HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	固定化キモシンの調製について : VI.　チーズ熟成中のカゼインの変化について
Author(s)	進藤, 一典; 桜田, 宏介; 有馬, 俊六郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 12(2), 83-88
Issue Date	1980-10-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11941
Type	bulletin (article)
File Information	12(2)_p83-88.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

固定化キモシンの調製について

VI チーズ熟成中のカゼインの変化について

進藤一典・桜田宏介・有馬俊六郎
(北海道大学農学部付属酪農科学研究施設)

(昭和55年3月19日受理)

Studies on Immobilized Chymosin Part VI

The degradation of casein during cheese ripening

Kazunori SHINDO, Kousuke SAKURADA
and Shunrokuro ARIMA
(Institute of Dairy Science, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060)

緒　言

GREEN[1], KONING[2]らの総説に見られる如く従来から代用レンネットの開発が多くの研究者により行われてきた。中でも微生物由来の凝乳酵素はもっとも期待される代用レンネットであり，KIKUCHIら[3~5]はMucor pusillus Lindtの産生する酵素について検討し十分にレンネットに代用できるとしている。しかし，今までに開発された代用レンネットはいずれも風味，収量，Curdの物理的性状などの点で多少とも劣ることが認められている。

近年，世界的な仔牛肥育化とチーズ生産量の増加にともないレンネット不足が大きな問題となりつつある。著者らはレンネット酵素を使い棄てないで連続使用に供するばかりでなく，キモシンのカゼインに対する作用機構の解明に応用することを目的として，固定化キモシンの調製法について検討してきた[6~11]。既に報告したように[10] Paraffin Waxによって調製した固定化キモシンはその調製法が簡単なこと，安定性が高いことから，さらにチーズ製造への応用を試みある程度の結果を得ることができた[11]。

本報は，固定化キモシンにより製造したチーズを用いて熟成中におけるタンパク分解過程を濃度勾配電気泳動，ゲルロ過，アミノ酸分析により検討したものである。

実験方法

1. チーズの製造

原料乳には北大農付属農場から得た合乳を70°C，15分間加熱殺菌処理したものを使用した。

固定化キモシンによるチーズは前報[11]と同じ方法で，対照チーズはゴーダ型チーズ製造法[12]で，スタータ無添加チーズは山本らの酸度規定法[13]で製造した。なおチーズの熟成条件は温度15°C，湿度85%である。

2. 濃度勾配電気泳動 (PAGE)

チーズからのカゼイン成分の分離はVisser and de Groot-Mostertの方法[14]により行った。

濃度勾配を持つポリアクリルアミド平板ゲルはGel Slab Casting Apparatus GSC-8 (Pharmacia Fine Chemicals Co., Sweden)を用いて調製した。電気泳動はTris-Glycineバッファ(pH 8.6)で，Gel Electrophoresis Apparatus GE-4 (Pharmacia Fine Chemicals Co., Sweden)を用いて行った[15]。泳動後アミドブラック10Bによる染色を行った。

3. 低分子量ペプチドの分離と定量

チーズ10gと脱イオン水30 mℓを乳鉢中で摩砕し，遠心分離(5,000 rpm, 15 min)にて不溶物，脂肪を除去，水溶性成分を得，次に最終濃度2%トリクロル酢酸(TCA)により除タンパクした。以上のようにして得た2% TCA可溶性画分をITOH[16]の方法に基づき0.1 Mリン酸バッファ(pH 7.0)で平衡化したSephadex G-

50カラム (3×30 cm) を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出液は280 nmにおける吸光度およびニンヒドリン発色法[17]により定量した。

4. アミノ酸分析

アミノ酸分析は日立クロマトグラフ Model 034を用いて WEAVER ら[18]の方法により行った。

結果および考察

1. カゼイン成分の分解

120日熟成したチーズから調製したカゼインのPAGE図を Fig. 1-1～Fig. 1-3 に示した。カゼイン成分は熟成の進行にともなって分解されるが，α_s-カゼインの分解が顕著であった。一方，β-カゼインの分解度は低く，図から明らかなように熟成120日でも大部分のβ-カゼインは分解されていなかった。また，いずれのチーズにおいても泳動パターンに大差は認められなかった。

