

令和 6 年度仙台市 NanoTerasu トライアルユース事業 事例報告書

1 課題名

小麦粉グルテンタンパク質中の含硫アミノ酸 S-S 結合計測に基づく特性評価

2 測定にあたっての体制 (社外委託先を含め記載)

• 株式会社 金トビ志賀

試料調製、放射光実験、小麦粉特性の評価、放射光測定と小麦粉特性評価の関連性の検討

• 東北大学 農学研究科附属放射光生命農学センター/国際放射光イノベーション・スマート研究センター (原田昌彦 教授、村松淳司 客員教授、高山裕貴 准教授、日高将文 助教)

放射光実験、放射光実験データ解析、放射光測定と小麦粉特性評価の関連性の検討

3 背景と測定目的

○背景

小麦粉は食品製造の原料として広く用いられている。受託者 (株式会社金トビ志賀) では、他社よりも製粉の各段階でのフリクションを減らす独自の製法 (伝統的な石臼製法を理想として、水冷ロールによる多段階製粉においても発熱や物理的衝撃を可能な限り抑制するなど) で小麦粉を製造し、製麺業者などから他社にない優れた品質を認められた小麦粉を製造している。これまでも受託者は、愛知県が主催した「愛知ブランドイノベーションアワード」特別賞を、「愛知のふるさと食品コンテスト」優秀賞を受賞している。しかし、そのような製法で製造した小麦粉においても一般的な試験ではユーザーの要求を満たさない小麦粉との差を検出することができず、もっぱら感触の違いやユーザーからのフィードバックに頼った評価が中心であった。このように感覚に頼っていた製品の特長や優位性を科学的分析によってデータ化し、品質優位性の維持や向上、ユーザーニーズに対応した新規製品の開発が求められている。

小麦粉は一般にその 70%前後がでんぷん、10%前後がタンパク質であり、タンパク質の大部分 (80%程度) をグルテンタンパク質が占める。受託者はこれまで、愛知県産業技術研究所の協力を得て、自社および他社の小麦粉の成分分析、粒度分布解析、タンパク質の電気泳動解析などを行ってきた (文献1)。しかし、これらの小麦粉の製麺工程や食味評価での明確な違いにもかかわらず、これらの試験では受託者の製品と他社製品の製品との差は観察されず、またユーザー評価との相関も観察されなかった。

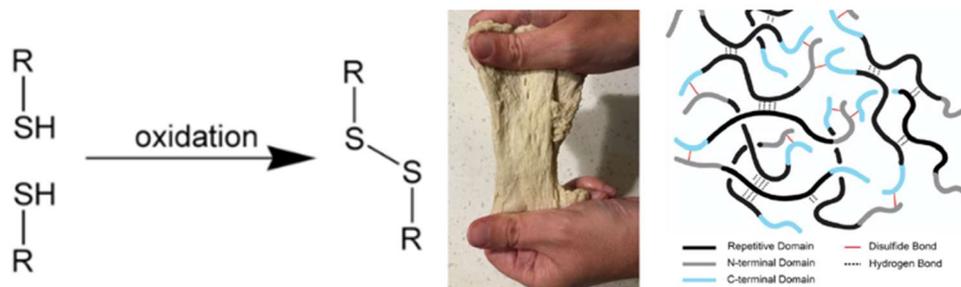


図1, S-S 結合の反応 (左) と S-S 結合によるグルテンネットワーク形成 (右)

小麦粉に水を加えて練ること生じる粘弾性を持つ生地（ドウ）の物性には、小麦粉中のグルテンタンパク質のジスルフィド結合（S-S結合）によって形成されるグルテンの立体構造やグルテンポリマーが重要であり、製麺性や食感（こし）などの小麦粉の性質に影響を与える（文献2,3）。グルテンのS-S結合は、グルテン中の含硫アミノ酸であるシステイン中のチオール基（-SH）同士が共有結合することで形成され（図1）、グルテンタンパク質の立体構造や重合体の形成に重要や役割を果たすが、同時にシステインの硫黄(S)と金属元素（Ca, Fe, Cu, Znなど）との結合や配位にも影響を及ぼす可能性がある。またこのS-S結合は、内在酵素、酸化還元反応、加熱、物理的力等の要因によっても変化する。

