

生食野菜類のアミラーゼ活性

Investigation of amylase activity in fresh vegetables

加藤 陽治*・照井 誉子**・羽賀 敏雄*・

小山 セイ*・日景 弥生*・盛 玲子*

Yoji KATO, Takako TERUI, Toshio HAGA,

Sei OYAMA, Yayoi HIKAGE and Reiko MORI

(1993.1.22受理)

要 旨

植物性食品の中から、日常の食生活で生食する機会の多い野菜9種とヤマイモの計10品種を選び、それらに含まれるアミラーゼ(デンプン分解酵素)活性をヨード呈色法を用いて調べた。酵素量は生重量100gあたりで比較すると、ヤマイモ>カブ>ダイコン>ニンジン>キャベツ>パセリ>ネギ>レタス>キュウリの順で、トマトには検出されなかった。ヤマイモおよびキャベツ生重量100gあたりの酵素活性は、それぞれヒト唾液約3.4mlおよび約0.4ml中のアミラーゼ活性に相当した。

デンプン消化実験の酵素源としてヒト唾液アミラーゼが広く使用されているが、これと同時に、生食するヤマイモ、カブ、ダイコン、ニンジンあるいはキャベツなどを酵素源に用いることにより、デンプン消化に関する実験授業内容をさらに深めることができると考えた。

1. 緒 言

酵素は、酸化・還元、加水分解、転移、脱炭酸、脱水・加水、異性化など、多様な反応を触媒し、われわれの身体の中で重要な働きをしているばかりでなく、われわれの生活を支えるための生産技術に、多方面に渡って昔より利用されている。さらに、現在では、身近な日用品にまで、いろいろな酵素製品が入り込んでいる。胃腸薬、消化剤はもちろんのこと、酵素入り洗剤、酵素入り歯磨きまでさまざまなものがあり、微生物由来の加水分解酵素が使用されている。また、衣・食・住生活において見かける諸現象のなかには種々の酵素作用で説明できるものも少なくない。食物領域に限ってみても、食物の消化と吸収あるいは生鮮食品の貯蔵、加工および調理時における種々の成分変化などを挙げるができる。

一方、デンプンは身近で馴染みの深い物質であり、小学校ではヨウ素による呈色を利用してデンプンの検出反応、中学校では食物中のデンプンの消化と唾液アミラーゼによる加水分解反応¹⁾が扱われている。

今回は、日常の食生活で生食する機会の多い植物性食品10品種を選び、アミラーゼ活性を調べ、唾液アミラーゼと比較しながら、デンプン消化実験の一助としての「生食野菜類のアミラーゼ」の教材化の可能性を検討した。

* 弘前大学教育学部家政学科教室 Department of Home Economics, Faculty of Education, Hirosaki University

** 現在 岩手県水沢市立水沢中学校 Mizusawa Junior High School, Mizusawa

2. 実験方法

1) 実験材料

キュウリ、ニンジン、パセリ、ネギ、カブ、ダイコン、レタス、キャベツ、トマトおよびヤマモは、すべて弘前市内のスーパーマーケットより購入した。

2) 酵素液の調製

各野菜の可食部を適当量（生重量34.5～263.0g）とり、これを包丁で細かく切り刻み20mm酢酸緩衝液（pH 5.5）（100～300ml）とともに、ミキサーで磨砕した。磨砕物を三枚重ねのガーゼで濾過し、濾液を得、図1に示す方法で、同一試料について三種類の酵素液、A、BおよびCを調製した。

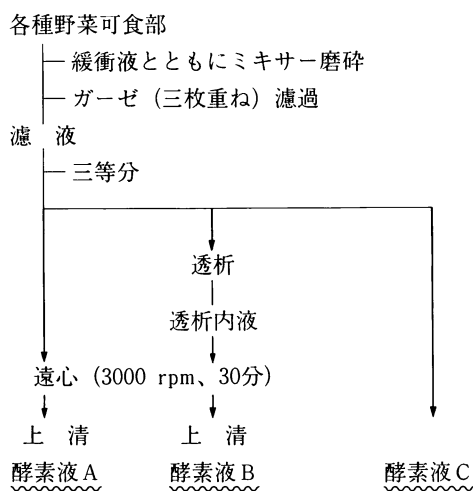


図1 各種野菜可食部からの酵素液の調製法

ヒト唾液5.0mlを20mlの20mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）とともにスターラーで緩やかに攪拌し、東洋濾紙No.2で濾過した。濾液をさらに同緩衝液で1250mlに希釈した。唾液は、口の中を水できれいに洗い、舌尖に酢を湿らした濾紙をつけ口腔内に分泌させたものを使用した。