CREAMER[19]はチェダチーズではβ-カゼインは分解されにくいが，α_s-カゼインは分解されやすいとしている。しかし，LEDFORD ら[20]はブルーチーズ，ミュンスターチーズではβ-カゼインは比較的分解されやすいと報告している。このような相異はチーズ中の微生物相の差によるものと思われる。

濃度勾配電気泳動は MARGOLIS and KENRICK[21], RÜCHEL[22]がその有効性を報告しているが，最近しばしば利用される手法である。著者らは従来，チーズ熟成中のカゼインの分解過程をポリアクリルアミド電気泳動(デスク法)で検討してきたが，熟成の進行にともない各カゼインフラクションと類似した移動距離を持つ分解産物が生じ分析上難点が認められていた。しかし，濃度勾配電気泳動法では分子量の差により分画されるとされており，今回β-カゼインの難分解性を明らかにすることができた。また，さらに濃度勾配電気泳動により分解

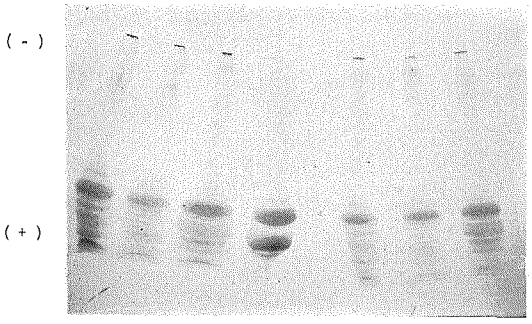

Fig. 1-1. Cheese patterns after electrophoresis in 3.75-30.00% linear gradient gel.

Electrophoresis was carried out in Tris-glycine buffer (pH 8.6) for 7 hr at 100 V and 5°C. Migration was from cathode to anode. Samples 1-3: 10 $\mu\ell$ of the cheese extracts. Samples 5-7: 5 $\mu\ell$ of the cheese extracts. Tracks: (1, 7) conventionally made cheese, (2, 6) cheese prepared by direct acidified method, (3. 5) cheese prepared with immobilized chymosin, (4) whole casein.

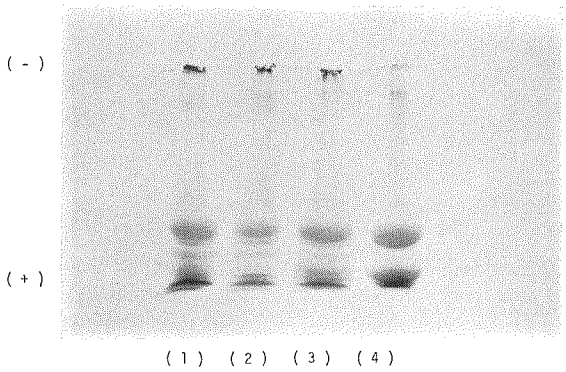

Fig. 1-2. Cheese patterns after electrophoresis in 10-30% linear gradient gel.

Electrophoresis was carried out in Tris-glycine buffer (pH 8.6) for 7 hr at 100 V and 5 C. Migration was from cathode to anode. Tracks: (1) conventionally made cheese, (2) cheese prepared by direct acidified method, (3) cheese prepared with immobilized chymosin, (4) whole casein.

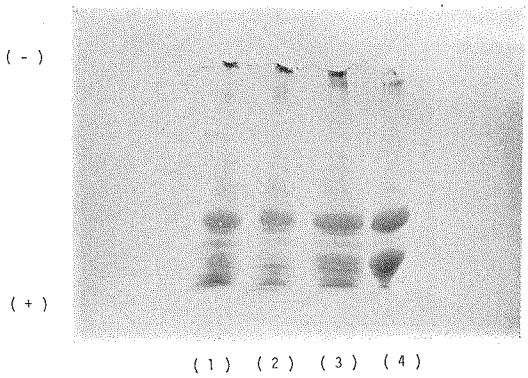

Fig. 1-3. Cheese patterns after electrophoresis in 10-30% linear gradient gel.

