

ライ小麦の発芽種子アミラーゼの性状解析ならびに 発芽ライ小麦味噌の開発

谷口（山田）亜樹子（管理栄養学科・准教授）

緒言

環境保全を踏まえた食糧生産、健康問題への取り組みが世界的に進む中、人口増加や食糧危機を乗り越える鍵となる作物として雑穀が世界の注目を集めている¹⁾。雑穀は土壌や気候条件などが不良な土地にも生産が可能であり、病気や害虫の害を受けにくく、安定した収穫が得られる²⁾。また、最近、アレルギーや成人病などの増加から食生活の改善が迫られており、雑穀は米、小麦に比べ、食物繊維とミネラルが非常に多く、良質のタンパク質と脂質が含まれ、栄養のバランスが優れていることから見直されている^{1), 3)}。しかし、米、麦、トウモロコシなどに比べ、雑穀に関する食品科学的な研究は少なく、これが雑穀の食品および加工原料としての利用拡大を妨げる要因のひとつとなっている。

ライ小麦は海外で注目されている雑穀のひとつであり、ライ麦と小麦を交配した雑穀で、現在食品加工の研究が進められ、海外では盛んに栽培されている⁴⁾。食品としてのライ小麦の価値は、リジン含量が通常的小麦の3倍高く、良質のタンパク質が多く、アミノ酸の組成が良いことである。日本人の主食である米はリジン含量が低く、栄養強化のためリジン添加やリジン含量の高いトウモロコシの複合食品などが開発されている⁵⁾。

本研究では、ライ小麦の加工利用および機能性食品への利用に関する研究の一環として、ライ小麦の発芽種子に関するアミラーゼを分離、精製し、その性状を明らかにし、ライ小麦の発芽生理とアミラーゼの性状との関係を検討した。さらに、発芽ライ小麦を用いて新規味噌の製造を行い、発芽ライ小麦味噌中のミネラル量、 γ -アミノ酪酸量、抗酸化活性量、ポリフェノール量に着目し、味噌の機能性について調べたので報告する。

方法

(1) ライ小麦の発芽種子アミラーゼの性状

試料はカナダ産ライ小麦 *X Triticosecale* WITTMACK の種子を用い、水に20時間浸漬後、20℃、暗所にて発芽させ実験に供した。

粗酵素の調製は、発芽種子重量に対し50倍容 McIlvaine 緩衝液 (pH5.5) を加え組織を破壊し、これを攪拌し酵素を抽出後、抽出液を硫酸塩析 (80%飽和) して沈殿画分を透析し、粗酵素液とした。アミラーゼ活性は基質に1%可溶性デンプン溶液を用い、Somogyi-Nelson 法⁶⁾にて生じた還元糖を定量し、1分間に1 μ molの還元糖を生成する酵素量を1単位とした。タンパク質はLowry法の改良法⁷⁾により定量した。

粗酵素の精製はDEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー、セファデックス G-100によるゲルクロマトグラフィーを用いた。分子量はゲル濾過法およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって測定し、等電点は電気泳動装置 (ロトフォア、バイオラット社製) を用いた⁸⁾。基質特異性は可溶性デンプン、アミロペクチン、アミロース (MW 2,900 および160,000)、プルラン、 α -および β -サイクロデキストリンの作用につ

いて検討した。分解生成物は0.2 %アミロース（MW 160,000）懸濁液に酵素を加え、40℃、24時間反応後の生成糖の薄層クロマトグラフィー⁹⁾にて検討した。

（2）ライ小麦味噌の製造および分析

味噌製造に用いたライ小麦は、水に3日間浸漬し、20℃、暗所にて発芽させ発芽ライ小麦とした。発芽ライ小麦3kgに種麹 *Aspergillus oryzae*（味噌用）を接種し製麹後、蒸煮大豆3kgおよび食塩1.2kgを混合、熟成し、ライ小麦発芽味噌とした。また、対照として未発芽ライ小麦についても同様に製麹し、ライ小麦未発芽味噌とした。

