小豆子葉細胞の示差走査熱量測定†

藤村知子*・釘宮正往*

Gelatinization of Starches inside Cotyledon Cells of Adzuki Bean Studied by Differential Scanning Calorimetry

Tomoko FUJIMURA and Masayuki KUGIMIYA

* Department of Food and Nutrition, Hiroshima Women's University,
1-1-71, Ujina-higashi, Minami-ku, Hiroshima 734

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to study the gelatinization of starches inside cotyledon cells of adzuki bean (*Vigna angularis*) and isolated starches. DSC thermogram of cotyledon cells showed an endothermic transition with peak temperature at about 70°C which trailed a shoulder up to about 98°C, although that of isolated starches showed a single endothermic transition with peak temperature at about 71°C. The transition enthalpy (cal/g starch) for cotyledon cells was nearly equal to that for isolated starches. From these results it was assumed that the endothermic phenomenon at 70°C of cells was ascribed to the starch gelatinization taken place by the same mechanism as that of isolated starches and the higher temperature transitions were ascribed to the starch gelatinization inside cells at higher temperatures, which suggested that the gelatinization of starches inside cotyledon cells was suppressed. Cotyledon cells were subjected to such treatments with pectolyase or cellulase under appropriate conditions that caused a rupture of cells by swelling of starch granule accompanied by gelatinization of starches inside cells. DSC thermograms and the transition enthalpy (cal/g starch) obtained for the cells previously treated with enzymes were almost the same as those for isolated starches except that a small shoulder was observed at about 75°C. Thermograms for isolated starches were not affected by the addition of adzuki protein. From these results it was assumed that the suppression of gelatinization might be related to the physical strength of cell walls and the limited supply of water required for the gelatinization of starches inside cells. (Received Feb. 26, 1993)

過剰の水の存在下でデンプンを加熱すると、その粒構造が崩壊し、ゲル状となる。その際、デンプンの結晶構造は消失し、デンプン粒は水和・膨潤し、デンプン分子の一部は溶解する。このような現象は総体的に糊化と言われている¹⁾。デンプンの糊化に伴って光学的性質、流動学的性質、化学反応性、磁氣的性質、熱的性質などの理化学的性質が変化するが、これらの性質変化は必ずしも同時に起こるものではない²⁾。これは糊化現象の多面性を反映していると考えられる。一般に糊化の評価方法

はこれらの性質変化に基づいて行われることから、糊化を評価する場合、その目的に適した方法を選ぶことが必要である。

デンプン質食品の製造とその品質はデンプンの糊化や糊化状態と密接に関係する。デンプン質食品の一つであるアン（餡）はアン粒子の集合体であり、アン粒子中のデンプンの糊化の状態はアン品質に密接に関係すると考えられる³⁾。アン粒子は小豆を煮熟、磨砕することによって得られるもので、子葉細胞の形態を維持している

† 細胞内デンプンの糊化に関する研究（第2報）、（前報、文献4）

* 広島女子大学（〒734 広島市南区宇品東1-1-71）

ものの、細胞内に存在するデンプンは糊化している、いわゆる変性した子葉細胞といえる。子葉細胞内に存在するデンプン（細胞内デンプン）の加熱による糊化は単離デンプンに比較して抑制されると言われている³⁾。このことをより直接的に証明するために、小豆からデンプンを糊化することなく分離した子葉細胞を用いて、加熱糊化に伴う細胞内デンプンの偏光十字消失割合、膨潤力、溶解度を測定し、単離デンプンと比較検討した⁴⁾。その結果、これらの理化学的性質変化から評価した細胞内デンプンの糊化は単離デンプンに比べて抑制されることが明らかとなった。

本研究では、糊化を評価するために示差走査熱量測定 (DSC) を行い、熱的性質の変化（規則構造の崩壊⁵⁾）に基づいて、小豆の子葉細胞内デンプンと単離デンプンの糊化の違いを比較検討した。また、細胞内デンプンの糊化抑制に対する細胞壁及びタンパク質の影響についても検討を行った。

