

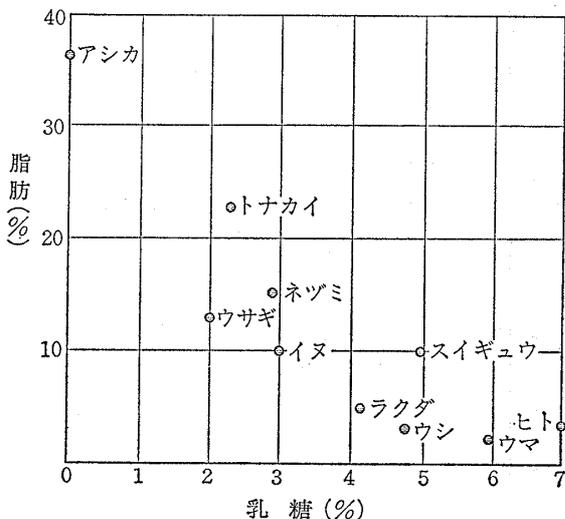
## 乳製品に対する固定化酵素の利用と効果

小 卷 利 章\*

### まえがき

牛乳は蛋白源としても、カルシウム源としても、極めて優れた栄養食品であることは周知のことである。一方で牛乳を飲むと下痢、腹痛や膨張感が伴うなどの症状を起し牛乳嫌いになった人がかなり多い。この原因は単一なものではないが、古くは牛乳成分中の蛋白質が抗原となって起る牛乳原因のアレルギー性胃腸病が主体と考えられていたようであるが、近年になって牛乳中の炭水化物である乳糖が、小腸粘膜において充分消化吸収されないためであることが明らかにされた。

第1図に示したが、動物の乳内の乳糖と脂肪の含有量は、動物の種類によってかなり異なる。アシカのほかにアザラシや太平洋の鯨など、全く乳糖や他の炭水化物を含まないものもある。

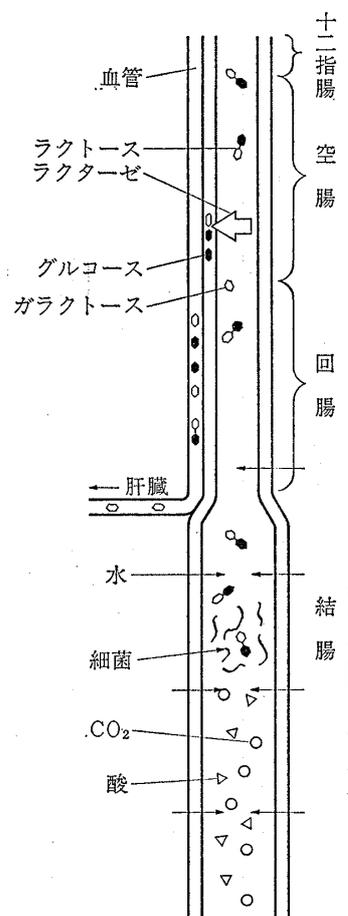


第1図 乳糖と脂肪の濃度 (N. Kretschmer 1972)

\* 長瀬産業 (株) 食品・生化学部門部長

前述のよう牛乳を飲んで起る症状が乳糖に原因している場合を乳糖不耐症 (Lactose intolerance) と呼んでいる。ヒトの小腸の微絨毛膜上に他の多くの消化酵素と共に乳糖を分解する作用力をもった酵素ラクターゼが存在しており、この酵素活性が充分な場合は乳糖は分解されてガラクトースとグルコースとなり、それぞれは腸管から吸収されて血管に入るが、ラクターゼ活性の弱いか欠除している場合は、乳糖は分解されずに2糖類のまま結腸に入る。この関係を第2図に引用したが、乳糖が結腸に入ることによって浸透圧が高くなり結腸粘膜から水分を取込み、またある種の細菌によって乳糖は酵酵されて乳酸と炭酸ガスを生ずる。このためにpHが低くなり、大腸を刺激し、その運動が大となり腹部膨満感、腹鳴り、腹痛や下痢といった症状が起るのである。

