

## サツマイモ $\beta$ -アミラーゼに及ぼすポリフェノール類の影響

Effects of Polyphenolics on Sweetpotato  $\beta$ -Amylase Activity

木戸めぐみ・三反田詩織・倉田理恵\*・寺原典彦\*\*・吉元 誠

Megumi Kido, Shiori Santanda, Rie Kurata\*, Norihiko Terahara\*\*, and Makoto Yoshimoto

鹿児島女子短期大学 九州沖縄農業研究センター\* 南九州大学\*\*

抄録:  $\beta$ -Amylase [EC 3.2.1.1] is an important enzyme for the industrial production of maltose as sweetener and as protective of starch degradation in food processing. Effects of polyphenolics, anthocyanin dyes and caffeic acid-derivatives prepared from sweetpotato on sweetpotato  $\beta$ -amylase were investigated for its industrial utilization. Crude extract of anthocyanin dyes did not inhibit  $\beta$ -amylase activity at a concentration of 2.0 mg/ml reaction mixture. In caffeoyl acid-derivatives, 3,4-dicaffeoyl-quinic acid had no inhibitory effect at a concentration of 2.0 mg/ml. Caffeic acid, chlorogenic acid, and 3,5-dicaffeoyl-quinic acid showed the inhibitory activity of about 20% against  $\beta$ -amylase at the same concentration.

**Key words** : sweetpotato,  $\beta$ -amylase, anthocyanin dyes, caffeic-acid derivatives, polyphenolics

**キーワード** : サツマイモ、 $\beta$ -アミラーゼ、アントシアニン色素、カフェ酸誘導体、ポリフェノール

### はじめに

サツマイモ塊根はバランスのとれた栄養成分、高含量・高品質の食物繊維、さらに抗酸化能など各種機能性を示すポリフェノール類を含有することは良く知られている<sup>1)</sup>。このような理由から、主に、熱帯から温帯地域において、野菜およびお菓子として世界中で利用されている。しかし、工業的には、日本で澱粉およびアルコール原料として利用されているにすぎない。

サツマイモ塊根を加熱調理して甘くなるのは、塊根中に含まれる  $\beta$ -アミラーゼ [EC 3.2.1.1] が澱粉に作用してマルトースとデキストリンに加水分解し、マルトースが顕著に増加するからである<sup>2-5)</sup>。マルトースは、澱粉を主原料とした加工品の老化防止抑制、グルコースに比べて褐変が起りにくい、結晶化しにくい、上品な甘味があるなどの特徴から、和菓子や澱粉加工品などの甘味料として広く利用されている。現在  $\beta$ -アミラーゼの供給源は、オオムギやコムギの酵素が主体である。日本においては1960年代後半、耐熱性に優れた大豆由来の酵素の製造、販売が始まったが、その後供給元であった製油会社での大豆油の搾油方法の変更による原料確保の問題が生じたため、1980年代後半にコムギ由来の酵素の製造・販売が開始された経緯がある。しかし、ムギ由来の酵素は耐熱性が劣るため工業的に利用するには難点がある。このような理由から、著者らは、サツ

マイモ塊根の  $\beta$ -アミラーゼを酵素製剤として利用することを提案した<sup>6)</sup>。サツマイモ塊根の  $\beta$ -アミラーゼの耐熱性は大豆由来の酵素には劣るが、麦芽由来の酵素よりは明らかに優れている。サツマイモ酵素を利用した奄美大島の伝統的飲み物に「ミキ」がある。「ミキ」は、米、白糖、サツマイモのみで作られ、仕込み後、サツマイモの  $\beta$ -アミラーゼにより、急速にマルトース含量が増加する<sup>7)</sup>。著者らはサツマイモのこのような特性を活かして、新たなサツマイモ加工品（サツマイモの澱粉を、サツマイモの  $\beta$ -アミラーゼで分解した甘味シロップ）を開発した（未発表データ）。これらの開発を進める際に、サツマイモ塊根自身に含まれるポリフェノール類やアントシアニン色素がサツマイモ由来の酵素を失活させている可能性が示唆された。