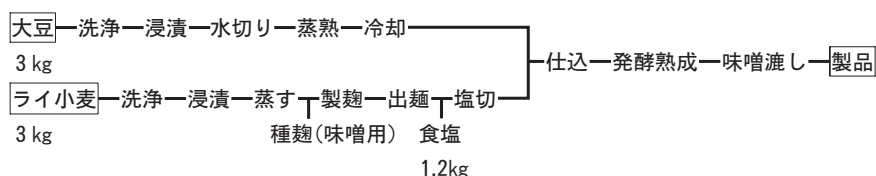


Fig. 1 ライ小麦味噌の製造法

味噌の一般成分は基準味噌分析法に従い¹⁰⁾、pH、水分（常圧加熱乾燥法）、灰分（550℃灰化法）、全窒素（ケルダール窒素法）、ホルモール窒素、水溶性窒素、酸度、食塩（モール法）、直接還元糖について測定した。味噌中の遊離アミノ酸量¹¹⁾はアミノ酸自動分析装置にて、カラムはイオン交換樹脂（4 mmI.D.×150mmL、カラム温度：35℃、流量：0.4 ml/min、試料注入量：10 μl）を使用した。ミネラル量は原子吸光分析法¹²⁾を用いて定量した。γ-アミノ酪酸量はHPLCによるアミノ酸分析法¹¹⁾により測定し、カラムはShimPack AMINO-Na（6mmI.D.×100mmL、移動相：20mM クエン酸・ナトリウム緩衝液 pH5.9、カラム温度：40℃、流量：0.4ml/min、試料注入量：10 μl）を用いた。抗酸化活性は分光光度計によるDPPHラジカル消去能の測定¹³⁾により検討した。ポリフェノール量の測定は、フォーリン・デニス法による比色定量法¹⁴⁾にて行った。

結果および考察

1. ライ小麦の発芽種子アミラーゼの性状

播種後、1週間のライ小麦種子の発芽状態とアミラーゼ活性の関係を調べたところ、活性はヒエ¹⁵⁾、アワ¹⁶⁾と同様に播種後2日目から著しく増加し、4日目では未発芽種子の約36倍の約 8×10^5 units/g 種子を示し、それ以降はほぼ同様の値だった。播種後4日目の発芽種子を用いて粗酵素液を調製し、DEAE-セルロースクロマトグラフィーに供した。アミラーゼ活性は未吸着画分、塩化ナトリウム濃度0.2Mおよび0.45M付近に溶出され、この3つの活性画分をさらにセファデックス G-100によるゲルクロマトグラフィーにて精製し、アミラーゼⅠ、アミラーゼⅡおよびアミラーゼⅢとしてその性状を検討した。

Table 1 ライ小麦発芽種子アミラーゼの性状

性状	アミラーゼ I	アミラーゼ II	アミラーゼ III
最適pH	pH5.5	pH5.0	pH5.0
最適温度	40℃	50℃	40℃
pH安定性	pH4.0-6.0	pH4.5-6.5	pH4.0-5.5
温度安定性	<50℃	<50℃	<50℃
分子量	MW62,000	MW56,000	MW52,000
等電点	pI7.2	pI5.5	pI5.0
基質特異性	デンプン、プルラン	デンプン、アミロペクチン	低分子アミロース
分解生成物	マルトース, テトラオース	マルトース	マルトース
阻害剤	Pb ²⁺ , Hg ²⁺ , PCMB	Ni ²⁺ , Hg ²⁺ , PCMB	Hg ²⁺ , PCMB

(1) pH および温度の影響

アミラーゼ I の最適 pH は pH5.5、アミラーゼ II および III は pH5.0 であった。pH 安定性は、アミラーゼ I は pH4.0～6.0、II は pH 4.5～6.5、III は pH 4.0～5.5 であった。アミラーゼ I および III の最適温度は40℃で、II の最適温度は50℃を示した。アミラーゼ I、II、III とともに50℃以下で安定であった。この性状は、オオムギ¹⁷⁾およびコムギ¹⁷⁾種子アミラーゼとアワ¹⁶⁾、ヒエ¹⁵⁾、キビ¹⁸⁾発芽種子アミラーゼと同様な性状を示した。

(2) 分子量および等電点

アミラーゼ I の分子量は62,000、II は56,000、III は52,000であった。アミラーゼ II の分子量はアワ¹⁶⁾、オオムギ¹⁷⁾およびモロコシ¹⁹⁾アミラーゼ (56,000) と同様な値であり、アミラーゼ III はコメ¹⁷⁾アミラーゼ (53,000) と同様の分子量を示した。等電点は、アミラーゼ I は pI 7.2、II は pI 5.5、III は pI 5.0 であった。

(3) 各種試薬の影響

アミラーゼ I、II および III は Hg²⁺ および PCMB によって活性が阻害され、ヒエ¹⁶⁾、アワ¹⁷⁾ および キビ¹⁹⁾ 発芽種子アミラーゼと同様、活性発現に SH 基が関与した。また、アミラーゼ II は Pb²⁺、アミラーゼ II は Ni²⁺ によって特に活性が低下した。

