

唾液及び膵 $\alpha$ -アミラーゼ活性へのポリフェノール類の影響

荒木裕子 山本直子

Effects of Polyphenols on the Activities of Salivary and Pancreatic  $\alpha$ -Amylases

HIROKO ARAKI and NAOKO YAMAMOTO

The effects of 10 polyphenols and 2 aromatic amino acids on human salivary  $\alpha$ -amylase (SA) and porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (PA) were investigated *in vitro* by Blue Starch method.

① Tannic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and gallic acid showed strong inhibitory effects and their concentrations of 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) were below 1mM for either of SA or PA, whereas  $IC_{50}$  of (+)-catechin were 1.583mM for PA and 6.778 mM for SA.

② Among the other chemicals tested, catechol, L-dopa, DL-dopa, guaiacol, L-phenylalanine and L-tyrosins did not have significant effects on the SA and PA activities.

③ Tannic acid was found to have larger effects on SA than PA, whereas all the other samples showed a stronger inhibition on PA than SA.

$\alpha$ -アミラーゼに対する阻害物質の検索や阻害機構の研究分野では、近年ヒトや家畜の唾液、膵液及び昆虫消化液中の $\alpha$ -アミラーゼに対する特異的な阻害作用を対象にした研究が増加し関連報文もおびただしい数にのぼっている。

そしてその多くは米麦、雑穀、各種豆類、イモ類などから抽出精製した蛋白性の阻害物質が主なものであり、これ以外の植物成分ではポリフェノール、フィチン酸、食物繊維などがあげられるにすぎない。しかもポリフェノール類ではタンニンに関するものが大部分であり、BJORCK 及び NYMAN<sup>1)</sup>はブタ膵 $\alpha$ -アミラーゼとタンニン酸及びカテキンを用いる *in vitro* の実験で、タンニンに強い $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用（以下AIと略称）カテキン

には弱いAIのあることを示した。インゲン豆<sup>2)</sup>、ヒヨコ豆及びキマメ<sup>3)</sup>、ソラマメ<sup>4)</sup>などの種皮に含まれるタンニンにも強いAIが認められ、さらに紅茶、緑茶のタンニン<sup>5)</sup>、カテキン類やテアフラビン類のAI活性の比較<sup>6)</sup>や緑茶カテキンによる肥満予防と消化抑制に関する研究<sup>7)</sup>なども進められている。

さらに三谷及び守<sup>8)</sup>はカテコール・ポリフェノールオキシダーゼ系褐変物質に強いAI活性を見出している。

しかし、農産食品に含まれるポリフェノール類はタンニンやカテキン類のほかクロロゲン酸、コーヒー酸、カテコール、ピロガロール及びドパなど多岐にわたっており、これらの物質のAI活性の有無、強弱関係などは明らかでない。

**key words** :  $\alpha$ -Amylase inhibitor, salivary  $\alpha$ -amylase, pancreatic  $\alpha$ -amylase, polyphenol

ここではこれらポリフェノール類12種について唾液及び膵 $\alpha$ -アミラーゼに対するAI活性を着色不溶性澱粉を用いる比色法（ブルースターチ法）を用い*in vitro*で比較検定した。

## 材料と方法

### 1. 阻害剤試料

使用したポリフェノール類と関連芳香族アミノ酸試薬は次の12種類である。

- 1) タンニン酸
- 2) コーヒー酸
- 3) クロロゲン酸
- 4) ガリックス酸
- 5) (+)-カテキン
- 6) カテコール
- 7) L-ドパ
- 8) D-L-ドパ
- 9) ピロガロール
- 10) グアヤコール
- 11) L-フェニールアラニン
- 12) L-チロシン

このうち、タンニン酸については別途減圧低温乾燥し（40℃、8 hr.）水分含量9.17%を算出した。

以上のうちタンニン酸、(+)-カテキン、コーヒー酸、クロロゲン酸はSIGMA社製品、他のものは国内メーカーのJIS特級品又はそれに準ずる分析用試薬を用いタンニン酸は0.1%水溶液、他の試料は5 mM水溶液を原液とし、阻害剤の濃度区分はその1/50、1/30、1/20、1/10、1/5及び原液(1)とした。ただし(+)-カテキンは $IC_{50}$ の算定のため原液の5倍濃度（25mM）の区も設定した。

### 2. $\alpha$ -アミラーゼ

(1) ヒト唾液 $\alpha$ -アミラーゼ（以下SA）：口腔内を水でうがいしてから10分前後を経過してから採取した唾液を、50mM（0.44g  $CaCl_2$ 、0.23g  $NaCl/l$  添加）pH6.9バッファーで100倍希釈し、混和後No 5 A及び5 Cろ紙で吸引ろ過し、更にメンブランフィルター孔径0.65  $\mu m$ でろ過した透明低粘度唾液を酵素原液とした。