アントシアニン色素やポリフェノール類が、生体内の各種酵素に作用し、健康の維持・増進に寄与する機能性成分であることは報告されている<sup>1)</sup>。また、サツマイモ塊根の  $\beta$ -アミラーゼについては、サツマイモ品種間における活性の差異、貯蔵中の変化、酵素化学的な特性については研究されている<sup>2), 5)</sup>。しかし、サツマイモ塊根  $\beta$ -アミラーゼ活性に及ぼすアントシアニン色素およびポリフェノール類の影響についてはこれまで報告されていない。

本研究においては、サツマイモ塊根の  $\beta$ -アミラーゼを工業的に利用する際に酵素反応の障害となることが予想される

化学成分、ポリフェノール類およびアントシアニン色素の本酵素活性に及ぼす影響について検討する。

## 試薬および方法

### 1. サツマイモ塊根試料

SDS-アクリルアミド電気泳動（以下 SDS-PAGE と略す）で使用されたサツマイモ試料、アヤマラサキ、アヤマラサキ変異体、九系165、タネガシマムラサキ、九州119号、九系174、九系175は、九州沖縄農業研究センター都城研究拠点で栽培された品種である。 $\beta$ -アミラーゼ活性阻害試験に供試されたコガネセンガン、タネガシマムラサキ、パールスイートロード、ムラサキムスメ、アヤマラサキ、ムラサキマサリ、アケムラサキはアネット有限会社より購入した。

### 2. 試薬

カフェ酸は Wako 純薬工業製（大阪）、クロロゲン酸は Sigma-Aldrich 社からそれぞれ購入した。ジカフェオイルキナ酸類は、サツマイモの葉から精製された標品を供試した<sup>8)</sup>。アントシアニン色素はアヤマラサキから抽出された<sup>9)</sup>。当研究に供試されたカフェ酸およびカフェオイルキナ酸類の構造式を図1に示す。

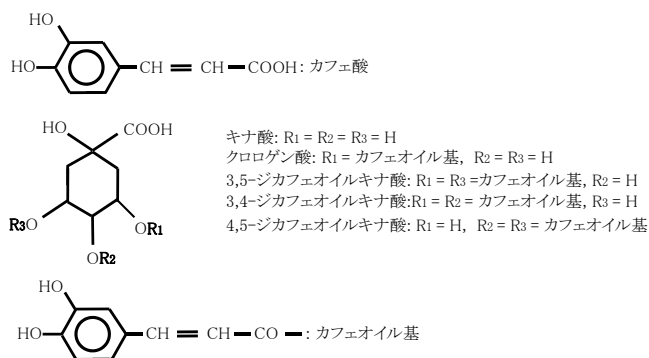


図1 カフェ酸およびカフェオイルキナ酸類の構造式

### 3. サツマイモ塊根の処理

サツマイモ塊根試料は、1品種当たり約200~300gの大きさの個体5個を処理した。塊根は洗浄後、中心を約1cmの厚さに輪切りにし、2枚を得た。これらのうち、1枚は生イモ用試料とし、他の1枚は、蒸し器で蒸煮して、蒸しイモ用試料とした。これらは、それぞれを凍結乾燥し、粉末にして冷蔵庫で供試するまで貯蔵した。

### 4. アントシアニン色素の抽出

色価測定のためのアントシアニン色素の抽出は、小野らの報告<sup>10)</sup>を参考にした。すなわち、粉末試料50mgを遠心

管に秤量し、1% (v/v) 塩酸-メタノール0.5mlを加えてボルテックスミキサーで攪拌後、さらに4℃で一晩静置して抽出を行なった。この抽出液を遠心分離 (10,000xg, 10分間) し上清を得た。残余の沈殿に0.5mlの1% (v/v) 塩酸-メタノール溶液を加え攪拌後、同遠心条件で残余の色素を抽出後、得られた上清を最初の抽出上清と合わせて試験溶液とした。

### 5. $\beta$ -アミラーゼ活性測定

サツマイモ  $\beta$ -アミラーゼ標品は、Sigma-Aldrich 社製 (A7005-10KU) を用いた。反応溶液は、0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) (ナカライテスク(株)、京都)、1 mM EDTA (ナカライテスク(株)、京都)、3 mM アジ化ナトリウム (Wako 純薬工業製、大阪)、基質として2% 可溶性澱粉 (WAKO 純薬工業製、大阪) を含む。アントシアニン色素液またはポリフェノール希釈溶液25  $\mu$ l、酵素溶液5  $\mu$ l (100U/ml) 添加、混和後、40℃、10分間反応させた。その後、基質溶液470  $\mu$ l 添加し混和後、40℃、10分間反応させ、ジニトロサリチル酸 (DNS) 溶液500  $\mu$ l 添加し反応を終了させた。この反応液を5分間煮沸し、冷却後2.5mlの精製水を加え540nmの波長を測定した<sup>11)</sup>。

