濁度法による小麦グルテン粒子の凝集速度の測定

荒川 力, 松本幸雄, 米沢大造

(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 48 年 10 月 29 日 受 理

Determination of Aggregation Velocity of Wheat Gluten Particles by Turbidimetry

By Tsutomu ARAKAWA, Sachio MATSUMOTO and Daizo YONEZAWA

*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture*

A kinetic study on the aggregation of gluten particles was made by measuring the change of turbidity with a recording spectrophotometer at pH 5.3 in the presence of 1M NaCl and 0.05M phosphate. To analyze the turbidity change, an equation $d\tau/dt = r/\tau^2$ (τ : turbidity, t : time) was derived from Smolukowski's equation $-dN/dt = KN^2$ (N : particle number) by relating the decrease of particle number by aggregation to the increase of the turbidity. The parameter r in the derived equation is proportional to the rate constant of aggregation K and to the fourth power of gluten concentration C in the system.

The values of r were determined from the results of turbidity measurements at the different gluten concentrations and the proportionality of r to C^4 was confirmed in accordance with the theory. The values of r/C^4 were determined with the gluten preparations obtained from four kinds of wheat flour different in quality. They were 6.22×10^4 , 8.76×10^4 , 12.7×10^4 , and 14.2×10^4 for a weak flour, two kinds of medium flour, and a strong flour, respectively.

(Received October 29, 1973)

緒 言

グルテンタンパク質は、小麦粉ドウのレオロジー的性質を支配する重要な成分である。ドウ形成において、水で膨潤したグルテンタンパク質は、混ねつにより分散凝集をくり返しマトリックス構造を形成する。そしてこのグルテンマトリックスの構造と物理的性質が、ドウの粘稠性やその持続性等の性質を決めるものと考えられている。

このように考えると、グルテンタンパク質の凝集性がドウのレオロジー的性質に重要な役割をになっていることになる。著者らは、このような考えのもとにグルテンタンパク質の凝集性を支配する因子を究明しようと考えた。この因子を明らかにすれば、従来小麦粉の性質の違いはグルテンタンパク質の「品質」によるといわれてきたが、その「品質」なるものの本質を解明するのに、重

要な手がかりが得られよう。

グルテンタンパク質の凝集性を支配する因子を明らかにするためには、まず凝集性を測定する方法を確立しなければならない。本報は、グルテンの希酢酸溶液の pH とイオン強度を上昇させたときに生ずるグルテン粒子の凝集にもとづく濁りの時間的変化の測定から、グルテン粒子の凝集性を定量的に示すパラメーターを決定する方法について検討したものである。本報では、品質を異にする 4 種の小麦粉からグルテンを分離して実験に用いたが、測定の結果これら 4 種のグルテンは凝集性を異にし、薄力、中力、強力粉の順に凝集性が高くなる結果が得られた。

理 論

分散系において分散粒子に凝集が生じるとき、凝集速度をあらわす式として、Smolukowski^(1,2)により次式が

提示されている。

$$-\frac{dN}{dt} = KN^2 \quad (1)$$

ここで N は、時間 t において単位体積中に存在する分散粒子の数、 K は速度定数である。この K が求められるならば、粒子の凝集性を比較するのに有用なパラメータとして用いることができよう*。

K を求めるためには N の時間的変化を十分な精度で測定する必要があるが、分散粒子が小さく、しかも変化が速い系では、粒子数を直接測定することはきわめて困難である。そこで N の代わりに実測の可能な濁度を用いて、(1) 式を書きあらわすことを試みた。

直径 D の球形粒子を分散相とする懸濁液の濁度 τ は、次式であらわされる^(3,4)。

$$\tau = QND^2$$

ここに Q は粒子の光散乱係数、 N は単位体積中の粒子数である。粒径に分布があるときは、 τ はそれぞれの大きさの粒子による濁度 τ_i の総和として次式で与えられる。

$$\tau = \sum_i Q_i N_i D_i^2$$

しかし粒径の分布があまり大きくない場合は、近似的に平均粒径 $\bar{D}$ を用いて次式であらわすことができる。

$$\tau = QN\bar{D}^2 \quad (2)$$

Q は一般に粒子の大きさと形、測定光波長、粒子と媒質の屈折率比等の複雑な関数で、Jöbst⁽⁵⁾ および Sinclair⁽⁶⁾ は球形粒子に対して近似的に次の関係を与えた。

$$Q = \frac{1}{2} \left\{ \frac{2\pi(m-1)}{\lambda} \right\}^2 \bar{D}^2, \quad m = \frac{n}{n_0} \quad (3)$$

ここに n , n_0 はそれぞれ分散粒子、媒質の屈折率、 λ は測定に用いた光の媒質中における波長である。この式は、分散粒子が λ と同程度の大きさで、 m の値が 1 に近い場合によくあてはまるとされている。

