モチ性変異体米澱粉の食品等への利用可能性試験

(2013年2月25日受付；2013年5月22日採択)

安東竜一^{1,*}, 影嶋富美¹, 高口 均¹, 奥田 茜¹, 藤村岳史¹,
相沢健太¹, 高木洋平¹, 高田正保¹, 中村保典², 藤田直子²

¹ 日本食品化工株式会社研究所 (417-8530 静岡県富士市田島 30 番地)

² 秋田県立大学生物資源科学部 (010-0195 秋田市下新城中野字道端西 241-438)

Food Application Tests of Starches in Waxy Mutant Rice Lines

Ryuichi Ando,^{1,*} Fumi Kageshima,¹ Hitoshi Takaguchi,¹ Akane Okuda,¹ Takefumi Fujimura,¹
Kenta Aizawa,¹ Yohei Takagi,¹ Masayasu Takada,¹ Yasunori Nakamura² and Naoko Fujita²

¹Research Institute, Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd. (30 Tajima, Fuji, Shizuoka 417-8530, Japan)

²Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University
(241-438 Kaidobata-nishi, Shimoshinjo-nakano, Akita 010-0195, Japan)

要旨：米澱粉における変異遺伝子と澱粉の利用特性との相関を解明することを目的として，結合型スターチシンターゼ I (GBSSI) に加えて他の澱粉生合成関連アイソザイム (スターチシンターゼ I (SSI), SSIIIa, 枝作り酵素 I (BEI)) が同時に欠損あるいは活性が低下したモチ性変異体米系統 (*ss1^L/gbss1*, *ss3a/gbss1*, *be1/gbss1*) の澱粉の食品への利用特性について分析し，GBSSI のみ欠損した変異体 (*gbss1*) と比較した。*ss1^L/gbss1* は粘度上昇温度が上昇したが，ピーク粘度は低下した。*ss3a/gbss1* は平均粒径が小さくなり，粘度上昇温度が低下し，ピーク粘度が低下した。*be1/gbss1* はピーク粘度が上昇した。*ss1^L/gbss1* と *be1/gbss1* では加熱膨潤度が増加した。*ss3a/gbss1* と *be1/gbss1* ではアセチル化アジピン酸架橋を施した後に吸水率が増加した。団子のタレによる利用評価では，*ss3a/gbss1* が保形性と口溶けのバランスに優れて良好な利用適性を示したものの，酸性フルーツソースでは澱粉粒の崩壊が促進され，保形性が大きく低下した。アセチル化アジピン酸架橋を施したモチ性変異体米澱粉では，酸性条件下での澱粉粒の崩壊が適度に抑制され，タレ・ソース用途において，保形性と口溶けの向上を両立させることができた。

キーワード：モチ性変異体米，澱粉，食品利用，アセチル化アジピン酸架橋澱粉，糊化挙動

ウルチ性の米はアミロースとアミロペクチンを含むが，結合型スターチシンターゼ I (GBSSI) 遺伝子に変異して GBSSI 活性を失うとアミロースが消失してアミロペクチンのみの澱粉，すなわち，モチ性 (*gbss1* あるいは *waxy* 変異体) となる¹⁾。古来より人類は，様々な作物のウルチ種とモチ種を分離し，それぞれ独特の用途に用いてきた。米においても，ウルチ米は，米飯，粥，せんべい等に用いられ，モチ米は，切り餅，おこわ，赤飯，大福，おかき，あられ等に用いられてきた。モチ品種は各県の試験場で多数開発されており，硬化性等の違いによってそれぞれに合致した用途に利用されてきた。一方で，硬化性を制御する遺伝的要因は全く未解明である。

モチ米澱粉を用いた食品への用途開発は米菓や和菓子が中心であり，その他の用途についてはそれほど多くの研究がなされていないのが現状である。一方，モチ種のトウモ

ロコシ澱粉であるワキシコーンスターチは，古くから米菓に用いられてきたものの，アセチル化アジピン酸架橋やリン酸架橋といった化学修飾²⁾が施されることによって，タレ・ソース，フィリング，フラワーペースト，ベーカーリー，惣菜等の様々な分野に対して利用適性が最適化されている³⁾。そもそもアミロペクチンが 100% であるワキシコーンスターチは老化し難い性質を有していることから，化学修飾されたワキシコーンスターチは，特に保存安定性が求められるタレ・ソース分野に非常に相性が良く，付加価値の高い食品素材として市場に受け入れられている。

一方，米に関しては，GBSSI が欠損したモチ変異体を含む澱粉生合成関連酵素の変異体米が，九州大学および秋田県立大学等によって開発されてきた⁴⁾。これに伴い，ユニークな物性を有するモチ性変異体米澱粉の実用化が大きい

*連絡先 (Tel. 0545-53-5995, Fax. 0545-53-1119, E-mail: ryuichi.ando@nisshoku.co.jp)

** Key words: waxy mutant rice line, starch, food application, acetylated distarch adipate, viscoelastic behavior SS, スターチシンターゼ；GBSS, 結合型スターチシンターゼ；BE, 枝作り酵素。

に期待されている。アミロペクチン構造に影響を与える遺伝子は多数存在する⁴⁾が、このうち、スターチシンターゼ I (SSI) はアミロペクチンの極短鎖の伸長に関与し⁵⁾、SSIIa はアミロペクチンのクラスターを連結する長鎖を伸長すること⁶⁾が知られている。また、枝作り酵素 I (BEI) はアミロペクチンクラスターの非結晶領域の枝作りに関与していると考えられている⁷⁾。

そこで本研究では、米澱粉における変異遺伝子と澱粉の利用特性との相関を解明することを目的として、各種変異体米澱粉の中でも、GBSSI と他の澱粉生合成関連アイソザイム (SSI, SSIIa, BEI) が同時に欠損あるいは活性が低下したモチ性変異体系統米の食品に利用される際の特性について分析し、タレ・ソース用途への利用適性について評価を行った。さらに、これらモチ性変異体系統米澱粉に対して、タレ・ソース用途で広く使用されているアセチル化アジピン酸架橋ワキシーコーンスターチと同様の化学修飾を施し、これら化学修飾されたモチ性変異体米澱粉のタレ・ソース用途への利用適性についても評価を行った。

