小麦グルテンに及ぼす γ 線照射の影響 (第4報)*

照射による小麦グルテン中のシステイン基の変化

道 口 正 雄 (東京都立衛生研究所)

昭和 38 年 9 月 30 日 受 理

緒 言

“小麦粉におよぼす γ 線照射の影響”について、継続的に行なっている一連の研究の中で、すでに3報^(1~3)にわたって照射による小麦グルテンの変性について検討してきた。その結果、照射量の増加につれて小麦グルテンの各種溶媒に対する溶解度、及び紫外外部吸収は増加するが、ポーラログラフ蛋白波は変化しないことを認め、また照射グルテンに小麦デンプンを加えて調製した混合粉について、そのレオロジー的性質の変化を検討した結果、照射によって定水分ファリノグラム及びミキソグラムに最高混ねつ抵抗の減少及び生地生成時間の短縮、エキステンソグラムに伸長抵抗及び伸長度の減少、マックマイケル粘度計による各種粘度及びアルカリビスコグラムの最高粘度の減少を認めた。これらの変化は-SH基の破壊や-SS-基の開裂によるものとは異質的な変化であり、照射による小麦グルテンの変性は主として直接的放射線分解による蛋白質分子の高次構造の変化にもとづくものと推定されるが、特に高線量試料において、-SH基や-SS-基に変化がないという断定は下しえなかった。

生地のレオロジー的性質に小麦蛋白質中の-SH基や-SS-基が密接に関与していることは、多くの研究者^(4~6)らによって認められているところであり、グルテンの照射変性機構を検討する上にこれらの官能基を測定する必要を生じた。

著者は、Sullivan⁽⁸⁾の推賞するKolthoff⁽⁷⁾らの方法に準拠して、小麦グルテン及びグルテン酢酸抽出液中の-SH基を測定し、 γ 線照射による小麦グルテンの変性機構について二、三の知見をえたのでここに報告する。

実 験 方 法

試料：市販粉末バイタルグルテン（商標ハイプロ、水分 3.0%，灰分 2.04%，蛋白質 72.0%）を用い、 $40 \sim 1,000 \times 10^4 \text{ rep}$ の γ 線照射試料を調製した。当実験に使用した試料は、先の報告⁽³⁾（小麦グルテンのレオロジー的性質に及ぼす γ 線照射の影響）の試料の一部を用いておこなったものである。

グルテン中の-SH基の測定：100ml容ビーカーに支持電解液（0.2M硝酸カリ-0.05M酢酸）50mlをとり、15分間窒素を通気した後、試料0.6gを精秤し電解液に加え、電磁攪拌器で攪拌しながら充分分散させ、ついで18gの尿素を加える。試料分散後に尿素を加えるほうが分散は良好となるようである。窒素導入管を液中より引上げ窒素を液の表面に通じながらさらに5分間攪拌し、試料を完全に分散させた後、M/1,000塩化第2水銀溶液で-SH基の滴定を行なう。指示電極は回転白金電極、回転数は850r.p.m.、電圧は -0.2V (VS. S.C.E.)、電流測定には柳本自記記録式ポーラログラフPA-102型を使用した。

酢酸可溶性蛋白質中の-SH基の測定 1) 抽出：試料1.2gを精秤し、これにあらかじめ約 5° に冷却し窒素を充分通気した0.02N酢酸40mlを加え、窒素気流下で10分間電磁攪拌器で攪拌し、試料を酢酸溶液によく分散させる。ついでこの分散液を窒素を満たした遠心沈澱管に移し、ビーカーを上記酢酸溶液5mlで2回洗滌し遠心沈澱管に合し、3,000r.p.m.で3分間遠心沈澱した後上澄液の一部を測定に供した。遠心沈澱器はドライアイスで冷却し、遠心沈澱中液温が 10° 以上に昇らぬよう配慮した。

