N-エチルマレイミド処理グルテンの物性に及ぼす 凍結および凍結乾燥の効果

吉田千秋*・矢埜みどり*・団野源一**

Effect of Freezing and Lyophilization on Rheological Properties of Gluten treated with N-Ethylmaleimide

Chiaki YOSHIDA*, Midori YANO* and Gen-ichi DANNO**

* *Kyoto Junior College, 3370, Hori, Fukuchiyama-shi, Kyoto 620*

** *Department of Agricultural Chemistry, Kobe University,
1-1, Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657*

The effects of lyophilization on the rheological properties of gluten prepared from wheat flour by washing with or without *N*-ethylmaleimide (NEMI) were studied. The extensibility of the gluten prepared with NEMI (NEMI-gluten) decreased by lyophilization, but recovered in the presence of cysteine. These phenomena were more noticeable on the gluten prepared without NEMI (control-gluten). The lyophilization or freezing of control-gluten caused the formation of larger amount of SDS-insoluble fraction than NEMI-gluten. The SDS-insoluble fraction will be high molecular weight aggregate containing intermolecular disulfide bonds, as the fraction was solubilized with 2-mercaptoethanol. Gel filtration chromatography on Sepharose 4 B and a viscosity measurement showed that high molecular weight gluten of NEMI-gluten remained in SDS-soluble fraction because of suppression of the formation of an aggregate. These results suggested that the disulfide polymer of gluten proteins formed during lyophilization will be responsible for the decrease in the extensibility of gluten.

(Received Aug. 18, 1995)

製パン過程においてドウを凍結するとパン容積の減少することが知られている。この原因として酵母の活性低下が考えられてきたが最近、ドウの構造変化¹⁾²⁾、およびドウ強度の減少³⁾⁴⁾によると報告されている。また、DREESE ら⁵⁾は凍結乾燥グルテンは加熱処理したグルテンに比べ弾性が増加し粘性が低下することを報告しているがその理由については明らかにされていない。一方、PRESTON ら⁶⁾は酸不溶性グルテンを小麦粉に添加するとドウの弾性が増加し粘性が減少すること、およびパン容積が低下することを報告している。以上のことから凍結および凍結乾燥中におこるドウの物性変化はグルテンタンパク質のSS重合によると考えられるので、N-エチルマレイミド (NEMI) でSH基を修飾したグルテンを

調製して凍結および凍結乾燥に伴う物性変化とグルテンタンパク質の分子量変化との関連性について検討した。

実験方法

1. 試料

日清製粉の1CWをn-ブタノール、ついでn-ヘキサンの脱脂したものを使用した。

2. NEMI処理グルテンの調製

本実験では混ねつに伴う相互作用を避けるため以下の方法でグルテンを調製した。小麦粉100gに0.5gのNEMIを含む水1000mlを加えて30分間おだやかに攪拌した後3000rpmで3分間遠心した。得られた沈澱を1000mlの水に分散して洗浄後、残渣をメッシュに移し

* 京都短期大学 (〒620 京都府福知山市宇堀 3370)

** 神戸大学農学部 (〒657 兵庫県神戸市六甲台町 1-1)

流水中でデンプンを除いて湿グルテンを集めた。これを NEMI グルテンとして実験に供した。NEMI 処理しないグルテンも同様に調製し対照グルテンとした。

3. 凍結および凍結乾燥グルテンの調製

凍結グルテンは湿グルテン 10 g を直ちに -20°C で 3 か月間凍結して実験に供した。凍結乾燥グルテンは湿グルテン 10 g を 2 g ずつに分割してドライアイス-アセトンで直ちに凍結後凍結乾燥した。乾燥後、乳鉢内ですりつぶし、ふるい (メッシュ 300 μm) にかけて実験に供した。

