

[成果情報名]農産物の有する糖および脂質の吸収抑制能を迅速かつ簡易に評価する手法

[要約]プレートリーダーを用いた α -グルコシダーゼおよび腓リパーゼ阻害性の測定法は、イチゴ等の有する糖の吸収抑制能および脂質の吸収抑制能を、迅速かつ簡易に評価できる。

[キーワード]機能性、 α -グルコシダーゼ、腓リパーゼ

[担当]長崎県農林技術開発センター・研究企画部門・食品加工研究室

[連絡先](代表) 0957-26-3330

[区分]総合営農

[分類]指導

[作成年度]2015 年度

[背景・ねらい]

本県では、機能性表示制度をビジネスチャンスと捉え、農産物の臨床試験ネットワークが構築されたが、試験に掛かるコスト・リスクが大きい。また、作用機序の根拠が表示申請に必須のため、*in vitro*から*in vivo*まで多角的評価が必要となる。生活習慣病の是正に関わる、*in vitro*での評価法は、いくつか報告されているものの、検体の種類や濃度および抽出溶媒によって、個別に条件検討を行わなければならない、抗酸化性の評価手法であるH-ORAC法を除いて、統一化された手法が存在しない。また、汎用機器である分光光度計の場合、一点ずつの測定となり、使用液量も多く、コストが大きい。そこで、多検体を同時に測定可能なプレートリーダーを用いて、 α -グルコシダーゼおよび腓リパーゼ阻害性による、糖および脂質の吸収抑制能を迅速かつ簡易に評価できる手法を確立・提供する。

[成果の内容・特徴]

1. α -グルコシダーゼ阻害性の分析操作は、検体と α -グルコシダーゼ溶液の混液を96穴マイクロプレートに分注し、p-NPG溶液を加え、プレートリーダー庫内にて37℃で25分間反応させた後、Tris溶液で反応を停止させてから400nmの吸光度を測定する(図1)。1検体あたりのコストは22円で、分光光度計を用いる従来法と比較すると、90%の削減となり、測定時間も大幅に短縮できる(図3、表1)。
2. 腓リパーゼ阻害性の基本試薬は、リパーゼキットS(DSファーマメディカル社製)を用いる。分析操作は、96穴マイクロプレートに、腓リパーゼ、検体を分注後、直前に調製した発色液と基質液の混液を混和し、プレートリーダー庫内にて30℃で30分間反応させてから、反応停止液を加えた後の412nmの吸光度を測定する(図2)。1検体あたりのコストは18円で、従来法と比較すると94%の削減となり、測定時間も大幅に短縮できる(図3、表1)。
3. α -グルコシダーゼおよび腓リパーゼ活性を50%阻害するときの濃度(IC₅₀)を機能性の強さの尺度とするため、検体原液から任意の希釈系列を作成し、IC₅₀を求める(図4)。

[成果の活用面・留意点]

1. α -グルコシダーゼおよび腓リパーゼの阻害性評価は、それぞれ松井(2009)および岡崎ら(2013)の手法を参考に、至適条件に改変した。 α -グルコシダーゼはパン酵母由来、腓リパーゼはブタ由来である。イチゴ、タマネギおよびポリフェノール標準品で妥当性を検討済みである。
2. 凍結乾燥粉末約200mgからMWA溶液(メタノール:水:酢酸の混液)を抽出溶媒とし、複数回収した上清を25mLに定容したものを検体原液とした。検体原液は、各種ポリフェノール類のHPLC分析やビタミンC分析および抗酸化能(H-ORAC法)評価にも使用可能である。

[具体的データ]

