

# カラシの消化酵素活性促進作用 (第1報)

—カラシ水抽出液の唾液アミラーゼ活性促進作用—

田 原 モ ト 子

## I 緒 言

香辛料の使用に関しては従来嗜好的な面が重要視されてきたが、生理薬理作用や油脂に対する抗酸化性<sup>1)</sup>、防腐効果なども認められており、多くの化学的検討がなされている。しかし、それらと香辛料中の単一成分との関係については顕著な事実は見出されていない。近年、Glatzel ら<sup>2)</sup>はその生理的効果について *in vivo* で多くの実験を行ない、各種香辛料が唾液分泌を促進し唾液アミラーゼ活性を増大させることを見出している。また福場ら<sup>3)</sup>は各種香辛料の水抽出液及びアルコール抽出液についてその消化酵素活性に及ぼす影響を *in vitro* で検討した結果、いずれも活性を促進する傾向のあることを報告している。しかし、その活性促進作用が香辛料中のいかなる成分の影響によるものか、作用機作の詳細については明らかにされていない。

本実験においては香辛料中比較的使用頻度も高く1回の使用量も多いと考えられるカラシをとりあげ、その中の消化酵素活性促進に関与する成分を検索することを目的とし、今回はまず消化酵素としてヒト唾液アミラーゼを用い、その活性に対するカラシ水抽出液の効果及びゲルろ過後の各フラクションの効果について検討を行なったので報告する。

## II 実験材料及び方法

### (1) カラシ水抽出液の調製

カナダ産黒カラシ粉(甘利香辛食品製)に水を加え、時々攪拌しながら室温で一夜放置し、東洋ロ紙(No. 4)を用いてろ過し透明液を得た。

### (2) 酵素液の調製

i) 唾液アミラーゼ: ヒト唾液を用い Meyer の方法<sup>4)</sup>に従いアセトン分別を行ない(図1)、71mlの唾液上澄液から得たアセトン48~70%分画を0.07M 酢酸ナトリウム溶液として13mlの標品を得た。これを冷蔵庫に保存し使用の都度希釈して用いた。

ii) 市販  $\alpha$ -アミラーゼ: 和光純薬製  $\alpha$ -アミラー

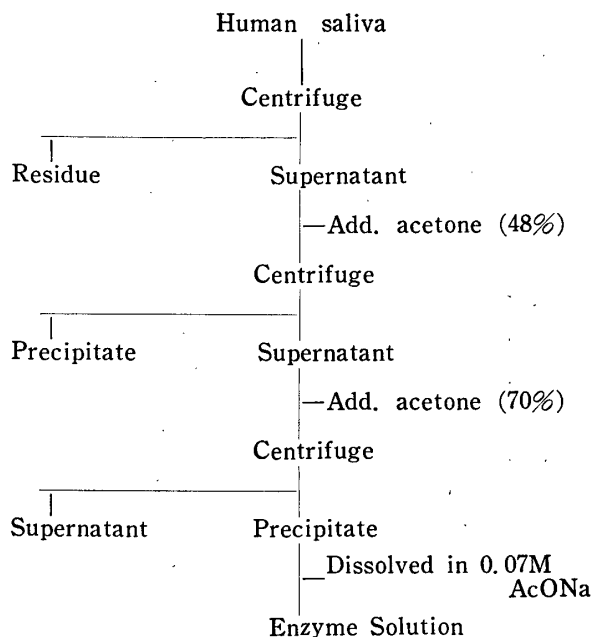


Fig. 1. Preparation of Salivary Amylase.

ゼ(ブタ膵臓)を水溶液として用いた。

### (3) 基質溶液の調製

市販アミロース(Sigma Chem. Comp. 製) 200mg を1N NaOH 4ml に溶かして一夜氷室に放置し、水で80mlに希釈してから1N 酢酸でpH7付近にして後、全量を100mlにする。使用の都度調製した。

### (4) 酵素活性の測定法

アミラーゼ活性の測定はBlue Value 法改良法<sup>5)</sup>に準じて行なった。すなわち、酵素液に緩衝液を加え40°Cで5分間予温し、これに0.2% アミロースを加えて40°Cで30分間反応したのち、10mlの0.5N 酢酸を加えて反応を停止させる。この液のうち1mlを10mlの0.005%ヨウ素溶液の中に入れてから、波長700m $\mu$ で水を対照として1cmのキューベットで吸光度を測定した。酵素の代りに水を加えたものについて同様に操作し盲検とした。酵素単位は40°C、30分間にBlue Valueを10%低下させた場合を1単位として表わした。

Table 1. Composition of Reaction Mixture.

