

酵素による糖類の定量（第2報）※

— β -h-フラクトシダーゼによるシヨ糖の加水分解条件—

出 来 三 男^{***}, 吉 村 実^{***}

シヨ糖の酵素的加水分解は選択性が高く共存糖類の影響が少ないので、酵母 β -h-フラクトシダーゼによる加水分解条件について検討した。試料（シヨ糖 0～5g）に酵素液 1～2ml（緩衝液 pH6.5 に溶解）を加え最終酵素濃度を 0.2%とし、緩衝液（pH6.5）を用いて全量を 10～20ml とし、35℃で 90 分間反応させた。実験に使用した酵素は pH5 から pH7 で高い活性を示し、アルカリ側では不可逆的失活をおこした。酵素液は 0℃以下で保存すると 3 ケ月間は活性に変化がなかった。この条件で 5g のシヨ糖を加水分解することができた。この方法を二、三の食品に応用したところ、シヨ糖の加水分解法として充分に利用できることを知った。

1 緒 言

食品中のシヨ糖分定量としては、酸で加水分解後生成した転化糖を化学的方法で定量する手段が広く用いられている。しかし、この酸による糖類の加水分解反応は選択性がないため使用する酸の濃度や加熱条件に著しく左右される。塩酸を用いてシヨ糖を加水分解する場合、分解完了に必要な最少時間内においては果糖の再分解は起らないが¹⁾、比較的高濃度の塩酸で加水分解を行なうと、分解完了後短時間の加熱でも生成した果糖が分解して還元力を減少し²⁾、その結果シヨ糖の定量値を低下させるので使用する酸の濃度、加熱温度および加熱時間等の条件を定めるのにかなり厳密さが要求されている。

さらに、通常税関で取扱われている食品中には、麦芽糖や乳糖のほか、デキストリンおよび澱粉等の多糖類を共存する場合が多く、これらの糖類は、加水分解に使用する酸の濃度によっては分解されて単糖類になることも考えられる。ことに、乳糖はシヨ糖を加水分解する条件で分解されて還元力を増すために乳糖共存中のシヨ糖を定量する場合補正する方法³⁾もあるが、平松⁴⁾によればシヨ糖の加水分解条件を厳守すれば共存する乳糖の分解は起らないことを報告している。しかし、酸によるシヨ糖の加水分解反応は多少なりとも共存する寡糖類の分解や果糖の再分解等を惹起していると考えられる。

これに対して、所謂グルコシダーゼによる糖類の酵素

的水解反応は、糖分子の構造に対して絶対特異性を示す酵素が得られることから寡糖類および配糖体の水解反応に広く利用されている。シヨ糖を分解する酵素系としてシヨ糖の橋状酸素を中心に、ブドウ糖側の結合を分解する α -グルコシダーゼと果糖側の結合を開裂させる β -h-フラクトシダーゼがある。これらの酵素は起源によつて酵素化学的な性質を多少異にするが、酵母の α -グルコシダーゼはアグリコンが 4- α -グルコースや β -h-フラクトシル基に働く等広いアグリコン特異性をもっているので、麦芽糖のような α -グルコシド結合を有する糖類を多量に共存する食品中のシヨ糖だけを選択的に加水分解するのに適当な酵素ではない。しかし、 β -h-フラクトシダーゼは β -フラクトシル基を有する糖類に特異的に作用してこれを分解し、ラフィノースに対するアグリコン特異性は低い⁵⁾ので食品中のシヨ糖を水解するのに適した酵素と考える。

本実験においては、酵母の β -h-フラクトシダーゼによるシヨ糖の加水分解条件について検討したので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

糖類：ブドウ糖、果糖およびシヨ糖は無水物、麦芽糖は 1 水物を 24 時間以上デシケーター中（塩化カルシウム上）で乾燥したものを使用した。

緩衝液：McIlvain 緩衝液（0.02M 第 2 リン酸ナトリウム、0.1M クエン酸）をガラス電極 pH メーターで所定の pH に調整した。

酵素液：メルク製酵母インベルターゼ（ β -h-フラ

※本報告は「酵素反応の分析化学的研究」の第2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

クトシダーゼ) 100Unit/mg を緩衝液に溶解して 2~5% の溶液とし、その一定量をとって反応液に加え最終酵素濃度をそれぞれ 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% とした。