愛知県産業技術研究所からもS-S結合解析の検討の必要性が指摘されていたが、非抽出・非破壊で小麦粉グルテンのS-S結合を効果的に評価する方法は限られていた。これまでに、放射光を用いた硫黄(S)のXANES解析によってS-S結合を評価できることは示されていたが（文献4、図2,3）、食品への応用例は少なかった。これまでの国内の放射光施設では得られなかったNanoTerasuの高輝度なテンドーX線を利用して硫黄(S)の化学状態の詳細測定を行うことで、小麦粉グルテンタンパク質中のS-S結合の詳細な評価を行うことが可能となる。

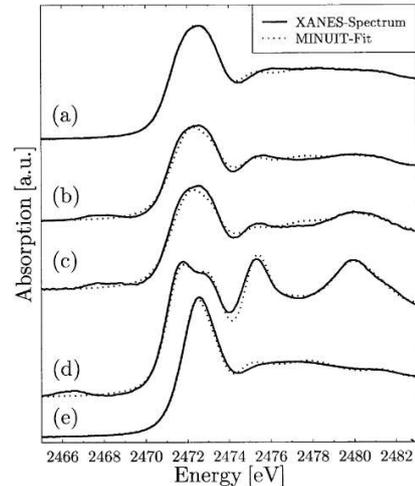


Figure 4. Sulfur K-edge XANES spectra of LMW subunits of glutenin: (a) reoxidized with potassium bromate at pH 8; (b) reoxidized with potassium bromate at pH 6; (c) reoxidized with potassium bromate at pH 4; (d) reoxidized with potassium bromate at pH 2; (e) LMW glutenin (reduced) and corresponding MINUIT fits.

○測定目的

これまで、受託者が製造する小麦粉の特長や優位性は、主に感覚的な評価やユーザーのフィードバックに依存しており、一般的な試験ではその品質の違いを定量的に示すことができなかった。

本課題では、NanoTerasuの高輝度なテンドーX線を用いた硫黄(S)のK-Edge XAFS (X線吸収微細構造分析)のXANES領域の分析により、小麦粉グルテンタンパク質中のSの環境構造解析を行った。これにより、小麦粉の製造方法や原料小麦の違いが小麦粉グルテンタンパク質中のS-S結合に与える影響を科学的に評価し、これまで定量的に示すことが困難であった受託者の小麦粉の性質を理解することを目的とした。

Table 1. Results of Fitting the Sulfur K-Edge XANES Spectra of Different LMW and HMW Subunits of Glutenin, Gluten, and Gliadin (cf. Figures 4, 6, and 7) to the Sum of Different Reference Spectra (cf. Figure 2)^a

	percentage contribution of sulfur speciation					
	C-S-H (GSH ^b)	C-S-S-C (GSSG ^b)	C-S-C (methionine)	C-SO-C (dimethyl sulfoxide)	C-SO ₃ -C (cysteic acid)	SO ₄ ²⁻ (zinc sulfate)
LMW ^c (bromate, pH2)	4	39	7	10	39	-
LMW ^c (bromate, pH 4)	17	53	-	2	27	-
LMW ^c (bromate, pH 6)	19	60	-	2	18	-
LMW ^c (bromate, pH 8)	14	43	36	-	5	-
LMW ^c (iodate, pH 2)	21	44	-	1	33	-
LMW ^c (iodate, pH 4)	22	44	-	1	33	-
LMW ^c (iodate, pH 6)	32	55	-	-	13	-
LMW ^c (iodate, pH 8)	14	49	32	-	4	-
LMW ^c (reduced)	40	7	53	-	-	-
HMW ^d (aged)	-	5	9	6	79	-
LMW ^c (aged)	-	4	11	8	76	-
gluten	12	65	24	-	-	-
gliadin	17	71	13	-	-	-

^a Reference compounds for the different sulfur species are shown in parentheses. Error: $\leq \pm 10\%$; -, contribution $< 0.1\%$. ^b GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione. ^c LMW subunits of glutenin. ^d HMW subunits of glutenin.