4. グルテンタンパク質の分画

タンパク質の分画は DANNO と HOSENEY の方法⁷⁾に従って行った。すなわち、湿グルテン 2.5 g に 2 g のラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を加えて混和し、ついで 0.01 M トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0 を 35 ml 加えて攪拌して溶かした後 12 000 rpm で 30 分遠心した。得られた不溶性画分を SDS 不溶性画分とした。凍結乾燥グルテンより SDS 不溶性画分の調製はグルテン 1 g に 1.6 g の SDS を加えて混和しトリス-塩酸緩衝液 20 ml を加えて同様に行った。タンパク質量はマイクロケルダール法 ($\text{N} \times 5.7$) で行った。

5. セファロース 4 B カラムクロマトグラフィー

グルテンタンパク質の分子量分布は 0.2% SDS を含む 0.01 M トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0 で平衡化したカラム (2.5 $\times$ 34 cm) で分析した。

6. 物性テスト

グルテンの伸張性は前報⁸⁾に従って測定した。

7. 粘度測定

粘度の測定は Cannon-Fenske 粘度計を用いて 30°C で行った。

8. SH 基の定量

SH 基は KARUSH ら⁹⁾の方法に従って定量した。

実験結果および考察

湿グルテンの引っ張り試験を行ない、伸張抵抗が最大となる時の伸びの大きさを測定した。Fig. 1 に示すように NEMI グルテンは対照グルテンより伸びが大きく伸張性に優れていた。両グルテン共システインの添加によって伸張性が増加した。NEMI グルテンを凍結乾燥すると伸張性は低下するがシステインの添加により回復した。対照グルテンは凍結乾燥により伸張性はさらに低下するがシステインの添加によりほぼ完全に回復した。

グルテンは凍結乾燥により粘性が低下し弾性が増加することが DREESE⁵⁾により報告されているがその原因に

Fig. 1 The extensibility of wet (A) and lyophilized (B) gluten

Wet gluten (1.5 g) or lyophilized gluten (1 g) was mixed with water or water containing 0.5 mg of cysteine, and molded into a rectangle of 3 mm thickness (cross section, 0.3 cm^2). The measurement was performed with a Tensipresser (Taketomo Inc.) with a hook of 5 mm diameter. a, control-gluten; b, control-gluten+cysteine; c, NEMI-gluten; d, NEMI-gluten+cysteine.

については明らかにされていない。以上のようなグルテンの伸張性の変化はグルテンタンパクの SS 重合と関連性があると考えられるのでグルテンのタンパク分画を行った。その結果は Table 1 に示すように湿対照グルテンは NEMI グルテンにくらべて SDS 不溶性画分が多く、凍結乾燥するとさらに増加した。この画分は 2-メルカプトエタノールで可溶化したことから SS 結合による重合物と考えられる。したがって、凍結乾燥した対照グルテンがシステイン添加で伸張性が著しく増加したのは生成した SDS 不溶性画分がシステインで還元されて低分子化されたためと考えられる。また、対照グルテンは凍結によっても SDS 不溶性画分が 38% に増加したが NEMI

グルテンでは12%であった。

SDS 不溶性画分はグルテンタンパク質が凍結および凍結乾燥中にSS重合したものと示唆される結果が得られたので湿グルテンのSH基の定量をおこなった。Table 2に示すようにNEMIグルテンのSDS可溶性画分のSH基は対照グルテンの約5分の1に減少した。両グルテン共、凍結および凍結乾燥してもSDS可溶性画分のタンパク当たりのSH含量はほとんど変化がなかった。これはSS重合により生じたSDS不溶性画分が除かれたためと考えられる。また、不溶性画分は2-メルカプトエタノールで可溶化することからも凍結および凍結乾燥によりSS重合体が生成されるものと考えられる。また、後述のゲルろ過で得られたNEMIグルテンの高分子区分も減少するがわずかに未修飾のSH基が認められた。凍結によるSDS不溶性画分が対照グルテンの38%に対してNEMIグルテンでは12%と少ないのは、NEMIによりグルテンタンパク質のSH基が修飾されSS重合の形成が抑えられたためと考えられる。NEMI

グルテンでも凍結によりSDS不溶性画分が増加するのは未修飾のSH基が存在することによる。凍結乾燥により不溶性画分がさらに増加するのは凍結乾燥過程中、グルテン塊内に部分的な非凍結や濃縮が生じSS重合が促進されたものと考えられる。

