

論文

タマネギ外皮抽出物の各種グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

瀬部 和美・進藤 直文・木庭 芳恵・奥田 香織・中原 司

(西九州大学健康福祉学部健康栄養学科)

(平成21年1月9日受理)

Effects of Onion Rind Extract on Activity of Various Glucosidases

Kazumi SEBE, Naofumi SHINDOH, Yoshie KOBA, Kaori OKUDA and Tsukasa NAKAHARA

Department of Health and Nutrition Science, Faculty of Health and Social Welfare Science, Nishikyushu University

(Accepted: January 9, 2009)

Abstract

The inhibitory effect of extract of onion rind on the activities of carbohydrate-metabolizing enzymes such as α -glucosidase and α -amylase, was examined *in vitro*. The onion rind extract was found to inhibit the activities of these enzymes and the inhibitory effect on the maltase activity was higher than that on the activities of the other enzymes. *In vitro*, the onion rind extract inhibited the maltase, isomaltase, glucoamylase, sucrase and α -amylase with IC₅₀ values of 2.1 mg/ml, 2.9 mg/ml, 2.9 mg/ml, 3.8 mg/ml, and 4.4 mg/ml respectively. In five compounds identified from onion rind extract, protocatechuic acid and quercetin showed inhibitory activity on each enzyme. Moreover, protocatechuic acid was main polyphenol in onion rind extract. These results suggest that onion rind extract has the α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities. In structural analogues of protocatechuic acid, gallic acid have the highest inhibitory activity against the α -glucosidase.

キーワード： α -グルコシダーゼ、 α -アミラーゼ、タマネギ外皮、ポリフェノール

Key words : α -glucosidase, α -amylase, Onion rind, polyphenol

1. 緒 言

近年、食品に関する多くの研究が行われ、食品の生理的機能が明らかになってきている。中でも、機能性成分の一つのポリフェノールは、野菜、お茶、果物、嗜好食品などに広く含まれており¹⁾、摂取する機会が多い機能性成分である。

ポリフェノール類の一つであるプロトカテキュー酸は、柑橘類（ミカン、ポンカンなど）、野菜（タマネギ、レタス、イチゴなど）等に含まれているフェノール類で、強い抗酸化作用を示し、発ガン抑制効果が報告されている²⁾。

本研究室では、廃棄物のタマネギ外皮の有効利用を目的として研究を行っているが、タマネギ外皮から強いDPPHラジカル消去能を持つ数種類のフェノール化合物を単離した³⁾。ポリフェノール類には抗酸化作用の他に血糖上昇抑制作用があると報告がある^{4,5)}。そこで今回はタマネギ外皮抽出液にも血糖上昇抑制作用があるのではないかと考え、糖質代謝酵素阻害活性について実験を行い、これまでに単離したタマネギ外皮抽出液に含まれるフェノール化合物との関係について検討した。

2. 実験方法

2.1 試料の調製

2.1.1 タマネギ外皮抽出物の調製

乾燥タマネギ外皮0.2gを10mlの熱水中に入れ、90℃で5分間抽出し、吸引ろ過したものを抽出液とした。

また、乾燥タマネギ外皮50gに蒸留水1Lを加え、90℃で30分加熱抽出した。吸引ろ過後、ろ液を凍結乾燥したものを作成した。

2.1.2 酵素液の調製⁴⁾

各種グルコシダーゼ阻害試験に用いた酵素は、市販のラット小腸アセトン粉末（SIGMA社製）に9倍量の56mMマレイン酸緩衝液（pH6.9）を加え、氷冷中にてホモジナイズした後、遠心分離（3000rpm, 10min, 4℃）を行い、上清を粗酵素液とした。この粗酵素液はグルコアミラーゼ反応には4倍希釈、マルターゼ反応には20倍希釈、スクラーゼ反応とイソマルターゼ反応には2倍希釈し、各種グルコシダーゼ阻害試験に用いた。

