温水処理甘藷の膜システムによる塊根成分の分画:

β -アミラーゼの動向

蟹江松雄, 永浜伴紀, 藤本滋生
(鹿児島大学農学部澱粉利用学研究室)

昭和 50 年 10 月 8 日 受 理

Fractionation of Tuber Components by a Membrane System of the Sweet Potato Treated with "Hot Water": Movement of β -Amylase

By Matsuo KANIE, Tomonori NAGAHAMA and Shigeo FUJIMOTO
*Laboratory of Applied Starch Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University, Kagoshima, Japan*

1. The strips of sweet potato tubers steeped in water at 65°C for 1~3 hr were capable of discharging juice easily under a moderate pressure, with their organization unbroken. The pressed strips swelled into the original shape by absorbing water. Thus, through the repeated pressings and imbibitions of the strips, almost all the soluble low molecular materials were excluded into the juice; while, in the pressed strips, β -amylase remained in a form freed from the above components. By the final homogenization of the pressed strips with water, almost all the enzyme activities were recovered in a colorless clear solution, showing an enhanced specific activity, separated from the solid components.

2. The above fractionation of the soluble low molecular materials, such as sugars, from β -amylase remaining in the pressed strips was ascertained to have resulted from the function of a membrane system consisting of cell-walls and cell-membranes, etc. of the treated tissues.

3. The increased resistance of the strips and their membrane system to the repeated pressings, was suggested to have been due, mainly, to the increased combination of calcium with pectin existing close to cell-walls and, partly, to the increase of pectin combined with the cell-wall cellulose, etc.; namely, to the increase of the bridge structure and hydrogen bond.

(Received October 8, 1975)

著者ら⁽¹⁾は前報において、甘藷を 55~65°C の温水に 1~3 時間浸漬すると、組織が柔軟になるとともに強じん性を増し、圧搾によって組織の崩壊をもたらさないで容易に汁液を分離できることを報告した。この処理は、糖組成や澱粉に大きな変化を与えないので、甘藷の脱汁法として応用できるだけでなく、さらに、この際 β -アミラーゼは汁液に移行せず圧搾切片に残存するので、圧搾切片を水とともに磨砕すれば容易に抽出できる。したがって、甘藷塊根の成分を 3 部に分画でき、それぞれの有効な利用が可能になることを指摘した。そして、このように β -アミラーゼが汁液に移行しないのは、 β -アミ

ラーゼが処理甘藷の細胞壁や細胞膜などからなる膜システムにさえぎられて、汁液に移行しないためと想定された。

しかし上記の操作だけでは、分画が充分に行われないう。もし処理甘藷の膜システムが強じんであれば、いったん圧搾搾汁した甘藷切片に再び吸水させ、再度これを圧搾搾汁することができ、この操作をくり返すことにより、可溶性糖などの低分子成分は汁液中に、 β -アミラーゼは圧搾切片中に分画される。

本報では、以上の示唆にもとづいて行った実験の結果、ならびに、このようなくり返し操作を可能にする切

片組織の強じん性の原因について検討を加えたので、これらに関して報告する。

実験方法

甘藷 実験に供した甘藷は、鹿児島県下で栽培された農林 2 号および高系 14 号である。甘藷の水分は、ほぼ 65% 程度であった。

温水浸漬と搾汁の条件 前報⁽¹⁾の結果にもとづいて、65°C の温水に甘藷を投入し、同温度で 1 時間放置後水道水で冷却することを標準条件とした。なおこの条件は、甘藷の品種にかかわらず適用した。

圧搾搾汁にあたっては、甘藷試料を角柱状切片（断面 1×1cm）とし、1.2kg/cm² の圧で搾汁した。

ペクチンの定量⁽²⁾ 甘藷試料を 5mm 角に切り、その 100g を 99% エタノール 250ml に投入、湯浴上で 15 分間逆流沸騰させる。吸引濾過して残渣をとり、乳鉢で磨砕しながら 70% エタノールで洗浄する。洗浄液について、フェノール・硫酸反応が消失するまで洗浄をくり返し、最後に残渣を 99% エタノールで洗浄する。残渣を風乾後、さらに 40°C、30 mmHg で減圧乾燥、1 日後秤量して、これをアルコール不溶性固形物 (AIS) とした。

