

報 文

架橋型りん酸エステル化でん粉の加水分解酵素による分解挙動

関川 義明, 大野 幸雄*

Degradation Behavior of Cross-linked Starch Phosphate by Hydrolase

Yoshiaki SEKIKAWA and Yukio OHNO *

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531,Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, 271 Japan

Degradation behavior of starch phosphates synthesized experimentally by hydrolase (glucoamylase and/or α-amylase) was studied.

Rate of hydrolysis of each starch phosphate was different from each other in phosphorus content. As phosphorus content in starch phosphate showed an increase, the rate of hydrolysis of starch phosphate decreased. Behavior of starch phosphate by hydrolase was remarkably different from that of non-modified starch.

It was found that the behavior of the starch by hydrolase and phosphorus content value were very important factors for the estimation of modification of starch.

- Received Aug. 25, 1983 -

1 緒 言

でん粉誘導体の一種である架橋型りん酸エステル化でん粉は、食品工業、製紙工業などに多量に使用され、比較的多量に輸入されている。

現行の関税制度においては、でん粉誘導体と未処理でん粉（生でん粉）は明瞭に区別されており、また我が国の輸入制度などの関係からも両者の鑑別は重要な問題となっている。

架橋型りん酸エステル化でん粉の合成法は、一般的には、でん粉に無機りん酸塩を架橋剤に用いて、比較的低温でエステル化させて製造される。このように合成された所謂架橋型りん酸エステル化でん粉の加工度（置換度）は、一般に、低いものが多い。加工程度の低いでん粉誘導体は、外観、検鏡、赤外吸収スペクトル等からは未処理でん粉と区別することは不可能であり、また、ラベンダー粘度などの

粘度挙動や、りん含有量においても未処理でん粉に近いものもあって、加工処理の有無を判定するのに非常に困難をきたす場合もある。

前報¹⁾において、各種でん粉誘導体の加水分解酵素（グルコアミラーゼ）による分解挙動が、異なることを報告した。

ここでは、実際に加工程度の異なる種々の架橋型りん酸エステル化でん粉を合成し、酵素の基質特異性を利用した、架橋型りん酸エステル化でん粉の分解挙動について、基礎的な検討を行い二、三の知見が得られたので報告する。

2 実 験 方 法

2・1 試 薬

架橋剤：トリメタリん酸ナトリウム（シグマ社製）
酵 素：グルコアミラーゼ（活性：36.7 U/mg，
生化学工業社製），α-アミラーゼ（和

光純薬社製)

でん粉: 小麦でん粉(和光純薬社製)

緩衝液: 0.2M 酢酸緩衝液(pH4.8) Å

よう素溶液: よう化カリウム 20g 及びよう素 2g を水に溶解して 1l としたもの。

ハーネス試薬: 常法により調製したもの。

その他: 0.5% 塩酸, IN 塩酸, 無水炭酸ナトリウム,

過塩素酸, アミドール, 亜硫酸水素ナトリウム, モリブデン酸アンモニウム

2・2 架橋型りん酸エステル化でん粉の合成

架橋型りん酸エステル化でん粉の合成は, Kerr² らの方法に準拠して行った。すなわち, 架橋剤としてトリメタリん酸ナトリウムを用いる方法である。合成方法の一例は下記のとおりである。500ml のビーカーの中へ, 脱イオン水 180ml を加え, トリメタリん酸ナトリウム 2g, 炭酸ナトリウム 3g を溶解し, 小麦でん粉 100g を懸濁させ, さらに炭酸ナトリウムを加えて pH10.2 に調整した後, 50°で 6 時間攪拌しながら反応を行った。反応終了後, 内容物を 500ml の水に注加, 分散し, 5% 塩酸で pH7.0 に調整し, 多量の水で数回洗浄した後, 風乾し, 試料とした。

なお, 結合りん含有量の調整は, トリメタリん酸ナトリウム及び炭酸ナトリウムの仕込量を変えることにより行い, 結合りん含有量の異なる 8 種類の架橋型りん酸エステル化でん粉の合成を行った。

2・3 試料の精製

試料の精製は, セルロース透析膜により行った。すなわち, 2・2 で得られた合成品をセルロースチューブ(ピスキング社製, 公称孔型サイズ: 24)に入れ, 脱イオン水で 3 日間透析を行い, 遊離の無機物を完全に除去した。風乾後, さらに 105°で乾燥したものを実験に供した。

2・4 結合りんの定量

合成した架橋型りん酸エステル化でん粉の結合りん含有量は, 2・3 で得られた精製試料 1g を過塩素酸 10ml で分解後 25ml に定容した後, 2ml 分取して, 一定濃度のアミドール・亜硫酸水素ナトリウム水溶液及びモリブデン酸アンモニウム水溶液を加

