近赤外分光法によるデンプン糊化の解析

恩田 匠*・阿部英幸**・松永暁子***

小宮山美弘*・河野澄夫**

Analysis of Gelatinization of Starch by Near Infrared Spectroscopy

Takumi ONDA*, Hideyuki ABE**, Akiko MATSUNAGA***,
Yoshihiro KOMIYAMA* and Sumio KAWANO**

* The Yamanashi Industrial Technology Center,
2094, Otsu-cho, Kofu-shi, Yamanashi 400

** National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and
Fisheries, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

*** Ibaraki Women's Junior College, 960-2, Higashikinokura,
Naka-cho, Ibaraki 311-01

Possibility of near infrared (NIR) spectroscopy for analysis of changes in structure of starch due to gelatinization, and determination of degree of gelatinization was investigated. Among second derivative NIR spectra of rice starch samples having different degrees of gelatinization, large deviations of spectra were observed at 1204, 1368, 1436, 1700, 1748, 1784, 1924, 2088, 2280, 2320 and 2348 nm. Especially, spectra in the vicinity of 2100 and 2280 nm changed complexly according to progress of gelatinization. As a result of linear regression using second derivative absorbance values of NIR spectra and degrees of gelatinization by BAP method, high correlations were obtained in the vicinity of 1807 nm and 2095 nm. In the vicinity of 1807 nm, characteristic absorption band due to starch was not observed. The particle size could be one of reasons why high correlation was obtained, because high correlation existed between degree of gelatinization and particle size. In the vicinity of 2100 nm, absorption due to starch and diffusion due to particle size overlapped. Then principal component (PC) analysis was applied to NIR spectra from 2040 nm to 2144 nm to reduce the effect of the diffusion on NIR spectra. Accurate linearity was obtained between second PC score and degree of gelatinization by BAP method. It was concluded that NIR spectroscopy has possibility to determine degree of gelatinization.

(Received Apr. 1, 1994)

米をはじめとするデンプン質食品の糊化および老化は、味、消化性、物理的特性などの品質に密接に関連した重要な要因の一つである。

デンプンの糊化および老化に関する研究の歴史は古く、多くの物理化学的、あるいは酵素学的手法により、多面的に研究^{1)~7)}が行われてきた。例えば、デンプンの

糊化度および老化度の評価⁸⁾は、主として酵素法、X線回折法、熱分析法、アミログラフ法などにより行われてきている。これらの方法には、迅速性に欠ける、操作が煩雑である、熟練を要するなどの問題点があった。また、これまでの研究では、デンプンの高次構造自体に未だ不明な点もあり、糊化および老化の機構はあまり解明され

* 山梨県工業技術センター (〒400 山梨県甲府市大津町 2094)

** 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

*** 茨城県女子短期大学 (〒311-01 茨城県那珂町東木倉 960-2)

ていない。このため、デンプンの構造変化を検出するための新しい手法の開発・導入が期待されている。

近赤外分光法（以下、近赤外法という）は、迅速・簡便性を特徴とし、今日まで主として食品中の化学成分の定量に用いられてきたが、最近では水の状態分析⁹⁾やタンパク質の構造解析¹⁰⁾などの基礎研究にも用いられ、その応用範囲が拡大している。特に、水の状態分析では、水素結合の状態解析に用いられている。デンプンに関しては、糊化デンプンのスペクトル測定・分析¹¹⁾が行われているが、帰属等に関する詳細な解析は行われていない。

以上のことから、近赤外法により、デンプンの糊化および老化による構造変化を捉えることができれば、糊化度および老化度の測定に有効なだけでなく、糊化および老化現象の機構解明に有力な手段となることが考えられる。

そこで本研究では、その焦点を糊化・老化のうち糊化に絞り、デンプンの糊化度の近赤外法による測定の可能性について検討した。

実験材料および方法

1. 供試材料

ウルチ米デンプン（島田化学社製）で、85%メタノールを用いた熱抽出により脱脂処理したものを供試した。

2. 糊化デンプンの調製

デンプンの糊化処理は、均一な糊化デンプンを再現よく得るためアミログラフ（ブラベンダー社製）を用いて行った。すなわち、デンプンの10%水懸濁液を、30℃からいくつかの異なる温度（30～100℃）まで、昇温速度1.5℃/min（回転数75rpm）で、昇温させることにより、段階的に糊化度の異なるデンプン糊を調製した。得られたデンプン糊は、3倍容のエタノールを用いて、直ちに脱水処理した。さらにエタノールによる洗浄、吸引ろ過を3回繰り返して、デンプンを粉末化した。その後、アセトン洗浄による脱エタノール処理を行い、風乾して、粉末デンプン試料（以下、糊化処理デンプン試料という）とした。

