

種々の“古代米”澱粉の糖鎖解析の比較および抗酸化成分について

中 田 忍¹⁾, 角 田 万里子²⁾, 奥 田 玲 子³⁾, 三 崎 旭⁴⁾

(1)大阪教育大・教育*, (2)甲南女大・人間科学**, (3)四条畷学園短大***, (4)四条畷学園大****)

Comparative Studies on the Unit Chain Distributions of Endosperm Starch of Ancient-type, Pigmented Rice Grains, and Their Antioxidant ActivitiesShinobu NAKATA¹⁾, Mariko KAKUTA²⁾, Reiko OKUDA³⁾ and Akira MISAKI⁴⁾¹⁾Osaka Kyoiku University, ²⁾Konan Women's University,³⁾Shijonawate Gakuen Junior College, ⁴⁾Shijonawate Gakuen University

Summary

Distributions of α -1,4 unit chains of the endosperm starch molecules of so-called ancient-type, pigmented rice grains were precisely analyzed by HPAEC, after enzymic debranching of their amylopectin fractions, and compared with those of cultivated, ordinary Japanese rice, and also of various non-kernel cereals. The results show that the unit chain of color pigmented rice starches are distributed DP 6 to 30 with high proportions of DP 10–12 peak, similar to those of other cereal starches, suggesting that the rice endosperm starches, used as main energy-supplied source would not significantly different during human long history. In the present studies we noted that, in the case of rice starch, the unit chain of amylopectin of the endosperm starch, might be shifted significantly to longer, as milling degrees are increased, as in the case of 10 %, 40 %, and 60 % milled Yamadanishiki rice, which would affect to sake-fermentation. The antioxidant activity in the bran fraction of red color pigmented rice grain was also confirmed.

栽培稲の起源は、アッサム–雲南にかけての山間部という説と長江の中、下流付近という説、また近年では遺伝子解析により東南アジアという有力な説もあり、また日本への渡来ルートにも諸説ある^{1,2)}。私たちは、わが国の栽培稲の渡来の歴史に興味を持ち、胚乳澱粉の構造特性、とくにアミロペクチン分子の α -1,4単位鎖の鎖長分布には種別特性や地域性などの特徴が存在するのではないかということ、またこのような視点から栽培稲の日本への渡来経路の解明に何らかの知見が得られると考え、アジア各地の米胚乳澱粉の構造解析を行なっている。

さらにその形質が野生種に由来するという視点から、いわゆる古代米と称される赤米や黒米などの有色米についても解析を行い、野生種との比較検討を行なった。

一方、有色米は、抗酸化などの機能活性の観点からも近年注目されている³⁾のでこれら有色米の抗酸化性についても検討を行った。

材料と方法

1. 胚乳澱粉の調製

使用した米試料は赤米⁴⁾(群馬県産)、白米は日本晴(生物資源研 渋谷氏より提供)、山田錦(灘酒造組合および小西酒造(株)より提供)、コシヒカリ(富山県産、市販品)、黒米(富山県産、市販品)、インディカ米(Tilda, ネパール産、市販品)(以上すべて *Oryza sativa* L.) および野生稲(W50, 大成建設(株)研究所より供与)である。これら米試料の胚乳部を粉碎後30メッシュのふるいに通し、実験材料とした。

雑穀のヒエ(Japanese barnyard millet, *Echinochloa utilis* Ohwi et Tabuno)、アワ(foxtailed millet, *Setaria italica* P. Beuv)、キビ(common millet, *Panicum miliaceum* L.)、アマランス(amaranthus, *Amaranthus cruentus*)は精白された市販品を購入し、米試料と同様に粉碎した後に実験に供した。

*所在地：柏原市旭ヶ丘4-698-1(〒589-8582)

**所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23(〒658-0001)

***所在地：大東市北条4-10-25(〒574-0011)

****所在地：大東市北条5-11-1(〒574-0011)

2. 糊化澱粉の調製

90% 搗精赤米などの澱粉 50 mg を 1 M NaOH (0.8 mL) に加え、窒素気流下または少量 (約 5 mg) の NaBH₄ の存在下で 45°C に加温、攪拌可溶化し、さらに 10°C で一晚攪拌を続け完全に糊化させた。等量の水で希釈後、HCl で中和し、糊化澱粉溶液とした。

