

小麦粉生地形成に及ぼす小麦粉タンパク質と β -ラクトグロブリンの分子間相互作用の影響について

| | |
|-------|---|
| 誌名 | 日本食品保蔵科学会誌 |
| ISSN | 13441213 |
| 著者 | 岡, 大貴 菊池, 千尋 塩野, 弘二 内田, 達也 野口, 智弘 高野, 克己 |
| 巻/号 | 39巻2号 |
| 掲載ページ | p. 87-91 |
| 発行年月 | 2013年3月 |

小麦粉生地形成に及ぼす小麦粉タンパク質と β -ラクトグロブリンの分子間相互作用の影響について

岡 大貴^{*1}・菊池千尋^{*2}・塩野弘二^{*2}
内田達也^{*3}・野口智弘^{*1§}・高野克己^{*2}

* 1 東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター

* 2 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Effect of the Molecular Interaction between Wheat Proteins and β -lactoglobulin on Wheat-flour Dough Formation

OKA Daiki^{*1}, KIKUCHI Chihiro^{*2}, SHIONO Kouji^{*2},
UCHIDA Tatsuya^{*2}, NOGUCHI Tomohiro^{*1§} and TAKANO Katsumi^{*2}

* 1 Food Processing technology Center, Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* 2 Faculty of Applied Bioscience, Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Here we investigated the effect of skim-milk proteins on both the decline in baking quality and on the reversal of the decline in baking quality of skim milk. β -lactoglobulin (β -Lg) molecule interacted with a part of gliadin and lysed the gliadin molecules. In case of the heated mixture of β -Lg and κ -casein (κ -CN), the influence of β -Lg on gliadin resolvability was low. Further, these results revealed that the decline in the baking quality of non-heated skim milk or low-heated skim milk was because of the dissolved part of gliadin. In addition, the results suggest that the decline in the baking quality of high-heated skim milk was reversed because of the influence of β -Lg on gliadin resolvability; hydrophobic interactions of the heated polymer of β -Lg and κ -CN with gliadin reduced the resolvability of gliadin.

(Received Apr. 10, 2012; Accepted Oct. 11, 2012)

Key words: baking quality, gluten formation, heat denaturation, hydrophobic interaction, κ -casein
製パン性, グルテン形成, 熱変性, 疎水性相互作用, κ -カゼイン

パンには、味や香りの向上、焼き色の良色化、栄養価の向上が期待されることから脱脂粉乳が加えられ製造されている¹⁾。しかし、脱脂粉乳は製造過程において殺菌や噴霧乾燥などの熱処理を受けており、その熱変性度に応じて製パン性が左右される。低度加熱処理した脱脂粉乳を用いると、クラムの硬さの増加や比容積の減少など製パン性が低下し^{2),3)}、高度加熱処理した脱脂粉乳では、製パン性低下が抑制されることが経験的に知られている⁴⁾。筆者らは、ホエータンパク質である α -ラクトアルブミン (α -La) と β -ラクトグロブリン (β -Lg) は、未変性状態では製パン性を低下させることを報告した⁵⁾。また、未変性のカゼインも製パン性を阻害すること、ホエ

ータンパク質とカゼインを混合し加熱するとそれらの製パン性阻害が消失すると共に、加熱によって κ -カゼイン (κ -CN) とホエータンパク質がジスルフィド結合 (SS結合) により複合体を形成することを明らかにした⁵⁾。

しかし、これら乳タンパク質の変性状態が小麦粉生地の骨格となるグルテンの形成性にどのように影響を及ぼしているのかは未解明である。

そこで本報では、 β -Lgの製パン性低下の要因ならびに β -Lgが κ -CNと複合体を形成することによる製パン性低下作用の消失について、小麦粉タンパク質と β -Lgの分子間相互作用に着目し検討を行った。

