

生姜搾汁による牛乳凝固機構の解析[†]

Analysis of Clotting Process of Milk with Ginger Juice

星 祐二^{*1} 阿部 (相澤) 真美^{*2}
Yuji HOSHI Mami ABE (AIZAWA)

In China, a dessert known as ginger milk pudding (Jiang Zhi Zhuang Nai) has been eaten, which is made by adding freshly squeezed ginger juice to heated milk to clot it. In this study, the coagulation process of skim milk induced by ginger juice was investigated, leading to the following findings:

- 1) The addition of ginger juice did not coagulate soy milk, indicating that ginger milk pudding was a phenomenon specific to cow's milk.
- 2) α -casein, β -casein, and κ -casein alone were susceptible to degradation by ginger proteases, respectively. In milk, however, κ -casein appeared to be selectively broken down, similar to rennet-induced cleavage, due to micellar structure.
- 3) Ascorbic acid further promoted ginger juice's low molecular weight transformation of digested peptides, which originally possessed milk coagulation ability.
- 4) Scanning electron microscopic observations of skim milk coagulates showed ginger milk pudding exhibited a more porous structure than rennet-induced coagulates. However, when ascorbic acid was present, it formed a denser network structure than rennet coagulates.

Keywords: ginger milk pudding, zingibain, Jiang Zhi Zhuang Nai
生姜ミルクプリン、ジンジバイン、薑汁撞奶

1. 緒言

中国では、加温した牛乳を生姜の搾り汁に注ぎ込んで固めた薑汁撞奶^{ジンズジュアンナイ} (Jiang Zhi Zhuang Nai) とよばれるデザートが、特に広東省や香港で食され、日本でも生姜ミルクプリン (ginger milk pudding) として知られるようになってきている¹⁾。薑汁撞奶は、新鮮生姜汁に70~80°Cに加温した牛乳を注ぐことによってゲル化させた食品で、牛乳のゲル化は生姜に存在するプロテアーゼ、ジンジバイン (zingibain) の作用によるものと考えられている¹⁻³⁾。

市川らは生姜プロテアーゼの分離精製を行い、2種のシステインプロテアーゼの存在を明らかにし⁴⁾、その後も生姜プロテアーゼの分離精製については、多くの報告がなされている⁵⁻¹⁰⁾。

山本らは、生姜搾汁のプロテアーゼ活性におよぼすシステインやアスコルビン酸添加の影響を検討し、いずれも酵素活性を高め、活性維持期間も伸びることを報告している²⁾。Nishimuraらは、生姜プロテアーゼ活性がヨードアセトアミドによって阻害される一方で、EDTAやアスコルビン酸が共存するとゲルの硬さが増し、生姜搾汁による牛乳のゲル化には生姜プロテアーゼの存在が必須であることを報告している¹⁾。

山田は、種々の牛乳種を用いて生姜汁による牛乳ゲルを作成し、ゲルの硬さと付着性は牛乳のタンパク質、脂質およびカルシウム濃度と正の相関があることなどを報告し¹¹⁻¹³⁾、さらに山田らは、牛乳ゲルが高齢者用食品や嚥下訓練食に適している可能性を指摘した¹⁴⁾。

以上のように、生姜搾汁による牛乳の凝固について、多くの報告がなされてはいるが、その凝固機構についてはまだ不明な点も多い。今回、スキムミルクを基質として、生姜搾汁による牛乳凝固過程について検討し、若干の知見が得られたので報告する。

II. 試料および実験方法

1. 試料

1) 生姜

ひね生姜は、必要時に市内量販店から購入し、実験に供した。おもに中国産生姜を使用した。熊本および千葉県産のひね生姜も使用した。

2) 牛乳および豆乳

必要な時にすぐに調製できることから、今回は牛乳試料として「CO・OPスキムミルク」(森永乳業株式会社MD)を使用した。また、生姜搾汁による凝固が牛乳に特異的な現象かどうかを確認するために「無調整有機豆

^{*1}宮城学院女子大学生活科学部食品栄養学科

^{*2}元宮城学院女子大学学芸学部食品栄養学科

[†]2023年12月1日受付, 2024年1月5日受理

乳」(マルサンアイ株式会社)も使用した。

2. 試薬類

レンネット、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、カゼインナトリウム、牛血清アルブミン、卵白アルブミン、炭酸脱水酵素、大豆トリプシンインヒビターおよびリゾチームはSigma社のものを、その他の試薬類は、和光純薬工業より特級試薬を購入して使用した。

3. 生姜搾汁の調製

購入した生姜を皮付きのまま、セラミックまたはプラスチック製のおろし器ですりおろし、キムワイブ(日本製紙クレシア)で包み、搾ったろ液を生姜搾汁として使用した。

4. 生姜搾汁アセトンパウダーの調製

上記「3. 生姜搾汁の調製」で得た生姜搾汁ろ液に3倍量の冷アセトン(-80℃)を加え、5分程度放置した。放置後、1,600×gで10分間遠心して得られた沈殿に再び冷アセトンを加え、再度1,600×gで10分間遠心分離を行った。このようにして得られた沈殿をシャーレに移し、真空デシケーターを用いて減圧乾燥後、乳鉢で磨り潰し、乾燥粉末(アセトンパウダー)を得た。

5. 生姜ミルクプリンの調製

9.5%濃度のスキムミルク分散液(溶媒は水)10 mLを80℃の恒温槽で温めておき、生姜搾汁が1 mL入った試験管に流し込み、5分間保温を続けた。5分後に試験管を恒温槽から取り出し、30分間放置して牛乳を凝固させた。また、豆乳についても、スキムミルク分散液と同様、加温した無調整豆乳10 mLを生姜搾汁の入った試験管に流し込み、5分間保温した。

6. カゼインミセルの可溶化

7.5%スキムミルク分散液100 mLにトリポリリン酸0.225 gを加え、ミセルの可溶化を行った¹⁵⁾。

7. 人工カゼインミセルの調製

Knoopらの方法に従って、以下のようにして人工カゼインミセルの調製を行った¹⁶⁾。

3%カゼインナトリウム分散液60 mLに3 mM塩化カルシウム溶液0.6 mLを加え、30分間放置した。その後、0.02 Mリン酸緩衝液(pH6.8)10 mL、10 mMクエン酸カリウム溶液10 mL、塩化カルシウム溶液9.4 mLを順番に加え、pHを6.8に調整後、100 mLに希釈して人工カゼインミセル分散液を得た。

8. SDS 電気泳動

1) 泳動用ゲル

泳動用ゲルは、ATTO社製プレキャストゲルe-PAGEL ET-12.5Lまたはe-PAGEL ET-520Lを用いた。

2) 試料処理液

試料処理液は、水7.0 mLにラウリル硫酸ナトリウム0.1 gを溶解後、0.5 M トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸緩衝液(pH 6.8)1.0 mL、2-メルカプトエタノール0.1 mL、グリセロール2.0 mLを混合して調製した。

