

# 遊離脂肪酸およびリノール酸ヒドロパーオキシド による $\alpha$ -アミラーゼ活性の阻害

川 崎 良 文

## Inhibition of $\alpha$ -Amylase Activity by Free Fatty Acids and Linoleic Acid Hydroperoxides

Yoshifumi KAWASAKI

### 緒 言

近年、生活様式の合理化と相まって、加工食品の発達には目覚ましいものがある。加工食品の中でポテトチップ、インスタントラーメン、焼そば等の油脂を含む食品は酸敗による品質の劣化が起りやすい。酸化油脂は食品の風味に悪影響を与えるだけでなく、毒性さえも示す。酸化油脂の毒性に関しては、多くの学者により研究され、その本体も次第に明らかにされつつある。その毒性については、二つの問題が考えられる<sup>1)</sup>。すなわち、常温において酸化した自動酸化油による毒性と、調理や加工中に生じた高温加熱油の毒性である。油脂を空気中で加熱すると、まず不飽和脂肪酸の過酸化物（パーオキシド）が生じ、次にこの物質は分解してカルボニル化合物やヒドロキノン酸等になる。一部は重合して、環状化合物や重合体になる。これらのうち、環状化合物や重合体は主に高温加熱油中で生成されるが、過酸化物やカルボニル化合物等は、比較的低温における油脂の自動酸化によっても生成される。過酸化物はビタミン等の低分子物質を酸化させる<sup>2-7)</sup>だけでなく、酵素およびタンパク質を変性させる<sup>6)8-13)</sup>。過酸化物のほかに、遊離の脂肪酸も種々の酵素活性を阻害することが知られている<sup>13-22)</sup>。

著者は枯草菌の  $\alpha$ -アミラーゼを酵素標品として用い、これの遊離脂肪酸および過酸化物の一種であるリノール酸ヒドロパーオキシドによる阻害の実験を行なったので、その結果について報告する。

### 実験材料および方法

#### 1. 材 料

##### 脂肪酸および大豆油

脂肪酸および大豆油は市販一級品を使用した。酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸の  $1.0 \times 10^{-2}M$  および  $1.1 \times 10^{-2}M$  エチルアルコール溶液を作り、これを原液とした。比較のためにリノール酸の容量と等量の大豆油をエチルアルコール：エチルエーテル（1：3）溶液に溶か

したものを使用した。したがって、本文中および図中に表示した大豆油のモル数はリノール酸の容量と等量の大豆油を含むことを意味する。

#### リノール酸ヒドロパーオキシド (LAHPO)

LAHPO は Banks らの方法<sup>23)</sup> にしたがって調製した。すなわち、直径 9 cm のシャーレにリノール酸 1 ml を入れ、少量の石油エーテルに溶かしたのち、これを揮発させ、リノール酸を被膜状に広げる。これを 37°C で 3 日間空気酸化させたのち、20 ml の石油エーテルに溶かし、5 ml の 85% メチルアルコールを加えて抽出する。Wheeler 法改良法<sup>24)</sup> により過酸化物質価 (POV) を測定する。POV = 20 のメチルアルコール溶液は  $1.0 \times 10^{-2} M$  の LAHPO に相当する。

#### $\alpha$ -アミラーゼ

Sigma 社製の枯草菌 (*Bacillus subtilis*) からの結晶、凍結乾燥品 (Bacterial TYPE II-A) を使用した。1.0 mg/ml の原液を 0.9% NaCl で希釈して 1.5  $\mu$ g/ml および 2.5  $\mu$ g/ml の溶液を作り、冷凍庫に保存した。

溶性デンプンは Merck 社製、アミロースは Sigma 社製、アミロペクチンは東京化成工業社製、溶性アルブミンは半井化学薬品社製の特級品を使用した。

## 2. アミラーゼ活性の測定法

アミラーゼ活性は Amyloclastic (Iodometric) 法によって測定した。

### (1) デンプンを基質とした場合

Caraway 法<sup>25)</sup> を次のように若干改良して活性を測定した。基質緩衝液 (0.1% soluble starch in 0.1 M phosphate buffer, pH 5.8) 0.8 ml に脂肪酸、LAHPO または大豆油 0.1 ml を混和し、37°C で 5 分間温める。これにアミラーゼ溶液 (2.5  $\mu$ g/ml) 0.1 ml を加え、ただちに混和して 37°C で正確に 7.5 分間反応させる。7.5 分後、0.01 N ヨウ素溶液 1.0 ml を加え、呈色と同時に酵素作用を停止させる。さらに水 8.0 ml を加えたのち、日立 139 型分光光度計にて 660<sub>nm</sub> における吸光度を測定する。同時に、反応停止後に酵素液を加えたものを空試験とし、脂肪酸等の代りに水を加えたものを対照とする。以下アミロースおよびアミロペクチンを基質とした場合の空試験および対照もこれと同様に行う。なお、脂肪酸、LAHPO および大豆油の溶剤である有機溶媒による阻害もいづらか認められたが、本実験においてはこの影響を考慮しなかった。また、pH 5 以下の酸性溶液中では、呈色液に混濁がみられる試料もあった。

### (2) アミロースを基質とした場合

Street-Close 法<sup>26)</sup> を次のように若干変えて活性を測定した。測定直前に、アミロース溶液 (0.14% amylose in 0.01N NaOH) 2 容、0.01 N 塩酸 2 容、緩衝液 (0.02 M phosphate buffer, pH 5.8) 5 容を混和した基質混合液を作る。この基質混合液 0.9 ml に脂肪酸、LAHPO または大豆油 0.1 ml を混和し、37°C で 5 分間温める。これにアミラーゼ溶液 (1.5  $\mu$ g/ml) 0.1 ml を加え、ただちに混和して 37°C で 15 分間おく。15 分後、0.01 N ヨウ素溶液 0.6 ml、ついで水 10.0 ml を加え酵素作用を止めると同時に呈色させる。この呈色液の吸光度を 620<sub>nm</sub> で測定する。

## (3) アミロペクチンを基質とした場合

アミロースを基質とした場合の活性測定法のうち、下記以外は同一条件にした。すなわち、基質をアミロペクチン溶液 (0.8% amylopectin in 0.01 N NaOH) に、アミラーゼ溶液を 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に、波長を 540 $\text{nm}$  に変えて活性を測定した。