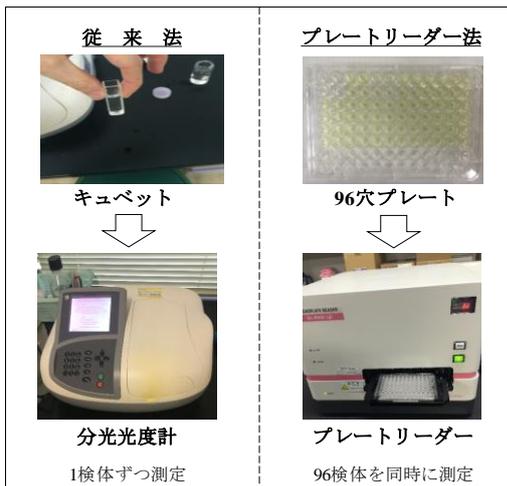
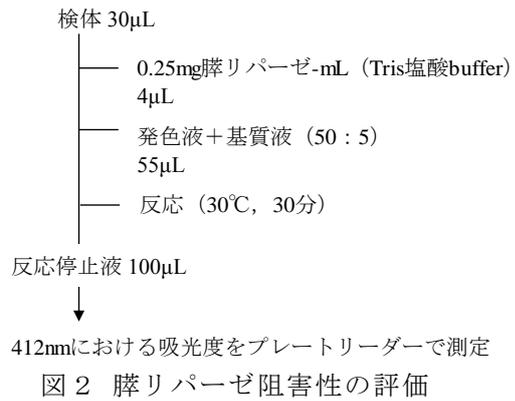
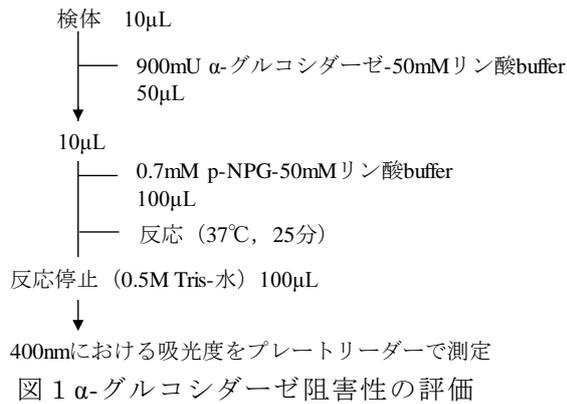


表 1 プレートリーダー法の反応液量、測定時間およびコスト

	従来法 ^x	プレートリーダー法
α-グルコシダーゼ阻害性		
反応液量 (μ L)	2000	200
96検体分の測定時間 (分)	48	0.5
1検体あたりコスト (円) ^y	220	22
アミラーゼ阻害性		
反応液量 (μ L)	3170 ^z	190
96検体分の測定時間 (分)	48	0.5
1検体あたりコスト (円) ^y	300	18

^x 分光光度計による測定方法

^y 任意の希釈濃度での反応試薬のみのコスト

^z 光路長1cmのキュベット使用の場合

図 3 従来法とプレートリーダー法の概要

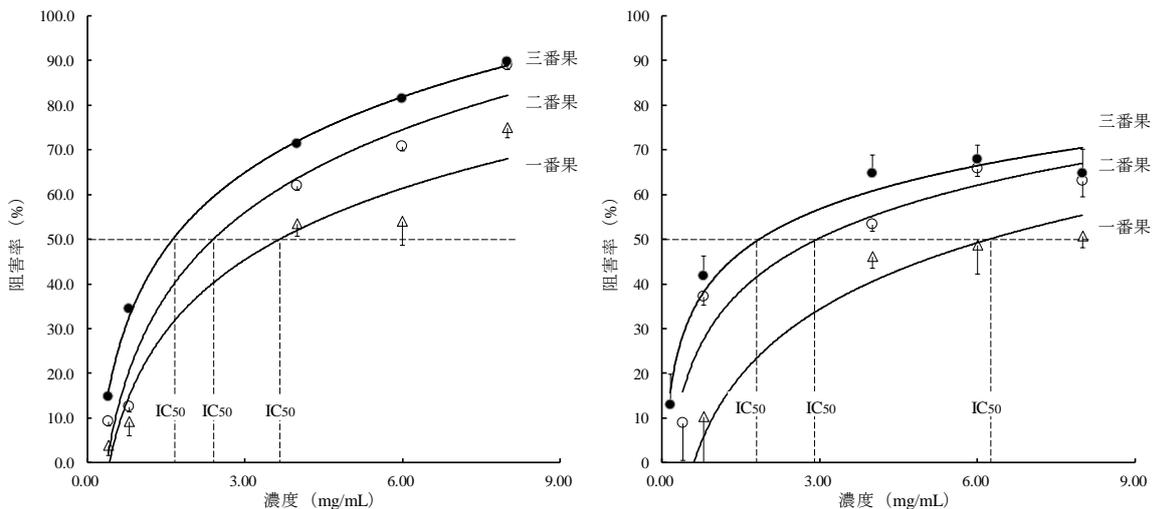


図 4 本手法で評価した α -グルコシダーゼ阻害性 (左) とアミラーゼ阻害性 (右) の例：イチゴ「ゆめのか」の一番果、二番果および三番果抽出液
 平均値 \pm 標準偏差 (n = 3)

[その他]

研究課題名：おいしい・機能性成分高含有県産農産物の探索、育成、販売プロジェクト
 予算区分：県単 研究期間：2015～2017年度
 研究担当者：中山久之、坂本麻衣子