

大豆グリシニンのゲル構造と分子間力

長野隆男*

川崎医療福祉大学臨床栄養学科

Relationship Between Gel Structure and Molecular Attraction of Glycinin Gel

Takao NAGANO

Department of Clinical Nutrition, Kawasaki University of Medical Welfare,
Kurashiki 701-0193

ABSTRACT

Heat-induced gels of glycinin and soybean protein isolate (SPI) were prepared using magnesium chloride as a coagulant. Viscoelastic properties and microstructures of glycinin and SPI gels were investigated using dynamic viscoelastic measurements (DVM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). DVM indicated that G' of a glycinin gel is two times higher than that of a SPI gel at appropriate NaCl concentrations. This difference of G' between two these gels was reduced by adding 2-mercaptoethanol (2-ME). The microstructures of glycinin and SPI gels using CLSM were analyzed by two parameters: the fractal dimension and the average density of network structures. The fractal dimension of glycinin gels increased and the average density of their network structures decreased with increasing of adding 2-ME concentration. These results suggested that S-S bonds are important for the formation of glycinin gels and make the density of their network structures high. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 58-62, 2009.

Key words : glycinin, S-S bond, heat-induced gel, dynamic viscoelastic measurement, confocal laser scanning microscopy

グリシニンは大豆たん白質の主要成分であり、今までの加熱ゲルや豆腐についての研究から、大豆たん白質の中で最もゲル形成性に優れていることが知られている¹⁾。しかし、その理由はいまだ十分に説明できてはいない。我々は、先の研究²⁾で共焦点レーザー走査

顕微鏡（以下、CLSM）を利用してゲル構造の面から研究をおこなった。その結果、グリシニンのゲルは分離大豆たん白質（以下、SPI）のゲルよりも、網目が太く、粗い構造であることを明らかにした。すなわち、グリシニンがゲル形成性に優れている理由は、たん白質分子が密に凝集する性質によることを示す知見を得た。

本研究では、先の研究²⁾をさらに進め、グリシニン

*〒701-0193 倉敷市松島288

とSPIのゲル形成に関与する分子間力とゲル構造の関係について検討した。

方 法

材料と試料の調製

大豆は品種フクユタカを使用し、グリシニンとSPIの調製は前報^{3,4)}に従った。

動的粘弾性測定 (DVM)

グリシニンとSPIのたん白質分散液を1N塩酸でpH6.8に調製し、96℃で10分間加熱した。加熱たん白質分散液に、2.5%塩化マグネシウム（以下、 MgCl_2 ）と塩化ナトリウム（以下、NaCl）を加えて攪拌し、測定台にのせた。なお、2-メルカプトエタノール（以下、2-ME）を添加する際にはNaClと同時期に加え、たん白質濃度は3.3%となるように調製した。DVMはAR550レオメータ（TAインスツルメントジャパン）を使用した。ジグは60 mmパラレルプレート、ギャップは1 mmに設定した。測定中に水分の蒸発を防ぐために少量のシリコンオイルで測定試料の表面を覆った。試料分散液は70℃、30分間加熱し、25℃に冷却（約3分）した後、25℃で30分間保持した。その後、1 Hzで歪を変化させて歪依存性を測定した。G'の値は、G'値が歪に依存しない領域（線形領域）の値を採用した。

共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM)

加熱たん白質分散液の調製は前述した方法と同様におこなった。加熱分散液に、まず、ローダミンB（10 mg/kg）を加えて攪拌し、次に、2.5% MgCl_2 とNaClを加えて攪拌し、プレパラートに封入した。なお、2-MEを添加する際にはNaClと同時期に加え、たん白質濃度は3.3%となるように調製した。加熱は、高温槽中で70℃、30分間おこない、室温、暗所で冷却したものを観察試料とした。ゲル構造の観察は、CLSM（TCS MP2, ライカ）を用い、543 nmで蛍光を激起して、油浸100倍対物レンズでおこなった。画像解析はImage-Pro Plus 5.0（日本ローバー）を使用し、フラクタル解析はボックスカウンティング法⁵⁾によりおこなった。