上記濃度のアミラーゼ溶液を使用したとき、対照 (脂肪酸等を加えないもの) の分解率は、アミロースおよびデンプンを基質とした場合約 90%，アミロペクチンを基質とした場合約 80%であった。

## (4) 活性の表示

アミラーゼ活性は脂肪酸等を加えたときの分解率を対照の分解率で割った値に 100 を乗じた数値、すなわち、残存活性 (%) として表示する。

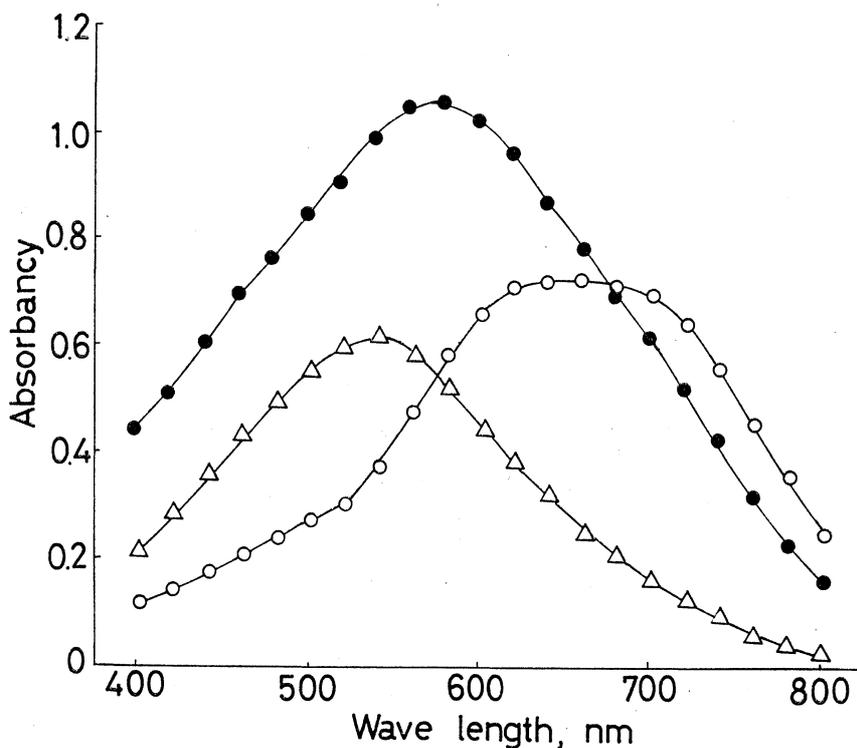
## 実 験 結 果

## 1. 各基質の吸収曲線, アミラーゼの至適 pH および酵素濃度と分解率との関係

阻害の実験を実施するに先立って、まず次の様な基礎実験を行なった。

## (1) ヨウ素デンプン反応による各基質の吸収曲線

デンプン、アミロースおよびアミロペクチンの各基質に対して、どの波長で吸光度を測定すればよいかを知るために、ヨウ素デンプン反応による各基質の吸収曲線を求めた。各基質に酵素液の代わりに水を加えて呈色させた空試験の吸光度から、基質の代わりに水を加えたヨウ素のみによる吸光度



第 1 図 ヨウ素デンプン反応による各基質の吸収曲線  
基質：—○—アミロース，—△—アミロペクチン，—●—デンプン

を差し引いた値を第1図に示す。アミロースを基質とした場合は  $660_{\text{nm}}$ 、アミロペクチンの場合は  $540_{\text{nm}}$ 、デンプンの場合は  $570_{\text{nm}}$  付近に吸収極大があった。しかし、アミロースを基質とした場合は Street-Close 法<sup>26)</sup> に準じて  $620_{\text{nm}}$ 、デンプンの場合は Caraway 法<sup>25)</sup> に準じて  $660_{\text{nm}}$  で吸光度を測定することにした。なお、アミロペクチンの場合は  $540_{\text{nm}}$  で吸光度を測定した。

### (2) アミラーゼの至適 pH

酢酸緩衝液 (pH 4.0, 5.0) およびリン酸緩衝液 (pH 5.8, 7.0, 8.0) を使用して、各基質についての分解率を求めた (第2図)。図から明らかなように、いずれの基質を用いた場合にも至適 pH は6付近であった。本酵素の至適 pH は文献<sup>27)</sup> によると  $5.6\sim 6.0$  となっていたので、以下の実験においては pH 5.8 の緩衝液を使用した。

### (3) 酵素濃度と分解率との関係

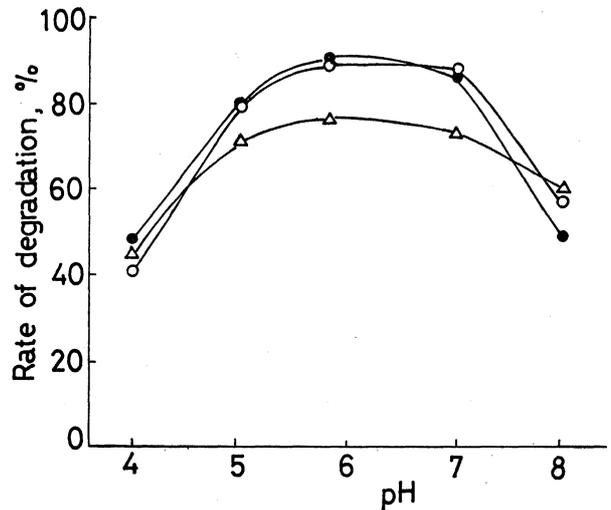
アミロース、アミロペクチンおよびデンプンの各基質について、酵素濃度と分解率との関係を調べた (第3図)。酵素濃度と分解率とは90%以下においても完全には直線性を示さなかったが、本実験ではアミロースを基質とした場合  $1.5\ \mu\text{g/ml}$ 、アミロペクチンおよびデンプンを基質とした場合  $2.5\ \mu\text{g/ml}$  のアミラーゼ溶液を使用することにした。

