資 料

工業用アミラーゼの JIS 規格の液化力試験の精度

宮下義弘*, 小高俊彦*

Accuracy and Precision of Assaying Starch-Liquefying
Activity of Bacterial α -Amylase by JIS Method

Yoshihiro MIYASHITA* and Toshihiko KOTAKA*

* Daiwa Kasei K. K.

(7-12, Uehonmach 5-chome, Tennoji-ku, Osaka 543, Japan)

Japanese Industrial Standards of amylase for industrial use (JIS K-7001) were revised on September 1, 1990. As for the assay method for starch-liquefying activity of α -amylase, the viscosimetric method was continued though some devices were adapted to improve the accuracy and the precision and to reduce variation in results among assayers.

On this revision, the starch-liquefying activity of one and the same α -amylase preparation was assayed at 7 laboratories according to the revised JIS method, 5 times per lot of substrate, using 6 and the same lots of potato starch as substrate. The results were as follows: 1) This method requires skill; In the case of skilled assayers, coefficients of variation (CV) were about 2 to 3%; 2) Variations of quality as substrate were significant among the lots of potato starch; 3) The levels of assay value varied significantly among the laboratories.

工業用アミラーゼの JIS 規格 (K-7001) が平成 2 年 9 月 1 日に改正された。アミラーゼの種類・アミラーゼの品質・試験方法にわたる 18 年ぶりの大改正である。細菌液化型アミラーゼについては、昭和 51 年ごろから市販されるようになった高耐熱性の液化型アミラーゼが新たに規定され、これに伴い従来のは中耐熱性液化型アミラーゼと呼ばれることになり、これら両者の耐熱性の識別方法も規定された。

液化力試験方法については引き続き粘度法が採用された。ただし、精度の向上と個人差の縮小が図られた。すなわち、1) 酵素試料溶液の調製に使用される希釈用液に、新たにポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテルが加えられた。これは 1 単位/ml 程度の希薄な液化型アミラーゼ溶液の安定化に効果がある。2) 希釈用液に加える緩衝液が酢酸・酢酸ナトリウム (pH 6.0) から、ほう酸・ほう酸ナトリウム (pH 8.0) に変更され

た。これは高耐熱性液化型アミラーゼの希薄溶液の安定化に効果がある。中耐熱性のものには影響がない。また、新希釈用液の pH (8.0) の影響が、基質液の pH (6.0) に及ぶことはない。3) 希釈用液に加えるカルシウム塩が、取扱いの便宜上塩化カルシウムから硫酸カルシウムに変更された。この影響は試験結果には及ばない。4) 希釈用液に加えられていた塩化ナトリウムは不要になったので削除された。5) 反応終点の判定の個人差を少なくするために、2 本の粘度比較液封入試験管の間に反応液入り試験管を挟んで液の流れるようすを観察することに改められた。以上のほか、高耐熱性液化型アミラーゼの 1 単位に当る酵素量が、今回の規定では上記の緩衝液の変更により、改正前の規定より約 25% 少なくなるなどの事情を考慮して、澱粉液化力の単位記号が LJ から JLU に改められた。

今回の液化力試験方法の改正に当り、企業および官庁を含む七つの試験室で、同じ一つの液化型アミラーゼ試料の液化力を、同じ 6 ロットのばれいし澱粉を使っ

* 大和化成株式会社 (543 大阪市天王寺区上本町 5 丁目 7-12)

で、ロットごとに5回測定したので、その結果を紹介する。

実験方法

1. 液化力試験方法 (JIS K 7001-1990 より原文のまま)

液化力

7.1 液化力 ばれいしょ澱粉を基質として酵素を作用させ、澱粉の全体的低分子化に伴って低下する澱粉の粘度を測定する。

7.1.1 試薬および器具 試薬および器具は、次のとおりとする。

(1) 試 薬

(a) **ほう酸緩衝液 (pH 7.0)** JIS K 8863 に規定するほう酸 26.35 g および JIS K 8866 に規定する四ほう酸ナトリウム十水和物 7.15 g を水に溶かし、1000 ml としたもの。

