

# インゲン豆中の $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性と その性質

吉 川 秀 樹  
桑 島 千 栄  
小 垂 眞

## I. 緒 言

デンプンの消化酵素である  $\alpha$ -アミラーゼの活性を阻害する  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター (AI) が穀類<sup>1)</sup>、豆類<sup>2)</sup>、イモ類<sup>3)</sup>などの植物性食品中に見出されている。一般に、これらは摂取時の糖の消化吸収に与える影響について様々な検討がなされているが<sup>4)</sup>、その一方で、肥満や糖尿病の予防・治療の際の食事療法の一つとしても関心を集めている<sup>5)</sup>。豆類では、特にインゲン豆に強い活性が見出されており、種々のインゲン豆<sup>2, 6, 7)</sup>から AI が精製されている。しかし、これらについては生化学的な性質について活発な検討がなされているものの、豆を調理・加工する際の挙動についてはあまり検討されていない。豆類と同じく AI 活性を有する小麦では、パンや朝食用シリアルといった加工品にもその活性が検出されている<sup>8)</sup>。また、穀類のアミラーゼ／トリプシンインヒビターが、製粉・製パン業従事者によくみられるアレルギー喘息の主要アレルゲンであるとの報告もあり<sup>9)</sup>、豆の調理過程や加工品における AI の活性についても検討しておく必要があると考える。

そこで本研究では、インゲン豆種子およびそれらの豆加工品に含まれる AI 活性を調べるとともに、活性に与える加熱や pH の影響について検討した。

## II. 実験方法

### 1. 試料

豆種子（乾燥豆）として市販の虎豆、金時豆、大福豆（何れも *Phaseolus vulgaris*）と白花豆、紫花豆（何れも *Phaseolus coccineus*）を、未成熟な豆種子としてサヤインゲンを、豆加工品として煮豆（虎豆、金時豆、白花豆）、甘納豆（金時豆、白花豆）を用いた。乾燥豆はミルで粉碎して粉末とし、それ以外の試料は乳鉢で磨りつぶした後、10倍量の水を加えて室温で1時間攪拌抽出した。布でろ過した後、遠心分離（3,000回転、10分）により得られた上清を試料液とした。

### 2. $\alpha$ -アミラーゼインヒビター (AI) の精製

北海道産の虎豆（Tora-mame, *Phaseolus vulgaris* cultivar Tora）を用いて部分的に精製した粗AI画分を調製した。すなわち、乾燥豆をミルで粉碎した後、5倍量の水を加えて室温で1時間攪拌抽出した。布でろ過した後、得られた上清に90%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え塩析を行った。一夜放置後、生じた沈殿を遠心分離（8,000回転、30分）により回収し、透析用チューブ（分子量3,500カット）に入れて蒸留水に対して透析した。透析終了後、内液の遠心分離（8,000回転、30分）により得られた上清を凍結乾燥し、粗AI画分とした。また、前報<sup>10)</sup>の方法に従って豆粉末より水抽出、エタノール分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィー、Sephacryl S-200ゲルろ過を行ってAIを精製した。

### 3. 酵素および阻害活性測定法

$\alpha$ -アミラーゼ活性は、酵素としてブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ（Type I-A, Sigma社）またはヒト唾液 $\alpha$ -アミラーゼ（Type IX -A, Sigma社）を、基質として可溶性デンプンを用いてヨウ素法により測定した。すなわち、50 mM塩化ナトリウムと5 mM塩化カルシウムを含む20 mMピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPES) 緩衝液 (pH 6.9) に酵素あるいは酵素とAI

を加えた反応液 1.0 ml を 37°C で 30 分間ブレインキュベーションした後、同緩衝液で調製した 1.5% 可溶性デンプン溶液 0.5 ml を加えて 10 分間反応させた。0.5 N 塩酸 - 0.5 N 酢酸混液 (1 : 5) 2.5 ml を加えて反応を停止させた後、その 0.4 ml を取り、ヨウ素液 (0.005% ヨウ素と 0.05% ヨウ化カリウム混液) 5.0 ml を加えて発色させ、660 nm における吸光度を測定した。酵素活性は酵素を含まないものをブランクとして酵素を作用させたものとの吸光度の差で表した。また、AI の阻害活性は AI 存在下における残存酵素活性から算出した。 $\alpha$ -アミラーゼの 1 酵素単位は、上述の反応系において 660 nm での吸光度を 10 分間あたり 1.0 変化させる酵素量とし、1 阻害単位 (IU) は 1 酵素単位を 50% 阻害する AI 量と定義した。

