

リパーゼ活性測定 of 簡便法開発とプーアル茶の阻害効果検討への応用

Brief Method for Lipase Activity Measurement, and its Application for Inhibition Effect by Pu'er Tea

榮 昭博, 関崎 悦子

要 約

食品成分のリパーゼ活性阻害を調べるため、従来の測定法より簡便で、有色試料を用いた場合でも測定可能な測定法（簡便法）を開発した。リパーゼの作用で生じた脂肪酸は、血清中の遊離脂肪酸測定法を用いて測定した。酵素活性阻害の実験を行うに当たり、次の3点を検討した。①エタノールによる呈色過程への影響、②実験に用いる酵素濃度および基質濃度の検討、③従来との中和滴定法との比較。

また、これらの検討結果から導かれた簡便法を用いて、プーアル茶によるリパーゼ活性の阻害について検討した。その結果、次のことがわかった。

1. NEFA C-テストワコーの非結合型脂肪酸の測定キットにおける発色過程においてエタノールによる影響はなかった。
2. 酵素反応において生成される遊離脂肪酸量はリパーゼの酵素濃度が0.5~4.0mg/mL 場合、直線的に増加した。
3. 基質濃度を0.5% から4% に増加させるに従い、遊離脂肪酸の生成量は徐々に増加した。
4. プーアル茶によるリパーゼ活性阻害率は中和滴定法と簡便法とに差がなかった ($P > 0.05$)。
5. プーアル茶によるリパーゼ活性阻害には濃度依存性が示された。

本実験で改良したパーゼ活性測定 of 簡便法は、短時間で測定ができ、かつ、有色試料でも測定できたことから、今後の阻害物質検索に有効な測定法になりうると考えられた。

はじめに

肥満の予防あるいは改善法のひとつとして、消化管内において脂肪等の栄養素の消化吸収を阻害し、体内への取り込みを抑制することが効果的な方法のひとつであることが示されている¹⁾。著者らは、*in vitro*において食品中の抽出物を添加した酵素反応において、いくつかの食品の抽出液が膵臓リパーゼ活性を阻害することを報告してきた^{2,3,4,5)}。これまでの報告では、天然油脂であるオリーブ油にリパーゼを作用させて生じた遊離脂肪酸を水酸化ナトリウム水溶液中で中和させて、その消費量から酵素活性を算出する中和滴定法や人工基質酢酸 p-ニトロフェノールにリパーゼを作用させて生じた p-ニトロフェノールの紫外外部吸収を測定する p-ニトロフェノール法^{6,7)}を使用してきた。しかしながら、中和滴定法では添加する試料（例えば赤色系の色がある等）によっては滴定終点の判定が困難な場合もあり、かつ測定に時間がかかる等の問題点があっ

た。また、p-ニトロフェノール法では人工基質を使用するため生理的な状況を反映しているかは定かでない。本実験では、血中の非結合型脂肪酸を測定するキットを用いて、天然基質にリパーゼを作用させて生じた遊離脂肪酸を測定する簡便なリパーゼ活性測定法を確立させたのでここに報告する。また同法を用いたプーアル茶のリパーゼ活性の阻害について若干の結果を得たので合わせて報告する。

材料および方法

1. 試料

実験に供したプーアル茶は、中国雲南省産の後発酵茶を原材料としたもので、愛知県豊田市の昭和製菓株式会社の茶を使用した。この茶葉3.0g に水100mL を加えて5分間沸騰させ、濾過（東洋濾紙 No.5A）した濾液を添加試料とした。

2. 試薬等

- ① 基質：4% オリーブ油乳化液を調製した。オリ

ブ油4.0g, 大豆レシチン0.5g, 胆汁粉末0.2g を十分攪拌し, 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.7) を少量づつ攪拌しながら加え全量を100g とした. これを1/15M リン酸緩衝液 (pH7.7) で希釈した各濃度のオリーブ油乳化液を基質とした.

② 酵素

ブタ膵臓リパーゼ (Lipase from porcine pancreas, Type II, sigma) 1.60g に1/15M リン酸緩衝液 (pH7.7) を加えて100mL とした. これを1/15M リン酸緩衝液 (pH7.7) で各濃度に希釈した.

③ 遊離脂肪酸の測定

NEFA C-テストワコー (和光純薬工業株式会社) の非結合型脂肪酸の測定キットを用いた.

3. 酵素活性の測定

以下のリパーゼ活性測定方法を簡便法とした.

