



Title	沖縄産サトイモ澱粉アミロペクチンのスミス分解, ならびに平均鎖長の測定(農芸化学科)
Author(s)	外間, 宏一; 仲宗根, 洋子; 宮城, 春勝
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(26): 169-181
Issue Date	1979-12-11
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4157
Rights	

沖縄産サトイモ澱粉アミロペクチンの スミス分解, ならびに平均鎖長の測定

外間 宏一*・仲宗根 洋子*・宮城 春勝*

Koichi HOKAMA, Yoko NAKASONE and Harukatsu MIYAGI:
Smith degradation of wet-taro starch amylopectin pro-
duced in Okinawa and determination of its average chain
length

I 緒 言

沖縄産サトイモ(田芋)は, *Colocacia esculenta Schott var aquatilis* (Wet-Taro)⁴⁾の一種で独特の粘性があり, かつ特有の香りと風味がある。沖縄では, 以前から副食品の一つとして珍重されている。サトイモ澱粉については, 東原ら⁵⁾の「さといも澱粉の分離と2,3の性質について」, 金城ら⁷⁾の「沖縄産田芋澱粉のアミロース含量, ならびに糊化と粘性特性について」などの研究報告があるが, その平均鎖長に関する研究は見当たらない。

本研究は, 分離精製したサトイモ澱粉から, アミロペクチンを精製し, スミス分解を行ない, その結果, 非還元末端分子から生ずるグリセロールとその他の糖分子から生ずるエリトリトールのモル比から平均鎖長を求めることを目的として行なった。

澱粉は天然には, 貯蔵炭水化物として高等植物の種子, 根, 根茎などに含まれ, α -1,4-グルコシド結合のD-グルコースからなる巨大分子を有する多糖類で, α -1,4-結合だけからなる直鎖構造のアミロースと α -1,6-結合の枝分れ構造を持つアミロペクチンから成立っていることは多くの専門書³⁾に記載されている。

II 実験方法

1. サトイモ澱粉の分離精製

沖縄県宜野湾市大山産のサトイモ(田芋)を試料とし, 東原ら⁵⁾のアリカリ浸漬法によって精製した。

2. アミロース及びアミロペクチンの精製

イソアミルアルコールを沈澱剤として併用するSchochのブタノール改良沈澱法⁹⁾によって行なった。

3. ペーパークロマトグラフィー(以下PPCと略称する)

サトイモ澱粉のPPCは展開溶媒として0.5~2.0 N KOHを, 発色試薬としてヨウ素アルコール溶液

* 琉球大学農学部農芸化学科

を用いる滝法¹⁰⁾に準じて行ない、スミス分解でえられたグリセロールとエリトリトールの PPC は展開溶媒として n-ブタノール：エタノール：水(4：1：5, V/V) を、発色試薬として Tollens の試薬を用いる J. K. Hamilton ら⁶⁾の方法に準じて行なった。

4. アミロース含量の測定

アミロースのアルカリ性溶液にヨウ素溶液を加えて呈色させ、その発色度を 630 nm で測定する McCreedy 法^{7,8)}に準じて行なった。

5. 過ヨウ素酸化¹⁾

正確に秤量した糖類を少量の水に溶解または懸濁した状態にし、この溶液に対して一定量の過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加え、5℃、暗所にて過ヨウ素酸化を行なった。この場合、過ヨウ素酸の最終濃度が 0.05 モル以上にならないよう水を加えて調節した。

また反応と同時に、空試験のため試料以外の試薬についても同じ条件の反応液をつくり同様な実験を行なった。試料であるアミロペクチンを過ヨウ素酸化する前に、あらかじめ構造既知の試料即ちグルコース、エリトリトールについても同様な実験を行ない過ヨウ素酸の消費量及びギ酸の生成量が理論値と一致するや否かを検討した。

6. 消費された過ヨウ素酸の定量¹⁾

標準亜ヒ酸溶液による定量法 (Fleury-Lunge 法)、ヨウ素法、分光光度計による方法などいろいろあるが、本実験では、分光光度計法によって 223 nm における吸収を測定して行なった。

7. ギ酸の定量¹⁾

一定量の反応液をとり、エチレングリコールを加えて過剰の過ヨウ素酸を分解し、メチルレッドを指示薬とし 0.01M 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。試料を含まない溶液についてもエチレングリコールを加えて同様に空試験を行なった。

8. ホルムアルデヒドの定量¹⁾

一定量の過ヨウ素酸酸化液をとり、硫酸を加えて酸性にし、亜ヒ酸ナトリウムを加えておだやかに振とうして得られた試料についてクロモトロープ酸試薬法で定量した。

9. スミス分解^{3,6)}

多糖の過ヨウ素酸化で得られた多糖アルデヒド誘導体をポリアルコール誘導体に還元する。この還元物を加水分解すると、アルコール、アルコールアルデヒドが、また過ヨウ素酸酸化が進行しない部分から、構成単糖の混合物を生ずる。これらの生成物の分析から多糖の結合様式及び構造を推定する方法、即ちスミス分解法を用いてサトイモ澱粉アミロペクチンの平均鎖長を図 1 に示す分解式より求めた。

