

市販牛乳の加熱処理条件と抗変異原性

新本 洋士・小林 正枝*・徳田 節子*・津志田藤二郎**

(東北農業試験場・*信州大学教育学部・**食品総合研究所)

Antimutagenic Effect of Several Commercial Milk on Trp-P2-

Induced Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* TA98

Hiroshi SHINMOTO, Masae KOBAYASHI*, Setsuko TOKUDA* and Tojiro TSUSHIDA**

(Tohoku National Agricultural Experiment Station・*Faculty of
Education, Shinshu University・**National Food Research Institute)

1. はじめに

食品は栄養素を供給し、私たちの健康を維持、増強する働きを持っている。これに加えて近年、食品成分のなかには、発癌や老化を防止したり、血圧を調節するような生体調節機能を持った成分が含まれることが明らかにされている^{1, 2)}。

乳製品中にもさまざまな機能をもつ成分が同定されており、健康維持、増強に役立つものと期待されている²⁾。なかでも、乳蛋白質や発酵乳の抗変異原性が報告され、乳製品の発癌予防への寄与が推論されている^{3, 4)}。しかしながら、市販牛乳に関する抗変異原性評価の報告はほとんどみられない。

そこで本研究では、変異原物質 Trp-P 2 の突然変異誘発に対する製造方法の異なる数種の牛乳の抗変異原性評価を行い、製造工程の加熱処理による抗変異原性の差を検討した。

2 試験方法

(1) 材料

市販牛乳 7 種類を購入した。低温殺菌牛乳 (63~65℃, 30分間加熱殺菌処理) 2 銘柄, チルド流通牛乳 (120~125℃, 2 秒間加熱殺菌処理, 以下チルド牛乳と表記) 2 銘柄, 及び常温流通の高温殺菌乳 (140℃, 2 秒間加熱殺菌処理, 以下 LL 牛乳と表記) 2 銘柄を用いた。

(2) 抗変異原性試験

サルモネラ (*Salmonella typhimurium*) TA98 を用いた Ames 法¹⁾ による抗変異原性試験を行った。変異原物質として Trp-P 2 を用いた。Trp-P 2 は DMSO に溶解して用いた。試料 (500 μ l), Trp-P 2 溶液 100 μ l (50 ng/ml), S-9 ミックス (キッコーマン株式会社) 100 μ l を滅菌小試験管内で混合し, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて全量を 900 μ l とした。ここに前培養した TA98 菌株懸濁液 100 μ l を加え, 37℃ で 20 分間振とうした。振とう後, 小試験管に 2 ml のトップアガーを加え, あらかじめ 10cm シャーレに用意しておいた最小グルコース培地に重層した。シャーレは 37℃ で 2 日間培養し, 生じたヒスチジン非要求性復帰突然変異コロニー数を計数した。測定は

2 連で行なった。抗変異原性 (%) は下式により求めた。Trp-P 2 (シャーレあたり 5 ng 添加) による復帰コロニー数は 600~700/シャーレであった。なお, 試料のみの添加による自然復帰コロニー数にはほとんど変化がなく (20~25 コロニー/シャーレ), 試料そのものの変異原性, あるいは試料の試験菌株に対する毒性は見られなかった。

$$\text{抗変異原性 (\%)} = \left(1 - \frac{A - B}{C - D}\right) \times 100$$

A ; 試料と Trp-P 2 添加時の数

B ; 試料のみ添加時の数

C ; Trp-P 2 添加時の数

D ; 添加物なしの時の数

(3) ラクトペルオキシダーゼ (LPO) 活性の測定

試料 5 μ l をマイクロ ELISA プレート (住友ベークライト) に分注し, 基質として 100 μ l の ABTS 溶液 (2, 2'-azino-di-benzthiazoline-6-sulfonic acid, 0.3 mg/ml, 0.003 % 過酸化水素を含む 0.1M クエン酸緩衝液 pH 4.0 に溶解) を添加し, プレートミキサーで混和後, 室温で 5 分間酵素反応を行った。酵素反応は 100 μ l の 1.5 % シュウ酸を添加して停止させ, マイクロプレートリーダー (東ソー, MPR-A 4) で 415nm の吸光度を測定した。LPO 精製標品 (カルビオケム社) を, 0.1 % 牛血清アルブミンを含む 10mM リン酸緩衝液で希釈した標準酵素標品を用いて作成した検量線より, 市販牛乳の LPO 活性 (IU) を算出した。

