

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：1 4 5 0 3

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：2 2 5 0 0 7 3 0

研究課題名（和文） 発芽法による低アレルギー性食品の調製と食味に関する研究

研究課題名（英文） Study of pre-germinated method on the preparation and taste of low-allergenic foods

研究代表者 前田 智子（MAEDA TOMOKO）

兵庫教育大学・学校教育研究科・准教授

研究者番号：0 0 3 4 6 2 9 8

研究成果の概要（和文）：ソバとアマランスに発芽処理を行うと、抗酸化性や酵素活性の向上と、ギャバを含む遊離アミノ酸やフェルラ酸の増加が見られ、アレルギー蛋白質は分解された。さらに、発芽ソバで調製された納豆や味噌でも、低アレルギー性が認められた。また、発芽ソバによる納豆の食味評価では、新たな性質を示し、従来の市販品に見られる納豆独特の香りや味などを嫌っていた消費者でもあっても、発芽ソバ納豆であれば最終製品として受け入れられる可能性が期待された。一方、発芽ソバ味噌でも、うま味、酸味、甘味の項目では市販品よりも高いスコアを得た。従って、ソバやアマランスへの発芽処理はそれらの機能性や栄養特性を改善し、最終製品に低アレルギー性と新しい美味しさをもたらす有効な手法であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Pre-germination of amaranth and buckwheat grains increased antioxidant-activity and amounts of free amino acids including GABA and ferulic acid. In addition, the allergenic proteins in the grains were decomposed, and *natto* (fermented soybeans) and *miso* (fermented soybean paste) made with the pre-germinated buckwheat showed the low-allergenic property. For the case of sensory test, the *natto* with the pre-germinated buckwheat made the different quality from the traditional flavor and taste in the commercial *natto*, and therefore it was expected to be liked by general consumers that have disliked the commercial *natto*. Furthermore, the sensory scores for the *umami*, sourness and sweetness for the *miso* made with the pre-germinated buckwheat were quite higher than the commercial *miso*. Therefore, the pre-germinated method for the grains was considered to improve their functional and nutritional properties, and also provide the low-allergenic property and new taste to the final products.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：アマランス、ソバ、発芽、低アレルギー性、アミノ酸、ギャバ、小麦、抗酸化性

## 1. 研究開始当初の背景

現在行われている食物アレルギーの治療

法には抗ヒスタミン剤をはじめ多数の薬剤

が開発されているが、最良の治療法は原因となる食品の摂取を避けることにあるとされている。しかしながら、食品の多くはこれを日常生活から完全に除去することは困難であり、何らかの手段で食品のアレルゲン活性を低減化することが望まれている。しかし、食品の種類は多くそのアレルゲン成分の性質も異なるため、全ての食品に適用できる低減化の方法は確立されていない。最近では、バイオテクノロジー技術を駆使したT細胞エピトープに対応するDNAワクチンやT細胞エピトープやIgE結合エピトープを改変したアレルゲン分子の利用なども考案され、医学的観点からのアプローチが多い。しかし一方で、食品の観点からすれば、ある程度の美味しさを備えた製品価値のある「低アレルゲン化食品」の開発を望むのが当然である。

現在、その他の食物アレルギー防止策として、「1.アレルゲン除去」と「2.アレルゲン分解」を戦略としたものがあり、既に米や牛乳では2の手法による市販品がある。これは、「IgEエピトープを切断してアレルギーの発症を抑える」ことを意味しているのだが、問題はこれらの「低アレルゲン化食品」が万人のアレルギー患者に効果があると言えないところであり、酵素分解によって大部分の患者に対するエピトープが切断されても一部の人に対するエピトープが残っていて、アレルギーにつながってしまうこともある。またアレルゲン蛋白質の除去と分解によって苦味を持つペプチドが逆に生成するなど、従来の加工特性を低下させることも頻繁にある。

一方、米や麦のような主要穀物以外のイネ科作物を中心とした穀類、所謂「雑穀」が米や麦に比べてアレルギー反応の発現が比較的少ないことが知られている。そのため、これらが主食となる米や麦に代用されることが多く、この点では雑穀の存在も重要視されている。しかしながら、その加工特性も単独使用では必ずしも良好ではないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では食物アレルギーを医学的観点ではなく、食品科学的観点から捉え、食品としての価値（味・テクスチャー・食感・保存性）を最も重要なポイントとしている。

