

乳製品中のでん粉部分加水分解物の分離定量

出来三男, 佐藤宗衛, 齊藤晋

デキストリン, ヘキサグルコース, ペンタグルコースを主成分とするでん粉部分加水分解物をマルターゼで加水分解したのち, 生成したグルコースをグルコースオキシダーゼ, パーオキシダーゼ及びクロモゲンの存在下で定量した。でん粉部分加水分解物はマルターゼで完全にグルコースにまで分解されるが, 加水分解に対する - アミラーゼ, - アミラーゼの促進効果はなかった。

でん粉, しょ糖, 乳糖の存在は定量に全く影響を与えなかった。この方法の再現精度は変動係数として 0.54% 以下であり, 粉乳中に含まれるでん粉部分加水分解物を高い回収率で定量することができた。

1. 緒 言

混合糖質の分別定量法として, 化学的定量法, 液体クロマトグラフ法, ペーパークロマトグラフ法及び酵素的定量法があるが, 化学的方法については容量法, 比色法など多くの改良がなされている。しかし, この方法は本質的には非特異的であるために性質の類似する糖質相互間の分離定量は困難である。自動液体カラムクロマトグラフィーによる分別定量は, 主としてほう酸塩によりイオン化された糖質のイオン交換樹脂に対する吸着挙動の相違による分別法であり, 非選択的な比色法による直接定量であるが, 単糖類相互, 二糖類と単糖類の相互間の分離がよく, 高い精度で分別定量できるので恒常分析法として利用されている。筆者ら¹⁾²⁾も自動液体クロマトグラフィーによる単糖類と二糖類の分離定量法についての諸条件を検討し, これを輸出入食品に含まれるしょ糖の分離定量に応用して良好な結果を得ている。しかし, 自動液体クロマトグラフィーによる方法は三糖類までの糖質混合物の相互分離は比較的よいが, 四糖類以上の糖質に対しては, 筆者らがこれまで用いている方法ではオリゴ糖類相互の分離が不充分であり, しかもバックグラウンドが高くなり定量的な操作は期待できない。

したがって, でん粉部分加水分解物のように単糖類以外に種々のオリゴ糖類及びデキストリンからなる混合糖質が乳糖, しょ糖などと共存する場合には化学的方法や

液体クロマトグラフィーでこれらの糖質を分別定量することは極めて困難である。

これに対して, 酵素による糖質の定量は酵素の糖質に対する基質特異性が極めて高いため化学的性質の類似する糖質相互の分離定量に優れていることが認められている。

³⁾筆者らは前報⁴⁾⁵⁾においてグルコースオキシダーゼを用いる単糖類及び二糖類の分離定量法についてその基礎的条件を検討した。ここでは乳製品に含まれているでん粉部分加水分解物を分離定量する方法について検討を加え, 二, 三の知見を得たので報告する。

2. 実 験 方 法

2・1 試薬

グルコースオキシダーゼ: デオキシシン (3×10^4 U/g)

パーオキシダーゼ: わさびから調製したもの
マルターゼ, - アミラーゼ: 東京化成の製品
- アミラーゼ: 三共製薬の製品

グルコスタット: ワシントン生化学工業社製のもの
糖類: ぶどう糖, 麦芽糖, 乳糖及びしょ糖は試薬等級を用いた。

でん粉部分加水分解物: マルトリン (以下 M-10 と略称) (Dextrose equivalent 9~12), マルトリン 15 (以下 M-15 と略称) (Dextrose equivalent 13~17), マルトリン 20 (以下 M-20 と略称) (Dextrose equivalent 18~22)。

2・2 酵素液の調製

グルコスタットを用いる以外は次の方法により調製し

た。すなわち、グルコースオキシダーゼ 200mg とパーオキシダーゼ 15mg を 250ml 容メスフラスコに入れ、0.5M 酢酸緩衝液 (pH5.8) 約 10ml を加えて溶かしこれに少量の水に溶かした 0 - トリジン塩酸塩 700mg を加え 0.5M 酢酸緩衝液を用いて 250ml に定容する。

