[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.65, No.8, pp.1213~1222, 1991]

イオン交換膜電気透析法による脱脂乳脱塩過程の カゼインミセルの形態変化

木村利昭, 内田幸生, 富沢 章
平岡康伸, 福島正義, 種谷真一
(雪印乳業株式会社技術研究所)

平成2年9月6日受理

Conformational Changes in Casein Micelles during Demineralization of Skim Milk by Electrodialysis with Ion Exchange Membranes

Toshiaki KIMURA, Yukio UCHIDA, Akira TOMIZAWA, Yasunobu HIRAOKA
Masayoshi FUKUSHIMA and Shin'ichi TANEYA
*Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products, Co.,
1-1-2 Minamidai, Kawagoe, Saitama 350*

Casein micelles in skim milk were dissociated into sub-micelles during demineralization, and the relationship between the amount of minerals and distribution casein micelles was studied. Ca and P amounts were determined as ionic, colloidal and binding phases. Casein micelle size distributions were determined by ultracentrifugation, turbidity intensity and electron microscopy.

The skim milk demineralization process in electrodialysis using ion exchange membranes was divided by the Ca demineralization ratio and mole ratio Ca/P of binding casein into three stages: (1) 0-50%, 1.38-1.0; (2) 50-80%, 1.0 and (3) over 80%, under 1.0. Ionic mineral components were demineralized at the first stage, and the mineral components binding casein were demineralized at the second stage. The latter caused casein dissociation from a micelle to sub-micelle state, and decreased micelle size and increased colloidal Ca and P. The further demineralization of Ca binding casein proceeded while organic P remained, and the Ca/P ratio was under 1.0.

The size of the casein micelles was reduced during demineralization. The minimum casein micelle size during demineralization was at 80% Ca demineralization ratio measured by turbidity intensity. The amount of Ca binding casein decreased under demineralization ratio. The surface hydrophobicity of the casein particle was maximized at 80% Ca demineralization ratio. The size of casein micelles increased at 90% Ca demineralization ratio because of coagulation of the sub-micelles.

(Received September 6, 1990)

緒 言

食品工業で利用されている機能性分離膜には精密濾過, 限外濾過膜, 逆浸透膜およびイオン交換膜がある。イオン交換膜電気透析法はイオン交換膜の分離能を利用し, 電気エネルギーを駆動力としてイオン性物質を分離する方法⁽¹⁾である。実用的には海水の脱塩, 砂糖, アミノ酸の精製, 乳業界ではホニーや脱脂乳の脱塩に利用されている^(2~5)。

脱脂乳をイオン交換膜電気透析法で脱塩すると, カゼ

インミセルはサブミセルに解離する⁽⁶⁾ものが増加することが知られている。カゼインミセルからサブミセルの解離現象は, 脱脂乳の酸性化, 透析による脱塩⁽⁷⁾, クエン酸ナトリウム, しゅう酸ナトリウムの脱カルシウム剤の添加によって生じる現象⁽⁸⁾と類似している。すなわち, カゼインに結合しているカルシウムやリンをいずれかの方法で除去すると, ミセルはサブミセルに解離する。このことは, カゼインのミセル形成に, 塩類の存在が重要な役割を果たすことを示唆している。

本報告では, 脱脂乳をイオン交換膜電気透析法で脱塩

する過程の、存在形態別カルシウム・リンに着目し、脱カルシウム・リン量と、カゼインミセルの解離の関係について明らかにした結果を報告する。

試料および実験方法

1. イオン交換膜電気透析 生乳からクリームを分離し、70°C 15 分間殺菌した脱脂乳 160 kg をイオン交換膜電気透析装置（徳山曹達 TS-24 型）を用い、温度 7.3~10.0°C で約 10 時間脱塩した。脱脂乳の組成は、脂肪 0.16%，蛋白質 2.92%，乳糖 4.51%，灰分 0.69%，全固形 8.28% であった。イオン交換膜は膜面積 0.24 m²/sheet のネオセプタ C 66-5 T と、ACH-45 T を 40 対用いた。

