

アルファ化度の測定における分解酵素の検討

池田 英貴^{*}, 郡司 正之^{*}, 高山 義紀^{*}, 富田 健次^{*}

Examination of Degrading Enzymes in Measurement of Gelatinization Degree

Hideki IKEDA*, Masayuki GUNJI*, Yoshinori TAKAYAMA* and Kenji TOMITA*

*Yokohama Customs Laboratory

1-6-2 Shinko, Naka-ku, Yokohama 231-8401 JAPAN

We calculated gelatinization degrees of corn starch, potato starch, rice flour, red bean flour and boiled red beans from the quantities of glucose generated by them when they were reacted with enzymes, and the results were examined. The examination confirmed that mixed enzymes and crude enzymes were unsuitable for gelatinization measurement because of their high degrading power against raw starch, and that a single enzyme made to react with glucoamylase gave the best result. In the case of boiled red beans, however, starch was wrapped in protein membrane and the enzyme was prevented from functioning fully, which tended to reduce measured values. This indicates that prudent, scrupulous preparation is essential in the pretreatment process.

1. 緒 言

糊化でん粉は、でん粉に水を加え加熱処理してできた糊状のものを、乾燥後、粉状にしたもので、製紙工業、繊維工業、食品工業等の分野で広く用いられている。^{1) 2)} この糊化でん粉は、関税分類上、変性でん粉の一つとして、税番第35.05項に分類され、「21.3%あるいは25.5円/kgのいずれか高い方」(協定税率)が適用されている。しかし糊化(アルファ化)の程度が低いものは、生でん粉として税番第11.08項に分類され、「119円/kg」(協定税率)が適用されており、税率格差も非常に大きいことから、糊化の程度(アルファ化度)を正確に測定することは、関税分類上、重要である。

一般にアルファ化度の測定は、二分した試料を一方はそのまま、他方は加熱あるいはアルカリ処理等により完全に糊化した後、両者に分解酵素を作用させ、生成するグルコースの量の比から算出している。^{3) - 6)}

それゆえ使用する酵素は、生でん粉には作用せず、糊化でん粉にのみ作用するものが望ましい。しかし同じ酵素であっても、その由来(原料となる起源)により、あるいは共存成分によりでん粉への作用も異なるといわれており^{2) 7) - 10)}、使用する酵素の選択が、測定上、重要である。

算出されるアルファ化度により分類が異なることから、測定する際に使用する酵素を、統一することは、税関間における測定値の相違を抑えるとともに、適正に分類を行う上で必要であると考えられる。

此度は、でん粉の分解酵素としてよく用いられる α アミラーゼ及びグルコアミラーゼのうち一般的なものについて、由来の異なるものを、各々単独で使用した場合及び組合せて使用した場合について、その分解能力が測定結果に与える影響を比較し、検討を行った。

2. 実 験

2.1 試薬及び試料

でん粉、穀類及び豆類

糊化とうもろこしでん粉:「マツノリンCM」(松谷化学製)

| | |
|-----------|----------|
| とうもろこしでん粉 | : SIGMA製 |
| 馬鈴薯でん粉 | : 和光純薬製 |
| 糊化米粉 | : 輸入糊化米粉 |
| 米粉 | : 輸入米粉 |
| 小豆 | : 市販国産小豆 |

* 横浜税関業務部 〒231-8401 神奈川県横浜市中区新港1-6-2

酵素

α アミラーゼ

Bacillus subtilis (枯草菌) 由来 : 和光純薬製

Porcin. pancreas (豚膵液) 由来 : SIGMA 製

グルコアミラーゼ

Aspergillus niger (黒カビ) 由来 : SIGMA 製

Rhizopus niveus (クモノスカビ) 由来 : 生化学工業製 (純)

Rhizopus niveus (クモノスカビ) 由来 : SIGMA 製 (粗)

