

ガスクロマトグラフィーによる単糖類の定量 (その2)*

——馬鈴薯澱分及び大豆種皮ガラクトマンナン加水分解物の検討——

三 好 康 之

The Gaschromatographic Determination of Monosaccharides in the Hydrolyzate of Potato-Starch and in those of Seed-Coat Galactomannan from Soybeen (2)

Yasutaka Miyoshi

1. は じ め に

緑色植物の光合成作用によって生合成された澱分は、生物のエネルギー源として重要な役割を果たしており、世界中の科学者によってその構造から生理作用まで研究し尽くされたともいわれている、数十万の分子量をもつ高分子多糖類の一つである。

澱分の一次構造は、グルコース単位が直鎖状に α -1 \rightarrow 4結合、あるいは分岐点で α -1 \rightarrow 6結合したアミロースおよびアミロペクチンからなっている。

澱分のアミラーゼによる分解では、使用するアミラーゼの種類によって、アミロースあるいはアミロペクチンに作用する機構が異なる。このため、使用する酵素によって、それぞれ特有の分解生成物がえられる等、澱分は興味のある化合物の一つである。

澱分加水分解物の分離分析には、ペーパークロマトグラフィー (PC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ロ紙電気泳動 (PE)、カラムクロマトグラフィー (CC) 等が使用されてきたが、近年ではガス液層クロマトグラフィー (GLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が多く使用され、その成果も飛躍的にあがっている。

ところで、GLC によって、多糖類を構成している単糖類の種類とその量比を知るためには、通常多糖類を加水分解あるいはメタノリシス後単糖類とし、それらを揮発性誘導体とすることが必要である¹⁾。

加水分解後にトリメチルシリル (TMS) 誘導体として分析する GLC の利点は、糖の炭素原子とエーテル結合した巨大な TMS 基の影響を受けるため、PC, TLC, PE, CC 等の手段により分離することができない α 型、 β 型、さらには γ 型の分離と定量が可能となることである。

これは糖類の α 型、 β 型といった重要な概念を理解するうえで大変有効であるが、多数の単糖が同時に存在する場合には、その保持時間が重複してクロマトグラムが複雑になり、単糖の同定、定量が困難となることが欠点である。

また、アミラーゼ等の酵素反応機構解析のための GLC では、酵素反応で生成された2糖類以上の糖類についても分析が必要とされる場合が多い。しかし、GLC 上の制約を受け、特殊な例を除き、これら重要な2糖類以上の多糖類を分析できないので、PC, TLC, PE, CC, あるいは高価な HPLC が必要とされる。

* 第1報；三好 康之，世良 早苗：馬鈴薯澱分のアミラーゼによる加水分解物の検討，広島文教食物栄養研究会誌，7，1 (1989)

本学生生活科学科食品科学コースでは、食品科学技術認定証書取得をめざす学生に対し、今や食品化学研究の常用機器の一つとなっている GLC の原理や取扱に習熟することを必須事項とし、重点的に指導している。

今回は、馬鈴薯澱分の amylase (α -amylase, β -amylase, glucoamylase) 加水分解物、および大豆種皮 galactomannan の mannanase、あるいは硫酸加水分解物について、ソモギー分析、PC、GLC 等によって、生成還元糖量の定量、生成糖類の同定及び定量を行い、これら三種類のアミラーゼによるグルコース生成を基とした分析結果から、各酵素の澱分分解機構の違い、ガラクトマンナンの構成単糖解明を試みた。

2. 実験方法及び結果

澱分の amylase (α -, β -, gluco-) による加水分解

pH 4.5 の酢酸緩衝溶液 100 ml に、1.25 g の市販可溶性馬鈴薯澱分 (α 澱分) を秤量し、水浴上で暖めて溶かし、1.25% 基質溶液とした。酵素は市販の α -amylase ((EC 3, 2, 1, 1) from *Bacillus species* Type II-A), β -amylase ((EC 3, 2, 1, 2) from Barley Type II-B), および glucoamylase ((EC 3, 2, 1, 3) from *Aspergillus niger*) を同じ緩衝溶液 2 ml に、それぞれ順に 2.0 mg, 2.0 mg, 1.0 mg 溶かして使用した。酵素反応は、それぞれの酵素溶液 1 ml と基質溶液 4 ml とを個別に 40 °C 10 分間予熱後、両試験管内容物を混合して基質濃度を 1 % とし、同温度の振とう恒温槽内で 30 分間行った。直ちに沸騰浴中で酵素反応を停止し、反応混液を PC, ソモギー分析, GLC の試料とした。