* K は次式であらわす内容をもつ速度定数である^(1,2)。

$$K = \left[\frac{4\kappa T}{3\eta} \right] \left[e^{-\frac{E}{RT}} \right]$$

κ : Boltzmann 定数, R : 気体定数, T : 絶対温度, η : 媒質の粘度, E : みかけの活性化エネルギー。

この式で $[4\kappa T/3\eta]$ は、分散粒子の熱運動にもとづく媒質中における粒子間の衝突の確率を示し、温度と分散媒を一定にすれば一定の値をとることになる。したがって K の特性性は、粒子の衝突が凝集に有効な場合の確率をあらわす項 $[e^{-E/RT}]$ によって示される。

一方、単位体積中で分散相が占める容積を $\bar{V}$ とすると、粒径の分布が大きくない場合には、 $\bar{V}$ は近似的に次式で与えられる。

$$\bar{V} = \frac{4}{3}\pi N \left(\frac{\bar{D}}{2} \right)^3 \quad (4)$$

(2) 式と (3) 式から

$$\tau = \frac{1}{2} a^2 N \bar{D}^4 \quad (5)$$

$$a = 2\pi(m-1)\lambda^{-1}$$

(5) 式と (4) 式から $\bar{D}$ または N を消去することにより、 τ と N または $\bar{D}$ の関係をあらわす (6) および (7) 式が得られる。

$$\tau = \frac{1}{2} a^2 b^4 N^{-1/3} \quad (6)$$

$$\tau = \frac{1}{2} a^2 b^3 \bar{D} \quad (7)$$

$$b = (6\bar{V})^{1/3} \pi^{-1/3}$$

(6) 式において a および b は時間に無関係な定数とみなせるから、(6) 式を t で微分することにより、

$$\frac{d\tau}{dt} = -\frac{1}{6} a^2 b^4 N^{-4/3} \frac{dN}{dt} \quad (8)$$

(8) 式に (1) 式の関係を代入すると、

$$\frac{d\tau}{dt} = \frac{1}{6} a^2 b^4 K N^{2/3} \quad (9)$$

(9) 式と (6) 式から N を消去すると (10) 式が得られる。

$$\frac{d\tau}{dt} = \frac{r}{\tau^2} \quad (10)$$

ここに

$$r = \frac{1}{24} a^6 b^{12} K = \frac{3456\pi^2}{\lambda^6} (m-1)^6 \bar{V}^4 K \quad (11)$$

また $t=0$ における濁度を τ_0 とすると (10) 式を t で積分して (12) 式が得られる。

$$\tau^3 = 3rt + \tau_0^3 \quad (12)$$

(12) 式によれば、実測される τ^3 と t をプロットして得られる直線の傾斜から r が求められる。

一方 r は速度定数 K と (11) 式に示す関係にある。ここで、分散相がタンパク質粒子からなる場合を考えてみる。すなわち単位体積中のタンパク質の重量濃度を C とすると、分散相を形成するタンパク質粒子の容積 $\bar{V}$ は次式で与えられる。

$$\bar{V} = IvC \times 10^{-2} \quad (13)$$

この式で v はタンパク質 1g が形成する分散粒子の総容積(膨潤性)、 I は粒子を形成しているタンパク質の全タンパク質に対する割合(%)である。(13) 式を (11) 式に

代入すると、

$$r = \frac{3456\pi^2}{\lambda^6} (m-1)^6 \left(\frac{IvC}{100} \right)^4 K \quad (14)$$

ここで $r/C^4 = k$ とおくと、

$$k = \frac{r}{C^4} = \frac{3456\pi^2}{\lambda^6} (m-1)^6 \left(\frac{Iv}{100} \right)^4 K \quad (15)$$

となり、 k は速度定数 K に比例するところのタンパク質濃度に無関係な定数となり、タンパク質粒子の凝集性を示す尺度として用いることができる。

試料および実験方法

1. グルテンの調製 原料小麦粉として、強力粉、中力粉、薄力粉に格付けされている未漂白の小麦粉4種を用いた。これらの小麦粉から調製されたグルテンを、本報ではそれぞれグルテンS(強力粉)、グルテンM-1およびM-2(中力粉)、グルテンW(薄力粉)と呼ぶことにする。

グルテンの調製は Jones らの方法⁽⁷⁾にしたがって行なった。すなわち *n*-butanol で脱脂した小麦粉から常法により採取した湿グルテンを、タンパク質濃度がほぼ5%になるように0.01M酢酸に分散させ、5000rpmで遠心分離し、さらにその上澄部を16,000rpmで遠心分離して不溶部分を除き、プロテナーゼを失活させるために98°Cで10分間加熱した後、凍結乾燥してグルテンを得た。