2. 2 分析装置及び分析条件

装置

恒温振盪水槽

Shaking Bath BW200 : ヤマト科学製

(37℃, 2 時間, 振盪数 90 回/分)

条件

酵素⁶⁾

α アミラーゼ : 80 u/ml

グルコアミラーゼ : 20 u/ml

反応温度 : 37℃

反応時間 : 2 時間

反応時の振盪数 : 90 回/分

反応に使用した酢酸緩衝液 : 0.2M (pH4.8)

アルファー化度の測定法 : ハーネス法

2. 3 実験方法

各試料でん粉を, でん粉の含有量が約1.0gになるように正確に量り取り, ガラスホモジナイザーで慎重に摩砕した後, 250mlに定容した。

この試料液を100mlメスフラスコに50mlずつ採取し, 一方(A)はそのまま100mlに定容し, 他方(B)は沸騰浴中で時々振り混ぜながら一時間半程加熱し, 冷却後100mlに定容した。Bのうちとうもろこしでん粉と米粉については, 入手した糊化とうもろこしでん粉及び糊化米粉を各々そのまま摩砕し, 定容した。

次に200mlメスフラスコに上記A, Bを, 各々100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100の割合で総量が20mlになるように採取した。これに酵素(混合酵素は α アミラーゼ80u/ml, グルコアミラーゼ20u/mlになるように, 単独酵素はグルコアミラーゼ20u/mlになるように調製した0.2M酢酸緩衝液)を1ml加え, 恒温振盪浴中で反応させた。

反応後, 除蛋白剤を加え, 200mlに定容したものを検体とした。

検体中のグルコース量の測定にはハーネス法を用いた。

3. 結果及び考察

3. 1 単独酵素及び混合酵素の分解能力の比較

3. 1. 1 とうもろこしでん粉

税関分析法では酵素の力価の測定にとうもろこしでん粉を用いていることから⁶⁾, 穀類でん粉として, とうもろこしでん粉を用いて分解能力の比較を行った。

糊化でん粉と生でん粉とをTable 1の割合で調製し, 検体とし

た。この検体にTable 2の酵素を添加し, ハーネス法により測定を行った。生成したグルコースはScheme.1によりでん粉に換算し, 算出した。

Table 1 Composition of Preparations

| | Gelatinized Flour or Starch (%) | Flour or Starch (%) |
|---------------|---------------------------------------|------------------------|
| Preparation 1 | 0 | 100 |
| Preparation 2 | 25 | 75 |
| Preparation 3 | 50 | 50 |
| Preparation 4 | 75 | 25 |
| Preparation 5 | 100 | 0 |

Table 2 Enzymes

| | Origin of Enzymes |
|-------------------|--|
| α -Amylase | <i>B. subtilis</i> <i>P. pancreas</i> |
| Glucoamylase | <i>A. niger</i> <i>R. niveus</i> (Pure) <i>R. niveus</i> (Crude) |
| Mixed Enzyme | <i>B. subtilis</i> + <i>A. niger</i> <i>B. subtilis</i> + <i>R. niveus</i> (Pure) <i>B. subtilis</i> + <i>R. niveus</i> (Crude) <i>P. pancreas</i> + <i>A. niger</i> <i>P. pancreas</i> + <i>R. niveus</i> (Pure) <i>P. pancreas</i> + <i>R. niveus</i> (Crude) |

Scheme.1 Calculation of Geratinization degree

Geratinization degree (%)

$$= \frac{\left(\frac{\text{Product Weight of Glucose}}{\text{Dry Weight of Sample}} \right) \times 0.9}{\left(\text{Dry Weight of Sample} \right)} \times 100$$

