

氏 名(本籍) 大 坪 研 一

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 364 号

学位授与年月日 平 成 元 年 3 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 ハトムギの特性及び利用に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 一島 英治

教授 伊崎 和夫

教授 小島 邦彦

# 論文内容要旨

## 序 論

ハトムギ(*Coix lacryma-jobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf)は、イネ科キビ亜科の一年生草本であり、トウモロコシやソルガムに近いと分類されている。従来、漢方薬や茶の原料として用いられ、食品原料としての利用が少ないために、穀類としての特性及び利用に関する研究報告は極めて少なく、僅かに吉村、木原、小原、平らの報告が有るのみである。吉村らは、ハトムギの主タンパクであるコイシンに関する研究を行い、木原は、バッチ式膨化機によるハトムギの膨化試験を行い、小原らは、ハトムギ種子成分や脱殻・精白方法に関する研究を行い、平は、ハトムギタンパクのアミノ酸組成に関する報告を行っている。本研究においては、ハトムギの品種特性の把握を目的として、輸入および国産ハトムギ穀粒に関する特性評価を行い、各品種の特徴を調べた。更に、その測定値の多変量解析により、品種間の群別化の可能性について検討を加えた。また、ハトムギの貯蔵性に関しては、従来その研究報告が見られないので、温度等の環境条件及び貯蔵形態の品種変化に及ぼす影響について、数種の代表的指標の測定試験を行った。ハトムギ種子中の生理活性物質に関しては、医学分野に数報見られるのみである。本研究においては、ハトムギ糠中にトリプシンインヒビター(JBTI)を発見し、その精製を試みた。更にJBTIの分子量、アミノ酸組成、耐熱性等のタンパク特性を明らかにするとともに、各種の塩やプロテアーゼが共存した場合の、インヒビター活性に与える影響についても検討を加えた。種子の登熟、休眠、発芽各過程におけるインヒビターの消長を検討し、存在時期及び存在部位について、貯蔵タンパクおよびプロテアーゼとの関係に留意しながら、酵素抗体法を用いて検討を加えた。さらに、JBTIにより阻害される内在性プロテアーゼをハトムギ種子中に探索し、その酵素特性に関して検討を加えた。

ハトムギを食品原料として利用する際には、他の穀類と比較して、①穀粒が硬い、②えぐ味や異臭がある、③耐熱性プロテアーゼインヒビターが存在する、等の問題がある。本研究においては、上記の問題点を改善し、ハトムギの食品価値を高める目的で、膨化加工に関する研究を行った。各種のハトムギを原料として、パフマシ(一軸エクストルーダー)による膨化試験を実施し、膨化適性の比較を行った。その結果を基礎として、原料段階で各種のハトムギの膨化適性の推定を可能とする指標を得ることを目的に、糊化粘度や粗脂肪含量等の測定値と膨化性との関係について検討した。適正膨化条件や膨化ハトムギの品質に関しても試験を行い、その特徴把握に努めた。更に、各種の高タンパク素材と混合膨化することによって栄養強化を図り、新規な食品素材の製造技術の開発研究を行った。

## 第一章 品質特性に関する研究

岡山系、中里系、タイ国産及び中国産のハトムギ18点を試料として粒形、粒重、容積重、脱殻歩留まり、硬度、一般化学成分、発芽率、脂肪酸度、アミノ酸組成等の品質評価試験を行い、

品種間の比較を行った(図1)。その結果、岡山系は、細形種子で、脂質含量が多く、タイ国産は、大粒で容積重が小さく、低タンパク、中国産は二種類に分かれ、硬殻、中里系は、中間的性質を示す等の特徴を認めた。更に、粒重、粒形、殻硬度及びアミノ酸組成分散の独立4変数によるクラスター分析を行い、品種間の類似度による群別化の可能なことを明らかにした<sup>1)</sup>(図2)。また、ハトムギの貯蔵試験を行い、糊化特性の変化、還元糖の増加、発芽率の低下等に加えて、高脂肪(5-9%)に起因する遊離脂肪酸増加の著しいことを示した(表1)。これらの変化は高湿度や高温、脱殻や粉碎によって促進され、未脱殻種子の低湿度貯蔵の場合に抑制されることを明らかにした<sup>2)</sup>。また、ハトムギの発芽率は、常温越夏1回では82-96%、常温越夏2回でも約30%の発芽能を保持することを明らかにした<sup>2)</sup>。

## 第二章 プロテアーゼインヒビターおよびプロテアーゼに関する研究

穀類種子中に含まれる生理活性物質としてプロテアーゼインヒビターに注目し、ハトムギ種子中にトリプシンインヒビター(JBTI)の存在することを見いだした。JBTIの精製方法を確立し(図3)、約16kdの単純タンパク質であり(図4)、ウシすい臓トリプシンを1:2のモル比で阻害することを明らかにした。JBTIは、分子中に多数の1/2シスチン残基を有する(表2)耐熱性インヒビターであり(図5)、ダイズBowman-Birk型インヒビターと類似性が高い<sup>3)</sup>。各種イオン、プロテアーゼ、アミノ酸化学修飾及び熱に対するJBTIの活性安定性を調べた結果、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等による賦活、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>等による失活が認められ(表3)、ペプシンに対する安定性、ズブチリシン、プロナーゼ(アグチナーゼE)に対する被消化性が示された(図6)。リシンの修飾に対して安定であり、アルギニンの修飾により失活する点では(表4)、コムギ等に存在する穀類インヒビターやダイズKunitz型インヒビターと類似性を示し、ダイズBowman-Birk型インヒビターとは異なっていた。また、示差走査熱量測定(DSC)により、精製JBTIの熱変性温度が93℃と極めて高いことを見いだした<sup>4)</sup>(図7)。

