に種々御教授戴いた東大応微研北原先生、各種菌株の分譲を戴いた東大応微研飯塚先生、武田醸酵研究所長谷川武治氏、長尾研究所椿啓介氏、国立衛生試験所宇田川俊一氏、Q. M. Culture Collection D. I. Fennel 博士等の各位に感謝の意を表します。

(1) K. Bernhauer, N. Böckl: <i>Biochem. Z.</i> , 253, 16 (1932).	(6) 楠瀬正道: 蛋白, 核酸, 酵素, 1, 126 (1957).
(2) J. L. Yuill: <i>Biochem. J.</i> , 22, 1504 (1928).
J. L. Yuill: <i>Chem. & Ind.</i> , 55, 155 (1936).	(7) 東京大学農芸化学教室編: 実験農芸化学, 下巻, p. 475 (1952).
(3) R. Schreyer: <i>Biochem. Z.</i> , 240, 295 (1931).	(8) A. E. Goodman, J. B. Stark: <i>Anal. Chem.</i> , 29, 1 (1957).
(4) 片桐英郎: 日本特許, 昭 32-3048 (1957).
片桐英郎, 立花精: ビタミン, 6, 674 (1953).	(9) H. A. Krebs, L. V. Eggleston: <i>Biochem. J.</i> , 37, 334 (1943).
(5) 北原覚雄, 福井作蔵, 三沢正愛: 昭和 33 年 7 月日本農芸化学会関東支部例会.	(10) C. Thom, K. B. Raper: <i>Manual of the Aspergilli</i> (1945).
	(11) H. Iizuka: <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 1, 1 (1955).

アミロースの重合度とヨード反応との関係*

大 橋 一 二 (岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 12 月 15 日 受理

普通の澱粉は Meyer 等⁽¹⁾によれば D-グルコースの α -1,4 結合のみからなる直鎖のアミロースと枝分れた構造のアミロペクチンからなっているものである。前者はヨード親和力が大で後者は小である⁽²⁾。澱粉・ヨード反応は古来多数の研究者によって研究され、その綜説^(3,4)もされている。反応機構に関しては Bear⁽⁵⁾, Rundle 等⁽⁶⁾によって説明された。著者⁽⁷⁾は各種澱粉のヨード親和力を測定した際に馬鈴薯、長芋等の澱粉のヨード親和力は玉蜀黍、小麦の澱粉のそれに比して小であるが、遊離ヨード濃度が高くなれば前者のヨード吸収量は後者のそれより大になることを認めた。又馬鈴薯、長芋澱粉のヨード呈色もヨード親和力が比較的大なる豆類澱粉のそれに相当する程の値を示した。この原因はアミロペクチン区分の性質特に直鎖部分の長さ、即ちアミロペクチン分子のグルコースの α -1,4 結合の長さに関係を有するであろうと推論した⁽⁸⁾。この現象を明らかにするためにはアミロースの重合度より小で、アミロペクチンの平均鎖長 20~27^(9,10) より少し大きい重合度を有するアミロデキストリンのヨード反応を明らかにしなければならない。

アミロースの重合度とヨード反応との関係については Baldwin 等⁽¹¹⁾, Kerr⁽¹²⁾, Swanson⁽¹³⁾, Mould 等⁽¹⁴⁾の報告がある。前二報告は主としてアミロースの重合度とヨード吸光頂点の関係で、後二報告はアミロデキストリンの重合度とヨード呈色との関係である。Swanson⁽¹³⁾はホスホリラーゼの合成途中のアミロデキストリンとヨード呈色との関係、Mould 等⁽¹⁴⁾はアミロースを α -アミラーゼで加水分解してその中間産物を電気泳動法によって分離したアミロデキストリンとヨード呈色との関係について報告しているが両報告によってかなりの差異がある。ヨード反応赤のアミロデキストリンの平均重合度は Swanson⁽¹³⁾では 13 程度、Mould 等⁽¹⁴⁾では 25~40 と異っているから、アミロデキストリンの重合度とヨード反応との関係について実験した。

