

湿熱処理でん粉の分析について（第 2 報）

石崎 哲章*, 原山 麻奈美*, 小林 俊哉*, 池田 啓久*, 甲田 政則*, 勅使川原 尚行*

Analysis of heat-moisture-treated starch (the second report)

Noriaki ISHIZAKI*, Manami HARAYAMA*, Toshiya KOBAYASHI*,
Yoshihisa IKEDA*, Masanori KODA* and Naoyuki TESHIGAWARA*

*Yokohama Customs Laboratory, 2-1-10, Shin-urashima-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-0031 Japan

In Japan, since there is a large difference in the tariff rates between untreated starches (Chapter 11), starch derivatives and other modified starches (Subheading 3505.10), it is important to identify starches. There is a heat-moisture-treated starch, which is one of the modified starches, and it is necessary for tariff classification to identify whether the starch is modified or not. However, commercial-scale production of heat-moisture-treated starch only became possible in recent years, and so there is little data and no customs analytical methods for it. This study aimed to distinguish heat-moisture-treated high amylose corn starch (HACS) from untreated HACS and three experiments are conducted. The comparison of the degree of hydrolysis by four kinds of amylase and their mixture conditions showed that the most appropriate method to distinguish was the case in which glucoamylase derived from *Rhizopus* sp. was solely hydrolyzed. The result of XRD showed a different pattern between heat-moisture-treated HACS and untreated HACS, especially there was a big difference shown at $2\theta = 23^\circ$. The result of DSC showed that the endothermic peak was observed only in untreated HACS at a water content of 50 %.

1. 緒 言

でん粉及びその調製品は、性状や加工度合いにより関税分類が異なり、税率も大きく異なる品目である。

税関の分析部門では、これらの貨物が分析依頼された際、税関分析法に従い分析を行っているが、当部門において「湿熱処理でん粉」という税関分析法に記載のないでん粉を含有する貨物の分析依頼があった。

湿熱処理でん粉は、でん粉を加湿条件下で加熱することにより製造されるものである。当処理法は、L. Sair により発見されて以来、でん粉の構造と機能を変える一つの方法として注目されており^{1)~3)}、耐熱性や耐酸性などの機能的特性を向上させつつも、化学的变化をほとんど伴わない⁴⁾。そのため、湿熱処理でん粉は自然な素材として、特に食品分野において需要のあるでん粉である。中でも、ハイアミロースコーンスターチ（以下、HACS と略記する。）を湿熱処理したものは、難消化性成分である食物繊維が大幅に増加することから、健康食品として利用されている⁴⁾。HACS とは、品種改良されたとうもろこしから製造されるでん粉であり、アミロースの含有量が高く、沈降性が確認される等、未処理の状態でも一般的などうもろこしでん粉であるデントコーンスターチ

（以下、CS と略記する。）とは特性が異なることが知られている^{5), 6)}。

従来、湿熱処理でん粉は、製造時に生じる不均一性の問題から実験室レベルの小規模なものに限られていたが、近年になって商業レベルでの生産が可能となった⁷⁾。それゆえに、湿熱処理でん粉が流通し始めたのは、比較的最近のことであり、税関における分析実績も少なく、また、その知見についても乏しいのが実情である。

このような背景から、第 1 報では対象をコーンスターチに絞り、CS と HACS について、それぞれ未処理のものと湿熱処理したものとの物性の違いを検討した⁸⁾。その結果、CS については、沈降性の確認とブラベンダービスコグラフィーによる粘度特性の変化により、両者の判別が可能であった。一方で、HACS に関しては、加水分解酵素による分解率の測定により、判別が可能であることが示唆されたが、再現性の確認やよりよい分解条件の検討を行うことで、有効性を検証する必要がある。

そこで、本研究では、対象をさらに HACS に絞り、未処理 HACS と湿熱処理 HACS について、4 種類の加水分解酵素を用いて分解率の測定を行い、最適条件の検討を行った。

また、加水分解酵素による分解率の測定以外の手法として、で

* 横浜税関業務部 〒221-0031 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町 2-1-10

ん粉研究の分野でよく利用されているX線回折測定及び示差走査熱量測定を行い、得られた知見から未処理 HACS と湿熱処理 HACS の判別可否について検討を行ったので、併せて報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

