

# ドライケミストリーによる 小麦 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法の開発

川崎 和也\* , 寺島 薫\*

## Development of FUJI DRI-CHEM $\alpha$ -AMY Slide for the Determination of $\alpha$ -Amylase Activity in Wheat Grains

Kazuya KAWASAKI\* and Kaoru TERASHIMA\*

### Abstract

The  $\alpha$ -amylase activity in wheat grains, one of the important quality indices of wheat, can be determined with an automatic analyzer that is based on wet chemistry and that has been introduced in the field of wheat grains assessment. However, this analyzer requires time-consuming sample preparation prior to the analysis.

To provide an easier and rapider analyzing method, Fuji Photo Film has developed FUJI DRI-CHEM (FDC)  $\alpha$ -AMY Slide for the determination of the  $\alpha$ -amylase activity in wheat grains. Common to all the FUJI FDC Slides, this Slide incorporates all the reagents required for the analysis based on dry chemistry.

In the  $\alpha$ -amylase activity determination, it is desirable to conduct reaction at the optimum pH for  $\alpha$ -amylase where its activity is the maximum. But p-nitrophenol (PNP) as the detector dye exhibits a small molar extinction coefficient at that pH. To raise the sensitivity, the following two techniques have been introduced to the  $\alpha$ -AMY recipes.

(1) Reduction of the apparent pKa of PNP by using a mordant, and

(2) Optimization of the NaCl and CaCl<sub>2</sub> concentrations for the stabilization of  $\alpha$ -amylase in the extract.

The  $\alpha$ -amylase activity determination system comprising  $\alpha$ -AMY Slide described above, the FDC analyzer and related instruments were applied to some wheat samples in Hokkaido. The correlation between the data obtained with this dry chemistry system and those with the conventional Ceralpha method based on wet chemistry proved fairly good. Our dry chemistry system has various advantages including little need for complicated pre- and post-analysis operations and no waste water formation.

### 1. 開発の背景

小麦の品質指標として、でんぷん粘度測定器であるアミログラフの最高粘度(以下、アミロ値と称する)がある<sup>1)</sup>。このアミロ値が300B.U.(Brabender Unit)以下まで低下した、いわゆる低アミロ小麦は、その後の加工適性が著しく悪化するため大きな問題となる。また、正常な小麦に低アミロ小麦が混入すると、全体のアミロ値が大きく低下するため、受け入れ段階で正常な小麦と低アミロ小麦を仕分けして、乾燥、流通させる必要がある。

この仕分け流通のためには、アミログラフによる粘度測定が最も基本であるが、測定に30分以上もかかる。

アミログラフに比べて、少量サンプルで短時間に測定可能なフォーリングナンバーの導入が進み、これをもとにした小麦の仕分けが行われている。しかし、これらの方法では前処理として小麦の乾燥と粉砕が必要であることから、決して迅速な測定法とは言えない。

小麦の低アミロ化は、収穫期における小麦中の発芽関連酵素の活性が上昇することにより起こり、その酵素のひとつである  $\alpha$ -アミラーゼによるでんぷんの分解が主要因である。 $\alpha$ -アミラーゼ活性とアミロ値およびフォーリングナンバー値の間には高い相関関係が認められることから、 $\alpha$ -アミラーゼ活性をもとにアミロ値を推定して、小麦を乾燥前の生麦の段階で仕分ける試みがなされている。

北海道農協では、検査現場に  $\alpha$ -アミラーゼ活性自動測定装置の導入が進められているが、多数の試料を集中して取り扱うため、複雑な操作のない、より簡便で迅速なシステムの開発が強く望まれている<sup>2)</sup>。

本誌投稿論文(受理2002年10月18日)

\*富士写真フイルム(株)朝霞研究所

〒351-8585 埼玉県朝霞市泉水3-11-46

\*Asaka Research Laboratories

Fuji Photo Film Co., Ltd.

