

## 酸化剤および塩による小麦グルテンタンパク質の重合と脱重合

吉田 千秋・桐村 ます美

Polymerization and Depolymerization of Wheat Gluten Proteins by Oxidants and Salts

### ABSTRACT

小麦グルテンタンパク質の製パン過程における重合および脱重合をラウリル硫酸ナトリウム (SDS) に不溶の高分子グルテンタンパク質 (SDS-ISG) を定量することによって調べた。ドウ中のSDS-ISGはヨウ素酸カリ ( $\text{KIO}_3$ ) レベルの増加とともに直線的に増加した。ドウを  $30^\circ\text{C}$  でねかすと 9 ppm付近にピークが現れ、このピークはドウを  $180^\circ\text{C}$  で焼成すると 3 ppmに移行した。これらの結果からグルテンタンパク質は低レベルの酸化剤により重合するが、高レベルでは脱重合し、高温で促進されることが示唆された。臭素酸カリ ( $\text{KBrO}_3$ ) およびアスコルビン酸 (AsA) でも同様の結果が得られた。パン容積は焼成したドウ中のSDS-ISG量と正の相関性を示すが混ねつやねかしたドウ中のSDS-ISG量とは相関性はなかった。したがって、焼成時における脱重合が製パン性を決定すると考えられる。これまで酸化剤による脱重合は混ねつ時におけるSH/SS交換反応やshear forceによるSS結合の切断、分子内SS結合の形成などで説明されてきたが、著者らはグルテンタンパク質の特異な性質にその原因があると考え混ねつせずに調製したグルテンタンパク質を用いて酸化剤とその塩の効果を調べた。その結果、グルテンタンパク質は低濃度の  $\text{KIO}_3$  または  $\text{KBrO}_3$  でわずかに溶解度が減少するのみであるが、粘度はグルテンタンパク質を2-メルカプトエタノールで還元したときの値まで著しく低下することが判明した。同様の結果は酸化剤だけではなくヨウ化カリ (KI) および臭化カリ (KBr) のような塩でも得られた。このことからグルテンタンパク質の脱重合は主に塩析による溶解性の減少によることが示唆された。以上の結果から製パン性過程における酸化剤の効果を考察した。

**key words:** SDS-insoluble gluten    Polymerization    Depolymerization    Potassium iodate  
Potassium iodide    Salting-out

Polymerization and depolymerization of gluten proteins during breadmaking process were studied by the protein measurement of sodium dodecyl sulphate insoluble gluten (SDS-ISG). The amount of the SDS-ISG in mixed dough increased linearly

with increasing level of potassium iodate( $\text{KIO}_3$ ), indicating the occurrence of oxidative polymerization. When the dough was allowed to rest at  $30^\circ\text{C}$ , a maximum appeared at around 9 ppm. The maximum shifted to 3ppm when the dough was heated at  $180^\circ\text{C}$ . These results were found to be due to the increase in the SDS-ISG by polymerization at lower levels and the decrease by depolymerization at higher levels of  $\text{KIO}_3$ . Similar results were obtained in heated doughs treated with potassium bromate( $\text{KBrO}_3$ ) and ascorbic acid(AsA). Loaf volume of the bread was positively related to the amount of SDS-ISG in the baked dough, but was unrelated to that in mixing and resting doughs. Accordingly, depolymerization of gluten at the baking stage will determine the quality of bread. Glutenin prepared without dough mixing became slightly insoluble by the addition of small amount of  $\text{KIO}_3$  and  $\text{KBrO}_3$ , but the relative viscosity decreased significantly to such a level that the glutenin was reduced by 2-mercaptoethanol. Interestingly, potassium iodide(KI) and potassium bromide(KBr) also gave the same result, suggesting that the depolymerization of glutenin by oxidants is mainly ascribed to their salting-out effect on the glutenin.

## INTRODUCTION

小麦グルテンタンパク質は球状で単量体のグリアジンと繊維状で凝集性のグルテニンから成っている。グリアジンとグルテニンはそれぞれ粘性と弾性をもち混ねつにより粘弾性をもつドウが形成される。この過程で最も重要な研究課題は酸化剤によるグルテンタンパク質の重合および脱重合の解明である。混ねつ中ドウは抗張性を増し、酸化剤存在でより増加することから、グルテニンの高分子サブユニット (HMW) 同士または低分子サブユニット (LMW) との間でSH基が分子間SS結合を形成して重合するためと考えられている。これを実証するためSH基の定量が試みられてきたが (Tsen 1968), グルテニン中のSH基が少ないことやグルテニン以外の低分子SH化合物が存在するため、重合にともなうグルテニンのSH基の減少を明確に証明するに至っていない (Schofield et al. 1983, Andrew et al. 1995)。

Schropp et al. (1995) はジチオスレイトールで還元したグルテンタンパク質の再酸化実験でSH基の著しい減少とそれにとまなうグルテンタンパク質の高分子化が起こることからグルテンタンパク質の重合はSS結合の形成によると報告している。しかし、これらの結果はタンパク質化学では当然予想されることであり実際の小麦粉中で酸化剤によるSS結合の形成が直接の重合の原因であるかどうかは疑問である。Panozzo et al. (1995) は臭素酸カリ ( $\text{KBrO}_3$ ) によってグルテンタンパク質のSH基が酸化されることによりタンパク質の構造が

変化してタンパクへの脂質の結合が増加することを明らかにし、重合に脂質が関与することを示唆している。現在、酸化説に替わってSH/SS交換反応説が有力である。小麦粉にグルタチオン (GSH) を添加するとグルテニンタンパク質のSH基とGSHとの間でSH/SS交換反応が起こり、より低分子量の混合ジスルフィドを生じるので (Sawrin et al.1993, Grosch and Sawrin 1994, Chen and Schofield 1995) ドウは著しく軟化するが、酸化剤によりGSHが酸化されると交換反応が起こらなくなるので抗張性が増加する (Kuninori and Sullivan 1968)。Bloksma and Bushuk (1988) は酸化剤による改良効果は主にタンパク性SH基および非タンパク性SH基の酸化によるもので、これによりSH/SS交換反応が抑えられるのでグルテンタンパク質の分子量分布が変わると考えている。事実、小麦粉中にはGSHやシステインのような内在性の低分子還元物質が存在することが証明されている (Chen and Schofield 1996)。また、この説によると高分子グルテニンの分子間ジスルフィドがより低分子量のグルテニン-GSH ジスルフィドに変わるので、混ねつ中に抗張性が減少するという現象 (ブレークダウン) をうまく説明することができる。このようにグルテンタンパク質の物性変化はSH/SS交換反応で説明されてきた。しかしGSH無添加の小麦粉での物性変化が交換反応のみで十分に説明できるかどうかは疑問である。小麦粉グルテンタンパク質の重合、脱重合の研究の最大の難点は小麦粉中のSH含量が非常に低いので直接的にその量的変化から証明することがむずかしいこと、および通常のタンパク質化学の手法に従ってグルテンタンパク質を溶液状に調製するには非常に過激な処理を要するので可溶化したグルテンタンパク質がドウ中のグルテンタンパク質の性状を反映しているとは限らないことである。