最も純粋なアミロースが得られると報告⁽¹⁵⁾されている Kerr 等⁽¹⁶⁾の温水抽出ブタノール法で玉蜀黍澱粉からアミロースを分離して塩酸で加水分解後、アミロース・ヨード複合体の沈澱性を利用して分別し、更に複合体として沈澱しない部分はアルコールで分別沈澱を行って分別し、各区分の重合度をメタ過ヨード酸ソーダを使用する酸化法^(10,15,17)で測定した。更にヨード呈色の吸光頂点を測定してアミロデキストリンの重合度とヨード反応との関係を明らかにした。

実験方法及び結果

1. アミロース加水分解産物の分別 市販玉蜀黍澱粉を 5 倍量の 0.1% NaOH 溶液で数回洗滌して蛋白を除き、アルカリ性のなくなるまで水洗、濾過風乾して粉砕する。Lansky 等⁽²⁾法にしたがって 85% メタノール

* Relation of Iodine Reaction and Polymerization Degree of Amylose.

By Kazuji OHASHI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Gifu)

で脱脂風乾した。アミロースの分別は Kerr 等⁽¹⁶⁾の方法にしたがって行った。ここに得たアミロースをそれぞれ 6.0 g ずつとってよく粉砕後 30 ml のアルコールに懸濁する。水 600 ml を 90° に加熱してよく攪拌しながら上記アミロース懸濁液を加えて溶解し、温時ガラスフィルターで濾過不溶物を除き、60 ml の 0.1 N HCl を加えて 100° にそれぞれ 0.5, 1, 2, 3, 4 時間加熱加水分解後流水中に冷却し、20 時間室温に放置老化析出させる。老化析出したアミロースはそれぞれ遠心分離し、沈澱を数回水で洗滌、次いでアルコールで脱水乾燥した。上澄液は全部混合してイオン交換樹脂 Amberlite IR 410 で処理して塩酸を除き減圧濃縮してアルコール濃度 70% (容量) で沈澱させた。1, 2, 3, 4 時間加水分解後老化析出したアミロース及びアルコールで沈澱したアミロデキストリンを全部混合して 1 N KOH 溶液に溶解し、1 N HCl で中和 (pH 4.0) してアミロース濃度が 0.3 % 溶液になるように、更に KCl, KI を加えて KCl, KI の最終濃度がそれぞれ 0.05 N になるように水を加える。徐々にヨード溶液 (I_2 : 0.01 N, KI, KCl はそれぞれ 0.05 N) を加えて遊離ヨードが $0 \sim 1.6 \times 10^{-6}$ N の濃度で沈澱するアミロース・ヨード複合体を遠心分離によって除去する。更にヨード溶液を加えて遊離ヨード濃度が、 $1.6 \sim 2.5$, $3 \sim 5$, $5 \sim 10$, $10 \sim 20 \times 10^{-6}$ N において沈澱するアミロース・ヨード複合体をそれぞれ遠心分離 (3500/分, 10 分間) して沈澱物を集める。KCl, KI のそれぞれの濃度 0.05 N, 遊離ヨードの濃度が 2.5 , 5 , 10 , 20×10^{-6} N の溶液でそれぞれ相当する沈澱を洗滌後水に溶解、0.1 N チオ硫酸ソーダ溶液でヨードをヨード塩に変えてからイオン交換樹脂 Amberlite IRA 410 及び IR 112 で処理脱塩後減圧濃縮し 99 % アルコールで沈澱、脱水、乾燥した。遊離ヨード濃度が 20×10^{-6} N において沈澱しない部分も同様に処理してアルコール濃度 (容量) 40, 50, 60, 70% で分別沈澱を行った。50, 60% の区分は少量であったから実験から除いた。