2.2 実験方法

2.2.1 酵素反応

試料(ショ糖として 1~6g) を緩衝液に溶解後その一定量を大型試験管にとり、酵素液 1ml を加え、反応液の全量が 10~20ml となるように緩衝液を加えて 35°C の恒温水浴中で一定時間反応後、必要な場合は 0.1N カセイソーダ 5ml を加えて反応を停止させた。転化糖を定量する場合は反応液を中和後定容して行なった。

2.2.2 転化糖定量

レエーン・エイノン法および転化糖を標準糖液とした逆滴定法により定量した。

2.2.3 ペーパークロマトグラフィー

糖類のペーパークロマトグラフィーは展開剤として n-ブタノール:酢酸:水 (4:1:1) を用い、上昇法により 2 回多重展開後、発色試薬としてアニリンハイドロゲンフターレイトを噴霧し、130°C で 5 分間加熱して顕色した。

3 結果と考察

既に前報⁵⁾においてグルコースオキシダーゼによるブドウ糖の定量条件について検討し、かなり高い精度でブドウ糖を定量できることを知ったので、本実験においてはそれとの関連性において、酵素作用の反応組成に用いる緩衝液は前報⁵⁾のリン酸-クエン酸系緩衝液をそのまま使用することにした。

3.1 至適 pH の検討

β -h-フラクトシダーゼ (以下 Fase と略す) は酵素標品の起源によって酵素反応の最適 pH を異にしており、例えば細菌サッカラーゼは pH8 付近で最高の酵素活性を示すが、酸性側では急激に活性が低下することが知られている。⁶⁾ これに対して酵母の Fase は一般に酸性側に至適 pH を有するとされているので、まづ酵素作用の最適 pH について検討した。すなわち、基質としてショ糖 500mg を含有するように各種 pH に調整した反応液に酵素の最終濃度が 0.01% になるように酵素液を加え、35°C の恒温水浴中で正確に 30 分間反応後、0.1

N カセイソーダ 5 ml を加えて反応を停止させ、中和後定容して生成した転化糖を定量し酵素活性を比較した。

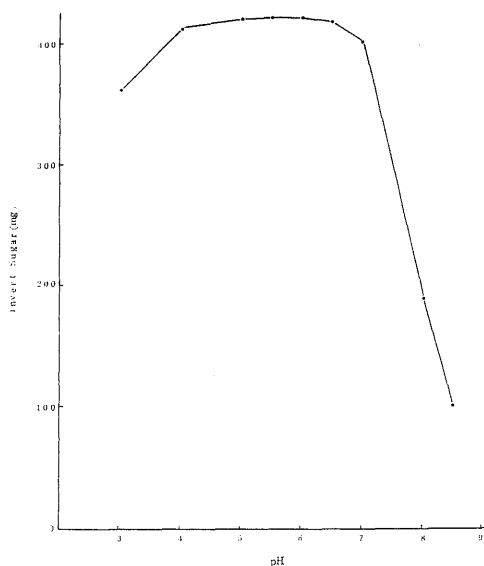


Figure 1. Optimum pH

Enzyme Solution 1ml (0.01%), Sample 5ml (Sucrose 500mg) Total Volume 10 ml with Buffer, 35°C, 30min. Incubated.

Fig.1 に示したように pH4 から pH7 の範囲では活性にほとんど差がみられない。しかも pH3 における活性は最高活性の約 80% 近く保持されており、酸性側では広い範囲で極めて安定であった。他方、pH がアルカリ側に傾くと転化糖の生成は急激に減少し、pH9 では最高活性の約 10% にまで低下した。

3.2 酵素の安定性

酵素が一般の分析化学に汎用されていない理由の一つとして、酵素材料の不安定性が挙げられている。さきの至適 pH の検策において、アルカリ側で活性が減少することが判ったが、この実験においては 35°C の水浴中で 30 分間という反応時間で生成する転化糖量を測定して活性を求めているのでこの反応期間中に酵素の不活性化が起こることも考えられる。そこで各種 pH に対する酵素の安定性について検討した。すなわち、種々の pH の緩衝液で 5% の濃度に酵素液を調整し、これをそれぞれ、0°C、20°C、35°C に 24 時間放置後、緩衝液を用いて再び pH6.5 とし、基質としてショ糖 500mg を含む反応液に最終酵素濃度が 0.01% となるように加え、

