

集団給食における脱脂粉乳用酵素剤の研究

光 森 女 里

序

学校給食の実施により、脱脂粉乳の使用は既に20年、児童、生徒の発育成長、体位の向上、栄養及び食生活の改善等に貢献した功績は幾多の事例が報告されている。しかし食糧難時代に比べ、現在は食糧事情の好転に伴ない、各人の嗜好も重んぜられるようになり、スキムミルクを飲まないものが多くなったことは、スキムミルク返上論、脱脂粉乳の質の問題、給食管理上の問題等種々の条件が混ざり合っていると考えられるが、「まずいから」というのが大きな原因だと思われる。

そこで現在使用されている脱脂粉乳を、「おいしく」飲用するための方法として食品添加酵素剤を学校給食では添加されつつあるので、この酵素剤の性質を調べ、より適切な給食を給与するための栄養指導の方法、集団調理法の改善向上に資するため本実験を試みた。

実験の方法

1. 試料

市販されている給食ミルク良化酵素剤を用いた。この錠剤は厚さ5mm、直径15mm程度の大きさで、うすく灰白色をおびたものであり、成分は、トリプシン、キモトリプシン、ペプチターゼからなるプロテアーゼを主成分とし、補足的に α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ及びリパーゼを含有しているといわれる。実験中はデシケーター中に保存した。温度は10°Cから20°Cの範囲である。

2. 活性度の測定法

Casein-Folin 呈色A法によった。⁽¹⁾即ち、酵素液1mlをT字試験管にとり、これに基質5mlを加え、37°Cの恒温槽に入れ、10分間振盪する。10分後恒温槽に入れた状態で、除蛋白試薬5mlを加え、再び30分間振盪する。以上の操作により沈澱物が生成した液を、東洋汙紙No.4を用いて汙過する。汙液を50ml容の三角フラスコに集めた。酵素液に除蛋白試薬、基質を加え、上記と同じ操作を行なったものを対照とした。

汙液2mlをT字試験管にとり、これに0.55M - Na₂CO₃溶液5mlと $\frac{1}{3}$ Folin試薬1mlを加えてから、37°Cの恒温槽中で30分間振盪する。反応終了後、内容液を1cm層のキューベットにとり、660m μ の波長で吸光度を測定した。この場合対照として蒸留水を用いた。使用した比色計は、日立製光電比色計FPW-4である。

測定に用いた試薬の調製法は次のとおりである。

基質には Hammersten の Casein を用い、Casein粉末0.6gに、0.05M - Na₂HPO₄溶液80mlを加えて加温溶解する。完全に溶解したら、pH7.6に調整後、100ml定容とする。これを実験の都度新しく調製して用いた。

除蛋白試薬には、0.44M - CCl₃COOH溶液を用いた。

Folin 試薬の調製法は次のとおりである。⁽²⁾水140mlを500ml容の丸底フラスコにとり、これにNa₂WO₄ · 2H₂O 20gと、Na₂MoO₄ · 2H₂O 5gとを加えて溶解する。溶解後、内容液に85% H₃PO₄溶液10mlと、conc. HCl溶液20mlとを加える。このフラスコにゴム栓をし還流

冷却器をつけ、穏かに沸騰させる。約2時間で濃緑色になり、合計10時間沸騰を続ける。後透明になった内容液に、 $\text{LiSO}_4 30g$ と水 $10ml$ とを加えてから、冷却器を外した状態で沸騰させる。次に沸騰させながら、脱色のために液体臭素 $5ml$ を加える。脱色後過剰の臭素を追い出すために15分間沸騰をつづける。内容液を冷却後、水で $200ml$ 定容としてから、ガラスフィルターで濾過する。

3. 結果のあらわし方

酵素剤の活性度は、基質（カゼイン）から遊離されたアミノ酸の量で比較することになるが、そのアミノ酸の量を、吸光系数（比色計の目盛）で示した。遊離アミノ酸の量が多ければ、それだけ吸光系数が増すからである。本来ならば、測定値から酵素単位を算出し、これを用いて活性度を示すのであるが、算出法などが複雑であるので、理解しやすいよう、単に比較の値として測定値をそのまま用いた。

