唾液 α -アミラーゼ活性測定法の開発および その褐変食品への応用

三 浦 理 代, 五 明 紀 春

女子栄養大学

A Novel Method for Estimating the Activity of α -amylase in Human Saliva and Its Application to Several Browened Foods

Masayo MIURA and Toshiharu GOMYO

Kagawa Nutrition University, Sakado 350-02

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) **47**, 35~41 (1994)

A study was conducted on the effects of several kinds of commercial processed foods, which were brown-colored due mainly to enzymatic or non-enzymatic browning, on the activity of α -amylase from human saliva. The investigated foods included 4 types of soy paste, 5 types of soy sauce, 5 types of sauce, 5 types of tea and 5 miscellaneous other products. Starch Azure, which is chemically modified and insoluble potato starch, was used as a probe substrate for digestion in the presence of food components. The enzymatic reaction medium was 0.1 M NaCl-0.04 M sodium/potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM CaCl_2 . The reaction solution was incubated at 37°C. The blue pigment solubilized from the solid substrate into the supernatant on digestion by α -amylase was determined by differential spectrometry using its absorption at 595 nm. Some foods below the concentration normally eaten were found to exert an adverse effect on the activity of α -amylase with the following relationship: $\log (A/100) = -a \cdot F$. F : conc. of food component, A : relative activity, a : coefficient corresponding to inhibitory efficiency. In this experiment, a correlation between inhibitory effect and coloredness of food components was not confirmed, and the involvement of complex factors in the inhibition was suggested.

Key Words α -amylase, browened food, inhibition, Starch Azure.

(Received April 5, 1993)

従来、種々の α -アミラーゼ阻害因子が食品素材から分離され、その性質について多くの研究がなされてきた。しかし、これらの阻害因子の実際の食事における栄養学的および臨床上の観点からの評価については未だ明確でない点が多く残されている¹⁾。

すでに著者らはモデル的に構成したアミノ酸-還元糖系 Maillard 反応によって生成する褐色重合色素 melanoidin のヒト唾液 α -アミラーゼ阻害作用を明らかにしている²⁾。周知のように Maillard 反応は食品の加工・貯蔵・調理の過程で普遍的に見られる成分間反応であり、その結果 melanoidin が蓄積し一般に食品は褐変する³⁾。広く褐色食品はこのような melanoidin を含む蓋然性が高く、モデル系での結果が実在の褐色食品において適用できるかどうかの確認作業はデンプンの消化吸収

速度制御という臨床上的の見地⁴⁾⁵⁾からも興味深い課題である。

しかし、melanoidin 自体その化学構造は多義的であり、そのアミラーゼ活性阻害作用の程度は生成反応条件、分子量、組成などによって異なっている²⁾。また現段階においては実在食品中での melanoidin の分離定量は方法的に困難であるため、本研究は melanoidin によるアミラーゼ活性阻害の知見を基礎としてはいるが、対象とした褐色食品が全体として有するアミラーゼ活性阻害効果の検出に及ぶものである。また、実在食品系には melanoidin 以外に種々のタイプの褐色色素があり、さらに褐色色素以外にもアミラーゼ活性影響因子が存在している可能性が十分あると予想されるので、結果の評価にあたってはこれらの点を当然考慮する必要がある。

一方、実在食品系においてアミラーゼ作用によるデンプン水解物の定量は共存成分による干渉を受け、一般に

正確な測定が困難であると予想された。そこで本研究では実在食品系に適用できるデンプン水解速度の新しい測定方法の開発を試みた。すなわち非食品成分である人工修飾デンプン Starch Azure[®] をブローブ基質として反応系に投入、この基質の分解度を追跡することによって α -アミラーゼ活性を測定することにした。

本研究では melanoidin およびそれに類似すると思われる褐色色素を比較的多量に含む市販褐色食品として、味噌類、醤油類、茶類、コーヒー、ココア、黒砂糖、コーラ、ソース類を取り上げ、それらのアミラーゼ活性に及ぼす阻害作用を比較検討した。なお、褐色度の必ずしも高くない場合でも同系統食品の比較対照を目的に測定した。

