

豆腐中油の安定化機構の解明

小野伴忠*・和田崇寛・今井敦子

岩手大学農学部

The Structure of Tofu for Preventing the Change of Lipid

Tomotada ONO, Takahiro WADA and Atsuko IMAI

Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550

ABSTRACT

The tofu (soybean curd), which is a traditional food in Japan & China, includes 38% lipid and 52% protein in dry matter. The lipid in the curd is extremely stable against oozing and oxidation by cooking and storing. Thus the tofu is an important food source for a stable lipid supply. Soy milk was prepared from the soybean ground with water, heated, and filtered. We have already proposed that the soy milk proteins consist of particulate and soluble proteins. The particulate protein is made up of mainly basic peptide (B) of 11S globulin and β subunit of 7S globulin. The soluble protein is made up of acidic peptide (A) of 11S, α and α' subunits of 7S. The tofu was made from soy milk by the addition of CaSO_4 or glucono- δ -lactone (GDL) as coagulants. The protein and lipids from tofu were extracted by the addition of urea or guanidine hydrochloride (GuHCl) as a denaturant with or without 2-mercaptoethanol. The proteins extracted from tofu were up to 40% even by the addition of 8M urea or 5M GuHCl without 2-mercaptoethanol. The yield of lipids was also low. In the presence of 2-mercaptoethanol, yield of both protein and lipid increased to 100% with each denaturant. The composition of extracted proteins was analyzed with SDS-PAGE. Proteins liberated from tofu, in turn, A, α and α' , and β and B with increasing denaturants. These results indicate that oil body particle covered with oleosin in tofu is packed with three protein layers, that is, oleosin, protein particles (mainly B and β), and soluble proteins (A, α and α'). Therefore, the lipid of tofu is extremely stable against oozing and oxidation by cooking and storing. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 42-47, 2004.

Key words : tofu, oil-body, proteins of tofu, structure of tofu

*〒020-8550 盛岡市上田三丁目18-8

大豆はたん白質約35%、脂質約20%、糖質約35%を含む優れた穀物である。大豆の中性脂質は常温で黄色の液体であり、リノール酸、リノレン酸といった多価不飽和脂肪酸のトリグリセリドを約60%含んでいる。このため酸化され易く、各種大豆製品では脂質の酸敗に注意する必要がある。しかし、豆腐は煮たり焼いたりしても油が出てくることはなく、沢山の空隙がある凍豆腐も空気に曝されているにもかかわらずほとんど酸化臭がない。これは大豆の脂質に含まれるトコフェノールの抗酸化作用も1つの要因ではあるが、豆腐は調理をしても脂質が遊離しないことから、脂質がたん白質等に囲まれることによって安定化しているためではないかと考えられる。

これまで豆乳の脂質とたん白質との関係について次の様な研究が行われてきた。Onoら¹⁾およびGuoら²⁾は、大豆を水で磨砕した生豆乳では脂質がたん白質と結合し巨大粒子を形成しているが、加熱すると脂質のほとんどが遊離するとともに新たなたん白質粒子が形成されることを報告した。このたん白質粒子は7Sの β と11Sのベーシックペプチドが主体となり、7S、11Sを含んだ中心粒径80 nmの会合体である。その他のたん白質は可溶性の会合体を形成していると考えられている。加熱により遊離した脂質は、中心粒径300 nmの油滴球で、ほぼオイルボディと同様の形態を取っていることが分かっている。

Guoら³⁾およびOno⁴⁾は豆乳に塩化カルシウムを添加して豆腐を製造する際に脂質が豆腐カードに取り込まれる機構について次のように報告するとともに、豆腐カード形成機構のモデルを提案した。豆乳に塩化カルシウムが添加されると、油滴球（粒径約300 nm）にたん白質粒子（粒径80 nm）が結合して互いに会合が始まり、さらにpH低下により可溶性のたん白質がその会合体に凝集し、豆腐カードの脂質たん白質複合体ネットワークが形成されると推測した。

そこで、本研究では脂質、たん白質が凝集して形成された豆腐カードについて、たん白質変性剤を段階的に添加し豆腐を溶解し、遊離してくるたん白質と脂質を調べることにし、豆腐カード中でたん白質がどのように脂質を取り囲み、安定化しているかを検討した。

