

ラクトパーオキシダーゼのヨーグルトへの応用

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者	平野, まゆみ
巻/号	47巻3号
掲載ページ	p. 195-199
発行年月	1998年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



平成10年度酪農科学シンポジウム講演内容

ラクトパーオキシダーゼのヨーグルトへの応用

平野まゆみ

(雪印乳業技術研究所)

Application of Lactoperoxidase to Yogurt

By Mayumi Hirano

(Technology and Research Institute, SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)

1. はじめに

ラクトパーオキシダーゼ (LPO) は乳中に含まれる分子量約8万の酵素で¹⁾, 牛乳中には約30 ppm 含まれている²⁾。LPO の機能としては、過酸化水素およびチオシアン酸イオンとともに働く抗菌効果 (LP システム) が知られている。一方、ヨーグルトにおいては保存中に酸度が上昇し、酸っぱくなるという現象 (アフターアンディフィケーション) がある。これはヨーグルト中の乳酸菌が発酵終了後も代謝を続け、低温下でもわずかながら乳酸を生成し続けるために起こるものであるが、このヨーグルト特有の酸味を嫌う生活者も少なくない。冷蔵保存中に起こるアフターアンディフィケーションが防止できれば、酸味の安定した製品を提供できるようになるため、従来より様々な方法が提案されている。しかし、いずれも味や組織、製造設備やコストの面で問題を残しており、残念ながら実用化されたものは少ない。筆者らは LPO に顕著なアフターアンディフィケーション抑制効果があることを見いだしたことから、LPO をヨーグルトへ応用し、その作用メカニズムについて検討を行った。

2. LP システム

LP システムは、様々な菌に対して抗菌効果を発揮することが報告されているが、大腸菌のようなグラム陰性菌に対しては殺菌効果、乳酸菌のようなグラム陽性菌に対しては静菌効果を示す³⁾。その作用機作については多くの報告があるが、LPO が過酸化水素を分

解することによって生じた活性酸素が、チオシアン酸イオン (SCN^-) を酸化してヒポチオシアン酸イオン (OSCN^-) とし、これが抗菌効果を示すとされている⁴⁾。チオシアン酸イオンは1~10 ppm 程度乳中に存在する他、唾液や胃液、アブラナ科の野菜等に多く存在する⁵⁾。なお、 OSCN^- は動物細胞に対しては損傷を与えないことが報告されているのをはじめ⁶⁾, LP システムの詳細については IDF (国際酪農連盟) によってまとめられており、その安全性についても全く問題のないことが述べられている⁷⁾。

未殺菌乳には LPO が活性を有した状態で含まれているため、乳にチオシアン酸イオンおよび過酸化水素を添加することにより LP システムが働く。このように、乳において LP システムを作用させることにより雑菌汚染を防止し、生乳の保存期間を延長させる試みが発展途上国を中心になされている他⁷⁾, LPO を配合した動物用飼料や歯磨き等が市販されているが^{8,9)}, 概して LPO の利用はまだあまり多とはいえない。日本においてはチオシアン酸イオンや過酸化水素の添加は法的に認められていないが、ヨーグルト中には乳酸菌によって産生された過酸化水素が存在し、原料乳由来として少量のチオシアン酸イオンが含まれている。したがって、ヨーグルトにおいては LPO のみを添加することにより、LP システムを働かせることが可能である。

3. ヨーグルトへの応用

LPO 添加ヨーグルトは、通常のヨーグルト製造工程とほぼ同じ工程で製造可能である。すなわち *Lb.*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* および *Streptococcus thermophilus* からなる乳酸菌スターターに殺菌した LPO を添加する。これを加熱殺菌したベースミックスに接種後、発酵させ、酸度約0.75%に達した時点で冷却する。LPO は熱に対して不安定であり、一般に加熱により活性を失うが、共存する塩の種類および濃度によって熱安定性が異なるため¹⁰⁾、少量の塩溶液中で LPO を殺菌することにより、LPO の活性を維持した状態で食品に添加することが可能である。

このようにして調製した LPO 添加ヨーグルトを 10°C にて 14 日間保存した際の酸度変化を Fig. 1 に示す。14 日目に酸度が約 1.1% まで上昇したコントロールと比較して、LPO を添加したヨーグルトは保存中の酸度上昇がほとんど認められず、顕著にアフターアシディフィケーションが抑制されることが明らかとなった¹¹⁾。保存中の乳酸生菌数の変化は Fig. 2 に示すように、LPO の添加により *S. thermophilus* は全く変化せず、*Lb. bulgaricus* は若干減少したものの、全菌数としては発酵乳の規定である 10^7 cfu/g を十分満たしており、全く問題なかった。また、LP システムの作用により乳酸菌の増殖阻害が起こり、発酵遅延が生じる可能性が考えられたが、発酵遅延は認められず、実際の製造においても問題のないことが示された。

