大豆の粉碎・圧扁処理に伴うトリプシンインヒビター熱安定性の増大

盛永宏太郎*

Thermal Stabilization of the Trypsin-Inhibitor by Crushing -Flaking of Soybeans

Koutarou MORINAGA*

* Toyama College, 444, Gankaiji, Toyama-shi, Toyama 930-0193

The author had evaluated the digestion of proteins of parched soybeans by trypsin and observed high digestibility after parching of intact whole soybeans but very low digestibility after parching of crushed soybeans, previously this was because the trypsin inhibitor (TI) that is present in intact whole soybeans is readily inactivated by parching, whereas the TI in crushed soybeans has become thermostable and is not inactivated by parching. In this paper, changes in TI activity after tissue destruction and heating of soybeans were evaluated. The TI activity in parched (150°C, 20 min.) intact whole soybeans was decreased by heat to about 1/20 of the initial level. On the other hand, TI activity in soybean flour or soybean flakes was less inactivated with a higher degree of tissue destruction. The TI activity in parched soybean flour with a particle diameter less than 1 mm was similar to that in raw soybeans. Proteins in raw soybeans, parched intact whole soybeans, and parched soybean flour were digested with trypsin. The digestion rate increased with the added amount of trypsin even when the amount of trypsin was lower than the unit amount of the residual TI. The digestion rate reached about 50% with an amount of trypsin the same as the unit amount of TI and increased thereafter in proportion to the added amount of trypsin, being the maximum with an amount of trypsin twice the unit amount of TI. (Received Oct. 16, 2001 ; Accepted Jan. 7, 2002)

筆者はトリプシンによる焙煎大豆のタンパク質消化を調べて、大豆を無傷の状態に焙煎したときのタンパク質の消化は良いが、粉碎後に焙煎した大豆のタンパク質は消化が非常に悪いことを見出した¹⁾。そしてこの原因として、無傷の大豆に存在するトリプシン・インヒビター(以後 TI と記す)は焙煎することにより容易に熱失活するのに対して、破碎大豆の TI は熱安定性が増して焙煎処理では熱失活しなくなることを認めた²⁾。そこで、大豆組織をどの程度破壊すると TI の熱安定性が増すかなどについて調べた結果、興味ある知見を得たので以下にその詳細を報告する。

実験方法

1. 試料

供試大豆：市販完熟乾燥丸大豆（平成 10 年度・栃木県産：タチナガハ）を購入し、無傷で健全なもの（以下、丸大豆と記す）を選別して使用した。その一般成分組成は Table 1 に示した。

破碎大豆：丸大豆をブレンダーで粒径 1 mm 未満にまで破碎して実験に供した。また、別に破碎して、粒径 2 mm 以上 5 mm 未満のもの、1 mm 以上 2 mm 未満のもの、0.6 mm 以上 1 mm 未満のもの、0.6 mm 未満のものに篩別し、実験に供した。

圧扁大豆：丸大豆の厚みの 3/4 に圧扁したもの（縁に亀裂が生じる程度）、2/4 に圧扁したもの、1/4 に圧扁し

* 富山短期大学（〒930-0193 富山市願海寺 444）

Table 1 Composition of soybean*

Composition	Content (%)
Water	11.6
Ash	4.6
Protein	31.6
Lipid	20.6
Carbohydrate	31.6

*: "Tachinagaha" of Japanese soybean.

たもの（油分が浸み出る程度）の各圧扁大豆を作成した。

2. 焙煎処理

筆者は先に、150℃で焙煎した大豆のタンパク質の消化は良好であるが、120℃では加熱温度が不足して消化が良くないこと、および180℃では加熱後5分までタンパク質の消化は急激に向上するが、その後は褐変などの影響により時間の経過と共に消化が悪くなることを報告した¹⁾。

そこで、大豆の各試料は150℃に調整した熱風循環式定温乾燥機に入れて20分間加熱した。なお加熱が均一になるように、丸大豆や圧扁大豆は互いに重ならないようにし、また破碎大豆は大豆1粒の厚さより厚くならないようにして、アルミ製トレーに入れて加熱した。加熱後、各々焙煎大豆は乳鉢に移し微粉になるまで磨砕してから以下の実験に供した。またはさらにエーテルを用いて脱脂した後に実験に供した。

