

雑豆に含まれる機能性因子の検討 (平成10年度)

研究開発課 清水英樹、大庭 潔

1. 研究の目的と概要

従来よりデンプンは小腸内で完全に消化され、グルコースとして吸収されるものと考えられていた。しかし、1980年代に入って食物繊維(DF)の研究が進むに伴い、消化されにくいデンプン、いわゆるレジスタントスターチ(RS)の存在が注目されるようになってきた。現在、RSと呼ばれているものには数種類が存在し、その生理的・栄養的重要性にも差があるといわれているが、大腸に達したデンプンが微生物により利用され短鎖脂肪酸を生産するという点では、RSはDFと同様であり、日常の食生活では量的にデンプンのほうがDFよりも比重が大きいことから、ヒトの健康面においては重要と考えられる。

また、池上らは豆類およびその加工品中の食物繊維定量法の検討において、デンプン含量の多い豆類では加熱によりDF定量値が高くなり、その要因は加熱によるRSの生成であると推察している¹⁾。

以上のような背景のもと、本研究では、十勝圏域の主要農産物である雑豆(小豆・手亡・金時)に含まれるデンプン、特にRSに着目し、それらの基礎的特性を把握するとともに、RSとしての機能性を明らかにし、その機能性を活かした新しい加工方法と機能性食品の提案を行うことを目的とする。

本年度は、雑豆中のデンプンに対して、RSが生成するといわれている種々の処理を行い、それらの特性を評価するとともにRS含量に関する検討を中心に行った。

2. 試験研究の方法

1) 乾豆からのデンプン調製

小豆・手亡・金時の各乾豆をピンミルで粉碎した後0.2%NaOH溶液で2回洗浄し、遠心分離により集めた沈殿について、水洗・静置・デカンテーションをpHが中性になるまで繰り返し、湿式篩分により75 μ m以下のものを集めて風乾することにより調製した。

2) デンプンの各種処理方法

調製した各デンプンについて以下のような処理を行った。

・脱脂処理

各デンプン試料に4倍量の85v/v%エタノールを加え、攪拌しながら2時間還流した後、熱時吸引ろ過した。この操作を3回繰り返した後、残さを85v/v%エタノールで洗浄し、風乾した。

・温水処理

各デンプン試料に20倍量の蒸留水とトルエンを若干加え、55 $^{\circ}$ Cで7日間振とうした後、吸引ろ過した。残さを、エタノール・アセトン・ジエチルエーテルで順次洗浄し風乾した。

・湿熱処理

各デンプン試料に蒸留水を加えて含水率27%に調製し、以下の3条件でオートクレーブ処理を行った後風乾し、乳鉢で解砕した。

100 $^{\circ}$ C - 30分、120 $^{\circ}$ C - 30分、130 $^{\circ}$ C - 30分

・糊化・凍結融解処理

各デンプン試料に蒸留水を加えて5w/v%の懸濁液を調製し、オートクレーブにて糊化(100 $^{\circ}$ C、30分 - 120 $^{\circ}$ C、20分)した後、-20 $^{\circ}$ Cで1晩凍結した。次に室温で解凍した後凍結乾燥し、粉碎した。

3) RS含量

食物繊維定量法であるProsky(AOAC)法²⁾により、各種処理デンプン中のRS含量および各乾豆粉碎物、煮豆粉碎物の食物繊維含量を求めた。また、各種処理デンプンに関して、X線回折、DSC、SEM観察等によりそれらの性質を調べた。

3. 試験研究の結果および考察

Prosky法における各種処理デンプン中のRS含量および各乾豆・煮豆粉碎物の食物繊維含量の測定結果を表1に示した。

表1 Prosky法による食物繊維(RS)含量

(DB%)

	小豆	手亡	金時
未処理	0.5	1.5	1.7
脱脂処理	0.5	1.6	1.9
温水処理	1.6	2.5	2.4
湿熱処理(100)	1.4	2.8	2.1
湿熱処理(110)	1.9	3.8	3.5
湿熱処理(120)	2.0	3.2	3.4
糊化・凍結融解処理	5.1	7.7	7.8
乾豆粉碎品	13.5	15.5	15.4
煮豆乾燥粉碎品	20.3	34.5	28.2