Senzui, Asaka, Saitama 351-8585, Japan

一方、われわれは、臨床検査分野において、高信頼性のもと、簡便で迅速に検査結果を提示できるシステムとして、富士ドライケム(以下、FDCと略す)を開発し、広く用いられてきている。この方法は、ドライケムストーリー法と呼ばれ、特定の化学反応に必要な試薬が乾燥状態で用意され、それに検体が添加されると検体中の水分を溶媒として、試薬が含まれるマトリックス中で反応が進行する分析法である<sup>3)</sup>。したがって、1)試薬、反応容器および反応セルが不要 2)試薬調製が不要 3)操作としては、検体を試薬が含まれるスライドに点着することだけであり、まさに、簡便・迅速検査システムといえる。

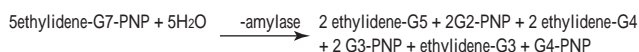
そこで、今まで臨床検査分野に適用してきたFDCを、臨床検査と同様に簡便、迅速が求められる農業分野へ適用して、ドライケムストーリー法による小麦 -アミラーゼ活性測定法の開発を行ったので紹介する。

## 2. 開発のポイント

### 2.1 測定原理の選定

-アミラーゼ活性測定法には種々の方法があるが、FDCアナライザーに適用可能な可視光を利用した比色法としては、主に色素でんぷんを利用する方法、還元末端に色素を修飾した合成オリゴ糖を用いる方法がある。小麦中には、-アミラーゼに加え、-アミラーゼが含まれるので、-アミラーゼの影響を回避するために、非還元末端をブロックした色素修飾合成オリゴ糖を用いる方法<sup>4)</sup>を選択した。

これは、従来、小麦 -アミラーゼ活性測定に使用されている方法(Ceralpha法)と同じ測定原理であり、以下に示すとおりである。



ethylidene-G7-PNP	: 4,6-Ethylidene-4-nitrophenyl-	-D-maltoheptaoside
ethylidene-G5	: 4,6-Ethylidene-	-D-maltopentaoside
ethylidene-G4	: 4,6-Ethylidene-	-D-maltotetraoside
ethylidene-G3	: 4,6-Ethylidene-	-D-maltotrioside
G2-PNP	: 4-Nitrophenyl-	-D-maltoside
G3-PNP	: 4-Nitrophenyl-	-D-maltotrioside
G4-PNP	: 4-Nitrophenyl-	-D-maltotetraoside
PNP	: 4-Nitrophenol	

### 2.2 感度アップの検討

小麦の -アミラーゼは、至適pH(活性が最大となるpH)が5.4付近にある(Fig. 1)<sup>5)</sup>。一方、検出色素であるPNPは、イオン化型(ニトロフェノキシド)がFDCで検出可能な400nmに吸収極大を有するが、非イオン型(ニトロフェノール)は320nmに吸収極大を有し、400nmにはほとんど吸収をもたない。PNPのpKaは、約7.0であるため、中性付近では検出に寄与できるイオン化型は50%存在することになるが、-アミラーゼの至適pH5.4では、イオン化型はわずかに2%しかない(Fig. 2)<sup>6)</sup>。つまり、pH = 5.4での測定では、生成した色素のうち2%しか感度に寄与しないことになる。

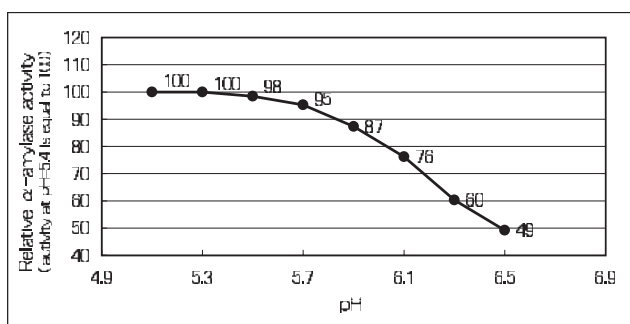


Fig. 1 pH activity curve for malted wheat.

