

Megazyme

アミロース／ アミロペクチン分析法

澱粉中のアミロース／
アミロペクチン含量測定法

AMYLOSE/AMYLOPECTIN

ASSAY PROCEDURE

FOR THE MEASUREMENT OF THE AMYLOSE
AND AMYLOPECTIN CONTENTS OF STARCH

K-AMYL 06/18

K-AMYL
(用手法 100 回分)

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

各種用途への適合性を左右する穀物澱粉の特性の多くはアミロース／アミロペクチン比に起因するものである。これらの特性には、糊化およびゲルの特性、溶解度、難消化性澱粉の形成、さらに米については穀物粒の調理や食味の特性が含まれます¹⁻⁵。したがって、澱粉のアミロース含有量の測定は澱粉加工の重要な品質パラメータです。

穀物澱粉のアミロースは一般的に、アミロース-ヨウ素反応物を形成させアミロースのヨウ素結合能を電位差測定、電流測定または比色測定により測定します⁶⁻¹⁰。しかしこれらの方法は不確実で精度面に問題があります。この時同時にアミロペクチン-ヨウ素反応物も形成され、これらは比色法以外の手法により測定される遊離ヨウ素濃度を低下させ、また比色法ではアミロース-ヨウ素反応物と同じ波長で測定されてしまいます。これはアミロースの過大評価をもたらし、何らかの補正する必要が生じます。これら分析法の問題は、Gibsonらによって数多く紹介されています¹¹。

レクチンであるコンカナバリンA (ConA) がアミロペクチンと特異的に複合体を形成することは、これらの不確実性を避け、澱粉中のアミロース測定に新しい道を切り開くことができます¹²⁻¹³。

ある一定のpH、温度およびイオン強度の条件下で、ConAは複数の α -D-グルコピラノシルまたは α -D-マンノピラノシル非還元末端残基を有する分岐多糖を特異的に認識し、沈殿を形成します。このようにConAは澱粉のアミロペクチン画分と効率的に結合しますが、主に直鎖状アミロースからなる成分とは結合しません。

このブックレット記載の方法¹³は、YunとMatheson(1990)¹³により開発されたConA法の改良版です。分析の前に脱脂目的でエタノール前処理工程が採用されています。
[MorrisonとLaignelet(1983)⁷から変更]。

原理 - PRINCIPLE -

澱粉試料はジメチルスルホキシド(DMSO)中で加熱することにより完全に分散します。エタノール中で澱粉を沈殿させ、沈殿した澱粉を回収することにより脂質を除去します。沈殿試料を酢酸／塩溶液に溶解した後、ConAの添加によりアミロペクチンを特異的に沈殿させ、遠心分離により除去します。上清中のアミロースは酵素的にD-グルコースまで加水分解され、それをグルコースオキシダーゼ／パーオキシダーゼ試薬により分析します。全澱粉量は別の酢酸／塩溶液の試料を同様にD-グルコースに加水分解し、グルコースオキシダーゼ／パーオキシダーゼで比色定量します。澱粉試料中のアミロース濃度は、ConA沈殿試料の上清を全澱粉試料のGOPOD反応による吸光度510nmの吸光度比として推量できます。

この分析法は、全ての精製澱粉試料および穀物粉末に適用可能です。

正確さ - ACCURACY -

実験室内で一連のサンプルを用い反復分析した結果、精製澱粉では5%以内、穀物粉末では約10%の相対標準偏差の再現性が得られました。

キット - KITS -

100検体分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

ボトル1: ConA凍結乾燥品。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル2: アミログルコシダーゼ[2mL、*p*-ニトロフェニル β -マルトシド*に対し200 U/mL(可溶性澱粉に対し3,300 U/mL)、pH 5.0、40°C]+カビ α -アミラーゼ(500 Ceralpha U、pH 5.0、40°C)。4°Cで5年以上安定です。

