

氏 名(本籍) ^{はたけ} 畠 ^{やま} 山 ^{えい} 英 ^こ 子

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 570 号

学位授与年月日 平 成 9 年 3 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 加工に伴う食品中のチオール・ジスルフィドの変化に関する研究

論文審査委員(主査) 教 授 目 黒 熙
教 授 村 本 光 二
教 授 大久保 一 良
助教授 大 類 洋

論文内容要旨

第 I 章 序 論

食品中の低分子含硫化合物は香気成分として注目されるが、システィン、グルタチオンなどの非揮発性含硫化合物は揮発性香気成分の前駆物質として重要である。さらに、低分子チオール (SH) 基やジスルフィド (S-S) 結合は、食品の加工時に容易に生じる SH \rightleftharpoons S-S 交換反応によるタンパク質中での S-S 架橋のかけかえに、重要な役割を果たすものと考えられている。しかし、これらの低分子 SH \cdot S-S 化合物は一般に食品中には微量にしか存在せず、富反応性の SH 化合物は酸化を受けやすいため、その定量分析法には温和な条件下での高い感度と迅速性が要求される。本研究の第 II 章では、N-(9-アクリジニル) マレイミド (NAM) を食品中の低分子 SH 化合物の定量に応用するための手法を検討した。また、食品中の低分子 SH 含量と S-S 含量を分別するために、S-S 結合の還元条件についても検討を行った。さらに、NAM 法の食品への応用も試みた。

食品タンパク質の分野においては、タンパク質中の SH 基および S-S 結合とレオロジー的性質や機能特性との関連が着目されることから、第 III 章では、NAM 法によるタンパク質中の SH 基 \cdot S-S 結合の定量に関する検討を行った。第 III 章-1 では、タンパク質中の遊離 SH 基ならびに S-S 結合に対する NAM の反応性を検討した。さらに、タンパク質中の S-S 結合の還元条件についても検討した。第 III 章-2 では、NAM 法による食品タンパク質中の SH 基 \cdot S-S 結合の微量分別定量法の確立を試みた。第 III 章-3 では、SH 基 \cdot S-S 結合のタンパク質分子内における存在状態、すなわち分子表面に露出しているか、半ば埋没しているか、埋没したり覆われた状態にあるかを把握するための NAM の応用について検討した。

食品中には低分子 SH \cdot S-S 化合物も共存しており、低分子由来の SH 基 \cdot S-S 結合とタンパク質に含まれる SH 基 \cdot S-S 結合の分別定量を行わないと、食品タンパク質のレオロジーや機能特性に対する SH 基 \cdot S-S 結合の寄与が明らかにされないことより、第 IV 章においては、食品中の低分子 SH 基 \cdot S-S 結合がタンパク質の高次構造変化にどのように関与するのか、加工過程でのタンパク質中の SH 基 \cdot S-S 結合の空間配置はどのようであるのか等、SH 基 \cdot S-S 結合の全体像を把握した。第 IV 章では、食品加工に伴う SH 基 \cdot S-S 結合の変化について検討を加えた。

第 II 章 食品中の可溶性低分子チオール \cdot ジスルフィド化合物の分別定量に関する研究

食品試料中の微量成分である可溶性低分子 SH \cdot S-S 化合物の定量時には、SH 基の酸化が促進されるために、また SH \rightleftharpoons S-S 平衡を崩す可能性があるために濃縮操作は望ましくない。SH 化合物の定量分析には加熱濃縮等の操作を一切行わず、SH 基の酸化促進因子である酸化酵素系や金属イオンの触媒を完全に除去あるいはマスクして実験を行う微量分析法が必要となる。第 II 章においては、SH 蛍光試薬である NAM を食品中の微量可溶性低分子 SH \cdot S-S 化合物の分別定量に応用することを検討した。また、第 II 章-1 においては、低分子 SH 含量と S-S 含量を分別定量するために電解還元装置を用いて、S-S 結合の還元条件について検討をし、さらに、NAM 法を食品に応用するための試料の前処理条件について検討した。第 II 章-2 においては、NAM による食品中の低分子 SH \cdot S-S 化合物の微量分別定量法を応用し、乳加工過程の低分子 SH \cdot S-S 化合物の変化を経時的に追究した。また、米の風味を論じる際に、NAM 法で求めた低分子 SH \cdot S-S 含量がどのように関わるかを検討した。さらに金属イオンと GSH との結合能について調べ、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) のキレート防止効果について検討した。

第Ⅱ章-1 蛍光試薬；N-(9-アクリジニル)マレイミドを用いた食品中の低分子チオール・ジスルフィドの分別定量条件の検討

Weitzman の電解還元装置をコンパクトに改良した装置 (Fig. 1) を用い、S-S結合の還元開裂を行った。水銀電極の純度を高めるとシスチン (Cys-Cys)、酸化型グルタチオン (GSSG) 中のS-S結合を 2 mA、5分の電解還元条件で完全に還元することができた。

食品中の低分子SH・S-S分別定量を行うための方法について、標準物質としてCys, GSH, Cys-Cys, GSSGを用いた添加回収試験を行って検討した。その結果、Fig. 2~ Fig. 4に示したとおりの前処理を行い、電解還元法、NAM法を用いると μmol ~ p mol レベルでの低分子SH・S-Sの分別定量が可能であった。

食品中の可溶性低分子SH含量は、前処理した試料溶液 0.1 mlを 0.5M 炭酸ソーダ-ホウ酸緩衝液 (pH8.80) 3.3 mlに加え、最適濃度 (SH含量の4倍以上) のNAM溶液を直ちに反応させ、室温で1時間後、蛍光強度 (励起波長 360nm, 蛍光波長 435nm) を測定し、SH標準物質であるCysもしくはGSHを同様に反応させて作成した検量線から求められた。

食品中の可溶性低分子S-S含量は、前処理した試料を 2 mAで5分間電解還元し、還元後の試料溶液 0.1 mlをSH定量時と同様にNAM法に供して求め、還元後の定量値から還元前の定量値を減じ、 $1/2$ を乗じて求めた。

第Ⅱ章-2 NAM法による食品中の低分子チオール化合物の定量

第1節 乳の発酵過程における低分子チオール・ジスルフィド含量の変化に関する研究

脱脂乳を原料とする日本酒型乳酒製造工程は、トリプシンによる酵素消化と乳酸菌による乳酸発酵を同時に進行させ、加熱処理により反応を停止させる段階と、*Sacch. sake*によるアルコール発酵を行う段階の二段階から成る。本節においては、含硫成分が重要な風味物質となることが推定される乳酒を試料に、その前駆物質となる非タンパク態可溶性画分のアミノ酸およびペプチドを主とするSHおよびS-S化合物の定量にNAM法を応用させ、製造工程中の消長を明らかにした (Fig. 5,6)。

酵素消化、乳酸発酵段階においては、全S-S含量が $40\mu\text{M}$ 、SH含量が $18\mu\text{M}$ 、アルコール発酵段階では、全S-S含量が $83\mu\text{M}$ 、SH含量が $40\mu\text{M}$ であった。両発酵過程におけるS-SとSHの比率は 2:1 であった。S-S含量は消化酵素および使用菌種の産生するプロテアーゼの作用に伴って増加することが明らかになった。