脱脂処理では、RS含量にほとんど変化は認められなかった。また、温水処理ではわずかにRS含量が増加する傾向にあるがその量は1%程度であった。湿熱処理では、X線回折図やDSC測定において明らかに未処理のものと違いがみられ、結晶構造や糊化特性に変化は起こっていると考えられたが、RS増加量は1~3%程度と低い結果であった。

糊化・凍結融解処理では、中ではRS含量が高く5~6%程度の増加がみられた。

以上のように、3種ともにデンプン自体にRSはほとんど存在せず、RSが生成するといわれている処理を行うことにより、生成はするがその増加量はそれほど多くはないことがわかった。ただし、糊化・凍結融解処理では比較的RS(おそらく老化デンプンと思われる)生成量が多く、この処理を繰り返しおこなった場合のRS生成量等に関し、さらに検討の必要があるかと思われる。

一方、乾豆および煮豆のDF含量を比較すると、小豆で約7%、手亡で約19%、金時で約13%と、3種ともに煮豆でDF含量が大きく増加し、池上ら¹⁾の報告と同様の傾向を示した。これらの試料をSEMで観察したところ、乾豆粉碎品では、物理的衝撃により粉碎された種皮や露出したデンプン粒子(一部タンパクと思われるものが表面に付着している)が観察され、子葉細胞のように複数のデンプン粒子が細胞壁に包まれた状態はみられなかった。一方、煮豆粉碎品では、粉碎された種皮の他にあん粒子と同様の形状をした粒子がみられた。あん粒子は、もともと子葉細胞のような状態で存在していた複数のデンプン粒子が、加熱操作により膨潤糊化し、さらにその表面が熱変性したタンパク等により強固に被覆されたものである。煮豆におけるDF含量の増加は、加熱操作により生成したあん粒子状のものが酵素分解されず、その結果DFとして定量されたことによるものと推察された。これについては、今後さらに検討を行う予定である。

参考文献

- 1) 本多千代, 難波豊彦, 浅岡修, 湯本邦子, 林敏夫, 池上幸江, 高居百合子: 食衛誌, 33, 46~51(1992)
- 2) 綾野雄幸: 改訂新版 食物繊維(印南敏, 桐山修八共編), 45~53, 第一出版(1995)

雑豆に含まれる機能性因子の検討（第2報）（平成11年度）

研究開発課 佐々木香子、清水英樹、大庭 潔

1. 研究の目的と概要

豆類には、デンプンを多く含むタイプとタンパク質や脂質を多く含むタイプがあるが、雑豆類は前者に相当し、煮豆やアン製品として利用されている。また、豆類には食物繊維（DF）が相当量含まれており、その供給源として重要な食品のひとつである。DFは、「人間の消化酵素で分解されない食物中の難消化性成分」と定義され、（1）非デンプン性多糖類とリグニン、（2）難消化性デンプンおよびその関連化合物、（3）その他の難消化性物質に分類することができる。この（2）に分類されるもののひとつにレジスタントスターチ（RS）がある。RSは、アミラーゼの作用を受けにくく、2N水酸化カリウムで可溶化した後にはじめてグルコースとして定量されるデンプンに対して与えられた名称であり、「健常人の小腸管腔内において消化吸収されることのないデンプンおよびデンプンの部分加水分解物の総称」と定義されている。RSは物理化学特性の違いからいくつかの種類に分けることができる。また、ある種の雑豆類を、煮豆などのように加熱処理をすると、RSが生成して食物繊維含量が増加することが報告されている。

昨年度は、雑豆（小豆、手亡および金時）を用い、それらを加熱することによるRSの生成に関し検討した。その結果、（1）雑豆類を煮豆にすると、食物繊維定量値が高くなること、（2）雑豆類から単離したデンプンを加熱加工処理すると、デンプン自体にも数%のRSが生成すること、を明らかにした。また、煮豆における食物繊維定量値の増加には、加熱によるデンプン自体のRSへの移行のほかに、アン粒子の形成が関与しているものと推察された。今年度は、アンに着目し、その食物繊維定量値と粒子形態との関係について明らかにすることを目的として検討を行った。

