

小麦グルテニンに及ぼす高温加熱の影響

団 野 源 一*

大阪青山大学健康科学部健康栄養学科¹⁾

Effect of heat-treatment on wheat glutenin subunits

Genichi DANNO

Faculty of Health Science, Department of Health and Nutrition, Osaka Aoyama University

Summary Glutenin dispersed in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) was heated at various temperatures for 15 min. Effects of the heat-treatment on the subunit pattern was studied by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). No change in the subunit pattern of glutenin was observed by heating at 120°C. A high molecular weight protein which did not migrate into gel matrix during electrophoresis was observed in the glutenin heat-treated at a temperature higher than 130°C. All the subunits disappeared by heating at 150°C. Increasing the temperature elevated the ratio of soluble fractions in 7.5% trichloroacetic acid (TCA-soluble fraction), and about 50% of glutenin changed into TCA-soluble fractions by heating at 170°C. These results suggest that polymerization and decomposition of glutenin subunits occurred simultaneously by heating at high temperatures. (accepted. Oct. 30, 2009)

Keywords : wheat glutenin, glutenin subunits, heat-treatment

小麦グルテニン, グルテニン・サブユニット, 加熱処理

実験方法

小麦粉をパンやクッキーに加工する際には加熱を行う。特に、パンやクッキー等において、加熱工程でその表面は高温に晒される。また、エクストルーダーによる加工の際にも材料は高温に曝される¹⁾。小麦の主要タンパク質であるグリアジンやグルテニンは、アルブミン、グロブリンにみられる熱凝固性を示さないが、より高温においては熱による影響を受ける。グリアジンは、分子内SS結合をもつ比較的低分子のたんぱく質である。グルテニンは、多種類のペプチド鎖（サブユニット）が分子間SS結合によって結合した巨大タンパク質である。グルテニンのサブユニットは、分子量9万から13万の高分子量サブユニット、3万から5万の低分子量サブユニット、アルブミン類似のアミノ酸組成をもつアルブミン様ペプチドからなる²⁾。本研究では、グルテニンを高温加熱した場合の影響について検討した。

1. 小麦粉・試薬

カナダ・ウエスタン No.1 (1CW) のテストミル粉 (60% extraction) をn-ブタノールで数回抽出、続いてn-ヘキサンで洗浄した後風乾して調製したものを脱脂小麦粉として本実験に用いた。電気泳動に用いたラウリル硫酸ナトリウム (SDS, 純度 99%) は、ナカライテスク (株) から購入した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

2. グルテニンの調製

脱脂小麦粉 (50 g) をN-エチルマレイミド 40 mg, EDTA 350 mg, 塩化ナトリウム 10 gを含む 0.05 Mリン酸ナトリウム (pH 6.8) 1000 mlに懸濁し、穏やかに30分間攪拌した。遠心分離により水溶性成分を除去した残渣に少量の0.1 M酢酸を加え、ワーリングブレンダーで激しく攪拌することによってグルテンを分散させた。遠心分離により得たグルテン分散液を95°Cに2分間加熱し、含まれているプロテアーゼを失活させた。グルテンの酢酸分散

* E-mail: g-danno@osaka-aoyama.ac.jp

1) 〒562-8580 箕面市新稲2-11-1

液にエタノールを70%となるように添加し、1 M 水酸化ナトリウムでpH 6.5に調節しすることによりグルテンを沈殿として分離した。グルテンを0.1 M 酢酸に再度分散し、70%エタノール沈殿操作を2回繰り返した後、0.01 M 酢酸に分散させ、0.01 M 酢酸に対して透析した。グルテンの低分子量サブユニットは、Bietzらの方法²⁾により還元グルテンの70%エタノール (pH 6.5) 可溶性画分として調製した。グリアジンは、グルテンの酢酸分散液から、Jonesら³⁾の方法に従って調製した。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEは、Weber とOsbornの方法⁴⁾に従って、ディスクゲル(7.5%ゲル、径5 mm、長さ100 mm)を用いて行った。試料たんぱく質を2%SDS溶液(1% 2-メルカプトエタノール、0.125 M トリス塩酸、pH 7.0、20%スクロース、プロモフェノールブルーを含む)に溶解し、80°C、30分加熱したもの25 μ lをゲル上に直接載せて電気泳動に供した。電気泳動ゲルを10%トリクロル酢酸(TCA)に数時間浸漬して泳動たんぱく質を固定した後、0.04% コマジーブリリアントブルーR250を含む10%TCA溶液に20時間浸漬して泳動たんぱく質を染色し、7%酢酸で洗浄して脱染色した。