穀物は我々の食生活の主食となるものであり、ソバも古来から日本人が喫食してきたものである。近年、その栄養価と機能性物質の含有量の高さから、各種加工食品への利用が奨励されつつあり、特にそれは小麦と共存して使用されることが多い。一方、アマランスはその優れた栄養価が注目され栄養補助食品としても利用が期待されている。

我々日本人は古来から米を主食としてき

たが、食生活の欧風化、生活スタイルの多様化と共に米の消費量は確実に減少し、パン、うどん、パスタ、ラーメン等の小麦粉製品の摂取が着実に増えつつある。小麦粉は米に替わる主食的な製品だけではなく、カレー、揚げ物等のレトルトや冷凍食品およびケーキ、菓子等の嗜好食品への加工にも幅広く用いられており、我々の食生活を支える最も重要な食品素材といえる。

そこで、本研究では、このように優れた加工特性を持つ小麦粉のアレルギーに苦しむ患者に対応できる穀物として、ソバやアマランスの機能性を生かし、低アレルゲン穀物とその加工品の開発を目指すことを目的とした。また最終製品は、アレルギー患者対応の食品であるからこそ特に、外観上また食べた瞬間に美しく、楽しく気持ちの良いものが最適と考える。酵素分解、アルカリ処理、高圧処理などはアレルゲンそのものを低減化できるが、処理過程で生じた新たな物質の出現により加工特性の低下も懸念されている。

本研究では添加物等の存在下でなく「発芽処理」により低アレルゲン化した穀物を使用することで、味・テクスチャーにこだわった最終製品の開発と検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験試料

#### ①ソバとアマランス

マンカン種のソバと、岩手県産とペール産のアマランス2種を用いた。コントロールとして市販ソバ粉「ばら」（三宅製粉（株））と市販小麦粉「ヘルメス」（奥本製粉（株））を使用した。

#### ②発芽ソバの調製

マンカン種のソバを用いて25℃の水に1時間浸漬し、85%、25℃で24時間蛍光灯下で発芽させる。発芽ソバを水洗し、オートクレープで120℃で10分間加熱する。凍結乾燥した後、Retsch製ローター式粉碎機を用いて120メッシュ（線径0.08mm）に粉碎し、粒子サイズを均一にしたものを各種分析用試料とした。

#### ③発芽アマランスの調製

2種のアマランスを30℃の水に浸漬し、85%、30℃で72時間暗蛍光灯下で発芽させる。発芽ソバを水洗し、凍結乾燥した後、Retsch製ローター式粉碎機を用いて120メッシュ（線径0.08mm）に粉碎し、粒子サイズを均一にしたものを各種分析用試料とした。

### (2) 発芽ソバおよび発芽アマランスの性質

#### ①一般分析

水分、蛋白質、脂質、食物繊維、糖質等を測定した。

#### ②アミノ酸および脂肪酸組成

アミノ酸と脂肪酸組成について、発芽中の

変化を調べた。

### ③酵素活性の測定

酵素活性の発芽中の変化を調べた。

### ④機能性物質の分布

機能性物質（フェルラ酸、ポリフェノール類、GABA）の変化を HPLC により測定し、発芽の影響を調べた。

### (3) 発芽ソバおよび発芽アマランスの蛋白質の分布

#### ①蛋白質の分画

ソバの場合、主にアレルゲンとなる蛋白質は水溶性と言われているため、発芽過程に伴う発芽ソバの水溶性蛋白質の分布の変化を調べた。

アマランスについては水溶性、不溶性蛋白質両者の分布を調べ、発芽に伴うそれらの分布の変化を調べた。

### ②SDS-PAGE とウェスタンブロット法による蛋白質ならびにアレルゲン分布の測定

発芽ソバおよび発芽アマランスの蛋白質についてアレルゲン分布の測定、ならびにアレルギー反応試験を行った。この特定の抗体として本研究の場合、ソバおよび小麦アレルギー患者の血清を使用し、発芽処理が抗原・抗体反応にどのような影響を及ぼすかを調べた。

