



外来アミラーゼ検査法

はじめに

はちみつは、古代エジプトの壁画にも描かれているように古くから愛用されてきた天然甘味料であり、その風味や美味しさだけでなく、疲労回復や運動後のエネルギー補給、さらには抗菌作用や抗酸化作用、免疫力を高めるといった健康効果も期待されているため、現代においても世界中で広く食されています。しかし、はちみつは甘味料として高価であるため、他の安価な人工甘味料などで水増し、それを表示することなく「純粋はちみつ」として販売されていることが問題となっています。

これまで、はちみつの水増しには人工甘味料である異性化糖(トウモロコシなどに含まれるデンプンを原料にして製造した糖)が使用されることが多かったため、異性化糖の添加を判別する方法が開発されてきました。例えば、異性化糖製造中に生じるオリゴ糖を薄層クロマトグラフィーによって確認する TLC 法や、はちみつの蜜源となる植物が主に C3 植物(アカシア、レンゲなど)であることから、C4 植物(トウモロコシ、サトウキビなど)が含まれているかに着目した炭素安定同位体比法(SCIRA 法)が開発されました。しかし、異性化糖の原料を C4 植物であるトウモロコシではなく、C3 植物であるバレイショに変更するなど、新たな偽和はちみつが出てきたことにより検出が困難になってきています。

はちみつの管理状況

ジアスターゼ活性値

はちみつには、ミツバチが分泌する酵素が含まれており、その一つにジアスターゼがあります。この酵素は、一般的にアミラーゼとも呼ばれ、デンプンを加水分解する作用(活性)を持ちます。また、ジアスターゼの活性は、長期保存や過度の加熱によって低下するため、国際規格であるコーデックス規格では、ジアスターゼ活性値を 8 Schade Units 以上、天然酵素が少ない柑橘系のはちみつなどでは 3 Schade Units 以上と設定し、品質規格の一つとして管理することを推奨しています。

外来アミラーゼ

ジアスターゼ活性値は、長期保存や加熱による低下に加え、人工甘味料により薄められた場合も低下します。そのため、ジアスターゼ活性値の低下を隠す目的で、微生物(*Aspergillus*, *Geobacillus* など)由来アミラーゼ(以下「外来アミラーゼ」)を添加し、意図的に活性を向上させるといった事例が国内外で確認されています。¹⁾

外来アミラーゼ検査法

外来アミラーゼを添加し、品質を偽装したはちみつが存在するため、外来アミラーゼ検査法について紹介します。

Native PAGE-活性染色法

外来アミラーゼはタンパク質であるため、電気泳動により分離しますが、アミラーゼとしての酵素活性を保持したまま泳動する必要があるため、タンパク質変性剤を添加しない非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Native PAGE）という手法を用います。電気泳動後、ゲルをデンプン溶液に浸し、デンプンとアミラーゼを酵素反応させます。続いて、ヨウ素溶液を加えることでゲルに浸透したデンプンがヨウ素と反応（ヨウ素デンプン反応）し、ゲルは赤紫色に変色します。しかし、アミラーゼが存在した場合は、その酵素活性によってデンプンは分解されているため、ゲルは変色せず、バンドとして外来アミラーゼを検出することが可能になります。

図-1 に Native PAGE-活性染色法の結果の一例を示しました。ミツバチ由来アミラーゼは黄色枠で示した原点付近に留まりますが、外来アミラーゼは緑色枠で示した位置まで移動し、バンドとして検出できます。ただし、蜜源がマヌカ、ソバ、ジャラ、サクラ、ナツメ、モミである場合、外来アミラーゼ同様にバンドが出現し、偽陽性を示すことがわかっています。その他の蜜源においても偽陽性を起こす可能性が否定できないため、バンドが検出された場合は液体クロマトグラフ-四重極/飛行時間型質量分析計（LC-QTOF/MS）による測定を行い、外来アミラーゼの有無を確定します。²⁾

