

## Influence of starch gelatinization and the following enzymatic treatments on the solubility of rice protein

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 矢野, 裕之, 竹内, 正彦, 加藤 (江森), 澄恵, 我妻, 義則, 田口, 計哉, 岡澤, 由晃, 西澤, 賢一, 黒田, 秧 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00002884">https://doi.org/10.24514/00002884</a>

報 文

澱粉の糊化と酵素処理が米蛋白質の溶解性に与える影響

矢野 裕之<sup>1,2§</sup>, 竹内 正彦<sup>3</sup>, 加藤 (江森) 澄恵<sup>4</sup>, 我妻 義則<sup>5</sup>,  
田口 計哉<sup>6</sup>, 岡澤 由晃<sup>6</sup>, 西澤 賢一<sup>3</sup>, 黒田 秧<sup>2,7</sup>

1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所, 2) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所, 3) 社団法人長野県農村工業研究所, 4) トキタ種苗株式会社, 5) わがつまこどもクリニック, 6) 長野興農株式会社, 7) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター

**Influence of starch gelatinization and the following enzymatic treatments  
on the solubility of rice protein**

Hiroyuki Yano<sup>1,2§</sup>, Masahiko Takeuchi<sup>3</sup>, Sumie Kato-Emori<sup>4</sup>, Yoshinori Wagatsuma<sup>5</sup>,  
Keiya Taguchi<sup>6</sup>, Yoshiaki Okazawa<sup>6</sup>, Kenichi Nishizawa<sup>3</sup>, Shigeru Kuroda<sup>2,7</sup>

<sup>1</sup> National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan; <sup>2</sup> National Institute of Crop Science, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan; <sup>3</sup> Agriculture and Technology Institute of Nagano Farmers, Suzaka, Nagano 382-0084, Japan; <sup>4</sup> Research Station, Tokita Seed Co., Ltd., Kazo, Saitama 349-1144, Japan; <sup>5</sup> Wagatsuma Pediatric and Allergy Clinic, Sapporo, Hokkaido 005-0804, Japan; <sup>6</sup> Nagano Kono Co., Ltd., Nagano 380-0948, Japan; <sup>7</sup> Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (BRAIN), Minato-Ku, Tokyo105-0001, Japan

**Abstract**

Effect of starch gelatinization and the following amylase/protease treatments on the recovery of amino acids as well as on the solubility of rice protein was investigated. In our previous study, the supernatant obtained by a centrifugation of gelatinized and liquefied (i.e., amylase-treated) rice slurry contained almost no protein. In this study, the slurry was further treated with protease before centrifugation. Analyses on SDS-PAGE have shown that after centrifugation, the supernatant contained almost no protein. Moreover, 36% of total protein was recovered in the supernatant as free amino acids. The recovery of total amount of amino acids and peptides was estimated to 63%. This report is a pilot study to develop less-allergenic or low protein food material which is rich in amino acids and sugars.

Keywords : アミノ酸, 糊化, 米, 蛋白質, 糖化液

## 緒言

米は国内で自給可能な数少ない重要な穀物の一つである。一方、食生活の多様化により、炊飯米としての需要は年々減少傾向にあり、国民1人当たりの年間米消費量も昭和37年をピークに半減している。米の消費量は食料自給率に大きく影響を与えるため、パンなどの加工品や飲料など、米の多様な利用法の開発が求められている。米や米粉を原料とした加工品は安価に製造できる利点があるが、米は五大アレルゲンの一つであり、アトピー性皮膚炎との関連性についても従来から指摘されている<sup>1)</sup>ことから、アレルゲン蛋白質の加工食品への混入が懸念される。また、特に飲料では、微量に混入した蛋白質が滓や濁りの原因になることがあるため、液状食品から蛋白質を除去する技術の開発が進められている<sup>2),3)</sup>。そこで、糖類やアミノ酸・ペプチドなどの栄養成分に富み、同時に蛋白質やアレルゲンなどの混入が著しく低減された加工原料を米から製造することができれば、飲料を含めた様々な加工食品への利用が期待できる。

