キャピラリー電気泳動法によるゴーダチーズ熟成過程 における蛋白質分解物の分析

井澤 登*・和泉徹治*・浅川茂樹**・林 清***

Application of Capillary Electrophoresis to the Study of Proteolysis during Ripening of Gouda-type Cheese

Noboru IZAWA*, Tetsuji IZUMI*, Shigeki ASAKAWA** and Kiyoshi HAYASHI***

* Milk Production Development Research Institute, The National Federation of
Dairy Cooperative Associations, 1535 Matoba, Kawagoe 350

** Analysis Centre, The National Federation of Dairy Cooperative
Associations, 1535 Matoba, Kawagoe 350

*** National Food Research Institute, 2-1-2 Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305

Using capillary electrophoresis, protein degradation during ripening of Gouda-type cheese manufactured from fresh raw milk was studied. α_{S0} -casein (CN) and α_{S1} -CN degraded in the early stage of ripening (<28 days) so that more than 90% of these proteins were hydrolyzed by 84 day maturation. In contrast, 38, 67 and 84% of α_{S2} -CN, βA^1 -CN and βA^2 -CN remained intact, respectively. Para- κ -CN derived from κ -CN by rennet action also slightly degraded. As ripening progressed, two main casein break down products appeared. From a comparison of the α_{S0} -CN/ α_{S1} -CN ratio to that of the break down products, these were considered to be α_{S0} -I-CN and α_{S1} -I-CN (fragment 24~199 derived from α_{S0} -CN and α_{S1} -CN). High correlation coefficient between the α_{S1} -I-CN/ α_{S1} -CN ratio and the maturation period (<70 days) which is considered to be a suitable parameter to judge the maturity of cheese was observed.

(Received Jun. 23, 1997 ; Accepted Aug. 20, 1997)

チーズの風味やテクスチャーは、熟成過程において乳の主要成分である乳糖、脂質、蛋白質が乳酸菌や酵素による分解・代謝を受けることにより形成される。熟成初期におけるカゼインの分解においては、チーズカードに特有のテクスチャーを与えるとともに、呈味成分であるペプチド、アミノ酸を生ずる。また、これらの物質は乳酸菌により代謝され、さらに香気成分であるアミン化合物、サルファー化合物へと変化する。したがって、チーズ熟成中の蛋白質分解機構を詳細に解明することは、チーズ熟成工程を制御し、品質の向上を図るために不可欠であると同時に、酵素添加による促熟チーズや酵素修飾チーズ等の新技術開発のためにも必要である。

一方、LEDFOORD¹⁾以来、ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)はSDS-PAGE、等電点電気泳動などの手法の改善と相まって、現在に至るまでチーズにおける蛋白質の分解過程を研究する有効な手段として広く活用されてきた。最近では、免疫ブロット法によるカゼイン分解物の同定も報告されている²⁾。しかし、いずれの手法も染色操作が不可欠であることから、定量性に劣る点はある³⁾。熟成過程における乳蛋白質の分解を高精度で定量化できるなら、得られる情報量は飛躍的に増大する。

キャピラリー電気泳動(CE)⁴⁾⁵⁾は、高速・高分離能の新しい分析手法として、分析化学の分野において活用さ

* 全国酪農業協同組合連合会乳業開発研究所 (〒350 埼玉県川越市の場 1535)

** 全国酪農業協同組合連合会分析センター (〒350 埼玉県川越市の場 1535)

*** 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

れているが、乳業分野における応用例は限られている⁶⁾⁷⁾。最近、プラスミンおよびキモシンによるカゼインの分解パターンが報告されたが⁸⁾、チーズ熟成過程における乳蛋白質の分解過程を追跡、解析した例はない。本研究は、チーズの熟成における蛋白質の分解をCEを用いて定量的に解析することを目的とした。その結果、カゼインの遺伝的変異体を含む8種の乳蛋白質およびその分解物の消長から、いくつかの新しい知見を得たので報告する。

実験方法

1. 供試チーズの製造

栃木県那須地方の酪農家から集荷したバルク乳を原料乳とし、全国酪農業協同組合連合会乳業開発研究所内のチーズプラントにおいて、1個あたり260±10gのミニタイプゴーダチーズを製造した。

