



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	牛乳脂肪球に含まれるリパーゼの分離精製とその性質
Author(s)	金, 居猷
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第3247号
Issue Date	1993-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3071543
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51182
Type	doctoral thesis
File Information	000000265385.pdf



牛乳脂肪球に含まれるリパーゼの
分離精製とその性質

北海道大学大学院農学研究科

畜産学専攻 博士後期課程

金 居 猷

①

牛乳脂肪球に含まれるリパーゼの 分離精製とその性質

北海道大学大学院農学研究科

畜産学専攻 博士後期課程

金 居 猷 (キム ゴオユウ)

目 次

緒論	1
第1章 脂肪球と脱脂乳からのリパーゼの精製	12
第2章 脂肪球に結合しているリパーゼの性質	32
第1節 脂肪球から分離精製したリパーゼの活性に 及ぼす添加物、及び反応温度の影響	33
第2節 脂肪球から精製したリパーゼの活性及び 安定性に及ぼすpHの影響	45
第3節 脂肪球から精製したリパーゼの活性に及ぼす 血清成分の影響	58
第4節 リパーゼの活性に及ぼすカゼインの影響	86
第3章 ガスクロマトグラフィーによるFFAの分析	96
第4章 総合考察	107
要約	113
謝辞	115
引用文献	116

緒 論

リパーゼ (EC 3.1.1.3.) は、トリアシルグリセロール中の脂肪酸エステルを順次加水分解し、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロールを経てグリセロールと脂肪酸に分解する酵素である。リパーゼは、ほとんどの哺乳類の乳汁中に含まれている。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。特に、牛乳脂肪は、酪酸、カプロン酸など揮発性、水溶性の低級脂肪酸を構成成分として含み、しかもリパーゼの作用を受け易い^{1,2)}1,3の位置に比較的多く結合している³⁾。従って、リパーゼによって脂肪が加水分解 (リポリシス) され、脂肪酸が遊離になると風味に及ぼす悪影響が特に大きいと考えられている。生成された FFA 量がある限界以上に達し、味覚で判別される異常風味を牛乳の分野ではランシッドという。このランシッドの原因であるリパーゼは、グリセロールの1.3の位置にエステル化した脂肪酸に対して特異性をもっている。またリパーゼは、高級脂肪酸を含むトリグリセリドより低級脂肪酸を含むトリグリセリドを速く分解する⁴⁾。ランシッドの原因となるのは、主に、炭素数 (C) 4 ~ 12 の FFA である^{5,6)}。Al-Shabibi ら⁷⁾ は、特に C4 ~ C8 の FFA がランシッドの原因であるとし、C10 ~ C12 の FFA は、苦味、石鹼臭、不潔臭の原因であると報告した。FFA は、牛乳の風味を構成する微量成分のひとつではあるが、原料乳についていえば FFA の増加は風味の低下、異常臭の発生につながるもので、その増加を防がなければならない。また、クリーム中での FFA の生成は乳製品の風味を損なう。このため酪農産業では、脂肪分解による牛乳および乳製品中のランシッドが重要な問題となり、

その原因について研究が行われてきた。

牛乳中には、ランシッドを引き起こすのに十分なリパーゼと脂肪があるが、通常、脂肪分解はほんの僅かしか見られず、風味を悪くすることもない。それは、脂肪球表面がリン脂質やタンパク質の複合体からなる脂肪球膜に取り囲まれており、リパーゼの作用から脂肪が保護されているからである。また、搾乳直後の新鮮な牛乳は、少量のFFAしか含まず、貯蔵法が適当であれば、数日間におけるFFAの増加は僅かである。しかし、乳脂肪球膜を破壊するような処理、例えば、生乳を均質化したり、乳脂肪の融点以上の温度で攪拌したり、泡立てたりすると脂肪球は均質化効果を受け、リパーゼ作用を受けるようになる⁸⁻¹⁰⁾。また5℃以下に冷却した生乳を30℃に加温後、再び10℃以下に冷却するとリポリシスが起こり、この現象を温度活性化という¹¹⁾。以上のような活性化処理によるものを誘導リポリシス(induced lipolysis)という。

一方、牛乳の冷蔵中に僅かに見られる遊離脂肪酸の増加を自然発生リポリシス(spontaneous lipolysis)といい、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ものと考えられている。自然発生リポリシスには、牛の泌乳期¹²⁻¹⁵⁾、飼料の質や量⁹⁾、栄養の状態^{9,16,17)}、泌乳量^{18,19)}、搾乳間隔^{20,21)}、ホルモンのバランス^{22,23)}および脂肪球膜の状態^{24,25)}などの様々な因子が影響するといわれている。生乳は冷蔵中に多少リポリシスを示すものであるが、乳牛の個体によってはその程度の高い牛乳を生産するものがある。自然発生リポリシスを引き起こす牛乳の発生率は、牛群によって差があり、個体乳の3~35%という値が報告されている²⁶⁾。

Saito²⁷⁾は自然発生リポリシスが脂肪球に結合したリパーゼに依存していると報告した。自然発生リポリシスにあたって、リパーゼは脂肪球

膜に吸着する^{24,28)}。この相互作用は牛乳を冷却することによって起こり、牛乳を再び温めても不可逆的である。このリパーゼと膜の複合体形成は、自然発生リポリシスの最も重要な現象である。なぜならば、冷却を遅らせるかあるいは、NaClの添加²⁴⁾によってこの相互作用が妨げられるとリポリシスの程度が低いか、起こらないからである。Deeth & Fitz-Gerald⁹⁾は、牛乳中の全リパーゼ活性、乳脂肪球膜の傷つきやすさ、活性化因子、阻害因子の四つの要因が自然発生リポリシスに影響すると述べている。リポリシスの中で誘導リポリシスは、牛乳の取扱いに注意すること、特に冷却後の温度変化を避けることによって最小限に留められる。一方、自然発生リポリシスを防ぐには、消極的な手段しかない。自然発生リポリシスには、様々な要因が影響しているので、その原因や機構を解明するのは難しいことである。しかし、自然発生リポリシスは、その原因となるリパーゼによって大きく影響される。自然発生リポリシスの最も重要な原因の一つであるリパーゼに関して多くの研究が行なわれてきた。

リパーゼが牛乳中に含まれていることは、今世紀初頭から知られていた。Marfan²⁹⁾が人乳及び牛乳中に、モノブチリンを分解し、酪酸を生成する酵素のあることを1901年に報告した。その後、Palmer³⁰⁾は牛乳中におけるリパーゼの存在を否定したが、1922年、Rice & Markley³¹⁾がショ糖で飽和した殺菌クリームを基質にして生乳を混合した場合に酸度が増加することを証明して以来、リパーゼの存在は一般に認められるようになった。リパーゼの存在が長い間疑問視されていたのは、リパーゼ活性の測定法が不完全であったことにもよるが、その主な理由は牛乳中のリパーゼは活性化処理をしない限り共存する乳脂肪をほとんど分解しないことである。活性化処理はリパーゼ自体よりも、むしろ基質とし

ての牛乳の物理的状态に影響を与えるものである³²⁾。Krukovsky & Herrington¹¹⁾は、5°C以下に冷却した牛乳を30°Cに加温した後、再び10°C以下にするとリパーゼが活性化されることを認めた。この現象は、脂肪球膜のリパーゼに対する透過性¹⁴⁾や脂肪の固化程度の変化³³⁾によるものと考えられたが、Rao³⁴⁾は、脂肪球表層における脂肪分子の配列の変化によると推定している。

牛乳中のリパーゼの存在が認められるようになってから、牛乳リパーゼの研究は、1950年代から1960年代にかけて主に物理化学的な性質、あるいは、活性化機構について行われた。また、牛乳中に何種類のリパーゼが存在するかについて研究され、Schwartzら³⁵⁾はリパーゼ活性における最適pHを調べ、牛乳中には三種類のリパーゼが存在するとした。また、Albrecht & Jaynes³⁶⁾は、pH 5.4と6.3に最大活性があることから二種類のリパーゼの存在を主張した。Frankel & Tarassuk³⁷⁾は、リパーゼが存在している脱脂乳を酵素源とし、乳脂肪、Tween-20、メチルブチレート、およびトリブチリンを基質に用いてpH、基質濃度、酵素濃度、反応時間、および反応温度とリパーゼ活性との関係を調べた。その結果、基質の種類により、これらの性質が異なることを示した。基質特異性の研究からTarassuk & Frankel²⁸⁾は、牛乳中に少なくとも二種類のリパーゼ、すなわち牛乳を冷却すると脂肪球膜に不可逆的に吸着されるmembrane lipaseと脂肪球に吸着されずカゼインと結合した状態で乳漿中にとどまるplasma lipaseが存在する考えた。しかし、それらの系では、多くの因子がリパーゼ活性に影響するので、牛乳中に二種類以上のリパーゼが存在することはなお論議された。

牛乳中のリパーゼの性質を研究するために、リパーゼの精製が試みられた。Gaffneyら³⁸⁾はレンネットカードの水抽出物から、イオン交換ク

ロマトグラフィーによって牛乳中の活性に対し、1,000倍の活性を持つリパーゼを得た。Fox & Tarassuk³⁹⁾は、分子量21万、最適pH 9.2、脱脂乳の500倍の活性を持つ均一なリパーゼを調製した。Montgomery & Forster⁴⁰⁾はトリブチリンを分解するリパーゼと思われる B-エステラーゼを部分的に精製した。

一方、Korn⁴¹⁾は、1962年に、牛乳がヘパリン処理した血漿、脂肪組織、および心臓に存在するリポタンパク質リパーゼ (LPL) と同じ特性を持つLPLを含むことを示した。このLPL(EC 3.1.1.34) は、脂質とタンパク質から構成されているリポタンパク質のトリグリセリド部分を分解するかあるいは、リポタンパク質が共存した場合にのみ脂肪を分解した。LPLは、初めヘパリン静脈注射後に食餌性脂血症の血漿を透明にするので、clearing factorとして定義された⁴²⁾。その後、Korn⁴³⁾は、ラットの心臓や脂肪組織のアセトン粉末からリパーゼを抽出し、それが人工基質であるトリグリセリドよりもリポタンパク質トリグリセリドをよく加水分解することから、この酵素をLPLと呼んだ。LPLのあるものは、乳腺細胞中で合成され、毛細血管内皮細胞へ移行する。そこで血液のリポタンパク質中のトリグリセリドをFFAとジグリセリドやモノグリセリドに加水分解する。これらの生成物は、乳腺細胞に吸収され、乳脂肪合成に使われる⁹⁾。牛乳中のLPLは上記の乳腺中に存在する酵素と同一で⁴⁴⁾、これが漏出したものであるといわれている。牛乳中のLPLが問題にされる以前に、血液や脂肪組織中のLPLが生化学者らによって詳細に研究された。その結果、LPLは至適pHをアルカリ側に持ち、高濃度のNaClやプロタミンで阻害され、血漿リポタンパク質C-IIで活性化される性質を持っているのが特性とされている。

牛乳中にLPLの存在が報告されて以来、LPLとリパーゼの関係が検討

された。リパーゼとLPLを区別する一般的基準は、両方とも乳化したトリグリセリドを優先的に分解するが、LPLの場合は最大活性を示すための重要な条件として血清アルブミンや適当な活性化剤、たとえばポリペプチドを必要とする^{43,45,46)}。しかし、LPLが血清を含まないトリグロセリドを分解するという報告もある⁴⁷⁾。Castberg および その共同研究者達^{48,49)}は、抗血清との交叉反応、NaClなどの試薬、加熱および紫外線に対するリパーゼとLPLの反応における類似性、また、最適pH、熱安定性、分子量、ヘパリンやNaClによるカゼインミセルからの遊離などの特性を比較し、牛乳中にはLPLのみが存在するとした。

一方、Downey⁵⁰⁾はリパーゼとLPLを分けることが出来ないし、NaClの阻害効果はリパーゼでも認められたので、牛乳中にはリパーゼだけが存在し、LPLは認め難いとした。斎藤⁵¹⁾は、牛乳中のリパーゼについて、遊離した高級脂肪酸は、水と脂肪の界面に残りリパーゼ活性を阻害するので、トリオレインやトリステアリンを基質とするときは、脂肪酸受容体としてリポタンパク質のタンパク質部分や血清アルブミンを必要とするのでLPLと考えられ、トリブチリンを基質にするときはこれらが不用であるから真正リパーゼと考えた。一方、乳脂肪を基質にするときは高級脂肪酸と低級脂肪酸を含むので両者の性質を示すと考えた。Downey⁵²⁾は、LPLがリポタンパク質を補助因子として必要とするのが絶対的なことではなく、むしろ基質の状態に依存すると報告した。

また、牛乳中には性質が異なる二つの脂肪分解酵素、すなわちリパーゼ^{37,53)}とLPL^{43,44)}が含まれているという意見もある。Driessen & Stadhouders⁵⁴⁾は、リパーゼとLPLの存在を報告した。しかし、彼らは、両者が同じ酵素である可能性も認めている。Jensenら⁵⁵⁾は、LPLが、リパーゼとは異なる酵素で、ランシットを発生させる原因ではない

とした。

このように牛乳リパーゼとLPLが、同じ酵素であるかどうかについて長い間検討されてきたが、その両方の酵素の相違をはっきり区別することができなかった。従って、現在は、一般的に牛乳中では、リパーゼと呼ばれてきた酵素とLPLが同じものであるとされている。また、この酵素に対する用語として両方を統一した別の用語を用いることも提案されたが結局は、研究者によってそれぞれリパーゼあるいは、LPLどちらかの用語が使われている。本報において筆者はリパーゼを用いるが、文献を引用する場合はその記述にしたがってリパーゼあるいはLPLを用いることとする。

牛乳中のLPLあるいはリパーゼの分布については、その大部分が脱脂乳中に存在しており、その多くはカゼインミセルと結合し⁵⁶⁻⁵⁹⁾、乳清中にも一部存在する⁵⁷⁾といわれる。そして少量のLPLが脂肪球に結合している^{24,28,41,48,60)}といわれている。LPLは、脂肪組織、心臓、骨格筋などにも含まれているが、脱脂乳は比較的多量のLPLを含んでいるため、LPL精製の出発材料としてよく利用されてきた。LPLの精製は、ヘパリンを固定化したセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーの利用によって急速に進展した。最初に本質的なLPLの精製を行ったのはOlivecronaら⁶¹⁾である。彼らは、0.02 M クエン酸ナトリウムで透析した脱脂乳からヘパリン・セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって脱脂乳より活性が2,000倍高いLPLを得た。Egelrud & Olivecrona⁴⁷⁾もヘパリン・セファロースによるアフィニティークラムクロマトグラフィーを用いて脱脂乳から5,000～7,000倍のLPLを精製し、このLPLは分子量62,000～66,000で炭水化物を含み、血清の添加によって活性が20倍となり、1 M NaClで完全に阻害されると報

告した。

高度に純化されたLPLの特性については、多くの研究結果がある^{49,62,63)}。LPLは、モノマーの分子量が約50,000で、天然では分子量約10万のダイマーで存在する糖タンパク質である^{63,64)}。非常に不安定な酵素で紫外線、加熱、酸、酸化剤によって不活性化される^{65,66)}。血清アルブミン、グリシン、グリセロール、ヘパリン、オレイン酸などの物質が精製したLPLを安定化するために用いられる^{48,63)}。牛乳中では、脱脂乳中に存在する因子⁶⁷⁾、おそらくヘパリン様のグリコサミノグリカンによって安定化されると考えられている⁶⁸⁾。人の血液中に存在するアポリポタンパク質C-II (apo C-II)^{69,70)}というポリペプチドがLPLの活性化因子とされている。牛の血液中にも分子量8,000~10,000の二つの活性化ポリペプチドが存在する⁷¹⁾と報告されている。人や牛の血液中には、活性化因子だけではなく阻害因子となるアポリポタンパク質も含まれている⁷¹⁻⁷³⁾。

血清は、乳化した長鎖のトリグリセリドを基質に用いた反応系では、LPLに対し活性化効果を示す。また、このような反応系では、脂肪分解によって生じたFFAが脂肪と水の界面に蓄積することによってLPLの作用を阻害するので、LPL作用を促進するためには血清アルブミンなどの脂肪酸受容体が必要である⁷⁴⁾。LPLはトリブチリンに対しても活性を有する。この場合は血清因子や脂肪酸受容体を必要としない⁷⁵⁾。牛乳中でのLPLは、乳脂肪が乳脂肪球膜によって保護されているから通常は作用できない。しかし、血清の添加がLPLと乳脂肪の間の相互作用を容易にし、その結果リポリシスが生じるという¹⁹⁾。

脱脂乳や脂肪球膜に存在する糖タンパク質がリポリシスを阻害するという発見^{76,77)}は、牛乳が阻害因子を含むという初期の報告⁷⁸⁾を支持し

ている^{24,25)}。Anderson⁷⁶⁾は、牛乳にプロテオ-ス・ペプトンを添加した場合、リポリシスが阻害され、その中でもコンポーネント3の方がコンポーネント5と8より効果的であると報告した。そのプロテオ-ス・ペプトン成分は、乳脂肪球膜の可溶性糖タンパク質と似た抗原性を示す^{79,80)}。Shimizuら⁷⁷⁾は乳脂肪球膜から分離した可溶性糖タンパク質がリパーゼの脂肪分解を著しく阻害すると報告し、その阻害作用は可溶性糖タンパク質が基質表層に局在し、リパーゼの基質への結合を阻止することによって起こると考えた。

LPLがヘパリンと相互作用することは、LPLの特有な性質である⁸¹⁾。ヘパリンは、牛乳やモデル系でLPLによるリポリシスを増強する⁶⁸⁾がLPLの活性化因子であるとは考えられない。むしろ、ヘパリンはLPLを安定化する効果を持ち、NaClのような試薬による阻害を取り消すといわれている⁶⁸⁾。固定化したヘパリンを用いた研究から、Bengtsson & Olivecrona⁸²⁾は、LPL分子が活性部位の他に少なくとも三個所の機能的領域を持っており、そのうちの 하나가ヘパリンと相互作用する領域であることを報告した。他の二つの領域は、活性化因子と相互作用する部分と、脂肪と結合する部分、あるいは界面を認知する部分であるといわれる⁸³⁾。

LPL活性が高い濃度の食塩によって阻害されることは、初期の研究で知られた特性の一つであり⁴³⁾、他のリパーゼとLPLを区別するために使われた。しかし、この阻害程度が、分析条件の相違、酵素源の違い、また同じLPLでも精製の度合によって、かなり変動することも示された⁸⁴⁾。LPL活性が食塩によって阻害されない系も報告され^{85,86)}、この阻害がLPLの活性部位には直接関係しないで、LPLと活性化剤の相互作用に影響すると考えられた⁸⁷⁾。LPLが、脂肪と結合する能力は食塩濃度

の増加による減少が示唆され⁸⁸⁾、食塩による阻害は基質とLPLの結合の現象に関与すると考えられた^{86,89)}。

基質には、活性化因子であるアポリポタンパク質を含む血清キロミクロンやリポタンパク質に存在する長鎖のトリグリセリドが用いられた。また、均質化乳、イントラリピッドやエディオールなどの乳化脂肪、トリブチリンなどが基質として用いられた。その活性は、基質脂肪の物理的状态すなわち、乳化の程度や脂肪球表面の状態によって大きく影響される¹⁰⁾。したがって、基質の種類、乳化法、純度などの差が各研究者の結果を比較するときに混乱を招き⁵³⁾、結果が一致しない原因でもある。

以上で述べた特性は、主に脱脂乳から精製されたLPLを用いた場合の結果である。このように脱脂乳部分に含まれているLPLの性質については、よく研究されているが、脂肪球と結合しているリパーゼあるいは、LPLについてはほとんど知られていない。今日、脂肪球膜に結合しているリパーゼは、脱脂乳中に含まれているLPLと同じものと推定されている⁴⁸⁾。しかし、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る。また、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は、脂肪球と結合しているリパーゼの性質を知ることである。

本研究では、脂肪球からリパーゼの分離精製を試み、その結果得られたリパーゼの性質について調べた。基質としては、通常LPLの基質としてよく使われているヤシ油を用いた。さらに牛乳中でのリポリシスにおいて示されるリパーゼの性質を理解するために市販の均質化牛乳中の乳脂肪を基質として用いた。一方、反応温度は、文献中の結果と比較する

ためには37℃、牛乳の冷蔵中における作用を検討するためには0℃を用いてリパーゼの性質について調査した。なお、リパーゼの性質は、いろいろな条件によって必ずしも同じ傾向を示さない場合もあるので、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、リパーゼを脱脂乳から分離精製し、同じ条件で実験を行った。以上のことから、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、脱脂乳中に含まれているLPLと同じものであるかどうかについても検討をした。

第1章 脂肪球と脱脂乳からのリパーゼの精製

牛乳中には、脂肪を加水分解して遊離脂肪酸を生産するのに十分なリパーゼが含まれている。そのリパーゼの大部分はカゼインミセルと結合し⁵⁷⁻⁵⁹⁾、少量が脂肪球に結合しているといわれている^{48,60)}。脱脂乳部分に含まれ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に結合しているリパーゼの性質についてはほとんど知られていない。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と推定した報告もあるが⁴⁸⁾、両者の関係には不明の点が多い。牛乳の冷蔵中に僅かにみられる遊離脂肪酸の増加を自然発生リポリシスといい、脂肪球膜に含まれていたリパーゼ、あるいは、冷却により脂肪球に吸着したリパーゼの関与によると考えられている。脂肪球と結合しているリパーゼの性質を知ることは、牛乳のリポリシス、特に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。脂肪球と結合しているリパーゼについては、いくつかの研究結果があるが^{90,91)}、精製されたものを用いた研究結果はない。従って、そのリパーゼの性質を調べるためには、高度に精製する必要がある。

本章では、脂肪球に結合しているリパーゼならびに脱脂乳中のリパーゼをヘパリン・セファロースアフィニティカラムクロマトグラフィーによって精製し、その回収率、比活性、分子量について検討した。

材料と方法

1) 材料

北海道大学農学部附属農場の牛群の混合乳を用いてクリーム分離機（昭和遠心機制作所）によって30℃でクリームと脱脂乳に分けた。脂肪率 30 ～ 35 %のクリームを脂肪球からのリパーゼ精製のための材料として使用した。脱脂乳からリパーゼを精製するための試料としては、混合乳を遠心分離（3000 rpm、4℃、30分間）して得られた脱脂乳を用いた。

2) クリームの洗浄およびバターミルクの調製

脂肪率30～35%のクリーム3 lを500 ml容の遠心管に250 mlずつ分け、それにショ糖を加えて（0.25 M）、その上にクリームと同量の0.05 M NaCl 溶液を重層し、一晚静置した（4℃）。その後、遠心分離（3000 rpm、4℃、30分間）によって脂肪球を分離し、これを再び2倍量の人工乳清⁹²⁾に分散させ、さらに遠心分離した。洗浄脂肪球を人工乳清に分散させ、3 lにした後、1.5 lずつ3 lのポリエチレン製の広口瓶に分け、時々窒素ガスを吹き込みながら振とうし、バター粒とバターミルクに相当する部分（以下バターミルクと略称）に分けた。バターミルクを再び遠心分離（3000 rpm、4℃、30分間）し、残存する少量の脂肪を取り除いた。

3) ヘパリン・セファロースの調製

ファルマシア・ファインケミカル社のヘパリン・セファロースCL-6Bの粉末10 gに脱イオン水を加え膨潤させた。15分間以上静置後、ガ

ラスフィルター（G 3）で濾別し、粉末1 gあたり約 500 mlの人工乳清で洗浄し、少量の人工乳清に懸濁した。

4) 脂肪球に結合しているリパーゼの精製

Matsuokaら⁸³⁾の方法による脱脂乳からのリパーゼ精製法をもとにしてヘパリン・セファロースによるアフィニティカラムクロマトグラフィーを行った。バターミルク約 1.3 l に0.4 MになるようにNaClを加え、約30分間4℃で攪拌した後、人工乳清中に懸濁したヘパリン・セファロース40 mlを加え、4℃で約 12時間穏やかに攪拌した。このゲルをガラスフィルター（G 3）上に集め、0.4 M NaClを含む0.02 M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.4）、0.2%トリトンX-100を含む同緩衝液、0.75 M NaClを含む同緩衝液各5 l で順次洗浄した。洗浄後のゲルをカラム（2.1×11 cm）に充填して、0.75 M NaClを含む同緩衝液で未吸着物質を洗い出した（4℃）。流速を一時間当り10 mlに調節し、溶出液にタンパク質が認められないことを吸光度（280 nm）により確認してから、2 M NaClを含む 0.02 M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.4）で溶出を行なった。溶出液を5 mlずつ採集し、各フラクションのリパーゼ活性を測定し、活性の高い部分を集めて4℃で水に対して透析後、実験に用いた。

5) 脱脂乳からリパーゼの精製

脱脂乳からのリパーゼ精製は、若濱⁹³⁾の方法にしたがって行った。

6) タンパク質濃度の測定、及びリパーゼ活性測定

タンパク質濃度は、280 nmの吸光度およびマイクロケルダール法によ

って測定した ($N \times 6.38$)。リパーゼ活性の測定には、市販の均質化乳中の乳脂肪 (市乳: 乳脂肪 3.6%、殺菌 140°C 2秒間) を基質とした。均質化乳を1.5 mlずつ共栓付き試験管に分注し、37°Cで5分間保持した。これに各画分の溶出液0.8 mlを加え、20分間反応させた。遊離する脂肪酸 (FFA) 量をフェノールレッド法⁹⁵⁾により測定した。標準直線をパルミチン酸により作成し、各測定値をパルミチン酸に換算して表した。

7) フェノールレッド法によるFFAの測定

FFAの測定は、Lindqvistら⁹⁴⁾の方法を一部改変したフェノールレッド法で行った。すなわち、試料2.3 mlに抽出溶媒 (イソプロパノール: ヘプタン: 1 N 硫酸 = 25:25:2) 7.5 mlを加えて反応を停止させ、2分間振とうし、2時間以上静置する。この上層液1 mlを比色用セルにとり、50%水酸化カリウム・ヘプタン層を通した窒素ガスを60秒通気後、指示薬液 (バルビツール酸ナトリウム 50 mg、フェノールレッド 10 mg、脱イオン水 2 ml、エタノール 40 ml) を2 ml加え、窒素ガス通気により30秒攪拌し、直ちに分光光度計 (日立220型 ダブルビーム分光光度計) で波長570 nmにおける吸光度を測定した。

8) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

アフィニティカラムクロマトグラフィーにより調製したリパーゼの純度および分子量を調べるために、Laemmli⁹⁶⁾の方法に従い SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行なった。電気泳動用の試料はウルトラフィルター・USY-1 (AdvantecToyo社、分画分子量10,000) を用い、5倍に濃縮した。0.1%SDSを含む7.5%のアクリルアミドのスラブゲルを用いて泳動後、クマシーブリリアントブルー

R250で染色した。標準試料として、ファルマシア社製の電気泳動用低分子量測定キット（ホスホリラーゼ-b 94,000、アルブミン 67,000、オボアルブミン 43,000、カルボニックアンヒドラーゼ 3,000、トリプシンインヒビタ 20,100、 α -ラクトアルブミン 14,400）を用いた。泳動したゲルのデンストグラムをデジタルデンストロールDMU-33C（東洋光電濃度計東洋科学）を用いて測定した。

結 果

1) 洗浄方法が異なるクリームのアフィニティークロマトグラフィーの溶出図の比較

パルミチン酸を用いて作成した標準曲線を図1に示す。この直線の傾きから各画分のFFA量をパルミチン酸量に換算して各画分の酵素活性とした。図2は、クリームに同量の蒸留水を加え、遠心分離（3000 rpm、4°C 30分間）によって脂肪球を分離し、その洗浄脂肪球から調製したバターミルクを用いた場合に得られたヘパリン・セファロースアフィニティークラムクロマトグラフィーの溶出図である。溶出画分のタンパク質濃度は、280 nmの吸光度によって比較した。その結果、タンパク質濃度は画分 No.10で最大値を示した。各画分の活性を市販の均質化乳中の乳脂肪を基質として測定したところ、画分No.10では活性が認められず画分No.13,17とNo.20に最大活性を示す三つのピークが見られた。図3は0.25 M ショ糖を溶かしたクリームに同量の 0.05 M NaCl溶液を混合し、遠心分離によって分離した脂肪球を再び2倍量の人工乳清に分散させ、さらに遠心分離し、その得られた洗浄脂肪球から調製したバターミルクを用いた場合の溶出図である。各画分のタンパク質を測定した