実験方法

1. 供試食品

供試した褐色食品はすべて市販加工品で普通液状ないし流動形態で食用する日常食品 24 品目を選んだ。供試食品は以下のとおりである。すべて 1992 年 6 月から 12 月にかけて埼玉県坂戸市内の食料品店にて購入した。() 内は『商品名』・製造年月日・製造(販売)者・所在地。

1) [味噌類] 4 品目 八丁味噌(『三葉葵』92.9.1・大田商店・愛知)、仙台味噌(『ジョウセン』92.6.18・仙台味噌醤油(株)・仙台)、信州味噌(『白づくりみそ』92.9.4・(株)イトーヨーカ堂・東京)、白味噌(『むかしの味』92.8.25・山永味噌(株)・埼玉)。

2) [醤油類] 5 品目 濃口醤油(『キッコーマンしょうゆ』92.3.19・キッコーマン(株)・千葉)、淡口醤油(『キッコーマンうすくち』92.7.16・キッコーマン(株)・千葉)、白醤油(『白むらさき』92.11.5・本むらさき(株)・広島)、再仕込み醤油(『玄妙』92.10.24・石山味噌醤油(株)・新潟)、たまり醤油(『本醸造さしみたま』92.9.4・盛田(株)・名古屋)。

3) [ソース類] 5 品目 ウスターソース(『ブルドックウスターソース』92.7.16・ブルドックソース(株)・東京)、中濃ソース(『ブルドック中濃ソース』92.6.26・同上)、とんかつソース(『とんかつソース』92.8.20・同上)、オイスターソース(『オイスターソースハオユー جان』92.10.7・キッコーマン(株)・千葉)、デミグラソース(『ハイツクッキングソース 1 デミグラ』92.9.30・ハイツ日本(株)・東京)。

4) [茶類] 5 品目 煎茶(『お茶小路/静岡茶』92.5.26・(株)イトーヨーカ堂・東京)、抹茶(『初昔』92.10.1・北川半兵衛商店・京都)、ほうじ茶(『ティーバッグほうじ茶』92.6.30・(株)小野園・東京)、ウーロン茶(『遠赤焙煎烏龍茶』92.10.21・日商物産(株)・茨城)、紅茶(『霧の紅茶』92.12.8・UCC 上島珈琲(株)・神戸)。

5) [その他] 5 品目 コーヒー(『The Blend Taste No.117』92.8.18・UCC 上島珈琲(株)・神戸)、ココア(『森永ミルクココア』92.7.3・森永製菓(株)・東京)、コーラ(『PEPCI』92.12.5・ペプシコ(株)日本支社・東京)、麦茶(『むぎ茶冷水用』93.1.9・ハウス食品工業(株)・大阪)、黒砂糖(『沖縄特産黒砂糖』92.8.11・日新カップ(株)・東京)。

2. 供試食品調製原液

各食品を以下に示す方法で調製し、調製原液として供試した。肉眼で濁りの認められるものについては 10,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清を用いた。調製原液は普通使用する食品濃度より高濃度に設定し、反応系への投入量は酵素反応溶液における終濃度が日常の喫食濃度付近を中心に 4/5, 2/5, 1/5 の 3 段階に希釈されるようにした。試料はすべて 0.04 M リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0) を溶媒とし pH 7.0 に調節した。

1) [味噌類] 試料 10 g を乳鉢で磨砕し 0.08 M リン酸ナトリウム・カリウム (pH 7.0) 緩衝液 25 ml を加え懸濁液を pH 7.0 に調節後、蒸留水で 50 ml に定容、これを遠心分離 (10,000 rpm, 10 min) 後上清を濾過した。

2) [醤油類] 試料 25 ml に 0.08 M リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0) 20 ml 弱を加え pH 7.0 に調節後、同緩衝液で 50 ml に定容した。