4. グルテンの加熱操作

0.01 M 酢酸に分散したグルテン分散液(15 mg-protein/ml, pH 4.5) 0.5 mlを12×120 mm硬質試験管に入れ、試験管の上端部を減圧下で封管した。100°Cから170°Cに調節したオイルバスを用いて15分間加熱処理を行った。pH 7.0の条件では、0.01 M 酢酸に分散したグルテン分散液(19 mg-protein/ml) 0.4 mlと1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 0.1 mlを硬質試験管に入れ、同様に封管して加熱処理を行った。

5. たんぱく質の定量

たんぱく質は、マイクロケルダール法で定量した(N×5.7)。

6. 加熱処理試料の遊離アンモニアの定量

加熱試料中に生成した遊離アンモニアの定量は、Chibnall等の方法に従って、Conwayの微量拡散法によって行った⁵⁾。加熱試料に水を加え、水層をConwayの微量拡散装置の試料室に移し、四ホウ酸ナトリウム飽和溶液(pH 10)を1 ml加えて試料をアルカリ性に保ち1夜アンモニアを拡散させて、遊離アンモニアを定量した。

実験結果

1. 加熱処理グルテンのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0, 0.2 M)に分散したグルテンを100°Cから170°Cに15分間加熱処理した。加熱グルテンのSDS-PAGEの結果をFig.1に示す。120°C以下では、泳動パターンに変化が認められないが、130°C以上では泳動ゲルの上端にゲル中に移行できない高分子成分が出現し、グルテンが重合していることを示している。150°C以上では、グルテンのサブユニットはほぼ完全に消失し、重合物のほかに泳動ゲルの下部に不鮮明なバンドが出現しグルテンの一部が低分子化していることを示している。グルテン・サブユニットには、高分子量サブユニット(図中A)、低分子量サブユニット(C)及びアルブミン様サブユニット(B)があるが、加熱による各サブユニットの挙動にはほとんど差がないことを示している。

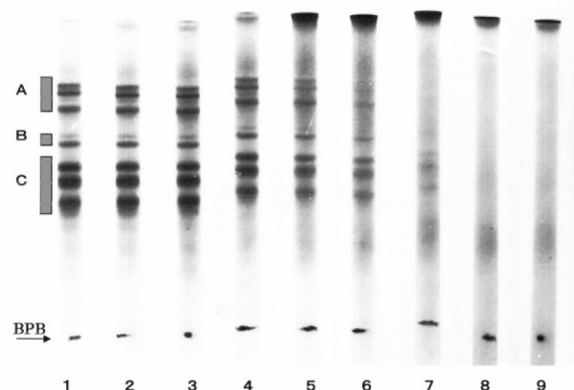


Fig. 1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of heat-treated glutenin suspended in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 15 min.

Lanes: (1) Un-heated glutenin, (2) heat-treated at 100°C, (3) 110°C, (4) 120°C, (5) 130°C, (6) 140°C, (7) 150°C, (8) 160°C, (9) 170°C.

A: high molecular weight subunits,
B: albumin-like polypeptides,
C: low molecular weight subunits.

0.01 M 酢酸に分散したグルテン(pH 4.5)を100°Cから170°Cに15分間加熱した。SDS-PAGEの結果は、Fig. 2に示すように、酸性下ではグルテン・サブユニットは加熱処理に対して比較的安定であった。160°Cにおいても高分子量サブユニット(A)及び低分子量サブユニット(C)が認められる。泳動ゲルの上端の重合物の存在は150°C以上において認められ、pH 7.0におけるよりも

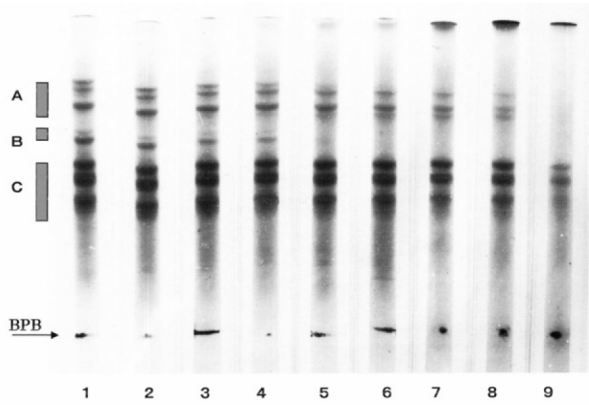


Fig. 2 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of heat-treated glutenin suspended in 0.01M acetic acid for 15 min.

Lanes: (1) Un-heated glutenin, (2) heat treated at 100°C, (3) 110°C, (4) 120°C, (5) 130°C, (6) 140°C, (7) 150°C, (8) 160°C, (9) 170°C.