2. 重合度の測定 澱粉、アミロース、アミロペクチン等の重合度の測定には粘度法、浸透圧、超遠心分離、溶液の光の分散等の物理的方法や、多糖類中の還元基の定量のような化学的方法によって行なわれている。前者は長時間と多量の試料を必要とし、後者は少量の試料で迅速に測定出来るが比較値しか得られない欠点がある⁽²⁾。更に直鎖分子であるアミロースの重合度の測定にはメタ過ヨード酸塩による酸化法^(10,15,17)がある。Kerr 等⁽¹⁵⁾によると温水抽出ブタノール法で調製した玉蜀黍結晶アミロースの重合度は浸透圧法とメタ過ヨード酸塩法とはよく一致すると報告されているからアミロース及びアミロデキストリンの重合度の測定はメタ過ヨード酸ソーダを用いて小林等⁽¹⁷⁾の方法に準じて測定した。その結果は第 1 表のようである。

第 1 表 アミロデキストリンの重合度

分 別 法	区分番号	平均重合度 DP
原アミロース (玉蜀黍澱粉, 温水抽出-ブタノール)	1	330
0.01 N HCl, 100°, 30 分間加水分解, 老化	2	120
遊離ヨード $1.6 \sim 2.5 \times 10^{-6}$ N で沈澱	3	61
遊離ヨード $3 \sim 5 \times 10^{-6}$ N で沈澱	4	41
遊離ヨード $5 \sim 10 \times 10^{-6}$ N で沈澱	5	34
遊離ヨード $10 \sim 20 \times 10^{-6}$ N で沈澱	6	28
40% アルコールで沈澱	7	21
60-70 % アルコールで沈澱	8	16

Kerr 等⁽¹⁵⁾によれば玉蜀黍澱粉から温水抽出ブタノール法で調製したアミロースの重合度は 255 であるから、このアミロースの重合度 330 は少し大である。

3. ヨード呈色 ヨード呈色強度の測定にはアミロースのヨード親和力 $18.5 \sim 20\%$ ⁽²⁾ に比して著るしく多量のヨードが使用される。又ヨードカリ等の無機塩の量は呈色強度及び吸光頂点に影響を及ぼす重要な因子であるが、澱粉、ヨード、ヨードカリの使用比は研究者によって異っている。普通にはその比^(12,13,18,19)は重量で澱粉 1 に対してヨード 1~2, ヨードカリ 2~10 程度である。アミロース、アミロペクチンについて澱粉量、ヨード、ヨードカリ量の関係について予備実験を行った結果重量比で 1:1:2 が適当であることが判明した。各区分 50 mg をとって 4 ml の 1 N KOH に溶解、イオン交換樹脂 Amberlite IR 112 で処理してアルカリを除き 200 ml とする。この溶液 10 ml にヨード・ヨードカリ溶液 (1 ml 中にヨード 0.50 mg, ヨードカリ 1.00 mg を含む) 5 ml を加えて 100 ml として約 2 時間放置後、ヨード呈色強度を $460 \sim 700$ m μ において日立分光光度計を使用して測定した。その結果は第 1 図のようである。アミロースの重合度が減少するにしたがってヨード反応の吸収帯の頂点は短波長の方へ移動し、吸光度も減少する。ヨード反応の淡赤黄色のアミロデキストリンの

第 1 図 ヨード呈色とアミロースの重合度との関係

番号とアミロースの平均重合度との関係は第 2 表のようである。

測定条件：アミロデキストリン 2.5mg, ヨード 2.5mg,
ヨードカリ 5.0mg, 液量 100ml

溶液を徐々に加えた場合にそのヨード反応の色は各区分共にその区分特有の色で始終変らなかった。更に 3. のヨード呈色の吸光頂点を測定した場合と同様に操作して、各区分を溶液として重量比でアミロデキストリンの 20%, 10% に相当するヨード量をヨード水溶液（ヨードカリを含まない）として加えた場合のヨード呈色の吸光頂点を測定した。その結果を 3. の場合と共に第 2 表に示した。区分 3, 4, 5, 6 はこれらのヨード呈色の測定条件では吸光頂点に変化はなかった。したがって区分 3, 4, 5, 6 のアミロデキストリンのそれぞれの分子量分布は狭いと推定される。