未処理 HACS (J-オイルミルズ製)

輸入品 未処理 HACS

輸入品 湿熱処理 HACS

2.1.2 試薬

2.1.2(1) 分解酵素

グルコアミラーゼ, クモノスカビ属 (*Rhizopus* sp.) 由来 (和光純薬工業)

グルコアミラーゼ, コウジカビ属 (*Aspergillus niger*) 由来 (sigma-aldrich)

α -アミラーゼ, 枯草菌 (*Bacillus* sp.) 由来 (sigma-aldrich)

α -アミラーゼ, 豚すい臓 (*Porcine pancreas*) 由来 (sigma-aldrich)

2.1.2(2) その他の試薬

フェリシアン化カリウム, よう化カリウム, 酢酸ナトリウム, 酢酸, グルコース, 水酸化ナトリウム, 塩化ナトリウム (以上特級, 和光純薬工業)

でん粉溶性 (一級, 和光純薬工業)

0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 (容量分析用, 和光純薬工業)

炭酸ナトリウム (一級, 小宗化学薬品)

硫酸亜鉛七水和物, メタノール, 水酸化バリウム八水和物 (以上特級, 関東化学)

2.1.3 調製試薬

ハーネス法用試薬, 除たんぱく剤 (A 液及び B 液) 及び酵素溶液は, 税関分析法⁹⁾の定めに従い調製した。酵素溶液の力価は, 既報¹⁰⁾を参考に調製した。

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 乾燥機

装置 : DRM620DD (ADVATEC)

温度 : 105 °C

時間 : 5 時間

2.2.2 オートクレーブ

装置 : Labo autoclave (三洋電機)

加熱温度 : 120 °C

加熱時間 : 180 分

2.2.3 粉砕機

装置 : ワンダーブレンダー (大阪ケミカル)

2.2.4 X 線回折装置

装置 : MiniFlex600 (株式会社リガク)

回折角 : 3~30°

掃引速度 : 2° / min

2.2.5 示差走査熱量測定装置

装置 : DSC8230 (株式会社リガク)

昇温速度 : 10 °C / min

測定温度 : 室温~100 °C

試料容器 : アルミニウム製 $\phi = 5$ mm, $h = 2.5$ mm (簡易密閉式)

2.3 実 験

2.3.1 試料の精製

未処理 HACS (J-オイルミルズ製) について, 税関分析法¹¹⁾に従い, 多量の水による方法で精製した (精製 HACS)。

2.3.2 湿熱処理でん粉の製造

2.3.2(1) 湿熱処理前の水分量の調整

原料となる精製 HACS の水分値を 2.2.1 の条件で測定し, 水分量が 25 % となるよう蒸留水を加えよく攪拌した。

2.3.2(2) 湿熱処理

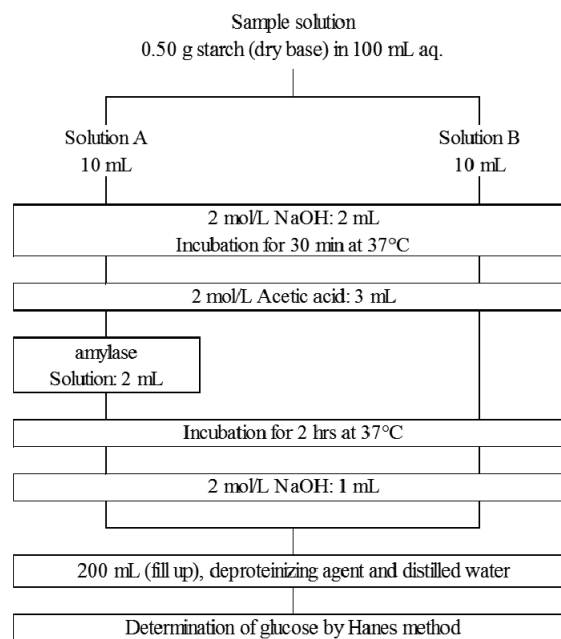
2.3.2(1)で調整した試料をポリエチレン製の袋に詰め, 8 時間以上静置させて水分の分布を均一にさせた。当該試料を平底フラスコに入れて密栓した後, 2.2.2 の条件により湿熱処理でん粉を得た。得られた湿熱処理でん粉は, 風乾した後, 2.2.3 の装置により粉碎し, 測定用試料とした (作製品湿熱処理 HACS)。

