

報文

11Sグロブリン変異大豆における豆腐加工適性とジスルフィド結合蛍光標識

門間 美千子[§], 矢ヶ崎 和弘^{*}

食品総合研究所, *長野県中信農業試験場

Quality evaluation of 11S globulin-mutant soybean for tofu preparation

Michiko Momma and Kazuhiro Yagasaki

National Food Research Institute, *Nagano Chushin Agricultural Experiment Station

Abstract

In order to estimate the involvement of disulfide proteins and composition of 11S globulins in the strength of tofu gel, tofu was prepared from genetic variants of 11S globulin with MgCl₂ and "Nigari", a conventional tofu-coagulant. Nigari-coagulated tofu showed higher rupture stress than MgCl₂-coagulated ones in 6 lines of soybean among the 8 variants. In the result of fluorescent labeling of disulfide bonds in 11S globulin, it was found that fluorescence intensity of acidic and basic polypeptides of 11S globulin significantly correlated to the rupture stress of tofu coagulated by Nigari, while no significant relationship was observed in MgCl₂-coagulated tofu.

大豆は良質な蛋白質を含み、さまざまな健康機能が期待されることから、日本人の食生活において重要な位置を占めている。豆腐は大豆の食品用途の代表的なもので、我が国で消費される食品用大豆の約半分が豆腐加工に使用されている。豆腐に加工することにより、有害成分が除去され、タンパク質の消化性が改善されるとともに、調理が容易になり、油あげ等の二次加工用途も広がる。豆腐加工において、安定なゲルの形成性が重要な品質要因となる。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をつくり、これに水素結合が補ってネットワーク構造をつくること明らかにされている^{4, 5)}。我々は前報⁶⁾で、蛍光色素標識法^{7, 8)}を用い、11Sグロブリンのジスルフィド結合蛍光標識強度が、グルコノデルタラクトンで凝固した充填豆腐の破断応力と相関

することを示した。11Sグロブリンは分子量300~380kDaの6量体蛋白質で、それぞれのサブユニットは酸性および塩基性ポリペプチドから構成されている。これまでに5種類のサブユニットが同定されており、相同性によってグループ (A1aB1b, A2B1a, A1bB2) とグループ (A5 A4B3, A3B4) に分けられる⁹⁾。本研究では、11Sグロブリンのジスルフィド結合と豆腐の物性の関連をさらに明らかにするために、サブユニット成分の異なる変異大豆系統を用い、ジスルフィド結合の蛍光標識強度と豆腐の破断応力の関連を調べた。また、豆腐の加工適性試験や食品加工の現場で広く使用される塩化マグネシウムおよびにがり凝固剤を使用し、凝固剤による豆腐物性の違いを明らかにした。

2005年10月5日受付, 2006年1月10日受理

[§]連絡先 (Corresponding author) michiko@affrc.go.jp

実験方法

1. 実験材料

11S蛋白質変異大豆系統(表1)は長野県中信農業試験場畑作育種部より供与された。これらはタマホマレを5回戻し交配した準遺伝子系統で、東山205号はすべての11Sサブユニットを欠失している。豆腐加工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を小型粉碎機(柴田SCM40-A)で30秒間粉碎後、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300mgを抽出用緩衝液(1mMフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF), 0.02%アジ化ナトリウム, 30mMトリス緩衝液, pH7.9)6ml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。SDS-PAGEはLaemmliの方法¹⁰⁾に従い、10-20%グラジエントゲル(e-T1020L, アトー)を用いて行った。泳動後のゲルをクーマジープリリアントブルー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16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、ガーゼで絞った。豆乳を湯煎で10分間加熱して氷冷した。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(0.18g/0.6ml)、または市販のにがり(井藤漢方製薬“天然にがり”MgCl₂ 1520mg, Ca 3.4mg, Na 665mg, K 331mg, Zn 47μg)3.6mlを加え混合し、70℃で60分加熱後水冷した。それぞれの凝固剤で3点の豆腐を調製し、卓上型物性測定器(山電TPU-2S)により、2カ所のゲル強度を測定し平均値を得た。測定は直径8mmのプランジャーを用い、毎秒2.5mmの速度で17mm貫入して破断強度を測定し破断応力を求めた。