3) [ソース類] 試料 25 ml に 0.08 M リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0) 20 ml 弱を加え pH 7.0 に調節後、同緩衝液で 50 ml に定容した。遠心分離 (10,000 rpm, 10 min) 後上清を用いた。

4) [茶類] 試料 10 g (麦茶は 11.5 g) に熱湯 150 ml を加え 100°C 5 分加熱した後、濾過して蒸留水で 100 ml に定容した。この 25 ml に 0.08 M リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0) 20 ml 弱を加え pH 7.0 に調節、同緩衝液で 50 ml に定容した。抹茶では試料 10 g に温湯 40 ml に懸濁し、同緩衝液 50 ml を加え pH 7.0 に調節し、蒸留水で 100 ml に定容した。

5) [コーヒー] 試料 2 g に熱湯 20 ml 弱を加え 0.08 M リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0) 25 ml で pH 7.0 に調節、蒸留水で 50 ml に定容した。

6) [ココア] 試料 30 g に熱湯 100 ml を加えて懸濁し、25 ml を取り 0.08 M リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0) 20 ml 弱を加え pH 7.0 に調節、同緩衝液で 50 ml に定容した。

7) [コーラ] 醤油類に同じ。

8) [麦茶] 茶類に同じ。

9) [黒砂糖] 試料 10 g を乳鉢で磨砕し 0.08 M リン酸ナトリウム・カリウム緩衝液 (pH 7.0) 25 ml を加え pH 7.0 に調節、蒸留水で 50 ml に定容した。

3. α -アミラーゼ活性の測定

Remazol brilliant blue R で化学修飾したジャガイモデンプン (Starch Azure : Sigma Chemical Co.) をプローブ基質として α -アミラーゼ/食品系に投入, 上清中に可溶化した青色色素を差スペクトル法により測定, 酵素活性を定量した。すなわちガラス製秤量ビンに Starch Azure 50 mg を採り, 供試食品調製原液を 1.0 mM CaCl_2 および 0.1 M NaCl を含む 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で指定倍率に希釈したものを 4.5 ml 加えた。適当な反応速度を得るために 100°C, 5 分間予備加熱し基質の Starch Azure を膨潤させた。この溶液を 37°C に恒温化した後, 1.0 mM CaCl_2 および 0.1 M NaCl を含む 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解したヒト唾液 α -アミラーゼ ([EC3.2.2.1], Sigma, Type IV-A) 2.5 IU/ml, 0.5 ml を加えて同温度で 10 分間インキュベートし 50% 氷酢酸 0.5 ml を加えて反応停止させた。さらに氷水中で 5 分冷却後, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離して得た上清を適当に希釈, さらにマイクロフィルター (0.45 μm) で透明化した後可視部差スペクトルを測定した。酵素反応から測定までの操作は 2 点法で行った。

4. 差スペクトルの測定

α -アミラーゼ溶液を 1.0 mM CaCl_2 および 0.1 M NaCl を含む 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml で置換した以外は前記反応溶液と同様に調製した溶液を差スペクトルのブランクとし食品由来の吸収スペクトルを消去した。ラピッドスキャン分光測定装置 USP-600 (パルスフラッシュ光源付属装置付, UNISOK) を用いて波長範囲 440~650 nm で差スペクトルを測定, Starch Azure の極大吸収波長 595 nm における吸光値から可溶化デンプン量を定量した。なお吸収スペクトルに関して食品成分と Starch Azure の相互作用のないことを食品ごとに回収試験を行って確認した。食品調製液添加時の吸光値の無添加時の吸光値に対する割合から相対活性 (%) を求めた。

5. 小麦種子 α -アミラーゼインヒビター

食品との比較対照のため小麦種子の α -アミラーゼインヒビター (α -Amylase Inhibitor from *Triticum aestivum* (Wheat seed) Type I, Sigma Chemical Co.) を用いた。すなわちインヒビター標品 (740 units/mg) 5 mg を 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に溶解し, 前記酵素反応溶液に一定量加えて阻害活性を測定した。

実験結果

1. Starch Azure に対する α -アミラーゼ作用

Fig. 1 は α -アミラーゼによる Starch Azure の可溶化の経時変化をスペクトルのピーク波長 595 nm における吸光値で示したものである。この吸光値を酵素活性の

Fig. 1. The time course of solubilization of Starch Azure.

