[澱粉科学 (*J. Jap. Soc. Starch Sci.*) 第23巻 第2号 p.77~81 (1976)]

High Amylose Corn Starch の γ 線照射に関する研究

(第2報) アミロメイゾ澱粉から調製したアミロース
およびアミロペクチンの性質に及ぼす γ 線照射の影響

渡邊幸雄* 綾野雄幸* 小原哲二郎**

(昭和50年12月22日受理)

Studies on Gamma Irradiation of High Amylose Corn Starch

Part II. Some effects of gamma irradiation on physicochemical properties
of amylose and amylopectin fractionated from amylo maize starch

Yukio WATANABE,* Yuko AYANO* and Tetsujiro OBARA**

* *Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture,
Chiba University (648 Tojo, Matsudo, Chiba, Japan)*

** *Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture (1-1-1 Sakuragaoka,
Setagaya-ku, Tokyo, Japan)*

In order to clarify the change of physicochemical properties of irradiated starches, fractionated amylose and amylopectin from amylo maize starch were treated with five different doses of gamma irradiation up to 1×10^6 rad. The samples were characterized by the determination of intrinsic viscosity, formation of free reducing groups, iodine absorption spectra, alkali number and amylase digestibility.

Irradiated samples of both amylose and amylopectin decreased in viscosity and iodine absorption, and increased in reducing value and alkali number. These results indicated that both amylose and amylopectin were degraded in the same manner as intact starches by gamma irradiation. Amylose, however, was more sensitive to this treatment than amylopectin.

Both fractionated components of amylo maize starch were unchanged in α -amylase digestibility after irradiation compared with non-irradiated samples. On the other hand, irradiated amylose showed a marked change in the β -amylolysis limit; it was gradually lowered in the β -amylolysis degree as increasing the radiation dose. Irradiated amylose with a dose of 1×10^6 rad decreased in β -amylolysis degree approximately 14% than non-irradiated sample. The low β -amylolysis limit of irradiated amylose was not restored to that of non-irradiated sample even by concurrent action of β -amylase and pullulanase.

前報¹⁾において、4種のトウモロコシ澱粉に100万radまでの γ 線照射を行ない、理化学的性質の変化について検討した。その結果、物性の変化は2万radの低線量照射から起こり、化学的諸性質の変化は20万rad以上の

照射から起こることを認めた。また普通トウモロコシおよびモチトウモロコシ澱粉の β -アミラーゼ分解限度は照射によって、やや向上する傾向が見られたが、アミロメイゾ澱粉では逆に低下することを報告した。

このように γ 線照射した澱粉に β -アミラーゼを作用させると、澱粉の種類(アミロース含量の相違)によって β -アミラーゼ分解限度が向上したり、また逆に低下

* 千葉大学園芸学部農芸化学科(松戸市戸定648)

** 東京農業大学農学部農芸化学科(世田谷区桜丘1-1-1)

したりするような相反する現象を呈したので、この現象を解明する目的で、今回は澱粉成分の面から検討した。アミロメイズ澱粉を試料としてアミロースおよびアミロペクチンを分離し、これらに固体状態で 100 万 rad までの範囲で γ 線照射を行ない、理化学的性質ならびに β -アミラーゼによる分解限度について調べた。

実験方法

1. アミロースおよびアミロペクチンの調製と γ 線照射条件

アミロースおよびアミロペクチンの調製は、アミロメイズ澱粉（豊年製油KK製、アミロース含量49.3%）を85%メタノールで室温で脱脂後、PACSUら²⁾の方法に準じて行なった。すなわち澱粉20gに500mlの1N水酸化ナトリウム溶液を加え4°Cに一夜放置して溶解した。これに50%リン酸を加えてpH 4.0とし、*n*-ブタノール50mlを加え、92°Cで5時間還流冷却器をつけて加熱した。加熱したものは不溶物をろ過した後、容器を布でいく重にもつつみ、室温まで徐冷した。

つぎに遠心分離（3,000回転、20分）を行ない沈殿を集め、*n*-ブタノール飽和水で洗浄、遠心分離を繰り返した。洗浄、遠心分離は上澄液にメタノールを加えたとき濁りが生じなくなるまで行なった。この操作を2回繰り返して再結晶させた後、エタノールおよびエーテルで脱水しアミロース画分とした。アミロースの収量は約5.5gであった。

アミロペクチン画分は最初の遠心分離液にエタノールを沈殿が生じなくなるまで加え、沈殿を集めてエタノールおよびエーテルで脱水して調製した。アミロペクチンの収量は約7gであった。なおアミロースを調製する際に空気酸化が起こり、 β -アミラーゼ分解率が低下することが報告されているので³⁾、その酸化を最小限度にするために、窒素ガス気流中で加熱を行なった。調製した試料の水分含量はアミロース10.8%、アミロペクチン9.4%であった。

