脂肪エマルジョンの皮膜形成に関与できる 牛乳蛋白質について

伊藤 徹敏, 中西 武雄
(東北大学農学部畜産利用学教室)

昭和 48 年 10 月 3 日 受理

On the Milk Protein Fractions Contributing to Make Fat Globule Membrane of Fat Emulsion

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

The milk protein components contributing to make stable fat emulsion by adsorbing on the fat globule when fat was emulsified in milk were separated and examined electrophoretically.

The fat globule membrane material (F.G.M.) from homogenized raw milk contained more milk protein components than F.G.M. from original milk, though its proportion differed by the extent of homogenization.

Fat emulsifying material (F.E.M.) obtained by emulsifying butter fat in casein solution was composed mainly from TS- and γ -casein. α_s - and β -casein were also involved when homogenized extremely. Para κ -casein was main component of F.E.M. from casein solution treated with rennet. F.E.M. from acid whey and rennet whey was constituted mainly from β -lactoglobulin and immune globulin. These components of F.E.M. from casein and whey differed according to the method and the extent of emulsification and the amount of fat added.

Emulsifying capacity of casein solution compared by extraction of free fat with petroleum ether was decreased by treatment with rennet, addition of Ca ion and lowering of pH. Rennet whey showed higher emulsifying capacity than acid whey when small amount of fat was emulsified.

(Received October 3, 1973)

緒 言

牛乳中に存在する脂肪は脂肪球膜によってつまれ、安定なエマルジョンとして分散している。このような脂肪球膜 (F. G. M.) の由来については多くの研究が行なわれた結果、それが乳腺細胞の細胞膜や細胞質より構成されていることが明らかにされてきた⁽¹⁾。また最近の研究では、特に細胞膜と脂肪球膜成分の類似性の高いことが報告されている^(2,3)。

ところで牛乳脂肪を均質化によって微細粒子とした場合、脂肪球の表面積が増大するのにもなって、本来の脂肪球膜成分に加えて、新たに牛乳中の蛋白質などが加

わって表面をおおう膜成分を形成し、安定な乳化状態の保たれることが知られており、このときカゼインやホエー蛋白質の一部が関与すると考えられている⁽⁴⁾。また一方、脱脂乳やホエーに脂肪を添加して均質化させた場合にも十分に安定な乳濁液を得ることができ、この場合にも牛乳蛋白質の一部が分散された脂肪の表面に分布して、乳濁液の保持にあずかると考えられている⁽⁵⁾。このように一部の牛乳蛋白質は、脂肪を乳化させた場合本来の脂肪球膜と同様に、乳濁液を安定に保持する効果をもっているが、どのような成分が効果をもたらすかについてはまだ十分知られていないので、本報告では皮膜成分として関与してくる成分のうち、特に蛋白質成分につい

て調べた。

実験方法

1. 脂肪球膜物質 (F.G.M.) の調製法 牛乳よりの F.G.M. の調製は Fig. 1 に示すような方法に従って行なった。カゼイン溶液あるいはホエーに脂肪を加えて乳化した試料よりの F.G.M. の調製も、同じ方法で行なった。電気泳動の研究を主目的としたため、脂質の抽出はヘキサンを用いて行なった。

2. カゼイン溶液の調製およびレンネット処理 脱脂乳に 0.1N HCl を加えて pH 4.6 でカゼインを等電点沈殿させ、水洗後溶解、沈殿の操作を 1 回くりかえしたのち、0.1N NaOH で溶解し pH 4.6 の溶液とした。ケルダール法により窒素含量を測定し、必要濃度に希釈して使用した。レンネット処理は、カゼイン溶液にレンネット粉末 (ハンゼン社製) の水溶液を、濃度が 0.01% になるように加えて 35°C に 15 分間保持したのち、80°C の湯浴中で 10 分間加熱して行なった。

3. 酸ホエーおよびレンネットホエーの調製 酸ホエーは、試薬添加による希釈を少なくするために、脱脂乳に 2N HCl を加えて pH 4.6 でカゼインを沈殿させて分離し、2N NaOH により pH を 6.7 に調整したものを使用した。レンネットホエーは、脱脂乳にレンネット粉末 (ハンゼン社製) の水溶液を濃度が 0.01% になるように加え、35°C に 15 分間保ってカゼインを凝固させて調製した。

4. 均質化の方法 均質機を用いて均質化を行なう場合には、三丸製作所製小型ホモジナイザー H 10 型を使用し、50°C に加温して 150 kg/cm² の圧力で行なっ