米に水を加えて加熱して糊化させ、これにアミラーゼを添加して液化させると糖化液ができる<sup>4)</sup>。前報では、この糖化液を遠心すると、その上清にはブドウ糖や麦芽糖が回収されるが、蛋白質はほとんど含まれないことを報告した<sup>5)</sup>。本報では、この糖化液にさらにプロテアーゼを添加し、遠心後の上清にアミノ酸を効率的に回収することができるか、また、その際に蛋白質の混入を抑えることができるかを調べた。極低蛋白質・低アレルゲンで、同時にアミノ酸や糖などの栄養成分に富んだ食品原料を開発するための予備研究に位置づけられる。

## 実験材料及び方法

### 1. 米糖化液の作成とプロテアーゼ処理

糖化液の作製は前報<sup>5)</sup>に従った。精白米に3倍量(w/w)の水を加え、多管式第一種圧力容器(有限会社アトラスエンジニアリング製、型式BEM)中で121℃、6分間加熱して糊化させた後、その糊化物を45℃まで冷却した。これにアミラーゼN-K T2(協和化成株式会社製)を0.2% (w/w) 添加し、45℃に保温したままホモジナイザー処理を10分間行って十分に攪拌・混合して液化した。液温を96℃に上昇させて酵素を失活させ、振動篩い(80メッシュ)で処理して米の糖化液を

得た。

この糖化液50mLに、エンドプロテアーゼおよびエキソペプチダーゼ活性の両方を含む食品用酵素フレーバザイム<sup>6)</sup>(ノボザイムズ社製)を250 $\mu$ L(250LAPU; 1LAPUは1分間に1 $\mu$ molのL-ロイシン-pニトロアニリドを加水分解する酵素量)添加し、50℃で1時間保温した。

### 2. SDS-PAGEによる蛋白質解析

糖化液に等量(w/w)の2倍濃縮SDSサンプルバッファー(4%SDS, 20%グリセロールを含む125mMトリス/塩酸, pH6.8)を加えて混合し、一晚室温で保存した(サンプルバッファーは還元剤として100mM DTTを含むものと含まないものを用いた)。これを5,000 x gで10分間遠心し、上清をSDS-PAGEに供した。SDS-PAGEはLaemmli<sup>7)</sup>の手法に従った。泳動にはアクリルアミド濃度が4-20%のプレキャストゲル(Bio-Rad社製)を用い、30mAの定電流で45分~1時間程度泳動した。泳動後のゲルは0.1%のCBB-250, 20%メタノール, 5%酢酸を含む染色液中にて室温で一晩浸漬した後、20%メタノール, 5%酢酸を含む脱色液中で浸漬し、染色像が明らかになった時点で脱色を終了した。

### 3. アミノ酸および糖分析

アミノ酸および麦芽糖、ブドウ糖の定量分析は財団法人日本食品分析センターで実施した。糖化液全液およびプロテアーゼ処理後の糖化液を遠心した後の上清画分について、20種類の遊離アミノ酸の定量分析および加水分解後の18種のアミノ酸の定量分析を実施した(アスパラギン、グルタミンは加水分解時に側鎖のアミノ基が脱落するため、それぞれアスパラギン酸、グルタミン酸として回収される。)アミノ酸の分析にはアミノ酸自動分析計JLC-500/V(日本電子株式会社製)を用い、カラムにはLCR-6(日本電子)を使用した。定量はニンヒドリン法で行い、アミノ酸標準試料と供試試料の面積比から遊離アミノ酸量を計測した。また、糖分析には高速液体クロマトグラフを用い、ブドウ糖、麦芽糖の標準試料と比較し、定量した。

