各種処理による牛乳カゼインの変化に関する研究 (第 10 報)

κ -カゼインの加熱変化

中西 武雄, 伊藤 敏敏
(東北大学農学部畜産利用学教室)

昭和 44 年 9 月 3 日 受理

Studies on the Changes of the Milk Casein by Various Treatments Part X. Changes of the κ -Casein Solution by Heat Treatment

By Takeo NAKANISHI and Takatoshi ITOH
(Laboratory of Chemistry and Technology of Animal Products,
Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

The effect of heat on the κ -casein solution were examined by heating for 30 min at 70~140°C.

The changes in electrophoretic patterns were observed by heating above 110°C. The presence of lactose during heating accelerated the electrophoretic change. Gel-filtration patterns by Sephadex G-200 using buffer containing 7 M urea and 2-mercaptoethanol diffused and spread gradually with increase in heating temperature. The liberation of non protein nitrogen (NPN) and free sialic acid due to heating increased also by heating at higher temperature, but liberation of sialic acid as bound form to NPN was almost identical in solutions heated above 110°C. Addition of NaCl to κ -casein solution loses typically the ability to stabilize α_s -casein in the presence of Ca ion by heating at 90~100°C. The addition of β -lactoglobulin did not decrease stabilizing ability to heating.

In general, heat changes of κ -casein became more distinct according to the increase in heating temperature and showed no specific changes such as observed in rennin reaction.

(Received September 3, 1969)

緒 言

κ -カゼインは牛乳中におけるカゼインミセルの安定性に対して重要な役割をはたしているため、加熱による牛乳の凝固や熱安定性の変化なども、 κ -カゼインの性質の変化と重要な関係を有していることが考えられる。

κ -カゼインの加熱変化については、Yoshino ら⁽¹⁾が、単独溶液についていろいろな面から調べた報告や、加熱によるシアル酸の変化⁽²⁾、 α_s -カゼインに対する安定化作用におよぼす加熱の影響⁽³⁾、あるいは加熱分解によって生じたペプチドの性質⁽⁴⁾などについての報告があるが、まだ研究も少なく、充分な知見が得られていない。

前報⁽⁵⁾においては、 κ -カゼインの加熱による α_s -カゼインに対する安定化力の変化と種々の添加物の影響につ

いて調べ、安定化力は加熱温度によって特徴ある変化を示すことを報告するとともに、 κ -カゼインの加熱変化が牛乳の加熱変化と関連性の深いことを述べたが、今回はこのような変化と関連して、 κ -カゼインの加熱による物理化学的な変化について調べた。

試料および実験方法

1. 試料 κ -カゼインは、Zittle ら⁽⁶⁾の尿素-硫酸法によって調製し、エタノール法によって 3 回精製した。

α_s -カゼインは κ -カゼインを分離した残渣より、Aschaffenburg の方法⁽⁷⁾によって β -カゼインを除去したのち、さらに Zittle らの方法⁽⁶⁾にしたがって調製し、エタノール法によって 2 回精製した。

β -ラクトグロブリンは, Aschaffenburg の方法⁽⁸⁾にしたがって結晶として調製した。

2. κ -カゼイン溶液の加熱方法 pH 7.0 とした 1% の κ -カゼイン溶液を, 硬質試験管内に封管して, 70~140°C で各 30 分間, 既報の方法⁽⁹⁾に従って加熱した。加熱後流水中で急冷し, 一部の試料は凍結乾燥した。

3. デンブングル電気泳動法 前報⁽⁹⁾と同様にして, 7M 尿素と 2-メルカプトエタノールを含んだ, pH 8.6 のトリスクエン酸緩衝液を用いて行なった。

4. ゲル濾過法 加熱後凍結乾燥した κ -カゼイン試料 50mg を, 7M 尿素および 0.02M の 2-メルカプトエタノールを含んだ, pH 7.6 の 0.05M トリス-HCl 緩衝液 3ml に溶解し, 同緩衝液で平衡とした Sephadex G-200 (Pharmacia, Sweden) の 2.2×65cm カラムに添加した。溶出は同じ溶液を用いて 6~8ml/hr の流速で, 約 4°C で行ない, 5ml ずつを分解捕集した。溶出液は 280m μ で吸光度を測定した。

