

高速液体クロマトグラフィーによる各種デンプンの α -Amylase 分解物中のオリゴ糖の分離

井上 節子

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により, ジャガイモデンプン, ウルチ米デンプンの α -Amylase 分解物を分離し, 7個のピークを得ることができた。また, 分解過程で生成する各オリゴ糖の分布の様子を知ることができた。

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性質, その食品中におけるデンプンの存在状態, 共存する物質, 調理加工の方法などによって変化すると思われる。先に¹⁾各種デンプンの特性や α -Amylase 分解については, 分子量の低下に相当する物性を, β -Amylase 分解については, 生成マルトースの量を調べることで, 加水分解の進行を追って来た。

α -Amylase による加水分解反応に伴う, 生成オリゴ糖の分布状態の時間的変化の推移は, アミロースでは行われているが, 分枝した基質を含むデンプンでは, 調べられていない²⁾。そして, この場合オリゴ糖の分離定量をすることは, 各種デンプンそのものの構造を知る手がかりとなると思われる。また, オリゴ糖の分離はペーパークロマトグラフィーによって行なわれているが, 展開に数日を用するなど, 迅速さに欠けるので, HPLCによる方法を試みた。 $G_1 \sim G_7$ のオリゴ糖の分離, $G_1 \sim G_8$ までの定量に比較的良好な結果が得られたのでここに報告する。

実験材料

①試料

ジャガイモデンプン: 市販品, ウルチ米デンプン: 農林29号種のウルチ米から得られたデンプン, とうもろこしデンプン: コーンスターチとして市販されているもの, さつまいもデンプン: 市販品

②デンプンの加水分解

α -Amylase: 液化型, Bacillus subtilis, 3 \times Cryst, 675 units/mg protein, 生化学工業 K. K., グルコース (G_1): 和光, 特級, マルトース (G_2): 和光, 特級, マルトトリオース (G_3): 和光, 一級, イオン交換樹脂:

Amberlite IR-120B, Amberlite IRA-400, リン酸二水素ナトリウム: 和光, 特級, クエン酸: 和光, 特級, 塩化ナトリウム: 和光, 特級

③ HPLC

アセトニトリル: 和光, 液体クロマトグラフ用, Column: Lichrosorb NH₂, Merk, 5 μ m

④オリゴ糖の定性

東洋ろ紙 No. 54, n-ブタノール: 和光, 特級, ペリジン: 和光, 特級, アニリンフタル酸試薬: アニリン (和光, 特級) を, 0.93 g, フタル酸 (和光, 特級) 1.60 g, 水飽和ブタノール (和光, 特級) 100ml を混合して作成した。

実験方法

①試料の精製

原料を粗砕 (すでにデンプンの形態になっているものは除く) し, 0.2%水酸化ナトリウム溶液中に放置7日。ふるいにかけ, 通過部分を, 0.2%水酸化ナトリウム溶液中に60日放置, 1%塩酸溶液中に放置7日。分別沈殿させ, 水洗し風乾する。85%アルコール温洗浄による脱脂12時間, 風乾し試料とした。

②酵素による分解

デンプン (1 g) に蒸留水 20ml を加え, 湯浴中で攪拌しながらゆっくりととかす。冷却後緩衝液 (0.2モルリン酸二水素ナトリウムと 0.1モルクエン酸で pH 6.8 に調整して作成した) 8ml と, 1%塩化ナトリウム 1ml 溶液を加えてよく混合し, α -Amylase (0.0005% または 0.05% 溶液) 1ml を加えて, バッチ法により, 各反応時間, 37 $^{\circ}$ C 恒温水槽内で反応させる。その後湯浴中で3分間煮沸させ, α -Amylase の活性を失活させ,

高速液体クロマトグラフィーによる各種デンプンの α -Amylase 分解物中のオリゴ糖の分離

冷却後試料とした。

③液体クロマトグラフ用試料の作成

α -Amylase によって分解された試料に再生した Amberlite IR-120 B (10g) を入れ、マグネティックスターラーによって10分間攪拌し、ろ過の後、ろ液を Amberlite IR-400 中に入れ、同様に処理し、脱塩した。この溶液をロータリーエバポレーターによって40°Cで濃縮し、全量を 3 ml とした。沈殿を生じたものは沈殿を除いて、液体クロマトグラフ用試料とした。