## 実験結果および考察

### 1. プロテアーゼを添加した米糖化液の蛋白質解析

まず、エキソプロテアーゼおよびエンドペプチダーゼ活性の両方を含む食品用酵素フレーバザイム(以降、

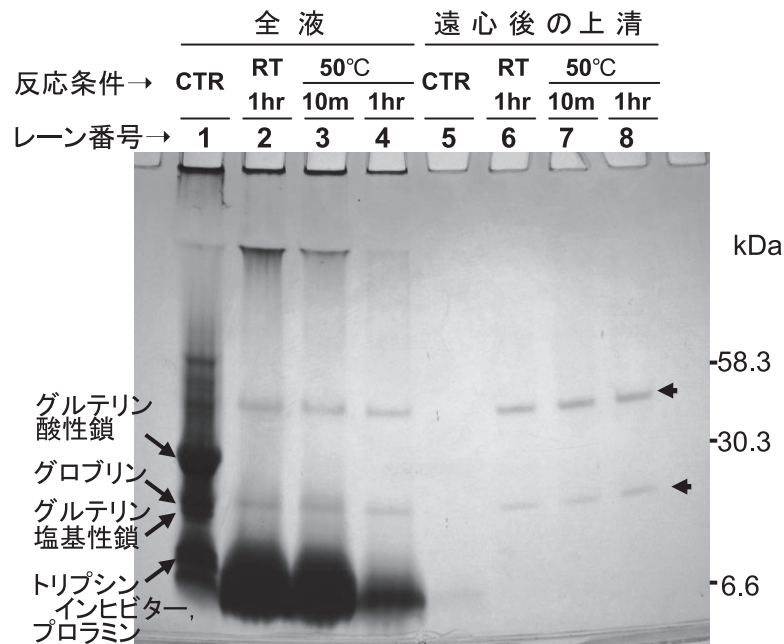


図1. 各条件でプロテアーゼ処理した糖化液の全液および遠心後の上清に含まれる蛋白質

CTR, プロテアーゼ処理しない標準サンプル. ◀, プロテアーゼ由来のバンド

「プロテアーゼ」と略)で米糖化液を処理した。図1のレーン1-4は糖化液あるいはそのプロテアーゼ処理液から一部をサンプリングし、還元剤ジチオスレイトール (DTT) を含むサンプルバッファーと混合してSDS-PAGEで分析したものである。プロテアーゼを添加する前の糖化液には、グルテリンやグロブリン、トリプシンインヒビターやプロラミン等の蛋白質が含まれる (レーン1) が、プロテアーゼを添加して室温で1時間、あるいは50°Cで10分~1時間処理すると (レーン2-4)、いずれの場合もこれらの蛋白質は分解を受け、分子量が数千程度の蛋白質断片が生成した。50°C、1時間以上処理しても、分解の程度は変わらなかった (データ略)。

また、レーン5-8は、それぞれレーン1-4で解析した糖化液やそのプロテアーゼ処理液を遠心し、各上清をサンプルバッファーで処理して泳動したものである。前報<sup>5)</sup>で報告したように、糖化液を遠心すると、上清には蛋白質がほとんど観察されなかった (レーン5)。また、プロテアーゼ処理後の糖化液においても、遠心後の上清から蛋白質はほとんど検出されなかった (レーン6-8)。

前報では、糖化液から蛋白質を抽出する際、還元剤DTTを含む通常のサンプルバッファーを使用すると蛋白質が抽出されるが、DTTを含まないサンプルバッファーを用いた場合には、抽出される蛋白質の量が

低減することを報告した<sup>5)</sup>。また、こうした蛋白質の溶解性の違いには、ジスルフィド結合が関係する可能性があることを推察した。そこで、プロテアーゼで処理した糖化液でも、DTTの有無で蛋白質の溶解性に違いがあるかを調べた。図2は糖化液のプロテアーゼ処理液と、それを遠心して得られた上清画分について、抽出バッファーに含まれるDTTの有無で蛋白質の溶解性に差が生じるかを調べたものである。プロテアーゼにより低分子化された蛋白質断片は、もとの蛋白質と同様に、還元剤DTTを含むSDSバッファーを用いた際には抽出できる (レーン5) が、DTTを含まないSDSバッファーでは抽出量が低減した (レーン2)。DTTはジスルフィド結合を切断する機能を有するため、低分子化された蛋白質がDTTを含まないバッファーではその抽出量が低減するのは、ジスルフィド結合がその不溶化に寄与するためであることが推定された。また、遠心後の上清からは、DTTの有無にかかわらず、蛋白質はほとんど抽出されなかった (レーン3および6)。