65℃・30分間の殺菌処理を行った原料乳100kgに対し、脱脂乳培地で前培養をしたスターター(LD-Culture CH-N 01, クリスタンハンセン社製)1kg、塩化Ca 20gを加え30℃で30分間保持した。これに、2.9kgのレンネット(HA-LA レンネットパウダー, クリスタンハンセン社製)を加え、45分間静置した後にカッティングを行った。以下、定法に従いクッキング、モールドリング、プレスを行った。プレス後直ちに5℃の冷水中で冷却した後に、5時間ブライン浸漬(18~19°Be')した。48時間乾燥した後にワックスコーティングを行い、13℃で3週間、以降は10℃で熟成した。実験はチーズ2ロット分について行い、結果はすべて2回分析した平均値で表示した。

2. 試料の調製

2個のチーズを無作為に抽出し、各々を二等分に切断し、それぞれの1/2断片を粉碎し調製した粉碎混合物から試料として1gを採取した。この試料に50mMグリシルフェニルアラニン水溶液100μlを内標として加え、6M尿素と0.3% (w/v) ジチオスライトール(DTT)を含有する5mMリン酸緩衝液pH 7.7の10mlに混合した。超音波処理により溶解し、遠心分離(2000×g, 10分間)で脱脂した試料をCE分析に供した。生乳は脱脂した後に凍結乾燥し、その0.3gを同様に処理した。

3. CE分析

キャピラリー電気泳動装置はCAPI 3000(大塚電子(株)製)を用いた。泳動用バッファーは6M尿素、0.05% (w/v) ハイドロキシプロピルメチルセルロース、5mMリン酸緩衝液、pH 2.5~3.5を用いた。分離電圧は

18kV、検出は220nmで行った。

キャピラリー(φ0.75mm×30cm)はシリカコーティングキャピラリー(ジューエルサイエンス(株))を以下の方法でコーティング処理したものを用いた。

シリカコーティングキャピラリーの内部を3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシランで満たし、35℃で12時間放置した後にメタノール、蒸留水で洗浄した。続いて、アクリルアミド1.05gを蒸留水25mlに溶解し、これに0.4% (w/v) 過硫酸アンモニウム溶液5ml, TEMED 30μlを加えたものを180分間吸引脱気したのち、蒸留水で洗浄しCEに用いた。

α-ラクトアルブミン、β-ラクトグロブリン(遺伝的変異体A, B混合)、α-カゼイン、κ-カゼインおよびβ-カゼインはシグマ社から購入した。また、パラκ-カゼインのピークは、κ-カゼインのレンネット分解物の分析結果から確認した。

実験結果および考察

1. CEによる乳蛋白質の分離

乳蛋白質の分離条件を検討するため、分離電圧を18kVに固定し、pH 2.5~3.5の範囲で生乳のCE分析を行った(Fig. 1)。pH 3.0以上では比較的低電流(~80μA)での分離が可能であったが、電気浸透流⁹⁾の影響と推定されるテーリングが発生し、ピークがブロードとなった(Fig. 1-a)。pHの低下とともに分離は良好になり、pH 2.5においてα-ラクトアルブミン(α-La)、β-ラクトグロブリン(β-Lg)、α₂-カゼイン(CN)、α_{s1}-CN、α_{s0}-CN、κ-CN、β A¹-CNおよびβ A²-CNが完全に分離された(Fig. 1-b)。このpH域での電気浸透流は無視できるものと考えられる。なお、このときの電流値は120~130μA(2.2~2.3W)で、機器の上限電力に近いことから、本バッファー系での分離電圧は18kVが限界であった。これらのことから、以後の分析条件は、バッファーpH 2.5、分離電圧18kVとした。

標準試料として用いたβ-Lgは、遺伝的変異体A, Bの混合物であったが、両者は分離されずに単一のピークとして検出された。低pH域(2.5~3.5)においては、これらの遺伝的変異体は分離されないことが報告されている⁷⁾。また、α-カゼインはα_{s0}-, α_{s1}-, α_{s2}-CNの3種類のピーク、β-カゼインはβ A¹-, β A²-CNの2種のピークに分離し、KANNINGら⁷⁾、RECIOら⁸⁾の報告と一致した。

2. チーズ熟成過程における乳蛋白質の分解

熟成0, 28, 56および84日目のチーズのフェログラムをFig. 2に示した。ホエー蛋白質のα-La, β-Lgはカー

Fig. 1 Electropherograms of whole protein obtained from raw bovine milk at (a) pH 3.5 and (b) pH 2.5 by capillary electrophoresis

α -La, α -lactalbumin; β -Lg, β -lactoglobulin; κ , κ -casein; α_{s2} , α_{s2} -casein; α_{s1} , α_{s1} -casein; α_{s0} , α_{s0} -casein; βA^1 , βA^1 -casein; βA^2 , βA^2 -casein.