Starch Azure suspended in 4.5 ml of 0.1 M NaCl -0.04 M sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM CaCl_2 was preheated at 100°C to be gelatinized, and added 0.5 ml of α -amylase (2.5 U/ml) solubilized in 0.1 M-0.04 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM CaCl_2 to be incubated at 37°C for 10 min, followed by the addition of 0.5 ml of 50% glacial acetic acid to stop the reaction. The blue-colored supernatant obtained by centrifugation was subjected to differential spectrometry to determine the absorption at 595 nm.

測定指標として用いた。また, 以下の実験ではこの経時変化における直線に相当する範囲で反応時間を選んだ。

Fig. 2 は Starch Azure と可溶性デンプンの二つの基質についてそれぞれ酵素投入量を等しくし, 同一条件で平行的に反応させたときの Starch Azure の可溶化度と可溶性デンプンのオリゴ糖生成量の相関を示す。この反応時間内においては両者は良く相関した。本実験条件下での Starch Azure の可溶化度とデンプン消化度の平行性は良好であり, Starch Azure のプローブ基質としての妥当性を支持する結果である。なお酵素反応量として ΔE_{595} 1.0 はオリゴ糖生成量約 3 mg/dl に相当した。

2. 青色色素スペクトルに及ぼす共存食品の影響

Starch Azure をプローブ基質として食品系に投入して酵素反応させた場合, 生成した可溶性青色色素のスペクトルに対する共存食品の影響を調べた。Fig. 3 に濃口醤油の例を示す。酵素反応によって得られた青色色素溶液に濃口醤油を添加した場合, その醤油に対する差スペ

Fig. 2. Correlation between the solubilization of Starch Azure and the production of oligosaccharides from soluble starch under the same reaction condition.

Starch Azure was determined under the condition described in the legend of Fig. 1. E_{595} indicates the value of solubilization. Soluble starch was digested under the same condition with that of Starch Azure. The production of oligosaccharide including maltose, maltotriose and maltotetraose was determined by HPLC in which the condition was as follows. Column : Shodex Ionpak KS-801 (8 mm ID×30 cmL), column temp. : 60°C, developing solvent : water, flow rate : 0.4 ml/min. Detected by a differential refractometer (ERMA Co., ERC 7520).

クトルはもとの青色溶液のスペクトルとほぼ一致した。この結果から、可溶性色素と醤油成分とは少なくともスペクトル的には相互作用は認められなかった。なお、他の食品についても同様の方法でスペクトル形に関して青色色素と食品との相互作用のないことを確認し、一方 E_{595} の回収率は $100 \pm 5\%$ 内に収まった。Starch Azure を基質とした活性測定法は本実験の供試食品の範囲内では十分妥当性があると結論した。

3. α -アミラーゼ活性阻害指標

Fig. 4 に示すように各食品について本実験の食品濃度範囲では、食品無添加時の相対活性を 100 とした場合、食品添加時の相対活性と食品濃度の間に近似的に次の実験式(1)が成立した。この式は非拮抗阻害において酵素量に対する阻害剤濃度が相対的に低い場合に理論的に導かれる関係と等しい⁷⁾。

$$\log(A/100) = -a \cdot F \quad (1)$$

(F : 食品濃度%, A : 相対活性%, a : 係数)

Fig. 3. Recovery test for the soluble blue pigment produced by the digestion of Starch Azure in the presence of food component (koikuchi shoyu).

Water was used as reference in spectrometry.

