

生活に広く利用されている有機化合物(糖)を用いた指導および教材開発 (III)

Development of educational material(III) utilizing widely used organic compound (carbohydrate)

山口 真 範

YAMAGUCHI Masanori

(和歌山大学教育学部化学教室)

2020年10月16日受理

Abstract

Carbohydrate is one of the three major nutrients and is a substance closely related to our food. Our vital activities are supported by carbohydrates, and the inability to ingest carbohydrates causes serious problems. Recently, overdose of sugar has become a problem, but carbohydrates should be an irreplaceable molecule for us. In the present paper, focused on carbohydrates in daily life and glycosidases that play important role in digestion and absorption of carbohydrates. And devised guidance and teaching materials using carbohydrates.

◆はじめに

生活に広く利用されている有機化合物(糖)を用いた指導及び教材開発(II)においては、糖質の代表的分子の一つとしてデンプンを取り上げた。ジャガイモからのデンプンの抽出及びその消化(分解)における過程を教材利用へとつなげたり。本稿では糖質の消化に焦点をあて、消化の役割を果たしている糖質加水分解酵素を取り上げた取り組みを報告する。

◆糖質分解酵素

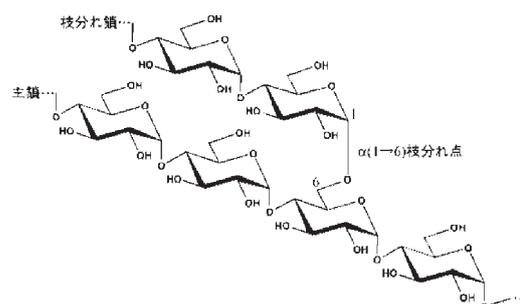
糖質分解酵素(グリコシダーゼ)は、糖鎖、配糖体、オリゴ糖などのグリコシド結合を加水分解する酵素のことである。高等生物から細菌に至るまで、幅広い生物の種において存在し、糖質の消化吸収だけにとどまらず、糖質の関わる様々な生命現象の制御に活躍している²⁾。

グリコシダーゼは1種類の酵素が全てのグリコシド結合を分解するわけではなく、糖の種類、その結合様式によって分解できる構造が厳密に決まっている。それを基質特異性という。

例えば、同じグルコースから成り立っているデンプンとセルロースを分解するには、それぞれ異なった酵素が必要となる。デンプンは $\alpha(1\rightarrow4)$ 、 $\alpha(1\rightarrow6)$ グルコシド結合から成っており、セルロースは $\beta(1\rightarrow4)$ グルコシド結合から成っているため、結合様式が少し異なる(図1)。よってデンプンの分解には α -グリコシダーゼ(アミラーゼ)、セルロースの分解には β -グリコシダーゼ(セルラーゼ)が必要となる。

化学的な酸加水分解反応では、双方の結合様式のグルコシド結合を切るができるが、酵素反応はその

デンプン(アミロペクチン)



セルロース

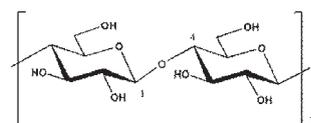


図1：デンプンとセルロースの構造

様な融通が利かないため、その分解に特化した酵素が要求される。それゆえ、自然界においては膨大なグリコシダーゼが存在し、我々の体内においても糖類の消化を司っている。また研究及び工業利用もなされ、様々な場面で我々の生活を支えている³⁾。

◆糖質分解酵素が関わる日常

古来よりの伝承で、相性の良い食べ合わせというものがある。それらは単独で摂取するよりも合わせて摂取の方が美味であるなどの主に食経験的な理由から、料理の定番として定着してきたものが多い。その中で糖質加水分解酵素が関わる1つの例を見てみたい。

大根おろしは日本人にとって、とても馴染みの深い

ものであるが、古くから胸やけや胃もたれを起こした時にその改善効果が知られていた。大根には消化を助ける様々な酵素が含まれており、その酵素を利用することにより、効果的に消化吸収が可能となる。大根に含まれる消化酵素の1つに、デンプンを分解するアミラーゼがある⁴⁾。

◆大根中に含まれるアミラーゼの確認

・デンプン水溶液の調製

生活に広く利用されている有機化合物(糖)を用いた指導及び教材開発(II)において、ジャガイモデンプンについての報告を行った⁵⁾。本稿においてもジャガイモから抽出したデンプンを用いて大根アミラーゼの存在を確認することにした。この場合、市販のデンプンを用いるのではなく、生徒自身が調製したデンプンを用いることを推奨したい。

今回はジャガイモデンプン 1gに水道水100 mLを加え加熱し、透明になるまで攪拌した。これをデンプン水溶液として用いた。

・ダイコンアミラーゼ(粗酵素)の調製

ダイコンをおろし金ですりおろし、得られた大根おろしをひだ折りろ紙(定性ろ紙No. 1)にて濾過し、不溶成分を取り除いた(写真1 ①②)。不溶成分を取り除いたダイコンの汁の中には、酵素の他に多くの水溶性の化合物(アスコルビン酸ナトリウム、糖類など)が含まれている。

