

## 研究論文

### 馬鈴薯澱粉の酵素アミラーゼによる加水分解物の検討

—ガスクロマトグラフィーによるグルコースの定量—

三 好 康 之 世 良 早 苗

### The Gaschromtographic Determination of Glucose in Potato-Starch Hydrolyzate by Amylases YASUTAKA Miyoshi SANA E Sera

近年、日本における食品加工工業の発展は驚異的で、近代的設備を備えた食品工場では、一定の規格基準を満たした加工食品が大量に生産され、流通消費されている。しかしながら、大量に生産された加工食品の一個一個が一定の規格基準を満たすことは容易な事ではない。そのため、食品会社では、一定の規格基準を満たすという保証書付きの原材料を購入し、食品衛生法あるいはJAS等に規定された方法に従って製造をおこない、更に製品各ロット毎の栄養成分及び食品衛生検査等を常に行って、品質の保持に努めている。

本学食物栄養学科食品管理コースでは、食品会社における栄養成分及び食品衛生検査等の品質管理をおこない得る人材の育成を目指している。その結果、卒業生の半数以上はこれら食品関連分野に就職し、活躍している。

ところで、澱粉を構成するグルコースの分離定量については、通常、酸あるいは酵素により加水分解し生じたグルコースを分別結晶しその重量を計る方法、あるいは Somogyi法に依る微量定量法等が試みられている。前者の方法が最も実用的で、確実な方法であるが、微量の定量分析には難点があり、後者の方法では、還元糖であればすべての糖が定量されるため、ペーパークロマトグラフィー（PC）等の併用が必要である。近年、これらの短所を克服した高速液体クロマトグラフィーを使用した分析法も用いられるが、この機器は価格的な面から、中規模食品工場の研究室にもあまり普及していない。しかしながら、ガスクロマトグラフィー（GLC）はほとんどすべての食品工場の研究室あるいは品質管理室であらゆる分析に使用されており、かつ、就職した卒業生の殆どが日常使用する分析機器の内では、GLCの比重が高い。このため、この機器の使用法を熟知することは、本コース学生の必須と考え、重点的に指導している。

GLCによる糖類の分離定量<sup>1)</sup>では、図1に示す様に、糖類をトリメチルシリル (TMS) 化した後、分析を行うため、単糖の分離定量のみが可能であり、二糖類以上の糖類はクロマトグラム上に示されない。しかし、単糖については $\alpha$ 、 $\beta$ の分離と定量が可能であり、糖類の $\alpha$ 、 $\beta$ の概念の理解にも有効である。