* 1 〒156-8502東京都世田谷区桜丘 1-1-1

§ Corresponding author, E-mail: tomo@nodai.ac.jp

* 2 〒156-8502東京都世田谷区桜丘 1-1-1

試料および実験方法

1. 試料

東京農業大学富士農場で飼育されている乳牛（ホルスタイン種）より搾乳した生乳を40℃に加温し、クリームセパレーターにて乳脂肪を分離除去後、非加熱脱脂乳を得た。また、この非加熱脱脂乳を80℃、30分間処理し加熱脱脂乳を調製した。

2. 乳タンパク質の分画

β -LgはASCHAFFEBURGら⁶⁾の方法に従い、 κ -CNはIGARASHIら^{7,8)}の方法に従い分画精製し、凍結乾燥（RLE II-205, 共和真空技術社製）させ試料とした。

3. パンの調製法および製パン性の評価

パンの調製法および製パン性の評価についてはKIKUCHIら⁹⁾の方法に従って行った。なお、 β -Lgおよび κ -CNの添加量は、生地200gに対し脱脂粉乳6g添加に相当するタンパク質量（日本食品標準成分表5訂）とした。パンの比容積およびクラムの硬さは、乳タンパク質無添加の値を100とし相対値（%）で表した。

4. 抗原抗体反応を用いた小麦粉タンパク質と β -Lgの分子間相互作用の解析

グリアジン（TCI）およびグルテニン（TCI）0.5gに脱脂乳0.5ml（タンパク質量として17mg）または0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した β -Lgと κ -CNの混合試料0.5ml（タンパク質量として2mgずつ）を添加し混合した。その後、混合物に超純水を加え十分に攪拌洗浄し余分な乳タンパク質を除き、残渣を β -Lg抗体との反応に供した。なお、一次抗体としてRabbit anti-Bovine beta-Lactoglobulin Antibody Affinity Purified（BETHYL Laboratories）、二次抗体にはECL Anti-Rabbit IgG HRP-linked whole antibody from donkey（GE Healthcare）を用いた。検出にはECL PLUS Western Blotting Detection Reagents（GE Healthcare）を用いて、ChemiDoc（Bio-Rad）により行った。

5. 疎水性クロマトグラフィーによるタンパク質の分画

SHEWRYら⁹⁾の方法に従い抽出したグリアジン2mgを0.1M酢酸緩衝液（pH5.0）1mlに溶解し、同緩衝液に

て平衡化させたButyl-Toyopearl 650S（ ϕ 1.35cm×4cm）に供した。その後、エタノール濃度0, 40, 100%のステップワイズ溶出を行い、タンパク質は280nmの紫外外部吸収にて検出した。また、同緩衝液にてpH5.0に調製した β -Lgと κ -CNの混合試料（タンパク質量として1mgずつ）1mlを同担体に供し同様に溶出を行った。溶出した各画分は、ドットプロット法により β -Lgの検出を行った。なお、抗原抗体反応は上記4に従って行った。

6. グリアジンの溶解挙動の解析

グリアジン（TCI）1gに β -Lgと κ -CNの混合試料（タンパク質量として5mgずつ）1mlを添加し混合した。その後、FRANCESら¹⁰⁾の方法を改良しグリアジンを分画し、乳タンパク質が与えるグリアジンの溶解挙動を解析した。すなわち、グリアジンと乳タンパク質の混合物に純水5mlを加えホモジナイザー（ヒスコトロン、マイクロテック・ニチオン社製）にて分散後、遠心分離（6,000xg, 20分間, 室温）し上澄液（可溶性画分, S1）を得た。さらに、沈殿に対し50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.8, S2）を加えて同様の操作を行い、順次50%プロパノール溶液（S3）、0.1M酢酸溶液（S4）、1%SDS溶液（S5）および0.1N水酸化ナトリウム溶液（S6）にて各可溶性画分を得た。各画分はゲル濃度15%のSDS-PAGE（Me+）に供し、セミドライプロット法によりPVDF膜にタンパク質を転写後、ウエスタンブロット法にてグリアジンを検出した。なお、グリアジンの一次抗体にはAnti Gliadin from Mouse CE-3（Cosmo Bio）、二次抗体にはECL Anti-Mouse IgG, HRP-linked whole antibody from sheep（GE Healthcare）を用い、検出は上記4に従って行った。

