蜂蜜の品質に関する研究

(第1報) 蜂蜜酵素の安定性

越後多嘉志*・竹中哲夫*・市村 真*

Studies on Quality of Honey

Part 1. Stability on enzyme activity of honey

TAKASHI ECHIGO, TETUO TAKENAKA and MAKOTO ICHIMURA

The Stability of enzyme in honey was investigated in a series of study on the quality of honey.

1) In the enzyme preparation were present amylase, glucose oxidase and α -glucosidase, and for each of them the optimum conditions were elucidated.

2) All of the enzymes were labile in the vicinity of pH 3.8 of honey, and amylase was relatively stable to heating.

3) The enzymic activity showed little decline on storage at cold temperature (3°C), but dropped gradually at room temperature.

In experiments on enzymic activity of honey stored in a sealed glass bottle for seven months at room temperature (20-28°C), the loss of amylase activity was least among the examined enzymes.

It was considered that the loss of enzymic activity during storage would depend on moisture content as well as pH value of honey.

(Received Aug. 21, 1973)

蜂蜜の品質研究として糖や酸などの一般成分の調査は数多いが^{1)~4)}、蜂蜜中酵素との関連における調査は少ない。

巣板から採集されたままの蜂蜜では、貯蔵中に品質が酵素化学的に変化すると考えられる。また加熱、溶解、混合などの加工処理をした蜂蜜では、酵素活性がいかに変化するか、またそれを貯蔵した場合の品質変化にも興味がある。

従来ジアスターゼ(アミラーゼ)はFAO/WHOが定めた国際規格に取り上げられており、この酵素の加熱貯蔵における活性変化の調査はこれまで多くなされている^{5),6)~7)}。

著者らは蜂蜜のインベルターゼ(α -グルコシダーゼ)が花蜜のスクロースを分解し、マルトースやエルロースなどのオリゴ糖を生成することを報告したが^{8),9)}、本酵素は蜂蜜の構成糖を生成する酵素の一つとして重要である。この酵素の加熱貯蔵における活性変化の研究例は

2, 3 がある^{10)~12)}。またSCHEPARTZら¹³⁾により検討されているグルコースオキシダーゼ(以下G. O. D. と略称)はグルコン酸生成酵素であり、著者らは蜂蜜中の酸生成酵素の一つとして注目しているが、この酵素の加熱貯蔵における活性変化に関する報告は少ない。

本報では上記3種の酵素の加熱貯蔵中における活性変化を比較調査し、蜂蜜中における酵素の安定性を考察した。

実験方法

1. 試料

昭和47年5月から6月までに入手した国産蜂蜜で、加熱処理されていないものを養蜂家より購入し、使用した。

その試料の内訳はつぎのとおりである。

レンゲ蜜: Chinese milk vetch

(*Astragalus sinicus* L.) 鳥取県産

* 玉川大学農芸化学科(東京都町田市玉川学園 6-1-1)

Department of Agricultural Chemistry, Tamagawa University, Machida, Tokyo

トチ蜜: Horse chestnut

(*Aesculus turbinata Blume*) 北海道産

アカシア蜜: *Acacia (Robinia Pseudo-Acacia L.)* 秋田県産

シナ蜜: *Lime (Tilia japonica Simk.)* 北海道産

2. 酵素液の調製

蜂蜜を水で2倍に希釈した後、ビスキングチューブで冷暗所(4°C)48時間、流水に対して透析し、酵素液とした。

3. 酵素活性の測定

アミラーゼ活性の測定は SCHADE 法¹⁾を改良した。すなわち 0.5 M NaCl を含みりん酸緩衝液 (0.01 M, pH 5.5) 中で 40°C, 1 分間に 1 μ g のデンプンを消化する酵素量を 1 単位とし、消化デンプン量は 0.0007 N-I₂-KI との反応を 600 nm の吸光度を測定して求めた。G.O.D. 活性の測定は SCHEPARTZ ら¹⁸⁾の方法を応用した。すなわちりん酸緩衝液 (0.01 M, pH 5.5) 中で, 38°C, 1 分間に 10⁻³ μ mol のグルコースを酸化する酵素量を 1 単位とし、消化グルコース量は G.O.D. により生成した H₂O₂ と、*o*-dianisidine との比色定量 (400 nm) により算出した。また α -グルコシダーゼ活性はりん酸緩衝液 (0.01 M, pH 5.5) 中で 30°C, 1 分間に 1 μ mol のスクロースを分解する酵素量を 1 単位とした。なお分解スクロース量は Lück¹⁴⁾の方法によって求めた。