2) 滴定：約 5° に冷却し窒素を充分通気した支持電解液（0.4M硝酸カリ-0.08M酢酸）25mlに尿素18gを加え、これに前記抽出上澄液25mlを加え、滴定中液温が 5° 近くに保たれるように冷却しながらM/1,000

* The Effects of Gamma Irradiation on Wheat Gluten. Part IV. Changes of Sulfhydryl Group of Wheat Gluten by Gamma Irradiation. By Masao DOGUCHI (Tokyo-To Laboratories for Medical Sciences)

塩化第 2 水銀で滴定する。測定条件はグルテン中の -SH 基の測定と同様である。抽出上澄液を支持電解液に加える前に必ず尿素を加えておく必要がある。さもないときは抽出液に溶存している蛋白質が凝集し、白色の沈澱を生ずるからである。また抽出及び滴定を室温及び 30° で行なった場合の抽出液中の -SH 基の測定もあわせ行なった。

酢酸抽出液のポーラログラフ蛋白波の測定 試料 0.2 g を精秤し、0.02 N 酢酸溶液 50 ml を加え、電磁攪拌器で 5 分間攪拌し、その後 30 分間室温に放置後東洋濾紙 No. 2 で濾過した濾液について蛋白波を測定した。先の報告⁽²⁾と同一測定条件で測定したが、抽出液濃度は 2/3 に減じた。

また抽出温度及び電解温度を約 5° に下げた他は上記と同一条件で蛋白波の測定を行なう実験もこころみてみた。

蛋白質含量の測定 グルテン及び抽出液中の蛋白質含量はマイクロケルダール法によって測定した。

結果及び考察

グルテン中の -SH 基の変化

第 1 表に示されるように 300×10⁴rep 以下の線量では、照射による -SH 基の変化は認められないが、1,000×10⁴rep では明らかに -SH 基の増加が認められ、対照に比較して約 20% の -SH 基の増加が照射によって惹起していることが知られる。

第 1 表 照射による小麦グルテン中の -SH 基の変化

照 射 量 (×10 ⁴ rep)	-SH 基*		-SH 基のシステ イン換算量蛋白 mg/100g
	μeq/g 蛋白	σ**	
対 照	5.8	0.2	70.3
40	5.7	0.3	69.1
100	5.8	0.1	70.3
300	5.9	0.3	71.5
1,000	6.9	0.1	83.6

* 同一試料について 3 回測定の平均値

** 標準偏差

Sokol⁽⁹⁾ らは室温で小麦粉を電解液に分散及び滴定する時は -SH 基の損失を生ずることを報告しており、また Sullivan⁽⁸⁾ らも 10° 以下で測定して、室温での測定値の約 2 倍ほど高い値を得たことを報告しているので、当実験においても分散及び滴定操作を 5° 近くに保ち測定してみたが、室温 (22°) での測定値と差異がなく、測定温度条件の影響は認められなかった。

酢酸抽出液中の -SH 基の変化 : 照射によるグルテン酢酸抽出液中の -SH 基の変化は第 2 表のとおりである。

第 2 表 照射による小麦グルテン酢酸抽出液中の -SH 基の変化

照 射 量 (×10 ⁴ rep)	抽出液中の* -SH 基 (×10 ⁻⁶ M) σ		システイン 換算量** mg/100g 蛋白	溶解 度 (%)
	低 温 (約 5°) 測 定			
対 照	2.10	0.07	55.8	52.8
40	2.10	0.08	54.1	54.5
100	2.14	0.06	52.8	56.8
300	2.15	0.06	51.0	59.1
1,000	2.97	0.05	63.5	65.5
室 温 (約 20°) 測 定				
対 照	2.16	0.05	54.9	55.0
40	2.18	0.07	53.1	57.2
100	2.16	0.08	51.8	58.3
300	2.20	0.07	50.3	61.1
1,000	2.28	0.06	48.1	66.0
30° 測 定				
40	2.00		46.9	59.4
100	2.00		46.7	59.8
1,000	2.12		45.0	65.7

