

博士論文

稲わら中の澱粉の特性解明と
糖化プロセス最適化に関する研究

松木 順子

目次

略語一覧	iii
序章	1
0.1 背景	1
0.2 原料としての稲わらの特徴	3
0.3 原料構成成分の構造と特徴	6
0.4 原料の前処理特性	10
0.5 糖化酵素の特徴と発酵	11
0.6 RT-CaCCO 法の開発と特徴	13
0.7 本研究の内容と意義	17
第1章 稲わらに含まれる澱粉の特性解析	19
1.1 実験材料および方法	20
1.1.1 材料	20
1.1.2 澱粉の単離	20
1.1.3 分析	21
1.1.4 澱粉の糖化	23
1.1.5 統計処理	23
1.2 結果	24
1.2.1 稈部への澱粉の蓄積	24
1.2.2 澱粉の構造特性	27
1.2.3 澱粉の糊化特性および粘度特性	33
1.2.4 澱粉の糖化特性	37
1.3 まとめと考察	39
第2章 水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和が澱粉の糊化特性および糖化特性に及ぼす影響の解析	44
2.1 実験材料および方法	46
2.1.1 材料	46
2.1.2 澱粉の糊化特性の測定	46
2.1.3 澱粉の粘度特性の測定	47
2.1.4 澱粉の水酸化カルシウム処理および二酸化炭素による中和	47
2.1.5 澱粉の X 線回折測定	47
2.1.6 澱粉の FT-IR 測定	48

2.1.7	澱粉のX線光電子分光法による元素の化学結合状態測定	48
2.1.8	アミロース-脂質複合体の調製	49
2.1.9	澱粉の糖化特性	49
2.1.10	統計処理	50
2.2	結果	51
2.2.1	水酸化カルシウム濃度が澱粉糊化に及ぼす影響	51
2.2.2	水酸化カルシウム濃度が澱粉の粘度特性に及ぼす影響	53
2.2.3	温度処理と水酸化カルシウムが澱粉糊化に及ぼす影響	56
2.2.4	二酸化炭素中和が澱粉糊化に及ぼす影響	59
2.2.5	水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和が澱粉の結晶性に及ぼす影響	60
2.2.6	澱粉の糖化特性	67
2.2.7	水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和がアミロース-脂質複合体の糊化特性に及ぼす影響	70
2.3	まとめと考察	75
第3章	稲ホールクロップへのRT-CaCCO法の適用	84
3.1	実験材料および方法	85
3.1.1	材料	85
3.1.2	分析	85
3.1.3	RT-CaCCO法中の前処理	87
3.1.4	酵素糖化	87
3.2	結果	88
3.2.1	RT-CaCCO法の稲ホールクロップ試料への適応	88
3.2.2	水酸化カルシウムが澱粉の糊化に及ぼす影響	91
3.2.3	酵素添加の効果	97
3.2.4	酵素糖化の改善	98
3.3	まとめと考察	99
第4章	総括	106
	引用文献	112
	公表論文	129
	謝辞	130

略語一覧

- AAC: apparent amylose content 見かけのアミロース含量
ALC: amylose lipid complex アミロース-脂質複合体
APC: amylose palmitic acid complex アミロースパルミチン酸複合体
ATR: attenuated total reflection 全反射法
BE: Branching enzyme 枝作り酵素
BPNPG7: *p*-nitrophenyl maltoheptaoside *p*-ニトロフェニルマルトヘプタオシド
CbU: cellobiase units セロビアーゼ活性ユニット
ConA: concanavalin A コンカナバリン A
DiSC: Direct saccharification of the culms 稈部直接糖化法
DP: degree of polymerization 重合度
DSC: differential scanning calorimetry 示差走査熱量測定
FPU: filter paper degrading units 濾紙分解活性ユニット
FT-IR: Fourier-transform infrared spectroscopy フーリエ変換赤外吸収スペクトル
GBSS: Granule bound starch synthase 澱粉粒結合性合成酵素
HPAEC-PAD: high performance anion exchange chromatography equipped with a pulsed amperometric detector パルスドアンペロメトリー検出器付き陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー
HPSEC: high performance size exclusion chromatography サイズ排除高速液体クロマトグラフィー
MHT: mild heat treatment 穏やかな温度処理
MTBE: methyl-*t*-butyl ether
NSC: non-structural carbohydrates 非構造的炭水化物
RT-CaCCO: calcium capturing by carbonation at room temperature 室温前処理後の二酸化炭素吹付によるカルシウム捕捉法
RVA: rapid visco analyzer 高速粘度測定装置
SCs: soft carbohydrates 易分解性糖質
SS: Starch synthase 澱粉合成酵素
Tc: conclusion temperature 糊化終了温度
To: onset temperature 糊化開始温度
Tp: peak temperature 糊化ピーク温度
WCS: whole crop silage ホールクロップサイレージ
XPS: X-ray photoelectric spectroscopy X線光電子分光分析
XU: xylanase units キシラナーゼ活性ユニット

ΔH : gelatinization enthalpy 糊化エンタルピー

序章

0.1 背景

石炭、石油等の化石資源は現代に豊かな生活をもたらしてくれる一方で、過度な化石資源への依存は様々な環境を悪化させる原因の一つとなっている。人間の活動に伴い発生する二酸化炭素等の温室効果ガスが地球温暖化を引き起こし、自然の生態系に悪影響を及ぼすとして、1992年、「環境と開発に関する国際連合会議」において「気候変動に関する国際連合枠組条約」が採択された¹⁾。それ以降、大気中の温室効果ガスの濃度を安定化させることが世界各国で協調的に取り組むべき課題として認識されている。本条約を受けて2005年2月に発効した京都議定書では、2012年までに先進国全体で温室効果ガスの排出量を1990年比で5%削減することが目標として定められた²⁾。

バイオエタノールは、生物資源（バイオマス）を原料として生産される燃料用エタノールのことである。二酸化炭素を吸収して生育する植物に由来することから、ガソリンと比較して燃焼エネルギー当たりの温室効果ガス排出量が少ないことが期待され、全二酸化炭素発生量の23%を占める輸送用燃料による、温室効果ガス発生抑制に貢献すると考えられる³⁾。また、地球温暖化防止に加え、エネルギー安全保障や国内農業振興の観点からもバイオエタノール製造に係る取り組みが重要であることから、米国、ブラジル、中国、タイなど各国で導入が図られている。2011年の世界のバイオエタノール生産量は8460万kLで、うち北中米諸国が5450万kL、南米2180万kL、EU諸国440万kL、アジア337万kLとなっている⁴⁾。

現在、商業化されているバイオエタノールの原料は、米国ではトウモロコシ、ブラジルではサトウキビ、EU諸国では小麦、トウモロコシ、ライ麦、甜菜が、アジア諸国では、廃糖蜜、キャッサバが主体であり、いずれも第一世代といわ

れる糖質系、澱粉系のバイオマスである。このような原料は食糧との競合が懸念されるため、草本系農業廃棄物（稲わら、麦わら、サトウキビ搾り滓、トウモロコシ茎葉他）、木質系廃棄物（建築廃材、間伐材、製紙廃材他）、資源作物（牧草、スイッチグラス、ソルガム、エリアンサス他）などのリグノセルロース系バイオマス（第二世代）の利用が注目される。農業廃棄物は、現行農業体系の中でまとまって産出される均質性の高い資源として期待が高い。中でも、稲わらは最も発生量の多い農業廃棄物の一つで、世界の生産量は年間7億トンを超える⁵⁾。このような中で、我が国においても稲わらをはじめとする農業廃棄物を利用したバイオエタノール製造技術の開発は急務である。

我が国での稲わらの生産量は主食用米の消費量低下に伴い減少傾向にあるが、平成22年産は850万トンになる⁶⁾。そのうち、飼料用に約10%、堆肥用に約6%、敷料用に4%程度が積極的に利用されているものの、残り8割近くはすき込み用および焼却処分となっている。土地の状態によっては、稲わらのすき込みは地力維持に有効であるが、多くの圃場ですき込みを行う現実的な理由は、コンバインによる収穫作業効率化をはかる中で、わらの収集作業が省かれるようになったことによると考えられる⁷⁾。このような稲わらについては、効率的に収集できるようになれば、バイオエタノールの原料となりうる。その一方で、主食用米の消費量低下に伴う生産調整対策として、他用途米の利用が進められている。稲わらや植物体の地上部全体であるホールクロップをバイオエタノールの原料として利用することは、年々増加する休耕田、耕作放棄地の活用を促進し、水の保持や土壌流出の防止といった水田のもつ機能を維持回復し、食糧の安全保障、食糧自給率の向上、生態系の安定化、地域社会の安定的な発展などに貢献できるものと考えられる。

稲わらのような農業廃棄物を利用する場合、生産時期が限定されていること、腐敗しやすいことが大きな問題となるため、このような原料からのバイオエタ

ノールの生産には比較的小規模な製造に適したバイオマス中の糖を回収しアルコール発酵する方法が検討されている。一般的な行程では、繊維質から発酵性の単糖を効率的に抽出するために原料に対して前処理を行い、さらにセルロースやヘミセルロースを酸、酵素等を用いて加水分解して発酵可能な単糖とした後にアルコール発酵を行う。適切に管理された稲わらには、他の農業廃棄物にはない特徴として、糖化を受けやすい易分解性糖質が含まれることが確認されている。既存の前処理技術では繊維質からの糖の回収に着目した過酷な熱化学処理が使用されることが多く、易分解性糖質は分解されてしまう問題がある。また、前処理後の中和・洗浄処理工程では易分解性糖質の流亡が問題となる。さらに原料の安定保存技術を確立する必要がある。稲わら原料の高度利用のためには、特にこの三点に着目した変換技術開発が必要不可欠である。

0.2 原料としての稲わらの特徴

稲わらは、その他の農業廃棄物と同様、セルロース、ヘミセルロースとリグニンが主要成分である。主要なバイオマスとその成分の構成比を Table 0.1 に示した。他の農業廃棄物原料と比較して無機塩が多く、その 8 割以上がケイ酸であることが特徴である⁸⁾。

Table 0.1 Composition of some agricultural lignocellulosic biomass

	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Ash	Others
Rice straw	35.9	24.3	16.0	14.7	9.1
Corn stover	35.7	25.9	11.7	12.3	14.4
Wheat straw	37.9	26.8	18.3	7.6	9.4
Sugarcane bagasse	37.3	35.8	20.2	5.7	1.0

Values in percentage of dry weight. Source: ref⁸⁾.

また、適切に管理された稲わら内には、ショ糖、グルコース、フラクトース、 β -1,3-1,4-グルカンなどのような、直接抽出や直接酵素糖化により容易に六炭糖が抽出できる成分が含まれることが確認されている⁹⁾。これらの糖は、糖化を受けやすいという観点から、糖化が困難なセルロースとの対比で易分解性糖質 (soft carbohydrates, SCs) と定義されている。この SCs という概念は、作物学分野での非構造的炭水化物 (Non-structural carbohydrates, NSC) と一部重複するが、易分解性の繊維質である β -1,3-1,4-グルカンの存在を考慮している点で区別される。

これまで、籾収穫後の稲わらは農業廃棄物としてみなされていたこともあり、バイオエタノールの原料糖質としての SCs の存在は殆ど注目されてこなかった。最近になり、Park らは出穂期と成熟期の稲わらの各 SC 含量を調査し、時期によっては乾物重の 30% 以上にのぼることを見いだした^{9,10)}。また、稈部には、葉鞘、葉身に比べて多くの澱粉等の SCs が集積していることを見だし、稈部がバイオマスとして高い可能性を持つことを明らかにした¹¹⁾。

稲の茎葉部には、無視できない量の澱粉粒が含まれていることが知られている^{12,13)}。稲の茎葉に含まれる澱粉の消長は、稲の生育、種子稔実、病虫害抵抗性の診断などに役立つための研究の一環として調べられてきた¹⁴⁻¹⁶⁾。イネ科植物では、茎葉のうち、中心部に通る中空の茎を稈と呼び、葉は稈を取り巻く葉鞘と、稈から外側へ伸びた葉身からなる (Fig. 0.1)。茎葉澱粉は主として葉鞘基部および稈の柔細胞内に蓄積している。生育に従った澱粉の消長を Fig. 0.2 に示した。幼苗では、生育に伴い葉鞘および稈の澱粉は増加し、移植後には生育に伴い澱粉は急速に減少していく。その後、分けつ末期から穂ばらみ期には再度増加し、開花が終わるころに稈部の澱粉蓄積量は最大になる。米粒の発達に伴い、稈の澱粉は減少し、出穂 1 ヶ月後には最も少なくなる¹⁶⁾。その後再度稈の澱粉は増加に転じる。完熟稲わらでは、澱粉は殆ど稈に蓄積している。

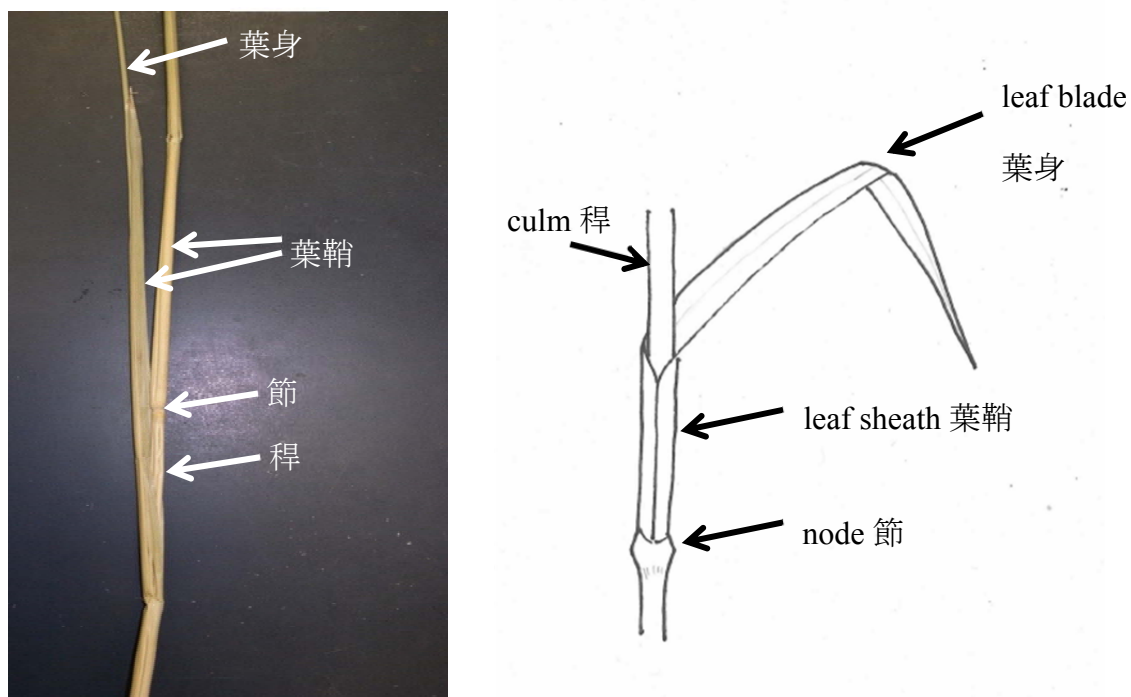


Fig. 0.1. The parts of the rice plant.

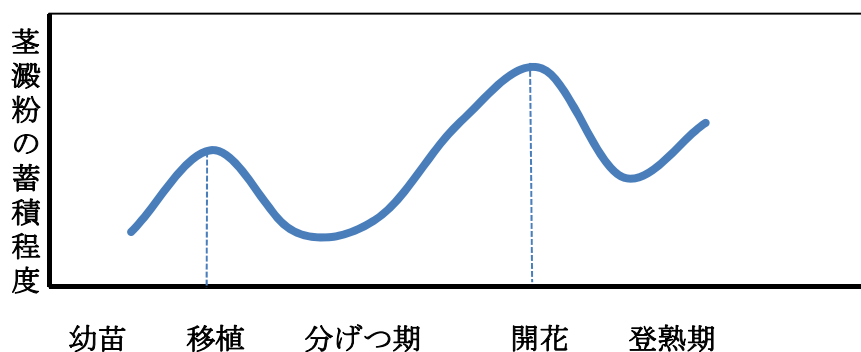


Fig. 0.2. The changes in the starch content of the rice culm. Redrawn from ref.¹⁶⁾

茎葉に一時的に蓄積された光合成産物は、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、ホスホリラーゼにより分解されてグルコースおよびグルコース 1-リン酸となり、さらに解糖系によってトリオースリン酸に変換される。トリオースリン酸はスクロースとなり、穂へ転流することが確認されている^{13,17)}。転流がグルコースではなくスクロースで行われているのは、還元性や浸透圧を下げるためと考えられる。

澱粉の生合成は、光合成の場である葉緑体と、貯蔵器官である種子や塊茎、塊根などを中心に行われる。葉緑体で作られた澱粉は同化澱粉と呼ばれ、種子や塊茎に蓄積する澱粉は貯蔵澱粉と呼ばれる。同化澱粉は、光合成カルビン-ベenson回路のフラクトース 6-リン酸からグルコース 6-リン酸、グルコース 1-リン酸を経て ADP-グルコースを基質として合成されるが、貯蔵澱粉は転流されたスクロースを出発点として合成される。稲の茎葉組織の観察から、同化組織は稈部では第一節間の先端部にのみ認められ、稈部の断面積の中で同化組織の占める割合は 10%程度であることが示されている¹⁸⁾。また、茎葉では、特に同化組織ではない維管束周辺の柔細胞に大粒の澱粉が蓄積しているのが認められている¹⁵⁾。成長した稈部では、澱粉の蓄積は維管束付近の細胞から始まり、逐次柔細胞に進行するとされている。柔組織には光合成産物であるスクロースが篩管を通過して輸送され、柔細胞内の小器官であるアミロプラストで澱粉が合成される¹⁹⁾。稈部に蓄積する澱粉は、貯蔵澱粉と考えられる。

稲わらは農業廃棄物であるが、茎葉部に含まれる澱粉を積極的に利用するという観点からは、収穫時期による澱粉蓄積量や特性を理解して利用する必要がある。

0.3 原料構成成分の構造と特徴

繊維質は主としてセルロース、ヘミセルロース、リグニンで構成される²⁰⁾。セルロースはグルコースが直鎖状に β -1,4-結合で 1000 から 10000 個以上が重合した多糖類である。天然型のセルロース（セルロース I）では、鎖の還元末端の向きが揃って平行に配列しており、分子内および分子間水素結合とファンデルワールス力を介して 30~50 本が束ねられ、結晶性のマイクロフィブリルを形成している。

ヘミセルロースは、植物細胞壁のセルロースマイクロフィブリルの間に存在し

ている多糖類のうち、ペクチン質を除く多糖類の総称である。構成糖は植物種間、細胞壁の壁層間で異なっており、イネ科の植物では、成長している伸縮性に富んだ一次壁の主要なヘミセルロースはアラビノキシランである^{21,22)}。アラビノキシランでは、(1→4)- β -結合したキシロースが主鎖となり、キシロースのC(2)位あるいはC(3)位にアラビノースが主要な側鎖として α 結合している。側鎖として結合しているものにはこの他にグルクロン酸、少量のアセチル基があり、成長の終わった細胞において一次壁の内側に形成される二次壁ではグルクロン酸の割合が高い。アラビノキシランの他、 β -1,3-1,4-グルカンが主として一次壁に存在し、細胞壁の伸長成長に関与していると考えられている。

リグニンは、フェニルプロパン基本骨格をもった基本単位(モノリグノール)が、エーテル、エステル、ピノレジノール型などでランダムに重合した分子である。イネ科植物では、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール、*p*-クマリルアルコールが構成要素となっている。導管の二次壁に多く蓄積し、細胞壁に物理的強度を付与している。

緊密な配列を形成して高度に結晶化したセルロースマイクロフィブリルが、一次壁ではヘミセルロースやペクチン、タンパク質などからなるマトリクス中に、二次壁ではヘミセルロースやリグニン、タンパク質などからなるマトリクス中に埋め込まれ、強固な細胞壁を形成し、植物体に物理的強度を付与し、微生物感染や動物捕食から身を守っていると考えられている。

ケイ酸は多くの無機養分とは異なり、分子状の形態で吸収されるといわれている。根から吸収されたケイ酸は、導管中を葉面蒸散の力で地上部へ移行し、体表面で濃縮されゲル化沈積(ケイ質化)する。いわゆるオパールと呼ばれる形態となり、ひとたび沈積したケイ酸は、再輸送されることはない²³⁾。

澱粉はアミロースとアミロペクチンの2種類のグルコースポリマーから構成されている。アミロースは、グルコースが主として α -1,4結合で直鎖状に結合し

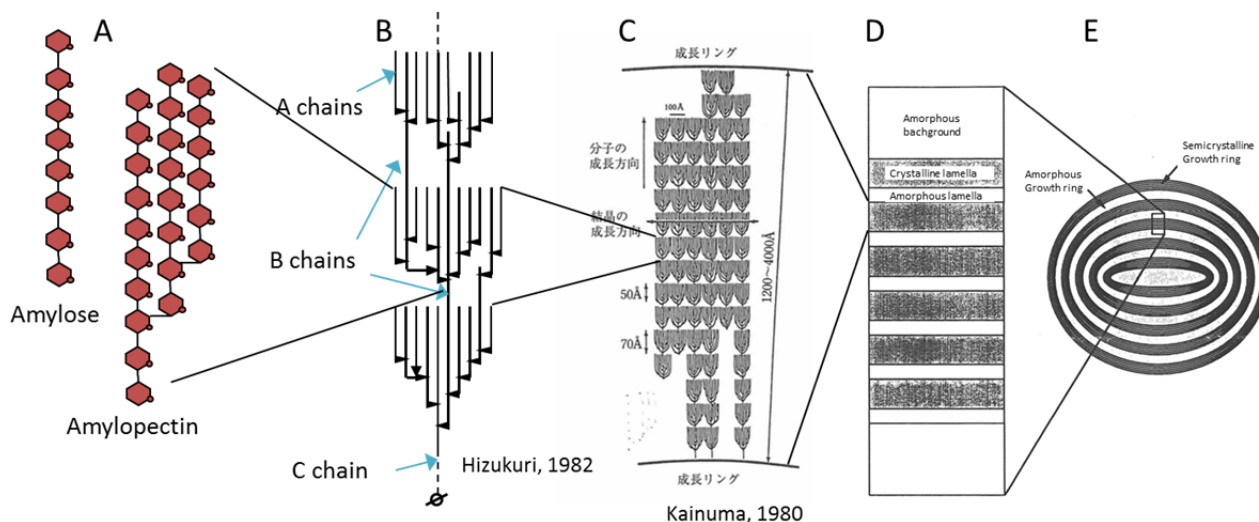


Fig. 0.3. Models for starch structure.

A: Structures of amylose and amylopectin; B: a cluster model for amylopectin; C: a model for amylopectin structure in the crystalline lamella; D: alternating layers of crystalline and amorphous lamella in the semicrystalline growth ring; E: alternating layers of semicrystalline and amorphous growth rings in the starch granule.

た分子であるが、稲などの穀類の場合平均重合度は 1000 程度であり²⁴⁾、アミロペクチンは、 α -1,4 結合で直鎖状に結合した鎖から、 α -1,6 結合により分岐した鎖を多く含んだ分岐構造をもつ分子で、平均重合度は $10^4 \sim 10^5$ 程度である (Fig. 0.3)。

アミロペクチンの分岐と直鎖部分は局在しており、房状 (クラスター) 構造をとっている (Fig. 0.3 B)²⁵⁾。 α -1,4 結合のみで結合したグルコースの鎖を単位鎖といい、単位鎖への他の単位鎖の結合の有無により、A 鎖と B 鎖に分類できる。A 鎖は構成グルコースの 6 位に他の単位鎖が結合していない単位鎖であり、B 鎖には単位鎖あたり一つ以上の単位鎖が結合してクラスターを形成している。

アミロペクチンクラスターの分岐部分は非晶質であるが、単位鎖同士では二重らせんを形成し、さらに分子内の水素結合により安定した結晶領域を形成している²⁶⁾。X 線結晶回折分析から、澱粉は回折パターンによって A 型との B 型の 2 種類に分類される。アミロペクチンの単位鎖長が澱粉粒の結晶構造を決定しており、A 型構造を示す穀類澱粉はアミロペクチンの平均鎖長 20 以下で、B

型構造を示す根茎澱粉は平均鎖長が 22 以上であることが示されている²⁷⁾。平均鎖長がその中間のものは、A 型と B 型の混合型を示す²⁸⁾。

アミロースの存在形態は、遊離状態、らせんに脂質を内包したアミロース脂質複合体、アミロース脂質複合体がさらに高次構造をとったものなどが知られている (Fig. 0.4)。これらのアミロースの澱粉粒内での存在様式については結論が出ていない。澱粉が糊化する際に、優先的にアミロースが溶出すること²⁹⁾、澱粉粒の酸加水分解により非晶領域を除去すると、アミロースも除去されること³⁰⁾などから、アミロースは澱粉粒内では結晶領域ではなく、非晶領域に存在すると考えられている。その一方で、アミロースを含む澱粉はモチ性澱粉と比べて水中加熱時に粒子の強度が保たれることや小角 X 線散乱解析から、アミロースはアミロペクチンとともにらせんを形成して部分的に結晶領域に関与しているとの考察もある³¹⁻³³⁾。

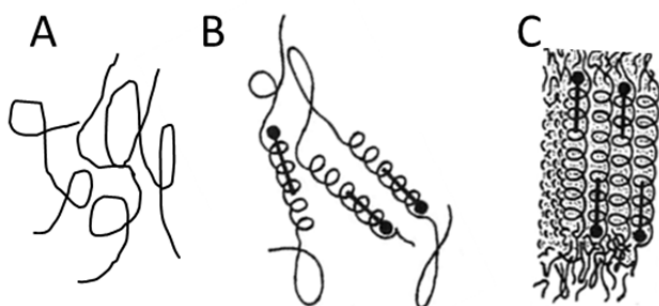


Fig. 0.4. Models for amylose structure.

A: Random coil of amylose; B: a model for amylose-lipid complex; C: a model for amylose-lipid complex in a stable form.

澱粉粒は植物の種類により特徴のある形をしており、粒心から同心円状に成長リングが観察される (Fig. 0.3 D, E)。アミロペクチンのクラスターは粒心から外側方向に伸長し、アミロペクチンの結晶部分は、隣り合ったクラスターとの間に成長していくと考えられている³⁴⁾。クラスターの直鎖部分と分岐部分はそれぞれ結晶領域と非晶領域を形成し、成長リング間に層状に存在すると考え

られる。結晶領域が形成されることによって澱粉は常温では水に溶けずに沈澱し、浸透圧を上げずに細胞内に存在できるので、細胞内でのストレスは低く、葉緑体や貯蔵器官で合成した糖類を大量に蓄積することが可能となるものと考えられる。

0.4 原料の前処理特性

アルコール発酵に利用できるのは単糖であるため、繊維質、澱粉を加水分解し、発酵可能な単糖を回収する必要がある。前処理は、細胞壁のマトリクスをゆるめて、セルロース、ヘミセルロースの加水分解を促進する効果を期待して行う³⁵⁾。稲わらをアルコール発酵の原料として用いる場合、繊維質と易分解性糖質 (SCs) という前処理特性の異なる糖質が共存することから、繊維質から糖質を遊離させつつ、SCs の分解・損失を防ぐ工夫が必要となる。

繊維質に対して利用される代表的な前処理法に対する、稲わらに含まれる成分の挙動を Fig. 0.5 に示した。希硫酸処理では、キシランを含む大部分のヘミセルロースが糖化するが、易分解性糖質の過分解や発酵阻害物質の生成などの問題がある。また、石灰によって中和した場合、石膏を系外に排出する必要がある³⁶⁾。水熱処理においては、中和の必要はないが、ヘミセルロースや易分解性糖質の過分解の問題がある^{37,38)}。水酸化ナトリウム処理では、リグニンの可溶化がおこり、リグノセルロースの構造が破壊されるため、セルロースの糖化率を上げることができるが、アルカリを除去するために中和、固液分離を行う必要があり、易分解性糖質が流出してしまう³⁹⁾。

洗浄除去が必要ない前処理方法としては、アンモニア処理と石灰 (水酸化カルシウム) による方法がある。アンモニア処理の効果は、リグニンの脱重合によること、また、バイオマス原料中のセルロース I 型結晶を III 型結晶に転移させることにより高い糖化率を得られるところにある⁴⁰⁾。前処理後に蒸発させる

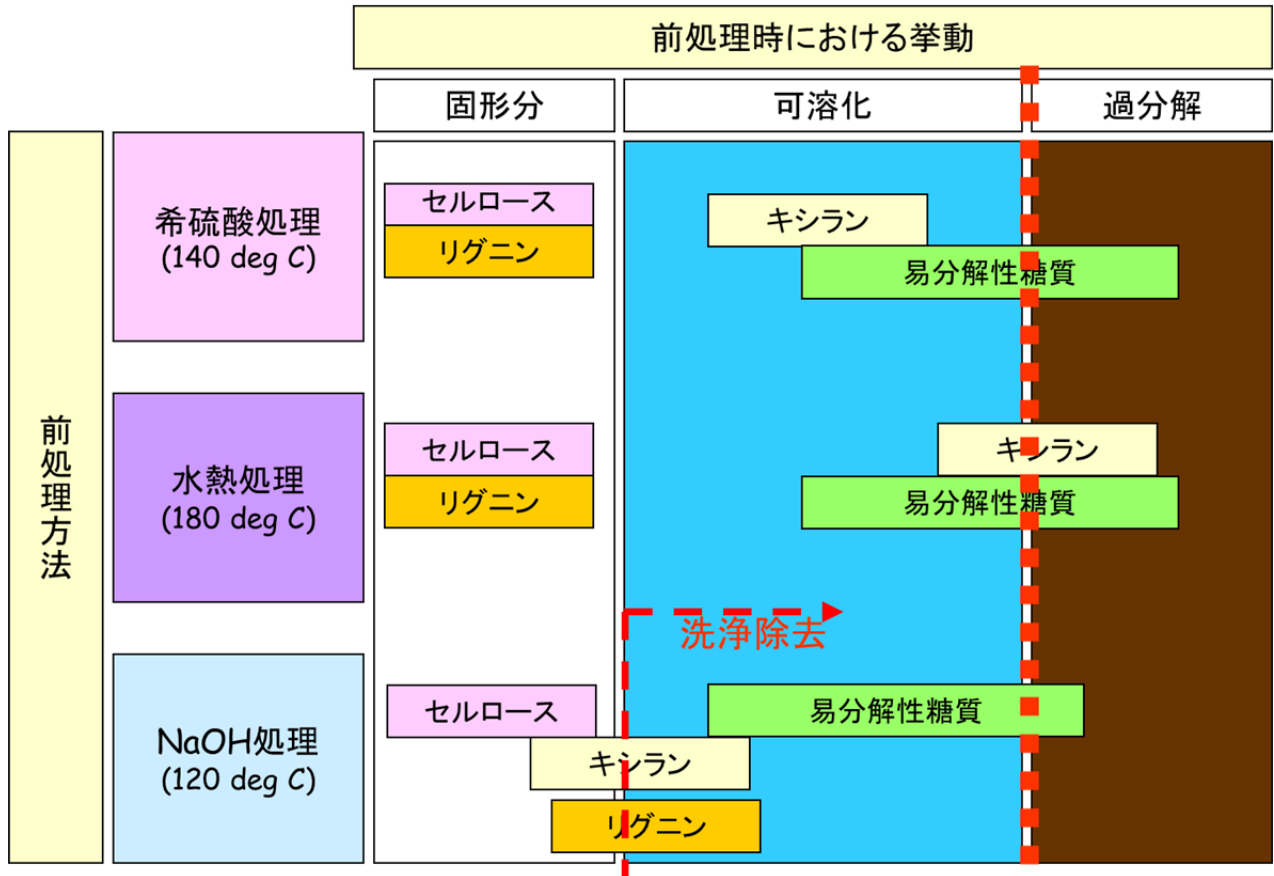


Fig. 0.5. Recovery of fermentable sugars from rice straw using various pretreatment methods.

ことによりアンモニアを回収できるが、臭気や毒性が強く、高度な管理が必要である³⁶⁾。水酸化カルシウム処理では、脱アセチル化および脱リグニンによってヘミセルロースの多くが可溶化される⁴¹⁾。比較的安価で、中和後により沈澱するために系内にとどめておくことができ、後に回収することも可能である。易分解性糖質のうち、還元性の強い遊離グルコースと遊離フルクトースは分解してしまうため、発酵可能な糖としては回収出来ない^{42, 43)}。

0.5 糖化酵素の特徴と発酵

前処理を施したバイオマスは、セルラーゼ、ヘミセルラーゼを用いて発酵可能な単糖まで加水分解する必要がある²⁰⁾。セルラーゼはセルロースを分解する一連の酵素の総称で、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、 β -グルコシダーゼが協奏的に働いてセルロースをグルコースまで分解する。エンドグルカ

ナーゼは、結晶性の低い領域やマイクロフィブリルの表面の β -1,4-グルカン鎖をランダムに切断する。セロビオヒドロラーゼは、セルロース鎖の還元末端側から、あるいは非還元末端側からセロビオース単位で切断していく機構を備えている。 β -グルコシダーゼ（セロビアーゼ）は、セロビオースやセロオリゴ糖を切断してグルコースを生じる。

ヘミセルラーゼはヘミセルロースを分解する酵素の総称である。イネ科の主要ヘミセルロースであるアラビノキシランを分解するには、キシランの主鎖をランダムに加水分解する β -キシラナーゼや、生じたキシロオリゴ糖を非還元末端から分解する β -キシロシダーゼの他、アラビノース側鎖を切断する α -アラビノフラノシダーゼ、グルクロン酸側鎖を切断する α -グルクロニダーゼ、アセチル基を切断するアセチルキシランエステラーゼ、フェルラ酸側鎖を切断するフェルロイルエステラーゼなど、種々のエンド型、エキソ型の酵素が必要である。

澱粉を分解するには、 α -1,4 結合と α -1,6 結合を切断する必要があるが、変換に用いる微生物由来の酵素としては、特に α -アミラーゼとアミログルコシダーゼが重要である。 α -アミラーゼは澱粉の α -1,4 結合をランダムに切断するエンド型酵素であり、生じる分解物の重合度の違いから、糖化型と液化型に分類される⁴⁴⁾。液化型はマルトオリゴ糖と分岐オリゴ糖を生じ、基質溶液の粘性を下げる。一方糖化型は単糖、二糖、三糖、分岐オリゴ糖を生じる。アミログルコシダーゼは α -1,4 結合と α -1,6 結合を非還元末端から切断するエキソ型酵素である。 α -アミラーゼとアミログルコシダーゼの相乗効果により澱粉の分解が効率的に行われ、最終的にグルコースを得る^{45,46)}。

加水分解により得られた単糖は、微生物を用いて発酵し、エタノールを得る。エタノール発酵においては、グルコース、フラクトースなどの糖質が分解され、エタノールと二酸化炭素を生成する。酒類やアルコール製造では、*Saccharomyces cerevisiae* および *Zymomonas mobilis* が広く用いられているが、発酵できる単糖は

六炭糖で、キシロースなどの五炭糖は発酵できない。五炭糖を利用する場合には、遺伝子組み換え等の技術を用いて五炭糖発酵能を付与する、五炭糖発酵能を持つ *Pichia stipitis* や *Candida shehatae*、*Pachysolen tannophilus* などの微生物にアルコール耐性を付与するといった取り組みが必要となる。六炭糖と五炭糖の両方を効率的に発酵する菌は報告されておらず、開発競争が繰り広げられている^{47,48)}。五炭糖を発酵性糖源として利用するか否かについては、原料品質、原料価格、プロセス全体の安定性、採算性などを考慮して判断する必要がある。例えば、麦わらを原料とした水熱前処理技術について大規模実証試験を行う Inbicon 社では、水熱処理の弱点である五炭糖回収性の低さを考慮し、五炭糖成分をバイオエタノール原料として使用せず、飼料用途に回すことを提案している⁴⁹⁾。筆者の属する研究室で行う稲わら原料の変換技術開発においても、六炭糖の含量が五炭糖よりも際だって多い原料では六炭糖のみを可能な限り回収利用する戦略を提案し、六炭糖に加えて無視できない量の五炭糖が含まれる原料ではバイオマスから全糖を最大限回収、発酵利用する戦略を提案している。前者として、稲稈部を直接糖化発酵する DiSC (Direct saccharification of the culms) 工程を⁵⁰⁾、後者として、CaCCO (Calcium capturing by carbonation) 法の開発を行っている⁵¹⁾。

0.6 RT-CaCCO 法の開発と特徴

これまでに述べたような繊維質と易分解性糖質に対する前処理効果の違いを踏まえ、Park らは稲わらなどの易分解性糖質を含む繊維質の原料に対する前処理法として、CaCCO 法 (calcium capturing by carbonation) の開発を行った⁵¹⁾。CaCCO 法における標準の前処理工程では、稲わら粉碎物に対して 10%の水酸化カルシウムと 20 倍量の水を作用させて 120°C で 1 時間処理した後に、二酸化炭素で中和する。この後、固液分離を行うことなく、セルラーゼ、ヘミセルラー

ぜ、アミラーゼを含む製剤を用いて酵素糖化を行う。中和によって炭酸カルシウムとして沈殿させるため、塩が電解質として糖化/発酵の過程を阻害することがない。固液分離の必要がないため、SCs や前処理によって遊離した単糖の流亡を抑えることが可能となる。

さらに Shiroma らは、CaCCO 法に貯蔵法としての機能をもたせるために RT-CaCCO 法 (calcium capturing by carbonation at room temperature) を開発した⁵²⁾。Fig. 0.6 に、RT-CaCCO 法の概要を示す。RT-CaCCO 法では、前処理を室温で7日間行う。この時アルカリに保たれていることから、湿式の保存技術としての役割を果たし、加熱操作を省くことで加熱コストを低減させることができる。

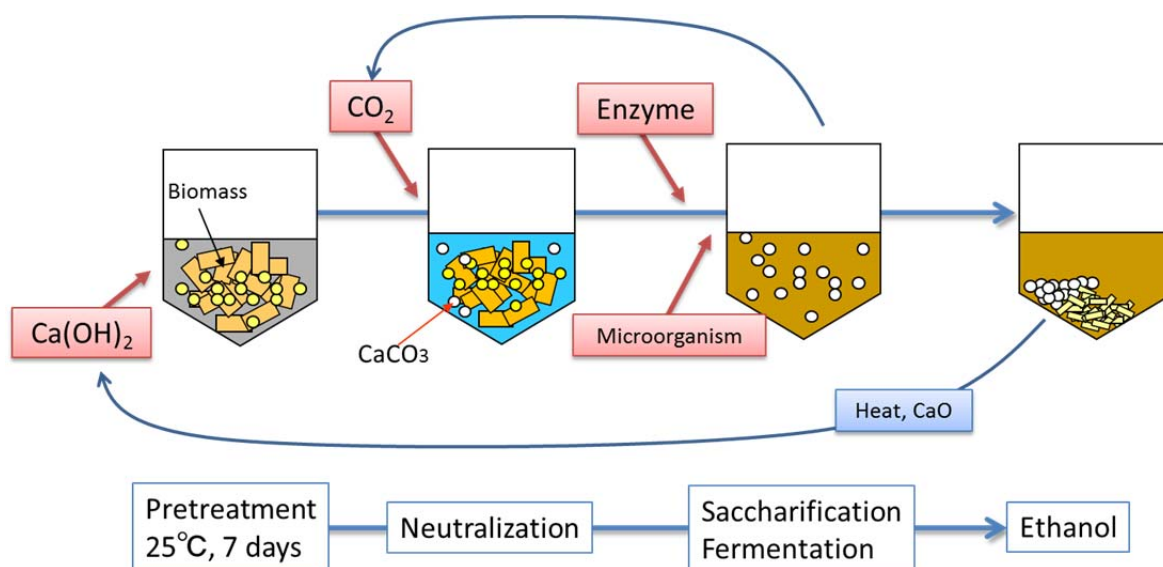


Fig. 0.6. Brief description of the RT-CaCCO process.

