イソアミラーゼによる分岐サイクロデキストリンの合成

檜作 進*, 安部淳一*, 溝脇直規*,
小泉京子**, 宇多村敏子**

Synthesis of Branched Cyclodextrins with *Pseudomonas* Isoamylase

Susumu HIZUKURI,* Jun-ichi ABE,* Naoki MIZOWAKI,*
Kyoko KOIZUMI** and Toshiko UTAMURA**

*Department of Agricultural Chemistry, Kagoshima University
(21-24, Korimoto-1, Kagoshima 890, Japan)

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University
(4-16, Edagawa-cho, Nishinomiya 663, Japan)

6-O- α -maltosyl- and 6-O- α -maltotriosyl-cyclodextrins (CDs) were produced from α -, β -, and γ -CDs and maltose and maltotriose with *Pseudomonas* isoamylase. The reaction rate was greater with maltotriose than with maltose, and with increasing size of CDs. Besides these branched cyclodextrins, branched hexaoses, 6¹-, 6²-, and 6³-maltotriosylmaltotriose in the 1:4.5:1 ratio were formed by the condensation of two maltotrioses. Thus, maltotriose was effective as both a side-chain donor and an acceptor as well, but maltose was only effective as a side-chain donor. The specific activities of isoamylase for the formation of maltotriosyl-CDs were greater than those of pullulanase. The branched CDs and the hexaoses were purified by liquid-gel chromatography and HPLC, and their structures were determined by chemical, enzymic and ¹³C-NMR spectroscopic analyses.

イソアミラーゼ [EC. 3. 2. 1. 68] は澱粉やグリコーゲンの分岐結合を加水分解する酵素で、これら多糖の構造研究に用いられるほか、マルトースやその他のオリゴ糖の工業生産に利用されている。1968年に原田らによって発見された *Pseudomonas amyloclavata* SB 15 の生産するイソアミラーゼは作用が強力で、非常に有用である¹⁾。その諸性質は詳細に検討され、精製酵素は試薬としても市販されている。

サイクロデキストリン (CD) は環状構造に由来するユニークな機能が、広く基礎と応用の分野の研究者の関心をよんでいる^{2,3)}。

檜作ら⁴⁻⁸⁾は澱粉の構造と関連して、種々のアミラーゼの作用の特徴を明らかにしている。本研究の目的は、1) *Pseudomonas* のイソアミラーゼの作用の特徴を逆反応から解析すること、2) 逆反応により分岐 CD を能率

よく合成すること、である。1)の目的には、オリゴ糖間の縮合作用を利用するよりも、一方に還元力をもたない、したがって、側鎖の供与体にはならないが受容体になる CD を、他方にオリゴ糖を側鎖の基質として用いるほうが解析が容易であること、これはまた、2)の目的にかなうことの一石二鳥を狙ったものである。分岐 CD はマルトオリゴ糖が α -1,6 結合で CD に結合したもので、CD の機能の改善や新開発が期待される物質である。

Pseudomonas のイソアミラーゼはアミロペクチンやグリコーゲンを分解する作用が他の同種の酵素 (たとえば、プルラーゼ) に比べて非常に強力であるため、逆作用が強く、種々の分岐 CD を容易に合成できることを期待した。イソアミラーゼの作用は基質のマルトシル側鎖に対しては非常に弱い⁹⁾が、マルトトリオシル以上の大きい側鎖に対しては強力である¹⁾。本研究では、この点を定量的に明らかにするために、逆反応の側鎖の供与体としてマルトース (G₂) とマルトトリオース (G₃) を用いることにした。

* 鹿児島大学農学部農芸化学科 (890 鹿児島市郡元 1-21-24)

** 武庫川女子大学薬学部 (663 西宮市枝川町 4-16)

基質の G_2 , G_3 や α -, β -, γ -CD は日本食品化工協と
 榊林原生物化学研究所から恵与されたものである。 β -CD
 は水溶液から再結晶化したものを用いたが、その他のもの
 は精製を省略した。イソアミラーゼは林原生物化学研
 究所より恵与された粗酵素をアミロースゲルなどを用い
 て純化し、 α -アミラーゼや α -グルコシターゼの活性が
 検出されないものを使用した。

