技術報告

オリゴ糖誘導体を基質とした α -アミラーゼ活性
測定による低アミロ小麦の迅速推定法

渡辺 満*・松倉 潮**・今井 徹***

A Rapid Method of Presuming Maximum Viscosity in
Amylography from Alpha-Amylase Activity using
Modified Oligosaccharide

Mitsuru WATANABE*, Ushio MATSUKURA** and Toru IMAI***

* Tohoku National Agricultural Experiment Station, 4, Akahira,
Simokuriyagawa, Morioka-shi, Iwate 020-01** National Agriculture Research Center, 3-1-1, Kannondai,
Tsukuba-shi, Ibaraki 05*** National Food Research Institute, 2-1-2, Kannondai,
Tsukuba-shi, Ibaraki 305

To presume maximum viscosity (MV) obtained by amylography a method based on alpha-amylase activity was developed. Alpha-amylase activity was assayed using blocked p-nitrophenylmaltoheptaoside as a substrate (CERALPHA METHOD, Megazyme Pty. Ltd., Australia). MV and alpha-amylase activity were determined in various flours prepared by mixing flours obtained from germinated and ungerminated wheats at various ratios. Log_e MV decreased linearly with increasing of log_e alpha-amylase activity. Regression lines of 4 varieties and one brand of wheat flours were different from each other, but the differences were very small in the low MV region which corresponds to wheat sprouted to some extent. Therefore, we made a tentative criterion to presume MV, that is, sprout damaged wheat, by alpha-amylase activity. Group 1: Wheat with alpha-amylase activity below 70 mU/g flour; wheat must be undamaged. Group 2: Wheat with alpha-amylase activity 70 mU to 100 mU/g flour; wheat may be sprout damaged. Group 3: Wheat with alpha-amylase activity above 100 mU/g flour; wheat must be sprout damaged. In order to examine adaptation of the criterion, 29 wheat samples which sprouted or unsprouted in fields were analyzed. The result indicated that the criterion may be available to judge sprouted wheats. With CERALPHA METHOD, almost 60 samples are analyzed in a day. Therefore sprout damaged wheats can be classified rapidly compared with amylography method.

(Received Apr. 27, 1994)

わが国では小麦が登熟期に降雨に遭い易く穂発芽し易い状況にあり、その結果小麦粉のアミログラムの最高粘度（以下、アミロ値と称する）が著しく低い小麦、いわ

ゆる低アミロ小麦がしばしば発生する。低アミロ小麦が正常な小麦に混入すると、その量が少量であっても全体の品質を大きく低下させ、加工適性を大きく劣化させ

* 農林水産省東北農業試験場（〒020-01 岩手県盛岡市下厨川字赤平4）

** 農林水産省農業研究センター（〒305 茨城県つくば市観音台3-1-1）

*** 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）

る¹⁾²⁾。従って低アミロ小麦を仕分けし、正常な小麦への混入を避けなければならない。低アミロ小麦の仕分けは、現在のところ外観の目視による発芽粒の混入率の調査によって行われている³⁾。しかし、より確実な仕分けを行うためには理化学的測定が望ましい。現在公定法的方法として用いられているアミログラフ法は測定に長時間を要するため、検査現場への導入は不可能に近い。また、一部地域において農協等で使用されているフォーリングナンバー法は簡便で迅速な方法であるが、全粒粉を使用するためアミログラムの最高粘度との相関関係は必ずしも高くなく⁴⁾、正常な小麦と低アミロ小麦の境界付近のアミロ値の差を十分に表すことができない⁵⁾。従って、実際に検査現場で使用できる迅速なアミロ値の簡易推定法が望まれている。アミログラフ法と他の方法との相関関係はこれまでも検討されているが^{6)~7)}、実際に小麦の仕分けへの適用が可能であるか検討することが必要となっている。