3) 泳動用緩衝液

泳動用緩衝液は、トリスヒドロキシメチルアミノメタン1.5 g、グリシン7.2 g、ラウリル硫酸ナトリウム0.5 gを水に溶解後、500 mLに希釈して調製した。

4) 泳動用試料の調製

(1) 分子量マーカー用タンパク質標品、牛乳構成タンパク質およびカゼインナトリウム

牛血清アルブミン1 mg、卵白アルブミン、炭酸脱水酵素、大豆トリプシンインヒビター、リゾチーム、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンおよびカゼインナトリウム各2 mgを試料処理液1 mLに溶解後、90℃、10分間加熱した。加熱後、流水で冷却してから0.2%ブロムフェノールブルー溶液を0.1 mL加えて電気泳動用試料とした。

(2) スキムミルク

8%スキムミルク分散液0.2 mLに試料処理液0.8 mLを、あるいは15%スキムミルク分散液0.025 mLに試料処理液1 mLを加え、80℃で15分間加熱した。加熱後、流水で冷却してから0.2%ブロムフェノールブルー溶液を0.1 mL加えて電気泳動用試料とした。

(3) 可溶化カゼインミセル

上記「6. カゼインミセルの可溶化」で得た可溶化カゼインミセル分散液0.025 mLに試料処理液1 mLを加え、80℃で15分間加熱した。加熱後、流水で冷却してから0.2%ブロムフェノールブルー溶液を0.1 mL加えて電気泳動用試料とした。

(4) 人工カゼインミセル

上記「7. 人工カゼインミセルの調製」で得た人工カゼインミセル分散液0.025 mLに試料処理液1 mLを加え、80℃で15分間加熱した。加熱後、流水で冷却してから0.2%ブロムフェノールブルー溶液を0.1 mL加えて電気泳動用試料とした。

(5) 泳動用生姜搾汁分解タンパク質試料の調製

i. スキムミルク

生姜搾汁上清1 mLを入れておいたスチロール棒ビン(口内径2.4 cm、胴径3.0 cm、高さ4.6 cm)に、80℃に加温した8%スキムミルク分散液10 mLを注ぎ、30分間放置して凝固させた。凝固物をガラス製ホモジナイザーで均質化し、その0.2 mLに試料処理液

0.8 mLを加え、90°Cで10分間加熱した。加熱後、流水で冷却してから0.2%ブロムフェノールブルー溶液を0.1 mL加えて電気泳動用試料とした。

ii. α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミンおよび β -ラクトグロブリン

牛乳構成タンパク質各10 mgを0.02 Mリン酸緩衝液1 mLに溶解したものにアセトンパウダー液（アセトンパウダー80 mgに0.02 Mリン酸緩衝液1 mLを加え、5分間攪拌後、1,600×gで10分間遠心分離して得た上清）0.025 mLを加えて、37°C、30分間反応させた。反応後、分解液0.2 mLに試料処理液を0.8 mLを加え、90°Cで10分間加熱後、流水で冷却し、0.2%ブロムフェノールブルー溶液を0.1 mL加えて電気泳動用試料とした。

iii. カゼインナトリウム

80°Cに加温した7.5%カゼインナトリウム分散液50 mLを生姜搾汁5 mLが入ったビーカーに注ぎ、30分間放置して凝固させた。凝固物はガラス製ホモジナイザーで均質化してから泳動に供した。泳動試料の調製は上記「(5)i. スキムミルク」と同様に行った。

iv. 可溶化カゼインミセル

上記「6. カゼインミセルの可溶化」で調製した可溶化カゼインミセル分散液50 mL（80°C）を生姜搾汁5 mLの入ったビーカーに注ぎ、30分間放置して凝固させた。凝固物はガラス製ホモジナイザーで均質化してから泳動に供した。泳動試料の調製は上記「(5)i. スキムミルク」と同様に行った。

v. ミセル化カゼインナトリウム

上記「7. 人工カゼインミセルの調製」で得た人工カゼインミセル分散液50 mL（80°C）を生姜搾汁5 mLが入ったビーカーに注ぎ、30分間放置して凝固させた。凝固物はガラス製ホモジナイザーで均質化してから泳動に供した。泳動試料の調製は上記「(5)i. スキムミルク」と同様に行った。

(6) 泳動、染色および脱色

所定量の各試料液を泳動用ゲル（e-PAGEL ET-12.5L）に添加し、20 mAで70分間泳動した。また、泳動用ゲルとしてe-PAGEL ET-520Lを使用した場合は、75分間泳動した。泳動後のゲルはComassie Brilliant Blue G-250で60分間染色し、脱色は酢酸-メタノール水溶液を用いて行った。

9. 破断応力の測定

スチロール棒ピン（口内径2.4 cm、胴径3.0 cm、高さ4.6 cm）に1 mL生姜搾汁を入れておき、あらかじめ所定の温度に調整しておいた15%スキムミルク分散液10 mLを注ぎ、30分間室温で放置して凝固させた。凝固物の破断応力は、直径2 cmの円板型プランジャーを装着したレオメーター（不動工業NRN-2010J-CW）で測定

した。2,000 gのロードセルを用いて（フルスケール200 gで使用）、スチロール棒ピン中の凝固物を5 cm/minで圧縮し、圧縮過程の最大応力値を破断応力とした。

10. 生姜プロテアーゼ活性測定

生姜のプロテアーゼ活性は、1%カゼインナトリウム分散液3 mL（0.02 Mリン酸緩衝液）に生姜搾汁（1,600×gで10分間遠心分離して得た上清）0.3 mLを加え、37°Cで20分間放置した。20分後、20%トリクロロ酢酸溶液1.5 mLを加え、10分間氷冷して反応を止めた。氷冷後、1,600×gで10分間遠心分離し、上清の280 nmにおける吸光度を島津UVmini 1240を用いて測定し、その値をプロテアーゼ活性とした（ $\Delta Abs/20 \text{ min}$ ）。また、生姜搾汁にアスコルビン酸添加したものについても同様にプロテアーゼ活性を測定したが、対照には同濃度のアスコルビン酸を含むリン酸緩衝液を用いた。

11. 生姜プロテアーゼ活性におよぼすトリクロロ酢酸濃度の影響

1%カゼインナトリウム分散液3 mLに生姜搾汁（1,600×gで10分間遠心分離して得た上清）0.3 mLを加え、37°C、20分間放置した。放置後、所定の濃度となるようトリクロロ酢酸溶液1.5 mLを加え、10分間氷冷した。氷冷後、1,600×gで10分間遠心分離し、上清の280 nmにおける吸光度を測定した。

12. HW-60を用いたゲルろ過による分子量推定

1%スキムミルク分散液10 mL（0.02 Mリン酸緩衝液）を80°Cで30分間加温後、27,167×gで15分間遠心分離し、さらにDISMIC-25cs（ADVANTEC）を用いて上清をろ過した（ポアサイズ0.2 μm ）。次に、ろ液2 mLにグリセロール0.4 mLを加えて混合し、1.6×52 cmのガラスカラムに詰めたToyopearl HW-60にかけてゲルろ過を行った。流速は0.8 mL/minで1フラクションあたり4 mLを分取し、溶出液の280 nmにおける吸光度を測定した。

