大麦の発芽過程における胚乳から分離した デンプンの諸性質*

桐 淵 滋 雄, 中 村 道 徳

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 12 月 25 日 受 理

Some Properties of Starch Granules from the Endosperm of Germinating Barley Seeds (Studies on Germination of Barley Seeds Part II)

By Shigeo KIRIBUCHI and Michinori NAKAMURA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
The University of Tokyo*

Some properties of starch isolated from the endosperm of germinating barley seeds were studied.

1) The size frequency distribution of starch granules showed that the granules with diameters larger than about 15μ were preferentially degraded and moreover the rate of degradation was higher than that of granules of any other size. It was apparent that the mean diameter of granules was at $15\sim 20\mu$ at all stages of germination.

2) Photopastography of starch granules isolated at various stages of germination gave little changes from each other. Thus, it was unable to make a comparison of the degree of crystallinity of the starch granules.

3) Judging from the general properties of the starch and their separated fractions (e.g. the amylose content, blue value, λ_{max} of the iodine complex, the β -amylolysis limit), it was postulated that preferential debranching of amylopectin might have occurred during the germination, leading to an increased content of the linear component with shorter chain lengths.

(Received December 25, 1972)

前報⁽¹⁾において、大麦の発芽過程における胚乳部のデンプン分解に関係する主なる酵素活性、および糖質含量の変動について報告した。発芽の進行とともにデンプンは、量的には減少するが、質的にはどのような変化を受けているのかは、興味ある問題である。

本報では、発芽過程における胚乳部からデンプン粒を分離精製し、その性質を検討した。

実 験 方 法

1. デンプン粒の分離精製 既報⁽¹⁾の方法で発芽させた大麦の胚乳部を用い、Greenwood の方法⁽²⁾に準じて次のように行なった。胚乳部を採取後、直ちに 0.01 M HgCl_2 溶液に 1 夜浸して酵素活性を止め、遠心分離後、

* 大麦の発芽に関する研究 (第 2 報)。

0.1 M NaCl 溶液とともにブレンダーで低速で磨砕した。これを三重ガーゼでしぼり、残渣は再び NaCl 溶液とともに同操作を行ない、得られたデンプン乳液を 100 および 300 メッシュの篩を通してから、デンプン乳液量の約 1/10 量のトルエンを加えて振盪し、除タンパクを行なった。デンプンの収率は考慮しなかったが、微細粒子を逃さないため、上澄を除くときは、常に遠心分離を行なった。得られたデンプンは、Lubonchinsky 法の改良法⁽³⁾で全窒素量を定量し、精製度の目安とした。さらに、デンプン粒の損傷具合を見るため、デンプン粒染色法⁽⁴⁾で観察し、損傷デンプン粒の少ないことを確かめた。精製デンプンは、一部は蒸留水、エタノールおよびエーテルで洗い、減圧乾燥した。残部は蒸留水に分散させ、トルエンを添加し冷蔵庫に保存した。ヨウ素呈色度およびア

Table I. Total Nitrogen Content of Purified Starch Obtained from Germinating Barley Endosperm

Days-old	N%
0	0.054
2	0.064
4	0.030
6	0.028
9	0.145
12	0.338

ミロース, アミロペクチンを分別する試料は, 80%エタノールで3回, 各1時間加熱還流し脱脂処理をした。

2. デンプン粒の粒度分布の測定 デンプン懸濁液の粒体沈降で生じる濃度勾配を光透過法で測定し, 粒度分布を求めるミクロンフォトサイザー (東洋電測株式会社製) を用いた。

3. フォトベーストグラフィー 貝沼らが改良した装置⁽⁶⁾を用いた。精製脱脂デンプンの0.1%懸濁液をマグネチックスターラーで30分間攪拌して, 完全に均質にして, デンプン粒が沈降しない程度に攪拌しながら, 30°C から 98°C まで, 2°C/分の速度で昇温させ, 経時的に 372 m μ における透光度を測定し, 横軸に温度, 縦軸に透光率をとり, 両者の関係を図示した。