#### 4. タンパク質の定量

タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準タンパク質として、ピロガロールレッド-モリブデン錯体発色法<sup>13)</sup>にて行った。

#### 5. 熱安定性

湿式加熱として、虎豆を室温で 18 時間水浸漬した後、そのまま室温より加熱した。水温が 80°C に達した時点から定時的に豆を取り出し、冷水で急冷した後、乳鉢で磨りつぶした。乾式加熱として、虎豆粉末を 100°C の恒温機中に入れ、定時的に豆を取り出し、冷蔵庫で急冷した。マイクロウェーブ加熱として、虎豆粉末を電子レンジ (500W) にて加熱後、冷蔵庫で急冷した。加圧加熱として、虎豆粉末をオートクレーブ (120°C) にかけて後、冷蔵庫で急冷した。熱処理後の試料は何れも 10 倍量の水を加えて室温で 1 時間攪拌抽出した後、遠心分離 (3,000 回転, 10 分) を行い、得られた上清を試料液とした。また、虎豆から得られた粗 AI 画分および精製 AI については、20 mM PIPES 緩衝液 (pH 6.9) に溶かし (1mg / ml)、80°C で一定時間加熱した後、冷水で急冷した。この溶液から一部を取り、残存する AI の活性を測定した。

## 6. pH の影響

40mM 塩化ナトリウムと 2mM 塩化カルシウムを含む 20mM の各緩衝液、すなわち酢酸緩衝液 (pH 4.0-5.5) あるいはリン酸緩衝液 (pH 6.0-8.0) に酵素と虎豆から精製した AI を加えて 37℃、30 分間ブレインキュベーションした後、AI の活性を測定した。なお、対照としてアミラーゼのみの酵素活性も各 pH において測定した。

## Ⅲ. 実験結果および考察

### 1. インゲン豆中の $\alpha$ - アミラーゼインヒビター (AI) の活性

豆種子、未成熟な豆種子 (サヤインゲン)、豆加工品中の AI 活性、タンパク

Table 1.  $\alpha$  -Amylase inhibitory activity in legume seeds

Legumes	$\alpha$ -Amylase inhibitor (IU* / g)	Protein (mg / g)	Specific activity (IU / mg, protein)
<i>(Phaseolus vulgaris)</i>			
Tora-mame	711	6.1	117
Kintoki-mame	595	6.3	94
Daifuku-mame	38	3.7	10
<i>(Phaseolus coccineus)</i>			
Shirohana-mame	425	6.3	67
Murasakihana-mame	341	3.8	90
(String bean)			
Sayaingen	58	22.4	3
(Nimame, Cooked bean)			
Tora-mame	21	6.9	3
Kintoki-mame	6	14.3	0
Shirohana-mame	0	9.1	0
(Amanatto, Sugared bean)			
Kintoki-mame	19	2.9	7
Shirohana-mame	4	8.0	1

\* 1IU is the amount of inhibitor required for 50% inhibition of lunit of  $\alpha$  -amylase(the amount capable of producing a 1.0 decrease in the absorbance at 660nm over 10min on the iodine-starch method).

質量、比活性を Table 1 に示した。豆種子の中では虎豆や金時豆の活性が比較的強く、最も弱い大福豆では虎豆の約 5% の活性しかなく、比活性で比べても 10% 程度であった。サヤインゲンの活性は大福豆と同程度であり、非常に弱いものであった。また、虎豆や金時豆の煮豆、甘納豆の活性も非常に弱いものであった。Jaffe ら<sup>12)</sup> は、25 種類の Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) について AI 活性を見出しているが、その強さには 1~7 倍の幅が見られる。また、9 種類の Runner bean (*Phaseolus coccineus*) にも AI 活性を見出しているが、Kidney bean に比べて活性は平均で約 35% しかなかった。今回の結果からは大福豆のように AI 活性の弱いものの存在が確認されたが、*Phaseolus vulgaris* (一般に、インゲン豆) と *Phaseolus coccineus* (一般に、ベニバナインゲン) 間には AI 活性の差はほとんど見られなかった。

前報において、我々は発芽インゲン豆において発芽 4 日目以降は AI 活性が減少することを見出している<sup>13)</sup>。また、長弘はインゲン豆の若さやでは未成熟種子にのみ AI 活性を検出している<sup>14)</sup>。表には示していないが、若さやを含んだサヤインゲン試料では未成熟種子のみを試料とした時よりも比活性は減少した。これらのことから、AI はインゲン豆の成熟に伴って種子中に生成されるとともに、完熟種子中において発芽のための貯蔵タンパク質としての役割を担っているものと考えられる。

