油揚げ生地の伸展に關与する SH 基・S-S 結合交換反応†

橋 詰 和 宗*・池 田 徹**・斎 尾 恭 子*

The Relationship of SH and S-S Exchange Reaction to the Expansion of Tofu-gels for Aburaage-making

(Studies on Aburaage-making Part II)

Kazumoto HASHIZUME*, Toru IKEDA** and Kyoko SAIO*

* National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kannondai, Yatabe-machi, Tukuba-gun, Ibaraki, 305

** Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 210

The mechanism of less expansion of Tofu-gels by excess-heating was investigated. The main results are as follows; (1) The expansion of Tofu-gels was inhibited by blocking or oxidizing reagents for SH groups in soybean proteins, whereas it was accelerated by reducing reagents for S-S bonds. The facts suggest that SH groups take an important role in the expansion of Tofu-gels. (2) The Tofu-gels could not expand considerably when prepared from soybean protein solutions where either SH groups were oxidized into S-S bonds or S-S bonds were reduced into SH groups. On the other hand, Tofu-gels prepared by mixing two soybean protein solutions expanded well. It suggests that SH and S-S exchange reaction is certainly involved in the mechanism of expansion of Tofu-gels. (3) The expansion rate of Tofu-gels markedly decreased by heating soybean protein solution under the conditions, where the proteins easily associated or aggregated. On the contrary the expansion rate rapidly increased by mercaptoethanol or high urea concentration due to the protein dissociation. It suggests that the association or aggregation of proteins by excess-heating may prevent Tofu-gel from the expansion.

(Received Nov. 1, 1983)

長時間加熱した豆乳を原料にした油揚げは、伸び率が著しく減少する。前報¹⁾で、その主な原因は、豆乳に含まれている空気が減少し、生地の中に油で揚げたときに沸騰石の役割をはたす気泡ができなくなるためであることを明らかにした。しかし豆乳を長時間加熱した場合には、空気を十分に補っても伸び率は完全には回復しなくなる。これは油揚げの伸びを抑える要因が、豆乳中の空気

量の減少以外にも存在していることを示している。大豆たんぱく質は加熱によって会合²⁾³⁾するが、特に豆乳のようにイオン強度の比較的高いものでは加熱による会合が促進される。³⁾ 油揚げ生地の伸展の際にはたんぱく質分子間にずれが起こると思われるが、この場合、強く会合したたんぱく質より、ゆるく会合したたんぱく質の方がずれやすいと考えられる。したがって、加熱によるたん

† 油揚げ製造に関する研究 (第2報)

* 農林水産省食品総合研究所 (〒 305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)

** 味の素中央研究所 (〒 210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1)

ばく質の会合と、油揚げの伸び率の低下の間にはなんらかの関係があるものと思われる。

一方、豆腐⁴⁵⁾、凍豆腐⁶⁾、大豆たんぱく質ゲルの高温伸展⁷⁾において、SH基は重要な役割を果たしていることが知られており、油揚げの製造においてもSH基が重要な役割を果たしていることが考えられる。

本報では、油揚げ生地伸展の際のSH基とS-S結合の役割、および加熱によるたんぱく質の会合と伸び率の低下の関係を明らかにするため、豆乳の代わりに大豆酸沈殿たんぱく質溶液を用いて試験を行った。

試料と実験方法

1. 試料

未変性脱脂大豆(味の素株式会社製)から、水抽出、酸沈殿、水洗して得た酸沈殿たんぱく質を、水に懸濁し、これに水酸化ナトリウム溶液を加え、pH 7.0にて溶解した酸沈殿たんぱく質溶液(たんぱく質濃度 2.5%)を試料とした。なお、加熱時のイオン強度を豆乳に近づけるため、⁸⁾ 特に言及しないかぎり塩化ナトリウムを最終濃度で 0.1 M 加えた。

2. 実験方法

(1) 加熱方法

たんぱく質溶液を試験管に入れ、前報と同じ方法で加熱した。加熱条件は特に言及しないかぎり、100°C 10 分間とした。

(2) SH基試薬と尿素の添加

加熱したたんぱく質溶液に、SH基封鎖剤としてN-エチルマレイミド(NEM)、酸化剤として臭素酸カリウムをそれぞれ 10^{-4} ~ 3×10^{-3} M 添加、S-S還元剤としてメルカプトエタノール(ME)を 10^{-4} ~ 10^{-2} M 添加、水素結合解裂剤として尿素を 0.1~1.5 M 添加した。なおMEを添加する場合には、MEの添加効果を明白にするため、たんぱく質溶液は、加熱後冷却した後空気を十分に混入させ、1夜冷蔵庫に放置してSH基をできるだけ酸化させた。