1. 材料および方法

1) 変異体米

本研究に用いたモチ性変異体米澱粉を表 1 に示した。*gbss1* (EM21) および *gbss1* (EM583) は、金南風および台中 65 号の受精卵を *N* メチル *N* ニトロソウレア処理することで得られた集団⁸⁾から胚乳澱粉のモチ性を選抜して得たものである。*ss1^L/gbss1* と *ss3a/gbss1* は、*ss1^L* (*L* はリーキーを意味し、SSI 活性が野生型の 1/6 に低下している⁹⁾) と *ss3a*⁶⁾をそれぞれ *gbss1* (EM21) と、*be1/gbss1* は、*be1* 変異体 (EM557⁷⁾) と *gbss1* (EM583) を交配した交配後代の F₂ 種子から、ウエスタンブロット法を用いて二重劣性ホモである個体を選抜して得られた二重変異体である。*gbss1* (EM21)、*gbss1* (EM583)、*be1/gbss1* は、九州大学大学院農学研究院の佐藤光前教授から譲渡された。

2) 変異体米澱粉の大量調製

上記の変異体米は、秋田県立大学生物資源科学部大潟キャンパスフィールド教育センターにて栽培し、得られた籾から脱穀および精米後、冷アルカリ法^{9,10)}を大規模化し、約 1 kg の精米から約 400 g の精製澱粉を得た。

変異米澱粉の対照として、市販のモチ米澱粉および市販のアセチル化アジピン酸架橋ワキシーコーンスターチ(日食マブス #449, 日本食品化工(株))を用いた。

表 1. 本研究に用いたモチ性変異体米澱粉

澱粉試料名 (遺伝子型)	親系統
<i>gbss1</i> (EM21)	金南風
<i>gbss1</i> (EM583)	台中 65 号
<i>ss1^L/gbss1</i>	日本晴/金南風
<i>ss3a/gbss1</i>	日本晴/金南風
<i>be1/gbss1</i>	台中 65 号

3) アミロペクチンの鎖長分布解析

2) で精製した澱粉 5 mg から Fujita ら¹¹⁾の方法に従い、イソアミラーゼ (*Pseudomonas* 由来, (株), 59,000 U/mg protein) で澱粉の α -1,6 グルコシド結合を分解 (枝切り) することで α -グルカン鎖を得た。各 α -グルカンの還元末端を APTS (1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid, trisodium salt) で蛍光標識¹²⁾、これをキャピラリー電気泳動 (P/ACE MDQ carbohydrate system, Beckman Coulter Inc.) によって、グルコース重合度 (DP, degree of polymerization) の違いで分離した。その後、同機種のアプリケーションを用いてデータの解析を行い、DP 5~60 を 100% としたときの各 DP の鎖数の割合 (Molar (%)) を求めた。

4) アセチル化アジピン酸架橋澱粉の作製

市販のモチ米澱粉および表 1 に示した未加工澱粉試料をそれぞれ原料として用い、市販のアセチル化アジピン酸架橋ワキシーコーンスターチと同程度の加工度が得られるように調製した。すなわち、まず、2 L 反応装置 (TS-M2L 型, (株)高杉製作所) の反応槽に澱粉試料を無水物換算で 320 g 計量し、これに水を加えて均一になるように攪拌して無水物換算 40% の澱粉スラリーを調製した。その後、以下の反応終了まで 750 rpm で攪拌し続け、自動温度調整によって 30°C を保った。澱粉スラリーに 3% 水酸化ナトリウム水溶液を添加して pH 8.7 に調整した。さらに、予め無水酢酸にアジピン酸を溶解させて調製したアセチル化アジピン酸架橋反応液を 120 分間かけて澱粉スラリーに添加しつつ、澱粉スラリーの pH が 8.5~8.7 に保たれるように適宜 3% 水酸化ナトリウム水溶液を添加することで、澱粉試料にアセチル化アジピン酸架橋反応を施した。アセチル化アジピン酸架橋反応液の添加終了後、9% 塩酸にて澱粉スラリーを pH 6.0 に調整して反応を終了した。反応槽中の澱粉スラリーを 5 L 容のポリバケツに移し、1.6 L の水を加えて攪拌した後、80 メッシュを通過させながらブフナー漏斗を用いて脱水した。脱水して得られたウェットケーキを軽く揉み砕いた後、40°C 設定された送風定温乾燥器 (DRK633DB, アドバンテック東洋(株)) 内にて水分が 10% 程度となるように乾燥した。これをジューサーミキサーで粉碎した後、50 メッシュを通過させて得られたものをアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料とした。なお、アセチル化アジピン酸架橋が施されていない澱粉試料を未加工澱粉試料と呼ぶが、未加工澱粉試料とアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料を総称して澱粉試料と呼ぶ。

5) 澱粉試料の性状および物性の分析

(1) 顕微鏡観察

澱粉試料の性状を、次の方法で観察した。精製水に 2.0% のヨウ化カリウムおよび 0.2% のヨウ素を加えて調製したヨウ素溶液を用いて澱粉試料を染色し、光学顕微鏡 (BX50, オリジナル光学工業(株))を用いて観察を行った。

(2) 水分の測定

澱粉試料の水分は、約 10 g の澱粉試料を迅速水分測定器 (MT-C, Brabender® GmbH & Co. KG) にて 130°C で 20 分間乾燥し、減少重量から算出した。

(3) 平均粒径の測定

澱粉試料の平均粒径を、次の方法で測定した。約 0.07 g の澱粉試料を 100 mL の蒸留水に懸濁した後、10 分間超音波を照射して分散した澱粉スラリーを調製し、超遠心式自動粒度分析装置 (CAPA-700, 株式会社堀場製作所) に供して測定した。測定方法は遠心沈降測定 (CS) とし、回転数は 500 rpm とした。

