

報 文

酵素による糖類の定量（第1報）*

——グルコースオキシダーゼによるブドウ糖の酸化能——

出 来 三 男**, 吉 村 実***

グルコースオキシダーゼによるブドウ糖酸化の最適反応条件について検討した。グルコースオキシダーゼ活性は McIlvain 緩衝液では pH5.5 から pH7.0 で安定であったが、クエン酸のみの緩衝液では活性がやや低下した。通気培養は静置培養に比較して著しく活性を高めた。ブドウ糖の水溶液（0～20 mg）2 ml に pH6.5 の McIlvain 緩衝液 2ml, 酵素液（Deoxin 0.25%）1ml を加え、アスピレーターで通気しながら 35℃の水浴中で 90 分間培養後、生成したグルコン酸を比色法あるいは電位差滴定法により定量した。ブドウ糖のいろいろな濃度で回収試験を行なった結果、90 分間の反応により、ブドウ糖 50 mg までの分解率の平均値は 100% となり、その標準偏差は 0.0408 で、対応するブドウ糖と吸光度との間には直線関係が成立した。この反応条件によりブドウ糖を容易に定量しうることを知った。

1 緒 言

食品中に含有されるブドウ糖、果糖、麦芽糖、ショ糖および乳糖のごときオリゴ糖の定量は税関分析においてしばしば要求されるが、食品中にこれらの糖類が単独に存在していることはまれであり、多くの場合 2 種以上の糖類が存在している。したがって、その分離定量にあたってはこれまで化学的な方法あるいはカラムクロマトグラフ pH, ペーパークロマトグラフ pH などを併用した方法が行なわれているが、糖類の化学構造が相互に類似しているためきわめて厳密な条件の設定と熟練が必要である。Coulthard¹⁾ らが *Penicillium notatum* の培養液からブドウ糖を酸化する酵素を認めてから、この酸化酵素によるブドウ糖の定量は代謝産物中の分離定量に利用されている。Kellin ら²⁾ は青カビのグルコースオキシダーゼを用いてマノメトリックにブドウ糖を定量している。また、Fleming ら⁵⁾ もでん粉の加水分解産物から麦芽糖の存在下でブドウ糖を定量している。しかるに、酵素的定量法は目的とする酵素標品が容易に得られないこと、反応に長時間を要する点および酵素液の不安定性などのため生体内代謝産物の追跡以外の分析にはあまり利用されていない。しかし、酵素のもつ基質特異性は糖類のような化学構造の類似するものを選択的に定量する

には有効な性質であると考えた。そこで、ブドウ糖を構成成分とする糖類をグルコースオキシダーゼにより酸化し、生成するグルコン酸を定量することにより各種混合糖を分離定量しようという目的から、本報告においてはグルコースオキシダーゼの反応条件について検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

糖類：ブドウ糖、果糖、麦芽糖、乳糖およびショ糖はすべて無水物（特級品）をデシケーター（塩化カルシウム上）中に 24 時間以上放置したものを使用した。

緩衝液：McIlvain 緩衝液（0.2M 第二リン酸ナトリウム、0.1M クエン酸）、Hasting-Sendroy 緩衝液（0.1M 第二クエン酸ナトリウム、0.1N カセイソーダ、0.1N 塩酸）のそれぞれを pH メーターで所定の pH に調整して用いた。

酵素液：デオキシシ（グルコースオキシダーゼおよびカタラーゼを含む、 3×10^4 U/g）を 0.25% の濃度になるようにそれぞれの緩衝液に溶解し、冷凍室に保存する。

2.2 実験方法

2.2.1 酵素反応

試料 2ml を大型試験管にとり、緩衝液 2ml を加え、これを 35℃の恒温水槽に入れ、酵素液 1ml を加えてアスピレーターで通気しながら一定時間培養した。グ

* 本報告は「酵素反応の分析化学的研究」の第1報とする。

** 長崎税関分析室 長崎市出島町 1-36

*** 長崎大学薬学部 長崎市文教町

ルコースオキシダーゼの適温は 20℃とされているが、著者の行なった実験では 40℃まで活性に変化が認められなかったもので以後の実験ではすべて 35℃で培養した。

2.2.2. グルコン酸の定量法

2.2.2.1 電位差滴定法

培養液はただちに 50ml 容ビーカーに移し入れ、これに正確に 0.1N カセイソーダ 5ml を加えマグネチックスターでかき混ぜながら pH7.5 まで 0.02N 硫酸で逆滴定し、酵素液を含まない試料について同様に操作してこれをブランク値とする。ブドウ糖が化学量論的に反応したとして生成したグルコン酸を次式によりブドウ糖として算出した。

$$\text{ブドウ糖 (mg)} = (\text{ブランク値} - \text{滴定値}) \times 0.02N \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ Factor} \times 3.6$$

