

発表番号 40 (0542)

小麦グルテンネットワーク形成における食塩の役割

裏出 令子 (京都大学大学院農学研究科)

鶴飼 智代 (京都大学大学院農学研究科)

製パン工程における食塩の添加は、パンの風味だけでなく酵母及び小麦粉成分に働きかけてパンの容積やすだちを改善する作用があると理解されている。透過型電子顕微鏡で生地の微細構造を観察すると、食塩の有無により差異が見られる。また、パン生地の物性に食塩が与える影響は大きく、生地の伸展性と抗張力を増大させ粘着性を減少させる。食塩のこのような効果は、ミキシングの際の小麦タンパク質間の相互作用への影響によるものと推定されている。すなわち、ミキシングにより小麦粉の主要タンパク質であるグルテニンとグリアジンなどが複雑に相互作用してグルテンが形成されるが、食塩はグルテン内のタンパク質間相互作用を変化させると考えられている。しかし、その分子機構は不明である。

われわれは、食塩を添加した生地を水中で洗いグルテンを調製すると、その収量が食塩無添加生地に対して著しく低いことを見出した。これは、生地のグルテンを構成するタンパク質の状態が食塩の有無によって異なるために、タンパク質の水への溶解性に差が生ずることを示唆している。そこで、パン生地から洗浄により水に溶け出してくるタンパク質の量を定量し、その組成を SDS-PAGE により分析した。

食塩無添加生地からは、最初の 10 分間の洗浄で全タンパク質の約 10% に相当するタンパク質が溶出し、これらのタンパク質は水溶性のアルブミン等のタンパク質であると推定された。その後の洗浄によるタンパク質の溶出は、ほとんどなかった。一方、食塩を添加した生地からは、アルブミン等の溶出後さらに洗浄を継続すると、20~30 分

後に分子量が 30~45 kDa のタンパク質が選択的に溶出した。溶出量は生地に添加した食塩濃度に依存して増加し、0.255 M 食塩添加では約 20%、0.51 M 食塩添加では約 30%、1.02 M 食塩添加では約 40% のタンパク質が溶出した。これ以上の食塩添加では、タンパク質の溶出量は増加せず頭打ちとなった。

食塩添加生地から特異的に溶出した 30~45 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析し、これらが α/β グリアジン及び γ グリアジンであることを明らかにした。グリアジンは洗浄開始 20 分以降にしか溶出しなかったことから、溶出には生地中の食塩濃度の低下が必要であることが推定された。そこで、0.51 M 食塩水で生地を洗浄したところ、グリアジンの溶出はほとんど検出されなかった。また、ナトリウムあるいは塩素以外のイオンの塩を生地に添加し、タンパク質溶出効果を検討した。リチウムイオン以外はカオトロピック効果の高い塩ほど高い効果が得られた。

以上の結果から、食塩の添加により生地のグルテンを構成しているタンパク質のうち特にグリアジンの状態が大きく変化することが明らかとなった。その原因として食塩によるタンパク質の構造が変化することが考えられたため、生地の蛍光スペクトルを解析しタンパク質のトリプトファン残基の環境がより疎水的な環境に変化することを明らかにした。また、フーリエ変換赤外吸収スペクトル解析による二次構造予測から、食塩添加により分子間 β シート構造が減少し、分子内 β 構造、 β ターン、ランダムコイル及びアミノ酸側鎖の伸展が増加することを明らかにした。

助成番号 0542

小麦グルテンネットワーク形成における食塩の役割

裏出 令子 (京都大学農学研究科)
鵜飼 智代 (京都大学農学研究科)

1. 研究目的

製パン工程における食塩の添加は、パンの風味だけでなく酵母及び小麦粉成分に働きかけてパンの容積やすだちを改善する作用があると理解されている。透過型電子顕微鏡で生地の微細構造を観察すると、食塩の有無により差異が見られる(Fig. 1)。また、パン生地の物性に食塩が与える影響は大きく、生地の伸展性と抗張力を増大させ粘着性を減少させる^(1,2)。食塩のこのような効果は、ミキシングの際の小麦タンパク質間の相互作用への影響によるものと推定されている。すなわち、ミキシングにより小麦粉の主要タンパク質であるグルテニンとグリアジンなどが複雑に相互作用してグルテンが形成されるが、食塩はグルテン内のタンパク質間相互作用を変化させると考えられている。しかし、その分子機構は不明である。われわれは、食塩を添加した生地を水中で洗いグルテンを調製すると、その収量が食塩無添加生地に比して著しく低いことを見出していた。これは、グルテンを構成するタンパク質の状態が食塩の存否によって異なるために、タンパク質の水への溶解性に差が生ずることを示唆していた。本研究では、グルテンのタンパク質間相互作用に食塩が及ぼす影響の分子機構を解明することを目的に、グルテンタンパク質の溶出挙動と食塩との関係を解析した。