AIS について、次のようにして各形態のペクチンを分別定量した。まず AIS に水を加え、20°C で 1 夜放置後、溶出するペクチンを定量し、水溶性ペクチン (WP) とした。残渣は、水洗した後 0.4% ヘキサメタリン酸ナトリウム中で 20°C、2 時間放置して、溶出するペクチンを定量し、ヘキサメタリン酸ナトリウム可溶性ペクチン (PP) とした。

なお、ペクチンの定量にはカルバゾール変法⁽³⁾を用い、ガラクトクロン酸無水物として表わした。

可溶性全糖、β-アミラーゼ活性 前報⁽¹⁾にしたがって行った。なお、酵素活性の測定においては、搾汁液を 15,000rpm、0°C、15 分間遠心分離して酵素液とした。また、Lowry 法⁽⁴⁾により蛋白値を測定して、比活性を求めた。

実験結果

1. 温水処理甘藷の圧搾切片の吸水-圧搾搾汁のくり返しによる β-アミラーゼの分画

生甘藷切片および温水処理甘藷切片の圧搾搾汁前後の形状は、Fig. 1 のとおりである。無処理甘藷では圧搾

Fig. 1. Pressed Strips of Raw and the Treated Sweet Potato.

(1) strips of raw sweet potato, (2) pressed strips of raw sweet potato, (3) strips of sweet potato which was treated with "hot water" at 65°C for 1 hr, (4) pressed strips of the treated sweet potato.

(1.2kg/cm², 2 分間) により組織の崩壊が起るが、処理甘藷では起らない。

処理甘藷の圧搾切片を水に浸漬し、1 夜冷蔵庫中に放置したところ、搾汁前の含水量（約 65%）に達したので、再度圧搾搾汁を行った。この吸水-圧搾搾汁を 2 回行い、3 回目の吸水を行った切片は、搾汁に先だってホモジナイザーで磨砕し、組織を破砕した。この処理を図示すれば Fig. 2 のとおりであり、これらの操作による汁液 1, 2, 3, 4 への可溶性全糖および β-アミラーゼの移行の状況は、Fig. 3 に示すとおりである。

圧搾搾汁-吸水-圧搾搾汁のくり返しをしたとき、汁液

Fig. 2. Procedure for Press and Imbibition of Sweet Potato Treated with "Hot Water."

Fig. 3. Distributions of Activity of β -Amylase and Soluble Sugars to the Juices.

* Determined on the extract obtained by homogenizing the strips in the presence of ten times as much water as strips.

** Determined on the juice obtained from the homogenate.

On preparation of the juices, see Fig. 2.

1, 2, 3に抽出される可溶性全糖の合計は全体の95.5%にのぼるが、 β -アミラーゼは1.9%に過ぎない。しかし、最後に磨砕して得られる汁液4には、可溶性全糖は残りの4.5%が移行するに過ぎないが、 β -アミラーゼの移行は全体の98.1%にのぼる。そのうえ、汁液の着色もほとんど認められない。

また、この実験を行うに先立ち、処理甘藷を2分し、一方はそのまま磨砕して搾汁し、他方には10倍量の蒸留水を加えたのち磨砕、搾汁して、両搾汁について β -アミラーゼを測定し、原甘藷100gあたりの総活性を求めたところ、それぞれ392,000単位および363,000単位であり、後者は前者の92.6%であった。この結果は、参考のためFig. 3中表示した。この結果から、希釈されずに抽出測定された β -アミラーゼの総活性は、加水抽出された後測定されたそれよりも僅少とはいえ高いので、加水して細胞汁液のイオン濃度を低下させることにより、新たに脱離活性化される β -アミラーゼはないものと考えてよい。したがって圧搾切片3が吸水、磨砕されたとき、はじめて大部分の活性が抽出されたのも、その時点での β -アミラーゼの活性化によるものではなく、膜システムにさえぎられて透過できなかった β -アミラーゼが、膜システムの破壊によって汁液中に抽出されたものと考えられる。

圧搾切片1, 2, 3をそれぞれ加水磨砕して、それらの磨砕汁液について β -アミラーゼ比活性を測定し、生甘藷のそれと比較した。その結果、Table Iに明かなように、吸水-圧搾搾汁のくり返しにより比活性が高まり、圧搾切片3では生甘藷の3.6倍を示した。処理切片の圧搾により搾汁液中に移行する成分には、可溶性糖のほ

Table I. Specific Activities of β -Amylase in Raw and Treated Sweet Potato

Sweet potato	Control (raw)	Treated		
		Pressed strips 1	Pressed strips 2	Pressed strips 3
Specific activity of β -amylase	101	231	256	362

Specific activity: represented by μ mole of maltose/min/mg of protein, and determined on juice obtained from a homogenate of the material.