以上のような化学的なアプローチと並行して、SDSにも溶けない高分子グルテンタンパク質が製パン性に深く関わっているということが明らかにされてきた。小麦粉の優れた製パン性は高分子のグルテンタンパク質によるガスセル構造の保持性によって決定される (Bloksma 1972,1975,Gupta et al.1992)。この高分子タンパク質はMechamら (1962,1972) がゲルタンパク質と呼んだのをはじめ、酢酸に不溶な残渣タンパク質 (Orth and Bushuk 1972) とかSDSに不溶なタンパク質、SDS-insoluble protein (Danno et al.1976) と呼ばれてきた。Weegels et al. (1996) はSDSに可溶なグルテニンと区別するためグルテニンマクロポリマーと呼んだ。この画分のタンパク量は品種の異なる多くの小麦粉についての研究の結果、パン容積との間に正の相関性があることが明らかにされている (Dachkevitch and Autran 1989, Singh et al. 1990a, Gupta et al. 1992,1993, Dupuis et al. 1996, Weegels et al. 1996)。Aussenac et al. (2001) はグルテンタンパク質のSDSに対する溶解性と分子量分布との間に密接な関係があることを明らかにし、ドウの混ねつ中にグルテンタンパク質の脱重合が起こっていることを確認した。さらにWeegels et al. (1997) はドウの混ねつおよびねかし中に起こるグルテンタンパク質の重合と脱重合についてサブユニットレベルの研究を行っている。

この画分の定量分析はグルテンタンパク質の構造と機能を明らかにする上で重要な意味をもつので、これまでSDS沈降値 (SDS-sedimentation value, Moonen et al. 1982) やZeleny volume (Zeleny 1947, Dachkevitch and Autran 1989)、SDS-protein ゲルテスト (Sapirstein and Suchy 1999) として定量されてきた。これは迅速で簡便な方法であるため小麦粉の製パン性の判定に広く用いられている。しかし、これらの値はタンパク量を表したものであるのではないのでパン容積との間には正の相関関係がないという報告もある (Wadhawan and Bushuk 1989)。酸化剤によるこの画分の量的変化は極微量であることが予想されるのでタンパク質の正確な定量が要求される。

最近著者らは酸化剤を添加したドウ中に生じるSDSに不溶性のグルテンタンパク質、SDS-insoluble gluten (SDS-ISG) をマイクロゲルダール法で測定し、製パン過程におけるグルテンタンパク質の重合と脱重合に関する知見を得た。この結果をもとに、これまで重合と脱重合に関して提唱されているいくつかの説について考察した。

### ヨウ素酸カリの効果

酸化剤による製パン性改良効果はグルテンタンパク質の酸化重合によるマクロポリマーの生成によると考えられるがこれまでにそれと矛盾する結果がいくつか報告されている。Fig. 1の

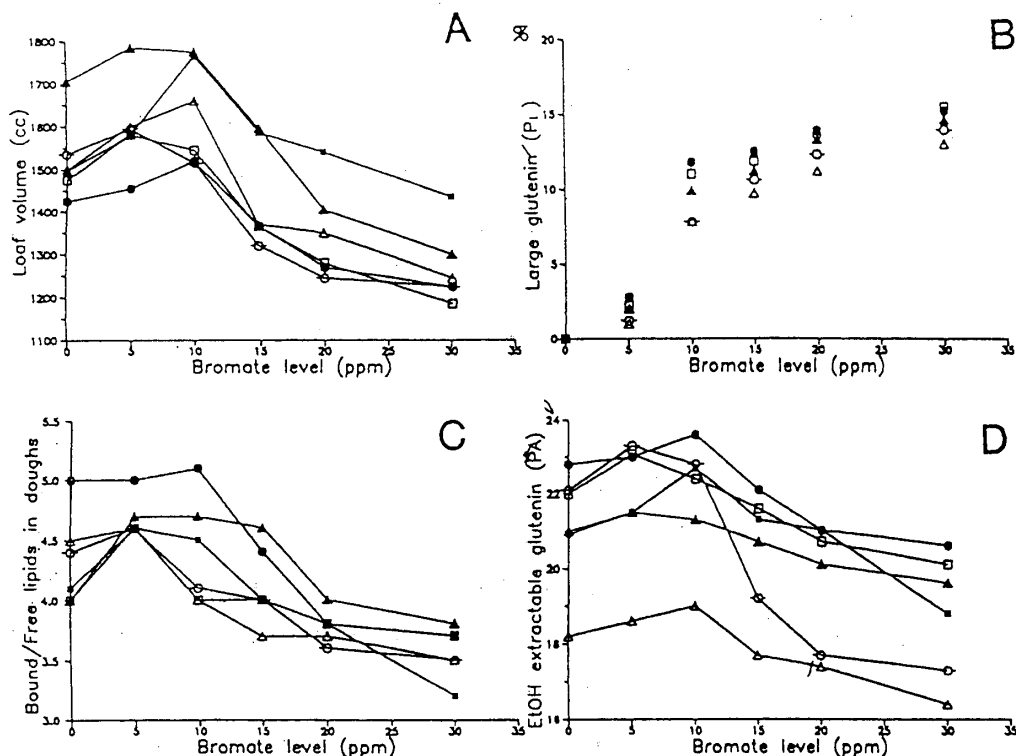


Fig. 1. Effects of bromate addition. A, Loaf volume. B, Amount of large glutenin fraction (P<sub>1</sub>) observed on the size-exclusion, high-performance liquid chromatography profiles of the total protein extracts from the dough (see Fig. 2). C, Lipid extractability from dough. D, Amount of ethanol-extractable glutenin (P<sub>A</sub>) observed on the size-exclusion, high-performance liquid chromatography profiles of the 70% aqueous ethanol proteins of dough. Cultivars used in the study included: Banks (●), Rosella (○), Hartog (□), Sunco (△), Sunfield (■) and baker's flour (▲).

