

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H00966

研究課題名(和文)米タンパク質分解物によるグルテンフリー米粉パンの品質改良効果の解明

研究課題名(英文)Elucidation of improvement effect of gluten-free rice bread by rice protein hydrolysate

研究代表者

本多 裕司 (Honda, Yuji)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：40399382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロテアーゼ処理した米タンパク質分解物がグルテンフリー米粉パンの品質を改善する作用機序について、米粉バターのタンパク質の性質とパン生地の物性から解明する事を目的とした。澱粉の周囲で網目構造を形成してグルテンフリー米粉パンの骨格を補強することで、生地の気泡保持力増加に寄与している可能性が高い米タンパク質分解物は、グルテリン由来のタンパク質であることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小麦はアレルギーを引き起こす三大食品の一つであり、また小麦タンパク質感受性の腸疾患である「セリアック病」が世界的によく知られている。そのような疾患を持つ患者の方が柔らかくてふわりとしたグルテンフリー米粉パンを食べる事ができるように米粉パンの品質改良と品質改善のメカニズムの解明に取り組んできた。米タンパク質分解物による焼成した米粉パンの品質改善機構を明らかにする手がかりをつかんだので、本研究は今後のグルテンフリー米粉パンの品質改良化に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism of improvement effect of gluten-free rice bread by rice protein hydrolysate. We studied the mechanism based on physicochemical and rheological properties of the rice protein hydrolysate in the gluten-free rice batter. The rice protein hydrolysate that contributes to the increase in bubble retention of the dough by forming a network structure around the starch to reinforce the skeleton of the gluten-free rice flour bread was a protein derived from glutelin.

研究分野：応用糖質科学

キーワード：グルテンフリー 米粉パン プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

米が主食である日本においても、小麦が炭水化物供給源として重要な役割を果たすようになってきている。しかしながら、小麦はアレルギーを引き起こす三大食品の一つであり、食物依存性運動誘発アナフィラキシーの最多原因食品でもある。小麦アレルギーとしては「セリアック病」が世界的によく知られており、長期にわたる小麦タンパク質感受性の腸疾患であり小腸組織損傷による吸収不良を伴う。最近の報告では、約 300 人のうち 1 人がセリアック病を発症するとされている。

一方、小麦タンパク質はグルテンを形成し、そのことが食品加工における大きな利点である。グルテンはネットワーク構造を持つタンパク質複合体である。ネットワーク形成の主な要因は小麦タンパク質であるグルテニンとグリアジンがジスルフィド結合していることである。パンや麺などの小麦粉加工品を作る上で、グルテンは弾性や柔軟性を与え、パンの膨らみを与える重要な要素となっている。従って、小麦以外のグルテンを含まない穀粉で焼成したパンは食感やふくらみが悪いものが多く、酵母が生産する炭酸ガスを保持するために、グルテンの代替となるネットワークが必要となる。

国内外問わず、小麦以外のグルテンフリー穀粉を用いたパン製造に関する研究は多くみられる。国内の米粉パン研究では、小麦グルテンが果たしていた生地の粘りを代替するために澱粉の変化に着目した例が多かった。一方、我々はそれぞれ独立して食品科学あるいは酵素科学的見地から米貯蔵タンパク質の分解に着目して研究を進めてきた。米粉を原料としたグルテンフリーパンの製造は、米粉に水を添加してドロドロの液状にした「バター」を用いた開発例が多い。米粉バターからパンを製造する場合、バターに発酵ガスを効率よく閉じ込めることが製パン上の重要な要素である。米粉バターに粘度を付与させる事は、発酵ガス保持に有効である。研究分担者は、プロテアーゼ処理した米タンパク質分解物を米粉に反応させると米粉バターの粘度が上昇することを発見し、その要因として米の貯蔵タンパク質の一部であるグルテリンが関係していることを見出した(奥西ら、2016 農化大会要旨集、2017 食科工大要旨集)。

研究代表者はプロテアーゼを米粉に添加すると、クラム(パン内相)が柔らかくて比容積が著しく増大したグルテンフリー米粉パンを焼成できることを報告した(Hatta et al., *J. Cereal Sci.*, 2015)。この報告では、米の貯蔵タンパク質がある程度分解される事により、グルテン様のネットワークを形成している事も示唆した。さらにプロテアーゼの差異によって、グルテンフリー米粉パンのバターの動的粘弾性(貯蔵弾性率など)が大きく異なる事も解明した。

以上の独立した研究成果から、プロテアーゼ処理した米タンパク質の分解物が、グルテンフリー米粉パンの品質向上に大きく寄与していることが判明した。しかし、米タンパク質分解物が果たす作用機序は解明できていないので、以下の課題を解明する必要があると考えた。

- 1) いくつかある米タンパク質のうちグルテリンが重要である理由
- 2) 米タンパク質分解物が新たに構築するグルテン様の複合構造体の形成

3) 製パンにおける攪拌、発酵、および焼成の操作に対して、米タンパク質分解物が与える影響

2. 研究の目的

本研究では、プロテアーゼ処理した米タンパク質分解物がグルテンフリー米粉パンの品質を改善する作用機序について、米粉バターのタンパク質科学とレオロジー特性から解明する事を目的とした。また、これまでの研究によって、プロテアーゼによって生成された米タンパク質分解物中のシステインがジスルフィド結合を形成することで澱粉の周辺で網目構造が形成され、生地気泡保持力が増加する可能性も検証されてきた。本研究では、さらにプロテアーゼ処理した米タンパク質分解物中のジスルフィド結合の有無を調べる事で、プロテアーゼによる米タンパク質分解物と比容積の関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

