

[研究ノート]

乳・乳製品に含まれる脂肪の 酵素作用による検出 (1)

生 地 暢・岡 輝 美

The detection of milk fat in some commercial milk and dairy products on Lipase hydrolysis (1)

ONJI Masashi and OKA Terumi

Abstract

To evaluate *in vitro* digestion of milk fat in some commercial milk and dairy products, the distinctive digestion on lipase hydrolysis was investigated in 6 different conditions at 0, 20 and 40 °C for 15 and 30 minutes, respectively.

The digestion remarkably was differentiated not only concentration of substances, passage of reactive time, optimal temperature but also other additive compositions which were factors of inhibitor, cofactor, sedimentation.

These comparative investigations of specificity of enzyme were expected the educational effect on the undergraduate experimentation.

Key words : Milk fat, lipase hydrolysis, *in vitro* digestion

キーワード : 乳脂肪, リパーゼ, *in vitro* 消化

「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」(以下、乳等省令)により、成分規格、製造および保存方法の基準が定められている¹⁾。この乳等省令に明記されている「乳」である牛乳、成分調整牛乳(低脂肪牛乳および無脂肪牛乳)および原材料に牛乳を含む乳飲料が現在、市場に流通している。

牛乳中の脂肪分は約3.5%を占め、脂肪球として存在し、直径は1.5-12.5 μm である。トリグリセリドを主成分とする脂肪滴は乳腺細胞で作られ、細胞外に放出されるとき、乳腺上皮由来のリン脂質の2重構造を持つ皮膜で取り囲まれて脂肪球となる。さらに、牛乳の脂質の組成は97~98%がトリグリセリドを中心とする中性脂肪で、1%がリン脂質であり、残りがコレス

テロールや脂溶性ビタミンなどである。この組成はバブコップボトルや、脂肪測定器によって計測できる。その特性はけん化価は他の油脂より少し高く、ヨウ素価は低い。また、牛乳は人乳などの他の動物の脂質と組成を比べると、酪酸やカプロン酸などの低級飽和脂肪酸が多く、脂質分解酵素(以下、リパーゼ)により分解しやすい性質がある²⁻⁴⁾。

牛乳に含まれる脂質の大部分である中性脂肪の消化は胃底腺より分泌される胃リパーゼから始まる。胃リパーゼはpH4付近で活性が強く、主に中性脂肪の3位のエステル結合を分解する。食事に含まれる全中性脂肪の20-30%は胃リパーゼにより消化される。胃リパーゼは酸性リパーゼであるが、十二指腸に入って、膵液中の

Na, K, Ca, Mg の陽イオンおよび Cl, HCO₃, PO₄, SO₄ などの陰イオンにより, pH6~7 に上昇しても活性がある。小腸に入った脂肪は胆汁および膵液とよく混合されて消化されやすくなり, 残りの 70-80% は膵リパーゼによって小腸上部で消化される。膵リパーゼはそのままでは胆汁-脂肪複合体 (ミセル) には作用しにくいので, 膵臓より分泌されるタンパク質のコリパーゼが必要である。コリパーゼは膵臓で前駆体の状態で膵液とともに分泌され, 小腸管腔でたんぱく質分解酵素であるトリプシンにより活性化される。膵リパーゼの活性は, コリパーゼと 1:1 の比率で結合して, はじめて油滴 (エマルジョン) の界面に結合しやすくなる。膵リパーゼは中性脂肪の 1 位と 3 位の脂肪酸エステル結合を加水分解し, 2-モノアシルグリセロールと脂肪酸を遊離する⁵⁻⁷⁾。

本報では, ウシ膵臓をアルコールおよびエーテルで洗浄し, 乾燥した後, 粉碎したもので膵液中の酵素が混合されたものであるパンクレアチン中に含まれる膵リパーゼを利用して, 市販牛乳および乳製品中の乳脂肪を *in vitro* で分解し, 定性的, かつ経時的に評価した。

材 料 と 方 法

供試牛乳

久留米市内で市販されている 4 社 10 種類の

牛乳を購入して供試した。パック上の表示を Table 1 にまとめた。内訳は, 乳脂肪分 (%) が 3.5% 以上である牛乳は 130℃ 以上 2 秒間殺菌された無調整牛乳 4 種類と, 成分調整牛乳 6 種類, つまり, 乳脂肪分 4.0% 以上の牛乳は乳化剤を添加された濃縮牛乳 1 種類, 乳脂肪分 1.0% 以上 2.5% 以下に調整された低脂肪牛乳 4 種類, 乳脂肪分 0.5% 以下に調整された無脂肪牛乳 1 種類の区分である。

