小麦でんぷん中のリンをグリセリン-リン酸として 定量する方法に関する研究

檜 作 進, 久塚 智明*

(鹿児島大学農学部農芸化学科)

昭和 51 年 4 月 21 日 受 理

Studies on the Determination of Wheat Starch Phosphorus as Glycerol Phosphates

By Susumu HIZUKURI and Tomoaki HISATSUKA*

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University, Korimoto-1, Kagoshima-shi, 890*

1. The phosphorus of glycerol-phosphate derivatives (Pg) in wheat and other cereal starches was determined quantitatively by the following method. Starch (100~400 mg) was suspended in 3.3 ml of 0.726 N HCl and hydrolyzed at 100°C for 90 min. Glycerol-phosphates thus formed were hydrolyzed further with alkaline phosphatase and the resulting glycerol, of which amount was equivalent to Pg, was assayed spectrophotometrically by using glycerokinase and glycerophosphate dehydrogenase. The amount of Pg, thus obtained, was corrected for the loss during the acid hydrolysis by a factor 1.013.

2. By the above procedure, the amounts (% of total phosphorus) of Pg of wheat I (commercial), wheat II (laboratory prepared), corn (commercial), rice I (commercial) and rice II (laboratory prepared) starches were determined as 90.8, 99.9, 69.8, 74.9 and 62.7. No Pg was detected in potato, sweet potato, kuzu (a kind of arrowroot), waxy corn, and waxy rice starches.

3. It was revealed that these cereal starches contained acid unstable unknown phosphate(s) which was hydrolyzed within 60 min under the conditions described above as a minor component.

(Received April 21, 1976)

* Present address : *Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812*

緒 言

いずれの植物のでんぷん粒も、温和な精製では除去することが困難な少量のリンを含有することはよく知られている⁽¹⁾。このリンは、化学構造上から2種に大別される。1つはグルコース残基にエステル結合したリンであり、他は化学結合ではないが、でんぷん粒に強く結合、あるいは取り込まれているリンである。檜作ら^(2,3)はジャガイモでんぷん中には、Posternak^(4,5)によって発見されたグルコース 6-リン酸としてのリンのほかに、その約半量のリンがグルコース 3-リン酸として存在する

ことを明らかにした。また、これらのエステル結合リンはジャガイモ、サツマイモでんぷんなどのイモ類でんぷんのほかに、コメ、トウモロコシ、モチトウモロコシ、モチゴメなどの穀類でんぷん中にも存在することを証明したが、バレイショでんぷんに匹敵する比較的多量のリンを含む小麦でんぷんについては検出し得なかった⁽⁶⁾。

小麦でんぷんのリンについては、Posternak⁽⁴⁾ はでんぷんの酸分解の結果、グリセリン・リン酸**を得て、Schoch⁽⁷⁾ はでんぷんを親水性有機溶媒で抽出して、リンと脂質が同時に除去されることから、それぞれリン脂

** 以下グリセリン-リン酸は、 α -および β -グリセリン-リン酸の意味である。

* 現在、九州大学農学部食糧工学科。

質であることを示唆した。Rooke ら⁽⁸⁾は小麦でんぶんの脂質を抽出して、その分別を行ない、リンとコリンを含む成分を分離して、その分析値がオレオパルミトホスファチドによく一致することから、レシチンの存在を示した。Acker ら⁽⁹⁾は、小麦でんぶんから分離したポーラーリッドを DEAE-セルロースカラムで分離し、大部分がリゾレシチンであることを見出した。また、Wren ら⁽¹⁰⁾は小麦でんぶんの脂質を抽出し、その 83% がリゾレシチンであると報告している。このように、小麦でんぶんの脂質はおもにホスホグリセリドで、特にリゾレシチンが大部分を占め、リン脂質がでんぶん中のリンの主体であると理解されている。しかし、いまだでんぶん中の微量のリン脂質の定量法は確立されておらず、定量的に明確な根拠は示されていないようである。そこで本研究では、でんぶん中のグリセロリン脂質など、グリセリンリン酸の誘導体として存在するリンを、日常分析に用いられるような簡易な方法で定量する方法を検討した。

ホスホグリセリドを構成する脂肪酸や塩基の残基は、希酸で処理すると容易に加水分解されて、酸に安定なグリセリンリン酸を生成する。リン脂質中のグリセリンリン酸は、L- α -グリセリン 3-リン酸であるが、加水分解中にリン酸基の転移が起り、 α -および β -グリセリンリン酸を生成する。従って、このグリセリンリン酸を定量することによって、ホスホグリセリドなどのグリセリンリン酸の誘導体として存在するリンの総量を定量することが可能である。ここで問題となるのは、酸分解の条件とグリセリンリン酸の定量である。そこで、本研究では、でんぶん中のグリセリンリン酸誘導体を完全にグリセリンリン酸に分解する条件を検討し、生成するグリセリンリン酸は以下述べるように、酵素を用いる特異的方法で定量することにした。