galactomannan の mannanase による加水分解

pH 4.5 の酢酸緩衝溶液 100 ml に、1.25 g の大豆種皮から調整した galactomannan (大豆種皮を砕き、次亜塩素酸ソーダ脱色、熱水抽出、アセトン沈澱、除蛋白を繰り返した調整品²⁾) を採り、水浴上で暖めて溶かし、1.25% 基質溶液とした。粗酵素 mannanase (*Rhizopus oligosporus* IFO 8631 株のふすま培養、水抽出、エチルアルコール沈澱、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー純化後の凍結乾燥調整品³⁾) を同じ緩衝溶液 1 ml に、2.02 mg 溶かして使用した。酵素反応は、それぞれの酵素溶液 1 ml と基質溶液 4 ml とを個別に 40 °C 10 分間予熱後、両試験管内容物を混合して基質濃度を 1 % として、同温度の振とう恒温槽内で 30 分間行った。直ちに沸騰浴中で酵素反応を停止し、反応混液を PC, ソモギー分析, GLC の試料とした。

galactomannan の硫酸による加水分解

2N-硫酸 10 ml 中に galactomannan 約 30 mg を溶かし、封管して、沸騰浴中 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 時間それぞれ個別に加水分解した。開管後、PC 分析はそのまま、2N-水酸化ナトリウムで中和しソモギー分析, GLC の試料とした。

澱分及び galactomannan 加水分解混液の Somogyi 分析⁴⁾

グルコース、ガラクトースの検量線の作成

大型の試験管に、ソモギー分析試薬 5 ml, グルコース、ガラクトースの各標準糖を各々 0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg を含む標準溶液 1 ml 及び純水 4 ml を加えて計 10 ml とし、15 分間沸騰浴中で反応後、硫酸酸性下、チオ硫酸ナトリウム溶液で逆滴定し、検量線を作成した。その結果を図 1 に示す。

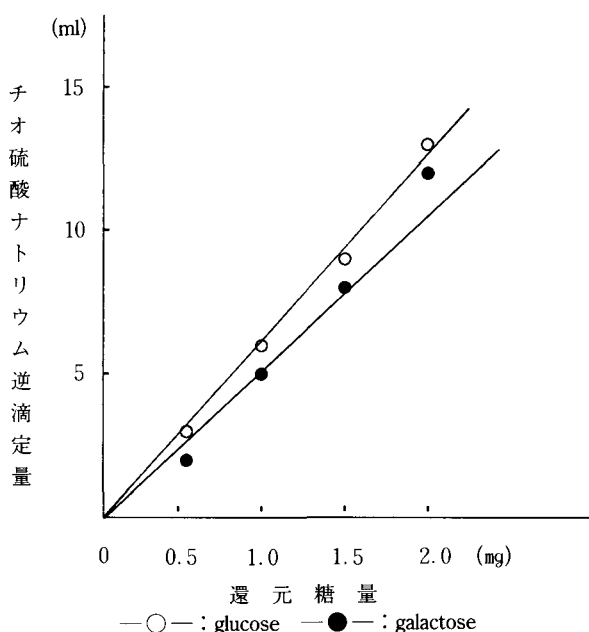


図1 Somogyi 法による還元糖の検量線

澱分の amylase (α -, β -, gluco-) 酵素加水分解混液中の還元糖の定量とアミラーゼ活性の算出

大型の試験管に、ソモギー分析試薬 5 ml、澱分の α -amylase, β -mylase, glucoamylase 加水分解反応混液をそれぞれ順に、0.4 ml, 0.4 ml, 0.1 ml を加え、さらに純水を加えて計 10 ml とし、15分間沸騰浴中で反応後、硫酸酸性下、チオ硫酸ナトリウム溶液で逆滴定した。グルコースの検量線を参照して、加水分解混液中の還元糖をグルコースとして定量した。ついで、各々のアミラーゼ活性を求めた。アミラーゼ活性は、便宜上ここに述べた反応条件下で、1 mg のグルコースを生成するとき、1 単位とした。その結果をまとめて表 1 に示す。

