

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	市原 敬司
学位授与の日付	平成27年3月31日	
論文名	Structure and physical properties of gel prepared from $\alpha$ -amylase-treated cassava starch ( $\alpha$ -アミラーゼ処理タピオカ澱粉から調製したゲルの構造と物性に関する研究)	
論文審査委員	主査	北村 進一
	副査	笠井 尚哉
	副査	乾 隆

## 論文要旨

### 緒論

澱粉は植物の貯蔵組織に不溶性の澱粉粒として存在している。澱粉粒は、水を加え、加熱すると糊化し、その後冷却することによりゲル化する。このゲル形成能は、古くから食品のテクスチャー改良に利用されている。澱粉のゲル形成能は、植物種を選定することや、澱粉を化学修飾することにより制御可能であり、これら技術の組み合わせにより、様々な食品の物性が生み出されている。

本研究では、タピオカ澱粉を用い、酵素処理による新たな澱粉ゲルの物性改変の可能性について検討を行った。

### 第1章 タピオカ澱粉粒の $\alpha$ -アミラーゼによる限定的加水分解がゲル物性へ与える影響

タピオカ澱粉に3種類の酵素、すなわち *Aspergillus niger* 由来 $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -AMA)、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来 $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -AMB)、大麦由来 $\beta$ -アミラーゼ ( $\beta$ -AMB) をそれぞれ作用させ、限定的加水分解を行った。加水分解率は酵素の種類によって異なり、 $\alpha$ -AMB では、15分で8.2% (w/w)であったのに対し、

$\alpha$ -AMA、 $\beta$ -AMB では非常に低く、23 時間でそれぞれ 2.8% (w/w)、0.5% (w/w)であった。得られた各種酵素処理澱粉の 20%ゲルについて、レオメーター測定によりゲル物性を調べた結果、 $\alpha$ -AMB と $\beta$ -AMB 処理澱粉は、未加工澱粉に比べ、破断応力、破断歪、ヤング率が低下したのに対し、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉は、破断歪は低下したが、ヤング率が 3.9 倍、破断応力も 1.5 倍に増加しており、酵素処理により弾性率が上がることが明らかとなった。

そこで、 $\alpha$ -AMA 処理によるゲル物性改変のメカニズムを明らかにするため、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉と未加工澱粉をそれぞれ 80 °Cにて 30 分温水処理した際に溶出する成分について、ゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った。その結果、未加工澱粉の溶出成分は主にアミロースとアミロペクチンであったが、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では主にアミロースであり、澱粉粒からのアミロペクチンの溶出が非常に少ないことが明らかとなった。澱粉ゲルは、膨潤した澱粉粒 (filler) が、澱粉粒から溶出した成分 (matrix) に捕捉された複合体 (filler in a matrix) であると考えられている。未加工澱粉では、この matrix の成分がアミロースとアミロペクチンの混合物であるのに対し、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では主にアミロースとなっており、それが澱粉ゲルの物性改変に影響していると考えられた。

## 第 2 章 $\alpha$ -アミラーゼ処理澱粉ゲルの粘弾性測定と小角 X 線散乱法による構造解析

$\alpha$ -AMA 処理澱粉のゲル形成メカニズムを明らかにするため、本章では、動的粘弾性測定によるゲル物性の解析と、小角 X 線散乱法 (SAXS) による構造解析を行った。

まず、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉と未加工澱粉の糊液を 5°Cにて 19 時間冷却してゲルを調製し、動的粘弾性測定を行った。その結果、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉の貯蔵弾性率 ( $G'$ ) は、未加工澱粉に比べ約 2 倍高値を示した。また、力学的損失正接 ( $\tan \delta = G'' / G'$ :ここで  $G''$ は損失弾性率) は、角周波数の増加に伴い、未加工澱粉では急激に増加したが、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では変化が少なく、かつ低値であった。

次に、両澱粉糊液を 5 °Cにて 19 時間冷却した時のゲル形成に伴うゲル構造の経時変化を、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL40B2 において SAXS 測定を行って解析した。