5. 非蛋白態窒素含量 (NPN) の測定法 κ -カゼイン溶液に等量の 24% トリクロル酢酸 (TCA), または等量の pH 4.6 の酢酸緩衝液を加えて濾過し, 濾液中の窒素含量をマイクロケルダール法によって測定した。

6. シアル酸含量の測定法 κ -カゼイン溶液の全シアル酸含量は, H₂SO₄ を 0.1N になるように加えて, 80°C で 60 分間加水分解したのち, pH 4.6 とした濾液について, Warren のチオバルビツール酸法⁽¹⁰⁾にしたがって測定した。遊離シアル酸含量は, κ -カゼイン溶液に pH 4.6 の酢酸緩衝液を等量加えて得た濾液について, 直接 Warren の方法にしたがって測定し, NPN 結合型のシアル酸含量は, この濾液に H₂SO₄ を 0.1N になるように加えて, 80°C で 60 分間加水分解した溶液について測定したシアル酸含量より, 遊離シアル酸含量を減じて求めた。シアル酸の標準品としては, Sigma 社製 (U. S. A.) の合成結晶 N-Acetylneuraminic Acid を使用した。試料として用いた κ -カゼイン中のシアル酸含量は 1.57% (乾物中) であった。

7. α_s -カゼインに対する安定化力の測定法 加熱した pH 7.0 の 1% κ -カゼイン溶液 1ml に, pH 7.8 の 1% α_s -カゼイン溶液 5ml を加え, 30°C に 30 分間保ったのち, 0.14M の CaCl₂ 1ml を加えて (CaCl₂ の最終濃度 0.02M), さらに 30°C に 15 分間保つ。次いで 2000 rpm で 5 分間遠心分離して, 上澄の窒素含量をマイクロケルダール法で測定して安定化力を求めた。1% の κ -カ

ゼイン溶液に 1% の β -ラクトグロブリン, または 0.05M の NaCl を加えて加熱した場合の安定化力の変化も同様にして測定した。

実験結果

1. 加熱によるデンブングル電気泳動的变化

κ -カゼイン溶液を 80~130°C で各 30 分間加熱した場合のデンブングル電気泳動図は Fig. 1 に示すとおりである。

100°C 以下の加熱では泳動図にほとんど変化は認められないが, 110°C 以上の加熱で変化が生じ, 温度の上昇とともに成分間の境界が次第に不鮮明となって, 泳動図が拡散する傾向を示す。 κ -カゼイン溶液にラクトースを 5% になるように加えて, 同様に加熱した場合の泳動図は Fig. 2 に示すが, κ -カゼイン単独の場合に比較して, 同じ加熱温度における変化が一般に強く現われる傾向を示し, 加熱変化は 100°C から認められる。110°C 以上では褐変が顕著となり, 130°C では均質な凝固を形成した。ラクトースを加えて加熱した場合には, κ -カゼインの α_s -カゼインに対する安定化力の低下が著しいことはすでに報告したとおり⁽⁵⁾である。

Fig. 1. Changes in the Starch-gel Electrophoretic Patterns of κ -Casein Solution by Heating.

Run in Tris-citrate buffer, pH 8.6 containing 7M urea and 0.02M 2-mercaptoethanol. One % solution at pH 7.0 was heated for 30 min.

a : Unheated, b : Heated at 80°C, c : at 90°C, d : at 100°C, e : at 110°C, f : at 120°C, g : at 130°C.

Fig. 2. Changes in the Starch-gel Electrophoretic Patterns of κ -Casein Solution Containing 5% Lactose by Heating.