### 6. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法（以下 SDS-PAGE と略す）は、前述の方法に従って行なった<sup>12)</sup>。ポリアクリルアミドの濃度は12.5%とした。塊根はサイコロ状に裁断した後、ワーリングブレンダーで処理後、懸濁液を10,000 x g、20分間遠心して上清を得た。上清は、低分子の可溶性成分を除去するため、十分量の蒸留水に対して透析チューブ (分子量カット、10,000MW) で処理した。透析内液は、遠心処理により沈殿を除去し、タンパク質濃度を測定した。試料にタンパク質可化溶液 (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol) を添加し、ゲルに供試する前に、3分間煮沸し、可溶化処理した。試料は、スラブゲルのレーン当たりタンパク質20  $\mu$ gをチャージした。SDS-PAGE用のタンパク質スタンダードはBio-Rad製を使用した。電気泳動後のゲルは、0.05% クマジーブルー R-250により染色した。

## 結果および考察

### 1. SDS-PAGE によるサツマイモタンパク質の電気泳動

サツマイモには、 $\beta$ -アミラーゼを欠損したジョイホワイト等の品種が存在する。 $\beta$ -アミラーゼ欠損品種は、加熱した時に、 $\beta$ -アミラーゼによる澱粉のマルトースへの変換が起こらないので、甘くならない。そこで、紫イモとして最

初に開発されたアヤマラサキについて、SDS-PAGE で  $\beta$ -アミラーゼが含まれることを確認した。

図2にアヤマラサキを含めた数品種のサツマイモタンパク質の SDS-PAGE の電気泳動写真を示した。サツマイモの主要タンパク質として、分子量24,000の貯蔵タンパク質と分子量49,400のタンパク質が観察された。サツマイモ塊根の  $\beta$ -アミラーゼは、同一サブユニットからなる四量体で、分子量が222,000で、単量体は498個のアミノ酸から構成されている<sup>13)</sup>。SDS-PAGE で観察される分子量49,000のバンドが  $\beta$ -アミラーゼの単量体に相当する。このことについては、Sigma 社製の  $\beta$ -アミラーゼ標品の SDS-PAGE においても確認した (未発表データ)。

SDS-PAGE の結果から、品種により  $\beta$ -アミラーゼ含量は異なることが明らかである。サツマイモ品種には、ジョイホワイトのように  $\beta$ -アミラーゼを欠損した品種も存在し、このような品種のタンパク質の SDS-PAGE では、 $\beta$ -アミラーゼの単量体に相当するバンドが観察されない (未発表データ)。アヤマラサキは、世界で初めて紫色素用の品種として開発された品種で、現在では、その色素抽出液は、野菜色素として清涼飲料、菓子類の着色料として、また、機能性飲料の主要成分として利用されている。アヤマラサキにおいては、 $\beta$ -アミラーゼの存在が推察されるが、蒸しイモはほとんど甘味を感じない。また、同一株から得られたアントシアニン色素の欠損した塊根は、加熱処理によりコガネセンガンなどのアントシアニン色素を含まないサツ

マイモと同程度の甘味度を示す。このことから、アントシアニン色素の存在は、 $\beta$ -アミラーゼが存在していてもサツマイモの甘味に影響を及ぼしていることが十分推察される。

## 2. 紫サツマイモの蒸煮

生および蒸煮したサツマイモの断面を図3 (写真) に示した。アントシアニン色素は、生イモの断面に均一に生成されているわけではなく、濃淡が見られる。表皮から中心に向けて色素濃度が薄くなる。蒸煮したイモでは、アントシアニン色素が断面全体に拡散している。これは、蒸煮することにより、色素含まれている液胞が破壊され、アントシアニン色素が細胞内外に拡散したためである。このようにポリフェノール類の拡散により、これらの成分と  $\beta$ -アミラーゼが接触することにより、酵素活性が阻害されることは容易に推察される。