A : Starch Azure was digested for 20 min under the same condition described in the legend of Fig. 1. The blue-colored supernatant was mixed with the equivolume of koikuchi shoyu. B : The supernatant was mixed with water in place of koikuchi shoyu in A. C : Theoretical spectrum calculated by subtracting D from A on the chart. D : Koikuchi shoyu was mixed with water in place of the supernatant in A.

食品濃度は反応系に投入した原食品の濃度を示す。食品の α -アミラーゼ活性に対する阻害指標として実用上の便宜のために活性半減濃度 F_{50} (相対活性 50% に相当する食品濃度) を定義し、また a を阻害係数と命名して食品固有の阻害指標とした。活性半減濃度と阻害係数には次式の関係がある。

$$F_{50} = \log 2/a \quad (2)$$

さらに食品の阻害効果を一般化するために小麦種子 α -アミラーゼインヒビターを基準阻害因子に選び、この阻害係数を a_0 として次式により標準阻害活性 I を定義した。なお、本実験条件下では小麦種子 α -アミラーゼインヒビターについても(1)式は成立した。

$$I \times 10^3 = a/a_0 \quad (3)$$

(1)式は阻害に及ぼす食品濃度の加算効果は相対活性の積として表れることを意味しており、また阻害因子が複合している場合には阻害効果は各因子同士の相乗効果として発現することをも示している。

4. 食品の α -アミラーゼ活性に及ぼす影響

Table 1 に供試食品について活性半減濃度 F_{50} 、標準

Fig. 4. Correlation between the relative activity of α -amylase and the concentration of food.

The relative activity A was estimated against the control where food component was absent. The conc. of food F indicates the ratio of the amount of the original food to that of the reaction solution. a : denoted as an inhibiting coefficient.

阻害活性 I , 実験式 (1) 成立の相関係数 r および信頼限界 p を示す。また、食品の褐色度指標として調製原液の 1% 希釈液の 450 nm における吸光値も合わせて示してある。活性半減濃度から各食品の通常の使用量レベルでの阻害効果の程度をほぼ推測することが可能である。

供試食品の褐色度と α -アミラーゼ阻害効果の間には相関が認められなかった。褐色色素による阻害作用の可能性は否定できないが、褐色色素以外にも食品中には種々のタイプの α -アミラーゼ阻害因子が含まれていることが示唆された。

1) 味噌類 味噌類の上清画分には相当程度の α -アミラーゼ活性阻害作用が共通的に認められた。ただし本実験で検出された阻害作用は味噌の水溶性因子に基づくものである。一方、阻害活性は仙台味噌が最も大きく信州味噌、白味噌、八丁味噌の順であった。前 3 者は米味噌に属し褐色度と阻害活性は平行し、活性半減濃度は通常の味噌汁濃度程度であった。豆味噌・米味噌の調合品である八丁味噌は着色度は最も大きかったが阻害活性は白味噌の 1/2 であり、このことから褐色色素以外の阻害因子の関与が示唆された。一方、味噌を遠心分離せずに固形分を含む形で供試した場合にはさらに活性抑制は強くなった。味噌の沈澱性粒子と酵素または基質との相互作用も阻害効果に影響しているものと考えられる。通常の喫食状況における味噌の阻害作用は本実験結果からの予想レベルを下回ることはないと考えられる。

2) 醤油類 淡口醤油以外の阻害作用はほぼ同程度で

あり、褐色度と阻害活性の間には相関が認められなかった。活性半減濃度は通常の煮物のほぼ倍濃度であった。淡口に比べて濃口のほうが阻害作用が大きい半面、白醤油の阻害作用は他のどれよりも高く、褐色色素以外の阻害因子の関与が強く示唆された。

3) ソース類 活性阻害は種類によって著しく異なった。褐色度と活性阻害の相関も認められなかった。ウスター、デミグラの活性半減濃度は 100% 以上であり実際使用時には α -アミラーゼ活性阻害は微弱であることを示唆している。食物重量に対するソース重量は通常 10~20% 調味が適当とされる。とんかつ、中濃、オイスターの活性半減濃度は実際使用時の濃度にほぼ相当し、喫食状況によっては活性阻害を起こす可能性がある。

