

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

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雑穀が見直されている。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。近年、発芽した種子は、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 γ -アミノ酪酸（ギャバ）が増大することが明らかにされ、新たな機能として注目されている。

本年度は、雑穀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、ライ小麦の発芽とアミラーゼ活性の発現の関係を調べ、さらに発芽種子のアミラーゼを分離、精製を行い、その性状を明らかにした。

来年度（平成22年度）は、発芽ライ小麦中の γ -アミノ酪酸量と発芽条件との関係を検討するとともに、抗酸化機能の挙動を明らかにし、ライ小麦の機能性について検討を行う。さらに、発芽ライ小麦および未発芽ライ小麦を用いて味噌の製造を行い、新規味噌の製造を行う。発芽ライ小麦の味噌中のミネラル量、 γ -アミノ酪酸量、ポリフェノール量などを測定し、味噌の機能性について調べる。

方法

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

粗酵素の調製は各発芽種子重量に対し50倍容の0.1M McIlvaine 緩衝液（pH5.5）を加え、ホモゲナイザー（10,000rpm、3分間、4℃）にて組織を破壊し、これを4℃で1時間攪拌し、酵素を抽出した。抽出液を硫酸塩析（80%飽和）し、沈殿画分を20mM McIlvaine 緩衝液に溶解、透析して粗酵素液とした。

アミラーゼ活性は酵素液0.5mlに1%可溶性デンプン溶液0.5mlを加え、40℃で10分間の反応を行った後、Somogyi-Nelson 法¹⁾にて生じた還元糖を定量して求めた。なお、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²⁾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を用いた。分子量は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³⁾。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（分子量2,900および160,000）、プルラン、 α -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スポットにて検討した。

結果および考察

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⁴⁾、アワ⁵⁾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 $8 \times 10^5 \text{units/g}$ 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 (Fig. 1)。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 つの活性画分をアミラーゼ a、アミラーゼ b およびアミラーゼ c とし、その性状を検討した。比活性は抽出液に比べアミラーゼ a は約 29 倍、アミラーゼ b は約 45 倍、アミラーゼ c は約 427 倍に上昇した (Table 1)。

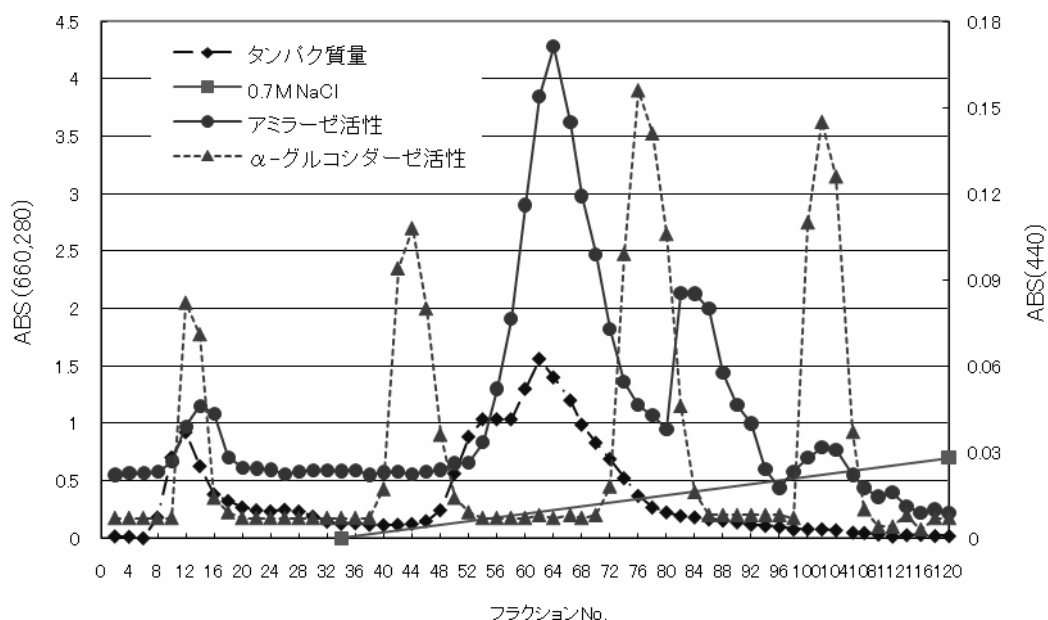


Fig. 1 発芽ライ小麦種子酵素の DEAE-セルロースクロマトグラフィー

Table 1 発芽ライ小麦種子酵素の精製段階表

段階	タンパク質量 (mg)	全活性量 (units)	比活性 (units/mg)	収率 (fold)	回収率 (%)
抽出液	54969.40	886.67×10^3	16.13	1	100
粗酵素液	24460.07	188.41×10^3	7.70	0.48	21.25
a 画分	5.00	2.37×10^3	473.86	29.38	0.26
b 画分	17.74	12.95×10^3	730.27	45.27	1.46
c 画分	0.68	4.69×10^3	6894.47	427.43	0.53