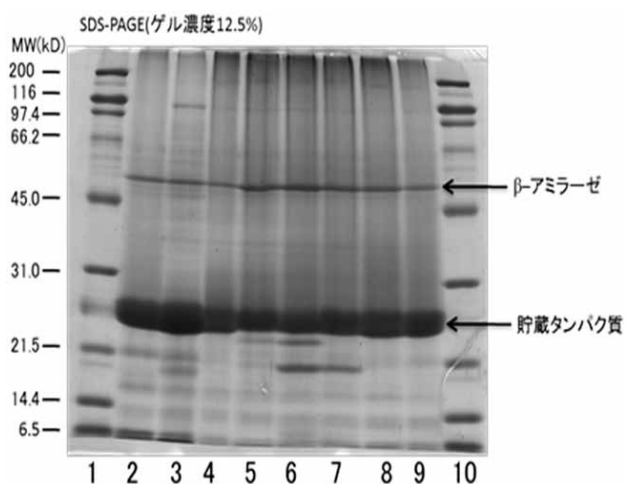
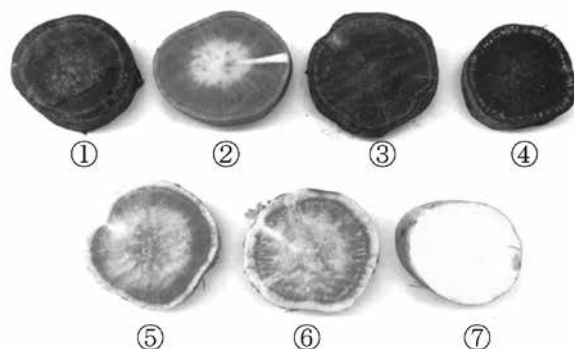


図2 サツマイモ塊根タンパク質の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

1,10: 標準タンパク質, 2: アヤマラサキ, 3: アヤマラサキ変異体, 4: 九系165, 5: タネガシマムラサキ, 6: 九州119号, 7: 九系174, 8: 九系175, 9: アヤマラサキ

### 生イモ



### 蒸しイモ

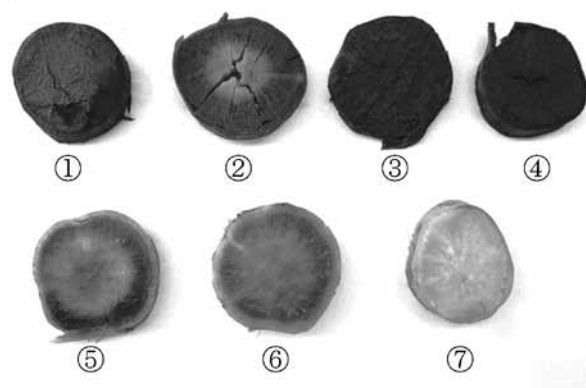


図3 生および蒸し紫イモ

①ムラサキマサリ、②パープルスイートロード、③アヤマラサキ、④アケムラサキ、⑤タネガシマムラサキ、⑥ムラサキムスメ、⑦コガネセンガン

### 3. 紫サツマイモの色価

6品種の紫サツマイモの生イモと蒸煮イモの色価の変化を図4に示した。コガネセンガンでは、生および蒸煮イモにおいて、色価はゼロであった。また、生イモにおいてパープルスイートロード、ムラサキムスメ、タネガシマムラサキの色価は、約2~7の値を示したが、ムラサキマサリ、アケムラサキおよびアヤムラサキの色価は、約30~50の値を示した。アヤムラサキ、アケムラサキおよびムラサキマサリの色価は、パープルスイートロード、ムラサキムスメ、タネガシマムラサキの約10倍以上のアントシアニン色素を含有することが明らかとなった。蒸煮イモでは、アヤムラサキおよびムラサキマサリの色価は約24、アケムラサキが40の値を示した。蒸煮により、アケムラサキ、ムラサキマサリ、アヤムラサキの色価は約30%程度減少した。

