ジャガイモおよび小麦デンプンの α -アミラーゼ分解性 に及ぼす高圧処理の影響

野口 智 弘^{*1}・谷口 (山田) 亜樹子^{*2}・佐藤 広 顕^{*3}

鈴木 敏 郎^{*1}・松本 信 二^{*1}・高野 克 己^{*3}

Effect of high-pressure treatment on decomposition of potato and wheat starch by α -amylase

NOGUCHI Tomohiro^{*1}, TANIGUCHI (YAMADA) Akiko^{*2}, SATO Hiroaki^{*3}

SUZUKI Toshiro^{*1}, MATSUMOTO Shinji^{*1} and TAKANO Katsumi^{*3}

* 1 Food Processing Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* 2 Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* 3 Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Gelatinization of starch is essential in order to saccharify starch by amylase. Starch is gelatinized by heat-treatment, which requires a lot of energy. This study investigated the possibility of gelatinization of starch by high-pressure treatment, which was to make a better alternative to heat-treatment with respect to energy conservation. Potato and wheat starches were used in this study. Decomposition of potato starch by amylase accelerated after pressure treatment over 600MPa, while that of wheat starch accelerated over 400MPa. The transition enthalpy decreased at the pressure intensity, where the decomposition of starch accelerated by amylase. Although, the polarized light of small starch grains remained, the polarized light of large grains disappeared after high-pressure treatment. The result shows that the crystal structure of small grains in starch is much stronger than that of large grains. These results clearly show that the decomposition of starch by amylase accelerate after high-pressure treatment because of the crystallinity of starch changed by high-pressure treatment.

(Received Jun. 2, 2003 ; Accepted Oct. 10, 2003)

デンプンは、液糖の製造やアルコール発酵などの原料、ならびに増粘剤、糊料などとして重要な役割を担っている。液糖およびアルコールなどの製造においては、デンプンのアミラーゼによる分解が必要であり、このため、耐熱性アミラーゼをはじめ、様々なアミラーゼの研究開発が行われてきた^{1), 2)}。デンプンは結晶性粒子でアミラーゼによる分解を効率よく行うために、熱糊化が行われる。このため省エネルギーの観点から、生デンプン消化性アミラーゼの開発も行われているが、実用には至っていない^{3), 4)}。熱処理によらずデンプンを糊化させ、さら

にその老化防止が可能であれば、デンプンのアミラーゼによる分解に対する省エネルギー化、すなわち糖化工業におけるCO₂排出の削減に大きく貢献するものと考えられる。

そこで、本研究では生デンプンの新規糊化技術の開発を目的とし、従来行われている熱処理に比べ、より省エネルギー的な処理である超高圧処理によりデンプンの結晶構造や表面構造を変化させ、アミラーゼによる分解性とデンプンの結晶性や表面構造と関係について検討を行った。

* 1 東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)
E-mail: 野口智弘; tomo@nodai.ac.jp, 鈴木敏郎; tosuzuki@nodai.ac.jp, 松本信二; smatsu@nodai.ac.jp

* 2 東京農業大学短期大学部醸造学科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)
E-mail: akiko@nodai.ac.jp

* 3 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)
E-mail: 佐藤広顕; hsato@nodai.ac.jp, 高野克己; takano@nodai.ac.jp

実験方法

1. 試料

試料には、ジャガイモデンプン（ナカライテスク社製）および小麦デンプン（和光純薬社製）を用いた。

2. 高圧処理

5% (W/V) 濃度となるようにデンプンを純水に懸濁させ、ポリエチレン製の袋に密封後、超高压処理装置 ITP-70（石川島播磨重工業社製）を用い、静水圧にて 10℃、30 分間行った。

3. α -アミラーゼによるデンプン分解

(1) α -アミラーゼによる分解試験 デンプン懸濁液に、20mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0) 1.5ml、純水 1.5ml および α -アミラーゼ (*Bacillus* 起源, シグマ社製) 26.8unit を加え、37℃ にて 3 時間振とう反応を行った。遠心分離後 (3,000 rpm, 10 分), 上澄液中の全糖量をフェノール・硫酸法^{5),6)}にて測定し、分解率を算出した。

(2) 分解生成物の分析 上述の分解上澄液を減圧乾固し、超純水にて再溶解後、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、HPLC (Shodex DS-4, 検出機: 示差屈折計・Shodex RI-71, カラム: Shodex SUGAR SC 1011 $\times$ 2, 溶離液: H₂O, 温度: 80℃, 流速: 1.0ml, 試料: 20 μ l) にて分析を行った。

