

学 位 論 文 題 名

牛乳脂肪球に含まれるリパーゼの分離精製とその性質

学位論文内容の要旨

牛乳中には、脂肪を加水分解して、遊離脂肪酸（FFA）を生産するのに十分なリパーゼが含まれているが、通常はその作用はごく僅かである。乳脂肪がリパーゼによって分解され（リポリシス）、遊離した脂肪酸がある濃度以上に達した場合は、牛乳にランシッドと呼ばれる不快な異常風味を与える。このため、リポリシスの原因となるリパーゼに関して多くの研究が行われてきた。牛乳中のリパーゼの大部分は脱脂乳中に存在しており、少量が脂肪球膜に結合している。牛乳を冷却すると一部のリパーゼが脂肪球に結合し、リポリシスを引き起こす（自然発生リポリシス）といわれている。この自然発生リポリシスは、脂肪球膜に含まれるリパーゼあるいは、冷却により脂肪球に吸着したリパーゼによると考えられている。

今日、脂肪球膜に結合しているリパーゼは、脂肪乳中に含まれているリパーゼと同じものと推定されている。しかし、牛乳のリポリシスに関する研究では脱脂乳中のカゼインミセルに結合しているリパーゼの性質についてはよく知られているが、脂肪球から精製したリパーゼを用いた研究は、ほとんど報告されていない。従って、脂肪球に結合しているリパーゼを精製し、その性質を調べる必要があり、それは自然発生リポリシスの原因や機構を理解するのに最も重要なことである。

本研究では、脂肪球からリパーゼの分離精製を試み、得られたリパーゼの性質について調べた。脂肪球から精製したリパーゼのいくつかの性質についてはカゼインミセルに結合しているリパーゼの性質と比較するために脱脂乳からもリパーゼを分離精製し、同じ条件で実験を行なった。それにより、自然発生リポリシスと脂肪球に結合しているリパーゼとの関係を考察した。また、脂肪球に結合しているリパーゼは、カゼインミセルに結合しているリパーゼと同じものであるかどうかについても検討をした。

脂肪球に結合しているリパーゼの性質を調べるために、ヘパリン・セファロースを用いたアフィニティクロマトグラフィーによってリパーゼを精製した。その分子量は58,000であった。精製リパーゼの純化度は、クリームに対し約3,100倍で、その回収率は3%であった。洗浄クリー

ムに対して純化度は1,182倍で、回収率は8%であった。

クリームの洗浄は、ショ糖を溶かしたクリームの上に0.05M NaCl 溶液を重ねてクリームを洗浄するのが効果的であった。洗浄脂肪球をチャニングするとき窒素ガスを吹き込むことにより、活性をほとんど失うことなくバターミルク部分に回収することができた。

これまでの研究においてリパーゼとリポタンパク質リパーゼ (LPL) を区別するために用いられた添加物が脂肪球に結合しているリパーゼの活性に及ぼす影響を調査した。すなわち、LPL の典型的な阻害剤として用いられてきた NaCl と硫酸プロタミン、活性剤として用いられてきた血清タンパク質、LPL と関係の深い牛血清アルブミン (BSA) とヘパリンを用いて基質の違い、反応温度の影響について検討した。BSA の添加による影響は反応温度に関係なく、基質がヤシ油では活性が増加したが、殺菌均質化乳中の乳脂肪を基質とした場合は低下した。ヘパリンを加えると、反応温度が37℃の場合、ヤシ油における活性は増加したが、乳脂肪では活性が低下した。反応温度が0℃の場合は、基質に関係なく活性が増加した。脱脂乳から精製したリパーゼと脂肪球から精製したリパーゼの活性に及ぼすヘパリンの影響は乳脂肪を基質とした場合、異なる結果が得られた。リパーゼの活性化因子として知られている血清タンパク質中のアポリポタンパク質 C-II の影響を調べた結果、ヤシ油の場合は、反応温度に関係なく、アポリポタンパク質 C-II と BSA をともに添加した方が、それぞれ単独に添加した場合より活性が増加した。乳脂肪を基質とした場合は、アポリポタンパク質 C-II を単独に添加した方がアポリポタンパク質 C-II と BSA をともに添加した場合より活性の増加が高かった。酵素液に硫酸プロタミンを加えて4℃に保持した場合、活性が低下した。硫酸プロタミンを基質液に添加した場合、反応温度37℃で乳脂肪を基質とした場合以外は活性が増加した。1.3M NaCl の添加によっては、基質と反応温度に関係なく活性が阻害された。このように添加物がリパーゼの活性に及ぼす影響は、用いる基質および反応温度によって異なった。リパーゼの基質として一般的によく使われるヤシ油を基質とした場合の添加物の影響は、均質化牛乳中の乳脂肪のように他の乳成分が共存している基質を用いた場合の結果と異なった。従って、ヤシ油を用いた単純系におけるリパーゼの性質を実際の牛乳におけるリポリシスとリパーゼとの関係を考える場合に直ちに当てはめることは出来ない。