アスコルビン酸ナトリウムが溶液中に存在した状態でヨウ素デンプン反応試験を行うと、ヨウ素はアスコルビン酸ナトリウムにより還元されてヨウ化水素(無色)に変化する。この反応は溶液中に存在するアスコルビン酸ナトリウムを消費しつくすまで続く。ダイコンのおろし汁を直接デンプンの消化実験に用いた場合は、その中に存在しているアミラーゼが作用してデンプンが分解されたため、ヨウ素デンプン反応が生じないのか、アスコルビン酸ナトリウムが存在しているために反応が生じないのかの判断が困難になる。よって、アスコルビン酸ナトリウムはあらかじめ除去する方が好ましい。アスコルビン酸ナトリウムは低分子であり、酵素は高分子であるため、透析操作により容易に分別できる。

そこで、濾液を透析膜に移し透析操作を行い(写真1 ③)、その透析内液をダイコンアミラーゼ溶液とした。

透析の概念は高等学校科学におけるコロイド溶液の性質の項において教示されている⁶⁾。扱う事象は異なるが、そのことも踏まえて透析操作を行うとよい。

透析操作が困難な場合は、デンプン溶液にダイコンアミラーゼ(ろ紙濾過溶液)を入れた直後に、ヨウ素溶液を少量ずつ注意深く滴下し、ヨウ素デンプン反応が

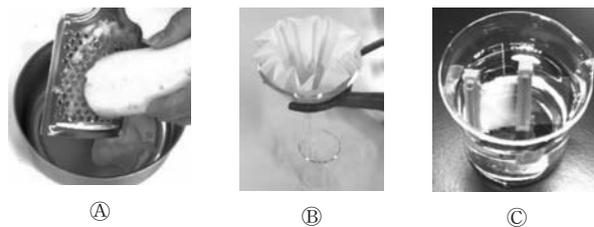
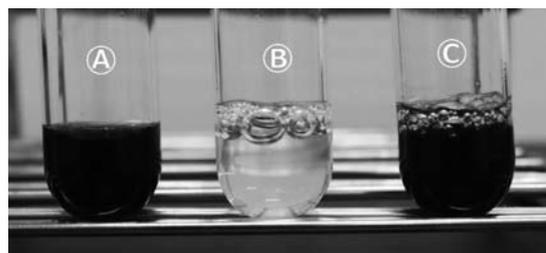


写真1：ダイコンアミラーゼの調製

生じるヨウ素溶液量をあらかじめ算出しておくといよい。つまりそこで算出した量以上のヨウ素溶液を加えることにより、アスコルビン酸ナトリウムの存在に左右されずにアミラーゼの作用を確認することができる。

・ダイコンアミラーゼによるデンプンの消化実験

デンプン溶液(1 mL)にダイコンアミラーゼ(200 μ L)を添加し、45 $^{\circ}$ Cにて、20分間インキュベートした。また、コントロール試験として、100 $^{\circ}$ Cにて10分間煮沸した大根アミラーゼ溶液(200 μ L)を加えたものも同様にインキュベートした。次いでヨウ素溶液(10 μ L)を滴下し、ヨウ素デンプン反応を行い、その呈色を見た(写真2)。



①デンプン溶液のみ
②ダイコンアミラーゼ溶液+デンプン溶液
③加熱処理したダイコンアミラーゼ溶液+デンプン溶液

写真2：ヨウ素デンプン反応の結果

写真2に示す通り、①③が青紫色に呈色し、②は無色透明だった。②の結果より、デンプンはダイコンアミラーゼにより加水分解されたことを示すことができる。③の結果より、加熱した酵素はその機能が失われ(失活)、デンプンを分解できないことを示すことが出来る。つまり、大根を加熱処理した場合は、含まれる酵素の大半が失活してしまうので、消化を助けてもらう効果は望めない。よって効能を利用するには生である大根おろしが適した食べ方であると、合わせて教示することが出来る。

◆食品素材中に含まれるグリコシダーゼの調査

グリコシダーゼには、アミラーゼ(α -グルコシダーゼ)の他にも多くの種類がある。例えば、ガラクトースを切り出すガラクトシダーゼにおいては糖のアノマー

位の結合様式は α 型、 β 型があるため、それぞれ α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼの2種類が存在する。

本稿では多くの糖の中でも、教科書に記載の多い代表的なグルコース、ガラクトース、キシロースを切り出す酵素(α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -キシロシダーゼ)の、日常でよく接する野菜中での存在を調査することにした。

各種グリコシダーゼの存在の検出には、前項のデンプンに替わり、糖基質としてパラニトロフェニル(p NP)糖を利用することにより、視覚的に検出を行った。

p NP糖基質の溶液は無色であるが、グリコシダーゼを溶液中に添加すると p NP糖基質が加水分解され、糖とパラニトロフェノールに分解される。その溶液に炭酸ナトリウム水溶液を加えると溶液が黄色を呈し、グリコシダーゼの存在を視覚的に容易に検知できる⁷⁾(図2)。