実験方法

1. 試料

試料として市販の大納言小豆（平成2年度北海道産）を用いた。

2. 子葉細胞およびデンプンの調製

小豆の子葉細胞および単離デンプンは前報⁴⁾に従って調製した。なお、加熱処理した子葉細胞中の崩壊細胞、損傷細胞および完全細胞の割合は、前報⁴⁾で報告したように、それぞれ 5.9 ± 4.3 、 3.4 ± 3.2 および 90.7 ± 3.4 % であった。

3. 細胞壁分解酵素処理細胞の調製

細胞壁構成成分であるペクチンやセルロースを部分的に分解する目的で、ペクトリアーゼ (SIGMA 社製, *A. Japonicus* 起源, 製品番号 P 3026) およびセルラーゼ (SIGMA 社製, *A. niger* 起源, 製品番号 C 7377) を用いた。酵素処理細胞を調製するための酵素反応条件はアン粒子のアミラーゼ処理によるデンプンの溶解率の測定法⁷⁾を用いて決定した。細胞壁分解酵素によって処理した後の子葉細胞を沸騰水浴中で10分間加熱した際のデンプンの溶解率がほぼ100%に達する条件を用いることとした。子葉細胞24 mg に対してペクトリアーゼ5 mg, セルラーゼ10 mg を用い、それぞれ pH 5.5, 5.0 の緩衝液50 ml 中で反応を行い、デンプンの溶解率に及ぼす酵素反応時間の影響を調べ、その結果を Fig. 1 に示した。その結果、それぞれ約25, 5時間でデンプンの溶解率がほぼ100%に達することが明らかと

Fig. 1 Effect of treatment time on solubility of starch in cotyledon cells treated with pectolyase or cellulase

●; pectolyase-treated ▲; cellulase-treated
Cotyledon cells (24 mg) were treated with 5 mg of pectolyase in 5 ml of acetate buffer (pH 5.5) at 25°C or 10 mg of cellulase in 5 ml of acetate buffer (pH 5.0) at 35°C.

なった。なお、顕微鏡観察の結果、この試料は子葉細胞と全く同じ形態を保持し、細胞内にデンプンが存在していたが、加熱すると細胞は崩壊または損傷し、糊化したデンプンが細胞外に多数認められた。これらの結果から、酵素処理細胞は細胞内デンプンの糊化に対する細胞壁の影響を調べる試料として適切であると考えられる。そこで、上記の条件で酵素処理を行った子葉細胞をガラスフィルター (G 3) を用いて水洗し、メタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、一晚風乾した後、真空ポンプを用いて減圧乾燥して、ペクトリアーゼ処理細胞及びセルラーゼ処理細胞を調製した。

4. 小豆タンパク質の調製

小豆タンパク質は平田らの方法⁷⁾により調製した。調製した小豆タンパク質（凍結乾燥物）の水分含量は10.0%であり、タンパク質含量は79.9%であった。

5. デンプン含量の測定

子葉細胞、単離デンプン及び酵素処理子葉細胞のデンプン含量は0.75 M の塩酸により加水分解を2.5時間行った後、ソモギー・ネルソン法⁸⁾により求めた。

6. 示差走査熱量測定 (DSC)

DSC は、以下の方法で行った。試料約4.5 mg および水50 μ l を銀製容器に密封して、セイコー電子工業 (株) 製示差走査熱量計 (DSC-10) を用いて、昇温速度1°C/分で行った。対照として水50 μ l を銀製容器に密封したものをを用いた。子葉細胞の場合は、2回目の加熱

で得られた DSC 曲線に基づいてベースラインを引き、DSC 曲線の特性値を求めた。

特性値として糊化の開始温度 (T_o)、ピーク温度 (T_p)、終了温度 (T_c) を Fig. 2 に示した方法で求めた。また、糊化のエンタルピー (ΔH) はピーク面積より算出し (cal/g 無水物)、試料のデンプン含量により補正を行った (cal/g デンプン)。以上の測定値は 3 回以上の測定結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