材料と実験方法

材 料

大豆は岩手大学付属農場で生産したスズユタカを4℃で冷蔵しておき必要に応じて使用した。貯蔵は1

年以内とした。

豆腐試料の調製

大豆を超純水（MQ水）に4℃で18時間浸漬後、大豆の6倍重量のMQ水を加え、磨砕した。これを脱脂綿濾過し、生豆乳を得た。生豆乳を95℃以上で5分間加熱し、豆乳を得た。豆乳に凝固剤として0.3%のグルコノ- δ -ラクトンもしくは硫酸カルシウムを添加し、80～85℃の恒温槽で1時間加熱しカードを形成させた。これを冷却後、3,000 rpm、10分間の遠心分離後豆腐（沈殿）を薬さじで細粒化したものを凍結乾燥し、豆腐試料とした。

豆腐試料の尿素と塩酸グアニジンによる溶解

豆腐試料のたん白質を溶解するために2-メルカプトエタノールの存在、非存在下で、尿素と塩酸グアニジンをそれぞれ0～8および0～5 M添加し、可溶化してきたたん白質および脂質を分析した。

豆腐溶解液の分析

豆腐溶解液をBeckman Allegra64R遠心機、Beckman F1010ローターを用いて25,000rpm（53,105×g）で20℃、30分間の高速遠心分離を行い、浮遊、上澄、沈殿の3画分に分画した。遊離脂質量は浮上画分に分画された脂質量、遊離たん白質量は上澄液中のたん白質量として求めた。たん白質濃度はBradford法で測定し、脂質濃度は、浮上画分を0.03% NaClに分散し、その濁度より求めた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

遊離したたん白質の組成はLaemmli法によるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により行った。泳動後の染色および脱色は、Blakesley & Boeji⁵⁾の方法で行い、泳動ゲルは乾燥後、スキャナーでそのパターンをコンピューターに取り込み、Scion画像処理ソフトを用いてたん白質サブユニットの相対濃度比を求めた。

結 果

尿素添加によりCaSO₄-豆腐から遊離するたん白質および脂質

CaSO₄-豆腐に2-メルカプトエタノール存在および非存在下で尿素を段階的に添加した場合の脂質（クリーム画分）およびたん白質の遊離量を2-メルカプトエタノール存在下で尿素8 M添加で遊離する量を100として、割合で示した。Fig. 1Aに示すように、尿素を2～8 Mと添加していくにつれて遊離するたん白質量は40%まで増加した。2-メルカプトエタノール存在下では、遊離たん白質量は非存在下での遊離量の2倍以上

の値となった。これは、S-S結合がカード形成に重要な役割を演じていることを示している。

Fig. 1Bに遊離クリーム画分量を示す。尿素濃度が2~8 Mと増加するに従い、クリーム画分の遊離量は増加した。2-メルカプトエタノールの効果は尿素4 M以上の添加で大きく、2倍以上の脂質が遊離した。たん白質の遊離量が脂質の遊離量と同様の挙動を示すことから、たん白質の遊離が脂質の遊離を可能にするものと考えられる。

Fig. 2Aに2-メルカプトエタノール非存在下で段階的に尿素処理し遊離したたん白質のSDS-PAGEパターンを示す。尿素無添加、即ち豆腐中で可溶化している成分として11SのアシディックペプチドおよびA5やベーシック7Sやその他のホエーたん白質が確認され、尿素2 M添加で7S成分の α サブユニットが、尿素4 M添加で α 、 α' 、 β サブユニットの遊離が確認された。尿素8 M添加では11Sのベーシックペプチドおよび7Sの β サブユニットがより鮮明に確認された。

Fig. 2Bに2-メルカプトエタノール存在下で遊離したたん白質の組成を示す。2-メルカプトエタノール存在下では11Sのアシディックペプチドがより鮮明に確認され、A5やベーシック7Sやその他のホエーたん白質も確認された。尿素4 M添加では7S成分の α 、 α' サブ