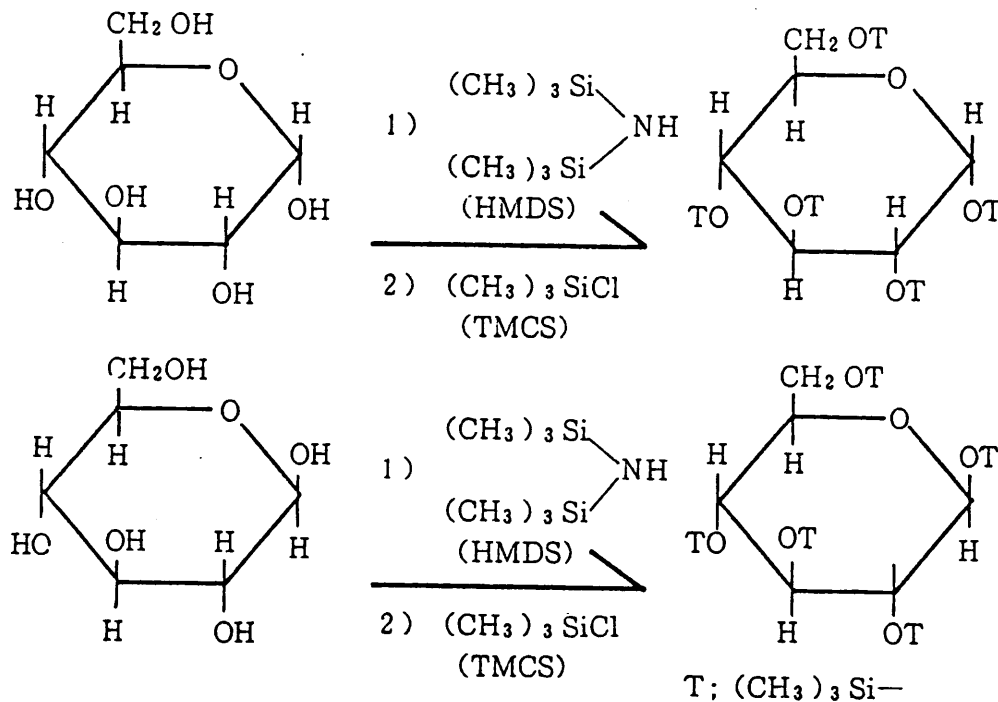


図1  $\alpha$ -D-Glucose 及び  $\beta$ -D-glucose のトリメチルシリル化

今回、澱粉を構成しているグルコースの分離定量に、PC, Somogyi 変法及びGLCを併用した。即ち、馬鈴薯澱粉を基質として、 $\alpha$ -amylase 及び glucoamylase の2種類のアミラーゼを個別に作用させ、PCによる生成糖の確認、生成還元糖の Somogyi 変法による定量、GLCによる生成単糖の分離定量を行った。なお、 $\alpha$ -amylase の活性は、澱粉糊精化力で示すのが通常であるが、今回は、馬鈴薯澱粉に対する両アミラーゼの作用の違いについて比較するため、生成グルコースを分離定量し、それぞれの力価を求めることとした。

## 実験方法

### I. 馬鈴薯澱粉の酵素アミラーゼによる加水分解

pH4.5の酢酸緩衝溶液100mlに、1.25gの市販可溶性馬鈴薯澱粉 ( $\alpha$ -澱粉) を採り、水浴上で温めて溶かし、1.25%基質溶液とした。

酵素は、 $\alpha$ -amylase (Spitase CP-40 from *Bacillus subtilis*.) 及び glucoamylase (Spitase SR from *Rhizopus delemar*.) をpH4.5の酢酸緩衝溶液1mlに、それぞれ2.43mg

( $OD_{280}=2.28$ ), 1.02mg ( $OD_{280}=0.43$ ) 溶かして使用した。

酵素反応は、酵素溶液 1 ml と基質溶液 4 ml とを個別に  $40^{\circ}C$  で10分間温めた後、両試験管内容物を混合して基質濃度を 1% とし、同温度の振盪恒湯槽内で30分間行った。直ちに沸騰水中で酵素反応を停止し、反応混液を PC, Somogyi 分析及び GLC の試料とした。なお、酵素は長瀬産業 (株) の試供品を用いた。

## II. 酵素反応混液の PC

東洋炉紙 No 51 A (40cm×7 cm) に酵素反応混液の約10倍濃縮液を打ち、n-Butanol-0.5N-Acetic acid-Ethanol=6-3-2 (V/V) の溶媒を用い、室温で20cm上昇展開した。発色はアンモニア-硝酸銀法<sup>2)</sup>で行った。

## III. Somogy 分析<sup>3)</sup>

### ① グルコースの検量線の作成

予めグルコースを 1.0mg/ml 含む標準水溶液を作り、その 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 2.0ml それぞれを Somogyi 分析用銅試薬 5.0 ml 中に採り、順に蒸留水 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0ml を加え合計 10ml とし、沸騰浴中で15分間反応させた。冷却後、2N-硫酸 2 ml を加え、遊離した沃素を 0.05N-チオ硫酸ソーダ溶液で逆滴定した。沃素の色が消える間際に、0.5 ml の 1% 澱粉溶液を加え、沃素-澱粉反応の消失する点を終点として、グルコースの検量線を作成し、図 2 に示した。

