農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

豆腐破断応力と11Sグロブリンジスルフィド結合蛍光標識強度

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 農業・食品産業技術総合研究機構 公開日: 2019-12-20 キーワード: 作成者: 門間, 美千子, 矢ヶ崎, 和弘, 羽鹿, 牧太 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002692

報　文

豆腐破断応力と11Sグロブリンジスルフィド結合蛍光標識強度

門間　美千子§，矢ヶ崎　和弘*，羽鹿　牧太**

食品総合研究所，*長野県中信農業試験場，**作物研究所

Relationship between rupture stress of tofu and labeling intensity of disulfide bonds in 11S globulin proteins

Michiko Momma§, Kazuhiro Yagasaki*, Makita Hajika**

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba Ibaraki 305-8642
*Nagano Chushin Agricultural Experiment Station, 1066-1, Sougatokoo, Shiojiri, Nagano 399-6461
**National Institute of Crop Science, 2-1-18 Kannondai, Tsukuba Ibaraki 305-8518

Abstract

Ability of tofu-gel formation is one of the most important qualities of soybeans. Tofus were prepared from 11 varieties of soybean with $MgCl_2$ and "nigari", a conventional tofu-coagulant, and the relationship of tofu gel strength to fluorescence labeled intensity of disulfide bonds in protein was examined. Nigari-coagulated tofus prepared from eight varieties showed higher rupture stress by more than 40% compared to $MgCl_2$-coagulated ones, which would be attributed to the difference of concentration of $MgCl_2$. Among them, four varieties including Sachiyutaka and Tamahomare lacked subunit Ⅱ a of 11S globulin. Fluorescence labeling of disulfide bonds indicated that labeled intensity of acidic polypeptides of 11S globulin significantly correlated to the rupture stress of nigari-coagulated tofu.

豆腐ゲル形成性は大豆の重要な品質要因のひとつであり，ゲル強度から求めた豆腐破断応力がゲル形成性の指標となっている．大豆蛋白質のゲル形成については数多くの研究が行われ[1,2,3]，そのメカニズムとして，蛋白質が加熱変性し，疎水結合を主力として線状会合体を形成し，続いてジスルフィド結合による分岐状会合体からネットワーク構造をつくることが明らかになっている[4]．11Sグロブリン（グリシニン）は多量のジスルフィド結合をもち、豆腐ゲル形成における重要性が初期の精製蛋白質を用いた研究からも指摘されている[5]．我々はこれまでに，SH基に特異的な蛍光色素モノブロモバイメイン(mBBr)[6) 7)]を用い，11Sグロブリン由来ジスルフィド結合の蛍光標識強度と，グルコノデルタラクトン凝固充填豆腐の破断応力の間に正の相関関係があることを見出した[8]．本研究では，豆腐加工適性試験や食品加工の現場で広く使用されている，塩化マグネシウムおよびにがりを凝固剤として豆腐を調製し，これらの豆腐で11Sグロブリン各ポリペプチドのジスルフィド結合標識強度が豆腐加工適性評価の指標となりうるか検討した．

実験方法

1．実験材料

作物研究所（茨城県つくば市）の圃場で平成14年に栽培した大豆11品種（シロセンナリ，タチユタカ，タ

2006年10月1日受付，2006年12月21日受理
§連絡先 (Corresponding author) michiko@affrc.go.jp

チナガハ，エンレイ，ゆめみのり，納豆小粒，Harosoy，タマホマレ，サチユタカ，フクユタカ，すずおとめ）を供試材料とした。大豆豆腐加工適性試験におけるコントロールとして市販白目大豆を使用した.

2．SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

分析用試料として大豆10gを小型粉砕機（柴田SCM40-A）で30秒間粉砕後，60メッシュの篩にかける操作を４回繰り返し試料粉末とし，使用時まで－20℃で保存した。粉末試料500mgを10mlの100mM HEPES-NaOH (pH7.0)とともにヒスコトロン（日音医理科 NS-50）で１分間ホモジナイズした後，10,000×gで20分間遠心した．上清をさらに10,000×gで20分間遠心分離し，この上清を試料溶液とした．Laemmliの方法[9] に従い，5-20%グラジエントゲル(PAGEL　NPG-520L, アトー)を用いて20mA定電流で90分間泳動した．泳動後のゲルをクーマジーブリリアントブルーR-250により染色した.

