

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：44523

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700814

研究課題名(和文)スーパーオキシドアニオンラジカルによるパン生地品質改良機構の証明

研究課題名(英文) Prove of improvement of dough mechanism by super oxide anion radical

## 研究代表者

宮本 有香 (MIYAMOTO, Yuka)

武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・講師

研究者番号：70399252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：パン製造時に添加するビタミンCが、ドウ中でスーパーオキシドアニオンラジカル(以下、 $O_2^-$ )を発生させ、小麦タンパク質間でSS結合重合体形成を促進し、品質改良効果をもたらすか検討した。L-AsA、D-AsA共にドウ中で $O_2^-$ を発生したが、品質改良効果を示す添加濃度は異なった。リボフラビンも、顕著な品質改良効果を示したが、L-AsAと共存すると、効果が抑制された。共存したL-AsAがラジカル化し、ドウ中で安定化すると、品質改良効果を阻害すると考えられた。以上の結果より、パンのSS結合重合体形成促進は、 $O_2^-$ が関与する系が存在し、この機構を豆腐などの品質改良効果に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In bread making, it was found that L-ascorbic acid (L-AsA) is used as an agent for improving bread quality. The improvement mechanism is promoted the formation of disulfide bridges in wheat proteins through a SS-sulfhydryl exchange reaction. We studied the presence of the mechanism due to a superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) by L-AsA, D-AsA and riboflavin (Rf). The beneficial effects by L-AsA, D-AsA and Rf were detected by the generations of  $O_2^-$  in dough and the increases in loaf volume. But it was not detected the effects on the concentration dependence of additive agents. However, we consider that the different concentrations of beneficial effects are influenced by an occurrence of stable L-AsA radical. Therefore, L-AsA radical prevented the beneficial effects due to  $O_2^-$ . These results indicate the possibility that the beneficial mechanism of bread making by L-AsA, D-AsA and Rf involved in  $O_2^-$ . This mechanism is widely applicable for the production process such as Tofu.

研究分野：調理科学 食品加工

キーワード：ドウ 品質改良 スーパーオキシドアニオンラジカル ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

(1) 1939年 Jorgensen がアスコルビン酸 (以下、L-AsA) がパンの品質を改良する事を見いだして以来<sup>1)</sup>、パンの品質改良剤として L-AsA は広く用いられてきた。その品質改良機構は、図1に示すように、添加された L-AsA が、ドウ中に存在するアスコルビン酸オキシターゼや遷移金属により酸化型 L-アスコルビン酸 (以下、DHA) となり、還元型グルタチオン (以下、GSH) を酸化型グルタチオン (以下、GSSG) とすることで、小麦タンパク質の SS-SH 基交換反応を促進させ、タンパク質分子間に SS 架橋を増やす事で、タンパク質の網目構造を密にするという物である<sup>2)</sup>。

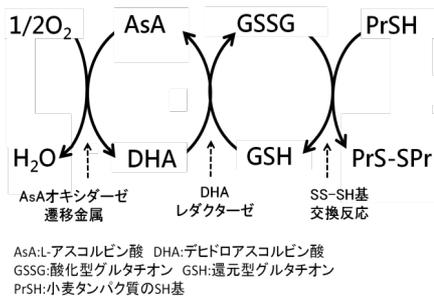


図1 L-AsA によるドウの品質改良機構<sup>2)</sup>

(2) かまぼこの品質改良効果にも L-AsA が関与しており、(1)と同様の品質改良機構だと長年考えられてきた<sup>3)</sup>。しかし、原材料中のすり身には、小麦粉中に存在する還元酵素が存在しない事から、図2のような機構が考えられた<sup>4),5)</sup>。すなわち、L-AsA 添加によりかまぼこ製造中に、すり身内にスーパーオキシドアニオンラジカル (以下、 $O_2^-$ ) が発生し、この  $O_2^-$  が、すり身中の筋原繊維タンパク質であるミオシン上の SH 基から水素を引き抜き、ミオシン重鎖上にチルラジカル (以下  $S\cdot$ ) を発生させ、この  $S\cdot$  同士がラジカル酸化を引き起こし、ミオシン重鎖間で SS 結合による重合化が促進され、網目構造が密となり、かまぼこの歯触りや弾力に結びつくというものである。