(2) ブタ膵 $\alpha$ -アミラーゼ（以下PA）：SIGMA社ブタ膵アミラーゼA-Iタイプ10mg入りを開封し、上述のバッファーで10000倍に希釈したものを原液とした。以上2種の酵素原液は使用に際し、所定の力価（最

終濃度600IU/l）に達するようさらに希釈した。

### 3. $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定

$\alpha$ -アミラーゼ活性の測定には、還元力の増加や沃素-澱粉反応の呈色度の減少などを測定する方法が広く用いられてきたが、ここではPharmacia社が開発した着色不溶性澱粉Phadebas（俗称blue starch）を第一化学薬品が $\alpha$ -アミラーゼの臨床検査用試薬キットとして発売しているものを使用した。

この比色法を採用した理由は、操作が簡便で反応が鋭敏で安定、再現性もすぐれていると考えたからであり、DESHPANDE及びCHERYAN<sup>13)</sup>もフィチン酸のAI活性の検定に本法を用いている。

実施にあたってはキットの使用法を次のように一部改変した。

試験管に3.7mlの阻害剤溶液を採り、37℃の恒温槽で5分間加温し、酵素液0.3mlとブルースターチ錠を加えて直ちにミキサーで10秒間混和液37℃で正確に30分インキュベートする。終われば0.5N NaOH 1 mlを加えて5秒間ミキサーで混和して反応を停止し、No 5 Cろ紙で吸引ろ過後、島津分光光度計UV1200、620nmで吸光度を測定した。

検量線はブルースターチ錠のロット毎に標準酵素液ファデバスビューミラーゼHを用いて作成されたものにより、吸光度を国際単位IU/lに換算した。

なお被検材料のうちフェニールアラニン、チロシン及びグアヤコール以外のものは反応停止剤にNaOHを用いると黄褐色に発色するので、吸光度に差を生じないことを確かめた上で反応停止剤を2 N酢酸に変更した。

### 4. 阻害度(%)と阻害度50%濃度( $IC_{50}$ )の算定

(1) 阻害度(AI)%：被検液の阻害度はコントロール酵素活性を(CA)とし、被検液の残存酵素活性を(RA)として、次式によって算出した。

$$AI(\%) = \frac{CA - RA}{CA} \times 100$$

(2) IC<sub>50</sub>の算定：AI活性の高いタンニン、クロロゲン酸、コーヒー酸、没食子酸、(+)-カテキンについては3水準以上の濃度で阻害度を測定し、そのパーセント阻害度をプロビット変換し、阻害物質濃度は対数変換し、得られるプロビット回帰直線からIC<sub>50</sub>を算出した。

以上のもの以外の試料は阻害度が低いため原液を用いる一水準の測定にとどめた。

## 結果と論議

供試阻害剤のSA、PAに対する阻害度(%)はTable 1で示し、蛋白質沈殿反応及びIC<sub>50</sub>はTable 2に示した。なお、酵素-阻害剤反応液における阻害剤最終濃度はタンニン酸原液区で84.018mg/dl、その他の阻害剤原液区では4.625mMであった。また大部分の阻害剤水溶液は弱酸性であったがブルースターチ錠に含まれる緩衝剤でpH6.8~7.0に矯正された。

### 1. 試料別α-アミラーゼ阻害作用

(1) タンニン酸：タンニン類はその種類組成は複雑多岐にわたっているが、ここで使用したタンニン酸は標準的な試薬としてのタンニンで、原料は没食子酸とグルコースが結合したガロイルグルコースの混合物とされ一般構造式と平均分子量が明らかにされている<sup>14)</sup>。ここでは他の試料との比較の必要から、実測固形分量90.83%と平均分子量に基づきmM濃度を算出した。

その結果はTable 2に見られるようにIC<sub>50</sub>値は0.017(SA)~0.048(PA)mMと他のポリフェノール類より一桁低く、強いAI活性が認められ、蛋白質沈殿反応<sup>15)</sup>も陽性であった。

(2) コーヒー酸、クロロゲン酸：コーヒー酸はC<sub>6</sub>(芳香環)-C<sub>3</sub>(側鎖)という基本構造のフェニルプロパノイドで果実野菜などに広く分布し、ポリフェノールオキシダーゼの基質として知られているがAI活性もIC<sub>50</sub>0.163(PA)~0.428(SA)mMと強いことが認められた。

クロロゲン酸はコーヒー酸を構成酸とする

配糖体でコーヒー豆、根菜類などに分布し、コーヒー酸同様農産食品中のポリフェノールオキシダーゼによる酵素酸化の主役でもあるが、AI活性もコーヒー酸と同水準のIC<sub>50</sub>は0.187(PA)~0.242(SA)mMであった。没食子酸は3価のフェノールカルボン酸で、ガロタンニンの構成酸でもあるが遊離態でも農産物に含まれ<sup>16)</sup>、AI活性は前二者より低くIC<sub>50</sub>0.223(PA)~0.278(SA)mMであった。