これらの試料に理化学研究所に設置された⁶⁰Co（15,000 Ci）を線源とした γ 線照射装置を用い、20万radまでの照射は5,900 rad/分、50万rad以上は15,100 rad/分の線量率で全線量100万radまで γ 線照射を行なった。

2. 測定方法

1) 理化学的性質の測定

極限粘度は1N水酸化ナトリウム溶液を溶媒として、0.5%以下の数種の濃度に調製した試料溶液について、

落下速度をオストワルド型粘度計を用いて35°Cで測定し、外挿法により求めた。還元力は同試料の一部をとり塩酸で中和後ソモギー・ネルソン法⁴⁾で測定した。ヨウ素呈色度はMcCREADYらの方法⁵⁾に準じて100ml中に試料乾量4mg、ヨウ素2mg、ヨウ化カリウム20mgを含む溶液の吸光度を450~750nmの範囲で測定した。またアルカリ数はデンブンハンドブック記載の方法⁶⁾により、ヨウ素親和力は小林らの方法⁷⁾により測定した。

2) α -アミラーゼによる分解率の測定

試料50mgに蒸留水2ml、1N水酸化ナトリウム溶液2mlを加えて冷室で一夜放置して溶解させた後、塩酸で中和し、これに1/15Mリン酸緩衝液（pH 6.8）5ml、酵素（Boehringer社、スイ臓 α -アミラーゼ、1,000 U/mg）10 μ g、トルエン1滴を加えて蒸留水で全量を50mlとし、37°Cに保って一定時間後に生成した還元糖をマルトースとしてソモギーのヨウ素滴定法⁸⁾で定量した。分解率は全炭水化物量をフェノール・硫酸法⁹⁾で求め、それに対する生成マルトース量を百分率で表わした。

3) β -アミラーゼ単独およびプルランナーゼとの併用による分解率の測定

β -アミラーゼ単独での分解率の測定は、試料10mgを1mlの蒸留水に懸濁し、1N水酸化ナトリウム溶液1mlを加えて冷室で一夜放置して溶解させ塩酸で中和した後、pH 4.8の0.2M酢酸緩衝液5ml、 β -アミラーゼ（Boehringer社、甘藷 β -アミラーゼ、500 U/mg）100 μ g、トルエン1滴を加え、蒸留水で全量を10mlとし40°Cで反応を行なった。生成マルトース量は30時間以上反応を継続しても変わらないことから、30時間反応をもって最終分解率とした。この条件はアミロペクチンをほぼ57%マルトースに分解するに十分な条件である。

β -アミラーゼとプルランナーゼ（Boehringer社、*A. aerogenes*）との併用分解は、試料10mgに蒸留水1ml、1N水酸化ナトリウム溶液1mlを加えて冷室で一夜放置して溶解させ塩酸で中和した後、pH 5.0の0.2M酢酸緩衝液5ml、プルランナーゼ100 μ g、 β -アミラーゼ100 μ g、トルエン1滴を加え、蒸留水で全量を10mlとし40°Cで30時間反応を行なった。生成マルトースおよび全炭水化物の定量は α -アミラーゼ分解の場合と同様な方法で行なった。分解率は次式¹⁰⁾により算出した。

β -アミラーゼ分解率

$$= \frac{\text{還元力に相当するマルトース量}}{\text{フェノール・硫酸法で求めた全炭水化物量}} \times \frac{324}{342} \times 100$$

実験結果および考察

1. 理化学的な性質変化

実験結果を Fig.1~4 に示した。 γ 線照射されたアミロースおよびアミロペクチンの極限粘度 (Fig.1) は照射線量の増加につれて減少を示し、100 万 rad の照射では未照射試料の値の約50%程度であった。ヨウ素吸収スペクトル (Fig.2) の測定では、未照射アミロースの最

Fig.1. Intrinsic viscosities of amylose and amylopectin irradiated with gamma rays.

Fig.2. Iodine absorption curves of amylose and amylopectin irradiated with gamma rays. Sample concentration; 4mg%
— Non-irradiated, --- 100×10^4 rad.

