合成糊料に対する各種酵素の影響について

とくに CMC, CMS および MC について

(昭和 39 年 1 月 27 日 受理)

林 敏 夫*

Influence of Some Enzymes on Artificial Thickening Agents with
Special Reference to Carboxymethylcellulose, Carboxymethylstarch
and Methylcellulose

Toshio HAYASHI

(National Institute of Hygienic Sciences :
Tamagawayoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo)

The action of enzymes such as diastase, takadiastase, pancreatin, amylase of *Bacillus subtilis*, cellulase and saliva, on carboxymethylcellulose(CMC), carboxymethylstarch(CMS), and methylcellulose (MC), was studied concerning the production of reducing sugar and the change of the viscosity of each 1 % aqueous solution.

Cellulase produced some reducing sugar from CMC and reduced the viscosity of CMC aqueous solution, and takadiastase followed it. Pancreatin, amylase of *B. subtilis* and saliva produced little or no reducing sugar from CMC, but these enzymes produced reducing sugar from CMS and reduced the viscosity of CMS aqueous solution. MC was affected slightly by cellulase but other enzymes gave no influence on MC.

(Received January 27, 1964)

I ま え が き

Carboxymethylcellulose (CMC), Carboxymethylstarch (CMS) および Methylcellulose (MC) はすでに食品添加物としてその使用を認められ、アイスクリーム、ジャム、つくだ煮、その他多くの食品に安定剤、増粘剤などとして用いられている。

CMC, CMS および MC についてはさきに川崎、岡田、五味氏ら¹⁾がアミラーゼによる分解について報告しており、また G. N. Festenstein²⁾はヒツジの腎液による CMC の分解について述べている。著者は上記糊料にジアスターゼ、タカジアスターゼ、枯草菌アミラーゼ、パンクレアチン、セルラーゼおよびヒトの唾液について還元糖の生成状態を検討し、またそれぞれの粘度に対する影響についても検討を加えた。

II 実験の部

1. 供試試料の分析

実験に用いた CMC 4 種, CMS 2 種および MC 2 種について Na または $-OCH_3$ 含量, 置換度, 粘度および

pH を測定した。すなわち, CMC, CMS 中の Na 量は過塩素酸による非水滴定³⁾により, MC 中の $-OCH_3$ 量はマイクロメキシル基定量装置を用いて行ない⁴⁾, 置換度はナフタレンジオール法⁵⁾により求めた。また, 粘度は 1 % 溶液についてベックマン pH メーターで測定した。結果は Table 1 に示すとおりである。

Table 1. Analytical Data of Samples

Thickening Agent	Na(%)	OCH_3 (%)	D.S.*	Viscosity (CPS, 25°)	pH (1% Soln)
CMC (A)	3.29	—	0.46	208	6.60
CMC (B)	4.49	—	0.72	20	6.80
CMC (C)	7.36	—	0.87	28	6.90
CMC (D)	4.37	—	0.66	259	7.00
CMS (A)	5.86	—	0.61	137	7.61
CMS (B)	4.48	—	0.38	1,890	7.32
M C (A)	—	29.59	1.95	5	6.80
M C (B)	—	30.82	2.03	147	6.80

* 国立衛生試験所:

東京都世田ヶ谷区玉川用賀町 2-203

* D.S.=Degree of Substitution

2. 還元糖生成試験

糊料に酵素が作用したときの影響を生成する還元糖の量より知る目的でこの実験を行なった。なお、対照として局方バレイショデンプンを用いた。

a) 試料溶液の調製

CMC, CMS にあっては、減圧デシケーター（硫酸）中で乾燥した試料約 0.5 g 共栓三角フラスコ中に精密にはかりとり、水 50 ml を加え、一夜放置して溶解した。MC は同様に乾燥した試料約 0.5 g を精密にはかり、60~70° の温湯 50 ml を加えて懸濁させたのち冷却し、さらに冷蔵庫中（5°）に 1 時間放置して均一の液とした。対照に用いたデンプンは乾燥試料約 0.5 g を精密にはかり、約 40~50° の水 15 ml を加えて振り混ぜながら、さらに熱湯 35 ml を加え、ゆるくセンをして水浴中に 30 分間加熱して糊化したのち冷却し試料溶液とした。