Table 1. Stability for pH

pH	3		4		5		6		7		8		9	
Temp.	Invert	Ratio	Invert	Ratio	Invert	Ratio	Invert	Ratio	Invert	Ratio	Invert	Ratio	Invert	Ratio
(℃)	sugar	(%)	sugar	(%)	sugar	(%)	sugar	(%)	sugar	(%)	sugar	(%)	sugar	(%)
(mg)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
0	332	78.9	418	99.3	421	100	420.8	99.9	421	100	191	45.4	83	19.7
20	329	78.1	419	99.5	421	100	421	100	420.8	99.9	123	29.2	51	12.1
35	316	75.1	419	99.5	421	100	421	100	413	99.8	120	28.5	43	10.2

Enzyme.....1ml (0.01%)

Sample.....5ml (Sucrose 500 mg)

Total10ml pH 6.5 Buffer, 35°C, 30 min.

35°Cで 30 分間反応させ生成する転化糖量を求めた結果, Table 1 に示したように各種 pH で酵素液を処理した場合, 処理温度間での活性の相違はほとんどみられないが, 処理した pH により顕著に差が現れ, この活性の動向は至適 pH 曲線と類似している。pH8 以上での活性の著しい低下は, この酵素がアルカリ側で不可逆的な不活性化を起していることを示している。

なお, pH6.5 の緩衝液で調整した酵素液を 0°C以下の氷室中に保存しておく少なくとも 3 ヶ月間は活性に変化がなかった。また耐熱性について試験した結果, 70°Cで 15 分間保持するか, あるいは 100°Cで 5 分間加熱すると完全に不可逆的な失活を起した。

3. 3 阻害剤の影響

酵素作用を阻害する物質が反応系に多量に含まれていては正常な酵素反応が行なわれないことは当然である。一般に重金属イオンの中には酵素作用を阻害したり賦活するものがある。Fase に対するこれら重金属イオンの影響として, Cu, Ag, Hg の各イオンは阻害的に作用することが知られている。

Table 2 に各種金属イオンの Fase に対する影響を示した。10⁻²M および 10⁻³M の濃度では殆んど酵素作用に影響を与えないことがわかった。青カビ⁷⁾等のβ-ガラクトシダーゼはリンゴ酸やクエン酸等で活性が著しく阻害されるので Fase に対する各種有機酸の影響について検討した。Table 2 に示したように通常食品中に含まれている有機酸は 10⁻²M から 10⁻³M の添加では全く阻害作用は認められなかった。

Table 2. Effect of Metals or Organic Acids on Invertase Activity

	10 ⁻³ M		10 ⁻² M			10 ⁻³ M		10 ⁻² M	
	Invert sugar	Ratio	Invert sugar	Ratio		Invert sugar	Ratio	Invert sugar	Ratio
	(mg)	(%)	(mg)	(%)		(mg)	(%)	(mg)	(%)
CaCl ₂	419.3	99.64	419.1	99.60	Oxalate	421.2	100.17	420.6	100.02
CoCl ₂	419.6	99.71	419.4	99.67	Acetate	419.7	99.81	420.2	99.93
FeSO ₄	420.9	100.02	421.0	100.05	Malate	420.2	99.93	420.2	99.93
MgCl ₂	423.5	100.64	423.1	100.55	Tartrate	420.4	99.98	419.8	99.83
MnSO ₄	420.6	99.95	421.2	100.10	Succinate	419.6	99.79	419.1	99.67
ZnCl ₂	419.8	99.76	420.5	99.93	Lactate	420.8	100.07	421.0	100.12
Nile	420.8	100	420.8	100	Nile	420.5	100	420.5	100

Enzyme.....1ml (0.01ml%)

Sample.....5ml (Sucrose 500 mg)

Additive.....4ml

Total10ml, pH6.5 Buffer, 35°C, 30min.