次に凍結によるSDS可溶性画分の分子量分布の変化をセファロース4Bを用いるゲルろ過で調べた。溶出パターンはFig. 2に示すようにピークI、ピークIIおよび中間区分からなりそれぞれ高分子グルテニン、グリアジンおよび低分子グルテニンである。湿対照グルテンは湿NEMIグルテンより全タンパクに対するピークI（高分子グルテニン）の比率が低い。これは湿対照グルテンに存在するSDS不溶性画分（20%）が湿NEMIグルテンのそれ（8%）より多いので対照グルテンのSDS可溶性画分に存在する高分子グルテニンがNEMIグルテンより少ないためである。

また、対照グルテンを凍結すると湿グルテンより高分子区分の比率が低くなるが、これは凍結により生じたSDS不溶性画分（18%）が除かれるためである。一方、NEMIグルテンでは凍結しても生じたSDS不溶性画分

Table 1 SDS-insoluble fraction of gluten

	Control-gluten	NEMI-gluten
Wet	20%	8%
Frozen	38	12
Lyophilized	46	37

SDS-insoluble fraction was dissolved in 2% of 2-mercaptoethanol and the protein content was assayed with the Kjeldahl method.

Table 2 SH groups in SDS-soluble fractions

	Control-gluten (SH moles/10 ⁶ g)	NEMI-gluten (SH moles/10 ⁶ g)
SDS-soluble fraction		
wet	26.0	5.4
frozen	25.5	5.3
lyophilized	24.3	5.5
Sephacrose 4 B chromatography		
Peak I	7.4	0.7
Peak II	12.3	2.1

SH contents of SDS-soluble fraction and the peaks from gel filtration indicated by arrows were determined by the method of KARUSH *et al.*

Fig. 2 Gel filtration of SDS-soluble fraction of wet (A) and frozen (B) gluten on a Sepharose 4 B column (2.5×34 cm)

SDS-soluble fraction (5 ml) of wet gluten (10 mg/ml) or of frozen gluten (1.2 mg/ml) was applied on the column. —, control-gluten; ----, NEMI-gluten.

Table 3 Relative viscosities of SDS-soluble fractions

	Control-gluten	NEMI-gluten
Wet	1.36	1.38
Frozen	1.35	1.52

Protein concentration ; 0.25%, Solvent ; 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.2% SDS.

(4%)はわずかなので凍結前後でこの比率はほとんど変わらなかった。凍結した NEMI グルテンの SDS 可溶性画分は湿 NEMI グルテンのそれより低濃度でも粘調性が高く、溶出パターンにみられるようにピーク I は遅れて溶出された。遅れて溶出されるのは低分子化によるものでなく凍結により粘度が増加したものであることを相対粘度測定で確かめた。Table 3 に示すように NEMI グルテンは凍結で SDS 不溶性画分がわずかながら除かれるにもかかわらず相対粘度は増加した。

また、対照グルテンは SDS 不溶性画分が 18% 除かれるが相対粘度はほとんど低下しなかった。凍結により相対粘度が高くなるのは SDS 可溶性画分中に分子間 SS 結合をふくむ高分子集合体が形成されることが考えられる。対照グルテンでは高度の分子間 SS 結合が形成されるため集合体は不溶化するので相対粘度は高くないが、NEMI グルテンではグルテンタンパク質の SH 基が少ないため不溶化しにくく、粘性の高い高分子集合体が SDS 可溶性画分に残るものと考えられる。以上のように凍結乾燥によりグルテンの SDS 不溶性画分が増加することからグルテンタンパク質の SS 重合体が形成され、そのためグルテンの伸張性が低下するものと考えられる。

小麦粉の混ねつ時に NEMI を加えるとドウが著しく軟化することおよびグルテンタンパク質の抽出性の増加することが知られているが、これらはグルテニンの低分子化によると説明されている⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。今回、混ねつせずに調製した NEMI グルテンの粘度は対照グルテンと変わらないので、NEMI 存在でも低分子化は起こっていないと思われる。また、混ねつなしでも SDS 可溶性画分は増加するがこれは低分子化に伴う溶解性の増加ではなく SS 重合による不溶化が抑えられたためと考えられる。

