

〔短報〕

小麦 α -アミラーゼ活性測定のための
簡易迅速前処理方法*1

奥村 理*2 加藤 淳*2

ドライケミストリー法による分析装置と組み合わせた小麦原粒に対応可能な α -アミラーゼ活性測定システムを開発するために、農業現場で活用しやすい簡易迅速な小麦 α -アミラーゼ抽出方法について検討した。小麦 α -アミラーゼの抽出は、麦専用ホモジナイザーを用いて、ジェネレーターと容器の位置関係を偏心2.0cm、クリアランス4.0cmとして、ホモジナイザーの運転条件を回転数8,000rpm、破碎時間120秒とすることが適当であると判断した。本抽出方法と α -アミラーゼ活性測定装置を用いた場合、1点あたりの分析時間がおおよそ12分、また連続操作することにより1時間あたり約25点（前処理装置2台稼働で35点）の分析が可能であった。

結 言

北海道産小麦の品質について最も重要な問題の一つとして低アミロ小麦の問題が挙げられる。低アミロ小麦発生の直接的な原因は、収穫前の降雨等により、小麦子実中のデンプン分解酵素である α -アミラーゼの活性が上昇し、デンプンが分解されることに因る。また、低アミロ小麦は量的に僅かであっても適正なデンプン粘度の小麦に混入すると全体の品質を低下させることが知られている。このことから、小麦集荷段階で極端に品質の劣る小麦を判別、仕分けし、乾燥、調整することは非常に重要なことである^{1,2,3)}。

生麦の α -アミラーゼ活性測定に関しては、オートアナライザー法を用いた活性測定システムが開発されており、道内のいくつかの農協で導入されている^{3,4)}。しかし、生麦からの α -アミラーゼ抽出工程および測定装置の保守、管理が煩雑であるなど、いくつかの問題が指摘されている。一方、従来から臨床分野で利用されているドライケミストリー法による分析装置を用いた小麦 α -アミラーゼ活性の測定方法が検討されており、実験室レベルにおいて全粒粉あるいは小麦粉のような小麦粉砕物の α -アミラーゼ活性の測定が可能となっている²⁾。

そこで本研究では、ドライケミストリー法による分析

装置と組み合わせた小麦原粒に対応可能な α -アミラーゼ活性測定システムを開発するために、農業現場での作業性に優れる小麦 α -アミラーゼ抽出方法を検討した。

試験方法

1. 小麦 α -アミラーゼ抽出条件の検討

麦専用開発されたジェネレーターを装着したホモジナイザー（「ヒスコトロン」、㈱マイクロテックニチオン）を用いて、小麦粒と抽出液をホモジナイズすることにより α -アミラーゼを抽出する場合の抽出条件について検討した。検討項目は①ジェネレーターと抽出容器の位置関係（「偏心」：ジェネレーターの回転軸と容器の中心との距離、「クリアランス」：ジェネレーター先端と容器底面までの距離）、②抽出液の濃度、③ホモジナイザー運転条件（回転数および破碎時間）、④抽出液の温度とした。

2. 小麦 α -アミラーゼ活性測定手順の検討

前項で検討した抽出条件およびドライケミストリー法による α -アミラーゼ活性測定装置（「富士ドライケム3030型」、㈱富士写真フイルム）を用いて測定を行う場合の手順について検討した。検討にあたっては、農業現場での利用を想定し、迅速かつ多点数の処理が可能になるよう配慮した。

試験結果および考察

1. 小麦 α -アミラーゼ抽出条件の検討

(1) ジェネレーターと抽出容器の位置関係

偏心およびクリアランスと水流安定性の関係を表1に示した。

2003年5月1日受理

*1 本報の一部は、2002年度日本土壌肥料学会北海道支部秋季大会で発表した。

*2 北海道立中央農業試験場、069-1395 夕張郡長沼町
E-mail:okumuros@agri.pref.hokkaido.jp

表1 偏心, クリアランスと水流安定性の関係

項目	距離 (cm)	設定回転数 (rpm)	
		7500	10000
偏 心	0.0	▲	▲
	1.0	▲	▲
	1.5	▲	▲
	2.0	○	○
	2.5	○	■
クリアランス	1.0	◆	◆
	1.5	◆	◆
	2.0	◆	◆
	2.5	○	○
	3.0	▲	▲
	3.5	▲	▲

