[農化 第 41 卷, 第 12 号, p.675~679, 1967]

加熱による牛乳蛋白質のポリアクリルアミドゲル 電気泳動における変化

西川 勲, 阿部宣明, 斎藤健輔
(雪印乳業株式会社技術研究所)

昭和 42 年 6 月 29 日 受 理

Changes of Bovine Milk Protein by Heating as Revealed by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis

By Isao NISHIKAWA, Nobuaki ABE and Kensuke SAITO
Research Laboratory, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

Effect of heat upon bovine skimmilk protein, whole casein and whey protein was studied by means of polyacrylamide-gel electrophoresis. Electrophoresis of casein was carried out in 7% acrylamide and 4.5M urea at pH 9.1 (tris-EDTA buffer) and that of whey protein in 8% acrylamide at pH 8.6 (borate buffer). Casein and whey protein solution, dialyzed against pH 7.0, 0.02M phosphate buffer, and skimmilk were heated for 20 minutes at 70, 80, 90, 100 and 120°C.

Heating casein at 120°C for 20 minutes caused definite changes in gel-electrophoretogram. Along with spreading zone, smaller and diffused α_s - and β -casein zone were observed. The gel-electrophoretograms of heated whey protein showed the increase of unmigrating protein and long diffused zone instead of clear β -lactoglobulin and α -lactalbumin zone. Marked increase of unmigrating protein was observed with heated skimmilk compared with heated casein or whey protein. This is probably due to the effect of salts and sugars existing in milk or due to the interaction between casein and whey protein during heating. Heat-aggregated whey protein, which remained in the starting slot, could be migrated into the gel and showed a new zone between α_s - and β -casein with the presence of urea and 2-mercaptoethanol.

(Received June 29, 1967)

緒 言

別報⁽¹⁾において、加熱による牛乳蛋白質の DEAE-セルロースにおけるクロマトグラム上の挙動を明らかにした。本報では、同様な観点から脱脂乳、全カゼイン、全乳清蛋白質の各混合系における加熱によって、ポリアクリルアミドゲルを支持体とする電気泳動図にどのような変化が起こるかについて検討した結果を報告する。

実 験 方 法

1. 蛋白質標品

加熱に供する試料は、別報⁽¹⁾と同様の操作で調製した脱脂乳、全カゼイン、全乳清蛋白質を用いた。

2. 加熱条件

別報⁽¹⁾と同様の条件で加熱し、供試した。

3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

カゼイン分離には、pH 9.1, トリス EDTA 緩衝液、4.5M 尿素含有の 7% アクリルアミドゲルを用いる、Thompson らの方法⁽²⁾に従い、また、乳清蛋白質分離には、Bell⁽³⁾ がデンプンゲルで用いた pH 8.6, 0.03M ホウ酸緩衝液を含有する 8% アクリルアミドゲルを用いた。必要に応じて 0.022M の 2-メルカプトエタノールを含有せしめた。

電極は銀-塩化銀電極、電極液はカゼイン用の場合、pH 9.1, 乳清蛋白質用の場合、pH 8.6 の 0.3M ホウ酸緩衝液を用い、厚さ 4mm, 幅 120mm, 長さ 200mm に整形した支持ゲルを水平に置いて、室温で泳動を行った。

蛋白質含量 2% 前後の試料 10~15 μ l を、幅 1mm, 深さ 4mm, 長さ 10mm の長方形のスロットに供試し、

カゼイン分離用の場合 190 V の定電圧下, 乳清蛋白質分離用の場合 130 V の定電圧で泳動させ, BPB を指示薬としてスロットより約 10 cm に達した後 (約 7 時間), Amido Black 10 B により染色し, 7% 酢酸水でバックグラウンドが透明となるまで脱色した. ゲル泳動上の各蛋白質の位置は前報⁽¹⁾同様に調製した蛋白質標品を用いて同定した.

4. 非泳動区分の割合

スロットに残存する非泳動蛋白質の全体に対する割合は, デンシトメーターによる測定は不可能なため, ゲルを洗浄後, スロット部分を切断し, 2% 炭酸ナトリウム含有 50% エタノールにてゲルより色素を抽出し, 日立 EPU-2 A 型分光光度計を用いて 620 m μ における吸光値を求め, 同時にスロット以外の泳動区分についても同様の処理により吸光値を求め, 全体に対する非泳動蛋白質の割合を算出した.