## 2. プロテアーゼ処理した糖化液のアミノ酸分析

次に、プロテアーゼで50°C、1時間処理した糖化液を遠心した際、上清画分にどの程度アミノ酸が回収されるかを調べた。表1に、糖化液100g当たりから回収される各アミノ酸の回収量 (g) を示した。蛋白質

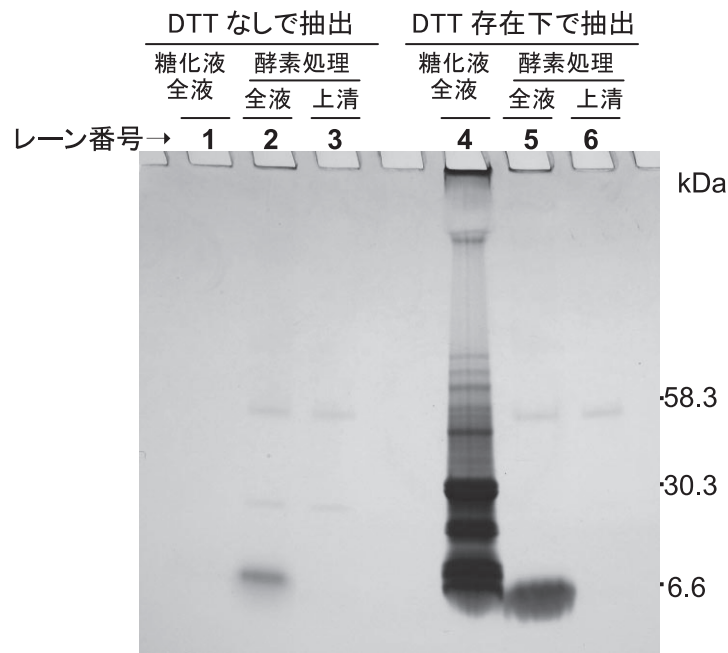


図2. 糖化液およびプロテアーゼで処理した糖化液から抽出される蛋白質の電気泳動図  
抽出バッファーに含まれる還元剤ジチオスレイトール (DTT) の有無で抽出される蛋白質を比較

表1. 糖化液のアミノ酸分析

アミノ酸	全液		遠心後の上清	
	加水分解		遊離アミノ酸	加水分解
アルギニン	153		83 (54)	104 (68)
リジン	66		30 (40)	48 (73)
ヒスチジン	47		17 (36)	30 (64)
フェニルアラニン	97		44 (45)	58 (60)
チロシン	85		43 (51)	52 (61)
ロイシン	147		65 (44)	82 (56)
イソロイシン	71		35 (49)	47 (66)
メチオニン	47		16 (34)	19 (40)
バリン	104		47 (45)	68 (65)
アラニン	101		33 (31)	63 (62)
グリシン	87		16 (18)	58 (67)
プロリン	86		6 (7)	53 (62)
グルタミン酸	310	}	38	201
グルタミン	0		61	
セリン	96		33 (34)	64 (67)
スレオニン	67		24 (36)	44 (66)
アスパラギン酸	173	}	27	117
アスパラギン	0		25	
トリプトファン	25		8 (32)	12 (48)
シスチン	43		0 (0)	20 (47)
合計	1805 (100)		652 (36)	1140 (63)

N = 3 の平均値.

mg/100g 糖化液で表示.

( ) 内は各アミノ酸の%回収率.