RT-CaCCO 法は、原料の貯蔵性を高め、固液分離・洗浄を省いた簡潔な仕組みによるものであり、地域固有の様々な農業廃棄物を利用したバイオエタノール生産に活用されることで、地域活性化へ貢献することが期待されている。本法は 10 mL のバイアルを用いた系で開発され、現在 19 L のタンクを用いたベンチプラントでの試験が行われている。将来的には、400 kL 程度のタンクを用い、

生成されるエタノールとしては一日当たりおよそ 50 kL、年間 15,000 kL の製造規模の比較的小規模なプラントでの活用を想定している。

澱粉は易分解性糖質に分類されるものの、水に不溶で、澱粉粒内では結晶構造を形成しているため、常温処理を利用した RT-CaCCO 法ではそのままでは酵素糖化効率が低く、糖化特性は構造特性に大きく依存する。これまでに、結晶型、アミロース含量、アミロペクチン鎖長分布、粒子サイズ等の構造特性が澱粉粒の酵素分解性に影響を及ぼすことが知られている。澱粉の起源により生澱粉のアミラーゼ分解性は異なり、トウモロコシ、コメ、コムギなどの穀類澱粉は比較的分解されやすく、ジャガイモ、ナガイモなどの根茎澱粉は分解されにくいことがよく知られている^{53,54)}。結晶型が A 型の穀類澱粉などは、単位鎖長が短く、結晶領域に分岐点が存在するため、結晶性が B 型の根茎澱粉に比べて低くなることから、分解されやすいと考えられている⁵⁵⁾。アミロースを含まないモチ種は分解されやすく、高アミロース種は分解されにくいことが知られている^{56,57)}。アミラーゼはらせん構造をとっているアミロース分子や、脂質と複合体を形成しているアミロースを分解しにくいことが示されている^{58,59)}。粒子サイズが小さい澱粉は、単位重量当たりの表面積が大きくなるため、酵素接触の機会が多くなり、分解性が高くなると考えられる。このようなことから、糖化効率を向上するための基礎データとして、稲わら澱粉の構造特性を把握する必要がある。

澱粉を水中で加熱すると、澱粉粒は吸水、膨潤し、澱粉粒内の結晶が崩壊することが知られている。この現象のことを糊化という。糊化とは、澱粉の分子内の水素結合が切断され、結晶構造が失われることであると定義される⁶⁰⁾。澱粉が糊化することで酵素糖化性が著しく向上することから、効率的な酵素糖化を実現するためには、澱粉を糊化状態にすることが重要となる。例えばブドウ糖、水飴等の澱粉糖の製造では、耐熱性の α -アミラーゼ存在下で瞬時に加熱す

ることで糊化と加水分解を同時に行う方法が定着している⁶¹⁾。

RT-CaCCO 法では加熱を行わないため、効率的糖化のためには、室温で糊化を促進する方法を見いだす必要がある。水酸化ナトリウムなどのアルカリ溶液中では、澱粉分子間および構造水との間の水素結合が破壊され、室温で糊化することが知られている⁶²⁾。RT-CaCCO 法で用いる水酸化カルシウムでは、室温では糊化はしないものの、水素結合の切断による糊化促進が認められている⁶³⁾。その一方で、澱粉は強アルカリ性溶液中で水酸基が解離して陽イオン交換的性質を示し、遊離した H^+ とアルカリの陽イオンが交換するが、水酸化カルシウムでは対イオンが 2 価であるため、架橋効果によって結晶構造の安定化に寄与すると考えられる⁶⁴⁾。このような相反する効果が認められるため、繊維質と澱粉が共存する原料に対して RT-CaCCO 法を適用する場合、糖化効率を向上させるためには、澱粉に対する水酸化カルシウム処理の影響を明らかにしておく必要がある。

さらに、澱粉の糊化は共存物の影響を受けることが知られている。繊維質とともに糊化した場合に、繊維質との相互作用や、老化によって、繊維質の前処理効果や酵素糖化性に影響を及ぼすことが懸念される。前処理の適合性や副次的効果などについての解析は十分に行われていない。本研究では、澱粉と繊維質が共存する稲ホールクロップでの前処理・糖化効率化を図る。

RT-CaCCO 法では、戦略的に、SCs の流亡を抑えつつ、前処理によってセルロース・ヘミセルロースから五炭糖・六炭糖を可能な限り回収することに主眼が置かれたため、比較的茎葉澱粉含量の低いコシヒカリやあきたこまちを用いて開発された⁵²⁾。このため、澱粉含量の高い原料を用いた際に十分に澱粉が回収されるかどうかは検討されていない。また、これまでに開発されたバイオエタノール生産方法は、それぞれ第一世代バイオマスを原料とした場合ではショ糖または澱粉からの糖回収、第二世代バイオマスを原料とした場合ではセルロー

ス・ヘミセルロースからの糖回収が検討され、澱粉とセルロースの両方が多く含まれた原料の利用についての報告は多くない。これまでに、澱粉とセルロースの両方が含まれる原料として、ウェットミリング工程の残渣であるトウモロコシ繊維⁶⁵⁾、トウモロコシの植物体の地上部全体を飼料用に長期保存が可能なように発酵調製したホールクロップサイレージ (whole crop silage, WCS)⁶⁶⁾、稲の WCS⁶⁷⁾の利用が検討されている。トウモロコシ繊維、トウモロコシ WCS では前処理法としてそれぞれ 121°C、180°C以上の高温処理が利用されており、このような条件では澱粉は完全に糊化することから、澱粉はほぼ 100%利用可能である。また、稲 WCS の利用では前処理を省略した方法を検討しているが、澱粉利用の向上のためには澱粉分解酵素添加の必要性が指摘されている。RT-CaCCO法では、比較的澱粉含量の低い子実収穫後の食用品種の稲わらのみならず、飼料用に生育された澱粉などの SC 含量の高いホールクロップを原料の対象として考えている。本法では原料の湿式保存技術としての役割から常温での前処理を特徴としていることから、このような澱粉とセルロースの両方が多く含まれる原料において水酸化カルシウムによる澱粉の糊化促進作用を引き出すためには、作用条件の最適化が必要であり、本論文において検討を行った。

0.7 本研究の内容と意義

以上の背景を踏まえ、本研究では、澱粉と繊維質が共存する稲地上部全体 (ホールクロップ) での前処理・糖化の効率化を図ることを目的とした。これまで、このような共存状態での効率的な前処理・糖化方法について検討された例は少なく、稲わら特有の問題の解決を目指している。澱粉の構造特性は、糖化性と密接な関わりがあるため、糖化の効率化を図るためには構造を知る必要があるが、稲わらに含まれる澱粉の構造についての情報はほとんどない。そこで、第 1 章では、稲稈部の澱粉を単離し、構造的特徴を明らかにし、澱粉の糖化適性と

の関連を明らかにした。

澱粉は水素結合によりらせん構造を安定化させて結晶性を保っているが、アルカリの水酸基は水素結合を切断することによって結晶構造を崩壊し、すなわち、糊化を促進すると考えられる。第2章では、モデル物質として稲胚乳澱粉を用いて、RT-CaCCO法における水酸化カルシウム処理および二酸化炭素による中和が澱粉の糊化および糖化に及ぼす影響を明らかにした。澱粉の糊化と糖化性が関連することを踏まえて、DSCを用いた澱粉の糊化特性を指標とし、水酸化カルシウムによる澱粉の糊化と構造の安定化について解析を行い、糊化に必要な条件を絞り込んだ。そして第3章では特に澱粉が多く含まれる稲ホールクロップを対象に、効率的なグルコース回収のための条件を決定した。

第1章 稲わらに含まれる澱粉の特性解析

本章では、稲稈部の澱粉を単離、構造解析し、澱粉の糖化特性との関連を明らかにすることを目的とした。解析にはリーフスター、夢あおば、コシヒカリの三品種を選択した (Fig. 1.1)。リーフスターは稲発酵粗飼料用として開発された品種であり、玄米収量が低い一方で茎葉の割合が高く、地上部が多収で、非構造的炭水化物 (Non-structural carbohydrate、NSC) 含量が高い。夢あおばはリーフスターと同様に稲発酵粗飼料向けであるが、茎葉と玄米の両方とも充実がよく、多収である。コシヒカリは我が国における主食用稲の主要品種である。澱粉の酵素反応感受性は、澱粉と酵素の接触しやすさ⁶⁸⁾、アミロペクチンの鎖長分布⁶⁹⁾、アミロース-脂質複合体の存在⁵⁹⁾、澱粉粒子サイズ⁷⁰⁾などに影響されることから、完熟期の稲稈部から澱粉を単離し、それぞれの構造特性を解析し、糖化特性との関係を明らかにした。



Fig. 1.1. Pictures of varieties of rice used.
From left to right: Yumeaoba, Koshihikari,
Leafstar.
Taken from Rice variety database search
system, National Institute of Crop Science,
NARO.

<http://ineweb.narcc.affrc.go.jp/index.html>

1.1 実験材料および方法

1.1.1 材料

稲3品種はそれぞれ、農研機構 中央農業研究センター北陸研究センター（夢あおば）、農研機構 作物研究所（コシヒカリ、リーフスター）で2009年に生育したものを、成熟期に収穫した。地際から刈り取り、澱粉の消失を防ぐために直ちに70°Cで3日間乾燥した。乾燥後、穂を切り離したものを乾燥稲わらとした。コシヒカリ穀粒は、つくば市の直売所で購入した。

イソアミラーゼ (E-ISAMY) は、Megazyme International Ireland 社製 (Wicklow, Ireland) を用いた。*Bacillus amyloliquefaciens* 由来の耐熱性 α -アミラーゼ (A-7595、319.3 kilo Novo α -amylase unit (KNU)/mL) は、Sigma-Aldrich 社製 (St. Louis, USA) を用いた。

特に断りがない限り、水は MilliQ (Millipore, Billerica, USA) で製造した超純水を用いた。その他試薬は、特級試薬を用いた。

1.1.2 澱粉の単離

稈部澱粉の単離には、乾燥稲わらから葉鞘と葉身を外して稈部のみを集め、縦方向に裂いて5 cm程度の長さに刻み、水に浸して4°Cで一晩置いた。胚乳澱粉の単離には、舂摺りした玄米を水に浸して4°Cで一晩置いた。浸漬した試料は、Oster blender (モデル 6812、Sunbeam Oster 社、Boca Raton, USA) を用いて冷水中で2分間破碎し、目開き 150 μm と 53 μm のふるいを通した。両ふるい上の残渣を集め、再び冷水中で破碎し、同ふるいを通した。ふるいを通過した液を集めて3,000 $\times g$ で15分間遠心分離し、上清を除去後に沈澱を集めて冷水に懸濁し、遠心分離する洗浄を2回繰り返した。沈澱に、冷水とトルエンを7:1の割合で混合したものを加え、15分間激しく振った後、3,000 $\times g$ で15分間遠心分離し、上清を除去した。沈澱に再び冷水とトルエンを加え、上記の冷水・トルエンに

よる洗浄操作を、トルエン層が着色しなくなるまで繰り返した。沈澱を再び冷水で洗浄した後に、目開き 40 μm のナイロンメッシュを通過させて繊維状の残渣を除去し、通過液を遠心分離して沈澱を集め、凍結乾燥したものを単離澱粉とした。

単離した澱粉の形状は、簡易偏光板を装着した光学顕微鏡(オリンパス CKX41)で観察した。走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察では、単離澱粉試料を両面カーボンテープで試料台に固定し、金でコーティングした後、JEOL 製 5600-LV を用いて、加速電圧 10 kV で観察した。

1.1.3 分析

澱粉含量は、総澱粉含量測定キット (Megazyme International Ireland) を用いて、amyloglucosidase/ α -amylase 法にて測定した。

単離澱粉の粒子サイズ分布は、レーザー回折式粒度分布測定装置 (島津製作所社製 SALD-2100) を用いて測定した。分散媒には水を用いた。

結合型脂肪酸は、Morrison と Coventry の方法⁷¹⁾を用いて抽出した。抽出した脂肪酸は、非エステル結合型脂肪酸キット NEFA-C test (和光純薬工業) を用いて測定した。

見かけのアミロース含量 (AAC) は、Nishi らの方法⁷²⁾の改良法に従って測定した。単離澱粉 20 mg を 1.8 mL の水に懸濁し、攪拌しながら 0.2 mL の 10 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、10 分間煮沸して糊化させた。冷却した後に 4 mL の 1 N 酢酸を加えて中和した後、さらに全量 10 mL となるように水を加えた。この溶液から 0.2 mL の液を取り、0.2 mL のヨウ素水溶液 (0.2% w/v I_2 + 2% w/v KI) と 4 mL の水を加えた。680 nm における吸光度から AAC を算出した。検量線作成にはバレイショアミロース (Janssen Chimica, Beerse, Belgium) を用いた。最大吸収波長 (λ_{max}) は、澱粉-ヨウ素溶液の 500 から 700 nm の吸収曲線の極大点

とした。

アミロース含量は、アミロース含量測定キット (Megazyme International Ireland) を用いて、Concanavalin A (ConA) 沈澱法にて測定した。糊化した澱粉溶液に ConA を加えて ConA アミロペクチン複合体を沈澱させ、澱粉溶液の総グルコース量に対する、上清に含まれる総グルコース量から、アミロース含量を推定した。

アミロペクチン鎖長分布は、2 種類の方法で分析を行った。サイズ排除高速液体クロマトグラフィー (High performance size exclusion chromatography, HPSEC) は、Matsuki らの方法⁷³⁾に従い、検出器には示差屈折計 (RI-2031 Plus、日本分光) を用い、クロマトデータ処理プログラム BORWIN (日本分光) を用いてピーク面積を算出した。陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーとパルスドアンペロメトリック検出器を組み合わせた方法 (High performance anion exchange chromatography with a pulsed amperometry detector, HPAEC-PAD) を用いた分析は、DX-500 システム (Dionex, Sunnyvale, USA) を用いて、Nagamine らの方法⁷⁴⁾で行った。

X 線結晶回折の測定は、X 線回折装置 (RAD-X システム、(株)リガク、東京) を用い、X 線源 Cu-K α 線 (湾曲結晶モノクロメータ使用)、X 線管電圧 40 kV、X 線管電流 25 mA、発散および散乱スリット 1°、受光スリット 0.3 mm、モノクロメータスリット 0.6 mm、ゴニオメーター走査速度 2°/min、ステップ 0.02° の条件で測定した。試料は両面テープでガラス板に固定した。

単離澱粉の糊化特性は、Diamond DSC (Perkin-Elmer, Shelton, USA) 示差走査熱量測定装置 (differential scanning calorimetry, DSC) を用いて測定した。容器には O-リング密閉式ステンレススチール製大容量カプセルを用いた。サンプルパンに約 10 mg のサンプルを計り取り、約 40 mg の水を加え、密閉した。参照側には空のサンプルパンを用いた。25°C から 140°C まで、1 分間に 10°C の速さで昇

温させた。校正用試料にはインジウムと水を用いた。糊化開始温度 (gelatinization onset temperature, T_o)、糊化ピーク温度 (gelatinization peak temperature, T_p)、糊化終了温度 (gelatinization conclusion temperature, T_c)、糊化エンタルピー (gelatinization enthalpy, ΔH) は、Pyris software (ver. 5.00.02、Perkin-Elmer) を用いて算出した。

粘度特性の測定は、粘度分析装置 RVA-4 (Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia) を用いて行った。RVA の容器に、澱粉試料 (乾物重として 2.0 g) と水 20 mL を入れて懸濁した。羽は毎分 160 回転させ、設定温度は、35°C で 1 分保持した後に 12 分で 95°C まで昇温し、95°C に 10 分間保ち、その後 12 分で 35°C まで降温し、35°C で 10 分間保持とした。

1.1.4 澱粉の糖化

2 mL のねじロプラスチックチューブに単離澱粉 10 mg を取り、500 μ L の 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.9、5 mM 塩化カルシウム、5 mM 塩化ナトリウム、0.01% アジ化ナトリウム) を加えた。チューブを反応温度 (60°C、70°C、80°C) で 15 分間保温した後、同温度で保温しておいた酵素溶液 (0.64 KNU α -アミラーゼ、500 μ L マレイン酸緩衝液中) を加え、90 分間反応させた。一定時間毎に 50 μ L ずつサンプリングし、200 μ L のエタノールを加えて酵素反応を停止させた。15,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した後、上清の還元糖量を Somogyi-Nelson の方法⁷⁵⁾ で測定した。検量線作成にはグルコースを用いた。

1.1.5 統計処理

線形回帰分析および Tukey 法による多重比較は、GraphPad Prism software (version 5.02 for Windows) を用いて行った。

1.2 結果

1.2.1 稈部への澱粉の蓄積

今回用いた成熟期稲わらの乾燥重量のうち、稈部の占める割合は、夢あおばで33.1%、コシヒカリで38.1%、リーフスターで32.2%であった。また、澱粉含量は、夢あおばで稲わら全体の17.9%、稈部重量の23.4%であり、コシヒカリでそれぞれ8.5%、18.2%、リーフスターで17.6%、46.3%であった。稲わらに蓄積する澱粉のうち、夢あおばで43.3%、コシヒカリで82.4%、リーフスターで84.7%が稈部に集積している計算となった。精製効率を考慮し、集積程度の高い稈部から澱粉を精製し、以降の実験を行うこととした。

各品種の稲わらから、澱粉を単離し、観察を行った。コシヒカリと夢あおばの澱粉粒度分布は3~20 μm に渡っており、平均粒径はそれぞれ7.2 μm 、7.5 μm であった。リーフスターでは5~30 μm に渡っており、平均粒径は11.4 μm であった。いずれも、コシヒカリ胚乳澱粉（粒径範囲1~15 μm 、平均粒径は5.8 μm ）よりも大きな粒子であった（Fig. 1.2）。光学顕微鏡および偏光顕微鏡を用いた観察により、単離澱粉粒が結晶構造を有することが観察された（Fig. 1.3 A-F）。さらにSEMでの観察により、澱粉粒の形状は、球形の他、レンズ型、多角形のものが確認された（Fig. 1.3 G-I）。稲の胚乳澱粉は一つのアミロプラストの中に数十から百程度の澱粉粒が含まれる複粒型であるが、これにはアミロプラストの分裂様式が関与していることが報告されている⁷⁶⁾。稈部澱粉では一つのアミロプラスト中に一つの澱粉粒が形成される単粒型と、複粒型が混在していた。単複混合型の澱粉粒を示すススキなどの植物種も知られている。稈部は単一の組織でなく、澱粉が増減を繰り返していることから、単粒型と複粒型が別の組織や時期に生成された可能性、混合型として生成した可能性が考えられた。

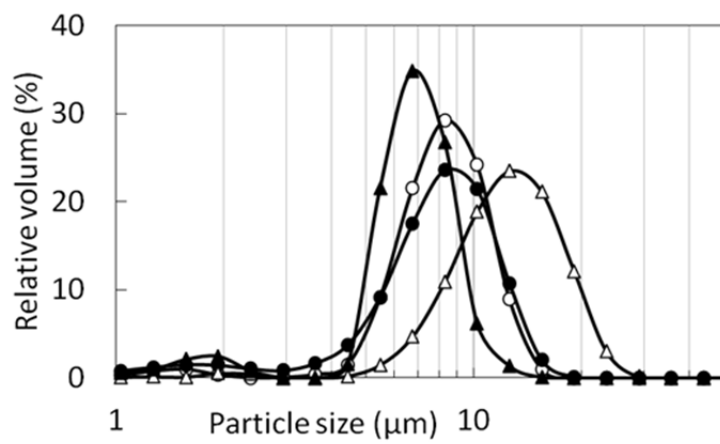


Fig. 1.2. Profiles of particle-size distributions of starches.

○ : Yumeaoba culm starch

● : Koshihikari culm starch

△ : Leafstar culm starch

▲ : Koshihikari endosperm starch

Taken from ref ¹⁵⁷⁾.

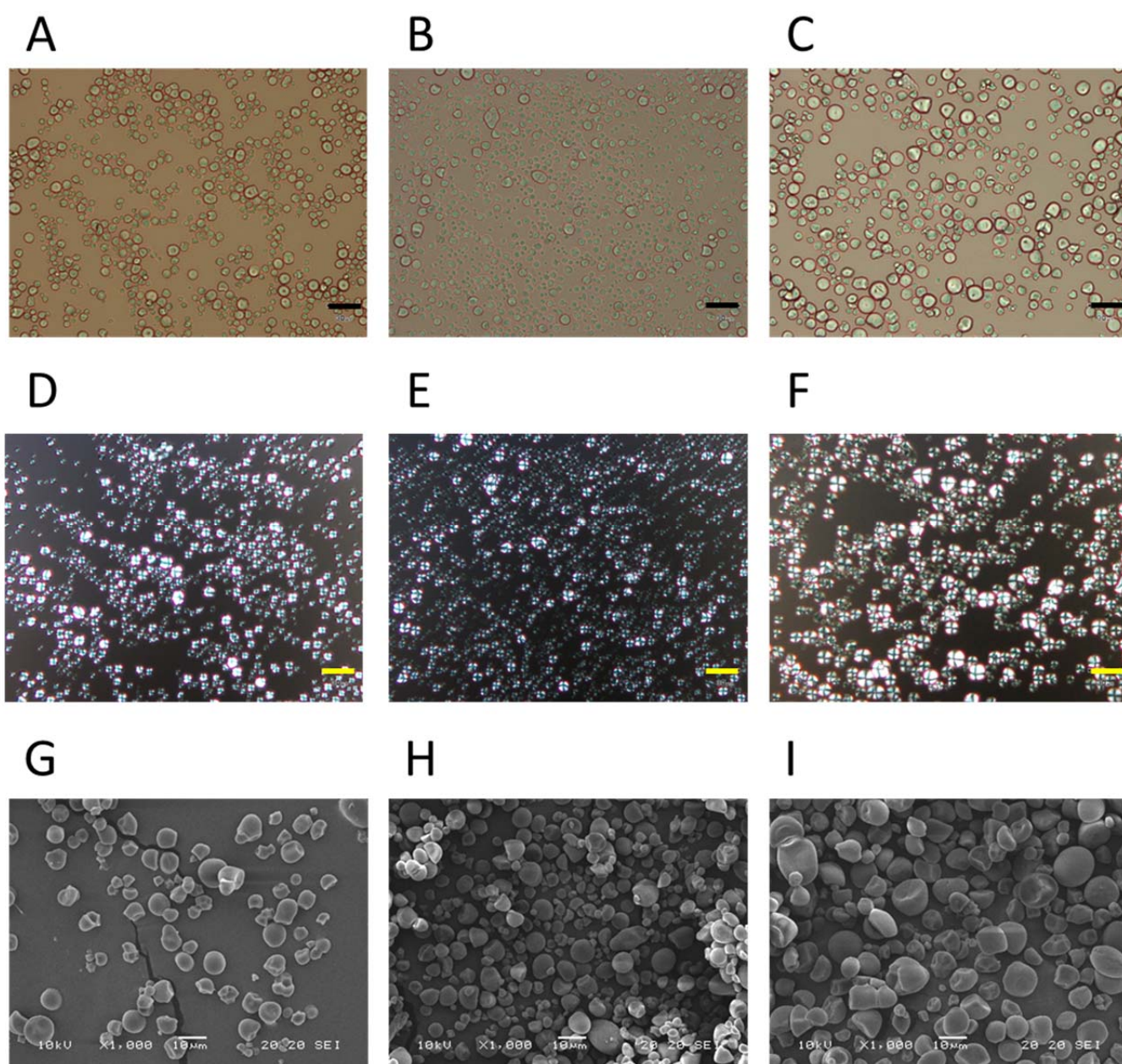


Fig. 1.3. Observation of culm starches.

A-C, Light micrograph; D-F, polarized micrograph; G-I, Scanning electron micrograph.

A, D, G, Yumeaoba; B, E, H, Koshihikari; C, F, I, Leafstar.

Bars in the micrographs indicate 30 μm (A-F) and 10 μm (G-I).

Partly taken from ref¹⁵⁷.

1.2.2 澱粉の構造特性

見かけのアミロース含量(AAC)、澱粉-ヨウ素複合体の最大吸収波長(λ_{\max})、ConA法によるアミロース含量を測定した結果をTable 1.1に示した。比較に用いた品種では、 λ_{\max} は胚乳澱粉で564~573nm、稈部澱粉で584~591nm、AACは胚乳澱粉で19.2~23.2%、稈部澱粉で25.8~30.4%、ConA法によるアミロース含量は胚乳澱粉で19.5~20.5%、稈部澱粉で20.2~25.8%と、胚乳澱粉と比較して稈部澱粉で大きな値を示し、また、各品種内でも稈部澱粉で大きな値を示した。

澱粉がヨウ素と複合体を形成することは古くから知られている。 λ_{\max} は鎖長に依存し、鎖長が長いほど λ_{\max} が大きな値を示すことから⁷⁾、直鎖部分の平均鎖長の目安として利用される。通常アミロペクチンの λ_{\max} は530~570、アミロースの λ_{\max} は640~660程度とされている²⁴⁾。アミロースとアミロペクチンの混合試料において、混合比が680nmにおけるヨウ素呈色度と比例することを利用し、混合試料のアミロース含量とヨウ素呈色度から検量線を作成する。ヨウ素-澱粉複合体の680nmにおける吸光度をこの検量線にあてはめ、AACが算出される。しかし、特にアミロペクチンの単位鎖の平均鎖長が長い場合には λ_{\max} が大きくなり680nmにおける吸光度を増加させることから、真のアミロース含量よりも高い値が算出されることになる。また、ConA法はアミロペクチンの複数の非還元末端と結合して沈澱することを利用した方法で、比較的真のアミロース含量に近い値が測定されることが多い。

胚乳澱粉ではConA法で算出されたアミロース含量とAACとの間の差は小さかったが、稈部澱粉ではConA法で算出されたアミロース含量に比べて、AACは明らかに高い傾向にあった。また、稈部澱粉では λ_{\max} の値が大きく、アミロペクチンの平均鎖長が長いことが示唆された。

Table 1.1 Wavelength of maximum absorbance (λ_{\max}) and amylose content of rice starches

Cultivar	Source	λ_{\max} (nm) ^a	Apparent amylose (%) ^b	Amylose (%) by ConA ^c
Yumeaoba	culm	584 ± 2	25.8 ± 0.5	20.2 ± 0.6
Koshihikari	culm	586 ± 1	30.4 ± 0.5	25.8 ± 0.2
Leafstar	culm	591 ± 2	30.3 ± 0.2	25.2 ± 0.5
Yumeaoba	endosperm	564 ± 1	19.4 ± 0.2	19.8 ± 0.3
Koshihikari	endosperm	564 ± 1	19.2 ± 0.3	19.5 ± 0.3
Leafstar	endosperm	573 ± 2	23.2 ± 0.6	20.5 ± 0.5

^a λ_{\max} was determined as the wavelength of the starch-iodine solution that yields maximum absorption.

^b The apparent amylose content was determined by the absorption of the starch-iodine complex at 680 nm.

^c The amylose content was determined by the ConA precipitation method.

各単離澱粉にイソアミラーゼを反応させて α -1,6 結合を切断した後に、HPSEC を用いて分析した結果を、Fig 1.4 に示した。また、全面積に対する各分画の面積比を Table 1.2 に示した。クロマトグラムは大きく Fraction I から III の 3 つのピークに分画できた。Fraction I は、アミロースおよびアミロペクチンの超長鎖、Fraction II と Fraction III はそれぞれアミロペクチンの長鎖 (B2 と B3 鎖) と短鎖 (A 鎖と B1 鎖) に分類される⁷⁸⁾。リーフスターとコシヒカリの稈部澱粉では、夢あおばの稈部澱粉と比較して Fraction I の面積比が大きく、アミロースと超長鎖の含量が高いことが示された。また、Fraction III/Fraction II の値が小さいことから、短鎖が少ないことが示された。また、胚乳澱粉と比較すると、稈部澱粉の Fraction III/Fraction II の値は小さく、Fraction I の値が大きいため、短鎖が少なく、アミロース含量またはアミロペクチンの超長鎖が多いことが示唆された。

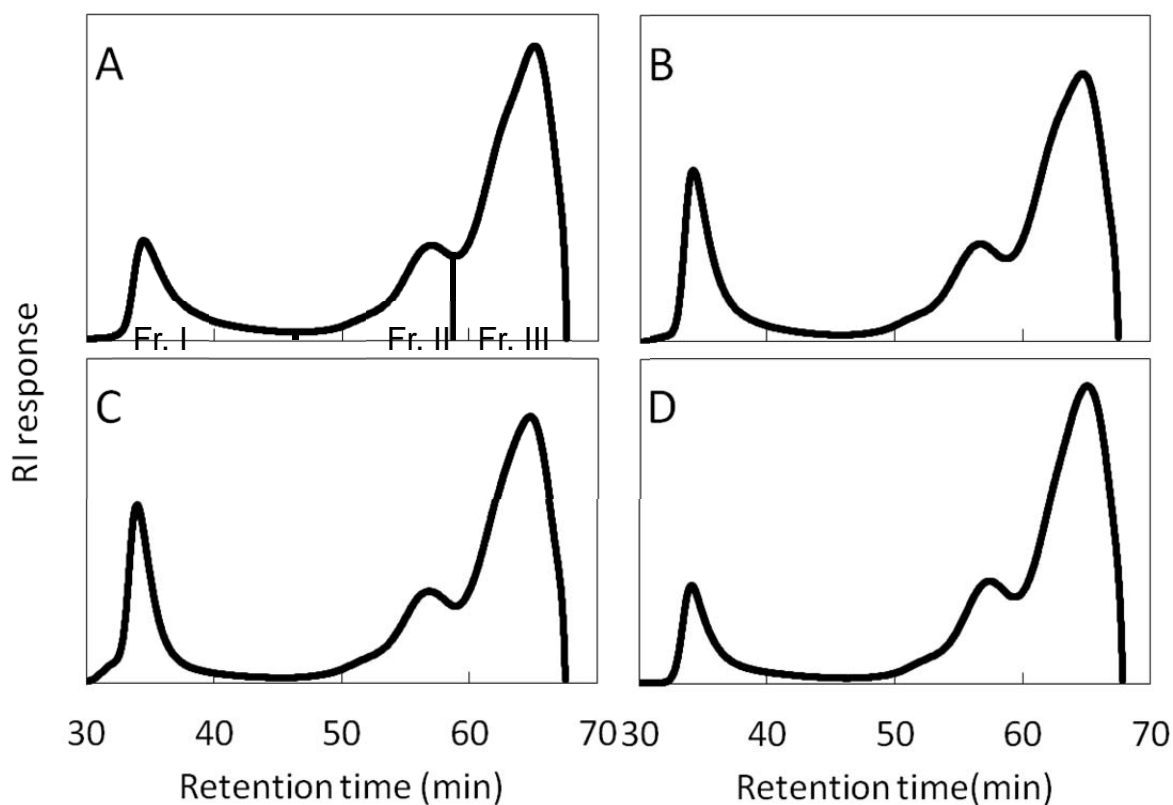


Fig. 1.4. Elution profile of debranched starches on HPSEC.

A, Yumeaoba culm; B, Koshihikari culm; C, Leafstar culm; D, Koshihikari endosperm.

Taken from ref ¹⁵⁷).

Table 1.2. Chain-length distribution of debranched starches

Cultivar	Source	Fractions of debranched starch ^a (%)			Ratio of Fr. III/Fr. II ^b
		Fraction I	Fraction II	Fraction III	
Yumeaoba	culm	17.0	19.9	63.1	3.2
Koshihikari	culm	20.5	20.5	59.0	2.9
Leafstar	culm	21.2	20.4	58.4	2.9
Yumeaoba	endosperm	12.5	20.2	67.3	3.7
Koshihikari	endosperm	13.4	21.5	65.0	3.0
Leafstar	endosperm	14.7	20.7	64.6	3.1

^a Fractions I, II, and III refer to percentages of each fraction areas to total area, as indicated in Fig. 4.

^b Ratio of Fr. III/Fr. II indicates the ratio of the short chains of amylopectin to the long chains of amylopectin.

次に、各単離澱粉にイソアミラーゼを反応させて α -1,6 結合を切断した後に、HPAEC-PAD を用いて分離することによりアミロペクチンの単位鎖の分布を測定した (Fig. 1.5)。この分析では、ピークが重合度 (DP) 毎に DP70 程度まで分離する。糖鎖が長くなると PAD の検出感度が低下するため、鎖長間の量の比較は困難であるが、試料間の鎖長分布パターンを詳細に比較することができる。Fig. 1.6 に、総ピーク面積に対する各ピークの面積比として分布を計算した後、二種類の澱粉試料間での分布パターンの差分を示した。コシヒカリとリーフスターの稈部澱粉は似たような分布を示し、夢あおば稈部澱粉はこれに比べて、短鎖長のものが多かった (Fig 1.6 A)。また、コシヒカリ胚乳澱粉は夢あおば稈部澱粉に比べてさらに短鎖長のものが多いことが示された (Fig. 1.6 B)。本結果を基に、重合度の面積の合計で比較した数値を Table 1.3 に示した。DP6-12 はアミロペクチンの A 鎖、DP13-24 は B1 鎖、DP25-36 は B2 鎖、DP37-は B3 に相当すると考えられる。コシヒカリとリーフスターは、夢あおばに比べて、DP6-12 の割合が低く、DP13-24 が高かった。夢あおばは、コシヒカリの胚乳澱粉と比較して DP6-12 の割合が低く、DP13-24 の割合が高かった。

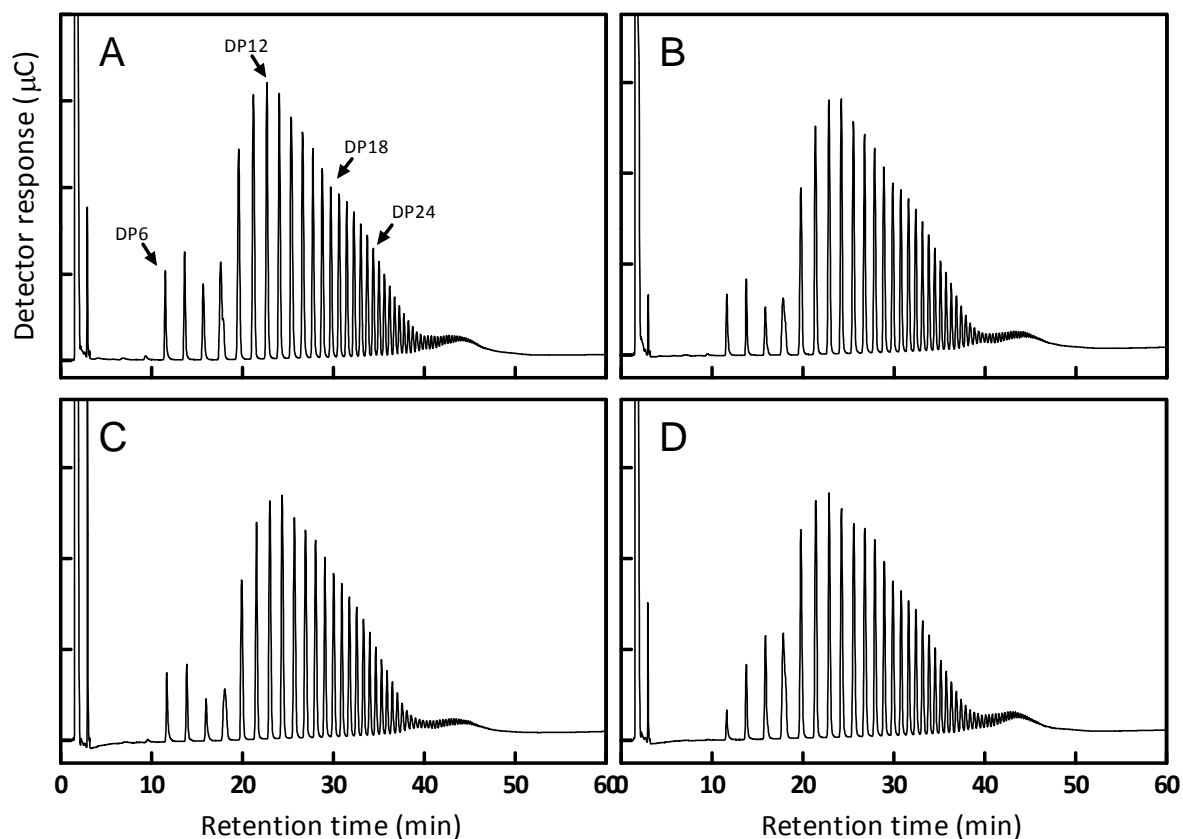


Fig. 1.5. HPAEC-PAD profiles of debranched starch samples.