図3, XANES解析で測定されたS-S結合の相対量比較の例。-SHを持つGSH（還元型グルタチオン）、SSを持つGSSG（酸化型グルタチオン）、その他のSの標準物質のXANESシグナルでサンプルのXANESピークをフィッティングし、SHとSSの割合を見積もることができる。

4 測定方法（測定手法、測定セットアップ、使用ビームラインなど）

小麦粉グルテンタンパク質中の S の環境構造の解析は、NanoTerasu BL08W のテンダー X線 XAFS 計測装置(図 4) を用いて実施した。測定時間は 10~20 分程度であり、真空環境下での測定だが、評価への影響は認められなかった。測定試料として、自社製法の小麦粉 2 種類、他社製法の小麦粉 2 種類、およびカゼイン、システイン、シスチン、小麦タンパク質の計 8 種類を用いた。さらに、自社製法の小麦粉 2 種類、他社製法の小麦粉のうち 1 種類は近年国内生産向けに開発された多湿耐性・多収小麦品種「きぬあかり」を原料としたものである。

測定試料の調整方法を図 5 に示す。第一回測定では小麦粉の粉末を金属製のプレートに両面テープで固定して測定を行った。しかし、この方法では試料の分布に不均一性が生じる可能性があったため、第二回測定では小麦粉を錠剤化した試料を作成し、測定を実施した。

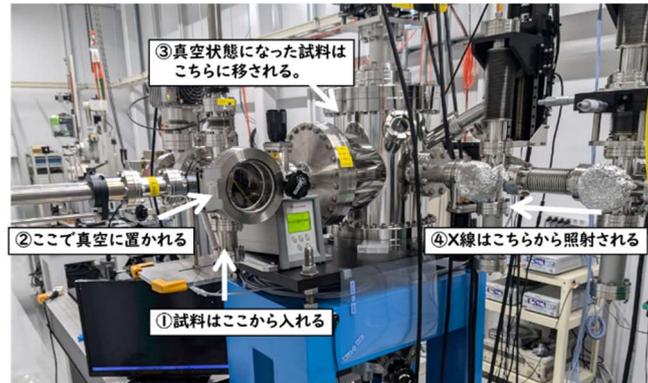


図 4, 測定試料の準備

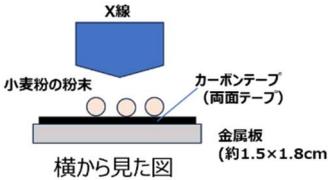
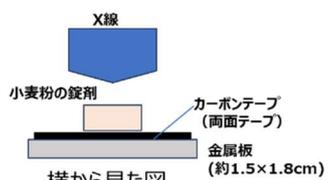
<p>第一回測定</p>	 <p>(約1.5×1.8cm)</p>	 <p>横から見た図</p>	<p>小麦粉の粉末を NanoTerasu BL08Wにある金属製のプレートに両面テープで固定する操作のみ実施</p>
<p>第二回測定</p>	 <p>(約1.5×1.8cm)</p>	 <p>横から見た図</p>	<p>濃度が薄い試料については粉末を錠剤化したものを用いた</p>

図 5, 測定試料のセット

5 結果及び考察 (代表的なグラフや図を用いて分かりやすく説明すること)

○標準物質(システインおよびシスチン)の区別

NanoTerasu BL08W を用いた XANES 測定により、標準物質であるシステインおよびシスチンのスペクトルを取得した(図 6)。システインは SH 基を持っており、そのスペクトルは 2470~2473 eV 付近にシングルピークを示した。一方、システインの SH 基が重合し S-S 結合を形成したシスチンでは、スペクトルが横に広がり、2つのピークに分裂する特徴が確認された。この結果から、NanoTerasu BL08W では、SH 基と S-S 結合を有する S の化学状態を識別可能であることが示された。

