

グルコース定量法の微量化と、イソマルトオリゴ糖加水分解反応の測定

田中 晶善・竹田 秀一

Development of a micro scale method for determining glucose concentration and its application to hydrolytic reaction of isomaltooligosaccharides

Akiyoshi TANAKA and Shuichi TAKEDA

要 旨

酵素法を用いたグルコース定量を従来の方法より微量で精度よく行う方法を開発した。本法を、グルコアミラーゼによるイソマルトオリゴ糖加水分解反応に応用し、良好な結果を得た。

1. はじめに

グルコアミラーゼは澱粉を非還元性末端側のグルコシド結合から逐次加水分解し、グルコースを生産する酵素である。この酵素はグルコースの工業的生産に広く用いられているが、その反応機構については未知の点が多い。とくにこの酵素の特徴とも言える α -1,6 グルコシド結合加水分解機構、いわゆる「枝切り」のメカニズムについては、ほとんど研究が進んでいないのが現状である。

α -1,6 結合でグルコースが重合した基質、イソマルトオリゴ糖は、本酵素の「枝切り」機構を調べるための格好のモデル物質であるが、その結合定数がマルトオリゴ糖に比べるとかなり小さいために、ミカエリス定数の決定には高濃度の基質溶液が必要とされる。そのため、元来、入手が必ずしも容易ではないイソマルトオリゴ糖が多量に必要なになってしまい、研究の遅れの原因のひとつとなっていると思われる。

筆者らは、グルコアミラーゼによるイソマルトオリゴ糖加水分解反応の経時変化を、従来法よりもはるかに微量で追跡することのできる実験系の確立を目指し、一定の結果を得た。その結果を報

告する。

2. 実 験

グルコアミラーゼ標品として、生化学工業製の *Rhizopus niveus* のグルコアミラーゼを用いた。本標品には分子量を異にする、少なくとも3種のアイソザイムが含まれていたため、イオン交換クロマトグラフィー法によって分離した分子量64,000の画分を酵素反応に用いた¹⁾。

グルコース重合度 (degree of polymerization; 以下 DP と略す) 2~7 のイソマルトオリゴ糖として、中塾酢店株式会社より供与された標品を用いた。イソマルトデカオース (DP=10) は、中塾酢店製の標品をフナコシ株式会社より購入した。これらの一連のイソマルトオリゴ糖は、高速液体クロマトグラフィーにより純粋であることを確認した²⁾。

グルコースオキシダーゼ・ペルオキシダーゼ・ムタロターゼ法によるグルコース定量試薬 (グルコーステストワコーIC) は、和研薬株式会社より購入した。本酵素法による発色液の吸光度を、島津製作所製分光光度計 (UV240) を用い、505 nm で測定した。濃度測定セルには、マスクト石英セル (必要サンプル量約 0.9 ml) を用いた。イソマルトオリゴ糖加水分解反応は、pH 4.5

の 20 mM 酢酸緩衝液中、25°C で観測した。

3. 結果と考察

3.1 グルコース検量線

使用する試薬の絶対量を少なくする方法としては、濃度を低くする方法と反応液量を少なくする方法の二つがある。

ミカエリス定数は酵素と基質の組み合わせに固有の量であり、一般にはミカエリス定数をはさむ種々の基質濃度で初速度を測定し、初速度の基質濃度依存性から求める。従って基質濃度を薄める方法によっては使用基質量の少量化は期待できないので、反応液量を微量化する方針を取らざるを得ない。

一般に酵素反応速度を不連続法で測定する場合、数 ml ないし 20 ml 程度の反応溶液から、0.5~1 ml 程度の反応溶液を逐次取り出し、酸・アルカリを加えるなどの方法で反応を止め、生成物の濃度を定量するのが標準的な方法である。しかしこのような方法では、ミカエリス定数の大きいイソマルトオリゴ糖の反応を追跡するには多量の基質が必要となる。

そこで反応液の全量を 100 μ l 程度、また一回ごとのサンプリング量を 10 μ l 程度にすることを目標とし、まずグルコース検量線の作成を試みた。

グルコース定量法としては、ソモジ・ネルソン法などの還元力測定法よりも、最近では酵素法が一般的となっている。この方法は廃液処理の問題もなく簡便であるので、今回はこれを用いた。

まず酵素反応液から採取するサンプル量を減らす必要があるが、定量試薬溶液の液量を標準法のまま (3 ml 程度) で、サンプル液量のみを微量化すると、発色液の吸光度が小さくなり、定量できるグルコース濃度の方下の限界が高くなってしまふ。そこで、定量試薬溶液の量を 950 μ l とし、これに被検液 (グルコース標準液または酵素反応液 10 μ l + 0.025 N-NaOH 40 μ l) を加え、発色液全体で 1 ml とし、定量試薬量に対するサンプル量の比をできるだけ大きくし、吸光度が小さくなりすぎないようにした。しかし、1 ml の液量では、分光光度計用の通常のセルでは測定できない。そこで、光路に対して正面が一部マスクされたマイクロセル (光路長 1 cm) を用いて、1 ml の液量で測定できるようにした。