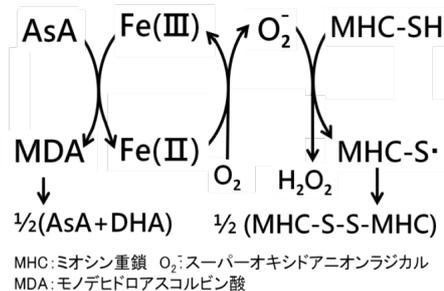


図2 L-AsA によるかまぼこの品質改良機構<sup>4),5)</sup>

(3) すなわち、パンとかまぼこでは、L-AsA 添加による品質改良機構が異なる事が明らかとされている。しかし、パンの材料である小麦粉中には、鉄のような遷移金属が存在する事から、L-AsA を添加する事で、 $O_2^-$  が発生する可能性は十分にあり、さらに、パンの

L-AsA 添加による品質改良機構は、図2で示した機構が、パンでも成り立つ可能性が考えられた。そこで、パン製造時に添加された L-AsA 由来の  $O_2^-$  がパンの品質改良効果に関与するかどうか、さらに、L-AsA 以外の品質改良剤についても検討を行いたいと着想するにいたった。

2. 研究の目的

(1) L-AsA 由来の  $O_2^-$  がドウ中においても発生可能か否か、ニトロブルーテトラゾリウムの発色試験を行い確認し、図2の機構がパン製造過程でも起こりうるか否か、検討を行う。

(2) L-AsA 添加が品質改良効果に与える影響の検討として、ドウの品質評価を行う。ヴァーサロガーミキシングモニターにて、ドウ混捏中の物性的な変化、および L-AsA 添加量の違いなどについて検討する。

(3) L-AsA の添加効果の評価として、焼成後のパン生地膨張率を測定し、比較する。

(4)  $O_2^-$  発生源として、L-AsA の異性体であるエリソルビン酸 (以下、D-AsA) および、照射によって  $O_2^-$  を発生するリボフラビン (以下、Rf) についても同様の検討を行い、L-AsA の品質改良効果との比較を行う。

3. 研究の方法

(1) パンのドウ調製方法は Nakamura らの方法<sup>6)</sup>を参考に調製した。各試料の終濃度は 1mM NBT、0.01% L-AsA とした。キッチンエイド・ミキサー (株式会社エフ・エム・アイ製 9KSM95) を用い、強力粉 200g、砂糖 10g (添加量 5%)、塩 2g (添加量 1%)、イースト 6g (添加量 3%) を攪拌し、 $O_2^-$  により発色する試薬 8mM NBT を含む 15mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 40ml を添加後、30 秒間混捏した。次に 15mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 40ml を加え、さらに 30 秒間混捏した。最後に 0.06% AsA を含む 15mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 50ml を添加し、11 分間混捏し調製したものを「AsA 添加ドウ」とした。また、15mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 40ml の代わりに  $O_2^-$  を消去する試薬 Tiron を 80mM 含む 15mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 40ml を添加したものを「AsA・Tiron 添加ドウ」とした。さらに、AsA も Tiron も含まないものを「盲検ドウ」とした。それぞれの試料を 50g ずつ量りとり、パウチしたものを、30 の恒温槽で 30 分間インキュベーションし、インキュベーション前後の各ドウの着色状況を観察した。L-AsA の代わりに D-AsA を添加した試料も同様に調製し、比較を行った。

(2) 焼成試験は瀬口らの方法<sup>7)</sup>を参照した。小麦粉 200g に砂糖 10g (添加量 5%)、塩 2g (添加量 1%)、カメラヤ及びこだまイースト 6g (添加量 3%)、蒸留水 130ml (添加量 60%) を添加し調製したものを「盲検」とした。盲検に L-AsA を 2.8, 8.5, 10, 10, 40, 80ppm 及びエリソルビン酸を 8.5, 10, 20, 40, 59, 80, 123, 246, 500ppm それぞれ添加し、12 分間混捏した。

混捏後、30 恒温器(ヤマト科学株式会社製 IC340S)で 30 分間一次発酵を行い、ガス抜き、成形後、120g ずつ量りとり丸め直してパン型(上底 11.5×7.0cm 下底 9.5×5.5cm 高さ 5.0cm)に入れ、30 で 22 分間二次発酵を行い、210 オープン(TOSHIBA 製電子レンジ ER-H10)で 30 分間焼成した。焼成後、型から取り出し 1 時間放冷後、菜種置換法にて体積を求めた。また、正確な膨張率を得るために成形時の重量を計測し、ドウ 1g 当たりの体積を膨張率として算出し比較を行った。膨張率は、焼成後の体積( $\text{cm}^3$ )÷成形時の重量(g)×100 で算出した。