さらに、LPO の添加はヨーグルトの物性面にも影響を及ぼすことが分かった¹²⁾。Table 1 に示すように、LPO の添加濃度にもなってヨーグルトの硬度およ

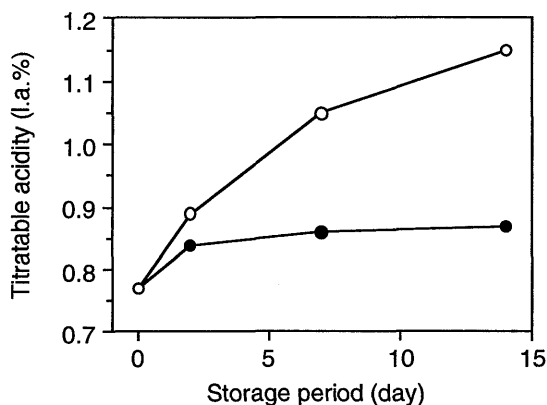


Fig. 1 Changes in titratable acidity (% lactic acid) of yogurt during storage at 10°C. 5 ppm of LPO added (●) and control (○).

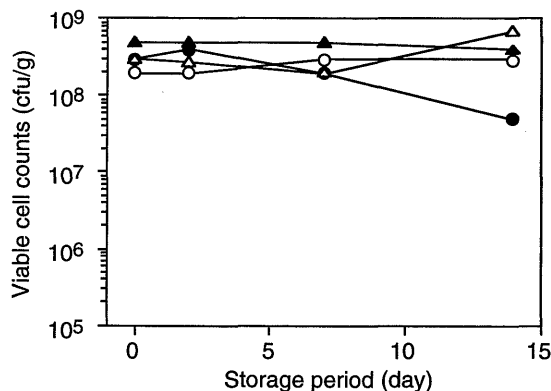


Fig. 2 Changes in viable cell counts of yogurt during storage at 10°C. *Lb. bulgaricus* with 5 ppm of LPO added (●) and control (○), and *S. thermophilus* with 5 ppm of LPO added (▲) and control (△).

Table 1 Effects of LPO concentration on hardness and apparent viscosity of yogurt.

	LPO (Unit/g)			
	0	0.45	0.9	9.0
Hardness*(N)	0.30	0.23	0.17	0.15
Apparent viscosity**(mPa·s)	393	354	320	278

* Hardness was measured with a rheometer (Rheoner, Yamaden Inc., Tokyo).

** Apparent viscosity was determined with a Haake Rotovisco RV2 (Haake, Karlsruhe, Germany).

び粘度は低下し、ソフトで滑らかな組織のヨーグルトが得られた。

4. 作用メカニズムの解明

LPO 添加ヨーグルトにおいて、LPO は原料乳由来の SCN^- を酸化して OSCN^- にするため、 SCN^- の減少量を測定することで LP システムの作用を裏付けることができる。LPO を添加したヨーグルト中の SCN^- 量は、保存中常にコントロール中の SCN^- 量よりも少なくなる (Fig. 3) ことから、ヨーグルトにおける LP システムの作用が示唆された。さらに、培地中に SCN^- を含まない系での検討として、Resting Cell を用いた実験を行った。ヨーグルトで用いた

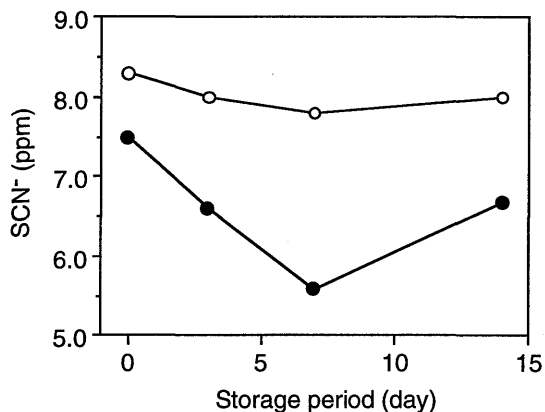


Fig. 3 Changes of thiocyanate (SCN⁻) concentrations in yogurt during storage at 10°C. 5 ppm of LPO added (●) and control (○).