(4) 吸水性の測定

澱粉試料の吸水性を、次の方法で評価した。200 mL 容量のビーカーに無水物換算 30.0 g の澱粉試料を取り、マグネチックスターラー (HI-POWER STIRRER HPS-10, 株式会社井内盛栄堂) を用いてスターラーバー (直径 6 mm, 長さ 450 mm) による攪拌が可能となる時点まで蒸留水をわずかずつ添加した。攪拌が可能となった時点での蒸留水添加量を測定し、次式によりスラリー調製限界濃度を求め、これを吸水性の評価指標とした。スラリー調製限界濃度が低いほど、未加熱状態での澱粉の吸水性が高いことを示す。

$$\text{スラリー調製限界濃度 (\%)} = 30 / (m + w) \times 100$$

m , 蒸留水の添加量 (g); w , 澱粉試料の風乾重量 (g)

(5) アセチル基含量の測定

澱粉試料のアセチル基含量を、Smith¹³⁾の方法で測定した。すなわち、澱粉試料を無水物換算で 5.0 g 量り、精製水 50 mL に懸濁し、フェノールフタレイン試液数滴を加え、液が微紅色を呈するまで 0.1 mol/L の水酸化ナトリウム溶液を滴下後、0.45 mol/L の水酸化ナトリウム溶液 25 mL を加え、温度が 30°C 以上にならないように注意しながら栓をして 30 分間激しく振り混ぜ、これを 0.2 mol/L の塩酸で滴定し、終点は液の微紅色が消えるときとした。また、別に空試験を行い、次式によりアセチル基 (CH_3CO) の含量を求めた。

$$\text{アセチル基含量 (\%)} = (e - f) \times n \times 0.043 \times 100 / 5.0$$

e , 空試験滴定量 (mL); f , 試料滴定量 (mL); n , 0.2 mol/L 塩酸の力価

(6) 加熱膨潤度・加熱溶解度の測定

澱粉試料の加熱膨潤度と加熱溶解度を、次の方法で測定した。密栓式 50 mL 容フalconチューブに無水物換算 1% のサンプルスラリーを 30.0 g 調製し、沸騰浴中に 30 分間保った後 (澱粉が沈殿しないようにときどき振盪した), 冷水浴中に 30 分間保ち放冷した。遠心分離機 (Centrifuge GS-6, Beckman Coulter Inc.) を用いて処理液を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上澄液の一部をアルミ皿に広げて重量を測定した (A)。一方でゲル層の一部もアルミ皿に広げて重量を測定した (B)。上澄液とゲル層を 105°C で 4 時間以上保って乾固させた後、上澄液乾固後重量 (C) およびゲル層乾固後重量 (D) を測定し、 $10,000 \times C/A$ を溶解度 (%), B/D を膨潤度 (倍) とした。

(7) 糊化特性の測定

澱粉試料の糊化特性を、次の方法で測定した。3% 水酸化ナトリウムを用いて pH 7.0 に調整された無水物換算 8% の澱粉スラリー 500 g を、ビスコグラフ (Viscograph-E, Brabender® GmbH & Co. KG) に供した。測定フィーラにはピン型を用い、回転速度は 75 rpm とした。測定は 35°C から開始し、1.5°C/min で 95°C になるまで昇温した。95°C に到達した後、95°C を 30 分間保ち、その後 1.5°C/min で 35°C になるまで冷却した。

(8) 糊の顕微鏡観察

澱粉試料の加熱糊化後の澱粉粒の崩壊の度合いを、次の方法で観察した。ビスコグラフ測定直後に得られた糊を採取し、精製水に 2.0% のヨウ化カリウムおよび 0.2% のヨウ素を加えて調製したヨウ素溶液を用いて糊を染色した後、光学顕微鏡 (BX50, オリンパス光学工業株式会社) を用いて観察を行った。

(9) 糊の老化度合いの観察

澱粉試料の糊の老化の度合いを、次の方法で観察した。前述のビスコグラフ測定直後に得た糊をプラスチックシャーレに約 20 g 採取して写真撮影を行い、これを調製直後とした。さらに、約 50 g の糊をチャック式ビニール袋に取ったものを作成し、これを冷凍 (-20°C) で一晩保存した後、翌日に 25°C で 4 時間程度放置して常温に戻した。これを 5 回繰り返した後、ビニール袋の中の糊をプラスチックシャーレに約 20 g 採取して写真撮影を行い、これを冷解凍 5 回目とした。調製直後と冷解凍 5 回目において、透明性、艶、離水および保水性を目視で比較した。

(10) 消化性の測定

ラット小腸アセトン抽出物粉末 (シグマアルドリッチジャパン合同会社) 0.5 g に 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を 10 mL 添加し、ボルテックスミキサーにて攪拌した。これを氷上で数分間保持し、13,000 rpm, 4°C にて 5 分間遠心分離して上清を得た (遠心分離機: SCR20B, 日立工機株式会社)。これをラット小腸消化酵素として以下の実験に使用した。ラット小腸消化酵素の活性は、マルターゼ活性として測定した。すなわち、以下の条件下で 1 分間に 1 μmol のマルトースを加水分解する酵素量を 1 U と定義した。酵素反応は、10 倍に純水で希釈した酵素溶液 10 μL に 0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を 10 μL 添加し、37°C に保持した。これに 0.25% マルトース水溶液 80 μL を添加して正確に 10 分間保持した。これに 2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7) 200 μL を添加して反応を停止し、グルコース C-II テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて遊離グルコース量を算出した。

糊化澱粉を用いた消化性試験として、澱粉試料を無水物換算で 10 mg となるように試験管に取り、純水 340 μL を添加して懸濁させた。これを沸騰水中にときどき攪拌しながら、ほぼ透明になるまで約 5 分間保持して糊化させた。次いで 0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 μL およびラット小腸消化酵素 560 μL (1.5 U, 澱粉固形分 1 g 当

