

博士論文

低フィチンダイズの開発と  
生育特性及び食品加工適性に関する研究

平成 24 年 3 月

福田 泰子

## 目 次

第 1 章 序論	1
第 1 節 フィチン酸とは	2
第 2 節 フィチン酸に係わる問題点	3
1) 家畜生産における問題点	
2) 食料としての問題点	
第 3 節 目的	7
第 2 章 低フィチンダイズ CX1834 の生育・品質特性の解析	9
第 1 節 緒言	10
第 2 節 材料及び方法	12
1) 供試植物と栽培条件	
2) 生育特性及び収量調査	
3) 子実中の各形態リン及び各種ミネラル成分の分析法	
4) 粗タンパク質の分析	
5) イソフラボンの分析	
6) 種子の外観品質	
7) 豆乳中固形物抽出率	
第 3 節 結果	17
1) 生育特性	
2) 収量特性	
3) 子実の品質特性	
4) 食用品種としての適性	
第 4 節 考察	21

第3章 丹波黒と低フィチンダイズ CX1834 交配系統の生育及び品質特性の比較

.....	33
第1節 緒言.....	34
第2節 材料及び方法.....	36
1) 供試植物と栽培条件	
2) 子実中の各形態リン、各種ミネラル及び粗タンパク質の分析	
3) 子実中の全糖、粗灰分及び粗脂肪の分析	
第3節 結果.....	38
1) 2009年度栽培試験	
2) 2010年度栽培試験	
第4節 考察.....	40

第4章 丹波黒と低フィチンダイズ CX1834 交配系統の豆腐加工適性の評価

.....	49
第1節 緒言.....	50
第2節 材料及び方法.....	52
1) 供試材料	
2) 豆乳の抽出(7倍加水)	
3) 豆乳の抽出(10倍加水)	
4) 豆腐の作成	
5) 豆乳のpH及び豆乳と豆腐のフィチン酸の分析	
6) 豆腐の粗タンパク質の分析	
7) 豆腐の破断応力測定	

8) 豆乳タンパク質の組成(SDS-PAGE)	
第3節 結果	55
1) 子実の吸水倍率、豆乳の固形分率、pH、豆乳抽出率及びフィチン酸濃度	
2) 豆腐の粗タンパク質及びフィチン酸濃度	
3) 豆腐の凝固及び破断応力	
4) 豆乳タンパク質の SDS-PAGE	
第4節 考察	57
第5章 総合考察	65
第6章 摘要	72
参考文献	78
謝辞	91

# 第 1 章

## 序論

## 第1節 フィチン酸とは

1872年に Pfeffer が小麦の内乳組織にカルシウムやマグネシウムと結合した有機態リン酸を発見し、1914年に Anderson によってこの有機態リン酸の構造はミオイノシトールの6つの水酸基にオルソリン酸がエステル結合した化合物であると発表された(Harland and Morris, 1995; Loewus and Murthy, 2000)。さらに、Johnson and Tate (1969)が NMR 分光器を用い、この有機態リン酸はフィチン酸であることを確認した(図 1-1)。フィチン酸(*myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6- hexakisphosphate、InsP<sub>6</sub>)は穀類に含まれる有機態リン酸の一つで、発芽や初期生育に必要なミオイノシトールとリンの供給源となっている(Lott *et al.*, 2000; Urbano *et al.*, 2000; Raboy, 2009)。ダイズ(*Glycine max* [L.] Merr.)に含まれる全リン酸のうち、フィチン態リン酸の割合は 65~85%に及ぶ(Raboy *et al.*, 1984; Raboy and Dickinson, 1993)。フィチン酸は鉄(Fe)、亜鉛(Zn)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)などの無機陽イオンとキレート結合し、「フィチン」と呼ばれる混合塩として存在している(Johnson and Tate, 1969) (図 1-1)。ダイズ種子では主に子葉に蓄積しており、発芽時にフィチン酸を分解する酵素(フィターゼ)によって無機態リン酸とミオイノシトールに加水分解される。各々、発芽や初期生育に栄養分として利用されるため、フィチンは主にリンの貯蔵形態として働いているといわれる(Raboy, 2001; Ockenden *et al.*, 2004)。また、植物において、リン酸は核酸、レシチン、フィチンなどの構成要素であり、細胞分裂や分裂組織の発達に不可欠である。フィチン酸は無機イオンの貯蔵、植物組織や器官の修復、シグナル調節や RNA 輸送および DNA 修復、さらには抗酸化剤など数多くの機能に関与することが知られている(Raboy, 2003)。

## 第 2 節 フィチン酸に係わる問題点

### 1) 家畜生産における問題点

家畜用飼料は、単味飼料(とうもろこしや魚粉等の個々の飼料原料)、配合飼料(2 種以上の飼料原料と飼料添加物等を混合して栄養のバランスをとった飼料)、混合飼料(ある特定の成分の補給等を目的とし、2 種以上の飼料を原料とする飼料)の 3 通りに大きく分類される。配合飼料のうち濃厚飼料として穀類、油粕類、糠類などが使用されているが、濃厚飼料の特徴は重量に比べ容積が小さく、粗繊維含量が少なく、養分含量が多い点である。配合飼料中の植物性飼料原料の配合割合は、トウモロコシが 35～54 %程度、ソルガム(マイロ)が 3～19 %程度、ダイズ粕が 5.5～21 %程度である(流通飼料便覧 - 1999 - 、2000)。子実の乾物 1 g あたりに含まれる全リンは、トウモロコシ 3.1 mg、ソルガム 3.0 mg、ダイズ粕 7.0 mg で、そのうちフィチン態リンの割合は、それぞれ 66 %、71 %、61 %と高い(日本標準飼料成分表(2001 年版)、2003)。

しかし、鶏や豚などの単胃家畜は消化器官にフィターゼを持たないためフィチン酸由来のリン酸を消化吸収できない(Peeler, 1972; Usayran and Balnave, 1995; Larson *et al.*, 1998)。家畜の飼料として摂取されたリンのうち、分解されなかったフィチン酸は排泄物として環境中に排出され、土壤微生物のフィターゼにより分解され無機態リン酸になる。この無機態リン酸が降雨の際に雨水とともに川や海に流入し、リン汚染や富栄養化による水質汚染の一因となる。農業由来のリン汚染物質は主に動物の排泄物中の消化されなかったフィチン酸であると言われている(Sharpley *et al.*, 1994; 2003)。家畜によるリン酸排出量は年間 293,000 トンに達し(生雲、2001)、これは 1 年間に使われるリン酸質化学肥料の約 4 割に相当する。リン酸は動物にとって必須元素だが、前述の通り単胃家畜には植物性飼料からのリン酸の吸収が困難であるため、植物性飼料のみではリン酸要求量を満たすことが難しい。このリン酸不足を補うため、リン

酸カルシウムなどの無機態リン酸を飼料に添加しているが(Näsi *et al.*, 1995)、その給源であるリン鉱石の埋蔵量はあと 50~100 年で枯渇すると予想されている(Steen, 1998)。

この家畜飼料における問題を解決するため、濃厚飼料に土壤微生物由来のフィターゼを添加し、フィチン酸を分解することでリン酸の利用率を高める研究も行なわれている(Usayran and Balnave, 1995; Vats *et al.*, 2005)。しかし、無機態リン酸と微生物フィターゼを植物性飼料に添加する方法に関しても、製造、精製にかかる高いコストや保管中のフィターゼの活性の低下などの問題が指摘されている。また、フィチン酸は元々結合していたカチオンのほかに周囲に存在するカチオンとも結合してその吸収を阻害することが指摘されている(Erdman, 1981; Persson *et al.*, 1998; Raboy, 2000)。さらに、塩基性アミノ酸や種子タンパク質、消化管中の酵素とも相互作用して錯体を形成し、そのためアミノ酸の有効性やタンパク質の吸収率が低下し、消化酵素の活性も阻害されるという報告もある(Cowieson *et al.*, 2004)。

アメリカの飼料専門誌 *Feedstuffs*(1997)や、2006 年度アメリカ大豆協会の資料(2006)によると、家畜の植物性飼料原料として求められているのは、高脂肪性飼料と利用しやすい有効態リン酸濃度の高い飼料である。特に家畜に吸収されやすい有効態リン酸濃度の高い飼料は、家畜のリン酸吸収率を高めるのと同時に、環境のリン酸汚染を抑制するために、早急に開発される必要があると論じている。

## 2) 食料としての問題点

一方、単胃動物であるヒトの食料の観点からも同様の問題が挙げられる。ミネラルの欠乏は穀類を主食とする発展途上国を中心に世界人口の 3 分の 1 以上に深刻な影響を与えており、特に妊娠中の女性や幼児への影響は著しい



(Mendoza, 2002)。先進国では食料が豊富で、穀類以外からもミネラルの補給が可能だが、発展途上国においては食料があまり豊富ではなく、穀物や豆類が食事の大部分を占めている。そのため、フィチン酸のような栄養成分の吸収を阻害する抗栄養因子の働きにより、家畜で起こるリンやミネラル欠乏と同様、人においてもリンやミネラルの欠乏を引き起こしていると言われている (Raboy, 2001)。ミネラル欠乏の中で最も起こりやすいのが Fe、Zn 欠乏である。Fe 欠乏は貧血を引き起こすだけでなく、知力や技能も低下させ、Zn 欠乏は発育不全の要因となる (Tamura and Goldenberg, 1996; Mendoza, 2002)。

ダイズは「畑の肉」と呼ばれるように、タンパク質など栄養に富んでおり、古来より味噌や納豆、醤油、豆腐などに加工、利用されてきた。日本において、多くのダイズ加工食品の中でも特に豆腐は、食品用ダイズの需要の 51.4 % を占めている (農林水産省、2010)。豆腐は、加熱した豆乳に凝固剤 ( $\text{CaCl}_2$  や  $\text{MgCl}_2$  など) を添加することによってカード形成したものである。豆乳からの豆腐カード形成には、二つの反応が関与している。一つ目は、凝固剤由来の  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  のカチオンがダイズタンパク質の負の電荷を中和しタンパク質同士の接触を起こし、サブユニットを会合させることによる三次元網状構造の形成である (村田、1995)。二つ目は、豆乳中のフィチン酸のリン酸基に  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  が結合すると  $\text{H}^+$  が放出され、pH が低下してタンパク質が凝集する反応である (Ono *et al.*, 1993)。そして、pH 低下のみによる凝集は、カチオンによるタンパク質の溶解度減少が起きる pH よりも低い pH で起こる。そのため、凝固剤添加による凝集は、凝固剤由来のカチオンにより凝集が始まり、さらに pH が低下することにより、凝集が促進されると考えられる。一方、豆腐加工の際に凝固剤として添加されている「にがり」の濃度が低い場合、フィチン酸はそのリン酸基の緩衝作用のため、フィチン酸の多い豆乳では pH の低下のためにより多くの  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  が必要となり、タンパク質凝固に必要な  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  が不足し、豆腐カー

ド形成が妨げられていると考えられる(Toda *et al.*, 2003; Toda *et al.*, 2006)。

日本において、豆腐加工用に多くの高タンパク質含有ダイズ品種が開発されてきたにもかかわらず、国産ダイズ中のフィチン酸濃度は栽培地域や環境条件によって大きく変化し、同一品種を用いてもその栽培条件の違いによって豆腐の硬さが変わる、といったことが起きている(Toda *et al.*, 2006)。

2007年現在、日本国内の食品用ダイズの需要の51.4%が豆腐用であるが、その75%はアメリカを主とした海外から輸入されており、国内で生産されたものは25%に留まる(農林水産省、2010)。しかし近年、中国やインドなどの人口超大国の経済発展により食料需要が増大するとともに、世界的なバイオ燃料の原料として穀物の需要が増大している。また、地球規模の気候変動による不作により穀物需給がひっ迫し、国際価格が高騰している。加えて、非遺伝子組み換えダイズの減産から、国産ダイズの需要は著しく増大している。国産ダイズは、実需者から食味の良さ、加工適性、安心感等が評価されている一方で、供給の不安定さや、品質のばらつき、ロット規模の小ささが問題点として指摘されている。

### 第3節 目的

上記で述べたフィチン酸に係わる諸問題を解決するため、全リン酸濃度が一定で、フィチン酸濃度が低く、単胃動物でも利用できる有効態リン酸(無機態リン酸)の高い穀物品種を育成することが求められている。このような品種を育成できれば、限りあるリン資源の有効利用、環境のリン汚染の低減などに貢献できるだけでなく、発展途上国の人々の栄養状態も改善することができる。

これまで、全リン濃度は変動せず、フィチン酸だけを減少させ、代わりに吸収しやすい有効態のリン酸を多く蓄積する低フィチン変異植物体の単離が、例えば、オオムギ (*Hordeum vulgare* L.; Larson *et al.*, 1998; Rasumussen and Hatzack, 1998)、イネ (*Oryza sativa* L.; Larson *et al.*, 2000)、トウモロコシ (*Zea mays* L.; Raboy *et al.*, 2000)、コムギ (*Triticum aestivum* L.; Guttieri *et al.*, 2004)、そしてダイズ (Wilcox *et al.*, 2000)で行われている。

ダイズの低フィチン系統 CX1834 は、アメリカ合衆国農務省農業研究局 (USDA-ARS) の V. Raboy 博士や同国 Purdue 大学 J. R. Wilcox 博士のグループによって、突然変異誘発剤 (EMS: エチルメタンサルホン酸) 処理により得られた変異体の中から選抜された系統である (Wilcox *et al.*, 2000)。この系統は全リン酸に対するフィチン態リン酸濃度が約 30 % と普通品種 (65~85 %) に比べて著しく低いことから、低フィチンダイズを育成する上で有利な育種素材であると考えられる。

一方、豆腐加工適性への影響に関する研究もこれまでに多くなされている。特に、フィチン酸が豆腐の加工適性に影響を及ぼすことが明らかになってから、豆腐の凝固とフィチン酸の関係に関する研究が活発にされてきている。しかし、これまでの研究では、フィチン酸濃度の高い普通栽培品種を使った研究例が多く (Saio *et al.*, 1969; Ishiguro *et al.*, 2006; Toda *et al.*, 2006)、豆腐の凝固に影響を与えるフィチン酸濃度の正確な情報が得られていない。しかし、低フィチ

ンダイズから調製した豆乳を用いることによって、フィチン酸と豆腐加工適性との関係が詳細に把握でき、結果的に、フィチン酸の豆腐加工への影響を詳細に解明できる。

本論文では、第 2 章で、低フィチン系統 CX1834 が日本、特に西日本において栽培可能かどうかを明らかにするため、西日本の多くの府県で奨励品種となっているエンレイを対照として、その生育特性や品質特性を調べた。さらに、第 3 章においては、より高品質でフィチン酸濃度の低い系統の育成を目的に、2004 年に日本の栽培品種丹波黒と CX1834 を交配し得られた F1 を養成後、F2 世代から F5 世代まで系統育種法により世代を進めてきた系統の中から、生産性の高い系統の選抜とその系統の生育特性を解析した。また、第 4 章では、低フィチン系統の食用としての有用性を明らかにするために、低フィチン系統と普通栽培品種から作成した豆乳の品質と、これから製造した豆腐の品質や凝固性など、豆腐の加工適性について評価した。第 5 章では、第 2 章から第 4 章で得られた結果から、フィチン酸の低いダイズの育種と選抜について総合的にとりまとめ、本研究によって得られた選抜系統の有用性について考察する。

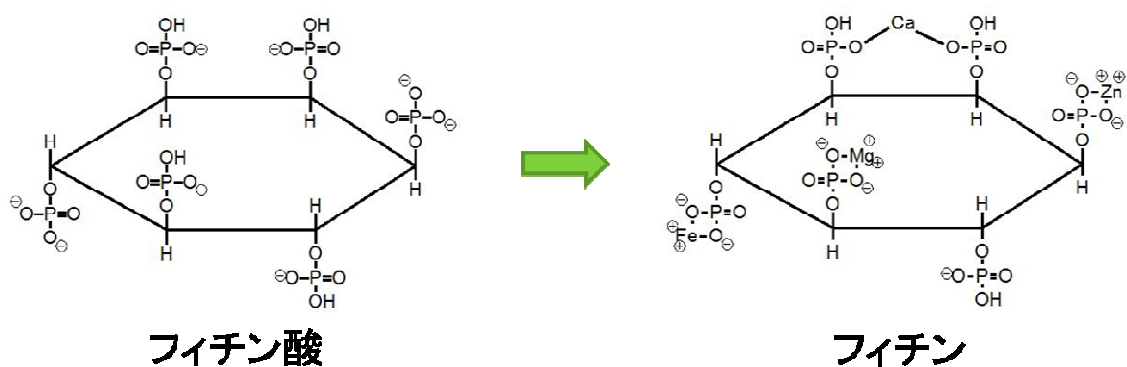


図 1-1 フィチン酸とフィチン

## 第 2 章

低フィチンダイズ CX1834 の

生育・品質特性の解析

## 第1節 緒言

これまでの研究で、ダイズの普通栽培品種の種子中における全リン酸に対するフィチン態リン酸の割合は 65~85 %と多量に集積されているのにもかかわらず、ヒトを含めた単胃動物が利用できる有効態リン(無機態リン)の割合は非常に少ない(Raboy *et al.*, 1984; Raboy and Dickinson, 1993; Oltmans *et al.*, 2005)。近年、フィチン酸に係わる諸問題を解決するための方法の一つに、全リン濃度は変化させず、フィチン酸濃度を減少させ無機態リン酸を多量に含む低フィチン穀類の開発がなされている。例えば、主要な穀類では、オオムギ(Larson *et al.*, 1998; Rasumussen and Hatzack, 1998)、イネ(Larson *et al.*, 2000)、トウモロコシ(Raboy *et al.*, 2000)、コムギ(Guttieri *et al.*, 2004)などで、低フィチン系統の育成に成功している。これらの低フィチン変異体から選抜したオオムギを豚や鶏などの単胃動物に給餌すると、リン酸や無機陽イオンの吸収が高まり、リン酸の環境への排出量を低減できることが報告されている(Leytem *et al.*, 2007; Veum *et al.*, 2009)。

ダイズでは、アメリカ合衆国農務省農業研究局(USDA-ARS)の Raboy 博士らのグループが、エチルメタンスルホン酸(EMS)を用いてフィチン酸の低い突然変異体の単離に成功し、この変異体から選抜を繰り返し、低フィチン系統 CX1834 が育成された(Wilcox *et al.*, 2000)。この CX1834 のフィチン酸合成を抑制する遺伝的な制御機構が明らかにされ、その中で低フィチンを起こす劣性遺伝子(*lpa1*)のホモログは、Glyma03 g32500(Marrof *et al.*, 2009)と Glyma19 g35230(Gillman *et al.*, 2009)遺伝子であることが報告されている。この Glyma03 g32500 と Glyma19 g35230 は ABC トランスポーター中の MRP 様遺伝子であり、フィチン酸の合成は主に細胞質で行なわれ、ABC トランスポーターによって液胞に輸送、蓄積される。(Gillman *et al.*, 2009)。CX1834 では、変異によってトランスポーターが機能していないため、フィチン酸が細胞質内

に溜まり、ネガティブフィードバック制御が引き起こされ、その結果、低フィチンとなると考えられている(Raboy, 2007; Panzeri *et al.*, 2011)。このように CX1834 における変異は、フィチン酸の合成経路が中断されるものではなく、発芽や初期生育に必要なミオイノシトールなどは合成されるため、CX1834 では発芽や初期生育に異常は見られないと考えられる。

一方、日本ではダイズは多くの加工食材として利用されており、食用品種としての適性に関する多くの研究報告がなされている。種皮色が黄で臍色が黒(いわゆる白地黒目)であると納豆や煮豆、味噌に加工された商品の外観が損なわれるため、食品適性は低くなる(平、1982; 1989; 高橋、1988)。さらに、ダイズの主要な加工食品の一つである豆腐用に適したダイズとして、豆腐歩留まりが高いこと、豆乳残渣であるオカラの量が少ないことなどが求められ、高タンパク質で、種皮が薄いダイズが適している(中村ら、1995)。このように、日本においてダイズを食用とする場合、子実の外観や粒大、子実における子葉重に対する種皮重の割合(種皮重率)などの品質特性も重要であると考えられる。