4. タンパク質量の測定

タンパク質量は卵白アルブミンを標準として、フオーリンチオカルト法あるいは 280 nm の吸光度から算出した。

5. 酵素液のゲルクロマトグラフィー

方法2に従って調製した酵素液 5 ml をセファデックス G-200 カラム (1.9×40.0 cm) におき、りん酸緩衝液 (0.01 M, pH 5.5) で溶出した。分画容量は 5 ml, 流出速度は 8 ml/hr である。

6. 酵素の作用最適条件

酵素液中の各酵素の作用最適条件は、それぞれの酵素について、一定の反応条件の下で、温度、pH、基質濃度をそれぞれ変えて活性を測定し、活性最大のときの作用条件を求めた。

7. 酵素の熱、pH 安定性

それぞれの酵素の熱安定性は酵素液を一定条件下でいろいろな温度および時間で処理したときの活性度を方法3に従って測定し、最高活性値を 100% として残存活性で表示した。また pH 安定性は pH 2.0~9.0 の緩衝液中で酵素液を 30°C, 2 時間処理したのち、pH 5.5 のりん

酸緩衝液中で方法3に従って活性度を測定し、上記同様残存活性で表示した。

8. 蜂蜜の加熱および貯蔵条件

蜂蜜を 40°C, 50°C, 70°C, 90°C で 1 時間処理したのち、方法2に従って酵素液をそれぞれ調製し、直ちに方法3によって活性度を測定し、40°C, 1 時間処理した蜂蜜の酵素活性を基準にして、残存活性で表示した。また蜂蜜を密封ガラス瓶に入れ、室温 (20°C~28°C), 明所に 7 か月間貯蔵し、貯蔵前後の酵素活性を比較し、貯蔵前の活性を基準にして、1 か月当りの活性損失度 (loss %) で示した。

実験結果

1. 酵素液の性質

方法2に従って調製した酵素液を、セファデックス G-200 カラムによりゲルろ過した結果が第1図である。この結果、本報で取り扱う3種の酵素の活性区分が明らかになったが、これは WHITE ら¹⁹⁾のゲルろ過パターンとほぼ一致していた。

第1表は3種の酵素の作用最適条件を示したが、アミラーゼは他の2種の酵素と比べ、pH は 5.0 とやや低く、温度は 40°C とやや高い。一方 G.O.D. の最適基質濃度 (グルコース濃度) は 1.5 M であり、かなり高濃度であることが注目された。

各酵素の熱安定性は、アミラーゼが 50°C, 40 分加熱で 70% の残存活性があるのに、 α -グルコシダーゼは 50°C, 10 分で 40%, G.O.D. は 50°C, 20 分で 40% であった。アミラーゼは他の2種の酵素に比べ、熱に安定

Fig. 1. Gel Filtration of Sephadex Column of Enzyme Preparation from Honey (Chinese milk vetch honey) : G-200 in 0.01 M phosphate buffer (pH 5.5)

●—● Protein
△·····△ Glucose oxidase
○—○ α -Glucosidase
□—□ Amylase

Table 1. Optimum pH, Temperature and Concentration of Substrate on Activity of Enzyme Preparation from Honey

condition *Enzyme	pH	Temperature (°C)	Concentration** of substrate
Amylase	5.0	40	0.5 (%)
Glucose oxidase	6.0	38	1.5 (M)
α -Glucosidase	6.0	35	0.2 (M)

* Protein content of enzyme preparation: 0.192 mg/ml enzyme sol.

** Concentration of substrate in reaction mixture

Substrate of each enzyme (Amylase : Starch
G.O.D. : Glucose
 α -Glucosidase : Sucrose)

Sample: Chinese milk vetch honey

Fig. 2. Effect of Heating on Stability of Enzyme Preparation (Chinese milk vetch honey)
○—○ 50°C ●—● 60°C △—△ 70°C

である。特に G. O. D. は 50°C, 10 分の加熱と 60°C 以上, 10 分の加熱とでは熱安定性に明らかな差が認められた。(第2図)。

各酵素の pH 安定性は, アミラーゼで 6~8, α -グルコシダーゼで 5~8, G. O. D. では 4~8 の pH 範囲で安定であった。(第3図)。

酵素液にトルエンを加え, 室温 (20°C) や冷温 (3°C) にそれぞれ 12 日間貯蔵して各酵素の活性変化を調べた (第4図)。冷温ではほとんど変化を認めなかったが, 室温では明所, 暗所貯蔵とも活性低下が認められた。アミラーゼは 12 日間で 20% 低下, α -グルコシダーゼは 25% 低下, G. O. D. は 35% 低下した。しかも G. O. D. は他の 2 種の酵素のどれよりも活性低下開始期が早く, 貯蔵 2 日目以降に起こる。

Fig. 3. Effect of pH on Stability of Enzyme Preparation (Chinese milk vetch honey)