A, Yumeaoba culm; B, Koshihikari culm; C, Leafstar culm; D, Koshihikari endosperm.

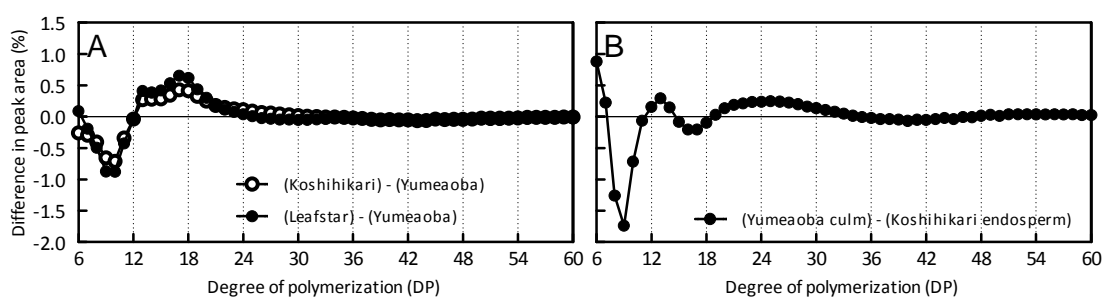


Fig. 1.6. Differences in the chain-length distribution patterns of debranched starches on HPAEC-PAD.

A, Chain length differences between culm starches of Yumeaoba and Koshihikari (open circle) and Yumeaoba and Leafstar (solid circle); B, Chain length difference between Yumeaoba culm starch and Koshihikari endosperm starch.

Taken from ref ¹⁵⁷.

Table 1.3. Chain-length distribution of starches shown as sum of relative peak area determined by HPAEC-PAD

Cultivar	Source	DP6-12	DP13-24	DP25-36	DP37-
Yumeaoba	culm	26.9 b	49.6 a	12.6 b	8.5 a
Koshihikari	culm	24.2 c	52.7 b	12.8 b	7.9 a
Leafstar	culm	24.1 c	53.7 b	12.2 b	7.6 a
Koshihikari	endosperm	29.4 a	48.7 a	11.1 a	8.1 a

DP6-12, DP13-24, DP25-36, DP37-, sum of proportion of oligosaccharide chains with degree of polymerization of 6 to 12, 13 to 24, 25 to 36, 37 and above, respectively.

Values followed by the same letter within a column show no significant difference.

X線回折分析の結果を Fig. 1.7 に示した。稈部澱粉と胚乳澱粉は同じ回折パターンを示した。穀類澱粉は A 型の回折パターンを示すことが知られており、稈部澱粉でも同様の A 型結晶を取ることが示された。

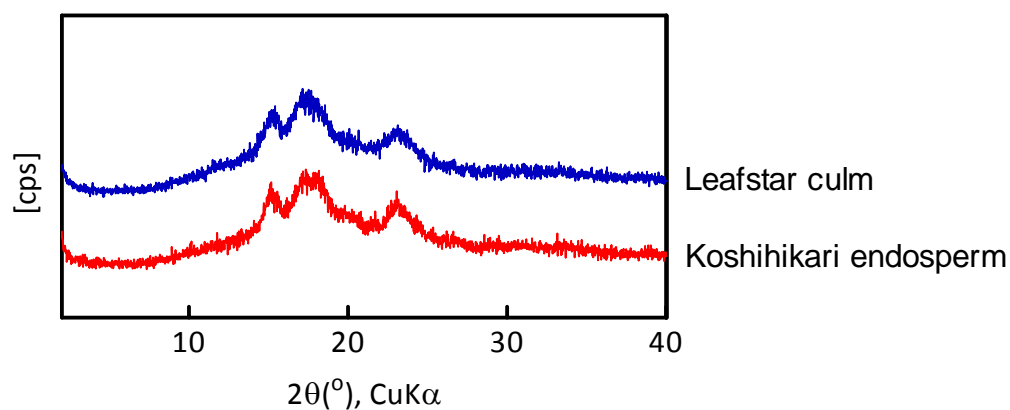


Fig. 1.7. X-ray diffraction patterns of starch samples.

1.2.3 澱粉の糊化特性および粘度特性

澱粉の構造特性が糊化特性に及ぼす影響を明らかにするため、DSCを用いて糊化温度および糊化エンタルピーを測定した (Fig. 1.8、Table 1.4)。夢あおば稗部澱粉の糊化温度および糊化エンタルピーは、コシヒカリ、リーフスターと比較して有意に低かった。

いずれの胚乳澱粉でも 100°C 付近のピークが明瞭に観察されたが、コシヒカリ稗部澱粉ではわずかに観察されるのみであり、夢あおばおよびリーフスター稗部澱粉では観察されなかった (Fig. 1.8)。このピークはアミロース-脂質複合体の解離によって生じ、ピーク面積は、澱粉のアミロース-脂質複合体の含量に比例することから、脂質を多く含む穀類澱粉の簡易なアミロース含量定量法としても利用される⁷⁹⁻⁸¹⁾。澱粉中の遊離脂肪酸含量は、夢あおばとリーフスターの稗部澱粉では少なかったものの、コシヒカリでは、稗部、胚乳澱粉で同程度の脂肪酸含量であった (Table 1.4)。稗部澱粉では、アミロースと脂肪酸は複合体を形成していないと考えられた。澱粉中のアミロースが脂質と複合体を形成している場合、澱粉粒の膨潤が抑制されることから、酵素分解性が低下することが報告されている⁵⁹⁾。アミロース-脂質複合体を含まない稗部澱粉は、酵素感受性が高いことが予測された。

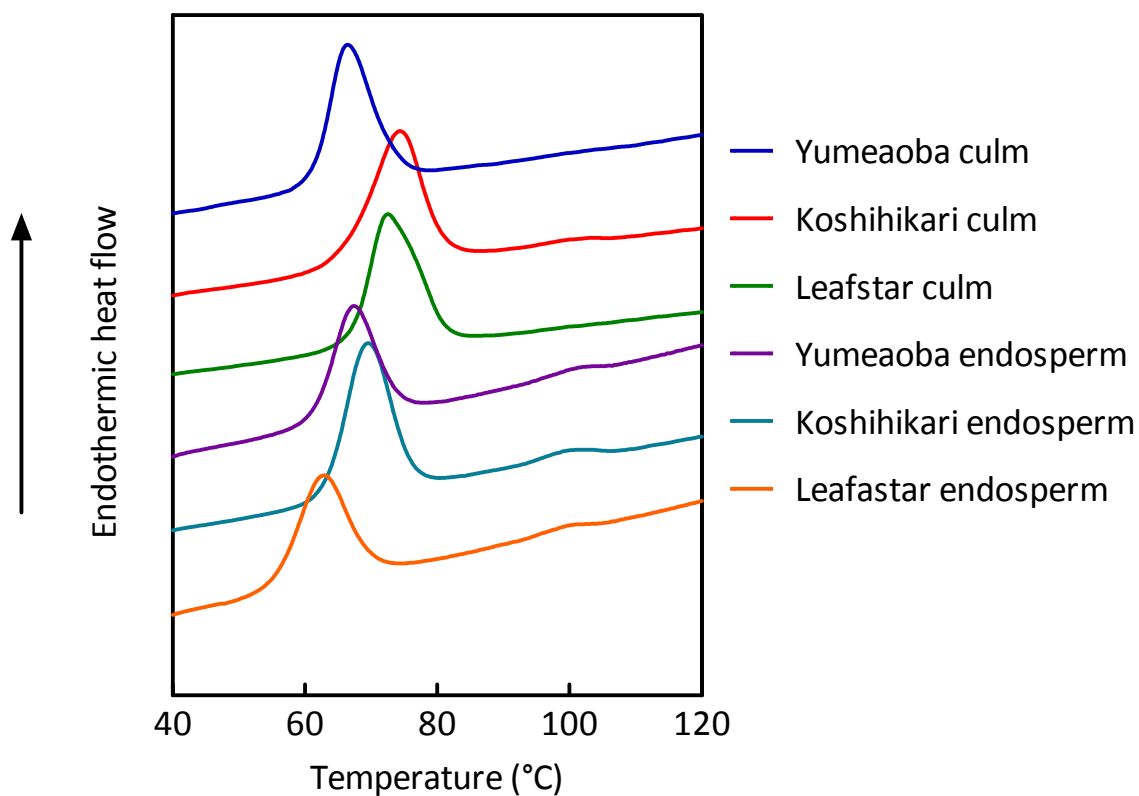


Fig 1.8. DSC thermograms of starches.

Table 1.4. Gelatinization properties of isolated culm starches^a

Cultivar	Source	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔH (J/g starch)	Lipid ($\mu\text{mol/g}$ starch)
Yumeaoba	culm	60.6 \pm 0.2	65.8 \pm 0.3	73.4 \pm 0.3	14.3 \pm 0.1	7.8 \pm 0.2
Koshihikari	culm	64.7 \pm 0.4	73.0 \pm 0.4	79.7 \pm 0.4	16.8 \pm 0.8	14.0 \pm 1.4
Leafstar	culm	66.4 \pm 0.2	71.7 \pm 0.2	80.5 \pm 0.2	15.5 \pm 1.0	7.7 \pm 0.3
Yumeaoba	endosperm	60.6 \pm 0.3	66.6 \pm 0.2	73.5 \pm 0.1	16.2 \pm 0.5	
Koshihikari	endosperm	62.3 \pm 0.3	68.6 \pm 0.1	75.5 \pm 0.1	15.9 \pm 0.1	16.8 \pm 0.2
Leafstar	endosperm	54.7 \pm 0.4	62.1 \pm 0.2	69.5 \pm 0.1	14.9 \pm 0.4	

^a To, gelatinization onset temperature; Tp, gelatinization peak temperature; Tc, gelatinization conclusion temperature; ΔH , gelatinization enthalpy

次に、粘度測定装置 Rapid visco analyzer (RVA) を用いて粘度特性の測定を行った。この装置は、試料の粘度を、温度調節しながら連続的に測定する回転式粘度計であり、澱粉懸濁液の測定の場合、温度上昇に伴う粘度上昇開始温度、最高粘度、最高粘度に達する時の温度、澱粉粒の崩壊による粘度の低下（ブレイクダウン）、冷却時の粘度上昇（セットバック）、最終粘度の値を澱粉の特性値として得る（Fig. 1.9）。

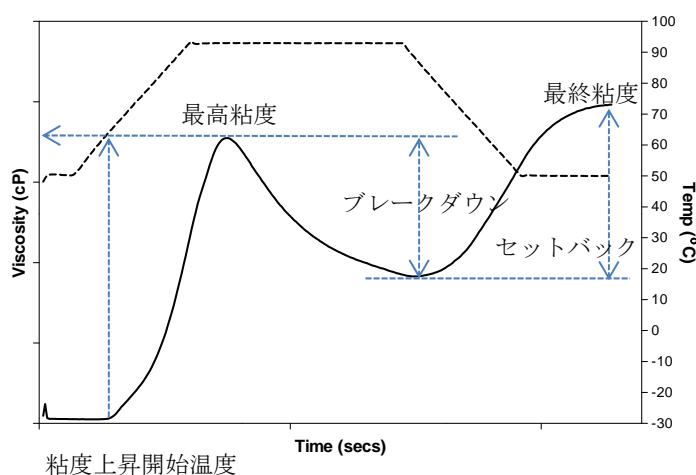


Fig. 1.9. Typical RVA pasting curve showing the commonly measured parameters.

代表としてコシヒカリ胚乳澱粉とリーフスターの稈部澱粉の測定結果を Fig. 1.10 に示した。稈部澱粉では胚乳澱粉と比較して、粘度上昇開始温度が高いにもかかわらず最高粘度に達するまでの時間が短く、最高粘度に達した後の粘度低下が緩やかで、最終粘度が高かった。加熱時の粘度変化には澱粉粒の膨潤と崩壊の程度と速度、冷却時には澱粉の老化が関与し、これらの現象には、澱粉粒サイズ、アミロース含量、アミロペクチン鎖長分布などの構造特性が関与していると考えられている。リーフスターの稈部澱粉はコシヒカリ胚乳澱粉よりも糊化開始温度が高く、粘度上昇開始温度の差と一致していた。稈部澱粉では粘度開始から急激に粘度が上昇していることから、膨潤を妨げる要因が少なく、

急激に吸水、膨潤していることが推察された。モチ性澱粉などアミロースを含まない澱粉でも同様の現象が観察される⁸²⁾。稈部澱粉には膨潤を抑制するようなアミロース-脂質複合体が胚乳澱粉と比較して少ないことと一致する結果となった。粘度低下は膨潤速度よりも澱粉粒が崩壊する速度が早くなったために起こるとされている⁸³⁾。稈部澱粉では崩壊が緩やかで、せん断安定性が胚乳澱粉より高いことが推察された。

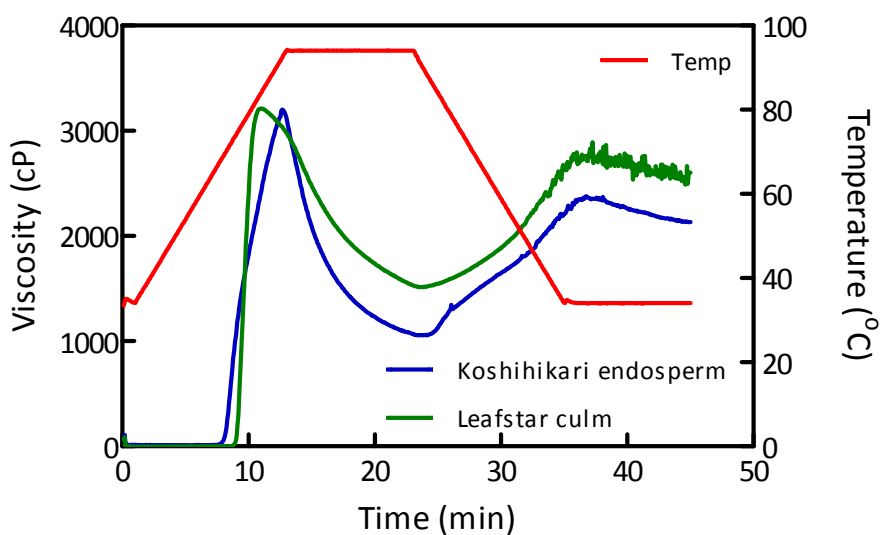


Fig. 1.10. RVA pasting curves of Koshihikari endosperm starch and Leafstar culm starch samples.

1.2.4 澱粉の糖化特性

稈部澱粉の糖化は、耐熱性アミラーゼを用いて 60、70、80℃にて測定した。

Fig. 1.11 に夢あおば稈部澱粉、リーフスター稈部澱粉、コシヒカリ胚乳澱粉について酵素分解反応の経時変化を示した。反応速度は、品種、部位、反応温度によって異なっていた。

これまでの構造特性の解析から、夢あおばの稈部澱粉では、他の稈部澱粉と比べて酵素との接触機会が多くなることが予想された。リーフスター稈部澱粉と比較すると、60℃、70℃では、いずれも夢あおば澱粉の初速度が速かった。60℃は、夢あおば、リーフスターのいずれの稈部澱粉も糊化開始温度以下であるため、生澱粉の糖化と相当の状態であるが、アミロペクチンの鎖長分布、アミロース含量、澱粉の結晶度、粒子サイズのいずれも夢あおばでの糖化性が高くなる条件であった。70℃では、夢あおば稈部澱粉はすでに糊化していると考えられた。80℃では、夢あおば、リーフスターのいずれの稈部澱粉の糊化開始温度よりも高く、糊化しており、同等の速度となった。胚乳澱粉ではいずれの反応温度でも速度は遅かった。これは、アミロースが脂質と複合体を形成しているために膨潤が抑制されたためと考えられた。

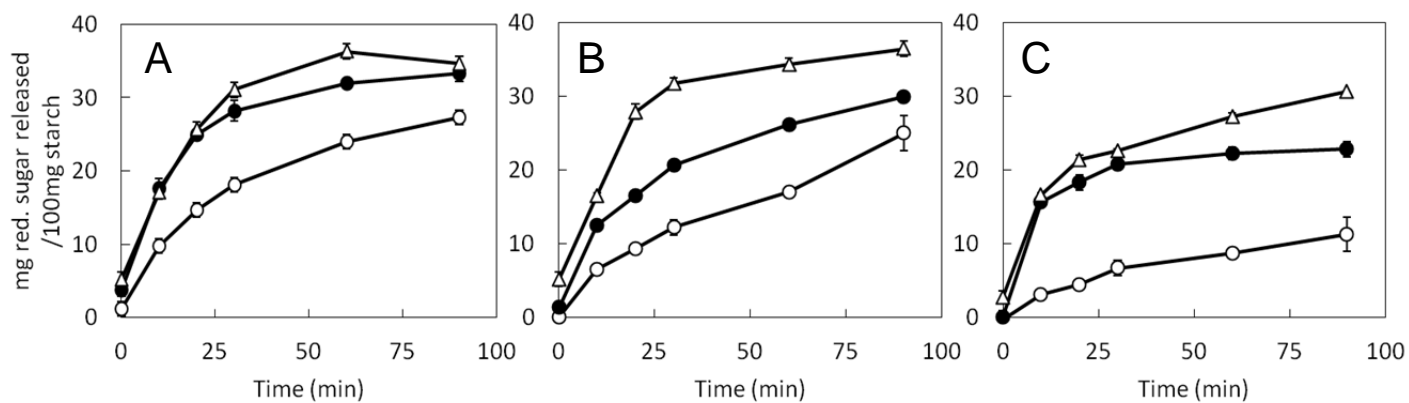


Fig. 1.11. Saccharification of starches by thermostable α -amylase.

A, Yumeaoba culm; B, Leafstar culm; C, Koshihikari endosperm. ○: saccharification at 60°C,

●: at 70°C, and △ at 80°C.

Taken from ref ¹⁵⁷.

1.3 まとめと考察

本章では、稈部澱粉の構造が供試品種ごとに異なることを、澱粉粒子サイズ、アミロース含量、アミロペクチン鎖長分布、糊化特性などにより解明するとともに、構造特性の差が糊化特性と酵素感受性を特徴付けていることを示すデータを得ることが出来た。また、各単離澱粉間の特性には幅があるものの、コシヒカリ由来の胚乳澱粉と比較して、かけ離れた特性を示すものは存在しないことが確認できた。

葉身、葉鞘、稈部の澱粉含量は稲の成長に伴い変化する。稈部の場合成熟期まで生育するのに対し、葉身、葉鞘の場合には寿命があり、穂の稔実が完了する前に下位葉から枯死する。枯死とともに澱粉が消失するため、多くの葉が枯死した成熟期には、澱粉があるのは稈部ということになる。施肥条件、環境条件、品種により、枯れ上がりの進行が異なる。今回用いた夢あおばは、他の二品種と比較して、成熟期の葉身、葉鞘の枯死程度が低かったため、葉身、葉鞘部分の澱粉が消失しておらず、稈部への集積程度が低かったと考えられる。

胚乳澱粉が通常多角形のもののみで構成されるのに対し、稈部澱粉の形状が多様であることから、生合成の場、時期が多様であることが推測される。リーフスターでは、登熟中に稲わら中の澱粉重量が減少することなく、増加し続けることが特徴とされている⁸⁴⁾。リーフスターの稈部澱粉の粒径が大きいことは、稈部での澱粉量の増加に関与していると考えられる。

本章の結果から、稈部と胚乳の澱粉の構造が異なることが示された。澱粉の生合成には、少なくとも、ADP-グルコースピロホスホリラーゼ、スターチシンターゼ、枝作り酵素（ブランチングエンザイム）、枝切り酵素（デブランチングエンザイム）の4種類の酵素群が関与している。それぞれの酵素には複数のアイソザイムが存在することが知られており、発現しているアイソザイムによって澱粉の構造が変わることが知られている。エンドウマメでは、葉と胚乳に

含まれる澱粉では構造が異なっており、両者で発現しているスターチシンターゼと枝作り酵素のアイソザイムがタンパク質レベルで異なることが示されている^{85,86}。異なるアイソフォーム間では反応特異性が異なることから、その発現パターン相違はアミロース含量やアミロペクチンの構造の決定に重要な役割を果たすと考えられる。

出穂期の稲の茎葉と胚乳では、異なるアイソフォームの澱粉合成関連酵素が発現していることが示されている^{87,88}。稲の胚乳では枝作り酵素 Branching enzyme (BE) I と BEIIb が、葉では BEIIa が発現している。BEI と BEII では基質となる α -1,4 鎖（基質鎖）と転移される α -1,4 鎖（転移鎖）の鎖長が異なっており、BEI は DP10-12 の鎖を転移するのに対し、BEIIa は DP6-10 の鎖を転移し、BEIIb は DP12-14 の外部鎖から DP6 と 7 のみを転移する⁸⁹。BEIIb の反応特異性は高く、BEIIb の欠如した変異体では DP17 以下の短鎖が激減する。稈部澱粉で BEIIb が発現せず BEIIa が発現していることで、DP6-12 の割合が低く、DP13-24 の割合が高くなっている可能性がある。

また、胚乳では澱粉合成酵素 Starch synthase (SS) I、SSIIa および SSIIIa が、葉では SSI、SSIIb および SSIIIb が発現している。SS は非還元末端からの鎖長を認識して、SSI は DP6,7 の鎖を伸長して DP8,9 の短鎖を生成し、SSIIa は DP10 を認識して DP24 を生成する。SSIIIa はさらに長鎖を生成している。SSIIb および SSIIIb の反応機構についての詳細は不明だが、認識鎖長および生成鎖長が異なっている可能性がある。

さらにアミロース合成に関わる澱粉粒結合性合成酵素 Granule bound starch synthase (GBSS) については、胚乳では GBSSI、茎葉では GBSSII のみ発現している。胚乳と葉で発現している GBSS のアイソフォームが異なることから、胚乳と茎葉のアミロース含量には相関がなく、胚乳がモチ性の品種でも、茎葉澱粉にはアミロースが含まれていることがある^{90,91}。本章の結果でも、茎葉と胚

乳ではアミロース含量とアミロペクチンの構造が異なっていた。

澱粉-ヨウ素複合体形成に関わる鎖長が長いほど λ_{\max} は大きな値となる。稗部澱粉の λ_{\max} は胚乳澱粉の λ_{\max} と比較して大きな値となったことから、稗部澱粉には胚乳澱粉と比較して鎖長の長いものが存在することが示唆された。また、AAC はアミロペクチンの単位鎖の鎖長分布を反映することが知られており、アミロペクチンの鎖長の長いものが多い場合に、真のアミロース含量と比較して高い値を示す⁹²⁾。ConA 法は、アミロペクチンの複数の非還元末端グルコースと ConA が結合して沈澱し、アミロースのように非還元末端グルコースが 1 つの場合は沈澱しないことを利用した測定法であり、アミロペクチンの鎖長分布の影響を受けないが、アミロースの分岐の割合が高い場合に、アミロースを沈澱させることにより真のアミロース含量と比較して低い値を示す可能性がある。AAC と ConA 法で求められるアミロース含量が異なる値を示す場合、鎖長の長いアミロペクチンや、ConA が結合できる分岐の多いアミロースの分子の存在が考えられる⁹³⁾。今回の測定の中で、コシヒカリの胚乳澱粉では、ConA 法で測定したアミロース含量と AAC との間に有意な差は認められなかった。一方、稗部澱粉では、ConA 法によるアミロース含量と比較して AAC が高く、アミロペクチン長鎖の割合が高く、アミロースの分岐が多い可能性が示唆された。

茎葉澱粉は先にも述べたとおり増減を繰り返しているため、澱粉の構造には、合成酵素のみならず分解酵素の影響もあると考えられる。稲が発芽する際の胚乳澱粉の分解には、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、枝切り酵素、 α -グルコシダーゼが関与していることが知られている⁹⁴⁾。また、稲の葉鞘では、全容は解明されていないものの、 α -アミラーゼと β -アミラーゼが澱粉の分解に関与していることが示唆されている^{95,96)}。稗部の澱粉では、生育に伴って小さくなる時、表面構造にほとんど変化がないまま小粒化することが確認されている¹⁵⁾。これは、発芽時に胚乳澱粉が分解される際に澱粉の表面に多数の穴が空き、浸食が

進んで行く様子とは異なるものであり、関与する酵素や澱粉の構造の相違が推測される。稈部澱粉では特にアミロペクチンの房状モデルにおける A 鎖に相当する DP6-12 の割合が低いことから、外側にある A 鎖が分解されている可能性がある。胚乳澱粉では、理由は不明であるが、DP5 以下の鎖長の側鎖が殆ど存在しない。澱粉を α -アミラーゼまたは β -アミラーゼで分解すると、 α -1,6 結合の近傍に分解できない部分があり、イソアミラーゼで切断した後の鎖長分布分析では、DP5 以下の鎖長の分子が多数検出される。稈部澱粉の分析では、DP5 以下の鎖長は検出されなかった。 α -アミラーゼまたは β -アミラーゼ以外の、 α -1,6 結合を切断する酵素が関与している可能性があると考えられる。しかし、今回用いた稈部澱粉は、成熟期の澱粉が増加している時期に採集しているため、構造への分解酵素の影響は小さい可能性がある。

アミロペクチンの鎖長分布と糊化特性の関係については詳細に調べられている⁹⁷⁻¹⁰¹⁾。アミロペクチンの側鎖は結晶領域中の二重らせん構造形成に関与し、アミロペクチンの短鎖が多い場合、結晶性の程度が低下して、糊化温度と糊化エンタルピーが低下することが知られている^{100, 102)}。夢あおば稈部の澱粉では、糊化温度と糊化エンタルピーがともにコシヒカリおよびリーフスターと比較して低かった。fraction III と fraction II の比 (Table 1.2) や DP6-12 と DP13-24 の相対ピーク面積 (Table 1.3) から明らかなように、短鎖の含量が高く、長鎖の含量が低いことが原因で結晶性の程度が低下したと考えられる。

糖化性解析の結果、茎葉澱粉においても、構造特性が糖化性を推測するための判断材料となりうることを確認された。茎葉澱粉構造に着目した稲わら原料特性の改良を考えた場合、例えばコムギの SGP-1 null 系統や¹⁰³⁾、サツマイモのクイックスイート¹⁰⁴⁾に見られるような、アミロペクチンの短鎖の割合が高い材料は、未糊化澱粉の糖化に適していると考えられる。

稲わらの前処理技術「RT-CaCCO 法」では、非加熱条件で茎葉に存在する澱

粉を効率的に酵素糖化するための技術開発が鍵となる。本章での解析の結果、効率的な糊化がおこる温度は 70°C から 80°C であり、温度処理が必要であることが示された。一方、RT-CaCCO 法で採用している水酸化カルシウムによる前処理条件により、温度処理することなく澱粉を糊化状態に出来る可能性がある。そこで、次章では、澱粉の水酸化カルシウム処理が酵素糖化率に及ぼす影響について解析する。

第2章 水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和が澱粉の糊化特性および糖化特性に及ぼす影響の解析

本章では、水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和処理が澱粉の糊化特性および糖化特性に及ぼす影響について詳細に検討し、RT-CaCCO 法条件下での澱粉の糖化効率の最適化を図ることを目的とした。

RT-CaCCO 法で繊維質の前処理時に用いる水酸化カルシウムは、澱粉の糊化を促進することが知られているが、その一方で、カルシウムイオンはアルカリ中でイオン化した水酸基と結合し、さらに架橋を形成して澱粉構造の安定化に働き糊化を抑制することが指摘されている⁶⁴⁾。このように、糊化の促進および抑制という、相反する効果を示す可能性があることから、前処理条件は、双方の影響を考慮した上で、適切な構造変化を促すように設定する必要がある。

水酸化カルシウムが澱粉の特性に及ぼす影響については、ほとんどがトルテイヤ製造との関連において研究されている。トウモロコシを水酸化カルシウム溶液中で煮る *nixtamalization* の工程では、澱粉粒は部分的に膨潤、糊化する。澱粉が部分的に糊化している様子は、SEM 観察、偏光顕微鏡観察、DSC 測定、X 線回折実験などによって示されている¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。Bryant は膨潤度、保水力、糊化特性の測定から、水酸化カルシウムの濃度が 0.4% w/v までは澱粉の糊化が促進され、それ以上では澱粉粒構造が安定化したと報告している⁶³⁾。しかし、Robles は、アミログラフによる粘度測定では水酸化カルシウム濃度 0.1% 以下で膨潤度が増加するとしながら、ヨウ素で染める青価法を用いた澱粉の糊化度の測定では、糊化が阻害されると報告している¹⁰⁸⁾。また、Rodríguez らは、X 線回折実験により、水酸化カルシウム濃度が 0.2% w/v 以下では結晶性が向上し、それ以上の濃度では結晶性が低下すると報告をしている¹⁰⁹⁾。このように、整合性のとれない報告があるため、構造変化を解析して適切な変化を促す条件を確認する必

要がある。そこで、RT-CaCCO 法の工程に従って、水酸化カルシウムの濃度、温度処理、二酸化炭素中和が澱粉の構造特性に及ぼす影響を、RVA および DSC を用いて解析した。

2.1 実験材料および方法

2.1.1 材料

本章でモデル澱粉として用いる試料として、つくば市内の直売所で購入したコシヒカリの穀粒から、アルカリ浸漬法を用いて単離した澱粉を用いた²⁸⁾。リーフスターの稈部澱粉は、第1章で単離した澱粉を用いた。アミロース (EX-III) は林原 (岡山) 製を用いた。水酸化カルシウムおよび炭酸カルシウムはナカライテスク社製の特級試薬を用いた。*Bacillus* α -アミラーゼ (A-6380) は、Sigma-Aldrich 社製 (St. Louis, USA) を用いた。 α -アミラーゼ活性は Ceralpha 法 (Megazyme International Ireland, Wicklow, Ireland) を用いて測定した。アミログルコシダーゼ (*Aspergillus niger* 由来、可溶性澱粉を基質としたときの活性が 3260 U/mL) は Megazyme International Ireland 社製を用いた。特に断りがない限り、水は MilliQ (Millipore, Billerica, USA) で製造した超純水を用いた。その他試薬は、特級試薬を用いた。

2.1.2 澱粉の糊化特性の測定

水酸化カルシウムまたは炭酸カルシウムが澱粉の糊化に及ぼす影響を調べるため、DSC を用いて糊化特性の測定を行った。澱粉試料の乾物重に対して 0、5、10、15、20% w/w の水酸化カルシウムまたは相当量の炭酸カルシウムを加え、澱粉 : 水が重量比で 1 : 5 となるように水を加えてスラリー状にした。炭酸カルシウムの場合は、水酸化カルシウムとモル濃度を合わせるため、0、5、10、15、20% w/w のサンプルに対応して、炭酸カルシウムとして 0、6.75、13.5、20.25、27.0% w/w を加えた。水酸化カルシウムの濃度は、RT-CaCCO 法で使用される濃度を参考に設定した。約 50 mg のスラリーを O-リング密閉式ステンレススチール製大容量カプセルに量り取った。また、二酸化炭素中和の影響を調べるため、

次項に述べる方法で水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和を行った後、スラリーを $10,000 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を 3.5 mL 取り除いた後、残りのスラリーを再度懸濁してサンプルカプセルに約 50 g を量り取った。DSC の測定は 1. 1. 3 と同様、Diamond DSC (Perkin-Elmer, Shelton, USA) を用いて行った。

2.1.3 澱粉の粘度特性の測定

水酸化カルシウムが澱粉の粘度特性に及ぼす影響を調べるため、粘度分析装置 RVA-4 (Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia) を用いて粘度特性の測定を行った。RVA の容器に澱粉試料 (2.2 g)、水酸化カルシウム (澱粉試料に対して 0、1、5、10、15、20% w/w)、水 20 mL を入れて懸濁した。羽は毎分 160 回転させ、設定温度は、35°C で 1 分保持した後に 12 分で 95°C まで昇温し、95°C に 10 分間保ち、その後 12 分で 35°C まで降温し、35°C で 10 分間保持とした。

2.1.4 澱粉の水酸化カルシウム処理および二酸化炭素による中和

澱粉試料 (乾物重で 100 mg) を 10 mL のバイアルに取り、澱粉試料の乾物重に対して 0、5、10、15、20% w/w の水酸化カルシウムを加えてよく混合した。4 mL の水を加えてスラリー状にした後にブチルゴム栓とアルミキャップで密閉した。処理条件は、25°C で 7 日間 (RT 処理) または 40°C、50°C、60°C で 6、12、24、48 時間 (温度処理) とした。水酸化カルシウム処理を行った澱粉は、二酸化炭素で中和した。バイアル瓶内のガスを二酸化炭素で置換し、二酸化炭素圧 0.15 MPa で 20 分間保持した⁵¹⁾。

2.1.5 澱粉の X 線回折測定

水酸化カルシウム処理が澱粉の結晶構造に及ぼす影響を調べるため、水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和した澱粉試料の X 線回折の測定を行った。

試料は両面テープでガラス板に固定した。X線回折装置 (RAD-X システム、(株)リガク、東京) を用い、X線源 Cu-K α 線 (湾曲結晶モノクロメータ使用)、X線管電圧 40 kV、X線管電流 25 mA、発散および散乱スリット 1 $^\circ$ 、受光スリット 0.3 mm、モノクロメータスリット 0.6 mm、ゴニオメータ一走査速度 2 $^\circ$ /min、ステップ 0.02 $^\circ$ の条件で測定した。

2.1.6 澱粉の FT-IR 測定

水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和した澱粉試料の赤外吸収スペクトル (FT-IR) 測定は、フーリエ変換型赤外分光光度計 (FT-720、(株)堀場製作所、京都) を用い、波長域 600~4,000 cm $^{-1}$ 、DuraSampl IR II $^{\text{TM}}$ を用い、積算 25 回でダイヤモンド ATR (attenuated total reflection) 法により測定した。

2.1.7 澱粉の X線光電子分光法による元素の化学結合状態測定

X線光電子分光分析 (XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy あるいは ESCA: Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) においては、粉末試料を Mo 板上の In 片上に置き、Al 箔で覆った後、プレス機で荷重を加え、In 中に粉末試料を埋め込む方法¹¹⁰⁾を用いた。加圧後、Al 箔を取り除き、測定試料とした。測定には Gamdata-Scienta AB (スウェーデン) の ESCA-300 を用い、以下の条件で行った。励起線: AlK α (モノクロメータ使用)、X線出力: 1 kW (10kV \times 0.1A)、スリット: 0.3 mm Curve、TOA (take of angle) : 90 $^\circ$ とした。試料室の真空度は、10 $^{-7}$ Pa オーダーであり、測定時には、帯電補正のために Gamdata-Scienta AB の中和銃、Flood gun 300 を KE (kinetic energy) = 4.00 eV の条件で用いた。ワイド測定においては、PE (pass energy) = 300 eV、step size = 1 eV、time/step = 0.133 s、スイープ回数を 1 回、ナロー測定においては、PE = 75 eV、step size = 0.03 eV、time/step = 0.333 s、スイープ回数を 2 回とした。また、別途 Ca2p のみ 8 回の測

定を行った。解析には、装置付属の専用統計処理ソフトウェアを用いた。特にナローズペクトルに対しては、Shirly 法を用いてピークにバックグラウンドを引き、Voigt 関数 (Gauss 関数と Lorentz 関数の複合関数) によりピーク分離を行った。

2.1.8 アミロース-脂質複合体の調製

アミロース-脂質複合体 (amylose lipid complex, ALC) のモデル物質として、アミロース-パルミチン酸複合体 (APC) を Kugimiya らの方法¹¹⁾に従って調製した。アミロース EX-III (350 mg) を 20 mL の 2 N 水酸化ナトリウムに溶解した。アミロース溶液をよく攪拌しながら、0.4 mL の 10% パルミチン酸エタノール溶液を滴下した。5 分間激しく攪拌した後、2 N 塩酸で中和し、70°C で攪拌しながら 4 時間加熱した。室温で一晩静置し、沈澱を得た。3000 × g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、沈澱に水を加えてよく懸濁し、遠心分離する洗浄を 4 回繰り返した。沈澱は 30°C で減圧乾燥した。ALC の糊化特性は、2.1.3、水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和の影響は 2.1.4 に従って測定した。