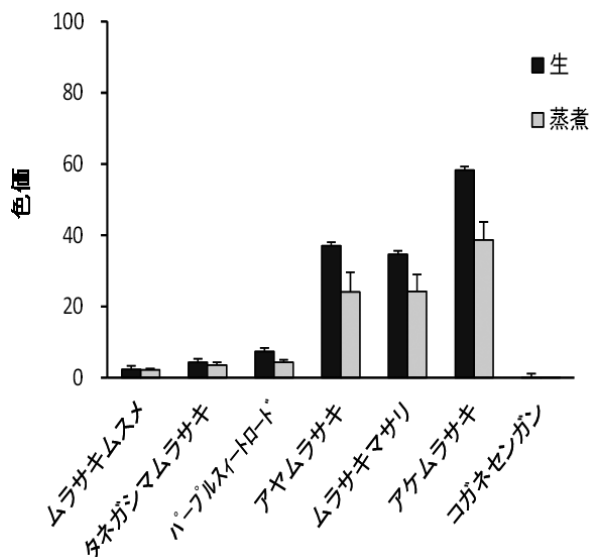


図4 生および蒸煮イモの色価

各品種の色価は、5個体の平均値と標準誤差を示した。

### 4. アントシアニン色素およびカフェオイルキナ酸類のβ-アミラーゼ活性に及ぼす影響

サツマイモ塊根には、カフェ酸、およびキナ酸にカフェ酸が1個結合したクロロゲン酸、2個結合した3,4ジカフェオイルキナ酸、3,5-ジカフェオイルキナ酸、4,5-ジカフェオイルキナ酸が含有されている(図1)。カフェ酸とクロロゲン酸、3種類のジカフェオイルキナ酸類のβ-アミラーゼ活性に及ぼす影響について検討した(図5)。添加したカフェ酸誘導体の濃度は反応液中、0.002, 0.02, 0.2, 2.0mg/mlとした。

3,4-ジカフェオイルキナ酸については、添加濃度2.0mg/

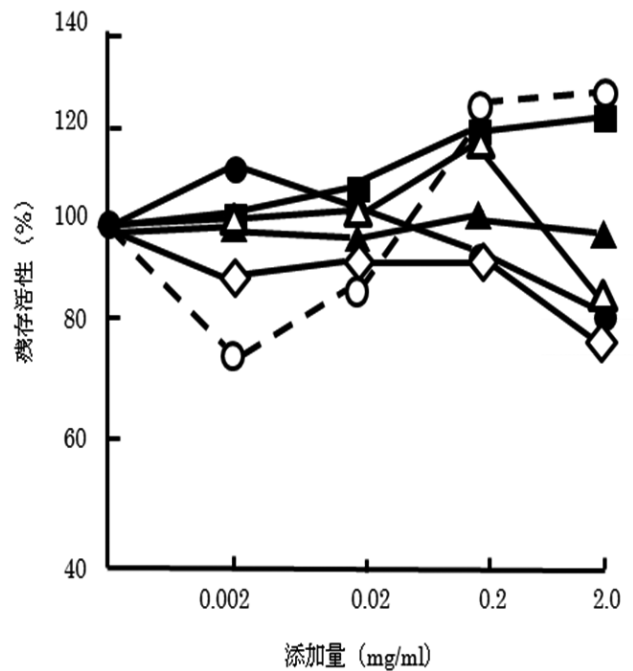


図5 アントシアニン色素およびカフェ酸誘導体のβ-アミラーゼ活性に及ぼす影響

○; アントシアニン色素、◇; カフェ酸、△; クロロゲン酸、▲; 3,4-ジカフェオイルキナ酸、●; 3,5-ジカフェオイルキナ酸、■; 4,5-ジカフェオイルキナ酸  
各値は、3回の試験の平均値を示した。

mlにおいても全く酵素活性に変化は見られなかった。カフェ酸、クロロゲン酸および3,5-ジカフェオイルキナ酸は、2.0 mg/mlの添加量で約20%の活性阻害が観察された。4,5-ジカフェオイルキナ酸は、0.002mg/mlおよび0.02mg/mlの添加量では、ほとんど酵素活性に影響はなかったが、0.2mg/mlおよび2.0mg/mlの添加量では、約20%高い値を示した。アントシアニン色素については0.002mg/mlおよび0.02mg/mlの添加量で、20~30%の活性が低い値を示したが、0.2mg/mlおよび2.0mg/mlの添加量では逆に20~30%高い値を示した。

