

ノート

水溶性たんぱく量測定による変性小麦グルテンの鑑別について

清水 和世^{*}, 川渕 哲^{*}, 古賀 哲^{**}, 笹川 邦雄^{**}

Characterization of wheat gluten modified or not by the content ratio of water soluble protein measurements.

Kazuyo SHIMIZU^{*}, Satoshi KAWABUCHI^{*}, Satoshi KOGA^{**} and Kunio SASAGAWA^{**}

^{*}Osaka Customs Laboratory

4 - 10 - 3, Chikko, Minato - ku, Osaka - shi, Osaka - Fu 552 - 0021 Japan

^{**}Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, 271 - 0076 Japan

A method for discrimination between the modified gluten "LMG" and commercial gluten was studied. The content ratio of water soluble protein (S.P.) to total protein (T.P.) measured and calculated by kjeldahl method was investigated. It found that the ratio of "LMG" was greater than of commercial products. Wheat gluten was roughly identified modified or not compared by the ratio of S.P. to T.P.

1. 緒 言

小麦グルテンは、保水性、粘弹性、ゲル形成性などの品質改良剤として、ソーセージ、水産練り製品、小麦粉加工品に汎用されている。

以前から、グルテンの機能性を改善する目的で、還元剤、酵素等で処理をした変性グルテンの輸入が続いているが、これらは現在、生の小麦グルテンとは税番が異なり、変性が認められれば調製食料品として税番第 2106.10 号、アミノ酸までの分解が認められれば税番第 2106.90 号、ペプトン画分、グリアジン画分等は税番第 3504.00 号にそれぞれ分類され、生小麦グルテンと調製食料品に分類されるものとでは税率にほぼ 2 倍の差がある。

なかでも今回試料としたグルテンは、結果的には変性小麦グルテンとして分類されたものの、通常の分析方法では違いが不明瞭である点が多く、生グルテンとの相違点を明らかにするため、主にたんぱく制限の脱アミド化によるものと考えられる水溶性の違いについて検討をおこなった。

2. 実 験

2.1 試 料

小麦グルテンとして市販しているもの 4種

: 東京化成、関東化学、SIGMA、ナカライトスク
変性小麦グルテンとして輸入されたもの 1種
(以下、Low Modified Gluten の略で、LMG と呼
ぶ。)

ACID Gluten として輸入されたもの 1種
SWP Gluten として輸入されたもの 1種

2.2 装 置

ガラスホモジナイザー

遠心分離器 KOKUSAN MODEL H - 9R

MRK 自動式窒素 / 蛋白質定量装置 KJEL - AUTO
Pharmacia 社 Phast System (電気泳動装置)

2.3 方 法

ホモジナイズにより試料から純水に可溶のたんぱく質を抽出し、ケルダール法により定量し、ドライベースでの水溶性たんぱく量を算出する。

総たんぱくをケルダール法により定量し、ドライベースでの総たんぱく量を算出する。

2.3.1 抽出法の検討

水溶性のたんぱくを抽出する方法として次の 3 法を検討する。

A 法 ; 25ml の水で 15 分間のホモジナイズを 4 回繰り返し、定容後、全量を遠心分離した後に分取する。

B 法 ; 25ml の水で 15 分間のホモナイズを 4 回繰り返

^{*} 大阪税關業務部 〒552 - 0021 大阪市港区築港 4 - 10 - 3

^{**} 大蔵省税關中央分析所 〒271 - 0076 千葉県松戸市岩瀬 531

し、定容後、その一定量を分取、遠心分離し、ケルダール管に直接ろ過する。

C法；30mlの水で60分間ホモジナイズし、定容後、全量を遠心分離した後に分取する。

2.3.2 遠心分離時間の検討

遠心分離の時間を10分から60分まで検討する。

2.3.3 UVによる水溶性たんぱく定量法の検討

Waddellによる0.9%食塩水に可溶のたんぱく質を215nmと225nmでの吸光度の差から求める方法¹⁾を検討する。

2.3.4 電気泳動による判別の検討

SDS-PAGE銀染色法及び等電点電気泳動について検討する。

3. 結果及び考察

3.1 抽出法の検討

市販グルテンで検討した結果をFig.1に示す。

Fig.1で、T.P.は総たんぱく、S.P.は水溶性たんぱく、S.P./T.P.が水溶性たんぱくの総たんぱくに対する比である。(いずれもドライベース。以下同じ。)