精製JBTIに対するウサギ抗血清を調製し、登熟、発芽時におけるJBTIの消長を、Western-Blottingにより調べた結果、登熟中期(開花後12日以降)に出現、増加し、完熟～発芽初期にかけて存在し、発芽中期(吸水後3日以降)に減少することが明らかになった(図8)。また、JBTIは、種子の胚芽部に存在し、胚乳部や殻には存在しない点で(図9)、米のシステインプロテアーゼインヒビター(CPI)とは異なっていた。ハトムギの貯蔵タンパクは、登熟中期に出現、増加し、発芽中期以降に分解消費された。同様に、ハトムギプロテアーゼの変動を、SDS-PAGEおよび活性染色により調べた結果、100kd以上および55-70kdの2群の活性が認められ、時期による消長が観察された(図10)。また、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)、パラクロメルクリ安息香酸(pCMB)等を用いた阻害剤試験の結果、プロテアーゼの一部はセリンプロテアーゼであり、JBTIおよびコメ、ダイズのタンパク性インヒビターによって阻害されることが示された<sup>5)</sup>(図11)。そこで、ハトムギ糠の抽出タンパクを、ダイズトリプシンインヒビターをリガ

ンドとするアフィニティークロマトグラフィーを用いて部分精製し、ベンゾイルアルギニンパラニトロアニリド (BAPA) 分解活性のあるプロテアーゼを得た (図12)。このプロテアーゼは、ゼラチンを基質とするSDS-PAGE活性染色により分子量約88kdと推定された (図13)。JBTIによる定量的阻害を受け (図14)、弱アルカリ性 (pH9) に至適pHを有する (図15) セリンプロテアーゼであった (表5)。<sup>3</sup>H-DFPにより活性セリンをアフィニティーラベルし、種子の登熟中のセリンプロテアーゼの変化を調べた結果、登熟中期以降に約88kdのバンドが認められた<sup>9)</sup> (図16)。一方、非吸着画分にはJBTIの阻害を受けないシステインプロテアーゼが存在しており、強い活性を有している。従来の知見及び本研究の結果を総合すると、穀類種子中には、胚芽部にセリンプロテアーゼとそのインヒビターが存在し、胚乳部にはシステインプロテアーゼとそのインヒビターが存在し、2種類のプロテアーゼとそれに対応するインヒビターの生理的な機構は、それぞれ独自の機能を有するものと推察される。

### 第三章 利用技術に関する研究

本研究においては、ハトムギの食品原料としての問題点を改善し、その食品価値を高める目的で、膨化加工に関する研究を行った。各種のハトムギを原料として、パフマシン (一軸エクストルーダー) による膨化試験を実施した結果、低精白度では中里系が岡山系より優れた膨化性を示した (表6)。膨化適性と各種理化学特性値との関連について検討した結果、ハトムギの糊化粘度 ( $r=0.91$ ) 及び粗脂肪含量 ( $r=-0.92$ ) と膨化適性との間に、高い相関のあることを見だし (図17)、原料段階における膨化適性の評価を可能とした。また、膨化性の劣る原料の場合においても、①精白の強化、②脱脂前処理、③米との混合膨化、等により膨化性の改良が可能なことを明らかにした<sup>7)</sup> (図18)。次いで、膨化ハトムギの品質性状に関して検討を加え、膨化処理によるJBTIの失活、貯蔵中の脂肪酸増加の抑制 (図19)、粉碎性の向上等の効果 (図20) を明らかにした<sup>8,10)</sup>。同時に、食感、溶解性、酵素消化性の向上も認められた。更に、栄養性の向上を目的として、各種高タンパク素材とハトムギの混合膨化試験を行い、ビール酵母が最適であることを見だし、リシン、ビタミンB等の強化された膨化食品の製造技術を開発した<sup>9,10)</sup>。

### 総 括

著者は、従来の知見を踏まえ、ハトムギ種子の特性及びその利用に関する研究を行った。まず、輸入および国産ハトムギに関する特性評価を行い、各品種の特徴を明らかにした。更に、その測定値を変数とした多変量解析により、品種間の群別化の可能なことを示した。また、ハトムギの貯蔵性に関する研究を行い、高脂質に起因して貯蔵中の遊離脂肪酸増加が顕著なことを認め、脱殻や粉碎等の貯蔵前の処理、或は温度、湿度等の環境要因の、貯蔵性に及ぼす影響

について明らかにした。

ハトムギ種子中の生理活性物質を探索した結果、糖中にトリプシンインヒビター (JBTI) を発見し、その精製方法を確立した。JBTIの分子量、アミノ酸組成、耐熱性等の知見を得、各種の塩やプロテアーゼが共存した場合の、インヒビター活性に与える影響を明らかにした。本インヒビターは、1/2Cys含量が多く、耐熱性が高い点でダイズBBIに近いが、活性部位にアルギニン残基を有する点、及びキモトリプシン阻害活性のない点で異なる独自のインヒビターであることを見いだした (表7)。種子の登熟、休眠、発芽各過程における貯蔵タンパク、プロテアーゼおよびインヒビターの消長を検討した結果、JBTIは、登熟後期から発芽初期にかけて、種子の胚芽部に存在することを、酵素抗体法によって明らかにし、同インヒビターは、対象プロテアーゼから胚芽を保護しているものと考察した。更に、種子中に、JBTIによる阻害を受けるセリンプロテアーゼの内在することを見だし、別に存在するシステインプロテアーゼとともに、インヒビターとの相互作用および酵素特性に関する研究を進めた。

また、ハトムギの食品価値を高める目的で、膨化加工に関する研究を行った。各種のハトムギの膨化適性指標としての糊化粘度および粗脂肪含量を設定し、適正膨化条件を確立した。膨化ハトムギの品質評価を行い、JBTIが失活し、貯蔵性、消化性等の改善されていることを示した。更に、ビール酵母と混合膨化することによりリシンやビタミンBの強化された食品素材を製造する技術を開発した。