Fig. 2 DSC thermograms of isolated starches (A) and cotyledon cells (B)

A; 4.49 mg of isolated starch with 48.65 mg of water

B; 8.66 mg of cotyledon cells with 48.70 mg of water

実験結果

1. 子葉細胞および単離デンプンの DSC

細胞内デンプンと単離デンプンの加熱糊化の違いを調べるために、子葉細胞および単離デンプンの DSC を行った。DSC 曲線の一例を Fig. 2 に、特性値を Table 1 に示した。その結果、単離デンプンは T_p が約 71°C である単一の吸熱曲線を示したが、子葉細胞は T_p が約 70°C であり、78°C 付近をショルダーとする高温部に大きくテーリングした吸熱曲線を示した。 T_o と T_p は両者ともほぼ一致したが、 T_c は単離デンプンの約 81°C に対して、子葉細胞では約 98°C と約 18°C 高温であった。また、糊化のエンタルピーはデンプン含量を補正すると両者はほぼ一致した。これらの結果から、子葉細胞で認められた 70°C 付近の吸熱反応は単離デンプンと同じ機構で生じる糊化に起因すると考えられ、一方、高温部で認められた吸熱反応は、単離デンプンの場合に比べてより高温部で生じる糊化に起因すると考えられる。

2. 細胞壁分解酵素処理細胞の DSC

ペクチナーゼ処理細胞およびセルラーゼ処理細胞の DSC を行った。得られた DSC 曲線の一例を Fig. 3 に、特性値を Table 1 に示した。吸熱曲線はいずれの場合も、単一ではなかったが、高温部 (75°C 付近) にショルダーを持つ曲線となり、子葉細胞の場合に認められた高温部の大きなテーリングは認められなかった。いずれの試料でも T_o , T_p , T_c は単離デンプンの値とほ

Table 1 DSC characteristics of isolated starches, cotyledon cells of, adzuki bean and cells treated with pectolyase or cellulase

	Endothermic transition (°C)			ΔH (cal/g anhydride)
	$T_o^{1)}$	$T_p^{2)}$	$T_c^{3)}$	
Isolated starches	63.7 $\pm$ 0.5	70.5 $\pm$ 0.7	81.0 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.2
Cotyledon cells	63.5 $\pm$ 1.3	69.8 $\pm$ 0.5	97.8 $\pm$ 1.7	2.0 $\pm$ 0.2 (2.7 $\pm$ 0.3) ⁴⁾
Pectolyase-treated cotyledon cells	64.9 $\pm$ 0.3	70.0 $\pm$ 0.4	81.1 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.0 (2.9 $\pm$ 0.0) ⁴⁾
Cellulase-treated cotyledon cells	63.7 $\pm$ 0.5	69.3 $\pm$ 0.4	83.7 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.0 (2.5 $\pm$ 0.0) ⁴⁾

DSC characteristics are expressed as mean and standard deviation for triplicates.

¹⁾ Onset temperature

²⁾ Peak temperature

³⁾ Conclusion temperature

⁴⁾ ΔH ; cal/g starch

ば一致した。また、 ΔH はデンプン含量を補正すると、単離デンプンの値とほぼ一致した。これらの結果から、酵素処理細胞と子葉細胞の DSC 曲線の違いは、細胞壁の強靱さの違いによるデンプンの糊化の違いに起因するのではないかと考えられる。

3. 単離デンプンの DSC に及ぼす小豆タンパク質の影響

子葉細胞内に含まれるタンパク質が細胞内デンプンの糊化にどのような影響を及ぼすかを DSC により調べた。小豆タンパク質単独およびタンパク質存在下での単離デンプンの DSC を行い、得られた DSC 曲線の一例を

Fig. 3 DSC thermograms of pectolyase-treated cotyledon cells (A) and cellulase-treated cotyledon cells (B)