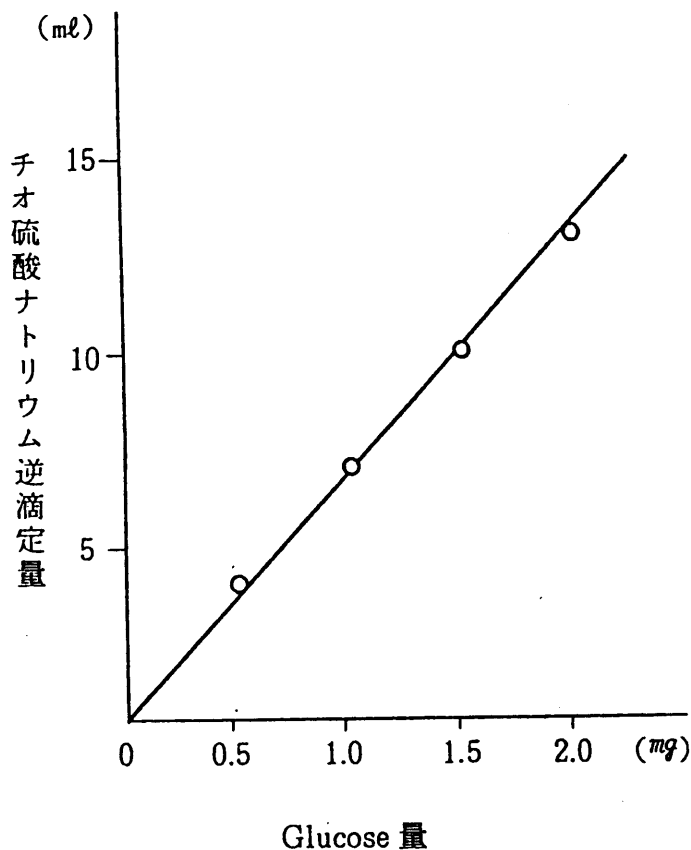


図 2 Somogyi 法によるグルコースの検量線

## ②酵素反応混液の分析

Somogyi 分析用銅試薬 5 ml中に、酵素反応混液の 1 mlと蒸留水 4 mlを加え、合計 10mlとし、沸騰浴中で15分間反応させた。冷却後、2 N-硫酸 2 mlを加え、遊離した沃素を0.05N-チオ硫酸ソーダ溶液で逆滴定した。酵素の力価は、基質馬鈴薯澱粉を 1%含む pH4.5 の酢酸緩衝溶液中で、40°C、30分間で、1.0mgのグルコースを生じる酵素量を 1 単位とした。

## IV. GLCによる生成単糖の分離定量<sup>4)</sup>

### ①グルコースの検量線の作成

予めグルコースを3.26mg/ml含む標準水溶液を作り、その 0, 0.25, 0.5, 1.0mlを試験管に採り、凍結乾燥した。次に、それぞれの試験管中に、内部標準物質として、D (+)-arabitol 0.94 mgを含む、1 ml の乾燥 N,N-dimethylformamide (DMF) を加えてグルコースを溶解した後、200  $\mu$ lの hexamethyldisilazane (HMDS) と 100  $\mu$ lの trimethylchlorosilane (TMCS) を順次加え、約 30 秒間激しく振り混ぜ、室温に 5 分間以上放置し、TMS 化を行った。これらの上澄をマイクロシリンジで 1~5  $\mu$ l 採り、GLC を行った。

GLCは、島津ガスクロマトグラフ GC-4C を使用し、次の条件で行った。カラムは、5% SE-30 on chromosorb W AW (60~80 mesh) を充填した 4 mm  $\times$  2.0 m のガラスカラム (dual column) を用い、キャリアーガスは窒素を使用した。TMS 化物の検出は、水素炎イオン化検出器 (FID) を用い、インジェクター槽温度を 200°C、ディテクター槽温度を 240°C、カラム槽温度は 180°C から 210°C まで、15分間で上昇させた。窒素流量は、40ml/min. (1 kg/cm<sup>2</sup>)、水素圧 0.5 kg/cm<sup>2</sup>、圧縮空気圧 1.0 kg/cm<sup>2</sup>、検出感度 100M $\Omega$ 、Range 0.64 V、チャートスピード 1 cm/min. に調整した。

