properties studied.

The cream was washed by diluting with nine volumes of 0.95% NaCl solution and re-separated after each dilution by means of a DeLaval cream separator. The fat-globule membrane protein was obtained after four washings.

The fat-globule membrane protein was compared with casein, whey-protein and nonwashed cream-protein on the basis of their electrophoretic properties.

Generally, 2 to 3 components were observed in the electrophoretic mobility pattern of the fat-globule membrane protein.

No positive identification of these components has been attempted from existing electrophoretic evidence, but the fat-globule membrane protein was provisionally classified as either whey-protein (other than β -lactoglobuline) or a protein with a whey-protein like nature.

牛乳脂肪球の皮膜物質について (第 2 報)

牛乳脂肪球に対する放射性 Ca^{45} -Caseinate 及び

Whey-protein の吸着実験

佐々木林治郎, 小 山 進 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 30 年 7 月 12 日 受 理

On the Fat-Globule Membrane Materials of Cow's Milk.

Part 2. Adsorption of Radioactive Ca^{45} -Caseinate and
Whey-Protein to Milk Fat-Globule.

By Rinjirō SASAKI and Susumu KOYAMA

(Dep. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

緒 言

第 1 報⁽¹⁾において著者等は牛乳の脂肪球に最も密接に吸着されている蛋白は、乳清蛋白の一部又はそれに類似したもので、カゼイン及び β -ラクトグロブリン等電気泳動的に易動度の大きい蛋白はクリームの洗滌によつて洗い出されてしまうことを認めた。よつてこの結果を更に確めるために Ca^{45} で放射性とした Ca^{45} -caseinate 及び乳清蛋白を用いて牛乳を再製し、これから分離したクリームを洗滌するとき

(1) カゼインはすべて洗い出されるか

(2) 乳清蛋白は一部のみが洗い出されるのか

どうかについて実験を行つた結果第 1 報と一致する結果を得たのでここに報告する。

実 験 の 部

1. カゼインカルシウムの吸着

牛乳中のカゼインはカルシウム塩として存在しているから、牛乳を再製するにはカゼインカルシウム (Ca-caseinate) を用いる。放射性 Ca^{45} を加えた放射性カゼインカルシウムをつくり、これを用いて牛乳を再製し、それから分離したクリームを洗滌して、カゼインが洗い出されるかどうかを検べるのに、洗滌クリーム中の放射能の有無を検すれば目的が達せられるわけである。しかも微量な Ca の有無を検べるには化学的な方法よりも放射能を利用する方がより簡単で且つ精密である。

(1) 放射性カゼインカルシウムゾルの調製

脱脂乳から塩酸カゼインをつくり、これに $N/2$ 苛性ソーダ液を加えて完全に溶解し pH を 6.6 にする。次に $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ (但し放射性 Ca^{45} は Oakridge National Laboratory より入手したものである) を加えて放射能を与えた $[\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2 + \text{CaCl}_2 \text{ 1:20}]$ 混合液を加えると液はゾル状に白濁する。これに蒸留水を加えてカゼインの濃度を 2.5% になるように希釈したのち 0° に 1 夜放置する。但し CaCl_2 混合液の添加量はカゼイン 1g に対して $\text{CaCl}_2 \text{ 0.0313 g}$ である⁽²⁾。

(2) 乳 化

上に調製した放射性カゼインカルシウムゾルに乳脂肪 3.5% を添加し, 37° に加熱してハレル式乳化機で乳化する. 次の 3 種の乳化について実験した. 但しレシチンは 0.07%, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ は 0.13% をカゼインカルシウムゾルに加えてから 0° に 1 夜置いた. ここに使用したレシチンは PANGBORN の方法⁽³⁾によつて調製したものである.

1. Ca-Caseinate, butterfat
2. Ca-Caseinate, butterfat, lecithin
3. Ca-Caseinate, butterfat, lecithin, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

(3) カゼインカルシウムの存在の証明

カゼインカルシウムゾルの中のカゼインカルシウムを確認するために次の実験を行った.

先ず $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ を加えない CaCl_2 を用い (1) と同じ方法でカゼインカルシウムゾルを調製する. これに無水エタノールの等量を加える. ここに生じた沈澱を集め 50% エタノール溶液で洗滌液に Ca の認められなくなるまで洗滌し, 沈澱を 500~600° で灰化した. この灰の Ca を検出するにはエチレンジアミンテトラ醋酸 (EDTA) を用いる方法を使用した^(4,5). 実験結果は Table 1 の通りである.

Table 1. Ca in the Washings and Precipitate

	Titer of E. D. T. A. soln. (cc)
Supernatant	16
Washing (first)	4.5
Washing (second)	0
Washing (third)	0
Ash	4

Table 1 から明らかなように, 2 回目洗滌液には既に Ca が認められない. 故に 3 回洗滌して得た沈澱には遊離の Ca は存在しないことになる. 従つてこの沈澱を灰化した灰の中に Ca が存在するとすれば, それはカゼインと結合していたものと考えなければならぬ. Table 1 に示された結果により前 (1) に調製した

放射性カゼインカルシウムゾルの中にカルシウムはカゼインと結合して在るものと認めた.

(4) カゼインカルシウムの吸着

再製牛乳から分離したクリームを第 1 報と同じ方法で洗滌し, 非洗滌クリーム, 2 回洗滌クリーム及び 4 回洗滌クリームの放射能を GM カウンターを用いて測定した結果は Table 2 に示す通りである.

Table 2. Radioactivity of Washed Cream (counts)

	Cream		
	non-washed	2 times	4 times
Cream 1	210	0	0
Cream 2	190	0	0
Cream 3	130	0	0

Table 2 に示されることから 3 種の試料はどの場合においても放射性カゼインカルシウムが 2 回の洗滌で洗い出されてしまうことが認められる.