3. 4 酵素標品の純度

酵素を用いる実験では使用する酵素標品が純粋であることが条件になるが単一の酵素のみを高い純度で収率よく得ることは容易でない。酵母の *Fase* はアミラーゼや α -グルコシダーゼおよび β -グルコシダーゼ等を混在する場合が多いので、とくに食品中のショ糖の加水分解にあたって混在してはならない α -グルコシダーゼの有無についてしらべた。すなわち、基質として麦芽糖 500mg を緩衝液 (pH6.5) に溶解し、最終酵素濃度が 0.1% となるように酵素液を加えて 35℃ で 90 分間反応後、反応液から分解生成物をペーパークロマトグラフィーにより検策した。Fig.2 にペーパークロマトグラムを示した。

麦芽糖を基質とした反応液からは麦芽糖以外の糖類は全く検出されなかった。 α -グルコシダーゼの至適 pH は pH6 から pH8 にあるので、この反応条件で麦芽糖が水解されなかったことから α -グルコシダーゼは混在しないものといえる。同様な反応条件でショ糖を基質とした場合の分解生成物を細密的に検策すると、反応時間 15 分間で転化糖と未反応のショ糖が僅かに検出されるほか、*R_f* 値の低いところにオリゴ糖と推定されるスポットが認められた。このスポットは 30 分間の反応でも

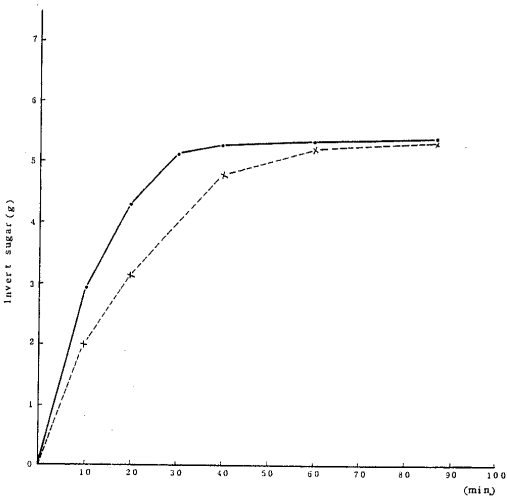


Figure 2. Rate of Sucrose Hydrolysis.
Enzyme Solution 2ml Sucrose 5g, Total Volume 20ml with Buffer pH6.5 at 35 °C Incubated.
————— 0.5% enzyme concentration
----- 0.2% enzyme concentration

Table 3. Ratio of Hydrolysis

Enzyme concentration (%)	Substrate (%)	30 min. Incubation		60 min. Incubation	
		Invert sugar(mg)	Ratio (%)	Invert sugar(mg)	Ratio(%)
0.01	0.5	419.8	79.61	518	98.42
0.02	0.5	526.0	99.94	526	99.94
0.05	0.05	52.1	98.99	52.4	99.56
	0.1	104.9	99.66	105.2	99.94
	0.5	526	99.94	526.3	99.99
	1.0	905.7	86.04	915	86.93
0.1	0.05	52.6	99.94	52.5	99.75
	0.1	105.2	99.94	105.3	100.04
	0.5	526.3	99.99	526.3	99.94
	1.0	970	92.15	985	93.56
0.2	0.05	52.5	99.75	52.6	99.94
	0.1	105.3	100.04	105.3	100.04
	0.5	526.1	99.95	526.2	99.97
	1.0	999.5	94.95	1052.5	99.99
0.5	0.05	52.6	99.94	52.6	99.94
	0.1	105.3	100.04	105.3	100.04
	0.5	526.3	99.99	526.3	99.99
	1.0	1053.0	100.04	1052.8	100.02

Enzyme Solution 1ml, Sample 5ml, Total Volume 10ml with Buffer pH 6.5 at 35°C

Table 4. Rate of Hydrolysis

Sucrose (g)	0.2% Invertase				0.5% Invertase				0.1N
	30 min		60 min		30 min		60 min		HCl
	Invert sugar (mg)	Ratio (%)	Invert sugar (mg)	Ratio (%)	Invert sugar (mg)	Ratio (%)	Invert sugar (mg)	Ratio (%)	(0.09%) (mg)
1	1.052	100	1.051	99.9	1.053	100.1	1.059	100.7	1.052
2	2.108	99.9	2.109	99.9	2.112	100	2.112	100	2.112
3	3.154	99.9	3.158	100	3.162	100.2	3.161	100.1	3.157
4	4.064	96.3	4.218	100	4.220	100	4.222	100	4.219
5	4.070	77.3	5.186	98.5	5.168	98.1	5.267	100	5.265
6	4.068	64.4	5.183	82.1	5.166	81.8	5.264	83.4	6.313