実験後得られたガスクロマトグラムから、内部標準物質 D (+)-arabitol に対する  $\alpha$ -及び  $\beta$ -グルコースの保持時間を求め、それぞれのピークを同定<sup>5)</sup>した。続いて、D (+)-arabitol に対する  $\alpha$ -及び  $\beta$ -グルコースの重量比、ならびに、同定したピークの半値幅  $\times$  同ピークの高さより求めた D (+)-arabitol に対する  $\alpha$ -及び  $\beta$ -グルコースの面積比を求め、グルコースの検量線を作成した。これらの結果を表 1-1~表 1-4、図 3 に示す。

なお、D (+)-arabitol、 $\alpha$ -D-glucose 及び  $\beta$ -D-glucose の保持時間は、それぞれ順に、6.6、10.6、13.3 min. と測定された。

表1-1 各ピークの面積 (半値幅×ピークの高さ)

Sugars	0.25 ml	0.50 ml	1.00 ml
Arabitol	383	374	299
$\alpha$ -Glucose	132	254	356
$\beta$ -Glucose	169	306	446

表1-2 各ピークの重量 (mg)

Sugars	0.25 ml	0.50 ml	1.00 ml
Arabitol	0.940	0.940	0.940
$\alpha$ -Glucose	0.357	0.739	1.447
$\beta$ -Glucose	0.458	0.891	1.813

表1-3 Arabitolに対する重量比 (WG/WA)

Sugars	0.25 ml	0.50 ml	1.00 ml
$\alpha$ -Glucose	0.379	0.786	1.539
$\beta$ -Glucose	0.487	0.948	1.929

表1-4 Arabitolに対する面積比 (SG/SA)

Sugars	0.25 ml	0.50 ml	1.00 ml
$\alpha$ -Glucose	0.345	0.679	0.199
$\beta$ -Glucose	0.441	0.819	1.492

## ② 酵素反応混液のGLC<sup>6)</sup>

実験Iの酵素反応で得られた反応混液の1mlを凍結乾燥し、①のグルコースの検量線の作成と同時の操作及び条件で、TMS化後GLCを行った。

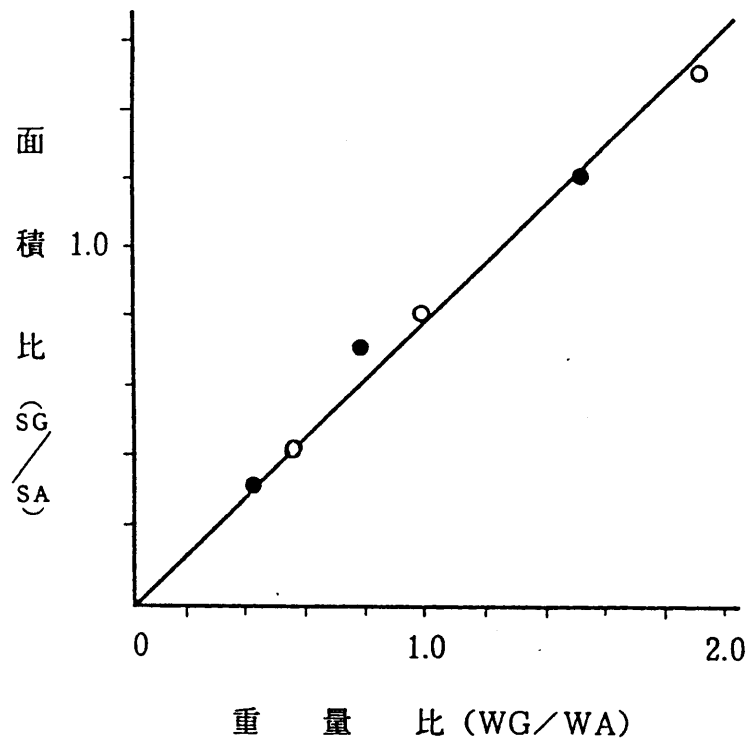


図3  $\alpha$ -D-Glucose及び $\beta$ -D-glucoseの検量線

●;  $\alpha$ -D-glucose ○;  $\beta$ -D-glucose

## 実験結果

### I. 酵素反応混液のPC

展開した炉紙を乾燥し、アンモニア-硝酸銀法で発色させたペーパークロマトグラム上の標準グルコース及びそれぞれの酵素反応混液中の糖類のRf値を求め、それらの結果を表2に示す。

