

(平成15年度)

脂質過酸化物のDough発酵促進作用とその機構

豊崎 俊 幸

(香蘭女子短期大学食物栄養学科教授)

1. はじめに

リポキシゲナーゼは、1z-4z —ペンタジエン構造を有する不飽和脂肪酸あるいは脂質に分子状態酸素を添加して過酸化物（以下、ヒドロペルオキシド）を生成させる。この酵素は一般に食品のOff-flavorの原因を誘発することはもちろんのこと、様々な悪影響を引き起こすことは既知の事実である¹⁻⁸⁾。さらにヒドロペルオキシドの分解物である様々な二次生成物は、食品分野あるいは生化学分野においてもヒドロペルオキシドと同様、デメリットを与える事実は古くから報告されている¹⁻⁸⁾。このように脂質過酸化反応により生成される様々な過酸化脂質はデメリットを与えることのみ取り扱われてきたのが現状である。しかし、古来より知られている伝統的な食品の中には脂質過酸化を誘発させることで美味さを引き出している食品、例えばソーメン、干物などがあることから、脂質過酸化反応により生成される過酸化脂質は食品分野においてはメリットとして作用している場合もあると考えられる。

著者は過酸化脂質がもつ性質を上手く利用することにより、食品のもつ性質をメリットに変えることができるものと考えた。今回はパン生地が発酵時にリポキシゲナーゼを添加すると、生地が発酵が促進される興味ある知見を得た。この現象は、脂質過酸化反応によって生成されるヒドロペルオキシドが発酵促進の引き金として作用することで、生地が発酵が促進されたものと考えられ

た。脂質過酸化反応により生成されるヒドロペルオキシドによってパン生地が発酵が促進された現象は、栄養学的に評価すると決して良いとは考えられないが、食品学的立場からこの現象を評価すると非常に好ましいものであると考える。そこで、本研究は脂質過酸化反応により生成されたヒドロペルオキシドによりパン生地が発酵促進作用について詳細に検討し、併せてこの現象がどのような機序で誘発されたものかを検討した結果、興味ある事実が得られたので報告する。

2. 実験方法

2.1 パンの調整

パン生地の調整に用いた小麦粉（強力粉）は市販されているものを用いた。また、添加した脂質はリノール酸（純度95%以上）を3%の割合で添加した。その他のパン製造に必要な材料はすべて市販されているものを用いた。リポキシゲナーゼはパン生地調整の最後に添加し、37℃、湿度75-80%での恒温装置内で一次発酵させた。発酵後、ガス抜きをし、10分のベンチタイム、90分の最終発酵後、200℃で12分焼成した。

2.2 グルテンとリノール酸とのモデル系の調整
一定量の市販グルテンとリノール酸を3%の割合で混合したモデル系を作成し、実験試料とした。この試料についてリポキシゲナーゼ誘発による発酵現象の実験を行った。

2.3 生地および焼成パン中のヒドロペルオキシドの測定

生地および焼成パン中のヒドロペルオキシドはMercierらの方法⁶⁾に準じて測定した。

2.4 Affinity Chromatographyによるグルテンの分離・精製

生地からのグルテン画分をAffinity Chromatographyを利用して分離・精製した。

2.5 タンパク質量の測定

Affinity Chromatographyによって分画された試料のタンパク質量はLowry法⁹⁾によって測定した。

2.6 SDS—ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmliの方法¹⁰⁾に準じて測定した。すなわちMini-Protein II Electrophoresis Cell (バイオラッド社製)を用いて、ゲル濃度の異なるレディーゲルJ 18mA/ゲルで電気泳動を行った。泳動後、クマシーブリリアントブルー R250を用いて染色した。また、Phast System全自動電気泳動装置を利用した。

2.7 焼成パンの物性試験

焼成パンの物性試験はレオメーターを用いて測定した。測定項目は硬さ、粘性および付着性を測定した。

2.8 生地の膨張率の測定

発酵にともなう生地の膨張率はメスシリンダーに一定量の生地を入れ、恒温庫内(温度30℃、湿度75%)で発酵させ、一定時間の膨張率を測定した。

2.9 官能検査

焼成したパンの官能検査を行った。方法はオープン法を利用し、パネリスト(女子学生)50名で行った。項目としては外観の良さ、香りの良さ、味の良さ、塩味の良さ、テクスチャーの良さ、硬さの良さおよび総合評価を行った。官能検査に関しては、パネリストの総合評価について試料間およびパネル間の判定に有意差があるかを二次元配置の分散分析法で検定した。