3. 1. 1. 1 単独酵素

結果をFig.1, Fig.2に示す。

各々生でん粉に対する分解能力を持つこと, 及び由来により分解能力が異なることが分かる。

また同じ由来の酵素であっても, 純酵素と粗酵素では分解能力に大きな違いがあるのが分かる。これは粗酵素の場合, 酵素

中に含まれる不純物（共存成分）により分解が促進されているためと考えられる。^{7) -10)}

3. 1. 1. 2 混合酵素

結果をFig.3～Fig.9に示す。

グルコアミラーゼは α アミラーゼ、イソアミラーゼなどが共存すると、その分解能力は促進されるといわれており^{7) -10)}、此度の結果も、いずれの場合においても、混合前と比べ分解能力が大きく向上しているのが分かる。

また酵素の組合せによっても分解能力に違いがみられ、由来が分解能力の促進に影響していることも分かる。(Fig.9)

このうち*R.niveus*（クモノスカビ）由来の粗酵素が、混合前と後でほとんど変化が見られないのは、粗酵素の場合、もとも

と共存成分を含んでいるため、それ以上に成分を加えても分解能力が変化しないためと考えられる。(Fig.7, Fig.8)

これまでの結果をまとめると、

- ・酵素は由来により分解能力が異なる。
- ・単独酵素であっても生でん粉に対する分解能力を有する。
- ・酵素は混合することで分解能力が促進され、生でん粉に対する分解能力も大きく向上する。
- ・粗酵素の場合、含まれている共存成分のため、単独酵素であっても分解能力は高い。

ことが確認された。

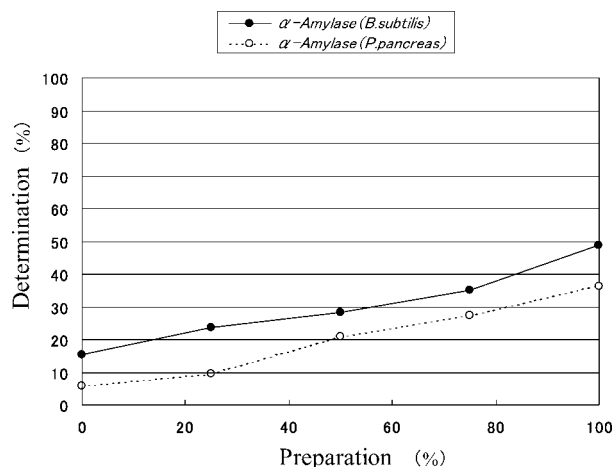


Fig. 1 Content of Geratinized Starch (Corn)

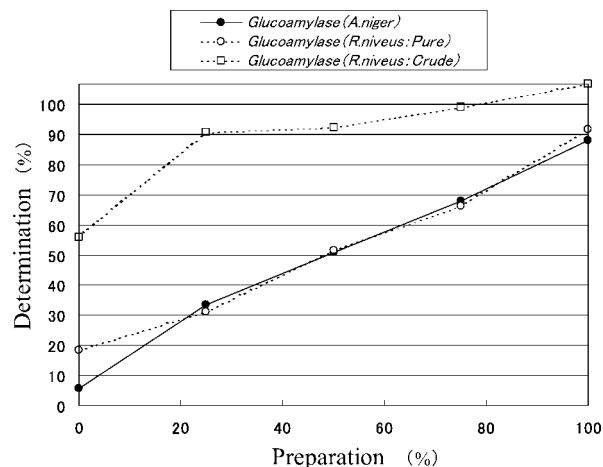


Fig. 2 Content of Geratinized Starch (Corn)

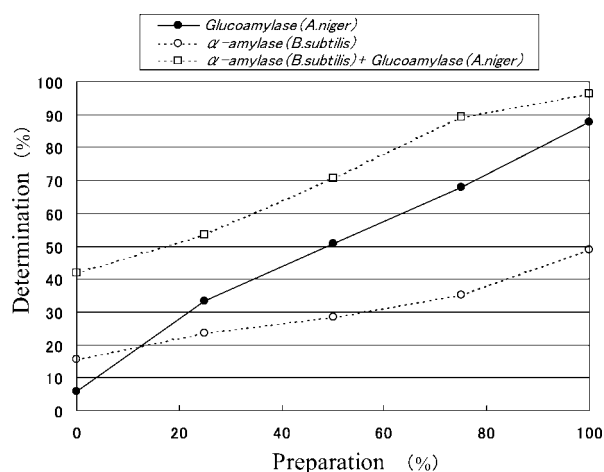


Fig. 3 Content of Geratinized Starch (Corn)

