

# カリウムイオンによるグルテンタンパク質の凝集

吉 田 千 秋

## Aggregation of Gluten Proteins by Potassium Ion

Key words: Potassium ion, Gluten Proteins, Aggregation

前報においてカリウムイオンが小麦粉タンパク質の製パン性改良に効果があることを報告した(吉田 2005)。パン容積はグルテン中のゲル状グルテンタンパク質の量と正の相関があることがよく知られており、カリウムイオンはこの相関性を示すことからこのイオンによる製パン性改良はグルテンタンパク質のゲル化によることが示唆された。最近、うどんの物性改良にカリウムイオンが効果があることが報告されているがタンパク分子に及ぼす影響についてはまだ明らかにされていない(森岡克司 2005)。今回はグルテンタンパク質を構成する繊維状タンパク質であるグルテニンと球状タンパク質であるグリアジンについてカリウムイオンの凝集効果を調べた。

### 材料と方法

小麦粉は日清カメリア(強力粉)を使用した。試薬は半井化学特級を使用した。濁度は島津分光光度計UV-120-02型を用い、420nmで測定した。タンパク量は280nmにおける吸光度より、1%タンパク溶液の吸光度を7.8として求めた。

#### グルテンタンパク質の調製

Jonesら(1959)の方法にしたがって調製した。すなわち、脱脂小麦粉20gに水を10ml加えてこねてグルテン塊を得、0.1N酢酸を5ml加えてWahring blenderでホモジナイズした。得られたホモジネートに0.1N酢酸20ml加えて60分間かくはん後、12,000rpmで20分間遠心して上澄をグルテン溶液とした。グルテン溶液にエタノールを加えて70%溶液とし酢酸ナトリウムでpHを6.6として一夜5℃で放置した。生じた沈澱を遠心で集めてグルテニンとした。上澄に水を加えてエタノール濃度を50%にまで下げ、生じた沈澱を遠心で集めてグリアジンとした。

### 脱アミドグルテンの調製

Ching-Yung Maら (1986) の方法にしたがって調製した。すなわち、凍結乾燥グルテン 3 g に 0.15N HCl 60ml 加えて 2 時間還流加熱した。反応液を 1 N NaOH で pH を 6.6 にして水に対して透析後凍結乾燥した。

### サクシニル化グルテンの調製

Chung-Yung Maら (1986) の方法にしたがって調製した。すなわち、凍結乾燥グルテン 3 g に水 60ml 加えて 2 N NaOH で pH を 8.0 に保ちながら無水コハク酸 0.4 g を少しずつ加えた。反応後、水に対して透析後凍結乾燥した。

## 結果と考察

タンパク質はタンパク濃度、溶液の pH、イオン強度、温度などの条件に依存して、溶液状態、透明ゲル、白濁ゲル、および凝集体を形成する。卵白アルブミンでは球状タンパク質が加熱変性し、線状の高分子となり、さらにその線状高分子が相互に結合して三次元の網目構造をもつゲルを形成するというモデルが提出されている (Clark et al. 1981)。大豆グリシニンのゲル化でも同様の機構で起こることが知られている。すなわち、グリシニンタンパク質は加熱により部分変性することにより数珠状のストランドを形成し、それがさらにカルシウムイオンの存在でネットワークを形成してゲルを生じる (森友彦 1988)。本研究ではカリウムイオンによるグルテンタンパク質の白濁化および凝集体形成について検討した。グルテンタンパク質の凝集実験に先立って、ゲル化の機構が明らかになっている大豆グリシニンタンパク質のカル

表 I 大豆タンパク質の白濁化

	塩濃度 (mg/ml)						
	CaCl <sub>2</sub>						
	0	0.025	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
E 420nm							
非加熱	0.104	0.112	0.125	0.175	0.256	0.402	0.470
加熱	0.103	0.132	0.285	沈澱	沈澱	沈澱	沈澱
	KCl						
	0	2.5	5	10	15	20	40
E 420nm							
非加熱	0.173			0.173		0.165	
加熱	0.173	0.242	0.409	0.605	0.725	0.645	0.655

