

## 食用大麦の加熱後褐変と ポリフェノール成分に関する研究

神山 紀子

### 抄 録

主食用大麦は、搗精後押麦や米粒麦に加工され「麦ご飯」として消費されるのが一般的であり、消費拡大のためには、麦ご飯として好ましくない大麦の特性を改善するとともに、健康機能性等の有用な特徴を持つ成分を利用して、新規需要を開拓することが必要である。大麦の好ましくない特性の一つである、加熱した際の褐変しやすさに注目し加熱後褐変の原因成分や要因を解明することと、有用な成分としてモチ性裸麦に含まれるアントシアニンに着目し、有効利用を図るための基礎的知見を得ることを目的に研究を行った。

42品種・系統の大麦を用いて、搗精粉ペーストの加熱前後のハンター白度の差を褐変指数 (BI) とし、ポリフェノール含量とBIとの高い相関 ( $r=0.766$ ,  $p<0.001$ ) と、プロデルフィニジンT1 (PDT1)、プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジンB3 (PCB3) と (+)-カテキンの各含量とBIとの間にも有意な相関 (それぞれ $r=0.400$ ,  $0.595$ ,  $0.599$ ,  $0.384$ ,  $p<0.05$ ) を認めた。

無機元素が褐変に及ぼす影響を評価するため、搗精粉ペーストに濃度の異なる無機塩やキレート剤を添加し、加熱後の色相を対照と比較した。銅と鉄を添加した場合は、顕著に濃度依存的に加熱後の $L^*$ 値が低下し、亜鉛やカルシウム、キレート剤であるDTPA、EDTAやフィチン酸を添加した場合は、加熱後の $L^*$ 値が増加し褐変が抑制された。

大麦のプロアントシアニン3種と(+)-カテキン及びその他関連するフェノール性成分を、大麦抽出液あるいは大麦ペーストに添加して加熱し、褐変に及ぼす影響を評価した。大麦抽出液では、(+)-カテキン、PCB3、PDB3とPDT1が濃度依存的に420nmの吸光度を増加させた。大麦ペーストにPDT1、PDB3、PCB3と(+)-カテキンを添加すると、濃度依存的に $L^*$ 値が低下し、 $a^*$ 値と $b^*$ 値が増加して褐変が促進されたが、PDT1とPDB3において顕著であった。プロアントシアニンと(+)-カテキンは、関連成分と比べて顕著に褐変を促進した。

搗精麦を炊飯および保温した凍結乾燥粉を用い、保温による $a^*$ 値の増分を褐変の指標とし、ポリフェノールによる炊飯後保温の褐変に対する影響を検討した。保温時間とともにフラバノール成分は減少した。プロアントシアニン欠失6系統の搗精麦は総ポリフェノール量、フラバノール含量と褐変程度が著しく低かった。野生型10品種間では、保温による褐変と搗精麦のフラバノール含量 ( $r=0.716$ ,  $p<0.01$ ) やフラバノール減少量 ( $r=0.838$ ,  $p<0.01$ ) との間に相関を認めた。

モチ性裸麦品種「ダイシモチ」穀粒に含まれるアントシアニンを単離精製し、シアニジン3-O-(3,6-ジ-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)他3成分と同定した。ダイシモチ穀粒のアントシアニンは、1粒当たりの乾物重が最大になる開花後35日に最も多く蓄積し、生理的乾燥期には徐々に減少し、収穫後の温風乾燥によっても減少した。また、アントシアニンは、90%の搗精歩留まりで玄麦の約1/3になった。

以上により、大麦穀粒に含まれるプロアントシアニジンや(+)-カテキンのフラバノールが加熱後褐変の主たる原因成分であり、それらが加熱や保温中に自動酸化することにより褐変することを明らかにした。また、モチ性裸麦アントシアニン成分を同定し、それを最大限利用するための収穫および加工法の基礎的知見を与えた。

キーワード：大麦、加熱後褐変、ポリフェノール、フラバノール、アントシアニン

## Studies on browning after cooking and polyphenols in barley grains

Noriko KOHYAMA

### Abstract

Barley grain is often pearled to remove the outer layers and processed into rolled barley or rice-shaped barley, which are generally cooked with rice as “mugi-gohan” in Japan. In order to expand barley consumption, it is important to reduce undesirable properties for mugi-gohan and to increase useful constituents that are good for health. Barley products, when cooked and kept warm, easily undergo browning, which is undesirable. One of the objectives of this study was to investigate the causal constituents and factors of browning. A second objective was to elucidate the major anthocyanins from purple waxy hull-less barley and the changes in these constituents during maturation and after harvest to explore the availability of anthocyanins.

First, using 42 varieties, the degree of browning, the browning index (BI), was estimated from the difference in Hunter’s whiteness value of pearled barley pastes before and after heat treatment. BI was correlated significantly with the polyphenol content of pearled flour ( $r=0.766$ ,  $p<0.001$ ). Of the constituents of the crude polyphenol fraction, the contents of prodelphinidin T1 (PDT1), prodelphinidin B3 (PDB3), procyanidin B3 (PCB3) and (+)-catechin were correlated with the BI ( $r=0.400$ ,  $0.595$ ,  $0.599$ ,  $0.384$ , respectively;  $p<0.05$ ).

To examine the effects of inorganic elements on the browning reaction, pearled barley pastes were heated with or without salts, including inorganic elements or chelators of various concentrations. Browning was enhanced by iron chloride and copper chloride and inhibited by zinc chloride, calcium salts (chloride, nitrate, acetate) and three chelators (DTPA, EDTA, phytate) in a dose-dependent manner.

To evaluate the effects of phenolic compounds on browning, various amounts of proanthocyanidins, (+)-catechin or related phenolic compounds were added to aqueous barley extracts or barley pastes and heated. In barley extract, PDT1, PDB3, PCB3 and (+)-catechin elevated absorbance at 420 nm after heating in a dose-dependent manner. In barley paste, PDT1 and PDB3 decreased the  $L^*$  value and increased the  $a^*$  and  $b^*$  values of the paste dose-dependently after heating, and PCB3 and (+)-catechin did so to a lesser extent. These compounds promoted the browning more effectively than other related phenolic compounds.

To evaluate browning of cooked barley kernels, pearled kernels were cooked and further incubated in a test tube. The  $a^*$  value of the flour was measured after lyophilization and pulverization, and the increase in the  $a^*$  value during incubation after

cooking ( $\Delta a^*$ ) was used as an indicator of browning. PDB3, PCB3 and (+)-catechin in cooked kernels decreased during incubation after cooking. In six proanthocyanidin-free lines, polyphenol and flavanol contents of pearled kernels were very low and browning was barely observed. The browning of cooked kernels was significantly correlated with the flavanol content in pearled kernels as well as the flavanol loss during incubation after cooking ( $r = 0.716, 0.838, p < 0.01$ , respectively) in 10 varieties.

From grains of purple waxy hull-less barley cv. Daishimochi, cyanidin 3-*O*-(3,6-di-*O*-malonyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) and other 3 anthocyanins were isolated and identified. These anthocyanins were most abundant at 35 days after flowering when the dry weight of grains was at a maximum, and their levels decreased during the physiological drying period and drying process after harvest. About two-thirds of these anthocyanins were distributed into bran when grains were pearled to 90% yield.

These results indicated that flavanols, such as proanthocyanidins and (+)-catechin, are the major factor causing the browning of cooked barley, and that their auto-oxidation causes browning during cooking and incubation after cooking. These results also show basic findings on harvest time and processing methods to isolate anthocyanins identified from purple waxy hull-less barley.

**Key Words:** barley, browning after cooking, polyphenol, flavanol, anthocyanin

# I 緒 言

## 1 主食用大麦の現状と課題

オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) はイネ科の一年生の作物であり、その種子（以下、大麦と記す）は古代から人間の食料として利用されてきた (Bhatty 1992、Newman and Newman 2008)。日本では室町時代の記録から米と一緒に炊飯し粒食していたことが伺える (阪本1996)。

オオムギは穂の形状から二条と六条に分かれ、また成熟した種子（穀粒）から穎（穀皮）が容易に分離しない皮麦と容易に分離する裸麦に分けられる。裸麦にも二条と六条があるが、現在栽培されている裸麦はほとんど六条である。また、大麦にはウルチ性とモチ性があるが、現在流通している大麦の殆どはウルチ性である。

食料需給表（農林水産省大臣官房食料安全保障課 2009）によると、大麦の国内生産量と輸入量との総和は、昭和35年から平成19年にかけてほぼ横ばい状態であるが、国内生産量は昭和30年代から40年代にかけて激減し、自給率が低下した（図1）。近年の国内生産量はほぼ横ばいであり、農林水産統計（農林水産省大臣官房統計部 2010）によると平成20年産は21.7万トン

で、その内訳は二条皮麦が約14.5万トン、六条皮麦が約5.6万トン、裸麦が約1.6万トンである。麦種により主な用途が異なっており、二条皮麦は麦芽用と焼酎原料用に、六条皮麦は麦茶用と主食用に、裸麦は主食用と味噌原料用に用いられているが、実際には他の用途にも用いられている。飼料用には輸入大麦が当てられている。食料用の大麦の消費量は、昭和30年代から昭和60年にかけて徐々に減少し、近年はほぼ横ばいである（図2）。平成19年の食料用の消費量は7.5万トンで、ほぼ国産の大麦が当てられている。食料用は国産大麦に対する需要が大きいため、品質を改善して高付加価値化を図ることで食料用の消費を拡大させることができれば、食料自給率の向上につながると考えられる。

主食用の大麦は主に「麦ご飯」として消費されており、米と一緒に炊飯して利用するのが一般的である。つまり、粉食である小麦とは異なり、粒食が基本であるが、一部は「はったい粉」（麦こがし）として粉食にも利用されてきた。また、近年は搗精粉や玄麦粉（全粒粉）が麺やパン、菓子原料等に利用されている。麦ご飯用の大麦は、加工の第一段階として「搗精」と呼ばれる工程で穀皮、果種皮や胚が砥石で連続的

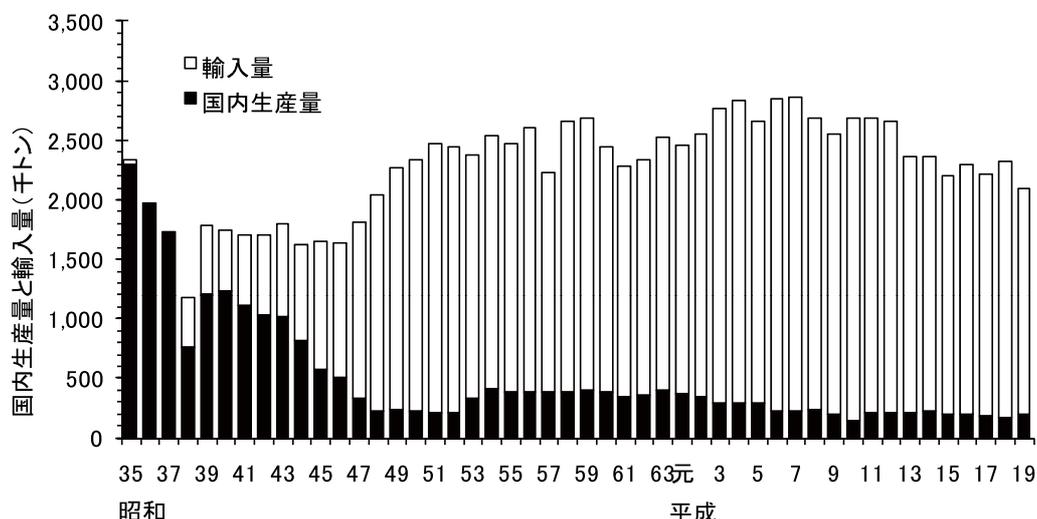


図1 大麦の国内生産量と輸入量の推移（農林水産省食料需給表平成19年度版による）

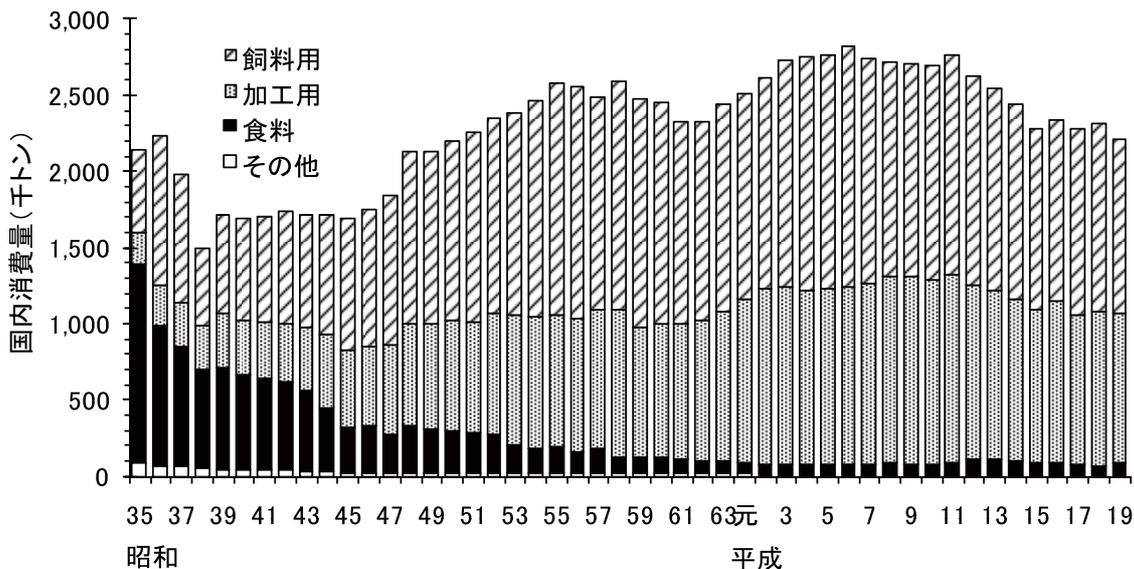


図2 大麦の国内消費量の推移（農林水産省食料需給表平成19年度版による）

に削り取られる。得られた「搗精麦（丸麦）」を蒸気で蒸し圧偏した「押麦」や、粒溝（黒条線）に沿って切断し、さらに搗精・蒸煮した「米粒麦」に加工されて流通している。玄麦の重量に対する搗精麦の重量の割合を搗精歩合や搗精歩留まりと呼ぶが、麦ご飯用に加工された製品の搗精歩合は50-60%程度であり、残りは糠として主に飼料に利用されている。

大麦の主成分は他の穀物と同様に澱粉を中心とする炭水化物であるが、他の穀類と比べて食物繊維、特に水溶性食物繊維が多く含まれている（表1）。また、大麦食に高脂血症患者の血

中コレステロール低下作用（McIntosh *et al.* 1991、Ikegami *et al.* 1996、Behall *et al.* 2004a、Behall *et al.* 2004b）や、食後の血糖値上昇抑制効果（佐藤ら1990）等の生理機能があることが報告されている。アメリカではFood and Drug Administration（FDA）（2006）が、大麦及び大麦由来の水溶性食物繊維を含む食品に冠動脈性心疾患のリスクを低減する可能性がある旨の健康強調表示（ヘルスクレーム）を認めている。また、大麦穀粒にはコレステロールの生合成を阻害する活性をもつトコトリエノール類が含まれることも報告されている（Quershi *et al.* 1986、

表1 穀物の食品成分（可食部100g当たり）

食品名	水分	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分	食物繊維		総量
						水溶性	不溶性	
	g	g	g	g	g	g	g	g
七分つき押麦	14.0	10.9	2.1	72.1	0.9	6.3	4.0	10.3
押麦	14.0	6.2	1.3	77.8	0.7	6.0	3.6	9.6
薄力粉(1等)	14.0	8.0	1.7	75.9	0.4	1.2	1.3	2.5
中力粉(1等)	14.0	9.0	1.8	74.8	0.4	1.2	1.6	2.8
強力粉(1等)	14.5	11.7	1.8	71.6	0.4	1.2	1.5	2.7
玄米	15.5	6.8	2.7	73.8	1.2	0.7	2.3	3.0
精白米	15.5	6.1	0.9	77.1	0.4	Tr	0.5	0.5
コーンミール	14.0	8.3	4.0	72.4	1.3	0.6	7.4	8.0

(五訂増補日本食品標準成分表による)

Wang *et al.* 1993)。このため、大麦は健康食として見直されてきている。

一方、麦ご飯は白米に比べ、炊飯や保温後に褐変しやすい、食感がボソボソしていて粘りが少ない、麦独特の香りがする等の特徴があり、麦ご飯を好まない消費者からは、色、食感、香りが悪いという指摘が多いため、これらは消費を拡大する上での障害になっていると考えられる。また、大麦を麺やパン等に加工する際も、小麦に比べて褐変しやすく色が悪くなる傾向がある。このため、消費を拡大するためには上記のような好ましくない特性を改善した大麦品種の開発が必要である。

## 2 大麦穀粒のポリフェノール成分

大麦穀粒には米や小麦に比べ、ポリフェノール成分が多く含まれている (Dykes and Rooney 2007, Hodzic *et al.* 2009) が、中でも (+)-カテキンやプロアントシアニジン二量体や三量体等のフラバノールが多く含まれている (McMurrough *et al.* 1983)。(+)-カテキンとプロアントシアニジンの二量体 2 種と三量体 4 種が、<sup>1</sup>H NMRにより同定されている (Outtrup and Schaumburg 1981)。同定されているプロアン

トシアニジンにはプロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジンB3 (PCB3)、プロデルフィニジンT1 (PDT1)、プロデルフィニジンT2、プロデルフィニジンT3とプロシアニジンT4であり、いずれも構成するカテキン及びガロカテキンユニットは2,3-trans型で4 $\alpha$ →8結合である (図3)。

プロアントシアニジンの生合成経路は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を始めとする植物の酵素や転写調節因子の突然変異遺伝子の研究を通じて解明されてきている (Marles *et al.* 2003, Lepiniec *et al.* 2006) が、ロイコアントシアニジンからフラバノールとアントシアニジンへの分岐の調節や、プロアントシアニジンの重合メカニズム等は未解明のままである (Xie and Dixon 2005)。図4に大麦のプロアントシアニジン生合成経路を示した。ロイコアントシアニジンからロイコアントシアニジンレダクターゼ (LAR) により2,3-trans型のフラバノールが合成される経路の他に、近年、アントシアニジンからアントシアニジンレダクターゼ (ANR) により2,3-cis型のフラバノールが合成される経路が解明されている (Lepiniec *et al.* 2006)。大麦ではプロアントシアニジンの生合成が遺伝的に阻害される突然変異が単離されて

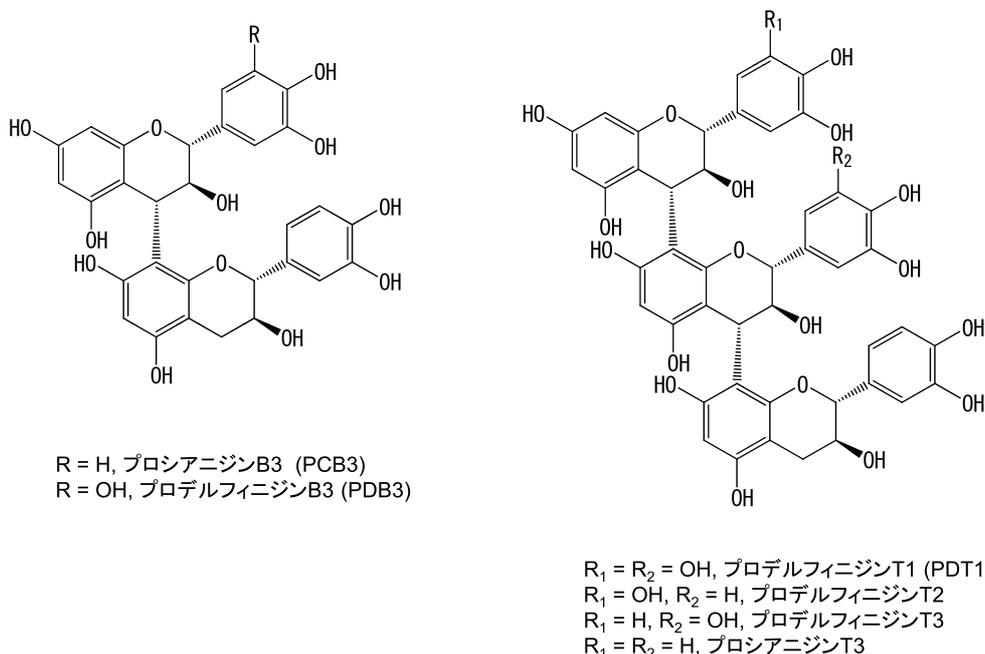


図3 大麦のプロアントシアニジンの構造



おり、現在 *ant13*, *17*, *18*, *19*, *21*, *22*, *25*, *26*, *27*, *28*, *29*, *30* の12個の遺伝子座が報告されている (Jende-Strid 1991, Jende-Strid 1993, Jende-Strid *et al.* 1999)。これらプロアントシアニジン欠失遺伝子の一部は、その機能が解明または推定されている。*ant13* はフラボノイド生合成経路の酵素の発現を調節する転写調節遺伝子であると推定されている (Jende-Strid 1993)。*ant17* と *ant22* はどちらも穀粒にホモエリオジクチオールとクリソエリオールを蓄積し、フラバノン3-ヒドロキシラーゼ (F3H) の構造遺伝子と推定されている (Meldgaard 1992, Jende-Strid 1993)。*ant18* はジヒドロフラボノールレダクターゼ (DFR) の構造遺伝子をコードしており、前駆体のジヒドロケルセチンを蓄積することが分かっている (Kristiansen and Rohde 1991, Wang *et al.* 1993)。*ant19* はLARの構造遺伝子をコードしていると推定されており (Kristiansen 1984)、*ant26* はロイコアントシアニジンとカテキンの重合に関わるフラバノール重合酵素を調節している可能性が指摘されている (Jende-Strid 1993)。また、*ant30* はカルコン配糖体であるイソサリプルポシドを葉に蓄積し、カルコンイソメラーゼ (CHI) を欠失していることが報告されている (Reuber *et al.* 1997)。

フラバノール以外のポリフェノール成分としては、*p*-クマル酸、フェルラ酸やジフェルラ酸等のフェノール酸 (Jende-Strid 1985, Holtekjølén *et al.* 2006, Quinde-Axtell and Baik 2006, Ferreres *et al.* 2009) やアピゲニン、ルテオリンやクリソエリオールをアグリコンとするC-グリコシルフラボンやO-グリコシル-C-グリコシルフラボン (イソビテキシン-7-O-グルコシド、イソオリエンチン-7-O-グルコシド、イソスコパリン-7-O-グルコシドやルテオリン-6-C-アラビノシド-8-C-グルコシド等) (Ferreres *et al.* 2009) が報告されている。O-グリコシル-C-グリコシルフラボンは若葉にも含まれている (Osawa *et al.* 1992, Ferreres *et al.* 2008)。また、大麦の中にはアントシアニンを蓄積する品種があり、複数の成分が報告されているが、共通する成分はシアニジン3-グルコシドだけである

(Mullick *et al.* 1958, Fossen *et al.* 2002, Abdel-Aal *et al.* 2006, Kim *et al.* 2007, Bellido and Beta 2009)。

### 3 研究目的

主食用の大麦の消費を拡大するためには、主な用途である「麦ご飯」として好ましくない特性を改善することと、大麦の有用な特徴を活かした新規需要の開拓が必要である。

麦ご飯として好ましくない特性の一つは、炊飯や保温後に褐変しやすいことであり、粉体として麺や饅頭等に加工した際にも色が悪いという問題が生じる。そのため、加熱による褐変を低減し、褐変しにくい大麦品種を育成することが求められているが、この目的を達成するためには褐変に関与する成分や要因を明らかにし、主な原因成分を特定することが重要である。一方、この加熱過程で生成する褐変物質は複雑な成分間反応によって生じた高分子と考えられ、不溶性で抽出や分取、構造解析は困難である。

本研究に着手した1998年当時、大麦にはポリフェノール成分が多く含まれることや、ポリフェノールが酵素的褐変 (村田・本間1998) や緑茶 (中林1990) や焙煎したコーヒー (中林・山田1987) の着色に関与すること等から、ポリフェノール成分が褐変に関与しているのではないかと考えられていたが、個別のポリフェノール成分と褐変との関係を検討した報告は無かった。佐藤 (1995) は加熱した搗精粉懸濁液のハンター白度を用いて褐変の評価を行い、pHや加熱温度が高いほど褐変すること、アスコルビン酸を添加することで褐変が抑えられること、24品種・系統の大麦間でポリフェノール含量とハンター白度に負の相関があること ( $r = -0.491$ ,  $p < 0.05$ ) を報告している。藤田ら (2000) は、31品種の裸麦品種を用いて、炊飯粒のハンター白度は加熱前の搗精粉の白度とは相関しないこと、加熱した大麦粉ペーストのハンター白度は炊飯粒のハンター白度と高い相関があり ( $r = 0.875$ ,  $p < 0.001$ )、プルシアンブルー法で測定した搗精麦のポリフェノール含量との間に有意

な負の相関がある ( $r = -0.768$ ,  $p < 0.001$ ) がポリフェノールオキシダーゼ活性とは相関しないことを報告している。このことから、大麦炊飯粒のモデルとして搗精粉のペーストで加熱後褐変の評価が可能で、加熱後褐変には酵素的褐変の影響は小さいことが示唆されている。そこで、IIでは、大麦の粗ポリフェノール画分に含まれる成分と加熱後の褐変との関係を明らかにするため、プロアントシアニジン欠失系統を含む42品種・系統の大麦を用いて、搗精粉ペーストの加熱による褐変と粗ポリフェノール画分に含まれる8成分の含量との相関分析を行い、これらが褐変の原因成分である可能性を検討した。

搗精粉ペーストの加熱後のハンター白度や搗精粉ゲルの加熱後の明度は搗精歩留まりが高いほど低く、褐変が顕著であることが報告されている (神山・藤田2000、Yeung and Vasan-than 2001) が、大麦穀粒の表層付近にはポリフェノールが多い (佐藤1995、神山・藤田2000) だけでなく、タンパク質、脂質、灰分も多く含まれている (Yeung and Vasanthan 2001)。そこで、IIIでは、無機成分が褐変に及ぼす影響を明らかにするため、搗精粉ペーストに濃度の異なる8種類の無機元素の塩やキレート剤を添加し、加熱後の色相変化を調べて褐変に対する効果を検討した。