2.1.9 澱粉の糖化特性

澱粉の前処理後の酵素糖化特性を解析するため、澱粉または ALC 試料に対して、上記の水酸化カルシウム処理、二酸化炭素による中和等の処理を行った後、 α -アミラーゼを用いて糖化を行った。1 mL の酵素溶液 (1 Ceralpha Unit の *Bacillus* α -アミラーゼ、0.1 M マレイン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0、0.03% 塩化カルシウム、および 0.02% アジ化ナトリウムを含む) をサンプルバイアル瓶に加え、50°C で反応させた。この酵素の至適温度は 65°C であるが、RT-CaCCO 法では 50°C で糖化反応を行うため、反応温度は 50°C とした。一定時間 (1、2、4、8、24、

48 および 72 時間) 毎に約 50 μL ずつサンプリングした。アミラーゼ糖化物をグルコース当量で示すため、15,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) を用いてグルコース当量 0.5 mg/mL 以下となるように適宜希釈した後に、100 μL のサンプルに 3.0 U のアミログルコシダーゼを加えて 50°C で 30 分間反応させ、溶液中のグルコース濃度をグルコース C-II テストキットワコー (和光純薬工業株式会社) で測定した。ここで用いたアミログルコシダーゼは、アミロースおよびアミロペクチンの非還元末端より α -1,4 および α -1,6 結合を加水分解し、 β -D-グルコースを生じる酵素であり、糖化後の上清中に含まれる全糖量を測定するために過剰に添加し、至適温度 (添付情報によると 60°C より低い) に近い温度で反応を行った。

2.1.10 統計処理

線形回帰分析および Tukey 法による多重比較は、GraphPad Prism software (version 5.02 for Windows) を用いて行った。

2.2 結果

2.2.1 水酸化カルシウム濃度が澱粉糊化に及ぼす影響

水酸化カルシウム存在下、リーフスターの稈部澱粉およびコシヒカリ胚乳澱粉試料の DSC 糊化曲線を Fig. 2.1 に示した。水酸化カルシウム濃度の上昇に従って、次のことが観察された。①水酸化カルシウム濃度の上昇に伴い、アミロペクチンの水素結合切断による結晶構造の崩壊に由来するピークの糊化温度が上昇し、糊化エンタルピーが減少した。②水酸化カルシウム濃度が 10%以上の時、糊化曲線のベースラインが発熱側へシフトした。③水酸化カルシウム濃度の上昇に従い、胚乳澱粉ではアミロース-脂質複合体由来 (ALC) のピークが消失した。

稈部澱粉は、胚乳澱粉と比較して形状が多様であることは第 1 章で観察されたとおりであるが、稈部における澱粉含量も増減を繰り返していることから、構造的にも多様であることが推測された。リーフスター稈部澱粉の DSC 糊化曲線ではピークの形状が対称でなく、少なくとも二つのピークが存在することが観察された。1.2.3 で示したとおり、リーフスター稈部澱粉では ALC 由来ピークが観察されないため、水酸化カルシウムによる影響として上記の③については当てはまらないが、稈部澱粉と胚乳澱粉で①、②については同様の効果が認められたこと、澱粉が均質でないために解析が複雑になることが予想されたことから、以下の実験では、モデル物質として、コシヒカリ胚乳澱粉を用いることとした。

水酸化カルシウム非存在下では 2 つの吸熱ピークが観察される。穀類澱粉では、それぞれ糊化ピーク温度 T_p が 69.6°C の吸熱ピークはアミロペクチンの崩壊、 T_p が 99.1°C の吸熱ピークは ALC の崩壊によるものと帰属されている¹¹⁾。①糊化温度の上昇および糊化エンタルピーの減少について、糊化温度 (糊化開始温

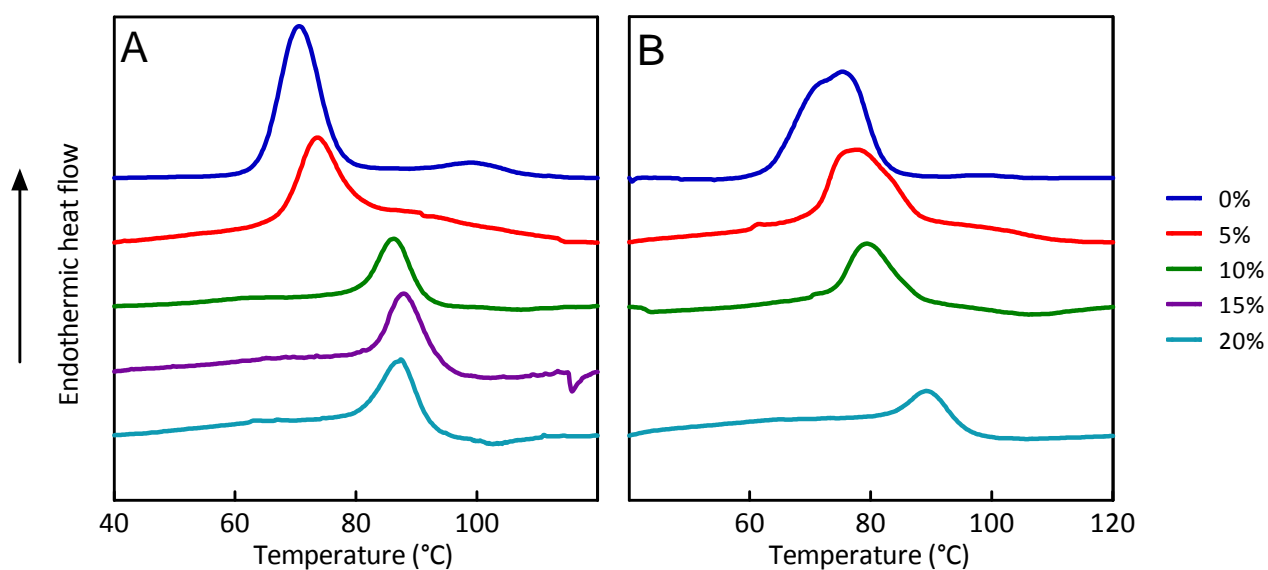


Fig. 2.1. DSC profiles of rice starches at different Ca(OH)_2 concentrations.

Starch sources are A: Koshihikari endosperm; B: Leafstar culm. The numbers indicate Ca(OH)_2 concentrations (w/w) as percentage of dry starch.

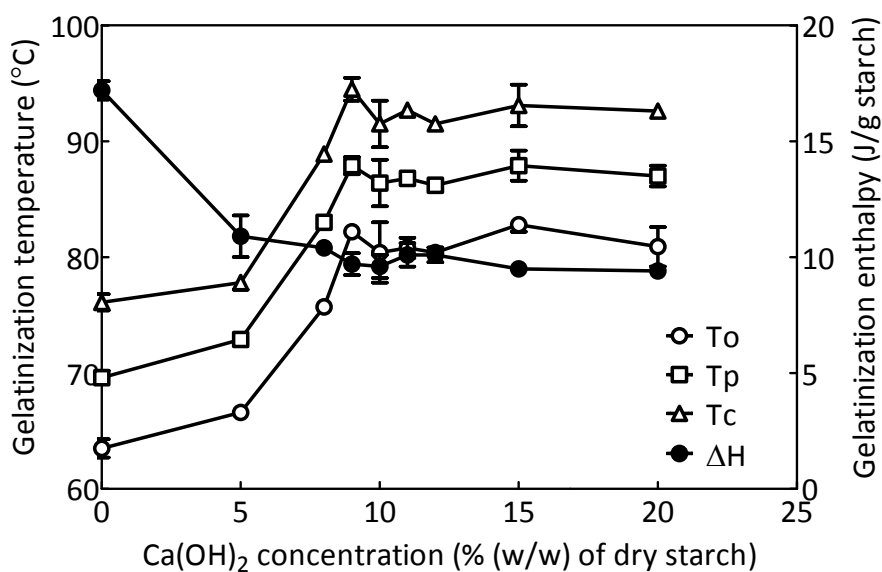


Fig. 2.2. Effect of Ca(OH)_2 concentrations on gelatinization temperatures and gelatinization enthalpies of rice starch. Taken from ref¹⁵⁸.

度 T_0 、糊化ピーク温度 T_p および糊化終了温度 T_c) と糊化エンタルピー ΔH を水酸化カルシウム濃度に対してプロットした図を Fig. 2.2 に示した。水酸化カルシウム濃度 10%以下では、水酸化カルシウム濃度が上昇するに従い糊化温度も上昇した。その一方で、同じ濃度範囲内で、 ΔH は水酸化カルシウム濃度上昇とともに減少した。10%以上の濃度では、糊化温度、 ΔH ともに一定の値を示した。

②ベースラインの発熱側へのシフトについて、水酸化カルシウム濃度が 10%以上のとき、ベースラインが発熱側にシフトする現象が観察された (Fig. 2.1)。水酸化カルシウムが含まれない場合には、吸熱現象の後にエネルギーレベルが吸熱前と同等の位置に戻るが、水酸化カルシウム 10%以上では、吸熱後のエネルギーレベルは吸熱前よりも低くなった。水酸化カルシウム量が上昇するに従い、その程度は大きくなった。

③水酸化カルシウム非存在下で観察される ALC 由来の 99.1°C の吸熱ピークが、水酸化カルシウム添加により消失した。ALC は澱粉の膨潤を抑制し、酵素分解性の低下を招くことが知られている⁵⁹⁾。水酸化カルシウムの影響により、アミロースのらせん構造が崩壊した場合、澱粉の酵素糖化性が上昇する可能性があるため、ALC と水酸化カルシウムの反応を、モデル物質を用いて確認することとした。これについては 2.2.7 で述べる。

2.2.2 水酸化カルシウム濃度が澱粉の粘度特性に及ぼす影響

水酸化カルシウムが澱粉懸濁液の粘度特性に及ぼす影響について、粘度測定装置 Rapid visco analyzer (RVA) を用いて測定した (Fig. 2.3)。澱粉の水酸化カルシウム濃度が上昇するに従い、粘度上昇開始温度は上昇した。最高粘度時の温度は水酸化カルシウム濃度が 5%以下では低下し、10%以上では上昇する傾向があった。また、水酸化カルシウム濃度 10%以上ではピーク粘度後の明瞭な粘度の低下 (ブレイクダウン) は認められず、澱粉の崩壊の抑制、あるいは膨潤

遅延等が起きていることが予想された。また、冷却時の粘度上昇の程度は、水酸化カルシウム濃度が1%の場合には低下していたが、5%以上で大幅に上昇した。15%以上では急上昇の後に殆ど粘度が観察されなくなった。測定後のゲルを観察したところ、15%以上ではゲルが硬化してもろくなっており、回転する羽によって破碎されたゲルの断片が浮いて、粘度が検出されなくなった。

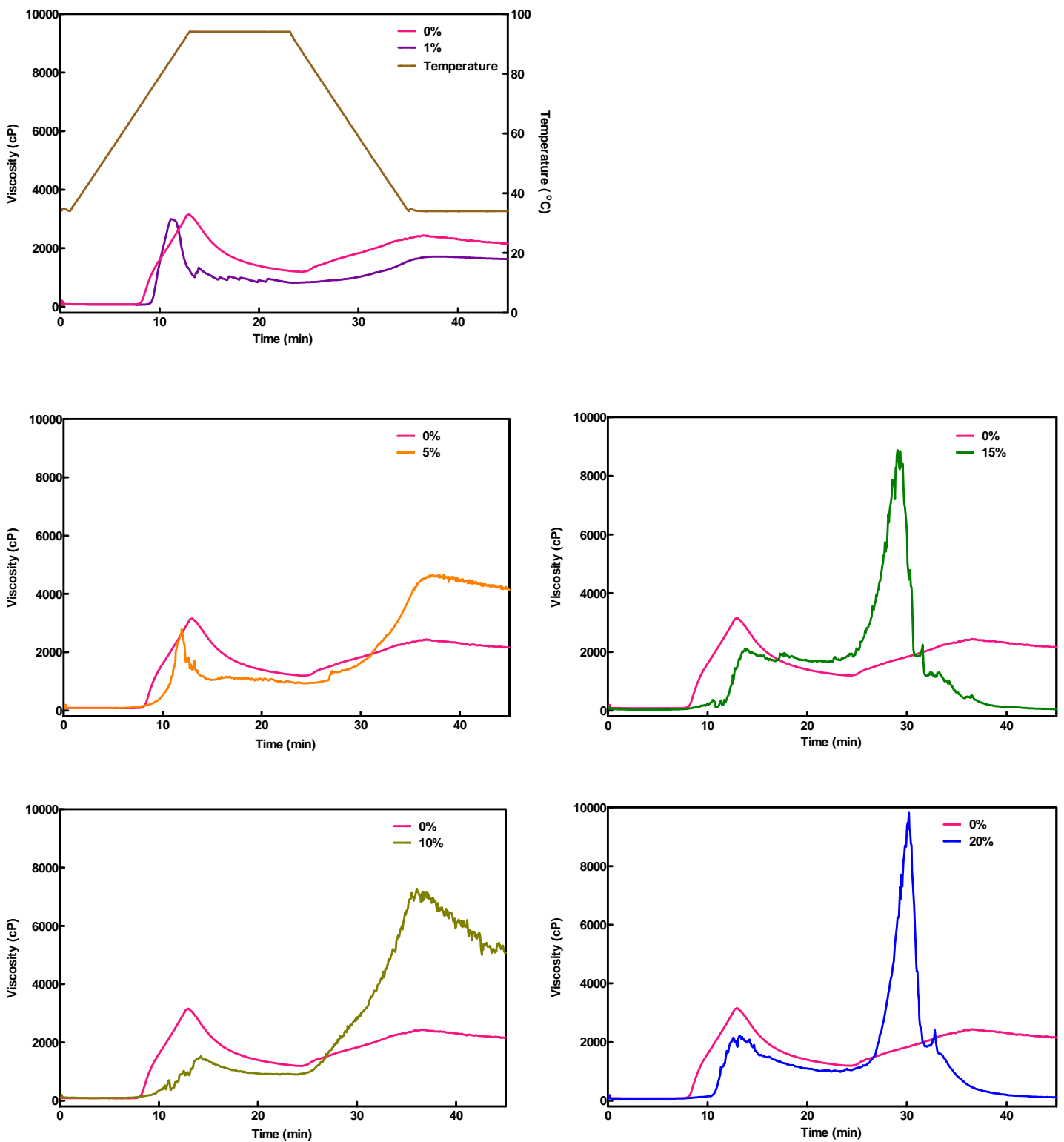


Fig. 2.3. Effect of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentration on the viscosity of rice starch suspension (10%) as determined by RVA.

The concentrations of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ are indicated in each figure.

2.2.3 温度処理と水酸化カルシウムが澱粉糊化に及ぼす影響

澱粉を 40% (w/w)以上の水分存在下、糊化温度以下で加温することにより、アニリングが起こり、澱粉の結晶性が向上することが知られている¹¹²⁾。一方、水酸化ナトリウム溶液中では、30°Cに比べて50°Cで澱粉の糊化が促進されることが報告されている¹¹³⁾。本研究では、水酸化カルシウム存在下で、糊化温度以下での温度処理を行った際の澱粉の構造特性変化を確認するため、対澱粉濃度 0、5、10、15、または 20% w/w の水酸化カルシウム存在下で澱粉試料を 40、50、または 60°Cで 6、12、24、または 48 時間処理した後に DSC 測定を行った。すべての水酸化カルシウム濃度において、処理温度が高いほど糊化温度は高く、処理時間によらず同様の傾向を示した。各水酸化カルシウム濃度条件下における処理後の糊化温度変化を Fig. 2.4 に示した。

各水酸化カルシウム濃度において、40°C処理後と 50°C処理後を比較すると、糊化温度の上昇の程度は緩やかであったが、60°C処理後には、水酸化カルシウム濃度 5%では他の濃度に比べて大きく上昇する傾向にあった。水酸化カルシウム濃度が 10%以上では、Fig. 2.2 に示したように、室温でもアルカリによる構造の安定化がすでに起きており、温度処理による効果は小さかった。しかし、室温では水酸化カルシウム濃度が 10%以上の場合に T_p が一定の値を示したが、温度処理により 15%以上でさらに T_p が高くなっていた。室温ではアルカリによる安定化効果が水酸化カルシウム濃度 10%以上で飽和するのに対し、40°C以上の加温時では水酸化カルシウム濃度 15%以上で飽和していた。一方で、水酸化カルシウム濃度が 5%の場合では、室温では構造の安定化は十分に起きておらず、60°Cまで加温したときに促進された。

また、処理時間による T_p の変化を Fig. 2.5 に示した。水酸化カルシウム濃度が 10%以下の場合、処理時間の経過による T_p の変化はほとんどなかったが、15%以上では、処理時間がなしの場合に比べて 6 時間処理で T_p が上昇していた。こ

これは、温度処理時にアルカリによる安定化効果が飽和するのが水酸化カルシウム濃度 15%であるというのと一致していた。

次に、各水酸化カルシウム濃度条件において、処理温度による ΔH の変化を、処理時間別に Fig. 2.6 に示した。処理温度が高く、処理時間が長くなるほど ΔH は減少した。この結果は、アルカリ溶液の温度を上昇させることにより静電相互作用が低下するとともに、陽イオンが解離し、水酸基が澱粉粒に入り込みやすくなることによって、水素結合の切断を促進するという Oosten の報告と合致する結果となった⁶⁴⁾。その一方で、静電相互作用によって澱粉粒構造が安定化しているとするならば、温度処理で静電相互作用が低下した場合糊化温度も低下すると考えられるが、逆に糊化温度は上昇した。水素結合の切断によりカルシウムイオンの結合できる水酸基が増加し、架橋が促進し、糊化温度が上昇した可能性が考えられた。

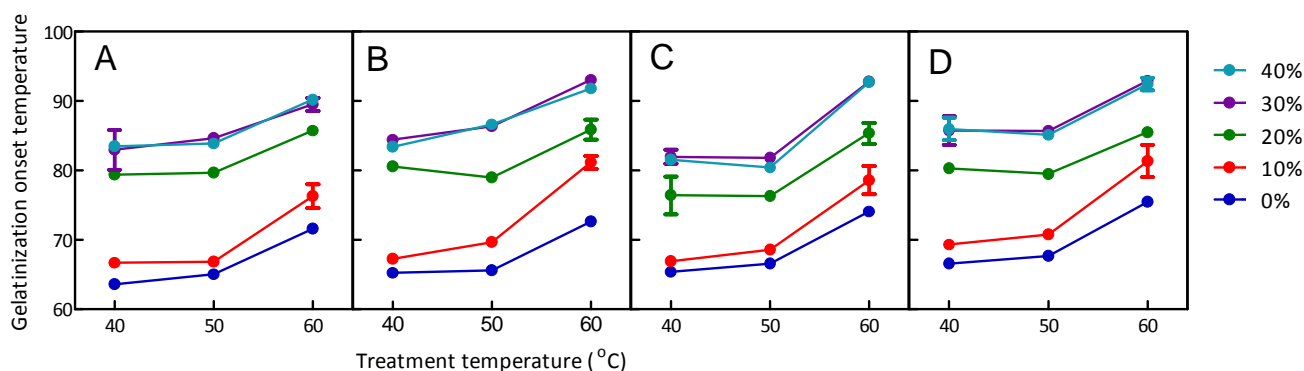


Fig. 2.4. Effect of heat treatment temperatures and duration on the gelatinization temperatures of starches treated with various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations.

The numbers indicate $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations (w/w) as percentage of dry starch.

A, 6 h; B, 12 h; C, 24 h; D, 48 h.

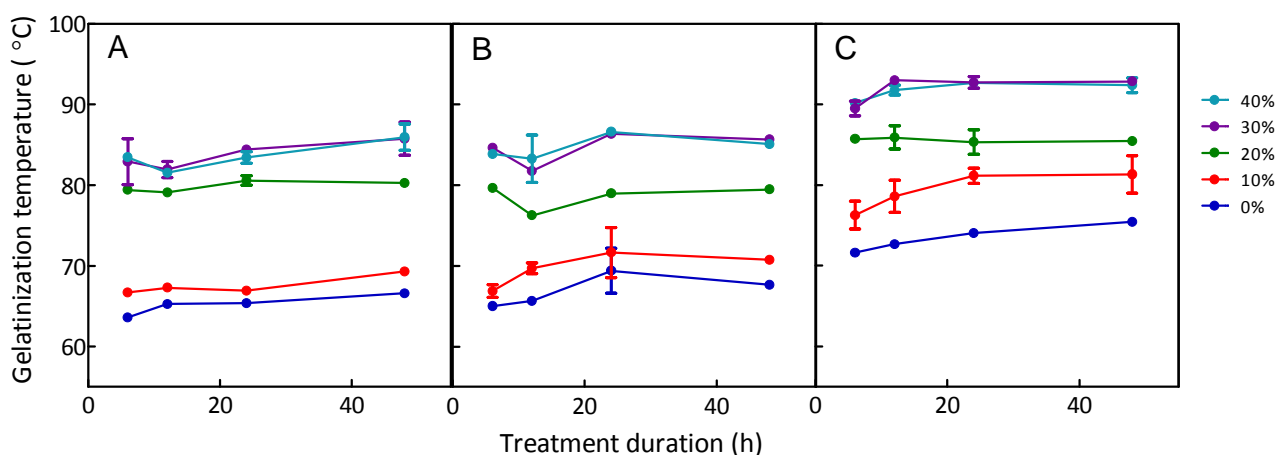


Fig. 2.5. Effect of treatment duration on the gelatinization temperatures of starch treated with various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations.

The numbers indicate $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations (w/w) as percentage of dry starch. A, treatment at 40 °C; B, 50 °C; C, 60 °C.

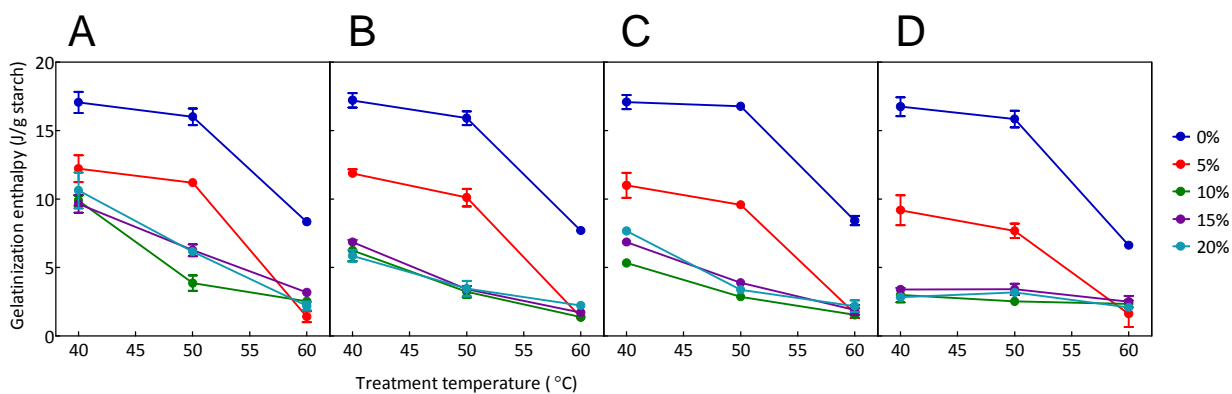


Fig. 2.6. Effect of treatment temperature and duration on the gelatinization enthalpies of starches treated with various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations.

The numbers indicate $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations (w/w) as percentage of dry starch. A, 6 h; B, 12 h; C, 24 h; D, 48 h. Taken from ref ¹⁵⁸).

2.2.4 二酸化炭素中和が澱粉糊化に及ぼす影響

次に、室温で7日間の水酸化カルシウム処理（RT 処理）を行った後に二酸化炭素で中和した澱粉試料について、糊化特性を確認した（Fig. 2.7 A）。糊化温度は、アルカリ処理後の中和により、中和前と比較して低下したが、未処理の澱粉試料と比較すると高い値を示した。カルシウムイオンは二酸化炭素と反応して炭酸カルシウムとなることから、その影響を確認するため、炭酸カルシウム粉末と澱粉を直接混合した試料についても糊化特性を測定した。糊化温度は濃度によらず一定の値を示した（Fig. 2.7 B）。

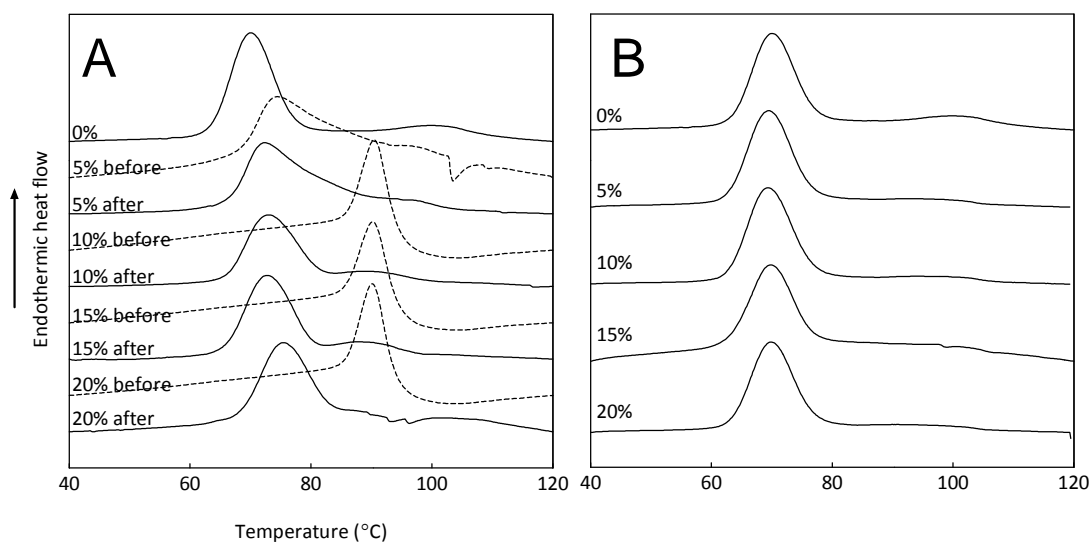


Fig. 2.7. DSC profiles of starches after alkali treatments.

A. DSC profiles of starches treated with various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations, before and after CO_2 neutralization. Numbers indicate $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations (w/w) as percentage of dry starch. B. Effect of CaCO_3 concentrations on DSC profiles of starches. CaCO_3 concentration is shown as molar equivalent of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentration. Taken from ref 158)

2.2.5 水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和が澱粉の結晶性に及ぼす影響

これまでの糊化特性、粘度特性の測定の結果から、水酸化カルシウム濃度 10% 程度までは、水酸化カルシウムが濃度依存的に澱粉の結晶性に影響することが示唆されたため、澱粉を水酸化カルシウム処理後および二酸化炭素中和した後に凍結乾燥した試料について、粉末 X 線回折分析およびフーリエ変換赤外吸収分析 (FT-IR) 分析を用いて結晶状態および結合状態の測定を行った。

X 線結晶回折では、コシヒカリ胚乳澱粉は典型的な A 型澱粉の回折パターンを示した (Fig. 2.8)。処理に用いた水酸化カルシウムの濃度が上昇するに従い、A 型結晶に特徴的なピークは減少し、結晶性が消失していることが示された。さらに、水酸化カルシウム由来の回折ピークは、水酸化カルシウム 10%以下では検出されず、20%以上では水酸化カルシウム濃度が上昇するに従い、ピーク強度が強くなった (Fig. 2.8 A)。一方、二酸化炭素中和した後には、水酸化カルシウム 5%の処理でも炭酸カルシウムのピークが確認された (Fig. 2.8 B)。

水酸化カルシウム濃度 10%では過飽和であることから、通常では不溶の水酸化カルシウムが存在していると考えられる。今回の結果から、10%処理時には水酸化カルシウムが結晶ではない形態で存在しており、乾燥した後にも析出していないことから、澱粉と相互作用している可能性が示唆された。澱粉との相互作用は X 線回折に影響のあるような規則的なものではないと考えられる。なお、 $2\theta = 23.0^\circ, 29.4^\circ, 37.6^\circ, 39.4^\circ$ に出現するピークは、炭酸カルシウム由来であることを、データベース (ICDD, JCPDS ファイル) との照合で確認した。

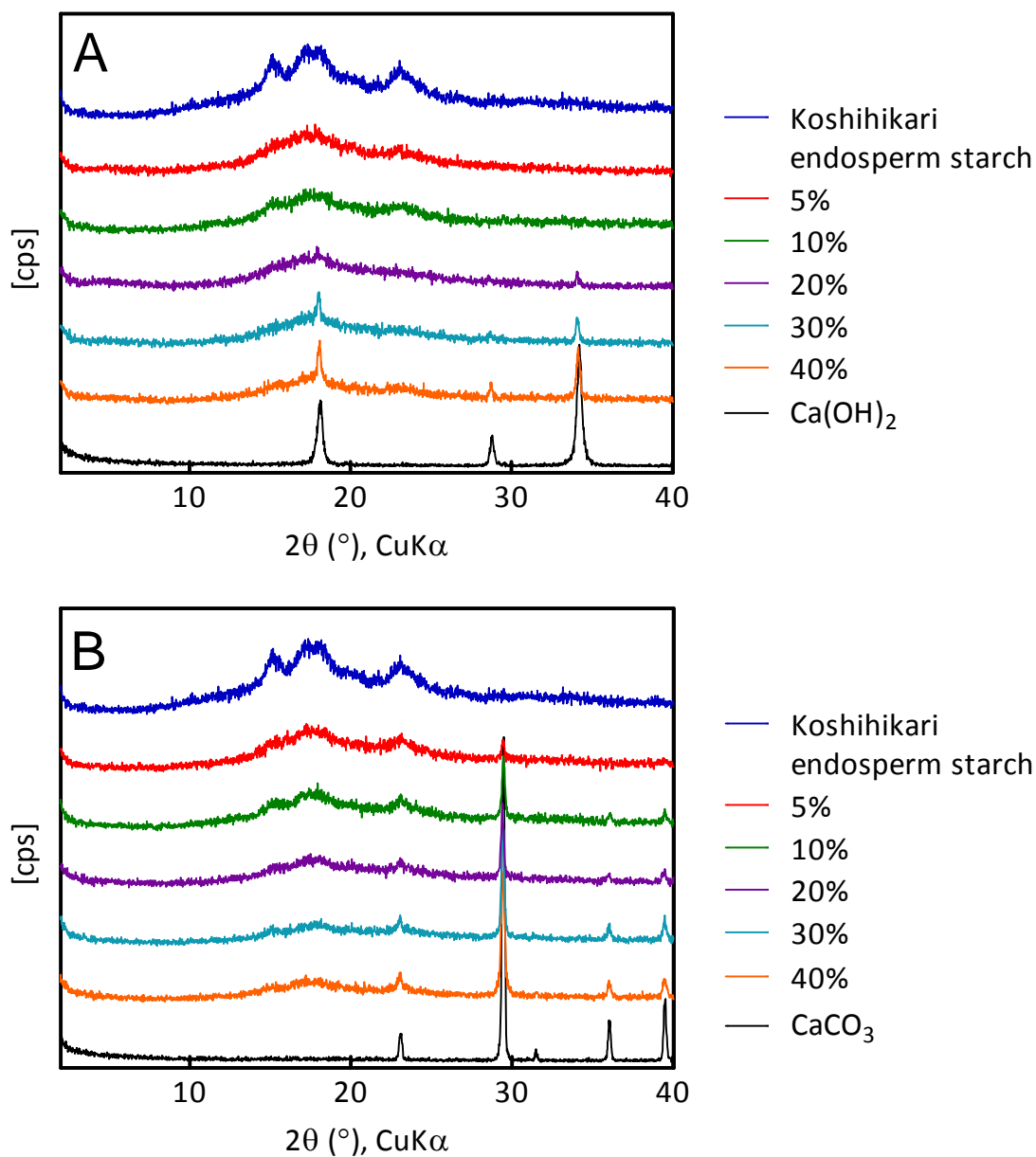


Fig. 2.8. X-ray diffraction patterns of starch samples after treatment with various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations.

The starch samples were treated at RT with various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations (A) or treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and neutralized with CO_2 (B), and freeze-dried. The numbers indicate $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations (w/w) as percentage of dry starch.

次に、FT-IR による分析の結果を Fig. 2.9 に示した。未処理のコシヒカリ胚乳澱粉で観測される代表的な吸収ピークの帰属を Table 2.1 に示した¹¹⁴⁾。2890、994、930、764 cm^{-1} 等の糖の骨格に関わる結合に帰属される吸収ピークへの水酸化カルシウム処理の影響は認められなかった。一方、3310、1640、1344、1153、1080 cm^{-1} の O-H が関わる結合に帰属される各吸収ピークは、未処理のコシヒカリ胚乳澱粉と比較し、水酸化カルシウム処理後の澱粉では小さくなっていた。

1020 および 1047 cm^{-1} における吸収は澱粉の糊化状態を示すとの報告があり¹¹⁵⁾、これらのピークは水酸化カルシウム濃度が高くなるに従い大きくなっていることから、水酸化カルシウムによる糊化の促進を示していると考えられる。3643 cm^{-1} に認められる水酸化カルシウムの O-H 由来の吸収ピークは、水酸化カルシウム濃度 20%以上で処理した場合に認められた。一方で、二酸化炭素で中和した場合は 872 cm^{-1} や 1400 cm^{-1} 付近の炭酸カルシウム由来のピークは、5%処理から認められ、X 線回折と一致する結果となった。

Table 2.1. Band assignments for infrared spectra of starch

764	C-C stretching
860	C(1)-H, CH ₂ deformation
930	skeletal mode vibrations of α -1,4 glycosidic linkage (C-O-C)
994	intramolecular hydrogen bond of O-H at C-6
1020, 1047	characteristic to amorphous region
1080	C(1)-H bending, C-O-H bending
1153	C-O, C-C stretching
1242	CH ₂ OH (side chain) related mode
1344	C-O-H bending, CH ₂ twisting
1415	CH ₂ bending, C-O-O stretch
1640	water adsorbed in the amorphous regions of starch
2929, 2890	CH ₂ stretching
3310	O-H stretching

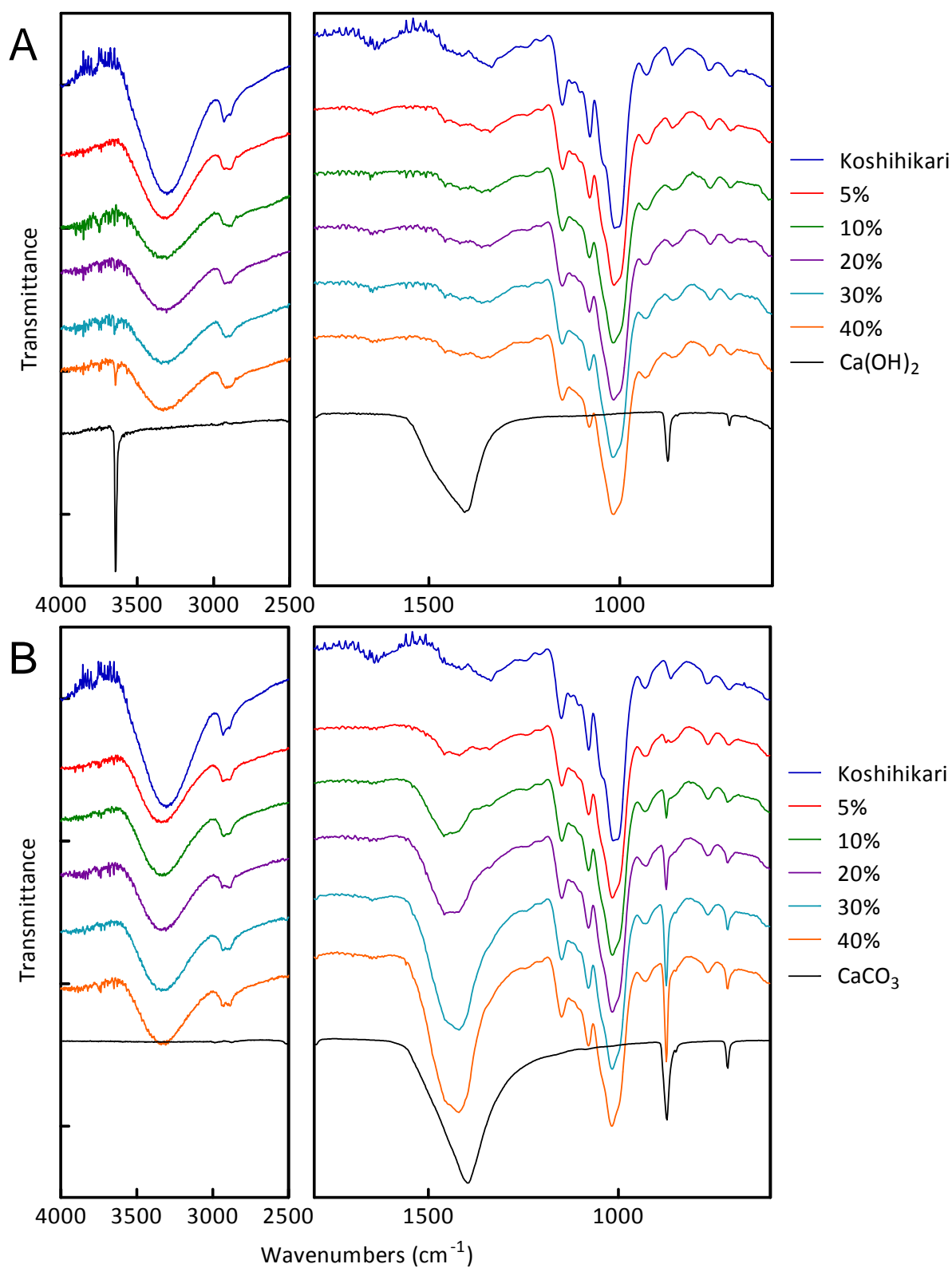


Fig. 2.9. FT-IR spectra of starches treated at various Ca(OH)_2 concentrations.

