

α -Amylase による各種デンプン分解物の協同性の比較

井 上 節 子

緒 言

デンプンを比較的多く含む食品の消化性は、含まれているデンプンそのものの特性、その食品中におけるデンプンの存在状態、共存する物質、調理加工上の方法などによって変化するとと思われる。先に各種デンプンの特性を α -Amylase 分解については、分子量の低下に伴う物性と、¹⁾ グルコース (G_1)、マルトース (G_2)、マルトトリオース (G_3) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離²⁾、反応速度の測定³⁾ を調べ、 β -Amylase 分解については、酵素のアロステリックな現象と、生成マルトースの量を調べて来た。

今回の実験においては、各種デンプン (ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、トウモロコシデンプン) の細菌液化型の α -Amylase によって生成する G_1 、 G_2 、 G_3 のそれぞれの生成反応初速度を求め、その協同性の比較をして反応性の違いをしらべた。そして、その結果から、これらの3種のデンプンの構造の相違を知る手がかりを得ることを目的とした。

実験材料、試薬および測定機器

①試料

ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、トウモロコシデンプン：和光純薬工業株式会社製のもの。

②酵素および試薬類

前報²⁾ と同じ。

③測定機器

高圧液体クロマトグラフ装置、高圧定量ポンプはAL-TEXを使用。DetectorはShodex RI, InjectorはPheodyne-7120型、RecorderはU-125 M. N. (島津)、Columnは $\phi 4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ にLicrosorb NH_2 を充填して使用した。

実験方法

①酵素による分解

ジャガイモデンプンの水分含量は17%、サツマイモデンプンは16%、トウモロコシデンプン (コーンスターチ) は15%あるので、その量を考慮して、ジャガイモデンプン、サツマイモデンプンについては、5g/l, 10g/l, 15g/l, 20g/l, 25g/l, 30g/l, の割合に秤量し、このほかサツマイモデンプンについては40g/lを加えて秤量した。はじめに、所定のデンプン量に対してその90%の水を加え、攪拌しながら沸騰湯浴中でり化させ、り化終了後ひきつづき5分間加熱したのち静置し、37℃に冷えたところで、水を追加して予定の濃度のデンプン溶液を作った。そのうち200mlをとり、その中に、緩衝液 (0.025モル-リン酸水素ニナトリウムと、0.0125モル-クエン酸でpH 6.8に調整して作成) 25mlと、1%一塩化ナトリウム10ml, 水5mlを加えて37℃の恒温槽に入れ、0.05% α -Amylase 10mlを加えて、各反応時間、(1, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 45, 60分) 反応させる。各反応時間ごとに25ml採取し、それを三角フラスコに入れ、ただちに加熱3分する。そして α -Amylase の酵素活性を失活させ試料とする。

②HPLC 用試料の作成

α -Amylaseによって分解された試料を、50℃~60℃でエバポレーターで蒸発乾固する。乾固した試料を一定量のアセトニトリル：水 (60:40) でとかし、デンプン5g/lの試料については5mlのメスフラスコに、10g/l, 15g/lについては10mlのメスフラスコに、20g/l, 25g/lの試料については20mlのメスフラスコに、30g/l, 40g/lについては25mlのメスフラスコ中に入れる。溶液が2層に分離するので、0.025モル-リン酸水素ニナトリウムを様子を見ながら数滴、滴下して、pHをアルカリ側によせ2層に分離している溶液を均一な溶液とする。沈殿物ができるので、ろ過して、HPLC用試料とした。

③展開

溶媒はアセトニトリル：水（60：40）を使用し、試料 $20\mu\text{l}$ をループによって注入した。Flow Rate は $1\text{ml}/\text{min}$, Chart speed $5\text{mm}/\text{min}$. Column Temperature は室温, Attenuator は $\times 8$, Pressure は 1000psi で行った。

④標準物質

G_1 , G_2 , G_3 をアセトニトリル：水（60：40）に溶解して、 $1.25\text{mg}/\ell$, $2.5\text{mg}/\ell$, $5.0\text{mg}/\ell$, $7.5\text{mg}/\ell$, $10\text{mg}/\ell$ を用意して、試料と同様に $20\mu\text{l}$ ループによって注入し、検量線を作成した。また、試料にこの標準物質を添加し、添加法による試料の定量も行った。

実験結果

各種デンプンの各反応時間における、 G_1 , G_2 , G_3 の生成量を HPLC により分離、定量し、各反応試料濃度 (S) における初速度を求めた。 G_1 については Fig. 1 に、 G_2 については Fig. 2 に、 G_3 については Fig. 3 に示す。

