

F-Kit NEWS FOOD ANALYSIS

環境分析・食品分析 No. 16

February 2003

最新製品情報

近日発売 PCR法試薬キット

微生物検出用キットの発売予定

First-Beer Magnetic Kit

R-Biopharm社からビール中の微生物を検出するキットの発売を予定しています。

微生物のDNAを抽出し、LightCycler™などを使用してPCR法で高感度に検出します。

特長

- 抽出から検出まで約3時間で
- ビーズ法を用いるため高純度の核酸が得られる
- 多くの汚染菌が検出できる
- 再現性が高い

ビール製造工場での品質管理は、製造時に予期できない腐敗微生物(たとえば、*Lactobacillus*, *Pectinatus* 等)の検出をすることが重要です。培養法による検出方法が一般的ですが、試料を培地に分注し、培養し、結果を得るまでに多くの時間が必要です。

First-Beer Magnetic Kitは、汚染微生物を迅速に、polymerase chain reaction(PCR)を基本にして汚染菌を検出することができます。

原理

微生物を溶解した後、DNAは選択的に磁性粒子に吸着します。この磁性粒子には微生物の死骸も吸着するため、これらを除去します。分離されたDNAは、PCR阻止物質を含みません(たとえば、微生物の残渣等)。PCRの際、持ち込まれるDNA量がほぼ一定です。

プライマーは、その鋳型DNAと相補的な領域で増幅が行われます。DNAと結合したプライマーは、Taq DNA-Polymeraseによって増幅され、PCR終了後、融解曲線を実施し、その曲線を負の微分した T_m 値から微生物を検出できます。

右別表の通り多種にわたる汚染微生物が検出できます。

リニューアル Mar. 2003



総輸入・発売元

(株) J.K. インターナショナル

ホームページ URL : <http://www.jki.co.jp>

詳細な資料およびお問い合わせは当社までご連絡下さい。

E-mail : jki@vesta.ocn.ne.jp

TEL : 03-5362-2907 FAX : 03-5362-7079

目次

ページ

最新製品情報

微生物検出用キットの発売予定..... 1

酵素法による食品成分分析

新シリーズ

第1回 酵素はどんなものか(その1)..... 2

技術情報 - (1)

酵素法・紫外部吸光度測定による

ワインのグルコースと果糖の定量..... 6

技術情報 - (2)

欧米で公定化された酵素法・研究分野別情報..... 6

お知らせ

平成15年・酵素法による食品分析研究会講演会 8

別表

検出菌種群 1	検出菌種群 2
<i>Acetobacter pasteurianum</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticum</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. brevisimilis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. brevisimilis</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. collinoides</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. malefermentans</i>
<i>L. coryniformis</i> ssp. <i>coryniformis</i>	<i>L. parabuchneri</i> (frigidus)
<i>L. coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. perolus</i>
<i>L. delbrückii</i> ssp. <i>delbrückii</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. delbrückii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. paraplantarum</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>Megasphaera cerevisiae</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>
<i>L. lindneri</i>	<i>Pectinatus frisingensis</i>
<i>L. malefermentans</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. parabuchneri</i> (frigidus)	<i>Pediococcus damnosus</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>Pediococcus inoptinatus</i>
<i>L. pentosus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>L. perolens</i>	
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. paraplantarum</i>	
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	
<i>Pectinatus frisingensis</i>	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>Pediococcus damnosus</i>	
<i>Pediococcus inoptinatus</i>	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Selenomonas laticifex</i>	

今回より、「酵素学の基礎から酵素を用いた分析法まで」のテーマで初心者にも理解いただける解説書をシリーズとして連載致します。

酵素法による食品成分分析

はじめに

酵素そのものについてはすでに多くの成書がでております。このシリーズでは今まで酵素法を取り扱ってこられなかった方々や、専門外の方で食品分析に初めて携わる方にも入り易いよう、「酵素の基礎」から始めて、平易に「酵素法による成分分析」を解説することを試みました。

第1回 酵素はどんなものか(その1)

第1章 酵素はどんなものか

1. 酵素の働き

酵素とは「生物の細胞により作られる、触媒の働きを持つたんぱく質である」と定義されます。

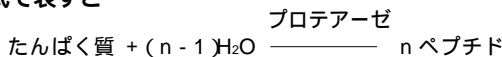
今までおおよそ5千から6千種類の酵素が見つけれられています。どの酵素でも物質としてみるとたんぱく質の一種です。たんぱく質は生物の重さの約15%を構成する主要成分ですからどこにでも普通に存在する物質です(70%の水分の他、核酸、炭水化物、脂肪が各数%)。酵素としての大切な意義は、その機能として「触媒としての働き」を持っている点にあります。

触媒とは「それ自体は変化せずに反応の進行を速める物質である」と定義されます。おそらく一度は化学の話の中で聞いたことがあるのではないのでしょうか。

触媒としての酵素の作用とはどんな働きでしょう。酵素の働きを身近な例で見ると洗剤中のリパーゼやプロテアーゼなどの例が挙げられます。最近の市販の洗剤のほとんどにはプロテアーゼが添加されています。プロテアーゼはたんぱく質を分解する酵素の総称です。プロテアーゼの作用はたんぱく質をアミノ酸や、アミノ酸が数個つながった断片(ペプチド)に分解する働きをします。普通衣服に付着する汚れを成分として見ると、主に汗や食べこぼしの中にある油脂とたんぱく質で、たんぱく質は繊維の内部にしみこんでしまうと繊維と固く結合・吸着してしまい、洗剤本来の界面活性作用や、物理的な揉みほぐしだけではなかなか落ちにくくなります。したがって酵素の働きを借りてたんぱく質の汚れを分解してやれば洗濯がきれいに速く仕上がるというわけですね。

この現象を分子のレベルで表すと、たんぱく質1個が酵素の働きで分解されてn個のペプチドができたことになり、この時n-1個の水が使われます。

式で表すと



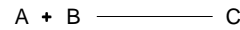
という化学反応式に書くことができます。ペプチドはさらにアミノ酸へと分解されてゆきます。