2. 成分分析法 水分、蛋白質、灰分の分析は乳製品試験法注解⁽⁹⁾に従い実施した。ただし、蛋白質のうちカゼイン態窒素は、脱脂乳を 10% 酢酸と 1 N 酢酸ナトリウム混合液でカゼインを沈殿させ、その上澄液をケルダール法により求め、この値と脱脂乳中の全窒素の値の差から算出した。無機成分の Na, K, Ca, Mg は原子吸光法（島津 AA-650）により、P はモリブデン酸による比色法で、Cl は硝酸銀法で、PO₄ はイオンクロマトグラフ（ダイオネックス 2000 I）により求めた。

3. 形態別 Ca, P の定量法 乳中の Ca, P の存在形態については、イオン状、コロイド状、カゼイン結合型に分けている報告^(10,11)がある。しかし、コロイド状とカゼイン結合型の区別が明らかでない。本報告では、塩が存在すると考えられる三形態すなわち、カゼイン結合型、コロイド状およびイオン状での平衡状態を変えないで測定する方法⁽¹²⁾のなかから限外濾過と遠心分離法を組み合わせ、Fig. 1 のように、110,000×g 2 時間超遠心分離し、カゼインとともに沈降する画分をカゼイン結合型とし、その上澄液を分画分子量 20,000 の限外濾過膜（AMICON 社製アミコン M-20）で加圧限外濾過し、その透過液に含まれる画分をイオン状、非透過性画分をコロイド状とした。

結合型カルシウム、リンは沈降カゼイン 10⁵ g 当りの mol 数で表し、Ca/P mol 比を算出した。

4. 濁度 小此木ら⁽⁴⁾の方法に準じ脱脂乳 0.5 ml を脱イオン水で 12 ml に希釈し、10 mm の石英ガラスセルで波長 610 nm、スリット 2 mm の条件で分光光度計（日立 220 A 型）を用い吸光度を測定し濁度とした。

5. 電子顕微鏡観察 脱脂乳 1 ml と、カコジレー

Fig. 1. Fractionation Process of Mineral Component in Skim Milk.

ト緩衝液で脱脂乳の pH に調整した 2.45% グルタルアルデヒド 1 ml を混合し、2~12 時間前固定をした。後固定は前固定と同じ pH の緩衝液で 2% 四酸化オスミウム溶液をつくり、これを前固定の終了した試料に等量混合し、2 時間固定した。その後、脱イオン水で 5000 倍に脱脂乳を希釈し、内径約 1 mm のガラス管を用い、あらかじめカーボン支持膜を張ったメッシュ上に、一滴載せ室温で乾燥した。これに白金を角度 30 度からシャドウイング後透過電子顕微鏡（日立 HU-12 A 型）で観察した。

6. 超遠心分離 分離用超遠心機（日立 ACP 85 H 型）でアングルローター SRP 70 AT を用い、110,900×g で 40 分間遠心分離し、上澄液量を測定後サンプリングした。

分画遠心⁽⁸⁾は 15,600×g, 27,700×g, 43,300×g, 62,400×g および 110,900×g の条件で順次 40 分間遠心分離した。そのときに沈殿したカゼインペレットの重量を測定し、遠心操作を繰り返して行った。遠心操作は温度 15°C で行った。

7. 表面疎水性指標 脱脂乳中の蛋白質の表面疎水性を Kato⁽¹³⁾ らの方法を改良して測定した。すなわち、脱脂乳と pH 7.4, 0.01 M イミダゾール緩衝液の等量混合液 2 ml に、3.6×10⁻³ M シスバリナリン酸エタノール溶液 10 μl を加えた。シスバリナリン酸・試料混合溶液の相対的蛍光強度は、325 nm で励起し蛍光分光光度

計(日立 650-10 St 型)を用い 420 nm で測定した。相対的蛍光強度は、シスバリナリン酸溶液 10 μ l を含まない試料を前記イミダゾール緩衝液に加えたときの値をブランクとして 1.0 とし算出した。〔蛍光強度/蛋白質濃度〕は蛋白質濃度に対する蛍光強度のプロットから求めた。