表 1 澱粉の各 amylase 分解により生成した還元糖量 (glucose 換算値) とそれらの酵素活性

amylase		全還元糖量 (mg/5 ml)	amylase 活性 (unit/g)
種 類	使用量 (mg)		
α -	1.0	9.6	9,600
β -	1.0	18.0	18,000
gluco-	0.5	32.5	65,000

galactomannan の硫酸加水分解混液の還元糖の定量と加水分解率の算出

大型の試験管に、ソモギー分析試薬 5 ml, galactomannan の硫酸加水分解後中和した混液 1 ml, 純水 4 ml を加え、15分間沸騰浴中で反応後、硫酸酸性下、チオ硫酸ナトリウム溶液で逆滴定し、ガラクトースの検量線を参照して、硫酸加水分解混液中の還元糖をガラクトースとして定量し、加水分解率を算出した。

galactomannan の mannanase 加水分解混液中の還元糖の定量とマンナナーゼ活性の算出

大型の試験管に、ソモギー分析試薬 5 ml, galactomannan の mannanase 加水分解混液 1 ml, 純水 4 ml を加え、15分間沸騰浴中で反応後、硫酸酸性下、チオ硫酸ナトリウム溶液で逆滴定し、ガラクトースの検量線を参照して、加水分解混液中の還元糖をガラクトースとして定量した。ついで、マンナナーゼ活性を求めた。マンナナーゼ活性は、ここに述べた反応条件下で、1 mg のガラクトースを生成するとき、1 単位とした。

これらの結果をまとめて表 2 に示す。

表2 Galactomannan の2N-硫酸及び mannanase 加水分解により生成した還元糖量 (galactose換算値) と硫酸加水分解率又は mannanase 活性

加水分解方法	全還元糖量	加水分解率又は酵素活性
H ₂ SO ₄ 0.5 h	25.60 (mg)	76.8 (%)
H ₂ SO ₄ 1.0 h	29.20 (mg)	87.6 (%)
H ₂ SO ₄ 2.0 h	30.30 (mg)	91.9 (%)
H ₂ SO ₄ 3.0 h	30.30 (mg)	91.9 (%)
mannanase	3.16 (mg)	1,560 (unit/g)

ペーパークロマトグラフィーによる構成糖の定性分析⁵⁾

常法に従い、2 種の展開液を用い、硝酸銀法で発色させ、澱分及び galactomannan 構成糖の同定を行い、その結果を表 3、表 4 に示す。

表3 馬鈴薯澱粉加水分解物のペーパークロマトグラフィー

酵 素 名 等	Rf×100 (溶媒 A)	Rf×100 (溶媒 B)	(原点)	展開溶媒 A	(50)
glucose	32	38	○
maltose	16	20	○
α-amylase	2 5 9 15 27	3 7 12 20 34	○ ○ ○ ○ ○
β-amylase	16	19	○
glucoamylase	28	33	○
amasake	6 11 23	4 13 32	○ ○ ○

展開溶媒 A : n-BuOH-AcOH-H₂O=12-3-5 B : n-BuOH-Pyridine-H₂O=6-4-3

表4 Galactomannan 加水分解物のペーパークロマトグラフィー

酵 素 名 等	Rf×100 (溶媒 A)	Rf×100 (溶媒 B)	(原点)	展開溶媒 A	(50)
mannose	25	36	○
galactose	19	28	○
H ₂ SO ₄ 0.5 h	20 26	1 26 30 37	○ ○
H ₂ SO ₄ 1.0 h	20 26	27 37	○ ○
H ₂ SO ₄ 2.0 h	19 25	28 36	○ ○
H ₂ SO ₄ 3.0 h	21 27	27 37	○ ○
mannanase	23 30	28 36	○ ○

展開溶媒 A : n-BuOH-AcOH-H₂O=12-3-5 B : n-BuOH-Pyridine-H₂O=6-4-3

ガスクロマトグラフィーによる単糖類の定量⁶⁾

グルコース、ガラクトース、マンノースの検量線の作成

グルコース、ガラクトース、マンノースの各標準糖各々 1.0 mg, 2.0 mg, 4.0 mg を含む標準溶液 1 ml を凍結乾燥し、内部標準物質アラビトールを (1 mg/ml) 含む N, N-Dimethyl formamide 1 ml を加えて溶かし、200 μ l の hexamethyldisilazane と 100 μ l の trimethylchlorosilane を加え、激しく振り混ぜ、5 分後にマイクロシリンジで上澄部の約 2 μ l をガスクロカラム中に注入し、クロマトグラム（図 3-I, 図 4-I, II に示す）をえた。それぞれの保持時間から、内部標準物質アラビトールに対する標準糖の保持時間の比 (R_a 値) を求め、表 5 に示す。また、それぞれの面積から、内部標準物質アラビトールに対する、グルコース ($\alpha+\beta$), ガラクトース ($\alpha+\beta$), マンノース ($\alpha+\beta$) それぞれの面積比、重量比を求めて、検量線を作成し、その結果を図 2 に示す。GLC の条件は、以下の通りである。

ガラスカラム充填物：5 %SE-30 on Chromosorb W AW

キャリアーガス： N_2 流量：40 ml/min.