3) 酵素液中の夾雑物質がデンプン・ヨウ素複合体形成におよぼす影響

《試薬の調製》 試薬A（デンプン溶液）：可溶性デンプン（和光純薬・一級）を、20mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）に濃度0.05%になるように溶解した。試薬B（0.01% I_2 -0.1% KI 溶液）：1M塩酸（和光純薬・特級）にヨウ化カリウム（KI, 和光純薬・特級）を0.1%になるように溶解した後、ヨウ素（ I_2 , 和光純薬・特級）を0.01%になるように溶解した。1Mの塩酸を用いているのは、酵素反応の停止とヨウ素液の添加を同時に行うためである。

《反応》 試薬A 2.0mlに試薬B 0.25mlを加えた。これに酵素液A（図1参照）を含む20mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）0.25ml（酵素液A 0ml, 0.05ml, 0.10ml, 0.15ml, 0.20mlおよび0.25mlそれぞれに緩衝液を最終容量0.25mlになるように加えた六種）を加え、よく混合後、蒸留水3.0mlで希釈した。室温に10分間放置後、620nmで吸光度を測定した。酵素液のかわりに緩衝

液を加えた時の呈色率を100%として、それぞれの酵素濃度における呈色率を求めた。また、透析遠心により得られた酵素液 B（図 1 参照）0.25ml について同様に呈色率を求めた。

4) 酵素活性測定

《試薬》 3)の試薬 A および B を使用した。

《反応》 試薬 A 2.0ml を 30℃ に保ち、酵素液 B 0.25ml を加え反応を開始させた。正確に 10 分、20 分、および 30 分後に、試薬 B 0.25ml を加えてよく混ぜた。これに、3.0ml の蒸留水を加えて混合し、620nm での吸光度を測定した。反応 0 分の場合は、同容量の試薬 A に、試薬 B、酵素液 B および蒸留水を順に加え、吸光度を測定した²⁾。

《酵素量の算出》 先ず反応 10 分の吸光度の値と酵素反応開始前（0 分）の吸光度の値から 10 分当りの呈色減少率 $A = \{(D - D') / D\} \times 100$ (D =反応 0 分の吸光度、 D' =反応 10 分の吸光度)] を算出した。10 分当り 10% 減少させる酵素量を 1 単位とし、酵素液 B 1 ml 当りの酵素量 [単位数 $X = (A/10) / 0.25$] を求めた。

5) 反応分解物の分析

試薬 A 2.0ml に酵素液 B 0.25ml を加え、防腐剤として数滴のトルエンを添加し、30℃ で、20 時間反応させた。反応終了後、10 分間沸騰湯浴中で処理し酵素を失活させた。反応液中の全糖量と還元糖量を、それぞれフェノール・硫酸法³⁾ およびネルソン・ソモギー法^{4,5)} で、グルコース相当量として算出し、分解率を、還元糖量/全糖量 (%) で求めた。

分解率を求めた残液を Amberlite IR-120 (H^+ 型) で脱塩、濾過し、濾液を濃縮した。これを東洋濾紙 No.50 (20×20cm) の下端 1.5cm のところにスポットし、65% n-プロパノールで展開（上昇法、二回）した。風乾後、アルカリ性硝酸銀試薬⁶⁾ で糖を発色した。標準糖として、グルコースおよびデンプン分解物（商品名グリスター、マルトオリゴ糖から成る）を用いた。

6) 呈色反応の観察

デンプン溶液（0.05%，バレイショデンプン（和光純薬製）50mg を 100ml の水に加熱溶解）2.0ml に酵素液 C（ヤマイモ、ニンジン、キャベツ、ダイコンおよびカブから調製したもの）1.0ml を加え、30℃ で、5 分、10 分、15 分および 30 分反応させ、ヨウ素試薬（0.1% I_2 -1.0% KI, 1M 塩酸にヨウ化カリウムを 1.0% になるように溶解した後、ヨウ素を 0.1% になるように溶解）0.25ml を加え、蒸留水 4.0ml で希釈した溶液の色調を観察した。反応 0 分は、同容量のデンプン溶液に、ヨウ素試薬、酵素液 C および蒸留水を、順に加えた後、色調を観察した。尚、ダイコンの場合は、ヨウ素試薬 0.50ml 添加の系でも行った。

