

機能性オリゴ糖を含む「乳清飲料」の開発

大井 修*, 中野哲郎*²Development of Functional Oligosaccharide-rich Whey Drink Using Cheese Whey
Osamu Ooi and Tetsuo Nakano

乳清の有効利用を目指し、乳清中に約 4.6 g/100 mL 含まれる乳糖を活用した機能性乳清飲料の製法について検討した。乳糖に対して約 2 倍の果糖を添加した乳清を、酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 由来の β -ガラクトシダーゼで酵素処理することにより、ビフィズス菌の増殖因子としても知られるラクツロースおよび 1-ラクツロースを合計で 1.0 g/100 mL 含む乳清飲料を開発することができた。

1. 緒 言

チーズ製造時には、副産物として大量の乳清(ホエー)が生じる。その一部はホエータンパク質の原料等に有効利用されているものの、利用できるのはスケールメリットのある一部の生産者に限られており、小規模のチーズ製造業者では乳清を廃棄しているのが実情である。

しかし、乳清には乳糖をはじめとした有用成分が多く含まれており、未利用資源としてのポテンシャルは高い^{1,2)}。

乳糖は β -ガラクトシダーゼを用いた糖転移酵素反応によりオリゴ糖へ変換できることが知られている^{3,4)}。特に果糖存在下の糖転移反応ではガラクトースと果糖からなる二糖のラクツロースが生じる(図 1)。ラクツロースはプレバイオティクスに該当し、腸内のビフィズス菌増殖を助ける働きをもつ近年注目を浴びる機能性オリゴ糖である^{5,6)}。

健康人を被験者とする臨床試験において、1日あたり 1-3 g のラクツロースを 2 週間摂取することで、いずれの摂取量でも腸内のビフィズス菌量が増え、排便回数が増加することが報告されている⁷⁾。また、1日あたり 0.65 g のラクツロース摂取で腸内のビフィズス菌量が増えることが別の研究グループから報告されている⁸⁾。この健康効果が発揮される約 1 g のラクツロース量は、乳清に含まれる乳糖を糖転移させることで合成可能な量と考えられた。そこで、乳清の有効利用を目的として、酵素処理による機能性オリゴ糖ラクツロースを多く含む乳清飲料の開発を試みた。

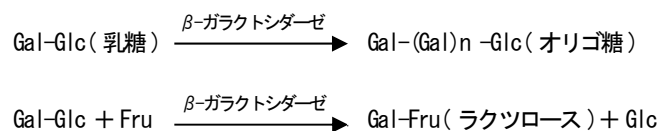


図 1 β -ガラクトシダーゼによる糖転移反応
(Gal:ガラクトース, Glc:グルコース, Fru:果糖)

2. 実験方法

2・1 原料

乳清は、山口県内においてチーズ等の乳製品を製造する(株)みるくたん様から提供されたものを使用した(図 2)。

ゴーダチーズの製造工程で生じた乳清をポリプロピレン製容器(内容量 2L)に入れてオートクレーブで殺菌し(105°C, 5分)、冷却後直ちに凍結保存したものを試験時に解凍して使用した。pH は 6.4、乳糖濃度は約 4.6 g/100 mL であった。

酵素製剤は SIGMA 社より購入した β -ガラクトシダーゼ (*Aspergillus oryzae*(*A. oryzae*) 由来・粉末状、および *Kluyveromyces lactis*(*K. lactis*) 由来・液状)を反応条件検討時に使用し、DSM(株)様よりご恵与いただいた Maxilact LGi 5000 (*K. lactis* 由来・液状)を飲料の試作時に使用した。

果糖は関東化学(株)特級品(酵素反応条件の検討時)および日新製糖(株)フルーツシュガー(試作品の製造時)を用い、クエン酸はミテジマ化学(株)食品添加物グレードのものを使用した。

2・2 酵素反応

酵素反応の条件検討は 50 mL ポリスチレン製チューブを用いてウォーターバス中で行った(図 3)。

チューブに所定量の果糖と 20 mL の乳清を入れて溶解させ、ウォーターバス中にしばらく放置して内部温度が一定となった後に酵素を添加して反応を開始した。所定時間ごとにサンプリングを行い、オリゴ糖分析に供した。

2・3 オリゴ糖の分析

オリゴ糖の分析は、同量の 2%スルホサリチル酸水溶液を加えてタンパク質の除去を行った試料をメンブレンフィルター(0.2 μm)でろ過した後、液体クロマトグラフ(株島津製作所・LC-10)により以下の条件で行った。