実験結果

1. β -Lgと κ -CNの加熱複合体形成が製パン性に与える影響について

β -Lgと κ -CNを非加熱の状態ですれぞれ生地に添加し製パン性試験を行ったところ、無添加と比較し、比容積（%）は 80.2 ± 5.3 （ \pm SD）、 79.0 ± 0.9 、硬さ（%）は 215.7 ± 19.0 、 142.8 ± 9.6 を示し、 β -Lgだけでなく κ -CNも製パン性を大きく低下させた（Table 1）。また、両

Table 1 The baking quality of bread made from dough containing β -lactoglobulin (β -Lg) and κ -casein (κ -CN)

| | Control | β -Lg | | κ -CN | | Mixture | |
|--------------------|---------|-------------|--------|--------------|--------|----------|--------|
| | | Unheated | Heated | Unheated | Heated | Unheated | Heated |
| Loaf volume | 100.0 | 80.2* | 79.1* | 79.0* | 89.1* | 79.4 | 105.4 |
| Standard Deviation | 3.5 | 5.3 | 6.0 | 0.9 | 4.3 | 2.3 | 4.3 |
| Hardness of crumb | 100.0 | 215.7* | 196.5* | 142.8* | 179.4* | 210.4* | 86.0* |
| Standard Deviation | 19.1 | 19.0 | 22.5 | 9.6 | 5.6 | 10.8 | 5.0 |

A comparison of the loaf volume and hardness of crumb values of bread made from dough containing β -Lg, κ -CN and a mixture of β -Lg + κ -CN with those of the bread made from dough containing no skim milk (Control). The values for control were set at 100. The experiments were repeated 8 times. Asterisks indicate values significantly different from that of the control ($p < 0.05$)

乳タンパク質をそれぞれ加熱 (80°C, 30分) し試験に供したところ, 非加熱試料と同様に製パン性は大きく低下した。一方, 両乳タンパク質を混合加熱したところ, 比容積 105.4 ± 4.3 , 硬さ 86.0 ± 5.0 を示し, 製パン性が回復した。

本結果から, β -Lgと κ -CNが加熱により複合体を形成することで, 両乳タンパク質の製パン性低下作用が消失することが明らかとなった。

2. β -Lgと κ -CNの加熱複合体と小麦粉タンパク質の分子間相互作用について

非加熱および加熱脱脂乳を添加したグリアジンおよびグルテニンに β -Lg抗体を作用させたところ, 非加熱脱脂乳を添加した両小麦粉タンパク質は β -Lg抗体に陰性反応を示した (Fig. 1)。一方, 加熱脱脂乳を添加した場合, グリアジンは非加熱脱脂乳と異なり β -Lg抗体に陽性反応を示し, グルテニンは非加熱脱脂乳を添加した場合と同様 β -Lg抗体に陰性であった。

次に, β -Lgと κ -CNの混合試料をグリアジンとグルテニンに添加したところ, 混合非加熱試料では非加熱脱脂乳と同様に β -Lg抗体に陰性反応を示した。一方, それらの混合加熱試料を添加したところ, グリアジンは β -Lg抗体に陽性反応を示し, グルテニンは混合非加熱試料と同様に β -Lg抗体に陰性であった。また, 非加熱および加熱した β -Lgを両小麦粉タンパク質に添加したところ, 共に陰性反応を示したことから, β -Lgはグリアジンおよびグルテニンとは相互作用性が無く, κ -CNと加熱複合体を形成することによってグリアジンと相互作用し会合することが明らかになった。