## 文 献

- 1) 大坪研一・柳瀬 肇・岩崎哲也：ハトムギの特性に基づくクラスター分析. 食研報, 50, 70-76(1987).
- 2) 大坪研一・柳瀬 肇・橋本勝彦：ハトムギの貯蔵性. 食研報, 45, 76-85(1984).
- 3) Ken'ichi Ohtsubo, Sonoe Yanagi and Hajime Yanase: Properties of a Trypsin Inhibitor from Job's-tears. Agric. Biol. Chem., 49, 1985-1991(1985).
- 4) Ken'ichi Ohtsubo: Effects of the Salts, Protease Digestions, Chemical Modifications and Heat Treatment to the Inhibitory Activity of the Protease Inhibitor from Job's-tears. Agric. Biol. Chem, 53(2), (1989)(印刷中).
- 5) Ken'ichi Ohtsubo, Kyuuya Harada and Shinji Kawasaki: Changes, Localization and Interaction of Proteases and a Trypsin Inhibitor in the Developing Job's-tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf) Seeds. Plant Cell Physiol. (Accepted).
- 6) Ken'ichi Ohtsubo and Shinji Kawasaki: Serine Protease Inhibited by the Endogenous Trypsin Inhibitor in the Job's-tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf) Seeds. Agric. Biol. Chem. (投稿中).
- 7) 大坪研一・柳瀬 肇・橋本勝彦・豊島英親・戸谷昭夫：ハトムギの膨化性およびその改良. 日食工誌, 31, 596-603(1984).
- 8) 大坪研一・柳瀬 肇：膨化ハトムギの性状について：日食工誌, 32, 101-107(1985).
- 9) 早川清一・鈴木平光・大坪研一：ハトムギタンパク質の栄養価への加工処理およびアミノ酸補足の影響. 食研報, 44, 45-49(1984).
- 10) 大坪研一：ハトムギ・酵母混合膨化製品の品質について. 食研報, 54, (1989)(投稿中).

## 参考論文

- 1) Ken'ichi Ohtsubo, Hikoichi Sakai, Hiromu Murofushi and Ryoko Kuriyama: Electrophoretic Separation of Tubulin  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits after S-Sulfonation. J. Biochem., 77, 17-21(1975).
- 2) 柳瀬 肇・大坪研一: 超多収米の品質予知. 食研報, 43, 31-39(1983).
- 3) 大坪研一・中川原捷洋・岩崎哲也: 新規育成米の利用特性. 日食工誌, 35, 587-594(1988).
- 4) 大坪研一・柳瀬 肇・石間紀男: 比色法による米の脂肪酸度の測定. 食研報, 51, 59-65(1987).
- 5) 柳瀬 肇・遠藤 勲・渋谷直人・大坪研一: パフドライスの加工と品質. 食研報, 41, 39-49(1982).
- 6) 大坪研一・柳瀬 肇: 脱脂米糠とくず米の混合膨化. 食研報, 47, 105-112(1985).
- 7) 大坪研一・柳本正勝・柳瀬 肇: ソルガムの膨化とその改良. 日食工誌, 35, 321-326(1988).
- 8) Ken'ichi Ohtsubo, Julie Siscar, Bienvenido O. Juliano, Masao Yokoo and Tetsuya Iwasaki: Texturometer and Instron Measurements on Cooked Japanese Milled Rices. 食研報, 54(投稿中).
- 9) 大坪研一・柳本正勝・柳瀬 肇: 栄養性および消化性の改良された膨化食品およびその製造方法. 特開昭60-193192.
- 10) 大坪研一・西田武司・太田哲朗: スエード調擬革の製造法. 特開昭52-3804.
- 11) 大坪研一: スエード調擬革の製造方法. 特開昭53-66402.
- 12) 大坪研一・雑賀久夫: スエード調擬革の製造方法. 特開昭54-49302.
- 13) 大坪研一・雑賀久夫: スエード調擬革の製造方法. 特開昭54-52705.
- 14) 大坪研一・遠藤徳雄: スエード調擬革の製造方法. 特開昭54-59302.
- 15) 大坪研一・遠藤徳雄: スエード調擬革の製造方法. 特開昭54-73101.
- 16) 大坪研一: スエード調擬革の製造方法. 特開昭54-105201.
- 17) 大坪研一・遠藤徳雄: プリントされたスエード調編織布の製造方法. 特開昭54-116464.
- 18) 大坪研一・牧田輝雄・村田太郎・福井 馨・市橋邦雄: 耐熱性ポリアミド組成物. 特開昭55-34231.
- 19) 大坪研一・牧田輝雄・村田太郎・市橋邦雄: 耐光, 耐熱性に優れたポリアミドの製造方法. 特開昭55-54329.
- 20) 大坪研一・中山 博・神野 紘: 固定化プロテアーゼの製造方法. 特開昭56-51983.
- 21) 大坪研一・神野 紘: 不溶性酵素及びその製造方法. 特開昭57-174090.