低アミロ小麦は、小麦登熟期の遭雨・低温などにより小麦粒内で α -アミラーゼをはじめ一群の発芽酵素の活性が上昇し、澱粉粒が分解を受けることによって発生する⁸⁾。アミロ値は、一部は澱粉そのものの糊化特性に関連するものの、 α -アミラーゼの作用に起因する部分が大きい⁹⁾。青色色素結合澱粉を基質として測定した α -アミラーゼ活性¹⁰⁾とアミロ値との相関関係は高く⁵⁾⁹⁾、この活性測定法に基づいた仕分け例が報告されている¹¹⁾。しかし、青色色素結合澱粉法では未分解の色素結合澱粉と遊離した青色色素を濾過あるいは遠心分離によって分離する必要があるため、操作が煩雑であるところが難点である³⁾⁵⁾。 α -アミラーゼ活性測定法としては、検査現場への導入を考慮すると常時安定した基質が入手できること及び将来の自動化が期待できることが必要である。そこで、これらの条件を満足するために、オリゴ糖誘導体合成基質を使用する測定法を用いることとし、 α -アミラーゼ活性とアミロ値との関係を検討した。次いで、 α -アミラーゼ活性に基づいたアミロ値による小麦の仕分け案を作成し、それによる仕分けを試みた。

実 験 方 法

1. 試 料

α -アミラーゼ活性とアミロ値の測定及び仕分け案を作成するための試料としては、穂発芽性の異なる小麦4品種・1銘柄〔ゼンコウジコムギ；穂発芽性難、農林61号；やや難、ホロシリコムギ；中、チホクコムギ；やや易、Australian Standard White (ASW)；易〕を用い

た。また仕分け案の検証には、農業研究センター及び九州農業試験場から分譲された小麦29点を使用した。

2. 試料調製方法

(1) 小麦粉の調製

小麦粒は常法に従い水分含量測定後¹⁾²⁾テンパリングを行い、水分含量を15%に調製した。これをブラベンダーテストミル (Quardumat Junior) で製粉し、60%粉を調製した。

(2) 低アミロ小麦粉の調製

小麦粒を24時間水に浸漬し、水切りをした後、25℃の恒温下で24時間発芽処理した。この発芽種子を室温で24時間通風乾燥後、(1)と同様に製粉し、低アミロ小麦粉を調製した。

(3) アミロ値及び α -アミラーゼ活性測定用試料の調製

正常な小麦から調製した小麦粉と、同一試料の発芽処理した小麦から調製した低アミロ小麦粉を種々の割合で混合し、様々なアミロ値と α -アミラーゼ活性値の粉を調製した。これをアミログラムの測定と共に α -アミラーゼ活性の測定に供した。

3. α -アミラーゼ活性測定方法

日本バイオコンから市販されている、合成基質 blocked *p*-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7) を用いた α -アミラーゼ活性測定キット (CERALPHA METHOD, Megazyme 社, オーストラリア) を使用した¹³⁾。小麦粉0.1gをエッペンドルフ遠心管に取り、抽出用緩衝液1ml (50mM リンゴ酸ナトリウム, 50mM 塩化ナトリウム, 2mM 塩化カルシウム, 3mM アジ化ナトリウム, pH5.2) を加え、5分間時々攪拌して抽出した。10000×gで10分間遠心分離し、上澄を酵素液とした。酵素液0.1mlを40℃で10分間ブレインキュベート後、同様にブレインキュベートしておいた基質液 (BPNPG7 5.45mg/ml, グルコアミラーゼ10U/ml, α -グルコシダーゼ10U/ml) 0.1mlを加えて反応を開始させた。反応はFig. 1に示したとおりであり、BPNPG7に小麦粉抽出液中の α -アミラーゼが作用した後、基質液中のグルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼが次々と作用し、*p*-nitrophenolを生成する。10分後、反応停止液 (20%Trizma base) 1.5mlを加え攪拌した。これにより一連の酵素反応が停止すると同時に、黄色に発色する。反応溶液は分光光度計で410nmにおける吸光度を測定した。 α -アミラーゼ活性は、BPNPG7の酵素分解物である *p*-nitrophenolの生成量として表示した。即ち、1分間に1 μ molの *p*-nitrophenolを生成する α -ア