パンクレアチンによる乳脂肪の消化

供試した牛乳 3 ml ずつを試験管に数本分注し, 5% 炭酸水素ナトリウム 1 ml および 0.1% フェノールレッド指示薬 (20% エタノール溶液で溶解) 50 μ l を添加, 混合した。半数は対照区として精製水 2 ml を, 残りを試験区として酵素液 (2% パンクレアチン溶液: 精製水にパンクレアチン (和光純薬) をよく混合し, 40℃ で 20 分間恒温後, 濾液を酵素液とした。) 2 ml を加え, 混合した。その後, 対照区および試験区である試験管をそれぞれ反応温度 0, 20, 40℃ に設定し, 0, 15, 30 分間反応した。反応後, 氷水中に 15 分間保存し, それぞれの試験管の溶液の呈色変化を観察, デジタルカメラで記録した⁸⁾。

小腸中の pH を *in vitro* 内で再現するために, 膵液に含まれる炭酸水素ナトリウムを添加しており, 牛乳中では, 乳脂肪がエマルジョ

Table 1 Commercial milk and dairy products in this study

		Solids not fat (%)	Milk fat (%)	Pasteurization	
A	1	9.8%	0.4%	130℃, 2 sec.	
	2	9.8%	1.5%	130℃, 2 sec.	
	3	8.3%>	3.5%>	130℃, 2 sec.	
B	1	8.9%	2.2%	—	*1
	2	8.3%>	3.5%>	130℃, 2 sec.	
	3	8.6%	4.4%	—	*2
C	1	8.4%>	1.5%	130℃, 2 sec.	
	2	8.3%>	3.5%>	135℃, 2 sec.	
D	1	10.0%	1.0%	—	*3
	2	8.4%>	3.6%>	130℃, 2sec.	

*1: Additive compositions follow as vitamin D, cellulose, calcium phosphate and ferruim pyrophosphate.

*2: Additive compositions follow as vitamin D and emulsifier.

*3: Additive compositions follow as vitamin D, cellulose, calcium carbonate and ferruim pyrophosphate.

ンとして存在しているので、特に乳化剤を添加せず、利用できる。本来、腓りパーゼを作用させるためには、脂肪を乳化する必要がある、*in vivo* では胆汁酸塩が乳化剤の役割を果たしている⁸⁾。

結果および考察

牛乳中の平均脂肪含量は3.0から3.8%の範囲にあり、多くの国々は約3.5%に調整し、市場に流通している。乳脂肪は食物中の脂肪および油の中でも最も消化に優れた脂肪である^{1, 3)}。指示薬としてのフェノールレッドは、pHの変化による比色 (pH6.8 以下で黄色、pH6.8~8.4では黄~赤色に変わり、pH8.4 以上では赤色に呈色する) であるから、ある限度以上の遊離脂肪酸が存在すると、反応液は完全に黄変してしまうため、高濃度の脂肪酸と著しく精度にかけるものの、低濃度の脂肪酸に対しては有利である⁹⁾。

今回の実験では、フェノールレッドを指示薬とし、乳脂肪が腓りパーゼ分解で生成した脂肪酸による pH の変化を観察、デジタルカメラで記録した結果を Figure 1 に示した。また、Figure 1 に示さなかった結果を含め、酵素作用による呈色変化を無脂肪牛乳、低脂肪牛乳、無調整牛乳、濃縮牛乳の順に Table 2 にまとめた。酵素を添加しない区 (Control) がネガティブコントロール区となり、酵素を添加した区 (Enzyme) のなかで、酵素反応が起こらなかった反応温度を 0℃に設定した区がポジティブコントロール区となった (Fig. 1 & Table 2)。

無脂肪牛乳は、ネガティブコントロール区と比較すると、20℃での酵素反応では15分後にすでに赤みがかかったオレンジ色に変化しており、30分後でもその色に大きな変化はなかった。また、40℃での酵素反応では、20℃での反応よりもオレンジ色を増した変化が15分後ですでに観察され、30分後はその色に変化は観察されなかった (Fig. 1(A)-1 & Table 2)。

低脂肪牛乳は、20℃での酵素反応では15分後および30分後の呈色変化とも若干、黄色かっ

た色の変化が見られたのみであった。40℃での酵素反応は、15分後に橙白色の変化が観察されたもの (Fig. 1(A)-2 & (C)-1) と20℃での反応と同等の若干の変化しか観察されなかったもの (Fig. 1(B)-1 & (D)-1) に分けられた。30分後にはすべてが橙白色までの呈色変化が観察され (Fig. 1(A)-2, (B)-1, (C)-1, (D)-1 & Table 2), 4種類のうち2種類が40℃での酵素反応にタイムラグが認められた。