(b) **希釈用液 [pH 8.0⁽⁵⁾]** JIS K 8963 に規定する硫酸カルシウム二水和物 0.344 g を水に溶かし、ほう酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml, ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル溶液⁽⁶⁾ 0.5 ml および水を加えて 1000 ml としたもの。

(c) **酢酸 (1 mol/l)** JIS K 8355 に規定する酢酸 60 g に水を加えて 1000 ml としたもの。

(d) **酢酸ナトリウム溶液 (1 mol/l)** JIS K 8371 に規定する酢酸ナトリウム三水和物 136 g を水に溶かし、1000 ml としたもの。

(e) **酢酸緩衝液 (pH 6.0)** 酢酸ナトリウム溶液 (1 mol/l) に酢酸 (1 mol/l) を加えて pH を 6.0 に調整したもの (混合比約 95 : 5)。

(f) **基質液** 無水物として 10.00 g に対応するばれいしょ澱粉 (日本薬局方バレイショデンプン、乾燥減量約 17% のもの) を正確にはかり、酢酸緩衝液 (pH 6.0) 10 ml および水を加えて正確に 100 ml としたもの。使用の都度調製する。

(g) **粘度比較液** シリコン油⁽⁷⁾ [ジメチルポリシロキサン]。

注⁽⁵⁾ ほう酸緩衝液 (pH 7.0) を水で 50 倍に希釈すると pH は 8.0 となる。

(6) ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (たとえば Triton X-100) 10 g に水を加え、加温して溶かし、100 ml とする。

(7) 25℃ における動粘度 $500 \pm 25 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ [$500 \pm 25 \text{ cSt}$]、粘度温度係数 0.60 ± 0.02 のもの。このものの 65℃ における動粘度は $250 \pm 20 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ [$250 \pm 20 \text{ cSt}$] である。

(2) 器 具

(a) **試験管** 胴外径 18 mm, 高さ 180 mm。

(b) **恒温水槽** $65 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に調節できるもの。

(c) **沸騰水槽**

(d) **粘度比較液封入管** 試験に使うものと同質同形の試験管に (1)(g) の粘度比較液 11 ml (10.67 g) を封入したもの。これを 2 本用意する。

7.1.2 試料溶液の調製 試料酵素に適量の希釈用液 (pH 8.0) を加えて溶かし試料溶液とする⁽⁸⁾。必要ならば加温抽出およびろ過する。

注⁽⁸⁾ 試料溶液中の酵素量とこれが反応液の動粘度を $250 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ [250 cSt] まで減少させるに要する時間とはほぼ反比例する。したがって、未知の試料を試験する場合には、まず任意の試料溶液を用いて試験操作を行い、反応液の動粘度が $250 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ [250 cSt] に達するまでの時間を求め、これからその試料溶液 1 ml 中の酵素量を推定し、これに基づいて 1 JLU/ml を中心とする約 5% 間隔の濃度の酵素に対応する一連の濃度の試料溶液を調製する。

7.1.3 操作方法 操作方法是、次のとおりとする。

(1) 基質液を澱粉が均一に分散するように激しくかき混ぜながら素早く 10.0 ml はかり試験管に入れる。

(2) 試料溶液 1 ml を、全量ピペットを用いて試験管内の基質液 10 ml に加える。

(3) 澱粉が均一に分散するよう試験管を激しく振りながら沸騰水槽中で加熱し⁽⁹⁾、澱粉がこ (糊) 化したときただちに $65 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温水槽に移す。

(4) 恒温水槽に移してから正確に 15 分後、同じ恒温水槽中にあらかじめ浸しておいた 2 本の粘度比較液封入試験管の間に反応液入り試験管を挟んで、3 本の試験管をそろえて持ち、恒温水槽から取り出し、その下部を水槽の縁にかけながら、口部を水平から約 $\pi/4 \text{ rad}$ [45°] 下方へ急速に傾け、試験管内の液の流動状態を観察する⁽¹⁰⁾。

