

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450180

研究課題名(和文) ブルーチーズの抗酸化成分の構造および生物活性並びに酸化ストレス軽減化チーズの開発

研究課題名(英文) The structure and bioactivity of antioxidant ingredients from Blue cheese and development of functional cheese to decrease oxidative stress

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

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に、チーズのABTSとスーパーオキシドラジカル消去活性およびそれらの活性成分について研究した。その結果、カビ熟成および細菌表面熟成タイプチーズに比較的高い活性が認められ、ブルーチーズから4-ヒドロキシフェニル酢酸がABTSラジカル消去成分として、アデニン、イソグアニンがスーパーオキシドラジカル消去成分として見出された。

*Penicillium roqueforti*と*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*の共培養による培養酵素添加チーズは、無添加チーズに比べ熟成率および抗酸化活性(ABTS、DPPHラジカル消去活性)が共に高まった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a functional cheese that can decrease oxidative stress, the antioxidant activities of commercial cheeses and the ingredients responsible these activities were studied. A relatively high activity was observed in mold type and bacterial surface type cheeses. In Blue cheese, 4-hydroxyphenyl acetic acid was found as the ABTS radical scavenging ingredient, and adenine and isoguanine were found as superoxide radical scavenging ingredients.

The ripening rate and antioxidant activity (ABTS and DPPH radical scavenging activity) were higher in Gouda cheeses ripened with the extract obtained from the co-cultivation of *Penicillium roqueforti* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* compared with those in the Gouda cheeses ripened without the extract (control).

研究分野：農学

キーワード：チーズ 抗酸化 4-ヒドロキシフェニル酢酸 アデニン イソグアニン 機能性チーズ *Penicillium roqueforti* *Lactococcus lactis*

1. 研究開始当初の背景

チーズに関するこれまでの研究は、凝乳メカニズムや熟成に関する微生物の研究、チーズ熟成中の風味発現や組織形成に関わるタンパク質や脂肪分解に関する研究、熟成の促進化に関する研究等、チーズ製造における技術開発や食品の二次機能(風味、呈味、組織)の改善等を目的としたものが多く、チーズの健康に関わる機能性(食品の三次機能)の視点からの研究は、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の諸外国においてもほとんどされてこなかった。

そこで報告者は、まだ明確にされていないチーズの機能性を、老化や生活習慣病に關与する活性酸素やフリーラジカル等の除去をもたらす抗酸化能に着目し、チーズの抗酸化活性と活性をもたらす成分並びにその成分の生成機構について明らかにする研究に着手した。これまでにカロテン退色法や 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性測定法を用いて、熟成方法の異なる 14 種類のチーズの抗酸化能が評価され、活性はチーズの種類で異なるものの、熟成の進行したチーズおよびカビやリネンス菌で熟成させたチーズに高い活性が見出された。次いで、比較的高い活性が見出されたブルーチーズからその成分並びにその生成機構について調べられ、の活性測定法で抗酸化ペプチド、の測定法でホモゲンチジン酸(HGA)とホモプロトカテク酸(DOPC)が見出された。また、抗酸化ペプチドの生成に關与するプロテアーゼについても明らかにされた。さらに、HGA と DOPAC はカゼインが分解され生じる Tyr から *Penicillium roqueforti* の異化代謝産物として生成されることが証明された。

このようなチーズの抗酸化に関する知見はチーズ研究の先進国であるフランス、オランダやイギリス等のヨーロッパの国々においても研究されていないことから、先駆的な研究といえる。しかし、多様な抗酸化成分をの活性測定法のみで把握することは困難で、チーズの抗酸化成分をより詳細に明らかにするためにはより多くの抗酸化測定法を用いてチーズの抗酸化能を評価する必要がある。そこで、本研究ではチーズの抗酸化について、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ラジカル消去活性および Superoxide(SO) ラジカル消去活性の 2 種類の活性測定をさらに追加し、チーズの抗酸化能を評価し、またその活性成分をブルーチーズから明らかにすることを目的に実施された。

