

細菌プロテアーゼによる大豆乳凝集機構の解析とその食品加工への利用

安田正昭*¹・久場恵美¹・橘 信二郎¹・青山みさ子²

¹琉球大学農学部 ²県立長崎シーボルト大学看護栄養学部

Analysis for Mechanism of Soybean-milk-coagulation by Bacterial Protease and Utilization of the Enzyme to the Food Processing

Masaaki YASUDA¹, Megumi KUBA¹, Shinjiro TACHIBANA¹ and Misako AOYAMA²

¹Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Okinawa 903-0213

²Faculty of Nursing and Nutrition, Siebold University of Nagasaki, Nagasaki 851-2195

ABSTRACT

The coagulation of protein in soybean milk by serine proteinase from *Bacillus pumilus* and utilization of the enzyme to the food processing were examined. The ratios of precipitated and 4% TCA soluble nitrogen to the total nitrogen increased with increasing reaction time. In order to elucidate the aspect of protein-degradation in soybean milk by this enzyme, slab-SDS-PAGE was carried out. The α' -, α - and β -subunits in β -conglycinin were degraded gradually. The acidic subunit in glycinin was degraded at an initial stage (0.5 min) and was completely degraded by the time the coagulation began (3 min). However, the basic subunit in glycinin still remained even after 30 min. When the enzyme reacted with the denatured glycinin, precipitation in the reaction mixture occurred, while this phenomenon was not observed in the case of denatured β -conglycinin. Therefore, it was considered that degradation of glycinin played a key part in the coagulation of protein in soybean milk. The amount of detectable sulfhydryl group in soybean milk reached the maximum just before the coagulation. The coagula obtained were completely dissolved in the presence of 0.5% SDS solution without 2-mercaptoethanol. Therefore, it is suggested that hydrophobic interaction played an important role in the coagulation process. Soybean protein curd that was prepared by this enzyme with calcium sulfate was firm, and it is expected to be useful for production of tofuyo. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 36-40, 2002.

Key words: serine proteinase, *Bacillus pumilus*, soybean-milk-coagulation, soybean protein curd, tofuyo

*〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地

近年、酵素は大豆たん白質の生化学的加工技術を支える不可欠な資源となっている。とりわけ、大豆乳凝集活性を有する酵素は、大豆たん白質の加工度を高める重要な酵素として期待されている。これまでに、植物起源プロテイナーゼであるプロメラインの大豆乳凝集性に関する研究^{1,2)}が行われ、大豆チーズの試作例^{3,4)}が報告されている。プロメラインによる大豆たん白質凝集のメカニズムは、グリシニン凝集物の切断およびその加水分解物フラグメントの会合によるネットワーク形成であり、それを結合させる力は分子間SH基のジスルフィド交換反応および疎水結合⁵⁾とされている。これに対して、微生物由来の凝集酵素に関する知見は少ないのが現状である。微生物酵素は植物酵素に比べて安価で安定供給が可能であり、産業化を図る上で大きなメリットとなる。著者らは、大豆乳凝集酵素生産菌 (*Bacillus pumilus* TYO-67) を沖縄県の伝統的大豆発酵食品であるとうふようの製造工程より分離し、その培養条件を明らかにした。また、本大豆乳凝集酵素の精製方法⁵⁾を確立し、その酵素化学的特性から本酵素がセリンプロテイナーゼである⁶⁾ことを明らかにしてきた。

本研究では、本酵素による大豆乳凝集機構の解析を行い、プロメラインと比較検討した。また、本酵素の食品加工への利用の一つとして、とうふよう製造に適した大豆たん白質カードの調製方法について検討したので報告する。

方 法

微生物と培養方法

供試菌株として *Bacillus pumilus* TYO-67 を用いた。本菌の培養は 2% SPI, 0.2% グルコース, 0.25% 酵母エキス, 0.2% リン酸水素二カリウムおよび 0.2% リン酸二水素カリウムを含む培地 (pH 11.0) で、30℃、48時間振とうして行った。遠心分離により得られた培養ろ液を粗酵素液として用いた。