結 果

1. 脱塩過程のミネラル組成の変化

脱塩中の各塩の脱塩率の変化を Fig. 2 に示した。脱塩初期に 1 価イオンの Cl, K が脱塩され、それに次いで Na, Mg, Ca, P が脱塩された。10 時間後の最終脱塩率は K, Cl が 100% で Na 94%, Ca 90%, および Mg 84%, P は 73% で最も低い脱塩率であった (Fig. 2)。このような各塩の脱塩挙動は Hiraoka ら⁽²⁾の脱脂乳、小此木ら⁽⁴⁾の還元脱脂乳の結果と同様であった。

2. 形態別カルシウム、リン量

イオン状、コロイド状およびカゼイン結合型に分離したカルシウムとリン量の結果を Fig. 3 に示した。

カルシウムの脱塩過程で、イオン状は脱塩初期に多く存在するが、カルシウム脱塩率 50% 以後ではかなり減少し、最終的にはほぼゼロになった。結合型はカルシウム脱塩率 80% まで減少しほとんどゼロとなり、その後増加する傾向を示した (Fig. 3A)。

リンの場合はカルシウムと似た経時変化であるがカル

Fig. 2. Changes in Relative Demineralizing Ratio during Demineralization Process of Each Mineral. $\square$, Cl (initial content: 107 mg/100 g); Δ , K (158 mg/100 g); $\circ$, Na (45 mg/100 g); $\bullet$, Ca (121 mg/100 g); $\blacksquare$, P (90 mg/100 g); $\blacktriangle$, Mg (11 mg/100 g).

Fig. 3. Relation between Classified Ca (A), P (B) Content and Ca Demineralizing Ratio. a zone: ionic phase, a' zone: PO_4 content of ionic phase, b zone: colloidal phase, c zone: Ca, P binding casein.

シウムに比べイオン状の比率がずっと高い (Fig. 3B)。このイオン状は大部分がリン酸基 PO_4^{3-} であった。結合型リンはカルシウム脱塩率 80% で最小値となり、最終 90% ではやや増加した。リンの脱塩過程はカルシウムの場合と同様の挙動を示した。

カゼイン結合型のカルシウムとリンの mol 量を Fig. 4 に示した。カゼイン結合型カルシウムは、脱塩初期からはほぼ直線的に減少しカルシウム脱塩率 80% で最小値となり、90% でふたたび増加した。また、リンの場合はカルシウム脱塩率 50% からカルシウムと同じ傾向になり、90% で大幅に増加した。Fig. 5 にカゼイン結合型 Ca/P mol 比を示した。カゼイン結合型 Ca/P 比は当初 1.38 であった。カゼイン結合型 Ca/P mol 比は、脱塩の進行に伴って徐々に減少し、カルシウム脱塩率 50% か

Fig. 4. Effect of Ca Demineralizing Ratio on the Content of Ca and P Bound to Casein. ○, Ca; □, P.

Fig. 5. Effect of Ca Demineralization on Ca/P Ratio. ●, total Ca/P; ○, Ca/P bound to casein.

ら 70% の間では、ほぼ 1 になった。カルシウム脱塩率 90% ではカゼインに結合するカルシウムが少なく、リンが増加するためその比は急激に減少した。一方、全 Ca/P 比率はカルシウム脱塩率 70% まではほぼ 1 で、あまり変化しないが、これを過ぎると小さくなる。カルシウム脱塩率 50% 以後は結合型とほぼ同じ値であった。

3. 脱塩過程のカゼインミセルの形態変化

1) 濁度による測定 脱塩率と濁度の関係 (Fig. 6) は、カルシウム脱塩率が増加するに従って濁度はほぼ直線的に減少するが、乳白色は最終脱塩脱脂乳でも消えなかった。また、濁度は脱塩率 80% で最小値を示し、それを超えるとやや増加した。これは Fig. 3 の結合型のカルシウム、リン量の経時変化と同じ傾向であった。

2) 電子顕微鏡による測定 一滴の脱脂乳をガラス

Fig. 6. Relation between Turbidity in Skim Milk and Ca Demineralizing Ratio.

