

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750022

研究課題名(和文)大麦と米の混炊における大麦内在性酵素の動態解析

研究課題名(英文)Analysis of the behavior of enzyme in the barley during cooking with rice.

研究代表者

露久保 美夏(TSUYUKUBO, MIKA)

お茶の水女子大学・サイエンス&エデュケーションセンター・講師

研究者番号：50646924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、大麦の内在性デンプン分解酵素 α -アミラーゼに注目し、米と混炊する麦飯において米粒に付着する大麦 α -アミラーゼの米粒内局在等を免疫フロットや免疫染色法を用いて明らかにし、麦飯の炊飯における糖生成機構について有用なデータを蓄積するとともに、従来困難とされている酵素局在や挙動を解析し得る実験手法を提案することを目的とした。

麦飯の炊飯過程において60℃までの所定の温度で米、大麦、炊飯液を分離して検討したところ、浸漬中に溶出した α -アミラーゼが米に付着していたこと、40℃で最も多く付着していたことなどが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The localization and functions of the starch degrading enzymes in the barley have been unknown. In this study, I investigated the localization of barley α -amylase when barley and rice were soaked in water and heated together 60℃. In the rice grains, the amount of barley α -amylase was highest when water temperature 40℃. By immunofluorescence microscopy analysis, I observed barley α -amylase specific signals mainly at the margins of rice grains. These data clearly showed that a part of barley α -amylase was translocated from barley grains into rice grains through cooking water.

研究分野：調理科学

キーワード：大麦 米 α -アミラーゼ 炊飯

1. 研究開始当初の背景

大麦は発芽過程において α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、枝切り酵素などのデンプン分解酵素が増大することが知られており、酵素の活性が麦芽品質と深く関連づけられているものの、未発芽種子に関する研究はあまり多くはなされていない。また、大麦の炊飯に関しては適切な加水比と加熱時間、麦飯の嗜好性などの報告があるが、内在性デンプン分解酵素に注目した研究、特に炊飯過程において酵素が粒の外に溶出するかどうかといった挙動に関する報告はされていない。

申請者は、これまで米について炊飯過程における糖生成メカニズムについて多くの知見を蓄積してきた。また、抗原抗体反応を用いることにより、特異性の高い酵素の動態把握を可能とする手法を確立してきている。さらに、イモ飯ではサツマイモ β -アミラーゼが米デンプンも分解して飯の還元糖量増加に寄与することを明らかにし、このような混炊時の酵素の影響についても研究を行ってきたことから、麦飯の炊飯過程でも大麦と米の酵素が相互に作用する可能性があると考えられるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、今後の大麦の利用拡充のための新規知見の蓄積を目指す研究として、内在性デンプン分解酵素 β -アミラーゼに注目し、大麦の炊飯過程における溶出挙動、米と混炊する麦飯において米粒に付着する大麦 β -アミラーゼの米粒内局在等を免疫染色法を主とする解析方法を用いて明らかにする。これにより、麦飯の炊飯における糖生成機構について有用なデータを蓄積するとともに、従来困難とされている酵素局在や挙動を解析し得る実験手法を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料

大麦は、2013年度埼玉産モッチリボシを歩留り75%に搗精したものを使用直前まで4で保存したものをを用いた。米は、2012年度滋賀県産日本晴を4で保存し、使用時に歩留り90%に搗精したものをを用いた。

なお、実験に用いる大麦試料を決定するため、モッチリボシの65%搗精と75%搗精について米を基準に用いてそれぞれ丸麦と切麦を50%混炊した麦飯について9段階嗜好意欲尺度による官能評価を行った。

(2) 一般成分分析

試料に用いた米と大麦について、一般成分分析を行った。測定項目および方法は以下の通りである。

水分含量 (赤外線水分計)

粗脂肪 (酸分解法)

灰分 (550 焼却による灰化)

粗タンパク質量 (ケルダール法)