2.2.2.2 比色法

Alt⁹⁾の方法を改変して行なった。すなわち、一定時間培養後培養液に 2.5M カセイソーダ水溶液 5ml を加えて反応を止め、つぎに 0.1M 硫酸銅水溶液 7.5ml を加えてよく振とうし、5 分間沸とう浴中で加熱冷却し蒸留水を用いて 25ml 容メスフラスコに移し入れ標線まで満たし、これを遠心分離してその上澄液を 0.25M カセイソーダを対照とし 660m μ で比色した。

2.3 装 置

島津製電位差滴定装置 AT 1, 日立製光電光度計 EPW1, 日立製ガラス電極 pH メーターを使用した。

3 結果と考察

3.1 緩衝液と至適 pH

数種の緩衝液を用いて各種 pH でのグルコースオキシダーゼ活性について検討した結果は Fig.1 に示したとおりである。

McIlvain 緩衝液および Sorensen 緩衝液ではかなり広い範囲で安定な活性を示すが、クエン酸塩のみの緩衝液では pH 安定性が低く活性も相対的に低下している。酵母によるブドウ糖からグルコン酸への生成は酸性側で促進されるが、Fig.1 で示したようにこの実験ではグルコースオキシダーゼ活性は pH5 以下と pH7 以上で急激に減少してくることがわかる。Foster³⁾ はカビのグルコースオキシダーゼについてリン酸塩を必要としないと述べており、著者ら⁴⁾ も糸状菌である、*Rhizopus* の無細胞抽出液を用いてブドウ糖からグルコン酸への酸化にリン酸塩の関与を必要としないことを認めている。クエン酸塩のみの緩衝液でグルコースオキシ

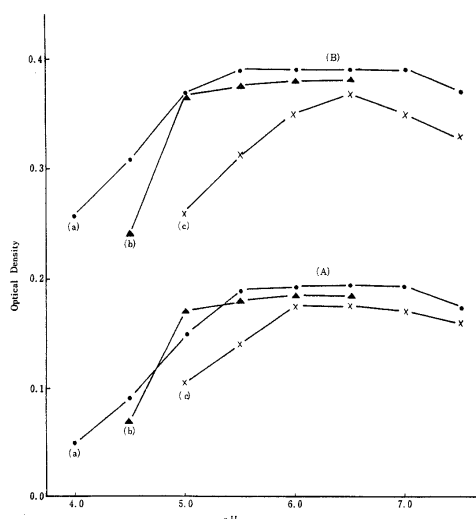


Figure 1. Influence of pH values on glucose oxidase activity. Reaction mixture: substrate 2 ml, deoxin(0.25% in each buffer) 1 ml, buffer 2 ml. The reaction mixture were incubated during aeration for 90 minutes at 35°C. Part A: glucose 20 mg as substrate; Part B: glucose 10 mg as substrate. Curve a: McIlvain buffer; Curve b: Sorensen buffer; and Curve c: citrate buffer.

ダーゼ活性が低下しているのは酵素の安定性とリン酸塩との間に関係があるものと考え。グルコースオキシダーゼの酵素標品はカタラーゼやムタローゼを含む場合が多く、このほかアミラーゼなどの混入されることもある。Flemin^gら⁵⁾ はマルターゼ活性を含むグルコースオキシダーゼ粗酵素標品を用いてブドウ糖を定量する場合、リン酸塩緩衝液ではマルターゼ活性は抑制できないが、Tris 緩衝液を用いるとマルターゼ活性は阻害されるとのべている。著者の使用した酵素標品は *Asp. niger* や *Penicillium glaucum* の糸状菌から得られた粗酵素標品でありマルターゼ作用の混入も考えられるが、麦芽糖のみを基質として培養した結果ペーパークロマトグラフ pH でもグルコン酸の生成は認められなかったことから、リン酸塩クエン酸系の緩衝液はこの実験において適した緩衝液であることを知った。

3.2 通気培養の効果

Müller⁶⁾ は *Asp. niger* の無細胞抽出液が酸素の存在でブドウ糖をグルコン酸に酸化することを認めた。グルコースオキシダーゼはオキシダーゼ的に働くものと、ブドウ糖から 2 個の水素が酸素分子に渡るデヒドロゲナーゼ的に作用する型がある。酸化的の場合には FAD 等を水素受容体とし脱水素反応では色素等が水素受容体となっている。そこで各種濃度のブドウ糖について、そのまゝ 35℃ で反応させたものとアスピレーターを用いて

