

発酵乳製品における乳たんぱく質のアレルゲンの減少について

下橋 淳子 寺田 和子

Decrease of Allergen of Milk Protein in Fermented Milk Products

Atsuko SHIMOHASHI Kazuko TERADA

緒言

乳製品は栄養価の高い食品であり、特に小児期の栄養に主要な役割を果たしている。

しかし、日本人では乳児あるいは幼児早期の100人~200人に1人の割合でミルクアレルギーが存在する¹⁾といわれ、10才以上の小児や成人にも多く見られるようになっている。

一般的なミルクアレルギーは、生後2~3ヶ月までに発症することが多く、成長とともに消失するとされるが、カルシウム給源としても最適な乳製品の摂取は、症状の軽減に配慮しつつアレルギー性の低いものから少量ずつ始めたいものである。

ミルクアレルギーの主なアレルゲンは、全タンパク質中10%を占める β -ラクトグロブリンと30%を占める α_{s1} カゼインである。

ミルクアレルギーの症状を見ながら、徐々に乳製品を増やしていく減感作食の時期には、発酵によりアレルゲンとなるタンパク質がある程度分解されている発酵乳製品も用いられる。

今回著者らは主に発酵乳における β -ラクトグロブリンと α_{s1} カゼインの減少をポリアクリルアミド電気泳動法により定量的に測定し、ミルクアレルギーの減感作食品としての発酵乳についていくつかの知見を得たので報告する。

実験

試料

(1) ヨーグルト・ケフィアの製造

国内製スキムミルク

ヨーグルト種菌；Meito社製ヨーグルト種菌
(活性乳酸菌)

使用乳酸菌

Lactobacillus bulgaricus

Streptococcus thermophilus

高活性ケフィア菌；カナダ・ローゼル社製乳業用カルチャー (種菌)

使用乳酸菌

Streptococcus lactis, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*

使用酵母

Saccharomyces florentinus

(2) 市販発酵乳

はっ酵乳；ソフトヨーグルト5点 ドリンク
ヨーグルト14点

乳製品乳酸菌飲料；3点

実験1 種菌の添加割合の異なるヨーグルトのアレルゲン性たんぱく質の変化

スキムミルクを沸騰後45℃程度に冷却した脱イオン水に溶解し10%濃度とした。このスキムミルク溶液のたんぱく質含量は、3.0%となる。

上記スキムミルク溶液100mlにそれぞれ0g、0.2g、0.3g、0.4g、0.5gのヨーグルト種菌を添加し、42℃の恒温機中で6時間発酵させヨーグルトを調製した。

ヨーグルトは常法²⁾により乳酸酸度の測定を行い、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE)³⁾によりたんぱく質を分離し、イメージサーバー (AE-6905C ATTO) によって取り込んだ画像をレーンアナライザー (AE-6920WLA ATTO) により解析した。

SDS-PAGE 用試料の調製法は次の通りである。

ヨーグルト20g に約150mlの脱イオン水を加えてホモゲナイズし、脱イオン水で200ml定量とした。この試料液に、等量の試料用緩衝液（1%SDS、20%グリセロール、1%2-メルカプトエタノール、0.01%BPB を含む50mM トリス-塩酸緩衝液）を加え100℃ 2 分間の加熱処理後 SDS-PAGE 用試料とした。