脂肪球に結合しているリパーゼの最適 pH は、基質として乳脂肪を用いた場合、反応温度37℃で pH 9.0 であったが、0℃の場合は最大活性を示さず pH の増加とともに活性が増加した。BSA を添加したヤシ油を基質にした場合は、37℃と0℃とも pH 9.5 に最大活性があった。精製リパーゼは非常に不安定であり、38℃で保存すると活性が著しく低下し、pH 9.5 以上では不可

逆に失活した。

リパーゼの大部分が結合しているカゼインが脂肪球に結合しているリパーゼの活性に及ぼす影響について調査した。ヤシ油を基質にした場合、酵素と基質のみの単純な系では、カゼインの添加によって活性が増加したが、基質に1%のBSAを添加すると活性の増加は見られなかった。添加したカゼインの濃度と同じ濃度のBSAを添加した場合は、再び活性が増加した。反応温度0℃では、 α_s -カゼインの添加によって脂肪球から精製したリパーゼの場合は活性が増加したが、脱脂乳から精製したリパーゼの場合は活性が低下した。このことはこの二つのリパーゼの性質が異なる可能性を示唆している。

精製リパーゼは、反応温度37℃の場合より0℃で全遊離脂肪酸の中の低級脂肪酸を多く生成した。反応温度0℃では、脂肪球から精製したリパーゼが脱脂乳から精製したリパーゼより低級脂肪酸、特に酪酸を多く生成した。この結果から、この二つのリパーゼの牛乳風味に関する役割は、異なる可能性が考えられる。

以上の結果で明らかになったように脂肪球から分離精製したリパーゼは、用いる基質によって異なる性質を示した。また、反応温度37℃と0℃において示す性質も異なった。この結果から、いままでの研究のようにリパーゼの最適条件で行われた結果に基づいて、牛乳の冷蔵中に見られる自然発生リポリシスとリパーゼの関係を推定することは不適當であると思われる。したがって、低温における牛乳中のリパーゼの性質について、さらに検討が必要であると考えられる。また、脂肪球に結合しているリパーゼは、脱脂乳中のリパーゼと異なる性質を示す場合も見られたので、同じ測定条件を用いて、この二つのリパーゼの性質についてさらに比較検討することが必要である。本研究の結果は、牛乳の脂肪分解、特に自然発生リポリシスの機構を解明する上で基礎的な資料になると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 善 一
副 査 教 授 高 橋 興 威
副 査 教 授 近 藤 敬 治

本論文は総頁数130で、図32、表16、引用文献135を含む和文論文である。別に参考論文4編が

そえられている。

牛乳にはリパーゼが含まれ、その作用により冷蔵中に若干の脂肪が分解し遊離脂肪酸が生成する。その多少は牛個体により大きく異なり、著しい場合は風味異常となり乳質上の欠陥とされる。リパーゼの大部分は脱脂乳部分に含まれ、よく研究されているが、クリーム部分中で脂肪球に結合しているリパーゼについてはほとんど知られていない。本研究は、クリームから脂肪球を分離し、それよりリパーゼを精製してその性質を調べ、脱脂乳中のカゼインミセルから精製したリパーゼと比較し、さらに至適温度と牛乳冷蔵温度において示す性質の差を明らかにし、牛乳の風味との関係を検討したものである。

