

助成番号 0744

小麦粉生地中のグリアジン会合体形成を支配する食塩機能

裏出 令子

京都大学大学院農学研究科

概要 小麦粉生地への食塩の添加は、生地を引き締め安定性を増加させるなど物性に大きく影響することが知られている。食塩効果は小麦粉成分のうち、主にグルテン構成タンパク質に作用してタンパク質間相互作用を変化させた結果生じると考えられている。グルテンは分子間ジスルフィド結合でポリマー化したグルテニンと、非共有的に会合したグリアジンから形成されており、食塩はこれらのタンパク質の相互作用を変化させると推定されるがその詳細は不明である。著者は、生地に食塩を添加するとグリアジンを不溶化させているタンパク質間の非共有結合による相互作用が変化し、水に溶出してくることを見出した。遠心沈降平衡法により、食塩添加生地から溶出されたグリアジンが可溶性モノマーとして存在することを示し、グリアジンが水にも溶解するタンパク質であることを初めて明らかにした。従来、グリアジンは水や中性緩衝液にはほとんど溶けないが、70%アルコールや希酢酸や希塩酸などの酸溶液にはよく溶解するとされてきたため、抽出したグリアジンの研究は上記のような溶液中で行われてきた。しかし、エタノールや酸中のグリアジンが生地中でのグリアジンと同じ特性を有しているか否かは不明である。それに対して、食塩を添加して作製した生地から水に溶出されたグリアジンは生地中でのグリアジンと類似した特性を有すると考えられる。そこで、水に可溶化したグリアジンの凝集に対する塩の影響を検討し、塩によってグリアジンは速やかに凝集するが、その効果は塩の種類によって異なることを明らかにした。さらに、塩の効果は塩素塩間ではほとんど差がみられないが、ナトリウム塩間では差があることを見いだした。これらの結果から、食塩の効果は単純なイオン強度の変化によるのではなく、Cl⁻イオンとタンパク質のアミノ酸側鎖との相互作用によると推定された。食品で用いる小麦粉生地の作製には、一般にグリアジンが十分に凝集する濃度の食塩(0.5~1 M)が添加されている。そこで、タンパク質架橋法により食塩添加生地中でのタンパク質間相互作用の検出を試みた。同じ官能基を分子の両端に有し、スペーサーアーム長が異なる3種類のタンパク質架橋剤、DSP(12)、DSG(7.7)、DST(6.4)を用いて生地中のタンパク質の架橋処理を行った。スペーサーアーム長が12 ÅのDSP(12)と7.7 ÅのDSG(7.7)処理では、食塩添加生地でも食塩無添加生地でもタンパク質の多くが架橋されるが、架橋されるタンパク質の量は食塩添加した生地で多いことが、SDS-PAGE分析により明らかとなった。一方、スペースアーム長が6.4 ÅのDST(6.4)処理では食塩添加生地の場合のみタンパク質の架橋が見られた。さらに、架橋によりSDSに不溶性となったタンパク質画分にはグリアジンとグルテニンの両方が含まれていた。これらの結果から、食塩添加によりグリテニンポリマーとグリアジン間の相互作用が増大し、相互作用するタンパク質の分子間距離が短縮されることが示唆された。このようなタンパク質間相互作用の変化が、食塩による物性変化に大きく寄与していると考えられる。

1. 研究目的

小麦粉生地への食塩の添加は、生地を引き締め安定性を増加させるなど物性に大きく影響することが知られている。食塩効果は小麦粉成分のうち、主にグルテン構成タ

ンパク質に作用してタンパク質間相互作用を変化させた結果生じてくると考えられている。グルテンは分子間ジスルフィド結合でポリマー化したグルテニンと、非共有的に会合したグリアジンから形成されており、食塩はこれらのタ

ンパク質の相互作用を変化させると推定されるがその詳細は不明である。著者は、グリアジンは水及び食塩水に不溶性であるが、生地に食塩を添加するとグリアジンを不溶化させているタンパク質間の非共有結合の性質が変化し、水に溶出してくることを見出した。また、グリアジンの抽出効率がアニオンの種類及び濃度により異なり、カオトロピック効果が高いアニオンほど抽出効果が高いことを見いだした⁽¹⁾。小麦粉中に最も多く含まれるタンパク質であるグリアジンは、水や中性緩衝液にはほとんど溶けないが、70%アルコールや希酢酸や希塩酸などの酸溶液にはよく溶解するとされてきたため、抽出グリアジンの研究のほとんどは上記のような溶液中で行われてきた。しかし、エタノールや酸で可溶化させたグリアジンが生地中でのグリアジンと同じ特性を有しているか否かは不明である。それに対して、食塩を添加して作製した生地から水に溶出されるグリアジンは生地中でのグリアジンと類似した特性を有すると考えられる。そこで、本研究では水に溶出されたグリアジンのタンパク質間相互作用を解析することにした。さらに、生地中で相互作用しているタンパク質を架橋法により検出し、食塩の存否によって変化するタンパク質間相互作用の変化の分子機構を明らかにすることを目指した。