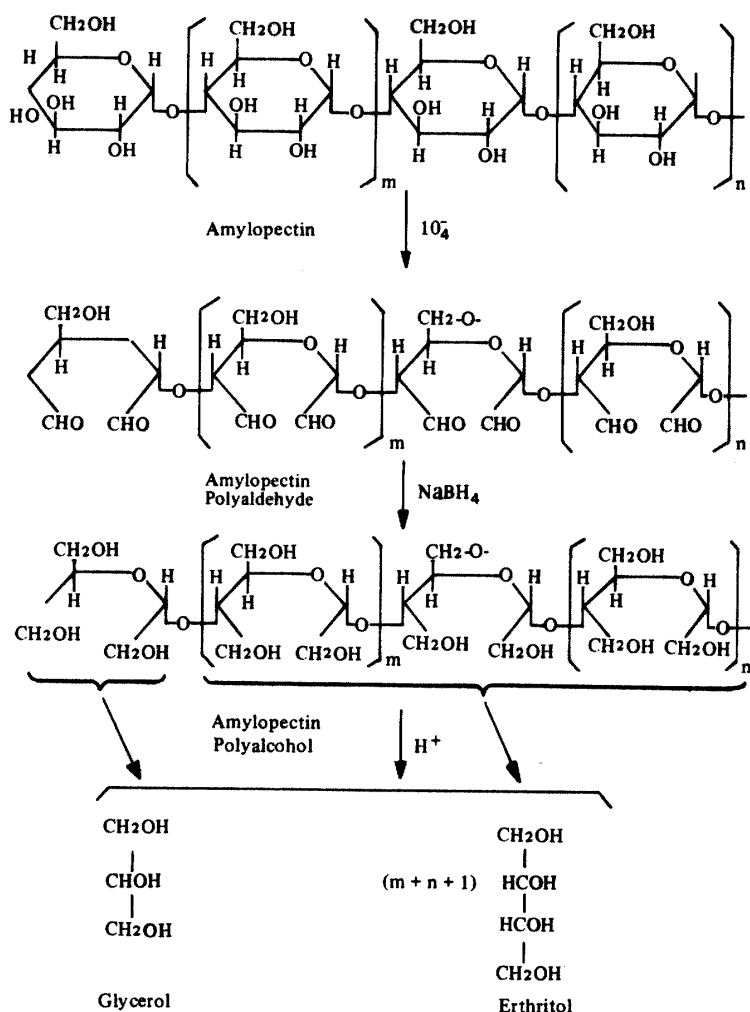


Fig.1. Smith degradation of amylopectin

III 実験結果及び考察

1. サトイモ澱粉の分離と収量

サトイモ600gを水洗し、剥皮したのち、ミキサーで粉碎し、水に懸濁分散せしめ、2枚重ねの木綿布で数回にわたってこした。この乳濁液を遠心分離し、沈澱物を採取した。これにpHを水酸化ナトリウム溶液で8.6としながら0.2M塩化ナトリウムを2倍容加え十分に攪拌した。

次いで遠心分離し、さらにpH8.6の微アルカリ液を加え攪拌懸濁させたのち、再度遠心分離した。同様な操作を3回繰返したのち、約3倍容の水で遠心分離法によって洗浄することを3回行ない、次いで95%エタノールを2倍容加えて脱水し、通風乾燥器で乾燥した。

さらにこれを約5倍容の0.3%水酸化ナトリウム溶液に懸濁し、室温で一昼夜放置した後、充分水洗し、エタノール、アセトン、エーテルで順次洗浄し、通風乾燥器で乾燥し、サトイモ澱粉162g(27%)を得た。

2. アミロース、アミロペクチンの分離と収量 (Schochのブタノール沈澱法)

サトイモ澱粉40gを水2ℓ, *n*-ブタノール300ℓの混合液に加え, 100℃, 3時間, 加熱して糊化し, 熱時に遠心分離し, さらに*n*-ブタノール100ml, イソアミルアルコール100mlを追加して再び加熱したのち, 室温で徐々に冷却し, 一昼夜, 5℃で静置した。

生じた沈澱物を遠心分離し, 次いで, *n*-ブタノールで飽和した冷水に懸濁して遠心分離を繰り返し, 上澄液にエタノールを加えたとき濁りが生じなくなるまで洗浄した。これを遠心分離し, 40℃で減圧乾燥し, 5.28g (13.2%) のアミロースを得た。先に分離した上澄液に多量のエタノールを加え, 一昼夜静置し, 生じた沈澱物を遠心分離し, エタノール, エーテルの順で洗浄し, アミロペクチン32.0g (80%) を得た。

3. サトイモ澱粉のペーパークロマトグラフィ

サトイモ澱粉, 同アミロース及び同アミロペクチンの5.0mgをそれぞれ1mlの1N水酸化カリウムに溶解したものを, 東洋ろ紙No.2にスポットし, 溶媒として1N水酸化カリウムを用いて展開した。風乾後, ヨウ素アルコール溶液を吹きつけて発色させたペーパークロマトグラムを図2に示した。

これによると, サトイモ澱粉の場合, 原点には, 赤紫色の円形の斑点があり, その周囲には, 青紫色のリングがあるスポットが認められ, 原点と溶媒先端とのほぼ中央にV字型の青紫色のスポットが認められた。

分離アミロースでは, 原点に赤紫色のリングがかすかに認められ, 原点と溶媒先端との中央部分にV字型の青紫色のスポットがはっきりと認められた。これに対して, 分離アミロペクチンの場合は, 原点に赤紫色のスポットが認められただけで, V字型のスポットは認められなかった。このことから, サト