フラクション No. : a 画分 No.10~20、b 画分 No.52~76、c 画分 No.84~90

精製酵素の性状

pH の影響 アミラーゼ a の最適 pH は pH5.5、アミラーゼ b および c は pH5.0 であり (Fig. 2)、オオムギ麦芽およびコムギの β -アミラーゼ⁶⁾とアワ発芽種子アミラーゼ (pH

5.5、pH5.0)⁵⁾ キビ発芽種子アミラーゼ (pH5.5、pH5.0)⁷⁾ と同様であった。pH 安定性は、アミラーゼ a は pH4~6、b は pH 4.5~6.5、c は pH 4.0~5.5 であった。

温度の影響 アミラーゼ a および c の最適温度は40℃で、ヒエ⁴⁾およびアワ⁵⁾発芽種子β-アミラーゼ (40℃) と同じであった。アミラーゼ b の最適温度は50℃を示し、ヒエ発芽種子α-アミラーゼ (50℃)⁴⁾ と同じであった (Fig. 3)。アミラーゼ a、b、c ともに50℃以下で安定であった。

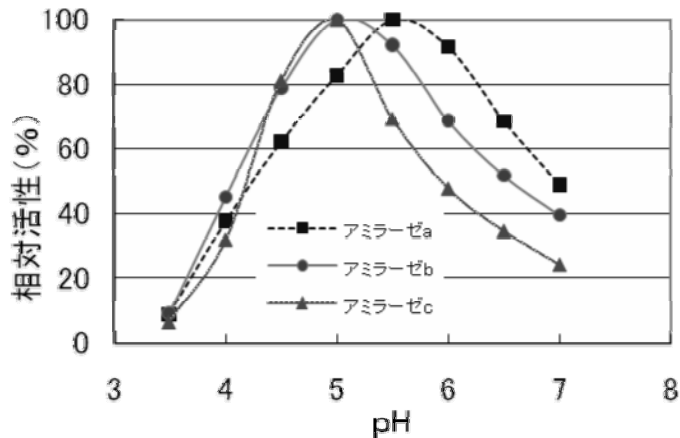


Fig. 2 発芽ライ小麦種子酵素の最適 pH

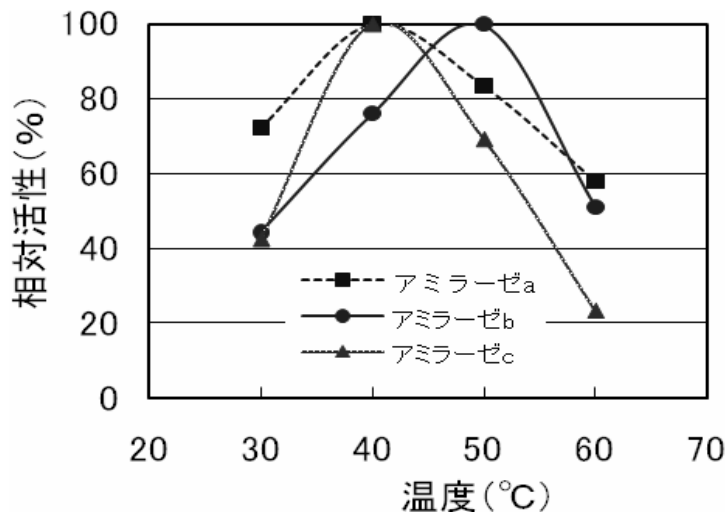


Fig. 3 発芽ライ小麦種子酵素の最適温度

分子量 3種のアミラーゼの分子量を測定したところ、アミラーゼ a は62,000、b は56,000、c は52,000であった。アミラーゼ b の分子量はアワ発芽種子β-アミラーゼ (56,000)⁵⁾、オオムギ麦芽β-アミラーゼ (56,000)⁸⁾、モロコシβ-アミラーゼ (55,950)⁸⁾ と同様な値であり、アミラーゼ c はコメβ-アミラーゼ (53,000)⁹⁾ と同様の分子量を示した。

等電点 等電点電気泳動法にて測定した結果、アミラーゼ a の等電点は7.2、b は5.5、c は

5.0であり、オオムギ麦芽 β -アミラーゼ (pI6.0)⁸⁾ および小麦 β -アミラーゼ (pI6.0)⁸⁾ に比べアミラーゼ a はアルカリ側であり、b、c は酸性側であった。また、b、c はそれぞれアワ β -アミラーゼ (pI5.4)⁵⁾、ヒエ β -アミラーゼ (pI 4.8)⁴⁾ の等電点と同様な値であった。

各種試薬の影響 アミラーゼ a、b および c は Hg^{2+} 、モノヨード酢酸および PCMB によって活性が阻害され、ヒエ⁵⁾、アワ⁶⁾ およびキビ⁷⁾ 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、3 種のアミラーゼは Ni^{2+} および Cd^{2+} によって阻害され、さらにアミラーゼ a、b は Pb^{2+} 、アミラーゼ b、c は Zn^{2+} によって活性が低下し、活性に対する金属の影響にやや相異がみられた (Table 2)。