(3) 基質親和性および最大反応速度 デンプンに対する α -アミラーゼの K_m 値, 最大反応速度および一次反応速度定数は, Line-weaver-Burk⁷⁾ のプロットに従い算出した。

4. デンプンの構造解析

(1) 示差走査熱量測定 (DSC) デンプン 2ml (50mg/ml) に、純水を 1ml 加え遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) し、得られた沈殿 5mg に純水 10 μ l を加え、アルミ製シールセルに密封後、示差走査熱量計 (島津社製, DSC-60) にて昇温速度 1℃/分で測定を行った。対照として水 15 μ l をアルミ製シールセルに密封したものを用いた。

(2) 偏光顕微鏡観察 デンプンをスライドガラス上にスポットし、偏光顕微鏡 (オリンパス社製, model POS) を用い、200 倍にて行った。

(3) 酸分解試験 デンプンの酸分解試験は, Nægeli の方法に従い行った^{8),9)}。デンプン懸濁液 2ml (50mg/ml) を遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) し、得られた沈殿に 16% 硫酸溶液を 3ml 加え、室温にて 0~9 日間処理し、遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) を行い、上澄液中の全糖量を測定し、分解率を求めた。

結果および考察

1. デンプンの α -アミラーゼ分解に及ぼす高圧処理の影響

Fig. 1 に、ジャガイモおよび小麦デンプンの α -アミラーゼ分解性に及ぼす高圧処理の影響を示した。ジャガイモデンプンは、500 MPa (30 分) 以下の処理まででは、 α -アミラーゼの作用によるデンプンの分解率は、0.1~0.2% であり、500MPa 以下の高圧処理では α -アミラーゼによる分解率は増加しなかった。600MPa 処理では分解率が 15%、さらに 650MPa 処理の場合には、デンプン分解率は約 52% と大きく増大した。

一方、小麦デンプンは 0~200MPa 処理 (30 分) では、分解率は、6~8% でジャガイモデンプンに比べ大きな値を示した。さらに、300MPa 処理で約 15%、400MPa で約 70% と分解率は大幅に増大し、600~650MPa 処理した場合には α -アミラーゼによる分解率は約 80% と大きく増大した。

Table 1 に 650MPa にて高圧処理したデンプンの α -アミラーゼによる分解生成物の HPLC 分析結果を示した。ジャガイモ、小麦両デンプンともに G1~G6 および G7 以上のオリゴ糖が確認され、特に G5, G6 の生成量が最も多く、次いで G7 以上, G3, G2, G4 および G1 であった。G1 の生成量を 1 とすると、各糖 (G1 : G2 : G3 : G4 : G5, 6 : $\geq$ G7) の生成比はジャガイモデンプンでは 1 : 5 : 6 : 2 : 24 : 17, 小麦デンプンでは 1 : 4 : 6 : 2 : 24 : 16 と両デンプン間に分解パタ

Fig. 1 Decomposition of high-pressure treatment starch by α -amylase

—○—Potato, —△—Wheat

Table 1 HPLC analysis of decomposition product of starch with 650MPa high-pressure treatment by α -amylase

Composition sugar	Ratio	
	Potato	Wheat
G 1 : Glucose	1	1
G 2 : Maltose	5	4
G 3 : Maltotriose	6	6
G 4 : Maltotetraose	2	2
G 5 : Maltopentaose	24	24
G 6 : MaltoHexaose		
$\geq$ G 7 : Maltoheptaose	17	16

ーンに差異はみられなかった。

以上のように、高压処理によってデンプンの α -アミラーゼによる分解性は、大きく増大した。しかし、その効果はデンプンの種類によって差がみられた。ジャガイモデンプンは生デンプンの状態では、他起源のデンプンに比べ α -アミラーゼによる分解性が低い。高压処理の影響にも大きな差異がみられたことから、ジャガイモデンプンの結晶構造が他の起源のデンプンに比べ強固であることが推察された。

2. デンプンの構造に与える高压処理の影響

(1) 糊化吸熱量の挙動 高压処理によるジャガイモおよび小麦デンプンの糊化吸熱量の変化をFig. 2に示した。ジャガイモデンプンは、500MPa以下の処理では、糊化吸熱量はいずれの圧力でも2.01~2.23 J/gと大きな変化はみられなかった。600MPa処理にて1.17J, 650

