。しかし 0.01M メルカプトエタノールと 0.01M EDTA を加えた場合, 尿素濃度 3M 以下では溶解度を増加させる効果は見られなかったが, 4M 以上の尿素が存在するときには, 溶解度が増加し, 5M 尿素で完全に溶解した。このように Ca ゲルは GDL ゲルが完全に溶解する条件でもその一部は溶解しなかったが, 0.01M EDTA の添加によって完全に溶解した。これは Ca ゲルにおいては, GDL ゲルを形成していると思われる水素結合, 疎水結合, S-S 結合以外に Ca 結合が重要な役割を果たしていることを示している。

一般に GDL ゲルは堅いが比較的割れやすく, Ca ゲルは柔らかいが GDL ゲルに比べ割れ難い性質を持つことが知られているが, これは Ca 結合の存在の有無によるものと思われる。またゲルを形成する反応において, GDL の場合は pH の低下による実効荷電の減少によって蛋白質分子が接近して, 分子間相互反応を起こし, S-S 結合, 疎水結合, 水素結合などを起こすと考えられ

る。カルシウムの場合は Ca 結合によって起こる pH の低下も影響すると思われるが, 蛋白質分子間に Ca 橋ができ, これによって引寄せられた蛋白質分子間に, S-S 結合, 疎水結合, 水素結合などができ, これらがゲルを形成すると思われる。このような凝固反応の違いが, 斉尾らが走査型電子顕微鏡で明らかにしている Ca ゲルと GDL ゲルの構造の差異⁴⁾として現われ, また一般に知られているカルシウムで凝固させた豆腐と GDL で凝固させた豆腐の食感の違いとして現われると思われる。しかし溶解度試験で見られたように, 両者ともその結合は S-S 結合や水素結合が主なものであり, 豆腐ゲルの形成において蛋白質分子間のこれらの結合が重要な役割を果たしていることは明白である。

要 約

カルシウム塩で凝固させた絹ごし豆腐は比較的柔らかいが壊れ難く, GDL (グルコノデルタラクトン) で凝固させた絹ごし豆腐は比較的堅いが壊れやすい。この原因を明らかにするため, 豆腐の堅さにおよぼす NEM (N-エチルマレイミド) の影響, 溶解度におよぼす尿素, メルカプトエタノール, EDTA の影響を検討した。

NEM 添加の影響から Ca ゲルと同様 GDL ゲルも S-S 結合がゲル形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。両者のゲルの溶解度におよぼす尿素, メルカプトエタノールおよび EDTA の影響から, GDL ゲルは S-S 結合, 水素結合, 疎水結合からなり, Ca ゲルにおいてはこれらの結合以外に Ca 橋が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

文 献

- 1) 中山 修・寺町弥生・渡辺篤二: 食品工試, **12**, 81 (1965).
- 2) 渡辺篤二・深町千晴・中山 修・寺町ヤヨイ: 食糧研報, **14-B**, 6 (1960).
- 3) 渡辺篤二・斉尾恭子: 化学と生物, **11**, 631 (1973).
- 4) GALLANT, D.J., SAIO, K. and OGURA, K.: *JEOL News*, **14**, 6 (1976).
- 5) SMITH, A.K., and CIRCLE, S.J.: *Ind. Eng. Chem.*, **30**, 1414 (1938).
- 6) SATO, K., KAJIKAWA, M. and WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 890 (1971).
- 7) WOLF, W.J. and TAMURA, T.: *Cereal Chem.*, **46**, 331 (1969).
- 8) HUGGINS, C., TAPLEY, D.F. and JENSEN, E.V.: *Nature*, **167**, 592 (1951).
- 9) CIRCLE, S.J., MEYER, E.W. and WHITNEY, R.W.: *Cereal Chem.*, **41**, 157 (1964).
- 10) KELLEY, J.J. and PRESSLEY: *Cereal Chem.*, **43**, 195 (1966).
- 11) CATSIMPOULAS, N. and MEYER, E.W.: *Cereal Chem.*, **47**, 559 (1970).

(昭和52年10月31日受理)