膵臓および唾液 α-アミラーゼ活性に及ぼす食品等の抽出物の影響

Inhibitory Effects of Various Extract of Foods on the Pancreatic α -Amylase and Ptyalin Activity

榮 昭博, 関﨑 悦子

要約

食品中の抽出物が多糖の消化に及ぼす影響を検討するため、膵臓 α -アミラーゼ(ブタ由来)および唾液 α -アミラーゼ(ヒト由来)を用いて、各食品の抽出物を添加した場合のそれぞれのアミラーゼ活性を測定した。その結果、次のことがわかった。

- 2. 月桂樹およびオレガノ抽出物も膵臓および唾液の α -アミラーゼ活性を阻害した(月桂樹の阻害率:膵臓53.3%・唾液54.8%、オレガノの阻害率:膵臓33.3%・唾液37.6%).
- 3. 桑葉における抽出物は膵臓 α -アミラーゼ活性を阻害したが(阻害率40.3%),唾液 α -アミラーゼ活性の阻害はわずかであった(阻害率14.5%).
- 4. ブラックベリー抽出液の α -アミラーゼの阻害活性には濃度依存性が認められた.
- 5. 加熱処理したブラックベリー抽出液を添加しても, α-アミラーゼの阻害活性は変化しなかった.
- 6. ブラックベリー抽出液にショ糖を添加しても α-アミラーゼ阻害活性は影響されなかった.

キーワード: α-アミラーゼ, 阻害活性, ブラックベリー, 月桂樹, オレガノ

はじめに

我国における代表的な生活習慣病のひとつである糖 尿病は、日本人の約1割が、その患者や予備軍といわ れている. 糖尿病はインスリンの欠乏または作用不足 によって, 高血糖をはじめ糖代謝・脂質代謝等の異常 をまねき, 腎症・網膜症・神経障害などの細小血管症 や動脈硬化症等の合併症を起こす疾患であるり、食事 療法の原則は適切なエネルギー摂取とバランスの良い 食事を摂取することであるが、食後の高血糖を抑制す ることが細小血管障害の予防のため重要であり, Glycemic Index (GI値) の低い食品を摂取することが 望ましいとされている"。また、薬物療法では経口血 糖降下剤もしくはインスリン製剤が投与されるが、こ れらの薬剤投与で十分な効果が期待されない場合, 小 腸に存在するグルコアミラーゼ,スクラーゼ,マルタ ーゼなどのような炭水化物の消化酵素を阻害し、糖の 吸収を遅らせる薬剤カルボース(商品名グルコバイ 錠), ベボグリボース(商品名ベイスン) などのよう

 α α - グルコシターゼ阻害剤の投与が有効であることが知られている。さらに、ある種の植物や茶成分には、アミラーゼインヒビターの存在が知られておりグバ茶²¹、茶³¹、桑葉のラテックス⁴¹、茶大豆種皮⁵¹、白インゲン⁶¹ の成分が、アミラーゼ活性を阻害することが報告されている。

著者らは、日頃、普通に食している食品中や飲料中成分に膵リパーゼ阻害活性を見出し、肥満の発症予防に寄与できる可能性を示唆した" & *** が、同様な考え方において、アミラーゼ活性を阻害する物質を含む食品の同時摂取が多糖の消化を遅延させ、その結果として食後の急激な血糖上昇を抑制する可能性があるとみている。そこで、本研究では、日常的に食されている食品中にアミラーゼを阻害する物質が存在するか否かを明らかにしようとして、桑葉、シソ葉、ブラックベリー、ローズマリー、月桂樹、オレガノおよび大福豆(白インゲン豆)について、アミラーゼ阻害活性を測定した。

材料および方法

I. 実験条件の設定

1. 酵素液の調製

ブタ膵臓 α-アミラーゼ (Amylase from porcine pancreas, Type Ψ-A, sigma, 500 units/mg protein; SIGMA) 19mgに1/15Mリン酸緩衝液(pH 6.9)25.3mlを加えてよく撹拌した.

唾液 α-アミラーゼ (プチアリン)

生理食塩水で口腔を洗浄した後、唾液を採取し、これをリン酸緩衝液で2倍希釈したものを粗酵素液とした。 2. α -アミラーゼ活性の測定

Somogyi-Nelson法による還元性を利用した測定法¹⁰⁾を一部改良して用いた.