On preparation of the pressed strips, see Fig. 2.

か、前報⁽¹⁾でも述べたように、低分子含窒素物やフェノール性物質も含まれる。したがって、圧搾搾汁液にこれらのLowry法比色値に影響する物質が移行し、圧搾切片から除去されることのほか、また処理中に一部の蛋白質が変性不溶化することも、比活性の高まる原因と考えられる。しかし、 β -アミラーゼについては、この処理による失活がほとんど認められないことを前報⁽¹⁾で報告した。

以上のことから、膜システムにより β -アミラーゼを切片中に分画できることが確かめられた。

2. 温水処理甘藷切片の難崩壊性

上記のごとく、温水処理甘藷の切片が吸水圧搾をくり返しても崩壊しないのは、温水処理によってある種の甘藷成分に変化が生じたことにほかならない。すでに古く住木⁽⁶⁾は、甘藷が冠水すると蒸煮しても軟化せず、その理由は、細胞液中の Ca^{2+} が細胞間の中層に移行し、プロトペクチンと結合して不溶性となるためだと報告している。この報告の中で住木は、冠水現象は70°Cの温水中では1時間の浸漬で起ると述べているので、本実験の温水処理は冠水の特殊なケースとも考えられる。

最近、Bartolome⁽⁷⁾は、馬鈴薯切片の蒸煮に先立ち、60~70°Cの温水中で2時間予熱すると、蒸煮後firmnessが認められるのは、ペクチンメチルエステラーゼの作用で細胞壁ペクチンがエステル分解を起し、原形質から移行した Ca^{2+} , Mg^{2+} と結合し架橋をつくるためだと報告している。

Bartolome⁽⁷⁾の予熱の条件は、本実験の温水処理条件とも類似しているので、温水処理した甘藷が蒸煮後にfirmnessを示すか否かを試験した。すなわち、65°Cの温水に一定時間浸漬した甘藷の硬度と、それらをさらに95°Cの熱水で1時間加熱した甘藷について硬度を測定した結果は、Fig. 4に示すとおりである。無処理甘藷と

Fig. 4. Effect of "Hot Water Treatment" and Successive Cooking on Hardness of Sweet Potato.

○ hardness of sweet potato treated at 65°C, ● "firmness" resulted from cooking at 95°C for 1 hr after treatment at 65°C.

Hardness was determined by use of a handy gauge for fruits (Kajitsu-Kōdōkei, Type UA, Kiya Seisakusho Ltd.).

Fig. 5. Alternate Change of the Pectic Materials of Sweet Potato during "Hot Water Treatment."

○ water soluble pectin (WP), △ Na-hexameta phosphate soluble pectin (PP), □ HCl soluble pectin (HP).

Pectin content was expressed in galacturonic anhydride/sweet potato, %.

Fig. 6. Electron Scanning Micrographs of Sections of the Treated Sweet Potato, and Line Analyses of Ca.

Electron Scanning Microscope and X-ray Microanalyzer: JSM-35, XMA (JEOL Ltd.). Samples were lyophilized and shadowed with gold. X-ray was scanned straightly along the central dotted line, and distribution of Ca, intensity of K_{α} 107.6 Å, on the line recorded as shown on the lower side of the photograph.