4) 茶類 阻害活性は紅茶で最も強くウーロン茶がこれに次ぎ、ほうじ茶、煎茶の順に弱くなった。煎茶では阻害活性がほとんど認められなかった。この 4 者間では褐色度と阻害活性は良く平行した。紅茶、ウーロン茶は茶葉の酵素的褐変が進行しており、ほうじ茶は主として加熱による非酵素的褐変により着色しているとみられる。茶葉内で形成された褐色色素あるいは二次的に生成した他の何らかの因子が活性阻害と関連のあることが示唆された。紅茶、ウーロン茶、ほうじ茶は日常食品のうちで α -アミラーゼ活性を最も強く阻害する食品として位置付けることが可能である。

一方、抹茶の阻害活性はほうじ茶の約 1/5 で、原料茶葉に最も近い性状の煎茶と同様にほとんど活性阻害がなく、予想に反した結果となった。原料茶葉中のポリフェノール類は α -アミラーゼ阻害因子として良く知られているが、本実験条件下で抽出された濃度ではほとんど影響はないものと推定される。しかし、茶葉処理過程でこれらのポリフェノールから重合褐変により生成するタンニン色素には melanoidin 類似の阻害作用があるものと推定される。また、茶葉の褐変過程で随伴生成する他の因子の阻害作用も考えられる。

5) 雑類 黒砂糖、ココア、麦茶の活性半減濃度は実際の喫食条件の範囲内にあった。半面、コーヒー、コーラの活性半減濃度は実際使用時よりも相当高く活性阻害はほとんどないと考えられる。

考 察

本研究は Maillard 反応の最終生成物 melanoidin が一定のアミラーゼ活性阻害効果を有するとのモデル的知見²⁾を基礎として、実在の褐色食品系においてこの知見が適用できるかどうかを検討したものである。melanoidin 含有の蓋然性が高い褐色系統の市販加工食品 24 種類についてアミラーゼ活性阻害の有無およびその程度を調べた。

Table 1. Inhibiting effects of browned foods on the activity of α -amylase.

Foods	$I \times 10^3$	r	p	F_{50} (%)	$E_{450}^{1\%}$
Soy pastes					
sendai	1.667	-0.953	0.1	10.2	1.875
shinshû	1.533	-0.973	0.05	12.3	0.641
shiro	1.333	-0.998	0.005	14.7	0.429
hacchô	0.667	-0.997	0.005	30.7	7.266
Soy sauces					
shiro	1.133	-0.997	0.005	17.8	0.103
koikuchi	0.933	-0.988	0.02	21.5	2.163
saishikomi	0.867	-0.980	0.05	23.1	0.130
tamari	0.867	-0.993	0.01	23.1	4.033
usukuchi	0.533	-0.937	0.1	43.4	0.809
Sauces					
tonkatsu	2.600	-0.998	0.005	8.8	1.083
chûnô	2.133	-0.984	0.05	12.7	1.145
oyster	0.800	-0.979	0.05	21.8	1.075
worcester	0.200	-0.976	0.05	>100.0	1.250
demigra	0.000	—	—	—	0.370
Tea					
black	26.133	-0.961	0.1	0.8	0.871
oolong	24.200	-0.945	0.1	0.8	0.335
hōjicha	10.600	-0.977	0.05	2.3	0.271
maccha	2.000	-0.876	0.2	9.0	0.110
sencha	0.000	—	—	—	0.093
Miscellaneous					
brown sugar	1.800	-0.923	0.1	8.1	0.249
cocoa	1.733	-0.992	0.01	12.0	0.249
mugicha	1.267	-0.825	>0.2	15.3	0.107
coffee	0.333	-0.582	>0.2	58.2	4.341
cola	0.000	—	—	—	0.250
Inhibitor*	10^3	-0.900	0.001	20.6×10^{-3}	—