2.3.2(3) 湿熱処理の水分量

作製品湿熱処理 HACS の水分値は, 2.2.1 の条件で測定した結果, 13.6 % であった。

2.3.3 加水分解酵素による分解率の測定

精製 HACS 及び作製品湿熱処理 HACS 並びに, 輸入品の各試料について, 税関分析法^{9), 11)}及び既報⁸⁾を参考に Fig. 1 の手順に従い測定した。測定は各条件において, それぞれ 3 回ずつ行った。



$$\text{Degree of Hydrolysis (\%)} = \frac{(\text{Product Weight of Glucose}) \times 0.9}{(\text{Dry Weight of Sample})} \times 100$$

Fig. 1 Procedure of the analysis method to observe hydrolysis by amylase. Product weight of glucose is converted from the difference of consumed amount of N/100 Na₂S₂O₃ for the test solution A and B by calibration curve.

2.3.4 X線回折測定

精製 HACS 及び作製品湿熱処理 HACS 並びに、輸入品の各試料について、2.2.4 の装置及び条件により測定した。

2.3.5 示差走査熱量測定

精製 HACS 及び作製品湿熱処理 HACS 並びに、輸入品の各試料について、水分量が 50 % 及び 90 % となるよう蒸留水を加えよく攪拌した。調整した各試料を試料容器に詰め、装置付属のシーラーを用いて密封したものを、2.2.5 の装置及び条件により測定した。

3. 結果及び考察

3.1 加水分解酵素による分解率の測定

前述のとおり、湿熱処理 HACS は、未処理 HACS と比べて難消化性成分の割合が増加することが知られている。換言すると、湿熱処理を行うことによって、HACS は加水分解酵素から受ける分解作用が低下するということである。この点に着目し、第 1 報においては、水分量を変えて作製した各湿熱処理 HACS に対して、加水分解酵素による分解挙動の検証を行っており、当該手法により未処理のものと湿熱処理をしたもので加水分解率に違いが生じることが示された。

でん粉を加水分解する酵素であるアミラーゼは、作用機序の異なる複数の種類が存在する¹²⁾。また、酵素の由来となる生物が異なると、アミノ酸残基に違いが生じることなどから、活性や至適条件の異なるものも多く存在している。実際に、アミラーゼの種類や由来の違いによってでん粉の加水分解率が変化することが既報¹⁰⁾でも報告されている。

そこで本研究では、作製品と輸入品に対して、2.1.2(1)に示した 4 種類のアミラーゼを用いて、単独で使用情况及びそれらを組み合わせた場合における湿熱処理前後の加水分解率をそれぞれ測定し、比較検証を行った。

3.1.1 作製品に対する検証（酵素を単独で使用情况）

精製 HACS 及び作製品湿熱処理 HACS に対し、各加水分解酵素を単独で使用情况の場合の加水分解率の結果を Fig. 2 に示す。

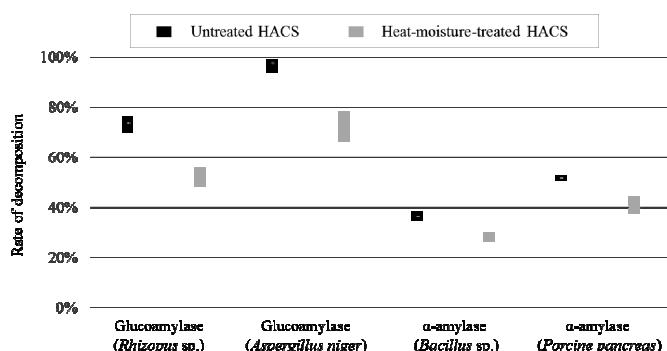


Fig. 2 Degree of hydrolysis of HACS by single amylases (n = 3).