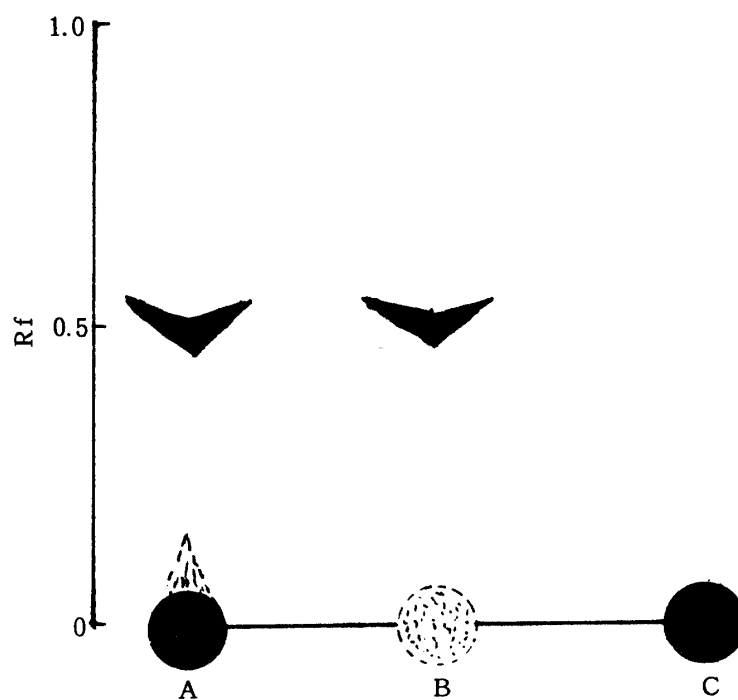


Fig.2. Paperchromatograms of starch, amylose and amylopectin of wet-taro starch
A: starch, B: amylose, C: amylopectin

イモから分離した澱粉，アミロース，アミロペクチンは，それぞれかなり高い純度に精製されていると言えよう。

ヨウ素反応により，アミロースは青紫色，アミロペクチンは，赤紫色を呈することにより，ペーパークロマトグラム上の原点における赤紫色のスポットはアミロペクチンを示し，原点と溶媒先端とのほぼ中央におけるV字型の青紫色のスポットはアミロースを示していることが明らかである。

以上の実験結果は，澱粉が糯澱粉について行なったそれと殆んど同じであった。

4. アミロースのMcCreedy法による定量

本実験において精製したアミロース100mgをメスフラスコにとり，エタノール1ml，水100mlを加えてうおし，10%水酸化ナトリウム2mlを加えて完全に溶解した。水を加えて100mlに定容し，この溶液1mlを100mlメスフラスコに入れ，水20mlを加え，6N塩酸2滴で微酸性にしたのち，ヨウ素溶液(2% KI中 I_2 0.2%を含む)5mlを加え，水で標線まで定容した。この溶液について，東芝ベックマン自記分光光度計を用いて測定した最大吸収波長は630nm(図3)で，図4に示す濃度でアミロースの検量線を作成した。試料澱粉についても同様な実験を行ない，検量線から求めたアミロース含量は，約12%であった。