(3) SH基の酸化と還元

塩化ナトリウム無添加で加熱したたんぱく質溶液それぞれに、ジチオスレイトール(DTT)を 10^{-2} M、臭素酸カリウムを 10^{-2} M 加え、1夜冷蔵庫に放置した後、0.1 M 塩化ナトリウム溶液を用い、セファデックス G-50 でゲルろ過した。

(4) たんぱく質溶液の濁度の測定

加熱したたんぱく質溶液に、塩化ナトリウムが 0.1 M 添加されている場合はそのまま、無添加の場合は塩化ナ

トリウムを 0.1 M 添加して pH を 7.0 にそろえた後、1夜冷蔵庫に放置し、600 nm の透過光度を測定した。

(5) たんぱく質溶液の尿素とメルカプトエタノール処理

無加熱、塩化ナトリウム無添加または 0.1 M 添加して加熱したたんぱく質溶液に、尿素を 6 M または 8 M、ME を 0 または 10^{-2} M 加え、1夜冷蔵庫に放置した後、0.1 M 塩化ナトリウム溶液を用いセファデックス G-50 でゲルろ過した。無加熱たんぱく質溶液はウレアーゼを含む⁸⁾ため尿素の添加で pH が上昇した。そのため 5 N 塩酸にて添加後とゲルろ過前に pH を調整した。

(6) GDLゲルの調製と堅さの測定

前報¹⁾に従った。ただし、GDL(グルコノデルタラクトン)の添加量は 8 ml たんぱく質溶液当たり、5% GDL 溶液を 0.25 ml とした。

(7) 油揚げ生地の調製、揚げの操作と伸び率の測定

前報¹⁾に従った。ただしたんぱく質溶液は、空気を十分に含ませるため冷却後振とうを行った。塩化カルシウムの添加量は、20 ml たんぱく質溶液に 1 M 塩化カルシウム溶液を 0.4 ml 加えた。

結果と考察

1. 油揚げ生地の伸びにおよぼすSH基試薬の添加効果

加熱たんぱく質溶液に、NEM と臭素酸カリウムを、それぞれ 10^{-4} ~ 3×10^{-3} M 加えて生地をつくり、油揚げすると Fig. 1 のような伸び率を示した。SH基封鎖剤、酸化剤とも添加量が多くなるにしたがい、伸び率は減少し、NEM では 10^{-3} M、臭素酸カリウムでは 3×10^{-3} M で油揚げはほとんど伸びなくなった。このようにSH基が

Fig. 1 Expansion of Aburaage effected by sulfhydryl reagents

○ N-ethylmaleimid, ● KBrO₃

Fig. 2 Expansion of Aburaage effected by mercaptoethanol

封鎖あるいは酸化によって減少した場合には、油揚げ地の伸びは完全に抑えられた。これは油揚げ地の伸び、すなわち豆腐が油中で加熱され、発生した水蒸気によって膨張する¹⁾には、SH 基の存在が不可欠であることを示している。

加熱たんぱく質溶液を冷蔵庫に放置して SH 基を減少させた後、ME を 10^{-4} ~ 10^{-2} M 添加して生地をつくり、油揚げにすると Fig. 2 のような伸び率を示した。SH 基を減少させたたんぱく質の油揚げの伸び率は小さいが、これに ME を添加すると増加し、 10^{-3} M 添加では 4 倍に達した。しかしこれより添加量が増加すると伸び率は低下し、 10^{-2} M ではまったく伸びなくなった。

このように、ME を添加して S-S 結合を還元すると油揚げ地の伸展は起こりやすくなった。これは、伸展の際のたんぱく質間のずれに必要と思われる SH 基が増加するほか、生地を構成しているたんぱく質ゲルが S-S 結合で強く結合しているより、S-S 結合が切断されてゆるく結合している方がずれが起こりやすく、伸展が容易になることを示していると思われる。実際、 10^{-3} M 程度の ME 添加によって、油揚げはゴムマリのよう球状に膨れ、上から押してある程度の成形をしないと伸び率の測定ができなくなった。ME 添加量がさらに増加すると生地は軟らかくなり、発生した水蒸気を包み込んでおくことができなくなって、水蒸気の散逸が起こり伸び率は著しく低下し、ついには油中で原形を保てなくなり崩壊した。このような現象は NEM を添加した場合にも認められた。