Enzyme Solution 1ml, Total Volume 10ml with Buffer pH 6.5 at 35°C Incubated

認められるが、さらに 60 分の反応ではこのスポットと近接してさらに一個のオリゴ糖が確認された。反応時間を 90 分まで延ばすとこれらのスポットはほとんど消失して転化糖のスポットのみが検出された。この Rf 値の低いスポットは糖転位反応により生成したオリゴ糖と考えるが反応時間を 90 分にすると消失してくることから、β-フラクトシド結合をもったオリゴ糖であり、最終的には Fase の基質として再分解したものと考えられる。

3. 5 シヨ糖の加水分解条件

これまで Fase の酵素化学的な一般性質について検討したが、これらの結果からさきにグルコースオキシダーゼによるブドウ糖の定量実験で使用したリン酸-クエン酸系の緩衝液 pH6.5, 35°C という反応条件が Fase によるシヨ糖の加水分解にも使用できることをしたので以後この反応条件でシヨ糖の水解条件について検討した。

酵素濃度を高めると分解される基質量も増すが、実際に分析に適用する場合は経済性も考慮する必要がある。酵素濃度と基質分解量との関係を見ると、Table 3 に示したように、酵素濃度が 0.01% では 30 分反応で 50mg のシヨ糖を 80% 転化するが、0.5% に酵素濃度を高めると 1g のシヨ糖を 30 分から 60 分の反応で完全に加水分解することができた。

これを塩酸による加水分解法（試料 100ml に 0.1N 塩酸 30ml をを加え沸とう浴中で 30 分間加熱）²⁾ と比較した。すなわち、シヨ糖濃度を種々にかえて両方法で各々加水分解し、塩酸分解によって生成した転化糖量を 100 としてこれに対応する比を求めた結果を Table

4 に示した。

酵素濃度が 0.2% では 60 分間に 4g のシヨ糖を完全に加水分解したが、6g のシヨ糖を完全に転化糖にすることはできなかった。

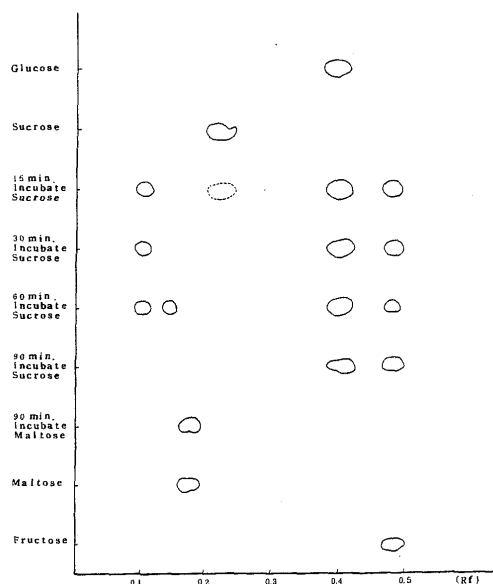


Figure 3. Incubation Products

Sample...1g of Sucrose, Enzyme Concentration 0.2%, Total volume 10ml with Buffer pH6.5, at 35°C Incubated.

Solvent System : n-BuOH-Acetic acid-Water (4 : 4 : 1), Multiple Development.

Table 5. Determination of Invert Sugar by the Method of Invertase Hydrolysis

No.	Experiment A		Experiment B	
	0.2% Invertase	0.1N HCl (0.09%)	0.2% Invertase	0.1 N HCl (0.09%)
	(%)	(%)	(%)	(%)
1	58.95	58.74	55.38	55.06
2	59.03	58.55	55.56	55.43
3	58.86	58.69	55.33	55.11
4	58.92	58.82	55.33	55.32
5	59.03	58.69	55.41	55.18
AV	58.96	58.70	55.40	55.22
σ	0.0731	0.0947	0.0983	0.1528
t	4.714		2.239	

Invert Sugar Contents (%)							
	Glico※	Hinode※	Molasses	Bontan※	Pineapple	Hinode※	Molasses
0.2 % Invertase	64.27	54.23	59.68	55.84	75.04	53.94	61.36
0.1 N HCl	64.14	54.07	59.60	55.91	75.18	53.77	61.22

Enzyme Solution 5ml, Sample 10ml, Total Volume 20mg with Buffer pH 6.5 at 35°C

90min. Incubated.