## 2. 脂肪酸および LAHPO のアミラーゼ活性に及ぼす影響

### (1) デンプンを基質とした場合

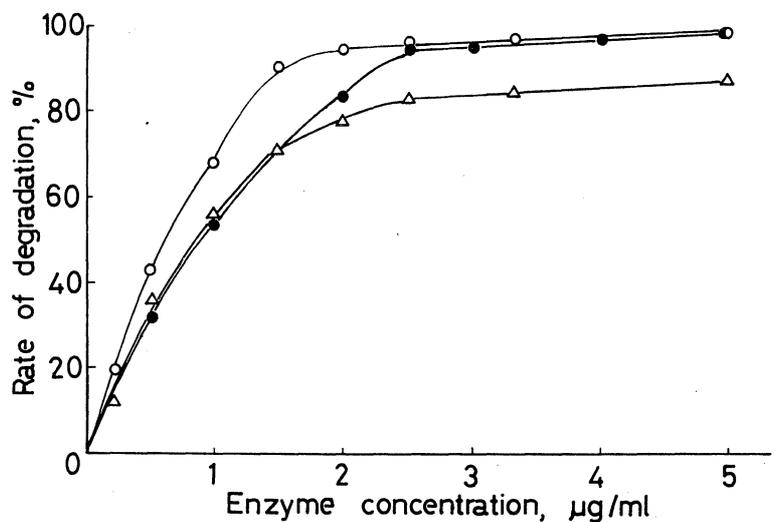
#### (a) 脂肪酸の濃度の影響

脂肪酸、LAHPO および大豆油の濃度を種々変えて、アミラーゼ活性を測定した (第4図)。横軸は反応液中における脂肪酸等の終濃度を対数目盛で示す。この図から明らかなように、炭素数4~8個の酪酸、カプロン酸、カプリル酸においては  $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$  でも阻害作用はほとんどみられなかったが、炭素数10個のカプリン酸、12個のラウリン酸、と炭素数の大きくなるほど阻害作用は大となり、炭



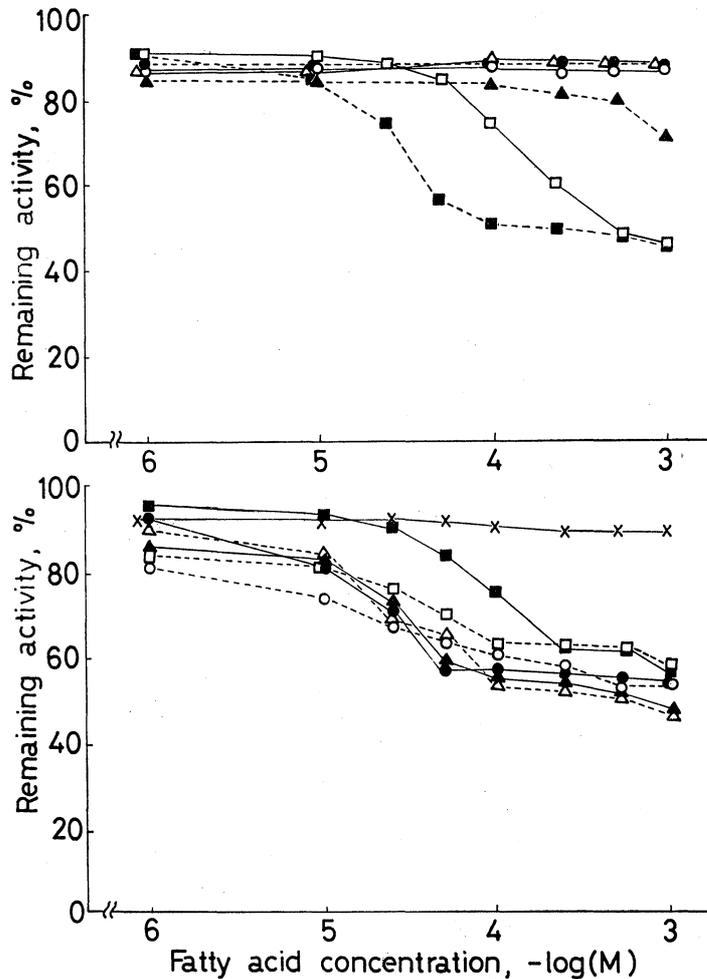
第2図  $\alpha$ -アミラーゼの至適 pH

基質：—○—アミロース，—△—アミロペクチン，  
—●—デンプン



第3図 酵素濃度と分解率との関係

基質：—○—アミロース，—△—アミロペクチン，—●—デンプン



第4図 脂肪酸の濃度とアミラーゼ活性との関係  
(基質: デンプン)

- |            |            |
|------------|------------|
| —○—酪酸,     | …●…カプロン酸,  |
| —△—カプリル酸,  | …▲…カプリン酸,  |
| —□—ラウリン酸,  | …■…ミリスチン酸, |
| …○…パルミチン酸, | —●—ステアリン酸, |
| …△…オレイン酸,  | —▲—リノール酸,  |
| …□…リノレン酸,  | —■—LAHPO,  |
| —×—大豆油     |            |

ては、酸性側の pH とくに pH 4.0 でアミラーゼ活性が著しく阻害された。

## (2) アミロースを基質とした場合

### (a) 脂肪酸の濃度の影響

脂肪酸、LAHPO および大豆油の濃度を種々変えて、アミラーゼ活性を測定した(第6図)。

大豆油および酪酸においては、アミラーゼ活性の阻害はほとんどみられなかった。しかし、炭素数6個のカプロン酸以上の脂肪酸においては炭素数の増加に伴って阻害作用は大となり、炭素数14個のミリスチン酸以上はほとんど変わらず  $1.0 \times 10^{-4}M$  でアミラーゼ活性はほぼ 100% 阻害された。LAHPO はラウリン酸と似た阻害曲線を示した。また、炭素数18個の脂肪酸の中で、二重結

素数14個のミリスチン酸以上はあまり変わらず、 $1.0 \times 10^{-3}M$  で約50%の阻害にとどまった。LAHPO は炭素数12個のラウリン酸とほぼ同様の阻害曲線を示した。また、大豆油による阻害はみられなかった。炭素数18個の脂肪酸の中で二重結合の数による阻害の差異はほとんどみられなかった。

### (b) pH の影響

終濃度  $1.0 \times 10^{-3}M$  の各脂肪酸、LAHPO または大豆油の存在下に、pH 4.0, 5.0, 5.8, 7.0 および 8.0 の緩衝液中でアミラーゼ活性を測定した。各 pH における対照(脂肪酸等を加えないもの)のアミラーゼ活性を100としたときの、脂肪酸等存在下の活性(比活性)を第5図に示す。大豆油および炭素数の少ない酪酸、カプロン酸およびカプリル酸においては、pH による影響はほとんどみられなかった。しかし、炭素数の多いカプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸および LAHPO におい