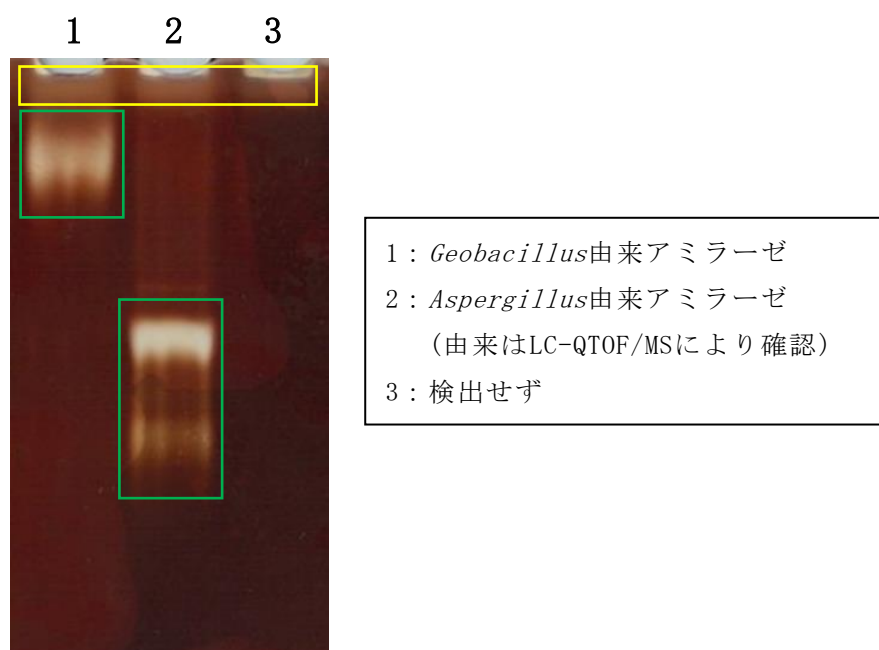


図-1 Native PAGE-活性染色法の結果の一例

LC-QTOF/MS による測定

LC-QTOF/MS とタンパク質解析ソフトウェアを用いて、はちみつ中のタンパク質を網羅的に同定し、外来アミラーゼの有無を確認します。まず、はちみつからタンパク質を抽出し、加熱変性、還元、アルキル化することで高次構造を形成しているタンパク質を一次構造にします。続いて、タンパク質分解酵素であるトリプシンを用いてタンパク質をペプチドに断片化し、LC-QTOF/MS により測定します(図-2)。

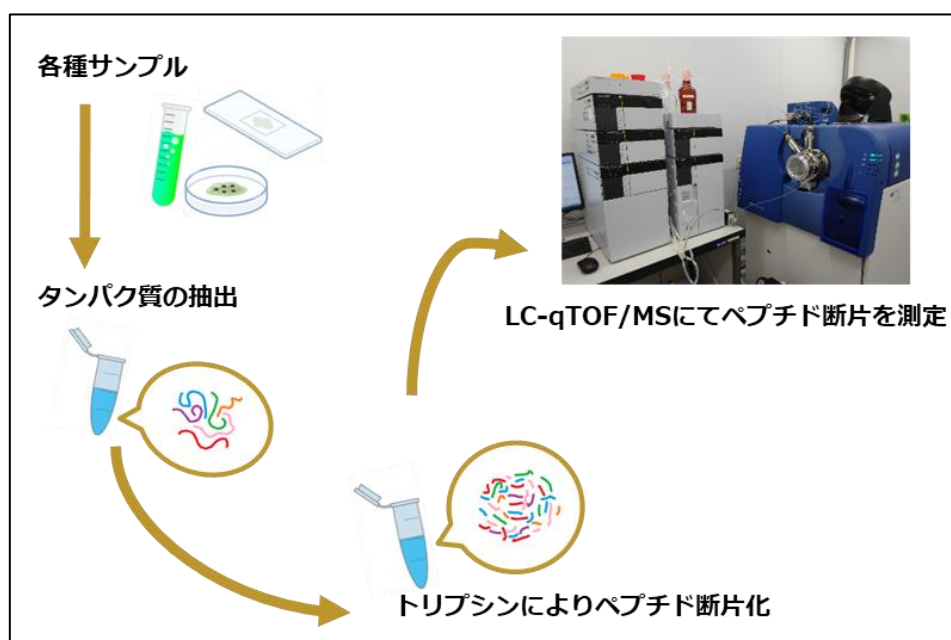


図-2 LC-QTOF/MS による測定の流れ

測定データとタンパク質データベースを照合した結果から外来アミラーゼを検索します。表-1 では *Aspergillus* 由来アミラーゼを検出した例を示しました。試験結果からは外来アミラーゼの有無だけでなく、外来アミラーゼの由来まで確認することが可能です。

Protein	Representative Accession	Species	Name	Unused ProtScore
1	sp O18330 MRJP1_APIME	APIME	Major royal jelly protein 1 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=MRJP1 PE=1 SV=1	50.87
2	sp Q17060 MRJP3_APIME	APIME	Major royal jelly protein 3 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=MRJP3 PE=1 SV=1	36.11
3	sp O77061 MRJP2_APIME	APIME	Major royal jelly protein 2 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=MRJP2 PE=1 SV=1	29.84
4	sp P0C1B3 AMYA1_ASPOR	ASPOR	Alpha-amylase A type-1/2 OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) OX=510516 GN=amy1 PE=1 SV=1	26.91
5	sp Q17058 MAL1_APIME	APIME	Alpha-glucosidase OS=Apis mellifera OX=7460 PE=1 SV=1	11.97

表-1 LC-QTOF/MS の結果の一例

おわりに

食品偽装を防ぐことは消費者保護や公正な市場維持の観点から重要な意義を持ちます。また、外来アミラーゼを添加したはちみつが国内外で確認されていることから、外来アミラーゼ検査法は偽和はちみつ検出法の一つとして有用であると言えます。

弊財団では、最新技術に注視しつつ、受託検査を通じて皆様のお役に立てるよう努めてまいります。

参考文献(参考資料)

- 1) Takahashi, Y. et al. Investigation of foreign amylase adulteration in honey distributed in Japan by rapid and improved native PAGE activity staining method. Journal of Applied Glycoscience. 2023, **70**, p. 67-73.
- 2) タンパク質の検索～LC-QTOF/MSによる異物検査への活用～
JFRL ニュース Vol.8 No.1 Oct. 2024