

乳発酵食品チーズの機能性

— 抗酸化活性 —

東海大学農学部 井越 敬司

要 約

チーズの機能性を、現在注目されている食品の抗酸化能の視点から、チーズの 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (以下 DPPH) ラジカル消去活性について研究した。10 種類の各種市販チーズ (モッツアレラ、カマンベール、ポンレベック、ブルー、ゴーダ、マリボー、グリエール、エメンタール、エダム、パルミジャーノ・レッジャーノ) から 70 %エタノール可溶性画分を調製し、その DPPH ラジカル消去活性について調べた。その結果、ポンレベック、カマンベールおよびブルーチーズに高いラジカル消去活性が見出され、またラジカル消去活性はチーズの熟成率 (水溶性窒素/全窒素) と高い相関性 ($r = 0.9714$) が認められた。白カビ系チーズ 9 種類 (輸入カマンベール 4 種類 (マリーハレル、ジロ、ボカージュ、プレジデント、) および国産カマンベール 3 種類 (A、B、C) およびシャウルス、ブリード・モー) について、それらチーズの 70 %可溶性画分の DPPH ラジカル消去活性を調べた。その結果、最も活性が高く認められたのはマリーハレルとジロで、次いでシャウルスであった。国産カマンベールは最も低かった。これらチーズのペプチド量あるいは遊離アミノ酸量と DPPH ラジカル消去活性との相関性を調べた。その結果、アミノ酸量とラジカル消去活性には相関性 ($r = 0.5097$) は低かったが、ペプチド量と消去活性には高い相関性 ($r = 0.8922$) が得られた。このことから DPPH ラジカル消去活性成分の一つとしてペプチドが考えられた。

比較的活性が高く認められたマリーハレルの 70 %エタノール可溶性画分を用いて、DPPH ラジカル消去活性成分の分離精製を行った。ダイヤイオン HP を用いて活性成分を分離した結果、活性は吸着および未吸着の両画分に認められた。しかし、活性は未吸着画分の方が高いことから、本画分を ODS カラムおよび HILIC カラムクロマトグラフィーにて精製した。精製成分を UV スペクトル、質量分析および uricase を用いた比色法により活性成分の同定を試みたところ、活性本体のひとつが尿酸と一致することが明らかとなった。従って、チーズ中の DPPH ラジカル消去成分の一つは尿酸であることが知られた。

キーワード：チーズ、熟成、機能性、DPPH ラジカル消去、抗酸化、尿酸

牛乳を発酵させ製造される乳発酵食品には、代表的なものとして発酵乳とチーズがある。最近、発酵乳の機能 (食品の三次機能) について精力的に研究され、抗腫瘍効果および抗高血圧抑制等、

多くの保健・健康効果が明らかにされてきている¹⁾。しかし、同じ乳発酵食品であるチーズの場合、国内は勿論、チーズ研究での先進国フランス、オランダおよびイギリス等における諸外国においてもほとんど研究されておらず、チーズの機能性研究は発酵乳に比べ非常に遅れている。

チーズに関する研究は、これまで凝乳メカニズムや熟成に関与する微生物の研究、チーズの風味発現、組織形成に関わる熟成中のタンパク質分解や脂肪分解に関する研究、そして熟成に関わる酵素の研究等、申請者²⁾を含め多くの研究者によって行われてきた。これらの研究のほとんどはチーズ製造における技術開発や熟成の促進化、食品の二次機能（風味、呈味、組織形成）の改善等を目的としたもので、チーズにおける食品の三次機能（生体調節機能）の視点からの研究はほとんどされてない。そこで申請者らはチーズの三次機能を明らかにする研究を進めている。

食品の機能性という視点で今注目されているのが抗酸化活性である。生体内で発生する活性酸素やフリーラジカル等による酸化ストレスは人の老化やガンおよび心疾患等の生活習慣病に関与する。従って、これら活性酸素やフリーラジカルの生成を抑制したり消去したりする成分、すなわち抗酸化物質を食品から積極的に摂取することが生活習慣病予防上重要と考えられている。その結果、食品成分による酸化ストレスの防止や抑制の観点から、食品の抗酸化能と成分の関係に関する研究や抗酸化成分の検索が行われ、今日までに野菜、果物を中心とした植物性素材を対象に多くの抗酸化物質が見出されてきている^{3, 4)}。しかし、チーズのような動物性素材由来は少なく、また発酵食品など加工食品からの抗酸化物質の検索も少ない。

そこで我々は、まだほとんど明らかにされていないチーズの機能性を、現在最も注目されている抗酸化能の視点から研究し、チーズが抗酸化食品として非常に優れた食品であることを明らかにする本研究プロジェクトを立ち上げた。今までに、抗酸化活性測定法としてβカロテン退色法を用いてチーズの抗酸化能を調べ⁵⁾、青カビチーズであるブルーチーズより抗酸化活性を有するカゼイン由来ペプチド5種類 (IH、GIH、DKIH、DKIHY および PGPIH)⁶⁾ を明らかにした。

本研究では、チーズの抗酸化能の視点から DPPH ラジカル消去を指標に、チーズにおけるラジカル消去活性について調べた。また、活性の高かったカマンベールチーズの一つマリーハレルからは活性成分を分離精製し、活性成分の一つが尿酸であることを明らかにした。以下その結果について報告する。

材料および方法

1. 供試チーズ

供試した市販チーズは非熟成タイプのモッツアレラ、青カビタイプのブルー、ウオッシュタイプのパンレベック、半硬質チーズのゴータとマリボー、硬質チーズのエダム、スイスチーズのエメンタールおよびグリエールそして超硬質のパルメザン等、合計10種類のチーズと白カビ系チーズ9種類、すなわち輸入カマンベール4種類（マリーハレル、ジロ、ボカージュおよびプレジデント）、輸入チーズのブリー・ド・モーとシャウルスおよび国産カマンベール3種類（A、B、C）

の合計 19 種類を使用した。これらチーズは熊本市内および東京のチーズ専門店あるいはデパートより購入した。

2. チーズの 70%エタノール可溶性画分の調製

各種市販チーズ 20g に高純度蒸留水 80ml を加え、ストマッカー（オルガノ株式会社 ストマッカー 400 - T）を用いて 15 分間破碎し、さらにポリトロンを用い 30 秒間、3 回低温下で破碎・抽出した。抽出後、pH を 6.0 に調整し 100ml に定溶、これをチーズ懸濁液とした。この懸濁液を遠心分離（6000rpm、4℃、20 分）し、脂肪と不溶物を除去後、得られた上清を Whatman113 の濾紙を用いて全量濾過し、この濾液を各種チーズの水溶性画分とした。次いで、水溶性画分 3 容量に対してエタノールを 7 容量の割合で混合し、4℃で一晩静置後、遠心分離（10,000rpm、4℃、20 分）し、得られた上清を各種チーズの 70%エタノール可溶性画分（以下 70%エタノール画分）とした。