b) 酵素分解

(1) ジアスターゼ、タカジアスターゼ

酵素はジアスターゼ（局方適品）、タカジアスターゼ（三共）を用い、CMC, CMS, デンプンの試料溶液に酢酸緩衝液（氷酢酸 3.0 ml および無水酢酸ナトリウム 6.0 g に水を加えて 250 ml とした液）を加えて pH を 5.0 に調整したのち、あらかじめ 55° の水槽中に 30 分間加温し、これに酵素液（酵素 100 mg に水を加えて 20 ml とし、十分に振り混ぜた液）2.0 ml を加え、よく振り混ぜてから 55° の水槽に 1 時間放置した。そのあとただちに 10% 水酸化ナトリウム液を 1 ml 加えて酵素の活性を止めて冷却し、200 ml メスフラスコ中に移したのち、水を加えて全量を 200 ml とし、還元糖の定量に用いた。別に試料を用いず、水 50 ml について試料の場合と同様に操作して空試験液を作製した。ただし、デンプン場合は酵素処理し、10% NaOH を加えた液に水を加えて全量を 500 ml した。MC は 55° 加温すると一部析出するため、本実験は行わなかった。

(2) パンクレアチン、枯草菌アミラーゼ、唾液

酵素はパンクレアチン（局方適品）、枯草菌アミラーゼ（大和化成製品）唾液（成人より得た新生液）を用い、試料溶液にリン酸塩緩衝液（無水リン酸ナトリウム 3.0 g およびリン酸一カリウム 2.8 g を水に溶かして 250 ml とした液）を加えて pH を 6.8 に調整し、MC の場合はさらに 3% 塩化ナトリウム溶液 1 ml を混和し、これをあらかじめ 40° の水槽に 30 分間放置した後酵素液（パンクレアチン、アミラーゼはそれぞれ 100 mg に水を加えて 20 ml とし、よく振り混ぜた液、ただし唾液は新生液をそのまま）2.0 ml、ただし唾液は 3.0 ml を加え、40° に 1 時間放置した。そのあとただちに 10% 水酸化ナトリウム液 1 ml を加え、酵素の活性を止めて冷却した後水で全量を 200 ml とした。別に水 50 ml について同様に操作し、空試験液を作製した。なお、デンプン場合は処理液を水で 500 ml とした。MC の場合は MC 溶液の持つ

強い保護コロイド性のため、還元糖の定量に際しチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定するときの終末点が不明瞭になり易いので MC を除いた液について定量を行なった。すなわち水酸化ナトリウム液で酵素作用を不活性化した液に無水硫酸ナトリウム 3 g を加えて溶かし、100° に 5 分間加熱した後熱時ろ過し、残留物は熱 6% 硫酸ナトリウム溶液で洗い、洗液はろ液に合わせ、水を加えて全量を 200 ml とした。なお、一定量のグルコースを添加した MC 溶液についてこの方法を試みたところ、回収率は 96% であった。

(8) セルラーゼ

酵素はセルラーゼ（大和化成成品）を用いた。さきに調製した試料溶液に酢酸緩衝液を加えて pH を 5.0 に調整し、MC 溶液にはさらに 3% 塩化ナトリウム溶液 1 ml を加え、40° の水槽中に 30 分間放置した後酵素液（セルラーゼ 100 mg に水を加えて 20 ml とし、よく振り混ぜた液）2.0 ml を加え、以下パンクレアチンなどの場合と同様に処理した。