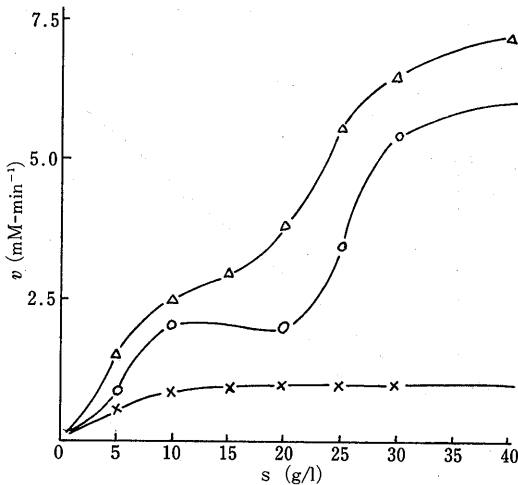


Fig. 1 ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、トウモロコシデンプンの G_1 生成初速度と基質濃度との関係

ジャガイモ：○ サツマイモ：△ トウモロコシ：×

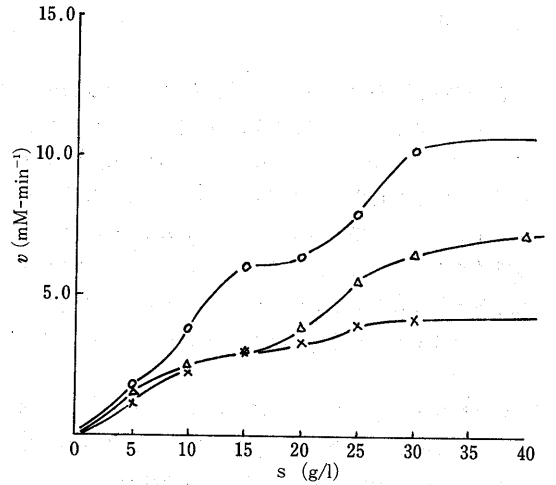


Fig. 2 ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、トウモロコシデンプンの G_2 生成初速度と基質濃度との関係

ジャガイモ：○ サツマイモ：△ トウモロコシ：×

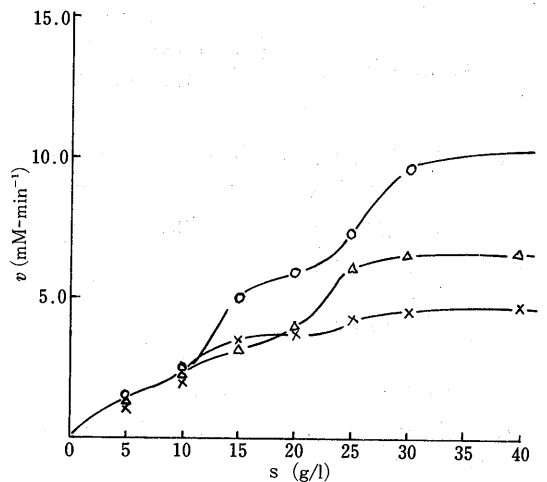


Fig. 3 ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、トウモロコシデンプンの G_3 生成初速度と基質濃度との関係

ジャガイモ：○ サツマイモ：△ トウモロコシ：×

考 察

先の実験で¹⁾ β -Amylase による各種デンプンの生成マルトース量は、ジャガイモデンプン>サツマイモデンプン>トウモロコシデンプンの順番であった。 α -Amylase 分解についても同様に各種デンプンについて比較すると、 G_1 , G_2 , G_3 の3種の糖については β -Amylase と同様の順番であった。このことはジャガイモデンプンの粒径、吸湿性ともに大きく、トウモロコシデンプンは他のデンプンと比較すると粒径、吸湿性ともに小さいということと相関がある。

先に報告³⁾したように、各種デンプンに対しては、多くの α -Amylase 酵素は反応初速度と基質濃度との関係が Michaelis-Menten 式に従って双曲線を示しているが、本実験に用いた細菌液化型 α -Amylase による加水分解反応はS字型を示した。このことは、 α -Amylase による加水分解生成物が、 α -Amylase の加水分解作用に影響を与えるという協同性の結果と考えられるので、各種デンプンについて協同性がどのようなものであるか比較してみた。

①基質による活性化

デンプンの協同性を2個またはそれ以上の基質が酵素と結合してはじめて反応が起ると考えると、

$$v_G = k_{+2}[ESS_A] = \frac{(k_{+2}/K_S K_A) e_0 \cdot s^2}{\{1/(K_A) s\} \{1 + (1/K_S) s\}}$$

