

食品の各種酵素阻害活性試験における試料溶解溶媒の影響

瀬戸山 央 (化学技術部 バイオ技術グループ)

1. はじめに

in vitro 食品機能性評価は、主に各種酵素阻害活性試験を行うことで評価される。各種酵素阻害活性試験に用いられる試料は、熱水抽出液や含水有機溶媒抽出液など様々だが、有機溶媒は酵素反応を阻害するなどの悪影響が懸念される^{1,2)}。しかし、食品機能性評価で対象とする酵素に対する有機溶媒の種類や濃度の影響について詳細に検討した事例はない。そこで本研究では、いくつかの酵素阻害活性試験を対象として許容される有機溶媒の種類とその濃度について検討を行い、試料溶解に許容される有機溶媒の種類や濃度を把握することを目的とした。

2. 材料および方法

2.1 試料溶解溶媒

試料溶解溶媒として、メタノール、エタノール、DMSO を用い、溶媒ごとに 100、50、10 vol% の濃度に調製し各種酵素阻害活性試験に用いた。

2.2 チロシナーゼ阻害活性試験

マッシュルーム由来チロシナーゼを 300 units / mL で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) に溶解したものを酵素溶液、L-DOPA を 1 mM で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) に溶解したものを基質溶液とした。96 穴マイクロプレートを用いて各溶媒 25 μ L、酵素溶液 100 μ L を入れ攪拌後、基質溶液 125 μ L を加え、37°C で 10 分間インキュベートした後、475 nm における吸光度を測定した。溶媒の代わりに純水を加えたものをコントロールとした。

2.3 コラゲナーゼ阻害活性試験^{3,4)}

コラゲナーゼを 0.02 mg / mL で 50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.3) に溶解したものを酵素溶液、MOCac-Pro-Leu-Gly-Leu-A2pr (Dnp) -Ala-Arg-NH₂ を 1 mM で DMSO に溶解し、使用直前に 50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.3) で 200 倍希釈したものを基質溶液とした。96 穴マイクロプレート (黒色) を用いて各溶媒 50 μ L、酵素溶液 100 μ L を入れ攪拌し 37°C で 10 分間インキュベートした後、基質溶液 50 μ L を入れ攪拌後、37°C で 1 分ごとに 60 分間蛍光強度 (励起波長 320 nm、蛍光波長 405 nm) を測定した。溶媒の代わりに純水を加えたものをコントロールとした。

2.4 エラスターゼ阻害活性試験

STANA (N - Succinyl - Ala - Ala - Ala - p - nitroanilide) を 1 mM で Tris 緩衝液 (pH 8.8) に溶解したものを基質溶液、ブタ由来膵臓エラスターゼを 0.5 units / mL で Tris

緩衝液 (pH 8.8) に溶解したものを酵素溶液とした。96 穴マイクロプレートを用いて各溶媒 25 μ L、酵素溶液 50 μ L、基質溶液 100 μ L を入れ攪拌し、37°C で 30 分間インキュベートした後、405 nm における吸光度を測定した。溶媒の代わりに純水を加えたものをコントロールとした。

3. 結果および考察

3.1 チロシナーゼ阻害活性試験

各溶媒を用いてチロシナーゼ阻害活性試験を行った結果を図 1 に示す。DMSO およびエタノールを用いた場合、100 vol% においてコントロールに対して有意に吸光度の低下が見られた。またエタノールを用いた場合、100 vol% においてコントロールに対して有意に吸光度の低下が見られた。一方、メタノールを用いた場合、すべての濃度で吸光度は若干低下する傾向が見られたが、有意差は認められなかった。これらの結果から、チロシナーゼ阻害活性試験において許容される試料溶解溶媒とその濃度については、DMSO およびエタノールは 50 vol% までの濃度、メタノールは 100 vol% までの濃度であると考えられる。

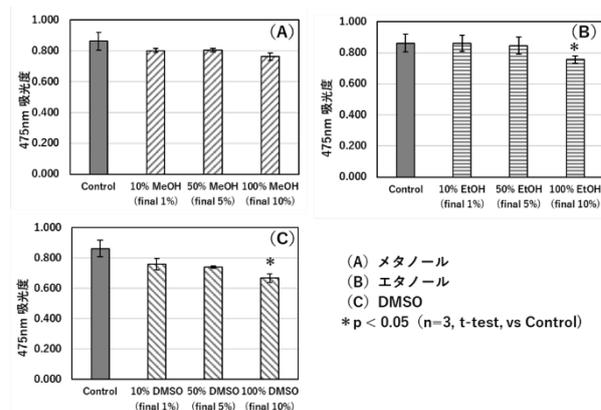


図 1 チロシナーゼ阻害活性試験の結果

3.2 コラゲナーゼ阻害活性試験

各溶媒を用いてコラゲナーゼ阻害活性試験を行った結果を図 2 に示す。用いたすべての溶媒、すべての濃度においてコントロールに対して有意に蛍光強度の低下が見られた。これらの結果から、コラゲナーゼ阻害活性試験においてメタノール、エタノールおよび DMSO のすべて溶媒で濃度にかかわらず不適であると考えられる。