c) 還元糖の定量

糖の定量は Somogyi 法によった。すなわちつぎの通りである。b) で作製した酵素分解液 10 ml（デンプン場合は 5 ml）に銅液（リン酸 2 ナトリウム 71 g, N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml, 硫酸銅 410 g, 酒石酸カリウムナトリウム 40 g, N ヨウ素酸カリウム溶液 25 ml をそれぞれ加えて溶かし全量を 1 L とした液）5 ml を加え、ゆるく栓をほどきて沸騰水浴中に 10 分間加熱した後直ちに冷却し、これに 2.5% ヨウ化カリウム溶液（微量の炭酸ナトリウム液でアルカリ性としたもの）2 ml および 2 N 硫酸 1.5 ml を加え、直ちに密栓してよく振り混ぜてから 5 分間放置し、0.005 N チオ硫酸ナトリウム溶液でデンプン試液を指示薬として滴定した。また、空試験液についても同様に操作した。空試験液で得たチオ硫酸ナトリウム液の消費量を試料液におけるチオ硫酸ナトリウム液の消費量より差引き、その差をもって試料に対するチオ硫酸ナトリウムの実消費量とした。別に対照として試料液の代りに水 10 ml を用いて試料液の場合と同様に操作して滴定し、次式により還元糖量をブドウ糖として算出した。

供試液中の還元糖量

$$= \left\{ \frac{\text{対照液の}}{\text{滴定数}} - \left(\frac{\text{試料液の}}{\text{滴定数}} - \frac{\text{空試験液の}}{\text{滴定数}} \right) \right\} \times 0.135$$

結果は Table 2 のとおりである。

3. 糊料溶液の酵素による粘度の変化

a) ジアスターゼ、タカジアスターゼ

CMC および CMS の 1% 水溶液 300 ml ずつをガラス円筒（6 × 12 cm）にとり、酢酸緩衝液（pH 4.8）15 ml ずつを加え、55° の水槽中に 30 分間加温した後同温度における粘度を B 形粘度計を用いてあらかじめ測定し

Table 2. Reducing Sugar as Glucose Produced from Samples which were Digested by Enzymes

Thickening Agent	Diastase	Takadiastase	Pancreatin	B.S.-Amylase	Cellulase	Saliva
CMC (A)	0.12	1.06	0.12	0.03	6.09	0.00
" (B)	0.11	0.47	0.05	0.01	3.40	0.00
" (C)	0.06	0.21	0.04	0.01	1.63	0.00
" (D)	0.06	0.44	0.04	0.02	4.02	0.00
CMS (A)	0.54	0.32	0.61	1.01	0.20	1.23
" (B)	0.90	0.72	0.97	2.34	0.18	3.93
M C (A)	—	—	0.00	0.00	0.32	0.00
" (B)	—	—	0.00	0.00	0.23	0.00
Starch	34.69	34.02	38.68	25.81	11.56	46.52

た。つぎにこの液に酵素液（酵素 0.6 g に水を加えて 30 ml とし、よく振り混た液）3 ml を加えてよくかき混ぜ、さきの水槽に戻して加温し、酵素添加後 30 分、1 時間および 2 時間後の粘度を測定した。なお、MC についてはこの温度で一部析出するため本実験は行わなかった。

b) パンクレアチン、枯草菌アミラーゼおよび唾液
CMC, CMS および MC の 1% 水溶液 300 ml ずつにリン酸塩緩衝液 (pH 6.8) 15 ml を加え、40° の水槽中に 30 分間加温し、以下ジアスターゼなどの場合と同様に操作し測定した。酵素液はパンクレアチン、枯草菌アミラーゼの場合はそれぞれ 0.6 g に水を加えて 30 ml とし、よく振り混ぜた液 3 ml ずつを用い、唾液は新生液 9 ml を用いた。唾液の場合はとくに添加直後にも測定した。

c) セルラーゼ
パンクレアチンなどの場合と同様に行なった。ただし、緩衝液は酢酸緩衝液 (pH 4.8) を用い酵素液はセルラーゼ 0.6 g を水に溶かして 30 ml とした液 3 ml を用いた。

上記それぞれの場合について（ただし唾液添加の場合を除く）酵素液の代りに水 3 ml を加えて対照とし、それぞれの場合に準じて粘度を測定したが、各試料ともほとんど変化は認められなかった。各試料について粘度の経時変化を図示すれば Fig. 1 のとおりである。