酵素の精製

粗酵素液 (2 L) に 30% 飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、その上澄み液を得た。上澄み液を 30% 飽和 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したブチルトヨパール 650M にパッチ法で吸着させ、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。活性画分を集め、限外濾過膜で濃縮し、続いて、DEAE-トヨパール 650M, CM-トヨパール 650M, ブチルトヨパール 650M の各カラムクロマトグラフィーにより、本酵素の精製を行った。精製された酵素は SDS-ポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動法により均一であることが確認された。

大豆乳の調製

大豆に 10 倍加水を行い、既報⁷⁾の方法で大豆乳を調製した。

酵素活性の測定

大豆乳凝集活性の測定は Arima ら⁸⁾の方法に従った。大豆乳凝集活性の 1 ユニットは、大豆乳 1.0 mL を 1 分間で凝集させる酵素量とした。

凝集反応における窒素量の測定

大豆乳凝集反応に伴う窒素成分の変化は、ケルダール法により測定した。

電気泳動

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli⁹⁾の方法に従い、ポリアクリルアミドゲル濃度 15% で行った。電気泳動終了後、クマシーブリリアントブルー R250 でたん白質の染色を行った。

大豆たん白質カードの調製

大豆乳 1.3 L に本酵素を 80 U 添加し、65℃ で 30 分間、ゆっくり攪拌しながら酵素反応を行った。酵素処理後、75℃ に温度を上昇させ、続いて硫酸カルシウム二水和物を添加した。その後 95℃ で 7 分間加熱して、金属製のフープ (φ 7.5 cm × 11 cm) に流し込み、41 g/cm² で 25 分間圧搾した。

大豆たん白質カードの物性測定

得られた大豆たん白質カードを 1.8 cm × 1.8 cm × 1.5 cm の大きさに切断し、その物性をレオメーターシステム (山電社製、レオナー RE-3305) で測定した。破断強度測定条件はクリアランスが 3.8 mm、プランジャーが直径 5 mm、試料台速度は 1 mm/min とした。測定結果は試料 10 個の平均値として表した。

結 果 と 考 察

大豆乳凝集反応における窒素成分の変化

本酵素の大豆乳凝集反応における窒素成分の変化を調べ、その結果を Fig. 1 に示した。大豆乳中総窒素量に対する凝集物の窒素量の割合は、酵素反応 10~14 分において急激に増大し、それ以降では一定の値を示した。このことから、反応 14 分間で大豆乳中窒素成分の 66% が凝集により沈澱したことが分かった。また、総窒素量に対するホエー中 4% TCA 可溶性窒素量の割合は、酵素反応開始直後より反応 14 分まで直線的に増大していた。この数値はホエー中に生成する非たん白質態窒素成分、すなわち、ペプチドやアミノ酸などの低分子の窒素成分を表しており、本酵素反応による大豆

たん白質の分解が確認された。

大豆乳凝集反応におけるたん白質の変化

本酵素を大豆乳に作用させ、大豆たん白質分解の様子をSDS-PAGEにより観察し、その結果をFig. 2 (A) に示した。酵素添加量は大豆乳が反応3分後に凝集する量に設定した。本酵素を大豆乳に作用させると、大豆たん白質の主要成分である β -コングリシニンの α' -、 α -、および β -サブユニットは反応時間の経過に伴いゆっくりと分解した。グリシニンの酸性サブユニットは反応0.5分にはすでに分解を受け、分子質量28 kDaの新しいバンドが現れた。このバンドは、反応時間の経過に伴い消失した。このように、グリシニンの酸性サブユニットは凝集が始まる3分までにほとんど分解された。しかしながら、グリシニンの塩基性サブユニットは凝集が完全に終了した30分後でも残存してい

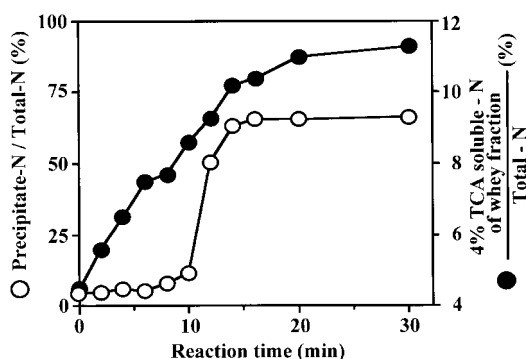


Fig. 1. Changes in the ratio of each nitrogen to the total nitrogen in soybean milk treated with the enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67.