- ボトル3:** GOPOD試薬緩衝液。緩衝液(50mL、pH7.4)、*p*-ヒドロキシ安息香酸およびアジ化ナトリウム(0.095%w/v)含有。4°Cで4年以上安定です。
- ボトル4:** GOPOD試薬酵素。グルコースオキシダーゼ+パーオキシダーゼ+4-アミノアンチピリン。凍結乾燥品。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル5:** D-グルコース標準液(5mL、1.0mg/mL) 0.2%(w/v)安息香酸溶液。室温で5年以上安定です。
- ボトル6:** 澱粉対象品(アミロース含量既知)。室温で5年以上安定です。

試薬溶液／懸濁液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. ボトル1の内容物をConA用緩衝液(緩衝液3、3ページ)50mL に溶解します。ポリプロピレンチューブに適量ずつ分注し、-10°C以下で保存します。使用中はなるべく冷却して下さい。-10°C以下で2年以上安定です。これが**溶液1**です。
2. ボトル2の内容物を酢酸緩衝液(100mM、pH 4.5)20mL に溶解します。ポリプロピレンチューブに適量ずつ分注し、-10°C以下で保存します。使用中はなるべく冷却して下さい。-10°C以下で2年以上安定です。これが**溶液2**です。
3. ボトル3(GOPOD試薬緩衝液)の内容物を蒸留水で1Lに希釈します。これが**溶液3**です。すぐに使用して下さい。

NOTE:

1. 緩衝液濃度が高いため、保存中に塩の結晶が生じることがあります。この緩衝液を蒸留水で1Lに希釈する際には、結晶を完全に溶解して下さい。
2. この緩衝液には、0.095%(w/v)のアジ化ナトリウムが含まれています。これは有毒化学物質ですので、留意してお取り扱い下さい。

4. ボトル4の内容物を 20mL の溶液3に溶解し、これを残りの溶液3のボトルに全量に移します。このボトルをアルミニウム箔で覆い、試薬を遮光保管します。これがグルコース測定試薬(GOPOD試薬)です。2~5°Cで約3ヶ月、-10°C以下で12ヶ月以上安定です。
凍結保存する場合は、1回の分析で使い切れる適量ずつ小分けにして保存して下さい。決して凍結／融解を繰り返さない下さい。
新しく調製した試薬は淡く黄色~ピンク色を呈しています。着色は4°Cで2~3ヶ月保存している間にピンク色がさらに強くなります。この試薬の吸光度は、蒸留水に対し0.05未満でなければなりません。それを上回る場合は新しい試薬をご用意下さい。
- 5,6. 付属のボトル5, 6をそのまま使用して下さい。室温で5年以上安定です。

CAUTION

安全性に関する事項

1. ジメチルスルホキシド(DMSO)は、皮膚刺激性物質として Merck Index(No. 3255)に記載されているため、慎重に使用する必要があります。皮膚を通して吸収され、皮膚と目の両方に刺激を与える可能性があります。防護具を着用し、溶剤の飛沫を防いで下さい。出来る限りドラフト内で作業して下さい。
2. コンカナバリンAは吸入、皮膚接触、経口摂取により有害作用を示します。効果は不可逆的であり、催奇形性を伴う危険性があります。ConA結晶を取り扱うときは適切な防護具を着用し、ConAを含む溶液を取扱う際は手袋を着用して下さい。
3. アジ化ナトリウムは有毒化学物質であり、それに応じて処理する必要があります。これは単に防腐目的で緩衝液に添加します。緩衝液調製法から削除できますが、緩衝液は4°Cで保存する必要があります。

