

# ジニトロサリチル酸法による アミラーゼ作用の測定に関する検討

Examination on Dinitrosalicylic Acid Method for Amylase Assay

大 山 重 信 ・ 潮 崎 三代子<sup>\*</sup>  
Shigenobu OOHYAMA Miyoko Shiozaki

(Received June 11, 1977)

There are several methods for amylase assay, for example, iodometric titration method, colorimetric method, measurement of reducing power and so on. Dinitrosalicylic acid method is one of those. So, examinations on this method were carried out in order to apply it to the digestion test of some foods. Amounts of substrate and enzyme, time for enzymatic reaction, stability of coloring, relation between the freshness of substrate and blank value etc. on this method were discussed.

## I 緒 言

筆者らは先に郷土食品に関する研究として、鹿児島県の郷土食品のうちカルカンを取りあげ、その一般成分や老化などについて調べた結果、現行の日本食品標準成分表に記載されている成分値とやや異なる点を指摘することができた。<sup>1)</sup>そして、さらにこの郷土食品に関する研究を発展させるためカルカンの消化率に関する実験を計画したが、その一部となる糖質の消化率に関する実験の基礎としてアミラーゼ作用の測定法を選択する必要を生じた。アミラーゼ作用の測定法としては種々の方法<sup>2)</sup>があり、沃度反応による糊精化力測定法、還元力の測定法などがある。また、還元力の測定法は大別して滴定法と比色法とに分けられる。筆者らはこれらの方法のうち後者の比色法に属するジニトロサリチル酸法を用いることとして、この方法について若干の検討を行ってみたのでその結果について報告することとする。

## II 実 験 方 法

### 1. 可溶性澱粉溶液

---

\* 旧 姓：坂 元

可溶性澱粉を pH6.9, 0.02M 磷酸バッファ 100ml にとかし, 0.0067M 食塩を加えた。

## 2. $\alpha$ -アミラーゼ 溶液, タカジアスターゼ 溶液。

$\alpha$ -アミラーゼは Sigma 製  $\alpha$ -アミラーゼ (Type III-A) (approx. 50-100 units/mg), タカジアスターゼは三共製薬製を用い, いずれも水に溶解した。

## 3. ジニトロサリチル酸 溶液

3,5-ジニトロサリチル酸 1 g を 2 N NaOH 20ml, 水 50ml にとかし, ロッセル塩 30 g を加えた後水で 100ml とし, 密栓して保存した。

## 4. 反応温度

アミラーゼを澱粉に作用させて酵素反応を行わせる温度については  $20^{\circ}\text{C}$ <sup>3)</sup> と記載されているが, 夏季には水道水の水温が  $25^{\circ}\text{C}$  以上にも達するので冷却装置を備えたインキュベーターを用いなければ  $20^{\circ}\text{C}$  の温度は守り難い。しかし, 当研究室ではそのようなインキュベーター利用の便が得られず, また, 実験を行った季節が夏季であったので, 水道水の水温 ( $25.3-28^{\circ}\text{C}$ ) で反応を行わせることとした。

## 5. 酵素作用力の測定

基質 1 ml と酵素 1 ml とを恒温水槽中で反応させた後, ジニトロサリチル酸溶液 2 ml を加えて反応を停止させ, 沸騰水中に 5 分間浸し, 冷却後水 20ml を加えて比色した。盲検は酵素液を加えないもので行った。比色計は日立製光電比色計, フィルターは G (緑色) を用いて測定した。

## 6. 標準曲線

マルトース溶液 2 ml にジニトロサリチル酸溶液 2 ml を加え, 以下酵素作用力の測定の場合と同様にして測定し標準曲線を作製した。

# III 実験結果および考察

## 1. 酵素反応のための時間

1% 可溶性澱粉と  $\alpha$ -アミラーゼ を用い  $25.3^{\circ}\text{C}$  で反応時間を変えて作用させた後, 還元力を測定した結果は Fig. 1 のようになった。この結果から, 反応は 0.5 分ではほぼ完了することがわかった。よって反応時間は文献<sup>3)</sup>と同様に 3 分で充分である。