* α -amylase inhibitor from wheat seed. $I \times 10^3$: $1000 \times a/a_0$ where a and a_0 are the inhibiting coefficients defined by the regression line $\log(A/100) = -aF$ (see the text) for the subjected food and α -amylase inhibitor from wheat seed, respectively. The I was defined as a standard inhibiting index of food. r : correlation coefficient between the logarithm of relative activity and the concentration of food ($N=8$). p : significance level of correlation coefficient ($N=8$). F_{50} : concentration of food required to reduce the activity of α -amylase by 50%. $E_{450}^{1\%}$: absorbance of the diluted solution (1%) of food as the index of coloredness.

いくつかの供試食品には通常の喫食濃度付近で顕著な活性阻害が認められたが、同一系統の食品においても褐色度と活性阻害度の間には必ずしも明確な相関はなく、当該食品におけるアミラーゼ活性阻害作用に対して種々の因子が関与し、測定結果はそれらの複合効果であることが示唆された。

すでに著者らは Maillard 反応の反応条件、生成 melanoidin の分子量、組成などによって melanoidin のアミラーゼ活性阻害作用の程度は大きく異なることを明らかにしている²⁾。したがって実在の褐色食品における melanoidin の定性、定量が困難である現段階においてはモデル的知見に基づいて直接的に測定結果を評価ないしは解釈することには当然限界がある。測定結果は個々の

褐色食品が全体としてアミラーゼ活性阻害にどのように寄与するかの尺度と解釈するのが適当である。

供試食品はいずれも加熱加工ないしは発酵、長期貯蔵を経たものであり、原料由来の植物起源 α -アミラーゼインヒビター⁸⁾⁹⁾ や豆類レクチン¹⁰⁾ など非耐熱性のタンパク質性因子はほとんど実験結果に影響していないものと推定された。

一方、従来 α -アミラーゼに対する耐熱性阻害因子としてフィチン酸^{11)~13)}、植物ポリフェノール^{14)~16)} が良く研究されており、*in vitro* におけるデンプンの酵素水解阻害作用だけでなく血糖値変動・インシュリン応答の抑制、glycemic index の低下など臨床的応用の可能性についても検討されてきた。しかし多くは未処理素材の粗抽

出物ないし分離成分を対象とした研究であり、これらの阻害因子が実在食品系に存在している場合の効果についてはほとんどわかっていない。しかし本研究における供試食品のうち豆類、穀類、茶類を原料とするものにおいてはこれら既知の耐熱性阻害因子が部分的に寄与している可能性は否定できない。

一般に食品の加熱処理に伴う成分間反応によって多数の二次的成分が生成することは良く知られている¹⁷⁾。melanoidin²⁾以外にもこれらの二次的成分の中で阻害作用を持つものがあると予想され、実在食品系の示す阻害作用の解析にはこれらの要因も無視できない。

供試食品の阻害係数は最大のものでも小麦種子 α -アミラーゼインヒビターの 1/100 以下であり、一般に食品中の阻害因子は相当程度希釈された状態で存在していると解釈される。しかし、問題は実際の喫食量において当該食品が α -アミラーゼ活性阻害作用を有するか否かということである。本実験では食品の試験濃度域を実際の喫食レベル近傍に設定してあり、測定の結果は大部分の供試食品が実際の食事においても有意の α -アミラーゼ活性阻害作用を発揮することを示唆している。なお、本研究において得られた阻害係数、活性半減濃度などの測定値は投入酵素量、反応温度、反応時間等の基準的に設定された条件に即したものである。食品による阻害度を一般的に相互比較するためには共通的な条件設定に留意する必要がある。

一般にデンプンの消化吸収速度には前述の因子以外にも食物繊維、デンプンの種類、デンプン-タンパク質相互作用、加工調理法(デンプン糊化度)、食品形態など多数の次元の異なる因子が影響する^{18)~20)}。血糖値制御を目的とした食品の臨床応用にはこれらの諸因子の総合的評価が前提となる。しかし本研究はデンプン性食品自体の条件のみならずともに摂食する他の食品因子の影響も考慮する必要があることを明らかにしている。デンプン性食品とともに同時摂食する他の食品の臨床上的応用については今後の検討課題となる。