緩衝液と溶解液（提供外） - BUFFERS AND SOLVENTS (NOT SUPPLIED) -

1. 酢酸ナトリウム緩衝液(100mM, pH 4.5 ; 緩衝液1)
氷酢酸(1.05g/mL) 5.9mL を蒸留水約 900mL に加えます。1M(4g/100mL)水酸化ナトリウム溶液を用い pH 4.5 に調整(約 30mL 必要)します。アジ化ナトリウム 0.2g を加え、1L に定容します。室温で2年以上安定です。
 2. 濃縮ConA用緩衝液(600mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.4)
無水酢酸ナトリウム (Sigma #71183、または同等品) 49.2g、塩化ナトリウム (Sigma #S7653、または同等品) 175.5g、CaCl₂·2H₂O (Sigma #C5080、または同等品) 0.5g、MgCl₂·6H₂O (Sigma #M2670、または同等品) 0.7g および MnCl₂·4H₂O (Sigma #M3634、または同等品) 0.7g を蒸留水約 900mL に溶解します。氷酢酸を滴下して pH 6.4 に調整し、蒸留水で1Lに定容します。4℃で2週間安定です。
- NOTE : この溶解用緩衝液を調製する際は、pH 調整を慎重に行なうことが重要です。pH が 6.4 より著しく下げると沈殿物が形成し、pH 調整によっても再溶解しません。その場合、廃棄して作り直して下さい。
3. ConA用緩衝液（緩衝液3）
濃縮ConA用緩衝液 30mLを蒸留水で100mLに希釈します。調製当日中に使用します。
 4. ジメチルスルホキシド(DMSO)
分析試薬グレード(BDH Analar #10323、または同等品)。室温で5年間安定です。

機器(推奨):

1. ガラス製品
 - メスフラスコ (25mL)
 - ガラス試験管(15mL 容、16×120mm)
 - ネジロ試験管(10mL 容)
2. マイクロピペッター(50~1000μL)分注用、例 Gilson Pipetman®
3. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
4. 2.0mL 容マイクロ遠心チューブ、例 Eppendorf 製
5. 沸騰水浴
6. 卓上型遠心分離機(2,000×g 対応のもの)
7. 510nm に設定した分光光度計
8. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
9. 分析用天秤
10. マイクロ遠心機(14,000×g 対応のもの)
11. 恒温水槽(40℃設定)

NOTE : 澱粉試料の場合、以下の手順で脂質を除去するためにエタノールで前処理します。エタノールで前処理されていない場合、サンプルによってはアミロース含有量が最大 50%も過小評価される可能性があります。

分析手順:

A. 澱粉の前処理

1. 澱粉または穀粒粉サンプル(20-25mg)を 10mL 容ネジ口試験管に精秤し、重量を 0.1mg 単位で記録します。

NOTE: 各分析バッチごとに標準品を測定します。試料5点ごとに2点測定して下さい

2. 試験管に 1mL のDMSOを加え、ボルテックスミキサーで低速でゆっくりと攪拌します。試験管の蓋を締め、サンプルが完全に分散するまで(約1分)沸騰水浴で試験管を煮沸します。ゼラチン状の澱粉塊が残っていないことを確認します。
3. 蓋をしっかりと締めてボルテックスミキサーで高速で激しく混合し、次に試験管を沸騰水浴に入れ、ボルテックスミキサーで時折り高速攪拌しながら15分間煮沸します。
4. 試験管を室温で約5分間放置後、ボルテックスミキサーで連続的に攪拌しながら 95% (v/v) エタノール 2mL を加えます。さらにエタノール 4mL を加え、蓋をして転倒し混和します。この工程で澱粉沈殿物が形成されます。試験管を15分間(または必要に応じて一晚)放置します。
5. 試験管を $2,000 \times g$ で5分間遠心し、上清を捨て、試験管をティッシュペーパー上で10分間水切りを行ない、エタノール分が全て排出されたことを確認します。沈殿画分をアミロースと澱粉定量に使用します。
6. ボルテックスミキサーで穏やかに攪拌しながら、澱粉ペレットにDMSOを 2mL 加えます。次に試験管を沸騰水浴中で1時折攪拌しながら5分間煮沸します。ゼラチン状の塊がないことを確認して下さい。
7. 試験管を沸騰水浴から取り出し、直ちにConA用緩衝液(緩衝液3; 3ページ) 4mL を添加し、十分に混合した後、試験管の内容物全量をConA用緩衝液で繰り返し洗浄しながら 25mL 容メスフラスコに移し、ConA用緩衝液で定容します(これが溶液Aです)。必要に応じて、Whatman®No.1 濾紙で濾過します(この手順は全ての粉末サンプル全般に必要です)。

NOTE: この溶液Aは2時間以内に分析して下さい。

B. アミロペクチンのConA沈殿とアミロースの定量

1. 溶液A 1mLを 2mL 容マイクロ遠心チューブに分取します。ConA溶液(溶液1) 0.5mL を添加し、チューブに蓋をして反転を繰り返し穏やかに混合します。サンプルを泡立てないように、十分に留意して下さい。
2. チューブを室温でそのまま1時間放置します。放置後、微量遠心機で室温で10分間、 $14,000 \times g$ で遠心分離します。

