酵素修飾蛋白質の製パンへの応用

加藤珠美*・島田淳子**・荒井綜一***

Application of an Enzymatically Modified Protein to Bread Making

Tamami KATO*, Atsuko SHIMADA** and Soichi ARAI***

*St. Catalina College, Hojo-shi, Ehime, 799-24

** Ochanomizu Univ., Bunkyo-ku, Tokyo, 112

*** Tokyo Univ., Bunkyo-ku, Tokyo, 113

An enzymatically modified protein was applied to bread making as an improving agent. Baking quality was valued through loaf volume, grain size of clumb and rate of the hardening during storage. Addition of modified gelatin which contained L-leucine dodecyl ester covalently to bread resulted in excellent effects, but gelatin, the mixture of gelatin hydrolysate and L-leucine dodecyl ester, and L-leucine dodecyl ester did not have any effect. The measurement of unfrozen water by a pulsed NMR spectrometer suggested that more water in the bread with the enzymatically modified protein was kept in the loosely bound state than in the bread without the surfactant over a long period of storage.

(Received Feb. 18, 1983)

食品蛋白質にアミノ酸エステルを共有付加しうる新しい酵素修飾法が開発され¹⁾, これによって両親媒性機能が付与された修飾蛋白質について, 食品加工あるいは調理における界面活性剤としての利用が試みられている²⁾。非常に親水性の高いゼラチンに疎水性のL-ロイシン *n*-アルキルエステルをバブイン存在下のpH 9という条件で反応させると両者は共有結合し, 両親媒性をもつ物質が生成する。しかもL-ロイシン *n*-アルキルエステルのアルキル鎖長の長さによってその機能特性は変化し, C₄~C₆ 鎖長のときに起泡性が, C₁₀~C₁₂ 鎖長のときに乳化性が最大となる³⁾⁴⁾。さらに, 実際に食品に応用してみると, C₂~C₆ のL-ロイシンエステルを導入したゼラチンはスノーゼリーに対して生クリームに近いテクスチャーを与え, C₁₂ のL-ロイシンドデシルエステルを導入したゼラチンはマヨネーズの乳化剤として有効であるばかりでなく⁵⁾, パンの品質改良剤としても有用であることが示唆された²⁾。

パンにおいて乳化剤は, ドウの耐性の向上, 内相の改良, 膨化体積の向上あるいは老化抑制というような効果を

を期待して品質改良剤として現在, 使用されているが, 1種類の乳化剤でこれらの効果のすべてを満たすものはなく, 用途に応じて最適のものを選ぶか, あるいは幾種類かを混合して用いられている。我が国では, 食品用乳化剤としてグリセリン脂肪酸エステル, ソルビタン脂肪酸エステル, プロピレングリコール脂肪酸エステル, ショ糖脂肪酸エステル, 大豆リン脂質およびパンにのみ添加できる乳化剤としてステアリン乳酸カルシウムが使用されているが, パン用乳化剤として一般に使用されているのはグリセリン脂肪酸エステルのみである。外国ではパン用乳化剤として他にステアリン乳酸ナトリウム, ステアリン乳酸カルシウムなどが使用されており, その諸効果の発現機構については詳しく研究されているが⁶⁾, 蛋白質状の乳化剤を使用した例は報告されていない。

本研究は WATANABE ら²⁾の方法によってゼラチンにL-ロイシン *n*-ドデシルエステルを共有付加して得た修飾蛋白質のパンに対する応用可能性をさらに検討し, 若干の知見を得たのでここに報告する。

* 聖カタリナ女子短期大学 (〒 799-24 愛媛県北条市北条 660 番地)

** お茶の水女子大学 (〒 112 東京都文京区大塚 2-1-2)

*** 東京大学 (〒 113 東京都文京区弥生 1-1-1)

試料および方法

1. 試料

(1) 材料

ゼラチンは関東化学（株）から、L-ロイシンは日本理研化学薬品（株）から得た。酵素としてはマイルス社のパバイン（ 1.16×10^{-2} BAPA 単位）を使用した。小麦粉は日清製粉（株）の強力粉カメリアを使用した。その他の原料成分としてドライイースト（オリエンタル酵母（株））、臭素酸カリウム（和光純薬（株））、水素添加ヤシ油（不二製油（株））、モノステアリン（東京化成工業）を使用した。

