

## 9 飼料用圧ぺんとうもろこし中の糊化度の吸光光度法による測定

八木 寿治<sup>\*1</sup>, 大島 慎司<sup>\*2</sup>, 堀米 明日香<sup>\*3</sup>, 福本 裕二<sup>\*4</sup>, 石黒 瑛一<sup>\*5</sup>,  
岩永 知子<sup>\*6</sup>, 末次 暁子<sup>\*6</sup>, 小泉 慶子<sup>\*6</sup>, 五十嵐 友二<sup>\*6</sup>, 瀧上 賢一<sup>\*6</sup>

### Measurement of Degree of Starch Gelatinization in Flaked Corn for Feeds by Absorption Spectroscopy

Toshiharu YAGI<sup>\*1</sup>, Shinji OSHIMA<sup>\*2</sup>, Asuka HORIGOME<sup>\*3</sup>, Yuji FUKUMOTO<sup>\*4</sup>,  
Eiichi ISHIKURO<sup>\*5</sup>, Tomoko IWANAGA<sup>\*6</sup>, Akiko SUETSUGU<sup>\*6</sup>, Keiko KOIZUMI<sup>\*6</sup>,  
Yuji IGARASHI<sup>\*6</sup> and Kenichi FUCHIGAMI<sup>\*6</sup>

(<sup>\*1</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Nagoya Regional Center),

<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Fertilizer and Feed Inspection Department,

<sup>\*3</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

(Now The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

<sup>\*4</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Kobe Regional Center Osaka Office),

<sup>\*5</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters (Now Japan Food Research Laboratories),

<sup>\*6</sup> Japan Food Research Laboratories)

A possibility of application of an improved analytical method for degree of starch gelatinization in flaked corn for feeds by absorption spectroscopy was examined.

Gelatinized starch in sample was decomposed to glucose by glucoamylase, and the glucose was colored by using glucose measurement kit. Absorbance of 505 nm for the colored glucose was measured by UV-visible spectrophotometer.

We studied technically three critical factors (Sample preparation, Enzyme deactivation time after the enzyme reaction and Difference of measured values for depending on the difference of the used enzyme) to optimize this analysis method.

A collaborative study with three samples was conducted to evaluate the accuracy of this method in 9 laboratories. As a result, the relative standard deviation of repeatability and reproducibility (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were in the range of 3.5~5.0%, and 6.6~11%, respectively.

Key words: 圧ぺんとうもろこし flaked corn ; デンプン starch ; 糊化 gelatinization ; グルコアミラーゼ glucoamylase ; グルコース glucose ; 吸光光度法 absorption spectroscopy ; 共同試験 collaborative study

<sup>\*1</sup> 独立行政法人肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター,

<sup>\*2</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部,

<sup>\*3</sup> (独) 肥飼料検査所本部, 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課,

<sup>\*4</sup> (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

<sup>\*5</sup> (独) 肥飼料検査所本部, 現 財団法人日本食品分析センター,

<sup>\*6</sup> (財) 日本食品分析センター

## 1 緒 言

高等動物にとって栄養素として重要なデンプンは、結晶構造の差異により  $\alpha$ -デンプンと  $\beta$ -デンプンに分類される。 $\beta$ -デンプンは結晶構造が硬く、 $\alpha$ -デンプンはデンプン分子の隙間に水分子が入り込むことで結晶構造が崩れたものであり、 $\beta$ -デンプンを加熱すると  $\alpha$ -デンプンになる<sup>1)</sup>。 $\alpha$ -デンプンは  $\beta$ -デンプンと比較して酵素による分解が容易<sup>2)</sup>で、デンプン中の  $\alpha$ -デンプンの割合を表したものが糊化 ( $\alpha$ 化) 度と呼ばれている。

デンプンは穀類中に多く含まれており、家畜の飼料原料として、とうもろこし、マイロ、大麦、ライ麦等が加熱圧ぺん加工されている。これらデンプンを  $\alpha$  化して消化性、栄養価、嗜好性を高めたものの配合飼料へ添加する割合が最近増加し、牛用配合飼料のほとんどは、 $\alpha$  化したフレーク状の圧ぺんとうもろこしが添加されており、種豚用及び子豚用飼料にも多用されている<sup>2)</sup>。