2. グルテン粒子分散系の濁度の経時変化の測定 0.01M酢酸に溶解したグルテン溶液(濃度0.02%前後)に、等量の2M食塩を含むpH5.3の0.1Mリン酸緩衝液を添加して、グルテンの凝集にもとづく微細な粒子の生成により系に生じた濁度の経時変化を、日立自記分光光度計を用いて記録した。この測定は、液相の厚さ1cmの石英セルを用い、波長350mμにおいて、20°Cで行なった。

3. タンパク質濃度の測定 ミクロケルダール法により測定した窒素量に5.8を乗じることによって、グルテンタンパク質の量を求めた。

4. グルテン粒子の膨潤度の測定 0.01M酢酸に溶かした4%グルテン溶液3mlを遠沈管にとり、等量の2M食塩を含むpH5.3の0.1Mリン酸緩衝液と混合後、2時間放置し、50,000rpmで1時間遠心分離することによって得たグルテンのペレットの容積を、比重びんを用いて測定した。すなわち比重びんの重量 W_1 、これにペレットを入れたときの重量 W_2 、さらにこれに水を満

たしたときの重量 W_3 、比重びんに水だけを満たしたときの重量 W_4 をそれぞれ測定し、ペレットの容積 V_p を次式で算出した。

$$V_p = \frac{(W_4 - W_1) - (W_3 - W_2)}{\rho_w}$$

ここに ρ_w は、測定に用いた水の密度である。

一方ペレットに含まれるグルテンの量は、比重びんからペレットを水とともに別の容器に移し、これに比重びんの洗浄液(0.1M酢酸)を加え、グルテンを溶解分散させ、0.1M酢酸で100ml定容とし、その一部をとってケルダール法で窒素量を測定することによって求めた。測定されたグルテンの量 p と先に求めた V_p とから、グルテン1gあたりのペレットの容積 $v (= V_p/p)$ を算出し、これをもってグルテン分散粒子のタンパク質1gあたりの容積とした。

結果と考察

1. 濁度の経時変化

0.01M酢酸に溶解した0.02%グルテン溶液に、2M食塩を含むpH5.3の0.1Mリン酸緩衝液を添加して生じた濁りを観察すると、小麦粉の種類によって異なる挙動をとることが肉眼的に観察された。グルテンWを用いた場合系の濁りは長時間青い色を残していたが、グルテンSを用いた系では速やかに白濁に変化した。Fig. 1は3種のグルテンに関する混合後の濁りの経時変化を、分光光度計により測定した結果である。濁度は、ど

Fig. 1. Turbidity Change by Aggregation of Gluten Particles after Mixing Gluten Solution with Buffer.

Gluten solution (0.02%) in 0.01M acetic acid was mixed with an equal volume of 0.1M phosphate buffer (pH 5.3) containing 2M NaCl and the turbidity of the mixture was measured with a recording spectrophotometer.

のグルテンにおいても最初速やかに増加し、徐々にその増加速度を減じ一定の値に近づいていく傾向を示したが、濁度の大きさは原料小麦粉によって異なり、グルテンS、グルテンM-1、グルテンWの順であった。

2. r および k の決定

Fig. 2の曲線は、グルテンSを用いた初期の濁度の経時変化を、記録紙の送りの速度を増して、より詳細に観測した結果で、Fig. 3はこの結果を用いて行なった τ^3 vs. t のプロットである。Fig. 3のプロットの初期の部分は

Fig. 2. Turbidity Change in an Early Stage of Aggregation.

The measurements were made with gluten S. C : gluten concentration.

Fig. 3. Plot of τ^3 vs. t . Time for the Results Shown in Fig. 2.

The values of r were determined from the slopes of the plots. C : gluten concentration.

かなりよい直線性を示すが、時間の経過とともに直線からのずれがあらわれるようになる。この原因の一つとして、速度定数 K が凝集の進行にともなって変化することが考えられる。したがって各種グルテンの凝集性を比較するには、初期の直線性を示す部分を用いるのが適切であると思われる。

各種のグルテンについて、 τ^3 vs. t のプロットの直線の傾斜から r を決定した。Fig. 4は、各種のグルテンについていくつかの濃度において測定された r の値を、濃度 C の4乗に対してプロットした結果である。(14)式によれば r は C^4 に比例するはずであるが、Fig. 4の結果は、そのような関係が成立することを示している。直線の傾斜より $k(=r/C^4)$ の値が求められ、グルテンW、M-2、M-1、Sの値はそれぞれ 6.22×10^4 、 8.76×10^4 、 12.7×10^4 、 14.2×10^4 であった。

3. グルテンの膨潤度と溶解タンパク質量の測定

(15)式によると、 k は K だけでなく、膨潤度 v 、屈折率比 m 、溶解性 I にも依存する値である。そこで、4種のグルテンのこれらの値について検討を加えた。

a. v および m の測定: 膨潤度 v の値をTable Iに示した。約4%の変動を測定誤差範囲内と考えると、4種のグルテンの膨潤度は同程度とみなされる。またグルテンが形成する粒子の屈折率は、膨潤の程度によってきま

Fig. 4. Plot of r vs. C^4 .