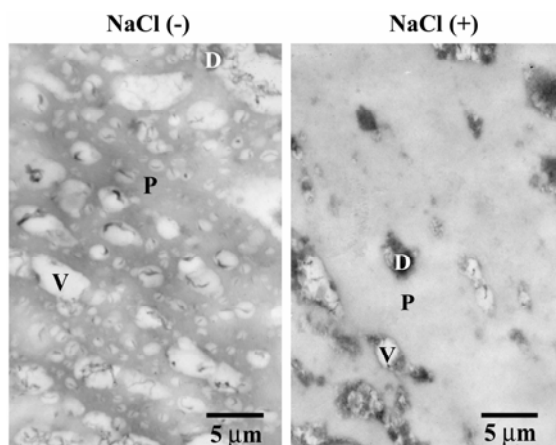


Fig. 1 Transmission electron microscopy of dough with or without 0.51 M NaCl. P, protein strand; V, vacuole; D, remnant of organelles and membranes.

2. 研究方法

2.1 パン生地の作製と洗浄

100 g の強力小麦粉(スーパーキング、日清製粉)、塩、蒸留水 66.7 ml をミキサー KN-200(大正電気販売株式会社)に入れ、20°C で 20 分間混捏した。混捏後の生地を 500 ml の蒸留水あるいは 0.51 M NaCl 溶液中で、洗液を 10 分毎に交換しながら、ラバー手袋をはめた手でもみ洗いした。各洗液は 18,000 x g で遠心後、上清液を以下の分析に供した。

2.2 溶出タンパク質の定量と同定

溶出したタンパク質の定量は、Lowry 法により γ グロブリンを標準タンパク質として定量した⁽³⁾。溶出タンパク質は SDS 化後 10%ゲルで SDS-PAGE により分離した⁽⁴⁾。SDS-PAGE 後のゲルからタンパク質を PVDF 膜(BioRad)にブロットし、ボンソー染色後、N 末端アミノ酸配列をタンパク質シーケンサー Model 492(Applied Biosystems)によって分析した。解読したアミノ酸配列からタンパク質を同定した。

2.3 蛍光スペクトル解析

パン生地を個体測定用のセルに詰め、蛍光光度計 F-3000(日立)により 280 nm の励起光で蛍光スペクトルを測定した。

2.4 フーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光スペクトル解析

FT-IR 分析用の生地は水の代わりに重水を用いて作製した。生地をセルに詰め、FT-IR-480 Plus (JASCO)を用いて全反射吸収測定法によりスペクトルを測定した。得られたスペクトルのうち 1,500~1,600 波数/cm の範囲の領域をカーブフィッティングし、二次構造由来のバンドを分離した。得られた二次構造バンドのピーク面積を計算し、全体に占める各構造の割合を算出した。

3. 研究結果

3.1 NaCl 添加生地からのグリアジンの特異的溶出

標準的な食パン製造のレシピに従った配合割合の小麦粉と純水に、NaCl を添加して生地を作製した。NaCl の濃度は、加えた純水に溶解した場合の濃度として表示した。尚、標準的な食パンに添加される NaCl 量は 0.51 M である。作製した生地を純水中で洗浄し、水へ溶出し