第 2 表 アミロースの重合度とヨード呈色との関係

ヨード呈色

区分	色	測定条件*		b		c	
		a	吸光度	吸光頂点 mμ	吸光度	吸光頂点 mμ	吸光度
1	青	630	0.87	620	1.22	620	0.49
2	青	620	0.84	610	0.92	610	0.38
3	青	600	0.80	600	0.88	600	0.28
4	青紫	580	0.75	580	0.47	580	0.05
5	紫	560	0.70	560	0.21	—	—
6	赤紫	540	0.61	540	0.06	—	—
7	赤	510	0.20	—	—	—	—
8	淡赤黄	480	0.07	—	—	—	—

* 測定条件

	アミロース mg	ヨード mg	ヨードカリ mg	液量 ml
a	2.5	2.5	5.0	100
b	10.0	2.0	0	200
c	10.0	1.0	0	200

5. Swanson の合成デキストリンの重合度とヨード反応との関係との比較 Swanson⁽¹⁹⁾の結果と比較するために同報告と同様に各区分の 5 mg %, ヨード 10 mg %, ヨードカリ 20 mg % の 0.01 N 硫酸溶液を調製して吸光度を測定した。その結果を参考のために Swanson の結果と共に第 3 表に表示した。同じヨード呈色のアミロデキストリンを比較すると Swanson の結果に比して本実験の結果では重合度が 10 程度大である。Mould 等⁽²¹⁾はホスホリラーゼで合成した平均重合度 34 のアミロデキストリンは重合度 23~46 程度のデキストリンの混

平均重合度は DP 16, 赤 21, 赤紫 28, 紫 34, 青紫 41 で 60 以上のアミロデキストリン及びアミロースは青色である。

4. 各区分の分子量分布 Bourne 等⁽²⁰⁾は“もち”玉蜀黍澱粉の濃い溶液に極めて稀いヨード・ヨードカリ溶液を加えるとそのヨード反応の色は始め青紫になり、ヨードが過剰になると赤紫に変化することからこの澱粉中にはヨード反応青色を呈する程に長い鎖長のアミロースの存在を推定している。著者も同様にイソamilアルコールを使用して分別した玉蜀黍アミロペクチンのヨード反応も徐々に稀いヨード・ヨードカリ溶液を加えると青、青紫、紫と色に変化することを認めた。これはアミロペクチンの直鎖部分の長さ差のあることを示すものであると推定される。分別したアミロデキストリンの各区分も重合度がかなり異ったアミロデキストリンの混合物であれば玉蜀黍アミロペクチンのようにヨード反応の色はヨード量と共に変化し、比較的均一な重合度のアミロデキストリンからなればヨード反応の色は変化しないと考えられるから少量のヨードを加えた時のヨード反応の色をみた。各区分の溶液に稀いヨード・ヨードカリ

合物であると報告しているから Swanson のホスホリラーゼで合成した合成デキストリンもその分子量分布はかなり広い幅を持っていると推定される。アミロデキストリンのヨード呈色の吸光度は第2表にあるように重合度の大なる程大であるから同じ平均重合度でも分子量分布の幅の広いアミロデキストリンのヨード呈色は分子量分布の幅の狭いアミロデキストリンより長波長側にあると推定される。それ故に Swanson の結果は平均重合度に比してヨード呈色の吸光頂点は長波長の方へずれているのではないかと推定される。Baldwin 等⁽¹¹⁾, Mould 等⁽¹⁴⁾

第3表 Swanson のヨード呈色測定条件で測定したアミロースの重合度とヨード呈色との関係

区分	平均重合度 DP	本実験		Swanson ⁽¹³⁾		
		ヨード呈色	吸光頂点 mμ	平均重合度 DP	ヨード呈色	吸光頂点 mμ
8	16	淡赤黄	480	7.4	薄赤	500
7	21	赤	510	12.9	赤	520
6	28	赤紫	540	18.3	ラベンダー	540
5	34	紫	560	20.2	紫	560
4	41	青紫	580	29.3	青紫	580
3	61	青	600	34.7	青	580
2	120	青	620	55.6	青	600
1	330	青	630	97.4	青	600