2・3 酵素反応の条件

試料 2 ml を試験管にとり、0.5M 酢酸緩衝液 1 ml を加え、30 の恒温水槽に置き予め同温度に保った酵素液 2 ml を加えて反応させる。一定時間反応後 4 規定塩酸水溶液 1 滴を加えて反応を停止させる。試料のかわりに水を用いて同様に処理したものを対照として 635nm における吸光度を測定する。

グルコスタットを用いる場合もほぼ同様な方法で反応させるが、吸光度の測定は 400nm で行なう。

0 - ジアニシジンを色素に用いるときはグルコースオキシダーゼ 200mg、パーオキシダーゼ 15mg を 200ml 容メスフラスコにとり少量の 0.01M リン酸緩衝液 (pH5.8) に溶かし、これに 0 - ジアニシジン 25mg を少量のエタノールに溶かしたものを加えて 0.01M リン酸緩衝液を用いて 250ml に希める。反応条件は 0 - トリジンの場合と同様であるが吸光度の測定は 400nm で行なう。

2・4 試料の調製

でん粉部分加水分解物を含む粉乳約 0.5g を正確に秤り取り、200ml 容メスフラスコに入れ少量の水を加えて溶かす。これに 10%トリクロル酢酸水溶液 5 ml を加えてよく振とうし、200ml に水で定容する。しばらく放置したのちろ過し、ろ液は分液ろ斗を用いてエチルエーテルで繰返し 2 ~ 3 回振とう抽出してトリクロル酢酸を除去し、これを酵素反応の試料とする。

3. 結果と考察

実験に用いた M - 10, M - 15, M - 20 は赤外吸収スペクトルからいずれも 925cm^{-1} に Type 1 の吸収、 840cm^{-1} に Type 2 の吸収、 760cm^{-1} に Type 3 の糖質に基づく特性吸収帯があり、- 1, 4 - グルコシッド結合をもつ糖質であることがわかる (Fig.1)。ペーパークロマトグラムからは数種の単糖類及びオリゴサッカライドからなることを示している (Fig.2)。また、自動液体クロマトグラムはデキストリン及び 5 ~ 6 糖類を主成分とし、ほぼ 12 糖類までのポリグルカンのピークを示しており、グルコースに比較して 2

糖類、3 糖類の割合が高くなっている (Fig.3)。

化学分析値の結果は Table1 に示した。これらの結果から明らかなように直接還元力に差がある以外は三種類のマルトリンの間に顕著な相違はないので以後の実験に用いたでん粉部分加水分解物はマルトリン - 10 (M - 10) を用いた。

