

だ液アミラーゼの簡易比色計を用いた測定

正元和盛*¹・木村知裕*²

Measurement of Salivary Amylase Activity with a Simple Colorimeter

Kazumori MASAMOTO*¹ and Tomohiro KIMURA*²

(Received October 1, 2003)

We made a simple colorimeter using a LED as the light source and a CdS cell as the detector. The simple colorimeter gave a linear-relationship between the concentration of starch (up to 0.01%) detected by coloration reaction with KI-I₂ and the resistance of the CdS cell. Using this colorimeter, the temperature dependence and time-courses of the activities of salivary amylase were shown clearly. The amylase activities of some vegetables were also detected with the colorimeter. These results indicate that the colorimeter is available for semi-quantitative measurement of the activities of amylase and is a useful tool for advanced courses of science learning in lower secondary schools.

Key words : colorimeter, salivary amylase, science learning, teaching materials, lower secondary school

はじめに

中学校理科では、「動物の体のつくりと働き」の項目の一部として、栄養分を吸収するしくみを学習する¹⁾。その具体的な扱いとして、消化酵素などが食物を吸収されやすい物質に分解していることを理解するために「だ液によるデンプンの分解」の実験が行われている²⁻⁶⁾。それらの実験は、器具などの違いはあるが次のような流れになっている。デンプンにだ液を加え、約40℃で数分間保温し、ヨウ素液を加えてもヨウ素デンプン反応の青紫色に発色しないことから、だ液がデンプンを分解したことを定性的に確認する。

色をもつ溶液の定量法に分光光度計による吸光度の測定がある。その原理を用いて、簡便な吸光度計(簡易比色計)を作製し、大気中の二酸化窒素測定の定量化に活用するなど、簡易比色計の実践事例が報告されている⁷⁻⁹⁾。

本研究では簡易比色計を用いて「だ液によるデンプンの分解」の実験の発展として、だ液の働きの温度や時間への依存性、酵素の性質などについて調べた。分

解せずに残ったデンプンの青紫色の発色を、簡易比色計を用いることで数値化し、だ液の働きをほぼ定量的に表すことができた。

材料と方法

1. 反応条件

0.2%デンプンのり溶液 1ml にだ液溶液を各量加え、37℃で10分間保温し、1N塩酸2滴(約0.08ml)で反応を止め、ヨウ素液を3滴(約0.12ml)加えることを基本条件とした。反応液を10または15倍に希釈してヨウ素液を加え、測定した。だ液の働きの温度依存性を調べる実験では、37℃を各温度に、また時間依存性を調べる実験では保温時間を変えて実験を行った。保温には恒温器(ドライサーモユニット TAL-2; 大洋工業)(アルミブロックバス ALB-300; 旭テクノグラス)を使用した。塩酸とヨウ素液の滴下には市販のプラスチック製の魚の形をした醤油さしを用いた。その1滴は約0.04mlだった。

*1 正元和盛: 熊本大学教育学部理科教育生物, 〒860-8555 熊本市黒髪 2-40-1

Kazumori Masamoto: Laboratory of Biology, Department of Natural Science, Faculty of Education, Kumamoto University, Kurokami 2-40-1 Kumamoto 860-8555, Japan