ユニットがはっきりと確認され、尿素4~6 M添加で7Sの β サブユニットと11S成分のベーシックペプチドの遊離が確認された。

7S成分の α 、 α' サブユニットは尿素の添加により遊離してくることから、疎水結合や水素結合で豆腐ゲルと結合しているものと考えられる。また、11S成分のアシディックペプチドは変性剤がなくても遊離した。これはアシディックペプチドには親水性アミノ酸が多いことによると考えられる。また、2-メルカプトエタノールの添加でアシディックペプチドのバンドが濃く現れることから、アシディックペプチドは豆腐カードにS-S結合を介して結合していると推測される。ベーシックペプチドは尿素を高濃度にしても遊離量が少なく不鮮明なバンドだったが、2-メルカプトエタノールの添加で遊離してきたことから、その結合には疎水結合や水素結合だけでなくS-S結合も関与しているものと考えられる。

塩酸グアニジン添加によりCaSO₄-豆腐から遊離するたん白質と脂質

2-メルカプトエタノール非存在下および存在下で、塩酸グアニジンを段階的に添加した場合のCaSO₄-豆腐から遊離するたん白質および脂質量を調べた。遊離したたん白質量は2-メルカプトエタノール存在下で塩酸

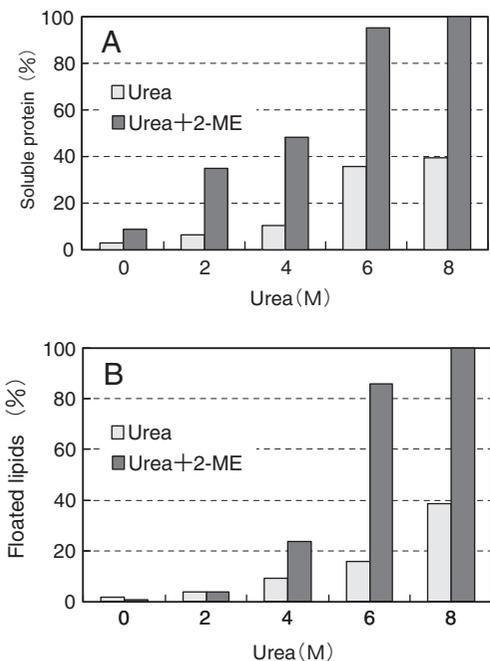


Fig. 1. The liberated protein (A) and lipids (B) from CaSO₄-tofu by adding urea in the absence and presence of 2-mercaptoethanol.

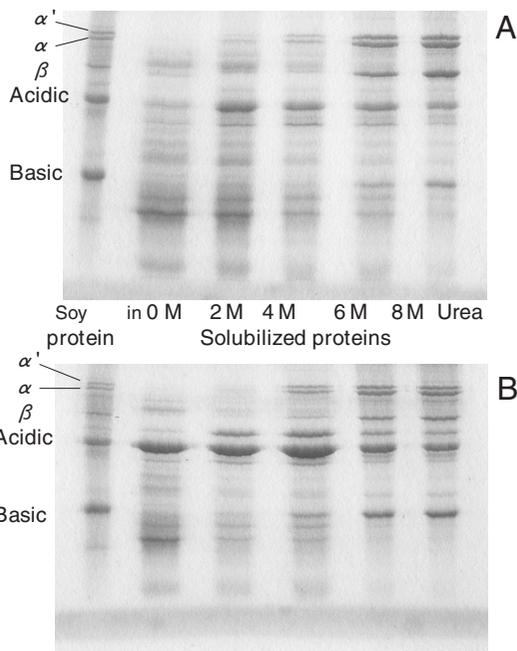


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of the liberated proteins from CaSO₄-tofu by adding urea in the absence (A) and presence (B) of 2-mercaptoethanol.