2. 乳清蛋白の吸着

脱脂乳からカゼインを分別した残りの乳清を濾紙で濾過し, これに $N/2$ 苛性ソーダを加えて pH を 6.6 にした. これを 1 夜 0° に置いてから乳脂肪 3.5% を加え, 37° に加熱して乳化を行った. ここに得た乳状液からクリームを分離し 1 の場合と同様に洗滌し, 非洗滌クリーム, 2 回洗滌クリーム及び 4 回洗滌クリームより得た乳清蛋白を濾紙電気泳動法によつて分別した結果は Fig. 1 に示す通りである. 泳動条件は第 1 報と同じである.

Fig. 1. Paper Electrophoresis. Electrophoretic diagrams of whey protein.

Fig. 1 から乳清蛋白のうち易動度の最も大なる成分 (I: β -ラクトグロブリン) は 2 回の洗滌で洗い出されてしまい, 易動度の小なる成分は 4 回の洗滌においてもなお脂肪球に吸着されていることが認められる.

考 察 及 び 要 約

放射性 $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ を加えて放射性カゼインカルシウムをつくり, これを用いて乳状液を調製し, カゼインカルシウムの吸着状態を検べた. その

結果, カゼインカルシウムは脂肪に吸着されるとしても非常に弱く吸着されており, PALMER 等⁽⁶⁾の報告したように特殊な蛋白 (皮膜蛋白) に蔽われた脂肪球の外側に弱く吸着されているものと考えられる. 従つて第 1 報の結果と合せ考えれば牛乳脂肪球の皮膜蛋白中にカゼインは含まれないということが出来る.

乳清蛋白を用いて調製した乳状液において各蛋白の吸着には差があると考えられる. 第 1 報及びこの実験によ

れば乳清の β -ラクトグロブリンが洗い出されており、常乳の皮膜蛋白と同じような泳動図が乳精を用いた乳状液の場合にも認められる。これ等のことから皮膜蛋白中には乳清蛋白のうち易動度の小さい蛋白が含まれる可能性を示している。従つて牛乳の皮膜蛋白がカゼインを含まないことは確かと認められるが、ラクトアルブミン及びグロブリンを含まないという PALMER⁽⁷⁾ の主張は本実験からは結論づけることは出来ない。

然しながら第 1 報に示したように皮膜蛋白には電気泳動的に 2, 3 の成分が存在する。故に皮膜蛋白が未知蛋白と乳清蛋白との混合物であることも考えられるので、今直ちに明確な結論はつけ難い。その前に皮膜蛋白及び乳清蛋白の各成分を精細に分別することも必要である。

要するに牛乳脂肪球の皮膜蛋白にカゼインは含まれていないが、それは乳清蛋白の一部か又は乳清蛋白の一部と未知蛋白の混合物であると考えられる。

(1) 佐々木林治郎, 小山進, 西川三千雄: 本誌, 29, 827 (1955).	(5) 上野景平, 山口靖人: 化学の領域, 6, 670 (1952).
(2) E. O. WHITTIER and B. H. WEBB: Byproducts from Milk (1950).	(6) L. S. PALMER: <i>J. Dairy Sci.</i> , 27, 471 (1944).
(3) M. C. PANGBORN: <i>J. Biol. Chem.</i> , 188, 471 (1951).	(7) C. E. RIMPILA and L. S. PALMER: <i>J. Dairy Sci.</i> , 18, 827 (1935).
(4) 上野景平: 化学の領域, 5, 481 (1951).	

Summary

The adsorption of Ca^{45} -caseinate and whey-protein on the surface of milk fat has been studied.

Pure butter fat was emulsified in each of the following two media resulting in a fat content of 3.5%: (1) a sol containing Ca^{45} -caseinate (pH 6.6, casein content 2.5%), (2) acid casein whey (neutralized to pH 6.6).

The emulsion was separated by means of a DeLeval cream separator, and the cream obtained was washed by diluting it with 9 volume of 0.95% NaCl solution and re-separated after each dilution.

Results are as follows,

(1) Ca^{45} -caseinate was not detected on the surface of fat-globule after two washings.

(2) The paper electrophoretic diagrams showed that β -lactoglobulin was washed out after two washings, but the other whey-protein components were still adsorbed on the surface of fat-globule after four washings.

From these experiments it is apparent that the fat-globule membrane protein of normal cow's milk does not contain Ca -caseinate.

It, therefore, seems probable that whey-protein components are contained in the fat-globule membrane protein of normal cow's milk.

反芻胃の消化に関する研究 (第 2 報)

Infusoria の人工培養に就て (その 1)

神 立 誠, 高 橋 直 躬 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 30 年 7 月 13 日 受 理

Studies on Reticulo-Rumen Digestion. Part 2.

The Artificial Culture of Some *Entodinia* (I)

By Makoto KANDATSU, and Naomi TAKAHASHI.

(Dept. Agr. Chem., Fac Agr., Univ. of Tokyo)

緒 言

反芻獣の第一、二胃 (以下便宜のため反芻胃と呼ぶことにする) 内には多数の微生物が棲息して活潑な活動を行っており、これが反芻胃内の消化に重要な役割を果している事は既に知られている⁽¹⁾。近時、これら反芻胃微生物の活動と反芻獣の栄養との関係が重要視され、これに関する多くの研究がなされている^(2,3)。就中細菌と栄養とに関する研究が特に多く^(4,5,6)、原生動物に就ては研究は少く、その存在の意義及び反芻獣の栄養との関係に