*2 木村知裕: 熊本大学大学院教育学研究科理科教育, 〒860-8555 熊本市黒髪 2-40-1

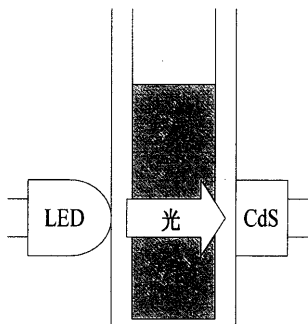


図1 簡易比色計のしくみ

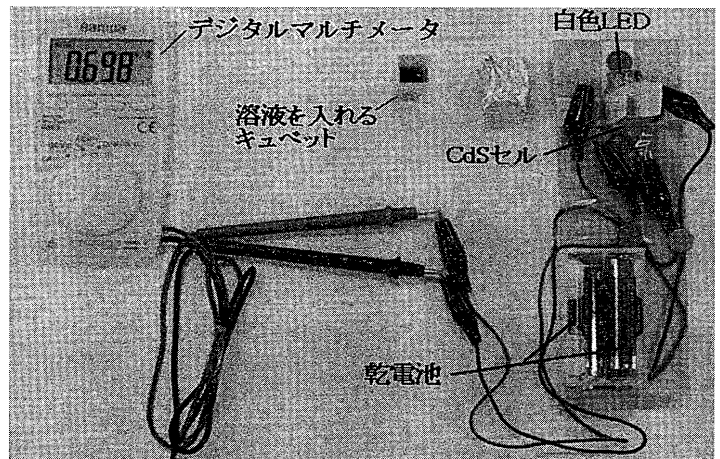


図2 作製した簡易比色計

2. 各溶液の調整

各溶液は以下のようにして調整した。

A) デンプンのり溶液

水 100ml に片栗粉 (馬鈴薯デンプン) 0.2g を加え (0.2%), 高压滅菌器で 10 分間加熱して完全に溶かした。各濃度のデンプンのり溶液は 0.2% デンプンのり溶液を薄めて調整した。調整デンプンのり溶液は糖試験紙によるグルコースの検出はなかった。高压滅菌器の代わりに電子レンジや沸騰水浴で十分に温めて溶かした場合には、溶液の散乱がなくなるまで注意して溶解させないとデンプンの粒が残ってしまう¹⁰⁾。

0.2% デンプンのり溶液を作り、冷蔵庫 (約 7°C) と室温 (約 26°C) で保存し、1 日ごとに 7 日間、また 2 週間後に再度、10 倍に希釈して 620nm の吸光度を測定すると、ヨウ素デンプン反応による吸光度に変化はほとんどなかった。一度デンプンのり溶液を調整したら冷蔵庫で保存しておけばよい。

だ液の働きに対する Cl^- や Ca^{2+} の影響を調べる実験では、30mM 酢酸カルシウム溶液と 30mM CaCl_2 溶液を 0.03mM, 0.3mM になるよう、また、600mM NaCl 溶液を 0.06mM, 0.6mM, 6mM になるようデンプンのり溶液に加えた。30mM CaCl_2 溶液は $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.13g を水に溶かして 30ml になるようにし、600mM NaCl 溶液は NaCl 0.7g を水に溶かして 20ml になるよう調整した。0.3mM 酢酸カルシウムの pH は 6.8 で、だ液への影響はない。

B) だ液溶液

水 20ml を 2 分間口に含んで採集したものをだ液溶液とした。だ液溶液の働きには個人差があり、同じ人でも日や時間によってだ液溶液の働きに差があった。ただし、基本条件のように 0.2% デンプンのり溶液を用いれば、だ液溶液の働きに差があっても、だ液溶液を 0.1ml も加えれば、デンプンは分解され、ヨウ素デ

ンプン反応の発色はない。また、0.2% でんぷんのり溶液が分解して生成された糖によるベネジクト反応のオレンジ色の発色も十分だった¹⁰⁾。

C) 野菜液

ダイコン汁はダイコン 60g をすりおろして汁だけ採取し、3000 回転で 3 分間遠心して上澄み液を使用した。サツマイモは 50g, ジャガイモは 30g をすりおろして水をそれぞれ 25ml, 15ml ずつ加え、液をとり遠心して上澄み液を使った。タマネギは 70g をみじん切りして水 35ml を加え、液をとって遠心し、上澄み液を使用した。全ての液を 15ml 以上採取した。なお、各野菜液はグルコースを含んでいるため、ベネジクト反応陽性なので、デンプン分解によって生じた糖のベネジクト反応による検出を行うことはできない¹⁰⁾。