このような乳糖不耐症の治療目的として黄麴菌起源のラクターゼ



第2図 乳糖の消化 (N. Kretschmer 1972)

## 乳製品に対する固定化酵素の利用と効果

を含んだ製剤が市販され、特に乳児の乳糖不耐症治療に多量消費されている（ガラクターゼ、東京田辺製薬製、昭和46年発売外数種）。

また牛乳中の乳糖を予め分解処理しておけば、乳糖不耐症の人でも安心して飲めることになるので、牛乳中の乳糖分解に用いるラクターゼの開発研究が始まった。この場合にもっとも問題となるのは、牛乳の製造工程では、ぶどう糖やアミノ酸製造時のように、濾過、脱色などの精製工程を全く加えることができないために、牛乳を処理して乳糖を分解したあとで、甘味の増加以外に味や臭の面で変化を伴ってはならないことである。このために用いる酵素剤の酵素化学的意味での純度および精製の程度にかなり厳しいものが要求される。

そこでラクターゼを包括法によって固定化し、牛乳中に溶け込まず、しかも繰り返し反復使用が可能な状態にして、牛乳中の乳糖を選択的に加水分解する技術がイタリアで確立され（1977）、我国へも導入された。

## 牛乳不耐症について

ヒトの身体では、口から摂取した食品は、唾液、胃液、膵液などに含まれている各種の消化酵素の働きで低分子化するが、砂糖、マルトースや乳糖などの二糖類は、小腸の吸収細胞の刷子状縁の表面にある円い突起状構造物中に存在する各種の二糖類分解酵素によって単糖類に分解・吸収されて血管の中へとり込まれる。この小腸粘膜内の酵素群は臨月に達した胎児ではほとんど揃って発達しているが、ラクターゼについては第3図に引用したごとく誕生後活性が最大になり離乳後に退化するとが知られている。先天的にラクターゼを欠損した乳児は極くまれのようなものである。離乳後にラクターゼ活性が低下して乳糖不耐症となることについて、人種、環境によってかなりの差があり、遺伝因子の要因と食習慣により酵素が誘導される要因とがある。WHOの調査では黒人や黄色人

種の一部に不耐症が多く、白人には少ないといわれている。

アフリカの純粹の Yoruba 族の2人の間に生れた子供は乳糖不耐性であり、Yoruba の男性と北欧の女性との混血の子供は、母親が乳糖耐性であることから乳糖耐性である。また米国の黒人も元は西アフリカの Yoruba 族に近い人種で乳糖不耐性であったが、10～15世代を経過している間に欧州人種の遺伝子が流れ込んだと思われるが乳糖不耐性は70%に減少している。Yoruba 族では98.5%という高率である。子供が乳糖耐性になるにはどちらかの親が乳糖耐性であればよいといわれている。

日本人の乳糖不耐性もかなり高率であるといわれているが、戦後の学校給食への牛乳導入によって学童の乳糖不耐症が激減しており、子供に少なく、高齢者に多く、乳製品摂取のチャンスの多いグループほど少ないという傾向があり、食習慣によって酵素が誘導的に生産される説もまた有力である。

ここで乳糖不耐性を何で判断するか測定法がいくつかありかなり異った数値が出ている。

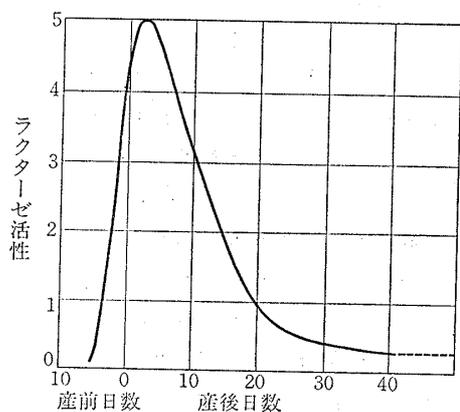
1つの方法は、症状から診断する方法で体重1kg当り2gの乳糖を与えて、下痢や腹痛、腹部膨満感などの症状を示すか否かを見る方法である。またこれらの症状を示した時にラクターゼ製剤を与えて症状が軽くなるか、なくなるかで確認することもある。