2. 試験研究の方法

（1）試料

試料として小豆、手亡および金時（いずれも平成10年産）の乾豆を用いた。また、アンは以下のように調製した。すなわち、各乾豆300gを水洗後、渋切りのために3倍量の水を加えて15分間煮沸し、乾豆と同量のピクリ水を加え10分間加熱を止めた。渋切り水を捨て、乾豆の5倍量の水を加えて沸騰した後、60分、90分および120分間の条件で煮熟した。次に水を加えて約80にした後磨砕機を通し、篩分け（40mesh、次いで65mesh）により、アンと残さを分離した。水さらしを2回繰り返した後、圧搾機により脱水し、凍結乾燥することにより生アン試料を調製した。

（2）乾豆およびアンの成分分析

乾豆およびアンの一般成分は常法により分析した。デンプン含量はアルカリ糊化 - グルコアミラーゼ - グルコースオキシダーゼ法により分析した。食物繊維はプロスキー法により分析した。

（3）粒度分布測定

アンの粒度分布は、粒度分布測定装置SALD-2000A（島津製作所製）を用い、水を分散媒として測定した。

（4）顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡（SEM）を用い、アンの粒子形状を比較した。また、クライオ - SEMにより乾豆およびアン粒子内部の状態を観察した。

（5）アンの完全粒子、損傷粒子および崩壊粒子の定量

釘宮らの方法にしたがい、アンの完全粒子、損傷粒子および崩壊粒子の存在割合を求めた。

3 試験研究の結果および考察

(1) アンの食物繊維(DF)定量値

アンのDF定量値は、手亡、金時、小豆の順に、それぞれ48~53%、44~51%、28~36%と高い値を示した(図1)。また、これらの内、小豆で20~36%、手亡で28~38%、金時で29~37%が、生成したRS様物質によるものと考えられた。また、DF定量値は、煮熟時間の増加に伴って減少した。

(2) アンの粒子形態

調製したアンの粒度分布は、煮熟時間によらずほぼ一定であった。また、SEMによってアン粒子を観察した結果、煮熟時間が長いと粒子表面の細胞壁に損傷部位が多い傾向がみられた。また、アン粒子内部では、煮熟により膨潤したデンプン粒が、熱変性したタンパク等を押し出すように広がっており、その度合いは煮熟時間の長いほうが大きかった。このことから、煮熟時間の増加に伴う細胞内デンプンの膨潤圧の増大が、細胞壁の損傷要因のひとつと考えられた。

