

アルコール水溶液による小麦の未還元グルテニンの抽出

団 野 源 一*

大阪青山大学健康科学部健康栄養学科¹⁾

Extraction of unreduced glutenin from wheat flour with aqueous alcohol

Genichi DANNO

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

Summary Glutenin from wheat flour was extracted with 40% 1-propanol containing 0.1 M acetic acid, without prior reduction of its disulfide bonds. The extraction method may be useful for preparation of native glutenin from wheat flour. Wheat flour was extracted with 70% ethanol. About 45% of flour nitrogen, gliadin, was extracted. The glutenin in the residue was extracted with 40% 1-propanol containing 0.1 M acetic acid by ultrasonic treatment or churning with a Waring Blendor. A part of glutenin was extracted also without intense churning processing. (accepted. Oct. 25, 2008)

Keywords: wheat proteins, glutenin, unreduced glutenin, glutenin subunits, separation
小麦タンパク質, グルテニン, 未環グルテニン, グルテニン・サブユニット

小麦粉に水を加えて混捏(ドウ・ミキシング)すると、粘弾性をもつドウ(dough)を生成する。ドウの粘弾性は、ドウ・ミキシングの工程で、小麦粉たんぱく質であるグリアジンとグルテニンが相互作用して生成したグルテンのネットワーク構造によるものであることが知られている¹⁾。小麦粉の製パン特性は、グルテンの薄膜が炭酸ガスを保持することにより生じるものである。グルテン形成は、小麦たんぱく質だけに備わった性質であり、他の穀物たんぱく質には認められない^{2, 3)}。

グリアジンは70%エタノール(pH7.0)に溶解するたんぱく質の総称で、水和グリアジンは強い粘性を示す。グリアジンは分子内ジスルフィド結合をもつ単量体たんぱく質の混合物である⁴⁾。グルテニンは70%エタノール(pH 7.0)に不溶のたんぱく質で、水和グルテニンは強い弾性を示す。小麦粉の製パン特性の良否は、主としてこの両たんぱく質の量と比率によるものであり、特にグルテニンの貢献度が高いことが知られている²⁾。

グルテニンは、多種類のサブユニットがジスルフィド結合で連結した巨大分子たんぱく質であるが、その分子量も測定方法により異なり十分な解明がなされていない⁵⁻⁸⁾。小麦粉を水と共に混捏して生じたドウを水で洗浄

してでんぷん等を洗い流して残った生グルテンを0.01 M酢酸に分散させると、ほぼ完全に分散液として回収できる。このグルテン分散液からグリアジンとグルテニンが分離調製できる。Jonesら⁹⁾は、0.01 M酢酸に分散したグルテン溶液に70%となるようにエタノールを加え、pHを6.5に調節することにより粗グルテニンを沈殿として分離した。Nielsenら¹⁰⁾は、グルテンを0.1 M酢酸に分散させたのち、0.5 M酢酸ナトリウムを加えてイオン強度0.05, pH 4.5に調節することによって粗グルテニンを沈殿として分離した。

グルテニン分子にグリアジン成分の混入を避けるため、小麦粉から直接グルテニンを抽出することが試みられている。0.1 M酢酸を用いて小麦粉から直接たんぱく質を抽出すると、小麦粉全たんぱく質の約30%が残渣中に残ることが知られている¹¹⁾。この不溶性のたんぱく質は、残渣たんぱく質¹²⁾、酢酸不溶性たんぱく質¹³⁾と呼ばれている。OrthとBushuk¹⁴⁾は残渣タンパク質含量と製パン性(パン容積)との間に正の相関のあることを報告している。Dannoら¹⁵⁾は1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS, pH 6.8)を用いて、小麦粉からたんぱく質を抽出したとき、でんぷんと共に残渣中に残るたんぱく質を

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

1) 〒562-8580 箕面市新稲2-11-1

SDS-不溶性たんぱく質 (SDS-insoluble protein) と名付け、SDS-不溶性たんぱく質の構成ポリペプチド組成がグルテニンのサブユニット組成と類似していることを報告した。

Danno¹⁶⁾ は、ジスルフィド結合を還元切断することなしにSDS-不溶性たんぱく質を可溶化させる方法を見出し、グルテニンの調製法として報告した。しかし、SDSを用いて調製したたんぱく質からSDSを完全に除去することは困難で、この方法により調製したグルテニンの用途は限られる。今回、除去の困難なSDSを用いないで未還元グルテニンを抽出・調製する方法を検討し、含水アルコール (40% 1-プロパノール) を用いて未還元グルテニンを小麦粉から直接抽出することができたので報告する。