A ; 3.05 mg of pectolyase-treated cotyledon cells with 49.71 mg of water

B ; 4.86 mg of cellulase-treated cotyledon cells with 49.58 mg of water

Fig. 4 に、特性値を Table 2 に示した。対照としての小豆タンパク質の吸熱曲線は約 79°C をピーク温度とするほぼ単一でブロードな曲線となり、 ΔH は約 0.9 cal/g タンパク質であった。単離デンプンの DSC 曲線に及ぼす小豆タンパク質の影響を調べるために、子葉細胞試料に含まれるデンプンとタンパク質の比率⁴⁾を考慮して、デンプンに対してタンパク質を約 40% 添加した。その結果、吸熱曲線は単離デンプンとほぼ同じ吸熱曲線を示した。また、 ΔH (cal/g デンプン) も単離デンプンの値とほとんど一致した。これらの結果から、子葉細胞に含まれる量のタンパク質の添加では、単離デンプン

Fig. 4 DSC thermograms of mixture of isolated starches and adzuki protein (A) and adzuki protein (B)

A ; 4.15 mg of isolated starches and 1.83 mg of adzuki protein with 37.12 mg of water

B ; 1.70 mg of adzuki protein with 46.23 mg of water

Table 2 DSC characteristics of adzuki protein and isolated starches in the presence of the protein

	Endothermic transition (°C)			ΔH (cal/g anhydride)
	To ¹⁾	Tp ²⁾	Tc ³⁾	
Protein	75.5±0.6	79.2±0.7	86.1±0.4	0.9±0.1
Mixture of isolated starches & protein ⁴⁾	63.9±0.7	71.1±0.3	82.5±0.2	2.7±0.1 (2.8±0.1) ⁵⁾

DSC characteristics are expressed as mean and standard deviation for triplicates.

¹⁾ Onset temperature

²⁾ Peak temperature

³⁾ Conclusion temperature

⁴⁾ Protein was added at about 40% based on dry-starch basis.

⁵⁾ ΔH ; cal/g starch

の DSC 曲線はほとんど影響を受けないと考えられる。

考 察

小豆の子葉細胞、細胞壁分解酵素で処理した子葉細胞、小豆から単離したデンプンおよびタンパク質の DSC によって得られた結果に基づいて、細胞内デンプンの糊化について考察する。

一般に、DSC 曲線にみられるデンプンの吸熱反応は、糊化の際に起こる規則構造（結晶構造^{9)~11)}または二重らせん構造⁵⁾¹²⁾の崩壊に基づき、タンパク質の吸熱反応は変性（立体構造の変化¹³⁾）に基づくと考えられる。本研究で認められた子葉細胞の吸熱曲線は主として主要成分であるデンプンおよびタンパク質の規則構造または立体構造の崩壊によるのではないかと推測される。しかし、以下の理由からタンパク質の寄与は除外できると考えられる。すなわち、1) 子葉細胞の ΔH , T_o , T_p は単離デンプンのそれらとほぼ一致した。2) 小豆タンパク質の ΔH は単離デンプンのそれと比べて約 1/3 と小さかった。3) 子葉細胞試料のデンプンに対するタンパク質の比率は約 40%⁴⁾と小さく、単離デンプンの ΔH はこの程度のタンパク質の存在ではほとんど影響されないと考えられる。4) 子葉細胞調製時の酸・アルカリ処理によってすでにタンパク質が変性している可能性も考えられる。5) たとえタンパク質の寄与があったとしても非常に小さいため、無視できると考えられる。以上の理由から、子葉細胞の DSC 曲線は主として細胞内デンプンの糊化に伴う規則構造の崩壊に基づく吸熱反応によるものと考えられる。以上の考えに基づき、細胞内デンプンの糊化の機構について考察する。