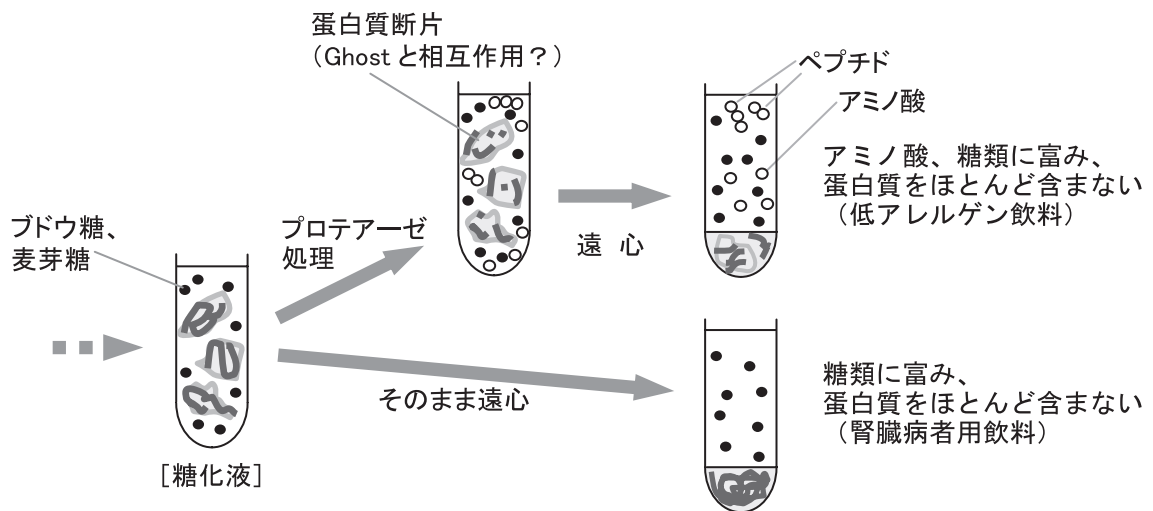


図3. 模式図：糖化液からのアミノ酸，糖類の回収

を塩酸加水分解すると，グルタミンとアスパラギンはそれぞれグルタミン酸，アスパラギン酸として回収されるため（{|に合計表示），加水分解した際のデータはグルタミン，アスパラギンを除いた18種類のアミノ酸で表示されている．糖化液全液を加水分解すると，18種類のアミノ酸を併せて1805mgが回収された．これを100%とすると，遠心後の上清に含まれる遊離アミノ酸の合計（652mg）は36%であった．プロテアーゼ処理前の糖化液や，同じ時間処理したプロテアーゼ単体からは遊離のアミノ酸がほとんど検出されなかった（データ略）．

図3の模式図に示すように，糖化液をプロテアーゼで処理し，遠心して得られた上清画分には遊離のアミノ酸以外に，アミノ酸が数個～数十個つながったペプチドも含まれるはずである．これらペプチドはアミノ酸分析のクロマト上で同定することはできない．そこで，上清画分に含まれる低分子ペプチドを遊離アミノ酸と併せて定量するため，上清を加水分解した後にアミノ酸分析を行った．上清には蛋白質がほとんど含まれないことがSDS-PAGEにより確かめられている（図1）ため，ここでは遊離のアミノ酸とともに，電気泳動では検出されない低分子ペプチドが定量されるはずである．分析の結果，糖化液全体を加水分解したときに得られるアミノ酸総量の63%がアミノ酸およびペプチドとして上清に回収されることがわかった（表1）．

次に，表1に示される個々のアミノ酸の回収について検討すると，まず，上清にはシスチンがほとんど回収されないことがわかる．これは，図1の結果から考察したようにジスルフィド結合が蛋白質の不溶化に関

与していること，また，ジスルフィド結合はプロテアーゼ耐性を有する場合があること<sup>8,9,10</sup>から，プロテアーゼで処理してもシスチンが遊離しなかったためと考えられる．また，プロリンの回収率が他のアミノ酸に比べて低いが，これはプロリンがイミノ酸であるため，プロリンのアミノ末端側のペプチド結合が一般的にプロテアーゼで切断されにくい傾向にある<sup>11,12</sup>ことに起因すると考えられる．