### (4) 低アレルゲン発芽穀物による加工食品への利用（発芽ソバの伝統食品への利用）

#### ①発芽ソバ納豆および発芽ソバ味噌の調製

納豆は上記処理によって発芽加熱したソバを *Bacillus natto* で接種し、Domestic natto maker (Tokyo Unicom Co., Ltd) により、40℃で 0-48 時間醗酵させて調製した。味噌は上記発芽ソバ 450g に対して米麴 300g、水 50g、塩 110g を添加し 30℃で 0-60 日間醗酵・熟成し調製した。

#### ②発芽ソバ納豆と発芽ソバ味噌の品質評価

発芽ソバ納豆と発芽ソバ味噌の熟成期間における色、外観、香り、pH、酸度 (TTA) を測定した。

#### ③アミノ酸と還元糖量の測定

調製した発芽ソバ納豆と発芽ソバ味噌から定法により水溶性成分を抽出し、醗酵・熟成過程におけるそれらの変化を、HPLC で調べた。

#### ④蛋白質の分画

調製された発芽ソバ納豆と発芽ソバ味噌について醗酵・熟成過程における蛋白質の変化を調べた。加工食品中の蛋白質の変化を調

べるため、不溶性・水溶性いずれの蛋白質についても検討した。

すなわち、発芽ソバで調製した納豆と味噌から水溶性、食塩水可溶性、70%エタノール可溶性、0.1N 酢酸可溶性成分を定法に準じて順に抽出し、醗酵・熟成段階における蛋白質の組成比を測定した。

### ⑤SDS-PAGE とウェスタンブロット法による蛋白質ならびにアレルゲン分布の測定

④で調製した各種蛋白質成分についてアレルギー反応試験を行った。即ち、(3) ②の手法に準じ、ソバアレルギー患者の血清を用いて醗酵・熟成過程が抗原・抗体反応にどのような影響を及ぼすかを調べた。

### ⑥発芽ソバによる伝統食品の食味評価

味認識装置により、製品の抽出液中の甘味、塩味、苦味、酸味、うま味について評価した。

また、評点法により通常的小麦や大豆を添加して作られた市販納豆ならびに味噌と比較しながら、パネリストによる官能評価も行った。以上の結果と、上記の科学的分析結果との相関性についても検討した。

以上の結果をもとに、低アレルゲン発芽ソバとアマランスの調製、ならびにそれらの加工特性、機能性、食味性を調べ、それらの新しい加工食品への有用性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 発芽ソバおよび発芽アマランスの性質

#### ①アミノ酸と酵素活性

発芽ソバは発芽時間の経過に伴い、遊離アミノ酸総量の増加、特に、イソロイシン、ロイシン、リジン、バリン、グリシン、ヒスチジン、チロシン、GABA の増加が顕著であった。

一方、発芽アマランスの酵素活性は、アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性とともに、24 時間後に、最も高い活性が認められた。アミラーゼ活性は国産のもので高く、プロテアーゼ活性は逆にペルー産のものが高かった。これに伴いデンプン含量が減少し、遊離糖が増加した。リパーゼ活性は 24 時間では殆んど認められず 48、72 時間と時間の経過に伴い僅かに増加した。また、発芽により細胞壁の構築や各器官の形成に伴いセルロース、食物繊維が増加することをわかった。

脂質においては、遊離脂質 (FL) に有意な変化は見られず、生体膜の構成要素であるリン脂質を含む結合脂質 (BL) が増加し、その脂肪酸組成については、発芽によりオレイン酸の減少、リノール酸及びリノレン酸の増加が FL と BL の両方で認められ、パルミチン酸は FL で減少、BL で増加、さらに BL においては、未発芽では存在しなかった炭素数 20 以上の高度不飽和脂肪酸の存在を確認した。

蛋白質に関しては、発芽によりアルブミンが増加し、グロブリン及びグルテリンは減少し、また全ての遊離アミノ酸が発芽により顕著に増加した。それは、未発芽に比べ 国産で約 6 倍、ペルー産約 16 倍と増加し、栄養価の改善効果が得られた。