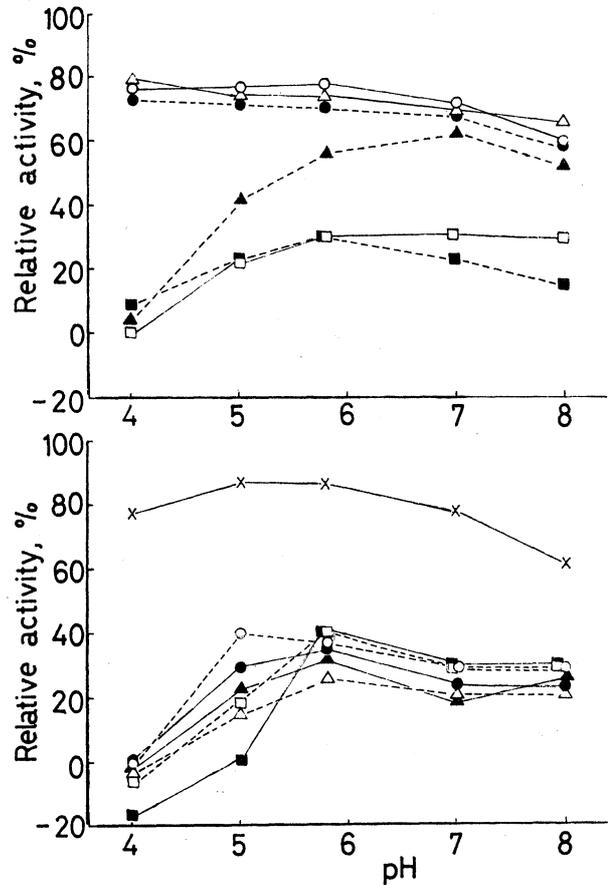
合の数による阻害の差違は、デンプンを基質とした場合と同じく、ほとんどみられなかった。

### (b) pH の影響

大豆油 (終濃度  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ )、酪酸 ( $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ )、カプロン酸 ( $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ )、カプリル酸 ( $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ )、カプリン酸 ( $4.0 \times 10^{-4} \text{M}$ )、ラウリン酸 ( $6.0 \times 10^{-5} \text{M}$ )、ミリスチン酸 ( $3.0 \times 10^{-5} \text{M}$ )、パルミチン酸 ( $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ )、ステアリン酸 ( $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ )、オレイン酸 ( $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$ )、リノール酸 ( $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ )、リノレン酸 ( $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$ )、または LAHPO ( $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ ) の存在下に pH 4.0, 5.0, 5.8, 7.0 および 8.0 の緩衝液中でアミラーゼ活性を測定した。各 pH における対照のアミラーゼ活性を 100 としたときの脂肪酸存在下の活性 (比活性) を第 7 図に示す。カプリル酸, カプリン酸, ラウリン酸, LAHPO および大豆油においては、酸性側の pH とくに pH 4.0 でアミラーゼ活性が著しく阻害された。しかし、これ以外の脂肪酸においては、pH による影響はそれほど顕著でなかった。

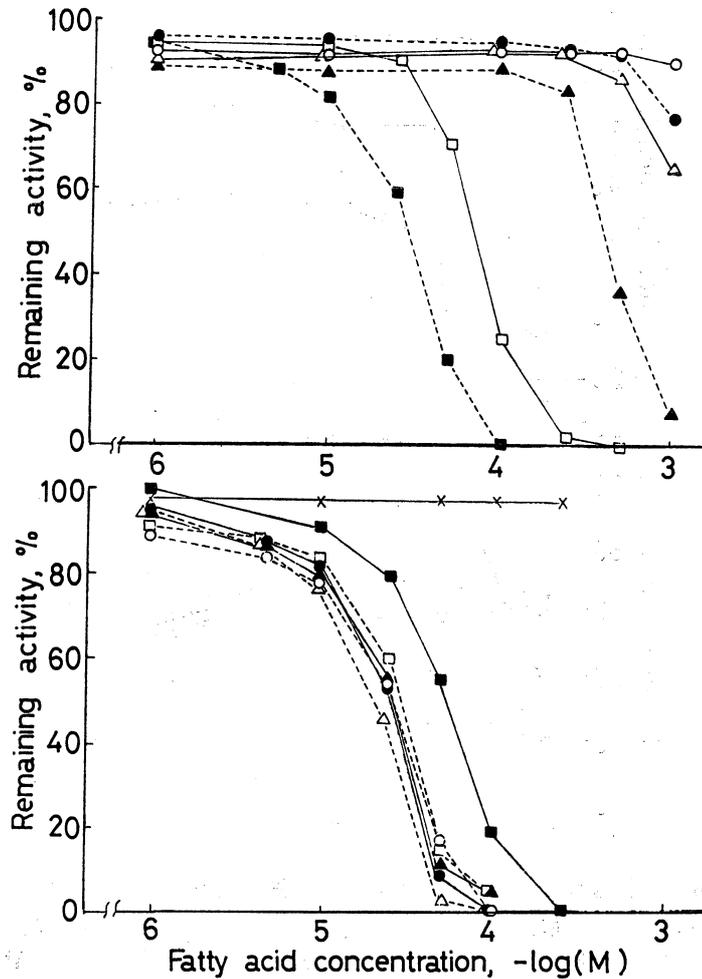
### (3) アミロペクチンを基質とした場合

デンプンあるいはアミロースを基質とした場合、脂肪酸によるアミラーゼ活性の阻害度を比較すると、明らかにアミロースを基質とした場合の方が阻害が大であった。デンプンは約 80% のアミロペクチンと約 20% のアミロースから成る。アミロースを基質とした場合の阻害が大きかったという実験事実から、デンプンを基質としたときの阻害はおもにアミロースによるもので、アミロペクチンを基質とした場合には阻害はみられないのではないかと推察した。そこでアミロペクチンを基質とした場合の阻害実験を行なった。脂肪酸として上記 (1), (2) の実験より代表的なカプリル酸, カプリン酸, ラウリン酸, リノール酸および LAHPO を選び、各脂肪酸および LAHPO の濃度を種々変えてアミラーゼ活性を測定した (第 8 図)。この図から明らかなように、カプリル酸, カプリン酸およびラウリン酸においてはほとんど阻害されなかったが、リノール酸においては  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  で少し阻害された。しかし、脂肪