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2 g、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。グリアジンが抽出される3回目の洗液を以下の分析に供した。

2.2 抽出グリアジンの超遠心分離

抽出グリアジン溶液を、100,000 gで1時間超遠心した。上清と沈殿を別々に SDS 化後、10%ゲルを用いて SDS-PAGE により分離し⁽²⁾、クマシー染色を行った。

2.3 抽出グリアジンの沈降平衡分析

抽出グリアジンの分子質量を分析用超遠心機(日立工機 CP100a)を用いた沈降平衡法により分析した。グリアジン溶液を A60M ローターを用いて、10,000回転で28時間遠心し、280 nm の吸光度を測定した。遠心半径の二乗に

対して 280 nm での吸光度の対数をプロットし、その傾き $(M(1 - \bar{v}\rho))$ から理論式 $d\ln(Ar)/dr^2 = M(1 - \bar{v}\rho)w^2/2RT$ ⁽³⁾ を用いてタンパク質の分子質量を算出した。タンパク質の比容 \bar{v} は 0.69 - 0.75 cm³/g とした。

2.4 塩による抽出グリアジン凝集の分析

抽出グリアジン溶液(0.27 mg/mL)に各種塩を添加し溶解させた。グリアジンの凝集は分光光度計を用いた 600 nm の吸光度の測定によりモニターした。

2.5 小麦粉生地中のタンパク質の架橋処理

生地 25 mg を 2.5 mM の架橋剤溶液に浸漬し、室温で 24 時間反応させた。食塩添加生地の場合は、架橋剤を 0.51 M NaCl に溶解させた溶液を用いた。架橋剤は Dithiobis [succinimidyl propionate] (DSP(12): 官能基間アーム長 12 Å)、disuccinimidyl glutarate (DSG(7.7): 官能基間アーム長 7.7 Å)、disuccinimidyl tartrate (DST(6.4): 官能基間アーム長 6.4 Å)を用いた。架橋剤処理した生地中のタンパク質は還元剤 β-メルカプトエタノール存在化あるいは非存在化で SDS 化した後、10%ゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、クマシー染色を行った。

DSP(6.4)処理した生地の一部は、5 mg/mL *m*-periodate / 0.1 M sodium phosphate 緩衝液(pH 7)中での室温 30 分間処理によりアームを酸化し、架橋を切断した。

2.6 小麦粉生地タンパク質のゲル濾過 HPLC 分析

DST 処理したあるいは未処理の食塩添加生地を還元剤 β-メルカプトエタノール存在化あるいは非存在化で SDS 溶液で可溶化した後、18,000 g で 7 分間遠心し上清を TSK gel 4000 HPLC カラム(トーソー製)に供した。0.1% trifluoroacetic acid / 50% acetonitrile を溶媒相とし、0.4 mL/min の流速で 4°C でクロマトグラフィーを行い、214 nm の吸光度をモニターした。溶出液は 0.4 mL ずつ分取し、還元条件の SDS-PAGE により分析した。

3. 研究結果

3.1 生地から抽出したグリアジンは水溶性モノマーである

グリアジンはアルコール水及び酸性水溶液には溶解するが、水及び中性緩衝液には溶けないタンパク質であるとされている。しかし、NaCl 添加生地から蒸留水洗浄によって抽出したグリアジン溶液は透明であり、グリアジンは蒸留水に溶解していると推定された。そこで、不溶性タンパク

質を沈殿させるために超遠心処理を行った。抽出液中のタンパク質は超遠心により全く沈殿しなかった (Figure 1A)。さらに、沈降平衡法により分子質量を測定したところ、30,000~35,000 の質量値が得られた (Figure 1B)。以上の結果は、溶出したグリアジンは水に可溶性で且つモノマーとして存在していることを示していた。溶出液の pH は溶存している二酸化炭素のために 5.8 であったが、脱気処理により溶存二酸化炭素を除いて pH を 7 にしてもグリアジンは水に溶解していた (data not shown)。