HPLCにより、乳酒中の主たるSH・S-S化合物はCys, Cys-Cys, GSH, GSSGであることが確認された。

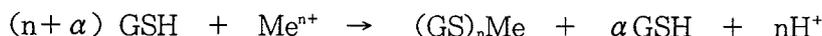
第2節 米の低分子チオール化合物の定量

NAM法を応用して、米・小麦粉中の低分子SH・S-S化合物含量を定量した。米の品種や産地の違い、貯蔵米と新米の違いが低分子SH・S-S含量の定量値に及ぼす影響について検討した (Fig. 7)。また、米の部位別に (胚乳部, 胚芽部, 糠部)、低分子SH・S-S化合物を定量した (Table 1)。さらに、小麦粉と米の含量の違いも調べた。NAM法を固体、粉体試料である米、小麦粉に応用し、低分子SH・S-S化合物の定量を行った結果、 $10^{-7}\text{M}/10\text{ mg}$ のスケールで分別定量が可能であった。米の定量値は、産地・品種の違いによる風味の差異や、貯蔵中の風味の変化について検討する指標になり得ることが示唆された。米の胚芽部、糠部には、単位重量あたり、精白米の

10～20倍の低分子SH・S-S化合物が検出された。特にS-S化合物が多いことが特徴的であった。HPLCの結果、検出されたSH・S-S化合物はGSH・GSSGであった。小麦粉中には精白米の5～10倍の低分子SH・S-S化合物が検出された。

第3節 グルタチオンと微量金属の結合能に関する研究

SH化合物の定量分析を行う過程で、試料中に微量の金属イオンが共存している場合、対象となるSH基を化学修飾する際にNAMの活性二重結合付加反応と同程度もしくは優先的にキレート結合を生じることが考えられる。ゆえに0.02M EDTAによるキレート結合の防止策をとってきたわけである。本節ではGSHと金属イオンの結合能を利用し、GSHと結合する金属イオン量を定量するために、結合前のGSH量($n + \alpha$)と結合後の定量値(α)をNAM法によって求め、その差から結合した金属量を求めることを検討した。



この方法によれば、試料の複雑な前処理に要する時間も短縮されるのみならず、NAM法の特性を生かし、 $n \sim p \text{ mol/ml}$ という高感度で金属イオンの定量が可能になる。また、生体活性部位であるSH基に特異的に反応する金属イオンのみをチェックすることにもなる。

蒸留水中では銅イオン、1価の水銀イオン、2価の水銀イオンに結合能が認められたが、EDTA存在下では銅イオンに対し、キレート防止効果があらわれ、結合能が消失した(Fig. 8,9)。

NAM法により食品中のSH基を定量する際に用いる0.02M EDTAの水銀イオン以外の金属イオンに対するキレート防止効果が確認できた。水銀化合物のGSHとの結合能は反応溶液のpHやイオン強度に依存し、1価の水銀イオン、2価の水銀イオン、メチル水銀とGSHとの反応は、反応溶液の種類により特異的であった。

各種水銀化合物とGSHの結合特性を生かし、1:1の当量比で反応する溶液環境を設定すると、水銀化合物の分別が可能となることが確認された(Fig. 10)。

水銀化合物と結合するGSH量をNAM法により定量することで、溶液中の水銀化合物量を $10^{-9} \sim 10^{-12} \text{ mol/ml}$ レベルまで測定することが可能であった。

第三章 タンパク質中のチオール基・ジスルフィド結合の定量に関する研究

タンパク質のSH基・S-S結合の総定量を行う手法として、システィン残基を定量するアミノ酸分析法があるが、SH基・S-S結合の分別定量はできない。分別定量の際はあらかじめS-S結合を開裂し、SH試薬による化学修飾を行う方法が一般的になっている。

SH基の化学修飾試薬として、多くの試薬が開発されているが、そのうちDTNBは最も多用されていると言える。しかし、検出感度的に限界があり、試料タンパク質が量的に少ない場合は問題となる。近年、高感度の検出能を有するSH蛍光試薬の開発も進んでいるが、全てのシスティン残基の修飾を行う際に、温和な条件で反応させうるものが少ないのが現状である。

タンパク質中のS-S結合は多くの場合、ポリペプチド鎖内もしくは鎖間に架橋をつくり、タンパク質の構造維持に関する役割を果たし、容易に切断されない。半面、このS-S結合はある条件下においては容易に切断されることもあり、他のS-S結合間で架橋のかけかえを生じさせる性質をも有する。これらの性質はタンパク質中に存在する共有結合の内では特徴的なものである。このようなS-S結合の開裂には、2-メルカプトエタノールに代表されるチオール化合物による方法が多用され

るが分別定量を行う際は、用いたチオール化合物の除去を行わねばならず、操作過程のSH基の再酸化や操作の複雑さの点で問題となる。その他の還元試薬による方法は、タンパク質構造中のS-S結合の位置、空間配置、試薬と接しうるかどうかという点、S-S結合近傍の官能基の種類あるいは歪みの程度等に左右される。

第Ⅲ章-1では、反応のメディウムから還元剤を除去する必要もなく、還元の種類々の段階でSH基の定量が可能な電解還元条件について検討した。さらに、タンパク質中のSH基・S-S結合に対するNAMの反応性についても検討した。

食品タンパク質の分野においては、SH基・S-S結合は特にレオロジー的性質や機能特性との関連が着目される。これらのSH基・S-S結合は、タンパク質分子中での空間的配置が重要な因子になることが考えられ、分子表面に露出しているか、埋没したり覆われた状態にあるかというような存在状態を把握することが重要になる。

第Ⅲ章-2では、低分子SH・S-S分別定量に用いたNAM法を、タンパク質中のSH基・S-S結合の定量に応用するための基礎的研究を行い、温和な条件で迅速に、しかも高感度の分別定量を可能にしたことをまとめた。

第Ⅲ章-3では、タンパク質中のSH基・S-S結合にNAMを反応させた場合、NAMの修飾特異性が見出だされたので、タンパク質分子中のSH基・S-S結合の存在状態識別能についても検討を行った。

第Ⅲ章-1 蛍光試薬NAMのタンパク質に含まれるチオール基・ジスルフィド結合に対する反応性の検討

第1節 タンパク質中の遊離SH基に対するNAMの反応性

タンパク質中のSH基に対するNAMの反応性について、BSAと β -Lg中のSH基を用いて検討した。BSAのSH基は、分子表面に露出しており、NAMと定量的に反応した。定量条件を検討した結果をもとに、0.5M 炭酸ソーダ-ホウ酸緩衝液 (pH8.80) 中で、BSA中のSH基濃度の5.7倍以上のNAMを反応させ、60分後に励起波長 360nm、蛍光波長 435nmにおける蛍光強度を測定した結果。BSA中のSH基は pmolレベルで検出され、BSA 1分子中に 0.7モルのSH基が存在することが確認された。この定量結果はDTNB法で定量したものに一致した。従来から多用されているDTNB法よりも 1,000倍の感度で定量が可能となった。

β -Lg中のSH基は、室温において分子表面近傍に半ば埋没した状態で存在していることが想定され、NAMやDTNBの化学修飾率は Native な状態においても、変性剤で変性させた場合においても100%に至らなかった。しかし、 β -Lg中のSH基はNAMと定量的に反応し、SH基濃度と蛍光強度は 10^{-10} mol / mlレベルで直線性の関係を示した。

第2節 タンパク質中のS-S結合に対するNAMの反応性

各種単離タンパク質を Native な状態で電解還元を行った場合は、全試料ともにDTNB法、NAM法で検出されなかった。タンパク質中のS-S結合の開裂時は変性剤による変性の必要があり、50mM 酢酸緩衝液 (pH4.00) に溶解した 6M 塩酸グアニジンで変性しつつ電解還元を行うと、DTNB法による吸光度およびNAM法による蛍光強度は還元時間の経過とともに (20分から120分) 平衡に達した。しかし、NAM法においては低い修飾率が得られ、DTNBと異なり、NAMの立体的特異性が修飾率に影響を及ぼすことが示唆された。この低い修飾率はタンパク質中のS-S結合が