シウムイオンおよびカリウムイオンによる凝集を調べた。粉末大豆 5 g に水 50ml 加えて 20 分間かくはん抽出し 12,000rpm で 20 分間遠心して上澄を試料とした。表 I に示すように抽出液は加熱処理しないと  $\text{CaCl}_2$  を加えてもわずかに白濁する程度であるが、加熱により 0.10mg/ml (約 1 mM) で凝集体を形成して沈澱した。豆腐をつくる際の  $\text{CaCl}_2$  の適量は 23.3mM (岑 友里恵ら 2005) であるのでかなり低い濃度で凝集が起こったことになる。なお、カリウムイオンは加熱により高い濃度 (10mg/ml, 130mM) ではあるが凝集が起こった。より高濃度で濁度が減少するのは沈澱が生じたためである。同じ一価の陽イオンでもナトリウムイオンは効果がなかった (データ不掲載)。

### グルテンタンパク質の凝集

前報のミネラルによるグルテンタンパク質の白濁化はラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 存在で行ったが、SDS はミネラル存在で析出する。また、SDS はゲルを可溶化する効果が強いため凝集化の実験に使用するのは不相当である (Hatta et al. 1986)。そこで本実験では、グルテンタンパク質は Jones ら (1959) の方法に調製し、酢酸溶液に溶かした。その結果を表 II に示す。本研究で用いた塩はそれぞれ分子量を異にするので、% (W/V) でよりもモル濃度で比較した。前報 (吉田 2005) と同様カリウムイオンによりグルテンタンパク質は白濁化した。モル濃度で比較するとカルシウムイオンが最も効果が高くカリウムイオンとナトリウムイオンもほぼ同等の効果を示した。10 分間ボイルするといずれのイオンも白濁が増加した。

次にグルテニンとグリアジンについて塩による凝集化のちがいを検討した。表 III と表 IV にそれぞれ示すように球状タンパク質であるグリアジンも繊維状タンパク質であるグルテニンとともにカルシウムが最も効果が高くカリウム、ナトリウムイオンは同等の効果を示した。また、

表 II グルテンタンパク質の白濁化

	塩濃度 (mM)						
	KCl						
	0	0.5	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
E 420nm							
非加熱	0.062	0.080	0.101	0.123	0.143	0.208	0.522
加熱	0.043	0.046	0.059	0.071	0.258	0.392	0.845
	CaCl <sub>2</sub>						
	0	0.5	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
非加熱		0.071	0.160	0.634	1.149	1.416	1.556
加熱		0.032	0.106	0.709	0.913	1.112	1.170

タンパク濃度 0.25mg/ml

表Ⅲ グルテニンの白濁化

	塩濃度 (mM)						
	KCl						
	0	0.5	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
E 420nm							
非加熱	0.070	0.097	0.138	0.193	0.253	0.338	0.743
加熱	0.037	0.088	0.138	0.182	0.321	0.545	0.926
	CaCl <sub>2</sub>						
	0	0.5	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
	E 420nm						
非加熱		0.120	0.509	0.931	1.197	1.173	
加熱		0.060	0.909	1.096	凝集	凝集	
	NaCl						
	0	0.5	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
	E 420nm						
非加熱			0.045	0.094	0.119	0.249	0.538
加熱			0.030	0.059	0.112	0.496	0.912

タンパク濃度 0.25mg/ml

表Ⅳ グリアジンの白濁化

	塩濃度 (mM)				
	KCl				
	0	1.0	2.0	2.5	3.0
E 420nm					
非加熱	0.024	0.029	0.127	0.428	1.002
加熱	0.027	0.022	0.146	0.640	1.186
	CaCl <sub>2</sub>				
	0	1.0	2.0	2.5	3.0
	E 420nm				
非加熱		0.052	1.345	1.650	1.875
加熱		0.063	1.248	1.353	凝集
	NaCl				
	0	1.0	2.0	2.5	3.0
	E 420nm				
非加熱		0.019	0.123	0.265	0.806
加熱		0.027	0.040	0.439	1.208

タンパク濃度 0.25mg/ml

加熱によりいずれのイオンも凝集性が増加した。グルテニンはランダムコイル構造をとっているため (Danno and Natake 1980) 白濁化は通常の球状タンパクのように疎水領域の露出によるとは考えられない。