## 2. 熱安定性

試料の中で最も AI 活性の強かった虎豆を用いて、加熱条件の違いによる AI 活性の変化を調べた結果を Table 2 に示した。豆種子を水浸漬し、吸水させた後の湿式加熱では 10 分後には活性は認められなかったが、水浸漬を行わずに加熱した場合 (乾式加熱) には失活はみられず、30 分加熱後もほとんど活性の低下は認められなかった。マイクロウェーブ加熱では 2 分加熱で豆粉末の焦げつきがみられ、この時の残存活性は 25% であった。オートクレーブ加熱では、10 分後には活性は認められなかった。

これらのことから、AI の失活を目的とするならば湿式加熱が最適であり、

Table 2. Thermal stability of  $\alpha$ -amylase inhibitor in Tora-mame

Treatment	Residual inhibitory activity(%)
Heating after soaking* <sup>1</sup>	0
Dry heating* <sup>2</sup>	100
Microwave heating* <sup>3</sup>	25
Autoclave heating* <sup>4</sup>	0

Heat treatments were done for 10min without microwave heating(2min).

\*1 The whole seeds were heated at 80°C in water after soaking for 18h.

\*2 The ground seeds were heated at 100°C in hot air oven. \*3 The ground seeds were heated in microwave oven(500W). \*4 The ground seeds were autoclaved at 120°C .

先の実験結果からも明らかなように煮豆や甘納豆などの豆加工品から摂取される AI は僅かなものであり、人体に対する影響はほとんど無いと考えられる。一方、AI の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を通して期待される血糖値上昇の抑制作用や抗肥満作用を発現させるためには、加熱条件として黄粉や炒り豆のような乾式加熱が適すると思われる。一般に、豆にはレクチンやトリプシンインヒビターといった抗栄養因子も含まれており、生や加熱不足のまま豆を摂取することで食中毒の原因となる<sup>15)</sup>。また、トリプシンインヒビターは AI と同様に乾式加熱では失活しにくく<sup>16)</sup>、今後はインゲン豆に含まれる他の抗栄養因子の失活も考慮した加熱条件の検討が必要であろう。

虎豆から調製した粗 AI 画分と精製 AI の 80°C における熱安定性を Fig. 1 に示した。何れの AI 活性も加熱時間の経過とともに低下したが、20分加熱後では、粗 AI 画分がほとんど失活するのに対して、精製 AI は約 60% の活性が残存していた。この結果から、AI を他のタンパク質から分離して精製することにより熱安定性が増すことが示唆された。このような現象は、金時豆に含まれるトリプシンインヒビターの熱安定性にも認められており<sup>17)</sup>、多くの共存するタンパク質の熱変性の際に AI との相互作用が起り、失活が早まるものと考えられる。また、虎豆と同様に白インゲン豆<sup>18)</sup> や黒インゲン豆<sup>19)</sup> にも耐熱性の AI

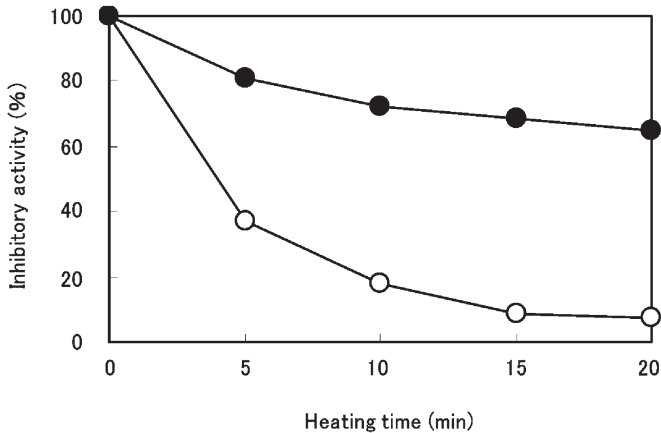


Fig. 1. Changes in  $\alpha$ -amylase inhibitory activity during heating of crude extract (○) and purified  $\alpha$ -amylase inhibitor (●) of Tora-mame at 80°C, pH 6.9.