The starch samples were treated at RT with various Ca(OH)_2 concentrations (A) or treated with Ca(OH)_2 and neutralized with CO_2 (B), and freeze-dried.

X線結晶回折およびFT-IR実験の結果から、水酸化カルシウムが過飽和でもさらにカルシウムが澱粉と結合していることが示唆されたため、さらに結合状態を確認するため、水酸化カルシウム処理の影響について、XPS (X-ray photoelectric spectroscopy; X線光電子分光分析) による表面近傍の化学結合状態の解析を行った。

結合エネルギーの広範囲をカバーする XPS wide spectrum では、定性的に澱粉がCとOからなる分子であること、C1s軌道とO1s軌道のピークは水酸化カルシウムの濃度が上昇するに従いピークの強度が減少し、Ca2s軌道とCa2p軌道のピークは水酸化カルシウム濃度20%以上で確認され、濃度上昇とともに強度が増加することが示された (Fig. 2.10)。

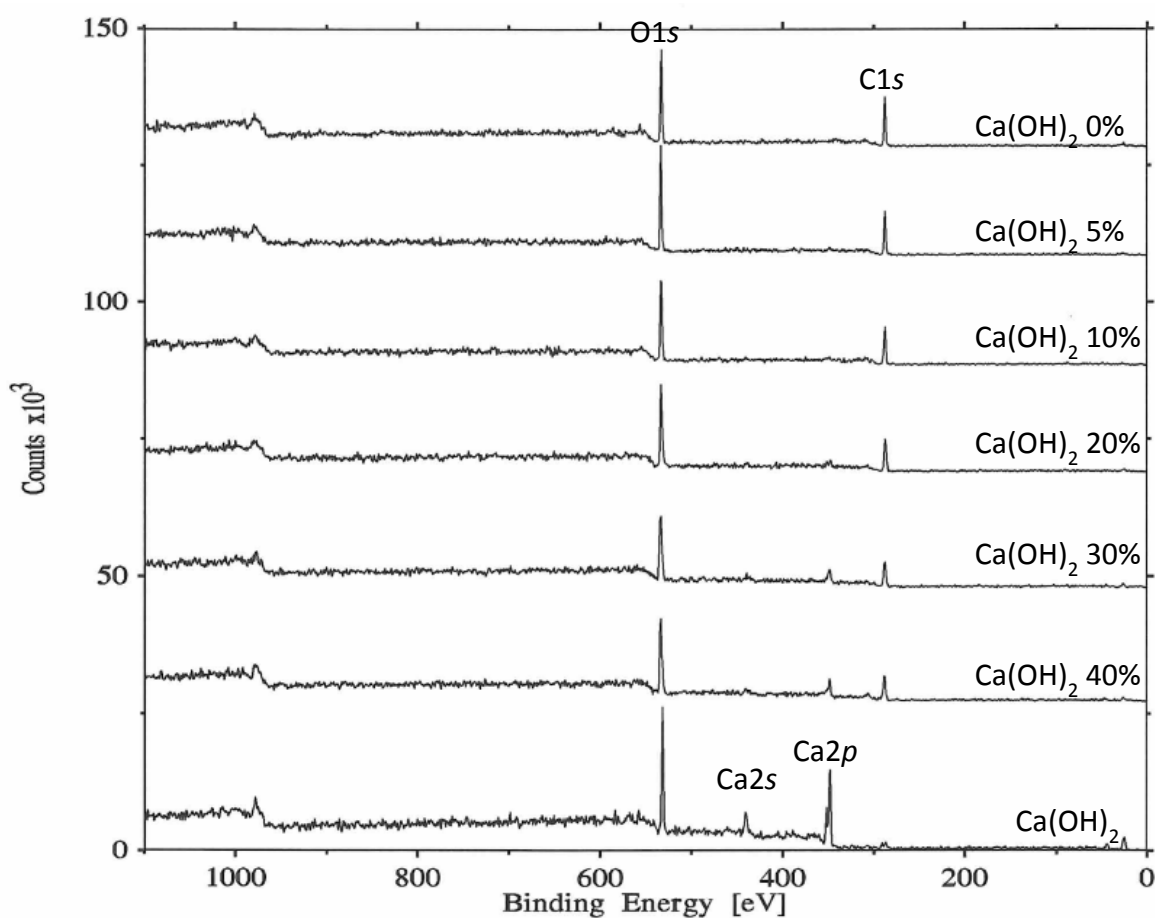


Fig. 2.10. XPS wide spectrum of Ca(OH)_2 treated starch samples.

そこで、Ca2*p*、O1*s*、Cl*s* 軌道の測定を行い、各元素の結合状態の分析を行った。Ca2*p* 軌道の測定では、水酸化カルシウムで処理した澱粉の 2*p*_{3/2} のピークの半値幅が水酸化カルシウムと比較して広がっていた (Fig. 2.11)。また、ピーク分離操作により、澱粉に結合していると考えられるカルシウム由来のピークと水酸化カルシウム由来のピークとの割合が、20%水酸化カルシウム処理澱粉では 6:4、30%水酸化カルシウム処理澱粉では 5:5、40%水酸化カルシウム処理澱粉では 4:6 となっていた。処理に用いた水酸化カルシウムの濃度が上昇するに従い、余剰の水酸化カルシウムの割合は高くなっていった。余剰の水酸化カルシウムとは異なる状態のカルシウムの存在が強く示唆された。

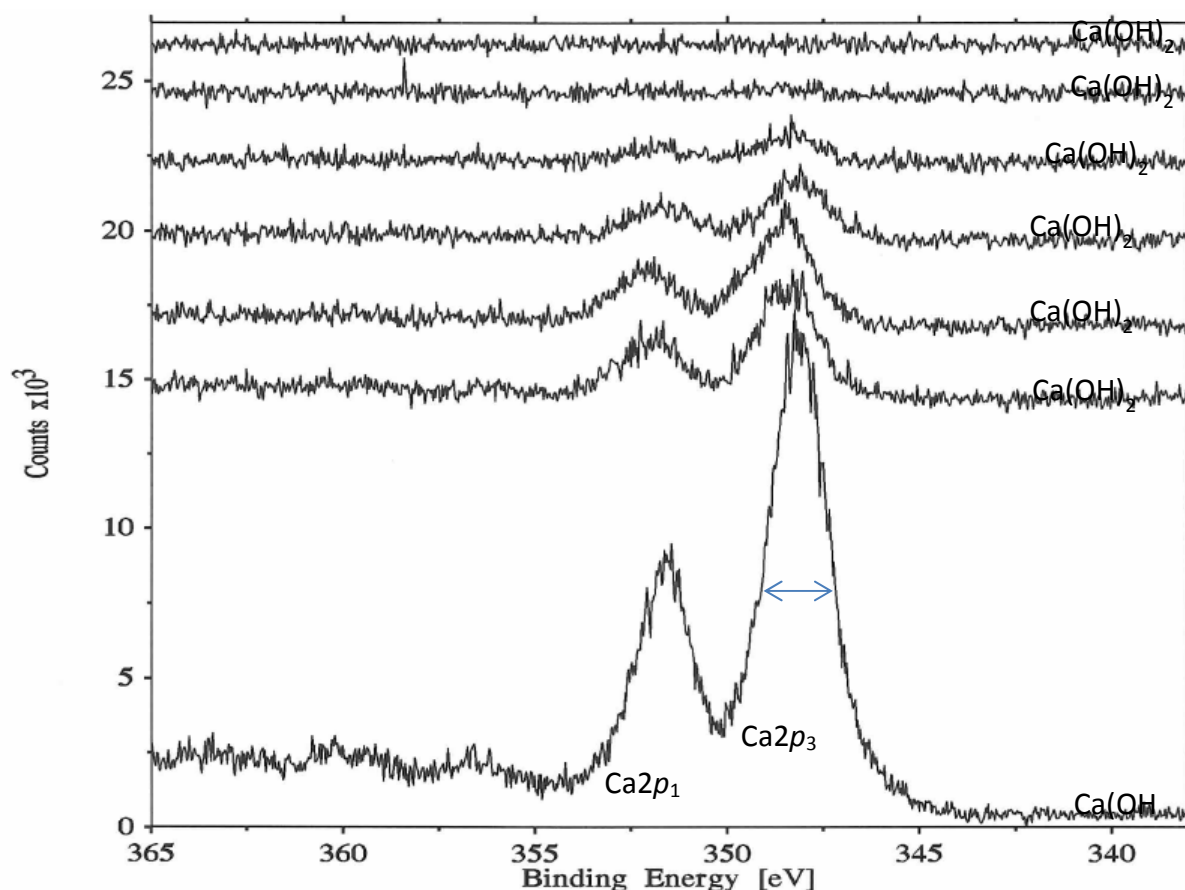


Fig. 2.11. XPS spectrum showing Ca2*p* peak of Ca(OH)₂ treated starch samples.

次に、O1s 軌道の測定を行った。O1s 軌道の測定では、澱粉由来の O が一つの幅広いピークとして観察された。水酸化カルシウム処理濃度が上昇するに従い澱粉由来のピークは対称性を失った (Fig. 2.12)。澱粉分子内の O に新たな結合が生じていることが推測された。

今回用いた試料に含まれているのは微量の混入物質を除けば、澱粉、水酸化カルシウム、水のみであることと、Ca2p 軌道、O1s 軌道の測定結果から、カルシウムと澱粉分子内の O との間に何らかの結合が生じている可能性が示唆された。澱粉を水酸化カルシウム処理することにより、両者は相互作用し、安定な構造ができており、これは、カルシウムと澱粉の O の結合である可能性が高い。

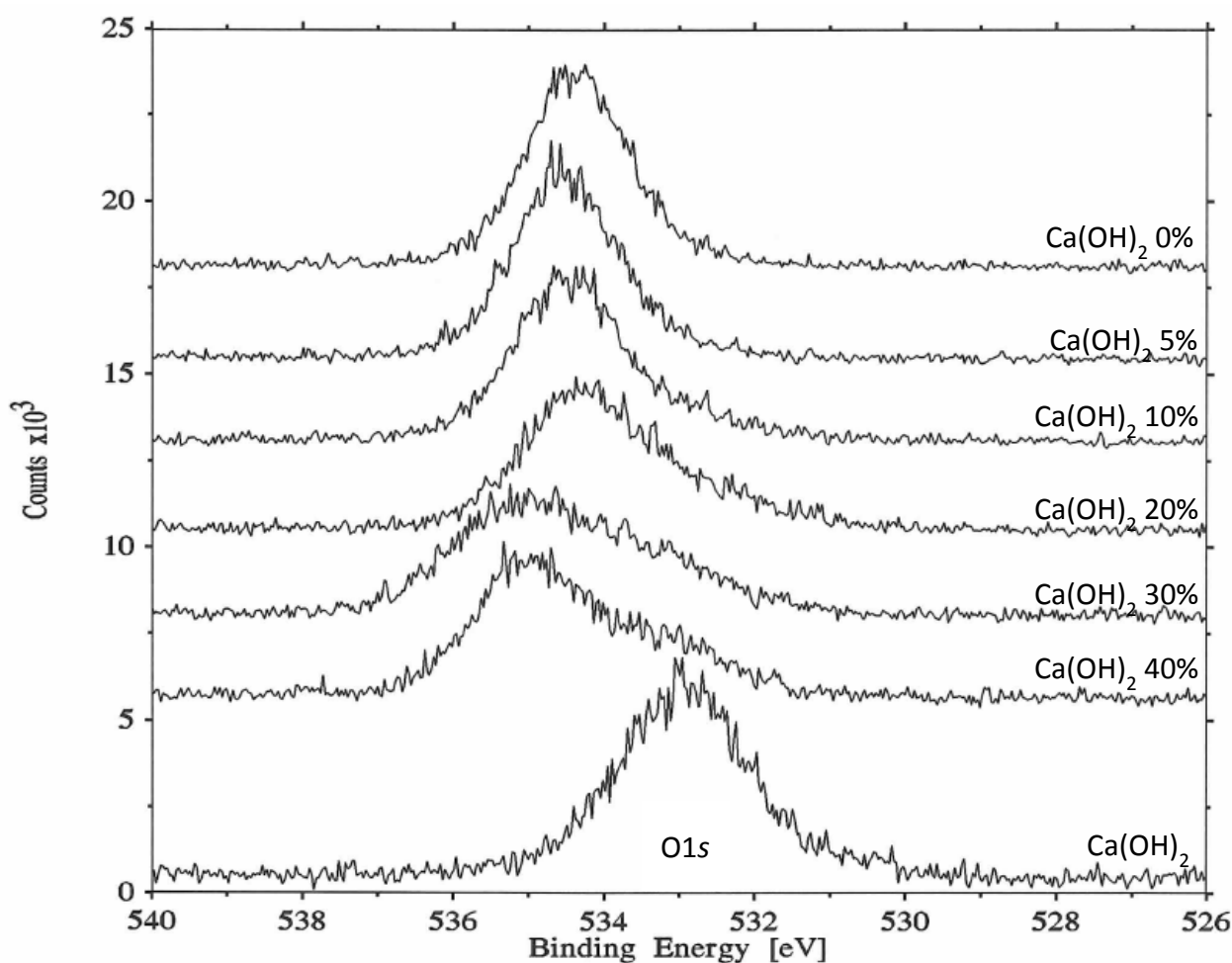


Fig. 2.12. XPS spectrum showing O1s peak of Ca(OH)₂ treated starch samples.

2.2.6 澱粉の糖化特性

2.2.3 で見いだした温度処理効果を適用し、室温アルカリ処理を特徴とする RT-CaCCO 法の改良に繋げるため、種々温度条件における水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和を経た澱粉試料に対して、 α -アミラーゼによる糖化を行った。酵素反応による糖化産物生成の経時変化を Fig. 2.13A に示した。水酸化カルシウム濃度 10%以下では濃度が高いほど糖化率が高かったが、10%以上では、濃度によらずほぼ一定の糖化率を示した。反応 24 時間後の遊離グルコース当量を指標として、温度処理の効果を評価した。水酸化カルシウム濃度 0、5%では温度処理時の温度が高く、処理時間が長いほど糖化率が高かったが、10%以上では 50°Cでの糖化率が最高値を示し、処理時間を長くしても効果は上がらなかった (Fig. 2.13 B および C)。

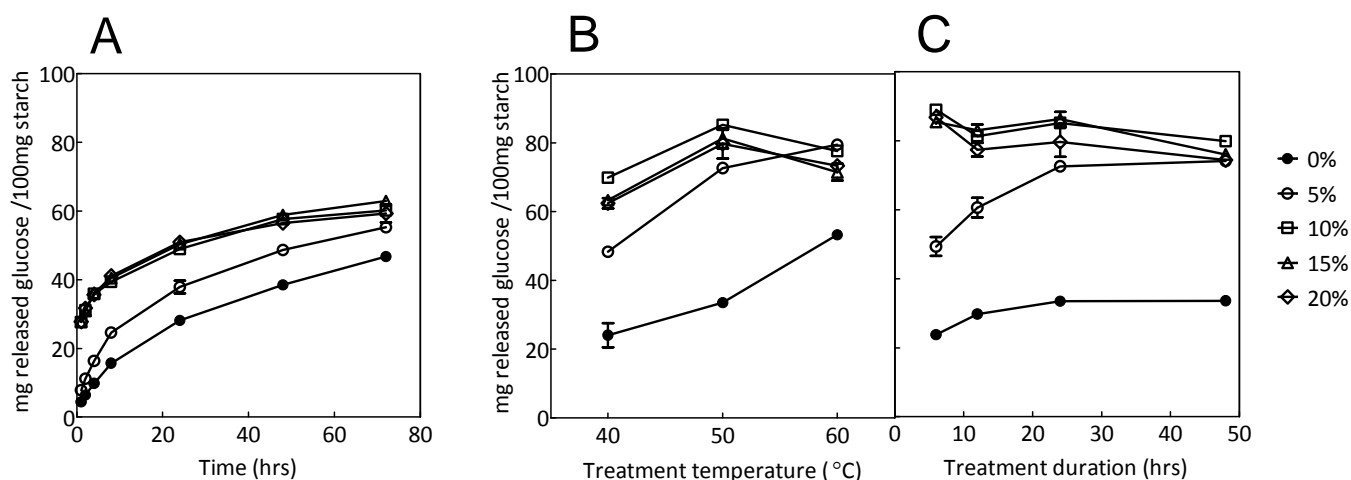


Fig. 2.13. Enzymatic saccharification of starches after treatment at RT with various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations.

A. Time course of glucose release from treated starches. B. Effect of treatment temperature on saccharification of starches treated for 24 h with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. C. Effect of treatment duration on saccharification of starches treated at 50 °C. Taken from ref ¹⁵⁸).

澱粉の結晶度は澱粉のアミラーゼ糖化率に影響し、 ΔH は分解率¹¹⁶⁾や糖化速度¹¹⁷⁾と負の相関があると報告されているが、本研究においても、糖化反応 24 時間後の糖化率と ΔH には、高い負の相関があることが示された (Fig. 2.14)。水酸化カルシウム処理と穏やかな温度処理によって、澱粉の結晶度を下げ、アミラーゼ糖化率を上げることができたが、水酸化カルシウム濃度が 10%以上の時、60°C 処理では、50°C 処理よりも ΔH が低いにもかかわらず、糖化反応 24 時間後の糖化率が低下する傾向にあった (Fig. 2.13 B)。この原因として、水酸化カルシウム濃度が高いほど、中和後の糊化温度が高かったことから、澱粉粒の結晶性が保たれ、糖化率が低下したと考えられる。本結果から、糖化率の向上には 50°C の温度処理が適していることが明らかとなった。

2.2.4 で、炭酸カルシウムの直接添加に糊化促進効果がないことが示されたことから、中和後に温度処理を行っても、糊化促進効果は薄いことが予想された。そこで、RT 処理した後に、温度処理を二酸化炭素中和の前後に行ったときの 24 時間糖化率を比較した (Fig. 2.15)。中和後の温度処理では、RT 処理と比較して、糖化率を向上させる効果はほとんど認められなかったが、中和前の温度処理では、水酸化カルシウム濃度が 5、10、15 および 20% のとき、それぞれ糖化率は 1.9、1.8、1.7 および 1.6 倍に上昇したことが確認できた。

水酸化カルシウム濃度 10% および 15% では、中和後の温度処理でも RT 処理のみの場合と比較して糖化率が高かった。この原因として、中和後の糊化温度が高いことから、中和が不十分であり、温度処理により糊化を促進させる効果があった可能性が考えられる。また、水酸化カルシウム濃度が上がるに従い、中和後の温度処理による糖化率は低くなり、20% では RT 処理のみの場合と同程度となった。中和が不十分であるだけでなく、析出した炭酸カルシウムが増加することにより、糖化阻害が起きている可能性が考えられる。

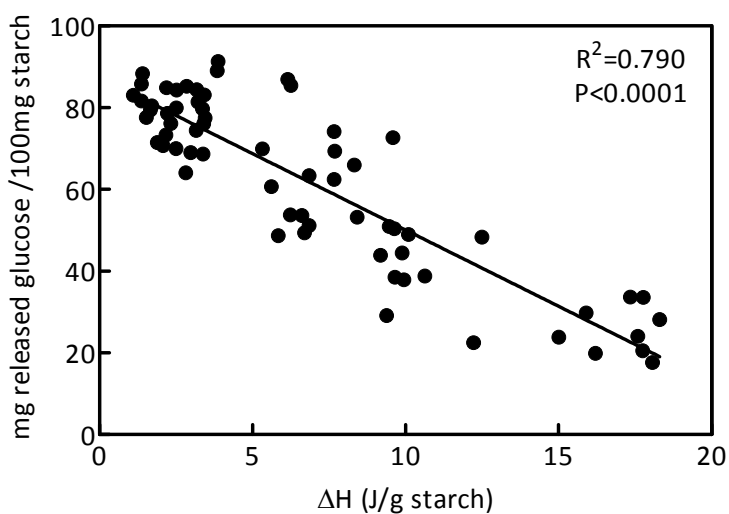


Fig. 2.14. Relationship between the amounts of released glucose in 24 h and gelatinization enthalpies of the treated starches.

The data were obtained from starches treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentration of 0, 5, 10, 15, or 20% for 6, 12, 24, or 48 h at 25, 40, 50, or 60 °C.

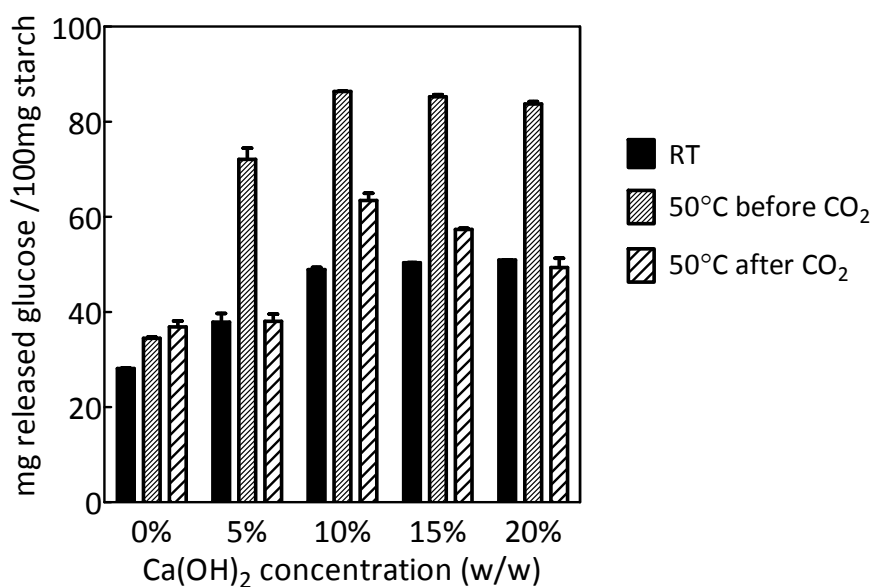


Fig. 2.15. Effect of temperature treatment before and after CO_2 neutralization on saccharification of starches treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 7 days at 25 °C (RT treatment) at various $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrations. Taken from ref ¹⁵⁸.

2.2.7 水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和がアミロース-脂質複合体の糊化特性に及ぼす影響

2.2.1 (Fig. 2.1) で、③水酸化カルシウム非存在下で観察される ALC 由来の 99.1°C の吸熱ピークが、水酸化カルシウム添加により消失する現象が観察されたため、モデル物質を用いて、水酸化カルシウムが ALC の DSC 糊化特性に及ぼす影響について解析した。稻胚乳澱粉に含まれる脂質として、リゾリン脂質およびパルミチン酸、リノレン酸などの遊離脂肪酸の含有量が高いことが知られている¹¹⁸⁾。そこで、アミロース-脂質複合体 (ALC) のモデル物質として、市販のアミロース (アミロース EX-III) とパルミチン酸の複合体を調製した。アミロースはヨウ素、脂肪酸、界面活性剤、ブタノールなど、様々な物質と複合体を形成し、結晶状となることが知られている。X 線結晶回折を用いたアミロースの構造研究から、アミロースの複合体は V-アミロースと呼ばれる 1 本鎖らせん構造を取り、らせん内部にヨウ素、脂肪酸などを内包することが明らかにされている。内包される物質によって、グルコース数 6~8 個でらせんが一巻きする構造を取り、炭素鎖部分はらせん内に内包され、カルボン酸部分は立体障害、静電的障害によりらせん内には入らないことが計算により示されている¹¹⁹⁾。また、X 線および電子回折により、V-アミロースは結晶質と非晶質が層状になったラメラ構造を取り、らせんの軸はラメラの層に垂直に配置していることが示されている¹²⁰⁾。

調製したアミロース-パルミチン酸複合体 (amylose-palmitic acid complex, APC) は、95°C に吸熱ピークを生じた。水酸化カルシウム濃度による DSC 糊化特性の変化を Fig. 2.16 に示した。水酸化カルシウム濃度が上昇するに従い、APC の糊化開始温度付近で発熱現象が観察された。さらに、水酸化カルシウム存在下では、125°C 付近に吸熱ピークが観察された。

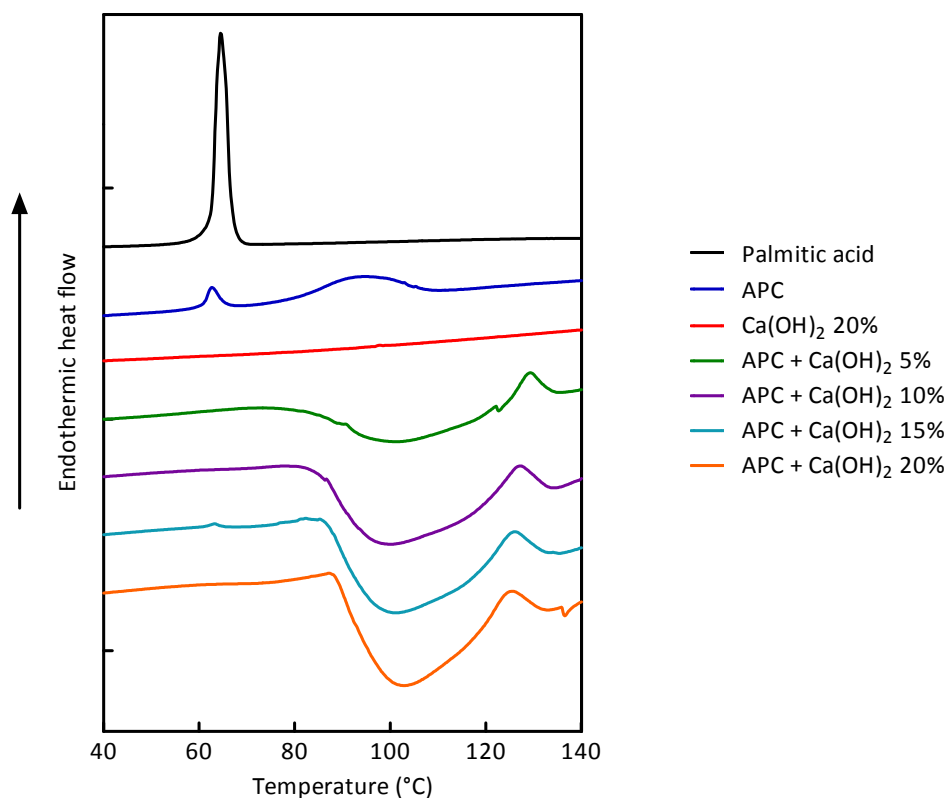


Fig. 2.16. DSC profile of APC with different Ca(OH)_2 concentrations.

The numbers indicate Ca(OH)_2 concentrations (w/w) as percentage of dry ALC.

次に、APC を室温で7日間水酸化カルシウム処理 (RT 処理) した後に二酸化炭素で中和した試料について、糊化特性を確認した (Fig. 2.17)。中和後には、80°C付近の発熱現象は観察されず、130°C付近にピークが観察された。また、Fig. 2.16 では水酸化カルシウム濃度が10%以上では125°C付近にピークが観察されたのに対し、中和後 (Fig. 2.17) には130°C付近にピークが観察された。

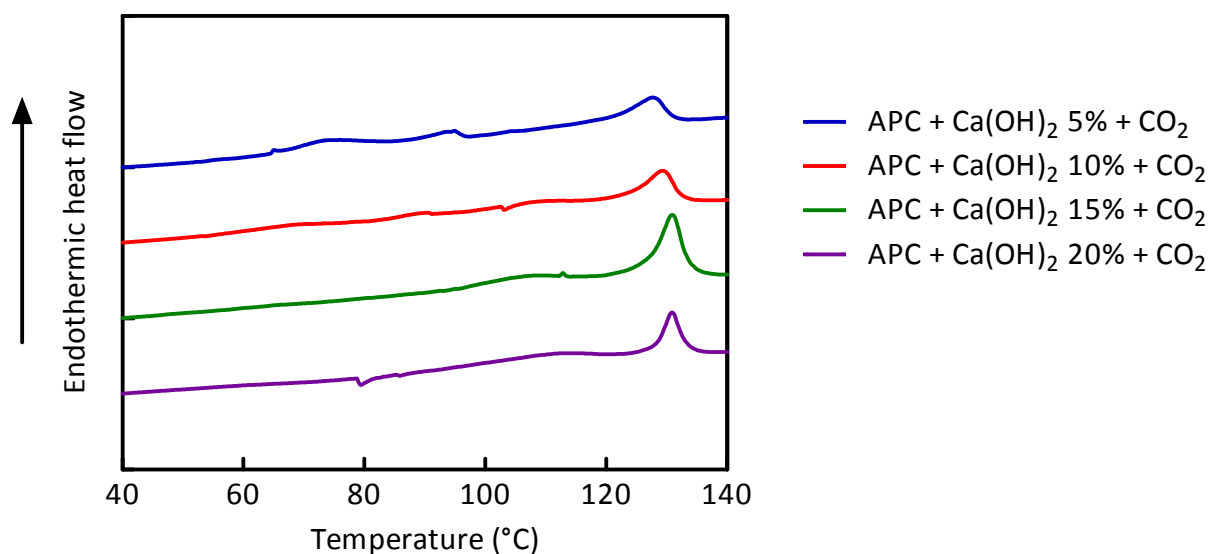


Fig. 2.17. DSC profile of APC with different Ca(OH)_2 concentrations after neutralization with carbon dioxide.

2.2.3では、水酸化カルシウム存在下澱粉を糊化温度以下で加温することにより、 ΔH が減少する現象が観察されたが、その一方で、ALCを加熱することにより form 2a および 2b の生成が促進されることが知られている。そこで、水酸化カルシウム濃度 10%で室温処理後、さらに 24 時間の温度処理を行い、加熱による APC の糊化特性への影響を確認した (Fig. 2.18)。水酸化カルシウム加熱温度 65°C までは主として 125°C のピークが観察されたが、加熱温度が高いほど 133°C のピークは大きくなり、 105°C 以上では 133°C のピークのみとなった。また、処理温度が高くなると 80°C での発熱現象が見られなくなった。

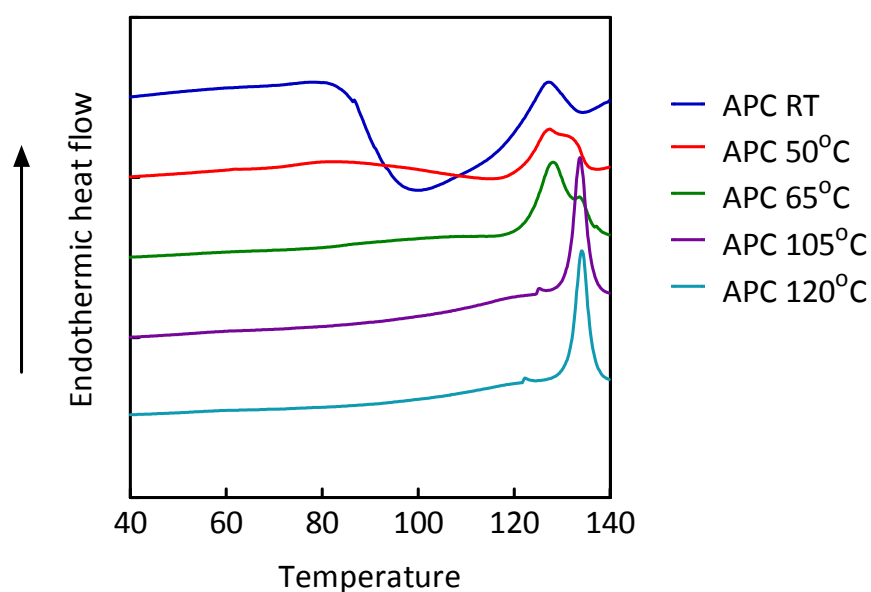


Fig. 2.18. DSC profile of APC treated with 10% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at different temperatures. The numbers indicate the treatment temperature.

次に、水酸化カルシウム処理および温度処理が APC の糖化性に及ぼす影響を確認した。水酸化カルシウム濃度 10% で室温処理後、 α -アミラーゼによる糖化産物生成の経時変化を Fig. 2.19A に示した。水酸化カルシウム処理により、糖化の初期速度は大幅に増加したが、72 時間後の糖化率はほぼ同等であった。一方、水酸化カルシウム濃度 10% で室温処理後、さらに 24 時間温度処理を行った後に α -アミラーゼによる糖化を行ったところ、Fig. 2.19 B に示すように、処理温度が高いほど糖化率が低下した。また、糖化後の残渣を回収して、DSC 測定を行ったところ、130°C のピークが観察された (Fig. 2.19C)。

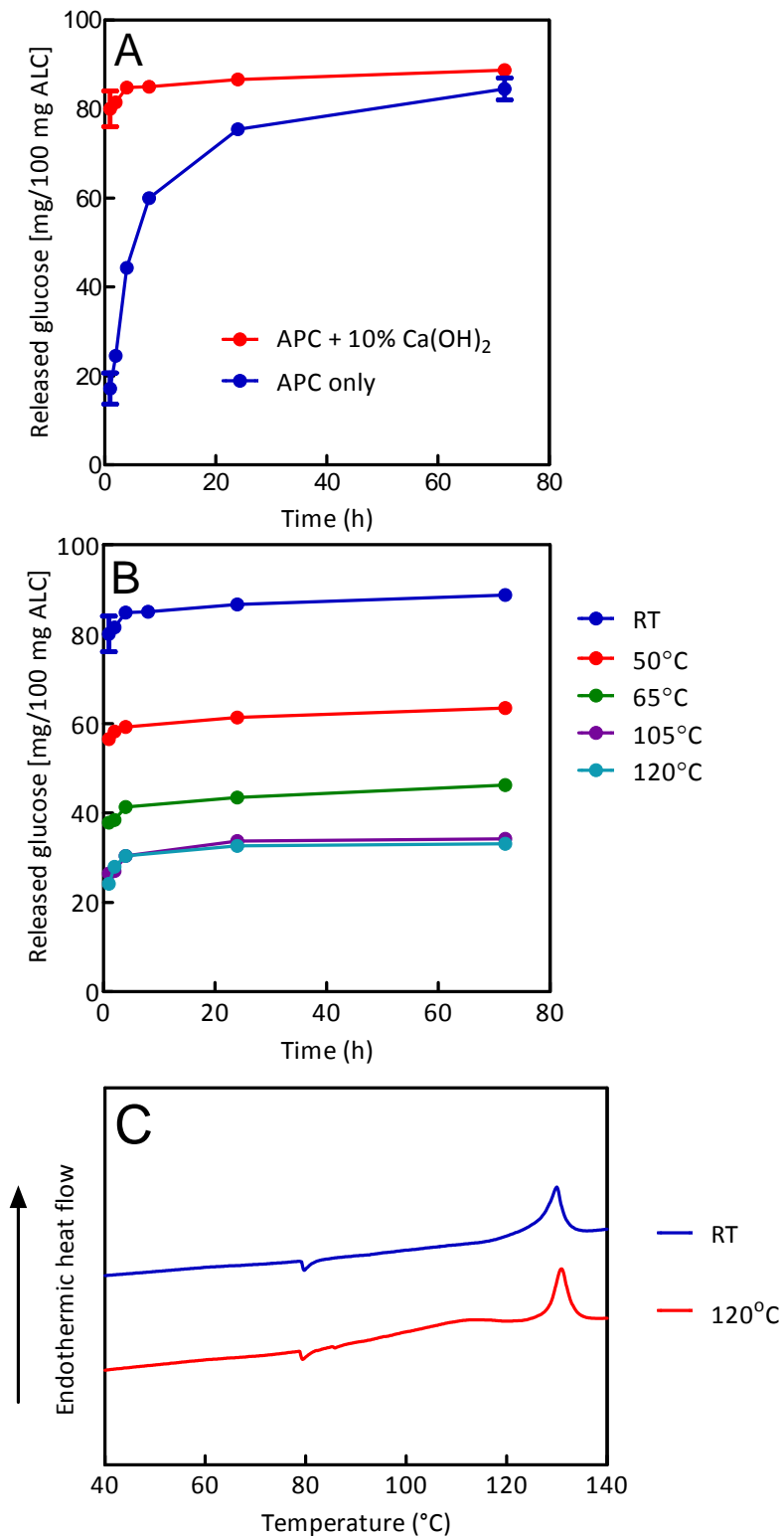


Fig. 2.19. Enzymatic saccharification of APC. A: Comparison between treatment with or without Ca(OH)₂. B: Effect of temperature treatment on glucose release. C: DSC profile of APC after enzymatic saccharification.