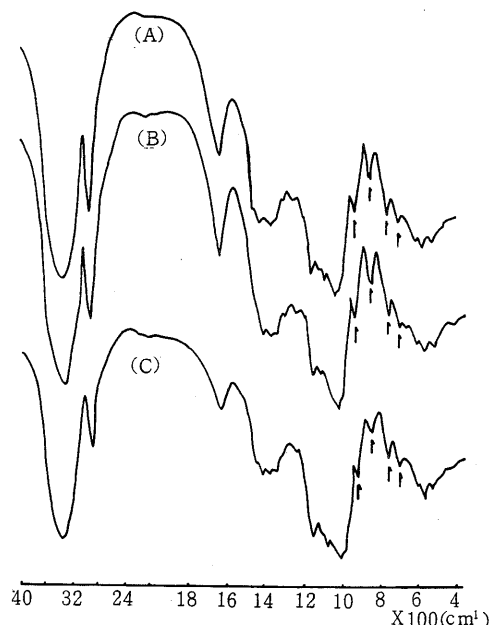


Fig.1 I R spectra of maltrins

(A) : Maltrin 10 (B) : Maltrin 15 (C) : Maltrin 20

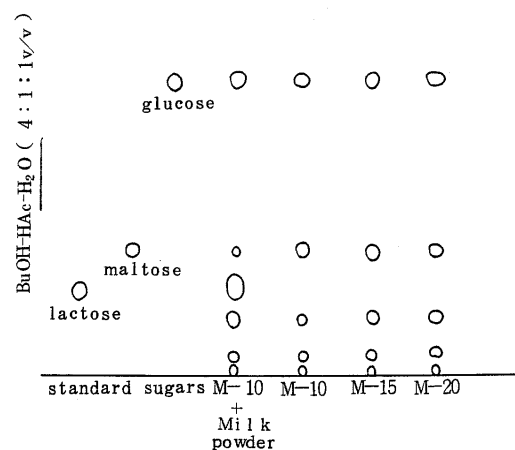


Fig.2 Paper chromatograms of sugars

Multiplex development : 2 times, Colour developed : Aniline hydrogen phthalate in buthanol

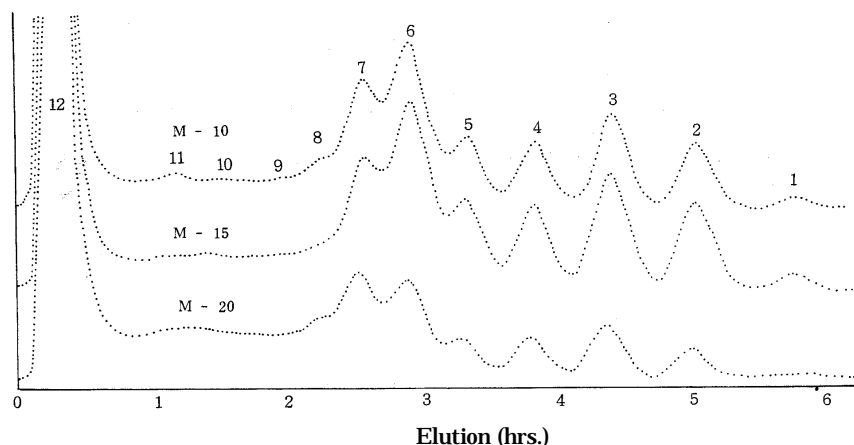


Fig.3 Chromatograms by automatic analysis of maltrins

Analysis conditions : Stationary phase : Biogel P - 2(200 to 400 mesh), Mobile phase : H₂O, column size : 2.0x 70cm, column temp. : 95 , Reaction temp. : 95 , reagent : orcin / H₂SO₄ 427nm.

Sugar peaks : 1 glucose, 2 maltose, 3 triglucose, 4 tetraglucose, 5 pentaglucose, 6 hexaglucose, 7 heptaglucose, 8 to 12 higher polyglucose

マルトリンのように一定の糖質組成を示さないでん粉部分加水分解物が単独で存在する場合は従来の化学的方法で定量することができるが、果糖、乳糖などの還元糖及びしょ糖などのような非還元糖と共存する場合、化学的方法で定量するにはこれらの共存する糖質の影響を除

ルコースオキシダーゼにより定量する方法を検討した。

- 1, 4 からなるポリグルカンは - グルコシダーゼで加水分解される。そこで, - アミラーゼ, - アミラーゼ及びマルターゼをそれぞれ単独に又は混合して用い, マルトリンに対する加水分解能をしらべた。

Table2 はこれらの酵素を単独にマルトリンと反応させ生成するぶどう糖をグルコスタットを用いて定量した結果である。Table2 からわかるように, - アミラーゼ及び - アミラーゼは15分間の反応でもグルコースの増加は殆んどみられないが, マルターゼを加水分

Table1 Chemical data of maltrins

Maltrin	Direct reducing sugar (%)	Total sugar [※] (%)
M - 10	11. 06	96. 76
M - 15	14. 40	96. 27
M - 20	19. 24	95. 59