たんぱく質も水も安定な物質ですので、もちろんそれだけで放置しておいてもペプチドに分解することはありません。ところがプロテアーゼが来ると室温で数分のうちに分解されてしまうのです。洗濯するときには風呂の残り湯などぬるま湯を使うとともに早く分解させることができますね。

プロテアーゼを使わずにたんぱく質を分解するにはどうしたらよいでしょう。方法があります。苛性ソーダなどの強アルカリを加えて数時間加熱することが必要になります。たんぱく質内のペプチド結合は安定な結合なので、これを断ち切るにはペプチド結合の強い結合力に打ち勝つ過酷な条件が必要なのです。これが強アルカリ(高濃度のOH-イオン)と熱を使う化学的な方法です。もちろんこんな方法は衣服が傷んでしまうので洗濯には使えません。逆に言うと、プロテアーゼという酵素を使うことにより、過激で危険な条件を使うことなく、上の反応を進めることができます。プロテアーゼという酵素の触媒作用を利用することで簡単、短時間に、安全にたんぱく質を分解することができたわけです。

たんぱく質は安定な物質です。なのにプロテアーゼがあるととても簡単に分解してしまいます。またプロテアーゼが存在してもn個のペプチドが結合してたんぱく質へと逆行する(重合すること)はありません。なぜでしょうか。ここからは化学の言葉を借りて整理しておきます。

上の反応をさらに単純化して



と書くことにします。Aはたんぱく質、Bは水、Cはペプチドです。

熱力学の言葉では：

物質はそれぞれ固有のエネルギーを持っています。これをグラフで表すと図1のように表せます。

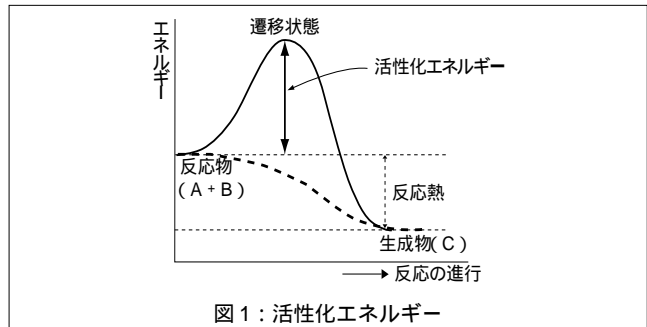


図1：活性化エネルギー

上の例で言いますと、反応物A+B(たんぱく質+水)の持つエネルギーは生成物C(ペプチド)の持つエネルギーより高いため、ちょうど水が高いところから低いところへ流れるように反応が進み、そのエネルギーレベルの差の分を熱として放出します。言い換えると、もともと反応は右方向へ(A+BからCへ、たんぱく質からペプチドへ)進みたがっています(図1の鎖線)。

ところが二つの間には山があってそのままでは水は流れません(反応は進みません)。反応を進めるためにはこのエネルギーの山(=活性化エネルギー)を越えさせる必要があります。たんぱく質の分子と水の分子がぶつかる力は弱く、活性化エネルギーの山を越えられません。このため化学法では、アルカリと熱をかけることで活性化エネルギーを与え、(OH-イオンでペプチド結合を攻撃させ、)活性化エネルギーの山を越えさせているのです。

生成物C(ペプチド)のエネルギーレベルは反応物A+B(たんぱく質+水)の持つエネルギーレベルより低いところにあるため、CからA+Bへそのままでは流れません。過らせるためにはより大きな活性化エネルギーが必要になります。これは酵素があるなしにはかわりません。物質の持つエネルギーはそれぞれに固有ですので、酵素は物質間のエネルギーレベルの位置

関係を変えることはできません。少し専門的な言葉で言うと酵素は化学平衡に到達する速度を速めるけれども化学平衡そのものをずらすわけではありません。

酵素の触媒としての働きとは活性化エネルギーの山越えをする代わりに図2に示すように、バイパスとしてトンネルを貫通させて水を楽に流してやることに相当します。

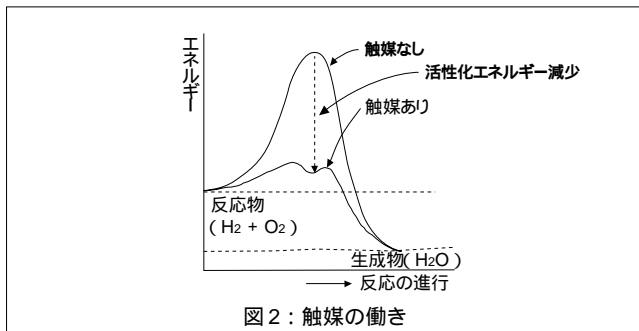


図2：触媒の働き

反応物のエネルギーレベルと生成物のエネルギーレベルの高低を変えることではなく、活性化エネルギーの障害の高さを下げてやる事にすぎません。障害を低くすることによって A + B から C へ反応を早く進ませるといふ単純なことなのです。ですからいくら酵素があっても生成物Cから反応物 A + B に逆行させることは、水を溯らせることのようにできません。(但し厳密にはボルツマン分布による。)

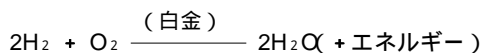
また酵素は触媒ですので、それ自体は反応の過程で消費されることはなく、反応の前後で変化することはありません。

化学反応で使われる触媒

それでは酵素はどのようにして活性化エネルギーを下げるのでしょ。この仕組みを知るためには酵素の分子構造について詳しく知る必要があります。ひとつ参考になるのは化学反応で使われている(酵素以外の)触媒についてです。触媒は生産現場でも化学反応工程には必ずといってよいほど使われています。

水素ガス(H₂)と酸素ガス(O₂)を混ぜ合わせてもそのままでは何も起こりません。室温では水素分子と酸素分子の衝突する速度が活性化エネルギーの山を越えるほど強くないからです。しかしこれに火を近づけて熱を与えると分子同士が衝突する速度が上がり、活性化エネルギーの山を越え、水素と酸素が爆発的に反応して水(2H₂O)となり、反応熱を放出(燃える)します。