D) ヨウ素液

エタノール 3ml に I_2 1g をほぼ溶かし、水約 30ml に KI 3g 溶かしたものを加えてまぜ、さらに水を加えて 100ml にしたものを原液とした。原液を 10 倍に希釈して使用した。長期に保存した希釈液は、ヨウ素が減少しているため、測定値の正確な再現性を要求される時は注意が必要である。

3. 簡易比色計

簡易比色計は呈色している試料溶液の光吸収を測定する装置で、それをういた環境調査などの実践事例が報告されている⁷⁻⁹⁾。発光ダイオードの発した光が色の付いた試料を通り CdS セル (硫化カドミウムを主成分とした光導電素子) に当たる (図 1)。このとき試料の濃度が高いほど色も濃いので光が多く吸収され、透過する光は少なくなる。CdS セルはそれに当たる光量が小さいほど、抵抗が高くなり電流が流れにくくなるという特徴を持つ¹¹⁾。つまり、試料の光吸収 (濃度) が大きくなり光の透過量が小さくなると、CdS セ

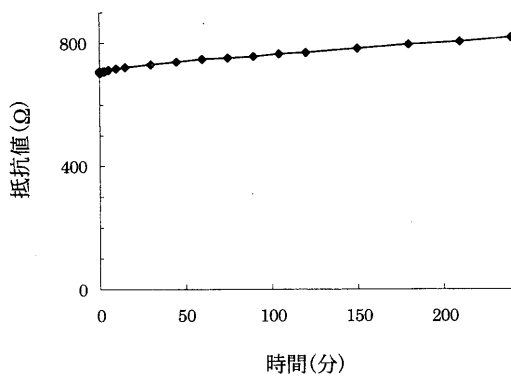


図3 簡易比色計の特性

作製した簡易比色計(図2)でキュベットを入れずに白色LEDの明かりをつけ、抵抗値の変化の時間依存性を調べた。

ルの抵抗は大きくなる。CdSセルはデジタルマルチメータにつないであり、それで抵抗値を読む。抵抗値の常用対数を取り測定値とした。抵抗値は水をキュベットに入れて測ったときの値(Ω_0)に対する、反応液にヨウ素液を加えヨウ素デンプン反応で青紫色になった反応液をキュベットに入れて測ったときの値(Ω)の比の対数($\log(\Omega/\Omega_0)$; CdSセルは溶液の光吸収によって光があたらなくなると抵抗値が大きくなるので、吸光度とは逆になる)をグラフの縦軸にとった。この値が溶液の濃度に比例する。

今回使用した簡易比色計は小中学生が自分達で作って使えるよう、セロテープや押しピンを使って各部をかまほ板に固定した(図2)。また、回路の接続もハンダ付けをせず、ワニ口クリップでつなぎ、スイッチを兼ねた。光源には白色LEDを用いた。白色LEDにつながれた乾電池の起電力により発光する。試料溶液の入ったキュベットを固定するホルダーは、前例の展開図⁹⁾を参考にして厚めの紙(ケント紙)で作製した。各部品は、白色LED(NSPW500BS;白亜化学工業)、CdSセル(P722-10R;浜松ホトニクス)、キュベット(9832E;サンプラテック)、デジタルマルチメータ(PM3;三和テスメック)を使用した。デジタルマルチメータ(3280円)以外の作製部品代は乾電池を除いて1150円程度だった。測定値($\log \Omega$; CdSセル抵抗値(Ω)の対数)から水だけの測定値($\log \Omega_0$)を差し引き、縦軸の表記値($\log(\Omega/\Omega_0)$)とした。