SAXS 測定で得られたデータを Kratky プロット ( $q^2 I(q)$  vs  $q$ :ここで  $q$  は散乱ベクトルの大きさ、 $I(q)$ は散乱強度)で解析した結果、両澱粉共に、 $q=2.3 \text{ nm}^{-1}$  付近で極大を持ち、 $q>3.5 \text{ nm}^{-1}$  では上昇するカーブを示した。 $q<1 \text{ nm}^{-1}$  の領域では、ナノスケールの凝集構造に由来するピークが観測され、特に $\alpha$ -AMA 処理澱粉は比較的大きなピークを示した。さらに、両澱粉共に、ゲル化に伴い  $q=4 \text{ nm}^{-1}$  付近に B 型結晶構造に由来するピークが観測された。

$q<1 \text{ nm}^{-1}$  のピークを解析するために、まず、アミロースの二重らせん構造と Monte Carlo 法により作成した一本鎖の分子モデルを用いて Debye 式より計算散乱曲線を算

出した。それらに加えて、二相系ランダム凝集モデルを仮定し、SAXS 測定で得られた散乱プロファイルに Debye-Bueche 型散乱関数を用いてフィッティングを行い、 $a$ (凝集構造の大きさ)を得た。 $a$  は、0 分から 1,140 分にかけて、未加工澱粉では 1.8 nm から 2.6 nm へ増加したのに対し、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では 2.2 nm から 3.5 nm へ増加したことから、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では、ゲル中に大きな凝集構造を持ち、その成長速度も速い事が示唆された。また、 $q=4 \text{ nm}^{-1}$  付近の B 型結晶構造に由来するピークも、未加工澱粉では 780 分で観測されたのに対し、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では 120 分に出現したことから、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では、B 型結晶構造が早く形成されることが明らかになった。

SAXS 解析により、澱粉糊液のゲル化に伴い、アミロース分子間に二重らせん構造を含む凝集構造が形成され、この部分がゲル中における架橋領域となっていると考えられた。未加工澱粉ゲルの **matrix** には、アミロペクチンが存在してアミロースの老化に伴う二重らせん形成を妨げるため、結果としてアミロース分子により形成される架橋構造が少なくなっていると考えられた。一方、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では、**matrix** の大部分がアミロースであるため、ゲル中により大きな凝集構造が早く形成されたと考えられた。

以上より、SAXS 測定で観測されたナノレベルでのゲル構造の微細な変化が、マクロレベルでのゲル物性と相関していることが明らかとなった。 $\alpha$ -AMA 処理澱粉のゲルでは、溶出したアミロースが、**filler** の周りに強固な 3 次元ネットワークを形成した結果、高い弾性率を示したと考えられた。

### 第 3 章 酵素処理とリン酸架橋の併用による新規なタピオカ加工澱粉の開発

既述の通り、澱粉はそのゲル物性を利用して、様々な食品のテクスチャーを変化させるために利用されている。特に化学修飾澱粉は広く活用されており、その 1 つに食品への弾力付与に用いられるリン酸架橋澱粉がある。本章では、タピオカ澱粉を用いて、第 1 章で開発した  $\alpha$ -AMA による酵素処理技術と、リン酸架橋技術の併用による新たなゲル物性を示す澱粉の開発を試みた。

未加工タピオカ澱粉、リン酸架橋タピオカ澱粉、 $\alpha$ -AMA 処理リン酸架橋タピオカ澱粉を調製し、糊化特性とゲル物性について評価した。

**Rapid Visco Analyzer** を用いて糊化特性を分析した結果、未加工澱粉に比べ、リン酸架橋澱粉と  $\alpha$ -AMA 処理リン酸架橋澱粉は、最高粘度到達温度の上昇と、95 °C で 5 分間保持後の粘度増加が確認された。