* 同一試料について 3 回測定の平均値 (ただし 30° 測定は 1 回)

** 酢酸可溶性蛋白 100 g 当りのシステイン mg

溶解度 = 酢酸可溶性蛋白 / グルテン総蛋白 × 100

低温での測定では、300×10⁴rep までは抽出液全量中の -SH 基は照射による変化を認めがたいが、照射量の増加につれて酢酸中に溶解する蛋白質質量が増加するので、おのおのの試料の酢酸可溶性蛋白質単位量当りの -SH 基は、照射量の増加につれて減少することになる。これに対して 1,000×10⁴rep 試料では、抽出液中の -SH 基は対照のそれより 40% ほど多くなり、酢酸可溶性蛋白質の増加にかかわらず単位蛋白質当りの -SH 基は、なお対照より約 10% ほど高い値を示した。

また室温における測定では、300×10⁴rep までは低温測定と同様の結果が認められたが、1,000×10⁴rep ではこれに反して抽出液中の -SH 基は減少し、他の試料とほぼ同じ値を示すようになり、従って単位蛋白質当りの -SH 基の減少が認められる。30° での測定でも同様の現象が認められこれらのことから、1,000×10⁴rep 試料の照射によって増加したと考えられる -SH 基は非常に不

安定なものであると推定されよう。

溶解度については、 $300 \times 10^4 \text{rep}$ までは抽出温度の上昇につれて酢酸に溶解してくる蛋白質量は増加するが、 $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ は他とことなつて抽出温度による溶解度の差異は認められなかった。

照射による酢酸抽出液中の $-\text{SH}$ 基の変化を解明するにはその不溶性部分中の $-\text{SH}$ 基も測定する必要があるが、対照及び低線量試料のこの部分は大変粘弾性の強いゴム状のかたまりとなり、電解液中によく分散させることができず、また高線量試料では遠沈沈澱部分から上澄液を除くとき沈澱の上部がはくりし上澄液中に移行し、ともに再現性のある測定値を得ることができなかった。

$1,000 \times 10^4 \text{rep}$ の滴定図は他の試料のそれらに比較して、過剰の塩化第 2 水銀による電流の増加率が低く、Kolthoff⁽⁷⁾ の報告にあるペプシン消化アルブミンと生アルブミンの滴定図の形状の差異のような変化が認められた。

第 3 表 照射小麦グルテン酢酸抽出液のポーラログラフ蛋白波

照射量 ($\times 10^4 \text{rep}$)	第 1 波 (mm)	第 2 波 (mm)
抽出 室温 電解 25°		
対 照	55	78
40	55	78
100	54	78
300	54	78
1,000	53	79
抽出 7° 電解 3.5°		
対 照	29	61
300	31	62
1,000	30	62

酢酸抽出液のポーラログラフ蛋白波：先の報文⁽²⁾で小麦グルテン酢酸抽出液の蛋白波は、照射によって波形波高とも変化しないことを認めたが、試料グルテンを異にする当実験においても同様の事実を再確認した。

低温で抽出及び測定するときは、 $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ 試料の酢酸抽出液中の $-\text{SH}$ 基は対照に比較して約 1.4 倍になることから、蛋白波が蛋白中の $-\text{SH}$ 基、 $-\text{SS}-$ 基にもとづく(10~13)ものであれば、少なくともこの $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ の蛋白波に変化のあることも期待されるので、抽出～電解にわたる一連の操作をすべて低温でおこなつて

たが、対照との間に差異は認められなかった。照射変性グルテンの酢酸可溶性蛋白フラクションのポーラログラフ蛋白波は興味ある問題を含み、さらに目下検討中である。

以上の結果を総括すると、当実験の結果からは $300 \times 10^4 \text{rep}$ 以下の線量の試料では、照射による $-\text{SH}$ 基の変化について明確な結論をくたしえないが、この線量までは $-\text{SH}$ 基に変化があるとしてもわずかなものであらうと推定される。