C : gluten concentration.

Table I. Values of v and I for the Gluten Preparations Used

Gluten	v (ml/g gluten)	I (%)
S	1.84	84
M-1	1.80	83
M-2	1.81	84
W	1.89	81

ると考えられるから、膨潤度が同程度であれば粒子の屈折率、したがって屈折率比 m もほぼ同じ値をとるものとみなしてよいであろう。

b. I の測定: 濁度測定の場合と同様にして、グルテン溶液と緩衝液とを混合し、2 時間放置後 50,000rpm で 1 時間遠心分離し、その上澄部のタンパク質量を測定した結果、Table I に示すように、 I はいずれも 83% 前後の値を示した。

以上の測定の結果、 v , m , I はグルテンの種類によってあまり大きく変動しないことが示された。したがって k は、主として凝集の速度定数 K に依存する値とみなすことができる。

なお v および I の値が、このようにグルテンの種類によってあまりかわらなかつたのは、系に 1M 食塩を含ませてグルテンの溶解をおさえたためであって、もし塩濃度を低くすれば、グルテンの溶解が増すとともに膨潤も大きくなり、このような条件のもとでは、グルテンの種類によって、 v や I の値にかなりのひらきが見られることになったかもしれない。

4. 各種グルテンの凝集性の遠心法による比較

上述の実験に用いたグルテン S, M-1, W について、それらの凝集性の違いを遠心法によって調べてみた。すなわち 0.01M 酢酸に溶かした 0.2% グルテン溶液に、pH 6.3 の 0.1M リン酸緩衝液 (食塩を含まない) を等量添加しよく振とうした後、10 分、90 分、24 時間後懸濁液の適量を 500rpm で 1 時間遠心分離して、上澄部のタンパク質量を測定した。その結果を Table II に示す。本実

Table II. The Amount of Nitrogen Remaining in the Supernatant after Centrifugation

Gluten	Supernatant $N \times 100 / \text{Total } N$		
	10 minutes	90 minutes	24 hours
S	46%	44%	36%
M-1	54	50	38
W	96	92	86

The gluten suspensions were centrifuged at 500rpm for 1 hour after standing for 10 minutes, 90 minutes and 24 hours.

験では、凝集を起こさせる条件が濁度法の場合とは少し異なっていたが、各種グルテンの凝集性の傾向は濁度法により求められたものと一致していた。

以上の測定によって、原料小麦粉を異にする 4 種のグルテンは凝集性を異にすることが明確に示された。この違いがいかなる要因によりもたらされるのかを明らかにすることが、今後に残された課題である。

要 約

(1) 0.01M 酢酸に溶解したグルテン溶液を pH 5.3, 食塩濃度 1M としたときに析出するグルテンの凝集にもとづく濁りの変化を、自記分光光度計を用いて記録した。

(2) この測定結果からグルテン粒子の凝集速度を求めるために、分散粒子の凝集速度を示す Smolukowski の式 $-dN/dt = KN^2$ (N : 粒子数, t : 時間, K : 凝集の速度定数) を、分散系の濁度 τ と関係づけることにより、式 $d\tau/dt = r/\tau^2$ を導いた。ここに r は K に比例する定数である。

(3) この式を用いて濁度の経時変化から r の値を求め、この値が、理論の示すとおりタンパク質濃度 C の 4 乗に比例することを確かめた。

(4) 品質を異にする小麦粉より分離した 4 種のグルテンについて求めた $k (= r/C^4)$ の値は、それぞれ 6.22×10^4 (薄力粉), 8.76×10^4 (中力粉), 12.7×10^4 (中力粉), 14.2×10^4 (強力粉) であって、薄力粉, 中力粉, 強力粉の順に凝集速度が大きくなる結果を得た。

- (1) M. v. Smolukowski : *Phys. Z.*, **17**, 557 (1916).
- (2) M. v. Smolukowski : *Z. Phys. Chem.*, **92**, 129 (1917).
- (3) G. F. Lothian and F. P. Chappel : *J. Appl. Chem.*, **1**, 475 (1951).
- (4) J. D. S. Goulden : *Trans. Faraday Soc.*, **54**, 941 (1958).
- (5) G. Jöbst : *Ann. Physik.*, **78**, 157 (1925).
- (6) D. Sinclair : *J. Opt. Soc. Am.*, **37**, 475 (1947).
- (7) R. W. Jones, N. W. Taylor and F. R. Senti : *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 363 (1959).