④ HPLC

高圧定量 Pump は ALTEX を使用、Detector は Shodex RI, injector は Pheodyne-7120型、Recorder は U-125 M. N. (島津)、Column は、 ϕ 4.6mm \times 250 mm に Lichrosorb NH₂ を充填し使用した。Solvent はアセトニトリル (60:40) を使用し、試料 10 μ l を注入した。

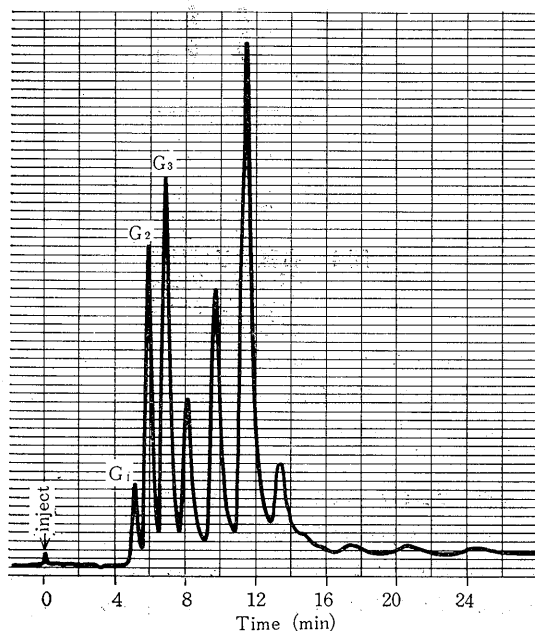


図1 HPLCによるジャガイモデンプン分解物中のオリゴ糖の分離

条件: column: Lichrosorb NH₂
solvent: H₂O/CH₃CN=40/60
flow rate: 1.5ml/min
attenuation: 0.16
chart speed: 5mm/min
sample: ジャガイモデンプン α -Amylase 30分反応10 μ l

⑤オリゴ糖の定性²⁾

ペーパークロマトグラフィーにより、上昇法で、n-ブタノール:ピリジン:水 (6:4:3) 溶媒中で、多重展開 (1回が 16cm で4回展開) して分離した。温度は室温で行った。風乾した後、アニリンフタル酸試薬をふきかけ、風乾し、110°C, 5分間、乾燥器中で加熱、発色させた。

実験結果

①オリゴ糖の HPLC による分離

ジャガイモデンプンとウルチ米デンプンによる分解物を、図1、図2のように分離することができた。7個のピークが得られた。その他、さつまいも、とうもろこしの各デンプンも同様に7個のピークを得ることができた。分解生成物を 3ml に濃縮すると、 α -Amylase, 0.05% の場合は0.16の感度で充分測定でき、0.0005% の

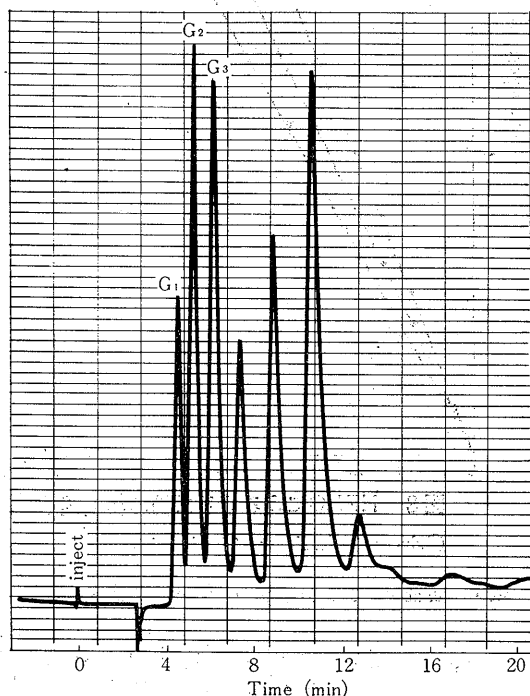


図2 HPLCによるウルチ米デンプン分解物中のオリゴ糖の分離

条件: column: Lichrosorb NH₂
solvent: H₂O/CH₃CN=40/60
flow rate: 1.5ml/min
attenuation: 0.16
chart speed: 5mm/min
sample: ウルチ米デンプン α -Amylase 100分反応10 μ l