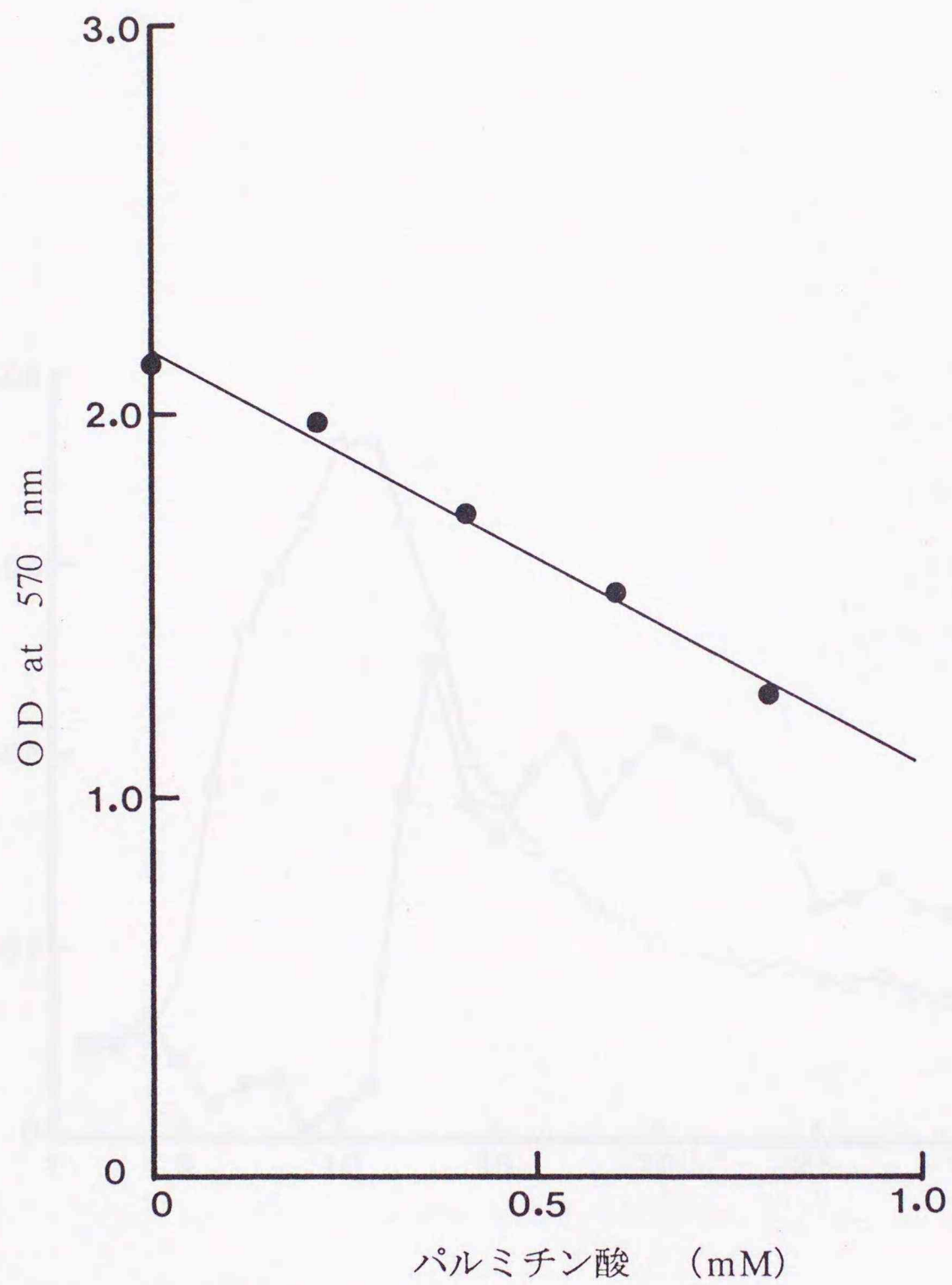


図1 パルミチン酸による標準曲線

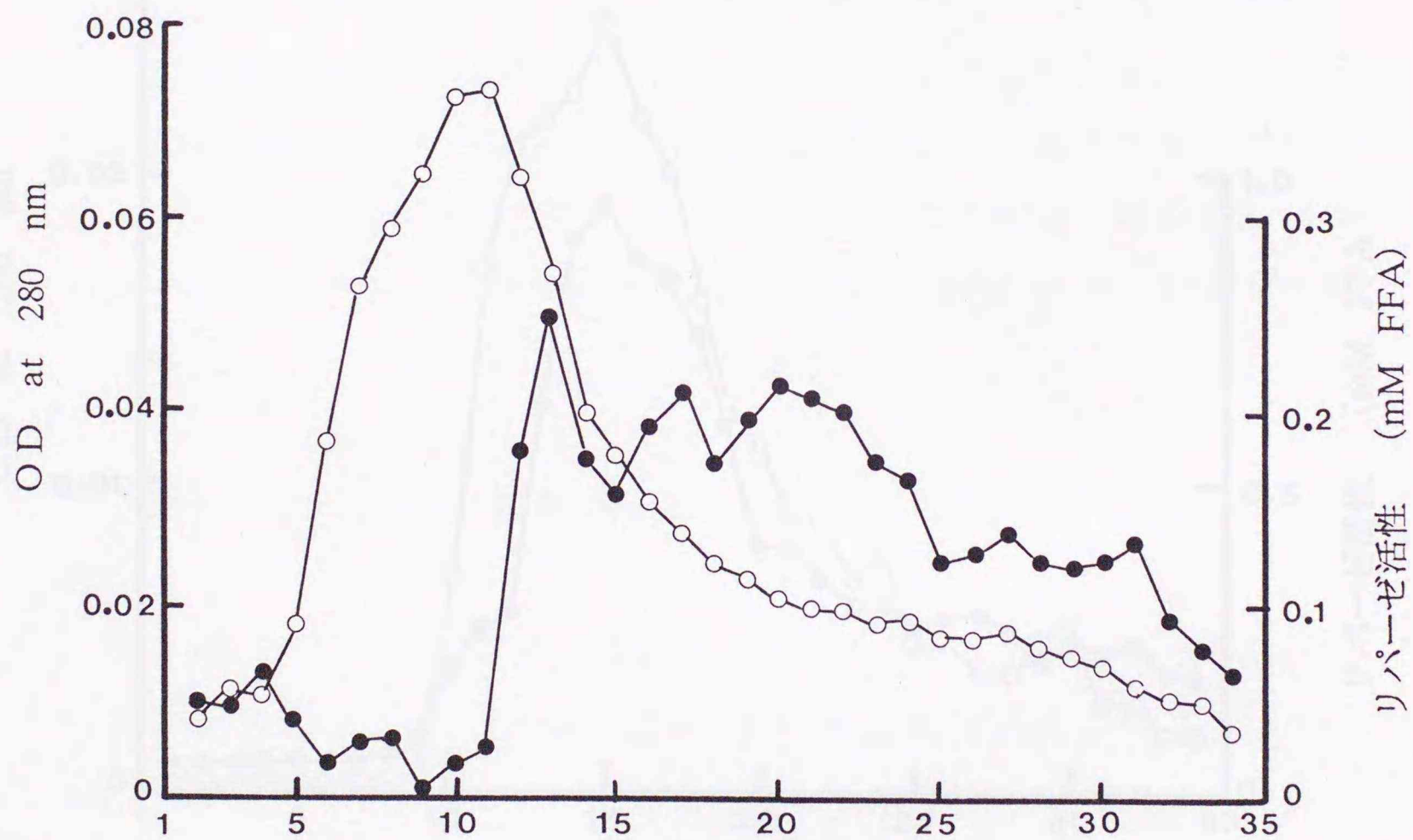


図2 蒸留水で洗浄した脂肪球により製造したバターミルクを用いた場合のアフィニティーカラムクロマトグラフィー
(○) 吸光度 (280 nm), (●) リパーゼ活性.

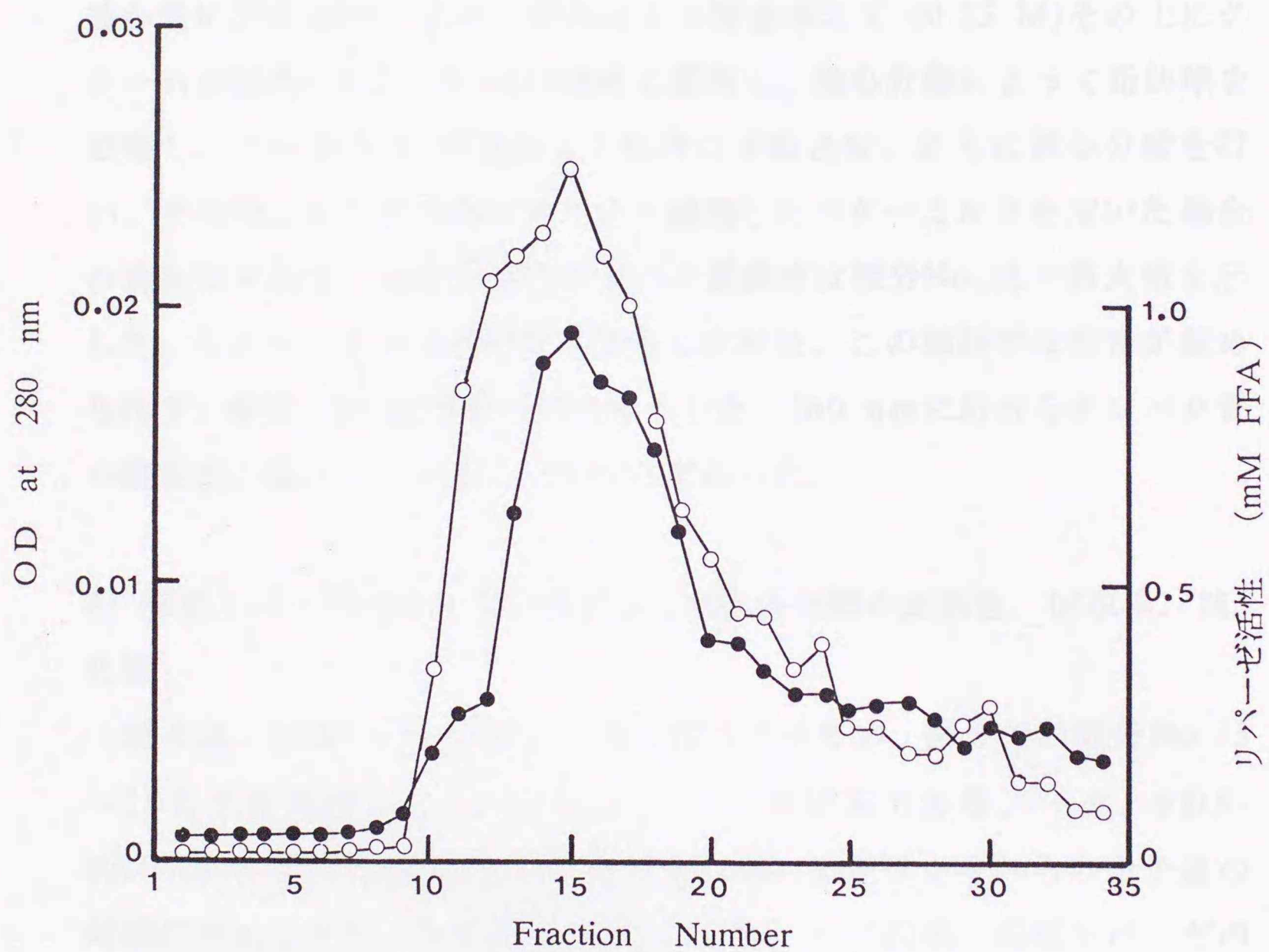


図3 ショ糖と0.05 M NaCl 溶液を混合してクリームを洗浄した場合に得られたバターミルクによるアフィニティーカラムクロマトグラフィー
(○) 吸光度 (280 nm), (●) リパーゼ活性.

結果、最大値は画分No.15にあった。リパーゼの最大活性は、最大タンパク質の最大溶出位置と同じく画分 No.15にあった。280 nmにおけるタンパク質の濃度は、蒸留水で1回クリームを洗浄した場合より低かった。図4は、図3での画分 No.14~19までを混合し、SDS-PAGEを行った結果である。リパーゼであると思われる主要なバンド以外にやや低分子のバンドが見られた。この低分子の成分は、デンストグラムから算出すると、全体の約25%であった。図5は、クリームを500 ml容の遠心管に250 mlずつわけ、それにショ糖を加えて(0.25 M)その上にクリームと同量の0.05 M NaCl溶液を重層し、遠心分離によって脂肪球を分離し、これを再び2倍量の人工乳清に分散させ、さらに遠心分離を行い、その得られた洗浄脂肪球により調製したバターミルクを用いた場合の溶出図である。溶出画分のタンパク質濃度は画分No.11で最大値を示した。しかし、各画分の活性を測定した結果、この画分では活性が認められず、画分 No.16で最大活性を示した。280 nmにおけるタンパク質の濃度は、図3での水準とほぼ同じであった。

2) 精製リパーゼの分子量の測定及び精製各段階の比活性、回収率、純化度

図6は、精製リパーゼの分子量を測定するため、図5での画分No.13~20までを混合し、SDS-PAGEを行った結果である。一方、SDS-PAGEから求めた標準タンパク質の相対的な移動度をそれらの分子量の対数に対してプロットしたのが図7である。この結果、精製リパーゼの主要な成分の分子量は、58,000であった。図4で見られたリパーゼより低分子の成分は、デンストグラムから算出すると全体の約7%であり、図4での濃度の約3分1であった。さらにいくつかの微量な成分を含ん

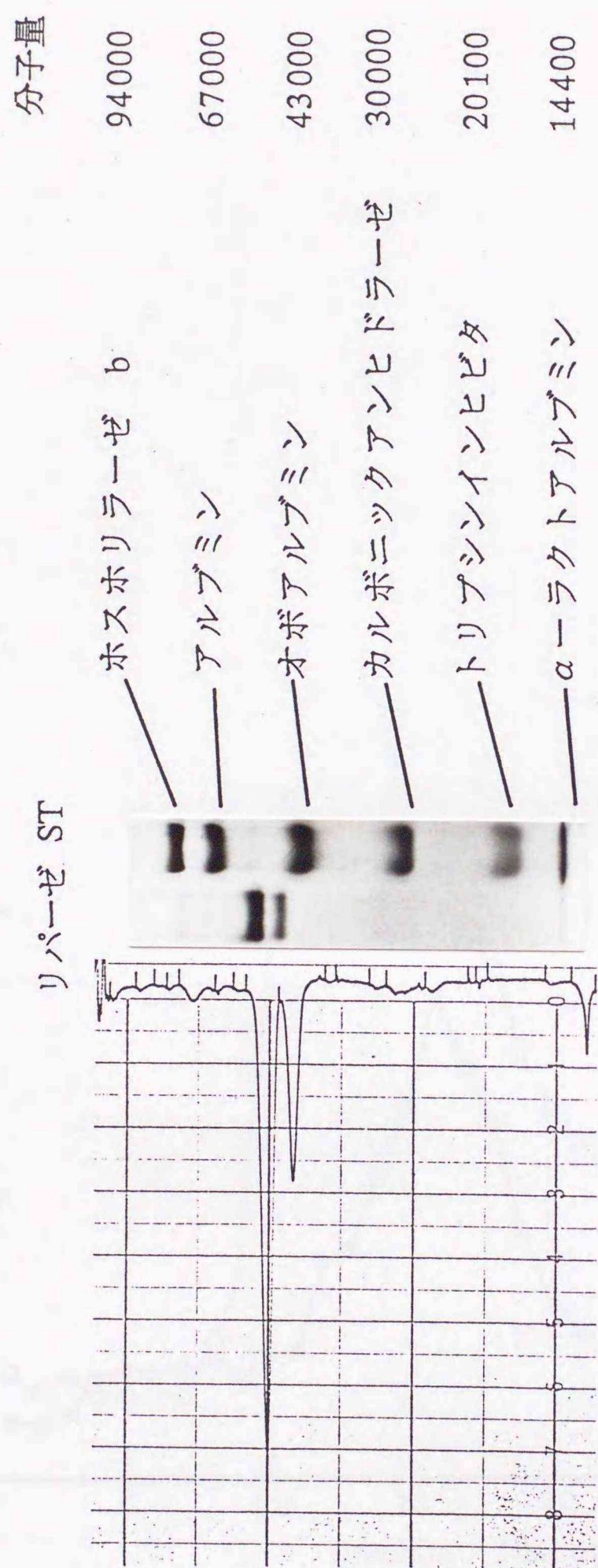


図4 図3で得られた画分 No. 14~19までのSDS-ポリアクリルアミドゲル

電気泳動

ST: 分子量測定用標準タンパク質

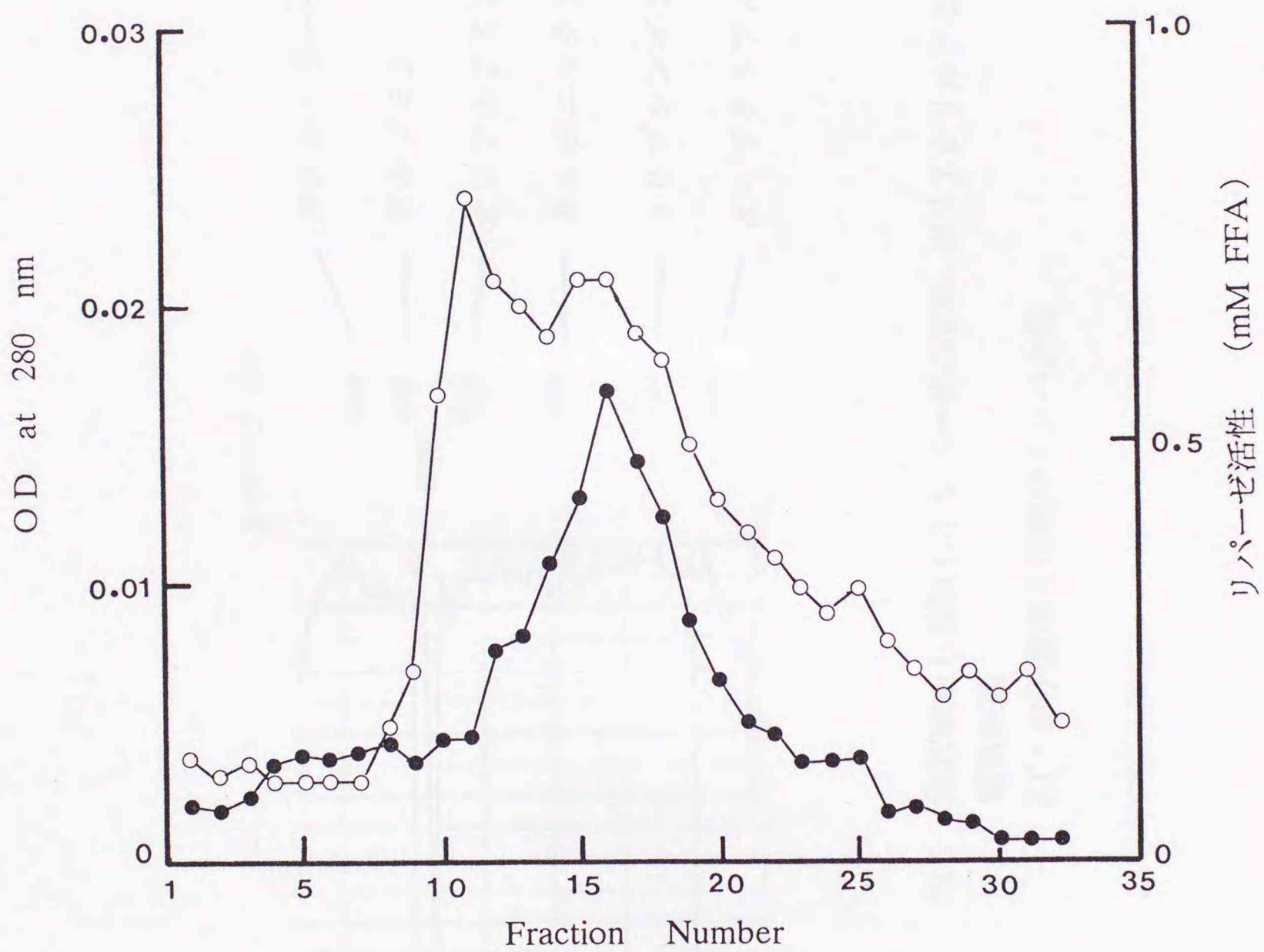


図5 リパーゼのヘパリン・セファロース上でのアフィニティーカラム
クロマトグラフィー
(○) 吸光度 (280 nm), (●) リパーゼ活性.

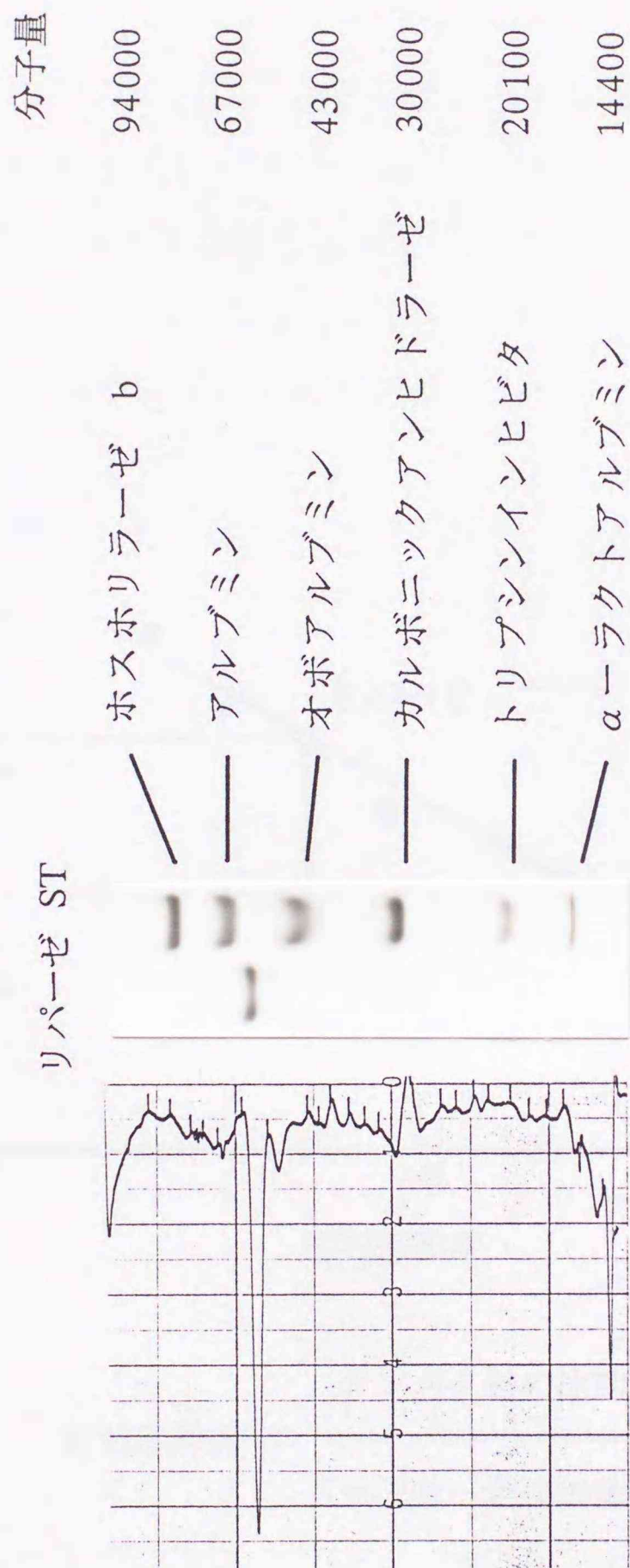
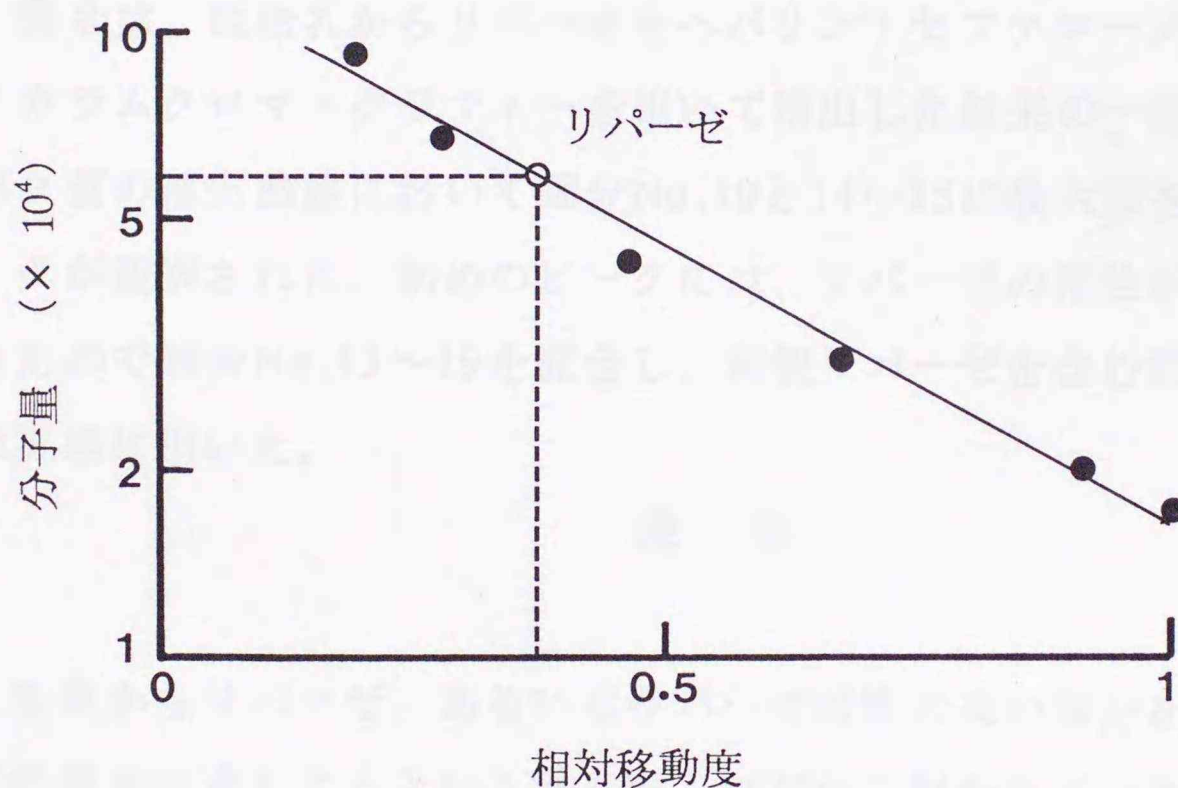


図6 脂肪球から精製したリパーゼのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ST : 分子量測定用標準タンパク質

さいなガゼンロトグラフから読みとる分子組成は、その約45%で
 あった。
 精製リパーゼの分子量測定は、図7に示すように、2% SDS 溶液の平均
 組成を求め、図8の式で計算し、その結果から、リパーゼの分子量は、
 約 50,000 であることがわかった。この結果は、そのリパーゼは、
 イソオクタドセンとステアリン酸からなる脂肪酸の平均組成、
 約 1.5:1.0 の割合で、組成は、約 1.5:1.0 である。

の 脂肪酸組成に由来する。リパーゼの分子量



$$\text{相対移動度} = \frac{\text{タンパク質の泳動距離}}{\text{マーカ色素の泳動距離}}$$

図7 SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製リパーゼの
 分子量の測定

でいたがデンストグラムから算出すると主要成分は、全体の約85%であった。

精製各段階の比活性、回収率および純化度は、4回の実験結果の平均値を求め表1に示す。バターミルク中のリパーゼのほとんど全部がヘパリン・セファロースに結合していることを確認したが、このアフィニティクロマトグラフィーにより得られた精製リパーゼの比活性は、クリームに対し約3,100倍で、回収率は3%であった。

3) 脱脂乳部分に含まれているリパーゼの精製

図8は、脱脂乳からリパーゼをヘパリン・セファロース アフィニティカラムクロマトグラフィーを用いて溶出した結果の一例である。タンパク質の溶出曲線において画分No.10と14~15に最大値を持つ二つのピークが観察された。初めのピークには、リパーゼの活性が認められなかったので画分No.13~19を混合し、精製リパーゼを含む画分とし、以後の実験に用いた。

考 察

牛乳からリパーゼ、あるいはリパーゼ活性の高い部分を取り出してその性質を追求しようという試みは、以前から行われていた。その精製の材料には、脱脂乳^{53,97-99)}、カゼインミセル⁹⁸⁾、レンネットカード³⁸⁾、バターミルク^{41,90)}などが用いられてきた。Quigley⁹⁰⁾は洗浄クリームから得たバターミルクを遠心分離して"milk microsomes"を取り出し、その中にLPL活性を見いだした。その後、Korn⁴¹⁾は牛乳がヘパリン静注後の血漿、脂肪組織、心臓で報告されている場合と同じLPLを含み、そのLPL活性の大部分が脱脂乳に存在すると報告した。しかし、リパー

表1 脂肪球からのリパーゼの精製

	比活性 (μ mol/min/mg N)	回収率 (%)	純化度 (倍)
クリーム	2.8	100	1
洗浄クリーム	7.4	36	2.6
バターミルク	12.8	31	4.5
リパーゼ	8753	3	3126

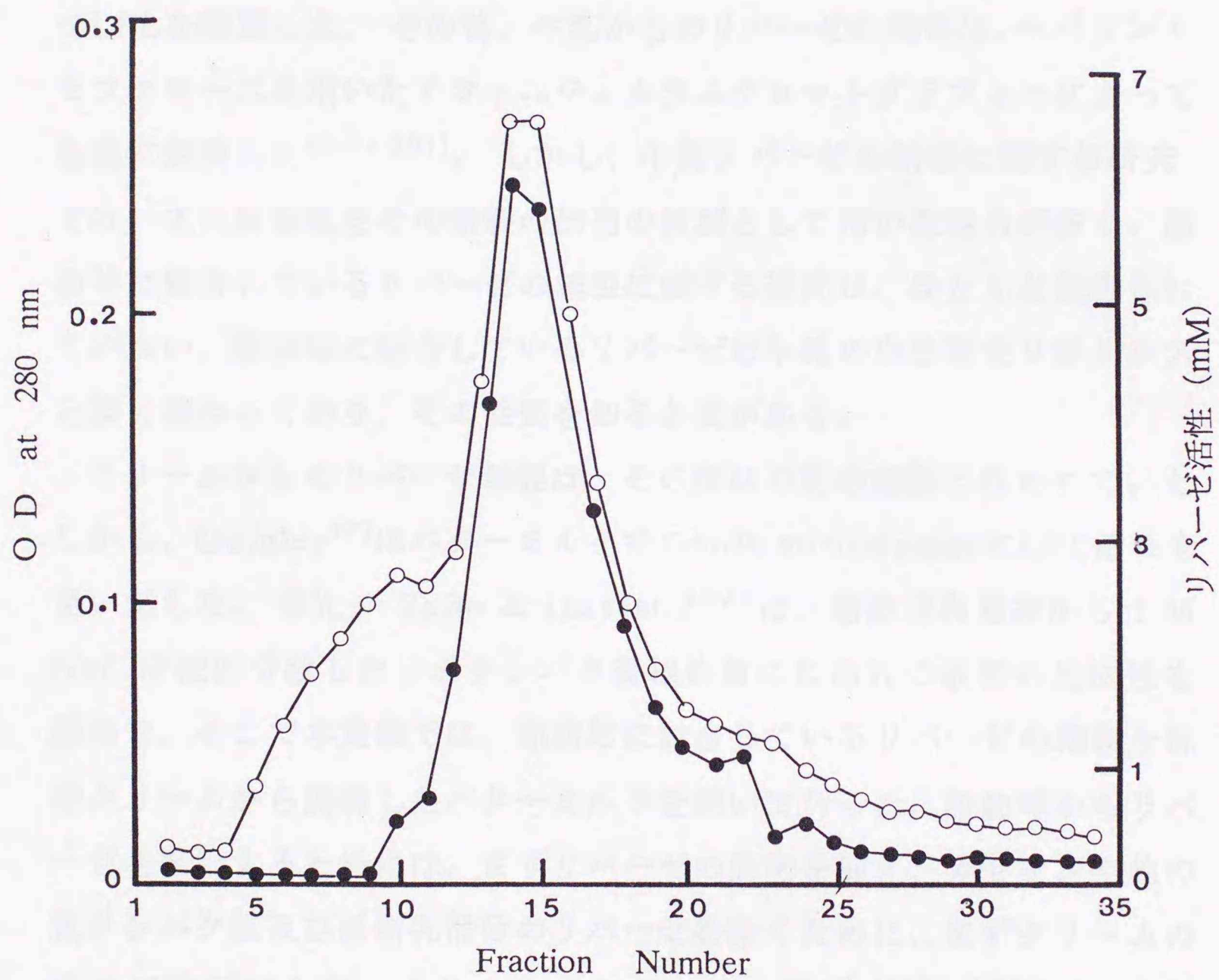


図8 脱脂乳からリパーゼの精製を行った場合のヘパリン・セファロース
アフィニティーカラムクロマトグロフィー
(○)吸光度 (280 nm), (●)リパーゼ活性.