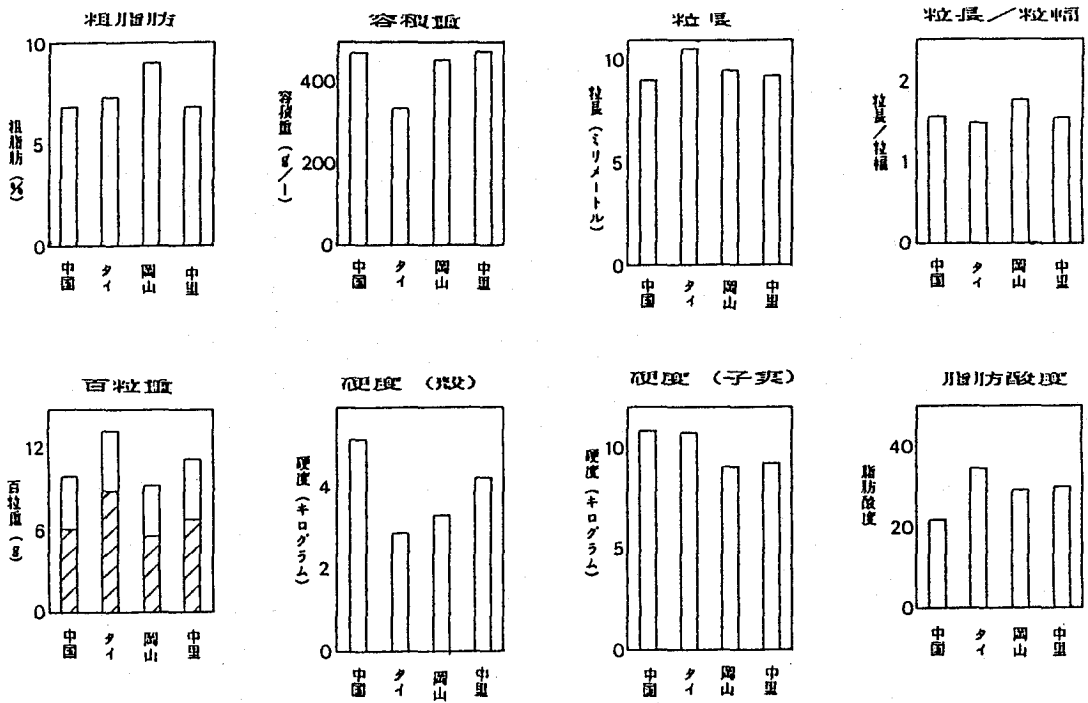


図1. ハトムギ各品種の特性比較

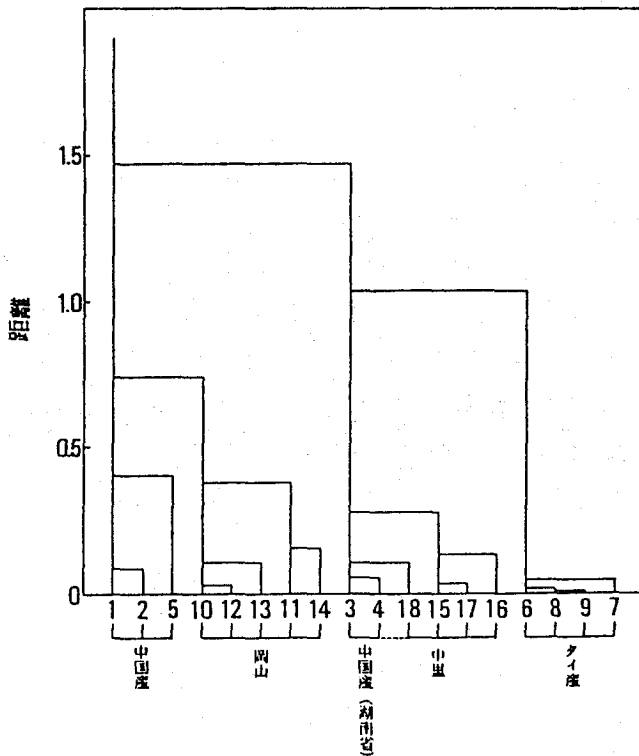


図2. ハトムギ品種間の類似性を現す樹状図



表1. ハトムギの常温貯蔵試験結果

貯蔵形態	貯蔵期間 (月)	水分含量 (%)	脂肪酸度 (mg-KOH /100g)	水溶性窒素 (%/全窒素)	抽出液 pH	還元糖 (mg-glucose /100g)	粉末の色調			発芽率 (%)
							L値	a値	b値	
殺付き貯蔵	0	12.7	11.7	7.8	6.8	29.1	73.82	1.65	7.84	100.0
	2	12.3	13.7	8.0	6.8	53.7	73.91	2.04	8.44	100.0
	4	12.7	15.9	8.3	6.9	90.5	74.49	2.45	8.10	100.0
	6	12.6	16.9	8.1	6.9	95.1	75.02	1.64	8.51	96.1
精白子実貯蔵	0	13.1	17.0	5.8	6.9	15.8	83.03	0.17	6.67	
	2	12.5	44.7	5.2	6.8	32.8	82.21	1.50	7.11	
	4	12.5	73.5	4.7	6.8	66.8	82.64	0.41	7.51	
	6	12.8	111.9	5.2	6.7	76.2	82.53	0.62	7.38	

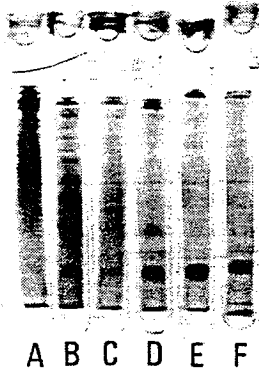


図3. JBTIの精製段階を示すPAGE

A, extracted total protein; B, protein after heat treatment; C, the fraction from DEAE-Sephacel CL6B chromatography; D, the fraction from gel filtration; E, Bio-Gel HTP chromatography fraction; F, purified protein after the final DEAE-Sephacel CL6B chromatography.