温水処理甘藷では、前者の硬度が最も大きい。しかし、これらをそれぞれ 95°C, 1 時間加熱すると、その硬度は最も低くなる。一方、温水処理時間が長くなるにつれて硬度は低下するが、各時間における処理甘藷をさらに 95°C, 1 時間加熱すると、それらの硬度はかえって増加する。無処理甘藷を 95°C, 1 時間加熱したものは十分に煮熟されているので、温水処理甘藷の 95°C, 1 時間加熱における硬度の増加は、firmness が起っていることを示すものである。

以上の事実から、温水処理もペクチンへの変性効果が大きいと考えられたので、ペクチンの分別定量を試みた。温水処理時間による水溶性ペクチン (WP)、ヘキサメタリン酸ナトリウム可溶性ペクチン (PP)、および塩酸可溶性ペクチン (HP) の消長は、Fig. 5 に示すとおりである。WP は温水処理 1~2 時間では減少するが、3 時間では増加している。一方 PP は 1 時間から増加の傾向がみられ、2~3 時間で最高に達するが、HP は 1 時間で増加が認められるだけで以後減少している。

このように、ペクチンの各形態の処理時間による消長は複雑であり、Fig. 4 で示したような処理時間と firmness との間に見られる直線的関係は存在しない。しかし、本実験における搾汁率のうえから効果の顕著な 65°C, 1~3 時間浸漬の条件では、特に PP の増加している事実が認められる。そこで、PP が細胞壁部やその周辺に存在しているか否かを判断するために、処理甘藷の組織薄片を調製し、走査型電顕ならびに X 線マイクロアナライザーでカルシウムの分布を観察した。その結果、Fig. 6 で明らかなように、65°C, 1 時間処理の甘藷薄片では細胞壁周辺に走査ピークが高くあらわれ、これらの組織部分へのカルシウムの集積が認められた。65°C, 3 時間の処理でも、やはり同様の傾向が認められた。しかし搾汁の効果のない 75°C, 1 時間の処理では、カルシウムの局在はみられなかった。

これらの結果から、搾汁に適した条件では、細胞壁周辺のペクチンがカルシウムとの架橋によって PP をまし、その機械的強度を高めて、これが吸水-圧搾のくり返しを可能にするのにあずかっているものと考えられる。さらにまた搾汁の最適条件に達した 65°C, 1 時間の浸漬で、すでに圧搾に対して組織の崩壊が起らない程度の強じん性が現われることから、強じん性の発現には PP の増加以外に HP の増加も関与しているものと考えられる。

考 察

1. 甘藷を凍結解凍したり、トルエン、亜硫酸などの薬剤で処理すると、組織が軟化し汁液が分離しやすくなることが知られている⁽⁷⁻⁹⁾。また冠心甘藷も同様の傾向を示すことが、住木⁽⁵⁾によって報告されている。その中で住木⁽⁵⁾は、冠水による組織の変化は、冠水によって原形質膜の半透過性の消失が起ることに始まると推論している。また Bartolome ら⁽⁶⁾も、馬鈴薯切片を 60~70°C で 2 時間予熱すると、まず細胞膜欠損が引き起されると述べている。そして両者とも、最終的には細胞壁周辺のペクチンに起る変化としている。両者の処理条件ならびに細胞壁周辺のペクチンに起る変化の様態は、本実験のそれらときわめて類似しているにもかかわらず、前二者では細胞膜の半透過性消失が推論され、塊根成分の膜分離の可能性についての記載はない。著者らの処理では切片の膜システムが維持強化されており、これによって低分子成分を排出し、圧搾切片中で β -アミラーゼなどの蛋白質や不溶性の澱粉、せんいなどが低分子成分を含まない状態に精製される。

蛋白質が搾汁切片中に残留しやすいことは、前報⁽¹⁾においても報告した。しかし β -アミラーゼが、搾汁-吸水-搾汁のくり返しを行っても、搾汁中にはほとんど抽出されず、大部分が搾汁切片に残留することについては、膜システムの存在だけでなく β -アミラーゼが細胞内で吸着・不活性化状態にあることも考察される必要がある。しかし、この点に関してはすでに前報において、処理甘藷を 2 分し、一方はそのまま搾汁、他方は磨砕した後搾汁したとき、後者の活性が著しく高かったことから、 β -アミラーゼの少なくとも大部分は細胞内で遊離状態にあることを推論した。また本報において、吸水-搾汁-搾汁をくり返した後の搾汁切片を吸水後磨砕すると、搾汁中に β -アミラーゼ活性が認められたが、これも細胞汁液の希釈によって新たに β -アミラーゼの脱離活性化が起ったためではなく、当初から活性状態であった酵素が膜システムの破碎によって、搾汁中に抽出されたことを意味するものであることを明らかにした。

