

# 各種デンプンの $\alpha$ -Amylase による 分解速度の測定

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<sup>1)</sup>各種デンプンの特性や、 $\alpha$ -Amylase 分解については、分子量の低下による物性と、<sup>1)</sup>高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離<sup>2)</sup>を、 $\beta$ -Amylase 分解については、酸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ることで、追って来た。

今回の実験ではHPLCでオリゴ糖を分離、定量し、速度論的な考え方と、取扱い方をする事によって、どんなことがわかるか調べてみた。そしてデンプンの  $\alpha$ -Amylase 分解反応速度におよぼす、いろいろの影響についてしらべること、デンプン構造を知る手がかりを得ることを目的とした。

## 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

### ②デンプンの加水分解<sup>2)</sup>

### ③HPLC<sup>2)</sup>

## 実験方法

### ①試料の精製<sup>2)</sup>

### ②酵素による分解<sup>2)</sup>

### ③液体クロマトグラフィー用試料の作成

$\alpha$ -Amylase によって分解された試料を再生したAmberlite IR-120B (10g) に入れ、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 (10g) 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、40~50℃で濃縮し、全量を水で、3~10mlに定量した。沈殿を生じたものは沈殿を除いて、HPLC用試料とし、20 $\mu$ lを注入した。

### ④HPLC<sup>2)</sup>

### ⑤標準物質

グルコース ( $G_1$ )、マルトース ( $G_2$ )、マルトリオース ( $G_3$ ) をそれぞれ水に溶かして、1.0mg/ml, 1.5mg/ml, 2.0mg/ml, 3.0mg/ml, のものを用意し、それを試料と同様20 $\mu$ l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なった。

## 実験結果

### ①反応の初高速度の測定

反応中に酵素活性が低下すること、反応生成物による阻害が起ること、また特に、試料がデンプンであるので、基質の不均一性による解析の不明確さ、その他時間経過を複雑にする要因がある。これらのいくつかの要因について調べて来た。今回はその最適条件を用いて、ジャガイモデンプンとウルチ米デンプンを比較しながら、 $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  についてのみ反応開始直後の生成速度 (初速度) を求めてみました。

### ①ジャガイモデンプンの $G_1$ , $G_2$ , $G_3$ の反応生成量の測定

$\alpha$ -Amylase 0.05% (W/V) を使って、基質濃度 5.00 g/l, 10.33 g/l, 15.33 g/l, 21.00 g/l の4種について、生成量を定量した。結果は図1, 図2, 図3のようであった