えて発色する青色を, 島津ダブルビーム分光光度計 UV-190 型を用いて, 530nm における吸光度を測定した。別途作製したりん酸一カリウムの検量線を用いて定量した。

2・5 加水分解酵素によるでん粉及び架橋型りん酸エステル化でん粉の分解

2・5・1 グルコアミラーゼによる分解

2・3 で得られた精製試料 0.3g を三角フラスコに量り取り, 水 50ml を加えて沸とう水中で 30 分間加熱してアルファー化した後, 100ml に定容した。20ml 分取して, 0.2M 酢酸緩衝液(pH4.8)に溶解したグルコアミラーゼ(5mg/50ml)を 2.5ml 加えて 37°の恒温槽で 2.5 時間反応を行った後, 1ml 分取してグルコアミラーゼの作用により生成した還元糖量をハーネス法により測定し, 消費した N/100 チオ硫酸ナトリウム水溶液の滴定量から分解率を検討した。

2・5・2 アミラーゼによる分解

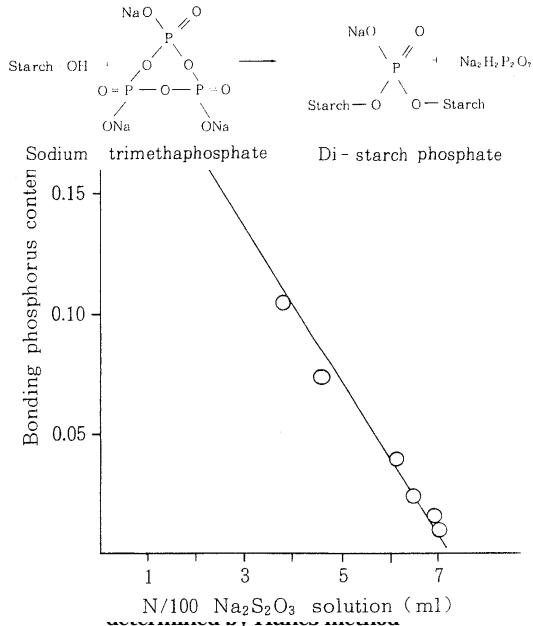
2・3 で得られた精製試料 0.6g を三角フラスコに秤り取り, 水 50ml を加えて沸とう水中で 30 分間加熱してアルファー化した後, 100ml に定容した。15ml 分取して, 0.2M 酢酸緩衝液に溶解したアミラーゼ(35mg/20ml)を 1ml 加えて 37°の恒温槽に放置し, 一定時間毎に 1ml を分取し, 1N 塩酸 1ml を加えて反応を停止させたのち, 1ml のよう素溶液を加えて 660nm における吸光度を島津ダブルビーム分光光度計 UV-190 型で測定し, 反応時間と吸光度の減少から分解率を検討した。

3 結果及び考察

3・1 結合りん含有量と還元力との関係

未処理でん粉をグルコアミラーゼを用いて所定の条件で分解した場合の分解挙動は Fig.1 のようになり, ほぼ 2 時間で分解率が一定になることが判明した。したがって, 以後の架橋型りん酸エステル化でん粉の分解時間として, 2.5 時間を採用することにした。還元力は, グルコアミラーゼで 2.5 時間加水分解を行い, 生成した還元糖量をハーネス法で測定し, N/100 チオ硫酸ナトリウム水溶液の滴定数で

報文 架橋りん酸エステル化でん粉の加水分解酵素による分解挙動



表わした。

Fig.2に結合りん含有量と還元力の関係を示した。Fig.2より、結合りん含有量の増加にしたがい、還元力、すなわちグルコアミラーゼによる分解率が低下していくことを示した。また、結合りん含有量と還元力は非常に良い直線関係を示し、相関係数を求めた結果 $r = -0.997$ で、両者の間には非常に強い相関関係があることが判明した。すなわち、結合りん含有量が少なければグルコアミラーゼによる分解率は大きく、結合りん含有量が大きくなれば分解率は小さくなることを示す。また、結合りん含有量の大小は、加工度の大小に換言することができ、加工度の大きい架橋型りん酸エステル化でん粉ほど、グルコアミラーゼによる分解率が小さくなることを示している。

結合りん含有量が増加することは、下記の合成反応式³⁾において、

Fig.2 Relationship between bondig phosphorus content (%) and titration volume of N/100 Na₂S₂O₃ solution
Coefficient of correlation : $r = -0.997$

の量が増加することで、架橋剤を介してでん粉分子がポリメライズしていくことが考えられ、その程度もりん含有量により異なるものと考えられる。また、3置換体の架橋型りん酸エステル化でん粉の生成も推定され、実際の架橋型りん酸エステル化でん粉の構造はきわめて複雑なものと推定される。以上のことは、酵素の反応特異性とも関係するが、一般に架橋型りん酸エステル化でん粉ではりん含有量が増加するにしたがって、分解率が低下していくものと言えよう。このことは、でん粉誘導体の物性のひとつである粘度特性にもあらわれてくる。すなわち、プラベンダー粘度計による粘度挙動では、結合りん含有量の少ないものは未処理でん粉の粘度挙動と比較的類似しているが、結合りん含有量が増加すると未処理でん粉とは全く異なった粘度特性を示す傾向が認められた。