サツマイモ塊根に含まれるアントシアニン色素およびポリフェノール類のβ-アミラーゼ活性に及ぼす影響について検討した。アントシアニン色素においては、低濃度で弱い阻害作用が、高濃度では逆に活性を促進するような結果が得られた。これらの結果に対する説明を我々は、現在の所持ち合わせていない。一方、カフェ酸、クロロゲン酸および3,5-ジカフェオイルキナ酸は、添加量2.0mg/mlで、約20%の阻害作用が観察された。これまで著者らは、各種生体内酵素に対するこれらのカフェ酸誘導体の酵素活性や抗変異原性試験に及ぼす影響を検討してきた<sup>1), 14)</sup>。その結果、

カフェ酸誘導体では、カフェ酸自体やキナ酸にカフェ酸が1個結合したクロロゲン酸より、キナ酸にカフェ酸が2個結合したジカフェオイルキナ酸類の阻害作用が強いことから、キナ酸に結合しているカフェ酸の数に関係していることを示した。 $\beta$ -アミラーゼに関しては、これまで他の酵素でみられたカフェ酸誘導体と結合しているカフェ酸の数との関連性は観察されなかった。

著者らは、高血圧の発症に関係するアンギオテンシンI変換酵素（以下 ACE と略す）に対するアヤマラサキ色素の影響を、生および蒸煮イモから粗抽出した色素および精製した色素の影響を検討している<sup>15)</sup>。生および蒸煮イモのアントシアニン色素の ACE の阻害活性 ( $IC_{50}$ ) は、2.80mg/ml および 2.32mg/ml で、生と蒸煮イモとの間で、大きな差はみられていない。精製されたアントシアニン色素の  $IC_{50}$  について、YGM-3 および YGM-6 はどちらも 0.16mg/ml であった。

アントシアニン色素を高濃度に含む紫イモは、 $\beta$ -アミラーゼが存在するにもかかわらず、加熱処理しても甘くない。今回著者らは、供試したサツマイモについても官能試験を実施したが、色素を含有していないコガネセンガンおよび色素を含有していても低濃度のタネガシマムラサキ、ムラサキムスメ、パープルスイートロードは美味しいという評価を得た（未発表データ）。アントシアニン色素およびカフェ酸誘導体の  $\beta$ -アミラーゼ活性に対する弱い作用などを考慮すると、高濃度のアントシアニン色素を含む紫イモが蒸煮しても甘くならないのは、アントシアニン色素の苦味が影響しているのかもしれない。今後はこれらの結果を踏まえて、研究を進めていく必要がある。

アントシアニン色素やカフェ酸誘導体などのポリフェノール類は、抗酸化能をはじめとして多くの機能性を有している<sup>16)</sup>。最近の知見によると、抗酸化成分の摂取が、アルツハイマー<sup>17)</sup>、糖尿病さらに酸化ストレス<sup>18)</sup>をはじめとして各種疾病の予防に効果のあることが報告されている。サツマイモが機能性食品として注目を浴びているのは、単にバランスの良い栄養成分や豊富な食物繊維だけ<sup>19)</sup>でなく、ポリフェノール類を高濃度含有しているからである。よって、これらのポリフェノール類を除去して加工することは、これらの機能性成分を廃棄することになる。

アントシアニン色素およびカフェ酸誘導体が  $\beta$ -アミラーゼ活性に及ぼす影響について、アントシアニン色素は酵素活性に影響はないと考えられるが、カフェ酸誘導体については、弱いながらも酵素活性に影響することは容易に推察できる。サツマイモのカフェ酸誘導体の約80%は、塊根の

表皮から形成層の部分に含まれていることが知られている<sup>20)</sup>。カフェ酸誘導体の酵素に対する影響を少なくするには、塊根の皮を厚く剥き、カフェ酸誘導体を除去すれば良いが、逆に機能性は弱くなる。

以上の理由から、サツマイモ塊根の澱粉を精製することなく、 $\beta$ -アミラーゼで加水分解する際はアントシアニン色素よりカフェ酸誘導体について考慮する必要がある。