た。脂肪を添加する試料の場合には、ミキサーであらかじめ攪拌して脂肪を分散させたのち均質機に通した。

5. デンブングル電気泳動法 Schmidt⁽⁶⁾ の方法に準じ、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 8.6 の 0.076M トリス-クエン酸緩衝液を電極液として用いて行なった。泳動後ゲルをアミドブラック 10B によって染色した。

6. カゼインのクロロホルム・メタノールによる抽出 酸沈殿させた湿カゼインに、クロロホルム・メタノール (2:1) を加えてはげしく攪拌して 2 回抽出し、溶媒相に 1/5 量の水を加え、上層と中間層を取り、水に対して透析したのち濃縮して凍結乾燥した。

7. 乳化力の測定法 カゼイン溶液またはホエー 150ml にバター脂肪を添加し、50°C に加温して日本精機製攪拌式ホモジナイザー HC 型を用い、18,000rpm で 60 秒間攪拌する。60°C の湯浴中に 30 分間保持したのち 3000rpm で 15 分間遠心分離する。クリーム層をビーカーにとり、石油エーテル (45~60°C 留分) 20ml を加えて 30~35°C に加温しながら、ゆるやかにかきまぜ遊離脂肪を抽出する。20ml ずつを用いて 4 回抽出をくりかえし、遠沈管内も石油エーテルで洗って全抽出液を合わせ、溶媒を留去する。抽出された脂肪量を秤量して、添加した全脂肪量に対する抽出された遊離脂肪量の割合を求め、乳化力とした。

実験結果

1. 牛乳の F.G.M. の組成

牛乳より分離した F.G.M. の組成と、その均質化による変化等をデンブングル電気泳動法によって調べた結果は、Fig. 2 に示すとおりである。

牛乳よりの F.G.M. はクリームを 0.25M シュークロース液で 3 回洗浄した段階 (c) では α_s や β -カゼインが含まれているが、6 回洗浄すると (d) このような成分はほとんど除去され、7M 尿素に可溶の泳動性成分が少なくなり、原点にとどまる成分が大部分をしめるようになる。ここで残った成分が、特に細胞膜由来の成分と考えられる。原料乳を 150 kg/cm² で 2 回均質化したのち分離した F.G.M. の組成は、クリームの洗浄回数が 3 回の場合には (e)、やはりカゼインが含まれているが、6 回洗浄後では (f) これらの成分はごく少量となる。しかし、均質化しない牛乳よりの F.G.M. に比較して、可溶性で泳動性のある成分が増加することが認められた。

Fig. 1. Procedure for the Isolation of Fat Globule Membrane Material.

Fig. 2. Starch Gel Electrophoresis of Fat Globule Membrane Material (F.G.M.) from Raw Milk and Homogenized Milk.

a : whole casein, b : whole whey protein, c : F.G.M. from raw milk, washed 3×, d : F.G.M. from raw milk, washed 6×, e : F.G.M. from raw milk homogenized 2× at 150 kg/cm², washed 3×, f : the same as e, washed 6×, g : the same as e, homogenized 6×, washed 6×.

均質化の回数を増すと (g), その成分には, さらに α_s -カゼインや β -ラクトグロブリンの一部とみられる易動度の高い成分が加わり, 可溶性区分のいっそう増加することが認められた. このような成分の増加は, 牛乳蛋白質の一部が, 均質化によって表面積の増加した脂肪球の皮膜形成にあずかっていることを示している.

2. カゼインおよびホエー中の脂肪乳化成分について
カゼイン溶液にバター脂肪を加えて均質化した乳濁液より分離した皮膜物質 (以下牛乳中の本来の F.G.M. と区別して, 脂肪乳化成分 F.E.M. と表示する) についての結果は Fig. 3 に示す.

pH 6.7 の 0.5% Na-カゼイン溶液に 5% のバター脂肪を加え, 150 kg/cm² で 2 回均質化して得たエマルジョンから, 牛乳の F.G.M. 調製法に準じて分離した F.E.M. は, c に示すように, 主として TS-カゼインおよび γ -カゼインからなっていることが認められ, これらの成分がカゼイン中でも特に脂肪表面に吸着されやすいことが知られた. レンネット処理をした Na-カゼイン溶液を用いて同様な実験をした場合には, d に示すように F.E.M. 中にパラ κ -カゼインが多量に含まれてきた.

Fig. 3. Starch Gel Electrophoresis of Fat Emulsifying Material (F.E.M.) from Casein Solution.

