

博士論文

Lactococcus lactis と Streptococcus thermophilus で

製造した新規発酵乳の機能特性に関する研究

平成 20 年 3 月

大前 允人

*Lactococcus lactis*と*Streptococcus thermophilus*で製造した新規発酵乳の機能特性に関する研究

目次

序論	1
1. ヨーグルトのおいしさとその要因	3
1) 食品のおいしさ	3
2) 味の受容機構	3
3) ヨーグルトのおいしさと味	7
4) ヨーグルトの呈味成分	7
2. ヨーグルトの生体調節機能	11
1) 生活習慣病と食生活	11
2) 食品の生体調節機能とその成分	11
3) ヨーグルトの生体調節機能	12
3. 本研究の目的	15
第1章 新規発酵乳の製造方法および呈味特性	16
緒言	16
1. 実験材料および方法	17
1) 供試材料	17
2) 発酵乳の製造方法	17
3) 滴定酸度および pH	17
4) 官能評価	17
2. 結果および考察	19
1) 製造工程における滴定酸度および pH の変化	19
2) 新規発酵乳の官能特性	19
第2章 新規発酵乳の呈味成分と寄与成分の特定	24
緒言	24

1. 実験材料および方法	25
1) 供試材料	25
2) 有機酸の分析	25
3) 糖の分析	25
4) ペプチドおよび遊離アミノ酸の抽出	25
5) アミノ酸分析	25
6) HPLC	26
7) ペプチド溶液の調製	26
8) 再構成遊離アミノ酸溶液の調製	26
9) 官能評価	26
2. 結果および考察	28
1) 新規発酵乳の有機酸と糖の分析	28
2) 新規発酵乳の遊離アミノ酸およびペプチドの分析	31
3) 新規発酵乳の呈味寄与成分の特定	37
第3章 新規発酵乳のストレス性胃潰瘍抑制効果	42
緒言	42
1. 実験材料および方法	43
1) 供試材料	43
2) 実験動物および飼育法	43
3) 胃潰瘍形成方法	43
4) 新規発酵乳等の試料の投与方法	43
5) 胃潰瘍評価法	43
①評価試料の調製方法	43
②Ulcer Index による潰瘍形成度の評価	44
③目視観察による潰瘍形成度の評価	44
④カタラーゼ活性の測定	44
⑤TBA 法	44
6) 統計処理	46

2. 結果	47
1) Ulcer Index への影響	47
2) 目視観察による潰瘍形成度への影響	47
3) カタラーゼ活性への影響	47
4) TBARS への影響	51
3. 考察	53
第4章 新規発酵乳の抗酸化作用成分	58
緒言	58
1. 実験材料および方法	59
1) 供試材料	59
2) 新規発酵乳抽出液の調製	59
3) DPPH ラジカル捕捉作用の測定	59
4) 抗酸化作用の評価	59
①酸化モデル系	59
②脂質酸化物の測定(ロダン鉄、TBA 法)	60
5) ペプチドの濃度測定	60
6) HPLC	60
7) ペプチドの構造決定	60
2. 結果	62
1) 新規発酵乳抽出液のラジカル捕捉作用	62
2) 新規発酵乳抽出液の抗酸化作用	62
①濃度依存性	62
②限外濾過物の抗酸化作用	62
③HPLC による抗酸化ペプチドの単離	62
④抗酸化ペプチドのアミノ酸配列	67
3. 考察	74
総括	76

引用文献	79
要旨	89
謝辞	93

序論

ヨーグルトは代表的な発酵乳製品であり、主に牛乳を原料とし、2種類の高温乳酸菌 (*Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) と *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*)) の発酵によって作られるものであると国際規格により定められている (1)。日本では、この2種類の高温乳酸菌に限らず、種々の有用乳酸菌やビヒズス菌を用いた発酵乳も全てヨーグルト類としてとらえられている。1950年代にヨーグルトが工業的に生産され、いろいろなタイプのもものが市場に出回ってきた。今日、スーパーマーケットやコンビニエンスストアではヨーグルト専用コーナーができるぐらいのヨーグルトブームで、1995年から2003年にかけて、ヨーグルトの消費量は約2倍に伸びている(図1)。その要因として、ヨーグルトが優れた官能特性、幅広い形態と保健用効果を持つためと考えられる。ヨーグルトにはプレーンヨーグルト、フルーツヨーグルト、ドリンクヨーグルトなどがあり、さまざまな有用な乳酸菌が使われている。これらのヨーグルトの多くは、酸味が強く、特有の風味を有するため、必ずしも日本人の嗜好性に合うものではない。また、近年の日本人の健康志向に合わせた生理機能をもつヨーグルトも多く開発されているが、その風味はこれまでのヨーグルトと類似している。このような背景から、今後の高齢化社会に向けて、健康に良いおいしい発酵乳の開発が求められている。

最近、新しいタイプの発酵乳として、チーズのスターターに利用される中温乳酸菌 *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) と従来からヨーグルト製造に使用されている *S. thermophilus* の組み合わせにより、8時間以上の長時間発酵させて製造した新規発酵乳が開発された。この新規発酵乳は、酸味が弱く、味がマイルドであると同時に、ヨーグルト特有の発酵臭が弱いため、日本人の嗜好性に合うことがわかってきた。しかし、新規発酵乳の風味特性並びに生体調節機能に関する研究は全くなされていないのが現状である。

そこで、本研究では新規発酵乳の呈味特性と生体調節機能について検討を行った。その結果、新規発酵乳の呈味形成に寄与する成分を明らかにした。さらにこの新規発酵乳のストレス性胃潰瘍抑制に効果があることを示し、その成分を特定した。

以下に、ヨーグルトのおいしさとその要因並びにヨーグルトの生体調節機能を概略

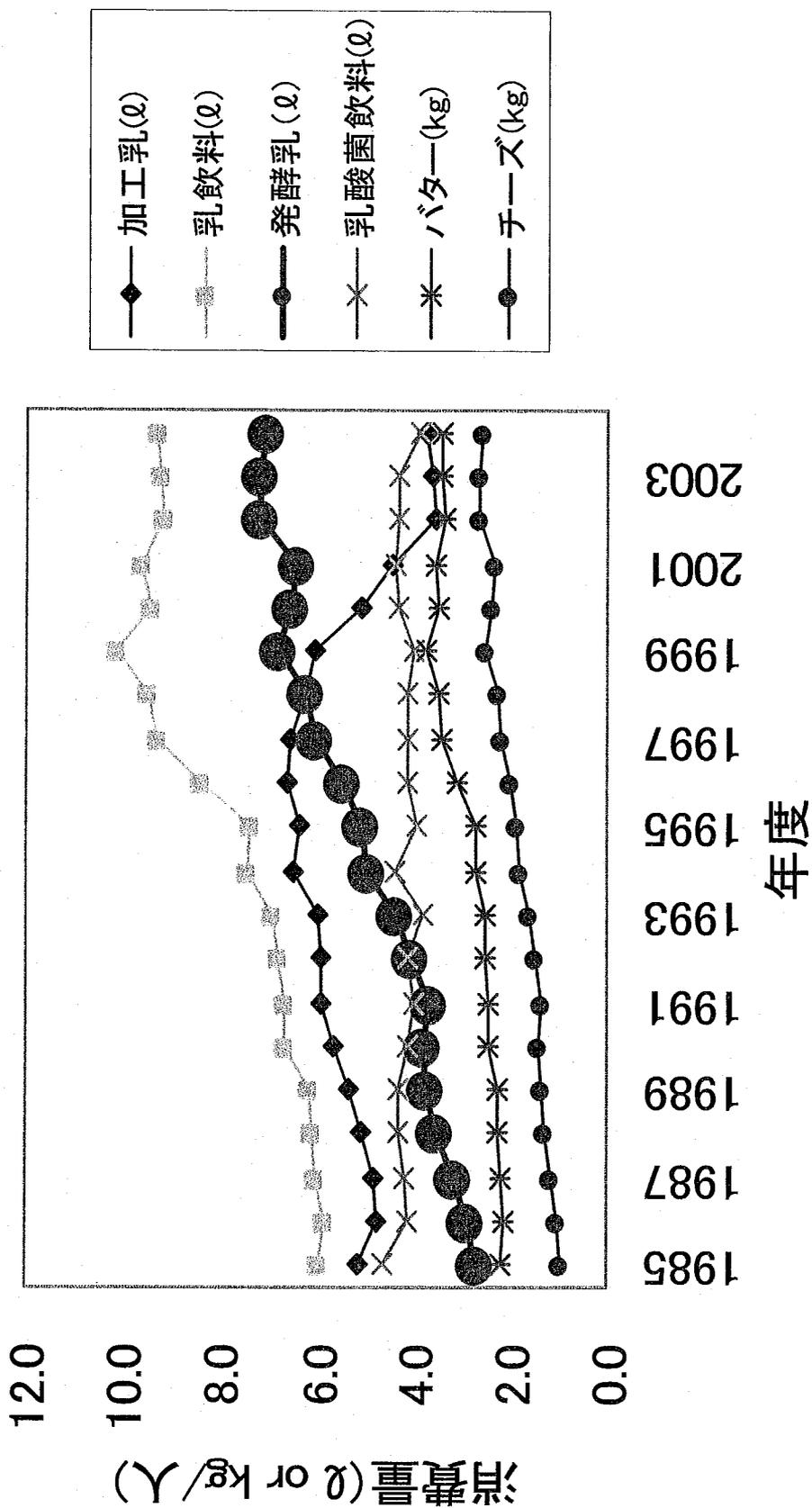


図1 乳製品の1人当たりの年間消費量の推移
 (2005年 農林水産省「乳製品統計調査」より引用)

し、本論文の意義を明確にすると同時に、考察に資することとした。

1. ヨーグルトのおいしさとその要因

1) 食品のおいしさ

食品のおいしさを決める要因には、味、におい、食感、色など食品自身の特性を反映するものと、食習慣、健康状態などの食品以外に由来するものがある。その中でも味とにおいを合わせた風味は重要な要因の1つである(図 2)。食品の風味はさまざまな成分により形成され、その含量、組み合わせ、相互作用などにより極めて複雑なものとなっている。食品の風味とりわけ味は、素材となる動物や植物に含まれている成分が影響する。そして、熟成、発酵や調理によって呈味成分が変化し、おいしい食品となる。その呈味成分として大きく寄与しているのが、糖、アミノ酸、ペプチド、有機酸、ヌクレオチドやミネラルである。

2) 味の受容機構

舌の上には茸状乳頭、有郭乳頭、葉状乳頭が存在し(2)、これらの乳頭中や口蓋、咽頭部などにある味蕾が味を受容する(図 3)。味蕾は、味細胞が 10~40 個集まった蕾状の構造をとり、味細胞がシナプスを介し味神経と接続している。舌の前方に存在する茸状乳頭中の味蕾は鼓索神経、舌の後方に存在する有郭乳頭および葉状乳頭中の味蕾は舌咽神経と接続している。また、咽頭部に存在する味蕾は上咽頭神経、軟口蓋に存在する味蕾は大浅錘体神経と接続している。このように、味の情報はこれら 4 系統の神経により脳へ伝えられる。

甘味、苦味およびうま味の受容機構は、セカンドメッセンジャーを介して伝えられる。呈味物質がレセプターに結合すると G タンパク質が活性化され、ホスホイノシチドカスケード系が働く。この系では、G タンパク質に共役するホスホリパーゼ C が活性化され、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸(PIP₂)をイノシトール 1,4,5-トリリン酸(IP₃)に加水分解する。IP₃ はセカンドメッセンジャーとして小胞体に拡散し、小胞体の膜貫通型 Ca²⁺輸送チャネルを開口させ、細胞内に Ca²⁺を放出させる。その結果、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し、脱分極が起こり、味の信号が神経を介して脳に伝えられる(図 4)。この機構においては、G タンパク質共役型レセプターである T1R2 および T1R3 のへ

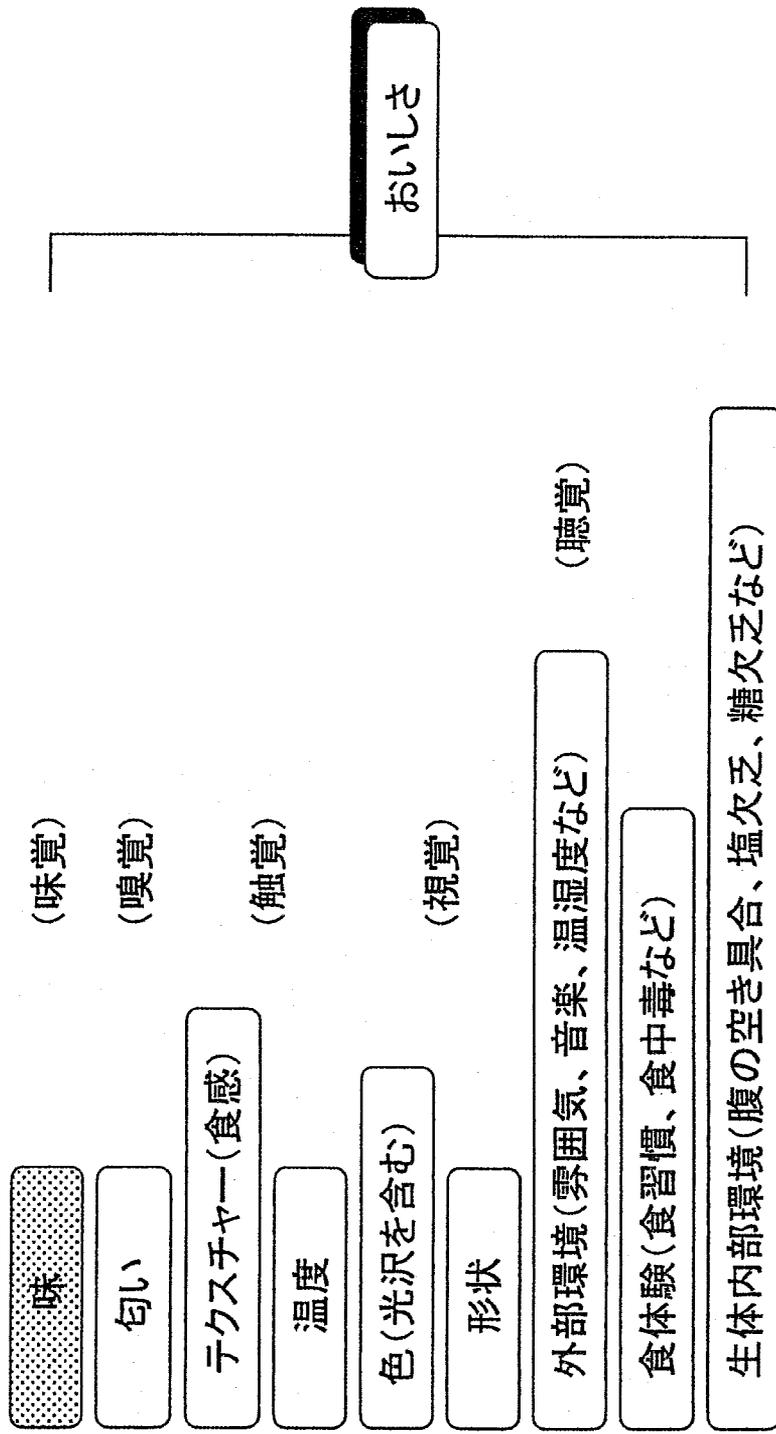


図2 食品のおいしさを決める要因(3)

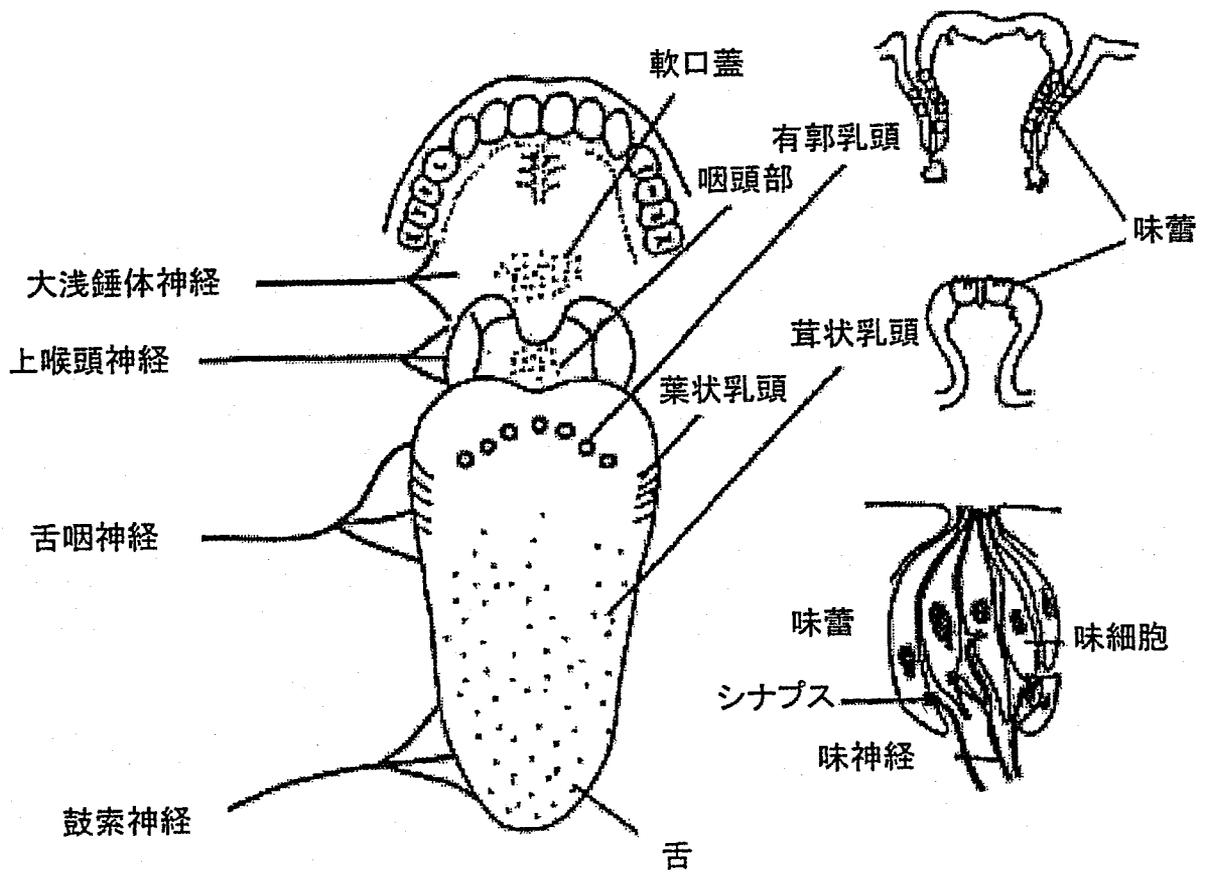


図3 味覚器の構造(4)

(栗原堅三:季刊化学総説,40, p.4(1999)より引用)

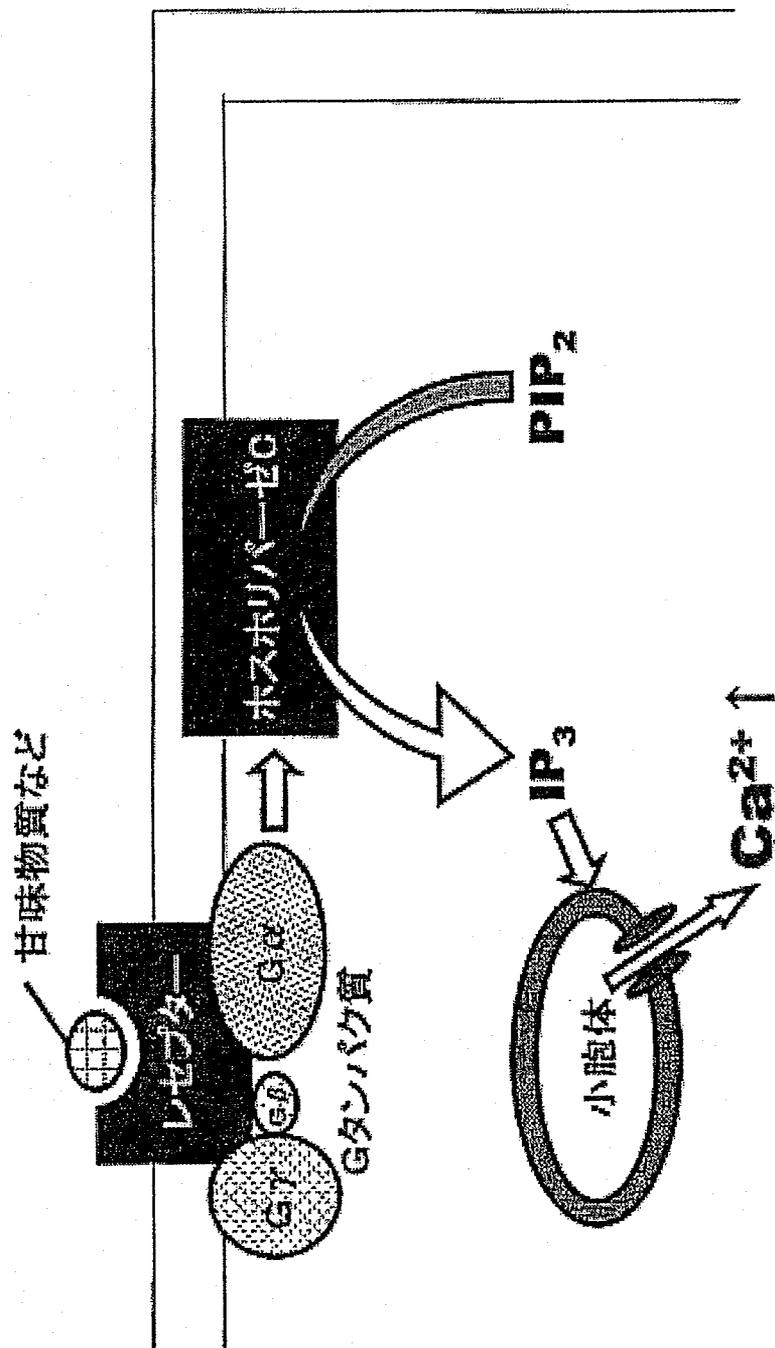


図4. 甘味物質の味細胞における受容機構(5)

(味覚の科学:朝倉書店,p.122より引用)

テロ2量体が甘味レセプターとして働くことが報告されている(6)。また、T1R1 および T1R3 のヘテロ2量体が、うま味レセプターとして、T2Rs が苦味レセプターとして働くことが報告されている(7)。うま味の受容機構においては、taste-mGluR4 がうま味レセプターとして働き、cAMP がセカンドメッセンジャーとして機能しているという報告もある(8)。一方、塩味および酸味の受容機構は、イオンチャネルを介して伝わる。塩味は、 Na^+ が味細胞膜上のイオンチャネルを通過して細胞内に流入し、脱分極が起こる機構が考えられている。酸味は、味細胞膜上のイオンチャネルを通過して細胞内に流入した H^+ により K^+ チャネルが閉まり、脱分極が起こる機構が考えられている(9)。

3) ヨーグルトのおいしさと味

ヨーグルトのおいしさは、風味、微細で滑らかなテクスチャー、カスタードのようなしつかりしたボディーにある(10, 11)が、とりわけ風味(味と香り)は、極めて重要な要素である。これまで消費者に受け入れられているヨーグルトの風味の研究について数多くなされている。これらを整理してみるとヨーグルトらしい風味をもったヨーグルトが好まれている(12, 13)。しかし、好ましいヨーグルト風味が、人によって異なるため決定的なものを出されていない。その中でも過剰酸度(pH4.0 程度以下)であるヨーグルトは、好まれていない(14)。アメリカで市販されている 17 種類のプレーンヨーグルトについて消費者嗜好調査した結果、大多数の消費者は、酸味が強くて甘味が不十分であると評価している(13)。ヨーグルトは、近年、酸味が弱く甘味が強い方が好まれる傾向にある。したがって、新規発酵乳を開発する条件として、酸味が弱く、甘味が強いことが必要である。

4) ヨーグルトの呈味成分

ヨーグルトは牛乳を原料として、発酵処理により製造されるが、この発酵工程中に、種々の呈味成分が生成されることが知られている。ここでは、ヨーグルトを含めた食品の呈味形成に寄与する成分を中心に記述する。

①遊離アミノ酸

一般的に L 型アミノ酸は、様々な味を呈するが、単純に基本味 1 つを呈するものは

少なく、複雑な味を呈している(15)。遊離アミノ酸は単一物質でありながら、5 基本味のいくつかの呈味質を併せもつものが多い(表 1)。また、濃度によって呈味が異なるものもある。水産物を用いたオMISSIONテストでは、多くの場合水産物の甘味やうま味の発現にグルタミン酸やグリシンが必要であると報告されている。また、メチオニンやアルギニンは、多くの場合水産物の独特な風味の発現に寄与している(16)。多くの食品で、遊離アミノ酸は単独で呈味を発揮することよりも、他の呈味物質と相互作用を起こして、呈味に関与していると考えられている(17)。ヨーグルトの場合、発酵中に遊離アミノ酸が増加していると報告されている(18)ことから、各遊離アミノ酸は呈味特性に寄与している可能性が考えられる。

②有機酸

有機酸は、多くの動物性および植物性食品に含まれている。食品は通常 2,3 種類以上の有機酸を含んでいることが多い。有機酸の呈味質はそれぞれで異なっている。即ち、みかんやレモンなどの柑橘類に多く含まれるクエン酸は爽快な酸味を呈し、キムチやヨーグルトに含まれている乳酸は渋みを伴う酸味を呈し、かつお節中の乳酸は、酸味およびうま味に寄与し、全体の味をまとめている(19)。コハク酸はハマグリ、アサリおよび帆立貝などの貝類のうま味成分として知られており、これらの貝に特有の風味を与えている。ヨーグルト中には、オロト酸、クエン酸、乳酸、ピルビン酸、尿酸、酢酸、プロピオン酸、ギ酸、リン酸、コハク酸などが含まれている(20)。発酵乳の酸味は、乳酸とコハク酸量に対して正の相関があり、酢酸量に対して負の相関があると報告している(21)。有機酸の呈味質について、よく知られているものの各有機酸それぞれのヨーグルトへの酸味の寄与度についてはあまり報告されていない。したがって、ヨーグルトの呈味形成におけるそれぞれの有機酸の役割は、大変興味深い課題である。

③糖

単糖類およびオリゴ糖類は一般的に甘味を呈し、糖の種類によって甘味特性は、異なっている。スクロースは、甘味が口腔内に残るのに対し、フルクトースは、切れ味のよい甘味を呈する。また、糖の種類によって甘味度も異なる(表 2)。オリゴ糖の場合は分子が大きい程、甘味度が減少する(22)。ヨーグルト中には、主に乳糖が含まれて

表 1 L-アミノ酸の閾値、弁別閾および味質(23)