第 5 図 pH とアミラーゼ活性との関係 (基質: デンプン)

- 酪酸, ...●...カプロン酸,
- △—カプリル酸, ...▲...カプリン酸,
- ラウリン酸, ...■...ミリスチン酸,
- ...○...パルミチン酸, —●—ステアリン酸,
- ...△...オレイン酸, —▲—リノール酸,
- ...□...リノレン酸, —■—LAHPO,
- ×—大豆油



第 6 図 脂肪酸の濃度とアミラーゼ活性との関係 (基質: アミロース)

—○—酪酸,            ...●...カプロン酸,   —△—カプリル酸,  
 ...▲...カプリン酸,   —□—ラウリン酸,   ...■...ミリスチン酸,  
 ...○...パルミチン酸, —●—ステアリン酸, ...△...オレイン酸,  
 —▲—リノール酸,   ...□...リノレン酸, —■—LAHPO,  
 —×—大豆油

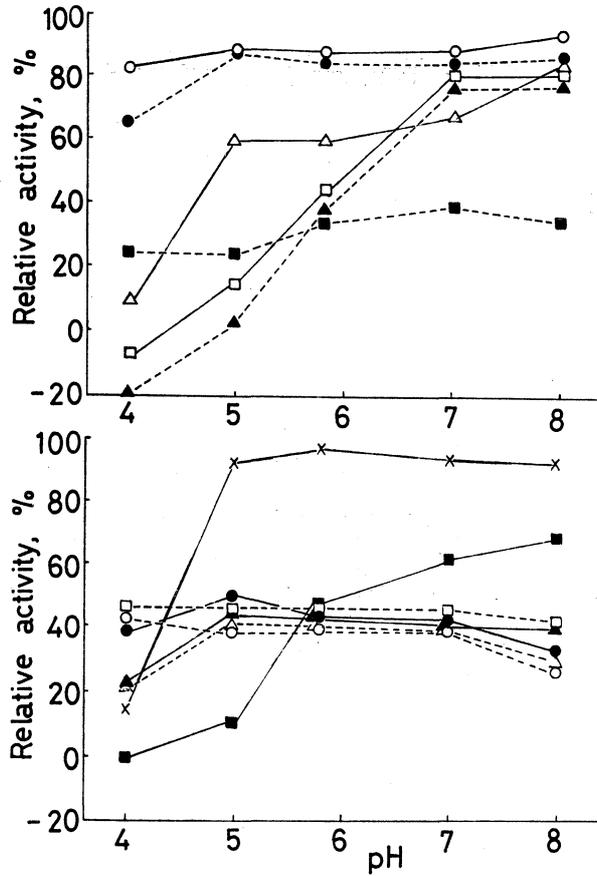
酸の場合と異なり LAHPO においては  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  で 100% 阻害された。

#### (4) 三基質間の比較

アミロース, アミロペクテンおよびデンプンを基質としたときの脂肪酸の濃度とアミラーゼ活性との関係を, 代表的な脂肪酸についてまとめて示すと第 9 図のようになる。脂肪酸においては, アミロースを基質としたとき最も阻害の程度が大きく, ついでデンプン, アミロペクテンの順であった。しかし, LAHPO においては, デンプンよりもアミロペクテンを基質としたときの方が阻害は大きかった。

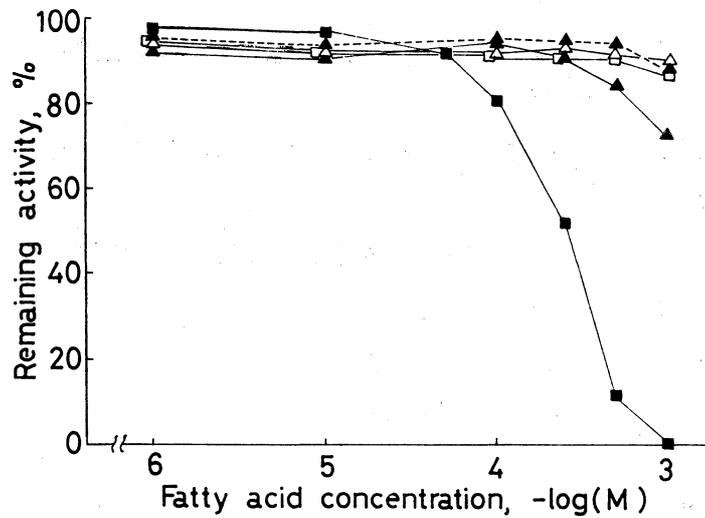
#### (5) 前処理時間の影響

阻害効果の大きいアミロースを基質として用い, 脂肪酸および LAHPO は酵素あるいは基質のいずれに作用することによって, アミラーゼ活性を阻害するのかについて調べた。脂肪酸 (0.1 ml)