結果と考察

塩化ナトリウム濃度の影響

豆腐の製造において、使用される MgCl_2 の濃度は0.25%が一般的である⁶⁾。 MgCl_2 は大豆たん白質を凝集する力が強いので、ゲルは適度なイオン強度下でないと形成されない。そこで、グリシニンとSPIのゲル

形成性に与えるNaCl濃度の影響を検討した。Fig. 1にDVMで得られたG'とNaCl濃度の関係を示した。グリシニンでは、0.1 M以上のNaCl濃度でゲルが形成され、ゲルのG'値はNaCl濃度が0.2 Mで最大値となり、それよりも高いと低下した。SPIでは、0.05 M以上のNaCl濃度でゲルが形成され、ゲルのG'値はNaCl濃度が0.1 Mで最大値をとり、それよりも高いと低下した。

グリシニンとSPIのゲル形成性に与えるNaCl濃度の影響を検討した。その結果、グリシニンのゲルでは、0.2 MのNaCl濃度でG'が最大値を示したことから、0.2 MがNaCl濃度の適切な濃度と考えた。SPIのゲルでは0.1 MでG'が最大値を示したが、G'は0.05 Mから0.1 MのNaCl濃度で急激に増加する、0.1 Mと0.15 MのNaCl濃度では差が小さい結果となった。これらの結果から、SPIは0.15 Mが適切なNaCl濃度と考えた。また、ゲルのG'の平均値は、グリシニンが0.1 M NaCl濃度で275 Pa、SPIが0.15 M NaCl濃度で143 Paとなり、グリシニンはSPIよりも約2倍高い値を示した。

2-メルカプトエタノール濃度の影響

2-メルカプトエタノール（2-ME）はSS結合の形成を阻害する。2-MEを用いてグリシニンとSPIのゲル形成性と構造に与えるSS結合の影響を検討した。実験は、たん白質濃度が3.3%、NaCl濃度がグリシニンは0.15 M、SPIは0.2 Mの条件において、2-MEの濃度を変化させてグリシニンとSPIの粘弾性特性とゲル構造を調べた。Fig. 2にDVMから得られたG'と2-ME濃度の関係を示した。グリシニンゲルのG'値は2-ME濃度の増加とともに大きく低下した。SPIのゲルでも2-ME濃度の増加とともにG'の低下が観察されたが、その低下はグリシニンと比べて小さいものであった。その結果、15

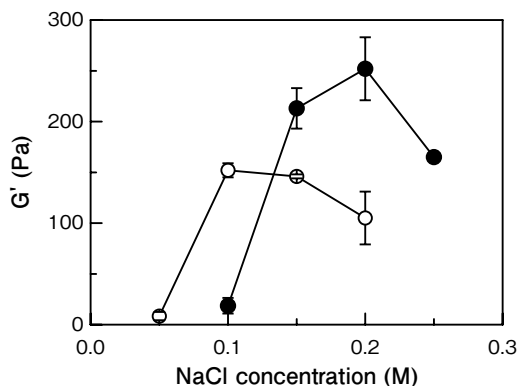


Fig. 1. Storage modulus G' of glycinin and SPI gels as a function of NaCl concentration. (●) glycinin, (○) SPI.

mM以上の2-ME濃度で11SとSPIのゲルのG'は変わらない値となった。

2-ME濃度を変化させて調製したグリシニンとSPIのゲル構造をCLSMで観察し、その結果をFig. 3に示した。使用した蛍光試薬ローダミンBはたん白質を染色するため、白く発色している部分がたん白質と考えられる。2-MEを加えていない条件では、グリシニンのゲル構造はSPIと比べて、より荒く不均一な構造であっ

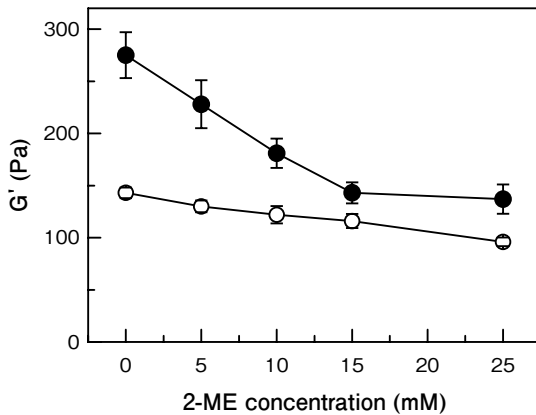


Fig. 2. Storage modulus G' of glycinin and SPI gels as a function of 2-mercaptoethanol concentration. (●) glycinin, (○) SPI.

