山羊乳ラクトペルオキシダーゼの 簡易迅速精製

小林正枝*・新本洋士**・津志田藤二郎**
徳田節子*

Simple Purification of Lactoperoxidase from Goat Milk

Masae KOBAYASHI*, Hiroshi SHINMOTO**,
Tojiro TSUSHIDA** and Setsuko TOKUDA*

* Faculty of Education, Shinshu University, 6-Ro,
Nishinagano, Nagano-shi 380-0871

** National Food Research Institute, The Ministry of
Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-2 Kannondai,
Tsukuba-shi 305-8642

Lactoperoxidase was purified from goat milk whey by one-step cation-exchange chromatography. The purified lactoperoxidase yielded a single protein band corresponding to a molecular weight of about 80 kDa by SDS-PAGE analysis. Analysis of heat stability showed that treatments of goat milk at high temperatures completely inactivated goat lactoperoxidase.

(Received Jun. 10, 1998 ; Accepted Oct. 2, 1998)

山羊乳および山羊乳加工品の需要は、世界的には少ない。米国には多くの生産加工業者があり、年間2万トン以上の山羊乳が生産され、600トン以上の山羊乳チーズが商業生産されている¹⁾。これに対し、わが国の山羊乳は農家における自家消費がほとんどと考えられ、わずかに地域的な生産が行われている程度である。このような中で、各地の特産品として山羊乳やその加工品の製造販売が試みられており、山羊乳の高度利用のための基礎的な知見の集積が求められている。

山羊乳には牛乳同様にラクトペルオキシダーゼ (LPO) が含まれている²⁾。LPO は乳中に含まれる分子量 78 kDa の酵素である。人乳中にはごく微量しか含まれていないが、牛乳中には約 30~100 ppm 含まれており、生乳、あるいはチーズホエーから牛乳 LPO が分離精製され工業利用が進んでいる³⁾。LPO はチオシアネート存

在下で乳酸菌による発酵を調節する作用があることが知られ (LP システム⁴⁾ と呼ばれる)、牛乳 LPO を発酵調節剤として用いたヨーグルトが市販されている⁵⁾。

筆者らはこれまで、山羊乳の高度利用を目的とし、脂質代謝改善作用、抗変異原性⁶⁾ などについて検討してきた。本研究では、山羊乳チーズ製造時の副産物である山羊乳ホエーの有効利用、およびホエーから分離した山羊乳 LPO の新しい機能性を明らかにするための予備的な知見を得ることを目的とし、山羊乳 LPO の迅速な精製法および乳中の LPO の熱安定性について検討したので報告する。

1. 実験方法

(1) 山羊乳

山羊乳は長野県内の生産者より直接入手した飲用山羊乳 (ザーネン種) を用いた。乳は入手後直ちに分析を行うか、保存する場合は -30℃ で凍結保存し、37℃ の温水で急速解凍して用いた。

(2) ラクトペルオキシダーゼ活性測定

LPO 活性は ABTS 法⁷⁾、あるいはピロガロール法⁸⁾ で測定した。ABTS 法では試料 5 μ l をマイクロ ELISA プレート (住友ベークライト) に分注し、基質として 100 μ l の ABTS 溶液 (2,2'-azino-di-benzthiazoline-6-sulfonic acid 0.3 mg/ml, 0.003% 過酸化水素を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 4.0 に溶解) を添加し、直ちにプレートミキサー (岩城硝子 MPX-96, 500 rpm) で 30 秒間混和後、20℃ で 5 分間酵素反応を行った。酵素反応は 100 μ l の 1.5% シュウ酸を添加して停止させ、マイクロプレートリーダー (東ソー MPR-A 4) で 415 nm の吸光度を測定した。牛乳 LPO 精製標品 (E.C.1.11.1.7, カルビオケム社, 100 IU/mg) を、0.1% 牛血清アルブミンを含む 10 mM リン酸緩衝液で段階希釈した標準酵素標品を用いて、ABTS 法で測定した吸光度から検量線を作成し、山羊乳 LPO 活性 (IU) を算出した。ピロガロール法では試料 1 ml に 0.5% ピロガロールと 0.05% 過酸化水素を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を 20 ml 加え、20℃ で 5 分間反応させた。反応は 2 規定硫酸 2 ml を添加して停止させ、生成したプルプロガリンをエーテル抽出し、430 nm の吸光度を測定した。