A法は、再現性が良好で、以後、この方法を用いた。詳細を

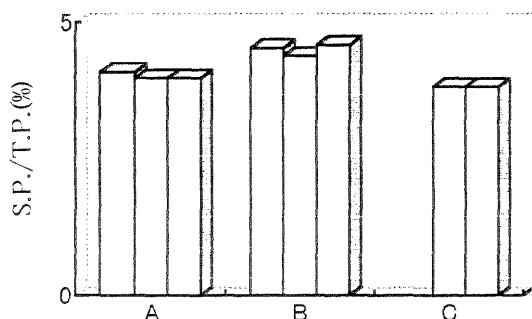


Fig.1 Extraction method

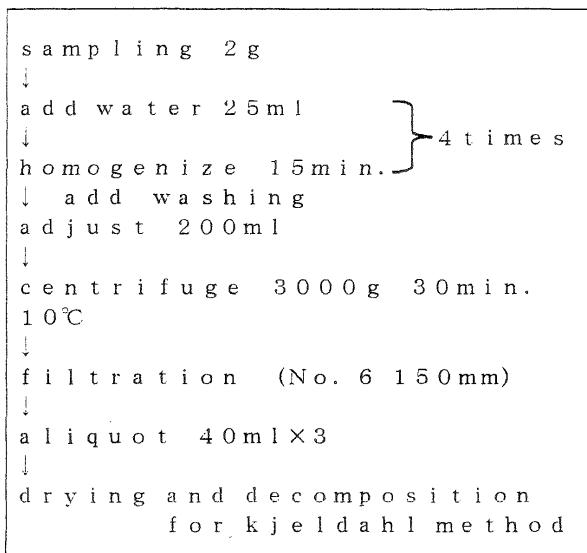


Fig.2 Extraction method A

Fig.2に示す。

B法は、A法に比較し定量値がやや高く出るもの、グルテンがメスフラスコ中に分散した状態のまま攪拌しながら分取するため、分取時にホールピペットにグルテンが付着し、若干で

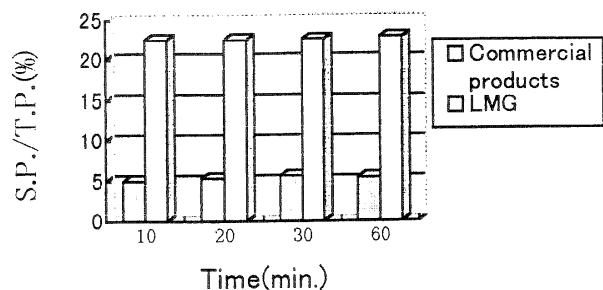


Fig.3 Centrifuge times

はあるが定量値にバラツキがみられた。

C法は、定量値が他の2法よりも低かった。

3.2 遠心分離時間の検討

市販グルテン及びLMGで検討した結果をFig.3に示す。10分から60分では特に変化はなく、上澄液は、いずれもほぼ透明であった。

3.3 水溶性たんぱく及び総たんぱくの比較

市販グルテン4種及びLMGの総たんぱく量、水溶性たんぱく量、水溶性たんぱくの総たんぱくに対する比をTable.1に示す。

水溶性たんぱくの総たんぱくに対する比における変動率はCommercial product Aの場合13.67% (n=8), LMGが10.08% (n=8)であり、ばらつきが認められるものの、単純に比較して5倍、変動率を考慮にいれて標準の最大とLMGの最小を比較しても3.6倍の違いが認められた。

Table1 Comparison between commercial products and LMG

	T.P.(%)	S.P.(%)	S.P./T.P.(%)
commercial product A	78.39	3.73	4.8
commercial product B	79.10	2.20	2.8
commercial product C	85.11	8.67	10.2
commercial product D	81.42	16.75	20.6
LMG	78.80	16.97	21.5

3.4 ACID 及び SWP グルテンの水溶性たんぱく量の比較

最近輸入されている ACID 及び SWP グルテンの水溶性たんぱく量を、A 法により定量した標準グルテンと LMG のデータを Table. 2 に示す。

ACID 及び SWP グルテンは市販グルテンと比較して電気泳動像 (SDS - PAGE) に違いが見られることから、分子量的な変性も進んでいると認められ、水にもかなり分散しやすい性質を持っている変性グルテンである。ところが、水に分散しやすくなる過に時間がかかるため、今回の抽出法を一部変更した。試料を 0.1% ~ 0.3% の濃度でメスフラスコに秤量し定容、スターラーで 30 分攪拌したのち、5000rpm、30 分間、10°で遠心分離、ろ過後、分取し、乾燥、ケルダール法により定量した結果である。