Quinde-Axtellらは、茹でた搗精粒や加熱した搗精粉ゲル、加熱していないドゥシートを用いて大麦の褐変の評価を行っており、プロアントシアニジン欠失系統は野生型に比べて明度が高いことを報告している (Quinde *et al.* 2004、Quinde-Axtell *et al.* 2005、Quinde-Axtell *et al.* 2006、Quinde-Axtell and Baik 2006)。また、加熱していないドゥシートの褐変が、搗精麦のカテキン含量と相関するがフェノール酸やプロアントシアニジンとは相関しないこと、粗精製したプロアントシアニジン画分を添加すると褐変が進むことを報告している (Quinde-Axtell and Baik 2006) が、加熱後の褐変に対する効果は検討されていない。そこで、IVでは、個別のポリフェノール成分が加熱後の褐変に及ぼす

影響を評価することを目的とし、大麦の主要なプロアントシアニジンを単離するとともに、搗精粉ペーストや搗精粉抽出液に濃度の異なるポリフェノール化合物を添加して加熱し、加熱後の色相に及ぼす各成分の影響を解析した。また、化合物の構造と褐変に対する効果との関係を考察した。

さらに、Vでは、より麦ご飯に近い評価系として炊飯粒を用いて加熱保温後の褐変の評価を行い、褐変の原因成分であることが示唆されたフラバノール成分の経時的変化を調べ、両者の関係を明らかにすることを目的とした。

一方、大麦の有用な特徴として、モチ性裸麦に含まれるアントシアニンに着目した。モチ性裸麦は、成熟期に葉、茎、種子が紫色に着色する特徴を有しており、大麦麺や菓子原料等の粉食として利用されているが、紫色に着色する特徴は十分に活かされていない。近年の研究により、アントシアニンのもつ抗酸化活性 (Philpott *et al.* 2004、Nam *et al.* 2006、Kim *et al.* 2007)、抗炎症作用 (Tsuda *et al.* 2002)、抗腫瘍作用 (Hyun and Chung 2004、Zhao *et al.* 2004)、血糖低下作用 (Tsuda *et al.* 2003)、冠動脈保護作用 (Dell'Agli *et al.* 2004) 等の生理活性が明らかになり、アントシアニンは健康機能性成分として認識されてきており、アントシアニンを含む黒米も注目されている。大麦は米やトウモロコシと比べて $\beta$ -グルカン等の食物繊維を多く含み (Li *et al.* 2003)、血中コレステロール低下作用や血糖値上昇抑制作用等の生理活性が明らかになっている (佐藤ら1990、McIntosh *et al.* 1991、Ikegami *et al.* 1996、Behall *et al.* 2004a、Behall *et al.* 2004b) ことから、アントシアニンを含有する大麦には冠動脈性心疾患のリスクを低下させる相乗効果がある可能性がある。そこで、VIではモチ性裸麦のアントシアニン色素の有効活用を図るため、品種「ダイシモチ」を用いて穀粒に含まれるアントシアニンの主成分を明らかにするとともに、成熟に伴う蓄積や穀粒内の局在性を明らかにすることを目的として研究を行った。

## II 大麦ペーストの加熱後褐変とポリフェノール成分との相関

### 1 緒言

Iで述べたように、大麦の加工品は、炊く、茹でる、蒸すといった加熱調理の過程で褐変しやすい。そのため、褐変しにくい大麦品種を育成し、加工時の褐変を低減することが求められており、この目的を達成するため、褐変に関与する主要な成分を明らかにすることが重要である。

これまでの研究から、プルシアンブルー法で測定した搗精麦のポリフェノール含量が多いほど、加熱した搗精粉ペーストのハンター白度が低い傾向があることが分かっている（藤田ら 2000、神山・藤田 2000）。プルシアンブルー法は穀粒のポリフェノールの定量にしばしば用いられている（Price and Butler 1977、Yanagisawa and Amano 1995）が、ポリフェノールとともに抽出される可能性があるシステイン、トリプトファン、アスコルビン酸やインドール化合物の共存により影響を受けることが知られている（Graham 1992）ため、ポリフェノール以外の成分が加熱した大麦製品の色相に影響している可能性もある。

そこで、プロアントシアニジン欠失系統を含む42品種・系統の大麦を用いて、総ポリフェノール含量および粗ポリフェノール画分の主な8成分の含量をHPLCで定量し、加熱した大麦ペーストの色相との相関を調べることにより、ポリフェノールの褐変に対する影響を調べた。

### 2 材料および方法

#### 1) 材料

岡山大学で収集した世界各国の在来品種の中から20品種（チベット白、Gondal 1、Rewari、赤神力、白トウ、一皮、早取裸、安城皮麦2、長項裸麦2、統営皮麦1、長項皮麦、Gho 1、

Turkey 61、Bursa 918、Orayio、Cygne、PLD 5、CSR 3、Binder、PLD 83c）を岡山大学資源生物科学研究所（現岡山大学資源植物科学研究所）の圃場（倉敷市）で栽培し、1998年に収穫した穀粒を用いた。プロアントシアニジン欠失3系統（ant13-152、ant17-148（Jende-Strid and Møller 1981）、大系HO4（長嶺ら 2006））と8栽培品種（イチバンボシ、すずかぜ、ニシノチカラ、マサカドムギ、ミサトゴールデン、ミノリムギ、ヤチホゴールデン、Triumph）および11育成系統（四系9399、四国裸83号、四国裸84号、四国裸92号、四国裸95号、四国裸96号、四国裸97号、四国裸98号、四国裸99号、四国裸100号、栃系216）を四国農業試験場（現（独）農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター四国研究センター）の圃場（善通寺市）で栽培し、1997年または1998年に収穫した穀粒を用いた。供試した品種・系統の内訳は、六条皮麦が11点、二条皮麦が14点、六条裸麦が14点で二条裸麦が3点である。穀皮の重量が穀粒の約10%に相当するため、皮麦は55%、裸麦は60%の搗精歩留まりまで搗精し、1mmのスクリーンをつけたサイクロテック1093サンプルミル（Tecator、Höganäs、Sweden）で粉碎し、搗精粉を得た。（+）-カテキン、PDB3、PCB3とコウジ酸はSigma社（St. Louis、MO、USA）より購入した。

#### 2) 褐変測定

内径90mmのガラスシャーレ内で、搗精粉5.0gと蒸留水10mlを混合し、大麦ペーストを作成した。ペーストは90℃で2時間加熱後に放冷した。加熱前と放冷後にペースト表面のL\*値（明度）、a\*値（赤み）とb\*値（黄色み）をCR310型色差計（ミノルタ株式会社、大阪）で測定した。ハンター白度（W）を式(1)で求めた。加熱前のペーストのハンター白度（W1）と加熱後のペーストのハンター白度（W2）の差を

褐変指数 (BI) と定義し、式(2)で算出した。褐変測定は2反復で行い、各測定の平均値で表した。

$$W = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad (1)$$

$$BI = W1 - W2 \quad (2)$$

### 3) ポリフェノール含量の測定

搗精粉の総ポリフェノール含量は、Yanagisawa and Amano (1995) の方法に従い、プルシアンブルー法で測定した。すなわち、搗精粉1.0gにメタノール10mlを加えて可溶性成分を抽出し、抽出液0.3mlを蒸留水5.0ml、8mM  $K_3Fe(CN)_6$  0.3ml、0.1M  $FeCl_3$ /0.1N HCl 0.3mlと混合し、15分後に720nmの吸光度を測定した。ポリフェノール含量は(+)-カテキン当量で表した。

### 4) 粗ポリフェノール画分の分析

粗ポリフェノール画分は、搗精粉1.0gに75%アセトン5.0mlと内部標準としてコウジ酸20 $\mu$ gを加え、30℃で1時間、振とう抽出した。3,000rpmで10分間遠心分離した後、上清をSepapak C18カートリッジ (Waters, Milford, MA, USA) に負荷し、非吸着画分を遠心エバポレーター (タイテック株式会社、越谷市) で乾固した後、75%メタノール1.0mlに溶解し、孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルター (アドバンテック東洋株式会社、東京) で濾過したものをHPLC分析試料とした。分析には内径4.6mm×長さ250mmのTSKgel ODS-80Ts QAカラム (東ソー株式会社、東京) を用い、McMurrough *et al.* (1983)

の方法に準じて、30℃、流速1 ml/minで2.5%酢酸を含む水 (A) と2.5%酢酸を含むメタノール (B) の混合溶媒により、以下の濃度勾配により溶出した。0-30分：0-30% B、30-35分：30-70% B、35-40分：70% B。検出はフォトダイオードアレイ検出器 (L-7450、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) で行い280nmの吸光度をモニターした。予め、コウジ酸と(+)-カテキンの検量線を作成し、クロマトグラムに共通して見られるA-Hの8ピーク (図5) の含有量をピーク面積から(+)-カテキン当量に換算し、搗精粉1g当たりの含量を算出した。1試料につき3回分析し、平均値を求めた。各ピークの照合は、イチバンボシの粗ポリフェノール画分を標準試料として11分析ごとに1回分析し、吸収スペクトルと保持時間を比較することにより行った。

(+)-カテキン、PDB3とPCB3のピークを同定するため、各標準化合物 (1.0 $\mu$ g/10 $\mu$ l) を単独または裸麦品種イチバンボシの抽出液 (50 $\mu$ l) と混合し、同じ条件で分析した。

### 5) 統計処理

相関分析、回帰分析および分散分析は統計ソフトウェアJMP version 3.22 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

## 3 結果および考察

### 1) 搗精粉ペーストの加熱による褐変とポリフェノール含量との関係

供試した42品種・系統のポリフェノール含量は0.14-0.69mg/gの変異があり (図6)、平均は0.50mg/gであった。プロアントシアニン欠失系統のポリフェノール含量は0.14-0.33mg/gと顕著に低かった。六条大麦と二条大麦、皮麦と裸麦間でポリフェノール含量に有意差はみられなかった ( $p>0.05$ )。加熱前のペーストの白度 (W1) は加熱後のペースト白度 (W2) と正の相関がみられたが、ポリフェノール含量とは相関がみられなかった (表2)。W1値は大麦粉の色相と加水直後の色相変化の両方の影響を受け

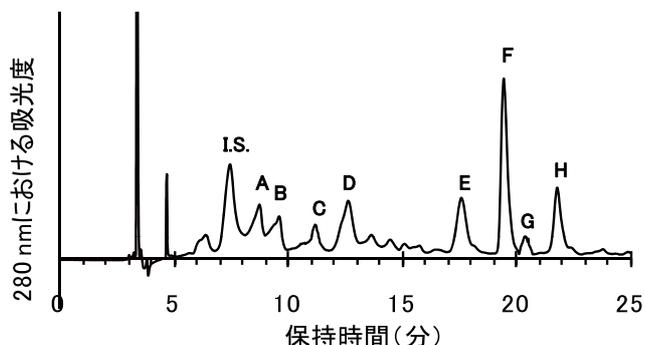


図5 イチバンボシの粗ポリフェノール画分のクロマトグラム

I.S.は内部標準として用いたコウジ酸、A~Hは共通にみられたピークを示した。

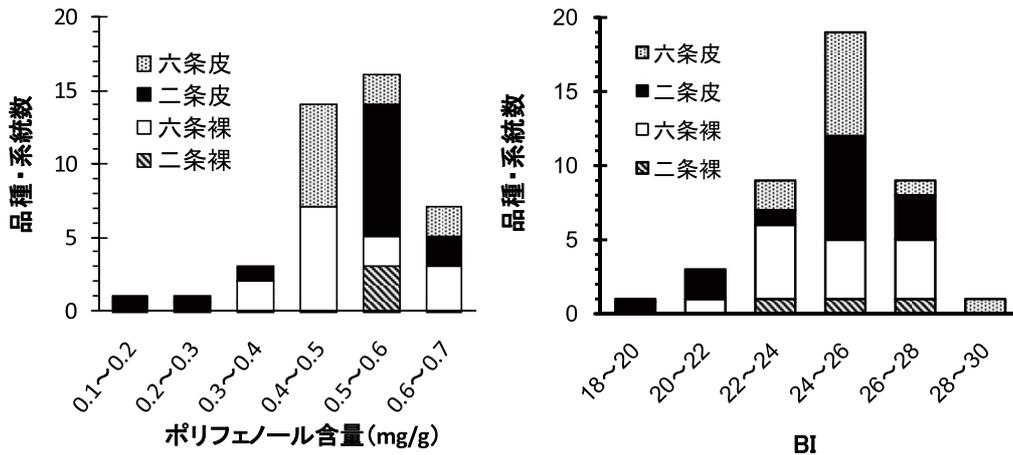


図6 供試した42品種・系統のポリフェノール含量と褐変指数のヒストグラム

褐変指数 (BI) は搗精粉ペーストの加熱前後のハンター白度の差から求めた。

表2 加熱前後のペースト白度、褐変指数とポリフェノール含量との相関係数

	W2	BI	ポリフェノール含量
W1	0.669***	-0.145	-0.178
W2		-0.832***	-0.672***
BI			0.766***

搗精粉5.0gに蒸留水10mlを加えてペーストを作成し、90℃で2時間加熱後、放冷した。W1とW2はそれぞれ加熱前後のペースト白度、褐変指数BI = W1 - W2を表す。ポリフェノール含量はプルシアンブルー法で測定した。  
\*\*\*はp<0.001で有意 (n=42)。

ていると思われる。そこで加熱前の色相の影響を排除するため、加熱処理による褐変の指標として褐変指数 (BI) を用いた。42品種・系統のBIは18.3-28.5の変異があり (図6)、平均値は24.5であった。BI値も、二条大麦と六条大麦、皮麦と裸麦の間で有意差はみられなかった (p>0.05)。プロアントシアニン欠失系統はBI値が18.3-21.6と非常に低かった。BI値はポリフェノール含量と高い正の相関がみられ (表2、図7)、ポリフェノール含量が高い品種・系統ほど褐変が著しい傾向があることが分かった。

ポリフェノール含量から褐変程度がどの程度予測可能かを明らかにするために、BI値を従属変数、ポリフェノール含量 (PP) を独立変数として回帰分析したところ、次式の回帰直線が得られ、回帰の寄与率は0.587と算出された。

$$BI = 17.88 + 13.28 \times PP$$

このため、ポリフェノール含量は強くBI値に影響しており、変異の6割弱を説明することができるが、ポリフェノール含量だけではBI値を予測できず、他の要因も関与していることが示唆された。

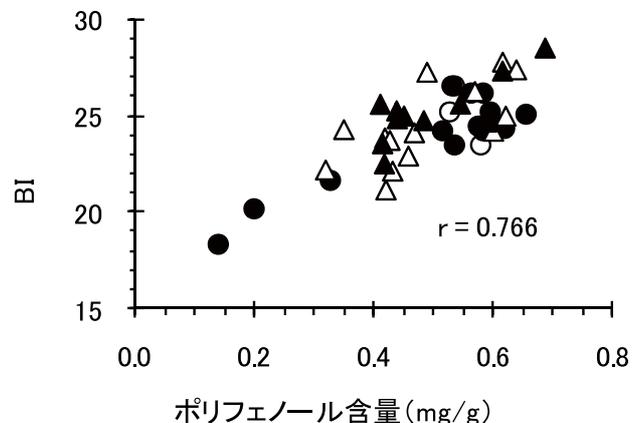


図7 搗精麦のポリフェノール含量とペーストの褐変指数

褐変指数 (BI) は搗精粉ペーストの加熱前後のハンター白度の差から求めた。▲六条皮、●二条皮、△六条裸、○二条裸。

## 2) ペーストの加熱による褐変とポリフェノール画分の成分との関係

BI値に影響を及ぼす可能性のある成分を探索するため、42品種・系統の粗ポリフェノール画分を分析した。粗ポリフェノール画分の代表的なクロマトグラムを図5に示した。280nmの吸光度をモニターした場合、プロアントシアニン欠失系統を除く39品種・系統ではA-Hの8つのピークが共通して検出された。各ピークの保持時間はAが9.09±0.26分、Bが9.99±0.28分、Cが11.81±0.41分、Dが13.27±0.42分、Eが18.25±0.47分、Fが19.62±0.30分、Gが20.41±0.38分、Hが22.43±0.46分であった。プロアントシアニン欠失系統ではC、D、Eのピークは検出されず、Hのピークも痕跡しか検出されなかった。市販の標品を用いて分析したところ、PDB3、PCB3と (+)-カテキンはイチバンボシ

表3 粗ポリフェノール画分の成分とポリフェノール含量および褐変指数 (B) との相関係数

	A	B	C	PDB3	PCB3	F	G	(+)-カテキン
ポリフェノール含量	0.232	0.206	0.676***	0.713***	0.686***	0.357	0.321	0.445**
BI	0.231	0.122	0.400**	0.595***	0.599***	0.108	0.248	0.384*

粗ポリフェノール画分は搗精粉1.0gに75%アセトン5.0mlと内部標準としてコウジ酸20 $\mu$ gを加えて抽出し、濃縮乾固後メタノールに溶解し、HPLCで分析した。280nmで検出される8ピーク (A、B、C、プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジンB3 (PCB3)、F、G、(+)-カテキン) の含量を定量した。ポリフェノール含量はプルシアンブルー法で測定し、褐変指数BIは加熱前後のペースト白度の差から求めた。\*、\*\*、\*\*\*はそれぞれ $p < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ で有意 ( $n = 42$ )。

表4 成分C、PDB3、PCB3と(+)-カテキン含量の相関係数

	PDB3	PCB3	(+)-カテキン
C	0.850***	0.570**	0.247
PDB3		0.738***	0.444**
PCB3			0.537***

搗精粉から抽出した粗ポリフェノール画分をHPLCで分析し、成分C、プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジンB3 (PCB3) と(+)-カテキンの含量を求めた。\*\*と\*\*\*はそれぞれ $p < 0.01$ 、 $0.001$ で有意 ( $n = 42$ )

の粗ポリフェノール画分のピークD、E、Hとそれぞれ一致した。このためピークD、E、Hに相当する成分は、それぞれPDB3、PCB3、(+)-カテキンであると同定した。また、ピークCとFに相当する成分は、IVで詳述する方法で単離精製し構造解析を行った結果、後にそれぞれプロデルフィニジンT1 (PDT1) とL-トリプトファンであることが判明した。

次に、8つのピークに相当する成分の含量とポリフェノール含量やBI値との相関分析を行った (表3)。PDB3とPCB3の含量は、ポリフェノール含量ともBI値との高い正の相関がみられた。成分Cと(+)-カテキンの含量も両者との間に正の相関がみられたが、相関係数はPDB3やPCB3に比べて小さかった。一方、成分A、B、FとGはポリフェノール含量ともBI値とも有意な相関はみられなかった。成分FであるL-トリプトファンはクロマトグラムでは大きなピークとして検出され、プルシアンブルー試薬と反応することが分かっているが (Graham 1992)、搗精粉のポリフェノール含量やペーストの褐変程度にはあまり影響を及ぼさないことが示唆された。また、成分C、PDB3、PCB3と(+)-カテキンの4成分は、いずれもBI値に対する相関よりもポリフェノール含量に対する相関の方が高かった。以上のことから、単独で大麥ペー

ストの褐変に大きく寄与する成分は見つからなかったが、成分C、PDB3、PCB3と(+)-カテキンの4成分は大麥ペーストの褐変に関与している可能性が示唆された。また、これらの成分は単独で褐変に関与するのではなく、他の成分と協働して褐変に関与していると考えられる。

次に、上記の4成分の含量が独立変数として加熱後の褐変程度を予測に用いることができるか否かを調べるため、4成分の含量間の相関を調べた (表4)。その結果、成分Cと(+)-カテキンの含量の間には有意な相関はみられなかったが、4成分の含量が互いに相関することから、これらは互いに独立した変数ではないことが明らかとなった。すなわち、PDB3を多く含む品種は、成分C、PCB3、(+)-カテキンのいずれの成分も多く含む傾向があり、逆に少ない品種はいずれの成分も少ない傾向があることを示している。このことは4成分の含量を同時に制御しうることを示唆している。また、成分CはPDB3との高い正の相関がみられたこと、プロアントシアニジン欠失系統で検出されなかったことは、その後の研究によりPDT1であると判明したことと合致する。分子内にガロカテキンをもつ成分CとPDB3との相関が、成分CとガロカテキンをもたないPCB3や(+)-カテキンとの相関よりも高いこと、またPDB3と(+)-カテキンの相関よりも同じプロアントシアニジン二量体であるPDB3とPCB3との相関が高いことは、成分間の相関係数とその成分の生合成経路の共通性の高さを反映していると考えられる。

以上の結果から、大麥の加熱による褐変はプルシアンブルー試薬に反応する成分、おそらくポリフェノール成分の含量に強く影響を受ける

ことが分かった。さらに、PDB3、PCB3、成分Cと(+)-カテキンが褐変に関わっていると思われる。そのため、これらの成分の含量が少ない品種、例えば、これらの成分の生合成経路に

欠損をもつような品種を用いることにより、大麦製品の褐変を低減することができると考えられる。

### III 大麦ペーストの加熱後褐変における無機元素の影響

#### 1 緒言

IIで述べたように、大麦ペーストの加熱後の褐変程度は、ポリフェノール含量やカテキンやプロアントシアニジンの含量と相関し、ポリフェノール成分が褐変に影響することが示唆されている。一方、回帰分析の結果から、大麦ペーストの加熱後の褐変はポリフェノール含量だけでは予測できないことも明らかになっており、他の成分や要因が関与していることが示唆されている。穀粒の搗精歩合と加熱後の褐変との関係では、搗精歩留まりが高い、すなわち表層部を多く含む程褐変が著しいことが明らかにされている(神山・藤田 2000、Yeung and Vasanthan 2001)が、穀粒の表層部は中心部に比べポリフェノールが多い(神山・藤田 2000)だけでなく、灰分、脂質、タンパク質の含有量も高い(Yeung and Vasanthan 2001)ため、これらの成分が複合的に影響している可能性がある。しかし、ポリフェノール以外の大麦成分が褐変に及ぼす影響についてはこれまで検討されていない。

一般に、鉄や銅等の遷移元素はポリフェノールの自動酸化を触媒すること(Kumamoto *et al.* 2001)が知られており、水溶液中でカテキン(Oszmianski *et al.* 1996)やケルセチン(Makris and Rossiter 2000)の褐変を促進することが報告されている。また、小麦粉や小麦麺では明度と灰分含有率(Feillet *et al.* 2000)や鉄含量(木谷ら 2002)との間に負の相関があることが報告されており、ミネラルが色相に影響することが示唆されている。そのため、大麦の加熱後

の色相に対しても穀粒に含まれるミネラルが影響する可能性がある。

本研究では、大麦炊飯時の褐変のモデルとして、表面色の測定が容易な大麦ペーストを用い、加熱による色相変化を測定した。無機元素が大麦の加熱後褐変に及ぼす影響を評価するため、大麦に含まれる8種類の無機元素を塩としてペーストに添加し、加熱後の色相を対照と比較した。また、ペーストにキレートを添加した際の加熱後の色相を同様に測定し、内在性無機元素が褐変に及ぼす影響を検討した。

#### 2 材料および方法

##### 1) 材料と試薬

裸麦品種「イチバンボシ」を四国農業試験場(現(独)農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター四国研究センター)の圃場(善通寺市)で栽培し、1998年に収穫した。穀粒を試験用搗精機TM-05(株式会社サタケ、東広島市)で搗精歩留まり60%まで搗精した後、1mmのスクリーンを付けたサイクロテック1093サンプルミル(Tecator、Höganäs、Sweden)で粉碎し、得られた60%搗精粉は実験に用いるま-30℃で保存した。

イチバンボシの60%搗精粉に含まれる無機元素の分析を財団法人日本食品分析センター大阪支所(吹田市)に依頼した。マグネシウム、カルシウム、マンガンと亜鉛は乾式灰化後、ナトリウムとカリウムはそのまま塩酸抽出し、原子吸光光度法で測定した。リンと鉄は乾式灰化後、それぞれバナドモリブデン酸吸光光度法、o-フェナントロリン吸光光度法で測定した。銅は湿式

分解後ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウムでキレートし、酢酸ブチル層を原子吸光度法で測定した。

フィチン酸含量は既報 (Latta and Eskin 1980) に従って測定した。すなわち、搗精粉を0.65N 塩酸で抽出した試料を希釈後陰イオン交換樹脂 AG1-X8 OH (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に吸着させ、蒸留水および0.1M NaClで洗浄した後、0.7M NaClで溶出し、Wade 試薬と反応させて500nmの吸光度を測定し、フィチン酸の濃度を算出した。

ジエチレントリアミン-*N, N, N', N'', N'''*-五酢酸 (DTPA)、エチレンジアミン-*N, N, N', N''*-四酢酸 (EDTA)、*O, O'*-ビス (2-アミノプロピル) エチレングリコール-*N, N, N', N''*-四酢酸 (BAPTA) は株式会社同人化学研究所 (上益城郡益城町) より、フィチン酸カルシウム塩はSigma社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。

## 2) 大麦ペーストの加熱後褐変の測定

直径90mmのプラスチックシャーレにイチバンボシの60%搗精粉5.0gと蒸留水 (対照) または添加物溶液10mlを加え、3分間ヘラで攪拌して平らなペーストを作成した。シャーレに蓋をして水分の蒸発を防ぎ、非密閉のまま90℃のナチュラルオーブン (東京理化株式会社、東京) で2時間加熱し、一晩放冷した。ペースト表面の色相は、加熱前と放冷後に色彩色差計CR-310 (ミノルタ株式会社、大阪) の遮光筒ガラス面を接触させてCIELAB表色系のL\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値を測定し、ハンター白度を次式で算出し、各2反復の平均値を求めた。

$$W = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

添加した無機塩溶液は0.06-2mM NaCl、1.5-50mM MgCl<sub>2</sub>、6-200mM KCl、2-20mM CaCl<sub>2</sub>、2-20mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、2-20mM Ca (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>、0.025-0.25mM MnCl<sub>2</sub>、0.05-0.5mM FeCl<sub>2</sub>、0.05-0.5mM FeCl<sub>3</sub>、0.01-0.1mM CuCl、0.01-0.1mM CuCl<sub>2</sub>、0.05-0.5mM ZnCl<sub>2</sub>であり、添加前に溶液のpHを測定した。DTPA、EDTA、BAPTAお