2. 研究の目的

本研究では、まずチーズの抗酸化活性を ABTS および SO ラジカル消去活性を指標に評価する。次いで、比較的高い活性の

高い活性成分を明らかにする。さらに、これまでが高い活性が認められたブルーチーズの抗酸化能をゴータタイプチーズに付与する試みとして青かびと乳酸菌の培養物を添加した酵素修飾チーズを試作する。そして、酵素修飾チーズのタンパク分解と抗酸化活性を調べ、酸化ストレス軽減化チーズの開発のための基礎的資料を得ること、の 3 点を実施することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) チーズの ABTS および SO ラジカル消去活性

市販各種チーズから 70%エタノール可溶性画分抽出し、その抗酸化活性を ABTS および SO ラジカル消去活性を指標に調べ、また活性成分の分離・精製素材として用いた。

(2) ブルーチーズからの抗酸化成分の分離・同定

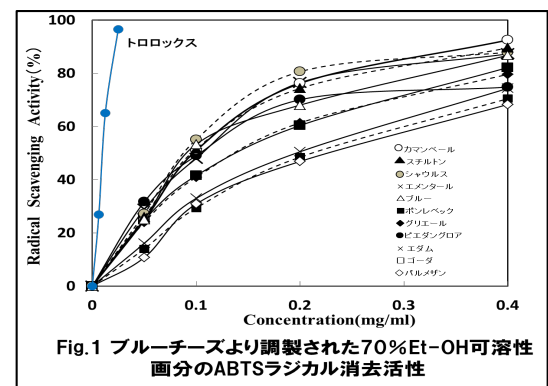
ABTS および SO ラジカル消去活性成分はブルーチーズの 70%エタノール可溶性画分からダイアイオン HP-20、トヨパール HW-40 および ODS-HPLC 等の各種クロマトグラフィーにて分離・精製した。ODS-HPLC により生成された成分は ¹H-NMR と LC/MS/MS により推定し、化成品との ODS-HPLC によるクロマトグラフィーにて同定した。

(3) 機能性チーズの試作

ブルーチーズ製造に使用される *Penicillium roqueforti* および *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* を脱脂乳にて共培養した。得られた培養液を遠心分離にて調製された上清液の凍結乾燥物をゴータチーズ製造過程中的のフープ詰め前に添加し、常法にしたがって熟成させ、培養酵素修飾チーズを製造した。4 ヶ月まで熟成したチーズを培養液無添加チーズ(コントロール)とタンパク質分解におけるカゼイン(電気泳動)、生成ペプチド(ODS-HPLC)および遊離アミノ酸について調べた。また、DPPH および ABTS ラジカル消去活性における抗酸化活性について培養酵素無添加チーズと比較した。

4. 研究成果

(1) チーズの ABTS および SO ラジカル消去活性



ABTS および S₀ ラジカル消去活性を指標に市販チーズの抗酸化能を評価した (Fig. 1)。ABTS ラジカル消去活性では活性の差はあるものの、いずれのチーズにおいても比較的高い値を示した。一方、S₀ ラジカル消去活性では (Fig. 2)、エポワス、ポンレベックのリネンス菌熟成やブルー、カマンベールのカビ熟成チーズに比較的高い活性が認められ、ゴダやエダムの乳酸菌熟成チーズでは活性が低かった。