ミラーゼの量をIUとして表示した。

4. アミログラムの最高粘度（アミロ値）測定方法

ブラベンダー社製のアミログラフを使用した。水分13.5%ベースとして65gの小麦粉と450mlの脱イオン水でアミログラフを行った¹²⁾。開始温度は25℃、昇温速度は1.5℃/分とした。

なお、アミロ値 (Maximum Viscosity ; MV) とはアミログラムの最高粘度をブラベンダーユニット (BU) で表示したものである。

実験結果及び考察

1. アミロ値と α -アミラーゼ活性との関係

それぞれの品種・銘柄におけるアミロ値と α -アミラーゼ活性については、両者の対数の間に高い負の相関関係が見いだされ、 $\log_e \alpha$ -アミラーゼ活性の増加につれて、 $\log_e MV$ は直線的に減少した (Fig. 2)。従って、各々の品種・銘柄について α -アミラーゼ活性からアミロ値の推定が可能であることが確認された。また、アミロ値の高いところでは品種・銘柄間に α -アミラーゼ活

Fig. 1 Reaction profiles of CERALPHA METHOD (B.V. McCLEARY, 1987)

* Involved in a kit.

Fig. 2 Relationship between maximum viscosity and α -amylase activity
 ■, Zenkousjikomugi $r = -0.997^{**}$ ($n=8$); ○, Norin 61 $r = -0.985^{**}$ ($n=10$);
 □, Horoshirikomugi $r = -0.990^{**}$ ($n=10$); ▲, Chihokukomugi $r = -0.994^{**}$
 ($n=10$); *, Australian standard white (ASW) $r = -0.994^{**}$ ($n=10$).

** Significance at 1% level.

性値の差異があるものの、アミロ値が低くなるほど α -アミラーゼ活性値の差異は小さくなった。このことは、低アミロといわれるアミロ値の近くにおいては、品種・銘柄にかかわらず同一の指標を用いた α -アミラーゼ活性による仕分けが可能であることを示している。

なお、同一の α -アミラーゼ活性値においてもアミロ値に品種・銘柄間差異が存在するのは、澱粉粒そのものの差異によることが示されている^{14) 15)}。 α -アミラーゼ活性が低い場合、品種による澱粉粒の差異がアミロ値として反映し、 α -アミラーゼ活性が高くなるにつれて澱粉の分解程度が大きくなるため澱粉粒自体のアミロ値への関与が小さくなり、その結果アミロ値の品種・銘柄間差異が小さくなるものとする。

また Fig. 2 の結果は、澱粉という高分子の粘度低下、言い替えば高分子への α -アミラーゼの作用を、低分子の基質を用いた測定法により測定できることを示して

いる。従来のアミログラフィー、フォーリングナンバー、青色色素結合澱粉による α -アミラーゼ測定法、グレイン α -アミラーゼアナライザー¹⁶⁾はいずれも高分子の澱粉あるいは β -リミットデキストリンを使用しているのに対し、本測定法はオリゴ糖誘導体を基質に用いており、基質の均質性、安定性に優れているところに利点があると考えられる。

2. α -アミラーゼ活性値による小麦仕分け案

低アミロ小麦の指標とされるアミロ値は 300 BU であり、この値における酵素活性を基準として低アミロ小麦の仕分けが可能であると考えられる。300 BU における α -アミラーゼ活性を Table 1 の回帰式から計算すると Table 2 のようになった。300 BU における α -アミラーゼ活性の最も低いのは、ゼンコウジコムギの 78.2 mU であり、今回の供試品種・銘柄においては、 α -アミラーゼ活性がこの値より低ければ、全て正常小麦であった。そ

Table 1 Regression line between maximum viscosity in amylography and α -amylase activity of mixed flours

Sample	Numbers of analysis	$\log_e y = a + b \log_e x$		
		a*	b**	$\pm sb$ ***
Zenkoujikomugi	8	10.411	-1.061	± 0.034
Norin 61	10	10.687	-1.091	± 0.067
Horoshirikomugi	10	9.069	-0.805	± 0.042
Chihokukomugi	10	8.783	-0.739	± 0.030
ASW****	10	8.725	-0.747	± 0.029

* Intercept of regression line.