前のたとえでは、水素ガス(H₂)と酸素ガス(O₂)はエネルギーのレベルが高く、反応物である水(H₂O)のレベルは低いところにあります。水が低いほうに流れることとなります。



熱を加えなくとも室温のまま白金の細かい粒を加えるとやはりこの反応は進み、水と反応熱を出します。このとき白金の働きは活性化エネルギーの山にバイパスを通し、室温では進まなかった反応を室温のまま進行させたのです。白金自体には変化は起こっていないので白金は触媒として働いたのです。

白金はどのようなメカニズムで活性化エネルギーを下げるのでしょ。厳密な証明は難しいのですが次のように考えられています。 - - 水素ガスの分子(H₂)と酸素ガスの分子(O₂)は白金粒子の表面に吸着される。吸着されると白金表面上で水素ガス分子と酸素ガス分子は原子単独のような状態(遷移状態)になると考えられる。この遷移状態は分子のときよりも

ずっと不安定で反応を起こしやすい。つまり活性化されている。したがって水素原子と酸素原子は次々と反応し、酸素原子1個と水素原子2個が結合した水分子ができると、白金触媒の表面から次々と放れてゆく。 - - 水素分子(H₂)内の水素原子間の結合や、酸素分子(O₂)内の酸素原子間の結合はもともと安定で、これらが切れて原子のような状態になることは普通ありえないのですが、白金触媒表面上ではこれが起こるらしいのです。

これが化学触媒の作用のメカニズムです。触媒の表面上で特別な「遷移状態」を作ることが重要な点です。そのような遷移状態を経由することで活性化エネルギーの山を低くして(つまり熱をかけずに)通過することができるというわけです。

後で触れますが、酵素の触媒作用も基本的には化学触媒と同じで、特別な「遷移状態」を作ることと考えられます。

2. 酵素の構造(その1)

アミノ酸とたんぱく質

酵素の本体はたんぱく質です。したがって酵素もたんぱく質としての共通の性質を持っています。

たんぱく質は多数の種類があり、生物の体の中でそれぞれが多様な働きをしています。細胞の構造を作り、運動をし、ホルモンとしての調節をし、体の防衛をします。そのたんぱく質の1つとして酵素があります。

たんぱく質は20種類のL-アミノ酸が鎖のように結合した高分子化合物です。アミノ酸は一般式で表すと図3に示す構造の化合物でどれもカルボキシル基(-COOH)とアミノ基(-NH₂)を持つ点は共通です。

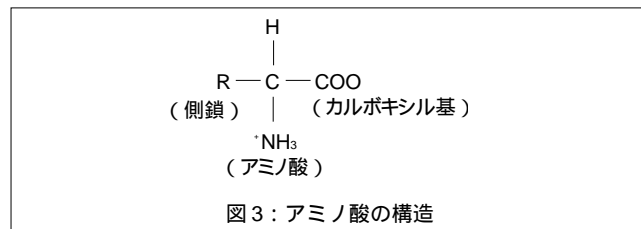


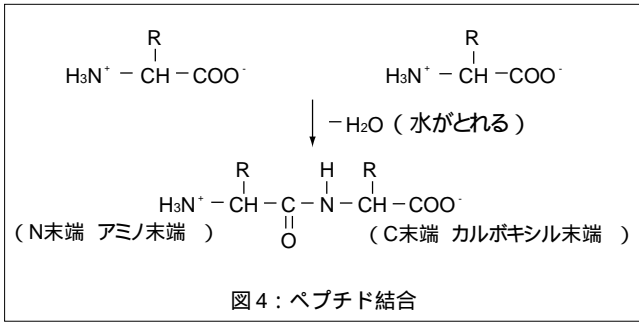
図3：アミノ酸の構造

R-の部分(側鎖といひます)の種類により表1に示した20種類があります。

表1：たんぱく質構成アミノ酸の構造と表示法

名称	構造式 共通の主鎖 側鎖 R	表示法	
		三文字表示法	一文字表示法
グリシン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{H} \end{array}$	Gly	G
アラニン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	Ala	A
バリン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH} \begin{array}{l} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	Val	V
ロイシン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{array}{l} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	Leu	L
イソロイシン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH} \begin{array}{l} / \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	He	I
セリン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$	Ser	S
トレオニン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{array}{l} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{OH} \end{array} \end{array}$	Thr	T
アスパラギン酸	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$	Asp	D
アスパラギン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2 \end{array}$	Asn	N
グルタミン酸	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$	Glu	E
グルタミン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2 \end{array}$	Gln	Q
システイン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH} \end{array}$	Cys	C
メチオニン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	Met	M
リシン	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$	Lys	L

アミノ酸同士はカルボキシル基と隣のアミノ酸のアミノ基との間で反応して水がとれるような形で結合します(図4)。



この結合をペプチド結合といいます。つぎつぎにアミノ酸がペプチド結合によりつながり、長い鎖を作ったものがたんぱく質です。一本の鎖(ペプチド鎖)を垂らして、その鎖の周りにアミノ酸の側鎖が突き出したような、ブラシのような形となります。

話が少しずれますが、地球上の生物の生命活動の主要な部分を担っているのがたんぱく質ですが、そのあらゆるたんぱく質をつくる部品としてのアミノ酸が20種類しかなく、その20種類の側鎖の構造には必ずしも統一的な理由が感じられず、思いつきで拾い集めたような感じのものであるのは不思議さを感じますね。もっとも核酸がATGCのたった4種類の部品からできているのを思えば、20種類は充分多いとも言えますが。

それでもここで注意しておかねばならないのは、20種類のアミノ酸の側鎖の性質のうち、「極性が高いか、低いか」という点です。アミノ酸の側鎖の「極性が高いか低いか」を別の言葉では「親水性か疎水性か」という言い方もします。「水になじみやすいか、油になじみやすいか」と同じ意味ですね。図5にアミノ酸残基の極性の度合いを表に示しました。水の中では水になじみやすいもの同士が、また油になじみやすいもの同士が、それぞれ集まろうとします。この性質がたんぱく質が高次構造を作るときに重要な役割をします。