試 料 と 方 法

でんぶん試料 おもに使用した小麦でんぶんは、市販品（三和澱粉工業株式会社製）である。その他、市販のトウモロコシ、米なども分析に供した。実験室で調製した小麦でんぶんは、市販の小麦粉（日清製粉株式会社製中力粉）から次のようにして精製した。すなわち、小麦粉を少量の水でねってドウを作り、布に包んで冷水中でもみ洗いし、でんぶん乳液とグルテンに分離した。でんぶん乳液から、でんぶんを低速(5000rpm)の遠心分離で回収し、蒸留水に懸濁し、遠心分離の操作を数回反覆し

て洗浄した後、0.1N 食塩水に懸濁し、多量のトルエンとともに激しく振盪して、白濁したトルエン層を除く操作を 2 回反覆した。このように精製したでんぶんを再び蒸留水に懸濁し、遠心分離する操作を数回反覆して食塩を除いて、カルシウム乾燥器中で減圧下に乾燥した。米（コシヒカリ）でんぶんは前田巖氏から恵与されたもので、希カセイソーダ溶液を用いる常法により調製されたものである。

分析方法 無機リン酸は、Fiske と Subbarow の方法⁽¹¹⁾で定量し、全リン酸は試料を 60% 過塩素酸を用いて湿式灰化後、無機リン酸として定量した⁽¹²⁾。

グルコース基の 6 位にエステル結合した結合リンの含量は既報⁽²⁾の方法に従い、でんぶんを 0.7N 塩酸中で 60 分加水分解し、生成するグルコース 6-リン酸をグルコース 6-リン酸脱水素酵素を用いて、分光光度計により測定した。

でんぶん中の無機リン酸の量は、試料（数 100 mg）を水 10 ml とともに激しく振盪し、遠心分離した上澄液の無機リン酸を測定して求めた。

グリセリンはグリセロキナーゼ、グリセリン 3-リン酸脱水素酵素を用いて、NADH+H⁺ の生成を分光光度計により測定する方法⁽¹³⁾で定量し、L-グリセリン 3-リン酸は、上記の系からグリセロキナーゼと ATP を除いて同様に定量した。

でんぶんの加水分解 適量のでんぶん（小麦でんぶんでは 100~200 mg、他のでんぶんでは 200~400 mg）を蒸留水 3 ml に懸濁し、0.3 ml の 8N HCl を加えて 100°C で所定の時間加水分解後、冷水で急速に冷却し、1N NaOH で pH 9.5 $\pm$ 0.2 に中和、蒸留水を加えて 10 ml にし、分析に供した。

酸分解液のアルカリホスファターゼ処理 上記の酸分解液 3 ml にアルカリホスファターゼ（ベーリンガー社製、1mg/ml）を 6 μ l 加えて、1 時間 37°C に保温しモノリン酸エステルを完全に分解した（加水分解は 20 分以内に一定値に達した）。

試薬 アルカリホスファターゼ、L-グリセリン 3-リン酸脱水素酵素、グリセロキナーゼ、グルコース 6-リン酸脱水素酵素、ATP、NADP、NAD はベーリンガー社のもの、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンはシグマ社製のものを使用した。他の試薬類は、すべて和光純薬社の特級試薬を用いた。

Fig. 1. Time Course of Formation of L-Glycerol 3-Phosphate, Glycerol and Inorganic Phosphate (Pi) in Acid Hydrolysis (0.726 N HCl, 100°C) of Commercial Wheat Starch.

Broken lines were measured after alkaline phosphatase action on the acid hydrolysate.