しかるに $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ では明らかに $-\text{SH}$ 基の増加をきたすことが認められ、またその一部は大変不安定な状態で存在すると思われる。この増加 $-\text{SH}$ 基が $-\text{SS}-$ 基の開裂に由来するとしても、その $-\text{SS}-$ 基はグルテン中の $-\text{SS}-$ 基の約 1% 強〔シスチン含量 1.9 mg/g 蛋白(H)として〕にしか当たらない。

グルテンのレオロジー的性質と $-\text{SH}$ 基とは密接な関係を有することは今日ほぼ定説化されているが、照射によるレオロジー的性質の変化を本報の $-\text{SH}$ 基測定結果と直接むすびつけることはできなかった。

要 約

(1) 小麦グルテンの $-\text{SH}$ 基は $300 \times 10^4 \text{rep}$ の線量までは変化せず、 $5.7 \sim 5.9 \mu\text{eq/g}$ 蛋白であるが、 $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ の高線量では対照より約 20% ほど $-\text{SH}$ 基の増加を認めた。

(2) グルテンの 0.02N 酢酸抽出液中の $-\text{SH}$ 基は低温(約 5°)で抽出及び滴定するときは、 $300 \times 10^4 \text{rep}$ までは変化が認められないが、 $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ では対照に比較して約 40% ほど高い値がえられたが、室温(約 20°)で測定すると $300 \times 10^4 \text{rep}$ までの結果は低温での測定と同じであったが、 $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ の $-\text{SH}$ 基は減少し他の試料にはほぼ等しい値を示す。このことから照射によって増加した $-\text{SH}$ 基はたいへん不安定なものであることが認められる。また低温、室温測定とも照射量の増加につれて酢酸可溶性蛋白は増加するので、 $1,000 \times 10^4 \text{rep}$ の低温測定を除いた他はすべて単位蛋白当りの $-\text{SH}$ 基は減少する。

(3) グルテンの酢酸抽出液のポーラログラフ蛋白波は照射によって変化しないことを再確認したが、この現象は抽出液中の $-\text{SH}$ 基の測定結果からは説明しえなかった。

当実験について御指導たまわつた東京水産大学岡田郁

之助教授, 御討論御批判いただいた京都大学秦忠夫教授, 日本製粉青山監査役に深く感謝いたします。

- (1) 道口正雄, 横山義春, 岡田郁之助: 工化誌, **62**, 1883 (1959).
- (2) 道口正雄, 岡田郁之助: 同上, **65**, 1837(1962).
- (3) 道口正雄, 横山義春, 岡田郁之助: 同上, **66**, 196 (1963).
- (4) H. A. Sokol, D. K. Mecham, J. W. Pence: *Cereal Chem.*, **37**, 151 (1960).
- (5) H. Matsumoto, I. Hlynka: *ibid.*, **36**, 513 (1959).
- (6) R. Frater, F. J. R. Hird, H. J. Moss, J. R.

Yates: *Nature*, **186**, 451 (1960).

- (7) I. M. Kolthoff, W. Stricks, L. Morren: *Anal. Chem.*, **26**, 366 (1954).
- (8) B. Sullivan, L. Dahle, F. Larson: *Cereal Chem.*, **38**, 272 (1961)
- (9) H. A. Sokol, D. K. Mecham, J. W. Pence: *ibid.*, **36**, 127 (1959).
- (10) 松浦二郎他: 日化誌, **83**, 287 (1962).
- (11) J. W. Pence, *et al.*: *Cereal Chem.*, **27**, 335 (1950).
- (12) 笹井外喜雄: 化学と工業, **14**, 530 (1961).
- (13) 館勇編: ポーラログラフイー, 岩波書店, p-393 (1954)