## 2. 呈色の安定性

1% 可溶性澱粉に 1%  $\alpha$ -アミラーゼ を 3 分間作用させてからジニトロサリチル酸を加え, 加熱, 冷却した後, 水 20ml を加えた時を 0 時間として呈色の安定性を約 13 時間にわたって調べたところ Fig. 2 のようになり, 吸光度は時間とともに低下した。しかし, その低下の割合は約 2 時間を経過するとゆるやかになった。一方, 冷却後にそのまま放置し, 一定時間経過後に水 20ml を加えて直ちに吸光度を測定した場合には Fig. 3 のようになった。

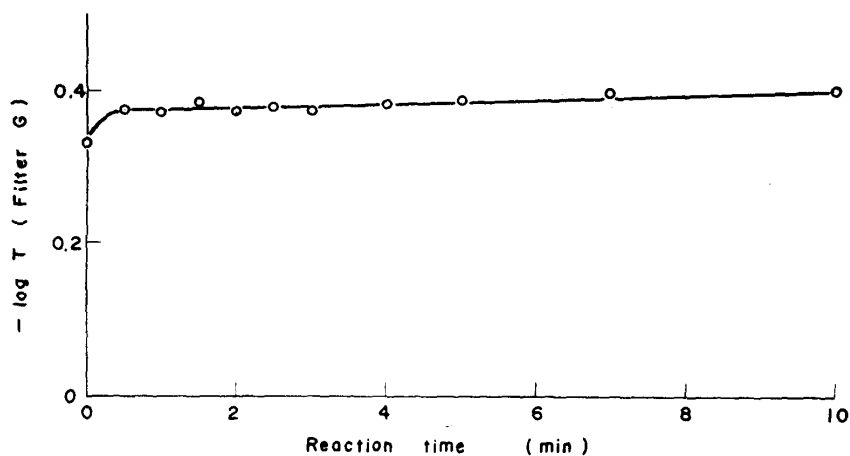


Fig. 1. Relation between reaction time and the reducing power liberated from starch by enzymatic reaction.

Substrate ; 1 ml of 1% soluble starch.

Enzyme ; 1 ml of 1%  $\alpha$ -amylase.

The enzymatic reaction was stopped by the addition of 2 ml of dinitrosalicylic acid solution. The mixture was heated for 5min in boiling water, cooled, and then added 20 ml of water.

Absorbance was measured with photometer (filter G).

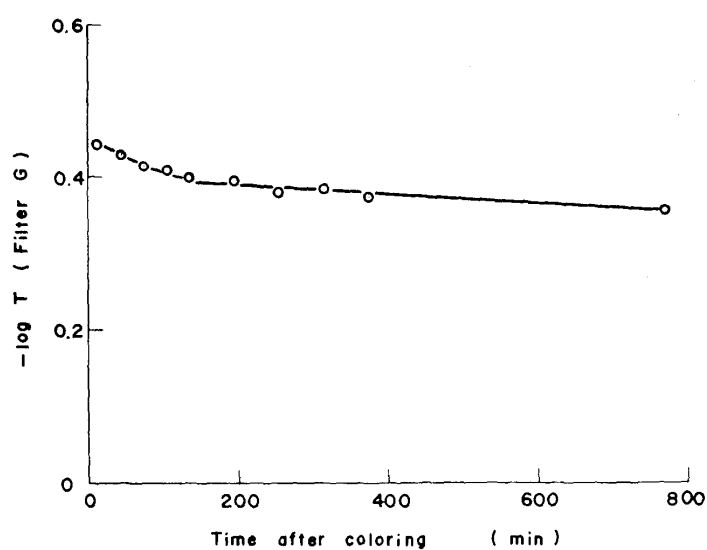


Fig. 2. Stability of coloring.

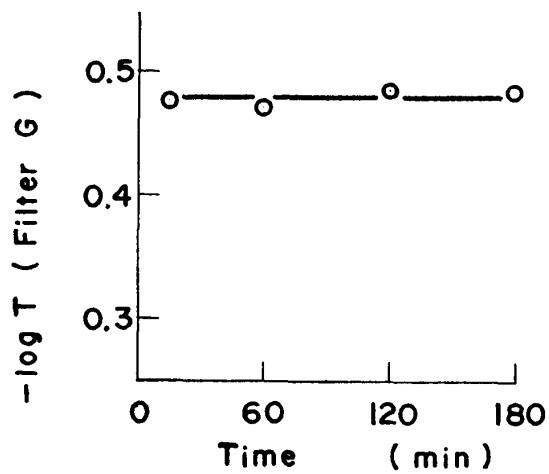


Fig. 3. Stability of coloring.