Electrophoresis was carried out in Tris-glycine buffer (pH 8.6) for 11 hr at 100 V and 5 C. Migration was from cathode to anode. Tracks: (1) cheese prepared with immobilized chymosin, (2) cheese prepared by direct acidified method, (3) conventionally made cheese, (4) whole casein.

産物を中心に知見を得ることができるものと期待されるので，この点に関して現在実験中である。

2. チーズ熟成中の低分子ペプチドの消長

チーズ熟成中の各種ペプチドの消長を Fig. 2-1～Fig. 2-3 に示した。

2% TCA 可溶性窒素化合物のゲルロ過では，フラクション No. 35 付近にいずれもピークが認められた。スタータ無添加チーズではゲルロ過パターンも多様で，量的には少ないが各種のペプチドが生成されていた。固定化チーズと対照チーズでは類似したゲルロ過パターンを示していた。一方，ニンヒドリン陽性物質については，熟成初期にはフラクション No. 30 付近にピークが認められたが，熟成 90 日ではフラクション No. 25, No. 35 付近にピークが認められた。このことは熟成の進行とともに各種の分子量をもったペプチドが生成されていることを示している。

以上の如く，本実験では，固定化チーズと対照チーズのタンパク分解活性は大体類似した結果を示していたが，一方スタータ乳酸菌を含まないチーズでは生成されたペプチド量は少なく，分解活性は低かった。このようなことから，カゼインが分解されて低分子ペプチドになるにはスタータ乳酸菌が大きな役割を果しているものと推察された。

3. 遊離アミノ酸の生成

本実験では 14 種類のアミノ酸の定量を行ったが，対照チーズおよび固定化チーズではグルタミン酸，ロイシン，フェニルアラニン，リジンの生成パターンは類似しており，この 4 種のアミノ酸量は全遊離アミノ酸量の約 60% を占めていた。

Fig. 3 から対照チーズでは，熟成 30 日において固定化チーズよりアミノ酸量は多かったが，しかし固定化チーズの場合，熟成日数に比例してアミノ酸量はほぼ直線的に増加しており，熟成 60 日では逆転していた。熟成 120 日におけるアミノ酸総量を対照チーズ，固定化チーズ，スタータ無添加チーズの三者で比較すると，スター

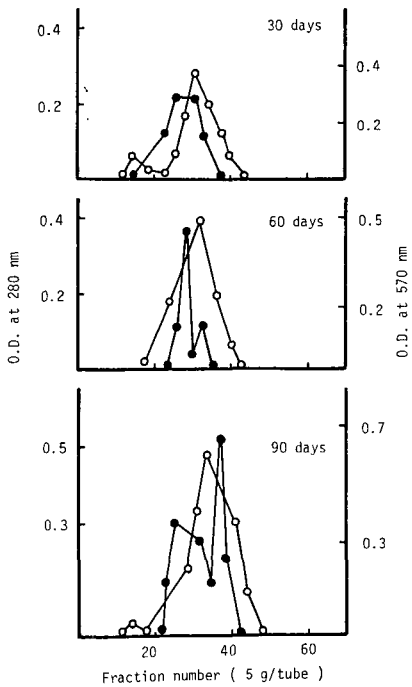

Fig. 2-1. Gel filtration of 2% TCA soluble nitrogen compounds from the conventionally made cheeses on a Sephadex G-50.

The symbols used were ○——○ for O. D. at 280 nm and ●——● for O. D. at 570 nm after reaction with ninhydrin. A flow rate was 20 mℓ per hour.