り 150 U) を添加し, 37°C で 90 分間反応した。これを 50 μ L サンプルングし, 2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 500 μ L と混合して反応を停止させ, グルコース C-II テストワコー (和光純薬工業(株)) を用いて遊離グルコース量を算出した。一方, 未糊化澱粉を用いた消化性試験においては, 反応中に澱粉試料が沈澱するため, 数分間ごとに反応液をボルテックスミキサーで攪拌し, その他は糊化澱粉を用いた消化性試験と同様に行った。

6) 澱粉試料のタレ・ソース用途への利用適性評価

表 2 の配合にて団子のタレを作製した。まず, 使用する砂糖の半分を残し, すべての材料を鍋に投入して混合し, 溶液を調製した。この溶液が 85°C になるまでヘラで攪拌しながらガスコンロの弱火で加熱し, 85°C に到達した後, 85°C を 4 分間維持した。次いで, 砂糖の残り半分

表 2. 団子のタレの配合

材 料	配合 (%)
水	31.58
砂糖 (上白糖)	22.56
醤油	20.30
水飴	8.46
オリゴ糖	5.64
みりん	5.64
澱粉試料	5.64
昆布だしの素	0.18

表 3. 酸性フルーツソースの配合

材 料	配合 (%)
イチゴピューレ	30.00
グラニュー糖	30.00
水	20.30
水飴	15.00
澱粉試料	4.00
50% クエン酸水溶液	0.70

量をこの溶液に投入し, ヘラで攪拌しながら 85°C を 4 分間維持した。これを常温になるまで室温で冷却し, 団子のタレを得た。

表 3 の配合にて酸性フルーツソースを作製した。まず, 使用するグラニュー糖の半分を残し, すべての材料を鍋に投入して混合し, 溶液を調製した。この溶液が 85°C になるまでヘラで攪拌しながらガスコンロの弱火で加熱し, 85°C に到達した後, 85°C を 4 分間維持した。次いで, グラニュー糖の残り半分をこの溶液に投入し, ヘラで攪拌しながら 85°C を 4 分間維持した。これを常温になるまで室温で冷却し, 酸性フルーツソースを得た。

10 名のパネラーにより, 市販のモチ米澱粉を用いた団子のタレおよび酸性フルーツソースをそれぞれ基準 (0 点) として, 澱粉試料を用いた団子のタレおよび酸性フルーツソースの保形性および口溶けの悪い~良いについて, -3 ~ +3 の尺度で評価を行った。基準との差の検定は, Student's *t*-test により行い, 危険率 5% 未満を有意水準とした。

2. 結果および考察

1) アミロペクチンの鎖長分布解析

キャピラリー電気泳動法を用いて, 未加工澱粉試料の鎖長分布解析を行った (図 1)。二重変異体に関しては, 親系統 (*gbss1* (EM21)) および *gbss1* (EM583)) との差分を示し

図 1. 未加工澱粉試料の鎖長分布解析

DP はグルコース重合度, Δ Molar (%) は二重変異体系統等から親のモチ系統を引いたモル (%)。

た。いずれの二重変異体の差分パターンも、ウルチ種の各酵素の変異体と野生型の差分パターン⁵⁻⁷⁾と近いパターンを示した。すなわち、*ss1^L/gbss1* は、*gbss1 (EM21)* よりも DP 8~12 が少なく、DP ≥ 13 が増加していた。*ss3a/gbss1* は、*gbss1 (EM21)* よりも DP 6~9 が少なく、DP 10~15 が増加していた。また、*be1/gbss1* は、*gbss1 (EM583)* より DP 6~8 と DP 23~36 が増加し、DP 11~20 が減少していた。一方、*gbss1 (EM583)* と *gbss1 (EM21)* は、最も大きな変化がみられた DP 10 でわずか 0.3% の差であったことから、両者の鎖長分布は非常に類似していることが明らかになった。市販のモチ米澱粉は、*gbss1 (EM21)* と比べて DP ≤ 14 の短鎖が少なく、DP 19~35 が増加していた。以上の結果から、バックグラウンドがモチ性になっていても、SSI、SSIIIa および BEI が欠損あるいは活性が低

下した場合には、その影響が鎖長分布に表れていることが明らかとなった。

2) 性 状

冷アルカリ法で精製した澱粉試料およびそれらのアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料について、その性状を調べた。澱粉試料をヨウ素染色して顕微鏡観察を行った結果、ウルチ性の澱粉では紫色に染色されるのに対し、本研究で用いた澱粉試料はいずれも澱粉粒が褐色に染色されたため、モチ性の澱粉であることが確認された (図2) なお、市販のモチ米澱粉には紫色に染まった澱粉粒、すなわち、ウルチ性の澱粉がわずかに混在していることが確認された。工業スケールで澱粉を製造する場合、常に製造設備を稼働させておく必要があり、単一の製造ラインを用いて複数の品種を製造することが一般的である。すなわち、ある品種を製造した後、別の品種を製造する。品種切り替えの際には水洗浄を行うが、澱粉の乾燥・包装工程は水洗浄ができないため、設備内に付着した前製造品種を後製造品種で押し出すといった作業を行う。前製造品種が多く含まれた押し出し相当の部分は廃棄されるが、前製造品種のわずかな混在は物理的に避けられない。一方で、変異体米澱粉は実験室で精製されているため、他品種の混入は起こり得ないが、変異体米澱粉を工業スケールで精製した場合には、市販のモチ米澱粉と同様に他品種のわずかな混入は起

図2. 未加工澱粉試料 (加工前) とアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料 (加工後) の顕微鏡写真

図3. 未加工澱粉試料 (加工前) とアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料 (加工後) のビスコグラフ測定後の糊の顕微鏡写真

図4. 澱粉試料の調製直後と冷解凍5回目の糊の外観写真

表4. 未加工澱粉試料 (加工前) とアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料 (加工後) の平均粒径, スラリー調製限界濃度およびアセチル基含量