実験方法

1. 試料

No.1 カナダウエスタン (No.1CW) のテストミル粉を1-ブタノールで脂質を抽出除去した後、ヘキサンで洗浄し、風乾したものを、本実験で脱脂小麦粉として用いた。

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. 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)。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEは、Laemmliの緩衝液系¹⁷⁾を用いて、スラブゲル (10%ゲル, 1 mm厚) 上で行った。試料たんぱく質を2%SDS溶液 (4%2-メルカプトエタノール, 0.125 M トリス塩酸, pH 7.0, 20%グリセロール, プロモフェノールブルーを含む) に溶解し, 80°C, 30分加熱したものを電気泳動に供した。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%コマジープリリアントブルー-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た。7%酢酸で洗浄して脱染色した後, 泳動ゲルをデンシトメーターでスキャンして泳動バンドの濃度を測定した。

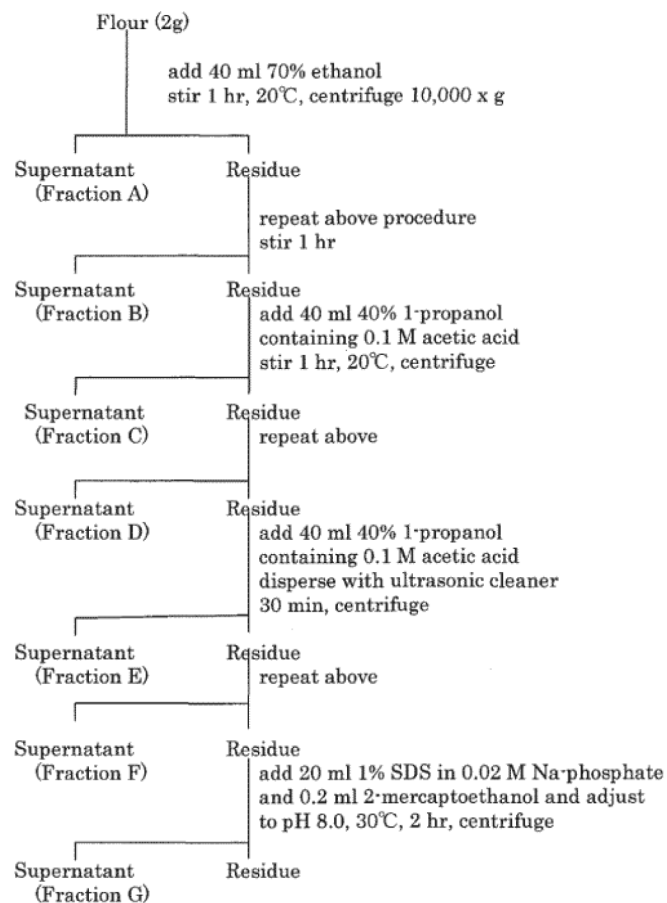


Fig. 1 Extraction of proteins from defatted wheat flour

4. 未還元グルテニンの抽出

脱脂小麦粉 (5 g) を 70% エタノール水溶液 (pH 未調整) 100 ml に懸濁し, 1 時間室温で攪拌後遠心分離 (10,000 × g, 20 分間) して透明な上澄み (Fraction A) を除いた残渣を 70% エタノールで同様の操作を行った。その残渣を 0.1 M 酢酸を含む 40% 1-プロパノール 100 ml に懸濁して 1 時間攪拌したのち, 遠心分離して透明な上澄み (Fraction C) を得た。0.1 M 酢酸を含む 40% 1-プロパノール 100 ml で残渣を再度処理した。残渣を 0.1 M 酢酸を含む 40% 1-プロパノール 100 ml に懸濁し, 攪拌しながら超音波洗浄器 (出力 50W) を用いて 30 分間超音波処理を行った。超音波処理液を 30 分間遠心分離 (15,000 × g) すると, 僅かに乳濁した半透明の上澄み (Fraction E) が得られた。同様の操作を繰り返した後, 残渣を 1% SDS (0.05 M リン酸ナトリウムを含む) に懸濁し, 2-メルカプトエタノールを 10 ml 加え, 2 M 水酸化ナトリウムを添加して pH を 8.0 に調節し, 時々攪拌しながら 2 時間 30°C に保った後遠心分離し, 上澄み (Fraction G) を得た。これら操作の手順を Fig. 1 に示す。