場合は0.08の感度で7個のピークまで分離可能であった。

②各種オリゴ糖のHPLCによる定量

標準物質 G₁, G₂, G₃ を 150 μ g, 300 μ g, 600 μ g の標準液を用いて図3の検量線を, G₁ は 0~300 μ g, G₂ は 0~300 μ g, G₃ は 0~600 μ g の範囲で, 書くことができた。

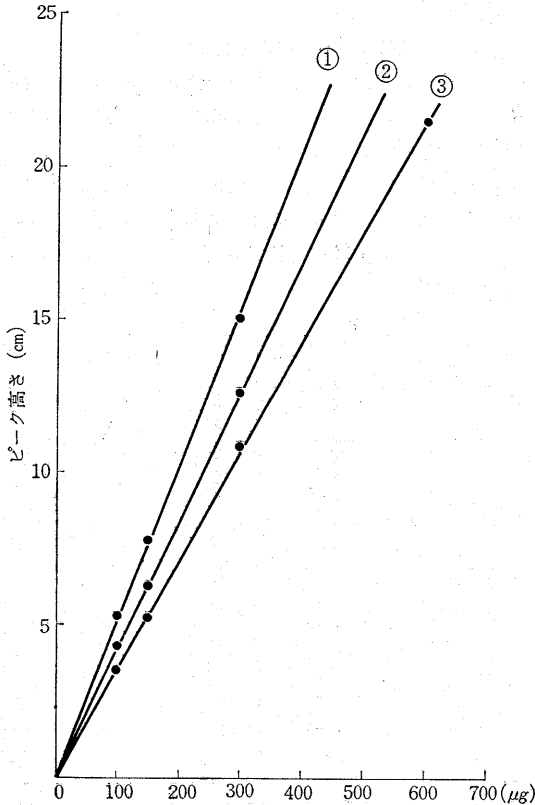


図3 HPLCによるオリゴ糖の検量線

①glucose ②maltose ③maltotriose

表1 各種デンプン分解物 G₁, G₂, G₃ の定量

デンプン	反応時間(分)	G ₁ (mg)	G ₂ (mg)	G ₃ (mg)	G ₁ +G ₂ +G ₃ /1g中(%)
ジャガイモデンプン(α -Amylase)0.05%	30	13.5	57.6	75.9	14.70
	60	27.0	70.8	84.6	18.24
	120	60.9	126.9	148.5	33.63
ウルチ米デンプン(α -Amylase)0.05%	30	15.0	50.1	61.5	12.66
	60	34.5	84.0	96.0	21.45
	120	50.1	102.0	111.0	26.31

各種デンプンの分解物中の G₁, G₂, G₃ の3つの糖について, 分解生成される量を, 表1のように定量することができた。

その他の G₄~G₇ については, このカラムでは, 各オリゴ糖を分取するのがむずかしく, 試料を得ることができなかつたため, 検量線を作れなかつた。この点について, 現在検討中である。

③各種オリゴ糖のペーパークロマトグラフィーによる分離

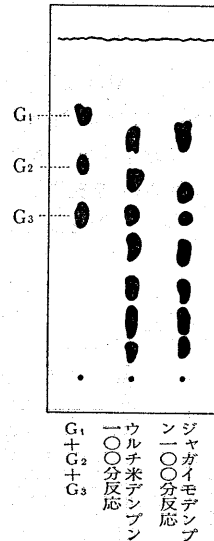


図4 各種オリゴ糖のペーパークロマトグラフィーによる分離

図4のように7個のスポットを得ることができた。文献⁹⁾の値と比較してみると, やや高め傾向があるが, ほぼ近い値の上昇をしていると思われる。

④デンプンの水解反応に伴う生成物の分布

α -Amylase 0.0005% (W/V) と 0.05% (W/V) を使って, ジャガイモデンプンと β -Amylase による加水分解反応で他のデンプンと比較してマルトース生成量の一番少なかったウルチ米デンプンとについて, 生成物の分布を比較, 検討した。