しかし、フィチン酸の低い穀類に関する研究はほとんどなされていない。そこで、本章では、ダイズの低フィチン系統 CX1834 及び西日本で奨励されている普通栽培品種エンレイを圃場条件で栽培し、両ダイズの生育、収量や栄養成分などを比較し、ダイズ子実のフィチン酸濃度を低下させることによって、生育、収量、成分に影響を及ぼさないかどうかを検証した。また、この低フィチン系統の生育特性を明らかにした。さらに、低フィチン系統 CX1834 の食用品種としての適性についても併せて検証した。

## 第2節 材料及び方法

### 1) 供試植物と栽培条件

低フィチン系統 CX1834 と普通栽培品種のエンレイを実験に用いた。両品種・系統を 2005 年と 2008 年の 2 年間、広島大学大学院生物圏科学研究科の精密実験圃場で栽培した。2005 年は 6 月 22 日に播種し、播種前に基肥として苦土石灰(250 kg 10 a<sup>-1</sup>)、化成肥料(N:P:K:=8%:8%:8%)を N とし 8 kg 10 a<sup>-1</sup> 施肥した。栽培条件は株間 15 cm、畝間 60 cm で 4 m×4 m を 1 区画として 2 品種各々 3 反復し、1 株 1 本植えて均一栽培した。7 月 26 日に硫酸アンモニウムを N 成分で 5 kg 10 a<sup>-1</sup> 追肥した。2008 年は、6 月 10 日に pH 調整のため苦土石灰(300 kg 10 a<sup>-1</sup>)を施用し、6 月 15 日に播種した。基肥は与えず、適宜追肥した。栽培条件は株間 15 cm、畝間 60 cm で 3 m×4 m を 1 区画として 2 品種各々 2 区画作り、1 株 1 本植えて均一栽培した。7 月 11 日に化成肥料(N:P:K:=14%:17%:14%)を N 成分で 20 kg 10 a<sup>-1</sup> 施肥した。

両年ともカメムシやマメシクイガの防除、紫斑病の防止のために殺虫剤(スミチオン、バイジット乳剤)、殺菌剤(ボルドー銅水和剤、トップジン M 水和剤)を適宜散布した。

### 2) 生育特性及び収量調査

サンプリングの時期を正確かつ客観的にするため、生育ステージを Fehr *et al.* (1971)の方法に従って分け(表 2-1)、2005 年は開花開始期(R1)と子実肥大始期(R5)及び成熟期(R8)に、2008 年は着莢始期(R3)、R5 及び R8 に調査した。各生育ステージにおいて以下の調査を実施した。

#### (1)生育特性

R1 期…主茎長、主茎節数、分枝数、葉面積、地上部乾物重(個体)

R3 期…主茎長、主茎節数、分枝数



R5 期…主茎長、主茎節数、分枝数、地上部乾物重(個体)、葉面積

R8 期…主茎長、主茎節数、分枝数、地上部乾物重(個体)

## (2)収量構成要素

R8 期…個体当たり着莢数、一莢内子実粒数、個体当たり子実粒数、子実収量

## (3)葉面積、乾物重

R5 期における各個体の葉 2~3 枚の葉面積を葉面積計(AAM-9、林電工株式会社)で測定後、乾物重との比によって個体当たりの葉面積を算出した。個体当たりの地上部乾物重は、各生育ステージで収穫した地上部を各個体、葉と茎に分け、80 °Cで 48 hr 以上熱風乾燥し、それぞれ計量した。

## (4)百粒重

各個体の健全粒 25 粒重を 2~3 回計量し、その 4 倍を平均し、個体の百粒重とした。

## 3) 子実中の各形態リン及び各種ミネラル成分の分析法

R8 期で収穫した子実を 80 °Cで 48 hr 以上熱風乾燥し、高速振動試料粉碎機(TI-100 型、HEIKO)で微粉碎し、これを分析試料とした。湿式灰化法により濃硫酸と過酸化水素を用いて試料を分解、高周波プラズマ発光分光分析装置(ICAP-575 II、日本ジャーレルアッシュ株式会社)によって、Ca、Mg、K 濃度を測定、算出した。全リン濃度はミネラル成分の分析に使用した試料溶液をモリブデン酸法(Chen *et al.*, 1956)により調整し、その吸光度(820 nm)をダブルビーム分光光度計(U-2001 型、日立)で測定し算出した。無機態リンとフィチン態リンの分析は Raboy and Dickinson (1987)の方法に従って実施した。試料を無機態リン抽出液(12.5 % (w v<sup>-1</sup>)トリクロロ酢酸含有 0.02 M MgCl<sub>2</sub> 溶液)で抽出後、その上澄みを全リンと同様にモリブデン酸法で測定した。またフィ

チン態リンは、試料をフィチン態リン抽出液(10 % (w v<sup>-1</sup>) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 含有 0.4 N HCl 溶液)で抽出後、遠心分離とろ過により残渣と上澄み液に分離し、その上澄み液にフィチン沈殿溶液(15 mM FeCl<sub>3</sub> 及び 5 % (w v<sup>-1</sup>) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 含有 0.2 N HCl 溶液)を加え加温、フィチンを沈殿させ、この沈殿物を湿式灰化法で分解、モリブデン酸法により測定した。細胞膜構成リン分析は Raboy *et al.* (2000)の方法に従って実施した。フィチン態リンを抽出した残渣を 0.4 M HCl で洗浄した後、乾燥させ、湿式灰化法で分解、モリブデン酸法により測定した。

#### 4) 粗タンパク質の分析

セミマイクロケルダール法(第十五改正 日本薬局方、2006)で分析した。試料をケルダール分解装置(ケルダーム分解装置 KB20S 型、Gerhardt 社)で分解後、蒸留装置(水蒸気蒸留装置 Vapodest30 型、Gerhardt 社)を用いて蒸留し、試料中の全窒素量を算出した。この値に 5.71 を掛けて粗タンパク質濃度とした。

#### 5) イソフラボンの分析

Kudou *et al.* (1991)の方法を参考に分析した。R8 の生の子実を微粉碎し、イソフラボン抽出液(0.1 % (w w<sup>-1</sup>)酢酸含有 70 % (v v<sup>-1</sup>)エタノール溶液)で抽出後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いて測定した。HPLC(送液ポンプ ; L-7100、カラムオーブン ; L-7300、UV 検出器 ; L-7400、HITACHI)で ODS カラム(ODS-80M、4.6/250 mm)を用いた。溶離液 A には蒸留水、溶離液 B には 0.1 % (w w<sup>-1</sup>)酢酸含有アセトニトリルを用い、溶離液 A 90 %、溶離液 B 10 % から溶離を始め、溶離液 A および溶離液 B の最終濃度が 50 %となるよう 30 分かけてグラジェントを行った。流速は 1.0 mL min<sup>-1</sup>、カラム温度は 40 °C、測定波長は 254 nm とし、サンプルを 10 µL 注入し、分離、測定した。定性用標準溶液と定量用標準溶液の結果から各イソフラボンの濃度を算出し、総イソ

フラボン量はその合計とした。

#### 6) 種子の外観品質

ダイズの食用品種としての適性を検証するため、2008年に得られた子実を用い、子実外観として種皮色、臍色、粒大を「品種特性分類審査基準」(表 2-2)に基づいて評価し、さらに豆乳残渣であるオカラの量の指標となる種皮重率を元木ら(1999)の方法を用い、各品種・系統 10 粒について測定した。

#### 7) 豆乳中固形物抽出率

##### (1)豆乳分離用容器(15 mL 容遠沈管+50 mL 容遠沈管)の作成

少量のサンプルから一定の条件で豆乳を抽出するため、瀬戸ら(2010)を参考に、呉から豆乳を遠心ろ過するための容器を作成した。蓋を外したコニカル底の 15 mL 容ポリプロピレン製遠沈管を 7 mL と 8 mL の目盛で切断し、上部の底面にさらしを付け、1.5 cm 角にカットした脱脂綿を詰めた。コニカル底の 50 mL 容ポリプロピレン製遠沈管の中に切断した 15 mL 容遠沈管の下部を入れ、その上にさらしと脱脂綿を底面に設置した 15 mL 容遠沈管上部を入れた。豆乳を分離する際は、この 15 mL 容遠沈管上部に呉を入れ、50 mL 容遠沈管の蓋をして用いる。

##### (2)豆乳の抽出(10 倍加水)

平(1982)、谷藤と加藤(2004)の方法を参考に、加熱絞り法でダイズから豆乳を抽出した。原料ダイズ重量の約 4 倍の水道水を加え、恒温器で 25 °C、15 hr 浸漬した後、水を切り、浸漬ダイズの重量を測定し、吸水量を算出した。浸漬ダイズをミル(TML15、株式会社テスコム)で破碎し生呉を得、さらに、ミル容器内に付着した呉を添加水(原料ダイズの乾物重の 10 倍量から吸水量を減じた量の水道水)で洗いながら 100 mL ビーカーへ移した。「ビーカー+生呉」の重量

を測定し、ホットスターラー(PC-320、CORNING 社)で加熱した。「ビーカー+加熱具」の重量を測定し、蒸発した水分量を算出し、85 °C以上の湯を加えて補った。加熱具をよくかき混ぜ、豆乳分離用容器に入れ、25 °C、120 ×g で 5 min 豆乳を遠心濾過し、得られた豆乳量を測定した。

### (3)豆乳中固形物抽出率の測定

平(1982)の方法を参考に測定した。得られた豆乳の一定量をあらかじめ恒量を求めておいた蒸発皿に採り、80 °Cで 24 hr 熱風乾燥したのち、放冷、精秤した。以後、80 °C、12 hr 乾燥、放冷、精秤を恒量に達するまで繰り返した。この恒量値から原料ダイズ乾物当たりの抽出率を算出し、これを豆乳中固形物抽出率とした。

### 第3節 結果

#### 1) 生育特性

2005年の開花期は低フィチン系統のCX1834、普通栽培品種のエンレイ両品種・系統とも播種後39日の7月30日前後であった。2008年ではCX1834が7月20日前後、エンレイが7月23日前後であった。

表2-3に両年の普通栽培品種のエンレイと低フィチン系統のCX1834の各生育ステージでの生育特性を示した。

2005年にはエンレイの主茎長は開花開始期(R1)から子実肥大始期(R5)までわずかに(約7cm)増加し、その後成熟期(R8)までほぼ一定であった。しかしCX1834では、R1では17.3cmであったのに、R5に43.7cmとこの間に2倍以上伸長し、その後もわずかに(約5cm)伸長が見られた。2008年においても、エンレイでは着莢始期(R3)からR8まで主茎長には大きな変化は見られなかったが、CX1834ではR3の28.6cmからR5の45.6cmまで茎の伸長が見られた。R8の主茎長はエンレイで38.1cm、CX1834で44.8cmとなり、エンレイよりもCX1834の方が長かった。

エンレイの主茎節数は、2005年にはR1で9.0個からR5で10.6個、2008年にはR1で11.6個からR5で12.3個と両年において大きな変化は見られなかったが、CX1834では、2005年にはR1からR5に7.8個から14.6個となり、約2倍に増加した。2008年においてもR3からR5にかけて12.5個から19.0個に増加した。2005年及び2008年の両年におけるR8の主茎節数はエンレイでそれぞれ10.4個と12.3個、CX1834でそれぞれ16.1個と18.1個となり、エンレイよりCX1834が多かった。

分枝数は、2005年のエンレイではR1の4.9個からR8の10.8個まで徐々に増加し、2008年にもR3の10.9個からR8の15.6個と増加し、2005年と同様の傾向が見られた。CX1834では2005年にはR1に4.2個と少なく、その後

も R8 で 5.1 個となり、顕著な増加は見られなかったが、2008 年には R3 では 6.8 個であったのに対し、R8 では 12.2 個となり 2 倍弱増加した。分枝数は CX1834 よりもエンレイで多い傾向にあった。

R5 における個体あたりの葉面積は、2005 年では両サイズとも R1 から R5 にかけて急増した。一方、2008 年には、両品種・系統間で 5 %水準で有意差は見られなかったものの、エンレイに比べ CX1834 の方が、葉面積が小さい傾向にあった。

個体あたりの地上部乾物重は、2005 年にはエンレイで R1(7.3 g 個体<sup>-1</sup>)から R5(41.9 g 個体<sup>-1</sup>)にかけて急増したが、その後 R8(49.3 g 個体<sup>-1</sup>)にかけては、あまり変動しなかった。CX1834 では R1 に 3.4 g 個体<sup>-1</sup>と小さかったが、R5 に 29.6 g 個体<sup>-1</sup>、R8 には 52.7 g 個体<sup>-1</sup>となり急増した。2008 年には CX1834 は統計的に有意な差が見られなかったものの、R5 から R8 にかけて 2005 年と同様、増加の傾向が見られた。R8 における個体当たりの地上部乾物重は、2005 年にはエンレイ及び CX1834 でそれぞれ 49.3 g 個体<sup>-1</sup>、52.7 g 個体<sup>-1</sup>、2008 年にはそれぞれ 36.8 g 個体<sup>-1</sup>、46.9 g 個体<sup>-1</sup>と、両品種・系統とも 2008 年の地上部乾物重は 2005 年のものに比べ減少傾向にあった。また、CX1834 の地上部乾物重の方がエンレイのものより高い値を示す傾向にあった。

## 2) 収量特性

表 2-4 に 2005 年と 2008 年におけるエンレイと低フィチン系統 CX1834 の収量と収量構成要素を示した。

個体当たりの莢数と一莢内子実粒数は、エンレイに比べて CX1834 の方が有意に高かった。CX1834 の子実収量はエンレイより高かったが、百粒重はエンレイに比べ CX1834 で約 28 %低く、CX1834 はエンレイに比べ小粒であった。CX1834 の個体当たりの子実数はエンレイに比べて 2005 年には約 1.5 倍、2008

年には約 2.2 倍と著しく高かった。2005 年に比べて一茨内子実粒数、個体当たりの子実数及び子実収量は 2008 年では低かった。

### 3) 子実の品質特性

子実中の成分として全リン(TP)、フィチン態リン(PP)、無機態リン(Pi)、細胞膜構成リン(Pc)、カチオン、粗タンパク質の濃度、イソフラボン濃度を分析し、その結果を表 2-5、2-6、図 2-1 に示した。

子実中の TP 濃度は 2005 年には両品種・系統とも  $8 \text{ mg g}^{-1}$  DW 前後で差はなかったが、2008 年にはエンレイが約  $8 \text{ mg g}^{-1}$  であったのに対し、CX1834 は約  $11 \text{ mg g}^{-1}$  となり、CX1834 の方がエンレイに比べて高かった(表 2-5)。PP 濃度はエンレイでは  $5.32 \sim 5.50 \text{ mg g}^{-1}$ 、CX1834 では  $2.14 \sim 2.55 \text{ mg g}^{-1}$  と、年度間で大きな差は見られなかったが、CX1834 ではエンレイに比べ 55~60% 低かった。一方で、CX1834 の Pi 濃度はエンレイでは  $0.55 \sim 0.70 \text{ mg g}^{-1}$  であったのに対し、CX1834 では 2005 年に  $3.92 \text{ mg g}^{-1}$ 、2008 年には  $6.08 \text{ mg g}^{-1}$  であり、エンレイの 5.6 倍(2005 年)~11 倍(2008 年)となり、著しい増加が見られた。TP に対する PP の割合は、エンレイで 66~70%、CX1834 で 23~27% であった。Pc 濃度では両ダイズ間で有意な差は見られなかった。

K の濃度は 2005 年に比べ 2008 年で増加する傾向が見られたが、両品種・系統間で有意な差は見られなかった(表 2-6)。逆に Mg 濃度は 2005 年に比べ 2008 年で低かったが、両品種・系統間では有意な差は見られなかった。Ca 濃度は CX1834 で Mg 濃度と同様に 2005 年に比べ 2008 年に減少する傾向が見られたが、エンレイに比べて CX1834 の方が 1.4~2.1 倍高かった。粗タンパク質濃度は両品種・系統とも 2005 年に比べ 2008 年でわずかに増加した。両品種・系統間では、統計的に有意な差は見られなかった。

総イソフラボン濃度においてエンレイが 2005 年に  $146.2 \pm 14.5 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$

DW (平均値±標準誤差)、2008年に  $91.2 \pm 1.2 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ 、CX1834 がそれぞれ  $164.9 \pm 20.8 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ 、 $135.7 \pm 4.6 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$  と、両品種・系統で2005年に比べ2008年には減少した。また、CX1834 でやや高い傾向にあるものの、両品種・系統間で有意な差は見られず、その組成に大きな違いは見られなかった(図 2-1)。

#### 4) 食用品種としての適性

CX1834 とエンレイの外観、粒大について表 2-7 に示す。両品種・系統とも種皮色は黄であった。臍色はエンレイが黄であるのに対し、CX1834 は黒であった。粒大は、豆腐用品種であるエンレイが「7: 大」に分類されるのに対してCX1834 は「5: 中」に分類された。

CX1834 と豆腐用品種であるエンレイの種皮重率を測定したところ、それぞれ  $7.7 \pm 0.21 \%$  (平均±標準誤差) と  $5.9 \pm 0.14 \%$  で、1%水準でも有意にエンレイよりもCX1834 の種皮重率が高かった(表 2-7)。

原料ダイズ乾物当たりの豆乳中固形物抽出率はCX1834 で  $53.2 \pm 1.15 \%$  (平均±標準誤差)、エンレイで  $64.4 \pm 0.02 \%$  であり、5%水準で有意にCX1834 では低かった(表 2-7)。



#### 第4節 考察

2年間の圃場試験の結果、低フィチン系統 CX1834 はエンレイと同等か、もしくはそれより若干高い収量性を示すことが明らかとなった。両ダイズでの大きな違いは、エンレイでは開花期(R1)から子実肥大始期(R5)にかけて主茎長および節数の増加はほぼ停止したが、CX1834 では R1 から R5 にかけての増加が著しかった。2008年には、CX1834 の葉面積はエンレイのものに比べて有意差はないものの少なく、分枝数も CX1834 の方がエンレイに比べて少なかった。ダイズでは R1 から R5 にかけては栄養生長期と生殖生長期が並行して進む時期である。エンレイではこの時期に茎の伸長より分枝数の増加に光合成産物を優先して分配しているのに対して、CX1834 では、茎の伸長および莢実の生長に光合成産物を分配する系統であると推察された。事実、個体当たりの着莢数および一莢内子実粒数は、2005年と2008年の両年においてエンレイに比べ CX1834 の方が多かった。

一方、2005年の子実収量は、エンレイで  $361 \text{ kg } 10 \text{ a}^{-1}$ 、CX1834 で  $378 \text{ kg } 10 \text{ a}^{-1}$ であったが、2008年にはそれぞれ約60%と約40%の減収となった。このように、両ダイズとも2008年は2005年に比べて収量の著しい低下が見られた。2008年には両ダイズともたくさんの莢を形成したが、そのほとんどは熟すことができなかった。

気象庁の東広島における気象データの資料によると、ダイズの生育盛期(開花期～子実肥大期)である7月から8月の2ヶ月間の降水量は2005年において468 mmであったのに対し、2008年では128.0 mmと平年の361.4 mmに比べても著しく低かった(図2-2)。ダイズの開花以降の生殖成長期が、最も水ストレスの影響を受けやすい時期であることは広く知られている (Sinclair *et al.*, 1987)。水ストレスがダイズに及ぼす影響は、開花期には落花、落莢を通じて、着莢始期・子実肥大期には光合成産物の転流が阻害されることを通じて観察さ

れる。両品種・系統で成熟期(R8)における着莢数が 2005 年より 2008 年で多かつたにもかかわらず、2008 年の一莢内子実粒数は 2005 年に比べエンレイでは 65 %、CX1834 では 52 %減少したことから(表 2-4)、水ストレスにより光合成産物の転流が阻害されていたと推察される。また、共生的窒素固定は干ばつに非常に敏感で、窒素蓄積と子実収量の減少につながることも知られており(Serraj *et al.*, 1999)、2008 年における減収の一因になっていると考えられる。減収の程度は、エンレイに比べて低フィチン系統 CX1834 の方が小さかった。その要因の一つとして、2008 年の R5 における CX1834 の個体当たりの葉面積は 3057 cm<sup>2</sup> で、エンレイでは 4700 cm<sup>2</sup> と、エンレイの方が大きいことから、エンレイの葉の蒸散量が CX1834 より多くなり、より強い水ストレスが生じたことが考えられる。しかし、葉の蒸散量は、本試験では調べていなかった気孔コンダクタンスや気孔密度などによっても左右される。そのため、正確な要因については、更に試験を行い解明する必要がある。