グルコアミラーゼを作用させた場合、酵素の由来によって異なる値を示したが、いずれも作製品湿熱処理 HACS は精製 HACS と比べて 20 % 程度低い結果となった。一方で、α-アミラーゼを作用

させた場合、精製 HACS と作製品湿熱処理 HACS の差は 10 % 程度であった。データのばらつきに関しては、グルコアミラーゼで 5~12 % 程度、α-アミラーゼで 3~7 % 程度の幅が見られた。グルコアミラーゼについては、由来の違いによってもばらつきに差が見られ、作製品湿熱処理 HACS に対する加水分解において、コウジカビ由来のものは、クモノスカビ由来のものよりも 4 % 程度ばらつきが大きかった。

3.1.2 作製品に対する検証（酵素を混合して使用情况）

精製 HACS 及び作製品湿熱処理 HACS に対し、グルコアミラーゼと α-アミラーゼを混合して使用情况の場合の加水分解率の結果を Fig. 3 に示す。

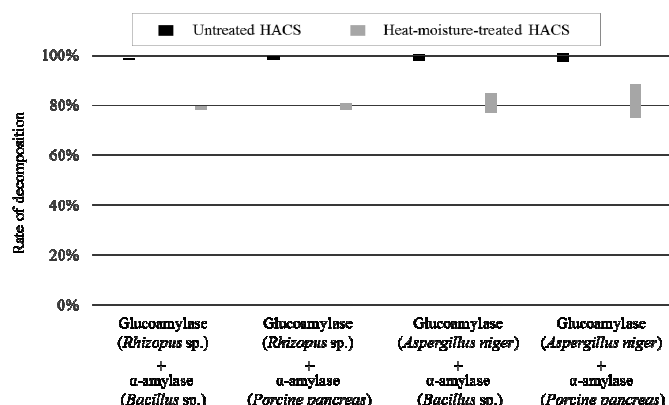


Fig. 3 Degree of hydrolysis of HACS by mixed amylases (n = 3).

いずれの組み合わせについても、単独で酵素を使用情况の場合と比べて高い分解率を示し、精製 HACS に対しては 100 % に近い分解率であった。また、いずれも、作製品湿熱処理 HACS は精製 HACS と比べて 20 % 程度低い結果となった。一方で、データのばらつきに関しては、グルコアミラーゼにクモノスカビ由来のものを用いた場合に 1~2 % 程度の幅であったのに対し、コウジカビ由来のものを用いた場合では、3~13 % 程度の幅が見られた。

3.1.3 輸入品に対する検証

輸入品の各試料に対し、クモノスカビ由来のグルコアミラーゼを単独で使用情况の場合及び α-アミラーゼと組み合わせて使用情况の場合の加水分解率の結果を Fig. 4 に示す。

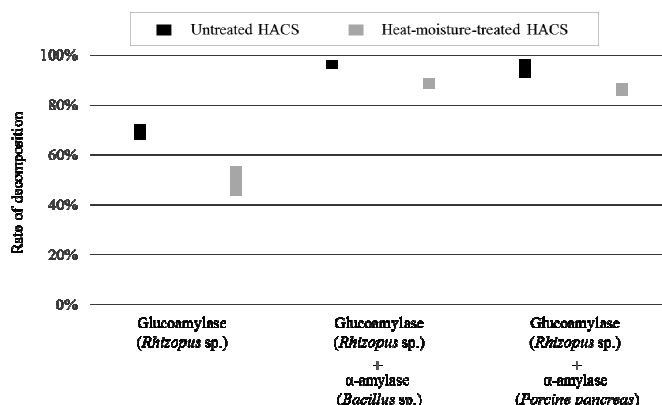


Fig. 4 Degree of hydrolysis of HACS (imported goods) by single and mixed amylases (n = 3).

単独で作用させた場合、湿熱処理 HACS は未処理 HACS と比べ 20 % 程度低く、作製品と同様の結果となった。データのばらつきに関しても、6~12 % 程度とほとんど変わらず、両者の判別には良好な結果となった。

一方で、 α -アミラーゼと組み合わせた場合、未処理 HACS と湿熱処理 HACS の差は 8~10 % 程度と小さく、データのばらつきも 3~7 % と大きかった。