① リパーゼ活性の測定

基質500 μ L, 水500 μ L および酵素500 μ L を37°Cで60分間インキュベートした後, エタノール2.0mL 加えて攪拌し, 反応停止と同時にリパーゼの作用によって遊離した脂肪酸の抽出を行った. このエタノール抽出液50 μ L を採りこれに NEFA C-テストワコー発色剤 A 1.0mL および発色剤 B 2.0mL を加えて37°C10分間インキュベートした. 冷却後, 30分以内に550nm における吸光度を測定した. また, 上記操作において酵素の代わりに酵素を含まない1/15M リン酸緩衝液500 μ L を用いて同様に操作した場合を盲検とし, 両者の差 C を算出した.

② 膵臓リパーゼ活性の阻害 (簡便法)

上記3. ①簡便法の水500 μ L の代わりに試料液 (プーアル茶の各希釈液) 500 μ L を用いて, ①と同様に操作し, 夫々の試料液盲検を差し引き, これらを X とした. なお, 上記3. ①簡便法で測定した C を対照とし, 次式で阻害率を求めた.

$$\text{阻害率} = (1 - X / C) \times 100 (\%) \quad (1)$$

③ 中和滴定法による膵臓リパーゼ活性の阻害

従法⁶⁾を用いた. 水または試料1.0mL と8mg/mL ブタ膵臓リパーゼ (pH7.7) 1.0mL に10% オリーブ油乳化液 (pH7.7, 大豆レシチンおよび胆汁粉末にて乳化) 1.0mL を加え, 37°Cで60分間インキュベートした後, エタノール10.0mL を加え, 1/20M 水酸化ナトリウム水溶液で中和滴定し, この消費量から遊離した酸濃度を測定した. 阻害率の計算は, 水を加えた場合を C, 試料を加えた場合を X とし, それぞれ盲検を差し引いた値から (1) 式より求めた.

4. 遊離脂肪酸測定に対するエタノールの影響

試験区として, 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.7) 500 μ L, 水500 μ L および1.00mEq/L オレイン酸500 μ L を37°Cで60分間置いた後, エタノール2.0mL 加えて攪拌し, ここから50 μ L を採り, これに NEFA C-テストワコー発色剤 A 1.0mL および発色剤 B 2.0mL を加えて37°C10分間インキュベートした. 冷却後, 30分以内に550nm における吸光度を測定した. 対照区としてエタノール2.0mL の代わりに水2.0mL を加え試験区と同様に操作した.

5. リパーゼ活性に及ぼす酵素濃度の影響

酵素液を1/15M リン酸緩衝液 (pH7.7) で希釈し0.5, 1.0, 2.0, 4.0および8.0mg/mL の酵素液を調製した. 基質は4% オリーブ油乳化液を用い, 上記3. ①簡便法のリパーゼ活性測定の実験を行い各酵素濃度における遊離脂肪酸生成量を求めた.

6. リパーゼ活性に及ぼす基質濃度の影響

4% オリーブ油乳化液を1/15M リン酸緩衝液 (pH7.7) で希釈して2, 1および0.5% オリーブ油乳化液を調製した. これらの基質と1mg/mL リパーゼ濃度の酵素を用いて, 上記3. ①簡便法のリパーゼ活性測定の実験を行い各基質濃度における遊離脂肪酸生成量を求めた.

7. 中和滴定法と簡便法のリパーゼ活性阻害の比較

簡便法と従法⁶⁾ (中和滴定法) によるリパーゼ活性の阻害の相違を検討するため, プーアル茶を用いて上記3—②簡便法によるリパーゼ活性阻害実験を行った. なお, 基質は簡便法で1% オリーブ油乳化液, 中和滴定法で10% オリーブ油乳化液を用い, 酵素濃度は中和滴定法で8mg/mL, 簡便法で1mg/mL を用いた. 統計処理はt検定を行った.

8. プーアル茶濃度によるリパーゼ活性の阻害率の変化

試料として調製したプーアル茶を水で1/8, 1/4, 1/2 に希釈して各添加試料とした. 酵素濃度は, 1mg/mL で, 基質は1% オリーブ油乳化液を用いて, プーアル茶の各希釈液について上記3—②簡便法のリパーゼ活性阻害実験を行いそれぞれの茶濃度における阻害率を求めた.

結果

簡便法におけるエタノールの影響を調べるためオレイン酸標準液を水またはエタノール2.0mL で抽出した液について NEFA C-テストワコーの非結合型脂肪酸の測定キットで測定した結果を表1に示した. 水とエ

Table 1. Comparison of the amount of fatty acids by extraction with water and ethanol.