3．豆腐調製と破断応力の測定

大豆100gに３倍量の水を加え，室温で15時間浸漬後，大豆の重量を測定し，乾燥重量の６倍となるように水を加えた．これをミキサーで１分間磨砕した後，ガーゼで豆乳を絞りとり，湯煎で10分間加熱後氷冷した．豆乳60mlを100mlのガラスビーカーに入れ，これに最終濃度0.3%の塩化マグネシウム六水和物（0.18g/0.6ml），または市販のにがり（井藤漢方製薬“天然にがり”Mg 1520 mg, Ca 3.4 mg, Na 665 mg, K 331 mg, Zn 47μg/100ml）3.6mlを加え混合し，70℃で60分加熱凝固した．各品種の豆乳からそれぞれの凝固剤で三点ずつの豆腐を調製した．豆腐のゲル強度を卓上型物性測定器(山電TPU-2S)により測定した．ビーカー壁面へのゲル付着の影響をさせるため、充填豆腐の中央部分の２箇所に約２cmの間隔を空けて直径８mmのプランジャーを毎秒2.5mmの速度で17mm貫入して破断強度を測定し，その平均値から破断応力を求めた.

4．蛍光色素標識によるジスルフィド結合の検出

粉末試料500mgを抽出用緩衝液（１mMフェニルメタンスルホニルフルオライド(PMSF), 0.02%アジ化ナトリウム, 30mMトリス緩衝液，pH7.9）10mlとともにヒスコトロン（日音医理科 NS-50）で１分間ホモジナイズした後，10,000×gで20分間遠心した．上清をさらに10,000×gで20分間遠心分離し，この上清を試料溶液とした．試料溶液10μlを，0.5mMジチオスレイトール(DTT)を含む緩衝液（30mMTris-HCl, pH7.9）に添加し、室温で20分おき，ジスルフィド結合を還元した．次に，20mMmBBrを５μl加え，室温で15分間おき，100mMβ-メルカプトエタノールを10μl，20%SDSを5μl加え反応を停止し，0.005%ブロモフェノールを含む80%グリセロールを添加した．コントロールとして，還元処理をしていない試料を同様にmBBrで標識した．mBBr標識試料を，5‐20％ポリアクリルアミドゲル（アトーパジェル520L）を用いて，90分間20mA定電流で電気泳動した．各ゲルで毎回同一試料（品種：エンレイ）を泳動し，ゲル間の蛍光強度の誤差を補正した．泳動後のゲルを，脱色液（40%（v/v）メタノール，10%（v/v）酢酸）中で２時間浸とうし，過剰なmBBrを除いた後，365nmのトランスイルミネータ上で標識蛋白質を検出し，バンドの蛍光強度を画像解析装置（バイオラッドモレキュラーイメージャー，ゲルドック1000）により計測した．蛍光標識実験は３回行い平均値をとった.

実験結果および考察

1．にがりおよび塩化マグネシウム凝固豆腐の破断応力

試料大豆11品種から，塩化マグネシウムとにがりで凝固させた豆腐を調製し破断応力を測定した（図１）．再現性を確認するために市販の白目大豆をコントロールに使用した．シロセンナリ，エンレイ，フクユタカ，すずおとめの豆腐は，いずれの凝固剤でも安定した凝固性を示した．エンレイのにがり凝固豆腐の破断応力が非常に高く，7Sグロブリンのαおよびα’サブユニットを欠失した品種ゆめみのりの豆腐破断応力が低かった．８品種でにがり豆腐の破断応力が高く，サチユタカ（にがり凝固で塩化マグネシウム凝固の2.54倍），タマホマレ（同1.72倍），エンレイ（同1.59倍）で差が大きかった．タチナガハ（1.37倍）やHarosoy（1.41倍）でもやや差が大きかった．サチユタカ等の品種では，豆腐破断応力が最大値を示す至適凝固条件に要する塩化マグネシウムの濃度が高いことが報告されている[10]．今回の実験で，にがり凝固の場合に添加した塩化マグネシウム量は、六水和物換算で0.46gと塩化マグネシウム単品よりかなり高かったことが原因と考えられる.