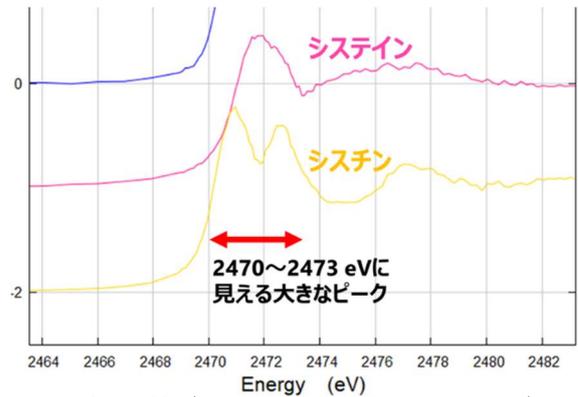


図 6, 標準物質 (システインおよびシスチン) の

○小麦粉および関連試料の XANES 測定

各試料の硫黄 S を XANES スペクトルで取得した結果(図 7)、2470~2473 eV 付近に大きなピーク①、2480 eV 付近にピーク②に特徴が見られた。試料として用いたものには、「きぬあかり」のなかでも除草剤を使用せずに生産された「きぬあかり S」やカゼイン、市販品の小麦粉、小麦タンパク質も含まれた。

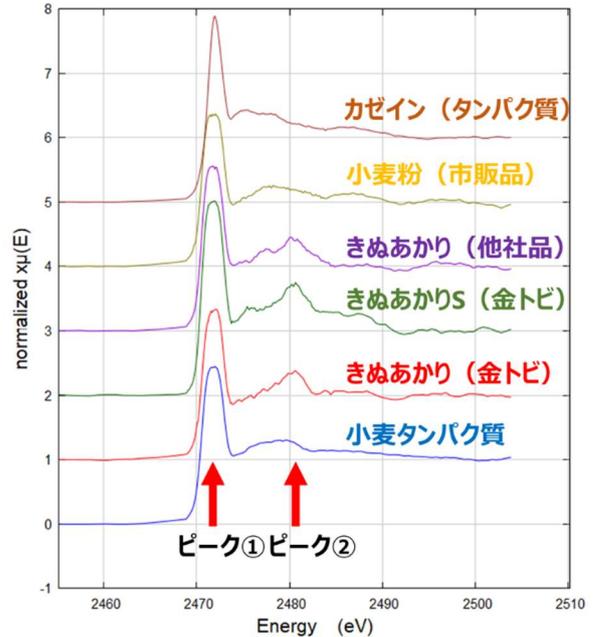


図 7, 小麦粉および関連試料の XANES 測定

○2470~2473 eV 付近のピークの解析

カゼインタンパク質の XANES スペクトルはシングルピークを示し(図 8)、カゼイン中のシステインが SH 基の状態で存在することが示唆された。一方、小麦粉に含まれるタンパク質のスペクトルは横に広がる特徴を示し、システインとシスチンの両方が共存している可能性が考えられる。この仮説を検証するため、還元剤を作用させて S-S 結合を切断し、その影響を評価することが今後の課題となる。

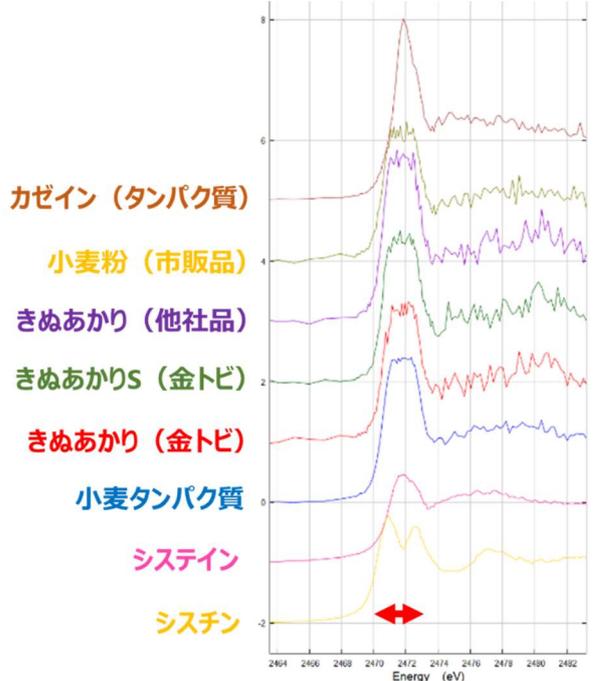


図 8, 2470~2473 eV 付近のピークの解析

○2480 eV 付近のピークの解析

「きぬあかり」では、2480 eV 付近に明確なピークが確認(図 9)された。このピークが右側に生じた要因の一つとして、酸化による影響が考えられる。特に、システインやメチオニンなど含硫アミノ酸の酸化が関与している可能性がある。また、このピークが「きぬあかり」に特有のものであるのか、あるいは製粉後の時間経過や保存方法による影響で生じたものなのかについては、さらなる検討が必要である。