よびフィチン酸は、各0.1-10mMの溶液を予め塩酸または水酸化ナトリウムでpH6に調整して用いた。添加物の効果は、測定ごとに対照 (無添加) のペーストの色相に対する変化量で表した。

## 3 結果および考察

本研究で用いたイチバンボシの60%搗精粉の無機元素量は表5の通りであった。このため、イチバンボシの60%搗精粉5gから調製した大麦ペーストに内在する無機元素量と添加した無機元素量は表6のようになり、添加した無機元素は内在量の約0.3-10倍に相当した。

表5 イチバンボシ60%搗精粉100g当たりの無機元素量

ナトリウム	0.9 mg
マグネシウム	25.9 mg
リン	152 mg
カリウム	168 mg
カルシウム	24.8 mg
マンガン	543 μg
鉄	0.77 mg
銅	231 μg
亜鉛	1.22 mg

表6 大麦ペーストに内在および添加した無機元素量

(μmol)

	内在量	添加量
ナトリウム	2	0.6~20
マグネシウム	53.3	15~500
カリウム	215	60~2000
カルシウム	30.9	20~200
マンガン	0.494	0.25~2.5
鉄	0.69	0.5~5.0
銅	0.182	0.1~1.0
亜鉛	0.933	0.5~5.0

加熱前の大麦ペーストの色相を比較すると、無機塩を添加したペーストと対照のペーストとのハンター白度の差は1未満と小さかったが、0.5mM FeCl<sub>2</sub>の添加でL\*値とb\*値が3.0低下し、0.5mM FeCl<sub>3</sub>の添加でL\*値が1.7低下した。一方、20mMのCaCl<sub>2</sub>、Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、Ca (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>を添加したペーストは、対照に比べL\*値がそれぞれ1.0、1.7、1.8高かった。

加熱後のペーストは、加熱前に比べL\*値が

低下し、 $a^*$ 値と $b^*$ 値が増加した。無機塩を添加したペーストと対照のペーストとの色相の差は加熱後に顕著になった。図8は $FeCl_2$ と $CuCl$ を

添加した加熱のペーストを示し、図9には各無機塩溶液を添加した加熱後のペーストの色相と塩溶液のpHを示した。 $CuCl$ 、 $CuCl_2$ 、 $FeCl_2$ 、



図8 無機塩を添加した加熱後の大麦ペースト

左の5個は対照と $FeCl_2$  (0.05~0.5mM) を添加したペースト、右の5個は対照と $CuCl$  (0.01~0.1mM) を添加したペースト。

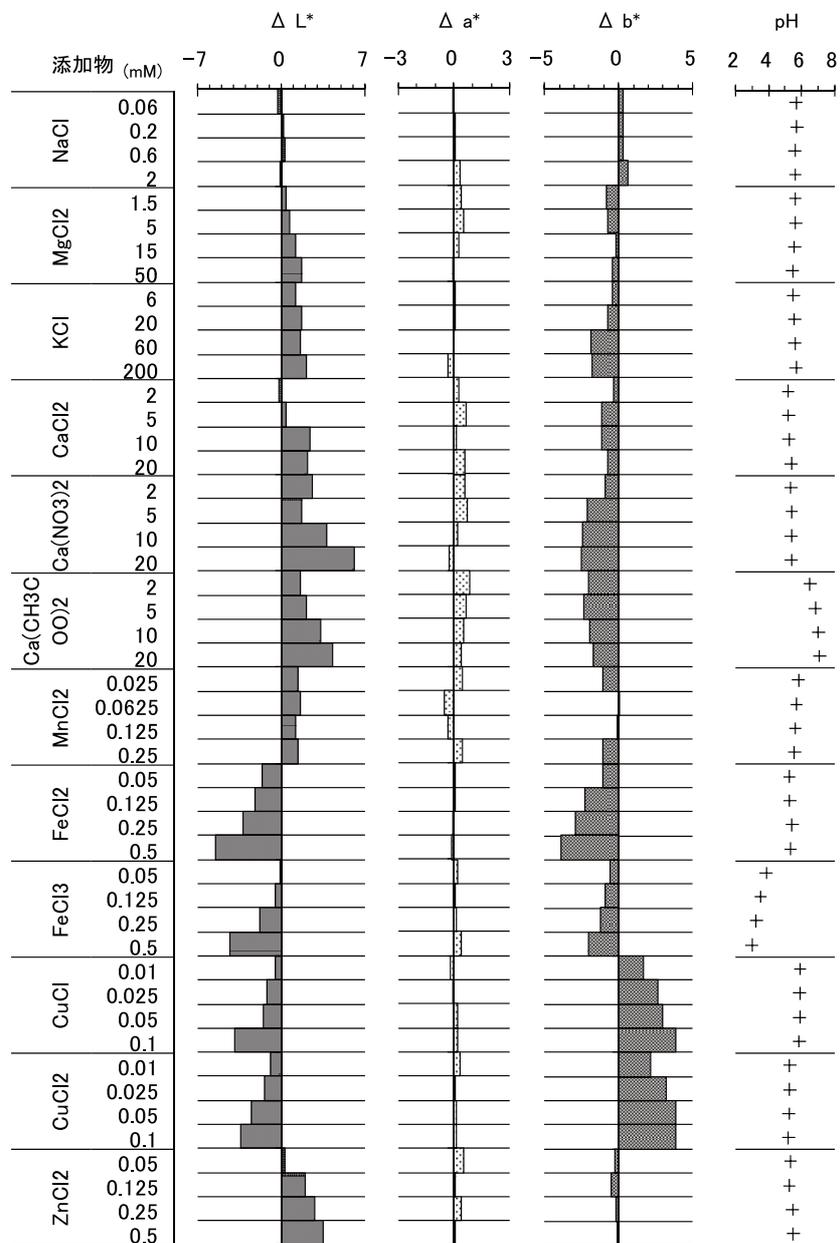


図9 無機塩を添加した大麦ペーストの加熱後の色相変化

大麦ペーストはイチバンボン60%搗精5.0gに10mlの蒸留水(対照)または無機塩溶液を加えて作製し、90℃で2時間加熱後、ペースト表面色を測定し、 $L^*$ (明度)、 $a^*$ (赤み)、 $b^*$ (黄色み)値の対照との差を算出した。各無機塩溶液の混合前のpHを測定した。

FeCl<sub>3</sub>を添加したペーストは、対照に比べてL\*値が濃度依存的に顕著に低下したが、鉄を加えたペーストと銅を加えたペーストとでは色調が異なっており、b\*値は鉄では低下し、銅では増加した。一方、ZnCl<sub>2</sub>を添加したペーストでは、添加した塩の濃度に依存して顕著なL\*値の増加が観察された。また、添加したCaCl<sub>2</sub>、Ca(N O<sub>3</sub>)<sub>2</sub>およびCa(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>溶液のpHはそれぞれ5.19-5.39、5.37-5.41、6.53-7.11と異なっていたが、いずれも濃度依存的なL\*値の増加が観察された。このため、カルシウム塩溶液を添加したことによるペーストの色相変化は、pHや対イオンの影響ではなくカルシウムによる効果であると考えられた。MgCl<sub>2</sub>とKClを添加したペーストもL\*値の増加が観察されたが、NaClとMnCl<sub>2</sub>を添加したペーストでは、濃度に依存した色相変化は観察されなかった。

次に、ペーストに添加した各無機元素量と搗精粉に内在する無機元素量との比を算出し、対照のペーストに対するハンター白度の差を表した(図10)。対照のペーストでは、加熱の前後でハンター白度が20.02±1.13 (n=36) 低下した。内在量と等量の無機元素を塩として添加した場合、加熱後白度はマグネシウム、カリウム、カルシウムと亜鉛では約1-2増加、鉄と銅では約0.5-1.5低下し、変動することが分かった。このように、無機元素の種類により加熱後の褐変

が促進あるいは低減されることが明らかとなった。大麦粉懸濁液の加熱後の色相を測定する評価系において、pHが高くなるとハンター白度が顕著に減少し、褐変しやすいことが報告されている(佐藤 1995) ため、無機塩の添加によりペーストのpHが変化し、その結果として褐変に影響した可能性は考えられる。しかし、弱酸性のFeCl<sub>2</sub>溶液とpHが低いFeCl<sub>3</sub>溶液が共に褐変を促進したことや、pHが異なる3種のカルシウム塩溶液がいずれも褐変を低下させたことから、無機元素自体の影響を反映していると考えられる。

さらに、大麦ペーストにキレートを添加することによる加熱後のペーストの色相変化を図11に示した。DTPAとEDTAを添加すると、0.3mM以上の濃度で顕著にL\*値とb\*値が高くなり、顕著な褐変抑制効果がみられた。フィチン酸を添加した場合は濃度依存的に徐々にペーストのL\*値とb\*値が増加し、褐変抑制効果がみられた(図11、図12)。塩化銅溶液を加えた場合はb\*値が高くなり、塩化鉄溶液を加えた場合はb\*値が低下したが、DTPA、EDTA、フィチン酸はb\*値が増加していることから、これらのキレート剤は特に内在する鉄の影響を阻害しているのではないかと考えられる。実験に用いた搗精粉に内在するフィチン酸量は1g当たり0.95μmolであったため、0.1mMのフィチン酸を添加した

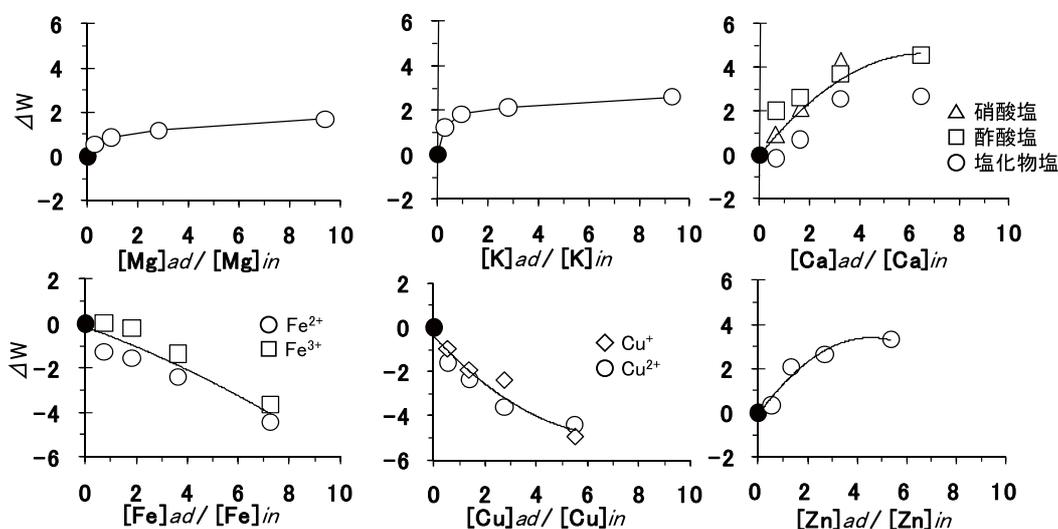


図10 大麦ペーストに含まれる無機元素の相対量と加熱後白度の差

内在性の無機元素の濃度 ( $[E]_{in}$ ) に対する添加した無機元素の濃度 ( $[E]_{ad}$ ) の比を算出し、加熱後のペースト白度の対照との差 ( $\Delta W$ ) を示した。  $W = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$

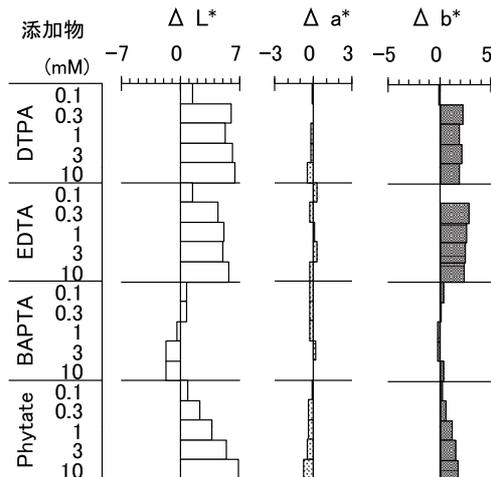


図11 キレートを添加した大麦ペーストの加熱後の色相変化

キレートを添加または添加しない（対照）大麦ペーストの加熱（90℃、2時間）後の色相を測定し、L\*（明度）、a\*（赤み）、b\*（黄色み）値の対照との差を示した。

場合、ペースト中の外来のフィチン酸は内在量の0.21倍量に相当する。このため、内在性のフィチン酸は大麦の褐変に対し、抑制的に作用している可能性がある。一方、カルシウムキレーターであるBAPTA (Tsien 1980) は3mM以上でペーストのL\*値を低下させた。

大麦穀粒において、ミネラルは表層部分に多く分布しているため、搗精歩留まりによりその含量の変動が著しいことが分かっている (Yeung and Vasanthan 2001)。また、小麦では栽培条件や品種によりミネラル成分が2-3倍の変動を示すことが報告されている (福岡・堀野 1989、佐藤ら 1996)。内在量と同程度の無機元素を塩として添加した場合、銅と鉄では褐変が促進し、亜鉛、カルシウム、マグネシウムとカリウムでは褐変が抑制されたことから、穀粒のミネラル成分の変動は大麦の加熱後の褐変程度に少なからず影響を及ぼすと考えられる。銅と鉄は水溶液中でカテキンの自動酸化 (Kumamoto *et al.* 2001) や褐変 (Oszmianski *et al.* 1996) を促進することが報告されているため、大麦ペーストにおいても銅や鉄がポリフェノール成分等の自動酸化を促進し、褐変を促進していると考えられる。また、Theuer (2002) は、大麦の全粒粉を食塩水で煮た粥に500mg/kgの硫酸鉄を添加した際、米、小麦、オーツ麦の粥に比べて顕著にL\*値が低下するが、プロアントシアニ

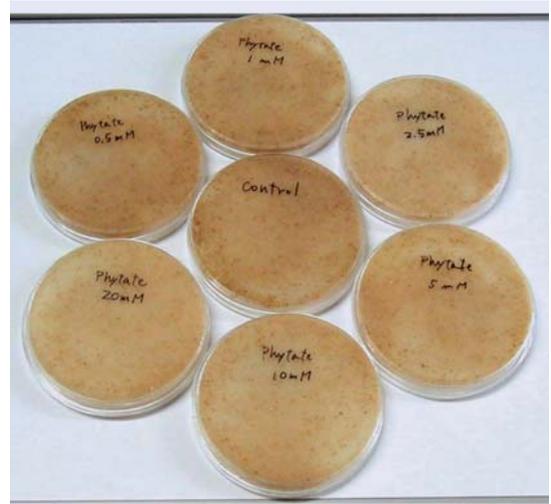


図12 フィチン酸を添加した加熱後の大麦ペースト

中央が対照（無添加）、左上から時計回りに0.5mM、1mM、2.5mM、5mM、10mM、20mMのフィチン酸を添加した。

ジン欠失遺伝子をもつ大麦ではL\*値の低下が小さいことを報告している。このことは、鉄による褐変促進効果がプロアントシアニジンの存在に強く影響されることを示唆している。

褐変抑制がみられた無機塩のうち、亜鉛とカルシウムは特に低濃度で効果がみられた。Vadlamani and Seib (1997) は、小麦麺に0.05%の亜鉛イオンやアルミニウムイオンを添加すると明度が高くなることを報告しているが、本研究で用いたZnCl<sub>2</sub>は、大麦粉の0.0003-0.003%に相当する低濃度である。亜鉛には遷移元素による生体分子の自動酸化を遅らせる作用があることが報告されている (Powell 2000) ため、鉄や銅が触媒するポリフェノール成分等の自動酸化を妨げることにより褐変を抑制している可能性がある。カルシウムによる褐変抑制のメカニズムは不明であるが、カルシウムはカット果実の軟化防止に効果があり日持ち向上に利用されており (Dong *et al.* 2000)、物理的に反応成分の拡散を妨げ、褐変を遅らせているのかもしれない。カルシウムキレーターであるBAPTAの添加でわずかながらペーストのL\*値が低下したことから、内在性カルシウムも褐変抑制的に作用していると考えられる。亜鉛やカルシウムは不足しがちなミネラルであるため、褐変抑制の添加物として期待できる。

## IV 大麦ポリフェノールの加熱による褐変評価

### 1 緒言

IIで明らかにしたように、大麦ペーストの加熱による褐変とポリフェノール含量、褐変と(+)-カテキンやプロアントシアニジンの含量との間には有意な相関がみられた(Kohyama *et al.* 2001)。また、搗精粉のポリフェノール含量と加熱した搗精粉ゲルの明度に負の相関がみられることやプロアントシアニジン欠失系統のゲルの明度が高いことも報告されている(Quinde *et al.* 2004, Quinde-Axtell *et al.* 2005, Quinde-Axtell *et al.* 2006)。これらの結果から、内在性のポリフェノール成分、特にカテキンやプロアントシアニジンが褐変に関与することが示唆されているが、ポリフェノールが加熱後褐変を促進するという直接的な実験結果は報告されていない。さらに、大麦穀粒にはカテキンやプロアントシアニジンの他に、*p*-クマル酸やフェルラ酸、ジフェルラ酸等のフェノール酸(Holtekjølen *et al.* 2006)やC-グリコシルフラボンやO-グリコシル-C-グリコシルフラボン(Ferrerres *et al.*, 2009)が含まれていることや、プロアントシアニジン欠失系統の中にはプロアントシアニジンの前駆物質であるフラバンやフラボン、デヒドロキシフラボノールを蓄積するものがあること(Jende-Strid 1993)が報告されているが、これらのポリフェノール成分の褐変に対する影響については検討されていない。

そこで、大麦製品の加熱による褐変のモデル評価系として、大麦抽出液と大麦ペーストを用い、大麦由来のポリフェノール成分や関連する成分を添加して加熱することにより、各化合物の濃度依存的な大麦製品の褐変に対する影響を調べるとともに、化合物の構造と褐変に対する影響との関連性を検討した。

### 2 材料および方法

#### 1) 材料と試薬

裸麦品種「イチバンボシ」を四国農業試験場(現(独)農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター四国研究センター)の圃場(善通寺市)で栽培し、1998年に収穫した穀粒を試験用搗精機TM-05(株式会社サタケ、東広島市)で60%または40%の歩留まりまで搗精した。60%搗精時の糠を1mmメッシュの篩にかけ、篩われた粉を粗フラバノール画分の調製に用いるまで-30℃で保存した。搗精粒は1mmのスクリーンをつけたサイクロテック1093サンプルミル(Tecator, Höganäs, Sweden)で粉碎し、得られた60%搗精粉と40%搗精粉を実験に用いるまで-30℃で保存した。

3-インドールアクリル酸、(+)-カテキン、PDB3、PCB3、*p*-ヒドロキシ安息香酸、バニリン酸、プロトカテク酸、*p*-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸、ナリンゲニン、アピゲニン、ケルセチンとミリセチンはSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。ホモエリオジクチオール、エリオジクチオール、(+)-ジヒドロケルセチン、クリソエリオール、ルテオリン、イソビテキシン、ホモオリエンチンとケンフェロールはExtrasynthèse (Genay, France)より入手した。他の試薬は和光純薬工業株式会社(大阪市)より購入した。

#### 2) 粗フラバノール画分の調製と内在性成分の精製

篩った糠1kgをヘキサンで脱脂した後、75%アセトン-水4:1で2回抽出した。抽出液を合わせて減圧下で濃縮乾固した画分を粗フラバノール画分として用いた。粗フラバノール画分に含まれる主要な成分をMcMurrough *et al.* (1996)の方法を改変した方法で単離した。粗フラバノー

ル画分10gを蒸留水40mlに懸濁し、3,000rpmで10分間遠心分離した上清を、予め蒸留水で平衡化した内径32mm×高さ350mmのSephadex LH-20カラム (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) に負荷した。カラムを蒸留水950mlと20%エタノール950mlで流速5 ml/minで洗浄し、続いて流速5 ml/minの80%エタノールで溶出し、画分 I (200-800ml) と画分 II (800-1500 ml) を回収し濃縮乾固した。画分 I はさらに内径20 mm×長さ250mmのTSK-gel ODS-80Tsカラム (東ソー株式会社、東京) に注入し、2.5% (v/v) 酢酸-5% (v/v) メタノールを流速5.0ml/minのアイソクラティック溶出により3つの主要な化合物を得た。画分 II は同じカラムに注入し、2.5% (v/v) 酢酸-2% (v/v) メタノールを流速5.0ml/minのアイソクラティック溶出により、主要な化合物を得た。

粗フラバノール画分4.5gをメタノールに溶解し、予めメタノールで平衡化した内径15mm×高さ283mmのSephadex LH-20カラムに負荷し、メタノールで溶出した40-100mlの画分を回収した。さらに内径7.8mm×長さ300mmの $\mu$  Bondapak C 18カラム (Waters, Milford, MA, USA) に注入し、30分間で0-20%メタノール-水のリニアグラディエント溶出を流速3.0ml/minで行った。280nmの吸光度によるピーク画分を回収し、同じカラムで繰り返し分離して主たる化合物を得た。

粗フラバノール画分と単離した5つの化合物は、内径4.6mm×長さ250mmのTSK-gel ODS-80Ts QAカラム (東ソー株式会社) を用い、以下の条件で分析した。カラム温度30℃で、溶媒A (2.5%酢酸-水) に対する溶媒B (2.5%酢酸-メタノール) の濃度を30分間で0-30%までリニアグラディエント溶出し、L-7450型ダイオードアレイ検出器 (株式会社日立ハイテクノロジー、東京) を用い240-400nmの紫外可視吸収スペクトルをモニターした。各化合物の純度は、280nmで検出されるクロマトグラムの全ピーク面積に対するピーク面積の割合から算出した。

### 3) 機器分析

エレクトロスプレーイオン化飛行時間 (ESI-TOF) 質量分析は、試料のメタノール溶液を流速2  $\mu$  l/minでMariner (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) に導入し、*m/z* 200-1000の範囲で測定した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) マススペクトルはReflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) を用い、マトリックスとして3-インドールアクリル酸を用いて測定した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルは重トリフルオロ酢酸 (TFA-*d*<sub>1</sub>) を含む重メタノール (CD<sub>3</sub>OD) に溶解し、Bruker Avance 500 spectrometer (Karl esruhe, Germany) を用いて500.13MHzで測定した。

### 4) 大麦抽出液による褐変評価

40%搗精粉20gに200mlの50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え室温で1時間攪拌した。10,000rpmで10分間遠心分離した後、得られた上清を大麦抽出液とした。1 mlの大麦抽出液と試料 (0-100  $\mu$  g) を溶解した100  $\mu$  lのメタノール溶液をマイクロチューブ内で混合し、ドライブロックバス (タイテック株式会社、越谷市) を用いて90℃で加熱した。1時間加熱後チューブを水中に移し、コロイド状の沈殿を除くため10,000rpm、4℃で10分間遠心分離し、上清の420nmでの吸光度をUV-2400PC型分光光度計 (島津製作所、京都) を用いて光路長10mmで測定した。

### 5) 吸収スペクトルの測定

試料20  $\mu$  gをメタノール100  $\mu$  lに溶解した溶液を50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 1 mlと混合し、90℃で0、10、20、30、45、60、120または180分間加熱し、氷冷した。各溶液の250-780nmまでの吸光度をUV-2400PC型分光光度計を用いて1nm間隔で光路長10mmでスキャンした。

### 6) 大麦ペーストによる褐変評価

内径16mmのガラス製シャーレに被検化合物の

メタノール溶液 (20mg/ml) 5、15または50  $\mu$ l (それぞれ0.1、0.3または1.0mg) を量り取り、窒素ガス気流下で乾燥させた。そこに、60%搗精粉400mgと50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 1.0mlを加えて静かに攪拌し、ペーストを作成した。被検化合物を含まないペーストをコントロールとし、1.0mgの (+)-カテキンを含むペーストをポジティブコントロールとして用いた。シャーレにガラス製の蓋をしてペーストをナチュラルオープン (東京理化学株式会社、東京) で90°C、2時間加熱した後、室温で放冷した。加熱前のペーストの色相はシャーレ底のガラス越しに、加熱後のペーストの表面色はシャーレから取り出した後に直接CM-3500d分光測色計 (コニカミノルタ株式会社、大阪) で測定した。試験は3反復で行った。ペーストの色相はCIELAB表色系のL\*値 (明度)、a\*値 (赤み) とb\*値 (黄色み) で表した。加熱による色相変化 ( $\Delta E$ ) は次式で算出した。

$$\Delta E = [(L^*_{\text{after}} - L^*_{\text{before}})^2 + (a^*_{\text{after}} - a^*_{\text{before}})^2 + (b^*_{\text{after}} - b^*_{\text{before}})^2]^{1/2}$$

## 7) 統計処理

各測定値の有意差は、JMPバージョン6ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて、一元配置分散分析とDunnnett検定により評価した。

## 3 結果および考察

### 1) 粗フラバノール画分の主成分の精製と同定

糖1kgを75%アセトン-水で抽出し、33.5gの粗フラバノール画分を得た。粗フラバノール画分をHPLCで分析することにより、280nm付近に吸収極大をもついくつかの化合物を検出した (図13)。化合物1-5をカラムクロマトグラフィーにより精製した。化合物2と3のESI-TOF質量分析ではそれぞれ $m/z$  617.2と601.3の強いイオンピークがみられ、これらはPDB3とPCB3のナトリウム付加イオンに相当すると考えられた。精製した化合物1-5とPDB3、PCB3と (+)-カテキンの標品のHPLCの保持時間と紫外可視スペ