(Panozzo et al. Cereal Chem., 71:195-199(1994) より引用)

ようにPanozzo et al. (1994) は酸化剤として臭素酸カリ ( $\text{KBrO}_3$ ) を用いてパン容積とグルテンタンパク質との相関性を調べた結果、パン容積はグルテンの高分子画分 (very large aggregate of gluten protein) とは相関せずエタノール可溶画分 (ethanol-extractable glutenin) と相関することを報告した。Veraverbeke et al. (1999) は製パン性過程でのヨウ素酸カリ ( $\text{KIO}_3$ ) のSDS不溶性グルテンにおよぼす効果を調べた。 $\text{KIO}_3$ は適量の添加でドウに抗張性を与えることが知られているがFig. 2のようにSDS不溶性グルテンは無添加の場合より少ない。また長時間の混ねつでブレークダウンを起こすことが知られているが (Kerr et al. 1993) Fig. 3のようにねかし中および焼成中ほとんど減少はみられない。しかも、酸化

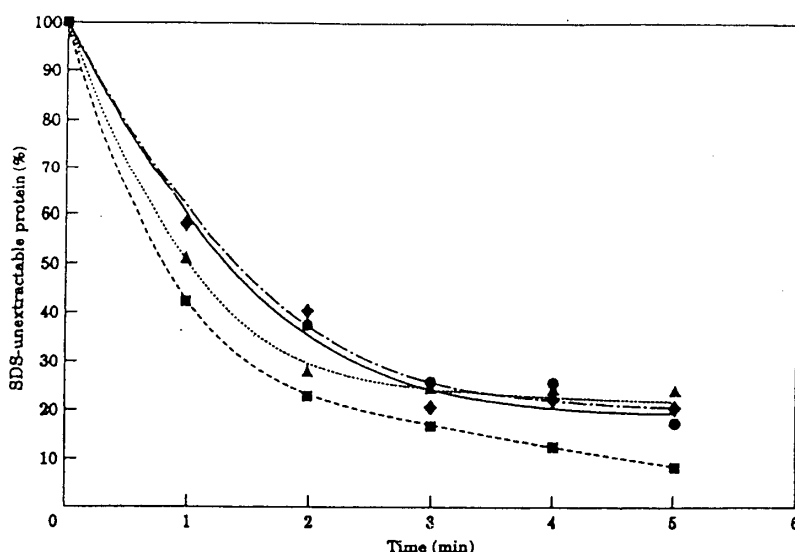


Figure 2 Level of SDS-unextractable protein (% dough SDS-unextractable protein on flour SDS-unextractable protein) as a function of mixing time for doughs mixed without additives (◆), with  $\text{KIO}_3$  (■), with cysteine (▲) and with xylanase (●). (Veraverbeke, W. S. et al. J. Cereal Sci., 29:129-138 (1999) より引用)

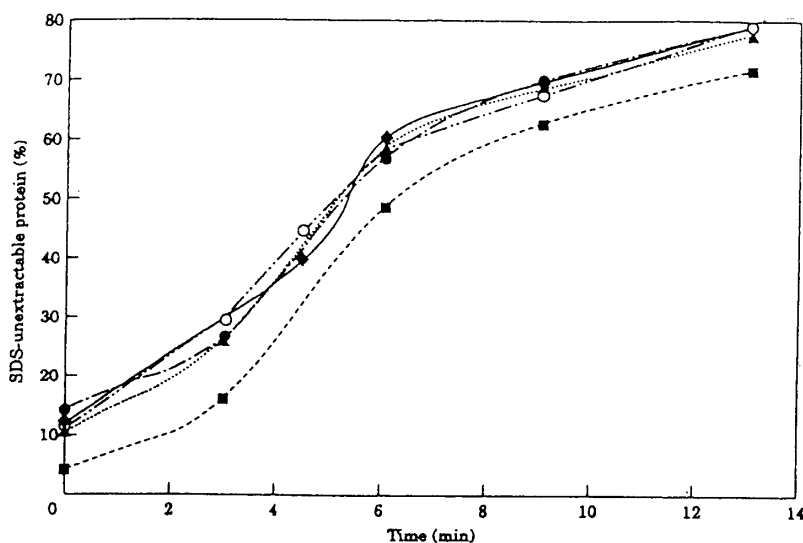


Figure 3 Level of SDS-unextractable protein (% unextractable protein on total protein) as a function of baking time for doughs prepared without additives (◆), with  $\text{KIO}_3$  (■), with cysteine (▲), with xylanase (●) and with WEAX (○). (Veraverbeke, W. S. et al. J. Cereal Sci., 29:129-138 (1999) より引用)

剤が存在するとグルテンタンパク質の抽出性は減少するはずであるがむしろ増加することが知られている (Weegels et al.1996, Veraverbeke et al.1999)。このように酸化剤の効果には不明な点が多い。そこで著者らは酸化剤によるマクロポリマーの量的変化はその添加量（レベル）、反応時間（混ねつ、ねかし、発酵、焼成）、反応温度に依存すると考え、おのおののファクターを厳密に設定してそれらの効果を調べた (Yoshida et al.2001)。

## 方 法

- 1 ドウの調製 小麦粉（日清カメリア）に酸化剤を含む水を加え5分間生地がスムーズになるまで手で捏ねた。得られたドウを直径5mmの棒状に成形し直ちに凍結するか、ねかした後（resting）または加熱後凍結乾燥した。
- 1 SDS不溶性グルテン（SDS-ISG）の調製および定量 凍結乾燥したドウ2gに2% SDSを20ml加えて30℃で3時間緩やかに攪拌した後、12,000rpmで30分間遠心した。生じた上澄みを捨て残査に2%の2-メルカプトエタノールを20ml加えて室温で30分間放置した後12,000rpmで20分間遠心した。得られた上澄をSDS-ISGとしてタンパクを定量した。Fig. 4に種々のKIO<sub>3</sub>レベルで混ねつしたドウ中のSDS-ISGの定量の結果を示す。混ねつ直後の無