(3) ラクトペルオキシダーゼの精製

生山羊乳 50 ml を 9 000 $\times$ g で 30 分間遠心し (日立冷却遠心機 18-PR-5)、浮上したクリームと沈殿とを除いた。クリームと沈殿を除いた脱脂山羊乳画分を 30℃ に

* 信州大学教育学部 (〒380-0871 長野県長野市西長野六ノロ)

** 農林水産省食品総合研究所 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

加温し、2 mg のレンネット (シグマ社, Type I) を加えよく攪拌した。混合液は 30°C で静置し、カゼインを凝固させた。カゼインを 1500×g で 15 分間遠心して沈殿させ、上清をホエー (乳清) 画分とした。ホエー画分を 0.45 μm のフィルター (ミリポア社, マイレクス HV) に通した後、この 3 ml を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した CM-トヨパール (東ソー, 1.2×2.3 cm) に負荷し、同緩衝液に塩化ナトリウムを加えた溶出液でステップワイズ溶出を行った。LPO 活性は、各画分を 0.1% 牛血清アルブミンを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 20 倍希釈して測定した。蛋白質濃度は牛免疫グロブリンを標準蛋白質とする DC プロテインアッセイ (パイオラッド社) で測定し 750 nm の吸光度で表示した。

(4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

5~20% 濃度のポリアクリルアミドグラジエントゲル (アトー社, PAGEL-NPG-520 L) を用い、還元条件下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った⁹⁾。泳動後のゲルはクーマシーブリリアントブルー G 250 で染色した。分子量マーカー蛋白質には、ファルマシア社低分子量マーカーキット (14.4 kDa~94 kDa) を用いた。

2. 結果及び考察

(1) 山羊乳からのラクトペルオキシダーゼの精製

分子篩いクロマトグラフィー、強陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー等、種々のクロマトグラフィーによる山羊乳 LPO の分画を検討した結果、以下に示す弱陽イオン交換クロマトグラフィーによって、比較的簡単な方法で山羊乳 LPO を精製できるという知見を得た。ここでは、脱塩や緩衝液交換を行っていないレンネットカゼイン除去ホエー (乳清) を、そのまま精製の出発物質として用いた。

図 1 にホエーの陽イオンクロマトグラフィーによる分画の結果を示す。蛋白質のほとんどは CM-トヨパールカラムを素通りした。素通り画分には LPO 活性はまったく検出されなかった。塩化ナトリウムのステップワイズ溶出によって吸着した蛋白質を溶出したところ、0.2 M の塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出されたフラクション 22 のごく小さな蛋白質のピークの位置に LPO 活性が溶出された。

LPO 活性溶出画分の SDS-PAGE の結果を図 2 に示す。分子量 70~90 kDa の位置に単一バンドが観察された。牛 LPO の分子量は 78 kDa であることから、このバンドに山羊乳 LPO が含まれると推定される。

LPO と類似した挙動をする塩基性乳蛋白質としてラクトフェリンが知られている¹⁰⁾。分子量も近いことか

図 1 山羊ラクトペルオキシダーゼの陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製

山羊乳レンネットホエー 3 ml を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した CM-TOYOPEARL (1.2×2.3 cm) に負荷した。同緩衝液に塩化ナトリウムを加えた溶出液でステップワイズ溶出を行い、溶出液の蛋白質含量 (■) は DC プロテインアッセイ法により、ラクトペルオキシダーゼ活性 (●) は ABTS 法により測定した。

図 2 山羊ラクトペルオキシダーゼ活性画分の電気泳動

レーン左: マーカー蛋白質, レーン右: 山羊ラクトペルオキシダーゼ活性画分 (図 1 のフラクション 22)

ら、フラクション 22 の溶出画分にラクトフェリンが混入している可能性もあるので、今後ラクトフェリンの検

表 1 陽イオン交換クロマトグラフィーによる山羊乳 LPO の収率

	蛋白質量 (mg)	LPO 比活性 (IU/mg)	全活性 (IU)	回収率 (%)
ホエー画分(3 ml)	15.4	6.8	105	100.0
CMトヨパール 画分(2 ml)	0.144	361.0	52	49.5

