

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580337

研究課題名（和文） 機能性チーズ創製の基盤研究—チーズの抗酸化成分の検索とその構造ならびに生物活性—

研究課題名（英文） Basic research on development of functional cheese - Antioxidant ingredients of cheese and their structure

研究代表者

井越 敬司 ( IGOSHI KEIJI )

東海大学・農学部・教授

研究者番号：80148973

研究成果の概要（和文）：

酸化ストレス軽減化チーズの開発のための基盤研究として、市販チーズの抗酸化活性およびその成分について研究した。その結果、非熟成タイプを除いた熟成チーズ全てに活性が見出された。特に、ブルー、スチルトン、エポワス、ポンレベック、カマンベールおよびブリー等のチーズに比較的高く見出された。ブルーチーズから抗酸化成分を分離・精製し、その構造を明らかにしたところ、抗酸化ペプチドとホモゲンチジン酸およびホモプロカテク酸のポリフェノールが見出された。

研究成果の概要（英文）：

Antioxidant activity and the structure of high-active ingredients in commercial cheeses were studied for development of functional cheese which can decrease oxidative stress. Antioxidant activities were observed in most of ripened cheeses, except of non-ripened cheeses. High activity was especially observed in Blue, Stilton, Époisses, Pont-1' Eveque, Camembert and Brie cheese. The antioxidant ingredients were purified and isolated from the Blue cheese, and the structure of them was clarified. Consequently, the antioxidant peptides and also the polyphenols such as the homogentisic acid and the homoprotocatechuic acid were identified from the Blue cheese.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：チーズ、機能性、抗酸化、ペプチド、ホゲンチジン酸、ホモプロトカテク酸、DPPHラジカル消去

## 1. 研究開始当初の背景

食品の三次機能の解明は、健康すなわち

予防医学の視点から食品科学分野において

現在最も重要な課題とされている。

最近、乳発酵食品である発酵乳の三次機能について精力的に研究がなされ、抗腫瘍効果、抗高血圧抑制等多くの保健・健康効果が明らかにされた。しかし、同じ乳発酵食品であるチーズ場合、三次機能に関する研究例は少なく、その生理機能についても未だ不明な部分が多い。チーズ研究は、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、チーズの風味発現および組織形成に関わる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、申請者を含め多くの研究者によって行われてきた。しかし、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、チーズにおける三次機能の視点からの研究は、ほとんどされてこなかった。そこでいまだ明らかにされていないチーズの三次機能である保健・健康効果を明らかにすることを目的に本研究は実施された。

## 2. 研究の目的

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。

そこで本研究は、現在最も注目されている抗酸化活性およびラジカル消去活性に焦点を当て、チーズにおけるこれら成分の検索とその構造およびその活性について明らかにした。次いで、チーズにおける抗酸化成分生成に関与する酵素を特定し、新規機能性抗酸化チーズ創製のための基盤的情報を得るこ

とを目的とした。

## 3. 研究の方法

チーズは市販チーズを用いた。チーズから70%エタノール可溶性画分(以下70%EtOHSE)を調製した後、これを活性測定および活性成分の精製に使用した。活性はβカロテン退色法およびDPPHラジカル消去活性を指標に行なった。ブルーチーズからの活性成分の分離・精製は、ペプチドの場合ODS-HPLCを主として用いた。また、精製されたペプチドはプロテインシークエンサーとアミノ酸組成分析によりそのアミノ酸配列を決定した。DPPHラジカル消去活性成分は、ダイアイオンHP-20クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーおよびODS-HPLCにより活性成分を精製した。また精製成分の同定は、<sup>1</sup>H-NMRおよびLC/MS/MSにより推定し、市販標品とのODS-HPLCによるコクロマトグラフィーにて同定した。

## 4. 研究成果

(1) βカロテン退色法によるチーズの抗酸化活性

### ① チーズの抗酸化活性

各種チーズのβカロテン退色法による抗酸化活性について調べた。その結果、抗酸化活性はいずれのチーズでも見出され、特にブルーチーズ等のカビ熟成タイプおよびポンレベック等のリネンス菌熟成タイプが高かった(Fig. 1)。

