

雑穀種子タンパク質の性質と乳酸菌飲料への利用

小浜 恵子*、大澤 純也*、西澤 直行**

アワやキビなどの雑穀類は近年再評価されている。本報告ではHDL（善玉コレステロール）上昇効果を有する雑穀タンパク質の解析と利用方法を検討した。Landry-Moureaux の溶媒抽出法により得られた蛋白質5画分のうち、プロラミン画分は全タンパク質の60~80%を占めていた。SDS-PAGEによりアワ及びキビプロラミンを分画したところ、Glx、Ala、Leuがそれぞれ15%以上を占めるポリペプチドとMet、Pro含量の高いポリペプチドで構成されており、トウモロコシゼインと相似性を有することがわかった。また、雑穀タンパク質の有効な利用方法として乳酸菌で醗酵を試みたところ、供試菌株中では、*Streptococcus thermophilus* (IFO 13957)をスターターとした場合にpHが4以下まで低下し、風味も優れていた。

キーワード：アワ、キビ、プロラミン、乳酸菌飲料

Characterization of Millet Proteins and Making Lactic Acid Beverage

KOHAMA Keiko, OHSAWA Junya and NISHIZAWA Naoyuki

We have previously reported that millet dietary protein elevated the plasma levels of HDL cholesterol in rats. In this study, we examined the composition of the polypeptides of millets protein to determine if the structure of millets protein may lead to an explanation of the effects of these grains. The proteins extracted from foxtail and proso millets were 64.1% and 80.0% prolamin, respectively. The polypeptides of the prolamins were classified into two groups. The major polypeptides of 27-19 kDa were rich in leucine and alanine, whereas the 17-14 kDa polypeptides were rich in methionine and proline. These results showed that the major polypeptides of prolamin were homologous to zein. We also investigated making a lactic acid beverage by using millets protein in fermentation. Three lactic acid bacteria were used, *Streptococcus thermophilus* (IFO13957) was a suitable strain under our condition.

key words : millet, prolamins, lactic beverage

1 緒 言

雑穀類（アワ、キビ、ヒエなど）はアジア、アフリカなどにおける重要な食糧源であるが、日本では食品として長い間評価されず伝統食として栽培されるのみであった。しかし最近、アレルギー患者の代替食としての需要が増加し、食の健康志向もあり、国産雑穀の生産量の約半数を占める岩手県の雑穀が首都圏の健康食業者や給食関係者に買い付けられるようになっている。雑穀類のタンパク質はHDL（善玉コレステロール）の上昇効果を

持ち、機能性素材としても注目されている^{1,2)}。しかし、雑穀タンパク質の構成成分についてはほとんど明らかにされておらず、何によって脂質代謝が変化するか判っていない。そこで、本研究では、機能性成分を明らかにし品種の評価・分類にも利用可能との観点から最初にタンパク質の構成成分を調べた。また、雑穀タンパク質の有効な利用方法として乳酸菌をスターターとし、雑穀粉をα-アミラーゼにより液化させてヨーグルト及び乳酸菌飲料の作成を試みたので報告する。

* 応用生物部

** 岩手大学農学部農業生命科学科

2 実験方法

2-1 雑穀タンパク質の解析

1) 雑穀試料

各種の雑穀は平成9年に岩手県農業研究センター県北農業研究所で栽培されたものを用いた。脱穀し精白した穀粒をミルで粉碎し、80メッシュのふるいにかけ、*n*-ブタノールで数回脱脂した後、風乾して用いた。

2) タンパク質の分離

Landry-Maureax による溶媒分画³⁾に基づき、5画分のタンパク質として抽出した。(I)0.5M NaCl 溶液、次に水を加えて抽出して得られた水溶性画分を透析脱塩した後、凍結乾燥してアルブミン・グロブリン画分とした。(II)残査に70% (V/V) イソプロパノールを加えてアワは室温、キビは60℃で抽出しこの画分を減圧乾固して true prolamin 画分とした。(III) 残査に0.6%のメルカプトエタノール(2-ME)を含む70%イソプロパノールを加えて抽出したものを prolamin-like 画分とした。(IV) 残査に0.6% 2-MEを含む0.1M ホウ酸緩衝液(pH 10)を同容量加えて室温で抽出し、透析、凍結乾燥して glutelin-like 画分とした。(V) (IV)の抽出で用いた緩衝液に SDS を0.5%となるように加えて室温で (IV) の残査を抽出した後、透析・凍結乾燥して true-glutelin 画分とした。それぞれの画分の窒素含量はマイクロケルダール法による自動分析機(Kieltec 1035、Tecator 社製)で測定した。

3) SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli⁴⁾の方法により、15%アクリルアミドゲル(Pharmacia Biotech 社製)を用いて実施した。試料はあらかじめ、0.6% ジチオスライトール(DTT)により還元処理を実施あるいは処理しないものを用いた。

4) アミノ酸組成分析

タンパク質の加水分解は常法に従い減圧下に封管し、6N 塩酸を用いて110℃、20 hr 行った。SDS-PAGE で分離したポリペプチドはメンブレン(Immobilon -P, Millipore 社製)にブロットングし、膜上で気相による塩酸加水分解を実施した。加水分解終了後、30%(V/V)メタノール-0.1N 塩酸にて膜から抽出し、試料とし

た。アミノ酸の定量は Pico-Tag (Waters 社製)を用いて実施した。

2-2 ヨーグルト及び乳酸菌飲料の試作

1) 雑穀試料及び供試乳酸菌

雑穀は平成11年に岩手県農業研究センター県北農業研究所で栽培された、もちアワ(大槌10)、もちキビ(釜石16)、ヒエ(達磨)を用いた。脱穀し精白した穀粒をミルで粉碎し、80メッシュのふるいにかけ雑穀粉とした。乳酸菌は(財)醗酵研究所(IF0)から入手した *Lactobacillus casei* subsp. *casei*(15833)、*Lactobacillus plantarum*(3070)、*Streptococcus thermophilus*(13957)を用いた。

2) 乳酸菌醗酵製品の製造方法

乳酸菌は *Lactobacilli* MRS 培地(Difco)100mlに植菌し、37℃、24時間静地培養した後、生理食塩水で3回遠心洗浄(4,000rpm 10分)後、10mlとしスターターとした。雑穀粉(ヒエ、キビ、アワ)10g、脱脂粉乳5g、グルコース2gに水を50ml加えた溶液、または雑穀粉15gとし脱脂粉乳を無添加とした溶液を100℃に加熱後、60℃に温度を下げてα-アミラーゼ(ラクターゼSR-40、洛東化成工業社製)を2mg添加し、一晚液化させた。スターターを1ml添加後37℃24時間醗酵させた。試作品中の乳酸菌数はBCP寒天培地(日水製薬(株)製)にプレーティングして求めた。

3 結果

3-1 雑穀タンパク質の構成

True prolamin の抽出はアワは室温で、キビ及びヒエは60℃に加熱したイソプロパノールで実施した。室温で抽出した場合のキビとヒエは全タンパク質のそれぞれ16及び23%しか回収できなかった。得られたタンパク質組成を表1に示す。ヒエは60℃で加熱抽出しても全タンパク質の回収率があまり改善されず39.7%であった。アワ及びキビの種子タンパク質中ではプロラミン画分(true prolamin+ prolamin-like protein)が大半でありそれぞれ64.1、80.0%を占めた。ヒエは回収率が低いが、抽出されたタンパク質中の割合はプロラミン画分が43%と最も多かった。

表1 雑穀タンパク質の組成

雑穀	%種子中 タンパク質	タンパク質画分 (%総タンパク質)					回収率%
		albumin globulin	true prolamin	prolamin like	glutelin like	true glutelin	
アワ	10.9	4.9	56.5	7.6	2.2	10.8	82.0
キビ	11.5	3.6	79.0	1.0	1.9	10.2	95.7
ヒエ	9.9	5.0	17.2	7.0	1.7	8.8	39.7

3-2 プロラミンポリペプチド構成

図1-Aはアワとキビの true prolamin, prolamin-like 画分を SDS-PAGE によって分離し、構成するポリペプチドを調べたものである。アワの true prolamin は14、19、22-23、27 kDa の主なポリペプチドから構成されており（レーン1）キビプロラミンは主に24、17、14 kDa のポリペプチドから構成されていた（レーン3）。アワ、キビともに prolamin-like 画分の構成は true prolamin とほとんど同じであるが、高分子領域に異なるバンドが見られた（レーン2、4）。true prolamin をあらかじめ還元処理を行わずに SDS-PAGE によって分離したのが図1-Bである。還元処理された試料では前述のようなポリペプチドが確認されたが、非還元サンプルでは高分子領域にそのホモオリゴマーの分子量の位置のバンドが明確に見られた。

3-3 ポリペプチドのアミノ酸組成

SDS-PAGE で分離した true prolamin 画分のポリペプチドのアミノ酸組成を図2に示した。アワ、キビともに組成の特徴によって2つのグループに分類できた。1つはプロラミンの主成分であるアワ：27、22-23、19 kDa 及びキビ：24kDa ポリペプチドであり、ロイシン、アラニンが非常に多く総プロラミンにおけるこれらアミノ酸の割合の高さを反映するものである（グループA）。もうひとつのグループは、アワ：14 kDa、キビ：17、14 kDa のポリペプチドであり、プロリン、メチオニン、シスチニンに富むものであった（グループB）。