カルシウム、マグネシウムイオンによる大豆タンパク質のゲル化はこれらの陽イオンが大豆タンパク質のアミノ酸残基の側鎖の負の電荷を中和し、タンパク質同士の接触を起こしてサブユニットを会合させることにより三次元網状構造を形成するためと解釈されている (浅原照三ら、1976)。グルテンタンパク質は脱アミド化やサクシニル化により負電荷が付加されて可溶化する。そこでカリウムやカルシウムイオンの効果が増すことが予想される。そこで脱アミド化およびサクシニル化グルテンタンパク質を調製してその効果を調べた。その結果を表Vと表VIに示す。脱アミド化グルテンはカリウム、カルシウムおよびナトリウムイオンのいずれも凝集効果は消失した。しかし、加熱処理によりカルシウムイオンのみ凝集効果があらわれた。サクシニル化グルテンでも同様の結果が得られた。そこでグルテンタンパクのうち凝集がグリアジ

表V 脱アミドグルテンタンパク質の白濁化

		塩濃度			
		KCl	CaCl <sub>2</sub>	NaCl	
		0	2.5	2.5	
	0	3.35	2.25	4.70	(mM)
E 420nm					
非加熱	0.032	0.035	0.036	0.032	
加熱	0.029	0.029	0.294	0.032	
タンパク濃度 0.10mg/ml					
非加熱	0.032	0.312	0.347	0.321	
加熱	0.029	0.435	1.985	0.466	

表VI サクシニル化グルテンタンパク質の白濁化

		塩濃度			
		KCl	CaCl <sub>2</sub>	NaCl	
		0	2.5	2.5	
	0	3.35	2.25	4.70	(mM)
E 420nm					
非加熱	0.178	0.249	1.692	0.252	
加熱	0.135	0.232	1.980	0.196	
タンパク濃度 0.45mg/ml					

表VII 脱アミドグルテニンタンパク質の白濁化

	塩濃度 (mM)						
	0	KCl		CaCl <sub>2</sub>		NaCl	
		50	100	50	100	50	100
E 420nm							
非加熱	0.030	0.061	0.064	0.108	0.104	0.056	0.059
加熱	0.012	0.008	0.012	凝集	凝集	0.001	0.007

タンパク濃度 0.6mg/ml

表VIII 脱アミドグリアジンタンパク質の白濁化

	塩濃度 (mM)						
	0	KCl		CaCl <sub>2</sub>		NaCl	
		50	100	50	100	50	100
E 420nm							
非加熱	0.067	0.078	0.080	0.091	0.087	0.084	0.088
加熱	0.071	0.082	0.064	0.258	0.236	0.074	0.077

タンパク濃度 0.6mg/ml

ンかグルテニンのどちらかによるかを調べるため前述のようにJonesの方法でグルテニンとグリアジンに分離し、それぞれを脱アミド化した。その結果を表VII、VIIIに示す。脱アミドグルテニンは加熱するとカルシウムイオンによる凝集がみられたがカリウムイオン、ナトリウムイオンは加熱しても効果がなかった。脱アミドグリアジンはすべてのイオンで加熱しても効果がなかった。このことより先の脱グルテンのカルシウムによる凝集はグルテニンの方であり、グリアジンは凝集能が消失することがわかった。

タンパク濃度により透明ゲル、白濁ゲル、凝集、溶液状態をとるのでグルテンタンパク濃度を高めたときどういう状態をとるかを調べた。その結果を表IXに示す。これまでの結果と同じくカルシウムイオンが最も凝集力が強くカリウムイオンとナトリウムイオンは同程度であった。しかし、10分間加熱しても凝集体の増加はほとんど認められなかった。なお、凝集体はゲル状を示したが混ねつしたドウから得られたような透明ゲルではなく半透明ゲルであった。塩が存在すると透明なゲルが得られないことが知られているので塩濃度をできるだけ下げてpH、タンパク濃度などを検討する必要がある。

食塩はドウを引き締める作用があることは古くから知られており、今回の実験で得られた結果からナトリウムイオンによる凝集効果も関係していると思われる。カルシウムイオンはタンパク質のみならず、ある種の多糖類の凝固にも関わっている優れた凝固剤であるがグルテナ