た。比較のために、プロメラインを大豆乳に作用させ、その結果をFig. 2 (B) に示した。プロメラインの場合には、反応0.5分では、グリシニンの酸性サブユニットのバンドは残っていたが、凝集が起こる反応3分にはグリシニンの酸性、塩基性サブユニットならびに β -コングリシニンの α' -、 α -、 β -サブユニットは完全に分解され、それらのバンドは消失した。これらの結果から、プロメラインと本酵素では、大豆乳に対して異なる分解様式を示すことが明らかとなった。このような大豆たん白質分解様式の違いが、それぞれの酵素の凝集能や得られた凝集物の特性に影響を与えると考えられる。

また、前述の結果から、大豆乳の凝集は酵素による各グロブリンの加水分解性と深く関わっていることが示唆された。そこで、本酵素による加熱変性 β -コングリシニンならびに加熱変性グリシニンの分解の様子をSDS-PAGEで調べた。加熱変性 β -コングリシニンでは、たん白質分解のパターンは大豆乳の β -コングリシニンの場合とほぼ同様であったが、沈澱物は生成されなかった。加熱変性グリシニンにおいては、電気泳動パターンは大豆乳のグリシニンの場合とほぼ同様に变化しており、酵素反応中に沈澱物の生成が確認された。プロメラインによる加熱変性グロブリンにおいても、加熱変性グリシニンの加水分解物は凝集・沈澱するが、加熱変性 β -コングリシニンの加水分解物は凝集しないとの報告²⁾があり、本酵素の場合にも類似の傾向を示した。以上の結果から、本酵素による大豆たん白質の凝集機構にグリシニンの加水分解性が深く関与していることが示唆された。

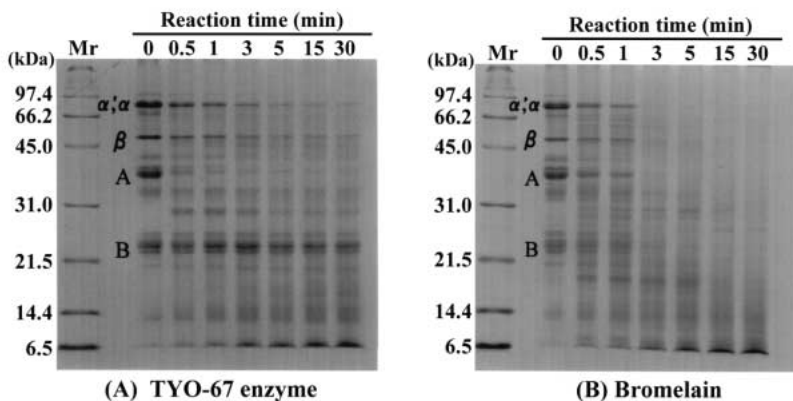


Fig. 2. Degradation of protein in soybean milk with the enzyme (A) or bromelain (B).

Mr; Molecular mass standards (Bio-Rad), Myosin 200 kDa, β -galactosidase 116.25 kDa, Phosphorylase b 97.4 kDa, Serum albumin 66.2 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Carbonic anhydrase 31 kDa, Trypsin inhibitor 21.5 kDa, Lysozyme 14.4 kDa, Aprotinin 6.5 kDa. α' -, α -, β -; α' -, α - and β -subunits in β -conglycinin, A, B; Acidic and Basic subunits in glycinin.