また，糖分析により糖化液上清にブドウ糖，麦芽糖がそれぞれ糖化液100gあたり12.2g，7.5g（n = 2の平均値）含まれることがわかった．

### 3. 推定されるメカニズムについて

前報で考察したように，遠心後の上清に蛋白質がほとんど回収されない原因についてバリア説<sup>13</sup>で説明される可能性がある．米蛋白質と米澱粉が相互作用すること<sup>14</sup>や，蛋白質が強固な網目構造を作り，澱粉粒を取り囲んでいること<sup>15</sup>はよく知られていた．Hamakerらは，ジスルフィド結合で高分子化した蛋白質が米の澱粉粒を取り囲み，澱粉の吸水を妨げるバリアの役割を果たす可能性があることを報告した<sup>13</sup>．また，Delcourらにより，このバリアは加熱により強化される可能性があることも報告されている<sup>16</sup>．糖化液を作製する際には白米に水を添加して加熱し糊化させるが，この際に，ジスルフィド結合により高分子化した蛋白質が澱粉粒と相互作用し，また，アミラーゼ処理した後も脱落せず，Ghost<sup>17</sup>と呼ばれる澱粉粒の外膜に吸着した可能性がある．DTTを含まないSDSバッファーでは糖化液から蛋白質がほとんど抽出されないが，DTT

を添加したバッファーからは抽出されることがこの推察を支持すると考えられる。また、糖化液にプロテアーゼを添加した際には、Ghost に蛋白質が吸着したままアミノ酸やペプチドが可溶化し、分子間ジスルフィド結合でつながったプロテアーゼ耐性フラグメントが不溶状態のまま Ghost に残留し、遠心した際には Ghost への吸着を維持したまま沈殿した可能性がある。DTT 存在下で抽出されるこれらフラグメントが、DTT なしでは抽出されないことがこの推察を支持する。あるいは、プロテアーゼ耐性フラグメントの不溶化はバリア説や澱粉粒への吸着とは全く関係なく生じた可能性も否定できない。メカニズムの解明にはさらなる検証を要するが、いずれの場合も上清は蛋白質やアレルゲンをほとんど含まない。

最近、グルタチオンを米粉生地に添加することで、グルテンを要せずにパンを発酵・焼成できることが報告されているが、ここでも還元剤としての機能をもつグルタチオンがバリアを破壊し、デンプンの吸水を促進したことが生地の粘性や発酵ガスの閉じこめ機能を高めたと推定されている<sup>18)</sup>。Hamaker らは、デンプン粒を取り囲む、ジスルフィドで架橋したポリマーの研究により、米製品のテクスチャーの制御が可能になるかもしれないと述べている<sup>13)</sup>。バリア機能とデンプンの吸水、粘度特性との関連性について理化学分析や分子解析など、さまざまな面から明らかにすることで、新しい特性をもった米粉食品を開発するための知見が得られるであろう。

本報により、白米に水を加え、加熱して糊化させた後、アミラーゼ、プロテアーゼで処理すると、遠心後の上清画分に単糖やアミノ酸・ペプチドを回収できること、そこに蛋白質がほとんど含まれないことが明らかになった。蛋白質がアレルゲン性を発現するには脂肪細胞と架橋するために2箇所のエピトープを要する。ひとつの分子内に2つの架橋部位が必要であるため、アレルゲン蛋白質はある程度以上(3.5~5kDa)の大きさが必要であるといわれており、電気泳動で検出されないほどの低分子ペプチドはアレルゲン性を有する可能性が低い<sup>9)</sup>。

前報の成果と併せ、本研究で得られた糖化液上清画分は、腎臓病者用の飲料や、低アレルゲン飲料の開発に応用できる可能性がある(図3)。医学研究者との共同研究によるアレルゲン性の評価や、食品としての品質向上研究を実施し、実用化を進める予定である。

## 謝 辞

本稿の作成に当たり重要な助言をいただいた作物研究所・青木法明博士に感謝する。本研究は農林水産省アグリバイオ実用化・産業化研究および科研費(22500752)の助成を受けたものである。