本試験で用いた低フィチン系統 CX1834 の子実中の TP 濃度は 7.99~10.9 mg g<sup>-1</sup> でエンレイ(7.86~8.07 mg g<sup>-1</sup>)とほぼ同程度であった。これまでの報告(Taira and Taira, 1971; 平ら, 1977; 赤木ら, 2009)によると、ダイズ子実中のリン濃度は 4.66~8.63 mg g<sup>-1</sup> の範囲で分布する。その分布範囲の広さから、2008 年における CX1834 の TP 濃度が高い傾向にあったが、有意な差異ではないと推察され、PP 濃度を低くする遺伝的改変による影響はなかったと思われる。TP 濃度に対する PP 濃度の割合は低フィチン系統 CX1834 では 23.5 %、エンレイでは 69.9 %であった。これに対して Pi 濃度の割合は、CX1834 で 56.0 %、エンレイで 7.0 %であった。この結果は Wilcox *et al.* (2000) と Hulke *et al.* (2004) の結果と一致しており、単胃動物が利用できるリンを多く蓄積するという低フィチン酸穀類の性質を CX1834 は保持していることが示された。PP はリン酸の貯蔵形態で種子の発芽の過程で分解され Pi 等の供給源として利

用されている。したがって、PP を低くすることによって発芽への影響が心配されたが、本研究では特に影響はみられなかった。

フィチン態リン(PP)は Ca、Mg、K などのミネラルとキレート結合してフィチンを形成する(Persson *et al.*, 1998)。PP 濃度を低くすることによって、これらのミネラルの濃度が影響を受けることが予想された。しかし、本試験では Ca 濃度がエンレイに比べて CX1834 で高かった点以外、両品種・系統間でこれらのミネラルに差は見られなかった。これまでの調査事例によると(Taira and Taira, 1971; 平ら、1977; 赤木ら、2009)、Ca 濃度は 0.96~5.24 mg g<sup>-1</sup>、Mg 濃度は 1.91~3.53 mg g<sup>-1</sup>、K 濃度は 11.0~22.8 mg g<sup>-1</sup> の範囲値を示したとの報告がある。本試験での結果も全てのミネラルでこれらの範囲内であったことから、PP の低下は種子中のミネラルの濃度に影響を及ぼさないと推察された。また、粗タンパク質濃度について、平(1982)は国産ダイズ 60 品種 7 系統 105 サンプルを調査した結果、387~485 mg g<sup>-1</sup> の範囲の値を、沼田(1998)は豆腐用品種 15 品種について調査した結果、339~406 mg g<sup>-1</sup> の範囲に分布していたと報告している。本試験での結果、両年において両品種・系統間で有意な差は見られず、また、全てこれらの報告で示された範囲内にあったことから、PP の低下は種子中の粗タンパク質の濃度にも影響を及ぼさないと推察された。

ダイズ子実中に含まれるイソフラボンは、植物エストロゲン(Phytoestrogen)と呼ばれ、弱い女性ホルモン様の作用を示すことが知られている(Kelloff, 1999)。近年、骨密度低下の防止(Potter *et al.*, 1998; Ishimi *et al.*, 1999)や、発ガン、ガン細胞増殖の抑制(Akiyama *et al.*, 1987; Coward *et al.*, 1993)、抗酸化作用(Naim *et al.*, 1976)など、様々な効果がイソフラボンにあることが分かり、注目されている。ダイズ子実中のイソフラボン濃度は、年次間変動が大きいという報告がある (Wang and Murphy, 1994; Hoeck *et al.*, 2000)。また、イソフラボン濃度は品種間で大きな差が認められ、その序列関係は試験年次を

通してほぼ一定であるという報告もある(境ら、2005)。本試験では低フィチン系統 CX1834 とエンレイを同じ栽培条件下で栽培し、完熟した生の子実中のイソフラボン濃度を測定した。その結果、総イソフラボン濃度は CX1834 で高かったものの、各イソフラボンの成分組成に明確な違いは見られなかった。いずれもマロニルゲニスチンおよびマロニルダイジンのマロニル化配糖体が主体をなしており、総イソフラボンの 62.2~88.6 %を占めていた。また、配糖体(ダイジン、ゲニスチン、マロニルダイジン、マロニルゲニスチン)およびアグリコン(ダイゼイン、ゲニステイン)の割合にも大きな差はなかった。赤木ら(2007)が国産ダイズ 14 品種について 3 ヶ年ないし 2 ヶ年の平均でマロニル化配糖体は総イソフラボン濃度の 76~89 %を占めているという報告をしている。2008 年において両品種・系統ともやや低い傾向が見られるものの、2005 年には両品種・系統ともこの範囲内にあり、イソフラボンの組成はフィチン酸が少なくなった影響を受けていないと推察される。また、2008 年は 2005 年より両品種・系統とも低い値で、エンレイは 2005 年の 62.3 %、CX1834 は 82.3 %になっており、Wang and Murphy(1994)や Hoeck *et al.*(2000)が報告しているイソフラボン濃度の年次間変動の大きさが表れたと言える。これらの結果から、ダイズ子実中の PP 濃度の著しい低下は、機能成分の一つであるイソフラボンの合成には影響を及ぼさないと考えられた。

本章で用いた低フィチン系統 CX1834 はエンレイと同程度の収量を示し、また各種ミネラル、タンパク質およびイソフラボン濃度においても普通栽培品種のエンレイとほぼ同程度であった。したがって、植物がリンを貯蓄する方法として PP が存在するが、種子中の PP の蓄積量を少なくしても、ダイズの生育や収量および栄養成分に対して負の影響を及ぼさないことが証明された(Bilyeu *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2007; Spear and Fehr, 2007)。

表 2-7 に示したように、CX1834 は、種皮色が黄で臍色が黒(いわゆる白地黒

目)であることから、納豆や煮豆、味噌への利用は商品の外観が損なわれ、難しいと考えられる(平、1982; 1989; 高橋、1988)。また、中村ら(1995)の報告によると、種皮重率と粒大との相関係数は  $r=-0.707^{**}$  で粒が大きくなると種皮重率が低くなることが認められ、豆腐原料としては大粒大豆が有利であることが報告されている。このことから、粒大の評価が「7: 大」であるエンレイに比べ、「5: 中」の CX1834 は豆腐原料としてやや不利であると考えられる。また、中村ら(1995)が指摘したように、本試験においても粒大が大きかったエンレイの方が、小さかった CX1834 より種皮重率が低かった。したがって、低フィチン系統 CX1834 は納豆や煮豆、味噌および豆腐といった食品にはあまり適さないとと思われる。

原料ダイズ乾物当たり豆乳中固形物抽出率において、CX1834( $53.2 \pm 1.15$  %)の方がエンレイ( $64.4 \pm 0.02$  %)に比べて低かった。平(1982)は、北海道から九州までの 23 か所の圃場で 1980 年に栽培された合計 60 品種 7 系統のダイズにおける固形物抽出率を調べた結果、70.8~82.2 %の範囲で、そのうちエンレイ( $n=6$ )では 78.3~79.9 %の範囲であったと報告している。本章で供試したエンレイは平(1982)の結果より低い値を示した。そして、低フィチンダイズ CX1834 の抽出率はエンレイよりもさらに低かった。

一方、中村ら(1995)は、種皮重率が高い品種は豆腐を加工する際の歩留まりが低いことを報告している。本章においても、エンレイに比べ低フィチンダイズ CX1834 の種皮重率は高く、かつ、豆乳中固形物抽出率は低いことから、CX1834 は豆腐加工の際の歩留まりの良くない系統と考えられた。

表 2-1 ダイズの生育ステージの分類(Fehr *et al.*, 1971)

生育ステージ	生育状況及び特徴
栄養生長期	発芽から開花までの期間。
R1(開花始)期	主茎上で1花が開花したとき。
R2(開花盛)期	完全展開した葉を着生している最上位2節のうち1節で開花したとき。
R3(着莢始)期	完全展開した葉を着生している最上位4節のうち1節で0.5 cmに達した莢を認めたとき。
R4(着莢盛)期	完全展開した葉を着生している最上位4節のうち1節で2 cmに達した莢を認めたとき。
R5(子実肥大始)期	完全展開した葉を着生している最上位4節のうち1節で粒が肥大を始めた(莢が圧迫されている感触がする)とき。
R6(子実肥大盛)期	完全展開した葉を着生している最上位4節のうち1節の莢の空隙を青豆が満たしたとき。
R7(成熟始)期	莢が黄化し、葉の50 %が黄葉したとき。生理的成熟。
R8(成熟)期	95 %の莢が熟色を呈したとき。完熟。

表 2-2 「だいず品種特性分類審査基準」に規定される分類(種苗特性分類調査報告書だいず、1995)

階級/区分	粒大	種皮色	臍色
1	極小 (~9.9 g)	黄白	黄
2	10.0~14.9 g	黄	極淡褐
3	小 (15.0~18.9 g)	淡緑	淡褐
4	19.0~22.9 g	緑	褐
5	中 (23.0~26.9 g)	淡褐	暗褐
6	27.0~30.9 g	褐	緑
7	大 (31.0~34.9 g)	黒	淡黒
8	35.0~39.9 g	—	黒
9	極大 40.0 g~	—	灰

表 2-3 エンレイ及び CX1834 の各生育ステージにおける生育特性の比較

実施 年度	品種 / 系統	調査 時期	主茎長 (cm)	主茎節数	分枝数	葉面積 (cm <sup>2</sup> plant <sup>-1</sup> )	地上部 乾物重 (g plant <sup>-1</sup> )
2005	エンレイ	R1	30.1±0.5 <sup>b</sup>	9.0±0.0 <sup>ab</sup>	4.9±0.3 <sup>a</sup>	1425.6±84.1 <sup>a</sup>	7.3±0.3 <sup>a</sup>
		R5	37.4±0.9 <sup>c</sup>	10.6±0.2 <sup>b</sup>	9.3±0.5 <sup>b</sup>	7024.2±744.5 <sup>c</sup>	41.9±2.4 <sup>bc</sup>
		R8	39.5±1.4 <sup>cd</sup>	10.4±0.2 <sup>b</sup>	10.8±0.7 <sup>b</sup>	—*	49.3±5.6 <sup>c</sup>
	CX1834	R1	17.3±0.8 <sup>a</sup>	7.8±0.3 <sup>a</sup>	4.2±0.3 <sup>a</sup>	655.9±79.4 <sup>a</sup>	3.4±0.4 <sup>a</sup>
		R5	43.7±2.4 <sup>d</sup>	14.6±0.9 <sup>c</sup>	5.4±0.5 <sup>a</sup>	4123.1±397.7 <sup>b</sup>	29.6±3.6 <sup>b</sup>
		R8	48.5±1.7 <sup>e</sup>	16.1±0.5 <sup>c</sup>	5.1±0.3 <sup>a</sup>	—	52.7±5.0 <sup>c</sup>
2008	エンレイ	R3	39.0±1.5 <sup>b</sup>	11.6±0.3 <sup>a</sup>	10.9±0.8 <sup>b</sup>	—	—
		R5	34.8±2.1 <sup>b</sup>	11.7±0.6 <sup>a</sup>	10.7±0.3 <sup>ab</sup>	4700.5±597.2 <sup>b</sup>	43.1±7.9 <sup>ab</sup>
		R8	38.1±0.7 <sup>b</sup>	12.3±0.1 <sup>a</sup>	15.6±0.3 <sup>c</sup>	—	36.8±2.0 <sup>a</sup>
	CX1834	R3	28.6±0.5 <sup>a</sup>	12.5±0.4 <sup>a</sup>	6.8±0.4 <sup>a</sup>	—	—
		R5	45.6±1.3 <sup>c</sup>	19.0±0.0 <sup>b</sup>	8.3±0.9 <sup>a</sup>	3056.9±251.5 <sup>a</sup>	37.5±3.6 <sup>ab</sup>
		R8	44.8±0.5 <sup>c</sup>	18.1±0.2 <sup>b</sup>	12.2±0.2 <sup>b</sup>	—	46.9±1.9 <sup>b</sup>

平均±標準誤差

各年度における表中右肩の異なるアルファベットは 5%水準で有意差あり

\* — = 測定値なし



表 2-4 エンレイ及び CX1834 の収量と収量構成要素の比較

実施 年度	品種 / 系統	着莢数	一莢内 子実粒数	百粒重 (g)	個体当たり 子実粒数	子実収量 (kg 10 a <sup>-1</sup> )
2005	エンレイ	69.4±4.9 <sup>a</sup>	1.78±0.03 <sup>a</sup>	25.3±1.3 <sup>b</sup>	119±9.9 <sup>a</sup>	361±40.1 <sup>a</sup>
	CX1834	94.1±10.0 <sup>b</sup>	2.08±0.04 <sup>b</sup>	18.6±0.5 <sup>a</sup>	190±20.0 <sup>b</sup>	378±11.3 <sup>a</sup>
2008	エンレイ	73.1±3.8 <sup>a</sup>	0.63±0.03 <sup>a</sup>	32.4±0.1 <sup>b</sup>	45±3.4 <sup>a</sup>	145±11.7 <sup>a</sup>
	CX1834	102.0±3.8 <sup>b</sup>	1.00±0.04 <sup>b</sup>	23.5±0.3 <sup>a</sup>	100±4.9 <sup>b</sup>	226±11.3 <sup>b</sup>

平均±標準誤差

各年度における表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

表 2-5 エンレイ及び CX1834 の子実中のリン画分

実施年度	品種・系統	TP	PP	Pi	Pc
		(mg g <sup>-1</sup> DW)			
2005	エンレイ	8.07±0.11 <sup>a</sup>	5.32±0.14 <sup>b</sup>	0.70±0.02 <sup>a</sup>	2.05±0.08 <sup>a</sup>
	CX1834	7.99±0.14 <sup>a</sup>	2.14±0.05 <sup>a</sup>	3.92±0.11 <sup>b</sup>	2.03±0.11 <sup>a</sup>
2008	エンレイ	7.86±0.11 <sup>a</sup>	5.50±0.11 <sup>b</sup>	0.55±0.01 <sup>a</sup>	1.81±0.04 <sup>a</sup>
	CX1834	10.9±0.12 <sup>b</sup>	2.55±0.05 <sup>a</sup>	6.08±0.05 <sup>b</sup>	2.22±0.03 <sup>a</sup>

平均±標準誤差

各年度における表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

TP; 全リン、PP; フィチン態リン、Pi; 無機態リン、Pc; 細胞膜構成リン

表 2-6 エンレイ及び CX1834 における子実成分

実施年度	品種・系統	K	Mg	Ca	粗タンパク質
		(mg g <sup>-1</sup> DW)			
2005	エンレイ	14.2±1.4 <sup>a</sup>	3.24±0.09 <sup>a</sup>	1.72±0.18 <sup>a</sup>	379±4.6 <sup>a</sup>
	CX1834	13.6±0.9 <sup>a</sup>	3.41±0.09 <sup>a</sup>	3.68±0.19 <sup>b</sup>	368±5.7 <sup>a</sup>
2008	エンレイ	18.7±0.1 <sup>a</sup>	2.51±0.05 <sup>a</sup>	1.73±0.23 <sup>a</sup>	409±4.6 <sup>a</sup>
	CX1834	19.8±0.3 <sup>a</sup>	2.39±0.03 <sup>a</sup>	2.45±0.15 <sup>a</sup>	396±4.2 <sup>a</sup>

平均±標準誤差

各年度における表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

表 2-7 エンレイ及び CX1834 における子実外観、種皮重率及び豆乳中固形物抽出率(10 倍加水)

品種・系統	粒大	種皮色	臍色	種皮重率	豆乳中固形物
				(%)	抽出率(%)
CX1834	中	黄	黒	7.7±0.2 <sup>b</sup>	53.2±1.2 <sup>a</sup>
エンレイ	大	黄	黄	5.9±0.1 <sup>a</sup>	64.4±0.0 <sup>b</sup>

平均±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

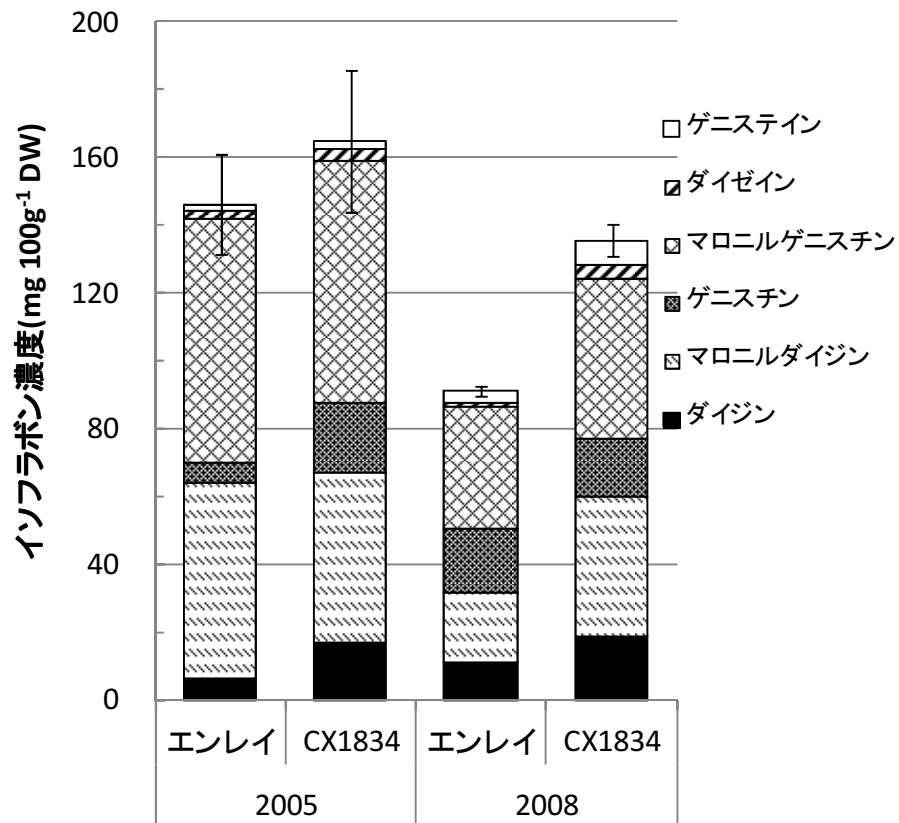


図 2-1

エンレイ及び CX1834 の子実中のイソフラボン濃度

エラーバーは総イソフラボン濃度の標準誤差

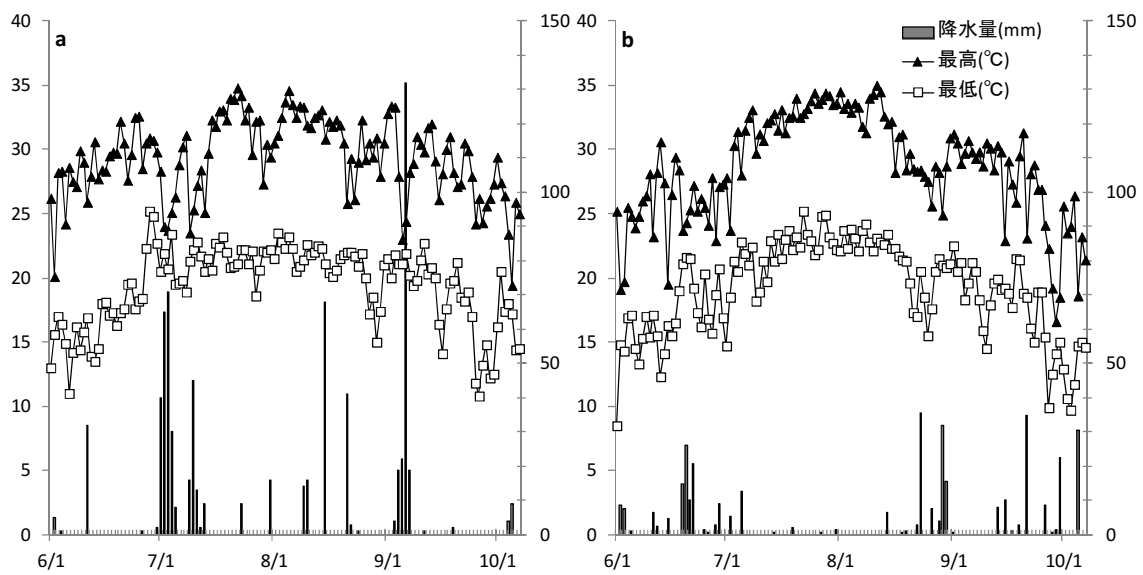


図 2-2 (a)2005 年及び(b)2008 年の栽培期間中における気象庁による東広島の  
気象データ

## 第 3 章

丹波黒と低フィチンダイズ CX1834

交配系統の生育及び品質特性の比較

## 第1節 緒言

第2章では、低フィチン系統 CX1834 がエンレイと同程度の収量を示し、また各種ミネラル、タンパク質およびイソフラボン濃度においても普通栽培品種のエンレイとほぼ同程度であったことから、植物がリンを蓄積する方法としてフィチン態リンを生産する一方で、種子中のフィチン態リンの蓄積量を低下させても、その生育や収量および栄養成分に対して負の影響を及ぼさないことを明らかにした。しかし、その一方で、低フィチン系統 CX1834 では、豆腐加工の際の歩留まりに大きな影響を及ぼすことが知られている種皮重率(中村ら、1995)がやや高いなど、その食用品種としての問題も生じた。