澱粉試料名	平均粒径 (μm)		スラリー調製限界濃度 (%)		アセチル基含量 (%)	
	加工前	加工後	加工前	加工後	加工前	加工後
<i>gbss1</i> (EM21)	3.92	3.82	41.1	30.9	0.0	1.5
<i>gbss1</i> (EM583)	4.21	4.35	39.2	34.9	0.0	1.5
<i>ss1^L/gbss1</i>	4.38	4.19	38.6	37.7	0.0	1.6
<i>ss3a/gbss1</i>	3.50	4.44	37.8	26.0	0.0	1.7
<i>be1/gbss1</i>	4.14	5.20	36.7	25.6	0.0	1.6
市販のモチ米澱粉	4.95	5.50	39.6	38.7	0.0	1.6

こり得ると考えられる。

表4に、澱粉試料の澱粉平均粒径, スラリー調製限界濃度 (吸水率) およびアセチル基含量を示した。アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料のアセチル基含量は1.5~1.7%であり, 市販のアセチル化アジピン酸架橋ワキシーコーンスターチであるマプス#449 (アセチル基含量1.6%) と同程度のアセチル化が施されていることを確認した。澱粉粒の平均粒径は *ss3a/gbss1* が最も低い値を示し, これはウルチ性の米澱粉で得られた結果⁹⁾と一致した。一方, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* は, アセチル化アジピン酸架橋を施すことによって平均粒径が大きく上昇した。スラリー調製限界濃度は, 未加工澱粉試料においては大きな差が認められなかったものの, アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料においては *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* が未加工澱粉試料と比べて特に低い値を示し, アセチル化アジピン酸架橋による吸水性の増加が認められた。*ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* においてアセチル化アジピン酸架橋による平均粒径や吸水性の増加が顕著であった。これは, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* の澱粉粒が, アセチル化アジピン酸架橋反応を施された際に膨潤したことに起因すると考えられる。アセチル化アジピン酸架橋反応は, 澱粉スラリーのpHが8.5~8.7に保たれるように適宜3%水酸化ナトリウム水溶液を添加するが, この操作によって局所的にpHが高くなり, 特に *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* の澱粉粒がアルカリによって膨潤したと考えられた。実際, アセチル化アジピン酸架橋反応後にブフナー漏斗を用いて脱水する際, 他の澱粉試料と比較して, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* はウェットケーキがべた付いた状態であった。

3) 物 性

表5に、未加工澱粉試料とアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料の加熱膨潤度および加熱溶解度の測定結果を示した。未加工澱粉試料では, *gbss1* (EM583) は *gbss1* (EM21) よりも非常に高い加熱膨潤度および加熱溶解度を示すことから, これらには品種のバックグラウンドの違い (表1) が関与している可能性も考えられる。金南風は1948年に愛媛県農業試験場で開発された中生品種であり, 台中65号は1924年に台中州立農事試験場で開発された晩生品種であるが, 台湾の在来種を親としており, 亜熱帯気候での二期作に適している。したがって, 両者に共通した親品種はないと考えられ, 物性や性質もかなり異なっていると予

表5. 未加工澱粉試料 (加工前) とアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料 (加工後) の加熱膨潤度および加熱溶解度

澱粉試料名	加熱膨潤度 (倍)		加熱溶解度 (%)	
	加工前	加工後	加工前	加工後
<i>gbss1</i> (EM21)	46.0	12.2	32.7	4.7
<i>gbss1</i> (EM583)	91.0	14.0	55.0	6.1
<i>ss1^L/gbss1</i>	65.6	13.2	43.5	5.9
<i>ss3a/gbss1</i>	44.7	17.3	33.5	5.1
<i>be1/gbss1</i>	68.0	22.6	26.8	4.1
市販のモチ米澱粉	53.6	17.3	21.0	3.7

想される。また, *gbss1* (EM21) と比べて *ss1^L/gbss1* と *be1/gbss1* で加熱膨潤度が高く, *be1/gbss1* は加熱溶解度が低かった。一方で, *gbss1* (EM583) と *be1/gbss1* は親品種が共通しているものの, *gbss1* (EM583) は *be1/gbss1* よりも高い加熱膨潤度および加熱溶解度を示した。これはBEIの欠損の有無に影響していると考えられた。また, いずれの澱粉試料においても, アセチル化アジピン酸架橋を施したことで加熱膨潤度および加熱溶解度は著しく低下し, 未加工澱粉試料で加熱溶解度が高いものは加工後も高い値を示した。

表6に未加工澱粉試料, 表7にアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料のビスコグラフ測定結果を示した。未加工澱粉試料を粘度上昇温度が低い順に並べると, *ss3a/gbss1* < *be1/gbss1* << *gbss1* (EM21) < *gbss1* (EM583) << 市販のモチ米澱粉 ≤ *ss1^L/gbss1* であった。これに対し, いずれのアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料もアセチル化によって粘度上昇温度が低下したものの, 系統間での順番は未加工澱粉試料と同様であり, 加工しても変異体澱粉の性質の違いが保持されることがわかった。なお, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* は, アセチル化アジピン酸架橋反応におけるアルカリ添加によって澱粉粒が膨潤したと考察したが, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* の粘度上昇温度が特に低い値を示したことから, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* の澱粉粒が膨潤し易いことが示唆された。これは, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* の澱粉粒が, 他の未加工澱粉試料と比較して構造的に脆いことに起因すると考えられた。

示差走査熱量測定器 (DSC) による糊化開始温度は, アミロペクチンの鎖長分布と密接に関連していることが知られている。すなわち, DP 12~16より短鎖が増えると糊化温度は低下し, 減少すると糊化温度は上昇する傾向がある⁹⁾。本研究における未加工澱粉試料の粘度上昇温度は,