α -Amylase 0.0005% を使って¹⁾ 初期水解反応の生成物の粘度測定をした試料について, オリゴ糖の分布状態を調べてみた。結果は図5のようであった。G₁, G₂, G₃ は絶対量で定量することができたが, その他の糖との比較のため, ピークの高さであらわしてある。G₄~G₇ が60分をすぎると, 徐々に増加しているのがわかった。

高速液体クロマトグラフィーによる各種デンプンの α -Amylase 分解物中のオリゴ糖の分離

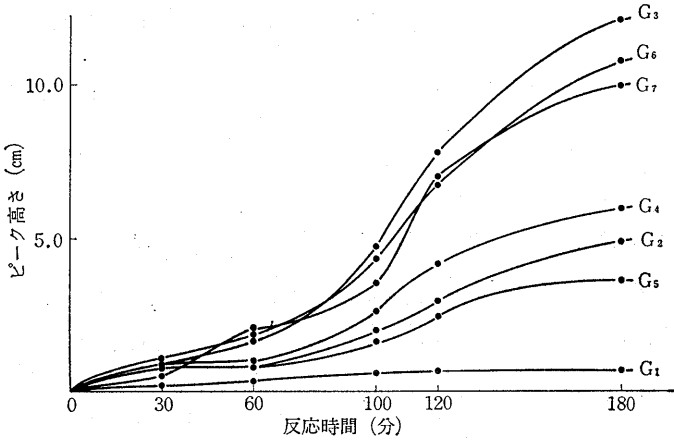


図5 ジャガイモデンプンの反応生成オリゴ糖の分布

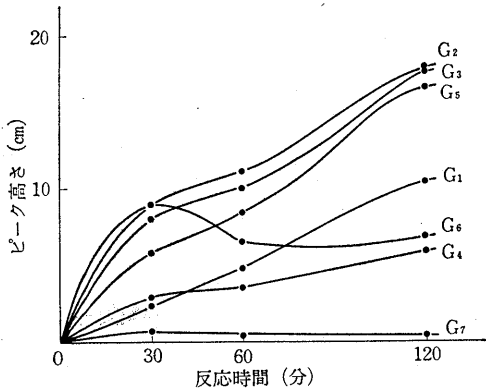


図6 ジャガイモデンプンの反応生成オリゴ糖の分布

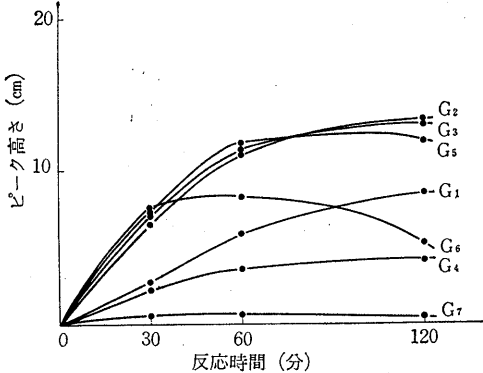


図7 ウルチ米デンプンの反応生成オリゴ糖の分布

α -Amylase 0.05% を使って同様にジャガイモデンプンについて生物成を調べたものが図6である。G₁ と G₅ が徐々に増加している。G₂ と G₃ は0.0005%の場合と同様に増加している。G₆ が30分反応後、減少して来ている。G₇ はほとんど生成していなかった。

同様の条件で、ウルチ米についても行いデンプン相互

による違いがあるか確かめてみた。図7のように、ほぼ各オリゴ糖の増減については同様な結果が得られた。ジャガイモデンプンとの違いは、全体的にピークの高さが低くなっている点である。定量の所で述べたように、G₁, G₂, G₃ の合計をとってみても少ないようである。

