

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：45305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00836

研究課題名(和文)食物ポリフェノールによる米澱粉消化抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of suppression of rice starch digestion by dietary polyphenols

研究代表者

廣田 幸子(Hirota, Sachiko)

山陽学園短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：00312140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アズキ種子のフラボノイドは、米澱粉の疎水領域に結合して、アミラーゼによる澱粉消化を抑えた。その抑制効果は、タキシフォリン<<ケルセチン<ヴィグナシアニジンの順であった。胃腔条件で、ケルセチンとヴィグナシアニジンによる澱粉消化の抑制効果は、亜硝酸処理によって低下し、ヴィグナシアニジンと亜硝酸との反応産物は、澱粉消化の抑制に関与できた。また、うるち米を用いて炊飯したアズキ飯の澱粉は白飯の澱粉よりも消化されにくかった。これは、アズキに含まれているプロシアニジンが飯アミロースに強く結合したためであると推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

米澱粉と疎水的に結合して、その澱粉消化を抑えやすいアズキ種子の成分としてヴィグナシアニジンが明らかになり、また、アズキ飯の緩やかな澱粉消化には、プロシアニジンが関与していることも明らかになった。これらの抑制は、胃腔条件で亜硝酸と反応した後も維持された。この結果は、アズキ飯等の低消化性は、小腸でも保たれていることを示し、さらに、食物ポリフェノールを用いて、米澱粉の摂取に伴う血糖値増加を抑制できる米調理法の提案が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Azuki bean flavonoids could suppress the digestion of starch by  $\alpha$ -amylase, and the suppressive effects were in the order of taxifolin << quercetin < vignacyanidin. This result suggests that these flavonoids could suppress the digestion by binding to the hydrophobic region of rice starch. The suppression of starch digestion by quercetin and vignacyanidin was reduced by treating with nitrite under gastric conditions, but the reaction product of vignacyanidin and nitrite could still contribute to the inhibition of starch digestion. Furthermore, it was shown that the starch digestion of rice cooked with adzuki bean was digested slowly. As the mechanism, binding of procyanidins in adzuki bean to rice starch during the cooking is proposed.

研究分野：食品科学、食物ポリフェノール

キーワード：アズキポリフェノール ヴィグナシアニジン 飯澱粉の消化 胃腔条件

## 1. 研究開始当初の背景

食物に含まれるポリフェノールは、種々の物質と結合できることが知られている。その一つとしてタンパク質と結合できることが知られているため、ポリフェノールの酵素タンパク質への結合が考えられていた。しかし、我々はこれまでに、食物から単離したポリフェノールおよび試薬ポリフェノールが澱粉と結合することによって澱粉消化を抑制することを見出した。この抑制は、ポリフェノールの疎水性の強さに応じて大きくなり、ポリフェノールの澱粉の疎水領域への結合の阻害による抑制であろうと予想した。

他方、植物性食品には硝酸塩が含まれており、これを摂取すると硝酸塩は小腸で吸収され、その一部は唾液成分として口腔内に分泌される。分泌された硝酸塩は、口腔内に常在している硝酸塩還元菌によって亜硝酸塩に還元される。生成した亜硝酸塩は胃腔 (pH = 2) で亜硝酸 (pKa = 3.3) に変化する。この亜硝酸は酸化剤として働くため、ポリフェノールは亜硝酸によって酸化される。そこで、胃腔を通過した条件で、亜硝酸と反応した食物ポリフェノールによる澱粉消化抑制は、反応前と異なっていると予想した。

## 2. 研究の目的

### (1) アズキフラボノイドによる澱粉消化の抑制

ポリフェノールが澱粉と結合できれば、ポリフェノールは澱粉消化酵素の活性を阻害することなく、澱粉消化を抑制できる可能性がある。この研究ではアズキ豆を実験試料として用いた。アズキは日本古来の食べ物として親しまれており、それを用いた料理には赤飯やアズキ飯などがあり、その飯は赤く色づいている。アズキによる飯への着色は、アズキに含まれている赤色素や炊飯過程で生成した赤色素によるものと思われる。アズキ豆に含まれるフラボノイドとしてカテキン、ルチン、ケルセチン、ケルセチン-7-グルコシド、ヴィグナシアニジンが報告されている。そこで、本研究では、米飯および米粉澱粉に結合しやすいアズキフラボノイドを明らかにし、結合しやすいフラボノイドが米飯澱粉および米粉澱粉の消化を抑制しやすいことを明らかにすることを目的とした。