次の方法は、小腸粘膜のラクターゼ活性を直接測定する方法である。

第1の方法は偏差が大きく、第2の方法は不便である。第3の方法としては乳糖を負荷して血糖値の上昇を測定する方法でかなり正確である。乳糖の負荷量は体重1kg当り2gとし、50gまたは100gを最大とする方法で、日本人では20gで行うことが検討されている。服用後の血糖値を測定し、100ml当り20mg以上に上昇しない時は乳糖不耐症とする測定法である。これは充分なラクターゼ活性があれば、服用した乳糖は小腸微絨毛膜で消化・吸収されて血管に入るのでこれを測定していることになる。この方法によると日本人は約70～80%という高率になる。

実際に健康なヒトで、牛乳を飲んで数時間以内に腹鳴り・嘔吐・腹痛さらには下痢といった症状を示す人は20～30%であると推定されている。

一般的に考えると日本人は20～30%が乳糖不耐性で、50～60%が牛乳に弱いと考えて良いと思われる。牛乳に弱い人は、牛乳を暖めて飲むとか、少しずつ「嚙んで飲む」ようにすれば、ラクターゼの作用が促進された効果となり良いはずである。



第3図 小児のラクターゼ活性 (N. Kretchmer 1972)

近年我国の牛乳生産量は、消費を上まわっており、生産地では牛乳消費のキャンペーンのために牛乳の入ったカクテルまで考案されている。乳糖を予め分解した牛乳は、甘味がかなり強くなるが、乳糖不耐症のヒトにも服用ができて牛乳消費拡大の有力な手段であると思っている。

### 酵素の固定化とその応用

澱粉を加水分解して水飴やぶどう糖などを製造する工程を始めとして食品加工の分野で酵素が利用されているが、通常の酵素の利用方法は、基質の溶液の中へ酵素を加えて目的とする反応に適した作用条件を与えて反応させ、希望する分解点に達したら反応を停止させるか反応が完結したものとして次の工程に移るのが一般的である。したがって当然のことながら使用した酵素は、反応終了後もかなり活性な形で残存しているが、回収されことなく次の精製工程で不純物と共に除去されて食品中からは取り除かれている。

またこの場合の目的とする反応に適した作用条件とは、単に酵素の働きからみた最適条件だけではなく、基質の側の状態の変化や、さらには雑菌汚染等の副作用も考慮した上で判断されなければならない。

乳製品中、特に牛乳に作用させて乳糖のみを分解しようとする場合は、次のような問題点を予測することができる。

① 酵素剤と共に牛乳の中へ持ち込まれた不純物や異臭は、反応終了後でもぶどう糖製造の場合のように、活性炭やイオン交換樹脂あるいは精密ろ過などによって除去・精製する工程が全く適用できない。

② 単に不純物が加わっただけでなく、もし蛋白や脂肪に作用する酵素類が共存すると、これらの酵素の分解作用で味や香りが変化する可能性が考えられる。

③ 牛乳の性質上、また酵素の耐熱性の両面から高温(60°C以上)での作用は好ましくないために必然的に、反応中の微生物の繁殖を防止する手段を考えねばならない……このことは糖濃度が35%以上のぶどう糖製造条件でもしばしば問題となり、作業場の環境浄化につとめる一方で耐熱性の糖化酵素を用い60°C近辺で糖化している。またマルトース製造の工程でも、澱粉分子の $\alpha$ -1,6結合を切断する枝切り酵素の耐熱性が低いためと、基質濃度を濃くできないためから反応中の微生物汚染が問題の一つである。しかしまだこれらの場合は反応終了後に各種の精製手段を応用できるために救われるが、牛乳の場合は救済手段がない場合も予測される。

これらの問題点中①及び②については用いる酵素を固定化して用いることによって解決をはかることが可能で

ある。

酵素の固定化とは、元来水溶性である酵素をある一定の空間内に閉じ込めたような状態で、あるいは不溶性の担体と結びつけたような多くの場合、水に溶けない形でも酵素活性を発揮できる状態に保ったものである。したがって不溶化とか不溶性酵素などとも呼ばれて来たが、固定化酵素 (Immobilized enzyme) と統一して呼ぶことになっている。