3. β -Lgと κ -CNの加熱複合体とグリアジンの疎水性について

グリアジンおよび β -Lgと κ -CNの混合試料を疎水性クロマトグラフィーに供したところ, グリアジンはエタノール濃度0, 40および100%のすべての画分に溶出され, 溶出比率はおおむね1:2:1であり, 疎水性度の異なるグリアジンが存在することが示唆された (Fig. 2A)。一方, 非加熱の β -Lgと κ -CNの混合試料では未吸着画分および40%画分にそのほとんどが溶出されたが, それらの混合加熱試料では未吸着画分が大きく減少しエタノール濃度40および100%画分に溶出された (Fig. 2B)。

次に, 得られた各画分の, β -Lgの溶出挙動をドットプロット法により解析したところ, 非加熱の β -Lgと κ -CNの混合試料では, β -Lg抗体の陽性シグナルは未吸着画分のみにもみられたが, それらの混合加熱試料の未吸着画分ではシグナルが消失し, 40および100%画分に同シグナルがみられた (Fig. 3)。

β -Lgと κ -CNの加熱複合体は, 疎水性クロマトグラフィーの溶出挙動がグリアジンと類似し, 両者は同様の疎水性であることが示唆された。このことから β -Lgは κ -CNと加熱複合体を形成すると疎水性が高まり, グリアジンとの疎水性相互作用性が強くなると推察した。

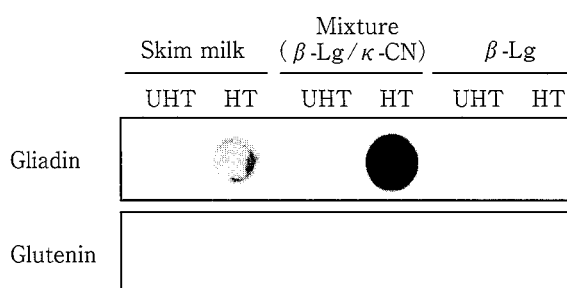


Fig. 1 Molecular interaction of β -Lg with gliadin and glutenin determined using antigen-antibody reaction

Primary antibody of β -Lg, Rabbit anti-Bovine beta-Lactoglobulin antibody (BETHYL Lab.); Secondary antibody of β -Lg, ECL Anti-Rabbit IgG HRP-linked whole antibody from donkey (GE Healthcare); UHT, Unheated; HT, Heated

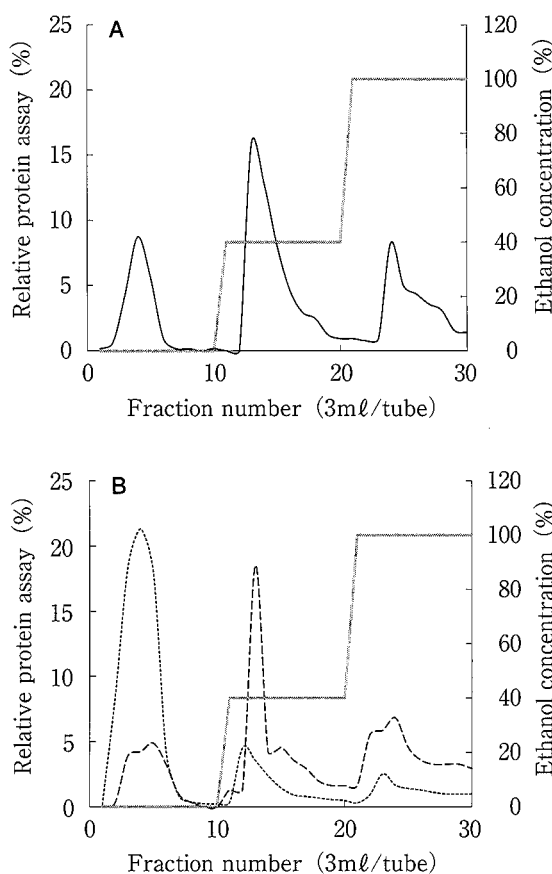


Fig. 2 A comparison of the hydrophobicity of gliadin and the heated polymer (β -Lg/ κ -CN) by using hydrophobic chromatography (Butyl-Toyopearl 650S)