イソアミラーゼの基質特異性と分岐 CD の生成

高濃度の G_2 または G_3 と β -CD を基質として、イソ
 アミラーゼを作用させると G_2 - β -CD または G_3 - β -CD を
 生成した。 G_3 を基質にすると、 G_3 - β -CD のほかに分岐
 マルトヘキサオース (分岐 G_6) を生成したが、 G_2 を基
 質にしたときには分岐 G_4 は生成しなかった。Fig. 1 は
 これらの反応の経過を示したものである (これら生成物
 の構造決定は後述する)。これらの結果は、適当な条件
 下ではイソアミラーゼの逆反応はかなり強力であることを
 示している。 G_3 は側鎖の供与体としても受容体とし
 ても機能することが認められたが、 G_2 は供与体として
 のみ有効であった。また、 G_2 よりも G_3 を基質とするほう
 が反応ははるかに速やかであった。これは正反応と同じである。
 イソアミラーゼの基質には G_3 以上の長さの
 主鎖が望ましいことを意味している。

分岐 CD を調製する適当な条件を見出すために、 α -,
 β -, γ -CD をほぼ飽和に近い濃度とし、 G_2 または G_3 の
 濃度と分岐 CD の生成との関係を調べた。結果は Fig. 2
 のように、溶解度の高い α -CD や γ -CD の場合には、
 CD の濃度の 2~2.5 倍の濃度の G_3 を加えると、45°C、

Fig. 1. Time courses of the formation of G_2 - β -CD, G_3 - β -CD and 6-*O*- α -maltotriosylmaltotrioses (G_6).

β -CD (80 mM) and G_2 or G_3 (1 M) dissolved in 50 mM acetate buffer, pH 3.5, were incubated with 6.4 U/ml isoamylase at 50°C.

19時間の反応で、ほぼ最高値に達するが、溶解度の低い
 β -CD ではかなり長時間が必要であること、反応速度は
 側鎖の供与体と受容体の両基質の大きさに依存して、か
 なり変化すること、などを示している。Fig. 3 は同一条
 件下で、これら分岐 CD の生成速度を調べた結果であ
 る。側鎖の受容体である CD は環の大きいものほど、同
 様に側鎖の供与体も G_2 よりも G_3 のほうが反応速度が

Fig. 2. Effects of the concentrations of maltose (G_2) and maltotriose (G_3) on the formation of maltosyl- and maltotriosyl-cyclodextrins (CDs).

Conditions: concentration (mM), α -CD(231), β -CD (40), γ -CD(276); isoamylase, 6.4 U/ml; temp., 45°C; incubation time, 19 hr; pH 3.5.

Fig. 3. Reaction rates for the formation of branched CDs.

CDs (40 mM), G_2 or G_3 (570 mM) dissolved in 50 mM acetate buffer, pH 3.5, and incubated with 6.4 U/ml isoamylase at 45°C.

Fig. 4. Time courses of the debranching of G_2 - β -CD and G_3 - β -CD.

Reaction mixtures containing 11.3 mM G_3 - β -CD (●) and 0.62 U of isoamylase, or 12.6 mM G_2 - β -CD and (▲) 6.2 U or (■) 0.62 U of isoamylase in 1 ml of sodium acetate buffer (pH 3.5) were incubated at 40°C. Debranching (%) was calculated from the amount of β -CD released.

大きい。したがって、 G_3 - γ -CD の生成速度は最も生成しにくい G_2 - α -CD の場合のほぼ 300 倍であった。 G_3 と G_2 に対する反応速度の比は、 α -CD が 36、 β -CD が 15、 γ -CD が 13 で、CD の環の大きさが大きいものほど小さいが、 G_2 に対する反応速度は G_3 の場合より桁違いに小さいことが明らかになった。これは正反応で β -限界デキストリンから G_2 の遊離が G_3 に比して著しく遅いことを裏づける結果で、グリコーゲンやアミロペクチンを分解するとき、主鎖の長さ、分岐間距離、側鎖の長さなどが反応速度に影響することを意味している。実際、 G_3 - β -CD と G_2 - β -CD を希薄溶液にしてイソアミラーゼで加水分解すると、 G_3 - β -CD は容易に完全に分解されるが、 G_2 - β -CD の完全分解には多量の酵素と長時間を要した (Fig. 4)。したがって、 G_3 側鎖は完全に分解され、 G_2 側鎖はほとんど分解されないような場合があるとしても、 G_2 側鎖は分解されない、というのは誤りである。Fig. 3 と 4 の結果は、イソアミラーゼの作用には側鎖と主鎖の大きさが関係し、 G_2 側鎖についてはとくに主鎖の長さが大きな影響を与えることを意味している。主鎖、側鎖ともにある程度長いものほどよい基質であると、結論される。これらの分岐 CD を生成する比活性をイソアミラーゼとプルランナーゼについて比較すると、 G_3 -CD、とくに G_3 - β -CD や G_3 - γ -CD に対しては、イソアミラーゼのほうがはるかに有利であった。

Fig. 5. Separation of G_3 - β -CD and G_6 from a reaction mixture by Sephadex G-15 gel-chromatography.