結果および考察

1. 酵素液の調製法

試料の酵素剤は錠剤であるので、そのまま実験できないので粉末にした。これを HCl 溶液で溶かし、酵素液とした。 HCl 溶液を用いたのは、酵素剤の主成分が、トリプシン、キモトリプシン、ペプチターゼなど、酸性で可溶性である理由によるためである。

(1) HCl 濃度が活性に及ぼす影響について

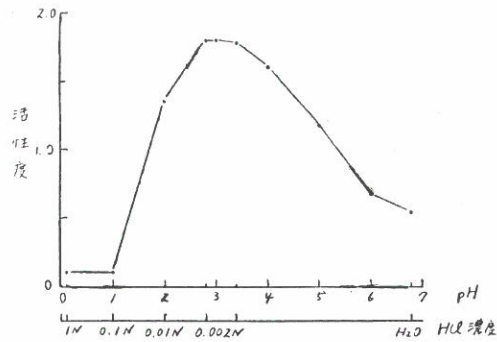
前述のように、酵素剤の主成分がトリプシンであることにより、その溶解に HCl 溶液を用いた訳であるが、この場合どの程度の HCl 濃度にすれば、酵素剤の活性に及ぼす影響が最も少ないかを考えてみた。酵素剤を働かせる時には、酵素液に基質と緩衝液を加えた。ここで酵素液の HCl 濃度があまり高すぎると、反応液の pH が緩衝能をこえてしまう。それでは酵素の反応に適した pH 条件が得られなくなるからである。

第1表と第1図にその結果を示した。実験の条件は酵素濃度 2% 、反応時間 10 分、反応温度 37°C であった。

第1表 HCl 濃度が活性に及ぼす影響

	HCl 濃度	HCl の pH	活性度
1	1 N	0.1	0.095
2	0.1 N	1.0	0.100
3	0.01 N	2.0	1.35
4	—	2.8	1.80
5	0.002 N	3.0	1.80
6	0.0002 N	3.4	1.76
7	—	4.0	1.60
8	—	5.0	1.18
9	—	6.0	0.674
10	H_2O	6.8	0.550

第1図 HCl濃度が活性に及ぼす影響



これを見ると、最も強い活性を示し、しかも調製時のHCl濃度が反応時の緩衝液の緩衝能をこえないものは、pH2.8~3.4即ちHCl濃度にして0.002N前後のものがよいとわかった。今後の実験には、0.002N-HCl溶液 (pH3.0) で調製した酵素液を用いることにした。

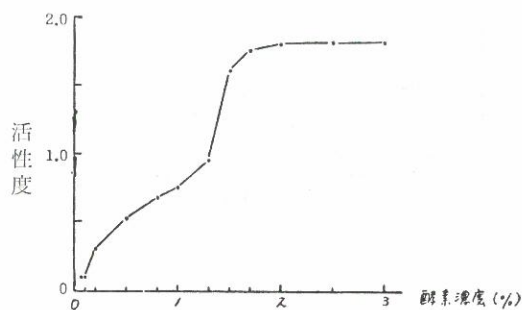
(2) 反応液の酵素濃度

酵素反応は、酵素量が多ければ反応量が増す。そこで反応液の酵素濃度と活性度の関係を見たのが、第2表と第2図である。この場合、反応のpHは7.5、反応時間10分、反応温度37°Cとした。

第2表 酵素濃度と活性の関係

	酵素濃度	活性度		酵素濃度	活性度
1	0.08%	0.115	7	1.3%	0.95
2	0.1	0.110	8	1.5	1.60
3	0.2	0.312	9	1.7	1.75
4	0.5	0.525	10	2.0	1.80
5	0.8	0.685	11	2.5	1.82
6	1.0	0.75	12	3.0	1.80