ド製造工程においてホエーとともにカード外に排出されるが、その一部分はカード中に残存した (Fig. 2-a). 熟成中これらのピークに変化は認められなかった (Fig. 2-a~d). ホエー蛋白質は、チーズ中の各種プロテアーゼの作用に対して抵抗性をもつことが報告されている³⁾. 凝乳工程において、キモシンにより分解される κ -CN も大部分が消失し、 κ -CN の 1~105 フラグメントであるパラ κ -CN が生じた (Fig. 2-a).

熟成過程におけるカゼインの残存率を Fig. 3 に示した. 84 日後の残存率は α_{s1} -CN, α_{s0} -CN では 10% 以下, α_{s2} -CN, βA^1 -CN および βA^2 -CN ではそれぞれ 38, 67, 84% で, α_s -CN は β -CN よりも速やかに分解された. ゴータチーズをはじめとする多くの硬質チーズでは、主に α_s -CN が分解されることは広く知られている³⁾. パラ κ -CN は熟成中分解されないとされているが³⁾, 84 日間の熟成中には 9% が分解された.

α_{s1} -CN はキモシン感受性であるため熟成の早い段階で分解されることはすでに報告されているが³⁾, α_{s2} -CN の変化については不明な点が多い³⁾. 両者の熟成

Fig. 2 Electropherograms of proteins fractionated from cheese at various stages of ripening: (a) 0, (b) 28, (c) 56 and (d) 84 days

GF, Glycylphenylalanine (internal standard substance); $p\kappa$, para- κ -casein; others are same as in Fig. 1.

28 日目の残存率を比較すると α_{s1} -CN は 28%, α_{s2} -CN は 54% で、熟成初期における α_{s2} -CN の分解速度は明らかに α_{s1} -CN よりも小さかった. これは α_{s2} -CN がキモシン耐性³⁾ であるためと考えられる. 反面, α_{s2} -CN はリジン残基に富むため、プラスミンをはじめとするミルクプロテアーゼの作用を受けやすいとされており¹⁰⁾, 両者の分解速度の相違はこれらの酵素に対する感受性の相違を反映した結果と考えられる.

α_{s0} -CN と α_{s1} -CN は同一のアミノ酸配列をもつが、リン酸基の数がそれぞれ、9 個、8 個と異なる³⁾. 両者の分解速度は等しく (Fig. 3), この構造の違いは少なくとも

Fig. 3 Proteolysis of caseins during ripening

■, para- κ -casein; ○, βA^2 -casein; □, βA^1 -casein; ●, α_{s2} -casein; ▲, α_{s1} -casein; △, α_{s0} -casein. Peak area of each casein before ripening (0 d) was defined as 100%.

一次分解において影響を与えないものと考えられる。

βA^1 -CN, βA^2 -CN の分解速度が異なることは酵素化学的に興味深い。両者は遺伝的変異体で, βA^1 -CN の His⁶⁷ が βA^2 -CN では Pro⁶⁷ に置換されている¹¹⁾。これまで, X-His⁶⁷/Pro⁶⁷, 或いは His⁶⁷/Pro⁶⁷-X を末端にもつ生成物は報告されていない。β-CN に由来する既知のペプチドは, キモシン分解物の β-I (1~189/192), β-II (1~165/167), β-III (1~139) あるいはミルクプロテアーゼ (おもにプラスミン) 分解物である γ_1 (29~209), γ_2 (106~209), γ_3 (108~208)³⁾ であるが, これらの切断点はいずれも His⁶⁷ あるいは Pro⁶⁷ から離れた位置にあるにもかかわらずこのように分解速度が異なる原因としては βA^1 -CN, βA^2 -CN の立体構造中で, His⁶⁷ と Pro⁶⁷ が酵素活性に影響を及ぼす位置にあることが示唆される。

熟成が進むにつれて, フェログラム中にはカゼインの分解生成物と考えられる 10 種あまりのピークが観察された (Fig. 2 a~d)。Fig. 4 にその中でも生成量の多い P_1 および P_2 の消長を示した。

P_1 は熟成当初 (0 日) から存在し, その後の消長は α_{s1} -CN のそれと連動している。すなわち, α_{s1} -CN が急速に分解される熟成初期における生成量が多く (0~14 日), α_{s1} -CN の分解速度が小さくなるにしたがって増加速度も小さくなり (14~56 日), α_{s1} -CN の 80% 以上が

Fig. 4 Time course of the main casein breakdown products during ripening

■, $P_1(\alpha_{s1}\text{-I-casein})$; ●, $P_2(\alpha_{s0}\text{-I-casein})$.