通気しながら培養した場合について吸光度を比較した。

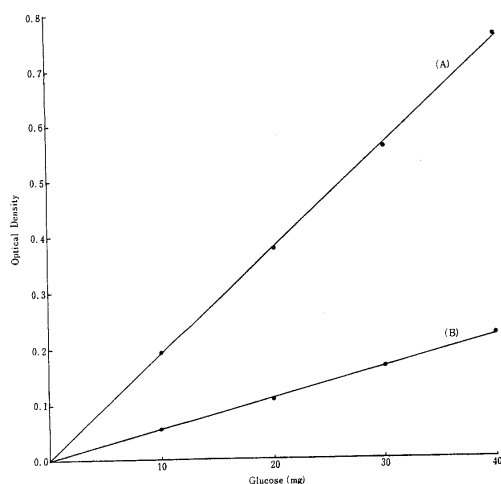


Figure 2. Effect of aeration on glucose oxidase activity. Reaction mixture : glucose 20mg as substrate, deoxin (0.25% in McIlvain buffer pH6.5) 2ml. The reaction mixture were incubated for 90 minutes at 35°C. Curve A : uncubated during aeration : Curve B : incubated without aeration.

Fig.2 で示したように、通気培養では著しく活性が高められた。この両者についてブドウ糖の分解率をみると、静置培養では基質濃度 40 mg で 90 分間培養により分解率 25% を示し、他方通気培養では同一基質濃度および培養時間で 100% の分解率を示した。この結果はグルコースオキシダーゼによるブドウ糖のグルコン酸への酸化に直接酸素の関与が必要であると云える。

3.3 反応時間と分解率

グルコースオキシダーゼによりブドウ糖を定量する場合反応に長時間を要することは定量法としての実用的な価値を低下させるので、短時間で多量の基質を分解する条件を選択する必要がある。

Table 1. に各種濃度のブドウ糖をいろいろな培養時間で反応させてその分解率を求めた結果を示した。培養時間 30 分間では酵素濃度 0.25% で 15~17 mg のブドウ糖を分解するが、反応時間を 90 分間にすると 40 mg のブドウ糖まで分解する。基質濃度、すなわちブドウ糖量を 60 mg まで高めると 120 分間の反応で 83.4% の分解率を示した。この分解率は酵素濃度を 2 倍に高めてもあまり変化はみられなかった。桑田等⁷⁾ は 8 mg~20 mg のブドウ糖を 6 時間培養して 97% から 99.5% の分解率を得ており、Fleming⁵⁾ や Mansford ら⁶⁾ は 0.5~2 mg の濃度範囲で 45 分から

Table 1. Oxidation Ratio of Glucose by the Glucose Oxidase

	Glucose 20.4 mg as substrate	Glucose 29.9 mg as substrate	Glucose 60.0 mg as substrate
Incubation times (min)	Glucose consumed (mg)	Glucose consumed (%)	Glucose consumed (mg)
15	10.47	51.32	10.47
30	14.80	72.55	17.68
60	19.13	93.77	25.98
90	20.39	99.95	29.90
120	20.39	99.95	29.90

Reaction mixture: each mg of glucose as substrate, deoxin (0.25% in McIlvain buffer pH 6.5) 2 ml. The reaction mixture were incubated during aeration for appropriate times at 35 °C

分間培養でブドウ糖を定量している。しかし、長時間の培養は分析の能率を妨げるばかりでなく、培養中に雑菌の汚染も起るので好ましい条件ではない。この実験においては、90 分間という短時間で基質濃度としてブドウ糖 40 mg 以下を完全にグルコン酸に酸化することができ、ブドウ糖の消費量に応じてグルコン酸が生成することを認めた。ブドウ糖 1 モルに対して 1 モルのグルコン酸が生成するからブドウ糖量に対応して吸光度をプロットすると Fig.3 のとおりとなり、吸光度とブドウ

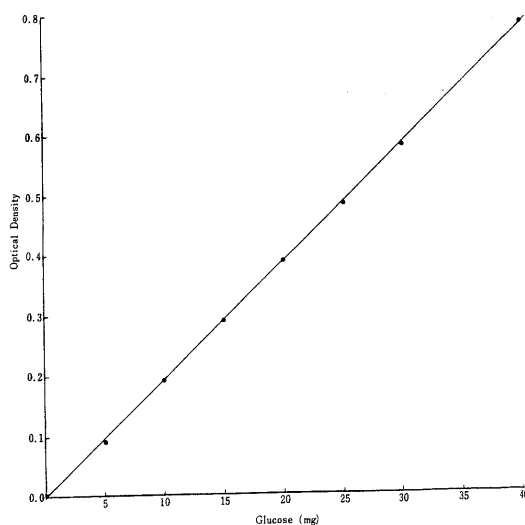


Figure 3 Calibration curve for glucose. Reaction mixture : substrate 2ml, enzyme solution 1ml (deoxin 0.25% in McIlvain buffer pH 6.5), McIlvain buffer 2ml. The . mixture were incubated during aeration for 90 minutes at 35°C