(Flow 1, 2) 検出器：FID

カラム温度設定：180 $^{\circ}C$ (グルコース)

190 $^{\circ}C$ (ガラクトース, マンノース)

Inj. Temp. : 200 $^{\circ}C$ Det. Temp. : 220 $^{\circ}C$

感度： 10^2-64

チャートスピード：10 mm/min.

表5 内部標準物質 arabitol の保持時間に対する糖類標品の保持時間の比 (R_a)

標品糖類	R_a 値	
	CT=190 $^{\circ}C$	CT=180 $^{\circ}C$
α -glucose	1.85	1.82
β -glucose	2.62	2.60
α -mannose		1.36
β -mannose		1.98
α -galactose		1.65
β -galactose		1.94

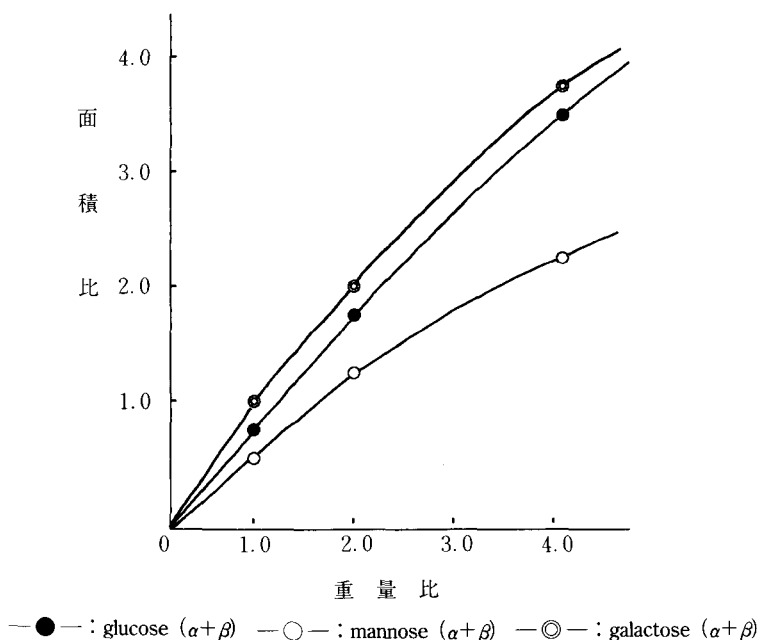


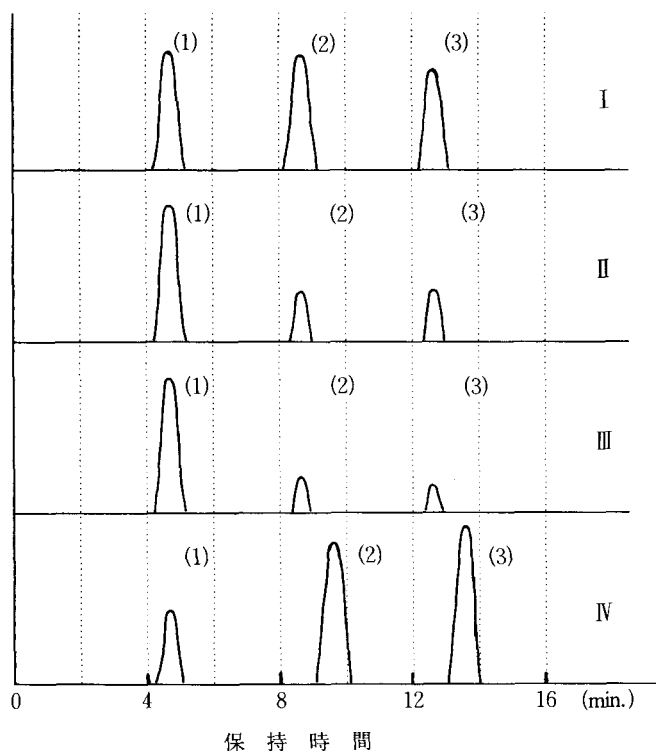
図2 Glucose, mannose, 及び galactose 標品の検量線