	Salivary amylase	Commercial $\alpha$ -amylase
Substrate	0.2% Amylose 2ml	0.2% Amylose 2ml
Buffer	0.2M Phosphate buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ ) or McIlvain buffer 1ml	McIlvain buffer 1ml
Enzyme	1ml	1ml

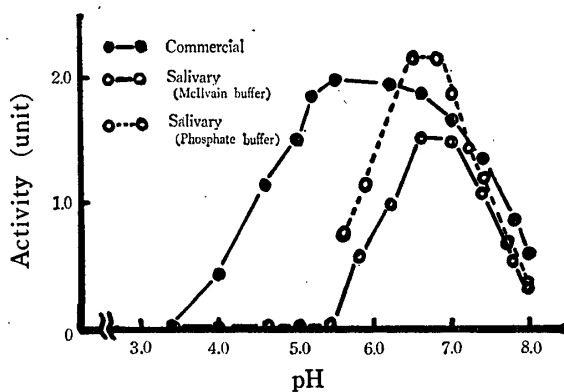


Fig. 2. Effect of pH on Amylase Activity.

Enzyme solution: Salivary amylase ( $\frac{1}{3000}$ ) 1ml  
Commercial  $\alpha$ -amylase (0.1mg%) 1ml  
The other conditions were the same as shown in Table 1.

### (5) ゲルろ過

Sephadex G-75, G-25 は水を加えて充分膨潤させた後カラムにつめ、カラム容積の5倍程度の水を流して安定化させる。カラムは G-75 の場合  $1.3 \times 40\text{cm}$ , G-25 の場合  $1 \times 36\text{cm}$  とし、試料はいずれもカラシ水抽出液 (20mg/ml) 3ml を用い、展開剤は脱イオン水を使用した。流速は  $20 \sim 25\text{ml/hr}$  とし、流出液は3ml ずつ採取して各フラクションの波長  $280\text{m}\mu$  での吸光値及び唾液アミラーゼ活性促進効果を測定した。

## Ⅲ 結果及び考察

### (1) 酵素の一般的性質の検討

まず唾液アミラーゼ及び市販  $\alpha$ -アミラーゼの2酵素についてその一般的性質を検討した。反応液の組成は表1に示す。

#### i) pH の影響

結晶ヒト唾液アミラーゼの反応 pH 域は  $3.8 \sim 9.4$  でその最適 pH は  $6.9^6)$  であることが知られており、

また唾液アミラーゼにアイソザイムの存在<sup>7)</sup>が指摘されており、異なる最適 pH をもつとの報告<sup>8)</sup>もあるため、McIlvain 緩衝液を用いて広範囲の pH について粗酵素液の活性を測定した。図2に示すとおり、唾液アミラーゼの反応 pH 域は  $5.4 \sim 8.0$  と比較的狭く、また最適 pH も  $6.6 \sim 7.0$  付近に唯1つしか認められなかった。なお、リン酸緩衝液でも同じ pH 付近にピークが認められたが、活性は前者より高かった。市販  $\alpha$ -アミラーゼの反応 pH 域は  $4.0 \sim 8.0$  とかなり広く最適 pH は  $5.4$  であった。

#### ii) 酵素量と活性

図3に示すように、市販  $\alpha$ -アミラーゼでは酵素濃度  $0.1\text{mg} \%$  までは活性は酵素濃度に比例し、唾液アミラーゼについては  $0.5 \times 10^{-3}$  (図1に示した酵素原液の  $\frac{1}{2000}$ ) の希釈度までは酵素量と活性の間に直線関係が得られた。