3. 近赤外吸収スペクトル測定

糊化処理デンプン試料の近赤外吸収スペクトル（波長領域：1100～2500nm、2nm ステップ）を近赤外分光装置（InfraAlyzer 500、ブラン・ルーベ社製）を用いて測定した。測定には、粉体用標準セルを用いた。測定時の実験室の温度は25℃、相対湿度20%RH以下とした。それぞれの試料は、シリカゲルが充填されたデシケーター

内（25℃）において、近赤外吸収スペクトル測定直前まで一晩以上放置した。

4. 糊化度測定

デンプン試料の糊化度（%）をBAP（ β -アミラーゼ・プルラーナーゼ）法¹²⁾により測定した。

5. 粒度測定

糊化処理デンプン試料の粒度をレーザー回折式粒度分布測定装置（LS100、コールター社製）を用いて測定した。平均径（ μm ）をもって粒度とした。糊化処理デンプン試料は、イソプロピルアルコールによく分散させて測定した。

6. 単回帰分析

近赤外吸収スペクトルの単回帰分析は、近赤外分光装置に付属の近赤外吸収スペクトル解析ソフトウェアを用いて行った。

スペクトル以外の単回帰分析は、表計算ソフトウェアExcel 4.0J（for Macintosh、マイクロソフト社製）を用いて行った。

7. 主成分分析

近赤外吸収スペクトルの主成分分析（以下、PCAという）は、BERTRAND ら¹¹⁾の開発した主成分分析ソフトウェアを用いた。また得られた主成分スコアを用いて、主成分回帰分析を行った。

実験結果および考察

1. 糊化処理デンプン試料の近赤外吸収スペクトル

糊化度が段階的に異なる糊化処理デンプン試料13点の近赤外吸収スペクトルを測定した。

糊化処理デンプン試料の近赤外吸収スペクトルは、粒度などの物理的な影響を受け、試料によりベースラインが上下にシフトした。そこで、近赤外吸収スペクトルを2次微分処理（微分条件：segment；12，gap；0）して、吸収ピークの変化を調べた（Fig. 1）。その結果、各試料間で1204，1368，1436，1700，1748，1784，1924，2088，2280，2320および2348nm近傍の吸光度の変動（分散）が大きいたことが明らかになった。1924nmの吸収は水のO-H基に、その他のピークは主としてデンプンのO-H基あるいはC-H基に由来する吸収¹³⁾であると考えられた。2100および2280nm近傍の吸収ピークは、糊化度が進むにつれて後述するように非常に複雑な変化を示した。この2つの波長帯には、デンプンの特徴的な吸収が存在することから、糊化による構造変化に関連する情報が反映しているものと考えられた。2100nm近傍において、生デンプンでは、2070nmに吸収ピーク

Fig. 1 Second derivative near infrared spectra of rice starch samples having different degrees of gelatinization

Numbers in the figure indicate wavelength (nm) at which large variance of absorbance exist.

の極小値が存在し、2120 nm にも吸収が存在するが、糊化処理温度が 56℃の試料までは 2070 nm の吸収が徐々に消失し、2090 nm の吸収が極小値になった。つぎに、56℃から 100℃までの試料では 2090 nm の吸収が増大し、かつ 2070 nm 付近の吸収も再び増大した (Fig. 2) デンプンの近赤外吸収スペクトルの 2100 nm 近傍には、2090 および 2100 nm の 2 つの吸収帯が重なって存在しており¹³⁾、上述したスペクトルの複雑な変動は、2 つの吸収の変化と密接な関連があるものと考えられた。一方、2280 nm 近傍では、2280 nm の吸収が 56℃までの試料で増大し、56℃から 66℃までの試料で減少した (Fig. 3A)。66℃から 70℃までの試料では、吸収が 2280 nm から 2270 nm にシフトした後、100℃の試料で吸収が再び 2280 nm にシフトするといった興味ある変化を示した (Fig. 3B)。2280 nm 近傍にも 2 つの吸収のピークの存在が示唆された。なお、図表には示さないが、ほぼ同様な変化が 2320 nm 近傍においても観察された。