この現象と類似した傾向を示した。すなわち、*gbss1* (*EM21*) を基準に考えたとき、 $DP \leq 14$ の短鎖が大幅に減少している *ss1L/gbss1* では、粘度上昇温度が *gbss1* (*EM21*) より約 6°C 高くなり、*gbss1* (*EM583*) や市販のモチ米澱粉も、わずかではあるが *gbss1* (*EM21*) より短鎖が少ないため、粘度上昇温度が高かった (表 6)。一方、 $DP 10 \sim 16$ が増加していた *ss3a/gbss1* は、粘度上昇温度が *gbss1* (*EM21*) より約 4°C 低くなり、 $DP 6 \sim 10$ がわずかに増加していた *bel/gbss1* も、粘度上昇温度が *gbss1* (*EM21*) より約 4°C 低かった。以上のように、アミロース含量の影響を受けないモチ性変異体米澱粉においては、粘度上昇温度は、DCS による糊化開始温度と同様に、アミロペクチンの鎖長分布パターンと関係があることが明確になった。

未加工澱粉試料をピーク粘度が高い順に並べると、*bel/gbss1* > 市販のモチ米澱粉 > *gbss1* (*EM21*) > *gbss1* (*EM583*) $\geq$ *ss1L/gbss1* $\geq$ *ss3a/gbss1* となり、ブレイクダウンが高い順に並べると、*bel/gbss1* > 市販のモチ米澱粉 > *gbss1* (*EM21*) > *gbss1* (*EM583*) $\geq$ *ss3a/gbss1* $\geq$ *ss1L/gbss1* となり、ピーク粘度の順とほぼ同等であった。米澱粉がウルチ性の場合、SSIIIa が欠損するとピーク粘度が極端に低下すること⁹が知られている。SSIIIa が欠損した *ss3a* 変異体では、SSIIIa の欠損を相補するため、GBSSI の発現が促進され、アミロース含量が増加することが知られている⁷。したがって、*ss3a* 変異体における大幅な粘度低下は、アミロース含量の増加に起因すると考えられる。一方、本研究の *ss3a/gbss1* は、*gbss1* (*EM21*) と比べても粘度が低くなっていたことから、アミロペクチン構造の特徴、すなわ

ち、SSIIIa が欠損することでアミロペクチン $B_{2,3}$ 鎖が減少する (図 1) ことに伴うアミロペクチンの分子量の低下⁷も粘度の低下に起因している可能性が示唆された。分級馬鈴薯澱粉の粘度特性を評価すると、平均粒径が大きいほど、ピーク粘度およびブレイクダウンが高い値を示す¹⁴。そこで、未加工澱粉試料を平均粒径が大きい順に並べると、市販のモチ米澱粉 > *ss1L/gbss1* $\geq$ *gbss1* (*EM583*) $\geq$ *bel/gbss1* > *gbss1* (*EM21*) > *ss3a/gbss1* となり、ピーク粘度およびブレイクダウンの高い順とは相関が認められなかった。したがって、表 5 に示される未加工澱粉試料の糊化特性の違いは、単に平均粒径の違いによるものではなく、遺伝子の変異による澱粉の構造的な違いに起因しているものと考えられた。

未加工澱粉試料とアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料のそれぞれにおいて、ピーク粘度、95°C・0 分粘度、95°C・30 分粘度および最終粘度を低い順に並べると、未加工澱粉試料およびアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料のいずれにおいても、*ss3a/gbss1* が最も低い粘度を示した。したがって、アセチル化アジピン酸架橋を施された後も、その性質を保っていることが示唆された。

ビスコグラフ測定後糊のヨウ素染色顕微鏡写真を図 3 に示した。未加工澱粉試料においては、いずれも澱粉粒が崩壊し、ウルチ種由来の澱粉粒以外は粒の残留が確認できなかった。一方、アセチル化アジピン酸架橋を施すと、いずれの澱粉試料においても澱粉粒は膨潤していたものの、ほとんど崩壊せずに粒形が保たれていることが確認された。

未加工澱粉試料およびアセチル化アジピン酸架橋澱粉試

表 6. 未加工澱粉試料のビスコグラフ測定値

澱粉試料名	粘度上昇 温度 (°C)	ピーク 粘度 (BU)	95°C・0 分 粘度 (BU)	95°C・30 分 粘度 (BU)	ブレイク ダウン (BU)	最終 粘度 (BU)
<i>gbss1</i> (<i>EM21</i>)	59.1	1,097	536	470	628	739
<i>gbss1</i> (<i>EM583</i>)	60.8	908	394	367	541	649
<i>ss1L/gbss1</i>	65.4	893	401	374	521	654
<i>ss3a/gbss1</i>	54.9	857	363	331	527	555
<i>bel/gbss1</i>	55.6	1,562	650	465	1,100	757
市販のモチ米澱粉	65.1	1,248	541	419	831	764

BU はブラベンダーユニット、粘度上昇温度は測定開始後、20 BU に到達した温度、ピーク粘度は粘度低下が起こるまでの最大粘度、95°C・0 分粘度は 95°C 到達時の粘度、95°C・30 分粘度は 95°C を 30 分間保った際の粘度、ブレイクダウンはピーク粘度とピーク粘度発現以降の最低粘度の差、最終粘度はビスコグラフ測定終了時の粘度。

表 7. アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料のビスコグラフ測定値

澱粉試料名	粘度上昇 温度 (°C)	ピーク 粘度 (BU)	95°C・0 分 粘度 (BU)	95°C・30 分 粘度 (BU)	ブレイク ダウン (BU)	最終 粘度 (BU)
<i>gbss1</i> (<i>EM21</i>)	53.9	1,439	1,330	1,338	113	1,889
<i>gbss1</i> (<i>EM583</i>)	57.0	1,480	1,400	1,377	85	1,962
<i>ss1L/gbss1</i>	62.0	1,390	1,319	1,366	76	1,964
<i>ss3a/gbss1</i>	51.4	1,074	969	966	110	1,345
<i>bel/gbss1</i>	52.6	1,441	1,317	1,313	134	1,781
市販のモチ米澱粉	62.0	1,462	1,417	1,436	53	2,131
マブス # 449	67.3	2,010	1,832	1,847	184	2,773

BU はブラベンダーユニット、粘度上昇温度は測定開始後、20 BU に到達した温度、ピーク粘度は粘度低下が起こるまでの最大粘度、95°C・0 分粘度は 95°C 到達時の粘度、95°C・30 分粘度は 95°C を 30 分間保った際の粘度、ブレイクダウンはピーク粘度とピーク粘度発現以降の最低粘度の差、最終粘度はビスコグラフ測定終了時の粘度。

