ノート

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 59, No. 5, pp. 519~522, 1985]

牛乳の熱安定性：カゼインミセルの Ca 塩の形態と γ -カゼイン A 型との関係

宮辺豊紀，友井弘二
(香川大学農学部食品学科)

昭和 59 年 8 月 20 日 受理

Heat-Stability of Cow Milk : Relationship between Calcium-Salts Formed and γ -Casein A in Casein Micelle

Toyoki MIYABE and Koji TOMOI
Department of Food Science, Faculty of
Agriculture, Kagawa University, Miki-cho,
Kagawa-ken 761-07

Milk heat-stability increased with a pH-rise when heated to 123°C at pH of 6.4 to 7.2. As the content of colloidal calcium phosphate [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] in micelle increased in parallel with a pH-rise, this calcium salt seemed to have an action of dissociating the casein micelle. It seemed that the portion of the peptide chain (unknown substance) containing 4 molecules of Ser-P, which was produced when β -casein was changed to γ -casein, associated to α_s -casein, contributed to the combination of calcium phosphate, and fulfilled a role to keep the stable micelle structure. Addition of γ -casein A to type-B milk further increased calcium phosphate in micelle and presumably formed a complicated caseinate complex. The conversion of type-B milk into type-A milk by γ -casein A seemed to be due to the reduction of calcium phosphate and κ -casein.
(Received August 20, 1984)

牛乳の pH-熱安定性については，最初，Rose^(1,2)が牛乳の pH と熱安定性の間に重要な関係があることを見出して以来，数多くの報告⁽³⁻⁸⁾が行われている。牛乳の熱安定性については，Fox & Morrissey⁽⁹⁾の総説がある。牛乳には pH 6.4~7.4 の狭い範囲において，pH 6.9 付近で，熱不安定となる A 型乳と pH の上昇とともに

に熱安定性が漸次，上昇する B 型乳とがある。 γ -カゼイン A 型は， Ca^{2+} -insensitive といわれている⁽¹⁰⁾が，詳細は不明である。また， γ -カゼインは， β -カゼインの分解により生成する⁽¹¹⁻¹³⁾。著者らは，B 型乳に γ -カゼイン A を添加すると，A 型乳に転換するという新しい現象を見出した。B 型乳および γ -カゼインを添加した場合，上記の pH 範囲で，自然状態の生乳中のカゼインミセルの Ca 塩の形態とカゼイン成分がどのように変化して，熱安定性に影響を及ぼしているかについて調べたので報告する。

実験方法 γ -カゼイン A はホルスタイン種の個体乳より分離・精製⁽¹⁴⁾し，4 M 尿素・ディスク電気泳動法^(15,16)とデンストロールにより純度を確認し，100% 純粋であった。個体乳の 60% 以上が A₂ 型といわれている⁽¹⁴⁾ので，A₂ 型の可能性が高い。牛乳の熱安定試験は，ホルスタイン種の約 300 頭の混合乳を用いた。 γ -A 1 mg をトリス緩衝液 0.1 ml に溶解して，脱脂乳 1 ml に加えた。123°C，1.2 気圧のオートクレーブで加熱して測定した。カゼインミセルの分画は，セファデックス G-150 のゲル濾過 (2.5×30 cm カラム，4°C，試料乳 10 ml) を行い，水を溶媒とした⁽¹⁷⁾。 γ -A の添加割合は，上記と同じである。宮辺ら⁽¹⁷⁾は，水溶媒のゲル濾過により得られたミセル中のミネラルを結合型，遊離したミネラルを吸着型としている。窒素はケルダール法，リンは Fiske & Subbarow 法により，全リン (Pw)，無機リン (Pi)，エステルリン (Pe) を測定した。Ca は原子吸光法によった。クエン酸はピリジン・無水酢酸法によった。ミセル中の Ca の計算法は，著者らのモデル計算法により，Pi はすべて，コロイド性無機リンとして， $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 量を算出し，クエン酸は 2 カルシウムの形で存在するものとして， Ca_2 -citrate 量を算出し，全 Ca より，これらの Ca を差引いて，カルボキシル基に結合する $-\text{COOCa}-$ 量として示した。カゼイン成分比は，4 M 尿素・電気泳動とデンストロールによった。