A: high molecular weight subunits,
B: albumin-like polypeptides,
C: low molecular weight subunits.

重合物の生成する温度は高くなっていることを示している。それに反して、アルブミン様サブユニットはpH 7.0の条件と同様に 130°Cにおいて消失しており、pHの影響は受けていないことを示している。

2. グルテニンの低分子量サブユニットとグリアジンの加熱処理の影響

グルテニンの低分子量サブユニットとほぼ同じ分子量分布をしめすグリアジンの加熱処理による挙動を比較した。Fig. 3 に示すように、グリアジンはグルテニンの低分子サブユニットよりも耐熱性に乏しい。140°Cの加熱処理によってグリアジンの泳動バンドは完全に消失し、泳動ゲル中に移動できない高分子凝集物の生成が認められた。また、120°Cにおいても高分子領域にバンドが認められ、凝集物生成の過程を示唆している。

3. 加熱処理による三塩化酢酸可溶性成分の増加

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0, 0.2 M) に分散したグルテニンを 100°Cから 170°Cに 15 分間加熱したものに三塩化酢酸を終濃度 7.5%になるように加え、たんぱく質を沈殿させた上澄液のたんぱく質をケルダール法により測定した。加熱温度の上昇に伴い三塩化酢酸可溶性成分の割合が増加し、170°C15 分間加熱処理によってグルテニンの 50%が三塩化酢酸に可溶となった。高温加熱処理によりグルテニン・サブユニットが低分子化したこと、

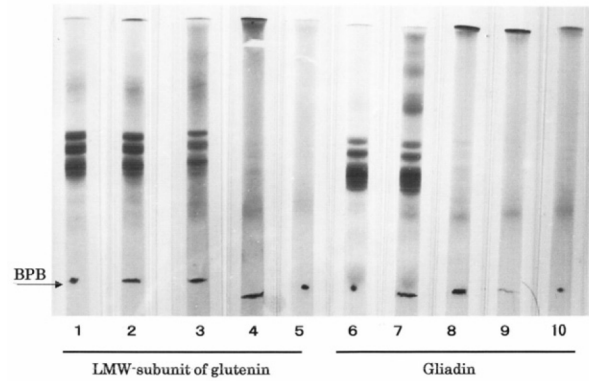


Fig. 3 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of heat-treated low molecular weight subunit of glutenin, and gliadin suspended in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 15 min.

Lanes: (1) and (6): Un-heated glutenin, lanes (2) and (7): heat treated at 120°C, lanes (3) and (8): 140°C, lane (4) and (9): 150°C, lanes (5) and (10): 160°C.

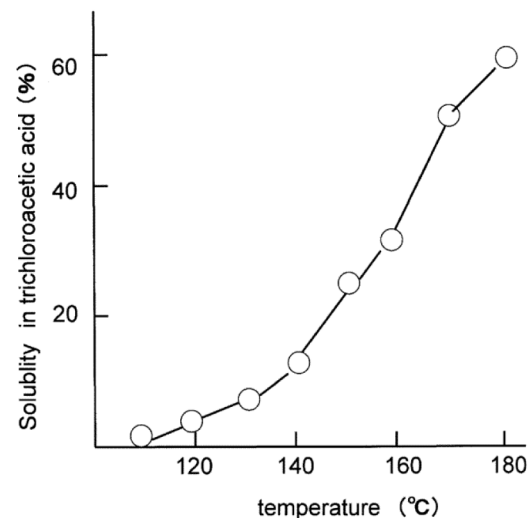


Fig. 4 Trichloroacetic acid-soluble fraction (TCA-soluble fraction) of the glutenin heated at various temperature levels.

The heated glutenin was precipitated by addition of trichloroacetic acid to 7.5% concentration, and successive centrifugation. Amount of TCA-soluble fraction was determined by micro Kjeldhal method. The values are expressed as percentage against glutenin nitrogen

サブユニットのペプチド結合が切断されたことを示唆している。

三塩化酢酸可溶性画分の性質を調べるため、そのアミノ酸組成を調べた。三塩化酢酸可溶性画分と不溶性画分に含まれる三塩化酢酸をエチルエーテルで抽出して除去した後、6 M塩酸、110°Cで24時間加水分解してアミノ酸組成を測定した。Table 1に示すように、三塩化酢酸可溶性画分、不溶性画分共にグルテンのアミノ酸組成を示した。三塩化酢酸可溶性画分のアミノ酸組成は、不溶性画分のそれに比べてグリシンが多く、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンが少ないことが認められた。このようなアミノ酸組成の特徴はグルテン・高分子量サブユニットと低分子量サブユニットのアミノ酸組成において報告されている⁶⁾。従って、三塩化酢酸可溶性画分にはグルテン・高分子量サブユニットが、三塩化酢酸不溶性画分はグルテン・低分子量サブユニットが多く含まれているものと思われる。