Extraction method	Fatty acid mEq/mL		
Extraction with water	0.97	±	0.04 #
Extraction with ethanol	1.09	±	0.05 NS

Values are means standard deviation.

NS Non-significantly different from this extraction with water ($p > 0.05$).

タノール抽出の両者には有意な差は認められなかった ($P > 0.05$).

次に、酵素活性阻害実験で使用する酵素濃度を定めるため、4% オリーブ油乳化液に、0.5~16mg/mL 濃度のブタ膵臓リパーゼを60分間作用させて生じた遊離脂肪酸を測定し、その結果を図1に示した。酵素濃度を0.5から4mg/mL まで高めると遊離脂肪酸生成量はほぼ直線的に増加し4mg/mL から16mg/mL まで一定の値を示した (図1)。

酵素活性阻害実験で使用する基質濃度を定めるため、各濃度に調製したオリーブ油乳化液 (基質液) にリパーゼを作用させ生じた遊離脂肪酸測定した結果を図2に示した。基質濃度を0.5% から4% に増加させると、遊離脂肪酸の生成量は徐々に増加した (図2)。

表2にはプーアル茶を用いたリパーゼ活性阻害について中和滴定法と酵素法 (簡便法) で比較した阻害率を示した。両者の間には有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。

プーアル茶の濃度を変え、それぞれの濃度における

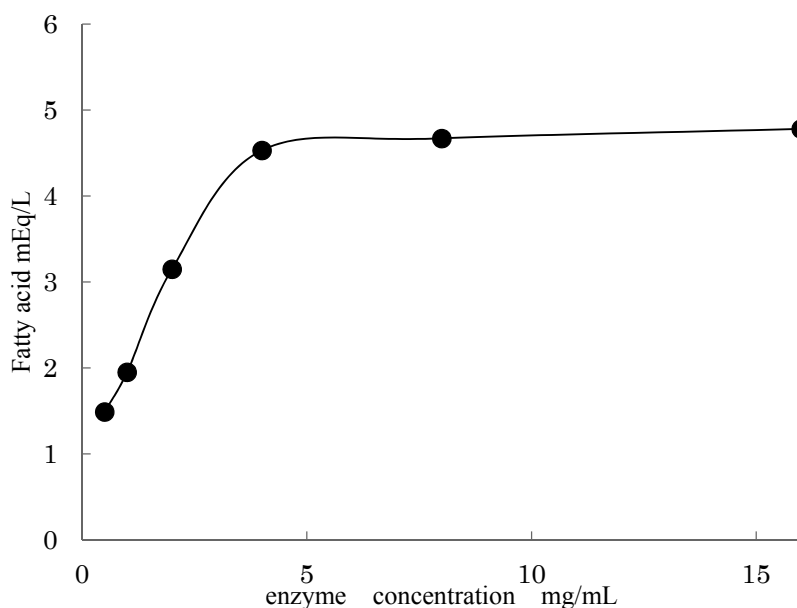


Fig. 1 Changes of production amount of Fatty acid by enzyme concentration

Table 2. Comparison of the inhibition rate of lipase in each assay.

Method	Inhibition rate of lipase(%)		
Neutralizing method	81.7	±	3.7 #
Enzymes method	86.7	±	1.5 NS

Values are means standard deviation.

NS Non-significantly different from this neutralizing method ($p > 0.05$).

リパーゼ活性の阻害率を図3に示した。プーアル茶の濃度を高めるとリパーゼ活性の阻害率も高まった。

考 察

NEFA C-テストワコーの非結合型脂肪酸の測定キットにおける発色過程はアシル CoA シンセターゼ, アスコルビン酸オキシダーゼ, アシル CoA オキシダーゼ, ペルオキシダーゼ等の酵素反応を利用した測定系である。本実験ではリパーゼの酵素反応の停止剤としてエタノールを用いているため、このエタノールが発色過程における酵素反応に影響を及ぼしているかを確認する必要があった。そこで、リパーゼによる酵素反応停止剤として使用しているエタノールとエタノールの代わりに水を用いて発色試験を行い、それぞれの場合の遊離脂肪酸量を表1に示した。その結果、両者の値には有意な差は観られなかった ($P > 0.05$)。それ故、本実験の発色過程に対してエタノールは影響を及ぼさないものと考えられた。