各種デンプンの $\alpha$ -Amylaseによる分解速度の測定

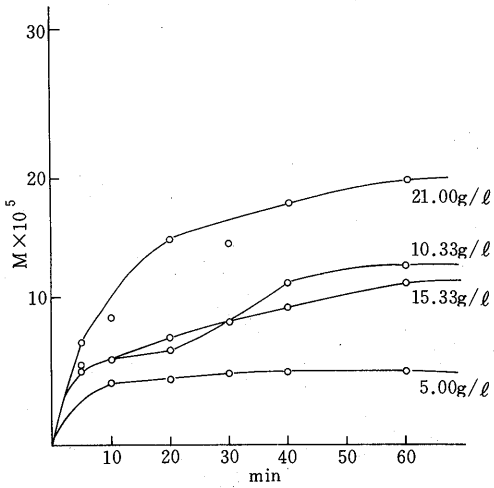


図1 ジャガイモデンプンのグルコース生成量

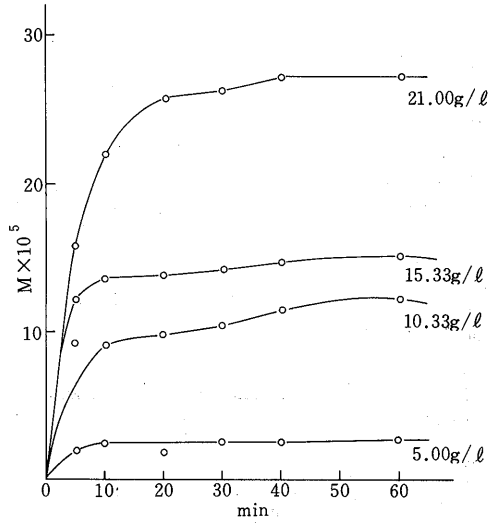


図3 ジャガイモデンプンのマルトリオース生成量

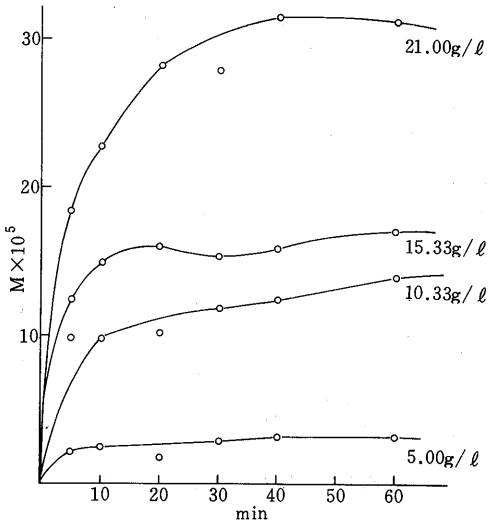


図2 ジャガイモデンプンのマルトース生成量

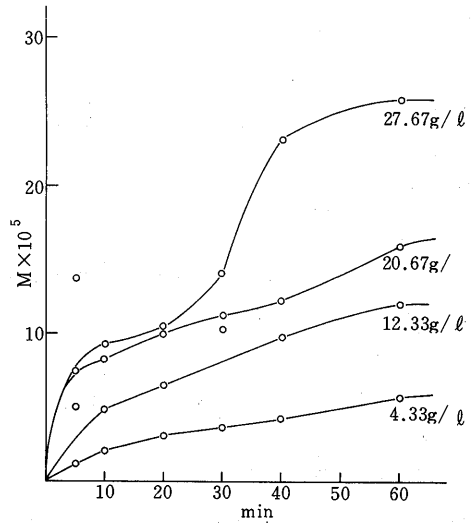


図4 ウルチ米デンプンのグルコース生成量

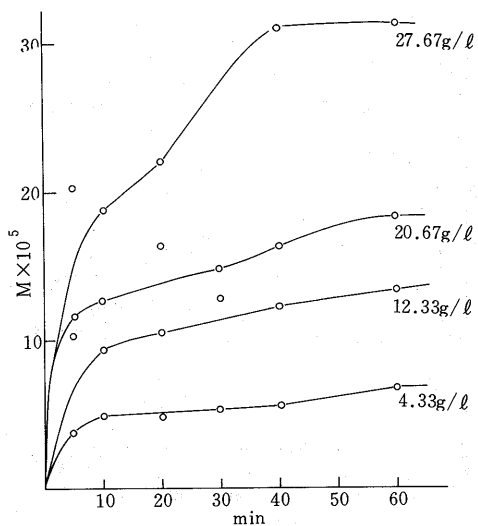


図5 ウルチ米デンプンのマルトース生成量

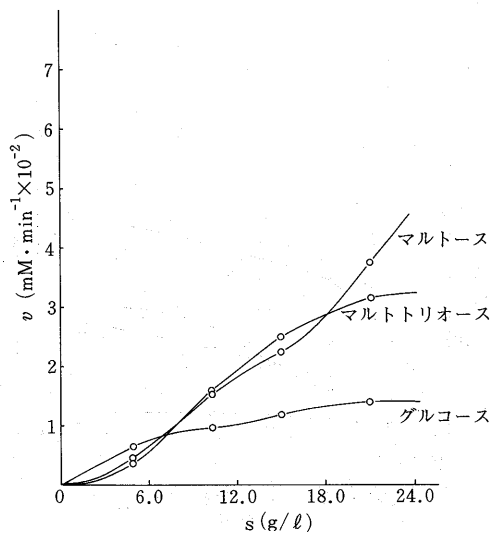


図7 ジャガイモデンプンにおけるグルコース、マルトース、マルトトリオース生成初速度と基質濃度との関係

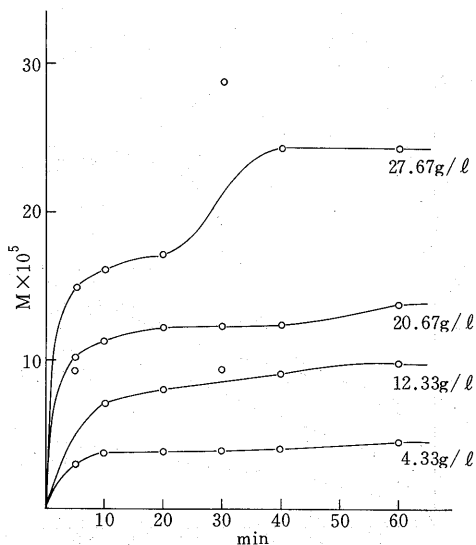


図6 ウルチ米デンプンのマルトトリオース生成量

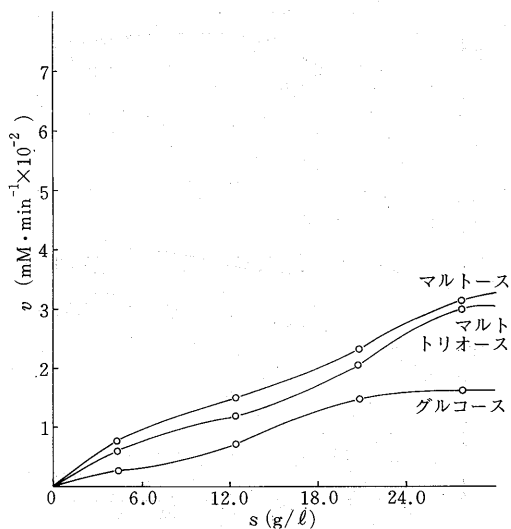


図8 ウルチ米デンプンにおけるグルコース、マルトース、マルトトリオース生成初速度と基質濃度との関係

各種デンプンの $\alpha$ -Amylaseによる分解速度の測定