図5：アミノ酸の親水性(水となじみやすさ)の度合

一文字記号	アミノ酸の名称	水となじみやすさ	
		疎水性 ←	親水性 →
A	アラニン	●	
R	アルギニン		●
N	アスパラギン		●
D	アスパラギン酸		●
C	システイン	●	
Q	グルタミン		●
E	グルタミン酸		●
G	グリシン		●
H	ヒスチジン		●
I	イソロイシン	●	
L	ロイシン	●	
K	リジン		●
M	メチオニン	●	
F	フェニルアラニン	●	
P	プロリン	●	
S	セリン		●
T	トレオニン		●
W	トリプトファン	●	
Y	チロシン	●	
V	バリン	●	

酵素たんぱくの一二次構造

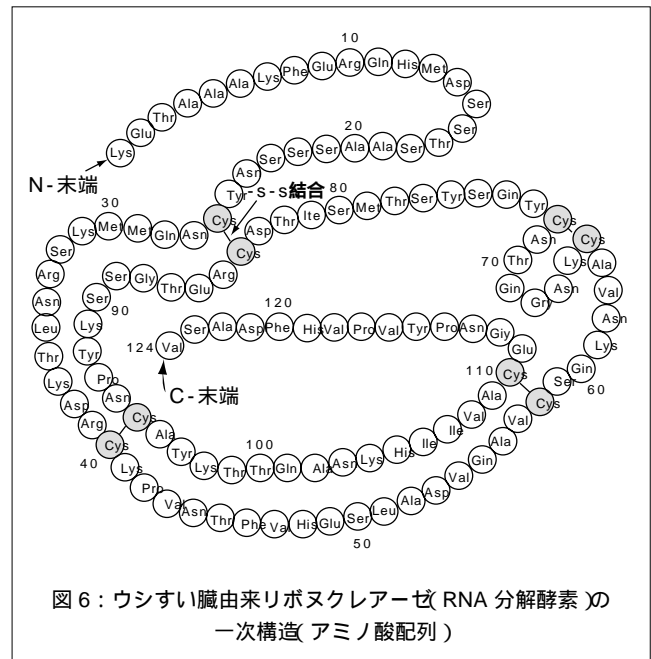


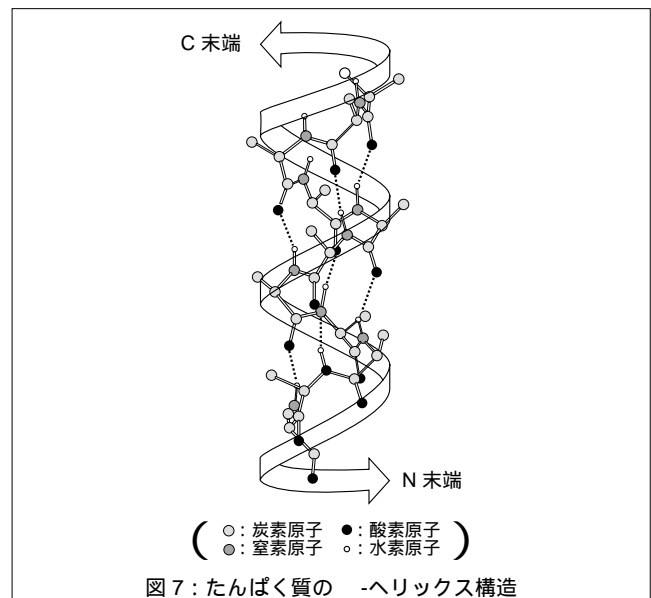
図6に示したウシの胃リボヌクレアーゼの例では、N-末端アミノ酸であるリジンから始まり、C-末端のアミノ酸のバリンにいたる124個のアミノ酸からなる1本鎖の構造を持っています。構成するアミノ酸残基の1つ分の分子量は平均すると約110なのでリボヌクレアーゼの分子量は約14,000です。このリボヌクレアーゼは酵素分子としては最も小さな部類に属します。

一般に酵素分子の大きさはまちまちで、分子量5~10万位のものが多いけれども、中にはグルタミン酸デヒドロゲナーゼの100~200万といった例もあります。

ウシの胃リボヌクレアーゼの1例を示しましたが、酵素としてのたんぱく質分子をつくるアミノ酸の数と種類と順序、つまり配列はその酵素の種類と由来により固有です。その鎖の中のアミノ酸の配列順序を一次構造と呼んでいます。

たんぱく質の高次(二次、三次、四次)構造

図6のリボヌクレアーゼのたんぱく分子の鎖(ペプチド鎖とも言う)は平面の上に広げられたように描かれていますが、実際の酵素たんぱく分子は鎖が立体的に折りたたまれることで、多くの場合球状になっています。実はタンパク質分子が立体的な構造をとるということは、その酵素が働きを示す上で非常に大切なことなのです。



たんぱく質の立体構造を二次構造および三次構造と呼びます。そのうちたんぱく質の鎖の中で局部的に規則性を示す構造を二次構造といいます。二次構造としては α -ヘリックス(図7)と β -構造(図8)がよく知られています。

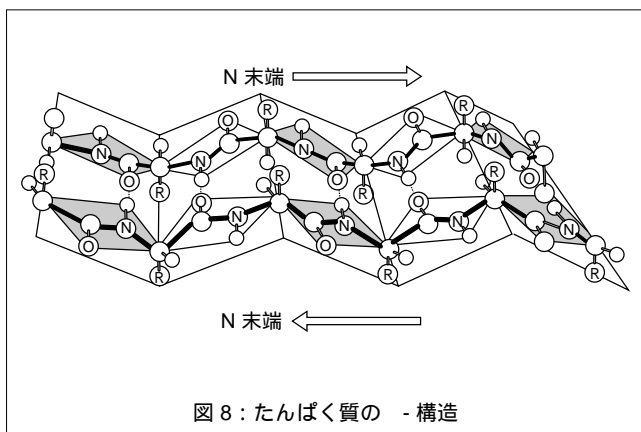


図8: たんぱく質の β -構造

α -ヘリックスは一本のペプチド鎖がらせんに巻いた筒状の構造です。この構造は同じペプチド鎖の中の4つ先の(または4つ後の)アミノ酸のC=Oと-NH-との間で形成される水素結合で安定化されています。また β -構造は2本のペプチド鎖が平行に並び、折りたたまれたシート状の繰り返し構造をとっています。この β -構造も2本のペプチド鎖間の主鎖のC=Oと-NH-との間で作られる水素結合で保持されています。