3. TI 活性測定

焙煎破碎脱脂大豆粉末100 mgに40℃に加温したClark-LubsのpH緩衝液(pH 7.6:以後CL液と記す)10 mlを加えて均質化し、40℃で1時間振とうしてから遠心分離し、この上澄液を試料原液とした。

TI活性値はN- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilideを用いるKAKADEらの方法³⁾で求めた。

4. トリプシン消化試験

焙煎破碎脱脂大豆粉末を100 mg遠沈管に取り、所定量のトリプシンを含むCL液25 ml加えて懸濁した。防腐のためにトルエンを1滴加えた後、37℃20時間放置して大豆のタンパク質を消化した。消化後、20%トリクロル酢酸5 ml加えて遠心分離し、沈殿区分を未消化大豆タンパク質、上澄液区分を既消化大豆タンパク質と見なして、各々の窒素量をケルダール法で求めた。

実験結果及び考察

1. 焙煎破碎大豆のTI活性

破碎の程度を変えた各破碎大豆を焙煎してTI失活の程度を調べ、その結果をTable 2に示した。

大豆を無傷の丸大豆の状態では焙煎するとTIはよく失活して、TI活性値は生大豆の約1/20に低下することはすでに報告した²⁾。

焙煎した破碎大豆のTIは、破碎の程度が増すほど熱安定性が増して失活しなくなった。粒径を2 mm以下にまで破碎して焙煎した破碎大豆のTIはほとんど熱失活せず、その値は生大豆のTI活性の約80%に相当した。

粒径1 mm以下に破碎した大豆を顕微鏡で観察すると(Fig. 1)、細胞顆粒は散乱して、大豆種子の組織細胞は壊滅的な破壊を受けていた。

このことから、大豆種子中のTIは大豆が無傷の状態では存在する場合は熱失活しやすいが、組織破壊を受けるとその程度に応じて熱安定性が増すものと思われた。この理由については、次項の2の結果と合わせて考察する。

日本の伝統食品である“きなこ”や“炒り豆”は無傷の丸大豆を焙煎したものである。従ってこれらのTIは熱失活するので、そのタンパク質の消化は良い⁴⁾と思われる。しかし、あらかじめ破碎した大豆は、本報の結果から見て、焙煎してもTIは熱失活せず、消化が非常に

Table 2 TI activity in parched soybean flour

Samples (particle diameter)				TI (unit/mg)*
Intact soybeans				4.6± 0.7
Parching (150°C, 20 min)	Crushed soybeans	coarse	(5-2 mm)	39 ± 3
		medium	(2-1 mm)	62 ± 8
		fine	(1-0.6 mm)	61 ± 7
		powder	(<0.6 mm)	67 ± 12
Control (raw soybeans)				75± 8

*: (n=3)

1mm

Fig. 1 Crushed soybean

Table 3 TI activity in parched soybean flakes

Samples (degree of thickness)		TI (unit/mg)*
Parching (150°C, 20 min)	Intact soybeans (4/4)	2.4±1.3
	Soybean flakes (3/4)	12.0±1.6
	Soybean flakes (2/4)	20.3±3.8
	Soybean flakes (1/4)	35.0±0.8
Control (raw soybeans)		71.7±3.4

*: (n=3)

悪い⁵⁾ことが予測される。従って生大豆粉や生脱脂大豆粉などを利用するときは、TIを熱失活するために加水後に加熱する⁶⁾などの特別な処置を行う必要があると思われる。

2. 焙煎圧扁大豆の TI 活性

組織破壊と TI の加熱安定性の関係を調べる目的で、圧扁の程度を変えた各圧扁大豆を焙煎して、TI 活性を測定し、その結果を Table 3 に示した。

大豆組織を丸大豆の厚みの 3/4~1/4 に押し潰した後焙煎加熱すると、TI はその圧扁の程度に応じて熱安定性が増し、TI は熱失活しなくなった。

この結果は前項の焙煎破碎大豆に同じく、大豆種子の組織破壊と共に TI 熱安定性が増大することを示している。

以上の結果を考察するに当たって、CARMER らは⁷⁾ TI 分子内に存在する SS 結合のブリッジを還元した後、再び元にもどすと、この TI は活性を取り戻すと報告している。また DiBella らは⁸⁾ TI 分子内に存在する 2 個の SS 結合の内の 1 個は TI の活性維持に不可欠であると報告している。そしてまた、KITABATAKE らは⁹⁾ 大豆の