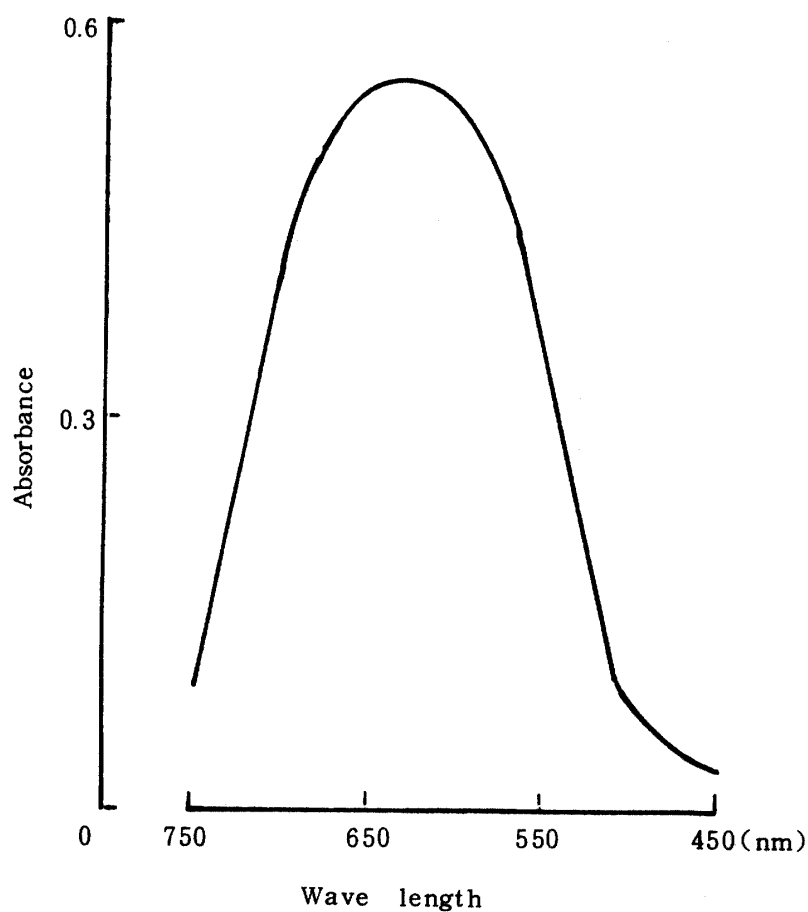


Fig.3. Visible absorption spectra of amylose composing wet-taro starch

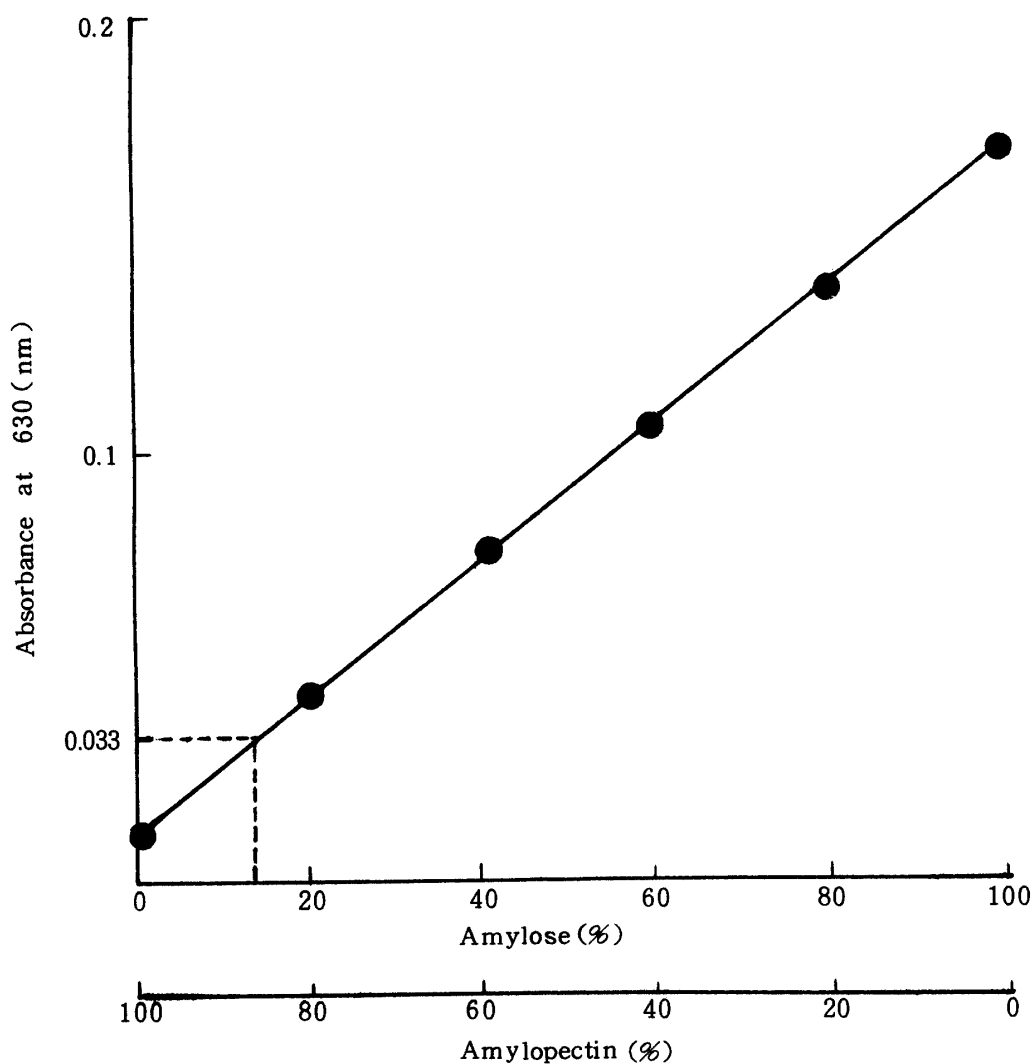


Fig.4. Photoelectric colorimetry of amylose and amylopectin composing wet-taro starch by Mcready procedure

本実験で測定したサトイモアミロースの最大吸収波長は630 nm (図3)にあり、また同含量は約12%であったが、前者は金城らが報告している660 nmよりはかなり低波長側に、東原らが報告している610 nmよりはやや高波長側にあった。後者は金城らが求めた10%よりはやや高く、東原らが求めた14%よりはやや低い値を示した。^{5,7)}

後者は、また先に述べたSchoch法に準じて澱粉より精製して求めたアミロース含量の約13%に比較して1%位しか低くなく、サトイモアミロース及びアミロペクチン(同法で80%)は、かなり高い純度に精製されていることを裏づけるが、このことは、PPCによっても証明されていることは既述のとおりである。

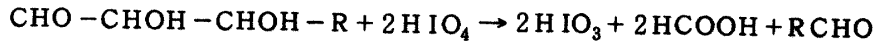
5. 分光光度計法

分光光度計法では、試料の量は、次式を満足する範囲で求めなければならない。

$$\mu\text{M} \times P = 70 \sim 100$$

ここで μM は炭水化物残基当りの μM 量, P は糖残基 1 モルについて消費された過ヨウ素酸のモル数である。

アルドースの過ヨウ素酸酸化の場合は, 次式に示すように反応し, さらに隣接水酸基が 1 個増すごとに 1 モルの過ヨウ素酸を追加消費する。従ってグルコース 1 モルは 5 モルの過ヨウ素酸を消費し, 前式において $P = 5$ となる。



$\mu\text{M} = 100$ として求めたグルコース 0.0036 g を 10 ml の 0.015 M 過ヨウ素酸ナトリウム溶液に溶解し, 暗所において至適 pH, 至適温度決定のための実験を行なった。反応混合液よりピペットで 1 ml をとり, 250 倍に希釈し, 日立 139 分光光度計によって 223 nm の吸収を測定し, 検量曲線から過ヨウ素酸の消費量を求めた。

検量曲線は, 0.015 M 過ヨウ素酸ナトリウム 1 ml を 250 倍に希釈し, 図 5 に示す各濃度の吸収を求めて作成した。この反応において生ずるヨードイオンは過ヨウ素酸による吸収にほとんど影響を与えない²⁾ と言われているので, それによる補正は行なわなかった。