3. α -1,6 分岐切断酵素処理

糊化澱粉溶液の一部 (0.2 mL) に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 0.1 mL を加えた後、分岐切断酵素 (結晶イソアミラーゼ, 林原) 100 unit を加え、37°C で 6 時間反応を行なった後、pH 6.0 にてプルラーゼ (林原) 10 unit により α -1,6 分岐結合を完全に切断した。試料溶液は酵素を熱失活後、一部を超純水で希釈、生成した α -1,4 結合のオリゴ糖の鎖長を Dionex 社の陰イオン液体高速クロマトグラフィーを用いた HPAEC-PAD (High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection) 法により解析した。溶出液として 150 mM 水酸化ナトリウム溶液と 150 mM 水酸化ナトリウム/0.1 M 酢酸ナトリウム溶液を用い、40 分間で酢酸ナトリウム濃度 150~400 mM となるようにグラディエントプログラムを設定し、流速 1.0 mL/min にて溶出した。

4. 抗酸化活性の測定

赤米および白米 (コシヒカリ) の玄米から調製した糠部分のメタノール抽出画分 (約 1 mg) を用いて 0.02% リノール酸エタノール溶液の自動酸化を抑制する効果 (37°C, 暗所保存で 27 日間) をロダン鉄アンモニウム法⁵⁾の変法⁶⁾およびチオバルビツール酸 (TBA) 法⁷⁾を用いて経時的に測定した。対照は抗酸化物質無添加とし、比較のために抗酸化剤の標準物質として α -トコフェロールおよびケルセチンを用いた。

結果と考察

1. 各種澱粉の鎖長解析

1) 赤米, 黒米, 白米

分岐酵素で完全に α -1,6 分岐切断処理した赤米および黒米の澱粉の鎖長分布を、パルス・アンペロメーターを検出器とした陰イオン液体高速クロマトグラフィー (Dionex LC, HPAEC) で解析し、在来白米 (日本晴) と比較した結果を Fig. 1 に示した。赤米および黒米では重合度 (DP) 10~12 を中心に 4 から約 30 にわたって分布し、山田錦の場合 DP10 および 11 を中心として 4~30 にわたって分布しており、両者ともよく似た鎖長分布を示した。山田錦の鎖長分布と古代米の形質を受け継ぐと想定される赤米を比較すると、胚乳澱粉の構造に関する限りある程度の差は見られるが、ほとんど分子進化がみられない。日本における栽培稲の胚乳澱粉の鎖長分布にはあまり多様性が無いことが示された。もっとも、いわゆる現在の赤米は本来の古代

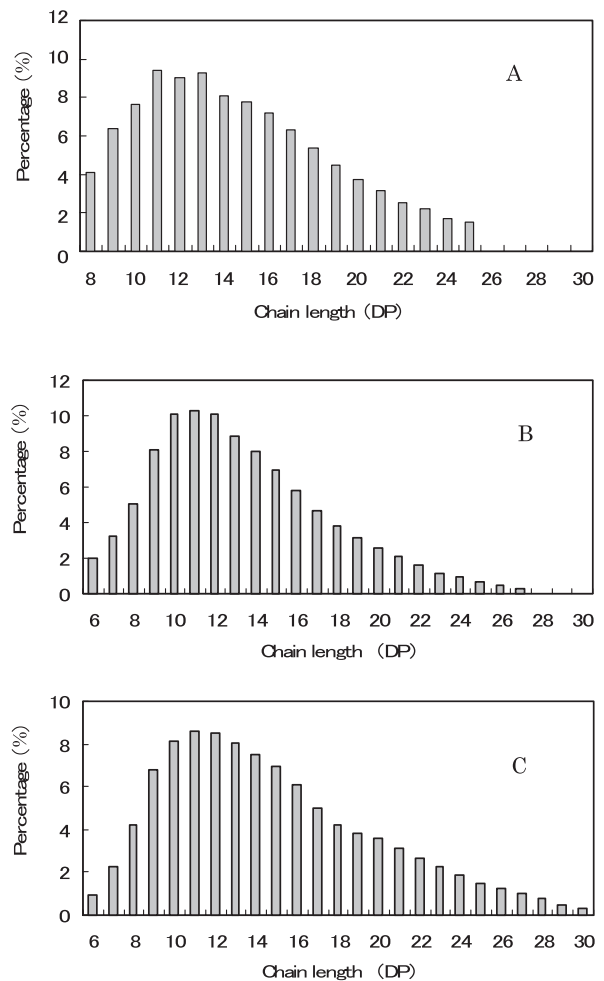


Fig. 1 HPAEC profiles of α -1,4 unit chain distributions of some rice starches, debranched by isoamylase plus pullulanase. A. ordinary cultivated rice (White rice, Nihonbare), B. red-color rice, C. black color rice (waxy).