加温したスキムミルク分散液に生姜搾汁またはアスコルビン酸含有生姜搾汁を添加したゲルろ過用試料の調製は以下のように行った。

10%スキムミルク分散液50 mL（80°C）を5 mLの生姜搾汁（熊本県産）に加え、室温で放置して凝固させた。凝固後、凝固物をガラス製ホモジナイザーで搗潰してから遠心分離にかけて上清画分を回収し、以後の操作は、スキムミルク分散液と同様に行った。

なおカラムは、ブルーデキストラン（分子量 2.0×10^6 ）、卵白アルブミン（分子量 4.5×10^4 ）、 α -ラクトアルブミン（分子量 1.4×10^4 ）各25 mgを5 mLの0.02 Mリン酸緩衝液に溶解させ、その上清2 mLに0.4 mLのグリセロールを混合したものをを用いて検定し、スキムミルク

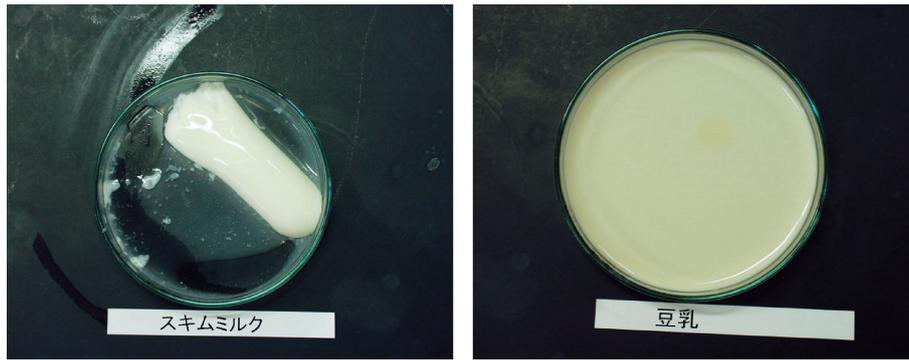


Fig. 1. Appearances of skim milk and soy milk treated with squeezed ginger juice.

Ten mL of 9.5% skim milk or soy milk was heated in a water bath at 80°C, then poured into a test tube containing 1 mL of ginger juice and kept for 5 minutes. After 5 minutes, the test tube was removed from the water bath and left for 30 minutes at room temperature. Then the contents were transferred to a chalice.

For the milk sample in this study, we used skim milk powder produced by Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Additionally, to confirm whether the coagulation induced by ginger juice was specific to milk, we also used commercially available soy milk (Marusan-ai Co., Ltd).

left: skim milk right: soy milk

クの溶出位置から分子量の推定を行った。

13. 走査型電子顕微鏡による生姜ミルクプリン微細構造の観察

走査型電子顕微鏡観察のための生姜ミルクプリン試料は、対照としたレンネット凝固スキムミルクとともに以下のように調製した。

1) 生姜ミルクプリン

80°Cに加熱した20%スキムミルク分散液50 mLを、生姜搾汁もしくは0.4%アスコルビン酸含有生姜搾汁5 mLの入ったビーカーに注ぎ、30分間放置して凝固させた。

2) レンネット凝固スキムミルク

60°Cに加熱した20%スキムミルク分散液50 mLに1 M塩化カルシウム溶液を1 mL加えてから、1%レンネット溶液0.2 mLを加えて軽く攪拌し、湯浴中で30分間放置して凝固させた。

上記1) および2) の凝固物から、1辺が約0.5 cmの立方体を切り出し、4%グルタルアルデヒド水溶液中で暗所にて一晩放置して固定した。固定後、蒸留水で水洗してから、50、60、70、80、90、95、99%エタノール、50%エタノールー50%*t*-ブタノール、30%エタノールー70%*t*-ブタノール、*t*-ブタノールの順にそれぞれ約15分程度浸漬して脱水・置換した。置換後、VFD-21S（真空デバイス社製）を用いて凍結乾燥を行った。乾燥試料は、走査型電子顕微鏡用の試料台に木工用ボンドで接着し、金を蒸着（Eiko IB3 Ion Coater）後、日立TM-1000走査型電子顕微鏡を用いて凝固組織の観察を行った。

III. 結果

1. 生姜搾汁による牛乳の凝固

9.5%スキムミルク分散液および豆乳10 mLを80°Cの恒温槽で温め、生姜搾汁1 mLの入った試験管に流し込み、5分間保温を続けた。5分後に試験管を恒温槽から取り出し、室温で30分間放置した。Fig. 1は、放置後の内容物をシャーレに移した外観で、写真のようにスキムミルクは滑らかに凝固したが、豆乳は凝固しなかった。

2. 牛乳タンパク質のSDS電気泳動パターン

α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、カゼインナトリウム、スキムミルクおよび生姜搾汁添加スキムミルクのSDS電気泳動パターンをFig. 2に示した。

カゼインナトリウム（レーン6）には、 α -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインのバンドが存在していたが、スキムミルクにはそれらカゼインのバンドに加えて、乳清タンパク質の β -ラクトグロブリンのバンドも存在していた（レーン7）。一方、生姜搾汁を添加したスキムミルクでは、 κ -カゼインのバンドが消失していた（レーン8）。

3. 牛乳構成タンパク質の生姜搾汁による分解性

α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミンおよび β -ラクトグロブリン単体の生姜搾汁による分解性をSDS電気泳動により検討し、結果をFig. 3に示した。 α -カゼインと κ -カゼインは完全に、 β -カゼインのバンドは若干存在するものの、ほぼ分解されていた。一方、 β -ラクトグロブリンと α -ラクトアルブミンは、カゼイン画分タンパク質に比べると分解されにくかった。

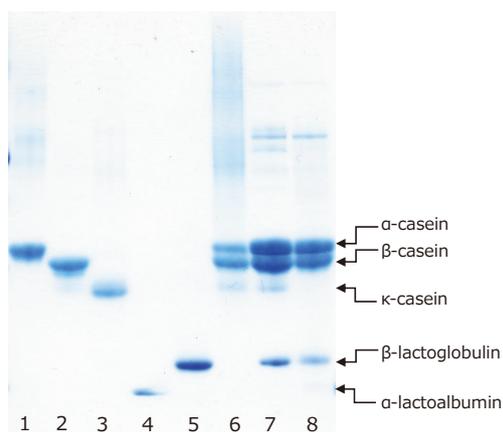


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of milk proteins.

Electrophoresis was carried out using e-PAGEL ET-12.5L (ATTO) at 20 mA for 70 min. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 for 1 hour and then destained using acetic acid – methanol – water solution.