### (2) 胃腔を通過したと想定した条件での米澱粉消化

食物を摂取すると食べ物は、唾液を混合され胃腔へと運ばれる。次に胃を通過した条件でフラボノイド画分の飯澱粉消化に対する影響を調べた。通常、ヒト唾液中には 0.05 から 1 mM の亜硝酸が含まれていると報告されていることから、この研究の第二の目的は、澱粉-アズキフラボノイド複合体やアズキ飯等を胃条件で処理することによって、 $\alpha$ -アミラーゼによるそれらの消化性が変化するかどうかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

試料のアズキ (*Vigna angularis*, cultivar *Erimoshozu*) は、北海道河西郡芽室町産、精白米 (*Oryza sativa*) は、山口県鹿野産こしひかり、上新粉 (米粉) は日の出製粉 (熊本) を用いた。アズキ飯は、アズキ 100g に対し水道水 150mL を加え沸騰させた。この沸騰水を除いたアズキに、さらに同量の水を加え 15 分間加熱し、煮汁を容器に取った。この操作を 3 回繰り返し、全量を 500mL とした。洗米した精白米 (320g) にアズキとその煮汁を加え、炊飯器 (NS - LY05、象印マホービン株式会社) を用いて通常炊飯した。得られたアズキ飯は、アズキと飯に分けて、飯を以下の実験に用いた。

飯に結合しているアズキ成分の分析は、HPLC を用いて、以下のように行った。まず、アズキおよび飯 (それぞれ 1 g) を 0.1% 塩酸メタノール 9mL に懸濁した後、1500 g で 5 分間遠心した。この上清をエバポレーターで乾固し、この乾固物を 1 mL のメタノールと 0.2% ギ酸の混合液 [4:7 (v/v)] に溶かし、その上清 (100  $\mu$ L) を HPLC の試料とした。HPLC は LC-20A ポンプ、Shim-pack CLC - ODS カラム (6 mm I.D. x 15 cm) およびフォトダイオードアレイ検出器 SPD - M20A (島津製作所) を用いて行った。移動相として、メタノールと 0.2% ギ酸混合液 (4:7, 3:4, 1:1, 3:2, 2:1, v/v) を用い、その流速は 1.0 mL/min とした。カテキン類は 280 nm フラボノイド類は 360 nm、ヴィグナシアニジン類は 560 nm で検出した。

プロシアニジン類は、HCl/Fe(III) 処理でアントシアニジンであるシアニジンに変化する。そこで、アズキ飯に含まれているプロシアニジン量をシアニジン生成量から推定した。飯 (0.5 g) を 1 mL の水と 4 mL の 1-ブタノールの混合液中でホモジナイズした。この懸濁液に 2 M HCl に溶かした 2% 硫酸アンモニウム鉄(III) を 0.13 mL 加え、続いて、濃塩酸を 0.4 mL 加えた後、沸騰水中で 30 分間加熱した。1500 g で 5 分間遠心分離した後、上澄み (1-ブタノール画分) のシアニジンを定量した。

澱粉消化は、還元糖の生成および澱粉断片の遊離から推定した。還元糖は 4-ヒドロキシベンズヒドラジドを用いて測定し、澱粉断片の遊離の測定にはヨードを用いた。全糖はフェノール-硫酸法で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) アズキフラボノイドによる米澱粉消化の抑制と着色