(5) 反応液が粘度比較液と同じ速さで流れるときの試料溶液 1 ml 中の酵素量を 1 JLU とする⁽¹¹⁾。

注⁽⁹⁾ 試験管にシリコンゴム栓をし、激しく振って澱粉を均一に分散させた後、すばやく栓をとりただちに加熱を始める。加熱に用いる熱湯を沸騰水槽になるべく満たすと操作が行いやすい。反応液の液化後に試験管の底に未反応のこ（糊）塊を認めたときは試験をやり直す。

(10) 高耐熱性のアミラーゼを試験する場合、観察操作を続けて繰り返すと、2度目には1度目より顕著に速く反応液が流れ、それ以後は流れがほぼ安定するという現象が見られる。そこで、所定の反応時間（15分）の10秒前および5秒前の計2回観察操作を行ってその都度ただちに試験管を恒温水槽に戻し、反応時間がちょうど15分になったときに3度目の観察操作を行って判定する。中耐熱性アミラーゼでは、高耐熱性のものの場合のような反応液の流れ方の急速な変化はない。

(11) 酵素濃度が異なる一連の試料溶液のうち、一つの試料溶液による15分後の反応液の動粘度が $250 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ {250 cSt} より高（低）く、その次の間隔の濃度の試料溶液では低（高）い場合、1 JLU/ml に対応する試料濃度は両試料溶液の濃度の平均値とする。

7.1.4 計算 試料酵素の液化力は、次の式によって算出する。

$$a=b$$

ここに、 a ：液化力（JLU/g または JLU/ml）

b ：試料酵素の希釈倍数

単位の定義

アミラーゼがばれいしょ澱粉 1g に相当する終濃度 91 g/l、pH 6.0 ののに 65°C で15分間作用するとき、こののりの動粘度を $250 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ {250 cSt} (65°C 測定) まで減少させる酵素量を1液化力単位（JLU）とする。

2. 試験材料とその取扱い

1) ばれいしょ澱粉は、5 銘柄・6 ロットの日本薬局方バレイショデンプンを一括購入し、無水物 10.00 g に対応するそれぞれの量を表示して配布した。

2) アミラーゼ試料は、約 5000 JLU/g の粉状の高耐熱性液化型アミラーゼ剤に、試料溶液の調製法を次のとおり指定して配布した。試料 190 mg を正確にはかり、希釈用液（pH 8.0）に溶かし 100 ml とする（一次希釈液）。一次希釈液を 1.00 ml ずつはかり、希釈用液（pH

8.0）を 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 ml のように加えて一連の試料溶液とする。試料溶液の使用期限は調製当日限りとする。

3) シリコン油（500 cSt）とポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル（トリトン X-100）も配布した。

4) 試験回数は、ばれいしょ澱粉の各ロットについて、一連の試験を5回とした。

5) 初めて JIS 液化力試験を行う人のために、次のような注意書きを添付した。

a) この試験で誤差を生みやすい操作は、基質液のはかり取りと加熱である。操作に習熟してから本試験を行うこと。

b) 基質液のはかり取りには、10 ml ホールピペットの先端を少し切って孔径を太くしたものを使う。5 ml 分注器（エッペンドルフ、ピペットマンなど）で2回取することもできる。基質液は三角フラスコに8分目以下入れ、激しく振り回して、澱粉が沈み始めない間に素早くはかる。基質液をビーカーに入れマグネチックスターラーで攪拌しながらはかるときは、十分強力なものを使うなければ、基質液の上下間に濃度差が生じる。

c) 加熱槽には、3~5 l のステンレスビーカーがよい。熱湯を槽に満たしておかなければ、加熱時に手が熱い。試験管の口を親指でふさぎ、上下を転倒させるように激しく振った後、ただちに試験管の口のところを持って、約 45° 傾けて熱湯中に浸し、縦軸方向に、液が飛び出しそうなくらい激しく振り動かす。加熱開始から糊化完了までの所要時間をあらかじめ求めておく（約 20 秒）。加熱は試験管を一度に必ず一本ずつ、一分間隔で次々に行う（慣れれば 30 秒間隔で行える）。