実験結果

Fig. 1, 2 に, 小麦でんぷんとその脱脂試料を 0.726 N 塩酸を用いて 100°C で加水分解したときの無機リン酸, L-グリセリン 3-リン酸, グリセリンの生成の時間経過を示した。L-グリセリン 3-リン酸の生成は 30 分の加水分解で最高となり, 全リン酸含量の 35% (未脱脂試料) 出現し, その後はほぼ一定値を保った。無機リン酸の生成は初期の 30~60 分間は比較的速かであったが, その後は生成速度が低下した。脱脂試料 (Fig. 2) では, この様子が明瞭である。酸加水分解によって生成した L-グリセリン 3-リン酸と無機リン酸を合したリン量は, 試料の全リンの含量よりも, はるかに少ない。たとえば, 90 分の水解時において, この値 (水解時間 0 時の無機リン酸を含めて) は小麦でんぷんで全リン酸の 44.8%, その脱脂試料で 51.5% であった。そこで残りのリンの構造を明らかにし, 分析するために加水分解の各時点の試料 (pH を 9.5 ± 0.2 に中和) にアルカリホスファターゼを作用させた後, グリセリンと無機リン酸の量を測定した。Fig. 1, 2 の点線で示した曲線が, その結果である。酸加水分解の初期の 30~60 分にホスファターゼによって生成するグリセリンと無機リン酸の量は急速に増加し, 90 分以後は一定

Fig. 2. Time Course of Formation of L-Glycerol 3-Phosphate, Glycerol and Inorganic Phosphate (Pi) in Acid Hydrolysis (0.726 N HCl, 100°C) of Defatted Commercial Wheat Starch.*

Broken lines were measured after alkaline phosphatase action on the acid hydrolysate.

* Defatted with 80% dioxane in a Soxhlet for 48 hours.

値を示した。このときの無機リン酸の値は, 試料を湿式灰化して測定した全リン酸の含量に一致し, 酸分解と酵素分解の結果, 試料中のリンは全量無機リン酸に分解したことが認められた。酸分解の初期 (60 分まで) の産物からは, アルカリホスファターゼの作用によって新たに生成した無機リン酸は, グリセリンの値よりも若干高い値を示したが, それ以後の産物では両者の値はよく一致した (Table I)。この事実は, 酸分解の初期にはグリセリン-リン酸以外のものからリン酸が生成するが, それ以後はグリセリン-リン酸が唯一のリン化合物であることを示している。同時に, これは酸分解の初期の無機リン酸の生成が速かであることと相通ずる事実である。グリセリン 3-リン酸は, この酸分解の条件下では安定に存在し, 60 分で 0.9%, 90 分で 1.3% が分解するにすぎ

Table I. Yields of Glycerol and Pi from the Acid Hydrolysates²⁾ of Wheat Starch by Alkaline Phosphatase

Hydrolysis time (min)	0	10	30	60	90	120	150
Wheat starch I							
Glycerol (μmoles/g)	0.02	6.25	13.97	15.28	15.86	15.74	15.74
Pi (μmoles/g)	0	8.19	14.97	15.95	15.65	15.99	15.70
W. S. I defatted ¹⁾							
Glycerol (μmoles/g)	0	1.46	2.49	2.79	2.82	2.77	2.78
Pi (μmoles/g)	0.04	2.15	2.62	2.76	2.70	2.81	2.82

¹⁾ extraction with 80% dioxane in a Soxhlet apparatus for 48 hr,

²⁾ 0.726 N HCl at 100°C.

ないことが確かめられた。

以上の結果から、小麦でんぷん中にホスホグリセリドなどのグリセリン-リン酸の誘導体として存在するリンは、以下のような方法で定量することが可能であると結論した。すなわち、試料でんぷんを0.726N塩酸で100℃に90分加水分解し、pH 9.5±0.2に中和し、アルカリホスファターゼを作用させて生成するグリセリンを定量し、酸加水分解時に分解したグリセリン-リン酸の量を補正することによって求められる（小麦でんぷんの場合Table I にみられるように、アルカリホスファターゼの作用によって生成するグリセリンと無機リン酸の量は一致するため、グリセリンの代わりに無機リン酸を定量してもよいが、試料によっては酸分解によってグリセリン-リン酸以外の酸に安定なリン酸エステルを生成する可能性があるため危険である）。酸分解によるグリセリン-リン酸の損失は、標準のL-グリセリン 3-リン酸が同条件下で1.3%が分解するため、グリセリン-リン酸の誘導体においても、リンの遊離はこれと同じと見なして補正し、グリセリン-リン酸の誘導体として存在するリン(Pg)は、次式により求められる。

$$Pg = (G - Go) \times 1.013$$

Go: アルカリホスファターゼ作用前のグリセリン量

G: アルカリホスファターゼ作用後のグリセリン量

酸分解60分によって生成する無機リン酸は、グリセリン-リン酸以外の未知のリン化合物に起因すると考え、ここでは P_{60} で表わすことにした。酸分解60分後の無機リン酸の測定値には、試料中に元来由来するものと、グリセリン-リン酸の加水分解（60分の水解で0.9%が分解する）に由来するものも含まれるので、 P_{60} は次式により求める。

$$P_{60} = P_{60}(\text{測定値}) - (\text{試料中の無機リン酸}) - 0.009 \times Pg$$

Table IIは、上述の方法に従って分析した各種穀類でんぷんのリンの分画定量の結果である。市販小麦でんぷんの90.8%、実験室調製小麦でんぷんの99.9%が、グリセリン-リン酸誘導体として存在することが認められた。