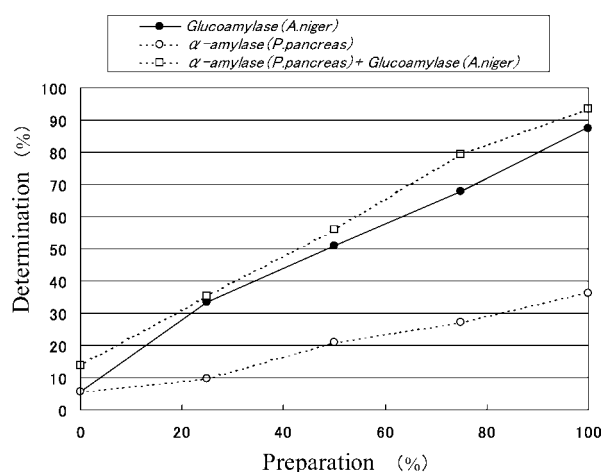


Fig. 4 Content of Geratinized Starch (Corn)

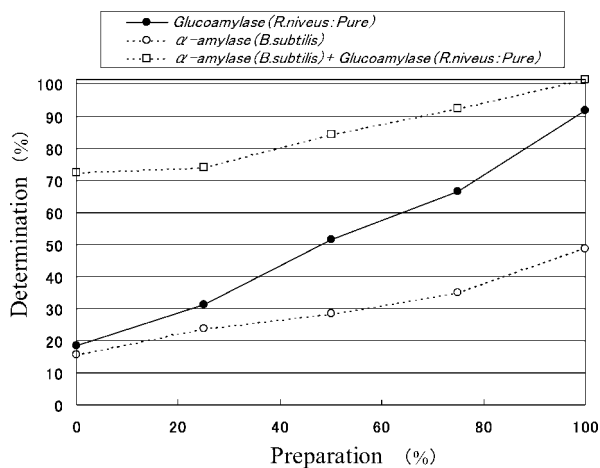


Fig. 5 Content of Geratinized Starch (Corn)

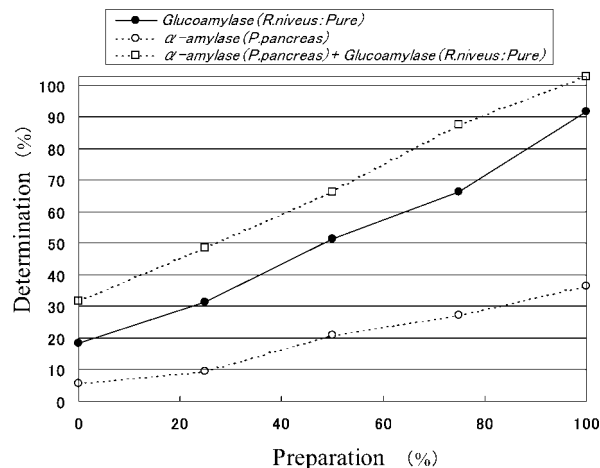


Fig. 6 Content of Geratinized Starch (Corn)

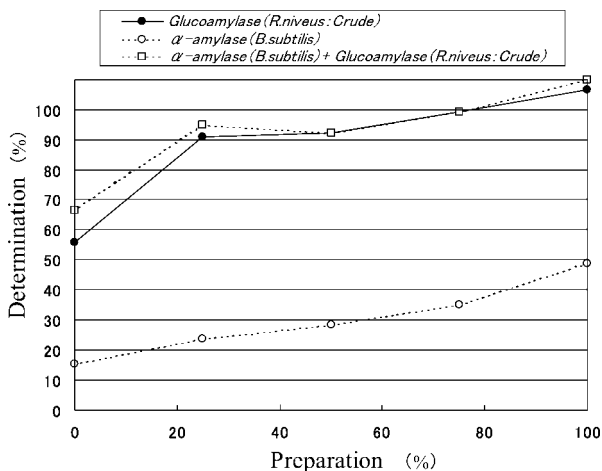


Fig. 7 Content of Geratinized Starch (Corn)