A, Chromatogram of gliadin; B, Chromatogram of a mixture of β -Lg and κ -CN; Symbols, — Gliadin; - - - - Unheated mixture of β -Lg and κ -CN; - - - - Heated mixture of β -Lg and κ -CN; — Ethanol concentration

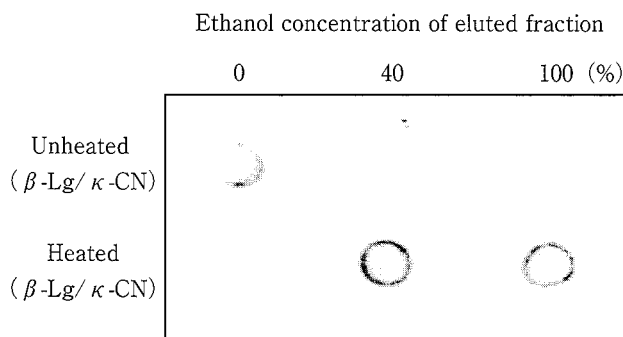


Fig. 3 Dot-blot detection of β -Lg of separated fraction obtained from hydrophobic chromatography experiment

Primary antibody of β -Lg ; Rabbit anti-Bovine beta-Lactoglobulin antibody (BETHYL Lab.), Secondary antibody of β -Lg; ECL Anti-Rabbit IgG HRP-linked whole antibody from donkey (GE Healthcare)

4. β -Lgと κ -CNの加熱複合体形成がグリアジンの溶解挙動に与える影響について

前述の試験の結果、グリアジンに β -Lgと κ -CNの加熱複合体が疎水性相互作用により会合することが示唆されたので、グリアジンに β -Lgと κ -CNの混合試料を添加し、グリアジンの溶解挙動の変化をウエスタンブロット法にて解析した。その結果、グリアジンはS2, S3およびS4画分に検出されたが、非加熱の β -Lgと κ -CNの混合試料をグリアジンに添加したところ、S1画分からS5画分に溶出し、グリアジンの溶解挙動が変化した (Fig. 4)。一方、それらの混合加熱試料では、グリアジンは無添加と同様にS2, S3およびS4画分に検出され、S1およびS5画分への溶出はみられなかった。また、非加熱および加熱の β -Lgをグリアジンに添加したところ、混合非加熱試料と同様にS1画分からS5画分に溶出がみられた。

以上のことから、 β -Lgはグリアジンに会合し、その疎水性を変化させ溶解性に影響を与えることが明らかになった。Fig. 1において、 β -Lgを添加したグリアジンが β -Lg抗体に陽性を示さなかったのは、 β -Lgが結合したグリアジンが水溶化し、試料作成過程で除去されたためと判断した。なお、非加熱および加熱 β -Lg, 非加熱の β -Lgと κ -CNの混合試料をグリアジンに加えるとS5画分にグリアジンが検出された理由については今後検討したい。また、本結果からグリアジンの一部は β -Lgと特異的に相互作用することで同タンパク質が水溶化し、生地形成と製パン性が低下すること、 β -Lgと κ -CNの加熱複合体が結合するとその水溶化が抑制され、生地形成と製パン性が維持されることが示唆された。

今後、 β -Lgが結合するグリアジンの特定を行い、グリアジンが果たす生地形成および製パン性への役割を解明すると共に κ -CNの阻害要因についても検討を進めたい。