が存在し、同程度の加熱で失活する穀類中のAI<sup>20, 21)</sup>よりもインゲン豆AIの方が熱安定性が高いことが認められた。

### 3. 虎豆 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの阻害活性

虎豆から精製したAIの膵臓および唾液  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性をFig. 2に示した。同じデンプン分解能を示す酵素量を50%阻害するのに必要なAI量を求めると、膵臓  $\alpha$ -アミラーゼに対しては1.36  $\mu$ g、唾液  $\alpha$ -アミラーゼに対しては1.45  $\mu$ gとなり、本AIが膵臓および唾液  $\alpha$ -アミラーゼに対して同じような阻害能力を有していることが明らかとなった。他のインゲン豆AIも本AIと同様に膵臓および唾液  $\alpha$ -アミラーゼを阻害することが知られている<sup>2, 6, 7)</sup>。一方、微生物のAIには膵臓  $\alpha$ -アミラーゼを阻害するが、唾液  $\alpha$ -アミラーゼを阻害しないものがある<sup>22)</sup>。小麦<sup>1)</sup>やヤマノイモ<sup>3)</sup>のAIにも膵臓  $\alpha$ -アミラーゼよりも唾液  $\alpha$ -アミラーゼを強く阻害するものがあり、これら

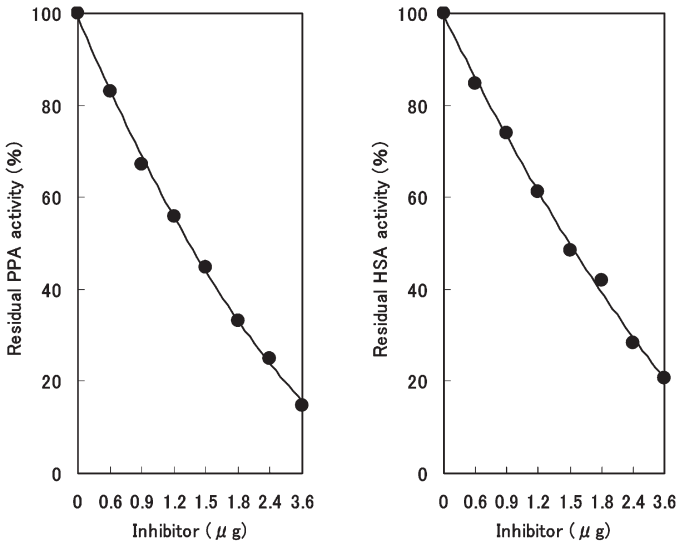


Fig. 2. Inhibitory activities of the  $\alpha$ -amylase inhibitor of Tora-mame against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (PPA) and human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA).

はインゲン豆 AI とは性質が異なっている。

虎豆から精製した AI の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性に及ぼす pH の影響を Fig. 3 に示した。膵臓  $\alpha$ -アミラーゼに対しては、pH 5.0 の時に阻害活性が最大となったが、唾液  $\alpha$ -アミラーゼに対しては、pH 5.0-5.5 の時に阻害活性が最大となり、より広い pH 域で阻害活性を有していた。膵臓  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性については、他のインゲン豆 AI も pH 4.5-5.5 において阻害活性が最大となることが報告されており<sup>2, 23, 24)</sup>、このような性質はインゲン豆 AI に共通したものであると考えられる。しかし、黒インゲン豆 AI は膵臓  $\alpha$ -アミラーゼに対するよりも低い pH 4.5 で唾液  $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性が最大となり、本 AI とは異なる性質を示している<sup>23)</sup>。小麦 AI は pH 5.8-7.0 において膵臓  $\alpha$ -アミラーゼを最も強く阻害することが報告されており<sup>1)</sup>、インゲン豆 AI を摂取した場合、唾液  $\alpha$ -アミラーゼによるデンプンの初期消化に対しては効果的に



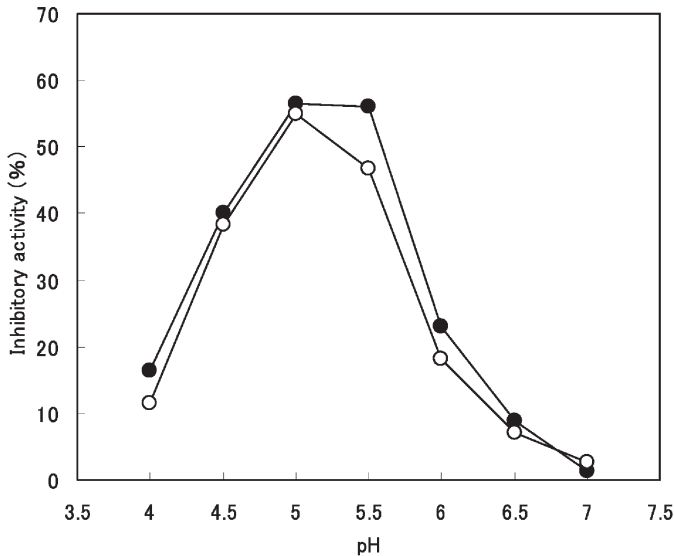


Fig. 3. Effects of pH on inhibition of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase(○) and human salivary  $\alpha$ -amylase(●) by the  $\alpha$ -amylase inhibitor of Tora-mame.