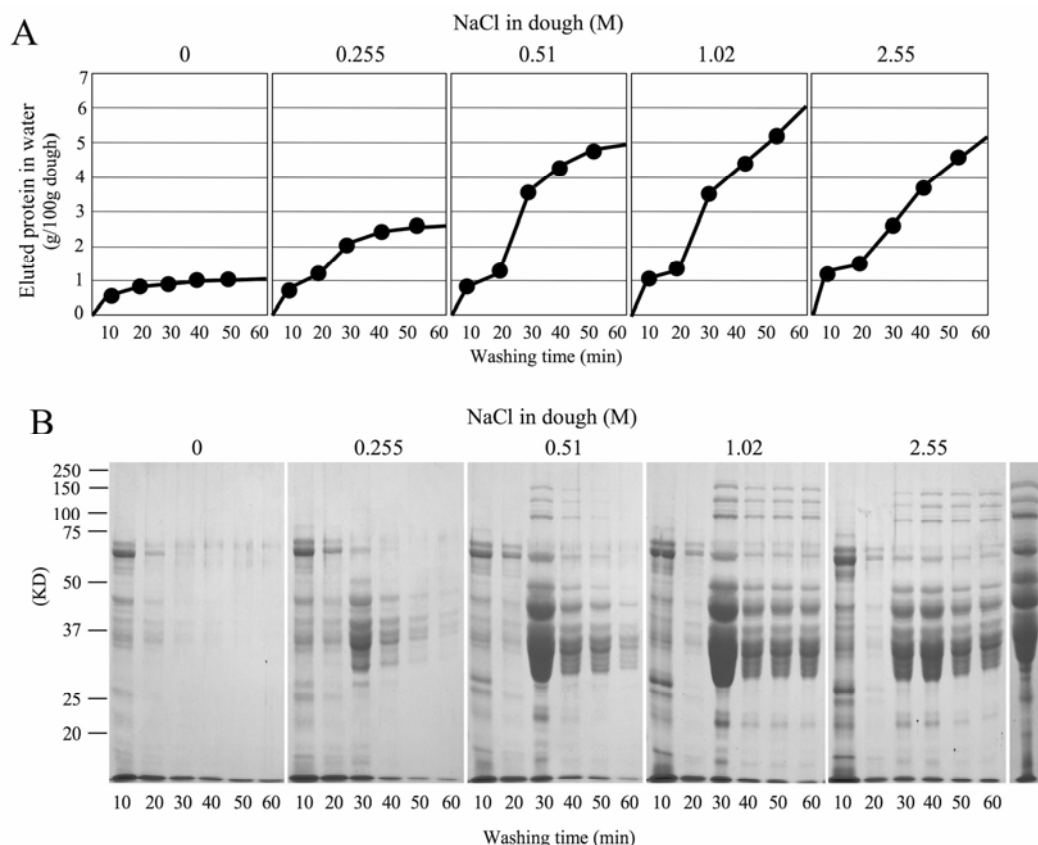


Fig. 2 Extraction of proteins from the dough supplemented with NaCl. The dough supplemented with or without 0.255, 0.51, 1.02 or 2.55 M NaCl was washed in distilled water for 60 min. Net proteins extracted in water were quantified by Lowry's method (A). Proteins extracted in water were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (B). SDS-PAGE of total wheat protein is shown in the right side.

てくるタンパク質の量を経時的に定量した (Fig. 2A)。また、タンパク質の組成を SDS-PAGE で検討した (Fig. 2B)。NaCl を添加していない 100 g の生地を純水の中で洗浄すると、最初の 20 分間に洗浄液にデンプン粒の大部分が流出した。それと同時に約 1~1.5 g のタンパク質が溶出したが、その後はほとんど溶出しなかった。生地の総タンパク質量は 12.6 g であったから、この時点で溶出したタンパク質は生地の全タンパク質の約 10% に相当した。溶出したタンパク質の SDS-PAGE のバンドパターンは小麦粉の全タンパク質のパターンとは異なっており、グルテンとはほとんど相互作用しない水溶性のアルブミンなどが溶出してきたと推定される。小麦粉タンパク質の約 10% がアルブミンとグロブリンであると報告されている⁽⁵⁾。NaCl を添加した生地では、最初の 20 分までは無添加の生地と同様、デンプン粒及びアルブミン等と推定されるタンパク質が溶出したが、20 分以降にあらたに 30~45 キロダルトンのタンパク質が溶出してきた。30 分以降はタンパク質の溶出が減少し、0.51 M NaCl 添加生地からは最終的に 5 g のタンパク質が溶出した。約 40% のタンパク質が

溶出したことになる。また、タンパク質の溶出量は生地に添加した NaCl 濃度が高くなるほど増加し最大約 6 g のタンパク質が 60 分の洗浄で溶出した。溶出量の増加は、主に 20 分以降に溶出したタンパク質の増加によるものであった。

NaCl 添加生地で 20 分以降の洗浄で特異的に溶出してきた主要なタンパク質の N 末端アミノ酸配列を分析したところ、タンパク質バンドのすべてが α/β グリアジン、あるいは γ グリアジンの N 末端アミノ酸配列と一致した (Fig. 3)。溶出したグリアジンは非還元条件下での SDS-PAGE でも移動度が変化せず、グルテンネットワークとはジスルフィド結合しないモノマーとして存在していたことが示された (Fig. 4)。また、あらかじめクロロホルムにより脱脂しておいた小麦粉を用いて作製した生地の場合にも、NaCl 添加に依存したグリアジンの溶出があった (data not shown)。従って、NaCl の効果は小麦粉脂質とは無関係な現象であることが明らかとなった。