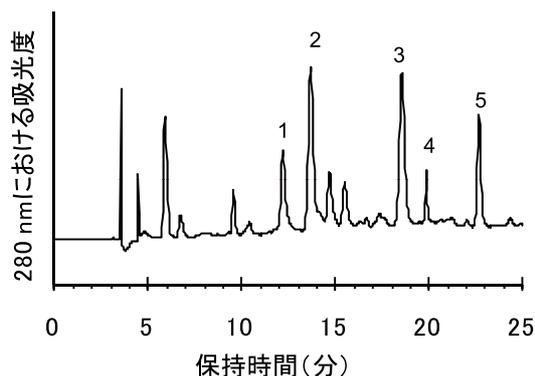


図13 粗フラバノール画分のHPLCクロマトグラム

粗フラバノール画分をTSKgel ODS-80Ts QAカラム (4.6×250mm) で溶媒A (2.5%酢酸-水) と溶媒B (2.5%酢酸-メタノール) のリニアグラディエントで分離した。数字は精製し同定した化合物に相当するピークを示す。1:プロデルフィニジンT1 (PDT1)、2:プロデルフィニジンB3 (PDB3)、3:プロシアニジンB3 (PCB3)、4:L-トリプトファン、5:(+)-カテキン

クトルを比較したところ、化合物2、3、と5はそれぞれPDB3、PCB3と (+)-カテキンと一致した。また、化合物2とPDB3、3とPCB3、5と (+)-カテキンを混合しクロマトグラフを行った結果、これらが一致することが確認できた。

化合物1のMALDI-TOFマスペクトルでは $m/z$  921.5に最も強いイオンピークが検出され、これは1個の (エピ) カテキンユニットと2個の (エピ) ガロカテキンユニットからなる三量体のナトリウム付加イオンに相当すると考えられた。ポストソース分解法で $m/z$  617.6と327.3のイオンが得られ、それぞれ $[M + Na - 304]^+$  と $[M + Na - 304 - 290]^+$  に相当すると考えられた。これらのイオンは、フラボノイド間結合のキノンメチド分解後に生じた三量体の中央-下部ユニットと上部ユニットに相当すると考えられる (Li and Deinzer 2007)。このことから、三量体の上部ユニットは (エピ) ガロカテキンであり、中央-下部ユニットは (エピ) ガロカテキン- (エピ) カテキンか、 (エピ) カテキン- (エピ) ガロカテキンであることが示唆された。さらに $m/z$  465.5 ( $[M + Na - 304 - 152]^+$ ) のフラグメントイオンが $m/z$  617.6のイオンの逆Diels-Alder反応分解産物に相当すると考えられ、下部ユニットが (エピ) カテキンであることが示唆された。従って、化合物1は大麦穀粒に主要な成分として含まれているガロカテキン-ガロカテキン-カテキンのプロアントシアニジン

三量体PDT1であると同定した。これらの化合物の構造は図14に示した。

化合物4の<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、L-トリプトファン標品のスペクトルと一致した。HPLC分析でL-トリプトファンと化合物4の保持時間

と吸収スペクトルを比較したところ両者は一致し、両者を混合して分析した場合にも同一であることが確かめられた。従って、化合物4はL-トリプトファンであると同定した。

糠より精製したPCB3、PDB3とPDT1の純度

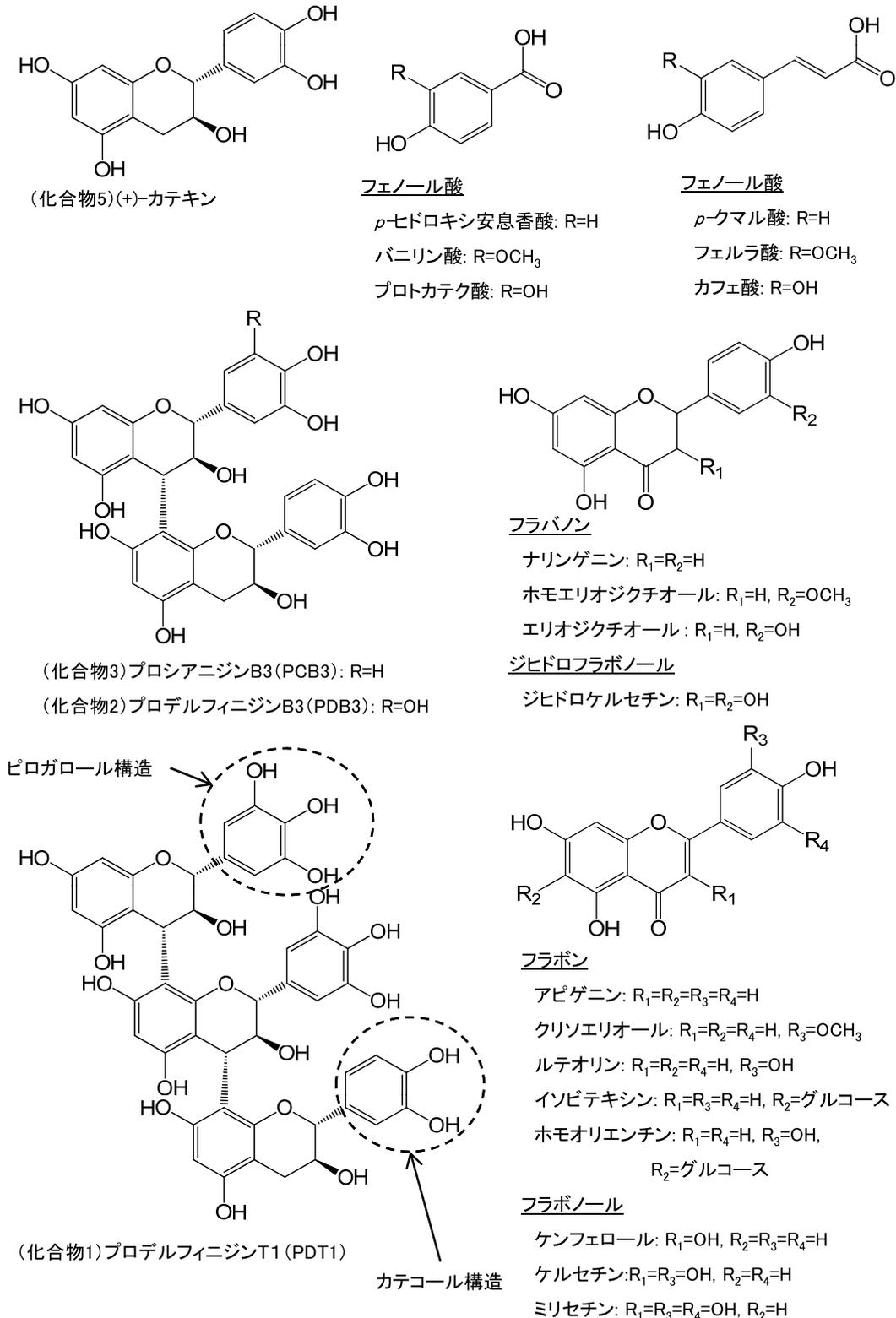


図14 被検化合物の化学構造

は280nmにおけるピーク面積比より、それぞれ97、95、93%であり、これらを以後の褐変評価に用いた。

### 2) 加熱による褐変における大麦フラバノールの影響

大麦に含まれる主要なフラバノールが褐変に及ぼす量的効果を調べるため、濃度の異なる(+)-カテキン、PCB3、PDB3、PDT1とL-トリプトファンを大麦抽出液と混合し、加熱した。大麦抽出液の調製に40%搗精粉を用いたのは、内在性のポリフェノール成分の混入を最小限にするためである。図15にこれら5つの化合物の大麦抽出液の褐変に対する量的効果を示した。添加した(+)-カテキン、PCB3、PDB3とPDT1の濃度が高くなるにつれて、大麦抽出液の420nmにおける吸光度はほぼ直線的に高まった。90℃で1時間加熱後の溶液では、(+)-カテキンによる褐変はPCB3、PDB3とPDT1による褐変よりも著しかった。一方、L-トリプトファンは添加した濃度に関わらず、大麦抽出液の420nmの吸光度には変化をもたらさなかった。これら5つの化合物をリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解したところ、加熱前はいずれの溶液も無色であったが、(+)-カテキンと3つのプロアントシアニジンを含む溶液は90℃で1時間加熱後にはピンク色からオレンジ色に着色し、L-トリプトワンの溶液は加熱後も無色であった。これらの結果から、(+)-カテキンおよびプロアントシアニジンは他の大麦由来の成分が共存する、しないに関わらず、溶液中で加熱すると容易に褐変することが示唆された。

(+)-カテキンとプロアントシアニジン溶液の加熱後の色調が化合物により異なっていたため、(+)-カテキン、PCB3またはPDB3を20 μg 含む溶液の加熱時間による経時的な吸収スペクトルの変化を測定した。(+)-カテキン溶液は加熱10分後に330nmと400nmに吸収極大をもち、加熱120分後には吸収極大が消失した (図16A)。PCB3溶液は加熱10分後に350nmと500nmに吸収極大を示し、加熱120分後には吸収極大が消失した (図16B)。また、PDB3溶液は加熱10分

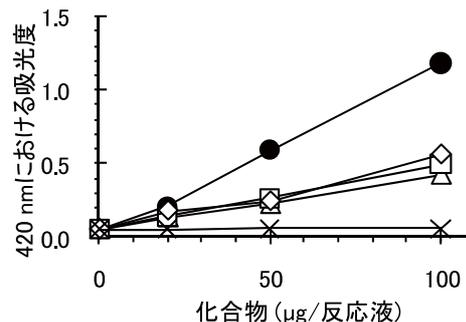


図15 大麦抽出液の加熱後の褐変に対する化合物の量的効果

大麦抽出液に(+)-カテキン(●)、プロシアニジンB3 (PCB3) (◇)、プロデルフィニジンB3 (PDB3) (□)、プロデルフィニジンT1 (PDT1) (△) またはL-トリプトファン(×)を加え、90℃で1時間加熱した。

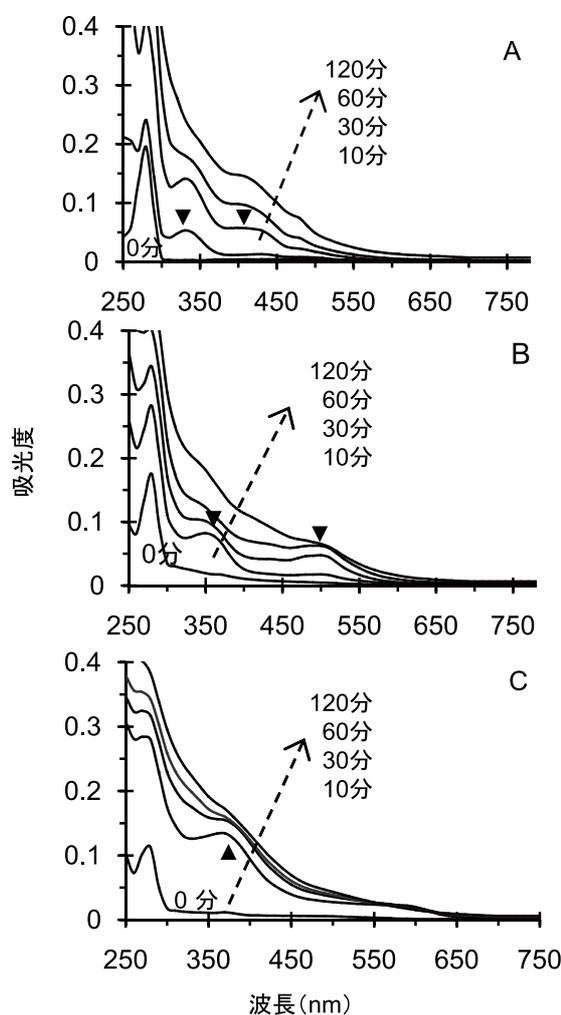


図16 化合物のリン酸緩衝液溶液の加熱による紫外可視吸収スペクトルの経時的変化

(+)-カテキン (A)、プロシアニジンB3 (PCB3) (B)、プロデルフィニジンB3 (PDB3) (C) 各20 μg/反応液を90℃で10、30、60または120分間加熱した。▼と▲は吸収極大を示す。矢印は加熱時間によるスペクトル変化を示す。

後に362nmの吸収極大を示したが、加熱60分後には吸収極大が消失した (図16C)。褐変の評価に420nmの吸光度を用いたのは、これがフェ

ノール性化合物のポリフェノールオキシダーゼによる酵素的褐変の測定でよく用いられている (Fujita *et al.* 1991, Siddiq *et al.* 1994, Das *et al.* 1997, Arslan *et al.* 1997, Ding *et al.* 1998) ためであるが、上記の結果から、(+)-カテキンを加熱した溶液の吸収極大付近で評価したことにより、図15の試験では(+)-カテキンの褐変をプロアントシアニジンに比べて過大に評価している可能性がある。3つの化合物の加熱時間による経時的な褐変を420nmの吸光度の変化で表す(図17)と、PDB3が最初に褐変し、45分ではほぼ頭打ちになった。420nmの吸光度の増加初速度を算出すると、PDB3、PCB3、(+)-カテキンはそれぞれ5.62、1.20、0.85mAU/minであった。従って、PDB3はPCB3や(+)-カテキンに比べて加熱により褐変しやすいことが分かった。

さらに、(+)-カテキンとプロアントシアニジンを添加した大麦ペーストの加熱後の褐変を評価した。表7は加熱前後の大麦ペーストの色相と加熱による色相変化(ΔE)を示した。3つのプロアントシアニジン(PDT1、PDB3、PCB3)と(+)-カテキンを添加したペーストは、加熱前は対照のペーストと比較しL\*、a\*、b\*値の

いずれにも影響を及ぼさなかったが、加熱後は対照と比較し明確に変化した。これらの化合物は添加した量が増加するに従い、ペーストのa\*値とb\*値が増加し、L\*値が減少した。添加量に依存して加熱による色相変化が顕著になったため、褐変を促進することが分かった。この褐変を促進する傾向は、PCB3と(+)-カテキンに比べPDT1とPDB3で顕著であった。

Quinde-Axtell and Baik (2006) は、大麦粉のドゥシートにプロアントシアニジンを添加して20℃で24時間保存するとL\*値が低下するが、この変色は添加するプロアントシアニジンの量

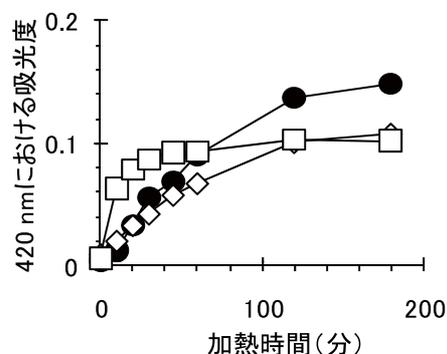


図17 化合物のリン酸緩衝液溶液の加熱による経時的な褐変 (+)-カテキン(●)、プロシアニジンB3(PCB3)(◇)、プロデルフィニジンB3(PDB3)(□) 各20 μg/反応液を90℃で0~180分間加熱した。

表7 大麦ペーストの色相に対するフラバノール添加の影響

化合物	添加量 (mg)	加熱前			加熱後			ΔE
		L*	a*	b*	L*	a*	b*	
対照	0.0	72.92	0.45	7.68	49.91	2.07	7.40	23.07
PDT1	0.1	73.09	0.48	7.48	47.45	3.40**	9.43	25.88
	0.3	73.48	0.59	7.53	44.75**	4.98**	12.10**	29.42**
	1.0	72.74	0.80	7.38	38.83**	9.28**	16.66**	36.17**
PDB3	0.1	73.05	0.54	7.34	46.45	3.79**	10.12**	26.94
	0.3	73.01	0.57	7.33	44.51**	5.22**	12.38**	29.32**
	1.0	72.34	0.57	7.48	38.40**	10.59**	16.21**	36.45**
PCB3	0.1	72.51	0.58	7.54	48.57	3.50**	7.89	24.13
	0.3	72.55	0.63	7.54	48.03	4.82**	8.84	24.91
	1.0	73.13	0.62	7.51	47.57	7.29**	9.45	26.48*
(+)-カテキン	0.1	73.02	0.46	7.40	49.61	2.62	7.88	23.52
	0.3	73.22	0.54	7.77	48.96	3.85**	9.44*	24.54
	1.0	72.36	0.69	7.53	48.08	5.30**	12.11**	25.14*

搗精粉400mgに各化合物と50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 1.0mlを添加してペーストを作成し、90℃で2時間加熱した。L\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値とΔE (加熱による色相変化) は3反復の試験の平均値で表した。プロデルフィニジンT1 (PDT1)、プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジンB3 (PCB3) は大麦から単離精製した。\*と\*\*はそれぞれp<0.05、0.01でDunnnett検定により対照(無添加)と有意差があることを示す。

には依存しなかったと報告している。また、この変色が内在性ポリフェノールオキシダーゼを失活させることで抑制されること、カテキンを添加したときの変色がプロアントシアニジンを添加したときの変色より大きいのはカテキンがポリフェノールオキシダーゼの基質としてプロアントシアニジンよりも優れるためかもしれないと報告している。本研究では、(+)-カテキンと3つのプロアントシアニジンは添加した濃度に依存して大麦抽出液や大麦ペーストの褐変を促進した。このため、加熱した大麦製品の褐変程度は(+)-カテキンやプロアントシアニジンの量に依存していると考えられる。また、本研究では大麦抽出液や大麦ペーストを90℃で加熱しているため、内在性のポリフェノールオキシダーゼは加熱中に失活していると思われる。さらに、彼らの報告とは異なり、PDB3とPDT1は大麦ペーストの褐変において(+)-カテキンよりも効果が高かった。従って、加熱による大麦製品の褐変は内在性のポリフェノールオキシダーゼではなく、フェノール性化合物の自動酸化によって起こると考えられる。

### 3) 加熱による褐変におけるプロアントシアニジン前駆物質および関連化合物の影響

プロアントシアニジン前駆物質や関連化合物を大麦抽出液と混合して90℃で1時間加熱し、これらの化合物が加熱による褐変に及ぼす影響を420nmの吸光度で評価した。また、化合物を添加した大麦ペーストを90℃で2時間加熱し、加熱による色相の変化から化合物の褐変に対する影響を評価した。いずれの測定でも(+)-カテキンをポジティブコントロールに用いた。

#### (1) フェノール酸

フェノール酸を含む大麦抽出液は、加熱前には無色で420nmの吸光度は0.1未満と低かった。加熱後にはカフェ酸の濃度が高いほど420nmの吸光度が高くなったが、高濃度では頭打ちになった(図18)。プロトカテキ酸もカフェ酸と同様の傾向がみられたが、その影響はカフェ酸よりも小さかった。一方、*p*-クマル酸とフェルラ酸は加熱後の褐変には殆ど影響せず(図18)、デー

タを示していないが

-ヒドロキシ安息香酸とバニリン酸も褐変には影響しなかった。

表8は、フェノール酸を添加した大麦ペーストの加熱前後の色相と加熱による色相変化を示した。フェノール酸は加熱前的大麦ペーストの色相には影響を及ぼさなかったが、加熱後は、カフェ酸の濃度が高くなるに従い、ペーストのL\*値を低下しb\*値とΔE値が増加し、1.0mgでは対照と比べ有意差がみられた。データを示していないが、プロトカテキ酸もカフェ酸と同様の傾向が認められたが、対照と比べ有意差は無かった。一方、フェルラ酸は加熱後のペーストのa\*値とb\*値を有意に低下させL\*値を増加させたが、濃度との関係は明確ではなかった。*p*-クマル酸は有意ではないがフェルラ酸と同様の傾向がみられた。以上のことから、カフェ酸は大麦抽出液と大麦ペーストの両方で濃度依存的に褐変を促進し、一方フェルラ酸は大麦ペーストの褐変を抑制した。フェルラ酸と*p*-クマル酸は異なる大麦品種の穀粒に1番目と2番目に多く含まれるフェノール酸である(Holtekjølen *et al.* 2006)ことを考慮すると、内在性のフェノール酸が大麦の褐変に及ぼす影響は(+)-カテキンやプロアントシアニジンに比べて小さいと考えられる。

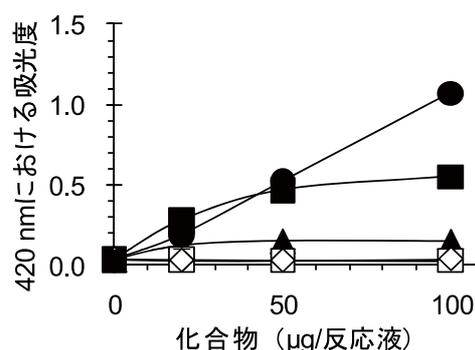


図18 大麦抽出液の加熱後の褐変におけるフェノール酸添加の影響

●: (+)-カテキン (対照)、▲: プロトカテキ酸、□: *p*-クマル酸、◇: フェルラ酸、■: カフェ酸

表 8 大麦ペーストの色相に対するフェノール酸添加の影響

化合物	添加量 (mg)	加熱前			加熱後			ΔE
		L*	a*	b*	L*	a*	b*	
対照		72.82	0.40	7.43	46.62	2.59	8.84	26.33
(+)-カテキン	1.0	72.60	0.62	7.56	45.94	4.74**	12.47**	27.43
<b>フェノール酸</b>								
p-クマル酸	0.1	72.52	0.44	7.35	47.03	2.00	8.03	25.54
	0.3	73.15	0.50	7.46	47.10	2.21	8.42	26.12
	1.0	73.14	0.52	7.31	47.50	2.05	8.09	25.70
フェルラ酸	0.1	73.14	0.42	7.43	47.86	1.74**	7.89	25.31
	0.3	73.05	0.41	7.39	48.54**	1.44**	7.56*	24.54*
	1.0	73.22	0.41	7.38	47.72	1.72**	8.85	25.58
カフェ酸	0.1	72.79	0.50	7.47	46.52	2.18	9.06	26.37
	0.3	72.64	0.45	7.37	45.30	2.38	9.59	27.51
	1.0	72.37	0.50	7.44	43.81**	2.73	11.29**	28.90**

搗精粉400mgに各化合物と50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 1.0mlを添加してペーストを作成し、90℃で2時間加熱した。L\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値とΔE (加熱による色相変化) は3反復の試験の平均値で表した。\*と\*\*はそれぞれp<0.05、0.01でDunnnett検定により対照 (無添加) と有意差があることを示す。

(2) フラバノンとジヒドロフラボノール

このグループの中では、エリオジクチオールと (+)-ジヒドロケルセチンの濃度が高いほど加熱後の大麦抽出液の420nmの吸光度は高くなった (図19)。一方、ホモエリオジクチオールとナリンゲニンは加熱後の大麦抽出液の吸光度には殆ど影響しなかった。

表9は、フラバノンとジヒドロフラボノールが加熱前後の大麦ペーストの色相に及ぼす影響を示している。ここで評価したフラバノンとジヒドロフラボノールは加熱前後とも大麦ペーストのL\*値とa\*値には影響しなかった。添加したエリオジクチオールと (+)-ジヒドロケルセチンの濃度が高くなる程、加熱後の大麦ペーストのb\*値が顕著に増加した。ナリンゲニンとホモエリオジクチオールも同様の傾向はみられたが、対照と比べて有意差は無かった。以上のことから、エリオジクチオールと (+)-ジヒドロケルセチンは、濃度依存的に大麦抽出液の加熱による褐変を促進したが、大麦ペーストの加熱後の褐変に対してはΔE値でみる限り明確ではなかった。

(3) フラボンとフラボノール

フラボンのアグリコン (アピゲニン、クリソエリオール、ルテオリン) のメタノール溶液を

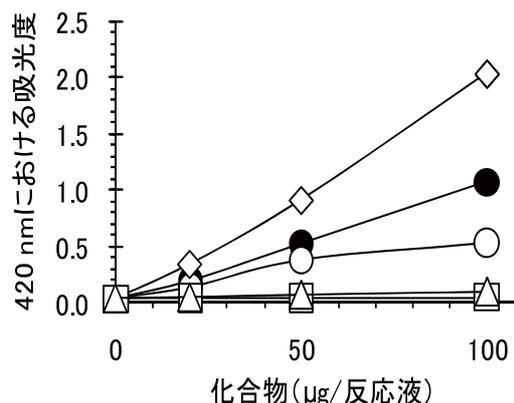


図19 大麦抽出液の加熱後の褐変に対するフラバノンとジヒドロフラボノール添加の影響

●: (+)-カテキン (対照)、◇: エリオジクチオール、△: ホモエリオジクチオール、□: ナリンゲニン (以上3点はフラバノン)、○: (+)-ジヒドロケルセチン (ジヒドロフラボノール)

リン酸緩衝液と混合すると黄色の沈殿を生じた。そこで、アグリコンに代わりグルコシル化した化合物 (イソビテキシン、ホモオリエンチン) を評価に用いた。その結果、ホモオリエンチン、イソビテキシン、ミリセチン、ケルセチンとケンフェロールは濃度依存的に加熱後の大麦抽出液の420nmにおける吸光度を上昇させた (図20)。しかし、これらの化合物を含む大麦抽出液は加熱前にも淡黄色であり、加熱後には濃黄色の沈殿を生じたため、上清の420nmにおける吸光度は加熱前よりも低下した。このため、大麦抽出

表9 大麦ペーストの色相に対するフラバノンとジヒドロフラボノール添加の影響

化合物	添加量 (mg)	加熱前			加熱後			ΔE
		L*	a*	b*	L*	a*	b*	
対照		73.03	0.58	7.60	46.87	2.59	8.90	26.36
(+)-カテキン	1.0	73.03	0.58	7.59	45.80	5.08**	11.37**	27.87
<b>フラバノン</b>								
ナリンゲニン	0.1	72.58	0.46	7.51	46.23	2.58	9.00	26.48
	0.3	73.09	0.44	7.69	46.97	2.53	9.37	26.27
	1.0	72.70	0.34	8.04	46.64	2.55	9.84	26.22
ホモエリオジクチオール	0.1	72.76	0.49	7.71	46.81	2.39	8.89	26.05
	0.3	72.97	0.46	7.63	46.74	2.46	9.38	26.38
	1.0	73.33	0.47	7.69	47.06	2.46	9.74	26.42
エリオジクチオール	0.1	73.27	0.42	7.70	47.29	2.38	8.96	26.08
	0.3	73.00	0.37	8.03	46.82	2.68	10.15*	26.37
	1.0	73.16	0.30	9.30**	47.85	2.13	12.54**	25.59
<b>ジヒドロフラボノール</b>								
(+) -ジヒドロケルセチン	0.1	73.55	0.35	7.64	46.26	2.71	9.85	27.48
	0.3	73.24	0.47	8.15*	46.97	2.56	10.51**	26.46
	1.0	72.84	0.36	8.84*	46.30	2.95	14.26**	27.22