2. 近赤外吸収スペクトルの単回帰分析

近赤外吸収スペクトルは、試料によりベースラインが上下にシフトしたため、単回帰分析には 2 次微分処理したスペクトルを用いた。まず BAP 法により得られた糊化度 (%) を目的変数として、吸光度の 2 次微分値を説明変数として単回帰分析を行い、Fig. 4 の結果を得た。同図は各波長毎に相関係数をプロットしたもの (以下、相関スペクトルという) である。2 次微分スペクトルにおいては、成分の増加とともに吸光度の 2 次微分と絶対

Fig. 2 Second derivative near infrared spectra of starch samples in wavelength region from 2000 nm to 2200 nm

Symbols: —, raw starch (gelatinization treatment to 25℃); — —, gelatinization treatment to 56℃; ····, gelatinization treatment to 100℃.

Fig. 3 Second derivative near infrared spectra of starch samples in wavelength region from 2240 nm to 2300 nm

(A) gelatinization treatment from 25℃ to 66℃.
(B) gelatinization treatment from 66℃ to 100℃.

Symbols: (A) —, raw starch (25℃); — —, to 56℃; ····, to 66℃; (B) ····, to 66℃; — —, to 70℃; ·····, to 100℃.

値が負の方向に大きくなるため、その相関係数はマイナスでなければならない。また相関スペクトルのピークのうち、その形状が丸みを帯びたものが再現よく相関の得られる波長と判断できる。Fig. 4 では、1220、1807 および 2095 nm で高い正の相関が得られた。1220 および 2095 nm 近傍にはデンプンの吸収が認められたが、1807 nm では高い相関 (相関係数 $r=0.99$) があるにもかかわらず、明瞭な吸収は観察できなかった。このことから、

Fig. 4 Spectrum of single correlation coefficient between $d^2\log (1/R)$ and degree of gelatinization

Fig. 5 Spectrum of single correlation coefficient between $d^2\log (1/R)$ and particle size of starch

1807 nm において高い相関係数が得られた原因は、糊化度に関連した別の要因、例えば糊化デンプン試料の粒度（デンプン粒の大きさ）などの物理的な要因に基づくものと考えられた。そこで、糊化デンプン試料の粒度（ μm ）を目的変数として、糊化度の場合と同様に2次微分した近赤外吸収スペクトルとの単回帰分析を行った。その結果、糊化度の場合とほぼ同様の相関スペクトルが得られた（Fig. 5）。また糊化度と粒度との間には、比較的高い相関性（ $r=0.96$ ）が認められた。このことは、水を加えて加熱する糊化処理によりデンプンの結晶状態の崩壊が進み、糊化度が進むにつれて、膨潤したデンプン粒の粒度が大きくなったことを意味している。以上のことから、デンプンの吸収が存在しない1807 nm で高い相関が示された実験結果は、その原因の1つとして近赤外吸収スペクトルに影響を及ぼす粒度等の物理的要因に基づくものと推察された。一方、2095 nm 近傍はデンプンの主要な吸収帯であることから、糊化に伴うデンプンの構造変化を捉えている可能性が高い。しかしながら、上述したようにこの波長帯においても粒度等の影響が及んでおり、2095 nm で高い相関が得られたのは、デンプンの構造変化によるものか、あるいは粒度などの物理的影響によるものかの判断が困難である。そこで、2100 nm 近傍のスペクトルデータの主成分分析を行うことにより、情報の分離を行った。

3. 近赤外吸収スペクトルの主成分分析（PCA）

2100 nm 近傍（2040～2144 nm）の吸光度の2次微分値をもとにPCAを行ったところ、得られた第2主成分スコアと糊化度との間に最も明瞭な直線性（ $r=0.98$ ）が認められた。（Fig. 6）。一般にPCAでは、測定対象物の

Fig. 6 Relationship between degrees of gelatinization by BAP method and second principal component scores

Principal component analysis was performed on spectrum in wavelength region from 2040 nm to 2144 nm.