表2 馬鈴薯澱粉の  $\alpha$ -amylase 又は glucoamylase による加水分解物の  
ペーパークロマトグラフィー

酵素名等	Rf 値	原点	先端
D-Glucose	0.37	○	
$\alpha$ -Amylase	0.25 0.30 0.38	○○○	
Glucoamylase	0.30 0.37 0.70	○○ ○	

これらの結果は、次のように纏められる。

①  $\alpha$ -amylase 及び glucoamylase 両酵素とも馬鈴薯澱粉を加水分解して、グルコースを生成しているが、分離定量は出来なかった。

② 生成物の R f 値及び発色の強さから推察すると、生成物の大部分がグルコースで、 $\alpha$ -amylase より glucoamylase のほうが馬鈴薯澱粉を分解して、大量のグルコースを生成していることが認められた。

③  $\alpha$ -amylase による生成物は、グルコース以外に、R f 値 0.30, 0.23 の生成物が認められた。

④ glucoamylase による生成物は、グルコース以外に、R f 値 0.30, 0.70 の生成物が認められた。

## II. 酵素反応混液の Somogyi 分析と力価

酵素反応混液の Somogyi 滴定値を、グルコースの検量線に照らしあわせ、酵素反応混液中の全還元糖量をグルコースとして求め、それらの結果を表3に示す。

表3 馬鈴薯澱粉の  $\alpha$ -amylase 又は glucoamylase による  
加水分解物の Somogyi 分析による全還元糖量及び力価

加水分解 酵素名	全還元糖量★ (mg / 5 ml)	力 価 (Unit / g)
$\alpha$ -Amylase	$1.33 \times 5 = 6.65$	$6.65 \times 1000 / 2.43 = 2,737$
Glucoamylase	$0.37 \times 10 \times 5 = 18.5$	$18.50 \times 1000 / 1.02 = 18,235$

★ ; 4回平均値

これらの結果は、次のように纏められる。

① $\alpha$ -amylase 及び glucoamylase 両酵素とも馬鈴薯澱粉を加水分解して還元糖を生成し、その4回平均の総量は、前者が 6.65mg、後者が 18.5mgと計算されたが、還元糖の種類はわからない。なお、後者の通常分析では、Somogyi 検量線を越えるため、10倍希釈液を用い分析した。