4. 青価の測定 青価は Bourne ら⁽⁶⁾により, 100 ml 中に多糖類 1 mg, ヨウ素 1 mg, ヨウ化カリウム 20 mg を含む溶液の 680 m μ における吸光度を, 液層 4 cm で測定した値と定義されているので, ここでは P₂O₅ 上で減圧乾燥した精製脱脂デンプンを用いて呈色させ, 室温で1時間放置してから液層 1 cm で測定し, その値を4倍した数字で表わした。同時に, 同溶液で最大吸収波長 $\lambda_{\max}$ を測定した。

5. デンプンの β -アミラーゼ分解限度 使用した β -アミラーゼは, 前報⁽¹⁾の方法で大麦から精製したもので, α -アミラーゼ, マルターゼおよび α, β -限界デキストリナーゼ活性のない標品を用いた。反応はアルカリ分散させたデンプン 5 mg, β -アミラーゼ (98 単位) を含む 80 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 内で行なった。1時間以内で反応が完了する酵素が加えてあるが, 反応は 24 時間行なった。反応前のデンプン量は 1 N HCl で加水分解後, 1 N NaOH 溶液で中和し, Somogyi-Nelson 法^(7,8)で, また生成するマルトースは Bernfeld 法⁽⁹⁾で定量した。

6. アミロースおよびアミロペクチンの分別 Schoch のブタノール法⁽¹⁰⁾で分別し, 分別したアミロ

Table II. Time Course of Periodate Oxidation of Maltose

Time (hr)	1	6.5	20	22	25	27
Formic acid (moles/mole of maltose)	1.75	2.55	2.59	2.96	2.99	3.01

Eight mg of maltose hydrate was treated with 80 ml of 0.02 M NaIO₄ at 5°C for various times. Formic acid produced was titrated with 0.01 N NaOH under nitrogen atmosphere.

スは5%ブタノールで3回精製した。なおアミロースの収率は, 精製前の重量から算出した。得られたアミロースおよびアミロペクチンは, それぞれエタノールで脱水後, 減圧乾燥した。

7. デンプン中のアミロース含量の測定 McCrea-
dy のヨウ素呈色比色法⁽¹¹⁾によった。あらかじめ, 発芽各日数のデンプンから分別したアミロースおよびアミロペクチンを, 種々の比率に混合した0.001%溶液のヨウ素呈色度を 680 m μ で測定し, ヨウ素呈色の付加性を確かめ, これを標準曲線として, 分別前のデンプンについて同じようにして得たヨウ素呈色度から, アミロース含有率を求めた。

8. アミロースおよびアミロペクチンの平均鎖長の測定 末端基定量法による小林の方法⁽¹²⁾に準じて, 次のように行なった。試料 (アミロースは約 70 mg, アミロペクチンは約 30 mg) をジメチルスルホキシド 1 ml に溶解させてから, 水で 40 ml にした。この溶液に, メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液を終濃度 0.02 M になるように加え, 全量の水で 80 ml にして密栓, 遮光して 5°C で酸化させた。生成するギ酸は 0.01 N NaOH 溶液で, フェノールレッドを指示薬として, N₂ 気流下で滴定した。基準物質としてマルトースを用い, 経時的に生成するギ酸量を定量すると, Table II に示すように, 25 時間で理論値に達するので, 以後の実験は, すべて 25 時間反応後の生成ギ酸モル数から平均鎖長を算出した。

実験結果および考察

1. デンプン粒の粒度分布

発芽の各段階におけるデンプン粒の粒度分布を Fig. 1 に示した。発芽過程でデンプンかは, 吸水後2日頃から減少し始め, 4~8 日で最も速やかに減少するが (前報⁽¹⁾の Fig. 3 参照), そのときどきに存在するデンプン粒の中では, 12~15 μ の粒子が常に最も大きい割合を占めている。また, 各粒径の占める割合の変化を比較すると, あ

Fig. 1. Size Frequency Distribution of Starch Granules of Germinating Barley Seed Endosperm.