** Regression coefficient.

*** Standard error of regression coefficient.

**** Australian standard white.

Table 2 Estimates of α -amylase activity at 300 BU and their confidence intervals

Sample	Estimate of α -amylase activity at 300 BU* (mU/g flour)	Confidence intervals (Confidence limits : 95%) (mU/g flour)
Zenkoujikomugi	78.2	73.71 ~ 82.88
Norin 61	86.6	78.72 ~ 95.34
Horoshirikomugi	87.7	83.34 ~ 92.39
Chihokukomugi	96.2	91.79 ~ 100.83
ASW**	86.8	84.76 ~ 88.86

* Brabender Unit.

** Australian standard white

れに対し、300BUにおける α -アミラーゼ活性の最も高いのはチホク小麦の96.2 mUであり、 α -アミラーゼ活性がこの値より高ければ、全て低アミロ小麦であった。そこで、小麦の仕分けの指標となるアミラーゼ活性の設定は、95%信頼区間を考慮し70 mUと100 mUで区切りをつけ、以下のような α -アミラーゼ活性値による小麦仕分け案（試案）を作成した。

① α -アミラーゼ活性が70 mU/g・flour未満：低アミロ小麦の可能性は小さい

② α -アミラーゼ活性が70～100 mU/g・flour：低アミロ小麦の可能性はある

③ α -アミラーゼ活性が100 mU/g・flour以上：低アミロ小麦の可能性が大きい

3. 仕分け案の検証

次に2で作成した仕分け案が実用に供試しうるかどうかを検討するため、実際に、圃場で降雨に遭遇するなどして様々なアミロ値を示す小麦29点に対し適用を行った（Table 3）。なお、一般には低アミロ小麦は300 BU未

Table 3 Comparison between result of classification by α -amylase activity and maximum viscosity

	α -Amylase activity (mU)	Classification by α -amylase*	MV (BU)***	Classification by MV**
1	465.1	×	132	×
2	305.8	×	100	×
3	243.0	×	180	×
4	132.7	×	315	△
5	116.5	×	297	×
6	114.1	×	392	△
7	110.8	×	324	△
8	92.2	△	567	○
9	92.2	△	509	○
10	91.7	△	308	△
11	89.7	△	330	△
12	78.8	△	677	○
13	75.5	△	405	○
14	72.1	△	414	○
15	69.2	○	690	○
16	68.9	○	578	○
17	68.8	○	503	○
18	68.8	○	496	○
19	65.4	○	674	○
20	60.2	○	625	○
21	57.3	○	607	○
22	42.4	○	518	○
23	32.4	○	800	○
24	32.0	○	979	○
25	31.8	○	645	○
26	30.6	○	1090	○
27	22.9	○	1357	○
28	22.4	○	1157	○
29	21.0	○	1365	○

* × : wheat must be sprout damaged

△ : wheat may be sprout damaged

○ : wheat must be undamaged

*** : MV (BU) : Maximum Viscosity (Brabender Unit)

** × : Sprout damaged wheat (below 300 BU)

△ : Sprout damaged wheat (300 BU～400 BU)

○ : Undamaged wheat

満の小麦をさすが、400BU 未満の小麦は何らかの問題を抱えている可能性がある²⁾。そこで 300 BU~400 BU のアミロ値を持つものは、アミロ値による分類で△と表示した。

α -アミラーゼ活性が 70 mU 以下の試料 (試料番号 15~29) はいずれもアミロ値が高く、これらの小麦は正常であった。70~100 mU の試料 (試料番号 8~14) については、アミロ値が 308~677BU の範囲内にあり、試料番号 10 が 308 BU, 11 が 330 BU, と 2 点が低アミロ小麦との境界付近のアミロ値であったが、その他は全て正常小麦に区分された。100 mU 以上の試料については、すべて 400 BU 未満であり、3 点が 300BU よりも大きかったが、ほぼ低アミロの範中に入るものであった。特に試料番号 1, 2, 3 のように α -アミラーゼ活性の高い試料はアミロ値も極めて低かった。