(3) アンの崩壊粒子、損傷粒子および完全粒子組成

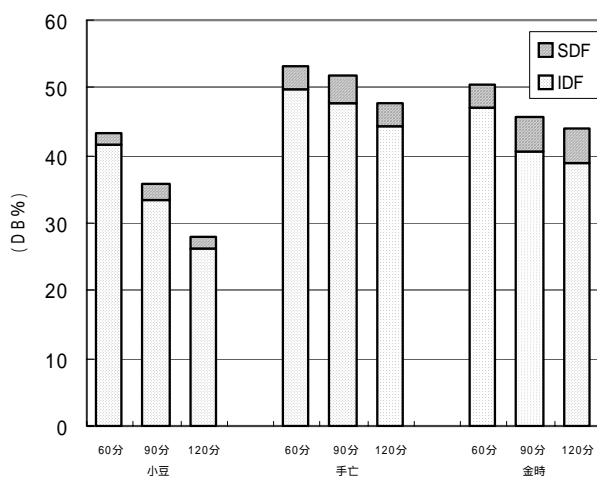


図1 アンの食物繊維定量値

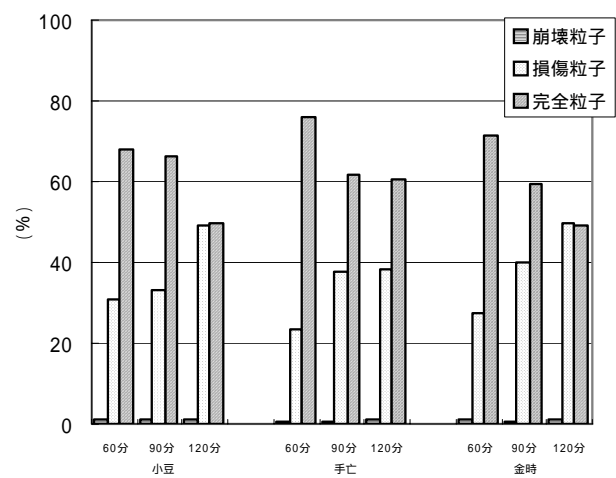


図2 アンの崩壊・損傷・完全粒子組成

釘宮らの方法¹⁾、²⁾により、調製したアンの崩壊粒子、損傷粒子および完全粒子組成を求めた(図2)。崩壊粒子はいずれも1%前後と少なく、水さらし工程で除去されていると考えられた。また、損傷粒子は煮熟時間の増加にともなって増大し、完全粒子は減少した。調製したアンのDF定量値と粒子組成の結果から、アンのDF定量値の増加要因であるRS様の作用を示す主体は、アン粒子中の「完全粒子」と考えられた。

RSは、物理化学特性の違いからいくつかの種類に分けられており、「食品のマトリクス構造中に包み込まれているため、消化酵素が作用できないデンプン」がそのひとつとされている。アン粒子の構造は、まさにこれに該当するものであり、アン粒子自体がRSと考えられた。また、その含量は調製条件によって異なる可能性はあるが、かなり多いことがわかった。それが食物繊維と類似した生理作用を示すものであれば、煮豆またはアンとして日常摂取する機会の多い食品であることからその意義は大きいと考えられた。

参考文献 1) 釘宮正往・平田 健：日食工誌，34，581(1987)

2) 釘宮正往・平田 健：日食工誌，34，654(1987)

雑豆類の新しい加工食品の開発（第3報）（平成12年度）

研究開発課 佐々木香子、田中 彰、大庭 潔

1. 研究の目的と概要

農産物の中でも豆類はタンパク質を多く含む食品として知られ、古くから、日本人の主要なタンパク源とされてきた。豆類の中でタンパク質について最も利用されているのは大豆であり、味噌、醤油、豆腐など様々な加工品を通して、タンパク質について多くの研究がなされ、その性質が明らかになっている。一方、十勝圏域の主要農産物でもある小豆などの雑豆類は、デンプンが主要成分であることから、加工品についてもアンや煮豆などデンプンの特性を生かしたものが多いが、タンパク質が20%以上も含まれており、他の農産物よりも高含量であるにも関わらず、それらの特性についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、雑豆(小豆、手亡、金時)に含まれるタンパク質について、その性質や機能性について明らかにするとともに、アン加工における、タンパク質の性質の変化や機能性についても明らかにした。

2. 試験研究の方法

(1) 供試試料

小豆、手亡および金時の乾豆を供試した。乾豆は超遠心粉碎機で粉碎した。アンの調整は前年度と同様に行い、凍結乾燥させてアン試料とした。

(2) 乾豆およびアンの成分分析

水分、タンパク質、脂質および灰分は常法にて分析した。炭水化物は差し引き換算であらわした。食物繊維はProsky法にて分析を行った。遊離アミノ酸は75%エタノールで抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析を行った。

(3) 乾豆およびアンからの分離タンパク質試料の調整

色素を除くために皮を除去した豆とアンを試料とした。試料に水酸化ナトリウム溶液を加えて抽出し、遠心分離して上澄みを得た後、硫酸アンモニウムを加え1時間攪拌してタンパク質を塩析させた。遠心分離して沈殿を集め、水酸化ナトリウムを加えて溶解し、脱塩装置で残った塩を除去した。脱塩した抽出液を凍結乾燥し、分離タンパク質試料とした。