実験結果および考察

1. 牛乳蛋白質の加熱による電気泳動図の変化

(i) カゼインの変化: 0.022 M メルカプトエタノールを含有せしめたカゼイン分離用ゲルを用い, 未加熱, 80°, 100°, 120° 各 20 分間加熱後の泳動図を Fig. 1 に示す. 100°, 20 分間加熱では α_s と β カゼイン間の微量成分がやや不鮮明になるほかはとくに変化は認めず, この結果は DEAE-セルロースでの結果⁽¹⁾と一致する. 120°, 20 分間の加熱では全体に泳動図が不鮮明となり, α_s , β カゼインが減少するとともに全体に拡散した泳動図となる. このような結果は, 中西⁽⁴⁾らのデンプンゲルによるカゼインの加熱変化とよく似た傾向である. また, 山

Fig. 1. Gel-Electrophoresis of Unheated and 20 minutes Heated Casein Using 7% Acrylamide, 4.5 M Urea and 0.022 M 2-Mercaptoethanol (ME) at pH 9.1 (Tris-EDTA Buffer): 1) unheated, 2) heated at 80°C, 3) 100°C, 4) 120°C.

Fig. 2. Gel-Electrophoresis of Unheated and 20 minutes Heated Whey Protein Using 8% Acrylamide at pH 8.6 (0.03M Borate Buffer): 1) unheated, 2) heated at 70°C, 3) 80°C, 4) 90°C, 5) 100°C, 6) 120°C.

内⁽⁵⁾らが自由界面電気泳動により α および β カゼイン峰が扁平になり, 相対的濃度も変化することを観察しているが, 電気泳動的手法においては類似した傾向を示すことがうかがわれる.

(ii) 乳清蛋白質の加熱による変化: 乳清蛋白質分離用ゲルを用い, 未加熱, 70°, 80°, 90°, 100°, 120° 各 20 分間加熱した場合の泳動図を Fig. 2 に示す. 70° では β ラクトグロブリン (β -LG), α ラクトアルブミン (α -AL) にはほとんど変化が認められないが, グロブリン (GL) は減少する. 80° 以上の加熱では β ラクトグロブリン, α ラクトアルブミンの境界が明瞭でなくなり全体に拡散した不鮮明な像が得られる. もう一つの変化は, 泳動しないでスロットに残る成分が加熱とともに多くなるようで, 後述するように乳清蛋白質の変性による分子会合等によってゲル孔に入り込めない大きくなったためではないかと思われる.

類似の実験の報告としては, Freimuth⁽⁶⁾ らはペーパークロマトグラフィーを用いて, 加熱により未変性の β ラクトグロブリンよりも易動度の遅い成分を認めている. また, Briggs ら⁽⁷⁾ は β ラクトグロブリンの熱変性の際の重合を観察し, 65° に加熱して 4 分子の会合が起ることを見出している. Hartman⁽⁸⁾ はディスクアクリルアミド電気泳動による牛乳蛋白質の加熱による変化を検討した中で, β ラクトグロブリンの 74.5° あるいは 85°, 30 分間の加熱によりやや易動度が遅くなる成分を認め, これは分子の大きさが増したか, あるいは分子の

立体配置が変化したためであろうと推論している。また、同時にゲルに入り込めない成分も認めており、われわれの行なった全乳清蛋白質についての同様な結果も、乳清蛋白質中 60% 程度を占める β ラクトグロブリンの挙動が主として影響しているのではないと思われる。

(iii) 脱脂乳の変化： カゼイン、乳清蛋白質さらに糖類、塩類の共存する脱脂乳における変化を、尿素を含有しない乳清蛋白質分離用ゲルでみると Fig. 3 (A) に示すとおりである。この場合、最も泳動の速い β ラクトグロブリン (β -LG) の消長のみが観察され、カゼインはこの条件ではポリマーとして存在するのでスロットに大部分残存し、一部モノマーの α_s , β カゼインのみが泳動するが、乳清蛋白質と重なるので変化の様相が明らかなでない。