カラム:(株)資生堂 CAPCELL PAK NH₂ UG80 (2.0×150 mm, 5 μm), カラムオープン:40°C, 溶離液:アセトニトリル/水=85/15, 流速:0.2 mL/min, 検出器:示差屈折計(RID)



図 2 使用した乳清



図 3 酵素反応条件の検討

* プロジェクト管理室

*2 元・イノベーション推進センター

3. 実験結果および考察

3・1 ラクトース生成の確認

β -ガラクトシダーゼは、乳糖不耐症者向け製品の製造において乳糖の分解に用いられるなど、加水分解反応を行うことが知られているが、高濃度の糖が存在する条件では、糖転移反応が加水分解と競争的に進行し、ガラクトース残基が転移したガラクトオリゴ糖が生成する^{3,4)}(図1)。

そこで、まず糖転移反応が進行しやすい高糖濃度条件下でラクツロースが生成することを確認するため、果糖濃度 50 g/100 mL、反応温度 40°Cにてオリゴ糖の生成を追跡した。なお、この時使用した酵素製剤は *K. lactis* 由来のものである。反応溶液中のオリゴ糖の分析結果(クロマトグラム)を図4に示す。

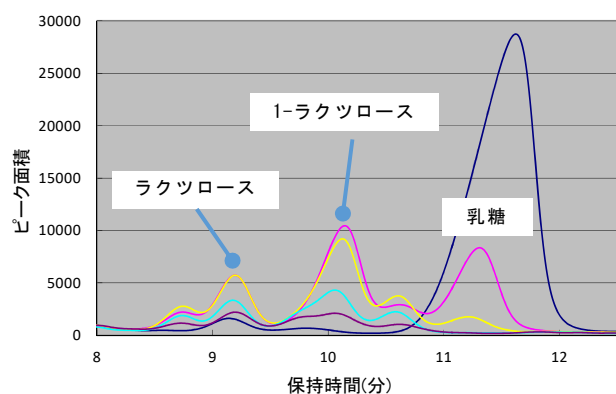


図4 時間経過による反応生成物の変化
(— 0 — 0.5 — 1 — 2 — 4hr)

乳糖は反応時間の経過とともに単調に減少した。ピーク面積を比較すると、反応開始から 0.5 時間の時点で残存量が 21%まで減少し、1 時間後に 3%まで減少、2 時間後にはピークが消失した。

一方、ラクツロースは反応開始後に増加し、0.5 時間の時点で最大濃度 0.43 g/100 mL に達した。ピーク面積を基にした単純比較では、反応開始時に存在していた乳糖の 12%がラクツロースへと変換された計算になる。その後、反応開始から 1 時間が経過した(乳糖がほぼ分解された)時点から減少に転じた。これは乳糖が消費されると、一旦生成したラクツロースが酵素による加水分解を受けてしまい、グルコースと果糖へと分解したためと推定された。よって生成したラクツロースを高濃度のまま保持するには、濃度が最大となるタイミングで酵素を失活させて反応を停止する必要があると判断した。

なお、反応開始時に既にラクツロースのピークが認められるが、牛乳は殺菌などで熱を受けると乳糖の異性化反応(Lobry-de Bruyn-van Ekenstein 転位)によりラクツロースを生じることから、原料乳清に元々存在していたものであると考えられる。

図4のクロマトグラムにはラクツロース以外にも新たなピークが認められ、いくつかのオリゴ糖が生じていることが予想された。このうち最大のピークは保持時間が約 10 分 (rt = 10.1) のものであるが、ラクツロースと乳糖の間に

溶出しており、ラクツロースのピークとの面積比がおおよそ 1:3 であった。これらの事実は Hua⁹⁾らが報告した内容と一致することから、このピークは 1-ラクツロースであると判断した。1-ラクツロースはラクツロースの異性体であり、ラクツロースが β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-fructose の構造であるのに対し、 β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-D-fructose の構造を有す^{10,11)}。また、Förster-Fromme らは 1-ラクツロースがヒト腸内のビフィズス菌や乳酸菌の増殖、便通改善などに効果があることを報告しており¹²⁾、ラクツロースと同様にプレバイオティクスとしての効果が期待できる物質である。このことから、今後の検討ではラクツロースと 1-ラクツロースを合算した「総ラクツロース」を指標として評価を行った。

3・2 酵素反応条件の検討

果糖濃度が高いほど総ラクツロースの生成に有利であるが、市販の乳飲料や清涼飲料水の炭水化物含有量(糖濃度)は一般的に 10-15%であるものが多いため、甘すぎない飲料とするには、果糖濃度を同程度に抑えることが望ましい。そこで、果糖の仕込み濃度を変化させたときのラクツロース生成量について検討した。