以上三者はいずれも蛋白質沈殿反応は陰性であった。

(3) カテキン：カテキン類はフラボノイドに属し縮合性タンニンの基本構造単量体でその種類も多く、ここでとりあげた(+)-カテキンは阿仙薬の主成分で茶葉その他の農産物にも分布しているが、そのAI活性は比較的弱くIC<sub>50</sub>1.583(PA)~6.778(SA)mMとmM水準の活性値であり蛋白沈殿反応も陰性であった。

しかし、前述のHARA and HONDA<sup>6)</sup>は緑茶、紅茶のカテキン類のうち(-)-カテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキン、(-)-ガロカテキンはμM水準でのAI活性は認められないがそれらのガレートでは20~260μM、さらに紅茶紅色色素であるテアフラビン類では0.6~18μMとさらに強いAI活性が認められるとしており、カテキン類はその種類や酵素酸化、重合度などによってAI活性に大差のあることを明らかにしている。

(4) その他のポリフェノール類と芳香族アミノ酸：これら7種の試料のうち、カテコールは典型的なO-ジフェノール型のポリフェノールで、ポリフェノールオキシダーゼの基質として果実野菜類に広く分布して褐変現象に関与しているが、カテコール自身のAI活性は弱い。

ピロガロールとグアヤコールはレンコン、サツマイモなどのペルオキシダーゼの基質でもあり、グアヤコールはアルカリ性での還元性は強いが中性域でのAI活性は弱い。グアヤコールの阻害活性は弱く不確実であった。

フェニールアラニンとチロシンは植物体内

で脱アミノ作用などによってポリフェノール類の代謝経路に組み込まれるが、フェニールアラニン自身にこの濃度水準で弱いAI活性が認められるがチロシンの阻害度はさらに弱く不確実であった。

なお、野菜果実類のポリフェノール類の種類や含量はそれほど広く解明されてはいない

が全フェノール含量40~150mg% (カテコール換算)、*o*-ジフェノール10mg%前後(ジャガイモ)緑茶抽出液の粗カテキン100~150mg%などの数値が知られている<sup>7),16),17),18),19)</sup>。したがってこの研究でとりあげた阻害剤のうちIC<sub>50</sub>が4~5 mM以上と推定されるポリフェノール類が単独で食品中で

**Table 1** Inhibitory effects of polyphenols on salivary and pancreatic  $\alpha$ -amylase activities

Samples	Enzymes	enzyme inhibition(%)						
		Concentrations of samples <sup>1)</sup>						
		1/50	1/30	1/20	1/10	1/5	1	5
Tannic acid	SA <sup>2)</sup>	46.9	63.3	75.8	84.3		100.0	
	PA <sup>3)</sup>		20.0	56.7	62.8		100.0	
Caffeic acid	SA			3.4	74.4		88.9	
	PA	19.6	50.6	65.1	94.6		100.0	
Chlorogenic acid	SA	6.2		52.3	85.6		100.0	
	PA	21.0		49.2	93.7		100.0	
Gallic acid	SA		19.8	29.4	89.8		100.0	
	PA		21.2	50.3	95.2		100.0	
(+) -Catechin	SA					17.0	42.7	71.8
	PA					36.1	77.4	94.6
Catechol	SA						12.5	
	PA						22.1	
L-Dopa	SA						5.5	
	PA						10.6	
DL-Dopa	SA						8.1	
	PA						16.0	
Pyrogallol	SA						10.7	
	PA						23.6	
Guaiacol	SA						0.1	
	PA						31.0	
L-Phenylalanine	SA						19.7	
	PA						7.8	
L-Tyrosine	SA						0.3	
	PA						7.7	

1) The basic concentrations of test samples were 84mg/dl for tannic acid and 4.625mM for other samples. And 1/50~5 show 1/50~5 times of each above concentrations.

2) Human salivary  $\alpha$ -amylase.

3) Porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase.

AI活性を示すことはほとんどないものと思われる。

しかし、貯蔵加工調理などの過程で酵素酸化による褐変重合した変性物には強いAI活性が生ずる例が知られていることは前述のとおりである。

## 2. 唾液 $\alpha$ -アミラーゼと膵 $\alpha$ -アミラーゼ

各試料ともSA、PAのそれぞれに対するAI活性にはかなりの差があり、タンニン酸のIC<sub>50</sub>の対PA値は対SAの2.5倍を越え、その他の試料では逆に一貫して対SAが高い数値を示した。これは酵素の起源に基づく本質的な差なのか、あるいは今回使用した酵素剤がPAは精製度が高いがSAは唾液から高粘度ムチンを除去しただけの粗酵素液であったので蛋白沈殿剤、収斂剤としての作用を併せ持つタンニン酸に対し他のフェノール性物質とは異なった挙動を示すためとも考えられる。しかし今回の研究計画は酵素の阻害様式や