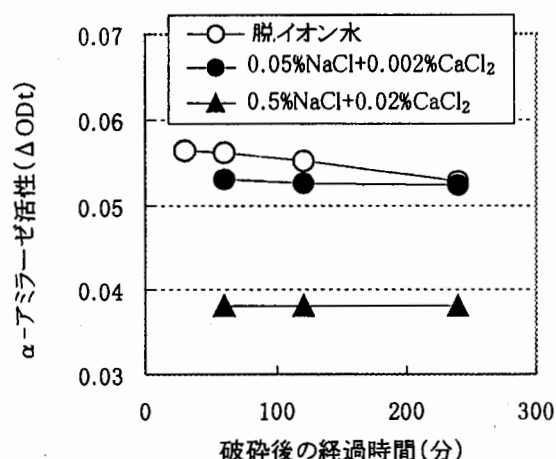
注) ○: 水流がほぼ安定
 ▲: 空気の巻き込みにより不安定
 ■: 突出水が壁面に当たり不安定
 ◆: 始動時に麦粒噛込みの危険性

回転軸が容器の中心にある場合,あるいは偏心が小さい場合は,溶液表面がすり鉢状になり,頻繁に刃が水流中から外れる現象が生じた。水流から外れた時には空気を巻き込み,水流が不安定となった。また,偏心が大きくなりジェネレーターが容器壁面に近づくと,水平方向に突出した水の容器壁面に当たる勢いが過剰に強くなり,水流が不安定となった。これらのことから,水流を安定させるためには,偏心を2.0cmとすることが適当であると考えられた。

一方,クリアランスが小さい場合は,始動時に小麦粒を噛み込み,刃がロックされる危険性があった。また,クリアランスが大きい場合には,ジェネレーター上部が溶液表面に近づき,空気を巻き込むことにより水流が不安定となった。本試験の結果では100gの小麦粒を加えた500mlの抽出液に対して,クリアランス2.5cmが最適であると考えられた。しかし,この場合にも,小麦粒の噛み込みの危険性が危惧されたことから,抽出液量を増やし,ジェネレーターの浸水深を維持しながらクリアランスを大きくすることで,噛み込みを防ぐことが望ましい。そこで,抽出液量を600mlとし,容器(底面積約70cm²)内の抽出液の高さを約1.5cm高くすることにより,浸水深を維持しつつ,クリアランスを2.5cmから4.0cmに広げることが適当であると判断した。

(2) 抽出液の濃度

抽出液のNaClおよびCaCl₂濃度と α -アミラーゼ活性の関係を図1に示した。60分経過後の α -アミラーゼ活性は脱イオン水が最も高く,0.05% NaCl+0.002% CaCl₂がこれに次ぎ,0.5% NaCl+0.02% CaCl₂が最も低かった。また,脱イオン水は時間の経過とともに明らかに活性が低下したが,NaClとCaCl₂を含む溶液はその濃度に関係なく活性は一定であった。

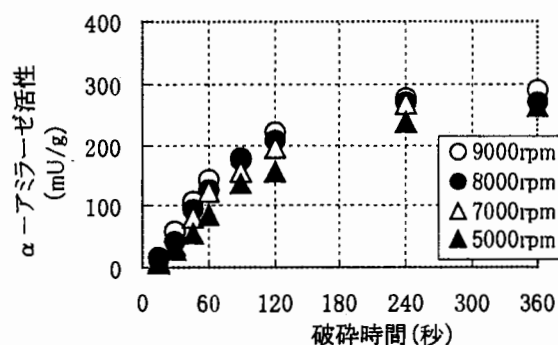
図1 抽出液の濃度と α -アミラーゼ活性の関係

本試験で用いた測定装置は抽出液の濃度が低いほど酵素反応に対する感度が高いことから,測定精度が高まると考えられたが,脱イオン水では経時的に活性が低下する傾向が認められた。そこで,酵素の安定性が確認された濃度0.05% NaCl+0.002% CaCl₂に酵素安定の安全性を見越して1.5倍濃度の溶液,つまり0.075% NaCl+0.003% CaCl₂水溶液を抽出液として用いることが適当であると判断した。また,抽出液の調製については,水道水中の塩濃度の影響が懸念されることから,脱イオン水を用いることが適当であると考えられた。

(3) ホモジナイザーの回転数と破砕時間

ホモジナイザーの回転数および破砕時間と α -アミラーゼ活性の関係を図2に示した。破砕時間に関して,120秒までは,破砕時間が長くなるにしたがって,急激に α -アミラーゼ活性が上昇したが,120秒以降の上昇程度は,わずかなものであった。また,回転数に関して,5000rpmの活性は明らかに低かったが,7000rpm以上では,回転数の増加にともなう活性の上昇はわずかであり,8000rpmの活性は9000rpmとほぼ同程度であった。