The mixture of substrate, enzyme and dinitrosalicylic acid was heated, cooled, and stood for various hours. Just before the measurement of absorbance, 20ml of water was added.

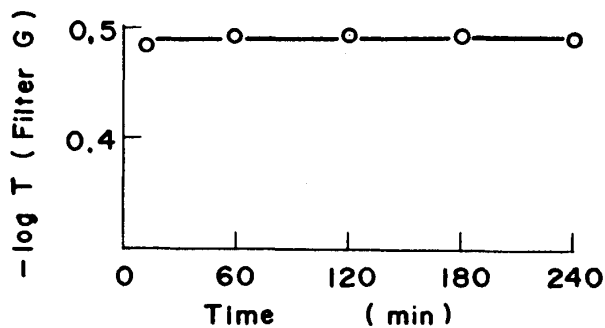


Fig. 4. Stability of coloring

Sample ; 6.0 mg/2ml of maltose.

Dinitrosalicylic acid was added to the sample, and the mixture was heated, cooled, and then stood for various hours. Twenty ml of water was added to the mixture just prior to the measurement of absorbance.

すなわち、冷却後180分間にわたって放置した後に水を加えて測定しても吸光度はほとんど一定していた。また、アミラーゼの作用力を示す一方法として、測定された還元力をマルトースに換算して示すことも行われるので、マルトースを用いて発色させ、Fig. 3の場合と同様に冷却後そのまま放置し、吸光度測定直前に水20mlを加えてみたところ、Fig. 4 のようになり、Fig. 3 と同様な結果が得られた。従って、吸光度の測定は加熱、冷却して水20mlを加え、2 時間放置後に測定するか、または、水20mlを加えて直ちに測定するかのいずれかの方法によればよいが、感度の点から考えれば後者の方がよい。

水を加えて放置しておいた場合に吸光度が低下するのは、水を加えるため pH などの条件が変り退色しやすくなるためであろう。

### 3. 酵素量

Fig. 5 は 1 %  $\alpha$ -アミラーゼ 溶液の使用量を 0.25~1.0ml の間で変化させて、酵素反応の結果生ずる還元力を測定した結果を示す。酵素量が 0.75ml 以上では測定された吸光度は同じであるがそれ以下では吸光度が低くなる。

### 4. 基質量

基質として 2 % 可溶性澱粉溶液を用い、その使用量を 0.25~1.0ml の間で変化させてみたところ、測定された還元力は Fig. 6 のようになり、基質量が増加すれば、酵素反応の結果生ずる還元

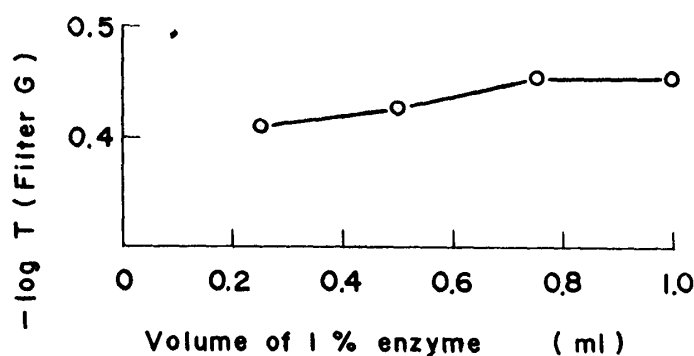


Fig. 5. Relation between the volume of enzyme solution and the reducing power liberated from starch by enzymatic reaction.

Substrate ; 1 ml of 1 % soluble starch.

Enzyme ; 1 %  $\alpha$ -amylase.