分子表面に露出していないという存在状態を反映するものと考えられた (Table 2)。

第三章-2 NAM法によるタンパク質中のチオール基・ジスルフィド結合の分別定量法

本研究においては、タンパク質中のSH基・S-S結合の総量を、高感度で分別定量する目的で、低分子SH・S-S化合物の微量定量 (1 p molレベル) が果たせたNAM法の、タンパク質試料への応用を試みた。NAMを用いてタンパク質中の総SH基・S-S結合を、温和な条件下で微量分別定量する方法を確立した。スブチロペプチダーゼ (Carlsberg type) で加水分解することによって、SH基の化学修飾時に問題となるタンパク質の立体障害を除去できた (Fig. 11)。加水分解試料にNAMを反応させ、SH基の定量を行い、S-S結合の定量は加水分解試料を電解還元してNAM法で行った (Fig. 12, 13)。モデルタンパク質 (α -La, BSA, β -Lg) 中のSH基・S-S結合含量と蛍光強度はn mol/mlレベルで直線性の関係を示し、DTNB法よりも1,000倍の感度でタンパク質中のSH基・S-S結合を定量することができた (Fig. 14)。本方法は定量時間の短縮も図れ、他のSH修飾試薬への応用をも可能にした。

第三章-3 蛍光試薬NAMを用いたタンパク質分子中のチオール基・ジスルフィド結合の存在状態識別ならびにタンパク質分子の高次構造変化に関する研究

第1節 NAMのSH修飾特異性とタンパク質中のSH基・S-S結合の存在状態識別

NAMを用いてタンパク質中のSH基・S-S結合を化学修飾する際は、修飾率が非常に低いことが明らかになった。数種のタンパク質を用いて、1) Nativeな状態、2)変性剤により変性させた状態、3)トリプシンならびにペプシンで加水分解を行った状態でのS-S結合部位に対するNAMの反応性を比較した (Fig. 15, Table 3, Fig. 16)。NAMはSH基がタンパク質中で埋没していたり、覆われていたりすると接触できないことが確認された (Fig. 17)。これはNAMのアクリジン環の影響によるものと考えられた。食品タンパク質においては、このように埋没していたり覆われている非反応性SH基・S-S結合が直接的にレオロジーに関わるとされており、タンパク質の構造維持に寄与するS-S部位やSH基を識別するためにNAMの特性が生かされるものと考えられた。

ミオシンを用いてNAMの選択修飾特異性について検討を行った。ミオシンには活性SH基が2個あり、SH₁は分子表面に位置し、SH₂は半ば埋没していることが明らかになっている。SH₁はCa-ATPase活性に関与し、修飾を受けると活性が上がり、EDTA-(K⁺)ATPase活性が減少するとされている。ミオシンの4倍モル濃度のNAMをミオシンに反応させると、EDTA-(K⁺)ATPase活性の減少が一定になり、Ca-ATPase活性の上昇も一定となった。NAMは、分子表面に位置したSH基とは反応するが、半ば埋没している場合は反応しないことが確かめられた (Fig. 18)。

第2節 β -ラクトグロブリン (β -Lg) の加熱過程における高次構造変化に関する研究

タンパク質に含まれるSH基・S-S結合の存在状態識別能を有することが示唆されたNAMを用いることによって、 β -Lgの加熱変性時の高次構造変化を定量的に示し得ることが明らかにされた。

乳タンパク質中で唯一の遊離SH基を有する β -Lgを試料に用い、加熱過程の高次構造変化を追跡する手法としてのNAMの有用性を明らかにした。NAM反応性のSH・S-S定量値のパターンは、 β -Lgの加熱変性による高次構造変化を反映するものとなった (Fig. 19, 20)。 β -Lgの加熱変性を論じる場合は、凝集反応に影響を与える因子として遺伝的変異体、試料濃度、溶液のpHおよびイオ

ン強度などが挙げられるが、これらの会合や凝集反応におよぼす影響をSH基・S-S結合の分別定量という手法でNAMを用いて明らかにすることができた (Fig. 21~24)。

第IV章 加工に伴う食品中のチオール・ジスルフィドの変化に関する研究

食品タンパク質のレオロジー的性質や加工特性はSH基・S-S結合と関わりを持つが、単離タンパク質の場合と異なり、共存成分の影響を受けたり、会合等の高次構造変化に伴うためにSH基・S-S結合の分別定量や存在状態識別は容易には行うことができないものと予測された。また、試料が食品そのものの場合、低分子SH・S-Sも共存しているので、この部分についても分別して定量を行わなければ、物性や加工特性への関わりが明確にされない。

しかし、反応性に富む低分子SH・S-S化合物や β -Lgのように加熱等の処理で活性化されるSH基はSH \rightleftharpoons S-S交換反応の引き金になったり、分子間S-S架橋を形成したりするために、食品中のSH基・S-S結合がどのような状態で存在しているのか、すなわち、低分子なのか、高分子中に存在しているのか、タンパク質中に存在するのなら、表面に位置して富反応性であるのか、分子内に半ば埋没しているのか、覆われている状態で高次構造の維持に関わっているのか等を識別することが重要となる。特に諸反応の引き金になる活性SH基は、微量でも反応種となるため、高感度の定量法が必要となる。

食品加工に伴うSH基・S-S結合の挙動を明らかにさせるために基礎的研究を行ってきたNAMの反応性に関する諸性質、すなわち低分子SH・S-S化合物に対する高感度な定量性やタンパク質中のSH基・S-S結合の分子内存在状態識別能を実際に食品タンパク質や食品そのものに応用させ、分別定量がなされておらず推測の域で論じられてきた物性変化や加工特性について定量的に明らかにするために研究を進めた。

第IV章-1 製パン工程中のチオール・ジスルフィドの変化

第1節 ドウ・ミキシングへのSH基・S-S結合の関わり

製パン工程中で最も重要なプロセスといわれるドウ・ミキシング過程の低分子SH基・S-S結合ならびにタンパク質中のSH基・S-S結合の変化をNAM法とDTNB法を用いて明らかにした (Fig. 25)。

また、これらの分別定量値とドウの改良効果を有する酸化剤の影響についても調べた。その結果、可溶性SH化合物の総S-S定量値に占める割合は、ドウの物性測定結果と相関することが明らかとなった (Table 4, 5, Fig. 26)。また、この割合は、遅効性といわれるプロメイトよりアスコルビン酸の方が小さく、ドウ改良剤の意義は、低分子SH基とタンパク質とのSH・S-S交換反応促進にあることが示唆される知見が得られた (Table 6, Fig. 27)。ドウのタンパク質中SH基・S-S結合は分子内表面に露出しておらず、強固なネットワーク形成に寄与していることが確認された。

第2節 第一発酵、ホイロ、焼成工程におけるSH基・S-S結合の変化

ドウの分析手法に準じ、ストレート法で製造した食パンを用い、第一発酵後、ホイロ後、焼成直後ならびに焼成終了後のSH基・S-S結合の変化について検討を行った。同時にアミノ酸分析を行いハーフシスキンを求めた。その結果、ミキシング直後にはほぼすべてのSH・S-Sが検出されて

いたが、生地発酵が進むにつれて検出可能なトータルシステイン残基は顕著に減少した (Fig. 28, Table 7)。また、酸化剤を添加した場合、検出可能なトータルシステイン残基の減少は早まり、焼成中に一時増加した。アミノ酸分析の結果 (table 8)、ハーフシステイン量にはほとんど変化がなかったことから、生地発酵中にプロテアーゼに耐性の固いグルテンマトリックスが形成され、システイン残基はこれに覆い隠されていくものと考えられた。この結果はレオロジー的に有効な反応性に富むSH基・S-S結合が生地発酵中に減少することを示唆している。