4. 分光光度計

吸収スペクトル、吸光度の測定には分光光度計(UV-240;島津)、(UV-2200;島津)を用いた。

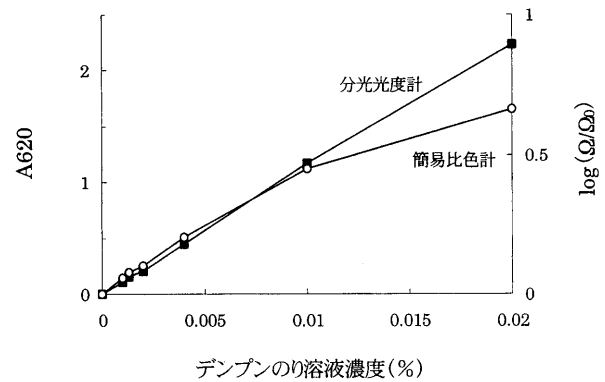


図4 デンプンのり溶液の濃度による青紫色発色の測定

各濃度デンプンのり溶液を希釈して調整し、ヨウ素液0.12mlを加えて青紫色に発色させ、分光光度計で620nmの吸光度(A_{620} ; ■)と簡易比色計で抵抗値による測定値($\log(\Omega/\Omega_0)$; ○)(材料と方法3参照)を測定した。

結果と考察

1. 作製した簡易比色計の特性

作製した簡易比色計は電源スイッチもなく、ワニ口クリップを1ヶ所はずしておいて(off;白色LEDの一つの端子側)、つなく(on)だけの簡易なものである(図2)。そのためコード類を測定中に引っ掛けて引っ張ったりしないよう、押しピンで押さえ込んだ。

簡易比色計のホルダーに何も入れない状態で測定した抵抗値の安定性をみると(図3)、スイッチを入れて数分間は抵抗値が安定するが、時間が経つと抵抗値が上がってきた。水のみ抵抗値を最初に測り記録した後、長時間経った測定はさける必要がある。次の測定が何十分も経った時には、水のみをもう一度測って更正するなど注意が必要である。本測定では白色LEDを点灯させ30分間以上した後に、10分程度以内に全測定を終え再度水のみで測定したところ、上昇値は測定値にほとんど影響を与えなかった。

2. デンプンのり溶液の濃度と青紫色発色

デンプンのり溶液の濃度を数段階とり、それぞれにヨウ素液を加えて青紫色に発色させ、簡易比色計で測定するとともに、同一試料の620nmの吸光度(A_{620})も測った(図4)。 A_{620} の値が2までは A_{620} とデンプンのり溶液の濃度との間に比例関係が見られた。デンプンのり溶液の濃度を薄くしていっただけなので、620nm付近に吸収極大があるヨウ素デンプン反応の発色の吸収スペクトルの様子が変わらなかったためだと考えられる。簡易比色計による測定は、0.01%デンプンのり溶液濃度まではほぼ直線関係にあるが、それより高濃度側では期待値より小さい値となった。した

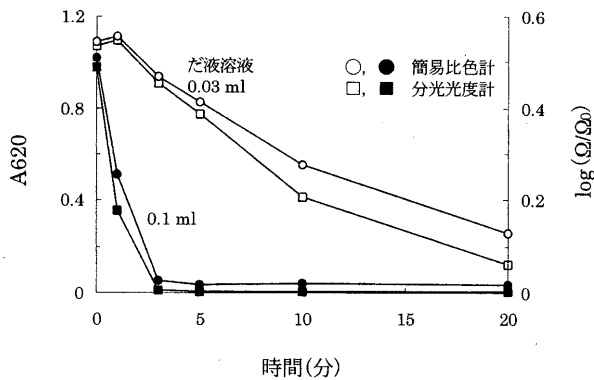


図 5A だ液の働きの時間依存性

0.2% デンプンのり溶液 1ml にだ液溶液を 0.03ml (○, □), 0.1ml (●, ■) 加え, 37°C で各時間保温した. 反応液を 15 倍に希釈し, ヨウ素液を 0.12ml 加え分光光度計 (□, ■) と簡易比色計 (○, ●) で測定した.

がって, 反応液は希釈してヨウ素デンプン反応をさせ測定した.