Hydrolysed with 2.5% HCl for 2 hours

去しなければならない。しかし、前述したように酵素を用いる定量はこのような糖質の共存によって全く妨害されないが、定量目的に応じた酵素と反応条件の設定に注意しなければならない。

3・1 加水分解酵素によるマルトリンの加水分解条件

マルトリンは Fig. 1 ~ 3 に示したように赤外吸収スペクトル及びペーパークロマトグラフィーの結果からポリグルカンを主成分とすることが認められたので、これを予め酵素的にグルコースにまで加水分解したのち、グ

Table2 Hydrolytic behavior of maltrin by hydrolase

Enzymes used	Glucose determined (μg) [※]		
	Reaction time (min)		
	0	10	15
α - Amylase	4. 98	4. 98	4. 98
β - Amylase	4. 98	4. 98	4. 98
Maltase	4. 98	61. 38	73. 00
Nile	4. 98	4. 98	4. 98

Analysed by the method of "Glucostat" after reaction with hydrolases for each time

解酵素に用いると 15 分間の反応で完全に加水分解され 10 分間の反応でも約 90%の分解率を示している。

この結果は α -アミラーゼ及び β -アミラーゼはマルトリンを或る程度加水分解するが、グルコースを生成するまでには作用しないためによとも考えられる。そこでこれらの加水分解酵素を組み合わせた混合酵素系を用いてマルトリンに対する分解能を検討した。

Table 3 の結果から明らかなように、マルターゼと β -アミラーゼ又は α -アミラーゼ及び三種の混合酵素系を用いた反応系でのマルトリンの分解率はマルターゼを単独に用いた場合と全く差がみられない。 α -アミラーゼの濃度を増加させても効果がないこと及びでん粉を共存させると急速に沃素反応が消失することなどから、マルトリンの加水分解には β -アミラーゼ及び α -アミラーゼの関与を必要としないことがわかる。このことは、*B.Subtilis* の α -アミラーゼを用いてアミロデキストリンを加水分解する場合、生成する最少の β -リミットデキストリンはペンタサッカライドであり、これに β -アミラーゼを作用させてもそれ以上加水分解されない⁶⁾ことと関連して、マルトリンのようにヘキサ及びペンタサッカライドを主成分とする比較的 low molecular weight のオリゴサッカライドに対して、 α -、 β -アミラーゼはこの反応系においてマルトリンのグルコースへの加水分解に関与しないことを示唆している。従って、この実験における加水分解酵素としてはマルターゼだけで充分であるので、

以後の実験における反応組成には α -、 β -アミラーゼは使用しないこととした。

3・2 乳糖，しよ糖及びでん粉の影響

グルコースに対して高い特異性を示すグルコースオキシダーゼは乳糖，しよ糖及び麦芽糖に対してはほとんど特異性を示さないことが明らかにされている。⁷⁾

マルトリンを定量する場合には、3・1 で述べたように予めマルトリンに含まれる種々のオリゴ糖類をマルターゼを用いてグルコースにまで加水分解する必要がある。しかし、マルトリンと共存する乳糖，しよ糖及びでん粉がマルターゼに対して親和性を持っている場合は加水分解酵素として使用できないことになる。

Table 4 に示したように、実験に使用したマルターゼは反応系に添加 (120mg/ml) された乳糖，しよ糖及びでん粉に対しては全く作用しないことがわかる。

3・3 検量線の作成

3・3・1 混合酵素液の調製

グルコースオキシダーゼ 200mg，パーオキシダーゼ 15mg 及びマルターゼ 250mg を 250ml 容メスフラスコに入れ、0.5M 酢酸緩衝液 (pH5.8) 約 10ml を加えて溶かし、これに少量の水に溶かした 0 - トリジン塩酸塩 700mg を加え 0.5M 酢酸緩衝液を