2. 油揚げ地の伸びにおよぼす尿素の添加効果

加熱たんぱく質溶液に尿素を 0~1.5 M 添加して生地をつくり、油揚げにすると Fig. 3 のような伸び率を示し

Fig. 3 Expansion of Aburaage effected by urea

た。尿素添加により、揚げの状態は無添加のものとは異なり、油から上げると伸展したままの形を保っていることができず、著しい収縮が起こった。そのため伸び率の測定は、 180°C の油で行った。

尿素の添加により生地は軟らかくなり、伸び率は増加したが、尿素濃度がさらに増加すると、水蒸気の散逸が起こり、伸び率は低下した。このように尿素を添加すると伸び率が增加することは、油揚げ地の伸展に水素結合の切断が関係していることが考えられる。すなわち、油揚げ地の伸展には、ゲルを形成している水素結合が弱められることが必要であると思われる。多量の尿素添加によって伸び率が著しく低下するのは、水素結合の切断によってゲルの結合力が弱まり、水蒸気をゲル中に保持できなくなるためと推定できる。

3. 油揚げ地の伸びに關する SH 基、S-S 結合交換反応

加熱したたんぱく質溶液を、臭素酸カリウムと DTT により酸化と還元を行った。それぞれの SH 基を Elman 法⁹⁾で測定したところ、たんぱく質 1 g 当り、 0.5×10^{-6} mol と 81.5×10^{-6} mol であった。加熱たんぱく質を還元した場合の SH 基含量は、Carter の方法¹⁰⁾で測定した Half cystine の含量¹¹⁾と一致することから、分子表面の S-S 結合はほぼ完全に還元されているものと思われる。これらの酸化および還元たんぱく質を単独で、または混合した後、GDL ゲルと油揚げをつくった。ゲルの堅さと油揚げの伸び率は Fig. 4 に示すようになった。

ゲルの堅さは、SH 基含量 0.5×10^{-6} mol から 17.5×10^{-6} mol (SH と S-S の比率 3:5) まで直線的に増加し

Fig. 4 Expansion of Aburaage and hardness of Tofu-gel effected by sulfhydryl content of protein

● expansion of Aburaage
○ hardness of gel

たが、SH 基が 20×10^{-6} mol (SH と S-S の比率 2:3) 以上になると減少し、さらに SH 基が多く S-S 結合が少なくなると著しく減少した。

油揚げの伸び率は、SH 基含量 0.5×10^{-6} mol では低い値であったが、 1.5×10^{-6} mol から 12.5×10^{-6} mol (SH と S-S の比率 1:27 から 1:3) の範囲で増加してほぼ一定となった。SH 基が 15×10^{-6} mol から 20×10^{-6} mol (SH と S-S の比率 1:2.2 から 2:3.1) になると伸び率はさらに増加したが、SH 基が 30×10^{-6} mol 以上になると減少し、 50×10^{-6} mol ではまったく伸びなくなった。このように、SH 基が増加するにつれて伸び率は著しく増加し、さらに増加すると逆に抑えられたが、この場合の状態は ME を添加したときの伸びの状態と同じであった。

油揚げ生地の伸びには SH 基の存在が不可欠であることは、SH 基の酸化剤や封鎖剤を加えた場合、あるいは酸化処理によって SH 基を減少させると伸び率が著しく低下することから明らかである。一方高濃度の ME 添加、あるいは S-S 結合を還元した場合に伸張が著しく抑えられることから、S-S 結合の存在も油揚げ生地の伸張に不可欠であることが明らかである。このように SH 基が圧倒的に多いたんぱく質、あるいは SH 基がほとんどなく S-S 結合だけのたんぱく質からは伸びる油揚げはできないが、SH 基と S-S 結合が適当な割合で存在する場合には伸張が起こる。これは、油中で加熱されたゲルが水蒸気によって押広げられる際に起こすたんぱく質分子間の

ずれは、SH 基、S-S 結合交換反応が関与していることを示すものである。

たんぱく質分子間の SH 基、S-S 結合交換反応は、微量の亜硫酸塩や ME などの S-S 結合還元剤によって促進¹²⁾¹³⁾される。油揚げの ME 添加による伸び率の増加も、還元剤による SH 基、S-S 結合交換反応促進によるものであると説明できる。また著者らの一人である斎尾は、大豆たんぱく質ゲルの高温下での伸張において⁷⁾、SH 基の反応性の高い 11 S たんぱく質が、7 S たんぱく質より伸張することから、伸張の際に SH 基、S-S 結合交換反応が起こることを推定しているが、これは本実験結果と密接に関連するものである。