(2) 酵素修飾蛋白質の調製

L-ロイシンドデシルエステルは *p*-トルエンスルホン酸による C-活性化法⁸⁾を用いて調製し、アセトン/水で結晶化を行った。L-ロイシンドデシルエステルをゼラチンに共有付加する際の条件は既報²⁾に従い、ゼラチン濃度 33% (w/w)、パバインとゼラチンの比 1/100 (w/w)、ロイシンドデシルとゼラチンの比 0.1 mol%，温度 37°C、反応時間 15 分とした。反応溶媒として 80 容の 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9) に 20 容のアセトン (2 mM メルカプトエタノール含有) を混合したものをを用いた。酵素反応は 1 N 塩酸で停止し、反応物全体を 4 日間流水透析して凍結乾燥した。さらに遊離の D-デシルエステルを除くため、ジクロルメタン洗滌を行い、薄層クロマトグラフィーを用いて試料中から遊離ロイシンドデシルエステルが除かれていることを確認した。このようにしてゼラチンに L-ロイシンドデシルエステルを共有付加して得た修飾蛋白質を以下の実験に供した。また、同様の条件で L-ロイシンドデシルを用いずに反応を行い、ゼラチン水解物を得た。そのほか、対照として未修飾ゼラチン、L-ロイシンドデシルエステルそのもの、L-ロイシンドデシルエステルとゼラチン水解物の混合物 (1 mol/12 000 g) およびモノステアリンを用いた。既報¹⁾によれば、この修飾蛋白質の平均分子量は 7 500 であり、ゼラチン 1 分子につき平均 1 分子の L-ロイシンドデシルエステルが導入されていることが認められている。なお、ゼラチン水解物・ロイシンドデシルエステル混合物はゼラチン水解物 (平均分子量/12 000) 1 分子について L-ロイシンドデシルを 1 分子の割合で混合して用いた。

2. 酵素修飾蛋白質の乳化力の測定

修飾蛋白質 200 mg を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に 25°C で 20 分浸漬したのちコーン油 20 ml を加え、10 000 rpm で 3 分間ホモゲナイズし (日本精機ホモ

ゲナイザー AM-5) エマルジョンを調製し、これを 1 000 rpm で 5 分間遠心分離した。乳化力はクリーム層量 (ml) と総量 (ml) の比として計算した。

3. 製パン法

製パンは実験室規模で行った。まず、ドライイースト 1.25 g に 40°C の水 15 ml を加え、38°C で 15 分予備発酵させた。次にヤシ油 2.5 g に修飾蛋白質および対照として用いたもの 0.4 g を懸濁させ、さらに水 15 ml を入れて、食塩 1.0 g、蔗糖 2.0 g、臭素酸カリウム 0.001 g を溶解させた。ここにドライイーストを加え、さらに小麦粉 50 g を加え、木箸 1 本で 100 回攪拌混合したのち、レディスニーダー (大正電機 (株) パンこね機) で 8 分間混ねつしてドウをつくった。以上の操作は 20°C の恒温室にて行った。混ねつしたドウは密閉容器に入れて第一発酵 (28°C) を行い、ガス抜きし、さらに第二発酵 (28°C) を行った。ただし発酵時間は既報²⁾では第一発酵 80 分、第二発酵 30 分としたが、本実験では第一発酵 30 分、第二発酵 20 分とした。発酵後、20 g ずつに分割し、30 分間ねかせ、麺棒で厚さ 0.5 cm 以下にのばしたのち、成形して底径 4.2 cm のブディング型に詰めた。40°C で 30 分間ほいろを行い、霧吹きし、200°C で 18 分焙焼した (三田村理研 LAB オープン使用)。