Table 3 Hydrolytic behavior of maltrin by mixed enzyme

Reaction time (min)	Glucose determined (μ g)※			
	Mixed enzyme used			
	Maltase	Maltase + α -Amylase	Maltase + β -Amylase	Maltase + α -Amylase + β -Amylase
0	31.44	31.44	31.44	31.44
1	66.16	64.85	65.50	65.50
2	103.49	104.80	104.15	104.80
3	123.80	122.49	125.11	123.80
4	144.10	145.41	143.45	144.10
5	157.20	158.51	157.20	157.80
7	176.20	175.54	176.20	175.54
12	199.78	196.33	203.06	201.09
15	206.33	206.33	206.33	205.68
20	206.33	206.33	206.33	206.33

*Analysed by the method of "Glucostat" after reaction with hydrolases for each time

Table4 Effect of sugars on enzymatic determination

Sugar added (mg/ml)	Glucose determined (μg)		
	Additives in milk		
	Lactose	Starch	Sucrose
Nile	106.81	106.81	106.81
30	106.81	106.95	106.38
60	106.38	106.38	106.81
120	106.38	106.38	106.38

Glucose determined by the method as follows :

Pipet 1ml of sample solution and 1ml of 0.5M acetate buffer(pH5.8) into test tube and let stand 5min in water bath at 30 , and then add 2ml of mixed enzyme solution containing maltase, glucoseoxidase, peroxidase and o - tolidine - HCl, and stop the reaction with 1 drop of 4N HCl solution after 20min. Read absorbance at 630nm against reagent blank

用いて 250ml に定容する。

3・3・2 操作

試料 2 ml を試験管にとり, 0.5M 酢酸緩衝液 1 ml を加えて 30 の恒温槽におき, これに混合酵素液 2 ml を加え 20 分間反応させる。反応終了時に 4 規定塩酸 1 滴を加えて反応を停止させ 635nm における吸光度を測定する。

この反応条件で 0.2mg から 2.0mg までの濃度範囲のマルトリンについて, 各濃度における 5 回の繰返し実験により得られた結果を Table5 に示した。

各測定値について回帰分析を行なった。Table5 からわかるように, 回帰からの推定誤差 (偏差) は各濃度

においていずれも正の誤差を示しているがその値は小さく, 回帰直線はほとんど原点を通り, 測定濃度の範囲において吸光度とマルトリン濃度との間に直線関係が認められた。

3・3・2 の反応条件により一定量のマルトリンを用いて繰返し測定を行ない測定値の再現精度を検討した。Table6 に示したように M - 10, M - 15, M - 20 のいずれのマルトリンも測定値のパラツキは少なく, 変動係数は 0.54% 以下であり再現性は極めて高いことが明らかにされた。

3・4 応用

マルトリンを約 2 % から 10% 含む粉乳を試料として,

Table5 Regression for results

Regression analysis										
X	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
Y	0.062	0.114	0.161	0.213	0.262	0.306	0.354	0.400	0.433	0.489
\hat{Y}	0.042	0.084	0.120	0.160	0.200	0.240	0.280	0.320	0.360	0.400
dyx	0.020	0.030	0.041	0.053	0.062	0.066	0.074	0.080	0.073	0.089

X : mg of maltrin, Y : optical density, $Y = bx$: estimate of optical density from X,

b : regression coefficient, dyx : deviation from regression $b = \sum XY / \sum X^2$

Maltrin determined by the method cited in Table 4

Table 6 Recovery of maltrin

Exp. No.	Determined maltrin (μg)		
	M-10	M-15	M-20
1	80.19	71.89	65.25
2	77.14	72.12	66.08
3	77.14	71.34	65.30
4	80.46	73.27	66.36
5	77.97	74.38	64.15
6	77.97	72.44	64.70
7	78.25	73.42	65.81
8	77.42	71.89	64.70
9	80.02	73.55	66.08
10	78.80	71.89	67.74
AV	78.54	72.62	65.62
σ	0.425	0.322	0.347
C (%)	0.540	0.443	0.529