板の上で乾燥すると、その跡は肉眼ではリング状に見える。Fig. 7 は固定・希釈した試料一滴を乾燥し、シャドウイング法を用い電子顕微鏡で観察したものである。Fig. 7a の黒い帯状部は、電子線が全く透過しない部分で、肉眼でリング状に見える部分に相当する。帯状部の上部は、肉眼でリング状に見える部分の内側に相当する。ここには、カゼイン粒子が分散していた。Fig. 7b は帯状部の外郭を拡大したところである。帯状部はカゼインが厚く堆積しており、大きなカゼインミセルの存在はわかるが、サブミセルのような小粒子は堆積部分に埋没し、その大きさは識別できない。Fig. 7c は帯状部から外側に離れた、液滴とカーボン支持膜の接触面の最外郭部である。最外郭部は、小さなサブミセルが直線状に配列し、その粒子の大きさは 8 nm であった。最外郭部の内側は、ミセル状の大きな粒子は存在せず、サブミセルだけが存在した。

このような観察結果から、Fig. 8 に固定・希釈後の脱脂乳一滴を乾燥した後のカゼイン粒子の分散状態を模式的に示した。

このように、カゼイン粒子は不均一に分布しているので、電子顕微鏡写真から正確な平均値は得られない可能性がある。しかし、カゼイン粒子の最大値、最小値はこの観察方法で、かなり正確に測定できる。ここではカゼイン粒子の最大・最小値に着目した。

脱塩過程の脱脂乳中のカゼインミセルの形態変化を Fig. 9 に示した。なお、a~e は Fig. 8 のリングの内側で、f は外側の部位を観察した。脱塩されるに従って大きなミセルは減少した。最大ミセル直径に着目すると、初期 (a) は 280 nm で、Ca 脱塩率 60% (d) では 60 nm に減少した。しかし、脱塩率 80% の (e) では、

Fig. 7. Observation of the Ring Consisting of the Dispersion of Casein Particles in a Skim Milk Drop of the After Drying. a) Black part : ring, above the black part : inside part of ring, b) outside part of the ring, c) the periphery of the contact surface between the drop and carbon film.

Fig. 8. Illustration of the Dispersion of Casein Particles in a Dried Drop of Skim Milk.

すべてのミセルがサブミセルに解離しているのではなく、100 nm 程度の粒子が多数存在した。リングの外側で観察した f では 50 nm 以下のサブミセル粒子だけが存在した。

Fig. 10 にカルシウム脱塩率 50% と 70% の遠心上澄液の加圧限外濾過の非透過性画分、すなわち、コロイド状カルシウム、リンの存在する画分の観察結果を示した。この画分には 50 nm 以下のサブミセル粒子だけが存在した。

3) 超遠心分離による測定 カゼインミセルの崩壊過程の変化を全体的にとらえるために、重力加速度を変えた遠心分離を繰り返し行い、その沈殿したカゼインペレットの重量を逐次測定した。Fig. 11 に各脱塩脱脂乳の重力加速度と沈降したペレットの乳に対する重量%を示した。脱塩初期から 35% 脱塩率までは、 $30,000 \times g$

の遠心分離で大部分のカゼインが沈降した。この程度の脱塩ではミセルは変化していないと考える。脱塩率が高くなるに従って、沈降するカゼイン量は減少し、多数のミセルがサブミセルに解離していることを示唆した。

各脱塩脱脂乳を $110,000 \times g$ で遠心したときのカゼインの沈降量を初期乳の沈降量を基準として指数化し、カルシウム脱塩率に対してプロットしたのが Fig. 12 である。脱塩に伴って沈降量は減少し、ミセルがサブミセルに解離していることを示した。カルシウム脱塩率 77% では約 35% が沈降し、ミセルのすべてがサブミセルに解離していないことを示した。この結果は濁度、電子顕微鏡観察の結果と一致した。

カルシウム脱塩率 77% 以上で沈降したカゼインの性質を知るために、カルシウム脱塩率 77% 脱脂乳に、生脱脂乳の乳濁色が消えると同じ量の EDTA を添加した。しかし、高脱塩脱脂乳の場合には通常脱脂乳のような乳濁色の消失はみられなかった。