まとめ

α -Amylase による生成物の分離では、もうすこし試料量を変化させ、感度を上げることによって、重合度の高い物質の分離も可能になると思われる。また、定量についても、分取用のカラムを用いることで、標準物質を得て、検討したいと思っている。またオリゴ糖の重合度による確認も検討したい。

図6と図7の中で、G₆の減少については、貝沼、French (1970) が、分枝オリゴ糖のうち、 α -1.6結合を1個含むものはほとんど、G₄~G₇の範囲に入り、図8の構造をもつことを明らかにしている⁴⁾⁵⁾。また、アミロペクチン分子中、 α -1.6結合の64%に相当するものがこの6種に含まれていることを明らかにしている。

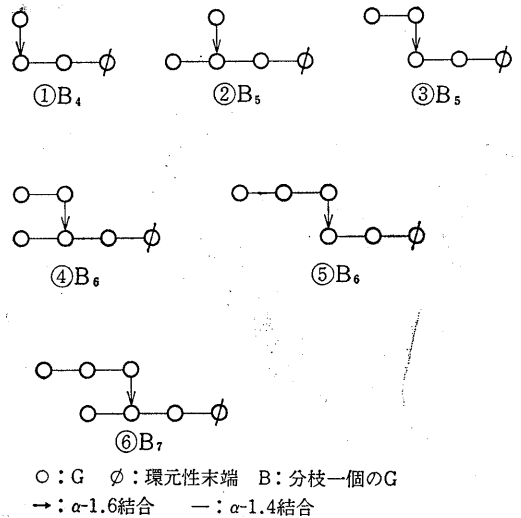
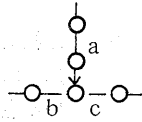


図8 α -1.6結合を1個含む分枝オリゴ糖

また、 α -Amylase (Bacillus, S.) は、次の図のように、a, b, c の α -1.4結合には、作用しないことがわかっている⁶⁾。従って、 α -1.6結合を1個もつ分枝オリゴ糖で、重合度が G₄~G₇ のものは次のように分解すると思われる。

- ① $B_4 \rightarrow B_3, G_1 \rightarrow \times$
- ② $B_5 \rightarrow B_4, G_1 \rightarrow \times$
- ③ $B_5 \rightarrow B_4, G_1 \rightarrow \times$
- ④ $B_6 \rightarrow B_5, G_1 \rightarrow \times$
- ⑤ $B_6 \rightarrow B_5, G_1 \rightarrow B_4, G_1 \rightarrow \times$
- ⑥ $B_7 \rightarrow B_6, G_1 \rightarrow B_5, G_1 \rightarrow \times$



この事から考えると、反応が進むと、 G_6 と G_7 は減少し、 G_1, G_3, G_4, G_5 の増加が考えられる。このことと今回の実験結果とはよく一致している。また、絶対的な量の比較はできないが、 G_2, G_3, G_5 について、反応60分を過ぎても、ジャガイモデンプンは増加するが、ウルチ米デンプンは増加しない。この現象は、2つのデンプンのアミロース量の違いではないかと思われる。

現在の実験の段階では、各デンプン間の分解様式の違いはわからない。これからは、酵素系、およびデンプン構造の違いを知る手がかりとして、分解様式の違いを検討したい。

参考文献

- 1) 21回栄養改善学会講演集
- 2) 松野, 上久保, 広海: 澱粉科学ハンドブック, 日本醸酵工学会50年大会講演集 p. 260
- 3) Allene, Jeanes, C. S. Wise, R. J. Dimler, : Anal. Chem., 23, 415 (1951)
- 4) 貝沼: 農化, Vol. 49, 12, PR 61~PR 67 (1975)
- 5) K, Umeki, T. Yamamoto : J. Biochem., 72, 1219, (1972)
- 6) Marshall, J. J. : 澱粉科学ハンドブック, Wallerstein, Lab. Commun., 35, 49.