(1) 試薬

①基質 0.5%水溶性デンプン

デンプンを1/15M リン酸緩衝液(pH6.9 7m mol塩 化ナトリウム, 1m mol塩化カルシウムを含む)に混 合し,加熱して可溶性デンプンとした.

②試薬A

無水炭酸ナトリウム12gとロッシェル塩6gを水125ml に溶かし、これに10%硫酸銅水溶液20mlを加えて溶かし、さらに、炭酸水素ナトリウム8gを加え溶かした.一方、無水硫酸ナトリウム90gを水250mlで溶かし、この両液を混合した.

③試薬B

モリブデン酸アンモニウム25gを水450mlに溶かし、これに濃硫酸21ml加えた.一方、ヒ酸二ナトリウム3gを水25mlで溶かし、両液を混合した.

- (2) α-アミラーゼ活性の測定
- ①小試験管に基質 200μ 1, 水 200μ 1, 酵素液 50μ 1を加え30℃5分間インキュベートした後, 試薬A 250μ 1加え,直ちに沸騰湯浴中に15分間おいた. 冷却後, 試薬B 500μ 1加えて20分間放置し, 水6m1を加えて撹拌し500nmにおける吸光度を測定した (A).
- ②別に、①の操作で、酵素液 50μ 1の代わりに、加熱処理(沸騰浴中10分)で不活性化させた酵素液 50μ 1 を加えたもの盲検とした (B).
- ③ (A) (B) の値をあらかじめ麦芽糖を標準液に用いて作成した検量線に代入して還元糖相当量 (m mol) を求めて、これを α -アミラーゼ活性とした.

3. インキュベーション時間の決定

酵素濃度 $750 \mu \text{ g/ml}$ のブタ膵臓酵素液およびリン酸 緩衝液で希釈した唾液(蛋白質1 mg/ml)を用いて、30 ℃でインキュベートを開始し、30 秒から40 分後まで の特定時間ごとに α-アミラーゼ活性を測定した.

4. 酵素濃度の決定

本実験で使用する酵素濃度を決定するため,ブタ膵臓 α -アミラーゼをリン酸緩衝液に溶解し750 μ g/mlから倍々希釈した酵素液について,ヒト唾液については,蛋白質濃度を基準にして,4mg/mlからリン酸緩衝液で倍々希釈して,それぞれを30℃5分間インキュベートして, α -アミラーゼ活性を測定した.

II. α-アミラーゼ活性阻害物質の検索

1. 試料

桑の葉、赤シソ、シソ(大葉)、ブラックベリーは群馬県みどり市で栽培したものを、月桂樹、オルガノ、ローズマリー、白インゲン(大福豆)はみどり市の小売店で市販されたものをそれぞれ使用した。ローレル、オルガノ、ローズマリーについては、各1.0gを細かく切りきざみ、石英砂と少量の水を加え乳鉢で磨砕して、さらに水49mlを加えて最終的に50gとした。白インゲン(大福豆)、桑葉、赤シソ、シソ(大葉)、ブラックベリーについては同様の操作を5.0gで行った。これらを室温(25 $^{\circ}$ C)で1時間放置後、遠心分離(3,000rpm、10分)して得られた上澄み液について、さらに遠心分離(30,000 $^{\circ}$ g、15分、4 $^{\circ}$ C)して得られた上清を添加試料とした。

2. 阻害物質を添加した場合の α -アミラーゼ活性測定前述のI-2-(1)-①の水200 μ 1に代えて各抽出液200 μ 1を加え,同様に操作し,この α -アミラーゼ活性をXとした.なお,抽出液の代わりに水を用いたものを対照Cとし,阻害率を次式で求めた.

阻害率= (1-X/C) ×100 (%)

3. 唾液中の蛋白質の測定

唾液中の蛋白質の測定はLowry法を用いた™. なお, 以降の実験においては, 唾液中の蛋白質濃度1mgにリン酸緩衝液で調製した希釈唾液を粗酵素液とした.

- III. 阻害物質濃度が α -アミラーゼ活性に及ぼす影響上述のII-1で調製したブラックベリー抽出液を水で倍々希釈して、これらを添加し膵臓 α -アミラーゼ活性を測定した.
- IV. 阻害物質の加熱処理がアミラーゼ活性に及ぼす影響上述のII-1で調製したブラックベリー抽出液を水で希釈しII-1で調製したブラックベリー抽出液を水で 希釈しII-10%液とし,これを加熱処理(沸騰浴中II-15分間)したものと,別に未加熱液(II-110%)を用意し,これらをそれぞれ添加して膵臓 α -アミラーゼ活性を測定した.

