

## 塩ストレス条件下で発芽させた豆類・穀類の高機能性物質生産について

金内 誠

宮城大学大学院食産業学研究科

**概要** 穀物や豆類の発芽物は、機能性物質が多く含まれる。特に大豆は、豊富なタンパク質や脂質を含み栄養価が高く、発芽によって更なる機能性物質生産が望まれる。そこで、大豆を食塩存在下の高ストレス条件下で発芽させ、機能性物質の生成について検討することを目的とした。それにより、塩類の食品への高度利用と機能性食品開発の一助とし、大豆の代表的品種におけるストレス耐性の有無も解明する。

大豆の代表的品種であるオオツル、トヨマサリ、ユキホマレの3種を試料とし、遊離アミノ酸やペプチドを示すホルモール窒素量を測定したところ、3日間の発芽によってホルモール窒素は上昇した。大豆の代表的品種の「東山」の系統であるオオツルのホルモール窒素は塩化ナトリウム水溶液によってタンパク質分解が促進されたと考えられた。一方、「十系」品種の系統であるトヨマサリは、0.5～1.0%塩化ナトリウム水溶液にて発芽させたトヨマサリのホルモール窒素量は上昇し、3～10%塩化ナトリウム濃度では減少した。同じ「十系」品種の系統であるユキホマレにおいては、塩化ナトリウム水溶液にて発芽させると徐々に減少した。このように大豆品種の中には、塩化ナトリウム中で発芽させることで、大豆の貯蔵タンパク質から遊離してくるペプチドやアミノ酸を示すホルモール窒素量が増加することが明らかとなった。

また、水で発芽させたオオツルのグルタミン酸構成比は28%であった。一方、1%塩化ナトリウム水溶液にて発芽させたオオツルの遊離アミノ酸中のグルタミン酸構成比も上昇し、その構成比は、41%となることが明らかとなった。さらに、グルタミン酸が前駆体となり生成されるGABA( $\gamma$ アミノ酪酸)を検討したところ、発芽前の各品種のGABA濃度は、2～3(mg/100 mL)程度であった。一方、塩化ナトリウム水溶液で発芽させたもののGABA濃度は、3～40倍に増加した。特に0.5～1.0%塩化ナトリウムで発芽させたもののGABA濃度は高いものであった。ACE阻害活性において、0.5%塩化ナトリウム水溶液で、2～3日間発芽させたオオツルのIC<sub>50</sub>は、0.02 mg、3.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものの0.05 mgと非常に小さい値を示した。トヨマサリとユキホマレは、塩化ナトリウムを含んだ水溶液での発芽によってIC<sub>50</sub>が大きくなり、ACE阻害効果が減少した。

以上のように、塩化ナトリウム溶液を用いて大豆を発芽させることで機能性や栄養成分を改良することが明らかとなった。

### 1. 研究目的

大豆は、豊富なタンパク質や脂質を含み栄養価が高いことが知られる<sup>(1)</sup>。また、大豆タンパク質の脂質代謝改善やイソフラボンのエストロゲン様活性効果などの新規高機能食品の開発されている<sup>(2)</sup>。

ところで、植物種子は、種子形成過程において合成・蓄積作用が活性化されている。一方で、吸水による発芽過程において分解機能が活性化される。このとき、様々な酵素が生産され、この酵素によって物質変換される。これま

で、大豆に含まれるタンパク質より分解・遊離したグルタミン酸が脱炭酸することで $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)が生産されることが知られる<sup>(3)</sup>。GABAは、血圧降下作用や利尿作用、ストレス低減作用などがある<sup>(4)</sup>。

豆類は発芽時のストレス応答が顕著であり、ストレス応答として高機能物質を生成することが知られている。片桐ら<sup>(5)</sup>は大豆を二酸化炭素下で発芽させることにより、GABAの蓄積量が二酸化炭素処理前の6～14倍に増加したと報告している。さらに、GABA含量の多い大豆もや

しを低温(5℃)かつ、脱酸素空气中で保蔵することにより、その低下を防ぐことができることも報告している<sup>(5)</sup>。また、伊藤ら<sup>(6)</sup>は大豆種子に塩によるストレスを与えたところ、植物中の機能性物質の生産が促進され、子葉中の GABA やプロリン、アラニンの含有量が増加すると報告した。このように、豆類のストレス条件下の発芽における抗ストレス物質の生成に関する報告はある。しかし、ストレス環境下での多様な健康機能性物質の変化については未解明である。

そこで本研究では、豆類の中でも大豆の塩によるストレスに着目し、大豆種子の発芽時における塩ストレス応答を明らかとすることとした。

大豆を塩(塩化ナトリウム)による高ストレス条件下で発芽させ、機能性物質になりうる物質の生成変動について検討し、塩類の食品への高度利用と機能性食品開発の一助とすることを目的とした。また、品種間におけるストレス耐性の有無も解明することとした。

## 2. 研究方法

**供試試料** 主要国産大豆品種の中で、東山系(オオツル)および十系(トヨマサリ, ユキホマレ)平成 25 年度産を用いた。

**幼芽測定方法** 大豆種子の発芽は、Fig. 1 に示す方法によった。すなわち、乾燥大豆(100 g)を 25℃で 30 分間、1.0%次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌した。その後、水洗し、水及び 0.5%~10.0%塩化ナトリウム水溶液(300 mL)に 8 時間浸漬した。その後、16 時間水溶液から取り出し、再度水溶液に 24 時間浸漬して得られたものを発芽大豆とした。殺菌後からの経過時間で示した。(Fig. 1)