さらに、焼成したパンは体積測定後、断面観察に用いた。

(3) 物性測定にはアトー株式会社製 Versa-Logger AF-1700 を用い、ヴァーサ・ロガーソフトウェアにて解析を行った。上記機器により試料混捏時にミキサーフックにかかる負荷の消費電力を測定し、数値化したものをドウの物性値とした。毎分回転数は 80rpm とした。(2)で調製した 10, 20, 40, 80ppm L-AsA ドウと 10, 20, 40, 80ppm D-AsA ドウに対して、混捏時に物性測定を行い、L-AsA 及び D-AsA がドウに与える影響について検討した。

(4)  $\text{O}_2$  発生剤に Rf を用いた検討を行った。強力粉 200g、砂糖 10g(添加量 5%)、塩 2g(添加量 1%)、イースト 6g(添加量 3%)を攪拌し、8mM NBT を含む 15mM リン酸緩衝液(pH7.0) 40ml を添加後、30 秒間混捏した。次に 15mM リン酸緩衝液(pH7.0) 40ml を加え、さらに 30 秒間混捏した。最後に 0.07% Rf を含む 15 mM リン酸緩衝液(pH7.0) 50ml を添加し、11 分間混捏し調製したものを「Rf 添加ドウ」とした。また、15mM リン酸緩衝液(pH7.0) 40ml の代わりに を消去する試薬 Tiron を 80mM 含む 15mM リン酸緩衝液(pH7.0) 40ml を添加したものを「Rf・Tiron 添加ドウ」とした。さらに、Rf も Tiron も含まないものを「盲検ドウ」とした。各試料の濃度は 1mM NBT、0.07% Rf、80mM Tiron とした。それぞれの試料を 25g ずつ量りとり、ドウがつぶれない程度に減圧し真空パックした。クリップライト(ELPA 朝日電器株式会社製)を用い、440 lm で光照射し、30 で 60 分間室温にて放置後、発酵前後の各ドウの着色状況を観察した。また、(2)の手順に従い、焼成試験もを行い、Rf がドウに与える影響も併せて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) ドウ中での  $\text{O}_2$  発生確認(L-, D-AsA) 「盲検」、「L-AsA 添加ドウ」、「L-AsA・Tiron 添加ドウ」を図 3 (A)に、「盲検」、「D-AsA 添加ドウ」、「D-AsA・Tiron 添加ドウ」を図 3 (B)に、それぞれ 30 で 30 分間インキュベーションした時の状態を示す。

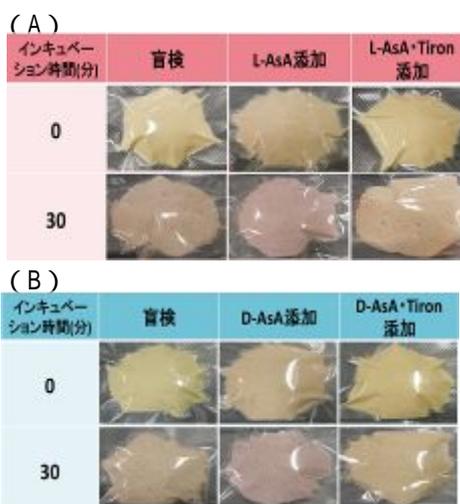


図3 NBTによるドウ発色試験

インキュベーション前(0 分)では盲検、L-AsA 添加ドウ、L-AsA・Tiron 添加ドウの各ドウに大きな色の差は認められなかった。しかし、30 で 30 分間インキュベーションすると盲検ではわずかな発色が見られ、L-AsA 添加ドウでは濃い紫色の発色が認められた。さらにこの発色は  $\text{O}_2$  スカベンジャーである Tiron の添加により抑えられたことから、AsA の添加によりドウ中でも  $\text{O}_2$  が発生することが認められた。さらに、D-AsA 添加ドウに関しても、インキュベーション前(0 分)では、盲検、D-AsA 添加ドウ、D-AsA・Tiron 添加ドウの各ドウに大きな色の差は認められなかった。しかし、30 で 30 分間インキュベーションすると盲検ではわずかな発色が見られ、エリソルビン酸添加ドウでは濃い紫色の発色が認められた。L-AsA 添加ドウと同様に、 $\text{O}_2$  スカベンジャーである Tiron の添加により、この発色は抑えられたことから、D-AsA 添加によりドウ中でも  $\text{O}_2$  の発生が認められた。すなわち、D-AsA にもドウの品質改良効果をもたらす可能性が示唆され、L-AsA と同様に図 2 の機構がパン製造においても成り立つ可能性が示された。