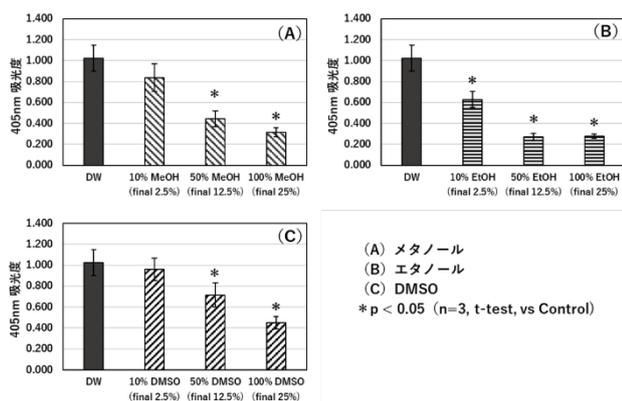


図2 コラゲナーゼ阻害活性試験の結果

3.3 エラスターゼ阻害活性試験

各溶媒を用いてエラスターゼ阻害活性試験を行った結果を図3に示す。DMSOおよびメタノールを用いた場合、50 vol%および100 vol%においてコントロールに対して有意に吸光度の低下が見られた。またエタノールを用いた場合、すべての濃度においてコントロールに対して有意に吸光度の低下が見られた。これらの結果から、エラスターゼ阻害活性試験において許容される試料溶解溶媒とその濃度については、DMSOおよびメタノールは10 vol%までの濃度であり、エタノールはすべての濃度で不適であると考えられる。

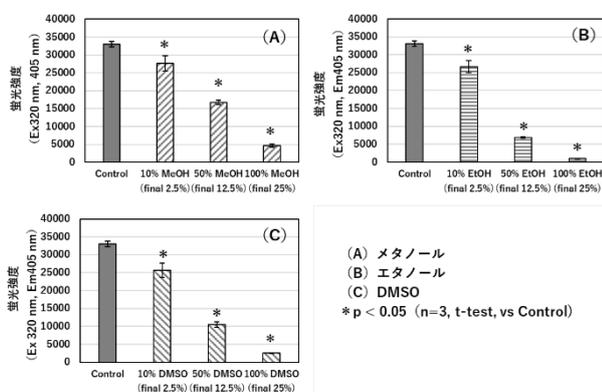


図3 エラスターゼ阻害活性試験の結果

4. まとめと今後の展開

本研究では、チロシナーゼ阻害活性試験、コラゲナーゼ阻害活性試験およびエラスターゼ阻害活性試験における試料溶解に許容される有機溶媒の種類や濃度について検討を行った。

チロシナーゼ阻害活性試験において許容される試料溶解溶媒とその濃度については、DMSOおよびエタノールは50 vol%までの濃度、メタノールは100 vol%までの濃度であることが明らかとなった。チロシナーゼは、今回の反応条件において、比較的高濃度の有機溶媒においても酵素反応が阻害されないことが示唆された。

コラゲナーゼ阻害活性試験においては、メタノール、エタノールおよびDMSOのすべて溶媒で濃度にかかわらず不適であることが明らかとなった。コラゲナーゼは、今回の反応条件において10 vol%程度の低濃度の有機溶媒においても酵素反応が阻害されることが示唆された。

エラスターゼ阻害活性試験において許容される試料溶解溶媒とその濃度については、DMSOおよびメタノールは10 vol%までの濃度であることが明らかとなった。一方、エタノールはすべての濃度で不適であることが明らかとなった。エラスターゼは、今回の反応条件において10 vol%程度の低濃度のDMSO、メタノールにおいて酵素反応が阻害されないことが示唆された。

今後は今回の結果から許容可能であると考えられた溶媒および濃度において、すでに酵素阻害活性が確認されている食品成分を用いて確認試験を行うことが必要であり、研究を進めていきたいと考えている。

【参考文献】

1. 木瀬秀夫, 日本醸造協会誌, 86(8), 581 (1991)
2. 木瀬秀夫, 日本油化学会誌, 46(12), 1447 (1997)
3. 杉本幸子, コスメトロジー研究報告, Vol.25, 9 (2017)
4. 石橋正己, コスメトロジー研究報告, Vol.12, 31 (2004)

【外部発表】 口頭発表 1件、 論文発表 0件