Table 1 Amino acid composition of heat-treated glutenin*

| | TCA-soluble fraction** | TCA-insoluble fraction** |
|-----|------------------------|--------------------------|
| Asp | 1.10 | 2.91 |
| Thr | 2.21 | 2.52 |
| Ser | 5.67 | 5.52 |
| Glu | 44.5 | 34.7 |
| Pro | 12.6 | 11.3 |
| Gly | 14.2 | 5.67 |
| Ala | 2.42 | 4.12 |
| Cys | | |
| Val | 3.04 | 6.94 |
| Met | 0.73 | 1.61 |
| Ile | 1.16 | 4.19 |
| Leu | 3.91 | 8.02 |
| Tyr | 3.23 | 3.32 |
| Phe | 1.71 | 3.86 |
| Lys | 0.79 | 1.72 |
| His | 1.23 | 1.63 |
| Arg | 1.46 | 3.91 |

* Values shown are expressed as number of residues per 100 total residues.

** Gluten was heated at 170°C for 15 min and added trichloroacetic acid (TCA) to concentration of 7.5%. TCA-soluble and -insoluble fractions were separated by centrifugation, and TCA in the fractions were removed by extraction with diethyl ether. The fractions were hydrolyzed with 6 M hydrochloric acid at 110°C for 24 hr.

4. 加熱処理によるアンモニアの生成

pH 5.5 から pH 8.0 のリン酸ナトリウム緩衝液 (0.2 M) に分散したグルテンを 120°C 及び 130°C に 15 分間加熱した後、その水溶性区分をコンウエー微量拡散法で遊離したアンモニアを定量した。Fig. 5 に示すように、120°C の加熱処理では、アンモニアの生成は pH 8.0 まで微増であるが、130°C 加熱では pH 7.5 以上で急増した。このアンモ

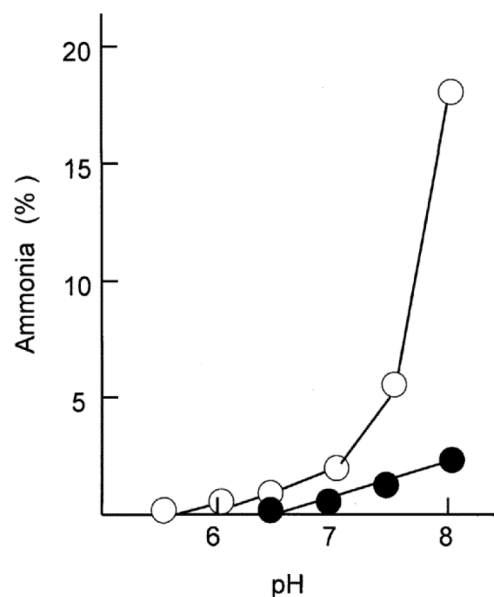


Fig. 5 Amount of ammonia formed from heat-treated glutenin at various pH levels.

● : 120°C, ○ : 130°C for 15 min

ニアがグルテンのアミドの分解により生じたものとする。pH 7.5 15 分の加熱によりアミドの約 20% が遊離したことになる。

5. 構成アミノ酸に及ぼす加熱処理の影響

リン酸緩衝液 (pH 7.0) に分散したグルテンを 140, 170 及び 180°C に 15 分加熱処理したものを 6 M塩酸で 24 時間加水分解してアミノ酸分析を行った。Table 1 に示すように、加熱処理グルテンのアミノ酸組成は未加熱のそれと変わらず、加熱処理によって損傷を受けるアミノ酸は認められなかった。また、データは示していないが、0.01 M酢酸、及びリン酸緩衝液 (pH 7.5) の加熱処理においても構成アミノ酸の損失は認められなかった。

Table. 2 Amino acid of heat treated glutenin.*

| | NT** | Heat treatment (°C) *** | | |
|-----|------|-------------------------|------|------|
| | | 140 | 170 | 180 |
| Asp | 0.12 | 0.13 | 0.12 | 0.12 |
| Thr | 0.16 | 0.17 | 0.15 | 0.14 |
| Ser | 0.34 | 0.36 | .033 | .031 |
| Glu | 1.86 | 1.91 | 1.86 | 1.82 |
| Pro | 0.78 | 0.83 | 0.79 | 0.75 |
| Gly | 0.51 | 0.53 | 0.53 | 0.54 |
| Ala | 0.19 | 0.19 | 0.19 | 0.19 |
| Cys | 0.06 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |
| Val | 0.21 | 0.22 | 0.21 | 0.21 |
| Met | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| Ile | 0.16 | 0.16 | 0.15 | 0.15 |
| Leu | 0.32 | 0.33 | 0.32 | 0.31 |
| Tyr | 0.18 | 0.18 | 0.17 | 0.17 |
| Phe | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.15 |
| Lys | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| His | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 |
| Arg | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.10 |

* Values shown are expressed as mmoles per 1 gram of glutenin.