搗精粉400mgに各化合物と50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 1.0mlを添加してペーストを作成し、90℃で2時間加熱した。L\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値とΔE (加熱による色相変化) は3反復の試験の平均値で表した。\*と\*\*はそれぞれ $p < 0.05$ 、 $0.01$ でDunnnett検定により対照 (無添加) と有意差があることを示す。

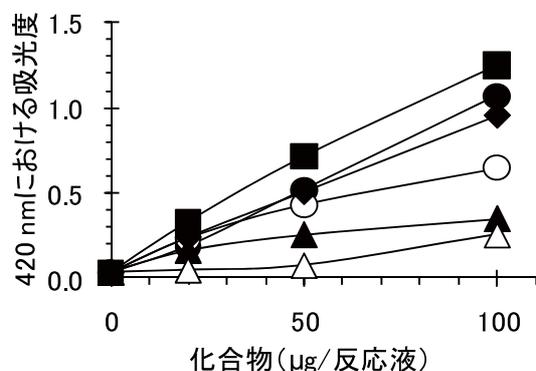


図20 大麦抽出液の加熱後の褐変に対するフラボンとフラボノール添加の影響

●: (+)-カテキン (対照)、■: ホモオリエンチン、◆: イソピテキシン (以上2点はフラボン)、○: ミリセチン、▲: ケルセチン、△: ケンフェロール (以上3点はフラボノール)

液を用いた褐変評価系ではフラボンとフラボノールの影響ははっきりしなかった。表10に、フラボンとフラボノールが大麦ペーストの加熱前後の色相に及ぼす影響を示した。これらの化合物は黄色であるため、フラボンとケルセチンは、大麦ペーストの加熱前のa\*値を濃度依存的に顕著に低下させ、b\*値を上昇させた。アピゲニンと

クリソエリオールは濃度が高い程加熱後のL\*値を顕著に増加させ、ΔE値を減少させたため、大麦ペーストの加熱による褐変を抑制することが分かった。ルテオリンは加熱後のペーストのb\*値を顕著に増加させたが、ΔE値からみた褐変に対する影響ははっきりしなかった。一方、ケルセチンとミリセチンは、濃度が高くなる程加熱後のペーストのL\*値が著しく低下し、a\*値が増加した。従って、この2つの化合物は、(+)-カテキンと比較して顕著に大麦ペーストの褐変を促進した。ΔE値でみるとミリセチンの褐変促進はケルセチンよりも著しかった。

IIで示した通り、プロアントシアニジン欠失系統の大麦ペーストの褐変は、野生型品種のペーストの褐変よりも小さかった。また、プロアントシアニジン欠失系統の中には、穀粒にプロアントシアニジンの前駆物質であるホモエリオジクチオールやクリソエリオールを蓄積するものがあることも報告されている (Jende-Strid 1991, Jende-Strid 1993)。本研究では、ホモエリオジ

表10 大麦ペーストの色相に対するフラボンとフラボノール添加の影響

化合物	添加量 (mg)	加熱前			加熱後			ΔE
		L*	a*	b*	L*	a*	b*	
対照		73.02	0.51	7.57	47.27	2.19	8.28	25.82
(+)-カテキン	1.0	73.04	0.67	7.43	46.19	4.38**	11.44**	27.41
<b>フラボン</b>								
アピゲニン	0.1	73.07	0.28	7.75	47.90	1.90	9.01	25.25
	0.3	73.53	-0.23	8.88	48.25	1.68	10.00**	25.38
	1.0	73.56	-0.84**	10.75**	50.46**	1.19*	10.51**	23.20**
クリソエリオール	0.1	72.77	-0.35**	8.98	46.96	1.72	10.11**	25.92
	0.3	73.41	-1.20**	11.16**	48.22	0.92**	10.95**	25.28
	1.0	73.62	-3.73**	17.00**	51.25**	-0.48**	14.68**	22.73**
ルテオリン	0.1	73.24	-0.08	8.79	46.88	1.65	11.36**	26.55
	0.3	72.90	-0.52**	10.70**	45.45*	1.99	14.39**	27.85*
	1.0	71.89**	-0.93**	13.79**	46.20	1.32	18.80**	26.28
<b>フラボノール</b>								
ケルセチン	0.1	73.10	-0.81**	10.49**	45.90	2.76	11.70**	27.46
	0.3	73.09	-2.61**	15.64**	44.68**	3.65**	15.97**	29.11**
	1.0	72.67	-4.53**	22.01**	42.77**	6.15**	23.01**	31.76**
ミリセチン	0.1	72.54	-2.36**	15.84**	45.30*	2.83	11.10**	28.14**
	0.3	72.29	-2.88**	18.28**	39.84**	6.67**	15.91**	34.06**
	1.0	72.28	-2.74**	17.80**	33.42**	13.51**	23.04**	42.45**

搗精粉400mgに各化合物と50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 1.0mlを添加してペーストを作成し、90℃で2時間加熱した。L\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値とΔE (加熱による色相変化) は3反復の試験の平均値で表した。\*と\*\*はそれぞれ p<0.05、0.01でDunnett検定により対照 (無添加) と有意差があることを示す。

クチオールやクリソエリオールは大麦ペーストの褐変を促進せず、一方プロアントシアニジンは顕著に褐変を促進したため、上述の観察と一致する。大麦穀粒には、多くのグリコシル化されたアピゲニンやルテオリンの類縁体が含まれていることが報告されている (Ferrerres *et al.* 2009) が、本研究ではアピゲニンとルテオリンは大麦ペーストの褐変を促進する効果は観察されなかったことから、内在性のフラボンは大麦製品の加熱による褐変にほとんど影響していないと考えられる。

#### 4) フェノール性化合物の構造と加熱による褐変効果との関係

プロアントシアニジンと (+)-カテキンは、大麦抽出液と大麦ペーストのいずれの系でも加熱による褐変を顕著に促進した。カフェ酸も両方の系で褐変を促進した。プロトカテキ酸、エリオジクチオールと (+)-ジヒドロケルセチンは

大麦抽出液の褐変を顕著に促進したが、大麦ペーストの褐変に対しては明確ではなかった。ケルセチンとミリセチンは、大麦ペーストの褐変を顕著に促進したが、大麦抽出液では評価できなかった。以上の結果は、ルテオリンを例外として、分子内にカテコール構造かピロガロール構造をもつ化合物 (図14) は、他の大麦成分の共存下において加熱による褐変を引き起こすことを示唆している。さらに、フラボノイドのB環にピロガロール構造をもつ化合物 (PDB3とミリセチン) は、B環がカテコール構造に置換された化合物 (PCB3とケルセチン) に比べ、大麦ペーストの褐変をより顕著に促進した (表7、8)。一方、*p*-ヒドロキシ構造や*m*-メトキシ-*p*-ヒドロキシ構造をもつ化合物 (*p*-クマル酸、フェルラ酸、ナリングニン、ホモエリオジクチオール、アピゲニン、クリソエリオール) は、加熱による褐変に効果がないか、阻害的な効果を示した。このような構造と活性の相関は、フラボ

ノイドやフェノール酸について報告されている構造と抗酸化活性との相関 (Rice-Evans *et al.* 1996、van Acker *et al.* 1996、Cao *et al.* 1997、Croft 1998、Fukumoto and Mazza 2000、Silva *et al.* 2002) に似ている。

本研究により、大麦抽出液や大麦ペースト中で (+)-カテキンやプロアントシアニジンは加

熱により褐変しやすいこと、濃度依存的に大麦の褐変を促進することが分かった。これらの化合物が内在性の遷移金属の共存下で自動酸化し、酸化促進的に作用することにより、加熱による大麦製品の褐変を促進しているのではないかと考えられる。

## V 炊飯麦の保温による褐変とフラバノール成分の関係

### 1 緒言

I で述べたように、主食用大麦では炊飯等の加熱後に褐変しやすいことが消費拡大における問題点の一つとされ、褐変の低減が求められている。これまでに、大麦製品の褐変を評価するために、搗精粉に水や緩衝液を加えてペースト (神山・藤田 2000、Kohyama *et al.* 2001、神山・松中 2003、Kohyama *et al.* 2009)、ゲル (Yeung and Vasanthan 2001、Quinde *et al.* 2004、Quinde-Axtell *et al.* 2005、Quinde-Axtell *et al.* 2006、Quinde-Axtell and Baik 2006) あるいは懸濁液 (佐藤 1995、Theuer 2002) を調製し加熱後の色相を測定する方法が多く用いられてきている。搗精粉に含まれるポリフェノール含量と加熱後のペーストの白度 (Kohyama *et al.* 2001) やゲルの明度 (Quinde *et al.* 2004、Quinde-Axtell and Baik 2006) に負の相関があること、プロアントシアニジン欠失遺伝子をもつ品種・系統のペースト (Kohyama *et al.* 2001) やゲル (Quinde *et al.* 2004、Quinde-Axtell *et al.* 2005、Quinde-Axtell *et al.* 2006) の加熱後の白度や明度が高いことが報告されている。

一方、主食用大麦の主な用途は米と一緒に炊飯する麦ご飯であり、炊飯時の褐変を評価する目的からすると搗精粉を用いた評価系よりも穀粒中の原因成分の局在性や炊飯時の吸水に伴う水溶性成分の溶出や拡散等の挙動を反映する搗

精麦を用いた評価系が望ましいと考えられるが、炊飯粒 (佐藤 1995、藤田ら 2000) や茹でた粒 (Quinde *et al.* 2004) の色相を測定した例は少ない。これは炊飯粒が固まりやすく作業性が劣ること、搗精粉を用いた系に比べて不均一でバラツキ易く、そのため少量での評価に不向きなこと等が原因であると考えられる。品種選抜の評価法としては、少量で多数の試料を扱う必要があるため、簡便で作業性が良いことが求められる。そこで、少量の炊飯麦を用いた加熱後の褐変を評価するとともに、炊飯・保温によるフラバノール成分の変化を明らかにし、品種間で炊飯麦の褐変とフラバノール成分の関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 2 材料および方法

#### 1) 搗精麦の調製

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の圃場 (つくば市) で栽培した2005年産の大麦10品種 (ほうしゅん、あまぎ二条、ファイバースノウ、ミノリムギ、はがねむぎ、会津4号、カシマムギ、トヨノカゼ、マンネンボシ、ナンプウハダカ) と2009年産のファイバースノウ、栃木県農業試験場栃木分場の圃場 (栃木市) で栽培した2005年産のプロアントシアニジン欠失遺伝子をもつ大麦6系統 (大系HO4と大系HL99は*ant 13*、大系HL106、大系HL107、大系HL109と大系HL112は*ant 28*をもつ) (長嶺ら 2006) の玄麦を用いた。玄麦は予め2.4

mm及び2.8mmの縦目篩で篩い、粒厚2.4-2.8mmのものを選別した後、試験用搗精機（TM-05、サタケ株式会社、東広島市）に180gを投入し、皮麦は55%、裸麦は60%の歩留まりになるように搗精した。2009年産のファイバースノウは85、70、55、40%の4段階に搗精した。玄麦と搗精麦は10℃で保存し、一部を1mmのスクリーンを装着したサイクロンサンプルミル（静岡製機株式会社、袋井市）で粉碎し、玄麦粉と搗精粉を得た。

## 2) 炊飯粒の色相測定と水分測定

マンネンボシの60%搗精麦120gに氷冷した蒸留水264mlを加え4℃で3時間浸漬した後、3合炊きの電気炊飯器（RCK-B5M、株式会社東芝、東京）で炊飯し、保温した。炊飯直後、及び保温4、18、24時間後に、内径18mmのガラスシャーレ10個に3.3gずつの炊飯麦を詰め、2次元測色システム（CI-1040i、コニカミノルタ株式会社、東京）により、D65光源で底面色をシャーレ越しに測定した。この装置は40mm×40mmの測色試料面の画像を448×384画素の解像度で取り込み、付属のカラー解析ソフトウェアCI-S2w（コニカミノルタ株式会社、東京）で各画素のL\*（明度）、a\*（赤み）、b\*（黄色み）値を測定することができる。L\*の閾値を設定してバックグラウンドを消去し、炊飯麦に相当する有効画素を抽出し、画像ごとにL\*、a\*、b\*値の平均値を求めた。炊飯直後、保温4、18、24時間後の順に閾値70-80、65-80、58-80、54-80を用いた。

水分と炊飯粒の色相との相関を調べる際には、炊飯粒20粒の背面を下にして2次元測色システムの測色試料面に置き、L\*値の閾値を55-75に設定して画像を抽出し、1粒ごとにL\*、a\*、b\*値の平均値を求めた。この20粒について1粒ずつ重量を秤量し、アルミ箔に包んで135℃で1時間加熱した後再度秤量し、加熱前後の重量差を水分量とした。

## 3) 少量炊飯と色相の測定

50mlのねじ付ガラス試験管に搗精麦5.0gとミネラルウォーター（サントリー株式会社、大阪

市）11.0mlを加え、105℃のアルミブロックヒーター（サイニクス株式会社、東京）で1時間加熱炊飯し、氷冷した。一部はさらに70℃のコンベンショナルオープン（東京理化株式会社、東京）で4、12、または24時間加熱保温した後、氷冷した。炊飯および保温試験は2反復で行った。炊飯粒及び保温粒を凍結乾燥した後、TI-100型高速振動試料粉碎機（株式会社CMT科学、いわき市）の標準ロッドで30秒間粉碎した。

炊飯粒及び保温粒の凍結乾燥粉を内径41mmの測色用ガラスセルに入れ、分光測色計（CM-3500d、コニカミノルタ株式会社、東京）のD65光源、10°視野でL\*、a\*、b\*値を測定した。保温後の凍結乾燥粉と炊飯直後の凍結乾燥粉のa\*値の差（ $\Delta a^*$ ）を保温による褐変の指標とした。

## 4) ポリフェノール含量の測定

搗精粉及び炊飯後の凍結乾燥粉100mgにメタノール1.0mlを加えて室温で1時間振とう抽出し、12,500rpmで10分間遠心分離した上清を粗ポリフェノール画分とした。総ポリフェノール量をフォリン-チオカルト法（Singleton *et al.* 1999）で測定し、(+)-カテキン当量で表した。また、ジメチルアミノ桂皮アルデヒド（DMACA）を用い既報（Nagel and Glories 1991）に従いフラバノール含量を測定し、(+)-カテキン当量で表した。測定は4反復で行った。

玄麦粉、搗精粉および炊飯後の凍結乾燥粉に含まれるPDB3、PCB3と(+)-カテキンはHPLC分析により定量した。粉100mgに対し1.0mlの75%アセトンを加えて1時間振とう抽出し、12,500rpmで10分間遠心分離した。沈殿は75%アセトンでさらに2回抽出した。まとめた上清を減圧下で濃縮乾固し、2.5%酢酸に溶解し、固相抽出カートリッジAutoprep EDS-1 50mg（昭和電工株式会社、東京）に吸着させた。メタノール溶出液を減圧下で濃縮乾固し、100 $\mu$ lの20%アセトニトリル-20mMリン酸アンモニウム緩衝液（pH 3.0）に再溶解し、12,500rpmで10分間遠心分離し、上清を析試料とした。TSKgel ODS-100Vカラム（内径4.6mm×長さ150mm、東ソー株式会社、東京）に20mMリン酸ア

ンモニウム緩衝液 (pH 3.0、移動相A) とアセトニトリル (移動相B) の混合溶媒を流速1.0ml/minで送液した。混合溶媒の勾配は以下の通りである。0-5分 : 5% B、5-35分 : 5-35% B、35-40分 : 35-50% B、40-45分 : 50% B。PDB3、PCB3と (+)-カテキンの濃度は、280nmの吸光度によるクロマトグラムピーク面積を各標品の検量線により定量し、4反復の平均値で表した。

### 3 結果および考察

#### 1) 炊飯粒の保温後の色相変化とバラツキの要因

炊飯器で炊飯、保温した大麦の画像を二次元測色システムで測色し、L\*、a\*、b\*値の分布を解析した例を図21に示した。保温時間が長くなるにつれて、全体的に粒が褐色になるが、周辺部が半透明になる傾向がみられた。シャーレの画像とL\*、a\*、b\*値の分布を比較すると、黒条線や粒間の隙間部分でL\*値が低く、a\*、b\*値が高くなっており、シャーレに詰める際の粒の向きや隙間の生じ方が測色値に影響することが確認できた。有効画素の平均値から求めたL\*値は保温時間が長くなるにつれて低下し、a\*値とb\*値は増加した (図22)。また、保温24時間後では特にa\*値のバラツキが大きくなった。炊飯麦は保温時間が経過するに従って釜の周辺部や上部から粒が硬く小さくなる傾向がみられた

が、粒の乾燥状態の不均一性がバラツキに影響している可能性が考えられた。

そこで、炊飯した粒の中から色相が異なる20粒を選び、1粒ずつ背面色を測定し水分との関係を調べた。その結果、炊飯粒のL\*、a\*、b\*値と水分との間には、それぞれ正、負、負の有意な相関 (p<0.001) がみられた (図23)。この

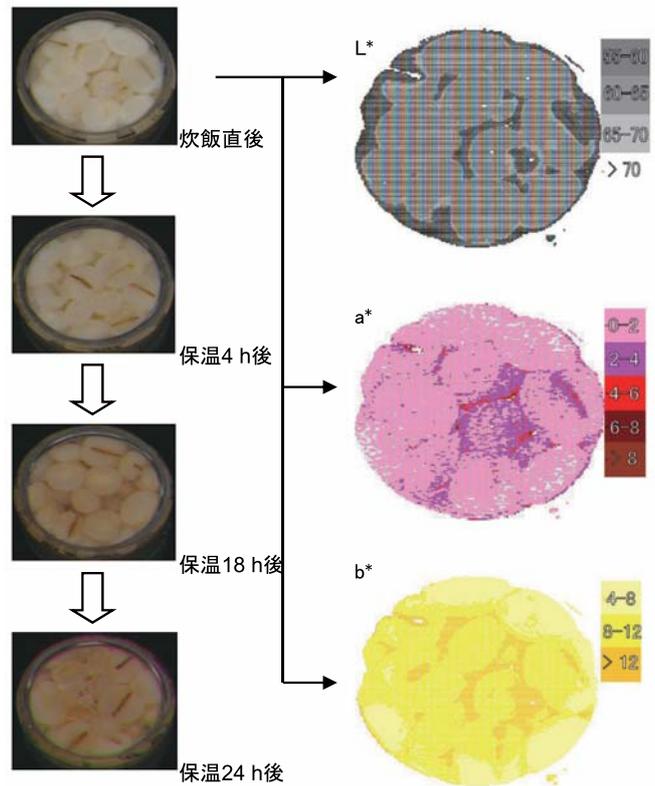


図21 二次元測色システムによる炊飯麦の色相分布

炊飯器で炊飯および4、18または24時間保温した炊飯粒をシャーレにつめて測定した画像 (左) と有効画素のL\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値の分布 (右) を示した。

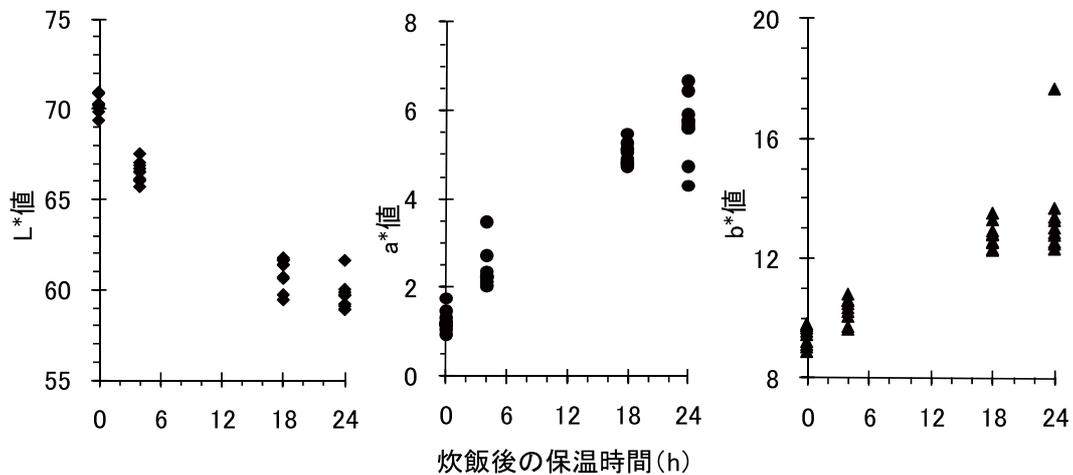


図22 炊飯麦の保温による色相変化

炊飯器で炊飯および4、18または24時間保温した炊飯麦をシャーレにつめて二次元測色システム測定した各画像の有効画素のL\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値の平均値を示した (n=10)。

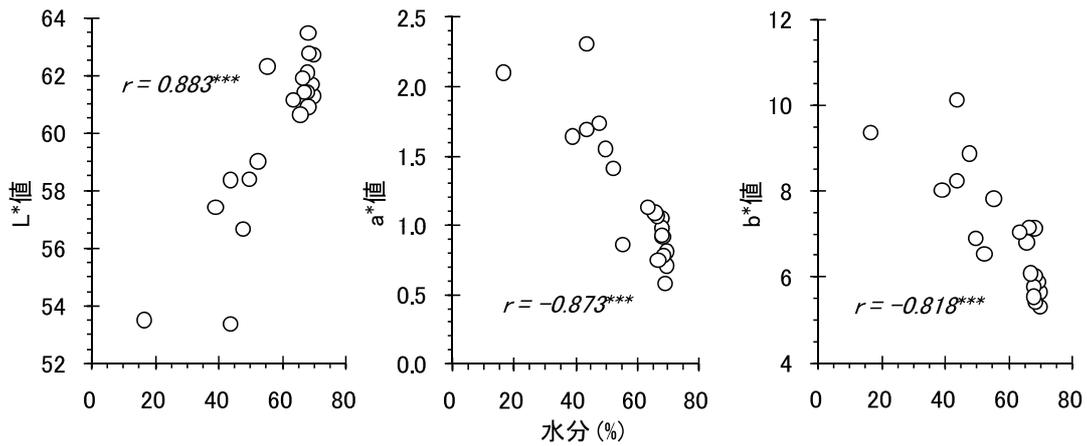


図23 炊飯麦 1 粒ごとの水分と色相

マンネンボシの炊飯麦20粒の水分と色相を測定し、1粒ごとのL\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値の平均値で表した。\*\*\*はp<0.001で有意であることを示す。

のため、保温中に起こる炊飯粒の乾燥が褐変に影響すると考えられ、乾燥状態の不均一性が色相のバラツキをもたらすことが示唆された。

## 2) 少量炊飯による経時的な褐変とフラバノール成分の変化

少量炊飯では、ガラス試験管内で搗精麦にミネラルウォーターを加えて加熱し、さらに一部を保温した後、全量を凍結乾燥後粉砕することにより試料の不均一性を解消した。また、保温前後の粉の色相を測定することにより変化量を求めた。ミネラルウォーターを使用したのは、ガラス試験管内では電気炊飯器に比べて褐変が起こりにくいので、遷移金属を補うためである。会津4号、あまぎ二条、トヨノカゼとファイ

バースノウの4品種を用いて炊飯直後および70℃で保温4、12、24時間後の凍結乾燥粉の色相を測定した(図24)。いずれの品種も保温時間が長くなるにつれてa\*値は増加したが、保温時間に対し直線的な増加ではなかった。L\*値は3品種で保温4時間後にいったん増加した後に低下し、b\*値の変化は品種により一様では無かった。また、炊飯直後のa\*値が高い会津4号とあまぎ二条は、トヨノカゼやファイバースノウに比べ、保温中のa\*値の増加も大きく、観察による褐変程度と一致していた。このため、保温によるa\*値の増加(Δa\*)を褐変の指標として用いた。

次に、この4品種について炊飯および保温後のフラバノール成分の変化を調べたところ、保

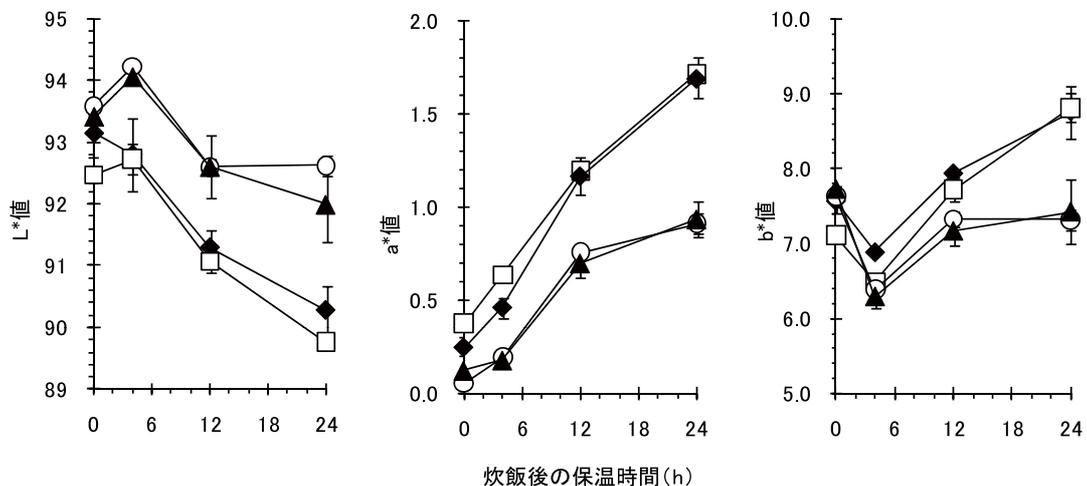


図24 少量炊飯麦の保温による凍結乾燥粉の色相変化

会津4号(□)、あまぎ二条(◆)、トヨノカゼ(▲)およびファイバースノウ(○)の搗精麦を試験管内で炊飯および70℃で保温した炊飯試験を2反復で行い、凍結乾燥粉の色相を測定し、L\* (明度)、a\* (赤み)、b\* (黄色み) 値の平均値で表した。縦棒は標準偏差を表す。