A five % of butter fat was emulsified in the casein solutions of pH 6.7 by homogenization at 150 kg/cm². Cream separated was washed 6× with 0.25M sucrose solution.

a : whole casein, b : whole casein treated with rennet, c : F.E.M. from Na-caseinate solution, homogenized 2×, d : F.E.M. from Na-caseinate solution treated with rennet, homogenized 2×, e : chloroform-methanol (2:1) extractable fraction from whole casein, f : chloroform-methanol (2:1) extractable fraction from whole casein treated with rennet, g : the same as c, homogenized 6×, h : the same as d, homogenized 6×.

次に, これら両試料について均質化処理を 6 回行なった場合の F.E.M. の組成は, g および h に示すが, 2 回の均質化で得た c および d でみられた成分に加えて, α_s -および β -カゼインならびにその中間に泳動する微量のカゼイン成分が含まれてくることが認められた. なお均質化の回数が少ない場合でも, 脂肪量を増加すると同様な傾向のみられることを観察しており, 脂肪の表面積が特に増加した場合には, α_s -や β -カゼインの一部も, F.E.M. として関与するものと考えられた.

一方, 牛乳やカゼインをクロロホルム・メタノール (2:1) で抽出すると, カゼインの一部が溶出してくることが Cerbulis ら⁽⁷⁻⁹⁾によって認められている. この成分は e に示すように, 主として TS- および γ -カゼインからなっており, c に示される F.G.M. と類似してい

Fig. 4. Starch Gel Electrophoresis of Fat Emulsifying Material (F.E.M.) from Rennet Whey and Acid Whey.

A five % of butter fat was emulsified in the whey of pH 6.7.

a: whey protein, b: F.E.M. from acid whey emulsified by vigorous agitation, c: F.E.M. from rennet whey emulsified by vigorous agitation, d: F.E.M. from rennet whey emulsified by homogenization 6× at 150kg/cm².

た。なおレンネットカゼインからはパラ κ-カゼインは溶出されてこなかった(f)。

次に、酸ホエーおよびレンネットホエーにバター脂肪を加えて乳化させた場合の F.E.M. の組成は、Fig. 4 に示すとおりである。まず d に示すように、レンネットホエーに脂肪を加えて 150 kg/cm² で 6 回の均質化処理を行なった場合の F.E.M. は、主要なホエー蛋白質成分のすべてを含んでいることが認められた。この場合、均質化の過程において試料溶液が次第に白濁し、ホエー蛋白質の凝固するのが認められ、このような機械的な処理によって不溶性となったホエー蛋白質の一部が脂肪に吸着してくることが考えられたので、次に均質機を用いずに攪拌器（日本精機製ホモジナイザー HC 型）により、18,000 rpm で攪拌することによって乳化させた乳濁液より分離した F.E.M. は、b および c に示すとおりである。b は pH 6.7 の酸ホエー、c はレンネットホエーを用いたものであるが、いずれも免疫グロブリンおよび β-ラクトグロブリンを主成分とし、さらに β-ラクトグロブリンよりも易動度の高い微量の数成分よりなっており、α-ラクトアルブミンや血清アルブミンは含まれてこなかった。微量成分はホエー蛋白質中に本来含まれている成分が、処理によって生じたものかは不明である。なお酸ホエーを用いた場合、レンネットホエーに比較して脂肪の乳化状態がこわれやすく、クリームの洗浄中に脂肪が次第に塊状を呈した。また、酸ホエーよりの

Fig. 5. Starch Gel Electrophoresis of Fat Emulsifying Material (F.E.M.) from Skim Milk.

A five % of butter fat was emulsified by homogenization 3× at 150 kg/cm². Cream separated was washed 6× with 0.25M sucrose solution.

a: whole casein, b: whole whey protein, c: F.E.M. from skim milk, d: F.E.M. obtained by reemulsifying in the liquid phase from c, e: F.E.M. obtained by reemulsifying in the liquid phase from d.