**試料調製方法** 発芽させた大豆種子 10 g を精秤し、蒸留水 30 mL を加えてホモジナイザー(SMT 社)で 5 分間ホモジナイズした。その後、濾紙(ADVANTEC 社)を用いて濾過を行い、蒸留水で 100 mL にメスアップした。次に、遠心分離(13,000×g, 10 分間)し、得られた上清をサンプル溶液とした。

**可溶性窒素量測定方法** ホルモール滴定法により測定した。滴定量からホルモール態窒素量を算出し、グリシン換算した。

**アミノ酸組成測定方法** 試料 20 g に 75%エタノールを添加し抽出後、ろ過し、乾固した。その後、0.02 mol/L の塩酸溶液を添加し、フィルター濾過したものを試料サンプルとした。分析は、アミノ酸分析機(日立高速アミノ酸分析計 L-8800 形)を用いた。

**GABA 濃度測定方法** 酵素法<sup>(7)</sup>により測定を行った。130 μL の 100 mM ピロリン酸カリウム緩衝液(pH8.6)(和光純薬工業株式会社)に、10 μL の 100 mM 2-メルカプトエタノール(和光純薬工業株式会社)、100 mM α-ケトグルタル酸(東京化成工業) 15 μL、10 mM β-NADP<sup>+</sup> 15 μL に、サンプル溶液 20 μL、GABase(0.58 U/mL)(SIGMA 社) 10 μL を加え、30℃で 1 時間酵素反応後、吸光マイクロプレートリーダー(Thermo SCIENTIFIC 社)を用いて A<sub>340</sub>を測定し、得られた検量線を用いて生成した NADPH 量から GABA の量を算出した。

**キレート率測定方法** メタロアッセイカルシウム測定 LP(メタロジェニクス株式会社)を使用して試料溶液中のカルシウムキレート量を測定した。試料ブランクとして蒸留水を使用し、カルシウム標準溶液は 10 mg/100 mL のものを使用した。

**ACE 阻害活性測定方法** マイクロプレート法<sup>(8)</sup>により測定を行った。試料 50 μL に 5 mU/mL の ACE 溶液(Angiotensin Converting Enzyme, from rabbit lung, SIGMA 社) 100 μL を添加し、プレートミキサーで混合後、37℃で 10 分間プレインキュベートした。次に、ACE

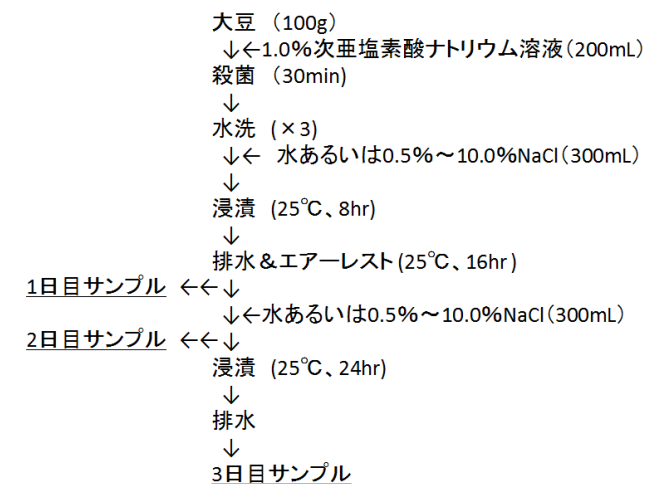


Fig. 1. 大豆の発芽法

基質溶液(アンジオテンシン変換酵素阻害活性測定試薬, 渡辺化学工業株式会社)を用い, 以下の式にて ACE 阻害活性(%)を算出し, ACE 阻害活性率が半分の 50%になる際の反応溶液中の大豆種子濃度を示す IC<sub>50</sub>の値を算出した。

$$\text{阻害活性}(\%) = [1 - (S - S_B) / (C - C_B)] \times 100 \quad (1)$$

試料溶液の蛍光強度を S, 試料溶液の代わりに蒸留水を添加した時の蛍光強度を C とした。また, S, C に対し酵素液の代わりに超純水を添加した時の蛍光強度をそれぞれ S<sub>B</sub>, C<sub>B</sub>とした。

### 3. 研究結果

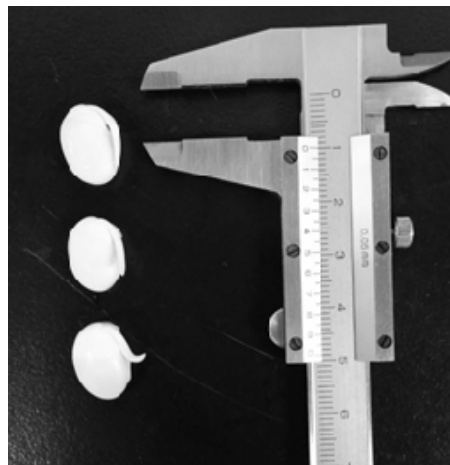
#### 3.1 塩化ナトリウム水溶液中で発芽させた大豆の遊離ペプチド及びアミノ酸組成の増加