実験結果・考察 B 型乳に γ -A を加えると，A 型乳に転換した (Fig. 1)。水溶媒によるゲル濾過で得たカゼインミセルを分析に供したので，イオン結合型の Ca 塩の形態である (Table I, Fig. 2)。B 型乳および γ -A 添加の場合ともに，コロイド性リン酸カルシウム [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] 量は，pH の上昇とともに増加した。 γ -A を添加すると，リン酸カルシウムの結合量は，いっそう増加した。pH 7.0 点 (熱不安定化，A 型乳転換) では，この

Fig. 1. The pH-Heat Stability of Milk. Type-B milk (○) showed a linear increase of heat stability with the high pH value. Type-B milk plus γ -casein A (●) was changed into type-A milk, although not a typical curve, which was unstable at pH 6.9. Type-A milk (×) is unstable near at pH 6.8.

Ca 塩の結合量が若干, 減少し, 反対に $-\text{COOCa}-$ 量は増加した。この結果から, セリンリン酸エステルとして, カルシウム・アパタイト塩の形で結合するリン酸カルシウムは, カゼインの分子間の会合を切断する働きがあるものと推定された。Ca₂-citrate は, ミセル中の結合量が大きいほど, 乳安定化の傾向にあったが, その役割は不明確であった。Rose⁽¹⁸⁾ によると, アパタイト塩の構造のなかで, 2価のクエン酸は H^+ イオンと交換した形で結合している。ミセル中のカゼイン成分比は Table II に示した。B 型乳では, pH の上昇とともに, β -カゼインを減少して, γ_1 -カゼインと未知物質を増加し

Fig. 2. Effect of γ -Casein A on the Composition of Calcium Salts in Casein Micelle when Heated at 123°C. This figure was illustrated from Table I. The content of colloidal calcium phosphate $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ in casein micelles showed more increased percentages in type-B milk plus γ -casein A (B) than in type-B milk (A).
 ■, Ca of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; ▨, Ca of Ca_2 -citrate; □, Ca of $-\text{COOCa}-$.

た。これは β が一部, 分解して γ_1 に変化し, この際, 生成した残りのペプチド鎖の部分 (N 末端から 28 番目までの鎖で Ser-P 4 分子と Glu 7 分子を含む) が未知物質として増加したものと推定された。 α_s と未知物質は相関的に増加するので, Ser-P 含量の多い未知物質が α_s と会合し, リン酸カルシウムを結合して, ミセル構造を安定にする役割を果たすものと判断された。pH 7.0 点では, κ が増加し, γ_2 が減少して, 逆相関を示した。糖蛋白で安定カゼインである κ と温度に sensitive な γ_2 との間のこの pH 点での相関作用は, おそらく熱安定性に影響を及ぼしているものと考えられた。次に, B 型乳に γ -A を添加した場合, β は酸性側で, α_s はアルカリ側で減少した。 α_s と未知物質は, pH の上昇とともに減少するので, この両者が同じ挙動をして相互作用するが, γ とくに, γ_1 と γ_3 が顕著に増加し, また, α_s , β , κ , γ の各カゼインの間に, 何ら, 相関がないのに, リン酸カルシウムの結合量は増加するので, γ -A の添加の場合

Table I. Effect of γ -Casein A on the Composition of Calcium Salts in Casein Micelle when Heated at 123°C