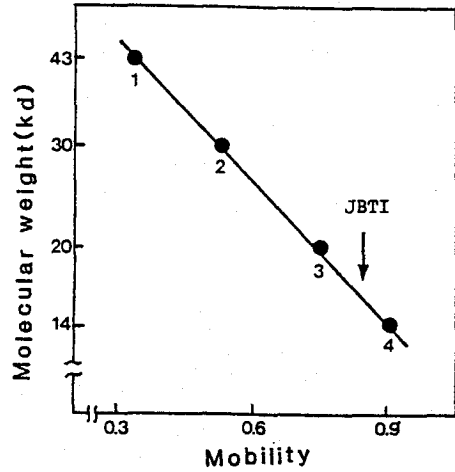


図4. SDS-PAGEによるJBTIの分子量測定

SDS-PAGE was done by the method of Laemmli using 12.5% polyacrylamide gel. Electrophoresis was done at the constant voltage of 85 V for 5 hr.  
1: Ovalbumin 2: Carbonic Anhydrase 3: Trypsin inhibitor  
4:  $\alpha$ -lactalbumin

表2. JBTIのアミノ酸組成

Amino acid	Hydrolysis			Integer
	22 hr	48 hr	72 hr	
Asp	17.87	18.59	18.78	19
Thr	5.74	5.03	4.60	6
Ser	2.73	1.83	1.58	3
Glu	8.57	8.72	8.86	9
Pro	9.40	9.48	9.40	9
Gly	5.30	5.93	5.75	6
Ala	3.40	3.52	3.61	4
Cys(half)	16.08	15.92	14.20	16
Val	5.45	5.82	5.75	6
Met	2.03	2.16	1.89	2
Ile	6.16	6.22	6.19	6
Leu	0.24	0.17	0.14	0
Tyr	2.76	2.13	2.52	3
Phe	1.80	1.87	2.01	2
Lys	5.03	5.12	5.26	5
His	3.42	3.42	3.57	3
Trp	3.86	2.98	3.53	4
Arg	8.04	8.03	8.07	8

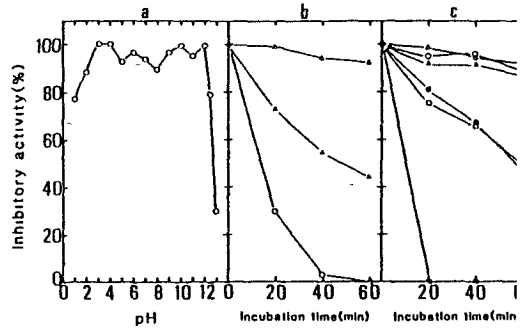


図5. JBTIのpH安定性及び耐熱性

a: JBTI stability at various pH's. JBTI activity analyzed using BAPA as substrate in 0.1 M Tris-I solution (pH 8.0, containing 20 mM CaCl<sub>2</sub>) after treatment in the solution of indicated pH's for 1 hr 37°C.

b: Thermal stability of JBTI at various pH's. JBTI lution at various pH's was heated for the indicated peri at 100°C followed by dilution with 3 volumes of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 20 mM CaCl<sub>2</sub> and kept 1 hr. Then trypsin inhibitory activity was measured u: BAPA as substrate. △, pH 7.0; ▲, pH 3.0; ○, pH 11.

c: Thermal stability of JBTI in various solutions at pH JBTI solution at pH 7.0 containing various salts incubated for 1 hr at 100°C followed by dilution wit volumes of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, contain 20 mM CaCl<sub>2</sub> and kept for 1 hr. The trypsin inhibi activity was measured using BAPA as substrate. ○, 20 Tris-HCl; △, 50 mM Tris-HCl; ▲, 100 mM Tris-HCl; distilled water; □, 100 mM NaCl; ■, 50 mM Tris-I containing CaCl<sub>2</sub> at 10 mM, 20 mM, and 30 mM.

表3. JBTIに対する各種の塩添加の影響

Salts	Trypsin	JBTI	Salts	Trypsin	JBTI
Control	1.00	1.00	MgSO <sub>4</sub>	1.85	1.29
NaCl	1.22	1.10	BaCl <sub>2</sub>	2.00	1.19
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.39	1.16	Ba(OH) <sub>2</sub>	1.29	0.78
KCl	1.16	1.15	CuCl <sub>2</sub>	0.48	0.53
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.28	1.07	CuSO <sub>4</sub>	0.50	0.38
CaCl <sub>2</sub>	2.41	1.37	ZnSO <sub>4</sub>	0.47	0.00
Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	2.20	1.30	NH <sub>4</sub> Cl	1.01	0.99
MgCl <sub>2</sub>	1.90	1.22	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.26	1.05

(Trypsin activities or trypsin inhibitory activities are expressed as the ratio of each activity with that of the control)

表4. JBTIのLys残基, Arg残基の化学修飾

Reagents	Modified Amino Acids	Substrate	Residual Activity	Effect
Control	-	BAPA, Casein	100.0 %	-
1,2-Cyclohexanedione	Arg	BAPA	8.2 %	+
Glyoxal	Arg, Lys	"	22.4 %	+
"	"	Casein	7.0 %	+
Trinitrobenzenesulfonate	Lys	BAPA	100.0 %	-
O-methyl-isourea	"	"	96.0 %	-
Acetic anhydride	"	"	100.0 %	-
"	"	Casein	100.0 %	-

(Residual activities are expressed as the ratio with that of the control)

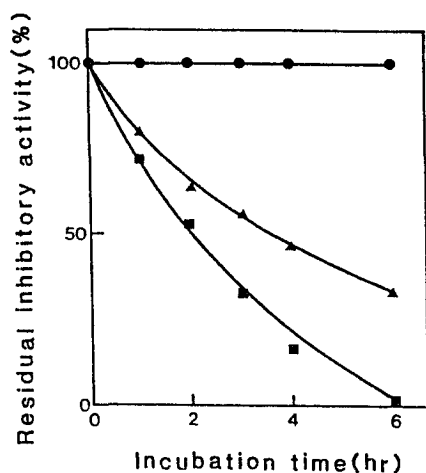


図6. JBTIに対するプロテアーゼ消化の影響

JBTI (88  $\mu$ g/ml) was digested by Pepsin (2800 u/ml of 50mM HCl-KCl buffer, pH 2.0), Subtilisin BPN' (3.9 units/ml of 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.6) or Actynase E (100 tyr units /ml of 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0) at 37°C for 20 hr. After the indicated periods, each aliquot was put followed by addition with 5 times volume of 0.1M tris-HCl buffer containing 20 mM CaCl<sub>2</sub>, and residual trypsin inhibitory activity was measured using BAPA as substrate.