酵素反応による大豆乳中SH基濃度の変化

酵素反応過程における大豆乳中SH基濃度の変化について調べ、その結果をFig. 3に示した。大豆乳中に検出されるSH基濃度は、大豆たん白質の分解の進行にともない反応2分までは増加した。その後、凝集反応が起こる3分では、すでに減少し始めており、反応7分以降20分まで一定の値を示した。また、得られた凝集物はメルカプトエタノール無添加の0.5% SDS溶液に溶解した。これらのことから、本酵素による大豆乳の凝集反応にはS-S結合よりもむしろ疎水結合の方が重要な役割を果たしていると考えられる。

本酵素による大豆たん白質カードの調製とその物性

本酵素による大豆たん白質カードの物性 本酵素で得た大豆乳凝集物をチーズ製造用フープに入れ、圧搾・成型し、大豆たん白質カードを調製した結果、軟質のカードが得られた。Fuke³⁾らはプロメライン、鎌田¹⁰⁾

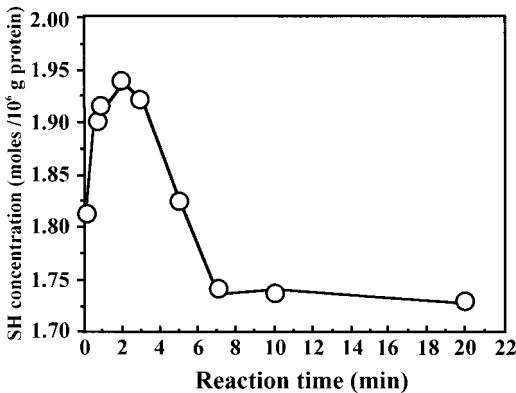


Fig. 3. Changes in sulfhydryl group content in the soybean milk treated with the enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67.

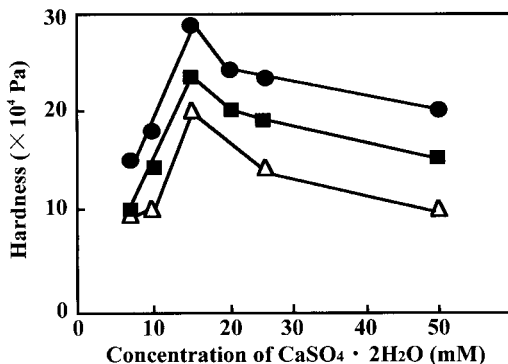


Fig. 4. Effect of $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentration on hardness of soybean protein curd. ●, TYO-67 enzyme + $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ■, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; △, bromelain + $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

はトリプシンを用いて大豆乳からたん白質カードをそれぞれ調製したが、いずれの場合でも得られたカードは軟らかかったと報告しており、本酵素の場合と同様の傾向を示した。これまでに、とうふよう製造には、 $20 \sim 30 \times 10^4$ Paという硬さのカードが適切であることが明らかとなっている⁷⁾。酵素のみの凝集物では、このような物性のカードを得ることが困難であったため、硫酸カルシウムの併用を検討した。

大豆たん白質カードの硬さに及ぼす硫酸カルシウムの添加濃度の影響

大豆たん白質カードの硬さに及ぼす硫酸カルシウムの添加濃度の影響について調べ、その結果をFig. 4に示した。比較のために、硫酸カルシウムのみ、プロメラインと硫酸カルシウム併用についても同様の実験を行った。いずれの場合にも大豆たん白質カードの硬さは硫酸カルシウムの添加濃度に依存して変化し、硫酸カルシウム濃度15 mMの時、最も硬いカードが得られた。本酵素と硫酸カルシウムを併用した大豆たん白質カードの硬さは硫酸カルシウムのみあるいはプロメラインと硫酸カルシウムを併用したもの比べて高い値を示した。

大豆たん白質カードの破断特性 本酵素による大豆たん白質カードの破断特性について調べ、その結果を

Table 1. Breaking characteristics of soybean protein curd treated with the enzyme

Samples	Breaking stress (Pa)	Breaking strain (cm/cm)	Breaking energy (J)
TYO-67 enzyme (+ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4.1×10^5	1.8×10^4	8.2×10^3
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.2×10^5	1.7×10^4	4.8×10^3
Bromelain (+ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3.9×10^5	1.4×10^4	7.3×10^3



Fig. 5. Soybean protein curd prepared by the enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67.