- lane 1: α -casein
- lane 2: β -casein
- lane 3: κ -casein
- lane 4: α -lactoalbumin
- lane 5: β -lactoglobulin
- lane 6: sodium caseinate
- lane 7: skim milk
- lane 8: skim milk digested with ginger juice

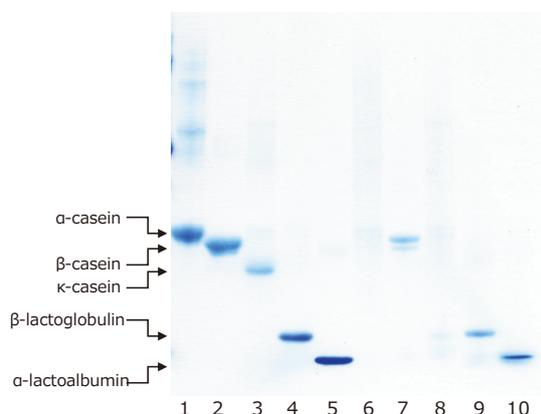


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of constituent proteins of milk digested with ginger protease.

Electrophoresis and gel staining/destaining were conducted as described in Fig. 2.

- lane 1: undigested α -casein
- lane 2: undigested β -casein
- lane 3: undigested κ -casein
- lane 4: undigested β -lactoglobulin
- lane 5: undigested α -lactoalbumin
- lane 6: digested α -casein
- lane 7: digested β -casein
- lane 8: digested κ -casein
- lane 9: digested β -lactoglobulin
- lane 10: digested α -lactoalbumin

4. 可溶性カゼインミセルおよび人工カゼインミセルの生姜搾汁による分解性

トリポリリン酸処理によりミセルを可溶化したスキム

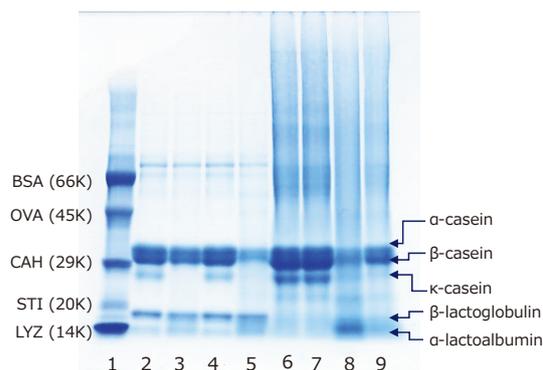


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of demicellized skim milk and micellized sodium caseinate digested with ginger juice. Electrophoresis was carried out using e-PAGEL ET-520L (ATTO) at 20 mA for 75 min.

Gel staining and destaining were conducted as described in Fig. 2.

- lane 1: molecular weight standard proteins
- lane 2: undigested skim milk
- lane 3: digested skim milk
- lane 4: demicellized and undigested skim milk
- lane 5: demicellized and digested skim milk
- lane 6: undigested sodium caseinate
- lane 7: micellized and undigested sodium caseinate
- lane 8: digested sodium caseinate
- lane 9: micellized and digested sodium caseinate

- BSA : Bovine Serum Albumin
- OVA : Ovalbumin
- CAH : Carbonic Anhydrase
- STI : Soybean Trypsin Inhibitor
- LYZ : Lysozyme

ミルク、および Knoop らの方法にしたがってミセル化を行ったカゼインナトリウムの生姜搾汁による分解性を SDS 電気泳動により検討し、結果を Fig. 4 に示した。なお、泳動には e-PAGEL ET-520L を用いた。

レーン 2 は未分解スキムミルクで、Fig. 2 と同様、カゼイン画分に加えて、 β -ラクトグロブリンのバンドが認められたが、さらに α -ラクトアルブミンのバンドも薄く染色されていた。スキムミルク分散液に生姜搾汁を添加すると、Fig. 2 と同様 κ -カゼインが分解されていた (レーン 3)。

未分解の可溶性カゼインミセルの泳動パターンは、未処理スキムミルクの泳動パターンと同じであったが (レーン 2 と 4)、トリポリリン酸処理を行って可溶化したカゼインに生姜搾汁を添加した場合、 κ -カゼインだけでなく、 α -カゼインや β -カゼインのバンドもかなり分解されるようになった (レーン 3 と 5)。

未分解のカゼインナトリウムとミセル化処理を行った未分解カゼインナトリウムの泳動パターンは同じであった (レーン 6 と 7)。ミセルを構成していないカゼインナトリウムに生姜搾汁を添加すると、レーン 8 のようにカゼイン画分のバンドはかなり消失していたが、ミセル化カゼインナトリウムでは、 α -カゼインや β -カゼインの

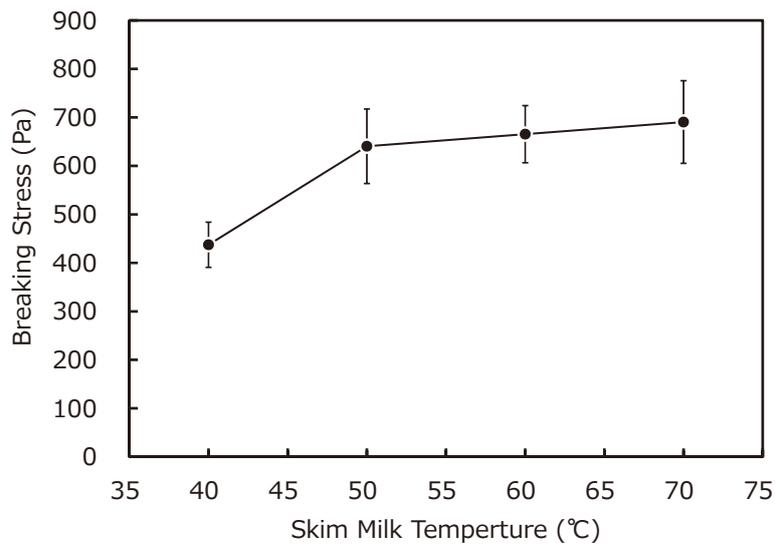


Fig. 5 Effect of skim milk temperature on breaking stress of ginger milk pudding.

Ten mL of 15% skim milk, previously adjusted to a specified temperature, was poured into a styrofoam vessel (capacity 13 mL) containing 1 mL of ginger juice. Then the mixture was left at room temperature for 30 minutes to allow it to coagulate. The breaking stress of the clotted milk pudding was measured using a rheometer equipped with a 2 cm ϕ disk plunger (Fodo Kogyo NRN-2010J-CW). Using a 2,000 g load cell (with a full-scale of 200 g), the compression speed was set at 5 cm/min.

Filled circles and bars indicate means \pm SDs, respectively ($n=10$).