3. 結果および考察

1) 主要生食野菜のアミラーゼ活性

デンプンはヨウ素と複合体を形成して青色を呈するが、アミラーゼによってデンプンが分解されていくに従いこの複合体（青色）の生成量が減少する。ここで用いる活性測定法はこの原理を利用したものであるが、調製したデンプン試薬（試薬 A）およびヨウ素試薬（試薬 B）が、複合体形成にあたり定量性があるか否かを検討した。図 2 に示すようにデンプン量の減少と共に吸光度がほぼ直線的に減少し、その定量性が確認された。

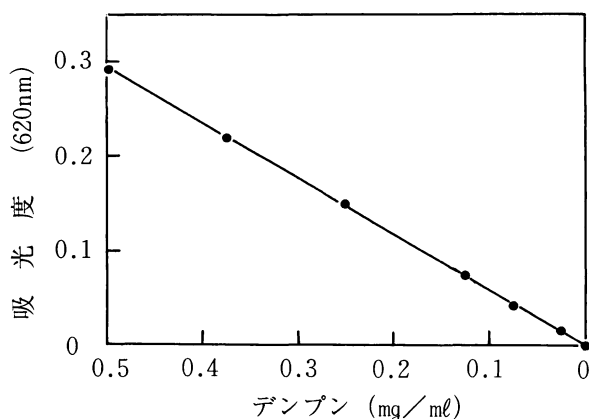


図2 ヨウ素・デンプン反応の定量性

デンプン溶液 (0~0.5mg/ml 20mM 酢酸緩衝液、pH 5.5、試薬 A を適宜希釈したもの) 2.0ml と 0.25ml の同緩衝液を混ぜ、これにヨウ素試薬 (0.01% I_2 - 0.1% KI/1M 塩酸) 0.25ml を加え攪拌した。これを蒸留水 3.0ml で希釈後、波長 620nm で吸光度を測定した。

野菜磨碎物の可溶性画分 (酵素液 A, 図 1 参照) には目的とする酵素であるアミラーゼ以外にも数多くの物質が含まれている。そこで先ず、夾雑物質がデンプン・ヨウ素複合体形成 (ヨウ素呈色反応) におよぼす影響を調べた。表 1 に見られるように、ダイコンの場合、酵素液量の増加とともに著しく呈色率が低くなった。このことは、ダイコン汁にはヨウ素・デンプン複合体形成 (呈色) を阻害する物質が含まれていることを示している。ダイコン汁の呈色阻害物質の除去方法を検討した結果、透析操作が有効であること (詳細は次項で述べる) が判明した。

表1 酵素液中の夾雑物質がデンプン・ヨウ素複合体形成におよぼす影響

野 菜	呈 色 率 (%)						
	酵素液 (緩衝液磨砕遠心上清画分) ¹⁾						透析酵素液 ²⁾
	0 ml	0.05ml	0.10ml	0.15ml	0.20ml	0.25ml	0.25ml
キュウリ	100	100.6	97.9	94.3	93.7	92.5	100
ニンジン	100	100.3	102.4	108.1	108.4	111.3	118.8
パセリ	100	94.6	92.8	86.6	85.4	83.6	107.2
ネギ	100	95.2	91.9	90.7	86.6	87.5	96.4
カブ	100	98.2	97.6	96.1	95.5	93.4	104.3
ダイコン	100	85.1	48.1	28.1	11.9	5.4	91.0
レタス	100	99.1	101.2	100.3	102.1	107.2	108.7
キャベツ	100	98.2	94.0	96.1	94.9	96.4	103.2
トマト	100	106.3	102.4	100	99.7	98.5	90.3
ヤマモ	100	101.5	98.5	97.3	96.4	93.7	90.3

1) 酵素液 A 2) 酵素液 B

即ち、透析後の酵素液0.25ml（酵素液B、図1参照）と透析前の酵素液A 0.25mlの呈色率を比較すると、それぞれ91.0%と5.4%で、明らかに阻害物質がほとんど除去されていることがわかる。

各野菜の緩衝液磨砕物可溶性画分の透析・遠心後の酵素液Bを用いてアミラーゼ活性を調べた（図3、キャベツ酵素液使用時の測定例）。全部の野菜について酵素量（単位）を求め、ま

