馬鈴薯摩砕液を用いたα−グルカンの合成に関する研究

福岡県立明善高等学校化学部
横山実穂　塚本優佳　江良宥明　髙山結衣　安武昴　藤野猛

1 はじめに（動機・目的）

一昨年の馬鈴薯澱粉に関する先輩の研究に触れ、ヨウ素澱粉反応とデンプン合成反応に興味をもった。我々は、馬鈴薯に多く含まれるホスホリラーゼの可逆的な触媒作用（α−グルカンの分解と合成）に着目し、馬鈴薯およびその摩砕液を用いてアミロース様の直鎖α−グルカンを合成することをめざした。

2 実験方法

(1)酵素反応材料

ア. 粗酵素液・・・馬鈴薯（メイクィーン種）に水を質量比1 ：1で加えミキサーで摩砕後、遠心分離して得た上澄み液

イ. グルコース−1−リン酸G−1−P：①馬鈴薯澱粉溶液に上記の粗酵素液を添加し加水分解した溶液 ②市販G−1−P

ウ. α−グルカン合成反応のプライマー ①マルトテトラオース②マルトース③グルコース

エ. 緩衝液・・・pH6リン酸緩衝液：澱粉分解反応用，pH6クエン酸緩衝液：α-グルカン合成反応用

オ.ヨウ素液・・・0.050M I2−KI溶液

(2)ホスホリラーゼによる酵素反応追跡のためのヨウ素呈色反応の条件確認

0.010%馬鈴薯澱粉溶液20mLに0.050mol/Lヨウ素液を所定の量（20μL～120μL）添加し、紫外可視吸収スペクトルの経時変化を測定し、添加ヨウ素量（適正ヨウ素濃度）や測定までの経過時間の適正条件を決定した。

(3)G−1−P生成実験

0.010%馬鈴薯澱粉溶液300mLに上記粗酵素液とリン酸緩衝液各30mLを添加し、pH6.8、35℃で反応させた。反応の経時変化を20～120分間紫外可視吸収スペクトル法で測定し、600nmにおける吸光度の低下やスペクトラム変化で加水分解の程度を確認した。また、 G−1−P の生成は薄層クロマトグラフィーで同定した。

(4)α-グルカン合成実験

上述の各種糖類をプライマーとして、(3)で調製したG−1−Pまたは薬品のG−1−Pを添加し、高濃度 G−1−P 下でホスホリラーゼの酵素反応をグルカン合成の向きに偏らせて合成を行った。 反応の経時的な測定は上記(3) と同様にヨウ素呈色法で実施し、600nmにおける吸光度増加でα-グルカンの合成を確認した。また、反応に伴い放出されるリン酸をリンモリブデン青法により測定することでも反応の進行を確認した。 更に、 20時間後の反応液をゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、溶出液中の全糖量をフェノール硫酸法で検出することで多糖生成を確認した。

3 結果および考察

(1)ヨウ素呈色反応の条件

反応液中のヨウ素最終濃度 2.5×10^{-4}mol/L、発色後5分の測定条件に統一して実験を行なうことにした。

(2)G−1−P調製実験

図1に示すように、澱粉のホスホリラーゼによる過リン酸分解の進行とともにヨウ素呈色値が低下しており、 澱粉の分解が進行していることが確認された。

(3)α-グルカン合成実験

図2に示すように、 次第にヨウ素呈色値が上昇し、ホスホリラーゼによる合成反応の進行が確認された。また、 リンモリブデン青法による分析でも、 リン酸の増加が確認された。ゲルろ過実験の結果より、分子量1000以上のグルカンが生成していると推定された。

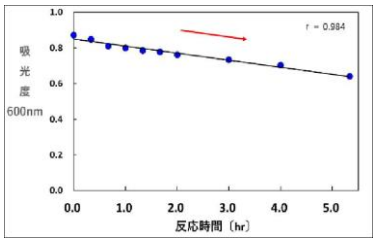

図１ G-1-P合成反応の経時変化

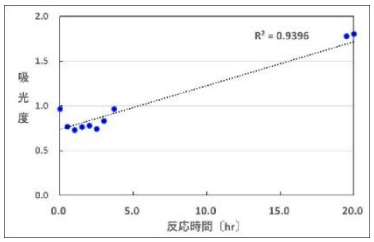

図２ グルカン合成反応の経時変化

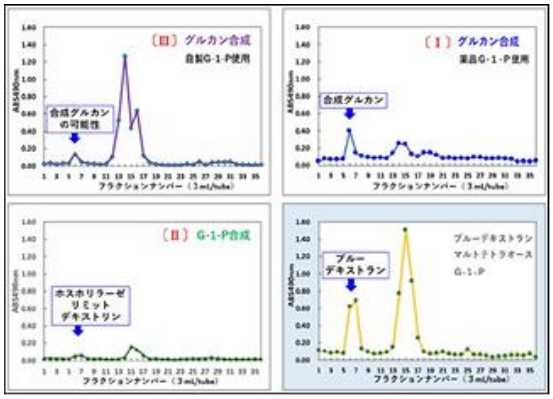

図３α-グルカン合成反応液のゲルろ過クロマトグラム
（各溶出液中の全糖をフェノール硫酸法で分析）ゲル：SephadexG50

4 結 論

(1) ホスホリラーゼを含む馬鈴薯摩砕液及び澱粉に摩砕液を添加して作った自製のG−1−P、 市販マルトテトラオースを用いることで、 簡便にα-グルカンを合成できることがわかった。

(2) グルカン合成のプライマーとして、マルトテトラオースと同様にマルトースも利用できることがわかった。

5 課題と展望

(1) ゲルろ過後の各分画の糖鎖鎖長分析　　(2)合成したグルカンの精製と利用法の開発

6 参考文献

(1) デンプン科学ハンドブックP.81,P.256（朝倉書店）　(2) 実験科学講座24巻生物化学P.398（丸善）
(3) 矢島博文「ヨウ素デンプン反応の発色のしくみ」化学と教育 63巻5号（2015） 日本化学会　他