圧ぺんとうもろこしは飼料用輸入とうもろこしを原料として製造されることがあるが、この際、承認工場制度により関税上の優遇を受けることが可能である。当該制度の下では飼料用輸入とうもろこしが飼料用以外に使用されることを防止するため、当該とうもろこしを变形加工することが義務づけられ、加工後、糊化度が 30%以上であることの証明が求められている<sup>3)</sup>。しかし、糊化度の測定法には、ジアスターゼ法<sup>4)</sup>、グルコアミラーゼ法<sup>5)</sup>、 $\beta$ -アミラーゼ・プルラナーゼ (BAP) 法<sup>6)</sup>等多種の分析法が存在し、採用する分析法によっては結果に大きな違いが生じ、取り扱いに問題が生じるようになってきている。今般、公定分析法として分析法の統一化の要望が多数寄せられたため、食品分析法に記載されている「グルコアミラーゼ法」<sup>7)</sup>を (財) 日本食品分析センターが一部改良した分析法 (以下、「分析センター法」という。) を基に飼料分析基準<sup>8)</sup> (公定分析法) への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

市販の圧ぺんとうもろこしを供試試料とした。

### 2.2 試 薬

#### 1) デンプン溶液

可溶性デンプン 0.2 g を 100 mL のビーカーに入れ、水 50 mL を加えて煮沸し、放冷後、水で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えた。

#### 2) グルコース標準液

グルコース [ $C_6H_{12}O_6$ ] 0.1 g を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてグルコース標準原液を調製した (この液 1 mL はグルコースとして 1 mg を含有する.)。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中に 20~80  $\mu$ g を含有するグルコース標準液を調製した。

#### 3) 酢酸溶液

酢酸 60 g に水を加えて 500 mL とした。

#### 4) 酢酸緩衝液

酢酸ナトリウム三水和物 136 g を水に溶かして 500 mL とし、酢酸溶液で pH を 4.8 に調整した。

#### 5) 1 mol/L 酢酸緩衝液

酢酸緩衝液を水で 2 倍量に希釈した。

## 6) 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 40.0 g を水に溶かして 100 mL とした。

## 7) 発色液

グルコース C-II テストワコー（和光純薬工業製）の発色試液を用いた。なお、発色液調製法は取扱説明書に従った。

## 8) 酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液

グルコアミラーゼ 0.1 g (*Aspergillus niger* 起源, Megazyme 製) を 100 mL の全量フラスコに入れ、1 mol/L 酢酸緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えた（使用時に調製した。）。

## 9) グルコアミラーゼ溶液

以下の手順により、酵素力価が 1 mL あたり 2.63 U となるようにグルコアミラーゼ溶液を調製した。

U: グルコアミラーゼが可溶性デンプンに 37°C で作用する時、1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコースを生成する量を 1 単位 (U) とした。

## i) グルコース生成量の測定

デンプン溶液 4 mL を 25 mL の試験管に正確に入れ、37°C の恒温槽中で 10 分間予備保温した後、酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液 1 mL を正確に加えて 37°C で正確に 10 分間反応させた。その後、試験管を沸騰水浴中に正確に 8 分間入れて酵素を失活させた。放冷後 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えて酵素力価測定用溶液を調製した。

同時に、予め酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液を沸騰水浴中で 8 分間煮沸し酵素を失活させておいたものを用いて同一操作を行い、空試験溶液とした。

次に酵素力価測定用溶液 1 mL を 25 mL の試験管に正確に入れ、発色液 3 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37°C の恒温槽中で 5 分間放置した。その後、水を対照として波長 505 nm の吸光度を測定した。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正した。

同時に各グルコース標準液について、酵素力価測定用溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して酵素力価測定用溶液中のグルコース濃度 G ( $\mu$ g/mL) を求めた。