成分無調整牛乳は、20℃での酵素反応は15分後および30分後の呈色変化とも低脂肪牛乳よりも乳白色の度合いが強いものの、若干の黄色に偏った色変化が観察された。40℃での酵素反応では、15分後および30分後の呈色変化とも遊離脂肪酸の生成量が最も多いと推察できる黄白色に変化していた (Fig. 1(A)-3, (B)-2, (C)-2, (D)-2 & Table 2)。濃縮牛乳は、乳脂肪分が5%未満の差であることから成分無調整牛乳と同様の变化であった (Fig. 1(B)-3 & Table 2)。

すべての種類の牛乳において、酵素反応の特徴である最適温度である体温付近の40℃での反応のほうが20℃での反応よりも pH 変化による黄変が進行する傾向が見られた。

また、酵素反応において、反応時間が一定以上経たとき、酵素反応が鈍る特徴がある。その要因には、①基質が使われて濃度が低下する、②反応生成物が反応を抑える (生成物阻害) ③反応によって pH が変化する、④酵素が失活するの4点が主に挙げられる¹⁰⁾。本実験の初期段階では、炭酸水素ナトリウムの添加により pH 8.4以上に保たれており、十分に基質である乳脂肪量が存在していた。酵素であるリパーゼにより分解が進むと、遊離脂肪酸が生成されていき、*in vitro* 内の pH が次第に低下していった。したがって、本実験では、反応時間が15分間経た場合の呈色変化と30分後での変化に大きな差異が見られない要因は、基質である乳脂肪濃度に違いがあるものの上記の②と③であると考えられた。

さらに、酵素の中には特定の金属イオン (K, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn など) がないと作用しないものが存在する。乳脂肪に

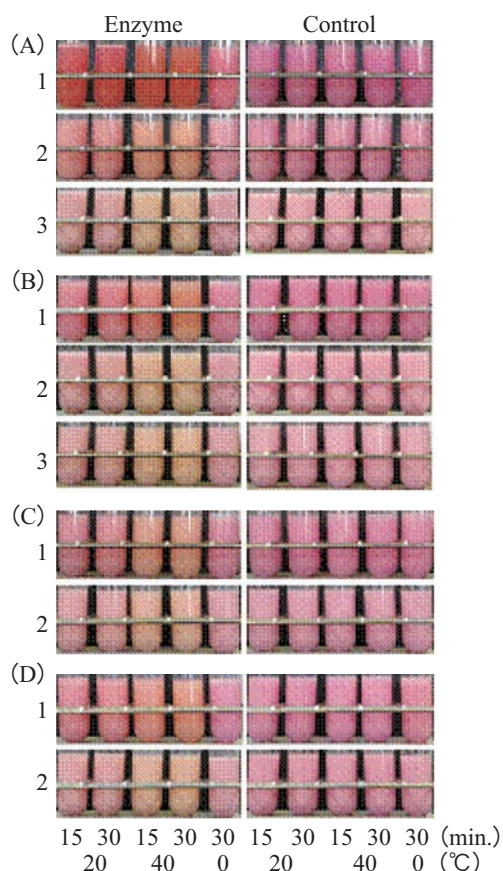


Figure 1 Lipase hydrolysis of commercial milk and dairy products.

Alphabet and Number are similar as Table 1.

おけるリパーゼの分解作用にも、微量のミネラルがその反応に影響を及ぼしているものの、酵素活性を促進するものではなく、 Fe^{2+} が酵素反応を阻害するとの報告である¹⁰⁾。その阻害効果の特徴は、微量の Fe^{2+} による阻害が長時間に及ぶと消失し、最終的には Fe^{2+} が存在しない条件と変わらない結果が得られるというものである。今回の実験でも、低脂肪牛乳4種類のうち、2種類にはFe(ピロリン酸鉄)が添加、強化されており、他の2種類とは異なった反応が生じた。すなわち、40℃での反応において、15分後の酵素反応では若干の呈色変化しか見られず、阻害されていたが、30分後では、酵素反応が進み、pH変化による呈色変化が観察された。

このFeが添加されている低脂肪牛乳2種類は組成がそれぞれ異なっていたが、Ca ((B)ミルカカルシウム(リン酸カルシウム)(D)炭酸カルシウム)も添加されている。 Ca^{2+} は細菌由来のリパーゼにおいて、わずかに酵素活性が増加させると報告されており、遊離脂肪酸と結合してカルシウム石鹸を生じ、反応液を乳化状態に変化させることによると考えられている¹⁰⁾。本実験では、 Ca^{2+} による阻害効果は明らかにできなかったものの、リン酸カルシウムのほうが炭酸カルシウムよりも沈殿する割合が高いと