Table 1 Effect of ascorbic acid (AsA) on the clotting ability and protease activity of ginger juice

Chiba prefecture-grown ginger	Clotting ability	Protease activity $\Delta Abs/20$ min	Kumamoto prefecture-grown ginger	Clotting ability	Protease activity $\Delta Abs/20$ min
Ginger juice only	×	0.038	Ginger juice only	○	0.097
Ginger Juice+0.2% AsA	×	0.033	Ginger juice+0.2% AsA	○	0.141
Ginger Juice+0.4% AsA	×	0.037	Ginger juice+0.4% AsA	○	0.136

Ginger juice (0.3 mL) was added to 3 mL of 1% sodium caseinate in 0.02 M of sodium phosphate buffer (pH 6.8), and the mixture was incubated at 37°C for 20 minutes. After 20 minutes, 1.5 mL of 20% trichloroacetic acid solution was added to the mixture, and the mixture was cooled on ice for 10 minutes to stop the reaction. After cooling, the mixture was centrifuged at 1,600 \times g for 10 minutes, and the absorbance at 280 nm in the supernatant was measured and this value was considered as the protease activity of ginger juice ($\Delta Abs/20$ min). ×: unable to clot milk, ○: able to clot milk

バンドがカゼインナトリウムよりも濃く染色されていた (レーン 8 と 9)。

5. 生姜ミルクプリンの破断応力におよぼすスキムミルク温度の影響

所定の温度に温めたスキムミルク分散液を生姜搾汁に加えて調製した生姜ミルクプリンの破断応力の測定結果を Fig. 5 に示した。スキムミルク温度が 40°C から 50°C に高まると、破断応力は 437 Pa から約 1.5 倍の 641 Pa に増加し、その後も 70°C にかけて漸増した。

6. 生姜搾汁の牛乳凝固能とプロテアーゼ活性におよぼすアスコルビン酸の影響

生姜搾汁のスキムミルク凝固能およびプロテアーゼ活性におよぼすアスコルビン酸添加の影響を検討し、その結果を Table 1 に示した。アスコルビン酸無添加時点で

凝固能のなかった千葉県産ひね生姜では、搾汁にアスコルビン酸を添加しても凝固能はないままで、プロテアーゼ活性 (搾汁添加 20 分後の吸光度) にも変化はなかったが、凝固能を有する熊本県産ひね生姜搾汁では、プロテアーゼ活性が 40% 程度高まった。

7. 生姜搾汁のプロテアーゼ活性におよぼすトリクロロ酢酸濃度の影響

生姜搾汁の反応を停止する際に用いるトリクロロ酢酸濃度が、プロテアーゼ活性におよぼす影響について検討し、その結果を Table 2 に示した。

千葉県産ひね生姜の場合、アスコルビン酸の添加の有無にかかわらず、牛乳凝固能はなく、また 20 分後の吸光度にもトリクロロ酢酸濃度は影響しなかった。一方、凝固能のあった熊本県産ひね生姜では、アスコルビン酸添加で吸光度が高まり、特にトリクロロ酢酸濃度が低い

Table 2 Effect of concentration of trichloroacetic acid (TCA) on the protease activity of ginger juice

Ginger-producing prefecture	Addition of AsA	Clotting ability	$\Delta Abs/20 \text{ min}$	
			Final concentration of TCA	
			0.14 M	0.38 M
Chiba	Ginger juice only	×	0.068	0.078
	Ginger Juice + 0.2% AsA	×	0.062	0.069
	Ginger Juice + 0.4% AsA	×	0.071	0.067
Kumamoto	Ginger juice only	○	0.098	0.138
	Ginger Juice + 0.2% AsA	○	0.363	0.172
	Ginger Juice + 0.4% AsA	○	0.392	0.173

Three mL of 1% sodium caseinate was mixed with 0.3 mL of ginger juice (with optional additions of 0.2 or 0.4% of ascorbic acid), and the mixture was kept at 37°C for 20 minutes. After 20 minutes, 1.5 mL of TCA solution at the specified concentration was added, followed by cooling on ice for 10 minutes. After cooling, the mixture was centrifuged at 1,600×g for 10 minutes, and the absorbance at 280 nm in the supernatant was measured.

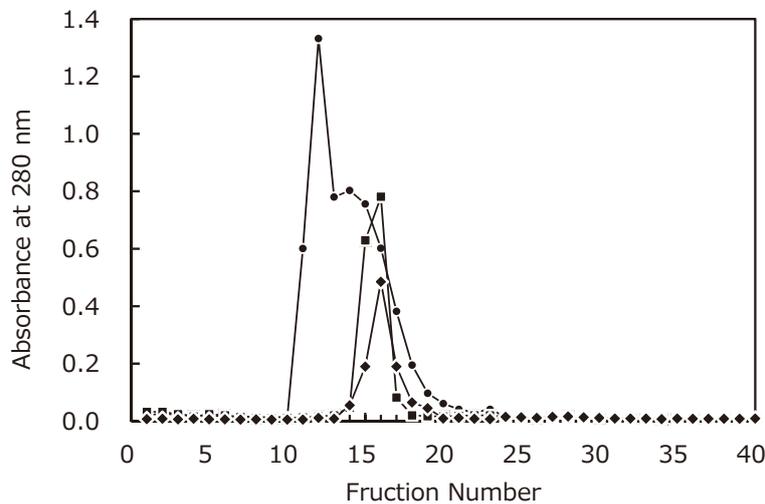


Fig. 6. Gel filtration patterns of standard proteins.

Gel filtration was carried out using Toyopearl HW-60 in a column size of 1.6×52 cm at flow rate of 0.8 mL/min. Effluent was collected in 4 mL fractions and absorbance at 280 nm was measured.

Each sample (25 mg) was dissolved in 5 mL of 0.02 M phosphate buffer (pH 6.8), of which 2 mL was mixed with 0.4 mL of glycerol and then applied to the column.

● blue dextran ■ ovalbumin ◆ α -lactalbumin

と高い活性（吸光度）を示した。

8. HW-60 を用いたゲルろ過による分解ペプチドの分子量推定

上記「7. 生姜搾汁のプロテアーゼ活性におよぼすトリクロロ酢酸濃度の影響」より、生姜プロテアーゼによるスキムミルク凝固能の有無と分解により生じるペプチドの分子量に関連のあることが示唆された。そこで次に、Toyopearl HW-60 によるゲルろ過を行い、分解ペプチドの分子量分布について検討した。

最初に、カラムの検定を行うためにブルーデキストラン、卵白アルブミンおよび α -ラクトアルブミンをHW-60によるゲルろ過にかけた。その溶出パターンをFig. 6に示したが、ブルーデキストランはフラクション

ナンバー 11 番付近に、卵白アルブミンと α -ラクトアルブミンはともにフラクションナンバー 16 番付近に溶出した。

次に、スキムミルク分散液、熊本県産ひね生姜搾汁添加スキムミルク分散液およびアスコルビン酸含有生姜搾汁添加スキムミルク分散液の上清画分の溶出パターンをFig. 7に示した。

生姜搾汁未添加のスキムミルク分散液では、分子量数百万以上の溶出成分が主要なものであったのに対し、生姜搾汁のみを加えた場合は、分解は進んでいるものの分子量数百万の成分もまだ溶出していた。一方、アスコルビン酸を添加して凝固力を高めた場合には、分子量数百万の成分はほぼ消失し、分子量1万以下のペプチドが主要な成分となっていた。