Sample	pH	mM/g Casein N								
		Ca	Pi ^a	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Ca of Ca ₃ (PO ₄) ₂	Ca except of Ca ₃ (PO ₄) ₂	Cit. ^a	Ca ₂ -Cit. ^a	Ca of Ca ₂ -Cit.	$-\text{COOCa}-$
TBM ^b	6.6	3.08	0.02	0.10	0.04	3.04	0.29	0.41	0.12	2.92
	7.0	4.06	0.30	1.50	0.58	3.48	0.31	0.44	0.13	3.35
	7.2	3.48	0.36	1.80	0.70	2.78	0.35	0.50	0.15	2.63
TBM ^b plus γ -casein A	6.6	2.62	0.05	0.25	0.10	2.52	0.24	0.34	0.10	2.42
	7.0	3.85	0.31	1.55	0.60	3.25	0.21	0.30	0.09	3.16
	7.2	3.48	0.45	2.25	0.87	2.61	0.27	0.38	0.11	2.50

^a Pi (inorganic P), Cit. (citric acid), Ca₂-Cit. (calcium citrate); ^b TBM (type-B milk).

Table II. The Protein Constituent of Casein Micelle Obtained by Gel Filtration of Type-B Milk (TBM) and TBM plus γ -Casein A on Sephadex G-150 Column

Sample	pH	%						
		γ_2	γ_3	γ_1	β	κ	α_s	Unknown
TBM	6.6	3.2 (100)	2.7 (100)	2.0 (100)	38.9 (100)	9.2 (100)	42.6 (100)	1.4 (100)
	7.0	1.2 (38)	2.1 (78)	3.0 (150)	36.9 (95)	11.6 (126)	43.3 (102)	1.9 (136)
	7.2	2.9 (91)	2.0 (74)	5.9 (295)	35.9 (92)	7.9 (86)	43.4 (103)	2.0 (143)
TBM plus γ -casein A	6.6	1.4 (100)	2.1 (100)	4.1 (100)	32.3 (100)	9.6 (100)	48.2 (100)	2.3 (100)
	7.0	4.4 (314)	4.0 (191)	4.8 (117)	35.5 (110)	8.4 (88)	42.4 (88)	0.5 (22)
	7.2	2.9 (207)	4.4 (210)	5.8 (142)	35.4 (110)	9.6 (100)	40.0 (83)	1.7 (74)

は、複雑なカゼイネイト複合体を形成するものと推定された。また、 γ -A の添加による B 型乳から A 型乳へ転換した原因は、pH 7.0 点でのミセル中の未知物質の減少に起因するリン酸カルシウムの結合量の減少および安定カゼインである κ の減少によるものと判断された。なお、 γ_2 の増加も不安定化に関与しているかもしれないが明瞭ではない。

山内ら⁽¹¹⁾、上野川ら⁽¹²⁾は、プロテアーゼによって、 β から TS および R に分解することを認めている。Tessier ら⁽¹⁹⁾は、 β -ラクトグロブリンが A 型乳から B 型乳へ、Pyne ら⁽²⁰⁾は、 κ が A 型乳から B 型乳へ転換させることを認めている。山内ら⁽²¹⁾は、コロイド相中の Ca と添加 Ca イオンの相互交換率を調べた結果、100°C、30 分の加熱により、可溶性 Ca の一部が若干、コロイド相へ移行することを認めている。祐川ら、仁木らによると、UHT 殺菌乳、滅菌乳の可溶性 Ca、P は、10% と 13% だけ減少し⁽²²⁾、2~4°C、48 時間の冷蔵で、ほとんどとの値にもどる⁽²³⁾という。Payens⁽²⁴⁾によると、 α_s は折りたたまれた構造で存在し、リン酸カルシウムは大部分、ミセルの表面に存在するという。Morr⁽²⁵⁾ や Rose⁽²⁶⁾ は、 β のポリマーに α_s の一部が会合し、コロイド性リン酸カルシウムがミセルの構造を保持し、Ca イオンにより、サブユニットは κ の存在しない部分で凝集し、 κ がミセルの表面にあれば抑制するという。本実験では、 β から γ に変化する際に生成するペプチド鎖 (Ser-P 4 分子含有) が、 α_s と挙動をともにして、コロイド性リン酸カルシウムの結合に関与すること、B 型乳に γ -A を添加すると、複雑なカゼイネイト複合体を形成して、リン酸カルシウムの結合量を増加させることなどが認められた。また、 γ -A の添加により、ミセル中の γ (γ_1 , γ_2 , γ_3) の結合量を増加するが、円偏光二色性 (CD) 曲線に微妙な変化があり、UV スペクトルにも変