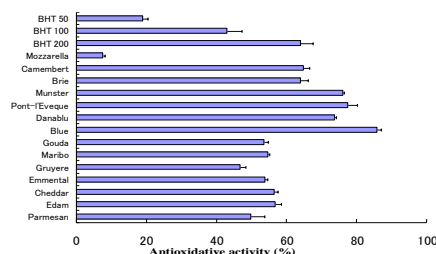


Fig.1 Antioxidative Activity of 70%EtOH Soluble Extract from Commercial Cheese

### ② ブルーチーズの抗酸化成分

高い活性が認められたブルーチーズ 70%EtOHSF から、Sep PakC18 カートリッジ、ODS-HPLC により抗酸化成分を分離し、その構造について調べた。その結果、IH、GIH、DKHY、DKIHP および PGPIH の構造を有する 5 種類の抗酸化ペプチドを見出した。これらペプチドは全て H を含むイミダゾールペプチドであった。

$\beta$  カロテン退色法では、DKIHP を除いていずれのペプチドも合成抗酸化剤の BHT やカルノシンより高く、DKHY > IH > GIH > PGPIH > DKIHP であった (Fig. 2)。この結果はロダン鉄法で測定した結果と同様であった。DPPH ラ

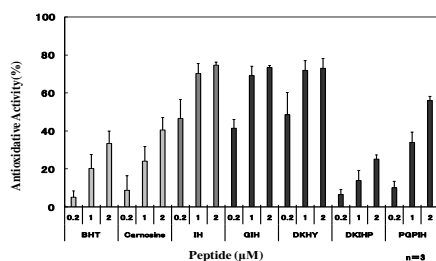


Fig. 2 Antioxidative Activity of Synthesized Peptides by  $\beta$ -Carotene Decolorization Method

ジカル消去およびスーパーオキシドラジカル消去活性はいずれのペプチドも低かった。ウサギ赤血球膜ゴーストを用いた脂質過酸化抑制効果を調べた結果、IH、GIH および DKHY において脂質過酸化抑制効果が認められ、IH および GIH の抑制効果はカルノシンよりも高いことが知られた。

### ③ *Penicillium roqueforti* の菌体外プロテアーゼ

抗酸化ペプチド生成に関わるプロテアーゼをブルーチーズのスターターである *Penicillium roqueforti* より検索した。その結果、ブルーチーズに存在するプロテアーゼと一致する酵素を *Penicillium roqueforti* の酸性培養により見出した。本酵素は培地が中性では産生されず、酸性側培地のみで生成した。本酵素の至適 pH は 5.5、至適温度は

50°Cのアスパラギン酸プロテアーゼであった。カゼインに作用させた結果、抗酸化ペプチドを生成した。

### (2) チーズの DPPH ラジカル消去活性とその成分

#### ① チーズの DPPH ラジカル消去活性

各種チーズの 70%エタノール可溶性画分の DPPH ラジカル消去活性について調べた。その結果、消去活性はゴーダ、チェダーチーズなどの乳酸菌熟成タイプ、エメンタールおよびグリュールチーズなどのプロピオン酸菌熟成タイプでは低く、ポンレベック、エボワス等のリネンス菌熟成およびカビ熟成タイプのチーズにおいて比較的高かった (Fig. 3)。

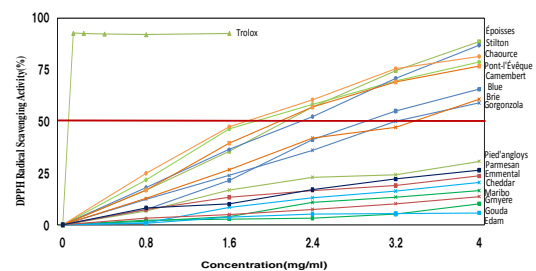


Fig. 3 DPPH Radical Scavenging Activity of 70% Et-OH Soluble Fraction Extracted from Various Cheeses

#### ② ブルーチーズの DPPH ラジカル消去成分

熟成の異なるブルーチーズの 70%EtOHSF における DPPH ラジカル消去活性は熟成とともに上昇し、この結果は本チーズの DPPH ラジカル消去活性成分が熟成中に生成されるものであることを示した。