Fig. 3 はショ糖の分解量を経時的に求めたものであり、転化糖の生成は短時間に急激な増加をしており、90分間では0.2%と0.5%の濃度の酵素液による分解率は殆んど一致している。

食品類のショ糖を化学的な方法で定量する場合の濃度範囲で Fase を用いて短時間に加水分解できることをしたので、これを二、三の食品に適用した。輸出用菓子類および糖みつをそれぞれ約 10g とり、100ml に定容し、その 10ml を大型試験管に入れ、酵素の最終濃度が0.2%となるように酵素液を加え35°Cで90分間反応させ、生成した転化糖を求め塩酸分解法と比較した。

Table 5 に示したように、酵素法がやや高い値を示す傾向がみられるが、繰返し実験による各測定値の標準偏差は酵素法が低い値を示しておりかなり高い精度が得られた。また酵素法と塩酸法との測定値間の有意性を検定すると $t_{0.01}$ のときの t 表の値4.604 より低いか、あるいは殆んど同一数値を示すことから両方の間には有意の差はないとみられる。数個の食品で得られた値は両法でよく一致しており酵素によるショ糖の加水分解が可

能であることを知った。

4 総 括

酵母の β -h-フラクトシダーゼを用いてショ糖の加水分解条件について検討した。

1. 使用した酵素材料は pH5 から pH6.5 の広い範囲で活性に変化がないが、pH8 以上では不可逆的な失活がおこった。

2. 緩衝液 (pH6.5) に溶解した酵素液は 0°C以下に保存すれば3ヶ月間は活性を維持できた。

3. 二、三の有機酸は反応を阻害しなかった。

4. 最終酵素濃度 0.2%, 35°C, 90 分間の反応によりショ糖 5g までを加水分解することができ、従来行なっていた塩酸分解法に比較して劣らない結果を得た。

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、関税鑑産官江藤正美および関税鑑査官長谷場純良の各氏に深謝します。

〔本研究は昭和41年1月28日第2回税関分析研究発表会で報告した。〕

※ 商品名

報 文 : 出来・吉村

文 献

- 1) 小曾戸和夫, 数見秀次郎, 小鷹正之, 薮花雄: 日農化, 32,671 (1958).
- 2) 出来三男: 税関鑑査資料, 第 5 号, 6 (1959).
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法註解, P.251.
- 4) 平松鐔一: 本誌, 1,23 (1965).
- 5) 出来三男: 本誌, 1,1 (1965).
- 6) 根来秀夫: 日農化, 31,250 (1957).
- 7) 村上浩: 科学, 20,326 (1950).
- 8) W.W.Pigman: AdV.Enzymol,4.41 (1946)

☆

Determination of Sugars by Enzyme(2) on the Hydro— lysis Conditions or Sucrose by β —h—Fructosidase

MITSUO DEKI, MINORU YOSIMURA

(Nagasaki Customs Laboratory,1—36 Deshimacho,Nagasaki City)

(Pharmaceutical Faculty,University of Nagasaki Bunkyo cho,Nagasaki City)

As the enzymatic hydrolysis of sucrose is specific in the presence of other sugars, the conditions of sucrose inversion by β —h—fructosidase from yeast was investigated. Powdered β —h—fructosidase are dissolved into McIlvain buffer solution at pH6.5 to appropriate enzyme concentration.

Add 1 to 2 ml of enzyme stock solution to test solution containing 0 to 5 g of sucrose,and the reaction mixture are made up to 10 to 20ml with buffer solution (pH6.5) to involving 0.2% enzyme concentration finally,and the mixture was incubated for 90minutes at 35°C.

After incubation,invert sugar produced in the reaction mixture was determined by the method of Lane—Eynone and or Back Titration.

The activity of β —h—fructosidase was stable at pH 5 to pH 7,but inactivated irreversibly at pH 8 and over.The activity of enzyme stock solution was not decreased for at least 3 mounths to stored in refrigerator at under 0°C.

5 g of sucrose was hydrolysed to invert sugar by this method.

The few food stuffs were analysed invert sugar by this enzymatic hydrolysis,and the results compared with those from an acid hydrolysis

We have found this enzymatic hydrolysis to be reliable in use.

(Received Feb.14.1966)