α -アミラーゼはブタ臍臓由来 α -アミラーゼ（SIGMA社製）を250units/mgになるように0.1Mリン酸緩衝溶液（pH7.0）で調整した。

フェノールカルボン酸による阻害試験に用いた α -グルコシダーゼは、市販ラット小腸アセトン粉末0.25gに10mlの0.05Mリン酸緩衝溶液（pH6.7）を加え、遠心分離（3000rpm, 10min, 4℃）した上清を粗酵素液とした。

2.2 糖質代謝酵素活性測定法

2.2.1 α -グルコシダーゼ活性測定^{4,5)}

グルコアミラーゼ活性測定にはデンプン、マルターゼ活性測定にはマルトース、スクラーゼ活性測定にはスクロース、イソマルターゼ活性測定にはパラチノースを基質として用いた。リン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した2%各種基質溶液100μlにタマネギ外皮抽出液50μlを添加し、37℃にて5分間保温後、上記各粗酵素液50μlを加え37℃にて30、60、90、120分間反応させた。対照には蒸留水を添加し、ブランクには失活酵素を用いた。反応停止は沸騰水中で1分間加熱して酵素を失活させた。反応停止後、上清20μlにグルコースCII-テストワコ（和光純薬工業社製）の発色剤3mlを添加した。グルコースオキシダーゼ法により、505nmの吸光度を測定し、生成したグルコース量を測定した。

50%阻害濃度の測定はタマネギ外皮凍結乾燥試料を適宜希釈したもの（0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、10、20、30、40、50mg/ml）を使用し、上記方法の反応時間を30分とした。阻害活性率は、タマネギ外皮凍結乾燥粉末希釈液を加えない対照の生成グルコース量を100%としたときの残存率で示し、50%阻害濃度（IC₅₀）を求めた。

2.2.2 α -アミラーゼ活性測定法

0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した4%可溶性デンプン1mlにタマネギ外皮抽出液1mlを添加し、37℃で5分間保温した。その後、 α -アミラーゼを20μl加え、37℃で30、60、90、120分間反応させた。対照は蒸留水、ブランクには失活酵素を用いた。反応停止は沸騰水中で10分間加熱し、酵素を失活させた。反応後、残存デンプン量を測定するため、上清100μlに0.01Mヨウ素溶液を添加し、660nmの吸光度を測定⁶⁾した。

また、50%阻害濃度は、タマネギ外皮凍結乾燥試料を適宜希釈（0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、10、20、30、40、50mg/ml）したものを使用し、反応時間を30分として上記の方法にて行った。阻害活性率は、タマネギ外皮凍結乾燥粉末希釈液を加えない対照の残存デンプン量を100%とした時の残存率で示し、50%阻害濃度を求めた。

2.2.3 タマネギ外皮に含まれるフェノール類が α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

タマネギ外皮抽出液の代わりに、0.2mg/ml濃度の5種のフェノール類（ケルセチン、プロトカテキュー酸、バニリン酸、フロログルシノール、p-ヒドロキシ安息香酸）を用い、上記の α -グルコシダーゼ及び α -アミラーゼ活性測定法と同様の方法にて試験を行った。

2.2.4 プロトカテキュー酸構造類似体が α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

2%デンプン溶液100μlにDMSOに溶解した25μMフェノールカルボン酸（プロトカテキュー酸、4-ヒドロキシ安息香酸、カテコール、2,4-ジヒドロキシ安息香酸、

2,5-ジヒドロキシ安息香酸、2,6-ジヒドロキシ安息香酸、没食子酸、フロログルシノール)を50μl添加し、37℃にて5分間保温した。 α -グルコシダーゼ50μlを加え、37℃にて60分間反応させた。対照はDMSO、ブランクには失活酵素を用いた。反応停止は沸騰水中で1分間加熱して酵素を失活させた。生成したグルコース量は上記のグルコース C II-テストワコーにて測定した。

3. 結果及び考察

3.1 タマネギ外皮抽出液が α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

タマネギ外皮抽出液のグルコアミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼ、イソマルターゼ、 α -アミラーゼに対する阻害作用をFig. 1に示した。タマネギ外皮抽出液は試験を行ったすべての酵素に対して阻害作用を示し、マルターゼに対して最も強い阻害作用を示した。 α -アミラーゼに対しては他のグルコシダーゼと比較すると低い阻害率であった。