第IV章-2 加熱に伴う食品タンパク質の高次構造変化に関する研究

加熱によるタンパク質の高次構造変化を乳清タンパク質、大豆酸沈澱タンパク質を試料に用いて検討した。さらに米を試料にし、炊飯を想定した加熱過程のSH基・S-S結合の変化について調べた。

酸沈澱の乳清を用い、加熱温度の上昇に伴うSH基・S-S結合の変化をDTNB法とNAM法により検討した。リン酸緩衝溶液中 (pH7.0) で5分間加熱した場合、DTNB法では確認できない、アンホールディングによるSH基の挙動や、反応に富むS-S結合の挙動が確認できた。乳清タンパク質は50°C加熱でアンホールディングによりSH基が露出し、加熱変性の引き金になる様子をNAM法によって定量レベルで明らかにできた (Fig. 29)。

大豆酸沈澱タンパク質を調製し、加熱時のSH基・S-S結合の分別定量を行った。可溶性SH基は50°Cで急増し、S-S結合は急激に減少した。この温度では、分子のアンホールディングに伴ってSH基が反応性に富むようになり、富反応性SH基がSH⇌S-S交換反応を促し、80°Cまで高分子との架橋のかけかえを展開することが示唆される結果となった (Fig. 30)。これらの結果と電気泳動パターンの変化には、関連性が認められた。

加水した米の加熱によるSH基・S-S結合の変化について検討した (Fig. 31)。100°Cまでの加熱で、富反応性SH・S-S含量が増加し、分子内部に埋没しているSH基・S-S結合が半ば埋没している状態になることが確認された。これらの変化は、分画して行ったアルブミンの加熱変性パターンと類似していた。中温域までは水溶性画分の低分子SH・S-S化合物ならびにアルブミン中のSH基・S-S結合の相互作用が生じているものと考えられた。

第IV章-3 魚肉練り製品・中華麺製造過程のSH基・S-S結合の変化

仙台名産の笹かまぼこ製造工程でSH基・S-S結合がどのような影響を及ぼすかについて検討を加え、食感のよい笹かまぼこの製造に寄与することを目的に実験を行った。

播潰時の温度、時間、食塩濃度がタンパク質の変化にどのような影響を与えるかについて検討した結果、3つの因子は低分子SH・S-S化合物には大きな影響を与えず、可溶性ならびに不溶性タンパク質中のSH基・S-S結合に顕著な影響を与えることが明らかとなった。塩溶性タンパク質の活性を失わないように温度を0°Cに設定して播潰操作を行った場合と、20°Cに設定した場合では、可溶性タンパク質中のSH基ならびに不溶性タンパク質中のSH基定量値に相違が見られ、0°Cの方が高い定量値となった。播潰時間10分までに可溶性・不溶性SH基が等しくなると良質な物性が得られることが確認された。播潰時の食塩濃度は3%が適切であったが、この濃度を上回ると可溶性タンパク質中のSH基が顕著に減少し、不溶性タンパク質中のSH基が増加した。

笹かまぼこの品質には可溶性SH基と不溶性SH基のバランスが関与し、1:1であることが望ましいという結果が得られた。

中華麺製造過程のSH基・S-S結合の挙動と食感の関わりを調べた。ミキシングにより、タンパク質は不溶化が進行するが、SH基は遊離して可溶化した。熟成過程ではタンパク質の可溶化が進行し、不溶性タンパク質分子中にS-S架橋が生じることが推察された。良質な中華麺の製造には、ミキシングを強固なネットワークが形成される前に終了し、可溶性タンパク質中のSH基を増加させて、熟成段階でのS-S架橋のかけかえを生じやすくすることが重要であるという結果が得られた。

第V章 要 約

1. NAM法を食品中の低分子SH化合物・S-S化合物の分別定量に応用させるための基礎的検討を加え、食品の性状別に前処理法を提示した。この方法で食品への応用を試みた結果、 $\mu\sim\text{p mol}$ レベルでの検出が可能であった。
2. タンパク質中のSH基・S-S結合を総定量する場合の手法として、スブチロペプチダーゼを用いて加水分解を行った後にNAM法を適用させる方法を考案した。従来法であるDTNB法に較べ、1,000倍感度の n mol レベルでの定量ができるばかりか、温和な条件で短時間に微量分別定量を行うことが可能となった。
3. NAMはその立体特異性からタンパク質中のSH基・S-S結合と反応する際に限定を受けるために、分子表面に位置する富反応性のSH基・S-S結合にのみ化学修飾することが明らかとなった。
NAMの選択的修飾特性は食品の加工過程におけるタンパク質分子の高次構造変化を把握したり、SH基・S-S結合の分子内での存在状態を把握することに応用できた。
4. 加工に伴う食品タンパク質または食品そのものの化学変化のうち、レオロジーや変性に関してこれまで想定されてきたSH基・S-S結合の挙動について、NAM法およびDTNB法を用いることにより分別定量レベルで明らかにした。