## 参考文献

- 1) Yoshimoto, M., Physiological functions and utilization of sweet potato, In "Sweet Potato: Post harvest aspects in food, feed and industry", Editors: Ramesh C. Ray & K.I. Tomlins, pp.59-89, Nova Publishers, New York, USA.
- 2) 熊谷亨, 吉元誠, 山川理, 高  $\beta$ -アミラーゼ活性サツマイモ系統の選抜, 育種学雑誌, **47(別2)**, 267 (1997).
- 3) Yoshimoto, M., Okuno, S., Kumagai, T., and Yamakawa, O., Selection of sweetpotato varieties with high content of  $\beta$ -amylase, *SPORF*, **2**, 3 (1996).
- 4) 谷津麻子, 中西洋子, 湯川夏子, 梁川正, サツマイモの貯蔵にともなう品質変化—調理実習での使用に向けて—京都教育大学環境教育年報, **20**, 109-117 (2012).
- 5) 馬場透, 仲間洋征, 田丸保夫, 河野利治, 低アミラーゼ活性サツマイモの貯蔵中における糖類および澱粉の変化, 日本食品工業学会誌, **34**, 249-253 (1987).
- 6) 吉元誠, 山川理, サツマイモの加工残さおよび副産物のバイオリサイクル, 農林水産技術研究ジャーナル, **27**, 412-45 (2004).
- 7) 久留ひろみ, 吉崎(尾花)由美子, 玉置尚徳, 和田浩二, 伊藤清, 奄美大島の伝統飲料「ミキ」の分析, *J. Brew. Soc. Japan*, **105**, 167-174 (2010).
- 8) 石黒浩二, 吉元誠, 鐔田仁人, 高垣欣也, サツマイモ茎葉の血圧降下作用, 食品科学工学会誌, **54**, 45~49 (2007).
- 9) Terahara, N., Konczak, I., Ono, H., Yoshimoto, M., and Yamakawa, O., Characterization of acylated anthocyanins in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas L*, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **5**, 279~286 (2004).
- 10) 小野廣紀, 杉原菜穂, 廣瀬裕子, 片桐久美子, 岐阜県産黒米からのアントシアニン系色素の抽出溶媒の検討, 岐阜市立女子短期大学研究紀要, **52**, 135-138 (2003).
- 11) 小倉長雄, 稲田瑞穂, 辰田和佳子, 平戸八千代, 野菜の  $\beta$ -アミラーゼについて II) さつまいもの加熱処理とマルトース生成量, 山脇学園短期大学紀要, **36**, 23-31 (1998).
- 12) Yoshimoto, M., Shichita, R., Shioyama, M., and Hayano, S., Dissociation of azo dye-treated heterochromatin and release of non-histone proteins, 食品衛生学雑誌, **31**, 244-250 (1990).
- 13) Cheong, C.G., Eom, S.H., Chang, C., Shin, D.H., Song, H.K.,

- Min, K., Moon, J.H., Kim, K.K., Hwang, K.Y., and Suh, S.W., Crystallization, molecular replacement solution, and refinement of tetrameric beta-amylase from sweet potato, *Proteins*, **21**, 105-117 (1995).
- 14) 吉元誠、サツマイモ茎葉に含まれるポリフェノール類の薬理作用、*食品工業*、**48**, 69-75 (2005).
- 15) 山川理、吉元誠、高濃度サツマイモの栄養・特性と利用開発、*月刊フードケミカル*、**1999**: **1**, 33-39 (1999).
- 16) 吉元誠、山川理、須田郁夫、紫サツマイモの生理機能、*食品と開発*、**33**, 15-17 (1998).
- 17) Engelhar, M.J., Geerlings, M.L., Ruitenber, A., Van Swieten, J.C., Hofman, A., Witterman, J.C.M., Breteler, M.M.B., Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease, *JAMA*, **287**, 3223-3229 (2002).
- 18) Maritim, A.C., Sanders, R.A., and Watkins III, J.B., Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review, *J. Biochem. Molecular Toxicology*, **17**, 24-38 (2003).
- 19) Yoshimoto, M., Yamakawa, O., and Tanoue, H., Potential chemopreventive, properties and varietal difference of dietary fiber from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots, *Japan Agricultural Research Quarterly*, **39**, 37-43 (2005).
- 20) Yoshimoto, M., Okuno, S., Kumagai, T., Yoshinaga, M., and Yamakawa, O., Distribution of antimutagenic components in colored sweetpotatoes, *Japan Agricultural Research Quarterly*, **33**, 143-148 (1999).

(平成26年1月10日 受理)