各試料は、12.5%ポリアクリルアミド均一ゲルにより定電流20mAで約85分間泳動後クーマシーブリリアントブルー染色を行った。

実験2 発酵時間の異なるヨーグルトのアレルゲン性たんぱく質の変化

実験1と同様10%濃度のスキムミルク溶液を調製し0.2%のヨーグルト種菌を添加した。

これを100mlずつに分注し、42℃の恒温機中で6、24、48時間発酵させた。

各試料について乳酸酸度の測定と SDS-PAGE 用試料の調製を行った。

SDS-PAGE は実験1と同様の手法で解析した。

実験3 種菌の添加割合の異なるケフィアのアレルゲン性たんぱく質の変化

実験1と同様10%濃度のスキムミルク溶液を調製した。

上記スキムミルク溶液100mlに0g、0.1g、0.2g、0.3g、0.4g、0.5g の高活性ケフィア菌を添加し、室温（25℃前後）で約20時間発酵させた。

それぞれの試料について実験1と同様に乳酸酸度の測定を行い、SDS-PAGE 用試料を調製した。SDS-PAGE は実験1と同様の手法で解析した。

実験4 市販のはっ酵乳、乳製品乳酸菌飲料のアレルゲン性たんぱく質の割合

市販のはっ酵乳（ソフトヨーグルト、ドリンクヨーグルトなど）19点、乳製品乳酸菌飲料（ヤクルトなど）3点を牛乳と同程度のたんぱく質濃度に希釈し、SDS-PAGE 用試料を調製した。SDS-PAGE は実験1と同様の手法で解析した。

結果および考察

表1に実験1の結果を示した。

ヨーグルト種菌の標準使用量は0.2%であるが、種菌の添加割合を増加させると、乳酸酸度は0.79%から1.20%になり乳酸生成の増加が見られた。

表1 種菌の添加割合の異なるヨーグルトのアレルゲン含量の変化

種菌含量(%)	酸度(%)	β -ラクトグロブリン(%)	α_{s1} -カゼイン(%)
0	/	100	100
0.2	0.79	28.1	67.0
0.4	0.91	32.1	59.2
0.6	1.06	31.5	66.7
0.8	1.14	36.0	65.6
1.0	1.20	34.8	64.1

種菌0%は材料のスキムミルク溶液
発酵温度 42℃ 発酵時間 6時間

アレルゲン性たんぱく質の乳酸発酵による低減化は、 α_{s1} カゼイン、 β -ラクトグロブリン両者に見られるが、 α_{s1} カゼインに比べ、アレルゲン性のより強い β -ラクトグロブリンにおいて顕著に認められた。

α_{s1} カゼインは、原料乳の65%程度までの減少であったが、 β -ラクトグロブリンは原料乳の33%前後に減少していた。

これらの変化は、ヨーグルト種菌の添加割合、乳酸酸度に特に関わりなく見られた。

ラットを用いた実験では、カゼインは胃を通過する間に消化され、低分子化されるのに対し、 β -ラクトグロブリンは、ペプシン分解に対して強い抵抗性を示し、胃内消化を受けず回腸にまで到達することが明らかにされている⁴⁾。

摂取した β -ラクトグロブリンが未消化の状態では腸管を透過することは人間においても間違いのない事実と考えられており、新生児の β -ラクトグロブリンの腸管透過率が在胎週齢の少ないほど高いこと⁴⁾、さらに、母乳に移行した牛乳中の β -ラクトグロブリンの一部が乳児の血清中に出現し、乳児がアトピー性皮膚炎の場合には症状が悪化すること⁴⁾も報告されている。

このような事実から特に早産児や、妊娠・授乳中の女性は β -ラクトグロブリンが原料乳より減少している発酵乳を、食事の中にうまく取り入れていくことが望ましいと考えられる。

表2に実験2の結果を示した。

種菌0.2%添加で42℃ 6時間の発酵により標準的なヨーグルトが調製されたが、発酵時間を24時間、48時間にしても β -ラクトグロブリンの減少率に差異は認められなかった。

今回の実験では、原料乳をヨーグルトに調製したことで発酵時間、乳酸酸度の違いに関わらずβ-ラクトグロブリンは30%以下に減少した。

表2 ヨーグルトの発酵時間によるアレルギー含量の変化

発酵時間	酸度(%)	β-ラクトグロブリン(%)	α _{s1} -カゼイン(%)
0時間	/	100	100
6時間	0.89	29.7	65.9
24時間	1.34	24.7	49.6
48時間	1.53	30.0	51.3

種菌0.2% 発酵温度 42℃

一方α_{s1}カゼインは、発酵時間6時間で作ったヨーグルトに比べ24時間以上発酵させた高酸度ヨーグルトの方が、減少率は大きい傾向が見られた。

α_{s1}カゼインは、6時間の発酵では66%程度まで減少したが、24時間、48時間の発酵時間では50%程度まで減少した。

実験1と実験2の結果から、今回使用したヨーグルト種菌は、添加割合を増加させ短時間で発酵させるよりも、標準的な添加割合で24時間発酵の高酸度ヨーグルトにした方がアレルギー性たんぱく質の減少には効果的であることが示唆された。