3. 結果および考察

3.1 発酵時における脂質過酸化とそれにとまなう膨張率の変化

パン調整材料の他に3%のリノール酸を添加した後、リポキシゲナーゼを添加した生地と無添加生地のそれぞれをミキサーで一定時間混合した。その後、恒温装置内で90分間一次発酵させ、経時的にヒドロペルオキシドの生成量を測定した。その結果を図1に示した。リポキシゲナーゼ誘発による脂質過酸化は発酵時間の進行とともに増加した。いっぽう、リポキシゲナーゼ無添加生地ではヒドロペルオキシドの生成量はほとんど増加傾向を示さなかった。その時の膨張率の割合を測定した結果を図2に示した。リポキシゲナーゼを添加した生地の場合、発酵開始から40分までは急激に膨張したが、その後膨張は急激に低下する傾向が確認された。いっぽう、リポキシゲナーゼ無添加の生地は発酵開始30分で最大の膨張率が確認され、その後、徐々に低下傾向が確認された。また

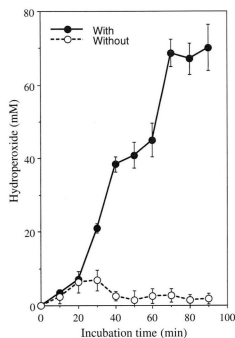


図1 リポキシゲナーゼ添加の有無による生地の発酵時にともなうヒドロペルオキシド生成量の変化

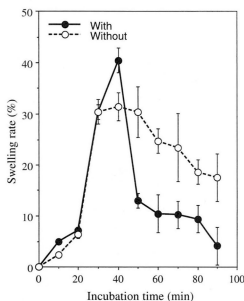


図2 リポキシゲナーゼ添加の有無による生地が発酵時にともなう生地の膨張率の変化

単位時間内での膨張率の変化はリポキシゲナーゼ添加生地と比較して少なかった。これらの現象変化は、脂質過酸化により生成されたヒドロペルオキシドが発酵段階で何らかの影響を及ぼしている可能性が高いものと推察された。

3.2 膨張率とヒドロペルオキシドとの関係

グルテンとリノール酸とのモデル系を作成して、生成されたヒドロペルオキシドが生地の発酵に関与しているのかを検討した。その結果を図3に示した。生地の膨張率はヒドロペルオキシドの濃度に影響され、本実験ではヒドロペルオキシド濃度30-40mMで膨張率が最大になった。この結果から、生成されるヒドロペルオキシドの濃度の高低により生地の発酵が左右されるものと推察された。

3.3 発酵時におけるイーストおよびグルテンの影響

生地の発酵は添加するイーストにより左右されることから、本実験でも添加するイーストの影響について検討した。図4に示したように、リポキシゲナーゼを添加した生地と無添加の場合とを比較すると、いずれもイースト2.0%までは発酵時間

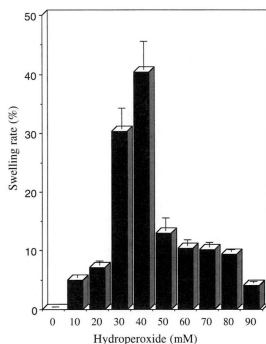


図3 リポキシゲナーゼ添加の有無による生地の膨張率に及ぼすヒドロペルオキシド量の影響

とともに膨張率も増加傾向を示したが、2.5%以上の膨張率の割合はほとんど変化なく、むしろ減少する傾向を示した。ただ、リポキシゲナーゼを添加した生地の膨張率は無添加生地よりも膨張率が増加傾向を示した。イーストと生成されたヒドロペルオキシドとの関係については詳細に検討しなかったことから今後検討する必要がある。

次にヒドロペルオキシド量の変化について検討し、その結果を図5に示した。リポキシゲナーゼを添加した生地の場合、イースト添加濃度1%で最大となり、イースト添加濃度が高くなるとともに、生成されるヒドロペルオキシド量も低下する傾向が観察された。この結果を図4の結果と照らし合わせて考察すると、生成されたヒドロペルオキシドとイーストとの間に何らかの関係があるものと推察されるが、詳しいことは今後の課題としたい。いっぽう、リポキシゲナーゼ無添加の場合、ヒドロペルオキシドはほとんど生成されていないが、図4の結果から、生成されるヒドロペルオキシドのみが生地の発酵に関与するものではな