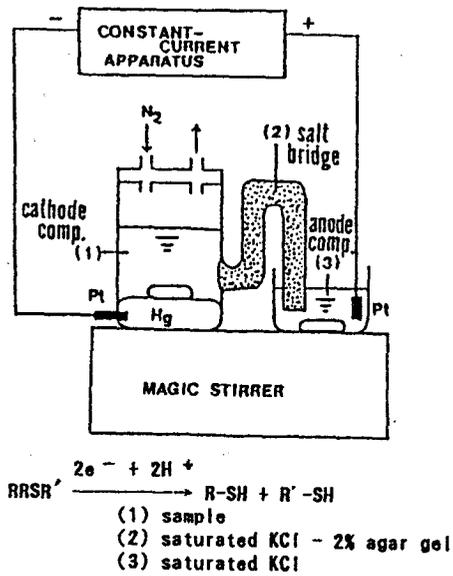


Fig. 1 Apparatus for the Reduction of Disulfide

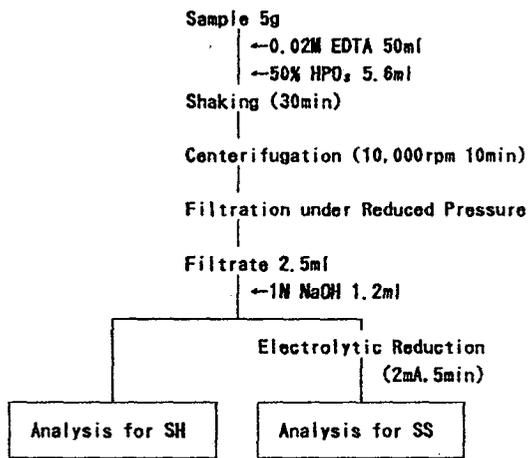


Fig. 3 Powder Food Preparation and Analytical Procedure

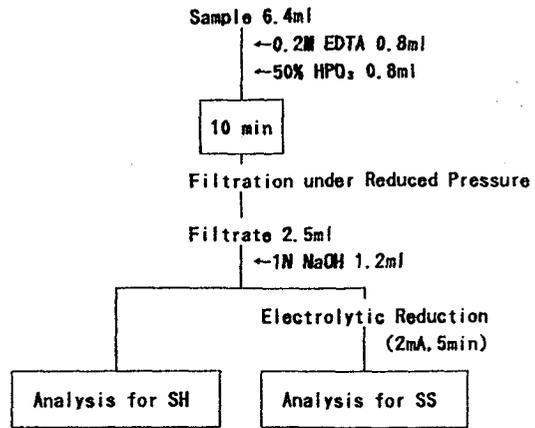


Fig. 2 Liquid Food Preparation and Analytical Procedure

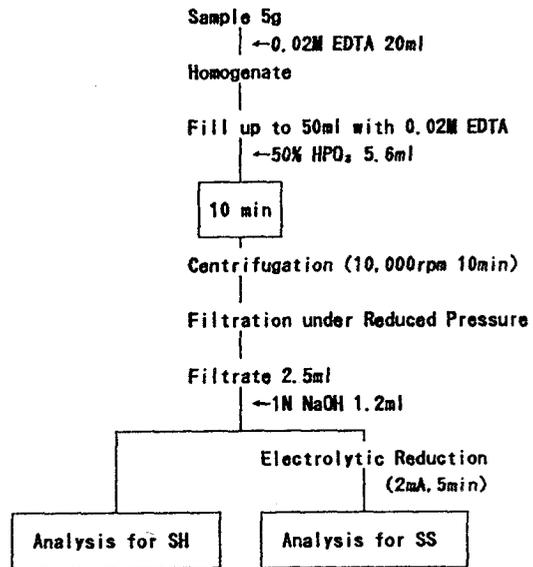


Fig. 4 Solid Food Preparation and Analytical Procedure

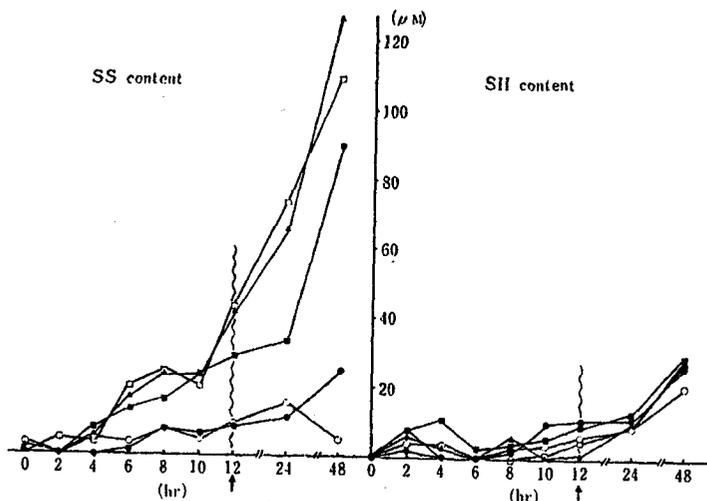


Fig. 5 SH and SS Contents in Lactic acid Fermented Media. ●, *Str. lactis*; ○, *L. bulgaricus*; ■, added trypsin and *Str. lactis*; □, added trypsin and *L. bulgaricus*; ▲, standard (trypsin digested media).
 ↓ stop the lactic acid fermentation in manufacturing of Nyushu (Sake-type).

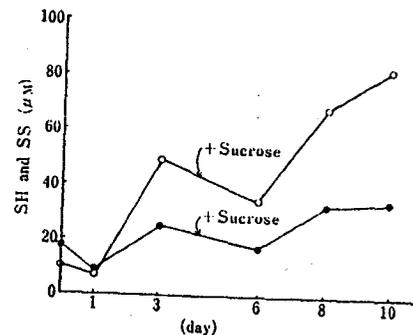


Fig. 6 SH and SS Contents in Alcohol Fermented Media Inoculated with *Sacch. sake*. ●, SH content; ○, SS content.

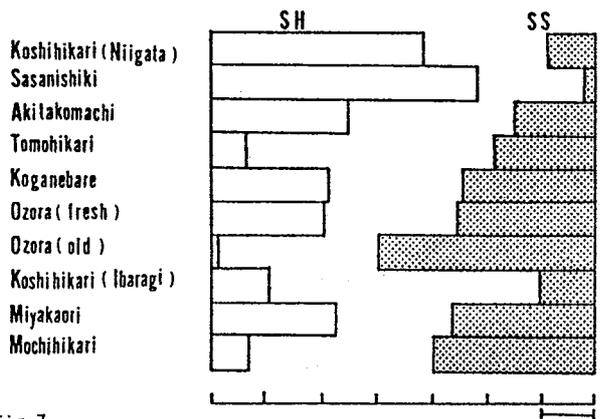


Fig. 7 Low Molecular SH & SS Contents in Milled (White) Rice (x 10⁻⁷ M / 10mg)

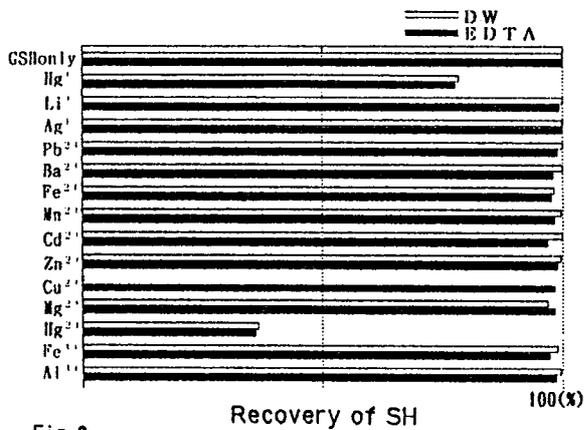


Fig. 8 Recovery of SH Binding Capacity of Metal with GSH

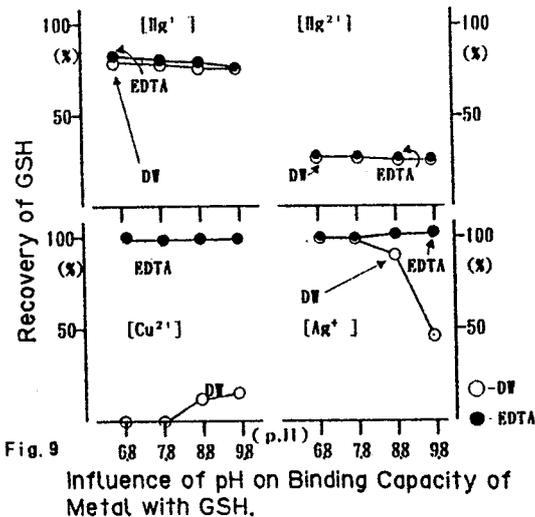


Fig. 9 Influence of pH on Binding Capacity of Metal with GSH.

Table 1 Low Molecular SH & SS Contents in Embryo and Bran (x 10⁻⁷ M / 10mg)

	Embryo		Bran	
	SH	SS	SH	SS
Koshihikari (Niigata)	78.1	107.7	10.6	30.2
Tomohikari	11.7	141.6	2.6	69.8
Ozora (fresh)	27.6	105.6	20.8	52.8
Ozora (old)	80.7	92.6	6.2	29.1

◀ Comparison ▶

	SH	SS
Hard wheat flour	26.6	29.0
Soft wheat flour	24.8	28.9

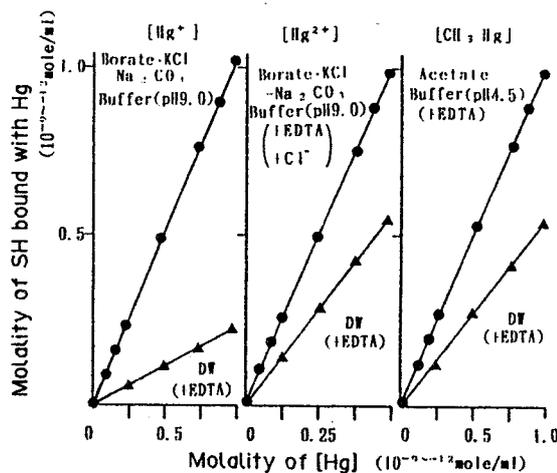


Fig. 10 Detern. of Hg with NAM-Method.