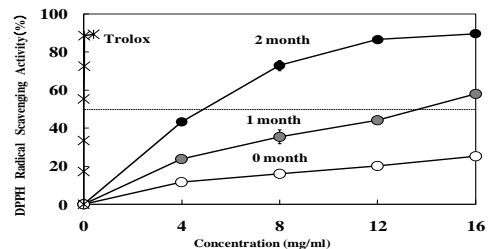


Fig. 4 DPPH Radical Scavenging Activity of 70% EtOH Soluble Fraction Extracted from Blue Cheese

各熟成ブルーチーズの 70%EtOHSF をダイアイオン HP-20 で分離したところ、活性は未吸

着と吸着画分の両者に認められ、両画分は熟成とともに活性が上昇した。両画分をそれぞれ HW-40 ゲルろ過クロマトグラフィーにより活性画分を分離したところ、熟成 0 ヶ月では活性画分はほとんど見出されなかったが、熟成 2 ヶ月では未吸着画分に 1 ヶ所、吸着画分に 2 ヶ所の活性画分が溶出した。

以上の結果から、本チーズには少なくとも分子量の異なる 3 種類の DPPH ラジカル消去活性成分が存在することが明らかとなった。

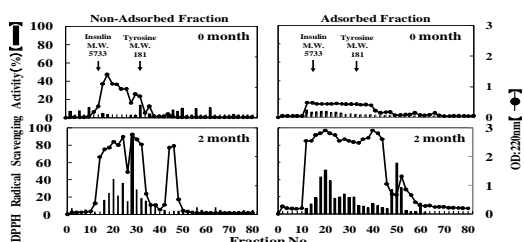


Fig. 5 TOYOPEARL HW-40F Gel Filtration of Non-Adsorbed Fractions and Adsorbed Fraction Separated by DIAION HP-20 Column  
Column: TOYOPEARL HW-40F, Flow Rate: 0.8 ml/min, Mobile Phase: 0.1% Trifluoroacetic Acid (TFA) + 30% Acetonitrile, Each Fraction: 10 ml

### ③ ブルーチーズ DIAION HP-20 吸着画分からの活性成分の分離精製およびその構造

上記②で調製された熟成 2 ヶ月ブルーチーズの DIAION HP-20 吸着画分からゲル濾過クロマトグラフィーおよび ODS-HPLC により DPPH ラジカル消去活性成分を分離・精製し、その構造を明らかにした。その結果、ホモゲンチジン酸 (HGA) およびホモプロトカテク酸 (DOPAC) が見出された (Fig. 6)。

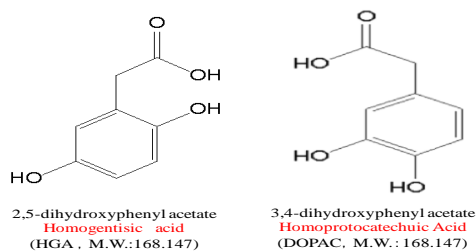


Fig. 6 Structure of Compounds Purified from Blue Cheese

市販品の HGA および DOPAC を用いて、ラジカル消去活性を既知抗酸化成分 (カテキン、Trolox, BHT) と比較した。その結果、DPPH ラジカル消去活性では、DOPAC > カテキン > HGA > Trolox > BHT、スーパーオキシドラジ

カル消去活性では HGA > カテキン > DOPAC > Trolox, BHT の順で高い活性を示し、ABTS ラジカル消去活性ではカテキン > DOPAC > BHT > HGA、β-カロテン退色法では BHT > カテキン > Trolox > DOPAC、HGA の順に活性を有していることが知られ、HGA および DOPAC は高いラジカル消去活性を有していることが示された (Table 1)。

Table 1 EC<sub>50</sub> Values of HGA and DOPAC on Five Different Antioxidant Assays

Antioxidant Assays	EC <sub>50</sub> Value (μM)				
	HGA	DOPAC	Positive Control		
			Catechin	Trolox	BHT
DPPH Radical Scavenging Assay	17.7	9.3	11.5	40.8	46.7
Superoxide Anion Radical Scavenging Activity	<0.026	0.095	0.074	0.2<	0.2<
ABTS Cation Radical Scavenging Activity	21.59	8.56	8.38	31.31	11.68
β-Carotene Decolorization Assay	9.52<	9.52<	1.59	5.49	0.323
Ferrous metal ion Chelating Assay	—	—	—	—	—