三次構造は二次構造を含むペプチドの鎖のもっと広い範囲で見られる折りたたみ構造で、立体的な空間配置のことを言います。図9はミオグロビン(正確には酵素ではありませんが)の三次構造の例ですが、 α -ヘリックスの筒が何回か折りたたまれているのがわかります。三次構造もまた水素結合や疎水結合などで維持されていると考えられます。

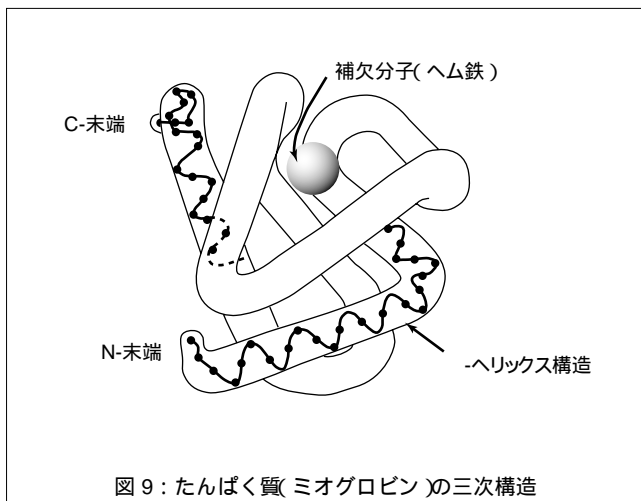


図9: たんぱく質(ミオグロビン)の三次構造

多くの酵素では三次構造をもつ2本以上のペプチド鎖が集まってさらに高次な構造を作ります。これを四次構造とよび、構成するペプチド鎖をサブユニットと呼びます。たとえば肝臓のアルコール脱水素酵素は2つの同一のサブユニットからなる2量体構造ですし、筋肉の乳酸脱水素酵素は4量体構造です。またグルタミン酸脱水素酵素は6量体構造を基本とし、それが更に重合して巨大分子を作ります。

酵素分子の立体構造と変性

酵素分子の一次構造、つまりペプチド鎖はアミノ酸同士が共有結合で繋がっていますので安定です。一方、二次構造、三次構造、四次構造では、共有結合以外の水素結合、イオン結合、疎水結合などによってペプチド鎖の中やペプチド鎖の間で引き合っており、その総和として立体構造が維持されています。

水素結合は電気陰性度(電子の偏り)の高い二つの原子(ペプチ

ド鎖の中で言えばO原子とN原子)の間で、電気陰性度の低い(つまり弱い正電荷を持つ)水素原子が仲立ちをすることで引き合う結合です。疎水結合はたんぱく質が極性の高い水の環境の中に入ると非極性基(または疎水性部分)が水から排除されることで疎水基同士が引き合う結合です。水素結合も疎水結合もそれぞれ自身が共有結合に比べてずっと弱いため、結果的に酵素の立体構造も決して強固なものではなくむしろ不安定な物と言えます。

酵素の溶液を熱湯の中で加熱するとほとんどの酵素では数分間で触媒活性が失われてしまいます。この失活した酵素分子を調べてみるとペプチド鎖の切断は起こっていない、つまり酵素たんぱく質の一次構造はそのままなのに、活性が失われてしまっているのです。これは酵素たんぱく質の鎖の立体構造が熱処理によって変化してしまったためと考えられます。このように、本来正しく折りたたまれていたたんぱく質の鎖の立体構造が変化してしまうことをたんぱく質の変性といいます。たんぱく質は多くの場合一度変性すると元通りには戻りません(不可逆の変性)。酵素たんぱく質が変性すると酵素は活性を失い、失活します。酵素が触媒活性を現わすには、その酵素分子が正しい立体構造を保っていることが絶対に必要なのです。

酵素の失活は熱処理以外にも、酸やアルカリ、尿素などの試薬によっても起こります。酸やアルカリはイオン結合を切ることによって酵素たんぱく質の立体構造をゆるめます。尿素は分子中の -HN-C=O という構造がペプチド鎖の構造(水素結合を作る部分)と同じであり、ペプチド鎖の作る水素結合を中和してしまうためと考えられます。

また酵素たんぱく質のペプチド鎖中の二つのシステイン残基の-SHからHがとれて-SS-の結合(ジスルフィド結合という)を作ることがあります(これは共有結合ですが)。-SS-結合によってペプチド鎖間に橋渡しができ、分子の立体構造(特に三次構造)が維持されることもよく見られます。図6のウシリボヌクレアーゼの場合にはアミノ酸残基の26番目と84番目、65番目と72番目のシステイン残基間でそれぞれ-SS-結合ができています。この場合は同一ペプチド鎖内での例ですが、異なるペプチド鎖間で橋渡しができることもあります。ジスルフィド結合の形成はH原子がとれる反応、つまり酸化反応ですから、還元剤によってもとの-SHに切りもどすことができます。リボヌクレアーゼの場合には還元剤によって-SS-結合を切ると触媒活性が失われます。立体構造をとめていた留め金が外れたようになり、構造が緩んでしまったためと考えられます。

しかし厄介なことに、多くの酵素では-SH基が近傍の他の-SH基と自発的に酸化反応して架橋を作ってしまう、そのために逆に酵素活性が失われることが多いのです。これは予定外の場所に-SS-結合ができることで、立体構造にゆがみや歪みができ、そのまま留め金でとめられたようになったためと考えられます。実際に酵素を扱う場合に、ジスレイトールなどの温和な還元剤を加えることが多いのは、この偶発的な酸化反応を防ぐためです。