可溶化されたグリアジンの CD スペクトル測定し二次構造予測を行い、 α ヘリックスが 14%、 β 構造が 47%、ランダムコイルと β -ターンを含む aperiodic 構造が 39%の値を得た (data not shown)。グリアジンの構造は熱に対して非常に安定で、摂氏 25 度から 120 度の示差走査熱量測定でも熱変性はまったく観察されなかった (data not shown)。

3.2 塩によるグリアジンの凝集

5~10 mM NaCl で始まり 10 mM~30 mM NaCl で急激に凝集した。30 mM~1 M NaCl まで緩やかに凝集は増加した。カオトロピックな塩は低濃度では NaCl より強い凝集効果を示した。20 mM NaI あるいは 20 mM NaBr の添加は、40 mM NaCl と同等の凝集を惹起した。しかし、NaI は 200 mM 以上の濃度では逆に急激に凝集効果が減少し、NaBr も 200 mM 以上で緩やかに凝集効果が減少した (Figure 2C)。グリアジンの生地からの可溶化には全く効果のない酢酸ナトリウムは、最も強い凝集効果を示した (Figure 2A)。KCl、LiCl、NH₄Cl は NaCl とほぼ同程度の凝集効果を示した (Figure 2B, D)。

3.3 グルテントタンパク質のタンパク質架橋剤による架橋に対する NaCl の影響

本研究で作製した生地中での NaCl の水溶液濃度は計算上約 0.51 M である。従って、グリアジンは生地中で凝集した状態であると推定される。会合あるいは凝集したタンパク質はタンパク質間の距離に応じて、適当なアーム長を有する架橋剤により架橋することができる。そこで、生地中で凝集したタンパク質間の距離に対する NaCl の影響を検討するために、同じ官能基を両端に有しアーム長が異なる 3 種類のタンパク質架橋剤を用いて架橋実験を行った。DSP (12) は β -メルカプトエタノールのような還元剤で切断可能な 12 Å のアームを有する架橋剤である。架橋後、生地のタンパク質を SDS-PAGE により分析した。ジスルフィド

結合を還元する条件の SDS-PAGE では、架橋処理、未処理に拘わらずほとんどすべてのタンパク質のバンドが検出された。 (Figure 3A, lanes 1-4)。

両サンプル間でバンド強度にほとんど差はなかった。唯一、NaCl 添加生地では ω -gliadin と推定される 65 kDa のバンドが DSP (12) 処理により消失していた。非還元条件の SDS-PAGE では DSP 処理によりゲル上のすべてのバンド強度が低下した (lanes 5-8)。特に NaCl 添加生地ではバンドが殆ど消失した (lane 8)。DSP (12) 処理によって架橋されたタンパク質はポリマーとなり、SDS-PAGE の分離用ゲルに入らないためバンド強度が低下したと考えられる。従って、NaCl 添加生地のほうが、DSP (12) により多くのタンパク質が架橋されたことを示唆していた。

DSG (7.7) は 7.7 Å のアームを有する架橋剤である。DSG (7.7) 処理により NaCl 添加・無添加両方の生地で高分子量グルテニンサブユニット (HMW-GS) の 3 本のバンドが消失した。また NaCl 添加生地では、65 kD のバンドも消失した (Figure 3B, lanes 2, 4)。さらに、他のすべてのバンド強度も DSG 処理により還元 SDS-PAGE (lanes 1-4) でも、非還元 SDS-PAGE (lanes 5-8) でも弱くなったが、その程度は NaCl 添加生地の方が大きかった。

DST (6.4) は酸化により切断することができる 6.4 Å の spacer arm を有する、架橋剤である。NaCl 無添加生地は DST (6.4) 処理富み処理で SDS-PAGE の結果にほとんど差がみられなかった (Figure 3C, lanes 1, 2, 5, 6)。これとは対照的に、NaCl 添加生地では架橋剤処理を行うと還元条件あるいは非還元条件の SDS-PAGE で検出されるタンパク質バンドの強度が低下した (Figure 3C, lanes 3,4,7,8)。以上の結果から、生地中のタンパク質の架橋は架橋剤により異なり、DSP (12) 及び DSG (7.7) では NaCl 添加及び無添加の生地の両方でタンパク質は架橋されるが、DST (6.4) では NaCl 添加生地のみが架橋されることが明らかとなった。

