

# ナチュラルチーズのポリフェノール量とラジカル消去活性

山田 正子<sup>1</sup> 細山田 康恵<sup>2</sup>

Cheese is a source of calcium and protein and has various functions that improve health and lower the risk of disease. Natural cheeses of good quality have recently produced in Japan. The polyphenol content, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical-scavenging activity were examined to clarify the additional functional properties of Mozzarella, Camembert, Gouda, and Cheddar cheeses produced in Japan.

The cheeses used included polyphenols; ripened Camembert, Gouda, and Cheddar cheeses had a greater polyphenol content than did unripened Mozzarella cheeses. All of the cheeses had DPPH and ABTS radical-scavenging activity. The ripened cheeses had higher radical-scavenging activity than did the unripened cheeses.

These findings indicate that polyphenols included in the cheeses are a factor for the antioxidant activity. Japanese natural cheeses are expected to be much consumed as a functional food.

key words : natural cheese, ripening, polyphenol, radical-scavenging activity

## 1. 緒言

チーズは、カルシウムやタンパク質の供給源として栄養面で重要な食品の一つであるとともに、身体機能の向上にかかわる様々な機能性が見い出されている。これまで、各種チーズの抗変異原性<sup>1,2)</sup>、ゴーダチーズに含まれるペプチドの抗高血圧作用<sup>3)</sup>、エダムチーズに含まれるペプチドがアレルギーを引き起こすタンパク質である $\beta$ -ラクトグロブリンの吸収を抑制する作用<sup>4)</sup>、カマンベールチーズのアルツハイマー予防効果<sup>5)</sup>などが報告されている。

一方、脂質過酸化物質や活性酸素によりタンパク質や酵素、核酸などの生体構成成分の攻撃が続き、最終的に癌や動脈硬化、糖尿病の合併症等の疾病

の原因となっていることが明らかにされてきている<sup>6)</sup>。活性酸素の働きを抑制する抗酸化物質として、アントシアニン、フラボノイド、カテキンなどのポリフェノール類や、カロテン、ビタミンE、ビタミンCなどのビタミン類がある。これらは主として植物性食品に含まれている。

本研究では、動物性たんぱく質のうちチーズに着目し、ナチュラルチーズのさらなる機能性を明らかにするために、ポリフェノール量と、抗酸化能測定として1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性および2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ラジカル消去活性を調べることを目的とした。近年、国内でも高品質のナチュラルチーズが生産されているため、試料には国産ナチュラルチーズを用いることにした。

1 東京家政学院大学現代生活学部食物学科

2 千葉県立保健医療大学健康科学部栄養学科

## 2. 方法

### 2-1 試料

チーズは、市販の国産ナチュラルチーズ4種類を購入し供試試料とした。種類は、非熟成タイプのチーズとしてモツアレラチーズ (A社製)、熟成タイプのチーズとしてカマンベールチーズ (BおよびC社製)、ゴーダチーズ (DおよびE社製) およびチェダーチーズ (FおよびG社製) とした。いずれのチーズも製品3個ずつ用い、結果はその平均値を示した。原料乳はいずれも北海道産であった。

### 2-2 試料調製

試料20gに水80mℓを加え均一化し、8,000rpm、20分間遠心分離後ろ過し、上清にエタノール濃度が80%となるように95%エタノールを加えた。一昼夜4℃で静置後、12,000rpm、20分間遠心分離した。上清を減圧乾燥し、80%エタノール10mℓで溶解したものを試料溶液とした。

### 2-3 ポリフェノール量の測定

ポリフェノール量は、木村ら<sup>7)</sup>が用いたフォーリン・チオカルト法で測定した。試料溶液0.1mℓに蒸留水0.9mℓを加え10倍に希釈した後、蒸留水で2倍希釈したフォーリン・チオカルト試薬1mℓを加え攪拌した。3分後、0.4mol/ℓ炭酸ナトリウム水溶液5mℓを加え攪拌した後、試験管を50℃で5分間保持した。試験管を1時間水冷後、765nmで吸光度を測定した。検量線は、没食子酸で作成し、試料のポリフェノール量は没食子酸相当量 (mg/100g) として求めた。