5. 高速ゲルろ過クロマトグラフィー

未還元グルテニンの分子量分布を TSK-Gel 3000SW カラム (7.5 × 600 mm, 東ソー株式会社) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。HPLC は, 0.1% SDS を含む 0.2 M リン酸ナトリウムを展開液として用い, 0.5 ml/min の流速で行った。

実験結果

1. 未還元グルテニンのアルコール溶液による抽出

含水アルコールを用いて脱脂小麦粉から直接たんぱく質を抽出することを試みた。抽出工程を Fig. 1 に, 各アルコール抽出画分 (Fraction A~F) および残渣 (Fraction G) のたんぱく質回収率を Table 1 に示す。各抽出画分に

Table 1. Percentage of proteins from defatted wheat flour

Fractions	Yield (%)
A	45.0
B	2.2
C	13.8
D	2.6
E	17.2
F	7.7
G	11.6

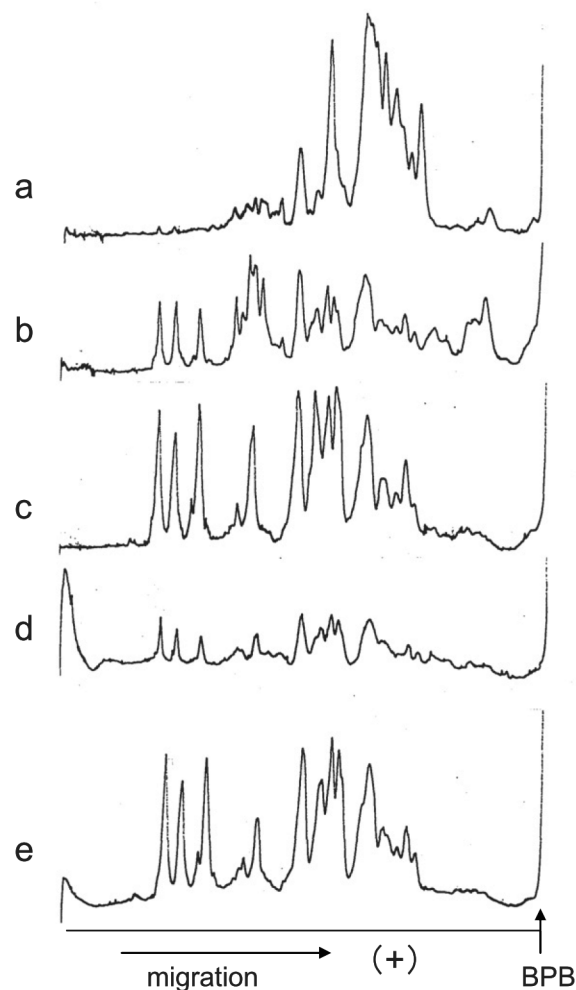


Fig. 2 SDS-PAGE patterns of reduced proteins.

a: Fraction A, b: Fraction C, c: Fraction E, d: Fraction G, e: Standard glutenin subunits (SDS-insoluble proteins, reduced)¹⁶⁾

含まれるサブユニット組成を SDS-PAGE により測定した (Fig.2)。小麦粉の全たんぱく質の 46% が Fraction A として抽出された。Fraction A は SDS-PAGE のパターンから主としてグリアジンであることが示された。0.1 M 酢酸を含む 40% 1-プロパノール抽出画分 (Fraction C) には, グルテニンの高分子サブユニットが認められ, グルテニンの一部が抽出されていることが明らかとなった。グルテニンのサブユニットパターンと比較すると, 中間分子量および低分子量領域にもペプチドバンドが認められ, グリアジンの一部や水溶性たんぱく質の一部がここで抽出されたものと考えられる。Fraction C および D を合わせて, 16.4% のたんぱく質が 0.1 M 酢酸を含む 40% 1-プロパノール抽出された。

Fraction D を抽出した残渣を 0.1 M 酢酸を含む 40% 1-プロパノールに懸濁させ, 超音波洗浄器を用いて超音波処理すると, 僅かに乳濁性を帯びた抽出画分 (Fraction E)

が得られた。SDS-PAGEの泳動パターンからFraction Eはグルテニンと考えられる。Fraction EおよびFを合わせて、小麦粉たんぱく質の約25%がこの操作で回収されたことになる。抽出残渣のたんぱく質を測定するため、残渣を1%SDS (pH 8.0) に懸濁し、2-メルカプトエタノールを10 ml加え、時々攪拌しながら2時間30°Cに保ち抽出を行い (Fraction G) を得た。残渣に含まれる未抽出の全たんぱく質がFraction Gに抽出されていると仮定して、Table 1の回収率を算出した。Fraction Gには、少量のグルテニンも含まれるが、大部分は水溶性たんぱく質などのグルテニン以外の成分と推察される。超音波処理の代わりにワーリングブレンダーを用いて高速攪拌したときにも同様の結果が得られたので、この操作を大量処理に応用することが可能である。