各種澱粉の 20%ゲルを作成し、ゲル物性をレオメーター測定により解析した。その結果、リン酸架橋澱粉は、未加工澱粉に比べ、破断応力が 1.2 倍、ヤング率が 1.8 倍に増加したが、 $\alpha$ -AMA 処理リン酸架橋澱粉は、破断応力が 3.4 倍、ヤング率が 4.0 倍と、更に増加した。

これらの結果より、 **$\alpha$ -AMA** 処理技術とリン酸架橋技術を組み合わせることにより、リン酸架橋澱粉ゲルが持つ高い弾性率を維持したまま、更に弾性率を高められる可能性が示された。これは、リン酸架橋化が **filler** 中に化学結合による架橋を増加させ、ゲル強度を高めることと、 **$\alpha$ -AMA** 処理が **matrix** のアミロース存在比率を高め、物理的架橋を増加させることで弾性率を付与すること、この両方が組み合わせり、特異なゲル物性を示したと考えられた。

## 総括

**$\alpha$ -AMA** によるタピオカ澱粉の限定的な加水分解処理が、澱粉ゲルの弾性率を高めるための新しい技術であることを見出した。 **$\alpha$ -AMA** 処理タピオカ澱粉では、ゲル中の **matrix** のアミロース存在比率が増加すること、この溶出したアミロースによって形成される架橋構造の増加により、二重らせん構造を含む大きな凝集構造が速やかに形成されること、そしてこれらがゲルの弾性率を高める要因であることを明らかにした。

従来より澱粉の物性改変に利用されてきたリン酸架橋技術と **$\alpha$ -AMA** 処理を併用することにより、非常に弾性率の高い独特なゲル物性を示す新規な加工澱粉を調製することに成功した。

澱粉粒の限定的な加水分解処理は、単独、または化学修飾との組み合わせにより、新たな物性を示す澱粉創出に貢献し、広く産業応用されると期待している。

## 審査結果の要旨

澱粉は植物の貯蔵組織に不溶性の澱粉粒として存在している。澱粉粒は、水を加え、加熱すると糊化し、その後冷却することによりゲル化する。このゲル形成能は、古くから食品のテクスチャー改良に利用されている。澱粉のゲル形成能は、植物種を選定することや、澱粉を化学修飾することにより制御可能であり、これら技術の組み合わ

せにより、様々な食品の物性が生み出されている。

本研究では、 $\alpha$ -アミラーゼ処理タピオカ澱粉から調製したゲルが弾性のある興味深い物性を示すことを見出し、その構造を分子レベルで解析したものである。さらにその応用として、酵素処理澱粉にリン酸架橋を導入して、これまでにない物性を示すゲルを形成する新しい加工澱粉を調製したものである。

第1章ではタピオカ澱粉を生澱粉のまま用い、*Aspergillus niger* 由来 $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -AMA)、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来 $\alpha$ -アミラーゼ ( $\alpha$ -AMB)、大麦由来 $\beta$ -アミラーゼ ( $\beta$ -AMB) による加水分解率を調べている。加水分解率は酵素の種類によって異なり、 $\alpha$ -AMB では、15分で8.2% (w/w)であったのに対し、 $\alpha$ -AMA、 $\beta$ -AMBでは非常に低く、23時間でそれぞれ2.8% (w/w)、0.5% (w/w)であった。得られた各種酵素処理澱粉の20%ゲルについて、レオメーター測定によりゲル物性を調べた結果、 $\alpha$ -AMB と $\beta$ -AMB 処理澱粉は、未加工澱粉に比べ、破断応力、破断歪、ヤング率が低下したのに対し、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉は、破断歪は低下したが、ヤング率が3.9倍、破断応力も1.5倍に増加しており、酵素処理により弾性率が上がることが明らかとなった。

そこで、 $\alpha$ -AMA 処理によるゲル物性改変のメカニズムを明らかにするため、80℃にて30分糊化処理した際に溶出する成分について、ゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った。その結果、未加工澱粉の溶出成分は主にアミロースとアミロペクチンであったが、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では主にアミロースであり、澱粉粒からのアミロペクチンの溶出が非常に少ないことを明らかにした。澱粉ゲルは、膨潤した澱粉粒 (filler) が、澱粉粒から溶出した成分 (matrix) に捕捉された複合体 (filler in a matrix) であると考えられている。未加工澱粉では、この matrix の成分がアミロースとアミロペクチンの混合物であるのに対し、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では主にアミロースとなっており、それが澱粉ゲルの物性改変に影響していると考えられた。