3. 熟成率（可溶性 N / 全 N）の測定

熟成率（水溶性窒素 / 全窒素）は Kuchroo ら⁷⁾の方法に従って行った。すなわち、各種市販チーズ中の全窒素（TN）および水溶性画分中の窒素（WSN）量は、マクロケルダール法により求めた。タンパク質の分解にはケルテック 2020Digester（フォスフォージャパン株式会社）、窒素蒸留にはケルテック 2200Kjeltec（同社）を用いた。得られた窒素量から以下の式より熟成率を算出した。

$$\text{熟成率 (\%)} = (\text{WSN} / \text{全 N}) \times 100$$

4. 遊離アミノ酸の分析

チーズの 70% エタノール画分 20 μ l を、遠心エバポレーターを用いて乾固し、0.02M HCl 150 μ l に溶解させ、孔径 0.2 μ m、サイズ 13mm のフィルターを通過後、アミノ酸分析（日立アミノ酸分析機 865、カラム：生体用カラム）を行った。

5. Sep-Pak C₁₈ カートリッジによる活性成分の分離

Sep-Pak C₁₈ カートリッジを用い、70% エタノール画分中より活性成分を次のように分離した。すなわち、70% エタノール画分 5ml をエバポレーターにて乾固し、等量の高純度蒸留水に溶解させ、孔径 0.45 μ m、サイズ 25mm のフィルターを通過後、この全量を Sep-Pak C₁₈ カートリッジ（Waters Co.）に負荷した。負荷後、蒸留水 10ml（5 ml \times 2）で洗浄し、これを未吸着画分とし、80%アセトニトリル 5 ml で溶出した画分を吸着画分として使用した。

6. ペプチドの定量

各種市販チーズ 70%エタノール可溶性ペプチドの定量は Lowry⁸⁾法に準じて行った。すなわち、試験管にスタンダードである BSA 溶液（1mg/ml）および各試料をそれぞれ 100 μ l ずつ入れ、次いで Lowry 試薬 1ml を加えた。ボルテックスミキサーで攪拌した後、直ちに 30℃の恒温槽で 10 分間インキュベートした。反応後、1/2 フェノール試薬を 100 μ l 加え、速やかにボルテックスミキサーで攪拌した後、再度 30℃の恒温槽で 30 分間インキュベートした。反応後 770nm における吸光度を測定し、スタンダードから検量線を作成し各試料のペプチド量を求めた。

7. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性の測定は、Ono et al.⁹⁾の方法に従っておこなった。すなわち、各サンプルの70%エタノール可溶性画分1ml および pH5.5、0.1M 酢酸緩衝液1ml を試験管に混合させ、混合後0.5mM DPPH 溶液を500 μ l 加えた。ボルテックミキサーにて10秒攪拌したのち517nmにおける吸光度(Δ_0)を測定した後、室温下で30分間静置後、再びO. D. 517nmを測定した(Δ_{30})。得られた吸光値から下記の式よりラジカル消去活性を求めた。なお、ポジティブコントロールとしてブチルヒドロキシトルエン(BHT)を最終濃度25 μ M、50 μ Mとなるように調製し、使用した。

$$\text{ラジカル消去活性率 (\%)} = 100 - \text{Sample } \Delta_{30} \div \text{Sample } \Delta_0 \times 100$$

8. NMRおよびLC/MS

¹H-および¹³C-NMR スペクトルはJEOL alpha 500 spectrometer (日本電子株式会社)を用いて、pyridine-*d*₅中で測定した。また、Chemical shift 値はTMSを内部標準とした δ 値(ppm)で表示し、結合定数(*J*)はヘルツ(Hz)で表した。LC/MSはヒューレット・パッカード社HP-1100を使用し、液クロカラムはODSを用いた。

9. 尿酸の測定

尿酸はニプロ(株)より体外診断用試薬として販売されているエспа・UA-FSを使用し、そのプロトコールに従って測定した。

結 果

1. 各種チーズのDPPH ラジカル消去活性

ポンレベック、ブルー、カマンベール(マリーハレル)、ゴータ、マリボー、エダム、エメンタール、グリエール、パツミジャーノ・レッジャーノそして非熟成タイプとしてモッツアレラの合計10種類のチーズを用いて、これらチーズから抽出された70%エタノール画分のDPPH ラジカル消去活性を調べた。その結果をFig. 1に示した。その結果、非熟成タイプのモッツアレラを除く全てのチーズにラジカル消去活性が認められた。最も活性が高かったのはポンレベック(78%)であった。次いでマリーハレル(69%)、ブルー(55%)の順であった。ゴータ、エダムおよびサムソーの乳酸菌熟成タイプおよびエメンタール、グリエールのプロピオン酸菌熟成タイプおよび超硬質のパルミジャーノ・レッジャーノはそれらより非常に低く、非熟成タイプのモッツアレラはほとんど活性が見出せなかった。

活性は熟成が高いチーズに高い傾向が認められた。そこで、チーズの熟成率(水溶性窒素/全窒素:WSN/TN)とラジカル消去活性の相関性について調べ、その結果をFig. 2に示した。モッツアレラは近似線を大きく外れているが、それ以外のチーズにおいては、若干の差はあるものの近似線から大きく外れているものはなかった。また両者の相関性は、回帰式: $y = 1.2568x - 22.397$ で表せ、相関係数は $r = 0.971$ で、DPPH ラジカル消去活性と熟成率は非常に高い相関性が認められた。

2. 白カビ系チーズの DPPH ラジカル消去活性

1) DPPH ラジカル消去活性と熟成率との相関性

我国において最も多く販売されている白カビ系チーズ9種類（輸入チーズ6種類、国産:3種類）のラジカル消去活性について調べた。その結果を Fig. 3 に示した。最も高い活性を示したのはマリーハレルおよびジロの2種類のカマンベールであった。次いでシャウルス、ブリー・ド・モー、ボカージュとプレジデントそして国産カマンベールの順で、国産カマンベールが最も低かった。活性と熟成率との関係を調べたところ（Fig. 4）、ボカージュは熟成率が高いにも関わらず活性は低かった。しかし、その他のチーズにおいては Fig. 1 の結果と同様に熟成率が高いチーズに活性が高い傾向が認められた。しかし両者の相関性は、回帰式： $y=1.2065x-5.3683$ 、相関係数 $r = 0.5769$ と Fig. 2 の結果より低かった。

2) 70%エタノール画分のペプチドあるいは遊離アミノ酸量とラジカル消去活性との相関性

70%エタノール可溶性画分中の主要な成分としてペプチドと遊離アミノ酸が考えられた。そこで各種チーズの70%エタノール画分中に含まれるペプチド量を調べ、そのペプチド量と抗酸化活性との相関性について検討した。その結果を Fig. 5 に示した。ペプチド量が最も多かったチーズはジロ（3.9mg/ml）とシャウルス（3.8mg/ml）およびマリーハレル（3.4mg/ml）であり、次いでボカージュ（3.1mg/ml）、ブリー・ド・モーおよびプレジデントであった。国産の3種類のチーズはいずれも低かった。これらペプチド量と DPPH ラジカル消去活性との相関性について調べた結果、回帰式： $y = 24.96x-27.933$ 、相関係数： $r = 0.8922$ で表せる非常に高い相関性が認められた。すなわち、ペプチドが多いチーズは高い抗酸化活性を有することが知られた。