4) 表面疎水性 蛋白粒子表面の疎水性を、シスバリナリン酸による蛍光強度で測定した結果を Fig. 13 に示した。表面疎水性はカルシウム脱塩率 70% までは大きな変化はないが、80% で急激に上昇し 90% ではやや下降した。80% にピークを持つことは Fig. 3, 4, 6 の結果と逆の傾向である。

考 察

乳中の無機成分は、カゼイン結合状、コロイド状、イ

Fig. 9. Electron Micrographs of Casein Micelles in Demineralization of Skim Milk. a) Skim milk before demineralizing, b) skim milk of 20% demineralizing of Ca, c) 40% demineralizing of Ca, d) 60% demineralizing of Ca, e) 80% demineralizing of Ca, f) observation of (e) sample out of ring on the Fig. 9.

Fig. 10. Electron Micrographs of UF Retentate of Supernatant by Centrifugal $1.1 \times 10^5 \times g$, a) Skim milk of 50% demineralizing of Ca, b) skim milk of 70% demineralizing of Ca.

Fig. 11. Precipitation Ratio Plotted against Centrifugal $\times g$. Demineralizing ratio of Ca: Δ , 0%; $\square$, 23.7%; $\diamond$, 43.2%; $\bullet$, 44.9%; $\blacksquare$, 54.2%; $\blacktriangle$, 67.8%; $\blacklozenge$, 77.1%.

オン状の形態で存在すると考えられている。カゼインミセル中にも無機成分は6%含まれ⁽¹⁴⁾、そのうち、カルシウムとリンはコロイド状リン酸カルシウム (CCP) と呼ばれ、カゼインとの複合体を形成している。CCP は pH の低下⁽¹⁵⁾、透析によってカゼインから容易に解離する。CCP とカゼインの結合様式は、CCP は正に、カゼインは負に帯電する静電的結合である⁽¹⁶⁾。カゼインに結合する CCP の定量は、カゼインに一部のカルシウムが直接結合することと、その部分を独立に測定できないことから困難である⁽¹⁶⁾。このようなことから、各種の形態で存在する無機成分の定量は、従来明瞭に測定されていなかった。本実験では脱塩過程における、カゼイン結合相、コロイド相、溶解相間で無機成分の平衡状態を変えずに、各相に存在するカルシウム、リンを定量することを試みた (Fig. 1)。コロイド状画分中には、サブミセルが独立した粒子として存在していた (Fig. 10)。このことは、コロイド状画分の無機成分は、解離したサブミセルに結合していると考えられる。もし、CCP がサブミセルと

Fig. 12. Relation between Centrifugal $1.1 \times 10^5 \times g$ and Precipitation Ratio.

Fig. 13. Relation between Surface Hydrophobicity Index and Ca Demineralizing Ratio.

結合せずに、独立した1個のコロイド粒子として存在するのであれば、CCP の分子量、および Betts と Posner⁽¹⁷⁾ がX線回折の結果から推定した大きさ 0.9 nm から考えて CCP は、イオン状とコロイド状に分画するとき、分画分子量 20,000 の限外濾過膜を通過するはずである。しかし、実際にはこの膜を通過していない。分画分子量 20,000 の膜を通過しないほどの大きな物質は、脱脂乳遠心上澄液中ではサブミセルしか考えられない。このことから、コロイド状画分中の CCP はサブミセルに結合していると考えられる。カゼインに結合しているという点で、コロイド状画分の無機成分の存在状態は、結合するカゼインの大きさが異なるだけで、カゼイン結合型と類似であるといえる。

次に、脱塩中にミセルが解離する過程を考える。脱脂乳脱塩挙動はカゼイン結合型 Ca/P 比に着目すると、3

Table I. Demineralizing Process of Skim Milk

Stage	Casein binding Ca, P mol ratio	Time (h)	Ca demineralizing of skim milk (%)	Micelle precipitate (%)
I	Ca/P=1.4~1.0	0~4	0~50	80
II	Ca/P=1	4~6	50~80	50~35
III	Ca/P<1	6~10	80~100	<35