このことから、タマネギ外皮茶はこれら糖質代謝阻害作用を持っているため、血糖上昇を抑制すると考えられる。

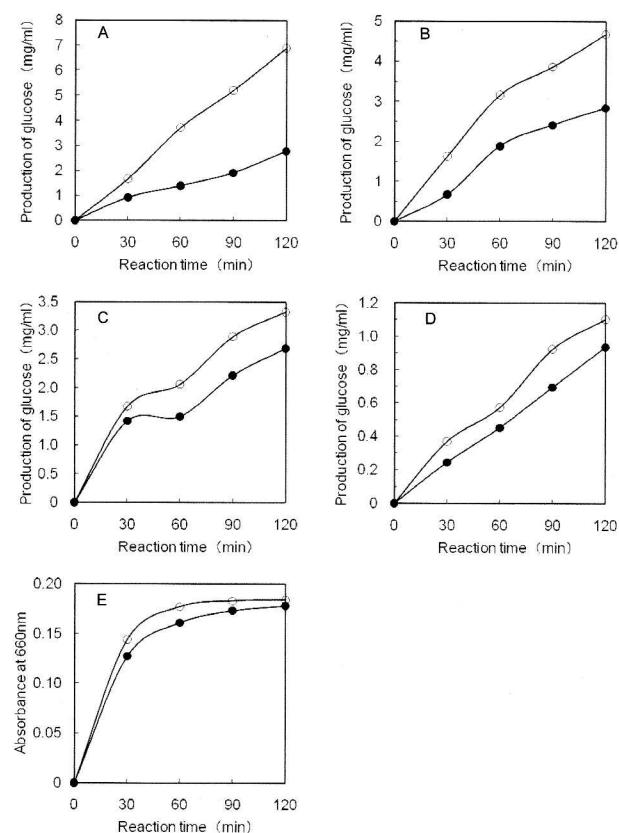


Fig. 1 Inhibitory effect of onion rind extract on the activities of glucoamylase(A), maltase(B), sucrase(C), isomaltase(D) and α -amylase(E). Symbols: ○, control; ●, onion rind extract

3.2 タマネギに含まれるフェノール類が α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

タマネギ外皮にはすでに知られているケルセチン⁷⁾の他に、プロトカテキュ酸、バニリン酸、フロログルシノール、*p*-ヒドロキシ安息香酸が含まれることを報告した³⁾。そこで、これらのフェノール類が α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響について検討した。各フェノール類を添加した時の120分後のグルコシダーゼ活性をTable 1に示した。また、Fig. 2に阻害作用がより強くみられたプロトカテキュ酸とケルセチンの影響を示した。試験したフェノール類のうち、グルコアミラーゼ、マルターゼ及びスクラーゼに対してはプロトカテキュ酸が最も強い

Table 1 Effect on various glucosidases activity of phenolic compounds in onion rind extract

	Glucosidase activity (%)			
	Glucoamylase	Maltase	Sucrase	α -Amylase
Protocatechuic acid	71.56	66.68	64.84	95.12
Vanillic acid	97.73	97.05	89.77	90.91
Phloroglucinol	96.14	95.80	93.58	88.10
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	93.35	100.2	86.15	93.71
Quercetin	69.68	80.61	84.94	86.70

