

加熱、冷却したときの α アミラーゼの分解速度上昇

稲村颯真

要旨

α アミラーゼの分解速度の効率的な上昇方法を模索するために加熱温度を変化させて実験を行った。その結果、冷却時間が短時間ときには α アミラーゼの分解速度上昇に加熱温度は関係がないことがわかった。しかし、冷却時間が短かったので、まずアミラーゼの分解速度上昇が起きていない可能性がある。

キーワード： α アミラーゼ 温度 分解速度

I. はじめに

現在、 α アミラーゼの持つ澱粉を分解し糖に変化させるという作用は様々な場面で用いられている。例を挙げると、食品加工や繊維加工、醸造、医薬、臨床検査、洗剤など多岐に渡る。この工業的に重要な酵素の分解速度を高める手段として石井ほか(2011)により、 α アミラーゼを分解される対象と混合させる前に加熱または加熱後冷却させる操作を行う方法が示されている。このとき、 α アミラーゼの形態や加熱処理方法は限定されない。また、加熱処理は、温度は $50^{\circ}\text{C}\sim 70^{\circ}\text{C}$ で時間は30秒 $\sim$ 20分間で行うことになっています。冷却は α アミラーゼが粒子のときは、 α アミラーゼの質量と水の質量の比が $1:10000\sim 1:4$ になるような量の水と混合させる事で行います。このとき、水の温度は $5^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ の範囲であり、それが加熱直後のアミラーゼの温度より $25^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ 低いことが好ましい。 α アミラーゼを含む液状物の場合は5分 $\sim$ 24時間かけて 30°C 以下の温度に徐冷する事で冷却を行う。私は、先行研究で加熱、冷却による効果は、加熱により活性部位の少ない不完全な構造の α アミラーゼを作り出し冷却により不完全なものの成長を促し活性部位を増やすことが結果的に完全な構造の α アミラーゼを増やすことにつながり、反応速度を上昇させているのではないかと考えた。なので α アミラーゼのタンパク質が熱で変形しない程度に高温であり冷却温度は温度が低ければその分、分子の動きが遅くなるので時間を増やさなければならないが分子の動きが停止しない程度の温度で長時間行えばあまり関係が無いと仮説を立てた。

本研究では温度に着目して、特に α アミラーゼが液体のときに最適な加熱、冷却の条件を探り、分解作用の更なる効率化を目的とした。

II. 手法

1) 試薬の調整

Dye Mixture(DOJINDO)と Reconstitution Buffer (DOJINDO)と Assay Buffer(DOJINDO), Enzyme(DOJINDO)を室温に戻す。そして、Dye Mixtureと Reconstitution Bufferを全量溶解させ Dye Mixture stock solutionを作成した。続いて、EnzymeとPBS65 mlをピペッティングにより溶解し Enzyme stock solutionを作成した。

2)検量線の作成

2-1)水酸化ナトリウム水溶液の作成

純水に水酸化ナトリウム(NaOH)を800 mg 加え濃度8%の水酸化ナトリウム水溶液を10 ml 作成した。

2-2)Working solution の作成

コニカルチューブに Dye Mixture stock solution を30 μl 入れ Assay Buffer を270 μl 加えた後、Enzyme stock solution を27 μl 加え Working solution を作成した。これを4倍に希釈するために純水を915 μl 加えた後、アルミホイルに包んで遮光した。

2-3) Glucose standard solution の作成

10 mmol/l の Glucose Standard(DOJINDO)30 ml を手順 2-1)で作成した水酸化ナトリウム水溶液570 μl で希釈した。さらに、希釈した溶液から300 μl 取り出し手順 2-1)の水酸化ナトリウム300 μl

1と希釈する操作を順次繰り返し、0.5 mmol/l、0.25 mmol/l、0.125mmol/l、0.0625mmol/l、0.0313mmol/lのGlucose standard solutionを作成した。

2-4)吸光度の測定

手順2-3)で作成したGlucose濃度0.5 mmol/l、0.25 mmol/l、0.125 mmol/l、0.0313 mmol/lのもの300 μ lと手順2-1)で作成した水酸化ナトリウム水溶液を300 μ l用意し、手順2-2)で作成したWorking solutionを300 μ lずつ加えていき37°Cで30分間●(●)を用いてインキュベートし、その後プレートリーダー(●)を用いて450 nmの吸光度を測定した。

3)加熱温度と吸光度の差の測定

3-1)水酸化ナトリウム水溶液の作成

水酸化ナトリウム1.6 gに純水を入れ濃度16%の水酸化ナトリウム水溶液を10 ml作成した。

3-2)Working solutionの作成

Dye Mixture stock solutionを60 μ l入れ、Assay Bufferを540 μ l加えた後、Enzyme stock solutionを10.8 μ l入れWorking solutionを作成した。これを4倍に希釈するために純水を1830 μ l加えた後、アルミホイルに包んで遮光した。