2.3 まとめと考察

本章では、水酸化カルシウム処理が澱粉構造の安定化と不安定化の双方に働いていること、さらに温度処理、二酸化炭素による中和が及ぼす影響を DSC 測定により解析し、中和前に糊化を促進しておくことが糖化効率の向上のために必要であることを確認した。効率的糖化に必要な条件を絞り込み、水酸化カルシウム濃度 10% で RT 処理し、50°C に加温した後に二酸化炭素中和することで、効率よく糖化が促進されることを見いだした。また、X 線結晶回折、FT-IR、XPS の測定から、水酸化カルシウムが澱粉と相互作用し、前処理として過飽和の水酸化カルシウムが必要であることを示した。さらに、ALC は温度処理によって form 2b が生じ、アミラーゼ抵抗性となることから、高温での処理は糖化率を低下させる原因となることを見いだした。Fig. 2.20 に、水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和による澱粉構造変化の概念図を示した。

Tp の上昇は、水酸化カルシウムの存在により澱粉粒の構造が安定することを示唆している。アルカリによる構造の安定化は、水酸化ナトリウム¹²¹⁾、炭酸ナトリウム¹²²⁾、水酸化カルシウム⁶³⁾で報告されており、この現象は、澱粉の水酸基とカチオンの間の静電相互作用によって説明されている。アルカリ溶液中では、澱粉の水酸基は解離して O⁻ となり、弱陽イオン交換基として機能し、陽イオンが澱粉粒の中に移動すると考えられる。一価イオンと二価イオンでは安定化のメカニズムは異なり、二価イオンであるカルシウムイオンは架橋構造を形成し、構造の安定化に寄与すると考えられる¹⁰⁹⁾。カルシウムイオンによる架橋効果は、RVA 粘度特性からも示唆される。澱粉の膨潤抑制、最高粘度に達した後のブレークダウンの欠如、冷却時の粘度上昇などは架橋澱粉においてしばしば観察される現象であり^{123,124)}、カルシウムイオンによって架橋効果が生じていることが示唆される。また、冷却時の粘度上昇が著しいことから、水酸化カルシウム前処理で 95°C に加熱した場合には、糖化のために冷却したときに攪拌不

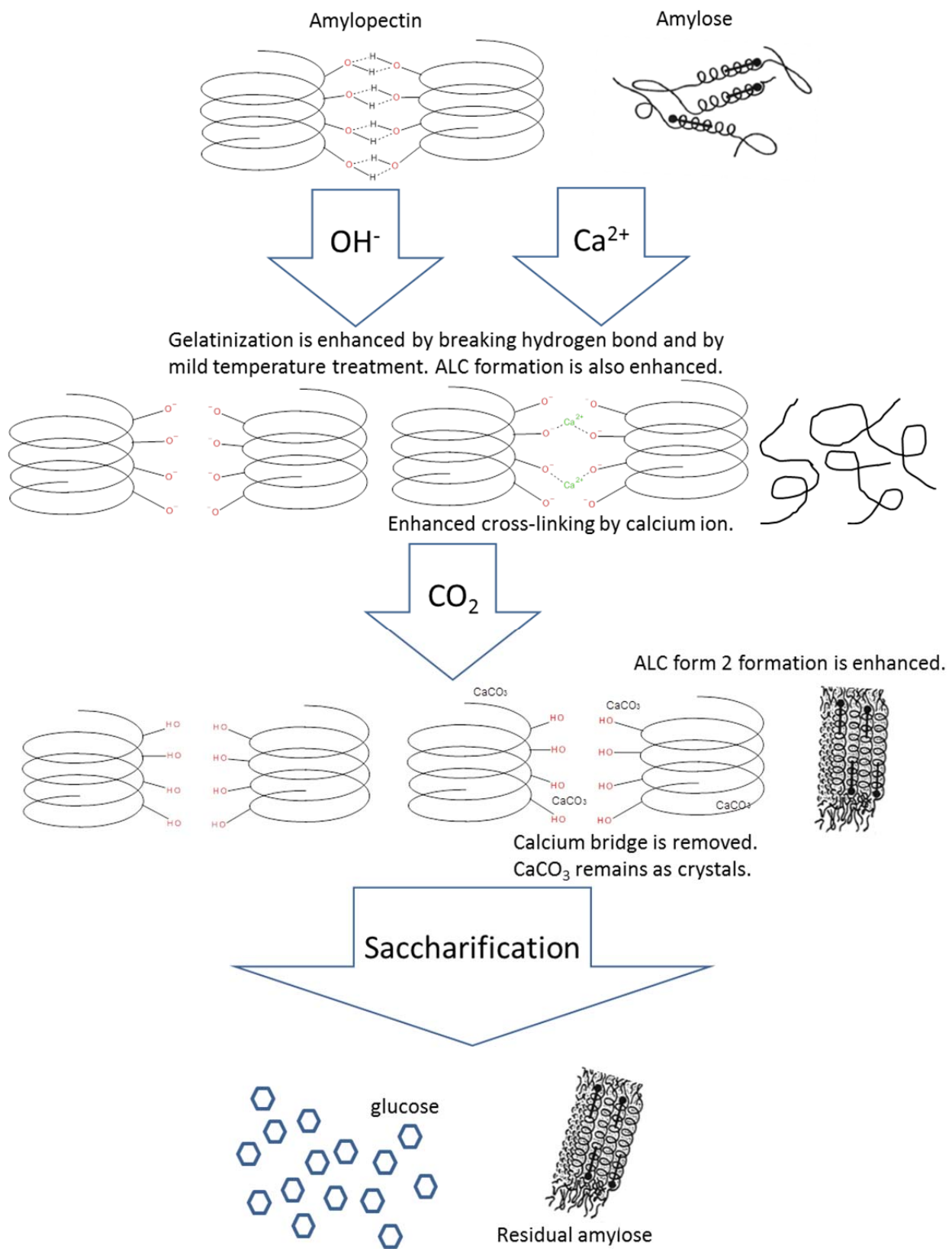


Fig. 2.20. Effect of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatment and CO_2 neutralization on saccharification of starch

良などの問題が生じる可能性がある。

その一方で、アルカリの水酸基は澱粉の鎖間の水素結合を切断し、澱粉粒構造を不安定化すると考えられる。Fig. 2.1 に示されたような、水酸化カルシウム濃度の上昇に伴う ΔH の減少は、水酸化カルシウムによる結晶構造の崩壊を示唆している。 ΔH はアミロペクチン分子の二重らせん構造の崩壊を反映するものであるとされている¹⁰²⁾。水酸化カルシウムの水酸基がアミロペクチン鎖間の水素結合を切断することにより、糊化が促進されたと考えられる。X線結晶回折および FT-IR の測定からも、糊化促進が示されている。

Fig.2.1 で観察されたようなベースラインのシフトは、試料の融解前後で熱容量や試料の重量が異なる場合に起こり、吸熱側、発熱側の両方向に起こり得る。試料の融解による熱容量の変化は広く観察されており、例えば、澱粉ではガラス状態から液体状態への変化に伴い比熱が変化するが¹²⁵⁾、この場合は、吸熱側へのシフトとなる。また、質量変化は、試料の分解によって引き起こされることが多い。アルカリ溶液中での加熱により、澱粉の低分子化が起こることが知られており^{113, 126, 127)}、今回観察されたベースラインのシフトは、測定中の加熱により澱粉が低分子化したことによる可能性がある。この現象は糊化前後での熱容量の相違で示されることから、糊化開始温度である 80°C 付近以上で生じるものと考えられ、熱処理を伴わない RT-CaCCO 法の最適化条件に直接反映される情報とはならないものの、加熱時に低分子化を引き起こすような構造の変化が水酸化カルシウム濃度 10%以上の処理で起きている可能性がある。糖はアルカリ中で加水分解や還元末端からの β 開裂反応が進行することが報告されており、澱粉糖化物の回収率の低下を招くことから、注意が必要である¹²⁸⁾。

水酸化カルシウム濃度 10%未満では、 T_p の上昇と ΔH の減少の両方の現象が観察されるが、水酸化カルシウム濃度 10%程度以上では双方とも一定の値となった。澱粉が糊化した場合、通常 ΔH は測定されなくなる。一定濃度以上の水酸

化ナトリウムまたは水酸化カリウム溶液中では、室温でも糊化することが知られており、水素結合切断による構造不安定化の作用が、アルカリによる構造安定化の作用よりも大きいときに糊化状態となると考えられるが、水酸化カルシウムの場合、二価のカルシウムイオンによる架橋効果が、室温糊化を抑制している可能性がある。

水酸化カルシウム処理後に中和しても、糊化温度は未処理の状態には戻らなかった (Fig. 2.7 A)。この原因については、澱粉粒の外に存在する炭酸カルシウムの影響ではなく、水酸化カルシウム処理によって澱粉粒の内部に入り込んだカルシウムイオンが澱粉内部で中和されて析出し、糊化に影響を及ぼした可能性がある。あるいは、内部に入り込んだカルシウムイオンの一部が中和されずに、内部に残って糊化温度を上昇させている可能性がある。 ΔH は中和前後で変化せず、アルカリ処理により糊化が促進したものの、中和によってカルシウム架橋が外れることによる糊化促進作用は推測できなかった。さらに、炭酸カルシウムと澱粉を直接混合した試料では、 ΔH は濃度に依らず一定の値を示し、炭酸カルシウムの直接添加による糊化促進効果はないと考えられた。

アルカリ溶液中のカルシウムの存在状態としては、 Ca(OH)_2 の他に Ca(OH)^+ 、 Ca^{2+} が考えられる。澱粉は X 線照射により表面が変質してしまうことから積算回数が限定されるため、今回の XPS の実験からは結合状態の同定には至らなかったものの、水酸化カルシウム濃度 10%以下と 20%以上では結合状態が異なることが示唆され、前処理には過飽和の水酸化カルシウムが必要であることを裏付けるものと考えられる。

アミロース脂質複合体の解析において、Fig. 2.16 で観察された発熱現象は、APC の溶解によりアミロースのらせん構造が解け、脂肪酸が遊離すると同時に、溶液中に含まれる水酸化カルシウムと遊離した脂肪酸の中和反応によると考えられた。Fig. 2.1 では、特に水酸化カルシウム濃度が 15%以上の時に 100°C 付近

に発熱側へのシフトが観察されるが、これは澱粉に含まれる ALC が溶解し、遊離した脂質と同時に発熱が起きたためと考えられた。

ALC には、低い糊化温度を持つ form 1 と高い糊化温度を持つ form 2 の二つのタイプが存在する。両者は複合体を形成するときの条件により生じ、form 1 は急速にあるいは低温で複合体を形成させたときに生じ、らせん構造がランダムに配置しているものであり、form 2 は高温で複合体形成させたときに生じ、らせん構造が結晶構造を形成していると考えられている (Fig. 2.21)¹²⁰⁾。Form 2 には 2a と 2b があり、複合体形成時にはまず form 2a を生じ、その後加温等により、より安定な form 2b へ移行すると考えられる。また、form 1 の ALC を長時間加熱することで form 2 へ移行することが知られている¹²⁹⁾。移行に必要な温度や時間はアミロースの長さや脂肪酸の種類によって異なる。125°C に観察される吸熱ピークは、form 2 の APC であると考えられる。すなわち、次のように考えられる。今回調製した APC は、form 1 である。水酸化カルシウム存在下で DSC

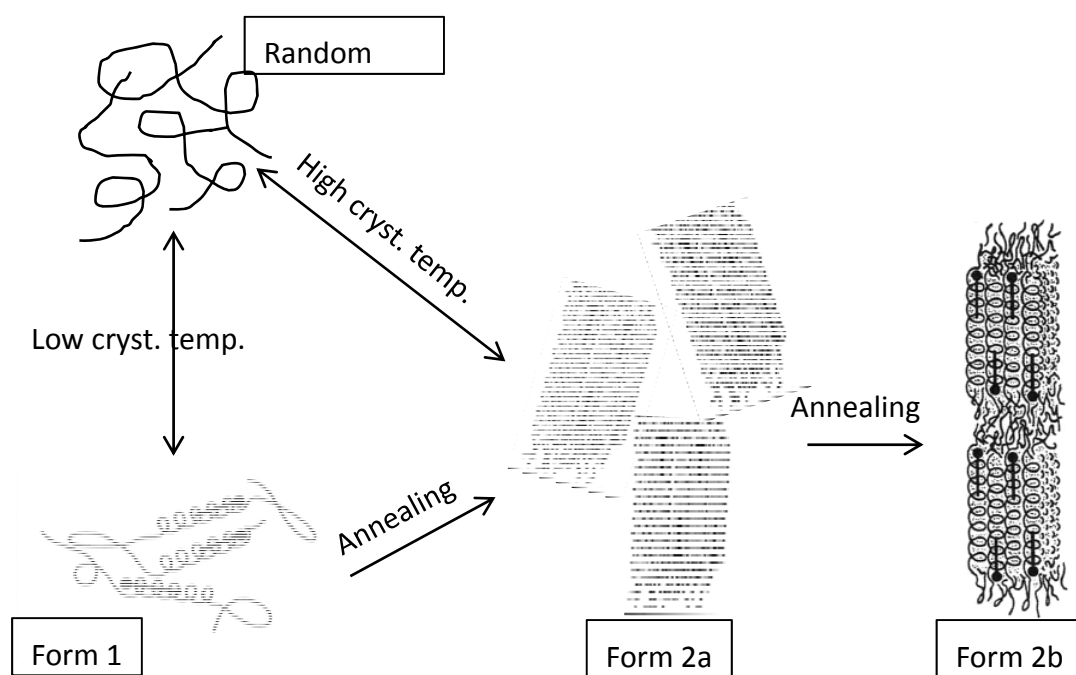


Fig. 2.21. Model structures of amylose-lipid complex.

測定を行うと、まず 80°C 付近で form 1 が糊化し、同時に遊離した脂肪酸が中和されて発熱する。その後の加熱により form 2a が生じ、125°C で form 2a が糊化する。125°C では form 2a の糊化に伴う発熱現象は観察されないことから、form 2a に内包された脂肪酸はすでに中和反応が起きた後のカルシウム塩であると考えられる。水中で糊化させた場合には form 2a と思われるピークが生じていないことから、水酸化カルシウムにより form 2a の生成が促進されたと考えられる。

さらに、中和後の糊化特性測定の結果から、水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和後には form 1 がすでに崩壊していると考えられた。Form 2a と 2b には、DSC 糊化温度では数度の差しかないものの、X 線結晶回折では 2b での結晶性が高くなっていることが観察されている¹³⁰⁾。130°C のピークは form 2b 由来であると考えられ、水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和は APC の結晶性の向上を促進したと考えられた。

加温処理後に 80°C での発熱現象が見られなくなったのは、65°C 程度の加熱でも、24 時間の処理でアミロースと脂質が解離してしまったためと考えられた。Fig. 2.19 で観察される 125°C のピークは form 2a、133°C のピークは form 2b 由来であると考えられた。

ALC の form 2b は form 2a と比較してアミラーゼに抵抗性であることが知られている¹³¹⁾。105°C 以上の加熱後の APC は、室温処理後の 30% 程度しか糖化されず、105°C 以上の加熱によって生じた DSC の 133°C のピークが form 2b であることが裏付けられる。また、定量的に残渣を集めることは困難であったため、ピークの大きさから量を推定することはできないが、form 2b の APC がアミラーゼに抵抗性であることが示された。2.2.6 の結果から、水酸化カルシウム濃度が 10% 以上の時、60°C 処理では、50°C 処理よりも ΔH が低いにもかかわらず、糖化反応 24 時間後の澱粉の糖化率が低下する傾向にあることが示されたが、この原因として、ALC が form 2b へと変化し、アミラーゼに抵抗性になったことが考

えられた。60℃処理時には、50℃処理時と比較して、温度処理による ALC の糖化率の低下が、アミロペクチン部分の糖化率上昇の効果より大きくなったと考えられる。

トルティーヤの製造試験におけるこれまでの報告では、水酸化カルシウムの濃度は、水に対する濃度として記載されている^{63, 105-109})。一方、バイオマスの前処理試験においては、バイオマス重量に対する濃度とすることが多い¹³²⁻¹³⁵)。稲わらやスイッチグラスなどの前処理において、バイオマスの量に対する水酸化カルシウムの量と水の量が前処理効果に及ぼす影響について検討されているが、水の量がバイオマスに対して7倍以上あるときには前処理効果に違いがなく、十分量の水を加えたときには水酸化カルシウム濃度が前処理効果に影響を及ぼすとしている^{133, 134})。また、水酸化カルシウムは溶解度が低く、標準の RT-CaCCO 法に用いられる 10%水酸化カルシウムは、過飽和であるため、溶液として扱うことが困難である。試料に添加する場合、水酸化カルシウムと水とを別々に加えることになるため、試料に対する濃度とするのが合理的である。RT-CaCCO 法においても、水に対するバイオマス濃度は 5%であり、水酸化カルシウム濃度はバイオマス量に対する濃度として表現していることから⁵²)、本研究でも澱粉量に対する濃度として検討した。本研究で、水酸化カルシウム濃度 10%処理が糊化の促進による糖化の改善の条件として最適と結論したが、溶液濃度としては 0.25%に相当する。この結果は、Bryant らが水酸化カルシウム濃度約 0.2%で、澱粉の糊化がもっとも促進されるとしているのに対応する⁶³)。

トルティーヤの製造では、トウモロコシ粉と水の割合を 1 : 2~3 で混合する 경우가多く、製造試験においても同様の割合を用いており、水の量の影響について検討した例は見あたらない。一方、モデル試験として検討された Bryant らの報告では、トウモロコシ粉あるいは澱粉の濃度は水に対して 5%であることから⁶³)、糊化促進効果と阻害効果が表出する水酸化カルシウム濃度についての齟

澱粉は、水の量が異なっていることが原因となっている可能性がある。澱粉が完全に糊化するためには熱糊化においてはグルコース 1 分子あたり 14 分子以上の水（水分が重量比で 61%以上）が必要とされている¹³⁶⁾。トウモロコシ粉と水を 1 : 2 で混合した場合には、粉に含まれる細胞壁の吸水性などを考慮すると、水分が不足している可能性があり、澱粉の糊化が抑制されるのは、水酸化カルシウムの影響とは別に、水分量の影響もあると考えられる。これが、これまでの報告で整合性の取れない原因の一つとなっている可能性が考えられる。澱粉のアルカリ糊化における水の役割は、熱糊化の場合とは異なると考えられることから、アルカリ条件下における澱粉濃度と糊化度の関係は熱糊化の場合と異なる部分があることが予想される。澱粉のアルカリ糊化は段ボール用接着剤に多用されており、澱粉濃度と糊化特性の関係が調査されているものの、製造速度の向上や品質向上を目的としているため、澱粉濃度は高々 40%程度までの試験となっている^{137, 138)}。アルカリ条件下における澱粉濃度と糊化度の関係の解明は今後の課題となる。

澱粉の糊化時にはアミロースが優先的に溶出するが¹³⁹⁾、逆にヨウ素や脂質によってアミロースの溶出を妨げると糊化しないことが知られている^{140, 141)}。アルカリ糊化においても、0.1%程度の水酸化ナトリウム溶液に 30 日間浸漬すると澱粉粒のアミロース含量が減少することが見いだされている^{142, 143)}。いずれの試験においても、処理によるアミロースの含量の減少分と重量の減少分は同等に近いものの、これがアミロースの溶出によるものか、アミロースの分解によるものかは明らかにされていない。城間らは、水酸化カルシウム処理後の澱粉の回収率はほぼ 100%であったことを報告している⁵²⁾。また、RT-CaCCO 法においては、前処理後に洗浄をしないことから、アミロースが溶出しても回収利用できる。このことから、本研究ではアミロースの溶出について考慮しなかった。カルシウムイオンが二価であることから、澱粉内部に架橋構造を形成しているこ

とが示唆されており、アミロペクチンの結晶性が向上することにより糊化が抑制されたと予想したが、架橋にアミロースが関与していた場合、アミロースの溶出が妨げられたことにより糊化が抑制された可能性が浮上する。一価、二価のアルカリによる処理と、溶出画分、膨潤、糊化との関係を詳細に比較検討することで、澱粉粒の構造特性と糊化・老化特性の現象解明への道が拓かれることが期待される。

第3章 稲ホールクロップへの RT-CaCCO 法の適用

本章では、成熟期の籾を含む稲地上部全体（ホールクロップ）を対象として、効率的なグルコース回収のための RT-CaCCO 法の前処理条件の絞り込みを行った。

稲ホールクロップには胚乳が含まれるため、登熟に従って茎葉澱粉は減少するものの、ホールクロップとしての乾燥重量および澱粉含量は急激に増加する。RT-CaCCO 法は主として稲わらの繊維質から効率的にグルコースとキシロースを回収するための前処理法として開発されている。前章では、モデル実験としての単離澱粉では水酸化カルシウム処理には糊化を促進する効果があることが示されたが、繊維質と澱粉が共存することによる前処理効果や酵素糖化性に及ぼす影響については、検討されていない。特に RT-CaCCO 法では、加熱処理工程がない中ではアルカリによる糊化が十分に進むことが糖化率向上のために重要である。また、ホールクロップサイレージを用いたエタノール生産の試験の中では、標準的な酵素糖化工程において澱粉分解酵素を強化することでグルコースの回収率が向上する可能性が示されている⁶⁷⁾。そこで、前章での検討結果を踏まえ、ホールクロップからの澱粉糖化率向上のための条件の絞り込みを行うこととした。

3.1 実験材料および方法

3.1.1 材料

本章では、稲ホールクロップとして、農研機構作物研究所（茨城県つくば市）の試験圃場で 2011 年に生育した成熟期のリーフスターの地上部全体を用いた。また、澱粉をほとんど含まない稲わらとして、同圃場で 2010 年に生育した成熟期のコシヒカリ地上部の籾を除いた部分を用いた。これらの材料は地際から刈り取り、直ちに 70°C で 3 日間乾燥した。長さ 3 cm 程度に切断した後、0.5 mm のフィルターを装着した 1093 Cyclotec サンプルミル（Foss Tecator, Höganäs, Sweden）で粉砕し、使用するまでアルミニウムコートサンプル袋に保存した。稲胚乳澱粉は 2. 1. 1 で単離したものをを用いた。

酵素製剤（Celluclast 1.5L、Novozyme 188、Ultraflo L）は、ノボザイムジャパン社製（千葉）を使用した。*Bacillus* α -アミラーゼ（A-6380）（*Bacillus amyloliquefaciens* 由来）は Sigma-Aldrich 製（St. Louis, USA）を用いた。*Rhizopus* sp. アミログルコシダーゼ（308-51183）はオリエンタル酵母製（東京）を用いた。特に断りがない限り、水は MilliQ（Millipore、Billerica, USA）で製造した超純水を用いた。その他試薬は、特級試薬を用いた。

澱粉粒の観察には、簡易偏光板を装着した光学顕微鏡（CKX41、オリンパス株式会社、東京）を用いた。

3.1.2 分析

澱粉含量は、総澱粉含量測定キット（Megazyme International Ireland）を用いて、amyloglucosidase/ α -amylase 法にて測定した。遊離ショ糖、グルコース含量は、sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure（Megazyme International Ireland）を用いて測定した。 β -1,3-1,4-グルカン含量は、Mixed Linkage Beta-Glucan Assay

キット (Megazyme International Ireland) を用いて測定した。セルロースおよびキシラン含量は、Park らの方法⁹⁾に従い、2 段階硫酸加水分解法を用いて測定した。

水酸化カルシウムが澱粉の糊化に及ぼす影響を調べるため、DSC を用いて糊化特性の測定を行った。稲ホールクロップ試料 (リーフスター地上部全体の粉碎物) については、乾物重に対して 0、5、10、20、30、40% w/w の水酸化カルシウムを加えて混合した。稲わら粉末 (コシヒカリの籾を除く地上部の粉碎物) と胚乳澱粉の混合物については、混合物中の澱粉の重量比が 0、5、10、20、30、40%となるように混合し、さらに、この混合物重量に対して上記と同様の比率で水酸化カルシウムを加えた。水酸化カルシウム添加後の各混合物を約 10 mg ずつステンレススチール製大容量サンプルカップセルにはかり取り、混合物と水の重量比が 1:5 となるように水を加え、密閉した。DSC の測定は 1.1.3 と同様、Diamond DSC (Perkin-Elmer, Shelton, USA) を用いて行った。

α -アミラーゼ活性は、Ceralpha 法 (Megazyme International Ireland) を用いて測定した。Ceralpha 法では、保護された *p*-ニトロフェニルマルトヘプタオシド (*p*-nitrophenyl maltoheptaoside, BPNPG7) を基質とし、過剰の耐熱性 α -グルコシダーゼ存在下で測定を行う。基質が α -アミラーゼで分解されると、生じたニトロフェニルオリゴ糖が α -グルコシダーゼで速やかに分解され、*p*-ニトロフェノールが遊離することを利用し、 α -アミラーゼ活性を測定する。1 Ceralpha Unit は、1 分間に BPNPG7 から 1 μ mole の *p*-ニトロフェノールを遊離させるのに必要な酵素量として定義される。アミログルコシダーゼ活性は、 β -グルコシダーゼ存在下で *p*-ニトロフェニル- β -マルトシドを基質とする方法 (Megazyme International Ireland) で測定した。1 Unit は、1 分間に *p*-ニトロフェニル- β -マルトシドから 1 μ mole の *p*-ニトロフェノールを遊離させるのに必要な酵素量として定義される。

3.1.3 RT-CaCCO 法中の前処理

稲ホールクロップ試料（乾物重 200 mg）と水酸化カルシウム（10、20、40 または 80 mg）を 10 mL 容のバイアル瓶に量り取り、4 mL の水を加えてよく混合した。RT-CaCCO 条件では、バイアル瓶をブチルゴム栓とアルミニウムキャップで密閉し、25°C で 7 日間保存した。試料の中和には、バイアル瓶内のガスを二酸化炭素ガスで置換し、二酸化炭素ガス圧 0.15 MPa で 20 分間保持した。MHT（mild heat treatment）では、25°C で 7 日間保存した後、50°C で 1 日保存し、同様に二酸化炭素ガス吹きつけによって中和した。

3.1.4 酵素糖化

前項の条件で水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和を行った試料に対し、酵素溶液 1 mL を加え、50°C で酵素反応を行った。酵素溶液は次のものを用いた。①CNU 酵素溶液：上記試料 1 g 当りに用いた酵素製剤および pH 6.5 における活性は、Celluclast 1.5L（12 filter paper degrading units (FPU) および 30 xylanase units(XU)）、Novozyme 188（7.2 cellobiase units(CbU)）、および Ultraflo L（40 XU および 2.0 CbU）。②AG 酵素溶液：上記試料 1 g 当りに用いた酵素液および pH 6.0 における活性は、*Bacillus α*-アミラーゼ（5 CU）および *Rhizopus sp.* アミログルコシダーゼ（25 U）。③ACNU 酵素溶液：CNU 酵素溶液に上記試料 1 g 当たり *Bacillus α*-アミラーゼ（5 CU）を加えたもの。④GCNU 酵素溶液：CNU 酵素溶液に上記試料 1 g 当たり *Rhizopus sp.* アミログルコシダーゼ（25 U）を加えたもの。酵素溶液添加後、1、2、4、8、24、48 および 72 時間後に反応液を採取し、15,000 × g で 5 分間遠心分離し、上清のグルコース含量をグルコース C-II テストキットワコー（和光純薬工業株式会社）で測定した。糖化後の上清のオリゴ糖含量を推定するため、上清に 0.7 M となるように 1 M 塩酸を上清に加えた後、100°C で一時間反応させた後にグルコース含量を測定した。

3.2 結果

3.2.1 RT-CaCCO 法の稲ホールクロップ試料への適応

本研究で用いたリーフスターホールクロップ試料の炭水化物の含量を、総乾物重に対する重量比で示すと、総澱粉含量 26.4%、ショ糖 3.7%、遊離グルコース 2.2%、 β -1,3-1,4-グルカン 1.6%、セルロース 16.2%、キシラン 8.9%であった。酸加水分解により試料中の総グルコース含量を求めた結果、理論的には乾物重 100 mg の試料から 51.8 mg のグルコースが遊離することが判明した。ホールクロップ試料を標準的な RT-CaCCO 法による処理に供した。すなわち、25°Cにおいて 10%水酸化カルシウム（乾物重に対する重量%）で 7 日間処理した後、二酸化炭素で中和し、RT-CaCCO 法で標準的に使用される CNU 酵素溶液を用いて糖化した。Fig. 3.1 に示すように、この条件下では糖化率が理論値の 53.3%にとどまった。

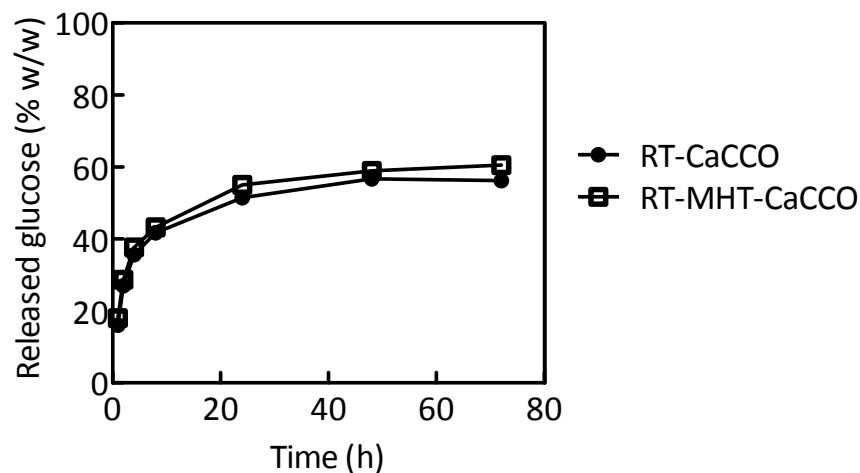


Fig. 3.1. The enzymatic saccharification of Leafstar whole-crop samples after RT-CaCCO (-●-) or RT-MHT-CaCCO (-□-) treatments.

Taken from ref ¹⁵⁹).

水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和後、糖化前と 72 時間糖化後に、固体画分を回収して顕微鏡観察をおこなった結果、糖化前後のいずれにおいても偏光十字が観察された。糖化後には澱粉粒がへこむなどの変形しているものや、偏光十字が不明瞭になっているものも見受けられるが、糖化後においても依然澱粉の結晶性が保たれているものが多く存在することが推察された (Fig. 3.2)。固体画分をエタノールで洗浄した後に澱粉含量を測定して求めた澱粉の糖化率は 39.6%であった。固体画分に含まれる澱粉重量あたりの糊化エンタルピーは 15 J/g から 26 J/g に増加していた。X 線回折分析から算出された稲胚乳澱粉の結晶化度は約 38%とされている¹⁴⁴⁾。ホールクロップに含まれる澱粉の結晶化度を、38%程度とすると、糖化後の固体画分に含まれる澱粉の結晶化度は計算上 66%程度となり、結晶質部分の比率が高まっていた。液体部分には、マルトースやマルトオリゴ糖は検出されず、糖化によって遊離した澱粉由来の α -グルカン は、すべてグルコースまで分解されていた。セルロースの糖化率は 59.1%と計算された。Shiroma らの報告⁵²⁾と比較して、澱粉を多く含む試料のセルロース糖化率は低く、水酸化カルシウム処理の効果が低くとどまった。

第2章では、単離した澱粉を用いて試験を行った場合、二酸化炭素中和の前のMHTが澱粉の糊化を促進することにより、澱粉の86.3%が糖化されることが示された。そこで、前章にならい、ホールクロップ試料にMHT処理を適用したが、効果はほとんど認められなかった (Fig. 3.1)。ホールクロップ試料に対する標準的なRT-CaCCOあるいはRT-MHT-CaCCO処理では、糊化が不十分であったか、アルカリ糊化澱粉の糖化の酵素活性が不十分であったと推察し、これを検証するために以下の実験を行った。

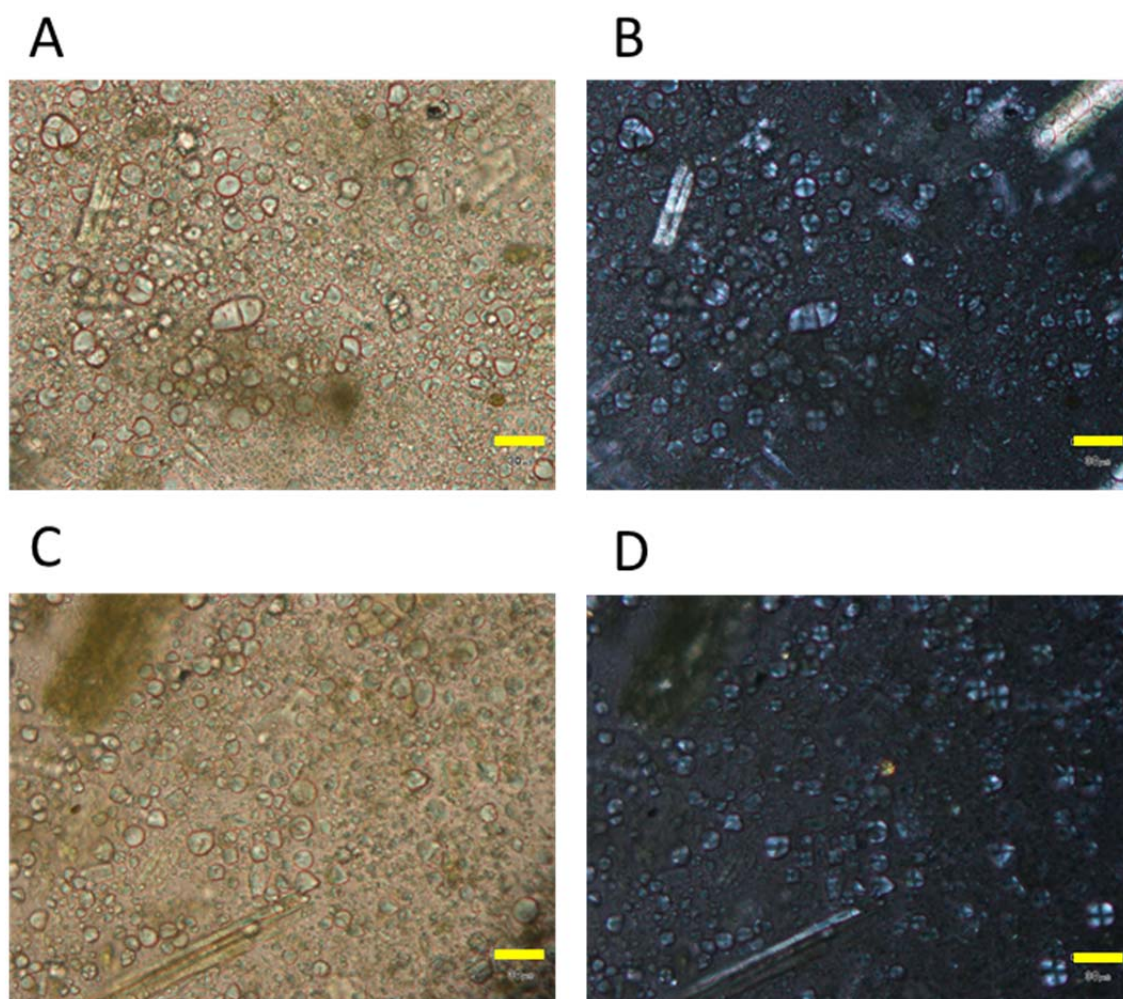


Fig. 3.2. Light micrograph (A, C) and polarized micrograph (B, D) of solid part of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treated and CO_2 neutralized Leafstar whole-crop samples before (A, B) and after (C, D) enzymatic saccharification. Bars in the micrographs indicate 30 μm .

3.2.2 水酸化カルシウムが澱粉の糊化に及ぼす影響

アルカリ処理による澱粉糊化の最適条件を見いだすために、水酸化カルシウム処理がホールクロップ試料中の澱粉の糊化に及ぼす影響について DSC 測定を行った。リーフスターの単離胚乳澱粉、リーフスター単離胚乳澱粉に澱粉を殆ど含まないコシヒカリのわら粉砕物を混合したもの、リーフスターの単離稈部澱粉、リーフスターの稈部粉砕物、リーフスターホールクロップ粉砕物についてそれぞれ DSC 測定を行った結果を Fig. 3.3 A に示した。ホールクロップ試料の DSC 曲線は、2つの明瞭なピークを示した。単離した胚乳澱粉の糊化温度 T_p はホールクロップのいずれのピークよりも低い値を示していたが、稲わら粉砕物を混合して測定すると、 71.2°C のピークの値と一致した。また、稈部澱粉も同様に単離した場合と稈部粉砕物では値が異なり、稈部粉砕物が 81.1°C のピークと一致した。そこで、 71.2°C のピークは胚乳澱粉、 81.1°C のピークは稈部澱粉由来と同定した。澱粉の糊化温度は、稲わらの成分により影響を受けることが判明した。

本章では、ホールクロップとしての茎葉、籾の混合物を試料としているため、両ピークの面積の合計値を用いて、水酸化カルシウム処理の影響を確認した。試料を封入したサンプル容器を、RT 処理では 25°C で7日間、RT-MHT 処理では 25°C で7日間処理した後に 50°C で1日間さらに処理し、DSC 測定を行った。水酸化カルシウムの濃度が上昇するに従い、RT 処理、RT-MHT 処理の両方で、いずれのピークの T_p も上昇した (Fig. 3.3 B および C)。 ΔH は RT 処理の水酸化カルシウム濃度が上がるに従い減少し、MHT ではさらにこれが促進された (Fig. 3.4)。第2章で示したように、単離澱粉を試料とした場合は、水酸化カルシウム濃度が9%程度で T_p の上昇と ΔH の減少の促進現象は横ばいとなったが、ホールクロップ試料での糊化程度を最大とするには、より高い30%程度まで上げるが必要があった。

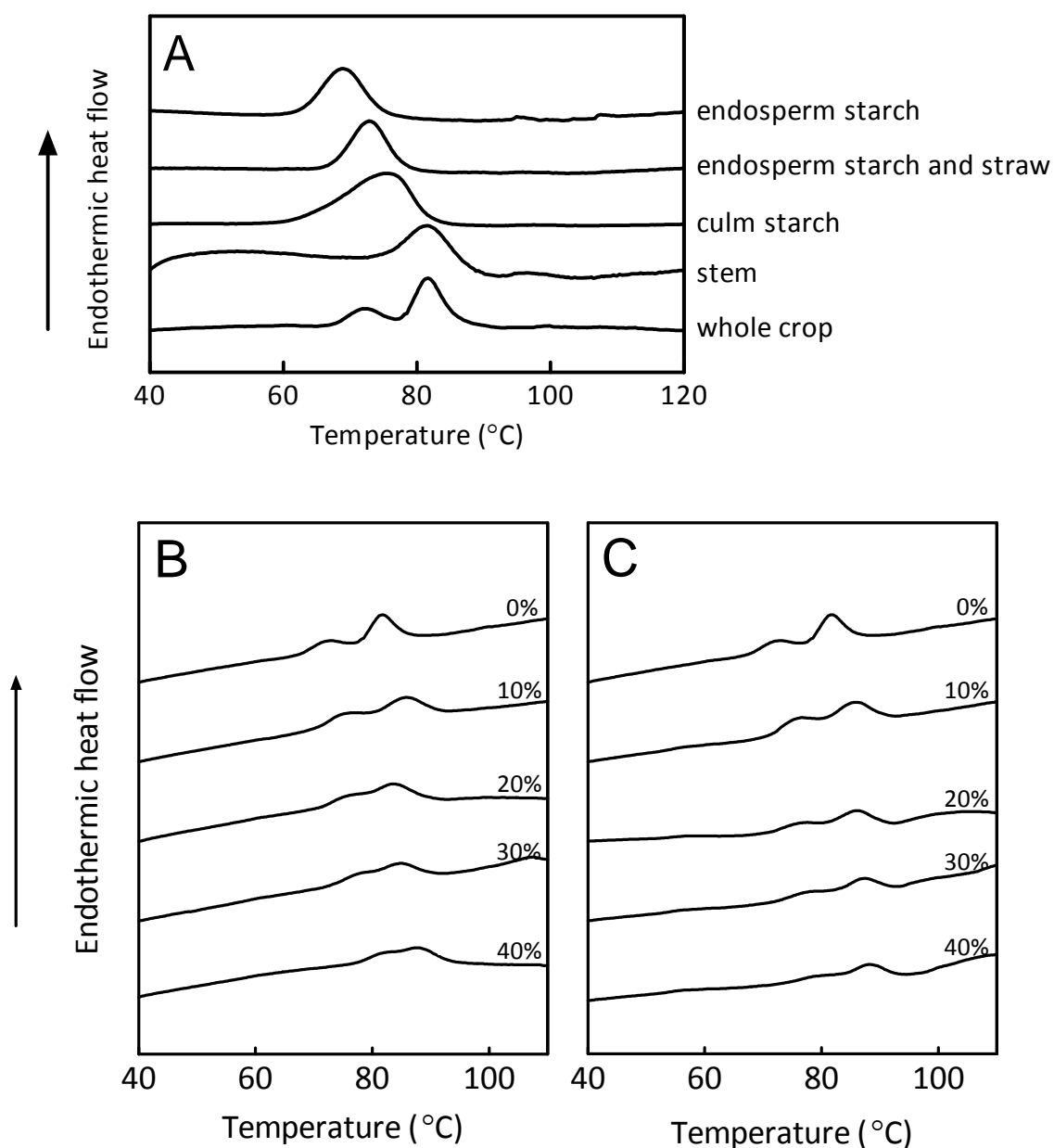


Fig. 3.3. Differential scanning calorimetry (DSC) profiles of Leafstar starch samples.