小麦でんぷんでは、無機リン酸、 P_{60} 、Pgの合計が全リンの含量と一致し、これら以外のリンは存在しないと結論された。このことは、グルコース基にエステル結合したリンが検出されないこと⁽⁶⁾と一致した結果である。

トウモロコシや米でんぷんにおいても小麦でんぷんと

Table II. Phosphorus Contents of Cereal Starches

Starch	Phosphorus [$\mu\text{moles/g}$ (%)]				
	Total	Inorganic	Pg	P_{60} (unknown)	Glucose-6-P
Wheat I	17.40 (99.4)	0.60 (3.5)	16.04 (90.8)	0.89 (5.1)	0
Wheat II (defatted)	3.60 (103.3)	0.40 (11.1)	2.85 (79.2)	0.47 (13.0)	0
Wheat II*	13.56 (101.5)	0.06 (0.4)	13.54 (99.9)	0.17 (1.2)	0
Corn	4.90 (89.0)	0.40 (8.1)	3.42 (69.8)	0.01 (0.2)	0.53 (10.9)
Rice I	4.30 (97.3)	0.10 (2.3)	3.22 (74.9)	0.64 (14.8)	0.23 (5.3)
Rice II* (koshi-hikari)	1.42 (81.6)	0.04 (2.8)	0.89 (62.7)	0.09 (6.3)	0.14 (9.8)

* prepared in the laboratory.

同様に、Pgがリンの主体であることが明らかにされた。これらのでんぷんは小麦でんぷんと異なり、無機リン酸、 P_{60} 、Pgの合計が全リンの含量よりも、かなり低い値を示し、グルコース残基の6位にエステル結合したリンを含み、これらと合しても全リンの含量より若干低い値が得られ、なお異質のリンを含む可能性を示唆している。小麦でんぷんとトウモロコシ、米のでんぷんとは量のみならず、質の異なるリンを含むことは興味ある事実である。

ジャガイモ、サツマイモ、クズなどの地下でんぷんや地上でんぷんでも、モチゴメ、モチトウモロコシのでんぷんには、本方法によりPgは検出されなかった。Ackerら⁽⁹⁾も、モチトウモロコシやジャガイモでんぷんには、リゾレシチンは存在しないと報告している。

Fig. 1, 2に見られるように、酸加水分解によって短時間に少量のグリセリンが遊離する。これは、試料中のグリセリドの分解に由来するものと考えられる。Table IIIは、加水分解90分の時点でグリセリンの量からグリセリン-リン酸誘導体の加水分解により生成するグリセリンと、試料中に元来検出される微量のグリセリン量を差引いたグリセリン量から求めたグリセリドとPgの含量を示したものである。Pgをホスホグリセリドと見なす

Table III. Glycerides Content of Wheat Starch

Starch	Glycerides (A) ($\mu\text{moles/g}$)	Pg/A
Wheat I (commercial)	0.70	22.9
Wheat I (defatted)	0.17	16.8
Wheat II (laboratory prepared)	0.50	27.1

と、小麦でんぷん中のグリセリドの量はホスホグリセリドの 5% 以下の微量であり、80% のジオキサン抽出により、ホスホグリセリドとほぼ同じ割合で除去されることが認められた。

考 察

小麦でんぷんの酸加水分解により生成した L-グリセリン 3-リン酸は、生成した全グリセリン-リン酸のはば 32~35% であった。これは、小麦でんぷん中に存在する L-グリセリン 3-リン酸の誘導体であるリン脂質などが酸分解をうけたときにリン酸基の転移をおこすためである。L-グリセリン 3-リン酸を小麦でんぷんの水解と同じ条件下で処理すると、Fig. 3 に示したようにほぼ 35% まで急速に減少し平衡に達する。この事実は、小麦でんぷんの水解により生成する L-グリセリン 3-リン酸と全グリセリン-リン酸の量的関係の妥当性を裏づけている。

でんぷんのリン脂質は、各種の溶媒によっても完全に抽出することは非常に困難である。Table IV は、Schoch⁽⁷⁾ が推賞した 80% ジオキサンと 85% メタノールを用いる抽出法による小麦でんぷんから、リンの抽出