(4) 分解生成物

アミラーゼ II、III のデンプン分解生成物はマルトースのみが検出され、デンプンをマルトース単位に分解する β -アミラーゼと推察された。アミラーゼ I はマルトース、マルトテトラオースが検出された。

(5) 基質特異性

アミラーゼ I はプルランを特異的に分解し、アミラーゼ II は可溶性デンプンおよびアミロペクチンに対する分解活性が高く、アミラーゼ III は低分子アミロースに対する作用は分解性が最も高かった。キビ発芽種子アミラーゼ¹⁸⁾はプルランを分解し特殊な酵素と考えていたが、ライ小麦も同様な性状を示した。

2. ライ小麦味噌の熟成中の成分変化

味噌の分析は、ライ小麦発芽味噌および未発芽味噌について検討した。味噌熟成中の成分の経時的変化は、仕込み後直後、熟成1か月、2ヶ月、3ヶ月、4か月の5点で調べた。

(1) pHの経時変化 pHは両味噌ともにpH5.15から4か月後にはpH4.80と熟成するに従いpHは低下し酸性に傾いた。この結果から、熟成中に味噌原料が分解され、ペプチド、アミノ酸の生成、酸度が上昇していることが推察され、味噌の熟成が進んでいることが示唆された。特に熟成1か月から2か月にかけて、pHの低下がみられ、また若干、発芽味噌の方が、pHが低いことからペプチド、アミノ酸の生成が高いことが推察された。一般の米味噌に比べやや高かったが、これは味噌中にミネラルが多く、緩衝作用が働いていることが考えられた。

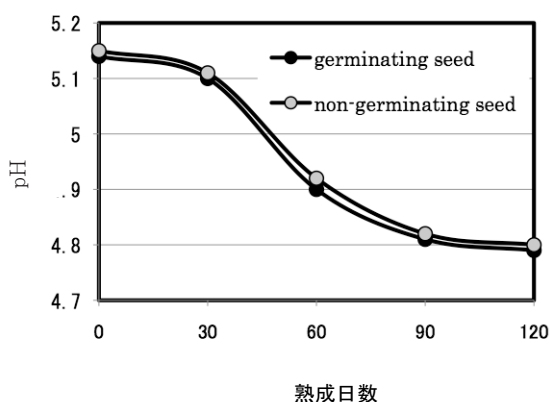


Fig.2 ライ小麦味噌熟成中のpHの経時変化

(2) ホルモン窒素量の経時変化 熟成が進むに従い、ホルモン窒素量は増加し、熟成4ヶ月後ではライ小麦発芽味噌は0.41%、未発芽味噌は0.27%と発芽味噌の方がホルモン窒素量は高く、熟成が進んでいることが確認された。この結果からタンパク質の分解が進み、低分子ペプチド、アミノ酸の増加が推察された。特にライ小麦発芽味噌はホルモン窒素量の上昇が確認され、熟成するに従い、増加する傾向がみられた。

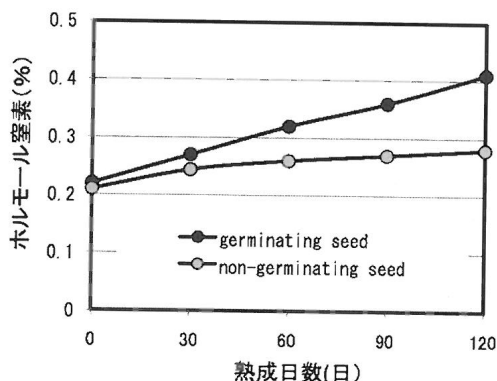


Fig. 3 ライ小麦味噌熟成中のホルモン窒素の経時変化

(3) 水溶性糖量の経時的变化 熟成1か月から2か月にかけて水溶性糖がやや多く分解され、低分子糖が生成されることが推察された。全糖量、還元糖量から、水溶性糖の平均重合度の変化を調べたところ、仕込み直後は糖の平均重合度は3.5前後であったが、熟成が進むに従い、低分子糖の生成がみられ、熟成4ヶ月後では2.2~2.1とマルトースの生成が増加していることが推察された。

