

ノート

アミラーゼ液化力の測定

佐藤宗衛* 出来三男*

1. 緒 言

酵素は一般の化学的操作で困難な反応を温和な条件で、極めて短時間に、しかも目的とする物質についてのみ作用するという酵素作用の特異性から、食品、医薬品および化学工業製品に広く利用されている。生理代謝は別にして、特に工業的に重要な酵素としては、炭水化物を分解する酵素であるインベルターゼ、アミラーゼ、エステルを加水分解するリパーゼ、ペクチナーゼ、蛋白質を分解する酵素としてのペプシン、トリプシンなどがある。最近では肉軟化剤としてのプロメリン、繊維工業用の糊抜き剤や洗剤としてのアミラーゼ製剤の輸入がみられる。

関税率表適用にあたり、これらの酵素製剤に対して、単一のもの、およびコンセントレートとよばれる濃縮製剤は関税率表第 29.40 に分類されることになっており、さらにプロテアーゼおよび細菌アミラーゼコンセントレートについては、プロテアーゼ力価あるいはでん粉液化力によってそれぞれの分類基準が定められている。

このうち細菌アミラーゼのでん粉液化力測定は、ばれいしょでん粉を基準として 70 の高温で反応させる方法である。この方法は操作が簡便であるという利点をもつが、基質でん粉の採取量および糊化の方法、ならびに反応後の液化でん粉流出点の判別などの条件を一定にすることに困難な面があり、これらの点を明らかにするために二、三、検討した。

2. 実験方法

2・1 試 料

Biolase (輸入品), Maxatase (輸入品), Rhozym (輸入品)

Takaamylase (三共), Bacterial amylase (和光)

2・2 液化力測定法

2・2・1 AnnexA 法 (関税率表解説 29・40)

酵素 1 g が 70 , 1 時間で液化するに要するでん粉の量で液化力を求める。すなわち精製されたばれいしょでん粉 10 g を水 15 ml に懸濁させ、(全量が 22 ml になる)これをよく攪拌して均一にし、その 2.2 ml ずつを 9 本の試験管 (16/160 mm) に分注する。これに予め約 20 の水 1 l に溶解した酵素液をそれぞれ 0.2, 0.3, 0.9, 1.0 ml ずつ加え、さらに蒸留水 1.6, 1.5, 0.8 ml を加え全量を 4 ml とする。試験管をよく攪拌し、70 に調節した恒温水槽に入れ糊化するまで激しく攪拌する。15 分毎に攪拌しながら正確に 1 時間反応させ、直ちに沸騰浴中で 5 分間加熱して酵素を失活させる。さらに試験管を 20 の水浴に 10 分間放置して冷却した後、直ちに 45 ° 傾斜にすると、でん粉を完全に液化する必要な酵素量を含む試験管は内容物が速やかに流出する。

液化力は次のようにして計算する。

| 試験管 | 基質でん粉 (1 g) | 酵素液 | 結 果 |
|-----|-------------|-----|--------|
| 1 | 2.2 ml | 0.2 | 流出しない |
| 2 | " | 0.3 | " |
| 3 | " | 0.4 | " |
| 4 | " | 0.5 | ゆっくり流出 |
| 5 | " | 0.6 | 速かに流出 |
| 6 | " | 0.7 | " |

酵素試料 5 g を 1 l の水に溶解 (0.5% 酵素濃度) したとする。

1 g のでん粉を完全に液化するに要する必要な 0.5% 酵素液は 0.6 ml であるから、0.5 酵素液 1 ml では、

$$\frac{100}{0.6} \times 167 \text{ センチグラムのでん粉を液化する。}$$

$$1 \text{ g の酵素では } \frac{167 \times 100}{0.5} = 33400 \text{ となる。}$$

一般に、力価 = $\frac{100,000}{11 \text{ 中の試料 (g)} \times \text{液化に要した酵素液}}$ であらわす。

2・2・2 Blue Value 法^{1) 2)}

3. 結果および考察

* 大蔵省関税中央分析所 千葉県松戸市岩瀬 531

3・1 酵素力価の比較

Annex A 法と Blue Value 法により各種酵素剤の力価を測定した結果は Table 1 に示すとおりである。

Table 1 Comparison of enzyme units of α -amylase by Annex A method and Blue value method

| | α -amylase units ($\times 10^3$) | | | | |
|-------------------|---|--------------|---------|--------|----------|
| | α -amylase | Taka amylase | Biolase | Rhozym | Maxatase |
| AnnexAⅣ method | 1000 | 4760 | 215 | 718 | 71.4 |
| | 1390 | 4760 | 302 | 62.8 | 71.4 |
| Blue Value method | 6300 | 15700 | 1808 | 3080 | 512 |

Enzyme units were expressed per 1 g of sample.