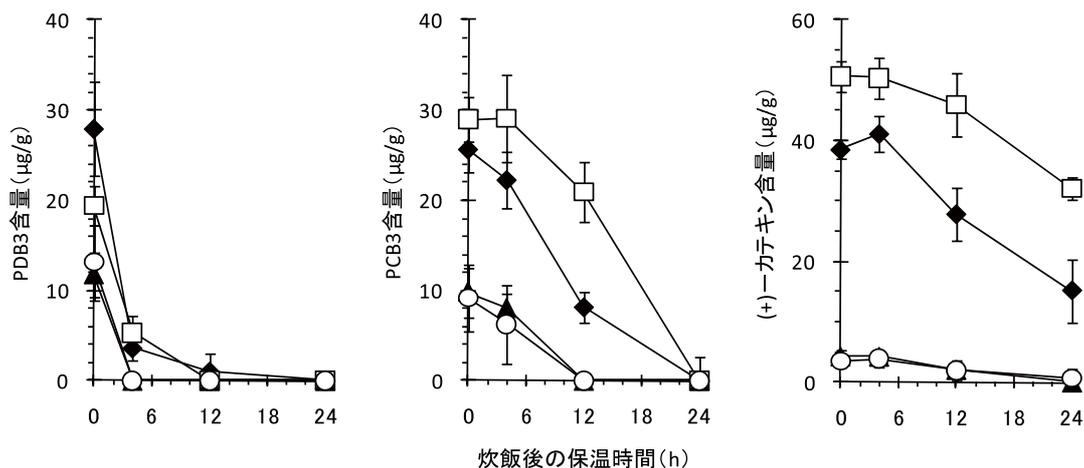


図25 少量炊飯および保温に伴う主要フラバノール成分含量の変化

会津4号(□)、あまぎ二条(◆)、トヨノカゼ(▲)およびファイバースノウ(○)の搗精麦を試験管内で炊飯および70°Cで保温し凍結乾燥粉に含まれるフラバノールをHPLCで測定した。プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジン (PCB3) と (+)-カテキンの含量は平均値±標準偏差 (縦棒) で表す (n=4)。

温時間が長くなるにつれて抽出されるフラバノール成分が減少するが、成分により減少速度が異なっていた (図25)。PDB3は保温後速やかに減少し含量の少ないトヨノカゼやファイバースノウでは4時間後には検出されないのに対し、PCB3は徐々に減少し、(+)-カテキンは4時間後以降に減少が始まった。フラバノール含量の多い会津4号とあまぎ二条では保温24時間後も(+)-カテキンが残存していたが、トヨノカゼやファイバースノウでは保温12時間以降は殆ど残存しなかった。3成分の中ではPDB3の減少が最も速く、次いでPCB3、(+)-カテキンの順であった。

これら4品種の玄麦と搗精麦のフラバノール成分を比較したところ、PDB3とPCB3は搗精により玄麦に含まれる量の8~9割が除かれているのに対し、(+)-カテキンは7~9割が残存していた (表11)。従って、フラバノール成分により玄麦中の分布が異なると考えられ、(+)-カテキンはPDB3やPCB3に比べて穀粒の内部に分布していることが示唆された。この現象は搗精歩合によりポリフェノール成分組成が異なるという報告 (佐藤1995、神山・藤田2000) と一致する。また、炊飯直後の3成分の含量は搗精麦における含量に比べて少なかった (図25、表11)。これは、炊飯の過程でフラバノールに化学的变化が起こった結果、可溶性成分量が減少したためと考えられる。

表11 玄麦および搗精麦のフラバノール含量

品種	画分	含量(μg/g)		
		PDB3	PCB3	(+)-カテキン
会津4号	玄麦	304 ± 29	232 ± 22	60 ± 5
	55%搗精麦	56 ± 4	51 ± 3	57 ± 4
あまぎ二条	玄麦	408 ± 12	253 ± 9	70 ± 6
	55%搗精麦	45 ± 4	32 ± 2	50 ± 3
トヨノカゼ	玄麦	227 ± 7	84 ± 3	11 ± 1
	60%搗精麦	34 ± 3	16 ± 2	10 ± 0
ファイバースノウ	玄麦	272 ± 33	124 ± 15	11 ± 5
	55%搗精麦	30 ± 4	15 ± 2	8 ± 1

プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジン (PCB3)、(+)-カテキンは大麦粉から75%アセトンで抽出し、固相抽出後HPLC分析により定量した。数値は平均値±標準偏差を表す (n=4)。

IVにおいて、リン酸緩衝液溶液や大麦ペーストを加熱した際にPDB3がPCB3や(+)-カテキンよりも褐変しやすいことを報告した (Kohyama *et al.* 2009) が、炊飯粒においてPDB3がPCB3や(+)-カテキンよりも速く減少することは、化合物の酸化しやすさが影響していると考えられる。また、総ポリフェノール量も搗精麦に比べて炊飯直後や保温後に減少がみられたが、フォリン-チオカルト法はポリフェノールの還元性水酸基に基づいた測定法であるため、フラバノールの酸化による水酸基の減少を反映している可能性がある。さらに、(+)-カテキンがPDB3やPCB3よりも穀粒の内部に分布していると考えられるが、このことが、炊飯・保温の過程で(+)-カテキンがPDB3やPCB3よりも遅れて減少する要因の一つであると考えられる。

炊飯粒のa\*値が水分と負の相関があること、

酸化されやすいPDB3がPCB3や (+)-カテキンより速く減少することを考え合わせると、炊飯粒の褐変では、粒の表面が乾燥するにつれてフラバノールの自動酸化が進行し、褐変が起ると考えられる。

### 3) 炊飯麦の褐変とポリフェノール含量の品種間差

プロアントシアニジン欠失遺伝子*ant13*または*ant28*をもつ6系統と野生型の10品種を用いて、搗精麦の総ポリフェノール量、フラバノール含量、PDB3、PCB3および (+)-カテキン含量と少量炊飯による炊飯直後と保温24時間後の色相を測定した (表12)。野生型10品種の総ポリフェノール量とフラバノール含量は111-249  $\mu\text{g/g}$  (平均178  $\mu\text{g/g}$ ) と29.9-95.4  $\mu\text{g/g}$  (平均60.2  $\mu\text{g/g}$ ) であるのに対し、プロアントシアニジン欠失系統は53-71  $\mu\text{g/g}$  (平均62  $\mu\text{g/g}$ ) と2.6-6.3  $\mu\text{g/g}$  (平均3.9  $\mu\text{g/g}$ ) と低かった。また、プロアントシアニジン欠失系統をHPLCで分析したところPDB3、PCB3および (+)-カテキン

に相当するピークは検出されなかった。

炊飯麦の色相をみると、野生型10品種の炊飯直後と24時間保温後の $a^*$ 値がそれぞれ0.41-0.77 (平均0.59) と1.27-2.07 (平均1.64) であるのに対し、プロアントシアニジン欠失遺伝子をもつ6系統は0.21-0.30 (平均0.24) と0.31-0.42 (平均0.36) と低く、保温による褐変 ( $\Delta a^*$ ) も極めて低かった (表12)。プロアントシアニジン欠失系統は炊飯においても加熱後の褐変を著しく低減できることが明らかになった。

次に、10品種のポリフェノール含量と炊飯麦の保温による褐変との相関を調べた (表13)。搗精麦のフラバノール含量とPDB3、PCB3と (+)-カテキンの含量との間には高い相関 ( $r = 0.832, 0.856, 0.942$ ) がみられた。また、搗精麦のフラバノール含量は炊飯直後のフラバノール含量 ( $r=0.986$ ) や保温後のフラバノール含量 ( $r=0.968$ )、炊飯直後と保温後のフラバノール含量の差 (フラバノール減少量) ( $r=0.921$ ) とも高い相関がみられた。従って、搗精麦のフラバノール量が多い品種ほど炊飯直後や保温後

表12 搗精麦のポリフェノール含量と炊飯麦の褐変

品種・系統	<i>ant</i> 遺伝子	搗精歩合 (%)	ポリフェノール含量 ( $\mu\text{g/g}$ )					$a^*$		
			総量	フラバノール	PDB3	PCB3	(+)-カテキン	炊飯直後	保温24h後	$\Delta a^*$
カシマムギ	野生型	55	249	50.9	60.2	40.9	21.3	0.77	1.62	0.86
会津4号	野生型	55	244	95.4	77.1	68.0	68.9	0.77	2.00	1.23
はがねむぎ	野生型	55	241	78.4	77.2	54.3	35.8	0.72	1.66	0.95
あまぎ二条	野生型	55	192	88.6	63.1	42.4	52.8	0.48	2.07	1.59
ほうしゅん	野生型	55	171	75.3	70.0	34.9	45.3	0.46	1.57	1.11
ミノリムギ	野生型	55	170	48.0	50.1	35.9	8.6	0.47	1.68	1.21
ファイバースノウ	野生型	55	153	37.6	39.2	18.6	9.4	0.41	1.36	0.95
マンネンボン	野生型	60	126	41.7	40.5	25.9	21.3	0.68	1.47	0.79
ナンプウハダカ	野生型	60	119	55.9	69.9	29.0	30.2	0.67	1.70	1.03
トヨノカゼ	野生型	60	111	29.9	47.3	19.0	11.2	0.51	1.27	0.76
大系HL99	<i>ant13</i>	55	71	4.9	ND	ND	ND	0.26	0.42	0.16
大系HO4	<i>ant13</i>	55	70	6.3	ND	ND	ND	0.22	0.31	0.09
大系HL106	<i>ant28</i>	55	65	3.1	ND	ND	ND	0.30	0.40	0.10
大系HL109	<i>ant28</i>	55	61	3.2	ND	ND	ND	0.24	0.39	0.15
大系HL107	<i>ant28</i>	55	54	2.6	ND	ND	ND	0.23	0.32	0.09
大系HL112	<i>ant28</i>	55	53	3.1	ND	ND	ND	0.21	0.31	0.10
野生型平均 (n = 10)			178	60.2	59.5	36.9	30.5	0.59	1.64	1.05
<i>ant</i> 平均 (n = 6)			62	3.9				0.24	0.36	0.11

総ポリフェノール含量はフォリンーチオカルト法で、フラバノール含量はジメチルアミノ桂皮アルデヒドを用いて4反復で定量し、(+)-カテキン当量の平均値で表した。プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジンB3 (PCB3) と (+)-カテキン含量はHPLCで分析し、4反復で定量し平均値で表した。炊飯麦の $a^*$  (赤み) 値は炊飯麦を凍結乾燥粉を用いて測定し、2反復の平均値で表した。NDは検出せず。

表13 ポリフェノール含量及びフラバノール減少量と炊飯麦の保温による褐変との相関係数

	搗精麦フラバノール	PDB3	PCB3	(+)-カテキン	炊飯直後フラバノール	保温24h後フラバノール	フラバノール減少量	保温による褐変 ( $\Delta a^*$ )
搗精麦総ポリフェノール	0.652*	0.598	0.848**	0.512	0.583	0.641*	0.454	0.292
搗精麦フラバノール		0.832**	0.856**	0.942***	0.986***	0.968***	0.921***	0.716*
搗精麦PDB3			0.789**	0.778**	0.821**	0.853**	0.708*	0.391
搗精麦PCB3				0.789**	0.826**	0.870**	0.696*	0.455
搗精麦(+)-カテキン					0.975***	0.957***	0.891***	0.608
炊飯直後フラバノール						0.966***	0.947***	0.698*
保温24h後フラバノール							0.831**	0.542
フラバノール減少量								0.838**

総ポリフェノール含量はフォリン-チオカルト法で、フラバノール含量はジメチルアミノ桂皮アルデヒドを用いて定量した。プロデルフィニジンB3 (PDB3)、プロシアニジンB3 (PCB3) と(+)-カテキン含量はHPLCで分析し定量した。炊飯直後と保温24h後の炊飯麦の凍結乾燥粉の $a^*$  (赤み) 値を測定し、その差を保温による褐変とした。\*、\*\*、\*\*\*はそれぞれ $p < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ で有意であることを示す (n=10)。

に残存するフラバノール量が多く、フラバノール減少量も多いことが分かった。保温による褐変程度は、搗精麦の総ポリフェノール量とは有意な相関がみられなかったが、搗精麦フラバノール含量 ( $r=0.716$ ,  $p < 0.05$ ) やフラバノール減少量 ( $r=0.838$ ,  $p < 0.01$ ) との間には有意な相関がみられた。図26に保温中のフラバノール減少量と炊飯麦の褐変との関係を示したが、両者の間にはほぼ直線的な関係がみられた。この褐変とフラバノール減少量との相関関係は、ファイバースノウの搗精歩合の異なる試料間でも同様に観察された ( $r=0.994$ ,  $p < 0.01$ )。搗精麦のフラバノール含量が高く、炊飯や保温によりフラバノールの減少が著しい試料ほど炊飯麦が褐変しやすい傾向があり、フラバノールの減少が褐変に影響することが示唆された。

以上のことから、フラバノールは炊飯麦の褐変の主原因成分であると推定され、プロアントシアニジン欠失系統や搗精麦のフラバノール含量の小さい系統を選抜することにより、炊飯・保温後に褐変しにくい系統を育成できると考えられる。搗精麦のフラバノール含量は、炊飯粒の褐変程度を測定するのに比べて、少量の試料で簡易に測定することができるため、有望系統の簡易選抜法としても有効であると考えられる。

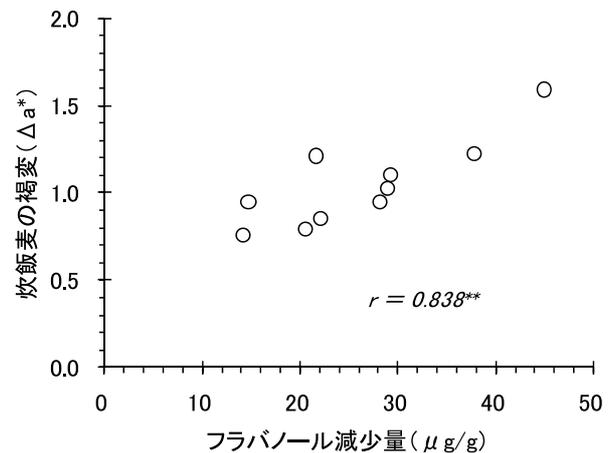


図26 少量炊飯麦の保温によるフラバノール減少量と褐変との関係

野生型の10品種を試験管内で炊飯および70℃で24時間保温し、凍結乾燥粉の $a^*$  (赤み) 値の変化量を求めた。炊飯直後と保温後のフラバノール含量の差をフラバノール減少量とした。\*\*は $p < 0.01$ で有意であることを示す。

## VI モチ性裸麦穀粒のアントシアニンの登熟過程および収穫後の変化

### 1 緒言

日本の中国地方や四国地方の瀬戸内海に面した諸県や九州北部の諸県では、古くからモチ性的大麦が栽培され、モチムギやダンゴムギと呼ばれモチ米の代用として自家用に供されてきた(阪本1996)。雨が少ない島嶼部では、昭和初期にも自家用に栽培され、粉にして保存し、ハレの日にモチ米の代用としてダンゴに加工して消費されていた(森ら 1988、神田ら 1987)。しかし、モチムギは栽培が難しかったため、モチ米が容易に入手できるようになるにつれて次第に作付けされなくなった。これらの日本のモチムギに共通して見られる特徴は、容易に脱穀できる六条裸麦であること、成熟期に葉、茎、種子が紫色に着色することであった(阪本 1996)。遺伝的にみるとモチ性であることと種子等が紫色に着色することは互いに独立した形質であり、紫色に着色しないモチ性六条皮麦品種「セツゲンモチ」(牛山ら 2002)や、紫色に着色するウルチ性大麦品種もみられる。現在では、在来品種の他に栽培上の短所を改善したモチ性裸麦品種「ダイシモチ」が育成され(土井ら 1999)、瀬戸内地方を中心に地域興しと結びついたモチムギの栽培が復活しつつある。そして、炊飯の他、モチムギ独特の粘りのある食感を活かして、麺、パンや菓子の原料として利用されているが、モチムギの紫色素はあまり利用されていない。

Iで述べたように、アントシアニンはその抗酸化活性(Philpott *et al.* 2004、Nam *et al.* 2006、Kim *et al.* 2007)、抗炎症作用(Tsuda *et al.* 2002)、抗腫瘍作用(Hyun and Chung 2004、Zhao *et al.* 2004)、血糖低下作用(Tsuda *et al.* 2003)、冠動脈保護作用(Dell'Agli *et al.* 2004)等の生理活性から健康機能性成分として認識されている。また、大麦は水溶性食物繊維である $\beta$ -グルカンを多く含んでおり(Li *et al.* 2003)、

大麦食には高脂血症患者の血中コレステロール低下作用(McIntosh *et al.* 1991、Ikegami *et al.* 1996、Behall *et al.* 2004a、Behall *et al.* 2004b)や食後の血糖値上昇抑制効果(佐藤ら 1990)等の生理機能がある。穀物は通常主食として摂取されるため、アントシアニン色素を含むモチ性裸麦は $\beta$ -グルカンだけでなくアントシアニンを日常的に摂取するための食材となると考えられ、両成分は冠動脈性心疾患のリスク低減にシナジー効果をもたらす可能性も期待される。

これまで大麦穀粒のアントシアニン成分について多くの研究が行われてきている(Mullick *et al.* 1958、Fossen *et al.* 2002、Abdel-Aal *et al.* 2006、Kim *et al.* 2007、Bellido and Beta 2009)が、共通する成分はシアニジン3-グルコシドのみであり、文献により報告されている成分が異なっている。また、大麦のアントシアニンの生合成は2つの遺伝子で制御されていることが報告されている(林ら 1977)。大麦穀粒では、カテキンとプロアントシアニジン二量体と三量体が主要なフェノール性成分であり、プロアントシアニジン欠失系統を除く通常の品種・系統では、これらの成分が登熟過程で蓄積することが分かっている(Kristiansen 1984)。アントシアニンやプロアントシアニジンの生合成経路はシロイヌナズナの多くの突然変異を用いて解明されてきており、アントシアニンとプロアントシアニジンは共通の前駆物質であるロイコアントシアニジンを経て合成されることが明らかとなっている(Springob *et al.* 2003、Lepiniec *et al.* 2006)。図4に示したように、ロイコアントシアニジンからアントシアニジンシンターゼ(ANS)によりアントシアニジンが、続いてUDPフラボノイドグルコシルトランスフェラーゼ(UFGT)によりアントシアニンが合成され、一方、LARによりカテキンが生成する。しかし、カテキンからプロアントシアニジンに重合するメカニズムやロイコアントシアニジンからアン

トシアニンやフラバノールの生合成経路を調節するメカニズムについては解明されていない。

そこで、モチ性裸麦のアントシアニンの有効利用を図るため、品種「ダイシモチ」を用いて、穀粒の主なアントシアニン成分を明らかにするとともに、登熟中の蓄積や収穫後の乾燥や搗精によるアントシアニン含量と組成の変化を調べ、カテキンやプロアントシアニジンとの比較を行った。

## 2 材料及び方法

### 1) 植物材料

モチ性裸麦品種「ダイシモチ」は、2002年と2003年には(独)農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター四国研究センターの圃場(善通寺市)で播種し、2004-2006年には(独)農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所の圃場(つくば市)で播種し、翌年収穫した。同日に最初の小花が開花した穂100個にラベルをつけ、開花後42日目まで1週間ごとに10穂ずつ収穫した。登熟期の穀粒は成熟のばらつきを最小限に抑えるため、穂の中央部の穀粒のみを集め $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、凍結乾燥後、TI-100型高速振動試料粉碎機(株式会社CMT、いわき市)で90秒間粉碎した。完熟種子は開花期の6週間後にまとめて収穫し、 $40^{\circ}\text{C}$ の温風で穀粒水分が約12%になるまで乾燥した。アントシアニンの単離には完熟種子をサイクロテック1093サンプルミル(Techator, Höganäs, Sweden)で粉碎し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した玄麦粉を用いた。完熟種子10gをパーレスト小型搗精機(ケット科学研究所、東京)で搗精歩留まり90、75、60%まで外層を取り除いた後、TI-100型高速振動試料粉碎機を用いて玄麦粉と搗精粉を得た。

### 2) 試薬

シアニジン3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシド、シアニジン、ペオニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、マルビジンの塩酸塩をExtrasynthèse(Genay, France)から購入した。PDB3、PCB3と(+)-カテキンはSigma-Aldrich社(St. Louis、

MO、USA)より購入した。

### 3) HPLC分析

#### (1) アントシアニン分析

完熟種子及び登熟期の穀粒の粉100mgに1mlの3%トリフルオロ酢酸(TFA)-50%アセトニトリルを加え、60分間振とう抽出し、12,500rpmで10分間遠心分離を行った。沈殿は同じ溶媒1mlで再度抽出し、まとめた上清に3%TFAを加えて全量を25mlとした。そのうち10mlを、予め3%TFAで平衡化した固相抽出カートリッジAutoprep EDS-1 50mg(昭和電工株式会社、東京)に吸着させ、3%TFA-50%アセトニトリル300 $\mu$ lで溶出した。試料はSPD-M10AVダイオードアレイ検出器(株式会社島津製作所、京都市)を備えたHPLCを用いて分析した。カラムは内径4.6mm $\times$ 長さ150mmのZorbax SB-C18(Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)を用い、3%リン酸(移動相A)とアセトニトリル(移動相B)の混合溶媒を流速1.0ml/minで送液した。混合溶媒の勾配は以下の通りである。0-5分:10%B、5-25分:10-20%B、25-35分:20%B、35-40分:20-50%B、40-45分:50%B。溶出液を520nmの吸光度でモニターし、アントシアニンの濃度は520nmにおけるクロマトグラムピーク面積からシアニジン3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシド当量として算出した。

#### (2) フラバノール分析

フラバノールは粉100mgに対し1mlの75%アセトンを加えて1時間振とう抽出し、12,500rpmで10分間遠心分離した。沈殿は75%アセトンでさらに2回抽出した。まとめた上清を減圧下で濃縮乾固し、2.5%酢酸に溶解し、固相抽出カートリッジAutoprep EDS-1 50mgに吸着させた。メタノール溶出液を減圧下で濃縮乾固し、100 $\mu$ lの20%アセトニトリル-20mMリン酸アンモニウム緩衝液(pH 3.0)に再溶解し、12,500rpmで10分間遠心分離し、上清を分析試料とした。内径4.6mm $\times$ 長さ150mmのTSKgel ODS-100Vカラム(東ソー株式会社、東京)に20mMリン酸アンモニウム緩衝液(pH 3.0、移動相A)とアセトニトリル(移動相B)の混合溶媒を流速1.0ml

/minで送液した。混合溶媒の勾配は以下の通りである。0-5分：5% B、5-35分：5-35% B、35-40分：35-50% B、40-45分：50% B。PDB3、PCB3と(+)-カテキンの濃度は、280nmの吸光度によるクロマトグラムのピーク面積から各標品の検量線を作成し、算出した。

#### 4) アントシアニンの単離と同定

完熟種子の玄麦粉500gに5倍量(v/w)の3% TFA-20%エタノールを加え4℃で4.5時間抽出し、12,000rpm、4℃で20分間遠心分離した。上清をろ過し減圧下で50mlまで濃縮し、予め0.4% TFAで平衡化したSephadex LH-20カラム(265ml)(GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Sweden)に吸着させ、11の3% TFA-エタノールで溶出した。得られた粗アントシアニン画分を減圧下で濃縮乾固した後、0.1% TFA-30%メタノールに溶解し、内径25mm×長さ100mmの $\mu$ Bondapak C18カラム(Waters, Milford, MA, USA)に注入し、メタノール濃度を30-70%に直線的に増加させた0.1% TFA混合溶媒を流速5.0ml/minで送液し、溶出、分画した。さらに内径4.6mm×長さ250mmのTSKgel ODS-80Ts QAカラム(東ソー)を用い、30-50%のメタノールを含む0.1% TFA溶液を1.0ml/minで送液し、520nmの吸光度をモニターしながら溶出し、4つのアントシアニン成分(1、2、3と6)を得た。分取クロマトグラフィーの各分画は、その都度前述のアントシアニン分析を行い、純度を確認した。単離した成分1はシアニジン3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシドの標品と一緒に前述のアントシアニン分析を行った。

ESI-TOF質量分析は、試料をメタノールに溶解し、試料流速2 $\mu$ l/minでMariner(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)に導入し、*m/z* 200-1000の範囲で以下の条件で測定した。ESIスプレーチップ電圧：4.0kV(ポジティブイオンモード)、ノズル温度：140℃、ノズル電圧：230V、シースガス：窒素、スキマー1電圧：10V。成分2、3、6をメタノール/水/酢酸(49：49：2、v/v/v)に溶解し、ESIポジティブイオンモードでApex II 70e型質量分析装置

(Bruker Daltonics Inc, Billerica, MA, USA)で高分解能フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(FT-ICR)スペクトルを測定した。

一次元及び二次元NMRスペクトルは、10% TFA-*d*<sub>1</sub>を含むDMSO-*d*<sub>6</sub>に溶解し、298Kで<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} クライオプローブを備えたAvance 500スペクトロメーター(Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)または、<sup>1</sup>H {<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N} TXI プローブヘッドを備えたAvance 800スペクトロメーター(Bruker Biospin)を用いて測定した。各ユニットの結合部位はグルコースの<sup>1</sup>HシグナルのダウンフィールドシフトやDQF-COSY、NOESY、HSQCやHMBCの二次元NMR測定を解釈することにより決定した。

#### 5) 粗アントシアニンの酸加水分解

Sephadex LH-20カラムで調製した粗アントシアニン画分2.36mgを18%塩酸1mlに溶解し、3分間加熱した。氷中で冷却した後、蒸留水1mlを加えて希釈し、*n*-ブタノール0.5mlで2回抽出した。*n*-ブタノール画分を窒素気流下で濃縮し、単独あるいはシアニジン、ペオニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、マルビジンを混合し、前述のアントシアニン分析の方法に従い、分析した。