2. 処理甘藷が吸水-搾汁のくり返しに耐えてその組織が崩壊しにくいのは、ペクチンの架橋構造の増大によるものであることが示唆されたが、架橋構造の内容に関しては複雑であることがわかった。しかし、搾汁に対して崩壊抵抗性を示す最大の原因は、細胞壁周辺のペ

Fig. 7. Proposed Mechanism of Fractionation of the Tuber Components through a Membrane System.

クチンのカルシウムによる架橋の増加であることが示唆された。馬鈴薯澱粉中のカルシウムの存在形態から考えて、甘藷の温水処理により細胞壁周辺に集積するカルシウムの多くは、本来は澱粉粒に含まれていたものと推測される。したがって、前報⁽¹⁾において温水処理条件では澱粉の糊化は起っていないことを述べたが、温水処理によりカルシウムは澱粉粒から放出拡散して細胞壁周辺に移行し、ペクチンのウロン酸基に結合するものと考えられる。

また今日まで、冠水の現象と Bartolome ら⁽⁶⁾や Hsu ら⁽¹⁰⁾の述べている予熱との間の関連性が明示された報告は見あたらないが、本実験によって両者の間に共通性の存在することが示唆された。

3. 以上の検討にもとづいて、温水処理甘藷切片の圧搾搾汁または吸水-圧搾搾汁のくり返しによる低分子成分、 β -アミラーゼ、および澱粉やせんいなどの分画の過程をモデル化して Fig. 7 に示した。

要 約

1. 甘藷塊根を 65°C の温水に 1～3 時間浸漬すると、適当な圧搾条件下では、圧搾甘藷切片が崩壊することなく、圧搾搾汁-吸水-圧搾搾汁のくり返しが可能である。そして圧搾により可溶性糖は搾汁中に排出されるが、 β -アミラーゼは圧搾切片中に残留するので、まず低分子成分を分画できた。最後の圧搾切片を吸水後磨碎して搾汁すると、ほとんどすべての β -アミラーゼは比活性の高い状態で搾汁中に抽出され、固形分から分画された。
2. 上記の可溶性糖などの低分子成分と β -アミラーゼの分画は、処理甘藷切片の細胞壁や細胞膜などからなる膜システムによる分画であることを明らかにした。
3. 処理甘藷切片の崩壊を伴わないで圧搾搾汁-吸水-圧搾搾汁のくり返しが可能なる理由は、主として細胞壁周辺のペクチンがカルシウムと結合し架橋構造を増したためであるが、一部はセルロースなどとの結合の増加によるものであることが示唆された。

本実験を行うにあたり、当研究室の専攻学生、前屋義孝、石塚浩敏、岡松洋の諸君ならびに研究生昇吉継君の協力をえた。また X 線マイクロアナライザーによる結果は、大蔵省関税中央分析所出来三男技官の終始熱心なご協力によるものである。記して謝意を表する。

なお、本報告の一部は昭和 49 年 10 月 18 日日本農芸化学会西日本支部大会パネル討論会で発表した。

- (1) 蟹江松雄, 永浜伴紀, 藤本滋生: 鹿大農学部学術報告, **24**, 155 (1974).
- (2) 農林水産技術会議事務局編: 食品分析研究会報告書, p. 185 (1974).
- (3) J. T. Galambos: *Anal. Biochem.*, **19**, 119, 133 (1967).
- (4) O. H. Lowry, N. J. Rosebrogh, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (5) 住木論介: 農学, **1**, 402 (1947).
- (6) L. G. Bartolome and J. E. Hoff: *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 262, 266 (1972).
- (7) 木原芳次郎: 農産製造, **1**, 3 (1947).
- (8) 木原芳次郎: 同上, 甘藷特集号, 1 (1948).
- (9) 渡辺篤二, 横沢一二: 農産製造, **3**, 26 (1949).
- (10) C. P. Hsu, S. N. Deshpande and N. W. Desrosier: *J. Food Sci.*, **30**, 583 (1965).