② $\alpha$ -amylase の平均力価は、2,700単位/1 gram 酵素と計算された。

③glucoamylase の平均力価は、18,100単位/1 gram 酵素と計算された。

### Ⅲ. GLCによる生成単糖の分離定量

得られた結果を図4、表4に示す。

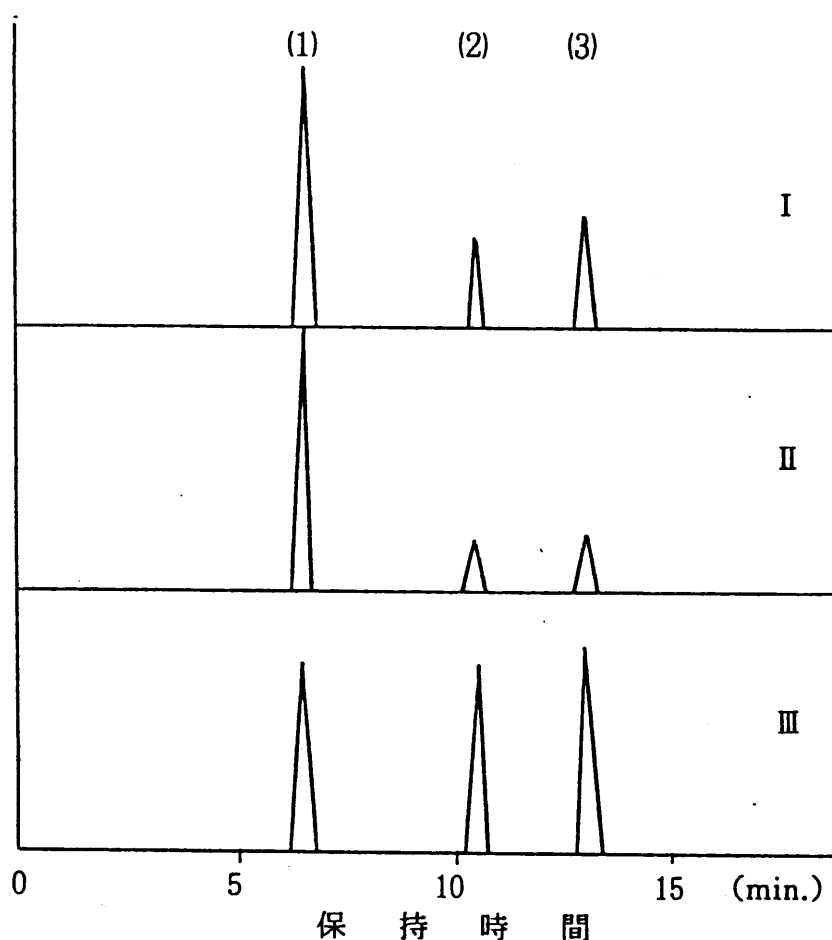


図4 馬鈴薯澱粉の $\alpha$ -amylase又はglucoamylaseによる加水分解物のガスクロマトグラム

- I ; D(+)-arabitol (1),  $\alpha$ -D-glucose (2)及び $\beta$ -D-glucose (3)の標品  
II ;  $\alpha$ -amylase による加水分解物  
III ; glucoamylase による加水分解物

表4 馬鈴薯澱粉の  $\alpha$ -amylase 又は glucoamylase 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力価

加水分解 酵素名	$\alpha$ -glucose (mg)	$\beta$ -glucose (mg)	全糖量 (mg)	力 価 (Unit/g)
$\alpha$ -Amylase	0.14	0.17	1.55	637
Glucoamylase	1.48	1.89	16.85	16.520

これらの結果は、次のように纏められる。

①  $\alpha$ -amylase 及び glucoamylase の両酵素とも馬鈴薯澱粉を加水分解し、グルコースを生成しており、標品の保持時間との比較から、 $\alpha$ -glucose、 $\beta$ -glucose に分離されていることが確認され、それぞれ定量された。

② 表4に示す実験で生成したグルコースの総量は、前酵素により  $0.31 \times 5 = 1.55\text{mg}$ 、後酵素により  $3.37 \times 5 = 16.85\text{mg}$  と計算された。

③  $\alpha$ -amylase の3回平均の力価は、690単位 / 1 gram 酵素と計算された。

④ glucoamylase の3回平均の力価は、16,500単位 / 1 gram 酵素と計算された。

## 考 察

$\alpha$ -amylase 及び glucoamylase の2種類のアミラーゼを用い、馬鈴薯澱粉を基質として、pH4.5の酢酸緩衝溶液中、40°C、30分個別に作用させ、それぞれのアミラーゼにより加水分解されて生じたグルコースの分離定量に、PC、Somogyi 変法及びGLCを併用し、全生成糖の確認、全還元糖量の定量、生成単糖の分離同定と定量、及び、基質馬鈴薯澱粉に対する両アミラーゼの作用の違いについて検討したところ、次のことが、考察された。

① GLCでは、酵素反応混液から生成単糖の分離同定と定量が同時に可能である。しかし、PC及びSomogyi分析の単独又は併用では、酵素反応混液から生成糖の確認と還元糖全量の定量を個別に行う必要がある。このため、単糖類の分離同定と正確な定量の目的には、GLCの使用が望ましい。但し、二糖類以上の糖類を分離同定し、定量しようとする場合には使用できない。

② GLCで単糖類の分析を行う時、TMS化を行うため、その糖の $\alpha$ -型あるいは $\beta$ -型を分離同定し、定量することが可能である。このため、糖類の $\alpha$ -型あるいは $\beta$ -型の概念の理解の手助けとなるばかりか、糖化合物の構造解析あるいは化学反応機構の解明に