Conditions are same as described in Fig. 1.
a: Unheated, b: Heated at 80°C, c: at 90°C, d: at 100°C, e: at 110°C, f: at 120°C, g: at 130°C.

加熱前の試料において認められる陰極方向に泳動する2成分は、パラ- κ -カゼイン様成分と考えられ、 κ -カゼインの調製過程において生じたものであるが⁽¹¹⁾、加熱温度の上昇に伴ってこのような成分も消失し、 κ -カゼインの加熱分解によってパラ- κ -カゼイン様成分の生ずるようなことはみられなかった。

Fig. 3. Gel Filtration Pattern of Heated κ -Casein by Sephadex G-200.

Fifty mg of κ -casein was eluted by 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 7 M urea and 0.02 M 2-mercaptoethanol using 2.2 × 65 cm column at 4°C. Five ml fractions were collected at a flow rate of 6~8 ml/hr.

—●— Unheated, ...●... Heated for 30 min at 90°C,
—●— at 110°C, —×— at 130°C

Fig. 4. Liberation of NPN from κ -Casein by Heating.

One % solution at pH 7.0 was heated for 30 min.

—●— NPN content in pH 4.6 filtrate,
—○— NPN content in 12% TCA filtrate.

2. 加熱によるゲル濾過溶出曲線の変化

加熱した κ -カゼイン溶液の Sephadex G-200 によるゲル濾過溶出曲線の変化は Fig. 3 に示すとおりである。還元剤と尿素の存在下では、 κ -カゼインの大部分はモノマーとして分画されと考えられるが、未解離のわずかの高分子成分が残っており、最初の部分に溶出される。加熱温度が上昇するにしたがって主成分のピークの溶出範囲が拡がり、ピークが平坦化する傾向を示す。

3. 加熱による NPN の遊離

各加熱温度における κ -カゼインからの NPN 遊離量は Fig. 4 に示すとおりである。TCA による除蛋白濾液および pH 4.6 による濾液中の NPN 量は、いずれも加熱温度の上昇につれてしだいに増加し、とくに 120°C 以上では急増するが、レンニン作用による場合のような特異的な増加曲線を示さない。

4. 加熱によるシアル酸の遊離

κ -カゼインを加熱した場合の全シアル酸含量、および pH 4.6 の濾液中の遊離シア

Fig. 5. Liberation of Sialic Acid from κ -Casein by Heating.

One % solution at pH 7.0 was heated for 30 min.

- Total sialic acid content,
- Liberated sialic acid (free+NPN bound) in pH 4.6 filtrate,
- Free, □ NPN bound.

ル酸量, または NPN に結合したシアル酸量の変化は Fig. 5 に示すとおりである。この場合, 結果は加熱前の全シアル酸量と比較するため, いずれも未加熱の κ -カゼイン溶液の全シアル酸量を 100 とした場合の百分率で表示した。

全シアル酸量は 120°C, 30 分の加熱まではほとんど変化しないが, 130°C 以上の温度ではしだいに減少する。加熱によって κ -カゼインより pH 4.6 の濾液中に遊離の形として分離されるシアル酸の量は, 加熱温度の上昇とともにしだいに増加するが, NPN に結合した形で分離されるシアル酸の量は, 110°C 以上の温度では 18~22 % であり変動しない。これは, シアル酸は加熱によって最初 NPN に結合した形で分離され, その量は加熱温度の上昇とともに次第に増加するが, 高温で加熱した場合には, その一部がさらに分解されて遊離の形に変わってゆくために, NPN 結合型の量があまり変動しないものと考えられる。

これらの結果は, 全カゼインを加熱した場合⁽⁹⁾とほぼ同じであり, また Koning ら⁽²⁾が 120°C で 30 分間加熱した場合の結果と一致する。 κ -カゼインにレンニンを作用させた場合には, シアル酸はグリコマクロペプチドとして, NPN に結合した形で分離されるのに比較して, 加熱した場合には, 一部分は遊離の形として分離される。