グアニジン4 M添加したときの遊離量を100としてあらわした。Fig. 3Aに遊離たん白質量を示す。塩酸グアニジン1~4 Mと添加していくにつれ遊離たん白質量は増加したが、2-メルカプトエタノール非存在下では全たん白質量の2割程度しか遊離しなかった。2-メルカプトエタノール存在下では2 M添加で非存在の5倍以上、4 Mで100%となった。

Fig. 3Bに遊離脂質（クリーム画分）の量を示す。2-メルカプトエタノール非存在下では塩酸グアニジン添加でクリーム画分の遊離量は4 Mまで徐々に15%程度まで増加し、5 M添加で50%近くまで増加した。2-メルカプトエタノール存在下では、たん白質遊離量と同様に1 M添加では16%だったが2 M添加で100%にまで急激に増加した。

Fig. 4Aに2-メルカプトエタノール非存在下で段階的に塩酸グアニジン処理し遊離したたん白質のSDS-PAGEパターンを示す。塩酸グアニジン1 M添加で11Sのアシディックペプチドが鮮明に確認できた。2 M添加で7Sの α 、 α' 、 β サブユニット、11Sのベーシックペプチドがさらに確認された。添加量4 M以上でベーシックペプチドがより鮮明となった。

Fig. 4Bに2-メルカプトエタノール存在下で遊離したたん白質のSDS-PAGEパターンを示す。塩酸グアニジン1 M添加で11Sのアシディックペプチドの割合が高

く、7Sの α サブユニットもわずかであるが確認できた。2 M、3 M添加でも1 Mとほぼ同様であった。4 M添加では7Sの α 、 α' β サブユニット、11Sのアシディックペプチド、ベーシックペプチドが確認できた。5 M添加ではバンドが不鮮明でアシディックペプチドとベーシックペプチドしか確認できなかった。これはSDS-PAGEの泳動用試料中に沈殿ができ、泳動できなかったことによると考えられる。

尿素添加によりGDL-豆腐から遊離するたん白質と脂質

GDL（グルコノ- δ -ラクトン）-豆腐に2-メルカプトエタノール存在および非存在下で尿素を段階的に添加した場合の脂質（クリーム画分）およびたん白質の遊離量を2-メルカプトエタノール存在下で尿素8 M添加で遊離する量を100として、Fig. 5Aに示す。尿素を2~8 Mと添加したが遊離するたん白質量は20%までしか可溶化しなかった。2-メルカプトエタノール存在下では、遊離たん白質量は非存在下の遊離量の5倍以上の値となった。これは、CaSO₄-豆腐の場合と同様にS-S結合がカード形成に重要な役割を演じていることを示している。

Fig. 5Bに遊離クリーム画分量を示す。尿素濃度4 Mで10%、8 Mで30%とクリーム画分の遊離量は少なかったが、2-メルカプトエタノール存在下では、尿素4 Mで30%、6 Mで100%となった。たん白質の遊離量が

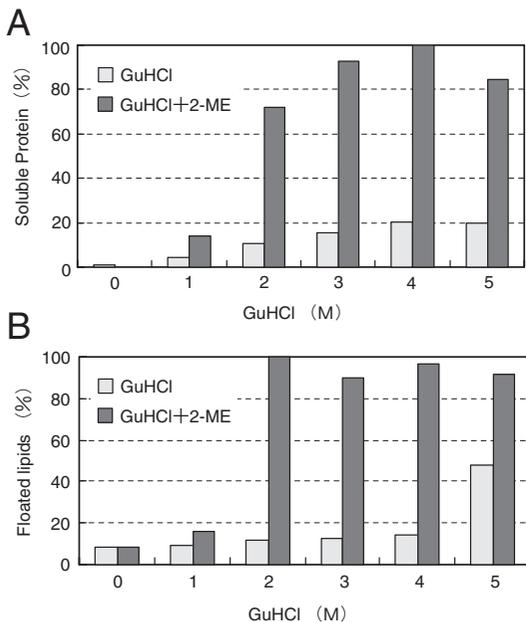


Fig. 3. The liberated protein (A) and lipids (B) from CaSO₄-tofu by adding GuHCl in the absence and presence of 2-mercaptoethanol.

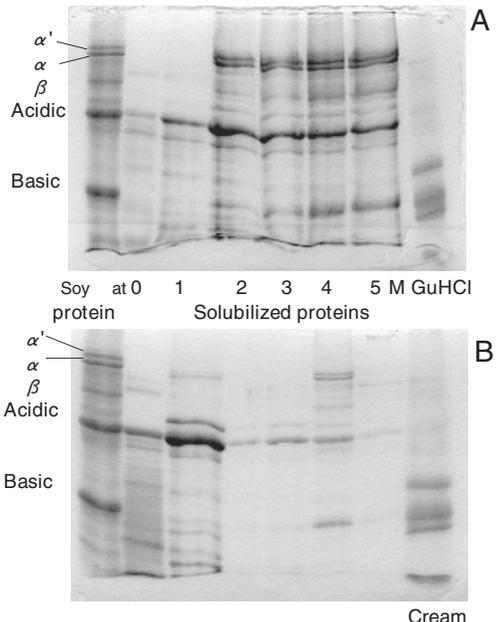


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of the liberated proteins from CaSO₄-tofu by adding GuHCl in the absence (A) and presence (B) of 2-mercaptoethanol.