ぜは活性が弱く、しかも不安定な事、活性の測定が簡単でないことなどが難点となって、その成果はあまり得られなかった。最近牛乳LPLは、ヘパリン様のグリコサミノグリカンに結合しているとOlivecrona & Lindahl¹⁰⁰⁾が報告して以来、牛乳LPLに対する研究は活発に行なわれた。Olivecronaら⁶¹⁾は脱脂乳を0.02 M クエン酸ナトリウムに透析してカゼインミセルを溶解させ、ヘパリン・セファロースのアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いて、脱脂乳に対して2,000倍の活性を持つLPLを精製した。その後、牛乳からのリパーゼの精製は、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って急速に進展した^{63,64,101)}。しかし、牛乳リパーゼの精製に関する研究では、主に脱脂乳をその精製の出発の材料として用いた場合が多く、脂肪球に結合しているリパーゼの精製に関する研究は、ほとんど報告されていない。脂肪球に結合しているリパーゼは牛乳の自然発生リポリシスと深く関わっており、その性質を知る必要がある。

クリームからのリパーゼ精製は、その脂肪のため困難と思われていた。しかし、Quigley⁹⁰⁾はバターミルク中のmilk microsomesにLPL活性を見いだした。また、Saito & Igarashi¹⁰²⁾は、脂肪球表層部から1 M NaClで抽出分離したリポタンパク質様物質に脱脂乳の数倍の比活性を認めた。そこで本実験では、脂肪球に結合しているリパーゼの精製を洗浄クリームから調製したバターミルクを用いて行った。脂肪球からリパーゼを精製するためには、まずリパーゼの失活を抑え、カゼインや他の乳タンパク質及び脱脂乳部分のリパーゼを除くために、まずクリームの洗浄が重要である。クリームの洗浄には、蒸留水¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾、ショ糖^{106,107)}あるいは、NaCl溶液¹⁰⁸⁾でクリームを希釈した後、遠心分離するような処理が必要である。Swope & Brunner¹⁰⁵⁾は、クリームを洗

浄するとき 0.25 M ショ糖溶液を用いた方が膜物質の損失が少なかったと報告した。また、Dowbenら¹⁰⁷⁾は、蒸留水を用いてクリームを洗浄するよりも 0.25 M ショ糖溶液で洗浄した方が脂肪球に含まれている酵素の活性が高かったと報告した。クリームの洗浄は、脂肪球に様々な物理化学的な影響をおよぼすことが知られている。Swope & Brunner¹⁰⁵⁾は、洗浄処理によって緩く結合している膜成分の損失、水相でのイオン濃度の減少、および洗浄のとき小さい脂肪球の損失などが生じると報告した。クリームの洗浄は、脂肪球膜の損失以外にもリン脂質や脂肪酸の割合の変化をもたらす。

本実験では、蒸留水または、ショ糖溶液を用いてクリームを洗浄し、その洗浄したクリームから得られたバターミルクを用いてリパーゼの精製を行なった。リパーゼ活性は、ショ糖を用いてクリームを洗浄した(図3, 図5)方が蒸留水を用いた場合(図2)よりやや高かった。280 nmにおけるタンパク質の濃度は、ショ糖と人工乳清でクリームを2回洗浄した(図3, 図5)方が蒸留水でクリームを1回洗浄した場合(図2)の約3分の1と低かった。また、SDS-PAGEの結果から、クリームの洗浄は、ショ糖を溶かしたクリームの上に0.05 M NaCl溶液を重層し、クリームを分離した方がNaCl溶液を混合してクリームを分離する方法よりリパーゼ以外の成分を除く上で効果的であった。このように0.25 M ショ糖を溶かしたクリームの上に0.05 M NaCl溶液を重層し、遠心分離により脂肪球を得た場合は、ショ糖によって比重が高くなったクリーム中の脂肪球が0.05 M NaCl溶液を通過するとき洗われることになる。従って、通常、用いられる洗浄の方法より脂肪球に対する影響が少ないと思われる。

脂肪球からリパーゼを精製するためには、その出発材料であるバター

ミルクの調製の過程が必要である。一般的にバターミルクの調製は、洗浄脂肪球を用いてチャーニングあるいは、機械的な処理によって行なわれる。しかし、バターミルクの調製のとき空気に曝されることは、避けられないことである。Saitoら¹⁰²⁾は、牛乳リパーゼの研究に際して、チャーニングは活性の上から望ましくないことであると報告した。本実験では、洗浄脂肪球をチャーニングするとき窒素ガスを吹き込んだのでチャーニングによる活性の低下はあまりみられず、窒素ガス処理をしなかったときより約5倍の高い回収率(3%)が得られた。これは窒素ガスを吹き込むことにより、酸化による失活が減少した結果であると思われる。

精製リパーゼの回収率は、洗浄する前のクリームに対しては約3%で、かなり低いものであるが、これはクリームの洗浄によってクリームに含まれていた脱脂乳由来のリパーゼが除去されたのが主な原因である。ほとんどの脂肪球リパーゼが含まれていると思われるバターミルクを基準とした場合は約10%であった。しかし、回収率はクリームからバターミルクまでの段階よりバターミルクからリパーゼの精製までの間で大きく低下している。これは、バターミルク調製以後の精製までに数日がかかったので、その間の失活が原因であると思われる。したがって、脂肪球からリパーゼを精製するためには、クリームの洗浄から精製までの間に起こる失活を少なくするのが最も重要なことである。

バターミルクから精製されたりパーゼの回収率および純化度は、実験毎に変動したが、このような結果の変動は、用いるクリームに含まれているリパーゼ活性の差異やクリームの洗浄による失活程度の差などによることが考えられる。

0.25 M ショ糖を溶かしたクリームの上に0.05 M NaCl溶液を重層して脂肪球を洗浄し、その得られたバターミルクを用いてヘパリン・セフ

アロースのアフィニティカラムクロマトグラフィーによるリパーゼの精製を試み、その得られたリパーゼの純度をSDS-PAGEにより確認した。その結果、高純度のリパーゼが得られたので、この方法を以後のリパーゼ精製に用いた。また、この方法によって調製したリパーゼを精製リパーゼとして以後の実験に用いた。

第2章 脂肪球に結合しているリパーゼの性質

牛乳の低温保存中に起こる自然発生リポリシスに対するリパーゼの役割については、まだはっきりしたことは分かっておらず、特に脂肪球に結合しているリパーゼの性質については、ほとんど知られていない。

本章では、粗リパーゼとしてバターミルクと脂肪球からヘパリン・セファロースのアフィニティカラムクロマトグラフィーにより得られた精製リパーゼを用いていくつかの性質について調べた。基質としては、通常リパーゼの基質としてよく使われるヤシ油と牛乳中でのリポリシスにおけるリパーゼの性質を理解するために市販の均質化牛乳中の乳脂肪を用いた。これらの基質を用いてリパーゼ活性に及ぼす添加物、pHおよび反応温度の影響を調査し、さらに脱脂乳中に含まれているリパーゼを分離精製し、そのいくつかの性質について、脂肪球から調製したリパーゼと比較検討した。

第1節 脂肪球から分離精製したリパーゼの活性に及ぼす 添加物、および反応温度の影響

牛乳中に含まれているリパーゼはLPLと同じもので⁹⁾、これが牛乳本来の脂肪分解酵素であるとされている。LPLは、至適pHをアルカリ側に持ち、高濃度のNaClや硫酸プロタミンで阻害される。最大活性のためには血清因子を必要とする酵素である。長鎖の脂肪酸を含む基質には脂肪酸受容体を必要とすることがLPLの特性として知られている⁷⁴⁾。しかし、このような特性は主に脱脂乳に含まれているリパーゼを用いた実験結果であり、脂肪球と結合しているリパーゼの性質についてはほとんど知られていない。そこで、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、およびLPLの活性と関係の深い添加物である牛血清アルブミン(BSA)とヘパリンを用いて脂肪球に結合しているリパーゼ(粗リパーゼおよび精製リパーゼ)の活性に及ぼす基質の違い、添加物、反応温度の影響を調査した。

材料と方法

1) 基質の調製

基質は市販の均質化乳(市乳:乳脂肪 3.6%殺菌140°C 2秒間)とヤシ油を用いた。ヤシ油を基質にする場合は、乳化安定剤としてアラビアゴム(半井化学)を用いた。アラビアゴムに0.16 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)を加え、約60°Cに加温し溶解させた後、同緩衝液で最終的に20% (w/v)となるように調整した。この溶液を1,870 × g、10分間遠心分離して不溶物を除いたものを20%アラビアゴム溶液とした。ヤ

シ油を20% (w/v) になるようにアラビアゴム溶液を加え、卓上型ホモジナイザー (特殊機化工業ホモミクサーM) で乳化した (7,000 rpm、10分間、50°C)。BSA (半井化学) を0.2 M NaClを含むpH 8.5の0.16 M トリス-塩酸緩衝液に溶解して必要濃度の2倍に調製した。同緩衝液でヘパリン、硫酸プロタミン、NaClをそれぞれ 40 IU、3 mg/ml、4 M になるように溶解した。これらの添加物溶液を、基質乳化液と同量混合して基質溶液とした。対照として、添加物溶液の代わりに0.16 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) を加えた基質を用いてリパーゼ活性を測定した。市販の均質化牛乳を基質とする場合には、直接添加物を加えて用いた。

2) 酵素活性の測定

基質溶液1.5 mlを共栓付き試験管に分注し、各反応温度に10分間保持した。これに酵素液 0.8 mlを加えて37°Cで20分間、または0°Cで1時間反応させた。脂肪分解によって生じるFFA量をフェノールレッド法⁹⁵⁾によって測定した。標準直線をパルミチン酸により作成し、各測定値をパルミチン酸量に換算し、増加量により活性を示した。高濃度のNaClを含む試料では、NaClによりフェノールレッド法による測定が阻害されるため、反応液を脱イオン水で希釈した後測定した。

3) 酵素液の調製

精製酵素は、第1章で精製したリパーゼを用いた。粗リパーゼとしては第1章で得られたバターミルクを4°Cで水に対して透析後、実験に供した。

結 果

1) 粗リパーゼを用いた場合

反応温度37°Cでのヤシ油と乳脂肪を基質とした場合の添加物の影響を表2に示す。リパーゼ活性は、各基質の対照の活性を100%として示した。脂肪酸受容体として用いられ⁴³⁾、LPLを安定化する⁵⁹⁾と言われる牛血清アルブミン(BSA)を添加するとヤシ油を基質とした場合には活性が低下した。しかし、乳脂肪を基質とした場合は活性が増加した。ヘパリンを添加すると、ヤシ油を基質としたときの活性は変化しなかったが乳脂肪を基質とした場合は活性が増加した。硫酸プロタミンの添加によって、ヤシ油を基質とした場合は活性が阻害されたが、乳脂肪の場合は活性が増加した。1.3 M NaClの添加によってはヤシ油、乳脂肪両方とも活性が低下した。

反応温度0°Cでヤシ油と乳脂肪を基質とした場合の添加物の影響を表3に示す。BSAの添加により、37°Cの場合とは逆にヤシ油を基質とした場合は活性が増加したが、乳脂肪では活性が低下した。ヘパリンの添加によって、ヤシ油の場合は活性が増加したが、乳脂肪の場合は活性の変化がなかった。硫酸プロタミンを添加したときのリパーゼ活性は、ヤシ油、乳脂肪とも活性が増加した。1.3 MのNaClの添加によっては、ヤシ油、乳脂肪とも活性が低下した。

2) 精製リパーゼを用いた場合

反応温度37°Cで20分間反応させたときの添加物の影響を対照の活性に対する割合として表4に示す。ヤシ油を基質とし、粗リパーゼ(バタ

表2 粗リパーゼの37°Cにおける活性に及ぼす添加物の影響

	BSA (1.96%)	ヘパリン (13 IU)	硫酸プロタミン (0.098%)	NaCl (1.3 M)
ヤシ油	81	105	86	17
乳脂肪	146	125	135	17

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。

表 3 リパーゼの0°Cにおける活性に及ぼす添加物の影響

	BSA (1.96%)	ヘパリン (13 IU)	硫酸プロタミン (0.098%)	NaCl (1.3 M)
ヤシ油	179	134	128	14
乳脂肪	54	93	217	4

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。

表 4 精製リパーゼの37°Cにおける活性に及ぼす添加物の影響

	BSA (1.96%)	ヘパリン (13 IU)	硫酸プロタミン (0.098%) 基質に添加 酵素液に添加*	NaCl (1.3 M)
ヤシ油	230	210	483	24
乳脂肪	72	85	130	4

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。

* 反応3時間前に添加、0°Cで保持

ーミルク)を用いた場合は、BSAの添加によって活性が低下したが、精製リパーゼを用いた場合は、活性が増加した。乳脂肪を基質とした場合は、活性が低下した。ヘパリンを添加した場合、ヤシ油を基質としたときの活性は増加したが、乳脂肪では活性が阻害された。硫酸プロタミンは、LPLの阻害剤として知られているが⁴³⁾、硫酸プロタミンを酵素と反応させる直前の基質に添加した場合、ヤシ油では活性が増加したが、乳脂肪の場合は大きな活性の変動が見られなかった。しかし、硫酸プロタミンを酵素液に加え、0°Cに3時間保持するとヤシ油、乳脂肪とも活性が低下した。反応液中に1.3 M NaClが存在すると、ヤシ油、乳脂肪を基質にした場合、両方とも活性が低下した。

反応温度0°Cで1時間の反応させたときの添加物の影響を表5に示す。BSAを添加すると、活性は37°Cの場合と同じく、ヤシ油を基質とした場合は、増加したが、乳脂肪の場合は低下した。

ヘパリンの添加によっては、ヤシ油と乳脂肪とも活性が増加し、ヤシ油の場合は対照の活性の4倍に増加した。硫酸プロタミンの添加の影響は37°Cの場合と同じく、硫酸プロタミンを酵素と反応させる直前の基質に添加すると、ヤシ油、乳脂肪両方とも活性が増加した。しかし、硫酸プロタミンを酵素液に加え、0°Cに3時間保持すると活性がやや低下した。硫酸プロタミンと酵素を混合し、0°Cで3時間保持した場合、反応温度0°Cでの酵素活性に対する硫酸プロタミンの影響はヤシ油、乳脂肪とも37°Cの場合より少なかった。1.3 M NaClの添加によっては、ヤシ油と乳脂肪とも活性が阻害された。

表 5 精製リパーゼの0°Cにおける活性に及ぼす添加物の影響

	BSA (1.96%)	ヘパリン (13 IU)	硫酸プロタミン (0.098%) 基質に添加 酵素液に添加*	NaCl (1.3 M)
ヤシ油	194	403	362	72
乳脂肪	52	160	202	57

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。
* : 反応3時間前に添加、0°Cで保持

考 察

Korn⁴¹⁾は、脂肪組織、心臓、骨格筋などに含まれているLPLと似た性質をもつリパーゼが牛乳中に含まれていることを報告した。それ以来、牛乳のLPLの性質について様々な研究がなされて来た。その結果、牛乳中のリパーゼはLPLと同じもの⁹⁾で、これが牛乳本来の脂肪分解酵素であると考えられるようになった。しかし、牛乳中には2種類の異なるリパーゼが存在するという意見もある²⁸⁾。リパーゼとLPLの違いをはっきり区別することは難しく⁴⁹⁾、今日、牛乳の分野では、リパーゼおよびLPLの両方の用語が用いられている。

LPLは、最適pHをアルカリ側に持ち、高濃度のNaClや硫酸プロタミンで阻害される。また、最大活性を示すためには血清因子を必要とする。長鎖の脂肪酸を含む基質には脂肪酸受容体を要することがLPLの特性として知られている^{43,88,116)}。しかし、LPLの活性は反応系や測定条件によって変わる。添加物は、LPLや基質と相互作用をして活性化あるいは阻害効果を示す。また、測定条件が変化すると添加物の影響も変化する場合がある。

リパーゼは脂肪を、脂肪酸、ジグリセロール、モノグリセロールに分解する。リパーゼにより遊離状態になった脂肪酸は、基質の脂肪粒子の表面に残り、リパーゼの接近を妨げる¹¹¹⁾。したがって、BSAや Ca^{2+} のような脂肪酸受容体が、酵素作用のために必要であると言われている^{43,74)}。一方、Posner⁸⁹⁾はBSAが脂肪と水の界面に吸着し、リパーゼの活性を阻害すると報告している。

粗リパーゼを用いた場合、BSAの添加による影響は、基質と反応温度によって異なった。本実験では、粗リパーゼとして透析したバターミ

ルクを用いたので、バターミルク中に遊離状態になっている脂肪酸が多少含まれている。BSA添加によって結果に相違が認められたのは、遊離状態の脂肪酸の量と添加したBSAの濃度とのバランスの変化、または反応温度による脂肪の状態の差などが考えられる。これに対し、精製リパーゼを用い、基質としてヤシ油を用いた場合は、反応温度37℃と0℃とも活性が増加した。この活性の増加はBSAが脂肪酸受容体としての役割を果たした可能性を示唆している。しかし、均質化牛乳中の乳脂肪を基質とした場合には、BSAの添加によって活性が阻害された。乳脂肪を基質とした場合の活性低下は、牛乳中に含まれている乳成分が脂肪酸の受容体として作用し、逆にBSAがリパーゼの活性を阻害した結果ではないかと思われる。

リパーゼ活性におけるヘパリンの影響に関しては、研究者の間で一致していない。ヘパリンは、リパーゼ活性を増加させる¹¹²⁾、あるいは活性を阻害する¹¹³⁾とも言われている。また、ヘパリンはリパーゼの活性にほとんど影響しないという報告もある¹¹⁴⁾。一方、Sundheim & Bengtsson-Olivecrona¹¹⁵⁾はヘパリンが分離精製した脂肪球のリポリシスも強めることから、ヘパリンの効果は単にカゼインミセルからのLPLの遊離だけではないとし、冷却による基質表面構造の変化がリポリシスにおけるヘパリンの影響を説明する上で重要であると述べている。表2～表5に示すように、ヘパリンの影響は、基質や反応温度によって異なっていた。このことから、ヘパリンはリパーゼの活性部位よりも基質に対して大きく影響していると考えられる。したがって、リパーゼの活性に及ぼすヘパリンの影響が研究者間で一致していないのは各研究者が用いた基質の違いが原因であると思われる。

硫酸プロタミンは、LPLの阻害剤として知られている⁴³⁾。Korn¹¹⁶⁾

は、酵素液に硫酸プロタミンを加えて0℃で30分間保持した場合、硫酸プロタミンによって活性が阻害されたと報告した。しかし、Hoynes & Downey¹¹⁷⁾はラットの心臓および脂肪組織から分離されたLPLの場合に見られる4℃での予備加温による硫酸プロタミンの阻害効果が、牛乳由来のリパーゼでは認められなかったと報告している。本実験では粗リパーゼを用い、基質液に硫酸プロタミンを加えた場合、リパーゼ活性の阻害は反応温度37℃でヤシ油の場合にしか認められなかった。精製リパーゼを用いた場合では、酵素液に硫酸プロタミンを加えて4℃に保持した場合に活性が阻害された。しかし、基質液に加えた場合、37℃での乳脂肪を基質とした場合以外には、活性が増加した。このように硫酸プロタミンの影響は、基質、反応温度および測定条件によって異なる結果が得られた。このことから、硫酸プロタミンの影響をLPLを分類する一つの基準として用いる事に対してはなお検討の必要があると思われる。

高濃度のNaClによる活性阻害は、LPLの特徴の一つである。しかし、Riley and Robinson⁸⁴⁾は、LPLの活性に対するNaClの影響は活性の測定方法、酵素の純化度や起原などによって大きく異なると述べている。Bengtsson & Olivecrona⁸⁶⁾は、用いる基質によっては、LPL活性がほとんど阻害されない場合もあると報告した。彼らはまた、乳脂肪の系において0.5 M NaClが基質とLPLの結合を阻害することも示した。Fielding & Fielding⁸⁷⁾はLPLと活性化剤との相互作用をNaClが阻害すると報告している。本実験の結果では、基質、反応温度および酵素源に関係なくNaClによって活性が阻害されたことや精製リパーゼを含む画分から透析によってNaClを除去すると活性が高くなったことから、NaClがリパーゼに直接影響したかあるいは、酵素と基質の結合に影響

を与えたものと思われる。

本実験においては、種々の添加物がリパーゼ活性に及ぼす影響は、用いる基質、反応温度、および酵素の純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。

第2節 リパーゼの活性および安定性に及ぼすpHの影響

自然発生リポリシスと総リパーゼ活性の間には、相関関係が低い。なぜならば、様々な生化学的な因子がリパーゼの活性に影響するからである^{21,62)}。それらの中でpHの影響はリポリシスにおいて重要な因子の一つである。

リパーゼ活性に対するpHの影響は、起源が異なるリパーゼ活性を特徴づけるため¹¹⁸⁾また、推定される活性部位の見かけの電離定数を求めるために重要である¹¹⁹⁾。pHとリパーゼ活性の関係については、種々の結果が得られている。多くの研究者^{88,120)}は、pH 8とpH 9の間に最適活性をもつベル型のカーブを示した。一方、基質により最適pHを示さず、リパーゼ活性がpHとともに連続的に増加するという報告もある^{86,121)}。このようにリパーゼの活性とpHの関係は研究者によって結果が相違している。

本節では、脂肪球に結合しているリパーゼ（粗リパーゼおよび精製リパーゼ）および脱脂乳部分に含まれているリパーゼの活性に対するpHの影響を基質と反応温度を変えて調べた。

材料と方法

1) 酵素液の調製

精製リパーゼと粗リパーゼ（バターミルク）は、第1節と同様にして調製した。

2) 基質溶液の調製

ヤシ油を20%になるように20%アラビアゴム水溶液に加えて、卓上型ホモジナイザーで乳化した。トリス-マレイン酸緩衝液(0.3 M, pH 6.0~7.0)、トリス-塩酸緩衝液(0.3 M, pH 7.5~8.5)または、グリシン-苛性ソーダ緩衝液(0.3 M, pH 9.0~10.5)を用い、基質乳化液と等量混合して基質液とした。市乳を基質とする場合は、1 N 塩酸または、1 N 水酸化カリウムを加えてpHを調整した。BSAを添加したヤシ油を基質にする場合は、BSAを各緩衝液に溶解(1% W/V)した。

3) リパーゼの安定性に及ぼすpHの影響

基質の調製に用いたpH 6.0~10.5の緩衝液をそれぞれ 6分の1に希釈(0.05 M)し、これらの緩衝液に精製リパーゼ(0.006 mg/ml)を添加し、37℃で20分間または、4℃で60分間保持した後のリパーゼ活性を測定した。基質には、均質化牛乳中の乳脂肪を用いた。

4) 酵素活性の測定

リパーゼ活性の測定は、第1節と同じ方法で行なった。

結 果

粗リパーゼ(バターミルク)を用いたときの37℃と0℃におけるリパーゼ活性に及ぼすpHの影響を図9と図10に示す。反応温度37℃では、基質として乳脂肪(図9)、およびヤシ油(図10)を用いた場合、いずれもpH 9.5に最大活性をもつpH依存曲線を示した。しかし、反応温度が0℃の場合はpH 10.0までpHの増加と共に増加した。

精製リパーゼを用いたときのpHの影響を図11と図12に示す。ヤ

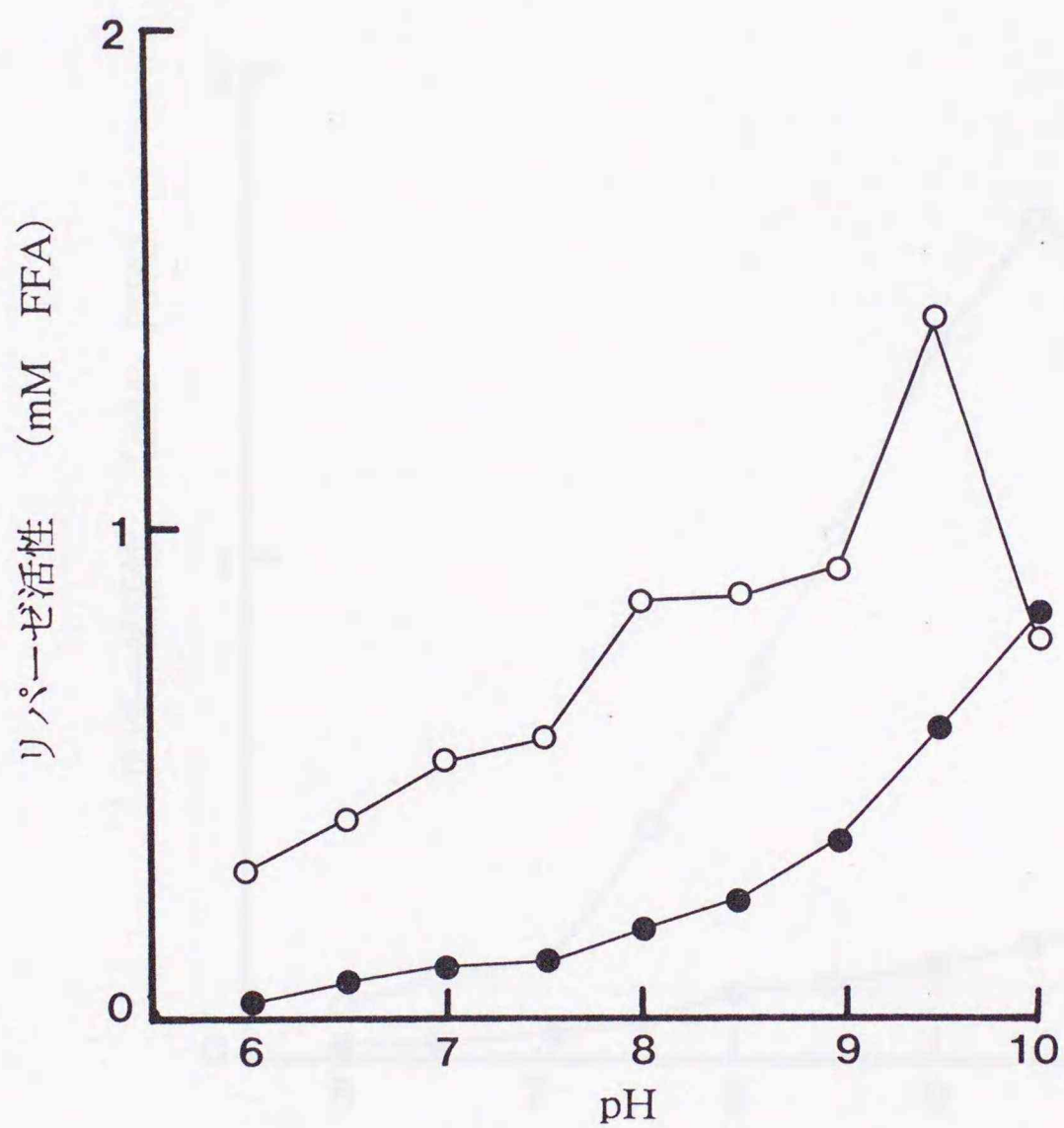


図9 乳脂肪を基質としたときの粗リパーゼの活性に及ぼす pHの影響
 反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

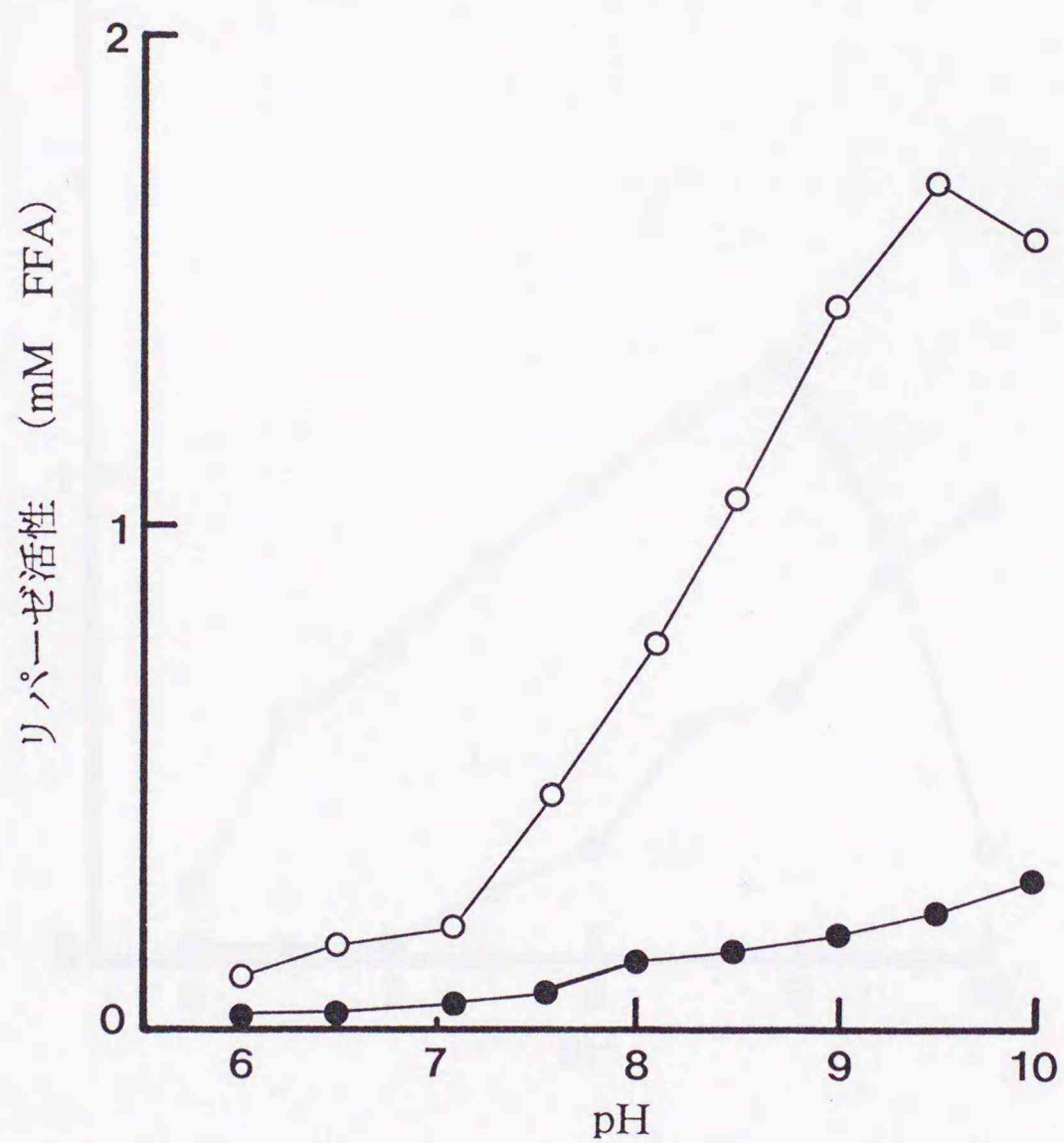


図 10 ヤシ油を基質としたときの粗リパーゼの活性に及ぼす pH の影響
 反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