表3に実験3の結果を示した。

表3 種菌の添加割合の異なるケフィアのアレルギー含量の変化

種菌含量(%)	酸度(%)	β-ラクトグロブリン(%)	α _{s1} -カゼイン(%)
0	/	100	100
0.1	0.75	72.0	96.6
0.2	0.80	67.9	98.1
0.3	0.87	62.0	98.2
0.4	0.86	53.2	95.1
0.5	0.88	51.7	75.9

種菌0%は材料のスキムミルク溶液
室温 25℃前後による発酵

ケフィアは、乳酸発酵にアルコール発酵が加わった発酵乳で、使用されている乳酸菌の種類も多く、発酵には酵母も関与している。ケフィアの製造に関わる乳酸菌と酵母については⁵⁾、いろいろな組み合わせがあり、独特の風味のある発酵乳が作られている。

今回使用した高活性ケフィア菌によるケフィアには、ヨーグルト種菌によるヨーグルトとは異なるアレルギー含量の変化がみられた。

ケフィアは、室温で発酵し、製造後乳酸酸度の上昇が起こらないという特徴がある。

ケフィアの標準的な高活性ケフィア菌の添加割合

は、0.1%であるが、添加割合を増加させても乳酸酸度の変化はあまり認められず、0.75~0.88%の範囲にあった。

β-ラクトグロブリンは、高活性ケフィア菌の添加割合が高くなるに従い72.0~51.7%まで減少したが、α_{s1}カゼインは、種菌の添加割合が標準の4倍まではほとんど減少せず、添加割合が標準の5倍になって原料のスキムミルクの76%程度まで減少した。

実験3の結果から、ヨーグルトの方がケフィアよりミルクアレルギーの減感作食品として適当であると思われた。

表4、表5に実験4の結果を示した。

表4 はっ酵乳のタンパク質含量とアレルギー含量の割合

試料	タンパク質含量(%)	β-ラクトグロブリン(%)	α _{s1} -カゼイン(%)
牛乳	2.9	100	100
ソフトヨーグルト1	3.4	58.5	82.3
ソフトヨーグルト2	3.6	41.5	80.8
ソフトヨーグルト3	4.0	50.3	61.1
ソフトヨーグルト4	3.2	27.5	45.9
ソフトヨーグルト5	3.7	46.2	71.8
ドリンクヨーグルト1	2.9	58.6	91.2
ドリンクヨーグルト2	3.1	62.5	189.3
ドリンクヨーグルト3	3.2	45.1	71.5
ドリンクヨーグルト4	2.1	55.5	87.2
ドリンクヨーグルト5	3.0	24.3	87.4
ドリンクヨーグルト6	3.1	24.8	86.0
ドリンクヨーグルト7	3.1	29.9	46.0
ドリンクヨーグルト8	4.5	27.4	34.3
ドリンクヨーグルト9	3.2	70.0	82.0
ドリンクヨーグルト10	3.1	45.1	41.5
ドリンクヨーグルト11	3.1	20.2	40.5
ドリンクヨーグルト12	3.1	29.1	61.4
ドリンクヨーグルト13	3.1	33.0	62.4
ドリンクヨーグルト14	2.5	14.2	67.0
最大値	4.5	70.0	189.3
最小値	2.1	14.2	34.3

表5 乳製品乳酸菌飲料のタンパク質含量とアレルギー含量の割合

試料	タンパク質含量(%)	β-ラクトグロブリン(%)	α _{s1} -カゼイン(%)
牛乳	2.9	100	100
乳製品乳酸菌飲料1	1.2	0	0
乳製品乳酸菌飲料2	2.0	0	63.4
乳製品乳酸菌飲料3	1.5	0	77.8