分解された 56 日以降は減少に転じた。これらのことは, P_1 がキモシンの作用によって α_{s1} -CN から生成するペプチドであり, 熟成中にさらに低分子化されていることを示唆する。 α_{s1} -CN は Phe²³-Phe²⁴ でキモシンの作用によって, α_{s1} -I-CN (24~199 フラグメント) を生成する³⁾。 α_{s1} -I-CN は多くのチーズにおいて熟成初期から観察される主要な生成物で, 熟成が進むとさらに低分子化されることが報告されており³⁾¹²⁾, 上述した P_1 の挙動と一致する。さらに Recio ら⁶⁾ は, カゼインのキモシン分解物の CE 分析を行い, βA^2 -CN の直後に検出されるピークを α_{s1} -I-CN と同定していることから, P_1 は α_{s1} -I-CN であると推定される。Fig. 5 に α_{s1} -CN と α_{s1} -I-CN の一次構造を模式図で示した。

もう一方の生成物 P_2 は熟成中 P_1 と同様の消長を示し, P_1 の P_2 に対する比 (以下 P_1/P_2 比と略す) は常に 2.9~3.9 の範囲にあった (Fig. 4)。これは, α_{s1} -CN/ α_{s0} -CN 比の 2.8~3.9 とほぼ等しく, P_2 が P_1 (α_{s1} -I-CN) に相当する α_{s0} -CN 由来のペプチド (α_{s0} -I-CN) であることを示唆する。ところで, CE において α_{s0} -CN と α_{s1} -CN が分離されるのは, それぞれに含まれるリン酸基の数の差によるもので, α_{s1} -CN よりも 1 個多い 9 個のリン酸基をもつ α_{s0} -CN³⁾¹³⁾ は, 大きな分子量と負電荷を帯びるために移動度が小さくなる。これらのリン酸基は, すべてキモシン作用点の Phe²³-Phe²⁴ の C-末端側に位置しており¹³⁾ (Fig. 5), α_{s0} -CN から 24~199 フラグメント (α_{s0} -I-CN) が生成すると仮定すれば, その移動度もまた α_{s1} -I-CN よりも小さくなるはずである。事

Fig. 5 Schematic diagram of α_{s1} - and α_{s1} -I-casein

α_{s1} -casein was hydrolyzed by chymosin at the Phe²³-Phe²⁴ bond, giving rise to α_{s1} -I-casein^{3) 6)}. Location of the phosphoric acid groups¹³⁾ was indicated with "P"

実、 P_2 の移動度は P_1 (α_{s1} -I-CN) よりも小さい (Fig. 2). 前述の RECIO ら⁵⁾ も P_2 に相当する生成物を認め、これを α_{s1} -CN 由来の生成物と推定したが、上述した知見から P_2 は α_{s0} -I-CN であると推定される。

チーズの熟成度の判定指標として、これまで水溶性窒素含量、トリクロロ酢酸 (TCA) 可溶性窒素含量あるいはスルフォサリチル酸 (SSA) 可溶性窒素含量を定量する方法が一般に用いられてきたが、抽出効率に起因する誤差が生じるのが欠点であった¹⁴⁾。CE 分析では特別な抽出操作を必要とせず、また、分離された分子種間の量比は試料注入量や検出感度の影響を受けない。そこで、分離された種々の分子種の量比と熟成日数との関係を調べた。その結果、Fig. 6 に示すとおり、熟成 0~70 日目の間において、 α_{s1} -I-CN/ α_{s1} -CN 比と熟成日数との間に高い相関 ($r=0.988$) が認められ、 α_{s1} -I-CN/ α_{s1} -CN 比が熟成終期を除いて、熟成度の判定指標となり得ることが示された。なお、熟成 84 日目のデータは明らかに回帰から外れるため、これを除外したデータから求めた回帰直線を示した。 P_2 が α_{s0} -CN に由来する α_{s0} -I-CN であると推定されることは前述したが、このことは、 P_2/α_{s0} -CN 比がこの回帰直線上にあることから示唆される。なお、熟成 56 日目のデータが大きく回帰から外れるが、これは、この時の P_2 含有量の測定値が、その前後に比較して高かったためと考えられる (Fig. 4)。また、熟成 84 日目には α_{s0} -CN 自体が分解消失したために P_2/α_{s0} -CN 比は得られなかった。