次に、メルカプトエタノール含有のカゼイン分離用ゲルで泳動図をみると、Fig. 3 (B) から明らかなように、カゼイン単独のごとき泳動図を示し、120°, 20 分間加熱で α_s , β カゼインがかなり減少して拡散した泳動を示す。後述するように、乳清蛋白質 (W.P.) はこの条件下では α_s , β カゼイン間に現われるが、明らかなバンドを示さないのはカゼインと乳清蛋白質が 80:20 という量的関係によるものといえよう。

2. 非泳動区分におよぼす尿素、メルカプトエタノールの影響

乳清蛋白質の加熱にみられた泳動しないスロットに残存する蛋白質の生成と加熱との関係および尿素、メルカプトエタノールの含有の有無による泳動条件の影響を検討するために、全カゼイン、全乳清蛋白質、脱脂乳を各温度で加熱し、Fig. 4 の説明に記載した各泳動条件 (1)~(4) で泳動、染色、洗浄後、スロット部分を切断し、スロット区分の全蛋白区分に対する割合を算出した。

(i) カゼインへの影響： その結果を Fig. 4 に示す。尿素を含有しない (1), (2) では、未加熱でも大部分ポリマーとして存在するので相互の分離が悪く、スロット残分が多いが、加熱に伴ってさらに増加を示すので重合のような現象が起こっているのではないかと考えら

Fig. 3. Gel-Electrophoresis of Unheated and 20 minutes Heated Skimmilk Protein Using (A) 8% Acrylamide at pH 8.6 and (B) 7% Acrylamide, 4.5 M Urea and 0.022 M ME at pH 9.1: 1) unheated, 2) heated at 70°C, 3) 80°C, 4) 90°C, 5) 100°C, 6) 120°C.

Fig. 4. Effect of Urea and ME on the per cent of Unmigrating Protein in the Gel-Electrophoretograms at Different Conditions: (1) electrophoresis in 8% acrylamide at pH 8.6 (0.03 M borate buffer), (2) the same as 1 but with 0.022 M ME, (3) electrophoresis in 7% acrylamide and 4.5 M urea at pH 9.1 (tris-EDTA buffer), (4) the same as 3 but with 0.022 M ME.

れる。

尿素を含有する (3), 尿素, メルカプトエタノールを含有する (4) の泳動条件では, 未加熱のものでも, ほとんどスロット残分が認められず, 尿素の作用によりカゼインミセルが解離することを示している。この条件の場合, 加熱によっても増加の傾向が認められず, 加熱によって生じた会合分子も高濃度の尿素の作用によってモノマーの状態に戻るものと推察される。なお, メルカプトエタノール含有 (4) によっても同様の傾向である。

(ii) 乳清蛋白質への影響: 尿素を含有しない (1), (2) では, スロット残分は加熱とともに増加し, 80~90° で最大となり, 120° では逆に減少を示す。この結果は, pH 7.0, 0.02 M 磷酸緩衝液中での加熱では,

ある程度以上の加熱では会合が抑制されることを示しており, Briggs⁽⁷⁾ もこのような現象を認めている。

(iii) 脱脂乳への影響: 乳清蛋白質単独では, 80~90° で最高に達し, さらに加熱すると減少する傾向にくらべて脱脂乳の場合には相対的なスロット残分含量が高く, しかも加熱に伴って増加するという傾向は, 脱脂乳中のカルシウム, 糖類の影響あるいはカゼインと乳清蛋白質の相互作用の影響ではないかと思われる。

3. 変性乳清蛋白質の挙動

全乳清蛋白質の加熱による泳動図は拡散した不鮮明な図と, 一部, 会合の高度に進んだ成分の存在を示すようなスロット残分の増加を認めるが, 変性した乳性蛋白質の挙動をさらに明らかにするために, 別報⁽¹⁾と同様, 乳清蛋白質を 90°, 20 分間加熱し, pH 4.6 として沈殿する区分を変性乳清蛋白質として, 未加熱のカゼインおよび乳清蛋白質との泳動条件による性状および相対的な位置関係を明らかにした。

尿素を含有しない場合, Fig. 5 (A) から明らかなように, スロット残分の増加と, やはり全体に拡散した泳動図を示すが, 未変性の乳清蛋白質と比較して β ラクトグロブリンと α ラクトアルブミンの間を中心とした不鮮明な拡散した泳動図といえよう。これにメルカプトエタノール

Fig. 5. Gel-Electrophoresis of Undenatured and Denatured Whey Protein Using (A) 8% Acrylamide with and without ME at pH 8.6 (0.03 M Borate Buffer) and (B) 7% Acrylamide and 4.5 M Urea with and without ME at pH 9.1 (Tris-EDTA Buffer): 1) unheated casein, 2) denatured whey protein, 3) undenatured whey protein.