## ii) グルコアミラーゼの酵素力価の計算

次式により酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液 1 mL あたりの酵素力価 E (U/mL) を求めた。

$$E \text{ (U/mL)} = \frac{100 \times G}{180.16 \times 10}$$

## iii) グルコアミラーゼ採取量の算出

次式により 2.63 U/mL のグルコアミラーゼ溶液の調製に必要なグルコアミラーゼ採取量 A (g) を算出した。

$$A \text{ (g)} = \frac{B \times 2.63}{E}$$

B: 酵素力価測定用グルコアミラーゼ溶液調製時のグルコアミラーゼ採取量 (g)

## iv) グルコアミラーゼ溶液の調製

グルコアミラーゼ A (g) を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えた（使用時に調製した。）。

10) 特記する以外の試薬は特級、水はイオン交換水を用いた。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 超遠心粉碎機：Retsch 製 ZM-100
- 2) ボールミル粉碎機：CMT 製 TI-100
- 3) 試験管ミキサー：柴田科学製 TTM-1
- 4) ウォーターバス：東京理化機械製 SB-35
- 5) 恒温槽：太洋科学工業製 M-100<sup>N</sup>
- 6) 紫外可視分光光度計：島津製作所製 UV-240

### 2.4 試料の調製

試料 10 g を超遠心粉碎機を用いて、液体窒素による冷却を行いながら粒径 0.15 mm (100 mesh) 以下になるまで粉碎した。次に 250 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、エタノール 150 mL を加えてかき混ぜ、脱脂を行い、100×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を捨てた。次にアセトン 150 mL を加えて同様に処理し、一夜風乾させたものを試料溶液の調製に供する試料とした。

### 2.5 測定方法

#### 1) 試料溶液の調製

試料 100 mg を量って 25 mL の試験管に入れ、水 8 mL を正確に加え、試験管ミキサーを用いて均一な懸濁液を調製した。懸濁液 2 mL ずつを 25 mL の試験管 3 本に正確に分取しそれぞれ (S)、(R) 及び (R<sub>0</sub>) とした。(S) には、酢酸緩衝液 1.6 mL 及び水 0.4 mL を正確に加えた (全量は 4 mL となる。)(R) 及び (R<sub>0</sub>) には、振り混ぜながら水酸化ナトリウム溶液 0.2 mL を正確に加え、65°C の水浴で 5 分間加温し完全に糊化させ、水冷後、酢酸溶液 1.6 mL を正確に加えて中和し、更に水 0.2 mL を正確に加えて 4 mL とした。

(S)、(R) 及び (R<sub>0</sub>) を、あらかじめ 37°C の恒温槽で 10 分間予備保温した後、(S) 及び (R) にはグルコアミラーゼ溶液 1 mL を加え、(R<sub>0</sub>) にはあらかじめグルコアミラーゼ溶液を沸騰水浴中で正確に 8 分間煮沸し失活させておいたもの (失活グルコアミラーゼ溶液) 1 mL を正確に加え、ときどき振り混ぜながら 37°C の恒温槽で正確に 60 分間反応させた。その後、(S)、(R) 及び (R<sub>0</sub>) を沸騰水浴中に正確に 8 分間入れて酵素を失活させた。

放冷後、(S)、(R) 及び (R<sub>0</sub>) を水で 200 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加え、ろ紙 (5 種 B) でろ過してそれぞれ試料溶液 (S)、(R) 及び (R<sub>0</sub>) とした。

#### 2) 発色及び吸光度測定

試料溶液 (S)、(R) 及び (R<sub>0</sub>) 各 1 mL をそれぞれ別の 25 mL の試験管に正確に入れ、発色液 3 mL ずつを正確に加えて振り混ぜた後、37°C の恒温槽中で 5 分間放置した。その後、水を対照として波長 505 nm の吸光度を測定した。