アズキ種子に含まれるフラボノイドの同定を行い、ルチン、ケルセチン、ケルセチン-7-グルコシド、ヴィグナシアニジン（シアニジン-カテキン複合体）が含まれていた（図1）。それぞれの濃度は、 $13.6 \pm 0.9$  mM、 $4.2 \pm 0.3$  mM、 $1.8 \pm 0.6$  mMであった。そこで、飯の懸濁液にフラボノイド画分を混合し、これを上清と沈殿に分け、上記フラボノイドの飯への結合を調べた。タキシフォリン、ケルセチン、ヴィグナシアニジンの非結合と結合の比率は、1:0.5、1:2、1:6であった。この結果は、フラボノイドの疎水性が高くなるにつれて、飯への結合比率が高くなることを示している。また、これらフラボノイドは、米澱粉の疎水領域に結合して、アミラーゼによる澱粉消化を抑えた。また、これらのフラボノイドによる澱粉消化抑制効果は、タキシフォリン<<ケルセチン<<ヴィグナシアニジンの順であることを明らかにした。これらの結果は、上記のアズキフラボノイドによる澱粉消化抑制効果は、その疎水性に依存することを示している。

アズキは、米とともに炊飯すると赤く色づく。この着色は、アズキに含まれている赤色色素や炊飯過程で生成した赤色色素によるものと思われる。そこで、アズキ飯の飯を用いて実験を行った。その結果、ヴィグナシアニジン等が米澱粉に結合することが分かり、炊飯したアズキ飯を炊飯器中での保温に伴い、結合したヴィグナシアニジン量の減少が観察されたが、飯の赤色は強くなった。この結果から、アズキ飯の色調の変化にはヴィグナシアニジン以外の化合物の酸化が関与していると予測した。

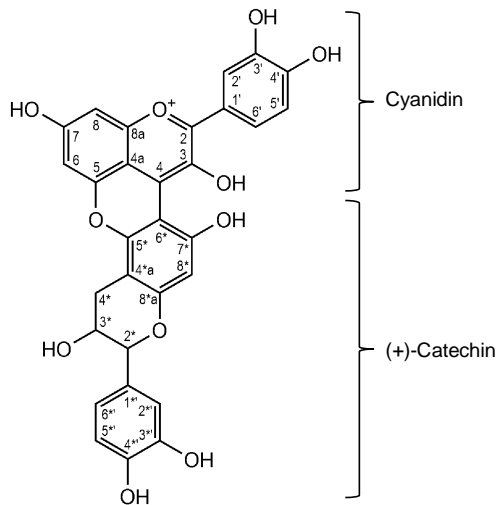


図1 Vignacyanidin

### (2) 胃を通過したアズキフラボノイド画分の飯澱粉消化に対する影響

食物は胃を通過して腸に達する。そのため食物成分は、胃腔で口腔由来の亜硝酸と反応できる。そこで、飯に結合しているケルセチンあるいはヴィグナシアニジンと飯懸濁液の混合液を亜硝酸処理した。その結果、ケルセチンによる澱粉消化の抑制効果は、亜硝酸処理によって完全に消失し、ヴィグナシアニジンの抑制効果は、亜硝酸処理によっても部分的に保たれた。この結果は、ケルセチンは亜硝酸による酸化に伴って、澱粉と結合できない化合物へ変化し、ヴィグナシアニジンはその酸化に伴って、澱粉と結合できる化合物に変化したことを示している。