た。グリシニンのゲルに2-MEを加えると、ゲルの網目構造に変化が見られ、荒い構造がより細かい構造になることが観察された。それに比べ、2-MEがSPIゲルの網目構造に与える影響は小さいものであった。

フラクタル次元をCLSM画像から求め、フラクタル次元と2-ME濃度の関係をFig. 4に示す。2-MEを加えていない条件でのフラクタル次元は、グリシニンゲルの方がSPIゲルよりも低い値を示した。グリシニンゲルのフラクタル次元は2-ME濃度に大きく影響を受け、2-ME濃度が増加するに従いフラクタル次元は増加した。SPIのゲルにおいても2-ME濃度の増加とともにフラクタル次元の増加が観察されたが、その増加はグリシニンゲルと比べて小さいものであった。グリシニンゲルとSPIゲルのフラクタル次元は、1.75から1.81の値を示したことから、ゲル形成はクラスター凝集 (cluster-cluster aggregation; CCA) モデルが適用できると考えられる。

ゲルの網目構造の密度をCLSM画像から求め、網目の平均密度と2-ME濃度との関係をFig. 5に示した。2-MEを加えていない条件での網目の平均密度は、グリシニンゲルの方がSPIゲルよりも高い値を示した。この結果から、グリシニンはSPIよりもたん白質分子がより密に凝集したゲル構造を形成すると考えられる。グリシニンゲルの網目の平均密度は2-ME濃度に

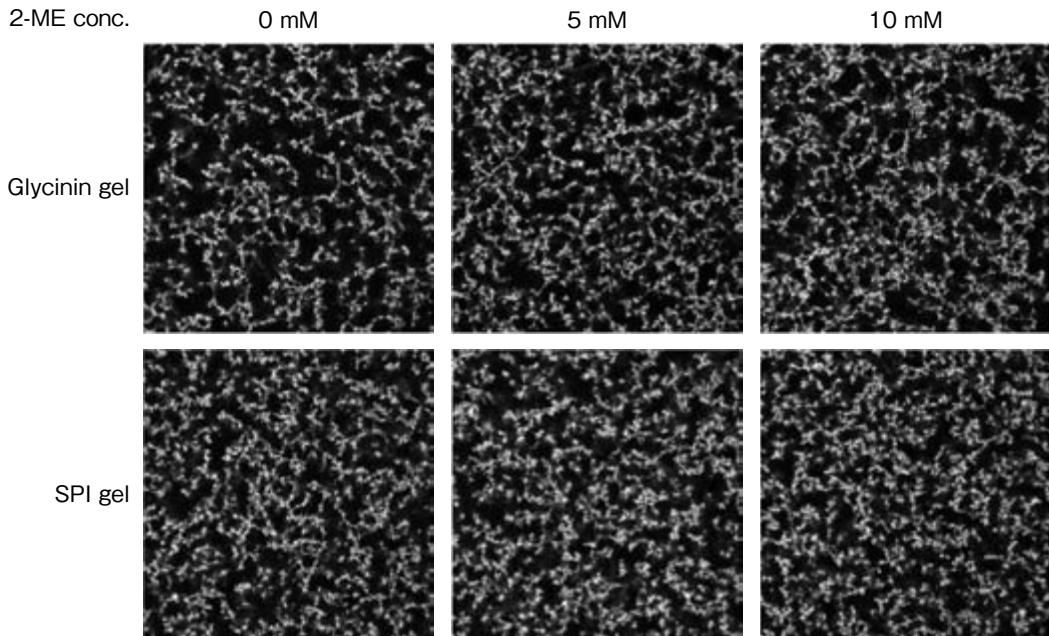


Fig. 3. CLSM images of glycinin and SPI gels at different 2-mercaptoethanol concentrations. Each image width is 75 μm .

