

Megazyme

損傷澱粉分析法

STARCH DAMAGE

ASSAY PROCEDURE

K-SDAM 06/18

K-SDAM

(用手法 200 回分)

AACC Method 76-31.01

ICC Method No. 164

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

小麦の粉碎は、小麦粉の澱粉顆粒の一部に物理的な損傷を引き起こします。澱粉の損傷レベルは、粉の吸水性並びに生地との混合特性に直接影響を及ぼすため、加工技術として重要です。さらに損傷した顆粒は急速に吸水するため、 α -および β -アミラーゼによって加水分解され、微生物が発酵可能な糖を生成します。伝統的な長時間発酵法の後期段階では、小麦粉中に存在する天然の糖が酵母によって発酵され、損傷澱粉の加水分解により生成されたマルトースは、さらなる発酵に利用されます。これらの発酵性糖がなければガス発生が不十分となり、パンのかさが小さく、硬くなってしまいます。

澱粉の損傷度を測定するための方法は、抽出法(「ブルーバリュー(BV)」法)、色素染色法、NIR法および酵素消化法の4つに大まかに分類することができます。これらのうち、酵素消化法が一般に用いられます。この方法では α -アミラーゼ、 β -アミラーゼまたはこれらの酵素を組み合わせ用いられ、穀類およびカビの α -アミラーゼ調製物が粗麦芽抽出物または粗発酵培養液として用いられています。加水分解度はフェリシアン化物滴定法やジニトロサリチル酸(DNS)法などの非特異的な還元糖法を用いて伝統的に測定されてきました。

原理 - PRINCIPLE -

本法では損傷澱粉顆粒に吸水させた後、精製カビ α -アミラーゼによる制御された処理によりマルトオリゴ糖と α 制限デキストリンに加水分解します。カビ α -アミラーゼ処理は、損傷を受けていない澱粉顆粒の破壊を最小限に抑えながら、損傷顆粒をほぼ完全に分解できるように設計されています。希硫酸添加により反応を停止し、過剰量の精製アミログルコシダーゼ処理によりデキストリンがグルコースにまで完全に分解されます。グルコースは高純度グルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ混合試薬により特異的に測定され、分析値は小麦粉の正味重量当たりの澱粉損傷度%として表示します。

正確さ - ACCURACY -

弊社実験室内では標準誤差3%未満が日常的に達成されています。研究所間相互評価の結果は本書ページ5に要約しています。

キット - KITS -

200 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:** カビ α アミラーゼ(10mL、1,000 Ceralpha*U/mL、pH 5.4、40°C)。硫酸アンモニウム懸濁液。4°Cで3年以上安定です。
* メガザイムから測定キットを提供しております(**K-CERA**)。
- ボトル2:** アミログルコシダーゼ(4mL、200 U**/mL、pH4.5、40°C)。硫酸アンモニウム懸濁液。4°Cで3年以上安定です。** 可溶性澱粉基質
- 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+パーオキシダーゼおよび4-アミノアンチピリン含有。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル5:** D-グルコース標準溶液(5mL、1.5mg/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:** 小麦粉標準品。ラベルに澱粉の損傷レベルが記載。室温で5年以上安定です。

試薬溶液／懸濁液の調製法

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. ボトル1の内容物を完全に再懸濁した後、1.0mL を 100mM 酢酸緩衝液 (pH5.0、5mM 塩化カルシウム含有) で 20mL に希釈します。適量ずつポリプロピレンチューブに小分けして凍結保存します。-10℃以下で3年以上安定です。なお分析中は氷冷しておきます。
2. ボトル2の内容物 1.0mL を 100mM 酢酸緩衝液で 10mL に希釈します(試薬1)。-10℃以下で3年以上安定です。
3. ボトル3(GOPOD試薬緩衝液)の内容物全量を蒸留水で 1L に希釈します(溶液3)。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℃で約3ヶ月、-10℃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。
試薬を新しく調製した際に、試薬が淡く黄色~ピンク色を呈していることがあります。着色は4℃で2~3ヶ月保存している間に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. ボトル5と6は付属のものをそのまま使用して下さい。室温で5年以上安定です。