V. 阻害物質に対するショ糖の影響

上述の II α-アミラーゼ活性阻害物質の検索1. 試料

で調製したブラックベリー抽出液の10%液を用意し、 これらを添加した後、さらに5、2.5、1.25%ショ糖水 溶液 200μ 1を加え、ショ糖水溶液の代わりに水 200μ 1 を加えたものを対照として膵臓 α-アミラーゼ活性を 測定した.

VI. 統計処理

t-検定を用いた.

結 果

図1-1には膵臓 α-アミラーゼ濃度750 μ g/mlの酵素液 を用いて、30秒から40分後までインキュベートした場 合の α -アミラーゼ活性を示した. 膵臓 α -アミラーゼ 活性はインキュベート開始から2分後まで急激に増加 し、以降40分までほぼ一定の値が示された。図1-2に は蛋白質濃度1mgの唾液を用いて、30秒から40分後ま でインキュベートした場合の唾液 α-アミラーゼ活性 を示した. 唾液 α-アミラーゼ活性はインキュベート 開始から2分後まで急激に増加し、以降40分までほぼ 一定の値が示され、この条件における最大値は膵臓 α-アミラーゼ活性より小さいものの、膵臓のものと 同様の変動を示した.

図2-1には各酵素濃度における膵臓 α-アミラーゼ活 性を示した. 膵臓 α -アミラーゼ活性は酵素濃度25 μ g/mlから750 µ g/mlまで急激に増加した. 図2-2には各 蛋白質濃度における唾液 α-アミラーゼ活性を示した. 蛋白質(酵素)濃度が高まるに従い、唾液 α-アミラ ーゼ活性は高まり、0.5mgから4mg/mlまでほぼ一定 の値が示された.

表1には各抽出液を添加した場合の膵臓および唾液 α-アミラーゼ活性を示した. 抽出液を含まない対照 と比較して、膵臓および唾液 α-アミラーゼの活性は ブラックベリー添加で著しく減少し、月桂樹、オレガ ノにおいても α -アミラーゼ活性が減少した. 一方, 白インゲン豆抽出液については膵臓 α-アミラーゼで は対照との間に有意な差は認められなかった.

図3-1には各抽出液を添加した場合の膵臓 α-アミラ ーゼの活性阻害率を示した. ブラックベリーでは顕著 な阻害が示され(76.4%),次いで月桂樹(53.3%), 桑の葉(40.3%),オレガノ(33.3%)であった.一 方、大福豆(白インゲン豆)では阻害率0%であった. 図3-2には唾液 α-アミラーゼに対する各抽出液の阻害 率を示した. ブラックベリーの阻害率はきわめて高く (88.7%), 次いで月桂樹 (54.8%), オレガノ (37.6%) であり、一方、大福豆の阻害率は低かった(8.6%).

図4-1には膵臓 α-アミラーゼにおいてブラックベリ

Pancreatic α - amvlase

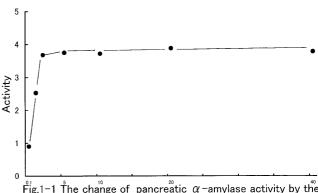


Fig.1-1 The change of pancreatic α-amylase activity by the incubation time(min.).

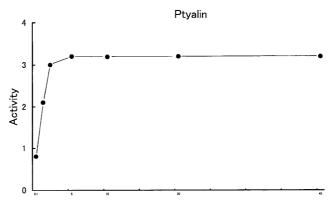
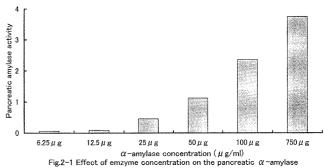


Fig.1-2 The change of ptyalin activities by the incubation

Pancreatic α-amylase



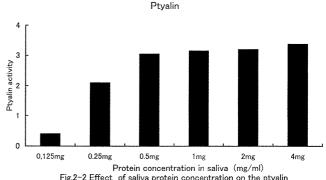


Fig.2-2 Effect of saliva protein concentration on the ptyalin

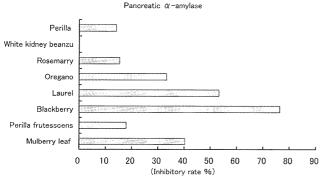


Fig. 3-1 Inhibitory effects of extracts from plants on the pancreatic α amylase activity