生地からのグリアジンの溶出は洗浄を開始してから 20 分以降に見られたが、このことは、最初の 20 分の洗浄中

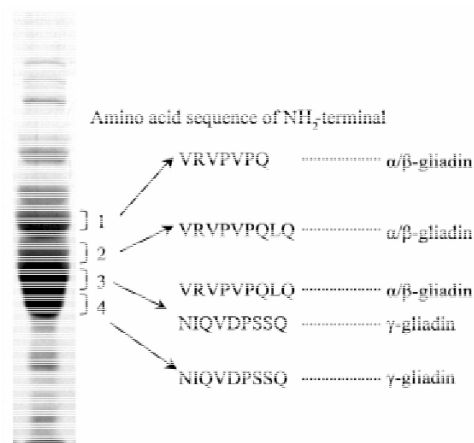


Fig. 3 Major proteins extracted from the dough supplemented with NaCl were gliadins. The proteins extracted into water by washing for 20 to 30 min from the dough with 0.51 M NaCl were separated by SDS-PAGE and blotted on a PVDF membrane. NH₂ terminal amino acid sequences of band 1, 2, 3 and 4 were analyzed with a protein sequencer.

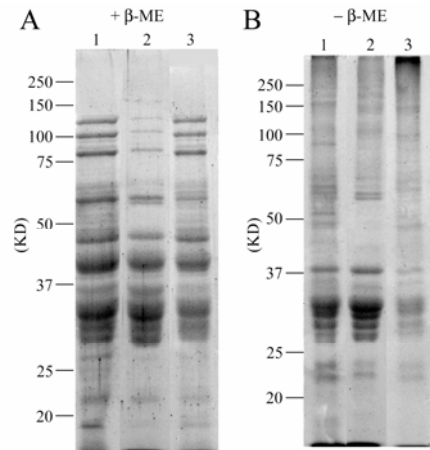


Fig. 4 Major proteins extracted from the dough with NaCl were monomers. Wheat proteins (lane 1), proteins extracted from the dough with 0.51 M NaCl by washing for 20 to 30 min (lane 2) and proteins of dough after washing (lane 3) were separated by SDS-PAGE under reduced (A) or nonreduced conditions (B). Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

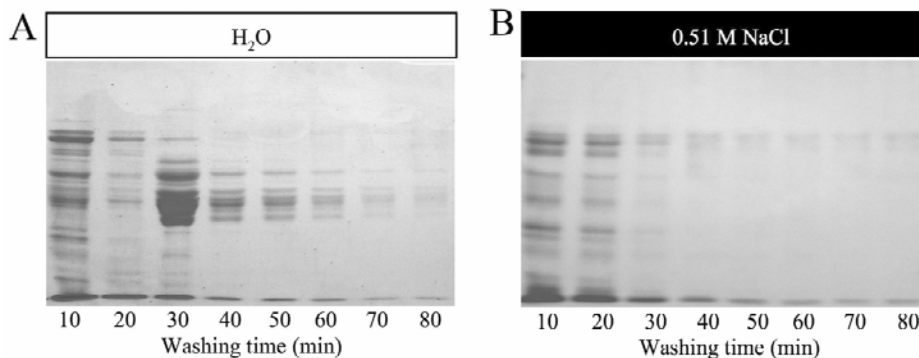


Fig. 5 No gliadin was extracted from the dough into NaCl solution. The dough with or without 0.51 M NaCl was washed with distilled water (A) or 0.51 M NaCl (B). Proteins extracted into the solution were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

に生地の中に含まれる NaCl が洗い流され、生地の中の NaCl 濃度が下がるにつれて、グリアジンが溶け出してくることを示唆していた。そこで、生地と同じ濃度の NaCl 水で生地を洗浄したところ、予想通りグリアジンは全く溶出しなかった (Fig. 5)。この結果から、NaCl 存在下で作製した生地には水に溶出可能なグリアジンが存在するが、それらのグリアジンは NaCl 存在下では不溶性であることが明らかとなった。

3.2 塩のグリアジン溶出効果とホフマイスター系列との関係

以上のような NaCl の効果が、NaCl のどのような性質によるのかを明らかにするために、いろいろな塩を用いて生

地を作製し、生地から溶出するタンパク質の量を検討した (Fig. 6)。Na 塩の場合、ホフマイスター系列の逆順に、すなわちカオトロピックな陰イオンほど効果が高いことが明らかとなった。一方、塩化塩の場合は、リチウムイオンを除いてやはりカオトロピックな陽イオンほど生地からのタンパク質の溶出量が増加する傾向があった。