(4) 分離タンパク質の性状

消化率の測定

分離タンパク質試料に0.2N HClとペプシンを加え、37℃の恒温槽で3時間反応させた。水酸化ナトリウム溶液を加え中和し、リン酸緩衝液(pH 7.5)とパンクレアチンを加え、37℃の恒温槽で24時間反応させた。遠心分離して上澄みを集め、上澄み中の遊離アミノ酸およびペプチドの総量をトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法で分析した。

SDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

分離用ゲルはアクリルアミド濃度が10%となるように調整した。泳動用緩衝液としてトリス-グリシン緩衝液を用い、定電流(15mA/枚)で2時間泳動を行った。

(5) アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性

熱水抽出は80℃で1時間、人工消化は前述の消化率測定に準じ、酵素処理はアルカラーゼを加え、60℃で3時間の酵素処理を行った。各抽出液の遊離アミノ酸およびペプチドの総量はTNBS法にて分析を行った。ACE阻害活性はCUCUMAN-CHEUNGの方法に準じた。阻害率が50%となる時の反応液中のタンパク質濃度を IC_{50} と定義した。

3. 試験結果および考察

(1) 乾豆およびアンのタンパク質

乾豆のタンパク質含量は小豆23.3%、手亡24.0%、金時21.8%に対し、アンは小豆27.3%、手亡25.5%、金時28.5%と乾豆よりわずかに多かった。また、非消化性と考えられるタンパク質が多く、乾豆、アンの両者において全タンパク質の47~80%も含まれていた。遊離アミノ酸含量は乾豆で金時が最も多く、手亡、小豆の順であった。アンは小豆で乾豆の約1/5、金時では1/10以下と少なく、アン加工時に遊離ア

ミノ酸が流出しているためと考えられた。

(2) 分離タンパク質の性状

分離タンパク質の人工消化率を図に示す。消化率は乾豆で小豆22.9%、手亡22.9%、金時18.0%、アンで小豆33.7%、手亡33.2%、金時33.6%とアンのほうが高かった。乾豆よりアンの消化率が高いのは、加熱処理などによる組織の軟化や阻害酵素の失活などが要因と考えられた。SDS PAGEのタンパク質の溶出パターンは手亡と金時は同じ傾向を示したが、小豆は他の2つと違ったパターンを示し、主要タンパク質の分子量は小豆が約54,000であったのに対し、手亡および金時では約49,000であった。アンのタンパク質溶出パターンは乾豆と同様であった。豆の消化率が低い原因として、組織が硬く消化酵素の作用を受けにくいこと、トリプシンインヒビターの存在などがあげられている。アンの消化率が乾豆よりも高いのは、加工時における組織の軟化やトリプシンインヒビターの失活によるものと考えられる。

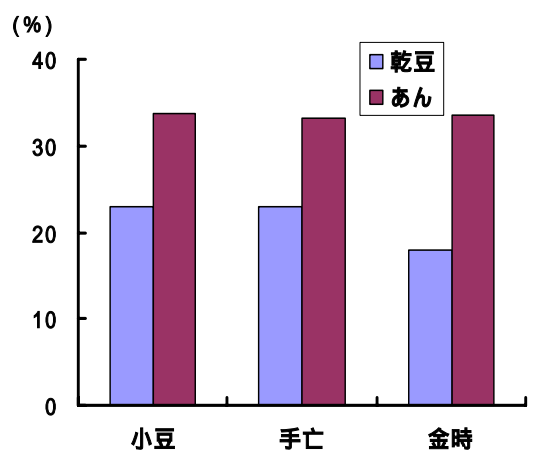


図. 分離タンパク質の消化率

(3) ACE阻害活性

ACE阻害活性の結果を表に示す。各抽出液におけるアミノ酸およびペプチド類の濃度は熱水抽出で最も少なく、また、酵素処理で最も多かった。IC₅₀は熱水抽出で値が小さく、阻害活性が最も高かった。また、アンの熱水抽出は活性が測定できなかった。人工消化を行うと、熱水抽出よりもアミノ酸及びペプチド濃度が上がるのに対し、IC₅₀は大きくなり、阻害活性は低くなった。酵素処理を行うとIC₅₀は乾豆の金時を除いて再び低くなった。雑豆に含まれるタンパク質の熱水抽出や酵素処理に高いACE阻害活性があることが期待された。