乳等省令によると発酵乳は、主に無脂乳固形分の含量によって表6のように分類される。

今回は、市販品の中から無脂乳固形分が3.0%以上

のはっ酵乳と乳製品乳酸菌飲料について、 β -ラクトグロブリンと α_{s1} カゼインの牛乳に対する割合を測定してみた。

表6 発酵乳の分類

乳酸発酵のみ			
種類別	製品	無脂乳固形分	乳酸菌数(/ml)
発酵乳	ハードヨーグルト ソフトヨーグルト ドリンクヨーグルト	8.0%以上	1000万個以上
乳製品 乳酸菌飲料	ヤクルトなど	3.0% ~8.0%	1000万個以上
乳製品 乳酸菌飲料 (殺菌)	カルピスなど (稀釈飲料)	3.0%以上	—
乳酸菌飲料		3.0%未満	1000万個以上
乳酸発酵およびアルコール発酵			
	製品	乳酸	アルコール
乳酒	ケフィア クミス	0.6~1.0% 1.0%前後	0.6~1.1% 3~5%

β -ラクトグロブリンは、市販のはっ酵乳で牛乳の約14%~70%までの減少を示し、 α_{s1} カゼインは、約34%~190%までの変化を示した。

β -ラクトグロブリンと α_{s1} カゼインの間に相関性は認められなかった。

発酵乳中のたんぱく質の分解の程度は使用する乳酸菌の種類や菌株により異なり、また、製造および流通条件によっても異なると考えられる。市販品の中には、ドリンクヨーグルト7や8のようにアレルギー性のある β -ラクトグロブリンと α_{s1} カゼインが両方ともかなり減少しているものもあったが、ドリンクヨーグルト9のように両者ともあまり減少していないもの、ドリンクヨーグルト2のように α_{s1} カゼインがかなり増加しているものなどさまざまであった。

図1に実験4のいくつかの試料のSDS-PAGEパターンを示した。

はっ酵乳に比べ、乳製品乳酸菌飲料1の、 β -ラクトグロ

ブリンと α_{s1} カゼインは、SDS-PAGE 用試料のたんぱく質量を牛乳と同じ $0.87 \times 10^{-7}g$ 程度にすると検出されなかった。

図2と図3に牛乳と乳製品乳酸菌飲料1のプロファイルを示した。

図3の乳製品乳酸菌飲料1のピーク1は、図2の牛乳のピーク2、3に相当する分子量29000程度のたんぱく質である。牛乳のピーク4は、分子量23600の α_{s1} カゼイン、ピーク5が分子量18300の β -ラクトグロブリンであるが、図3ではこれに相当する位置にわずかなたんぱく質の存在を示すだけであった。

今回測定した乳製品乳酸菌飲料は、3点とも β -ラクトグロブリンは検出されず、乳製品乳酸菌飲料1では、 α_{s1} カゼインも検出されなかった。

市販の発酵乳製品のアレルゲン含量は、一般に牛乳より減少しており、よりアレルゲン性の強い β -ラクトグロブリンの方が α_{s1} カゼインより減少率は大きかった。

しかし、ドリンクヨーグルト2のように、高分子のたんぱく質が分解したためか、 α_{s1} カゼインと同じ分子量のたんぱく質が増加し、 α_{s1} カゼイン含量が牛