小麦粉を酢酸で抽出したとき残渣中に残る、いわゆる酸不溶性タンパク質⁽¹²⁾は抽出方法や使用する溶媒によって残存量が異なる⁽¹³⁾。本研究における SDS 不溶性画分はこのような可溶化以前のグルテンの存在状態をあ

らわすものではなく凍結および凍結乾燥により不溶化したグルテンである。混ねつにおいて NEMI はグルテニンの SH 基を修飾することによりグルテニンの重合を抑えることが報告されている⁽¹⁴⁾。混ねつ中、グルテンタンパク質の可溶化と並行して SS 重合によるグルテンタンパク質の不溶化が起こりその量比がグルテンの物性に大きな影響を与えると考えられる。

小麦粉に酸不溶性タンパクを添加するとパン容積が低下することが報告されている⁽⁶⁾。グルテンを冷凍保存すると製パン性が低下するが、保存中に生成する難溶性の高分子タンパクが関係するものと思われる。製パンにおいて小麦粉にバイタルグルテンが添加されるがタンパク量の強化とともに全タンパクに対する難溶性の高分子タンパク質の比率も製パン性改良の要因であろう。

要 約

小麦粉を水で懸濁して得たグルテン (対照グルテン) および NEMI 処理したグルテン (NEMI グルテン) の凍結および凍結乾燥にともなう物性変化を調べた。両グルテン共、凍結乾燥すると伸張性は低下し、システインの添加により回復するが、低下および回復の程度は対照グルテンの方が著しかった。凍結乾燥または凍結により SDS 不溶性画分が増加するが対照グルテンの方が多かった。SDS 不溶性画分は分子間 SS 結合による高分子重合体であるが、NEMI グルテンは凍結しても SDS 不溶性画分の生成はわずかであった。しかし、NEMI グルテンの SDS 可溶性画分は高分子グルテンタンパク質が増加するため高粘調性を示した。これらのことより凍結および凍結乾燥によりグルテンタンパク質の SS 重合体が形成されるためグルテンの伸張性が低下すると考えられる。

文 献

- 1) BERGLUND, P.T., SHELTON, D.R. and FREEMAN, T. P. : *Cereal Chem.*, **67**, 139 (1990).
- 2) BERGLUND, P.T., SHELTON, D.R. and FREEMAN, T. P. : *Cereal Chem.*, **68**, 105 (1991).
- 3) INOUE, Y. and BUSHUK, W. : *Cereal Chem.*, **68**, 627 (1991).
- 4) INOUE, Y. and BUSHUK, W. : *Cereal Chem.*, **69**, 423 (1992).
- 5) DREESE, F.C., FAUBION, J.M. and HOSENEY, R.C. : *Cereal Chem.*, **65**, 354 (1988).
- 6) PRESTON, K.R. and TIPPLES, K.H. : *Cereal Chem.*, **57**, 314 (1980).
- 7) DANNO, G. and HOSENEY, R.C. : *Cereal Chem.*, **59**,

-
- 249 (1982).
- 8) KARUSH, F., KLINMAN, N.R. and MARKES, R. : *Annal. Biochem.*, **9**, 100 (1964).
- 9) YOSHIDA, C. and DANNO, G. : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 121 (1989).
- 10) MEREDITH, P. and BUSHUK, W. : *Cereal Chem.*, **39**, 411 (1962).
- 11) TANAKA, K. and BUSHUK, W. : *Cereal Chem.*, **50**, 590 (1978).
- 12) ORTH, R.A. and BUSHUK, W. : *Cereal Chem.*, **49**, 268 (1972).
- 13) CHAKRABORTY, K. and KHAN, K. : *Cereal Chem.*, **65**, 333 (1988).
- 14) DANNO, G., XU, S.R. and NATAKE, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 985 (1990).
- (平成7年8月18日受理)
-