NaCl 添加生地で DST (6.4) によって架橋されるタンパク質を同定するために、架橋処理を行った NaCl 添加あるいは無添加生地から還元あるいは非還元条件下で SDS で可溶化したグルテントタンパク質をゲル濾過 HPLC (SE-HPLC) に供し、クロマトグラフィーの各フラクションを還元条件 SDS-PAGE で分析した。NaCl 無添加生地は DST (6.4) 処理と未処理の間で SE-HPLC で溶出されたタ

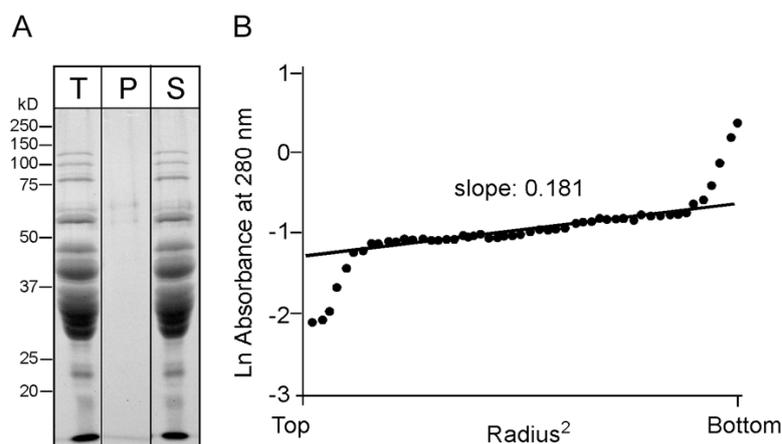


Figure 1. Extracted gliadins are monomers and soluble in water. (A) The extract obtained from dough prepared with 0.51 M NaCl after third washing with distilled water was centrifuged at 100,000 x g for 1 h at 4 °C. The extract (T), precipitate (P), and supernatant (S) obtained after centrifugation were all subjected to SDS-PAGE under reducing conditions. (B) Ultracentrifugation analysis of the extract obtained from the dough prepared with 0.51 M NaCl after washing with third distilled water. Data were plotted as the natural log of the absorbance at 280 nm versus the radius². Molecular masses (30,000~35,000) were calculated from the slope of the plotted line (0.181) as described under "Experimental Procedures."