●: Pepsin, ▲. Subtilisin BPN' ■: Actynase E.

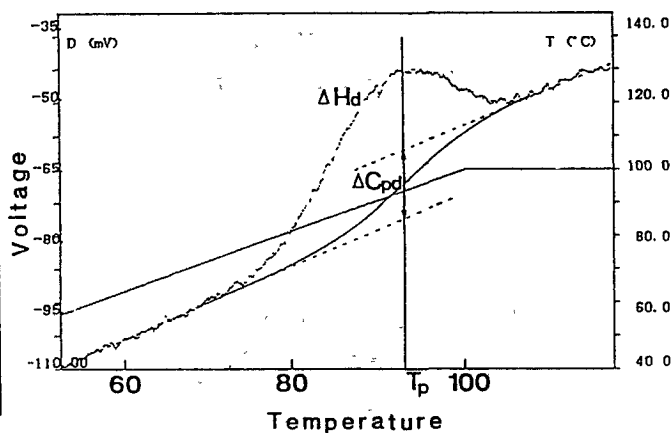


図7. DSCによるJBTI分子の熱測定結果

The JBTI solution was heated at the heating rate of 1 K min<sup>-1</sup> from 20°C to 120°C in an adiabatic differential scanning calorimeter (DASH-4, manufactured by Mashpriborintorg, Moscow, USSR and partially modified by Sinku-Riko, Inc., Yokohama). Protein concentration, 0.5 mg ml<sup>-1</sup>