そこで、より高品質でフィチン酸濃度の低い系統の育成を目的に、2004年に低フィチン系統 CX1834 と入手できた普通栽培品種約 30 品種を交配した。そのうち、普通栽培品種である丹波黒(♀種子親)と低フィチン系統 CX1834(♂花粉親)の交配で F1 種子を得ることができ、これを養成後、F2 世代から F5 世代まで系統育種法により世代を進めてきた(図 3-1)。選抜は、生育が旺盛で子実収量の多かった個体の子実数粒の無機態リン酸濃度を、半粒法を用いて調べ、無機リン酸濃度の多かった個体を系統として翌年栽培することにより実施した。ここで無機態リン酸の濃度を調べるのは、低フィチン穀類ではフィチン態リン酸濃度が減少する分、無機態リン酸濃度が増加することが分かっており、より分析が簡易である無機態リン酸濃度がフィチン酸濃度の指標となるためである。また、半粒法はイネの育種でも用いられる方法で、種子の胚の反対側 1/3 程度を切り出して分析に用い、求めている形質が検定されたものについて、胚のある方を播いて、栽培育成する方法である。

選抜過程で、種皮色が黄白～黄の系統もあったが、交配親の臍色が共に黒であることから、食用への応用も視野に入れると更に白目品種と交配、選抜する必要が考えられたため、本研究では試料として用いなかった。また、ダイズ食

品の高付加価値化として、有色ダイズの利用加工が進められている(田畑ら、1995; 秋山ら、1999)。種子親が丹波黒であることから、有色であることによる高付加価値化、さらに丹波黒のブランド力に着目し、子実外観が丹波黒に似た低フィチン系統の育成を目指した。

本章では、より収量性が高く品質の良い系統を選抜した。その結果、2009年に得られた F5 世代個体 T-2-250-4-20 に着目し、生育特性や収量性などの基本的な特性を明らかにしようとした。さらに、2010年に得られた F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 の収量性について生産性試験を行い解析した。

## 第 2 節 材料及び方法

### 1) 供試植物と栽培条件

#### (1)2009 年度栽培試験

低フィチン系統 CX1834、丹波黒及び低フィチン交配系統 F5 世代個体の T-2-250-4-20 の計 3 品種・系統を用いた。2009 年 6 月 13 日にペーパーポットへ播種し、6 月 26 日に圃場に移植、株間 50 cm、畝間 90 cm、1 株 1 本植えて均一栽培した。pH 調整のため移植前に苦土石灰(300 kg 10 a<sup>-1</sup>)を施用し、基肥は与えず、適宜追肥した。7 月 11 日に硫酸アンモニウムを N 成分で 7.5 kg 10 a<sup>-1</sup>、7 月 23 日に化成肥料(N : P : K = 6 % : 15 % : 13 %)を N 成分で 5 kg 10 a<sup>-1</sup> 施肥した。

#### (2)2010 年度栽培試験

丹波黒と、2009 年に栽培したものの中で生産性の高い系統として有望であると考えられた低フィチン交配系統 F6 世代個体の T-2-250-4-20-34 の計 2 品種・系統を用いた。2010 年 6 月 18 日にペーパーポットへ播種し、7 月 10 日に圃場に移植、株間 50 cm、畝間 100 cm で 5 m × 5 m を 1 区画として 2 品種・系統各々 3 区画作り、1 株 1 本植えて均一栽培した。pH 調整のため移植前に苦土石灰(300 kg 10 a<sup>-1</sup>)を施用し、基肥は与えず、適宜追肥した。7 月 18 日に硫酸アンモニウムを N 成分で 7.5 kg 10 a<sup>-1</sup>、化成肥料(N : P : K = 6 % : 15 % : 13 %)を N 成分で 5 kg 10 a<sup>-1</sup> 施肥した。

#### (3)サンプリングの時期と調査、分析項目

両年とも R8 期に主茎長、主茎節数、総節数、個体当たり子実粒数、百粒重を調査した。また、2010 年には稔実着莢数や一莢内粒数、単位面積当たりの子実収量も求めた。なお、百粒重は第 2 章と同様に調査した。



2) 子実中の各形態リン、各種ミネラル及び粗タンパク質の分析

第 2 章の分析法に準じた。

3) 子実中の全糖、粗灰分及び粗脂肪の分析

子実中の全糖濃度は、微粉碎試料を熱エタノール抽出し、アントロン法(Spiro, 1966)により分析した。吸光度(630 nm)の測定結果からグルコース当量の全糖濃度を算出した。粗灰分の分析には電気マッフル炉を使用し、乾式灰化法で測定した。粗脂肪はジエチルエーテルを用いたソックスレー法(Thiex *et al.*, 2003)で抽出、分析した。

### 第3節 結果

#### 1) 2009年度栽培試験

##### (1)生育特性

表3-1にT-2-250-4-20とCX1834と丹波黒の各生育ステージの時期を示した。T-2-250-4-20の開花は8月上旬に始まり、着莢は8月中旬から始まった。また、登熟期はCX1834より遅く、丹波黒より若干早い11月上～中旬であった。

表3-2に各品種・系統の生育特性と収量構成要素を示した。T-2-250-4-20の主茎長や主茎節数は丹波黒やCX1834よりも有意に大きい値を示した。また、T-2-250-4-20の総節数は、丹波黒とは有意差が見られなかったが、CX1834の約4.97倍とCX1834より有意に大きい値を示した。T-2-250-4-20の百粒重はCX1834の約1.81倍と大きく、丹波黒より12.9%少なかったが、個体当たりの子実収量は丹波黒の約1.35倍と多かった。

表3-3に子実の形態的特性と種皮重率を示す。T-2-250-4-20は子実の形態的特性(粒大、粒形、種皮色、臍色、種皮光沢、裂皮性、子葉色)において丹波黒と同じ分類となり、種皮重率はCX1834と丹波黒とも5%水準で有意差は見られなかった。

##### (2)子実の品質

各品種・系統の子実成分を表3-4と図3-2に示した。T-2-250-4-20のTP濃度は $6.59 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ で、CX1834と丹波黒ではそれぞれ $7.26$ と $7.72 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ であった(図3-2)。T-2-250-4-20の子実中TP濃度は他のものよりわずかに低かったものの、目立った違いはこれらの品種・系統間になかった。T-2-250-4-20のPPのTP比は23.1%、CX1834では30.3%と、どちらも丹波黒の68.6%の半分以下で、PiのTP比はT-2-250-4-20で75.0%、CX1834では66.1%と、丹波黒の3.5%の約20倍高かった。

T-2-250-4-20におけるCa、Mg、Kそして粗タンパク質の子実中の濃度は

丹波黒や CX1834 のものと同程度であった(表 3-4)。CX1834 の粗脂肪濃度が他の品種・系統より若干高かった。

## 2) 2010 年度栽培試験

### (1) 生育特性

表 3-5 に T-2-250-4-20-34 と丹波黒について 2010 年度の栽培試験における生育特性を示した。T-2-250-4-20-34 は主茎長では丹波黒の約 1.56 倍、主茎節数では約 1.31 倍と、共に有意に大きい値を示した。T-2-250-4-20-34 は総節数でも丹波黒より大きい値を示したが、有意差は見られなかった。

T-2-250-4-20-34 の稔実莢数は丹波黒の約 1.25 倍、一莢内子実粒数は約 1.29 倍と共に 5 %水準で有意に多かった(表 3-6)。また、百粒重は丹波黒の約 0.79 倍と少なかった。個体当たりの子実収量は丹波黒の約 1.24 倍と多く、単位面積当たりの子実収量でも約 1.22 倍であり、共にも多い傾向が見られた。

### (2) 子実の品質

図 3-3 に T-2-250-4-20-34 と丹波黒の子実中の各形態リンの画分を示した。T-2-250-4-20-34 の TP 濃度は  $7.80 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  で、丹波黒では  $8.54 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  であった。T-2-250-4-20-34 の子実中 TP 濃度は丹波黒よりもやや低かったが、大きな違いはこれらの品種・系統間になかった。T-2-250-4-20-34 の PP の TP 比は 17.8 %で、丹波黒の 70.1 %の約 4 分の 1 であった。一方、T-2-250-4-20-34 の Pi の TP 比は 60.1 %と、丹波黒の 5.1 %の約 20 倍高かった。

#### 第4節 考察

F5 世代個体 T-2-250-4-20 の開花、着莢の生育ステージは丹波黒より早く、CX1834 より遅かったが、T-2-250-4-20 における登熟期は丹波黒よりわずかに早い程度であった(表 3-1)。このことから、T-2-250-4-20 は晩生品種に分類されると考えられる。T-2-250-4-20 の主莖長、主莖節数が丹波黒より大きな値を示したが、総節数では有意差が見られなかったことから、T-2-250-4-20 は丹波黒に比べ、主莖の伸長が旺盛で分枝の伸長が少ない系統であると推察される(表 3-2)。

T-2-250-4-20 の百粒重は丹波黒よりも小さい値を示したものの(表 3-2)、粒大は「9: 極大」に分類された(表 3-3)。T-2-250-4-20 の個体当たりの子実収量は丹波黒よりも多く(表 3-2)、T-2-250-4-20 は日本の普通栽培品種である丹波黒と比較しても十分な生育能力と生産性を示すことが示唆された。表 3-1 に示したように、T-2-250-4-20 の開花、着莢の生育ステージは丹波黒より早く、登熟期はわずかに早い程度で、着莢の期間が丹波黒よりも長かったことから、着莢数が丹波黒より多くなり、その結果、子実収量が丹波黒を上回ったと推察される。

粒大で「9: 極大」に分類された T-2-250-4-20 と丹波黒の種皮重率は、「4: 中の小」に分類された CX1834 の種皮重率との間に 5%水準で有意な差は見られなかった(表 3-3)。

F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 の主莖長、主莖節数は丹波黒より大きな値を示したが、総節数では有意差が見られなかった。このことから、T-2-250-4-20-34 は丹波黒に比べ、主莖の伸長が旺盛で分枝の伸長が少ない特性があると言える(表 3-2)。

T-2-250-4-20-34 の稔実莢数、一莢内粒数は丹波黒より多かったが、百粒重は丹波黒よりも小さい値を示し、粒大は「7: 大」に分類された(表 3-2、3-3)。

T-2-250-4-20-34 の個体当たりの子実収量は丹波黒よりも多く、T-2-250-4-20-34は日本の普通栽培品種である丹波黒と比較しても十分な生育能力と生産性を有することが示唆された。

F5 世代個体 T-2-250-4-20 と F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 において、共にその主茎長、主茎節数は丹波黒より大きな値を示したが、総節数では有意差が見られなかった。このことから、両系統は丹波黒に比べ、主茎の伸長が旺盛で分枝の伸長が少ない特性があり、この生育特性が安定して受け継がれていることが示唆された。

子実中の TP 濃度は 2009 年には各品種・系統とも  $7 \text{ mg g}^{-1}$  DW 前後で大きな差はなかった。2010 年の試験においても両品種・系統とも  $8 \text{ mg g}^{-1}$  前後と大きな差は見られなかった(図 3-2、3-3)。

2009 年度の試験において、T-2-250-4-20 の PP の TP 比は 23.1 %、CX1834 では 30.3 %と、どちらも丹波黒の 68.6 %の半分以下で、Pi の TP 比は T-2-250-4-20 で 75.0 %、CX1834 では 66.1 %と、丹波黒の 3.5 %の約 20 倍高かった。このことから、T-2-250-4-20 は CX1834 から低フィチンの形質を受け継いでいることが示唆された。

さらに、PP 濃度は、丹波黒では  $5.29 \text{ mg g}^{-1}$ (2009 年)と  $5.98 \text{ mg g}^{-1}$ (2010 年)で、年度間で大きな差は見られなかった。また、F5 世代個体 T-2-250-4-20 と F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 ではそれぞれ  $1.57 \text{ mg g}^{-1}$  と  $1.39 \text{ mg g}^{-1}$  であり、世代が進んでも PP 濃度に大きな変化は見られず、いずれも丹波黒に比べ 70~77%低かった。一方で、丹波黒の Pi 濃度は  $0.27\sim 0.44 \text{ mg g}^{-1}$  であったのに対し、F5 世代個体 T-2-250-4-20 では  $4.34 \text{ mg g}^{-1}$ 、F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 では  $4.69 \text{ mg g}^{-1}$  であり、丹波黒に比べ 11 倍(2010 年)~16 倍(2009 年)と著しい増加が見られた。以上より、本試験で用いた低フィチン交配系統では、F5 世代から F6 世代へと世代が進んでも、低フィチンの形質が安定して受け継が

れていることが明らかになった。

2009年の栽培試験において、Ca、Mg、Kの濃度に品種・系統間で目立った違いは見られなかった(表 3-4)。これまでの調査事例によると(Taira and Taira, 1971; 平ら、1977; 赤木ら、2009)、Ca濃度は $0.96\sim 5.24\text{ mg g}^{-1}$ 、Mg濃度は $1.91\sim 3.53\text{ mg g}^{-1}$ 、K濃度は $11.0\sim 22.8\text{ mg g}^{-1}$ を示したと報告している。また、沼田(1998)は、豆腐用品種 15 品種の組成成分について調べた結果、粗タンパク質濃度は $339\sim 406\text{ mg g}^{-1}$ の間に、粗脂肪濃度は $158\sim 211\text{ mg g}^{-1}$ 、全糖は $198\sim 287\text{ mg g}^{-1}$ 、粗灰分は $46\sim 58\text{ mg g}^{-1}$ に分布していたと報告している。本研究における T-2-250-4-20 の粗タンパク質、粗脂肪、全糖、粗灰分の濃度は、それぞれ 316、176、224 と  $52.5\text{ mg g}^{-1}$ であった。このことは、T-2-250-4-20 における粗タンパク質濃度は豆腐用品種に比べ低いものの、ミネラル、粗脂肪、そして全糖の濃度は豆腐加工に適切であることを示唆している。

2009年における CX1834 の粗タンパク質濃度は  $308\text{ mg g}^{-1}$  であり、T-2-250-4-20 でも  $316\text{ mg g}^{-1}$  であった。しかし、この粗タンパク質濃度は沼田(1998)の報告に比べてやや低かった。また、栽培品種の丹波黒においてもその粗タンパク質濃度は  $308\text{ mg g}^{-1}$  と低かった。この原因が栽培条件によるものか不明であり、粗タンパク質濃度についてはさらに詳細に解析する必要がある。

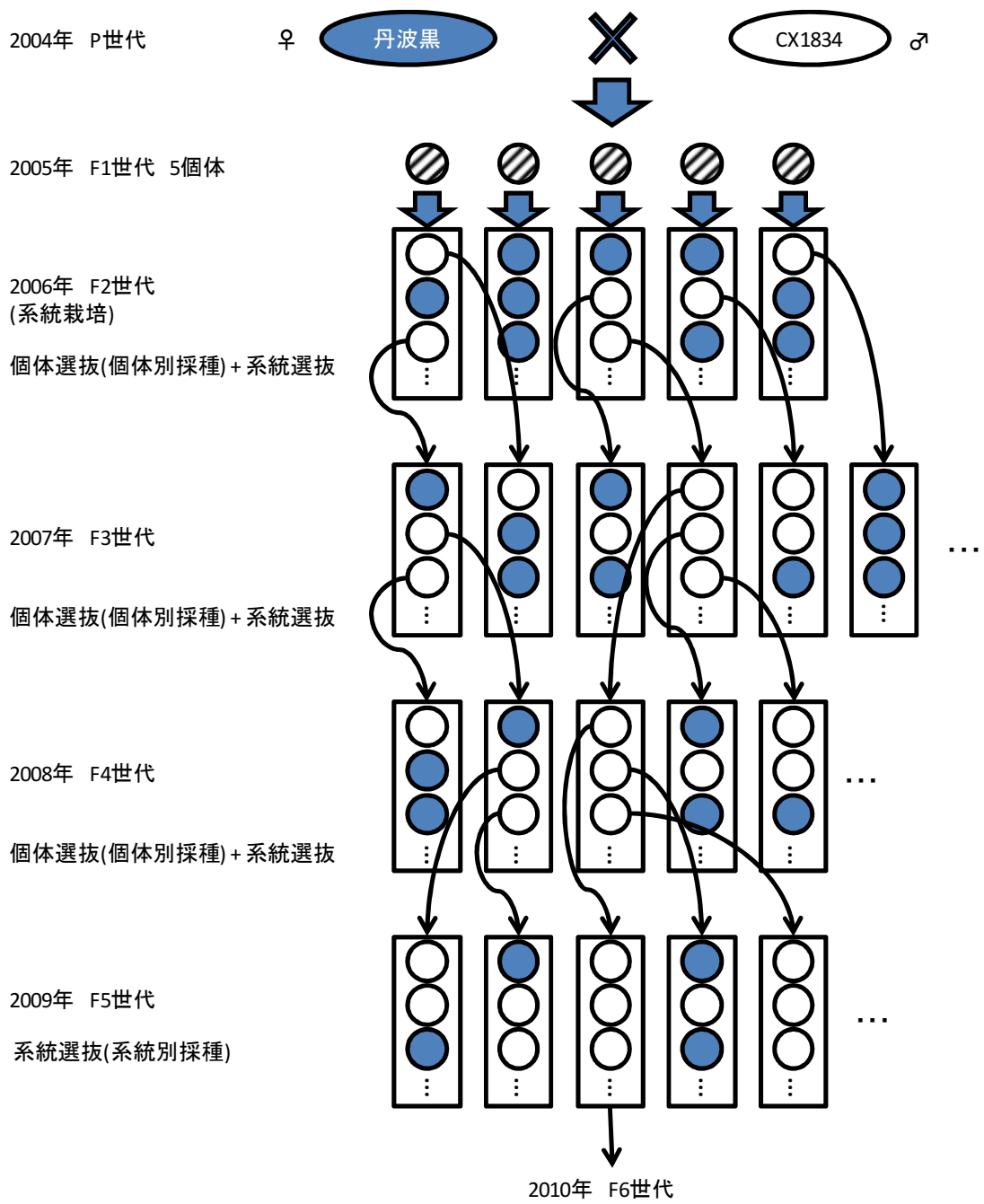


図 3-1 系統育種法概略図

- ; 低フィチン個体
- ; 高フィチン個体
- ⊗ ; フィチン酸濃度の不明な個体

表 3-1 T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒における生育ステージ(2009 年)

品種・系統	播種期	R1 期	R5 期	R8 期
T-2-250-4-20	6/12	8/8	8/18	11/13
CX1834	6/12	8/1	8/12	10/15
丹波黒	6/12	8/14	8/25	11/17

表 3-2 T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒における生育特性と収量構成要素  
(2009 年)

品種・系統	主茎長	主茎節数	総節数	百粒重	個体当たり 子実収量
	(cm)			(g)	(g)
T-2-250-4-20	72.0±2.5 <sup>c</sup>	21.9±0.6 <sup>c</sup>	188.9±7.3 <sup>b</sup>	40.3±0.3 <sup>b</sup>	112±4.7 <sup>c</sup>
CX1834	28.2±1.0 <sup>a</sup>	14.0±0.5 <sup>a</sup>	38.4±2.1 <sup>a</sup>	22.2±0.3 <sup>a</sup>	22±1.4 <sup>a</sup>
丹波黒	56.8±1.2 <sup>b</sup>	18.4±0.3 <sup>b</sup>	173.5±4.9 <sup>b</sup>	46.2±0.6 <sup>c</sup>	83±5.1 <sup>b</sup>