㊸ウルチ米デンプンの $G_1, G_2, G_3$ の反応生成量の測定  
 $\alpha$ -Amylase 0.05% (W/V) を使って、基質濃度4.33g/l, 12.33g/l, 20.67g/l, 27.67g/lの4種について、生成量を定量した。結果は図4, 図5, 図6のようであった。

㊹初速度に対する基質濃度の影響

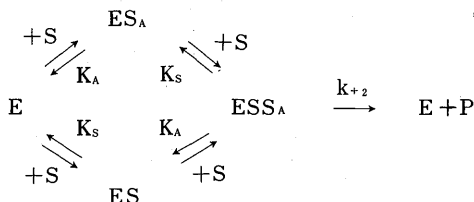
㊸ジャガイモデンプンの生成初速度と基質濃度との関係  
 結果は図7に示した。横軸の基質濃度は、デンプンの分子量が明確になっていないのでg/l単位で表わしてある。

㊸ウルチ米デンプンの生成初速度と基質濃度との関係  
 結果は図8に示した。

まとめ

多くの酵素は初速度と基質濃度との関係がMichaelis-Menten式に従って双曲線型の飽和曲線を示しているが、今回の実験においては、特に $G_1, G_3$ については図7, 図8に示したようにS字型を示していた。これは $\alpha$ -Amylaseと各種デンプンの加水分解反応において、正の協同性をしているのではないかと考えられる。このような協同性はいくつかのポリペプチド鎖の単位(サブユニット)からできている酵素に多く見られるといわれている。この場合の協同性は2個又はそれ以上のデンプン基質が、酵素と結合してはじめて起ると考える。すなわち第二の基質分子による活性化を考えるのである。