糖量との間には直線関係が成り立つ。

以上の実験結果からグルコースオキシダーゼによるブドウ糖の酸化において、McIlvain 緩衝液は酵素の安定性に対しても適しており、pH6.0～6.5 で最高の活性を示し、さらに通気培養により酵素活性が高められることを知った。

Table 2. Recovery for Glucose

Exp.No.	Glucose 20 mg as substrate		Glucose as substrate (mg)	Found as glucose (mg)	Recovery (%)
	Found as glucose (mg)	Recovery (%)			
1	19.95	99.75	5	5.00	100.0
2	20.03	100.02		5.00	100.0
3	20.01	100.01	10	9.98	99.8
4	20.02	100.01		10.02	100.2
5	19.99	99.95	20	19.99	99.95
6	20.03	100.02		19.95	99.75
7	19.99	99.95	30	30.06	100.20
8	20.00	100.00		30.03	100.10
9	20.01	100.01	40	40.02	100.05
10	19.97	99.85		40.04	100.01
			50	49.98	99.96
				50.01	100.02

The experiments were carried out in the same manner as indicated in Figure 3.

酵素濃度 0.25%, 90 分間の反応で 40 mgのブドウ糖を完全に分解することができた。したがって、この条件で定量できるブドウ糖量の最適濃度は 0～40 mg であり、分析精度については Table 2.に示したように、ブドウ糖 20 mgの分解率の標準偏差は 0.0269 となり、また 40 mgまでの各濃度のブドウ糖の分解率の標準偏差は 0.0408 でありかなり良好な結果が得られており、これらの結果から酵素による混合糖類の分離定量の可能性が示された。

本研究にあたり御指導、御便宜を賜った長崎税関鑑査部長窪井東一および関税鑑査官長谷場純良の各氏に感謝します。

文 献

- 1) C.E.Coulthard, W.F.Michaelis, G.Sykes, G.E.H.Strimshire, A.F.B.Standfast, J.H.Birkinshaw, H.Raistrick : *Biochem.J.*, **39**, 24 (1945)
- 2) D.Keilin, E.F.Hartree : *Biochem.J.*, **42**, 230 (1948)
- 3) J.W.Foster : *Chemical Activity of Fungi* (1949)
- 4) 蟹江松雄, 出来三男 : 鹿児島大学学術報告 7 号 (1958),
- 5) I.D.Fleming, H.F.Pegler : *Analyst*, **88**, 967 (1963).
- 6) D.Muller : *Biochem.Z.*, **199**, 136 (1928).
- 7) 桑田五郎 : 私 信
- 8) K.R.L.Mansford, R.K.Opie : *Analyst*, **88**, 646 (1963).
- 9) L.L.Alt : *Anal.chem.*, **27**, 749 (1955).



Determination of Sugars by Euzymes(1)
Ability of oxidation of Glucose by Glucose oxidase

MITSUO DEKI, MINORU YOSHIMURA

(Nagasaki Customs Laboratory, 1-36 Deshimacho, Nagasaki City.)

(Pharmaceutical Faculty University of Nagasaki, Bunkyocho, Nagasaki City)

The optimum reaction conditions of glucose oxidation by glucose oxidase was investigated.

The activity of glucose oxidase was stable with McIlvain buffer at pH 5.5 to 7.0, but slightly reduced with citrate buffer.

The aeration to the reaction mixture was promoted the glucose oxidase activity.

The test solution (2 ml) usually containing between 0 and 20 mg of glucose per one ml was incubated during aeration with 2 ml of McIlvain buffer at pH 6.5 and one ml of the enzyme solution (deoxin 0.25% in buffer, 3×10^4 U/g) for 90 minutes at 35°C. After incubation, the gluconic acid produced was determined colorimetrically with CuSO_4 as the color developing agent, or potentiometric titration with 0.02N sulfuric acid.

The recovery of several concentration of glucose was 100% as average to 50 mg of substrate incubated for 90 minutes, and the standard deviation were 0.0269 and 0.0408. A plot of optical density against the glucose, the linear calibration line was obtained for each concentration. We have found this reaction conditions to be reliable in assayed glucose

(Received Aug. 2, 1965)