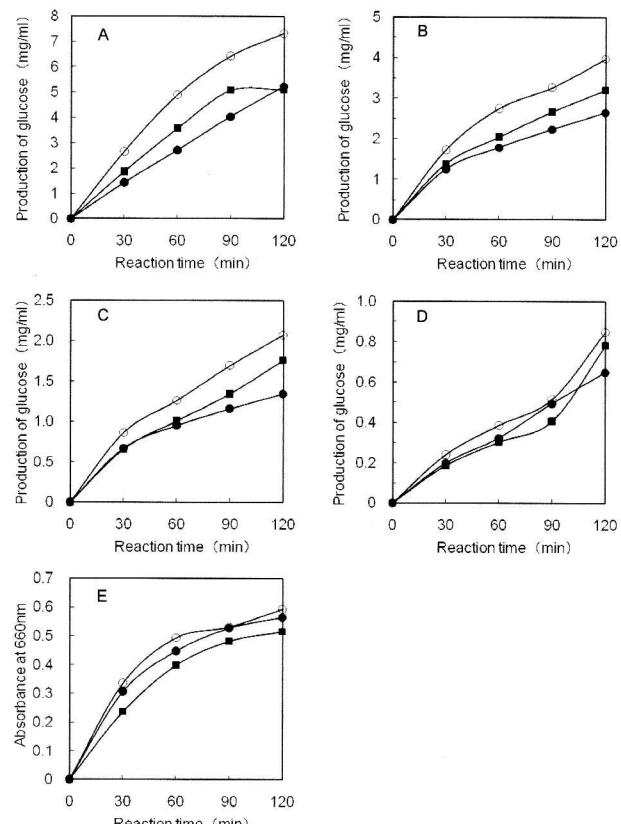


Fig. 2 Inhibitory effect of protocatechuic acid and quercetin on the activities of glucoamylase (A), maltase (B), sucrase (C), isomaltase (D) and α -amylase (E).

Symbols: ○, control; ■, protocatechuic acid; ▲, quercetin

阻害作用を示した。 α -アミラーゼに対しては、ケルセチンの阻害作用が強く、プロトカテキュ酸にはほとんど阻害作用がみられなかった。

次にタマネギ外皮抽出物の、それぞれの酵素に対する阻害作用の濃度依存性について検討を行った。その結果、すべての酵素に対して、濃度依存的に阻害作用を示し、マルターゼ、イソマルターゼ、グルコアミラーゼ、スクラーゼ、 α -アミラーゼの順に強い阻害作用がみられた(Fig. 3)。それぞれのIC₅₀はマルターゼが2.1mg/ml、イソマルターゼとグルコアミラーゼは2.9mg/ml、スクラーゼは3.8mg/ml、 α -アミラーゼは4.4mg/mlであった。マルターゼとスクラーゼについては、すでに報告されているグアバ葉の抽出液と同程度の阻害作用を有することが認められた⁴⁾。

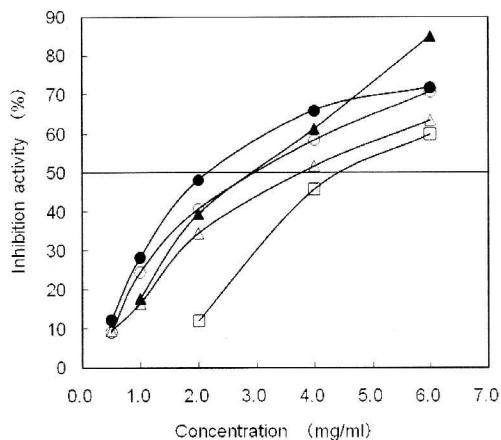


Fig. 3 Dose response curves of inhibitory effect of onion rind extract on the activities of glucoamylase(○), maltase(●), sucrase(△), isomaltase(▲) and α -amylase(□).

タマネギ外皮水抽出物のフェノール類の含有量を比較すると、ケルセチンよりもプロトカテキュ酸が多く含まれていた⁸⁾。このことより、タマネギ外皮水抽出物の酵素活性阻害は、主にプロトカテキュ酸によるものではないかと推察される。これが小腸に存在する糖類分解酵素の活性を阻害することによりブドウ糖への分解を抑制し、その結果、腸管からのブドウ糖の吸収を遅延または抑制することが考えられる。

3.3 プロトカテキュ酸構造類似化合物が α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

阻害作用が強くみられたプロトカテキュ酸と構造が類似した他のフェノールカルボン酸について、 α -グルコシダーゼ活性阻害試験を行い、その構造との関係を検討した。9種類のフェノールカルボン酸の60分後の阻害作用を比較した結果をFig. 4に示した。4-ヒドロキシ安息香酸、2,4-ジヒドロキシ安息香酸、2,6-ジヒドロキシ安息香酸は、ほとんど糖質代謝酵素阻害作用が認められ