第2図 酵素濃度と活性の関係



以上の結果をみると、酵素量が多いほど活性が強くなるが、酵素濃度が1.7%以上において最も強い活性を示し、それ以上の濃度にしても余り変らない。これは、酵素量と基質

量の関係によると思われる。そこで本実験は、最少の酵素量で最大の活性を得られる2%の酵素濃度を用いた。即ち酵素粉末50倍量の0.002N-HCl溶液 (pH 3.0) にとかした酵素液を用いることにした。

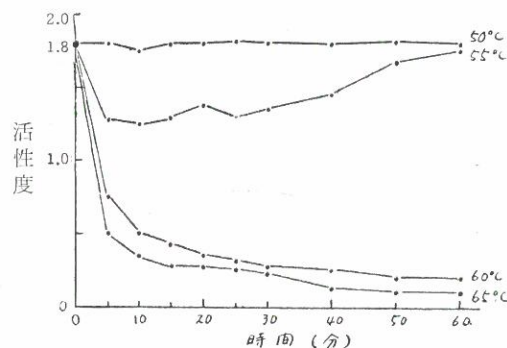
2. 酵素作用失活の加熱条件

酵素の本体は蛋白質である。したがって、加熱によって失活し、その効果を失う。そこで実用に際して、ミルクの温度がどの程度だと失活するかを調べてみた。方法としては、前述のように調整した酵素液を、各種の温度に加熱し、温度を一定に保ちながら、一定時間ごとに試料を分取した。反応のpHは7.5、温度37°C、時間10分とした。得られた結果は第3表と第3図に示した。これによると、50°Cをこえると、酵素失活の可能性があり、60°C以上になると、10分以内で完全に失活する。

第3表 失活の温度と時間の関係

温度 時間	50°C	55°C	60°C	65°C
加熱しないもの	1.80	1.76	1.80	1.80
加熱 5 分	1.80	1.27	0.75	0.500
10	1.75	1.25	0.50	0.350
15	1.80	1.29	0.425	0.315
20	1.80	1.38	0.350	0.280
25	1.82	1.29	0.315	0.245
30	1.80	1.35	0.280	0.225
40	1.81	1.45	0.250	0.120
55	1.82	1.68	0.200	0.115
60	1.80	1.76	0.200	0.115

第3図 失活の温度と時間の関係



3. 酵素の保存性

酵素剤は、ある程度保存性を考慮した形で販売されている。しかし実際に酵素を使用する場合、一度に全量を使うことはない。そこで使い残しの製剤をどのような温度、状態で保存すれば最適であるかを調べた。先づ温度については、季節別の温度条件を考慮して、次の項目にわけた。

- 1) 冷蔵庫の中：0～4℃であり，冬季あるいは実際に冷蔵庫に入れて保存した場合を想定した。
 - 2) 室温に放置：春又は秋季の気温を考慮し，実験には15℃前後で行なった。
 - 3) 29℃の恒温器中：夏季の場合を想定した。
 - 4) 42℃の恒温器中：夏季の高温時，あるいは太陽の直射を受ける場所や火気に近いところを想定した。
 - 5) 50℃の恒温器中：実際には殆ど考えられないが，加熱による失活を考え合わせて行なった。
- (1) 酵素液での保存性について

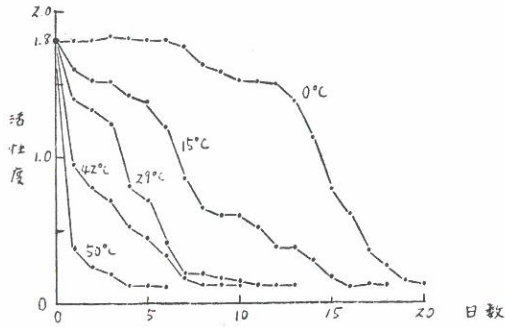
前述の方法で調製した酵素液を用いて，その保存性を調べた。保存中に水分の蒸発がおこるので密封し，冷蔵に際しては凍結しないよう注意した。この場合酵素濃度はすべて2%，pH7.5，温度37℃，時間10分とした。得られた結果は，第4表と第4図に示した。