まず, 予備試験として 1%塩化ナトリウム溶液を用い穀物(大麦 2 種, 小麦 1 種, アワ 1 種, 米 2 種)や大豆 3 類(オオツル, トヨマサリ, ユキホマレ)など 10 種類の検討を行った。その結果, 塩化ナトリウムに浸漬させた大豆のみが発芽できた。**Photo.1** に示したように発芽 1 日目で幼芽の生育が確認できた。一方, 大麦や米で同様の試験を行った結果, 発芽による幼芽・幼根が確認できなかった。そこで, 塩化ナトリウムに対して耐性を持つ大豆の品種のオオツル, トヨマサリ, ユキホマレを用い, まず, 発芽中のホルモール態窒素量を **Fig. 2** に示した。

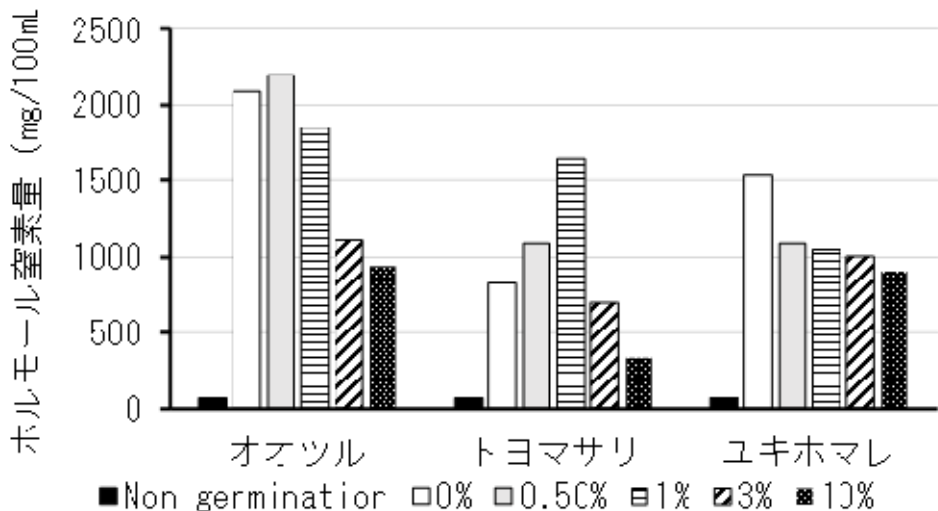
東山系品種であるオオツル, 十系のトヨマサリ, ユキホマレの各品種とも, 3 日の発芽中にホルモール態窒素は上

昇した(データ未提示)。これは, 金内<sup>9)</sup>が報告したように発芽が促進され, プロテアーゼが作用し, 大豆タンパク質が分解し, 食した時に消化が良くなると考えられた。そこで, 大豆のタンパク質の分解によって増加するペプチドやアミノ酸量を示すホルモール態窒素量を検討した。

各品種において, 発芽前大豆のホルモール態窒素は, ほとんど検出されず, 3 日目のホルモール態窒素量が高い傾向を示した。このときのホルモール態窒素量を示した。塩化ナトリウムを含まない水にて発芽させたオオツルのホルモール態窒素は 2,088(mg/100 g), 0.5%塩化ナトリウム水溶液にて発芽させたものは 2,199(mg/100 g)と, 塩水によってタンパク質分解が促進されたと考えられた。一方, 十系のトヨマサリは, 水にて発芽させた後の大豆のホルモール



**Photo.1.** 1.0%塩化ナトリウム水溶液中で発芽中の大豆



**Fig. 2.** 各大豆品種による発芽後のホルモール態窒素量

窒素は 826 (mg/100 g) とオオツルに比べ低かった。しかし、0.5%あるいは 1.0%塩化ナトリウム水溶液にて発芽させたトヨマサリのホルモール窒素量が上昇し、特に 1.0%塩化ナトリウムにて発芽させたもの 1,650 (mg/100 g) まで上昇した。

ユキホマレにおいては、塩化ナトリウムを含まない水で、発芽させた後のホルモール窒素は、1,544 (mg/100 g) と一番高く、0.5%塩化ナトリウム水溶液にて発芽させたものは 1,086 (mg/100 g)、1.0%塩化ナトリウム水溶液にて発芽させたものは 1,046 (mg/100 g)、3.0%塩化ナトリウムのものは、1,005 (mg/100 g) と徐々に減少した。このように大豆品種によっては、塩化ナトリウムにて発芽させると、貯蔵大豆から遊離してくるペプチドやアミノ酸を示すホルモール窒素量が異なることが明らかとなった。

次に、これら発芽大豆中のアミノ酸組成について検討した (Table 1)。塩化ナトリウムを含まない水にて発芽させたオオツルの遊離アミノ酸は、グルタミン酸が約 3 割を占めていた。また、0.5%塩化ナトリウムにて発芽させたもののグルタミン酸は 39.6%、1.0%塩化ナトリウムにて発芽させたもののグルタミン酸は 41.7%と、遊離アミノ酸中のグルタミン酸の構成比が上昇した。また、1.0%塩化ナトリウムで発芽させたものでは、遊離アルギニン酸の構成比が 7.7%、10%塩化ナトリウムでは 34.5%と、塩化ナトリウム濃度の異