効果を示したものである。80% のジオキサンで 48 時間抽出する方法が、85% メタノール処理よりも有効であったが、なお 20% のリンが残留した。この方法で脱脂した試料の残留リン中の P_{60} の含有率が高く、 P_{60} の実態は不明であるが、でんぷん分子と親和性の高いものと推測される。脱脂操作によるリン脂質の抽出の難易は、リン脂質の脂肪酸残基の種類によるアミロースらせんとの親和性の相違に依存するところが大きいと考えられるが、粒の物理的構造に由来する可能性もあろう。

少量（数 100 mg 以下）の でんぷん試料から脂質を定量的に抽出し、抽出物からグリセリン脂質を他のリン脂質や脂質と分離し、試料中のグリセリン脂質の含量を定量することは容易ではない。しかし、本研究で設定したでんぷん中のリンの定量方法は、リン化合物を最終的にすべて無機リン酸として回収し、その過程でリンを形態別に定量するもので、少量の試料（数 100 mg）で可能である。この方法では、グリセリン脂質のリンはグリセロールリン酸として回収され、定量される。でんぷん中には、グリセリン脂質以外に酸分解でグリセリン-リン酸を与える物質の存在は知られていないので、このグリセリン-リン酸のリン (P_g) の量は、すべてグリセリン脂質に由来するものと見なして差支えないであろう。従って、この方法はでんぷん中のグリセリン脂質のリンの実用的定量法として役立つであろう。

小麦でんぷんの 1 試料（実験室調製品）の P_g 値が全リンの含量とよく一致したことは、この試料にはグリセリン脂質以外のリンが存在しないことを意味し、興味ある事実である。

要 約

1. 小麦でんぷんを 0.726 N 塩酸を用いて 100°C で加水分解し、経時的に生成するリン化合物を分析し、でんぷん中にグリセリン-リン酸の誘導体（グリセリン脂質と見なされる）として存在するリン (P_g) の定量条件を検討した。その結果、90 分間加水分解し、遊離するグリセリン-リン酸をアルカリホスファターゼで分解し、生成するグリセリンを測定し、酸分解によって分解する量を補正することによって、 P_g の量を定量することが可能であると結論した。

2. 上記の方法を実験室調製の小麦、市販の小麦、市販のトウモロコシ、市販の米、実験室調製の米などに適

Fig. 3. Decrease of L-Glycerol 3-Phosphate in Acid Conditions (0.726 N HCl at 100°C).

Table IV. Removal of Phosphate from Wheat Starch

Methods	Extraction, %
(1) Extraction with 80% dioxane in a Soxhlet apparatus for 48 hrs.	79.3
(2) Repeated digestions with 85% methanol : 3 hr × 1	41.4
" × 2	53.5
" × 4	55.8
" × 8	68.4

用し, Pg の量を測定した結果, それぞれ全リン含量の 99.9%, 90.8%, 69.8%, 74.9%, 62.7% であった. ジャガイモ, サツマイモ, クズ, モチ米, モチトウモロコシのでんぷんでは, Pg は検出されなかった.

3. 小麦でんぷんや他の穀類でんぷん中に, 0.726N 塩酸, 100°C で 60 分以内の処理で加水分解される酸に, 不安定な未知のリンの存在が示唆された.

でんぷん試料をご恵与いただいた林学園女子短期大学の 前田巖氏, 島田化学工業の島田達二郎氏, 三和澱粉工業の小堀通夫氏に謝意を表します.

- (1) 田端司郎, 檜 作 進: 澱粉科学, **22**, 27 (1975).
- (2) S. Hizukuri, S. Tabata and Z. Nikuni: *Stärke*, **22**, 338 (1970).
- (3) S. Tabata and S. Hizukuri: *ibid.*, **23**, 267

- (1971).
- (4) T. Posternak: *Helv. Chim. Acta*, **18**, 1351 (1935).
- (5) *idem*: *J. Biol. Chem.*, **188**, 317 (1951).
- (6) S. Tabata, K. Nagata and S. Hizukuri: *Stärke*, **27**, 333 (1975).
- (7) T. Schoch: *J. Amer. Chem. Soc.*, **64**, 2954 (1942).
- (8) H. S. Rooke, L. H. Lampitt and E. M. Jackson: *Biochem. J.*, **45**, 231 (1949).
- (9) L. Acker and H. J. Schmitz: *Stärke*, **19**, 233, 275 (1967).
- (10) J. J. Wren and D. S. Merryfield: *J. Sci. Food Agr.*, **21**, 254 (1970).
- (11) C. H. Fiske and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- (12) R. J. L. Allen: *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).
- (13) O. Wieland: "Methoden der Enzymatischen Analyse," 2 Auflage, Band II, 1367 (1970).