** Un-heated glutenin.

*** Glutenin suspended in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) were heated for 15 min.

考 察

グルテニンは、高分子量サブユニットと低分子量サブユニット及びアルブミン様ポリペプチドがジスルフィド結合で重合した巨大分子タンパク質である。グルテニンを0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁して加熱処理を行い、グルテニンのサブユニットの挙動をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた。130°C以上の加熱処理により、泳動ゲルの上端に泳動ゲル中に移行できない高分子成分が出現し、150°C以上では、グルテニンのサブユニットはほぼ完全に消失した (Fig. 1)。泳動バンドの消失は、グルテニンのサブユニットのすべてが重合したこと、分解して低分子化したこと、及びサブユニットが色素により染色されない性質に変化したことが考えられる。このことを明らかとするため、三塩化酢酸を加えてタンパク質を沈殿させ、非タンパク質の生成を調べた。7.5%三塩化酢酸に沈殿しない画分 (三塩化酢酸可溶性画分) は加熱処理の温度の上昇に伴って増加し、170°C 15 分間加熱処理によってグルテニンの50%が三塩化酢酸に可溶となった (Fig. 4)。グルテニンに含まれるアミド態窒素は全グルテニンの約35%であるので、高温加熱処理により生じた三塩化酢酸可溶性画分は、アミド態窒素の割合よりも多い。したがって、高温加熱処理によりグルテニン・サブユニットのペプチド結合が切断され、低分子化した

ことを示唆している。三塩化酢酸可溶性画分と不溶性画分を6 M塩酸で加水分解してアミノ酸組成を調べた。三塩化酢酸可溶性画分のアミノ酸組成は、不溶性画分比べて、グリシンが多く、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンが少ないことが認められた (Table 1)。三塩化酢酸可溶性画分のアミノ酸組成は、グルテニンの高分子量サブユニットのアミノ酸組成に、三塩化酢酸不溶性画分のアミノ酸組成は、グルテニンの低分子量サブユニットのアミノ酸組成に類似している⁶⁾。従って、三塩化酢酸可溶性画分は、高分子量サブユニット由来であり、不溶性画分は低分子量サブユニット由来であると思われる。さらに、180°C加熱処理によっても、損傷を受けたアミノ酸は認められず (Table 2)、栄養的な観点からはグルテニンの加熱処理の影響はないと思われる。

グルテニンの加熱処理による影響は、加熱時のpHによって影響を受けることが示された。リン酸緩衝液 (pH 7.0) では、150°Cの加熱でサブユニットのバンドは完全に消失するが、0.01 M酢酸 (pH 4.5) では160°Cの加熱においても高分子量サブユニット、低分子量サブユニットのバンドが認められ、酸性pHにおいて、グルテニンは耐熱性があることが示された (Fig. 1 Fig. 2)。130°Cの加熱においても、pH 6.5よりも低いpHではアンモニアの遊離は認められず、酸性pHにおいてより安定であることが示された。

文 献

- 1) Lawton, J. W., Davis, A. B. and Behynke, K. C., High-temperature, short-time extrusion of wheat gluten and a bran-like fraction, *Cereal Chem.*, 1985, 62, 267-271.
- 2) Bietz, J. A. and Wall, J. S., Isolation and characterization of gliadin-like subunits from glutenin, *Cereal Chem.*, 1973, 50, 537-547.
- 3) Jones, R. W., Taylor, N. W. and Senti, E. R., Electrophoresis and fractionation of wheat gluten, *Arch. Biochem., Biophys.*, 1959, 84, 363-376.
- 4) Weber K. and Osborn M., The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406-4412.
- 5) 日本生化学会編, 生化学実験講座 1, タンパク質の化学II, 東京化学同人, 1976, 110.
- 6) Danno, G., Kanazawa, K. and Nataka, M., Improved fractionation of constituent polypeptides from wheat glutenin, *Agric. Biool. Chem.*, 1978, 42, 11-16.