(次回に続く) 執筆者: 深見 博一(理学博士)

本書で引用した図表の出典

参考図書-1: 「酵素反応のしくみ」、藤本大三郎著、株式会社講談社ブルーバックス、2001.12.1

参考図書-2: 「酵素のおはなし」、大島敏久・左右田健次共著、財団法人日本規格協会、1997.11.20

図5、アミノ酸の親水性の度合い: 参考図書-1、p.111、図5-5

図6、ウシすい臓由来リボヌクレアーゼの一次構造: 参考図書-2 p.38、図2.7

図7、たんぱく質の α -ヘリックス構造: 参考図書-1、p.117、図5-9

図8、たんぱく質の β -構造: 参考図書-2、p.40、図2.10

図9、たんぱく質(ミオグロビン)の三次構造: 参考図書-2、p.40、図2.11

表1、たんぱく質構成アミノ酸の構造と表示法: 参考図書-2、p.27、表2.1

技術情報 - (1)

酵素法・紫外外部吸光度測定法による

ワインのグルコースと果糖の定量

D-グルコースとD-果糖は果実の糖関係の主成分として共に重要な等質で、ワイン、ジュースなどの食品製造管理に不可欠な分析項目です。

F-キット D-グルコース / 果糖
Cat. No. 139106 各25回 ¥13,000

Journal of the Association of Official Analytical Chemists Collaborative Study(Vol. 68, No. 5, sept./Oct.1985)に、GUENTHER HENNIGERらが「酵素法・紫外外部吸光度測定法によるワインの

表1: ワイン中のグルコース測定(mg/mL)

ラボ	サンプル							
	1	6	2	5	4	9	7	8
1	0.124	0.121	0.215	0.213	0.154	0.151	0.170	0.175
2	0.127	0.128	0.217	0.216	0.156	0.156	0.180	0.178
3	0.134	0.126	0.232	0.232	0.159	0.163	0.190	0.194
4	0.123	0.124	0.210	0.209	0.150	0.146	0.169	0.168
5	0.124	0.125	0.211	0.213	0.154	0.154	0.176	0.177
6	0.123	0.124	0.213	0.213	0.155	0.156	0.174	0.176
7	(0.111)	(0.095)	(0.182)	(0.180)	(0.128)	(0.136)	(0.152)	(0.148)
8	0.128	0.127	0.221	0.221	0.164	0.164	0.188	0.192
9	0.131	0.126	0.219	0.212	0.156	0.161	0.180	0.181
10	0.136	0.136	0.219	0.225	0.161	0.161	0.189	0.184
11	(0.126)	(0.286)	0.208	0.197	0.151	0.147	0.171	0.171
12	0.124	0.125	0.220	0.227	0.159	0.158	0.181	0.186
13	(0.048)	(0.079)	(0.163)	(0.151)	0.149	0.148	(0.184)	(0.346)
14	0.128	0.125	0.219	0.199	0.162	0.244	0.174	0.178
15	0.130	0.129	0.222	0.218	0.157	0.159	0.186	0.181
16	0.137	0.127	0.235	0.225	0.158	0.162	0.180	0.187
17	0.125	0.124	(0.124)	(0.210)	(0.152)	(0.269)	0.174	0.178
18	0.117	0.121	0.204	0.205	0.151	0.148	0.169	0.169
X	0.127	0.126	0.218	0.210	0.156	0.161	0.178	0.180
SD	0.005	0.004	0.008	0.010	0.004	0.022	0.007	0.008
CV, %	3.9	3.2	4.1	3.7	4.7	13.7	3.9	4.4

表2: ワイン中の果糖測定(mg/mL)

ラボ	サンプル			
	1	6	2	5
1	0.548	0.543	0.220	0.218
2	0.557	0.549	0.223	0.223
3	(0.609)	(0.574)	(0.239)	(0.236)
4	0.557	0.570	0.216	0.216
5	0.561	0.564	0.217	0.216
6	0.560	0.559	0.224	0.220
7	(0.501)	(0.433)	(0.187)	(0.187)
8	0.574	0.555	0.229	0.227
9	0.547	0.569	0.215	0.214
10	0.584	0.576	0.226	0.232
11	(0.542)	(0.689)	0.218	0.202
12	0.554	0.561	0.232	0.229
13	(0.434)	(0.013)	(0.168)	(0.151)
14	0.569	0.556	(0.227)	(0.201)
15	0.569	0.573	0.232	0.224
16	0.578	0.601	0.234	0.232
17	0.552	0.571	0.217	0.214
18	0.496	0.503	0.203	0.205
X	0.558	0.561	0.222	0.219
SD	0.021	0.022	0.008	0.009
CV, %	3.8	3.9	3.6	4.1

ラボ	サンプル			
	4	9	7	8
1	0.217	0.212	0.151	0.155
2	0.221	0.222	0.161	0.162
3	(0.232)	(0.221)	(0.161)	(0.169)
4	0.216	0.209	0.153	0.152
5	0.216	0.214	0.157	0.157
6	0.217	0.216	0.157	0.159
7	(0.183)	(0.188)	(0.137)	(0.135)
8	0.233	0.227	0.168	0.162
9	0.217	0.221	0.162	0.162
10	0.228	0.226	0.168	0.167
11	0.214	0.209	0.156	0.152
12	0.220	0.223	0.163	0.166
13	0.210	0.208	0.160	0.156
14	0.226	0.139	0.153	0.157
15	0.222	0.224	0.157	0.162
16	0.228	0.224	0.166	0.167
17	(0.211)	(0.102)	0.155	0.159
18	0.203	0.201	0.144	0.149
X	0.219	0.212	0.158	0.159
SD	0.008	0.022	0.006	0.005
CV, %	3.7	10.4	3.8	3.1

グルコースと果糖の定量を報告している。F-キット グルコース/果糖と同様の反応系、試薬組成、操作の酵素法で検討しているので、データを紹介します(AOAC公定法として1985年に採用)。