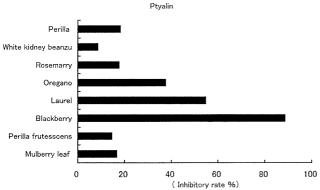
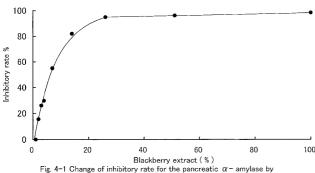


Fig. 3-2 Inhibitory effects of extracts from plants on the ptyalin activity.



quantity of addition of blackberry extract

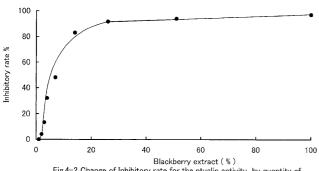


Fig.4-2 Change of Inhibitory rate for the ptyalin activity by quontity of

ー抽出液を段階的に希釈し添加した場合の阻害率を示 した. 0.78%から12.5%まで抽出液の濃度が高まると 阻害率は急激に増加し、25%から100%抽出液添加で は阻害率は飽和状態 (プラトー) を示した. 図4-2に

Table 1. Effect of various extracts on the a-amylase activity.

Extract	Pancreat	Pancreatic a-amylase		Ptyalin(Salivary a-amylase)				
Control	3.90	±	0.06	#	3.72	±	0.05	#
Mulberry leaf	2.33	±	0.06	***	3.10	±	0.10	**
Perilla frutesscens	3.20	±	0.40	***	3.18	±	0.09	**
Blackberry	0.92	±	0.02	***	0.42	±	0.03	***
Laurel	1.82	±	0.08	***	1.68	±	0.04	***
Oregano	2.60	±	0.06	***	2.32	±	0.03	***
Rosemarry	3.30	±	0.03	**	3.06	±	0.06	**
White kidney beanzu	3.90	±	0.06		3.40	±	0.04	**
Perilla	3.35	±	0.01	***	3.04	±	0.05	•••

- #Values are means ± standard error.
 **Significantly different from control(p<0.01)
- ***Significantly different from control(p<0.001)

Table2. Effect of heat of blackberry extract on the pancreaticse a-amylase activity

Extract (mg/ml)	Pancreatic a-amylase				
Control	2.92 ±	0.04 #	a		
Heat blackberry extract	0.35 ±	0.04 **	* b		
Non-heat blacberry extra-	0.33 ±	0.03 **	* Ъ		

- #Values are means ± standard error.

 ***Significantly different from control (p<0.001).
- ^{a,b} Values in a same column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

Table3. Effects of sucrose concentraion on the a-amylase activity

Extract	Pancreaticse α-amylase					
Control	2.92	±	0.04	# a		
Blackberry + 5%Sucrose	0.46	±	0.02	*** b		
Blackberry + 2.5%Sucros	0.51	±	0.03	*** p		
Blackberry + 1.25%Sucro	0.59	\pm	0.02	*** b		

- #Values are means ± standard error
- **Significantly different from control (p<0.001).
- a.b Values in a same column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

は唾液 α-アミラーゼにおいてブラックベリー抽出液 を段階的に希釈し添加した場合の阻害率を示した. 膵 臓におけるものとほぼ同様な阻害率が示され、0.78% から12.5%まで阻害率は急激に増加し、25%から100% までは高い値で維持されていた.

表2にはブラックベリー抽出液を加熱処理した場合 と未処理の膵臓 α-アミラーゼにおける活性を示した. 加熱処理をした場合においても, 未処理においても対 照と比較して活性は著しく低下した (p<0.001). 一 方,加熱処理と未処理 α-アミラーゼ活性の間には有 意な差は認められなかった (p>0.05).

表3にはブラックベリーにおける膵臓 α-アミラーゼ 阻害活性に及ぼすショ糖の影響を調べた結果を示し た. 1.25%から5%までのショ糖を加えても膵臓 α -ア ミラーゼ活性はブラックベリーの添加で低下し(p< 0.001), また、ショ糖濃度の違いによる膵臓 α -アミラ ーゼ活性の差はみられなかった (p>0.05).

ヒトにおけるデンプン等の多糖の消化は口腔におい て唾液 α -アミラーゼ (プチアリン) によりはじまり、 小腸では膵臓の α -アミラーゼにより行われる. もし, 口腔および小腸内に消化酵素の阻害物質が存在した場

合, 多糖類の消化・吸収は抑制される可能性がある.