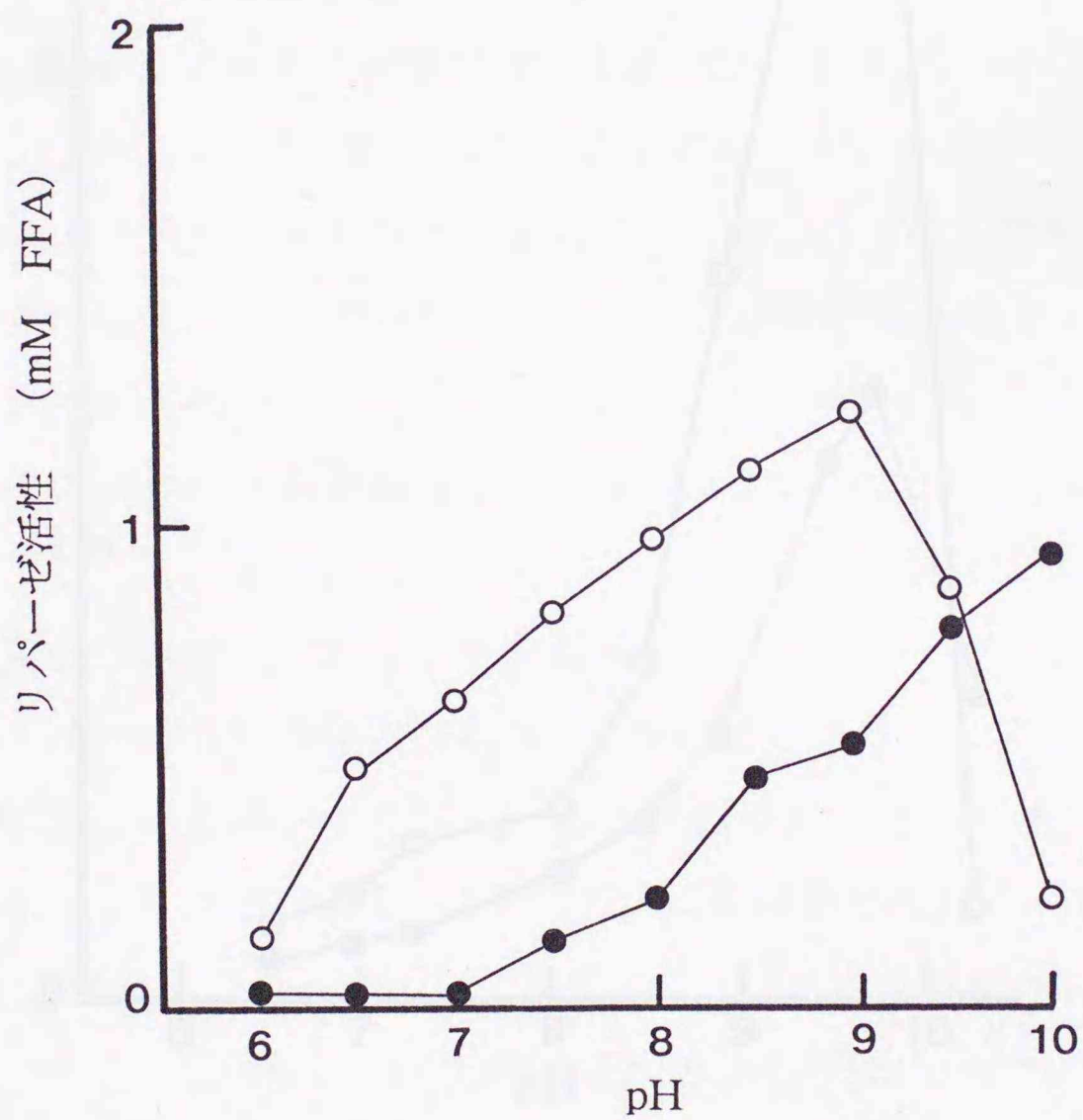


図 1 1 乳脂肪を基質としたときの精製リパーゼの活性に及ぼす pH の影響
 反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

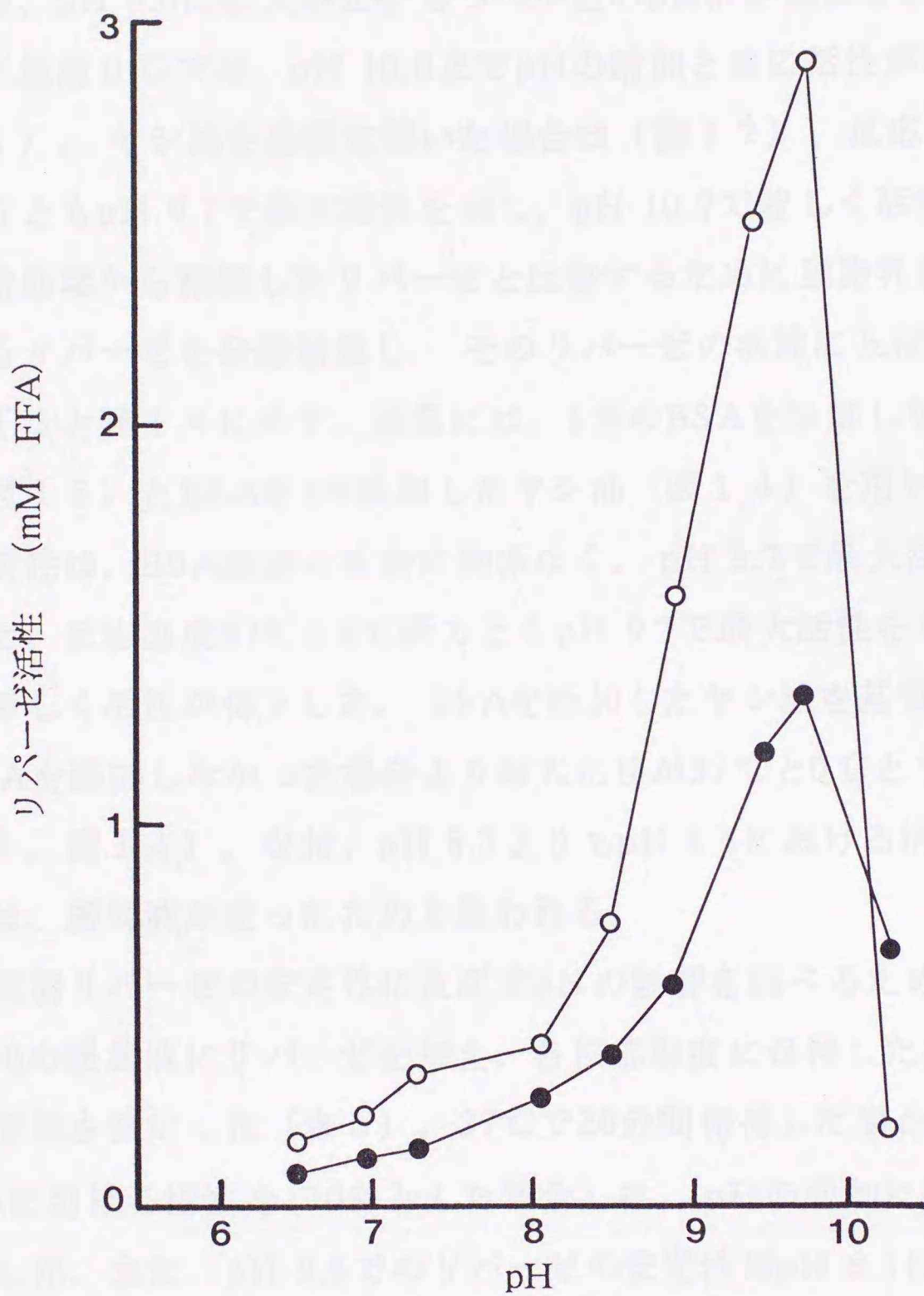


図 1 2 1%のBSAを添加したヤシ油を基質としたときの精製
リパーゼの活性に及ぼすpHの影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

シ油を基質にする場合は、ヤシ油に 1%のBSAを添加したものを基質として用いた。反応温度37℃で乳脂肪を基質にしたときのリパーゼ活性は、pH 9.0に最大活性をもつベル型のpH依存曲線を示した。また、反応温度0℃では、pH 10.0までpHの増加と共に活性が増加した（図11）。ヤシ油を基質に用いた場合は（図12）、反応温度37℃と0℃両方ともpH 9.7で最大活性を示し、pH 10.2で著しく活性が低下した。

脂肪球から精製したリパーゼと比較するために脱脂乳部分に含まれているリパーゼを分離精製し、そのリパーゼの活性に及ぼすpHの影響を図13と図14に示す。基質には、1%のBSAを添加しなかったヤシ油（図13）とBSAを1%添加したヤシ油（図14）を用いた。リパーゼの活性は、BSA添加の有無に関係なく、pH 9.7で最大活性を示した。また、反応温度37℃と0℃両方ともpH 9.7で最大活性を示し、pH 10.2で著しく活性が低下した。BSAを添加したヤシ油を基質にした場合がBSAを添加しなかった場合より最大活性が37℃と0℃とも高かった（図13、図14）。なお、pH 8.3よりもpH 8.6における活性がやや低いのは、緩衝液が変わったためと思われる。

精製リパーゼの安定性に及ぼすpHの影響を調べるために、pH 7.5～10.0の緩衝液にリパーゼを加え、各反応温度に保持した場合のリパーゼの活性を測定した（表6）。37℃で20分間保持した場合、安定性（pH 8.5における活性を100%とした場合）は、pHの増加に伴って著しく低下した。また、pH 9.5でのリパーゼの安定性はpH 8.5にくらべて3分の1に低下し、安定性は著しく低下した。これにくらべ0℃で1時間保持した場合、pH 7.5～pH 10.0の範囲でのリパーゼ活性は安定であった。

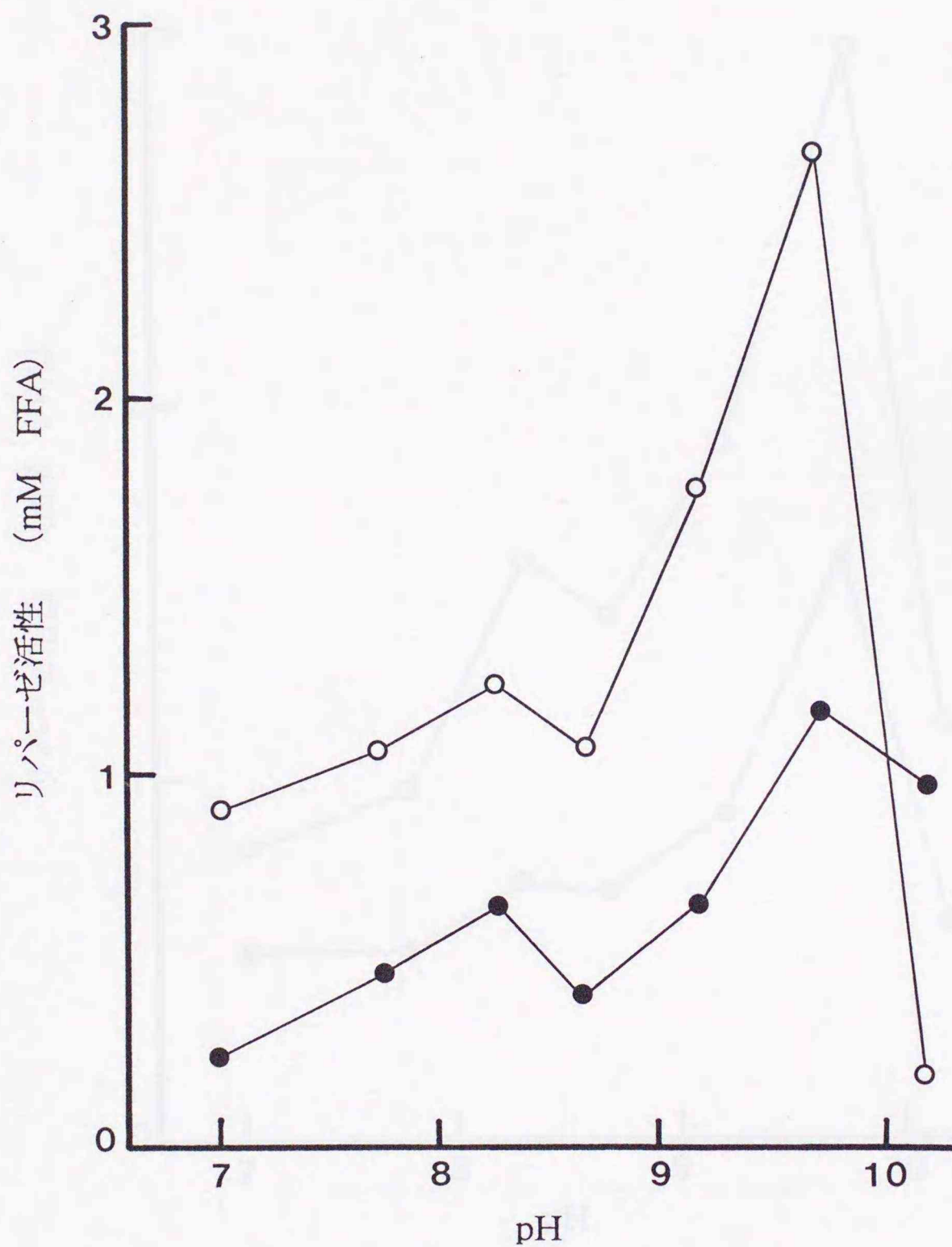


図 1 3 ヤシ油を基質としたときの脱脂乳により精製したリパーゼの活性に及ぼすpHの影響
 反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

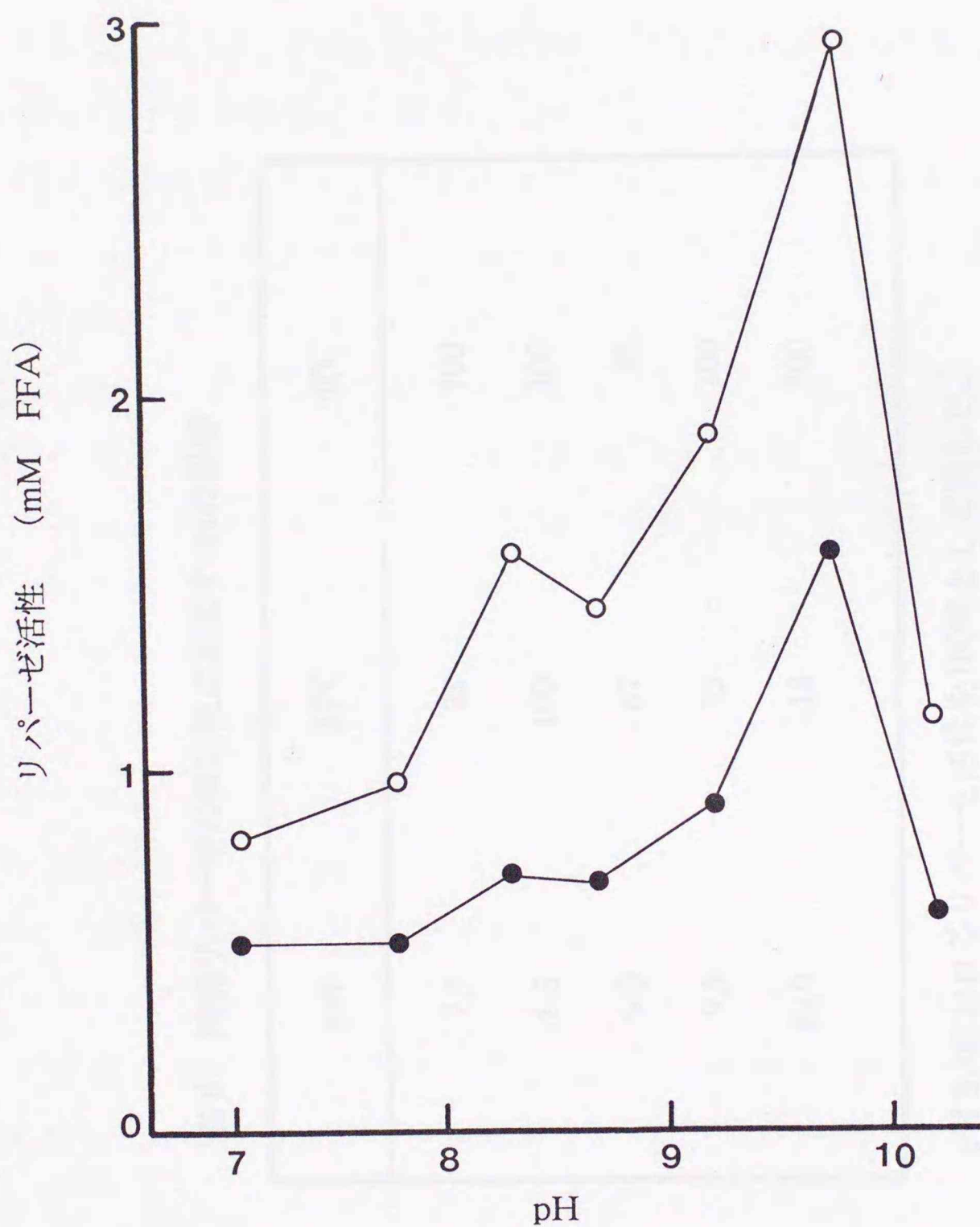


図 1 4 1%のBSAを添加したヤシ油を基質としたときの脱脂乳により
精製したリパーゼの活性に及ぼすpHの影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

表 6 精製リパーゼの安定性に及ぼすpHの影響

pH	37°C	0°C
7.5	98	100
8.5	100	100
9.0	67	85
9.5	33	100
10.0	13	100

pH 8.5におけるリパーゼ活性を100%として表した。

考 察

酵素反応はある限られたpH範囲で起こり、その限られたpHで酵素活性は最大値を示し、そのpHを最適pHと呼ぶ。一般的に最適pHは、起源が異なる酵素の特徴の一基準として使われている。しかし、最適pHは、用いる緩衝液の種類、イオン強度、あるいは用いる酵素源によって異なる。また、リパーゼのような水に不溶の基質に作用する場合は、基質の種類や、その基質分子の反応系での存在状態（エマルジョン状態）が問題となる。その基質の存在状態を支配する因子は、乳化剤添加の有無や乳化剤の種類はもとより、反応温度、反応pH、さらには、反応の進行とともに蓄積する生成物（脂肪酸、ジグリセリド、モノグリセリド、グリセロール）の組成比などがある。

牛乳リパーゼの典型的な最適pHは、アルカリ側でpH 8.0とpH 9.0の間にあるといわれている⁸⁸⁾。従って、リポリシスは、pHが高いほど、また温度が高いほど促進されると思われる。しかし、実際の反応では、pHや温度の上昇とともにリパーゼ活性が増加するとは限らない。その理由は、酵素の安定性がpHや温度の上昇によって低下するし、また様々な因子が作用するからである。精製リパーゼの安定性は、添加した酵素タンパク質の濃度、温度やpHの変化によって大きく影響される。

Parryら¹²²⁾は牛乳中のリパーゼ活性は、pH 8.5からpH 9.0の間で最適pHを示し、精製リパーゼを用いた場合は、pH 8.6で最適pHを示したと報告している。

粗リパーゼを用いた場合(図9,図10)、反応温度37℃ではpH 9.0からpH 9.5の間で最適pHを示したが、反応温度0℃ではリパーゼ活性がpH 10.0までpHとともに増加した。これは、反応温度0℃の方が37℃よ

リパーゼが安定であるためリパーゼ活性が pH の増加と共に増加したと思われる。

精製リパーゼを用い、均質化牛乳中の乳脂肪を基質にした場合、反応温度 37°C では pH 9.0 で最大活性を示したが、0°C 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（図 1 1）。しかし、長鎖の脂肪酸をもつヤシ油のような単純な系に BSA を添加した基質を用いた場合は、反応温度 37°C と 0°C とともに pH 9.5 に最大活性があった（図 1 2）。若濱ら¹²³⁾は、脱脂乳から分離精製した LPL について、BSA を添加したヤシ油を基質に用いた場合、反応温度 0°C における活性は pH の増加と共に増加したと報告した。基質および反応温度によって最適 pH が異なるのは、用いた基質の構成脂肪酸が異なるため、また、反応温度による固体脂肪と液体脂肪の割合の違いによることが原因として考えられる。

脱脂乳から精製したリパーゼを用いた場合の最適 pH（図 1 4）は、脂肪球から精製したリパーゼの最適 pH（図 1 2）と同じであった。すなわち、この二つのリパーゼは、同じ最適 pH をもっている。図 1 3 と図 1 4 で見られる pH 8.6 における活性低下は、緩衝液の変更によって起きたと思われる。

最適 pH とは別に、酵素の安定性に及ぼす pH の影響も、酵素の性質を知る上で重要な要因の一つである。0°C に保持した場合のリパーゼは高い pH でも安定であり、最適温度（37°C）に保持したリパーゼは、不安定であった。リパーゼを最適 pH に戻してもリパーゼ活性は回復しなかったことからリパーゼを高い pH（pH 10.0 付近）におくと、不可逆的な失活が生じるとと思われる（表 6）。このように低温に保持されたリパーゼが安定であることが、反応温度 0°C での pH の増加とともに活性が増加した原因の一つであると思われる。

第3節 脂肪球から精製したリパーゼの活性に及ぼす血清成分の影響

正常乳に血清を添加するとリポリシスが起こる^{116,124)}。血清によるリパーゼ活性化の効果は、これに含まれている活性化剤、アポリポタンパク質C-II (a p o C-II) によることが、よく知られている^{69,70,111)}。このように血清成分は、リパーゼ活性と深い関係をもっている。

本節では、第1節で反応温度、基質によって異なる影響を示したBSAとヘパリンについて、その濃度の影響を調べた。また、リパーゼの活性化因子であるa p o C-IIの濃度の影響について調べた。さらに、脂肪球から精製したリパーゼあるいは粗リパーゼ(バターミルク)の活性に及ぼす血清成分の影響を調べた。また、脂肪球と脱脂乳から各々分離精製したリパーゼの活性に及ぼすヘパリンの濃度の影響を調査した。

材料と方法

1) 基質溶液の調製

ヤシ油は第1節と同様にして乳化した。添加物は、必要な濃度の2倍になるように0.2 M NaClを含む0.16 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に溶解した。これらの添加物溶液を、基質乳化液と同量混合し、基質として用いた。対照には、添加物の代わりに0.16 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)を加えた。乳脂肪を基質にする場合は、市販の均質化牛乳に直接添加物を加えて用いた。牛血清は、採血後、 $1,870 \times g$ 、 4°C 、20分間遠心分離し、0.11 M NaClに対して透析した後、凍結保存した。

アポリポタンパク質C-II (apo C-II: コスモ・バイオ株式会社) は Bengtsson & Olivecrona¹²⁵⁾ の報告を参考にして、5 M 塩酸グアニジンを含む0.02 M トリス-塩酸緩衝液に溶解 (500 μ g/ml) した。必要な濃度のアポリポタンパク質C-II溶液を酵素添加前に基質溶液1.5 ml に加えた。対照としては、アポリポタンパク質C-II溶液の代わりに5 M 塩酸グアニジンを含む同緩衝液を加えた。

2) 酵素活性の測定

リパーゼ活性の測定は、第1節と同じ方法で行なった。

3) 酵素液の調製

粗リパーゼ (バターミルク) と精製リパーゼは、第1節と同様にして調製した。

結 果

1) リパーゼの活性に及ぼすBSA濃度の影響

ヤシ油を基質とし、反応温度37°Cと0°Cにおける粗リパーゼの活性に及ぼすBSAの濃度の影響を図15に示す。反応温度37°Cでは、BSA濃度の増加に従ってリパーゼ活性が低下した。反応温度0°Cでは、BSA濃度が1%まで活性は、対照の活性の1.8倍に増加した。しかし、BSAの濃度が1%より高くなると活性は次第に低下し、BSAの濃度が5%では、対照とほぼ同じになった。

基質として乳脂肪を用いた場合のBSA濃度の影響を図16に示す。活性は、反応温度37°Cと0°CともBSA濃度の増加に従って減少した。

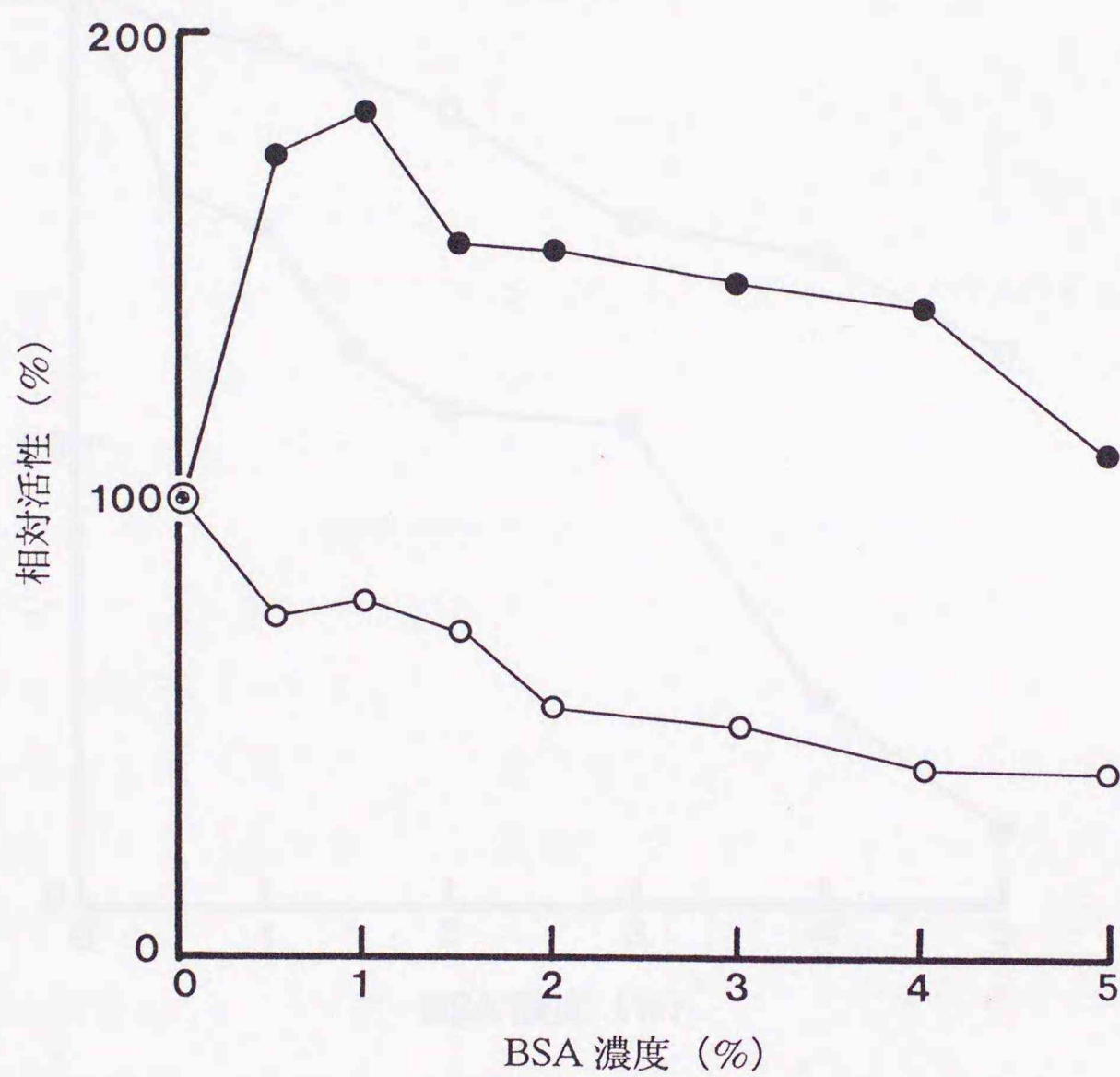


図 1 5 ヤシ油を基質としたときの粗リパーゼの活性に及ぼす
BSA 濃度の影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

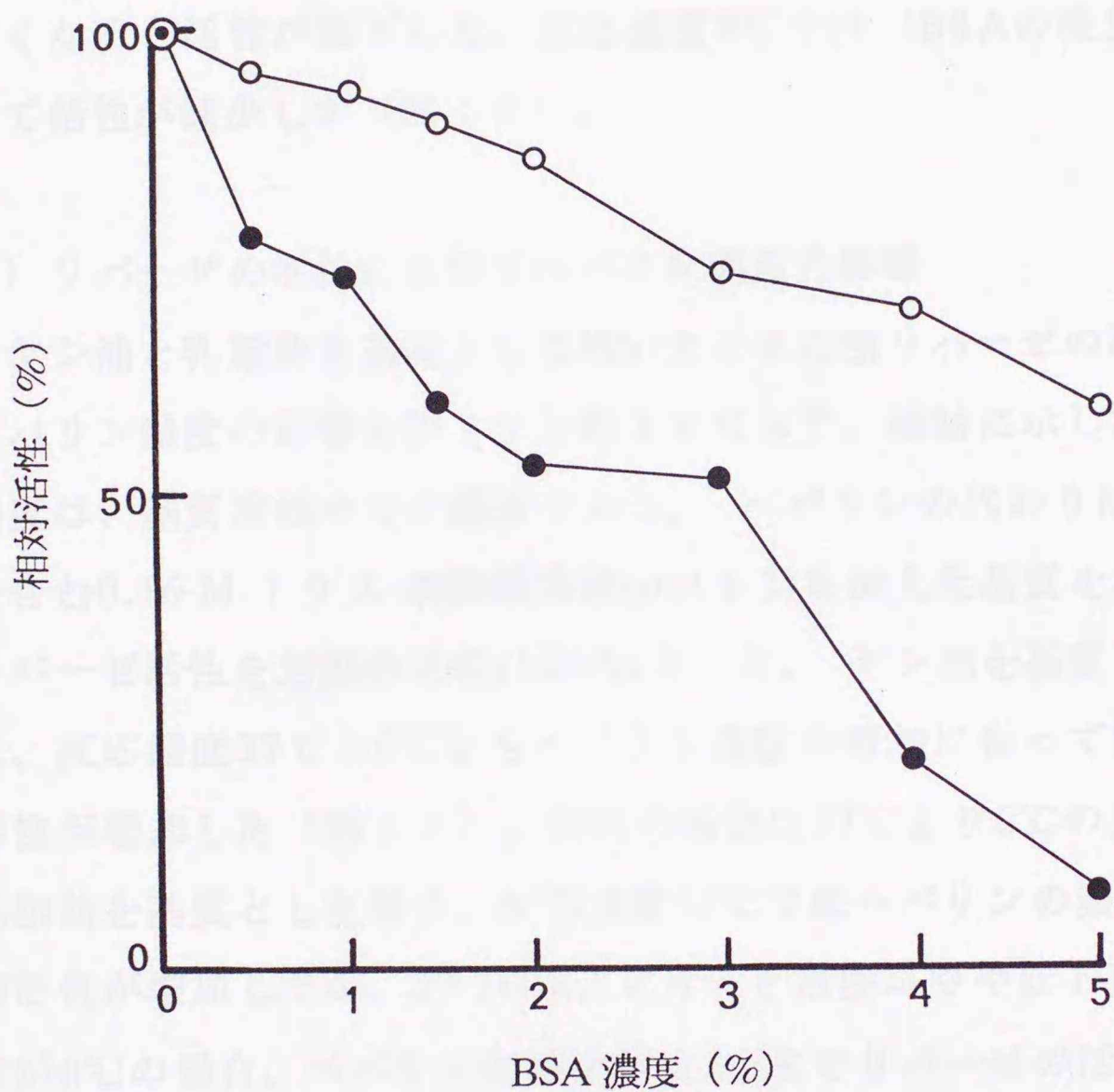


図 1 6 乳脂肪を基質としたときの粗リパーゼの活性に及ぼす

BSA 濃度の影響

反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

精製リパーゼの活性におよぼすBSA濃度の影響を図17と図18に示す。ヤシ油を基質とした場合、反応温度37℃ではBSAの濃度が1%まで、また0℃では、1.5%まで濃度の増加に従って活性がそれぞれ対照に比べて3.9倍、2倍に増加した。しかし、BSAの濃度がそれ以上高くなると活性は、低下する傾向を示した(図17)。乳脂肪を基質とした場合、反応温度37℃では、BSAの濃度が1%まで活性が増加したが、それ以上高くなると活性が低下した。反応温度0℃では、BSAの濃度の増加に従って活性が減少した(図18)。