3.3 グルテンタンパク質の高次構造に対する NaCl の影響

以上の結果から、NaCl の添加によりグルテンを構成するタンパク質間の相互作用が大きく変化することが強く示唆された。このような変化は、構成タンパク質の高次構造の変化を伴っていることが予想された。そこで、生地の蛍

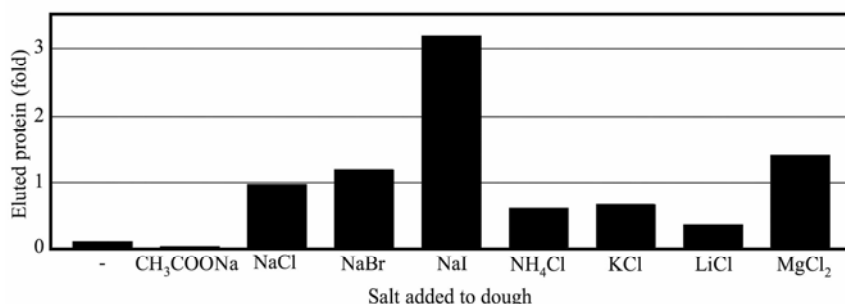


Fig. 6 Effects of ions on the extraction of proteins from dough by washing. Dough supplemented with or without 0.255 M CH₃COONa, NaCl, NaBr, NaI, NH₄Cl, KCl, LiCl or 0.1275 M MgCl₂ was washed with distilled water. The amount of proteins extracted into water by washing for 20 to 60 min was determined. Values represent ratios to the amount of proteins extracted from the dough supplemented with NaCl.

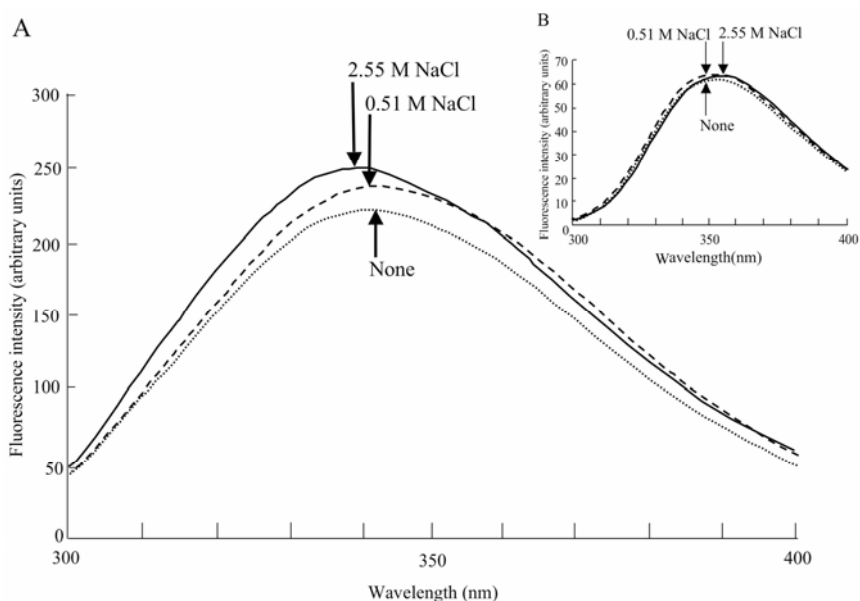


Fig. 7 Effects of NaCl on a fluorescence emission spectrum of dough. Fluorescence emission spectrum of dough with or without 0.51 or 2.55 M NaCl were analyzed after excitation at 280 nm (A). Fluorescence emission spectrum of 10 μM tryptophan in distilled water or 0.51 or 2.55 M NaCl were also analyzed (B). Arrows indicate a position of maximum fluorescence intensity in each spectrum.

光スペクトルを測定した。NaCl 無添加の生地からは、トリプトファン残基に由来する 341 nm に極大値を持つ蛍光スペクトルが得られた。0.51 M NaCl 添加生地では極大値のわずかなブルーシフトがあった (Fig. 7A)。5 倍濃度の 2.55 M NaCl 添加生地では更に大きなブルーシフトが観察された。遊離のトリプトファン溶液に NaCl を添加した場合には、蛍光極大波長は逆にレッドシフトしたことから (Fig. 7B)、生地の測定で観察されたブルーシフトはトリプトファンに固有の現象ではなく、タンパク質の高次構造変化によるトリプトファン残基の環境変化によるものと考えられる。すなわち、塩の添加による生地のタンパク質の高次構造変化により、トリプトファン残基がより疎水的な環境におかれたと考えられる。