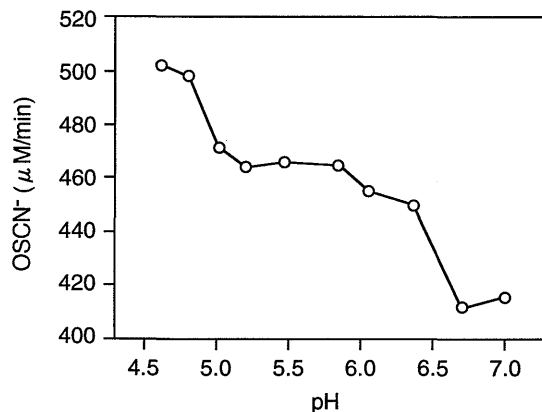


Fig. 5 Effects of pH on production of hypothyocyanite (OSCN⁻). 10 ppm of LPO, 10 ppm of SCN⁻ and 5 ppm of H₂O₂ was mixed in 0.01 M phosphate buffer at 37°C. Produced OSCN⁻ was determined by the method of Aune et al. (1977)⁴.

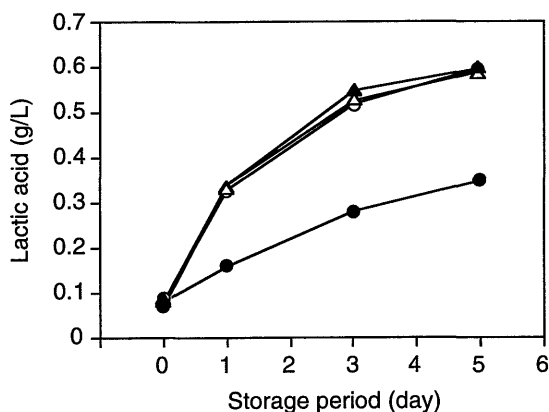


Fig. 4 Changes in production of lactic acid by *Lb. bulgaricus* suspended in 2% glucose-PBS buffer during storage at 10°C. 10 ppm of LPO and 10 ppm of SCN⁻ added (●), 10 ppm of LPO added (△), 10 ppm of SCN⁻ added (▲), and control (○).

Lb. bulgaricus を MRS 培地にて培養，集菌後，菌体を 2% グルコースを含む PBS (生理的リン酸緩衝溶液) に懸濁し，10°C における乳酸生成量を測定した。結果は Fig. 4 に示すように，LPO あるいは SCN⁻ を単独で添加した場合にはコントロールと同様に乳酸を生成したが，LPO および SCN⁻ を添加した系では，乳酸菌の生成する過酸化水素により LP システムが作用し，乳酸の生成が抑制された。この検討から，ヨー

グルトにおける乳酸生成の抑制はいわゆる LP システムによるものであることが示された。

LPO の影響は乳酸菌の菌種および菌株によって異なり，乳酸菌の過酸化水素生成量の他，OSCN⁻ を SCN⁻ に変換する酵素 (NHOR, NADH-OSCN oxidoreductase)¹³ 活性が LP システムに対する菌の感受性に影響していることが示された。NHOR 活性の低い菌は LP システムの影響を受けやすいが，NHOR 活性の高い菌は生成した OSCN⁻ を SCN⁻ に変換する能力が高いため，LP システムの影響を受けにくいものと考えられる。また，ヨーグルト発酵中と保存中の LP システムによる乳酸生成抑制の違いの原因を調べる目的で，pH の違いによる OSCN⁻ の生成量の違いを調べたところ，Fig. 5 に示すように pH が低いほど OSCN⁻ の生成量は多くなることが明らかとなった。したがって，pH が比較的高く，乳酸菌の代謝も活発な発酵温度では LP システムの影響を受けないが，pH の低下した保存中には OSCN⁻ が多く蓄積し，乳酸菌の活性も低下しているために，過度な乳酸生成が抑制されると考えられる。

LPO によるヨーグルトの物性変化についても検討を行った。乳酸菌の影響を除く目的で glucono-δ-lactone の添加により調製したゲル (GDL ゲル) を用いて硬度の変化を調べたところ，Fig. 6 に示すように