チーズの70%エタノール画分中に含まれる総遊離アミノ酸量を調べ、その総量とラジカル消去活性との相関性について検討した。その結果を Fig. 6 に示した。遊離アミノ酸の総量（ $\mu\text{g/ml}$ ）が最も多かったチーズはボカージュ（54.0 $\mu\text{g/ml}$ ）、次いでマリーハレル（42 $\mu\text{g/ml}$ ）であった。最も少なかったチーズは国産カマンベールチーズ A と B（4 $\mu\text{g/ml}$ ）であった。これらチーズの総遊離アミノ酸量とラジカル消去活性において、高い消去活性を有するマリーハレルは総遊離アミノ酸量も多かったが、消去活性の高かったジロとシャウルスの総遊離アミノ酸量は必ずしも多くなかった。また、総遊離アミノ酸量が多かったボカージュの消去活性は必ずしも高くなかった。すなわち、チーズ中の遊離アミノ酸量とラジカル消去活性との相関性はペプチドのそれより低いことが示された（回帰式： $y = 0.6478x+19.336$ 、相関係数： $r = 0.5097$ ）。

3) 活性成分抽出におよぼす抽出 pH の影響

ラジカル消去活性が中程度であったブリー・ド・モーとシャウルスを用いて、活性画分抽出におよぼす抽出 pH の影響（pH3.0、4.5、6.0 および 7.5）について調べ、その結果を Fig. 7 に示した。その結果、抽出 pH に大きな影響は認められなかった。従って、いずれのチーズでもラジカル消去成分は pH に影響なく抽出される化合物であると考えられた。そこで本実験では pH6.0 で抽出した試料を以下用いることとした。

4) Sep-Pak カートリッジによる活性成分の分画

マリーハレル、ジロ、ボカージュおよびプレジデントの抽出液を用いてセパック C 18 カートリッジによる活性画分の分離を試み、その結果を Fig. 8 に示した。その結果、いずれのチーズにおいても未吸着および吸着両画分に活性が認められ、またいずれのチーズにおいても未吸着画分がより高い活性を示した。この結果は、チーズには吸着と未吸着に存在するラジカル消去物質が少なくとも 2 種類以上存在することを示した。そこで活性の高かったマリーハレルの未吸着画分を用いて、幾つか性質を調べた。

まず、100℃、30 分あるいは 121℃、10 分 (オートクレーブ) による加熱の影響について調べた (Fig. 9)。その結果、活性は加熱による影響は認められず、ラジカル消去活性成分は加熱により活性が低下する成分ではないものと考えられた。同サンプルをスーパーデックスペプチドによりゲル濾過を行い、分子量の推定を試みた。その結果 (Fig. 10)、活性成分は 2 箇所 (フラクション 19、20 と 27、28) に認められ、前者は分子量 1,350 以下、後者は 280 以下の成分と考えられた。

3. カマンベールチーズからの活性成分の分離・精製

活性の高かったマリーハレルを材料に活性成分の分離精製を行い、その成分について検討した。

1) 分離・精製

① マリーハレルチーズの 70%エタノール画分およびエタノール粗画分の調製

DPPH ラジカル消去活性が高かったマリーハレルチーズ 550g に高純度蒸留水 1,100ml を加え、ストマッカー (オルガノ株式会社 ストマッカー 400-T) を用いて 15 分間破碎した。破碎後、さらにポリトロンを用い 1 分間、低温下で破碎・抽出を行ない、0.1M NaOH を用いて pH を 6.0 に調製したものをチーズスラリーとした。このチーズスラリーを遠心分離 (8,000rpm、4℃、30 分) し、脂質および不溶物を除去後、上清を脱脂綿により全量濾過した。得られた濾液はその 3 容量 (1,020ml) に対してエタノールを 7 容量の割合で混合し、4℃で一晩静置した。静置後、遠心分離 (8,000rpm、4℃、30 分) にて不溶物を除去し、得られた上清を 70% エタノール可溶性画分とした。

② ダイアイオン HP20 (三菱化学) カラムを用いたカラムクロマトグラフィーによる活性画分の分離

70%エタノール画分全量をエバポレーターにより乾固し (38.436g)、高純度蒸留水 1,000ml に溶解させた。溶解後、不溶物を遠心分離 (8,000rpm、4℃、30 分) により除去し、上清液をワットマン 113 の濾紙を用いて全量濾過した。ろ液を孔径 0.45μm、サイズ 80mm のフィルターを通過後、全量をダイアイオン HP20 を充填したカラム (Φ55mm×420mm: ベッド量: 500ml) に負荷した。負荷後、超高純度蒸留水約 4L にて洗浄し、これを未吸着画分とした。次いで 80%エタノール溶液約 4 L にて全ての吸着成分を溶出させ、これを溶出吸着画分とした。未吸着画分はそのまま全量凍結乾燥し、80 %エタノール溶出画分はエバポレーターでア

ルコール分を排除し、200ml の蒸留水を加え、それを全量凍結乾燥した。得られた各画分の凍結乾燥重量は未吸着画分 18.731 g、吸着画分 3.503 g であった。アルコール抽出画分 38.436 g から判断するとおよそ 17 g のロスが認められた。これはアルコール画分を濃縮後、蒸留水に溶解した際に生じた不溶物を除去したため、回収が低下したためと考えられた。未吸着画分は 0.05 % TFA187ml、吸着画分は蒸留水 187ml に溶解後、それぞれの活性を測定した。その結果は Fig. 11 に示した。その結果、未吸着および吸着のどちらにも活性が認められたが、未吸着画分の方が高かった。そこで、未吸着画分をさらに精製することとした。

③ COSMOSIL 5C₁₈AR- II カラムを用いた逆相 HPLC による活性画分の分離

未吸着画分 18.731g / 187ml のうち 5ml を孔径 0.2 μ m、サイズ 13mm の液クロディスクフィルターを通過後、全量を COSMOSIL 5C₁₈AR- II カラム (Φ 20mm \times 250mm) に負荷した。負荷後、0.05%TFA にて 50 分間活性成分の溶出を図り、カラム吸着成分は 100%メタノールで溶出した。なお、ポンプ流速：4.0ml/min、検出波長：220nm、検出感度：2.56AUFS でクロマトグラフィーを行った。溶出プロファイルは Fig. 12A に示した。分画は 40 分過ぎの大きなピークと、これを境にした（フラクション II および III）三つのフラクションに分けた。3 画分（I、II および III）それぞれを全量乾固後、70%エタノール 15ml を加え、DPPH ラジカル消去活性を測定し、その結果を Fig. 12B に示した。その結果、活性は II に 85 %、III に 60 % と強く認められた。そこで残りの試料を同様に操作し、最も活性の高かったピーク II を集めた。