Table II. Demineralizing Process and Conformational Change of Casein Micelle

Demineralizing Process	Conformational Change of Casein Micelle
I. Ionized mineral in skim milk was demineralized.	After demineralization of ionized mineral, CCP was dissociated. The dissociation of submicelle from micelle is caused by the decrease of CCP bridge.
II. The CCP bound to micelles in colloidal phase is dissociated in ionized state and then demineralized.	The submicelle dissociated from micelle is in colloidal phase. The mineral bound to precipitated casein are $\text{PO}_4\text{-Ca}$, and the ratio Ca/P is one.
III. Ca of $\text{Ser-PO}_4\text{-Ca}$ bound to casein is dissociated and demineralized.	Only PO_4 bound to serine remains in casein.

段階に分けて整理できる。各段階の脱脂乳中の無機成分の脱塩の挙動とそれに伴う変化の推論をそれぞれ Table I, II に示す。

Table II 中 I の段階は乳中に初めからイオン状で存在した無機成分が主に脱塩される。Ca の場合、初期脱脂乳中のイオン状は、全 Ca の約 30% である。これが脱塩される時間は、Fig. 2 から約 2 時間である。乳中の無機成分はイオン状、コロイド状および結合型が平衡状態にある⁽¹⁸⁾ので、イオン状が脱塩されると、この平衡を保つように CCP がミセルから解離しイオン状になり、逐次脱塩されると考える。

次に II の段階は、カゼイン結合型 Ca/P 比が約 1 であり、カゼイン結合型カルシウム、リン量の減少が著しく (Fig. 4)、沈降するカゼイン量も減少する。Ca/P 比が 1 であることを Schmidt のモデル⁽¹⁹⁾に当てはめて考えると、すべての $\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_3$ がミセルから解離し、Serine (以下 Ser)- $\text{PO}_4\text{-Ca}$ のリン酸とカルシウムだけがカゼインに結合している状態と考える。

一方、この段階のコロイド相中には多数のサブミセルが存在し (Fig. 10)、カルシウム、リン含量も増加する (Fig. 3)。これは、サブミセル間を結合しているリン酸カルシウム架橋の主体である CCP が、 $\text{Ser-PO}_4\text{-Ca}$ ・ $\text{CCP-Ca-PO}_4\text{-Ser}$ の部分の一方が解離し、サブミセル間の架橋がはずれる。このような現象が複数の位置で発生した時点でサブミセルは、ミセルから解離するであ

ろう。この解離は、サブミセル 1 個に対し複数個存在するリン酸カルシウム架橋が、どの程度はずれたところで生じるか不明である。

ミセル 1 個からのサブミセルの解離は、ミセルの大きさの変化から考えて、一度に発生するのではなく、ミセル表面から徐々に進行すると考える。サブミセルがミセルから解離するとき CCP は、サブミセルに結合した状態でミセルから解離し、コロイド相で徐々にイオン状に解離するものとする。この解離に要する時間は 2 時間でこの間沈降するカゼインに結合する Ca/P 比は変化しない。コロイド相の CCP の解離・脱塩が完了すると、次の III の段階に移行する。

III の段階でカルシウムの脱塩は、さらに進行するが、リンの脱塩率は、73% でほぼ平衡に達する。このことは、II 段階で残ったカゼイン結合型の $\text{Ser-PO}_4\text{-Ca}$ のカルシウムだけが脱塩され、Ser に結合する有機リンだけが残る。そのため、Ca/P 比は急激に低下する。

本実験のカゼイン結合型カルシウム、リンの比は脱塩前 1.38 であった。乳中に存在するカルシウムとリンの比率に関しては過去にいくつかの報告がある。Morr⁽⁷⁾らは生乳の CCP の Ca/P は EDTA 法で 1.50, pH 4.9 法で 1.56 であることを示した。小野ら⁽⁸⁾は分画遠心によりミセルの大きさを分けて、それに結合するカルシウム、リンの量を測定した。15,000×g で沈降する大きな (120 nm) ミセルに結合するカルシウム、リンはおのお