も重要な役割を演じるものと思われる。しかし、糖の種類が数種類以上になると $\alpha$ -型及び $\beta$ -型に分離されるためガスクロマトグラムが複雑になり、糖類の分離が悪くなる傾向がみられる。なお、分析に際しては糖のTMSの分解を避けるため、ガラスカラムを使うことが必要である。

③ $\alpha$ -amylase 及び glucoamylase の両酵素が、基質馬鈴薯澱粉を加水分解して生成する全還元糖量をグルコースとして定量した。Somogyi分析では、glucoamylase の活性は $\alpha$ -amylase のその約7倍であるのに対し、GLC使用の場合のそれは約24倍と計算される。これは、GLCの場合には、 $\alpha$ -型及び $\beta$ -型グルコースのみの定量値であるのに対し、Somogyi分析の場合には、グルコースを含む全還元糖を対象とした定量値であるためである。したがって、この実験のようにグルコースを対象とする定量では、GLCを使用することによって、より正確な分析が期待できる。

④ $\alpha$ -amylase 及び glucoamylase が、馬鈴薯澱粉を加水分解して生成する全還元糖量をグルコースとして定量し、Somogyi分析で求めた全還元糖量に対する、GLCで求めたグルコース量の割合を計算した。その結果、 $\alpha$ -amylase の場合、23%、glucoamylase の場合、91%となる。これは、 $\alpha$ -amylase は、澱粉糊精化力が強く、glucoamylaseは、グルコース生成力が強いと推察され、両酵素の特徴をよく示している。

⑤GLCによる場合、glucoamylaseのグルコース生成活性は、 $\alpha$ -amylase のその約24倍と計算される。これは、酵素の精製度合いの差も考えられるが、主として、④にも述べたように、馬鈴薯澱粉に作用する両酵素の反応機構の差異であると推察される。

以上、澱粉を加水分解してグルコースを生産する作用機構の異なる2種類のアミラーゼを、馬鈴薯澱粉に作用させ、その加水分解物の検討を、主に、GLCを用いておこなった。その結果、 $\alpha$ -amylase (Spitase CP-40) 及びglucoamylase (Spitase SR) の両酵素は、基質馬鈴薯澱粉に作用してグルコースを生産し、後者の活性は前者のその約24倍で、その力価は同酵素1g当たり約16,500単位であることがわかった。

謝 辞

本論文の御校閲を頂きました。本学食物栄養学科能美良作教授に対し、厚く御礼申し上げます。

## SUMMARY

The gaschromatography, paperchromatography and Somogyi's method were applied to determine the glucose produced from potato-starch by  $\alpha$ -amylase or glucoamylase. By using the gaschromatography, the glucose-producing activities of Spitase CP-40 ( $\alpha$ -amylase) and Spitase SR (glucoamylase) were 690 units and 16,500 units per gram, respectively. 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) C.C.Sweeley, R.Bentley, M.Makita and W.W.Wells; J. Am. Chem. Soc., 85 2497 (1963)
- 2) W.E.Trevelyan, D.P.Proctor and J.S.Harrison; Nature, 166 444 (1950)
- 3) J.E.Hodge and B.T.Hofreiter; Determination of Reducing Sugars and Carbohydrates, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol 1, pp. 380, Academic Press (1962)
- 4) 池永 徳治; 糖質研究法 (蛋白質 核酸 酵素 別冊), pp. 49, 共立出版 (1968)
- 5) 森本 由美子; 食物栄養課題研究, 広島文教女子大学短期大学部 (1983)
- 6) 三好 康之; 広島文教女子大学紀要 (自然科学編), 23 37 (1988)

—平成元年8月25日受理—

## 第6号訂正

p 22 ; 18行, p 23 ; 21行 「24.8g」を「25.1±4.3g」

p 22 ; 30行 「101」を「1101」

p 46 ; 22行 「られなかった。」を「られるといわれているが、それぞれの差は認められなかった。」にそれぞれ訂正。