澱分の amylase (α -, β -, gluco-) 加水分解物の分析

澱分の α -amylase, β -amylase, glucoamylase 加水分解反応混液をそれぞれ 1.5 ml を凍結乾燥し, 内部標準物質アラビトールを (1 mg/ml) 含む N, N-dimethyl formamide 1 ml を加えて溶かし, 200 μ l の hexamethyldisilazane と 100 μ l の trimethylchlorosilane を加え, 激しく振り混ぜ, 5 分後にマイクロシリンジで上澄部の約 2 μ l をガスクロカラム中に注入し, 図 3 に示すクロマトグラムをえた。ついで内部標準物質アラビトールに対する検出糖の Ra 値とその面積比を求め, グルコースを同定定量し, 酵素活性を求めた。酵素活性は便宜上, 上記反応条件下で, 1 mg のグルコースを生成するとき, 1 単位とした。その結果を表 6 に示す。

galactomannan 加水分解物の分析

galactomannan の mannanase あるいは 硫酸加水分解中和溶液 2 ml を凍結乾燥し, 内部標準物質アラビトールを (1 mg/ml) 含む N, N-Dimethyl formamide 1 ml を加えて溶かし, 200 μ l の hexamethyldisilazane と 100 μ l の trimethylchlorosilane を加え, 激しく振り混ぜ, 5 分後にマイクロシリンジで上澄部の約 2 μ l をガスクロカラム中に注入し, 図 4 に示すクロマトグラムをえた。ついで内部標準物質アラビトールに対する検出糖の Ra 値とその面積比を求め, ガラクトース, マンノース, グルコースをそれぞれ同定定量した。その結果を表 7 に示す。

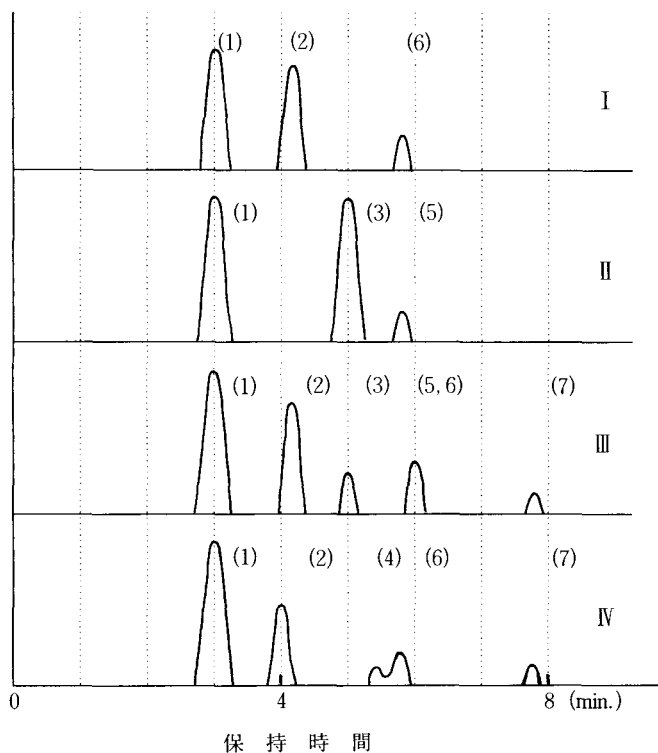


I : D(+)-arabitol (1), α -D-glucose (2) 及び β -D-glucose (3) の標品
 II : α -amylase による加水分解物 III : β -amylase による加水分解物
 IV : glucoamylase による加水分解物 (Column temp. = 180 °C)

図 3 馬鈴薯澱粉の amylase による加水分解物のガスクロマトグラム

表6 馬鈴薯澱粉の α -amylase による加水分解物のガスクロマトグラフィーによる定量及び酵素力価

加水分解酵素名	Ra値	同定糖	糖量 ($\alpha+\beta$) (mg)	力 価 (Unit/g)
α -amylase	1.83	α -glucose	0.73	2,400
	2.61	β -glucose		
β -amylase	1.82	α -glucose	0.51	1,700
	2.60	β -glucose		
glucoamylase	1.86	α -glucose	8.10	54,000
	2.68	β -glucose		