生地タンパク質の二次構造への NaCl の影響を、全反射吸収測定法による FT-IR スペクトルの測定により検討した。タンパク質のアミド I に由来するシグナルが出る 1,600~1,700 波数/cm の領域をカーブフィッティングし、二次構造由来のバンドを分離した。得られたバンドに、Secundo and Guerrieri の報告⁽⁵⁾に従って二次構造を割りあてた (Fig. 8)。おのおののバンドのピーク面積を計算し、全体に占める各構造の割合を算出した (Fig. 9)。その結果、NaCl の添加により分子間の β シート構造が減少し、分子内 β シート構造の比率が増加することが明らかとなった。また、β ターン、ランダムコイル及びアミノ酸側鎖の伸展が NaCl の添加により増加することが明らかとなった。他の二次構造の比率には有意差は認められなかった。

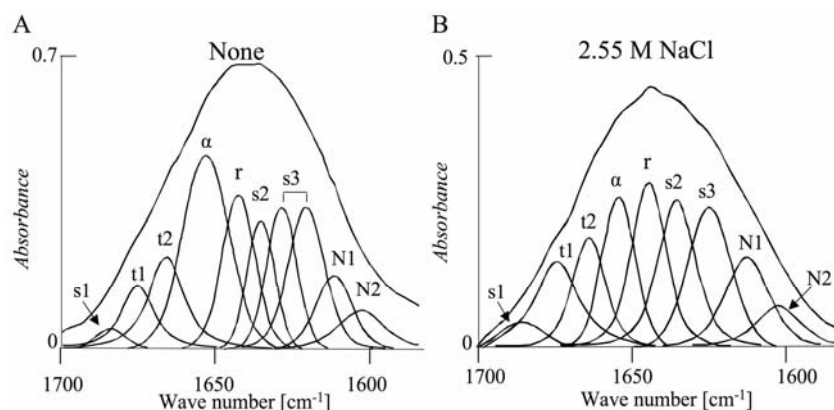


Fig. 8 Fourier-deconvoluted FT-IR spectra in the amide I region of dough with (B) or without (A) 2.55 M NaCl and reconstituted spectra after curve fitting.

The reconstituted spectrum was drawn as the sum of fitted Gaussian bands. Each band assigned to the component of the secondary structure as below, s1, intermolecular β -sheet; t1, β -turn; t2, internally hydrogen-bonded β -turn; α , α -helix; r, random coil; s2, intramolecular β -sheet; s3, intermolecular β -sheet; N1, (NH_2^+) hydrogenated extended side chain; N2, (NH_2^+) hydrogenated extended side chain.