### 3 結果及び考察

#### 1) アントシアニンの主成分

モチ性裸麦品種ダイシモチの完熟種子のアントシアニンの典型的なHPLCクロマトグラムを図27に示した。完熟種子の粗アントシアニン画分には520nmで7つのピークが検出され、最も多い成分は6であった。粗アントシアニン画分由来の成分1、2、3と6を分取クロマトグラフィーにより単離精製し、それぞれ0.47、0.09、0.20、0.30mgを得た。これら4成分のESI-TOF質量分析を行ったところ、それぞれ*m/z* 449.2、535.1、535.1、621.1の強いピークを検出し、これらは分子式C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup>、C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>14</sub><sup>+</sup>、C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>14</sub><sup>+</sup>、C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>O<sub>17</sub><sup>+</sup>に相当すると考えられた。また、これら4成分

にはシアニジンに相当する $m/z$  287.1のプロダクトイオンのピークも検出された。成分1をシアニジン3- $O$ - $\beta$ - $D$ -グルコピラノシドと一緒にクロマトグラフを行ったところ、ピークは完全に一致した。そのため、成分1はシアニジン3- $O$ - $\beta$ - $D$ -グルコピラノシドと同定した。成分2、3、6について高分解能FT-ICRで精密質量分析を行ったところ、それぞれ $m/z$  535.1074、535.1079、621.1081のイオンピークが検出されたため、それぞれ $C_{24}H_{23}O_{14}=535.1082$ 、 $C_{24}H_{23}O_{14}=535.1082$ 、 $C_{27}H_{25}O_{17}=621.1086$ の分子式の理論値に相当すると考えられた。 $^1H$  NMRスペクトルから、これらの化合物はシアニジンアグリコンとマロニル化された $\beta$ -グルコピラノシル残基をもつことが分かった。各ユニットの結合位置は、グルコース部分の $^1H$ シグナルのダウンフィールドシフトやDQF-COSY、NOESY、HSQCやHMBC等の二次元NMRスペクトルを解析することにより決定した(図28)。グルコース部分が $\beta$ 結合であることは、アノメリックな位置の $J$ 値が大きい(7.7-7.8Hz)ことから確かめられた。 $^1H$  NMRデータの帰属を表14に示した。以上の結果より、成分2、3、6はそれぞれシアニジン3- $O$ - $(3-O$ -マロニル- $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド)、シアニジン3- $O$ - $(6-O$ -マロニル- $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド)、シアニジン3- $O$ - $(3,6$ -ジ- $O$ -マロニル- $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド)と同定した。Andersen and Fossen (1995)は*Allium victorialis*の茎から成

分2、3と6を単離し、 $CD_3OD/TFA-d_1$  (95/5)に溶解して測定した $^1H$  NMRデータを報告している。ここではDMSO- $d_6/TFA-d_1$  (9/1)に溶解して測定したが、ほぼ彼らの結果と一致している。

Fossen *et al.* (2002)は二条大麦の穂のアントシアニンとして、成分6が63%、成分3が14%、ペオニジン3- $O$ - $\beta$ - $D$ -グルコピラノシドが3%、成分1が2%、ペオニジン3- $O$ - $(3,6$ -ジ- $O$ -マロニル- $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド)が1%とその他の成分と報告している。成分6が主成分であることは本研究と一致しているが、成分2については言及されていない。大麦穀粒に成分2が含まれていることを報告したのはこれが初めてである。Abdel-Aal *et al.* (2006)は青色の大麦穀粒から塩酸酸性メタノールでシアニジン3-グルコシドとペチュニジン3-グルコシドを抽出したと報告している。Kim *et al.* (2007)は紫色の大麦穀粒から0.1%塩酸を含む80%メタノールで抽出したアントシアニンが主にシアニジン3-グルコシド、ペオニジン3-グルコシド、ペラルゴニジン3-グルコシドであると報告している。Bellido and Beta (2009)は、紫色及び黒色の大麦穀粒のアントシアニンを塩酸酸性メタノールで抽出し、デルフィニジン3-グルコシド、デルフィニジン3-ルチノシド、シアニジン3-グルコシド、ペチュニジン3-グルコシドを検出したと報告している。また、Mullick *et al.* (1958)は青色、紫色や黒色の大麦の果皮やアリューロン

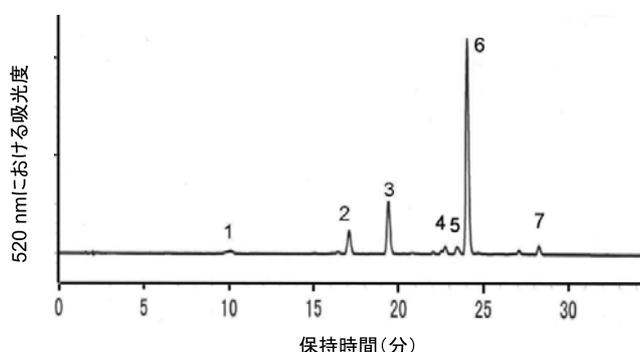


図27 モチ性裸麦(ダイシモチ)穀粒の粗アントシアニン画分のクロマトグラム

数字はアントシアニンの吸収スペクトルをもつピークを示す。1:シアニジン3- $O$ - $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド、2:シアニジン3- $O$ - $(3-O$ -マロニル- $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド)、3:シアニジン3- $O$ - $(6-O$ -マロニル- $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド)、6:シアニジン3- $(3,6$ -ジ- $O$ -マロニル- $\beta$ - $D$ -グルコピラノシド)、4、5、7は未同定成分。

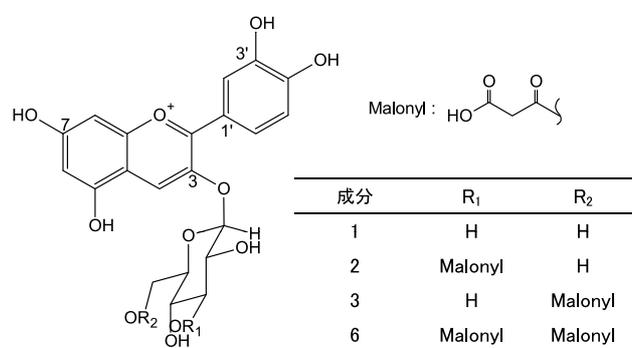


図28 モチ性裸麦(ダイシモチ)穀粒由来のアントシアニンの構造

表14 モチ性裸麦（ダイシモチ）穀粒由来のアントシアニンの<sup>1</sup>H NMRデータ

position	成分 2	成分 3	成分 6
	$\delta$ (ppm), multiplicity, $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), multiplicity, $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), multiplicity, $J$ (Hz)
	cyanidin		
4	8.923, s	8.804, s	8.833, s
6	6.702, s	6.711, d, 2.0	6.712, d, 1.9
8	6.895, s	6.887, d, 2.0	6.885, brs
2'	7.979, d, 2.4	7.978, d, 2.3	7.943, d, 2.2
5'	7.019, d, 8.7	7.017, d, 8.7	7.009, d, 8.8
6'	8.185, dd, 8.7, 2.4	8.216, dd, 8.7, 2.3	8.177, dd, 8.8, 2.2
	3-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside		
1	5.527, d, 7.7	5.375, d, 7.7	5.554, d, 7.8
2	3.700, dd, 9.5, 7.7	3.511, dd, 9.3, 7.7	3.726, dd, 9.5, 7.8
3	5.010, dd, 9.5, 9.3	3.393, dd, 9.3, 8.8	5.028, dd, 9.5, 9.3
4	3.457, dd, 9.8, 9.3	3.231, dd, 9.9, 8.8	3.482, dd, 9.8, 9.3
5	3.615, ddd, 9.8, 5.7, 2.1	3.806, ddd, 9.9, 7.7, 1.8	3.937- 3.972, m
6	3.688, dd, 12.1, 2.1	4.439, dd, 11.8, 1.8	4.394, brd, 11.1
6	3.518, dd, 12.1, 5.7	4.107, dd, 11.8, 7.9	4.158, dd, 11.8, 7.4
	3-O-Malonyl		
CH <sub>2</sub>	3.435*, s		3.340*, brs
	6-O-Malony		
CH <sub>2</sub>		3.353, d, 15.9	3.442* s
		3.363, d, 15.9	

化合物をDMSO-*d*<sub>6</sub>/TFA-*d*<sub>1</sub> (9/1) に溶解し、成分2と3は800.1MHzで、成分6は500.13MHzで測定した。\*は2つのプロトンがほぼ同等に観察された。

組織由来のアントシアニンを希塩酸で抽出し、シアニジン、ペラルゴニジン及びデルフィニジン由来の化合物であると報告している。

以上のように、大麦穀粒由来のアントシアニンの研究でアシル化されたアントシアニンが報告されている例は少ない。しかし、アントシアニンの抽出時や分析時に塩酸のような無機酸を用いると、アントシアニンの糖部分とアシル基の結合が壊れる可能性があることが報告されている (Andersen and Fossen 1995) ため、前述の報告 (Abdel-Aal *et al.* 2006、Kim *et al.* 2007、Bellido and Beta 2009) では塩酸酸性の溶媒を用いたことにより脱アシル化されている可能性がある。本研究では抽出時や分析時のアントシアニンの脱アシル化を避けるために、TFAで酸性にした溶媒を用いた。従って、ダイシモチ由来のアントシアニンは主にシアニジンマロニルグルコピラノシドである。また、前述の報告ではペオニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジンやペチュニジンをアグリコンとするアン

トシアニンが報告されているが、本研究で粗アントシアニン画分を酸加水分解したところ、アグリコンとしてシアニジンのみが検出された。これは用いた品種や栽培条件の相違によるものと考えられる。

一方、同じイネ科植物では、黒米のアントシアニンの主成分はシアニジン3-グルコシドであり、少量のペオニジン3-グルコシドが含まれている (Escribano-Bailón *et al.* 2004) が、アシル化アントシアニンの報告はない。紫トウモロコシではシアニジン3-O- $\beta$ -D-グルコシド、ペラルゴニジン3-O- $\beta$ -D-グルコシド、ペオニジン3-O- $\beta$ -D-グルコシド、シアニジン3-O- $\beta$ -D-(6-マロニルグルコシド)、ペラルゴニジン 3-O- $\beta$ -D-(6-マロニルグルコシド)、ペオニジン3-O- $\beta$ -D-(6-マロニルグルコシド)、シアニジン3-O- $\beta$ -D-(3,6-ジマロニルグルコシド) が報告されているが、アシル化アントシアニンの含量はアシル化されていないアントシアニンに比べて少ないことが報告されている (Aoki *et al.* 2002、Moreno

et al. 2005)。このことから、成分6を始めとするシアニジンマロニルグルコピラノシドを主成分とする組成は、ダイシモチ由来のアントシアニンの特徴であると考えられる。

2) 登熟中の穀粒のアントシアニンとプロアントシアニジンの変化

登熟中の穀粒のアントシアニンの含量を表15に示した。アントシアニンは開花後7、14、21日までは検出されず、開花後28日以降に蓄積した。1粒当たりのシアニジンマロニルグルコピラノシド(成分2、3、6)の含量は開花後35日まで増加し、開花後42日では減少したが、成分1は開花後42日まで増加した。穀粒の着色程度は開花後35日が最も鮮明で開花後42日にはやや褪色したため、抽出したアントシアニンの含量とよく合致していた。成分6は登熟期間を通して最も多く含まれるアントシアニンだが、全アントシアニン含量に占める割合は開花後28日から42日にかけて徐々に減少した。一方、成分1、2と3は開花後28日から42日にかけて相対的な割合が増加した。登熟期のアントシアニン含量の変化は3年間同様に観察された。1粒当たりの乾燥重量は開花後35日まで増加し、開花後35日から42日まではほぼ一定であった(表15)。通常、穀粒水分は登熟期間の後期まで徐々に減少し、1粒当たりの乾物重が最大に達した後は急激に低下する。このため、アントシアニンが減少する時期は、穀粒の生理的な乾燥の時期と

重なる。

登熟中の穀粒の(+)-カテキンとプロアントシアニジン二量体含量の変化を図29に示した。(+)-カテキンは開花後21日までに蓄積し、その後急激に減少したが、PCB3とPDB3は(+)-カテキンに比べてゆっくりと蓄積し、開花後28日以降も比較的安定していた。ダイシモチの穀粒では、プロアントシアニジンの蓄積は1粒当たりの乾物重が急激に増加する時期に起こっており、アントシアニンが蓄積する時期より早かった。このため、大麦穀粒においてプロアントシアニジンとアントシアニンは生理的な役割が異なる可能性がある。Kristiansen (1984)は、グロースチャンパー内で栽培した大麦種子(品種:

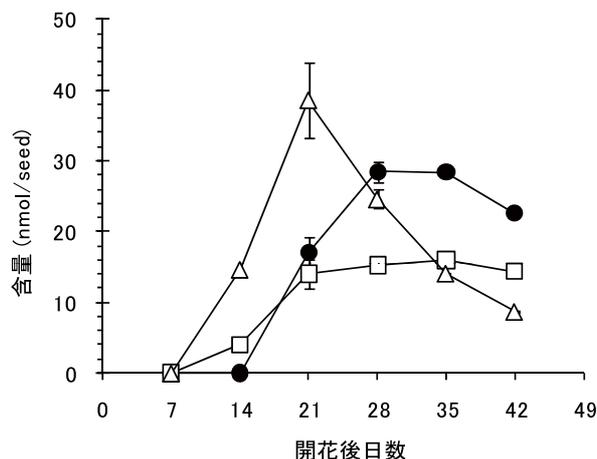


図29 登熟期のモチ性裸麦(ダイシモチ)穀粒中のフラバノール含量

(+)-カテキン(△)、プロシアニジンB3(PCB3)(□)、プロデルフィニジンB3(PDB3)(●)の含量は平均値±標準偏差(縦棒)で表す(n=4)。

表15 登熟中のダイシモチ穀粒中のアントシアニン含量の推移

開花後日数	乾物重 (mg/seed)	成分 (nmol/seed)				
		1	2	3	6	1-7
7	1.3 ± 0.1	ND	ND	ND	ND	ND
14	5.5 ± 0.1	ND	ND	ND	ND	ND
21	15.6 ± 0.2	ND	ND	ND	ND	ND
28	23.3 ± 1.0	0.05 ± 0.00 (2)	0.17 ± 0.02 (7)	0.34 ± 0.01 (13)	1.91 ± 0.09 (74)	2.58 ± 0.12 (100)
35	30.2 ± 1.0	0.35 ± 0.04 (2)	1.53 ± 0.17 (9)	2.51 ± 0.23 (15)	11.07 ± 1.17 (68)	16.34 ± 0.59 (100)
42	30.6 ± 1.3	0.42 ± 0.06 (4)	1.22 ± 0.21 (12)	2.07 ± 0.31 (21)	5.43 ± 1.05 (55)	9.95 ± 1.72 (100)

含量はシアニジン3-O-β-D-グルコピラノシド当量の平均値±標準偏差(n=4)で表す。括弧内は組成比(%)を示す。成分1-7は図27の各ピークに対応する。1:シアニジン3-O-β-D-グルコピラノシド、2:シアニジン3-O-(3-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)、3:シアニジン3-O-(6-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)、6:シアニジン3-O-(3,6-ジ-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)。NDは検出せず。

Nordal) におけるカテキンとプロシアニジンの蓄積について、カテキンは開花後18日をピークに減少すること、PCB3やプロシアニジン3量体は開花後4-8日から蓄積し始め開花後20日までに合成されること、開花後28日のカテキン、PCB3とプロシアニジン3量体の1種子当たりの含量が40、9.7、4.3nmolであること等を報告している。1種子当たりのカテキン含量が増加した後で減少することは本研究での観察と一致するが、カテキンとPCB3のモル比は大きく異なっている。これは、品種と栽培条件の相違が影響していると考えられる。アントシアニンの蓄積に先立ってプロアントシアニジンが蓄積する現象は、ビルベリーの果実 (Jaakola *et al.* 2002) やブドウの果皮 (Kennedy *et al.* 2001、Fournand *et al.* 2006) でも報告されている。

### 3) 収穫後の乾燥及び搗精によるアントシアニンの変化

収穫後の乾燥工程が穀粒のアントシアニン含量に及ぼす影響を調べた。収穫後温風乾燥した穀粒に含まれるアントシアニンの総量は、凍結乾燥した穀粒に含まれる量の約1/5だった (表16)。また、アントシアニン総量に対する成分6

の比率は温風乾燥した穀粒では52%であり、凍結乾燥した穀粒の63%に比べて小さく、逆に成分1の比率は温風乾燥した穀粒で3%であり凍結乾燥した穀粒の2%よりも大きかった。一般に、アントシアニンは分子内の糖がアシル化されると安定性が増すとされている (Escribano-Bailón *et al.* 2004) が、ここでの結果からはシアニジンマロニルグルコピラノシド、特に成分6がアシル化されていないシアニジン3-O-β-D-グルコピラノシドに比べて不安定であることが示唆された。ブドウの果皮では、収穫直前にアントシアニンの総量が減少し、その分解速度はアシル化されていない分子に比べクマロイルグルコシドを含む分子の方が速いこと、クマロイルグルコシドを含む分子はアシル化されていない分子に比べ抽出されにくいことが報告されている (Fournand *et al.* 2006)。そのため、登熟後期や収穫後のダイシモチ穀粒で観察されたアントシアニン総量や成分6の減少は、分解、脱アシル化や不溶化によると考えられる。また、アシル化されていない分子は貯蔵や抽出操作の過程でシアニジンマロニルグルコピラノシドが脱アシル化して生じた人為的産物である可能性もある。

表16 収穫後の乾燥調製がダイシモチのアントシアニン含量に及ぼす影響

調製法	成分 (nmol/g)				
	1	2	3	6	1-7
A	7.3 ± 0.3	31.4 ± 2.3	71.3 ± 5.9	239.5 ± 17.1	379.7 ± 27.6
B	2.6 ± 0.2	5.2 ± 1.0	22.2 ± 3.8	39.8 ± 6.0	77.3 ± 11.1

完熟種子は調製法A (凍結乾燥) または調製法B (40℃の温風乾燥) で調製した。含量はシアニジン3-O-β-D-グルコピラノシド当量の平均値±標準偏差 (n=3) で表す。成分1-7は図27の各ピークに対応する。1:シアニジン3-O-β-D-グルコピラノシド、2:シアニジン3-O-(3-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)、3:シアニジン3-O-(6-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド) 6:シアニジン3-O-(3,6-ジ-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)。

表17 ダイシモチ穀粒の搗精歩留まりとアントシアニン含量

搗精歩留まり (%)	成分(nmol/g)				
	1	2	3	6	1-7
100	9.2 ± 1.7	14.5 ± 0.7	39.0 ± 0.5	70.0 ± 3.6	157.6 ± 3.0
90	3.0 ± 0.0	5.6 ± 0.5	15.1 ± 0.6	25.7 ± 1.6	58.3 ± 3.3
75	ND	0.7 ± 0.6	2.4 ± 0.3	4.2 ± 0.5	7.3 ± 1.4
60	ND	ND	ND	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2

含量はシアニジン3-O-β-D-グルコピラノシド当量の平均値±標準偏差 (n=3) で表す。成分1-7は図27の各ピークに対応する。1:シアニジン3-O-β-D-グルコピラノシド、2:シアニジン3-O-(3-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)、3:シアニジン3-O-(6-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)、6:シアニジン3-O-(3,6-ジ-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)。NDは検出せず。

次に、ダイシモチの穀粒を用いて搗精歩合とアントシアニン含量の関係を調べた (表17)。穀粒を歩留まり90%まで搗精すると、アントシアニンは玄麦の約1/3に減少し、約2/3は糠として除去されることが分かった。通常、裸麦は醸造原料では約75%まで、押麦用としては約60%まで搗精されているが、75%や60%まで搗精すると、アントシアニンは殆ど残らなかった。紫色のモチ性裸麦は色素を残すために搗精歩合90%程度の製品も市販されているが、それでも半分以上の色素が捨てられていることになる。これに対し、PDB3やPCB3は歩留まり90%では玄麦の約2/3が含まれており、歩留まり60%でも10%以上、(+)-カテキンは80%以上が残存していた (表18)。このことは、アントシアニンとプロアントシアニン二量体と (+)-カテキンの穀粒内での分布が異なっているおり、アントシアニンの分布はプロアントシアニジンの分布よりも外側であることを示唆している。穀粒のアントシアニンをより多く摂取するためには、あまり搗精しないか玄麦粉 (全粒粉) での利用が望ましいと考えられる。

本研究により、紫色に着色するモチ性裸麦品種ダイシモチの穀粒の主なアントシアニンは、シアニジン3-O-(3,6-ジ-O-マロニル-β-D-グルコピラノシド)を主成分とするシアニジンマロニルグルコピラノシドであることが明らかとなった。これらのアントシアニンの含量は収穫時期で異なり、抽出量は乾燥温度や搗精歩留まりの影響を受けることが分かった。今までのところシアニジンマロニルグルコシドに特異的な生理機能性は報告されていないが、アントシアニンを摂取する目的で着色したモチ性裸麦の玄麦を利用することは有効であると思われる。また、この糠はシアニジンマロニルグルコシドを含む天然食用色素の原料となり得ると考えられる。

表18 ダイシモチ穀粒の搗精歩留まりとフラバノール含量

搗精歩留まり (%)	成分(nmol/g)		
	(+)-カテキン	PCB3	PDB3
100	94 ± 4	322 ± 12	509 ± 13
90	109 ± 5	206 ± 3	334 ± 9
75	88 ± 6	70 ± 6	127 ± 7
60	82 ± 0	43 ± 3	83 ± 5

(+)-カテキン、プロシアニジンB3 (PCB3)、プロデルフィニジンB3 (PDB3) の含量は平均値±標準偏差 (n=3) で表す。

## VII 総 括

我が国における主食用大麦の主な用途は、粒食として米と一緒に炊飯される「麦ご飯」であるが、近年では粉食として麺やパン、菓子原料にも利用されている。主食用にはほぼ国産大麦が当てられているため、主食用大麦の消費を拡大すれば食料自給率の向上につながると考えられる。主食用大麦の消費を拡大させるためには、麦ご飯として消費者に好まれない特性を改善し品質の向上を図ることと、大麦のもつ有用な特徴を活かした新規需要の開拓することが必要である。ここでは、IIからVIで得られた知見を整理し、主食用大麦の産業的な視点から再度考察する。

本研究では、麦ご飯として好ましくない特性の中から、加熱調理の際の褐変に着目した。褐

変しにくい大麦品種の開発のためには、褐変の原因成分を特定し原因成分の少ない系統を選抜することが必要であり、加工方法により褐変を低減するためには褐変に至るメカニズムの解明も必要である。

IIでは、プロアントシアニン欠失系統を含む42品種・系統の大麦を用いて、搗精粉ペーストの加熱前後のハンター白度の差を褐変指数として褐変の評価を行った。また、メタノールで抽出しプルシアンブルー法で測定したポリフェノール含量と75%アセトンで抽出した粗ポリフェノール画分に共通してみられた8成分の含量を測定し、褐変との相関分析を行った。その結果、ポリフェノール含量と褐変指数との間に高い正の相関 ( $r=0.766$ ,  $p<0.001$ ) を見だし、さ

らにプロアントシアニジン 3 成分 (PDT1、PDB3、PCB3) と (+)-カテキンの各含量と褐変指数との間にも有意な相関 (それぞれ  $r=0.400$ 、 $0.595$ 、 $0.599$ 、 $0.384$ 、 $p<0.05$ ) を認め、これらのポリフェノール類が褐変に関与することが示唆されたが、その相関係数はポリフェノール含量と褐変指数との相関係数より小さかった (Kohyama *et al.* 2001)。このことから、褐変には単独の成分が大きく寄与しているのではなく、複数の成分が協働して関与していると考えられる。また、プロアントシアニジン 3 成分と (+)-カテキンの含量の間には PDT1 と (+)-カテキン間を除き互いに正の相関がみられた (Kohyama *et al.* 2001) ことから、プロアントシアニジン欠失に限らず、これら 4 成分の含量を同時に制御しうると考えられる。

Ⅲでは、ポリフェノール以外で加熱後の褐変に関与している可能性のある成分として無機元素に着目し、搗精粉ペーストに濃度の異なる無機塩やキレート剤を添加して、加熱後の色相を対照と比較することにより影響を評価した。その結果、銅と鉄は搗精粉に内在する量と同程度の濃度で添加した場合でも、顕著に濃度依存的に加熱後の  $L^*$  値やハンター白度を低下させた (神山・松中2003)。一方、亜鉛やカルシウムを添加した場合は、濃度依存的に加熱後の  $L^*$  値やハンター白度が高くなった (神山・松中2003)。また、キレート剤である DTPA、EDTA やフィチン酸を添加した搗精粉ペーストは、加熱後の  $L^*$  値と  $b^*$  値が高くなり、褐変を抑制した (神山・松中2003)。以上のことから、大麦に内在する鉄や銅は加熱後の褐変に対して促進的に、フィチン酸は抑制的に作用していることが示唆された。鉄や銅の遷移金属はポリフェノールの自動酸化を触媒し (Kumamoto *et al.* 2001)、水溶液中でカテキン (Oszmianski *et al.* 1996) やケルセチン (Makris and Rossiter 2000) の褐変を促進することが報告されているため、搗精粉ペーストでも内在性の遷移金属がポリフェノールの自動酸化を触媒することにより褐変を促進していると考えられる。亜鉛やカルシウムの褐変抑制効果のメカニズムは明らかではない