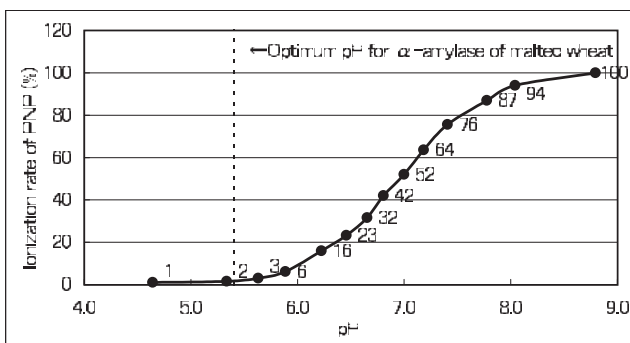


Fig. 2 Effect of pH on the ionization of PNP.

したがって、感度の観点からは、-アミラーゼの反応は、pH=5.4付近で行わせ、アルカリ側で検出することが望まれる。実際、上記のCeralpha法では、反応はpH=5.4付近で行わせ、一定時間後、アルカリ添加して反応を停止させるとともに検出を行っている。

しかしながら、検体点着の1回の操作で、結果を提供するFDCにおいては、別の手段が必要となる。そこで、感度アップの手段として、次の2点の施策を盛り込んだ。

#### 2.2.1 媒染剤の適用

検出色素であるPNPは、-アミラーゼの至適pH5.4付近では、感度に関与するイオン化型がわずか2%であるため、パラニトロフェノール/パラニトロフェノキシドの平衡を右側に寄せる(見かけのpKaを下げる)手段として、媒染剤の添加の検討を行った。Fig. 3に示すように、媒染剤の添加により、現実に見かけのpKaを1.0低下させることができた。

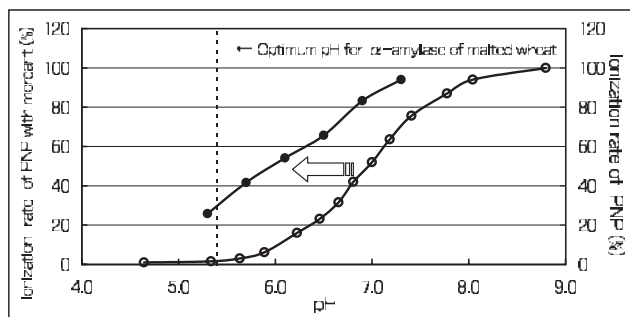


Fig. 3 Effect of the mordant on the ionization of PNP.  
Ionization rate of PNP with mordant  
Ionization rate of PNP without mordant

さらに媒染剤を含むpHの異なるスライドにて、 $\alpha$ -アミラーゼ活性のpH依存性の確認を行った(Fig. 4)。その結果、感度上はpH=6.1が最適であることが判明した。pH=6.1よりもpHが低い領域では、PNPのイオン化率の低下が影響し、また、pH=6.1よりもpHが高い領域では、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の低下が影響し、感度が低下すると考えられる。

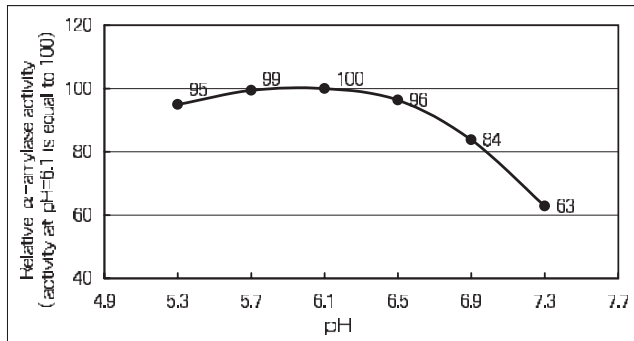


Fig. 4 pH dependence of  $\alpha$ -amylase in  $\alpha$ -AMY Slide.