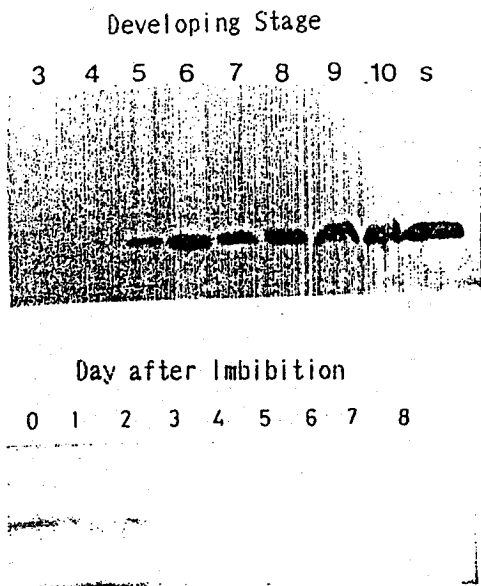


図8. Western Blotting による  
登熟及び発芽時のJBTIの検出



図9. Western Blotting による  
JBTI存在部位の解明

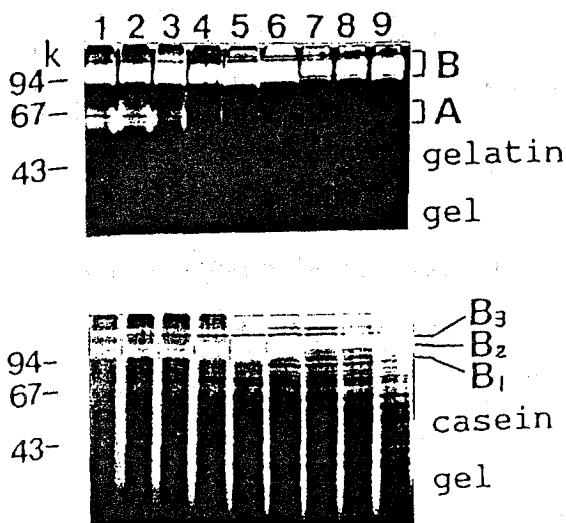


図10. SDS-PAGE 活性染色による登熟種子  
プロテアーゼの検出



図11. 登熟種子プロテアーゼに対する  
各種阻害剤の影響

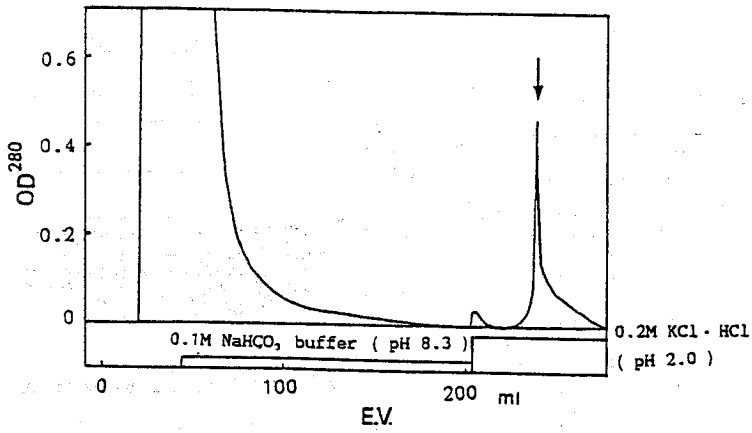


図12. SBTI-Sepharose4BによるJBPのアフィニティークロマトグラフィー

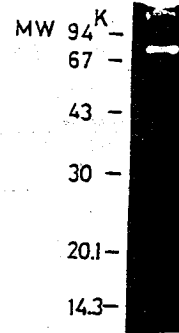


図13. JBPのSDS-PAGE活性染色

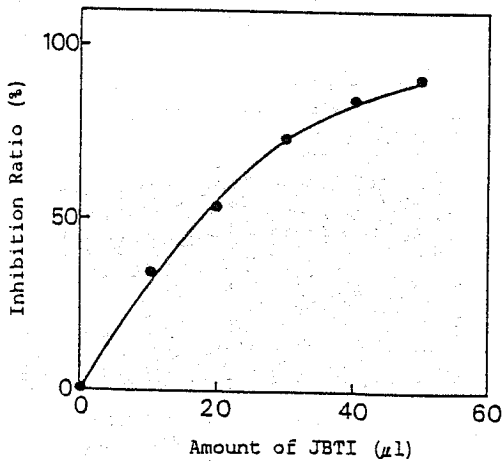


図14. JBTIによるJBP阻害

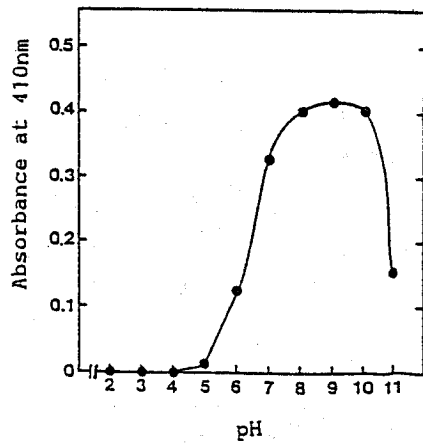


図15. JBPのBAPA分解活性に及ぼすpHの影響

表5. JBPのBAPA分解活性に及ぼす阻害剤の影響

inhibitor	target protease(p)	dose	inhibition (I %)
DFP	serine p.	1 mM	+ (80.5 %)
PMSF	-	-	+ (46.9 %)
Leupeptin	serine p., SH-p.	1 μM	+ (91.6 %)
pHMB	SH-p.	50 μM	± (24.8 %)
NEM	-	1 mM	- (0.0 %)
EPNP	Asp.p.	5 mM	+ (74.8 %)
Pepstatin	-	0.2 μM	+ (85.0 %)
o-phenanth.	Metal p.	1 mM	- (0.0 %)
EGTA	-	1 mM	- (0.0 %)
Kunitz-SBTI	serine p.	1 mg/ml	+ (77.0 %)
Bowman-Birk TI	-	1 mg/ml	+ (86.3 %)
Rice Bran TI	-	0.1 mg/ml	+ (90.7 %)
JBTI	-	0.1 mg/ml	+ (68.6 %)

substrate; BAPA (25mg/100ml)  
 reaction; overnight at 28°C

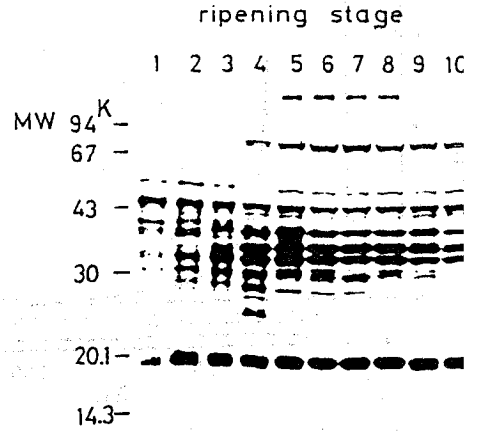


図16. <sup>3</sup>H-DFPによる登熟ハトムギ種子中(セリンプロテアーゼの探索  
 ← 88kDaSerプロテアーゼ相当バンドと推定

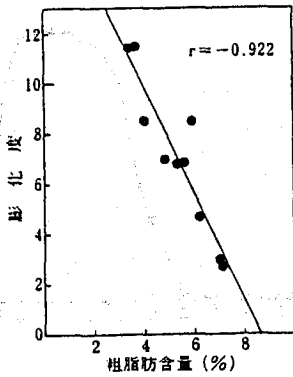
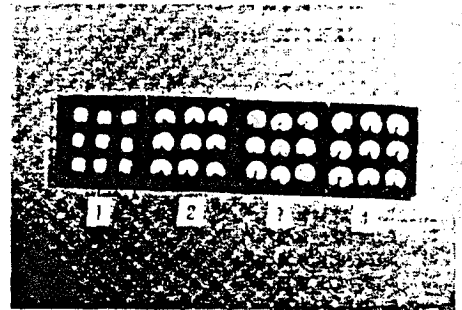


図17. 原料の粗脂肪含量と膨化性



1. 未脱脂
2. 1時間抽出
3. 6時間抽出
4. 20時間抽出

図18. 脱脂処理の有無と膨化性

表6. 原料ハトムギの種類と成分, 膨化性, 色調の関係

No.	試料 品種 (産地)	年産	搗精 歩留り (%)	一般成分*(%)				膨化性		色調					
				粗 蛋白質	粗 脂肪	炭水 化物	灰分	倍率	評価	原 料			膨化製品		
										L	a	b	L	a	b
1	岡山 (岡山)	56	74.8	12.9	3.4	69.9	0.8	11.4	◎	86.0	0.2	6.6	84.6	1.1	8.0
2	" (兵庫)	"	79.0	11.7	5.9	67.9	1.5	8.5	○	82.8	0.7	7.1	81.4	1.3	9.2
3	" (岡山)	57	79.4	12.4	5.6	67.7	1.3	6.9	○	83.0	1.1	6.8	82.0	1.5	9.3
4	" (兵庫)	"	79.2	12.3	4.8	68.6	1.3	7.0	○	84.1	0.4	6.9	81.7	1.4	9.0
5	中里 (青森)	"	79.9	13.3	4.0	68.4	1.3	8.5	○	85.0	0.6	6.4	82.2	1.5	9.0
6	インドネシア	56	79.7	12.2	3.7	70.2	0.9	11.5	◎	84.1	0.4	8.0	81.3	1.7	9.1
7	岡山 (兵庫)	"	89.2	12.3	7.0	65.9	1.8	3.0	×	78.7	1.7	7.7	77.5	1.3	9.7
8	" (岡山)	57	89.8	12.8	7.1	65.3	1.8	2.7	×	78.6	1.3	8.1	76.3	1.5	9.6
9	" (兵庫)	"	90.5	12.8	6.2	66.3	1.7	4.7	△	79.2	0.8	7.9	77.6	0.6	9.3
10	中里 (青森)	"	88.2	13.8	5.3	66.3	1.6	6.8	○	78.9	1.9	7.9	77.9	0.7	9.7