Analytical conditions are same as the method cited in Table 4

3・3・2の条件によりマルトリン含有量を定量した。

試料は2・4で記述した方法により予め10%トリクロル酢酸で除蛋白したものをを用いた。添加したマルトリンの量は予め2.5%塩酸水溶液で加水分解し、レインエイノン法で定量しグルコースの値として表わした。

Table 7に示したように、乳糖が多量に含まれる粉乳中のマルトリンの回収率はマルトリンの添加量2%ではやや高い回収率を示すが一般により回収率を示すことがわかる。

4. 総 括

でん粉の部分加水分解物のように重合度の異なるポリグルカン混合物を乳糖、しょ糖及びでん粉の共存下で、

Table 7 Yield of maltrin in milk powder

Experiment No.	Determined maltrin (μg) ^{a)}					
	Maltrin added in milk powder (g) ^{b)}					
	2.04	3.04	5.09	6.07	8.06	10.01
1	5.03	7.84	10.57	15.95	23.66	28.09
2	5.03	7.78	10.57	16.01	23.92	28.29
AV. ^{c)}	5.03	7.81	10.57	15.98	23.79	28.19
Yield (g)	2.12	3.03	5.09	6.08	8.06	9.99
Ratio ^{d)} (%)	103.5	99.67	100.0	100.1	100.0	99.9

a) : Analytical conditions are same as the method cited in Table 4

b) : Quantities of maltrin contained in 100g of milk powder

c) : Expressed as ratio of Yield/Added maltrin

d) : Determined by the method of Lane - Eynon after hydrolysis with 2.5% HCl

グルコースオキシダーゼ、マルターゼの混合酵素系による定量法について検討した。でん粉部分加水分解物であるマルトリンは少量のグルコース、マルトースのほかにヘキサー、ペンタグルコース、デキストリンを主成分とする混合糖質であるが、これらのポリグルカンは、
- アミラーゼではグルコースにまで加水分解されないがマルターゼによって完全にグルコースにまで加水分解される。したがって、マルターゼ、グルコースオキシダーゼ及びパーオキシダーゼからなる混合酵素液を用いて、多量の乳糖を含む粉乳中のでん粉部分加水分解物を直接定量することができた。また、でん粉及びしょ糖の共存も定量を妨害しなかった。この反応条件で0.2mg から 2.0mg までの範囲で吸光度とマルトリンの濃度との間に直線関係が認められた。

文 献

- 1) 出来三男；本誌，No.6，1 (1968)。
- 2) 加藤時信，出来三男；本誌，No.10，89 (1970)。
- 3) J.T.Brady，J.A.Zagorski；AOAC，52，556 (1969)。
- 4) 出来三男，吉村実；本誌，No.1，1 (1965)。
- 5) 出来三男，吉村実；本誌，No.2，15 (1966)。
- 6) W.J.Whelan；"Method in carbohydrate chemistry Vol.4" (1964)。
- 7) D.Keilin，E.F.Hartree；Biochem.J.，50，331 (1952)。

Determination of Sugars by Enzyme (3)**Quantitative Determination of Partial Hydrolysate of Starch in Milk Powder**

Mitsuo DEKI, Soei SATO , Susumu SAITO

Central Customs Laboratory

531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken.

Yokohama Customs

1-1, Kaigan-dori Naka-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken.

Partial hydrolyzate of starch which contains dextrine, hexaglucoase and pentaglucoase as major components, was determined by enzymatic method with glucose oxidase in the presence of maltase, peroxidase and chromogen. Partial hydrolyzate of starch is completely hydrolyzed to glucose by maltase, but hydrolysis of those compounds was not affected by the addition of α -amylase and β -amylase. Presence of starch, sucrose and lactose in reaction mixture was not altered for the determination at all. The precision is reasonably good with a relative standard deviation of 0.54% being the largest encountered. The yield of partial starch hydrolyzate in milk powder is also good.

Received Oct. 1, 1971