Table 1 からわかるように Biolase, Rhozym, Maxatase はいずれも結晶 Taka amylase の 1/10 から 1/50 程度の力価しか示さない。とくに Maxatase は Protease との混合製剤であるため単位当りの力価は弱い。Rhozym の α -amylase 活性は強くある程度精製されたものといえる。また Biolase および, Maxatase では Annex 法による液化力 1 単位は Blue Value 法の約 7 単位に相当しており、この関係は他の酵素製剤に対しても同様な傾向を示した。

3・2 反応温度の影響

酵素にはその作用温度に一定の範囲があり、それぞれ最適作用温度をもつが、殆どどの酵素蛋白質が高温では作用が低下し、100 数分間の加熱で変性して活性を失う。

液化型アミラーゼは一般に耐熱性であり、その結晶化において糖化型アミラーゼとの分離にこの性質が利用されている。また *Bacillus Subtilis* の結晶アミラーゼは 0.05% 程度の Ca^{2+} の存在下では 50 度でも安定でありさらに、*Bacillus Stearothermophilus* アミラーゼも金属イオン、特に Ca^{2+} の存在下では 55 度以上でも熱変性されないことが報告³⁾されている。しかし一般に酵素の最適作用温度は 40 前後である。

Annex 法において 70 度で酵素反応を行なっているのは他の加水分解酵素作用を抑制する目的以外に反応基質として生でん粉を使用しているためであると考えられるが、このような高温における測定が十分な酵素力価を示すかに問題がある。そこで Annex 法と Blue Value 法の各種反応温度と力価との関係を検討した。

その結果を Fig. 1 に示す。

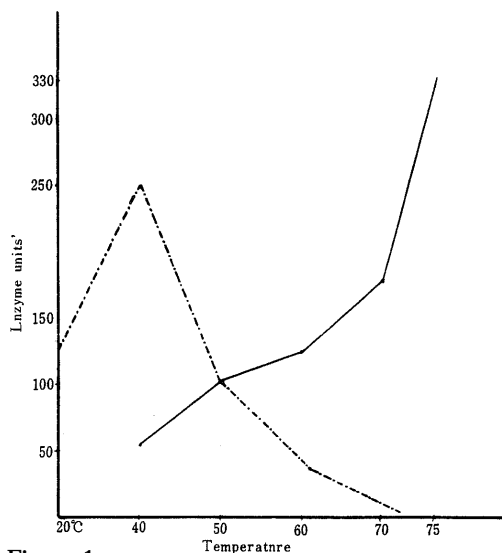


Figure. 1

Influence of temperature for amylase reaction

— AnnexAⅣ method ($\times 10^3$)
 - - - - - Blue Value method ($\times 10^4$)

Fig. 1 からわかるように AnnexA 法は反応温度が高くなるに従い力価を増し、50 度では 40 度のほぼ 2 倍の力価を示している。さらに反応温度を 75 度にしても力価の減少は認められずむしろ増加している。

これらの結果から用いた Biolase が極めて耐熱性の強い アミラーゼであることがわかるが、反応温度が低い場合に力価が低下しているのは基質として用いたでん粉が 60 度以下では α -型構造を取り得ず、ミセル構造を保っており、従って酵素作用が充分行なわれず低い力価を示しているためであり、必ずしも最適作用温度からずれているためとは考えられない。このことはアミロースを基質とした Blue Value 法によるアミラーゼ活性と反応温度との関係を示した結果から明らかにされる。すなわちアミロースを基質とする Blue Value 法においては、40 度で最高の活性を示し、50 度ではほぼ 40 度の 1/3、60 度では 1/6 に アミラーゼ活性が減少し 70 度以上の活性の減少は顕著である。

従って Ca^{2+} の存在を必要とする非耐熱性 アミラーゼを含む酵素製剤については、この高温における測定法は妥当な方法とはいえない。

3・3 再現性

AnnexA 法による測定法は生でん粉を水に懸濁させ激しく攪拌して均一な懸濁液から基質として一定量採取して反応させているが生でん粉懸濁液を完全に均一にしてとるためには極めて厳密さが要求される。また、採取したでん粉基質を 液化するときの条件を一定

にすることは困難である。これらの不利な点が測定値の変動として現われるかを知るために Biolase の種々の濃度を用いて、アミラーゼ力価のバラツキを検討した。

その結果を Table 2 に示す。

Table 2 Reproducibility of amylase units by AnnexA and Blue value methods

| Experimental NO. | α -amylase units $\times 10^3$ | | | | | | |
|-------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| AnnexA method | 167 | 333 | 250 | 333 | 275 | 250 | 292 |
| Blue Value method | 510 | 510 | 506 | 510 | 510 | 514 | 510 |

Enzyme units were expressed per 1 g of samples.
Blue value method : measured at 660 m μ .

Table 2 からわかるように、AnnexA 法は Blue Value 法に比較して測定値の変動が大きく、各測定値の力価の差は 10 万 U あり、この差は Maxatase の力価に相当し極めてバラツキが大きい。これに対し Blue Value 法は殆んど一定した値を示しており、又測定法が比色法によっているため人為的な誤差はないこと、および基質がアミロースであり、常に一定した基質が使用できること、さらに分析時間が AnnexA 法の半分に短縮できることなどの利点をもっている。

4. 総 括

関税率表に記載されている細菌アミラーゼの液比力測定法について、反応温度、再現性について検討したところ、液化力の終点判定が極めて困難であり、従って測定値の変動が大きいことを知った。この方法と、Blue Value 法とのアミラーゼ力価を比較したところ、約 1 : 7 の関係にあった。

本実験にあたり御指導戴いた当所大野副分析官に感謝いたします。

文 献

- 1) R. M. MoCreadg and W. Z. Nassid:
J. Am. Chem. Soc., 65, 1154 (1943)
- 2) H. Fuwa ; J. Biochen(Japan); 41, 5 (1954)
- 3) S. HARRON, P. EUELLE and W. H. ELLIOT, J. Biol. chem. 244, 48 (1969)

Observation on determination of liquefying power of amylase

Soe SATO and Mitsuo DEKI

Central Customs Laboratory
531 Iwase Matsudo City, Chiba Pref.,
Received Feb. 10, 1969