	アミノ酸	閾 値 (mg/dl)	弁 別 閾 (%)	甘	塩	酸	苦	旨
甘味系の アミノ酸	グリシン	110	10	◎				
	ヒドロキシプロリン	50	-----	◎			○	
	アラニン	60	10	◎				△
	スレオニン	260	7	◎				
	プロリン	300	50	◎			◎	
	セリン	150	15	◎				△
	リジン塩酸塩	50	20	○			○	△
	グルタミン	250	30	△				△
苦味系の アミノ酸	フェルニアラニン	150	20				◎	
	トリプトファン	90	10				◎	
	アルギニン	10	20				◎	
	アルギニン塩酸塩	30	-----	△			◎	
	イソロイシン	90	15				◎	
	バリン	150	30	△			◎	
	ロイシン	380	10				◎	
	メチオニン	30	15				◎	△
酸味系の アミノ酸	ヒスチジン	20	50				○	
	ヒスチジン塩酸塩	5	-----		△	◎	△	
	アスパラギン酸	3	30			◎		△
	グルタミン酸	5	20			◎		○
旨み系の アミノ酸	アスパラギン	100	30			○	△	
	グルタミン酸ナトリウム	30	-----	△	△			◎
	アスパラギン酸ナトリウム	100	20		○			○

閾値:味を感じ得る最低濃度

弁別閾:味の強さを識別し得る最小濃度差

味の強さ ◎>○>△

表 2 糖質の甘味度(22)

糖質	甘味度	糖質	甘味度
スクロース	100	マルトース	40
グルコース	64~74	マルトトリオース	30
フルクトース	115~173	マルトテトラオース	20
α -フルクトース	60	マルトペンタオース	15
β -フルクトース	180	トレハロース	45
α -ガラクトース	32	ラフィノース	23
β -ガラクトース	21	エリスリトール	75
α -マンノース	32	キシリトール	100
β -マンノース	苦味	マンニトール	40
キシロース	40	ソルビトール	60
ラクトース	16	マルチトール	75
パラチノース	42	ラクチトール	30
イソマルトース	40	パラチニット	45

いる。牛乳中の乳糖はほのかな甘味に寄与している(24)ことから、発酵乳でも呈味形成に寄与していると考えられる。しかし、発酵中に乳糖から乳酸へ代謝されるため、十分な評価はなされていない。

④ペプチド

発酵食品や熟成食品には、2~10 個程度のアミノ酸から成るオリゴペプチドが含まれており、食品の味に影響を与えている。これまでにアミノ酸配列によって、甘味(25)、苦味(26, 27)、塩味(28)、うま味および酸味ペプチド(29)が見つかっている。また、添加効果によってうま味増強ペプチド(30)、苦味および酸味抑制ペプチド(31)などその他さまざまな呈味を呈するペプチドが報告されている(32)。乳由来のチーズにも、苦味を有するペプチドが報告されている(26, 27)ので、ペプチドがヨーグルトの呈味性に寄与すると考えられるが、全く検討されていない。

2. ヨーグルトの生体調節機能

1) 生活習慣病と食生活

日本は、世界で最も速く高齢化が進んでいる国である。加齢に伴い肉体的機能が低下し、糖尿病、高血圧・高脂血症・心臓病・ガンなどの生活習慣病患者および予備軍が増加してきている。これらの疾患は加齢だけではなく、食生活の欧米化・ストレスの増加・運動不足などによっても誘発されるため、中高年・若年層にも生活習慣病が増加しつつある。日本人の3大死因であるガン・心臓病・脳血管疾患は、生活習慣病もしくはそれが悪化した高度疾患として捉えられている。これら生活習慣病は食事・運動・休養の3つが関連因子と考えられており、中でも特に食事の影響は大きく、食生活の改善で生活習慣病の進行を抑制したり、予防したりすることが可能と考えられている。これらのことから健康を維持し、生活習慣病の予防または進行を抑制する効果的な食品が求められている。

2) 食品の生体調節機能とその成分

食品は、栄養素の供給、嗜好性の付与のほかに生体調節機能を有することが知られている(33)。ヒトの身体には、食物を消化吸収する消化系、唾液や胃液、ホルモン

の分泌を調節する分泌系、ウイルスや病原菌といった外部からの侵入を防ぐ免疫系、様々な情報伝達を行う神経系、血液やリンパ球などが流れる循環系などがあり、これらのうち 1 つでも正常にコントロールできなくなると、病気や障害を引き起こす。例えば、糖の調節を担うホルモン「インスリン」の異常は糖尿病を、脳神経系の異常はアルツハイマー病を、血液の流れの異常は心筋梗塞や動脈硬化を、消化系の異常は便秘を、また、免疫系の異常は、がんの発症あるいはアレルギーや感染症を引き起こす。生体調節機能は、上記の各系の恒常性、異常化の防止や異常からの回復に関わる機能のことを言う(34)。これまでに報告された機能性成分を含む主な食品、期待される機能と機能性成分を表 3 に示した。牛乳は多くの機能成分を有しており、そして乳酸菌により発酵されたヨーグルトは、さらに多くの機能が見出されている。

3) ヨーグルトの生体調節機能

ヨーグルトの生体調節機能は、大きく 3 つに大別される。

1. 乳酸発酵による乳成分の栄養的価値の向上(消化性や吸収性の向上など)(35)
2. 生きている乳酸菌が発揮する生理的効果(整腸作用や乳糖不耐症予防効果など)(36, 37)
3. 乳酸菌の菌体や発酵生産物の有する生理効果(抗変異原性、血中 LDL-コレステロール低減作用、抗腫瘍性、血圧上昇抑制作用など)(38-47)

そのうち 3 の分野が注目されており、研究が進められている。ここではヨーグルトの主な生体調節機能について記述する。

(1) 整腸作用

腸管内には夥しい数の腸内細菌が棲息し、成人でおよそ 100 種類、総細菌数は 100 兆個と言われている。この巨大な細菌叢は、食生活、環境、疾患、ストレスなどに大きく依存している。ビフィズス菌や乳酸桿菌で発酵したヨーグルトの摂取は、人体に有害な細菌の増殖を抑制し、良好な細菌叢を腸管内で維持させる効果があることが数多く報告されている(36, 37)。

(2) LDL-コレステロール低下作用

表3 主な食品の生体調節機能と機能性成分(48)

食品	生体調節機能	機能性成分
牛乳	免疫増強	カゼイン由来オリゴペプチド
	カルシウム吸収促進	カゼイン由来ホスホペプチド
	脳神経鎮静	カゼイン由来のオピオイドペプチド
	血圧上昇抑制	カゼイン由来のオリゴペプチド
	抗感染(抗菌)	ラクトフェリン
米	抗酸化	ガンマオリザノール
	抗感染(抗菌)	オリザシスタチン
	血圧上昇抑制	γ -アミノ酪酸
小麦	免疫増強	リボ多糖
	抗アレルギー	グルテイン由来のハプテインペプチド
	脳神経鎮静	グルテイン由来のエキソルフィン
大豆	インシュリン作用増強	グリシニン
	がん予防、脂肪代謝改善	イソフラボン
	血圧上昇抑制	グリシニン由来のオリゴペプチド
茶	抗アレルギー	ポリフェノール類
	抗酸化	ポリフェノール類
	がん予防	ポリフェノール類
野菜	がん予防	β -カロテンアスコルビン酸、糖タンパク質
	免疫増強	野菜(抽出物)
	メラニン産生制御	高分子成分、クロロゲン酸
柑橘類	抗酸化	ポリフェノール類
	がん予防	アスコルビン酸、オーラプテン、 β -クリプトサンチン
ゴマ	抗酸化	セサミナール
	脂質代謝改善	ゴマセサミン
	肝機能改善	ゴマセサモリン
エビ、カニ	免疫増強	キチン
	血圧上昇抑制	キトサン
シイタケ	免疫増強	B-1,3-グルカン
納豆	カルシウム吸収促進	メナキノ7(ビタミンK2)
トウガラシ	アドレナリン分泌	カプサイシン
青魚	抗血栓	EPA

心疾患は、死亡原因の上位を占めている。特にコレステロールの過剰摂取は、アテローム性の心疾患を惹き起こす原因となっている。子供の時、血中 LDL・コレステロールが高いと、成人期に高い割合で心疾患を引き起こしている(40)。近年、ヨーグルトの摂取が LDL・コレステロールの血中濃度を低下させる上で有効であると報告されている。

(3) 癌予防効果

a) 抗変異原性作用

ヨーグルトのもつ抗変異効果の作用機序は、乳酸菌体の変異原物質と吸着し、不活化されていると考えられている(41, 42)。Zhang ら(42)は、*Salmonella typhimurium* TA98 からストレプトマイシン依存性株をつくり、それを指標菌に用いて発酵乳の AF2 (2-(2-furyl)-3-(5-amino-2-furyl)acrylamide, 4NQO (4-nitro-quinoline-1-oxide)に対する抗変異原性を調べた。そして、これらの物質に対して発酵乳が顕著な抗変異原性を示すことを報告した。さらに、乳酸菌の菌体(特に細胞壁ペプチドグリカン)には変異原物質や癌原物質と強く結合する性質を有しており、死菌体でもその能力を有していることを報告した。

b) 抗腫瘍性作用

ヨーグルトが抗腫瘍効果に優れていることが明らかにされてきた(43, 44)。Sarcoma180 を移植したマウスにラングフィルと高粘質性酸乳を投与し、発酵乳に強い抗腫瘍効果があることを明らかにした(44)。それらの発酵乳は *Lc.lactis subsp. lactis* および *Lb.casei subsp. casei* で製造されており、いずれの乳酸菌も莢膜生産性であった(43, 44)。ヨーグルトによる抗腫瘍性作用は、乳酸菌の菌体、特に多糖類の作用に発現されることを強く示唆している。

(4) その他

胃潰瘍の原因であるピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) の生育阻害を示すヨーグルト(45)や *L. herveticus* を用いた血圧上昇抑制作用をもつヨーグルト(46)、ラクトフェリン(49)を添加したヨーグルト、カルシウムの吸収を促進する CPP (カゼインホスホペプチド)(47)を加えたヨーグルトなどさまざまな生体調節機能を有するヨーグルトが知られて

いる。

3. 本研究の目的

これまで述べてきたように、食品の重要な機能として、栄養素を供給する機能以外に、嗜好の付与並びに生体調節機能がある。今後の高齢化社会に向けて、健康にいいおいしい食品が求められている。その中で、発酵乳は両方の機能を有する食品として期待されているものの1つである。しかし、これまで、ヨーグルトの嗜好性は、フレーバーと物性に研究の焦点が当てられ呈味性についての報告は比較的少ない。また、ヨーグルトの生体調節機能は、主にプロバイオティクスやプレバイオティクスについてであり、発酵代謝物成分の生体調節機能は少ないのが現状である。特に、*Lactococcus lactis*と*Streptococcus thermophilus*で8時間以上発酵して製造した新規発酵乳については全く報告されていない。

そこで、本研究では、この新規発酵乳の機能として呈味特性と生体調節機能を明らかにすることを目的とした。具体的には、新規発酵乳の呈味特性を検討するため、官能検査によって新規発酵乳を従来のヨーグルトと比較した。そして、新規発酵乳とヨーグルトの呈味成分を解析し、呈味形成に寄与する成分を同定することを試みた。さらに、この新規発酵乳の生体調節機能として、ストレス性胃潰瘍形成抑制効果を検討した。得られた結果を以下のように4章に分けて記述した。

第1章では、新規発酵乳とヨーグルトを官能評価で比較し、新規発酵乳は酸味が弱く、甘味をもち、まろやかであると評価した。

第2章では、新規発酵乳とヨーグルトの呈味成分を調べ、糖や有機酸の比較、遊離アミノ酸およびペプチドの量や種類の違いを明らかにした。また、新規発酵乳の酸味の弱さは、乳酸量の少ないことに起因し、酸味の弱いことが相対的に甘味を強く、まろやかに感じさせると結論した。

第3章では、新規発酵乳が、生体内酸化ストレスで生じる胃潰瘍抑制効果があることを明らかにした。

第4章では、新規発酵乳から抗酸化成分を探索し、分子量1000以上画分から新規抗酸化ペプチドを単離し、構造決定した。

第 1 章 新規発酵乳の製造と呈味特性

緒言

ヨーグルトは代表的な発酵乳製品であり、主に牛乳を原料とし、2 種類の高温乳酸菌 (*Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) と *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*)) の発酵によって作られるものであると国際規格により定められている(1)。このヨーグルトの多くは、酸味が強く、特有の風味を有するため、必ずしも日本人の嗜好性に合うものではない。最近、新しいタイプの発酵乳として、チーズのスターターに利用される中温乳酸菌 *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) と従来からヨーグルト製造に使用されている *S. thermophilus* の組み合わせにより、8 時間以上の長時間発酵させて製造した新規発酵乳が開発された。この新規発酵乳は、酸味が弱く、味がマイルドであると同時に、ヨーグルト特有の発酵臭が弱いため、日本人の嗜好性に合うことがわかってきた。しかし、新規発酵乳の風味特性に関する研究は全くなされていない。

そこで、第 1 章では、*L. lactis* と *S. thermophilus* の組み合わせで発酵し、新規発酵乳を製造した。また、同様の酸度まで発酵させたヨーグルトを製造し、2 つの呈味特性の違いを官能検査で評価した。

1. 実験材料および方法

1) 供試材料

水酸化ナトリウムは、和光純薬工業株式会社から購入した。フェノールフタレインは、ナカライテスク化学薬品株式会社から購入した。全粉乳は、雪印乳業株式会社から購入した。供試菌として用いた *L. lactis*, *S. thermophilus* と *L. bulgaricus* は日本ルナ株式会社から供与された。そして、*L. lactis* は 38 °C で、*L. bulgaricus* と *S. thermophilus* を 42 °C で 24 時間培養したものをスターターとして使用した。

2) 発酵乳の製造方法

新規発酵乳およびヨーグルトの製造は、図 5 に示した。12 %全粉乳を 90 °C で 10 分間殺菌した後に、室温まで冷却した。これに新規発酵乳では *L. lactis* と *S. thermophilus* をそれぞれ 1 % 添加し、38 °C で発酵した。そして、滴定酸度 0.85 ± 0.05 % を終点とした。ヨーグルトでは *L. bulgaricus* を 1 %、*S. thermophilus* を 2 % 添加して 42 °C で発酵した。新規発酵乳と同様に滴定酸度 0.85 ± 0.05 % を終点とした(50)。

3) 滴定酸度および pH

滴定酸度は、発酵乳に等量の蒸留水を加えて希釈し、1 %フェノールフタレインを 2 ~ 3 滴加えた後、0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液で滴定し、乳酸当量として求めた。

発酵乳に直接 pH 電極(Beckman, USA)を挿入して pH を測定した。

4) 官能評価

新規発酵乳およびヨーグルトの呈味について官能検査を行い、2 つの発酵乳の基本 5 味(旨・塩・甘・苦・酸味)の強さを 13 人のパネルによって 2 点識別法で評価した。

スターターの組み合わせ	
新規発酵乳	<i>Lactococcus lactis</i> 1% (中温菌) <i>Streptococcus thermophilus</i> 1% (高温菌)
ヨーグルト	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 1% (高温菌) <i>Streptococcus thermophilus</i> 2% (高温菌)

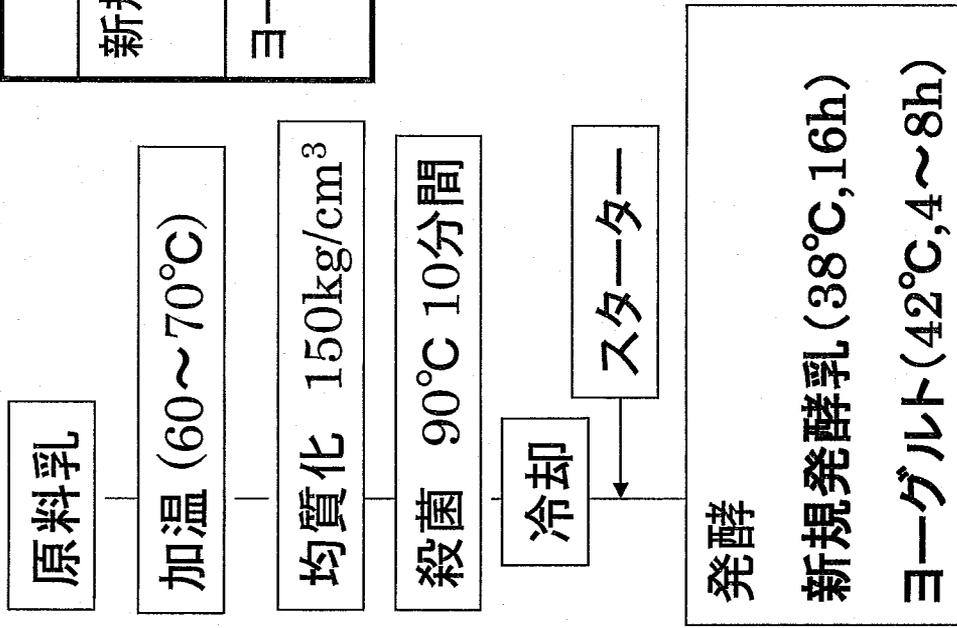


図5. 新規発酵乳とヨーグルトの製造工程

2. 結果および考察

1) 製造工程における滴定酸度および pH の変化

新規発酵乳とヨーグルトの製造過程において、滴定酸度 0.85 %を、発酵の終了時点とした。発酵中の滴定酸度および pH の変化をモニターした時の結果を Figs.1-1,1-2 に示した。

両製品の滴定酸度は、発酵と共に上昇し、ヨーグルトは 4 時間で 0.57 %に、6.5 時間で 0.85 %となった (Fig. 1-1)。一方、新規発酵乳では 4 時間で 0.37 %、8 時間で 0.70 %、12 時間で 0.79 %、16 時間で 0.85 %となり、発酵を終了させた。また、両製品の pH は、発酵と共に低下し、新規発酵乳は 4 時間で 5.81、8 時間で 4.84、12 時間で 4.62、16 時間で 4.5 となった。ヨーグルトは、4 時間で 5.20、6.5 時間で 4.5 となった (Fig.1-2)。

この発酵時間の違いは、用いた乳酸菌の組み合わせと発酵温度の違いによるものと考えられた。ヨーグルトに用いた乳酸菌 *L.bulugaricus* と *S.thermophilus* は、至適 pH がそれぞれ 5.5 および 6.5 である。従って、発酵初期の牛乳 (pH6.8) の状態では *S.thermophilus* が優勢となり、活発に乳酸生成を行う。乳酸の生成に伴って pH が低下することにより、次に至適 pH が 5.5 である *L.bulugaricus* が代わって活発に乳酸生成を行う。そのため発酵中の乳酸生成能は定常的に高いと考えられ、pH 低下および酸度上昇が速やかに行われたものと示唆された。一方、新規発酵乳に用いた乳酸菌 *L.lactis* と *S.thermophilus* は、至適 pH が 6.5 前後である。そのため、発酵初期段階では活発に乳酸生成が行われるが、ある程度 pH が低下し酸度が高くなると、乳酸生成が緩慢となったと推察された。そのため長時間にわたって発酵する必要があったものと考えられた。また、新規発酵乳の製造において、発酵温度が低かった故に、乳酸の生成が遅れて発酵時間が長くなったと推察された。

2) 新規発酵乳の官能特性

新規発酵乳とヨーグルトの呈味の違いを明らかにするために、官能評価を行った (Table1-1)。2 つの発酵乳の pH および滴定酸度に殆ど差異がない (Figs.1-1,1-2) にもかかわらず、新規発酵乳は、ヨーグルトよりも酸味が弱いと評価された。さらに、新規発酵乳は甘味があると評価された。また、多くのパネルが新規発酵乳の方がまるや

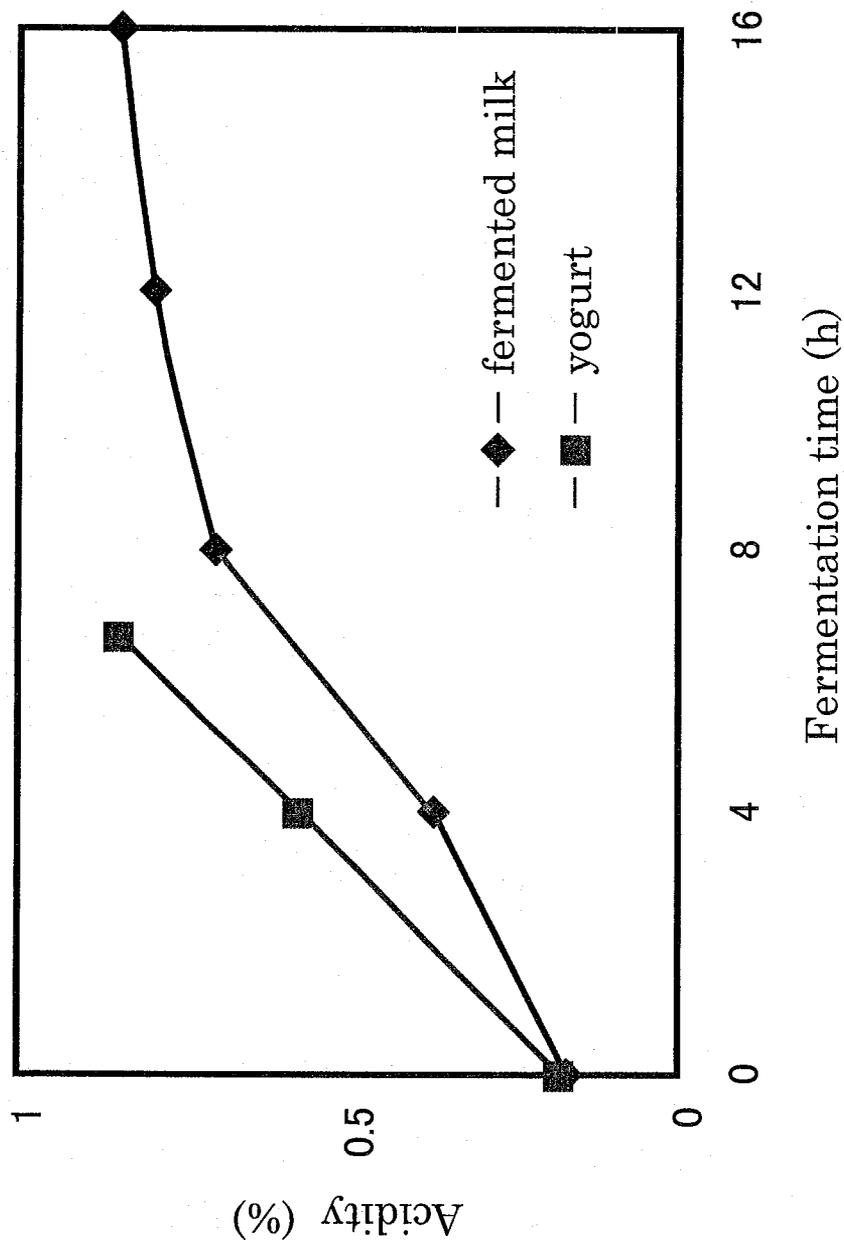


Fig.1-1 Changes in acidity (%) of fermented milk and yogurt
 Acidity was measured by titration with 0.1N NaOH and expressed by lactic acid equivalent (%).

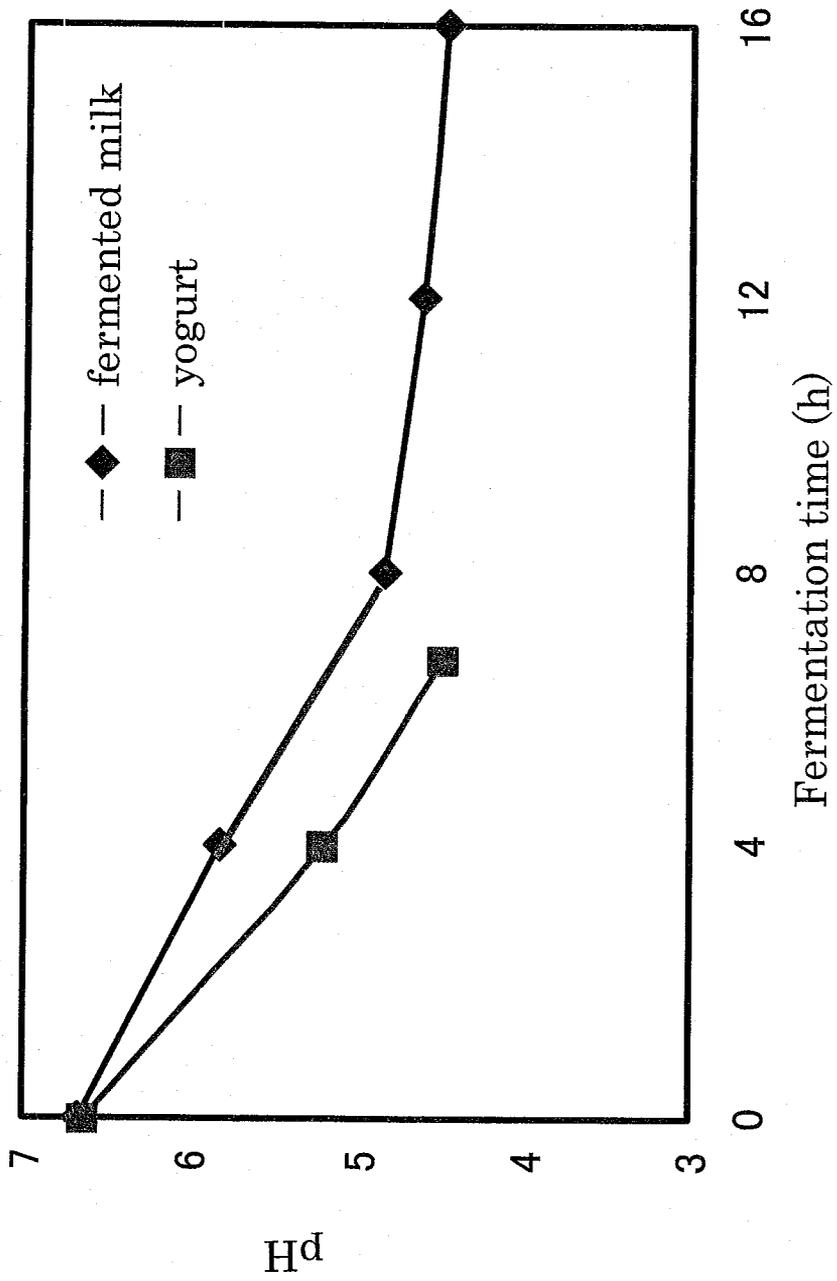


Fig.1-2 Changes in pH of fermented milk and yogurt

Table 1-1 Comparison of taste of fermented milk and yogurt

Taste	fermented milk	yogurt
Sweetness	12*	1
Sourness	2	11*
Bitterness	10	3
Saltiness	5	8
Umami	9	4

Sensory evaluation was performed by 13 trained panels. Numbers in table indicated the number of panels who judged as the sample possessing stronger taste .

*Significantly different ($p < 0.05$).