の式が得られ、分母と分子に s^2 の項が入っているため $v_G \sim s$ プロットはS字を示すことになる。⁴⁾ $s \gg K_S$ が成り立つ高い基質濃度域では分母の $(1/K_S) s$ は1より充分大きいから、速度式は

$$v_G = \frac{k_{+2} \cdot e_0 \cdot s}{K_A + s}$$

となり $s/v_G \sim s$ プロットは直線となるはずである。

Fig. 4, 5, 6 に G_1 , G_2 , G_3 の各デンプンの s/v_G $\sim s$ プロットが示してある。

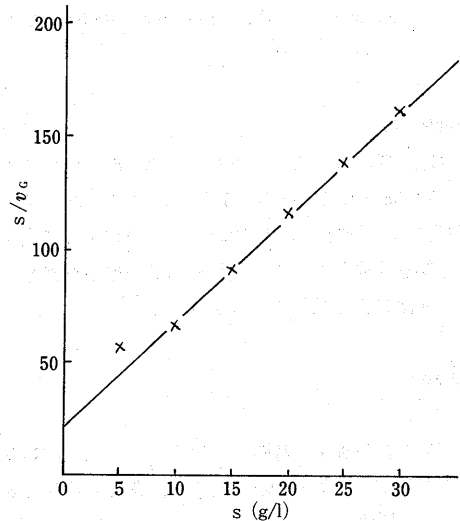


Fig. 4 トウモロコシデンプンの G_1 生成反応の $s/v_G \sim s$ プロット

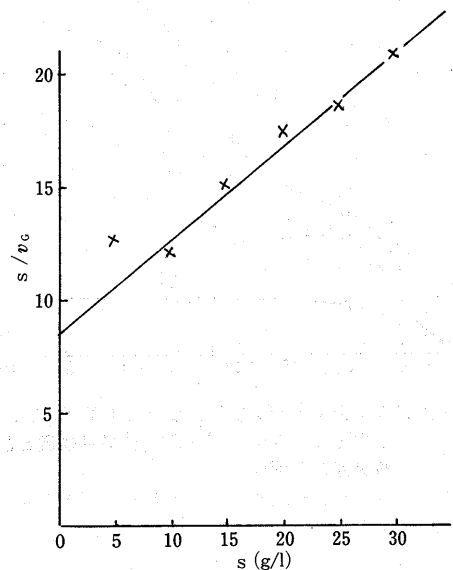


Fig. 5 トウモロコシデンプンの G_2 生成反応の $s/v_G \sim s$ プロット

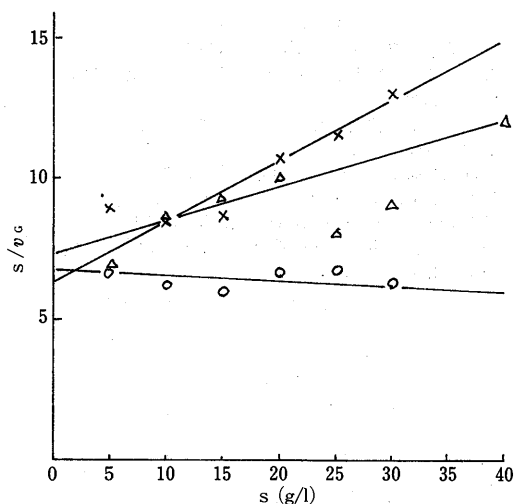


Fig. 6 ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、トウモロコシデンプンの G_3 生成反応の $s/v_G \sim s$ プロット

ジャガイモ:○ サツマイモ:△ トウモロコシ:X

Fig. 4 にみるように、 G_1 ではトウモロコシデンプンで直線が得られたが、他の2種のデンプンについては直線が得られなかった。 G_2 についても同様である。Fig. 6 に示したように、 G_3 ではどのデンプンも直線が得られた。本実験では、低い基質濃度域での確認ができなかったが、トウモロコシデンプンの G_1 、 G_2 、 G_3 、ジャガイモデンプンとサツマイモデンプンについては G_3 に、結合部位が2個あって、基質が両方の部位に結合してはじめて反応がおきると言う協同性が、確認できた。

②Hill プロット

先の報告³⁾の中にもあるようにシグモイド性の程度を表わすのに Hill 係数と呼ばれるパラメーターが用いられる。

$$\log \left(\frac{v_G}{V - v_G} \right) = n \log s + \log Kn$$

の式に従って $\log \{v_G / (V - v_G)\}$ を $\log s$ に対してプロットすると、傾斜 n の直線が得られる。Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9 に G_1 、 G_2 、 G_3 の Hill プロットが示してある。