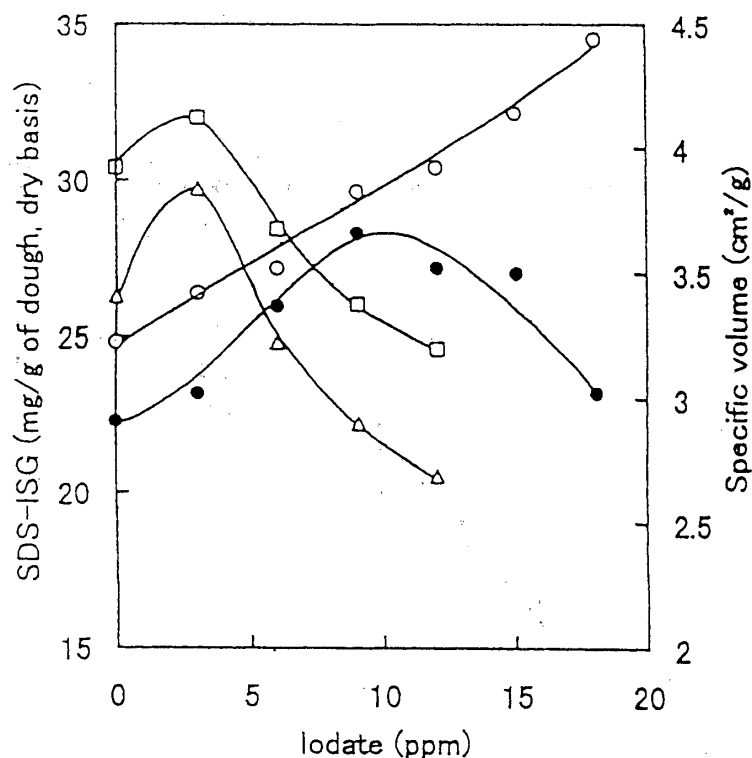


Fig4. Change in the amount of SDS-insoluble gluten and specific volume with increasing levels of iodate. Flour dough was extracted with 2% of SDS solution at 30°C for 3 hr and the SDS-insoluble gluten was solubilized with 2% of 2-mercaptoethanol. Flour dough after mixing (○), after resting (●) and after heating at 180°C (Δ). Loaf volume of baked dough (□).

添加のドウ中のSDS-ISG量は乾燥重 1 g 中24.8mgであり、全ドウタンパク質 (138mg/ g of dough as a dry basis) の18%であった。この値は酢酸不溶性グルテンについて報告されている値よりかなり低い (Chakaraborty and Khan 1988, Chen et al. 1992, Hahn and Grosch 1998)。ドウの調製法が異なると違う値が得られるが、同じ試料でも溶媒の種類、抽出条件によっても異なるであろう (Chakaraborty and Khan 1988, Singh et al. 1990b)。グルテンタンパク質のSS結合は激しい攪拌や超音波処理を行うと切断されることが知られているが (MacRitchie 1975) 本実験では穏やかな攪拌抽出を行っているので低い値が出たのはこのことが原因ではない。混ねつ直後のドウ中のSDS-ISGはKIO<sub>3</sub>レベルの増加とともに増加した。しかし、ドウを発酵に相当する温度でねかすと 9 ppm以下ではわずかに減少するだけであるが12ppm以上では著しく減少するので結果的に 9 ppm付近で最大を示した。最大値における増加分は約 8 mgで全グルテンタンパク量の約 6 %であった。このような低い値でもドウの物性変化を生じさせるには十分な値である (Bloksma 1972)。Jones et al. (1974) も高分子グルテンタンパク質のSSを 3 ~ 4 %切断すると80%が脱重合すると報告している。酸化剤無添加でねかすとSDS-ISGが減少するのは構造緩和として説明されている (Hlynka and Barth 1955, Dong and Hoseneey 1995)。ドウを焼成に相当する温度で加熱するとSDS-ISGは 3 ppmまでは増加するがそれ以上のレベルでは著しく減少するので 3 ppmにピークがあらわれた。製パンテストでもパン容積に最大値を与えるレベルは 3 ppmであった。Table I に示すように直ごね法 (Straight dough method) による製パンテストでパン容積を最大にする酸化剤のレベルはKBrO<sub>3</sub>やAsAなどで報告されているがKIO<sub>3</sub>では明らかにされていない (Yamada and Preston 1994)。これはKIO<sub>3</sub>の最適レベル

TABLE I

Effects of Increasing Levels of Ascorbic Acid(AA), Azodicarbonamide(ADA), Potassium Bromate, and L-Cystine on Sponge-and-Dough Loaf Volume

AA		ADA		Bromate		L-Cystine	
Level (ppm)	Volume (cc)	Level (ppm)	Volume (cc)	Level (ppm)	Volume (cc)	Level (ppm)	Volume (cc)
0	947 c	0	934 c	0	945 e	0	959 c
5	973 b	5	970 a	5	993 bc	10	995 b
10	988 a	10	974 a	10	1,008 a	20	1,010 a
15	994 a	15	973 a	15	998 ab	30	1,014 a
20	988 a	20	967 a	20	989 bc	40	1,013 a
50	987 a	25	955 b	25	998 ab	50	1,018 a
100	991 a			30	993 bc	60	1,013 a
150	993 a			35	983 cd		
				40	974 b		

Values represent average of six blocks. Different letters indicate significant differences at the 5% level. (Yamada, Y. and Preston, K.R. Cereal Chem., 71:297-300(1994)より引用)

が非常に低レベルでしかもせまい範囲で起こるため検出できなかったためと思われる。短時間法（short-time baking method）は直ごね法に比べて高レベルの試薬を必要とし（Tsen and Hlynka 1967）、 $\text{KIO}_3$ の最適レベルは30ppmで $\text{KBrO}_3$ の75ppmより低い（Yamada and Preston 1992）。したがって、今回 $\text{KIO}_3$ の最適値、3 ppmが $\text{KBrO}_3$ より低い値であるのは妥当であろう。 $\text{KBrO}_3$ およびAsAでも焼成温度で加熱するとSDS-ISG量はおのおの10 ppm, 15ppmにピークがあり、これらはそれぞれパン容積のピークに一致した（図省略）。

### SDS-ISG とパン容積との間の相関関係

Fig. 4 に示したようにパン容積は混ねつ直後またはねかしたドウ中ではなく焼成したドウのSDS-ISG量との間で相関性があると思われたので他の酸化剤、 $\text{KBrO}_3$ とAsAについてもいくつかのレベルでパン容積と焼成後のSDS-ISG量との関係を求め相関性を調べた。Fig. 5 に示すように焼成したドウ中のSDS-ISG量とパン容積の間に明らかな正の相関性が認められた。このことは酸化剤による製パン性は焼成の段階におけるマクロポリマー量に依存することを示している。高レベルの $\text{KIO}_3$ を添加したドウでは焼成によりSDS-ISGが著しく減少するので、その原因を知るため焼成過程でのSDS-ISG量の時間的変化を調べた。Fig. 6 に示すように無添加のドウではSDS-ISGはゆっくりとした増加がみられる。この増加は空気中の酸素による