含有せしめると未加熱の乳清蛋白質自体相互の分離が悪くなり, スロット残分もみられ, 泳動部分はやや鮮明となる。このことから, メルカプトエタノールを含まない泳動図の不鮮明な原因に -S-S- 結合が関係していることが推察される。

なお, カゼインの分離に関しては Fig. 5 (A) と (B) を比較して明らかなように, 尿素を含有しない (A) では, スロットに残存する部分が多く分離も不充分であるが, 尿素を含有する (B) で α_s , β , κ カゼインに分離される。

Fig. 5 (B) のカゼイン分離用の尿素含有ゲルでは, 未加熱の乳清蛋白質自体, 全体に不鮮明となり, 尿素変性を来たしたと考えられ, 変性と未変性間の泳動図上の差異も認められない。これにメルカプトエタノールを入れると泳動図はかなり鮮明となり, これをカゼインの位置と比較すると, α_s , β カゼイン間に大部分の乳清蛋白質が現われることが明らかである。

以上のように, 尿素含有の場合には変性乳清蛋白質と未変性のものとは全く同じ泳動図を示すとともに, 加熱変性により生じた会合分子は, 尿素の作用により再び解離する性質を有することを示している。

要 約

新鮮な牛乳より調製した全カゼイン, 全乳清蛋白質を pH 7.0, 0.02 M 磷酸緩衝液に透析し, 脱脂乳は透析しないでそのまま, 70°, 80°, 90°, 100°, 120° 各 20 分間加熱したときの変化を, ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて未加熱のものと比較した。

(1) カゼインの加熱により, pH 9.1, トリス EDTA 緩衝液, 4.5 M 尿素含有, 7% アクリルアミドゲルを用いる電気泳動では, 120°, 20 分で明らかな変化が認められ, α_s カゼイン, β カゼインが減少し, 全体に拡散した泳動図を示す。

(2) 全乳清蛋白質の加熱により, pH 8.6, 0.03 M ホウ酸緩衝液含有, 8% アクリルアミドゲルを用いる電気泳動では, ゲル孔に入り込めないスロット残分の増加と, β ラクトグロブリンと α ラクトアルブミンの中間を頂点とする全体に拡散した泳動図を示す。

(3) 脱脂乳の加熱により全カゼイン, 全乳清蛋白質単独の加熱にくらべて, スロット残分の増加が著しいが, これは共存する塩類, 糖類の影響や, カゼインと乳清蛋白質との相互作用によるものではないかと思われる。

(4) 熱変性によって会合し, 泳動しない変性乳清蛋白質は尿素および 2-メルカプトエタノールの作用により再び解離して泳動するようになり, 未変性, 変性の別なく, β カゼインにやや重なって, α_s と β カゼイン間に現われる。

本報告の要旨は昭和 41 年 4 月 1 日, 日本農芸化学学会大会シンポジウムで講演した。

- (1) 西川 勲, 阿部宣明, 斎藤健輔: 本誌, **40**, 414 (1966).
- (2) M. P. Thompson, C. D. Kiddy, J. O. Johnston, R. M. Weinberg: *J. Dairy Sci.*, **47**, 378 (1964).
- (3) K. Bell: *Nature*, **195**, 705 (1962).
- (4) 中西武雄, 伊藤敬敏: 本誌, **41**, 130 (1967).
- (5) 山内邦男, 津郷友吉: 同上, **32**, 311 (1961).
- (6) V. Freimuth, E. Ludwig: *Dairy Sci. Abstrs.*, **25**, 1219 (1963).
- (7) D. R. Briggs, R. Hull: *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 2007 (1945).
- (8) G. H. Hartman, A. M. Swanson: *J. Dairy Sci.*, **48**, 1161 (1965).