3. 簡易比色計を用いただ液の働きの測定

デンプンのり溶液にだ液溶液を加えて, 各時間保温し, 反応液にヨウ素液を加えて簡易比色計で測定した (図 5A). だ液溶液を 0.1ml 加えた方は数分間でデンプンが完全に分解されていた. また, だ液溶液 0.03ml 加えたほうは反応時間の経過とともにデンプンの分解が進んだが, 10 分では半分ほどデンプンが残っていた.

また, 保温温度を各温度とし, 温度依存性を調べた (図 5B). 30°C ~ 40°C 付近で最もよくデンプンが分解された. 60°C 以上ではデンプンをほとんど分解しない.

デンプンのり溶液に加えるだ液溶液の量を変えて基本条件で反応させると, だ液溶液量がある量 (本実験では約 0.01ml) まではあまり分解せず, ある量以上になると, だ液溶液の量が増えるにつれてデンプンの分解の程度も大きくなり, 完全な比例関係ではなかった (図 6). この関係は分光光度計での測定 (A620) でも同じなので, 簡易比色計の特性のせいではなく, ヨウ素デンプン反応の原理 (デンプンの構造とヨウ素発色の原理) に依存したものと考えられる.

4. 野菜液によるデンプンの分解

デンプンのり溶液に野菜液 (材料と方法 2-C) 参照) を加え, 基本条件で反応させ, 反応液にヨウ素液を加え簡易比色計で測定した (図 7). 野菜液を加えたものとコントロールの測定値を比較すると, ダイコン液またはサツマイモ液を加えたほうが測定値が低く, その差の分だけデンプンが分解されていることがわかる. 野菜液についてはダイコン汁を使う実験例²⁾ など

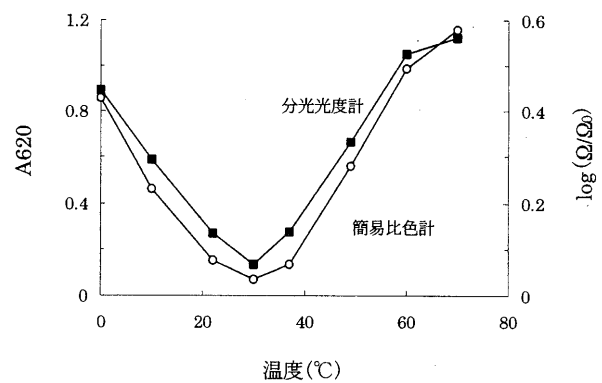


図 5B だ液の働きの温度依存性

0.2% デンプンのり溶液 1ml にだ液溶液 0.06ml を加え, 各温度で 10 分間保温した. 他の条件は図 5A に同じ.

が報告されているが, 野菜液の中にはヨウ素液を脱色してしまうものがある. そのため, ヨウ素液を脱色量以上加えて, コントロールと発色に使われるヨウ素液の量を合わせるなど注意が必要で, 操作が難しい点が多い¹⁰⁾. なお, ジャガイモとタマネギについても同様の実験を行ったが, デンプンが分解されたという証拠はえられず, 逆にそれらを加えた液の測定値がコントロールの測定値より高かった. 原因については今後検討したい.

5. 塩によるだ液の働きの活性化の測定

α -アミラーゼ (だ液の酵素も α -アミラーゼ) は, 酵素タンパク質の構造を維持するためにカルシウムを分子内に結合させていて, カルシウムを除去すると活性を失う¹²⁻¹⁴⁾. また塩素イオンは活性化に必要とされる^{12, 15-17)}. アミラーゼの活性化を測定した (図 8). 確実にデンプンを分解させるためには NaCl を 6mM 加えたほうがよい. 0.3mM CaCl_2 添加でもよいが, Ca はもともと酵素に結合していると考えられる¹²⁻¹⁴⁾ ので, Ca の添加効果は顕著ではない.