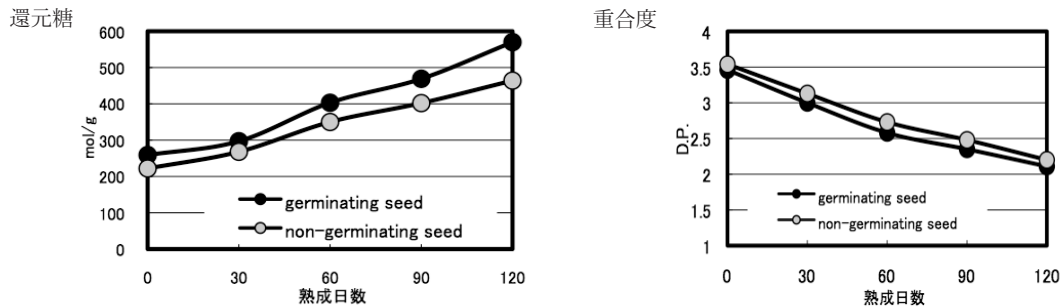


Fig.4 ライ小麦味噌熟成中の水溶性糖量の経時的变化

3. ライ小麦味噌の γ -アミノ酪酸量

γ -アミノ酪酸は、脳の血流や機能を高め、脳卒中後遺症の改善に有効であるとされ、近年注目されている。熟成するに従い、 γ -アミノ酪酸の生成は増加し、ライ小麦発芽味噌では4か月熟成後仕込み時の約1.8倍量となった。熟成後、ライ小麦発芽味噌では26mg/100g味噌、未発芽味噌は18.4mg/100g味噌とライ小麦発芽味噌は未発芽味噌の約1.4倍であった。ライ小麦発芽味噌の γ -アミノ酪酸含量は非常に高く、米味噌より約10倍高かった。この γ -アミノ酪酸含量は食品として非常に高い値であり、機能性として注目する値と考えた。

Table 2 ライ小麦味噌の γ -アミノ酪酸量
(mg/100g 味噌)

ライ小麦発芽味噌	ライ小麦未発芽味噌
26.0	18.4

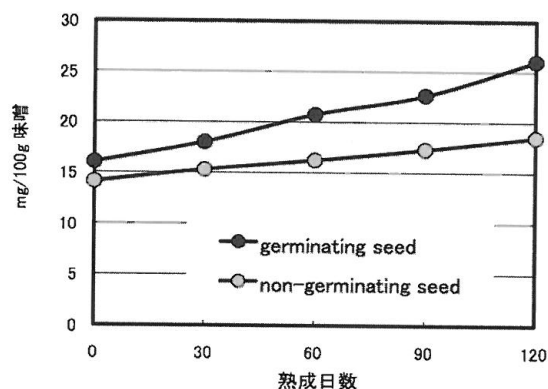


Fig. 5 ライ小麦味噌熟成中の γ -アミノ酪酸量の経時的变化

4. ライ小麦味噌の抗酸化活性量

最近、食品の機能性として、食品中の抗酸化活性が非常に注目されている。ライ小麦味噌は熟成に従い、抗酸化活性は増加し、100g中に各々0.149mol、0.146mol Troloxであった。この味噌の抗酸化活性は高く認められ、米味噌とほぼ同様に検出された。この結果から、ライ小麦味噌は抗酸化作用のある機能性の味噌であることが確認された。

Table 3 ライ小麦発芽味噌の抗酸化活性量（DPPHラジカル消去能）
（mol Trolox/100g 味噌）

ライ小麦発芽味噌	ライ小麦未発芽味噌
0.149	0.146

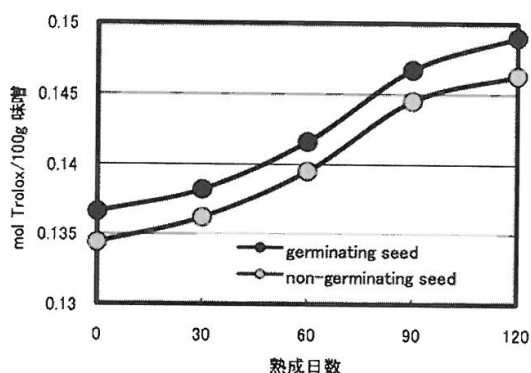


Fig. 6 ライ小麦味噌熟成中の抗酸化活性量の経時的変化

5. ライ小麦味噌のポリフェノール量

標準物質に没食子酸を用いて測定した結果、ライ小麦味噌100g中に発芽味噌は653mg、未発芽味噌は615mgと発芽味噌の方が、ポリフェノール量が多いことが確認された。この結果からも抗酸化作用が期待された。