#### (2) アミラーゼ活性に対するカラシ抽出液の影響

上述の検討により得た基礎条件を用いてカラシ水抽出液のアミラーゼ活性に対する影響を調べた。反応液の組成は表2に示す。

#### i) カラシ濃度の影響

唾液アミラーゼ及び市販  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する添加カラシ濃度の影響を調べた結果、図4に示すように、前者ではカラシ濃度の増加と共に活性は顕著に促進され  $5\text{mg}/0.5\text{ml}$  では無添加のコントロールに対して約2倍の活性を示した。後者では  $1\text{mg}/0.5\text{ml}$  ではほぼ飽和に達し、活性促進効果はコントロールに対して25%増にとどまった。唾液アミラーゼについてはさらに高いカラシ濃度で実験を行なったが、 $10\text{mg}/0.5\text{ml}$  で約2.4倍まで活性は上昇し、その上昇率はゆるやかになるもののこの条件ではなお飽和点に達しなかった。

以上の実験より、カラシ水抽出液のアミラーゼ活性

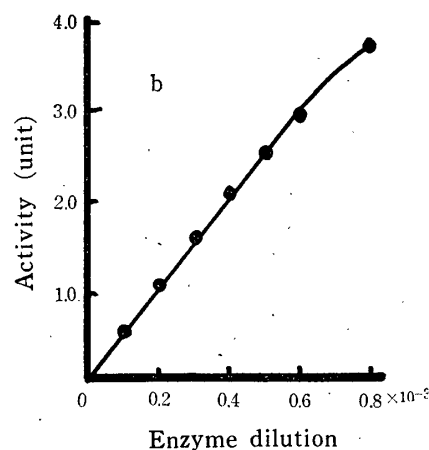
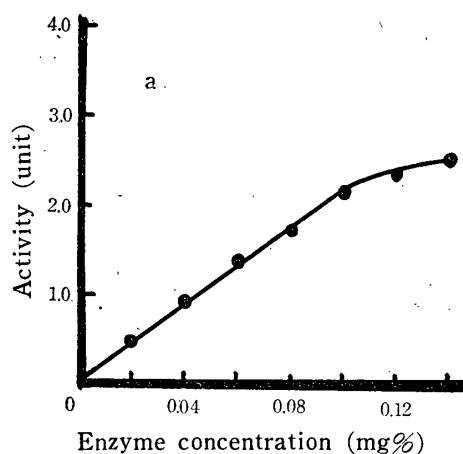


Fig. 3. Effect of Enzyme Concentration on Amylase Activity.

a : Commercial  $\alpha$ -amylase Buffer : McIlvain buffer pH 5.4

b : Salivary amylase Buffer : Phosphate buffer pH 6.8

The other conditions were the same as shown in Table 1.

Table 2. Reaction Mixture for Determining the Activating Effect.

Salivary amylase			Commercial $\alpha$ -amylase		
	Without additive	Additive		Without additive	Additive
Enzyme ( $\frac{1}{1500}$ )	0.5 ml	0.5 ml	Enzyme (0.12mg%)	0.5 ml	0.5 ml
0.2M Phosphate buffer (pH6.8)	1	1	McIlvain buffer (pH5.4)	1	1
Extract from mustard	—	0.5	Extract from mustard	—	0.5
Water	0.5	—	Water	0.5	—
0.2% Amylose	2	2	0.2% Amylose	2	2

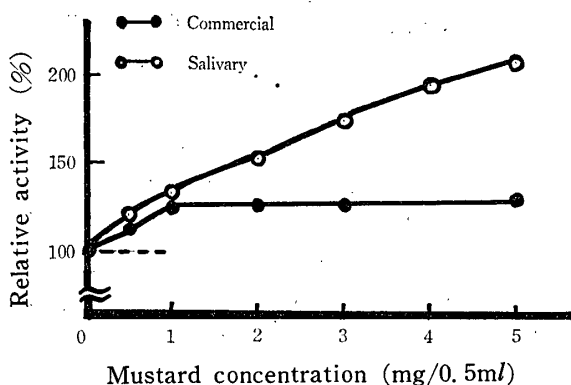


Fig. 4. Effect of Mustard Concentration on Amylase Activity.

Enzyme solution and the extraction of mustard were pre-incubated at 40°C for 5 minutes, then activity was determined by the addition of substrate.