4. 蛍光色素標識によるジスルフィド結合の検出

2.で得られた試料溶液10μlを、0.5mMジチオスレイトール(DTT)を含む30mMトリス緩衝液(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、20mMモノプロモパイメイン(mBBBr)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、さらに80%グリセロールと0.005%プロモフェノールを含むSDS-PAGE試料液を添加した。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mBBBrで標識した。mBBBr標識試料を、分子量マーカー(プレジジョンプロテインスタンダード, バイオラッド161-0362)とともに、5-20%ポリアクリルアミドゲル(アトー-PAGEL 520L)を用いて、80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mBBBr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、バンドの相対的蛍光強度を画像解析装置(バイオラッドゲルドック1000, モレキュラーイメージャー)により計測した。

実験結果および考察

1. 11Sグロブリン変異大豆系統の豆腐破断応力

11Sグロブリン変異大豆系統のSDS-PAGEパターンを図1に示した。今回使用した大豆は、タマホマレを戻し交配した系統で、東山205号はすべての11Sサブユニットを欠失している。このようなサブユニット成分の

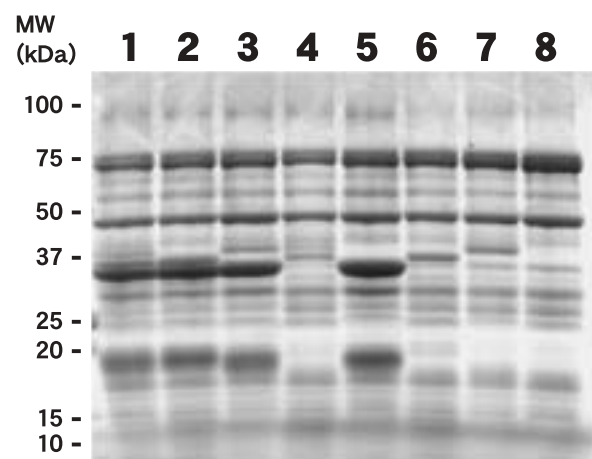


図1 11Sグロブリン変異大豆のSDS-PAGEパターン

レーン1, 111; レーン2, 110; レーン3, 101; レーン4, 011; レーン5, 100; レーン6, 010; レーン7, 001; レーン8, 東山205号

表1. 11Sグロブリン欠失大豆のサブユニット構成

11S蛋白質のサブユニット構成			
系統名		a	b
111	+	+	+
110	+	+	-
101	+	-	+
100	+	-	-
011	-	+	+
010	-	+	-
001	-	-	+
東山205号	-	-	-

+ 保有, - 欠失

一部あるいはすべてを欠失した変異大豆系統は、他の成分要因の影響が少ないため、サブユニット各成分と加工特性の関連を検討するのに適している^{9, 11)}。11Sグロブリン欠失大豆のサブユニット組成は表1のようになっている。豆腐調製の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とし、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2)。その結果、111, 110の2系統では塩化マグネシウムおよびにがり凝固豆腐で破断応力に有意な差は見られなかったが、それ以外の系統ではにがり凝固豆腐の方が高い破断応力を示した。特に、011, 010, 100等、あるいはaのいずれかが欠失しているもので差が大きかった。塩化マグネシウムとにがりでの破断応力の差と11Sサブユニット成分のバランス(とaおよびb)に着目すると、100(にがり凝固で塩化マグネシウム凝固の1.77倍)での差は101(1.52倍)や110(有意差なし)より大きく、011(2.23倍)は010(1.88倍)や001(1.41倍)より大きかった。つまり、11Sサブユニット成分を含有している系統では、bが欠失している系統、aが欠失している系統、a, bがどちらも欠失している系統の順に凝固剤に対する反応性の差が増大した。一方、サブユニット成分がないときは、bがある系統、aがある系統、aおよびbがどちらも存在する系統の順に凝固剤に対する反応性の差が増大した。これらのことから、11Sサブユニットと、サブユニットaおよびbの間の違いが大きいと凝固剤に対する反応性の差が増大する傾向が認められた。Todaら¹²⁾はサチユタカ等の品種では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を示している。本実験のにがり凝固における塩化マグネシウム終濃度は、塩化マグネシウム凝固の約3分の1である