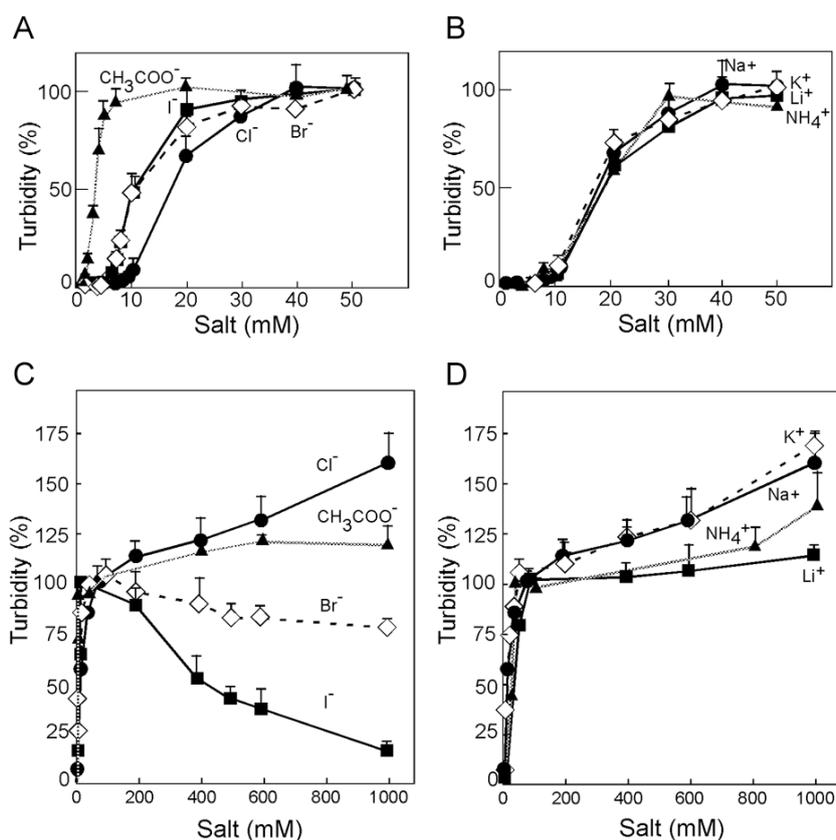


Figure 2. Effects of salts on the aggregation of water-soluble gliadin. (A, C) Effects of sodium salts of chloride (circle), iodine (square), bromine (rhomboid), and acetate (triangle). (B, D) Effects of chloride salts of sodium (circle), ammonium (triangle), lithium (square), and potassium (rhomboid). Salt was added to gliadin solution at concentrations of 0-50 mM (A, B) or 0-1,000 mM (C, D). Data are expressed as the percent of the absorbance (0.613) obtained by the addition of 50 mM NaCl. The results are shown as the mean \pm SEM for three experiments.

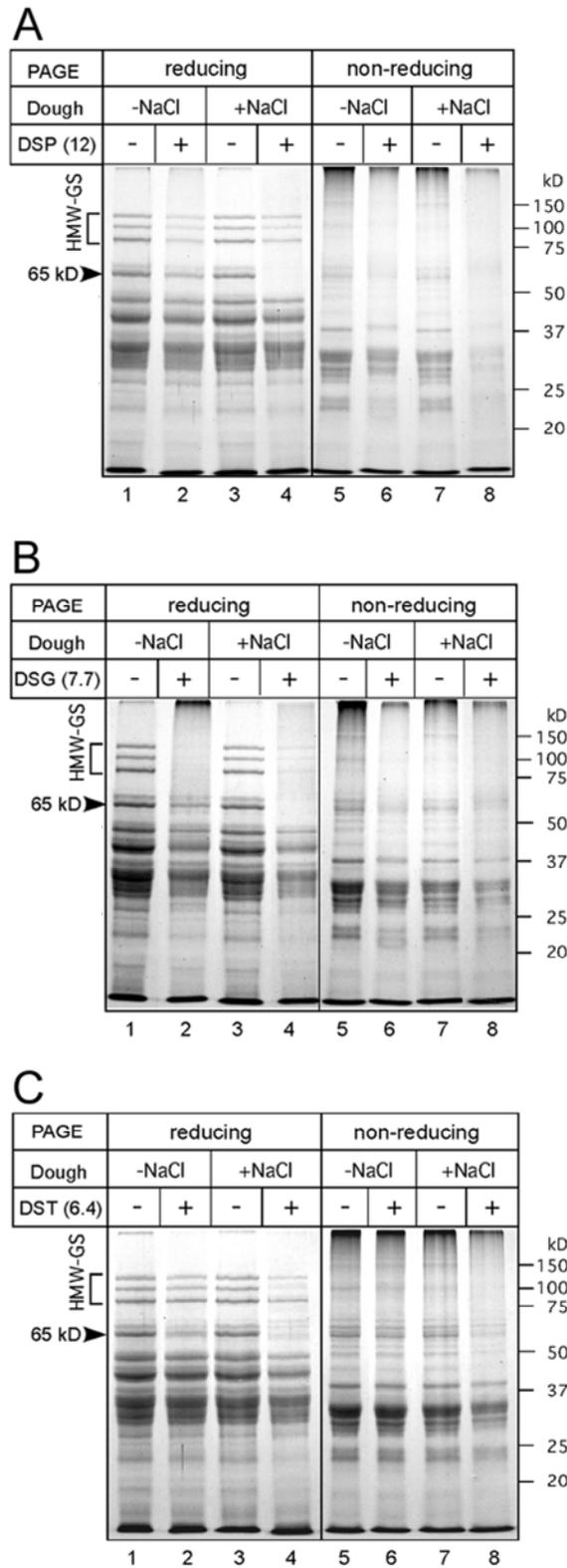


Figure 3. Effects of NaCl on the cross-linking of gluten proteins. Dough prepared without (lanes 1, 2, 5, and 6) or with 0.51 M NaCl (lanes 3, 4, 7, and 8) was treated without (lanes 1, 3, 5, and 7) or with 2.5 mM DSP (12.0) (A, lanes 2, 4, 6, and 8), 2.5 mM DSG (7.7) (B, lanes 2, 4, 6, and 8), or 2.5 mM DST (6.4) (C, lanes 2, 4, 6, and 8). The treated dough (0.357 mg) was subjected to SDS-PAGE under reducing (lanes 1 - 4) or non-reducing conditions (lanes 5 - 8).