力も増加することが示された。従って、本実験のように基質として1%可溶性澱粉1 ml, 酵素として1%  $\alpha$ -アミラーゼ1 mlを用いる反応系では、基質量に比べて酵素量が多く、基質は酵素で飽和している。

#### 5. 澱粉溶液の鮮度とブランクとの関係

筆者らは時折、ブランクの値が著しく高くなることを経験したので、澱粉の鮮度が関係するかもしれないと考え、澱粉溶液調製後の経過日数と酵素反応後に測定される吸光度との関係を調べてみた。その結果をFig. 7に示した。この図に見られるようにブランクの吸光度は澱粉溶液調製後の日数経過とともに大きく上昇し、一方、澱粉と酵素とを反応させたものについての値は低下

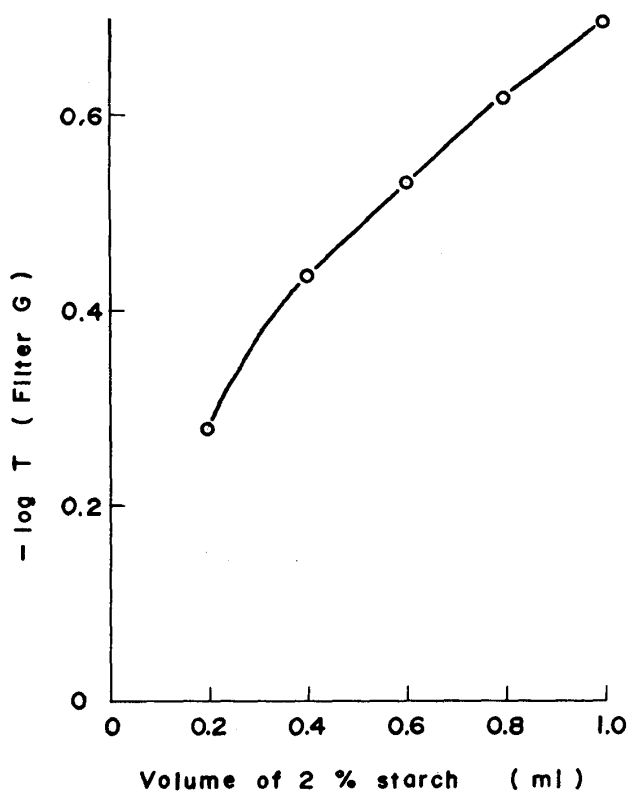


Fig. 6. Relation between the volume of starch solution and the reducing power liberated from starch by enzymatic reaction.

Substrate ; 2 % soluble starch.

Enzyme ; 1 ml of 1 %  $\alpha$ -amylase.

した。従って澱粉溶液は実験当日新調したものを用いるべきであって、日数を経たものを使用すべきでないことが明らかになった。ジニトロサリチル酸法による場合、新調した澱粉溶液を用いるべきであることは実験書に記載されていないので注意すべき点である。

Fig. 7 におけるブランクの吸光度の上昇と、基質に酵素を作用させたものについての吸光度の低下とが、ほぼ同じであることから判断すれば、溶液とした澱粉は、日数を経ると酵素を作用させなくても澱粉分子中の結合が切れて還元力をもつ糖が生成されやすくなるのではないかと考えられる。

#### 6. マルトースの標準曲線

Fig. 8 はマルトース 0.6~3.0mg/ml の水溶液各 2 ml を用いて求めた標準曲線である。この線は直線とはならず、やや曲線状となった。

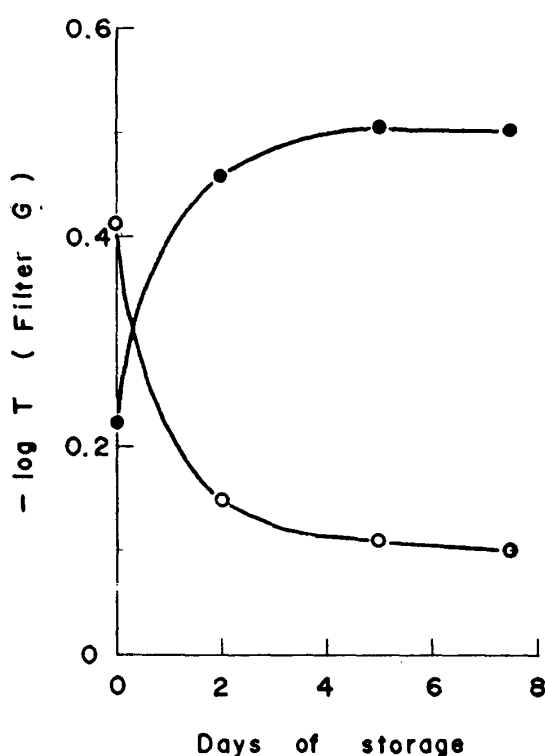


Fig. 7. Relation between the freshness of starch solution and absorbance. Substrate ; 1% soluble starch solution. The solution was kept in refrigerator.