一方、共役酵素である $\alpha$ -グルコシダーゼの等電点は、pH=6.0付近にあるため、塗布液の保存安定性を考慮して、2番目に感度の高いpH=6.5に系のpHの設定を行った。

### 2.2.2 塩濃度 (NaCl, CaCl<sub>2</sub>)

小麦中の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定するためには、小麦を粉碎し、溶液中に $\alpha$ -アミラーゼを抽出することが必要となる。 $\alpha$ -アミラーゼには、安定化および活性化因子として、CaCl<sub>2</sub>およびNaClが知られている。通常、人由来のアミラーゼ活性測定においては、それぞれ、1.0 ~ 10mM, 2.0 ~ 50mM程度添加されている。ところが、小麦アミラーゼの場合、活性化因子としての寄与はほとんどなく(Fig. 5)、安定化因子として寄与していることが判明した(Fig. 6)。そこで、安定化に必要な最低量として、0.003mM $\cdot$ CaCl<sub>2</sub>, 0.13mM $\cdot$ NaClを添加することに決定した。

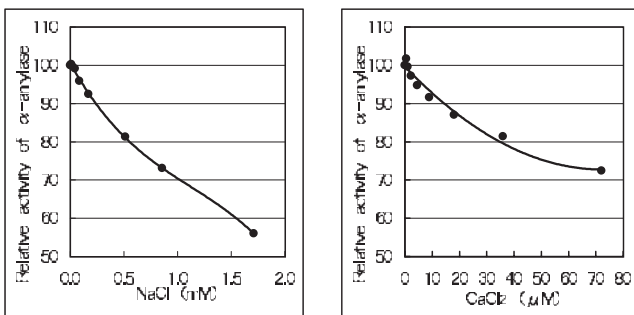


Fig. 5 Effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> concentrations in the extract on  $\alpha$ -amylase activity.

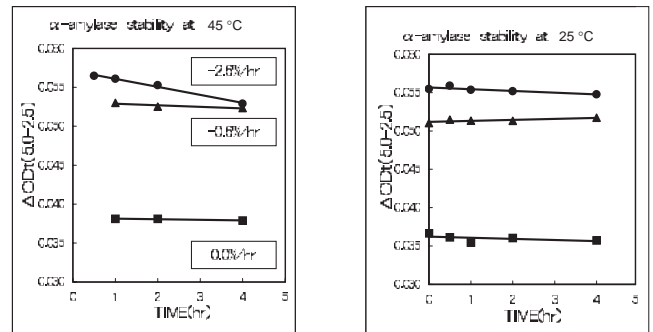


Fig. 6 Effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> in the extract on  $\alpha$ -amylase stability.

Temporal change of  $\alpha$ -amylase activity without NaCl and CaCl<sub>2</sub>

Temporal change of  $\alpha$ -amylase activity with 0.86mM $\cdot$ NaCl and 18  $\mu$ M $\cdot$ CaCl<sub>2</sub>

Temporal change of  $\alpha$ -amylase activity with 0.09mM $\cdot$ NaCl and 2  $\mu$ M $\cdot$ CaCl<sub>2</sub>

## 2.3 スライド層構成

$\alpha$ -AMY スライドの層構成を Fig. 7 に示す。

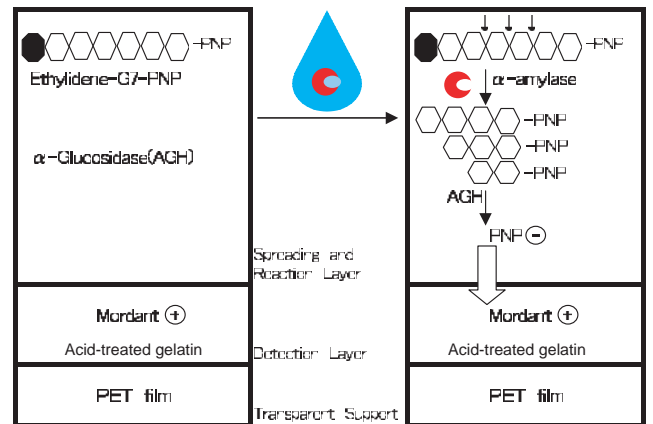


Fig. 7 Structure and reaction scheme of FUJI DRI-CHEM  $\alpha$ -AMY Slide.