緒論では、従来の研究をまとめ、牛乳の分野でリパーゼあるいはリポタンパク質リパーゼと別々に呼ばれていたものが同一のものと認められるにいたった経緯を示し、基質の種類など活性測定条件の違いによる混乱があったことを指摘し、さらに本研究の背景と目的を示している。

第1章では、リパーゼの分離精製について述べている。クリームセパレーターで分離したクリームにショ糖を加えて比重を高め、その上に0.05M食塩水を重層し遠心分離をした。食塩水の層を通して上部に集まった脂肪球を人工乳清液に分散させ、遠心分離、再分散により洗浄脂肪球を得た。これを窒素ガス置換をした容器中で攪動してバター粒と、バターミルクに相当する部分に分けた。バターミルク部分からヘパリンセファロースを用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーによりリパーゼを精製した。平均するとリパーゼの回収率はクリームに対し3%、洗浄クリームに対し8%であり、純化度はそれぞれ3,100倍、1,200倍であった。電気泳動的にはほぼ単一の成分で分子量は58,000であった。なお、脱脂乳からもアフィニティカラムクロマトグラフィーによりリパーゼを精製している。

第2章は脂肪球から精製したリパーゼの性質を示したものである。アラビアゴム溶液中で乳化したヤシ油と殺菌均質化乳の乳脂肪を基質とし、リポタンパク質リパーゼに対する阻害剤や賦活剤を添加した場合の影響を調査した。いずれの基質についても、リポタンパク質リパーゼの特徴を示すこともあり、示さないこともあった。したがって、脱脂乳のリパーゼについて言われているように、脂肪球から分離したリパーゼもリポタンパク質リパーゼと区別が明確ではなかった。ヤシ油を基質とした場合は、0℃においても添加物の影響は同様であったが、乳脂肪を基質にすると、反応温度による差がみられることが多かった。従来、多くの論文にみられるように、ヤシ油を基質として得られたリパーゼの性質をもとにして原料乳の冷蔵中における脂肪分解を説明することは混乱をまねき、妥当ではないことを明らかにした。

脱脂乳から精製したリパーゼと比較したところ、乳脂肪を基質にすると、ヘパリンあるいは

α_s -カゼインを添加した場合の影響が異なり、性質がやや異なることが判明した。

本リパーゼの最適 pH は、乳脂肪を基質とした場合、37℃では pH 9.0であったが、0℃では pH 9.5まで pH の増加と共に活性が増加し、このことは、低温で安定性が著しく増大し、pH 10に1時間保持しても活性が変わらないためであった。一方、ヤシ油を基質とした場合は、37℃、0℃共に pH 9.5に最大の活性を示した。

第3章では、リパーゼの作用により乳脂肪から遊離した各脂肪酸の割合をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより測定している。0℃で遊離する全遊離脂肪酸中に占める酪酸、オイレン酸の割合が高かった。酪酸は、異常風味の原因となるものであるから、原料乳の冷蔵中における脂肪由来の異常風味における脂肪球リパーゼの重要性を示唆するものである。

第4章は以上の結果をもとにして、リパーゼの精製における失活とその防止、リボタンパク質リパーゼとの関係、脱脂乳中のリパーゼとの差および脂肪球に含まれるリパーゼが牛乳の冷蔵中における異常風味の発生に果たす役割について論じている。

以上のように、本論文は、脂肪球に含まれるリパーゼを初めて分離精製し、基質、反応温度の差により示される性質の違いを明確にすることにより、牛乳のリパーゼシステムの中で、未知の部分について重要な新知見を提示した。本研究は、原料乳の冷蔵中における風味劣化の原因を解明するための資料となるばかりでなく、乳製品製造の面からも示唆に富むものである。

よって審査員一同は、最終試験の結果とあわせて、本論文の提出者 金・居猷は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。