### 2-4 ラジカル消去活性測定

抗酸化能を調べるために、DPPHラジカル消去活性およびABTSラジカル消去活性の測定を行った。

DPPHラジカル消去活性は、須田ら<sup>8)</sup>の方法に準じ測定した。400μM DPPH、200mM 2-Morpholino-ethanesulphonic acid (MES) バッファー (pH6.0) および20%エタノール溶液の混液0.9mℓに、80%エタノール溶液および試料溶液が0.1mℓとなるように加え、20分間静置後、

520nmで吸光度を測定した。検量線はTroloxを用い作成した。

ABTSラジカル消去活性の測定は、抗酸化能測定キットTAS (Total Antioxidant Status Assay Kit, Randox Laboratories Ltd.) を用い、600nmで吸光度を測定した。検量線はTroloxを用い作成した。

### 2-5 統計処理

統計処理には、SPSS Statistics21 (IBM) を用い、非熟成タイプのモツアレラチーズAと熟成タイプのチーズ間について $t$ 検定を行った。有意水準は危険率5%未満および危険率1%未満とした。

## 3. 結果

ポリフェノールは、全てのチーズに含まれていた (Table 1)。非熟成タイプのモツアレラチーズAに含まれていたポリフェノール量は12.8mg/100gであった。熟成タイプのチーズのポリフェノール量は、カマンベールチーズBで67.3mg/100g、カマンベールチーズCで79.8mg/100g、ゴーダチーズDで56.6mg/100g、ゴーダチーズEで45.8mg/100g、チェダーチーズFで61.5mg/100gおよびチェダーチーズGで40.7mg/100gであり、いずれもモツアレラチーズAよりも有意に高値であった ( $p<0.01$ )。

DPPHラジカル消去活性も、ポリフェノール測定の結果と同様の傾向であった。モツアレラチーズAの6.3μmol/100gより、カマンベールチーズBの12.4μmol/100g ( $p<0.01$ )、カマンベールチーズCの18.3μmol/100g ( $p<0.01$ )、ゴーダチーズDの18.3μmol/100g ( $p<0.01$ )、ゴーダチーズEの10.5μmol/100g ( $p<0.05$ )、チェダーチーズFの12.2μmol/100g ( $p<0.05$ ) およびチェダーチーズGの8.7μmol/100gで高値であった (Table 2)。

ABTSラジカル消去活性も、モツアレラチーズAの0.29mmol/100gより、カマンベールBの2.64mmol/100g ( $p<0.01$ )、カマンベールチーズCの2.53mmol/100g ( $p<0.01$ )、ゴーダチーズDの1.70mmol/100g ( $p<0.01$ )、ゴーダチーズEの1.38mmol/100g ( $p<0.01$ )、チェダーチーズFの1.46mg/100g ( $p<0.01$ ) およびチェダーチーズG

Table 1 Polyphenol content of natural cheeses produced in Japan

Polyphenol content (mg/100g)	
Mozzarella cheese	
A	12.8 ± 0.06
Camembert cheese	
B	67.3 ± 0.41 **
C	79.8 ± 0.54 **
Gouda cheese	
D	56.6 ± 0.45 **
E	45.8 ± 11.04 **
Cheddar cheese	
F	61.5 ± 0.29 **
G	40.7 ± 0.33 **

Each value is means±SD (n=3)

\*\* :  $p < 0.01$  versus Mozzarella cheese A using  $t$ -test.

Table 2 DPPH and ABTS radical-scavenging activities of natural cheeses produced in Japan

	DPPH radical-scavenging activity ( $\mu\text{mol-Trolox equivalent /100g}$ )	ABTS radical-scavenging activity ( $\text{mmol-Trolox equivalent /100g}$ )
Mozzarella cheese		
A	6.3 ± 1.55	0.29 ± 0.042
Camembert cheese		
B	12.4 ± 1.03 **	2.64 ± 0.077 **
C	18.3 ± 2.39	2.53 ± 0.235 **
Gouda cheese		
D	18.3 ± 0.79 **	1.70 ± 0.191 **
E	10.5 ± 0.82 *	1.38 ± 0.171 **
Cheddar cheese		
F	12.2 ± 1.34 *	1.46 ± 0.033 **
G	8.7 ± 0.90	1.05 ± 0.118 *

Each value is means±SD (n=3)

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

ABTS : 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

\* :  $p < 0.05$  versus Mozzarella cheese A using  $t$ -test.