4. パンに関するパラメーターの測定

(1) 膨化体積

焙焼後、1 時間室温放置し、菜種法により測定した。

(2) 内相の硬さの変化

テクスチュロメーター ((株) 全研 Model GTX-2) を使用し、直径 1.8 cm のルサイト製ブランジャー、平皿を用いて、クリアランス 1 mm、電圧 1 V、チャートスピード 750 mm/回、そしゃくスピード Low、温度 20°C で測定した。試料は製造後 1・2・3・4 日経過したパンの内相中心部を 1 cm³ に切ったものとした。なお、パンの保存条件は 20°C、*A_w* 0.93 (Na₂SO₄・10 H₂O の飽和蒸気と平衡化) とした。

(3) 内相のきめ

パン断面を写真撮影した。

(4) 官能検査

各パン試料について製造 3 日後の内相の硬さを 10 人のパネルによって調べ、順位法で評価した。

(5) パルス NMR による凍結曲線 および不凍水量の測定装置は温度可変型パルス核磁気共鳴分析計 (Plaxis モデル PR-1005 VT 周波数 10.72 MHz) を使用し、次の条件で測定した Function 90°, Display FID, P.C. clock 0.9 S, Variable delay-SW)。試料は製造 1~3 日

表1 パンの成績に及ぼす修飾蛋白質の影響^a

試料 ^b	膨化体積 (ml)	硬さ (kg) ^c			
		1日後	2日後	3日後	4日後
無添加	72.3±2.6	3.1±0.4	4.4±0.1	5.2±0.3	5.7±0.5
ゼラチン	72.1±3.7	2.7±0.2	3.9±0.2	5.1±0.3	5.7±0.5
ロイシンドデシルエステル	65.3±2.2	3.0±0.2	4.5±0.2	4.6±0.5	5.0±0.2
ゼラチン水解物+ロイシンドデシルエステル	70.2±2.3	2.9±0.2	3.7±0.2	4.1±0.3	4.5±0.2
修飾蛋白質	75.9±2.4	2.3±0.2	2.5±0.1	3.1±0.2	3.3±0.2
モノステアリン	73.1±1.3	2.6±0.2	3.0±0.2	4.4±0.5	5.0±0.2

^a 各データは4回繰返実験の平均値±標準偏差^b 試料濃度: 小麦粉に対して 0.8%^c 測定条件: 試料の大きさ 1cm³, ブラウンジャー径 1.8cm ルサイト製, 皿平皿, クリアランス 1mm, 電圧 1V, 温度 20°C

後のパンの内相とし, 直径1cmのNMR管に充填し, 中央に熱電対温度計(飯尾電機 EDH-613 スリーベンコーダー)を挿入し, -12°Cに至るまでの各温度におけるシグナル強度を読み取った。-12°Cおよび-20°Cにおける不凍水量を既報⁹⁾¹⁰⁾によって算出し, 乾物1g当たりとして表わした。乾物量は試料を105°C常圧乾燥させてあらかじめ求めておいた。

結 果

1. 乳化力

修飾蛋白質とゼラチン水解物の乳化力を測定したところ, ゼラチン水解物は乳化力が0であったが, 修飾蛋白質は0.74という高い乳化力を示した。

2. パンに関するパラメーター

既報²⁾は, 修飾蛋白質の効果を現在一般的に使用されているモノステアリンと比較することのみを目的としたが, 今回は, この他に対照としてゼラチン, ゼラチン水解物・ロイシンドデシルエステル混合物, ロイシンドデシルエステルをも用い, 修飾蛋白質の効果を詳細に検討した。製パンし, 膨化体積および硬さの経日的変化を測定した結果を表1にまとめた。膨化体積はロイシンドデシルエステル添加群において最も小さく, ゼラチン, ゼラチン水解物・ロイシンドデシルエステル混合物の添加群は無添加群とほとんど差はなく, 修飾蛋白質を添加した群が最も大きかった。また, 本実験でつくったパンでは, テクスチュロメトリーによって測定した硬さが4.0kg以上になると硬いと感じられた。ロイシンドデシルエステル添加群のパンおよび無添加群のパンでは, 2日後には硬さが4.0kgを越え, ゼラチン添加群のパン, ゼラチン水解物・ロイシンドデシルエステル混合物添加