この方法によるグルコース検量線の例を図 1 に示す。内挿図は低濃度側の拡大図である。検量線

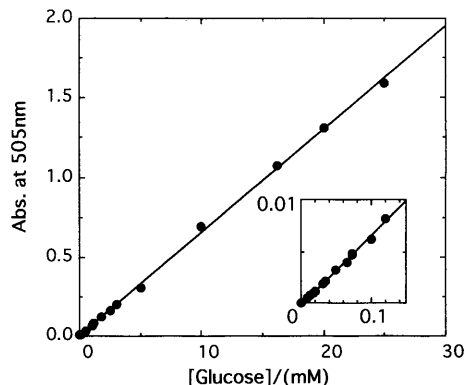


図 1. グルコース検量線の例。縦軸は 505 nm における吸光度。内挿図は低濃度領域の拡大図。

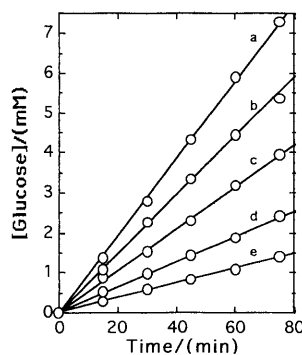


図 2. 基質イソマルトペンタオース加水分解反応の経時変化。pH 4.5、25°C。酵素濃度；2.2 μ M。反応初速度 v は、反応初期の直線の傾きから求めた。基質初濃度：57.9 (a)、23.2 (b)、11.5 (c)、5.8 (d) および 2.9 mM (e)。

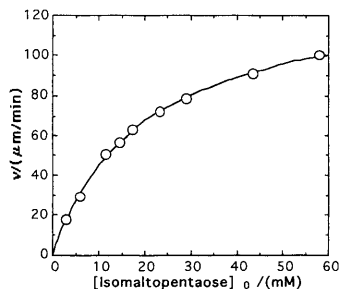


図 3. イソマルトペンタオース加水分解反応の基質初濃度 s と反応初速度 v のプロット。酵素濃度；2.2 μ M。pH 4.5、25°C。実線は、ミカエリス定数 = 18 mM、分子活性 = 1.01 s^{-1} に基づいて描いた理論曲線。

は実験濃度範囲である10 μ M から 25 mM まで良好な直線性を示した。この方法では、セルの形状を改良して更に微量化することも考えられるが、発色反応に増幅系を加えるなどをしない限り、検出範囲としては上記の濃度の1/10程度が下限であろう。

3.2 酵素反応の観測

恒温槽で一定温度に保ったマイクロチューブ内の基質溶液 100 μ l に、酵素溶液 10 μ l をマイクロシリンジで注入し、反応を開始した。反応開始後一定時間ごとに、反応溶液 10 μ l をマイクロシリンジで取り出し、それぞれ別のマイクロチューブ中の0.025規定 NaOH 水溶液 40 μ l に注入し反応を停止させた。

それぞれの反応停止液にグルコース定量試薬を 950 μ l ずつ加え、室温 (約20°C) で約20分保った後、505 nm での吸光度を測定した。グルコース標準液を用いた標準検量線は、一連の酵素反応観測の度ごとに作成した。

基質イソマルトペンタオース (DP=5) を用いたときの、生成グルコース濃度の経時変化例を図2に示す。またこのような経時変化から求めた、反応初速度 v の、基質濃度 s 依存性を図3に示す。

以上のように、マイクロ化したグルコース定量法を用い、従来よりはるかに少量の基質溶液を用いて、ミカエリス定数の大きいイソマルトオリゴ糖の加水分解反応の速度パラメータを精度よく求めることができることがわかった。

イソマルトオリゴ糖を供与いただいた中塾酢店株式会社 に深謝いたします。

文 献 と 註

- 1) A. Tanaka and S. Takeda, *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1809-1813 (1994)
- 2) イソマルトオリゴ糖のサンプルのロットによっては、微量の不純物、主としてマルトオリゴ糖が含まれているものがあつた。このようなサンプルを用いた場合、マルトオリゴ糖はイソマルトオリゴ等に比べて数十倍の速さで加水分解されるため、反応開始直後にパースト状にグルコースの生成が見られ、その後、定常状態が続く。従って定常状態部分の直線を補外すると原点を通過しない。その切片の値から不純物の濃度を求めることができる。実験に用いたサンプルでは、ほぼ原点を通る経時変化のグラフが得られた。すなわち、ほぼ純粋であることが再度確認された。