GDL ゲルの場合も、SH 基だけのたんぱく質、あるいは S-S 結合だけのたんぱく質からは強いゲルはできず、両者を結合して SH 基と S-S 結合が存在するときに強いゲルができた。この結果はゲル形成の際の S-S 結合生成も、SH 基、S-S 結合交換反応によるものであることを示している。この場合、強いゲルを形成するための SH 基と S-S 結合の比率は、油揚げの正常な伸びが起こる 1:27 の比率では不十分であり、油揚げが異常に伸張する 3:5 の比率が最適であった。強いゲルを形成するために必要な SH 基は、通常の大豆たんぱく質に含まれる SH 基に比べ多いことから、普通、大豆たんぱく質ゲルを形成する場合には、SH 基が多いほど強いゲルが形成されるということができる。

一方、油揚げの場合、少量の SH 基で正常な伸びを示し、この SH 基の値は通常の大豆たんぱく質に含まれる SH 基の範囲内にある。したがって、油揚げの伸びに関する SH 基の量は、ゲル形成における SH 基の量ほど重要でなく、SH 基の不足による伸び率の低下はほとんど起こらないと思われる。なぜなら、SH 基の不足によって油揚げの伸びに異常が現れるより先に、生地（豆腐）の形成の段階で異常が現れると考えられるからである。

4. 油揚げ生地の伸び率の低下におよぼすたんぱく質の加熱による会合の影響

長時間加熱した豆乳から調製した生地を油揚げにしてもまったく伸びないが、加熱によって失われた空気を補うと再び伸びるようになる。しかし伸び率は完全に回復しない。この原因は、加熱によってたんぱく質の会合が進み、揚げの際のたんぱく質間のずれが起こり難い状態になるためと推定できる。これを立証するため、加熱によるたんぱく質の会合と、油揚げの伸びの関係を調べた。

塩化ナトリウム 0.1 M 添加のたんぱく質溶液と無添加のたんぱく質溶液の pH をそれぞれ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5

に調整した後 80~100°C で所定の時間加熱した。加熱後塩化ナトリウム無添加には塩化ナトリウムを 0.1 M 加え、各溶液の pH を 7.0 にそろえた後、会合の程度を

Fig. 5 Turbidity of protein solutions effected by ionic strength and pH in heating
 Δ 80°C 3 min, $\square$ 90°C 3 min, $\blacktriangle$ 100°C 3 min, $\blacksquare$ 100°C 10 min, $\bullet$ 100°C 20 min

Fig. 6 Expansion of Aburaage effected by ionic strength and pH in heating

The symbols are the same as in Fig. 5.

調べるため透過光度を、さらに同じ処理溶液から生地をつくり、油揚げにして伸び率を調べた。

加熱によるたんぱく質溶液の透過光度の変化は Fig. 5 に示すようになった。塩化ナトリウム無添加のたんぱく質溶液では加熱温度、加熱時間が增加しても透過光度はほとんど減少せず、pH が低い場合も減少の程度は少なかった。一方塩化ナトリウムを添加した場合は、加熱による透過光度の減少は著しく、特に pH が低い場合に影響が大きかった。このように透過光度の減少、すなわち濁度の増加は、加熱時の pH が低く、加熱温度が高く、時間が長いほど著しく、また塩化ナトリウムの添加すなわちイオン強度の増加によって著しい影響を受けた。

油揚げの伸び率の変化は Fig. 6 に示すようになった。低い pH で長時間加熱したものほど、また加熱時のイオン強度が高い方が伸び率は減少した。油揚げの伸び率を低下させる条件は、濁度を増加させる条件と同じであり、油揚げの伸び率の低下とたんぱく質の会合の間に密接な関係があることが認められた。

加熱によるたんぱく質の会合と油揚げの伸びの減少の関係をさらに明確にするため以下の実験を行った。たんぱく質溶液を塩化ナトリウム 0.1 M 添加と無添加で、100°C 10 分間加熱をし、尿素と ME 処理をした後生地をつくり、油揚げにすると Table 1 のような伸び率を示した。

無加熱たんぱく質を ME 処理しただけでは生地はできず、したがって油揚げにすることはできなかった。しかし 6 M 尿素処理によって生地ができるようになり、油揚げにした場合大きな伸び率を示した。6 M 尿素と ME 処理、または 8 M 尿素処理により伸び率は最大値に達した。加熱した場合には 6 M 尿素と ME 処理、または 8 M 尿素処理では最大値に達せず、特に塩化ナトリウムの存在下で加熱した場合に伸び率は低い値を示した。8 M 尿素に ME が加わると加熱たんぱく質の油揚げの伸び率も最大値に達し、加熱時の塩化ナトリウムの影響は認められなくなった。