表. 各抽出液のACE阻害活性(IC₅₀)

	IC ₅₀ (μg/ml)		
	熱水抽出	人工消化	酵素処理
乾豆			
小豆	347	1520	592
手亡	240	1230	749
金時	237	854	811
あん			
小豆	-	2610	561
手亡	-	2670	772
金時	-	2280	862

4. まとめ

雑豆類(小豆、手亡、金時)のタンパク質は約80%が難消化性のタンパク質であった。これらの難消化性タンパク質はアンに加工することにより若干消化されるものの、大部分が難消化性として残った。また、水溶性タンパク質や難消化性タンパク質の酵素分解物にACE阻害活性が認められた。難消化性タンパク質には生理活性があることが知られており、レジスタントスターチとともに雑豆加工品の生理活性物質として期待される。

なお、本試験は(社)北海道豆類価格安定基金協会より一部ご協力を受けて実施されたものである。

小豆、菜豆品種に含まれる機能性因子の検討（第4報）（平成13年度）

研究開発課 田中 彰、大庭 潔

1. 研究の目的と概要

十勝圏域の主要農産物でもある小豆や隠元などの菜豆について、これまで、難消化性デンプンをはじめ、それらの機能性に関する研究を行ってきた。また、昨年は、タンパク質に注目し、それらの性質や機能性およびアン加工時における変化について、いくつかの試験を行ってきた。その結果、タンパク質の消化性が低いことや血圧上昇を抑制する効果があることが示唆された。本年度は、煮豆加工におけるタンパク質の性質の変化について検討し、また、昨年度に引き続き機能性因子についての検討をおこなった。

2. 試験研究の方法

(1) 煮豆の成分およびタンパク質の性質

供試試料

小豆、金時および手亡の乾豆を供試した。乾豆は超遠心粉碎機で粉碎した。煮豆の調整は次のように行なった。すなわち、乾豆に対し3倍量の水を加え、沸騰後15分間加熱して火を止め、等量の水を加え、10分間放置後、澱水を分離した。さらに5倍量の水を加え、45分間加熱して澱水を分離して煮豆を得た。凍結乾燥させて煮豆試料とした。

成分分析

水分、タンパク質、脂質および灰分は常法にて分析した。炭水化物は差し引き換算であらわした。食物繊維はProsky法にて分析を行った。遊離アミノ酸は75%エタノールで抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析を行った。

消化率の測定

前年度と同様に行なった。すなわち、試料にペプシンおよびパンクレアチンを加えて反応し、分解して生成した遊離アミノ酸およびペプチドの総量をトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法で分析した。

(2) 機能性因子の検討

供試試料

小豆、金時および手亡の乾豆を水に浸漬後、剥皮し、凍結乾燥して試料とした。

乾豆と煮豆の比較

熱水抽出、人工消化、酵素処理を行ない、機能性試験に供した。熱水抽出は80℃で1時間、人工消化は前述の消化率測定に準じ、酵素処理はアルカラゼを加え、60℃で3時間の酵素処理を行った。

溶媒による分画

乾豆熱水抽出画分に対し、50%濃度となるようにエタノールを加え、-20℃で1夜静置して生成した沈殿を遠心分離して集め、F-1画分とした。また、上清に対し、90%濃度となるようにエタノールを添加し、-80℃、1時間静置して同様に沈殿を集めF-2画分とした。上清を溶媒留去しF-3画分とした。それぞれの画分をリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し、以下の機能性試験に供した。