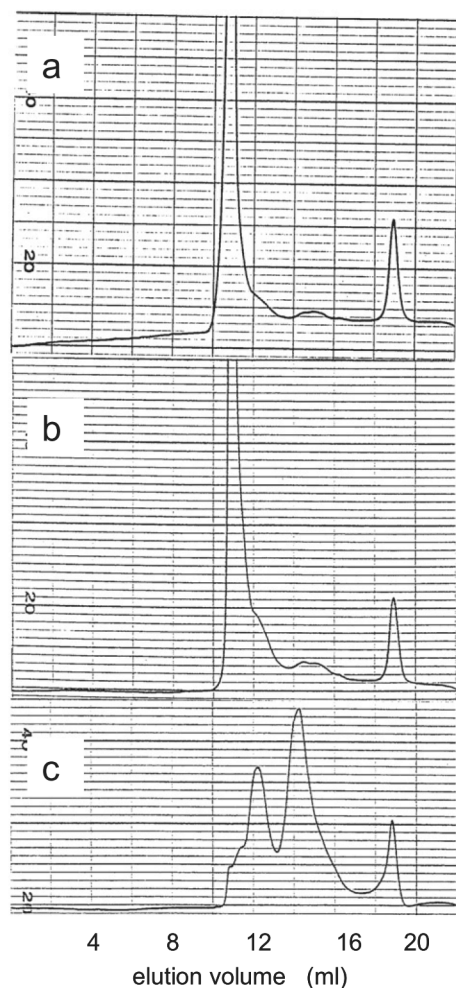


Fig. 3 Molecular sieve high performance liquid chromatography of glutenin treated with sonication on TSK-Gel 3000SW column (7.5×600 mm) with 0.05 M Na-phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.1% sodium dodecyl sulfate.

- a: glutenin treated with sonication for 10 min,
 b: glutenin treated with sonication for 60 min,
 c: reduced glutenin treated with 2-mercaptoethanol.

2. 音波処理によってグルテニンのSS結合は切断されるか

超音波洗浄器をもちいた処理によってグルテニンが希酢酸可溶性になるのは、グルテニンの低分子化の結果と考えられる。超音波処理によってグルテニンのジスルフィド結合が切断されるか否かを明らかにするため、超音波処理したグルテニンの分子量変化をTSK-3000SWカラムを用いたHPLCで分子量分布を調べた。

1%SDSを含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) に未還元グルテニンを溶解し、その10 mlを20 ml容サンプル管(φ 27 mm)に移し、径7 mmのチップをセットした超音波ホモジナイザー (日本精機US-150) を用いて10秒、60秒間超音波処理を行った。超音波処理グルテニンの分子量分布を高速ゲルろ過クロマトグラフィーで分析した。Fig. 3に示すように、60秒の超音波処理によっても分子量分布は10秒のそれと大きくは変わらず、また低分子成分の増加もほとんど認められなかった。グルテニンのジスルフィド結合の切断は、超音波処理によっては顕著におこらないことを示唆している。この超音波処理の条件は、グルテニンの抽出に用いた超音波処理 (Fig. 1) に比べて超音波密度が大であることから、超音波処理によるグルテニンの抽出性の増加は、単にジスルフィド結合の切断によるものではなく、凝集物からのグルテニンの分散が促進された結果であることを示唆している。

考 察

小麦粉に水を加えるとグルテンが形成され、溶媒に分散させることが困難となる。本研究で用いたアルコールによる抽出法では、グルテンの形成はなく、溶媒に対する分散性もよく比較的抽出操作も容易であった。また、グルテン形成時に見られるたんぱく質間の相互反応も抑制されているものと考察した。

70%エタノール分画法では、グリアジンとグルテニンの比率は約1:1と報告されている。先に報告したように、SDS抽出法により得られたグルテニンは、小麦粉全たんぱく質の20~24%で、グリアジン量の半量以下であった¹⁶⁾。今回の結果は、グリアジン約46%、グルテニン約25%であり、SDS抽出法の結果と一致性が認められた。しかし、一部のグルテニンが超音波処理等をするこなしに40%1-プロパノールで抽出されることが見出された。Matternら¹¹⁾は、小麦粉中の数%のたんぱく質が0.1 M酢酸で抽出され、約30%のたんぱく質が不溶性として残渣中に残ることを見出し、前者を酢酸可溶性たんぱく質、後者を酢酸不溶性たんぱく質と名づけた。Orthと