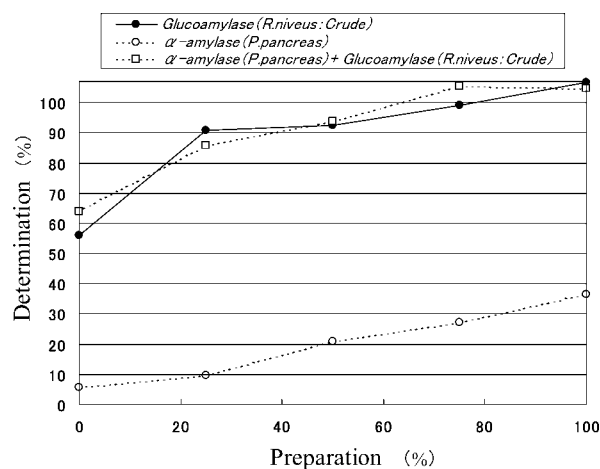


Fig. 8 Content of Geratinized Starch (Corn)

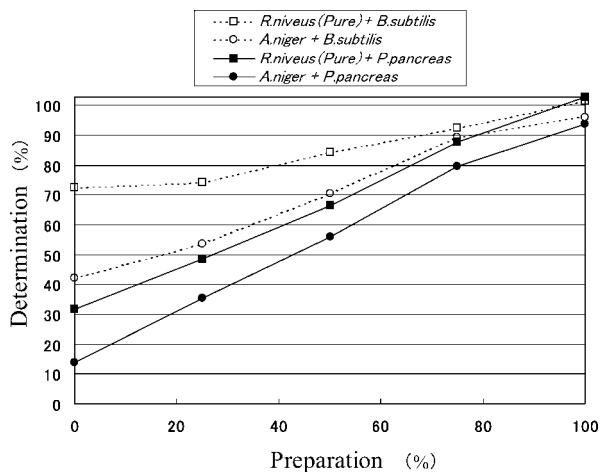


Fig. 9 Content of Geratinized Starch (Corn)

3. 2 グルコアミラーゼの分解能力の比較

とうもろこしでん粉の結果から、調製値と測定値の相関が良好であったA.niger (黒カビ) 由来及びR.niveus (クモノスカビ) 由来のグルコアミラーゼを単独で用い、比較を行った。

3. 2. 1 馬鈴薯でん粉

芋類でん粉として馬鈴薯でん粉について比較を行った。

検体は、とうもろこしでん粉同様、Table 1の配合比で調製し、準備した。

結果をFig.10に示す。

両者とも調製値と測定値の相関は良好であるが、A.niger由来のものと比べR.niveus由来のものは糊化でん粉の分解がやや低いのが分かる。

3. 2. 2 米 粉

次に穀類として米粉を用い、A.niger及びR.niveus由来のグルコアミラーゼの分解能力の比較を行った。

結果をFig.11に示す。

両者とも調製値と測定値の相関は良好であるが、*R.niveus*由来のグルコアミラーゼは生米粉の分解力が高いのが分かる。

3. 2. 3 小豆粉

市販の国産小豆をミルで微粉状にしたものを用いて比較を行った。

結果をFig.12に示す。

両者とも糊化小豆粉で50%程度と、分解が進んでいないように見えるが、小豆の組成¹¹⁾のうち、糖質は乾燥状態で約6割程度であることを考慮すると、小豆中のでん粉の大半を分解していると考えられる。