2) リパーゼの活性に及ぼすヘパリン濃度の影響

ヤシ油と乳脂肪を基質として用いたときの粗リパーゼの活性に及ぼすヘパリン濃度の影響を図19と図20に示す。横軸に示したヘパリンの濃度は、基質溶液中での濃度である。ヘパリンの代わりに0.2 M NaClを含む0.16 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)を加えた基質を用いたときのリパーゼ活性を対照の活性(100%)とした。ヤシ油を基質に用いた場合は、反応温度37℃と0℃ともヘパリン濃度の増加に従って粗リパーゼの活性が増加した(図19)。活性の増加は37℃より0℃の方が高かった。乳脂肪を基質とした場合、反応温度37℃ではヘパリンの濃度が20 IUまで活性が増加したが、20 IU以上になると活性がやや低下した。反応温度が0℃の場合、ヘパリンの濃度が5 IUまでリパーゼの活性は、対照の61%に減少した。しかし、ヘパリンの濃度が5 IUより高くなると活性は増加し、40 IUまでに対照の92%まで増加した(図20)。

ヤシ油を基質に用いたときの精製リパーゼの活性におよぼすヘパリン濃度の影響を図21に示す。反応温度37℃では、ヘパリンの濃度が10 IUまで、対照の活性に比べて活性が3.9倍に増加した。しかし、ヘパリ

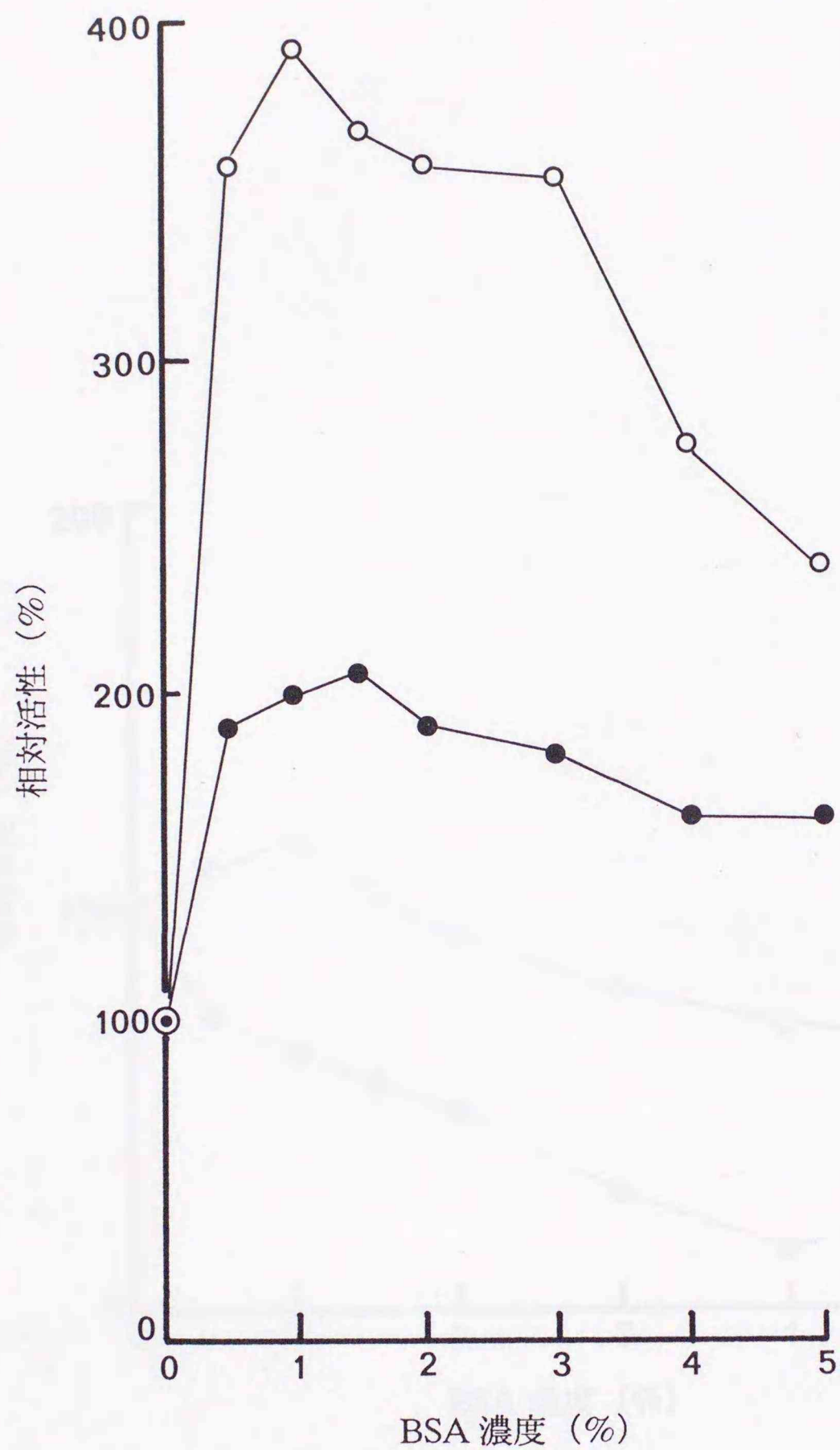


図 1 7 ヤシ油を基質としたときの精製リパーゼの活性に及ぼす
BSA 濃度の影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

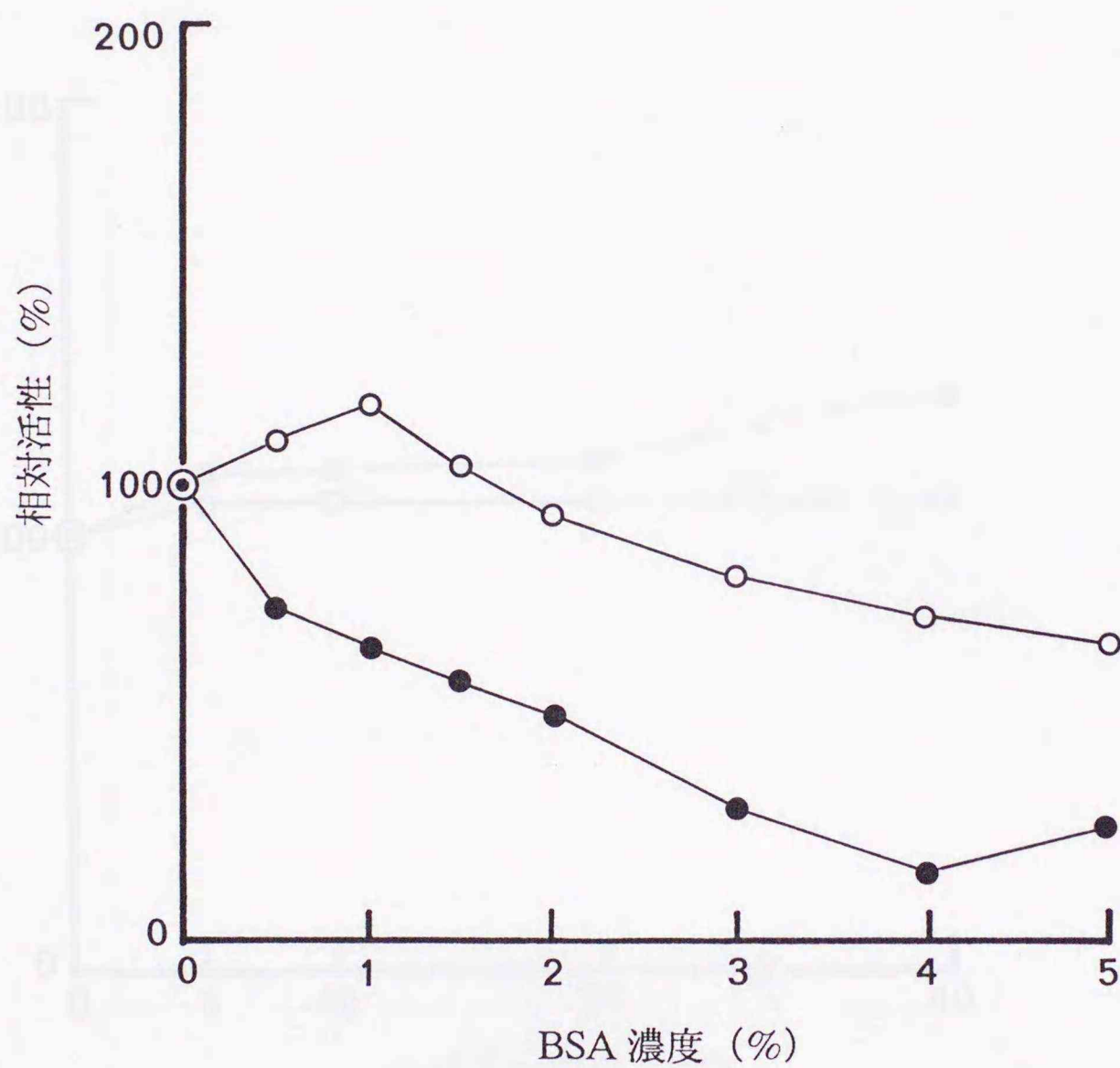


図 1 8 乳脂肪を基質としたときの精製リパーゼの活性に及ぼす BSA 濃度の影響
 反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

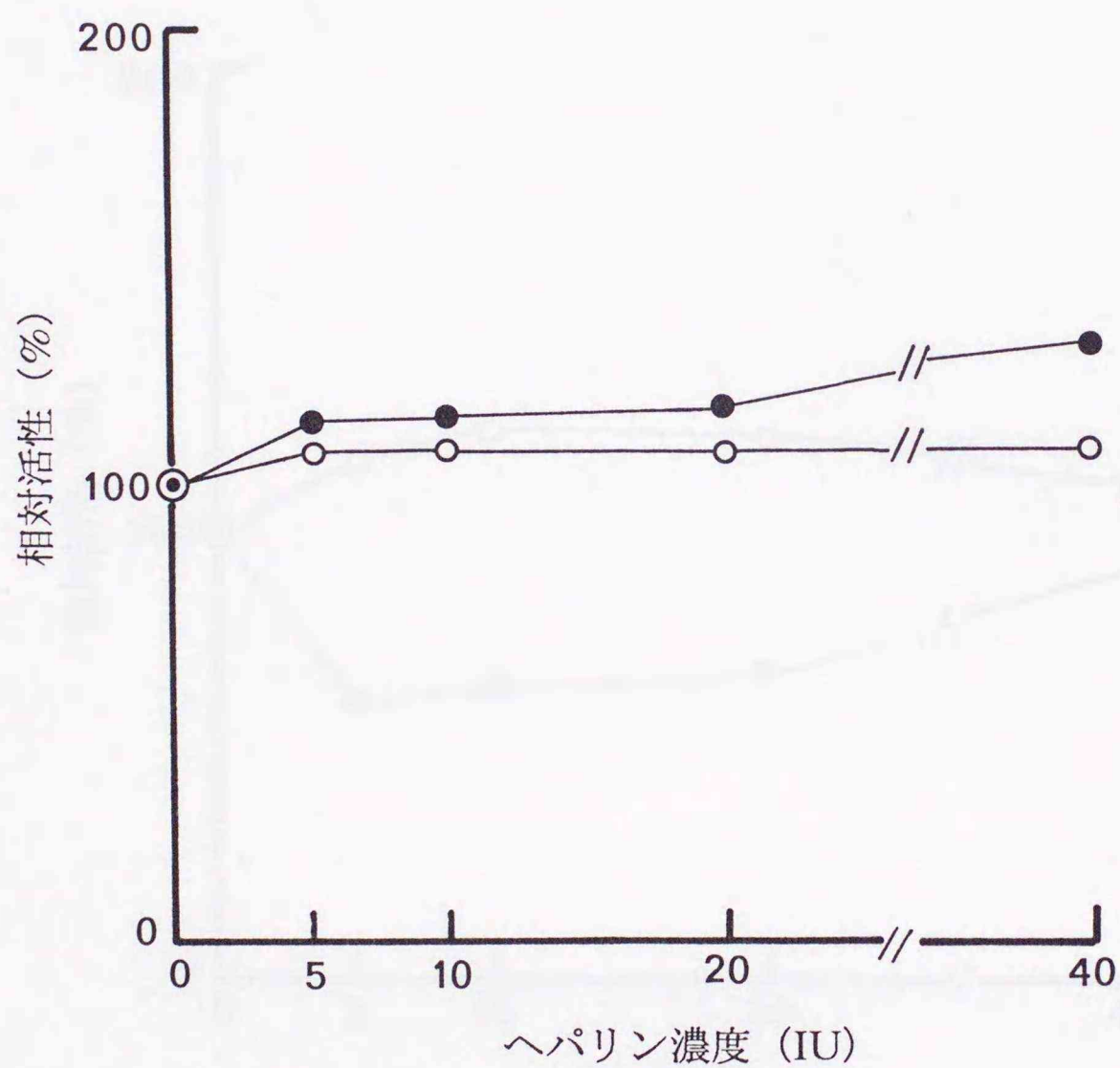


図 1 9 ヤシ油を基質としたときの粗リパーゼの活性に及ぼす
ヘパリンの影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

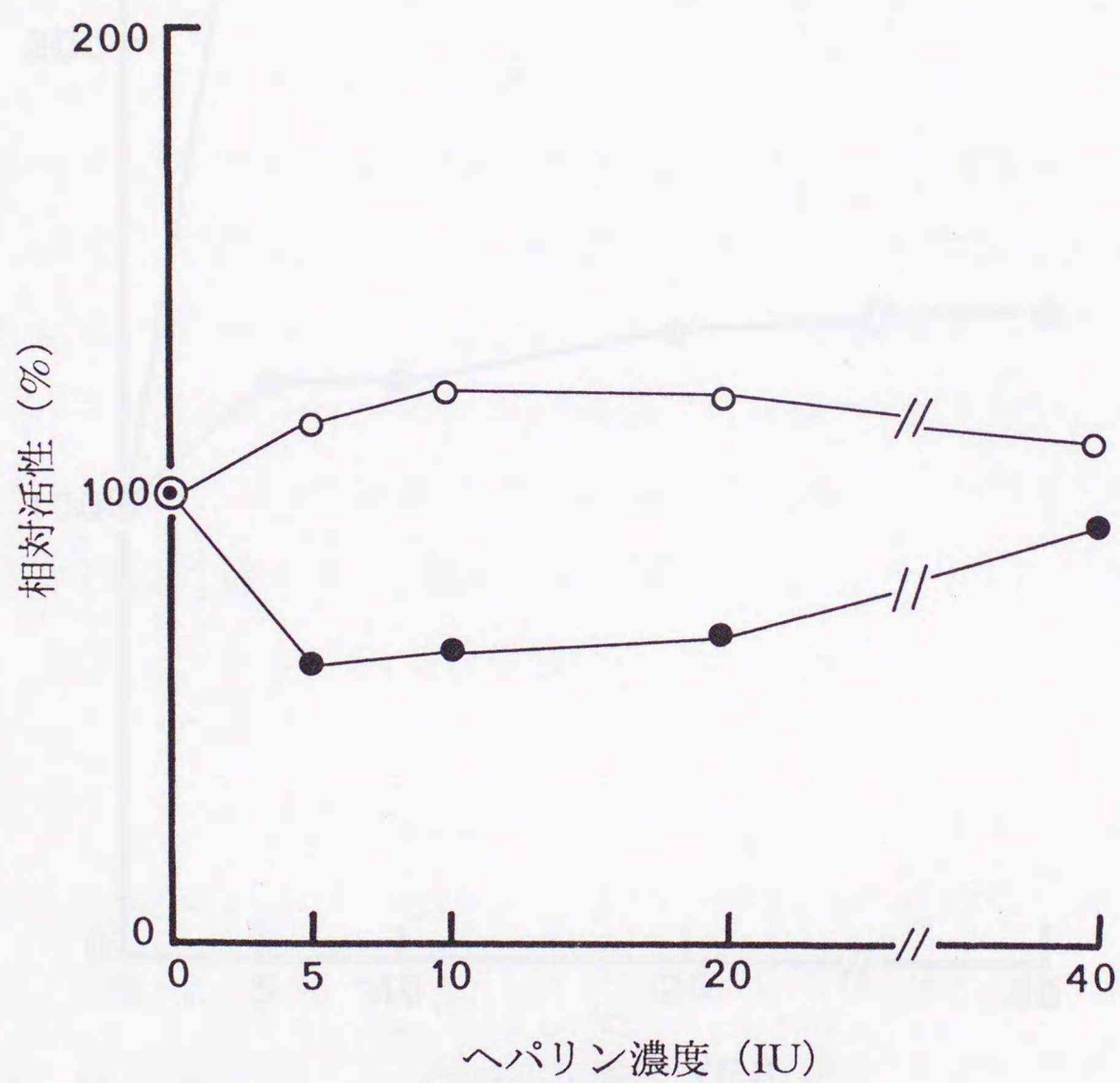


図 2 0 乳脂肪を基質としたときの粗リパーゼの活性に及ぼす
ヘパリンの影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

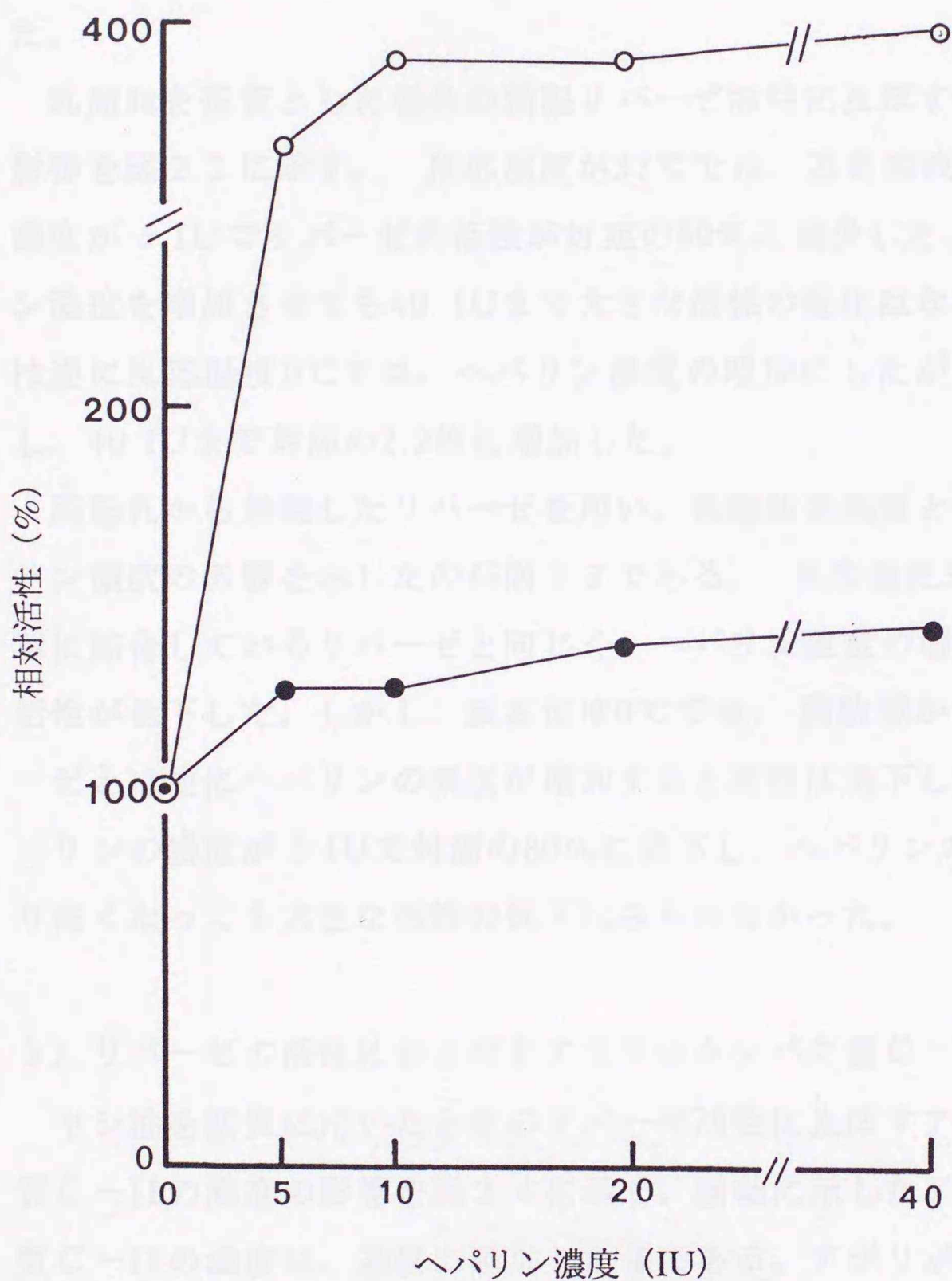


図 2 1 ヤシ油を基質としたときの精製リパーゼの活性に及ぼす
ヘパリンの影響

反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

ンの濃度をさらに40 IUまで増加させてもそれ以上の大きな活性の増加は見られなかった。反応温度0℃では、ヘパリン濃度の増加にしたがってリパーゼの活性が増加したが、37℃の場合より増加の程度は低かった。

乳脂肪を基質とした場合の精製リパーゼ活性に及ぼすヘパリン濃度の影響を図22に示す。反応温度が37℃では、基質溶液中のヘパリンの濃度が5 IUでリパーゼの活性が対照の80%に減少した。さらにヘパリン濃度を増加させても40 IUまで大きな活性の変化はなかった。37℃とは逆に反応温度0℃では、ヘパリン濃度の増加にしたがって活性も増加し、40 IUまで対照の2.2倍に増加した。

脱脂乳から精製したリパーゼを用い、乳脂肪を基質とした場合のヘパリン濃度の影響を示したのが図23である。反応温度37℃では、脂肪球に結合しているリパーゼと同じく、ヘパリン濃度の増加にしたがって活性が低下した。しかし、反応温度0℃では、脂肪球から精製したリパーゼとは逆にヘパリンの濃度が増加すると活性は低下した。活性は、ヘパリンの濃度が5 IUで対照の80%に低下し、ヘパリンの濃度が5 IUより高くなっても大きな活性の低下はみられなかった。

3) リパーゼの活性におよぼすアポリポタンパク質C-IIの濃度の影響

ヤシ油を基質に用いたときのリパーゼ活性に及ぼすアポリポタンパク質C-IIの濃度の影響を図24に示す。横軸に示したアポリポタンパク質C-IIの濃度は、基質に添加した量である。アポリポタンパク質C-IIの代わりに5 M 塩酸グアニジンを含む0.02 M トリス-塩酸緩衝液を加えた基質を用いたときのリパーゼ活性を対照の活性(100%)とした。反応温度37℃では、45 μ lのアポリポタンパク質C-IIの添加によって

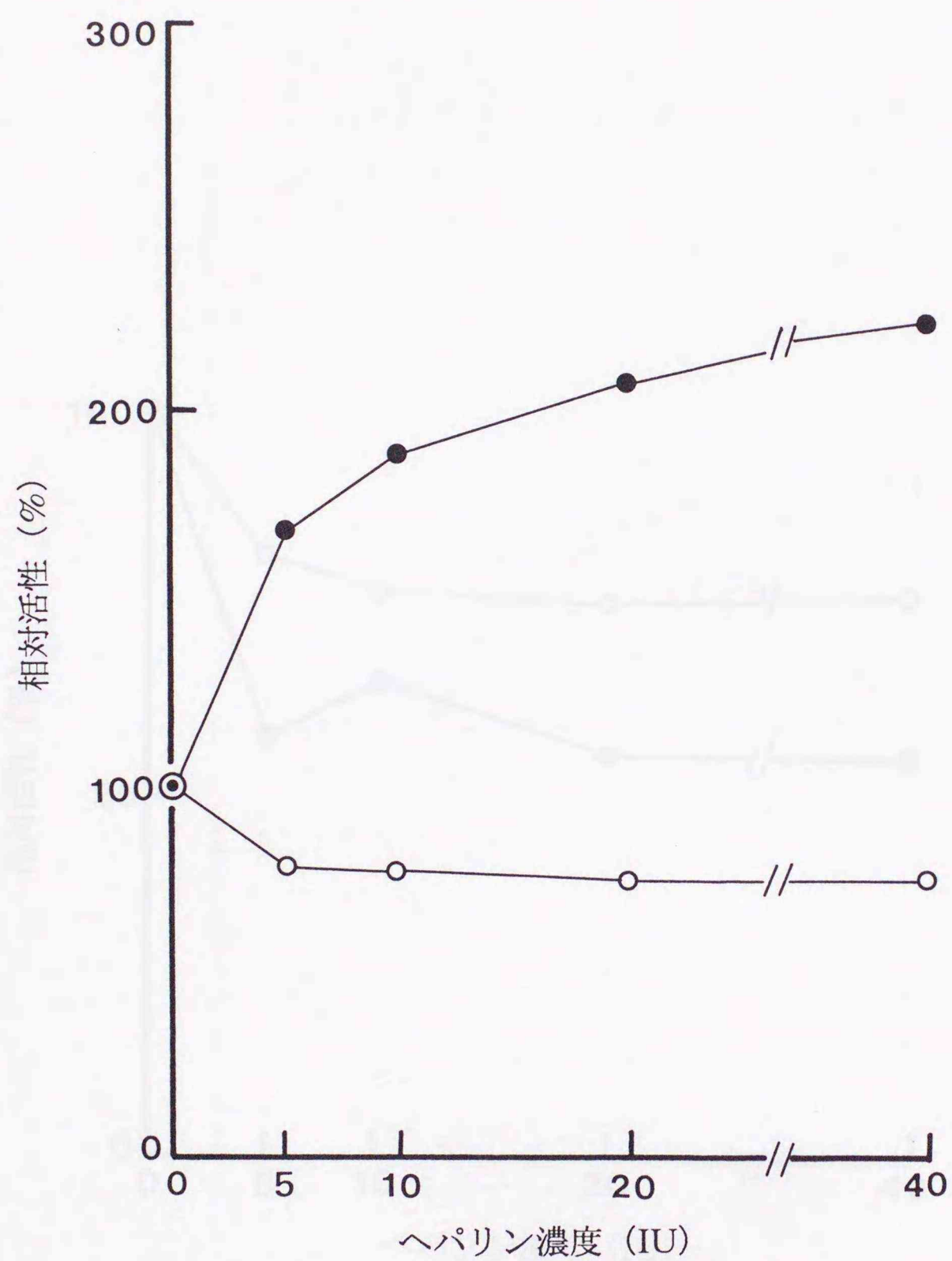


図 2 2 乳脂肪を基質としたときの精製リパーゼの活性に及ぼす
ヘパリンの影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