促進作用は市販  $\alpha$ -アミラーゼに対してはさほど著しい影響は認められず、唾液アミラーゼに対してより顕著であることを見出したので、以下の実験では唾液アミラーゼに対する促進作用のみを扱った。

#### ii) Pre-incubation time の影響

カラシ水抽出液 (5mg/0.5ml) と緩衝液の混合液に酵素を加え 40°C で 1~30 分間 pre-incubate し、その後基質を加えて反応を行ない残存活性を測定した結果を図5のaに示した。活性促進作用に対して pre-incubation time の影響はほとんど認められず1分ですでに活性は約2倍に上昇し、その後30分まで大差なかった。

つぎに添加順序を変更し、カラシ水抽出液と緩衝液の混合液に基質を加えて同様に 40°C で pre-incubate し、その後酵素を加えて反応を行ない残存活性を測定

したところ、図5のbに見られるとおりやはり1分で活性は上昇し、その後30分までごくわずか減少の傾向を示した。また活性上昇率は前者と比して約30%低かった。このように、基質と pre-incubate するよりも酵素と pre-incubate する方が活性促進効果が増大したことから、カラシ水抽出液は基質に作用してその

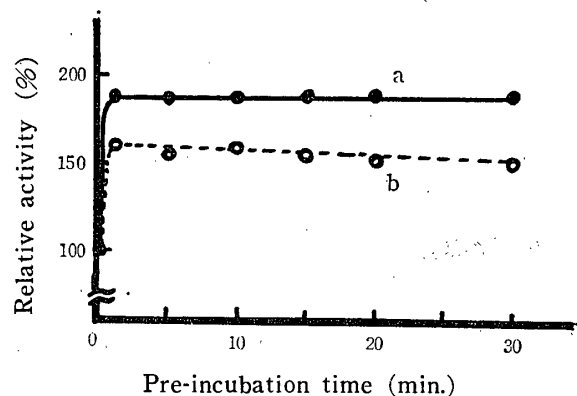


Fig. 5. Effect of Pre-incubation Time on Salivary Amylase Activity with Mustard.

- a : Enzyme solution and the extraction of mustard were pre-incubated.  
b : Substrate solution and the extraction of mustard were pre-incubated.

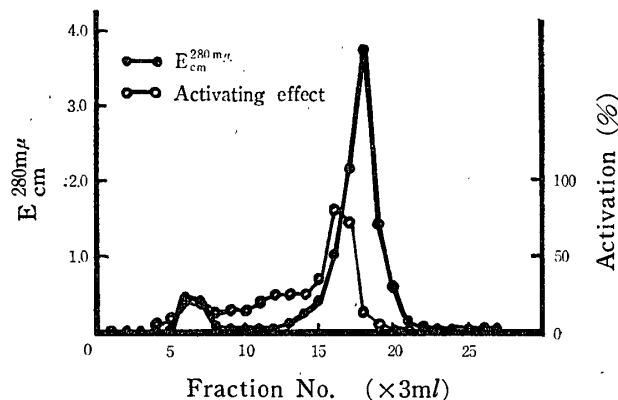


Fig. 6. Gel-filtration by Sephadex G-75 Column.

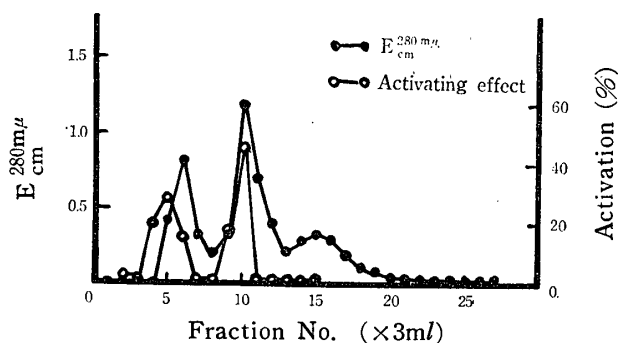


Fig. 7. Gel-filtration by Sephadex G-25 Column.