また上記グルコースが 100% 過ヨウ素酸酸化されるために消費される過ヨウ素の理論量は, $4 \times 10^{-8} \text{M}$ と計算された。

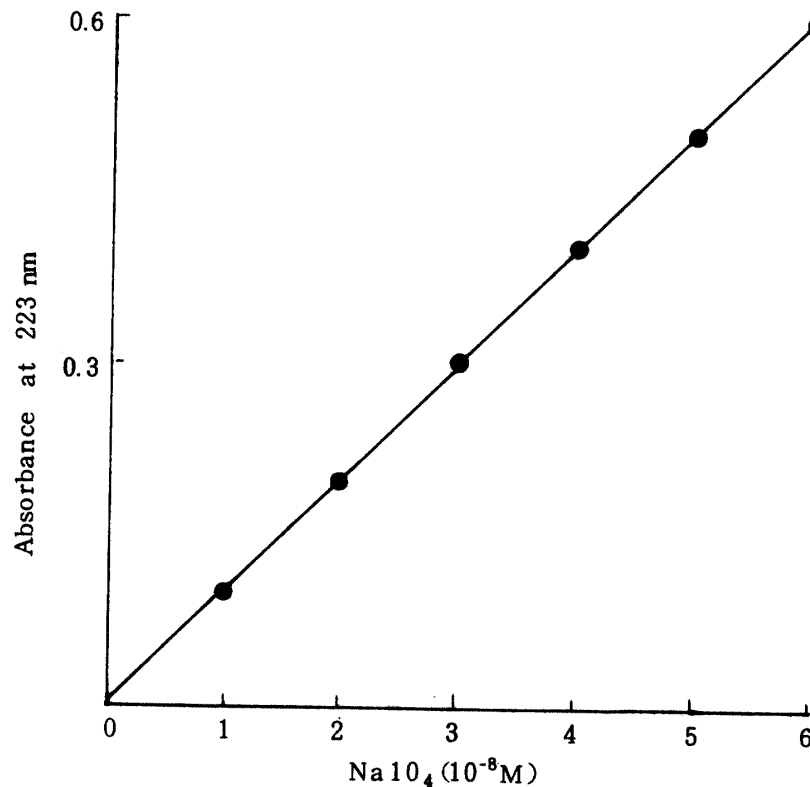


Fig.5. Calibration curve of periodates consumed in periodate oxidation of carbohydrates

6. 至適温度及びPH

多糖の過ヨウ素酸化において最も影響を与え、かつ重要な因子は、pHと温度である。前述のように、グルコースを用いて過ヨウ素酸化を行ない、至適作用pHと同温度を検討した。最初に、至適作用温度を決定するための実験を行なった。過ヨウ素酸化において、酸化剤としてナトリウム塩を用いるときは中性または弱酸性で、またカリウム塩を用いるときはアルカリ性で行う必要がある。¹⁾

本実験では酸化剤として過ヨウ素酸ナトリウムを用いているので酸性側で実験を行なった。反応温度については、2~4℃、35℃といろいろの報告があるが、最初に、pH 5を有する反応原液について5℃と25℃の場合に及ぼす温度の影響を検討した(図6)。25℃の場合には反応は初め急激に進行し、それ以降は徐々に進行して容易に過ヨウ素酸消費量は一定値に達しなかったが、5℃の場合には反応は最初から定率的かつ円滑に進行し、約400分間経過すると過ヨウ素酸消費量は一定値に達した。以上のことより、高温の場合よりも低温の場合の方が反応は順調、かつ正常に進行することがわかった。

次に、pH調整を硫酸で行ない、反応温度を5℃に設定して、pHの影響をpH 3, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0の場合についてそれぞれ検討した(図7)。いずれの場合においても、温度の場合と同様に400分間で過ヨウ素酸消費量は一定値に達し、pH 4.5の場合が最も高い消費量を示したことは、過ヨウ素酸化に際しては、pH 3~5以外は不適当であるとの報告¹⁾を満足する。

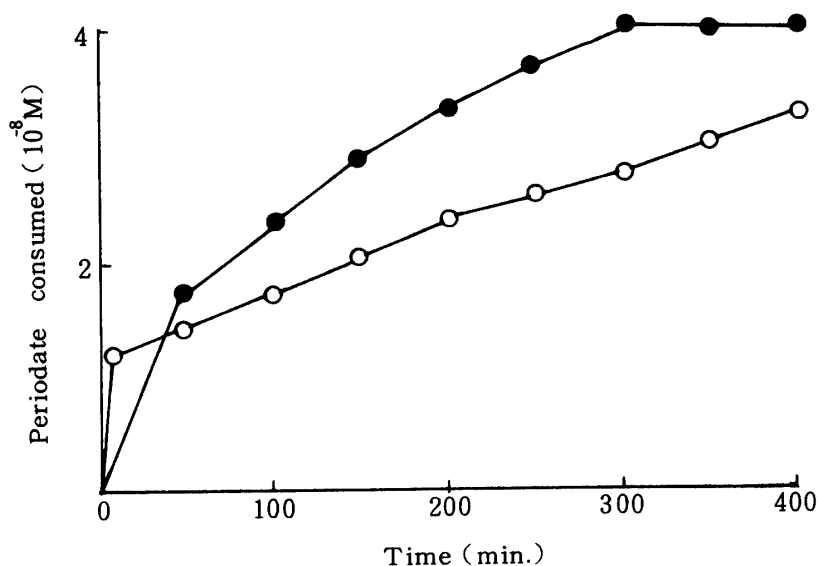


Fig. 6. Effect of temperature on periodate oxidation of carbohydrates

○—○ : 25℃, ●—● : 5℃

また至適作用温度、同pH決定のいずれの実験においても、図6及び図7に示すように、先にのべた理論値 4×10^{-8} Mを満足できる結果をえたので、この過ヨウ素酸化反応は正常に進行するものとみなし、以後の実験では温度は5℃、pHは4.5に設定して行なった。