物理的な特性による近赤外吸収スペクトルの変動が大きい場合、これらの物理的特性やノイズが主に第1主成分に、それ以外の潜在的な情報は第2主成分以下に集約される。第1主成分と第2主成分の固有ベクトルの“重み（loading weight）”を調べたところ（Fig. 7）、第1主成分では変化が認められず、粒度などの物理的な影響を捉えているものと考えた。第2主成分の“重み”には、2100 nm に $+$ ・ $-$ の変曲点が存在し、デンプンのO-H基の情報を捉えていることが推察された。このことにより、PCAを行うことにより、近赤外吸収スペクトルから、デンプンの構造変化に付随した間接的要因による影

Fig. 7 Spectra of loading weights of first and second principal component

Symbols: ·····, first principal component;
——, second principal component.

響を除き、糊化に伴うデンプンの構造変化に直接関連した情報のみを抽出することができたものと考えられた。

以上のことから、近赤外法により、糊化処理したデンプンの糊化度を計測できることが明らかになった。

要 約

デンプンの糊化による構造変化および糊化度の近赤外法による計測について検討を行い、以下の結果を得た。

(1) 糊化度の異なるデンプンの近赤外吸収スペクトルを調べたところ、1204, 1368, 1436, 1700, 1748, 1784, 1924, 2088, 2280, 2320 および 2348 nm 近傍の吸収度の変動(分散)が大きかった。特に、2088 および 2280 nm 近傍のスペクトルは、糊化の進行に伴い複雑な変動を示した。

(2) BAP 法の糊化度またはデンプンの粒度をそれぞれ目的変数とし、吸光度の2次微分値を説明変数とする回帰分析を行ったところ、ともに 1807 および 2095 nm で高い相関が得られた。

(3) デンプンの吸収帯が存在しないことから、1807 nm における高い相関は、その原因の1つとして粒度などの物理的な要因に基づくものと考えられた。

(4) 糊化度と粒度の間には、高い正の相関 ($r=0.96$) が認められた。糊化度が進むにつれて、デンプンの粒子が大きくなるものと考えられた。

(5) 2100 nm 近傍のスペクトルデータは、粒度などの情報とデンプンの構造変化の情報が重なっていることから、主成分分析により、情報の分離を行ったところ、得られた第2主成分スコアと糊化度との間に高い直線性 ($r=0.98$) が認められた。

以上のことから、近赤外法によりデンプンの糊化度を計測できることが明らかとなった。

デンプンに関する一般的な実験操作にあたり、貴重なご助言を頂きました農林水産省食品総合研究所炭水化物室長小林昭一博士に謝意を表します。また、アミログラフによるデンプンの糊化処理および粒度測定において、技術のご指導を頂いた同研究所穀類利用研究室長今井徹博士に感謝します。

文 献

- 1) 檜作 進: 食品工業, 12, 1下, 89 (1969).
- 2) 檜作 進: 食品工業, 12, 2下, 83 (1969).
- 3) 二國二郎: 調理科学, 2, 6 (1969).
- 4) 貝沼圭二: *New Food Industry*, 28, 49 (1986).
- 5) 不破英次: 調理科学, 20, 2 (1987).
- 6) SCHOCH T.J.: 澱粉科学, 14, 15 (1967).
- 6) LEACH, H.W.: *Starch; Chemistry and Technology*, 2nd ed., edited by WHISTER, R.L., BEMILLER, J.N. and PASCHALL, F.R., (Academic Press, London) (1984).
- 8) 中村道徳・貝沼圭二: 澱粉・関連糖質実験法, (学会出版センター, 東京) p.163 (1986).
- 9) IWAMOTO, M., UOZUMI, J. and NISHINARI, K.: *Near Infrared Diffuse Reflectance/Transmittance Spectroscopy*, edited by HOLLO, J., KAFFKA, K.J. and GONCZY, J.L., p.3 (1987).
- 10) KAMISHIKIRYO-YAMASHITA, H., TATARA, M., TAKAMURA H. and MATOBA T.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41, 65 (1994).
- 11) BERTRAND, D. and SCOTTER, N.G.: *Applied Spectroscopy*, 46, 1420 (1992).
- 12) 貝沼圭二・松永暁子・板川正秀・小林昭一: 澱粉化学, 28, 235 (1981).
- 13) OSBORNE, B.G. and FEARN, T.: *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis* (Longman Scientific Technical, New York), p.28 (1986).

(平成6年4月1日受理)