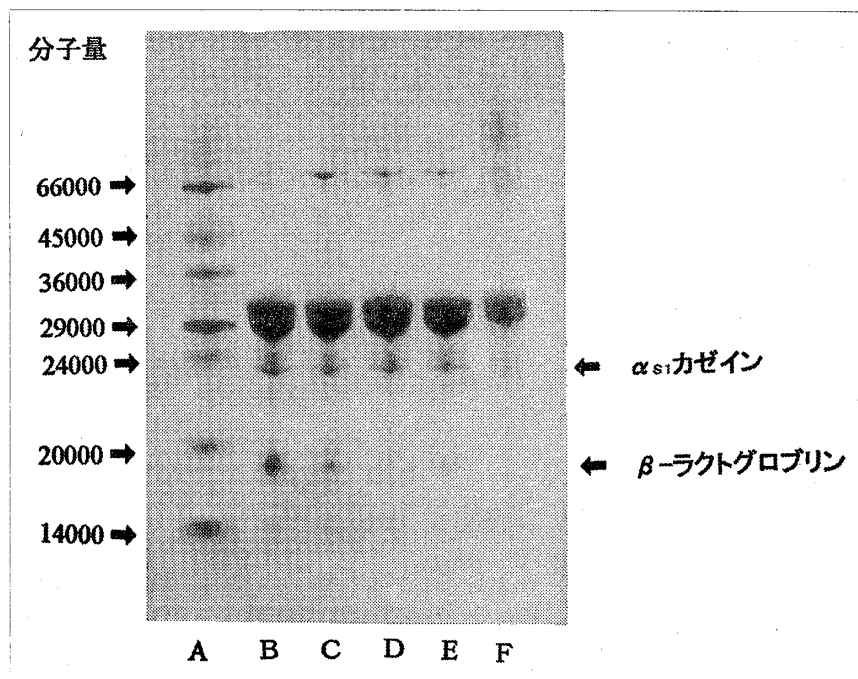


図1 発酵乳および乳製品乳酸菌飲料のSDS-PAGEパターン

- A スタンダード
- B 牛乳
- C ソフトヨーグルト1
- D ドリンクヨーグルト6
- E ドリンクヨーグルト8
- F 乳製品乳酸菌飲料1

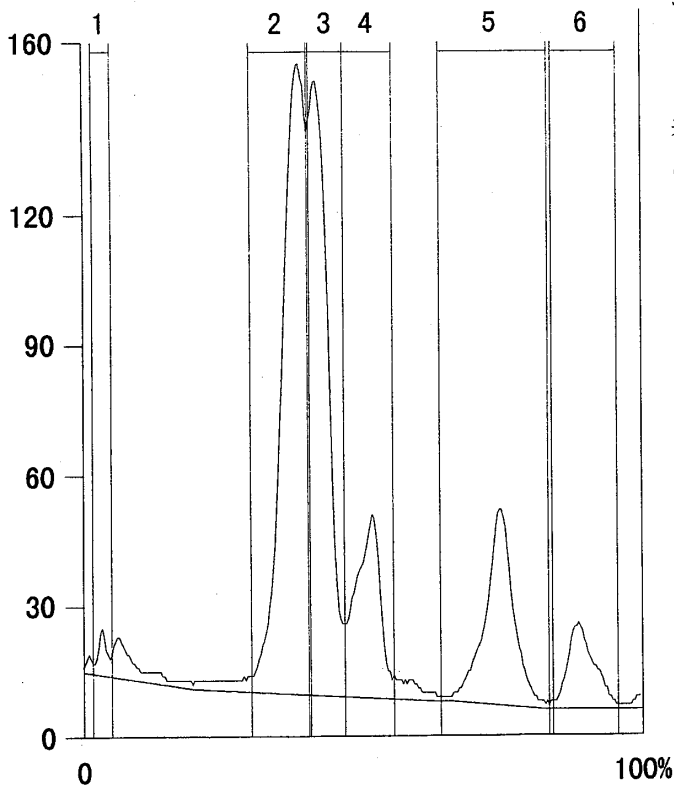


図2 牛乳のプロファイル

ピーク4 α_{s1} カゼイン
ピーク5 β -ラクトグロブリン

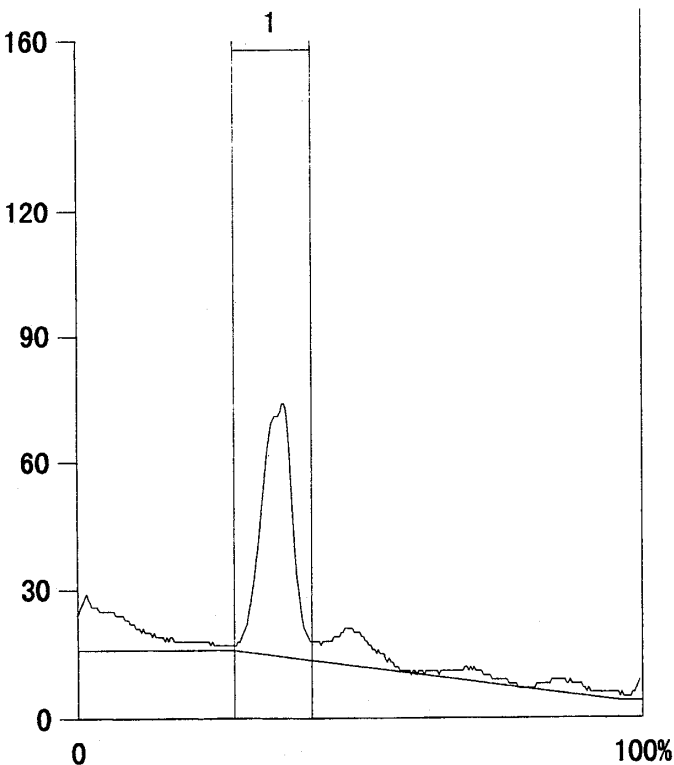


図3 乳製品乳酸菌飲料1のプロファイル

乳より多くなっているものもあった。

発酵乳製品は、ミルクアレルギーの減感作食品として有効であるがアレルギーの含量は、製品により差が大きいので製品の選択はミルクアレルギー症状の程度により考慮することが必要である。

β -ラクトグロブリンを選択的に分離する方法^{6)~7)}は、種々検討され、乳児用調製粉乳の製造にも利用されている。また、減アレルギー化人工乳のたんぱく質素材として加熱変性乳清たんぱく質の有用性⁸⁾も考えられているが、人工的な操作により新たなアレルギーの発現もあり、実用化には課題も残されている。

このような中で、発酵乳製品をミルクアレルギーの減感作食品として取り入れていくことは、強いアレルギーを避け、アレルギー性を減じた刺激を与えることにより、ミルクアレルギーの予防や消化機能の発達を促す安全な方法として有意義なことと考えられた。

要約

発酵乳製品のミルクアレルギーに対する減感作食品としての効果を調べるため種菌の添加割合や発酵時間を変えたヨーグルト、種菌の添加割合を変えたケフィアおよび市販のはっ酵乳、乳製品乳酸菌飲料について β -ラクトグロブリンと α_{s1} カゼインの含量を測定し、次のような結果を得た。

1. ヨーグルト種菌の添加割合を変えて発酵条件を42°Cで6時間とした場合、 β -ラクトグロブリンと α_{s1} カゼインの減少に種菌の添加割合による影響は認められなかった。