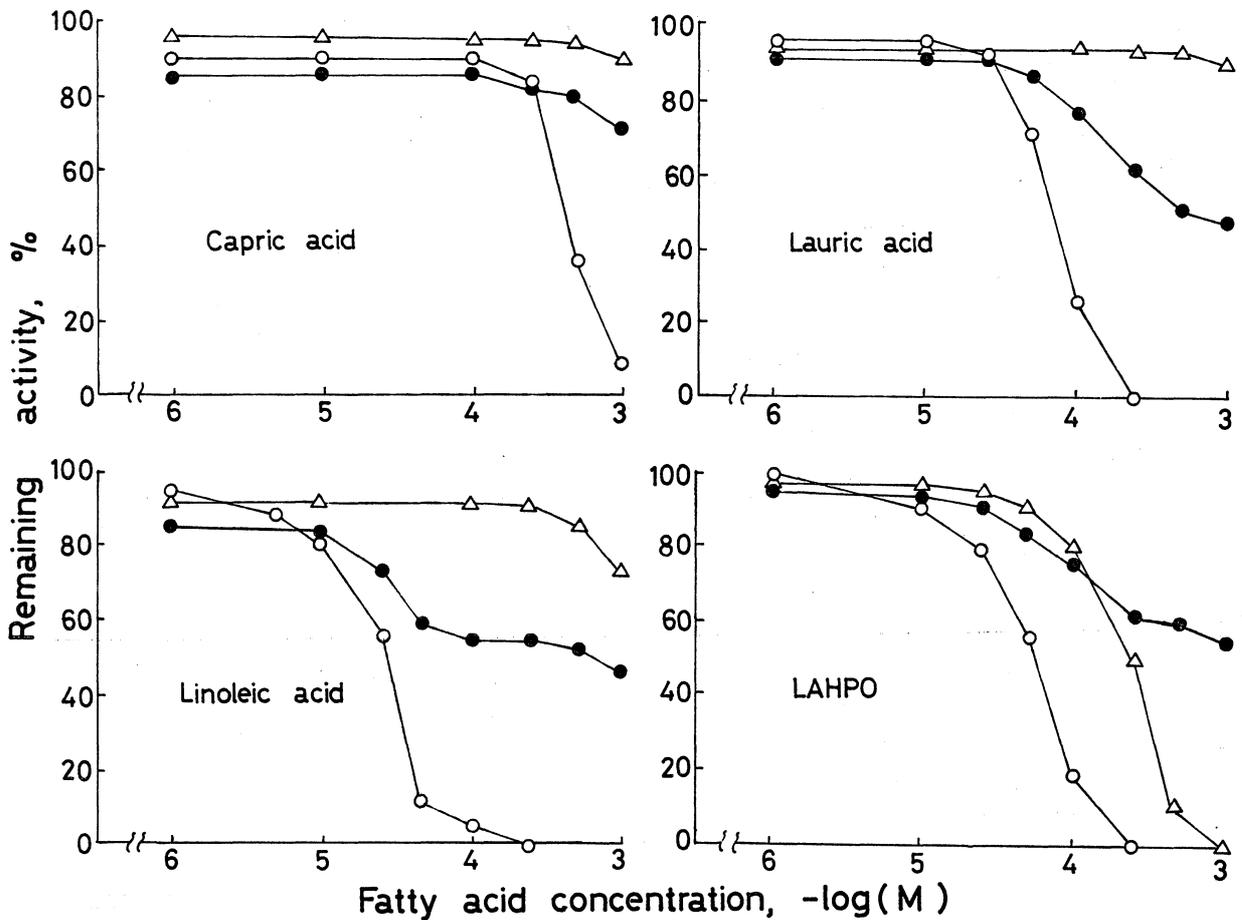
第 7 図 pH とアミラーゼ活性との関係 (基質: アミロース)

- 酪酸,                    ...●...カプロン酸,            —△—カプリル酸,
- ...▲...カプリン酸,        —□—ラウリン酸,            ...■...ミリスチン酸,
- ...○...パルミチン酸,      —●—ステアリン酸,        ...△...オレイン酸,
- ▲—リノール酸,        ...□...リノレン酸,        —■—LAHPO,
- ×—大豆油



第 8 図 脂肪酸の濃度とアミラーゼ活性との関係 (基質: アミロペクチン)

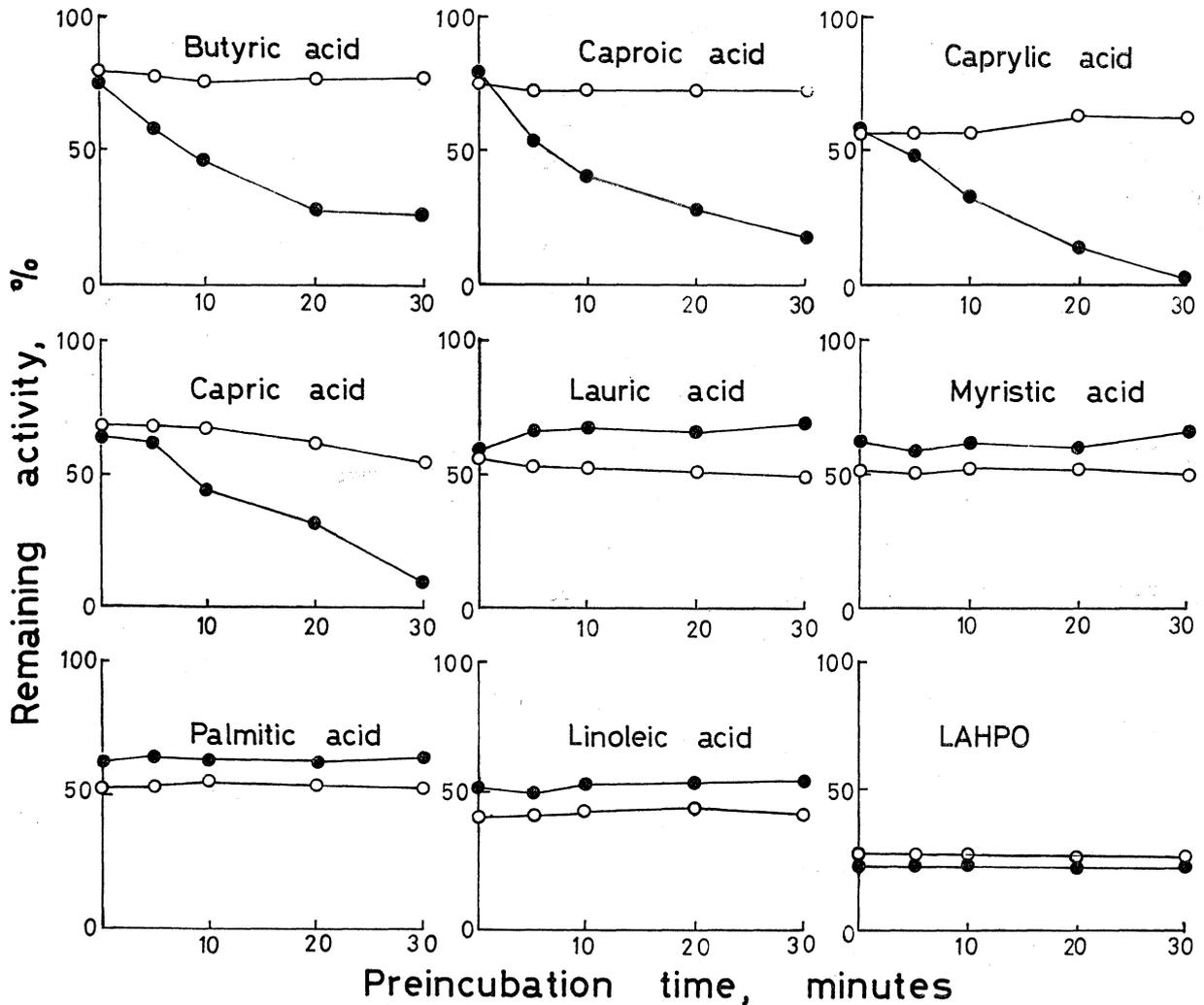
- △—カプリル酸,            ...▲...カプリン酸,            —□—ラウリン酸,
- ▲—リノール酸,        —■—LAHPO