Fig.12中の点線の直線は、アルカリ処理の後、*A.niger*由来のグルコアミラーゼを作用させたときの測定値である。

アルカリ処理したものを基準として換算した結果をFig.13に

示す。

3. 2. 4 茹小豆

輸入の際、小豆は、全形のまま茹でた状態、あるいは餡の状態であることが多い。そこで小豆を微粉状ではなく、全形のまま茹でて茹小豆としたものを用いて比較を行った。

茹小豆は、市販の国産小豆を水に浸漬させ2時間程茹でた後、ホモジナイズし調製した。

結果をFig.14に示す。Fig.14中の点線の直線は、アルカリ処理したときの測定値である。

アルカリ処理したものを基準として換算した結果をFig.15に示す。

豆類は加熱の際、蛋白質がでん粉を包み込んだまま熱変性を受け凝固してしまう¹²⁾ため、小豆を粉状にした場合と比べると生成するグルコース量が少ないのが分かる。

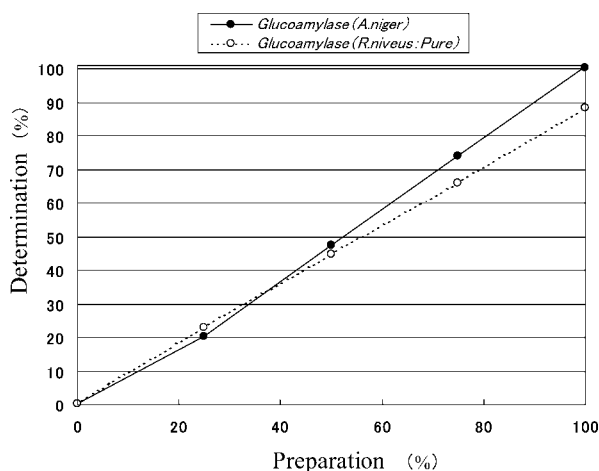


Fig. 10 Content of Geratinized Starch (Potato)

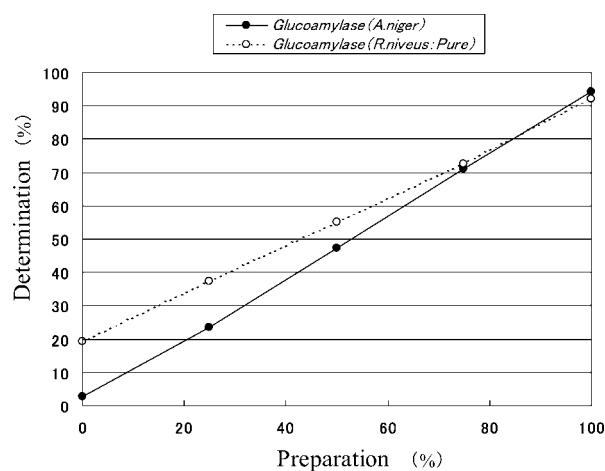


Fig. 11 Content of Geratinized Starch (Rice Flour)

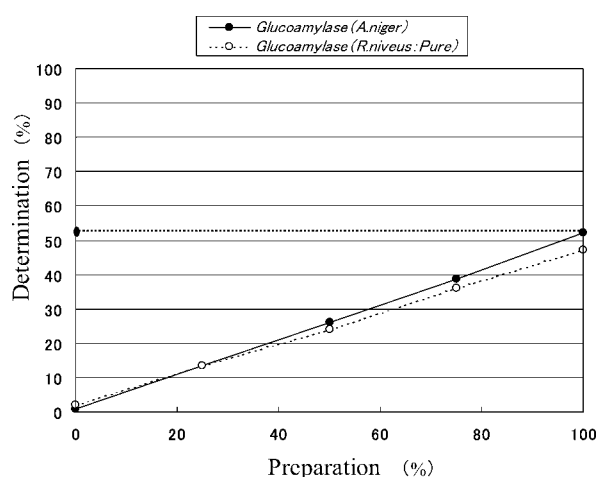


Fig. 12 Content of Geratinized Starch (Red Bean Flour)