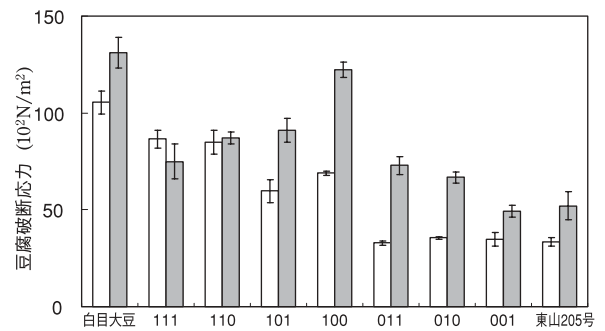


図2 11Sグロブリン変異大豆における塩化マグネシウムおよびにがり凝固豆腐の破断応力、塩化マグネシウム; にがり

ことから、図2での凝固剤による豆腐破断応力の差は、サブユニットの構成やにがりに混在する塩などによるものと推察される。

本研究ではタマホマレ品種から育成された系統を用いたが、11Sグロブリンaサブユニットを欠失した品種エンレイでも同様の変異大豆系統が得られている。このエンレイ由来変異大豆系統で塩化マグネシウムを凝固剤として豆腐物性を調べ、11Sグロブリンサブユニット成分のうち、b(A₃B₄)サブユニット成分の増加に伴い豆腐ゲルの破断応力が増大すると報告されている¹¹⁾。これらの塩化マグネシウム凝固豆腐において110および101系統では、100系統より高い豆腐破断応力を示し、11Sグロブリン微量成分が豆腐の物性に影響を与えることが明らかとなっている。Moriら¹³⁾は7Sおよび11Sサブユニット変異大豆系統を用い、11Sグロブリンのグループサブユニットの等電点はグループより酸性側にあることを示している。また、Lakemondら¹⁴⁾はグループサブユニットがグループより熱安定性が高いことを明らかにしている。これまでに加工特性評価実験によく用いられる塩化マグネシウムと、加工の現場で使用されるにがりでの凝固特性の違いについてはほとんど知られていなかったが、今後これらのサブユニット成分の等電点や熱安定性等の化学的性質と、凝固剤への反応性の関連についてさらに詳細に検討していく必要がある。

2. 蛍光色素標識による豆腐物性の推定

図3に11S変異大豆におけるジスルフィド結合と豆腐の破断応力の関係を示した。塩化マグネシウム凝固豆腐では有意な相関関係は見られなかったが、にがり凝固豆腐では、11Sグロブリンの酸性および塩基性ポリペ

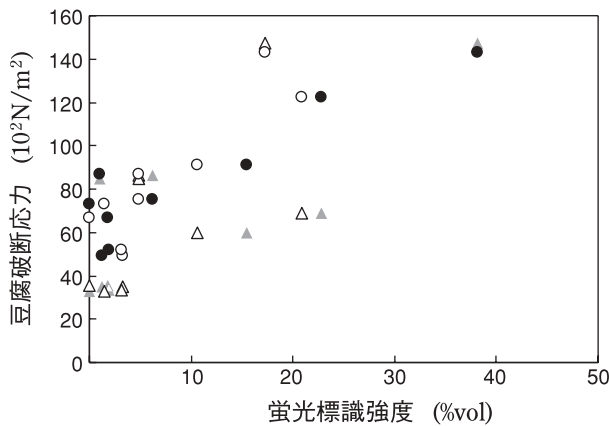


図3 11Sグロブリン変異大豆におけるジスルフィド蛍光標識強度と豆腐の破断応力の関係
塩化マグネシウム凝固豆腐, 11Sグロブリン酸性ポリペプチド; , 11S塩基性ポリペプチドにがり凝固豆腐, グロブリン酸性ポリペプチド, 11S塩基性ポリペプチド