かであると評価した。

2つの発酵乳の pH に殆ど差異がないにもかかわらず、官能評価において酸味に違いがあると判断された理由として、次のようなことが考えられた。第一に、新規発酵乳とヨーグルトを構成する有機酸組成に違いが見られる可能性がある。第二に、酸味抑制作用を示すペプチドが、新規発酵乳に存在する可能性である。例えば、石井ら(51)は、牛肉を真空調理法で加熱したペプチド画分に、酸味を抑制するペプチドが含まれていることを報告している。また、Okumura ら(31)によって、豚肉の分子量 500-1000 のペプチド画分に酸味を抑制するペプチドが存在することが見出しされている。このようなペプチド類が、発酵中に発酵乳内で増加している可能性が考えられた。

そこで次章では、これらの呈味特性の違いに寄与する因子を糖、有機酸、遊離アミノ酸およびペプチドから探索した。

第2章 新規発酵乳の呈味成分と寄与成分の特定

緒言

第1章では、新規発酵乳の風味は、酸味が弱く、甘味をもち、まろやかであることが明らかとなった。ヨーグルト製造中の牛乳成分の変化は、乳酸菌による発酵によって特徴づけられており、この発酵過程で特有の風味をもつようになる。この発酵過程において変化する呈味成分として乳糖、有機酸、遊離アミノ酸およびペプチド類などが挙げられる。これらのうち、乳糖はラクテートデヒドロゲナーゼにより乳酸等に変換される。また、乳タンパク質はプロテアーゼやペプチダーゼなどによって分解される。ヨーグルトの場合、*S.thermophilus*が*L.bulgaricus*の成長促進因子であるギ酸およびピルビン酸を乳糖から生成し(52)、*L.bulgaricus*が*S.thermophilus*の成長促進因子であるいくつかの遊離アミノ酸を乳タンパク質から生成している(53, 54)。このように、2つの乳酸菌には共生関係が成り立っており(55)、呈味成分の変動に大きく寄与している。従って、新規発酵乳では、製造に使用する乳酸菌がヨーグルトとは異なっているため、呈味成分も異なっていることが予想される。

そこで、第2章では新規発酵乳とヨーグルトの発酵過程で生じた呈味成分の変化を調べた。有機酸は、HPLC に供して分析した。ある種の遊離アミノ酸やペプチドは酸味を抑制していることが知られている。新規発酵乳およびヨーグルトのアミノ酸分析を行い、遊離アミノ酸およびペプチドの変動を調べた。また、ペプチドについては、HPLCに供してそのペプチドパターンを調べた。糖については、最終製品の測定を行った。さらに、呈味成分の分析結果に基づいて再構成溶液を調製し、新規発酵乳とヨーグルトの呈味形成の違いに寄与する成分の特定を試みた。

1. 実験材料および方法

1) 供試材料

オロト酸、ピルビン酸、ギ酸、酢酸、尿酸、プロピオン酸、酪酸および馬尿酸は、和光純薬工業株式会社から購入した。クエン酸、乳酸、乳糖、ガラクトース、ショ糖、塩酸キニーネ、塩化ナトリウムは、関東化学株式会社から購入した。遊離アミノ酸は、協和発酵工業株式会社から購入した。

2) 有機酸の分析

有機酸は、Garciaら(20)の方法を用いて分析した。ヨーグルト 4.0 g に 0.01 N 硫酸を 25 ml 加え、5 °C で有機酸を一晩抽出した。不溶物を遠心分離 (10,000 × g, 10 分) により除去した後、得られた上清を HPLC (AMINEX HPX-87H ion-exchange column (300×7.8 mm), カラム温度 65 °C、流速 0.7 ml/分、移動相 0.0075 N 硫酸、検出 UV 210 nm) で分析した。各有機酸の同定は、以下のようにして行った。有機酸の抽出液に、試薬の乳酸、オロト酸、クエン酸および尿酸をそれぞれ加え HPLC 分析を行い、各試薬の添加によって、増加したものを、添加した有機酸であると同定した。

3) 糖の分析

乳糖は、J.K.International の F-キットを用いて分析した。乳糖を β-ガラクトシダーゼで β-D-ガラクトースと D-グルコースに分解し、分解した β-D-ガラクトースを NAD 存在下 β-ガラクトースデヒドロゲナーゼによって D-ガラクト-γ-ラクトンに酸化させた。形成された NADH を 340 nm で吸光度を測定した。

4) ペプチドおよび遊離アミノ酸の抽出

任意の時間発酵させた発酵乳に、タンパク質を除くため 4 倍量の 80 % エタノールを加え、5 °C で一晩抽出した。不溶物を遠心分離 (10,000 × g, 30 分) により除去し、可溶性成分を抽出した。得られた上清を抽出液とした。

5) アミノ酸分析

アミノ酸自動分析計(島津 LC-10A)を用いて、抽出液のアミノ酸量とペプチドのアミノ酸組成を調べた。なお、アミノ酸自動分析用の移動相 A、B および C 液は、株式会社島津製作所から購入し、アミノ酸混合標準溶液 (AN-II 型、B 型) は、和光純薬株式会社から購入した。抽出液を 6 N HCl 存在下で 110 °C、24 時間酸加水分解して得られた全アミノ酸量から遊離アミノ酸量を差し引いたものを、ペプチド態のアミノ酸量とした。

6) HPLC

発酵に伴って増減したペプチドを解析するため発酵乳を逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した。カラムは ODS カラム (Pegasil-3000DS, Senshu Scientific Co) を用い吸光度 $\lambda = 220 \text{ nm}$ で検出した。溶離には 0.1 % TFA 水溶液から、0.085 % TFA を含む 30 % アセトニトリル溶液への 100 分までの濃度勾配法 (0.63 %/min) を用いた。流速は、1.0 ml/min に設定した。

7) ペプチド溶液の調製

新規発酵乳中からペプチド溶液を調製した。まず、タンパク質を除くため 4 倍量の 80 % エタノールを加え、攪拌した。5 °C で一晩静置することにより、ペプチドを抽出した。不溶物を遠心分離 (10,000 × g, 30 分) により除去し、得られた上清を限外ろ過膜 (Amicon) を用いて分子量 1000 以上の画分を得た。これをペプチド溶液とした。

8) 再構成遊離アミノ酸溶液の調製

新規発酵乳とヨーグルトに含まれている遊離アミノ酸の分析値に基づいて、各遊離アミノ酸を蒸留水に溶解し、それぞれ 1 N NaOH と 1 N HCl で pH を 4.5 に調整した。

9) 官能評価

有機酸の酸味形成への寄与を調べるため、新規発酵乳とヨーグルトに含まれている有機酸量に基づいて、有機酸の再構成液を調製した。まず、0.71 % と 0.78 % 乳酸溶液を調製した。さらに 0.16 % と 0.20 % オロト酸溶液を調製した。最後に 0.2 % オロト

酸を含む 0.71 % 乳酸溶液と 0.16 % オロト酸を含む 0.78 % 乳酸溶液を調製した。これらの溶液の酸味の強さを 11 人のパネルによって 2 点識別法で評価した。全ての溶液は、1N NaOH と 1N HCl で pH を 4.5 に調整した。

乳糖の甘味形成への寄与を調べるため、新規発酵乳とヨーグルトに含まれている乳糖量に基づいて、乳糖再構成溶液を調製した。3.84 % と 3.34 % 乳糖溶液調製し、13 人のパネルによって 2 点識別法で評価した。

ペプチドの添加効果は、各基本味溶液に新規発酵乳とヨーグルトから調製されたペプチド溶液を添加し、2 点識別法で評価した。各基本味溶液として、甘味はスクロース 1.0 %、塩味は塩化ナトリウム 0.6 %、酸味は乳酸 0.15 %、うま味は MSG 0.03 % および苦味は塩酸キニーネ 0.0002 % 水溶液を用いた。全てのペプチド溶液は、1 N NaOH と 1 N HCl で pH 4.5 に調整した。

2. 結果および考察

1) 新規発酵乳の有機酸と糖の分析

新規発酵乳およびヨーグルトに含まれる有機酸を HPLC で分析した結果を Fig.2-1 に示した。

新規発酵乳では、乳酸、オロト酸、クエン酸および尿酸が検出された。新規発酵乳にはなくヨーグルトにのみ検出されるピークが認められた。標準試薬であるピルビン酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸および馬尿酸を同様に HPLC に供し、同定を試みた。未知のピークの溶出時間は、これらと一致せず、ヨーグルトのみで検出された有機酸ピークを同定することはできなかった。

新規発酵乳、ヨーグルトともに、発酵に伴い乳酸が増加した。これは酸度上昇の速さと一致した。一方、オロト酸は、ヨーグルトのみ減少した。これは、*L. bulgaricus* には、オロト酸デヒドロゲナーゼ活性があることが報告されている(56)ことからヨーグルトに使用した *L. bulgaricus* にも同様な活性があるものと考えられた。一方、*L. lactis* と *S. thermophilus* にはそのような活性がないものと考えられた。尿酸およびクエン酸については、新規発酵乳もヨーグルトも原料乳からはわずかに増加したもののその量はほとんどかわらなかった。

2 つの発酵乳に含まれる有機酸中で乳酸とオロト酸が主要な有機酸であった (Table 2-1)。新規発酵乳では、乳酸およびオロト酸はそれぞれ 710 mg/100 ml, 202 mg/100 ml であった。一方、ヨーグルトでは 780 mg/100 ml, 160 mg/100 ml であった。新規発酵乳に含まれている乳酸は、ヨーグルトのものとは比べて、有意 ($P < 0.05$) に多く、オロト酸は有意 ($P < 0.05$) に少ない量であった。また 2 つの発酵乳に含まれていたクエン酸および尿酸量には有意な違いは見られなかった。

2 つの酸味の違いについてさらに次のような要因も考えられた。ヨーグルトのみに検出されるピークが認められた (Fig.2-1)。この成分が、官能評価において、ヨーグルトの方が酸味が強いと評価された要因の1つである可能性が考えられた。今後、同定し、酸味特性を明らかにする必要がある。また、Tamime ら (57) は、ヨーグルト中の L(+) 乳酸と D(-) 乳酸の比率が、ヨーグルトの酸味やまろやかさに寄与していると報告している。ヨーグルト中の乳酸は、一般的に、L(+) 乳酸が 45~60 %, D(-) 型が 40~55 % の割合で含まれている。そのうち、L(+) 型の多いときにはまろやかで酸味が弱く、

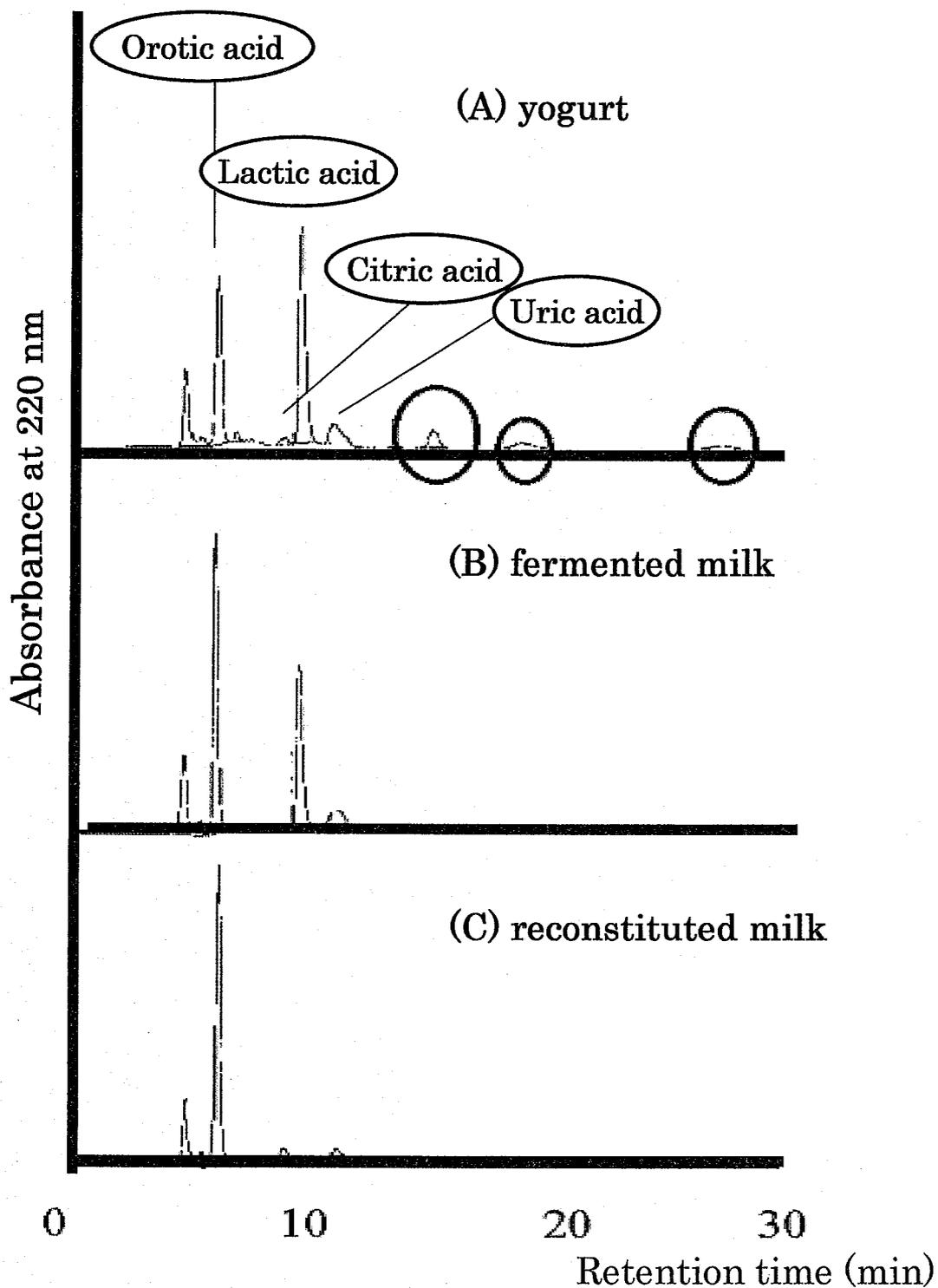


Fig.2-1 HPLC profiles of organic acids in yogurt (A), fermented milk (B) and reconstituted milk (C)
 Organic acids in yogurts were applied on an ion-exchange column at 65°C. Organic acids were detected at 210nm.

Table 2-1 Content of organic acids in fermented milk and yogurt

Organic acids (mg / 100g)					
	Lactic acid	Orotic acid	Uric acid	Citric acid	Total
fermented milk	710±0.029	202±8.2	4.03±0.150	1.97±0.081	918.0±8.46
yogurt	780±0.031	164±6.3	4.08±0.059	2.00±0.082	950.1±10.49

D(-)型の多い時には酸味が強くなる。L(+)乳酸は、*Streptococcus* 属(58)と *Lactococcus* 属が産生し(59)、D(-)乳酸は、*Lactobacillus*属が産生する(60, 61)。そのため、滴定酸度に差がないにもかかわらず、ヨーグルトより新規発酵乳の方がまろやかで酸味が弱いと評価された理由として、*Streptococcus* 属と *Lactococcus* 属で発酵を行った新規発酵乳では、L(+)乳酸の比率が高い可能性が考えられた。今後、L(+)とD(-)乳酸とを区別して解析する必要がある。

新規発酵乳およびヨーグルトに含まれる乳糖を測定した結果を Fig.2-2 に示した。乳糖の含有量は、新規発酵乳で 3.83 %、ヨーグルトで 3.34 %であった。乳糖はミルク中の甘味に寄与していることから 2 つのヨーグルトの甘味の違いに関係している可能性が考えられた。

2) 新規発酵乳の遊離アミノ酸およびペプチドの分析

新規発酵乳およびヨーグルトの発酵に伴う遊離アミノ酸およびペプチドの経時的変化を Fig.2-3 に示した。新規発酵乳では、遊離アミノ酸量は 0.6-0.8 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ で大きな変化は見られなかった。ペプチド量は発酵 4 時間後 25 %まで減少し、その後約 0.3 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ で一定値を示した。一方、ヨーグルトでは、遊離アミノ酸が原料乳の 3-4 倍まで増加した。ペプチドは発酵 4 時間後まで約 50 %まで減少し、その後増加した。

新規発酵乳とヨーグルトの遊離アミノ酸およびペプチドの経時的変化の違いは、それぞれの乳酸菌のもつプロテアーゼ活性の違いに起因するものと考えられた。ヨーグルトで発酵 4 時間後までペプチドが減少したのは、至適 pH5.5 の *L.bulugaricus* がカゼインを分解せず、もともと乳に含まれていたペプチドを *S.thermophilus* が分解したため、ペプチドが減少したものと考えられた。また、新規発酵乳には、*L.lactis* と *S.thermophilus* のプロテアーゼ活性が弱いため、ペプチドが増加しなかったと推察された。

これらのデータは、Igoshi ら(62)の報告からも支持された。Igoshi らは *L.bulugaricus* と *S.thermophilus* をそれぞれ単独で培養した結果、*L.bulugaricus* では多数のペプチドの生成が認められたが、一方、*S.thermophilus* では殆ど生成しなかったことを報告している。これは、相対的に *L.bulugaricus* のプロテアーゼ活性が

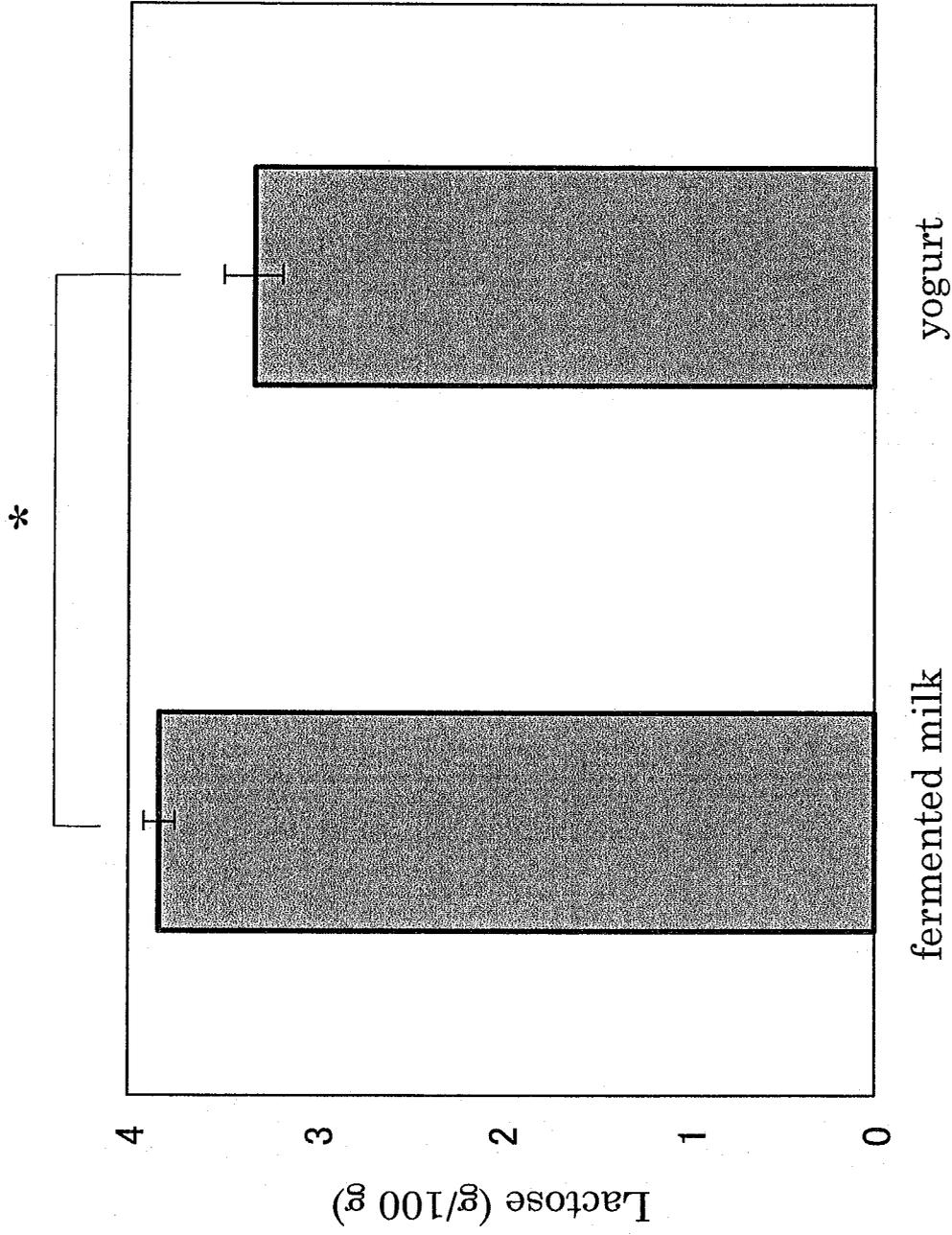
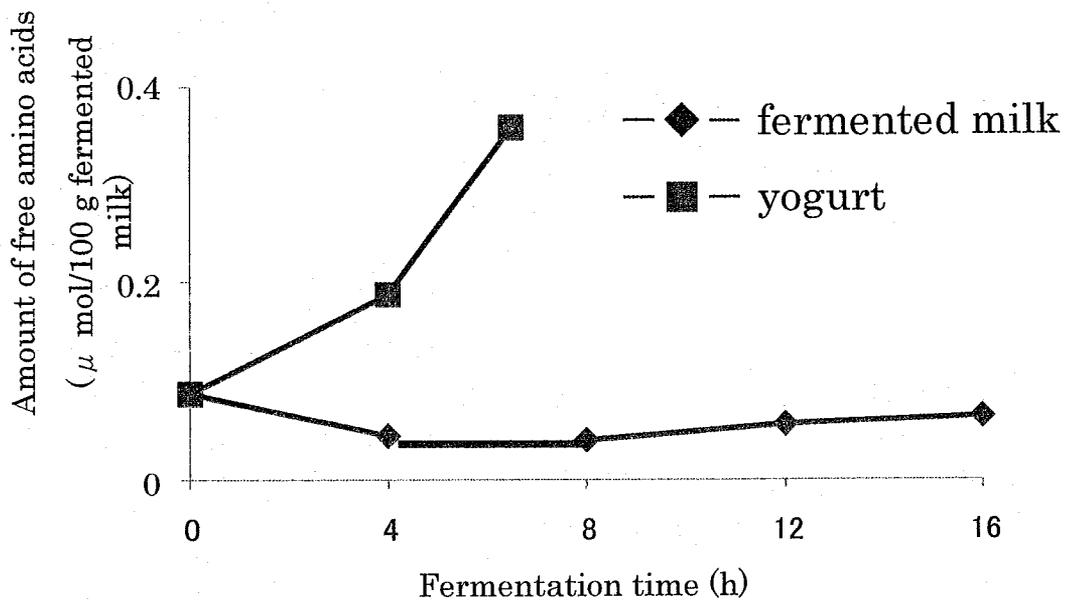


Fig. 2-2 Content of lactose in fermented milk and yogurt

*Significantly different ($p < 0.05$).

(A) free amino acids



(B) peptides

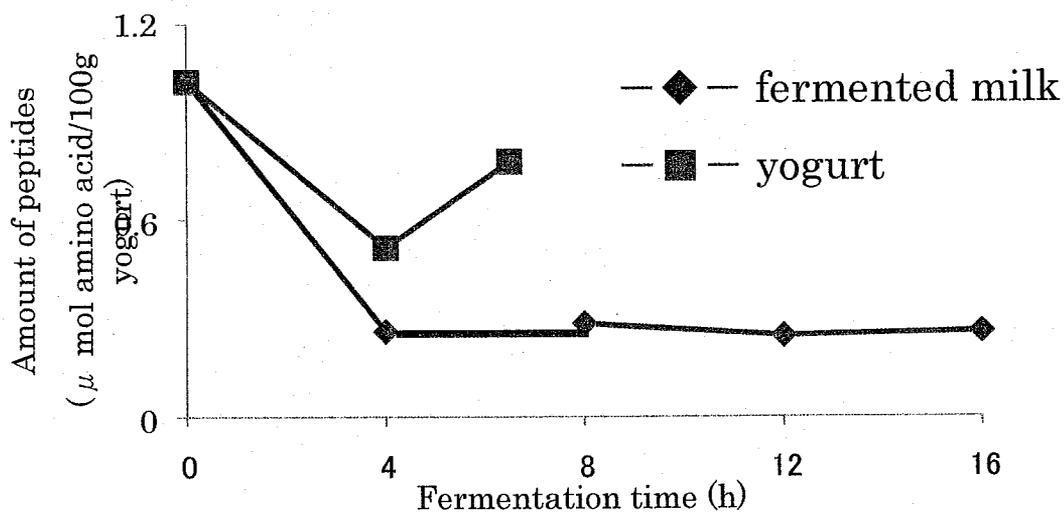


Fig.2-3 Change in the amino acids (A) and peptides (B) in fermented milk and yogurt.