料について、調製直後と冷解凍5回目の糊の外観写真(図4)を比較したところ、5回の冷解凍による外観の変化はいずれも軽微なものであり、高い老化耐性が示された。ただし、市販のモチ米澱粉は5回の冷解凍によって若干白濁化する傾向にあり、これは図2および図3の顕微鏡観察で確認されたウルチ性の米澱粉の混入が影響しているものと考えられた。

表8に、各試料の未糊化澱粉および糊化澱粉での消化性を示した。未加工澱粉は、いずれの系統の未糊化および糊化澱粉でも、77%以上がグルコースにまで消化された。未糊化澱粉および糊化澱粉のいずれにおいても、アセチル化アジピン酸架橋を施したことによって澱粉試料の消化性が低下した。なお、アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料において未糊化澱粉の消化性を比較すると、*ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* が比較的高い消化性を示した。これは、アセチル化アジピン酸架橋反応によるアルカリ添加によって澱粉粒が膨潤し、消化性が高まったことによると考えられた。糊化澱粉においては、アセチル化アジピン酸架橋された *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* の消化性が、他のアセチル化アジピン酸架橋澱粉試料と同等であったことから、澱粉が加熱糊化されたことで、膨潤していた澱粉粒の特徴が失われたと考えられる。

4) タレ・ソース用途への利用適性

団子のタレおよび酸性フルーツソースを作製した直後にpHを測定したところ、団子のタレは4.8~4.9、酸性フルーツソースは3.0~3.2であった。表9に、団子のタレおよび酸性フルーツソースの官能検査結果を示した。

表8. 澱粉試料の未糊化状態と糊化状態での消化性^a

澱粉試料名	未糊化澱粉の消化性 (%)		糊化澱粉の消化性 (%)	
	加工前	加工後	加工前	加工後
<i>gbss1</i> (EM21)	81.4	65.4	86.9	77.7
<i>gbss1</i> (EM583)	79.0	64.6	80.6	76.4
<i>ss1L/gbss1</i>	79.5	63.7	87.7	75.5
<i>ss3a/gbss1</i>	80.6	69.2	82.4	77.8
<i>be1/gbss1</i>	82.9	69.4	82.2	75.1
市販のモチ米澱粉	77.3	55.9	85.5	76.6

^a ラット小腸消化酵素で37°C, 90分間反応後の消化性を示す。

タレ・ソース用途に使用する澱粉には、食品に付着させた際に流れ落ちない適度な粘性(保形性)と、喫食した際に舌に残らない粘性の低さ(口溶け)を同時に向上させる機能が求められている。例えば、硬いゲルであれば保形性は極めて良いものの、口溶けが極めて悪い結果となる。反対に、水のような液体であれば、口溶けは極めて良いものの、保形性が極めて悪い結果となる。したがって、保形性と口溶けのバランスが非常に重要であるが、タレ・ソース用途に広く普及している市販のアセチル化アジピン酸架橋ワキシーコーンスターチであるマプス#449を用いた場合においても、口溶けの向上が不十分であり、課題となっている。澱粉試料を団子のタレに用いた際、アセチル化アジピン酸架橋が施されていない未加工澱粉試料の中で、基準に対して保形性と口溶けのどちらの項目についても有意差が認められたのは *ss3a/gbss1* のみであった。しかしながら、*ss3a/gbss1* を酸性フルーツソースに用いたところ、基準に対して保形性については有意差が認められなかった。これは、酸性条件下での加熱調理によって、澱粉粒の崩壊が促進されたことによると考えられた。

アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料を団子のタレに用いたところ、基準に対して保形性と口溶けのどちらの項目についても有意差が認められたのは、*gbss1* (EM583), *ss1L/gbss1*, *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* にアセチル化アジピン酸架橋を施した澱粉試料とマプス#449であった。さらに、これらをマプス#449と比較するとどの澱粉試料も保形性の評価が低い傾向を示したが、*gbss1* (EM583), *ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* にアセチル化アジピン酸架橋を施した澱粉試料は、口溶けにおいて、マプス#449(+1.0)よりそれぞれ+0.2, +0.4, +0.4高い平均評点(好ましい評価)を示した。アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料を酸性フルーツソースに用いたところ、*ss3a/gbss1* および市販のモチ米澱粉において、アセチル化アジピン酸架橋の導入による保形性の平均評点が高くなる傾向が認められた。したがって、アセチル化アジピン酸架橋の導入により、酸性条件下での加熱調理時に起こる粘度低下を抑制することができたと考えられた。基準に対して保形性と口溶けのどちらの項目についても有意差が認められたのは、*gbss1* (EM21) にアセチル化アジピン酸架橋を施した澱粉試料の

表9. 澱粉試料を用いた団子のタレおよび酸性フルーツソースの官能検査

澱粉試料名	団子のタレ				酸性ソース			
	保形性		口溶け		保形性		口溶け	
	加工前	加工後	加工前	加工後	加工前	加工後	加工前	加工後
<i>gbss1</i> (EM21)	+0.5	+1.9*	+0.3	+0.5	未実施	+0.7*	未実施	+1.4*
<i>gbss1</i> (EM583)	+1.3*	+1.9*	+0.5	+1.2*	未実施	+2.4*	未実施	+0.1
<i>ss1L/gbss1</i>	-0.5	+1.7*	+0.4	+1.0*	0	0	+0.9	+0.6*
<i>ss3a/gbss1</i>	+1.2*	+0.5*	+1.8*	+1.4*	+0.3	+1.4*	+1.0*	+0.4
<i>be1/gbss1</i>	+0.5	+1.4*	-0.3	+1.4*	未実施	+2.1*	未実施	-0.1
市販のモチ米澱粉	0 (基準)	+1.9*	0 (基準)	+0.7	0 (基準)	+2.2*	0 (基準)	+0.2
マプス#449	+2.6*		+1.0*		+2.6*		-0.8	