発芽による遊離アミノ酸組成は、未発芽と比較すると、全ての遊離アミノ酸が発芽時間の経過に伴い増加するという結果が得られた。未発芽に比べて産地に関わらずアスパラギンがそれぞれ約 15 倍、62 倍、グルタミン酸が約 5 倍、55 倍、バリンが約 7 倍、13 倍、ロイシンが約 8 倍、15 倍、イソロイシンが約 7 倍、13 倍、リジンが約 13 倍、24 倍、ヒスチジンが約 7 倍、14 倍と顕著に増加した。また、GABA についても約 5~6 倍に増加するという結果が得られた。

また、産地に関わらずいずれのアマランスにおいても第一制限アミノ酸はメチオニンであったが、米にはメチオニンやシステインなど含硫アミノ酸が豊富に含まれており、含硫アミノ酸を多く含む米などの食品と組み合わせることでアミノ酸スコアも改善されると考えられた。また、小麦に不足しているリジンも発芽による増加が認められたことから、小麦や米の摂取量が多い現代人にとって非常に有益な効果を与える食品素材として期待された。

## ②SDS-PAGE とイムノブロットングによる低アレルゲン化

発芽ソバと発芽アマランスはともに、アレルゲン性を低減化する可能性が示唆された。

発芽ソバは、ソバアレルゲンとなる蛋白質バンドの低下、消失をもたらした。ソバアレルギー患者における抗原・抗体反応では、IgE と結合する蛋白質のバンドが消失したことから、発芽によりアレルゲンの低減化をもたらす有効な食品素材であると期待された。

一方、発芽アマランスは、発芽時間の経過に関わらずプロラミンは殆んど存在しなかった。その他の画分では数種のバンドが見られたが、24 時間ではバンドに若干の消失が見られ、48 時間以降ではこれらのバンドはほぼ消失したが、これは蛋白質の低分子化・分解によるものと考えられた。

そこでアマランスの全蛋白質を抽出して SDS-PAGE 及びイムノブロット法により低アレルゲン化について検討した。主要穀物の一つである小麦蛋白がアレルゲンとなる患者血清を用いて抗原・抗体反応をおこなうと、未発芽では IgE と結合する蛋白質が大きく分けて 3 つの領域で確認されたが、発芽時間の経過と共に結合蛋白質のバンドが消失した。特にほぼ完全に消失した領域もあり、発芽によるアレルゲンの低減化の可能性が認められた。

## ③機能性物質の変動

発芽による機能性成分の生成、抗酸化物質の変化及び抗酸化能や生理作用の発現等について検討を行った。

フィチン酸は結石予防、コレステロール低減化作用等があり、ミネラルと非常に強いキレート作用を起こし、ミネラルの吸収を著しく低下させることが知られている。

今回の発芽によりアマランス中のフィターゼ活性が増大すると共に、フィチン酸が分解されることが明らかになった。従って、ミネラル吸収能が高まり、分解物であるミオイノシトールによる栄養価の改善作用が期待できた。

一方、フェルラ酸は抗酸化作用や紫外線を吸収しメラニンの生成を抑制する作用として知られているが、このフェルラ酸は発芽により 24 時間以降で増加する傾向を示し、特に国産よりもペルー産で顕著に増加した。また、不溶性食物繊維の増加とフェルラ酸の増加には高い相関関係があることが明らかになった。

また、ポリフェノール類は発芽により増加するが、その生成には光が関与している可能性が示唆された。このポリフェノール類は抗酸化能 (DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性)、TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity トロロックス当量抗酸化能力)、SOD (Superoxide dismutase スーパーオキシドの不均化) 等を持ち、ポリフェノール量と抗酸化能の間には高い相関関係が認められた。

## (2) 加工食品 (ソバ納豆、ソバ味噌) への応用

### ①一般分析

発芽ソバ納豆の総蛋白含量は醗酵時間の経過に伴い低下した。一方、発芽ソバ味噌の色は、醗酵 60 日後には 0 日目に比較して、明度 (L\*) は低下し、全体に黄色味を帯びるようになり、醗酵期間の増加と共に、pH の低下と TTA 値の増加が顕著となった。

また、還元糖については、発芽ソバ納豆中のフルクトース、グルコース、マルトースは醗酵時間の経過と共に低下したが、ラクトースとシュクロースの量は 48 時間後には増加した。