表IX 高濃度グルテン溶液の凝集

	塩濃度 (mM)				
	KCl				
	0	1	10	25	50
沈澱タンパク %					
30°C	18.3	17.4	25.5	79.2	91.2
80°C	22.5	17.4	30.8	72.2	94.2
	CaCl <sub>2</sub>				
	1	2	5	10	25
沈澱タンパク %					
30°C	21.2	19.3	18.5	33.6	90.9
80°C	32.1	24.6	28.5	44.7	88.7
	NaCl				
	1	5	10	25	50
沈澱タンパク %					
30°C	20.8	24.0	26.3	63.6	91.7
80°C	26.8	19.1	32.5	71.5	94.7

タンパク濃度 80mg/ml

ンパク質に対しても強い凝集効果があることが判明した。カリウムイオンについても最近、うどんの物性改良にカルシウムイオンと並んで効果的であることが報告されている（森岡ら 2005）。今回得られた結果からカリウムイオンの凝集効果について考察した。カリウムイオンは以下にあげる理由からグリアジンが数珠状に連なってグルテニンとともにグルテンタンパク質の網目構造を形成する効果があると推察した。

1. グリアジンのうちA-グリアジンはpH 5で低濃度の食塩（5 mM）添加で会合が促進され、その微繊維集合体はモノマーサブユニットが疎水結合と水素結合によって結合したものである（Kasarda et al. 1976）。電子顕微鏡による観察ではその直径は 70-80オングストローム、長さ数百から4000オングストロームである（Kasarda et al 1967）。
2. 大豆タンパク質と同じく加熱により凝集体の形成が促進される。
3. 脱アミド化、サクシニル化により負電荷が付加されたにも関わらず凝集能は消失した。これらの修飾により分子の形状が球状からランダムコイル状に変化した可能性がある。
4. 高濃度では加熱なしでもすでに凝集効果がある。これは高濃度では会合を起こしている可能性がある。

以上の結果からカルシウムによるグリアジン分子の凝集促進が製パン性改良の一因と考えられるが分子の形状変化については光散乱法、電子顕微鏡観察による直接的な証明が必要である。

製パンには製パン性改良に必要なカリウム量に比べて多量の食塩が必要である。食塩はドウを引き締める働きとともにイーストの生育に必要である。もしナトリウムイオンとカリウムイオンがグルテンタンパク質に対して同じ作用をするのであれば微量のカリウムイオンが加わっただけでは改良効果があらわれないはずである。しかし、最近、森岡らはうどんの物性に及ぼすカリウムイオンの効果を調べ多量の食塩 (2.5%) 存在で塩化カリウム (0.04%) を添加するとうどんの引っ張り強度および伸びが高くなることを報告している (森岡ら 2005)。したがって、カリウムイオンはナトリウムイオンとは異なった働きが考えられるが今回行った実験ではとらえることはできなかった。このことについては今後の研究課題である。

#### 引用文献

- 浅原照三、戸倉仁一郎、大河原信、熊野溪従、妹尾学編 溶剤ハンドブック 講談社、東京 p.p. 415 (1976).
- 森岡克司、延近愛子、亀井美希、川越雄介、伊藤慶明、久保田賢、深見公雄 Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 52, 420 (2005).
- 岑 友里恵 村上香織、東敬子、吉原志保、福永公寿、佐伯隆、澤野悦雄 Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 52, 114 (2005).
- 森友彦 日本農芸化学会誌 62, 882 (1988).
- 吉田千秋 京都短期大学紀要 第33巻第1号 (2005).
- Bernardin, J. W., Proceeding of the 10th National Conference on Wheat Utilization on Research, Arizona, 1977, p.101. G, Danno and M. Nataka. Agric. Biol. Chem., 44, 2155 (1980).
- Chung-Yung Ma, B.D.Ooman and J.Holme Effect of Deamidation and Succinylation on Some Physicochemical and Baking Properties of Gluten J. Food Sci., 51, 99-103 (1986).
- A.H. Clark, F.J. Judge, J.B. Richards, J. M. Stubbs, A. Suggett: Int. J. Peptide Protein Res., 17, 380 (1981).
- H. Hatta., N.Kitabatake and E.Doi, Agric. Biol. Chem., 50, 2083 (1986).
- Kasarda, D.D., Bernardin J. W. and Thomas, R. S., science, 155, 203 (1967).
- Kasarda, D.D., Bernardin, E. and Nimmo, C.C., "Advances in Cereal Sci. Tech." ed. by Pomeranz, Y., Amer. Asso. of Cereal Chem. Inc., St Paul 1976. p 158.