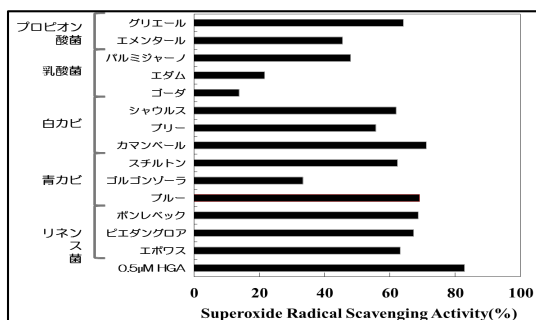


Fig. 2 ブルーチーズより調製された70%Et-OH可溶性画分のスーパーオキシドラジカル消去活性

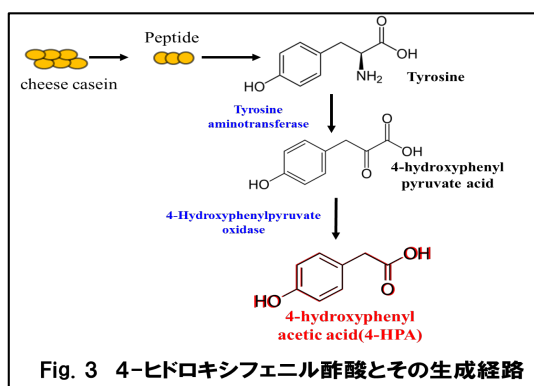
(2) ブルーチーズからの ABTS ラジカル消去成分の分離・精製および同定

ブルーチーズからの ABTS ラジカル消去成分の同定

ブルーチーズから ABTS ラジカル消去活性成分を分離・精製し、その成分を同定した。その結果、4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4-HPA) が見出された (Fig. 3)。本成分は DPPH および S₀ ラジカル消去の活性に対しては非常に低く、ABTS ラジカル消去活性に強く作用した。

4-HPA の生成経路

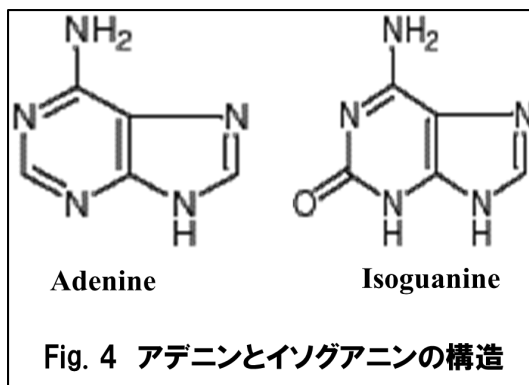
4-HPA はチロシンの異化代謝産物である。そこでポテトデキストロース培地にチロシンを添加し、*Penicillium roqueforti* で培養したところ、培地中に 4-HPA が蓄積された。したがって、ブルーチーズの 4-HPA はチロシンから *Penicillium roqueforti* によって生成されたものと考えられた (Fig. 3)。



(3) ブルーチーズからの S₀ ラジカル消去成分の分離・精製および同定

ブルーチーズからの S₀ ラジカル消去成分の同定

S₀ ラジカル消去活性を指標にブルーチーズの 70%エタノール可溶性画分から活性成分が分離・精製された。その結果、S₀ ラジカル消去成分として、ブルーチーズからアデニンおよびイソグアニンが同定された。



両成分の化成品を用い、数種のラジカル消去活性法 (S₀, DPPH および ABTS ラジカル消去活性) にて既知抗酸化物質 (ホモゲンチジン酸、ホモプロトカテク酸、カテキン、トロロックス) と活性を比較した。その結果、イソグアニンおよびアデニンは S₀ ラジカルに対して高い活性を見出し、DPPH および ABTS ラジカル消去活性においては非常に低い活性であることが知られた。なお、アデニンおよびイソグアニンに S₀ ラジカル消去活性が有ることを見出したのは本研究が最初である。

Table 1 3種類の異なる抗酸化測定法によるアデニン、イソグアニン、HGAおよびDOPACのEC₅₀

Antioxidant Assays	EC ₅₀ ¹⁾ (μM)					
	Isoguanine	Adenine	HGA	HPA	Catechin	Trolox
Superoxide	0.48	13.19	0.22	21.15	4.32	50<
DPPH	50<	50<	16.73	9.01	14.52	39.29
ABTS	50<	50<	26.09	11.08	10.94	32

1) The Superoxide radical scavenging activity was expressed as EC₅₀, the sample concentrated 50% radical scavenging activity.