\*\* :  $p < 0.01$  versus Mozzarella cheese A using  $t$ -test.

の1.05mg/100g ( $p < 0.05$ ) で高値であった。

#### 4. 考察

本研究で用いた試料のポリフェノール量、DPPH ラジカル消去活性および ABTS ラジカル消去活性はいずれも、非熟成タイプのチーズより熟成タイプのチーズで高かった。

まず、チーズにラジカル消去活性および ABTS ラジカル消去活性があった主な要因は、ポリフェ

ノールの存在が考えられる。チーズにポリフェノールが含まれていることは、田中ら<sup>9)</sup>が、放牧乳牛からの乳およびその乳から製造したチーズ中の共役リノール酸、パクセン酸、 $\beta$ -カロテン含量が混合飼料給与方式の乳と比較し高く、また放牧牛の牛乳からのチーズ製造に関しては、牛乳中の機能性成分のほとんどがチーズに移行したと報告していることから、本研究で用いた試料の原乳が放牧牛から得たものかどうかは不明であるが、

ポリフェノールも乳牛の牧草等の餌から乳に移行していたと考えられる。また、石渡ら<sup>10)</sup>が、種々の乳製品のポリフェノール量とペルオキシラジカル捕捉活性および DPPH ラジカル捕捉活性に高い相関があったと報告していることから、チーズにおいてもポリフェノールがラジカル消去活性に関与していることは明らかといえる。

次に、ポリフェノール量が非熟成タイプのモツアレチーズより熟成タイプのチーズで多かったのは、チーズの製造過程で水分除去および熟成中の水分蒸発によりポリフェノールが濃縮されたために、熟成期間の長い熟成タイプのチーズの方が多くなったと考える。本研究では試料の水分量の測定は行わなかったが、日本食品標準成分表 2015 年版では、各チーズの水分含量は、モツアレチーズは 56.3 g/100g、カマンベールチーズは 51.8g/100g、ゴーダチーズは 40.0 g/100g、チェダーチーズは 35.3 g/100g と示されており<sup>11)</sup>、熟成タイプのチーズのうちカマンベールチーズを除いたゴーダチーズおよびチェダーチーズの方が非熟成タイプのチーズであるモツアレチーズより水分量が少ない。したがって、カマンベールチーズを除いた熟成タイプのチーズで DPPH ラジカル消去活性および ABTS ラジカル消去活性が高いのは、チーズの製造過程での水分除去および熟成中の水分蒸発によるポリフェノール濃縮が関与していると考えられる。

ラジカル消去活性を示す他の要因に、ペプチドの作用があると考えた。熟成タイプのチーズは、熟成中に製造に使用される微生物が生成する酵素等により乳タンパク質であるカゼインが分解され、ペプチドやアミノ酸が生成する。Gupta *et al.*<sup>12)</sup> は、チェダーチーズの熟成過程における ABTS ラジカル消去活性の強さは熟成による可溶性ペプチドの形成速度が関連していたことを報告している。また、Igoshi *et al.*<sup>13)</sup> は、 $\beta$ -カロテン法による抗酸化能試験を行った結果、モツアレチーズの抗酸化能は低く、数種類の熟成タイプのチーズの抗酸化能が高かったことから、熟成タイプのチーズの抗酸化能の強さは熟成中に生成した抗酸化ペプチドによるものと報告している。本研究で試料に用いた熟成タイプのチーズのラジカ

ル消去活性は、Igoshi *et al.* と異なる抗酸化能試験の方法にも関わらず類似しており、特に熟成タイプのチーズに抗酸化作用があることは明らかといえる。熟成タイプのチーズの抗酸化活性は、濃縮されたポリフェノールに加え、熟成中に生成したペプチドも関与していると考えられる。