微生物酵素のなかには、菌体内に存在してそのままでも活性なものもある。例えばストレプトマイセス属のグルコース・イソメラーゼなどであるが、このような場合は微生物菌体ごと固定化することも可能であるから、厳密には固定化微生物というべきであるが、機能的に考えれば固定化酵素と呼んで差支えない。

固定化方法としては次のように分類できる。

- 1) 担体結合法
  - 1)-1 物理的吸着法
  - 1)-2 イオン結合法
  - 1)-3 共有結合法
- 2) 架橋法
- 3) 包括法
  - 3)-1 格子型
  - 3)-2 マイクロカプセル型

物理的吸着法とは、活性炭、骨炭、多孔性のガラス、多孔性アルミナ、セラミック、チタニア、ジルコニア、ベントナイト、カオリナイト、シリカゲル、酸性白土、澱粉、グルテン、ゼラチン、磷酸カルシウムゲルなどに物理的に吸着させることによって固定化する方法で、担体粒子の大きな表面積、多孔度、孔径、親水部位、化学組成からの親和性などの多くの要因によって吸着量はかなり異なる。また後述する架橋法と組み合わせることで固定化酵素の物理的性質を強化、改善する場合も多い。

イオン交換結合法は、イオン交換基を有する不溶性の担体に吸着させる方法であるが、この場合酵素蛋白はかなりの高分子であるから、単なるイオン交換反応のみならず、母体の多孔性網目構造と酵素蛋白の親和性がなければならない。この方法の特徴は多くの場合、酵素活性が弱くなると補充あるいは再生が可能である。これに対して共有結合法の場合は、担体と酵素の吸着は半永久的と考えられる。この結合は酵素蛋白のアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、水酸基、イミダゾール基、フェノール基などの官能基と、他の反応基をもった担体とを適当な条件で反応させることによってできる。

架橋法もまた、共有結合と同様に化学結合で固定化する方法であり、酵素蛋白中の官能基と、架橋試薬の二官能基または多官能基とを反応させて固定化する。この場合に酵素蛋白、または微生物菌体とを直接架橋する場合