大吸収波長は 630 nm であったが、50 万 rad 照射アミロースではわずかに短波長側に移行し、100 万 rad 照射したものでは 615 nm であった。最大吸光度は未照射アミロースに比し、100 万 rad 照射時で約 0.1 の低下であった。同時にヨウ素親和力も測定したが、未照射アミロースの 20.3 (I_2 g/100 g) から 100 万 rad 照射で 18.5 とわずかに低下したにすぎなかった。アミロペクチンでは最大吸収波長および吸光度には変化が見られなかった。還元糖値 (Fig.3) およびアルカリ数 (Fig.4) は 20 万 rad 以上の線量では両試料ともに顕著な増加が見られた。

以上の結果から、アミロースおよびアミロペクチンともに γ 線照射により、そのグルコース連鎖が切断され、分子の重合度が減少したことを示しているものと考えら

Fig.3. Reducing sugars of amylose and amylopectin irradiated with gamma rays.

Fig.4. Alkali numbers of amylose and amylopectin irradiated with gamma rays.

れる。このような結果は、澱粉について報告されている^{1,11-13)}ものと同様な結果であった。

またアミロースおよびアミロペクチンに対する照射影響を比較すると、アミロースの方が性質の変化が大きく、より影響を受けやすいように思われる。

2. α -アミラーゼおよび β -アミラーゼによる分解

α -アミラーゼによる照射アミロースおよびアミロペクチンの分解率を Fig. 5 に示した。100 万 rad までの γ 線照射による分解率の変化は両者ともにほとんど見られなかった。西村¹⁴⁾は馬鈴薯澱粉から調製した固体アミロースに γ 線照射を行ない、100 万 rad 程度の線量でも α -アミラーゼ分解率が低下したと報告しているが、これとは異なった結果を示した。

β -アミラーゼによる分解限度を Table 1 に示した。アミロペクチンでは α -アミラーゼ分解の場合と同様、分解率の変化は見られなかった。これは、モチトウモロコシ澱粉で分解限度がやや上昇するという結果¹⁾と異なっているが、アミロメイズ澱粉のアミロペクチンは通常のアミロペクチンに比較して、単位鎖長が長いという構造的な差異に基づくのではないと思われる。

アミロースでは未照射試料の分解限度に比較し、5 万 rad の照射から約 4% の低下を示した。分解限度の低下の度合は照射線量の増加に伴って大きくなり、100 万 rad の照射では約 14% の低下であった。

このように、アミロースとアミロペクチンの β -アミラーゼ分解限度への影響に差が生じる原因として、両者ともに γ 線照射によって β -アミラーゼの作用を阻止するような構造変化と、同時に還元力の増加に見られるよ

うな分解も起こっていることが考えられる。つまりアミロペクチンではグルコース連鎖の内部が切断を受けると、 β -アミラーゼが作用できる部分が多くなり分解限度も増加するであろう。一方、アミロースではグルコース

Fig. 5. α -Amylase digestibilities of amylose and amylopectin irradiated with gamma rays. Reaction mixture contained 50 mg of polysaccharides dissolved in 2 ml of 0.5N NaOH and neutralized with 1N HCl, α -amylase (pancreas, Boehringer Co.) 10 μ g, 5 ml of 1/15M phosphate buffer (pH 6.8) and was made up to 50 ml with distilled water. The reaction mixture was incubated at 37°C for 30 hr and samples of 1 ml were removed at intervals. Reducing sugar was measured as maltose by SOMOGYI's method. — Non-irradiated, - - - - 100 $\times$ 10⁴ rad.

Table 1. Degradation of irradiated amylose and amylopectin by β -amylase and pullulanase.

Dose $\times 10^4$ rad	Amylose		Amylopectin	
	Degree of β -amylolysis %		Degree of β -amylolysis %	
	I*	II**	I*	II**
0	80.3	91.6	64.0	103.1
5	76.3	85.2	64.7	102.8
10	74.3	84.7	65.1	102.7
20	69.6	80.9	64.4	102.5
50	67.6	79.5	64.0	101.6
100	66.7	73.4	64.0	100.4

* β -amylase alone, ** concurrent action of β -amylase and pullulanase.

Reaction mixture contained 10 mg of polysaccharides dissolved in 2 ml of 0.5N NaOH and neutralized with 1N HCl, β -amylase (sweet potato, Boehringer Co.) 100 μ g, pullulanase (*A. aerogenes*, Boehringer Co.) 100 μ g, 5 ml of 0.2M acetate buffer (pH 5.0). The reaction mixture was incubated at 40°C for 30 hr. The liberated maltose was measured by SOMOGYI's method⁹⁾.