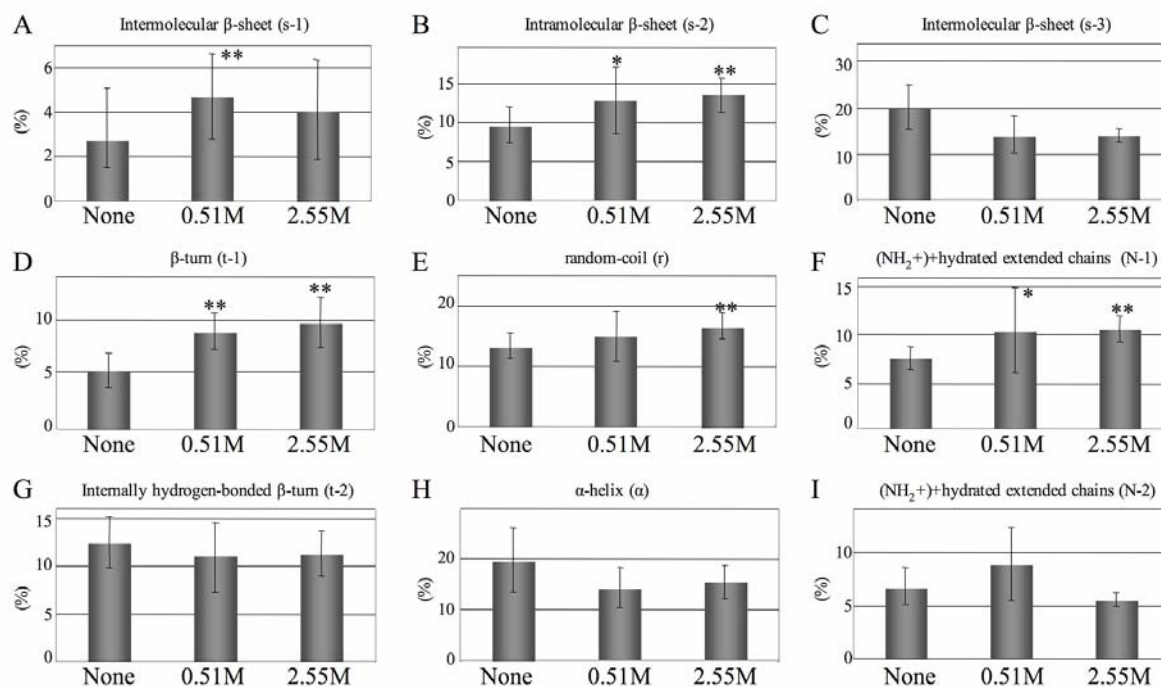


Fig. 9 Relative areas of the bands fitted the Fourier-deconvoluted spectra of dough. Each band was assigned to the component of the secondary structure as described under Fig. 6.

4. 考察

本研究により、NaCl 添加により生地を構成するタンパク質の高次構造が変化していることが明らかとなった。また、食塩添加生地グルテンからはグリアジンが水中へ溶出することが明らかとなった。生地中のグルテンは小麦の主要タンパク質であるグルテニンとグリアジンから形成されている。グルテニンは全タンパク質の約48%を占め、そのうち高分子量サブユニット(HMW)が9%、低分子量サ

ブユニット(LMW)が39%である^(5, 7)。HMWのC末端とN末端には α -ヘリックスに富んだ球状のドメインがありこれらは、480から680アミノ酸残基からなる β -スパイラル構造で連結されている⁽⁸⁾。C末端とN末端に存在するシステイン残基はHMW間で分子間ジスルフィド結合を形成しており、これによりHMWはポリマーとして存在している。さらに、LMWの一部もHMWと分子間ジスルフィド結合している。このようなポリマー化がグルテニンの水への不

溶性の原因であると考えられている。一方、グリアジン (α/β と γ) は全タンパク質の約 40% を占め C 末端近傍に 6~8 個のシステイン残基を有している^(5,9)。グリアジンは分子内ジスルフィド結合のみを有し、他のタンパク質との間には分子間ジスルフィド結合を形成しないため、グルテニンとは非共有的に会合していると考えられている。本研究でも、非還元条件の SDS-PAGE によりグリアジンは生地中でもほとんどがモノマーとして存在していることが示された。従って、NaCl を添加せずに作製した生地では、グリアジンはポリマー化したグルテニンに非共有的に結合しており、水には不溶性であるため溶出しないと考えられる。一方、NaCl を添加した生地では、NaCl の存在下でタンパク質の高次構造が変化し、そのためグリアジンがグルテニンに結合していないか、あるいは水中で解離しやすい結合で会合しているため、水で洗浄すると溶け出しやすくなると思われる。また、NaCl を添加した生地から NaCl 溶液による洗浄ではグリアジンが溶出しなかったが、この理由として、次のことが考えられる。(i) グリアジンは不溶性のグルテニンと結合していないが、塩濃度が高い条件ではグリアジンは不溶性である。水で洗浄することによって NaCl 濃度が低下するとグリアジンの高次構造が変化し、水に可溶性となって溶出してくる。(ii) グリアジンは NaCl 存在下でグルテニンに結合している。水で洗浄することによって NaCl 濃度が低下するとグリアジンの高次構造が変化し、グルテニンとの非共有結合がなくなって溶出してくる。

Wellner らにより、グルテンタンパク質の二次構造に塩が及ぼす影響が FT-IR を用いて解析された⁽¹⁰⁾。彼らの研究では塩を添加して作製した生地を水で 30 分洗浄することにより調製したグルテンのスペクトルを解析しているため、洗浄によるグリアジンの減少も結果に反映されていた可能性がある。本研究では、洗浄前の生地の FT-IR スペクトル解析を行った。従って、タンパク質の二次構造の変化だけが捕らえられたと考えられる。小麦粉タンパク質のうちグリアジン及び LMW グルテニンが全タンパク質の約 80% を占めるため、今回得られた二次構造の NaCl による変化はこれらのタンパク質の変化に起因している可能性が高い。今後、個々のタンパク質の高次構造への NaCl の影響を明らかにしていきたい。

本研究により、小麦粉生地中でのタンパク質の状態が NaCl の存在によって変化していることを、タンパク質の溶出現象の解析で初めて証明することができた。グルテンネットワーク形成に対する NaCl の影響はパンのみならず小麦粉生地を使った多くの食品にも共通する現象であると考えられ、本研究成果の意義は大きいと考えられる。