Table 2 Rate of Modification to Disulfide

Sample	DTNB (%)	NAM (%)
insulin	117	7
serum albumin	102	4
α-lactalbumin	75	2
pepsin	75	10
trypsin	107	3
lysozyme	91	2
ribonuclease	40	7
α-chymotrypsin	101	3
β-lactoglobulin	99	20

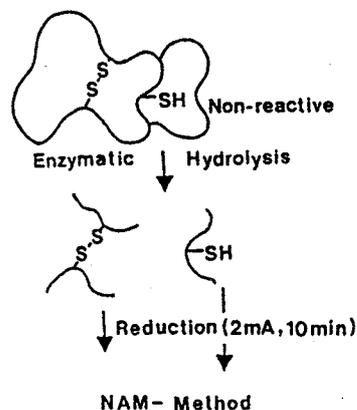


Fig. 11 Deternation of Total Thiol and Disulfide in Protein

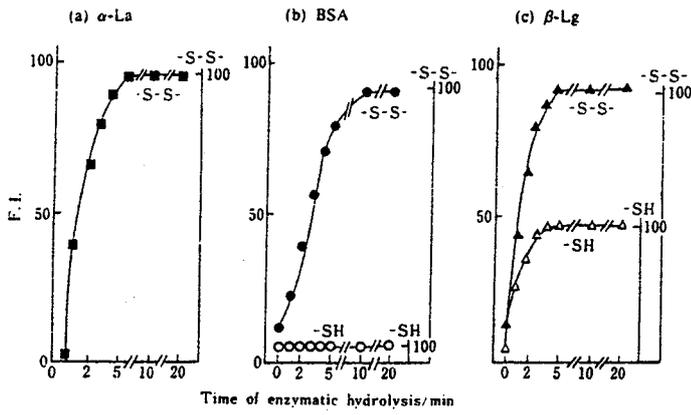


Fig. 12 Time course of the enzymatic hydrolysis of protein and the NAM-reactivity of the SH moiety. The SS content was determined after electrolytical reduction.

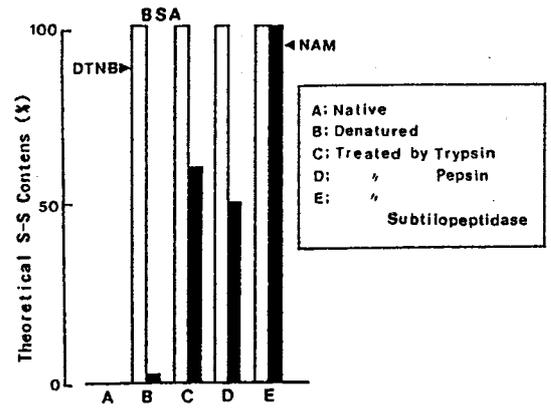


Fig. 16 S-S Determination by DTNB and NAM

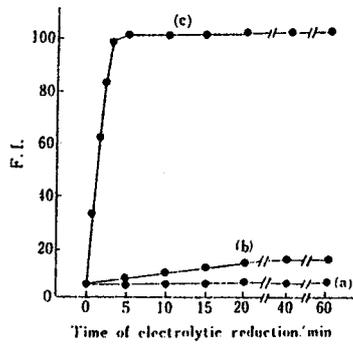


Fig. 13 Time course of the reduction of the SS moiety in BSA before (a) and after the denaturation with guanidine hydrochloride (b) and the enzymatic hydrolysis (c). (a), native; (b), 6 M guanidine-HCl added (not hydrolyzed); (c), hydrolyzed by the protease.

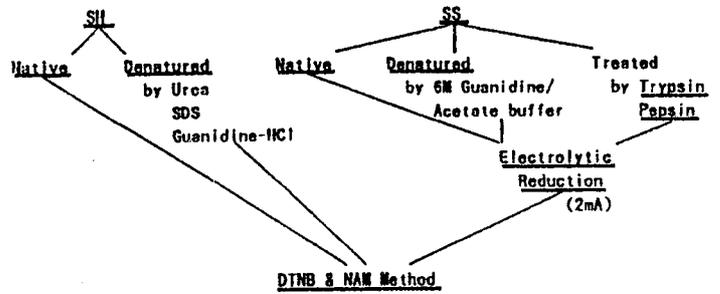


Fig. 15 SH and SS Determination in Protein and Polypeptide

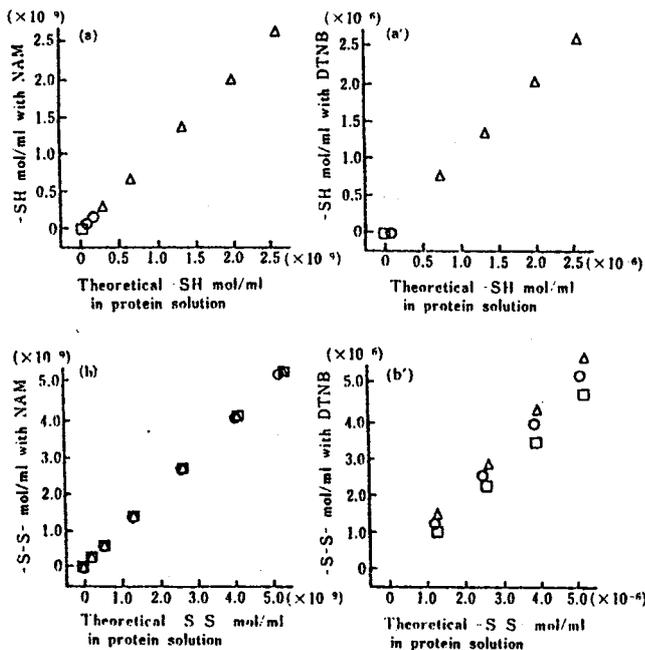


Fig. 14 Comparison of the NAM method (a and b) with the DTNB method (a' and b'). (a) and (a'), SH determination; (b) and (b'), SS determination. □, α-La; ○, BSA; △, β-Lg.

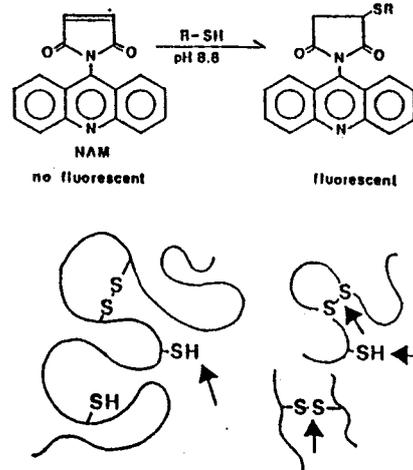


Fig. 17 Reaction Mechanism of Thiol with NAM

Table 3

SS Contents and Rate of Modification by DTNB and NAM Method

	SS/mol		Native	Denatured	Treated by Trypsin	Treated by Pepsin
insulin	3	DTNB	0	3.51 (117)	3.45 (115)	3.54 (118)
		NAM	0	0.21 (7)	0.54 (15)	1.29 (43)
serum albumin	17	DTNB	0	17.34 (102)	17.85 (105)	17.51 (103)
		NAM	0	0.68 (4)	10.37 (61)	8.84 (52)
α -lactalbumin	4	DTNB	0	3.00 (75)	3.92 (98)	4.16 (104)
		NAM	0	0.08 (2)	2.16 (54)	3.20 (80)

GSSG was used as a standard.

() : rate (%) of modification.