\* 一般成分は水分 13.0% に換算して示す。

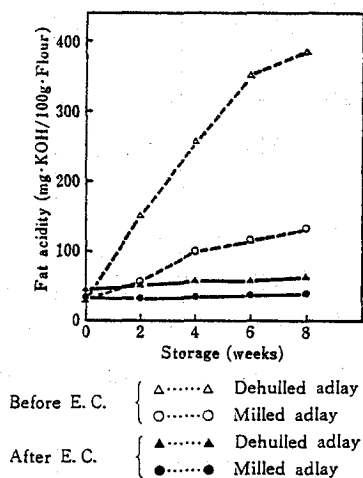


図19. 40 °C貯蔵における脂肪酸度の変化

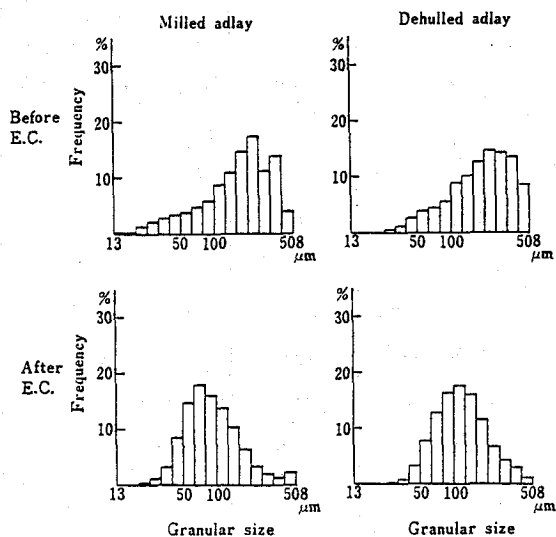


図20. 膨化处理による粉碎性の向上

表7. 各種の植物プロテアーゼインヒビターの比較

植物	部位	阻害する プロテアーゼ	阻害の 反応型	分子量	Cys含量 (残基%)	活性部位 アミノ酸
ハトムギ	胚芽	トリブシン 内在プロテアーゼ	double	16500	14	Arg
米	糠	トリブシン	double	14500	12	ArgとLys
米	胚乳	システイン型 プロテアーゼ	single	12000	0	--
小麦	胚芽	トリブシン	--	16000 10000	2.6, 3.2	Arg
小麦	胚乳	トリブシン (キモトリブシン)	single	12500 7800	16	--
大麦	胚芽	トリブシン (プロナーゼ)	double	15500	12, 14	--
大麦	胚乳	トリブシン	single	14200	4.7	Arg
大豆 (Kunitz)	子葉	トリブシン (キモトリブシン)	single	20100	2.2	Arg
大豆 (Bowman-Birk)	子葉	トリブシン キモトリブシン	double	8000	20	Lys
馬鈴薯	地下茎	トリブシン キモトリブシン	double	10500	12	Lys



## 審査結果の要旨

近年わが国においては、過剰米の発生を抑えるための水田利用対策（転作）の一環として、ハトムギが特定作物に指定されている。ハトムギはイネ科キビ亜科の一年生草本であるが、基幹食糧ではないために、その食品成分、品質特性に関する研究はきわめて少なかった。

本研究は岡山系、中里系、タイ国系、中国系のハトムギ18種類について粒、粒重、容積重、脱穀歩留まり、硬度、一般化学成分、脂肪酸度、アミノ酸組成、発芽率などの品質評価試験ならびに貯蔵試験を行った。その結果をもとに、ハトムギの群別化の方法を提唱した。

ハトムギは高タンパク質含量であるにもかかわらず、生物価が低いことが知られている。本研究者は、その原因を制限アミノ酸であるリシンのほかに、プロテアーゼインヒビターの存在を推定し探索した。その結果、ハトムギ種子胚芽中に熱変性温度が93℃という極めて耐熱性の高いトリプシンインヒビターを新たに見出した。このインヒビターは活性中心にアルギニンを持ち、トリプシンとインヒビターの比は2：1で阻害する双頭型のものであることを明らかにした。また、このインヒビターは胃のペプシンに対して強い抵抗性をもつことを明らかにした。さらに、抗体によりその消長を調べた。

ハトムギの貯蔵タンパク質の変動にかかわる酵素を推定し検討したところ、胚芽に新しい88 KDaのセリンプロテアーゼを見出した。これとは別に胚乳中にシステインプロテアーゼとそのインヒビターの存在を見出した。

ハトムギの食品素材としての問題の改善のためにパフマシを用いて膨化加工を検討した。ハトムギに酵母を加え、膨化加工することにより、栄養成分を強化し、貯蔵性を高め、膨化ハトムギの応用への途を拓いた。

以上のように、本論文はハトムギの品質特性、新規プロテアーゼインヒビターならびに新規プロテアーゼについての多くの知見を加え、さらにハトムギの欠点を克服する食品加工法を開発した。よって審査員一同、本研究者に対し、農学博士の学位を授与するに値するものと認定した。