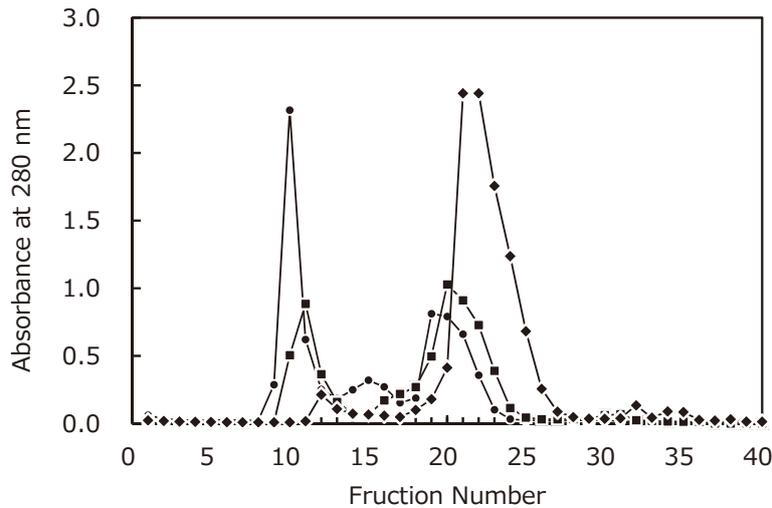


Fig. 7. Gel filtration pattern of the supernatant of skim milk clotted with ginger juice.

Gel filtration was conducted according to the method described in Fig. 6.

A supernatant of 2 mL of skim milk, which was filtered through DISMIC-25s (ADVANTEC), was mixed with 0.4 mL of glycerol, and the mixture was applied to the column.

Fifty mL of 10% skim milk, previously adjusted to 80°C, was mixed with 1 mL of ginger juice (with or without ascorbic acid). Then the mixture was left at room temperature for 30 minutes to allow it to coagulate, followed by grinding with glass homogenizer and centrifugation. The resultant supernatant was applied to the column similarly to the supernatant of the skim milk.

- intact skim milk
- skim milk clotted with ginger juice
- ◆ skim milk clotted with ascorbic acid-containing ginger juice

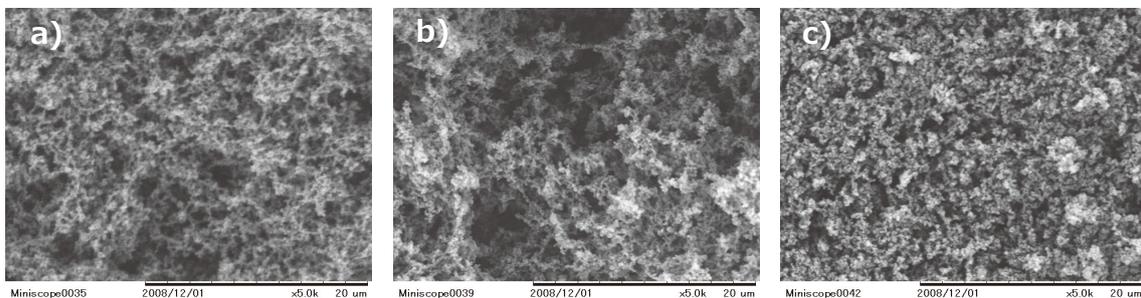


Fig. 8. Scanning electron microscopic image of clotted skim milk.

Samples were fixed overnight in a 4% glutaraldehyde solution. After fixation, they were rinsed with distilled water, dehydrated and replaced with ethanol and *t*-butanol in a stepwise manner. Then the samples were subjected to freeze-drying using a VFD-21S vacuum freeze-dryer (Vacuum Device Inc.). The dried samples were sputter-coated with gold (Eiko IB3 Ion Coater) and observed using a Hitachi TM-1000 scanning electron microscope.

- a) skim milk clotted with rennet
- b) skim milk clotted with ginger juice
- c) skim milk clotted with ascorbic acid-containing ginger juice

9. 走査型電子顕微鏡による生姜ミルクプリン微細構造の観察

レンネット、熊本県産ひね生姜搾汁添加スキムミルク、および0.4%アスコルビン酸含有生姜搾汁添加スキムミルク凝固ゲル微細構造の走査型電子顕微鏡による観察結果を Fig. 8 に示した。なお今回は、走査型電子顕微鏡用試料の調製をしやすいするためにスキムミルクの濃度は20%とした。

生姜搾汁のみを添加したミルクプリンでは、レンネットゲルよりも空隙の多い構造を示していたが、アスコルビン酸含有生姜搾汁凝固ミルクプリンはレンネットゲルの微細構造よりも緻密な組織となっていた。

IV. 考察

生姜搾汁添加により牛乳の凝固は観察されたが、一方、豆乳では観察されず、牛乳に特異的な現象と考えられた

(Fig. 1)。

山田は、ゲルの力学的特性が、ホルスタイン種に比べて脂質およびタンパク質含量の高いジャージー種で2~3倍高いこと^{11,12)}、ゲルの硬さおよび付着性がタンパク質、脂質およびカルシウム濃度と相関することなどを報告している¹³⁾。著者らも、数種の市販牛乳に生姜搾汁を加え、脂質、タンパク質およびカルシウム含量などによって凝固性が異なることを確認した¹⁷⁻¹⁹⁾。しかしながら、同一産地の生姜でも、入手時期によって牛乳凝固能が大きく変動するため、検討年度によって市販牛乳種の生姜搾汁による凝固性は異なり¹⁷⁻¹⁹⁾、牛乳成分と凝固性の関係については、今後も検討を重ねる必要がある。以上のような事情、および必要なときに試料を調製しやすいことから、本研究においては市販スキムミルクを牛乳試料とした。

カゼインナトリウムの構成タンパク質が、 α -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインであることを確認した一方 (Fig. 2; レーン6)、牛乳試料として用いたスキムミルクには、それらカゼイン構成タンパク質に加え、乳清タンパク質の β -ラクトグロブリンも含まれていた (レーン7)。これは、スキムミルクが遠心分離によって乳脂肪のみを除去していること²⁰⁾、および製造工程の殺菌処理により κ -カゼインと β -ラクトグロブリンがジスルフィド結合を介して複合体を形成するためと考えられた²¹⁾。

市販スキムミルク分散液に生姜搾汁を作用させると κ -カゼインのバンドが消失したが (Fig. 2; レーン8)、Nishimuraらもカゼイン中の κ -カゼインの分解が顕著であることを報告しており¹⁾、今回の結果と一致していた。生姜にはジンジベインとよばれるプロテアーゼが含まれており¹⁾、ジンジベインが κ -カゼインのペプチド結合を切断したのと考えられた。