実験に使用した11品種の大豆の蛋白質組成を図２に示した．レーン１から12が豆腐の調製に用いた大豆で，レーン13から16が，11Sグロブリン変異大豆系統である．大豆11Sグロブリンは酸性および塩基性ポリペプチドから構成され，グループⅠ（$A_{1a}B_{1b}$, A_2B_{1a}, $A_{1b}B_2$）とグル

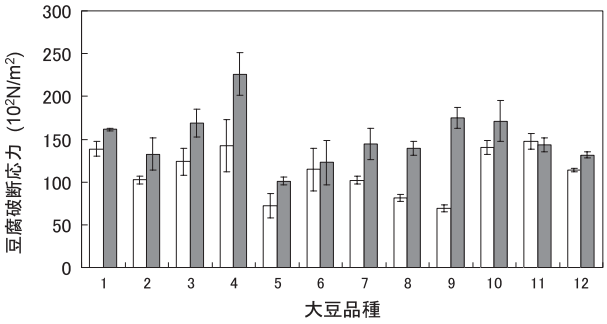

図１　塩化マグネシウムおよびにがり凝固豆腐の破断応力

□，塩化マグネシウム；　■，にがり
1 シロセンナリ；2 タチユタカ；3 タチナガハ；4 エンレイ；5 ゆめみのり；6 納豆小粒；7 Harosoy ；8 タマホマレ；9 サチユタカ；10 フクユタカ；11 すずおとめ；12 市販白目大豆（コントロール）
豆腐破断応力の標準偏差をバーで示した

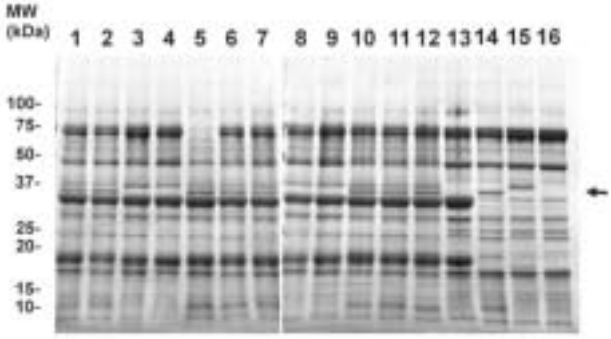

図２　大豆11品種の蛋白質組成

1 シロセンナリ；2 タチユタカ；3 タチナガハ；4 エンレイ；5 ゆめみのり；6 納豆小粒；7 Harosoy；8 タマホマレ；9 サチユタカ；10 フクユタカ；11 すずおとめ；12 市販白目大豆（コントロール）；13 11S変異大豆100（Ⅱa,bを欠失）；14 11S変異大豆010（Ⅰ，Ⅱbを欠失）；15 11S変異大豆001（Ⅰ，Ⅱaを欠失）；16 東山205号(11S全欠失)
← 11SグロブリンⅡaサブユニット