5. 今後の課題

本研究では、パン生地中でのタンパク質、特にグリアジンの状態が NaCl 添加によって変化することを明らかにした。カオトロピックな塩ほど生地からのグリアジンの溶出を高める効果が高かったことから、NaCl 添加によるタンパク質の水和性の増加と関連して生じる現象である可能性が考えられる。しかし、NaCl はむしろアンチカオトロピックな塩に分類されており、カオトロピック効果のみで解釈することには無理があると思われる。解離度の高い NaCl にはタンパク質の水和性を高める効果以外に、タンパク質間の水素結合及び静電的結合を切断する効果もあり、タンパク質の高次構造及びタンパク質間相互作用を変化させた可能性が高い。従って、今後は、NaCl のタンパク質の高次構造への影響をさらに深く追求する必要がある。さらに、生地形成のミキシングの際に、あらたなジスルフィド結合の形成や交換が生じており、NaCl がジスルフィド結合の量及び質を変化させ、生地の物性に影響を与える可能性がある。従って、この点を踏まえた研究も展開させる必要がある。以上の点を詳細に検討することにより、最終的にはタンパク質間の相互作用の変化と物性変化との関係が解明されることが期待される。

文 献

- 1) Preston, K. R. (1989) *Cereal Chem.* 66, 144-148
- 2) Butow, B. J., Gras, P. W., Haraszi, R. and Bekes, F. (2002) *Cereal Chem.* 79, 826-833
- 3) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 4) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- 5) Dupont, F. M., Chan, R., Lopez, R., and Vensel W. H. (2005) *J. Agric. Food Chem.* 53, 1575-1584
- 6) Secundo, F. and Guerrero, N. (2005) *J. Agric. Food Chem.* 53, 1757-1764
- 7) Howitt, C. A., Tamas, L., Solomon, R. G., Gras, P. W., Morell, M. K., Bekes, F. and Appels, R. (2000) *In Bread Making: Improving quality* (eds. by Cauvain, S. P.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp220-252
- 8) Shewry, P. R., Popineau, Y., Lafiandra, D. and Belton, P. (2001) *Trends Food Sci. Technol.* 11, 433-441
- 9) Shewry, P. R. and Tatham, A. S. (1997) *J. Cereal Sci.* 25, 207-227
- 10) Wellner, N., Bianchini, D., Mills, C. E. N. and Belton, P. S. (2003) *Cereal Chem.* 80, 596-600

0542

Functions of Sodium Chloride in the Formation of Wheat Gluten Networks

Reiko Urade and Tomoyo Ukai
Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

The addition of sodium chloride to dough influences not only the taste of bread, but also the loaf volume and crumb structure. These effects may arise from the actions of the salt on yeast and wheat flour components. Differences between the microstructures of dough with or without sodium chloride are observed on a transmission electron microscopy. In addition, sodium chloride increases the strength, elasticity and stability of dough, and decreases its viscosity. These rheological changes are assumed to be due to changes in the interactions between gluten proteins. Gluten is formed with glutenins polymerized via intermolecular disulfide bonds, and gliadins, which are major wheat storage proteins, and associate with each other non-covalently on the mixing of wheat flour and water. Sodium chloride may cause changes on their interactions. However, the details of the mechanisms underlying the interactions of sodium chloride with these proteins remained unknown. Previously, we found that the yield of gluten from dough supplemented with sodium chloride was much lower than that from dough without sodium chloride. This suggested that the solubility of proteins in water increased in the addition of sodium chloride. Based on this finding, we determined the amounts of proteins extracted from the dough and analyzed them by SDS-PAGE. After 10-min washing, 10% of the total dough proteins was extracted from the dough independent of the presence of salt. These proteins may be water-soluble albumins. On continuous washing for 20 to 30 min, additional proteins from 30 to 45 kD in size were extracted from the dough supplemented with salt, but not from the salt-less dough. The extracted proteins increased in a salt-concentration dependent manner, reaching a plateau at 1.02 M sodium chloride. They were identified as α/β - or γ -gliadins on N-terminal amino acid sequencing. The elution of gliadins was predicted to occur only under the condition of a lower salt concentration of the dough on washing with water, since gliadins were not extracted on washing with 0.51 M sodium chloride. The effects of ions other than sodium or chloride on the extraction of proteins from the dough were examined. More chaotropic anions and cations other than lithium had stronger effects on the elution of proteins from the dough. On fluorescence emission spectroscopy, tryptophan residues of dough proteins were observed to migrate to more hydrophobic circumstances due to conformational changes in the proteins. In addition, it was shown on Fourier Transform IR spectroscopy that intermolecular β -sheet decreased, and intramolecular β -sheet, β -turn, random coil and extension of amino acid residues increased on the addition of sodium chloride to the dough.