ブチドのジスルフィド蛍光標識強度と、豆腐の破断応力の間には正の相関関係（相関係数0.83および0.86, $P < 0.01$ ）が示された。これまでに、精製蛋白質を用いた研究から^{5),15)}, 11Sグロブリンのジスルフィド結合がゲル強度に深く関与することが知られている。また、前報において、国産大豆33品種を用い、11Sグロブリンの酸性および塩基性ポリペプチドのジスルフィド結合蛍光標識強度と、グルコノデルタラクトン凝固豆腐の破断応力が、正の相関関係（相関係数0.39および0.69）にあることを明らかにした⁶⁾。本研究において、食品加工でよく用いられるにがりで凝固させた豆腐で、11Sグロブリンのジスルフィド結合と豆腐ゲルの破断応力の関係がより明確に示されたことから、ジスルフィド結合蛍光標識法を大豆の豆腐加工適性評価の指標とする可能性が示された。

要 約

豆腐ゲルの形成においてタンパク質ジスルフィド結合の解裂再会合は重要な役割を果たしている。これまでに蛍光色素標識法を用い、11Sグロブリンのジスルフィド結合とグルコノデルタラクトン凝固充填豆腐の破断応力との相関関係を示した。本研究では、凝固剤として塩化マグネシウムとにがりを使用し、11Sグロブリン変異大豆系統を用いて、ジスルフィド結合蛍光色素標識による豆腐物性予測の可能性を検討した。実験に用いた8系統の大豆のうち6系統で、にがりでの凝固

性が高い傾向が認められた。塩化マグネシウム凝固豆腐ではジスルフィド蛍光標識強度と豆腐の破断応力に有意な相関はなかったが、にがり凝固豆腐では11Sグロブリン酸性および塩基性ポリペプチドの蛍光標識強度と豆腐破断応力の間には、相関係数0.83および0.86 ($P < 0.01$) の正の相関関係がみられた。これらのことから、にがり凝固豆腐において11Sグロブリンのジスルフィド結合を蛍光色素法で解析することにより、豆腐の加工適性を評価する可能性が示された。

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 Effect of sulfhydryl groups on physical properties of tofu-gel, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 890-898 (1971).
- 6) 門間美千子, 関友子, 羽鹿牧太, 蛍光色素モノプ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).
- 7) O'Keefe, D. O., Quantitative electrophoretic analysis of proteins labeled with monobromobimane, *Anal. Biochem.*, **222**, 86-94 (1994).
- 8) 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).
- 9) Nielsen, N. C., The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1680-1686 (1985).

- 10) Leammli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 11) Yagasaki, K., Yamada, N., Takahashi, R., Takahashi, N., Growth habit and tofu processing suitability of soybeans with different glycinin subunit composition, *The Hokuriku Crop Sci.*, **34**, 126-128 (1999).
- 12) 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).
- 13) Mori, T., Maruyama, N., Nishizawa, K., Higasa, T., Yagasaki, K., Ishimoto, M., Utsumi, S., The composition of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum determines the transport pathways of soybean seed storage proteins, *The Plant J.*, **40**, 238-249 (2004).
- 14) 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)
- 15) Adachi, M., Chunying, H., Utsumi, S., Effect of designed sulfhydryl groups and disulfide bonds into soybean proglycinin on its structural stability and heat-induced gelation, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5717-5723 (2004).