④ COSMOSIL HILIC カラムを用いた順相 HPLC による分離 ③の COSMOSIL 5C₁₈AR- II カラムを用いた逆相 HPLC による分離で得られた活性ピーク II は全量エバポレーターで乾固し、アセトニトリル：100mM 酢酸アンモニウム = 2：1 に調製した溶媒 5ml で溶解させ、0.5ml を COSMOSIL HILIC カラムに負荷した。負荷後、同溶媒で成分の溶出を行った（流速：4ml/min、検出波長：220nm、検出感度：2.56AUFS）。その結果を Fig. 13A に示した。分画は 40 分過ぎの大きなピークと、これを境にした前後で行った（I、II、III）。それぞれを全量乾固後、15ml の 70%エタノールを加え、消去活性測定を行った。その結果を Fig. 13B に示した。その結果、活性はピーク II に認められた。そこで残りの試料を同様に操作し、活性画分 II を集めた。本ピークはクロマトグラフィー的に均一と考えられたので、本試料を用い、幾つかの性質について調べた。

2) 精製成分の性質および成分の同定

得られた精製ピークを乾固し、100 μ l の 70%エタノールに溶解させ、TLC (DC-Alufofin Kieselgel F₂₅₄) に供試した。展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水 = 6：4：1 を用いた。検出は UV 照射、5%硫酸噴霧、ニンヒドリン試薬噴霧および DPPH 溶液噴霧により行った。その結果は Fig. 14 に示した。その結果、活性成分としてシングルスポットを呈し、紫外吸収もシングルスポットとして検出された。本試料はニンヒドリン反応は認められず、従ってアミノ基を有しない成分と考えられた。また、硫酸による検出は認められなかった。UV スペクトルの結果 (Fig.

15A)、本成分は吸収極大を 230 と 270nm に認められた。しかし、NMR においてはシグナルピークが検出されなかった (データなし)。LC/MS により本試料の分子量を求めた結果 (Fig. 16)、本試料は 167.9 の分子量を提示した。溶媒に対する溶解性においては、エタノール、メタノールには非常に溶けやすく、水においても溶解性は低いことが知られた。

以上のこのような性質を有する成分の一つとして尿酸が考えられた。尿酸は分子量が 168.11、牛乳中にも存在することが知られている DPPH ラジカル消去活性成分である。そこで市販の尿酸を LC/MS および紫外吸収スペクトルを求め、本試料と比較した。その結果、紫外吸収スペクトル (Fig. 15、A、B) および尿酸の LC/MS (Fig. 16、A、B) の結果はよく一致した。次いで、HPLC によるクロマトグラフィーを行ったところ (Fig. 17)、両成分は保持時間 12 分で完全に一致し、混合した試料は単一のピークを示した。さらに、尿酸の検出キットを用いて、本試料の尿酸の検出を行った。すなわち、最終精製された物質を 0、10、15、20mg/dl となるよう蒸留水で溶解させたものを調製し、体外診断用医薬品のエスパ UA-FS (ニプロ株) を用いたウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法により測定を行った。その結果は Fig. 18 に示した。その結果、本試料は尿酸検査試薬に反応し、本成分が尿酸であることを示した。以上の結果から精製された本試料の主要成分は尿酸であることが示された。

考 察

チーズはその数 800 種類以上存在するといわれ、大きく熟成タイプと非熟成タイプの 2 種類に分類される。また、熟成タイプチーズはその硬さ、水分含量から大きく軟質、半硬質、硬質および超硬質の 4 種類に、熟成に関わる主要微生物から、乳酸菌熟成、青カビ熟成、白カビ熟成、プロピオン酸菌熟成およびリネンス菌熟成の 5 種類に分類される¹⁰⁾。今回使用したチーズはボンレベックが軟質のリネンス菌熟成タイプ、マリーハレルカマンベールが軟質の白カビ熟成タイプ、ブルーが半硬質の青カビ熟成タイプ、ゴードとマリボーが半硬質の乳酸菌熟成タイプ、エダムが硬質の乳酸菌熟成タイプ、グリエールとエメンタールが硬質のプロピオン酸菌熟成タイプ、パルミジャーノ・レッジャーノが超硬質の乳酸菌熟成タイプ、そしてモッツアレラが非熟成タイプに分類される。これらチーズから 70 %エタノール画分を調製し、DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、非熟成タイプのモッツアレラを除き、熟成タイプ全てのチーズにラジカル消去活性が認められた。その活性はチーズの種類によって異なっており、リネンス菌およびカビ熟成タイプで活性が高く、乳酸菌およびプロピオン酸菌熟成タイプでは活性が小さかった。一般に前者のチーズは熟成率が高く、後者はそれより低いことが知られていることから、活性と熟成率の相関性について調べた。その結果、両者に非常に高い相関性が認められた。

そこで、チーズのラジカル消去成分の情報を得るために、比較的活性が高く、わが国において最もよく食されている白カビチーズを用いて、いくつか実験を行った。白カビチーズには輸入カマンベールチーズ 4 種類、国産カマンベール 3 種類、その他ブリーおよびシャウルス (輸入) の

合計9種類を用いた。まず、これらチーズから70%エタノール画分を抽出し、DPPHラジカル消去活性を調べたところ、いずれの白カビチーズにも活性が認められた。しかし、国産カマンベールは非常に低かった。最も高かったのはジロとマリーハレルのカマンベールで、次いでシャウルスであった。輸入カマンベールのプレジデントとボカージュは活性が低く、ブリーも高くはなかった。また、ボカージュは熟成率が高いにも関わらずラジカル消去活性は低く、必ずしも熟成率が高いチーズの消去活性が高いとは限らないようであった。これら白カビチーズの熟成率と活性との相関性は $r = 0.5769$ で、Fig. 2の相関性より低かった。

70%エタノール可溶性画分中の主要な成分はペプチドとアミノ酸と考えられることから、同画分中のペプチド量とアミノ酸量を求め、ラジカル消去活性との相関性について調べた。その結果、遊離アミノ酸量と消去活性との相関性は低かったが、ペプチド量と消去活性は高い相関性が確認できた。また熟成率が高く、消去活性が低いボカージュはペプチド量が少なく、遊離アミノ酸が高いチーズであることが知られた。以上の結果は、白カビチーズ中のラジカル消去活性成分の一つがペプチドであることを示唆した。熟成の進行したチーズには多数の種類のカゼイン由来ペプチドが存在する。これらペプチドにDPPHラジカル消去活性を有するペプチドが存在するのかもしれない。近藤ら⁶⁾はブルーチーズから β カロテン退色法を用いた抗酸化活性測定法により抗酸化ペプチド5種類を見出した。しかし、これらペプチドはいずれもDPPHラジカル消去活性がほとんど検出されなかった。従って、チーズ中のラジカル消去活性成分はこれらペプチドと異なると考えられた。Suetuna et al.¹⁰⁾はカゼインのプロテアーゼ分解物からDPPHラジカル消去ペプチドを見出している。このことから、チーズ中にもDPPHラジカル消去ペプチドが存在すると考えられた。