ープⅡa, b（A_5 A_4B_3, A_3B_4）の５種類のサブユニットが同定されている[11]．グループⅡサブユニットは，グループⅠサブユニットに比べて，等電点が酸性側にあることや，熱安定性が高いことが明らかにされている[12)13)]．豆腐破断応力に顕著な差が見出された５品種のうち，タチナガハ，エンレイ，タマホマレ，サチユタカの４品種において，11Sグロブリン酸性ポリペプチドのうち，Ⅱa成分由来のバンドが欠失していた．前報で11Sグロブリン変異大豆系統で同様の実験を行ったところ，11SサブユニットⅠあるいはⅡのどちらかが欠失している系統で，豆腐破断応力の差が大きかった[14]．本研究においても，11Sグロブリンが，サブユニットⅠ，ⅡaおよびⅡb成分からなるときは，豆腐破断応力の差は小さいが，サチユタカ等，サブユニットが一部欠失し，蛋白質成分が多様性に欠けると，破断応力の差が大きくなるという傾向があった．豆腐ゲル形成において変性温度や等電点の性質の異なる11Sグロブリン成分が混在することで，安定した物性の豆腐が形成されるのではないかと考えられた．ゆめみのりはアレルゲン性を低減するために,7Sグロブリンのαおよびα’サブユニットを欠失させた品種である．豆腐ゲルの形成には11Sグロブリンの寄与が大きいことから，ゆめみのりの豆腐破断応力はさほど影響を受けないものと予想された．しかし，図１に示したように，ゆめみのりでの豆腐ゲル破断応力は他の品種に比べて著しく低く，変性温度の低い7Sグロブリンの存在が安定した豆腐破断応力を確保するために必要と考えられた．

２．蛍光色素標識によるジスルフィド結合の検出

これまでに，グルコノデルタラクトン凝固充填豆腐において，11Sグロブリンのジスルフィド結合特異的な蛍光色素mBBrによる標識強度と豆腐破断応力の間に相関関係があることを示した[8]．グルコノデルタラクトン凝固は再現性がよく実験が容易であるが，豆腐の食味は，塩化マグネシウムやにがり凝固の方が優れている．そこで，塩化マグネシウムおよび市販にがり液を凝固剤として豆腐を調製し，ジスルフィド結合蛍光標識強度と豆腐物性の関係を検討した．１．で使用した大豆について11Sグロブリン成分の相対的標識強度と豆腐の破断応力をプロットしたが顕著な相関関係は認められなかった．次に，一般的に豆腐加工に利用される成分組成，形態の大豆として，ゆめみのりおよび納豆小粒以外の９品種について再検討した．その結果，にがり凝固豆腐において，11Sグロブリン酸性ポリペプチドのジスルフィド結合蛍光標識強度と豆腐の破断応力に正の相関関係（$r=0.89$，$p<0.005$）が見られた（図３）．7S成分の一部を欠失するゆめみのりと，極小粒の納豆小粒では，ジスルフィド標識強度が５以上の高い値を示したが，豆腐破断応力は中程度であった．以上のことから，塩化マグネシウムによる凝固の場合，グルコノデルタラクトンに比べると，11Sグロブリンジスルフィド結合の蛍光標識強度から物性の予測をすることは困難であるが，凝固条件によっては可能性があるものと考えられた．

前報で11Sグロブリン変異大豆の，11Sグロブリンの

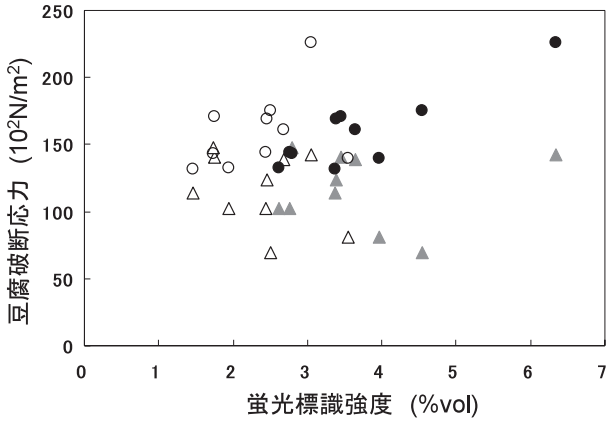

図３　11Sグロブリン各サブユニットのジスルフィド蛍光標識強度と豆腐の破断応力

塩化マグネシウム凝固豆腐　▲ 11Sグロブリン酸性ポリペプチド；△ 11S塩基性ポリペプチド：にがり豆腐　● 11Sグロブリン酸性ポリペプチド ○ 11Sグロブリン塩基性ポリペプチド