農業現場において小麦受入時に α -アミラーゼ活性を測定する場合は,迅速な処理が望まれる。また高速回転ではホモジナイザーの音が非常に大きく現場での作業環

図2 破砕条件と α -アミラーゼ活性の関係

境が悪くなることが指摘されている。これらのことから、現場の作業環境を考慮に入れ、破碎時間については、おおむね活性値が安定する120秒、回転数については8000rpmがホモジナイザー運転条件として適当であると判断した。

(4) 抽出液の温度

抽出液温度19～25℃の範囲における液温と α -アミラーゼ活性の関係を図3に示した。比較的活性の低い試料Aでは抽出液温の上昇とともに活性がやや高まる傾向にあったが、有意な差ではなかった。また、比較的活性の高い試料Bでは抽出液温による活性の関係は判然としなかった。

酵素活性の測定においては、酵素液の温度が測定値に影響を及ぼすことが懸念される。しかし、本試験における α -アミラーゼの抽出に関しては、抽出液温が通常の作業環境として想定される20～25℃の範囲内であれば、測定上問題はないと考えられた。

抽出条件に関するこれまでの検討結果および現場における対応について表2および図4にまとめた。抽出液には20～25℃に調整した0.075% NaCl, 0.003% CaCl_2 水溶液を用い、ジェネレーターと抽出容器の位置関係を偏心2.0cm、クリアランス4.0cmとし、8000rpmで120秒間ホモジナイズすることにより、安定的に α -アミラーゼが抽出されることが考えられた。

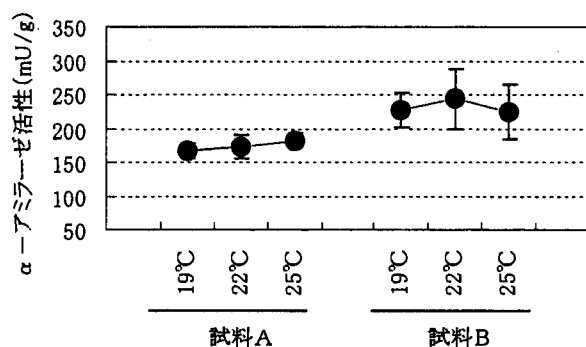


図3 抽出液の温度と α -アミラーゼ活性の関係

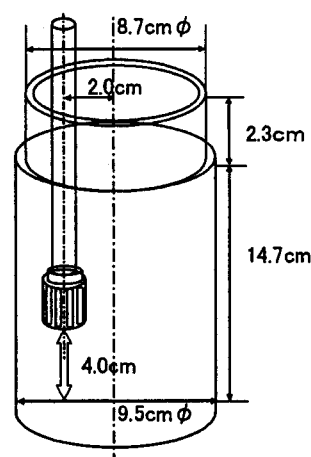


図4 偏心とクリアランス

(5) 抽出精度

α -アミラーゼ活性が異なる3種類の小麦試料について、10回の抽出操作を行った時の活性値の変動を表3に示した。比較的 α -アミラーゼ活性が低い試料A（平均値：163mU/g）の変動係数は6.3%、活性が中程度の試料B（平均値：239mU/g）の変動係数は11.0%、比較的活性が高い試料C（平均値：414mU/g）の変動係数は17.5%であった。このように本抽出法の精度は α -アミラーゼ活性の程度によって異なり、活性が高くなるほど抽出精度は低下する傾向が認められた。

小麦の α -アミラーゼ活性は小麦粉デンプンの粘度を示すアミログラム最高粘度（アミロ値）と密接に関係し、活性が低いものはアミロ値が高く、活性が高いものはアミロ値が低い。

表3 小麦 α -アミラーゼの抽出精度（単位＝mU/g）

項目 (アミロ値)	試料A (900BU)	試料B (270BU)	試料C (105BU)
最小値	148	197	289
最大値	180	276	529
平均値	163	239	414
標準偏差	10	26	72
変動係数	6.3%	11.0%	17.5%

注) 10反復の測定結果

表2 小麦 α -アミラーゼ活性測定のための抽出条件

項目	設定条件	現場での対応
小麦試料	100g	はかり（最小目盛0.1g）
抽出液	液量	600ml
	組成	0.075%NaCl, 0.003% CaCl_2
	温度	20～25℃
抽出容器	容器	1リットル
	位置	偏心：2.0cm クリアランス：4.0cm
ホモジナイズ	回転数	8000rpm
	時間	120秒