- I : D(+)-arabitol (1), α -D-mannose (2) 及び β -D-mannose (6) の標品
 II : D(+)-arabitol (1), α -D-galactose (3) 及び β -D-galactose (5) の標品
 III : H_2SO_4 2.0 h による加水分解物 (α -D-glucose (4) 及び β -D-glucose (7))
 IV : mannanase による加水分解物 (column temp. = 190 °C)

図4 Galactomannan 加水分解物のガスクロマトグラム

3. 考 察

澱分に対する α -amylase, β -amylase, glucoamylase の作用機作の確認

PC (表3) の結果から推定される遊離糖類をみると, α -amylase 区分は麦芽糖, グルコー

表7 Galactomannan 加水分解物のガスクロマトグラフィーによる定量

加水分解法	R _a 値	同定糖	各糖量 (mg/ml)			全糖量 (mg)
			mannose	galactose	glucose	
H ₂ SO ₄ 2.0 h	1.36	α -mannose	1.28	0.10	0.02	13.7
	1.65	α -galactose				
	1.97	β -mannose				
		β -galactose				
	2.63	β -glucose				
mannanase	1.36	α -mannose	0.26	0	0.04	0.75
	1.85	α -glucose				
	1.95	β -mannose				
	2.62	β -glucose				

スの他に R_f 値が小さく、分子量がより大きいと推察される 3 個のスポット, β -amylase 区分は麦芽糖のみのスポット, glucoamylase 区分はグルコースのみのスポットが検出された。

このことから、通常液化アミラーゼともいわれる α -amylase は、澱分の α -1 \rightarrow 6 結合を除く α -1 \rightarrow 4 結合分子をランダムに加水分解するように作用した結果、少なくとも 5 種類の還元糖を生じているものと推定される。

通常澱分分子の非還元末端から、 α -1 \rightarrow 4 結合分子をランダムに加水分解して、グルコース 2 個からなる二糖類麦芽糖を生じ、 α -1 \rightarrow 6 結合は分解できないといわれている β -amylase は、澱分分子の大部分を麦芽糖に分解し、 α -1 \rightarrow 4 結合した枝別れの部分、いわゆる限界デキストリンは発色しなかったためと推定される。

澱分分子の α -1 \rightarrow 6 及び α -1 \rightarrow 4 結合共直接グルコースに分解できるといわれている glucoamylase は、澱分の大部分をグルコースに分解したものと推定される。

以上のように、PC を用いると、澱分分解酵素アミラーゼ類 (α -amylase, β -amylase, glucoamylase) の作用によって生じた糖類の種類とその濃淡から量を実際にペーパー上で確認できるので、学生実験でアミラーゼ類の作用機作を学習するのに手軽で確実な方法と思われる。

アミラーゼ活性の比較

一般に、 α -amylase 活性は酵素作用によって低下する澱分分子の粘度測定、 β -amylase 及び glucoamylase (amyloglucosidase) 活性は、澱分分子から遊離される還元糖量を Somogyi 分析等により定量し、グルコース等に換算して算出されるのが一般的である。

GLC を主体とする分析では、機器上の制約から、グルコース等の単糖類は定量分析可能であるが、麦芽糖等の二糖類以上の糖類は分析できないので、その分析値は低くなる場合が多い。

今回 Somogyi 分析からえられた酵素活性値は、還元糖量をすべてグルコースに換算した値であるので、GLCからえられた酵素活性値とを単に比較するために、便宜上グルコースを基準としてあらわすこととした。

そのため、アミラーゼ活性は、pH 4.5, 40 °C, 30 分間の反応条件で、澱分から 1 mg のグルコースが遊離されるとき、1 単位となる。

Somogyi 分析 (表 1) の結果から算出したアミラーゼ活性は、glucoamylase, β -amylase, α -amylase の順となった。

PC (表 3) の結果から推定される遊離糖類をみると、 α -amylase 作用区分からはグルコー

ス、麦芽糖の他に分子量のより大きい3個のスポット、 β -amylase のそれからは麦芽糖のみのスポット、glucoamylase のそれからはグルコースのみのスポットが検出された。

単糖類のみを検出することが出来る GLC（表6）の結果からは、 α -amylase、 β -amylase、glucoamylase 区分すべてから、 α -及び β -グルコースのみが検出定量された。