#### 3) 計算

得られた各吸光度から次式により糊化度を求めた。

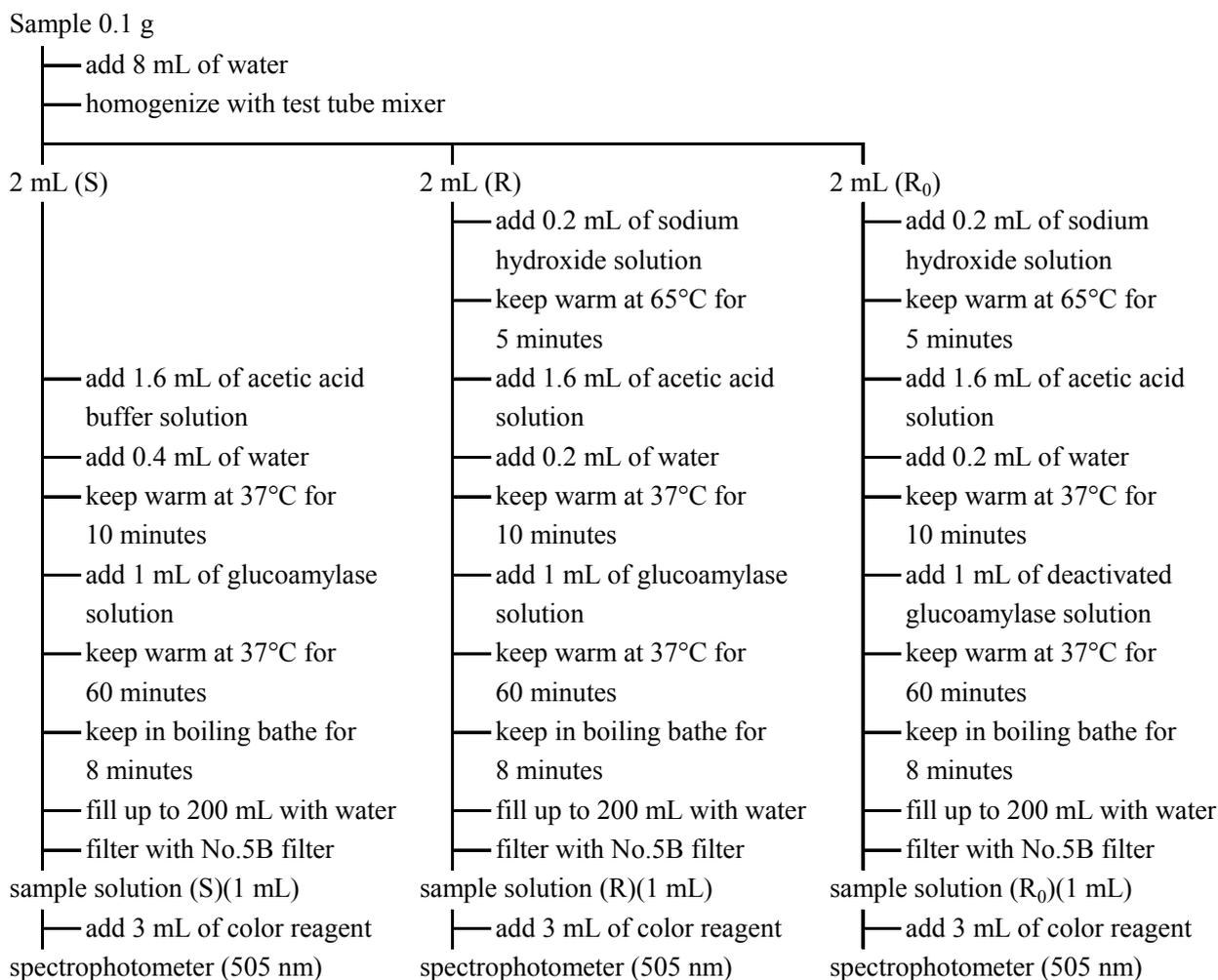
$$\text{糊化度 (\%)} = \frac{A_S - B_R}{A_R - B_R} \times 100$$

A<sub>S</sub> : 試料溶液 (S) の吸光度

A<sub>R</sub> : 試料溶液 (R) の吸光度

B<sub>R</sub> : 試料溶液 (R<sub>0</sub>) の吸光度

なお、測定法の概要を Scheme 1 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for measurement of degree of starch gelatinization**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 試料の調製方法の検討