平均値±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり



表 3-3 T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒の子実の形態的特性と種皮重率  
(2009 年)

品種・系統	粒大	粒形	種皮色	臍色	種皮 光沢	裂皮 性	子葉 色	種皮重率 (%)
T-2-250-4-20	極大	楕円体	黒	黒	無	難	黄	6.8±0.2 <sup>a</sup>
CX1834	中の小	楕円体	黄	黒	やや有	難	黄	7.0±0.2 <sup>a</sup>
丹波黒	極大	楕円体	黒	黒	無	難	黄	6.8±0.4 <sup>a</sup>

平均値±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

表 3-4 T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒の子実中における Ca、Mg、K、粗タンパク質、粗脂肪、全糖、粗灰分の濃度(2009 年)

品種・系統	K	Mg	Ca	粗タンパク質	粗脂肪	全糖	粗灰分
	(mg g <sup>-1</sup> )						
T-2-250-4-20	15.2±0.2 <sup>a</sup>	2.32±0.05 <sup>a</sup>	1.36±0.18 <sup>a</sup>	316±11.5 <sup>a</sup>	176±2.6 <sup>a</sup>	200±5.3 <sup>a</sup>	52.5±0.9 <sup>a</sup>
CX1834	16.5±0.4 <sup>a</sup>	2.20±0.05 <sup>a</sup>	1.61±0.17 <sup>b</sup>	308±11.9 <sup>a</sup>	215±5.2 <sup>b</sup>	202±5.1 <sup>a</sup>	59.1±1.2 <sup>b</sup>
丹波黒	16.4±0.4 <sup>a</sup>	2.29±0.05 <sup>a</sup>	1.10±0.11 <sup>a</sup>	308±11.6 <sup>a</sup>	170±12.8 <sup>a</sup>	170±12.8 <sup>a</sup>	54.1±1.5 <sup>a</sup>

平均値±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

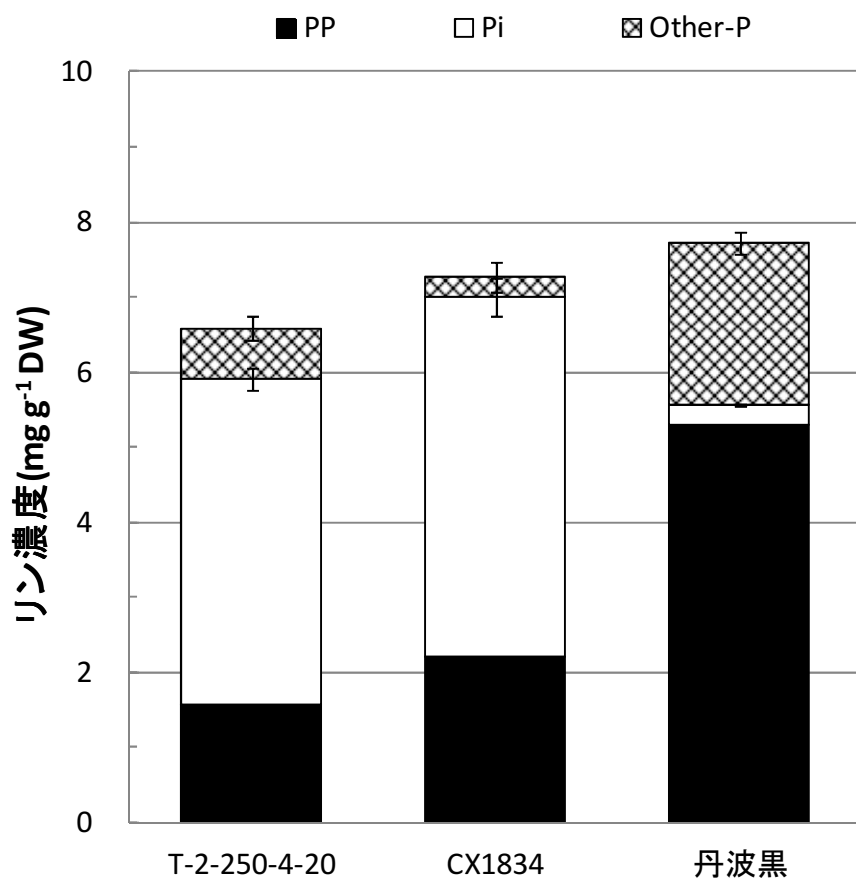


図 3-2

T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒の子実中のリン画分(2009 年)

PP; フィチン態リン、 Pi; 無機態リン、 Other-P; その他のリンは全リンから  
PP と Pi を減じて算出

エラーバーは Pi と全リン濃度の標準誤差

表 3-5 T-2-250-4-20-34 及び丹波黒における生育特性(2010 年)

品種・系統	主茎長	主茎節数	総節数
	(cm)		
T-2-250-4-20-34	74.9±2.3 <sup>b</sup>	22.2±0.6 <sup>b</sup>	159.0±6.2 <sup>a</sup>
丹波黒	48.0±1.1 <sup>a</sup>	17.0±0.4 <sup>a</sup>	141.1±7.0 <sup>a</sup>

平均値±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

表 3-6 T-2-250-4-20-34 及び丹波黒における収量構成要素(2010 年)

品種・系統	稔実莢数	一莢内	百粒重	粒大	個体当たり	子実
		子実粒数			子実収量	収量
		(g)			(g)	(kg 10 a <sup>-1</sup> )
T-2-250-4-20-34	193.8±10.7 <sup>b</sup>	1.61±0.06 <sup>b</sup>	33.7±0.6 <sup>a</sup>	大の小	102±5.4 <sup>b</sup>	201±23.5 <sup>a</sup>
丹波黒	155.5±11.3 <sup>a</sup>	1.25±0.05 <sup>a</sup>	42.6±0.9 <sup>a</sup>	極大	82±6.9 <sup>a</sup>	164±34.6 <sup>a</sup>

平均値±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

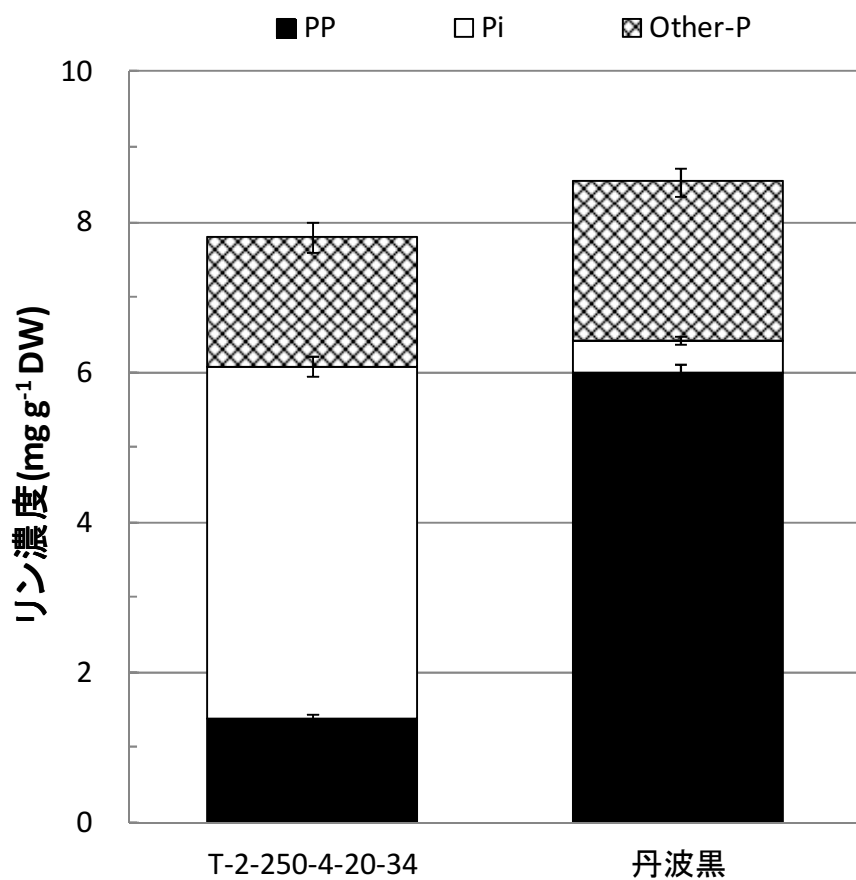


図 3-3

T-2-250-4-20-34 及び丹波黒の子実中のリン画分(2010年)

PP; フィチン態リン、 Pi; 無機態リン、 Other-P; その他のリンは全リンから  
PP と Pi を減じて算出

エラーバーは PP、 Pi、 全リン濃度の標準誤差

## 第 4 章

丹波黒と低フィチンダイズ CX1834

交配系統の豆腐加工適性の評価

## 第 1 節 緒言

第 3 章では低フィチン系統 CX1834 と丹波黒を交配親とする低フィチン系統 F5 世代個体の T-2-250-4-20 と F6 世代個体の T-2-250-4-20-34 の生育特性や収量性について検討した。その結果、F5 世代 T-2-250-4-20 と F6 世代 T-2-250-4-20-34 において、共にその主莖長、主莖節数は丹波黒より大きな値を示したが、総節数では有意差が見られなかった。このことから、両系統は丹波黒に比べ、主莖の伸長が旺盛で分枝の伸長が少ない特性があり、この生育特性が安定して受け継がれていることが示唆された。また、両系統の個体当たりの子実収量は丹波黒よりも多く(表 3-2、3-6)、この低フィチン交配系統は日本の普通栽培品種である丹波黒と比較しても十分な生育能力と生産性を持ち、後代にも受け継がれていることが示唆された。

国産大豆は、そのおよそ 54 %が豆腐加工用として利用されている。近年、フィチン酸が豆腐の加工適性に影響を及ぼすことが明らかとなり、フィチン酸と豆腐の凝固に関係した研究が報告されている(Saio *et al.*, 1969; Toda *et al.*, 2003; 2006; Ishiguro *et al.*, 2006)。豆腐カード形成には、凝固剤由来のカチオンがダイズタンパク質の負の電荷を中和し、サブユニットを会合させることによる三次元網状構造の形成が係わっている(村田、1995)。また、豆乳中のフィチン酸のリン酸基にカチオンが結合することにより  $H^+$ が放出され、その結果、pH が低下してタンパク質の凝集が起こる(Ono *et al.*, 1993)。そして、pH 低下のみによる凝集は、カチオンによるタンパク質の溶解度減少が起きる pH よりも低い pH で起こる。そのため、凝固剤添加による凝集は、凝固剤由来のカチオンにより凝集が始まり、さらに pH が低下することにより、凝集が促進されると考えられる。添加される「にがり」の濃度が低い場合、そのリン酸基の緩衝作用のため、フィチン酸の多い豆乳では pH の低下により多くのカチオンが必要となり、その結果、タンパク質凝固に必要なカチオンが不足し、豆腐カー

ド形成が妨げられると考えられる(Toda *et al.*, 2003; Toda *et al.*, 2006)(図 4-1)。

そこで本章では、第 3 章までの選抜で得られた低フィチン系統について、豆腐加工適性を評価すると同時に、フィチン酸が豆腐の凝固にどのような影響を及ぼすかを検討した。

## 第 2 節 材料及び方法

### 1) 供試材料

豆腐加工適性試験には第 3 章で示した 2009 年度に採種した低フィチン系統 CX1834、丹波黒及び交配系統 F5 世代個体の T-2-250-4-20 の計 3 品種・系統を用いた。

### 2) 豆乳の抽出(7 倍加水)

平(1982)、谷藤と加藤(2004)の方法を参考に、大豆から豆乳を加熱絞り法で抽出した。原料ダイズ 80 g を秤量したのち、水で洗い、種子重量の約 4 倍の水を加え、恒温器で 25 °C、15 hr 浸漬した。その後、水を切り、浸漬ダイズの重量を測定し、吸水量を算出した。原料ダイズの乾物重の 7 倍量から吸水量を減じた量の水を添加水として用意した。浸漬ダイズを湿式ミキサー(Vita-Mix 社)に入れ、添加水を徐々に入れながら攪拌し、全体がスムーズに攪拌し始めたから水の投入をやめ、蓋をし、さらに回転数を上げ 1 分 30 秒磨砕し、生呉とした。事前に重量を測定しておいたテフロン鍋に生呉を移し、ミキサー容器の壁面に付着した呉も残りの添加水で洗いながら鍋に移した。鍋と生呉の総重量を測定し、消泡剤としてクルトン(花王株式会社、東京)を原料ダイズの 0.6 % 添加した。卓上電磁調理器の「強」で呉の温度変化を確認しながら沸騰が始まるまで加熱し、沸騰し始めたら呉の温度が 95 °C 以上であることを確認して、さらに「弱」で 7 分間加熱した。加熱中は焦げ付かないよう注意しながらゴムべらで混ぜた。鍋と加熱呉の総重量を測定し、蒸発した水分量を算出して 85 °C 以上の湯を加えて補った。加熱呉を蒸し布で濾し、さらに油圧プレス機にかけ、豆乳を搾った。搾った豆乳は細目のナイロンメッシュを通して微塵を除去し、得られた豆乳量を測定した。豆乳は放冷し、豆腐を作るまで冷蔵庫内で保管した。



### 3) 豆乳の抽出(10倍加水)

第2章の方法に準じた。

### 4) 豆腐の作成

まず、豆腐作成用容器(25 mL 容シリンジ)を Ishiguro *et al.* (2006)を参考に作成した。25 mL 容プラスチック製シリンジの針側を切り取り、そこにゴム製のストッパーを凸面が内側になるよう取り付け付けた。

よく冷やした豆乳を 50 mL 容ビーカーに 28 g 採取し、事前に作成しておいた  $\text{MgCl}_2$  溶液(濃度 18.25 %)を最終濃度が  $3.1 - 15.7 \text{ mmol L}^{-1}$ になるよう添加し、すばやくガラス棒で攪拌し、1 処理の豆乳を豆腐作成用容器にほぼ全量入れた。80°Cで 60 min 湯浴後、流水で 10 min 冷却した。

### 5) 豆乳の pH 及び豆乳と豆腐のフィチン酸の分析

豆乳の pH は pH メーター(pH/ion meter F-23、HORIBA)で測定した。豆乳及び豆腐中のフィチン酸の分析は Raboy and Dickinson(1987)の方法を参考にした。それぞれを凍結乾燥器(EYELA FDU-2200、東京理化学工業株式会社)で凍結乾燥し、その乾燥試料を分析に用いた。分析は第2章に従って実施した。

### 6) 豆腐の粗タンパク質の分析

豆腐を凍結乾燥器で乾燥した後、セミマイクロケルダール法(第十五改正 日本薬局方、2006)で分析した。

### 7) 豆腐の破断応力測定

豆腐の破断応力はレオメーター(NRM-2002J、不動工業)を用いて測定した。

シリンジから 13 mm ずつ押し出し、切断したシリンジ中央部の 3 個の豆腐カード(高さ 13 mm、直径 20 mm)の破断応力を、直径 15 mm の円筒形プランジャーで圧縮速度 1 mm sec<sup>-1</sup> の条件で加圧し測定した。

#### 8) 豆乳中タンパク質の組成(SDS-PAGE)

Yagasaki *et al.* (1997)の方法を参考に分析した。豆乳を冷却遠心機で 4 °C、約 10,000 ×g、20 min 遠心分離し、上澄みをさらに 4 °C、10,000 ×g、20 min 遠心分離した。得られた上澄み液を 5 倍希釈し、約 2 mL を 2.5 mL 容テルモシリンジ(ロックタイプ、針なし)に採った。0.80 μm ディスポーザブルフィルターユニット(DISMIC-25CS、ADVANTEC)に通した液を 0.45 μm マイクロフィルター遠心分離式ディスポーザブル限外ろ過器(CENTRICUT U-MO、倉敷紡績株式会社)を用いて、冷却遠心機で 4 °C、約 1,000 ×g、1 hr 遠心ろ過した。得られたろ液中のタンパク質量を BIO-RAD 社の DC プロテインアッセイ試薬を用い、マイクロアッセイ法で分析した。ろ液中のタンパク質濃度が 1 %(w w<sup>-1</sup>)になるよう蒸留水で希釈し、この希釈したろ液 1 mL にサンプル処理液 8 μL と 2-ME 1 μL を加え 90 °C 2 min 加熱処理した液を、15 μL ずつセルに流し込み 30 mA で 120 min 電気泳動にかけた。泳動後、染色液に浸漬した後、脱色し、脱色したゲルを GelDoc-It TS Imaging System (UVP)で撮影、ImageJ を用いてデンシトメトリー解析を実施した。

### 第3節 結果

#### 1) 子実の吸水倍率、豆乳の固形分率、pH、豆乳抽出率及びフィチン酸濃度

子実の吸水倍率は、T-2-250-4-20、CX1834及び丹波黒で、それぞれ2.21、2.27及び2.38倍であったが、品種・系統間での有意差は見られなかった(表4-1)。7倍加水で作成した豆乳では品種・系統間で固形分率に差はなかったが、10倍加水ではCX1834でやや低い結果となった(表4-1、4-2)。豆乳抽出率では品種・系統間に有意差は見られなかったが、原料ダイズ乾物当たりの豆乳中固形物抽出率に換算すると丹波黒がT-2-250-4-20やCX1834よりも5%水準で有意に高かった。丹波黒の豆乳のpHは6.69で、T-2-250-4-20及びCX1834のpHはそれぞれ6.55及び6.58であり、低フィチン系統で豆乳のpHが低下する傾向にあった(表4-2)。豆乳中のフィチン酸濃度は、丹波黒では $4.0 \text{ mmol L}^{-1}$ と高かったが、T-2-250-4-20及びCX1834では、丹波黒と比べてそれぞれ55%及び70%の低下が見られた。

#### 2) 豆腐の粗タンパク質及びフィチン酸濃度

T-2-250-4-20、CX1834及び丹波黒の豆腐の粗タンパク濃度は、それぞれ451、433及び $450 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ であり、CX1834でやや低かったものの、各品種・系統間で差は見られなかった(表4-1)。豆腐のフィチン酸濃度は、丹波黒に比べてT-2-250-4-20では82%、CX1834では71%減少した。

#### 3) 豆腐の凝固及び破断応力

丹波黒から作成した豆腐が $\text{MgCl}_2$ 濃度  $12.6 \text{ mmol L}^{-1}$ で最大破断応力を示したのに対して、T-2-250-4-20とCX1834から作成した豆腐は $\text{MgCl}_2$ 濃度  $9.5 \text{ mmol L}^{-1}$ で最大破断応力を示した(図4-2)。 $\text{MgCl}_2$ 濃度  $6.3 \text{ mmol L}^{-1}$ において、丹波黒から作成した豆腐では破断応力を測定できないほど柔らかくなったのに

対し、T-2-250-4-20 から作成した豆腐は依然高い破断応力を示した。また、 $\text{MgCl}_2$  濃度  $3.1\text{mmol L}^{-1}$  では破断応力を測定することが不可能であった。丹波黒から作成した豆乳は凝固しなかったが、CX1834 から作成したものはわずかに凝固した。また、T-2-250-4-20 から作った豆乳は凝固し豆腐カードを形成した(図 4-3)。

#### 4) 豆乳タンパク質の SDS-PAGE

供試した 3 品種・系統間で SDS-PAGE パターンの違いは見られなかった(図 4-4)。また、この SDS-PAGE から算出した 11S/7S 比は、T-2-250-4-20 で 3.36、CX1834 で 2.75、丹波黒で 2.99 であった。