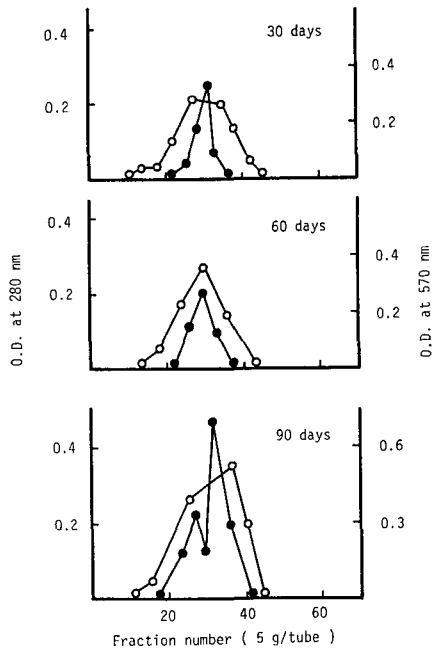

Fig. 2-2. Gel filtration of 2% TCA soluble nitrogen compounds from the cheeses prepared with immobilized chymosin on a Sephadex G-50.

The symbols used were ○——○ for O. D. at 280 nm and ●——● for O. D. at 570 nm after reaction with ninhydrin. A flow rate was 20 mℓ per hour.

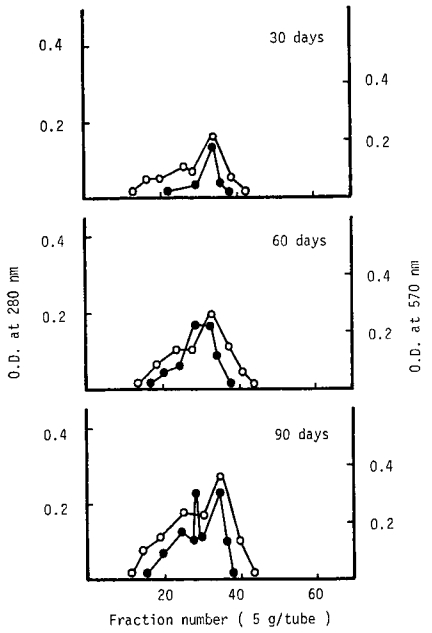

Fig. 2-3. Gel filtration of 2% TCA soluble nitrogen compounds from the cheeses prepared by direct acidified method on a Sephadex G-50.

The symbols used were ○——○ for O. D. at 280 nm and ●——● for O. D. at 570 nm after reaction with ninhydrin. A flow rate was 20 mℓ per hour.

タ無添加チーズでは固定化チーズの約70%であった。これらの結果は，アミノ酸の生成には乳酸菌スタータが生産する酵素が重要であることを示している。山本ら[13]もチーズタンパクは，乳酸菌の酵素によってより低分子の窒素化合物に分解されるとしており，大宮と佐藤[23]は乳酸菌菌体内酵素およびレンネットの作用について検討している。牛乳中には多くの酵素が含まれており[24]，BULLOCK and IRVINE[25]はアミノ酸の生成には，これら牛乳中の酵素が重要であるとし，さらに YAMAUCHI and KAMINOGAWA[26]は牛乳プロテアーゼの作用について報告している。また，DULLEY[27]はチーズ CURD には添加レンネットの約7%が移行すると報告している。このように熟成中のタンパク質の分解は主にレンネット酵素，スタータ乳酸菌の生産する酵素，牛乳中の酵素などにより行われるものと思われる。しかし，チーズ熟成過程は非常に複雑で，その詳細については未だ不明な点が多い。