連鎖が切断されても分解限度はほとんど影響されないものと考えられる。これらの変化と β -アミラーゼ作用阻害がからみ合っただけで、アミロースでは分解限度が低下し、アミロペクチンではほとんど影響が現われないという結果を与えたものと考えられる。

β -アミラーゼの作用を阻止するような異常構造の生成に関して、貝沼ら¹⁰⁾は澱粉を焙焼処理した際の β -アミラーゼ分解限度の低下は、新しい分岐の生成などの構造変化に基づいていると報告している。

そこで、本実験で見られた照射アミロースの β -アミラーゼ分解限度の低下は、分岐の生成などの構造変化によるものかどうかを確かめるために、 α -1,6 結合を切る酵素としてプルラーゼを用い、 β -アミラーゼと同時に作用し分解を行なった。この両者の酵素により馬鈴薯澱粉から調製されたアミロースはほぼ分解されると報告されている¹⁵⁾。

本実験の結果を Table 1 に示した。未照射アミロースの分解限度は β -アミラーゼ単独の場合の 80.3% からプルラーゼ併用では 91.6% に上昇したが、100% の分解までには達せず、反応液にはヨウ素と青色に反応する高分子の部分が分解されずに残っているのが認められた。分解限度が 100% に達しない原因については、さらに検討中である。照射アミロースのプルラーゼ併用分解では、未照射アミロースで得られた分解限度まで達せず、 β -アミラーゼ単独の場合の分解限度からの上昇は未照射アミロースの場合とほぼ同じ約 10% 程度であった。また照射線量の多いアミロースほど分解限度は低かった。

同様の実験をアミロペクチンについて行なったところ、未照射試料の分解限度は約 103%、100 万 rad 照射したものは約 100% であった。

以上のように、照射アミロースの β -アミラーゼ分解限度は、プルラーゼを併用しても未照射アミロースの値まで回復しない。これらの結果から、 β -アミラーゼ分解限度が照射によって低下する原因は α -1,6 結合の生成によるというよりは、グルコース残基が何らかの化学変化を受けて β -アミラーゼの反応を阻止しているのではないかと考えられ、この点はさらに検討中である。

要 約

澱粉を γ 線で照射した際の各種の性質変化を澱粉成分上から明らかにする目的で、アミロメイズ澱粉から調製したアミロースおよびアミロペクチンに 100 万 rad までの γ 線照射を行なった。これらの試料について極限粘

度、ヨウ素吸収スペクトル、還元力、アルカリ数、アミラーゼ分解率を測定し、次の結果を得た。

1) アミロースおよびアミロペクチンは γ 線照射により、澱粉の場合と同様な変化を受けることが、線量の増加に伴う極限粘度およびヨウ素呈色度の減少、還元力およびアルカリ数の増加から観察された。以上の性質変化はアミロースの方がアミロペクチンよりも大きかった。

2) アミロースおよびアミロペクチンの α -アミラーゼ分解率は照射によって変化が見られなかった。しかしアミロースの β -アミラーゼ分解限度は照射線量の増加につれて低下し、100 万 rad の照射では未照射アミロースの分解限度よりも約 14% 低かった。また照射アミロースに β -アミラーゼとプルラーゼを併用して作用させても、その分解限度は未照射アミロースのそれよりも低かった。

終りに本実験を行なうにあたり、試料澱粉の提供をいただいた豊年製油株式会社および γ 線照射に御協力いただいた理化学研究所の岡澤精茂博士に深謝します。また本報告をまとめるにあたり、御助言をいただいた食品総合研究所の貝沼圭二博士に深謝します。

文 献

- 1) 渡邊幸雄, 綾野雄幸, 小原哲二郎: 食品工誌, **23**, 13 (1976).
- 2) 二國二郎編: デンプンハンドブック, p.623, 朝倉書店, 東京 (1961).
- 3) W.BANKS, C.T.GREENWOOD and J.THOMPSON: *Chem. and Ind.*, 928 (1959).
- 4) M.SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 339 (1952).
- 5) R.M.MCCREADY and W.Z.HASSAD: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1154 (1943).
- 6) 二國二郎編: デンプンハンドブック, p.239, 朝倉書店, 東京 (1961).
- 7) 小林恒夫, 吉田恵一: 澱粉工誌, **8**, 48 (1960).
- 8) M.SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 9) M.DUBOIS, K.A.GILLES, J.K.HAMILTON, R.A.REBERS and F.SMITH: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 10) 貝沼圭二, 古川 孝, 鈴木繁男: 澱粉科学, **20**, 1 (1973).
- 11) 三品岡良, 二國二郎: 農化, **33**, 930 (1959).
- 12) Z.I.KERTESZ, E.R.SCHULZ, G.FOX and M.GIBSON: *Food Res.*, **24**, 609 (1959).
- 13) 道口正雄, 横山義春, 岡田郁之助: 工化, **64**, 2001 (1961).
- 14) 西村明美: 農化, **35**, 510 (1961).
- 15) W.BANKS and C.T.GREENWOOD: *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 674 (1966).