NOTE:

1. アミロースは老化して沈殿する傾向があるため、ConA用緩衝液中の試料(すなわち、上記セクションAに記載の溶液A)は所定の時間以上、放置してはいけません。
2. アミロペクチンをConAで充分沈殿(上記のステップ B1)させるには室温で1時間必要です。一方、アミロースは老化傾向があるため、これらの反応液を2時間以上放置しないで下さい。従って溶液A調製後、1時間後~2時間以内に少なくともB4の酵素反応まで進める必要があることに留意して、迅速に作業して下さい。
3. この手順ではサンプルをエタノールで前処理するため、分析に悪影響を生じる各種の可溶性糖類を除去できるという利点もあります。

3. 上清 1mL を 15mL 容遠心チューブに分取します。100mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 3mL を加え、pH を5近くにまで下げます。軽く攪拌し、ビー玉で軽く蓋をして沸騰水浴で5分間加熱し、ConAを失活させます。
4. チューブを40°Cの恒温水槽に入れ、5分間放置します。次にアミログルコシダーゼ／ α -アミラーゼ溶液 (溶液2、2ページ) 0.1mL を加え、40°Cで30分間反応させます。反応後、チューブを $2,000 \times g$ で5分間遠心します。
5. 上清 1mL を2連で分取し、GOPOD試薬 4mL を加え、40°Cで20分間加温します。同時に試薬ブランクと D-グルコース標準液も反応させます。
6. 試薬ブランクに対するサンプルおよび標準液の 510nm 吸光度を測定します。

NOTE :

試薬ブランクは、100mM 酢酸緩衝液 (緩衝液1; 3ページ) 1.0mL にGOPOD試薬 4.0mL を添加します。**D-グルコース標準 (2連)**は、D-グルコース標準液 (1mg/mL) 0.1mL に、酢酸緩衝液 0.9mL およびGOPOD試薬 4.0mL を添加し、共に40°Cで20分間反応させます。

この標準液の値は計算には使用しませんが、分析手順に問題がないことを確認するために実施されることをお勧めします。

C. 総澱粉量の測定

1. **溶液A** 0.5mL を 100mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 4mL と混合します。
2. アミログルコシダーゼ／ α -アミラーゼ溶液 (溶液2) 0.1mL を加え、40°Cで10分間反応します。
3. ガラス試験管に反応液 1mL を2連で分取し、**GOPOD試薬** 4mL を加え良く混合した後、40°Cで20分間加温します。この反応は、上記のセクションBのサンプルおよび標準と同時に実行する必要があります。

アミロース含量の算出

アミロース% (w/w)

$$= \frac{\text{吸光度 (ConA上清)}}{\text{吸光度 (総澱粉量)}} \times \frac{6.15}{9.2} \times \frac{100}{1}$$