Table 4 ライ小麦味噌のポリフェノール量
（mg/100g 味噌）

ライ小麦発芽味噌	ライ小麦未発芽味噌
653	615

6. ライ小麦味噌の遊離アミノ酸量

ライ小麦発芽味噌の遊離アミノ酸量は、米味噌に比べ遊離アミノ酸量が高く、特にグルタミン酸、アスパラギン酸およびアラニンが約1.5倍、プロリンは約2倍、リシンは約3倍多く検出された。グルタミン酸およびアスパラギン酸はうま味成分であり、このことからうま味の高い味噌であることが確認された。米味噌に比べてリシン含量が特に多いことから、特性の高い味噌となった。

Table 5 ライ小麦味噌の遊離アミノ酸量

(g/100g 味噌)

アミノ酸	ライ小麦発芽味噌	ライ小麦未発芽味噌
グルタミン酸	2.11	1.94
アスパラギン酸	1.44	1.24
アルギニン	0.90	0.85
ロイシン	0.88	0.84
リジン	0.72	0.71
アラニン	0.71	0.70
フェニルアラニン	0.68	0.61
プロリン	0.66	0.65
チロシン	0.54	0.52
イソロイシン	0.52	0.50
セリン	0.50	0.48
バリン	0.48	0.45
グリシン	0.48	0.38
スレオニン	0.44	0.38
グリシン	0.39	0.35
ヒスチジン	0.31	0.28
メチオニン	0.18	0.15
トリプトファン	0.09	0.08
シスチン	0.04	0.02

7. ライ小麦味噌のミネラル量

ミネラルは細胞や組織つくるのに必須であり、体の機能の維持や調節に必要な栄養素であるため、最近、注目されている。味噌のミネラル含量を比較したところ、ライ小麦発芽味噌、未発芽味噌ともに同じような値を示した。麦味噌に比べ、亜鉛、銅はやや低かったものの他のミネラルは約1.6倍高い値を示し、ミネラルも非常に豊富であり、機能性のある味噌であることが確認された。

Table 6 ライ小麦発芽味噌のミネラル量

(mg/100g 味噌)

アミノ酸	ライ小麦発芽味噌	ライ小麦未発芽味噌
ナトリウム	3780	3610
カリウム	552	483
カルシウム	119	115
マグネシウム	86	81
リン	188	165
鉄	3.7	3.3
亜鉛	0.8	0.4
銅	0.30	0.29

8. ライ小麦味噌の一般成分

全窒素量は、ライ小麦発芽味噌は2.05%、未発芽味噌は1.87%と発芽味噌のほうが全窒素量は高い値を示した。水溶性タンパク質は各々1.08%、0.6%であり、ライ小麦発芽味噌は未発芽味噌の1.8倍高い値を示した。ライ小麦発芽味噌のタンパク溶解率は52.7%であり、これは一般の味噌（50%前後）に比べ高い値を示し、水溶性タンパク質の比が多いことから、栄養価の高い味噌であることが考えられた。タンパク質分解は20%で、アミノ酸およびペプチドが多く、熟成率が高いことが推察された。全糖および還元糖も多く、糖の分解も進んでいることが推察された。酸度Ⅰ、Ⅱともに発芽味噌の値が高く、この結果から有機酸およびアミノ酸（リシン、アルギニンなど塩基性アミノ酸）、ペプチドの含有量が高いことが推察された。ライ小麦発芽味噌は若干淡く、きれいなキツネ色を示し照りがあり、香りは強く甘い香りがあった。味は濃く、うま味とまろやかな味が感じられ、味のバランスがよく全体的な総合評価は高い味噌となった。

Table 7 ライ小麦味噌の一般成分

	ライ小麦発芽味噌	ライ小麦未発芽味噌
全窒素量 (%)	2.05	1.87
水溶性窒素量 (%)	1.08	0.60
ホルモール窒素 (%)	0.41	0.27
タンパク溶解率 (%)	52.7	32.1
タンパク分解率 (%)	20.0	14.4
全糖量 (%)	28.8	27.5
直接還元糖 (%)	16.9	15.4
pH	4.79	4.80
酸度Ⅰ (ml)	9.5	7.5
酸度Ⅱ (ml)	10.2	9.1
食塩 (%)	14.5	13.2
水分 (%)	9.6	9.2
灰分 (%)	12.6	12.4