試薬の調製法 (キット提供外) - REAGENTS (NOT SUPPLIED) -

1. 酢酸緩衝液(100mM、pH5.0)、塩化カルシウム(5mM)含有
 - 蒸留水 900mL に氷酢酸(1.05g/mL) 5.7mL を加えます。2M(8g/100mL)水酸化ナトリウム溶液を注意深く加えて pH を 5.0 に調整します。(約 60mL 必要)
 - 塩化カルシウム二水和物 0.74g を加えて溶解後、1L に定容します。
4℃で6ヶ月間以上安定です。
2. 希硫酸(0.2%v/v)
蒸留水 998mL に、濃硫酸 2.0mL を注意深く添加します。室温で2年以上安定です。
(防護メガネ等を着用して下さい)

器具（推奨）： - EQUIPMENT (RECOMMENDED) -

1. ガラス試験管（丸底、16×100mm、12mL 容）。
ガラス遠心管（16×120mm；12mL 容の厚手のもの）
2. マイクロピペッター、100 μ L（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[®]
 - Combitip[®] 5.0mL（アミログルコシダーゼ溶液 0.1mL 分注用）
 - Combitip[®] 12.5mL（カビ α -アミラーゼ溶液 1mL 分注用）
 - Combitip[®] 50mL（希硫酸 8.0mL およびGOPOD試薬 4.0mL 分注用）
4. 卓上型遠心分離機（3000rpm、約 1,000g 対応のもの）。（4ページの「注意」を参照）
5. 分析用天秤
6. 分光光度計（510nm に設定）
7. ボルテックスミキサー
8. 恒温水槽（40 $^{\circ}$ C設定）
9. 実験室用タイマー（ストップウォッチ）

コントロールと注意事項：

1. 小麦粉試料とカビ α -アミラーゼとの反応時間は厳密に10分間としなければなりません。
 - アミログルコシダーゼとの反応時間は厳密ではありませんが、少なくとも10分間は必要です。
 - GOPOD試薬との反応時間は厳密ではありませんが、少なくとも20分間は必要です。発色物は40 $^{\circ}$ Cで少なくとも2時間安定です。
2. 分析手順ステップ4では、粉体の凝集を防ぐため、 α -アミラーゼ添加時に試験管と内容物を直ちにかつ激しく攪拌することが重要です。
3. 分析手順ステップ5では、サンプルを試験管の底の部分に分注することが重要です。これにより、試料がアミログルコシダーゼと確実に混合することができます。
4. 分析セットごとに、試薬ブランクとグルコース標準(150 μ g)を2連で用意して下さい。
 - 試薬ブランク… 酢酸緩衝液 0.2mL + GOPOD試薬 4.0mL
 - グルコース標準… 酢酸緩衝液 0.1mL + グルコース標準液 (150 μ g/0.1mL) 0.1mL + GOPOD試薬 4.0mL

グルコース標準液は 0.2%安息香酸溶液で調製されており、室温で保存可能です

5. 各分析セットには、小麦粉標準品を少なくとも1点同時に測定する必要があります。
6. 酵素調製液はクロスコンタミネーションしない（お互いに混じり合わない）よう留意して下さい。

NOTE :

1. 卓上型遠心分離機が利用できない場合、希硫酸添加後の懸濁液を Whatman No.1 濾紙または Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過することができます。
2. 丸底ガラス試験管を推奨します。円錐形試験管では、混合が上手く行かなかつたり試料が凝集したりします。またポリカーボネート試験管では、温度が均一にならない可能性があります。
3. 分析手順のステップ4では試料の一部が試験管の側面に付着することがありますが、分析精度には影響しません。
4. GOPOD試薬は低温保管することを推奨します。これにより試薬の寿命が長くなります。
5. マルチディスペンスピペッターを使用すると、多検体分析時の作業時間を大幅に短縮します。またこれらのディスペンサーは分析再現性および利便性を向上させます。
6. 澱粉損傷レベルが非常に高い試料では 510nm の吸光度がグルコース標準品の値を超えることがあります。この場合、分析手順ステップ4の反応液を水で適宜希釈し、分析手順ステップ5から再測定して下さい。