まず1つの活性部位(基質の反応が起る部位)の他にもう1つの活性部位と言うものを考える。前者をS部位、後者をA部位と名づける。基質が両部位に結合したときのみ反応がある。すなわち第二の基質分子による活性化を考える。また、基質はS部位とA部位に独立に結合できるとすれば、反応モードは、次のようになるといわれる。



ここでESはS部位に基質が結合した状態を示し、 $\text{ES}_A$ は基質がA部位に結合した状態を示す。また、Pは $G_1$ または $G_3$ を示す。

迅速平衡法により、基質の解離定数を次のように定義する。

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[\text{ES}_A][S]}{[\text{ESS}_A]}$$

$$K_A = \frac{[E][S]}{[\text{ES}_A]} = \frac{[ES][S]}{[\text{ESS}_A]}$$

$G_1, G_3$ の生成速度 $V_{G_1}, V_{G_3}$ は

$$V_G = k_{+2}[\text{ESS}_A] = \frac{(k_{+2}/K_s K_A) e_0 \cdot s^2}{\{1/(1/K_A)_s\} \{1+(1/K_s)_s\}}$$

Michaelis-Menten 型の速度式と異なる点は、 $s^2$ 項が入っていることであり、 $V_G$ と $s$ のプロットはS字型を示すことになる。このことは今回の実験結果にもあてはまるのではないかと考えられる。今回の結果があてはまるかどうかを試すために2つの場合に分けて考える。 $(K_s < K_A)$ とする)

1)  $s \gg K_s$ の低い基質濃度域では分母の $(1/K_s)_s$ は1より充分大きいので

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

となりMichaelis-Menten 型になり、 $s/V \sim s$ のプロットは直線となる。

2)  $s \ll K_A$ 低い基質濃度域では

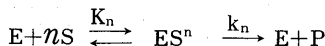
$$V_G = \frac{(k_{+2}/K_A) \cdot e_0 \cdot s^2}{K_s + s}$$

$$\frac{s^2}{V_G} = \frac{K_A}{k_{+2} \cdot e_0} (K_s + s)$$

となり $s^2/V_G \sim s$ のプロットが直線になることが期待される。

デンプンの場合には、低い基質濃度域で考えると図9, 図10のように $s^2/V_G \sim s$ プロットが直線になることが見出された。

また、協同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。これは次のような仮想的な反応機構から導かれる、経験的なパラメーターである。



$\text{ES}^n$ の解離定数を $K_n$ ,  $\text{ES}^n$ の分解速度定数を $k_n$ とすれば、迅速平衡法により、次式が得られる。