以上の結果より、作製品・輸入品ともに湿熱処理の有無を判別する際には、クモノスカビ由来のグルコアミラーゼを単独で使用するが適当であると考えられる。

3.2 X線回折測定

でん粉は結晶構造の違いにより、大きく 2 つのグループに分かれることが知られている⁴⁾⁶⁾。通常の CS や小麦でん粉では細密充填した構造をとり、X 線回折測定において“A 型”と呼ばれる回折パターンが得られる (Fig. 5(a))。一方で、ばれいしょでん粉や HACS では、空隙のある充填構造をとることから、“B 型”と呼ばれる A 型とは異なった回折パターンとなる (Fig. 5(b))。

精製 HACS 及び作製品湿熱処理 HACS 並びに輸入品の各試料について、X 線回折測定の結果を Fig. 6 に示す。

各未処理 HACS の回折図は、回折角 6°に 1 本のピーク、15°にブロードなピーク、17°に 1 本のピーク、23°に 2 本のピークがあり、典型的な B 型でん粉のパターンを示した。一方で、各湿熱処理 HACS の回折図は、回折角 6°のピークの減少、15°のピークのシャープ化などが見られ、特に 23°ではピークが 1 本化し、未処理ピークとの顕著な違いが確認された。

B 型のでん粉は、湿熱処理を行うと、回折パターンが A 型へと変化することがバレイショでん粉による研究で知られている⁴⁾。本実験で生じた変化は、完全には A 型へ移行していないものの、一部のピークが A 型の特徴を有しており、バレイショの場合と同様の変化が起きているものと考えられる。

なお、湿熱処理 HACS について、作製品では回折角 13°及び 20°にもピークが確認された。これは湿熱処理の際に生成されるアミロースと油脂の複合体によるものと推測される⁴⁾¹³⁾。

3.3 示差走査熱量測定

でん粉の糊化は、吸熱を伴う変化である。でん粉を構成しているアミロペクチンとアミロースは、水素結合により粒構造を保っているが、糊化が始まると、この水素結合が切断されることから、吸熱反応が起こると考えられている⁴⁾。そのため、でん粉研究の分野では、糊化を観測する手段として、温度変化に伴う物質の発熱・吸熱を観測することのできる示差走査熱量測定が用いられている。

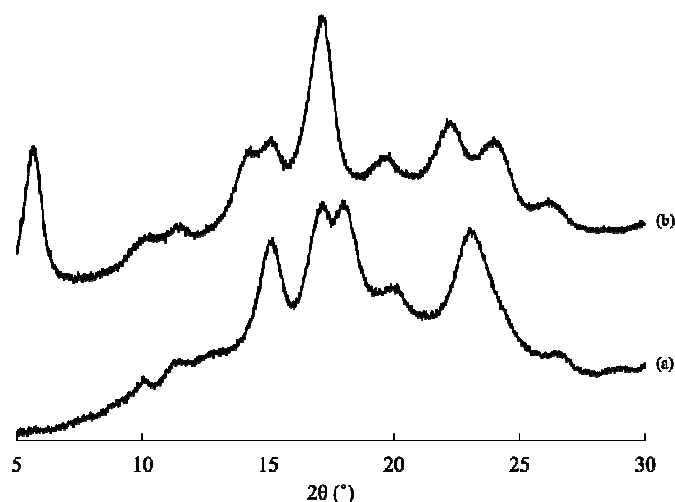


Fig. 5 Typical XRD patterns of (a) corn starch (A-type) (b) potato starch (B-type)

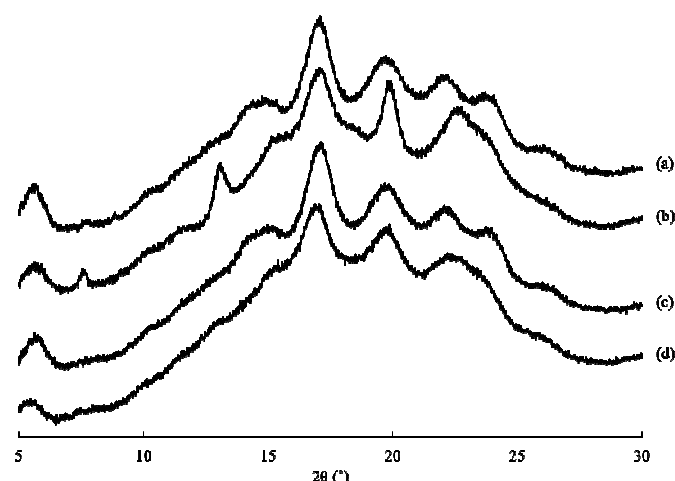


Fig. 6 XRD patterns of (a) untreated HACS (b) Heat-moisture-treated HACS (c) Untreated HACS (imported goods) (d) Heat-moisture-treated HACS (imported goods).