直線にのっていない部分もあるが、トウモロコシデンプンでは、Fig. 7 から $n_{G_1} = 2.53$ 、Fig. 8 から $n_{G_2} = 1.92$ 、Fig. 9 から $n_{G_3} = 2.69$ の値が得られた。また、Fig. 9 からジャガイモデンプンの $n_{G_3} = 2.33$ 、サツマイモデンプンの $n_{G_3} = 1.22$ が得られた。トウモロコシデンプンは他の2種のデンプンと比較すると、協同性が大きい。このこと

は、高重合度のオリゴ糖が反応初期に、相対的に多く生じて、このオリゴ糖が G_1 、 G_2 、 G_3 の反応曲線にS字を生じる原因を作っているためと思われる⁵⁾⁶⁾。

なお生成量の測定値は、トウモロコシデンプンではばらつきは小さかったが、ジャガイモデンプンとサツマイモデンプンではばらつきが大きかった。このことは、トウモロコシデンプンにくらべてジャガイモデンプンとサツマイモデンプンでは、溶液の粘性がかなり高くなるので、ミクロ的には不均一になっていたためとも考えられる。

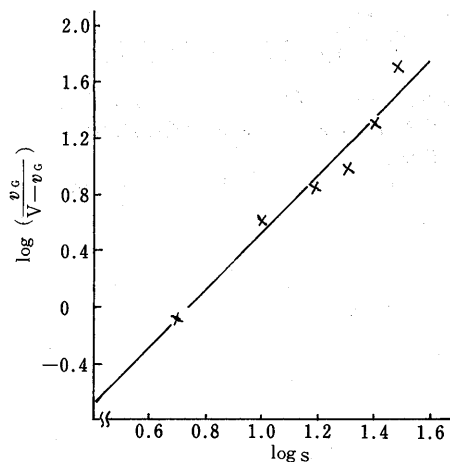


Fig. 7 トウモロコシデンプンの G_1 生成反応のHillプロット

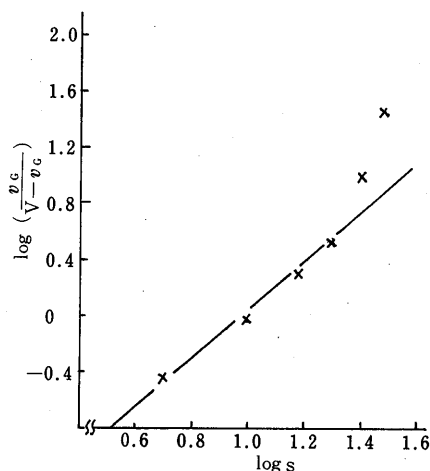


Fig. 8 トウモロコシデンプンの G_2 生成反応のHillプロット

参考文献

- 1) 井上節子：第21回栄養改善学会講演集
- 2) 井上節子：文教大学女子短期大学部研究紀要第23集，p. 52 (1979)
- 3) 井上節子：文教大学女子短期大学部研究紀要第24集，p. 44 (1980)
- 4) 小野宗三郎：入間酵素反応速度論，共立出版
- 5) H. Fujimori, M. Ohnishi, M. Sakoda, R. Matsuno, K. Hiromi: FEBS. Letters 72, 283 (1976)
- 6) 石倉清，新田康則，渡辺武彦：農化大会講演要旨集 133 (1975)

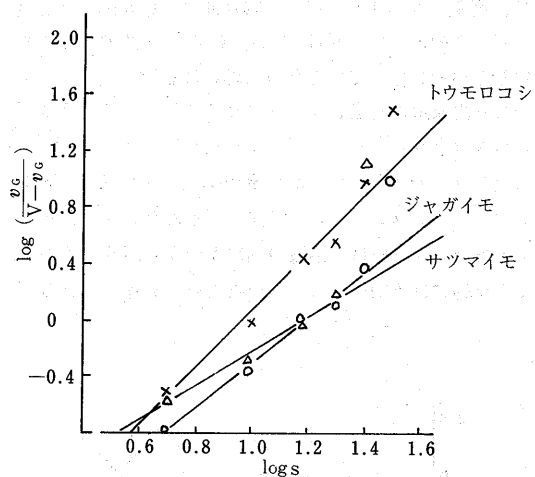


Fig. 9 ジャガイモデンプン、サツマイモデンプン、トウモロコシデンプンの G_3 生成反応のHillプロット

ジャガイモ：○ サツマイモ：△ トウモロコシ：×