Table 2 Comparison between ACID gluten and SWP gluten

	T.P.(%)	S.P.(%)	S.P./T.P.(%)
ACID gluten	77.20	57.95	75.1
SWP gluten	77.59	62.30	80.3
commercial product A	78.39	3.73	4.8
LMG	78.80	16.97	21.6

分析回数 3 回の変動率は、ACID が 1.45%、SWP が 2.23% となった。

市販グルテンと LMG は、1% 濃度でメスフラスコにはかりとってメスアップ、スターラーで 30 分攪拌すると、メスフラスコの壁面にグルテンの乾燥した状態のものが付着してしまい、この方法では定量できなかった。

3.5 ケルダール法によらない水溶性たんぱくの定量法の検討 (UV 法の検討)

Waddell の方法¹⁾は、ケルダール法と比較して手間がかからないのが特徴であるが、結果として、一応の差異が見られたもののケルダール法と比較すると値がかなり低く算出された。

UV 法は本来生化学の分野でたんぱく質として μ オーダーを対象にしており、また、Waddell の方法¹⁾では比較する検体に立体的な違いがないことなどが条件にあげられていることなどから、このような単純な方法では無理があり、Lowry らによる他法²⁾等を検討すべきかと考えられる。

3.6 電気泳動法による判別の検討

電気泳動法では銀染色法、等電点電気泳動法などを検討した。

銀染色法ではとくに有意な結果は得られず、等電点電気泳動法においては泳動しようとするたんぱく等電点で可溶、安定であることが泳動条件のひとつとなっている³⁾が、小麦グルテンは通常 pH 7 付近で電荷を持たず、水に不溶である。

小麦グルテンは界面活性剤である SDS を添加することにより水に可溶となるが、電気泳動の試料調製時に添加するだけではいずれのたんぱくも同じ位置に泳動され、変化がみられない。これは判別しようとするたんぱくが SDS によりミセルを形成し同一の電荷を有してしまうためではないかと推測される。

また、Holmes により pH 7 で水に可溶な変性グルテンである SWP グルテンが、pH 3 付近で沈殿を起こす事が報告されている⁴⁾が、同様の実験を市販小麦グルテン及び LMG で行うことが可能であるとしても、両者にそれほどの変化があるとは考え難い。

3.7 考 察

小麦グルテンの不溶性は、そのアミノ酸組成の 30% を占めるグルタミン酸がたんぱく側鎖である時にグルタミンとして存在し、かなり広範囲にわたって分子内で水素結合し、疎水性となっていることに起因するものである。この側鎖を 0.02N または 0.05N 塩酸などで短時間に脱アミド化処理をすると、電気泳動像 (SDS - PAGE) では特に変化がみられない、すなわちペプチド結合が分断されるなどの顕著な分子量変化を伴わない変性が起こり、機能性が改善され、粘弾性の低下、伸展性の増加などが認められることが知られている⁵⁾。

今回の LMG においても電気泳動像 (SDS - PAGE) では特に変化がみられない。また、物性としてはほとんど変わらないなどの状況から同様の変性が起こっているものと推定され、それを水溶性の変化としてとらえた今回の実験では水溶性たんぱく量にあきらかな違いが認められた。

しかしながら、市販のうち 1 種は、水溶性たんぱくの粗たんぱくに対する比が、20.6% という結果が得られ、LMG と同等の値を示す。この小麦グルテンはホモジナイズする時点での状態から、他の市販品と精製段階で違いがあるものと推測され、小麦グルテンによっても精製方法の違いにより物性が変化することが示唆されることから、製造・精製法の詳しい調査も必要となるであろう。

4.要 約

変性小麦グルテンには、LMG のように、顕著な分子量低下を伴わない程度の変性をほどこしたものがあり、物性としてはほとんど変わらない。しかし、ホモジナイズにより試料から純水に可溶のたんぱくを抽出、ケルダール法により定量を行い、ドライベースでの総たんぱくに占める割合を比較することにより、市販小麦グルテンと LMG ではあきらかな違いが認められた。

文 献

- 1) W.J. Waddell : J. Lab. Clin. Med.,48,311 (1956)
- 2) O.H.Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall : J. Biol. Chem.,193,265 (1951)
- 3) R.K. Scopes : 「新・タンパク質精製法 理論と実際」 , p.233 (1995), (シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社)
- 4) Holmes : GLUTEN ; STRUCTURE AND FORMATION. (1996)
- 5) C.H. Wu, S. Nakai, W.D. Powrie : J. Agric. Food Chem.,24,504 (1976)