ポリエチレンテレフタレート的光透過性支持体上に、媒染剤を含む吸水層、基質、共役酵素およびバッファーを含む展開反応層の2層から構成されている。展開反応層に試料である麦抽出液が点着されると、試料は、展開層で均一に展開され、基質である ethylidene-G7-PNP と、共役酵素である $\alpha$ -グルコシダーゼが溶解され、反応が進行する。

すなわち、基質である ethylidene-G7-PNP に $\alpha$ -アミラーゼが作用すると、基質中央付近の $\alpha$ -1,4-グルコシド結合が切断され、主にG2-PNPとG3-PNPが生成する。さらにこれらは、 $\alpha$ -グルコシダーゼの作用を受け、PNPを生成する。生成したPNPは媒染剤の作用を受けて、吸水層へと拡散する。この吸水層に拡散したPNPの生成速度を、400nmにおける2.5分から5.0分の反射ODの変化よりもとめ、アナライザーに内蔵された検量線より $\alpha$ -アミラーゼ活性に変換される。

### 3. システムの概要

小麦  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定システムは、 $\alpha$ -AMY スライド、FDC アナライザー (FDC3500A)、および関連機器よりなる。

関連機器には、小麦から  $\alpha$ -アミラーゼを抽出するための前処理機 (小麦懸濁液をホモジナイズする装置) およびホモジナイズされた小麦懸濁液より上澄みをとるための遠心分離装置がある。小麦  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定手順は、以下のとおりである。

- 1) 抽出液 (0.003mM $\cdot$ CaCl<sub>2</sub>, 0.13mM $\cdot$ NaCl を含む) 600ml を計量する (25秒)
- 2) あらかじめ計量しておいた小麦試料 100g を上記抽出液に添加する (5秒)
- 3) 小麦試料を添加した抽出液を前処理機にて 9000rpm でホモジナイズする (1分)
- 4) ホモジナイズした抽出液の一部をサンプルチューブに移し、13000rpm で遠心分離する (1分)
- 5) 遠心分離したサンプルチューブを FDC アナライザーにセットする (10秒)
- 6) アナライザーに  $\alpha$ -AMY スライドと富士クリーンチップをセットし、スタートキーを押す (20秒)
- 7) アナライザー内で約 10秒ごとに 400nm における反射 OD を測定し、内蔵検量線より  $\alpha$ -アミラーゼ活性を算出する (初期動作 $\cdot$ 約 1分、測定時間 $\cdot$ 5分)

以上のように、1測定あたり約 9分で結果が得られるシステムを完成させた。実際には、アナライザーに測定セルが 6つあるため、並行作業により、1時間あたり約 40測定が可能である。

### 4. システムの有効性の確認

#### 4.1 従来法 (Ceralpha 法) との相関

今回開発したシステムの有効性を確認するために、現場試料にて従来法との相関を確認した。現場試料としては、システムの概要で示した方法により、北海道産小麦 $\cdot$ 2品種 (ホクシン、ハルユタカ) 90 試料を調製した。従来法としては、メガザイム社製キットを用いて、試薬及び試料濃度がキットと一致するように調製し、日立 7170 自動分析装置にて測定した。

相関テストの結果を Fig. 8 に示す。

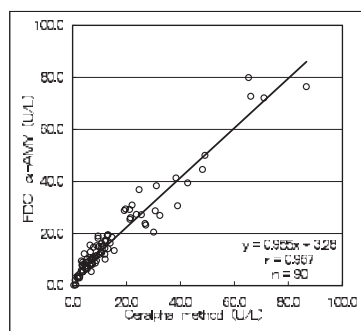


Fig. 8 Correlation of the data with FDC  $\alpha$ -AMY Slide and those with Ceralpha method.