これらのことは、ナチュラルチーズ、特に熟成タイプのチーズが機能性食品として活用できることを示しており、国産ナチュラルチーズの消費拡大につながる事が期待される。

なお、本研究結果は、同種類のチーズでもメーカーが異なり、チーズの原乳となった牛の飼料の内容が不明確であった。また、試料中の水分量の測定も行わなかったため、今後はこれらの点を標準化して同様の実験結果を積み上げて、さらに立証していく必要がある。

## 5. まとめ

ナチュラルチーズのポリフェノール量および抗酸化能として DPPH および ABTS ラジカル消去活性を調べた。

その結果、使用した試料全てにポリフェノールが含まれていた。その量は、非熟成タイプよりも熟成タイプのチーズの方が多かった。DPPH ラジカル消去活性および ABTS ラジカル消去活性は、熟成タイプのチーズで高く、ポリフェノール量と同様の傾向を示した。

これらの結果から、ナチュラルチーズが機能性食品として活用することができることが示唆された。

## 6. 参考文献

- 1) Yamada M., Nakazawa Y., Tsukasaki F. and Hosono A. Antimutagenic activity of Camembert cheese on the Trp-P-I-induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD510 of *Salmonella typhimurium* TA98. *Int. Dairy J.*, 7 (12) :795-798 (1997)
- 2) Yamada M., Nakazawa Y. and Hosono A. Desmutagenicity of commercial cheese against the Trp-P-I-induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD510 of *Salmonella typhimurium* TA98. *日本畜産学会報* 69 (4) :359-364 (1998)

- 3) Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y. and Itoh T., Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.*, 83 (7) :1434-1440 (2000)
  - 4) Tanabe S., Tesaki S., Watanabe J., Fukushi E., Sonoyama K. and Kawabata J. Isolation and structural elucidation of a peptide derived from Edam cheese that inhibits beta-lactoglobulin transport. *J. Dairy Sci.*, 86 (2) :464-468 (2003)
  - 5) Ano Y., Ozawa M., Kutsukake T., Sugiyama S., Uchida K., Yoshida A. and Nakayama H. Preventive effects of a fermented dairy product against Alzheimer's disease and identification of a novel oleamide with enhanced microglial phagocytosis and antiinflammatory activity. *PLOS ONE.*, 10 (3) : e0118512 (2015) DOI: 10.1371/journal.pone.0118512 2019/3/1
  - 6) Osawa T. Immunochemical Approach for Evaluation of Oxidative Damages Caused by "Free Radicals and Active Oxygens", *J. Japanese Society Nutr. Food Sci.*, 51 (6) :365-371 (1998)
  - 7) 木村英生, 長沼孝多, 小嶋匡人, 小松正和, 恩田匠, 辻政雄. 山梨県産果実の総ポリフェノール含量とその DPPH ラジカル消去活性. 山梨県工業技術センター研究報告 22:59-63 (2008)
  - 8) 須田郁夫: 抗酸化能①分光学的抗酸化機能評価. 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一(編) 食品機能研究法. pp.218-220 (光琳, 東京, 2000)
  - 9) 田中桂一, 花田正明: 飼養方式および放牧形態による牛乳 CLA 含量の変化. 酪農ジャーナル 61 (4) :25-27 (2008)
  - 10) 石渡仁子, 山口智子, 高村仁知, 的場輝佳: 種々の乳製品のラジカル捕捉活性. 日本調理科学会誌 39 (4) :21-24 (2006)
  - 11) 文部科学省科学技術学術審議会資源調査分科会: 日本食品標準成分表 2015 年版. (全国官報販売協同組合, 東京, 2015)
  - 12) Gupta A., Mann B., Kumar R., Sangwan R.B., Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 62 (3) : 339-347 (2009)
  - 13) Igoshi K., Kondo Y., Kobayashi H., Kabata K. and Kawakami H., Antioxidative activity of cheese. *Milchwissenschaft*, 63 (4) :424-427 (2008)
- 
- (受付 2019.3.26 受理 2019.6.6)