これによると，いずれも20日以内で完全に失活し，20日以上は保存はできない。

第4表 酵素液での保存性

温度 日数	0℃	15℃	29℃	42℃	50℃
調整時	1.81	1.80	1.80	1.75	1.80
1	1.80	1.60	1.40	0.95	0.375
2	1.80	1.52	1.32	0.79	0.250
3	1.82	1.51	1.22	0.70	0.205
4	1.81	1.43	0.80	0.525	0.120
5	1.80	1.37	0.70	0.450	0.120
6	1.80	1.20	0.41	0.323	0.115
7	1.75	0.85	0.20	0.180	
8	1.63	0.65	0.21	0.125	
9	1.57	0.59	0.17	0.120	
10	1.52	0.60	0.145	0.120	
11	1.51	0.515	0.125		
12	1.49	0.375	0.120		
13	1.37	0.380	0.120		
14	1.12	0.290			
15	0.78	0.172			
16	0.610	0.115			
17	0.355	0.123			
18	0.250	0.120			
19	0.155				
20	0.120				

第4図 酵素液での保存性



(2) 粉末での保存性について

実際に保存する場合は、錠剤のままであるが、実験の都合上粉末としたのでこの保存性を調べた。この場合の条件は(1)と同じ濃度、pH、温度、時間とした。

得られた結果は第5表と第5図に示した。これによると、いずれも30日である程度の活性を保持している。しかし42°C、50°Cでは1/2~1/3程度におちる。以上(1)と(2)により、酵素剤を保存する場合、29°C以下ならば1カ月程度は大丈夫であるといえよう。30°C以上になるような場合は、冷蔵庫中に保存するのが安全である。

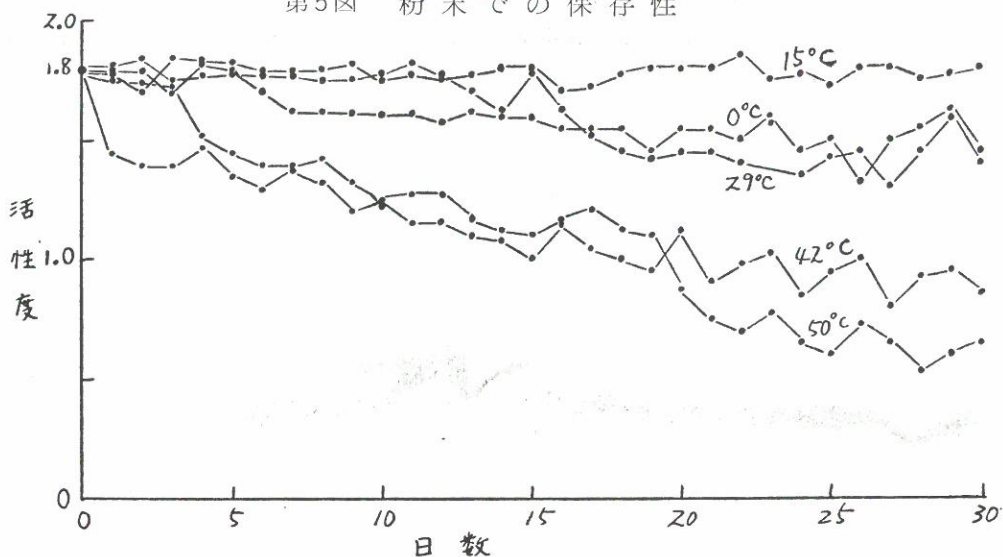
4. 牛乳に対する凝固性

実用に際して、酵素量がどの程度で凝固するかを調べた。各種牛乳をそれぞれ10mlずつ試験管にとり、これに異なる量の酵素を入れ、37°Cの恒温槽中で、時間を追ってその凝固性をみた。