なる水溶液中での発芽によって、特定の遊離アミノ酸の構成比が上昇することが明らかとなった。次にトヨマサリにおいては、1.0%塩化ナトリウム溶液を用いて発芽させたもののグルタミン酸は 21.8%まで上昇した。さらに、1.0%塩化ナトリウム発芽によって発芽させたものアルギニン酸比が、17.7%まで上昇した。ユキホマレにおいては、3.0%塩化ナトリウム水溶液によって発芽させたものは 44.8%まで上昇した。さらに、他の品種と同様に、塩化ナトリウムの濃度に伴って、アルギニン酸比が上昇し、水で発芽させたもののアルギニン酸比は 12.9%であった。一方 10%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたもののアルギニン酸比は 22.7%まで上昇した。これはプロテアーゼによって遊離し、さらに、発芽の代謝が食塩濃度によって阻害され、大豆中に蓄積したと考えられた。

### 3. 2 塩化ナトリウム水溶液中で発芽させた大豆の $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA)

次に本実験で上昇が見られたグルタミン酸の代謝物である  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) について検討した。GABA は抑制性神経伝達物質で、グルタミン酸にグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) が作用し、脱炭酸されて生成される。GAD は高等動物の中樞神経系の酵素として発見された<sup>(10-12)</sup>。GABA は、血圧上昇抑制効果<sup>(13)</sup>や不安障害などの脳機

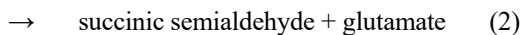
Table 1. 各大豆品種による発芽後の遊離アミノ酸組成

	オオツル					トヨマサリ					ユキホマレ				
	0.0%	0.5%	1.0%	3.0%	10.0%	0.0%	0.5%	1.0%	3.0%	10.0%	0.0%	0.5%	1.0%	3.0%	10.0%
Asp	7.2	4.0	2.0	1.7	2.5	1.8	3.0	1.7	2.7	2.9	2.4	3.5	1.5	1.6	4.0
Thr	5.1	0.0	0.0	0.0	0.8	6.1	6.2	4.9	4.8	5.6	5.8	3.5	2.6	2.0	4.5
Ser	3.3	2.1	3.8	4.6	5.4	4.7	5.0	4.0	4.6	4.1	4.3	3.8	3.4	3.3	4.4
Glu	28.1	39.6	41.7	30.0	14.2	19.0	19.8	21.8	18.6	20.9	21.5	29.2	39.4	44.8	16.6
Gly	3.8	4.8	4.5	5.6	5.4	4.4	4.4	4.3	4.3	4.1	4.2	4.7	3.7	3.5	4.4
Ala	5.0	8.1	7.8	5.3	8.7	10.9	8.9	8.7	8.0	7.1	10.3	8.7	7.1	5.0	7.3
Val	4.9	5.1	4.8	4.7	0.0	7.9	6.1	5.0	5.5	5.3	7.5	4.1	4.7	3.7	5.4
Met	1.4	1.3	1.2	1.3	0.0	0.0	2.3	2.1	2.2	1.8	1.6	1.5	1.7	1.3	1.7
Ile	3.7	4.0	4.0	3.9	3.3	4.3	5.0	4.2	4.4	4.1	4.1	4.6	3.5	3.0	3.5
Leu	5.0	5.3	5.3	5.7	4.7	6.1	7.2	5.9	6.7	5.8	5.9	6.5	4.8	4.5	4.9
Tyr	5.4	5.7	4.5	5.6	4.6	6.2	6.7	5.9	6.1	6.4	5.9	6.4	4.6	4.2	5.2
Phe	5.6	5.9	5.7	5.7	4.5	6.1	7.1	6.2	6.7	5.9	6.0	6.7	5.1	4.5	4.9
Lys	7.9	4.9	4.6	5.2	6.6	4.8	5.9	4.9	7.2	8.0	4.7	3.9	4.0	4.6	6.9
His	3.1	3.2	2.5	3.1	4.7	3.4	2.8	2.6	2.5	2.9	3.2	3.1	2.2	2.0	3.5
Arg	10.5	6.0	7.7	17.8	34.5	14.6	9.6	17.7	15.9	15.1	12.9	9.9	11.8	12.1	22.7
合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

能へも作用することが知られる<sup>(14, 15)</sup>。まず、簡易に測定するために酵素法を用い、GABA 量を測定した。

GAase は、 $\gamma$ -aminobutyrate glutamate aminotransferase (GABA-T) と succinic semialdehyde dehydrogenase (SSDH) 活性を有する酵素で、以下のような反応によって生成物が生じる。

GABA +  $\alpha$ -ketoglutarate



SSDH succinic semialdehyde + NADP



結果は Fig. 3-5 に示した。各品種とも発芽前の GABA 濃度は 2-3(mg/100 mL) 程度であった。発芽中のオオツルにおいて、水によって発芽させた大豆の 1 日目の GABA 濃度は、82(mg/100 mL)であったのに対し、同日の 0.5%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものは、92(mg/100 mL)であった。しかし、2-3 日目では減少した。十系のトヨマサリでは、水で発芽させたものは、徐々に GABA 濃度が上昇し、3 日目には 60(mg/100 mL)であった。0.5%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものは、2 日目には 72(mg/100 mL)と、トヨマサリの試験系の中で高かったが、3 日では減少した。1.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものは、2 日目には 39(mg/100 mL)と上昇したが、0.5%と同様に 3 日では減少した。同じ十系のユキホマレでは、3.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものの GABA 量は、1 日目には 63(mg/100 mL)と、水で発芽させたものより早期に高生産できた。このように、同品種間において GABA 生成量も異なることが明らかとなった。