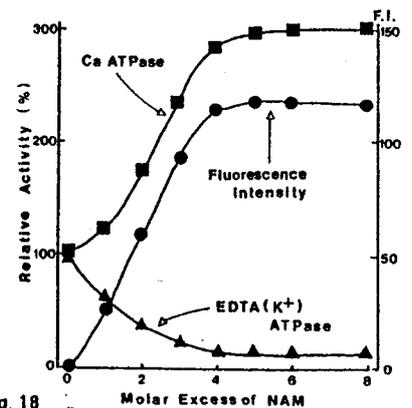


Fig. 18 Relative ATPase Activities of NAM-Modified Myosin

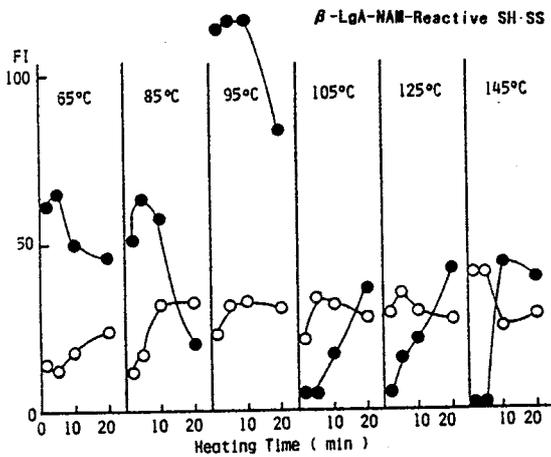


Fig. 20 Effect of Heating Time and Temp to Active SH (O) and SS (●) at pH 7.00

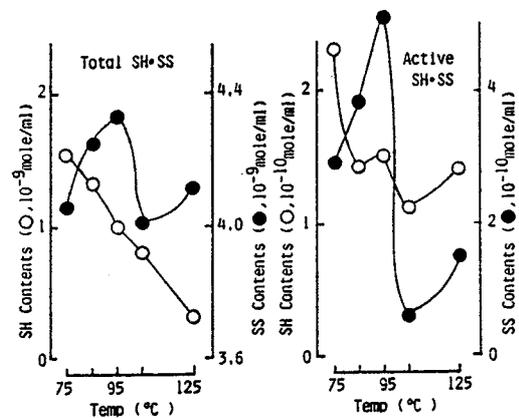


Fig. 19 Effect of Heating to SH and SS in β -Ig A

Sample conc: 1×10^{-9} mole/ml
Heating time: 10 min pH: 7.00

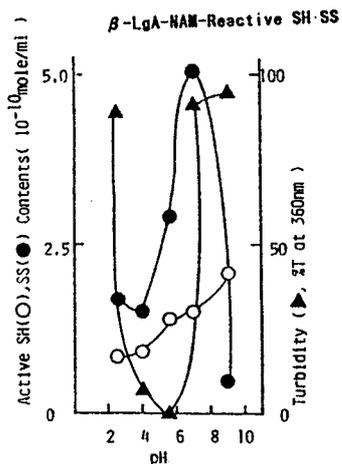


Fig. 21 Effect of pH (95°C, 10 min)

Sample conc: Anal for turbidity
0.0047g/ml
Anal for SH, SS
 1×10^{-9} mole/ml

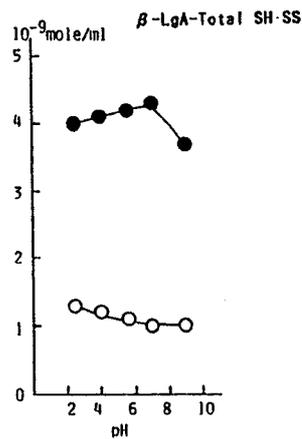


Fig. 22 Effect of pH to total SH (O) and SS (●)

Heating time: 10 min
Heating temp: 95°C
Sample conc: 1×10^{-9} mole/ml

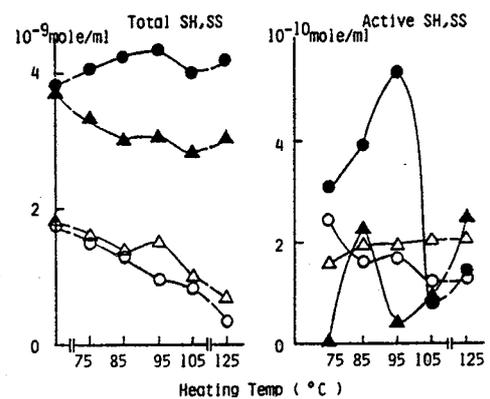


Fig. 23 Effect of Heating to SH and SS in β -Ig A and β -Ig B at pH 7.00

β -Ig A : SH (O), SS (●)
 β -Ig B : SH (Δ), SS (▲)

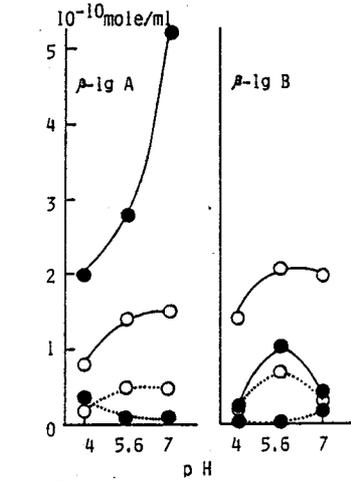


Fig. 24 Effect of pH and Ionic Strength to Active SH(O),SS(●) in β -Ig A and β -Ig B
 — : buffer system solution
 - - - : pHs were adjusted with 0.1M HCl

Table 4

小麦中のSH, SS含量 ($\mu\text{mol/g}$)			
	低分子	可溶性	総量
SH	0.043	0.045	2.952
SS	0.175	0.177	12.34
SH/SS	0.246	0.252	0.240

低分子SH/総SH : 0.015
 低分子SS/総SS : 0.014

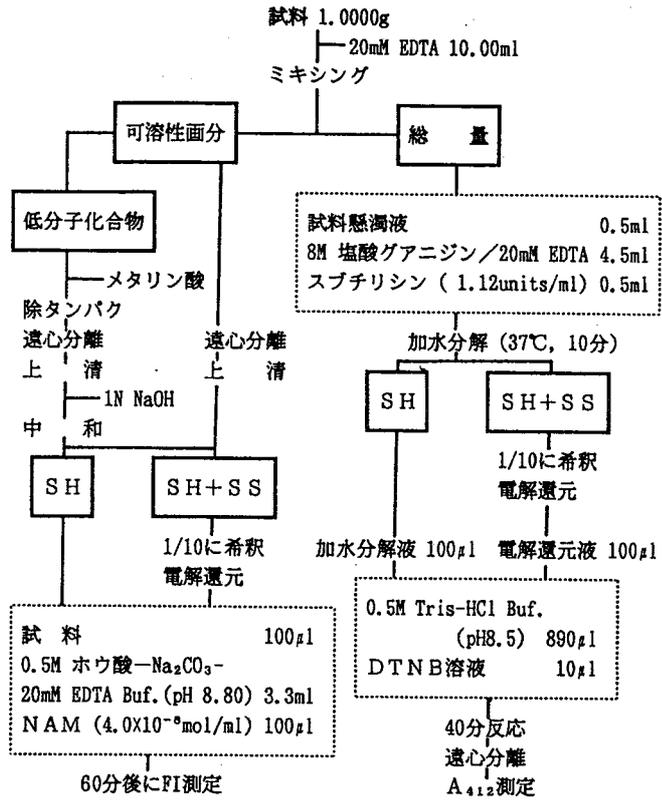


Fig. 25 小麦に含まれるSH基・SS結合の分析方法

Table 5

小麦混練過程における物性測定値とSH定量値の変化

混練時間	1分	6分	20分
エキスグラフ			
抗張力(BU)	460	540	1020
伸張度(mm)	246	191	128
形状比	1.8	2.8	8.0
面積 (cm ²)	14.7	13.0	15.2
可溶性SH	85 (nmol/g)	78	34
低分子SH	80 (nmol/g)	78	34