次に、酵素活性阻害実験で使用する酵素濃度を定め

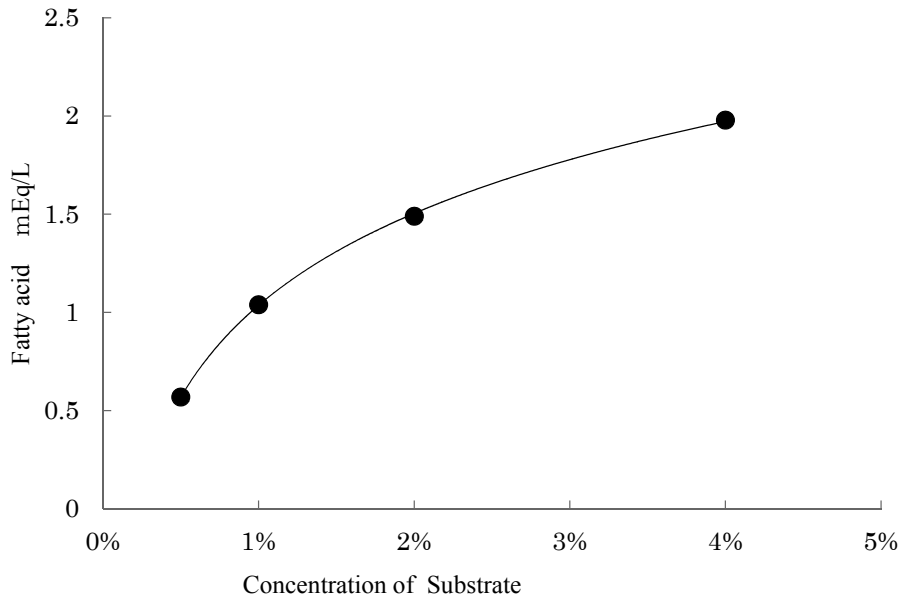


Fig. 2 Changes of production amount of Fatty acid by substrate concentration

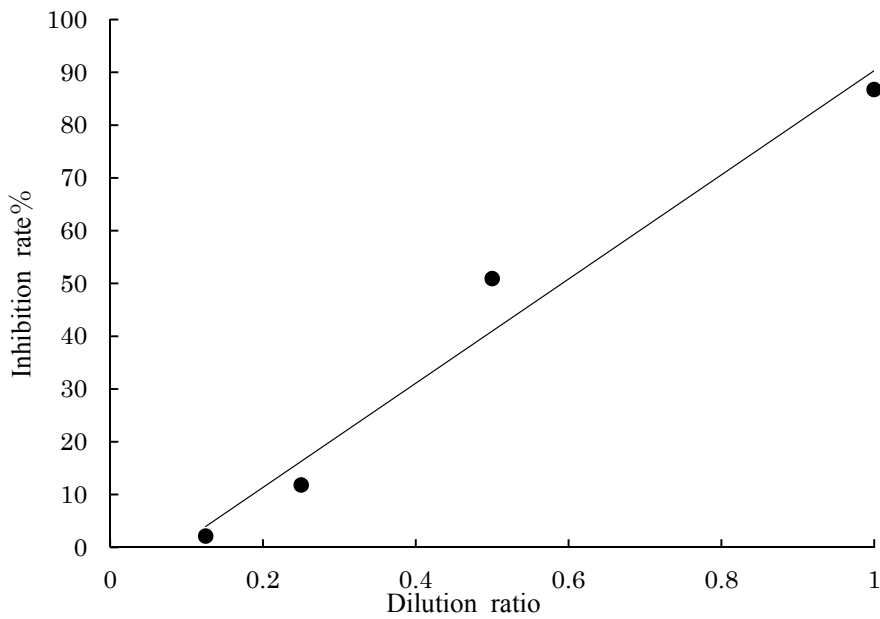


Fig. 3 Changes of the inhibition rate by tea concentration.

るため、リパーゼ濃度を変えて、それぞれの酵素濃度における遊離脂肪酸を測定した。その結果、酵素濃度が高まるに従い遊離脂肪酸生成量はほぼ直線的に増加し、4mg/mL以上では飽和に達した(図1)。これらの結果から、酵素活性阻害実験で用いるリパーゼの酵素濃度を、図1のグラフの直線上に位置し、かつ分光光度計の吸光度が適正範囲(0~1.0)にある酵素濃度1.0mg/mLとした。

酵素活性阻害実験で使用する基質濃度を定めるため、各濃度に調製したオリーブ油乳化液にリパーゼ

を作用させ生じた遊離脂肪酸測定した(図2)。その結果、NEFA C-テストワコーの非結合型脂肪酸の測定キットの適正測定範囲(脂肪酸濃度0~1.97mEq/L)にある1%基質濃度(生成脂肪酸1.04mEq/L: 図1)を酵素活性阻害実験で使用することとした。

従来の中和滴定法と簡便法のリパーゼ活性の阻害率を比較したところ(表2)、両者の間には差は認められなかった($P > 0.05$)。従って、今後の酵素活性阻害実験で簡便法を使用することは問題ないと判断した。

リパーゼ活性に及ぼすプーアル茶の影響を調べるた

め、プーアル茶の濃度を変え、それぞれの濃度におけるリパーゼ活性の阻害率を調べた結果 (図3), プーアル茶濃度を高めるにもなってリパーゼ活性の阻害率も上昇した。それ故, プーアル茶は, 濃度依存的にブタ膵臓リパーゼ活性を阻害することがわかった。既報⁵⁾のリパーゼ活性測定法では, プーアル茶にはリパーゼ活性阻害効果は見られなかったが, これは, 既報の中和滴定法⁵⁾で使用した酵素は鶏膵臓由来であったことや乳化剤として非生理的な Tween60を使用したこと, 今回の簡便法ではより生理的な条件に近い胆汁粉末および大豆レシチンを油脂の乳化剤として使用していること等の条件の相異なるものと考えられる。

今回, 改良したリパーゼ活性測定の簡便法は, 短時間で測定可能なため多くの試料を測定でき, かつ, 有色試料でも測定できることから, 幅広い阻害物質の検索が可能となった。また, 使用する酵素濃度も従法^{3,4,6)}と比較して低濃度となり, 微量な阻害物質も検出も可能となった。これらのことから, 本簡便法は今後の阻害物質検索に有効な測定法になりうると考えられた。

引用文献

- 1) 池田義雄: 海外におけるオルリスタットの最近の使用状況, 肥満研究, 7(3): 316-318. 2001.
- 2) 榮 昭博, 井桁千恵子, 関崎悦子: 食品から得られた水抽出物が膵リパーゼ活性に及ぼす影響: 桐生短期大学紀要, 15: 77-81. 2004.
- 3) 榮 昭博, 関崎悦子: 食品およびサプリメント中の膵リパーゼ活性阻害物質: 桐生短期大学紀要, 17: 11-18. 2006.
- 4) 榮 昭博, 関崎悦子: 消化酵素活性に及ぼすブラックベリー抽出物の影響: 桐生大学紀要, 20: 49-56. 2009.
- 5) 榮 昭博, 関崎悦子: 茶およびにがりが膵リパーゼ活性に及ぼす影響: 桐生短期大学紀要, 16: 13-17. 2005.
- 6) 榮 昭博, 関崎悦子: ブタ膵臓リパーゼ活性に及ぼす食物繊維の影響: 桐生大学紀要, 21: 77-83. 2010.
- 7) 小原哲二郎ら監修, 改訂食品分析ハンドブック, 437-439. 建帛社 (東京). 1982.

Brief Method for Lipase Activity Measurement, and its Application for Inhibition Effect by Pu'er Tea

Akihiro Sakae, Etsuko Sekizaki

Abstract

To examine the lipase activity inhibition by food ingredients, we have developed a new enzyme activity inhibition assay. Fatty acids produced in this assay was measured by a kit for measuring free fatty acids in serum. This assay was examined by the following three points: ① Effect on the coloration process with ethanol. ② Examination of enzyme concentration and substrate concentration used in the experiment. ③ Comparison with the neutralization titration method. And these examination led us to new brief method for lipase activity assay.

Then, we examined inhibition of lipase activity by Pu Erh tea. As a result, the findings were as follows:

1. Coloring process in NEFA C-Test Wako Fatty acid Measurement Kit was not affected by ethanol.
2. The amount of free fatty acids produced in the enzymatic reaction was linearly increased in the range of enzyme concentration of 0.5 ~ 4.0mg / mL.
3. In accordance with increasing the substrate concentration to 4% from 0.5%, the amount of free fatty acids was gradually increased.
4. As for lipase activity inhibition rate due to Pu'er tea, there was no significant difference in the neutralization titration method and the simplified method of this experiment ($P > 0.05$).
5. In the lipase activity inhibition rate due to Pu'er tea, concentration dependence was shown.

This simple method of lipase activity measurement of this experiment could be measured in a short time. In addition, this method could be measured even in the colored sample. Therefore, we consider the new simplified method is an effective measuring method for the search of inhibitors