ンパク質の量及びパターンに差はみられなかった (data not shown)。一方、NaCl 添加生地の場合、DST (6.4) 処理により還元条件下で SDS で可溶化する全種類のタンパク質の量が減少していた (Figure 4B, 4D)。非還元条件下

で可溶化した場合には、グルテンポリマー (HMW-GS + LMW-GS) とグリアジンが SE-HPLC により分離したが、これらの量も DST (6.4) 処理によって激減していた (Figure 4F, 4H)。

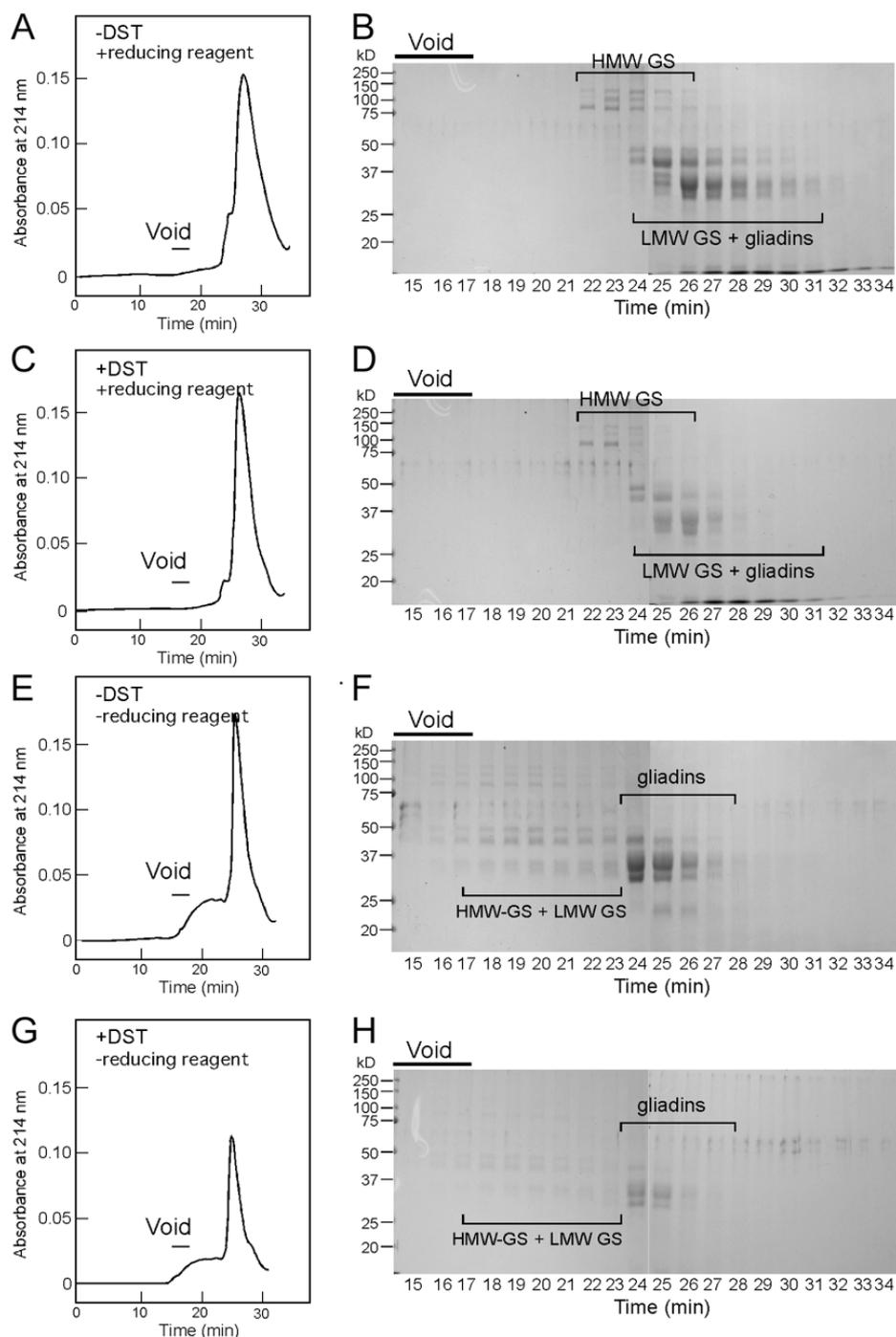


Figure 4. Analysis of gluten proteins from dough prepared with 0.51 M NaCl by SE-HPLC. SE-HPLC profiles for proteins solubilized with SDS buffer in the presence (A, C) or absence (E, G) of β -mercaptoethanol from dough after cross-linking with (C, G) or without (A, E) DST. Shown on the right (B, D, F, H) are the results for the SDS-PAGE of the fractions obtained from the chromatogram shown on the left.