$$= \frac{\text{吸光度 (ConA上清)}}{\text{吸光度 (総澱粉量)}} \times 66.8$$

ここで 6.15 と 9.12 はConAと総澱粉量分析の希釈率を示します。

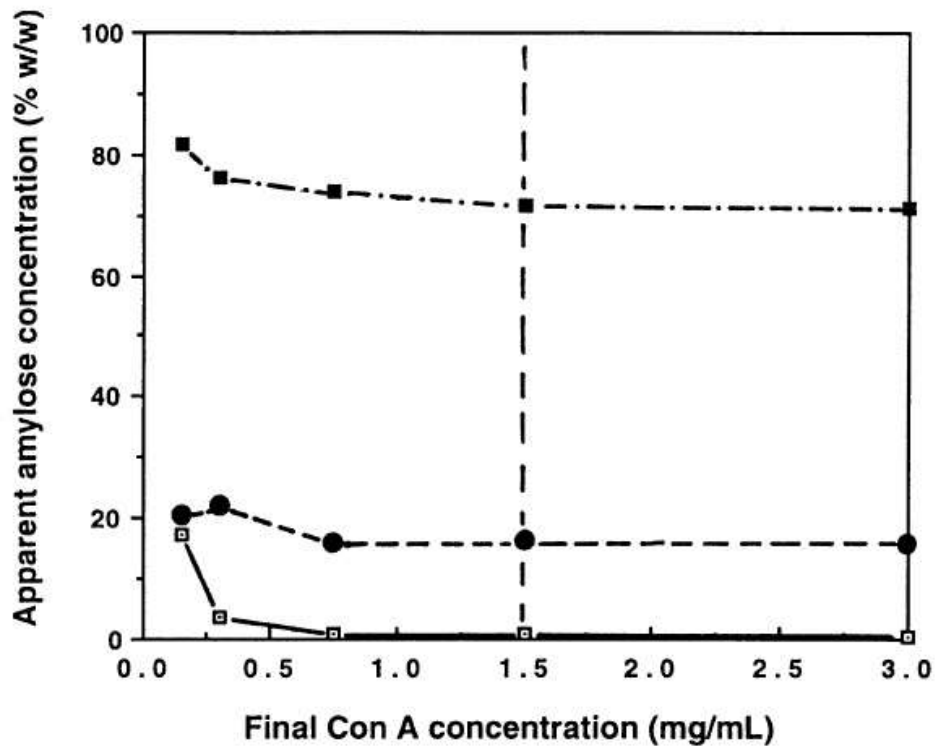


図1. 改良ConA法による澱粉試料中のアミロース定量におけるConA濃度の影響
 ■ = 高アミローストウモロコシ澱粉 (74.4%w/w アミロース)、● = 米澱粉 (16.9%w/w アミロース)、□ = トウモロコシ澱粉 (1.9%w/w アミロース)。縦破線は採用された濃度を表す。

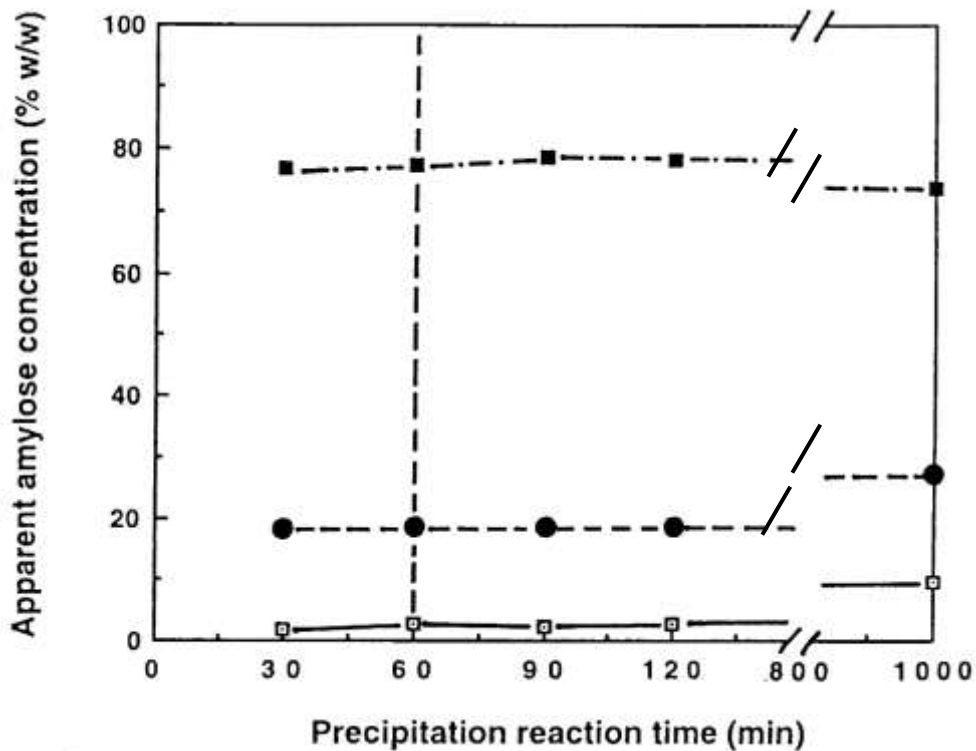


図2. 改良ConA法による澱粉試料中のアミロース定量における沈殿反応時間の影響
 ■ = 高アミローストウモロコシ澱粉 (74.4%w/w アミロース)、● = 米澱粉 (16.9%w/w アミロース)、□ = トウモロコシ澱粉 (1.9%w/w アミロース)。縦破線は採用された濃度を表す。