の結果とは条件が異なるから正確には比較出来ないが、Baldwin 等⁽¹⁴⁾の平均重合度 44 のアミロデキストリンの吸光頂点は 580 mμ, 本実験の吸光頂点 580 mμ のアミロデキストリンの平均重合度は 41 であるからほぼ一致した結果になった。Mould 等⁽¹⁴⁾の結果は重合度 10 以下無色, 19~25 オレンジ色, 25~40 赤, 40~130 青である。本実験では青のヨード反応を呈するアミロデキストリンの平均重合度は 41 以上であるから Mould の結果とよく一致している。ヨード呈色オレンジ色, 赤色のアミロデキストリンの平均重合度は Mould 等に比較すると若干小さい結果になった。

要 約

玉蜀黍澱粉から温水抽出ブタノール法でアミロースを調製し、塩酸で時間を変えて加水分解して得たる加水分解産物からアミロース・ヨード複合体の沈澱性を利用してアミロデキストリンの分別を行った。沈澱しないアミロデキストリンはアルコールを用いて分別沈澱を行った。得られたアミロデキストリンのヨード反応の色と平均重合度との関係はヨード反応の色 青平均重合度 61 以上, 青紫 41, 紫 34, 赤紫 28, 赤 21, 淡赤黄 16 であった。

〔註〕 ヨード親和力とヨード吸収量との関係。

ヨード親和力の測定は S. Lansky 等⁽²⁾と同様に測定し、各測定点における加えた全ヨード量から遊離ヨード量を差引いたヨード量をヨード吸収量 (Lansky 等は結合ヨード量) とし、遊離ヨード量 (本研究では N で表示する。Lansky 等は mg で表示) とヨード吸収量との関係をグラフに書き、画かれたグラフの上の直線部分を軸に外挿して得たヨード吸収量を、特に試料のヨード親和力とする。ヨード吸収量, ヨード親和力共に試料に対する % で表わす。(二国二郎: 澱粉化学, p. 363 (1955), J. A. Radley: Starch and its derivatives, p. 150 (1953) 参照)。

終りに本実験を実施するに当り、始終御指導と御援助を頂いた岐阜大学教授高橋悌藏先生に厚くお礼申し上げます。(本報告の要約は昭和 31 年 5 月日本農芸化学会関西、中部支部連合大会 (香川県高松市) において講演発表した。)

(1) K. H. Meyer, W. Brentano, P. Bernfeld: <i>Helv. Chim. Acta</i> , 23, 845 (1940).	(6) R. E. Rundle, R. R. Baldwin: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 65, 554 (1943).
(2) S. Lansky, M. Kooi, T. J. Schoch: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 71, 4066 (1949).	(7) 大橋一二: 岐大農報, 6, 107 (1956).
(3) R. W. Kerr: <i>Chemistry and Industry of Starch</i> , 2nd ed. 455 (1950).	(8) 大橋一二: 岐大農報, 7, 86 (1956).
(4) J. A. Radley: <i>Starch and its derivatives</i> , vol. I, 235 (1953).	(9) F. Brown, T. G. Halsall, E. L. Hirst, J. K. N. Jones: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1948, 27.
(5) R. S. Bear: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 64, 1388 (1942).	(10) A. L. Potter, W. Z. Hassid: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 70, 3488 (1948).
	(11) R. R. Baldwin, R. S. Bear, R. E. Rundle: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 66, 111 (1944).

- (12) R. W. Kerr: Chemistry and Industry of Starch, 2nd ed. 679 (1950)
- (13) M. A. Swanson: *J. Biol. Chem.*, 172, 825 (1948).
- (14) D. L. Mould, R. L. M. Synge: *Biochem. J.*, 58, 585 (1954).
- (15) R. W. Kerr, F. C. Cleveland: *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 4036 (1952).
- (16) R. W. Kerr, G. M. Severson: *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 193 (1943).
- (17) 小林恒夫, 門脇信: 本誌, 27, 599 (1953).
- (18) E. J. Bourne, W. N. Haworth, A. Macey, S. Peat: *J. Chem. Soc.*, 1948, 924.
- (19) R. M. McCready, W. Z. Hassid: *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 1154 (1943).
- (20) E. J. Bourne, S. Peat: *J. Chem. Soc.*, 1949, 5.
- (21) D. L. Mould, R. L. M. Synge: *Biochem. J.*, 58, 571 (1954).