高く、*S.thermophilus* のものは低いことを示しており、本研究で得られた結果とよく符合する。また、新規発酵乳において遊離アミノ酸量があまり変化しなかったのは、ペプチドを分解する速度と遊離アミノ酸を利用する速度とがほぼ等しく、結果的に遊離アミノ酸として蓄積しなかったためと考えられた。

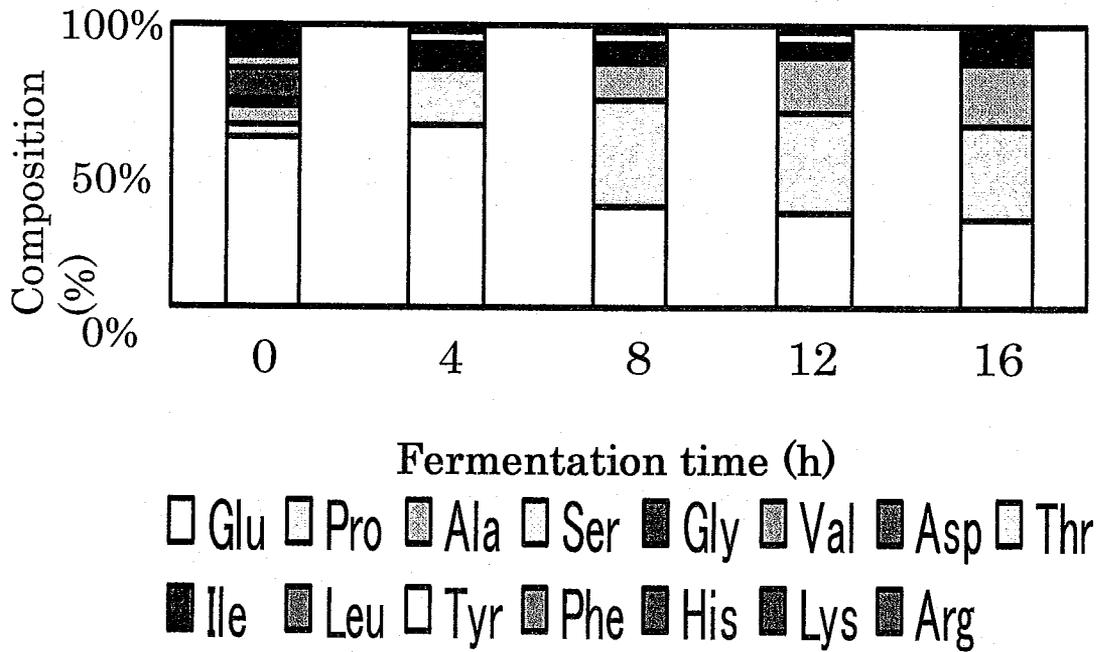
次に、新規発酵乳とヨーグルトに含まれる遊離アミノ酸組成の経時的変化を Fig.2-4 に示した。新規発酵乳では Glu, Pro, Ala が遊離アミノ酸全体の 80 %以上を占めていた。一方、ヨーグルトでは、発酵とともに上記 3 種類以外にも様々な遊離アミノ酸が生じていた。このような違いを生じた理由の一つとして、乳酸菌のもつペプチダーゼ活性の違いによるものと考えられた。新規発酵乳では、共培養している乳酸菌が非常によく似た性質の乳酸菌であるため、2 つの乳酸菌のもつアミノペプチダーゼの基質特異性が近く、切断部位も似ているため結果的に Glu, Ala, Pro が新規発酵乳中に残ったものと考えられた。一方、ヨーグルトで用いた *L.bulugarius* と *S.thermophilus* の場合は、両者に含まれるペプチダーゼの性質が異なるため、ヨーグルトにはさまざまな遊離アミノ酸が含まれているものと考えられた。また、増殖に必要な遊離アミノ酸の違いも理由の一つとして考えられた。事実、*L.lactis* と *S.thermophilus* は Ala を要求しないことが報告されている (63, 64)。

発酵乳の呈味性という観点で考えた場合、Glu,Ala,Pro は甘味およびうま味といった好ましい呈味を呈する(表1)。従って、これらが新規発酵乳の甘味やまろやかさに寄与していることが示唆された。

新規発酵乳およびヨーグルトの発酵時間の違いについて遊離アミノ酸の生成からも考えられた。ヨーグルトに使われた *L.bulgaricus* と *S.thermophilus* には共生関係があることが知られている。His, Leu と Ile は、*S.thermophilus* の成長促進因子として報告されており(52)、ヨーグルトでは、4時間から増加していた。このことからヨーグルトに使われた 2 つの乳酸菌には共生関係があり、そのため発酵が速く進んだものと考えられた。一方、新規発酵乳では、Val, Leu, Ile と His が 2 つの乳酸菌の成長促進因子であるが、これらの遊離アミノ酸は、増加していなかった。したがって、共生関係がないものと予想される。よって新規発酵乳の発酵時間が長くなったのは共生関係に無いことが一因と考えられた。

新規発酵乳とヨーグルトに含まれるペプチドの構成アミノ酸の変化を Fig.2-5 に示し

(A) fermented milk



(B) yogurt

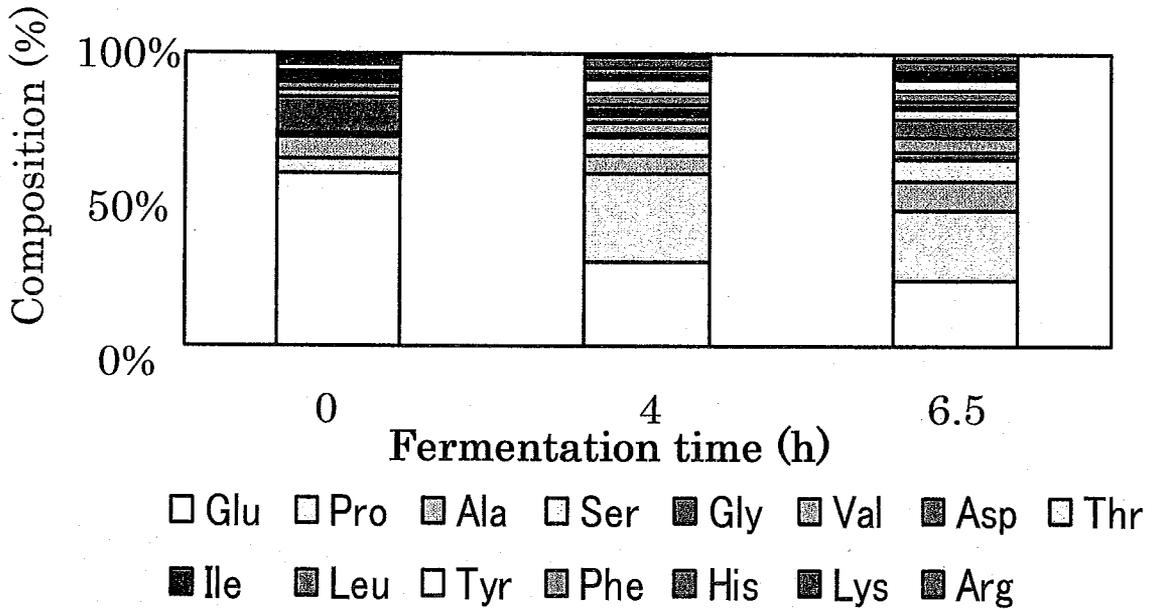
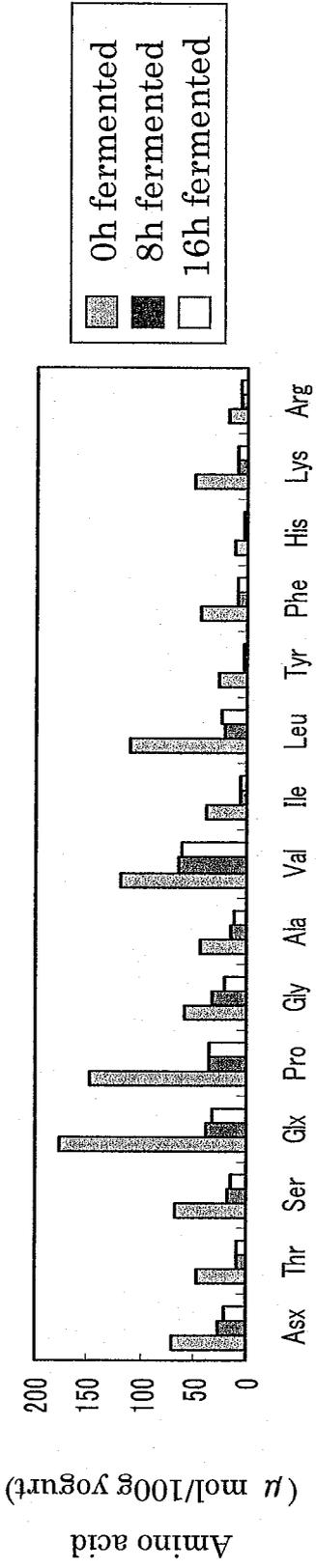


Fig.2-4 Composition of free amino acids in fermented milk (A) and yogurt(B).

(A) fermented milk



(B) yogurt

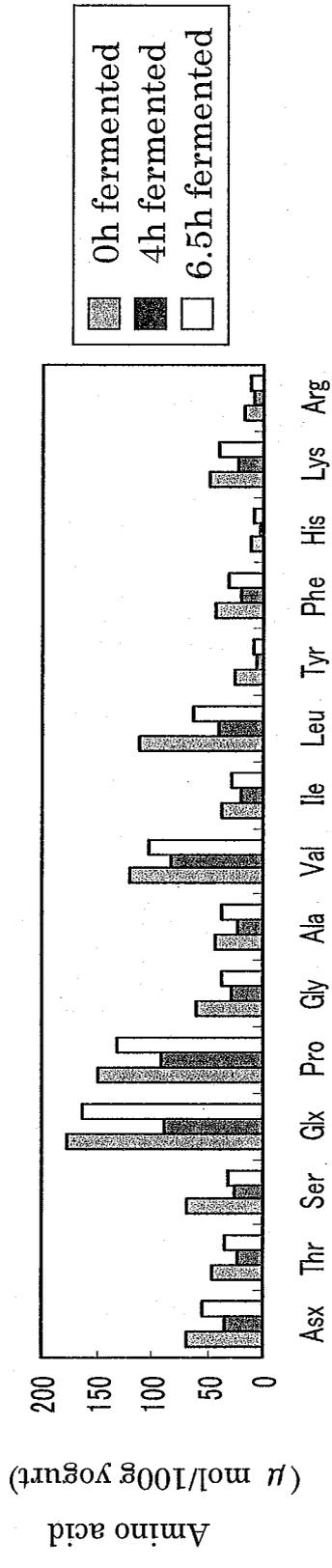


Fig.2-5 Changes in the constituent of amino acid of peptides in fermented milk(A) and yogurt(B)

た。ヨーグルトでは、発酵 4 時間までペプチドが減少し、その後増加していた。一方、新規発酵乳では発酵 8 時間後まで減少した後、殆ど変化しなかった。これは、遊離アミノ酸の経時変化と同様に、用いた乳酸菌のプロテアーゼ活性の違いによるものと考えられた。

新規発酵乳とヨーグルトに含まれるペプチドの種類を比較するために、HPLC に供して分析した結果を Fig.2-6 に示した。新規発酵乳では溶出時間約 40~50 分のピーク群が相対的に多いのに対し、ヨーグルトのものでは溶出時間約 60 分~70 分のピーク群が多く見られた。したがって、2 つの発酵乳に含まれているペプチドは、異なっていることが示唆された。

3) 新規発酵乳の呈味寄与成分の特定

前項ならびに前々項において、2 種類の発酵乳に含まれる呈味成分の違いを明らかにした。そこで、本項では、これらの分析値に基づいて、再構成溶液を調製し、新規発酵乳の呈味形成に寄与する成分を同定し、ヨーグルトの呈味との差異に寄与する成分を特定することとした。

まず、新規発酵乳とヨーグルトに含まれている主要な有機酸の酸味の強さへの寄与について官能検査にて評価した(Fig. 2-7)。0.71 %乳酸(pH4.5)の酸味は 0.78 %乳酸(pH4.5)より有意($P < 0.05$)に酸味が弱いものであった。そして、0.2 %オロト酸を含む 0.71 %乳酸溶液(pH4.5)の酸味は、0.16 %オロト酸を含む 0.78 %乳酸溶液(pH4.5)より有意($P < 0.05$)に酸味が弱いものであった。これらの結果から 2 つのヨーグルトの酸味の要因は乳酸量によるところが大きいことが判明した。そして、オロト酸、は乳酸ほど酸味に影響していないことが明らかとなった。

新規発酵乳とヨーグルトに含まれている乳糖の甘味の強さを官能検査にて評価した(date not shown)。3.84 %と 3.34 %乳糖溶液の甘味に、有意な差は認められなかった。したがって、3.4 %程度の乳糖溶液 0.5 %の差では分別閾に達していないことが明らかとなった。

新規発酵乳とヨーグルトに含まれている遊離アミノ酸含量を含む、それぞれの混合アミノ酸溶液を調製し、その呈味を官能検査にて評価した(date not shown)。その結果、2 つの再構成溶液は十分な呈味を呈しなかった。その要因として、含まれていた

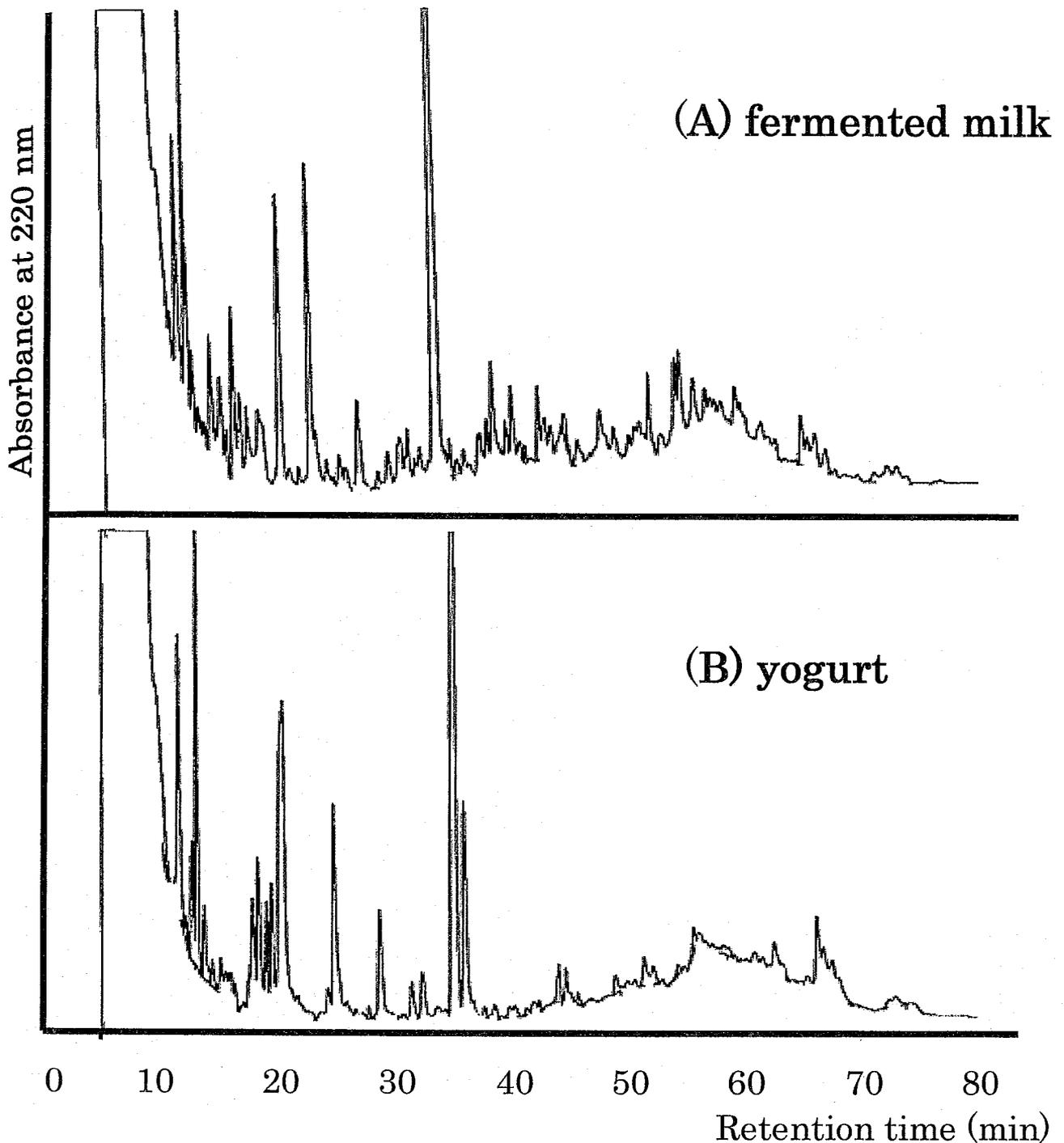


Fig.2-6 HPLC profiles of peptides in fermented milk (A) and yogurt (B)

Peptides in fermented milk and yogurt were applied on an ODS column, and eluted by a linear gradient of acetonitrile at 0.5%/min. at room temperature. Peptides were detected at 220 nm.

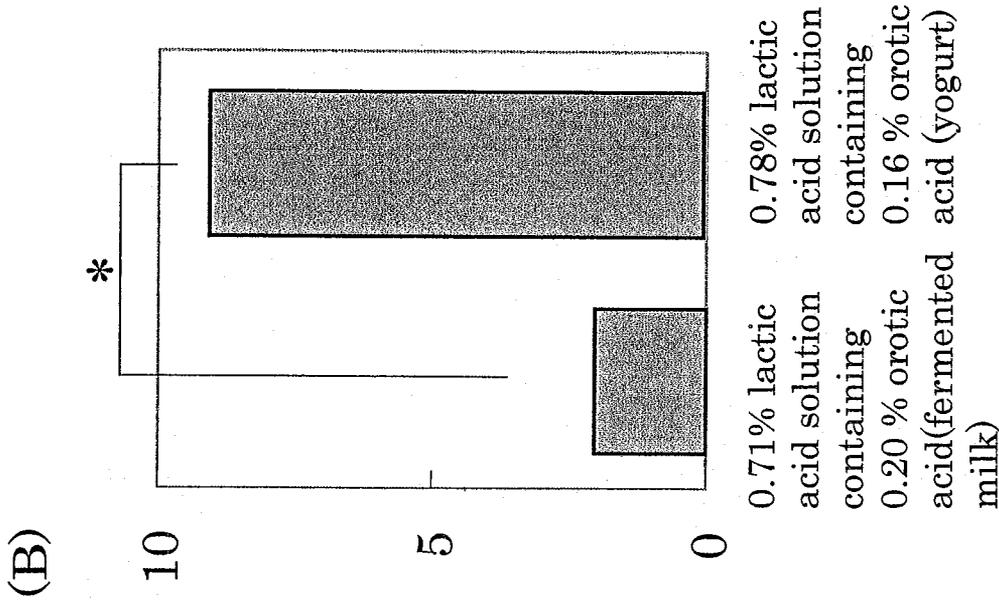
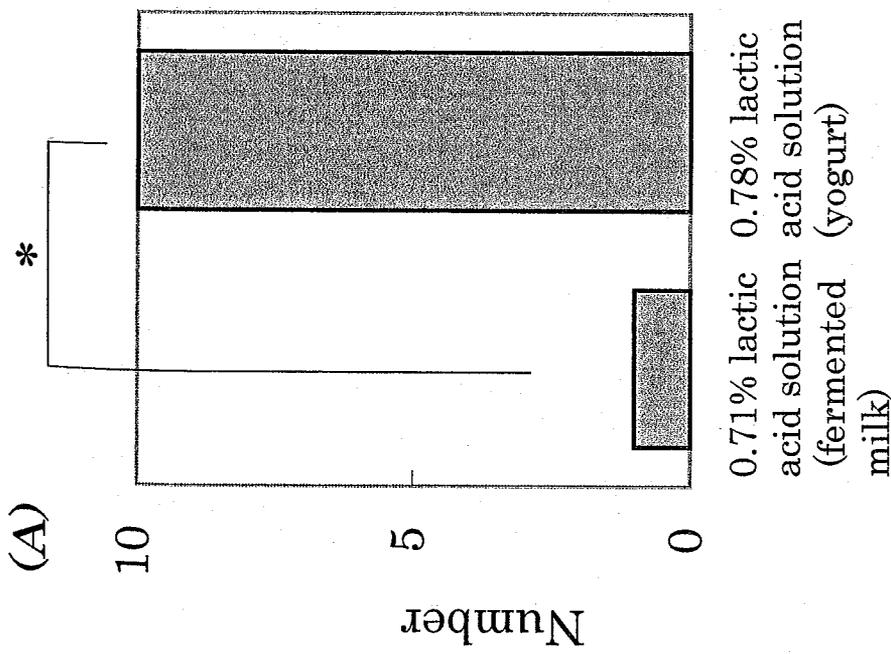


Fig 2-7 Comparison of sourness intensity of the major organic acids solution reconstituted on the basis of the analysis of fermented milk and yogurt

The 0.71 % (fermented milk) and 0.78 % (yogurt) lactic acid solutions (pH 4.6) were prepared and evaluated (A). The 0.71 % lactic acid solution (pH 4.6) containing 0.20 % orotic acid (fermented milk) and 0.78 % lactic acid solution (pH 4.6) containing 0.16 % orotic acid (yogurt) were also prepared and evaluated (B). Sensory evaluation was performed by 11 trained panels. Number in figures indicated the number of panels who judged as the sample possessing stronger sourness. *Significantly different ($p < 0.05$).

遊離アミノ酸の濃度が閾値に達していなかったことが考えられた(Table 2-2)。主要な遊離アミノ酸である Glu, Pro, Ala の閾値はそれぞれ 5 mg/100 g, 5 mg/100 g, 300 mg/100 g で、新規発酵乳は、それぞれ 1.93 mg/100 g, 1.37 mg/100 g, 1.07 mg/100 g、ヨーグルトでは、それぞれ 3.23 mg/100 g, 5.07 mg/100 g, 1.99 mg/100 g であった。これらの値は、閾値を下回っており、そのため十分な呈味を呈さなかった。

新規発酵乳とヨーグルトに含まれているペプチド画分の呈味および基本5味への添加効果を調べた。その結果、酸味、甘味、塩味、苦味とうま味全ての溶液対してその添加効果は、有意な差は認められなかった(date not shown)。

新規発酵乳とヨーグルトの呈味特性と呈味成分について比較した。pH、酸度および有機酸総量が、ほぼ同じにも関わらず新規発酵乳は、ヨーグルトより有意に酸味が強いことが明らかとなった。次の4点から酸味の強さは乳酸量によって決まると結論した。

- ①新規発酵乳は、ヨーグルトより有意に乳酸量が少ないこと
- ②オロト酸は、2つの発酵乳の酸味に影響を与えていないこと
- ③クエン酸、尿酸、乳糖は、呈味の違いを示すほどの差はないこと
- ④遊離アミノ酸およびペプチドは、呈味を示すほど十分量ないこと

Yuguchi ら(22)は、ヨーグルト中の乳酸は、呈味に重要な役割を果たしているとして報告しており、本研究の結果と一致している。したがって、ヨーグルトの酸味は、pH や酸度だけで決まるのではなく、乳酸量も大きく担っていることが示唆された。

新規発酵乳は、ヨーグルトより乳酸量は少なく、その少ない乳酸が、新規発酵乳の酸味を弱く、甘味を強く感じさせたものと考えられた。そして、そのことが新規発酵乳の方が、ヨーグルトよりまろやかに感じさせたものと推察された。Yuguchi ら(22)は、発酵乳中の低い酸度は、相対的に強い甘味を示すと報告している。また、酸度が上がるにつれて酸味、渋みが上昇し、pH および甘味が減少する。この報告から酸度は、呈味特性を決めるための重要な要素であることが示された。本研究では酸度がほぼ同じにもかかわらず、新規発酵乳の方がヨーグルトより酸味が弱かった。それゆえに、発酵乳の呈味形成において、乳酸量が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

Table 2-2 Content of free amino acids in fermented milk and yogurt

(mg/100 g)

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val
fermented milk	0.25±0.02	0.15±0.05	0.24±0.11	1.93±0.40	1.37±0.11	0.13±0.05	1.07±0.06	0.05±0.03
yogurt	1.26±0.12	0.30±0.02	1.31±0.11	3.24±0.35	5.07±0.32	0.55±0.16	1.99±0.22	0.41±0.10
Threshold value	3	260	150	5	300	110	60	150

	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
Cys	ND	0.01±0.01	0.01±0.01	0.66±0.08	0.11±0.00	0.07±0.01	0.12±0.01	0.38±0.06
ND	ND	0.22±0.05	0.66±0.13	0.61±0.02	0.35±0.00	1.19±0.07	0.35±0.01	0.77±0.03
/	30	90	380	/	150	20	50	10

ND: Not Detectable

第3章 新規発酵乳のストレス性胃潰瘍抑制作用

緒言

第1章並びに第2章において、おいしさをもたらす新規発酵乳の呈味形成に関する解析を進め、新規発酵乳が酸味が弱く、まろやかな味を有し、現代日本人の嗜好性に合う製品であることを明らかにした。また、その理由として、新しい乳酸菌の組み合わせ(*L. lactis*と*S. thermophilus*の組み合わせ)で、乳酸の生成量が従来のヨーグルトより少なかったことによると結論した。このように、新規発酵乳のおいしさに関する機能を明らかにできたが、今後の高齢化社会に向けて、おいしさだけでなく保健機能を有する食品の開発が求められている。新規発酵乳も従来のヨーグルトと同様、生体調節機能の存在が期待できる。しかし、これまで生体調節機能に関する知見は全く無いのが現状である。そこで、現代人の生活習慣の中で、問題となっているストレスに着目することとした。

現在の日本では、ITによる情報処理の急速な進歩や学校、家庭、社会など、基本的な人間関係の変化によって、かつてないほどのストレスにさらされている。また、喫煙、過渡の飲酒などの食生活によってもストレスにさらされている。このストレスの激増に耐えられなくなり、心と体の病を訴える人が増えている。このストレスは、生活習慣病の原因の一つと考えられており、各種疾患を引き起こしていることが明らかにされてきている。例えば、癌や動脈硬化などを含めた心臓疾患、アルツハイマー病など酸化ストレスが関与していることが報告されている(65-69)。また、精神的ストレスによって胃は顕著に影響を受け、胃潰瘍などの消化管障害を引き起こす。そして、この胃潰瘍には活性酸素が深く関与していることが報告されている(70)。

そこで、第3章では新規発酵乳の水浸拘束ストレスで生じる胃潰瘍抑制効果について検討した。

1. 実験材料および方法

1) 供試材料

ジエチルエーテル、酢酸、ブタノールおよびピリジンは、関東化学株式会社から購入した。Sodium dodecyl sulfate(SDS)は、和光純薬工業株式会社から購入した。Thiobarbituric acid(TBA)試薬は、ナカライテスク化学薬品株式会社から購入した。

2) 実験動物および飼育法

7 週齢の Wister 系雄ラットを株式会社広島実験動物より購入した。1 週間の予備飼育後の体重に基づき、各群間の標準偏差の値が最小となるように1群 10 匹の 5 群に分けて実験に供した。温度 23 ± 2 °C、湿度 55 ± 2 %、明暗サイクル 12 時間(明:7-19 時、暗:19-7 時)の環境条件下、ステンレス鋼製のケージで飼育した。飼料には市販の固形飼料 MF(オリエンタル酵母株式会社)を与え、水は自由摂取とした。

3) 胃潰瘍形成方法

ストレス性胃潰瘍の形成は、Matsumoto ら(70)の方法を改良して行った。ラットはステンレス製のケージに入れ、水温を 23 °C に保った水槽に浸けた。水の深さは、ラットがケージに上った状態で顔が水面に出る深さにした。水槽への浸漬は、3 時間の水浸拘束とした。

4) 新規発酵乳等の試料の投与方法

試験開始の 24 時間前から絶食とし、飲用水のみを与えた。水浸拘束実験前にラット体重 1 kg あたり 100 mg の試料(新規発酵乳、原料乳、 α -ラクトアルブミン)を経口投与した。また、コントロールには生理食塩水を同様の条件で投与した。

5) 胃潰瘍評価法

①評価試料の調製方法

3 時間の水浸拘束の後、直ちにエーテル麻酔下にて開腹し、胃の摘出を行った。取り出した胃を生理食塩水で軽く洗浄した後、胃底面側の弓状に添い、ハサミを入れ

内面を露出させた。胃内面の出血斑長を測定し、Ulcer Index を求めた。また、潰瘍形成度を目視観察で評価した。さらに、カタラーゼ活性並びに TBARS の測定用の試料は、以下のように測定した。摘出された胃の表面を冷水で洗い、50 mM トリス緩衝液(pH7.4)を加えホモジナイズ(16,000 rpm, 2分)した。その後遠心分離(2,000 rpm, 30分)し、得られた上清を試料とした。

②Ulcer Index による潰瘍形成度の評価(70)

ラット解剖後の胃粘膜表面を生理食塩水で軽く洗浄し、胃粘膜表面にできた血痕を測り、その長さの総和(mm)で示した。

③目視観察による潰瘍形成度の評価

無作為に選んだパネルには実験内容を知らせず、予め出血段階を 4 段階(−;出血なし、+;胃壁面積に対し 30%以下の出血、++;胃壁面積に対し 30~50%の出血、+++;胃壁面積に対し 50%以上の出血)に分類したパネル(Fig.3-1)を渡し、サンプルと見比べた上で 4 段階に分類した。各段階を 0(−)、1(+)、2(++), 3(+++)とし、各ラットの出血段階を点数化した。

④カタラーゼ活性の測定

カタラーゼ活性の測定は、Arafa ら(71)の方法によって測定した。0.1 M リン酸緩衝液(pH7.4, 19 mM 過酸化水素水を含む)を 24 °C±1.0 でプレインキュベートし、抽出液を加え 5 分間インキュベートさせた。反応前後の溶液の 240 nm での吸光度を測定した。カタラーゼ活性は、タンパク質 1 mg 当たり 1 分間での過酸化水素消費量 mM で表示した。

⑤TBA 法(72)

抽出液 0.1 ml に 8.1 %SDS 溶液 0.2 ml、20 %酢酸 1.5 ml、0.8 %TBA 液 1.5 ml を加え蒸留水で 4 ml に定容した。この溶液を沸騰湯浴中で 60 分間反応させ、室温まで冷却した。さらにこの溶液に蒸留水 1 ml、n-ブタノールピリジン(15:1)5 ml を加え、遠心分離(4,000 rpm, 10 分)した。上清を 532 nm の吸光度で測定した。