5. α_s -カゼインに対する安定化力におよぼす加熱の影響

κ -カゼインを加熱した場合の Ca イオン存在下での α_s -カゼインに対する安定化力の変化および NaCl, β -ラクトグロブリン添加の影響は Fig. 6 に示すとおりである。 $\alpha_s : \kappa$ の割合が 5 : 1 の場合, κ -カゼイン単独溶液の安定化力は加熱温度の上昇とともにしだいに減少するが, 0.05 N の NaCl を含む場合には, 90~100°C 付近で安定化力が極度に低下し, 110~120°C でいくぶん回復する。 β -ラクトグロブリンを κ -カゼインと同じ割合に加えて加熱した場合の安定化力は, 90°C 以上では無添加の場合と比較して良好な結果を示した。

κ -カゼイン溶液に各種の添加物を加えて加熱した場合の, α_s -カゼインに対する安定化力の変化については前報において報告し⁽⁶⁾, 安定化力は 90~110°C で低下し, 110~120°C である程度回復して, 130°C 以上の加熱では再び低下するといった変化を示すことを述べたが, これらの変化のうち, 90°C 付近での安定化力の低下は, 塩類の添加によってとくに顕著に現われることが今回の結果で再確認された。NaCl を加えて加熱した κ -カゼインの安定化力が低下することは, Zittle⁽¹²⁾ も 100°C で 5 分間加熱した κ -カゼイン溶液について認めており, このような変化は塩類の添加によって, 帯電した κ -カ

Fig. 6. The Effect of Heating on the Ability of κ -Casein to Stabilize α_s -Casein in the Presence of Ca Ion.

One % κ -casein solution containing 0.05 M NaCl or 1% β -lactoglobulin at pH 7.0 was heated for 30 min. One ml of heated samples was mixed with 5 ml of unheated α_s -casein ($\alpha_s : \kappa = 5 : 1$) followed by 1 ml of 0.14 M CaCl_2 .

- No additive,
- One % β -lactoglobulin added,
- x— 0.05 M NaCl added.

ゼイン分子間の静電的な斥力が減少するためであろうと述べている。110~120°C での安定化力の部分的な回復については、原因は明らかでないが、加熱による構造的な変化と関係があるものと考えられる。

κ -カゼインは β -ラクトグロブリンとともに加熱することによって、S-S 結合を通して相互作用を生じ^(13,14)、牛乳中でのこのような反応が、 κ -カゼインの α_s -カゼインに対する安定化力を低下させると報告されている⁽¹⁵⁾が、 κ -カゼインに β -ラクトグロブリンを加えて加熱した場合には安定化力が低下が認められず、また κ -カゼインの α_s -カゼインに対する安定化機構に対する SH 基の役割についても充分明らかになっていないため、これらの関係についてはさらに追求する必要がある。

なお κ -カゼインと β -ラクトグロブリンの混合溶液は、130°C で加熱した場合でも白濁は生じることが、凝固は生じなかった。

考 察

κ -カゼイン溶液を 130°C 以上で加熱した場合には、 α_s -カゼインに対する安定化力が失われる⁽²⁾が、このような高温で加熱した場合には、今回の電気泳動的变化などの結果からみて、安定化力の喪失は加熱分解によるものであることが明らかである。牛乳が加熱凝固を起こすような条件で加熱された場合には、 κ -カゼインは当然安定化力を失っているものと考えられる。しかし、NaCl などの塩類を添加した場合の、90°C 付近における安定化力の低下に関連した変化は、電気泳動図等において認めることができず (0.05 M の NaCl を加えて加熱した κ -カゼインの電気泳動図は、添加しないものと比較して相違は認められなかった。泳動図略)、このような変化は、おそらく Zittle⁽¹²⁾ の言うように、静電的な斥力の変化、あるいは高次構造上の変化にもとづくものと考えられるが、これらの解明にはさらに別的手段による追求が必要である。