## 乳製品に対する固定化酵素の利用と効果

と、ゲラチン、アルブミン、キトサン、アミノ基を含む多糖類誘導体などと混じて共に架橋させる方法がある。

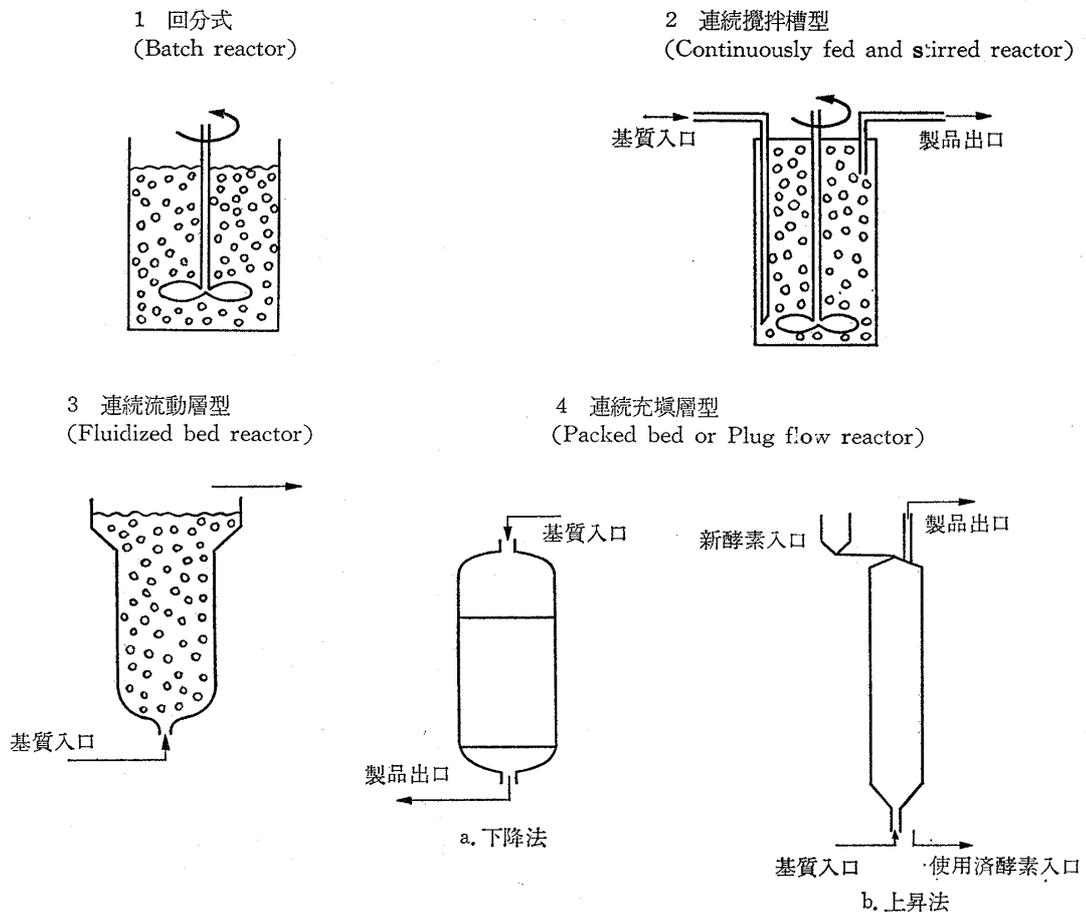
最後に**包括法**は、酵素を高分子の水不溶性の物質で包みこんでしまう方法である。ゲルの細い格子の中に閉じこめられたと考えられるのが**格子型**で、半透膜の皮膜で覆われているのが**マイクロカプセル型**と呼ばれている。いずれも酵素分子は外へ出ることはできないが、分子量の小さい基質は比較的自由に出入りができると考えられている。したがって基質の分子量が比較的大きい場合、例えば蛋白質や澱粉のような高分子多糖類の加水分解などにはあまり適していない手段といえる。

酵素を固定化する手段や、それに用いる物質については随分広い範囲にわたって開発されているが、実用化に当っては次のような問題点を考慮して選択しなければならない。

特に食品加工の場合は、食品衛生法上の取扱いから、固定化の工程が化学的手段によって分解反応以外の化学反応を起させていると解釈されるので、食品中に添加、混和、浸潤等の方法で使用する場合は食品添加物と見なされるのである。

具体的には固定化酵素を食品製造工程で食品中に添加

することは、たとえあとで**沝過**その他の方法で完全に除いたとしても食品添加物の認可のないものを用いたことになって許されない。しかし固定化酵素を反応器の中に充填しこの中を通過させるときは、固定化酵素は装置の一部と見なされて食品添加物の規制は受けないことになる。同じようなことが沝過助剤の場合にもある。酸性白土、白陶土、ベントナイト、タルク、砂、ケイソウ土およびパーライトならびにこれらに類似する不溶性の鉱物性物質は、食品の製造または加工上必要不可欠な場合のみ使用でき、食品中の残存量が0.5%以下でなければならぬという使用基準がある。ところでこれに類似するものとして、水不溶性の水和珪素(Silica Hydrogels)がコロイドの吸着能と共に沝過助剤として欧米でビール工業でビールの清澄・安定化目的に使われているが、水和珪素の製造法が珪素を含んだ砂を炭酸ソーダで処理して、珪酸ソーダとして抽出し、これを硫酸で中和して製造する方法である。ここで珪素を珪酸ソーダーにする造塩反応を化学反応と見て食品添加物の認可が要求される。しかしこれを沝過機にプレコートしておいて用いるときは装置の一部と見なされて何らの制限は受けませんが、食品溶液の中へ添加して混合して、沝過するときは認可がな



第4図 固定化酵素用反応器概念図

いと使用できないというしくみになっている。

したがって食品加工に用いる固定化酵素は、カラム法もしくは何らかの反応器内に充填されて、ここを基質溶液が通過、循環等を行うことによって反応が営まれるのに好都合な物理的性質を有していることが必要条件となる。