Conditions, see text.

分岐 CD の調製

種々の CD と G_2 または G_3 を反応させた反応液から既報⁹⁾のゲルクロマトグラフなどによって、分岐 CD を分離、精製した。一例を示すと、 G_3 (40.3 g) に β -CD (7.3 g) を 50 mM 酢酸ソーダ緩衝液 (pH 3.5, 80 ml) に溶解し、イソアミラーゼ (694 U) を加えて、45°C で 48 時間反応させた。100°C で 15 分反応混液を加熱して、反応を止め、容積を 75% に濃縮し、0°C に一夜保存して、析出する β -CD を遠心分離して除去した。上澄液を Sephadex G-15 のカラム (6.0×115 cm) にかけて、水で溶出した (Fig. 5)。最初に溶出した小さなピークは分岐 G_6 で、ついで G_3 が溶出し、そのピークの後半の肩状部分に G_3 - β -CD が溶出した。 β -CD は Sephadex に親和性があり、最も遅れて溶出した。分岐 G_6 と G_3 - β -CD を含む画分をそれぞれ集めて、濃縮し、Bio-Gel P-2 のカラム (2.6×95 cm) にかけて、水で溶出し、それぞれの画分を集めた。この 2 度のゲルクロマトグラフでほとんど均一な (純度約 98%) 分岐 G_6 と G_3 - β -CD が得られた。他の分岐 CD も同様な方法で調製し、純度が低いときは、これらのクロマトグラフを繰り返して純化した。分析用の試料は純度 98~99% のものをさらに Hibar LiChroprep RP-18 または Asahipak GS-320¹⁰⁾を用いる HPLC で純化した。

分岐 CD の構造

β -CD と G_3 から分岐 G_6 (生成物 A) と G_3 - β -CD (生

Fig. 6. ^{13}C -NMR spectra of $\text{G-}\beta\text{-CD}$ (1), $\text{G}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ (2) and $\text{G}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ (3).

S-1, *etc.* denote Carbon-1 in S residue, *etc.* (see Scheme 1). The spectra were recorded on a JEOL JNM FX-200 spectrometer (operated at 50.10 MHz) at 50°C. The FT NMR measurement conditions were: spectral width, 3,000 Hz; pulse flipping angle, 45°; number of data points, 16,384. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from that of tetramethylsilane using 1,4-dioxane (67.40 ppm) as an internal standard. Samples were dissolved in D_2O at a concentration of 2–3% in a micro cell.

Scheme 1.

成物B)と想定される生成物を上述の方法で純化し、構造を決定した。

生成物Bは非還元性で、イソアミラーゼにより等モルの G_3 と $\beta\text{-CD}$ に、グルコアミラーゼで2モルのグルコースと1モルの $\text{G-}\beta\text{-CD}$ に分解した。メチル化¹¹⁾後水解し、アルジトールアセテートとし、ガスクロマトグラフで分析¹²⁾した結果、1,5-ジ-O-アセチル-2,3,4,6-テトラ-O-メチル-D-グルシトールと1,4,5-トリ-O-アセチル-2,3,6-トリ-O-メチル-D-グルシトールおよび1,4,

5,6-テトラ-O-アセチル-2,3-ジ-O-メチル-D-グルシトールを1.0:8.0:1.0の割合で検出した。Smith 分解¹³⁾すると、グルコース残基当たり0.1モルのグリセロールを生じた。以上の結果から、生成物Bは6-O- α -マルトリオシルシクロマルトヘプタオース (G_3 - β -CD) と同定した。