親和性を高めるよりもむしろ酵素に直接作用して活性化されると思われるが、この点についてはさらに詳しく検討する必要がある。

なお、後者の順序で添加した場合 pre-incubation time が長くなるに伴ない盲検の吸光値が減少したが、このことは、コントロールと比較して常にカラシ添加試料の盲検の吸光値がわずかながら低い値を示すこともあわせ考えると、カラシ水抽出液中にアミラーゼの存在を示唆するものと思われる。しかし、この実験条件下ではそれはごくわずかである。

### (3) カラシ水抽出液のゲルろ過

カラシ水抽出液中の唾液アミラーゼ活性促進物質の本体を見きわめる第一段階として、そのおよその分子量を知るために Sephadex G-75 およびG-25を用いてゲルろ過を試み、各フラクションの活性促進作用を測定すると共に、高分子物質としてタンパク質の存在が予想される<sup>9)</sup>ので、280mμにおける吸光値の測定も行なった。G-75の場合図6に示すとおり280mμでの吸収のピークはフラクション No. 18 にあり、No. 6, No. 7 付近に小さいピークが認められた。

一方、唾液アミラーゼ活性促進効果は、表2に示す反応液組成のカラシ水抽出液の代りにゲルろ過後の各フラクション 0.5ml を加えて反応を行ない、無添加のコントロールに対する活性上昇率で示したところ、No. 16, No. 17 付近に最大ピークがあり、280mμでの吸光値の最大ピーク No. 18 では活性促進効果はさほど認められなかった。

一方、G-25 を用いた場合は(図7)、280mμでの吸収は No. 6, 10, 15 に3つのピークをもち、活性促進効果は No. 5, No. 10 にピークがあり No. 11 より後に流出する部分には全くその効果は認められなかった。

以上の結果より、カラシ水抽出液のヒト唾液アミラーゼ活性促進作用は単一成分によるものではなく、水抽出液中の数種の成分が関与するものと考えられ、G-25 のゲル粒子内部に充分拡散しうような低分子物質の他に G-25 のゲル粒子内に拡散し得ない比較的高分子の物質が関与する可能性が考えられる。ゲルろ過法で溶出液に水を使用する場合は特にイオン効果や吸着効果により分子篩効果から考えられる溶出位置より早く現われたり遅く現われたりすることがあり<sup>10)</sup>、またゲルろ過の原理より考えて溶出位置は分子量のみでなく分子の形に大きく影響を受けられるので、溶出位置から直ちに分子量の大小を論ずることは早計であるが、カラシ水抽出液を透析した後もなお透析内

液がかなり活性促進効果を有すること<sup>11)</sup>とも考えあわせると、G-25 の場合に先に溶出してくる部分の活性促進作用は比較的大きい分子、少なくとも無機イオン以外のものによるのではないかと推測される。ヒト唾液アミラーゼがCl<sup>-</sup>により活性化されることはよく知られており<sup>12)</sup>、他の陰イオン、Br<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、I<sup>-</sup>なども弱いが活性化されると言われるが<sup>12)</sup>、無機イオン以外のものについてはあまりその例が見られないため今後この点をさらに検討したい。

#### IV 要 約

ヒト唾液アミラーゼに対するカラシ水抽出液の影響を調べた結果、極めて明瞭な活性促進作用を示すことが明らかとなったため、この活性促進物質の検索の第一段階として Sephadex G-75および G-25 を用いてゲルろ過を行なった。

各フラクションの唾液アミラーゼ活性促進作用を測定した結果、無機イオン以外のものもこの作用に関与する可能性を見出した。

最後に、大崎先生をはじめお世話になりました食品学研究室の方々に感謝致します。

#### 文 献

- 1) 渡辺, 綾野: 栄養と食糧, 27, 181 (1974).
- 2) H. Glatzel: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 64, 1 (1968)
- 3) 福場, 加藤: 第27回日本栄養食糧学会講演要旨集, p. 138 (1973)
- 4) P. Bernfeld: Methods in Enzymology, 1, 150 (1955), Academic press Inc., New York.
- 5) 赤堀: 酵素研究法, 2, 108 (1965)
- 6) P. Bernfeld: Methods in Enzymology, 1, 153 (1955), Academic press Inc., New York.
- 7) R. O. Wolf and L. L. Taylor: Nature, 213, 1128 (1967)
- 8) 陳, 横田, 坂口: 日衛誌, 26, 486 (1972)
- 9) The Flavour Industry, 1, 596 (1970)
- 10) 武内, 森: ゲルクロマトグラフィー <基礎編> p. 82 (1972) 講談社
- 11) 田原: 未発表
- 12) P. Bernfeld: Methods in Enzymology, 1, 154 (1955), Academic press Inc., New York.