DST(6.4)で架橋されたタンパク質はSE-HPLCのクロマトグラムの排除容積に溶出されることが期待されたが、排除容積部分にはペプチド由来の吸収が検出されなかった(Figure 4C)。従って、架橋されたタンパク質の大部分はSDSに不溶性でSE-HPLCカラムに入らなかった可能性が考えられた。そこで、DST(6.4)処理した生地を還元条件下でSDS処理した後、超遠心分離を行い、得られた沈殿をDST(6.4)のアームを切断するために酸化剤で処理し、SDS-PAGEに供した。DST(6.4)処理したNaCl添加生地から得た沈殿を酸化剤処理した場合のみ、タンパク質のバンドが検出された(Figure 5)。検出されたタンパク質にはグルテニンとグリアジンの両方が含まれていた。この結果から、DST(6.4)によりグリアジン及びグルテニンの両方が架橋され、不溶性になっていることが示唆された。

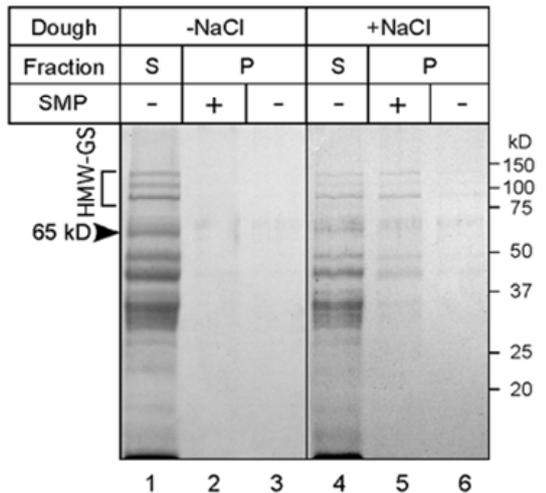


Figure 5. Dough prepared without (lanes 1-3) or with (lanes 4-6) 0.51 M NaCl were treated with 2.5 mM DST (6.4). After treatment, dough proteins were solubilized in SDS sample buffer containing β -mercaptoethanol. The SDS-insoluble proteins were separated from the soluble proteins (lanes 1 and 4) by ultracentrifugation and treated with sodium *meta*-periodate (SMP) (lanes 2 and 5) or untreated (lanes 3 and 6). Each sample was subjected to SDS-PAGE under reducing conditions.

4. 考 察

本研究によりグルテンネットワーク形成の際にグルテンタンパク質の構造に対してNaClは少なくとも二種類の作用を発揮することが明らかとなった。一つはグリアジンを水に可溶性にする作用である。NaCl添加生地から蒸留水洗

浄により抽出されるタンパク質は α/β グリアジンと γ グリアジンが主成分でモノマーとして水に溶けて存在していることが明らかとなった。NaCl処理をしない生地からはグリアジンの溶出はほとんどみられないことから、グルテンタンパク質の構造及び相互作用がNaClによって変化したことによりグリアジンが蒸留水に溶けるようになったと推定される。ClementsはNaCl処理したグルテンを水で洗浄してゆくことによりグルテンの容積が増大することを報告した⁽⁴⁾。本研究の結果と考え合わせると、NaCl添加生地の蒸留水洗浄でグリアジンが溶出した後に残ったグルテニンは、より親水性に変化しており水で膨潤すると考えられる。このことから、NaClによるグリアジンとグルテニンの構造変化により、グルテニンとグリアジン間の疎水性相互作用及び静電的な相互作用が変化したか、あるいはNaClによりタンパク質間相互作用が変化した結果グルテニン及びグリアジンの構造が変化したと考えられる。