### 3. 3 塩化ナトリウム水溶液中で発芽させた大豆のカルシウムキレート作用

オオツル、トヨマサリ、ユキホマレの日数経過に伴う発芽大豆中のキレート率の測定結果を示した (Fig. 6)。なお、各品種の発芽させていない大豆を対照とし、キレート量を 100%としたときの相対キレート率を示した。水を用いて発芽させたオオツルは、発芽 2 日目で、対照の 3 倍まで上昇した。また、0.5%塩化ナトリウムで発芽させたものでは、発芽 1 日目~3 日目まで 20~24 倍まで上昇した。1.0%塩化ナトリウム以上では、発芽経過時間によって減少した。特に 1.0%塩化ナトリウムで発芽させたものは 1 日目で、発芽前の約 24 倍まで上昇し、2 日目で

12 倍、3 日目で 70%まで減少した。

トヨマサリは、水を用いて発芽させたものでは、発芽 2 日目で、対照の 3 倍まで上昇した。また、0.5%塩化ナトリウムで発芽させたものでは、発芽 1 日目~3 日目まで 20~24 倍まで上昇した。1.0%塩化ナトリウム以上では、発芽経過時間によって減少した。特に 1.0%塩化ナトリウムで発芽させたものは 1 日目で、発芽前の約 24 倍まで上昇し、2 日目で 12 倍、3 日目は、約 70%まで減少した。