この結果は、高いラジカル消去活性成分である HGA および DOPAC を多く含むチーズは高いラジカル消去活性を示す可能性が考えられた。

HGA および DOPAC はチロシン代謝産物であることが知られている。従って、チーズ中のこれら成分は、熟成中にカゼインの分解によって生成されたチロシンから生成されたと推定された。

### (3) まとめ

酸化ストレス軽減化チーズの開発のための基盤研究として、市販チーズの抗酸化活性およびそれら成分について研究した。その結果、非熟成タイプのチーズを除き、いずれのチーズでも活性が見出された。特に、カマンベールやブルーチーズの様なカビ熟成タイプやポンレベックやエポワスチーズのようなリネンス菌熟成タイプチーズに比較的高く見出された。ブルーチーズから抗酸化成分を分離・精製し、その構造を明らかにしたところ、抗酸化ペプチドとホモゲンチジン酸お

よびホモプロカテク酸のポリフェノールが見出された。

また抗酸化ペプチドの生成には *Pen. roqueforti* のアスパラギン酸プロテアーゼの関与が示唆された。また、ブルーチーズから見出された DPPH ラジカル消去活性成分 HGA および DOPAC はチーズに抗酸化成分として見出された最初のポリフェノールである。

以上の基盤研究は、ブルーチーズに使用される *Pen. roqueforti* のプロテアーゼ等の酵素を利用した機能性（抗酸化）チーズを創製する上で貴重な情報を提供するものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Shin Yasuda, Yukio Kadokoka, Keiji Igoshi (員数9名、9番目)、Effects of highly ripened cheeses in HL-60 human leukemia cells: Antiproliferative activity and induction of apoptotic DNA damage. *Journal of Dairy Science*, **93** 1393-1400, (2010)、査読有り。

②河本 佳奈江、井越 敬司、門岡幸男、小林 弘昌、安田 伸、市販ヤギ乳チーズの過酸化水素およびスーパーオキシドアニオンラジカルに対する消去作用、東海大学紀要、**31**、31-38(2012)、査読有り。

〔学会発表〕（計 8 件）

① 井越 敬司、*Penicillium roqueforti* の菌体外プロテイナーゼの精製と性質、日本畜産学会、2010年3月28日、明治大学駿河台校舎キャンパス(東京)

② 井越 敬司、チーズのビフィズス菌増殖活性とその成分、日本酪農科学会、2010年8月20日、共立女子大学(東京)

③ 井越 敬司、ブルーチーズ中に含まれる DPPH ラジカル消去成分について、日本農芸化学西日本支部、2010年9月18日、崇城大学(熊本)

④ 井越 敬司、各種チーズの DPPH ラジカル消去活性の比較、日本農芸化学西日本支部、

2010年9月18日、崇城大学(熊本)

⑤ 井越 敬司、*Penicillium roqueforti* BS の脱脂乳培養過程におけるミルクタンパク質の分解と抗酸化活性、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部、2010年9月25日、宮崎観光ホテル(宮崎)

⑥ 井越 敬司、ブルータイプチーズ熟成中の DPPH ラジカル消去活性、熊本県産学官技術交流会実行委員会、2012年1月18日、熊本県産業技術センター

⑦ 井越 敬司、ブルーチーズ熟成中に生成される DPPH ラジカル消去成分、日本畜産学会、2012年3月29日、名古屋大学

⑧ 井越 敬司、機能性チーズ創製のための基盤研究—チーズの機能性成分—、日本畜産学会、2012年3月29日、名古屋大学

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ペプチド

発明者：井越 敬司、川上 浩、元賣 睦美  
権利者：学校法人東海大学、雪印メグミルク

種類：特許

番号：特願 2011-218853

出願年月日：2011年10月3日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：ペプチド

発明者：井越 敬司、川上 浩、元賣 睦美  
権利者：学校法人東海大学、雪印メグミルク(株)

種類：特許

番号：第 4845102 号

取得年月日：平成 23 年 10 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.ktokai-u.ac.jp/~kigoshi/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井越 敬司 (IGOSHI KEIJI )

東海大学・農学部・教授

研究者番号：80148973

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

安田 伸 (YASUDA SHIN )

東海大学・農学部・講師

研究者番号：10512923