Table 2 発芽ライ小麦種子酵素の各種試薬の影響

各種試薬 (1mM)	アミラーゼ a (%)	アミラーゼ b (%)	アミラーゼ c (%)
None	100	100	100
CaCl_2	115	106	111
KCl	100	92	100
ZnCl_2	100	20	15
AlCl_3	98	68	90
MgCl	91	100	95
CuCl_2	18	95	74
NiCl_2	15	5	28
CdCl_2	10	20	10
PbCl_2	0	38	100
HgCl_2	0	0	0
CH_2ICOOH	41	24	32
PCMB	19	7	0
EDTA	23	100	46

分解生成物 アミラーゼ b、c ではヒエ⁴⁾ およびアワ⁵⁾ の場合と同様にマルトースのみが検出され、分解様式からアミラーゼ b、c は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 a はマルトース、マルトテトラオースの他、グルコースが検出され、アミラーゼ a は α -アミラーゼとグルコシダーゼの性質を持つことが確認された。

基質特異性 アミラーゼ a はプルランを特異的に分解し、可溶性デンプン分解に比べ約 1.5 倍の活性がみられた。アミラーゼ b 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、低分子量アミロース (分子量 2,900) に対する分解はその約 1/2 であった。アミラーゼ c は低分子量アミロースに対する作用は分解性が最も高く、可溶性デンプンおよびアミロペクチンの 3.2 倍であった。キビ発芽種子アミラーゼ⁷⁾ はプルランを分解し特殊な酵素と考えていたが、ライ小麦のアミラーゼ a もプルランを分解し、ヒエおよびアワのアミラーゼと基質認識に相違が示唆された。3 種ともに α -サイクロデキストリンの環状オリゴ糖に対する分解はみられず、各アミラーゼは非還元末端を認識し、基質を分解

するものと推察された (Table 3)。

Table 3 発芽ライ小麦種子酵素の基質特異性 (%)

各種基質	アミラーゼ a	アミラーゼ b	アミラーゼ c
デンプン	100	100	100
アミロペクチン	35	98	108
アミロース (M.W.2,900)	10	53	320
アミロース (M.W.160,000)	55	35	35
プルラン	148	0	0
α -シクロデキストリン	0	0	0

要約

ライ小麦発芽種子からアミラーゼを抽出し、イオン交換クロマトグラフィーにて精製を行い、アミラーゼ a、アミラーゼ b およびアミラーゼ c の 3 種類の精製酵素を得た。

アミラーゼ a、b および c の最適 pH は、a は pH 5.5 であり、b、c は pH 5.0 であり、その活性はアミラーゼ a は pH 4~6、b は pH 4.5~6.5、c は pH 4.0~5.5 で安定であった。最適温度はアミラーゼ a および c は 40℃、b は 50℃ であり、それぞれ 50℃ で 30 分間まで安定であった。分子量を測定したところ、アミラーゼ a は 62,000、b は 56,000、c は 52,000 であり、等電点は各々、アミラーゼ a は 7.2、b は 5.5、c は 5.0 であった。3 種のアミラーゼは Hg^{2+} 、モノヨード酢酸および PCMB によって活性が阻害され、SH 酵素であり、また、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} によっても阻害された。分解生成物からアミラーゼ b、c は β -アミラーゼであり、アミラーゼ b はアミロペクチンに、アミラーゼ c は低分子量のアミロースによく作用した。アミラーゼ a はプルランを分解した。3 種とも環状オリゴ糖には全く作用しなかった。

雑穀は米に比べ、アミラーゼ活性量が高いことから、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。この結果より発芽雑穀の機能性食品への利用、応用が考えられた。

文献

- 1) 福井作蔵：還元糖の定量法、50-52、学会出版センター、1991.
- 2) HATREE E.F：Determination of protein. Anal.Biochem., 48、422-427、1972.
- 3) PETRASH M.and EGEN N：Separation of Aldose-Reductase Isoelectric Forms Using the Rotoform Cell. Bio-Rad Laboratories, Bulletin 1539、1989.
- 4) 山田亜樹子、高野克己、鴨居郁三：東農大農学集報、37、173-180、1994.
- 5) 山田亜樹子、高野克己、鴨居郁三：東農大農学集報、39、72-78、1992.
- 6) SHINKE R.：The Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press, 83787、1988.
- 7) 谷口 (山田) 亜樹子、高野克己、鴨居郁三：東農大農学集報、45、331-339、2000.
- 8) SHINKE R.：Handbook of Amylase and Enzymes, The Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press, 83-87、1988.
- 9) 上田誠之助：澱粉科学ハンドブック (中村道徳、鈴木繁雄編集)、朝倉書店 (東京)、91-114、1977.