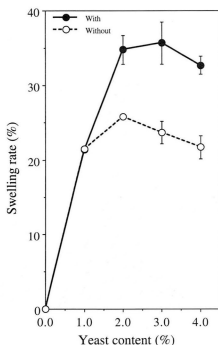


図4 リボキシゲナーゼ添加の有無による生地の影響率に及ぼすイースト量の影響

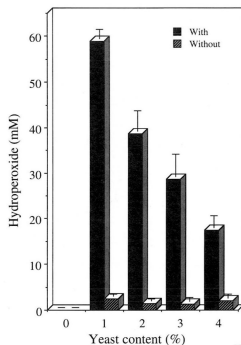


図5 リボキシゲナーゼ添加の有無による生地中に生成されるヒドロペルオキシド量に及ぼすイースト量の影響

いと考えられることから、生成されるヒドロペルオキシドはおそらくイーストの発酵機構に相乗的に関与しているものと推察される。

次にグルテン含有量の差が生地の発酵に関与しているものかを検討した。その結果を図6に示した。グルテン含有量40%から生地の影響率が始まり、60%濃度のグルテン含有量で影響率は最大となった。その後、徐々に影響率は減少する傾向を示した。リボキシゲナーゼを添加した生地の場合、60%のグルテン含有量で影響率は約35%であるが、リボキシゲナーゼ無添加の場合15%であったことから、ヒドロペルオキシドの存在の有無が影響率に影響を及ぼしているものと推察された。このことは生成されたヒドロペルオキシドが発酵促進的に作用しているものと考えられる。

3.4 グルテンとヒドロペルオキシドとの関係

生地が発酵にヒドロペルオキシドが促進的に関与することで、結果として生地の影響率が増加し、この現象が生地を焼成した場合に結果としてプラスに作用したのと考えられる。生地が発酵

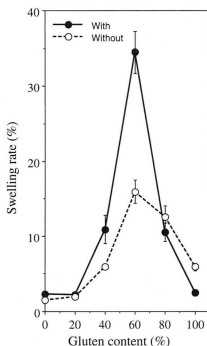


図6 リボキシゲナーゼ添加の有無による生地の影響率に及ぼすグルテン含有量の影響

時に生成されたヒドロペルオキシドがグルテンに対してどのような効果を有しているのかを検討するために、発酵終了後にグルテンをAffinity Chromatographyを利用して分離・精製を行い、最

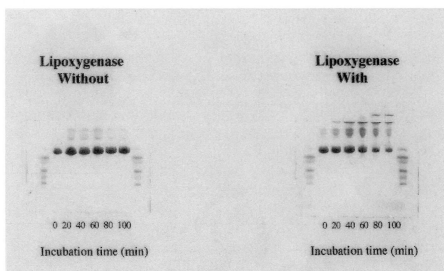


図7 リボキシゲナーゼ添加の有無による発酵生地から分離・精製したグルテンの分子量の変化

最終的にグルテン画分を得た。それらのグルテン画分についてSDS—ゲル電気泳動を行い、発酵段階でのグルテンとヒドロペルオキシドとの関係について検討した結果を図7に示した。リボキシゲナーゼ無添加生地の場合、発酵時間100分間のグルテンの分子量はほとんど変化は確認されなかった。いっぽう、リボキシゲナーゼ添加生地の場合、発酵とともにグルテンの分子量に変化が現れ、発酵とともにグルテンの高分子化が確認された。この現象は生成されたヒドロペルオキシドがグルテンに作用することで、変性を誘発している可能性が考えられる。図4および図5の結果と照らし合わせて考察すると、リボキシゲナーゼ添加により誘発されたヒドロペルオキシドがグルテンを変性させることで、グルテンのネットワークが強化され、その結果生地の膨張が増加したものと推察される。

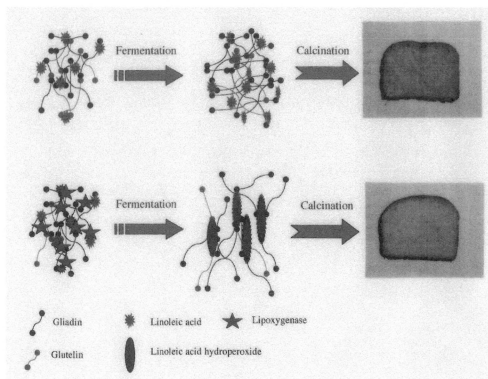
3.5 物性試験と官能検査

発酵、膨潤させた生地を焼成したものについて様々な物性試験を試みた。本実験ではパンの堅さ、粘着性および付着性について測定した(Data not shown)。パンの堅さについては、ヒドロペルオキシド量の増加とともに柔らかくなる傾向を示

した。粘着性については、ヒドロペルオキシド量の増加とともに高くなった。また、付着性についても粘着性と同様な結果が得られた。官能検査の結果、外観の良さ、香りの良さおよびテクスチャーの良さについて、脂質過酸化を誘発させたパンに高い有意差($p < 0.01$)が確認された。総合評価でも脂質過酸化を誘発させたパンに高い有意差($p < 0.05$)が確認された(Data not shown)。

3.6 ヒドロペルオキシドによる発酵促進の作用機序

これまでに得られた様々な実験結果を総合的に解析し、ヒドロペルオキシドによる発酵促進の作用機序をスキーム1に示した。グルテン形成にはグリアジンとグルテリンにより網目構造をとることで形成される。この際、ヒドロペルオキシド存在下ではグルテンとの架橋をとることで分子そのものが巨大化する。その結果、生地の発酵時に生成される炭酸ガスを多く取り込むことで膨張が促進されるものと考えられる。この現象が最終的に生地を焼成する際にメリットとして働き、テクスチャーを良くするものと考えられる。いっぽう、脂質過酸化がほとんど誘発されない場合、未酸化リノール酸はグルテンとの相互作用がなく、その