β -CD と G_2 から G_2 - β -CD と予想される生成物Cを得、 G_3 - β -CD と同様に酵素分解、メチル化分析、Smith 分解などの手法により、 G_2 - β -CD と同定した。これら分岐CDの構造はさらに ^{13}C -NMR スペクトルの解析によって支持された (Fig. 6, Scheme 1)。これらの化学シフトは β -CD や G - β -CD¹⁰⁾のスペクトルを参考にして帰属された。CD リングのグルコシル基 (R と R')、CD に直接結合した側鎖残基 (S)、その他の側鎖残基 (S', S'') の C-1 (R-1, R'-1; S-1; S'-1, S''-1) の化学シフトは、それぞれ分離して、 δ 約 103, 100 および 101 に、強度比が G_2 - β -CD では7:1:1に、 G_3 - β -CD では7:1:2の割合で観察された。分岐CDすべてについて、側鎖のS残基のC-1の結合定数 ($J_{1\text{C}-1\text{H}}$) は、CDの主リングや側鎖の他残基のものと同じ170 Hzであった。したがって、側鎖のS残基とCDとの結合は α 型であるこ

とが確認された。グルコンド結合しているC-6のシグナルは δ 約68に、その他のC-6のシグナルは δ 約61に帰属された。両者のシグナルの強度比は G_2 - β -CD で1/8, G_3 - β -CD で1/9で、この帰属を裏づけている。また、INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) 法 (待ち時間 $\Delta=3J/4$, 5.1 msec) では $-\text{CH}_2-$ のシグナルは他のものと逆方向 (図の下方) に出現することにより、これらのシグナルがC-6のものであることが確かめられた。これらの結果からも、 G_2 または G_3 は β -CD に (1 $\rightarrow$ 6)- α -グルコンド結合で付加していることが明らかにされた。

その他、 G_2 - α -CD, G_3 - α -CD, G_2 - γ -CD, G_3 - γ -CD の構造についても、酵素分析、メチル化分析、スミス分解、 ^{13}C -NMR スペクトル解析などの手段により、構造を確認した。Fig. 7 は重合度1~7のマルトオリゴ糖と種々のCDのTSK-gel NH₂-60 (東洋曹達) のカラムを用いたHPLCにおける溶出位置と重合度との関係を示したもので、分岐CDの側鎖が長くなると、溶出位置はマルトオリゴ糖の場合と同じ勾配で変化し、CDの環が大きくなる場合と異なる勾配を示した。この事実は分岐CDの構造を支持している。

分岐 G_6 の構造

β -CD と G_3 を基質にしたときに生成する生成物Aは、 G_3 のみを基質とするときにも生成したので、分岐ヘキサオースであると予想された。TSK-gel NH₂-60 カラ

Fig. 7. Relationship between $\log t_{Rglc}^*$ and DP for maltooligosaccharides, CDs and branched CDs on HPLC.

HPLC was conducted at room temperature with an HLC-803D pump, a differential refractometer, RI-8 (range 32×10^{-6} RIU/full scale) and a column of TSK-gel NH₂-60 (4.6 $\times$ 250 mm) and 65% acetonitrile-35% water as the eluent (flow rate, 0.8 ml/min). Five μ l of a mixture of 30 mg/ml of each compound was injected.

* Relative retention time to glucose.

Fig. 8. Separation of reduced branched G_6 .

HPLC was performed at room temperature with a JASCO TRIROTAR SR-1, a differential refractometer, Shodex SE-31 (2×10^{-5} RIU/full scale) and a column of YMC AL-312 ODS. The column was eluted with water at 1 ml/min.

1, OS1; 2, OS2; 3, OS3.

ムを用いた HPLC では、生成物 A はマルトヘキサオースとマルトヘプタオースの間で、前者に近接した位置に溶出し、還元力と全糖の測定から、重合度 6.0 の値が得られ、イソアミラーゼによる水解反応で 2 分子のマルトトリオースを生成したので、分岐 G_6 であると結論した。メチル化分析の結果から、分岐結合の位置が異なる少なくとも 2 種の分岐 G_6 の混合物であることが示唆されたので、以下のような手段でこれら分岐 G_6 を分離、定量し、構造を決定した。

生成物 A をホウ素化水素ナトリウムで還元後 (α -, β -アノマーの存在による複雑化を避けるため)、YMC AL-312 ODS のカラム (6×150 mm) を用いた HPLC で Fig. 8 のように、3 成分が存在することが認められた。これら 3 成分 (溶出順に OS1, OS2, OS3 とする) を分取し、それぞれ再クロマトして純化し、 ^{13}C -NMR で分析した。3 種の分岐 G_6 が存在することは、可能性のあるすべての分岐 G_6 が生成していることを意味している。これら 3 種の糖アルコールの構造を Scheme 2