(2) ドウ焼成後の膨張率変化(L-, D-AsA)

図 4、5 に、L-AsA および D-AsA を添加し焼成したパンの膨張率をそれぞれ示す。

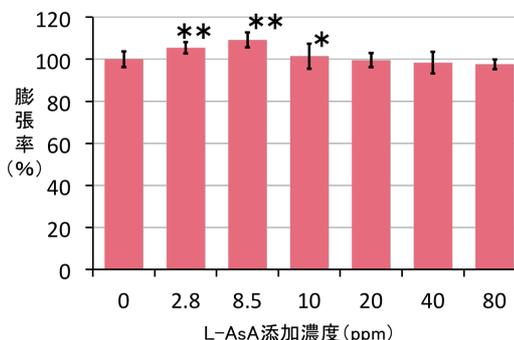


図4 L-AsA 添加によるパン膨張率変化

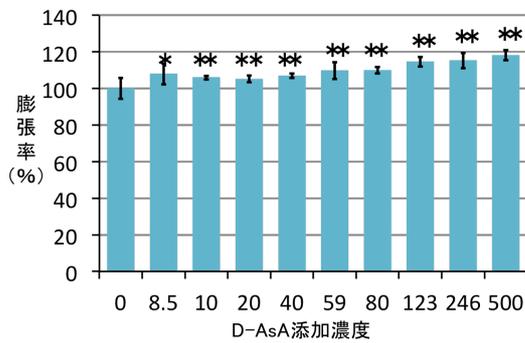


図5 D-AsA 添加によるパン膨張率変化  
\* ( $p<0.05$ )、\*\* ( $p<0.01$ )は、盲検と L-AsA、D-AsA 添加間で有意差があることを示す。

図4の膨張率より、L-AsAを添加したパンでは、10ppm添加までは、膨張率の有意な増加が認められた( $p<0.05$ )が、添加濃度を80ppmまで上昇させると、膨張率は減少傾向を示した。一方、図5の膨張率より、D-AsAを添加したパンでは、8.5ppm添加から有意な膨張率増加が認められ、添加量の増加と共に膨張率が有意に増加した( $p<0.01$ )。すなわち、L-AsAを添加した場合でも、D-AsAを添加した場合でも共に品質改良が認められたが、その添加量には差がある事が明らかとなった。

### (3) ドウ混捏時の物性変化(L-, D-AsA)

図6にL-AsAおよびD-AsAを添加したドウの混捏時に測定したドウ物性値の平滑化した波形を示す。

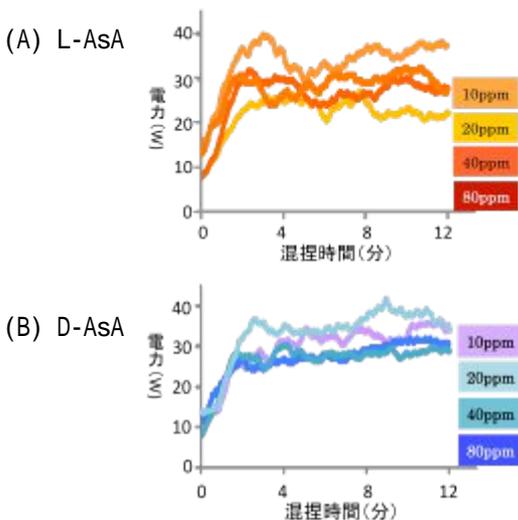


図6 ドウ混捏時の物性値変化

L-AsAを添加したドウの物性値(A)では、10ppm添加が一番高値を示し、その後、添加量の増加と共に物性値は低下、すなわちドウの粘弾性低下している。一方、D-AsAを添加したドウの物性値(B)では、添加濃度の違いでわずかな物性値に差が認められるが、全ての添加濃度において、物性値を示すグラフが右肩上がりとなっており、ドウの粘弾性が上昇もしくは維持できている事が示された。ドウ混捏時においても品質改良効果の違いが