抗酸化活性の測定

DPPHラジカルの消去能を測定した。DPPH試薬に試料溶液を加え、一定時間反応させ、516nmにおける吸光度を測定した。

アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性

各抽出液の遊離アミノ酸およびペプチドの総量はTNBS法にて分析を行った。ACE阻害活性はCUCHUMAN-CHEUNGの方法に準じた。

3. 試験結果および考察

(1) 煮豆の成分およびタンパク質の性質

煮豆のタンパク質含量(表1)は小豆26.2%、金時25.7%、手亡24.3%であり、アンと同様に乾豆よりわずかに多かった。食物繊維は小豆18.2%、金時19.6%、手亡28.0%でアンより少なく、乾豆に近い含量であった。煮豆においては十分なアン粒子の形成がなされていないと考えられた。遊離アミノ酸含

量は100gあたり小豆が27mg、金時が147mg、手亡が86mgと、豆の大きいほど遊離アミノ酸含量も多く、小豆はアンと同じくらいに少なかった。人工消化によるタンパク質の消化率は小豆が74.5%、金時が66.8%、手亡が73.4%とアンが約33%であるのに対し、顕著に高くなった。豆のタンパク質は煮熟中にデンプンを包み込み、アン粒子を形成する。煮豆の場合、アン粒子の形成が十分ではなく、タンパク質が消化しやすい状態にあると考えられる。

(2) 機能性因子の検討

乾豆と煮豆の比較

抗酸化活性は熱水抽出画分より人工消化画分や酵素処理画分で高かったが、いずれも約10%と活性は高いとは言えなかった。ACE阻害活性は、熱水抽出画分において煮豆より乾豆の方が高く、また、酵素処理画分においては乾豆、煮豆いずれも60%と活性があることが示された。しかし、人工消化画分は低く、煮豆の摂食による効果は期待できなかった。

溶媒による分画

抗酸化活性は小豆のF-3で46%と高い活性を示した。金時もF-3が最も高かったが、F-3はポリフェノール含量も多く、小豆、金時の色素によるものと考えられる。ACE阻害活性は(図1)金時、手亡のF-1で高く、80%を超えていた。小豆はF-3分画が最も高く、金時、手亡とは異なる傾向を示した。大豆ペプチドにACE阻害活性があることは報告されているが、小豆や菜豆類にも同様の効果があることが期待される。活性の高かった金時、手亡のF-1画分はペプチド含量も低く、高い活性をもつ物質の存在も示唆される。

表1. 煮豆の成分

	%DB		
	小豆	金時	手亡
たんぱく質	26.2	25.7	24.3
脂質	2.0	2.8	3.0
灰分	1.9	2.7	2.6
炭水化物	69.9	68.8	70.1
食物繊維	18.2	19.6	28.0
たんぱく質消化率*	74.5	66.8	73.4

* %-prot.

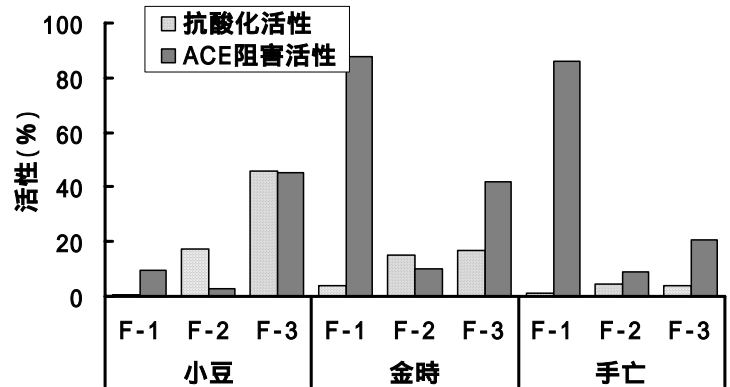


図1. 抗酸化活性とACE阻害活性

4. まとめ

煮豆の食物繊維含量はアンより少なく、タンパク質の消化率が高かった。煮豆はアン粒子が生成しないことから、難消化性の成分が持つ機能性は期待できないものの、栄養的には豆の栄養素を十分に補給できる加工方法といえる。抗酸化活性は煮豆にはほとんど認められず、ACE阻害活性は熱水抽出や酵素処理で高かったが、乾豆よりは低く、加工の際に損失していると考えられる。また、金時、手亡の熱水抽出の50%エタノール濃度における沈殿物に高い活性が認められ、機能性因子の存在が期待できる。