表4 ドライケミストリー法を用いた小麦 α -アミラーゼ活性の測定手順

作業工程	作業内容	所要時間* (分)	人員配置 (例)		
			A	B	C
試料の採取	小麦子実 (500g程度) を採取する	0.5	○		
子実水分測定	水分測定装置を用いて子実水分を測定する	1	○		
分析試料の計量	小麦子実100g (± 1 g) を計量する	0.5	○		
抽出液の準備	抽出液600mlをポリビーカー (1L) にとる	0.5			○
抽出	抽出液に小麦子実を添加し、ホモジナイズ (120秒間) する	2		○	
分離	懸濁液 (1.5ml) を専用チューブに取り、遠心分離 (60秒間) する	1.5		○	
測定	分析装置を用いて α -アミラーゼ活性を測定する	6		○	
その他	抽出容器の洗浄, 抽出液の希釈, スライドの準備, 廃液処理等	—			○
合 計		12			

※全工程を1名で操作した場合の所要時間

ミロ値が低くなる。 α -アミラーゼ活性を品質仕分けの基準として用いる場合に問題となるのは、低アミロ小麦の基準とされるアミロ値300B.U. (ブラベンダー・ユニット) に相当する活性値である。アミロ値が270B.U. である試料Bの変動係数が11.0%であることから考えれば、アミロ値300B.U. 程度に相当する活性値の変動係数は、10%前後であると推察される。また、 α -アミラーゼ活性に基づく仕分け基準を設定する場合に、明らかな低アミロ小麦、低アミロ小麦でないもののほかに低アミロ小麦の疑いがあるもの (中間領域) を加えた3種類程度の区分を設けることを想定すれば、本試験で用いた抽出方法の精度は実用上問題のないものであると考えられた。

2. ドライケミストリー法を用いた小麦 α -アミラーゼ活性測定手順の検討

前項で検討を行った抽出方法およびドライケミストリー法による α -アミラーゼ活性測定装置を用いた測定手順と、農業現場での活用を想定し多点数の試料の測定を行うための人員配置 (例) を表4に示した。試料の計量から測定結果が算出されるまでの所要時間はおよそ12分であった。また3名の人員を配置し人員Aが試料の採取から計量までを、人員Bが抽出から測定までを、人員Cが抽出液の準備、器具の洗浄、スライドの準備等を担当することで、円滑な測定作業が可能であると考えられた。また、この人員配置によれば、最初のサンプルの分析結果が出るまでは約12分を要するものの、その後は連続的に作業することにより約2分おきに測定結果を出すことが可能であり、1時間当たり約25点 (前処理装置2台稼動で35点) の測定が可能であると考えられた。

以上のとおり、本試験で検討した α -アミラーゼ抽出方法とドライケミストリー法による分析装置を組み合わせた測定システムは、農業現場において、品質に基づく3区分程度の仕分けに利用する場合には、実用上問題のない精度を有するとともに、簡易・迅速に小麦子実の α -

ミラーゼ活性を測定することが可能である。本システムを用いて小麦集荷時に α -アミラーゼ活性を測定し、極端にデンプン粘度の低いものを仕分けすることは、高品質小麦の流通の実現に向けた有効な手段であると考えられる。

謝 辞：本研究を進めるにあたり、富士フィルムメディカル株式会社ならびに静岡製機株式会社には多大なる御協力をいただいた。各位に心から謝意を表する。

引用文献

- 1) 阿部英幸, 加藤 淳, 野田高弘, 岩田幸良. " α -アミラーゼ活性を指標とした小麦品質評価システム". 農業および園芸. 78(1), 73-77 (2003).
- 2) 一ノ瀬靖則, 桑原達雄, 高田兼則, 西尾善太, 堀金 彰. "多層フィルム式ドライケミストリーの低アミロ小麦選別への適応性". 日作記. 70(4), 588-594 (2002).
- 3) 加藤 淳, 奥村 理. " α -アミラーゼ活性に基づく小麦の品質区分". 北農. 69(4), 318-322 (2002).
- 4) 中津智史, 埜村朋之, 今井 徹. "オートアナライザーによる低アミロ小麦の簡易迅速検定法". 日作記. 66(1), 35-41 (1997).

A Rapid and Convenient Preparation Method for the Measurement of α -Amylase Activity of Wheat Grains

Osamu OKUMURA* and Jun KATO

* Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan
E-mail: okumuros@agri.pref.hokkaido.jp