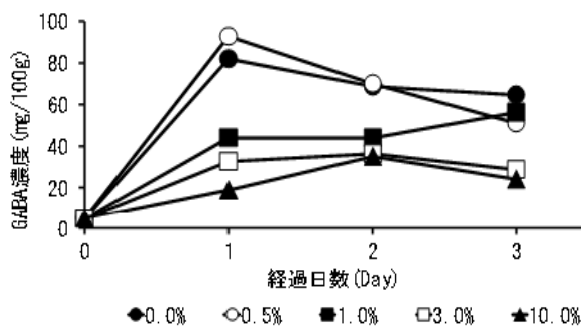


Fig. 3. 発芽中のオオツルの GABA 濃度測定

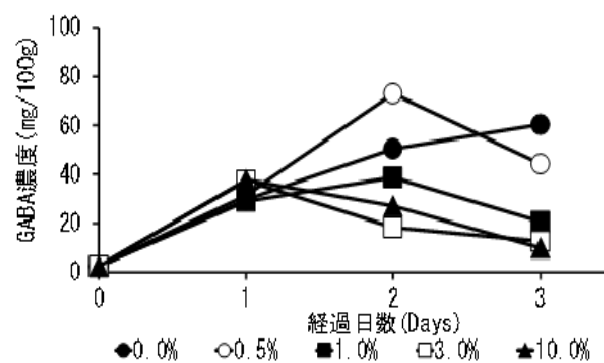


Fig. 4. 十系品種トヨマサリの GABA 濃度測定

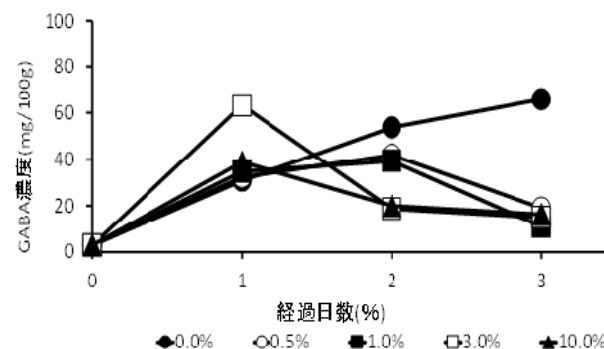


Fig. 5. 十系品種ユキホマレの GABA 濃度測定

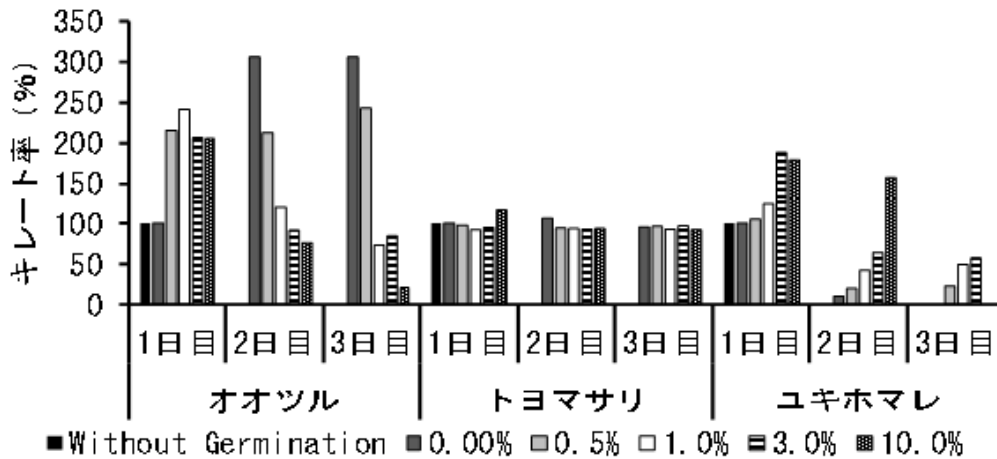


Fig. 6. 各大豆品種による発芽後のキレート率の測定

十系品種のトヨマサリにおいて、塩化ナトリウムの濃度や経過日数に関わらず、キレート率は 92~106%と大きく変化なかった。また同じ十系品種のユキホマレでは、日数経過に伴う変化が見られた。水で発芽されたものは、2 日目でキレート作用は完全に消失した。発芽 1 日目では、発芽させる時用いた塩化ナトリウム水溶液の濃度によってキレート作用が上昇した。1.0%塩化ナトリウム水溶液を用いたものは対照である未発芽の 1.2 倍、3.0%塩化ナトリウム水溶液を用いたものは対照の 1.9 倍、10.0%塩化ナトリウム水溶液を用いたものは対照である未発芽の 1.8 倍であった。一方、キレート率は 2 日目以降では減少したが、塩化ナトリウム水溶液濃度が高いものは、キレート消去率が減少しない傾向があった。水で発芽させたものは 2 日目で 10%まで減少し、0.5%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものは 2 日目で 20%、1.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものは 2 日目で 42%まで減少した。しかし、10.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものは 2 日目で 1.6 倍と、減少しない傾向があった。また、大豆種子は成熟過程においてカルシウム量よりもフィチン酸量の増加が著しい<sup>(16)</sup>。そこで、一部の条件で、発芽させることでキレート作用を増大したと考えられた。

### 3. 4 塩化ナトリウム水溶液中で発芽させた大豆の ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害活性

血圧変動は昇圧系のレニン-アンジオテンシンが関与している<sup>(17)</sup>。この時 ACE(アンジオテンシン変換酵素)は、アンジオテンシン I を昇圧ペプチドホルモンであるアンジオテンシン II へ変換する。そこで、ACE の作用を抑えるこ

とでアンジオテンシン II の産生を抑制し、血圧の上昇を抑制できることが知られている。そこで、発芽大豆中の ACE 阻害活性を測定することとした。

オオツル、トヨマサリ、ユキホマレの ACE 阻害活性の結果を Fig. 7 に示した。オオツルにおいて、3.0%と 10.0%では、IC<sub>50</sub> が高く、それぞれ血圧上昇効果が低下した。しかし、発芽開始後、2 日目、3 日目では減少し、0.5%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものは 0.02 mg、3.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものでも 0.05%と非常に小さい値を示した。一方、十系の品種のトヨマサリは、水で発芽させたものを除き、塩を含んだ水溶液での発芽によって IC<sub>50</sub> が大きくなり、ACE 阻害効果が減少した。特に 3.0%においては 1.8 mg まで上昇した。またユキホマレも同様の傾向があり、水で発芽させたものでも 1 日目では 0.03 mg であったのに対し、3 日目には、0.38 mg まで上昇した。さらに、10%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものにおいては、徐々に上昇し、3 日目では 1.5 mg となった。

### 4. 考 察

塩化ナトリウム水溶液中で発芽させた大豆の遊離ペプチド及びアミノ酸組成において、本研究では、発芽経過に伴い増加し、3 日目にホルモール窒素量が最大となる傾向があった。これまで、金内<sup>(9)</sup>は、経過に伴いプロテアーゼ活性が増加し、これに伴い遊離ペプチド及びアミノ酸が増え、ホルモール窒素量が増大すると報告した。遊離アミノ酸において、グルタミン酸が増加する傾向があった。また、水野<sup>(18)</sup>は、発芽大豆のアスパラギン酸が減少し、グ



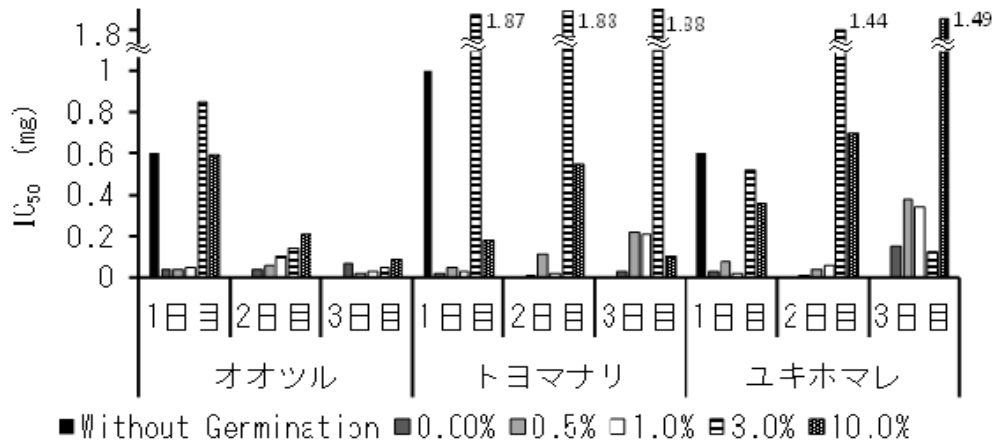


Fig. 7. 各大豆品種による発芽後の ACE の IC<sub>50</sub>

ルタミン酸の増加が顕著であったと報告している。伊藤ら<sup>(6)</sup>は大豆の発芽時に、ナトリウムストレスを与えたところ、プロリン、アラニンの含量が増加したと報告している。しかし本結果では、増加は見られず、品種間や条件によって異なることが示唆された。