(3) 大麦、米、炊飯液からの粗酵素液調製
同量の大麦と米を用い、大麦は加水比1.8倍、米は加水比1.5倍となるよう加水して20分、1時間浸漬させた後、加熱開始から沸騰まで11分となるようスライダックで調節して加熱を行った。20分(浸漬後)、40分、60分の時点で大麦、米、炊飯液を分離し、それぞれ凍結乾燥処理をした。生米2g相当の凍結乾燥大麦と米を破砕してリン酸緩衝液を加え、凍結乾燥炊飯液も同様の緩衝液を加え、20分、1時間攪拌してタンパク質抽出を行った。抽出液を遠心分離および濾過後、粗酵素液とした。

(4) SDS-PAGE

大麦、米、炊飯液より調製した粗酵素液よりタンパク質を濃縮し、10%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。アプライ量は、1レーンにつき米は生米10mg相当量、大麦は生麦1mg相当量、炊飯液は全体の1/1000相当量とした。泳動後のゲルは0.2%クマシブリリアントブルーR-250で染色した。

(5) ウェスタンブロッティング

粗酵素液をSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜を用いてタンパク質をブロッティングし、ブロッティングした後にポリクローナル大麦 β -アミラーゼ抗体(4000倍希釈)と抗ウサギIgG抗体を反応させ、化学発光法により大麦 β -アミラーゼの検出を行った。

(6) 免疫染色

米粒を4%パラホルムアルデヒド溶液に真空下で4分、3日間浸漬後、冷却アセトンとSCEM(Leica Microsystems)を用いて包埋した。クライオスタッドで5 μ m厚の切片を作製後、大麦 β -アミラーゼ抗体(10000倍希釈)と抗ウサギIgG抗体による免疫染色を行い、米粒に付着した大麦 β -アミラーゼの分布を解析した。

(7) 糖量測定

米と大麦をそれぞれ単独で炊飯したものと、混炊して麦飯としたものについて、糖量測定を行い、混炊することによる酵素の相互作用について検討した。

4. 研究成果

(1) 大麦試料の官能評価

大麦試料を決定するために官能評価を実施した結果を図1に示した。

65%搗精、75%搗精ともに、丸麦と切麦を比較すると切麦の評価が低くなった。切麦は炊飯すると湾曲し外観が悪くなるため評価に影響したと考えられた。

丸麦の搗精度の比較では、75%搗精の評価が高かった。これらの結果から、本研究に用いる大麦試料はモッチリボシの75%搗精丸麦

にすることを決定した。

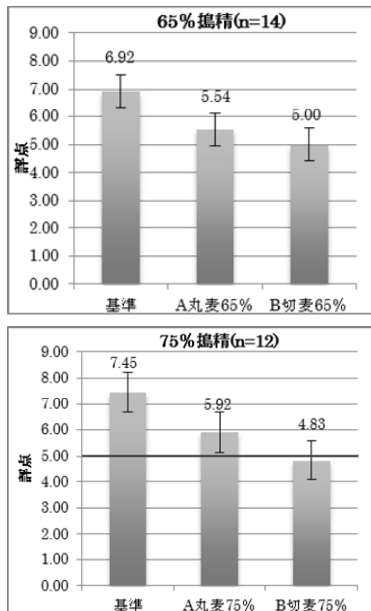


図1 モッチリボシの官能評価結果

(2) 一般成分分析

米と大麦の一般成分分析の結果、以下の通りであった (100g あたり)。

水分含量：米 16.3%，大麦 12.6%

粗脂肪：米 1.1g，大麦 0.9g

灰分：米 0.4g，大麦 0.9g

粗タンパク質：米 6.1g，大麦 7.0g

(3) 麦飯炊飯過程における大麦β-アミラーゼの局在

麦飯の炊飯過程において所定の段階 (20, 40, 60) で大麦, 米, 炊飯液を取り出し, 大麦β-アミラーゼ抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果, 大麦と炊飯液中で約 55kDa の位置にβ-アミラーゼの存在が確認され, 大麦から炊飯液へのβ-アミラーゼの溶出が認められた (図2)。その量は加熱が進み温度が高くなるにつれて徐々に減少していた。

米粒においても, わずかに大麦β-アミラーゼが検出され, 40 の時点で最も多く認められた。この結果から, 大麦β-アミラーゼは, 炊飯の早い段階 (浸漬時) から炊飯液中に溶出し, 米粒に付着していることが明らかとなった。