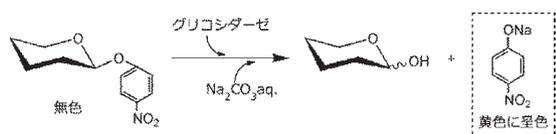


図2： p NP糖基質を用いたグリコシダーゼの検出

この現象を用いることにより、野菜に含まれるグリコシダーゼの種類を調査することにした。野菜には複数のグリコシダーゼが存在する可能性があるため、代表的な糖類の p NP糖基質を用意して調査することにした。本研究においては5種類のパラニトロフェニル糖基質を使用した(図3)。

| | | |
|---|-------------------------|--|
| ① | α - p NPグルコース | |
| ② | β - p NPグルコース | |
| ③ | α - p NPガラクトース | |
| ④ | β - p NPガラクトース | |
| ⑤ | β - p NPキシロース | |

図3：使用した p NP糖基質の種類と構造

例えば、図3の①に示されている α - p NPグルコースの溶液が、酵素反応の結果黄色くなれば、その野菜の中には α -グルコシダーゼが存在しているということ

を示すことが出来る。

◆試料(野菜)からの粗酵素の抽出

試料はキャベツ、タマネギを使用した。それぞれみじん切りにした後、3gを秤量した。次いで、試料をホモジェナイザーに入れ、Tris-HCl b.f. (50 mM, pH=7.4) 9 mLを加えて、氷浴中にてホモジェナイズした。得られた溶液を遠心分離(3,500×g, 5 min)し、その上清を粗酵素溶液として使用した。

◆試料(野菜)に含まれるグリコシダーゼの調査

それぞれ20 mMの濃度になる様に、蒸留水に溶解した5種類の p NP糖基質(125 μ L)と粗酵素溶液(400 μ L)を混和し、30℃にて12時間インキュベートした。次いで、0.2 M Na_2CO_3 (500 μ L)を加え、反応を停止して溶液の発色を見た。

キャベツは全ての基質溶液が黄色に着色したことから、全ての p NP糖基質が加水分解されていることが示され、5種類のグリコシダーゼの存在が明らかになった。さらに β - p NPグルコース②、 β - p NPガラクトース基質④のものが濃く色づいたことから、 β -グルコシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼがより多く含有されていることが判明した(図4)。

タマネギは α - p NPガラクトース③と β - p NPガラクトース基質溶液④が黄色に着色したことから、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼが含まれていることが判明した(図4)。

| | | | | | |
|-------------|---|----|---|----|---|
| キャベツ | | | | | |
| p NP基質の種類 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ |
| 発色強度 | + | ++ | + | ++ | + |
| タマネギ | | | | | |
| p NP基質の種類 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ |
| 発色強度 | - | - | + | + | - |

図4：各種 p NP糖基質を用いた酵素反応結果

◆まとめ

小学校から高等学校の教科書に掲載されている糖類について、その指導法および教材の開発について述べた。デンプンは市販のものを使用するのではなく、ジャガイモから自身の手で調製したデンプンを使用した。各種野菜のグリコシダーゼ調製は、学校現場でも実施

可能な範囲にとどめた。厳密に考えれば酵素は精製したものを使用すべきであるが、自然界では多様な物質の中で酵素が働いているので、精製酵素と基質のみを用いた反応系に比べると、より自然に近い環境下での実施といえる。

デンプン以外の糖を分解する酵素の存在を示すため、*p*NP糖基質を用いた教示方法を導入した。*p*NP糖基質は容易に入手可能な化合物で、呈色反応を伴うことから、野菜中の各種グリコシダーゼの存在を容易に明らかにすることが出来た。ヨウ素デンプン法と合わせてこの方法を用いれば、1つの酵素だけでなく、多くの酵素が生体に存在していることを実際に体感させることが可能である。

論文中に掲載した全ての図及び写真は、筆者が作成及び撮影したものである。

注

- 1) 山口真範、生活に広く利用されている有機化合物(糖)を用いた指導および教材開発(II)、和歌山大学教育学部紀要、第70集、29-32頁、2020年
- 2) 秋吉一成監修、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック、NTS出版、62-73頁、2015年
- 3) 秋吉一成監修、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック、NTS出版、599-628頁、2015年
- 4) 長弘美智子、大根抽出液中の α -アミラーゼのアイソザイムの研究、家政学雑誌28(6)、一般社団法人日本家政学会出版、391-397頁、1977年
- 5) 山口真範、生活に広く利用されている有機化合物(糖)を用いた指導および教材開発(II)、和歌山大学教育学部紀要、第70集、30-31頁、2020年
- 6) 高等学校学習指導要領解説 理科編、文部科学省、62-64頁、2009年
- 7) キッコーマン糖化力分別定量キット、1-3頁、2011年