50%に達した6 Mで脂質のほとんどが遊離した。S-S結合の切断とたん白質の遊離が脂質の遊離を可能にするものと考えられる。

Fig. 6Aに2-メルカプトエタノール非存在下で段階的に尿素処理し遊離したたん白質のSDS-PAGEパターンを示す。尿素無添加、即ち豆腐中で可溶化している成分として11SのアシディックペプチドおよびA5やベーシック7S、その他ホエータン白質が確認され、尿素2 M添加で7S成分の α サブユニットが、4 M添加で α 、 α' 、 β サブユニットの遊離が確認された。6 M添加では11Sのベーシックペプチドおよび7Sの β サブユニットがより鮮明に確認された。

Fig. 6Bに2-メルカプトエタノール存在下で遊離したたん白質の組成を示す。2-メルカプトエタノール存在下では11Sのアシディックペプチドがより鮮明に確認され、A5やベーシック7Sも確認された。尿素4 M添加では7S成分の α 、 α' サブユニットがはっきりと確認され、尿素6~8 M添加で7Sの β サブユニットと11S成分のベーシックペプチドが鮮明に確認された。

11S成分のアシディックペプチドは変性剤がなくても遊離した。これはアシディックペプチドには親水性アミノ酸が多いことによると考えられる。また、2-メルカプトエタノールの添加でアシディックペプチドのバンドが濃く現れることから、アシディックペプチド

の一部は豆腐カードにS-S結合を介して結合していると推測される。7S成分の α 、 α' サブユニットはある程度の尿素の添加により遊離することから、疎水結合や水素結合で緩く豆腐ゲルと結合しているものと考えられる。またベーシックペプチドは尿素を高濃度にしても遊離量が少なく不鮮明なバンドだったが、2-メルカプトエタノールの添加で遊離してきたことから、その結合には疎水結合や水素結合だけでなくS-S結合も関与しているものと考えられる。

考 察

疎水結合、水素結合さらにイオン結合を切断する尿素と塩酸グアニジン (GuHCl) を段階的に添加し、豆腐より溶出してくるたん白質および脂質を調べた。一般的なたん白質がほぼ変性する尿素8 M、GuHCl 5 Mを添加してもたん白質の20~40%しか溶出せず、脂質もほぼ同様であった。ジスルフィド結合を切断する2-メルカプトエタノールを添加するといずれの豆腐も多量のたん白質を遊離させ、尿素では8 Mで、GuHClでは3~4 Mでほぼ100%溶解した。脂質の遊離もたん白質とほぼ同様の傾向を示した。CaSO₄-豆腐とGDL-豆腐での変性剤に対する違いは見られなかった。2-メルカプトエタノールだけでは11Sのアシディックペプチ

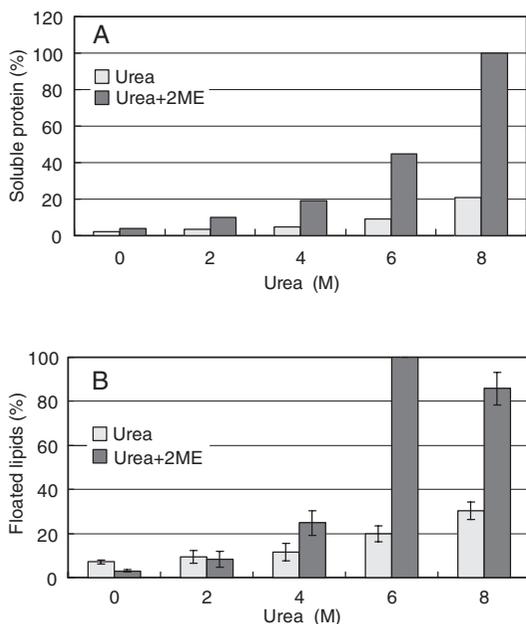


Fig. 5. The liberated protein (A) and lipids (B) from GDL-tofu by adding urea in the absence and presence of 2-mercaptoethanol.