の 38, 22 mg/casein でこれから算出した Ca/P の mol 比は 1.37 であった。大きなミセルの mol 比 1.37 は本実験の初期値とほぼ同じである。Holt⁽²⁰⁾ は乳中の CCP のカルシウムとリンの比率を EDTA で分析した結果 Ca/PO₄ は 1.61±0.04 で歯のエナメル質の値と類似であることを示した。このように、多くの研究者によって報告されているカゼインに結合するコロイド状リン酸カルシウムの Ca/P 比は 1.37 から 1.6 である。

このような CCP 架橋がミセル内部のどのような位置に存在するか、直接的な証明は生乳ではされていない。

しかし、Knoop⁽²¹⁾ らは、人工ミセルの超薄切片を無染色で観察し、ミセル内部のサブミセル粒子間に高弾性散乱コントラスト部分があり、これがカルシウム、リンによるものであると述べている。生乳の場合でもサブミセル間にリン酸カルシウムブリッジとして存在しているであろう。

Fig. 3, 4, 6 においてカルシウム脱塩率 80% の部分に山や谷がみられる。これらの現象はすべて 1 つのことに由来していると考え。つまり、脱塩が進行すると、カゼインミセルの大きさは小さくなり、サブミセルに解離するものが増加する。しかし、カルシウム脱塩率が 90% になると、一度解離したサブミセルがふたたび凝集していると考え。再凝集すると、カゼイン粒子は大きくなり、濁度は再上昇する。また、カゼイン沈降量の増加によりカゼイン結合型 Ca, P 含量も増加する。この凝集する現象を疎水性指標値でみると、Ca 脱塩率 80% の疎水性指標値は増加し、90% でふたたび低下する (Fig. 13)。これは、脱塩の過程で、ミセル内部に存在していた表面が疎水性のサブミセルが、多数解離していることを示唆している。このようなサブミセルは、脱脂乳中で安定なコロイドとして長時間存在できず、疎水性部分どうしを接合するように凝集する。その結果、表面疎水性指標は、疎水性部分が新たにできた凝集体の内部に位置するために、ふたたび減少すると考える。

この再凝集カゼイン粒子間に働く作用は、90% 脱塩脱脂乳に EDTA を加えても透明にならずに乳白色のままであったことから考えて、残存する少量のリン酸やカルシウムによるブリッジによる結合ではなく、疎水性相互作用であろう。

このようなカゼイン微粒子が凝集する現象は他の食品蛋白質のゲル化機構⁽²²⁾、とくに加熱によるゲル形成過程でみられる可溶性凝集体の網目構造への移行と類似のも

のであると考える。たとえば、大豆蛋白質⁽²³⁾、卵白アルブミン⁽²⁴⁾においての可溶性凝集体の生成と網目構造への移行や、卵白リゾチーム⁽²⁵⁾のジスルフィド結合の一部が分子表面に露出し、それとともに加熱ゲル形成性が著しく増加するという報告がある。以上のように、蛋白質の凝集およびゲル形成性には、疎水性相互作用が重要な役割を果たしていると考え。

要 約

イオン交換膜電気透析法を用いて脱脂乳の無機成分を脱塩した。カゼインミセルは脱塩の過程でサブミセルに解離した。その解離過程を無機成分量とカゼインミセルの大きさの変化について考察した。脱塩中の無機成分のうちとくにカルシウムとリンは、イオン状、コロイド状およびカゼイン結合型に分けて測定した。カゼインミセルの形態変化は遠心分離、濁度および電子顕微鏡で測定した。

脱脂乳の脱塩過程は、次の三段階に分けて考えることができた。脱塩の各段階を、カルシウム脱塩率で表わすと、0~50%, 50~80% および 80% 以上で、カゼイン結合型 Ca/P の mol 比で表わすと、おのおの 1.38~1.0, 1.0 および 1.0 未満である。脱塩の第一段階は乳中にイオン状で存在していた無機成分が脱塩される。第二段階は、カゼインに結合していた無機成分が解離し、それに伴いミセルからサブミセルが解離する。この段階はミセルの大きさが減少し、コロイド相のカルシウム、リンが増加する。第三段階は、わずかに残ったカゼインに結合するカルシウムは脱塩されるが、有機リンは脱塩されずに残り、Ca/P 比は 1.0 未満になる。