澱粉の鎖長について*

大 橋 一 二 (岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 12 月 15 日 受 理

先に馬鈴薯澱粉は玉蜀黍澱粉よりヨード親和力は小であるが、遊離ヨード濃度が増加すると玉蜀黍澱粉より多量のヨードを吸収することを報告⁽¹⁾した。本研究はこの現象を説明するために行なわれた。

澱粉のヨード反応は α -1,4 結合で結合したグルコースの数即ちグルコースの直鎖の長さによって決るもので、本実験の結果が示すように重合度 DP 60 程度以上のアミロースのヨード反応は青色で、 $2.5 \times 10^{-6} N$ のような低い遊離ヨード濃度においてもヨードを吸収する。これを長鎖長部とする。重合度 DP 28~41 程度のアミロデキストリンは $2.5 \times 10^{-6} N$ のような低い遊離ヨード濃度ではヨードを吸収せず、 $20 \times 10^{-6} N$ のような遊離ヨード濃度になるとヨードを吸収して赤紫、紫、青紫色になる。DP 16~21 程度のアミロデキストリンは遊離ヨード $20 \times 10^{-6} N$ の濃度においてはヨード吸収量は極めて小である。このヨード反応の色は淡赤黄—赤色で、これを短鎖長部とする。このように澱粉の鎖長を長-, 中間-, 短鎖長部の三つに分けてヨード滴定の結果から澱粉中の鎖長を計算によって求めた。その結果、馬鈴薯、長芋澱粉のアミロース(長鎖長部)は玉蜀黍、小麦澱粉のそれより少ないが、DP 28~41 程度の中間鎖長部は比較的多く含まれていると推定される。

この計算法の原理はアミロース、アミロデキストリンのヨード吸収量は溶液中の遊離ヨード濃度と平衡関係にあつて鎖長の短いアミロデキストリンは、遊離ヨードがある濃度に達しないとヨードを吸収しない事、並びにある遊離ヨード濃度におけるヨード吸収量はそれぞれ異つた鎖長のアミロース、アミロデキストリンのその遊離ヨード濃度におけるヨード吸収量の和であると言ふ実験結果に基礎を置いている。(ヨード親和力とヨード吸収量については前報⁽²⁾の註参照)。

実 験 お よ び 結 果

1. アミロース、アミロデキストリンの重合度とヨード親和力、ヨード吸収量との関係 前報⁽²⁾において分離したアミロース、アミロデキストリンを使用した。ヨード親和力、ヨード吸収量の測定には電圧滴定法^(3,4,5,6)と電流滴定法⁽⁷⁾があるが、本実験にはポテンショメーターを使用する Bates 等⁽³⁾の改法である Lansky 等⁽⁴⁾の方法に準じて行った。測定温度は 20° (恒温水槽中)である。滴定溶液中の遊離ヨード量は原報では mg 数で表してあるが、N で表示した方がより妥当であると推定されるから遊離ヨード量は N で表して計算に使用した。アミロース、アミロデキストリンのヨード滴定曲線は第 1 図のようで遊離ヨード濃度と吸収されたヨード量との関係は第 2 図のようである。第 2 図からヨード親和力及び遊離ヨード 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 及び $50 \times 10^{-6} N$ におけるヨード吸収量(アミロース、アミロデキストリン 100 mg によって吸収されたヨードの mg 数)を示めせば第 1 表のようである。

アミロデキストリンのヨード滴定については Dvorch 等⁽⁸⁾, Mould⁽⁹⁾の報告がある。Dvorch 等⁽⁸⁾はその結果から DP 50 以下のアミロデキストリンはヨード複合体の形成と表面吸収との区別をすることが出来ないと報告

* On the Chain Length of Starches.

By Kazuji OHASHI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Gifu).