レンネットを構成する主要プロテアーゼはキモシンであり、キモシンは κ -カゼインのPhe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶のペプチド結合を選択的に切断するが²²⁾、生姜プロテアーゼは κ -カゼインのAla⁹⁰-Glu⁹¹とHis¹⁰²-Leu¹⁰³間のペプチド結合を切断する⁹⁾、あるいはThr¹²¹-Ile¹²²間のペプチド結合を切断するという報告がある²³⁾。生姜プロテアーゼは、キモシンと同様、 κ -カゼインを選択的に分解するのか確認したところ、 β -カゼインで未分解のバンドが若干認められたが、 α -カゼインと κ -カゼインは完全に分解されていた (Fig. 3)。牛乳凝固作用のあるキモシン以外の微生物や植物由来のプロテアーゼの場合、ジンジベインを含め、 κ -カゼインよりも α -カゼインや β -カゼインを分解しやすいとの報告もあるが^{8,10,24)}、今回のSDS電気泳動による解析結果は、それらとは異なっていた。

生姜プロテアーゼは、個々のカゼイン構成タンパク質を分解できるにもかかわらず、スキムミルクに作用させると κ -カゼインが優先的に分解されるのは、カゼインがミセル構造をとっているためとの仮説を立て、カゼイ

ンミセルの可溶化や人工ミセル化の影響を検討した (Fig. 4)。

ミセルを可溶化したスキムミルクのSDS電気泳動パターンは、未処理のスキムミルクのそれと同じであったが (レーン2とレーン4)、生姜プロテアーゼを作用させると、 κ -カゼインだけでなく、 α -カゼインや β -カゼインもかなり分解を受けていた (レーン3とレーン5)。

カゼインナトリウムに生姜プロテアーゼを作用させると、可溶化スキムミルクと同様の分解パターンを示した (レーン5とレーン8)。一方、未分解のカゼインナトリウムとミセル化したカゼインナトリウムの泳動パターンに差異はなかったが (レーン6とレーン7)、ミセル化したカゼインナトリウムに生姜プロテアーゼを作用させると、 κ -カゼインのバンドは消失したままであるが、 α -カゼインと β -カゼインのバンドは残存するようになった (レーン9)。以上のことから、カゼインはミセルを形成することにより、ミセルの外側を覆っている κ -カゼインが生姜プロテアーゼによって選択的に分解され、形式的にはレンネットによる牛乳の凝固と同様、不安定となったカゼインミセル同士が凝集する可能性が考えられた²⁵⁾。

レンネットによる牛乳の凝固は2つの相からなり、一次相では κ -カゼインの選択的分解、二次相では不安定となったカゼインミセルが疎水性相互作用により凝集するとされている²⁶⁾。レンネット凝固の場合、酵素分解後、処理乳の温度を高めると疎水性相互作用が促進されてゲル強度が高くなることが報告されており^{14,26)}、生姜ミルクプリンの破断応力におよぼすスキムミルク温度の影響を検討したところ、Fig. 5に示したように、スキムミルク温度が高くなると破断応力も大きくなる傾向があり、生姜プロテアーゼによる牛乳の凝固にも、不安定となったミセル間の疎水性相互作用が関与している可能性が考えられた。

著者らは、産地別の生姜搾汁のプロテアーゼ活性も測定した¹⁷⁻¹⁹⁾。先述のように、同一産地の生姜でも測定値の変動が大きく、産地によるものなのか生姜個体によるものなのか考慮する必要はあるが、プロテアーゼ活性と凝固能の間に必ずしも相関はなく、凝固能のない生姜搾汁を作用させても κ -カゼインは切断されていた¹⁷⁻¹⁹⁾。したがって、生姜搾汁による牛乳の凝固にとって、 κ -カゼインの分解は必要条件であっても十分条件ではないと思われた。

生姜プロテアーゼは、システインプロテアーゼの一種であり¹⁾、著者らもシステインの共存が生姜プロテアーゼの凝固能におよぼす影響について検討したが、プロテアーゼの活性維持には有効でも、凝固能のない生姜に凝固能を付与するものではなかった¹⁹⁾。

アスコルビン酸にもジンジベインの活性維持作用^{2,7)}や凝固能を高めるとの報告があり¹⁾、今回、著者らも凝

固能のない千葉県産ひね生姜と凝固能を有する熊本県産生姜のプロテアーゼ活性におよぼすアスコルビン酸添加の影響を検討し、結果を Table 1 に示した。

凝固能のない千葉県産生姜搾汁のプロテアーゼ活性は、アスコルビン酸共存の有無にかかわらず低かったが、凝固能のある熊本県産生姜搾汁では、アスコルビン酸が共存するとプロテアーゼ活性が高まった。さらに、反応停止に用いるトリクロロ酢酸の濃度を変えると、凝固能のない千葉県産生姜では、20 分後の吸光度に変化はほとんどなかったが、凝固能を有する熊本県産生姜では、アスコルビン酸存在下ではトリクロロ酢酸濃度が低くなると活性がほぼ倍増した (Table 2)。これは、凝固能のある生姜の場合、アスコルビン酸共存下では分解過程で生じるペプチドの分子量が小さく、トリクロロ酢酸濃度が高いと、これら分子量の小さいペプチド類も沈殿するために上清の吸光度が低くなるが、トリクロロ酢酸濃度が低いと分子量の小さなペプチド類は上清に残存するため吸光度が高まるものと考えられた。一方、凝固能のない生姜の場合は、分解ペプチドの分子量が大きいため、トリクロロ酢酸濃度にかかわらず沈殿画分に移行し、プロテアーゼ活性が低くなると考えられた。なお、別の時期に購入した千葉県産ひね生姜は凝固能を有しており、熊本県産生姜と同様の挙動を示した¹⁹⁾。

Fig. 7 に、生姜搾汁を添加して調製したミルクプリン播漬物上清のゲルろ過パターンを示したが、アスコルビン酸未添加の場合は、ゲルろ過の排除領域にも溶出する成分が認められたのに対し、アスコルビン酸が共存する場合は、ほとんどが低分子量領域に溶出していた。このことは、上清画分に限定された結果であることに留意する必要はあるが、Table 2 の結果を支持するものと考えられる。

生姜ミルクプリンの微細構造を走査型電子顕微鏡で観察した結果を Fig. 8 に示した。レンネットゲルと生姜ミルクプリンの微細構造を比較すると (Fig. 8a と b)、生姜ミルクプリンでは、カゼインミセルによる三次元的ネットワークが形成されているが、レンネットゲルよりも空隙の多い構造を呈していた。一方、0.4% アスコルビン酸共存生姜ミルクプリン (Fig. 8c) では、レンネットゲルよりもさらに密でしっかりとしたネットワーク構造となっていた。Nishimura らも、アスコルビン酸共存下では、生姜ミルクプリンの空隙の直径が未添加の 35.1 μm から 23.8 μm に低下し、より密なネットワーク構造を形成するためにゲル強度が増加することを報告しており¹⁾、今回の走査型電子顕微鏡観察の結果と一致していた。