第5表 粉末での保存性

温度 日数	0°C	15°C	29°C	42°C	50°C
開始時	1.75	1.80	1.82	1.80	1.78
1	1.80	1.80	1.80	1.75	1.45
2	1.80	1.70	1.85	1.82	1.40
3	1.70	1.85	1.75	1.75	1.40
4	1.82	1.82	1.78	1.52	1.48
5	1.80	1.82	1.80	1.45	1.35
6	1.70	1.80	1.81	1.40	1.30
7	1.63	1.80	1.80	1.40	1.40
8	1.62	1.80	1.75	1.42	1.32
9	1.63	1.82	1.75	1.32	1.20
10	1.61	1.75	1.78	1.25	1.25
11	1.62	1.78	1.82	1.15	1.28
12	1.58	1.75	1.75	1.17	1.28
13	1.62	1.78	1.70	1.10	1.17
14	1.60	1.80	1.62	1.08	1.12
15	1.60	1.80	1.80	1.00	1.10
16	1.55	1.70	1.63	1.15	1.15
17	1.54	1.72	1.52	1.05	1.20
18	1.55	1.78	1.45	1.00	1.12
19	1.45	1.80	1.42	0.95	1.10
20	1.55	1.80	1.45	1.12	0.88
21	1.55	1.80	1.45	0.90	0.75
22	1.50	1.85	1.40	0.98	0.70
23	1.60	1.75	1.65	1.02	0.78
24	1.45	1.78	1.35	0.85	0.65
25	1.50	1.72	1.42	0.95	0.60
26	1.32	1.80	1.45	1.00	0.72
27	1.50	1.80	1.30	0.80	0.65
28	1.55	1.75	1.45	0.92	0.52
29	1.62	1.78	1.60	0.95	0.60
30	1.45	1.80	1.40	0.85	0.65

第5図 粉末での保存性



第6表 牛乳に対する凝固性

		酵素量	凝固性
規定量		0.001 g	- (2時間)
脱脂乳	pH 6.7 (そのまま)	0.01	- (2時間)
		0.05	- (〃)
		0.1	- (〃)
生乳	pH 5.6 (調整)	0.01	+ (18分)
		0.05	++ (5分)
		0.1	++ (2分)
生乳	82°C 加熱殺菌	0.01	- (2時間)
		0.05	- (〃)
		0.1	- (〃)
乳	未殺菌	0.01	- (〃)
		0.02	- (〃)
		0.03	+ (65分)
		0.04	+ (50分)
		0.05	++ (21分)
	0.1	++ (8分)	

- : 全く変化のないもの。
 + : 少し凝固したもの。
 ++ : 完全に凝固したもの。

得られた結果は、第6表に示した。これによると脱脂乳の場合、規定量を使用する限り凝固性の心配はなかった。しかし胃中では凝固性を示すと考えられる。

要 約

近年、集団給食を対象とした食品添加酵素が種々市販されている。そのひとつに、脱脂粉乳の風味や栄養価に有効と宣伝されているものがある。このものについて、酵素化学的に研究し、集団給食の際に考えられる条件で使用した場合の問題点を明らかにした。すなわち、使用の際、加熱に際しては60°C以下に止めること。溶かした液は冬で1週間、夏では当日使用す

ることである。また、この酵素剤の本体はプロテアーゼであるが、その蛋白分解は pH 2.5～3.0 において最も強い。しかし牛乳蛋白の凝固は、正常な（古くなって酸度の高い粉乳でなければ）スキムミルクでは、問題にならない。

参考文献

- 1) 赤堀四郎他著，酵素研究法Ⅱ，(昭31) 初版 P 238～246. 朝倉書店.
- 2) 赤堀四郎他著，酵素研究法Ⅰ，(昭30) 初版 P 160～168. 朝倉書店.