3 試験結果及び考察

Salmonella typhimurium TA98 は hisD3052 遺伝子に変異がありヒスチジン要求性であるが, 変異原物質によるフレームシフト変異によってヒスチジン非要求性となり, 最小グルコース培地で増殖できるようになる。本研究では TA98 を指示菌株として用い, Trp-P 2 による変異誘導に対する市販牛乳の抗変異原性を検討した。Trp-P 2 は肉の魚げなどに生成すると考えられる変異原物質である。Trp-P 2 の変異原性を抑制する作用を持つ物質は, 食品由来の

変異原物質の作用を低減できると考えられる。

変異原物質 Trp-P 2 の突然変異誘発に対する 7 種の市販牛乳の作用を表 1 に示す。ここでは 500 μ l の牛乳添加時の抗変異原性を示してある。低温殺菌乳は非常に強い抗変異原性を示し、抗変異原性(突然変異阻止率)は 79~89% に達した。これに対して、チルド牛乳、LL 牛乳は 37~52% の低い突然変異阻止率にとどまった。

牛乳中の熱感受性酵素としてラクトペルオキシダーゼ (LPO) が知られている。LPO は乳清中に含まれる酵素である。LPO 活性は加熱殺菌工程で急速に失われることが知られており、牛乳の加熱処理の指標酵素である。表 1 で用いた市販牛乳の LPO 活性を ABTS を基質とするマイクロアッセイで測定した。測定結果を表 2 に示す。低温殺菌乳の LPO 活性は 15 及び 25 IU であった。表 1 の結果では LPO 活性の高い P 2 のほうが P 1 よりも高い抗変異原性を示しており、熱に不安定な成分が低温殺菌乳の抗変

異原性に関与している可能性を示唆している。これに対してチルド牛乳、LL 牛乳には LPO 活性はまったく認められなかった。

製造工程の高温加熱殺菌処理によって LPO 活性は完全に失活すると考えられる。したがって、表 1 に示したチルド牛乳と LL 牛乳の弱い抗変異原性は、熱に安定な成分によると考えられる。

4 ま と め

Trp-P 2 で誘導されたサルモネラ菌 TA98 に対する市販牛乳の抗変異原性を検討した。低温殺菌乳の抗変異原性は強かったが、高温殺菌乳の抗変異原性は低かった。低温殺菌乳は加熱処理の指標酵素であるラクトペルオキシダーゼ活性を保持していたが、高温殺菌乳では活性は検出されなかった。以上のから、低温殺菌乳の抗変異原性に熱感受性の乳成分が重要な役割を果たしているものと推測した。

引 用 文 献

- 1) Ames, B. N. ; Lee, F. D. ; Durston W. E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 782-786.
- 2) 堂迫俊一. 1993. ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの機能特性. SNOW BRAND R&D REPORTS 100 : 1-13.
- 3) Hosoda, M. ; Hashimoto, H. ; Morita, H. ; Chiba, M. ; Hosono, A. 1992. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Dairy Sci. 75 : 976-981.
- 4) 鈴木建夫. 1993. 食品の機能性~農林水産省の考え方と研究から~. Health Sciences 9 : 131-135.
- 5) Tamai, Y. ; Oishi, H. ; Nakagawa, I. ; Watanabe, Y. ; Shinmoto, H. ; Kuwabara, Y. ; Yamato, K. ; Nagai, S. 1995. Antimutagenic activity of the milk fermented by mixed-cultured with various lactic acid bacteria and a yeast. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 42 : 383-387.
- 6) 津志田藤二郎. 1994. 最近の食品機能研究の現状と今後の課題. FRAGRANCE JOURNAL 1994-7 : 14-22.

表 1 市販牛乳の抗変異原性

牛 乳	熱 処 理	抗変異原性 (%)
P-1	65℃ 30分	79
P-2	65℃ 30分	89
C-1	120℃ 2秒	44
C-2	125℃ 2秒	52
L-1	140℃ 2秒	37
L-2	140℃ 2秒	49
L-3	140℃ 2秒	45

注. 牛乳の抗変異原性は *Salmonella typhimurium* TA98 を用いた Ames 法で行った。変異原 Trp-P 2, 牛乳, S9-ミックス, リン酸緩衝液及び TA98 を 37℃ で 20 分間インキュベーション後, 最小グルコースプレートに播種した。培養 2 日後の His⁺ 復帰変異コロニー数から, 抗変異原性を算出した。

表 2 市販牛乳試料中のラクトペルオキシダーゼ活性

牛 乳	ラクトペルオキシダーゼ活性
P-1	15
P-2	25
C-1	0
C-2	0
L-1	0
L-2	0
L-3	0

注. 5 μ l の牛乳を 96 穴プレートに加え, 基質として ABTS 溶液 100 μ l を添付し, 5 分後の 415nm の吸光度を測定した。