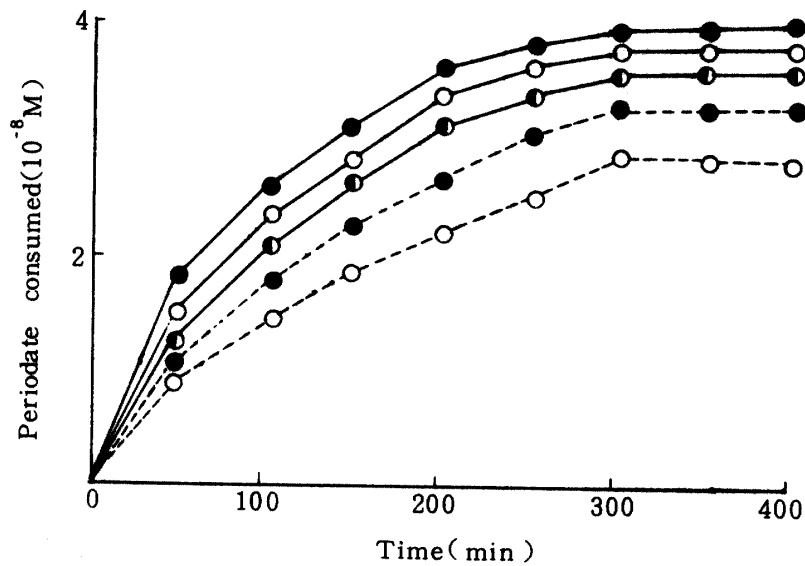


Fig.7. Effect of pH values on periodate oxidation of carbohydrates

●—●: pH 4.5, ○—○: pH 4.0, ●—●: pH 5.0
 ●---●: pH 3.5, ○---○: pH 3.0

7. サトイモアミロペクチンの平均鎖長の測定^{1,6)}

(1) アミロペクチンポリアルデヒドの調整と単離

サトイモ澱粉より分離精製したアミロペクチン20gを三角フラスコにとり、水を加えてオーターパス上で加熱(68~75℃)して糊化した後、室温で徐々に冷却し、過ヨウ素酸ナトリウム(85.6g)溶液と混合し、1,000 mlに調整した。反応混合液を充分振とうしながら5℃に急冷し、この温度で過ヨウ素酸消費量が一定値に達するまで暗所に8日間保存した。

この反応混合液は40℃で少量になるまで減圧濃縮し、メタノールを加えて酸化多糖を沈殿させた。この沈殿物を遠心分離し、蒸留水で水洗し、次いで無水アルコール、石油エーテルを用いて溶媒交換によって乾燥し、最後に減圧乾燥器中45℃で恒量(約10g)になるまで乾燥した。

J. K. Hamilton らは20gのトウモロコシアミロペクチンを用いて、前述と同じ条件下で48日間反応させて12gのポリアルデヒドを得たと報告しているが、筆者らの行なった実験に較べて反応時間が5倍も長く、かつ収量が多いのは、反応温度(2~4℃)がかなり低いこと、使用原料の相違などによるものと思われる。

(2) アミロペクチンポリアルコールの調製と単離

このようにして得られたポリアルデヒド5gを蒸留水300 ml中に懸濁し、2gの水素化ホウ素ナトリウムを攪拌しながら加え、18時間還元反応を行なった。更に水素化ホウ素ナトリウム0.5gを追加し、6時間放置した。反応が終了後、このアルカリ性反応液は、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解するために、6N酢酸で中和し、減圧下で少量になるまで濃縮した。

(3) アミロペクチンポリアルコールの加水分解

上記アミロペクチンポリアルコール溶液に濃塩酸を約pH1になるまで加えた。酸性溶液は、おだやかに10時間還流しながら加水分解を行なった。加水分解物は、冷却後、炭酸バリウムで中和し、脱イオンの目的で陽イオン交換樹脂 (Amberlite IR-120 及び陰イオン交換樹脂 (IRA-400) を通した。このようにして得られた中性流出液は、減圧下でシラップ状になるまで濃縮し、少量のエタノールに溶解した。

この一部をとって室温で展開溶媒として *n*-ブタノール：エタノール：水 (4：1：5) を、発色試薬として Tollens 試薬を用いて PPC 分析を行なったところ、スミス分解の際、アミロペクチン非還元末端基より得られるグリセロール (Rf 0.39) と 1.4 結合及び C₆ 分岐点より得られるエリトリトール (Rf 0.29) の存在を検出したが、J. K. Hamilton らが報告している少量のグルコースは確認できなかった (図 8)。