この場合反応させようとする基質溶液が清澄で通液性に問題の少ないぶどう糖液のような場合と、牛乳のように乳化液である場合とで要求される性質がかなり異ってくる。ぶどう糖の異性化の場合に用いる固定化グルコースイソメラーゼの場合は、均一に充填し、基質溶液の通過が層流で流れ、逆混合が少ないほど反応は好都合であるから、球状または短棒状の充填しやすく、目詰りが起りにくく、膨潤、収縮ができるだけ少ないものが適している。このような反応装置は連続充填型 (Packed bed or Plug Flow reactor) と呼んでおり、液の流れの方向によって下降型と上昇型があり、直径1.5m、高さ約3m、あるいは直径1.2m、高さ4.5mの反応層が実用的に使われている。

しかし牛乳中の乳糖を分解するために固定化酵素を用いるときは、牛乳の性質上充填型の使用は大変に難しい。食品添加物の解釈が日本とは異なり、不溶性の汚濁助剤等は食品添加物ではなく、加工助剤であると見ている欧米では、回分式の方法を採用し、固定化ラクターゼを反応槽に添加し15~20時間攪拌して作用させたのち固定化酵素を分離する回分式が実用化している。これは先述のごとく我国では適用できない。

第4図は予想される固定化酵素の反応器の概念図を示したものである。

#### 牛乳中の乳糖の固定化酵素による分解

上述したごとく、牛乳中の乳糖を予め分解しておく事で乳糖不耐症の人も安心して牛乳が飲めることは、我国では過剰生産されている牛乳の消費増加に結びつくのみならず、脱乳糖処理をした粉乳は開発途上国の子供達の栄養源として極めて有効な役割を果すはずである。しかし今までのべて来たごとく実用上の技術として種々の解決すべき問題点を含んでいる。

酵素の固定化手段としては包括法が適している。牛乳の成分中カゼインや脂肪は乳糖に比較して高分子であるために膜や格子を通り抜けられない。したがってラクターゼ中にプロテアーゼやリパーゼが夾雑して混在していたとしても、これらが作用する可能性は少なくなるからである。

イタリアで開発された固定化ラクターゼは醋酸繊維の中に包括されたもので、太さが40ミクロン、長さが2.5

~3.0cmに切り揃えられている。

反応温度は牛乳の品質、ラクターゼの安定性および反応中の微生物増殖を押えるために5~7°Cという極低温で行われる。したがって酵素の寿命は極めて長い。

一般的に固定化酵素の作業の初速度は高温ほど速くなるが、逆に寿命の方は短くなり、全体的に見た固定化酵素単位重量あたりの反応生成物の量は低温作用ほど大になる。グルコースイソメラーゼによるぶどう糖の異性化では、希望する能力よりも大型の反応器をもち、酵素が新鮮な間はできるだけ低い温度で作用させて酵素活性の減少と共に反応温度を徐々に上昇させ、反応器当りの1日の生産性をできるだけ均一化し、かつ固定化酵素単位重量当りの生産性を大にする方法がとられ、酵素コストの減少に役立っている。

この点において牛乳は取り扱いに、厳密な技術管理と細心の注意が要求される代表的なケースであり、ぶどう糖の異性化に成功した固定化酵素の応用技術がそのまま当てはまるものではない。

この技術は飲用の牛乳に適用するのみならず、チーズ製造、ヨーグルト製造用の原料乳中の乳糖を予め分解することで、製造所要期間を短くしたり、酸の生成が促進されるなどの効果も期待される。

また、チーズ製造のホエーの活用方法として、この中の乳糖を分解することでホエーの濃縮が容易になる利点がある。乳糖の溶解度が17%であるが、80%加水分解されると55%になるので、イオン交換膜法による脱塩操作とを組合せると、固形物50~75%まで濃縮しても乳糖結晶によるざらつきがなく、牛乳のフレーバーを有したホエーシラップが製造可能である。そして、このものは脱脂乳に代えて、アイスクリーム、パン、その他のベーカリー製品にも応用される可能性をもっている。