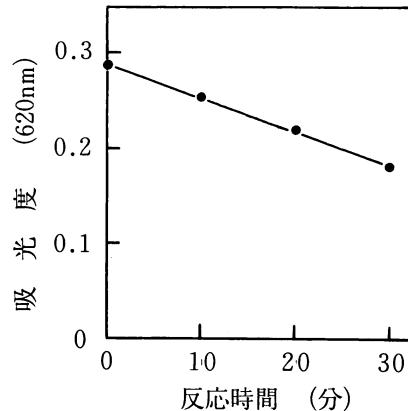


図3 キャベツ酵素液Bによるデンプン分解の経時的変化

とめたものが表2である。100g生重量当りの活性はヤマイモ>カブ>ダイコン>ニンジン>キャベツ>パセリ>ネギ>レタス>キュウリの順で、トマトには検出されなかった。ヤマイモあるいはキャベツ生重量100gあたりの活性は、それぞれヒト唾液約3.4mlと約0.4ml中のアミラーゼ活性（但し、pH 5.5で測定した場合）に相当した。

表2 ヒト唾液および主要生食野菜中のアミラーゼ活性

材 料	生 重 量 (g)	酵素液量 ¹⁾ (ml)	単位/ml	総単位	単位/100g生重量
キュウリ	92.67	205	0.77	157.88	170.37
ニンジン	109.37	248	5.43	1346.79	1231.41
パセリ	34.50	135	1.17	157.95	457.83
ネギ	210.29	629	1.05	660.45	314.07
カブ	109.05	220	25.74	5662.80	5192.85
ダイコン	82.60	159	21.43	3407.14	4124.87
レタス	112.35	210	1.02	214.20	190.65
キャベツ	262.99	517	4.80	2482.29	943.87
トマト	152.24	226	— ²⁾		
ヤマイモ	88.06	360	18.72	6739.20	7652.96
ヒト唾液	5.0(ml)	1250	8.92	11150	2230/唾液 1 ml

1) 酵素液量の値は図1で調製した酵素液Bの量を3倍した値。

2) 用いた方法では検出されなかった。

これらの酵素によるデンプン分解物の分析を行った。20時間反応物の分解率（グルコース相当量の還元糖量/全糖量）は、キュウリ，ニンジン，パセリ，ネギ，カブ，ダイコン，レタス，キャベツ，トマトおよびヤマイモで，それぞれ2.7%，18.8%，9.8%，1.8%，44.8%，28.3%，4.8%，44.0%，0%および44.5%であった。また，分解物中の構成糖をペーパークロマトグラフィーで調べたのが図4である。分解率が45%前後の値を示しているヤマイモ，カブおよびキャベツの主要生成物は，グルコース（G），マルトース（麦芽糖， M_2 ）およびマルトトリオース（ M_3 ）であり，分解率の結果を支持した。

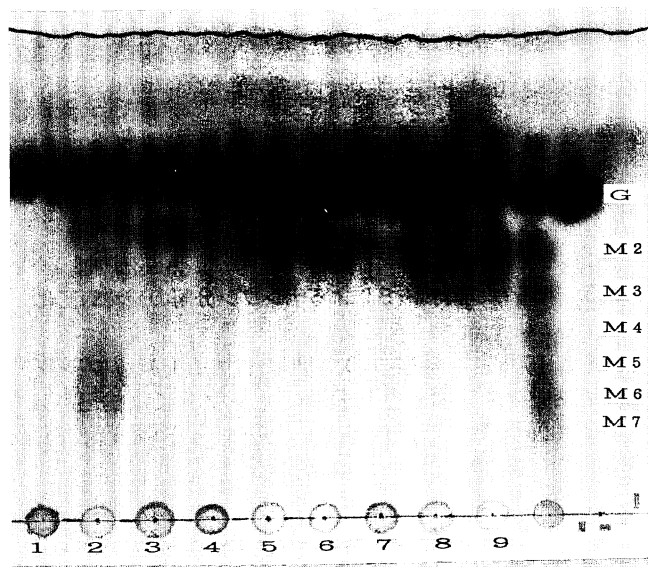


図4 各種野菜アミラーゼによるデンプン分解物の分析

20時間反応物のペーパークロマトグラム。1: キュウリ，2: ニンジン，3: パセリ，4: ネギ，5: カブ，6: ダイコン，7: レタス，8: キャベツ，9: ヤマイモ。Gおよび $M_2 \sim M_7$ は，それぞれ標準糖，グルコースとマルトオリゴ糖類。