市販ワインを希釈し、4種類濃度の対8種類のサンプルを18の共同研究施設でグルコースと果糖をHK(ヘキソキナーゼ)・G6PDH(グルコース・6-リン酸脱水素酵素)とホスホグルコースイソメラーゼ、NAD、を用いた酵素法で定量した。この方法では、分割せずに同一試料中でグルコースと果糖を定量することができる。また定量操作が簡単であるが、少量を正確に扱う注意が必要となる。

グルコース測定の結果では、反復性の偏差: 2.6~14.6 mg/L、再現性の偏差 4.7~16.5 mg/Lとなった。果糖測定では、反復性の偏差: 2.4~16.1 mg/L、再現性の偏差: 6.0~21.3 mg/Lとなり、迅速に良好な結果を得た。

技術情報 - (2)

欧米で公定化された酵素法・研究分野情報

公定法および公式勧告法 Official Methods and Recommendations
数多くの酵素による分析法が次のような国際基準機関や政府機関によって採用されています。

ISO(国際標準機構) International Standardization Organization

ISO2963	(1997)	チーズの化学分析のための方法。チーズおよびチーズ加工品の中のクエン酸含量測定法(酵素法)
ISO4133	(1979)	肉および肉製品 - グルコン - ラクトンの含量。(基準法)
ISO4134	(1999)	肉および肉製品 - L - グルタミン酸含量の測定法。(基準法)
ISO8069	(1986)	粉乳および粉乳製品の分析法。粉乳中の乳酸および乳酸塩含量の分析法。
ISO8451	(1991)	タバコ - でんぷん含量の測定酵素法。
ISO11213	(1995)	修飾でんぷん - アセチル基含量の測定 - 酵素法。
ISO13965	(1998)	肉および肉製品の試験方法。でんぷんおよびグルコース含量の測定。(酵素法)
ISO/DIS5765-1	(1998)	乳粉末、アイスクリーム粉末、およびプロセスチーズ - 乳糖含量の測定 - 第1部: 乳糖中のグルコース含量の測定における酵素法
ISO/DIS5765-2	(1998)	乳粉末、アイスクリーム粉末、およびプロセスチーズ - 乳糖含量の測定 - 第1部: 乳糖中のガラクトース含量の測定における酵素法

AOAC(アメリカ分析化学協会：)American Association of Analytical Chemists

AOAC公式法	984.15	牛乳中の乳糖(酵素法)
AOAC公式法	985.09	ワイン中のグルコースとフルクトース
AOAC公式法	985.11	ワイン中のクエン酸(酵素法)
AOAC公式法	993.05	リンゴジュース中、L リンゴ酸割合

IFU(国際果実ジュース生産者連合)International Federation of Fruit Juice Producers

IFU21	1985	L リンゴ酸(酵素法)
IFU22	1985	クエン酸(酵素法)
IFU22	1996	エタノール(酵素法)
IFU53	1996	D/L 乳酸(酵素法)
IFU54	1984	D イソクエン酸(酵素法)
IFU55	1985	グルコース(酵素法)
IFU55	1985	フルクトース(酵素法)
IFU56	1988	ショ糖(酵素法)
IFU62	1995	ソルビトール(酵素法)
IFU64	1995	D リンゴ酸(酵素法)
IFU66	1996	酢酸(酵素法)
IFU76	2001	ブドウジュース中のD グルコン酸
IFU77	2001	ブドウジュース中のグリセロール

OIV(国際ワイン事務局：)International Wine Office

- グルコースおよびフルクトース(酵素法)
- グリセロール(酵素法)
- D/L 乳酸(酵素法)
- クエン酸(酵素法)
- L リンゴ酸(酵素法)
- D リンゴ酸(酵素法)

IDF(国際乳業連合：)International Dairy Federation

IDF34C	1992	クエン酸の酵素的測定法：チーズ、プロセスチーズ、および牛乳中
IDF69B	1987	D/L 乳酸の酵素的測定：ドライミルク中
IDF79B	1991	乳糖/D ガラクトースの酵素的測定法：プロセスチーズ、乳製粉末中
IDF79B	1991	乳糖/D グルコースの酵素的測定法：ドライミルク、アイスクリームミックス、乳製粉末中
IDF97A	1984	硝酸(亜硝酸)塩の酵素的測定法：乳製品、および乳製粉末中
IDF175	1995	乳糖/D グルコースの酵素的測定法：牛乳中

EBC(欧州ビール総会：)European Brewery Convention

9.3	ノンアルコールおよび低アルコールビール中のエタノール：酵素的測定法
9.23	ビール中の亜硝酸塩：酵素的測定法
9.25.2	ビール中の総亜硫酸：酵素的測定法
9.32	ビール中の酢酸：酵素的測定法
9.33	ビール中のグリセロール：酵素的測定法
9.34	ビール中の乳酸：酵素的測定法

MEBAK(中央欧州ビール分析委員会：)Mittelleuropäische Brautechnische Analysen-Kommission

下記成分の酵素的分析法

エタノール	グリセロール	蟻酸
L リンゴ酸	アスコルビン酸	クエン酸
酢酸	D/L 乳酸	蔞酸
グルコース・フルクトース	ショ糖	マルトース
でんぷん	アンモニア	亜硫酸塩
亜硝酸塩		

ASBC分析法(アメリカビール化学学会：)American Society of Brewing Chemists

1991	低アルコール濃度の酵素的分析法
------	-----------------

ICUMSA(糖分析統一法への国際委員会：)International Commission for Uniform Methods for Sugar Analysis

ICUMSA法 GS2/3-35	酵素法による精製糖製品中の亜硫酸塩の分析法
ICUMSA法 GS8/1/2/3/4-19	総ガラクトシドおよびラフィノースの酵素的分析法
ICUMSA法 GS8/4/6/-4	酵素法による甜菜ジュース中グルコースおよびフルクトースの分析法
ICUMSA法 GS8/4/6/-13	乳酸の酵素的分析法
ICUMSA法 GS8/4/6/-14	酵素法による甜菜ジュース中グルコースおよびフルクトースの分析法

欧州規格(European Norm, EU加盟国で実施されている)