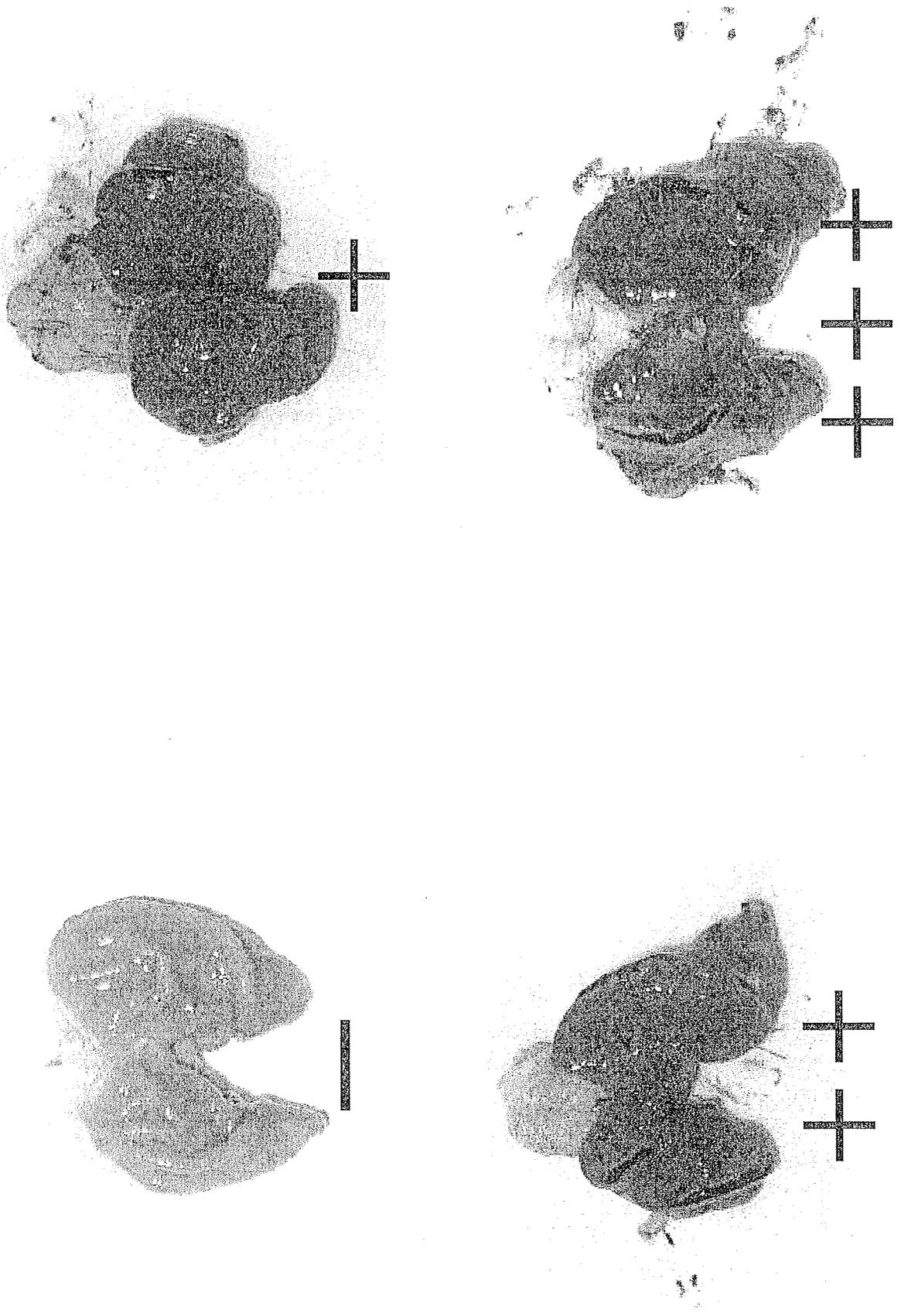


Fig.3-1 Standards for evaluation of gastric mucosa injury

6) 統計処理

胃潰瘍形成評価および出血斑長測定で得られた結果は Student t-test に基づき有意差検定を行った。

2. 結果

1) Ulcer Index への影響

Fig.3-2 に、水浸拘束ストレスを与えた時の Ulcer Index の測定結果を示した。Ulcer Index は、ラット解剖後の胃粘膜表面の血痕の長さの総和 (mm) を示した。Ulcer Index は個体差が大きく、測定値にバラツキがみられた。そのため Fig.3-2 は平均値のみで示した。

非ストレス群の胃壁には、血痕は全く認められなかった。ストレスを与えて、試料を投与していないブランク群では、最も高い Ulcer Index 値を示した。3 時間の水浸拘束ストレスによって、胃粘膜障害が生じることを確認した。新規発酵乳と原料乳を投与した群の Ulcer Index 値は、ブランク群と比べ、約 20 % 低い値を示し、新規発酵乳は、ストレス性胃潰瘍の抑制に効果があることが明らかとなった。これまでの報告において、 α -ラクトアルブミンはストレス性胃潰瘍を抑制すると報告されている(70)が、本研究においては、ブランク群と同様の高い値を示した。これは α -ラクトアルブミンの調製方法の違いによると推察された。

2) 目視観察による潰瘍形成度への影響

Fig.3-3 に、水浸拘束ストレスを与えた時の胃潰瘍の様子をパネルに 4 段階で判定させ、点数化した。ブランク群では、 2.46 ± 0.65 と高い値を示したが、新規発酵乳および原料乳投与群では、 1.62 ± 0.9 , 0.65 ± 1.62 を示し、有意に低いことが明らかとなった。

3) カタラーゼ活性への影響

Fig.3-4 に、水浸拘束ストレスを与えた時のカタラーゼ活性の結果を示した。新規発酵乳と原料乳群は、非ストレス群とブランク群よりやや低いものの有意な差は認められなかった。カタラーゼは活性酸素である過酸化水素を、水と酸素に分解する酵素である。したがって、カタラーゼ活性が高いことはそれだけ生体内の酸化ストレスとなる活性酸素を多く取り除くことができることになる。本研究では、新規発酵乳の添加によりカタラーゼ活性の上昇が認められなかったことから、カタラーゼ活性の活性化による胃潰瘍抑制でないことが判明した。

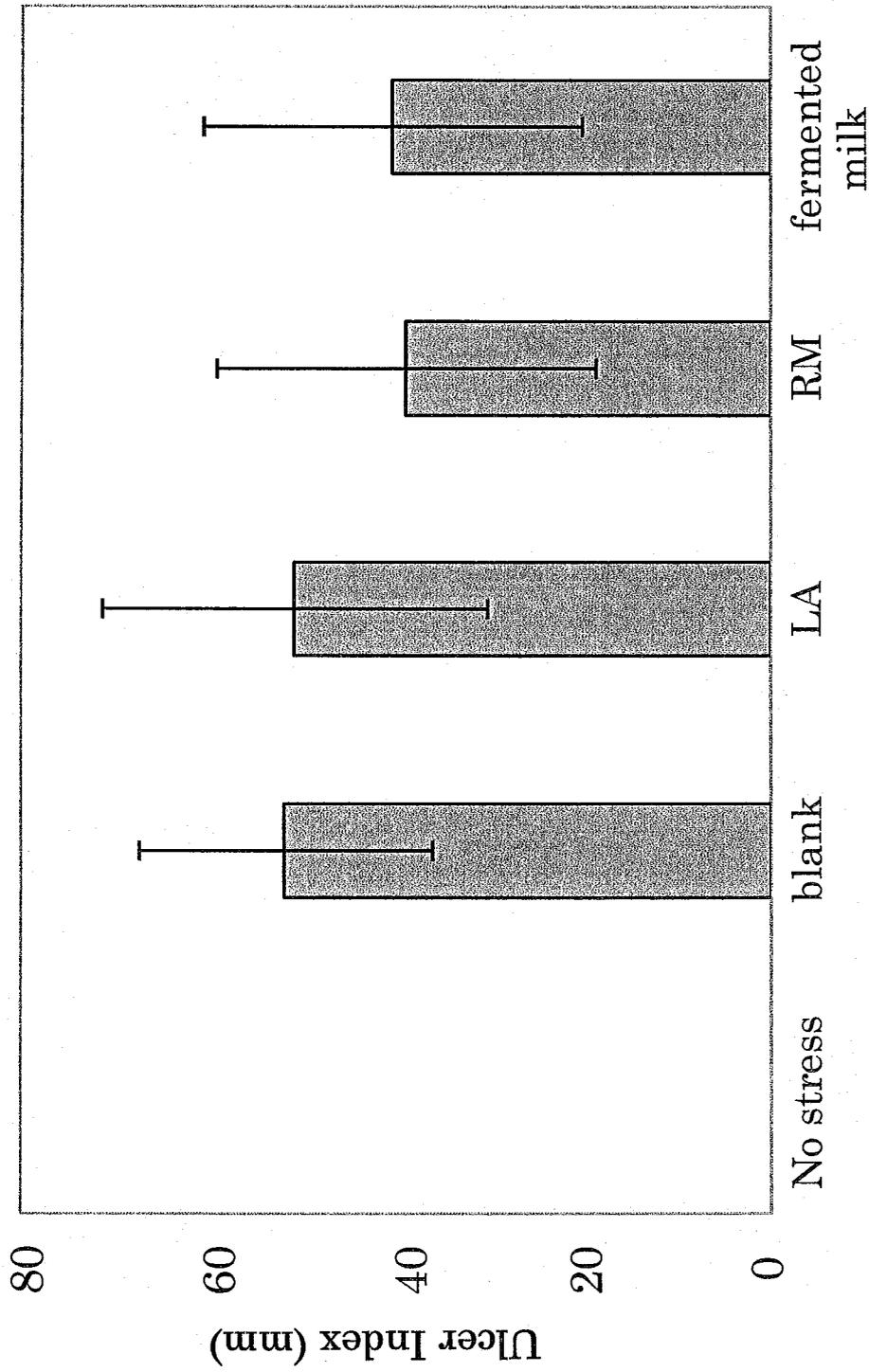


Fig. 3-2 Effect of fermented milk on Ulcer Index in the gastric mucosa of rats immersed in water for 3.0 h.

Rats were immersed in water after administration of α -lactalbumin (LA), reconstituted milk (RM) or fermented milk (200 mg/kg). Ulcer Indexes were measured after immersion. Results are mean \pm SEM.

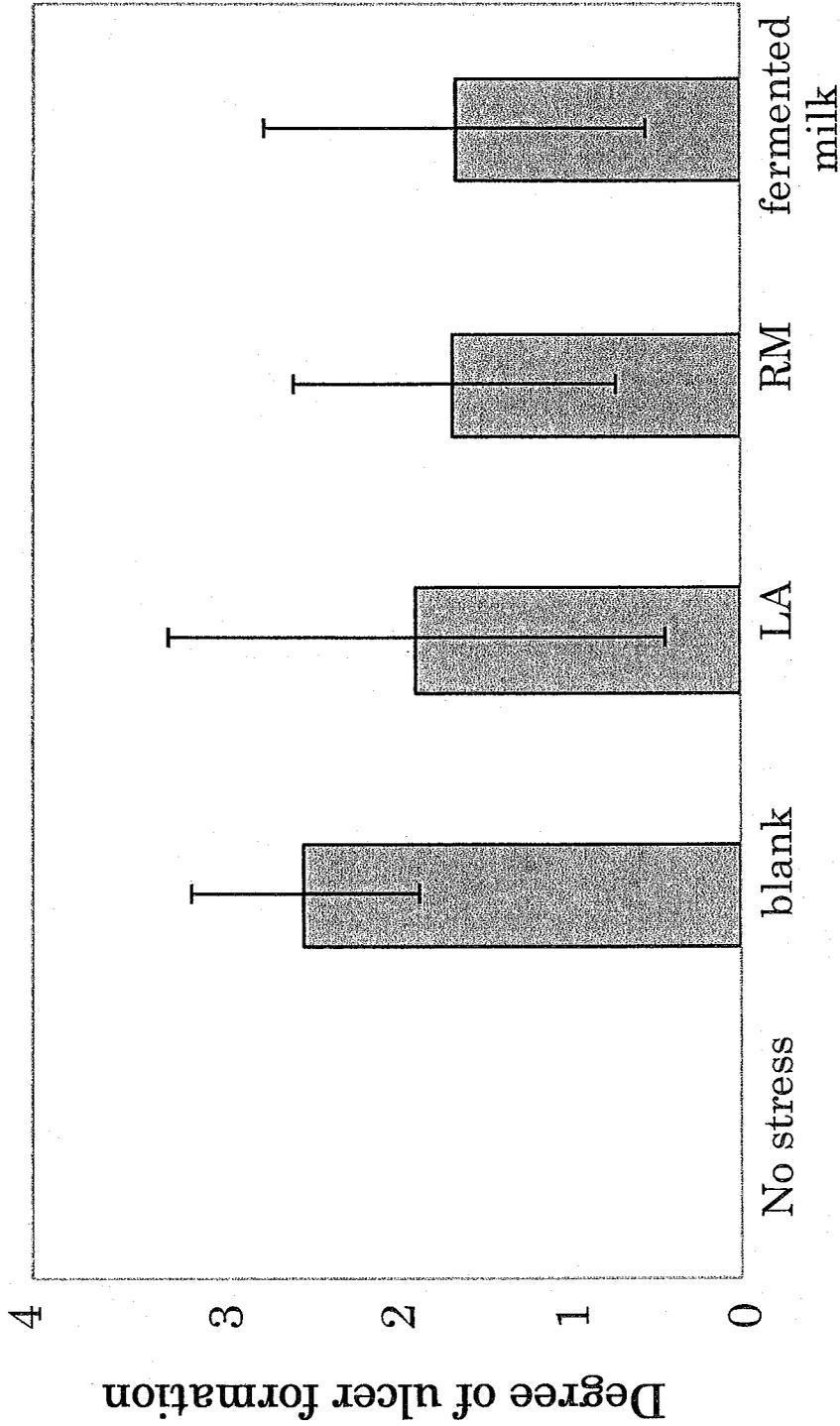


Fig. 3-3 Effect of fermented milk on ulcer formation in the gastric mucosa of rats immersed in water for 3.0 h.

Rats were immersed in water after administration of α -lactalbumin (LA), reconstituted milk (RM) or fermented milk (200 mg/kg). Degree of ulcer formation were measured after immersion. Results are mean \pm SEM.

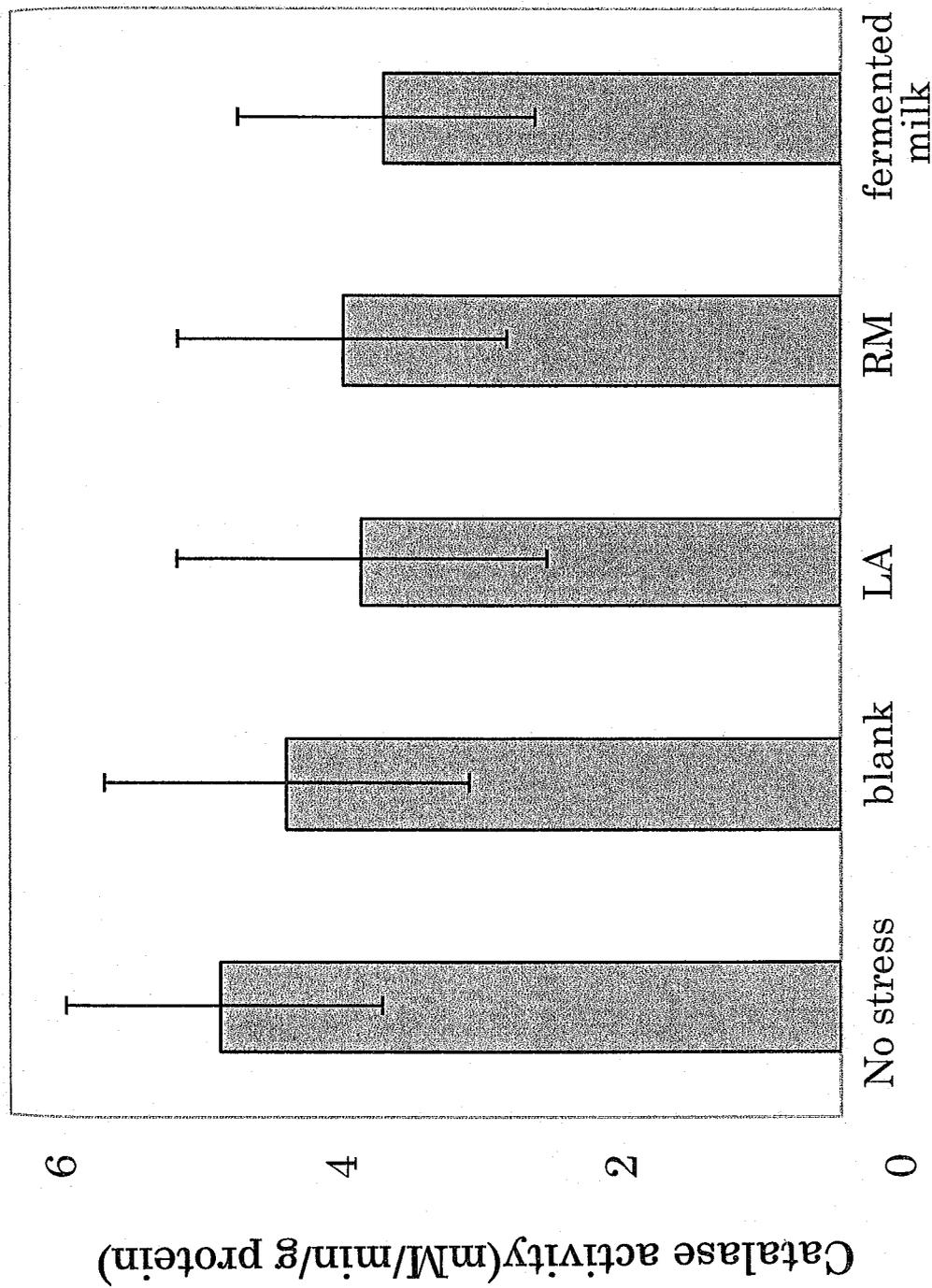


Fig. 3-4 Effect of fermented milk on catalase activity in the gastric mucosa of rats immersed in water for 3.0 h. Rats were immersed in water after administration of α -lactalbumin (LA), reconstituted milk (RM) or fermented milk (200 mg/kg). Activity was measured after immersion. Results are mean \pm SEM.

4) TBARS への影響

Fig.3-5 に、水浸拘束ストレスを与えた時の TBARS の結果を示した。TBARS は脂質の酸化代謝物に反応して生じたもので脂質酸化の指標となる。生体内にはリン脂質があり、酸化ストレスによってカルボニル化合物が生じ、TBA 試薬と反応して TBARS が生成される。非ストレス群の胃から調製した試料の TBARS は、他のすべての群と比べ、有意に低い値を示し、非ストレス群ラットが、酸化ストレスをほとんど受けていないことが明らかとなった。また、有意な差は認められなかったが、新規発酵乳および原料乳投与群の TBARS は、ブランク群よりも約 40 %低い値を示し、酸化を受けている程度が緩和されることが示唆された。以上の結果から、新規発酵乳と原料乳の投与は、脂質酸化の抑制により、ストレス性胃潰瘍を抑制していると推察された。

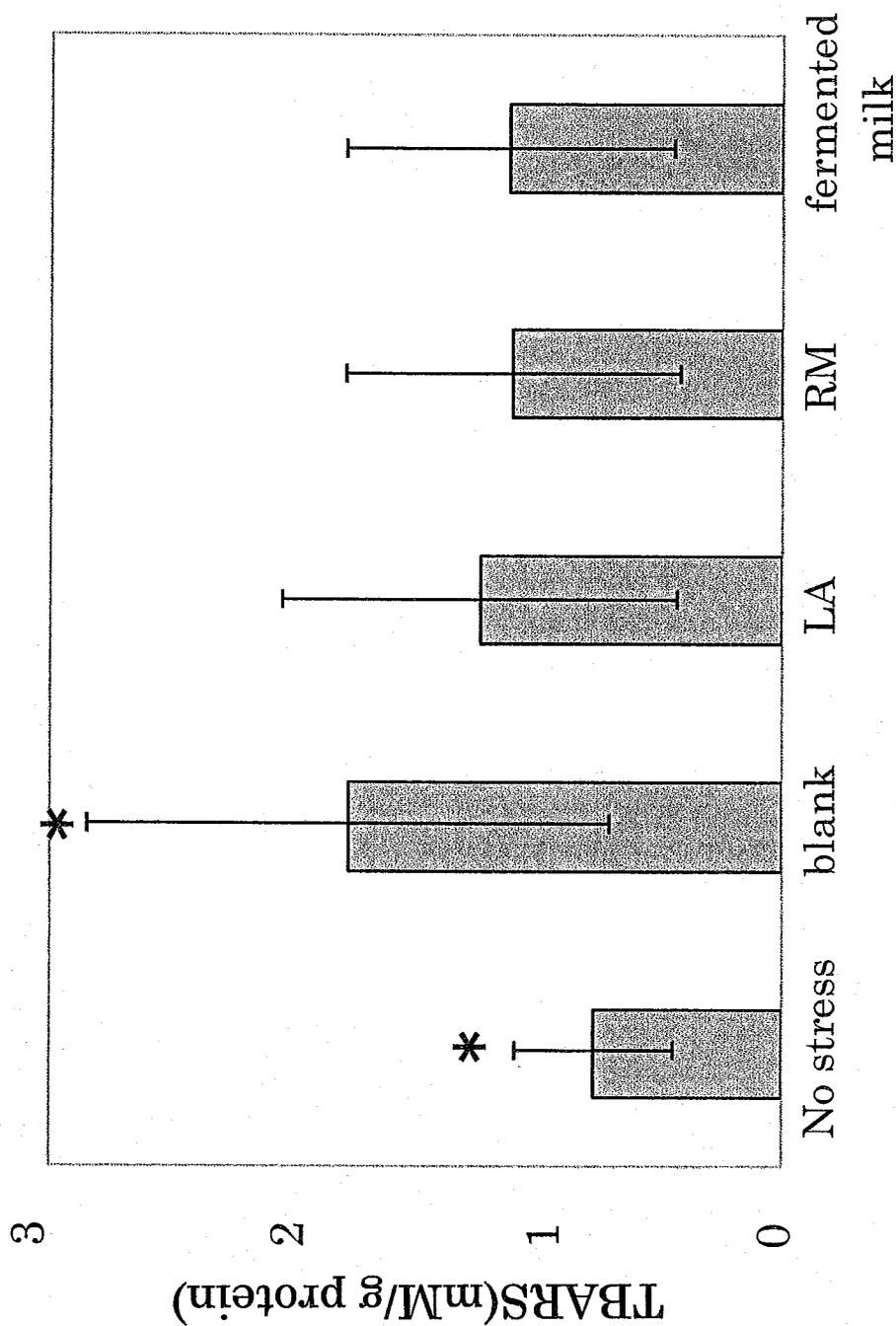


Fig. 3-5 Effect of fermented milk on amount of TBARS in the gastric mucosa of rats immersed in water for 3.0 h.

Rats were immersed in water after administration of α -lactalbumin (LA), reconstituted milk (RM) or fermented milk (200 mg/kg). TBARS was measured after immersion. Results are mean \pm SEM.

3. 考察

ストレスによって引き起こされる消化管粘膜障害 (Fig.3-6) は、主に、i) 「好中球由来フリーラジカルによる潰瘍」、ii) 「胃酸上昇による潰瘍」および iii) 「ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系由来のフリーラジカルによる潰瘍」の 3 種類の経路で発症すると考えられている (73)。

i) ストレスが好中球を活性化させるメカニズムについては、まだ明らかにされていないが、好中球の活性化から消化器疾患発症までの機序はよく調べられている。白血球を活性化し (74, 75)、炎症性サイトカインの一つである IL-8 の産生を促す。好中球の細胞膜にある NADH オキシダーゼが活性化されると、NADPH からの電子が細胞内外の酸素と反応してスーパーオキシドアニオン (O_2^-) が産生される。 O_2^- から SOD の働きにより派生する過酸化水素 (H_2O_2) やヒドロキシラジカル ($HO\cdot$) は、それ自身細胞有害性を示す上に、好中球ミエロペルオキシダーゼにより次亜塩素酸 ($HOCl$) を生じる。これらが、胃壁を傷つけ潰瘍を形成すると考えられている。(73)。

ii) ストレスによって視床下部が刺激され、副交感神経が興奮し、胃液分泌を亢進させる。視床下部の刺激が、脳下垂体前頭葉を刺激し副腎皮質刺激ホルモンの分泌を促し、それによって胃液を更に分泌する。そして、この多量の胃酸によって胃壁を傷つけ潰瘍を形成すると考えられている (73)。

iii) ストレスによって視床下部が刺激され、副交感神経が興奮すると、交感神経も亢進して胃の末梢血管が収縮し、胃粘膜の血流量と粘液分泌量が少なくなり、虚血状態となる。通常、胃粘膜の血管内皮細胞にはキサンチンデヒドロゲナーゼが多量に存在し、この酵素は NADH を利用してキサンチンやヒポキサンチンを尿素に代謝させる働きを担っている。しかし、虚血状態では細胞内プロテアーゼによってキサンチンデヒドロゲナーゼが限定分解し、キサンチンオキシダーゼへと変化する (Fig.3-7)。また ATP の分解が促進されヒポキサンチンが生成し、細胞内のヒポキサンチン濃度が上昇する。そして、再灌流時にヒポキサンチンを基質としてキサンチンオキシダーゼおよび再灌流によって豊富に供給される酸素によって O_2^- が生成される。さらにキサンチンを基質として酸素とキサンチンオキシダーゼにより O_2^- と尿酸が生成される。こうして産生した活性酸素が胃粘膜組織に障害を与え、潰瘍を形成すると考えられている (73)。