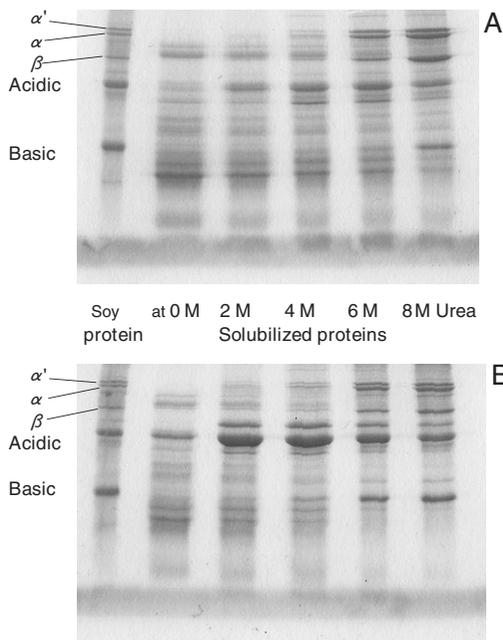


Fig. 6. SDS-PAGE patterns of the liberated proteins from GDL-tofu by adding urea in the absence (A) and presence (B) of 2-mercaptoethanol.

ドのバンドがよりはっきり見られるのみで、他のたん白質や脂質は遊離しないことから、豆腐カードの保持には疎水結合や水素結合などが主要な役割をしていて、S-S結合はカードをよりしっかりしたものにするのに関与しているものと考えられる。

変性剤が低濃度で遊離するものほどカードの外側に位置するものと考え、油滴球を核として、11Sのベーシックペプチド、7Sの β サブユニット、次に α' 、

α サブユニット、外側にアシディックペプチドが結合しているものと考えられる。豆乳から豆腐形成のメカニズムと合わせて考えると、油滴球には先ずベーシックペプチドと β サブユニットを多く含むたん白質粒子が結合し、その周りに可溶性たん白質である α' 、 α サブユニットやアシディックペプチドが結合しているものと考えられる。

要 約

硫酸カルシウムとグルコノ- δ -ラクトンで調製した豆腐について脂質の安定化機構について変性剤による可溶化実験を行い、次のような結果を得た。①尿素、塩酸グアニジンのみでは20~40%のたん白質脂質の遊離しか見られず、2-メルカプトエタノールの存在ではほぼすべてが溶解した。②たん白質の遊離は、11Sのアシディックペプチド、7Sの α 、 α' 、7Sの β 、11Sのベーシックペプチドの順で遊離した。③グルコノ- δ -ラクトンと硫酸カルシウムで調製した豆腐のたん白質と脂質と遊離パターンに違いは見られなかった。以上のことを豆腐形成のメカニズムと合わせ考えると、脂質はベーシックペプチドと β サブユニットを含むたん白質粒子に覆われ、その周囲に可溶性たん白質である α' 、 α サブユニット、さらにアシディックペプチドの順で覆われ、それらがジスルフィド結合によってより強固な構造体となっていると考えられる。

文 献

- 1) Ono T, Rak Choi M, Ikeda A and Odagiri S (1991): Changes in the composition and size distribution of soymilk protein particles by heating. *Agric Biol Chem*, **55**, 2291-2297.
- 2) Guo ST, Ono T and Mikami M (1997): Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature. *J Agric Food Chem*, **45**, 4601-4605.
- 3) Guo ST, Ono T and Mikami M (1999): Incorporation of soy milk lipid into protein coagulum by addition of calcium chloride. *J Agric Food Chem*, **47**, 901-905.
- 4) Ono T (2000): The mechanisms of curd formation from soybean milk to make a stable lipid food. *Proceedings of ISPUC- III*, 51-52.
- 5) Blakesley RW and Boezi JA (1977): A new staining technique for proteins in polyacrylamide gel using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem*, **82**, 580-582.