子葉細胞の DSC 曲線における約 70℃ をピークとする約 64~81℃ での吸熱反応は単離デンプンと同じ機構で起こる規則構造の崩壊によるものと考えられる。一方、この温度範囲を含むさらに高温部での吸熱反応は単離デンプンと比べてより高い温度で規則構造が崩壊することによるものと考えられる。これらの結果は子葉細胞内デンプンの偏光十字が消失し始める加熱温度が単離デンプンの場合とほとんど変わらなかったのに対して、完全に消失するのに必要な加熱温度が単離デンプンの場合に比べて高かったこと（約 90℃）⁴⁾とよく一致している。従って、細胞内デンプンの糊化は低温部と高温部では異なる機構で生じると考えられる。これらの結果から、子葉細胞内デンプンの糊化は単離デンプンの場合と比較して、規則構造が完全に崩壊するのにより高い温度での加熱が必要であると言う意味から、抑制されると結論できる。

このような細胞内デンプンの糊化抑制に細胞内に存在するタンパク質の関与が考えられている⁷⁾。しかし、小豆デンプンの吸熱反応は小豆タンパク質の添加によってほとんど影響されなかったことから、タンパク質は糊化に伴う規則構造の崩壊には影響しないと考えられる。

細胞内デンプンの糊化抑制に対する細胞壁の影響を調べる目的で、DSC を行う前にあらかじめ細胞壁分解酵素で子葉細胞の処理を行った。ペクトリアーゼ及びセルラーゼで処理した子葉細胞の細胞壁の強靱さが消失することが明らかとなったことから、細胞壁の強靱さの保持にペクチンやセルロースが関与しているのではないかと考えられる。しかし、用いた酵素の純度や夾雑物が細胞壁構成成分に与える影響については不明である。本研究では細胞壁の強靱さを消失させた二つの酵素を用いて処理を行い、それぞれの子葉細胞の DSC を行った。その結果、いずれの試料の DSC 曲線も 75℃ 付近にショルダーを示したが、未処理の子葉細胞で認められた高温部での大きなテーリングを示さなくなり、 T_o , T_p , T_c は単離デンプンのそれらとほとんど一致した。酵素処理細胞の ΔH はデンプン含量を補正するとほとんど単離デンプンの値と同じであった。これらの結果から、酵素処理することによって子葉細胞で認められた高温部の吸熱反応は低温部に移動したものと考えられる。酵素処理細胞の場合に認められたショルダーの発生の原因として、この部分にタンパク質の吸熱反応が重なる可能性も考えられるが、タンパク質存在下でのデンプンの DSC の結果からこの可能性は少ないのではないかと考えられる。未処理の子葉細胞は加熱した場合、崩壊・損傷細胞の割合が約 9% と少なかった⁴⁾ことから、子葉細胞で得られた 78℃ 付近のショルダーは細胞壁の崩壊・損傷に関係するとは考えにくい。

しかし、酵素処理細胞の場合、細胞壁の崩壊がショルダーの発生に関与する可能性がある。すなわち、処理細胞では 64℃ 付近からのデンプンの膨潤に伴って細胞壁の崩壊・損傷が開始し、温度の上昇に伴ってさらに崩壊・損傷が起こることによって、より多くのデンプンが糊化・流出すると考えられる。デンプンの膨潤と細胞の崩壊・損傷が完全に平行して生じるとは考えにくく、後者は前者に比べてより高温で生じると考えられる。従って、酵素処理細胞の加熱に伴う崩壊・損傷がショルダーの発生の原因ではないかと考えられる。