影響を受け、2-ME濃度が増加するに従い低下した。SPIのゲルにおいても、網目の平均密度は2-ME濃度の増加とともに低下したが、その低下はグリシニンゲルと比べて小さいものであった。以上の結果から、S-S

結合はグリシニンのゲル形成に重要な分子間力であり、ゲル構造の形成において網目の密度を高めていると考えられる。

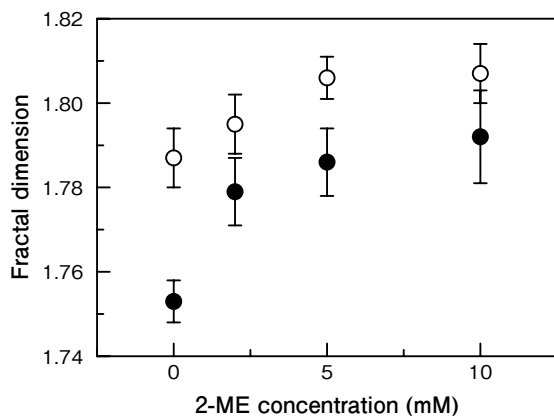


Fig. 4. Fractal dimensions of glycinin and SPI gels obtained by CLSM images at different 2-mercaptoethanol concentrations. (●) glycinin, (○) SPI.

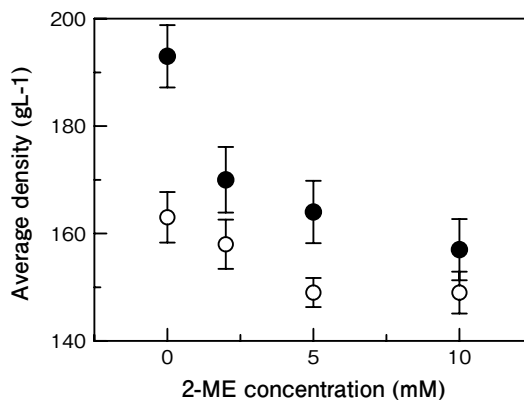


Fig. 5. Average density of gel networks for glycinin and SPI gels obtained by CLSM images at different 2-mercaptoethanol concentrations. (●) glycinin, (○) SPI.

要 約

グリシニンは大豆たん白質の主要成分であり、加熱ゲルや豆腐についての研究から大豆たん白質の中で最もゲル形成性に優れることが知られている。本研究では、グリシニンとSPIのゲル形成に関与する分子間力とゲル構造の関係について検討した。まず、塩化ナトリウム (NaCl) 濃度がゲル形成性に与える影響を検討し、グリシニンは0.2 M, SPIは0.15 Mが適切なNaCl濃度と考えられた。その条件におけるゲルのG'は、グリシニンがSPIよりも約2倍高い値を示した。次に、S-S結合の形成を阻害する2-メルカプトエタノール (2-ME) がゲル形成性に与える影響を検討した。その結果、2-MEの添加に伴い、G'はグリシニンのゲルで大きく低下したがSPIのゲルでは大きな低下は見られなかった。さらに、CLSMを用いてゲル構造を観察した結果、2-MEの添加でグリシニンゲルのフラクタル次元は増加し、網目の平均密度は低下することが示された。以上の結果から、グリシニンはSPIよりも硬いゲルを形成し、その分子間力にはS-S結合の寄与が大きく、S-S結合はゲル構造における網目の密度を高めていると考えられた。

文 献

- 1) Utsumi S, Matsumura Y and Mori T (1997): Structure-function relationships of soy protein. In: Food proteins and their applications. Damodaran S and Paraf A eds., Marcel Dekker, Inc, New York, 257-291.
- 2) 長野隆男 (2007) : 大豆たん白質のグリシニン成分がゲル形成性に優れている理由の解明, 大豆たん白質研究, **10**, 30-33.
- 3) Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, Kohyama K and Nishinari K (1992): Dynamic viscoelastic study on the gelation properties of β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 941-944.
- 4) Nagano T, Fukuda Y and Akasaka T (1996): Dynamic viscoelastic study on the gelation properties of β -conglycinin-rich and glycinin-rich soybean protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3484-3488.
- 5) 松下 貢 (2002) : フラクタルの物理 (I) —基礎編一, 小裳華房, 東京.
- 6) Toda K, Ono T, Kitamura K, Hajika M and Takahashi K (2003): Seed protein content and consistency of Tofu prepared with different magnesium chloride concentrations in six Japanese soybean varieties. *Breeding Sci.*, **53**, 217-223.