Fig. 2 Effect of high-pressure treatment on enthalpies of starch

—○—Potato, —△—Wheat

MPa処理で0.33Jと無加圧に比べ1/7に低下した。小麦デンプンでは、300MPa以下の処理では糊化吸熱量は1.03~1.17J/g大きな変化はみられず、400MPa以上で大幅な吸熱量の低下が観察されたことから、高压処理により熱糊化と同様に結晶性が崩壊することが明らかになった。

また、これら糊化吸熱量の減少と、先の α -アミラーゼによる分解性増大に対する圧力の影響は両デンプンとも一致した。このことから、 α -アミラーゼによる分解率の増大は、デンプンの高压処理による結晶性の低下によるものと推察した。

(2) 偏光顕微鏡による観察 Fig. 3に高压処理を行ったデンプンの偏光顕微鏡による観察の結果を示した。

Fig. 3 Photograph of polarization microscope of starch treated by high-pressure ($\times 200$)

ジャガイモ、小麦両デンプンともに無加圧では、すべてのデンプン粒子に偏光十字が観察された。一方、650MPa処理のジャガイモデンプンでは、一部に偏光十字の消失が観察され、また偏光十字の消失した粒子は、粒子全体が2～3倍に膨潤していた。また、小麦デンプンでは、650MPa処理によりすべての粒子において偏光十字が消失し膨潤していた。両デンプンともに650MPaの高圧処理により結晶構造の一部またはすべてが崩壊することが明らかになった。しかし、デンプン粒子が溶解するまでには至らず、粒子の輪郭は保持していた。

なお、650MPaの処理による両デンプンの偏光十字消失の挙動に差異が生じたのは、両デンプン粒の結晶構造の違いが影響しているものと推察した。

また、650MPa処理のジャガイモデンプンで、一部の粒子に偏光十字が観察され、これらは、偏光十字が消失した粒子よりもいずれも粒子が小さかった。このことから、ジャガイモデンプンの小粒子は、大粒子に比べ結晶構造が強固であることが推察された。

(3) 酸分解試験 両デンプンの結晶性および高圧処理の影響を調べるため、酸分解試験を行った。Fig. 4に示したように、無加圧のジャガイモおよび小麦デンプンは、酸処理による分解率が日数に従い比例して増加し9日目ではそれぞれ約8%および約13%を示し、ジャガイモデンプンは、小麦デンプンに比べ結晶性が大きかった。一方、650MPa処理デンプンでは、9日目において分解率はジャガイモデンプンが約25%、小麦デンプンが約50%であり、両デンプンとも未処理に比べ高い分解率を示した。

生デンプンは、高い結晶性のため酸による分解を受け難いが、650MPa処理によって、結晶性の指標である偏光十字が消失したことから、高圧処理によるデンプンの酸分解率の増加は、その結晶構造の崩壊によることが明

らかになった。

無加圧デンプンでは、いずれも酸による分解率が処理日数に従いほぼ直線的に増加した。一方、650MPa処理した両デンプンとも、それぞれ2日目で、9日目の約50%の分解率に達し、それ以降の分解率の上昇は緩慢であった。このような分解率の挙動は、高圧処理デンプンの結晶構造の崩壊が粒内で均一に起こっているのではないことを示唆しているものと考えられた。また、小麦デンプンはジャガイモデンプンに比べ分解率およびその上昇が大きかったが、これは両デンプンの結晶構造の強さを反映したものと推察した。

3. 基質親和性および最大反応速度

Table 2に、ジャガイモデンプンに対する α -アミラーゼの K_m 値、最大反応速度および一次反応速度定数を示した。 K_m 値は無加圧、600MPa処理デンプンともに同様の値を示し α -アミラーゼのジャガイモデンプンに対する基質親和性に対し、高圧処理はほとんど影響がみられなかった。一方、最大反応速度および一次反応速度定数は、600MPa処理により無加圧の約13倍の値を示した。これらのことより、高圧処理によるデンプンの α -アミラーゼ分解性は、加水分解速度が速くなることによって、大幅に増加することが明らかとなった。

Table 2 Effect of high-pressure treatment at K_m , V_{max} and V_{max}/K_m to potato starch of α -amylase