従来法と本法である  $\alpha$ -AMY スライドとの間には、相関係数 ( $r$ ) = 0.967 の良好な相関が認められた。ここで、約 50U/L 以下を正常な小麦、それ以上を低アミロ小麦のおそれがあると判定している。

#### 4.2 同時再現性の確認

繰り返し測定した場合のバラツキの程度が許容レベルかどうかの確認を行った。4.1 と同様に調製された 3 試料を用いて、10 回繰り返し測定した結果を Table 1 に示す。どの濃度レベルにおいてもバラツキの尺度である CV 値は 2.5% 以下であり、正常小麦と低アミロ小麦の判別に対しては、十分許容できるレベルにあることが確認できた。

Table 1 Reproducibility in the Measurement with FDC  $\alpha$ -AMY Slide for Wheat Grains Samples.

	sample 1	sample 2	sample 3
1	25.8	42.9	106.4
2	25.2	42.7	108.3
3	25.4	42.1	104.2
4	25.0	42.1	107.7
5	25.2	40.6	107.6
6	25.2	41.9	110.6
7	25.1	43.1	105.3
8	25.8	42.7	110.7
9	25.8	42.8	111.8
10	26.0	42.2	110.3
average (U/L)	25.5	42.3	108.3
SD (U/L)	0.36	0.71	2.53
CV (%)	1.43	1.68	2.34

### 5. まとめ

臨床検査分野で簡便 $\cdot$ 迅速を特長として活用されてきた FDC システムの、小麦  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定への適用可能性を検討した。

小麦  $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定は、その至適 pH 付近で行うのが好ましいが、その pH のもとでは、検出色素である PNP の (モル吸光係数) が小さいため、十分な感度がとれない。

検討の結果、1) 媒染剤の使用による PNP の見かけの pKa の低減 2)  $\alpha$ -アミラーゼの活性化と安定化の機能をもつ塩 (NaCl, CaCl<sub>2</sub>) 量の最適化により感度アップを図った。

上記の施策を導入した  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定システムは、従来の溶液法との相関が良好で、バラツキも許容レベルにあり、分析前後の操作が不要、廃液を出さないなどの特長を有しており、現場のニーズに適合したシステムであることが確認できた。

### 6. 謝辞

小麦  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定システムの開発においては、開発提案にはじまり、前処理装置の開発、現場への導入と、精力的に進められてきた富士フィルムメディカル 升田喜士氏に帰るところが大きく、この場をお借

---

りして深謝の意を表します。また、**相関テストに用いた現場試料(抽出処理液)の収集にご協力いただきました、静岡製機(株)電子事業部 増田英昭氏、深澤克彦氏に感謝致します。**

### 参考文献

- 1) 長尾精一．小麦の科学．朝倉書店, 1995, 127.
- 2) 一之瀬靖則, 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．日本作物学会紀事．70(4), 588-594 (2001).

- 3) 亀井幸子．ドライケミストリーとその展望．化学と生物．25, 379-387 (1987).
- 4) Krusen-Jarres, J.D.; Kaiser C. Evaluation of a new  $\alpha$ -amylase assay using 4,6- ethy lidene -4-nitrophenyl-  $\alpha$ -D-maltoheptaoside as a substrate. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27, 103-113 (1989).
- 5) ALPHA-AMYLASE ASSAY PROCEDURE Megazyme 17.
- 6) 臨床化学会夏季セミナー技術資料 1994 .

(本報告中にある“FUJI”、“DRI-CHEM”は富士写真フイルム(株)の商標です。)