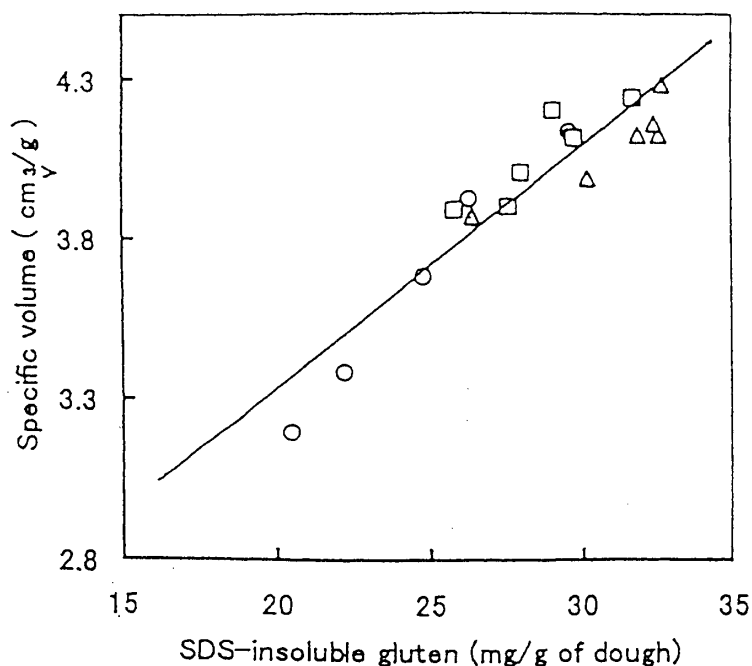


Fig.5. Relationship between the amount of the SDS-insoluble gluten and specific volume. O, iodate; □, bromate; △, ascorbic acid. Regression equation;  $Y=0.0757X+1.803$ . Correlation coefficient,  $r=0.93$ . X: amount of SDS-insoluble gluten (mg/g of dough), Y: specific volume ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )



グルテンタンパク質の酸化重合によるものと思われる。最適レベルより過剰な 6 ppm の添加では SDS-ISG の増加は急激に起こるが以後は急激に減少し、焼成終了時には無添加の場合より少なくなった。一方、最適レベルの 3 ppm では増加はより遅れて起こるがその後の減少は 6 ppm の場合より少ないので無添加の場合より SDS-ISG は多かった。同様の結果は  $\text{KBrO}_3$  および AsA でもみられた (図省略)。

酸化剤による製パン性の改良はかまあげ (パン容積の伸び, oven rise) が増加するオーブン中でもっとも顕著にあらわれる (Kilborn et al. 1990, Yamada and Preston 1992)。最適レベルではかまあげの速度が速くその持続期間も長いがオーバーオキシデーション (Over-oxidation) を起こしたドウでは焼き上げ中、急速に減少していく。このようなかまあげの様子はドウの加熱中の SDS-ISG の変化とよく対応している。すなわち、最適レベル (3 ppm  $\text{KIO}_3$ , 10 ppm  $\text{KBrO}_3$ ) での SDS-ISG の増加は高レベル側より持続時間が長くその後の減少は少ない (Fig. 6)。

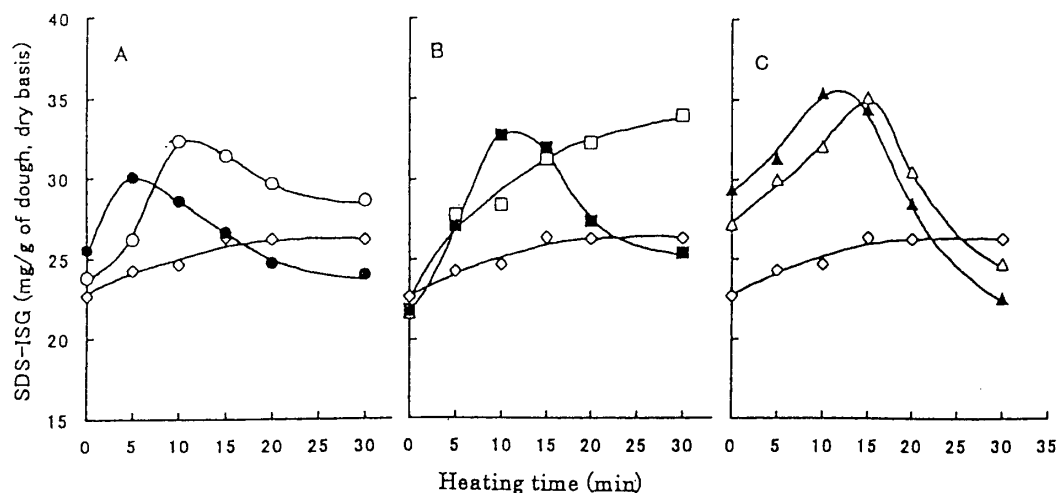


Fig. 6. Effect of oxidants on the amount of SDS-insoluble gluten during heating. Flour dough treated with indicated levels of oxidants. A: Iodate, 0 ppm ( $\diamond$ ), 3 ppm ( $\circ$ ), 6 ppm ( $\bullet$ ); B: Bromate, 0 ppm ( $\circ$ ), 10 ppm ( $\square$ ), 20 ppm ( $\blacksquare$ ); C: Ascorbate, 0 ppm ( $\diamond$ ), 15 ppm ( $\triangle$ ), 30 ppm ( $\blacktriangle$ ).

### 酸化剤による重合と脱重合

SDS-ISG は 2-メルカプトエタノールで可溶化するので低レベルでの SDS-ISG の増加はグルテンタンパク質の分子間 SS 結合の形成による酸化重合と思われるが、SH 基の定量を行っていないので結論はできない。グルテンを 80℃ で加熱すると SDS-sedimentation volume は時間とともに徐々に増加するが 90℃ 以上で加熱すると急激な増加が起こり以後減少する (Ververabeke et al. 1997)。この増加はグルテンタンパク質の熱変性であると解釈されているが、今回の実験での SDS-ISG の増加は加熱中だけでなくねかし中でも起こり、しかも時間経過とともに減少するので変性によるものではなく酸化重合によるものである。

高レベルの酸化剤存在で長時間混ねつを続けるとドウの抗張性が減少することが知られオー

パーオキシデーションと呼ばれている。この現象は次のように説明されている。すなわち、酸化剤はグルテンタンパク質間に過度のSS結合の架橋をつくりドウの硬さを増加させる。このことは混ねつ中ドウに働く切断力 (shear forces) を増加させることになるので共有結合や非共有結合が切れ、その結果ドウは軟化するという説明である。Fig. 4 に示したように高レベルの $\text{KIO}_3$ 存在でSDS-ISGが減少するのはオーバーオキシデーションに相当するが、SDS-ISGは過剰の $\text{KIO}_3$ レベルでドウをねかしている間 (図省略) や焼成している間 (Fig. 6) でも減少するので混ねつによる切断力により結合が切れるという説は当てはまらない。過剰の $\text{KIO}_3$ が存在すると重合とSS結合の切断によらない脱重合が並行して起こり、加熱処理は重合と脱重合の速度を一段と速めるものと考えられる。SDS-ISGが増加後減少するという結果はSeivert et al. (1991) の結果と良く一致する。彼らによると酢酸不溶性グルテンははじめ増加するが時間の経過と共に減少していく。