A: Isolated Leafstar endosperm starch, a mixture of isolated Leafstar endosperm starch and Koshihikari straw, isolated Leafstar culm starch, powdered Leafstar stem, and powdered Leafstar whole crop were used for measurement. Samples were treated with Ca(OH)₂ at various concentrations with **B:** RT conditions and **C:** RT-MHT conditions. Numbers indicate the Ca(OH)₂ concentration as a percent of the sample dry weight. B and C taken from ref¹⁵⁹.

水酸化カルシウム処理の効果的な濃度は、城間らの報告から稲わらで20%⁵²⁾、第2章から単離澱粉では10%であることが示されており、今回のホールクロップ試料試験結果からは、より高い水酸化カルシウム濃度が必要となるものと示唆された。そこで、稲わら成分と澱粉の両方が混在していることがこの現象を引き起こしているとは仮説を立て、モデル実験として、澱粉を殆ど含まないコシヒカリ稲わらと単離澱粉を混合し、水酸化カルシウムの濃度の影響を確認した。澱粉濃度が10%以下の場合、水酸化カルシウムの濃度によらずRT処理により ΔH が低くなった。澱粉濃度が20%以上の場合、水酸化カルシウム濃度が高くなる程 ΔH は低下した。RT-MHT処理でも同様の傾向が見られ、その程度としては、全体として ΔH は低下していたが、澱粉濃度が10%以下の場合でも水酸化カルシウム濃度が10%では ΔH が高かった (Fig. 3.5)。澱粉濃度が20%以下の場合、RT-MHTによって澱粉を十分に糊化するためには水酸化カルシウム濃度20%が必要であり、澱粉濃度が高い場合には、水酸化カルシウム濃度30%が必要であった。今回用いたホールクロップ試料の場合、澱粉濃度は26.4%であったため、十分に糊化するためには水酸化カルシウム濃度は30%が必要であった。

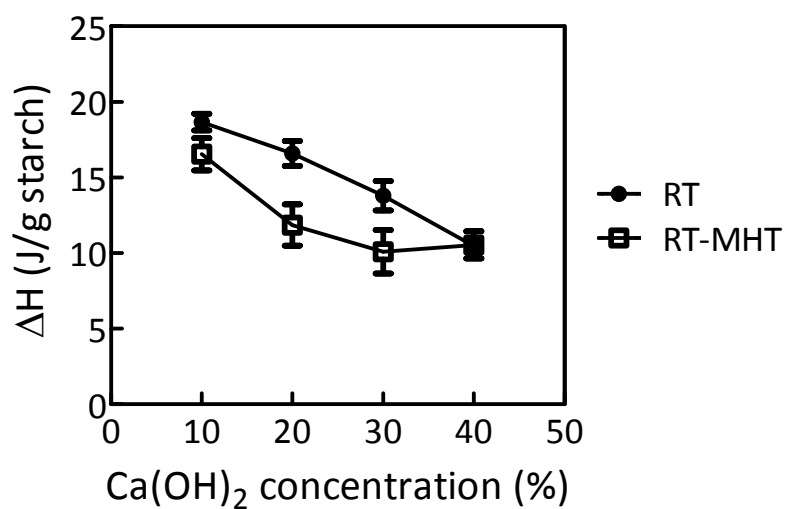


Fig. 3.4. The effect of the Ca(OH)_2 concentration on the gelatinization enthalpy (ΔH) of Leafstar whole-crop samples with RT (-●-) or RT-MHT (-□-) conditions. Taken from ref¹⁵⁹.

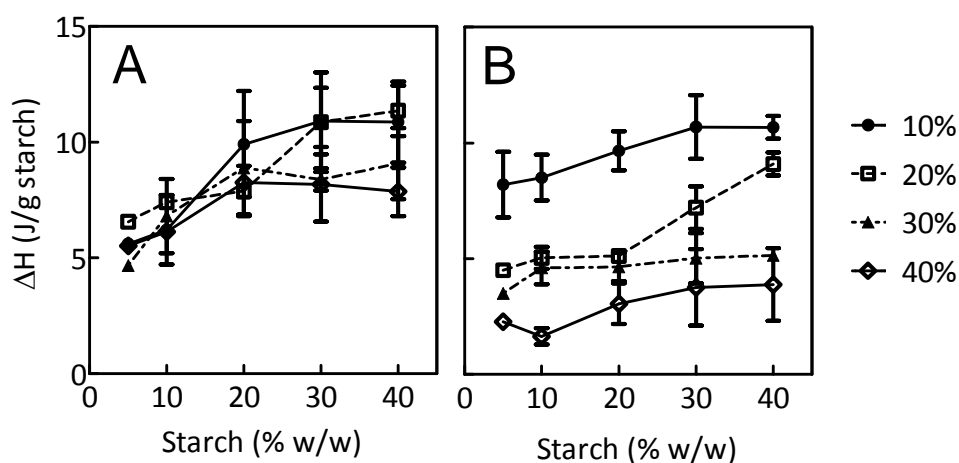


Fig. 3.5. The effect of starch and Ca(OH)_2 concentrations on the ΔH of the Koshihikari straw-starch mixture with A: RT conditions and B: RT-MHT conditions. Ca(OH)_2 concentrations as the percent of the sample dry weight: (-●-), 10%; (-□-), 20%; (-▲-), 30%; and (-◇-), 40%. Taken from ref¹⁵⁹.

次に、X線回折分析を用いて、ホールクロップに含まれる結晶性物質への水酸化カルシウムの影響の分析を行った (Fig. 3.6)。ホールクロップの回折パターンでは、二つのブロードなピークが観察された。このうち、 18° 付近のピークは澱粉の最もピーク強度の大きいピークと一致し、水酸化カルシウム濃度の上昇に従い減少し、30%以上で最小となった。 22° 付近のピークも同様に水酸化カルシウムの濃度上昇とともに減少したが、減少の程度は澱粉のピークよりも低かった。水酸化カルシウムのピークは、2.2.5で示したように、澱粉のみの場合と同様、水酸化カルシウム処理濃度 20%以上で検出され、本章で得られている前処理に 30%必要であるという結果と一致しなかった。一方、中和後の回折パターンでは、澱粉のみの場合とは異なり、炭酸カルシウムのピークは水酸化カルシウム濃度 20%以上でのみ検出された。

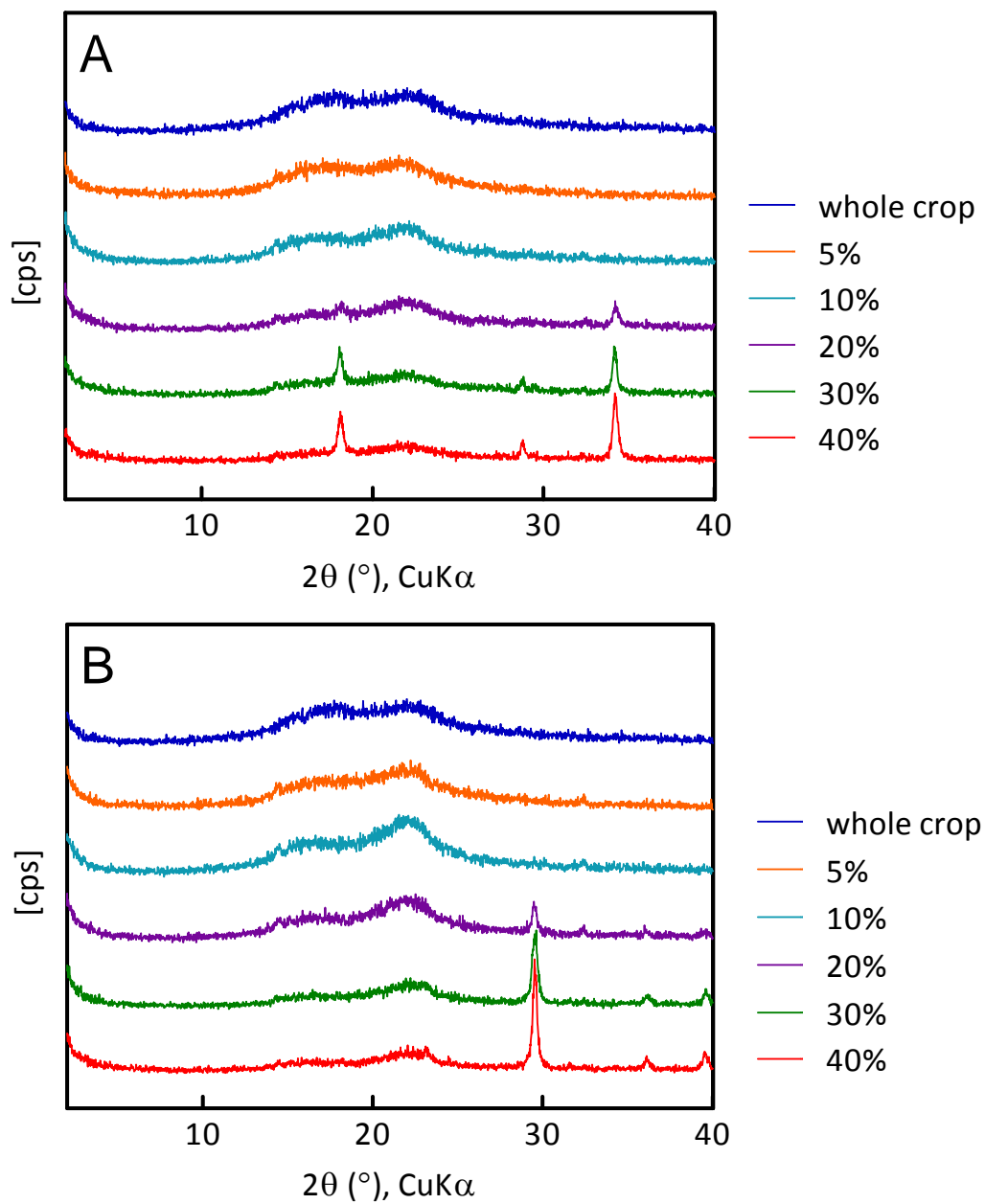


Fig. 3.6. X-ray diffraction patterns of whole crop sample after treatment with various Ca(OH)_2 concentrations (A) of treated with Ca(OH)_2 and neutralized with CO_2 (B), and freeze dried.

The numbers indicate Ca(OH)_2 concentrations (w/w) as percentage of dry sample.

3.2.3 酵素添加の効果

前節で RT-CaCCO 条件下でホールクロップ試料の糖化率が低い原因として、糊化が不十分であった可能性について述べたが、もう一つの可能性として、澱粉の糖化のためには酵素活性が十分でない可能性について検証した。糖化時の反応液中の α -アミラーゼおよびアミログルコシダーゼ活性の変化を Fig. 3.7 A に示した。 α -アミラーゼ活性は 72 時間後に 95%以上保持されていたが、アミログルコシダーゼ活性は 10%程度にまで低下していた。酵素添加の効果を確認するため、標準の RT-CaCCO 条件下で用いられる CNU 酵素溶液に、 α -アミラーゼまたはアミログルコシダーゼをそれぞれ添加した ACNU、GCNU を調製した。Fig. 3.7 B に示すように、10%水酸化カルシウム条件下での RT-CaCCO 処理後の糖化性で比較すると、いずれの酵素を添加した場合でも、酵素糖化性は向上した。

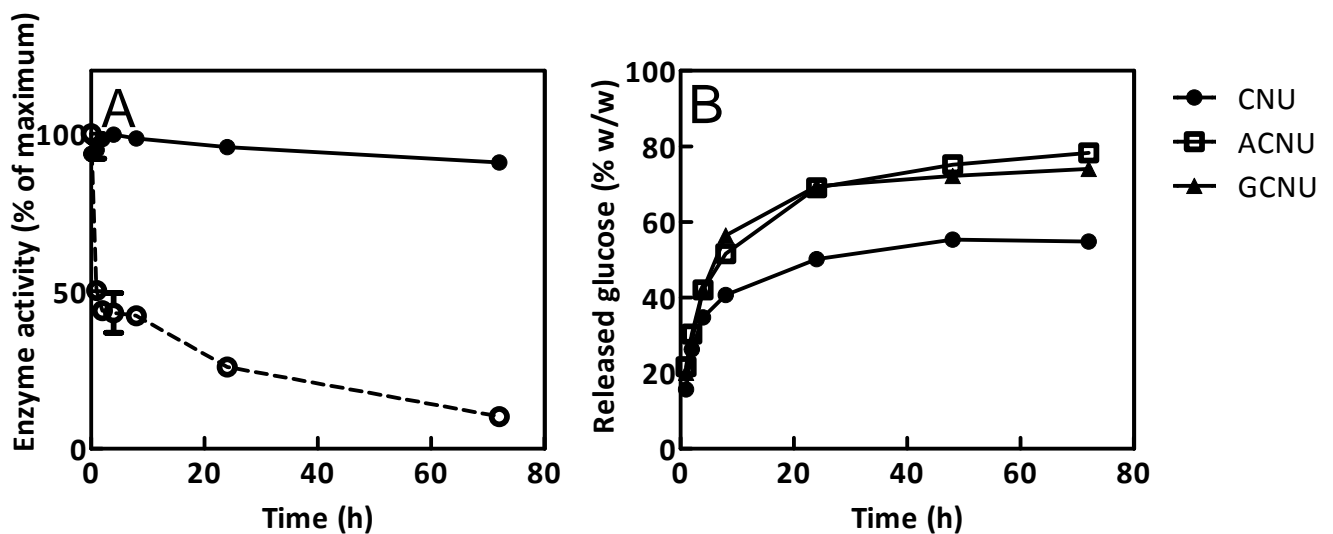


Fig. 3.7. A: Enzyme activity remaining in the saccharification solution.

Enzymes: (-●-), α -amylase; (-○-), amyloglucosidase. B: The effect of added enzymes on the saccharification of Leafstar whole-crop samples in the RT-CaCCO process with 10% $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Enzyme preparations: (-●-), CNU; (-□-), ACNU; and (-▲-), GCNU.

3.2.4 酵素糖化の改善

リーフスターホールクロップ粉砕試料について 30%水酸化カルシウム条件下で RT-CaCCO および RT-MHT-CaCCO 処理を行った後に、ACNU 酵素溶液で糖化し、糖化の改善効果を確認した。Fig. 3.8 に、8 時間後および 72 時間後の総グルコース遊離量を示した。CNU 酵素溶液での糖化で比較した場合に、MHT により、糖化率は 52.4%から 65.5%に上昇した。RT-MHT-CaCCO 処理と ACNU 酵素溶液の組み合わせで、糖化率は 79.8%まで改善した。

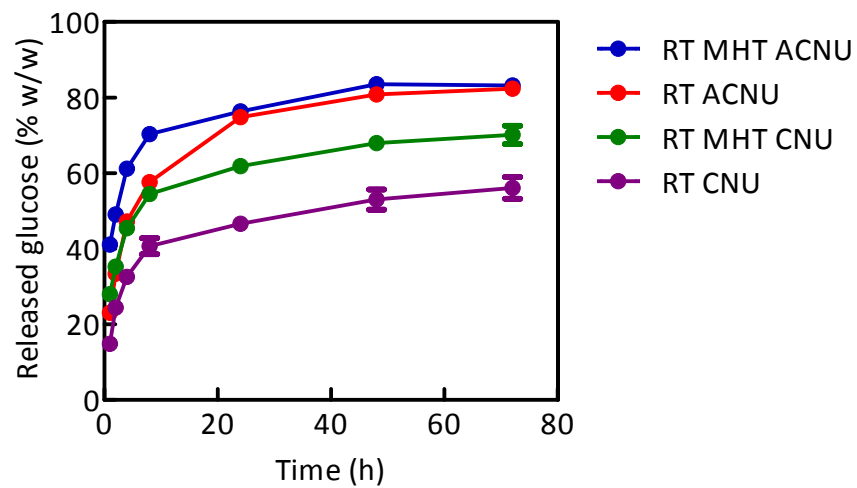


Fig. 3.8. Glucose release after enzymatic saccharification of Leafstar whole-crop samples in the RT-CaCCO and RT-MHT-CaCCO processes with different enzyme preparations.

3.3 まとめと考察

稲ホールクロップ試料に RT-CaCCO 処理を施した場合、各炭水化物成分のうち、遊離グルコースはアルカリにより分解されてしまうが、澱粉は総回収量の半分以上を占め、澱粉からは大部分のグルコースが回収可能と期待されることから⁵²⁾、澱粉の有効利用が必要であることが示唆された。リーフスターホールクロップ試料には、回収可能なキシロースの 5.5 倍の回収可能なグルコースが含まれていた。バイオエタノール生産によく使用される *Saccharomyces cerevisiae* は、キシロースからエタノールを生産できない。キシロースからエタノールを生産できるようにするためには、遺伝子組み換え、育種などにより五炭糖発酵能を付与する必要がある、含量の少ないキシロースの回収を考慮することは、生産コストを上げる要因となる。六炭糖のみを回収することで生産工程の負担の軽減となることから、本研究においては、六炭糖、特にグルコースの回収のみを考慮した。

水酸化カルシウムによる糊化温度の上昇程度は、茎葉澱粉と胚乳澱粉で異なっており、茎葉澱粉では 40%の水酸化カルシウムを加えても糊化温度が上昇していた。顕微鏡観察により、リーフスターの茎葉澱粉と胚乳澱粉では、形状と粒径が大きく違っていることが確認できる (Fig. 3.9)。粒径の大きい茎葉澱粉では、体積も大きいため、水酸化カルシウムが澱粉粒内に保持される量も大きくなる可能性がある。さらに、澱粉の構造の違いがアルカリ処理の効果の差に反映されている可能性もあり、構造とアルカリ処理効果の関係については今後の課題となる。

Shiroma らの報告⁵²⁾によれば、水酸化カルシウム濃度が 20%の場合、RT 処理中の稲わらの pH は 12.1 程度で安定している。pH 12.1 では、ヘミセルロースのアセチル基やフェルロイル基などのエステルやリグニン分子内のエステルが加水分解されるとともに、リグニンやシリカの一部が可溶化し、酵素糖化性が向

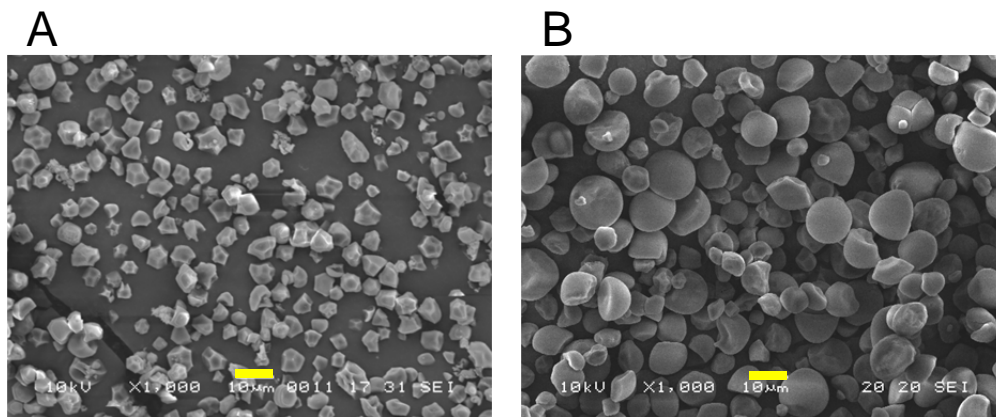


Fig. 3.9. Scanning electron micrographs of starch samples from A: endosperm, and B: clum of Leafstar. Bars in the micrographs indicate 10 µm.

上する。このように水酸化カルシウム前処理は、ヘミセルロースのアセチル基の除去とリグニンの除去に効果が高い一方で、セルロースの結晶性を低下させる効果は薄いことが示されている¹⁴⁵⁾。Shiroma らは、稲わらを RT-CaCCO 前処理した後に固体部分に残った成分を定量し、リグニン、キシラン、灰分が減少していることを示している。繊維質の水酸化カルシウム処理によるセルロース糖化性の向上は、セルロース結晶性の低下によるものではなく、セルロースを取り巻くリグニンやヘミセルロースからなるマトリクス除去による効果の結果であると考えられる。ホールクロップのセルロースの糖化率が Shiroma らの報告と比較して低くとどまった原因として、水酸化カルシウムが繊維質以外の物質と相互作用している可能性が示唆された。

一方、カルシウムイオンは、ヘミセルロースのイオン化した水酸基、カルボキシル基^{51,146)}、リグニンのフェノール基、澱粉の水酸基と強く結合すると考えられる⁶⁴⁾。Fig. 3.6 の X 線回折図では、18° 付近のピークは澱粉に帰属するものと考えられたが、22° 付近のピークは、データベースの opal ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) または cristobalite (CT: SiO_2) の近傍であることから、稲のケイ酸蓄積体であるオパール CT 由来であると考えられた。稲のケイ酸蓄積量は、稲わらでも 10 数%に

なり、特に粍殻での蓄積量は 20 数%にもなることが知られている²³⁾。セルロースの回折ピークは量の多い澱粉およびオパール CT のピークと重なって観測できなかったものと考えられる。中和後の炭酸カルシウムのピークが、澱粉のみの場合とは異なり処理濃度 20%以上でのみ検出されたことから、ホールクロップ処理時には、中和によっても炭酸カルシウムとならないようなカルシウム化合物が生じている可能性が示された。ケイ酸は水酸化カルシウムと反応することから、これにはケイ酸が関与している可能性がある。

さらに、水酸化カルシウムから生じるカルシウムイオンのリグニン、ヘミセルロース、澱粉への結合は pH および温度依存性が報告されている¹⁴⁷⁾。MHT 条件下では、吸着が促進され、RT-CaCCO 条件下に比べて前処理として高い水酸化カルシウム濃度が必要であった可能性が考えられる。

本実験で得られたデータは、リーフスターのみならず、澱粉と繊維質の共存する様々な材料に対して、水酸化カルシウム処理条件を決定する際の指標となりうると考えられる。

標準的な RT-CaCCO 条件下で用いられる CNU 酵素溶液は、pH 6.0 で 1.9 CU/mL の α -アミラーゼ活性および 5.7 U/mL の アミログルコシダーゼ活性を示し、いずれの活性も Novozyme 188 製剤由来であった。3.2.1 で示されたように、CNU 酵素溶液を用いた場合、72 時間の澱粉糖化率が 39.6%であったのに対し、AG 酵素溶液を用いた場合では、糖化率は 86.3%であった。AG 酵素溶液と CNU 酵素溶液は、可溶性基質を用いた活性測定で、同等の α -アミラーゼ活性およびアミログルコシダーゼ活性をもつように調製してあるので、双方に含まれる酵素は異なる作用機構を有していると考えられた。

細菌およびカビの生産する α -アミラーゼは、液化型と糖化型に分類することができる⁴⁴⁾。両酵素の分解様式は異なり、糖化型の α -アミラーゼによる加水分解では、速やかにグルコース、マルトース、マルトトリオースおよび分岐オリ

ゴ糖が生成する。それに対し、液化型の α -アミラーゼによる加水分解では、基質溶液の粘度が速やかに低下するものの、分解限度は糖化型よりも低く、加水分解生成物は各種マルトオリゴ糖と分岐オリゴ糖となる。カビの生産する α -アミラーゼは主に前者に分類されるのに対し、*B. amyloliquefaciens* の生産する α -アミラーゼは後者に分類される^{148, 149)}。CNU 酵素溶液中の α -アミラーゼ活性は、72 時間反応後も 1.85 CU/mL であり、活性を保っていたが (Fig. 3.7 A)、*Bacillus* の α -アミラーゼを添加することにより、劇的にホールクロップ試料からのグルコース遊離が促進された。これは、添加した α -アミラーゼにより、澱粉からアミログルコシダーゼの基質となりうる新たな非還元末端が露出したことを意味しており、 α -アミラーゼとアミログルコシダーゼの相乗効果により分解が促進されたと考えられる^{45, 46, 150-152)}。添加した *Bacillus* 由来 α -アミラーゼは、Novozyme 188 製剤 (*Aspergillus niger* 由来) に含まれる α -アミラーゼと比較して、アミログルコシダーゼの基質を効率的に生産すると考えられる。

澱粉の糊化は、吸水と澱粉粒の膨潤を伴う、結晶構造の崩壊と定義されている。十分な水の存在下で加熱した場合、糊化が促進されることにより、アミラーゼ等による糖化が十分に進行する。一方、アルカリ処理は、結晶構造の崩壊と安定化の両方の作用をもつ⁶⁴⁾。アルカリ条件下では、水酸化カルシウムによる前処理によりカルシウム架橋が生じ、澱粉粒の膨潤、結晶構造の崩壊を妨げると考えられる。水酸化カルシウム処理をした澱粉は、Novozyme 188 製剤中の α -アミラーゼで十分に分解される基質ではないと思われる。

一方、CNU 酵素溶液中のアミログルコシダーゼ活性は、72 時間反応後には 0.58 U/mL となり、活性の 90% が失われていたが (Fig. 3.7 A)、反応上清中の糖の分析から α -アミラーゼにより遊離したグルカンはすべてグルコースまで分解されていることが確認され、CNU 酵素溶液中には十分なアミログルコシダーゼ活性が含まれていたと考えられる。アミログルコシダーゼ添加による糖化率の上昇

は、結晶性の澱粉が直接分解されたことによると考えられる。反応液の pH は、常に 6.0 から 6.2 に保たれていた。*Bacillus* 由来 α -アミラーゼと *Rhizopus* 由来アミログルコシダーゼの至適 pH はそれぞれ 5.9 と 4.5 とされている。反応条件はアミログルコシダーゼ活性の至適 pH および安定 pH からはずれているため、澱粉分解効果が得られるために必要な酵素量は多くなる。従って、効率的な糖化には *Bacillus* 由来 α -アミラーゼを添加することが必要であると考えられる。

RT、水酸化カルシウム 10%条件下で酵素添加したときの糖化率は 78.2%、RT-MHT、水酸化カルシウム 30%条件下での糖化率は 79.8%であり、1.6%の違いとして表現された。結晶性澱粉に対する分解性の比較的高いアミラーゼの追加による 72 時間反応後の効果が、MHT の効果よりも見かけ上大きく表現されている。第 2 章では、アミロース脂質複合体の加温により、糖化に抵抗性を示す form 2b への移行が確認されている。第 1 章ではリーフスター稈部澱粉の脂肪酸量は高くないことが示されているが、稲ホールクロップには胚芽由来のものをはじめとする脂質が含まれていることが知られており、水酸化カルシウム存在下で加熱した際にこのような脂質を巻き込みながら form 2a が形成され、最終的な糖化率が上がらない原因となっている可能性がある。しかしながら、8 時間後のグルコース遊離量で比較すると、RT-MHT-ACNU の条件下 (71.9%、Fig. 3.8) では RT-ACNU 条件下 (56.6%、Fig. 3.8) よりも有意に高い値を示しており、初期の糖化が速くなっている。今後、糖化条件を最適化する中で、水酸化カルシウム濃度と MHT が反応時間の短縮や酵素量の低減などの効果を発揮すると考えられる。

RT-MHT-CaCCO 処理後に ACNU 酵素溶液で 72 時間反応させた後の固体画分について澱粉含量を測定し、澱粉とセルロースの糖化率を計算したところ、総澱粉量の 87.0%、セルロースの 65.9%が糖化されていた。ACNU 酵素溶液による糖化率は、AG 酵素による糖化率 (90.5%) とほぼ同等であった。AG 酵素溶液

を用いても、澱粉の約 10%がアミラーゼとアミログルコシダーゼで分解されずに残る。この理由として、水酸化カルシウム処理では澱粉が十分に糊化されず、結晶性の領域が残ること、二酸化炭素による中和の際に澱粉と炭酸カルシウムが凝集して難分解性となること¹⁵³⁾、アミロース-脂質複合体が形成されること⁵⁹⁾、繊維状の部分に澱粉が物理的にトラップされることなどが考えられる。

セルロースの分解は、水酸化カルシウムの増加、MHT、酵素追加により 59.1%から 65.9%に上昇した。Shiroma らの報告では、RT-CaCCO 法において水酸化カルシウム濃度を 20%以上に上げることにより最大のセルロース糖化率が得られることが示されており⁵²⁾、水酸化カルシウム量を 10%から高めた効果が大きいと考えられる。一方、グルコースなどの反応生成物の濃度が上昇した場合、セルラーゼ活性に阻害的な働きをすることが知られている^{154, 155)}。Novozyme 188 製剤中の β -グルコシダーゼに対して、*p*-ニトロフェニル β -グルコピラノシドを基質としたときの添加グルコースの阻害効果は、 K_i が 0.1~0.2%程度となった(池、私信)。澱粉含量の高い試料を糖化する場合、グルコースが多く遊離することにより β -グルコシダーゼ活性が阻害され、セルロースの糖化が抑制される可能性がある。澱粉由来のグルコースを回収しつつ、セルロースの糖化効率を低下させないためには、並行複発酵の実施によって反応溶液中のグルコース濃度の上昇を抑制するなどの注意が必要である。

本研究では 10 mL バイアルというごく小規模での RT-CaCCO 法改良のための検討を行ったが、将来的には、400 kL 程度のタンクを用い、生成されるエタノールとしては、1 L あたり 100 円の製造コストで、一日あたりおよそ 50 kL、年間 15,000 kL の製造規模の比較的小規模なプラントでの活用を想定している。現在筆者の属する研究室では、19 L の発酵槽を用いたバイオエタノール生産検討が進められている。スケールアップによる問題として、特に糖化に関わる部分では、攪拌の問題と酵素の問題が指摘される。実験室内ではバイアルごとロー

タリーミキサーで回転させ、バイアルの中身は常に上下反転する条件で攪拌されるが、容器が大きい場合には中に羽を入れて攪拌することになる。粉碎した稲わらを水に懸濁した際に、粉碎状態によっては稲わらに泡が付着して浮いて攪拌効率が悪くなる。その一方で澱粉は沈み、糊化が進むと懸濁液に粘性が生じて攪拌が困難となる。酵素にかかわる部分として、酵素の種類による至適 pH の違い、至適温度と安定温度の差などが問題となる。二酸化炭素で中和した後の pH は約 6.0 で、多くの酵素にとって最適ではない。また、糖化効率から反応温度は 50°C に設定されているが、酵素安定性の観点からは低い方が望ましい。

RT-CaCCO 法によるバイオエタノール生産におけるライフサイクル評価では、原料コスト、粉碎を含めた前処理コスト、酵素のコストが大きいことが指摘されている¹⁵⁶⁾。コストを抑えつつ上記の問題を解決するために、粉碎方法の検討、攪拌装置の開発、二酸化炭素加圧による pH 低下、オンサイト酵素生産技術の開発など、多方面からの改良研究が精力的に進められている。その中であって、澱粉糖化率の向上は、前処理コストを抑えつつ原料を最大限に活用するために、小さいながらも必要な技術であり、上記の改良を加える際の参考となると確信している。

第4章 総括

バイオエタノールは、温室効果ガス発生抑制に貢献することが期待されているガソリン代替燃料である。農業廃棄物をはじめとしたいわゆる第二世代のリグノセルロース系バイオマスは、食糧との競合を回避できるバイオエタノール原料として注目されている。一方、稲わらの生産量は世界で年間7億トンを超える発生量の最も多い農業廃棄物の一つである。日本でも生産される稲わら850万トンのうち8割は有効利用されておらず、食糧安全保障、地域社会の発展等に貢献するものとして、稲わらおよび稲地上部全体（ホールクロップ）の利用が期待されている。

稲わらの茎葉には、他の農業廃棄物には観察されない特徴として、澱粉をはじめとする易分解性糖質を蓄積するというユニークな性質が知られている。澱粉はセルロースとともに重要なグルコース供給源であるが、これまでに澱粉と繊維質の両方を含むバイオマス原料の変換特性は十分に検討されていない。繊維質に対する加熱を伴う一般的な前処理では、易分解性糖質は分解され、前処理後の固液分離や洗浄の工程では、澱粉の一部は液層に移行すると予想される。このような中、稲わらをバイオエタノール原料として使用するためのRT-CaCCO法の開発が行われた。本工程では、稲わらの粉碎物に水酸化カルシウムを常温で作用させることで、加熱操作、固液分離を行うことなく単糖を回収することができる。しかしながら、RT-CaCCO法は繊維質からの糖質回収を主眼において開発されたため、ホールクロップのような澱粉含量の高い原料からの糖の回収は検討されていない。熱処理を経ない澱粉の酵素糖化を効率的に行うには、前処理で澱粉分子内の水素結合を切断して結晶構造を崩壊させ、澱粉を糊化状態にしておく必要がある。RT-CaCCO法で用いられる水酸化カルシウムはアルカリであり、糊化促進作用があることが知られている。その一方で、陽イオン

が澱粉の安定化に働くとの報告もあり、糖化効率向上のためには、澱粉に対する水酸化カルシウム処理の影響を明らかにしておく必要がある。そこで、本研究では、稲わらに含まれる澱粉の性質を明らかにし、RT-CaCCO 法の工程が澱粉の酵素糖化に及ぼす影響を解析し、澱粉と繊維質が共存する稲わらからグルコースを効率的に回収するための RT-CaCCO 法の改良を行うことを目的とした。

第1章では、稲わらの稈部に含まれる澱粉の単離、構造解析を行い、糊化特性および糖化性との関連を明らかにした。一般に、澱粉の結晶型、アミロース含量、アミロペクチン鎖長分布、粒子サイズ等の構造特性は澱粉粒の酵素分解性に影響を及ぼすことが知られており、澱粉の起源により特徴的な構造特性を示すことが多い。本章では、稲発酵粗飼料用として開発され、茎葉の割合が高く NSC 含量の高いリーフスター、同じく稲発酵粗飼料用で茎葉と玄米の両方も充実がよく多収である夢あおば、主食用主要品種であるコシヒカリの三品種の稲の稈部から澱粉を単離し、稈部澱粉の粒子サイズ、アミロース含量、アミロペクチン鎖長分布などの構造特性が供試品種毎に異なっており、構造特性の差が糊化特性、酵素感受性を特徴づけていることを示した。稈部澱粉の特性として、胚乳澱粉と比較して平均粒径は大きく、結晶型は胚乳澱粉と同様に A 型で、ConA 法によるアミロース含量は胚乳澱粉が 19~20%であったのに対し、稈部澱粉は 20~25%と高かった。見かけのアミロース含量、 λ max、鎖長分布解析から、稈部澱粉ではアミロペクチンの単一クラスターを構成する A 鎖、B1 鎖は少なく、長鎖の割合が高かった。DSC 糊化特性として、糊化開始温度は胚乳澱粉で 54~62°Cであったのに対して稈部澱粉では 60~66°Cと高いものが多かった。また、稈部澱粉では遊離脂肪酸含量は低く、アミロース含量は高いものの、脂質と複合体を形成しているものの割合は低かった。糖化特性では、稈部澱粉の糖化速度は胚乳澱粉よりも速かった。構造特性は糊化特性や酵素感受性と関連し、稈部澱粉間でも、短鎖が多く、長鎖が少ない夢あおばの場合には、糊化温