表2 各種パン試料のやわらかさの官能検査による評価

パネル No.	やわらかい順			
	無添加群	ゼラチン 水解物添 加群	修飾蛋白 質添加群	モノステ アリン添 加群
1	3	2	1	4
2	4	1	3	2
3	3	2	1	4
4	3	2	1	4
5	3	4	1	2
6	3	1	2	4
7	3	1	2	4
8	4	2	1	3
9	4	2	3	1
10	1	3	2	4
順位合計	31	20	17*	32

* 5%の危険率で有意差あり

試料 各群でパンは8個つくり, 20°Cで3日保存した。

群のパンは2日後は4.0kgより若干小さい値を示し, 3日後には4.0kg以上となった。修飾蛋白質添加群のパンは4日後でも3.3kgという低い値でやわらかかった。さらに官能検査によってもこの群のパンは製造3日後において他のいずれのものよりやわらかいことが確認された(表2)。

図1から観察されるパンの内相は修飾蛋白質添加のパンがきめ細かく美しかった。また膨化もよく行われていることが伺われる。

図1 パン内相の「きめ」に及ぼす修飾蛋白質の影響

3. パルス NMR による凍結曲線および不凍水量

図2はパンの凍結曲線を示し、修飾蛋白質添加のパンと無添加のパンについて経日的に変化を比べたものである。凍結曲線は横軸にパンの内部温度を、縦軸に0°Cのときの FID シグナル強度を 100 としたときの各温度におけるシグナル強度の換算値をとってプロットすることにより作成した。

無添加のパンでは保存1日経過後、パンの内部温度が-12°Cに至ると同時にシグナル強度は減少した。すなわちパン中の一部の水が凍結したことを示す。2日後、

図2 パンの凍結曲線の経日的変化に及ぼす酵素修飾蛋白質の影響

表3 パン中の -12°C および -20°C における不凍水量の変化

	-12°Cにおける 不凍水量 (g/乾物 1g)			-20°Cにおける 不凍水量 (g/乾物 1g)		
	1日 後	2日 後	3日 後	1日 後	2日 後	3日 後
修飾蛋白質	0.50	0.47	0.45	0.23	0.26	0.24
無添加	0.50	0.25	0.27	0.26	0.23	0.24

3日後としないで水の凍結開始温度は上昇した。一方、修飾蛋白質添加のパンにおいてシグナル強度が急激に減少する現象は -12°C までは認められず、修飾蛋白質添加パン中の水は3日経過後も -12°C においてほとんど凍結しなかった。-12°C における不凍水量は表3に示されるように修飾蛋白質添加のパンが無添加のパンの約2倍多く、修飾蛋白質添加パンは日がたつにつれて減少する傾向を示したが、無添加パンはほとんど変化がなかった。また、-20°C における不凍水量については両者の差は認められなかった(表3)。

考 察

修飾蛋白質はパンの品質改良剤として、膨化体積の向上、内相のきめの改良、さらに硬化の抑制という3つの効果を示した(表1)。ロイシンドデシルエステル、ゼラチン、ゼラチン水解物・ロイシンドデシルエステル混合物にはいずれもそのような効果は認められず、パンの品質改良剤としての効果はロイシンドデシルエステルが共有付加した修飾蛋白質においてはじめて生ずることが明らかになった。

そこでこの修飾蛋白質がパンを構成する他成分と相互作用することによってパン中の水の存在状態に変化を与えていることを予想して、パルス NMR を用い、不凍水を測定したところ、パン中の水は -12°C では凍りにくくなっていた(図2, 表3)。しかし -20°C における不凍水量は修飾蛋白質添加のパンと無添加のパンでは差がなかった(表3)。すなわち修飾蛋白質を添加したパン中の水は弱い結合状態あるいは FENNEMA の分類¹¹⁾に従えば、溶質近傍の多層水和水に準ずる状態にあるものと思われる。このような水の存在状態をつくり出し、パンの膨化体積を向上させ、きめを細かくし、硬化を抑制するなどの効果を発揮すると推定される、修飾蛋白質とパン中の他成分たとえばグルテン、デンプン、脂質との分子間相互作用についても今後検討していく予定である。