第2章は $\alpha$ -AMA 処理澱粉のゲル形成メカニズムを明らかにするため、ゲル形成に伴うゲル構造の経時変化を、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL40B2 において小角 X 線散乱 (SAXS) 測定を行って構造の面から解析を行っている。SAXS 測定で得られたデータを Kratky プロット ( $q^2I(q)$  vs  $q$ :ここで  $q$  は散乱ベクトルの大きさ、 $I(q)$  は散乱強度) で解析した結果、両澱粉共に、 $q=2.3 \text{ nm}^{-1}$  付近で極大を持ち、 $q>3.5 \text{ nm}^{-1}$  では上昇するカーブを示した。 $q<1 \text{ nm}^{-1}$  の領域では、ナノスケールの凝集構造に由来するピークが観測され、特に $\alpha$ -AMA 処理澱粉は比較的大きなピークを示した。さらに、両澱粉共に、ゲル化に伴い  $q=4 \text{ nm}^{-1}$  付近に B 型結晶構造に由来するピークが観測された。この SAXS のデータをシミュレーション法にて解析したところ、澱粉糊液のゲル化に伴い、アミロース分子間に二重らせん構造を含む凝集構造が形成され、この部分がゲル中における架橋領域となっていると考えられた。未加工澱粉ゲルの matrix には、アミロペクチンが存在してアミロースの老化に伴う二重らせ

ん形成を妨げるため、結果としてアミロース分子により形成される架橋構造が少なくなっていると考えられた。一方、 $\alpha$ -AMA 処理澱粉では、**matrix** の大部分がアミロースであるため、ゲル中により大きな凝集構造が早く形成されたと考えられた。

以上より、**SAXS** 測定で観測されたナノレベルでのゲル構造の微細な変化が、マクロレベルでのゲル物性と相関していることが明らかとなった。 $\alpha$ -AMA 処理澱粉のゲルでは、溶出したアミロースが、**filler** の周りに強固な **3** 次元ネットワークを形成した結果、高い弾性率を示したと考えられた。

第3章では、 $\alpha$ -AMA による酵素処理技術と、リン酸架橋技術の併用による新たなゲル物性を示す澱粉の開発を試みている。各種澱粉の **20%**ゲルを作成し、ゲル物性をレオメーター測定により解析した。その結果、リン酸架橋澱粉は、未加工澱粉に比べ、破断応力が **1.2** 倍、ヤング率が **1.8** 倍に増加したが、 $\alpha$ -AMA 処理リン酸架橋澱粉は、破断応力が **3.4** 倍、ヤング率が **4.0** 倍と、更に増加した。これらの結果より、 $\alpha$ -AMA 処理技術とリン酸架橋技術を組み合わせることにより、リン酸架橋澱粉ゲルが持つ高い弾性率を維持したまま、更に弾性率を高められる可能性が示された。

以上、 $\alpha$ -AMA によるタピオカ生澱粉の限定的な加水分解処理が、澱粉ゲルの弾性率を高めるための新しい技術であることを見出した。 $\alpha$ -AMA 処理タピオカ澱粉では、ゲル中の **matrix** のアミロース存在比率が増加すること、この溶出したアミロースによって形成される架橋構造の増加により、二重らせん構造を含む大きな凝集構造が速やかに形成されること、そしてこれらがゲルの弾性率を高める要因であることを明らかにした。さらに、澱粉の物性改変に利用されてきたリン酸架橋と $\alpha$ -AMA 処理を併用することにより、非常に弾性率の高い独特なゲル物性を示す新規な加工澱粉を調製することに成功した。

これらのことは、応用生命科学とくに食品物性科学に新たな知見を見出した点で高く評価できる。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。