これに関連して酸化剤は還元剤と同様にグルテンタンパク質の抽出性を高めることが知られている (Mamaril and Pomeranz 1966, Tsen 1969, Endo et al. 1987, Sievert et al. 1991)。酸化剤の効果が還元剤と異なる点は、酸化剤はドウ混ねつ中に抽出性を高めるが還元剤は混ねつしなくても抽出性を高めることである。Weegels (1996) が指摘しているように、酸化剤はグルテンタンパク質のSH基を酸化してSS結合を形成させ、溶解性の低い高分子グルテンタンパク質を生成させると考えられるので抽出率が上がることは矛盾する。しかし、これは酸化剤のレベルを考慮すると理解できることであって、適量のレベルでは脱重合は起こりにくい、過剰のレベルでは脱重合が著しいので抽出性が増加する。Danno and Hosney (1982) はドウを30ppmの $\text{KIO}_3$ で混ねつするとグルテンタンパク質の粘度が著しく減少することを報告した。以上の結果より、酸化剤による抽出性におよぼす効果はグルテンタンパク質のSS結合を切断して可溶化する還元剤の効果 (Tsen 1969) とは明らかに異なる。

### 非混ねつにより調製したグルテンタンパク質の脱重合

前述したようにオーバーオキシデーションが過度のSS結合が混ねつによる剪断力によって切れるためという説明には疑問がもたれるが、最近の研究でオーバーオキシデーションは次のようにも説明されている。Schropp et al. (1995) は還元したグルテンタンパク質の再酸化実験で $\text{KBrO}_3$ は効果的に重合化を起こすが $\text{KIO}_3$ は不完全なことから $\text{KBrO}_3$ はグルテンタンパク質の分子間SS結合を促進し $\text{KIO}_3$ は分子内SS結合の形成を促進すると解釈した。Antes and Wieser (2001) も同様の結果を得ている。しかし、SS結合の形成は分子内結合より分子間結合の方が起こりやすいと考えられるので $\text{KIO}_3$ が分子内SS結合を促進するという説明にはかなり無理があると思われる。そこでSS結合以外の非共有結合がグルテンタンパク質の脱重

合に関与すると考え、酸化剤およびそれに関連する塩の効果を調べた。以下は未発表の結果である。混ねつによる切断効果をのぞくためグルテニンタンパク質はDanno (1981) の方法に従って混ねつせずに調製した：脱脂小麦粉10 gを200mlの0.5% SDSを含む0.05Mリン酸緩衝液、pH6.8に懸濁し50分間穏やかに攪拌後遠心してグルテンを集めた。グルテンに少量の0.5% SDSを加えてWahring blenderで2分間激しく攪拌後、同溶媒を15ml加えて20分間穏やかにかき混ぜ上澄みを遠心で集めた。得られたグルテニン画分に0.01N酢酸を加えてタンパク濃度を0.25%とし、酸化剤または塩によるグルテニンタンパク質の溶解性におよぼす効果を調べた。TABLE IIに示すようにKIO<sub>3</sub>レベルの増加とともにグルテニンの濁度は肉眼では観察できないが6.25mg/mlまで徐々に増加していき7.5mg/ml以上で急激に白濁した。KBrO<sub>3</sub>でも同様の結果が得られたがより低濃度で著しい白濁化が起こった。興味深いことにヨウ化カリウム (KI) および臭化カリウム (KBr) でも同様に低濃度でわずかな濁度の増加に続いて急激な白濁化がみられた。高濃度における白濁化は塩析によるグルテニンタンパク質の不溶化と考えられる。低濃度でも長時間放置するかタンパク濃度を高めると沈殿するので塩析と考えられる。塩析が二相性を示す原因については現在研究中である。KIO<sub>3</sub> (MW=214.0) はKBrO<sub>3</sub> (MW=167.0) より速効性で低レベルで効果を発揮するが (Tsen 1964) 低濃度における濁度の増加はKBrO<sub>3</sub>より低かった。これはKIO<sub>3</sub>の方が分子量が大きいので分子数が少ないためであろうと思われる。同様にKI (MW=166.0) の方がKBr (MW=119.0) より濁度増加は少なく、またKIよりKIO<sub>3</sub>の方が、KBrよりKBrO<sub>3</sub>の方が少なかった。TABLE IIIに示すように濁度の増加に呼応してグルテニンタンパク質は非常に低濃度の酸化剤で粘度が著しく低下した。濁度の

TABLE II  
Salting-out Effect of Oxidants and Salts on Glutenin in 0.01N Acetic Acid

Reagent (mg/ml)	Absorbance at 412 nm			
	KBrO <sub>3</sub>	KBr	KIO <sub>3</sub>	KI
0	0.057	—	—	—
1.25	0.151	0.094	0.086	0.070
2.50	0.171	0.248	0.121	0.086
3.75	0.212	1.416	0.143	0.682
5.0	0.368		0.158	1.788
6.25	2.182		0.183	
7.50			2.030	

Glutenin was prepared according to the method of Danno (1981). Defatted flour (10 g) was suspended in 200ml of 0.05M sodium phosphate buffer, pH7.0 containing 0.5% SDS. The suspension was gently stirred for 50min and then centrifuged. Glutenin, as the remaining proteins in the residue, was extracted with 15ml of 0.5% SDS at pH7.0, by stirring with a Wahring blender for 2min and centrifuged. The supernatant was diluted with 0.01N acetic acid to give a protein concentration of 0.25%. Turbidity was measured at 412 nm using a spectrophotometer UV 120-02 (Shimazu Co.Ltd).

TABLE III  
Effect of Oxidants and Salts on the Relative Viscosity of Glutenin in 0.01N Acetic Acid

Reagent (mg/ml)	Relative viscosity ( $\eta/\eta_0$ )			
	KBrO <sub>3</sub>	KBr	KIO <sub>3</sub>	KI
0	1.458	—	—	—
0.125	1.326	1.314	1.337	1.313
0.25	1.271	1.249	1.293	1.256
0.50	1.223	1.180	1.242	1.196
0.75	1.186	1.149	1.205	1.159
1.00	1.166	1.132	1.180	1.143

Viscosities of glutenin (0.25%) were determined with a Cannon-Fenske viscometer (size 50) at 30°C. Reported reading are the average of at least three determinations.