さらに、遊離アミノ酸、グルタミン酸が前駆体となり生成される GABA について検討した。大豆が発芽することにより、GABA 最多含量時には原料大豆と比較して、24.0~29.1 倍にまで増大すると報告された<sup>(17)</sup>。これまで、品種間の GABA 生産を検討した結果において、東山系品種であるオオツル、シュレイはそれぞれ発芽 1 日目、2 日目に GABA 濃度が最大となり、十系品種であるトヨマナリ、ユキホマレは両品種とも 3~4 日目に GABA 濃度がピークであった(データ未提示)。

瀧川ら<sup>(19)</sup>はグルタミン酸量 100 g/L までは、GABA の生成量は添加したグルタミン酸量と比例して増加すると報告している。オオツルは 0.5%塩化ナトリウム水溶液で発芽させることで、グルタミン酸が高くなり、トヨマナリは 0.5~1.0%塩化ナトリウム水溶液、ユキホマレは 3.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽させると上昇し、GABA 濃度ともほぼ一致した。また、伊藤ら<sup>(6)</sup>は大豆の発芽時に 50 mM のナトリウムストレスを与えると GABA 含量が増加したと報告しており、本結果と一致した。

一般的な植物は、ストレスにより細胞内の Ca<sup>2+</sup>イオン濃度が高まり、GAD アミノ酸配列の C-末端部分のカルモジュリン結合部位 (CaMBD) にカルシウム/カルモジュリンが結合することで GABA 生成が誘導される<sup>(20)</sup>。このことか

ら、食塩を添加することで、塩ストレスによりキレート作用が低下し、Ca<sup>2+</sup>イオン濃度が上昇し、GABA の生成が促進されたと考えられた。そこで、GABA の生成とカルシウムキレート作用について検討することとした。その結果、キレート作用と GABA 濃度を検討すると、キレート作用と GABA 濃度は、相関がないと考えられた。

しかし、カルシウムなどのミネラル類は、骨粗しょう症や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病予防のために重要な栄養成分の1つである。一般的に大豆に含まれるフィチン酸やその他のキレート力の強い物質は、多くの金属イオンと強く結合してミネラルの体内吸収率を低下させる<sup>(21)</sup>。

そこで食塩濃度を変えた溶液で大豆を発芽させ、発芽大豆中のキレート作用を検討した結果、継時的に減少する品種と増加する塩化ナトリウム濃度が見られた。これらを組み合わせによりキレート作用を低下させ、カルシウム取り込みを増加し、骨粗しょう症のような疾病リスクを軽減できると考えられた。

次に、血圧上昇抑制に関わる食品中の ACE 阻害能を調べた。その結果、オオツルにおいて、3.0%塩化ナトリウム水溶液で発芽開始後、2-3 日目で IC<sub>50</sub> が非常に小さい値を示した。鈴木ら<sup>(22)</sup>は大豆食品、茶類、貝類、果実類、および蕎麦において ACE 阻害が確認されたと報告している。特に、発芽後に、ACE 阻害活性は高くなると考えられた。伊澤ら<sup>(23)</sup>は、豆類 41 品種類の熱水抽出液の ACE 阻害活性とニコチアミン含量を測定したところ、ニコチアミン含量が多いほど高い ACE 阻害活性を示したと報告した。また、伊澤ら<sup>(23)</sup>は、未熟豆と完熟した豆類を比較す

ると、未熟豆の方がニコチアナミンを多く含有している傾向があり、これはニコチアナミンが水溶性であり、冷凍枝豆やそら豆等の茹で加工品においては、ニコチアナミン含量が大きく減少すると報告した。

板垣<sup>(24)</sup>は、大豆から単離精製した ACE 阻害物質はムギネ酸の前駆体物質であるニコチアナミンであると報告し、伊澤ら<sup>(23)</sup>は豆類抽出物の ACE に対する IC<sub>50</sub> 値はニコチアナミンと相関があることが示され、その時の抽出物中ニコチアナミンの存在量は、ニコチアナミン標品の IC<sub>50</sub> 値と一致していたと報告している。今後は、発芽中のニコチアナミン含量についても検討が必要であると考えられた。

## 5. 今後の課題

本研究では、遊離ペプチドやアミノ酸量、アミノ酸構成比、遊離したアミノ酸であるグルタミン酸が前駆体として生成する GABA、キレート作用、ACE 阻害活性など現象を中心に検討してきた。しかし、本検討においては、プロテアーゼやグルタミン酸デカルボキシラーゼなどの個別の酵素の発現や活性など詳細に検討することができなかった。特に、ACE 阻害活性は、IC<sub>50</sub> が非常に小さくなる条件が見いだされた。この条件により発芽したニコチアナミン量やアンジオテンシンと拮抗阻害するペプチドを単離・同定する必要が考えられた。今後は、発芽大豆から生成していく予定である