d) 加熱操作に失敗がないことを、次のようにして必ず確認する。すなわち、判定が終わった試験管をそのまま 65°C の恒温水槽にしばらく浸して、液の粘度が十分低下してから液をそっと流してみると、未反応の糊塊があるときは発見できる。さらに、液の粘度が十分低下した後の試験管を恒温水槽から取り出し、しばらく放置しておくと、糊塊だけが老化して白くなるので、小さな糊塊でも発見できる。糊塊を発見したときは試験をやり直す。加熱操作に慣れた人でも時には失敗する。

実験結果

実験結果を Table 1 に示す。

Table 1. Experimental data by seven laboratories.

Laboratory	Lot of starch	Repetition					Averages
		1	2	3	4	5	
F	A ₁	5530	5780	5530	5780	5780	5680
	A ₂	5260	5260	5260	5260	5260	5260
	A ₃	5530	5260	5530	5530	5530	5476
	A ₄	5530	5780	5780	5780	5780	5730
	A ₅	5530	5780	5530	5780	5530	5630
	A ₆	5260	5260	5260	5530	5260	5314
G	A ₁	5130	5130	5390	5390	5130	5234
	A ₂	4870	4870	4610	4870	4870	4818
	A ₃	5130	5390	5130	5390	5130	5234
	A ₄	5130	5390	5130	5390	5390	5286
	A ₅	4870	5130	5130	5130	5130	5078
	A ₆	4870	5130	5130	4870	4870	4974
H	A ₁	4740	5260	5000	5260	5000	5052
	A ₂	5260	4740	5000	4470	5000	4894
	A ₃	5000	4740	5260	5000	5260	5052
	A ₄	4740	5260	5000	5000	4740	4948
	A ₅	5000	4740	5260	5000	5260	5052
	A ₆	4470	4210	5000	4740	4740	4632
I	A ₁	5130	5000	5530	5390	5260	5262
	A ₂	4740	4870	5260	5260	5000	5026
	A ₃	5000	5260	5260	5260	5390	5234
	A ₄	5390	5260	5390	5530	5390	5392
	A ₅	5260	5530	5390	5260	5390	5366
	A ₆	5260	5390	5390	5260	5130	5286
J	A ₁	5390	5390	5390	5260	5260	5338
	A ₂	5390	5130	5530	5130	5130	5262
	A ₃	5130	5530	5130	5130	5390	5262
	A ₄	5130	5130	5130	5260	5260	5182
	A ₅	5000	5260	5390	5130	5260	5208
	A ₆	5260	5000	5260	5260	5260	5208
K	A ₁	4950	5450	4680	5160	5000	5048
	A ₂	4950	5190	4680	5160	5000	4996
	A ₃	4950	5190	4940	5160	5000	5048
	A ₄	5210	5320	4810	5160	5000	5100
	A ₅	5210	5450	4810	5550	4740	5152
	A ₆	4950	5190	4940	4910	5000	4998
L	A ₁	5260	5000	5260	5130	5530	5236
	A ₂	4870	4870	4740	4740	5000	4844
	A ₃	5260	5260	5130	5260	5390	5260
	A ₄	5390	5390	5390	5130	5530	5366
	A ₅	5530	5260	5260	5260	5390	5340
	A ₆	5260	5260	5000	5000	5260	5156

考 察

1. 測定精度

各試験室における測定の変動係数は、HとKを除き約2～3%であった (Table 2). H と K での変動係数が大きかったのは不慣れに起因すると思われる。すなわち、本法では澱粉を糊化する操作に熟練を要するので、この影響が現れたものと思われる。本法はかなりばらつきが大きいので、繰返し測定を行うことが望ましい。

2. 基質澱粉の品質が測定値に及ぼす影響

澱粉のロット間で測定値に有意な差が生じるかどうかを調べるために、試験室ごとのデータについて分散分析を試みた。分散分析においては各水準(澱粉ロットごと)の分散が等しいことを前提としているので、R管理図により検定を行った結果、等分散性が認められた。分散分析表を Table 3 に示す。Table 3 の結果をまとめる

Table 2. Precision of the measurement in each laboratory.