試料の粒径が 0.15 mm (100 mesh) 以下であれば、粒度の不均一は糊化度の測定値の結果に影響を及ぼさないという報告<sup>9)</sup>もあることから、分析センター法では試料を粉砕機を用いて粉砕、次いで脱脂処理をした後、0.15 mm の網ふるいを通過したもののみを分析に供している。しかし、試料の種類が圧ぺんとうもろこしの場合では、外皮が硬いため試料を粉砕機にかけても、全量が 0.15 mm の網ふるいを通過するほど細かく粉砕できず、ふるい下には白色の胚乳部等、ふるい上には黄色の果皮部等が残り、大きく分けて 2 つの部位に分離された。

著者らは、ふるい下及びふるい上のこれら 2 つの部位について、糊化度の測定値の同一性に関して疑問を感じたため、糊化度に影響を与えないよう比較的発熱しないと言われているボールミル粉砕機を用いて粉砕を行い、脱脂処理・ふるいによる分離後、2.5 の測定方法に準じて糊化度を求めた (Table 1 試料 A, B)。

その結果、ふるい下 (試料 A) 及びふるい上 (試料 B) の糊化度は異なった値を示したことから、このことは、とうもろこしの部位の違いによるものと考えられた。

なお、ふるい上（試料 B）は 0.15 mm の網ふるいを通過しなかったため分析に供することができるように、液体窒素による冷却を行いながら試料の粒径が 0.08 mm（185 mesh）まで再粉碎を行った。

著者らは、圧ぺんとうもろこしの粒全体の糊化度を求めるために、超遠心粉碎機を用いて 0.08 mm 以下の粒度になるように粉碎を行い、脱脂処理した後、2.5 測定方法に準じて糊化度を求めた（試料 C）。また、熱の影響を避けるために、液体窒素による冷却を行いながら同様に粉碎、脱脂処理したもの（試料 D）との比較検討を行った（Table 1 試料 C, D）。

液体窒素による冷却を行わなかった試料は、冷却を行った試料に対して糊化度が高く測定された。これは、糊化度は 50°C 以上になると熱の影響を受けて変化する<sup>9)</sup>と言われており、今回、冷却を行わなかった試料は粉碎途中で摩擦による熱が発生し、糊化度が高くなったと考えられた。よって、粉碎を行う際には、液体窒素による冷却を行いながら、超遠心粉碎機を用いて粉碎を行う方法で試料の調製を行うこととした。

**Table 1 Comparison of  $A_S$ ,  $A_R$  and degree of starch gelatinization in sample preparing**

| Sample          |   | $A_S$ <sup>a)</sup> | $A_R$ <sup>b)</sup> | Degree of starch gelatinization (%) |
|-----------------|---|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
| A <sup>c)</sup> | 1 | 0.326               | 0.652               | 49.1                                |
|                 | 2 | 0.334               | 0.641               | 51.2                                |
|                 | 3 | 0.340               | 0.638               | 52.4                                |
| Mean (RSD)      |   | 0.333               | 0.644               | 50.9 (3.3)                          |
| B <sup>d)</sup> | 1 | 0.374               | 0.564               | 65.5                                |
|                 | 2 | 0.398               | 0.568               | 69.4                                |
|                 | 3 | 0.387               | 0.561               | 68.2                                |
| Mean (RSD)      |   | 0.386               | 0.564               | 67.7 (2.9)                          |
| C <sup>e)</sup> | 1 | 0.369               | 0.702               | 51.7                                |
|                 | 2 | 0.377               | 0.705               | 52.7                                |
|                 | 3 | 0.396               | 0.711               | 54.9                                |
| Mean (RSD)      |   | 0.381               | 0.706               | 53.1 (3.1)                          |
| D <sup>f)</sup> | 1 | 0.290               | 0.671               | 42.2                                |
|                 | 2 | 0.281               | 0.683               | 40.1                                |
|                 | 3 | 0.277               | 0.663               | 40.7                                |
| Mean (RSD)      |   | 0.283               | 0.672               | 41.0 (2.6)                          |

a) Absorbance of sample solution (S)

b) Absorbance of sample solution (R)

c) The sample passed 0.15 mm screen after crushing with ball mill and removing fat.

d) The sample that did not pass 0.15 mm screen after crushing with ball mill and removing fat, and that was recrushed to 0.08 mm under the condition of cooling with liquid nitrogen.

e) The sample passed 0.08 mm screen after crushing with super-centrifugal and disintegrator and removing fat.

f) The sample passed 0.08 mm screen after crushing with super-centrifugal and disintegrator (under the condition of cooling with liquid nitrogen) and removing fat.