カゼインミセルの大きさは、脱塩に伴って徐々に減少し濁度測定の結果、カルシウム脱塩率 80% で最小値になった。遠心分離で沈降するカゼインに結合するカルシウム量は、脱塩初期からほぼ直線的に減少しカルシウム脱塩率 80% で最小となり、90% でふたたび増加した。また、表面疎水性はカルシウム脱塩率 80% で最大値になった。このことはカゼインミセルがサブミセルに解離し、ミセル内部に存在する表面が疎水性のサブミセルが、多数解離していることが示唆された。疎水性のサブミセルどうしが凝集するために、カルシウム脱塩率 90% でふたたび大きな粒子が増加すると考えた。

本研究の実施、発表について許可をいただき、推進の

指導、激励をいただいた雪印乳業株式会社専務取締役研究本部長、十河幸夫博士に深く感謝申し上げます。また、本研究を実施するにあたり、脱脂乳の成分分析をしていただいた分析部矢吹智宜氏、菊地 聡氏に厚く感謝いたします。

- (1) 小久見善八：表面，**23**，443 (1985)。
- (2) Y. Hiraoka, K. Itoh and T. Taneya : *Milch-wissenschaft*, **34**, 397 (1979)。
- (3) 長沢太郎，小此木成夫，富田 守，田村吉隆，溝田輝彦：日畜会報，**44**，426 (1973)。
- (4) 小此木成夫：日畜会報，**45**，141 (1974)。
- (5) 小此木成夫：Jpn. J. Dairy Food Sci., **28**，A225 (1979)。
- (6) T. Kimura, H. Murata, S. Taneya and E. Furuichi : IDC Proc. p.238 (1978)。
- (7) C. V. Morr, R. V. Josephson, R. Jeness and P. B. Manning : J. Dairy Sci., **54**，1555 (1971)。
- (8) 小野伴忠，早川美次，小田切敏：農化，**49**，8，417 (1975)。
- (9) 乳製品試験法注解：日本薬学会編，金原出版 (1984)。
- (10) 桜井俊二：雪印乳業研究所報告，**66**，1 (1962)。
- (11) J. C. D. White and D. T. Davis : J. Dairy Res., **25**，236 (1958)。
- (12) R. Jeness and S. Patton : Principles of Dairy Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., p.169 (1959)。
- (13) A. Kato, N. Tsutsui, N. Matsudomi, K. Kobayashi and S. Nakai : *Agric. Biol. Chem.*, **45**，2755 (1981)。
- (14) D. G. Schmidt : Development in Dairy Chemistry, 1 I Applied Sci. Publishers, p.62 (1982)。
- (15) R. Jeness and S. Patton : Principles of Dairy Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., p.309 (1959)。
- (16) D. G. Schmidt : Development in Dairy Chemistry, 1 I Applied Sci. Publishers, p.76 (1982)。
- (17) F. Betts and A. S. Posner : *Trans. Am. Crystallogr. Assoc.*, **10**，73 (1974)。
- (18) 津郷友吉，谷口宏吉：牛乳，朝倉書店，p.93 (1963)。
- (19) D. G. Schmidt : Development in Dairy Chemistry, 1 I Applied Sci. Publishers, p.78 (1982)。
- (20) C. Holt : J. Dairy Res., **49**，29 (1982)。
- (21) A. M. Knoop, E. Knoop and A. Wiechen : *Neth. Milk Dairy J.*, **29**，356 (1975)。
- (22) 中村 良：農化，**62**，879 (1988)。
- (23) T. Mori, T. Nakamura and S. Usumi : J. Food Sci., **47**，26 (1982)。
- (24) A. Kato, Y. Nagase, N. Matsudomi and K. Kobayashi : *Agric. Biol. Chem.*, **47**，1829 (1983)。
- (25) S. Hayakawa and R. Nakamura : *Agric. Biol. Chem.*, **50**，2039 (1986)。