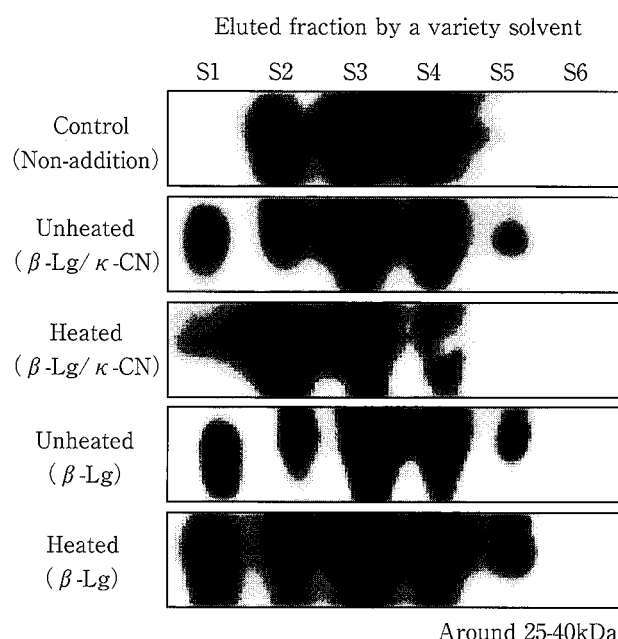


Fig. 4 Western blot analysis of the elution behavior of gliadin containing milk proteins

The fractionated proteins were analyzed using SDS-PAGE (T = 15%). This PAGE was then transcribed onto a PVDF membrane by semidry blotting, and was analyzed by western blotting (Anti-gliadin). S1, Water; S2, 50mM Tris buffer (pH 7.8); S3, 50% Propanol; S4, 0.1M Acetic acid; S5, 1% Sodium dodecyl sulfate; S6, 0.1N Sodium hydrate-soluble fractions

要 約

本研究では、脱脂乳中のタンパク質による製パン性低下の要因ならびに加熱処理による同タンパク質の製パン性低下作用の消失について検討を行った。 β -Lgはグリアジンの一部と結合し、それを水溶化させた。一方、 β -Lgと κ -CNの加熱複合体では、このような現象はみられず、グリアジンの溶解性は変化しなかった。これらのことから、非加熱あるいは低加熱脱脂乳の添加による生地形成および製パン性の低下は、グリアジンの一部に β -Lgが結合することによって、同タンパク質が水溶化することで惹起されることが明らかになった。また、加熱脱脂乳における製パン性の回復は、形成された β -Lgと κ -CNの加熱複合体の疎水性がグリアジンと同程度で、このため加熱複合体が結合したグリアジンの水溶化が生じることなく、生地が形成されたためと推察された。

文 献

- 1) 田中康夫・松本 博編：製パンの科学II 製パン材料の科学 (光琳, 東京) (1992)
- 2) LARSON, B. L., JENNESS, R., GEDDES, W. F. and COULTER, S. T.: An evaluation of the methods used for determining the baking quality of nonfat

- dry milk solids, *Cereal Chem.*, **28**, 351~370 (1951)
- 3) VOLPE, T. and ZABIK, M. E.: A whey protein contributing to loaf volume depression, *Cereal Chem.*, **52**, 188~197 (1975)
- 4) HARPER, W. J. and ZADOW, J. G.: Heat induced changes in whey protein concentrates as related to bread manufacture, *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **19**, 229~237 (1984)
- 5) 菊池千尋・岡 大貴・上野 宏・塩田 誠・野口智弘・高野克己: 脱脂乳による製パン性阻害に対する乳タンパク質の熱変性の影響, *日食保蔵誌*, **38**, 211~215 (2012)
- 6) ASCHAFFENBURG, R. and DREWRY, J.: Improved method for the preparation of crystalline β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin from cow's milk, *J. Biochem.*, **65**, 273~277 (1957)
- 7) IGARASHI, Y.: An improved procedure for the preliminary fractionation of milk proteins, *Int. Dairy J.*, **5**, 305~310 (1995)
- 8) IGARASHI, Y.: Separation of caseins by chemical procedures, *Int. Dairy J.*, **9**, 377~378 (1999)
- 9) SHEWRY, P. R., MIFLIN, B. J., ELLEN, J.-L. Lew and KASARDA, D. D.: The preparation and characterization of an aggregated gliadin fraction from wheat, *J. Experimental Botany*, **34**, 1403~1410 (1983)
- 10) FRANCES, M. D., RONALD, C., ROCIO, L. and WILLIAM, H. V.: Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenin, and other proteins from small samples of wheat flour, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1575~1584 (2005)
- (平成24年4月10日, 平成24年10月11日受理)