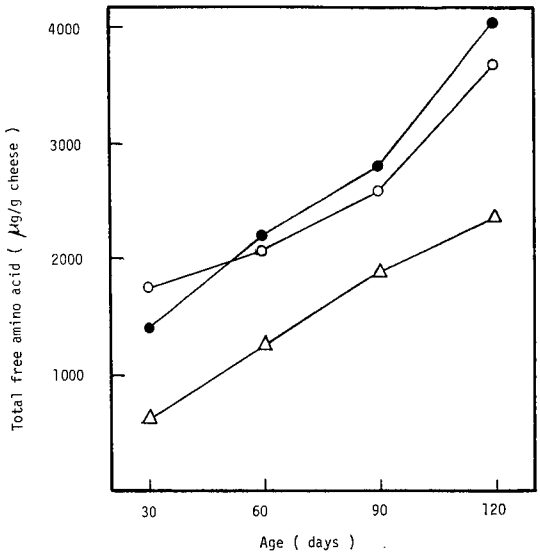

Fig. 3. Changes in total free amino acids during ripening of conventional, immobilized chymosin and direct acidified method cheeses

The symbols used were ○——○ for conventionally made cheese, ●——● for cheese prepared with immobilized chymosin and △——△ for cheese prepared by direct acidified method.

要　約

固定化キモシンによりチーズを製造し，熟成中のタンパク分解過程を対照チーズおよびスタータ無添加チーズと比較検討した。

1) カゼインの変化を濃度勾配電気泳動により検討した結果，熟成120日では α_s-カゼインは完全に分解されていたが，β-カゼインの分解度は低かった。

2) 2% TCA 可溶性低分子量ペプチドの消長を Sephadex G-50 によるゲルロ過およびニンヒドリン発色法により検討した。対照チーズ，固定化チーズではその生成パターンは類似していたが，スタータ無添加チーズでは生成量は少なかった。

3) 遊離アミノ酸総量については，対照チーズ，固定化チーズでは生成パターンは類似していたが，一方スタータ無添加チーズでは熟成120日において，対照チーズ，固定化チーズの約60%量であった。

謝　辞

本研究を行うにあたり，終始ご指導をいただいた北大農，仁木良哉助教授，三河勝彦博士に深謝致します。ま

たアミノ酸分析に関してご助言をくださいました北大農，上山英一教授，チーズ製造に協力していただいた北大農付属農場，長橋隆雄，板谷 一，加藤秀雄の諸氏に感謝致します。