そこで比較的活性の高かったマリーハレルチーズからラジカル消去活性成分を分離精製した。70%エタノール可溶性画分からダイイオンHPを用いて、活性成分の分離を行ったところ、活性は未吸着と吸着画分の両者に認められた。しかし、活性は未吸着画分においてより高いことから、未吸着画分より活性成分をODSおよびHILICによる高速液体クロマトグラフィーにより分離精製し、その構造について検討した。その結果、マリーハレルカマンベールチーズからDPPHラジカル消去活性成分の一つとして尿酸が見出された。当初チーズ中のDPPHラジカル消去成分はペプチドと予想されていたが、本実験ではペプチドは見出せなかった。DPPHラジカル消去活性はダイイオンHPにより吸着と未吸着に認められ、本研究では未吸着画分のラジカル消去活性成分を追跡した。ペプチドの活性成分は恐らくダイイオンHPの吸着画分に多く存在するものと考えられ、現在吸着画分よりDPPHラジカル消去成分を分離中である。

牛乳中には尿酸が存在していることは既に報告¹²⁾されているが、チーズ中に尿酸を見出したのは本研究が最初である。尿酸は強いラジカル消去活性があることが知られており、またLDLの酸化を抑制することが見出されている^{13,14)}。フランス人は脂肪摂取量が多いにも関わらず、心疾患による死亡率が非常に低いことが知られている(フレンチパラドックスという)。これはフランス人

が愛飲しているワイン中のポリフェノールによるLDLコレステロールの酸化抑制によるとされている。ブルーチーズなど熟成が高いチーズには抗酸化活性が高いことが認められ、また本研究の結果、熟成チーズには高いラジカル消去活性が認められた。従って、フレンチパラドックスにはワインの他にチーズに存在する抗酸化成分、ペプチドや尿酸等が関与している可能性も考えられた。最近、チーズをよく食べる国ほど心疾患死亡率が低いというデータが報告¹⁵⁾されており、チーズは抗酸化食品として優れた食品の一つなのかもしれない。

尿酸は痛風の原因成分であることが知られている。従って、健康に良いからといって、過剰の摂取は害をもたらすことは言うまでもない。しかし、チーズは数千年の昔から食されてきた食品であることから、毎日適量食べることは全く問題はなく、栄養価のみならず抗酸化食品として、そして毎日食べる食品として推奨できる食品であると考えられる。

参考文献

- 1) 細野明義編、発酵乳の科学、アイ・ケイコーポレーション、2002.
- 2) 井越敬司、乳発酵食品のタンパク質分解、ミルクサイエンス、53、1、2004.
- 3) 木村俊之ら、農産物のラジカル消去能の検索、日本食品科学工学会誌、49、257、2002.
- 4) 津志田藤二郎ら、各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定、日本食品科学工学会誌、41、611、1994.
- 5) K. Igoshi, et al., Antioxidative activity of cheese, *Milchwissenschaft*, 63, 424, 2008.
- 6) 近藤祐希ら、ブルーチーズ由来抗酸化ペプチドの同定とその抗酸化能、日本畜産学会第106回大会、講演要旨 p. 146、2006.
- 7) C. N. Kuchroo et al., Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures, *Milchwissenschaft*, 37, 331, 1982.
- 8) O. H. Lowry, et al., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 9) M. Ono, et al., Antioxidative constituents from *Tessaria integrifolia*, *Food Sci. Technol. Res.*, 6, 106, 2000.
- 10) 中江利孝、世界のチーズ要覧、1982.
- 11) K. Suetuna, et al., Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein, *J. Nutr. Biochem.*, 11, 128, 2000.
- 12) H. Ostdal, et al., Antioxidative activity of urate in bovine milk, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5588, 2000.
- 13) V. Schlotte, et al., Effect of uric acid and chemical analogues on oxidation of human low density lipoprotein in vitro, *Free Rad. Biol. Med.*, 25, 839, 1998.
- 14) S. Kopprasch, et al., Urate attenuates oxidation of native low-density lipoprotein by hypochlorite and the subsequent lipoprotein-induced respiratory burst activities of polymorphonuclear leukocytes, *Mol.*

Cell. Biochem., 206, 51, 2000.

15) 堂迫ら, チーズの栄養健康機能, 乳業技術, 55, 21, 2005.