HACS はアミロース分の多いでん粉であり、糊化には 135 °C 以上の加熱が必要とされている⁶⁾。そのため、第 1 報で報告したとおり、ブラベンダービスコグラフィーで測定できる範囲では、糊化が観測できない。一方、示差走査熱量測定で得られるピークは、ブラベンダービスコグラフィーで得られる糊化温度よりも低い温度帯に生じることが知られており⁶⁾、当測定を行うことで、新たな知見が得られる可能性がある。そこで、精製 HACS 及び作製品湿熱処理 HACS 並びに輸入品の各試料について、それぞれ水分量の異なる 2 種類の試料 (水分量 50 % 及び 90 %) を作製し、示差走査熱量測定を行った (Fig. 7, 8)。

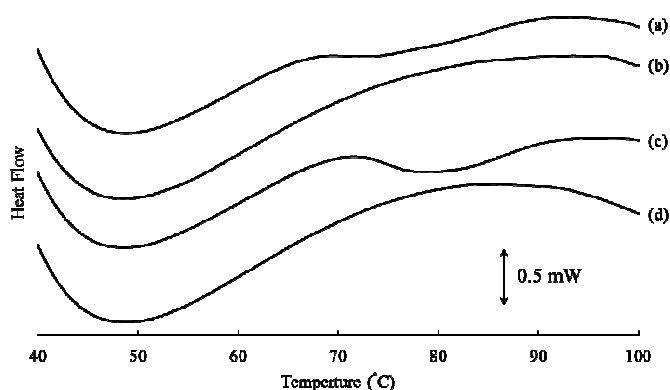


Fig. 7 DSC curves of (a) untreated HACS (b) Heat-moisture-treated HACS (c) untreated HACS (imported goods) (d) Heat-moisture-treated HACS (imported goods).
Water content of each sample is prepared at 50 %.

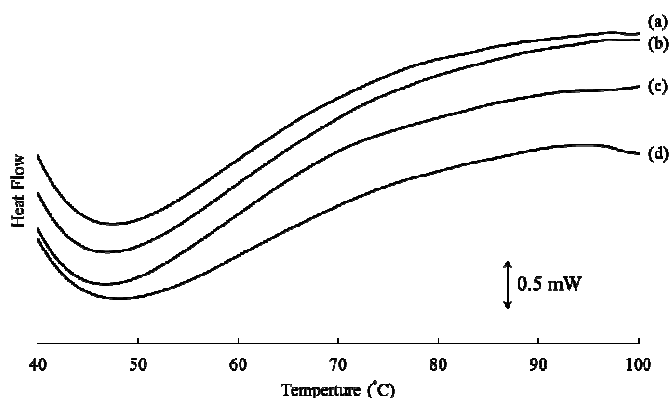


Fig. 8 DSC curves of (a) untreated HACS (b) Heat-moisture-treated HACS (c) untreated HACS (imported goods) (d) Heat-moisture-treated HACS (imported goods).
Water content of each sample is prepared at 90 %.

試料の水分量を 50 %に調整した場合、湿熱処理を行う前は、70 °C から 90 °C にかけて吸熱ピークが確認されたが、湿熱処理を行ったものにおいては、このピークが現れなかった。

湿熱処理を行うと、糊化温度が高温側にシフトすることが他のでん粉による実験で知られている⁴⁾。本結果も、湿熱処理前に見られたピークが、湿熱処理後では今回測定されていない温度範囲にまでシフトした可能性があると考えられる。