Fig. 4. Effect of Storage on Stability of Enzyme Preparation (Chinese milk vetch honey)

×—× Cold temp. (20°C), dark
○—○ Room temp. (3°C), bright
●—● Room temp. (20°C), dark

2. 蜂蜜中の酵素の安定性

第2表に蜜源を異にする4種の蜂蜜の化学組成および酵素活性を示した。蜂蜜の水分量や pH が加熱や貯蔵中の酵素活性変化に影響するという報告⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾ から蜂蜜の加工や貯蔵条件の差のみならず, 化学成分によっても酵素活性度に差があると考えられる。

第5図は蜂蜜を加熱処理したときの酵素の安定性を検討した結果である。50°C, 1時間加熱で残存活性はアミラーゼ 90%, G. O. D. 25%, α -グルコシダーゼ 54% であり, 90°C, 1時間の加熱でも, なおアミラーゼ

Table 2. Composition of Honey Samples

Component	Chinese milk vetch	Acacia	Horse chestnut	Lime
Amylase*	68600	66900	86900	55500
Glucose oxidase*	800	3500	13200	2100
α -Glucosidase*	94	214	474	574
Water, %	20.4	21.3	19.2	21.7
Sugar, %	79.6	78.7	80.8	78.3
Fructose	48.86	51.72	48.72	47.83
Glucose	38.93	36.39	39.84	38.86
** Sucrose	2.53	3.54	2.91	3.36
Maltose	7.82	6.70	7.32	8.39
higher sugars	1.86	1.65	1.21	1.56
Protein, %	0.21	0.24	0.18	0.19
pH	3.8	3.9	3.8	3.9

* Unit/100 ml/ Honey

** g/Honey sugar 100.

The activities and protein content were determined for enzyme preparation.

Fig. 5. Effect of Heating on Enzymic Activity of Honey
Sample: Lime honey

10%, α -グルコシダーゼ 6% の残存活性を示した。アミラーゼがかなり安定であり、次に α -グルコシダーゼ、G. O. D. の順であった。これは第2図の傾向と同様である。

蜂蜜の冷温(3°C)暗所、7か月間貯蔵では、3種の酵素に活性変化をほとんど認めなかったが、室温(20~28°C)明所に7か月間貯蔵した場合、アミラーゼは22.1%, G. O. D. は42.9%, α -グルコシダーゼは47.4%の活性損失を認めた(第3表)。またアミラーゼと α -グルコ

Table 3. Effect of Storage on Enzymic Activity of Honey

Enzyme		Activity U/100 ml/ Honey	Loss %	Loss % per Month
Amylase	before Storage	55500	—	—
	after Storage	43200	22.1	3.2
Glucose oxidase	before Storage	2100	—	—
	after Storage	1200	42.9	6.1
α -Glucosidase	before Storage	574	—	—
	after Storage	302	47.4	6.8

Sample: Lime honey

シダーゼの活性の減少度(loss %)を比べると WHITE¹⁰⁾の結果とほぼ一致した。なお RYCHLIK¹²⁾ は蜂蜜を室温に2年間貯蔵し、インペルターゼ活性の減少を66%と報告している。

考 察

蜂蜜中の各酵素がいかなる性質を示しているかを調べる必要から透析酵素液と蜂蜜を実験試料にして比較検討した。

酵素液中にはアミラーゼ、G. O. D., α -グルコシダーゼ以外に各種の酵素が混在していると考えられるが、本報では上記3種の酵素に着目し、ゲルろ過による各酵素の活性区分から、分子量の大きさは G. O. D. > α -グルコシダーゼ > アミラーゼの順序であることを知った。

WHITE¹⁰⁾らは G. O. D. の分子量が120,000と200,000以上の2成分、 α -グルコシダーゼが51,000、アミラーゼが24,000と報告している。

酵素液中の各酵素活性は低温貯蔵では、ほとんど変化を認めないが、室温に貯蔵した場合には活性低下が徐々に認められたのでさらに高温で貯蔵すると、より低下度は大きくなると考えられる。一方 pH 安定性試験から、通常の蜂蜜の pH 3.8 付近ではこれらの酵素は不安定であるから、蜂蜜中の酵素の活性低下は、pH の要因によることも考慮しなければならない。

SCHADE⁵⁾らは蜂蜜の pH が低いほど、ジアスターゼ(アミラーゼ)活性の加熱による低下度は大きいと報告し、長谷ら⁷⁾も蜂蜜貯蔵中のジアスターゼ活性低下について、同様指摘している。また GONTARSKI¹¹⁾は蜂蜜を加熱した場合のインペルターゼ(α -グルコシダーゼ)活性の減少度は低水分(17%)よりも、高水分(23~25%)の方が大きく、また pH が低い蜂蜜ほど大きいと報告している。著者らも予備実験で、水分量25%に希釈した蜂蜜中の上記3種の酵素活性低下度が、希釈前の蜜よりも