に、 ^{13}C -NMR スペクトルを Fig. 9 に示した。 ^{13}C -NMR スペクトルの帰属はマルトトリオース¹⁴⁾と D-グルシトール¹⁵⁾のものを参考にした。すなわち、Fig. 9 の INEPT 法 (待ち時間 $d=3J/4$) によるシグナルのうち、グルコピラノース基の 6 位のシグナル (M' -, M'' -, S -, S' -, S'' -6) は通常最も高磁場 (δ 約 61.5) に位置する。グルシトール基の C-1 のシグナルは 3 者共通して同じ磁場環境にあるので、同じ位置 (δ 63.76) にあらわれる。OS2 と OS3 に共通するシグナル δ 63.28 (OS1 にはない) はグルシトール基の C-6 (M-6) に帰属され、OS1 の M-6 はグルコシド結合のために δ 69.65 の低磁場へシフトする。OS2 の M'' -6 と OS3 の M' -6 も同様に通常の位置から 6~7 ppm 低磁場にシフトする。OS1 の M-6, OS2 の M'' -6, OS3 の M' -6 のピークが顕著に低磁場にシフトしていることは G_3 基がそれぞれその位置に結合していることを意味している。これら 3 者はいずれも分子内に 2 個の遊離の C-4-OH を有し、それらの C-シグナルは δ 70~83 付近に観測されるが、こ

Fig. 9. ^{13}C -NMR spectra of reduced branched G_6 with the INEPT method ($d=3J/4$).

1, OS1; 2, OS2; 3, OS3.

Scheme 2.

れら2個の C-4 の環境の違いが構造決定に役立つ。すなわち、OS1 の S'' と M'' の C-4 は等価な磁場環境にあるが、OS3 では若干異なり、OS2 では M'' の C-4 は隣接位の C-6 におけるグルコシド結合の影響を受けてシフトし、S''-4 とは明らかに異なるものと理解される。これを裏づけて、OS1 の M'' と S'' の C-4 のレゾナンスは δ 70.36 に1本のシグナルになるが、OS3 では δ 70.38 に重なったほぼ1本のシグナルが観測され、OS2 の C-4 は δ 70.53 と δ 70.36 の2本のシグナルに分離して観測された。一方、M', S, S'-4 のレゾナンスはグルコシド結合のために、M'' と S'' のシグナルに比べて 8 ppm 低磁場にシフトしている (δ 約 78)。グルシトールの C-4 のレゾナンス (M-4) は δ 約 83 に観測された。また、C-4 と C-6 にグルコシド結合している C-1 のシグナルは、それぞれ δ 約 101 と δ 約 99 に出現した。C-1 の結合定数 (J_{C-1-H}) は INEPT/Non-decoupling 法で、OS1 が 170.7, OS2 が 170.5, OS3 が 170.7 Hz で、 α 型であることが確認された。以上の結果から、還元前の OS1, OS2, OS3 は、それぞれ、6¹-マルトトリオシルマルトトリオース、6³-マルトトリオシルマルトトリオース、6²-マルトトリオシルマルトトリオースであると決定した。Fig. 6 のクロマトグラムから、OS1, OS2, OS3 の生成比はほぼ 1 : 1 : 4.5 であった。6²-マルトトリオシルマルトトリオースが最も生成しやすいこ

とは、3者の分岐 G₆ のうち、これが最もよい基質（正反応に対して）であることを意味し、イソアミラーゼには主鎖の 1→6 結合の両端にグルコシル基が存在することが作用しやすい基質であることを示している。

分岐 CD の性質

β -CD は CD 中で最も水に対する溶解度が低い、側鎖を付加することによって、著しく溶解度が上昇し、G₂- β -CD では 0°C で溶解度は 50% 以上であった。また、分岐 CD は非分岐 CD に比して、種々の α -アミラーゼの作用を受けにくいことが見出された。これらの諸性質は種々の脂質の水溶性化、安定化などに役立ち、医薬品や食品への幅広い用途が期待される。

おわりに、貴重な試料のご提供をいただいた佛林原生物化学研究所と日本食品化工協の関係各位にお礼を申しあげる。本研究は文部省科学研究費、特定研究「食品機能の系統的解析と展開（代表者、お茶の水女子大学・学長 藤巻正生；班長、東京大学・教授 矢野俊正）の援助によって行われたもので、ここに感謝の意を表します。なお、本研究の一部分は同研究の昭和 60 年度の報告書¹⁶⁾に記述した。