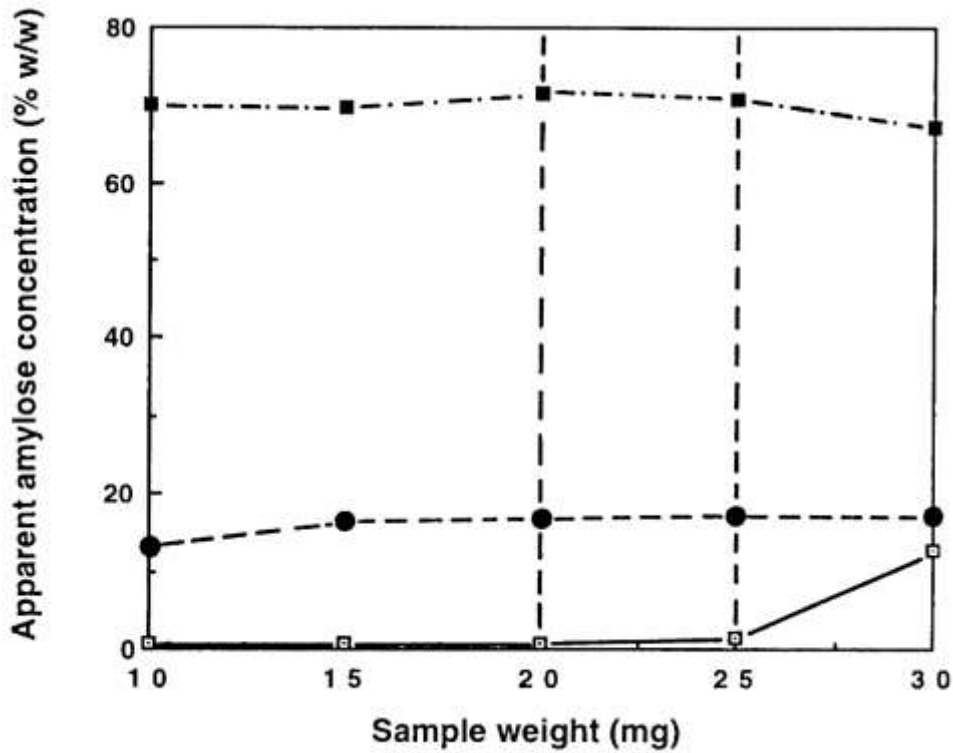


図3. 改良ConA法による澱粉試料中のアミロース定量におけるサンプル量の影響
 ■ = 高アミローストウモロコシ澱粉 (74.4%w/w アミロース)、● = 米澱粉 (16.9%w/w アミロース)、□ = トウモロコシ澱粉 (1.9%w/w アミロース)。縦破線は採用された濃度を表す。