認められており、この差が、焼成後の膨張率に大きく影響したと考えられた。

(4) ドウ中での $O_2$ 発生確認(Rf、カメライ) L-AsAとD-AsA添加実験で用いたイースト(カメライースト)は、ビタミンCが含まれていることから、同条件において、L-AsAおよびD-AsA以外の $O_2$ 発生剤、Rfについて検討を行った。「盲検」、「Rf添加ドウ」、「Rf・Tiron添加ドウ」のインキュベーション前と30分で30分間照射およびインキュベーションした時の状態を図7に示す。



図7 NBTによるドウ発色試験(カメライ)

Rf添加ドウとRf・Tiron添加ドウでは、ドウがRf特有の黄色に着色した。照射後30分で盲検はわずかに薄い紫色の発色が認められた。Rf添加ドウでは30分照射後、さらに濃い紫色の発色が認められた。すなわち、Rfの添加によりカメライースト使用ドウ中でも $O_2$ が発生することが認められた。しかし、 $O_2$ のスキャベンジャーであるTironを含むRf・Tiron添加ドウではその発色が抑えられた事から、ドウに使用したカメライースト由来のL-AsAが $O_2$ を発生させたことによりNBTと反応し発色した可能性が考えられる。この可能性を確かめるために、ビタミンCを含まないイースト、こだまを用い同様の検討を行った。

### (5) ドウ中での $O_2$ 発生確認(Rf、こだま)

こだまいーストとRfを用いた「盲検」、「Rf添加ドウ」、「Rf・Tiron添加ドウ」を図8にインキュベーション前および30で60分間照射およびインキュベーションした時の状態を示す。



図8 NBTによるドウ発色試験(こだま)

Rf添加ドウとRf・Tiron添加ドウでは、ドウがRf特有の黄色に着色したが、照射後60分も盲検は全く発色を示さず、イースト内に $O_2$ 発生源となるものが全く含まれていない事が明らかとなった。さらに、Rf添加ドウでは60分照射後、紫色の発色が認められ、Tironを含むRf・Tiron添加ドウ

ではその発色が抑えられた事から、Rf 添加においてもドウ中に  $O_2$  が発生する事が明らかとなった。さらに、カメリヤイーストに含まれる L-AsA も  $O_2$  発生に大きく関与していることが認められた。

#### (6) ドウ焼成後の膨張率変化 (Rf)

$O_2$  発生剤として Rf を添加し、イーストはビタミン C を含むカメリアと含まないこだまを用いて検討を行った。焼成後のパン膨張率を図 9 に示す。

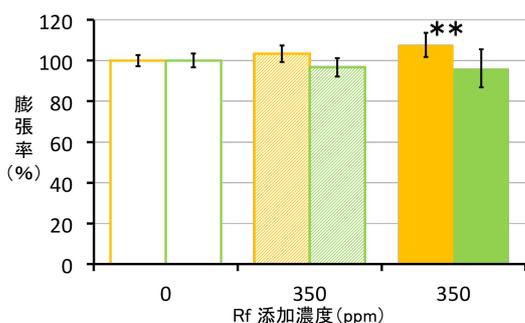


図 9 Rf 添加によるパン膨張率変化

□ はこだまイーストを使用した盲検、□ はカメリヤイーストを使用した盲検、▨ はこだまイースト使用・照射なし、▨ はカメリヤイースト使用・照射あり、■ はこだまイースト使用・照射ありを示す (n=3)。