### (3) アズキフラボノイドによる老化上新粉の澱粉消化の抑制

米の加工品である上新粉 (xx mg) を用いて、上新粉澱粉の消化に対するアズキ抽出物の影響を調べた。パンクレアチンによる老化上新粉から還元糖生成は  $5 \mu\text{L}$  および  $10 \mu\text{L}$  のアズキ抽出液によってそれぞれ約 50% および 95% 抑制された。老化上新粉にアズキ抽出液を加えた後、遠心分離 ( $1500 \text{ g}$ ,  $5 \text{ min}$ ) によって上澄みと沈殿に分け、それぞれの画分での還元糖の遊離を測定した。その結果、沈殿では  $5 \mu\text{L}$  および  $10 \mu\text{L}$  のアズキ抽出液で、それぞれ、約 10% および 50% 抑制され、上澄みでは約 80% および 90% 抑制された。上澄みでの大きな抑制は、上澄みの澱粉量の減少による可能性が考えられるので、上澄みの全糖量を測定した。その量は  $0, 5, 10 \mu\text{L}$  のアズキ抽出液を加えた場合、それぞれ、 $2.58 \pm 0.02$ ,  $1.85 \pm 0.33$ ,  $1.46 \pm 0.03$  mg of glucose 相当量であった。このことから、上澄みでのアズキ抽出液による還元糖生成抑制の大きな原因は、上澄みの澱粉量の減少によるものではないこと、および、上新粉から糊化/老化過程で遊離した澱粉断片がアズキ抽出液中の成分と結合し、その断片からの還元糖遊離が抑制されることが分

かった。アズキ抽出物は、上新粉澱粉の消化も抑制した。その抑制は、アズキ抽出物中の成分と上新粉澱粉との結合によるものと推測した。さらにアズキ抽出物中のケルセチンとヴィグナシアニジンは、パンクレアチンによる澱粉粒子からの澱粉断片の遊離を抑え、さらに遊離された澱粉の分解を抑制した。

#### (4) プロシアニジンの飯への結合

前に述べたフラボノイドは、アズキと米との炊飯に伴って、飯澱粉に非共有的に結合し、そのフラボノイドと澱粉のグルコースとのモル比は 1:1 万 ~ 1:100 万であった。このモル比から、非共有的に結合したフラボノイドのアズキ飯澱粉消化に対する抑制効果は小さいと考えた。他方、アズキのプロシアニジン類は、加熱に伴って、タンパク質や澱粉に共有的に結合できる。このことから、プロシアニジン類がアズキ飯の澱粉消化抑制に関与していると考え、実験を行った。その結果、プロシアニジン類は飯澱粉のグルコースとのモル比、1:1000~2500 で飯澱粉に結合していた。このことは、アズキ飯の澱粉の低消化性は、アズキのプロシアニジンおよびその酸化産物と澱粉との結合によるものであることを示唆している。また、プロシアニジン類は、澱粉と加熱することによって赤色化合物に変化した。このプロシアニジン由来の化合物が、アズキ飯の赤色に関与していると考えている。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. Takahama, U., Yamauchi, R., and Hirota, S. (2016) Antioxidative flavonoids in adzuki-meshi (rice boiled with adzuki bean) react with nitrite under simulated stomach conditions. *J. Funct. Food.* 26: 657-666. DOI:10.1016/j.jff.2016.08.032
2. Hirota, S., and Takahama, U. (2017) Inhibition of pancreatin-induced digestion of cooked rice starch by adzuki (*Vigna angularis*) bean flavonoids and the possibility of a decrease in the inhibitory effects in the stomach. *J. Agric. Food Chem.* 65: 2172-2179. DOI:10.1021/acs.jafc.6b05442
3. Takahama, U. and Hirota, S. (2017) Possible reactions of dietary phenolic compounds with salivary nitrite and thiocyanate in the stomach. *Antioxidants* 6: 53. <http://www.mdpi.com/2076-3921/6/3/53>
4. Takahama, U. and Hirota, S. (2018) Interactions of flavonoids with  $\alpha$ -amylase and starch slowing down its digestion. *Food Funct.* 9: 677-687. DOI:10.1039/c7fo01539a
5. Hirota, S., and Takahama, U. (2018) Suppression of pancreatin-induced digestion of starch in starch granules by starch/fatty acid and starch/flavonoid complexes in retrograding rice flour. *Foods* 7: 128. DOI:10.3390/foods7080128
6. Takahama, U., Hirota, S., and Yanase, E. (2019) Slow starch digestion in the rice cooked with adzuki bean: Contribution of procyanidins and the oxidation products. *Food Res. Int.* 119: 187-195. DOI:10.1016/j.foodres.2019.01.062
7. Takahama, U., Hirota, S., and Morina, F. (2020) Procyanidins in rice cooked with adzuki bean and their contribution to the reduction of nitrite to nitric oxide in artificial gastric juice. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 71, 63-73. DOI:10.1080/09637486.2019.1605338
8. Morina, F., Hirota, S., and Takahama, U. (2020) Contribution of amylose-procyanidin complexes to slower starch digestion of red-colored rice prepared by cooking with adzuki bean. *Int. J. Food Sci. Nutr.* DOI:10.1080/09637486.2020.1719389