N = 10 (評価点は-3~+3), *P < 0.05 で有意差あり。

みであったが、アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料をマップス#449と比較すると、*gbss1* (EM583), *be1/gbss1* および市販のモチ米澱粉にアセチル化アジピン酸架橋を施した澱粉試料は、保形性において、マップス#449 (+2.6) に近い評価を示し、口溶けにおいて、マップス#449 (+0.8) より高い評価 (好ましい評価) を示した。

以上より、モチ性変異体米澱粉にアセチル化アジピン酸架橋を施すことで、タレ・ソース用途における保形性と口溶けの向上を両立できることが明らかとなった。しかしながら、市販のモチ米澱粉にアセチル化アジピン酸架橋を施しても同様の効果が得られることから、変異体米澱粉の実用化に向けては、変異体米澱粉の特徴を生かしたさらなる用途開発が不可欠と考えられる。

3. 要 約

結合型スターチシンターゼ I (GBSSI) に加えて他の澱粉生合成関連アイソザイム (SSI, SSIIa, BEI) が同時に欠損あるいは活性が低下したモチ性変異体米澱粉 (*ss1L/gbss1*, *ss3a/gbss1*, *be1/gbss1*) と、これを原料に用いたアセチル化アジピン酸架橋澱粉について、諸性質の分析とタレ・ソース用途への利用適性評価を行った。

未加工澱粉試料の鎖長分布解析を行った結果、モチ性変異体米澱粉においても、SSI, SSIIa および BEI が欠損あるいは活性が低下した場合には、その影響が鎖長分布に表れていることが明らかとなった。澱粉粒の平均粒径は *ss3a/gbss1* が最も低い値を示したが、*ss3a/gbss1* および *be1/gbss1* は、アセチル化アジピン酸架橋を施すことによって平均粒径が大きく上昇するとともに、吸水性の増加が認められた。

糊化特性の系統間の違いは、アセチル化アジピン酸架橋が施されてもある程度保持されることが明らかとなり、粘度上昇温度が低い順に並べると、*ss3a/gbss1* < *be1/gbss1* < *gbss1* (EM21) < *gbss1* (EM583) < 市販のモチ米澱粉 ≤ *ss1L/gbss1* であった。

未加工澱粉は、いずれの系統においても、80% 以上がグルコースにまで消化されたが、アセチル化アジピン酸架橋を施したことによって消化性が低下した。

未加工澱粉試料の利用適性を評価したところ、*ss3a/gbss1* が団子のタレの保形性と口溶けを両立して向上させることができたものの、酸性フルーツソースでは保形性が大きく低下した。アセチル化アジピン酸架橋澱粉試料は、さらなる用途開発の必要性が示唆された。市販のアセチル化アジピン酸架橋ワキシーコーンスターチと比較したとこ

ろ、団子のタレにおいては、保形性は及ばなかったものの、口溶けが高い評点を示した。酸性フルーツソースにおいては、保形性を同程度に保ちつつ、口溶けにおいて高い評点を示した。

謝辞

gbss1 (EM21), *gbss1* (EM583) および *be1/gbss1* をご提供頂きました九州大学大学院農学研究院の佐藤光前教授に感謝致します。本研究は、イノベーション創出基礎的研究推進事業 (生研センター) の支援のもと行われました。

文献

- 1) Y. Sano: Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.*, **68**, 467-473 (1984).
- 2) 小倉徳重: 化学的変性澱粉. 「澱粉科学の辞典」, 朝倉書店, 東京, pp. 396-406 (2003).
- 3) 安東竜一: コーンスターチの特性と新加工・利用技術. でん粉情報, **5**, 1-7 (2008).
- 4) 藤田直子: イネを用いた澱粉生合成関連酵素の機能解明とユニークな澱粉の開発(総説). 応用糖質科学, **1**, 58-64 (2011).
- 5) N. Fujita, M. Yoshida, N. Asakura, T. Ohdan, A. Miyao, H. Hirochika and Y. Nakamura: Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol.*, **140**, 1070-1084 (2006).
- 6) N. Fujita, M. Yoshida, T. Kondo, K. Saito, Y. Utsumi, T. Tokunaga, A. Nishi, H. Satoh, J.H. Park, J.L. Jane, A. Miyao, H. Hirochika and Y. Nakamura: Characterization of SSIIa-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.); the function of SSIIa and pleiotropic effects by SSIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol.*, **144**, 2009-2023 (2007).
- 7) H. Satoh, A. Nishi, K. Yamashita, Y. Takemoto, Y. Tanaka, Y. Hosaka, A. Sakurai, N. Fujita and Y. Nakamura: Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiol.*, **133**, 1111-1121 (2003).
- 8) H. Satoh and T. Omura: Induction of mutation by treatment of fertilized egg cell with N-methyl-N-nitrosourea in rice. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **24**, 165-174 (1979).
- 9) K. Yamamoto, S. Sawada and I. Onogaki: Properties of rice starch prepared by alkali method with various condition. *Denpun Kagaku*, **20**, 99-104 (1973).
- 10) K. Yamamoto, S. Sawada and I. Onogaki: Effects of quality and quantity of alkali solution on the properties of rice starch. *Denpun Kagaku*, **28**, 241-244 (1981).
- 11) N. Fujita, H. Hasegawa and T. Taira: The isolation and characterization of a waxy mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Plant Sci.*, **160**, 595-602 (2001).
- 12) M.G. O'Shea and M.K. Morell: High resolution slab gel electrophoresis of 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) tagged oligosaccharides using a DNA sequencer. *Electrophoresis*, **17**, 681-688 (1996).
- 13) R.J. Smith: Characteristics and Analysis of starches. in *Starch: Chemistry and Technology Vol. 2*, R.L. Whistler and E.F. Paschall, eds., Academic Press, New York, p. 621 (1967).
- 14) 安田久美, 弘中和憲, 小嶋 浩, 山本和夫: リン酸架橋分級馬鈴薯澱粉の物理化学特性. 応用糖質科学, **1**, 327-335 (2011).