変化と同様にKIO<sub>3</sub>はKBrO<sub>3</sub>より、またKIはKBrより粘度の低下は少なかった。KIの場合1.25mg/mlで濁度の増加は吸光度にしてわずか0.013であるが (TABLE II) 粘度は1.0mg/mlの低濃度でグルテニンを2-メルカプトエタノールで還元したときと同等の粘度にまで低下した。この粘度の低下はグリアジンの塩析によるものではない。というのは調製したグルテニンタンパク質にグリアジンが混在するとしても極わずかであり、またグリアジンはこのような高い粘性 ( $\eta/\eta_0=1.458$ ) を示さないからである。以上の結果よりオーバーオキシデーションの要因の1つは塩析によるわずかな溶解度の減少によりグルテニンタンパク質の粘性が著しく減少することによる。加熱によるグルテニンタンパク質の脱重合はSS結合の切断の可能性も考えられるが塩による溶解性の減少効果の方が大きいと思われる。このように酸化剤による脱重合はSS結合の切断によるものではなくグルテニンタンパク質の塩による不溶化が原因と考えられる。AsAのような非イオン性の酸化剤でも高レベルでSDS-ISG量が低下するので (Fig. 6) 塩析以外の要因もあるが、その低下はKIO<sub>3</sub>やKBrO<sub>3</sub>ほど著しくはない。AsAがKBrO<sub>3</sub>より効果は速いがほとんど製パン性を低下させることがなく広範囲のレベルで使うことができる (Dempster et al.1956, Tsen 1964) のは非イオン性であるため塩析による脱重合が起こらないことによると思われる。したがって、製パン性改良にはグルテニンタンパク質の重合の促進とともに脱重合の阻止が大きく関わっているのも塩による脱重合も考慮すべきである。

## おわりに

酸化剤の製パン性改良を支配するグルテニンタンパク質の脱重合に焦点を合わせて考察した。過剰の酸化剤存在でドウが脱重合する、いわゆるオーバーオキシデーションの現象はいろいろ

の解釈がなされてきた。SH/SS交換反応、混ねつ時のshear forceによるSS結合の切断、分子間SS結合の形成が考えられている。これらの説を否定する証拠はないが、これらの説にはやや無理があるように思われる。筆者は酸化剤によるグルテンタンパク質の脱重合は主に塩析効果によると示唆した。小麦粉の製パン性を論じるにはグルテンタンパク質の特異的な性質を理解する必要があると考える。

## Literatures

- Andrew, D.C., Caldwell, R.A. and Quil, K.J. (1995). Sulfhydryl analysis. II. Free sulfhydryl content of heated doughs from two wheat cultivars and effect of potassium bromate. *Cereal Chem.*, 72:330-333.
- Anssenac, T., Carceller, J.L. and Kleiber, D. (2001). Changes in SDS solubility of glutenin polymers during dough mixing and resting. *Cereal Chem.*, 78:39-45.
- Antes, S. and Wieser, H. (2001). Reoxidation behavior of wheat and rye glutenin subunits. *Cereal Chem.*, 78:8-13.
- Bloksma, A.H. (1972). The relation between the thiol-disulfide contents of dough and its rheological properties. *Cereal Chem.*, 49:104-117.
- Bloksma, A.H. (1975). Thiol and disulfide groups in dough rheology. *Cereal Chem.*, 52:170r-183r.
- Bloksma, A.H. and Bushuk, W. Rheology and Chemistry of dough. in 'Wheat Chemistry and Technology'. Vol. II (V. Pomeranz ed.), AACC, St Paul. Minesota (1988). pp131-150.
- Chakraborty, K. and Khan, K. (1988). Biochemical and bread-making properties of wheat protein components. I. Compositional differences revealed through quantitation and polyacrylamide gel electrophoresis of protein fractions from various isolation procedures. *Cereal Chem.*, 65:333-340.
- Chen, J., Khan, K., Shelton, D.R. and D'Appolonia, B.L. (1992). Isolation and fractionation of carbohydrate-containing proteins from wheat gluten. *Cereal Chem.*, 59:475-480.
- Chen, X. and Schofield, J.D. (1995). Determination of protein-glutathione mixed disulfide in wheat flour. *J. Agric. Food Chem.*, 43:2362-2368.
- Chen, X. and Schofield, J.D. (1996). Changes in the glutathione content and breadmaking performance of white wheat flour during short-time storage. *Cereal*

Chem.,73:1-4.

- Dachkevitch, T. and Autran, J.-C. (1989). Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 66:448-456.
- Danno, G., Kanazawa, K. and Natake, M. (1976). Identity of SDS-insoluble proteins with purified glutenin from wheat flour. *Agric. Biol. Chem.* 40: 739-744.
- Danno, G. (1981). Extraction of unreduced glutenin from wheat flour with sodium dodecyl sulfate. *Cereal Chem.*, 58:311-313.
- Danno, G. and Hoseney, R. D. (1982). Effect of dough mixing and rheologically active compounds on relative viscosity of wheat proteins. *Cereal Chem.*, 59:196-198.
- Dempster, C. J., Cunningham, D. K., Fisher, M. H., Hlynka, I. and Anderson, J. A. (1956). Comparative study of the improving action of bromate and iodate by baking data, rheological measurements and chemical analysis. *Cereal Chem.*, 33:221-239.
- Dong, W. and Hoseney, R. C. (1995). Effects of certain breadmaking oxidants and reducing agents on dough rheological properties. *Cereal Chem.*, 72:58-64.
- Dupuis, B., Bushuk, W. and Sapirstein, H. D. (1996). Characterization of acetic acid soluble and insoluble fractions of bread wheat. *Cereal Chem.*, 73: 131-135.
- Endo, S., Okada, K. and Nagao, S. (1987). Studies on dough development. III. Mixing characteristics of flour streams and their changes during dough mixing in the presence of chemicals. *Cereal Chem.*, 64:110-115.
- Grosch, W. and Sarwin, R. (1994). Quantification of free and protein-bound glutathione in wheat flours and doughs. Pages 356-361 in: *Gluten Proteins 1993*. Assoc. Cereal Research: Detmold, Germany.
- Gupta, R. B., Batey, I. L. and MacRitchie, F. (1992). Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal Chem.*, 69:125-131.
- Gupta, R. B., Khan, K. and MacRitchie, F. (1993). Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *J. Cereal Sci.*, 18:23-41.
- Hahn, B. and Grosch, W. (1998). Distribution of glutathione in Osborn fractions as affected by addition of ascorbic acid, reduced and oxidized glutathione. *J. Cereal Sci.*, 27:117-125.
- Hlynka, I. and Barth, F. W. (1955). Chopin alverograph studies. *Cereal Chem.*, 32:472-480.