一方で、試料の水分量を 90 %に調整した場合は、作製品と輸入品のいずれにおいても湿熱処理の前後で違いは見られなかった。

この水分量による挙動の違いについて、まず、でん粉試料の絶対量の違いが挙げられる。今回検討した条件では、測定容器の容

量の関係上、水分を含めた試料の総量を揃えてそれぞれ測定を行ったため、水分量 90 %では 50 %のものに比べて測定に使用したでん粉の量が少ない。水分量 50 %で確認されたピークにおいても、ベースラインの変動に対して得られたピークは大きくはないため、でん粉の絶対量が少ない水分量 90 %においてはピークが検出できなかった可能性が考えられる。

また別の理由として、でん粉の糊化は、含有する水分量によってその挙動が変化する。水分量が多い場合、得られるピークは単純なものになるが、水分量が少ないと複雑化したピークとなる^{4),14)}。前述のとおり、HACS の糊化温度は非常に高いため、糊化のメインピークは今回測定が行われていない 100 °C 以上の領域にある可能性がある。水分量 50 %で見られたピークは、複雑化したピークのうちの低温側のものが観測された可能性も考えられる。

これらの推察を検証するためには、100 °C 以上でも測定可能な大容量の密封式高圧試料容器を用いて各データを取得することが必要であり、今後の課題である。

3.4 原料の必要性

以上の測定結果により、各手法で湿熱処理 HACS と未処理 HACS に違いが見られることが確認された。他方で、原料の HACS には様々なアミロース含有量のものが存在するため、原料が異なると上記の測定により得られる原料データに違いが生じうる。また、湿熱処理に関しても、処理時の水分量や処理時間、処理温度等により処理の程度が変化し、処理後のデータのみによって湿熱処理が行われていることを判断することは困難である。このようなことから、HACS に湿熱処理が施されたことを確認するためには、原料との比較によって判断することが必要である。

4. 要 約

未処理 HACS と湿熱処理した HACS を判別する方法について、各種検討を行った。

加水分解酵素による分解率について、酵素の種類及び組み合わせを変えて検討した結果、クモノスカビ由来のグルコアミラーゼを単独で使用した条件で、両者の判別に良好な結果が得られた。X 線回折測定では、湿熱処理により、回折パターンが B 型から A 型へ移行し、特に回折角 23°付近のピーク形状の変化が大きく、当ピークを確認することで、湿熱処理の有無による違いを確認することが可能であった。また、示差走査熱量測定においても、試料の水分量を 50 %に調整することで、未処理 HACS のみ 70 °C から 90 °C にかけて吸熱ピークを生じることから、湿熱処理の有無による違いを確認することが可能であった。

文 献

- 1) L. Sair : *Cereal Chemistry*, **44**, 8 (1967).
- 2) 福井俊郎, 二国二郎 : 農化, **38**, 226 (1964).
- 3) Hyun-Jung Chung, Qiang Liu, Ratnajothi Hoover : *Carbohydrate Polymers*, **75**, 436 (2009).
- 4) 不破英次, 小巻利章, 檜作進, 貝沼圭二編集 : “澱粉科学の事典”, P.40, P.183, P.417, P.510 (2012), (朝倉書店) .
- 5) 田中佑樹, 熊澤勉 : 関税中央分析所報, **54**, 49 (2014).
- 6) 高橋禮治 : “でん粉製品の知識”, P.19, P.49, P.72 (2016) (幸書房).
- 7) 蔵橋嘉樹, 吉野善市 : *Journal of Applied Glycoscience*, **47**, 125 (2000).
- 8) 小林俊哉, 松井智史, 甲田政則, 池田英貴, 勅使川原尚行 : 関税中央分析所報, **58**, 23 (2019).
- 9) 関税中央分析所ホームページ「110 でん粉のアルファー化度の測定法」. (http://www.customs.go.jp/ccl_search/analysis_search/a_110_j.pdf)
- 10) 池田英貴, 郡司正之, 高山義紀, 富田健次 : 関税中央分析所報, **42**, 41 (2002).
- 11) 関税中央分析所ホームページ「403 でん粉誘導体の分析法」. (http://www.customs.go.jp/ccl_search/analysis_search/a_403_j.pdf)
- 12) 小巻利章 : “酵素応用の知識”, P.80 (1986) (幸書房) .
- 13) 日比喜子, 久下喬 : 澱粉科学, **34**, 271 (1987).
- 14) 石田信昭, 小林登史夫, 貝沼圭二 : 日本食品工業学会誌, **35**, 30 (1988)