なお、 β -ガラクトシダーゼは起源となる微生物によってさまざまな種類のもが存在しており、至適反応条件や反応生成物の組成などに相違があるため、由来の異なる 2 種類の市販酵素製剤(*K. lactis* 由来および *A. oryzae* 由来)を用いた。

ラクツロースへの変換率(反応開始時の乳糖の量に対するラクツロース生成量)を図5に示す。

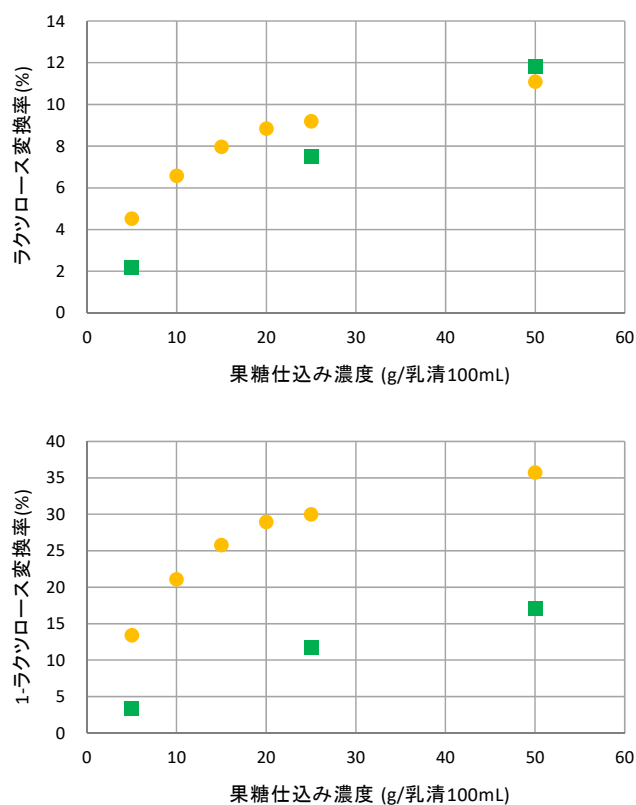


図5 果糖濃度がラクツロース生成に及ぼす影響
(● *K. lactis* 由来, ■ *A. oryzae* 由来)

いずれの酵素製剤も果糖濃度が低くなるに従い、ラクツロース、1-ラクツロースともに生成量が減少した。1-ラクツロースの生成量は酵素による違いが顕著であり、*K. lactis*由来の酵素製剤が約3倍の生成量を示した。以後の検討では*K. lactis*由来の酵素製剤を用いることとした。

次に反応温度について検討した。ここまでの検討は酵素反応に適した40℃でデータを取得したが、乳清は微生物による腐敗や変質を受けやすいため、実際の加工工程は低温で行うことが望ましい。そこで、5℃での反応を行い、40℃での反応と比較した。その結果、5℃では反応時間は10倍以上となり大幅に増加したが、ラクツロースなどの反応生成物の組成比に変化は見られなかった(データ略)。

乳清に仕込むことのできる果糖濃度は甘さの観点から10 g/100 mLが上限である。この上限濃度におけるラクツロース、1-ラクツロースへの変換率は、それぞれ6.6%、21%であり(図5)、乳清に含まれる乳糖が約4.6 g/100 mLであることから、酵素処理後の総ラクツロース生成量は約1.2 g/100 mLと算出される。この濃度であれば、100 mLを飲食することで、健康効果が期待できる総ラクツロース1 gの摂取が可能であり、機能的飲料として妥当な含有量となる。

以上の結果を踏まえ、果糖濃度10 g/100 mL(乳糖に対して約2倍)、反応温度5℃で酵母(*K. lactis*)由来のβ-ガラクトシダーゼを用いるという条件をラクツロース富化乳清飲料加工の基本的手法として定めた。

3・3 乳清飲料の試作

反応条件の検討結果を基に、実生産を視野に入れた数Lスケールでの試作実験を行った。

製品化を目指すためには、ラクツロース含有量だけでなく、消費者の嗜好性を考慮する必要がある。風味についても検討を加え、不快臭の原因となってしまう脂肪分やタンパク質の除去工程を組み込んだプロセスとした。製造手順を図6に示す。この手順に従って、表1の配合で仕込みを行った際の一連の加工の様子は図7のとおりであり、淡黄色透明の飲料を製造することができた。