11S や 7S タンパク質は共存する水分が多量の場合はその水分量に影響を受けないが、少量の場合は水分量が少なくなるのに比例して熱変性しないと報告している。本報の場合も大豆を組織破壊すればそれだけ大豆中の TI が空気酸化を受けやすくなり、また共存する水分も蒸発しやすくなるなどが考えられる。本報の組織破壊と TI の熱安定性の試験結果もこのような影響を受けるものと推測できるが、具体的な検討については稿を改めて報告したい。

3. 焙煎大豆タンパク質のトリプシン消化

トリプシン添加量と TI が残存する焙煎大豆タンパク質の消化との関係を調べ、その結果を Fig. 2 に示した。

焙煎丸大豆は TI の大部分が失活してその活性は極端に小さい。それ故に少量のトリプシンを添加するだけで焙煎丸大豆のタンパク質は良く消化されるようになった。しかし、消化液中に残存する TI 単位に等しい量を添加しても消化率は 50% 程度であった。TI の 2 倍の単位量を添加してようやく消化率は約 80% になった。

破碎大豆の TI は丸大豆中の TI と違って焙煎加熱しても熱失活せず、生大豆並の活性を維持する。従ってこの生大豆と焙煎破碎大豆のタンパク質をトリプシンで消化するには共存する TI に相当する多量のトリプシンを必要とした。そしてこの生大豆と焙煎破碎大豆についてもトリプシン添加量が消化液中に共存する TI 量に等しい単位量になったときにタンパク質の消化率が約 50% になった。そして TI 量の約 2 倍量のトリプシン添加で消化率が約 70% になった。また、トリプシンを 2 倍量以上に過剰添加しても、焙煎丸大豆ほどの良好な消化率にはならなかった。

TI はトリプシンと 1 対 1 の関係で結合してトリプシンの消化作用を阻害するといわれている¹⁰⁾。従って TI 活性の測定時に観察されるようにトリプシンの添加量が試料液中の TI 量に達するまではタンパク質は消化されないものと思ったが、本報の結果は TI 単位量よりトリプシンの添加量が少量であってもその添加量に比例して TI と共存する基質タンパク質が消化することを示した。これは消化時間が TI 活性測定時のように分単位の短時間ではなく、20 時間も長時間をかけて消化したことが影響したものと思われた。また、共存する TI の単位と等量のトリプシンの添加で大豆タンパク質の消化が約 50% に達し、このタンパク質を十分に消化するには TI の約 2 倍量以上のトリプシンの添加を必要としたことも含めて、これらはいずれも棚橋ら¹¹⁾ が報告している TI とトリプシンとの親和力の影響が消化時間を長く取った

Fig. 2 Trypsin digestion of parched soybeans

Defatted soybean samples (100 mg) were suspended in 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.6 20 ml) and digested with trypsin at 37°C for 20 h.

Fig. 3 Serial changes in soybean TI activity during parching

ことで顕在化したものと思われた。

4. 焙煎したときの大豆 TI の経時変化

丸大豆及び破碎大豆を 120°C, 150°C, 180°C で焙煎して TI 活性値の経時変化を調べその結果を Fig. 3 に示した。

120°C の加熱では、比較的容易に熱失活する無傷の丸大豆でも TI は充分には失活せず、20 分間加熱で TI 活性はわずかに 1/3 程度の減少であった。破碎大豆はこの温度ではまったく失活しなかった。

150°C に加熱すると、丸大豆は加熱 5 分間で TI 活性

が 1/5 にまで急激に減少した。その後も活性値は減少して加熱 20 分後の TI 活性値は生大豆の 1/20 になった。破碎大豆のこの温度での TI 失活は前項 1 でも示した通り、わずかであった。

180℃にまで加熱温度を上げると、丸大豆の TI は 15 分でほぼ完全に活性を失った。しかしこの温度の加熱では、加熱 5 分で大豆はすでに褐変して、以後も時間と共に褐変が進行して黒く焦げた状態になった。そしてこの大豆のタンパク質のトリプシン消化は、基質タンパク質の過度の加熱による変性のために、加熱時間が長いほど悪くなることはすでに報告した¹⁾。