文 献

- 1) T. HARADA: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **1**, 39 (1984).
- 2) M. L. BENDER and M. KOMIYAMA: *in* Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry, Vol. 6, Cyclodextrin Chemistry, Springer-Verlag, New York (1978).
- 3) J. SZEITLI: *in* Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes, Akadémiai Kiadó, Budapest (1982).
- 4) Y. TAKEDA and S. HIZUKURI: *Carbohydr. Res.*, **89**, 174 (1981).
- 5) S. HIZUKURI, Y. TAKEDA, M. YASUDA and A. SUZUKI: *Carbohydr. Res.*, **94**, 205 (1981).
- 6) J. ABE, Y. TAKEDA and S. HIZUKURI: *Biochim. Biophys. Acta*, **703**, 26 (1982).
- 7) Y. TAKEDA and S. HIZUKURI: *Biochim. Biophys. Acta*, **749**, 302 (1983).
- 8) J. ABE, H. NAGANO and S. HIZUKURI: *J. Appl. Biochem.*, **7**, 235 (1985).
- 9) J. ABE, Y. TAKEDA, S. HIZUKURI, K. YAMASHITA and N. IDE: *Carbohydr. Res.*, **131**, 175 (1984).
- 10) K. KOIZUMI, T. UTAMURA, M. SATO and Y. YAGI: *Carbohydr. Res.*, (1986) (印刷中).
- 11) P. PREHM: *Carbohydr. Res.*, **78**, 372 (1980).
- 12) M. HISAMATSU, J. ABE, A. AMEMURA, and T. HARADA: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1049 (1980).

- 13) S. HIZUKURI and S. OSAKI: *Carbohydr. Res.*, **63**, 261 (1978).
- 14) T. USUI, N. YAMAOKA, K. MATSUDA, K. TUZIMURA and S. SETO: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 2425 (1973).
- 15) S. J. ANGYAL and R. L. FUR: *Carbohydr. Res.*, **84**, 201 (1980).
- 16) 檜作 進: 文部省科学研究費特定研究 (1), 食品機能の系統的解析と展開, 昭和 59 年度研究報告集, p. 154 (1985).

【質問】

東京農大総研 中村

1. 私の聞き誤りかもしれませんが, 加水分解活性が高いものは縮合活性も高いであろうといわれたと思いますが, これはどういう根拠なのでしょう。

2. イソアミラーゼで縮合反応を行われたのは, 誠に立派なご研究と思います。ところで生産物の $G_3\text{-}\alpha\text{-CD}$ は, $\alpha\text{-CD}$ と G_3 が $\alpha\text{-1,6}$ で結合していると思いますが, 現在まで $\alpha\text{-1,6}$ 結合の加水分解の $\Delta G'$ のデータは発表されておられません。今回の実験からこれを出していただけるとたいへんありがたいと思います。

【答】

1. 一つの平衡反応 ($A \rightleftharpoons B$) を接触する二つの酵素 (E と F) があり, それぞれ正と逆の反応速度を v_e, v_i ; $\bar{v}_e, \bar{v}_i$ とするとき, $v_e > v_i$ であると, $\bar{v}_e > \bar{v}_i$ である。

ここで, E と F をイソアミラーゼとプルラーナーゼとすると, アミロペクチンとグリコーゲンに対する加水分解の比活性は, イソアミラーゼのほうがプルラーナーゼよりもはるかに大きいので縮合反応もイソアミラーゼのほうが速やかであるということです。

2. 平衡定数を測定して, 計算してみます。

($G_3 + \beta\text{-CD} \rightleftharpoons G_3\text{-}\beta\text{-CD} + H_2O$ の $\Delta G' = 790 \text{ cal/mol}$, 45°C , 後日の計算)

ありがとうございました。

【質問】

大阪市工研 北畑

1. 今日のご発表では, 精製されたイソアミラーゼを使用されておりますが, 粗酵素標品を用いた場合には, どうなりますでしょうか。

2. CD に G_3 が 2 分子別の位置に結合した $G_3\text{-CD}\cdot G_3$ は合成されますでしょうか。

【答】

1. 粗酵素標品でもよく分岐 $\alpha\text{-}, \beta\text{-CD}$ を生成しますが, 今回は酵素反応の速度を解析するため, 精製酵素を用いています。

2. HPLC によって, 保持時間が $G_3\text{-}\beta\text{-CD}$ より長い成分が少量生成しているのを観察しておりますが, 同定していません。