今回、用いた水浸拘束ストレスは、iii) 「キサンチンオキシダーゼ系で生じる酸化スト

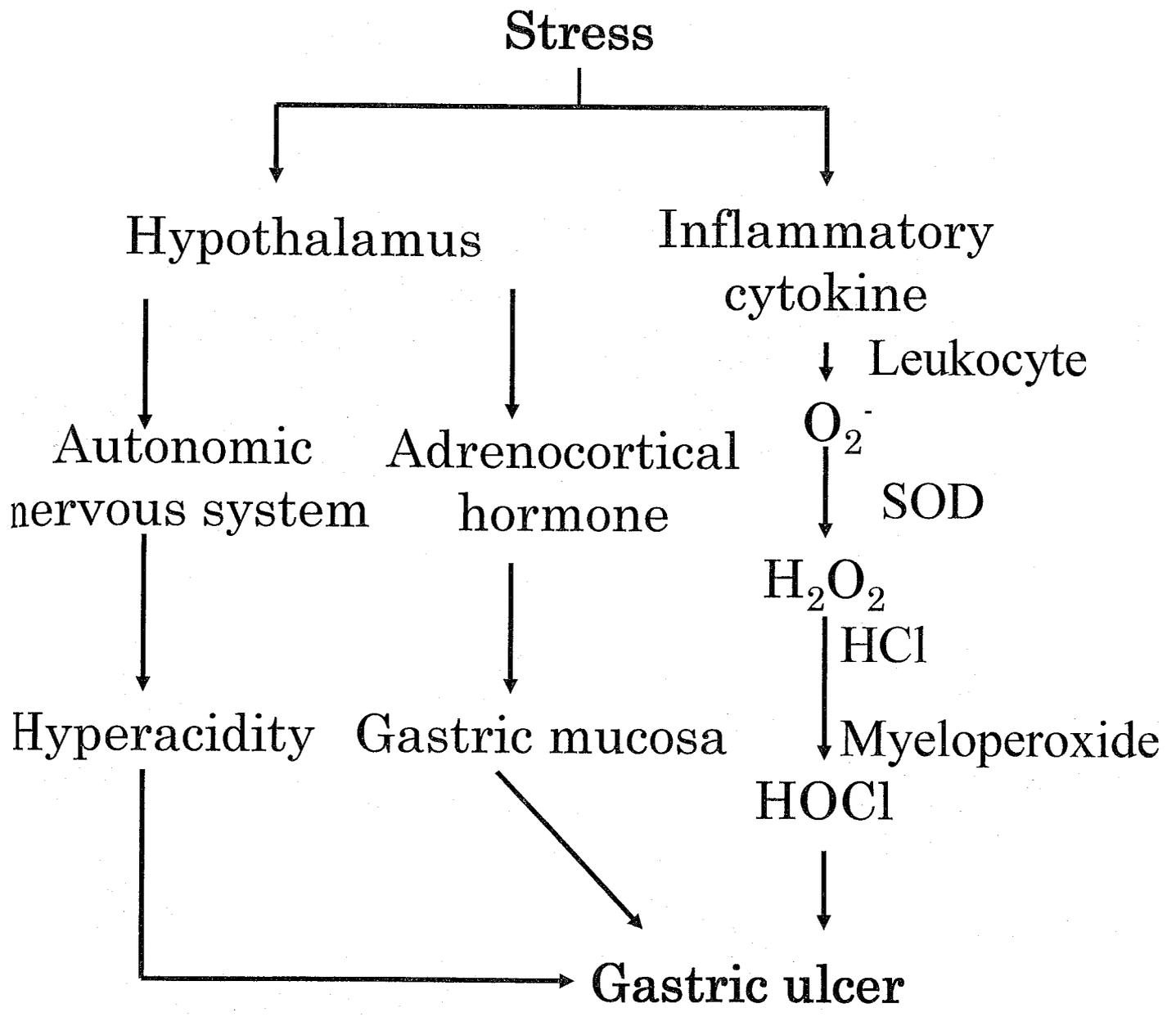


Fig. 3-6 Mechanism of ulcer formation

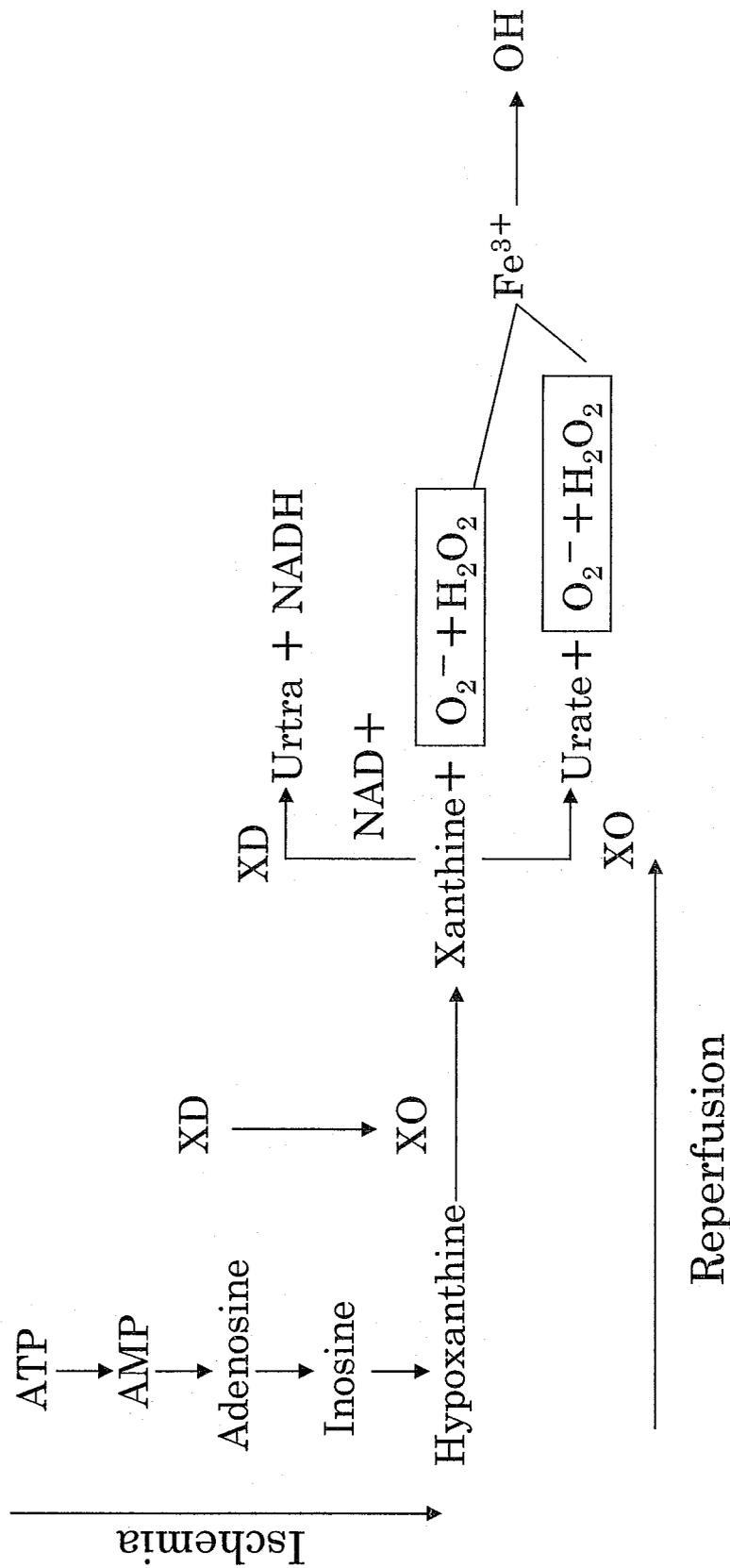


Fig.3-7 The proposed mechanism for the generation of reactive oxygen species in Ischemia-Reperfusion

XD: xanthine dehydrogenase, XO: xanthine oxidase

レス」を主要なメカニズムとして考えた。この系で発生する活性酸素の多くは O_2 で、2 次的に H_2O_2 、 $OH\cdot$ へと派生する。酸化ストレスにおける細胞障害の直接的な原因は、反応性の低い O_2 や H_2O_2 より、反応性の高い $OH\cdot$ が関与していると報告されている (76)。虚血時のアシドーシス(血液 pH7.4 を酸性側にしようとする状態)ではトランスフェリン、フェリチンなどの鉄結合タンパク質から O_2 により Fe^{3+} が還元されて Fe^{2+} として遊離し、 H_2O_2 と反応して $OH\cdot$ が生じ、この $OH\cdot$ が DNA、タンパク質などを直接攻撃する。一方で、 $OH\cdot$ は脂質と反応して脂質ラジカルを経て、脂質ヒドロペルオキシドを生成し、脂質酸化の連鎖反応を引き起こす。胃の場合、細胞膜を形成している膜リン脂質が影響を受ける。膜リン脂質の多価不飽和脂肪酸鎖が過酸化を受けると、極性の $HOO\cdot$ が生成され脂肪酸鎖の疎水結合は弱くなり膜のコンホメーションが変化し、その流動性が増す。その結果、ホスホリパーゼ A2 が膜リン脂質に接近しやすくなり、 $LOOH$ を切り離す。遊離された $LOOH$ は鉄や銅などの遷移金属イオンと反応し、 $LO\cdot$ や $LOO\cdot$ を生成し、新たな脂質過酸化反応の開始剤になり連鎖反応が進行する。その結果、膜構造を保てなくなり、細胞障害・潰瘍へと進む。

本研究において、その胃潰瘍抑制機序を調べるため活性酸素種を分解する酵素(カタラーゼ)の活性と TBARS を評価した。その結果、カタラーゼ活性において新規発酵乳と空白群にあまり差は認められなかった。これまでに報告されてきた食品由来の物質は、この活性酸素種を分解する酵素群を上昇させ、胃潰瘍を抑制してきた。(77,78)しかし、本研究においては認められなかった(Fig.3-4)ことから、この機序における胃潰瘍抑制の可能性は低いものと推測される。TBARS において新規発酵乳は空白群に比べて有意に抑えられていた。同じストレスを与えて活性酸素種を分解する酵素の活性もほぼ同じであることから、 O_2 から TBARS までの段階において新規発酵乳は胃潰瘍の進行を抑えていたと示唆された。

酸化の進行を抑制する成分には、活性酸素を消去するビタミン類、グルタチオン、アミノ酸(His, Trp)、カロテノイドなど、ラジカル捕捉・連鎖反応を切断するビタミン類、フラボノイド類、アミノ酸・ペプチド類、カロテノイド類など、ヒドロペルオキシド分解するメラノイジン、リン脂質の褐変物、金属をキレートするフラボノイド類、リン脂質類、ペプチドなどがある。

これまでに、豚筋原線維タンパク質をパパインで加水分解して得られたペプチド画

分の投与が、ラットに水浸拘束ストレスを与えた時の酸化ストレスを抑制し、Ulcer Index や潰瘍形成度を低下させることが明らかにされている(79)。この場合に、パパイン水解物に含まれる抗酸化ペプチドが酸化ストレスの抑制に寄与していると推定されている。本研究で明らかとなった酸化ストレスの抑制も、新規発酵乳中に含まれるペプチドあるいはタンパク質が酸化を抑制し、ストレス性胃潰瘍を抑制したと推察された。

次章では、活性酸素除去を除く機序を網羅的に調べることができる系を用いてこの胃潰瘍抑制過程で抑制する成分を探索した。

第4章 新規発酵乳の抗酸化成分の探索と同定

緒言

第3章で、新規発酵乳の生体調節機能として、ストレス性胃潰瘍抑制効果があることを明らかにした。また、その抑制機構として、新規発酵乳中に含まれる抗酸化物質による可能性が示された。

生体内には、優れた酸化に対する防御システムが備わっており、生体の健康維持に寄与している(80)。しかし、反応性の高い活性酸素が、生体内で過剰に生成されると、防御システムだけでは処理できなくなり、活性酸素等の酸化物質がタンパク質、脂質、DNAといった生体成分に障害を与えることになる。従って、近年、食品に含まれる抗酸化成分が注目されており、盛んに研究されている。古くから知られている食品の抗酸化成分は、ビタミンCやビタミンEで、これらは生体内の酸化還元状態を適正に保ち、ストレスなどによる体内での活性酸素の発生に対応して、それを速やかに消去することによって健康の維持に貢献している。ビタミン類以外で知られている抗酸化成分は、ポリフェノール類、カロテノイド類、抗酸化ペプチドなどがある。

そこで、第4章では、新規発酵乳の抗酸化成分について探索し、効果成分の特定を行った。

1. 実験材料および方法

1) 供試材料

リノレン酸、塩化鉄(Ⅱ)四水和物は、関東化学株式会社から購入した。Thiobarbituric acid(TBA)試薬とチオシアン酸アンモニウムは、ナカライテスク株式会社から購入した。また、3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluene(BHT)と1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)は、東京化成株式会社から購入した。

2) 新規発酵乳抽出液の調製

新規発酵乳に4倍量のエタノールを加え、除タンパク処理をした。エタノールの混合物を5℃で一晩放置し、可溶性成分を抽出した。不溶物を遠心分離(10,000×g, 30分)により除去し、得られた上清を抽出液とした。この抽出液を限外ろ過膜(Amicon Ultrafiltration membrane YC10; MW=1000)を用いて、分子量1000以上のペプチド画分と分子量1000以下の画分に分画し、これらの溶液の抗酸化活性を調べた。

3) DPPHラジカル捕捉作用(81)の測定

粗調製ペプチドによるラジカル捕捉活性は、比較的安定なラジカルであるDPPHラジカル(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Free Radical)を用いて測定した。4mlのサンプル溶液あるいは蒸留水に1mlの99.5%エタノールに溶解させた0.02%DPPH溶液を加え、よく攪拌した。この溶液を室温暗所で60分間放置し、517nmでの吸光度を測定した。

4) 抗酸化作用の評価

①酸化モデル系

酸化モデル系は、Chenら(82)の方法に改良を加えて行った。5ml容バイアル瓶に10mgリノレン酸および2mlの0.2N K-phosphate (pH7.0, 1% TritonX-100)を加えた。これに酸化促進剤として塩化鉄(Ⅱ)(終濃度0.05mM)と蒸留水を添加し、40℃で4分間超音波処理を行ってエマルジョン溶液を作成した。最終容量が4mlとなるようにサンプルおよび蒸留水を加え、80℃の恒温槽で60分間加熱、振とうし

た。加熱前および加熱後の反応液は直ちに、ロダン鉄法で POV を、TBA 法で TBARS を測定した。抗酸化作用の評価は、加熱前後の POV と TBARS の増加量の比較で行った。

②脂質酸化物の測定

a)ロダン鉄法

Osawa ら(83)の方法に準じて行った。0.1 ml の反応液に 99.5 %エタノール 4.5ml、30 %チオシアン酸アンモニウム水溶液 0.1 ml、1N HCl 0.2 ml および 0.02 M FeCl₂/1 N HCl 0.1 ml を加え、よく攪拌後 500 nm での吸光度を測定した (Jasco.V-530 UV spectrophotometer)。

b)TBA 法(84)

0.5 ml の反応液に 3 %BHT 15 μl、25 %トリクロロ酢酸 0.25 ml および 0.67 % TBA 溶液 0.5 ml を加え、攪拌後、沸騰湯浴中で 10 分間加熱した。氷冷後 10,000 ×g で 15 分間遠心分離を行い、上清の 535 nm で吸光度を測定した。

5) ペプチドの濃度測定

ペプチドの濃度測定はLowry法(85)で行った。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

6) HPLC

ペプチドを単離するため、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行った。カラムとして ODS カラム(Pegasil-250 ODS, Senshu Scientific Co.)を用い、溶離には 0.1 %TFA 水溶液から、0.85 %TFA を含む 80 %アセトニトリル溶液への 80 分間での濃度勾配法(1.0 %/min)を用いた。ペプチドは、220 nm での吸光度で検出した。

7) ペプチドの構造決定

HPLC で単離したペプチドのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーG-1005A(ヒューレット・パッカー)を用いて分析した。タンパク質データベース(SWISS-PROT)でホモロジー検索し、既知タンパク質との相同性を比較することにより、ペプチドの由来

タンパクを特定した。

HPLC で単離したペプチドの分子量を ESI-MS(Finngan MAT, Thrmofinnigan) で測定した。

2. 結果

1) 新規発酵乳抽出液のラジカル捕捉作用

DPPH ラジカル溶液に新規発酵乳抽出液を添加し、60 分間インキュベートした。反応前後における DPPH ラジカル量を測定し、DPPH ラジカル残存量(%)で表した(Fig.4-1)。その結果、新規発酵乳抽出液のラジカル残存率は 1 桁であり、ほとんどラジカル消去能を発揮しないことが明らかとなった。

2) 新規発酵乳抽出液の抗酸化作用

① 濃度依存性

新規発酵乳抽出液の濃度と抗酸化作用との関係を調べるため、抽出物の終濃度を 0.001 %, 0.01 %, 0.1 %に調整して、抗酸化作用を測定した(Fig.4-2)。

POV、TBARS ともに添加濃度が高くなるにつれて、抗酸化作用が、有意に強くなることを示した。そして、0.1 %添加させた時、 α -トコフェロールを上回る強い活性があった。また 0.01 %でも十分添加効果を示した。以後の実験では、サンプル量を考慮して、0.01 %で測定することとした。

② 限外濾過物の抗酸化作用

抽出物を分子量 1000 以下の画分と分子量 1000 以上の画分に分画し、それぞれに含まれる物質の抗酸化作用を測定した(Fig.4-3)。その結果、両画分から抗酸化作用が見られた。新規発酵乳中には、原料乳に含まれるビタミン類が残っているので、分子量 1000 以下の画分では、このビタミン類が、高い抗酸化作用を発揮したものと考えられる。そこで、本研究では、ビタミン以外の物質、特にペプチドに着目していることから、新規抗酸化物質を分子量 1000 以上の画分から探索した。

③ HPLC による抗酸化ペプチドの単離

新規発酵乳抽出液に含まれる抗酸化ペプチドを単離するために、逆相カラムを用いた HPLC に供した。0.1 %TFA 水溶液から 0.85 %TFA を含む 80 %アセトニトリル溶液への 80 分濃度勾配でペプチドを溶出した。溶出時間の違いから 3 つの画分 (I :0-40 分, II :40-60 分, III :60-80 分)を得た(Fig.4-4)。3 つの画分での回収率

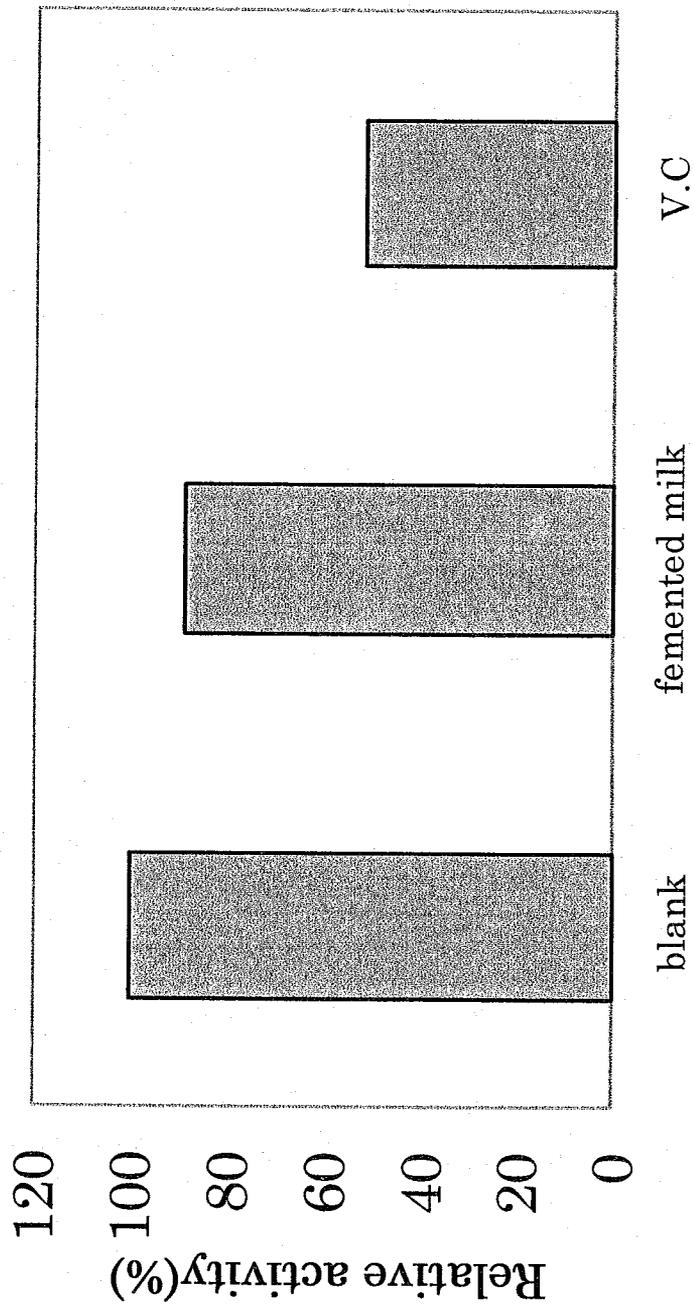


Fig. 4-1 DPPH radical scavenging activity of fermented milk
 DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, free radical

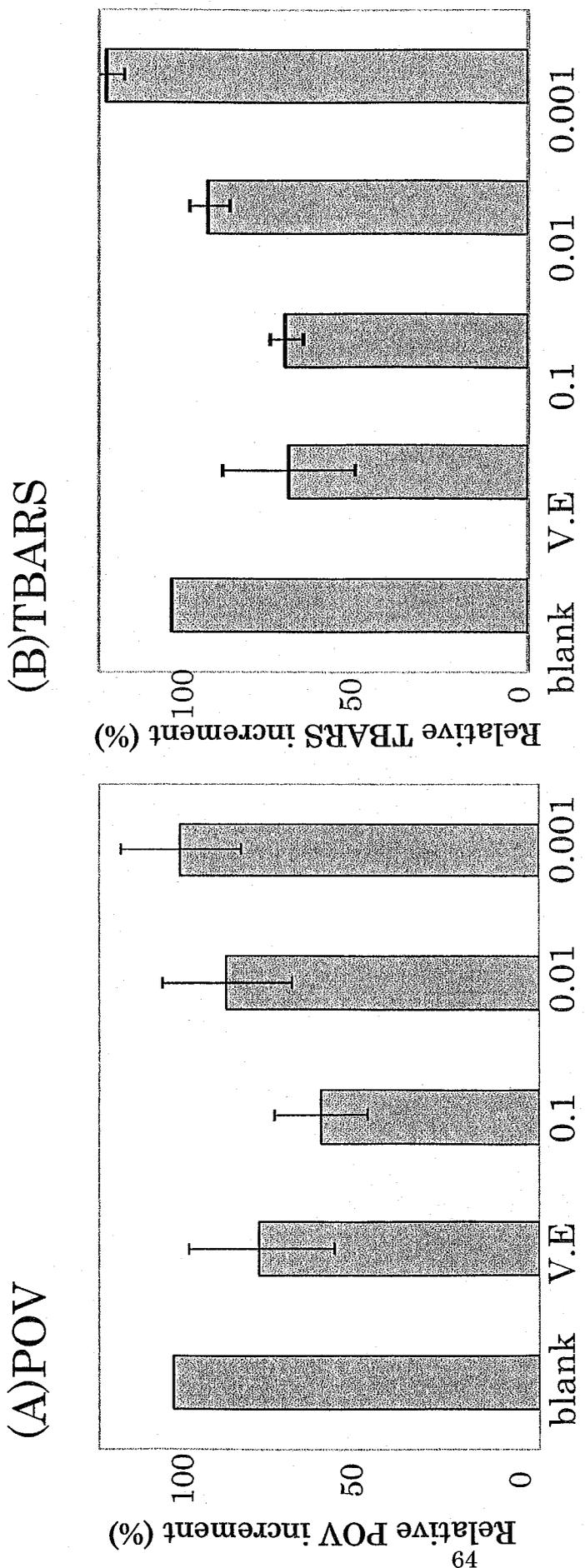
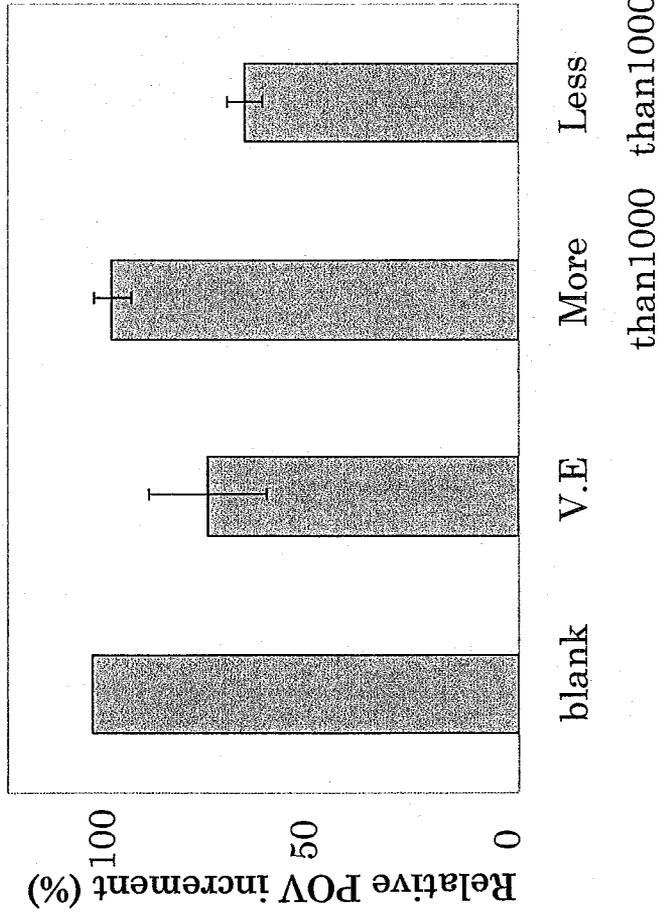


Fig.4-2 Effect of extract from fermented milk on antioxidant activity measured by POV(A) and TBARS(B).

Antioxidant activity was measured by increment of POV and TBARS during heating. The increment of POV and TBA during heating in the absence of fermented milk was arbitrarily indicated as 100%.

POV;peroxide value, TBA;2-thiobarbituric acid, TBARS;TBA reaction substance

(A)POV



(B)TBARS

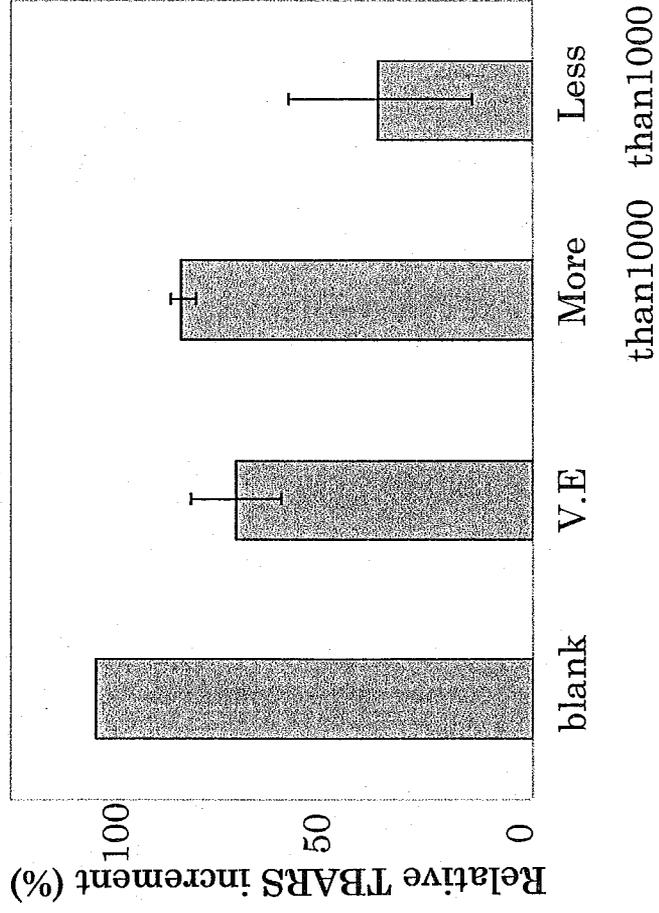


Fig. 4-3 Effect of fractions in the extract on antioxidant activity measured by POV(A) and TBARS(B).

Antioxidant activity was measured by increment of POV and TBARS during heating. The increment of POV and TBARS during heating in the absence of fermented milk was arbitrarily indicated as 100%.