\*\* ( $p < 0.01$ ) は、盲検と Rf 添加間で有意差があることを示す。

図 9 に示した、こだまイーストを用い、350ppm Rf を添加したドウでは、照射なしで  $103.4 \pm 4.1\%$ 、照射ありで  $107.7 \pm 6\%$  と、両者とも膨張率は増加し、照射ありでは有意 ( $p < 0.01$ ) な品質改良効果が認められた。一方、カメリヤイーストを用いたドウでは、照射なし、照射ありの両者ともに膨張率はそれぞれ  $96.7 \pm 4.6\%$ 、 $96.2 \pm 9.3\%$  と盲検に比べ減少し、改善効果が認められなかった。照射したドウで有意に膨張率が増加したのは、Rf の光増感反応により発生した  $O_2$  が働いたためと考えられたが、照射していないものでも膨張率に改善が見られた。これは、Rf は熱によっても  $O_2$  を発生することから、焼成開始時にドウが高温に曝されたことにより  $O_2$  発生が急激に促進され、ローフボリュームに影響したと考えられた。また、カメリヤイーストで膨張率の改善が認められなかった理由としては、カメリヤイーストに含まれる 90ppm 相当量の L-AsA が Rf の働きを阻害している可能性も考えられた。すなわち、カメリヤイーストに含まれている L-AsA は  $O_2$  発生源になると同時に、L-AsA 自身も安定な L-AsA ラジカルとなることで、 $O_2$  による品質改良効果を阻害する。そのため、Rf 由来の  $O_2$  の働きよりも、L-AsA ラジカルの方が優位に働き、膨化を阻害している可能性が考えられた。

#### (7) 結論

以上の結果より、L-AsA および D-AsA は、パンドウ中で  $O_2$  を発生させる事が明らかとなり、この事から、パンの品質改良機構には、図 1 の機構のみだけでなく、図 2 の  $O_2$  が関与する機構も成り立つ可能性が示唆された。また、L-AsA と D-AsA では、添加濃度とパン焼成時に示される品質改良効果に差が認められ、L-AsA は、品質改良効果を示す添加濃度は 10ppm までであるのに対し、D-AsA は 500ppm 添加しても品質改良効果を顕著に示した。今回用いたカメリアイーストの添加量では 90ppm 相当の L-AsA を含んでいる事から、L-AsA のみの品質改良効果は 100ppm 以内であると考えられた。さらに、L-および D-AsA 以外の品質改良剤として用いた Rf でもドウ中に  $O_2$  が発生しうることが明らかとなった。さらに、L-AsA を含まないこだまイーストを用いた実験より、Rf は顕著な膨張率増加を示し、さらに、L-AsA を含むカメリアイーストを用いた検討では、その膨張率増加を抑制したことから、共存した L-AsA はその多くが L-AsA ラジカルとなってドウ中で安定化し、 $O_2$  を介した小麦タンパク質上の S・発生を阻害しているのではないかと考えられた。そのため、L-AsA 添加量が多すぎると品質改良効果を逆に阻害し、膨張率が減少したと考えられた。以上、本研究の結果より、SS 結合重合体形成促進には、 $O_2$  が関与する系が存在し、さらに、タンパク質間の SS 結合重合体形成を起こす加工品、かまぼこや豆腐などの品質改良効果に対して応用できる可能性が強く期待される。

#### <引用文献>

H.Jorgensen, Further investigations into the nature of the action of bromates and ascorbic acid on the baking strength of wheat flour. *Cereal Chem.*, **16**, 51-59 (1939).

T.Kuninori and J.Nishiyama, Recent advances in dough improvement with ascorbic acid and its derivatives. *Cereal Food World*, **38**, 554-559 (1993).

R.Yoshinaka *et al.*, Effects of ascorbic acid on the gel formation of fish meat. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **38**(5), 511-515 (1972).

K.Nishimura *et al.*, Participation of the Superoxide Radical in the Beneficial Effect of Ascorbic Acid on Heat-induced Fish Meat Gel (Kamaboko). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**(12), 1966-1970 (1996).

Y.Miyamoto and K.Nishimura, Beneficial Effects of Ascorbic Acid on Heat-Induced Fish Gel (Kamaboko) from the Superoxide Anion Radical. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**(2), 480-488 (2006).

M.Nakamura and T.Kurata, Effects of

L-Ascorbic Acid and Superoxide Anion Radical on the Rheological Properties of Wheat Flour-Dough. *Cereal Chem.*,74(5) 651-655(1997).

N.Morimoto and M.Seguchi, Restoration of Breadmaking Properties to Frozen Dough by Addition of Sugar and Yeast and Subsequent Processing. *Cereal Chem.*, **88**(4),409-413(2011).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

宮本有香、西村公雄、スーパーオキシドアニオンラジカルによるパン生地品質改良機構について.日本食品化学工学会第 60 回、2013 年 8 月 31 日、実践女子大学(東京都・日野市)に於いて。

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

宮本 有香 (MIYAMOTO, Yuka)  
武庫川女子大学・短期大学部・講師

研究者番号：70399252