表1 試作品の配合割合

材料	配合量	濃度
乳清	3.5L	—
果糖	350g	10%
クエン酸	12.25g	0.35%
酵素製剤	3.5mL	0.1%

3・4 試作品の評価

試作品の成分について分析した結果を表2に示す。1-ラクツロースは標準試料を入手できなかったため、ラクツロース標準試料を用いて作成した検量線を代用して計算した濃度を用いた。

総ラクツロースの含有量は1.0 g/100 mLであった。ラクツロースを含む市販商品には、便通改善効果をうたい1パッケージ当たり4 gを含有するものがある一方、1 gを含有する商品もある。試作品は1 gの総ラクツロースを含んでおり、健康機能が発揮できることが期待される。

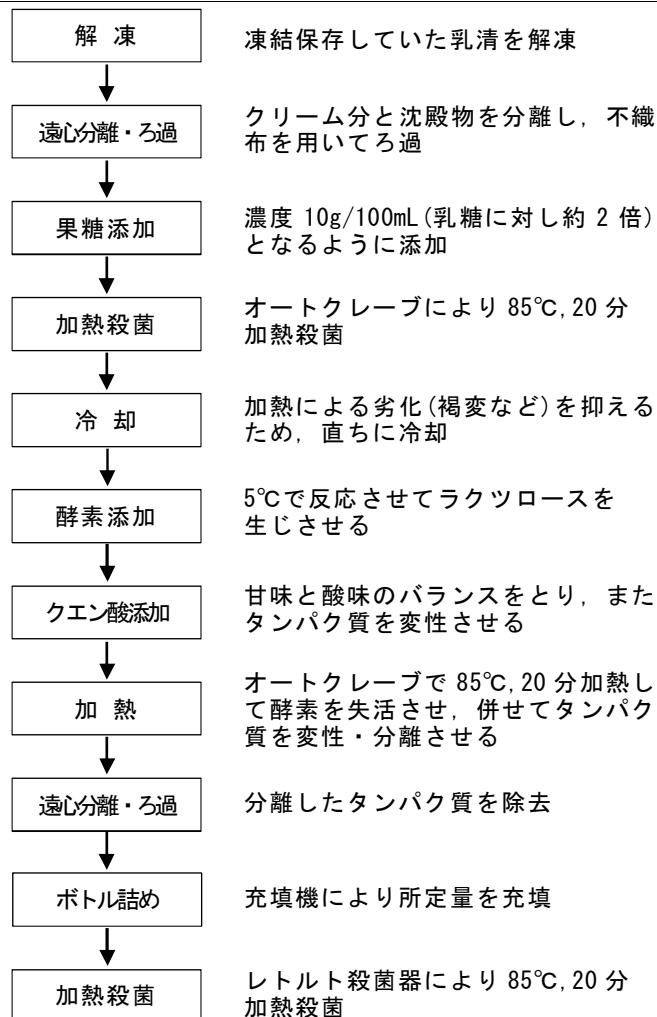


図6 乳清飲料の製造手順

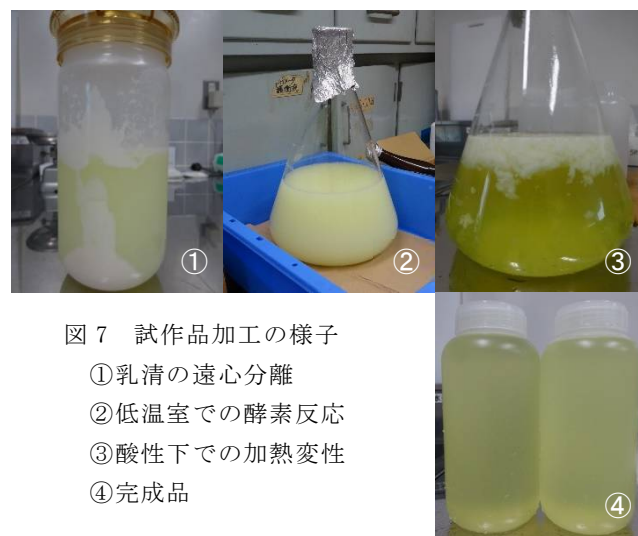


図7 試作品加工の様子

- ①乳清の遠心分離
- ②低温室での酵素反応
- ③酸性下での加熱変性
- ④完成品

表2 試作品の糖含有量 (g/100 mL)

糖の種類	濃度
果糖	9.3
ブドウ糖, ガラクトース	3.3
乳糖	0.3
その他	0.3
総ラクツロース	1.0
(ラクツロース)	0.3)
(1-ラクツロース)	0.7)
合計	14.2

次に、甘さを評価するため、市販の飲料(合成甘味料を使用していないもの)について、甘さ(糖濃度)の目安となる炭水化物含有量を比較した。結果を表3に示す。

表3 炭水化物量の比較 (100g または 100mL あたり)