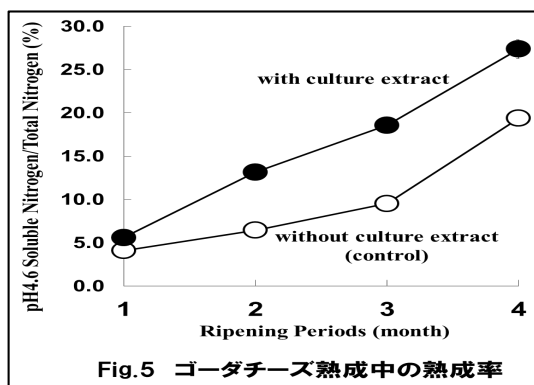
各種チーズのアデニンおよびイソグアニン含量を分析した結果、アデニンはプロピオン酸菌 (エメンタール、グリエール) および乳酸菌 (ゴダ、バルメザン) 熟成タイプには見出されなかった。しかし、リネンス菌 (エポワス、ポンレベック) およびカビ (ブルー、スチルトン、カマンベール、フリー) 熟成チーズで検出され、特に青かび熟成タイプチーズで他のチーズより高い含量を示した。一方、イソグアニンはブルーチーズのみ検出され、その他のチーズでは見出されなかった。

生成経路

ブルーチーズ製造に使用された *Penicillium roqueforti* および *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* をそれぞれ脱脂乳培養にて培養し、アデニンおよびイソグアニンの生成について調べた。その結果、*Penicillium roqueforti* 培養物からは分離できなかったが、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* から同成分を見出した。したがって、ブルーチーズ中のアデニンおよびイソグアニンは乳酸菌が生成したものと推定された。

(4)機能性チーズの開発

培養酵素を添加した酵素修飾ゴーダチーズと培養酵素無添加のコントロールチーズを4ヶ月まで熟成させ、チーズの熟成率、タンパク質分解および抗酸化活性について両チーズにおいて比較した。その結果、酵素修飾チーズは無添加チーズと比較し、カゼインの分解が進行し、生成ペプチドや遊離アミノ酸の増加が認められ、熟成率(WSN/TN)も亢進された。次いで、DPPH および ABTS ラジカル消去活性を調べたところ、酵素修飾チーズはコントロールに比べ両活性とも上昇が認められた。したがって、*Penicillium roqueforti* および *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* の脱脂乳共培養酵素を添加する本チーズ製造は機能性チーズの開発に有効な製造方法と考えられた。



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)

近藤祐希、安田 伸、井越敬司、チーズの70%エタノール可溶性画分を Sep-PakC18 カートリッジにより分離した非吸着および吸着画分のペプチドと抗酸化活性、東海大学農学部紀要、34、7-12 (2015)。査読あり

Shin Yasuda, Keiji Igoshi, Anticancer effect in HL-60 human leukemia cells and other health-beneficial functions of cheeses, Open Journal of Blood Diseases,

3, 7-10 (2013)。査読あり

[学会発表](計 10 件)

井越 敬司、ブルーチーズ熟成中に生成されるスーパーオキシドラジカル消去成分と関与微生物の研究、日本食品科学工学会西日本支部、2015年10月31日、市町村会館(沖縄県・沖縄市)

井越 敬司、青カビと乳酸菌の脱脂乳共培養におけるタンパク質分解とACE阻害活性、日本食品科学工学会西日本支部、2015年10月31日、市町村会館(沖縄県・沖縄市)

井越 敬司、ブルーチーズ熟成中に生成されるスーパーオキシドラジカル消去活性成分、日本畜産学会、2015年3月29日、宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)

井越 敬司、チーズスターター用 *Penicillium roqueforti* の脱脂乳培地におけるタンパク質分解と機能性、日本食品科学工学会西日本支部、2014年12月6日、九州大学(福岡県・福岡市)

井越 敬司、ブルーチーズ熟成中のスーパーオキシドラジカル消去活性とその成分に関する研究、日本食品科学工学会西日本支部、2013年10月19日、九州大学(福岡県・福岡市)

[図書](計 2 件)

Shin Yasuda, Keiji Igoshi, NOVA Science Publishers, Handbook on cheese: Productions, Chemistry and Sensory Properties, 2013, 583-591.

Shin Yasuda, Keiji Igoshi, Wageningen Academic Publishers, Handbook of cheese in health: Productions, Nutrition and Medical, 2013, 703-717.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

()
研究者番号：