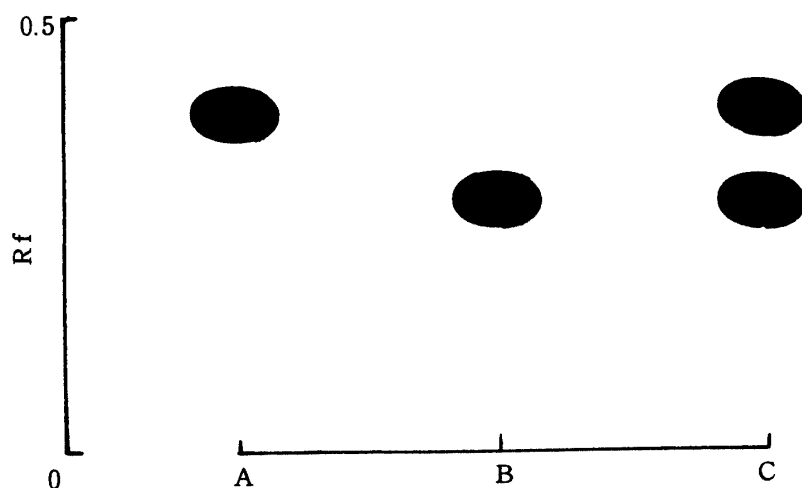


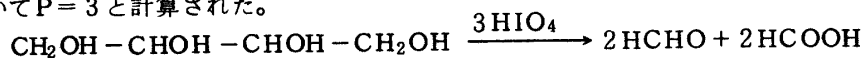
Fig.8. Paperchromatograms of hydrolyzate of amylopectin polyalcohol (sample) obtained in smith degradation

- A: Authentic glycerol
- B: Authentic erythritol
- C: Sample

前者の生成量は、後者に較べて理論的にかなり少ないことは、図1に示す分解式より明らかであるが、そのことは、ペーパークロマトグラム上の両者の発色呈度においてかなりの差があることから裏づけられた。

(4) ホルムアルデヒドの理論生成量の確認

前述の $\mu\text{M} \times \text{P} = 100$ 式を満足すべく求められたエリトリトール 0.0041 g を過ヨウ素酸酸化し、その消費量を分光光度計法で求めたところ、 3.9×10^{-8} Mなる値を得た。また下記の反応式より上式において $\text{P} = 3$ と計算された。



この値は、理論値 4×10^{-8} M を満足し、またその際生ずるギ酸滴定のために消費した 0.01 M 水酸化ナトリウム 6.5 ml も理論値 6.7 ml を満足することによって、エリトリトールの過ヨウ酸酸化の際生ずるホルムアルデヒドの生成量は、理論値を満足することが明らかであるので、下記のとおり検量曲線を作成

した。

(5) ホルムアルデヒドの検量曲線の作成

エリトリール1gを正確に秤取して0.5M過ヨウ素酸ナトリウムに溶解し100mlとなし、さらに5mlの1M亜ヒ酸ナトリウムを加え、おだやかに振とうした。亜ヒ酸ナトリウムを加えるのは、過ヨウ素酸イオンを還元したり、また硫酸酸性にしたために、反応液中に発生したヨウ素を還元してその色を消失させるためである。

このようにして得られた23mlの反応混合液より1mlをとり50mlに希釈すると1モルのエリトリールより2モルのホルムアルデヒドを生ずるため、その1ml中に含まれるホルムアルデヒドの量は $0.428\mu\text{mole}$ となる。これは、ホルムアルデヒド量は $0.62\mu\text{mole/ml}$ を越えてはならないという反応条件を満足する。

この希釈液1mlと10mlのクロモトロープ酸試薬(1gのクロモトロープ酸を100mlの蒸留水に溶解し、12.5M硫酸を加えて500mlとなしたものを)を試験管内に混合し、オーターパス上で30分間加熱呈色させ、図9に示す濃度により検量曲線を作成した。