6. ヨウ素デンプン反応の青紫発色を簡易比色計ではかる時の可能性と限界

だ液溶液量によるデンプンのり溶液の発色には厳密な比例関係はないが, だ液溶液量が多くなると A620 の値もだんだん小さくなった (図 9, 図 10). また, だ液溶液量が多くなり, デンプンの分解量が多くなると A515 付近の相対的な吸収が大きくなった (図 9). A515 もデンプンの分解がすすむとだんだん小さくなった. 用いた簡易比色計の CdS セルは 560nm 付近の感度が最も高く, それより短波長側でも長波長側でも感度が落ちていく. また, ヒトの目の波長特性 (比

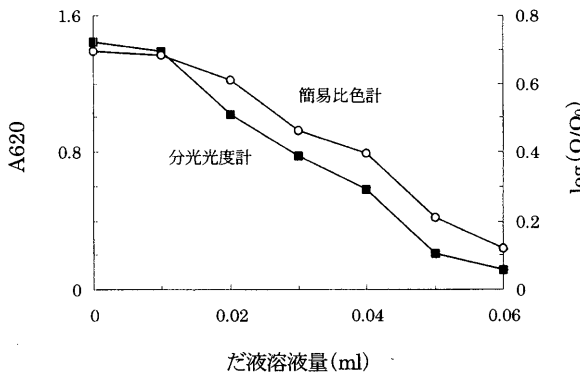


図6 だ液溶液量とヨウ素デンプン反応の発色測定

0.2%デンプンのり溶液 1ml にだ液溶液を各量加え、37℃で 10 分間保温した。反応液を 10 倍に希釈しヨウ素液を 3 滴加えて各反応液を簡易比色計で測定した (○)。同時に A620 (■) も測定した。加えただ液溶液量が 0.1ml に足りない分は水を加えて反応液の総量が 1.1ml になるようにした。

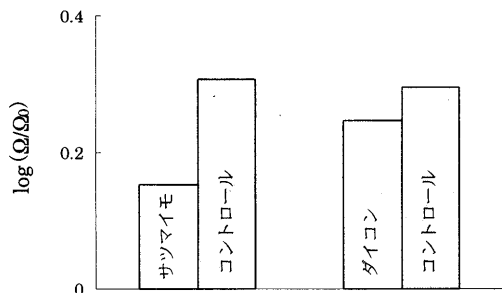


図7 野菜液の働き

0.02%デンプンのり溶液 1ml に NaCl を 6mM になるよう加え、各野菜液を 0.1ml 加え 37℃で 10 分間保温した。反応後、反応液を 2 倍に希釈し、サツマイモ液を加えたものにはヨウ素液を 2 滴 (そのうち約 1 滴分は脱色される)、ダイコン汁を加えたものにはヨウ素液を 3 滴 (そのうち約 2 滴は脱色される) 加えた。それぞれのコントロールの方には野菜液の代わりに水 0.1ml 加えてあり、ヨウ素液を 1 滴ずつ入れて、ヨウ素液約 1 滴分の青紫色の発色を比べてある。

視感度) に似ていて可視光の波長は全て感度がある¹¹⁾ ので、図の吸収スペクトルの範囲は全て光を受けることができる。しかし、ヨウ素デンプン反応の発色が、デンプンの分解の程度によってよく吸収する波長が変化することや、上述のように CdS セルの抵抗値はあたる光の波長特性によって変化することから、簡易比色計での測定値と分解せずに残ったデンプン量はデンプン残量が小さいほど比例関係からはずれると考えられる。このような制限があっても、作製した簡易比色計で、デンプンの分解をほぼ定量的に扱うことができる。