第9図 脂肪酸の濃度とアミラーゼ活性との関係

基質：—○—アミロース，—△—アミロペクチン，—●—デンプン

と酵素 (0.1 ml) とを前処理 (preincubate) したのち基質 (0.9 ml) を加えた場合、および脂肪酸 (0.1 ml) と基質 (0.9 ml) とを前処理したのち酵素 (0.1 ml) を加えた場合の2つについて、前処理の時間を変えてアミラーゼ活性を測定した (第10図)。脂肪酸としては酪酸 (活性測定時における反応液中の終濃度  $1.0 \times 10^{-3} M$ )、カプロン酸 ( $1.0 \times 10^{-3} M$ )、カプリル酸 ( $1.0 \times 10^{-3} M$ )、カプリン酸 ( $4.0 \times 10^{-4} M$ )、ラウリン酸 ( $6.0 \times 10^{-5} M$ )、ミリスチン酸 ( $3.0 \times 10^{-5} M$ )、パルミチン酸 ( $2.5 \times 10^{-5} M$ )、リノール酸 ( $2.5 \times 10^{-5} M$ ) および LAHPO ( $5.0 \times 10^{-5} M$ ) を使用した。なお、脂肪酸と酵素との前処理時における脂肪酸の終濃度は上記濃度の 5.5 倍、脂肪酸と基質との前処理時における脂肪酸の終濃度は上記濃度の 1.1 倍となっている。酪酸、カプロン酸、カプリル酸およびカプリン酸においては前処理の時間、すなわち脂肪酸と酵素との接触時間が長くなるほどアミラーゼ活性は低下した。ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸および LAHPO においては、脂肪酸と基質あるいは脂肪酸と酵素とを前処理しても、前処理時間の長さによるアミラーゼ活性の低下はほとんどみられなかった。しかし、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸およびリノール酸においては、脂肪酸と酵素とを前処理したときの方が、脂肪酸と基質とを前処理したときよりもアミラーゼ活性が高かった。これは脂肪酸と基質とを前処理したときに空試験の吸光



第10図 前処理時間とアミラーゼ活性との関係

—○—脂肪酸とアミロースとを前処理したのち活性を測定  
 —●—脂肪酸と酵素とを前処理したのち活性を測定

度が低下したことによる。

#### (6) タンパク質添加の影響

上記の実験において酪酸、カプロン酸、カプリル酸あるいはカプリン酸と酵素とを前処理すると時間の経過につれてアミラーゼ活性は低下することが判明した。これは脂肪酸が酵素タンパク質を変性させたためと考えられる。これらの脂肪酸だけでなく、ほかの脂肪酸あるいは LAHPO も酵

第1表 タンパク質添加の影響

	残 存 活 性 (%)				
	カプリル酸	カプリン酸	ラウリン酸	リノール酸	LAHPO
対 照	100	100	100	100	100
+ 脂 肪 酸	56	49	39	47	32
+ 脂肪酸+タンパク質	70	65	45	50	72

素に何らかの影響を与えているのではないかと考えた。そこで、タンパク質として卵アルブミンを反応液中に加えた場合にアミラーゼ活性がいかなる影響を受けるかをみた。基質混合液 0.8 ml に 1.1 % 卵アルブミン溶液 0.1 ml を加えて、ほかの条件はアミロースを基質とした場合のアミラーゼ活性測定法と同一にした。使用した脂肪酸はカプリル酸 (終濃度  $1.0 \times 10^{-3} M$ )、カプリン酸 ( $4.0 \times 10^{-4} M$ )、ラウリン酸 ( $6.0 \times 10^{-5} M$ )、リノール酸 ( $2.5 \times 10^{-5} M$ ) および LAHPO ( $5.0 \times 10^{-5} M$ ) である。その結果を第 1 表に示す。卵アルブミンを添加することにより LAHPO においては 40 %、カプリル酸およびカプリン酸においては約 15 %、ラウリン酸およびリノール酸においては数 %、アミラーゼ活性の障害が軽減された。

## 考 察

種々の酵素活性が遊離の脂肪酸により阻害される<sup>13-22)</sup>ことから、これを代謝調節 (とくに解糖と糖質新生) と関連づけた報告もある<sup>14)22)</sup>。しかし、遊離の脂肪酸による酵素活性の阻害は非特異的で、脂肪酸塩の界面活性剤としての性質と関係があるという報告もある<sup>16)20)21)</sup>。遊離の脂肪酸によるアミラーゼ活性の阻害実験の結果にはさらに複雑さが加わる。というのは、脂肪酸はアミロースと複合体を作るからである。すなわち、高岡らは各種脂肪酸のアミロース沈でん効率を検討した結果、カプリル酸およびカプリン酸が最もよいことを認め、また脂肪酸と結合しないアミロペクチンはアミラーゼで分解されることを報告している<sup>28)</sup>。

事実、本研究においてもアミロペクチンを基質とした場合には、脂肪酸によるアミラーゼ活性の阻害はあまりみられず、アミロペクチンはアミラーゼで分解された。高岡らの実験条件と異なっているのは、もしアミロース-脂肪酸複合体の生成のみによってアミラーゼ活性が阻害されると考えれば、カプリル酸およびカプリン酸において最も阻害作用が大きくならねばならない。しかし、本実験でアミロースを基質とした場合には、脂肪酸の炭素数の増加に伴ってアミラーゼ活性の阻害は大きくなった。なお、pH の影響の実験において pH 4.0 で、とくにカプリル酸、カプリン酸およびラウリン酸存在下の呈色液に混濁が生じてアミラーゼ活性が低下したのは、おそらく多量のアミロース-脂肪酸複合体の生成によるものであろう。また、本実験においてはヨウ素法によってアミラーゼ活性を測定しているので、アミロースが脂肪酸と複合体を作るとヨウ素分子との間に拮抗作用が起こり、呈色にも影響が現われる。一方、脂肪酸 (酪酸、カプロン酸、カプリル酸およびカプリン酸) と酵素 (アミラーゼ) との前処理によって酵素は失活したが、この失活はタンパク質 (卵アルブミン) の添加によって若干防止できた。いずれにせよ、脂肪酸は主としてアミロースと複合体を作り、一部分は酵素を変性させることにより活性を阻害するものと考えられる。溶性デンプンを基質とした場合、脂肪酸存在下のアミラーゼ活性が約 50 % 止まりとなっているのは、これに含まれるアミロペクチンのみが分解されたためと考えられる。したがって、脂肪酸の種類、濃度および酵素の濃度等の条件を設定することによって、デンプン中のアミロースおよびアミロペクチン含量の酵素による分別定量が可能とならう。