POV;peroxide value, TBA;2-thiobarbituric acid, TBARS;TBA reaction substance

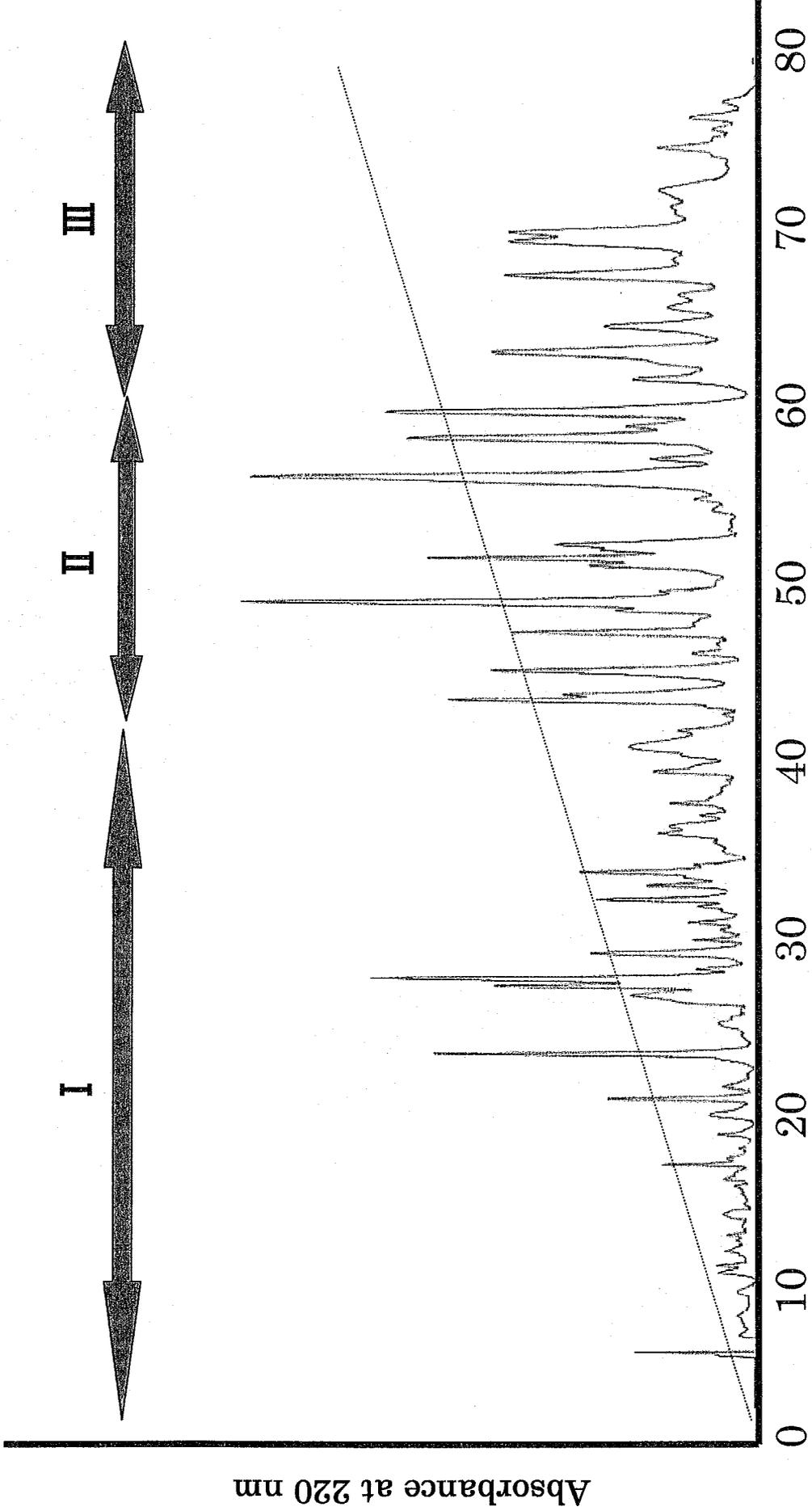


Fig.4-4 Fraction of antioxidant activity fraction obtained from fermented milk extract by HPLC on an ODS column

The gradient conditions for elution on both HPLCs are given under Materials and Methods.

は約 60 %であった。3 つの画分の抗酸化活性を調べた結果、II と III の画分から高い抗酸化活性が見られ、II 画分では POV 43.0 %, TBARS 35.7 % の酸化を抑制した (Fig.4-5)。一方、III 画分では POV 49.6 %, TBARS 32.0 % の酸化を抑制した。次に抗酸化活性が高かった II と III の画分から含有量が高い 11 Peaks を分取し、さらに抗酸化活性を測定した (Fig.4-6)。Peak2 と 8 に抗酸化活性が認められた (Fig.4-7)。

④ 抗酸化ペプチドのアミノ酸配列

抗酸化活性が認められた Peak2, 8 に含まれるアミノ酸配列をプロテインシーケンサーにより解析した (Table 4-1)。その結果、得られた配列は、Peak2 が、AQTQSLVYPPFGPIHN (β -casein f68-83)、Peak8 が、LYQQPVLGP (β -casein f207-215) であった。2 つの配列は、質量分析計からも確認された (Figs.4-8,9)。

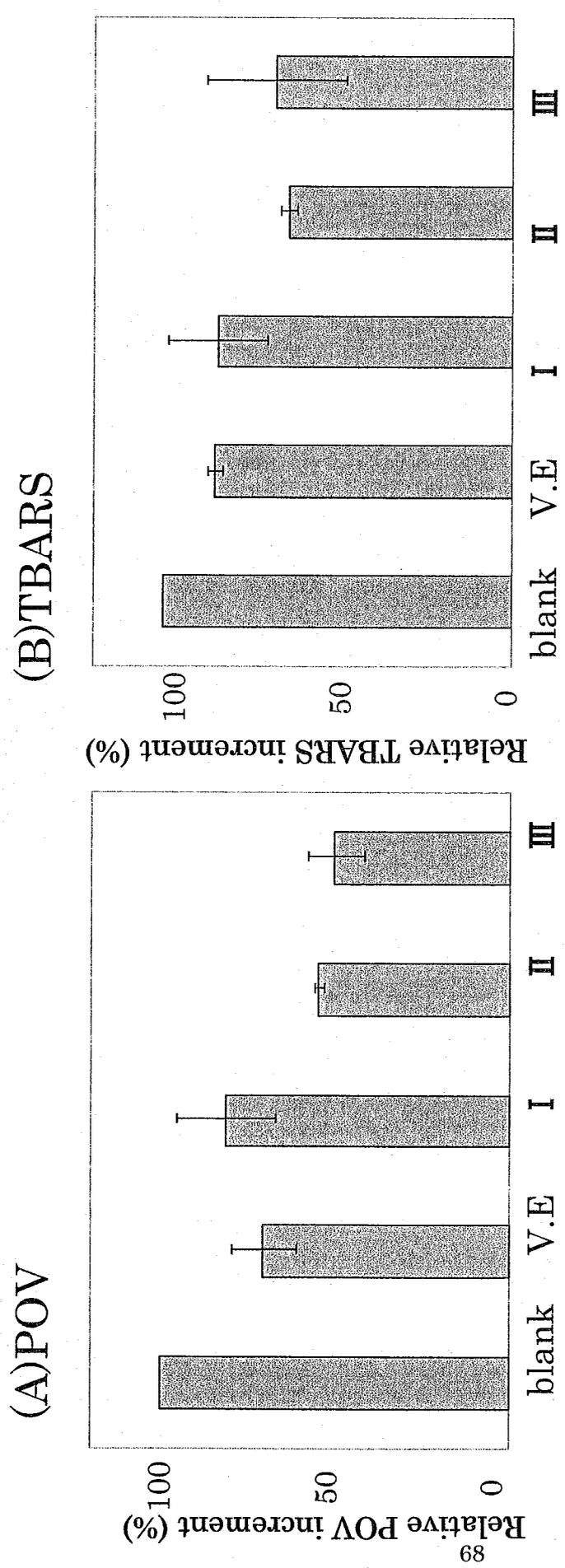


Fig.4-5 Effect of 3 fractions obtained on HPLC on antioxidant activity measured by POV(A) and TBARS(B).

Antioxidant activity was measured by increment of POV and TBARS during heating. The increment of POV and TBARS during heating in the absence of fermented milk was arbitrarily indicated as 100%.

POV;peroxide value, TBA;2-thiobarbituric acid, TBARS;TBA reaction substance

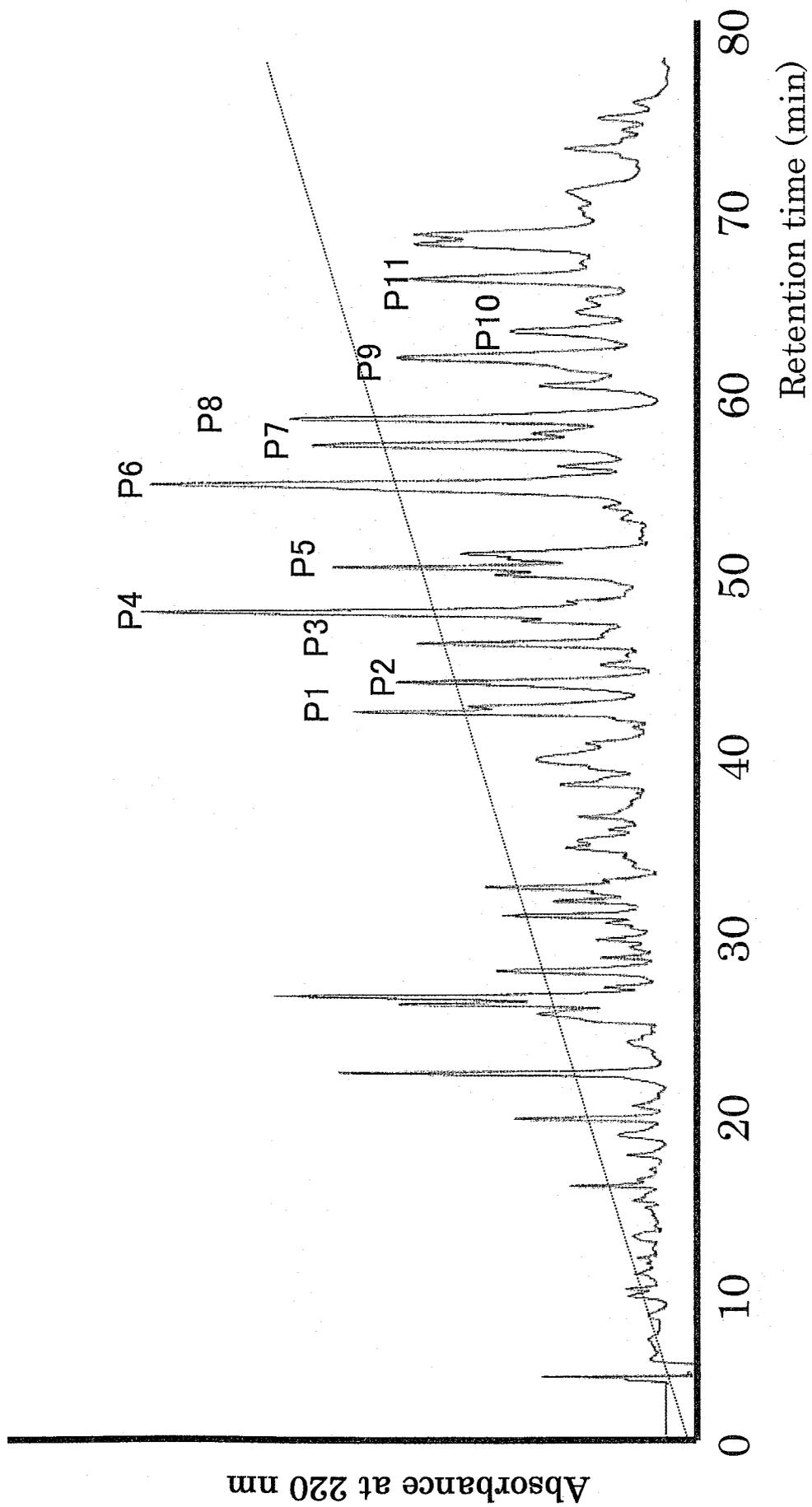


Fig.4-6 Isolation of antioxidant peptides in fermented milk extract by HPLC on an ODS column

The gradient conditions for elution on both HPLCs are given under Materials and Methods.

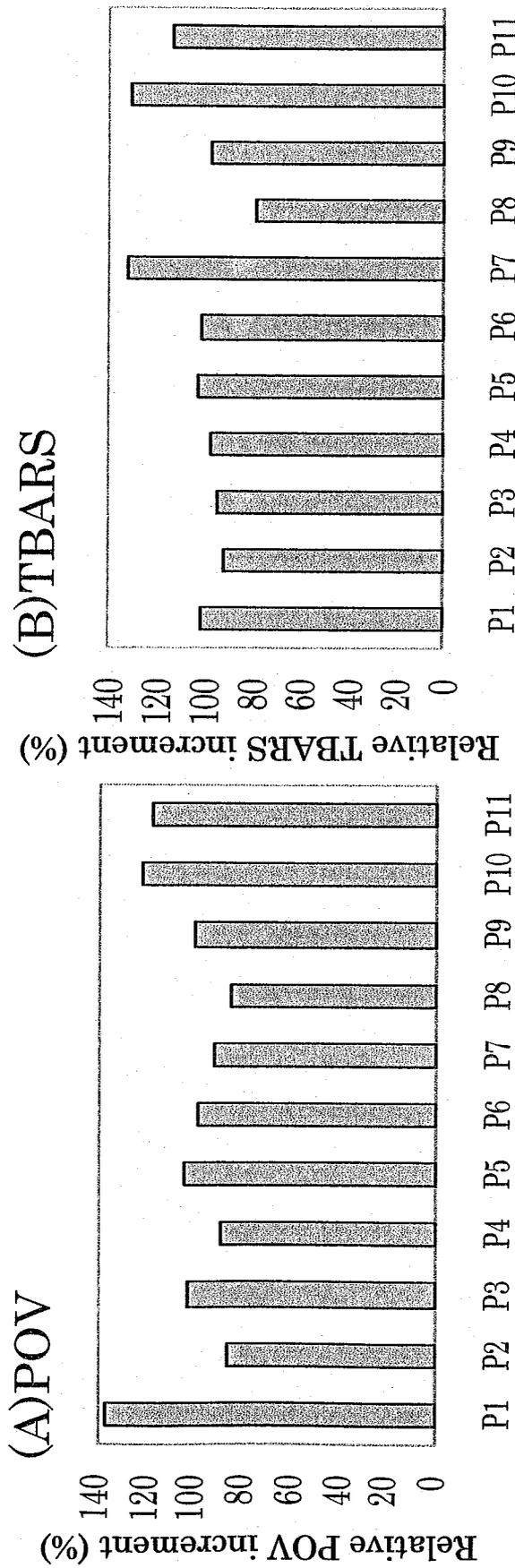


Fig.4-7 Antioxidant activity of 11 peaks on HPLC

Antioxidant activity was measured by increment of POV(A) and TBARS(B) during heating. The increment of POV and TBARS during heating in the absence of fermented milk was arbitrarily indicated as 100%.

POV;peroxide value, TBA;2-thiobarbituric acid, TBARS;TBA reaction substance

Table 4-1 N-terminal amino acid sequences of anti-oxidative peptides in fermented milk

Peak No.	Sequence	Origine
P2	Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-	
	Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn	β -casein f 53-68
P8	Lys-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Lys-Gly-Pro	β -casein f 192-200

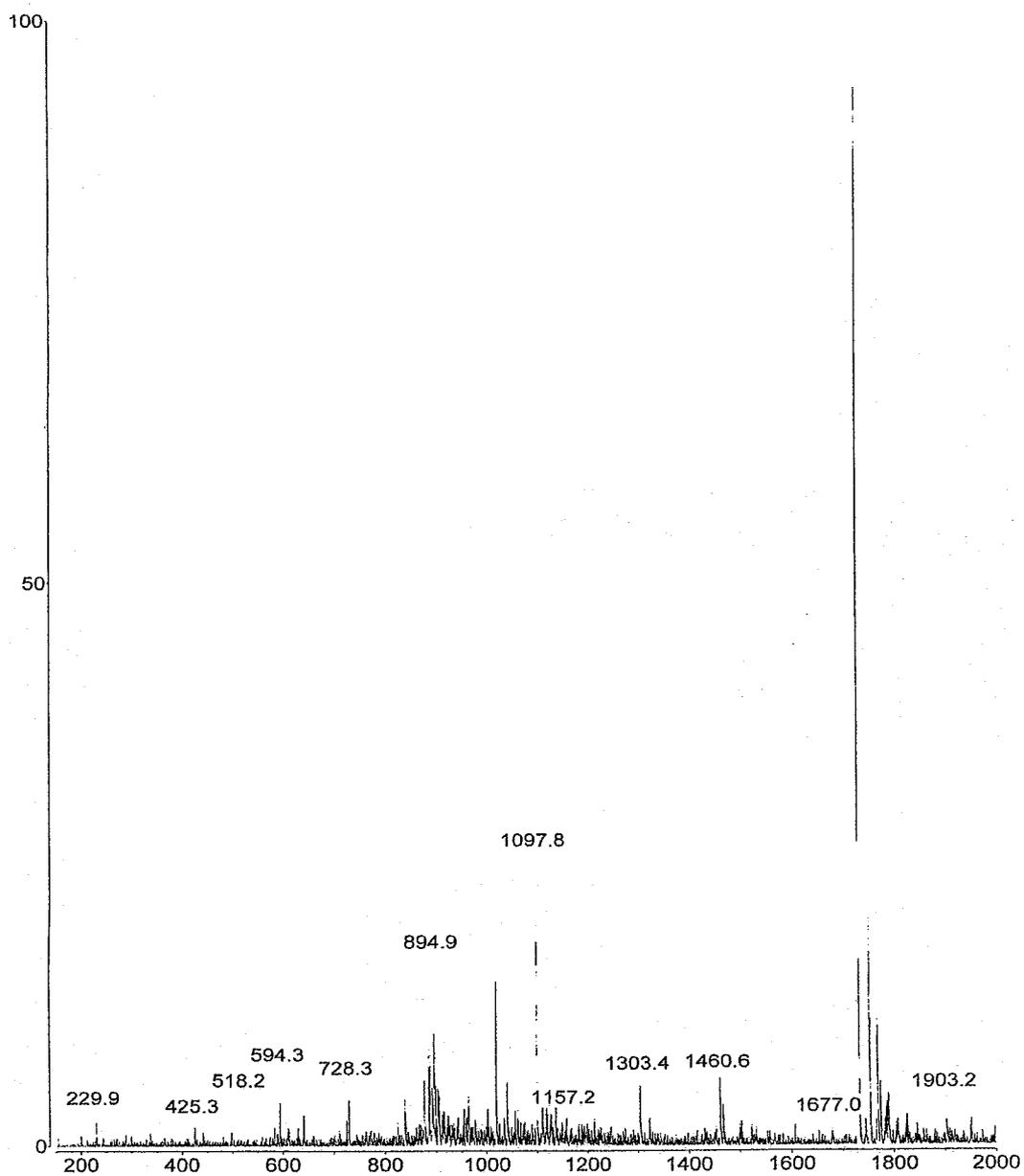


Fig. 4-8 Mass spectrogram of the peptide in peak 2

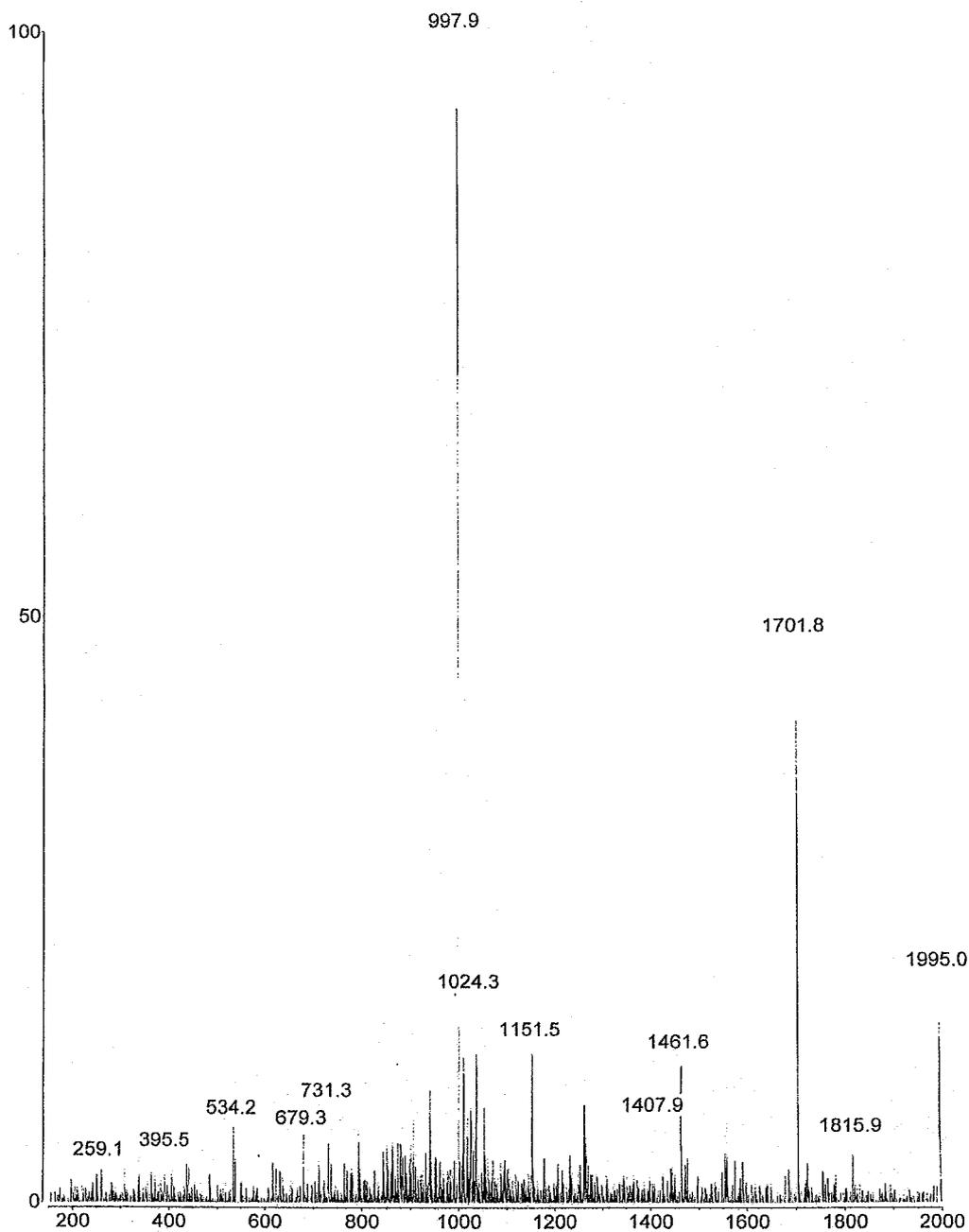


Fig. 4-9 Mass spectrogram of the peptide in peak 8

3. 考察

カゼイン由来のペプチドには生理活性を示すものが多く報告されている(86)。Sakanakaら(87)は、3kDaのカゼインカルシウムペプチドに、Rivalら(88)は、カゼインおよびカゼイン分解物に抗酸化作用があること示した。今回単離したPeak2の切断部位β-カゼイン f52-53 および f68-69 は、比較的分解されやすい部位(89)で、この部位で切断されたペプチドに、オリゴペプチドとして菌体内に取り込まれているものもあると報告されている(89)。一方、Peak8のペプチドは、このC末端で切断されてきたペプチドの報告はない。エンドプロテアーゼで分解後、さらにエキソプロテアーゼで分解されてきたものと推定された。したがって、*L.lactis*と*S.thermophilus*の新しい組み合わせによってはじめて生成したペプチドである可能性が考えられた。

これまでに報告されている抗酸化ペプチドの特徴は、N末端アミノ酸にVal, Leuといった疎水性アミノ酸で、Tyr, Met, His, Lys, Trp, Pro, Hyp, Arg, Cysなどの芳香族、疎水性、塩基性アミノ酸および含硫アミノ酸を有するペプチドに抗酸化作用があることが知られている(90, 91)。トリペプチドでは、C末端アミノ酸にLeu, Proとなった時に高い抗酸化活性が見られている(92)。本研究で単離した抗酸化ペプチドもAQTQSLVYPPFGPIHN, LYQQPVLGPと疎水性および塩基性アミノ酸を含んでおり、これら報文と一致するものであった。ペプチドによる抗酸化の機序は、ラジカル捕捉作用・連鎖反応の切断作用、金属キレート作用および他の抗酸化成分との相乗効果と説明されている(93-95)。例えば、Hisを多数含むペプチドは、イミダゾール環が脂質の代わりにラジカルの攻撃を受けてイミダゾールラクテートやイミダゾールアセテートに変化し、ラジカル捕捉・連鎖反応の切断作用を発揮している(96)。また、金属キレート作用もイミダゾール環が、金属との結合に寄与しているとされている。しかし、His以外のアミノ酸については、不明なところが多く、金属と結合部位やラジカルとの反応性についてよくわかっていない。今後、合成ペプチドを調製し、この抗酸化作用についてラジカル捕捉・連鎖反応の切断作用や金属キレート作用を検討するとともにペプチドマッピングを行い、活性部位の特定を行う必要がある。

乳およびヨーグルトは胃潰瘍患者の治療に有効とされてきた食品である。乳はアルコール、塩酸、アスピリンおよびストレスによって引き起こされる潰瘍から効果的に保護してきた(97, 98)。この胃保護効果は、乳中のリン脂質によって形成される保護膜とプ

ロスタグランジン上昇によるものと推測されている(97)。また、ヨーグルトは、塩酸によって引き起こされる潰瘍から胃を保護した。(99)。その機序を炎症性サイトカインIL-8の産生を阻害したためと推察されている。本研究において新規発酵乳にこれらの要因の他に、抗酸化ペプチドの寄与もあることが、初めて示唆された。

総括

本研究は、これまでに使用されていない乳酸菌の組み合わせ (*Lactococcus lactis* (*L. lactis*) と *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*)) によって製造した新規発酵乳の呈味特性と生体調節機能を解明することを目的として行った。まず、新規発酵乳の発酵過程における呈味物質の変化を検討した。その結果、新規発酵乳が、従来のヨーグルトよりも酸味が弱く、甘味およびまろやかさが強いことが確認された。これらの呈味特性の違いは、新規発酵乳の乳酸量がヨーグルトよりも少ないことに起因すると結論した。また、新規発酵乳がストレス性胃潰瘍を抑制することを明らかにすると同時に、それが脂質酸化を抑制することによってもたらされると推察した。さらに、胃潰瘍を抑制する因子として、新規発酵乳から抗酸化ペプチドを単離し、その構造を決定した。これらの結果から、本研究の目的をほぼ達成できたといえよう。

第1章では、新規発酵乳を長時間発酵する必要性が、乳酸菌の酸生成能の遅さにあると示唆された。従来のヨーグルトでは *Lactobacillus* 属と *Streptococcus* 属との併用によって製造されてきた。2つの乳酸菌に共生関係があるため酸生成能が高く、短時間で目的の酸度まで下げることが可能であった。しかし、本研究で用いた乳酸菌は *Lactococcus* 属と *Streptococcus* 属の併用であるため酸生成能が低い。特に酸度が上昇してからは酸生成能が緩慢になる。この2つの乳酸菌では酸度上昇までに長時間必要とし、その長い発酵時間によってさまざまな成分が変化し、新規発酵乳の好ましい風味をもたらしたものと考えられた。

新規発酵乳とヨーグルトを官能評価し、新規発酵乳の風味は酸味が弱く、甘味をもち、まろやかであることが明らかとなった。そして新規発酵乳の香りは甘いミルク臭であり、不快臭は殆ど感じられないと多くのパネルがコメントした。これらの結果は、新規発酵乳が好ましい風味を持っていることを支持するものであった。また、これらは新規発酵乳の呈味を科学的に検討したはじめての結果である。