Enzyme ; 1%  $\alpha$ -amylase.

—○— ; Adsorbance for sample. Blank value was substructed.

—●— ; Absorbance for blank.

# 7. 温度一活性曲線

上述のようなことを参考として基質は1%可溶性澱粉、酵素は1%タカジアスターゼを用い、温度を2, 10, 20, 31, 40, 50, 60, 69, および82℃として反応させ、温度一活性曲線を求めた結果は、Fig. 9 に示すように高温側に偏った形となり、典型的な温度一活性曲線が得られた。

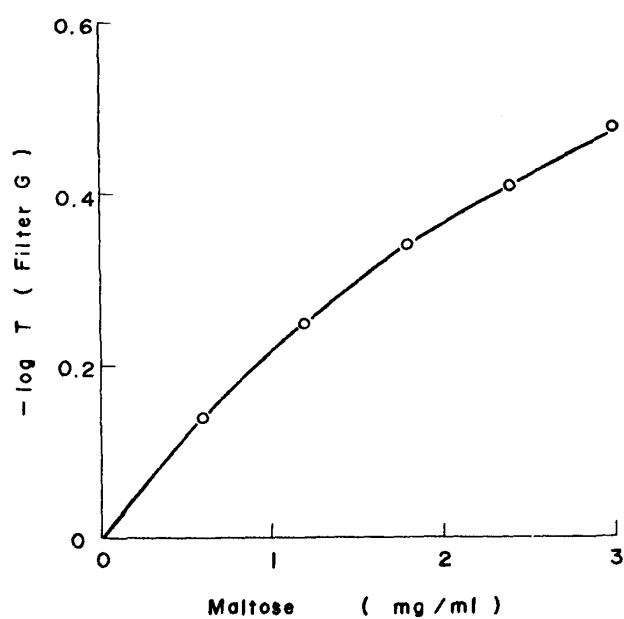


Fig. 8. Standard curve for maltose.

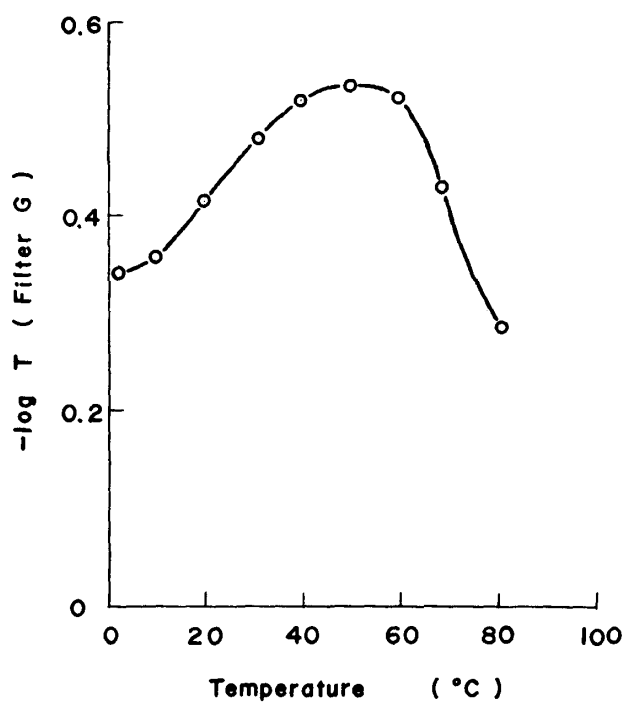


Fig. 9. Temperature-activity curve for takadiastase.

#### IV 要 約

アミラーゼ作用の測定法であるジニトロサリチル酸法について基質，酵素の添加量，反応時間呈色の安定性，基質の鮮度とブランクとの関係，その他について検討した結果を述べた。

#### 文 献

- 1) 大山重信，坂元三代子：未発表
- 2) 赤堀四郎編，酵素研究法 **2**，P.108，朝倉書店（1966）
- 3) 小原哲二郎，鈴木隆雄，岩尾裕之編，食品分析ハンドブック，P.396，建帛社（1973）