本実験では、食品等の抽出物に α -アミラーゼ阻害活性の有無を検討するため、哺乳動物由来の α -アミラーゼについて、先ず、酵素における反応条件を確かめた、その結果(図1-1、1-2および図2-1、2-2)、本実験では膵臓 α -アミラーゼの酵素濃度を750 μ g/ml、唾液 α -アミラーゼ(プチアリン)については、唾液蛋白質1mg/mlに希釈した唾液を酵素液とし、インキュベート時間を5分間とした。

表1および図3-1,3-2に示したように、ブラックベ リーでは強い α-アミラーゼ阻害活性が示され、膵臓 由来, 唾液由来いずれの α-アミラーゼについても極 めて高い阻害効果を認めた. 月桂樹、オレガノについ ても高い阻害が示された. 月桂樹については、水に不 溶で、エタノール可溶画分にα-アミラーゼ阻害作用 があり、これを製品化したものもある12. 本実験の結 果,水溶性画分にも阻害作用が認められたことから, 通常の調理法などでも、月桂樹によるα-アミラーゼ 阻害効果を期待できると考えられる. オレガノの α-アミラーゼ阻害効果については三浦らの報告がある13). Konnoら® は桑葉の白乳液 (ラテックス) 中に糖類似 アルカロイドが存在し,これが多くの昆虫対してアミ ラーゼ活性を拮抗的に阻害することを報告している. 本実験の結果では、桑葉については、膵臓α-アミラ ーゼに対しては比較的高い阻害を認めたが、ヒト唾液 α-アミラーゼに対しては、わずかな阻害作用が示さ れたにすぎなかった (表1, 図3-1, 図3-2). 酵素の由 来によって阻害活性に相違が生じることは、月桂樹四, インゲン豆6 に存在する α-アミラーゼインヒビターで も報告されている.また、本実験で観られた活性阻害 は桑のラテックス(粘性物質)が遠心分離(30,000× g) の操作で大部分が除去されていたので、Konnoら® の報告とはことなる成分あるいは、抽出液にわずかに 残存したラテックスの成分が関与した可能性も考えら れる.

本実験の結果では、白インゲン豆(大福豆)抽出物はヒト唾液 α -アミラーゼおよび豚膵臓 α -アミラーゼ活性をいずれも阻害せず、従来のTV等の報道 α -アミラーゼ活性をいずれも阻害せず、従来のTV等の報道 α -アミラーゼ活性をいたこととは異なる結果であった。 Yamadaら α -アミラーゼーンには阻害特異性のことなる4種類の α -アミラーゼインヒビター(α AI-1, α AI-2, α AI-Pal および α AI-Pa2)の存在を明らかにし、その主体は蛋白質で加熱などの調理の過程で失活すること, α AI-1はヒトおよび豚由来の α -アミラーゼ活性を阻

害するが、昆虫や微生物由来のものは阻害しないこと、 α AI-2、 α AI-Pa1は哺乳動物由来の α -アミラーゼを阻害しないことを報告している.

本実験における Ια-アミラーゼ活性阻害物質の検 索で,阻害効果が示されたブッラクベリーについて, 阻害物質濃度のことなる抽出液で α-アミラーゼ活性 阻害を検討した結果、膵臓(図4-1)および唾液(図 4-2) いずれの α-アミラーゼにおいても阻害活性に顕 著な濃度依存性と飽和性が認められた. また, ブラッ クベリーの α-アミラーゼ阻害活性が加熱によって影 響を受けるか否かを調べた結果(表2),ブラックベリ ー抽出液は,加熱した場合でも非加熱の抽出液と同程 度の阻害効果があり、その α -アミラーゼ阻害効果は、 加熱の影響を受けないことが明らかとなった. さら に、ブラックベリーのα-アミラーゼ阻害活性はショ 糖が1.25%以上5%まで混在しても,変化を示さなか った(表3). ブラックベリーは生食するよりジャム等 に加工されることが多い. 本実験の結果より, ブラッ クベリーの有する α-アミラーゼ活性阻害効果は加熱 やショ糖の添加いずれの影響も受けないことから,ジ ャムとして摂取しても急激な血糖の上昇を抑える等の 効果が期待できると考える.

近年,薬学の研究分野では,糖尿病や肥満予防役立つ機能性素材の探索が行われており,その品質評価の指標として, α -グルコシターゼ阻害活性 たか と抗酸化活性 が調べられている。今回,強力な α -アミラーゼ阻害活性の観られたブラックベリーについてこれらの点についても今後検討する必要があると考えている.