NaClのもう一つの作用は、元から存在したグルテニン及びグリアジンの相互作用の変化後の再凝集である。凝集は様々な塩によって生じるがその感受性は異なるため、単なるイオン強度の変化によるのではなく各イオンとタンパク質のアミノ酸側鎖との相互作用によると推定される。塩の効果は塩素塩間ではほとんど差がみられないがナトリウム塩間では差があったことから、アニオンとタンパク質のアミノ酸側鎖との相互作用が重要であると推定される。NaClの場合、生地作製には0.51 Mで用いられているため生地内ではグリアジンはそれ自身が凝集していると考えられる。グリアジン溶液中にTriton X-100のような非イオン性界面活性剤を添加し、NaClを添加した場合にもグリアジンの凝集を妨げることはできなかったため(data not shown)、NaClによるグリアジン凝集の基礎となっている分子間相互作用は疎水性相互作用ではなく静電的な相互作用によると考えられる。おそらく、塩素イオンがグリアジンを可溶性にしていた極性側鎖による分子間の反発を中和することによって、タンパク質のグルタミン残基間などの水素結合形成を可能にさせ、その結果タンパク質が凝集するのではないかと推定される。

グルテン内におけるタンパク質間相互作用のNaCl添加による変化は、本研究の架橋実験により初めて明確に示された。本研究に用いたいずれの架橋剤でも、NaCl添加生地のほうが無添加生地に比して架橋されるタンパク質量は

多かった。特に、6.4 Å のアームを持つ GST(6.4)を用いた場合は NaCl 添加生地でのみ、グルテンタンパク質が架橋された。これらの結果は、NaCl 存在下でのタンパク質の分子間距離が短縮されていることを示唆している。グルテンに含まれるタンパク質の多くが架橋され SDS にも溶けない巨大ポリマーになっていたことから、NaCl を添加することによりグルテニンやグリアジンの相互作用が変化し、新たに分子間水素結合を介してタンパク質が会合し、巨大なタンパク質複合体が形成されると推定される。このようなタンパク質複合体の形成が、NaCl 添加によって誘導される物性特性の変化の原因であると考えられる。

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。NaCl は、グルテン構成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物性を変化させるが、特にグリアジン及びグルテニン間の分子間距離を短縮させるよ

うな相互作用を増加させる効果があることを明らかにした。今後は、相互作用の変化に伴う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) Ukai, T., Matsumura, Y. and Urade, R. (2008) *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1122-1130
- 2) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- 3) Richards, E. G., Schachman, H. K. (1959) *J. Phys. Chem.* **63**, 1578
- 4) Clements, R. L. (1973) *Cereal Chem.* **50**, 87-100

No. 0744

Functions of Sodium Chloride in the Formation of Gliadin-Aggregate in Dough

Reiko Urade

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

The addition of NaCl to wheat dough increases the strength, elasticity and stability of dough, and decreases the its viscosity. These rheological changes are assumed to be due to changes in the interactions between gluten proteins. However, the details of the mechanisms underlying the interactions of NaCl with these proteins remained unknown. Previously, we found that the yield of gluten from dough supplemented with NaCl was much lower than that from dough without NaCl. Gluten proteins were extracted with distilled water from dough prepared in the presence of NaCl. We characterized the extracted proteins to be α/β -gliadin or γ -gliadin by N-terminal amino acid sequencing. Gliadins are thought to have extremely low solubility in water and neutral buffers. Hence, most studies on extracted gliadins have been performed in alcohol-water mixtures and acidic solutions. However, it is unclear whether alcohol- or acid-solubilized gliadins have the same properties as those in dough. The proteins extracted into water from the dough prepared using a NaCl solution are predicted to have properties similar to those in dough containing NaCl. In this study, we showed that the extracted gliadins were soluble monomers in distilled water by analytical ultracentrifugation. Extracted proteins were aggregated by the addition of NaCl at concentrations greater than 10 mM. The aggregation of gliadins was induced by various salts, but the effects were salt species-dependent. Therefore, gliadin aggregation may be induced by the interaction of a certain ion with the specific amino acid residues of a given protein, but not by an increase in ionic strength. Since there was little difference in aggregation among chloride salts and large differences among sodium salts, it is presumed that the interactions of anions with specific amino acid residues may be necessary for aggregation. The changes in protein-protein interactions induced by NaCl in the dough were clearly indicated by the cross-linking experiments. In particular, DST (6.4), with a spacer arm of 6.4 Å, cross-linked gluten proteins in dough only in the presence of NaCl, suggesting that the distances between the amino groups were shortened to less than 6.4 Å by NaCl. Most kinds of gluten proteins are cross-linked to macro-polymers that are insoluble in SDS. Therefore, a model is proposed in which the interactions of gliadins and glutenins are altered by NaCl, co-aggregating into protein complexes via intermolecular hydrogen bonds and/or ionic bonds. The formation of protein complexes may cause changes in the rheological properties of dough induced by NaCl, such as dough stability and optimal dough development.