添加割合に関わらず、 β -ラクトグロブリンは原料のスkimミルクの33%前後、 α_{s1} カゼインは65%前後まで減少した。

2. ヨーグルト種菌の添加割合を標準にして、42°Cで発酵時間を変えた場合、 β -ラクトグロブリンの含量は発酵時間に関わらず原料のスkimミルクの30%程度で差異が認められなかったが、 α_{s1} カゼインは24時間以上発酵させることによりスkimミルクの50%程度まで減少し、標準条件より減少割合が大きくなった。

3. 乳酸菌と酵母による発酵乳製品ケフィアは、種菌の量を変えると原料のスkimミルクに比べ β -ラクトグロブリンでは添加割合が多くなる

- に従って減少割合が大きくなる傾向が認められたが、 α_{s1} カゼインはほとんど減少せず、いずれもヨーグルトに比べると減少割合は少なかった。
4. 市販のはっ酵乳の β -ラクトグロブリンの量は牛乳の約14~70%、 α_{s1} カゼインの量は牛乳の約34~190%と様々で、各試料の β -ラクトグロブリンと α_{s1} カゼインの量に関連性は認められなかった。
 5. 市販の乳製品乳酸菌飲料では、 β -ラクトグロブリンがほとんど存在せず、 α_{s1} カゼインも牛乳の約0~78%ではっ酵乳よりアレルギー性が低いと考えられた。

文 献

- 1) 金森 正雄ら編；今日の乳児栄養、光生館、129 (1985)
- 2) 荒井 綜一編；食品学実験、樹村房、114(1989)
- 3) 高木 俊夫；ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、廣川書店 (1990)
- 4) 日本栄養・食糧学会監修 山内 邦男ら編；牛乳成分の特性と健康、光生館、45 (1993)
- 5) 足立 達ら；最新食品加工講座 乳とその加工、建帛社、298 (1987)
- 6) Milliart, P. et al; J. Food Sci., 50, 605 (1988)
- 7) 大友 英生ら；日食工誌, 35, 755 (1988)
- 8) Heppell, L. M. J. et al; Br. J. Nutr., 51, 29 (1984)