#### 第 4 節 考察

子実の吸水倍率、7 倍加水豆乳の固形分率、そして豆腐の粗タンパク質において、品種・系統間で有意な差は見られなかった(表 4-1)。また 10 倍加水豆乳において、原料のダイズと水の合計重量に対して得られた豆乳割合を示す豆乳抽出率でも品種・系統間で有意な差は見られなかった。一方で、原料ダイズ乾物当たりの豆乳中固形物抽出率では丹波黒が他の低フィチン 2 系統に比べ有意に高く、10 倍加水豆乳の固形分率は T-2-250-4-20 と丹波黒が CX1834 より有意に高かった(表 4-2)。固形分率とは、豆乳中にタンパク質や炭水化物などのダイズの固形成分がどれだけ溶出しているかを示し、豆乳の濃さの指標となる。また、この固形分率を原料ダイズ乾物当たりに換算したのが、原料ダイズ乾物当たりの豆乳中固形物抽出率である。豆乳中固形物抽出率は最終加水倍率の違いなどの影響が排除された指標として用いられ、この値が高いほど豆腐の加工適性は高いと判断できる。すなわち、加水倍率 10 倍で豆乳を作成した際、丹波黒と T-2-250-4-20 からの豆乳は CX1834 からのものより濃厚な豆乳が得られ、原料ダイズ乾物当たりの固形成分の溶出量としては丹波黒が最も多かった。したがって、供試した 3 品種・系統の中では豆腐加工適性は丹波黒で最も高く、次いで T-2-250-4-20 で高いと考えられる。

加水倍率 10 倍で作成した豆乳の pH では低フィチン系統の 2 系統が丹波黒よりも 5 %水準で有意に低い値を示したが、平(1982)は国産ダイズ 60 品種 7 系統 105 サンプルについて pH を調べた結果、6.40~6.69 であったと報告しており、低フィチン系統においても国産品種と同様な値であった。

Toda *et al.* (2006)は豆乳中のフィチン態リン濃度は子実中のフィチン態リンと非常に高い相関関係を示すと報告している。フィチン酸は豆腐加工において凝固に影響すると考えられている(Torikata *et al.* 1987, Ono *et al.* 1993, Ishiguro *et al.* 2008)。MgCl<sub>2</sub>の必要量と凝固反応に対するフィチン酸濃度の影

響を調べるために、本試験では、様々な  $\text{MgCl}_2$  濃度で T-2-250-4-20 と CX1834、丹波黒から豆腐を作成し、その破断応力を測定した(図 4-2)。丹波黒から作成した豆腐が  $\text{MgCl}_2$  濃度  $12.6 \text{ mmol L}^{-1}$  で最大破断応力を示したのに対して、T-2-250-4-20 と CX1834 から作成した豆腐は  $\text{MgCl}_2$  濃度  $9.5 \text{ mmol L}^{-1}$  で最大破断応力を示した。 $\text{MgCl}_2$  濃度  $6.3 \text{ mmol L}^{-1}$  において、丹波黒から作成した豆腐では破断応力を測定できないほど柔らかくなったのに対し、T-2-250-4-20 から作成した豆腐は依然高い破断応力を示した。また、 $\text{MgCl}_2$  濃度が  $3.1 \text{ mmol L}^{-1}$  の時、丹波黒から作成した豆乳は凝固しなかった。一方、CX1834 ではわずかに凝固した。T-2-250-4-20 では破断応力を測定することが不可能であったものの、凝固し豆腐カードを形成した(図 4-3)。

豆腐加工において豆腐の硬さは、豆乳を熱することによりタンパク質を分離し、これに凝固剤を加えることにより基質タンパク質が形成されることによって生じる(Poysa *et al.* 2006)。豆乳中のタンパク質の量と質が豆腐加工に影響する。グリニシン(11S グロブリン)と  $\beta$ -コングリニシン(7S グロブリン)は、最も重要なタンパク質である。グリニシンは通常、6 量体を形成し、各々のモノマーユニットは S-S 結合した 1 つの酸(acidic)と 1 つのポリペプチド(basic)からなる。 $\beta$ -コングリニシンは、分子量 180 kDa の 3 量体糖タンパク質で、 $\alpha'$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  の 3 つのサブユニットからなる(Tezuka *et al.* 2004; Poysa *et al.* 2006)。11S タンパク質で作成した豆腐ゲルが 7S グロブリンで作成したものよりかなり硬く、11S グロブリンも 7S グロブリンより高い粘着性と弾力性を示す(Saio *et al.* 1971)。Toda *et al.*(2008)の報告によると、11S/7S 比が増加すると豆腐の最大破断応力を示す凝固剤濃度は減少する。粗グリニシンで作成した豆腐が粗  $\beta$ -コングリニシンで作成したものより硬く、この硬さの違いは S-S 結合の多さによることを Cai *et al.*(1997)が報告している。供試した豆乳中のタンパク質の SDS-PAGE パターンを図 4-4 に示す。供試した 3 品種・系統間でパターンの違

いは見られなかった。しかし、この SDS-PAGE から算出した 11S/7S 比は、T-2-250-4-20 で 3.36、CX1834 で 2.75、丹波黒で 2.99 であった。このように、T-2-250-4-20 では 11S/7S 比が CX1834 や丹波黒に比べて高く、このことが、凝固剤(MgCl<sub>2</sub>)がより低濃度の場合でも凝固した要因の一つであると考えられる。

豆腐の凝固には、本研究で着目した、タンパク質濃度やその質(11S/7S 比)、フィチン酸濃度、凝固剤の濃度などの他にも、タンパク質サブユニットの種類(Nishinari *et al.*, 1991; Poysa *et al.*, 2006)、脂質濃度(Guo *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2002)、多糖類や Ca イオンの濃度(Toda *et al.*, 2007)などの関与も指摘されている。このように豆腐の凝固には多くの成分が複雑に絡み合い、影響を及ぼしているが、その成分の相互作用について解明されていない点が多い。品種/系統間における豆腐の破断応力の序列関係が、凝固剤の濃度が変わると入れ替わったのは(図 4-2)、その様々な成分の相互作用の結果であると考えられ、さらに詳細な解析が必要である。

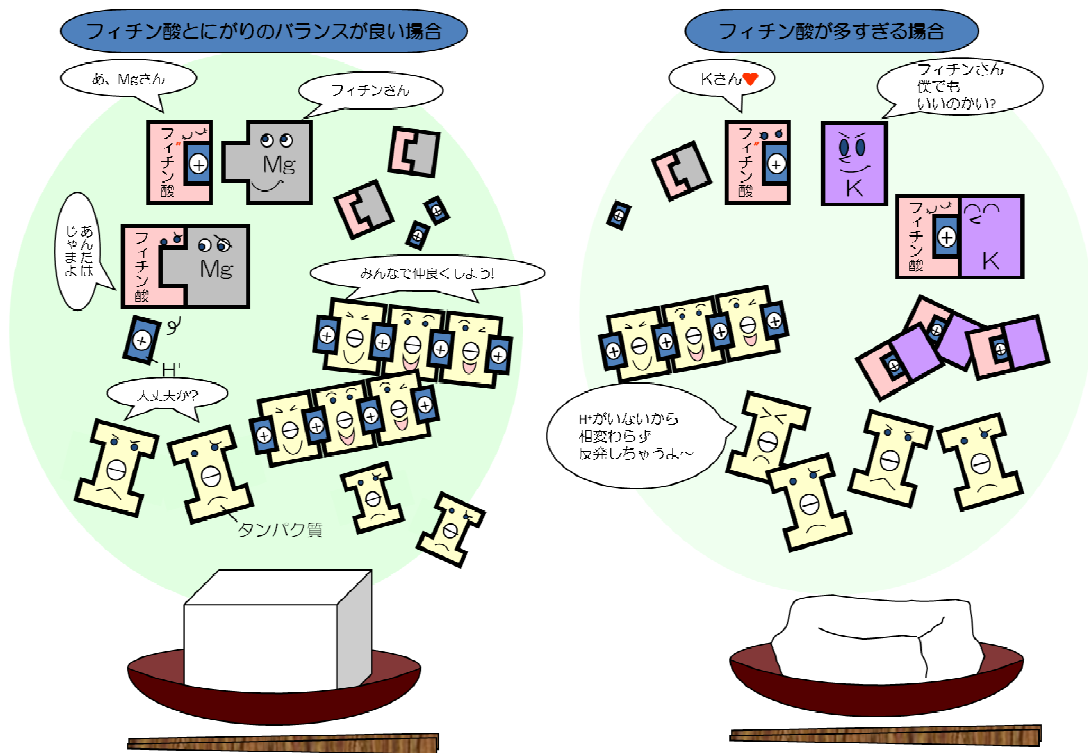


図 4-1 豆腐カード形成時のイメージ図

(日本農業新聞 2005 年 8 月 24 日『固まりにくい、固まりやすい豆腐の差は? 「鍵握るフィチン酸」量に見合ったにがり必要』を改変)



表 4-1 T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒から豆腐を作成した際の子実の吸水倍率、豆乳中の固形分率とフィチン酸濃度、豆腐中の粗タンパク質濃度とフィチン酸濃度(7 倍加水)

品種・系統	豆乳			豆腐	
	吸水倍率	固形分率	フィチン酸	粗タンパク質	フィチン酸
	(倍)	(%)	(mmol L <sup>-1</sup> )	(mg g <sup>-1</sup> DW)	(mg g <sup>-1</sup> DW)
T-2-250-4-20	2.21±0.13 <sup>a</sup>	9.68±0.10 <sup>a</sup>	1.2±0.6 <sup>a</sup>	451±12 <sup>a</sup>	4.6±0.2 <sup>a</sup>
CX1834	2.27±0.13 <sup>a</sup>	9.56±0.01 <sup>a</sup>	1.8±0.5 <sup>a</sup>	433±21 <sup>a</sup>	7.4±0.2 <sup>b</sup>
丹波黒	2.38±0.08 <sup>a</sup>	9.67±0.03 <sup>a</sup>	4.0±0.6 <sup>b</sup>	450±15 <sup>a</sup>	25.7±0.4 <sup>a</sup>

平均値±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

表 4-2 T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒から作成した豆乳の特性(10 倍加水)

品種・系統	豆乳抽出率	豆乳中固形物抽出率	固形分率	pH
	(%)	(%)	(%)	
T-2-250-4-20	76.9±0.1 <sup>a</sup>	61.3±0.3 <sup>a</sup>	7.2±0.0 <sup>b</sup>	6.55±0.01 <sup>a</sup>
CX1834	79.1±1.0 <sup>a</sup>	59.1±0.8 <sup>a</sup>	6.8±0.0 <sup>a</sup>	6.58±0.01 <sup>a</sup>
丹波黒	77.3±1.8 <sup>a</sup>	65.7±0.3 <sup>b</sup>	7.7±0.2 <sup>b</sup>	6.69±0.02 <sup>b</sup>

平均値±標準誤差

表中右肩の異なるアルファベットは 5 %水準で有意差あり

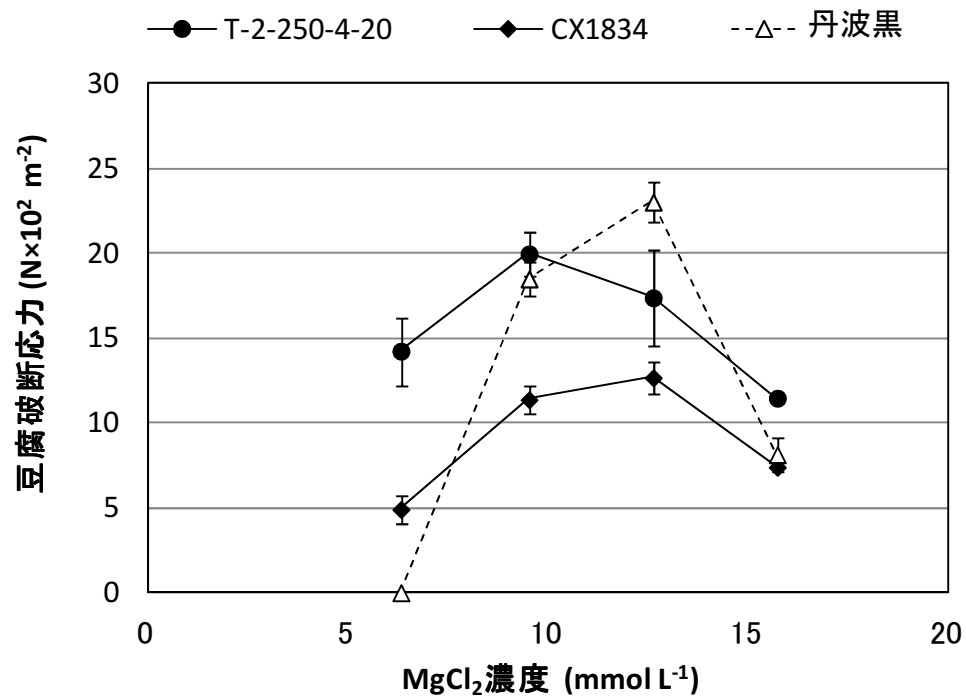


図 4-2

豆乳中の MgCl<sub>2</sub> 濃度と T-2-250-4-20、CX1834 及び丹波黒から作成した豆腐の破断応力との関係

エラーバーは標準誤差

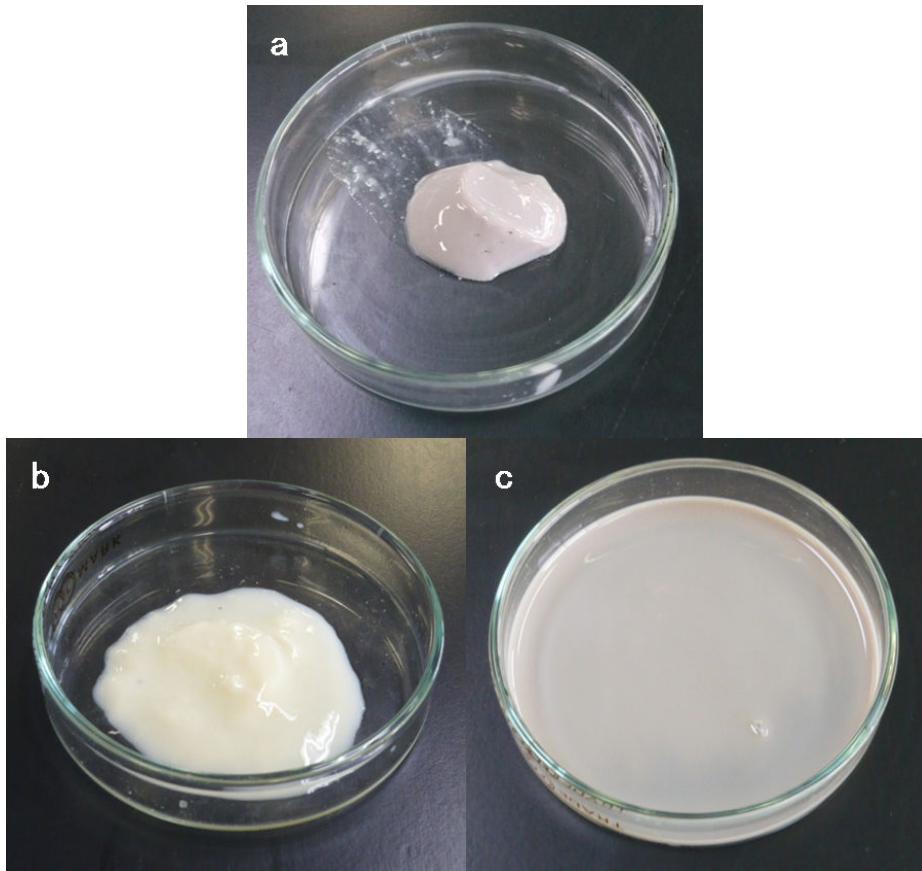


図 4-3

T-2-250-4-20 (a)、CX1834 (b)及び丹波黒(c)から  $\text{MgCl}_2$  濃度  $3.1 \text{ mmol L}^{-1}$  で作成した豆腐の状態

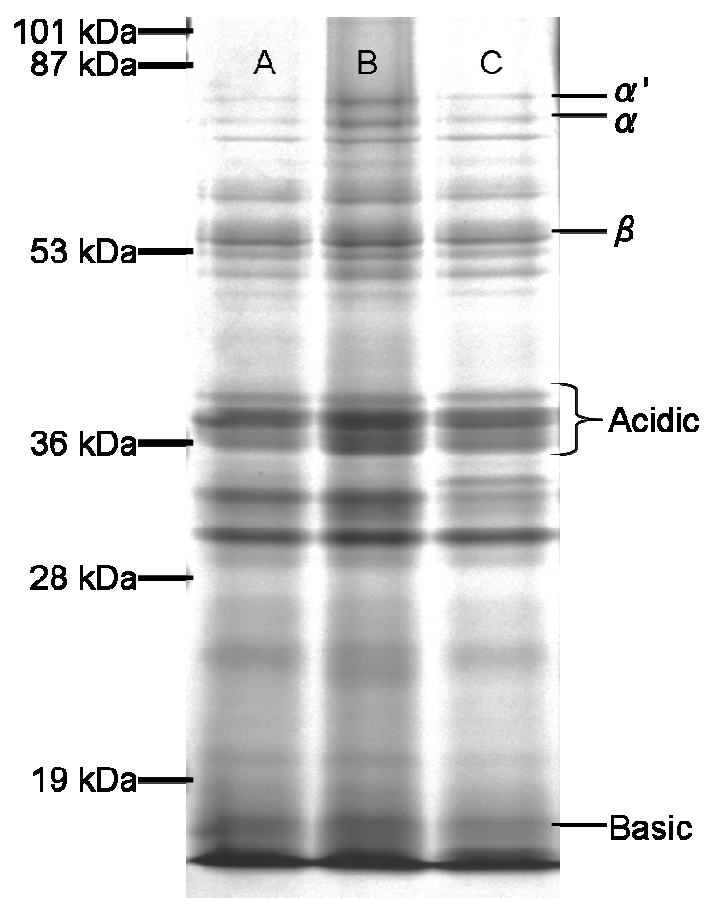


図 4-4

T-2-250-4-20 (A)、CX1834 (B)及び丹波黒(C)から作成した豆乳の SDS-PAGE

# 第 5 章

## 総合考察

ダイズを始め、多くの穀類には有機態リン酸の一つであるフィチン酸(ミオイノシトール 6 リン酸)が多く含まれている(Lalos *et al.*, 1976; Lott *et al.*, 2000; Raboy *et al.*, 2001)。フィチン酸は人間などの単胃動物では吸収・利用されな  
いばかりでなく、フィチン酸はカチオンやアミノ酸、タンパク質などの吸収を  
阻害したり、消化酵素の活性を減少させたりする (Erdman, 1981; Persson *et al.*, 1998; Raboy, 2000; Cowieson *et al.*, 2004)。そのため、家畜生産ばかりで  
なく、食料として利用する場合にも多くの問題が生じている(Sharpley *et al.*,  
1994, 2003; Raboy, 2001)。

近年、このようなフィチン酸に係わる諸問題を解決するため低フィチン穀類  
の開発がなされている(Larson *et al.*, 1998; Rasumussen and Hatzack, 1998;  
Larson *et al.*, 2000; Raboy *et al.*, 2000; Guttieri *et al.*, 2004)。フィチン酸濃  
度の低いダイズは、1995年に USDA-ARS の Raboy 博士らのグループにより、  
エチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理した突然変異体の中から初めて単離さ  
れた。CX1834 系統は、この変異体から得られた系統を毎年栽培し選抜する中  
で、フィチン酸が低いという形質を安定して引き継いでいた系統である。この  
CX1834 系統は、全リン酸に対するフィチン態リン酸濃度が約 30 %と普通品種  
(65~85 %)に比べて著しく低く、低フィチンダイズとして有望な系統である  
(Wilcox *et al.*, 2000)。

一方、フィチン酸が豆腐の加工適性に影響を及ぼすことが明らかになって以  
来、豆腐の凝固とフィチン酸の関係に関する研究が活発に行われている(Saio *et al.*, 1969; Ishiguro *et al.*, 2006; Toda *et al.*, 2006)。しかし、その多くはフィ  
チン酸濃度の高い普通栽培品種を使った研究例で、豆腐の凝固に影響を及ぼす  
フィチン酸濃度に関する正確な情報が得られていない。

本論文では、まず、第 2 章において低フィチン系統 CX1834 の生育特性や品  
質特性を明らかにし、わが国で豆腐などの製造に利用する上で問題が見られな

いかを検討した。さらに、第 3 章では、CX1834 と丹波黒との交配系統から生産性が高く、品質の良い系統の選抜を行い、その生育と品質特性を解析した。第 4 章では食用としての利用、特に豆腐としての利用を想定し、選抜した系統から豆乳及び豆腐を製造し、その特性を解析した。同時に、フィチン酸が豆腐の凝固に及ぼす影響も併せて検討した。これらの結果に基づき、本章では、本研究の選抜過程で得られた低フィチン系統の特性や、その有用性について総合的に考察する。