本研究の着手にあたって実在食品系におけるデンプン水解速度の正確な測定法の確立が課題であった。ここでは人工基質である Starch Azure をブロープ基質として実在食品系に投入、酵素反応によって生成した可溶性青色色素を定量するという方法を開発した。本法は共存成分による干渉を最小限にし、かつ簡便迅速であり、食品のような複雑な組成を持つ系においては有効な測定法であることを実証した。本法はその考え方の面で臨床検査技術の分野で古くから展開されている測定原理に基礎を置いている。一般に実在食品系内で生起する諸反応の追

跡のために目的に応じた多数のブロープ物質の開発が待たれる。

要 約

1) 褐色系統の市販加工食品 25 品目(味噌類 4, 醬油類 5, ソース類 5, 茶類 5, その他 5) の α -アミラーゼ活性阻害作用を化学修飾デンプン Starch Azure をブロープ基質として測定、比較した。供試食品の範囲では褐色度と活性阻害効果には相関が認められなかった。

2) 活性阻害食品について次の関係式を得た。

$$\log(A/100) = -a \cdot F$$

(F : 食品濃度%, A : 相対活性%, a : 係数)

阻害効果の尺度として次式で活性半減濃度を定義した。

$$F_{50} = \log 2/a$$

文 献

- 1) Thompson, L.U.: *Food Technol.*, **April**, 123 (1988)
- 2) 三浦理代, 五明紀春: 栄食誌, **46**, 309 (1993)
- 3) Mauron, J.: *Prog. Food. Nutr. Sci.*, **5**, 5 (1981)
- 4) Jenkins, D.J.A. and Wholever, T.M.S.: *Proc. Nutr. Soc.*, **40**, 227 (1981)
- 5) Wholever, T.M.S., Jenkins, D.J.A., Jenkins, A.L., Thorn, M.J., Thompson, L.U. and Taylor, R.H.: *ACS Symp. Ser.*, **214**, 17 (1983)
- 6) Rinderknecht, H., Wilding, P. and Haberback, B. J.: *Specialia*, **15**, 805 (1967)
- 7) 中村隆雄: 酵素-反応速度論と機構, 98, (1977), 学会出版センター (東京)
- 8) Marshall, J. and Lauda, C.M.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 8030 (1975)
- 9) Buonocore, V. and Silano, V.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, **199**, 483 (1986)
- 10) Thompson, L.U., Reaand, R. and Jenkins, D.J.A.: *J. Food Sci.*, **48**, 235 (1983)
- 11) Buonocore, V., Poerio, E., Silano, V.H. and Tomasi, M.: *Biochem. J.*, **153**, 621 (1976)
- 12) Deshpande, S.S. and Cheryan, M.: *J. Food Sci.*, **49**, 516 (1984)
- 13) Thompson, L.U., Price, G. and Mang, G.: *Cereal Food World*, **31**, 596 (1986)
- 14) Thompson, L.U., Yoon, J.H. and Jenkins, D.J.A.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **39**, 745 (1984)
- 15) Thompson, L.U. and Yoon, J.H.: *J. Food Sci.*, **49**, 1228 (1984)
- 16) Griffiths, D.W.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, **199**, 509 (1986)
- 17) 五明紀春: 食品の品質と成分間反応, 第 6 章食品の栄養・生理機能性, 237 (1990), 講談社サイエンティフィック (東京)
- 18) Andeson, J.W., Chen, W. and Sieling, B.: *Metabolism*, **29**, 551 (1980)
- 19) Crapo, P.: *Nutr. Today*, **14**, 6 (1984)
- 20) Dreher, M.L., Dreher, C.J. and Berry, J.W.: *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **20**, 47 (1983)

(1993 年 4 月 5 日受理)