以上の結果より，今回使用したトマト以外の野菜には，その存在量にかなりの差が見られるもののアミラーゼが含まれていることが確認された。

2) ダイコン磨碎物中のアミラーゼ分布

ダイコンの葉がついている方を上部，根端に近い方を下部とし，上，中および下部ごとに酵素溶液がデンプン・ヨウ素複合体形成におよぼす影響について，三種の方法で調べた（表3）。ダイコンにはヨウ素呈色反応を阻害する物質が含まれており，しかもそれは下部組織ほど多いことが判った。また，この物質は，酵素液の加熱失活（方法③）でも残存することから熱に安定な物質であることが判った。

表3 ダイコン各部位より調製した酵素液がデンブ・ヨウ素複合体形成におよぼす影響

ダイコンの上、中および下部（葉のついてる方を上部、根端に近い方を下部とした）から、それぞれ約25gをとり同量の20mM 酢酸緩衝液とともに磨砕、磨砕物を遠心分離操作し、その上清を酵素液として次の三種の方法で発色率を調べた。

方法①：試薬A 2.0mlを30℃で保温し、これに酵素液0.25ml、試薬B 0.25ml、蒸留水3.0mlを順に加え、波長620nmで吸光度を測定。方法②：酵素液0.25mlに、試薬B 0.25ml、試薬A 2.0ml、蒸留水3.0mlを順に加え、吸光度測定。方法③：酵素液0.25mlを沸騰湯浴中で10分加熱失活後、試薬B 0.25ml、試薬A 2.0ml、蒸留水3.0mlを順に加え、吸光度を測定。

酵素液のかわりに緩衝液0.25mlを用いた時の呈色率を100%として、それぞれの方法での呈色率を算出した。

ダイコン 部 位	呈 色 率 (阻 害 率) %		
	方法①	方法②	方法③
上 部	80.0(20.0)	79.8(20.2)	85.6(14.4)
中 部	73.6(26.4)	63.9(36.1)	77.0(23.0)
下 部	48.6(51.4)	37.7(62.3)	40.1(59.9)

そこで、つぎに酵素液を4℃で24時間20mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）に対して透析を行い、その透析内液を酵素液として、方法②で吸光度を測定した。ダイコン上部由来の酵素液では、呈色阻害率が6.3%、ダイコン下部由来の酵素液でのそれは10.6%であり、透析が阻害物質除去方法に有効であることが判った。

ダイコン磨砕物を透析に供しヨウ素呈色反応阻害物質を除去した後、遠心分離操作により可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれのアミラーゼ活性分布を調べた（表4）。簡単な磨砕操作では、総活性の約80%が、可溶化することが判った。

表4 ダイコン磨砕物中のアミラーゼ分布

ダイコンの上部および下部それぞれ約25gを、20mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）とともに磨砕し、同緩衝液に対し、24時間、4℃で透析した。透析内液を遠心分離し、沈澱と上清に分けた。沈澱は同緩衝液で洗浄し、洗液を先の遠心上清に加え可溶性画分とした。洗浄済み沈澱は緩衝液に懸濁して、不溶性画分とした。

ダイコン 部 位	アミラーゼ活性分布 (%)		
	可溶性画分	不溶性画分	合 計
上 部	79	21	100
下 部	81	19	100

3) 呈色反応の観察

単位重量当りのアミラーゼ活性が強いヤマモ、カブ、ダイコン、ニンジンおよびキャベツの搾り汁（酵素液C，図1参照）を酵素源として，また，身近なデンプンとしてバレイショデンプンを用いて加水分解時間ごとのヨウ素試薬による呈色反応を調べた。この時のヨウ素試薬は，上述実験で用いた試薬より10倍濃い0.1% I_2 -1.0% KI のものを使用した。

ヤマモの場合はヨウ素試薬添加により糸状の不溶物が形成された。これは酵素液中の粘質物によるものと考えられる。また，ニンジンとキャベツの場合の色調観察に，それぞれ汁の赤橙色と黄緑色による影響が見られた。ダイコンの場合，はじめ色調変化が観察できたが，室温放置とともに退色がみられた。この問題は，ヨウ素試薬0.50mlの添加により解消された。カブは何の影響もなく表5に示すように，加水分解時間の増加に伴う色調変化が明確に観察された。