$$V = k_n[\text{ES}^n] = \frac{V \cdot s^n}{K_n + s^n}$$

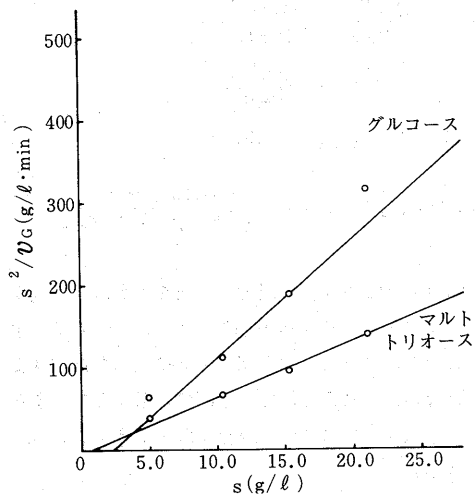


図9 ジャガイモデンプンにおけるグルコース、マルトトリオース生成反応の  $s^2/v_G \sim s$  プロット

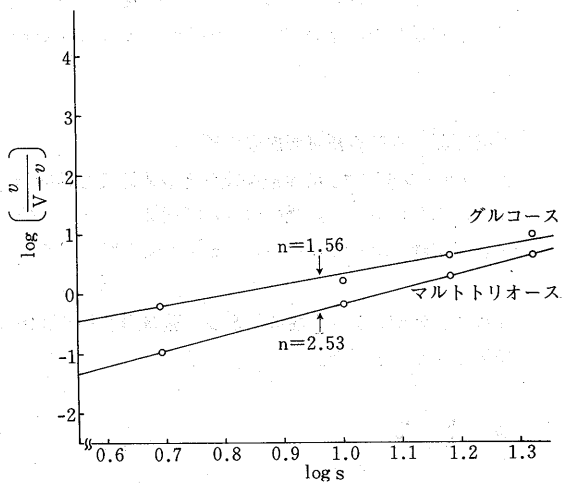


図11 ジャガイモデンプンにおけるグルコース、マルトトリオース生成反応のHillプロット

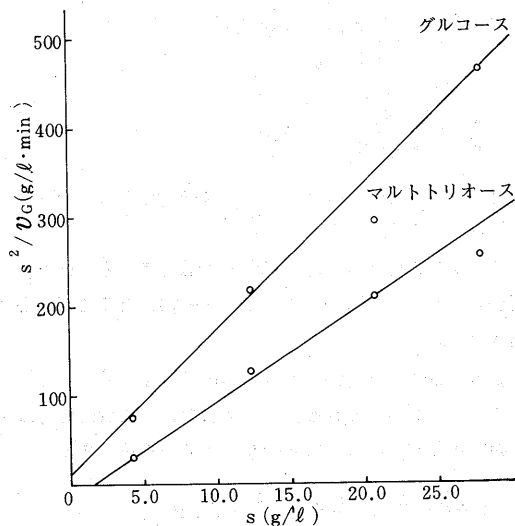


図10 ウルチ米デンプンにおけるグルコース、マルトトリオース生成反応の  $s^2/v_G \sim s$  プロット

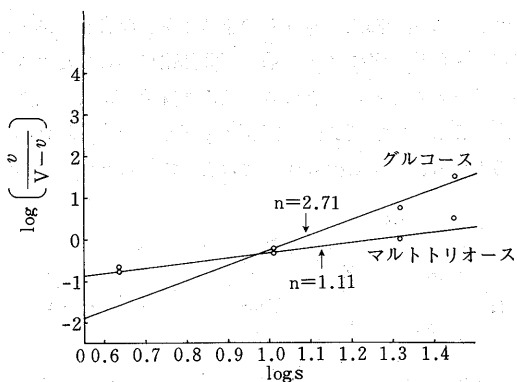


図12 ウルチ米デンプンにおけるグルコース、マルトトリオース生成反応のHillプロット

ここでVは最大速度 ( $=k_n \cdot e_0$ ) である。この式は

$$\log \left( \frac{v}{V-v} \right) = n \log s - \log K_n$$

と書きかえることができる。従って  $\log(v/V-s)$  と  $\log s$  についてプロットする傾斜nの直線が得られる。これにデンプンの実験結果をプロットしたのが図11, 図12である。nについて求めると, ジャガイモデンプンの  $n_{G1} = 1.56$ ,  $n_{G2} = 2.53$ , ウルチ米デンプンの  $n_{G1} = 2.71$ ,  $n_{G2} = 1.11$  であった。この値は, 酵素における基質の結合部位の数を表わすとは言えない。むしろ協同性の大きさを表現する尺度と考えた方がよいと言われる。今回の実験では, デンプンの均一に溶解するのが困難であるという点で, 高い基質濃度の所の値を得ることができなかったが,  $G_2$  についてもこの値が得られると, Hillプロットが得られると思われる。また  $G_4$  以後のオリゴ糖についても同様に値が得られるのではないかと思われる。

#### 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) 小野宗三郎：入門酵素反応速度論, 共立出版
- 4) 澱粉科学ハンドブック
- 5) 松野隆一, 中西一弘, 上久保正, 廣海啓太郎：日本醗酵工学会50年大会講演集 P.260 (1975)
- 6) H. Yoshida, K. Hiromi, S. Ono : J. Biochem., 65, 741. (1969)
- 7) T. Shibaoka, T. Inatani, K. Hiromi. T. Watanabe : J. Biochem., 77. 965 (1975)