まり明確にはいえないが、 15μ 以上の大粒子から優先的に分解されていく傾向にあるようである。その分解速度は各粒径のうち最も速く、その結果、 $12\sim 15\mu$ の中粒も分解されているにもかかわらず、発芽中は、見掛上むしろ中径粒子の割合が増加するような傾向になるのであろう。発芽中期から後期（6～9 日）には、 5μ 以下の微粒子の割合がいったん増加するが、また次第に分解、消費されてしまう。

発芽時に、大径デンプン粒子から分解されるのは、発芽馬鈴薯のデンプン粒についても観察されている⁽¹³⁾。Schwimmer⁽¹⁴⁾ は、生デンプン粒への α -アミラーゼの吸着は、デンプン粒の表面積に逆比例すると述べている。この結果に従うと、表面積の小さい小径粒子の方が、分解されやすいと考えられる。しかし *in vivo* では、Schwimmer の結果と異なっている。これは、デンプン粒の分解は、単に粒子表面から一様に分解されていくのではなく、二国⁽¹⁵⁾ が電顕で観察しているように、デンプン粒の表層面に存在する構造的に弱い所から酵素が侵入し、層状構造の強弱に伴い、求心状の溝を作りながら内部へ向かって分解が進むと考える方が、よく説明がつく。すなわち、一般的に粒径の大きいものの方が、登熟乾燥時に粒表の損傷を受けやすいので、初めは粒径の大きい方が、分解を受けやすい傾向にあると考えられる。

2. デンプンのフォトペーストグラフィー

デンプン粒を加熱糊化したときの变化を、透光度の変

化として測定する方法は、古くから検討されているが、その結果の評価については一致しておらず、たとえば Sandstedt⁽¹⁶⁾ は、単にデンプン粒の膨潤、溶解の現象に伴う透光度の変化を測定しているに過ぎないと評価している。一方、貝沼⁽¹⁷⁾ はデンプン粒の複屈折性（偏光十字）消失と、フォトペーストグラムとの関連性を調べ、檜作⁽¹⁷⁾ のデンプン粒の複屈折性消失は、ミセル配行性の乱れに起因するという考え方にに基づき、フォトペーストグラフィーによる観察は、デンプン粒の膨潤による透光度の変化だけではなく、それ以前に起こるデンプン粒内のミセル構造の変化をも反映していると評価している。フォトペーストグラフィーは、きわめて薄いデンプン濃度（ $0.1\sim 0.5\%$ ）で行なうので、操作中に膨

潤したデンプン粒同士の摩擦による破壊がなく、デンプン粒の膨潤過程のみを追跡でき、デンプン粒のミセル構造の強度を知ることができると考えられる。生デンプンが酵素分解されるには、ミセル構造がルーズになり、酵素の侵入が容易になることが必要で、発芽が進むに従いミセル構造がルーズになり、その結果デンプンの糊化温度の低下が予想され、事実、大麦麦芽デンプンの糊化温度は低下している⁽¹⁸⁾。

Fig. 2 は、未発芽大麦のデンプン粒のフォトペーストグラムで、最初の変曲点は 53.5°C で、これからいったんわずかに透光度が下がる。これは、熱のため鎖間の水

Fig. 2. Photopastegram of Barley Starch.

Starch suspension (0.1%) was heated at the rate of 2°C per minute by a linear temperature-programed procedure, and the transmittance at $372\text{ m}\mu$ was measured at different intervals of time.