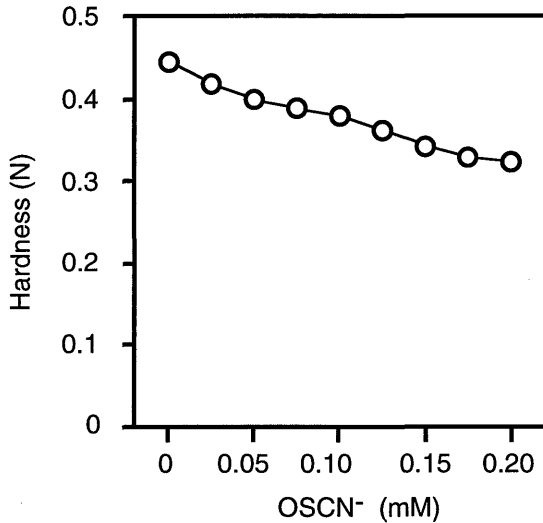


Fig. 6 Effect of OSCN^- on the hardness of GDL-gel. Reconstituted skim milk gel was prepared by addition of glucono- δ -lactone. Hardness was measured using Rheoner.

GDLゲルの硬度は OSCN^- の添加により低下し、 OSCN^- が乳タンパクに直接影響していることが明らかとなった¹⁴⁾。通常、ゲルのネットワーク形成には、 β -ラクトグロブリン (β -LG) と κ -カゼイン間のS-S結合および疎水性相互作用が重要な役割を果たすとされている。一方、LPシステムの抗菌効果は OSCN^- による菌体膜等に存在するSH基の酸化であることから、ヨーグルトの物性に関わる β -LGのSH基に及ぼす影響を調べたところ、加熱により反応性の高まった β -LGのSH基は OSCN^- の添加により酸化されることが分かった (Fig. 7)。したがって、LPO添加ヨーグルトでは、 OSCN^- の生成によりSH基が酸化されるために、 β -LGと κ -カゼイン間のS-S結合が一部阻害され、その結果ゲルのネットワーク形成が一部不十分になっているものと推察した。

また、ゲル化特性を調べる目的で、ゲル化pHおよび疎水性度の変化を調べた。ゲル化pHに影響を及ぼす因子としては、乳の加熱やゲル化温度等についてすでに多くの報告があるが、本研究によりLPOの添加によってもゲル化pHの上昇することが示された。Fig. 8に示すように、発酵温度を高めるとゲル化pHは上昇し、各発酵温度においてLPOの添加濃度に応

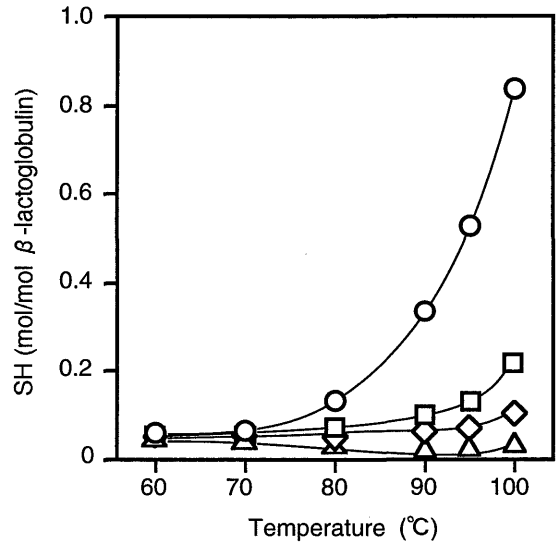


Fig. 7 Effects of the addition of OSCN^- on the SH content of heated β -LG. After β -LG solution was heated for 3 min, OSCN^- was added at various concentrations. The content of the SH in β -LG was determined using DTNB. OSCN^- concentration: \circ , 0 mM; \square , 0.05 mM; \diamond , 0.1 mM; \triangle , 0.2 mM.

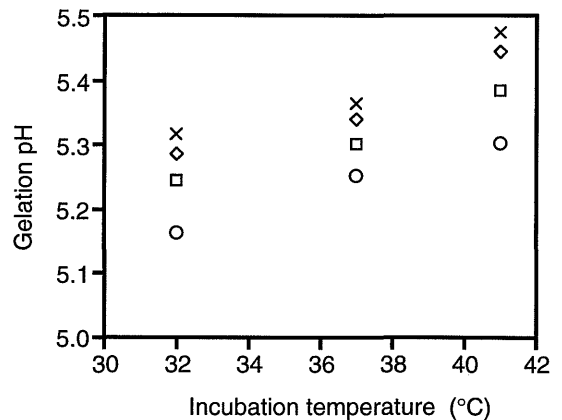


Fig. 8 The effects of incubation temperature and LPO concentrations on gelation pH of yogurt. A mixed culture (*Lb. bulgaricus*: *S. thermophilus*=1:1) were inoculated into 10% reconstituted skim milk and incubated at 32, 37, and 41°C. (\circ), No LPO added; and (\square), 0.45 unit/g of LPO; and (\diamond), 0.9 unit/g of LPO; and (\times), 1.8 unit/g of LPO.