LAHPO により SH 酵素<sup>6)</sup>, チトクローム C<sup>10)</sup> およびリボヌクレアーゼなど<sup>13)</sup> の酵素タンパク質は不活性化されることが知られている。この油脂過酸化物とタンパク質との反応によるタンパク質の変性は、ラジカル付加反応によるものと考えられている<sup>29)</sup>。また、この反応によってできる付加化合物の結合は主として過酸化物による結合 (peroxy bonds) で、残りはエーテル結合ないし炭素-炭素結合らしい<sup>11)</sup>。松下らはリボヌクレアーゼ, トリプシン, キモトリプシンおよびペプシンの LAHPO およびリノール酸による阻害実験より, LAHPO と酵素との反応は, 過酸化物基のアミノ酸残基との反応のみならず, 疎水化合物としてのタンパク質への結合をも考慮すべきだろうと報告している<sup>13)</sup>。

本研究により, LAHPO はアミロース, アミロペクチンおよびデンプンのいずれを基質とした場合にも枯草菌の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害することが判明した。LAHPO が酵素タンパク質のみに影響を及ぼすのであれば基質の種類には無関係のはずであるが, 実際には基質の種類によりその阻害の程度は異なっていた。このことから, LAHPO は酵素を不活性化するのみならず, 基質 (とくにアミロースおよびアミロペクチン) にも何らかの影響を及ぼしているのではなかろうか, あるいはデンプンには酵素の失活を防止する効果があるとも考えられる。

## 要 約

$\alpha$ -アミラーゼ活性は遊離の脂肪酸およびリノール酸ヒドロペーオキシドにより阻害される。この阻害は濃度に依存し, 長鎖の脂肪酸ほど低濃度で阻害する。

脂肪酸による酵素活性の阻害は, 主としてアミロース-脂肪酸複合体の生成によるもので, 一部分は脂肪酸による酵素タンパク質の変性も考えられる。

一方, リノール酸ヒドロペーオキシドによる酵素活性の阻害は, 主として酵素タンパク質の不活性化によるもので, 一部分は基質との反応も推定される。

実験の一部を担当された卒業論文学生の上菌久子, 佐伯伸子両嬢に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 松下雪郎: 化学と生物, **7**, 132(1969).
- 2) R. T. Holman: *Arch. Biochem. Biophys.*, **26**, 85(1950).
- 3) A. L. Tappel: *ibid.*, **50**, 473(1954).
- 4) A. S. Csallany and H. H. Drapper: *ibid.*, **100**, 335(1967).
- 5) W. T. Roubal and A. L. Tappel: *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 402(1967).
- 6) C. Little and P. J. O'Brien: *Biochem. J.*, **106**, 419(1968).
- 7) 新田ゆき, 松下雪郎: 栄養と食糧, **22**, 506(1969).
- 8) A. Ottolenghi, F. Benheim, and K. M. Wilbur: *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 157(1955).
- 9) A. L. Tappel and H. Zalkin: *ibid.*, **80**, 326(1959).
- 10) R. C. McKnight and F. E. Hunter: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2757(1966).
- 11) I. D. Desai and A. L. Tappel: *J. Lipid Res.*, **4**, 204(1963).
- 12) W. T. Roubal and A. L. Tappel: *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 5(1966).
- 13) S. Matsushita, M. Kobayashi, and Y. Nitta: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 817(1970).

- 14) G. Weber, M. A. Lee, H. J. H. Concery, and N. B. Stamm: *Adv. Enzyme Regulat.*, **5**, 257(1967).
- 15) H. M. Korchak and E. J. Masoro: *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 753(1964).
- 16) I. Eger-Neufeldt, A. Teinzer, L. Weiss, and O. Wieland: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**, 43(1965).
- 17) T. O. Henderson and J. J. McNeill: *ibid.*, **25**, 662(1966).
- 18) J. Ferdinandus and J. B. Clark: *J. Bacteriol.*, **98**, 1109(1969).
- 19) J. D. Robinson, R. O. Brady and R. M. Bradley: *J. Lipid Res.*, **4**, 144(1963).
- 20) S. V. Pande and J. F. Mead: *J. Biol. Chem.*, **243**, 6180(1968).
- 21) P. A. Srera: *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 445(1965).
- 22) M. A. Lea and G. Weber: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1096(1968).
- 23) A. Banks, S. Fazakerley, J. N. Keay, and J. G. M. Smith: *Nature*, **184**, 816(1959).
- 24) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之編: 食品分析ハンドブック, 建帛社, 1969, p. 151.
- 25) 齊藤正行, 北村元仕, 丹羽正治編: 臨床化学分析IV, 東京化学同人, 1970, p. 26.
- 26) 齊藤, 北村, 丹羽編: 同上, p. 28.
- 27) 日本化学会編: 実験化学講座, **24**, 丸善, 1966, p. 293.
- 28) 高岡研一, 二国二郎: 農化, **26**, 186(1952).
- 29) K. S. Ambe, U. S. Kumta, and A. L. Tappel: *Radiation Res.*, **15**, 709(1961).

### Summary

The  $\alpha$ -amylase activity is inhibited by free fatty acids and by linoleic acid hydroperoxides as well. This inhibition depends on their concentrations. The longer chain fatty acids are more effective at low concentrations than the shorter ones.

The inhibition of the enzyme activity by fatty acids may be mainly due to the formation of amylose-fatty acid complexes and partly due to the denaturation of the enzyme.

On the other hand, the inhibition of the enzyme activity by linoleic acid hydroperoxides may be largely caused by the inactivation of the enzyme and partly be caused by the reaction between the hydroperoxides and the substrates.