## 要 約

米デンプンの糊化と、その後のアミラーゼおよびプロテアーゼ処理が蛋白質の挙動に与える効果を解析した。前報では、米粉に加水・加熱し糊化させた後、アミラーゼ処理で液化した糖化液を遠心すると、上清には蛋白質がほとんど含まれないことを報告した。本研究では、糖化液をさらにプロテアーゼ処理し、遠心後の上清にやはり蛋白質がほとんど含まれないことを SDS-PAGE で確認した。また、糖化液に含まれる蛋白質の36%がアミノ酸として、アミノ酸とペプチドを併せると63%が上清に回収されることがわかった。本報は極低蛋白質・低アレルゲンでアミノ酸、糖類に富む食品原料を開発するための予備研究に位置づけられる。

## 参考文献

- 1) Ikezawa, Z., Miyakawa, K., Komatsu, H., Suga, C., Miyakawa, J., Sugiyama, A., Sasaki, T., Nakajima, H., Hirai, Y., Suzuki, Y. A probable involvement of rice allergy in severe type of atopic dermatitis in Japan. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* **176**, 103-107 (1992)
- 2) 山口敏弘, 中尾俊章, 西田淑男. 蛋白質吸着メソポーラス材料の開発. *生物工学会誌*, **87**, 314-318 (2009)
- 3) 森真基, 山内隆寛, 神谷久弥, 松永将義, 松下桂子, 和田渚, 岡田秀也, 市橋誠. 清澄化液状食品の製造方法. 公開特許公報. 特開2010-252670.
- 4) 竹内正彦. 米由来天然甘味の特性と食品への応用. *食品と科学*, **44**, 73-75 (2002)
- 5) 矢野裕之, 竹内正彦, 加藤(江森)澄恵, 我妻義則, 佐藤里絵, 田口計哉, 岡澤由晃, 西澤賢一, 黒田秧. 米澱粉の糊化における蛋白質の溶解性変化に関する解析. *食品総合研究所研究報告*, **75**, 1-8 (2011)

- 6) Tsou, M. J., Kao, F. J., Tseng, C. K., Chiang, W. D. Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chem.* **122**, 243–248 (2010)
- 7) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685 (1970)
- 8) Yano, H., Kusada, O., Kuroda, S., Kato-Emori S. Disulfide proteome analysis of buckwheat seeds to screen putative allergens. *Cereal Chem.*, **83**, 132–135 (2006)
- 9) Yano, H. Disulfide-related proteomic studies on food allergens. *Expert Rev. Proteomics*, **6**, 563–571 (2009)
- 10) Buchanan, B. B., Adamidi, C., Lozano, R. M., Yee, B. C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R., Frick, O. L. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 5372–5377 (1997)
- 11) Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., Scharpé, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **9**, 736–744 (1995)
- 12) Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D., Pevzner, P. A. Does trypsin cut before proline? *J. Proteome Res.*, **7**, 300–305 (2008)
- 13) Hamaker, B. R., Griffin, V. K. Effect of disulfide bond-containing protein on rice starch gelatinization and pasting. *Cereal Chem.* **70**, 377–380 (1993)
- 14) 竹内五男, 島田潔, 中村清二. 清酒酒母の窒素成分の生因: (第2報) 米蛋白質と米澱粉の相互作用および澱粉ゲルによる溶解蛋白質の収着について. 日本醱酵工学会大会講演要旨集. **41**, 63–66 (1966)
- 15) 森高真太郎, 安松克治. 精白米のS H基と貯蔵中の品質劣化との関係. 栄養と食糧 **25**, 59–62 (1972)
- 16) Derycke, V., Veraverbeke, W. S., Vandeputte, G. E., De Man, W., Hosney, R.C., Delcour, J. A. Impact of proteins on pasting and cooking properties of nonparboiled and parboiled rice. *Cereal Chem.* **82**, 468–474 (2005)
- 17) Atkin, N. J., Abeysekera, R. M., Robards, A. W. The events leading to the formation of ghost remnants from the starch granule surface and the contribution of the granule surface to the gelatinization endotherm. *Carbohydr. Polym.* **36**, 193–204 (1998)
- 18) Yano, H. Improvements in the bread-making quality of gluten-free rice batter by glutathione. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7949–7954 (2010)