米ではなく長い栽培過程において普通米との交雑が行われた可能性も否定できない。

2) 野生種米, インディカ米

同様に、野生種米である WS50, インディカ米の Tilda 米, の鎖長分布と普通種の日本晴とをそれぞれ比較し、結果を Fig. 2-A, B に示した。日本晴の鎖長分布は山田錦とほとんど同じであり、WS50 の場合にはやはり重合度 (DP) 10~12 を中心とした分布を示したが、DP 6~10 の短鎖部分の比率は日本晴より低く、長鎖部分の比率が高くなるという結果が得られた。インディカ米も DP 12 にピークがあるが、日本晴に対してインディカ米試料では明らかに長鎖側の比率が高くなり、顕著な差異が存在した。このことは、米澱粉の鎖長分布に地域差や種による差異が存在することを示唆する。

3) 雑穀

市販のいわゆる雑穀 4 種の胚乳澱粉を用いて赤米と同様の酵素による分岐切断操作を行い、アミロペクチン部分の鎖長分布を解析した結果を Fig. 3 に示した。キビ, ヒエ, アワはイネ科, アマランスは双子葉植物のヒユ科に属して

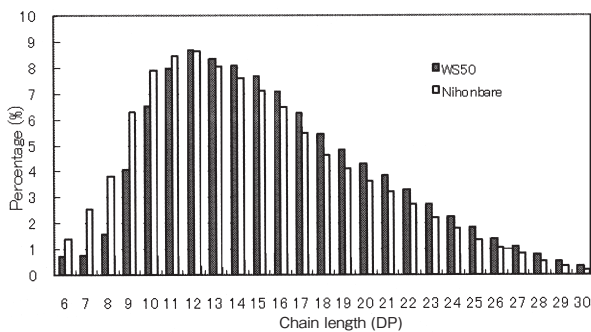


Fig. 2-A Comparison of unit chain distributions of wild rice (WS50) and ordinary white rice (Nihonbare)

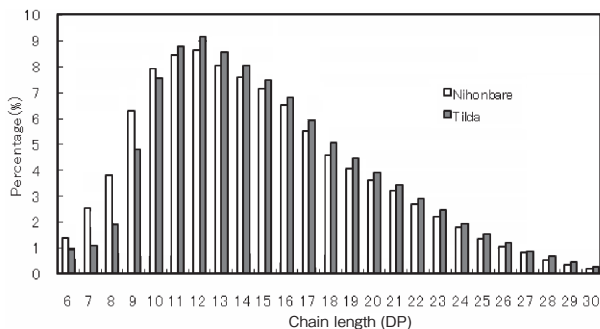


Fig. 2-B Comparison of unit chain length distribution of *indica*-type rice (Tilda) and *japonica*-type rice starches.

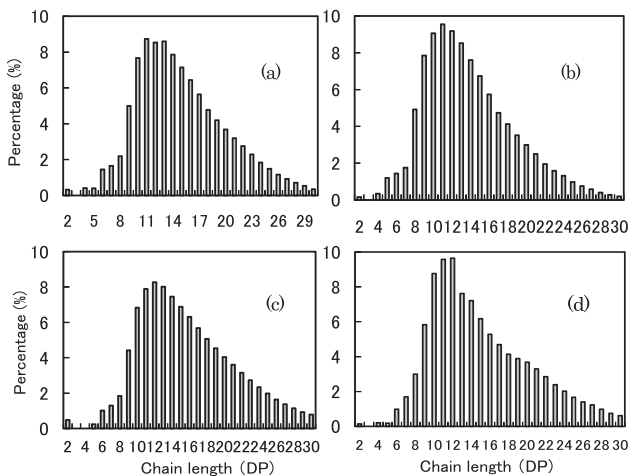


Fig. 3 Comparison of unit chain distributions of some pseudo-cereal grain starches.