要約

ライ小麦発芽種子からアミラーゼを抽出し、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー、セファデックス G-100 によるゲルクロマトグラフィーにて精製を行い、アミラーゼⅠ、Ⅱ、Ⅲの3種類のアミラーゼを得た。アミラーゼⅠの分子量は62,000、Ⅱは56,000、Ⅲは52,000であり、等電点は各々pI7.2、pI5.5、pI5.0であった。3種のアミラーゼは Hg^{2+} および PCMB によって活性が阻害され、SH 酵素であり、また、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} によっても阻害された。分解生成物からアミラーゼⅡ、Ⅲは β -アミラーゼであり、アミラーゼⅡはアミロペクチンに、アミラーゼⅢは低分子量のアミロースによく作用した。アミラーゼⅠはプルランを分解した。ライ小麦は米に比べ、アミラーゼ活性量が高く、加工、調理過程での食味形成に対する酵素作用の影響が大きいことが考えられた。この結果よりライ小麦発芽種子の機能性食品への利用、応用が考えられ、さらにライ小麦味噌の製造を行っ

た。

ライ小麦味噌を4カ月熟成させ全窒素量および水溶性窒素量を測定したところ、ライ小麦発芽味噌は2.05%および1.08%、未発芽味噌は1.87%および0.60%とライ小麦発芽味噌の方がタンパク溶解率は高かった。ホルモール窒素量は各々0.41%、0.27%とタンパク分解率はライ小麦未発芽味噌より発芽味噌の方が高かった。また、味噌中の γ -アミノ酪酸量を定量した結果、熟成が進むに従い γ -アミノ酪酸量は増加し、4か月熟成後約1.8倍量となった。さらに、味噌熟成中の抗酸化活性を調べた結果、熟成が進むに従い抗酸化活性量は増加し、4か月熟成後約1.3倍となった。ライ小麦発芽味噌はアミノ酸およびミネラル含量も高く、栄養価が優れていた。発芽ライ小麦を味噌の原料に用いることにより、アミノ酸およびミネラルが豊富で、 γ -アミノ酪酸含量の高い、抗酸化作用の優れた機能性の高い味噌が製造できることが確認された。

引用文献

- 1) 小原哲二郎：雑穀 その科学と利用、1-8、樹村房、1981.
- 2) 吉沢典夫：雑穀づくり方・生かし方、22-41、ライスシード・ネットワーク編、創森社、2001.
- 3) 嘉田良平：雑穀が未来をつくる、14-56、国際雑穀食フォーラム編、創森社、2001.
- 4) P.J.Bebeli: Multivariate Statistical Analysis of the Effects of Rye Telomeric Heterochromatin on the Agronomic Traits of Hexaploid Triticale. *Breeding Science*, 45, 151-156, 1995.
- 5) 小原哲二郎：雑穀 その科学と利用、352-390、樹村房、1981.
- 6) 福井作蔵：還元糖の定量法、50752、学会出版センター、1991.
- 7) HATREE E.F : Determination of protein. *Anal.Biochem.*, 48, 422-427, 1972.
- 8) PETRASH M.and EGEN N : Separation of Aldose- Reductase Isoelectric Forms Using the Rotofor Cell. Bio-Rad Laboratories、 Bulletin 1539、 1989.
- 9) 友田正司：糖質実験法、蛋白・核酸・酵素編集部編、27738、共立出版、1968.
- 10) 全国味噌技術会：新・みそ技術ハンドブック 基礎みそ分析法、1-53、2006.
- 11) 菅原龍幸：新食品分析ハンドブック43-56、建帛社、2000.
- 12) 文部科学省 科学技術学術審査会：五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル36-53、2005.
- 13) 須田郁夫：食品機能研究法、218-220、光琳、2000.
- 14) 津志田藤二郎：食品機能研究法、318-322、光琳、2000.
- 15) 山田亜樹子、高野克己、鴨居郁三：ヒエ発芽種子アミラーゼの精製ならびに性状について、東農大農学集報、37、173-180、1994.
- 16) 山田亜樹子、高野克己、鴨居郁三：アワ発芽種子アミラーゼの精製ならびに性状について、東農大農学集報、39、72-78、1992.
- 17) SHINKE R. : The Amylase Research Society of Japan、 Pergamon Press、 83-87、 1988.
- 18) 谷口（山田）亜樹子：キビ (*Panicum miliaceum*, L.) 発芽種子アミラーゼの精製ならびに性状について、東農大農学集報、45、331-339、2000.
- 19) 上田誠之助：澱粉科学ハンドブック、91-114、朝倉書店、1977.