F.E.M. 中には、7M 尿素に不溶性で非泳動性の成分がかなり含まれているのが認められた。

脱脂乳に脂肪を加えて乳化させた場合の F.E.M. の組成は、Fig. 5 に示すとおりである。この場合、脱脂乳に 5% のバター脂肪を加えて 150 kg/cm² で 3 回均質化したのち、遠心分離によってクリームを分離し、液相中に新たに 5% のバター脂肪を加えて均質化してクリームを分離するといった操作を 3 回くりかえして得たクリームを、それぞれ 6 回洗浄して F.E.M. を分離した。

いずれの場合も F.E.M. の組成は類似しており、α_s-, β-, γ-, TS-カゼインおよび β-ラクトグロブリン等から構成されているのが認められたが、初回では TS-カゼインが比較的多く、回数が増すにつれて α_s-カゼインの割合が高くなる傾向にあった。また 2 回目までの F.E.M. にはパラ κ-カゼインが多く含まれており、牛乳中ですでに κ-カゼインの分解により生じていたものが吸着されたものと思われる。

3. 乳化力の比較

0.5% のカゼイン溶液にバター脂肪を加えて攪拌し、石油エーテルで抽出される脂肪量を求め、添加した脂肪量に対する割合によって乳化力を比較した結果は Fig. 6 に示すとおりである。Na-カゼイン溶液の場合には、脂肪添加量が 20% までは遊離の脂肪量が少なく、よく乳

Fig. 6. Emulsifying Ability of Casein Solution.

Butter fat was emulsified by vigorous agitation in 0.5% casein solution of pH 6.7.

○ Na-caseinate, × Ca-caseinate (Ca, 25 mg), ● Na-caseinate treated with rennet.

Fig. 7. Effect of pH on the Emulsifying Ability of Casein Solution.

Butter fat was emulsified by vigorous agitation in 0.5% Na-caseinate solution.

○ 20% fat, × 15% fat.

化されるが、脂肪量が20%を越えると乳化されないで遊離状態となる脂肪量が増加してくる。Ca(OH)₂を用いて溶解したCa-カゼイン溶液(Ca 25mg%)の場合には、Na-カゼイン溶液に比較して乳化力が弱く、全体を通して約2倍量の脂肪が遊離状態として抽出された。Na-カゼイン溶液をレンネット処理しておいた場合には、脂肪の乳化力がさらに低下し、遊離の脂肪量が増加した。この場合、F.E.M.の組成はFig. 3-dに示されるようにパラκ-カゼインが多量に含まれることから、レンネット処理によって乳化力の増加することが期待されたが、逆に低下するといった結果を示した。

Fig. 7はpHを変化させた場合のNa-カゼイン溶液の乳化力の変化を示す。pHが6.5以下になると乳化力が急激に低下することが認められた。

Fig. 8. Emulsifying Ability of Acid Whey and Rennet Whey.

Butter fat was emulsified by vigorous agitation in whey of pH 6.7.

○ rennet whey, × acid whey.

レンネットホエーおよび酸ホエーを用いて、乳化力の比較を行なった結果はFig. 8に示す。脂肪量が20%以下の場合には、酸ホエーの方がレンネットホエーよりも乳化力が少し低い、脂肪量の多い所では両者の乳化力はほぼ同じとなる。酸ホエーの場合、カゼインを等電点沈殿させたのちpHを6.7に調整してしばらく放置すると、蛋白質の一部が沈殿するのがみられるが、このために乳化に関与する蛋白質量が多少低くなることが考えられる。

考 察

牛乳を均質化した場合、得られるF.G.M.の組成は、本来のF.G.M.のほかに表面積の増加した脂肪球の皮膜を形成する成分として牛乳蛋白質の一部が関与してることが認められたが、その組成は均質化の程度によってかなり異なってくる。カゼインの単独溶液に脂肪を乳化させた場合の乳化に関与する成分としては、TS⁻およびγ-カゼインが主なものであることが認められたが、これらの成分は、またクロロホルム・メタノールで抽出されるカゼイン成分とも類似していることが知られた。TS-カゼインやγ-カゼインはβ-カゼインのフラグメントであると考えられているが^(10,11)、β-カゼインよりもリン酸基や親水性アミノ酸が少なく、特に疎水性の強い性質を持っており、そのために脂肪球の表面に強く吸着されたり、溶媒によって抽出されるものと考えられ、脂肪への吸着には特に疎水性結合が関与していると推定される。

カゼイン溶液をレンネット処理しておくと、F.E.M.