Table 1に示した。本酵素またはブロメラインと硫酸カルシウムを併用した大豆たん白質カードの破断応力および破断エネルギーは、硫酸カルシウム単独の場合に比べて高い値を示した。本酵素法による大豆たん白質カードの破断応力、破断歪みおよび破断エネルギーは硫酸カルシウムおよびブロメラインによるものに比べていずれも高い値を示した。本酵素法で調製した大豆たん白質カードの硬さは 29×10^4 Paの値を示し、とうふよう

製造の適切な物性範囲内にあることが分かった。また、破断特性の結果から、本大豆たん白質カードは長期間の熟成にも耐え得るしっかりしたボディーを有しており、とうふよう製造への適用が可能であると考えられた。本法で得られた大豆たん白質カードの外観をFig. 5に示した。今後、本法による大豆たん白質カードを用いた「とうふよう」の製造を行い、その食品化学的特性について伝統的なとうふようと比較・検討したい。

要 約

*Bacillus pumilus*由来セリンプロテアーゼの大豆乳凝集反応において、総窒素量に対する凝集物の窒素の割合ならびにホエー中4% TCA可溶性窒素の割合が、反応に伴い増大した。本酵素を用いた凝集反応における大豆たん白質加水分解の様子をSDS-PAGEにより調べたところ、 β -コングリシニンの α' -, α -, β -サブユニットは反応に伴い次第に分解された。グリシニンの酸性サブユニットは反応0.5分で分解をうけ、凝集が始まる3分までに消失した。しかしながら、グリシニンの塩基性サブユニットは凝集が終了しても残存した。加熱変性グリシニンに本酵素を作用させると凝集反応が認められたが、加熱変性 β -コングリシニンでは沈澱物がほとんど生成されなかった。これらのことから、本酵素の大豆乳凝集機構において、グリシニンの分解性が重要であることが示唆された。凝集反応に伴う大豆乳中SH基濃度の変化を測定したところ、凝集直前に最大値を示した。また、得られた凝集物はメルカプトエタノール無添加の0.5% SDS溶液に溶解した。これらのことから、本酵素による大豆乳の凝集には、S-S結合よりもむしろ疎水結合が重要であることが示唆された。本酵素と硫酸カルシウム二水和物を用いて大豆たん白質カードを調製し、とうふよう製造に適した硬さのカードを得ることができた。

文 献

- 1) Fuke Y, Sekiguchi M and Matsuoka H (1985): Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean proteins. *J Food Sci*, **50**, 1283-1288.
- 2) Mohri M and Matsushita S (1984): Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain. *J Agr Food Chem*, **32**, 486-490.
- 3) Fuke Y and Matsuoka H (1984): Preparation of fermented soybean curd using stem bromelain. *J Food Sci*, **49**, 312-313.
- 4) Kamata Y, Ohta K, Yamauchi F and Yamada M (1991): Cheese analogs from soybeans or soymilk-curd by limited proteolysis. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, **38**, 1143-1148.
- 5) Yasuda M, Aoyama M, Sakaguchi M, Nakachi K and Kobamoto N (1999): Purification and characterization of a soybean-milk-coagulating enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 474-479.
- 6) Aoyama M, Yasuda M, Nakachi K, Kobamoto N, Oku H and Kato F (2000): Soybean-milk-coagulating activity of *Bacillus pumilus* derives from a serine proteinase. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**, 390-395.
- 7) 安田正昭, 外間郁夫 (1984): 豆腐よう製造に用いる原料豆腐の製造. 日食工誌, **31**, 19-23.
- 8) Arima K, Yu J, Iwasaki S and Tamura G (1968): Purification and crystallization of *Mucor* rennin from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Appl Microbiol*, **16**, 1727-1733.
- 9) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 10) 鎌田慶郎, 高畑受之, 山内文男 (1989): 限定分解酵素大豆グロブリンのゲル物性. 日食工誌, **36**, 557-562.