スキーム1 脂質過酸化物による発酵促進の作用機序

結果としてグルテンとの架橋が形成されず、焼成したパンのテクスチャーが悪くなるものと推察される。

4. ま と め

今回の研究で明らかとなったことは、少なくとも生地が発酵を行う場合、脂質過酸化を誘発させることで発酵状態のよい生地を作り出すことができることである。脂質過酸化の誘発については、今回はリポキシゲナーゼ誘発を利用して行ったが、他の方法で脂質過酸化を誘発させることでも同じような現象が起こるものと考えられる。いずれにしてもこの現象はパン製造におけるメリットとして考えられることができ、パン製造においては有効な手段として利用できるものと考えられる。また、焼成したパンの美味しさについては、今回の物性試験結果をもとにさらに詳細に検討する必要がある。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、多大なるご援助を賜りました浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に対し心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Ames, B. M., Shigena, K., Hagen, T. M., Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 7915-7922 (1993).
- 2) Gardner, H.W., Lipoxygenase as a versatile biocatalyst. *JAACS*, **73**, 1347 (1996).
- 3) Grosh, W., Reactions of hydroperoxides-products of low molecular weight, *Autoxidation of Unsaturated Lipids* (H. W.S Chan, ed.), Academic Press, London, (1987).
- 4) Pokorny, J., *Handbook of Food Preservation*, Antioxidant in Food Preservation, Marcel Dekker Inc., New York, (1999).
- 5) Shewfelt, R. L., Del Rosario, B. A., The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *Hort Sci*, **35**, 575-579 (2000).
- 6) Mercier, M., Gelinas, P., Effect of lipid oxidation on dough bleaching. *Cereal Chem.*, **78**, 36-38 (2001).
- 7) Toyosaki, T., Sakane, Y., Antioxidant effect of NaCl on

- the aqueous solution, emulsified and enzymic lipid peroxidation. *Bull. Soc. Sea Water Sci. Jpn.*, **56**, 10-16 (2002).
- 8) Toyosaki, T, Koketsu, M., Oxidative stability of silky fowl eggs. Comparison with hen eggs. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1328-1330 (2004).
- 9) Lowly, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 263-275 (1951).
- 10) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1979).

Reaction of the Fermentation on Dough with Lipid Peroxides and Its Mechanism

Toshiyuki Toyosaki

(Department of Foods and Nutrition, Koran Women's Junior College)

Lipoxygenase (linoleate: oxygen oxydoreductase, EC 1.13.11.12) is widely distributed in plants and animals, and catalyzes the dioxygenation of the *cis*, *cis*-1,4-penta-diene structure in fatty acids (eg linoleic and linolenic acids) and fatty acid esters by molecular oxygen. This enzyme has negative and positive effects on the quality of products from plant and animals origins. The lipoxygenase-mediated reaction contributes to the formation of off-flavor and decreases in nutritional value of food.

By the way, Lipid peroxide gives a demerit in a food field and a biochemistry field. However, lipid peroxide is considered that it may give a merit. For example, there are some and dried foods. In nutritional science, it is a demerit. However, in food study, it is a merit. The author checked the phenomenon in which the fermentation of dough was promoted by hydroperoxide generated by induction of lipoxygenase. The object of the current study was to investigate reaction of the fermentation on dough with lipid peroxides and its mechanism.

The results obtained were as follows; the fermentation of dough was promoted by lipoxygenase addition. The concentration of hydroperoxide made the rate of expansion the maximum by 30-40mM. The rate of expansion was made into the maximum at 1% of concentration of yeast at the dough with lipid peroxies. The rate of expansion became the maximum a 60% of gluten contents at the dough with lipid peroxides. Lipid peroxides in a fermentation stage denatured gluten. The rate of expansion became high because gluten denatured. The rheological properties and organoleptic evaluation were measured. Fermentation of dough with lipid peroxides showed hardly change in hardness and adhesion. In contrast, the fermentation of dough without lipid peroxides increased drastically a hardness of the bread and decreased an adhesion of the bread (data not shown). Organoleptic evaluation were showed high of comprehensive evaluation on the fermentation of dough with lipid peroxides (data not shown).

Mechanism of fermentation of dough with lipid peroxides was discussed. Gluten is formed of gliadin and glutelin. Gluten were denatured by hydroperoxide, which gluten molecule grows large. Fermentation is promoted by this phenomenon.

Having been clarified by this research is that the fermentation of cloth was promoted by hydroperoxide. I think that this phenomenon is made as for a big contribution to a food field.