3-4 乳酸菌による醗酵

今回の条件下では供試菌株中、*Streptococcus thermophilus* (IFO13957) を用いた場合にpHが4以下まで低下し、カードを形成して風味にも優れていた（図3）。また雑穀粉15gとして脱脂粉乳無添加とした場合も同様であり、それぞれの試作品中の乳酸菌数は 10^7 /ml以上であり乳酸菌飲料として充分であった。

4 考察

アワプロラミンとキビプロラミンは70%イソプロパノールでの抽出率が異なった。70%アルコールではプロラミンの一部はほとんど抽出されないと言われており、これらはグルテリン態に分類されてきた³⁾。アワはアルコール可溶性のプロラミンが主成分であり、一方キビ、ヒエはグルテリン態が主成分との報告もある⁹⁾。しかし、同一のポリペプチドであっても貯蔵条件により溶媒に対する溶解性が変わる。プロラミンポリペプチドが生合成され貯蔵部位に沈着した後、周囲のポリペプチドとの相

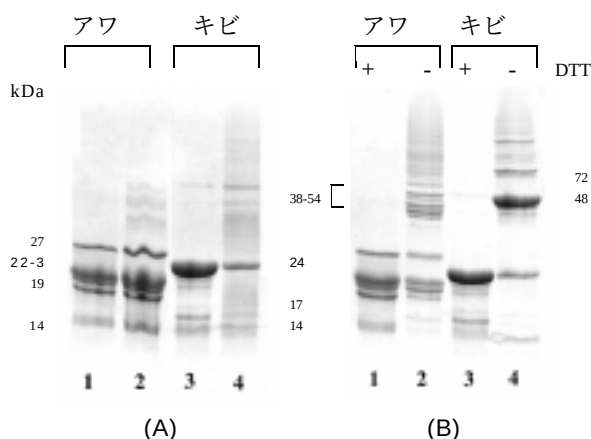
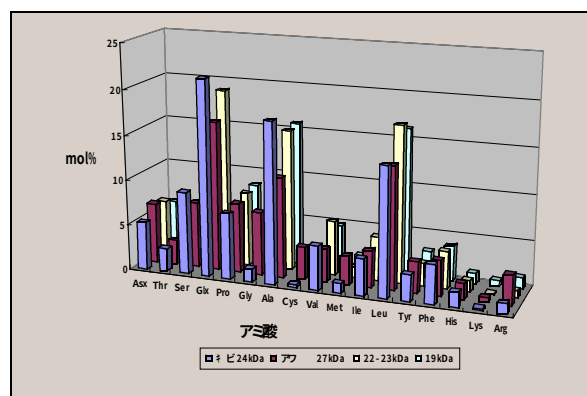


図1 プロラミンSDS-PAGE

(A) アワ、キビ true prolamin (lane 1,3) prolamin like-protein (lane 2,4) (B) true prolamin DTT の影響

グループA



グループB

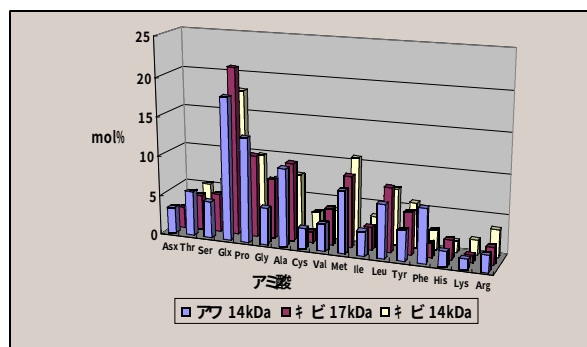


図2 ポリペプチドのアミノ酸組成

互作用によりシスチン残基の架橋高分子化、疎水結合の進行が考えられるためである。本結果においてはアミノ酸組成が非常に似ていること、室温で抽出した場合と加温して抽出した場合の SDS-PAGE パターンに差が見られなかった（データ未公表）ことから、プロラミンに分類するのが妥当と思われる。