- Jones, I.K., Phillips, J.W. and Hird, F.J.R. (1974). The estimation of rheologically important thiol and disulfide groups in dough. *J.Sci.Food Agric.*, 25:1-10.
- Kerr, C., Hosney, R.C. and Faubion, J.M. (1993). Mixing studies. VI. Combined effects of charge (pH), activated double-bond compounds, and oxidants on dough mixing properties. *Cereal Chem.*, 70:633-636.
- Kilborn, R.H., Preston, K.R. and Kubota, H. (1990). Description and application of an experimental heat sink oven equipped with a loaf height tracker for the measurement of dough expansion during baking. *Cereal Chem.*, 67:443-448.
- Kuninori, T. and Sullivan, B. (1968). Disulfide-sulphydryl interchange studies of wheat flour. 6. Reaction of glutation. *Cereal Chem.*, 45:486-495.
- MacRitchie, F. (1975). Mechanical degradation of gluten proteins during high-speed mixing of doughs. *J.Polym.Sci.Symp.* 49:85-90.
- Mamaril, F.P. and Pomeranz, Y. (1966). Isolation and characterization of wheat flour proteins. IV. Effects on wheat flour protein of dough mixing and oxidizing agents. *J.Sci.Food Agric.*, 17:339-343.
- Mecham, D.K., Sokol, H.A. and Pence, J.W. (1962). Extractable protein and hydration characteristics of flours and doughs in dilute acid. *Cereal Chem.*, 39:81-93.
- Mecham, D.L., Cole, E.W. and Ng, H. (1972). Solubilizing effect of mercuric chloride on the 'gel' protein of wheat flour. *Cereal Chem.*, 49:62-67.
- Moonen, J.H.E., Scheepstra, A. and Graveland, A. (1982). Use of the SDS-sedimentation test and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for screening breeder's samples of wheat for bread-making quality. *Euphytica*. 31:677-690.
- Orth, R.A. and Bushuk, W. (1972). A comparative study of the proteins of wheats of diverse baking qualities. *Cereal Chem.*, 49:268-275.
- Panozzo, J.F., Bekes, F., Wrigley, C.W. and Gupta, R.B. (1994). The effect of bromate (0-30ppm) on the proteins and lipids of dough. *Cereal Chem.*, 71: 195-199.
- Sapirstein, H.D. and Suchy, J. (1999). SDS-protein gel test for prediction of bread loaf volume. *Cereal Chem.*, 76:164-172.
- Sarwin, R., Laskawy, G. and Grosch, W. (1993). Changes in the level of glutathione and cysteine during the mixing of doughs with L-threo- and D-erythro-ascorbic acid. *Cereal Chem.*, 70:553-557.
- Schofield, J.D., Bottomley, R.C., Timms, M.F. and Booth, M.R. (1983). The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphydryl-disulfide intermediate

- reactions. *J.Cereal Sci.*, 1:241-253.
- Schropp, P., Belitz, H.-D., Seilmeier, W. and Wieser, H. (1995). Reoxidation of high molecular weight subunits of glutenin. *Cereal chem.*, 72:406-410.
- Singh, N.K., Donovan, G.R. and MacRitchie, F. (1990a). Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. II. Relative quantity of glutenin as measure of breadmaking quality. *Cereal Chem.*, 67:161-170.
- Singh, N.K., Donovan, G.R., Batey, I.L. and MacRitchie, F. (1990b). Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chem.*, 67:150-161.
- Sievert, D., Sapirstein, H.D. and Bushuk, W. (1991). Changes in electrophoretic patterns of acetic acid-insoluble wheat flour proteins during dough mixing. *J.Cereal Sci.*, 14, 243-256.
- Tsen, C.C. (1964). Comparative study on reactions of iodate, azodicarbonamide, and acetone peroxides in simple chemical systems and in dough. *Cereal Chem.*, 41:22-31.
- Tsen, C.C. (1968). Oxidation of sulfhydryl groups of flour by bromate under various conditions and during the breadmaking process. *Cereal Chem.*, 45: 531-538.
- Tsen, C.C. (1969). Effects of oxidizing and reducing agents on the changes of flour proteins during dough mixing. *Cereal Chem.*, 46:435-442.
- Tsen, C.C. and Hlynka, I. (1967). Flour improvers: their effects, applications and chemical actions. *Baker's Digest*. 41:58-64.
- Veraverbeke, W.S., Roels, S.P. and Delcour, J.A. (1997). Heat-induced changes in sodium dodecyl sulphate-sedimentation volume and functionality of vital wheat gluten, *J.Cereal Sci.*, 26:177-181.
- Veraverbeke, W.S., Courtin, C.M., Verbuggen, I.M. and Delcour, J.A. (1999). Factors governing levels and composition of the sodium dodecyl sulphate-unextractable glutenin polymers during straight dough breadmaking. *J. Cereal Sci.*, 29:129-1438.
- Wadahawan, C.K. and Bushuk, W. (1989). Studies on vitality of commercial gluten. I. Physical, chemical and technological characteristics. *Cereal Chem.*, 66:456-461.
- Weegels, P.L., Hamer, R.J. and Schofield, J.D. (1996). Critical reviews. Functional properties of wheat glutenin, *J. Cereal Sci.*, 23:1-18.
- Weegels, P.L., Hamer, R.J. and Schofield, J.D. (1997). Depolymerisation and re-polymerisation



- of wheat glutenin during dough processing. II.Changes in composition. *J.Cereal Sci.*,25:155-163.
- Yamada,Y.and Preston,K.R. (1992). Effects of individual oxidants on oven rise and bread properties of Canadian short process bread. *J. Cereal Sci.*,15:237-251.
- Yamada,Y.and Preston,K.R. (1994). Sponge-and-dough bread:Effects of oxidants on bread and oven rise properties of a Canadian red spring wheat patent flour. *Cereal Chem.*,71:297-300.
- Yoshida,C.,Kirimura,M.and Danno,G. (2001). Change in the amount of SDS-insoluble gluten by oxidants during breadmaking. *Food Sci.Technol.Res.* 7:99-103.
- Zeleny,I. (1947). A simple sedimentation test estimating the bread-baking and gluten qualities of wheat flour. *Cereal Chem.*,24:465-475.