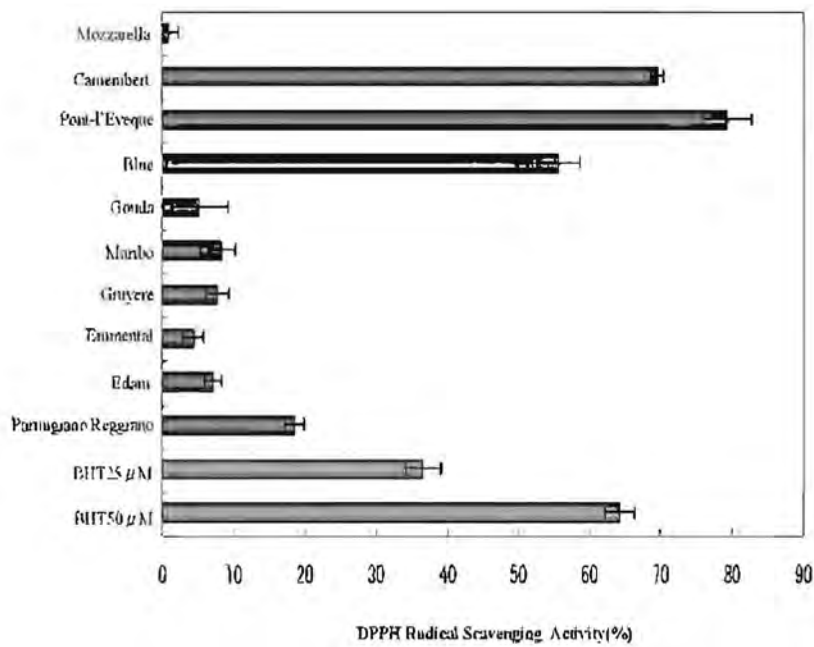


Fig. 1 各種チーズの DPPH ラジカル消去活性

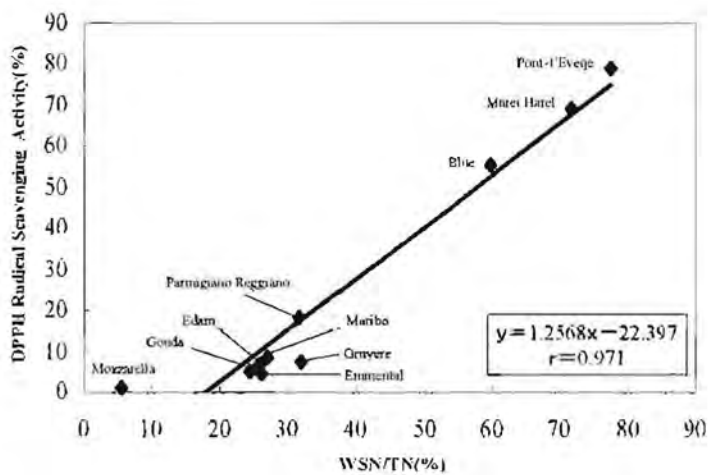


Fig. 2 各種チーズのラジカル消去活性と熟成率 (WSN/TN) の関係

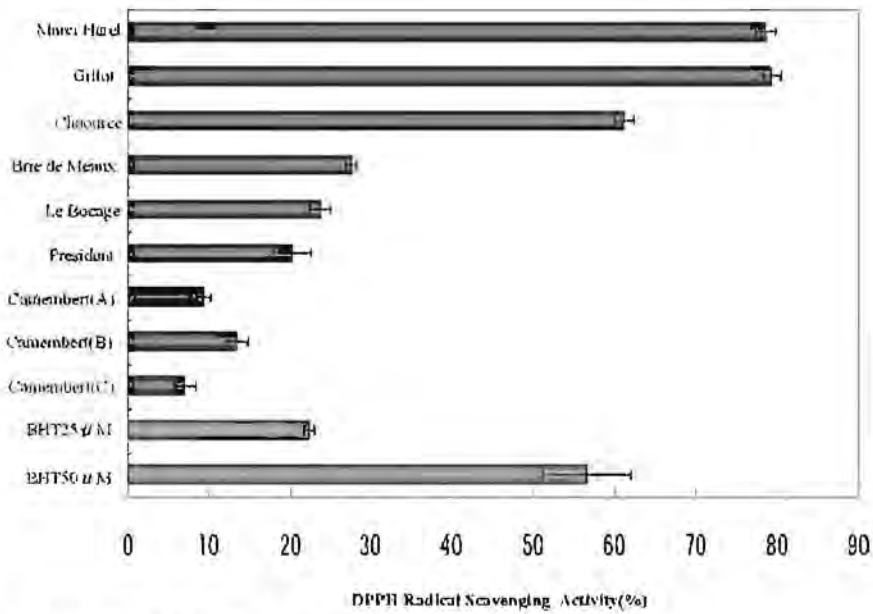


Fig. 3 白カビ系チーズのDPPHラジカル消去活性

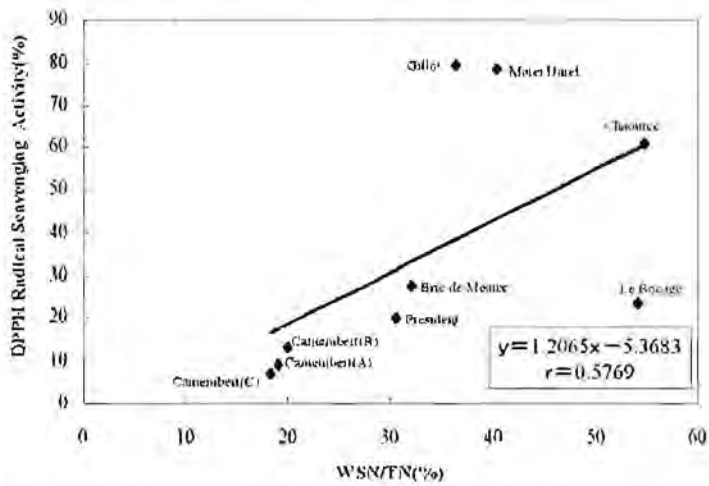


Fig. 4 白カビ系チーズのラジカル消去活性と熟成率 (WSN/TN) の関係

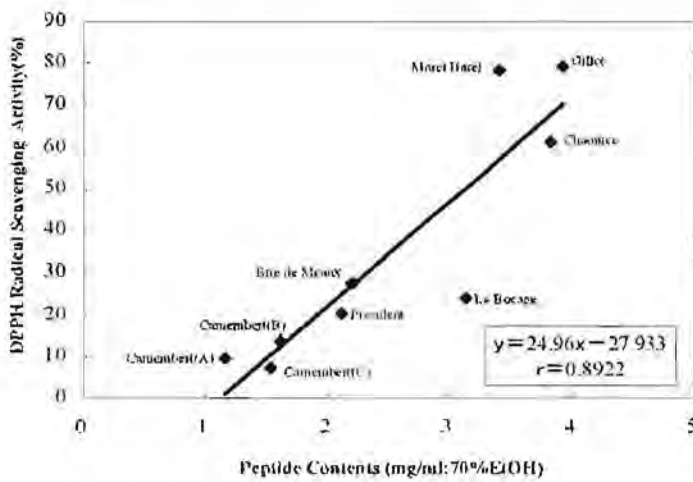


Fig. 5 白カビ系チーズのラジカル消去活性とペプチド量の関係

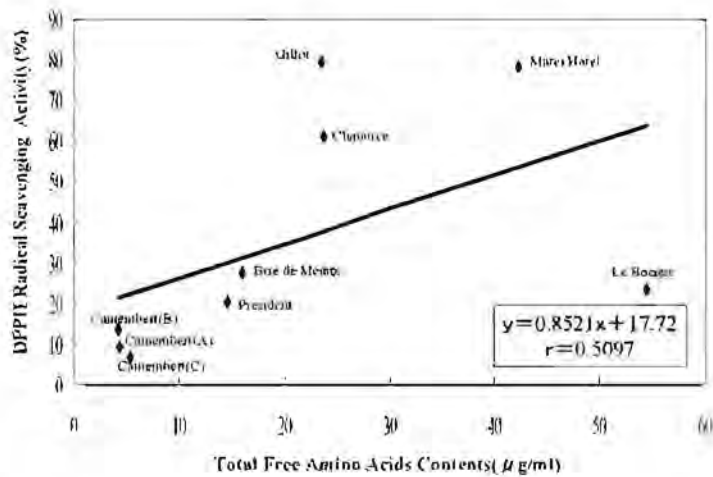


Fig. 6 白カビ系チーズのラジカル除去活性と遊離のアミノ酸との関係

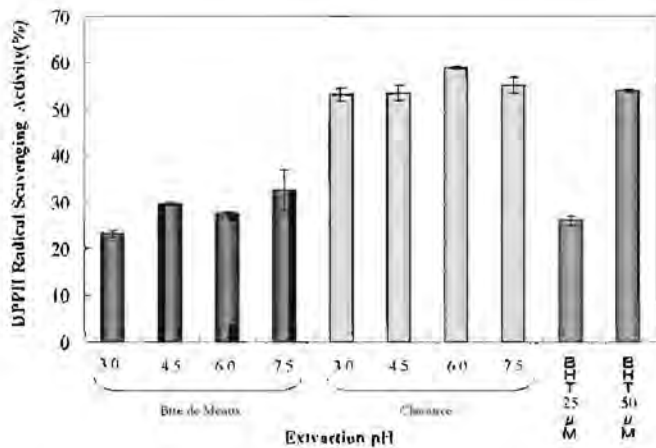


Fig. 7 活性成分抽出に及ぼす抽出 pH の影響