κ -カゼインの加熱による磷酸や NPN の遊離、蛋白分解酵素による消化性の変化などについてはすでに報告されているが⁽⁴⁾、今回の結果とあわせて、 κ -カゼインの加熱変化は他のカゼイン成分の場合と同様に、一般に温度の上昇とともに次第に顕著となるものであり、加熱分解の過程においてレンニン作用に類似したペプチドの生ずることはあっても⁽⁴⁾、その変化にはレンニン作用のような特異的な変化はみられない。カゼイン成分中で

κ -カゼインがとくに加熱変化を生じやすい成分ではないが、 κ -カゼインはミセル安定化作用に重要な役割をはたしているため、加熱の κ -カゼインにおよぼす影響は、牛乳の加熱によるいろいろな変化と密接な関係を有するものと考えられる。これらの変化はまた、牛乳中に存在する他成分、とくにラクトースやホエー蛋白質との反応によって複雑になるので、これらの関係についても検討しなければならない。

要 約

κ -カゼイン溶液を加熱した場合の変化について調べ、次のような結果を得た。

(1) κ -カゼインを単独で加熱した場合には、110°C 30 分以上の加熱によってデンブング電気泳動図に変化が認められるようになるが、5% のラクトースを含む場合には 100°C、30 分の加熱によって変化する。

(2) 7 M 尿素および 2-メルカプトエタノールを含んだ緩衝液を用いての Sephadex G-200 によるゲル濾過溶出曲線は、加熱温度の上昇とともに主なるピークの溶出範囲が広がり、ピークが平坦化する。

(3) 加熱による NPN および遊離のシアル酸量は、加熱温度の上昇とともに増加するが、NPN 結合型のシアル酸量は、110°C 以上の加熱では、温度によってあまり変動しない。

(4) κ -カゼイン溶液を 90°C 付近で加熱した場合の α_s -カゼインに対する安定化力の低下は、とくに NaCl などの塩類を添加した場合、顕著に現われることが確認された。 β -ラクトグロブリンを添加しても、安定化力がとくに低下することはなかった。

(5) κ -カゼインの加熱による変化は、一般に加熱温度の上昇とともに顕著となるものであり、レンニン作用による場合のような特徴ある変化は示さない。

- (1) U. Yoshino, M. Samuro, K. Yamauchi and T. Tsugo: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 82 (1964).
- (2) P. J. De Koning, J. Jenness and H. P. Wijnand: *Neth. Milk Dairy J.*, **17**, 352 (1963).
- (3) C. A. Zittle: *J. Dairy Sci.*, **44**, 2101 (1961).
- (4) C. Alais, N. Kiger and P. Jollés: *ibid.*, **50**, 1738 (1967).
- (5) T. Nakanishi and T. Itoh: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1270 (1969).
- (6) C. A. Zittle and J. H. Custer: *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183 (1963).
- (7) R. Aschaffenburg: *J. Dairy Res.*, **30**, 259 (1963).

- (8) R. Aschaffenburg and J. Drewry : *Biochem. J.*, **65**, 273 (1957).
(9) 中西武雄, 伊藤敏敏 : 農化, **41**, 130 (1967).
(10) L. Warren : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971 (1959).
(11) 中西武雄, 伊藤敏敏 : 農化, **43**, 866 (1969).
(12) C. A. Zittle : *J. Dairy Sci.*, **52**, 12 (1969).
(13) W. H. Sawyer and S. T. Coulter : *ibid.*, **46**, 564 (1963).
(14) G. H. Hartman, Jr. and A. M. Swanson : *ibid.*, **48**, 1161 (1965).
(15) 吉野梅夫, 竹本 平, 山内邦男, 津郷友吉 : 日畜会報, **40**, 299 (1969).
-