K_m (mg/ml)		V_{max} (10^{-4} mg/ml/min)		V_{max}/K_m (10^{-5} /min)	
0	600 (MPa)	0	600 (MPa)	0	600 (MPa)
35.12	37.84	13.85	187.01	3.94	49.42

要 約

各種デンプン中で最も難分解性であるジャガイモデンプンの α -アミラーゼ分解性に及ぼす高圧処理の影響について検討を行い、またジャガイモデンプンに比べ分解性の高い小麦デンプンを比較対照として試験を行った。ジャガイモデンプンでは、600MPa以上の処理によって分解率の増大がみられたのに対し、小麦デンプンは400MPa以上の処理により分解性が著しく増加し、両デンプンの耐圧性に大きな差異がみられ、ジャガイモデンプンは他起源のデンプンに比べ構造が強固であることが推察された。また、両デンプンの α -アミラーゼによる分解生成物のパターンを測定したところ、ジャガイモ、小麦両デンプンともにG5以上のオリゴ糖の生成が多く、両デンプン間の分解パターンに差異はみられなかった。さらに、600MPaの高圧処理による分解性の増大は、 K_m 値に変化はみられず、最大反応速度が大きく増加したこ

Fig. 4 Decomposition of 650 MPa high-pressure treated starch with sulfuric acid

●—Potato, non-Pressure, ○—Potato, 650MPa
▲—Wheat, non-Pressure, △—Wheat, 650MPa

とより、加水分解速度が速くなることによって、大幅に増加することが明らかとなった。

また、糊化吸熱量はジャガイモデンプンで600MPa以上、小麦デンプンでは400MPa以上の圧力処理にて著しく低下し、これら糊化吸熱量の減少は、 α -アミラーゼによる分解性増大圧力量と一致した。

さらに、高压処理デンプンの構造は、生デンプンの結晶性構造の指標である偏光十字が、ジャガイモデンプンでは、650MPa処理にて一部消失し、小麦デンプンでは、すべてが消失した。これら、偏光十字が消失した粒子は、粒子全体が膨潤していたが、熱糊化デンプンのようなデンプン粒子が溶解するまでには至らず、粒子の輪郭は保持していた。また、偏光十字が観察された粒子は、消失したデンプン粒より、いずれも粒子が小さかった。このことから、ジャガイモデンプンの小粒子は、大粒子に比べ結晶構造が強固であることが推察された。また、酸による分解性は両デンプンともに650MPa処理で大きく増大し、酸処理初期に分解が進みが大きく、それ以降の分解率の上昇は緩慢であった。このような分解率の挙動は、高压処理デンプンの結晶構造の崩壊が粒内で均一に起こっているものではないことを示唆しているものと考えられた。

以上のことから、デンプンは高压処理によりその結晶性が低下し、酵素反応の反応速度が増加する構造へ変化することで、 α -アミラーゼによる分解性が増大すること明らかとなった。

文 献

- 1) SASAKI, H., KUROSAWA, K. and TAKAO, S.: Screening of Microorganisms for Raw Starch Saccharifying Enzyme Production, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1661 (1986)
- 2) TAKAO, S., SASAKI, H., KUROSAWA, K., TANIDA, M. and KAMAGATA, Y.: Production of Raw Starch Saccharifying Enzyme by *Corticium rolfi*, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1978 (1986)
- 3) 高崎義幸: 耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの開発, 食品工業, **37**, 44 (1994)
- 4) 高崎義幸: 工業的利用特性の高い α -アミラーゼ, グルコースイソメラーゼ及びマンノースイソメラーゼの探索とその性質, 日食科工誌, **48**, 150 (2001)
- 5) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and SMITH, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- 6) HODGE, J. E. and HOFREITER, B. T.: *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Academic Press, New York), **1**, p. 388 (1962)
- 7) 永井 裕・石倉久之・林 利彦: シーゲル・生化学計算法 (廣川書店, 東京) pp. 263~276 (1985)
- 8) 鈴木繁男・中村道徳: 澱粉科学実験法 (朝倉書店, 東京), pp. 183~196 (1979)
- 9) 檜作 進・竹田靖史・今村茂行: 甘藷でんぷん粒の酸分解とNägeli型アミノデキストリンの迅速調製に関する研究, 日農化誌, **46**, 119 (1972)

(平成15年6月2日受付, 平成15年10月10日受理)