細胞内デンプンで観測された高温部の吸熱反応の原因について考察する。デンプンの吸熱曲線が高温部へ移行する事例として、低水分下で、また糖や塩の存在下で加

熱した場合が報告されている^{14)~16)}。これらの添加による糊化温度の上昇すなわち糊化抑制は水の容積分率の減少¹⁴⁾、水分活性の低下¹⁵⁾、水の容積分率に対する水分活性の比の増加¹⁶⁾などで説明されている。いずれも基本的には、デンプンの規則構造の崩壊に利用される水の量や活性が不足することに起因すると解釈されている。従って、細胞内デンプンの加熱による膨潤が著しく抑制された⁴⁾ことを考え合わせると、規則構造の崩壊に関わる水の供給不足が吸熱ピークの高温部への移行の原因ではないかと考えられる。細胞壁をあらかじめ酵素処理した場合、高温部の吸熱が消失したのは、細胞壁がデンプンの膨潤に伴って崩壊または損傷するために、糊化に必要な水の供給が容易になったためではないかと考えられる。従って、細胞内デンプンの糊化抑制には、細胞壁の強靱さが糊化時の膨潤を抑制すること、また規則構造の崩壊を助ける水の供給が不十分になることが関係しているのではないかと考えられる。細胞壁による膨潤抑制と水の供給不足の因果関係については今後の検討課題である。

要 約

小豆の子葉細胞内デンプンと単離デンプンの糊化について、示差走査熱量測定により比較検討した。その結果、単離デンプンは約 71°C をピーク温度とする単一の吸熱曲線を示したが、子葉細胞は約 70°C をピーク温度とし、78°C 付近をショルダーとする高温部に大きくテーリングした吸熱曲線を示した。子葉細胞で認められた 70°C 付近の吸熱反応は単離デンプンと同じ機構で生じる糊化に基づくものと考えられた。子葉細胞内デンプンの糊化のエンタルピーは単離デンプンのエンタルピーと同じであったことから、高温部の吸熱はより高温でのデンプンの糊化を反映したものと考えられた。子葉細胞をあらかじめ細胞壁分解酵素で処理することによって、加熱の際に細胞が崩壊しやすくなった試料を調製した。この試料の吸熱曲線は、細胞で認められた高温部の吸熱が消失し、単離デンプンの吸熱曲線とほぼ一致した。また、単離デンプンの吸熱曲線は小豆タンパク質の添加（デンプンの約 40% 添加）によってほとんど影響を受けなかった。これらの結果から、小豆細胞内デンプンの糊化は、単離

デンプンに比べて高温で完了することから、抑制されることが明らかとなった。この糊化抑制にはタンパク質はほとんど関与せず、細胞壁の強靱さが糊化時の膨潤を抑制すること、また糊化に必要な水の供給が不十分になることが関係するのではないかと推察した。

本研究の一部は平成 4 年度文部省科学研究費によるものであることを記し、謝意を表します。

文 献

- 1) ZOBEL, H.F.: *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd ed., WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N. and PASCHALL, E.F. (Academic Press, New York), p. 285 (1984).
- 2) 久下 喬: 澱粉科学, **39**, 51 (1992).
- 3) 小川 健・安部章蔵・釘宮正往: 日食工誌, **30**, 323 (1983).
- 4) 藤村知子・釘宮正往: 日食工誌, **40**, 490 (1993).
- 5) COOKE, D. and GIDLEY, M.J.: *Carbohydr. Res.* **227**, 103 (1992).
- 6) 釘宮正往・平田 健: 日食工誌, **34**, 581 (1987).
- 7) 平田 健・釘宮正往: 日食工誌, **32**, 35 (1985).
- 8) SOMOGY, M.: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- 9) DONOVAN, J.W.: *Biopolymers*, **18**, 263 (1979).
- 10) BILIADERIS, C.G., MAURICE, T.J. and VOSE, J.R.: *J. Food Sci.*, **45**, 1669 (1980).
- 11) BURT, D.J. and RUSSELL, P.L.: *Starch*, **35**, 354 (1983).
- 12) RUSSELL, P.L.: *J. Cereal Sci.*, **6**, 133 (1987).
- 13) DELBEN, F., CRESCENZI, V. and QUADRIFOGLIO, F.: *Int. J. Protein Res.*, **1**, 145 (1969).
- 14) LELIEVRE, J.: *Polymer*, **17**, 854 (1976).
- 15) SPIES, R.D. and HOSENEY, R.C.: *Cereal Chem.*, **59**, 128 (1982).
- 16) EVANS, I.D. and HAISMAN, D.R.: *Starch*, **34**, 224 (1982).

(平成 5 年 2 月 26 日受理)