ジスルフィド結合標識強度と豆腐破断応力に関係を検討し，正の相関関係があることを示した[14]．変異大豆においても，11Sグロブリンサブユニット成分のバランスが，凝固性に関与していることが示唆された．サチユタカ，エンレイ，タマホマレは豆腐加工適性で評価が分かれることの多かった品種である[10) 15)]．今後，豆腐物性予測による加工適性評価法を開発している上で，蛋白質サブユニット成分組成の影響を考慮していく必要がある．

要　約

豆腐ゲル形成特性は大豆の重要な品質要因のひとつである．11品種の大豆から，塩化マグネシウムおよびにがりを用いて豆腐を調製し，ジスルフィド結合蛍光標識強度と豆腐破断応力の関係を検討した．８品種の大豆で，塩化マグネシウム濃度の高いにがり豆腐で，高い破断応力を示し，特にサチユタカ，タマホマレでそれぞれ2.54倍，1.72倍の違いがあった．これらの破断応力の差の大きい４品種の大豆で11SグロブリンのⅡa成分が欠失していた．にがり凝固豆腐では，11Sグロブリン酸性ポリペプチドのジスルフィド蛍光標識強度と豆腐破断応力の間に正の相関関係があり，ジスルフィド蛍光標識による豆腐物性予測の可能性が示唆された．

文　献

1）Mori, T., Nakamura, T., Utsumi, S., Gelation mechanism of soybean 11S globulin: Formation of soluble aggregates as transient intermediates. *J. Food Sci*., **47**, 26-30 (1981).

2）Ono, T., Katho, S., Mothizukki, K., Influences of calcium and pH on protein solubility in soybean milk. *Biosci., Biotech., Biochem*., **57**, 24-28 (1993).

3）Fukushima, D., Recent progress in research and technology on soybeans. *Food Sci. Technol. Res*., **7**, 8-16 (2001).

4）Kohyama, K., Sano, Y., Doi, E., Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (soybean curd). *J. Agric. Food Chem*., **43**, 1808-1812 (1995).

5）Saio, K., Kajikawa, M., Watanabe, T., Food Processing Characteristics of soybean proteins. Part Ⅱ Effect of sulfhydryl groups on physical properties of tofu-gel. *Agric. Biol. Chem*., **35**, 890-898 (1971).

6）O'Keefe, D. O., Quantitative electrophoretic analysis of proteins labeled with monobromobimane. *Analytical Biochemistry*, **222**, 86-94 (1994).

7）Wong, J. H., Yano, H., Lee, Y.-M., Cho, M.-J., Buchanan, B. B., Identification of thioredoxin-linked proteins by fluorescence labeling combined with isoelectric focusing / sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol*., **347**, 339-349 (2002).

8）門間美千子，関友子，羽鹿牧太，蛍光色素モノブロモバイメイン標識による大豆タンパク質ジスルフィド結合の解析，日本食品科学工学会誌，**51**, 406-412 (2004).

9）Leammli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).

10）Toda, K., Ono, T., Kitamura, K., Hajika, M., Takahashi, K., Nakamura, Y., Seed protein content and consistency of tofu prepared with different magnesium chloride concentrations in Japanese soybean varieties. *Breeding Sci*., **53**, 217-223 (2003).

11）Nielsen, N. C., The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc*., **62**, 1680-1686 (1985).

12）Mori, T., Maruyama, N., Nishizawa, K., Higasa, T., Yagasaki, K., Ishimoto, M., Utsumi, S., The composi-

tion of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum determines the transport pathways of soybean seed storage proteins. *The Plant Journal*, **40**, 238-249 (2004).

13) Lakemond, C. M. M., de Jongh, H. H. J., Gruppen, H., Voragen, G. J., Differences in denaturation of genetic variants of soy glycinin. *J. Agric. Food Chem*., **50**, 4257-4281 (2002).

14) 門間美千子，矢ヶ崎和弘，11Sグロブリン変異大豆における豆腐加工適性とシスルフィド結合蛍光標識，食品総合研究所報告，**70**，13-17 (2006).

15) 平春枝，国産大豆の品質特性とその変動要因の解明，日本食品科学工学会誌，**39**, 122-133 (1992).