#### あとがき

近年精密化学、ファインケミカルと言葉しげく使用され、当社にも精密化学品部がある。

ファインケミカルを一言でいいあらわすならば、“化学物質としてではなく、製品の持つ機能によって取引されるもの”であると言えると思う。こうした意味では酵素はその最も典型である。またせっかくの優れた機能が誤まった方向に発揮されたのではその価値は全くない。

この意味で酵素の応用の研究は、異なる技術領域の協力がますます盛んに行われるようになって、より広い分野に伸展することを期待している。

#### 参考文献

- 1) 青柳利雄：“牛乳不耐症”，内科 28, No.6, 1050~1054 (1971)

## 乳製品に対する固定化酵素の利用と効果

- 2) Kretchmer. N. : "Lactose and Lactase" Sci Am. 227 (4) Oct 71—78 (1972)
- 3) Morisi. F, Pastore. M, et al. : "Reduction of Lactose Content of Milk by Entrapped  $\beta$ -Galactosidase", J Dairy Science, 56, 1123~1127 (1973), 57, 629—272 (1974)
- 4) 祐川金次郎 : "ラクターゼによる牛乳中の乳糖分解", 栄養と食糧 27, 7~11 (1974)
- 5) 祐川金次郎 : "固定化ラクターゼの安定性", 栄養と食糧 28, 33—38 (1975)
- 6) デノ・デネリ他 : "ミルク及びその類似物の酵素分解生成物及びその製法", 日特開 47—9722 (1972)
- 7) 川西悟生 : "ラクターゼによる牛乳中の乳糖分解", 食の科学 49, No.8, 42—49 (1978)
- 8) 八木直樹 : "乳糖不耐症とラクターゼで乳糖を加水分解した新しいタイプの牛乳", 食品と科学No. 9, 116—122 (1978)
- 9) 外山章夫 : "乳糖を減らした乳とホエーの利用", 食品と科学 No.7, 104—107 (1978)
- 10) V. H. Holsinger : "New Dairy Products for Use in Candy Manufacture", The Manufacturing Confectiones January, 25—28 (1976)
- 11) A. Y. Tamime : "The Behaviour of different starter cultures during the manufacture of yogurt from Hydrolysed milk", Dairy Industries International, August, 7—11 (1977)
- 12) J. D. Mitchell : "Weight-Gain Inhibition by Lactose in Australian Aboriginal Children, A controlled trial of Normal and Lactose Hydrolysed milk", The Lancet, March, 5, 500—502 (1979)
- 13) H. H. Nijpels : Nordeuropaisk mejer-tidsskrift, nr 8/76, 274—276, nr 10/26, 356—360, nr 11~12/76, 382—388  
S. Poznanski : Nordeuropaisk mejer-tidsskrift, 8/76, 265—273, 9/77, 310—315 (Milan is now selling milk with split milksugar)
- 14) C. Nermark : Nordeuropaisk mejer-tidsskrift, 1/78, 14—19

## 新 刊 紹 介

## 竹林やゑ子著 「洋菓子材料の調理科学」

(A 5判 256 ページ 定価 2,800 円 柴田書店)

本書は洋菓子の材料となる個々の食品の調理上の性質と製造技術との関係を豊富なデータを挿入して述べられた優れた著書である。

著者竹林やゑ子氏は長年都立立川短期大学教授を勤め、同校退職後現在は東京学芸大学、国際文化カレッジの講師を勤めている。長い間洋菓子の研究にたづさわっていて洋菓子業界においてもその製造の理論と実際に精通した貴重な存在である。先に「洋菓子教本」を出版され、本書は社団法人日本洋菓子協会連合機

関誌「ガトー」に昭和51年4月より54年7月まで3年余にわたり掲載されたものを修正、補筆して一冊にまとめたものである。内容は、Ⅰ小麦粉、Ⅱ甘味料、Ⅲ卵、Ⅳ牛乳・乳製品、Ⅴ油脂、Ⅵ乳化剤、Ⅶチョコレート、Ⅷペクチン、Ⅸカナゲーナンとなっている。洋菓子業界の方々は勿論、食物学の研究にたづさわる人々また洋菓子作りを熱心に行っている家庭の人々にとって優れた参考書である。

(吉松)