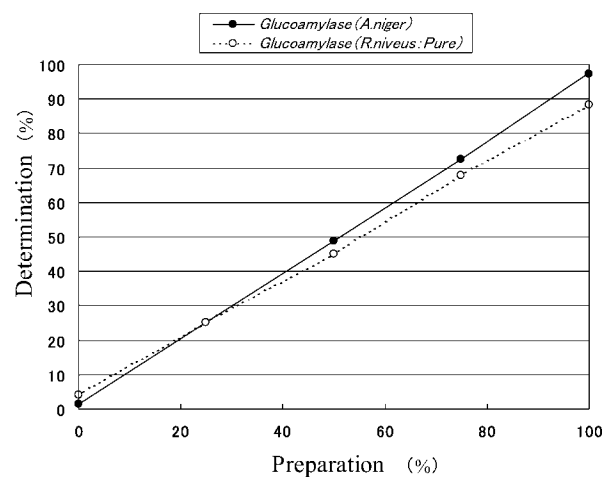


Fig. 13 Conversion Value (Red Bean Flour)

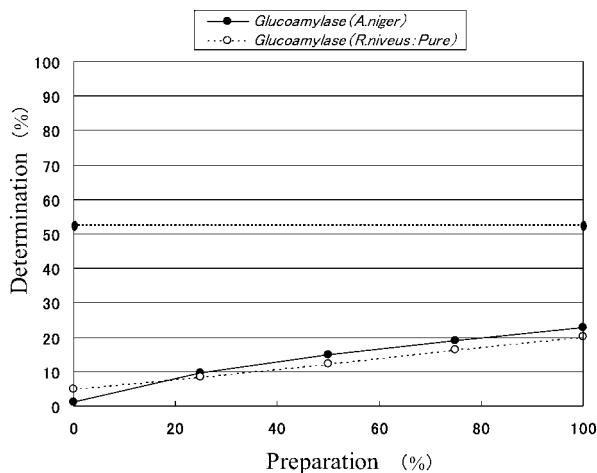


Fig. 14 Content of Geratinized Starch (Boiled Red Bean)

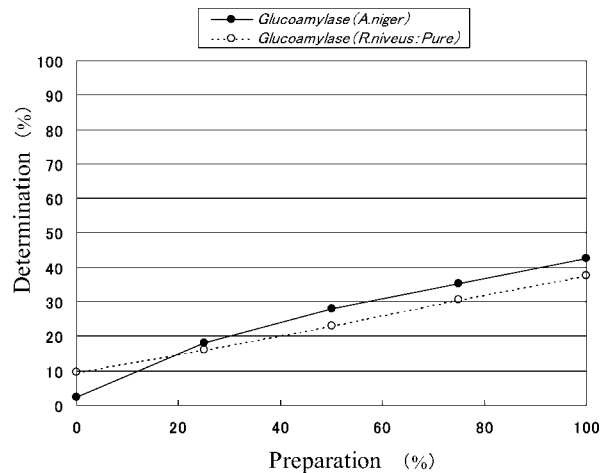


Fig. 15 Conversion Value (Boiled Red Bean)

試料調製の際、慎重にホモジナイズを行ったつもりであるが、蛋白質膜を十分に破壊するまではいかなかったようである。

蛋白質膜の破壊にプロテアーゼを使用するという考え方もあったが、併用する場合グルコアミラーゼに対し阻害剤として作用する可能性があり¹³⁾、また前処理剤として使用しても、失活処理によりでん粉質が影響を受ける、あるいはその後のグルコアミラーゼの作用に影響を与える¹³⁾、といった可能性もあることから、検討はしていない。