180℃加熱の破碎大豆は、20 分加熱後に TI 活性値は約 1/3 にまで減少した。しかしこの破碎大豆は過度の加熱で焦げた状態になりタンパク質も不消化性になる。それ故に TI が失活しても 180℃焙煎破碎大豆のタンパク質のトリプシン消化は良くない¹⁾。

要 約

(1) 乾燥丸大豆を破碎後に焙煎して、TI 活性の変化を調べたところ、無傷の大豆の TI 活性は熱失活して 1/20 程度に低下したが、破碎して微細になった大豆ほど TI は熱安定性を増して熱失活しなくなった。粒径 1mm 以下に破碎した大豆の TI 活性値は未加熱大豆の TI 活性に近い高い値を示した。

また、乾燥大豆を圧扁してから焙煎してその TI 活性の変化を調べたところ、破碎の場合と同様に、薄く圧扁した大豆の TI は熱失活せず TI 活性は高い値になった。

これは破碎または圧扁処理により、大豆細胞が破壊されたために TI が熱安定性を増したものと思われた。

(2) 生大豆および焙煎丸大豆、焙煎破碎大豆のタンパク質をトリプシンで消化したところ、三者共にトリプシン量が残存する TI 単位量以下の少量であっても、そのトリプシン添加量に応じて消化率は徐々に向上し、TI 単位量に達したときに消化率は約 50% になった。その後もトリプシンの添加量に比例して消化率が向上した。添加トリプシン量が TI 単位量の約 2 倍になったときに消化率はほぼ最大値に近くなった。

また、焙煎丸大豆のタンパク質は TI 活性が低いので少量のトリプシン量で良く消化するのに対して、生大豆

と焙煎破碎大豆は TI 活性が高いために消化が悪く、多量のトリプシンを加えないと消化率は良くならなかった。

(3) 焙煎大豆の TI 失活に及ぼす焙煎温度と時間の影響を調べたところ、120℃加熱では温度が低く、無傷の丸大豆でも TI 失活は不充分であった。破碎大豆 TI はまったく失活しなかった。150℃加熱の丸大豆は加熱 10 分後に TI 活性値は 1/10 に減少し、20 分後には 1/20 になった。150℃加熱の破碎大豆の TI は 20 分後でもわずかに 10% 減少しただけだった。180℃加熱の丸大豆は加熱 5 分で TI 活性値が 1/10 に減少した。しかしこのとき大豆は黒変して焦げた状態になった。破碎大豆の TI は 180℃加熱でもなお幾分活性を持続し 20 分後の値は生の約 1/5 を示した。

終わりに臨み、本研究の遂行に終始ご教示ご指導を賜りました東京農業大学名誉教授・前川昭男博士、聖徳大学教授・江指隆年博士、東京農業大学教授・田所忠弘博士に感謝申し上げます。また英文要旨の校閲を賜りました富山短期大学教授・児玉博英博士に深謝致します。

文 献

- 1) 盛永宏太郎: 食科工, **44**, 219 (1997).
- 2) 盛永宏太郎: 食科工, **46**, 352 (1999).
- 3) KAKADE, M.L., SIMONS, N. and LIENER, I.E.: *Cereal Chem.* **46**, 518 (1969).
- 4) 渡辺篤二・海老根英雄・太田輝夫: 大豆食品 (光琳書院, 東京), p. 204 (1971).
- 5) 林 寛・有山 恒 栄養と食糧, **10**, 134, (1957).
- 6) ALBRECHT, W.J., MUSTAKAS, G.C. and MCGHEE, J.E.: *Cereal Chem.*, **43**, 400 (1966).
- 7) CARMER, N. and BOHAK, Z.: *Israel J. Chem.*, **6**, 1 (1968).
- 8) DIBELLA, F.L. and LIENER, I.E.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2824 (1969).
- 9) KITABATAKE, N., TAHARA, M. and DOI, E.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1201 (1989).
- 10) KUNITZ, M.: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).
- 11) 棚橋勝道・高野勝己・松本信二・鴨居郁三・小原哲二郎: 日食工誌, **35**, 541 (1988).

(平成 13 年 10 月 16 日受付, 平成 14 年 1 月 7 日受理)