- (a) common millet, *Panicum miliaceum* L.,
- (b) Japanese barnyard millet, *Echinochloa utilis* Ohwi et Tabuno,
- (c) foxtailed millet, *Setaria italica* P. Beuv.,
- (d) amaranthus, *Amaranthus cruentus*.

いる。鎖長分布測定の結果は米澱粉の場合と同様、重合度10から12を中心とした分布を示し、イネ科の3種間には短鎖・長鎖の鎖長分布にも大きな差は見られなかったが、一般的には野生種であるWS50に近い分布を示した。ただしアマランスではイネ科の3種に比べて鎖長13から16の占める割合が低くなる特徴があった。

2. 胚乳澱粉の精白度の違いによる鎖長分布

米を食する場合には玄米を搗精し、精白米として利用す

るのが一般的である。搗精度 (milling) が高くなる (精白歩留りの低い) に従い、より胚乳の中心部の割合が高くなるとみなされる。このような搗精度の違いが澱粉の鎖長分布にどのように影響するかを検討し、興味ある結果を得た。試料は赤米 (精白歩留り 90% および 40%) および白米 (山田錦, 精白歩留り 90%, 60% および 40%) を用い、糊化後に分岐切断酵素を反応させ、HPAEC 分析に供した。酒米である山田錦の場合、中心鎖長は搗精度 90% では DP 11, 60% では DP13, 搗精度 40% では DP14 であり、分布も搗精度が高くなるに従い長鎖側にシフトした (Fig. 4A)。搗精度 40% の酒米は胚乳表層に多く含まれるタンパク質やビタミン類を除去することで雑味の防止、大吟醸酒としての酵母によるアルコールの良好な発酵のために選択されているが、この画分のアミロペクチン分子の分枝の単位鎖長は長いことから、結果的に分子内空間が広がり、酵母の発酵作用により効果をもたらすことが考えられる。赤米の場合には搗精がすすんでも中心鎖長 (DP11) に変化はなく、中心鎖長の占める割合は低くなり、鎖長分布のパターン曲線は緩やかになる傾向がみられた (Fig. 4B)。胚乳の中心に近いほどアミロペクチンの鎖長の比率が増加する傾向にあることは興味ある事実である。

3. 抗酸化性の検討

有色米は、抗酸化などの機能性の観点からも近年注目されている。赤や黒の着色は果皮の部分にあり、着色を生かすために玄米もしくは玄米に近い形態で使用される。そこ

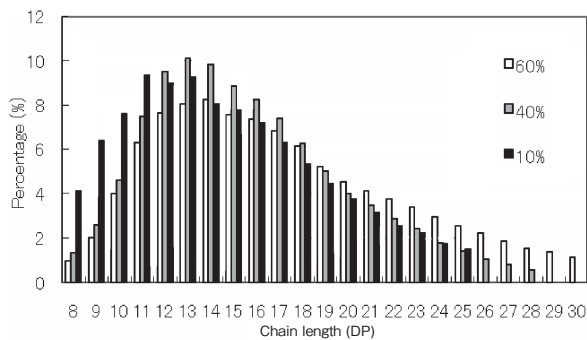


Fig. 4-A Comparison of unit chain distributions of 10%, 40% and 60% milled sake-rice (Yamadanishiki).

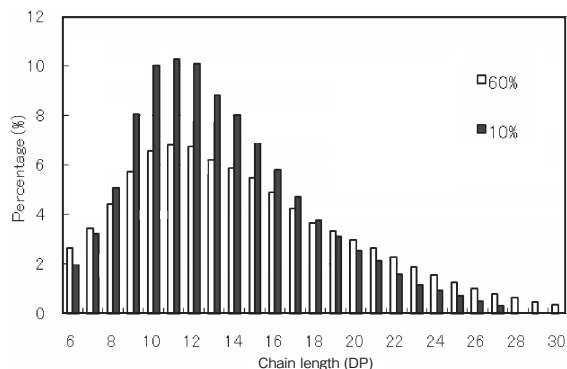


Fig. 4-B Comparison of unit chain distributions of 10% and 60% milled red rice.