先行研究では, 米の炊飯過程において40 ~ 70 で糖が炊飯液中に著しく溶出することが示されている。これらのことから, 麦飯の炊飯において浸漬中に大麦から炊飯液中に溶出し米に付着したβ-アミラーゼが, 加熱による温度上昇に伴い再び炊飯液中に糖とともに溶出したことが示唆された。

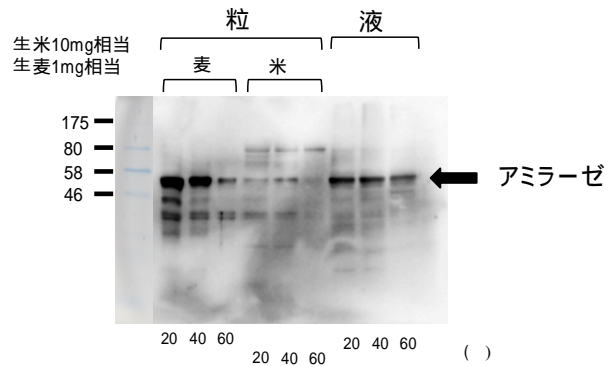


図2 炊飯過程における大麦β-アミラーゼの局在

(4) 米粒におけるβ-アミラーゼの詳細分析

麦飯の炊飯中に大麦から米に移動したβ-アミラーゼの米粒における局在をより詳細に分析するため, 炊飯中に取り出した米粒から切片を作製し, 大麦β-アミラーゼ抗体を反応させ, 免疫染色を行った。

この結果, 20 (浸漬後) の時点では, 米粒の外側に近い切片でβ-アミラーゼが存在していた。また, 同一の切片内では, 米粒の背側よりも腹側の部分で多く検出された。これより, 大麦から炊飯液中に溶出したβ-アミラーゼは米粒の腹側から優先的に付着し, 浸漬後には表面全体に存在していたと示唆される。40 および60 時点で取り出した米粒についても, 浸漬後の米粒と同様, 内側より外側に多く, 背側より腹側において多く存在していた。

米の吸水は腹側から起こることが明らかにされており, 大麦β-アミラーゼが腹側に多く存在していたことは米の吸水部位との関連性が示唆された。

(5) 麦飯の糖量測定

米と大麦を混炊した麦飯の糖量を測定し, それぞれを単独炊飯したときの糖量との比較を行った。

この結果, 混炊した麦飯の糖量は単独炊飯した飯よりも多かった。また, 単独炊飯した米と大麦のそれぞれの値を用いて, 混炊時と同じ配合割合になるように麦飯の計算上の糖量を算出し, 実測値と比較したところ, 実測値が計算値を上回った。このことから, 混炊したことによって米と大麦に含まれる酵素が相互作用を起こし, 糖の生成を促進させたことが示唆された。

また, 炊飯中に40 または60 に達した時点で一定時間温度保持を行うことによって, 通常の方法で炊飯した麦飯に比較して糖量が増加した。

(6) 今後の展望

本研究により、これまで明らかにされていなかった大麦と米の混炊による大麦β-アミラーゼの挙動を明らかにすることができた。また、従来困難とされている酵素局在や挙動を解析し得る実験手法として一助となる成果が示せたものと考えられる。米粒の酵素局在を免疫染色法により解析する方法は困難とされ常法が確立されていなかったこともあり、包埋や切削過程での実験条件を定めることに時間を要した。しかし、本研究で得られた方法により検出が可能であることを示せたことは、今後の様々な研究において新たな広がりを見せる可能性があると考ええる。

今後は、酵素の挙動と麦飯の糖生成量との関係についてさらに詳細な解析を進めるとともに、食味への影響に関する知見を蓄積していく。甘味やうま味などの化学成分やかたさや粘りのような物理的性質を総合的に分析し、嗜好性の高い麦飯の特性とその調理条件を解明していくことを目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1件)

浜守杏奈, 露久保美夏, 大倉哲也, 香西みどり, 米と大麦の混炊に及ぼす大麦β-アミラーゼの影響, 一般社団法人日本調理科学会, 2015年8月24日, 静岡県立大学(静岡県, 静岡市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

露久保 美夏 (TSUYUKUBO, Mika)

お茶の水女子大学・サイエンス&エデュケーションセンター・講師

研究者番号: 50646924