V. 要約

中国では、加温した牛乳に生姜の絞り汁を加えて固めたミルクプリン (薑汁撞奶; Jiang Zhi Zhuang Nai) がデ

ザートとして食されている。今回、生姜搾汁によるスキムミルクの凝固過程について検討したところ、以下のことが明らかとなった。

- 1) 豆乳に生姜搾汁を加えても凝固せず、生姜ミルクプリンには牛乳に特異的な現象であった。
- 2) カゼイン構成タンパク質の α -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインは、単独では生姜プロテアーゼによって分解を受けるが、乳中ではミセル構造をとるために、見かけ上、レンネットと同様、 κ -カゼインが選択的分解された。
- 3) アスコルビン酸は、生来、牛乳凝固能を有する生姜搾汁による分解ペプチドの低分子量化を促進した。
- 4) 走査型電子顕微鏡によるゲルの微細構造観察の結果、生姜ミルクプリンではレンネットゲルよりも空隙の多い構造を示していたが、アスコルビン酸が共存すると、レンネットゲルよりも緻密なネットワーク構造をとることが示された。

VI. 謝辞

本研究の実施にあたり、実験に協力いただいた本学学芸学部食品栄養学科卒業生の浅野一美氏、鈴木理恵氏、小西亜紀奈氏、中川西藍氏、赤松志乃氏、伊藤梨恵氏、佐久間愛美氏、山口温子氏、渡辺愛穂氏に御礼申し上げます。

VII. 引用文献

- 1) Kimio Nishimura and Masahiro Goto, Identification of the protease involved in and the effects of vitamin C on gel formation in ginger milk pudding (Jiang Zhi Zhuang Nai). *J. Home Econ. Jpn.*, **61**, 463-471 (2010)
- 2) 山本誠子, 奥村麻里, 大場智美, 為積沙奈絵, 松岡博厚, 良質な乳カード形成にむけての生姜搾汁の牛乳凝固性についての研究. *日本調理科学会誌*, **42**, 309-314 (2009)
- 3) 星 祐二, ショウガ搾り汁による牛乳の凝固について. 2009 年度日本家政学会東北・北海道支部第 54 回研究発表会講演要旨
- 4) 市川芳江, 佐々初世, 道喜美代, ショウガたん白分解酵素の分離精製. *栄養と食糧*, **26**, 377-383 (1973)
- 5) Kozo Ohtsuki, Kuniko Taguchi, Kenji Sato and Makoto Kawabata, Purification of ginger protease by DEAE-Sepharose and isoelectric focusing. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1243**, 181-184 (1995)
- 6) Kyung H. Choi, Richard A. Laursen and Karen N. Allen, The 2.1 Å structure of a cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*. *Biochemistry*, **38**, 11624-11633 (1999)

- 7) Pitaya Adulyatham and Richard Owusu-Apenten, Stabilization and partial purification of a protease from ginger rhizome (*Zingiber officinale Roscoe*). *J. Food Sci.*, **70**, C231-234 (2005)
- 8) Hou-Pin Su, Mei-ju Huang and Han-Tsung Wang, Characterization of ginger proteases and their potential as a rennin replacement. *J. Sci. Agric.*, **89**, 1178-1185 (2009)
- 9) X. W. Haung, L. J. Chen, Y. B. Luo, H. Y. Guo and F. Z. Ren, Purification, characterization, and milk coagulating properties of ginger proteases. *J. Dairy Sci.*, **94**, 2259-2269 (2011)
- 10) Malik Muhammad Hashim, Dong Mingsheng, Muhammad Farooq Iqbal and Chen Xiaohong, Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, **72**, 458-464 (2011)
- 11) 山田徳広, 生姜汁による牛乳ゲルの形成に及ぼす牛乳種の影響. 帝塚山大学現代生活学部紀要, 第10号, 49-56 (2014)
- 12) 山田徳広, 生姜汁による牛乳ゲルの形成に及ぼす牛乳種の影響 (第2報). 帝塚山大学現代生活学部紀要, 第11号, 7-12 (2015)
- 13) 山田徳広, 生姜プロテアーゼによる牛乳ゲルの調製におよぼす牛乳の種類と成分の影響. 日本食生活学会誌, **26**, 79-84 (2015)
- 14) 山田徳広, 永島伸浩, 志垣 瞳, 稲熊隆博, 生姜汁を用いた牛乳ゲルの形成について. 日本食品保蔵科学会誌, **41**, 111-115 (2015)
- 15) 小出 薫, 食品用原料としてのカゼイン. *New Food Industry*, **27**, (6), 69-74 (1987)
- 16) Anne-marie Knoop, Ernst Knoop and Arnold Wiechen, Sub-structure of synthetic casein micelles. *J. Dairy Res.*, **46**, 347-350 (1979)
- 17) 相澤真美, 浅野一美, 鈴木理恵, ショウガプロテアーゼの牛乳凝固作用について (第1報). 2006年度宮城学院女子大学学芸学部食品栄養学科卒業論文 (指導教員: 星 祐二)
- 18) 小西亜紀奈, 中川西藍, 赤松志乃, ショウガプロテアーゼの牛乳凝固作用について (第2報). 2007年度宮城学院女子大学学芸学部食品栄養学科卒業論文 (指導教員: 星 祐二)
- 19) 伊藤梨恵, 佐久間愛美, 山口温子, 渡辺愛穂, ショウガプロテアーゼによる牛乳凝固作用について. 2008年度宮城学院女子大学学芸学部食品栄養学科卒業論文 (指導教員: 星 祐二)
- 20) "Milk Powder Production"
https://www.rotronic.com/media/news/files/1466670855_FF-Milk-Powder.pdf (参照 2023-09-06)
- 21) Sultan Mahomud, Nakako Katsuno and Takahisa Nishizu, Role of whey protein-casein complexes on yoghurt texture. *Reviews in Agricultural Sci.*, **5**, 1-12 (2017)
- 22) 上野川修一, 蛋白分解酵素によるカゼイン分解の機構. 日畜会報, **52**, 627-638 (1981)
- 23) Fan Jin-bo, Hou Yu, Huang Xun-wen, Zhou Su-zhen LV Chang-xin, Feng Xu-quio, The curd process and related mechanism of ginger protease. *Food and Fermentation Industries*, **40**, 60-65 (2014)
- 24) Kaoru Sato, Kenya Goto, Azusa Suzuki, Takayuki Miura, Motoi Endo, Kazuo Nakamura and Morimasa Tanimoto, Characterization of a milk-clotting enzyme from *Hericiumu erinaceum* and its proteolytic action on bovine caseins. *Food Sci. and Technol. Res.*, **24**, 669-376 (2018)
- 25) 上野川修一, 清水 誠, 1983年, 乳タンパク質の機能特性—特に構造との関連を中心に—. 食品タンパク質の科学—化学的性質と食品特性—, 山内文男編著, 食品資材研究会, 東京, 153-168
- 26) 仁木良哉, 鴫田昌之, レンネットゲルの物性. *New Food Industry*, **30**, (4) 33-45 (1988)