3.2 アミラーゼによる分解挙動

Fig.3は、架橋型りん酸エステル化でん粉の

反応仕込量の架橋剤（トリメタリん酸ナトリウム）

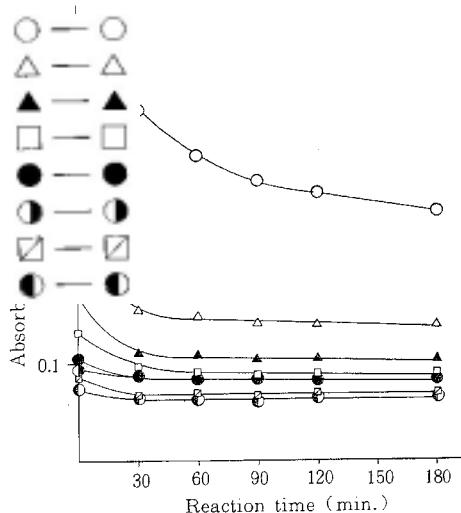


Fig.3 Rate of hydrolysis of phosphate starch synthesized in the laboratory by -amylase

Non-modified starch
Phosphorus content : 0.010%
Phosphorus content : 0.024%
Phosphorus content : 0.039%
Phosphorus content : 0.074%
Phosphorus content : 0.105%
Phosphorus content : 0.191%
Phosphorus content : 0.198%

アミラーゼによる分解挙動を示すもので、結合りん含有量の増加にしたがい、-アミラーゼによる分解率が低下していくことを示している。この傾向は、グルコアミラーゼの場合と全く同様であった。未処理でん粉は、約1.5時間までに-アミラーゼにより急激に分解されるが、それ以降は徐々に分解されていくことを示している。一方架橋型りん酸エステル化でん粉は、約1時間で分解はほぼ終了し、それ以降は分解されないことを示唆している。このように-アミラーゼを用いた場合も、架橋型りん酸エ斯特化でん粉と未処理でん粉では全く異なった分解挙動を示し、さらに加工程度、すなわちりん含有量の増加にしたがい分解挙動が著しく変化していくことが明らかになった。

Fig.3は、架橋型りん酸エ斯特化でん粉が、結合りん含有量の増加にしたがいよう素による発色の度合を低下させていくことも示している。これは、結合りん含有量が増加していくことにより、でん粉分子の立体構造が複雑に変化していく、よう素分子を包接しにくくなるような構造を形成していくものと考えられ、この三次元的構造変化と一次元構造変化の度合が、-アミラーゼによる分解率の差に対応するものと考えられる。

以上の結果のように、加水分解酵素による分解挙動はグルコアミラーゼ及び-アミラーゼ共に、同様の分解挙動を示した。すなわち、未処理でん粉と架橋型りん酸エ斯特化でん粉では分解挙動は全く異なっていた。さらに、架橋型りん酸エ斯特化でん粉間では、結合りん含有量の違い、換言すれば加工程度の違いにより加水分解酵素による分解挙動が異なり、結合りん含有量が大きくなるにしたがい、分解率は低下していくことが判明した。

3.3 輸入品への応用

以上の実験結果を基として、実際、架橋型りん酸エ斯特化でん粉として輸入されたでん粉誘導体に応用してみた。すなわち、輸入品をセルロース透析膜で精製を行った後、りん含有量、グルコアミラーゼにより生成した還元糖量の還元力及び-アミラーゼによる分解挙動などを測定した結果は、未処理でん粉とは全く異なっており、容易に加工処理の有無を知ることができた。

4 要 約

架橋型りん酸エ斯特化でん粉の合成を行い、結合りん含有量と加水分解酵素による分解挙動の関係について検討を行った。

架橋型りん酸エ斯特化でん粉の加水分解酵素による分解挙動は、未処理でん粉とは全く異なっており、さらに結合りん含有量の増加にしたがい、この分解率は低下する傾向を示すことが判明した。

加水分解酵素による分解挙動及びりん含有量の値は、架橋型りん酸エ斯特化でん粉の分析を行う際に、加工処理の有無の判定に有効な知見を与えるものと考えられる。

文 献

- 1) 関川義明, 出来三男: 本誌, 23, 101 (1982).
- 2) Kerr, R.W. and Cleveland, F.C.: 1957. U. S. Pat. 2,801,242.
- 3) 鈴木繁男, 中村道徳編: 澱粉化学実験法, 朝倉書店 P253 (1979).