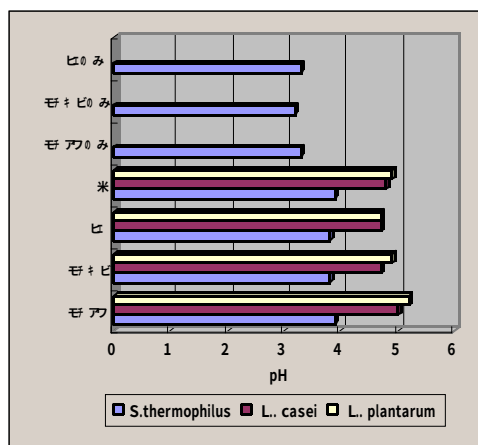


図3 雑穀粉を用いた乳酸発酵

非還元のプロラミンを泳動した場合の SDS-PAGE パターンをみると、グループ A はモノマー、ダイマー、オリゴマーの単純な会合構造をとっていることが予測される。Danno ら⁷⁾はアワのプロラミンを分離し、ポリペプチドを還元、S-シアノエチル化したところ、同一のサブユニットから構成されており、ホモオリゴマー構造をとると報告している。本研究で得られた結果は、キビのプロラミンの主ポリペプチドもサブユニット構造をとり、分子量からの推定では、ホモオリゴマー構造をとることが示唆された。したがって、アワやキビのタンパク質は、米や小麦とは異なり、貯蔵タンパク質の大部分は単純なポリペプチドの重合体から成り立つと予測される。

これらの結果は、雑穀プロラミン中のポリペプチドはトウモロコシプロラミンであるゼインのサブユニット構成^{8,9)}と相似していることを示唆している。主成分であるアワ、キビのポリペプチドのN末端配列がα-ゼインと相同性を有する結果¹⁰⁾もこれを裏付けている。雑穀タンパク質中のどの成分がHDL上昇に関与しているのかは未だ検討中である。ヒト腸管細胞(Caco-2)に雑穀から分離したプロラミンを人工消化したペプチドを添加した結果、HDLの主要アポリポタンパク質であるapoA-Iの遺伝子発現が無添加あるいはカゼインペプチド添加の場合に比べて有意に上昇するとの結果¹⁰⁾も得ており、主成分であるプロラミンによると推察している。

本報告では雑穀タンパク質の有効な利用方法として乳酸発酵を試みた。醗酵乳・乳酸菌飲料は整腸効果、免疫賦活、抗ガン作用、コレステロール値を正常に保つ効果等を有する健康食品として研究が進められている¹¹⁾。本研究では、乳系乳酸菌である *L. casei*、*S. thermophilus*、植物系乳酸菌である *L. plantarum* のうち今回の条件で

は、*S. thermophilus* が適していた。これはヨーグルト製造に汎用されている菌種である。雑穀粉のみでも十分にpHが低下し、省令による乳酸菌飲料としての基準菌数も充分であるので食品としての可能性は高い。しかし、特にヒエは雑穀特有の匂いに問題があるように思われた。また、今回は1種類の条件の結果であり、発酵時間を含めた検討がさらに必要である。雑穀タンパク質との相乗作用も期待され、製品の生理機能性についても調べる予定である。

5 結語

HDL(善玉コレステロール)上昇効果を有する雑穀タンパク質の解析と利用方法を検討した。雑穀類ではプロラミン画分が全タンパク質の60~80%を占めていた。ポリペプチド構成は、Ala、Leu 含量の高い主成分ポリペプチドと Met、Pro 含量の高いポリペプチドで構成されており、トウモロコシゼインと相似性を有することがわかった。また、乳酸菌で醗酵を試み、*Streptococcus thermophilus* (IFO 13957)をスターターとした場合にpHが4以下まで低下し、風味も優れていた。

本研究を推進するにあたり、雑穀試料を分譲いただきました岩手県農業研究センター鮮流通研究室、菊池淑子研究員及び県北農業研究所やませ研究室、飯村茂之室長、長谷川聡研究員に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nishizawa, N., Oikawa, M., and Hareyama, S.: Agric. Biol. Chem., **54**, 229, (1990).
- 2) Nishizawa, N., and Fudamoto, Y: Biosci. Biotechnol. Biochem., **59**, 333, (1995).
- 3) Landry, J., and Moureaux, T.: Bull. Soc. Chim. Biol., **52**, 1021, (1970).
- 4) Laemmli, U. K.: Nature, **227**, 680, (1970).
- 5) Shewry, P. R., and Tatham, A. S.: Biochem. J., **267**, 1, (1990).
- 6) Parameswaran, K. P., and Thayumanavan, B.: Plant Foods Hum. Nutr., **48**, 119, (1995).
- 7) Danno, G. and Natake, M.: Agric. Biol. Chem., **44**, 913, (1980).
- 8) Esen, A.: J. Cereal Sci., **5**, 117, (1987).
- 9) Paulis, J. W.: Cereal Chem., **58**, 542, (1981).
- 10) 小浜恵子: 岩手大学大学院 博士論文(2001)
- 11) 光岡知足: 食品工業, 2月28日号, 18, (2001).