商品	炭水化物(g)
試作品	14.2
A社 乳性飲料	15.0
A社 乳酸菌飲料	14.0
B社 ドリンクヨーグルト	12.5(糖類 10.8)
C社 乳酸菌飲料	11.2
D社 乳酸菌飲料	17.7

甘さ控えめ(11.2 g/100 mL)のタイプから甘みの強い(17.7 g/100 mL)タイプまで幅広い範囲の商品が見られ、平均的なものは 15.0 g/100 mL ほどであった。試作品は 14.2 g/100 mL であり、一般的な範疇に含まれていた。

さらに、乳清を排出している事業者の商品開発担当者により試作品の評価を行ったところ、おおむね好評であった。しかし甘味が強いとの指摘もあった。試作品には多くの果糖が含まれているが、果糖は糖の中でも特に甘みが強いいため、糖濃度の数値以上に甘みが感じられたものと思われる。

以上を総合すると、甘みの点では若干の改善が求められるものの、開発した乳清飲料には十分な商品価値が期待できる。

4. 結 論

チーズ製造時に副生する乳清を原料として、市販の酵素製剤を用いた糖転移反応により、機能性オリゴ糖を多く含む飲料の開発を試みた。

反応条件について検討し、乳糖に対して約2倍の果糖を加えた乳清を、*K. lactis* 由来のβ-ガラクトシダーゼにより処理することで、ラクツロース、1-ラクツロースの生成量が高くなることを確認した。

実製造を見据えた試作実験を行い、ラクツロースおよび1-ラクツロースを合計 1.0 g/100 mL 含む乳清飲料を開発することができた。



図8 乳清飲料(左手前)と原料乳清

参考文献

- 1) 安藤邦雄：乳清について，調理科学，**19**(2)，pp.73-77(1986)。
- 2) 桑田 有：ホエイからの各種有用成分の分離と栄養，機能食品への応用研究，*Milk Science*，**61**(2)，pp.95-103(2012)。
- 3) 松本圭介，小林洋一，田村なつ子，渡辺常一，菅 辰彦：β-ガラクトシダーゼによるガラクトオリゴ糖の生産，澱粉科学，**36**(2)，pp.123-130(1989)。
- 4) 齋藤忠夫，長畑直樹，木村一雅：β-D-ガラクトシダーゼの開発と利用，乳業技術，**67**，pp.1-15(2017)。
- 5) 溝田輝彦，関 信夫：多様な側面を持つラクチュロース：開発と生理効果に関する最近の研究動向，*Milk Science*，**50**(2)，pp.39-47(2001)。
- 6) 境 洋平：ラクチュロース：その歴史と機能，生産と技術，**71**(4)，pp.38-40(2019)。
- 7) Y. Sakai, N. Seki, H. Hamano, H. Ochi, F. Abe, F. Shimizu, K. Masuda, and H. Iino: A study of the prebiotic effect of lactulose at low dosages in healthy Japanese women, *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, **38**(2), pp.69-72(2019)。
- 8) T. Tomoda, Y. Nakano, and T. Kageyama: Effect of Yogurt and Yogurt Supplemented with *Bifidobacterium* and/or Lactulose in Healthy Persons: A Comparative Study, *Bifidobacteria and Microflora*, **10**(2), pp.123-130(1991)。
- 9) X. Hua, R. Yang, Q. Shen, F. Ye, W. Zhang, and W. Zhao: Production of 1-lactulose and lactulose using commercial β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose, *Food Chemistry*, **137**, pp.1-7(2013)。
- 10) Q. Shen, R. Yang, X. Hua, F. Ye, H. Wang, W. Zhao, and K. Wang: Enzymatic synthesis and identification of oligosaccharides obtained by transgalactosylation of lactose in the presence of fructose using β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Food Chemistry*, **135**, pp.1547-1554(2012)。
- 11) C. M. Schmidt, F. Balinger, J. Conrad, J. Günther, U. Beifuss, and J. Hinrichs: Enzymatic generation of lactulose in sweet and acid whey: Optimization of feed composition and structural elucidation of 1-lactulose, *Food Chemistry*, **305**, 125481(2020)。
- 12) K. Förster-Fromme, R. Schuster-Wolff-Bühring, A. Hartwig, A. Holder, A. Schwiertz, S. C. Bischoff, and J. Hinrichs: A new enzymatically produced 1-lactulose: A pilot study to test the bifidogenic effects, *International Dairy Journal*, **21**(12), pp.940-948(2011)。