## 5. 文献

- 菅野道広, 尚弘子:大豆たんぱく質の加工特性と生理機能, 建帛社, 東京都 (1999)
- 西山美樹, 江崎秀男, 森久美子, 山本晃司, 加藤丈雄, 中村好志:豆乳を用いたチーズ様食品の調整とその抗酸化性および特性, 日本食品科学工学会誌, Vol.60 No.9 p480-489 (2013)
- 江刺洋司:種子における休眠・発芽の制御機構, 化学と生物, Vol.15, No.10, p623-634 (1977)
- Stanton, H. C.: Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 143, 195-204 (1963).
- 片桐充昭, 清水純夫:もやし(大豆, グリーングラム, ブラックグラム)の二酸化炭素ガス処理による  $\gamma$ -アミノ酪酸含量変化, 日本食品工業学会誌, Vol.36, No.11, p916-919 (1989)
- 伊藤直子, 中山宣洋, 瀧石幸子, 実岡寛文:発芽時におけるダイズ子葉中の塩ストレス下での溶質濃度の変動, 日本作物学会中国支部研究集録(46), p34-35 (2005)
- 塚谷 忠之, 樋口 智子, 松本 清: 酵素反応を利用した  $\gamma$ -アミノ酪酸のマイクロプレートアッセイ:  $\gamma$ -アミノ酪酸生産性乳酸菌のスクリーニングへの適用 福岡県工業技術センター研究報告 No.16(2006)
- 平成 20 年度農林水産省補助事業(食料産業クラスター展開事業)食品機能性評価マニュアル集第Ⅲ集, 社団法人日本食品科学工学会
- 金内誠, 畑中咲子, 下山田真, 落合孝次, 高橋義洋, 津志田藤二郎: 発芽大豆中のプロテアーゼの特徴と豆乳タンパク質への作用について, 日本食品保蔵学会誌, 40(5), 233-240 (2014)
- J. Awapara, A. J. Landua, R. Fuerst, B. Seale, Free  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain, J. Biol. Chem., 187, 35-39 (1950)
- E. Roberts, S. Frankel,  $\gamma$ -Aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid, J. Biol. Chem., 187, 56-63 (1950)
- E. Roberts, S. Frankel, Glutamic acid decarboxylase in brain, J. Biol.Chem., 188, 789-95 (1951)
- Stanton H.C.: Mode of action of gamma amino butyric acid on the cardiovascular system. Arch Int Pharmacodyn Ther., 143, 195-204 (1963).
- Petty F, Kramer GL, Dunnam D, Rush AJ. Plasma GABA in mood disorders.Psychopharmacol Bull. 26(2):157-161 (1990)
- Roy A. DeJong J, Lamparski D, George T, Linnoila M. Depression among alcoholics. Relationship to clinical and cerebrospinal fluid variables. : Arch Gen. Psychiatry, 48, 428-432 (1991)
- 喜多村啓介:大豆のすべて, 株式会社サイエンスフォーラム, 千葉県 (2010)
- 木元幸一, 清水恵美子, 黒田裕子:食品中の ACE 阻害物質に関する研究, 東京家政大学研究紀要, Vol.38, No.2, p59-63 (1998)
- 水野時子, 島田信二, 丹治克男, 山田幸二:大豆の水浸漬による遊離アミノ酸の変動, 日本家政学会



- 誌, Vol.53, No.12, p1197~1202 (2002)
- 19) 瀧川重信, 大笹稿, 鈴木達郎, 遠藤千絵, 橋本直人, 齋藤勝一, 山内宏昭, 野田高弘:小麦を用いた $\gamma$ -アミノ酪酸の効率亭製造法, 日本食品科学工学会誌, Vol.56, No.2, p114-117 (2009)
- 20) 阿部利徳, 竹屋佳奈子:エダマメ中の $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)含量の差異, 日本食品科学工学会誌, Vol.52, No.11, p545-549 (2005)
- 21) 早川利朗, 伊賀上郁夫:フィチン酸の構造と機能, 日本食品工業学会誌 Vol.7, No.7, p647-655 (1992)
- 22) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒熙:食品中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について, 日本農芸化学会誌, Vol.57, No.11, p1143-1146 (1983)
- 23) 伊澤華子, 吉田望, 白貝紀江, 青柳康夫:豆類のニコチアナミン含量とアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性, 日本食品科学工学会誌, Vol.55, No.5, p253-257 (2008)
- 24) 板垣史郎:アンジオテンシン変換酵素を標的とした大豆由来内臓脂肪型肥満症改善物質の探索, 大豆たん白質研究, Vol.16, p144-149 (2013)

## The Production of High Healthy Functional Substance from Germinating Bean or Cereal under High Salty Stress

Makoto Kanauchi

Miyagi University

### Summary

Germinated cereals and beans contain many nutrients and healing food functional substances. Particularly, soybeans are thought to have many such nutrients and healing food functional substances, and to produce more such substances. This study investigated some nutrients and healing food functional substances produced by germinated soybeans. Soybean varieties of *Ohtsuru*, *Toyomasari*, and *Yukihomare* were germinated in 0–10% sodium chloride solution. After germination, free dissolved amino acids and peptides increased during three days, especially in the *Ohtsuru* variety, the free nitrogen as free dissolved amino acid and peptide was increased during germination through the degradation of stored proteins. Moreover, the ratio of free glutamic acid in germinated soybeans was increased. The *Ohtsuru* variety was particularly noteworthy: the 1% sodium chloride was found to have 41% glutamic acid in it. Soybeans have 60–90 (mg/100 mL) of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid). They have 20–40 times as much as non-germinated soybeans. Moreover, their angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity was found to be 12 times as high as that of non-germinated soybeans. Results show that many nutrients and healing food functional substances in soybean were modified through germination in a sodium chloride solution.