第 2 章では、植物がリンを貯蓄する方法としてフィチン態リン酸を生産する一方で、種子中のフィチン態リン酸の蓄積量を少なくしても、生育や収量および栄養成分に対して影響を及ぼさないことが証明された。しかし、その子実外観から納豆や煮豆、味噌といった食品への適性は低いと考えられた。また、その種皮重率の高さや豆乳中固形物抽出率の低さから、低フィチン系統 CX1834 は豆腐加工の際、歩留まりの良くない系統と結論付けられた。データは示さなかったが、エンレイでは特に降雨の後、莢が破裂しやすく、高い脱粒性が観察されたが、CX1834 はほとんど脱粒しなかった。この難脱粒性から、CX1834 は、収穫時のロスが少なく、収穫作業上の利点も見られた。CX1834 は日本で食料とするためには、品質適性が悪いことが示された。第 3 章では、2004 年に、品質の高い品種として知られている丹波黒(♀種子親)と低フィチン系統 CX1834(♂花粉親)を交配し得られた系統から、低フィチン系統を選抜した研究をまとめた (図 3-1)。2009 年度および 2010 年度に有望と考えられる系統を圃場栽培し、生育特性や品質特性を評価した。その圃場試験の結果から、F5 世代個体 T-2-250-4-20 と F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 を選抜した。この系統は、親品種である丹波黒と同等の生育能力と生産性を示し、さらに、F5 世代から F6 世代へと世代が進んでも、低フィチンの形質が安定して受け継がれていた。また、その子実成分の分析では、粗タンパク質濃度は豆腐用品種に比べ低いも

の、ミネラル、粗脂肪、そして全糖の濃度については豆腐加工に適切であることが示唆された。2009年における親系統のCX1834の粗タンパク質濃度は $308 \text{ mg g}^{-1}$ であり、T-2-250-4-20でも $316 \text{ mg g}^{-1}$ であった。この粗タンパク質濃度は沼田(1998)の報告に比べてやや低かったが、栽培品種の丹波黒においても $308 \text{ mg g}^{-1}$ と低かった。この原因が栽培条件によるものか不明であり、粗タンパク質濃度についてはさらに詳細に解析する必要がある。いずれにしても、T-2-250-4-20-34は、親品種の丹波黒に比べて大幅にフィチン酸は減ったものの、収量特性や品質は丹波黒と同等であった。

また、データは示さなかったが、丹波黒では収穫期に高い脱粒性が見られたが、低フィチン系統の脱粒性は、親系統CX1834の形質を引き継いで、小さかった。脱粒性が見られる品種は、収穫期に作業する場合に種子が落下しやすく、収穫ロスが多いが、脱粒性が低い品種は収穫期のロスが少なく管理のしやすい品種である。脱粒性の低さからも、T-2-250-4-20は、丹波黒に比べ有用性の高い系統と結論付けられた。

日本では国産大豆のおよそ54%が豆腐加工用として利用されている。第4章では、第3章で有望と考えられたT-2-250-4-20と親品種の丹波黒とCX1834から作成した豆乳の品質と、その豆乳から製造した豆腐の加工適性を評価した。各系統・品種から製造した豆乳中のフィチン酸濃度は、丹波黒では $4.0 \text{ mmol L}^{-1}$ と高かったが、T-2-250-4-20では $1.2 \text{ mmol L}^{-1}$ 、CX1834では $1.8 \text{ mmol L}^{-1}$ と、丹波黒と比べて低フィチン系統ではそれぞれ70%及び55%の低下が見られた。しかし、7倍加水豆乳の固形分率は、3つの品種・系統間で有意な差は見られなかった。また、10倍加水豆乳においても、原料のダイズと水の合計重量に対して得られた豆乳割合、すなわち豆乳抽出率には3つの品種・系統間で有意な差は見られなかった。一方、豆乳中にタンパク質や炭水化物などのダイズの固形成分がどれだけ溶出しているかを示す固形分率(豆乳の濃さの指標)は、



CX1834 では 6.78 %、T-2-250-4-20 と丹波黒ではそれぞれ 7.24 %と 7.73 %であり、T-2-250-4-20 と丹波黒が CX1834 に比べて統計的に有意に高かったが、T-2-250-4-20 と丹波黒の間では統計的な有意差は見られなかった。従って、CX1834 と丹波黒を交配してできた T-2-250-4-20 から製造した豆乳は、CX1834 よりも品質が改良され、かつ丹波黒から製造した豆乳と同等の品質となった。

豆乳中のフィチン態リン濃度は子実中のフィチン態リンと非常に高い相関関係を示し、豆乳中のフィチン酸が多いと豆腐の凝固が阻害されやすく、柔らかい豆腐ができる (Toda *et al.*, 2006)。豆腐の凝固にフィチン酸がどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、豆腐の凝固に必要な「にがり」である  $MgCl_2$  の濃度を変えて、3 系統・品種から豆腐を作成し、その破断応力を測定した。丹波黒から作成した豆腐が  $MgCl_2$  濃度  $12.6 \text{ mmol L}^{-1}$  で最大破断応力を示したのに対して、T-2-250-4-20 と CX1834 から作成した豆腐は  $MgCl_2$  濃度  $9.5 \text{ mmol L}^{-1}$  で最大破断応力を示した。 $MgCl_2$  濃度が低い  $6.3 \text{ mmol L}^{-1}$  では、丹波黒から作成した豆腐では破断応力を測定できないほど柔らかくなったのに対し、T-2-250-4-20 から作成した豆腐は依然高い破断応力を示した。また、より低濃度の  $3.1 \text{ mmol L}^{-1}$  で作成した場合、丹波黒では凝固せず、CX1834 ではわずかに凝固した。一方、T-2-250-4-20 では凝固し豆腐カードを形成した。

豆乳中のタンパク質の量と質が豆腐加工適性に影響することから、供試した豆乳中のタンパク質について SDS-PAGE により解析したが、泳動パターンの大きな違いは見られなかった。しかし、デンストメトリーを用いて、この SDS-PAGE パターンから算出した 11S/7S 比は、T-2-250-4-20 で 3.36、CX1834 で 2.75、丹波黒で 2.99 であり、T-2-250-4-20 では 11S/7S 比が CX1834 や丹波黒に比べて高かった。豆腐の凝固に最も関係している大豆のタンパク質がグリニシン(11S グロブリン)と  $\beta$ -コングリニシン(7S グロブリン)であり、この組成割合が豆腐の凝固に影響を及ぼすことが知られている (Poysa *et al.*, 2006)。す

なわち、11S グロブリンで作成した豆腐が 7S グロブリンで作成したものよりかなり硬く、11S グロブリンは 7S グロブリンより高い粘着性と弾力性を示すことから、11S/7S 比が高いと豆腐が固まりやすいと考えられている(Saio *et al.*, 1971; Cai *et al.*, 1997; Toda *et al.*, 2008)。T-2-250-4-20 で凝固剤(MgCl<sub>2</sub>)がより低濃度の場合でも凝固した要因の一つとして、その 11S/7S 比が高いことが考えられた。

豆腐の凝固に関して、糖質がタンパク質の凝固を抑えるため、高糖質ダイズの豆腐収率は低くなるという報告がある(橋詰、1992)。また、豆乳中の凝固剤と反応し、凝固に影響を及ぼす要因として、タンパク質やフィチン酸の他にクエン酸なども挙げられる(小原ら、1992)。このように豆腐の凝固には多くの成分が影響を及ぼしていることが明らかにされてきた。本研究において、凝固剤の濃度により、品種・系統間で豆腐の硬さの序列が異なっていた。これは豆腐カード形成に係わる様々な因子が複雑に絡み合っていることを示唆していると考えられ、それぞれの関係性など、まだ解明すべき多くの問題が残されている。

また、パネラーを募っての正式な食味試験による官能評価は行っていないが、実際に T-2-250-4-20 で作成した豆腐カード(9.5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>)を食べてみたところ、えぐ味がなく、ミルクプリンのような、きめの細かい、なめらかな舌触りであった。木綿豆腐や絹ごし豆腐を製造する際、最後に豆腐を水に晒すため凝固剤は溶出するが、充填豆腐では水に晒されることがないため、使用された凝固剤はそのまま豆腐内に残っている。凝固剤(MgCl<sub>2</sub>)に含まれる Mg はその酸化物を「苦土」とも言うように、苦味(えぐ味)の基となる。一般的に豆腐を製造するの際に使用される凝固剤(MgCl<sub>2</sub>)の濃度は 12.3 mmol L<sup>-1</sup> であるが、T-2-250-4-20 の豆腐は 9.5 mmol L<sup>-1</sup> と通常より低い濃度で作成したため、えぐ味を感じにくかったと考えられる。きめの細かい、なめらかな舌触りであった要因は不明だが、T-2-250-4-20 を豆腐として利用する場合、軟らかな充填豆腐

として、そのなめらかな食感を楽しむのに適していると考えられる。

以上の結果から、本研究の選抜過程で得られた T-2-250-4-20 は、丹波黒と比較しても十分な生育能力と生産性を持った低フィチン系統であり、その生育及び品質の特性は後代の T-2-250-4-20-34 に安定して受け継がれていることが明らかとなった。また、最大破断応力を指標とし豆腐加工適性を考えると、その適性は CX1834 よりも高く、丹波黒と同等であると考えられた。ダイズ食品の高付加価値化として、有色ダイズの利用加工が進められている(田畑ら、1995; 秋山ら、1999)ことから、T-2-250-4-20 は、有色であることによる高付加価値化、さらに種子親の丹波黒のブランド力から、食品としての利用価値が非常に高いと考えられる。加えて、ダイズではないが、人間栄養学において、低フィチントウモロコシでは Fe、Zn と Ca の吸収が、通常のトウモロコシに比べて 30%~50%増加することが実証されている(Mendoza *et al.*, 1998; Hambidge *et al.*, 2004; Hambidge *et al.*, 2005)。低フィチンダイズにおいても同様の効果が期待されることから、ミネラルがより多く摂取できる高機能性食品への応用も有望であると考えられ、豆腐以外のダイズ食品としての加工適性についてもさらに詳しい解析が望まれる。

また、本研究において、CX1834 はダイズ食品への加工には適していないと考えられたが、今後は、その利用性を高めるため、家畜飼料として用いた場合の消化吸収試験や環境へのリン酸の排泄量の評価などについて検討する必要がある。

## 第 6 章

### 摘要

ダイズを始め多くの穀類には有機態リン酸の一つであるフィチン酸(ミオイノシトール 6 リン酸)が多く含まれている。しかし、フィチン酸加水分解酵素であるフィターゼをほとんど持たない豚、鶏などの単胃動物では植物性飼料原料からのフィチン酸の利用率は低く、鶏、豚の場合、それぞれ 10 % および 20 ~ 30 % である。そのため、飼料中のリン酸はほとんど消化吸収されずに、そのまま環境中に放出され農耕地へのリン酸の過剰蓄積につながると同時に環境汚染を引き起こす原因ともなっている。リン酸は動物にとって必須元素であるが、植物性飼料原料からリン酸の吸収が難しいため、植物性飼料原料のみではリン酸の要求量を満たすことが難しい。このため、リン酸カルシウムなど消化性の高い無機態リンが濃厚飼料に添加されている。しかし、原料であるリン鉱石の埋蔵量はあと 50 ~ 100 年で枯渇することが予想されており、リンの節約が求められている。

一方、単胃動物ではこのフィチンが分解できないためにミネラルの吸収・利用も阻害される。主食を穀類や豆類に依存している途上国において Fe や Zn の欠乏による栄養障害が問題になっているが、その原因物質(抗栄養成分)として穀類に含まれるフィチンが考えられている。また、国産大豆はそのおよそ 54 % が豆腐加工用として利用されているが、フィチン酸が豆腐の凝固および加工適性に影響を及ぼすことが明らかになって以来、豆腐の凝固とフィチン酸の関係に関する研究が活発にされてきている。しかし、これまでの研究では、フィチン酸濃度の高い普通栽培品種を使った研究例が多く、豆腐の凝固に影響を及ぼすフィチン酸濃度に関する正確な情報が得られていない。

以上のことを背景に、本論文では、エチルメタンスルホン酸処理により得られた突然変異体から選抜された低フィチン系統 CX1834 が西日本において栽培可能かどうかを明らかにするために、西日本の多くの府県で奨励品種となっているエンレイと、その生育特性や品質特性を比較した。さらに、日本の栽培品

種丹波黒と 2004 年に交配して得られた F1 種子を養成後、F2 世代から F5 世代まで系統育種法により世代を進め、生産性の高い系統の選抜とその系統の生育特性を解析した。また、低フィチン系統の食用としての有用性を明らかにするために、低フィチン系統と普通栽培品種から作成した豆乳の品質と、これらから製造した豆腐の品質や凝固性など、豆腐の加工適性について評価した。

#### 1. 低フィチンダイズ CX1834 の生育・品質特性の解析

2005 年と 2008 年に低フィチン系統 CX1834 と西日本の多くの府県で奨励品種となっているのエンレイを圃場条件で栽培し、両ダイズの生育、収量や栄養成分などを比較し、この低フィチン系統の生育特性を明らかにすると同時に、低フィチン系統 CX1834 の食用品種としての適性についても併せて検証した。

その結果、1) 子実の全リン濃度は 2005 年度では同じであったが、2008 年度は低フィチン系統でやや高かった。フィチン態リン濃度は低フィチン系統で  $2.14\sim 2.55\text{ g kg}^{-1}$ 、エンレイで  $5.32\sim 5.50\text{ g kg}^{-1}$  であり、全リンに対するフィチン態リンの割合は低フィチン系統で 23~26%，エンレイで 66~70%であった。2) 2005 年度においては、低フィチン系統の地上部乾物重、子実重にエンレイと差が見られなかったが、2008 年度には低フィチン系統がエンレイに比べて地上部乾物重は 30%、子実収量は 50%高かった。3) 低フィチン系統は、エンレイに比べて着莢数、一莢内子実粒数が多かったが、百粒重は逆に小さかった。4) 子実中の K、Mg、Ca、タンパク質濃度、さらにイソフラボン濃度およびその成分組成には、両系統・品種で差はなかった。以上の結果から、ダイズのフィチン酸合成能力を低下させても、生育や収量および栄養成分の濃度に影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、その子実外観から納豆や煮豆、味噌といった食品への適性は低いと考えられ、また、その種皮重率の高さや豆乳中固形物抽出率の低さから、低フィチン系統 CX1834 は豆腐加工の際の

歩留まりの悪い系統と結論付けられた。

## 2. 低フィチンダイズ交配系統の生育及び品質特性

フィチン酸濃度が低く、より高品質な系統を育成する目的で、2004年に普通栽培品種である丹波黒(種子親)と低フィチン系統 CX1834(花粉親)を交配した中から、収量性および品質の良い系統の選抜を行った。その中でも特に有望と考えられた F5 世代個体 T-2-250-4-20 について、2009 年度に生育特性や収量性などの基本的な特性を明らかにし、さらに、2010 年には F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 の生産性試験によって収量特性などより詳細な解析を行った。

その結果、1) F5 世代個体 T-2-250-4-20 と F6 世代個体 T-2-250-4-20-34 において、共にその主茎長、主茎節数は丹波黒より大きな値を示したが、総節数では有意差が見られなかった。このことから、両系統は丹波黒に比べ、主茎の伸長が旺盛で分枝の伸長が少ない特性があり、この生育特性が安定して受け継がれていることが示唆された。2) T-2-250-4-20 と T-2-250-4-20-34 は共に、百粒重は丹波黒よりも小さい値を示したものの、個体当たりの子実収量は丹波黒よりも多く、日本の普通栽培品種である丹波黒と比較しても十分な生育能力と生産性を有することがわかった。3) T-2-250-4-20-34 世代から収穫した子実の全リン酸濃度に対するフィチン態リンの割合は丹波黒で約 70 %であったが、T-2-250-4-20 で約 18 %、CX1834 系統では約 30 %、また、無機リン酸の割合は T-2-250-4-20 および CX1834 では約 66 %、丹波黒で約 5 %であった。4) Ca、Mg、K 濃度に 3 つの品種・系統間での目立った違いは見られず、粗タンパク質濃度では、T-2-250-4-20 で日本の豆腐用品種に比べやや低いものの、ミネラル、粗脂肪、全糖の濃度、外観品質などから、T-2-250-4-20 が豆腐加工用として適していることが示唆された。

### 3. 低フィチンダイズ交配系統の豆腐加工適性の評価

国産大豆はそのおよそ 54 %が豆腐加工用として利用されている。そこで、T-2-250-4-20 系統について、豆腐加工適性を評価すると同時に、フィチン酸が豆腐の凝固にどのような影響を及ぼすかを検討した。

その結果、1) 3 系統・品種から製造した豆乳中のフィチン酸濃度は、丹波黒では  $4.0 \text{ mmol L}^{-1}$  と高かったが、T-2-250-4-20 では  $1.2 \text{ mmol L}^{-1}$  及び CX1834 では  $1.8 \text{ mmol L}^{-1}$  と、丹波黒と比べて低フィチン系統ではそれぞれ 70 %及び 55 %低下した。2) 7 倍加水豆乳の固形分率は、3 つの品種・系統間で有意な差は見られなかった。また、10 倍加水豆乳においても、原料のダイズと水の合計重量に対して得られた豆乳割合、すなわち豆乳抽出率には 3 つの品種・系統間で有意な差は見られなかった。3) 豆乳の固形分率(豆乳の濃さの指標)は、CX1834 に比べて T-2-250-4-20 と丹波黒で有意に高かった。T-2-250-4-20 から製造した豆乳は、CX1834 よりも品質が改良され、かつ丹波黒から製造した豆乳と同等の品質が見られた。4) 丹波黒から作成した豆腐では  $\text{MgCl}_2$  濃度  $12.6 \text{ mmol L}^{-1}$  で最大破断応力を示したのに対し、T-2-250-4-20 と CX1834 から作成した豆腐は  $\text{MgCl}_2$  濃度  $9.5 \text{ mmol L}^{-1}$  で最大破断応力を示した。また、 $\text{MgCl}_2$  濃度が低い  $6.3 \text{ mmol L}^{-1}$  では、丹波黒から作成した豆腐では破断応力を測定できないほど柔らかくなったのに対し、T-2-250-4-20 から作成した豆腐は依然高い破断応力を示した。5) より低濃度の  $3.1 \text{ mmol L}^{-1}$  で作成した場合、丹波黒では凝固せず、CX1834 ではわずかに凝固したが、T-2-250-4-20 では凝固し豆腐カードを形成した。6) 豆乳中のグリニシン(11S グロブリン)と  $\beta$ -コングリニシン(7S グロブリン)は、最も重要なタンパク質であり、11S/7S 比が増加すると豆腐の最大破断応力を示す凝固剤濃度は減少する。供試した系統の豆乳中のタンパク質の SDS-PAGE 泳動パターンに違いは見られなかったが、この SDS-PAGE から算出した 11S/7S 比は、T-2-250-4-20 で 3.36、CX1834 で 2.75、



丹波黒で 2.99 であった。

以上の結果から、低フィチン系統 CX1834 は、日本の栽培品種(エンレイ)に比べて収量性には問題はなかったが、日本で食するための必要な外観品質や、種皮重率の高さ、豆乳中固形物抽出率が低く、豆腐加工の際の歩留まりの悪い系統と結論付けられた。しかし、丹波黒との交配した系統の中から、フィチン酸が低く、かつ、生産性および品質の高い系統を選抜した結果、系統 T-2-250-4-20 をより有望な系統として選抜した。さらに、この系統の豆乳を使って豆腐加工適性を評価した結果、T-2-250-4-20 ではフィチン酸濃度は著しく低下したが、その他の成分など特性は丹波黒とさほど変わらないという結果が得られた。加えて、豆腐凝固に係わるにがりの濃度を低下させた場合、丹波黒から作成した豆腐では破断応力が低下したが、T-2-250-4-20 から作成した豆腐では豆腐の硬さを示す最大破断応力が維持された。フィチン酸濃度は豆腐の硬さに影響を及ぼすことが明らかとなった。本論文で得られた T-2-250-4-20 は、品質および豆腐加工適性も良好であり、将来性のある系統として有望であると考えられる。

## 参考文献

- 赤木功、西原基樹、上田重英、横山明敏、浅野陽樹、佐伯雄一 (2007) 宮崎県で栽培された暖地向けダイズ品種のイソフラボン含量. 日作紀 76:454-458.
- 赤木功、西原基樹、上田重英、横山明敏、佐伯雄一 (2009) 暖地向けダイズ品種における子実中の無機成分含有量について. 宮崎大学農学部研究報告 55: 91-98.
- Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M. and Fukami Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595.
- 秋山美展、高橋徹、熊谷昌則 (1999) 青大豆の豆腐加工適性について. 秋田総食研報 1: 35-47.
- アメリカ大豆協会 (2006) 大豆ミール(粕)の各種飼料への利用 副題: 飼料・原料セールスの観点から要点を考える. pp79. 東京
- Bilyeu K. D., Zeng P., Coello P., Zhang Z. J., Krishnan H. B., Bailey A., Beuselinck P. R. and Polacco J. C. (2008) Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiol.* 146: 468-477.
- Cai T. D., Chang K. C., Shih M. C., Hou H. J. and Ji M. (1997) Comparison of bench and production scale methods for making soymilk and tofu from 13 soybean varieties. *Food Res. Int.* 30: 659-668.
- Chen P. S. Jr., Toribara T. Y. and Warner H. (1956) Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28: 1756-1758.
- Coward L., Barnes N. C., Setchell K. D. R. and Barnes S. (1993) Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agri. Food Chem.* 41:

1961-1967.