にはパラ κ -カゼインが多量に含まれてくるが、この場合、パラ κ -カゼインは等電点がアルカリ側にあることから、静電結合も関与していることが考えられる。しかし、 γ - や TS-カゼインに比較して疎水性アミノ酸が必ずしも多くないこと、パラ κ -カゼイン自体が非常に凝集しやすい性質のあることなどから考えて、脂肪に吸着されやすいにもかかわらず、脂肪球全体をおおった形で安定な皮膜を形成しないため、TS- や γ -カゼインの吸着をさまたげて、カゼインの乳化力をむしろ低下させる原因となると考えられる。

カゼイン溶液が Ca を含む場合も乳化力が低下するが、これはミセルが形成されるためにカゼイン成分の脂肪球への吸着が阻害されることによるものと考えられる。

ホエーを用いた場合には、 β -ラクトグロブリンや免疫グロブリンが主として乳化に関与する成分であることが認められたが、これらの成分はアルブミン系の蛋白質に比べて比較的疎水性が強いいため、脂肪に吸着されやすいものと考えられる。なお過度の均質化や加熱によってホエー蛋白質が凝固した場合には、表面疎水域の増大によって油との親和性が増し吸着されやすくなるが、この場合は脂肪球全体をおおう皮膜として吸着されないため安定な乳化状態が得られない。0.5% の Na-カゼイン溶液とホエー（粗蛋白質含量 0.7%）の乳化力を比較してみると、同じ条件下でカゼイン溶液では脂肪が 20% 程度まで乳化されるのに対し、ホエーでは 15% 程度までであり、ほぼ同じ蛋白質含量においてカゼインの乳化力の方が高いといえる。

脂肪エマルジョン生成に関与する牛乳中の蛋白質成分については以上のとおりであるが、さらに実験条件を種々変化させて調べた結果から、F.E.M. の組成は乳化の条件によって非常に異なってくるものであり、脂肪の添加量、均質化の程度、溶液の pH などを変化させると脂肪球皮膜を形成する成分の割合が変化し、また種々の成分が共存する場合にも影響をうけることが観察された。

なお、牛乳以外の蛋白質の脂肪乳化力については、例えば柴崎ら⁽¹²⁾は、大豆乳について調べており、やはり特定の蛋白質が脂肪に吸着されやすいことを認めている。また児島⁽¹³⁾は、ベンゼンに対する血清や尿の蛋白質の乳化力を比較している。

分の他に牛乳蛋白質の含まれてくることが認められた。

カゼイン溶液に脂肪を乳化させた場合、皮膜を形成する成分としては、TS- や γ -カゼインがおもなものであることが認められたが、均質化の回数が増すと α_s - や β -カゼインも含まれてきた。レンネット処理をしたカゼインを用いると、パラ κ -カゼインが含まれてきた。

ホエーに脂肪を乳化させた場合には、膜成分は主として β -ラクトグロブリンと免疫グロブリンによって構成されていた。これら皮膜物質の組成は、脂肪を乳化させる場合の方法や程度、脂肪の添加量などによって異なることが認められた。

カゼイン溶液の乳化力を比較した結果、Ca を添加したり、レンネット処理をすると乳化力が低下し、また pH が低くなると乳化力が著しく減少することが認められた。酸ホエーとレンネットホエーでは、脂肪添加量の少ないとき酸ホエーの方が乳化力が低かった。

- (1) J. R. Brunner: "Fundamentals of Dairy Chemistry," ed. by B. H. Webb and A. H. Johnson, AVI. Pub. Co., Westport, Conn., 1965, p. 440.
- (2) T. W. Keenan, D. J. Morré, D. E. Olson, W. N. Yunghans and S. Patton: *J. Cell Biol.*, **44**, 80 (1970).
- (3) T. W. Keenan, D. E. Olson and H. H. Mollenhauer: *J. Dairy Sci.*, **54**, 295 (1971).
- (4) R. H. Jackson and J. R. Brunner: *ibid.*, **43**, 912 (1960).
- (5) 小山 進: 農化, **34**, 912 (1960).
- (6) D. G. Schmidt: *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 411 (1964).
- (7) J. Cerbulis: *J. Agr. Food Chem.*, **16**, 646 (1968).
- (8) *idem*: *Milchwiss.*, **24**, 140 (1969).
- (9) J. Cerbulis and J. H. Custer: *J. Dairy Sci.*, **50**, 1356 (1967).
- (10) W. G. Gordon, M. L. Groves, R. Greenberg, S. B. Jones, E. B. Kalan, R. E. Peterson and R. E. Townend: *ibid.*, **55**, 261 (1972).
- (11) B. Ribadeau-Dumas, G. Brignon, F. Grosclaude and J. C. Mercier: *Eur. J. Biochem.*, **25**, 505 (1972).
- (12) 柴崎一雄, 大久保一良, 佐藤隆生: 食品工誌, **19**, 580 (1972).
- (13) 児島和男: 生化学, **32**, 118 (1960).

要 約

牛乳を均質化すると脂肪球膜物質として、本来の膜成