Bushuk¹⁴⁾ は、パン容積が酢酸可溶性たんぱく質含量との間に負の相関が、酢酸不溶性たんぱく質含量との間に正の相関のあることを報告している。

小麦粉を含水アルコールで抽出したとき残渣中に残るグルテニンは、残渣を 0.1 M 酢酸を含む 40% 1-プロパノールに懸濁させ、超音波処理すると可溶化することができた。このときグルテニンの分子量の低下が認められるか否かを明らかにするため、超音波処理したグルテニンの分子量変化を調べた。Fig. 3 に示すように、超音波処理によるグルテニンの低分子化は認められなかった。Danno と Hoseny¹⁸⁾ は、1% SDS (pH 7.0) によって抽出されるたんぱく質はドウ・ミキシング (dough mixing) によって増加すること、ドウ・ミキシングによって新たに抽出されるたんぱく質はグルテニンであるが、可溶化されたグルテニンの顕著な分子量の低下は認められないことを明らかにした。超音波処理、激しい攪拌、ドウ・ミキシングなどによる可溶化は、ジスルフィド結合の切断によるものではなく凝集物からのグルテニンの分散の結果であることを示唆している。しかし、せん断力による不溶性グルテニンの特定の場所のジスルフィド結合が切断を受けた可能性も否定することはできない。

文 献

- 1) Hoseny, R. C. Gas retention in bread dough, *Cereal Food World*, 29, 305 (1984).
- 2) Kasarda, D. D. Nimmo, C. C. Kohler, G. O. Proteins and the amino acid composition of wheat fraction, in *Wheat: Chemistry and Technology* 2nd ed. Y. Pomeranz, ed. Amer. Ass. Cereal Chem. Inc., St Paul, p.227 (1978).
- 3) He, H. and Hoseny, R. C. Gas retention of different cereal flours, *Cereal Chem.*, 68, 334-336 (1991).
- 4) Wrigley, C. W. and Shepherd, K. W. Electrofocusing of grain proteins from wheat genotype, *Ann. NY Acad. Sci.*, 209, 154 (1973).
- 5) Jones, R. W. Babcock, G. E. Taylor, N. W. and Senti, F. R. Molecular weight of wheat gluten fractions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 483 (1964).
- 6) Nielsen, H. C. Babcock, F. E. and Senti, F. R. Molecular weight studies on glutenin before and after disulfide-bond splitting, *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 252 (1962).
- 7) Orth, R. A. and Bushuk, W. Studies of glutenin. II, Relation of growth and baking quality to molecular weight distribution of subunits, *Cereal Chem.*, 50, 191 (1973).
- 8) Huebner, F. R. and Wall, J. S. Wheat glutenin: Effect of dissociating agents on molecular weight and composition as determined by gel filtration chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 28, 433 (1980).
- 9) Jones, R. W. Taylor, N. W. and Senti, F. R. Electrophoresis and fractionation of wheat gluten, *Arch. Biochem. Biophys.*, 84, 363 (1959).
- 10) Nielsen, H. C. Babcock, F. E. and Senti, F. R. Molecular weight studies on glutenin before and after disulfide-bond splitting, *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 252 (1962).
- 11) Mattern, P. J. Salem, A. and Volkmer, G. H. Modification of the Maes continuous-extraction process for fractionation of hard red winter wheat flour proteins, *Cereal Chem.*, 45, 319 (1968).
- 12) Orth, R. A. and Bushuk, W. Studies of glutenin. I. Comparison of preparative methods, *Cereal Chem.*, 50, 191 (1973).
- 13) Khan, K. and Bushuk, W. Glutenin: Structure and functionality in breadmaking, *Baker's Dig.* 25(2), 14 (1978).
- 14) Orth, R. A. and Bushuk, W. A comparative study of the proteins of wheats of diverse baking qualities, *Cereal Chem.*, 49, 268 (1972).
- 15) Danno, G. Kanazawa, K. and Natake, M. Identity of SDS-insoluble proteins with purified glutenin from wheat flour, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 739 (1976).
- 16) Danno, G. Extraction of unreduced glutenin from wheat flour with sodium dodecyl sulfate, *Cereal Chem.*, 58, 311 (1981).
- 17) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 681 (1970).
- 18) Danno, G. and Hoseny, R. C. Effects of dough mixing and rheologically active compounds on relative viscosity of wheat proteins, *Cereal Chem.*, 59, 196 (1982).