引 用 文 献

1. GREEN, M. L.: Review of the progress of dairy science: Milk coagulants, *J. Dairy Res.*, **44**: 159-188. 1977
2. DE KONING, P. J.: Coagulating enzymes in cheese making, *Dairy Industries International*, **43**: 7-12. 1978
3. KIKUCHI, T., TAKAFUJI, S., TOYODA, S. and SUZUKI, Y.: Studies on microbial rennet I. The characteristics of microbial rennets, *Report Res. Lab., Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Japan)*, No. 70, P. 1-6. 1968
4. KIKUCHI, T., TAKAFUJI, S., TOYODA, S. and SUKEGAWA, K.: Studies on microbial rennet II. Experimental trials of edam cheese making using microbial rennets, *Report Res. Lab., Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Japan)*, No. 70, P. 7-12. 1968
5. KIKUCHI, T., TOYODA, S., AHIKO, K. and SUZUKI, Y.: Studies on microbial rennet III. practical application of microbial rennet in cheese making, *Report Res. Lab., Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Japan)*, No. 70, P. 13-22. 1968
6. 有馬俊六郎・島崎敬一・山住哲一・金丸義親： 不溶性レンニンの調整について，酪農科学の研究，**23**: A 83-A 87. 1974
7. SHINDO, K. and ARIMA, S.: Studies on the immobilized chymosin Part II, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **59**: 284-293. 1979
8. SHINDO, K. and ARIMA, S.: Studies on the immobilized chymosin Part III, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **59**: 294-302. 1979
9. 進藤一典・有馬俊六郎： キモシンに関する研究，酪農科学・食品の研究，**28**: A 177-A 182. 1979
10. 進藤一典・阪本 弘・有馬俊六郎： Paraffin Wax による固定化キモシンの調製について，北大農邦文紀，**12**: 46-49. 1980
11. SHINDO, K., SAKURADA, K., NIKI, R. and ARIMA, S.: Studies on immobilized chymosin V. Experiments in cheese making with immobilized chymosin, *Milchwissenshaft* (in Press)
12. KOSIKOWSKI, F. W.: Cheese and fermented milk foods, P. 65-83, Edwards Brothers, Inc., Michigan, 1966
13. 山本藤五郎・吉武 充： チーズの熟成中におけるレンネットおよび乳酸菌の作用に関する研究，畜産試験所研究報告，**1**: 213-221. 1963
14. VISSER, F. M. W. and DE GROOT-MOSTERT, A. E. A.: Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavor development in gouda cheese, *Neth. Milk Dairy J.*, **31**: 247-264. 1977
15. Pharmacia Fine Chemicals: Specifications for polyacrylamide gradient gel electrophoresis
16. ITOH, T.: Comparison of the proteolytic action of rennet extract and pepsin on casein fractions, *Milchwissenschaft*, **27**: 470-472. 1972
17. 日本化学会編： 実験化学講座 23, p. 124-130, 丸善，東京，1957
18. WEAVER, J. C., KROGER, M., and THOMPSON, M. P.: Free amino acid and rheological measurements on hydrolyzed lactose cheddar cheese during ripening, *J. Food Sci.*, **43**: 579-583. 1978
19. CREAMER, L. K.: β-Casein degradation in gouda and cheddar cheese, *J. Dairy Sci.*, **58**: 287-292. 1975
20. LEDFORD, R. A., O'SULLIVAN, A. C. and NATH, K. R.: Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide —gel electrophoresis, *J. Dairy Sci.*, **49**: 1098-1101. 1966.
21. MARGOLIS, J. and KENRICK, K. G.: Polyacrylamide gel—electrophoresis across a molecular sieve gradient, *Nature*, **214**: 1334-1336. 1967
22. RÜCHEL, R.: Preparations of continuous gradient gel slabs: A simple technique, *Anal. Biochem.*, **92**: 91-98. 1979
23. 大宮邦雄・佐藤 泰： 酪農用乳酸菌の菌体内酵素，化学と生物，**9**: 440-441. 1971
24. SHAHANI, K. M., HARPER, W. J., JENSEN, R. G., PARRY, R. M. and ZITTLE, C. A.: Enzymes in bovine milk: A Review, *J. Dairy Sci.*, **56**: 531-543. 1973
25. BULLOCK, D. H. and IRVINE, D. R.: A chromatographic study of cheddar cheese ripening, *J. Dairy Sci.*, **39**: 1229-1235. 1956
26. YAMAUCHI, K. and KAMINOGAWA, S.: Decomposition of milk proteins by milk protease, *Agric. Biol. Chem.*, **36**: 249-254. 1972
27. DULLEY, J. R.: The Contribution of rennet

and starter enzymes to proteolysis in cheese, *Aust. J. Dairy Tech.*, **29**: 65–69. 1974

Summary

This study was undertaken to investigate the application of immobilized chymosin to cheese manufacture. Immobilized chymosin was prepared with Paraffin Wax. Proteolytic patterns were compared among the cheese prepared with the immobilized chymosin (CIC), the conventionally made Gouda-type cheese (Control) and the cheese prepared by the direct acidified method (CDAM).

Electrophoresis in linear gradient slab gel was used to investigate the mode of degradation of casein during ripening. α_S-casein was degraded nearly completely in every cheese for 120 days, while β-casein was resistant to proteolysis.

In order to investigate the formation of low molecular nitrogen compounds (2% TCA soluble fraction) in cheese of various ripening periods, gel filtration by Sephadex G-50 and ninhydrin reaction were applied. No differences were observed in the gel ffltration patterns between the control and the CIC. On the other hand, the amount of low molecular nitrogen compounds in the CDAM was less than those in the control and the CIC.

The concentration of free amino acids were measured to certain the extent of proteolysis. Amounts of total free amino acids were almost same between the control and the CIC, but in the CDAM it was only about 60% of the amounts of the other two cheeses.

This is concluded that immobilized chymosin with Paraffin Wax would be useful for cheese manufacturing if a suitable manufacturing method would be applied.