素結合が切れ、ミセルがゆるみ始め、膨潤（体積増加）し始める温度と考えられ、このときの粒の体積増加が、透光度の低下となって現われるのであろう。この温度は糊化開始温度で、顕微鏡下の観察で、10~20%の粒子が膨潤し始める温度に相当すると思われ、また偏光十字の消失する温度でもある。いったん、わずかに減少した透光度は、55~56°C から再び第一段階の透光度の増加が始まるが、粒子がさらに膨潤を続けるとともに、アミロース成分が粒から浸出され始め、水中にゆっくり分散し、アミロペクチンの外側の枝同士の水素結合（結晶部分）も切れ水和し始め、これがゆるやかな透光度の増加となって現われるものと考えられる。62~63°C から透光度増加勾配はゆるくなるが、この温度付近では、アミロースはさらに浸出し続けるが、粒内には若干のまだ分散していないアミロースと、十分水和し膨潤してはいるが、まだ分散するまでにはなっていないアミロペクチンが残っている状態で、糊化終了温度に相当するものであろう。また、この温度はアミログラムでの粘度の立ち上りの温度に、ほぼ一致している。75°C から、第二段階の急勾配の透光度増加が始まる。この温度で、粒子は膨潤の極限に達し、ついに粒子が崩壊してしまい、アミロペクチンが分散してしまうものと考えられる。発芽の各段階のデンプンのフォトベーストグラムを比較すると、全体のパターンに差異は認められず、また糊化開始温度にも差は認められなかった。これはデンプン粒を胚乳から分離し、精製、脱水乾燥したため、*in vivo* の構造と違いが生じたのではないかと考えられるが、糊化温度が単にデンプン粒のミセル構造の強度のみで決まるものではなく、粒子の大小、アミロース含量などが関係する複雑な現象であるから⁽²⁰⁾、フォトベーストグラフィーの結果から、*in vivo* のデンプン粒のミセル構造など、

微細な構造をうかがうのは無理かもしれない。

3. 酵素作用を受けたデンプンの諸性質

発芽過程におけるデンプンへの酵素の *in vivo* での作用機作を、*in vitro* での酵素活性やデンプンの諸性質から適確につかむことは困難であるが、一般的なパターンを観察した結果が Table III である。デンプンの青価は、吸水後 6 日目からわずかに増加し、ヨウ素呈色の $\lambda_{\max}$ も、わずかに長波長側にシフトしている。また、 β -アミラーゼ分解限度も増加している。これは、デンプン中の直鎖構造の成分の増加を示唆するが、上記デンプンからのアミロース画分が、吸水後 4 日目から顕著に増加していることと一致している。しかし、アミロース画分の増加に比べると、デンプンの青価の増加やヨウ素呈色の $\lambda_{\max}$ の長波長へのシフトは小さい。また、分離したアミロースの青価が、発芽日数を追って著しく小さくなっている。これは、発芽が進むに従い、アミロペクチンの分枝が切れ、従って直鎖成分が量的に増加し、質的には平均鎖長の短いものになっていくことを示唆している。

これらの実験結果は、麦芽デンプンの観察^(18,19)からいわれているように、発芽の際、まずアミロペクチンの exterior chain が優先的に分解を受け、それに比べると interior chain やアミロースは、ほとんど分解を受けずに残っているということとよく合致している。

しかし以上の推論は、過ヨウ素酸化法で測定したアミロースの平均鎖長に、ほとんど変化がないという結果とは矛盾する。しかし、過ヨウ素酸化法による平均鎖長の測定には、アミロース成分の老化、部分的な酸化と不十分な酸化の問題をも含めて、Greenwood⁽¹⁹⁾ も指摘しているように、実験法自体に問題があるので、今後さらに検討する予定である。

Table III. General Properties of Starch Isolated from the Endosperm of Germinating Barley Seeds

Days germinated	Blue value	$\lambda_{\max}$ (μ)	β -Amylolysis limit (%)	Amylose		Blue value		Average chain length	
				Yield* (%)	Content** (%)	Amylose	Amylopectin	Amylose	Amylopectin
0	0.40	603	62	25.5	17.0	1.33	0.26	245	24.6
2	0.40	603	62	47.5	19.5	1.03	0.25	230	24.9
4	0.40	604	63	72.0	21.5	1.00	0.25	235	23.5
6	0.41	604	63	75.5	32.3	0.77	0.25	242	24.6
9	0.43	608	64	80.0	38.3	0.73	0.25	227	20.0
12	0.44	609	66	74.0	42.1	0.70	0.25	234	21.2

* The yield of amylose separated from starch was estimated from the dry weight of the precipitated butanol complex.