[学会発表](計3件)

1. 廣田幸子、高濱有明夫 アズキフラボノイドによるパンクレアチン依存の飯澱粉消化抑制 日本食品科学工学会 2016年
2. 廣田幸子、高濱有明夫 アズキ種子抽出物に含まれているフラボノイドによる上新粉澱粉消化の抑制 日本食品科学工学会 2017年
3. 廣田幸子、安細敏弘、高濱有明夫 アズキ飯の飯に結合するプロシアニジン類の澱粉消化に対する影響 日本食品科学工学会 2019年

### 6. 研究組織

#### (1)連携研究者

氏名：高濱 有明夫

所属研究機関名：九州歯科大学

部局名：歯学部

職名：名誉教授

研究者番号：30106273

(2) 研究協力者

氏名 : Filis Morina

所属研究機関名 : Czech Academy of Sciences, Biology Centre, Institute of Plant  
Molecular Biology, Ceske Budejovice, Czech Republic

部局名 : Department of Plant Biophysics and Biochemistry

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahama Umeo, Yamauchi Ryo, Hirota Sachiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Antioxidative flavonoids in adzuki-meshi (rice boiled with adzuki bean) react with nitrite under simulated stomach conditions	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 657 ~ 666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2016.08.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirota Sachiko, Takahama Umeo	4. 巻 65
2. 論文標題 Inhibition of Pancreatin-Induced Digestion of Cooked Rice Starch by Adzuki ( <i>Vigna angularis</i> ) Bean Flavonoids and the Possibility of a Decrease in the Inhibitory Effects in the Stomach	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 2172 ~ 2179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.6b05442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umeo Takahama, Sachiko Hirota	4. 巻 6
2. 論文標題 Possible Reactions of Dietary Phenolic Compounds with Salivary Nitrite and Thiocyanate in the Stomach	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 53 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox6030053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirota Sachiko, Takahama Umeo	4. 巻 7
2. 論文標題 Suppression of Pancreatin-Induced Digestion of Starch in Starch Granules by Starch/Fatty Acid and Starch/Flavonoid Complexes in Retrograding Rice Flour	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 128 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods7080128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahama Umeo, Hirota Sachiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Interactions of flavonoids with $\alpha$ -amylase and starch slowing down its digestion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 677 ~ 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7fo01539a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahama Umeo, Hirota Sachiko, Yanase Emiko	4. 巻 119
2. 論文標題 Slow starch digestion in the rice cooked with adzuki bean: Contribution of procyanidins and the oxidation products	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Research International	6. 最初と最後の頁 187 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodres.2019.01.062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morina Filis, Hirota Sachiko, Takahama Umeo	4. 巻 0
2. 論文標題 Contribution of amylose-procyanidin complexes to slower starch digestion of red-colored rice prepared by cooking with adzuki bean	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Food Sciences and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09637486.2020.1719389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 廣田幸子, 高濱有明夫
2. 発表標題 アズキフラボノイドによるパンクレアチン依存の飯澱粉消化抑制
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 廣田幸子、高濱有明夫
2. 発表標題 アズキ種子抽出物に含まれているフラボノイドによる上新粉澱粉消化の抑制
3. 学会等名 食品科学工学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣田幸子、安細敏弘、高濱有明夫
2. 発表標題 アズキ飯の飯に結合するプロシアニジン類の澱粉消化に対する影響
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高濱 有明夫  (Takahama Umeo)  (30106273)	九州歯科大学・歯学部・名誉教授    (27102)	