このように、8 M 尿素と ME 処理をした無加熱たんぱ

Table 1 Expansion of Aburaage effected by urea and mercaptoethanol (times)

	untreated	0.01 M ME	6 M urea	6 M urea 0.01 M ME	8 M urea	8 M urea 0.01 M ME
unheated	—	—	8.2	9.3	9.2	9.2
heated (NaCl 0 M)	4.6	5.6	6.2	6.8	7.1	9.3
heated (NaCl 0.1 M)	3.9	4.5	5.4	6.0	6.7	9.3

く質と加熱たんばく質からつくった油揚げは、ほぼ同じ伸び率を示した。この理由は、生のたんばく質、あるいは加熱変性してさらに会合したたんばく質にかかわらず、尿素と ME 処理によりいずれもサブユニットまで切断されるため¹⁴⁾、同じ性質を持つ生地ができるためと考えられる。一方 6 M 尿素と ME、あるいは 8 M 尿素のみでは、加熱たんばく質、特にイオン強度の高い状態で加熱したたんばく質は、サブユニットまで切断されず、会合が残っているため最大値まで達しないものと思われる。無加熱たんばく質では、低い尿素濃度でも、または ME が存在しなくても十分に伸びる生地ができたが、これは加熱による会合とは無関係のためであろう。

これらの結果から、豆乳を長時間加熱した場合に起こる油揚げの伸びの低下は、豆乳中に含まれる空気の減少のほか、たんばく質の加熱による会合も原因であると結論できる。特に豆乳は、大豆に含まれる塩類が溶解しているためイオン強度は高い状態にあり、また pH も中性付近とはいえ酸性側であり、加熱によるたんばく質の会合が促進される条件にあるものと思われる。

要 約

前報に引続き、油揚げ生地の伸びの機構と、豆乳を長時間加熱した場合に伸び率が低下する原因を検討し、以下の結果を得た。

(1) 油揚げの伸びは、SH 基封鎖剤や酸化剤の添加により著しく抑制されたが、低濃度の S-S 還元剤の添加で著しい増大を示し、SH 基が関与していることが明らかになった。

(2) SH 基を酸化してほとんど S-S 結合だけにしたたんばく質と、S-S 結合を還元してほとんど SH 基だけにしたたんばく質それぞれからつくった油揚げはほとんど伸びなかった。しかし両者を混合した場合に大きく伸び、油揚げ生地が伸展する場合のたんばく質間のずれには、SH 基、S-S 結合交換反応が関与していることが明らか

になった。

(3) 油揚げの伸び率は、たんばく質を会合しやすい条件で加熱すると著しく低下した。しかし、加熱により会合したたんばく質をメルカプトエタノールと高濃度の尿素で処理し、会合を解離させると伸び率は著しく増大した。この結果から、豆乳を加熱することによって油揚げの伸び率が減少する原因は、加熱によるたんばく質の会合であることが明らかになった。

文 献

- 1) 橋詰和宗・池田 徹・斎尾恭子: 日食工誌, **31**, 389 (1984).
- 2) WOLF, W. J. and TAMURA, T.: *Cereal Chem.*, **46**, 331 (1969).
- 3) HASHIZUME, K., NAKAMURA, N. and WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1339 (1975).
- 4) SAIO, K., KAJIKAWA, M. and WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 890 (1971).
- 5) 橋詰和宗・前田正道・渡辺篤二: 日食工誌, **25**, 387 (1978).
- 6) HASHIZUME, K., KAKIUCHI, K., KOYAMA, E. and WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 449 (1971).
- 7) SAIO, K., SATO, I. and WATANABE, T.: *J. Food Sci.*, **39**, 777 (1974).
- 8) SMITH and CIRCLE 編, 渡辺篤二・柴崎一雄翻訳監修: 大豆タンパク質, 初版 (建帛社) p. 131 (1974).
- 9) ELLMAN, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959).
- 10) CARTER, J. R.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1705 (1959).
- 11) HASHIZUME, K. and WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 683 (1979).
- 12) HUGGINS, C., TAPLEY, D. F. and JENSEN, E. V.: *Nature*, **167**, 592 (1951).
- 13) CECIL, R. and WAKE, R. G.: *Biochem. J.*, **82**, 401 (1962).
- 14) 橋詰和宗・小原忠彦・安藤洋子: 日食工誌, **25**, 635 (1978).

(昭和 58 年 11 月 1 日受理)