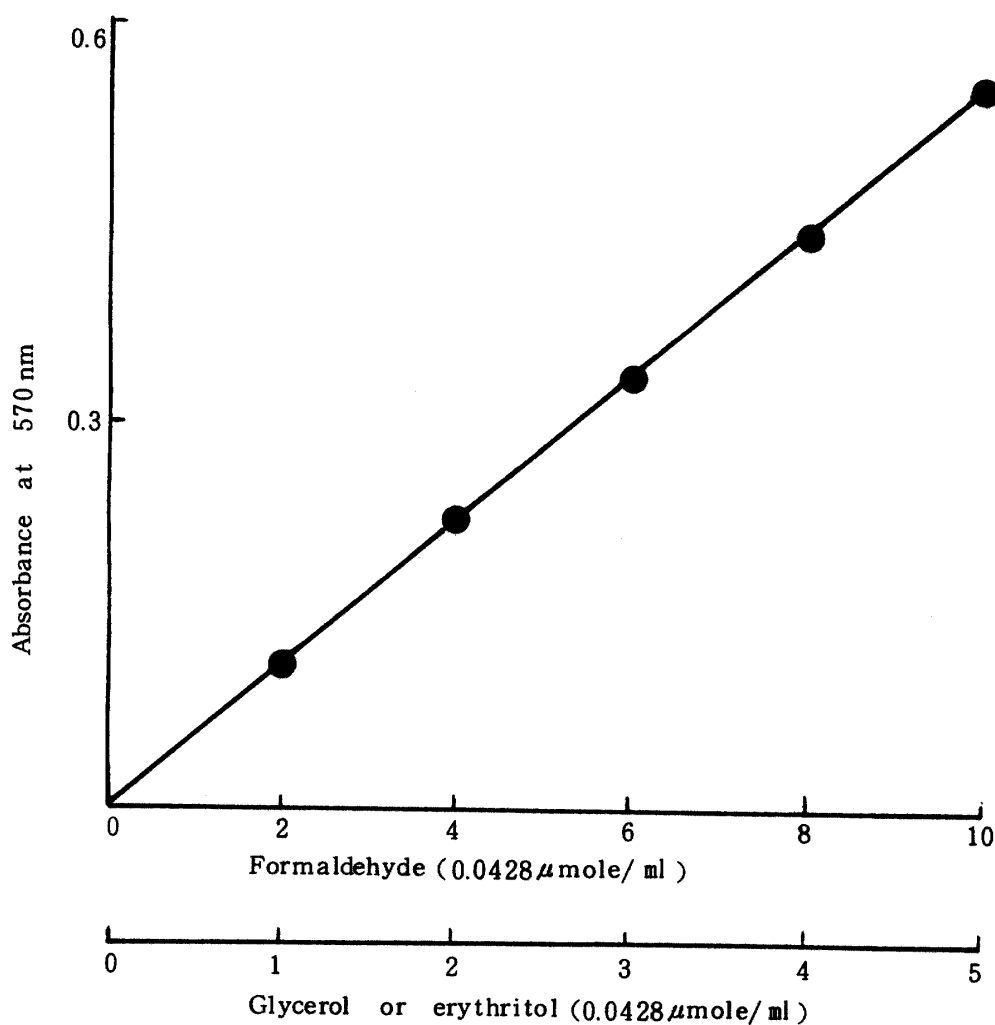


Fig. 9. Calibration curve of formaldehyde, glycerol or erythritol obtained in Smith degradation

(6) エリトリトール及びグリセロールの定量

上記アミロペクチンポリアルコールのシラップ状加水分解物をエタノールに溶解し、10mlにしたものを、東洋ろ紙No50 (40×40 cm) 3枚に等量宛帯状に塗布し、展開溶媒としてn-ブタノール：エタノール：水(4：1：5)を用い、20時間PPC(上昇法)を行なって両成分を分離した(Rf値は図8参照)。

前述のように、グリセロールの生成量は、エリトリトールに較べて極めて少いことが明らかであるので、グリセロールの抽出には3枚、エリトリトールの抽出には一枚の帯状切りろ紙を用いた。3枚分の60mlのグリセロール抽出液は減圧濃縮して20mlにした。

このようにして得られたグリセロール及びエリトリトールの20ml抽出液は、それぞれ100mlのメスフラスコに入れ、1mlの10N硫酸を加えて酸性にした。これに0.1M過ヨウ素酸ナトリウム液5mlを攪拌しながら加え、5分後1M亜ヒ酸ナトリウム液5mlを加えた。15分位経過するとヨウ素が遊離して褐変したが漸次退色した。さらに5分後にフラスコ内の容量を攪拌しながら蒸留水を加え標線まで満たした。

過ヨウ素酸酸化は、5℃で約6時間行ない、この1mlにクロモトロープ酸試薬10mlを加え、570nmにおける吸収で比色定量を行ない、図9に示す検量曲線からグリセロール0.12mmole、エリトリトール1.52mmoleを得た。従って両者のモル比より、サトイモ澱粉アミロペクチンの平均鎖長は約12と計算された。またその他の澱粉質植物アミロペクチンの平均鎖長(表1)³⁾に較べてサトイモ澱粉のそれはかなり短いように思われた。

Table 1. Average chain lengths of amylopectin in various kinds of plant

Barley	26	Wheat	23
Malt	17 ~ 18	Coco	22
Lily	27	Sweet corn	11 ~ 12
Corn	25	Glutinous corn	22
Potato	27	*Wet-taro	12

* Produced in Okinawa and determined by the authors

要 約

1. 約30%の澱粉質を含む沖縄産サトイモ(田芋)におけるアミロースとアミロペクチンの含有割合は、それぞれ、12%と88%であった。
2. 同アミロペクチンの過ヨウ素酸酸化反応における至適pHは4.5、至適温度は5℃で、反応は8日間で完了した。
3. スミス分解法で求めた同アミロペクチンの平均鎖長は約12で、その他種々の植物のアミロペクチンのそれに較べてかなり短いことがわかった。

参 考 文 献

1. 安藤鋭郎, 寺山宏, 西沢一俊, 山川民夫 1967 生化学研究法1, 275~281, 東京, 共立出版

2. Dixon J, Lipkin D, 1954 Spectrophotometric determination of vicinal glycols, *Anal. Chem.*, **26**: 1092~1093
3. 江上不二夫, 鈴木旺, 松村剛, 山科郁男 1969 多糖生化学 1, 211~213, 東京, 共立出版
4. 初島住彦 1975 沖縄生物研究会, 906, 沖縄
5. 東原昌孝, 梅木公雄, 山本武彦 1975 さといも澱粉の分離と2,3の性質について, *澱粉科学*, **22**(3): 61~65
6. Hamilton J. K, Smith F. 1956 Reduction of the products of periodate oxidation of carbohydrates, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 5907~5909
7. 金城須美子, 福場博保 1978 沖縄産田芋澱粉のアミロース含量, ならびに糊化と粘性特性について *澱粉化学*, **25**(3): 193~197
8. McCready R. M., Hassid W. Z. 1943 The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**: 1154~1157
9. 二国二郎編 1969 デンプンハンドブック, 202, 東京, 朝倉書店
10. 滝基次 1958 澱粉のクロマトグラフィーに関する研究 *農化*, **33**(3): 216~220

Summary

1. The wet-taro produced in Okinawa was found to contain approximately 30% starch which consisted of amylose and amylopectin at a weight ratio of 1 to 7.
2. An optimum pH value and temperature were 4.5 and 5°C, respectively, for the periodate oxidation of amylopectin, which completed in 8 days.
3. The average chain length of amylopectin, as determined by Smith degradation procedure was found to be approximately 12 and to be considerably shorter in comparison with those of other various kinds of plant.