LPO 活性：ABTS 法。

表 2 種々の温度条件で加熱した山羊乳の LPO 活性

処 理	比活性 (%)
生山羊乳	100.0
65℃	79.1
70℃	55.2
72℃	0

5 分間保持後残存活性測定。

LPO 活性：ピロガロール法。

出法について検討したい。

表 1 に CM-トヨパール陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによる LPO 精製の要約を示す。3 ml のホエーから最終的に 144 μ g の LPO 活性を含む蛋白質が得られた。単一のカラム操作だけによる精製で、比活性はホエーの 53 倍に達した。しかしながら、山羊乳 LPO 活性の回収率は約 50% とそれほど高くはなかった。標準として用いた牛乳 LPO の活性測定時に、蛋白質を含まない緩衝液だけで試料を希釈すると、みかけの LPO 活性が低くなった。この LPO 活性の低下は、希釈液に 0.1% の牛血清アルブミンを添加することで防ぐことができた。この現象は LPO の容器等への非特異的吸着が著しいためと考えられ、カラム操作中やその後の測定操作中に試験管内壁などへ LPO が吸着して回収量が少なくなったものと推測される。このような非特異的吸着をなんらかの方法で抑制することにより、LPO の回収量を向上させることができると考えている。前述の、ラクトフェリンの混入の有無についても今後の検討課題と考えている。

実際の山羊乳チーズ製造時には、スターターとして添加した乳酸菌によって乳が弱酸性になると考えられる。したがって今後、大量に山羊チーズホエーから LPO を精製する場合には、溶出条件を若干変換させる必要があるかもしれない。

(2) 山羊乳ラクトペルオキシダーゼの熱安定性

山羊生乳を種々の温度条件で加熱処理し、LPO の残存活性を測定した。ウォーターバスで試料温度が設定温

度に達した後、5 分間温度を保持し、直ちに氷冷して活性を測定した。表 2 に示すように、72℃ の処理で LPO 活性は完全に失われた。このことは山羊乳 LPO を調製する際の、原料乳の殺菌処理工程を考える条件として重要である。

Sato ら¹¹⁾ は、牛 LPO の熱安定性に関する検討を行い、単に加熱温度のみならず、加熱時の溶液の pH およびイオン強度が牛 LPO の安定性に重要な影響を与えることを報告している。このなかで、65℃ 30 分の加熱条件では、中性 pH、イオン強度 0.01 から 0.1 の範囲の塩化カルシウム存在下で、比較的安定であることが示されている。本研究では、山羊乳をそのまま加熱処理したが、山羊乳中のカルシウム濃度は 1.2 mg/ml (30 mM)¹²⁾ と報告されており、このうち解離しているカルシウムイオン濃度は Sato らが見いだした最適加熱殺菌条件に近いかもしれない。今後、LPO 活性を最大限維持できる山羊生乳の加熱条件についてさらに詳しく検討したい。

3. 要 約

山羊乳の高度利用に資することを目的とし、山羊乳ラクトペルオキシダーゼ (LPO) の精製を試みた。レンネットホエーの陽イオン交換クロマトグラフィーによって、高活性の LPO を比較的簡単な操作で精製することができた。

参 考 文 献

- 1) HAENLEIN, G.F.: *J. Anim. Sci.*, **74**, 1173 (1996).
- 2) ZAPICO, P., GAYA, P., DE PAZ, M., NUNEZ, M. and MEDINA, M.: *J. Dairy Sci.*, **74**, 783 (1991).
- 3) 堂迫俊一: 日食工誌, **41**, 523 (1994).
- 4) REITER, B. and HARNULV, B.G.: *J. Food Prot.*, **47**, 724 (1984).
- 5) 平野了悟・平野まゆみ・大岡 実・堂迫俊一: 食科工, **44**, 877 (1997).
- 6) 小林正枝・新本洋士・津志田藤二郎・徳田節子: 日本食品科学工学会第 43 回大会講演集, p. 59, 仙台 (1996).
- 7) MAKINEN, K.K. and TENOVUO, J.: *Anal. Biochem.*, **126**, 100 (1982).
- 8) SUMMNER, J.B. and GJESSING, E.C.: *Arch. Biochem.*, **2**, 291 (1943).
- 9) LAEMMLI, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 10) FRANCIS, G.L., REGESTER, G.O. and BALLARD, F.J.: *J. Dairy Sci.*, **78**, 1209 (1995).
- 11) SATO, K., DOSAKO, S., NAKAJIMA, I. and IDO, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 2054 (1992).
- 12) 科学技術庁資源調査会編: 四訂日本食品標準成分表 (二版, 大蔵省印刷局, 東京) p. 188 (1997).

(平成 10 年 6 月 10 日受付, 平成 10 年 10 月 2 日受理)