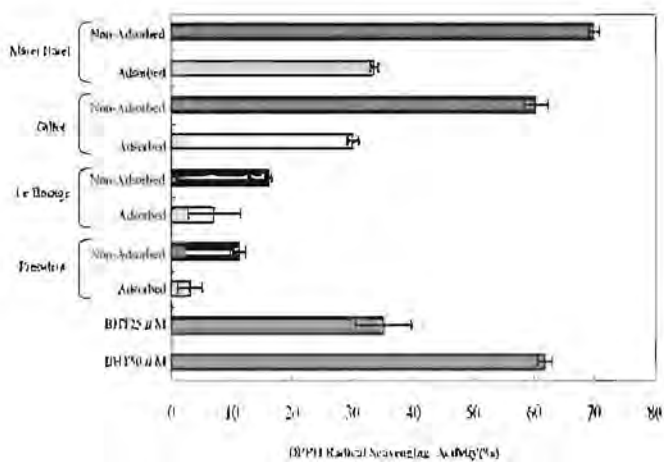


Fig. 8 Sep-Pak カートリッジによる活性成分の分離

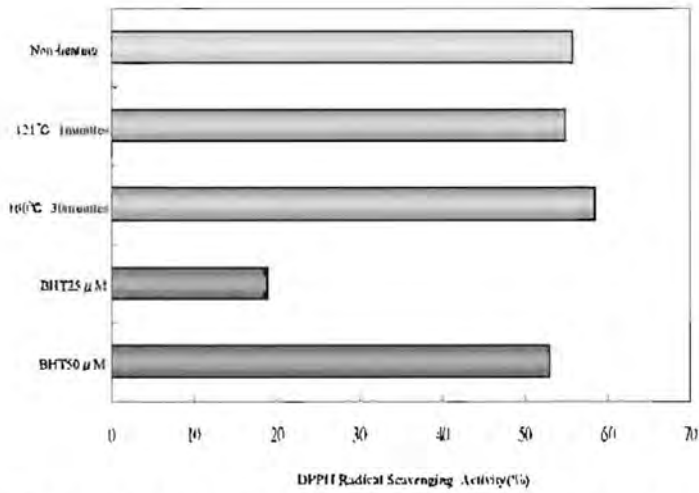


Fig. 9 活性に及ぼす Sep-Pak 未吸着面分の加熱による影響

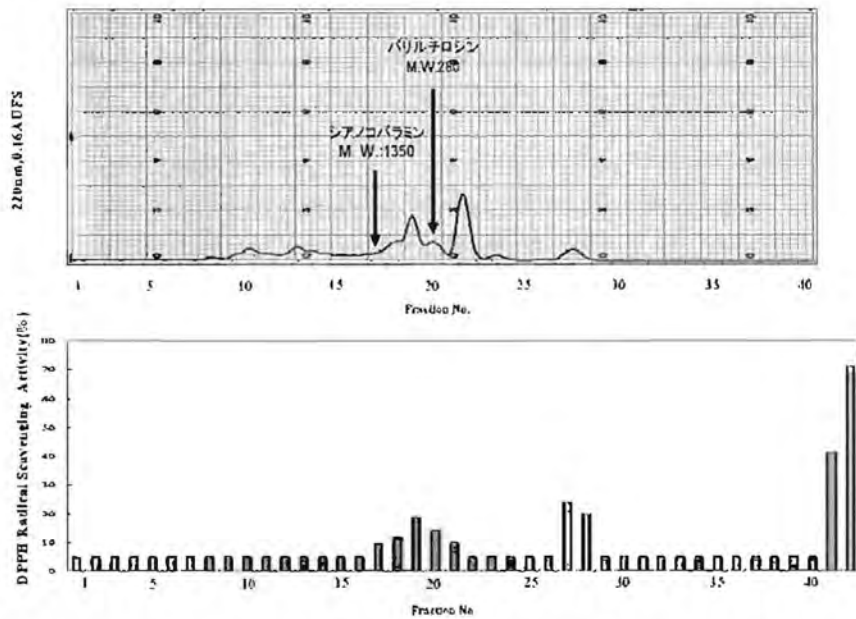


Fig. 10 Sep-Pak 未吸着のゲル透過パターン (A) 及び DPPH ラジカル消去活性 (B)

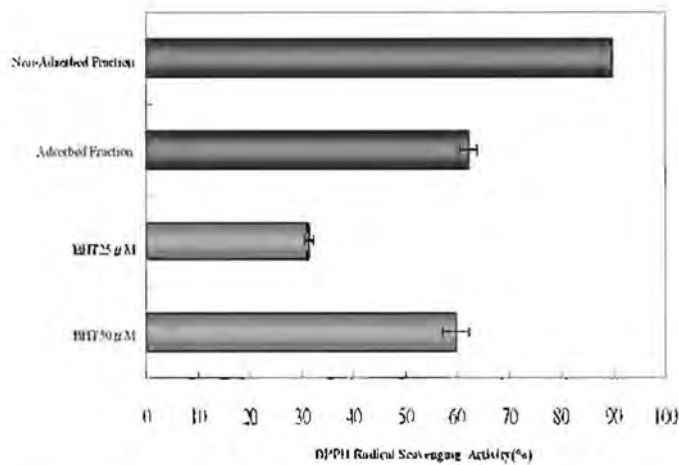


Fig. 11 ダイアイオン HP-20 カラムでの活性画分の分離

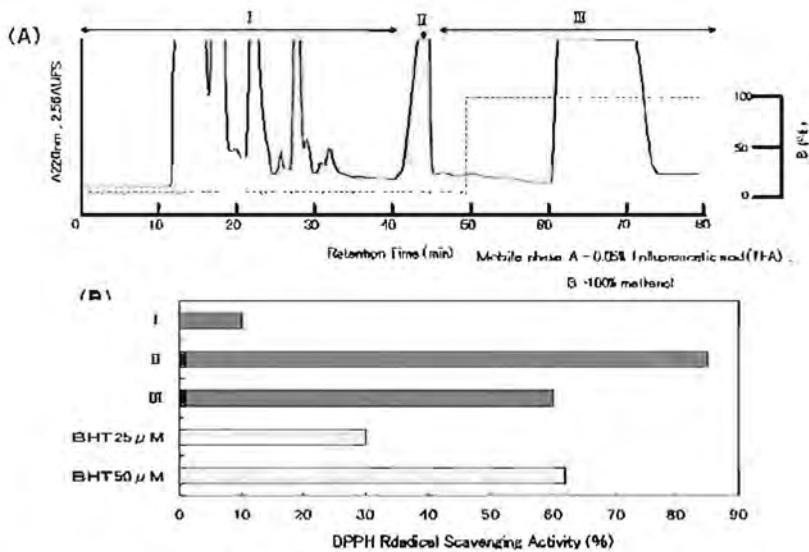


Fig. 12 未吸着画分の COSMO SIL 5C18 AR-II カラムによる分離 (A) およびラジカル消去活性測定 (B)

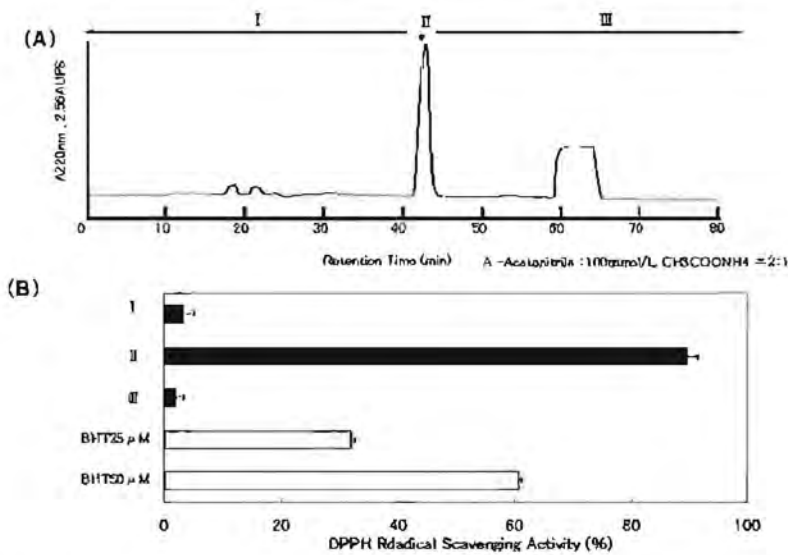


Fig. 13 COSMO SIL HILIC カラムを用いた HPLC による活性成分の分離 (A) およびラジカル消去活性測定 (B)