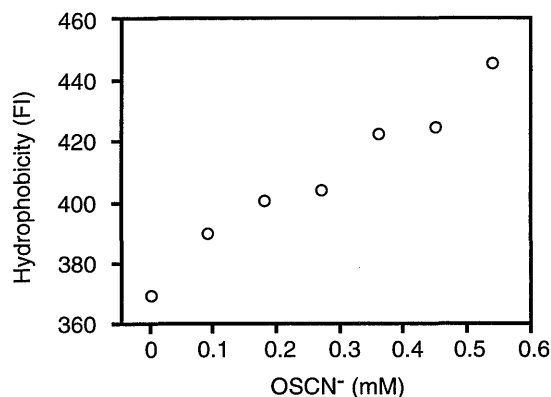


Fig. 9 The effects of OSCN^- on the hydrophobicity of reconstituted skim milk. 10% reconstituted skim milk was heated for 15 min. Hydrophobicity was determined using 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid as a fluorescence probe.

じてゲル化 pH の上昇が認められた。一般に、ゲル化温度の上昇にともなうゲル化 pH 上昇の原因として、カゼイン解離の温度依存性や温度による疎水性度の変化、また加熱処理にともなうゲル化 pH 上昇の原因として、ホエータンパクとの反応によるカゼインミセル表面の疎水性度の上昇やミセル構造の変化によるカルシウムイオン感受性の変化等が挙げられている¹⁵⁾。乳タンパクの疎水性度に与える OSCN^- の影響を調べたところ、Fig. 9 に示すように OSCN^- の添加により疎水性度が上昇することが明らかとなった。したがって LPO の添加によるヨーグルトの物性変化は、LP システムで生じた OSCN^- の作用により、 β -LG と κ -カゼイン間の S-S 結合形成が一部阻害されると同時に、乳タンパク間の疎水性相互作用が上昇することによると考えられる。

5. おわりに

近年、Probiotics という考え方が注目されつつある。これは、宿主に健康をもたらす乳酸菌を積極的に摂取しようという考え方であるが、乳酸菌を理想的な状態で生活者に届けるという点では、LP システムの応用も Probiotics の考え方にあてはまるといえる。

乳酸菌を利用した食品には、ヨーグルトをはじめ発酵飲料、チーズ、アイス（フローズンヨーグルト）、その他の発酵食品等、様々なものが挙げられる。これらに LP システムを応用することにより、今まで以上に乳酸菌を積極的に利用した、付加価値の高い食品を生活者に提供することが可能になると考える。

参考文献

- 1) G. Sievers, *FEBS Lett.*, 127, 253 (1981).
- 2) B. D. Polis and H. W. Shmuckler, *J. Biol. Chem.*, 201, 475 (1953).
- 3) B. Reiter, *Protides of the Biological Fluids*, 32, 111 (1985).
- 4) T. M. Aune and E. L. Thomas, *Eur. J. Biochem.*, 80, 209 (1977).
- 5) S. J. Klebanoff, *Science*, 169, 1095 (1970).
- 6) M. Adamson and J. Carlsson, *Infect. Immun.*, 35, 20 (1982).
- 7) Bulletin of the International Dairy Federation, 234, 2-14 (1988).
- 8) B. Reiter, R. J. Fulford, V. M. Marshall, N. Yarrow, and M. J. Ducker: *Anim. Prod.*, 32, 297 (1981).
- 9) O. M. Poulsen, Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 88/02600, 20 (1986).
- 10) K. Sato, S. Dosako, I. Nakajima, and K. Ido, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 2054 (1992).
- 11) M. Nakada, S. Dosako, R. Hirano, M. Oooka, and I. Nakajima, *Int. Dairy J.*, 6, 33 (1996).
- 12) R. Hirano, M. Hirano, M. Oooka, S. Dosako, I. Nakajima, and K. Igoshi, *J. Food Sci.*, 63, 35 (1998).
- 13) J. Carlsson, Y. Iwami, and T. Yamada, *Infect. Immun.*, 40, 70 (1983).
- 14) 平野了悟, 平野まゆみ, 大岡 実, 堂迫俊一, 日本食品科学工学会誌, 44, 37 (1997).
- 15) J. A. Lucey, C. T. Teo, P. A. Munro, and H. Singh, *J. Dairy Res.*, 64, 591 (1997).