Laboratory	F	G	H	I	J	K	L
CV, %	1.9	2.6	5.0	2.9	2.5	4.2	2.6

* Average of coefficient of variation (CV) obtained for each lot of starch.

と、澱粉ロット間の差の判定は Table 4 のとおりである。

つぎに、澱粉ロットごとの平均値の95%信頼区間は、

$$t_{0.025}(24)\sqrt{(\text{誤差の平均平方})/5}$$

であるから、これらを Table 3 から求めて図示すれば Fig. 1 のとおりである。澱粉ロット間に有意差ありと判定した試験室 F, G, I, L ではいずれも似た傾向を示し

Table 3. Analysis of variation.

Laboratory	Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F_0 (F-ratio)
F	Between A	968110	5	193622	14.68**
	Error	316640	24	13193	
	Total	1284750	29		
G	Between A	831480	5	166296	9.22**
	Error	432640	24	18027	
	Total	1264120	29		
H	Between A	673300	5	134660	2.18
	Error	1480120	24	61672	
	Total	2153420	29		
I	Between A	350420	5	70084	2.68*
	Error	627920	24	26163	
	Total	978340	29		
J	Between A	108990	5	21798	1.23
	Error	425080	24	17712	
	Total	534070	29		
K	Between A	91190	5	18238	0.34
	Error	1290040	24	53752	
	Total	1381230	29		
L	Between A	903620	5	180724	9.45**
	Error	458880	24	19120	
	Total	1362500	29		

$F_{0.01}(5, 24) = 3.90$, $F_{0.05}(5, 24) = 2.62$.

* Significant(at 5% level), ** Highly significant (at 1% level).

Table 4. Testing if the variation between the lots of starch is significant.

Laboratory	Result of test
F, G, L	Highly significant (at the 1% level)
I	Significant (at the 5% level)
H, J, K	Not significant

Fig. 1. The 95% confidence interval of the averages obtained for each lot of starch.

たこと、および有意差なしと判定した試験室のうちHとKは誤差が大きかったことから総合的に判断し、有意差ありと結論した。

Fig. 2. The 95% confidence interval of the grand averages obtained for each laboratory.

3. 試験室間の差

各試験室における測定値の総平均は各試験室の測定値の水準を反映しているものと思われる。測定値の総平均の95%信頼区間は、幅が、

$$t_{0.025}(24)\sqrt{(\text{誤差の平均平方})/(5 \times 6)}$$

であるから、これらを Table 3 から求めて図示すれば Fig. 2 のとおりである。Fig. 2 から、試験室間にかなりの差があることが明らかである。

要 約

工業用アミラーゼの JIS 規格 (K-7001) が平成2年9月1日に改正された。液化力試験方法については引き続き粘度法が採用されたが、精度の向上と個人差の縮小が図られた。この改正に当り、七つの試験室で、同じ一つの液化型アミラーゼ試料の液化力を、改正後の試験方法で、同じ6ロットのばれいしょ澱粉を使って、ロットごとに5回測定した。その結果、

- 1) 本法は習熟を要するが、習熟者による測定の変動係数は約2~3%であった。
- 2) ばれいしょ澱粉のロット間には、基質としての品質の差が認められた。
- 3) 各試験室の測定値の水準には、かなりの差が認められた。

この試験に協力された天野製薬㈱、上田化学工業㈱、昭和産業㈱、通商産業検査所、ナガセ生化学工業㈱、洛東化成工業㈱に感謝します。

(平成3年3月6日受付・受理)