が、低濃度で効果があるため、添加物としての利用も考えられる。

Ⅳでは、加熱後の褐変評価系として搗精粉ペーストと搗精粉抽出液を用い、濃度の異なる被検化合物を添加し、色相に対する影響を評価した。被検化合物としては、大麦から精製したプロアントシアニジン 3 成分 (PDT1、PDB3 と PCB3) と前駆物質を含むフェノール性化合物を用いた。大麦抽出液にプロアントシアニジン 3 成分と (+)-カテキンを  $20-100 \mu\text{g}/1.1\text{ml}$  の濃度で添加し、 $90^\circ\text{C}$  で 1 時間加熱したところ、濃度依存的に  $420\text{nm}$  の吸光度が増加した (Kohyama *et al.* 2009)。また、PDB3、PCB3、(+)-カテキン  $20 \mu\text{g}/1.1\text{ml}$  のリン酸緩衝液を  $90^\circ\text{C}$  で 0-180 分間加熱し、経時的に吸収スペクトルを測定した結果、 $\text{PDB3} > \text{PCB3} > (+)\text{-カテキン}$  の順に褐変しやすかった (Kohyama *et al.* 2009)。搗精粉ペーストに PDT1、PDB3、PCB3 と (+)-カテキンを添加したところ、濃度依存的に  $L^*$  値が低下し  $a^*$  値と  $b^*$  値が増加して褐変が促進されたが、その効果は PDT1 と PDB3 で顕著であった (Kohyama *et al.* 2009)。関連するフェノール性化合物の中では、カフェ酸がペーストと抽出液の両方の系で褐変を促進し、プロトカテキ酸、エリオジクチオールと (+)-ジヒドロケルセチンが抽出液で、ミリセチンとケルセチンがペーストで褐変を促進した (Kohyama *et al.* 2009)。褐変を促進した化合物の構造には、共通してカテコールまたはピロガロール構造が含まれており、ペーストの褐変ではカテコール構造をもつ化合物よりもピロガロール構造をもつ化合物の促進効果が大きかった (Kohyama *et al.* 2009)。この構造-活性の相関はポリフェノールの構造と抗酸化活性との相関と類似していた (Rice-Evans *et al.* 1996、van Acker *et al.* 1996、Cao *et al.* 1997、Croft 1998、Fukumoto and Mazza 2000、Silva *et al.* 2002)。

ポリフェノールはフリーラジカルに対して抗酸化物質として作用するだけでなく、遷移金属が作用しうる条件下では酸化促進活性をもつことも報告されている (Cao *et al.* 1997、Fukumoto and Mazza 2000、Silva *et al.* 2002) ため、

遷移金属共存下におけるポリフェノールの自動酸化や酸化促進的な特性が、大麦製品の加熱による褐変に影響していると考えられる。また、大麦穀粒に多く含まれているプロアントシアニジンや (+)-カテキンが顕著に褐変を促進するのに対し、フェノール酸であるフェルラ酸や*p*-クマル酸、フラボンであるアピゲニンやルテオリンが褐変に抑制的に作用するか、効果を示さなかった (Kohyama *et al.* 2009) ことから、プロアントシアニジンや (+)-カテキンのフラバノールが大麦の加熱後の褐変の主な原因成分であると考えられる。

Vでは、より麦ご飯に近い褐変の評価系として、試験管で搗精麦を炊飯および保温した凍結乾燥粉を用い、保温による $a^*$ 値の増分を褐変の指標とした。炊飯麦において、水分が低い穀粒ほど褐変していることから、乾燥が褐変に影響すると考えられる (神山ら 2010)。また、炊飯および保温に伴うフラバノール成分含量の経時的变化を調べた結果、 $PDB3 > PCB3 > (+)$ -カテキンの順に減少することが明らかとなった (神山ら 2010)。プロアントシアニジン欠失6系統の搗精麦は総ポリフェノール量およびフラバノール含量と褐変が著しく低いことが確かめられた (神山ら 2010)。また、野生型の10品種間では、保温による褐変と搗精麦のフラバノール含量 ( $r=0.716$ ,  $p<0.01$ ) や保温によるフラバノール減少量 ( $r=0.838$ ,  $p<0.01$ ) との間に有意な相関がみられた (神山ら 2010)。このことは、炊飯および保温の過程でフラバノールが酸化されて減少することが褐変に影響し、フラバノールが褐変の主たる原因成分であることを強く示唆している。また、搗精麦のフラバノール含量の測定は少量の試料で簡易に行えるため、褐変しにくい有望系統の簡易選抜法として利用しうると考えられる。

大麦の加熱後褐変についてIIからVで得られた結果から、カテキンやプロアントシアニジンが加熱後褐変の主たる原因成分であることが明らかになった。現在、育種の現場では加熱後褐変の原因成分がカテキンやプロアントシアニジンを含むフラバノールであると認識されており、

褐変しにくい品種としてプロアントシアニジン欠失遺伝子をもつ二条皮麦の「とちのいぶき」と「白妙二条」、六条皮麦の「はるしらね」、二条裸麦の「キラリモチ」が品種登録されているが、本研究は加熱後褐変しにくい特性の理論的な裏付けとなる。

また、本研究では大麦のもつ有用な特徴を活かした新規需要の開拓につなげるため、モチ性裸麦に含まれているが十分に活用されていないアントシアニンにも注目し、基礎的な知見を得た。VIでは、モチ性裸麦品種「ダイシモチ」穀粒に含まれるアントシアニンの主な4成分を単離精製し、機器分析によりシアニジン3-O-(3,6-ジ-O-マロニル- $\beta$ -D-グルコピラノシド)、シアニジン3-O-(6-O-マロニル- $\beta$ -D-グルコピラノシド)、シアニジン 3-O-(3-O-マロニル- $\beta$ -D-グルコピラノシド)、シアニジン3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシドと同定した (Kohyama *et al.* 2008)。これまでにFossen *et al.* (2002) が大麦由来のアントシアニン成分としてアシル化された化合物を報告しているが、シアニジン3-O-(3-O-マロニル- $\beta$ -D-グルコピラノシド)を大麦で報告したのは初めてである。また、他の報告ではシアニジンの他にペオニジン、ペラルゴニジン、デルフィニジン、ペチュニジンをアグリコンとするアントシアニンが報告されている (Fossen *et al.* 2002, Abdel-Aal *et al.* 2006, Kim *et al.* 2007, Bellido and Beta 2009) が、本研究では検出できなかった。

大麦のアントシアニンは、シアニジン3-グルコシドを除き、報告によりその成分が異なっているが、その要因は抽出方法や用いた品種、栽培条件の相違と考えられる。シアニジンマロニルグルコピラノシドを主成分とする組成は、ダイシモチ由来のアントシアニンの特徴であると考えられ、今後シアニジンマロニルグルコピラノシドに特有の生理機能が見つければ、その供給源として有望である。また、ダイシモチ穀粒のアントシアニンは1粒当たりの乾物重が最大になる開花後35日に最も多く蓄積し、生理的乾燥期には徐々に減少することが分かった (Kohyama *et al.* 2008)。また、収穫後の温風乾燥で

もアントシアニンが減少した (Kohyama *et al.* 2008)。このため、穀粒のアントシアニンをなるべく損なわないためには適期収穫が重要である。搗精歩留まりとアントシアニン含量の関係では、90%の歩留まりで玄麦の約1/3に減少し、75%や60%の歩留まりでは殆ど残らず、アントシアニンの多くが糠画分に移行することが分かった (Kohyama *et al.* 2008)。このため、アントシアニンを多く摂取するためにはあまり搗精しないか玄麦粉（全粒粉）での利用が望ましいと考えられる。ダイシモチ穀粒ではアントシアニンはプロアントシアニジンよりも遅く蓄積し、プロアントシアニジンより外側に分布することから、両者の生合成は異なるメカニズムで調節されていることが示唆された。ダイシモチ穀粒のアントシアニンは、黒米のアントシアニン含

量 (Escribano-Bailón *et al.* 2004) に比べて少ないため、アントシアニンを利用するためにはより多く蓄積する品種の育成も必要と考えられる。

以上のとおり、本研究では大麦穀粒に含まれるプロアントシアニジンや (+)-カテキン等のフラバノールが加熱後褐変の主な原因成分であり、それらが加熱や保温過程で自動酸化することにより褐変することを明らかにした。また、モチ性裸麦のアントシアニン成分を同定し、それを多く利用するための収穫法や加工法の基礎的知見を与えた。本研究で得られた知見は、褐変しにくい大麦品種の育成や健康機能性成分を最大限に利用するための加工法につながるものであり、大麦の新規需要の開拓につながることを期待する。

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり、お茶の水女子大学大学院の村田容常教授から懇切なるご指導とご校閲を賜った。

本研究は、四国農業試験場、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構の近畿中国四国農業研究センターおよび作物研究所で実施したものである。四国農業試験場の藤田雅也博士（現九州沖縄農業研究センター）には、本研究に着手するにあたり、ご協力とご助言をいただいた。元岡山大学資源生物科学研究所の武田和義博士と栃木県農業試験場栃木分場の長嶺敬氏（現中央農業総合研究センター）には、貴重な材料をご提供いただいた。食品総合研究所の小野裕嗣博士と亀山眞由美博士には、化合物の構造解析にあ

たり多大なるご協力とご助言をいただいた。近畿中国四国農業研究センターの柳澤貴司博士（現作物研究所）には、激励とご協力、ご助言をいただいた。近畿中国四国研究センターの松中仁氏（現九州沖縄農業研究センター）と高山敏之氏（現作物研究所）には、ご支援とご助言をいただいた。また、作物研究所企画管理室長の長峰司博士（現近畿中国四国研究センター所長）には、本研究をまとめるにあたり多大なる激励とご理解を賜った。作物研究所の小前幸三博士と一ノ瀬靖則博士にはご理解とご支援をいただいた。(独) 農業生物資源研究所の土門英司博士には、用語についてご助言をいただいた。

ここに各位に深甚なる感謝の意を表する。

## 引用文献

Abdel-Aal, E.-S. M., J. C. Young and I. Rabalski (2006) Anthocyanin composition in black, blue,

pink, purple, and red cereal grains. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4696-4704.

- Andersen, Ø. M. and T. Fossen (1995) Anthocyanins with unusual acylation pattern from stem of *Allium victorialis*. *Phytochemistry*, 40, 1809-1812.
- Arslan, O., A. Temur and I. Tozlu (1997) Polyphenol oxidase from *Allium* sp. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2861-2863.
- Aoki, H., N. Kuze and Y. Kato (2002) Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Foods Food Ingrid. J. Jpn.*, 199, 41-45.
- Behall, K. M., D. J. Scholfield and J. Hallfrisch (2004a) Lipids significantly reduced by diets containing barley in moderately hypercholesterolemic men. *J. Am. Coll. Nutr.*, 23, 55-62.
- Behall, K. M., D. J. Scholfield and J. Hallfrisch (2004b) Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. *Am J. Clin. Nutr.*, 80, 1185-1193.
- Bellido, G. G. and T. Beta (2009) Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1022-1028.
- Bhatty, R. S. (1992) "Dietary and nutritional aspects of barley in human foods". *Barley Genetics VI*. ed. by Munck, L., Copenhagen, Munksgaard International Publishers, Ltd., 913-923.
- Cao, G., E. Sofic and R. L. Prior (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure and activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 749-760.
- Croft, K. D. (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 854, 435-442.
- Das, J. R., S. G. Bhat and L. R. Gowda (1997) Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the Kew cultivar of Indian pineapple fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2031-2035.
- Dell'Agli, M., A. Buscialà and E. Bosisio (2004) Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc. Res.*, 63, 593-602.
- Ding, C.-K., K. Chachin, Y. Ueda and Y. Imahori (1998) Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4144-4149.
- 土井芳憲・伊藤昌光・藤田雅也・土門英司・石川直幸・片山正・神尾正義 (1999) モチ性裸麦品種「ダイシモチ」の育成. 四国農業試験場報告, 64, 21-36.
- Dong, X., R. E. Wrolstad and D. Sugar (2000) Extending shelf life of fresh-cut pears. *J. Food Sci.*, 65, 181-186.
- Dykes, L. and L. W. Rooney (2007) Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, 52, 105-111.
- Escribano-Bailón, M. T., C. Santos-Buelga and J. C. Rivas-Gonzalo (2004) Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr. A*, 1054, 129-141.
- Feillet, P., J. -C. Autran and C. Icard-Verniere (2000) Pasta brownness: an assessment. *J. Cereal Sci.*, 32, 215-233.
- Ferreres, F., P. B. Andrade, P. Valentão and A. Gil-Izquierdo (2008) Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves *O*-glycosyl-*C*-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1182, 56-64.
- Ferreres, F., Z. Kršková, R. F. Gonçalves, P. Valentão, J. A. Pereira, J. Dušek, J. Martin and P. B. Andrade (2009) Free water-soluble phenolics profiling in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2405-2409.
- Food and Drug Administration, HHS. (2006) Food labeling: health claims; soluble dietary fiber from certain foods and coronary heart disease. Final rule. *Fed Regist.*, 71, 29248-29250.
- Fossen, T., R. Slimestad, D. O. Øvstedal and Ø. M. Andersen (2002) Anthocyanins of gra-

- sses. *Biochem. Syst. Ecol.*, 30, 855-864.
- Fournand, D., A. Vicens, L. Sidhoum, J. M. Souquet, M. Moutounet and V. Cheynier (2006) Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7331-7338.
- 藤田雅也・武田和義・神山紀子・土門英司・土井芳憲 (2000) オオムギにおける穀粒の加熱褐変とポリフェノール含量の品種間差異. 四国農業試験場報告, 65, 9-16.
- Fujita, S., T. Tono and H. Kawahara (1991) Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Sci. Food Agric.*, 55, 643-651.
- Fukumoto, L. R. and G. Mazza (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3597-3604.
- 福岡忠彦・堀野俊郎 (1989) 小麦とその60%粉の窒素およびミネラル含量—硬質小麦と軟質小麦の比較—. *日本作物学会紀事*, 58, 502-506.
- Graham, H. D. (1992) Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 801-805.
- 林二郎・高橋隆平・守屋勇 (1977) オオムギのアントシアニン着色に関与する2遺伝子の連鎖研究. *農学研究*, 56, 167-178.
- Hodzic, Z., H. Pasalic, A. Memisevic, M. Srabovic, M. Saletovic and M. Poljakovic (2009) The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. *Eur. J. Sci. Res.*, 28, 471-477.
- Holtekjølén, A. K., C. Kinitz and S. H. Knutsen (2006) Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2253-2260.
- Hyun, J. W. and H. S. Chung (2004) Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjin-jubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G<sub>2</sub>/M phase and induction of apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2213-2217.
- Ikegami, S., M. Tomita, S. Honda, M. Yamaguchi, R. Mizukawa, Y. Suzuki, K. Ishii, S. Ohsawa, N. Kiyooka, M. Higuchi and S. Kobayashi (1996) Effect of boiled barley-rice-feeding in hypercholesterolemic and normolipemic subjects. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 49, 317-328.
- Jaakola, L., K. Määttä, A. M. Pirttilä, R. Törrönen, S. Kärenlampi and A. Hohtola (2002) Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.*, 130, 729-739.
- Jende-Strid, B. and B. L. Møller (1981) Analysis of proanthocyanidins in wild-type and mutant barley (*Hordeum vulgare* L.). *Carlsberg Res. Commun.*, 46, 53-64.
- Jende-Strid, B. (1985) Phenolic acids in grains of wild-type barley and proanthocyanidin-free mutants. *Carlsberg Res. Commun.*, 50, 1-14.
- Jende-Strid, B. (1991) Gene-enzyme relations in the pathway of flavonoid biosynthesis in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 81, 668-674.
- Jende-Strid, B. (1993) Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas*, 119, 187-204.
- Jende-Strid, B., U. Lundqvist and J. D. Frankowiak (1999) Descriptions of barley genetic stocks for 1998. *Barley Genetic Newsletter*, 29, 80-99.
- 神田三亀男・山根郁子・平川林木・山崎妙子 (1987) 日本の食生活全集34聞き書広島の記事. 農山漁村文化協会, 355pp.
- Kennedy, J. A., Y. Hayasaka, S. Vidal, E. J. Waters and G. P. Jones (2001) Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5348-5355.
- Kim, M.-J., J.-N. Hyun, J.-A. Kim, J.-C. Park,

- M.-Y. Kim, J.-G. Kim, S.-J. Lee, S.-C. Chun and I.-M. Chung (2007) Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4802-4809.
- 木谷裕亮・堀田博・本多一郎 (2002) 国内産小麦粉色相とミネラル含量の関係. *日本食品科学工学会誌*, 49, 49-52.
- 神山紀子・藤田雅也 (2000) オオムギ粉の加熱褐変におけるポリフェノール成分の影響. *四国農業試験場報告*, 65, 1-7.
- Kohyama, N., M. Fujita and K. Takeda (2001) Correlations between barley constituents and the browning reaction in heat-treated barley pastes. *Food Sci. Technol. Res.*, 7, 297-299.
- 神山紀子・松中仁 (2003) 大麦ペーストの加熱後褐変における無機元素の影響. *日本食品科学工学会誌*, 50, 96-99.
- Kohyama, N., H. Ono and T. Yanagisawa (2008) Changes in anthocyanins in the grains of purple waxy hull-less barley during seed maturation and after harvest. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5770-5774.
- Kohyama, N., M. Fujita, H. Ono, M. Ohnishi-Kameyama, H. Matsunaka, T. Takayama and M. Murata (2009) Effects of phenolic compounds on the browning of cooked barley. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6402-6407.
- 神山紀子・長嶺敬・村田容常 (2010) 炊飯麦の保温による褐変とフラバノール成分の関係. *日本食品科学工学会誌*, 57, 372-379.
- Kristiansen, K. N. (1984) Biosynthesis of proanthocyanidins in barley: Genetic control of the conversion of dihydroquercetin to catechin and procyanidins. *Carlsberg Res. Commun.*, 49, 503-524.
- Kristiansen, K. N. and W. Rohde (1991) Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol-4-reductase and molecular analysis of *ant18* mutants blocked in flavonoid synthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 230, 49-59.
- Kumamoto, M., T. Sonda, K. Nagayama and M. Tabata (2001) Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 126-132.
- Latta, M. and M. Eskin (1980) A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1313-1315.
- Lepiniec, L., I. Debeaujon, J.-M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi and M. Caboche (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 405-430.
- Li, H. J. and M. L. Deinzer (2007) Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Anal. Chem.*, 79, 1739-1748.
- Li, J., T. Kaneko, L.-Q. Qin, J. Wang, Y. Wang and A. Sato (2003) Long-term effects of high dietary fiber intake on glucose tolerance and lipid metabolism in GK rats: Comparison among barley, rice, and cornstarch. *Metabolism*, 52, 1206-1210.
- Makris, D. P. and J. T. Rossiter (2000) Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3830-3838.
- Marles, M. A. S., H. Ray and M. Y. Gruber (2003) New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, 64, 367-383.
- McIntosh, G. H., J. Whyte, R. McArthur and P. J. Nestel (1991) Barley and wheat foods: Influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1205-1209.
- McMurrough, I., M. J. Loughrey and G. P. Hennigan (1983) Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 62-72.
- McMurrough, I., D. Madigan and M. R. Smyth (1996) Semipreparative chromatographic pro-

- cedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1731-1735.
- Meldgaard, M. (1992) Expression of chalcone synthase, dihydroflavonol reductase, and flavanone-3-hydroxylase in mutants of barley deficient in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 695-706.
- 文部科学省技術・学術審議会・資源調査分科会 (2005) 「五訂増補日本食品標準成分表」  
[http://www.mext.go.jp/b\\_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802/002.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802/002.htm) (参照2011-01-20)
- Moreno, Y. S., G. S. Sánchez, D. R. Hernández and N. R. Lobato (2005) Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *J. Chromatogr. Sci.*, 43, 483-487.
- 森正史・山上ユリ子・常盤井忠伽・秋田忠俊・薦田道子・高岡ミエ子 (1988) 日本の食生活全集38聞き書愛媛の食事. 農山漁村文化協会, 357pp.
- Mullick, D. B., D. G. Faris, V. C. Brink and R. M. Acheson (1958) Anthocyanins and anthocyanidins of the barley pericarp and aleurone tissues. *Can. J. Plant Sci.*, 38, 445-456.
- 村田容常・本間清一 (1998) ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御—最新の研究動向—. *日本食品科学工学会誌*, 45, 177-185.
- 長嶺敬・山口恵美子・大関美香・関和孝博・渡邊修孝・渡辺浩久・大野かおり・桑川伸晃・望月哲也・河田尚之・加藤常夫 (2006) 極低ポリフェノールビール大麦育成系統の品質および農業特性. 栃木県農業試験場研究報告, 58, 79-86.
- Nagel, C. W. and Y. Glories (1991) Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 364-366.
- 中林敏郎・山田恭史 (1987) 焙煎によるコーヒー褐色色素の形成順序. *日本食品工業学会誌*, 34, 211-215.
- 中林敏郎 (1990) “カテキンとアミノ酸の熱反応による発色”. *食品の品質と成分間反応*. 並木満夫・松下雪朗編, 講談社, 37-40.
- Nam, S. H., S. P. Choi, M. Y. Kang, H. J. Koh, N. Kozukue and M. Friedman (2006) Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chem.*, 94, 613-620.
- Newman R. K. and C. W. Newman (2008) “Barley history: Relationship of humans and barley through the ages”. *Barley for food and health: Science, technology, and products*. Hoboken, New Jersey, A John Wiley & Sons Inc., 1-17.
- 農林水産省大臣官房食料安全保障課 (2009) 品目別累年表. 「平成19年度食料需給表」農林統計協会, 120-121.
- 農林水産省大臣官房統計部 (2010) 平成21年産4麦の収穫量 (第2報). *農林水産統計*  
[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_kome/pdf/syukaku\\_4mugi2\\_09.pdf](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/pdf/syukaku_4mugi2_09.pdf) (参照2011-01-20)
- Osawa, T., H. Katsuzaki, Y. Hagiwara, H. Hagiwara and T. Shibamoto (1992) A novel antioxidant isolated from young green barley leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1135-1138.
- Oszmianski, J., V. Cheynier and M. Moutounet (1996) Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1712-1715.
- Outtrup, H. and K. Schaumburg (1981) Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by  $^1\text{H}$  270 MHz NMR spectroscopy. *Carlsberg Res. Commun.*, 46, 43-52.
- Philpott, M., K. S. Gould, C. Lim and L. R. Ferguson (2004) In situ and in vitro antioxidant activity of sweetpotato anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1511-1513.
- Powell, S. R. (2000) The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.*, 130, 1447S-1454S.
- Price, M. L. and L. G. Butler (1977) Rapid visual estimation and spectrophotometric de-

- termination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1268-1273.
- Quershi, A. A., W. C. Burger, D. M. Peterson and C. E. Elson (1986) The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J. Biol. Chem.*, 261, 10544-10550.
- Quinde, Z., S. E. Ullrich and B. K. Baik (2004) Genotypic variation in color and discoloration potential of barley-based food products. *Cereal Chem.*, 81, 752-758.
- Quinde-Axtell, Z., S. E. Ullrich and B. K. Baik (2005) Genotypic and environmental effects on color and discoloration potential of barley in food products. *Cereal Chem.*, 82, 711-716.
- Quinde-Axtell, Z., J. Powers and B. K. Baik (2006) Retardation of discoloration in barley flour gel and dough. *Cereal Chem.*, 83, 385-390.
- Quinde-Axtell, Z. and B. K. Baik (2006) Phenolic compounds of barley grain and their implication in food product discoloration. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9978-9984.
- Reuber, S., B. Jende-Strid, V. Wray and G. Weissenböck (1997) Accumulation of the chalcone isosalipurposide in primary leaves of barley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase. *Physiol. Plant.*, 101, 827-832.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-956.
- 阪本寧男 (1996) ムギの民族植物誌—フィールド調査から. 学会出版センター, 210pp.
- 佐藤暁子・小柳敦史・和田道宏 (1996) コムギの子実と粉の無機成分に及ぼす土壌の種類と施肥の影響 (第一報) 子実と粉の無機成分含有率と灰分含有率との関係. *日本作物学会紀事*, 65, 29-34.
- 佐藤寿一・大沢功・服部温子・押田芳治・佐藤祐造 (1990) 食物繊維の糖代謝に及ぼす影響—健常者及び糖尿病患者を対象として—. *総合保健体育科学*, 13, 75-78.
- 佐藤有一 (1995) 大麦の加工時の褐変に及ぼす pH, 保存温度, 添加物ならびにポリフェノール成分の影響. *福井県農業試験場研究報告*, 32, 43-50.
- Siddiq, M., J. N. Cash, N. K. Sinha and P. Akhter (1994) Characterization and inhibition of polyphenol oxidase from pears (*Pyrus communis* L. cv. Bosc and Red). *J. Food Biochem.*, 17, 327-337.
- Silva, M. M., M. R. Santos, G. Carço, R. Rocha, G. Justino and L. Mira (2002) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radic. Res.*, 36, 1219-1227.
- Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventós (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.
- Springob, K., J. Nakajima, M. Yamazaki and K. Saito (2003) Recent advances in biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 288-303.
- Theuer, R. (2002) Effect of iron on the color of barley and other cereal porridges. *J. Food Sci.*, 67, 1208-1211.
- Tsien, R. Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19, 2396-2404.
- Tsuda, T., F. Horio and T. Osawa (2002) Cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48, 305-310.
- Tsuda, T., F. Horio, K. Uchida, H. Aoki and T. Osawa (2003) Dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in

- mice. *J. Nutr.*, 133, 2125-2130.
- 牛山智彦・細野哲・久保田基成・桑原達雄  
(2002) 大麦新品種「セツゲンモチ」の育成.  
北陸作物学会報, 37, 63-65.
- Vadlamani, K. R. and P. A. Seib (1997) Two metal ions improve brightness in wheat-dough products and affect aqueous dispersion of gluten. *Cereal Chem.*, 74, 318-325.
- van Acker, S. A. B. E., D.-J. van den Berg, M. N. J. L. Tromp, D. H. Griffioen, W. P. van Bennekom, W. J. F. van der Vijgh and A. Bast (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 331-342.
- Wang, L., R. K. Newman, C. W. Newman, L.L. Jackson and P. J. Hofer (1993) Toco-trienol and fatty acid composition of barley oil and their effects on lipid metabolism. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 43, 9-17.
- Wang, X., O. Olsen and S. Knudsen (1993) Expression of the dihydroflavonol reductase gene in an anthocyanidin-free barley mutant. *Hereditas*, 119, 67-75.
- Xie, D. Y. and R. A. Dixon (2005) Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry*, 66, 2127-2144.
- Yanagisawa, A. and Y. Amano (1995) “Degradation of flour color in wheat damaged by rain in Hokkaido”. Seventh International Symposium on Pre-post Sprouting in Cereals 1995. ed. by Noda, K. and D. J. Mares, Center for Academic Societies Japan, 19-26.
- Yeung, J. and T. Vasanthan (2001) Pearling of hull-less barley: Product composition and gel color of pearled barley flours as affected by the degree of pearling. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 331-335.
- Zhao, C., M. M. Giusti, M. Malik, M. P. Moyer and B. A. Magnuson (2004) Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6122-6128.