Cowieson A. J., Acamovic T. and Bedford M. R. (2004) The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45: 101-108.

だいで種苗特性分類調査委員会 (1995) 種苗特性分類調査報告書だいで. 日本特殊農作物種苗協会 1-55.

独立行政法人農業技術研究機構編 (2003) 日本標準飼料成分表(2001 年版). p.198.

Erdman J. W. Jr. (1981) Bioavailability of trace minerals from cereals and legumes. *Cereal Chem.* 58: 21-26.

Fehr W. R., Caviness C. E., Burmood D. T. and Pennington J. S. (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) MERRILL. *Crop Sci.* 11: 929-931.

Gillman J. D., Pantalone V. R. and Bilyeu K. (2009) The low phytic acid phenotype in soybean line CX1834 is due to mutations in two homologs of the maize *low phytic acid* gene. *Plant Genome* 2: 179-190.

Guo S. T., Ono T. and Mikami M. (1999) Incorporation of soy milk lipid into protein coagulum by addition of calcium chloride. *J. Agric. Food Chem.* 47: 901-905.

Guo S. T., Tsukamoto C., Takahashi K., Yagasaki K., Nan Q. X. and Ono T. (2002) Incorporation of soymilk lipid into soy protein coagulum by the addition of calcium chloride. *J. Food Sci.* 67: 3215-3219.

Guttieri M., Bowen D., Dorsch J. A., Raboy V. and Souza E. (2004) Identification and characterization of low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 44: 418-424.

- Hambidge K. M., Huffer J. W., Raboy V., Grunwald G. K., Westcott J. L., Sian L., Miller L. V., Dorsch J. A. and Krebs N. F. (2004) Zinc absorption from low-phytate hybrids of maize and their wild-type isohybrids. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 1053-1059.
- Hambidge K. M., Krebs N. F., Westcott J. L., Sian L., Miller L. V., Peterson K. L. and Raboy V. (2005) Absorption of calcium from tortilla meals prepared from low-phytate maize. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 84-87.
- Harland B. F. and Morris E. R. (1995) Phytate: A Good or Bad Food Component? *Nutr. Res.* 15: 733-754.
- Hulke B. S., Fehr W. R. and Welke G. A. (2004) Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced phytate and palmitate. *Crop Sci.* 44: 2027-2031.
- Hoeck J. A., Fehr W. R., Murphy P. A. and Welke G. A. (2000) Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Sci.* 40: 48-51.
- 生雲晴久 (2001) 家畜排泄カリウム量の原価単位と我が国における窒素、リン酸、カリウムの農地負荷. *農業技術* 56: 421-424.
- Ishiguro T., Ono T. and Nakasato K. (2008) The localization of phytate in tofu curd formation and effects of phytate on tofu texture. *J. Food Sci.* 73: C67-71.
- Ishiguro T., Ono T., Wada T., Tsukamoto C. and Kono Y. (2006) Changes in soybean phytate content as a result of field growing conditions and influence on tofu texture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 874-880.
- Ishimi Y., Miyaura C., Ohmura M., Onoe Y., Sato T., Uchiyama Y., Ito M., Wang X., Suda T. and Ikegami S. (1999) Selective effects of genistein, a

- soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinol.* 140: 1893-1900.
- Johnson L. F. and Tate M. E. (1969) Structure of 'phytic acids'. *Can. J. Chem.* 47: 63-73.
- 厚生労働省 (2006) 第十五改正 日本薬局方 p.22.
- Kelloff G. J., Lieberman R., Steele V. E., Boone C. W. Lubet R. A., Kopelovich L., Malone W. A., Crowell J. A. and Sigman C. C. (1999) Chemoprevention of prostate cancer: Concepts and strategies. *Eur. Urol.* 35: 342-350.
- Kudou S., Fleury Y., Welti D., Magnolato D., Uchida T., Kitamura K. and Okubo K. (1991) Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds ( *Glycine max* MERRILL ) *Agric. Boil. Chem.* 55: 2227-2233.
- Larson S. R., Rutger J. N., Young K. A. and Raboy V. (2000) Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice ( *Oryza sativa* L.) *low phytic acid 1* mutation. *Crop Sci.* 40: 1397-1405.
- Larson S. R., Young K. A., Cook A., Blake T. K. and Raboy V. (1998) Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. *Theor. Appl. Genet.* 97: 141-146.
- Leytem A. B., Thacker P. A. and Turner B. L. (2007) Phosphorus characterization in feces from broiler chicks fed low-phytate barley diets. *J. Sci. Food Agric.* 87: 1495-1501.
- Loewus F. A. and Murthy P. P. N. (2000) *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* 150: 1-19.
- Lott J. N. A., Ockenden I., Raboy V. and Batten G. D. (2000) Phytate and phosphorus in crop and fruits: a global estimate. *Seed Sci. Res.* 10: 11-33.

- 農林水産省(2010) 大豆をめぐる最近の動向について. (オンライン)、  
〈 [http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/pdf/daizu\\_doukou.pdf](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/pdf/daizu_doukou.pdf) 〉  
(2010年3月19日参照).
- 農林水産省流通飼料課監修 (2000) 流通飼料便覧-1999-. p.51.
- Maroof M. A. S., Glover N. M., Biyashev R. M., Buss G. R. and Grabau E. A.  
(2009) Genetic basis of the low-phytate trait in the soybean line CX1834.  
*Crop Sci.* 49: 69-76.
- Mendoza C. (2002) Effect of genetically modified low phytic acid plants on  
mineral absorption. *Int. J. Food Sci. Tech.* 37: 759-767.
- Mendoza C., Viteri F. E., Lönnerdal B., Young K. A., Raboy V. and Brown K.  
H. (1998) Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on  
absorption of iron from tortillas. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1123-1127.
- 元木悟、山田直弘、田中進久、高松光生、高橋信夫 (1999) 味噌用高加工適性  
大豆の選抜に関する試験 第1報 種皮率測定法の検討. 北陸作物学会報 34:  
108-109.
- 村田容常 (1995) 豆腐作りの化学. 化学と教育 43: 101-102.
- Naim M., Gestetner B., Bondi A. and Birk Y. (1976) Antioxidative and  
antihemolytic of soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 4: 1174-1177.
- 中村茂樹、湯本節三、高橋浩司 (1995) 大豆品種の特性に関する研究 一種皮  
重率について一. 日作東北支部報 38: 81-82.
- Näsi J. M., Helander E. H. and Partanen K. H. (1995) Availability for  
growing pigs of minerals and protein of a high phytate barley-rapeseed  
meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or soaked with whey.  
*Anim. Feed Sci. Technol.* 56: 83-98.
- 夏目悠司、二村優次、実岡寛文 (2006) 播種期の違いによる低フィチンダイズ

- と栽培品種の生産性と子実の無機イオン濃度の比較. 日本作物学会中国支部研究集録 47: 36-37.
- Nishinari K., Kohyama K., Zhang Y., Kitamura K., Sugimoto T., Saio K. and Kawamura Y. (1991) Rheological study on the effect of the A<sub>5</sub> subunit on the gelation characteristics of soybean proteins. *Agric. Biol. Chem.* 55: 351-355.
- 沼田邦雄 (1998) 大豆の成分及び豆腐加工適性. 東京都立食品技術センター研究報告書 7: 21-27.
- Ockenden I., Dorsch J. A., Reid M. M., Lin L., Grant L. K., Raboy V. and Lott J. N. A. (2004) Characterization of the storage of phosphorus, inositol phosphate and cations in grain tissues of four barley (*Hordeum vulgare* L.) low phytic acid genotypes. *Plant Sci.* 167: 1131-1142.
- Oltmans S. E., Fehr W. R., Welke G. A., Raboy V. and Peterson K. L. (2005) Agronomic and seed traits of soybean lines with low-phytate phosphorus. *Crop Sci.* 45: 593-598.
- Ono T., Katho S. and Mothizuki K. (1993) Influences of calcium and pH on protein solubility in soybean milk. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 24-28.
- Panzeri D., Cassani E., Doria E., Tagliabue G., Forti L., Campion B., Bollini R., Brearley C. A., Pilu R., Nielsen E. and Sparvoli F. (2011) A defective ABC transporter of the MRP family, responsible for the bean *lpa1* mutation, affects the regulation of the phytic acid pathway, reduces seed *myo*-inositol and alters ABA sensitivity. *New Phytologist* 191: 70-83.
- Peeler H. T. (1972) Biological availability of nutrients in feeds: Availability of major mineral ions. *J. Anim. Sci.* 35: 695-712.
- Persson H., Türk M., Nyman M. and Sandberg A. S. (1998) Binding of Cu<sup>2+</sup>,



- Zn<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup> to Inositol Tri-, Tera-, Penta-, and Hexaphosphates. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3194-3200.
- Potter S. M., Baum J. A., Teng H., Stillman R. J., Shay N. F. and Erdman J. W. Jr. (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(suppl): 1375S-1379S.
- Poysa V., Woodrow L. and Yu K. (2006) Effect of soy protein subunit composition on tofu quality. *Food Res. Int.* 39: 309-317.
- Raboy V. (2000) Low-phytic-acid grains. *Food Nutr. Bull.* 21: 423-427.
- Raboy V. (2001) Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Plant Sci.* 6: 458-462.
- Raboy V. (2003) *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64: 1033-1043.
- Raboy V. (2007) The ABCs of low-phytate crops. *Nat. Biotechnol.* 25: 874-875.
- Raboy V. (2009) Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Sci.* 177: 281-296.
- Raboy V. and Dickinson D. B. (1987) The timing and rate of phytic acid accumulation in developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 85: 841-844.
- Raboy, V. and Dickinson D. B. (1993) Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Sci.* 33: 1300-1305.
- Raboy V., Dickinson D. B. and Below F. E. (1984) Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, calcium, magnesium, and protein among lines of *Glycine max* and *G. soja*. *Crop Sci.* 24: 431-434.

- Raboy V., Gerbasi P. F., Young K. A., Stoneberg S. D., Pickett S. G., Bauman A. T., Murthy P. P. N., Sheridan W. F. and Ertl D. S. (2000) Origin and seed phenotype of maize *low phytic acid 1-1* and *low phytic acid 2-1*. *Plant Physiol.* 124: 355-368.
- Rasmussen S. K. and Hatzack F. (1998) Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis. *Hereditas* 129: 107-112.
- Saio K., Kajikawa M. and Watanabe T. (1971) Food processing characteristics of soybean proteins. II. Effects of sulfhydryl group on physical properties of tofu-gel. *Agric. Biol. Chem.* 35: 890-898.
- Saio K., Koyama E., Yamazaki S. and Watanabe T. (1969) Protein-calcium-phytic acid relationships in soybean Part III. Effect of phytic acid on coagulative reaction in tofu-making. *Agric. Biol. Chem.* 33: 36-42.
- 境哲文、菊池彰夫、島田尚典、高田吉丈、河野雄飛、島田信二 (2005) ダイズ子実中のイソフラボン含量および組成の品種・系統間差異と子実特性および播種時期との関係. *日作紀* 74: 156-164.
- Saneoka H. and Honda N. (2003) Changes in phytic acid-P and phosphorus compounds with the maturity of maize grain. *Grassl. Sci.* 49: 425-429.
- Saneoka H., Hosokawa T., Yorizane A., Nakayama N., Itani T. and Fujita K. (2006) Changes in the composition of phytate, phosphorus and other cations in soybean seeds with maturity. *Grassl. Sci.* 52: 99-104.
- Serraj R., Sinclair T. R. and Purcell L. C. (1999) Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* 50: 143-155.
- 瀬戸亮哉、森塚直樹、井上博茂、稲村達也 (2010) 遠心分離法による土壌溶液採取の簡便法の紹介. *日本土壌肥料学会講演要旨集* 56: 193.

- Sharpley A. N., Chapra S. C., Wedepohl R., Sims J. T., Daniel T. C. and Reddy K. R. (1994) Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters: Issues and options. *J. Environ. Qual.* 23: 437-451.
- Sharpley A. N., Daniel T., Sims T., Lemunyon J., Stevens R. and Parry R. (2003) Agricultural phosphorus and eutrophication. 2nd ed. *U.S. Dep. Agric., Agric. Res. Serv. ARS-149.*
- Shi J., Wang H., Schellin K., Li B., Faller M., Stoop J. M., Meeley R. B., Ertl D. S., Ranch J. P. and Glassman K. (2007) Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat. Biotechnol.* 25: 930-937.
- Sinclair T. R., Muchow R. C., Bennett J. M. and Hammond L. C. (1987) Relative sensitivity of nitrogen and biomass accumulation to drought in field-grown soybean. *Agron. J.* 79: 986-991.
- Spear J. D. and Fehr W. R. (2007) Genetic improvement of seedling emergence of soybean lines with low phytate. *Crop Sci.* 47: 1354-1360.
- Spiro R. G. (1966) Analysis of sugars found in glycoprotein. In: Neufeld E.S., Ginsburg V. (ed) *Methods in Enzymology. Complex Carbohydrates, vol. VIII* pp. 3-26. Academic Press, New York.
- Steen I. (1998) Phosphorus availability in the 21st century: Management of a non-renewable resource. *Phosphorus and Potassium* 217: 25-31.
- Stilborn H. L. and Crum R. C. Jr. (1997) New corn varieties to provide feed options in the future. *Feedstuffs* 69: 12, 14-16.
- 平春枝 (1982) 国産大豆の品質 (第 1 報) 物理的性状・化学成分組成および加工適性. 食品総合研究所研究報告 40: 35-54.
- 平春枝 (1989) 国産大豆の品質と加工適性. 農業技術 44: 385-391.

- Taira H. and Taira H (1972) Influence of location on the chemical composition of soybean seeds. II. Potassium, phosphorus, magnesium, and calcium contents. *Proc. Crop Sci. Japan* 41: 213-225.
- 平春枝、平宏和、斉藤正隆 (1977) ダイズの粒度・品種および栽培年度が化学成分組成に及ぼす影響. *日作紀* 46: 483-491.
- 田畑広之進、松原甲、澤正樹、中川勝也 (1995) 青大豆の系統分類と加工適性. *兵庫農技研報(農業)* 43: 79-84.
- 高橋信夫 (1988) 高品質ダイズ品種の育種—その現状と今後の課題—. *農及園* 63: 903-910.
- Tamura T. and Goldenberg R.L. (1996) Zinc nutriture and pregnancy outcomes. *Nutr. Res.* 16: 139-181.
- 谷藤健、加藤淳 (2004) 北海道産大豆の成分特性および豆腐加工適性の評価. *北海道立農試集報* 86: 39-46.
- Tezuka M., Yagasaki K. and Ono T. (2004) Changes in characters of soybean glycinin groups I, Iia, and Iib caused by heating. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1693-1699.
- Thiex N. J., Anderson S. and Gildemeister B. (2003) Crude fat, diethyl ether extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): Collaborative study. *J. AOAC Int.* 86: 888-898.
- Toda K., Chiba K. and Ono T. (2007) Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. *J. Food Sci.* 72: c108-c112
- Toda K., Ono T., Kitamura K., Hajika M., Takahashi K. and Nakamura Y. (2003) Seed protein content and consistency of tofu prepared with different magnesium chloride concentrations in six Japanese soybean

- varieties. *Breed. Sci.* 53: 217-223.
- Toda K., Takahashi K., Ono T., Kitamura K. and Nakamura Y. (2006) Variation in the phytate content of soybeans and its effect on consistency of tofu made from soybean varieties with high protein content. *J. Sci. Food Agric.* 86: 212-219.
- Toda K., Yagasaki K. and Takahashi K. (2008) Relationship between protein composition and coagulation reactivity, particulate formation, and incorporation of lipids in soymilk. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 2824-2830.
- Urbano G., López-Jurado M., Aranda P., Vidal-Valverde C., Tenorio E. and Porres J. (2000) The role of phytate in legumes: antinutrient or beneficial function? *J. Physiol. Biochem.* 56: 283-294.
- Usayran N. and Balnave D. (1995) Phosphorus requirements of laying hens fed on wheat-based diets. *Br. Poult. Sci.* 36: 285-301.
- Vats P., Bhattacharyya M. and Banerjee U. (2005) Use of phytases (*myo*-Inositolhexakisphosphate phosphohydrolases) for combatting environmental pollution: A biological approach. *Environ. Sci. Technol.* 35: 469-486.
- Veum T. L., Ledoux D. R., Bollinger D. W., Raboy V. and Cook A. (2002) Low-phytic acid barley improves calcium and phosphorus utilization and growth performance in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 2663-2670.
- Veum T. L., Ledoux D. R., Raboy V. and Ertl D. S. (2001) Low-phytic acid corn improves nutrient utilization for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 2873-2880.
- Veum T. L., Ledoux D. R., Shannon M. C. and Raboy V. (2009) Effect of

graded levels of iron, zinc, and copper supplementation in diets with low-phytate or normal barley on growth performance, bone characteristics, hematocrit volume, and zinc and copper balance of young swine<sup>1</sup>. *J. Anim. Sci.* 87: 2625-2634.

Wang H. and Murphy P. A. (1994) Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effect of variety, crop year, and location. *Am. Chem. Soc.* 42: 1674-1677.

Wilcox J. R., Premachandra G. S., Young K. A. and Raboy V. (2000) Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Sci.* 40: 1601-1605.

Yagasaki K., Takagi T., Sakai M. and Kitamura K. (1997) Biochemical characterization of soybean protein consisting of different subunits of glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 45: 656-660.

# 謝辭

本論文は、筆者が広島大学大学院生物圏科学研究科環境循環系制御学専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

同専攻教授実岡寛文先生には指導教官として、本研究を行う機会を与えていただき、その遂行にあたって終始ご指導、ご鞭撻いただいた。ここに深謝の意を表す。県立広島大学生命環境学部生命科学科教授猪谷富雄先生、広島大学大学院生物圏科学研究科生物機能開発学専攻教授江坂宗春先生、同研究科環境循環系制御学専攻教授正岡淑邦先生、並びに、同専攻講師上田晃弘先生には、副査としてご校閲の労と貴重なご助言を賜った。ここに深謝の意を表す。

本研究の第4章の実験において、広島県立総合技術研究所農業技術センター保科亨氏と上藤満宏氏には、豆腐加工について初歩からご指導いただくとともに多大なご協力と有益なご助言をいただいた。ここに感謝の意を表す。

本専攻植物栄養生理学研究室の各位には、研究を遂行するにあたり、日頃より多大なご協力をいただくとともに有益なご討論ご助言をいただいた。ここに感謝の意を表す。特に、第3章における低フィチンダイズの選抜育種は、同研究室卒業・修了生である細川武志氏、二村優次氏、夏目悠司氏、政岡賢一氏らの多大な労なくして遂行できなかった。ここに同氏らに対して重ねて感謝の意を表す。

最後に、京都大学大学院農学研究科農学専攻教授の白岩立彦先生、同専攻作物学研究室の各位、並びに、同研究科附属農場の各位には、仕事をしながら本研究の遂行及びとりまとめを行うことに深いご理解をいただき、多大なご協力と貴重なご助言をいただいた。ここに感謝の意を表す。