### 3.2 酵素失活時間の検討

酵素反応後、沸騰水浴中に試験管を入れ酵素失活の操作を行うが、その酵素失活時間について検討を行った。2.5 に準じ、60 分間グルコアミラーゼ溶液と反応させた後、沸騰水浴中にて 0, 1, 3, 5, 7 及び 10 分間正確に計時し酵素を失活させ、以下、発色及び吸光度測定に関しては測定方法と同様に行った。その結果を Table 2 に示した。なお、試料は前項で検討したのと同じ試料を用いた。

酵素失活時間と  $A_S$  の関係では酵素失活時間を 1 分間とした試料溶液が最も高い吸光度を示し、酵素失活時間が長くなるにつれて吸光度値の低下が認められ、約 7 分間以降は一定になる傾向が見られた。これは十分な酵素失活時間があれば酵素反応は停止し、吸光度値は一定となることを示している。また、酵素失活時間 1 分間付近に最も大きい吸光度を示すことは、試料溶液 (S) に含まれている  $\beta$ -デンプンが熱により糊化されつつ、酵素失活が起こるため、酵素失活時間 1 分間では熱により  $\alpha$ -デンプンが増加したところに、酵素失活時間不足により失活しきれなかった酵素が吸光度測定までの間に作用したためであると考えられた。

一方、酵素失活時間と  $A_R$  の関係では酵素失活時間が長くなるにつれて吸光度値の低下が認められ、約 7 分間以降は一定になる傾向が見られた。また、吸光度値の変化は試料溶液 (S) に見られたような極大を示さなかった。これは、試料溶液 (R) はアルカリ添加により含有している  $\beta$ -デンプンを完全に  $\alpha$ -デンプン化させたものであるため、加熱による変化は受けず、また、酵素は加熱時間に比例して失活し、失活しきれなかった酵素が吸光度測定までの間に作用したことによるためと考えられた。

以上の結果及び酵素失活時間と糊化度の関係より、酵素失活時間は 7 分間以上必要であると考えられたため、本法では安全を見込んで 8 分間とした。

**Table 2 Comparison of  $A_S$ ,  $A_R$  and degree of starch gelatinization in examination of enzyme deactivation time**

| Enzyme deactivation time (min) |   | $A_S$ <sup>a)</sup> | $A_R$ <sup>b)</sup> | Degree of starch gelatinization (%) |
|--------------------------------|---|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 0                              | 1 | 0.399               | 0.772               | 50.9                                |
|                                | 2 | 0.402               | 0.760               | 52.1                                |
| Mean (RSD)                     |   | 0.401               | 0.766               | 51.5 (1.7)                          |
| 1                              | 1 | 0.435               | 0.710               | 60.6                                |
|                                | 2 | 0.426               | 0.703               | 59.9                                |
| Mean (RSD)                     |   | 0.431               | 0.707               | 60.3 (0.81)                         |
| 3                              | 1 | 0.360               | 0.685               | 51.7                                |
|                                | 2 | 0.372               | 0.694               | 52.8                                |
| Mean (RSD)                     |   | 0.366               | 0.690               | 52.2 (1.5)                          |
| 5                              | 1 | 0.303               | 0.678               | 43.5                                |
|                                | 2 | 0.317               | 0.687               | 45.0                                |
| Mean (RSD)                     |   | 0.310               | 0.683               | 44.3 (2.4)                          |
| 7                              | 1 | 0.281               | 0.668               | 41.0                                |
|                                | 2 | 0.284               | 0.672               | 41.2                                |
| Mean (RSD)                     |   | 0.283               | 0.670               | 41.1 (0.35)                         |
| 10                             | 1 | 0.288               | 0.671               | 41.9                                |
|                                | 2 | 0.293               | 0.670               | 42.7                                |
| Mean (RSD)                     |   | 0.291               | 0.671               | 42.3 (1.4)                          |

a) Absorbance of sample solution (S)

b) Absorbance of sample solution (R)