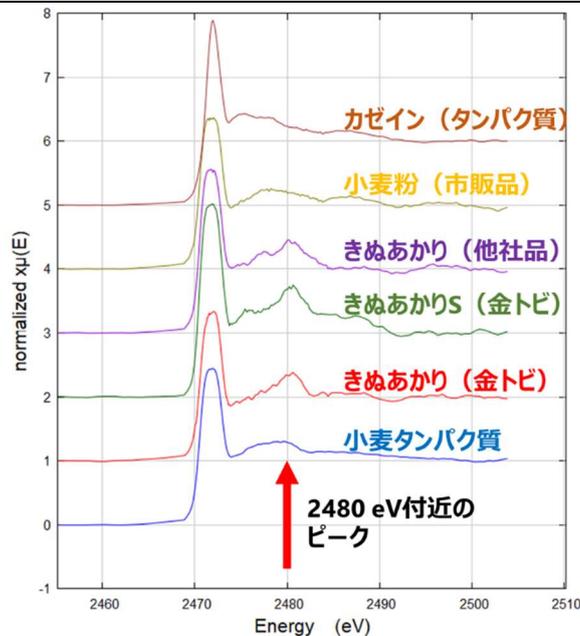


図9, 2480 eV 付近のピークの解析

○まとめ

本事業では、小麦粉に含まれる硫黄 (S) の化学状態を XANES(X-ray Absorption Near Edge Structure) により解析可能であるかを検討するため、NanoTerasu BL08W を用いた測定を実施した。小麦粉中の硫黄 (S) は、SH 基または S-S 結合の形態で存在すると考えられる。BL08W を用いた測定において、SH 基を有する標準物質 (システイン) と S-S 結合を有する標準物質 (シスチン) では、得られたスペクトルの形状に明確な差異が認められた。このことから、小麦粉中の SH 基と S-S 結合の割合が異なる場合、それらを識別することが可能であることが示唆された。また、濃度が低い試料に関しては、試料を錠剤化することによりシグナル強度の増強が可能であることが示された。加えて、小麦粉の種類ごとに XANES スペクトルの特徴に差異が見られる可能性が示唆された。特に、小麦タンパク質の粉末試料では SH 基の比率が高い一方で、小麦粉中では SH 基および S-S 結合の両形態が共存していることが示唆された。

6 今後の課題

今後は今回確立した測定手法を用いて、SH 基が重合して S-S 結合となる可能性がある製造工程や、SH 基と S-S 結合の割合が異なる可能性のある以下の観点に着目し、小麦粉の定量的な解明を目指していきたい。

□製粉工程

- ・挽砕中のロールによって摩擦が発生し、温度上昇によって S が変化する可能性
- ・製粉中に粉が空気に晒されることで、S が変化する可能性

□製麺工程

- ・練り工程で空気が入り込み S が変化する可能性
- ・塩の作用で S の変化を助長する可能性

□小麦の部位

- ・小麦の外側と内側から採取できる小麦粉で SH 基と S-S 結合の割合に差がある可能性

□原料

- ・「きぬあかり」と他原料小麦粉で SH 基と S-S 結合の割合に差がある可能性

7 参考文献

- 1, 半谷、近藤、西田、石川、矢野、日渡、内藤、志賀: 愛知県産業技術研究所研究報告、80-83 (2010)
- 2, 岡田、市川、下村 : 日本調理科学会誌 5, 327-336 (2008)
- 3, Jones EM, Fogle EJ: *CorrseSource* 9, 1-6 (2022)
- 4, Prange A, Kuhlsen N, Birzela B, Arzberger I, Hormes J, Antes S, Kohler P: *J. Agric. Food Chem.* 51, 7431-7438 (2003)