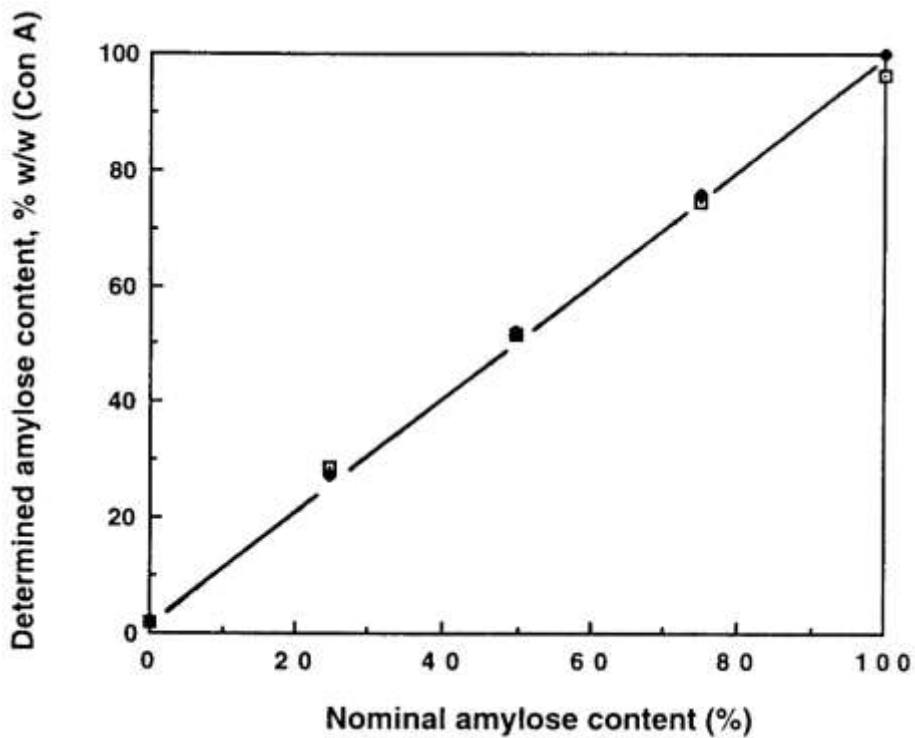


図4. 改良ConA法によるアミロース／アミロペクチン混合品の標準曲線
 回帰式は $y = 0.956x + 3.259$ 、相関係数は 0.999 です。表示アミロース含有量はICNバレイショ澱粉 (約 100%w/w アミロース) とワキシートウモロコシ澱粉 (約 0%w/w アミロース; ヨウ素滴定法による) の混合割合に基づく推測値。マーカーはそれぞれ2連で分析した平均値を示す。

文献 - REFERENCES -

1. Juliano, B. O. (1971). A simplified way for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today*, **16**, 334-338.
2. Berry, C. S., l'Anson, K., Miles, M. J., Morris, V. J. & Russell, P. L. J. (1988). Physical chemical characterization of resistant starch from wheat. *J. Cereal Sci.*, **8**, 203-206.
3. Sievert, D. & Pomeranz, Y. (1989). Enzyme resistant starch I. Characterization by enzymatic, thermoanalytical, and microscopic methods. *Cereal Chem.*, **66**, 342-347.
4. Tester, R. F. & Morrison, W. R. (1990). Swelling and Gelatinization of Cereal Starches. I. Effects of Amylopectin, Amylose, and Lipids. *Cereal Chem.*, **67**, 551-557.
5. Leloup, V. M., Colonna, P. & Buleon, A. (1991). Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties. *J. Cereal Sci.*, **13**, 1-13.
6. Matheson, N. K. (1971). Amylose changes in the starch of developing wheat grains. *Phytochem.*, **10**, 3213-3219.
7. Morrison, W. R. & Laignet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.*, **1**, 9-20.
8. Knutson, C. A. (1986). A Simplified Colorimetric Procedure for Determination of Amylose in Maize Starches. *Cereal Chem.*, **63**, 89-92.
9. Chrastil, J. (1987). Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. *Carbohydr. Res.*, **159**, 154-158.
10. International Organisation for Standardisation (1987). **ISO 6647:1987E**. Rice: determination of amylose content.
11. Gibson, T. S., Solah, V. A. & McCleary, B. V. (1996). A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with Concanavalin A. *J. Cereal Science*, **25**, 111-119.
12. Matheson, N. K. & Welsh, L. A. (1988). Estimation and fractionation of the essentially unbranched (amylose) and branched (amylopectin) components of starches with Concanavalin A. *Carbohydr. Res.*, **180**, 301-313.
13. Yun, S. H. & Matheson, N. K. (1990). Estimation of Amylose Content of Starches after Precipitation of Amylopectin by Concanavalin-A. *Starch/Starke*, **42**, 302-305.

謝辞： このブックレットの記載手順は、NSW（オーストラリア・ニューサウスウェールズ州）農業局の生物学的化学研究所と共同で開発しました。
またこの分析法の開発中に N. K. Matheson 教授と多くの貴重な議論が出来たことを感謝しております。

日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル
TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)

E-mail : info@biocon.co.jp

Homepage : <http://www.biocon.co.jp>

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません