

コーヒーに含まれるポリフェノールの α -glucosidase 阻害活性の検討

Alpha-glucosidase inhibition activity of polyphenols derived from coffee

中村(杉本)優子*・上野由美子*・米澤恵**

Yuko Nakamura-Sugimoto, Yumiko Ueno and Megumi Yonesawa

*食品開発研究所 バイオ技術科、**株式会社澤井珈琲

コーヒー中に多く含まれるポリフェノールであるクロロゲン酸は、糖尿病などヒトの血糖値調整に関与する酵素 α -glucosidase を阻害することが知られている。このため、コーヒー飲料を試料とした酵素阻害試験を行った所、コーヒー中のクロロゲン酸濃度から想定される阻害率を遥かに上回るという現象が観察され、クロロゲン酸以外のコーヒー成分も酵素阻害に大きく関わっている可能性が示唆された。

1. はじめに

食事により摂取された炭水化物は、小腸において α アミラーゼにより二糖類に分解され、更に小腸粘膜上皮に存在する二糖分解酵素である α -glucosidase (α -glu)により単糖に分解され、吸収される。この α -glu を阻害することで食後血糖の上昇を穏やかにする事から、 α -glu 阻害薬は糖尿病患者で食後血糖の調整のためにインスリン投与と併用されている。糖尿病は一度発症する治癒することはなく、放置すると目、腎臓、神経などに様々な合併症を引き起こすだけではなく、心血管疾患の発症、進展を促進する事で、患者の生活の質を著しく低下させる。そのため、普段の食事から糖尿病予防を行える事のメリットは大きく、特定保健用食品の保健の用途の一つとして取り入れられており、腸管からの糖の吸収を遅らせる食物繊維や、 α -glu 阻害成分などが成分として利用されている。

コーヒーは日本人が最も摂取する飲料であり、コーヒーの年間消費量は、昭和 50 年に緑茶の消費量を上回ってから現在に至るまで依然として増加傾向にある¹⁾。コーヒーにはクロロゲン酸やマンノオリゴ糖など、血糖値を穏やかに低下させることが期待される成分が含まれている。本研究ではまず、コーヒー飲料そのものの機能性に着目し、 α -glu 阻害活性について検討を行ったので、その概要について報告する。

2. 実験方法

2.1 α -glu 阻害活性の測定

酵素液として、ラット小腸アセトン粉末 (Sigma) を 50 mM リン酸緩衝液(pH6.5)に溶解し、不純物を除いたものを用いた。基質には 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside を同緩衝液で 3 mM に調整したものをを用いた。96 穴マイクロプレートに試料溶液を 20 μ L、酵素液を 50 μ L、基質を 50 μ L、緩衝液を 120 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。0.2 M glucine-NaOH 緩衝液 (pH10.2) を 50 μ L 加え反応を停止した。プレートリーダー (Tecan) を用いて励起波長 350 nm、蛍光波長 450 nm で蛍光強度を測定した。酵素活性は以下の式にて算出した。

$$\text{阻害活性 (\%)} = 100 - \frac{(\text{sample-blank})}{(\text{control-blank})} \times 100$$

Sample : 試料を加えた際の蛍光強度

control : 試料の代わりに緩衝液を加えた際の
蛍光強度

blank : 緩衝液と基質のみを加えた際の蛍光強度

2.2 ORAC 法による抗酸化性測定

食品機能性評価マニュアル集 (日本食品科学工学会発行) に従い、測定した。即ち、親水性抽出あるいは親油性抽出を液-液抽出にて行った試料 20 μ L に 94.4 nM Fluorescein 200 μ L、ラジカル発生源と

して 31.7 mM AAPH 75 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C における励起波長 485 nm、蛍光波長 520 nm の蛍光強度を、2 分毎に 45 回測定した。ORAC 値は蛍光の減弱を標準物質となる 6.25~50 μ M Trolox と比較し、親水性抽出液と親油性抽出液の両方より Trolox 当量として求め、その和を ORAC 値とした。

2.3 コーヒー中のポリフェノールの分析

(株)澤井珈琲より提供を受けた通常焙煎あるいは低温焙煎コーヒー8g を、熱水で 5 分間抽出して、最終液量 150 mL としたものを、熱水抽出物とした(コーヒーの焙煎条件等は、企業秘密の為非公開)。

総ポリフェノール濃度は、既報に基づきフォーリン・チオカルト法で測定した³⁾。96 穴マイクロプレート上で、蒸留水で希釈した試料 70 μ L と蒸留水で 2 倍希釈したフォーリン・チオカルト試薬(シグマ)を 15 μ L 混和した。5 分後 2%炭酸ナトリウム水溶液を 75 μ L 加え攪拌した後、15 分間反応させた。吸光度 660 nm を測定し、没食子酸水溶液で作成した検量線からポリフェノール含量を没食子酸相当量 (mg GAE/mL) として算出した。

ポリフェノールの個別分析は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC、島津製作所) により実施した。熱水抽出物を 0.45 μ m フィルター(ザルトリウス)でろ過し、分析に供した。分析条件は、以下の通りである。

分析カラム: CAPCELLPAK C18 MG S-5 (4.6 mm Φ \times 150 mm、資生堂)

分離液: 5 mM KH₂PO₄(pH2.5)-メタノール (7 : 3)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

検出波長: UV280nm

2.4 ポリフェノールの精製

ポリビニルポリピロリドン (PVPP) によるコーヒーポリフェノールの精製を行った。PVPP を一定の割合で混合し、4 $^{\circ}$ C で一晩振とうした。その後遠心分離を行い、非吸着成分を除き、残った PVPP に 50% メタノールを加えて吸着成分を溶出し、その後の分

析に供した。

3. 結果と考察

3.1 コーヒーの α -glu 活性の検討

コーヒー中のクロロゲン酸が α -glu 阻害活性を持つ事は、既報により報告されている²⁾。クロロゲン酸は熱で分解される事から、コーヒー豆の焙煎により、その量が減少し、 α -glu 阻害活性も同様に低くなると予想された。その事を確かめるため、通常焙煎と低温焙煎により加工されたコーヒー豆熱水抽出物でのクロロゲン酸量と α -glu 活性を比較した(図 1、2)。クロロゲン酸量は低温焙煎のもので増加している一方で、 α -glu 阻害活性の差異は見られなかった。また、クロロゲン酸の他、コーヒー熱水抽出物中に含まれると想定される他の成分での α -glu 阻害活性を確認した(図 3)。クロロゲン酸以外にも、カフェー酸に α -glu 阻害活性が見られたが、どちらのコーヒー熱水抽出物でも検出することは出来なかった(データ未掲載)。クロロゲン酸の効果について、コーヒー熱水抽出物の酵素阻害濃度(低温焙煎コーヒーでは IC₅₀=13.6%、図 1 の結果よりクロロゲン酸は 0.172 mg/mL に相当)と α -glu 阻害活性を示すクロロゲン酸濃度(IC₅₀>1 mg/mL)にかい離が見られた。そのため、コーヒー熱水抽出物の α -glu 阻害活性にはクロロゲン酸以外の成分も寄与している可能性が示唆された。

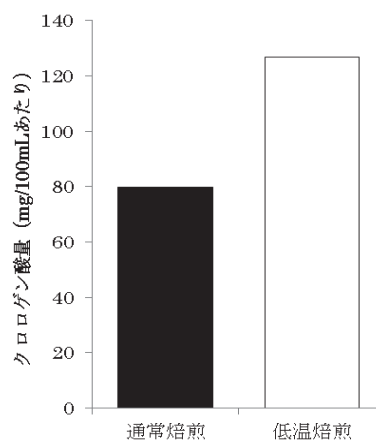


図 1 コーヒー熱水抽出物中のクロロゲン酸量

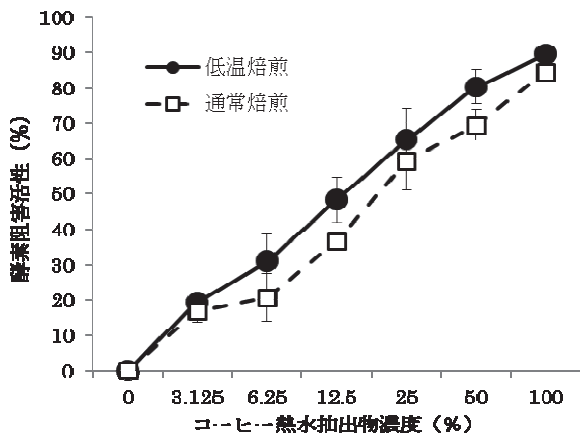


図2 コーヒー熱水抽出物の α -glu阻害活性の比較

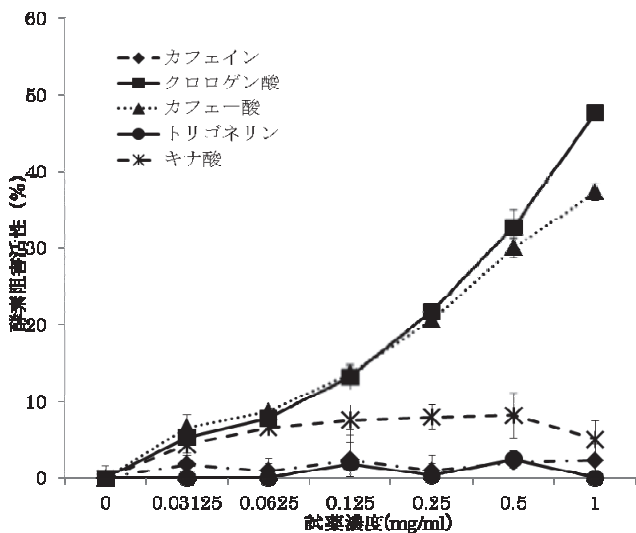


図3 コーヒーに含まれる主な成分の α -glu阻害活性

3.2 α -glu 阻害活性成分の精製

コーヒー熱水抽出物に含まれる酵素阻害活性物質が何かを推測するために、生理活性物質が概ね共通して持つ性質である抗酸化性と、最も多く含まれる生理活性物質である総ポリフェノールについて通常焙煎と低温焙煎のもので比較した(図4、5)。ラジカル消去活性は低温焙煎のもので優位に高かった一方で、総ポリフェノール量は差異がなく α -glu阻害活性と同じ傾向を示した。コーヒー熱水抽出物中のポリフェノールが特異的に α -glu阻害活性を示すかどうかを検討するために、ポリフェノールを吸着できる樹脂であるPVPPを用いて、コーヒー熱水抽出物に含まれるポリフェノールが α -glu阻害活性を

示すかどうかを検討した(図6)。PVPPによる処理を行った分画ではポリフェノールが減少し、また、同分画の α -glu阻害活性が低下することが分かった。PVPPに吸着したポリフェノールを用いて同様の試験を行うべきであるが、PVPPからの抽出に用いる溶媒そのものが α -gluの活性を低下させるため、抽出分画にポリフェノールが含まれることと、PVPP濃度依存性があることを確認するのみにとどまった(データ未掲載)。PVPPに吸着したポリフェノールを用いて、HPLCによる解析を行ったところ、クロロゲン酸を含む他の成分が複数検出された(図7)。得られたピークはPVPPの濃度依存的であること、PVPPのみではピークは得られないことを確認している(データ未掲載)。

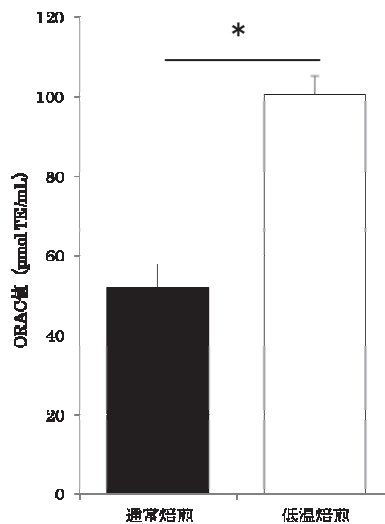


図4 コーヒー熱水抽出物の抗酸化性の比較

(* : $p < 0.05$)

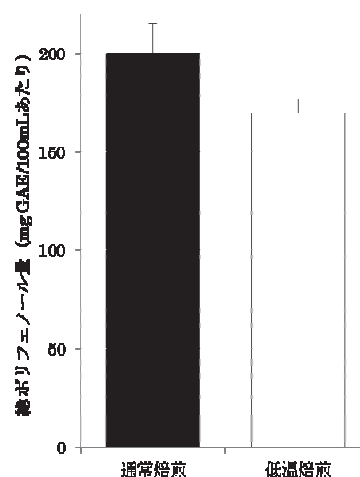


図5 コーヒー熱水抽出物の総ポリフェノール量の比較

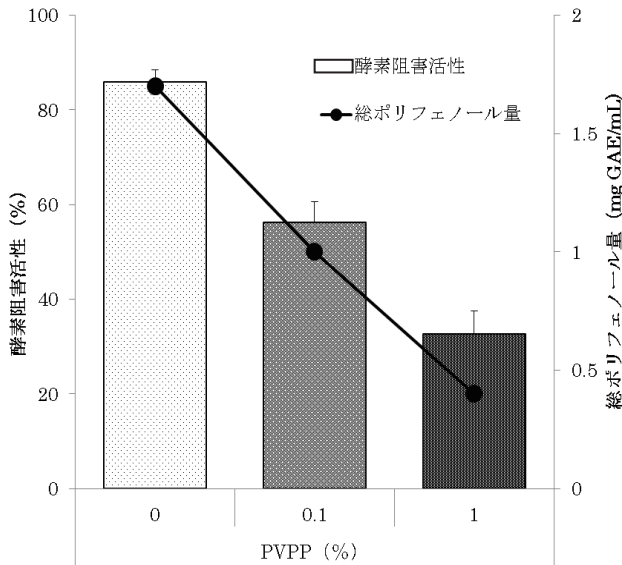


図6 PVPPによるポリフェノール除去の効果

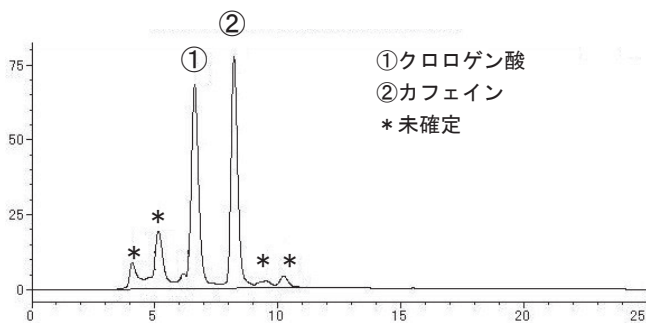


図7 低温焙煎コーヒー熱水抽出物の1%PVPP処理で吸着した成分のクロマトグラム

4. おわりに

本研究は、コーヒー熱水抽出物が α -glu阻害活性を持つ事を確認したが、既報とは異なりクロロゲン酸のみでその活性を説明できない事を明らかにし、他のポリフェノールの関与を示唆するものである。その活性は焙煎により大きく低下しないことから(図2、5)、一般に市販されているドリップタイプのコーヒーで同様の活性が期待出来る。そのため、コーヒーの積極的な摂取は穏やかな血糖値上昇に役立つことが期待されるが、その一方で刺激性物質であるカフェインを多く含む飲料であることから、摂取に際しては注意が必要である。そのため、コーヒ

一の成分を活かしつつ、カフェインの除去や低減が行われた製品の開発が期待される。

その一方で、本研究において、低温焙煎による加工で熱水抽出物中のクロロゲン酸が増加すること(図1)、抗酸化性が向上すること(図4)を明らかにした。この抗酸化性向上にはクロロゲン酸も寄与していると推測されるが、それ以外の抗酸化性を示す成分の保持が期待され、 α -glu阻害活性以外の機能性を示すことも推測される。今後、低温焙煎コーヒーの他の機能性についても検討を重ねていきたい。

本研究において、クロロゲン酸以外のポリフェノールで α -glu阻害活性を持つ物質がコーヒー熱水抽出物に含まれることを示唆した(図7)。今後も研究を継続し、質量分析等により新たな α -glu活性阻害物質の探索を行いたいと考えている。

参考文献

- 1) 全日本コーヒー協会、統計資料 (2015), http://coffee.ajca.or.jp/wp-content/uploads/2011/08/d ata05_2015-11.pdf
- 2) Oboh, G. *et.al.* ; Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 26(2), p.165-70(2015).
- 3) 辻ら; 山梨県工業技術センター研究報告, 15, p.34-39(2000).