なかつた。4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮酸は、約20%の糖質代謝酵素阻害作用を示した。2,5-ジヒドロキシ安息香酸(ゲンチシン酸)、3,4-ジヒドロキシ安息香酸(プロトカテキュ酸)、フロログルシノールは約40%の阻害作用であった。カテコールと没食子酸は、約80~90%と強い阻害作用を示した。これらの構造より、OH基が多いもの、またその中でもOH基が隣接しているものに強い阻害作用がみられた。

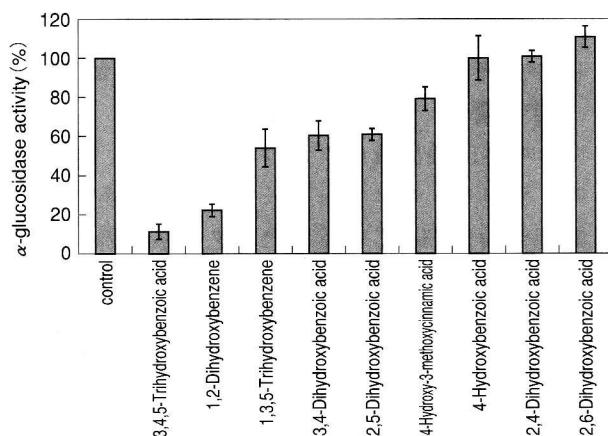


Fig. 4 Inhibitory effect of structural analogues of protocatechuic acid.

強い阻害作用がみられたフェノールカルボン酸の中でOH基の位置に例外が見られたので、詳細な阻害機構についてはさらに検討する必要があるが、タマネギ外皮は血糖上昇抑制作用を有する食品として有効利用できる可能性が示唆された。

4. 要 約

タマネギ外皮にポリフェノール類が含まれており、ポリフェノール類には抗酸化作用の他に血糖上昇抑制作用があると報告されている。そこでタマネギ外皮抽出液にも血糖上昇抑制作用があるのではないかと考え、糖質代謝酵素阻害活性、また、フェノール化合物との関係について検討した。

その結果、タマネギ外皮抽出液は、マルターゼ、イソマルターゼ、グルコアミラーゼ、スクラーゼ、 α -アミラーゼに対して阻害作用を示した。それぞれのIC₅₀は、2.1mg/ml、2.9mg/ml、2.9mg/ml、3.8mg/ml、4.4mg/mlであった。

また、これまでにタマネギ外皮から同定したプロトカテキュ酸、バニリン酸、フロログルシノール、p-ヒドロキシ安息香酸及びケルセチンの糖質代謝酵素阻害活性について検討した結果、ケルセチンとプロトカテキュ酸に強い阻害作用がみられた。タマネギ外皮の水抽出液にはプロトカテキュ酸が最も多く含まれていることから、糖質代謝酵素阻害作用はプロトカテキュ酸によるもので

あると示唆された。

このプロトカテキュ酸の構造類似体のフェノールカルボン酸の α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響について検討した結果、没食子酸が最も強い阻害作用を示し、OH基が多いもの、また、OH基が隣接した構造をもつものが強い阻害作用を示す傾向がみられた。

5. 参考文献

- 1) 吉田勉：栄養と健康のライフサイエンス， 1， 71 (1996)
- 2) 島健太郎：がんの予防食品の開発， 175
- 3) 瀬部和美， 進藤直文， 伊藤洋子， 古賀里美， 西島美絵子， 前間麻衣：西九州大学健康福祉学部紀要， 38， 17 (2008)
- 4) 出口ヨリ子， 永田邦子， 内田和美， 木村広子， 芳川雅樹， 工藤辰幸， 保井久子， 緋貫雅章：日本農芸化学会誌， 72， 923 (1998)
- 5) 鈴木裕子， 林和彦， 坂根巖， 角田隆巳：日本栄養・食糧学会誌， 54， 131 (2001)
- 6) 吉川雅之， 西田典永， 下田博司， 高田美紀， 河原有三， 松田久司：薬学雑誌， 121， 371 (2001)
- 7) A. Bilyk, P. L. Cooper, G. M. Sapers: *J. Agric. Food Chem.*, 32, 274 (1984)
- 8) 瀬部和美， 進藤直文：日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会講演要旨集 (2005)