

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 松 木 順 子

バイオエタノールは、温室効果ガス発生の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、易分解性糖質を含む稲わらをバイオエタノール原料として使用する場合の繊維質への前処理技術として、RT-CaCCO法(Calcium capturing by carbonation at room temperature)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、糊化特性及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、茎葉の割合が高く非構造性炭水化物（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と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では19~20%であったのに対し、稈部澱粉では20~25%と高かった。見かけのアミロース含量、 $\lambda_{max}$ 、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。示差走査熱量測定（DSC）による糊化特性として、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。これまで稲稈部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、澱粉の生合成に関わる酵素遺伝子の発現制御、澱粉の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に加熱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、粘度測定装置(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、ブレー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はで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、X線光電子分光分析(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-脂質複合体は加熱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、加熱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。

この結果を踏まえ、第3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。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、最大の糖化効率を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。

以上に述べたとおり、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ホールクロップからグルコースを効率的に回収するための RT-CaCCO 法の改良条件を示した。ここで提案する条件は、澱粉を多く含むホールクロップをバイオエタノール生産の原料として利用する際の条件設定に貢献するものと確信する。