** The amylose content in starch was estimated by the color reaction with iodine according to McCready and Hassid.⁽¹¹⁾

要 約

発芽過程の大麦胚乳からデンプン粒を分離精製して、その諸性質を調べた。

(1) 発芽過程でのデンプン粒度分布を観察すると、 15μ 以上の大径粒子が優先的に、かつ最も速く分解を受け、見掛上、全発芽期間を通して、 $12\sim 15\mu$ のデンプン粒が最も大きい割合を占めている。

(2) フォトペーストグラフィーでは、発芽各段階のデンプン粒ではほぼ同じ図形を示し、これからミセル構造の強度などの比較はできなかった。

(3) デンプンおよびその中のアミロース、およびアミロペクチンの含有率、分別収率、さらにこれらの青価、ヨウ素呈色の $\lambda_{\max}$ 、 β -アミラーゼ分解限度などの結果から、発芽に伴い、まずアミロペクチンの分枝が切断され、量的には直鎖成分が増え、質的には短鎖成分が増えると推論した。

粒度分布、フォトペーストグラフィーの測定にご便宜をはかっていただき、またご助言をいただいた農林省食糧研究所、鈴木繁男博士および貝沼圭二博士に深謝いたします。

- (1) 桐沢滋雄, 中村道徳: 農化, **47**, 333 (1973).
- (2) J. M. G. Gowie and C. T. Greenwood: *J. Chem. Soc.*, **1958**, 2958.
- (3) B. Lubonchinsky and J. Zalya: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 1369 (1954).
- (4) 鈴木繁男: “デンプンハンドブック”, 二国二郎編, 朝倉書店, 1961, p. 350.
- (5) 貝沼圭二, 小田恒郎, 鈴木繁男: 澱粉工誌, **16**, 51 (1968).
- (6) E. J. Bourne, W. H. Haworth, A. Macey and S. Peat: *J. Chem. Soc.*, **1948**, 924.
- (7) N. Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- (8) M. Somogyi: *ibid.*, **195**, 19 (1952).

- (9) P. Bernfeld: “Methods in Enzymology,” Vol. I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1955, p. 149.
- (10) E. J. Willson, Jr., T. J. Schoch and C. S. Hudson: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1380 (1953).
- (11) R. J. McCready and W. Z. Hassid: *ibid.*, **65**, 1154 (1953).
- (12) 小林恒夫, 門脇 信: 農化, **27**, 599 (1955).
- (13) W. Banks and C. T. Greenwood: *Biochem. J.*, **73**, 237 (1959).
- (14) S. Schwimmer: *J. Biol. Chem.*, **180**, 880 (1949).
- (15) Z. Nikuni and R. L. Whisler: *J. Biochem. (Tokyo)*, **44**, 227 (1947).
- (16) O. C. Brekord and R. M. Sandstedt: *Cereal Chem.*, **24**, 250 (1947).
- (17) 檜作 進, 藤井ミチ子, 二国二郎: 農化, **34**, 178 (1960).
- (18) C. T. Greenwood and J. Thomson: *J. Inst. Brew.*, **65**, 346 (1959).
- (19) C. T. Greenwood: “The Carbohydrates,” 2nd edition, Vol. IIB, ed. by W. Pigman and D. Horton, Academic Press, New York, 1970, p. 471.

〔後記〕

脱稿後に入手した G. N. Bathgate らの文献 [Stärke, **24**, 336 (1972)] によると、大麦デンプン粒は大径粒子 (約 25μ) と小径粒子 (約 5μ) の 2 群からなっており、小粒子は重量平均では全体のわずか 10% だが、数平均では約 90% も占めている。これらをそれぞれ分離し、その理化学的性質を比較すると、著しい差異が認められたと報告されている。

著者らの研究では、デンプン粒をトルエンで除タンパクする際、小粒子はトルエン層の凝固タンパクに吸着されるので、ほとんど大径粒子のみによる実験結果になっていると考えられる。