で、色素を有する果皮部分を含んだ赤米の糠部分をメタノール抽出し、ロタン鉄アンモニウム法およびTBA法でリノール酸酸化の抑制効果を測定し、抗酸化性の検討を行ない、白米との比較を行なった。その結果、赤米、白米試料ともに生成する過酸化脂質量をケルセチンと同様に30日近く抑制したことから、酸化の抑制効果を十分に有する

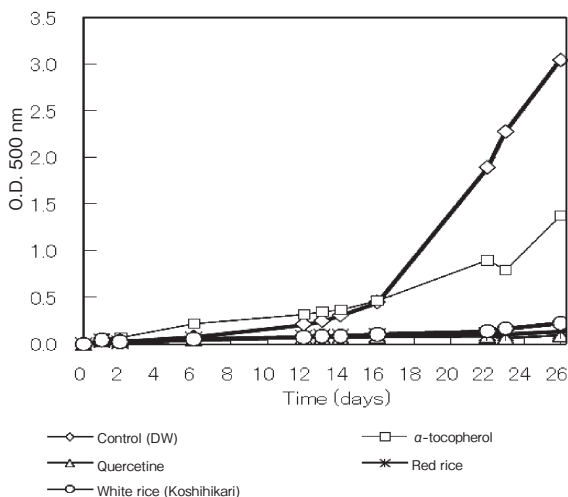


Fig. 5-A Antioxidative red rice bran (methanol extract), as assayed by ferric thionate method.

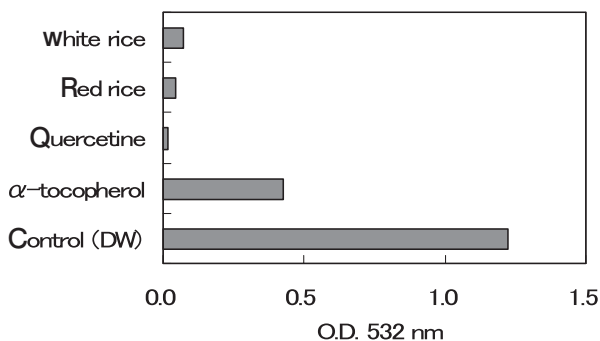


Fig. 5-B Antioxidative activity of red rice bran (methanol extract), as assayed by TBA method.

ことが認められた。3週間以降では赤米糠抽出物のほうに抑制効果が高い傾向が見られるが、含有色素の効果とも考えられる (Fig. 5-A, B)。

以上の結果から、わが国において栽培される米澱粉の単位鎖の鎖長分布は、品種による多様性はほとんど見られな

いが、インディカ米や野生種米との比較において短鎖の比率が高くなる特徴を有することから、アミロペクチン分子の α -1,4単位鎖の鎖長分布には種別特性や地域性などの特徴の存在する可能性が示唆された。

今後、アジア各地のジャポニカやインディカ栽培種米試料についての解析を行い、その点を明確にする必要がある。また、胚乳内層と外層のアミロースおよびアミロペクチンの短鎖と長鎖の比は同一品種内に差異は無いとの報告⁷⁾はあるが、単位鎖長分布に違いが見出されたことから、物性や加工特性との関連性を含め、詳細については今後の検討課題であろう。

謝 辞

野生米の試料をご提供いただきました大成建設(株)研究所 吉田光毅氏および Asahi フードアンドヘルスケア 遠藤昇氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 渡部忠世 (1977) 稲の道, 日本出版協会, 東京.
- 2) Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanagae H, Konishi S, Yano M (2008) Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nature Genetics* 40: 1023–1038.
- 3) 猪谷富雄, 小川正巳 (2004) わが国における赤米栽培の歴史と最近の研究情勢, *日作誌* 73: 127–147.
- 4) 奥田玲子, 中田 忍, 石村哲世 (2007) 色素米の調理に関する基礎的研究, *四条曜短大紀要* 40: 49–56.
- 5) Osawa T, Namiki M (1981) A Novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric Biol Chem* 45: 735–739.
- 6) Inatani R, Nakatani N, Fuwa H (1983) Antioxidative effect of the constituents of Rosemary (*Rosemarinus officinalis L.*) and their derivatives. *Agric Biol Chem* 47: 521–528.
- 7) Okuda M, Kobayashi K, Itani, T, Aramaki I, Hashizume K (2007) Effects of milling ratio of properties of endosperm starches and Rice Flours from milled Japanese rice grains. *J Appl Glycosci* 54: 1–5.