これらを総合し、Somogyi 分析から求めたアミラーゼ活性値（表1）とグルコースを分析対象としている GLC のそれ（表6）とを比較すると、 α -amylase の作用した結果生じた還元糖量の約4分の1がグルコースと推定され、残りはグルコース以外の麦芽糖を含む二糖類以上の還元糖であると推定される。

β -amylase の作用では通常麦芽糖を生じるといわれている。PC では麦芽糖のみが検出されたが、GLC では微量のグルコースが検出された。これは酵素 β -amylase の純化が不十分のためではないかと思われる反面、GLC 分析の感度の良さが確認された。

なお、ここで定義した活性値の算出法では、 α -amylase、 β -amylase の酵素本来の活性を示していない。

glucoamylase の活性については、PC、GLC の両結果ともグルコースのみが検出されているため、Somogyi 分析での定量値はグルコース由来と考えられ、Somogyi 分析から求めたアミラーゼ活性値（表1）とグルコースを分析対象としている GLC のそれ（表6）を比較すると、それらの活性値はほぼ一致する。

以上のことから、澱分分解酵素アミラーゼ類（ α -amylase、 β -amylase、glucoamylase）の作用機作は大幅に違い、それらの酵素活性値を算出するには、Somogyi 分析、PC、GLC 等を総合的に利用し判断する必要がある、また酵素作用機作の異なる酵素活性値を便宜上であれ定義するには無理がある。

ガラクトマンナンの構成糖

ガラクトマンナンの構成糖を知るために、 $2N-H_2SO_4$ で水浴上加水分解し、その加水分解混液を Somogyi 分析した。えられた全還元糖量を、表2に示すガラクトース換算値、及び表4に示す加水分解混液の PC 結果から、加水分解は2時間が適当と判断し以後この条件を用いた。

表4に示すように、ガラクトマンナンの硫酸および *Rhizopus* 起源の酵素マンナーゼによる加水分解混液の PC 結果から、ガラクトマンナンの構成糖はマンノース、ガラクトースで、発色度合から判断すると、量的にはガラクトースが多量に存在していることが示唆された。

表7に示す GLC の結果からは、ガラクトースの量が極端に少量で、その原因について再検討したい。

要 約

- 1) 澱分に対する α -amylase、 β -amylase、glucoamylase の作用機作の違いを、Somogyi 分析、PC、GLC の手法を総合的に用いて再確認することが出来た。
- 2) α -amylase、 β -amylase 及び glucoamylase 等の酵素活性の測定は、それぞれの酵素の特徴を見きわめた後に、各種データで確認しながら行うことが望ましい。糖類分析における Somogyi 分析、PC、GLC 等の基礎的手法は、今も充分貢献できることを確認した。
- 3) 大豆種皮から抽出したガラクトマンナンの構成糖は、硫酸加水分解及び酵素分解混液の PC の硝酸銀発色の度合から、ガラクトースを主成分とし、マンノースを副成分とする多糖

類であると示唆された。この結果は GLC の定量結果と矛盾するので、再検討したい。

SUMMARY

Gaschromatography, paperchromatography and Somogyi's method were applied to determine glucose produced from potato-starch by α -amylase, β -amylase or glucoamylase. By using Somogyi's method, the glucose-liberating activities of glucoamylase was calculated to be 65.000 units per gram. On the other hand, by using the gaschromatography, the same activities of glucoamylase was calculated to be 54.000 units per gram. An unit corresponds to enzyme activity producing one milligram glucose from potato-starch under pH 4.5, at 40 °C, for 30 min.

参 考 文 献

- 1) W. W. Wells, C. C. Sweeley, and R. Bentley: Biomedical Application of Gas Chromatography, pp 169, Plenum press (1964)
- 2) 福本寿一郎, 辻坂好夫, 竹西繁行: ヘミセルラーゼに関する研究 (第一報), 農化, **44**, 447 (1970)
- 3) 三好康之: 大豆の利用に関する研究, 広島文教女子大学紀要 (自然科学編), **23**, 37 (1988)
- 4) J. E. Hodge and B. T. Hofreiter: Determination of Reducing Sugars and Carbohydrates, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol I, pp. 380, Academic Press (1962)
- 5) 友田正司: ペーパークロマトグラフィ, 糖質研究法, pp 27, 共立出版 (1968)
- 6) 池永徳治: ガスクロマトグラフィ, 糖質研究法, pp 49, 共立出版 (1968)

—平成 5 年 9 月 27 日受理—