第2章では、新規発酵乳の発酵に伴う呈味成分の変化を検討し、有機酸、遊離アミノ酸およびペプチドの変化が、新規発酵乳とヨーグルトのものと異なることを示した。

新規発酵乳とヨーグルトに含まれる有機酸を HPLC に供し、分析した結果、新規発酵乳はヨーグルトより乳酸量が少なく、オロト酸量が多いことを明らかにした。ヨーグルト

のみに特定の有機酸ピークが認められた。このピークが新規発酵乳の方が酸味が弱いと評価された要因の1つと考えられた。しかし、この成分は HPLC では同定できなかった。今後、このピークを HPLC で分取し、NMR および MS を用いて同定する必要がある。

新規発酵乳の遊離アミノ酸の構成成分は Glu,Pro,Ala の 3 つの遊離アミノ酸が占めるようになった。一方、ヨーグルトではさまざまな遊離アミノ酸が含まれていた。またペプチド解析の結果、2 つの発酵乳は発酵とともに顕著に増加しているピークが複数認められた。また、ヨーグルトと比べ新規発酵乳の方が、ペプチドの種類が増えていた。これらのことから新規発酵乳とヨーグルトでは発酵過程が異なることを明らかにした。

さらに、新規発酵乳とヨーグルトに含まれている呈味成分からその特徴となる寄与成分について検討した。新規発酵乳の酸味が、ヨーグルトのものより弱い理由は、乳酸含量が低かったことであると結論した。それ以外に、①オロト酸は2つの発酵乳の酸味に影響を与えていなかったこと、②クエン酸、尿酸、乳糖は、両製品の呈味の違いを示すほどの差はなかったこと、③遊離アミノ酸およびペプチドは、呈味を示すほど十分量なかったことが明らかにされた。また、新規発酵乳の乳酸含量が、ヨーグルトに比べて低かったことが、新規発酵乳の酸味を弱く、甘味を強く感じさせると同時に、まろやかに感じさせたものと推察された。

第 3 章では新規発酵乳のストレス性胃潰瘍抑制作用を評価し、新規発酵乳を経口投与した群は Ulcer Index 値、目視による潰瘍形成度が、非投与群に比べて、低い値を示した。このことから、新規発酵乳投与は、ストレス性胃潰瘍を抑制する効果があると示唆された。また、今回の実験結果から、新規発酵乳投与群では、非投与群に比べて胃の TBARS を低下させたことから、新規発酵乳の抑制効果が、脂質酸化抑制によってもたらされたと推察された。

そこで、第 4 章では、新規発酵乳の抗酸化成分について探索し、その成分の 1 つが分子量 1000 以下のビタミン類であり、もう 1 つがカゼイン由来の抗酸化ペプチドである可能性を示した。本実験で単離したペプチドは、新規の抗酸化ペプチドであった。そして、新しい乳酸菌の組み合わせによって生成したペプチドであることから乳酸菌の組み合わせによって、新しいペプチドが生成される可能性を示した。一方、本研究ではこの抗酸化ペプチドを合成し、その効果を確認するまでには、至らなかった。今後、

検討する必要がある。

以上述べてきたように、本研究により、これまでほとんど明らかにされていなかった新規発酵乳の機能に関して、呈味特性ならびにストレス性胃潰瘍形成抑制効果を明らかにすることができた。健康に良いおいしい食品の開発は、今後の高齢化社会に向けた重要な課題であることから、本研究で得られた知見は、これからの食品科学分野に少なからず貢献できたといえよう。

引用文献

- (1)第 26 回コーデックス委員会 「はっ酵乳改正規格案」 (2003)
- (2)山本隆:美味の構造(講談社)、 p.111-119 (2001)
- (3)西村敏英:日本味と匂い学会誌、 11, p.121 (2004)
- (4)栗原堅三:季刊化学総説「味とにおいの分子認識」、 40, p4 (1999)
- (5)佐藤昌康:味覚の科学(朝倉書店)、 p.122 (1997)
- (6)Nelson, G., Hoon, MA., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, NJ., and Zuker, CS. Mammalian sweet taste receptors: *Cell*, 106, 381-390 (2001)
- (7)Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E. Human Receptors for sweet and umami taste: *PNAS*, 99, 4692-4696 (2000)
- (8)Adler, E., Hoon, MA., Mueller, KL., Chandrashekar, J., Ryba, NJ., and Zuker, CS. A novel family of mammalian taste receptors: *Cell*, 100, 693-702 (2000)
- (9)Chaudhari, N., Landin, AM., and Roper, SD. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor: *Nature Neurosci.*, 3, 113-119 (2000)
- (10)Ott, A., and Hugi, A., Baumgartner, M., and Chaintreau, A. Sensory investigation of yogurt flavour perception: mutual influence of volatiles and acidity: *J. Agric. Food Chem.*, 48, 441-450 (2000)
- (11)Gallardo-Escamilla, F.J., Kelly, A.L., and Delahunty, C.M. Influence of starter culture on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk: *J. Dairy Sci.*, 88, 3745-3753 (2005)
- (12)Steven, H., Debbie, B., Floyd, B., and Mina, M. Sensory ratings of commercial plain yogurts by consumer and descriptive panels: *J. Dairy Sci.*, 74, 2927 - 2935 (1991)
- (13)Debbie, B., Steven, H., Floyd, B., and Mina, M. Prediction of consumer acceptability of yogurt by sensory and analytical measures of sweetness

- and sourness: *J. Dairy Sci.*, 74, 3746 - 3754 (1991)
- (14)Cooke, S., and Welker, L.A. Optimizing the market potential for yogurt: *Cult. Dairy Prod. J.*, 21(3), 23
- (15)福家眞也:季刊化学総説「味とにおいの分子認識」、40, p.92-100 (1999)
- (16)Fuke, S., and Ueda, Y. Interactions between umami and other flavor characteristics: *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 407-411 (1996)
- (17)河合美佐子:アミノ酸の味 その2、*Ajico News*, 209, (2003)
- (18)Beshkova, DM., Simova, ED., Frengova, GI., Simov, ZI., and Adilov, EF. Production of amino acids by yogurt bacteria: *Biotechnol Prog.*, 14(6), 963-965 (1998)
- (19)Fuke, S., and Konosu, S. Taste-active components in some foods: *Physiol. Behav.*, 49, 863-868 (1991)
- (20)Garcia, E., and McGregor, J. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt: *J. Dairy Sci.*, 77, 2934-2939 (1994)
- (21)Yuguchi, H., Hiramatsu, A., Doi, K., Ida, C., and Okonogi, S. Studies on the flavour of yogurt fermented with *Bifidobacteria* - Significance of volatile components and organic acids in the sensory acceptance of yogurt: *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 60, 734-741 (1989)
- (22)北畠寿美雄:季刊化学総説「味とにおいの分子認識」、40, p.50-60 (1999)
- (23)アミノ酸ハンドブック(味の素)p.47, (2003)
- (24)Chapman, KW., Lawless, HT., and Boor, KJ. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk: *J. Dairy Sci.*, 84(1), 12-20 (2001)
- (25)網野裕右:季刊化学総説「味とにおいの分子認識」、40, p.20-26 (1999)
- (26)Singh, TK., Young, ND., Drake, M., and Cadwallader, KR. Production and sensory characterization of a bitter peptide from beta-casein: *J. Agric. Food Chem.*, 53(4), 1185-1189 (2005)
- (27)Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., and Nuñez, M.

- Hydrolysis of caseins and formation of hydrophilic and hydrophobic peptides by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese: *J. Appl. Microbiol.*, **91**(5), 907-15 (2001)
- (28) Tada, M. L-Ornithyltaurine, a new salty peptide: *J. Agri. Food chem.*, **32**, 992-996 (1984)
- (29) Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H., and Fujimaki, M. Isolation and identification of acidic oligopeptide occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 49-53 (1975)
- (30) Maehashi, K., Matsuzaki, M., Yamamoto, Y., and Udaka, S. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(3), 555-559 (1999)
- (31) Okumura, T., Yamada, R., and Nishimura, T. Sourness-suppressing peptides in cooked pork loins: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(8), 1657-1662 (2004)
- (32) Nakata, T., Takahashi, M., Nakatani, M., Kuramitsu, R., Tamura, M., and Okai, H. Role of basic and acidic fragments in delicious peptides (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) and the taste behavior of sodium and potassium salts in acidic oligopeptides: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**(4) 689-693 (1995)
- (33) 篠原和毅: 食品機能研究法 (学会出版センター)、p.1-7 (2000)
- (34) 細野明義: 発酵乳の科学 (アイ・ケイコーポレーション)、p.94-98 (2002)
- (35) Hosoda, M., Hashimoto, H., He, F., Morita, H., and Hosono, A. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine: *J. Dairy Sci.*, **79**, 745-749 (1996)
- (36) Gilliland, SE., and Kim, HS. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans: *J. Dairy Sci.*, **67**, 1-6 (1984)

- (37)Jiang, T., Mustapha, A., and Savaiano, DA. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*: *J. Dairy Sci.*, **79**, 750-757 (1996)
- (38)Bakalinsky, AT., Nadathur, SR., Carney, JR., and Gould, SJ. Antimutagenicity of yogurt: *Mutat. Res.*, **350**(1), 199-200 (1996)
- (39)Clemmesen, J. Antitumor effect of lactobacilli substances "*L. bulgaricus* effect": *Mol. Biother.*, **1**(5), 279-82 (1989)
- (40)Lauer, RM., Obarzanek, E., Hunsberger, SA., Van Horn, L., Hartmuller, VW., Barton, BA., Stevens, VJ., Kwiterovich, PO Jr., Franklin, FA Jr., Kimm, SY., Lasser, NL., and Simons-Morton, DG. Efficacy and safety of lowering dietary intake of total fat, saturated fat, and cholesterol in children with elevated LDL cholesterol: the Dietary Intervention Study in Children: *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 1332S-1342S (2000)
- (41)Orrhage, K., Sillerström, E., Gustafsson, JA., Nord, CE., and Rafter, J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria: *Mutat. Res.*, **311**, 239-248 (1994)
- (42)Zhang, XB., and Ohta, Y. Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole: *Can. J. Microbiol.*, **39**(9), 841-845 (1993)
- (43)Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T., and Mutai, M. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice: *Gann*, **72**(4), 517-523 (1981)
- (44)Matsuzaki, T., Kato, I., Yokokura, T., and Mutai, M. Augmentation of antitumor activity of *Lactobacillus casei* YIT 8018 (LC 9018) in combination with various antitumor drugs: *Gan To Kagaku Ryoho*, **11**(3), 445-51 (1984)
- (45)Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T., and Koga, Y. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans: *J. Antimicrob. Chemother.*, **47**(5),

- (2001)
- (46) Yamamoto, N., Maeno, M., and Takano, T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4: *J. Dairy Sci.*, 82(7), 1388-93 (1999)
- (47) Kawahara, T., Aruga, K., and Otani, H. Characterization of casein phosphopeptides from fermented milk products: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 51(5), 377-81 (2005)
- (48) 農林水産省 平成 14 年度第 4 回農林水産技術会議の概要 資料 2
- (49) Soejima, T., Yamauchi, K., Yamamoto, T., Ohara, Y., Nagao, E., Kanbara, K., Fujisawa, M., Okuda, Y., and Namba, S. Determination of bovine lactoferrin in lactoferrin-supplemented dairy products and raw milk by an automated latex assay: *J. Dairy Res.*, 74(1), 100-105 (2007)
- (50) 足立達: 乳とその加工、p.280-290 (1987)
- (51) 石井克枝: 日本家政学会誌、45, p.797 (1994)
- (52) Higashio, K., Yoshioka, Y., and Kikuchi, T. Isolation and identification of growth factor of *Streptococcus thermophilus* produced by *Lactobacillus bulgaricus*: *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 51, 203-208 (1977)
- (53) Higashio, K., Yoshioka, Y., and Kikuchi, T. Isolation and identification of growth factor of *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*: *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 51, 209-215 (1977)
- (54) Bautista, E. S., Dahiya, R.S., and Speck, M.L. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk: *J. Dairy Res.*, 33, 299-307 (1966)
- (55) Zourari, A., Accolas, J. P., and Desmazeaud, M. J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria: *Lait.*, 72, 1-34 (1992)
- (56) Taylor, W.H., Taylor, C.D., and Taylor, M.L. Biosynthetic dihydroorotate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus*: partial characterization of the enzyme: *J. Bacteriol.*, 119, 98-105 (1974)

- (57) Tamime, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications: *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56**, S2-S15 (2002)
- (58) Garvie, E.I. Lactate dehydrogenases of *Streptococcus thermophilus*: *J. Dairy Res.*, **45**, 515-518 (1978)
- (59) Thomas, T.D. Regulation of lactose fermentation in group N *Streptococci*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 474-478 (1976)
- (60) Gasser, F. Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*: *J. Gen. Microbiol.*, **62**, 223-239 (1970)
- (61) Gasser, F. and Gasser, C. Immunological relationships among lactic dehydrogenases in the genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc*: *J. Bacteriol.*, **106**, 113-125 (1971)
- (62) Igoshi, K., Hamasuna, H., Kobayashi, H., Kudo, Y., and Matuda, S. Identification of hydrolyzed peptides from casein in milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* IFO13953: *Nihon Chikusan Gakkaiho*, **76**(3), 315-320 (2005)
- (63) Letort, C. and Juillard, V. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*: *J. Appl. Micro.*, **91**, 1023-1029 (2001)
- (64) Foucaud, C., Hemme, D., and Desmazeaud, M. Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*: *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**(1), 20-25 (2001)
- (65) Kasprzak, K.S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis: *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 958-967 (2002)
- (66) Chen, F., Vallyathan, V., Castranova, V., and Shi, X. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals: *Mol. Cell. Biochem.*, **222**, 183-188 (2001)
- (67) Lopez, F.A., and Casado, S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction: *Hypertension*, **38**, 1400-1405 (2001)
- (68) Finkel, T. Redox-dependent signal transduction: *FEBS Lett.*, **476**, 52-54 (2000)

- (69)Smith, M.A., Nunomura, A., Zhu, X., Takeda, A. and Perry, G. Metabolic, metallic, and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease: *Antioxid. Redox Signal.*, **2**, 413-420 (2000)
- (70)Matsumoto, H., Shimokawa, Y., Ushida Y., Toida, T., and Hayasawa, H. New biological function of bovine β -lactoalbumin: Protective effect against ethanol- and stress-induced toxicity and gastric mucosal injury in rats: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1104-1111 (2001)
- (71)Arafa, HM., and Sayed-Ahmed, MM. Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats: *Pharmacol. Res.*, **48**, 285-290 (2003)
- (72)仁木鋭雄:抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御—(学会出版センター)
- (73)Nishida, K., Ohta, Y., Kobayashi, T., and Ishiguro, I. Involvement of the xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress: *Digestion*, **58**, 340-351 (1997)
- (74)Harris, P.R., and Mobley, H.L. *Helicobacter pylori* urease is potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production: *Gastroenterology*, **111**, 419-423 (1996)
- (75)Suzuki, M., and Miura, S. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal injury: *Am. J. Physiol.*, **263**, 719-725 (1992)
- (76)Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts: *FASEB J.*, **1**(5), 358-364 (1987)
- (77)La, Casa C., Villegas, I., Alarcón, de la Lastra C., Motilva, V. Martín, and Calero, MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions: *J. Ethnopharmacology*, **71**, 45-53 (2000)
- (78)Rao, ChV., and Vijayakumar, M. Protective effect of (+)-catechin against gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in rats: *J.*

- Pharm. Pharmacol.*, 59(8), 1103-7 (2007)
- (79) 雑賀愛: 博士論文「食肉タンパク質由来ペプチドの機能に関する研究」、p.74-80 (2003)
- (80) Wang, X., and Quinn, P.J. The location and function of vitamin E in membranes: *Mol. membr. Biol.*, 17, 143-156 (2000)
- (81) 福沢健治ら: 脂質酸化実験法(廣川書店)、p.79-80 (1990)
- (82) Chen, H.M., Muramoto, K., and Yamauchi, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin: *J. Agric. Food Chem.*, 43, 574-578 (1995)
- (83) Osawa, T., and Namiki, M. A Novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *eucalyptus* leaves: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 735-739 (1981)
- (84) Sapan, C.V., Lundblad, R.L., and Price, N.C. Colorimetric protein assay techniques: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 99-108 (1999)
- (85) 菊川清見ら: 衛生化学、p.9 (1993)
- (86) Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., and Di Cagno, R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42, 223-239 (2002)
- (87) Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., and Juneja, L.R. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates: *J. Agric. Food. Chem.*, 53, 464-468 (2005)
- (88) Riveal, S., Boeriu, C.G., and Wichers, H.J. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition: *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 295-302 (2001)
- (89) Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., and Konings, W.N. The proteolytic systems of lactic acid bacteria: *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221 (1996)
- (90) Hattori, M., Yamaji-Tukamoto, K., Kumagai, H., and Feng, Yaowen, Takahashi, K. Antioxidative activity of soluble elastin peptides: *J. Agric.*

- Food Chem.*, 46, 2167-2170 (1998)
- (91) Marcuse, R.: *Nature*, 186, 886-887 (1960)
- (92) Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, HG., and Kim, SK. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems: *J. Nutri. Biochem.*, 16, 562-569 (2005)
- (93) Mendis, E., Rajapakse, N., and Kim, SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate: *J. Agric. Food Chem.*, 53(3), 581-587 (2005)
- (94) Saito, K., Jin, DH., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., and Nokihara, K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry: *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3668-3674 (2003)
- (95) Chen, HM., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., and Nokihara, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein: *J. Agric. Food Chem.*, 46, 49-53 (1998)
- (96) Bridgewater, JD., Srikanth, R., Lim, J., and Vachet, RW. The effect of histidine oxidation on the dissociation patterns of peptide ions: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18(3), 553-62 (2007)
- (97) Dial, EJ., and Lichtenberger, LM. Milk protection against experimental ulcerogenesis in rats: *Dig. Dis. Sci.*, 32, 1145-1150 (1987)
- (98) Materia, A., Jaffe, BM., Money, SR., Rossi, P., De Marco, M., and Basso, N. Prostaglandins in commercial milk preparations. Their effect in the prevention of stress-induced gastric ulcer: *Arch. Surg.*, 119, 290-292 (1984)
- (99) Uchida, M., and Kurakazu, K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 exerts gastroprotective action against [correction of agaisnt] acute gastric lesion and antral ulcer in rats: *J. Pharmacol. Sci.*, 96, 84-90

(2004)

要旨

Lactococcus lactis と *Streptococcus thermophilus* で製造した新規発酵乳の機能特性に関する研究

大前 允人

ヨーグルトは代表的な発酵乳製品であり、国際規格では牛乳を原料とし 2 種類の高温乳酸菌 (*Lactobacillus bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus*) の発酵によって作られたものと定められている。日本では、この 2 種類の高温乳酸菌に限らず、種々の有用乳酸菌やビフィズス菌を用いた発酵乳も全てヨーグルトとしてとらえられている。これらのヨーグルトは、いずれも酸味が強く、特有の風味を有するため、必ずしも日本人の嗜好性に合うものではない。また、近年の日本人の健康志向に合わせて整腸作用などの生理機能をもつヨーグルトも多く開発されているが、その風味はこれまでのヨーグルトと類似している。このような背景から、今後の高齢化社会に向けて、健康に良いおいしい発酵乳の開発が求められている。最近、新しいタイプの発酵乳として、チーズのスターターに利用される中温乳酸菌 *Lactococcus lactis* と従来からヨーグルト製造に使用されている *S. thermophilus* の組み合わせにより、8 時間以上の長時間発酵させて製造した新規発酵乳が開発された。この新規発酵乳は、酸味が弱く、味がマイルドであると同時に、ヨーグルト特有の発酵臭が弱いため、日本人の嗜好性に合うことがわかってきた。しかし、新規発酵乳の風味特性並びに生体調節機能に関する研究は全くなされていないのが現状である。

そこで本研究では、新規発酵乳の特性を呈味特性と生体調節機能から明らかにすることを目的とした。具体的には、新規発酵乳の呈味特性を検討するため、新規発酵乳の各基本味を従来の短時間発酵ヨーグルト(以下、ヨーグルトとする)と官能検査により比較した。また、発酵過程で生成する呈味物質の変化を解析した。さらに、この新規発酵乳の生体調節機能として、ストレス性胃潰瘍形成抑制効果を検討した。

1. 新規発酵乳の製造方法と呈味特性

新規発酵乳は、原料乳を殺菌し、中温乳酸菌 *L. lactis* と高温乳酸菌 *S. thermophilus* を接種して、38 °C で 16 時間発酵して製造した。この時の、滴定酸度は、 $0.85 \pm 0.05\%$ であった。一方、ヨーグルトは 2 種の高温乳酸菌 (*L. bulgaricus* と *S. thermophilus*) を接種し、42°C で 4-6 時間発酵させて製造した。ヨーグルト製造における発酵終了は、新規発酵乳と同じ滴定酸度になった時点とした。2 つの製品の呈味特性を官能検査により比較した。その結果、新規発酵乳の方が、ヨーグルトより、酸味が弱く、甘味があり、かつまろやかであると評価された。

2. 新規発酵乳の呈味成分分析と呈味寄与成分の特定

(1) 新規発酵乳とヨーグルトの呈味成分の分析

新規発酵乳およびヨーグルトに含まれる有機酸、糖、遊離アミノ酸およびペプチドの含量を分析した。新規発酵乳の乳酸量は、ヨーグルトよりも少なく、逆にオロト酸量が多いことが明らかとなった。また、ヨーグルトのみに検出される特定の有機酸の存在が明らかとなった。これらがヨーグルトの酸味の違いをもたらした要因の1つであると推定された。

新規発酵乳に含まれる主な遊離アミノ酸量は、Glu, Pro, Ala であった。一方、ヨーグルトでは、これらのアミノ酸に加えて、各種アミノ酸が含まれていた。これらの遊離アミノ酸の組成の違いが、両者の呈味性の違いをもたらしていると思われた。次に、HPLC で両者に含まれるペプチドを解析した。いずれの製品でも、ペプチドは発酵時間とともにピーク数の増加が認められた。特に、新規発酵乳では、発酵 8 から 16 時間後にかけて複数のペプチドが増加しており、検出されたペプチドの種類は、ヨーグルトに比べて多かった。近年、ペプチドは様々な呈味性に寄与することが知られていることから、ペプチドが新規発酵乳の味のまろやかさに関与している可能性が示唆された。このように、様々な呈味成分において、量的並びに質的違いが認められたので、新規発酵乳とヨーグルトの呈味特性の違いを明らかにするため、呈味寄与成分の特定を試みた。

(2) 新規発酵乳の呈味特性寄与成分の特定

新規発酵乳とヨーグルトに含まれている呈味成分の分析値に基づいて、最も味への

寄与が大きいと考えられる有機酸あるいは遊離アミノ酸の再構成呈味液を作製した。また、ペプチドの呈味への寄与を評価するため、2つの製品から、分子量 1000 以上のペプチド画分を調製した。

新規発酵乳分析値に基づく乳酸溶液の酸味強度は、ヨーグルトの分析値に基づいて作製されたものより有意に酸味が強いことが明らかとなった。各乳酸溶液へのオロト酸の添加は、その酸味の強さを変化させなかったことから、両者の酸味強度の違いは乳酸量の違いによることが明らかとなった。

次に、両製品の再構成遊離アミノ酸溶液とペプチド画分溶液の呈味性並びにそれらを酸味溶液に加えた時の呈味変化を官能検査によって評価した。再構成遊離アミノ酸溶液およびペプチド画分溶液に、呈味は認められなかった。また、これらを酸味溶液に加えても、それぞれの酸味強度に影響を与えなかった。

以上の結果から、新規発酵乳がヨーグルトに比べて、酸味が弱く、マイルドであった主要な理由は、新規発酵乳で乳酸含量が少なかったことによると結論した。

3. 新規発酵乳のストレス性胃潰瘍形成抑制作用

1 週間予備飼育した Wister 系雄ラット(7 週齢)を 24 時間絶食させた後、温水(23℃)に漬けて(水浸拘束)ストレスを発生させた。水浸拘束 1 時間前に、原料乳あるいは新規発酵乳を経口投与した。これらを投与しないものをブランク群とした。胃潰瘍形成抑制作用は、3 時間の水浸拘束後、胃を摘出し、胃粘膜の障害度と血痕の長さで評価した。また、抑制作用のメカニズムを推定するために、カタラーゼ活性および TBARS を測定した。

ストレスを受けたラットは、いずれの群でも出血が認められた。しかし、血痕の長さの総和は、新規発酵乳および原料乳投与群で、ブランク群と比べて抑制された。活性酸素の分解に関わるカタラーゼ活性は、いずれの群間でも有意な差が認められなかった。一方、脂質酸化の指標である TBARS は、原料乳および新規発酵乳群でブランク群よりも低い値を示した。以上の結果から、新規発酵乳は、胃の脂質酸化を抑制することにより、ストレス性胃潰瘍形成を抑制したと推察された。

4. 新規発酵乳に含まれる抗酸化作用ペプチドの単離・同定

新規発酵乳にエタノールを加えて除タンパクし、ペプチドを抽出した。このペプチド溶液から、リノレン酸酸化系を用いて、抗酸化作用を評価すると共に、抗酸化作用を有するペプチドを分画し、単離した。

調製したペプチド溶液は、POV および TBARS とともに、0.1% ビタミン E 溶液に匹敵する強い抗酸化作用を示した。次に、これを限外ろ過膜で分画し、分子量 1000 以上とそれ以下のペプチド画分を調製した。分子量 1000 以上の画分と以下の画分のいずれにも、抗酸化作用が認められた。抗酸化作用ペプチドを単離するために、1000 以上のペプチド画分を ODS カラムで 3 つに分画した。このうち活性の高い画分から、11 のピークを分取した。さらに、活性の高い 3 つのペプチドを単離、プロテインシークエンサーに供して解析した結果、AQ TQSLVY PFP GPIHN (β -casein f68-83), LYQQPVLGP (β -casein f207-215) が明らかになった。

まとめ

本研究において、中温乳酸菌 *Lactococcus lactis* と高温乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* の組み合わせにより製造された新規発酵乳の呈味特性を解析し、酸味が弱く、マイルドな呈味特性を有することを明らかにした。また、この呈味特性が、従来のヨーグルトに比べて、乳酸量が少ないことに起因すると推察された。さらに、新規発酵乳が胃潰瘍形成抑制作用を有することを明らかにし、その寄与成分とし 2 つの抗酸化ペプチド単離・構造決定した。これらの成果は、高齢化社会に向けた健康でおいしい新規発酵乳の機能特性を解明した点で、食品化学分野の発展に少なからず貢献したものと見えよう。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学大学院教授、西村敏英先生に感謝と敬意の意を申し上げます。

ご多忙中、本論文の審査の労をお執り下さいました広島大学大学院教授 堀貫治先生、広島大学大学院教授 羽倉義雄先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に用いました乳酸菌およびその他試料を提供していただきました日本ルナ株式会社およびに小野莞爾氏、前山佳昭氏に感謝致します。

そして、有意義なご助言ならびにご支援くださいました広島大学生物圏科学研究科の先生方ならびに動物資源化学研究室の皆様から心から感謝致します。

論文をまとめるにあたり時間を与えてくださいました株式会社興人社員の方々に心から感謝致します。

最後に、絶えず励まし支え続けてくれました両親に心から感謝致します。