分析手順 : - ASSAY PROCEDURE -

1. 小麦粉または糊化澱粉粉碎品試料を、ガラス遠心管 (16×120mm; 12mL 容の厚手のもの) に 100±10mg 精秤します。
2. 試料が入った遠心管を40℃で約5分間予熱します。
3. カビ α-アミラーゼ溶液 (50 U/mL) を小さなビーカー等に入れ、40℃で約5分間予熱します。
4. 予熱したカビ α-アミラーゼ溶液 (50U/mL) 1.0mL を各遠心管に加え、ボルテックスミキサーで約5秒間攪拌し、酵素の添加から正確に10分間、40℃で加温します。
5. α-アミラーゼ添加から正確に10分後、各遠心管に希硫酸 (0.2%v/v) 8.0mL を添加し、約5秒間激しく攪拌します。これにより酵素は不活性化し、反応が停止します。
6. 遠心管を 3,000 rpm (1,000 g) で5分間遠心分離するか、スラリーをワットマン No.1 (9 cm) 濾紙で濾過します。
7. 上清 (または濾液) 0.1mL を試験管底部に分取します (2連)。
8. 各試験管にアミログルコシダーゼ溶液 (2 U) 0.1mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、40℃で10分間加温します。
9. 各試験管 (グルコース標準および試薬ブランク入りの試験管を含む) にGOPOD試薬 4.0mL を加え、40℃で20分間加温します。
10. 試薬ブランクを対照にして、510nm の吸光度を測定します。

澱粉損傷度の算出 - CALCULATION OF STARCH DAMAGE LEVEL -

$$\begin{aligned}\text{澱粉損傷度\%} &= \Delta E \times F \times 90 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta E \times F/W \times 8.1\end{aligned}$$

ここで:

ΔE	=	ブランクを対照とした反応液の吸光度
F	=	$\frac{150 \text{ (グルコース } \mu\text{g)}}{\text{吸光度(グルコース } 150\mu\text{g)}}$ (吸光度を μg に換算)
90	=	液量の換算 (0.1mL \rightarrow 9.0mL)
1/1000	=	$\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算
100/w	=	澱粉損傷度の小麦粉当たりの%表記
w	=	小麦粉試料の秤量正味重量(mg)
162/180	=	グルコースのアンヒドログルコース(澱粉内の構造様式)換算

標準的な分析法との関連

1. SD%(AACC 76-30A 法) = $1.4 \times \text{SD\% (メガザイム)} - 0.09$ (r = 0.99; n = 21)
2. SD%(ウースター法) = $1.2 \times \text{SD\% (メガザイム)} + 0.5$ (r = 0.99; n = 21)
3. SD%(ファラン法) = $5.2 \times \text{SD\% (メガザイム)} - 10.3$ (r = 0.98; n = 26)
4. SD%(バーンズ法) = $1.5 \times \text{SD\% (メガザイム)} + 0.44$ (r = 0.96; n = 45)

メガザイム法の研究所間評価

AOAC INTERNATIONAL ガイドラインに従って、10試料に対し24の研究所間相互評価を分割レベル (Youden Pairs) で行いました。結果は、Australian Standard 2850-1986 (ISO 5725 に基づく) に従って統計的に解析しました。研究所内の変動係数 (%) は、2.9 から 6.8 の範囲であり、研究所間の変動係数 (%) は、研究所相互間で 5.0 から 10.3% の範囲でした。また澱粉の損傷度が最も低い試料について、変動係数が最も高いという結果が得られました。

これらの結果に基づいて、この手順は、オーストラリアロイヤル化学研究所 (RACI) の穀物化学部門と米国穀物化学者協会に承認されました (AACC 法 76-31.01)。またこの方法は、国際穀物科学技術協会によって評価され、承認されています (ICC 法 No.164)。

文献

1. Gibson, T. S., Al Qalla, H. & McCleary, B. V. (1991). An improved enzymatic method for the measurement of starch damage in wheat flour. *J. Cereal Sci.*, **15**, 15-27.
2. Gibson, T. S., Kaldor, C. J. & McCleary, B. V. (1993). Collaborative evaluation of an enzymic starch damage assay kit. *Cereal Chem.*, **70**, 47-51.
3. Evers, A. D. & Stevens, D. J. (1985). Starch Damage, "Advances in Cereal Science and Technology", Vol. VII. (Pomeranz, Y. Ed.), American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, pp. 321-349.

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