化があった。 β から γ_1 生成の際の未知物質は β の N 末端から 28 番目までのペプチド鎖であるが、この部分の短い鎖中には、Ser-P の 4 分子と Glu の 7 分子を含んでいるので、前者は、リン酸カルシウムの結合、後者は、グルタミン酸のカルボキシル基が水素結合あるいはイオン結合をしやすい物質である。おそらく、 α_s と会合すると判断された。また、 γ -A の添加で、 α_s が減少するのは、 α_s - γ 複合体を形成して、分子量の小さい複合体となって、ミセルから遊離するためであろう。なお、不明の点も多いが、詳細は今後の研究に待ちたい。

- (1) D. Rose : *J. Dairy Sci.*, **44**, 430 (1961).
- (2) D. Rose : *J. Dairy Sci.*, **44**, 1405 (1961).
- (3) H. Tessier and D. Rose : *Dairy Sci., Abstr.*, **47**, 1047 (1964).
- (4) W. H. Sweetsur and J. C. D. White : *J. Dairy Res.*, **41**, 349 (1974).
- (5) W. M. Sweetsur and J. C. D. White : *J. Dairy Res.*, **42**, 57 (1975).
- (6) W. M. Sweetsur and J. C. D. White : *J. Dairy Res.*, **42**, 73 (1975).
- (7) W. M. Sweetsur and D. D. Murir : *J. Dairy Res.*, **47**, 327 (1980).
- (8) D. B. Hylop and P. F. Fox : *J. Dairy Res.*, **48**, 123 (1981).
- (9) P. F. Fox and P. A. Morrissey : *J. Dairy Res.*, **44**, 627 (1977).
- (10) W. N. Eigel and H. E. Randol : *J. Dairy Sci.*, **59**, 203 (1976).
- (11) K. Yamauchi and S. Kaminokawa : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 249 (1972).
- (12) S. Kaminokawa and K. Yamauchi : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 255 (1972).
- (13) W. G. Gordon and M. L. Groves : *J. Dairy Sci.*, **58**, 574 (1975).
- (14) M. L. Grove and W. G. Gordon : *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 421 (1968).
- (15) 電気泳動学会編:「電気泳動実験法」, 文光堂, 1964, p. 264.

- (16) M. L. Groves and C. A. Kiddy : *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 188 (1969).
- (17) 宮辺豊紀, 森川康文 : 農化, **50**, 447 (1976).
- (18) D. Rose : *J. Dairy Sci.*, **48**, 139 (1965).
- (19) H. Tessier and D. Rose : *J. Dairy Sci.*, **50**, 1744 (1967).
- (20) G. T. Pyne and T. C. A. McGann : *J. Dairy Res.*, **27**, 9 (1960).
- (21) K. Yamauchi and Y. Yoneda : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2395 (1977).
- (22) 祐川金次郎, 村沢久司, 佐々木正人 : 栄養と食糧, **34**, 445 (1981).
- (23) 仁木 達, 桜井俊二, 土肥 達 : 雪印乳業酪農研報, **57**, 1 (1959).
- (24) T. A. J. Payens : *J. Dairy Sci.*, **49**, 1317 (1966).
- (25) C. V. Morr : *J. Dairy Sci.*, **50**, 1744 (1967).
- (26) D. Rose : *Dairy Sci., Abstr.*, **31**, 171 (1969).
-