### 3.3 酵素の相違による測定値の差の検討

酵素の違いによる糊化度の測定値の差について検討した。前項で検討したものと同じ圧ぺんとうもろこしに対して 2.5 に準じ、各メーカーから販売されている酵素を用いて検討を行った結果を Table 3 に示す。

その酵素起源の違いによると思われる測定値の差が顕著に見られた。現在、*Rhizopus* 起源の酵素は数多く市販されているが、 $\alpha$ -デンプンと老化デンプン ( $\beta$ -デンプンの一種で  $\alpha$ -デンプンが水を遊離して不溶の状態となったもの) の識別が非常に悪く、食品分析法では *Aspergillus niger* 及び *Endomyces* 起源の酵素の使用を推奨している<sup>10)</sup>。正確に糊化度を求めるためには、どちらかの起源の酵素の使用が望ましいが、*Endomyces* 起源の酵素は販売されていることは確認できなかった。*Aspergillus niger* 起源の酵素は Megazyme 製のものが販売されているため、使用酵素として *Aspergillus niger* 起源の酵素を本法に適用することにした。

**Table 3 Comparison of  $A_S$ ,  $A_R$  and degree of starch gelatinization between different enzymes**

| Enzyme maker | Enzyme origin            |   | $A_S$ <sup>a)</sup> | $A_R$ <sup>b)</sup> | Degree of starch gelatinization (%) |
|--------------|--------------------------|---|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Wako         | <i>Rhizopus sp.</i>      | 1 | 0.244               | 0.650               | 36.3                                |
|              |                          | 2 | 0.231               | 0.647               | 34.4                                |
|              |                          | 3 | 0.236               | 0.646               | 35.2                                |
| Mean (RSD)   |                          |   | 0.237               | 0.648               | 35.3 (2.7)                          |
| Toyobo       | <i>Rhizopus sp.</i>      | 1 | 0.219               | 0.624               | 33.6                                |
|              |                          | 2 | 0.217               | 0.631               | 32.9                                |
|              |                          | 3 | 0.213               | 0.639               | 31.8                                |
| Mean (RSD)   |                          |   | 0.216               | 0.631               | 32.8 (2.7)                          |
| Megazyme     | <i>Aspergillus niger</i> | 1 | 0.288               | 0.663               | 42.4                                |
|              |                          | 2 | 0.285               | 0.665               | 41.8                                |
|              |                          | 3 | 0.302               | 0.672               | 43.9                                |
| Mean (RSD)   |                          |   | 0.292               | 0.667               | 43.8 (2.5)                          |

a) Absorbance of sample solution (S)

b) Absorbance of sample solution (R)

### 3.4 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。圧ぺん度合いが異なる 3 種類の圧ぺんとうもろこしを用い、財団法人日本穀物検定協会東京分析センター、同神戸分析センター、同九州分析センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）及び同福岡事務所（現 同福岡センター）の 9 試験室において共同試験を行った。その結果を Table 4 に示す。得られた試験結果から IUPAC の共同試験のプロトコル<sup>11)</sup>を参考にし、Cochran 及び Grubbs の検定によつてはずれ値を除外した後、総平均測定値と室内繰返し精度及び室間再現精度の相対標準偏差を算出した。

試料 A の総平均測定値は 37.4%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ $RSD_I$  及び  $RSD_R$ ）として 5.0% 及び 11%，試料 B の総平均測定値は 58.2%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は  $RSD_I$  及び  $RSD_R$  として 3.5% 及び 6.6%，試料 C の総平均測定値は 47.8%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は  $RSD_I$  及び  $RSD_R$  として 3.6% 及び 8.9% であった。