発芽ソバ味噌のマルトースは醗酵期間の増加と共に減少したが、ラクトースとグルコースは増加する傾向を示した。特に、発芽ソバ味噌中の還元糖の変化は、pH の減少と TTA 値の増加に関係すると考えられた。

また、遊離アミノ酸については、GABA は発芽ソバ納豆、味噌ともに 48 時間と 60 日間の醗酵後には開始時 (0 時間、0 日間) より 2-3 倍に増加した。総アミノ酸量についても

発芽ソバ納豆では減少、発芽ソバ味噌では増加傾向が見られた。

また、発芽ソバ納豆中のグルタミン酸は醗酵中に減少、発芽ソバ味噌では熟成中に逆に増加する傾向を示した。このことは納豆中のグルタミン酸の大部分はポリグルタミン酸の生成に利用されたと考えられる。

### ②アレルギー蛋白質の変化

発芽ソバ納豆中の高分子量蛋白質であるアルブミンとグロブリンは、醗酵期間中に分解された。特に48時間後の45-97 kDaの蛋白質は0時間のものに比べ非常に弱いバンド濃度となったが、22 kDaの蛋白質分布は若干増加する傾向を示した。これらの蛋白質を用いて、ソバアレルギー患者の血清中の特異的IgEをイムノブロッティングで検出したところ、特にソバアレルギー蛋白質として報告されている14-15 kDa、並びに22 kDa蛋白質に対する反応は醗酵36時間で顕著に減少したが、これはアルブミン、グロブリンのいずれにおいても同じ傾向を示した。従って、発芽ソバを用いた納豆では、36時間の醗酵によりアレルギー蛋白質の一部は低分子化され、遊離アミノ酸や低分子量ペプチドとなり、低アレルギー化が期待できることがわかった。

発芽ソバを用いた味噌でも、醗酵中の低アレルギー化の確認を、ソバアレルギー患者の血清中の特異的IgEのイムノブロッティングにより調べた結果、同様の傾向が見られた。

従って、発芽ソバが低アレルギーあるいはノンアレルギー性を示す納豆や味噌の生成に新しい食品素材として有効利用できることが考えられた。

### ③食味評価

醗酵中、納豆には独特の粘りをもたらす物質としてポリグルタミン酸やフルクタンが生成され、最終的には「ネバネバ感」のテクスチャーを示すことが知られている。今回の発芽ソバ納豆でも、醗酵0、24、36時間後には0、2.5、8%のポリグルタミン酸ナトリウムが生成されており、一般の市販納豆と類似した粘性を持つことが示唆された。さらに、市販の大豆納豆との比較をした官能評価では、特別気になる味や香りはなくプレーンな味わいであると評価された。従って、従来の市販品に見られる納豆独特の香りや味などを嫌っていた消費者でもあっても、発芽ソバ納豆であれば最終製品として受け入れられるのではないかと期待された。

また、発芽ソバ味噌についても市販の大豆味噌と比較による官能評価を行った結果、多数の項目において有意差は認められなかった上に、うま味、酸味、甘味の項目では市販品よりも高いスコアを得ることが出来た。この結果は既述のpH、TTA、アミノ酸組成など

の結果に対応していた。また、今回の発芽ソバ味噌はあまり粘度が高すぎず、軟らかく、しっとり感があるとの評価も得られた。

味認識装置でも、上記で示した基本的な味については検出されたものの、数値は不安定であり、官能評価で得られたテクチャーや、香りに伴う微妙な味のトーンを得ることは、出来なかった。

特に複雑な香気成分やテクスチャーをもたらず醗酵食品などについては、人間と機械による評価、二つの利点を相互に確認しながら検討を進める必要があると考えられた。

以上の結果より、ソバとアマランスの発芽処理による成分特性や抗酸化能の向上、低アレルギー性等の新たな機能性と新しい食味の発現が明らかとなった。これらの知見は発芽穀類を食品素材として利用していく上で重要であり、今後の食品加工への応用にも一助となるものと考えられた。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田智子 (MAEDA TOMOKO)

兵庫教育大学・学校教育研究科・准教授

研究者番号：00346298