III 考 察

a) 還元糖の生成

CMC から還元糖を生成する酵素はセルラーゼがもっとも多く、1.63~6.09%（ブドウ糖として、以下同じ）の糖を産生している。つぎに多いのはタカジアスターゼの 0.21~1.06% であるが、これはタカジアスターゼがセルラーゼを含有しているためと思われる。その他の酵素は CMC からはほとんどまたは全く還元糖を生成しなかった。

CMS の場合酵素の作用は CMC と逆で、唾液がもっとも多く還元糖を生成し、枯草菌アミラーゼ、パンクレ

アチンなどがこれについている。しかし、デンプンと比較した場合、いずれの場合もその作用力はかなり減弱されている。Table 1 と Table 2 を見較べた場合、CMC も CMS も全般的に置換度が高いほど酵素の作用を受けにくくなる傾向が見受けられる。これはグルコース残基について側鎖が酵素分解を阻害するためと考えられる。

MC はセルラーゼ以外の酵素に対しては安定であり、セルラーゼの作用力も CMC と比べると大分弱められている。

b) 粘度に対する影響

CMC の粘度にもっとも影響を与えるものはセルラーゼで、最初の 30 分ですでに相当低下し、酵素作用前の粘度を 100% とした場合 3~26% にまで低下し、置換度の低いものほど低下した。この現象は還元糖生成の場合と一致している。セルラーゼについてはタカジアスターゼで 30 分以内に 29~65% にまで低下したが、パンクレアチン、枯草菌アミラーゼによるものはそれほど低下しなかった。なお、唾液については添加量が多かったため、とくに添加直後の粘度を測定したが、この場合粘度の高い試料にあっては幾分低下したが、その後変化が認められなかったことから考えて、この粘度低下は分解によるものではなく、試料液が希釈されたためと考えられる。CMS については CMC とは逆で、セルラーゼの影響はわずかで、唾液、枯草菌アミラーゼ、パンクレアチンなどは 30 分以内にいちじるしい粘度低下をきたした。しかし、その割合に還元糖が多くないのは α -1,4 結合を分解しつつもその大部分が比較的分子量の小さい多種類に止まっているものと思われる。

MC は CMC と同様セルラーゼの作用を受けるが、CMC ほどではなく、粘度に対する影響という点からみても三者のなかでもっとも安定しているといえる。

IV むすび

CMC, CMS および MC について各種酵素を作用させたときの還元糖の生成および粘度の変化について試験を行なった。CMC にもっとも大きく作用するのはセル

Fig. 1. Time course of viscosity of the thickening agent solutions in presence of the enzymes

ラーゼで、還元糖の生成も粘度低下も最も大きな値を示した。タカジアスターゼ、ジアスターゼもある程度影響を与えるが、セルラーゼに比べると大分弱く、パンクレチアン、枯草菌アミラーゼ、唾液はほとんど影響を与えなかった。ただ一般的に置換度が高くなるにつれて酵素の活性は弱められた。CMS に対してはセルラーゼの作用は比較的弱く、唾液、枯草菌アミラーゼ、パンクレチンは粘度をかなり低下させた。また唾液、枯草菌アミラーゼはある程度の還元糖を生成した。MC に対してはセルラーゼがやや活性を示すが他の酵素はほとんど影響を与えなかった。

本実験を御指導いただいた大阪大学教授川崎近太郎博士、ご鞭撻いただいた国立衛生試験所長刈米達夫博士、

同所食品部長川城巖博士、同食品添加物部長藤井清次博士ならびに御助言をいただいた同所山羽力技官に謹謝する。

また試料を提供して下さった日本シーエムシー株式会社、安達糊料株式会社、日本資糧工業株式会社および酸素の一部を提供して下さった大和化成株式会社に深謝する。

文 献

- 1) 川崎近太郎他：第15回日本薬学大会講演。
- 2) G. N. Festenstein: Biochem. J. **69**, 562(1958).
- 3) J. P. VII. p. 196.
- 4) 食品添加物公定書追補 I.
- 5) R. W. Eyler et al.: Anal. Chem. **19**, 24 (1947).