終わりに、本実験を行うにあたり御指導いただきました東京大学農学部、渡辺道子助手に深く感謝いたします。

文 献

- 1) YAMASHITA, M., ARAI, S., IMAIZUMI, Y., AMANO, Y. and FUJIMAKI, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 52 (1979).
- 2) WATANABE, M., SHIMADA, A., YAZAWA, E., KATO, T. and ARAI, S.: *J. Food Sci.*, **46**, 1738

- (1981).
- 3) WATANABE, M., TOYOKAWA, H., SHIMADA, A. and ARAI, S.: *J. Food Sci.*, **46**, 1467 (1981).
 - 4) SHIMADA, A., YAZAWA, E. and ARAI, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 173 (1982).
 - 5) 島田淳子・矢沢悦子・荒井綜一: 日食工誌, **29**, 100 (1980).
 - 6) KROG, K.: *Cereal Chem.*, **58**, 158 (1981).
 - 7) ARAI, S. and WATANABE, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1979 (1980).
 - 8) 加藤哲夫・牧角 啓・大野素徳・泉屋信夫: 日化誌, **83**, 1151 (1962).
 - 9) 永嶋伸也: 化学と生物, **18**, 593 (1980).
 - 10) 野口 駿・中沢文子: 調理科学, **12**(1) (1979).
 - 11) FENNEMA, O. R.: "Principle of Food Science Part 1. Food Chemistry" **28** (1975).

(昭和58年2月18日受理)

新刊紹介

Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses

Paul A. SEIB and Bert M. TOLBERT 編

ビタミンC, すなわち L-アスコルビン酸は以前から抗壞血病因子として知られてきたが, 最近は特に比較的大量摂取した場合に期待される薬理作用等の面で注目を集めている。しかし, このビタミンの生体内における作用機作の詳細については未だに不明の点が多い。

本書はアメリカ化学会の "Advances in Chemistry Series" に属するもので, 1980年8月ラスベガスで同学会主催下に行われたシンポジウムの内容を中心にまとめられたものである。全体で24章から成り, 1~10章では主としてアスコルビン酸およびその関連物質(例えば酸化型アスコルビン酸やアスコルビン酸フリーラジカルなど)の化学, 11~19章では主としてその代謝(人間や各種実験動物における代謝速度, 栄養性など), また, 20~23章では食品への利用等をめぐるいくつかの話題がとり上げられている。随所に最新の分析技術に基づく知見が取り入れられており, 内容的には非常に豊富で, ビタミンCに興味を有する食品, 栄養化学関係の研究者にとって好適の座右の書となろう。

16×23.5 cm 604 ページ

American Chemical Society

Washington, D. C.

新刊紹介

食品の安全性評価

栗飯原景昭・内山 充編著

最近食品の「安全性」に対する関心がとみに高まっている折から, 時宜を得た書といえることができる。本書は雑誌「化学と生物」誌上の連載講座「食品の安全性をめぐって」をもとに書き改め, 執筆者も増やし(執筆は専門家10名が担当), 内容の充実をはかっている。内容は以下の4部からなっている。(第1部) 食品の安全性とは何か: 1. 食品の安全性を考える背景, 2. 食品の安全性評価の原則, (第2部) 化学物質の安全性試験とその結果の評価: 1. 化学物質の安全性事前評価, 2. 生体内動態試験, 3. 催奇形試験・多世代試験, 4. 一般毒性試験, 5. 変異原性試験の現状と評価, (第3部) 安全性評価をめぐる諸問題: 1. 安全性評価概論, 2. 有害物質の存在量と安全性評価, 3. 食品の安全性評価における変異原の評価, 4. 癌原性試験による安全性評価, 5. 残留薬剤・化学物質の許容濃度, 6. 栄養と安全性評価, (第4部) 資料: 農薬の1日許容摂取量 (FAO/WHO), 食品添加物の1日許容摂取量 (FAO/WHO) 等。

本書は医学, 農学, 食品学, 家政学等の教育, 研究関係者には好著である。

15 cm×21 cm, 311 頁, 3600 円

学会出版センター(東京), 1983年発行