大きいことを認めている。

特殊な貯蔵条件下におかれた蜜は例外として、普通の蜂蜜では50~60°C,あるいは70°C以上の加熱の有無をアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、G. O. D. の安定性から判定しうる。すなわちアミラーゼを50°Cや60°Cに数時間加熱しても活性低下がほとんどないということから、蜂蜜中のアミラーゼ活性が非常に低い場合には、70°C,数時間以上の加熱があったと考え、 α -グルコシダーゼやG. O. D. 活性が非常に低い場合には50°C,数時間以上の加熱があったと考えてもよからう。しかし加熱以前の貯蔵状態によって、すでに活性低下が起きていることもあるので厳密には判定しがたい。

上記のごとく室温以上に貯蔵した場合、蜂蜜中の酵素活性は、弱い熱変性と蜂蜜中の酸度の影響で非常に緩慢であるが低下していると考えられ、またそれに伴う成分の変動も予想される。WHITE ら¹⁶⁾は2年間の室温貯蔵試験で単糖含量や滴定酸度がわずかに変動することを認め、著者らの9か月間の貯蔵試験では、酸度の変化は認めず、スクロース糖含量の変化を認めている。

今後、各温度に加熱し、貯蔵した場合の酵素活性変化と蜂蜜成分変化の比較に着目したい。

要 約

蜂蜜の品質に関する一連研究として、蜂蜜中の酵素の安定性を調べた。

(1) 酵素液中にはアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -グルコシダーゼが存在し、ゲルろ過法によってそれらの活性区分を明らかにした。

(2) 酵素液中の上記各酵素の作用最適条件を第1表に示した。またpH安定性試験から蜂蜜のpH(約3.8)附近ではどの酵素も不安定であった。

(3) 酵素液あるいは蜂蜜中でのアミラーゼは、加熱に対して比較的安定であり、グルコースオキシダーゼは最も不安定であった。酵素液を冷温(3°C)貯蔵すると活性低下をほとんど認めないが、室温(20°C)貯蔵では低下を認め、この場合アミラーゼの低下度が少なく、グルコ

ースオキシダーゼが最も大きかった。

(4) 密封したガラス瓶に蜂蜜を7か月間室温(20~28°C)貯蔵した結果、酵素活性の損失度合はアミラーゼが最も少なく、 α -グルコシダーゼとグルコースオキシダーゼはともにアミラーゼよりも2倍ぐらゐ多かった。

本報告の一部は昭和48年4月、日本農芸化学大会において講演発表した。

文 献

- 1) THAWLEY, A. R.: *Bee World*, **50**, 51(1969).
- 2) STEINKRAUS, K. H., MORSE, R. A., HOANG van MINK, MENDOZA, B. V. and LAIGO, F. M.: *Bee World*, **52**, (3), 122(1971).
- 3) 玉川大農化研究室: 玉川大農研報, **7** & **8**, 173(1968).
- 4) 越後多嘉志: 玉川大農研報, **11**, 37(1971).
- 5) SCHADE, J. E., MARSH, G. L. and ECKERT, J. E.: *Food Res.*, **23**, 446(1958).
- 6) 白鳥つや子・慶田雅洋・川城 徹: 栄養と食糧, **21**, (4), 261(1968).
- 7) 長谷 幸・大立真理子・紅林曉美・鈴木 繁男: 食品工誌, **20**, (6), 257(1973).
- 8) ECHIGO, T., TAKENAKA, T. and ICHIMURA, M.: *Bull of faculty of Agri. Tamagawa Univ.* **12**, 17(1972).
- 9) 越後多嘉志・竹中哲夫: 農化, **47**, (3), 177(1973).
- 10) WHITE, Jr. J. W., KUSHNIR, I., SUBERS, M. H.: *Food Technol.*, **18**, 555(1964).
- 11) GONTARSKI, H.: *Z. Bienenforsch.*, **5**, (7), 191(1961).
- 12) RYCHLIK, M., FEDOROWSKA, Z. *Roczniki PZH*, **13**, (1), 53(1962).
- 13) SCHEPARTZ, A. I. and SUBERS, M. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 228(1964).
- 14) LÜCK, H.: *Methods of Enzymatic Analysis* (Academic press), p. 901(1965).
- 15) WHITE, Jr. J. W. and KUSHNIR, I.: *J. Apicul. Res.*, **6**, (2), 69(1967).
- 16) WHITE, Jr. J. W., RIETHOF, M. L. and KUSHNIR, I.: *J. Food Sci.*, **26**, (1), 63(1961).

(昭和48年8月21日受理)