**Table 4 Collaborative study results for measurement of degree of starch gelatinization**

| Laboratory                         | Flaked corn A |      | Flaked corn B      |                    | Flaked corn C |      |
|------------------------------------|---------------|------|--------------------|--------------------|---------------|------|
| 1                                  | 32.3          | 37.0 | 55.1               | 53.4               | 41.9          | 43.7 |
| 2                                  | 36.0          | 35.2 | 57.1               | 63.1               | 46.8          | 45.3 |
| 3                                  | 35.8          | 36.9 | 59.8               | 58.5               | 48.2          | 49.2 |
| 4                                  | 38.6          | 37.7 | 58.2               | 58.1               | 45.1          | 47.8 |
| 5                                  | 32.1          | 32.3 | 51.9               | 55.9               | 43.1          | 44.7 |
| 6                                  | 43.1          | 48.5 | 67.9 <sup>c)</sup> | 85.3 <sup>c)</sup> | 57.2          | 55.3 |
| 7                                  | 37.4          | 36.8 | 55.9               | 55.1               | 47.2          | 44.7 |
| 8                                  | 41.2          | 39.3 | 63.6               | 65.1               | 48.6          | 53.6 |
| 9                                  | 37.7          | 35.7 | 61.4               | 59.1               | 48.9          | 49.9 |
| Mean (%)                           | 37.4          |      | 58.2               |                    | 47.8          |      |
| RSD <sub>r</sub> <sup>a)</sup> (%) | 5.0           |      | 3.5                |                    | 3.6           |      |
| RSD <sub>R</sub> <sup>b)</sup> (%) | 11            |      | 6.6                |                    | 8.9           |      |

a) Relative standard deviation of repeatability

b) Relative standard deviation of reproducibility

c) Excluded by Cochran test

#### 4 まとめ

飼料用圧ぺんとうもろこし中の糊化度について吸光光度法による測定について検討したところ次の結果を得た。

- 1) 試料の調製は全量を粒度 0.15 mm 以下に液体窒素による冷却を行いながら、超遠心粉碎機を用いて粉碎を行う方法が最適であると考えられた。
- 2) 酵素反応後、沸騰水浴中に試験管を入れ酵素失活を行うが、その酵素失活時間に関しては7分間以上は必要であり、安全を見込んで8分間とした。
- 3) 酵素起源及び製造メーカーの異なる3種のグルコアミラーゼを用いたところ、糊化度の測定値に差が見られた。このことから起源及び製造メーカーの統一化が望ましく、本法には *Aspergillus niger* 起源の Megazyme 製の酵素を使用することとした。
- 4) 圧ぺん度合いが異なる3種類の圧ぺんとうもろこしを用い、計9試験室において本法による共同試験を行った。その結果、今回用いた試料の室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 3.5~5.0% 及び 6.6~11% の範囲であった。

なお、本報告の一部は日本食品科学工学会第53回大会(2006)において発表された。また、本法は平成18年5月15日付けで飼料分析基準に収載された<sup>12)</sup>。

#### 謝 辞

共同試験にご協力いただいた財団法人日本穀物検定協会及び財団法人日本食品分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

また、検討用飼料を提供していただいた協同飼料株式会社鹿島工場、ジェイエイ東海くみあい飼料株式会社清水工場、JA 東日本くみあい飼料株式会社群馬工場、清水港飼料株式会社鹿島工場、全国酪農業協同組合連合会鹿島飼料工場、明治飼糧株式会社鹿島工場、雪印種苗株式会社鹿島工場の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 社団法人 日本科学飼料協会：新編 飼料ハンドブック第二版，220 (2004).
- 2) 化学大辞典編集委員会編：化学大辞典 6 縮刷版，288 (1963).
- 3) 農林水産省生産局長通知：飼料用とうもろこし等の変形加工等証明取扱要領について”，平成 13 年 3 月 31 日，13 生畜第 1441 号 (2001).
- 4) 渡辺長男，長谷 幸：澱粉工業会誌，5，110 (1958).
- 5) 外山忠男，檜作 進，二国二郎：澱粉工業会誌，13，69 (1966).
- 6) 貝沼圭二，松永暁子，板川正秀，小林昭一：澱粉科学，28，235 (1981).
- 7) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編：食品分析法，646 (1982).
- 8) 農林水産省畜産局長通達：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 9) 農林省名古屋肥飼料検査所：改訂版 実用飼料検査法，70 (1978).
- 10) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編：食品分析法，653 (1982).
- 11) IUPAC Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: Revised 1994, Horwitz, W.: Pure and Appl. Chem., 67 (2), 331 (1995).
- 12) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 5 月 15 日，18 消安第 1333 号 (2006).