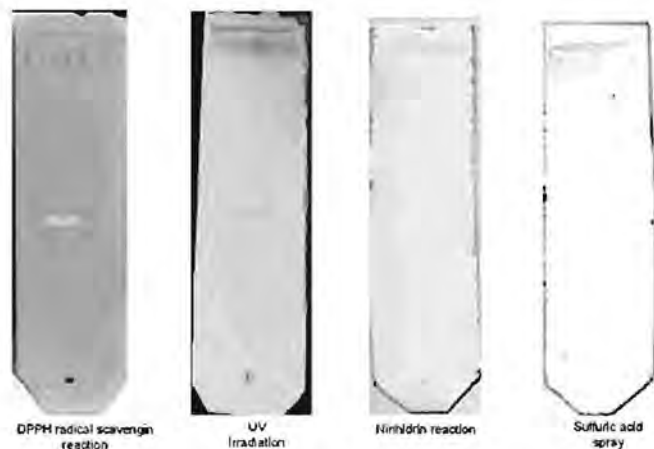


Fig. 14 精製物質の TLC 展開溶媒 (Chloroform : Methanol : H₂O=6 : 4 : 1)

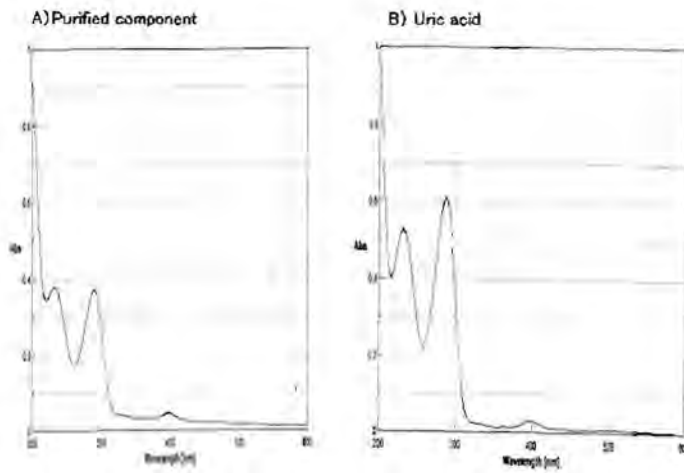


Fig. 15 精製物質 (A) と尿酸 (B) の UV スペクトル

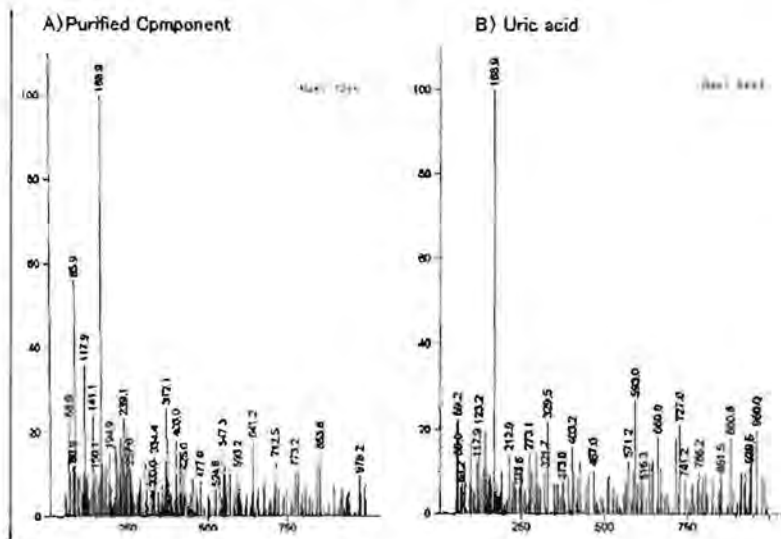


Fig. 16 精製物質 (A) と尿酸 (B) の LC/MS による分析

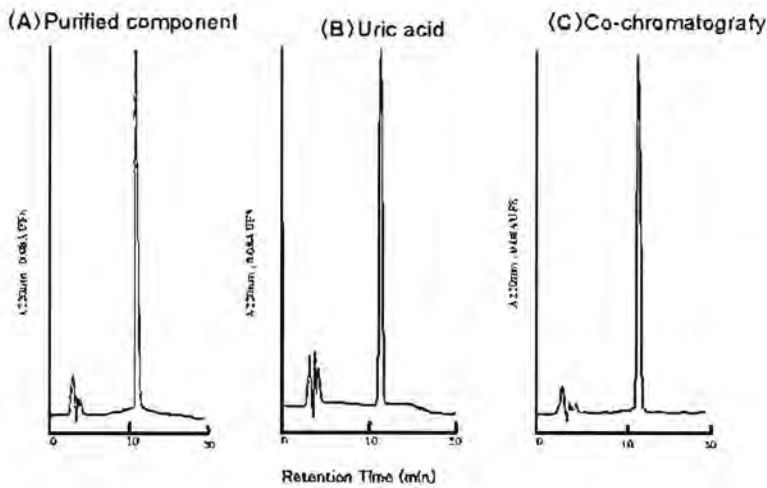


Fig. 17 精製物質 (A) と尿酸 (B) の順相 HPLC によるコクロマトグラフィー (C)
 カラム : COSMOSIL HILIC (4.6×250 mm)、流速 0.8mVmin、
 移動相 : Acetonitrile : 100mmol/L CH₃COONH₄=2 : 1

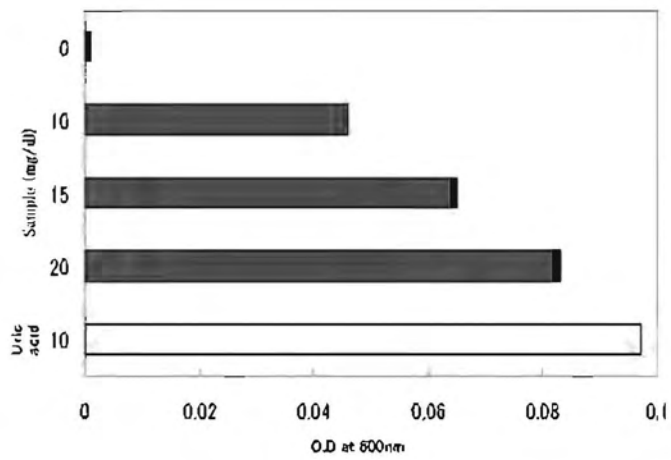


Fig. 18 精製物質のウリカーゼでの発色反応