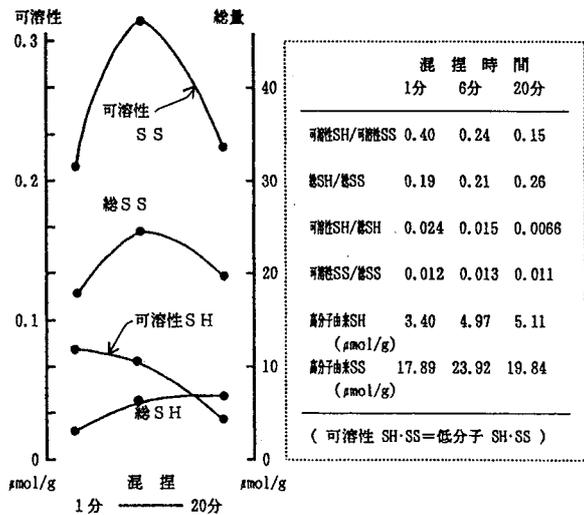


Fig. 26 混練過程のSH基・SS結合の定量値及び比率の変化

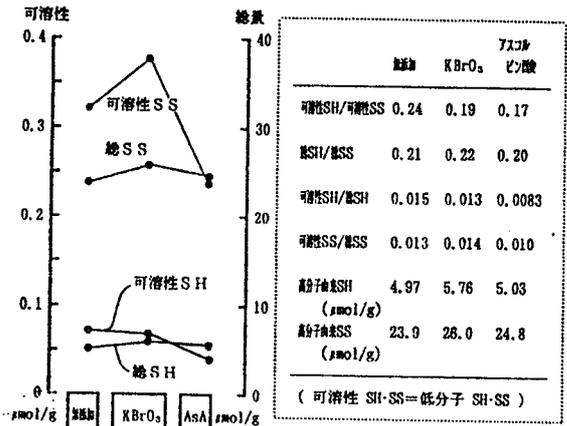


Fig. 27 SH基・S-S結合の定量値及び比率に与える酸化剤の影響

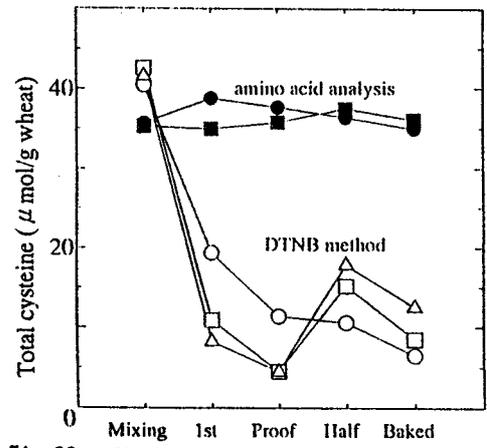


Fig. 28 Change of the amount of total cysteine. ●○, no addition; ■□, +bromate; △, +AsA

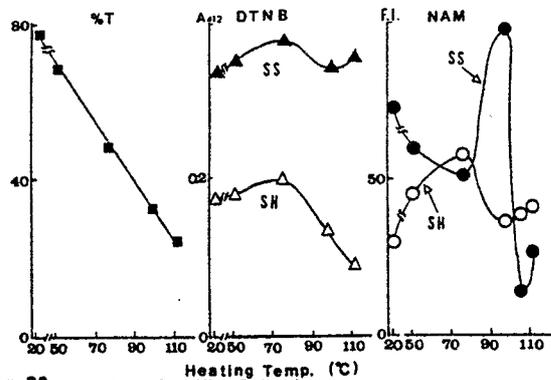


Fig. 29 Thiol and Disulfide Detrn. in Whey

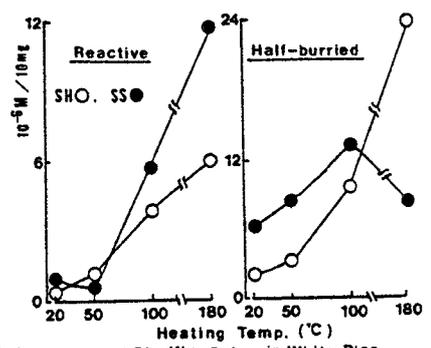


Fig. 3-7 Thiol and Disulfide Detrn. in White Rice

Table 6 ドウの物性に及ぼす酸化剤の影響とSH基の関与

酸化剤	無添加	KBrO ₃	アスコルビン酸
エキスツヅラム			
抗張力(BU)	540	700	880
伸張度(mm)	191	156	108
形状比	2.8	4.5	8.1
面積 (cm ²)	130	131	113
可溶性SH	7.8 (nmol/g)	7.3	4.2
低分子SH	7.8 (nmol/g)	6.5	4.2

Table 7 製パン工程中のSH, S-Sの変化 (μmol/g wheat)

Oxidant		Mixing	1st	Proof	Half baked	Bread
no add.	SH	3.8	0.3	1.6	0.4	1.0
	S-S	18.3	9.5	4.9	5.1	2.8
KBrO ₃	SH	3.6	0.8	1.7	0.5	1.3
	S-S	19.5	5.1	1.4	7.4	3.6
AsA	SH	2.5	0.6	2.4	0.8	1.8
	S-S	19.5	3.8	1.1	8.6	5.4

Table 8 アミノ酸分析結果 (μmol/g wheat)

Oxidant	performic acid treatment	Mixing	1st	Proof	Half baked	Bread
no add.	-	4.2	3.8	3.7	3.9	3.7
	+	35.7	38.8	37.7	36.4	35.0
KBrO ₃	-	3.6	3.5	3.7	3.8	3.6
	+	35.3	35.0	35.8	37.5	36.1
AsA	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.6
	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33.9

n.d.: not determined

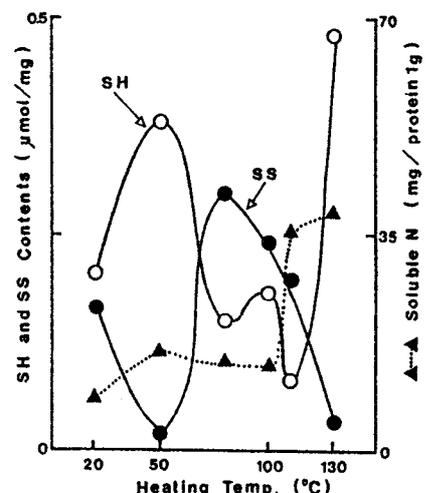


Fig. 30 Thiol and Disulfide Detrn. in Soybean Protein

論文審査結果要旨

食品中の含硫化合物は低分子では香気成分、味成分として、また高分子特にタンパク質ではその物理性に大きな影響を与えている。本論文はSH蛍光試薬であるN-9アクリジニルマレイミド (NAM) を用いて、(1)食品中の微量の低分子-SH, -S-S-化合物を定量する高感度で迅速な方法の開発、(2)水銀等の重金属と-SHとの反応機構を明らかにし、-SH結合型金属イオンの定量法の開発を行い、また、(3)高分子であるタンパク質中の-SH, -S-S-の分別定量法を開発し、これを食品の物理性の解析に応用したものである。

具体的には、低分子化合物としては大部分がグルタチオン及びシステインであることを明らかにした。分別定量では電気還元法を用い、-S-S-を-SHに還元し、-SHと-S-S-をそれぞれ別々に定量する方法を見出した。また、高分子であるタンパク質においては-SH基はNAMと反応する表面近くのものやペプチド鎖によりマスクされているものが存在するが、タンパク質をスブチロペプチダーゼを用いて加水分解し、すべての-SHを反応させる新しい定量法を確立した。また、酵素分解後、同様に電気還元し-S-S-を分別分析する方法も確立した。

これらの分析法をパンを中心とする小麦製品の物性変化の解析に応用し、各製造過程ごとに-S-S-, -SHとの関連を明らかにした。また、米、大豆、乳等の加熱変化変性に伴う-S-S-, -SHの変化等をも明らかにした。

本研究は食品化学、食品製造科学の発展に寄与することが大であり、審査員一同、本研究者に博士(農学)の学位を授与するものと認定した。