作用するものの、小腸内における膵臓  $\alpha$ -アミラーゼによるデンプン消化に対しては小麦 AI よりも効果が弱いことが推測される。

#### IV. 要 約

$\alpha$ -アミラーゼインヒビター (AI) の活性は、虎豆や金時豆で強く、大福豆、サヤインゲン、煮豆や甘納豆では非常に弱かった。豆種子を水浸漬した後の加熱では AI は 10 分で失活したが、水浸漬をせずに加熱すると 30 分後もほとんど失活しなかった。マイクロウェーブ加熱、オートクレーブ加熱では短時間で失活した。これらのことから、豆中の AI を有効的に摂取するためには黄粉や炒り豆のような乾式加熱が適することが示唆された。虎豆 AI は膵臓と唾液  $\alpha$ -アミラーゼを同じように阻害し、膵臓  $\alpha$ -アミラーゼに対しては pH 5.0 の時に、

唾液  $\alpha$  - アミラーゼに対しては pH 5.0-5.5 の時に阻害活性が最大となった。

終わりに、本研究を行うにあたり、実験にご協力頂きました本学卒業生西村美紀さんに深謝致します。

### 参考文献

- 1) O'donnell, M.D. and Mcgeeney, K.F. : *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 159 (1976).
- 2) Marshall, J.J. and Lauda, C.M. : *J. Biol. Chem.*, **250**, 8030 (1975).
- 3) Sharma, K.K. and Pattabiraman, T.N. : *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 255 (1982).
- 4) Yoshikawa, H., Kotaru, M., Tanaka, C., Ikeuchi, T. and Kawabata, M. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **45**, 797 (1999).
- 5) 横田 隆, 桐原 修, 大石一二三, 谷 久典, 渡辺乾二, 大網 弘: 栄食誌, **47**, 341 (1994).
- 6) Powers, J.R. and Whitaker, J.R. : *J. Food Biochem.*, **1**, 217 (1977).
- 7) 小垂 眞, 吉川秀樹 : 家政誌, **39**, 1065 (1988).
- 8) Gallaher, D. and Schneeman, B.O. : *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety* (Plenum Press, New York), p.299 (1984).
- 9) 中村 良 : 栄養と健康のライフサイエンス, **2**, 569 (1997).
- 10) Yoshikawa, H., Kotaru, M., Tanaka, C., Kawabata, M. and Ikeuchi, T. : *J. Home Econ. Jpn.*, **50**, 243 (1999).
- 11) Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A. and Tokudo, K. : *Clin. Chem.*, **32**, 1551 (1986).
- 12) Jaffe, W.G., Moreno, R. and Wallis, V. : *Nutr. Rep. Int.*, **7**, 169 (1973).
- 13) 小垂 眞, 木本文喜, 吉川秀樹, 池内常郎 : 栄食誌, **40**, 240 (1987).
- 14) 長弘美智子 : 栄養と食糧, **34**, 341 (1981).
- 15) 高橋久仁子 : 食文化誌ヴェスタ, **67**, 42 (2007).

- 16) 光永俊郎, 福岡千鶴子, 清水まゆみ : 家政誌, **36**, 665 (1985).
- 17) Tsukamoto, I., Miyoshi, M. and Hamaguchi, Y. : *Cereal Chem.*, **60**, 194 (1983)
- 18) Cinco, F.J., Frels, J.M., Holt, D.L. and Rupnow, J.H. : *J. Food Sci.*, **50**, 533 (1985).
- 19) Frels, J.M. and Rupnow, J.H. : *J. Food Biochem.*, **8**, 281 (1984).
- 20) Nagaraj, R.H. and Pattabiraman, T.N. : *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 646 (1985).
- 21) Kutty, A.V.M. and Pattabiraman, T.N. : *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 552 (1986).
- 22) Arai, M., Oouchi, N. and Murao, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 987 (1985)
- 23) Lajoro, F.M. and Filho, F.F : *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 132 (1985).
- 24) 吉川秀樹, 小垂 眞, 田中千栄, 河端 信, 池内常郎 : 光華女子短期大学  
研究紀要, **37**, 1 (1999).