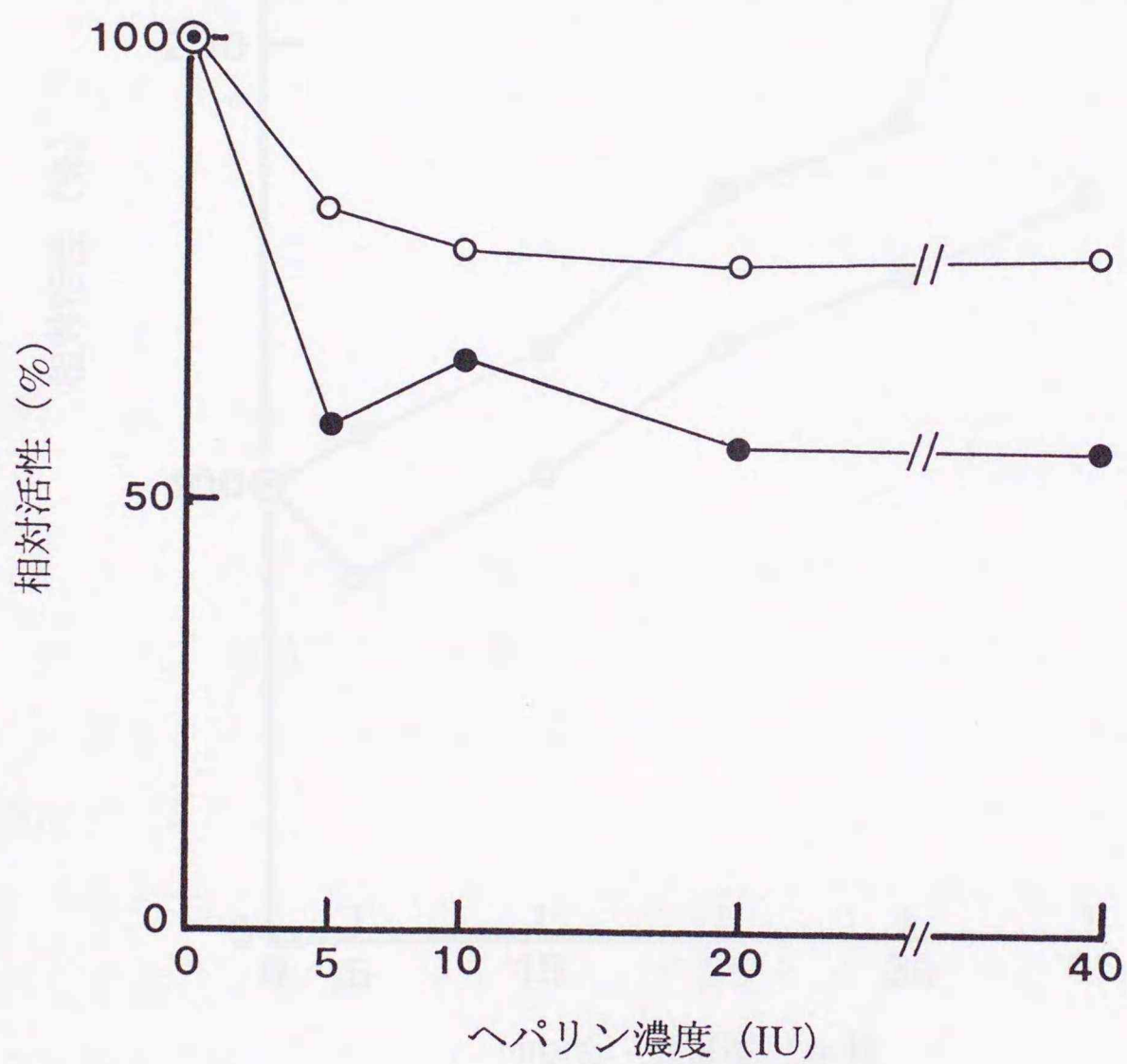


図 2 3 乳脂肪を基質としたときの脱脂乳より精製したリパーゼの活性に及ぼすヘパリンの影響

反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

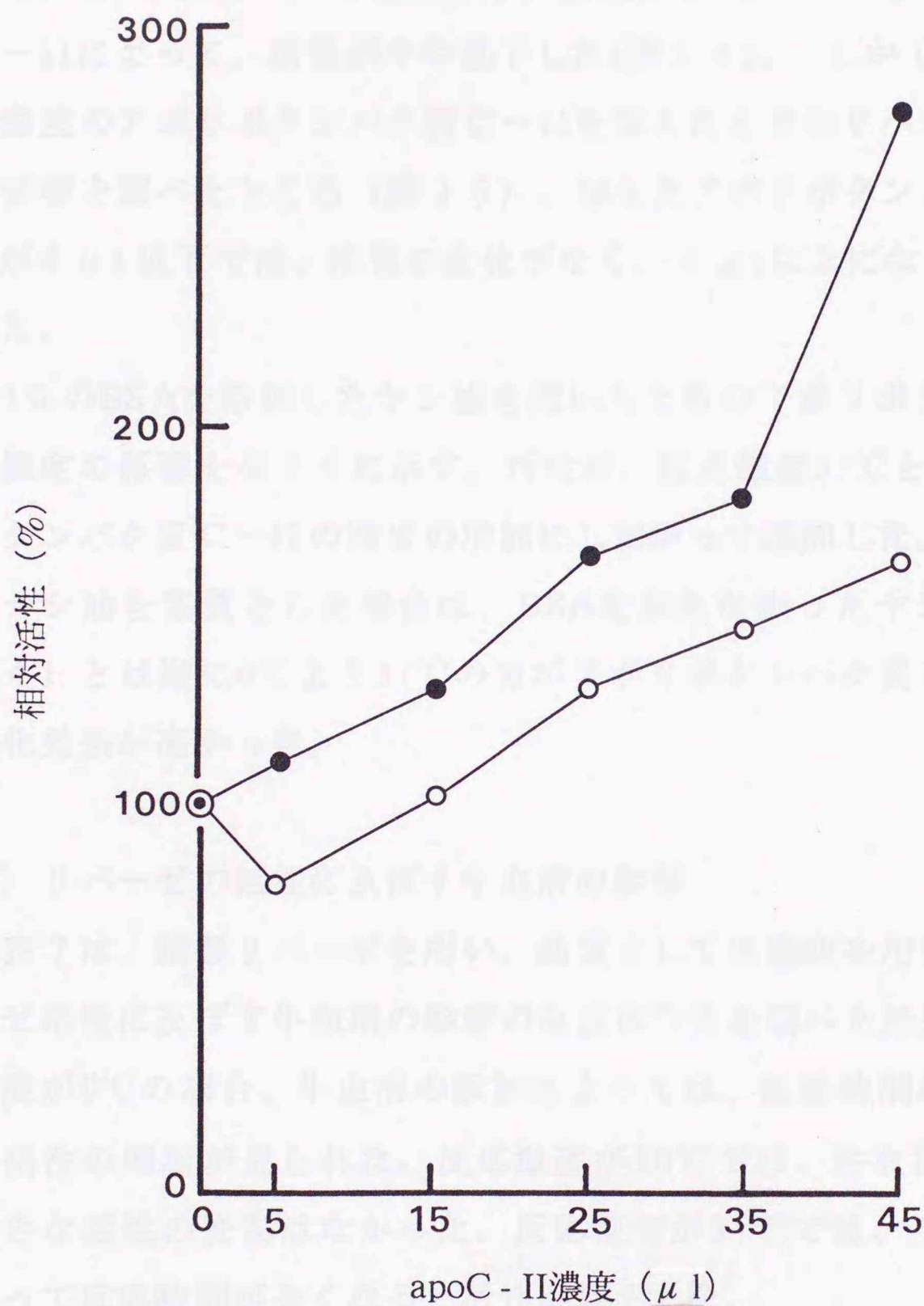


図 2 4 ヤシ油を基質としたときの精製リパーゼの活性に及ぼす apoC - II の影響
 反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

活性が対照に対して1.6倍増加し、0℃では2.8倍に増加した。アポリポタンパク質C-IIの添加による活性の増加は、37℃より0℃の方が高かった。反応温度37℃の場合では、低濃度(5 μ l)のアポリポタンパク質C-IIによって、活性がやや低下した(図24)。しかし、0~12 μ lの低濃度のアポリポタンパク質C-IIを加えたときのリパーゼ活性に及ぼす影響を調べたところ(図25)、加えたアポリポタンパク質C-IIの量が4 μ l以下では、活性の変化がなく、4 μ l以上になると活性が増加した。

1%のBSAを添加したヤシ油を用いたときのアポリポタンパク質C-II濃度の影響を図26に示す。活性は、反応温度37℃と0℃ともアポリポタンパク質C-IIの濃度の増加にしたがって増加した。BSAを添加したヤシ油を基質とした場合は、BSAを加えなかったヤシ油の場合(図24)とは逆に0℃より37℃の方がアポリポタンパク質C-IIによる活性化効果が高かった。

4) リパーゼの活性に及ぼす牛血清の影響

表7は、精製リパーゼを用い、基質として乳脂肪を用いた場合のリパーゼ活性に及ぼす牛血清の影響の温度依存性を調べた結果である。反応温度が0℃の場合、牛血清の添加によっては、反応時間が長くなるとやや活性の増加が見られた。反応温度が10℃では、牛血清の添加による大きな活性の変動はなかった。反応温度が37℃では、牛血清の添加によって反応時間が長くなると活性が低下した。

粗リパーゼを用いて、ヤシ油と乳脂肪を基質としたときの37℃におけるリパーゼ活性に及ぼす血清タンパク質の影響を表8に示す。添加物を含まない基質を用いたときのリパーゼ活性(対照)を100%として表

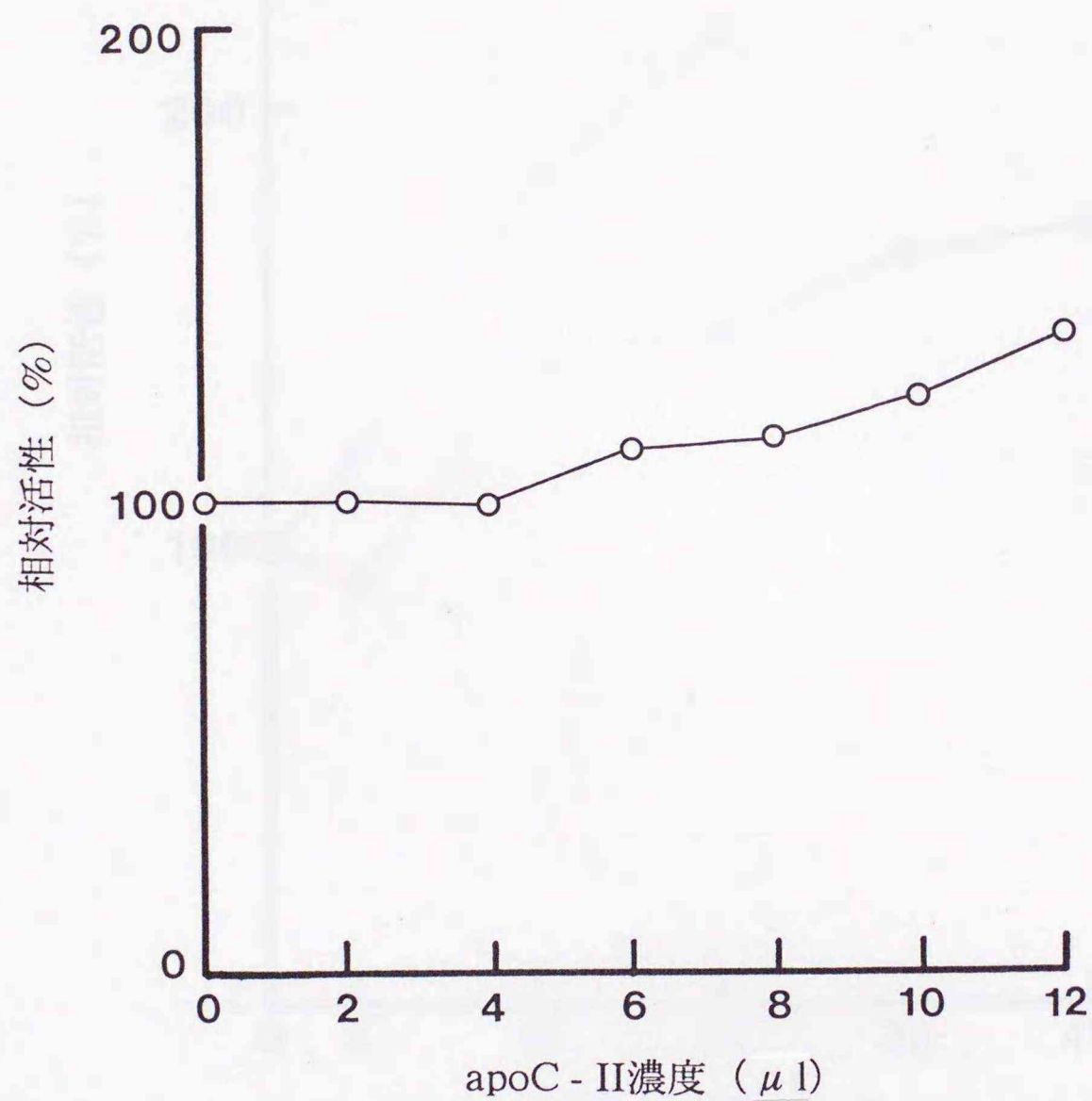


図 2 5 ヤシ油を基質としたときの精製リパーゼの活性に及ぼす
apoC - IIの影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) .

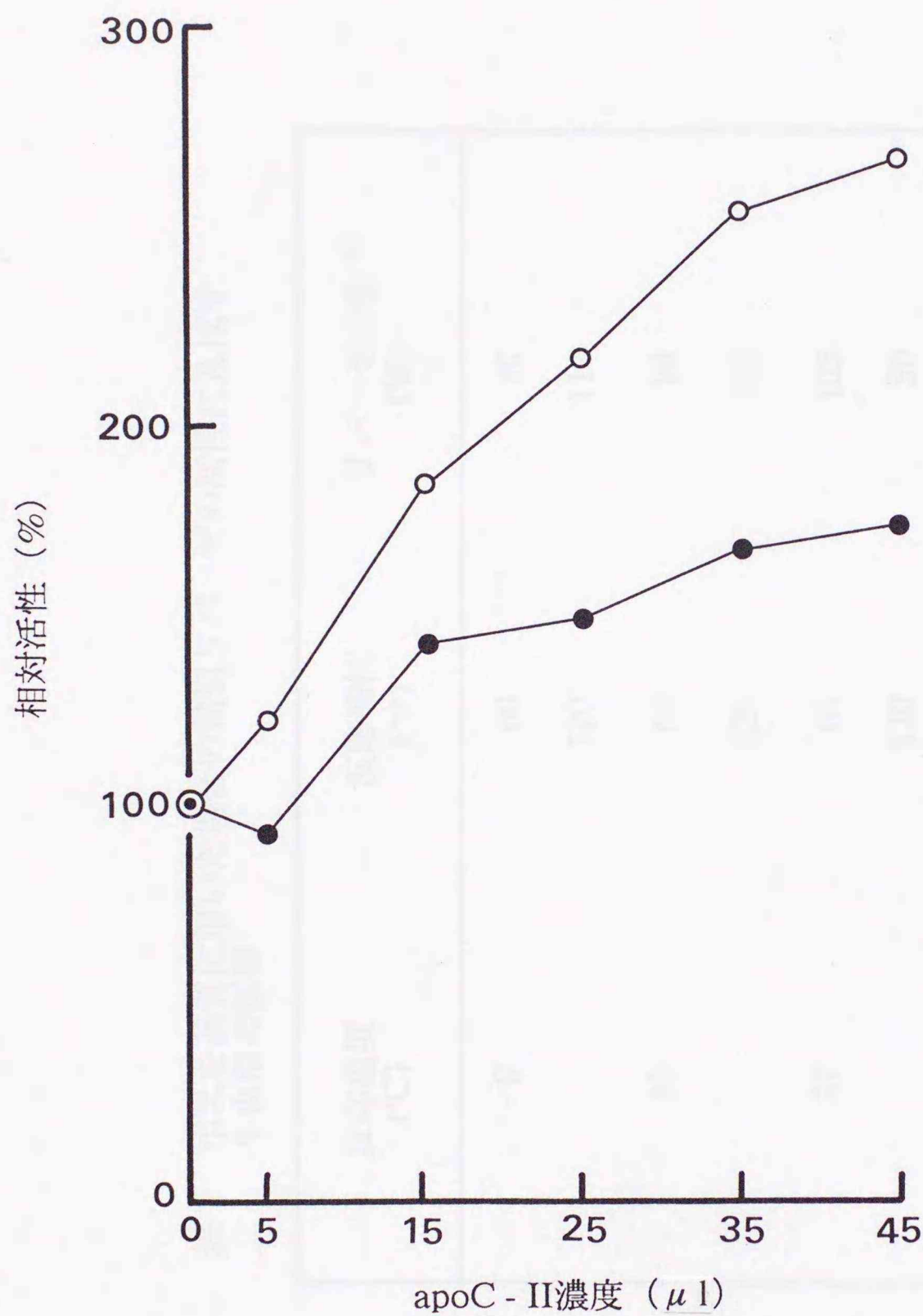


図 2 6 1 %のBSAを添加したヤシ油を基質としたときの精製
リパーゼの活性に及ぼすapoC - IIの影響
反応条件 : 37°C、20分 (○) ; 0°C、60分 (●) .

表7 市乳を基質に用いた場合の精製リパーゼの活性に及ぼす
牛血清の影響

反応温度 (°C)	反応時間 (分)	リパーゼ活性 ^{a)} (%)
0	60	50
	120	111
10	60	94
	120	112
37	60	105
	120	50

a) : 牛血清を含まない市乳を基質に用いたときのLPL活性を100%とした。

表 8 粗リパーゼの37°Cにおける活性に及ぼす血清タンパク質の影響

	牛血清 (6.5%)	apoC-II (0.033%)	apoC-II + BSA (0.033%) (6.5%)
ヤシ油	104	190	114
乳脂肪	228	158	168

添加物を含まない基質の活性を対照のリパーゼ活性とし、これを100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。

apoC-II: アポリポタンパク質C-II

した。ヤシ油を基質に用いた場合、牛血清の添加による活性の変動は見られなかった。しかし、アポリポタンパク質C-IIの添加により活性は約2倍になり、アポリポタンパク質C-II+BSAの添加によっても幾分活性が増加した。乳脂肪を基質にした場合は、牛血清、アポリポタンパク質C-II、アポリポタンパク質C-II+BSAの添加によって活性が増加した。反応温度が0°Cの場合(表9)、ヤシ油を基質とした場合は、牛血清、アポリポタンパク質C-II、アポリポタンパク質C-II+BSAの添加によって活性が増加し、アポリポタンパク質C-IIの添加による活性の増加が最も高かった。乳脂肪を基質として用いた場合は、牛血清の添加によって活性が低下した。しかし、アポリポタンパク質C-II、アポリポタンパク質C-II+BSAの添加によつては、活性が増加した。アポリポタンパク質C-IIの添加による活性の増加は、対照の約4.7倍で最も高かった。

表10には、精製リパーゼを用いた場合の37°Cにおけるリパーゼの活性に及ぼす血清タンパク質の影響を示してある。添加物を含まない基質を用いたときのリパーゼの活性(対照)を100%として表わした。ヤシ油を基質にした場合、牛血清、アポリポタンパク質C-II、アポリポタンパク質C-II+BSAの添加によつては、それぞれ対照の3.4、1.1、4.2倍に活性が増加した。アポリポタンパク質C-IIのみの添加よりは、アポリポタンパク質C-IIとBSAを同時に加えた方が活性を大きく増加した。乳脂肪を基質に用いた場合、牛血清の添加による活性の変化は、見られなかった。アポリポタンパク質C-II、アポリポタンパク質C-II+BSAの添加によつて活性は、対照の1.6、1.5倍に増加した。

反応温度が0°Cのときの精製リパーゼの活性に及ぼす血清タンパク質の影響を表11に示す。ヤシ油を基質にした場合は、37°Cのときと同

表9 粗リパーゼの0°Cにおける活性に及ぼす血清タンパク質の影響

	牛血清 (6.5%)	apoC-II (0.033%)	apoC-II + BSA (0.033%) (6.5%)
ヤシ油	112	155	142
乳脂肪	50	467	135

添加物を含まない基質の活性を対照のリパーゼ活性とし、これを100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。

apoC-II: アポリポタンパク質C-II

表 10 精製リパーゼの37°Cにおける活性に及ぼす血清タンパク質の影響

	牛血清 (6.5%)	apoC-II (0.033%)	apoC-II + BSA (0.033%) (6.5%)
ヤシ油	340	114	417
乳脂肪	102	161	154

添加物を含まない基質の活性を対照のリパーゼ活性とし、これを100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。

apo-C-II: アポリポタンパク質C-II

表 1 1 精製リパーゼの0°Cにおける活性に及ぼす血清タンパク質の影響

	牛血清 (6.5%)	apoC-II (0.033%)	apoC-II + BSA (0.033%) (6.5%)
ヤシ油	143	109	173
乳脂肪	96	134	107

添加物を含まない基質の活性を対照のリパーゼ活性とし、これを100%として表した。
()内の数値は反応液中の添加物の濃度を示す。

apoC-II: アポリポタンパク質C-II

じ傾向であった。すなわち、牛血清、アポリポタンパク質C-II、アポリポタンパク質C-II+BSAの添加によってリパーゼの活性が増加した。また、アポリポタンパク質C-IIとBSAを同時に加えた方がアポリポタンパク質C-IIのみの添加より活性の増加が大きかった。乳脂肪を基質とした場合、活性増加は、アポリポタンパク質C-IIのみを添加した方がアポリポタンパク質C-IIとBSAを同時に添加した場合より大きかった。

考 察

自然発生リポリシスは、様々な要因によって発現される。それらの要因の中で、リパーゼに対する促進因子を含む血清成分の乳中への混入によることが、ひとつの要因として考えられている。正常乳に血清を添加するとリポリシスが起こる^{116,124)}。この現象は、リパーゼと複合体を形成している耐熱性の共同因子、すなわち、ホスホリポプロテインによると考えられている。Driessen & Stadhouders⁵⁴⁾は、牛乳に含まれているリン脂質を含むある物質の含量によって自然発生リポリシスの程度が分かると述べている。さらに彼らは、ある生理的条件下では、それらの物質が牛乳の中に移動し、その結果自然発生リポリシスが促進されると推測した。Sundheim¹²⁶⁾は、血清の添加によりクリームにリパーゼ活性が移行することを示し、血清中の高密度リポプロテインがリパーゼ活性を増加させるとした¹²⁴⁾。牛乳では、リパーゼが脂肪球に対して正常の活性を示さない。これは脂肪が脂肪球膜によって保護されているからである。しかし、血清の添加は酵素と脂肪の間の相互作用を促進し、リポリシスを増加させるとの意見もある¹⁹⁾。この血清による酵素の活

性化効果は、これに含まれるタンパク質成分であるアポリポタンパク質 C-II によることが知られている^{70,111)}。

本実験では、酵素源、基質および反応温度によって牛血清のリパーゼ活性への影響が異なった。また、乳脂肪を基質に用いた場合の精製リパーゼの活性に及ぼす牛血清の影響を調べた結果、通常の牛乳の保存温度である10℃以下では、牛血清による大きな活性の増加が見られなかった(表7)。牛血清の添加によるこれらの異なる結果は、血清中には活性化因子だけではなく、アポリポタンパク質 C-II^{71~73)}や C-II⁷¹⁾などの阻害因子も含まれているのでこれらの因子のバランスがリパーゼの活性に影響するためと思われる。

リパーゼ活性に及ぼすアポリポタンパク質 C-II の影響に対しては、様々な報告がある。リパーゼは脂肪と水の界面に吸着する¹²⁷⁾と言われている。活性化タンパク質 (a p o - II) は、この結合に必要なものではなく、リパーゼが界面に結合した後に作用するという報告⁸⁵⁾あるいは、界面との結合性に影響するという報告¹²⁵⁾がある。Posner¹²⁸⁾は、アポリポタンパク質 C-II の役割はリパーゼ分子に構造的な変化を引き起こして酵素の触媒作用を強めることで、それによって基質にリパーゼが結合しやすくなりリパーゼ活性を増加させると述べた。

ヤシ油のような長鎖の脂肪酸を含む脂質を基質として用いた場合、精製リパーゼの活性は、アポリポタンパク質 C-II 単独の添加よりアポリポタンパク質 C-II + BSA を加えることによって著しく増加した(表11)。しかし、乳脂肪を基質に用いた場合は、アポリポタンパク質 C-II + BSA を加えても大きな活性の増加は見られなかった。また、0℃の場合は、アポリポタンパク質 C-II + BSA の添加のよって活性が低下する傾向もあった(表11)。このことは、ヤシ油のような単純系の基質

の場合、BSAのような脂肪酸受容体が存在しなければ活性化因子であるアポリポタンパク質C-IIを加えてもリパーゼ活性の増加はわずかであることを示している。市販の均質化乳中の乳脂肪を基質に用いた場合は、乳脂肪以外にもカゼインやホエータンパク質が共存している。従って、これらの成分が脂肪酸受容体としての役割を果たしたため、BSAの添加による活性の変動がないか、あるいは反応温度0℃での結果のように逆に活性が低下したと思われる。

粗リパーゼを用い、基質にアポリポタンパク質C-IIおよびアポリポタンパク質C-II+BSAを加えた場合は、基質および反応温度によって結果が異なった。本実験で用いた粗リパーゼには、脂肪球膜物質やバターミルクの調製のときすでに遊離になった脂肪酸などが存在しているため、添加物の影響を推定するのは難しいことである。

脂質と水の界面に蓄積された反応生産物であるFFAによってリパーゼの活性が阻害されるということは、当然考えられる。従って、BSAのような脂肪酸受容体が酵素作用を高めるのに必要である。このBSAの濃度の変化がリパーゼ活性におよぼす影響について調べた。基質として乳脂肪を用いた場合は、粗リパーゼと精製リパーゼ両方ともBSAの濃度が高くなると活性が低下した(図16, 18)。これは用いた基質の中に含まれているカゼインミセル、可溶性カゼイン、混在する微量のホエータンパク質などの乳成分が受容体の役割を果たし、その結果、BSAの阻害効果のみが現われたと思われる。ヤシ油を基質として用い、粗リパーゼを用いた場合は、反応温度によってBSA濃度の影響が異なった(図15)。また、精製リパーゼを用いた場合は、BSAの濃度が高くなると活性の増加が低下する傾向があった(図17)。Posner¹²⁸⁾はBSAが脂肪と水の界面に吸着し、リパーゼの活性を阻害すると報告

している。本実験の結果から、BSAによって活性化あるいは阻害効果の両方の性質が示されるのは、用いた基質の違い以外に、酵素反応生産物であるFFAの量と添加したBSA濃度とのバランスの差によることが考えられる。また、多量のBSAの添加は、基質の広い部分がBSAによって覆われ、リパーゼが結合しにくくなり、その結果、活性が低下するのではないかとと思われる。

ヘパリンは、LPLの不活性化や他の物質の阻害作用を防ぐ⁶⁸⁾、あるいは、逆に阻害効果を示す¹¹³⁾と報告されている。牛乳にヘパリンを加えるとリポリシスが起こる。これは、ヘパリンがカゼインミセルからLPLを遊離し脂肪球に結合することを容易にするためと考えられている⁵⁸⁾。基質としてヤシ油を用いた場合、活性はヘパリン濃度の増加に従って増加した(図19, 21)。しかし、乳脂肪を基質とした場合は、反応温度によってヘパリン濃度の影響が異なった(図20, 22)。Sundheim & Bengtsson-Olivecrona¹¹⁵⁾は、ヘパリンの効果は単にカゼインミセルからのLPLの遊離のためという説明だけでは不十分であるとし、冷却による基質表面構造の変化がリポリシスにおけるヘパリンの影響を説明する上で重要であると述べている。図19～22に示すように、ヘパリンの影響は用いる基質によって異なる結果が得られた。特に、ヤシ油を基質とした場合は反応温度に関係なく活性が増加したが、乳脂肪を基質とした場合は、反応温度によって異なる結果が得られた。このように乳脂肪を用いた場合の異なる結果は、乳脂肪のように融点異なる脂肪が含まれている基質を用いた場合、反応温度による基質の異なる状態が原因として考えられる。リパーゼの活性に対するヘパリンの影響は、用いた測定条件が異なるとその影響も変わる。したがって、いままでに報告されている各研究者の間で見られた結果の不一致は、用いた測

定条件の差によることが大きいと思われる。

基質として乳脂肪を用い、脂肪球と脱脂乳により精製したリパーゼの活性に及ぼすヘパリンの影響について調べた結果、このふたつのリパーゼは、異なる結果を示した（図22，23）。したがって、同じ測定条件を用いた本実験の結果から、これらの二つのリパーゼのヘパリンに対する性質に差があると思われる。

以上の結果から、自然発生リポリシスの発現に血液が関与しているとすれば、特定の成分の選択的移行が必要であると考えられる。しかし、リポリシスには、活性化因子あるいは、阻害因子だけが作用するのではなく、これらの因子の複合的な作用とその因子間のバランスなどが影響している。したがって、従来のように血液の各成分がリパーゼの活性におよぼす影響から直ちに牛乳におけるリポリシスの増大の原因を説明するのは難しいことである。

第4節 リパーゼの活性に及ぼすカゼインの影響

牛乳中におけるリパーゼ活性の一部が脂肪球に、大部分がカゼインミセルに結合¹⁰⁹⁾していることは、すでに知られている。リパーゼが、個々のカゼインと特異的に結合しているがどうかについては、いろいろな意見がある。すなわち、リパーゼが α_s -カゼイン⁹⁷⁾、または β -カゼイン⁹⁸⁾、あるいは κ -カゼインと結合しているという説⁵⁶⁾、リパーゼが κ -カゼインの一部であるという報告⁹⁹⁾などがある。しかし、リパーゼは、単一のカゼイン成分と結合している訳ではないという意見もある¹²⁹⁾。Shahani & Chandan¹¹⁰⁾は、 κ -カゼインとホエータンパク質の一部にLPLの活性化効果があることを示した。

本節では、このように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べた。

材料と方法

1) カゼインの調製

酸カゼインは、北大農学部附属農場のホルスタイン種乳牛の混合乳を遠心分離により脱脂後、常法により調製した。各カゼインの分離精製は、この酸カゼインを用いてChristensenら¹³⁰⁾の方法にしたがって行った。

2) リパーゼの活性に及ぼすカゼインの影響

α_s -、 β -、 κ -、酸-カゼインを0.2 M NaClを含むトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に0.1%(W/V)になるように溶解した。これらのタンパク質溶

液で精製リパーゼ溶液を4倍 (0.0015 mg/ml)に希釈し、37℃で20分間または、0℃で60分間保持した後、均質化牛乳中の乳脂肪を基質としてリパーゼ活性を測定した。

さらに、反応時におけるカゼインの影響を知るため、各カゼインを0.2 M NaClを含むトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)および0.1%または、1%のBSAを含む同緩衝液で0.1%(W/V)になるように溶解し、第1節と同じ方法で乳化したヤシ油と等量混合して基質溶液とした。これらの基質溶液1.5 mlに酵素液 0.8 mlを加えて、37℃で20分間、または、0℃で60分間反応させた。対照には、各カゼインを含まない緩衝液を基質に加えてリパーゼ活性を測定した。

3) 酵素液の調製

脂肪球に結合しているリパーゼと脱脂乳部分に含まれているリパーゼは、第1章と同じ方法で調製した。

4) 酵素活性の測定

リパーゼ活性の測定は、第一節と同様にして行なった。

結 果

脂肪球から精製したリパーゼに各種カゼインを加え、37℃または0℃に保持後、均質化乳を加え活性を測定した結果を表12に示す。保持温度37℃と0℃の両方において活性が増加し、カゼインはリパーゼを安定化させたと考えられるが、各カゼインによって大きな差は見られなかった。

表 1 2 脂肪球から精製したリパーゼの活性に及ぼすカゼインの影響

保持条件*	α s-カゼイン	β -カゼイン	κ -カゼイン	酸-カゼイン
37°C、20分	142	132	124	158
0°C、60分	136	127	148	135

リパーゼ活性は、対照の活性を100%として表した。

基質：均質化乳中の乳脂肪

*：各タンパク質を0.1%溶解したトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)で精製
リパーゼ液を4倍(0.0015 mg/ml)に希釈し、各反応温度で保持した。

ヤシ油を基質に用いたとき、脂肪球から精製したリパーゼの活性に及ぼす α s-、 β -、 κ - の影響を表 1 3 に示す。反応温度が37℃では、各カゼインの添加によってリパーゼ活性が対照の活性に比べて1.9~2.4倍に増加した。活性の増加は、他のカゼインにくらべて κ -カゼインの添加の場合が最も高かった。反応温度が0℃では、各カゼインの添加によりリパーゼ活性は、1.1~1.6倍に増加した。 κ -カゼインによる活性化の効果は、 α s-と β -カゼインにくらべてやや低かった。

脂肪球からのリパーゼと比較するため、脱脂乳から精製したリパーゼの活性に及ぼす各カゼインの影響を調べた結果を表 1 4 に示す。反応温度37℃では、各カゼインの添加によってリパーゼ活性が対照の1.9~2.5倍に増加した。 κ -カゼインによる活性化効果が最も高かった。反応温度が0℃では、 β -、 κ -カゼインの添加によってほとんど活性の変化がなかったが、 α s-カゼインの添加によっては、やや活性が低下した。

表 1 5 は、1%のBSAを添加したヤシ油を基質に用いたとき、脂肪球から精製したリパーゼの活性に及ぼすカゼインの影響である。反応温度37℃と0℃ともカゼインの添加による大きな活性の変動は見られなかった。しかし、添加したカゼインと同じ濃度の0.1%のBSAを添加したヤシ油を基質に用いた場合は、各カゼインの添加によって活性が増加した(表 1 6)。

考 察

牛乳中のリパーゼの性質に関する研究では、リパーゼの極度の不安定性がこの酵素に対する研究を妨げている。Posner & Bermudez⁶⁷⁾は、牛乳のLPLがラットの心臓や脂肪組織抽出物、あるいは、ヘパリン静注

表 1 3 ヤシ油を基質に用いたときの脂肪球から精製したリパーゼの
活性に及ぼす各カゼインの影響

反応条件	α -s-カゼイン	β -カゼイン	κ -カゼイン
37°C、20分 0.1% ^{a)}	224	187	240
0°C、60分 ^{a)}	161	130	111