引用文献

- 1) 中村丁次ら:栄養・代謝疾患患者の食事療法4 糖尿病 系統看護学講座専門基礎3 人体の構造 と機能 [3] 栄養学. 医学書院(東京), 第10版, 186-187, 2007.
- 2) Deguchi Y.: Effects of Extract of Guava Leaves on the Development of Diabetes in the db/db Mouse and on the Postprandial Blood Glucose of Human Subjects. 日本農 芸化学会誌, 72 (8), 1998.
- 3) 岡本佳乃:茶の機能性飲料抽出法の開発 高カテキン系統のカテキン分析とα-アミラーゼ阻害活性測定. 高知県工業技術センター研究報告, 35: 23-26, 2004.
- Konno K. et al.: Mulberry latex rich in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars.
 Proceedings of the National Academy of Sciences

- PNAS published January 23, 2006. 57: 2011-2020, 1995.
- 5) 小林美緒ら: 茶大豆種皮のラジカル消去活性とプロアントシアニジン含量. 九州農業研究, 65: 54, 2003.
- 6) Yamada T. et al.: Transformation of azuki bean by Agrobeterium tumefaciens. Plant Cell Tissue and Organ Cult, 64: 47-54, 2001.
- 7) 榮昭博, 関崎悦子: 茶およびにがりが膵リパーゼ 活性に及ぼす影響.桐生短期大学紀要, 16:13-17, 2005.
- 8) 榮昭博, 井桁千恵子, 関崎悦子: 食品から得られた水抽出物が膵リパーゼ活性に及ぼす影響.桐生短期大学紀要, 15:77-81, 2004.
- 9) 榮昭博, 関崎悦子: 食品およびサプリメント中の 膵リパーゼ活性阻害物質. 桐生短期大学紀要, 16:11-18, 2006.
- 10) 菅原龍幸,前川昭男:新食品分析ハンドブック. 建帛社(東京),329-330,2000.
- 11) Lowry O. H. et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275,

1951.

- 12)特許第1919036号特許2032272号. http://www.biosafe.co.jp/htmls/detail.html
- 13) 三浦理代ら:市販香辛料の α -アミラーゼ活性および α -グルコシターゼ活性に及ぼす影響. 日本食品科学工学雑誌, 43 (2) :157-163, 1996.
- 14) http://www.tbs.co.jp/company/newsrelease/20060508. html
- 15) http://www.ffcci.jp/cgi-bin/news/news.cgi?96
- 16) 吉川雅之ら:タイ産Salaciachinensisの生物活性: α -グルコシダーゼ阻害活性を指標とした品質評価.薬学雑誌, 123(10):871-880, 2003.
- 17) 吉川雅之ら:Salacia属植物ポリフェノール成分: α グルコシターゼ及びアルドースレダクターゼ 阻害活性成分. 薬学雑誌, 121 (5) :371-378, 2001.
- 18) 寺田澄男ら:ヤーコン地上部の抗酸化活性と α -グルコシターゼ阻害活性に関する成分. 薬学雑誌, 126(8):665-669, 2006.

Inhibitory Effects of Various Extract of Foods on the Pancreatic α -Amylase and Ptyalin Activity

Akihiro Sakae, Etsuko Sekizaki

Abstract

To evaluate the influence of extracts of various foods on digestion of polysaccharides (starch), the amylase activity of porcine pancreas and human saliva were examined when the extracts were included. The findings were as follows,

- 1. Aqueous extract of blackberry remarkably inhibited the α -amylase activity (Inhibitory rate: porcine pancreas 76.4%, human saliva 88.7%).
- 2. Aqueous extracts of laurel and oregano inhibited the α -amylase activity (Inhibitory rate of laurel : pancreas 53.3% and human saliva 54.8%, inhibitory rate of oregano : pancreas 33.3% and saliva 37.6%) .
- 3. Aqueous extract of mulberry leaf inhibited the pancreatic α -amylase activity (inhibitory rate 40.3%). However, the inhibition effect of the mulberry leaf for the α -amylase from human saliva was low (inhibitory rate 14.5%).
- 4. The inhibitory activities of α -amylase on the extracts of blackberry were dependent on the whole blackberry-extracts contents.
- 5. When the heated blackberry extract was added, inhibitory activities of α -amylase did not change.
- 6. The inhibitory activities of α -amylase on the extracts of blackberry were not effected by addition of sucrose.

Keywords: α -Amylase, Blackberry, Laurel, Oregano