このように、BPNPG7 を基質とした α -アミラーゼ活性測定により、アミロ値の推定とそれに基づく仕分けができることが示された。特にアミロ値の高い正常な小麦については、はっきりとした仕分けが可能であった。低アミロ小麦であるアミロ値が 300BU 未満の小麦を仕分けするためには、 α -アミラーゼ活性値が 100 mU の線で区切ればよいということがわかった。また正常な小麦の仕分けには、 α -アミラーゼ活性値が 70 mU の線で区切ればよいということがわかった。

本研究で行った α -アミラーゼ活性測定法は、小麦粉が調製されていれば活性測定自体は 1 日当たり 60 点程度の分析が可能である。アミロ値の測定が 1 点あたり 1 時間程度要し、1 日に 8 点程度しか分析が行えないことと比較して迅速な小麦の仕分けが可能である。さらに、より簡便化あるいは自動化がなされれば、検査現場への導入も期待できる。

要 約

オリゴ糖誘導体を基質とした α -アミラーゼ活性測定法によるアミロ値迅速推定および低アミロ小麦の仕分けの可能性を検討した。1) 穂発芽性の異なる 4 品種と 1 銘柄の小麦から様々なアミロ値の小麦粉を調製し、 α -アミラーゼ活性とアミロ値との相関関係を求めた。その結果、いずれの品種・銘柄においても α -アミラーゼ活性とアミロ値の対数の間には、高い負の相関関係が存在した。従って、各々の品種においては、 α -アミラーゼ活性からアミロ値の推定が可能である。2) 両者の回帰式は品

種・銘柄により若干異なるが、アミロ値が小さいほど α -アミラーゼ活性の品種・銘柄間の差異は小さかった。3) 得られた結果に基づき α -アミラーゼ活性による小麦仕分け案を作成した。4) 実際の様々なアミロ値を持つ小麦に試案を適用した結果、仕分け案の妥当性が確認された。

本酵素法はアミログラムの測定と比較して迅速な分析が可能であり、低アミロ小麦の推定法として有用であることが示された。

本研究を行うに当たり、貴重な試料を提供していただきました農業研究センター小麦育種研究室、九州農業試験場小麦育種研究室に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 安永 隆: 日作紀, **32**, 358 (1964).
- 2) 山崎晴雄: 農産物検査とくほん, **85**, 67 (1987).
- 3) 食糧庁管理部検査課 (アミロ問題懇談会): 小麦のアミロをめぐる諸問題, **13** (1988).
- 4) 今井 徹: 食糧 No. 30 (農林水産省食品総合研究所) 105 (1992).
- 5) 中津智史・市川信雄・平 春枝・斉藤昌義・相馬 暁: 北農, **56**, 17 (1989).
- 6) D'APOLONIA, B. L., MACARTHUR, L. A., PISEOGBUNTERNG, W. and CIACCO, C.F.: *Cereal Chem.* **59**, 254 (1982).
- 7) FINNEY, P.L.: *Cereal Chem.*, **62**, 258 (1985).
- 8) 平野寿助: 中国農業試験場報告 A, **20**, 27 (1971).
- 9) 松倉 潮・加藤一郎・平 春枝・今井 徹: 食品総合研究所報告, **45**, 97 (1984).
- 10) AACC Method. 22-06 (1980).
- 11) 中津智史・市川信雄・大村邦男・北農, **60**, 397 (1993).
- 12) 農林水産技術会議事務局: 小麦品質検定法, **12** (1968).
- 13) McCLEARY, B.V. and SHEEHAN, H.: *J. Cereal Sci.*, **6**, 237 (1987).
- 14) 今井 徹・熊谷憲一・松倉 潮・平 春枝・柴田 茂久: 食品総合研究所報告 **45**, 111 (1984).
- 15) 今井 徹・宮崎裕一・松倉 潮・平 春枝・柴田 茂久: 食品総合研究所報告, **47**, 118 (1985).
- 16) KRUGER, J.E. and TIPPES, K.H.: *Cereal Chem.*, **58**, 271 (1981).

(平成 6 年 4 月 27 日受理)