3-3)澱粉溶液の作成

澱粉(昭和一級)3 gに純水を加え、全て溶けるまで加熱し濃度10%の澱粉溶液を30 ml作成した。

3-4) α アミラーゼ溶液の作成

α アミラーゼ(富士フィルム和光純薬)10 mgに純水を加え濃度0.1%の α アミラーゼ溶液を10 ml作成した。

3-5) α アミラーゼ溶液の温度調整

α アミラーゼ溶液を10 μ lずつチップに入れ、サーマルサイクラー(アステック)を使って40°C、50°C、60°C、70°Cの環境下に、それぞれ2つずつチップを1分11秒間放置した。その後、サーマルサイクラーを用いて15°Cの環境下に30秒間放置した。

3-6)Sampleの作成

手順3-5)のそれぞれの α アミラーゼ溶液に手順3-3)の澱粉溶液を140 μ l入れ、●を用いて37°Cで6分45秒間インキュベートした。その後、それぞれに純水を1350 μ lずつ加え10倍に希釈した。

そして、その希釈したものからそれぞれ150 μ lずつ取り出し、純水を1350 μ l加えるという作業を2回行った。次に、できたものからそれぞれ150 μ l取り出し手順3-1)の水酸化ナトリウム水溶液150 μ lと混合させた。

3-7)吸光度測定

手順3-6)でできた溶液300 μ lに手順3-2)で作成したWorking solutionを300 μ l混ぜ合わせ●を用いて37°Cで30分間インキュベートした。その後、プレートリーダーを使用して450 nmの吸光度を測定した。

III. 結果

結果は以下の表1、表2のようになった。

表1 Glucose濃度と吸光度

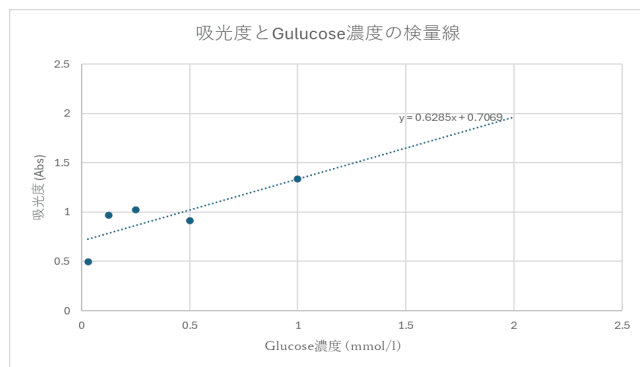
Glucose濃度 (%)	吸光度(Abs)
0.5	0.91
0.25	1.02
0.125	0.97
0.0313	0.49

表2 α アミラーゼの加熱温度と吸光度

温度 (°C)	吸光度(Abs)	
40	1.21	1.11
50	1.14	1.08
60	1.16	1.18
70	1.1	1.18

IV. 考察

表 1 をグラフにするとグラフ 1 のようになった。



グラフ 1 吸光度と Glucose 濃度の関係

また、これを表 2 と組み合わせると次の表 3 のようになった。

表 3 温度と Glucose 濃度

温度 (°C)	平均吸光度 (Abs)	Glucose 濃度 (mmol/l)
40	1.16	1.5
50	1.11	1.4
60	1.17	1.44
70	1.14	1.42

表 3 より 40°C のとき Glucose 濃度は 1.5 mmol/l、50°C のとき Glucose 濃度は 1.4 mmol/l、60°C のとき Glucose 濃度は 1.44 mmol/l、70°C のとき Glucose 濃度は 1.42 mmol/l と殆ど変化していないことから冷却時間が短い時の加熱温度は関係がないことがわかった。しかし、冷却時間が短かったがために活性部位を十分なものにできなく、 α アミラーゼの分解速度上昇が起こらなかった可能性もあるため冷却時間を長くしてみる必要があると考えた。

V. 結論

α アミラーゼの冷却時間が 30 秒と短いときには α アミラーゼの分解速度上昇に加熱温度は関係ないことが明らかになった。しかし、これは冷却時間が短かったことで十分に α アミラーゼの分解速度を上昇させることができなかった可能性があるため α アミラーゼの分解速度上昇に加熱温度が関係ないとは言えない。なので加熱した後に十分に冷却させたものと加熱した後に短時間冷却させたもの、特に何も操作せず反応させたものを比較して α アミラーゼの活性が本当に見られるかどうかを考察していきたい。

謝辞

テーマ決めるときからこの研究を進めている最中までご迷惑をおかけしたこともあったと思いますが庵原先生には終始多くの助言や指導を頂きました。心から感謝いたします。また、この論文を査読して下さった方々にもお礼申し上げます。

文 献

石井陽子ら (2011) : α アミラーゼの活性化方法. 4749781 号. 特許公報.