表5 カブしぼり汁を使用したジャガイモデンプンの加水分解時間ごとのヨウ素試薬による呈色

0.05%バレイショデンプン溶液（2.0ml）に，酵素液C1.0mlを加え，30℃で反応。反応後，ヨウ素試薬（0.1% I_2 -1.0% KI）0.25mlを加え，水4.0mlで希釈した。

時間(分)	0	5	10	15	30
呈 色	青 ¹⁾	青紫	紫	赤紫	赤褐

1) ヨウ素試薬を加えることにより，青色の不溶性の複合体を形成。

さらに，ヤマモ，キャベツおよびニンジンのいずれの場合でも，搾り汁の遠心上清画分（酵素液A）を用いると影響を最小限にとどめることができた。

4. 総 合 考 察

デンプンは，グルコースの重合体で，直鎖状のアミロースと分枝状のアミロペクチンからできている。アミロースおよびアミロペクチンの外側の鎖状部は，ヨウ素イオン（ I_3^- ）があるとラセン構造をとり，複合体を形成し呈色する。アミロース鎖は青色を呈するが，呈色の強さは鎖の長さによって異なる（グルコース15～20個で赤，30で赤紫，40で青紫，60以上で青⁷⁾）。従って，デンプンに加水分解酵素を作用させ，一定時間ごとに反応物質のヨウ素試薬による呈色を観察することにより，デンプンが加水分解されてグルコース数の少ない分子に次第に変化していく様子を理解させることができる。この時，酵素源として一般に唾液が用いられているが，今回の実験結果より，ヤマモ，ダイコン，カブ，キャベツおよびニンジンなども酵素源として有効であることが判った。

ダイコンを用いれば，「ダイコンおろしは，米飯やもちのデンプン消化を助ける」と言われていることをより深く理解させることができる。また，2)の実験を組み合わせれば「汁のほうに大部分のアミラーゼ（約80%）が含まれるので，消化補助を目的とする時は汁の摂取に心がけなければならない」ことも理解させることができる。但し，ダイコンおろしの汁を直接酵素源として使用するときは，ヨウ素呈色反応を阻害する物質が含まれているので，ヨウ素試薬の濃度あるいは添加量に注意しなければならない。また，必ず反応0分のものとの比較が必要である。しかし，ダイコン上部を使用すれば阻害物質の影響が少ない（表3）ことは注目すべき点である。

デンプン性食品（イモ類、穀類、豆類など）を摂取する時は、ほとんど加熱操作が施されるが、イモ類の中でもヤマイモは生で食べることができる。その理由は、「ヤマイモに強力なアミラーゼが含まれており、生で食べた方がデンプンの消化がよくなるため」⁸⁾である。このことを理解させるのにも、ヤマイモを酵素源として利用できる。但し、磨砕物は非常に粘性が高いため希釈が必要であり、できればガーゼ濾過による濾液ではなくて、濾紙濾過による濾液か、あるいは遠心分離操作による上清を用いた方が色調変化観察に都合がよい（粘性物質の影響を防げる）。ヤマイモ磨砕物の自己消化実験は、上記内容をさらに理解させることができると考えられ、今後の研究課題である。

さらに、キャベツ、ニンジンあるいはカブを使用すれば、「キャベツ、ニンジン、カブを生で食べるときには、ダイコンおろし同様の効果が期待できる」ことを理解させることが可能になるであろう。

デンプン消化実験の酵素源として唾液を用いる際、上記野菜も併用し活性（消化能）の違いなどを比較することは、デンプンの消化をより身近なものとして捉えさせることができると思われる。

本研究費用の一部は、平成元年度文部省大学教育方法等改善経費に依った。

引用文献

- 1) 新しい科学2分野上, 東京書籍, 東京, 99(1992)
- 2) 中村道徳, 貝沼圭二編: 澱粉・関連糖質酵素実験法, 学会出版センター, 東京, 17(1989)
- 3) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956)
- 4) Nelson, N. J.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375(1944)
- 5) Somogyi, M.: Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19(1952)
- 6) Robyt, J. and French, D.: Action pattern and specificity of an amylase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 451(1963)
- 7) 栄養学・食品学・健康教育研究会編: 食品学総論, 同文書院, 東京, 72(1987)
- 8) 杉田浩一: 「こつ」の科学, 柴田書店, 東京, 49(1987)