グルコースの生成比から算出する場合、でん粉質の分解が十分でないとアルファー化度が低い値を示すため、特に茹豆類では蛋白質膜を可能な限り破壊する必要があるが、でん粉質に影響を与えることなく蛋白質膜だけを破壊し、またグルコアミラーゼにも影響を及ぼさない手法はなかなか見つからず、現況では、間隙の小さいガラスホモジナイザーを用い、慎重かつ丁寧にホモジナイズするのが最も有効な手段であろうと思われる。

3. 3 考 察

以上、結果から判断すると、

- ・ 酵素を用いたアルファー化度の測定においては、混合酵素を使用することは生でん粉に対する分解能力が高いことから適当ではない。
 - ・ 糊化でん粉の分解能力が高く、生でん粉の分解能力が比較的低いグルコアミラーゼを単独で使用するのが望ましい。
 - ・ 程度にもよるが、使用する酵素は純度の高い方が望ましい。
- ことから、酵素を用いたアルファー化度の測定には、比較的純

度の高いグルコアミラーゼを、単独で使用するのが適当であると考えられる。

使用する酵素の由来については、今回使用した酵素、でん粉、穀粉及び豆粉に限って比較すると、*R.niveus*由来のグルコアミラーゼよりは*A.niger*由来のグルコアミラーゼの方が調製値と測定値との相関は良好であった。特にグルコースの生成比からアルファー化度を算出する⁶⁾ 場合は、生でん粉に対する分解力が低い*A.niger*由来のグルコアミラーゼの方が良好な相関を示すと考えられる。

ただし、いずれの場合も、茹小豆のような茹豆類については、蛋白質膜の破壊が容易ではないことから、グルコースの生成比による算出ではアルファー化度が低い値を示す傾向があり、注意が必要である。

4. 要 約

とうもろこしでん粉、馬鈴薯でん粉、米粉、小豆粉及び小豆について、各々酵素を作用させ、そのグルコースの生成量からアルファー化度を算出し、検討を行った。

その結果、混合酵素及び粗酵素は生でん粉の分解能力が高いためアルファー化度の測定には適さず、単独でグルコアミラーゼを作用させた場合が最も良好であることが確認された。

しかし小豆（茹小豆）の場合は、でん粉を蛋白質膜が包んでしまい酵素の作用が十分に及ばないことから、測定値が低くなることと、前処理の際の慎重かつ丁寧な調製を行うことに注意が必要である。

文 献

- 1) 二國二郎編集：“デンプンハンドブック”，(1961)，(朝倉書店)
- 2) 二國二郎監修，中村道德，鈴木繁男編集：“澱粉科学ハンドブック”，(1980)，(朝倉書店)
- 3) 鈴木繁男，中村道雄編集：“澱粉科学実験法”，(1979)，(朝倉書店)
- 4) 二國二郎監修，中村道德，鈴木繁男編集：“澱粉科学ハンドブック”，242 (1980)，(朝倉書店)
- 5) 福井作蔵：“還元糖の定量法”，15 (1973)，(東京大学出版会)
- 6) 関税中央分析所：税関分析法No.110 (2000)
- 7) 小崎道雄監修：“酵素利用ハンドブック”，(1982)，(地人書館)
- 8) 二國二郎監修，中村道德，鈴木繁男編集：“澱粉科学ハンドブック”，104 (1980)，(朝倉書店)
- 9) 小巻利章：“酵素応用の知識”，(1986)，(幸書房)
- 10) 長谷幸，安井健：食品総合研究所研究報告，36，98 (1980)
- 11) 科学技術庁資源調査会編：“四訂 日本食品標準成分表”，(1982)，(大蔵省印刷局)
- 12) 二國二郎監修，中村道德，鈴木繁男編集：“澱粉科学ハンドブック”，P551 (1980)，(朝倉書店)
- 13) 山田常雄，前川文夫，江上不二夫，八杉竜一，小関治男，古谷雅樹，日高敏隆編集：“生物学辞典”，(1978)，(岩波書店)