Table 2 Effect of lipase hydrolysis on commercial milk and dairy products

			Enzyme										Control										
			°C			0			20			40			0			20			40		
			min.	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30		
Very low-fat milk	A	1 ^{#1}	n	n	n	n	PR	PR	n	OR	OR	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Low-fat milk	A	2 ^{#1}	n	n	n	n	P+	P+	n	O	O	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	B	1 ^{#1}	n	n	n	n	P+	P+	n	P++	O	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	C	1 ^{#1}	n	n	n	n	P+	P+	n	O	O	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	D	1 ^{#1}	n	n	n	n	P+	P+	n	P++	O	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Normal milk	A	3 ^{#1}	n	n	n	n	PY	PY	n	Y	Y	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	B	2 ^{#1}	n	n	n	n	PY	PY	n	Y	Y	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	C	2 ^{#1}	n	n	n	n	PY	PY	n	Y	Y	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	D	2 ^{#1}	n	n	n	n	PY	PY	n	Y	Y	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Concentrated milk	B	3 ^{#1}	n	n	n	n	PY	PY	n	Y	Y	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

n : No reaction (Pink), PR : Pinkish red, OR : Orangish red, P+ : Pale pink, P++ : Pink little yellow,

O : Orange, PY : Pinkish yellow, Y : Yellow

#1 : Alphabet and Number are similar as Table 1.

されており, 40℃での酵素反応では, 30分後に沈殿がリン酸カルシウム添加低脂肪牛乳にのみ生じていた。

本実験では, 酵素反応を比較することが容易かつ可能な乳・乳製品を材料として用い, 酵素作用の検出を行った。学生実験として, 比較検討することは酵素反応およびその特徴を理解することを深め, 時間経過と反応状況を観察する機会を与えることになる。しかも, 短時間で定性反応を可能であり, 陽イオンにおける阻害効果も考慮しなければならないことも理解できる。このように, 一つの目的だけでなく, 様々な酵素反応の特徴を理解することを可能になる。既報かつ常法ではあるが, 若干の工夫により, 簡易かつ明確な乳脂肪分濃度の違いによる酵素作用および特性を視覚的に知ることができ, 教育的に効果が得られると考える。今後, バターやヨーグルトなどの乳製品についても, 同様の酵素作用による検出を行ってみたいと考える。

要 約

学生実験にあつては, 限られた時間で行う必要性に迫られ, 三大栄養素の定性が主としてなされている。本報では, 分光による定性のみならず, 基質濃度, 反応時間, 至適温度, 阻害効果 (Fe^{2+}) 等の酵素反応の特徴を多岐にわたり観察, 比較することを目的とした。

これらを比較検討することは学生実験として, 酵素反応の特徴を定性的に観察できると同時に, 経時的に観察することで定量性をも推測可能となる。低脂肪牛乳での酵素反応で見られたカルシウム塩による沈殿の相違は炭酸イオンあるい

はリン酸イオンの影響についても認識でき, 今後の観察研究を発展させるものであることを確信する。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省令第132号. 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令. 平成19年10月30日.
- 2) 生乳検査マニュアル. (社)日本酪農乳業協会生乳検査精度管理委員会. 平成22年4月.
- 3) Edmund Renner. Milk and dairy products in human nutrition.
- 4) 斎藤善一. 牛乳中のリパーゼ. 日蓄会報. 48, 299-307, 1977.
- 5) 菅野道広. 脂質の消化・吸収. 化学と生物. 18, 687-694, 1980.
- 6) 今泉勝己・窄野昌信. 脂肪の消化と吸収. 栄養学雑誌. 54, 271-283, 1996.
- 7) 丸山芳夫・鈴木裕一. 消化と吸収. 標準生理学. 医学書院. 東京. pp.679-758, 2007.
- 8) 田代操. *in vitro* 消化実験. 生化学実験. 化学同人. 京都. pp.79-83, 2004.
- 9) 斎藤善一. 原料乳の Lipolysis に関する検査におけるフェノールレッドの利用について. 日蓄会報. 50, 710-715, 1979.
- 10) 丹治幹男・大西正男・司城不二. 乳脂肪およびその分別物のリパーゼ分解. 帯蓄大研報. 22, 89-94, 2001.
- 11) Albert L. Lehninger. 酵素. レーニンジャーの新生化学(第5版). 山科郁男監修. 廣川書店. 東京. 2010.

(2012年3月30日受稿)