EN1137	1995	果実および野菜ジュースのクエン酸(塩)含量の測定法：NADH分光光度法
EN1138	1995	果実および野菜ジュースのL リンゴ酸(塩)含量の測定法：NADH分光光度法
EN1139	1994	果実および野菜ジュースのD イソクエン酸含量の測定法：NADH分光光度法
EN1140	1995	果実および野菜ジュースのD グルコースおよびD フルクトース含量の測定法：NADH分光光度法
EN1988 2	1998	食品原料
EN ISO 8069	2001	粉乳 - 乳酸および乳酸塩含量の測定
EN ISO 11213	1995	蔞酸でんぷん - アセチル含量の測定(酵素法)
EN12014 3	1998	食品、食材。硝酸および(または)亜硝酸の含量の測定。肉製品中の硝酸と亜硝酸を硝酸から亜硝酸へ酵素的に還元した後、分光光度計で測定する。
EN12014 5	1998	食品、食材。硝酸および(または)亜硝酸の含量の測定。硝酸と亜硝酸を分光光度計で測定する。野菜を含む幼児および小児向け食品中の硝酸塩含量の酵素的測定法。
EN12138	1998	果実および野菜ジュース。D リンゴ酸含量の測定法。NADの分光光度法。
EN12146	1997	果実および野菜ジュース。ショ糖の酵素的測定法。NADPの分光光度法。
EN12631	1999	果実および野菜ジュース。D およびL 乳酸(塩)含量の酵素的測定法。NADの分光光度法。
EN12632	1999	果実および野菜ジュース。酢酸(塩)含量の酵素的測定法。NADの分光光度法。
EN ISO 13965	1998	肉および肉製品。でんぷんとグルコース含量の測定 - 酵素的測定法。

1990年9月17日の委員会規則EEC 2676 / 90はワインの分析法について欧州共同体の方法を定めた。

その付表中において以下の酵素的測定法が規定された。

グルコース・フルクトース
クエン酸
乳酸
L リンゴ酸
D リンゴ酸

DIN (ドイツ工業規格: Deutsche Industrie Norm ENに入らなかった追加規格)

DIN10325	(1986)	プロセスチーズ中のクエン酸の測定。(酵素法)
DIN10326	(1986)	牛乳および乳製品中のショ糖およびグルコースの測定。(酵素法)
DIN10344	(1982)	牛乳および乳製品中の乳糖およびガラクトースの測定。(酵素法)
DIN10335	(1987)	牛乳および乳製品中のL-/D-乳糖の測定。(酵素法)
DIN10381	(1979)	でんぷんおよびでんぷん製品についての試験。D グルコースおよびD フルクトースの測定。
DIN10471	(1997)	牛乳および乳製品中のD グルコン酸の測定。(酵素法)
DIN10476	(2000)	乳製品中の硝酸塩および亜硝酸塩の測定。(酵素法)
DIN54604-1	(1988)	紙およびダンボールの試験。でんぷんの測定。(酵素法)

食品分析のための酵素法についてドイツ食品法の35条において下記の製品について記載されている。

食品一般:	亜硫酸塩
牛乳および乳製品:	乳糖/ガラクトース、L-/D-乳酸、D グルコン酸
チーズ:	D グルコン酸
鶏卵:	L 乳酸、コハク酸、D-3-ヒドロキシ酪酸、/フルクトース/ショ糖
肉および加工肉:	クエン酸、酢酸、L-/D-乳酸、グルコン酸、グルタミン酸、グルコース、乳糖、ショ糖、でんぷん、総グルコース(でんぷんとして)
パン/ケーキ:	乳糖、酢酸、D ソルビトール
缶詰トマト:	クエン酸/グルコース、グルタミン酸、蟻酸
トマトケチャップ香料:	クエン酸、糖含量、グルタミン酸、蟻酸、酢酸
野菜ジュース:	D イソクエン酸、D グルコース/フルクトース、クエン酸、リンゴ酸、ショ糖
果実製品:	亜硝酸塩
果実ジュース:	D イソクエン酸、D グルコース/フルクトース、クエン酸、リンゴ酸、ショ糖
ビール:	亜硝酸塩、エタノール(低アルコールビール中)
チョコレート:	乳糖
シリアル(コーンフレーク)をペーストにした幼児食品:	グルコース/フルクトース、マルトース、でんぷん、乳糖
野菜をベースとした幼児食品:	亜硝酸塩

このほか多数の試験法がEU加盟国により認められています。

お知らせ

平成15年・酵素法による食品分析研究会講演会

主催: 酵素法による食品分析研究会

日時: 平成15年3月10日(月)

下記のプログラムを予定しています。

講演 1	11:00 ~ 12:30
総会	14:00 ~ 14:30
ポスターセッション	14:30 ~ 15:30
講演 2	15:30 ~ 17:00
懇親会	17:30 ~

会場: 東洋大学白山キャンパス内
東京都文京区白山5-28-20 電話: 03-3945-7223

交通: 都営地下鉄三田線「白山」駅
または営団地下鉄南北線「本駒込」駅下車、徒歩5分

演題:

- 1.「BSE(牛海綿状脳症)検査における異常プリオン蛋白測定法」
ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社 井芹 明敏 氏
- 2.「内分泌かく乱物質の分析と最近の研究」
星薬科大学 中澤 裕之 氏

参加費: 会員・学生 無料

協賛学会員 1,000円 その他 6,000円

懇親会参加費: 会員・学生 4,000円 その他 2,000円

問い合わせ先: 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52-1

(財)日本食品分析センター内

酵素法による食品分析研究会事務局 金谷、織本

(Tel. 03-3469-7131 FAX. 03-3469-7156)

製造元



ロシュ・ダイアグノスティクス社

世界総発売元



バイオフาร์ม社



総輸入・発売元

(株) J.K. インターナショナル

〒160-0022 東京都新宿区新宿2-9-22 SVAX新宿ビル

TEL.03-5362-2907(代) FAX.03-5362-7079

URL: http://www.jki.co.jp E-mail: jki@vesta.ocn.ne.jp