測定精度を確保するためには常に一定量以上が存在する分子種を分析対象とするのが望ましいが、熟成終期における α_{s1} -CN の残存量は 9% に過ぎず、このことが熟成 84 日目のデータが回帰直線から外れた一因と考えられる。 β -CN は α_{s1} -CN よりも穏やかに分解され、熟成終期まで相当量が残存したことから、 β -CN とその分解生

Fig. 6 Correlation between the α_{s1} -I-CN/ α_{s1} -CN ($\square$) and P_2/α_{s0} -CN ($\circ$) ratios and the maturation period

The indicated regression line was calculated on the basis of the data of α_{s1} -I-CN/ α_{s1} -CN ratio excluding the data at 84 d.

成物である γ -CN の量比が、熟成期間の全般にわたって有効な指標となることも予測され、 γ -CN の同定が今後の検討課題である。

要 約

新鮮な生乳からゴーダチーズを製造し、その熟成中の蛋白質分解過程を、キャピラリー電気泳動 (CE) を用いて分析し、以下の知見を得た。

(1) α_{s1} -カゼイン (CN)、 α_{s0} -CN は熟成初期 (0~28 日) に速やかに分解され、熟成 84 日後には 90% 以上が消失した。これに対して、 α_{s2} -CN、 β A¹-CN および β A²-CN の分解速度は小さく、それぞれ 38, 67, 84% が残存した。レンネットの作用で κ -カゼインから生じたパラ κ -カゼインもわずかに分解され、84 日後の残存率は 90% であった。

(2) 熟成が進むにつれて、カゼイン分解生成物と考えられる 10 種あまりのピークが観察されたが、これらの内の 2 種は、 α_{s1} -CN の α_{s0} -CN に対する比 (α_{s1} -CN/ α_{s0} -CN) との比較から、 α_{s1} -CN、 α_{s0} -CN の 24~199 フラグメントである α_{s1} -I-CN、 α_{s0} -I-CN であると考察された。

(3) α_{s1} -I-CN の α_{s1} -CN に対する比 (α_{s1} -I-CN/ α_{s1} -CN) は 70 日目まで熟成日数と高い相関 ($r=0.988$) を示し、チーズ熟成度の判定指標として有効であること

が示された。

文 献

- 1) LEDFORD, R.A., O'SULLIVAN, A.C. and NATH, K.R. : *J. Dairy Sci.*, **49**, 1098 (1966).
- 2) ADDEO, F., GARRO, G., INTORCIA, N. and CHIANESE, L. : *J. Dairy Res.*, **62**, 297 (1995).
- 3) GRAPPIN, R., RANK, T.C. and OLSON, N.F. : *J. Dairy Sci.*, **68**, 531 (1985).
- 4) GORDON, M.J., HUANG, X., PENTONEY, S.L. and ZARE, R.N. : *Science*, **242**, 224 (1988).
- 5) RANDY, M.M. : *Anal. Chem.*, **21**, 2322 (1988).
- 6) RECIO, I., MOLINA, E., RAMOS, M. and De FRUTOS, M. : *Electrophoresis*, **16**, 654 (1995).
- 7) KANNING, M., CASELLA, M. and OLIEMAN, C. : *LC GC International*, **6**, 701 (1993).
- 8) RECIO, I., AMIGO, L., RAMOS, M. and LOPEZ-FANDIÑO, R. : *J. Dairy Res.*, **64**, 221 (1997).
- 9) 宋 項光・長岡 利・金丸義敬・葛谷泰雄 : 日食工誌, **40**, 287 (1993).
- 10) Le BARS, D. and GRIPON, J.C. : *J. Dairy Res.*, **56**, 817 (1989).
- 11) JAKOB, E. : *Mljelarstvo*, **44**, 197 (1994).
- 12) MCSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F., HEALY, A. and HØJRUP, P. : *J. Dairy Res.*, **60**, 401 (1993).
- 13) 中澤勇二・細野明義 : 新説チーズ科学 (食品資材研究会, 東京), p. 47 (1989).
- 14) FOX, P.F. : *Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology*, 2nd ed. (Chapman and Hall pub., London), 1, p. 341 (1993).

(平成9年6月23日受付, 平成9年8月20日受理)