阻害機構に言及できる構造ではなかったのでこの問題は今後の課題とした。

## 要 約

ポリフェノール類及び芳香族アミノ酸12種についてヒト唾液アミラーゼ(SA)とブタ膵アミラーゼ(PA)に及ぼす阻害作用をブルースターチ法を用い*in vitro*で検定した。

(1) タンニン酸、コーヒー酸、クロロゲン酸及び没食子酸は強い阻害作用を示し、50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)はSA、PAいずれに対しても1 mM以下であった。カテキンはこれに次ぐ阻害活性を示し、IC<sub>50</sub>は1.583(PA)及び6.778(SA)mMであった。

(2) その他の試料のカテコール、L-ドーパ、DL-ドーパ、ピロガロール、グアヤコール、L-フェニールアラニン及びL-チロシンはSA及びPAに対して意味のある程の阻害活性を示さなかった。

**Table 2 Protein precipitation reaction of polyphenols and their IC<sub>50</sub> for salivary and pancreatic  $\alpha$ -amylase**

Samples	MW	Protein precipitation <sup>2)</sup>	IC <sub>50</sub> (mM)	
			SA <sup>3)</sup>	PA <sup>4)</sup>
Tannic acid	(1032) <sup>1)</sup>	+	0.017	0.048
Caffeic acid	180.2	-	0.428	0.163
Chlorogenic acid	354.3	-	0.242	0.187
Gallic acid	170.1	-	0.278	0.223
(+)-Catechin	290.3	-	6.778	1.583
Catechol	110.1	-	>4.625	>4.625
L-Dopa	197.2	-	>4.625	>4.625
DL-Dopa	197.2	-	>4.625	>4.625
Pyrogallol	126.1	-	>4.625	>4.625
Guaiacol	124.1	-	>4.625	>4.625
L-Phenylalanine	165.2	-	>4.625	>4.625
L-Tyrosine	181.2	-	>4.625	>4.625

1) Presumed molecular weight.

2) Bovin serum albumin 1mg/ml(pH5.0)<sup>15)</sup>.

3) Human salivary  $\alpha$ -amylase.

4) Porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase.

(3) タンニン酸はPAよりSAに対して強い阻害作用を示したがタンニン酸以外の試料は一貫してSAよりPAに強い阻害作用を示した。

終わりに臨み、ご懇切なご指導と原稿のご校閲をいただいた本学名誉教授箕口重義博士にお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) BJORCK, I. M. and NYMAN, M. E. : J. Food Sci., **52**(6), 1588 (1987).
- 2) DESHPANDE, S. S., SATHE, S. K. SALUNKHE, D. K. and CORNFORTH, D. P. : J. Food Sci., **47**(6), 1846 (1982).
- 3) SINGH, U: Nut. Rep. Int., **29**(3), 745 (1984).
- 4) MONEAM, N. M. A. : J. Agric. Food Chem., **38**(7), 1479 (1990).
- 5) 田中伸子, 岡村浩 : 日本家政学会誌, **40**(7), 587 (1989).
- 6) HARA, Y. HONDA, M. : Agric. Biol. Chem., **54**(8), 1939 (1990).
- 7) 松本なつき, 原征彦 : 食品工業, **35**(14), 26 (1992).
- 8) 三谷璋子, 守康則 : 栄養学雑誌, **38**(6), 295 (1980).
- 9) CESCO, M., BIRATH, K and BROWN, B. : Clin. chem. Acta., **26**, 437 (1971).
- 10) 佐々木禎一, 大水幸雄, 種村邦子 : 臨床検査, **15**(7), 19 (1971).
- 11) 第一化学薬品株式会社 : ネオアミラーゼテスト第一データ集 (東京), 1980.
- 12) MATHEWSON, P. R. and POMERANZ, Y: J. AOAC, **60**(1), 16 (1977).
- 13) DESHPANDE, S. S. and CHERYAN, M. : J. Food Sci., **49**, 516 (1984).
- 14) 西岡五夫 : 化学と生物, **24**(7), 428 (1986).
- 15) HAGERMAN, A. E. and BUTLER, L. G. : J. Agric. Chem., **26**(4), 809 (1978).
- 16) 黒木証吉, 別所康守 : 食総研報, No36, 33 (1980).
- 17) 辰巳保夫, 茶珍和雄, 緒方邦安 : 日食工誌, **19**(11), 508 (1972).
- 18) 名和義彦, 細田浩, 椎名武夫, 伊藤裕朗, 黒木証吉 : 食総研報, No50, 65 (1987).
- 19) 名和義彦, 黒木証吉 : 食総研報, No36, 27 (1980).