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。

a)：基質溶液中のカゼイン濃度

表 1 4 ヤシ油を基質に用いたときの脱脂乳から精製したリパーゼの
活性に及ぼす各カゼインの影響

反応条件	α s-カゼイン	β -カゼイン	κ -カゼイン
37°C、20分 0.1% ^{a)}	188	216	249
0°C、60分 0.1% ^{a)}	88	108	105

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。

a) : 基質溶液中のカゼイン濃度

表 1 5 BSA(1%)を添加したヤシ油を基質に用いたときの脂肪球から精製したリパーゼの活性に及ぼす各カゼインの影響

反応条件	α s-カゼイン	β -カゼイン	κ -カゼイン
37°C、20分 0.1% ^{a)}	107	97	97
0°C、60分 ^{a)}	111	99	90

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。

a)：基質溶液中のカゼイン濃度

表 1 6 BSA(0.1%)を添加したヤシ油を基質に用いたときの脂肪球
から精製したリパーゼの活性に及ぼす各カゼインの影響

反応条件	α s-カゼイン	β -カゼイン	κ -カゼイン
37°C、20分 0.1% ^{a)}	154	108	138
0°C、60分 ^{a)}	260	132	126

リパーゼ活性は対照の活性を100%として表した。

a): 基質溶液中のカゼイン濃度

後の血漿中に存在するLPLよりもずっと安定であると報告した。彼らは、牛乳中にはLPLに結合し Ca^{2+} と高濃度のNaClで分離されるLPL安定化因子が含まれていると結論つけた。そして、安定化効果は、この因子が37℃での予備加温による不活性化からLPLを保護するためであると述べた。Iveriusら⁶⁸⁾は、牛乳中のLPLがタンパク質分解産物やグリコサミノグリカンと思われる物質を含むと報告した。

本実験で用いた反応温度時間に相当する保存を行った後、均質化乳を加えて活性を測定した場合、カゼインの種類にかかわらず、37℃においても0℃においても同程度の活性の増加が見られた。したがって、カゼインはリパーゼに対する安定化効果あるいは、活性増加効果を有すると考えられた。次に酵素と基質のみの単純な系でリパーゼ活性におよぼすカゼインの影響を調べた結果、各カゼインの添加によっては活性が増加した。しかし、1%のBSAを添加した基質を用いた場合は、カゼインの添加による活性の増加は見られないことと、添加したカゼインの濃度と同じ濃度(0.1%)のBSAを添加した基質を用いた場合は、ふたたび活性が増加した。このことからカゼインは、脂肪酸受容体として働き、リパーゼ活性を促進したと思われる。

若濱¹³¹⁾は、脱脂乳から精製したリパーゼについて、ヤシ油を基質とし、各カゼインを0.1%添加した場合の活性の変化を報告している。本研究の結果は、BSAを添加しない場合はこれと同じ傾向を示しているがBSAを1%添加した場合についてはやや差がみられた。これらの結果には、用いた酵素の純度、酵素の濃度、カゼインの純度などの要因が影響していると思われる。したがって、これらの結果を単純に比較することは難しいことである。しかし、本実験では、脱脂乳からリパーゼを精製し、その精製リパーゼを用いて各カゼインの添加による影響を調べた

結果、 α s-カゼイン添加の場合について脂肪球から精製したリパーゼを用いた場合とはやや異なる結果が得られた。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。

脱脂乳は、リパーゼと脂肪球の結合および牛乳のリポリシスを妨げるという報告¹³²⁾やイントラリピット (Intralipid; リパーゼの基質として用いられるレシチンで乳化した大豆油) を基質とし、精製した牛乳リパーゼを用いた場合には、少量の脱脂乳の添加はリパーゼの活性を増加させ、多量の添加は活性を減少させる場合もあること、さらにプロテオースペプトンのコンポーネント5がリパーゼを活性化し、脂肪球に由来するコンポーネント3が活性を阻害したという報告¹³³⁾がある。牛乳の中には、カゼイン以外にもホエータンパク質や脂肪球膜物質などが含まれているし、またカゼインはミセルの状態で存在している。従って、各カゼインがリパーゼ活性に及ぼす影響を直ちに牛乳のリポリシスと関連させることは難しいことである。しかし、本研究の結果からカゼインは、脂肪酸受容体としての作用あるいは、加温による不活性化からリパーゼを保護する働きをしていると考えられる。

第3章 ガスクロマトグラフィーによる F F A の分析

牛乳中のリパーゼは乳脂肪を加水分解し、FFAを生成する。乳脂肪には、水溶性、揮発性の脂肪酸が含まれているので、この脂肪酸が遊離になると牛乳の脂肪分解臭あるいは、ランシッドといわれる異常風味を与える。FFAは、ごく少量であれば牛乳らしい風味を与えるが、ある濃度以上になると牛乳の不快な風味の原因になる。この異常風味を起こす原因であるリパーゼは、大部分がカゼインミセルと結合し、少量のリパーゼが脂肪球に結合している。生乳の冷蔵中に僅かなFFAの増加が見られるが、これ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¹³⁴⁾。

本章では、脂肪球から分離精製したリパーゼにより生成されたFFAをガスクロマトグラフィーを用いて調べた。さらに脱脂乳から分離精製したリパーゼを用いた場合と比較検討した。

材料と方法

1) リパーゼの精製

脂肪球に結合しているリパーゼと脱脂乳中に含まれているリパーゼの精製は、第1章と同じ方法で行った。

各リパーゼの活性を第1章と同じ方法で測定し、ほぼ同じ活性となるように蒸留水で希釈したものを酵素液とした。

2) リパーゼによる乳脂肪の分解及びFFAの抽出

市販の均質化乳 8 mlを共栓付き試験管に分注し、各反応温度に5分間保持した。これに各精製リパーゼの同じ活性を示す希釈液 2 mlを加えて37℃で1時間、0℃で24時間反応させた。20%の硫酸 1 mlを加えて反応を停止させ、これにヘプタン酸を内部標準として加え、2分間振とうした。FFAは、5%のブタノールを含むクロロホルムを用い、シリカゲル法¹³⁵⁾に従って抽出した。不活性化させたアルミナ (ICN Bio-medicals社の ICN Alumina N-Super I) にFFAを吸着させ、さらに10 mlの5%のブタノールを含むクロロホルムで脂肪を溶出させた。FFAを吸着させたアルミナを一晩風乾し、FFAをアルミナから遊離させるため 2.5 mlの3%ギ酸を含む エーテルで2回抽出を行った。この溶液を濾紙 (TOYO Advantec社、No.2) で濾過し、濾液0.5 mlをガスクロマトグラフィー (GC) に注入、分析した。

3) GCによるFFAの分析

ガスクロマトグラフィーには、Shimadzu GC-14Aを用いた。カラムは、液相がポリエチレングリコールの、キャピラリーカラム(25 m×0.22 mm i.d., Shimadzu社)を用いた。カラム温度は、35℃で5分間保持後、10℃/minの速度で240℃まで昇温させた。検出器には、水素炎イオン化学検出器を用いた。FFAの定量は、内部標準として添加したヘプタン酸に対する比率より算出した。なお、この際ヘプタン酸に対する各種の脂肪酸の補正係数をあらかじめ既知試料について算出しておき補正した。

結 果

図 2 7 には、FFA の分析に用いた反応温度 37°C でのガスクロマトグラムの一例を示した。図 2 8 には、反応温度 0°C でのガスクロマトグラムの一例を示した。

FFA の分析は、酪酸 (C4) からステアリン酸 (C18) までの炭素数が偶数の長鎖飽和脂肪酸とオレイン酸 (C18:1) を定量した。しかし、その回収率は、脂肪酸によって若干異なるので各脂肪酸について補正を行った。

図 2 9 は、脂肪球から精製したリパーゼを用い、反応温度 37°C で 1 時間あるいは、 0°C で 24 時間反応させたときに生成した全体の FFA の量に対する各 FFA の量をその割合として示した図である。 37°C より 0°C の方がランシッドの主な原因である C4~C12 までの低級脂肪酸を多く生成した。全体の FFA に対する低級脂肪酸の比率は、反応温度 37°C では約 11 % で、 0°C の場合は約 15 % であった。反応温度 0°C では、低級脂肪酸 (C4~C12) の中で特に C4 と C12 が他の脂肪酸より多く生成された。

図 3 0 は、脱脂乳から精製したリパーゼを用い、反応温度 37°C で 1 時間、あるいは、 0°C で 24 時間反応させたときに生成した全体の FFA の量に対する各 FFA の量をその割合として示した図である。低級脂肪酸は、脂肪球から精製したリパーゼを用いた場合と同じく、 37°C より 0°C の方が多く生成した。全体の FFA に対する低級脂肪酸の比率は、 37°C で約 11 %、 0°C では約 17 % であった。C4~C12 までの低級脂肪酸の中で C12 が、反応温度 37°C と 0°C とともに他の脂肪酸よりやや多く生成された。

図 3 1 は、脂肪球と脱脂乳により精製したリパーゼを用いて反応温度 37°C で反応させたときに生成した FFA の割合を比較した図である。

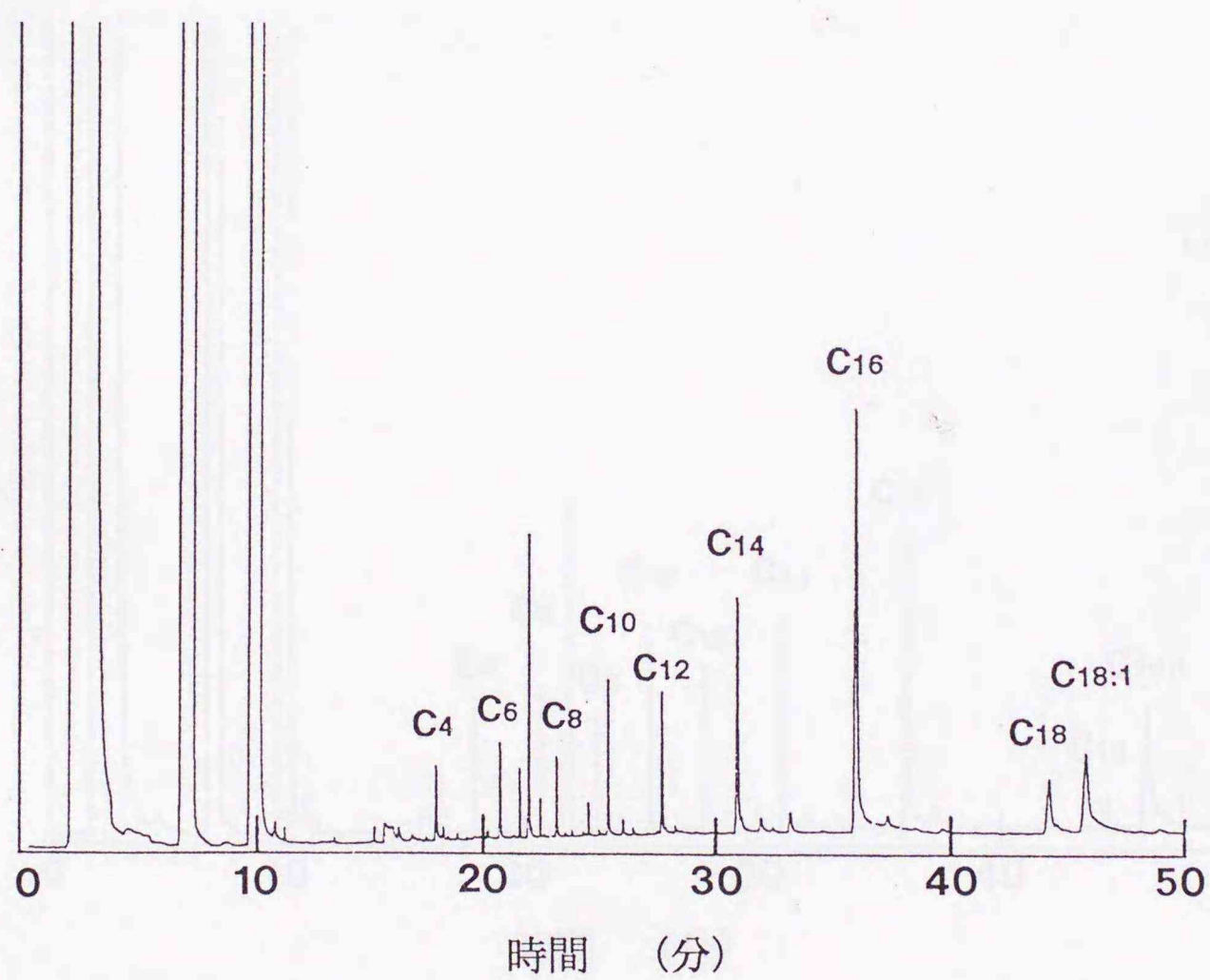


図 2 7 脂肪球から精製したリパーゼによって生成したFFAの
ガスクロマトグラム
反応条件 : 37°C、1時間

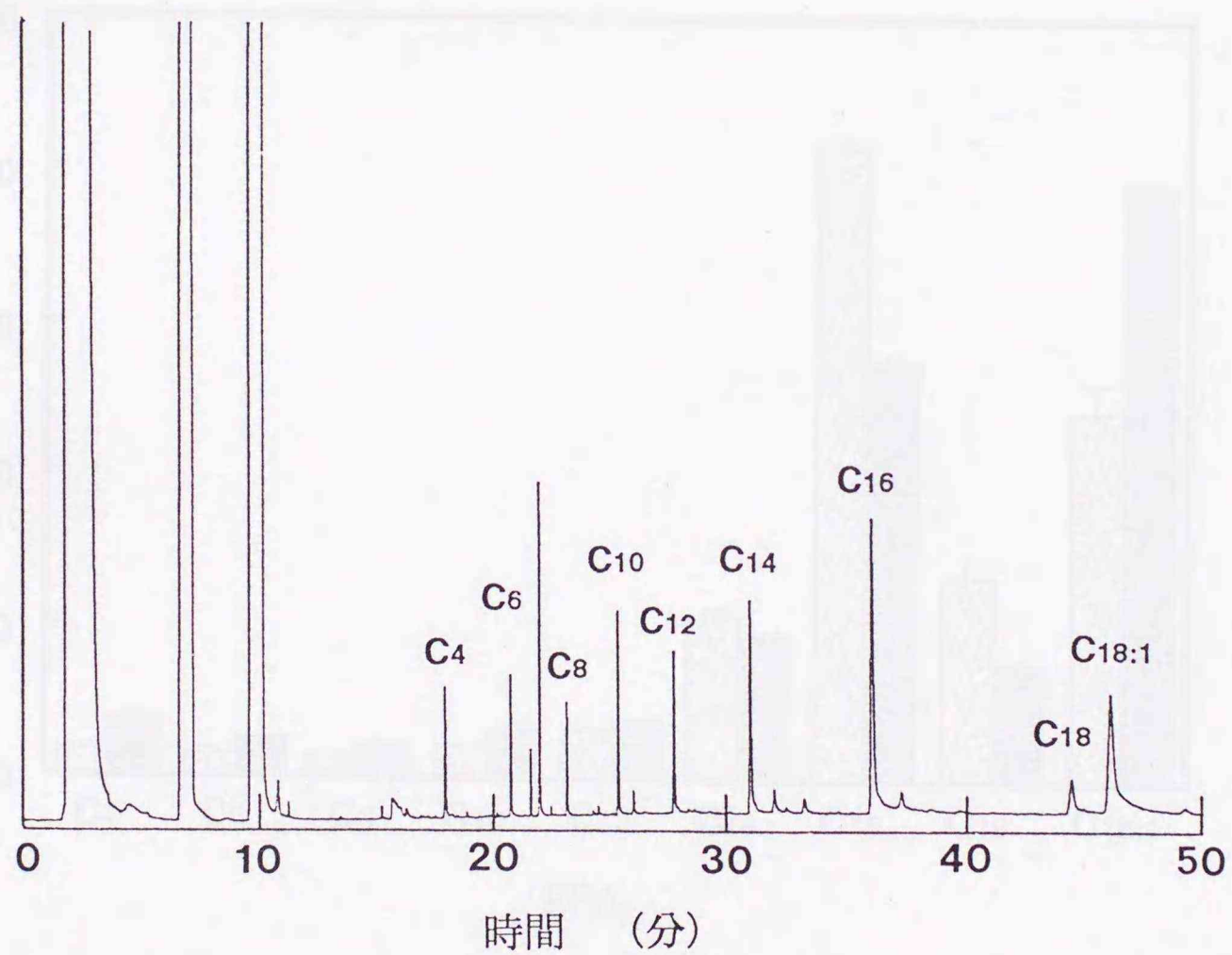


図 2 8 脂肪球から精製したリパーゼによって生成したFFAの
ガスクロマトグラム
反応条件 : 0°C、24時間

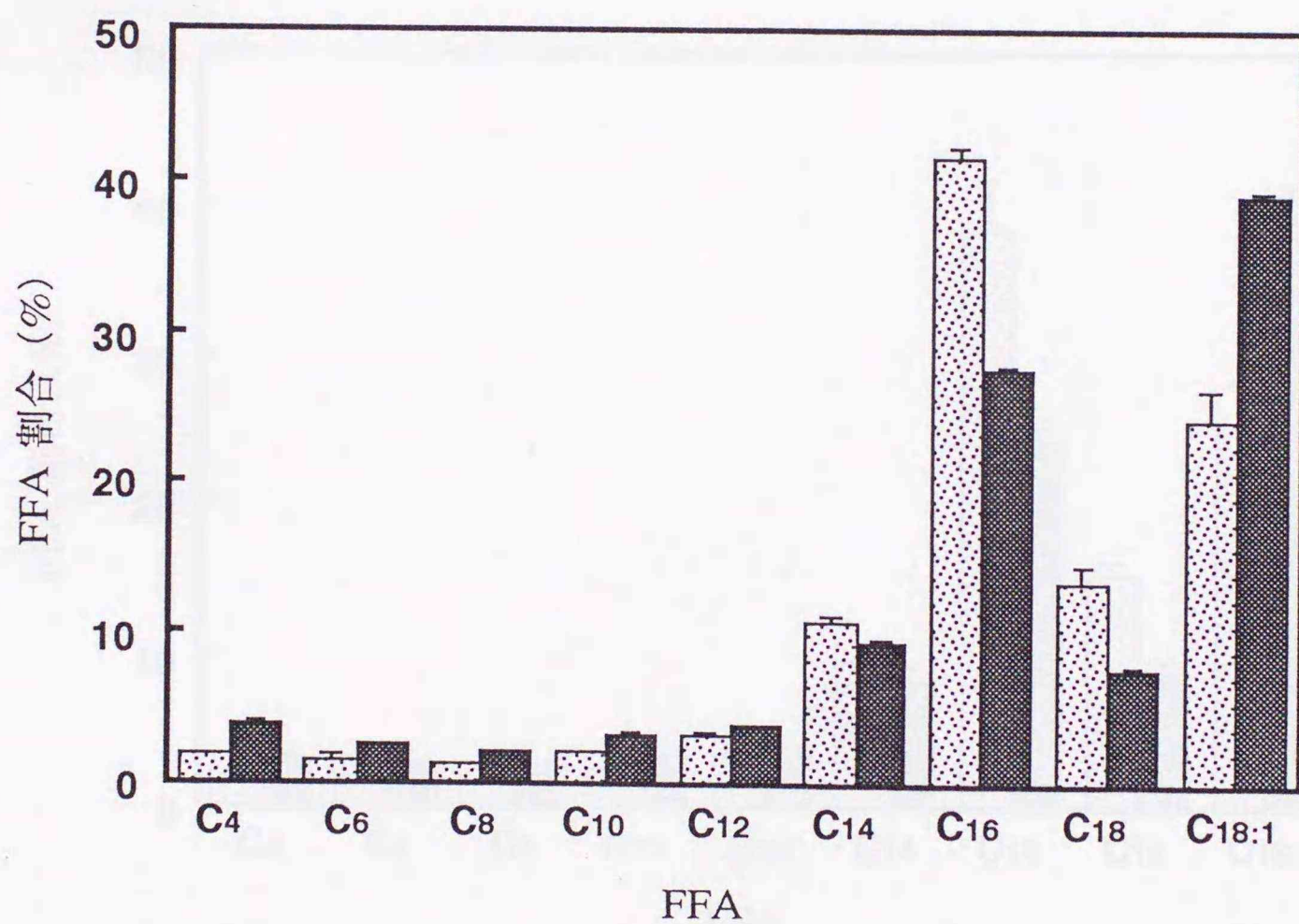


図 2 9 脂肪球から精製したリパーゼによって生成したFFAのプロフィール
 反応条件 : 37°C、1時間 (▨) ; 0°C、24時間 (■) .

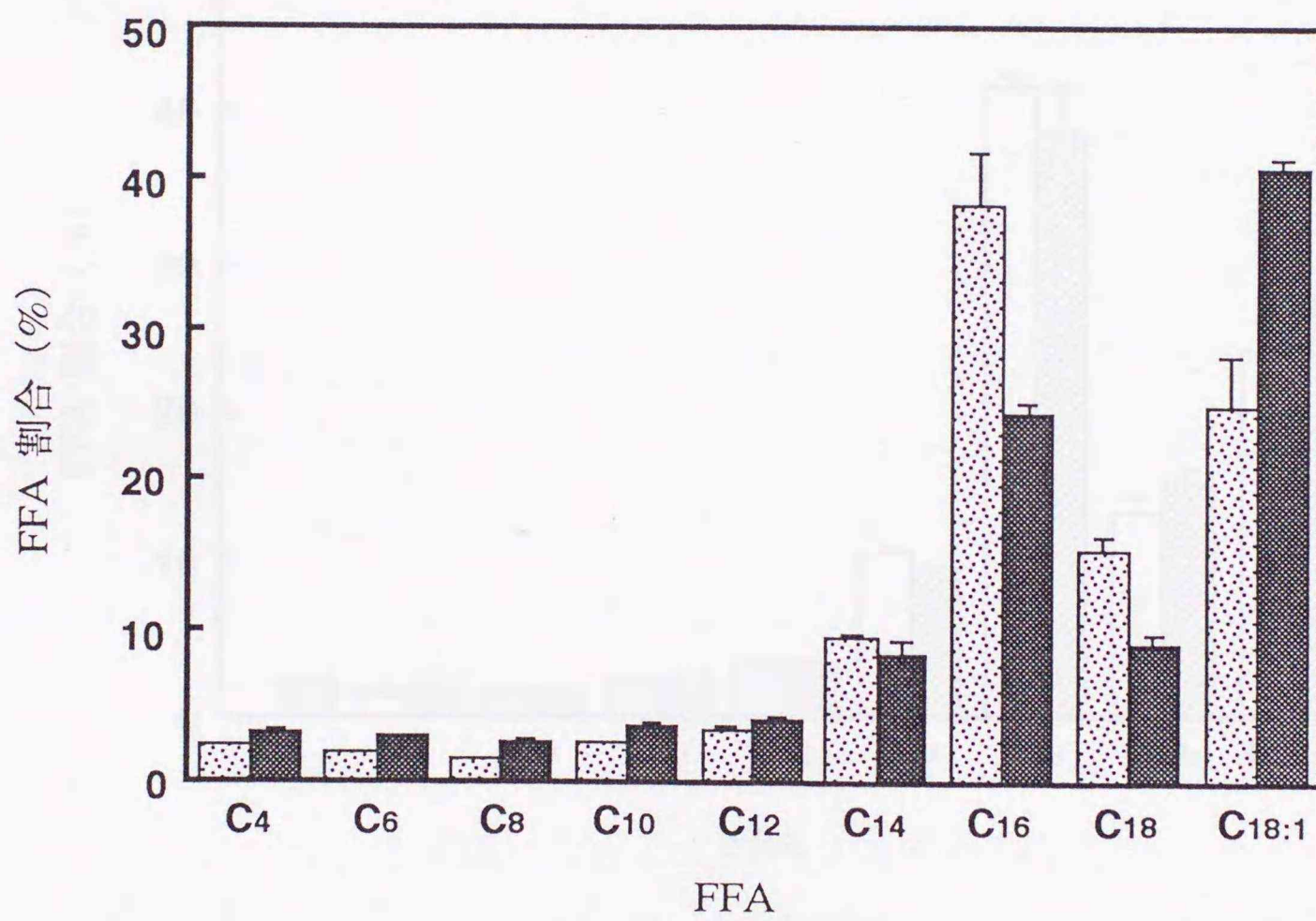


図 3 0 脱脂乳から精製したリパーゼによって生成したFFAのプロフィール
 反応条件 : 37°C、1時間 (▨) ; 0°C、24時間 (■) .

脂肪球から精製したリパーゼと脱脂乳から精製したリパーゼを用いて、脂肪酸の生成を比較した。脂肪酸の生成は、脱脂乳から精製したリパーゼの方が多かった。

図 3 1 は、脂肪酸の生成を比較した結果を示している。脂肪酸の生成は、脱脂乳から精製したリパーゼの方が多かった。脂肪酸の生成は、脱脂乳から精製したリパーゼの方が多かった。

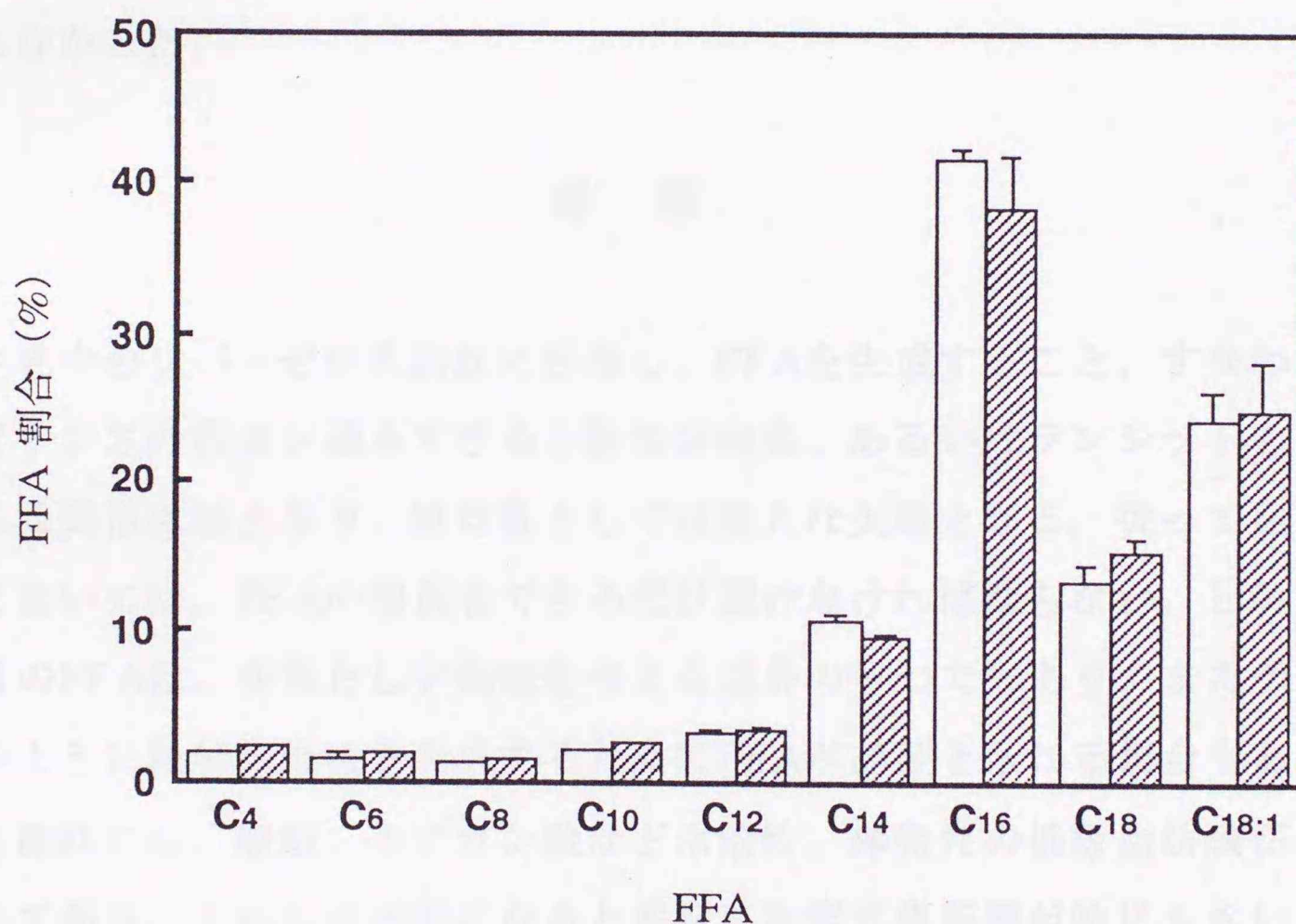


図 3 1 37°Cで1時間反応させたときのリパーゼによって生成した FFAのプロフィール

- : 脂肪球から精製したリパーゼ
- ▨ : 脱脂乳から精製したリパーゼ

脂肪球からのリパーゼはC14とC16を多く生成したが、全体的に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より生成された低級脂肪酸の割合には、大きな変動は見られなかった。

図32は、脂肪球と脱脂乳により精製したリパーゼを用いて反応温度0℃で反応させたときに生成したFFAの割合を比較した図である。反応温度0℃の場合、37℃の場合とは逆に脱脂乳からのリパーゼより脂肪球からのリパーゼが低級脂肪酸の中でC4を多く生成した。C12より大きい飽和脂肪酸の場合は、37℃の場合と比べ、その割合に大きな変動は見られなかった。

考 察

牛乳中のリパーゼが乳脂肪に作用し、FFAを生成すること、すなわち、リポリシスの程度が進みすぎると脂肪分解臭、あるいはランシッドといわれる異常風味となり、原料乳としては重大な欠陥となる。従って原料乳においては、FFAの増加をできるだけ避けなければならない。しかし、少量のFFAは、牛乳らしい風味を与える成分の一つでもあり、またチーズのように独特の風味を形成するためにFFAが必要とされる場合もある。牛乳脂肪には、酪酸、カプロン酸など水溶性、揮発性の低級脂肪酸が含まれており、これらが遊離になると風味に及ぼす悪影響が特に大きいと考えられている。ランシッドは、主に炭素数C4～C12のFFAが原因である^{5,6)}。Al-Shabibiら⁷⁾は、特にC4～C8の低級脂肪酸がランシッドの原因であるとし、C10～C12のFFAは、苦み、石鹼臭、不潔臭の原因であると報告した。