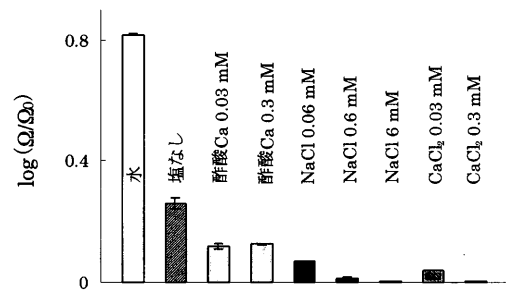


図8 塩によるアミラーゼの活性化

各濃度になるよう酢酸カルシウム、NaCl、CaCl₂を加えた 0.2%デンプンのり溶液 1ml に、だ液溶液 0.06ml を加え 37℃で 10 分間保温した。反応後 10 倍に希釈し、ヨウ素液を 3 滴加え簡易比色計で抵抗値を測定した。「水」のカラムはだ液溶液の代わりに水を 0.1ml 加えてあり、デンプン全量の青紫色の発色を表わしている。「塩なし」は、酢酸カルシウム、NaCl、CaCl₂のどれも加えていないデンプンのり溶液に、だ液溶液を加えて反応させたときの反応液の青紫色発色を表わしている。「水」と「塩なし」の発色の差がだ液アミラーゼの活性量を示す。

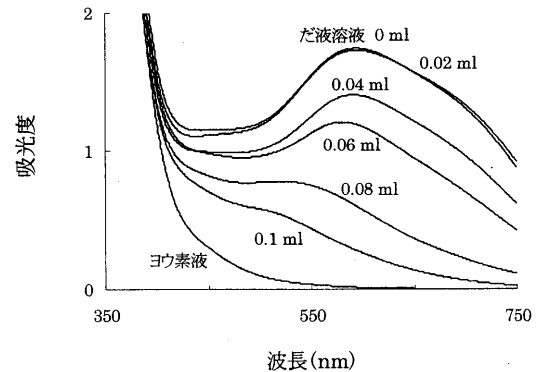


図9 だ液による分解デンプンのり溶液の吸収スペクトル

0.2%デンプンのり溶液 1ml にだ液溶液を各量加え、37℃で 10 分間保温した。反応液を 10 倍に希釈しヨウ素液を 3 滴加えて各反応液の吸収スペクトルを測定した。だ液溶液量が 0.1ml 以下の時は反応液の総量が 1.1ml になるように水を加えてある。

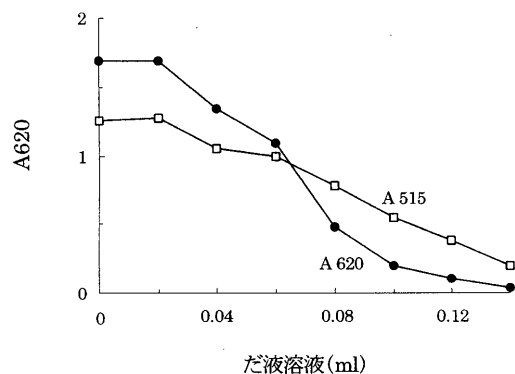


図10 デンプン分解吸光度のだ液量依存性
各だ液溶液量での A620, A515 の値を図9 からプロットした。

7. 発展的な学習への簡易比色計の利用可能性

中学校理科の学習では、新学習指導要領¹⁾を実施する上で、個々の生徒の学習内容の理解や習熟度に応じて発展的補充的な学習を行っていくことが望まれている¹⁸⁾。そのための資料が文部科学省によって作成されている。その中に、進め方として、「さらに進んだ内容の把握」、「発展的な活動を重視した学習の実施」、「生徒の自主性を重視した学習の実施」を指摘している。生徒の知的好奇心や探究心を高めるような題材を取り扱い、その過程で問題解決能力や科学的なものの見方考え方が育成されると良いとされている。