3.1 米タンパク質分解物の調製

米粉（パウダーライス D、新潟製粉）から 0.08 % NaOH を用いて米タンパク質を抽出した。次に、硫酸沈澱によって米タンパク質を回収し、透析後に凍結乾燥して米タンパク質を得た。得られた米タンパク質にプロテアーゼ（プロチン-NY、サモアーゼ（天野エンザイム））を作用させた後、凍結乾燥することで、米タンパク質分解物を得た。

3.2 グルテンフリー米澱粉パンの焼成

米澱粉（ファインスノウ、上越スターチ）に米タンパク質分解物を添加したグルテンフリー米澱粉パン生地を調製した。調製したパン生地にドライイーストを加えて混捏し、35 で 30 分間発酵させてから 200 で 30 分間焼成した。なお、プロテアーゼを添加せずに凍結乾燥した米タンパク質を添加した米澱粉パンも同様の方法で焼成した（コントロール）。

米澱粉パンのクラムを凍結乾燥した後に走査型電子顕微鏡（Miniscope TM-1000, 株式会社日立製作所）を用いて、1,000 倍におけるパンのクラム断面を観察し、 $2.6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ あたりの気泡の数を分析した。

3.3 グルテンフリー米澱粉パン生地の分析

グルテンフリー米澱粉パン生地の動的粘弾性のパラメーター（貯蔵弾性率 G' 、損失弾性率 G'' ）の温度依存性は回転レオメーター（MCR302 (Anton Paar)）で測定した。

米澱粉パン生地に含まれるタンパク質の分子量分布はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）で分析した。

米タンパク質分解物のジスルフィド結合の状態を調べるために、モノプロモバイメインで SH 基の蛍光標識をした。比容積の増大効果が認められたプロテアーゼを添加した米粉パン、米澱粉にプロテアーゼ分解物を添加した米澱粉パンの 2 種類を用いた。これらの試料を還元状態または非還元状態にして、SDS-PAGE で分析した。さらに米タンパク質分解物を分析するために、脱脂した米粉（パウダーライス D、新潟製粉）から米タンパク質 4 種類（アルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリン）を様々な溶媒を用いて抽出し、凍結乾燥することで試料を回収した。分離した 4 種のタンパク質にプロテアーゼ処理した後、タンパク質分解物の組成を SDS-PAGE によって分析した。

4．研究成果

焼成後のグルテンフリー米澱粉パンの比容積を比較すると、米タンパク質分解物を添加した米澱粉パンの比容積はコントロールと比較して 110%に増大した。また、米タンパク質分解物を添加した米澱粉パンのクラムの気泡数はコントロールよりも増加する傾向が見られた。

米タンパク質分解物を添加した米澱粉パン生地の 30～55における G' はコントロールの 2-3 倍、 G'' はコントロールの 3～7 倍の値を示した。プロチン-NY 処理した米タンパク質分解物を添加した米澱粉パン生地の $\tan\delta$ (G''/G') はコントロールの 1.8 倍の値を示した。

SDS-PAGE の結果から、プロチン-NY 処理した米タンパク質分解物を添加した米澱粉パン生地にはコントロールには見られなかった 10 kDa 以下と 25 kDa のタンパク質がみられた。また、サモアーゼ処理した米タンパク質分解物を添加した米澱粉パン生地にも 10 kDa 以下と 38 kDa のタンパク質がみられた。

米粉パンと米澱粉パンにおいて 32 と 33 kDa に蛍光標識されたタンパク質が検出された。また、米澱粉パンにプロテアーゼ分解物を添加したものにおいて、32 と 33 kDa のバンドが消失し、15 kDa の低分子に蛍光標識されたタンパク質が検出された。抽出した米タンパク質のうち、32 と 33 kDa のタンパク質はグルテリンであると判断した。グルテリンのプロテアーゼ分解物から 15 kDa 以下にいくつかのタンパク質が検出された。

以上のことから、澱粉の周囲で網目構造を形成してグルテンフリー米粉パンの骨格を補強することで、生地の気泡保持力増加に寄与している可能性が高い米タンパク質分解物は、グルテリン由来のタンパク質であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上七海、奥西智哉、本多裕司
2. 発表標題 米タンパク質分解物がグルテンフリー米澱粉パンの製パン性に与える影響
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部三重講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上七海、奥西智哉、本多裕司
2. 発表標題 米澱粉に米タンパク質を添加したグルテンフリー米澱粉パンの製パン性
3. 学会等名 第12回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上七海・本多裕司
2. 発表標題 米タンパク質分解物を添加したグルテンフリー米粉生地の動的粘弾性
3. 学会等名 岐阜大学応用生物科学部公開講演会 パンシンポジウム2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上七海・本多裕司
2. 発表標題 プロテアーゼ処理した米タンパク質が米粉パンバターの動的粘弾性と製パン性に与える影響
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上七海・本多裕司
2. 発表標題 米タンパク質分解物がグルテンフリー米粉パン生地の動的粘弾性と製パン性に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第 183 回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上七海・本多裕司
2. 発表標題 米タンパク質分解物を添加したグルテンフリー米粉パンの製パン性
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本多裕司
2. 発表標題 タンパク質分解酵素を使ったグルテンフリー米粉パンの膨らみの改善
3. 学会等名 岐阜大学応用生物科学部公開講演会 パンシンポジウム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥西智哉・岡留博司・五月女格・宮下香苗
2. 発表標題 米バター粘度挙動と米粉パン特性に与えるグルテリンタンパク質の可溶化の影響
3. 学会等名 日本食品科学工学会第65回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	奥西 智哉 (Okunishi Tomoya) (20353964)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------