脂肪球または、脱脂乳から精製したリパーゼは、反応温度37℃より

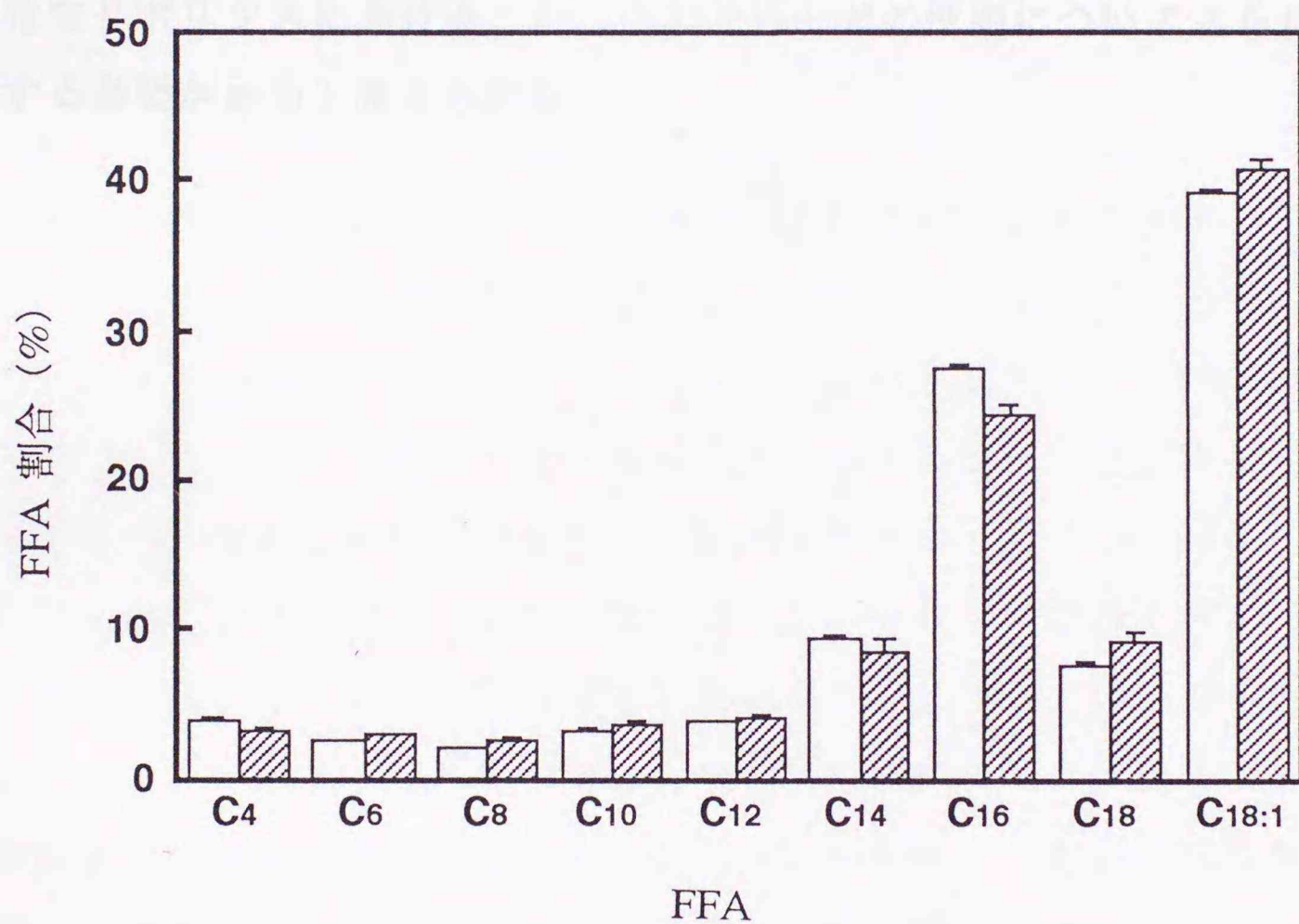


図 3 2 0°Cで24時間反応させたときのリパーゼによって生成した FFAのプロファイル

- : 脂肪球から精製したリパーゼ
- ▨ : 脱脂乳から精製したリパーゼ

0℃で低級脂肪酸およびオレイン酸を多く生成した（図29，図30）。すなわち、この二つのリパーゼは、37℃より0℃において、融点の低い脂肪酸を比較的によく遊離した。したがって、牛乳の低温保存中に起こる自然発生リポリシスは、ランシットに結びつきやすいといえよう。

反応温度37℃と0℃におけるこの二つのリパーゼのFFAの生成の割合を比較した結果（図31，図32）、37℃では、両方のリパーゼの間に低級脂肪酸の大きな変動は見られなかったが、0℃の場合は生成された各FFAの割合に差が見られた。したがって、低温保存中に発生する自然発生リポリシスにおけるこの二つのリパーゼの役割についてさらに検討する必要があると考えられる。

第4章 総合考察

牛乳は、搾乳後さまざまな化学的物理的变化を受ける。その一つは、リポリシスすなわち、脂肪のトリグリセリドがリパーゼによって分解され、その結果、脂肪酸が遊離する変化である。牛乳中に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、その結果、牛乳が飲用に耐えないものとなる。またリポリシスにより牛乳の風味が著しく損なわれた場合、加熱によりリパーゼは失活しても異常臭は残り、製品の風味を悪くする。牛乳中にはランシッドを引き起こすのに十分なリパーゼが含まれており、その大部分は脱脂乳中にあり、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。従って自然発生リポリシスの原因や機構を解明するために最も重要なことは、脂肪球と結合しているリパーゼの性質を知ることである。しかし、牛乳を冷却した場合、脂肪球に結合するリパーゼは脱脂乳中のリパーゼの中である特定のリパーゼだけが脂肪球に移動するのか、あるいは無作為な吸着であるかについてはまだはっきりしたことはわかっていない。また、冷却によって脂肪球に結合したリパーゼが、脱脂乳中に留まっているリパーゼと同じ性質であるかどうかについても不明である。

本研究の主な目的は脂肪球に結合しているリパーゼの性質を調べるために、まず脂肪球からリパーゼの分離精製を試みることにあった。脂肪

球からリパーゼを精製するためには、まずリパーゼの失活を少なくして、カゼインや他の乳タンパク質および脱脂乳部分のリパーゼを除くためにクリームの洗浄が重要である。

本研究の結果、クリームの洗浄には、0.25 M ショ糖を溶かしたクリームの上に0.05 M NaCl溶液を重層し、遠心分離によって脂肪球を回収する方法が蒸留水または、ショ糖溶かしたクリームに0.05 M NaCl溶液を混合してクリームを洗浄する方法より効果的であった。

脂肪球からリパーゼを精製するためには、その出発材料であるバターミルクの調製にあたって空気に曝されることは、避けられないことである。Saitoら¹⁰⁹⁾は、牛乳リパーゼの研究に際してチャーニングは活性の上から望ましくないことであると報告した。本研究では、洗浄脂肪球をチャーニングするとき窒素ガスを吹き込んだ場合が窒素ガス処理をしなかったときより高い回収率が得られた。このことからチャーニングに際して窒素ガスを吹き込むことが酸化による失活を防ぐと思われる。精製リパーゼの回収率は、クリームに対し3%でかなり低いものであった。これは、クリームの洗浄によってクリームに含まれていた脱脂乳由来のリパーゼが除去されたのが主な原因である。また、クリームの洗浄からバターミルクを分離するまでの過程が室温で行なわれた結果、その間の失活も無視できないことである。しかし、回収率は、クリームからバターミルクまでの段階よりバターミルクからリパーゼ精製までの間で大きく低下している。これは、バターミルクからアフィニティカラムクロマトグラフィーによる精製まで数日が必要であり、その間の失活が大きな原因であると思われる。したがって、脂肪球からリパーゼの精製を行うためには、活性の失活を防ぐことがなによりも重要なことである。

アフィニティカラムクロマトグラフィーによって得られたリパーゼの

分子量および純度をSDS-PAGEにより調べた結果、分子量が58,000で十分な純度のリパーゼが得られた。以上の結果から本研究で用いた精製方法は、脂肪球に結合しているリパーゼを精製するのに有効であると思われる。

牛乳中には性質が異なる二つの脂肪分解酵素、すなわち、リパーゼ^{37,53)}とLPL^{43,44)}が含まれているという報告もあるが、リパーゼとLPLを区別することは難しく、リパーゼはLPLと同じものと考えられ⁹⁾、牛乳中の唯一の脂肪分解酵素であると結論されている^{47,49)}。しかし、この結論は、おもに脱脂乳から分離精製したリパーゼを用いた結果であり、脂肪球から分離精製したリパーゼを用いて行なった報告はない。本研究では、脂肪球から得られた精製リパーゼを用い、LPLの典型的な阻害剤として用いられてきたNaClと硫酸プロタミンならびにLPLの活性と関係の深い添加物であるBSAとヘパリンを用いて活性に及ぼす影響について調査した。その結果、これらの添加物がリパーゼに及ぼす影響は、用いる基質、反応温度、および酵素の純度によって異なった。斎藤⁵¹⁾は、用いる基質の種類によってLPLの特徴を示す場合とリパーゼとLPLの両者の性質を示すときがあると報告した。本実験で脂肪球から精製したリパーゼは、用いた基質によってLPLの特徴を示す場合もあり、一般的に知られているLPLの性質を示さない結果も得られた。従って、このような結果から脂肪球に結合しているリパーゼがLPLであるかどうかについての結論は得られなかった。脱脂乳中のリパーゼについても、いままでの多くの研究者による報告の中で結果が一致しない場合が多いのは、基質など測定条件の違いによるためであろう。

牛乳のリポリシスには、様々な要因が影響する。それらの中でpHの影響は、重要な因子の一つである。多くの研究者^{88,120)}は、リパーゼの

活性が pH 8 と pH 9 の間に最適 pH をもっていると報告した。一方、基質によっては最適 pH を示さず、リパーゼ活性が pH とともに連続的に増加するという報告もある^{86,121)}。本研究で、精製リパーゼを用い、基質として乳脂肪を用いた場合は、反応温度 37°C では pH 9 が最適 pH であったが、0°C 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 (図 1 1)。しかし、BSA を添加したヤシ油を基質にした場合は、37°C と 0°C とともに pH 9.5 に最大活性が見られた (図 1 2)。このように反応温度および基質によって最適 pH が異なるのは、用いた基質の構成脂肪酸が異なるため、また、反応温度による基質の状態の違いおよび反応中の失活も原因として考えられる。特にリパーゼのように水に不溶な基質に作用する場合は、基質の種類やその基質分子の反応系での存在状態が問題となる。最適 pH は、起源が異なる酵素の特徴をつけるための一つの基準として使われるが、脱脂乳から精製したリパーゼを用いた場合の最適 pH (図 1 4) は脂肪球から精製したリパーゼの最適 pH (図 1 2) と同じであった。酵素の安定性に及ぼす pH の影響を調べた結果、0°C に保持した場合のリパーゼは最適温度 (37°C) に保持した場合よりも高い pH でも安定であることがわかった。このように低温でのリパーゼの安定性が反応温度 0°C で最適 pH を示さず、pH の増加とともに活性が増加した原因のひとつであるだろう。

自然発生リポリシスは、さまざまな要因によって発現される。それらの要因の中で、リパーゼに対する促進因子を含む血清成分の乳中への混入によることがひとつの要因として考えられる。血清中の活性促進因子は、アポリポタンパク質 C-II であることはよく知られている^{69,70)}。本実験では、酵素源、基質および反応温度によって牛血清の添加による影響が異なった。また、乳脂肪のようにいろいろな乳成分が混合されて

いる基質を用いた場合、通常牛乳の保存温度である10℃以下の温度でも牛血清による大きな活性の増加は見られなかった。ヤシ油のような長鎖の脂肪酸を含む基質を用いた場合、精製リパーゼの活性に及ぼすアポリポタンパク質C-IIの影響はBSA添加の有無また、反応温度によって異なる結果が得られた。さらに市販の均質化乳中の乳脂肪を基質に用いた場合は、ヤシ油のような人工基質の場合と逆の結果も見られた。反応温度0℃におけるリパーゼ活性は、牛血清を添加したときには増加しないがアポリポタンパク質C-IIを添加すると増加した（表9，11）。以上の結果から自然発生リポリシスの発現には、活性促進因子あるいは阻害因子だけが作用するのではなく、これらの因子の複合的な作用とその因子間のバランスなどが影響を及ぼすと思われる。

基質として乳脂肪を用い、脂肪球と脱脂乳により精製したリパーゼの活性におけるヘパリンの影響について調べた結果、低温において異なる結果が得られた。したがって、同じ測定条件を用いた本実験の結果からこれらのふたつのリパーゼは、性質が異なる可能性が示唆されている。

牛乳中のリパーゼの大部分がカゼインミセルに結合していることはすでに知られている。このように主なりパーゼが結合しているカゼインがリパーゼの活性に及ぼす影響について調べた。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、BSAを添加すると活性の増加は見られなかった。また、添加したカゼインの濃度と同じ濃度のBSAを添加した基質を用いた場合は、再び活性が増加した。したがって、カゼインは、脂肪酸受容体あるいは、加温による不活性化からリパーゼを保護する働きをもち、その結果リパーゼの活性を促進させられると思われる。

牛乳中のリパーゼが乳脂肪を加水分解すると脂肪酸が遊離する。遊離

脂肪酸がある濃度以上になると牛乳の異常風味すなわち、ランシッドの原因となり、原料乳においては重要な欠陥となる。そのランシッドの原因は、主に炭素数C4~C12の遊離脂肪酸である。C4~C8までの低級脂肪酸が、特にランシッドの原因であると思われる⁷⁾。脂肪球または、脱脂乳から精製したリパーゼは、反応温度37℃より0℃で低級脂肪酸(C4~C12)を多く生成した。したがって、牛乳の低温保存中に起こる自然発生リポリシスには、この二つのリパーゼが関与していると思われる。反応温度37℃と0℃におけるふたつのリパーゼのFFAの生成の割合を比較した結果、37℃では、両方のリパーゼの間に大きな変動は見られなかったが、0℃では、差が見られた。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な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検討が必要である。

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確信する。

要 約

脂肪球からリパーゼの分離精製を試み、その得られたリパーゼを用い、反応温度37℃と0℃における性質を基質としてヤシ油と市販の均質化乳中の乳脂肪を用いて調べ、以下のような結果を得た。

1. 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り得られた精製リパーゼの分子量は、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14%であった。

2. クリームの洗浄は、ショ糖を溶かしたクリームの上に0.05 M NaCl溶液を重層してクリームを洗浄した方が、蒸留水または、ショ糖を溶かしたクリームに0.05 M NaCl溶液を混合して洗浄する方法より効果的であった。

3. 洗浄脂肪球をチャージ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回収することができた。

4. 精製リパーゼの活性に及ぼす添加物の影響は次のとおりであった。

1) 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乳脂肪の場合は低下した。

2) 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。

3) アポリポタンパク質 C-II と BSA をともに添加すると、ヤシ油の場合は、反応温度に関係なく、牛血清および apo C-II 単独の添加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牛血清およびアポリポタンパク質 C-II + BSA の添加より活性が高かった。

4) 酵素液に硫酸プロタミンを加えて 4°C 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°C で乳脂肪を基質とした場合以外は活性が増加した。

5) 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。

6) 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°C では、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 α s-カゼインの影響は異なった。

5. 精製リパーゼの最適 pH は、基質として乳脂肪を用いた場合、反応温度 37°C では pH 9.0 であったが、0°C 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°C と 0°C とともに 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°C で保存すると活性が著しく低下し、pH 9.5 以上では不可逆的に失活した。

6. 精製リパーゼは、反応温度 37°C より 0°C で低級脂肪酸を多く生成した。反応温度 0°C 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。

謝辞

本研究の企画・進行及び論文作成に至るまで始終直接御指導、御助言を賜わり、また公私に亙り温かい励ましを頂きました北海道大学農学部齋藤善一教授に深く感謝致します。

北海道大学農学部 高橋興威教授、近藤敬事教授には論文の御校閲と貴重な御意見を賜りましたことに深く感謝の意を表します。また、仁木良哉教授及び三河勝彦助教授には実験遂行に際し懇切丁寧な御指導を賜りましたことに深く感謝致します。

本研究遂行にあたり、大変お世話になりました北海道大学農学部附属農場畜産製造部 板谷 一、加藤秀雄及び日置昭二技官に感謝致します。

研究のみならず、様々な面でお世話になりました北海道農学部畜産科学科酪農科学講座玖村朗人助手、佐々木美晴事務官及び酪農科学講座の各位に深く感謝致します。

1990年4月から1993年3月の間に米山奨学生として採用され、安定した研究生活が続けられたことに対し、ここに記して財団法人ロータリー米山記念奨学会及び札幌北ロータリークラブに感謝の意を表します。

終わりに、今日まで私を育ててくださった母国の父母に深く感謝します。また、日本での外国生活を明るく、元気で過ごしてくれた妻 銀淑と長男 成旭にも感謝する。

文 献

- 1) Jensen, R.G. (1964) *J. Dairy Sci.*, 47, 210-215
- 2) Chandan, R.C. and Shahani, K.M. (1964) *J. Dairy Sci.*, 47, 471-480
- 3) Pitas, R.E., Sampugna, J. and Jensen, R.G. (1967) *J. Dairy Sci.*, 50, 1332-1336
- 4) Kuzdzal-Savoie, S. (1980) *Int. Dairy Fed. Doc.*, 118, 53-66
- 5) Kolar, C.W. and Mickle, J.B. (1963) *J. Dairy Sci.*, 46, 569-571
- 6) Scanlan, R.A., Sather, L.A. and Day, E.A. (1965) *J. Dairy Sci.*, 48, 1582-1584
- 7) Al-Shabibi, M.M.A., Langner, E.H., Tobias, J. and Tuckey, S.L. (1964) *J. Dairy Sci.*, 47, 295-296
- 8) Tarassuk, N.P. and Frankel, E.N. (1955) *J. Dairy Sci.*, 38, 438-439
- 9) Deeth, H.C. and Fitz-Gerald, C.H. (1983) "Developments in Dairy Chemistry-2", (ed. by Fox, P.F.), p.195-237, Elsevier Applied Science Pub., London and New York
- 10) 斎藤善一 (1982) 乳技協資料, 32, 2-12
- 11) Krukovsky, V.N. and Herrington, B.L. (1939) *J. Dairy Sci.*, 22, 137-147
- 12) Hileman, J.L. and Courtney, E. (1935) *J. Dairy Sci.*, 18, 241-257
- 13) Fouts E.L. and Weaver, E. (1936) *J. Dairy Sci.*, 19, 482-483

- 14) Tarassuk,N.P. and Regen,W.M. (1943) J. Dairy Sci., 26,
987-996
- 15) Jensen,R.G. (1959) J. Dairy Sci., 42, 1619-1621
- 16) Gholson,J.H., Schexnailder,R.H. and Rusoff,L.L. (1966) J.
Dairy Sci., 49, 1136-1139
- 17) Astrup,H.N., Baevre,L., Vik-Mo,L. and Ekern,A. (1980) J.
Dairy Res., 47, 287-294
- 18) Pfeffer,J.C., Jackson,H.C. and Weckel,K.G. (1938) J. Dairy
Sci., 21 (Abstr.), 143
- 19) Jellema,A. and Schipper,C. (1975) Proc. Lipolysis Sympo.,
Int. Dairy Fed. Doc., 86, 2-6
- 20) Saito,Z. (1981) J. Dairy Sci., 64, (Suppl. 1) 60
- 21) Suhren,G., Hamann,J., Heeschen,W. and Tolle,A. (1981)
Milchwissenschaft, 36, 150-153
- 22) Bachman,K.C. and Wilcox,C.J. (1977) J. Dairy Sci., 60,
(Suppl. 1), 61
- 23) Downey,W.K. (1980) J. Dairy Res., 47, 237-252
- 24) Deeth,H.C and Fitz-Gerald,C.H. (1975) Int. Dairy Fed.
Doc., 86, 24-34
- 25) Dunkley,W.L. and Smith,L.M. (1951) J. Dairy Sci., 34,
940-947
- 26) Roadhouse,C.L. and Henderson,J.L. (1936) J. Dairy
Sci., 19 (Abstr.), 107

- 27) Saito, Z. (1984) Research in Food Science Vol.5.
(McCloughlin, J. V. and McKenna, B. M. eds.) 273-283,
Boole Press.
- 28) Tarassuk, N. P. and Frankel, E. N. (1957) J. Dairy Sci.,
40, 418-430
- 29) Marfan (1901) La Press Medicale, Jan., 9, 13-16
(Rice, F. E. and Markley, A. L. (1922) J. Dairy Sci., 5,
64-82 より引用)
- 30) Palmer, L. S. (1922) J. Dairy Sci., 5, 51-63
- 31) Rice, F. E. and Markley, A. L. (1922) J. Dairy Sci., 5, 64-82
- 32) 斎藤 善一 (1967) 酪農科学の研究, 16, 1-13
- 33) Krukovsky, V. N. and Sharp, P. F. (1940) J. Dairy Sci., 23,
1109-1118
- 34) Rao, S. R. (1951) ph.D. Diss. Univ. of Wisconsin
- 35) Schwartz, D. P., Gould, I. A. and Harper, W. J. (1954) J. Dairy
Sci., 37 (Abstr.), 644
- 36) Albrecht, T. W. and Jaynes, H. O. (1955) J. Dairy Sci.,
38, 137-146
- 37) Frankel, E. N. and Tarassuk, N. P. (1956) J. Dairy Sci.,
39, 1506-1516
- 38) Gaffney, P. J., Jr., Harper, W. J. and Gould, I. A. (1966) J. Dairy
Sci., 49, 921-924
- 39) Fox, P. F. and Tarassuk, N. P. (1968) J. Dairy Sci., 51, 826-833
- 40) Montgomery, M. W. and Forster, T. L. (1961) J. Dairy Sci., 44,
721

- 41) Korn,E.D. (1962) J. Lip. Res., 3, 246-250
- 42) Hahn,P.E. (1943) Science, 98, 19-22
- 43) Korn,E.D (1955a) J. Biol. Chem., 215, 1-14
- 44) Askew,E.W., Emery,R.S. and Thomas,J.W. (1970) J. Dairy Sci., 53, 1415-1423
- 45) Fielding,C.J. (1970a) Biochim. Biophys. Acta, 206, 109-117
- 46) Fielding,C.J. (1970b) Biochim. Biophys. Acta, 206, 118-124
- 47) Egelrud,T. and Olivecrona,T. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6212-6217
- 48) Castberg,H.B., Egelrud,T., Solberg,P. and Olivecrona,T. (1975) J. Dairy Res., 42, 255-266
- 49) Olivecrona,T., Egelrud,T., Hernell,O., Castberg,H. and Solberg,P. (1975) Int. Dairy Fed. Doc., 86, 61-72
- 50) Downey,W.K. (1975) Int. Dairy Fed. Doc., 86, 80-89
- 51) 斎藤善一 (1977) 日畜会報, 48, 299-307
- 52) Downey,W.K. (1974) 19th Int. Dairy Cong., 2, 323-352
- 53) Downey,W.K. and Andrews,P. (1965a) Biochem. J., 94, 642-650
- 54) Driessen,F.M. and Stadhouders,J., (1974) Neth.Milk Dairy J., 28, 130-145
- 55) Jensen,R.G. and Pitas,R.E. (1976) J. Dairy Sci., 59, 1203-1214
- 56) Fox,P.F., Yaguchi,M. and Tarassuk,N.P. (1967) J. Dairy Sci., 50, 307-312
- 57) Anderson,M. (1982) J. Dairy Res., 49, 51-59

- 58) Downey, W.K. and Murphy, R.F. (1970) *J. Dairy Res.*, **37**, 47-59
- 59) Sundheim, G. and Bengtsson-Olivecrona, G. (1986) *J. Dairy Sci.*, **69**, 1776-1783
- 60) Herrington, B.L. (1954) *J. Dairy Sci.*, **37**, 775-789
- 61) Olivecrona, T., Egelrud, T., Iverius, P.H. and Lindahl, U. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 524-529
- 62) Olivecrona, T. (1980) *Int. Dairy Fed. Doc.*, **118**, 19-25
- 63) Iverius, P.H. and Ostlund-Lindqvist, A.M. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7791-7795
- 64) Kinnunen, P.K.J., Huttunen, J.K. and Ehnholm, C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **450**, 342-351
- 65) Frankel, E.N. and Tarassuk, N.P. (1959) *J. Dairy Sci.*, **42**, 409-419
- 66) Shahani, K.M. and Khan, I.M. (1968) *J. Dairy Sci.*, **51**, 941
- 67) Posner, I. and Bermudez, D. (1977) *Acta Cient. Venez.*, **28**, 277-283
- 68) Iverius, P.H., Lindahl, U., Egelrud, T. and Olivecrona, T. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6610-6616
- 69) La Rosa, J.C., Levy, R.I., Hervet, P., Lux, S.E. and Fredrickson, D.S. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 57-62
- 70) Ostlund-Lindqvist, A.M. and Iverius, P.H. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 1447-1455
- 71) Clegg, R.A. (1978) *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 1207-1210

- 72) Brown, W.V. and Baginsky, M.L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 375-382
- 73) Jackson, R.L., Tajima, S., Yamamura, T., Yokoyama, S. and Yamamoto, A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **875**, 211-219
- 74) Bengtsson, G. and Olivecrona, T. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **106**, 557-562
- 75) Rapp, D. and Olivecrona, T. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **91**, 379-385
- 76) Anderson, M. (1981) *J. Dairy Res.*, **48**, 247-252
- 77) Shimizu, M., Miyaji, H. and Yamauchi, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 795-799
- 78) Tarassuk, N.P. and Henderson, J.L. (1942) *J. Dairy Sci.*, **25**, 801-806
- 79) Kanno, C. and Yamauchi, K. (1978) *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1697-1705
- 80) Kanno, C. and Yamauchi, K. (1979) *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2105-2113
- 81) Bengtsson, G. and Olivecrona, T. (1977) *Biochem. J.* **167**, 109-119
- 82) Bengtsson, G. and Olivecrona, T. (1981) *FEBS Lett.*, **128**, 9-12
- 83) Matsuoka, N., Shirai, K. and Jackson, R.L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 308-316
- 84) Riley, S.E. and Robinson, D.S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **369**, 371-386

- 85) Jackson, R.L., Pattus, F. and De Haas, G. (1980) *Biochemistry*, 19, 373-378
- 86) Bengtsson, G. and Olivecrona, T. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 751, 254-259
- 87) Fielding, C.J. and Fielding, P.E. (1976) *J. Lipid Res.*, 17, 248-256
- 88) Olivecrona, T. and Bengtsson, G. (1984) "Lipases", (ed. by Borgstrom, B. and Brockman, H.L.), p. 206-261, Elsevier Pub. Co., Amsterdam, Neth.
- 89) Posner, I. and Morrison, A.D. (1979) *Acta Cient. Venez.*, 30, 143-151
- 90) Quigley, T.W., Roe, C.E. and Pallansch, M.J. (1958) *Fed. Proc.*, 17, No.1, Pt.I, 292
- 91) Morton, R.K. (1954) *Biochem. J.*, 57, 231-237
- 92) Jenness, R. and Koops, J. (1962) *Neth. Milk Dairy J.*, 16, 153-164
- 93) 若濱有子 (1989) 北海道大学. 博士論文
- 94) Lindqvist, B., Roos, T. and Fujita, H. (1975) *Milchwissenschaft*, 30, 12-17
- 95) Saito, Z. (1979) *Jap. J. Zootech. Sci.*, 50, 710-715
- 96) Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685
- 97) Skea, J.D. and Overcast, W.W. (1961) *J. Dairy Sci.*, 44, 823-832
- 98) Saito, Z. and Hashimoto, Y. (1963) *Jap. J. Zootech. Sci.*, 34, 393-403

- 99) Yaguchi,M., Tarassuk,N.P. and Abe,N. (1964) J. Dairy Sci.,
47, 1167-1172
- 100) Olivecrona,T. and Lindahl,U. (1969) Acta Chem.Scand, 23,
3587-3589
- 101) Kinnunen,P.K.J. (1977) Med. Biol., 55, 187-191
- 102) Saito,Z and Igarashi,Y (1969) Bull. Fac. Agric. Hirosaki
Univ., 15, 50-56
- 103) Chien,H.C. and Richardson,T. (1967) J. Dairy Sci.,
50, 1868-1872
- 104) King,R.L. (1962) J. Dairy Sci., 45, 1165-1171
- 105) Swope,F.C. and Brunner,J.R. (1968) Milchwissenschaft, 23,
470-473
- 106) Anderson,M. and Brooker,B.E. (1975) J. Dairy Sci.,
58, 1442-1448
- 107) Dowben,R.M., Brunner,J.R. and Philpott,D.E. (1967)
Biochim. Biophys. Acta, 135, 1-10
- 108) Sasaki,R., Koyama,S. and Nishikawa,M. (1955) J. Agr.
Chem. Soc. Japan, 29, 827-831
- 109) Saito,Z. and Hirose,M. (1972) Bull. Fac. Agric. Hirosaki
Univ., 18, 35-42
- 110) Shahani,K.M and Chandan,R.C. (1965) Archiv. Biochem.
Biophys., 111, 256-263
- 111) Bengtsson,G. and Olivecrona,T. (1979) FEBS Lett.,
106, 345-348

- 112) Fielding, C.J and Higgins, J.M. (1974) *Biochemistry*, 13, 4324-4329
- 113) Miller, A.L. and Smith, L.C. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 3359-3362
- 114) Fielding, D.E., Shore, V.G. and Fielding, C.J. (1977) *Biochemistry*, 16, 1896-1900
- 115) Sundheim, G. and Bengtsson-Olivecrona, G (1987) *J. Dairy Sci.*, 70, 2467-2475
- 116) Korn, E.D. (1955) *J. Biol. Chem.*, 215, 15-26
- 117) Hoynes, M.C.T. and Downey, W.K. (1973) *Biochem. Soc. Trans.*, 1, 256-259
- 118) Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A.S. and Schotz, M.C. (1980) *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 667-693
- 119) Fielding, C.J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta.*, 316, 66-75
- 120) Bimpson, T. and Higgins, J.A. (1969) *Biochim. Biophys. Acta.*, 187, 447-449
- 121) Bengtsson, G. and Olivecrona, T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta.*, 712, 196-199
- 122) Parry, R.M., Jr., Chandan, R.C. and Shahani, K.M. (1966) *J. Dairy Sci.*, 49, 356-360
- 123) 若濱有子・斎藤善一 (1989) *酪農科学・食品の研究*, 38, 225-230
- 124) Jellema, A. (1975) *Neth. Milk Dairy J.* 29, 145-152
- 125) Bengtsson, G and Olivecrona, T. (1982) *FEBS Lett.*, 147, 183-186

- 126) Sundheim, G., T.- L. Zimmer and Astrup, H.N. (1983) J. Dairy Sci., 66, 400-406
- 127) Shirai, K., Matsuoka, N. and Kackson, R.L. (1981) Biochim. Biophys. Acta., 665, 504-510
- 128) Posner, I. (1980) Acta Cient Venez., 31, 318-323
- 129) Saito, Z and Igarashi, I. (1971) Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ., 17, 126-135
- 130) Christensen, Tove M.I.E. and Munksgaard, L. (1989) Milchwissenschaft, 44, 480-484
- 131) 若濱有子.(1990) 酪農科学・食品の研究, 39, 75-82
- 132) Sundheim, G. and Bengtsson-Olivecrona, G. (1987) J. Dairy Sci., 70, 499-505
- 133) Cartier, P. and Chilliard, Y. (1986) J. Dairy Sci., 69, 951-955
- 134) 斎藤善一 (1987) 日本畜産学会, 北海道支部会報, 29, 16-27
- 135) Harper, W.J., Schwartz, D.P, and El-Hagarawy, I.S. (1956) J. Dairy Sci., 39, 46-50