だ液のはたらきについて、本方法は自ら測定装置を作製し、それで何を調べるのかを決め、実験を行い、結果をよく見て、よく考えることの一つの教材として適していると著者らは考えている。簡易比色計は半定量的とはいえ、だ液溶液のはたらきを比較できることから、それへの塩の促進効果（血液中の塩分濃度、浸透圧、海水中の塩分濃度との関連の考察へ広げてよい）、あるいは阻害剤の探索（ダイエット茶や種々の健康食品の活性への影響）など、生徒の興味関心にに応じて、その活用例を広げていくことも今後の課題である。

ま と め

ヨウ素デンプン反応で発色させた試料液を簡易比色計で測定した。簡易比色計で示した抵抗値による測定値 ($\log(\Omega/\Omega_0)$) は、約0.01%デンプンのり溶液の濃度までは、デンプンのり溶液の濃度との間に比例関係があった。簡易比色計を用いて、だ液が30～40℃で最もよく働くことや、時間が経つにつれてだ液がデンプンを分解していること、また、デンプンのり溶液に加えるだ液溶液量を多くすると、デンプンの分解の程度が大きくなるという結果を示すことができた。野菜液についても、ダイコン汁とサツマイモ液にデンプンを分解する働きがあることが簡易比色計を使って測定できた。NaClを6mMデンプンのり溶液に加えることでだ液の働きが十分活性化された。このように、見た目だけで定性的に判断しにくい実験でも簡易比色計を用いることでほぼ定量的に測定できる。

参 考 文 献

- 1) 文部省「中学校学習指導要領（平成10年12月）解説—理科編—」pp.83-84 平成11年
- 2) 戸田盛和ほか「中学校理科2分野上」pp.94-95 大日本図書 平成14年
- 3) 竹内敬人、山極隆、森一夫ほか「中学校理科2分野上」pp.98-99 新興出版啓林館 平成14年
- 4) 竹内敬人「指導書第二部詳説理科2分野上」pp.318-321 新興出版啓林館 平成14年
- 5) 遠藤純夫ほか「中学校理科2分野上教師用指導書」pp.322-323, 344 大日本図書 平成14年
- 6) 「新観察・実験大辞典」編集委員会「新観察・実験大事典〔生物編〕2動物」pp.29-31 東京書籍 2002
- 7) 紺野昇、大塚淳子、杉本良一 自作の比色計とコンピュータを用いた大気汚染調査の教材化 日本理科教育学会研究紀要 36:11-20 1995
- 8) 伏島均、大谷龍二「LEDを利用した簡易比色計の製作と利用」群馬県総合教育センター長期研修報告 1999
- 9) 今倉康宏 ふれあいサイエンス 2001
<http://ostwald.naruto-u.ac.jp/~imakura-labhureai2001/hureaitext.pdf>
- 10) 正元和盛、木村知裕 だ液の働き-デンプンのり溶液の濃度とダイコン汁について pp.9-13 熊本生物研究誌 第33号 2002
- 11) 谷腰欣司 第4章CdS光導電セル「光センサとその使い方」pp.123-164 日刊工業 2000
- 12) EMBL Human protein:P04745
<http://harvester.embl.de/harvester/P047/P04745.htm>
- 13) 萩原浩、林康弘、尾崎克也 カルシウムを含まない α -アミラーゼが存在した—自然界から見いだされた新規Bacillus属 α -アミラーゼの構造活性相関 化学と生物 41:79-82 2003
- 14) Steer, M. and Levitzki, A. The metal specificity of mammalian α -amylase as revealed by enzyme activity and structural probes FEBS Lett. 31:89-92 1973
- 15) Levitzki, A. and Steer, M. The allosteric activation of mammalian α -amylase by chloride Eur. J. Biochem. 41:171-180 1974
- 16) 武藤泰敏「消化・吸収—消化管機能の調節と適応—」pp.102-106 第一出版 1976
- 17) 宇津木和夫、玉野井逸朗、吉田治「生物の実験法—生物体の機能—」pp.30-31 培風館 1982
- 18) 文部科学省「個に応じた指導に関する指導資料—発展的な学習や補充的な学習の推進—(中学校理科編)」教育出版 平成14年