度は低くなり、糖化速度は速くなることが示された。このように各単離澱粉間の特性には幅があり、胚乳澱粉とは異なるものの、澱粉としての基本的性質からかけ離れた特性を示すものは存在しないことが確認できた。これまで稲茎葉澱粉の構造特性を詳細に検討した例はなく、特に同じ植物体内で胚乳の澱粉と稈部の澱粉では異なる構造特性を示すことから、糖化利用における特徴付けのみならず、澱粉構造特性の解明や、澱粉の生合成にかかわる遺伝子の発現制御や生合成機構の解明のための素材としても有用な情報となることが期待される。

第2章では、RT-CaCCO法で用いられる水酸化カルシウム前処理が、澱粉結晶構造に及ぼす影響を明らかにした。代表例として用いたコシヒカリ胚乳澱粉では、水酸化カルシウム10%で室温処理し、50°Cに加温した後に二酸化炭素中和することで、効率よく糖化が促進されることを見いだした。DSC糊化エンタルピーの減少から、水酸化カルシウムのアルカリの効果によって水素結合が部分的に切断され、結晶構造が不安定化することを示した。その一方で、水酸化カルシウム処理により、DSC糊化温度の上昇、RVAの粘度上昇開始温度の上昇、最高粘度低下から示される膨潤抑制、ブレイクダウンの欠如から示される構造の安定化、冷却時の粘度上昇から示される再結晶化の促進などが起こることを明らかにした。カルシウムイオンの架橋効果により結晶構造が安定化するという現象を裏付けるものである。処理に用いた水酸化カルシウム濃度が、澱粉に対して10%以上では、糊化温度、糊化エンタルピーともに一定の値を示すことから、この現象が飽和することが示唆された。水酸化カルシウム濃度が10%までは処理後のX線結晶回折の測定で水酸化カルシウムの結晶由来のピークが検出されないのに対し、中和後には5%でも炭酸カルシウムの結晶由来のピークが検出されることから、水酸化カルシウムは澱粉との相互作用により結晶ではない形態をとっているが、中和によって炭酸カルシウム結晶として析出することを示した。同様のことを、FT-IR測定の結果からも示した。また、結合の種類ま

では特定できなかったものの、XPSにより、カルシウムが澱粉と結合していることを示すことができた。このように、カルシウムが澱粉と結合するため、水溶液としては過飽和である水酸化カルシウム濃度 10%が必要であることを示した。また、中和前の温度処理は糊化エンタルピーを減少させることから糖化効率向上のために有効であること、炭酸カルシウムには糊化促進作用がないため、温度処理は中和前に行う必要があることを示した。その一方で、アミロース-脂質複合体は加温により安定性の高い結晶構造 form 2b を取るようになるため、これを増やさないような温度調節が必要であることを示した。これまでに直接的にカルシウムと澱粉の結合を示した例はなく、今後さらに詳細な結合様式について検討を加え、カルシウムが澱粉粒のどこにどのように入り込んでいくのか、架橋の位置、加温による糊化温度上昇の機構などの解明のための足がかりとなることが期待される。また、アルカリの種類、澱粉の種類などによっても結合様式が異なることが予想されるため、澱粉とアルカリの関係を利用した新たな用途開発や素材開発に繋げていくための基礎的な情報となることが期待される。

この結果を踏まえ、第3章では、成熟期の粳を含む稲ホールクロップを対象として、効率的なグルコース回収のための RT-CaCCO 法の前処理条件の絞り込みを行った。水酸化カルシウム処理による糊化は熱糊化と異なっており、澱粉含量の高い稲ホールクロップからの効率的な単糖回収のためには、水酸化カルシウム濃度の調整に加えて液化型のアミラーゼの添加が重要であることを示した。繊維質と澱粉が共存している場合、繊維質の成分により澱粉の糊化温度が上昇すること、また、澱粉が十分に糊化されるためには、単離澱粉への水酸化カルシウム処理から見いだされた条件よりも多くの水酸化カルシウムで処理する必要があることを確認した。試料の澱粉含量により必要となる水酸化カルシウムの量は異なり、澱粉濃度によって必要な水酸化カルシウム濃度の目安を示すことができた。X線結晶回折では水酸化カルシウム濃度 20%で析出が見られ

るものの、澱粉の十分な糊化には30%が必要であることが確認された。中和後の炭酸カルシウムの析出は20%以上で検出されることから、水酸化カルシウムとケイ酸の反応の関与により、水酸化カルシウムの前処理効果を低減させている可能性を指摘した。水酸化カルシウムによる糊化は、熱糊化とは異なるメカニズムがあること、反応液のpHが6.0付近であり、アミログルコシダーゼの至適pHから外れることなどから、液化型アミラーゼの利用が十分な糖化のための鍵となることを示した。本研究で用いた澱粉含量26%のリーフスターのホールクロップの場合、水酸化カルシウム濃度30%で室温処理した後にさらに50°Cで処理して澱粉の糊化を促進した後に二酸化炭素で中和し、標準の酵素製剤に液化型アミラーゼを補填することで、最大の糖化効率が得られることを示した。本研究によって見いだされた澱粉糖化効率化のための条件は、RT-CaCCO法のスケールアップ時に問題となる攪拌や酵素に関する問題を解決していくための基礎となることが期待される。本研究によって見いだされた澱粉糖化効率化のための条件は、RT-CaCCO法のスケールアップ時に問題となる攪拌や酵素に関する問題を解決していくための基礎となるものである。

本研究によって見いだされた条件では、糖化されずに残る澱粉が存在すること、セルロースの糖化効率が低下することが問題として残されている。本研究ではグルコースの回収のみに注目していたが、本来RT-CaCCO法は、繊維質からの五炭糖を最大限回収することを目的とした戦略であるため、今後の課題として、五炭糖の回収との適合性を図っていく必要がある。また、水酸化カルシウム処理は、水分量によって発揮される効果が異なると考えられたため、基質濃度を上げた場合の水酸化カルシウムの前処理効果については新たな検討が必要となる。澱粉はバイオマス糖化においては比較的糖化が容易な材料と考えられていたが、本研究では、澱粉の水酸化カルシウム処理によって、糖化効率が低下する可能性があること、糖化できずに残る澱粉が存在すること、糖化時の

酵素の選択が重要であることが示された。これは熱糊化澱粉では生じなかった現象であり、水酸化カルシウムによる糊化が熱糊化とは異なることを示すものである。今後澱粉と繊維質の共存する様々な材料を糖化利用するにあたって基礎データとなると期待している。さらに、稲わらの DSC 糊化測定では、胚乳由来と茎葉由来の構造の異なる澱粉では水酸化カルシウム処理に対する反応が異なっていることが示唆された。このことを利用して、澱粉の微細構造の解析に利用できるのではないかと考えている。

引用文献

- 1) United Nations. United Nations framework convention on climate change. 1992 [cited 2012 Sept. 6]; Available from: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/conveng.pdf>.
- 2) United Nations. Kyoto Protocol to the United Nations framework convention on climate change. 1998 [cited 2012 Sept. 6]; Available from: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>.
- 3) OECD International Energy Agency (2011) CO₂ Emissions from fuel combustion highlights (2011 edition).
- 4) Renewable Fuels Association. World fuel ethanol production. 2012 [cited 2012 August 15]; Available from: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>.
- 5) S. Kim, B.E. Dale (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, **26**: 361-375.
- 6) 農林水産省生産局畜産部畜産振興課、消費・安全局畜水産安全管理課 (2012) 飼料をめぐる情勢 平成 24 年 7 月.
- 7) 農林水産省生産局畜産部畜産振興課 (2005) 稲わらをめぐる状況 平成 17 年 3 月.
- 8) Energy Research Centre of the Netherlands. Phyllis2, database for biomass and waste. [cited March 19, 2013]; Available from: <http://www.ecn.nl/phyllis2>.
- 9) J.-y. Park, T. Seyama, R. Shiroma, M. Ike, S. Strichuwong, K. Nagata, Y. Arai-Sanoh, M. Kondo, K. Tokuyasu (2009) Efficient recovery of glucose and fructose via enzymatic saccharification of rice straw with soft carbohydrates. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **73**: 1072-1077.

- 10) J.-y. Park, E. Kanda, A. Fukushima, K. Motobayashi, K. Nagata, M. Kondo, Y. Ohshita, S. Morita, K. Tokuyasu (2011) Contents of various sources of glucose and fructose in rice straw, a potential feedstock for ethanol production in Japan. *Biomass and Bioenergy*, **35**: 3733-3735.
- 11) J.-y. Park, M. Arakane, R. Shiroma, M. Ike, K. Tokuyasu (2010) Culm in rice straw as a new source for sugar recovery *via* enzymatic saccharification. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**: 50-55.
- 12) 村田孝雄, 保坂優子, 平野貢, 黒田栄喜 (1997) 水稻あきたこまちの登熟期における葉身および茎の炭水化物代謝. *日本作物學會紀事*, **66**: 221-228.
- 13) 北条良夫 (1971) 光合成産物の転流. *日本作物學會紀事*, **40**: 549-565.
- 14) 戸苅義次, 岡本嘉, 玖村敦彦 (1953) 水稻に於ける炭水化物の生産及び行動に関する研究 : 第1報 生育に伴う諸器官中の主要成分含量の推移. *日本作物學會紀事*, **22**: 95-97.
- 15) 佐藤庚 (1955) 稻の組織内澱粉に関する研究 (第1報) 組織の発達に伴う澱粉粒の形態変化. *日本作物學會紀事*, **23**: 261-263.
- 16) 馬場赴, 橘高昭雄 (1953) 水稻の茎葉基部に於ける澱粉粒の形成に就いて. *日本作物學會紀事*, **22**: 43-44.
- 17) S. Lian, A. Tanaka (1967) Behaviour of photosynthetic products associated with growth and grain production in the rice plant. *Plant and Soil*, **26**: 333-347.
- 18) 長南信雄, 田代卓 (1972) 水稻の各器官における同化組織の分布と同化細胞の形態. *日本作物学会東北支部会報*, **14**: 31-32.
- 19) N. Aoki, T. Hirose, R.T. Furbank (2012) Sucrose transport in higher plants: from sink to source, in *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*, J.J. Eaton-Rye, B.C. Tripathy, T.D. Sharkey, Editors, Springer. p. 704-728.

- 20) M.B. Sticklen (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews. Genetics*, **9**: 433-43.
- 21) B. Xiao, X.F. Sun, R. Sun (2001) Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability*, **74**: 307-319.
- 22) T. Watanabe, M. Shida, Y. Furuyama, K.-i. Tsukamoto, T. Nakajima, K. Matsuda, K. Kainuma (1983) Structure of the arabinoxylan of rice hull. *Carbohydrate Research*, **123**: 83-95.
- 23) 高橋英一 (2003) ケイ酸 (元素の吸収と生理作用), 農業技術体系 土壤肥料編 第2巻 作物の栄養と生育. p. 77~83.
- 24) 檜作進 (2003) 澱粉の分子構造, 澱粉科学の事典, 不破英次, 小巻利章, 檜作進, 貝沼圭二編集 朝倉書店: 東京. p. 11-38.
- 25) S. Hizukuri (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research*, **147**: 342-347.
- 26) K. Kainuma, D. French (1972) Naegeli amylopectin and its relationship to starch granule structure. II. Role of water in crystallization of B-starch. *Biopolymers*, **11**: 2241-2250.
- 27) S. Hizukuri (1985) Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, **141**: 295-306.
- 28) 檜作進, 二國二郎 (1957) X線ディフラクトメータによる澱粉の研究 (2) “C”-型微結晶構造について. *日本農芸化学会誌*. 525-527.
- 29) S. Hizukuri (1991) Properties of hot-water-extractable amylose. *Carbohydrate Research*, **217**: 251-253.

- 30) J.P. Robin, C. Mercier, R. Charbonniere, A. Guilbot (1974) Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*, **51**: 389-406.
- 31) W.R. Morrison, R.F. Tester, M.J. Gidley, J. Karkalas (1993) Resistance to acid hydrolysis of lipid-complexed amylose and lipid-free amylose in lintnerised waxy and non-waxy barley starches. *Carbohydrate Research*, **245**: 289-302.
- 32) J. Jane, S.A.S. Craig, P.A. Seib, R.C. Hoseney (1986) Characterization of granular cold water-soluble starch. *Starch/Stärke*, **38**: 258-263.
- 33) P.J. Jenkins, A.M. Donald (1995) The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, **17**: 315-321.
- 34) 貝沼圭二 (1980) 澱粉の微細構造. *調理科学*, **13**: 83-90.
- 35) J.J. Cheng, G.R. Timilsina (2011) Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, **36**: 3541-3549.
- 36) N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **96**: 673-686.
- 37) N. Mosier, R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak, M.R. Ladisch (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, **96**: 1986-1993.
- 38) 藤本真司, 井上宏之, 矢野伸一, 坂木剛, 美濃輪智朗, 遠藤貴士, 澤山茂樹, 坂西欣也 (2008) リグノセルロース系バイオマスからの非硫酸バイオエタノール製造法の開発—メカノケミカル前処理・酵素糖化法—. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, **51**: 264-273.
- 39) 森川泰 (2009) バイオマスアルコール生産技術, バイオエネルギーの技術と応用, 柳下立夫監修, シーエムシー出版. p. 165-177.

- 40) 和田昌久, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (2008) 糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法、並びにこれらに用いられる酵素糖化用セルロース及びその製造方法. 特開 **2008-161125**.
- 41) S. Kim, M.T. Holtzaple (2005) Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, **96**: 1994-2006.
- 42) E.R. Garrett, J.F. Young (1970) Alkaline transformations among glucose, fructose, and mannose. *The Journal of Organic Chemistry*, **35**: 3502-3509.
- 43) I.I. Ziderman, J. Belayche (1986) Using disaccharides as a kinetic model for alkaline degradation of celluloses and starches. *Journal of Applied Polymer Science*, **32**: 3255-3261.
- 44) J. Fukumoto, S. Okada (1963) Studies on bacterial amylase : amylase types of *Bacillus subtilis* species. *Journal of Fermentation Technology*, **41**: 427.
- 45) J.-i. Abe, K. Nakajima, H. Nagano, S. Hizukuri, K. Obata (1988) Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* SP. K-27: A synergistic action of glucoamylase and alpha-amylase. *Carbohydrate Research*, **175**: 85-92.
- 46) W.J. Wang, A.D. Powell, C.G. Oates (1996) Sago starch as a biomass source: Raw sago starch hydrolysis by commercial enzymes. *Bioresource Technology*, **55**: 55-61.
- 47) B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M.F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, G. Zacchi (2006) Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, **24**: 549-556.
- 48) S. Katahira, A. Mizuike, H. Fukuda, A. Kondo (2006) Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**: 1136-1143.
- 49) [cited 2012 August 15]; Available from:
<http://www.inbicon.com/pages/index.aspx>.

- 50) J.-y. Park, M. Ike, M. Arakane, R. Shiroma, Y. Li, Y. Arai-Sanoh, M. Kondo, K. Tokuyasu (2011) DiSC (direct saccharification of culms) process for bioethanol production from rice straw. *Bioresource Technology*, **102**: 6502-6507.
- 51) J.-y. Park, R. Shiroma, M.I. Al-Haq, Y. Zhang, M. Ike, Y. Arai-Sanoh, A. Ida, M. Kondo, K. Tokuyasu (2010) A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw - Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresource Technology*, **101**: 6805-6811.
- 52) R. Shiroma, J.-y. Park, M.I. Al-Haq, M. Arakane, M. Ike, K. Tokuyasu (2010) RT-CaCCO process: An improved CaCCO process for rice straw by its incorporation with a step of lime pretreatment at room temperature. *Bioresource Technology*, **102**: 2943-2949.
- 53) R.M. Sandstedt, R.L. Gates (1954) Raw starch digestion: a comparison of the raw starch digesting capabilities of the amylase systems from four alpha-amylase sources. *Food Research*, **19**: 190-199.
- 54) 杉本温美, 大西恵子, 高谷友久, 不破英次 (1979) 起源をことにする各種澱粉粒のパンクレアチンによる分解性. *澱粉科学*, **26**: 182-190.
- 55) J.-I. Jane, K.-S. Wong, A.E. McPherson (1997) Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegli dextrans. *Carbohydrate Research*, **300**: 219-227.
- 56) T. Noda, T. Kimura, M. Otani, O. Ideta, T. Shimada, A. Saito, I. Suda (2002) Physicochemical properties of amylose-free starch from transgenic sweet potato. *Carbohydrate Polymers*, **49**: 253-260.
- 57) H. Fuwa, M. Nakajima, A. Hamada, D.V. Glover (1977) Comparative susceptibility to amylases of starches from different plant species and several single endosperm mutants and their double-mutant combinations with opaque-2 inbred Oh43 maize. *Cereal Chemistry*, **54**: 230-237.

- 58) J.-L. Jane, J.F. Robyt (1984) Structure studies of amylose-V complexes and retro-graded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amylopectins. *Carbohydrate Research*, **132**: 105-118.
- 59) A.C. Eliasson, N. Krog (1985) Physical properties of amylose-mono-glyceride complexes. *Journal of Cereal Science*, **3**: 239-248.
- 60) C.G. Biliaderis (2009) Structural transitions and related physical properties of starch, in *Starch: Chemistry and Technology*, J. BeMiller, R. Whistler, Editors, Academic Press. p. 293-372.
- 61) 小巻利章 (2003) 澱粉の液化, 澱粉科学の事典, 不破英次, 小巻利章, 檜作進, 貝沼圭二編集, 朝倉書店: 東京. p. 431-432.
- 62) J.-L. Jane (1993) Mechanism of starch gelatinization in neutral salt solutions. *Starch/Stärke*, **45**: 161-166.
- 63) C.M. Bryant, B.R. Hamaker (1997) Effect of lime on gelatinization of corn flour and starch. *Cereal Chemistry*, **74**: 171-175.
- 64) B.J. Oosten (1982) Tentative hypothesis to explain how electrolytes affect the gelatinization temperature of starches in water. *Starch/Stärke*, **34**: 233-239.
- 65) B. Saha, R. Bothast (1999) Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **76**: 65-77.
- 66) M.H. Thomsen, J.B. Holm-Nielsen, P. Oleskiewicz-Popiel, A.B. Thomsen (2008) Pretreatment of whole-crop harvested, ensiled maize for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **148**: 23-33.
- 67) Y. Shinozaki, H.K. Kitamoto (2011) Ethanol production from ensiled rice straw and whole-crop silage by the simultaneous enzymatic saccharification and fermentation process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **111**: 320-325.

- 68) P. Colonna, A. Buléon, F. Lemarié (1988) Action of *Bacillus subtilis* alpha-amylase on native wheat starch. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**: 895-904.
- 69) S. Srichuwong, T.C. Sunarti, T. Mishima, N. Isono, M. Hisamatsu (2005) Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. *Carbohydrate Polymers*, **60**: 529-538.
- 70) T. Noda, S. Takigawa, C. Matsuura-Endo, S.-J. Kim, N. Hashimoto, H. Yamauchi, I. Hanashiro, Y. Takeda (2005) Physicochemical properties and amylopectin structures of large, small, and extremely small potato starch granules. *Carbohydrate Polymers*, **60**: 245-251.
- 71) W.R. Morrison, A.M. Coventry (1985) Extraction of lipids from cereal starches with hot aqueous alcohols. *Starch/Stärke*, **37**: 83-87.
- 72) A. Nishi, Y. Nakamura, N. Tanaka, H. Satoh (2001) Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiology*, **127**: 459.
- 73) J. Matsuki, T. Yasui, T. Sasaki, M. Fujita, Y. Kitamura (2008) Effects of the barley *am1* and *wax* genes on starch structure and physicochemical properties. *Starch/Stärke*, **60**: 279-285.
- 74) T. Nagamine, K. Komae (1996) Improvement of a method for chain-length distribution analysis of wheat amylopectin. *Journal of Chromatography A*, **732**: 255-259.
- 75) M. Somogyi (1952) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, **195**: 19-23.
- 76) M.-S. Yun, Y. Kawagoe (2009) Amyloplast division progresses simultaneously at multiple sites in the endosperm of rice. *Plant and Cell Physiology*, **50**: 1617-1626.

- 77) J.M. Bailey, W.J. Whelan (1961) Physical properties of starch: I. Relationship between iodine stain and chain length. *Journal of Biological Chemistry*, **236**: 969-973.
- 78) Y. Ikawa, D.V. Glover, Y. Sugimoto, H. Fuwa (1978) Amylose percentage and distribution of unit chain-length of maize starches having a specific genetic background. *Carbohydrate Research*, **61**: 211-216.
- 79) M. Kugimiya, J.W. Donovan (1981) Calorimetric determination of the amylose content of starches based on formation and melting of the amylose-lysolecithin complex. *Journal of Food Science*, **46**: 765-770.
- 80) C. Mestres, F. Matencio, B. Pons, M. Yajid, G. Flidel (1996) A rapid method for the determination of amylose content by using differential-scanning calorimetry. *Starch/Stärke*, **48**: 2-6.
- 81) D. Sievert, J. Holm (1993) Determination of amylose by differential scanning calorimetry. *Starch/Stärke*, **45**: 136-139.
- 82) T. Yasui, T. Sasaki, J. Matsuki (1999) Milling and flour pasting properties of waxy endosperm mutant lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**: 687-692.
- 83) G.B. Crosbie, A.S. Ross (2007) The RVA handbook, American Association of Cereal Chemists.
- 84) 須永薫子, 本林隆, 東城清秀, 松村修, 平沢正, 大川泰一郎 (2009) 水稻品種リーフスターの茎葉部貯蔵炭水化物の蓄積特性. *日本作物学会紀事別号*, 第**227**回日本作物学会講演会: 246-247.
- 85) K. Tomlinson, J. Craig, A.M. Smith (1998) Major differences in isoform composition of starch synthase between leaves and embryos of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, **204**: 86-92.

- 86) K.L. Tomlinson, J.R. Lloyd, A.M. Smith (1997) Importance of isoforms of starch-branching enzyme in determining the structure of starch in pea leaves. *The Plant Journal*, **11**: 31-43.
- 87) T. Hirose, A. Endler, R. Ohsugi (1999) Gene expression of enzymes for starch and sucrose metabolism and transport in leaf sheaths of rice (*Oryza sativa* L.) during the heading period in relation to the sink to source transition. *Plant Production Science*, **2**: 178-183.
- 88) T. Hirose, T. Ohdan, Y. Nakamura, T. Terao (2006) Expression profiling of genes related to starch synthesis in rice leaf sheaths during the heading period. *Physiologia Plantarum*, **128**: 425-435.
- 89) Y. Nakamura, Y. Utsumi, T. Sawada, S. Aihara, C. Utsumi, M. Yoshida, S. Kitamura (2010) Characterization of the Reactions of Starch Branching Enzymes from Rice Endosperm. *Plant and Cell Physiology*, **51**: 776-794.
- 90) A.B. Blakeney, N.K. Matheson (1984) Some Properties of the Stem and Pollen Starches of Rice. *Starch/Stärke*, **36**: 265-269.
- 91) T. Taira, M. Uematsu, Y. Nakano, T. Morikawa (1991) Molecular identification and comparison of the starch synthase bound to starch granules between endosperm and leaf blades in rice plants. *Biochemical Genetics*, **29**: 301-311.
- 92) Y. Takeda, S. Hizukuri, B.O. Juliano (1987) Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydrate Research*, **168**: 79-88.
- 93) N.K. Matheson, L.A. Welsh (1988) Estimation and fractionation of the essentially unbranched (amylose) and branched (amylopectin) components of starches with concanavalin A. *Carbohydrate Research*, **180**: 301-313.
- 94) H. Nakai, T. Ito, S. Tanizawa, K. Matsubara, T. Yamamoto, M. Okuyama, H. Mori, S. Chiba, Y. Sano, A. Kimura (2006) Plant α -glucosidase: molecular analysis of rice α -glucosidase and degradation mechanism of starch granules in germination stage. *Journal of Applied Glycoscience*, **53**: 137-142.

- 95) S. Asatsuma, C. Sawada, K. Itoh, M. Okito, A. Kitajima, T. Mitsui (2005) Involvement of α -Amylase I-1 in Starch Degradation in Rice Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **46**: 858-869.
- 96) T. Hirano, Y. Takahashi, H. Fukayama, H. Michiyama (2011) Identification of two plastid-targeted β -amylases in rice. *Plant Production Science*, **14**: 318-324.
- 97) J. Matsuki, T. Yasui, K. Kohyama, T. Sasaki (2003) Effects of environmental temperature on the structure and gelatinization properties of wheat starch. *Cereal Chemistry*, **80**: 476-480.
- 98) T. Noda, Y. Takahata, T. Sato, I. Suda, T. Morishita, K. Ishiguro, O. Yamakawa (1998) Relationship between chain length distribution of amylopectin and gelatinization properties within the same botanical origin for sweet potato and buckwheat. *Carbohydrate Polymers*, **37**: 153-158.
- 99) Y.-C. Shi, P.A. Seib (1995) Fine structure of maize starches from four wx-containing genotypes of the W64A inbred line in relation to gelatinization and retrogradation. *Carbohydrate Polymers*, **26**: 141-147.
- 100) G.E. Vandeputte, R. Vermeulen, J. Geeroms, J.A. Delcour (2003) Rice starches. I. Structural aspects provide insight into crystallinity characteristics and gelatinisation behaviour of granular starch. *Journal of Cereal Science*, **38**: 43-52.
- 101) K.-S. Wong, A. Kubo, J.-L. Jane, K. Harada, H. Satoh, Y. Nakamura (2003) Structures and properties of amylopectin and phytoglycogen in the endosperm of sugary-1 mutants of rice. *Journal of Cereal Science*, **37**: 139-149.
- 102) D. Cooke, M.J. Gidley (1992) Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, **227**: 103-112.

- 103) M. Yamamori, S. Fujita, K. Hayakawa, J. Matsuki, T. Yasui (2000) Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **101**: 21-29.
- 104) K. Katayama, K. Komae, K. Kohyama, T. Kato, S. Tamiya, K. Komaki (2002) New sweet potato line having low gelatinization temperature and altered starch structure. *Starch/Stärke*, **54**: 51-57.
- 105) M.H. Gomez, C.M. McDonough, L.W. Rooney, R.D. Waniska (1989) Changes in corn and sorghum during nixtamalization and tortilla baking. *Journal of Food Science*, **54**: 330-336.
- 106) W.S. Ratnayake, A.B. Wassinger, D.S. Jackson (2007) Extraction and characterization of starch from alkaline cooked corn masa. *Cereal Chemistry*, **84**: 415-422.
- 107) A. Trejo-Gonzalez, A. Feria-Morales, C. Wild-Altamirano (1982) The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation, in *Modification of Proteins, Advances in Chemistry vol. 198*, R.E. Feeney, J.R. Whitaker, Editors, American Chemical Society: Washington, D.C. p. 245-263.
- 108) R.R. Robles, E.D. Murray, O. Paredes-Lopez (1988) Physicochemical changes of maize starch during the lime-heat treatment for tortilla making. *International Journal of Food Science and Technology*, **23**: 91-98.
- 109) M.E. Rodríguez, M. Yáñez-Limón, J.J. Alvarado-Gil, H. Vargas, F. Sánchez-Sinencio, J.D.C. Figueroa, F. Martínez-Bustos, J.L. Martínez-Montes, J. González-Hernández, M.D. Silva, L.C.M. Miranda (1996) Influence of the structural changes during alkaline cooking on the thermal, rheological, and dielectric properties of corn tortillas. *Cereal Chemistry*, **73**: 593-600.
- 110) 八田珠郎 (1997) XPS(ESCA)による鉱物の表面分析技術. *鉱物学雑誌*, **26**: 198-202.

- 111) M. Kugimiya, J.W. Donovan, R.Y. Wong (1980) Phase transitions of amylose-lipid complexes in starches: a calorimetric study. *Starch/Stärke*, **32**: 265-270.
- 112) H. Jacobs, J.A. Delcour (1998) Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **46**: 2895-2905.
- 113) M. Wootton, P. Ho (1989) Alkali gelatinisation of wheat starch. *Starch/Stärke*, **41**: 261-265.
- 114) R. Kizil, J. Irudayaraj, K. Seetharaman (2002) Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FT-IR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 3912-3918.
- 115) J.J.G. van Soest, H. Tournois, D. de Wit, J.F.G. Vliegenthart (1995) Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **279**: 201-214.
- 116) M.G.E. Wolters, J.W. Cone (1992) Prediction of degradability of starch by gelatinization enthalpy as measured by Differential Scanning Calorimetry. *Starch/Stärke*, **44**: 14-18.
- 117) R. Tahir, P.R. Ellis, P.J. Butterworth (2010) The relation of physical properties of native starch granules to the kinetics of amylolysis catalysed by porcine pancreatic α -amylase. *Carbohydrate Polymers*, **81**: 57-62.
- 118) W.R. Morrison (1988) Lipids in cereal starches: A review. *Journal of Cereal Science*, **8**: 1-15.
- 119) M.C. Godet, A. Buléon, V. Tran, P. Colonna (1993) Structural features of fatty acid-amylose complexes. *Carbohydrate Polymers*, **21**: 91-95.
- 120) C.G. Biliaderis, G. Galloway (1989) Crystallization behavior of amylose-V complexes: Structure-property relationships. *Carbohydrate Research*, **189**: 31-48.

- 121) B.J. Oosten (1979) Substantial rise of gelatinization temperature of starch by adding hydroxide. *Starch/Stärke*, **31**: 228-230.
- 122) L.N. Lai, A.A. Karim, M.H. Norziah, C.C. Seow (2002) Effects of Na₂CO₃ and NaOH on DSC thermal profiles of selected native cereal starches. *Food Chemistry*, **78**: 355-362.
- 123) J.B. Hirsch, J.L. Kokini (2002) Understanding the mechanism of cross-linking agents (POCl₃, STMP, and EPI) through swelling behavior and pasting properties of cross-linked waxy maize Starches1. *Cereal Chemistry*, **79**: 102-107.
- 124) P.S. Smith (1982) Starch derivatives and their use in foods, in *Food carbohydrates*, D.R. Lineback, G.E. Inglett, Editors, AVI Pub. Co.: Institute of Food Technologists, International Union of Food Science Technology. p. 237-269.
- 125) 鈴木徹 (2006) 食品のガラス状態とその利用. *食品と技術*, **2006-12**: 1-9.
- 126) D.S. Jackson, C. Choto-Owen, R.D. Waniska, L.W. Rooney (1988) Characterization of starch cooked in alkali by aqueous high-performance size-exclusion chromatography. *Cereal Chemistry*, **65**: 493-496.
- 127) A.A. Ragheb, I. Abdel-Thalouth, S. Tawfik (1995) Gelatinization of starch in aqueous alkaline solutions. *Starch/Stärke*, **47**: 338-345.
- 128) P. Tomasik, C.H. Schilling (2004) Chemical modification of starch, in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, D. Horton, Editor, Elsevier. p. 175-403.
- 129) F. Tufvesson, M. Wahlgren, A.-C. Eliasson (2003) Formation of amylose-lipid complexes and effects of temperature treatment. Part 2. Fatty acids. *Starch/Stärke*, **55**: 138-149.
- 130) C.G. Biliaderis, H.D. Seneviratne (1990) On the supermolecular structure and metastability of glycerol monostearate-amylose complex. *Carbohydrate Polymers*, **13**: 185-206.

- 131) H.D. Seneviratne, C.G. Biliaderis (1991) Action of α -amylases on amylose-lipid complex superstructures. *Journal of Cereal Science*, **13**: 129-143.
- 132) V. Chang, M. Nagwani, M. Holtzaple (1998) Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **74**: 135-159.
- 133) V. Chang, B. Burr, M. Holtzaple (1997) Lime pretreatment of switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **63-65**: 3-19.
- 134) M. Winugroho, M.N.M. Ibrahim, G.R. Pearce (1984) A soak-and-press method for the alkali treatment of fibrous crop residues. Calcium hydroxide and sodium hydroxide treatments of rice straw. *Agricultural Wastes*, **9**: 87-99.
- 135) J. Xu, J.J. Cheng, R.R. Sharma-Shivappa, J.C. Burns (2010) Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresource Technology*, **101**: 2900-2903.
- 136) J.W. Donovan (1979) Phase transitions of the starch–water system. *Biopolymers*, **18**: 263-275.
- 137) 高橋礼治, 山本正樹 (1969) 苛性ソーダ中におけるデンプンの挙動. *澱粉工業学会誌*, **17**: 289-293.
- 138) 小役丸孝俊 (2011) 段ボールシート製造用ノーキャリアー(NC)型澱粉接着剤における加熱糊化時の熱量的挙動と接着剤の調製に及ぼす添加苛性ソーダの影響. *応用糖質科学*, **1**: 247-256.
- 139) A.C. Eliasson (1986) Viscoelastic behaviour during the gelatinization of starch. I. Comparison of wheat, maize, potato and waxy-barley starches. *Journal of Texture Studies*, **17**: 253-265.
- 140) K. Larsson (1980) Inhibition of starch gelatinization by amylose-lipid complex formation. *Starch/Stärke*, **32**: 125-126.
- 141) I. Lindqvist (1979) Cold gelatinization of starch. *Starch/Stärke*, **31**: 195-200.

- 142) M.Z. Nor Nadiha, A. Fazilah, R. Bhat, A.A. Karim (2010) Comparative susceptibilities of sago, potato and corn starches to alkali treatment. *Food Chemistry*, **121**: 1053-1059.
- 143) S. Wang, L. Copeland (2012) Effect of alkali treatment on structure and function of pea starch granules. *Food Chemistry*, **135**: 1635-1642.
- 144) H.F. Zobel (1988) Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Stärke*, **40**: 44-50.
- 145) V. Chang, M. Holtzaple (2000) Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **84-86**: 5-37.
- 146) T.D. Duong, M. Hoang, K.L. Nguyen (2005) Sorption of Na⁺, Ca²⁺ ions from aqueous solution onto unbleached kraft fibers-kinetics and equilibrium studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, **287**: 438-443.
- 147) H.L. Doppert, A.J. Staverman (1966) Polyelectrolytic character of amylose. I. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **4**: 2367-2372.
- 148) H. Chung, F. Friedberg (1980) Sequence of the N-terminal half of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase. *Biochemical Journal*, **185**: 387-395.
- 149) S. Okada, S. Kitahata, M. Higashihara, J. Fukumoto (1969) Classification of α -amylases by the action patterns on maltooligosaccharides. *Agricultural and Biological Chemistry*, **33**: 900-906.
- 150) M. Fujii, Y. Kawamura (1985) Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**: 260-265.
- 151) T. Matsubara, Y.B. Ammar, T. Anindyawat, S. Yamamoto, K. Ito, M. Iizuka, N. Minamiura (2004) Degradation of raw starch granules by α -amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, **37**: 422-428.

152) M. Monma, Y. Yamamoto, N. Kagei, K. Kainuma (1989) Raw starch digestion by α -amylase and glucoamylase from *Chalara paradoxa*. *Starch/Stärke*, **41**: 382-385.

153) Y. Zhao, Z. Hu, A. Ragauskas, Y. Deng (2005) Improvement of paper properties using starch-modified precipitated calcium carbonate filler. *TAPPI Journal* **4**: 3-7.

154) M. Holtzapple, M. Cognata, Y. Shu, C. Hendrickson (1990) Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, **36**: 275-287.

155) C. Tengborg, M. Galbe, G. Zacchi (2001) Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, **28**: 835-844.

156) P. Roy, K. Tokuyasu, T. Orikasa, N. Nakamura, T. Shiina (2012) A techno-economic and environmental evaluation of the life cycle of bioethanol produced from rice straw by RT-CaCCO process. *Biomass and Bioenergy*, **37**: 188-195.

公表論文

157) J. Matsuki, J.-y. Park, R. Shiroma, Y. Arai-Sanoh, M. Ida, M. Kondo, K. Motobayashi, K. Tokuyasu (2010) Characterization of starch granules in rice culms for application of rice straw as a feedstock for saccharification. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**: 1645-1651.

158) J. Matsuki, J.-y. Park, R. Shiroma, M. Ike, K. Yamamoto, K. Tokuyasu (2012) Effect of lime treatment and subsequent carbonation on gelatinization and saccharification of starch granules. *Starch/Stärke*, **64**: 452-460.

159) J. Matsuki, R. Shiroma, M. Ike, K. Tokuyasu (2012) Improvement of the RT-CaCCO Process for Efficient Glucose Recovery from Starch-rich Whole-crop Rice. *Journal of Applied Glycoscience*, **59**: 139-144.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜り、親身なご助言をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科教授 長澤寛道博士に心より感謝申し上げます。学位論文審査において、貴重なご指導とご助言をいただきました同准教授 作田庄平博士に深謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重な試料をご提供いただきました(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 近藤始彦博士、同 荒井(三王) 裕見子博士、同 井田 仁氏、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター 元林浩太博士に感謝いたします。示差走査熱量測定に関してお世話になりました(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 山本和貴博士にお礼申し上げます。X線回折、FT-IR、XPSの測定について貴重なご助言を賜りました(独) 国際農林水産業研究センター 八田珠郎博士に心より感謝いたします。

本研究に携わる機会をくださり、数多くのご助言と激励をいただきました(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 徳安 健 博士には、心より感謝申し上げます。また、本研究の実施にあたり朴 正一 博士、城間 力 博士、池 正和 博士をはじめとする糖質素材ユニットの皆さまのご協力に感謝いたします。

最後に、ここまで私を支えてくれた家族に感謝します。