pH 6.8 と pH 5.8 における牛乳カゼインミセルの沈降分析

梁 逸・浜渦善一郎・松本幸雄・米沢大造

Sedimentation Analysis of Bovine Milk Casein Micelle at pH 6.8 and pH 5.8

I, LIANG, ZENICHIRO HAMAUZZU, SACHIO MATSUMOTO and DAIZO YONEZAWA

The particle size of bovine milk casein micelle was determined by means of sedimentation. The sedimentation analysis was based on the opacity transfer velocity of micelle under ultra-centrifugal field and photograms were taken with a schlieren optical system on the plate. The sedimentation coefficients determined at 30°C in milk serum were 440 S at pH 6.8 and 570 S at pH 5.8, respectively, at the maxima of the concentration gradient curves. The distribution of sedimentation coefficient at pH 6.8 ranged from 250 to 1500 S. The distribution of micelle size calculated from these results ranged from 850 to 2100 Å in diameter with a most probable value of 1200 Å. The size distribution was calculated also at pH 5.8. The micelle size at pH 5.8 was smaller in diameter by about 10% than at pH 6.8, indicating the shrinkage of micelles with decreasing pH.

(Received Apr. 17, 1973)

牛乳カゼインミセルは牛乳中で多く分散状態で存在しており、温度、pH などの変化に対応してその状態を変化する¹⁾²⁾。著者らは脱脂乳の pH を 6.8 から 5.8 附近に低下させたとき、カゼインミセルが収縮を起すことを、粘度やペレット容積の測定から推論したが、さらにこのことを確かめるために、pH 6.8 と pH 5.8 においてカゼインミセルの沈降速度の測定を試みた。カゼインミセルの沈降速度の測定は CHOATE ら³⁾、WILSON ら⁴⁾、および WAUGH⁵⁾ によって、調製用超遠心機を用い、所定時間内にセル底に沈積するミセルの量を測定することによって求められているが、古く NICHOLS⁶⁾ らは SVEDBERG⁷⁾ によって提示された方法を適用して、分析用超遠心機を用いてカゼインミセルの沈降を測定している。著者らは分析用超遠心機による方法でカゼインミセルの s 分布を求め、これより粒子径分布を算出して、pH 5.8 におけるミセルの粒子径が pH 6.8 におけるよりも約 10% 小さくなっていることを示す結果を得た。この測定について述べる。

実 験 方 法

1. 試料の調製

ホルスタイン個牛から採取した牛乳を 16 時間低温で貯蔵後 900×g で 20 分間遠心分離し、布でろ過して脂

肪その他の粗い粒子を除き、脱脂乳を調製した。脱脂乳の希釈に用いた乳清は、脱脂乳を 1 時間 30°C で放置後、30°C で 50,000 rpm 1 時間遠心分離し、生じた上清液の清澄な部分を注射器で取り出すことによって調製した。

2. カゼインミセルの沈降速度の測定

乳清で 5 倍に希釈した脱脂乳を用い、ベックマン分析用超遠心機 E 型を用いて 30°C で 13,000 rpm で遠沈し、シュリーレン光学系を用いて 2 分間隔で撮影し、乾板に記録されたミセルの濁りの移動を本文に記述する方法で解析して、ミセルの沈降速度を求めた。使用した乾板は富士分光分析用乾板である。

3. カゼインミセルの密度の測定

pH を調節した脱脂乳について、50,000 rpm 1 時間の遠心分離により、カゼインミセルをペレットとして分離し、その重量を測定するとともに、比重瓶を用いてその容積を測定することにより密度を求めた。

4. 乳清の粘度の測定

Ubbelohde 粘度計を用いて 30°C で測定した。

実 験 結 果

乳清で 5 倍に希釈された脱脂乳をベックマン分析用超遠心機 E 型で 13,000 rpm で遠心分離し、シュリーレン

* 大阪府立大学農学部食品化学研究室

Laboratory of Food Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka.

Fig. 1. Photographs of Sedimentation of Diluted Skimmilk at pH 6.8 Taken with Schlieren System.

The photographs were taken at intervals of 2 minutes.

Fig. 2. Denstiiometer Tracings of Absorption Pattern Shown in Fig. 4.

upper: pH 5.8; lower: pH 6.8

光学系を用いて、13,000 rpm に到達した時間をゼロとして3分後より2分間隔で撮影した。その写真を Fig. 1 に示す。これは乾板を印画紙にやきつけたもので、沈降していくカゼインミセルの濁りが黒く現われているが、乾板上ではそれが白く現われ、濁りの強さに対応して濃淡を生じ、カゼインミセルが沈降していく状態が示される。この乾板の黒化度を Ozumor 82 Densitometer を用いて測定して Fig. 2 に示す曲線を得た。一方、同じ乾板を用いて露出時間をいろいろかえて露光し、受光量と黒化度との関係を調べたのが Fig. 3 である。これによると乾板の黒化度 0.3~1.4 の範囲で受光量の対数と黒化度とは直線関係を示すことになり、この範囲では次式が成立することになる。

$$\log It + aD + b = 0 \quad (1)$$

ここに I は乾板に到達した光の強さ、 t は露出時間、 D は乾板の黒化度、 a 、 b は定数である。一方セル内におけるカゼインミセルの濃度 c とその散乱光強度 $\log I_0/I$ とは比例するものとする、

$$\log I_0/I = fc \dots \dots \dots (2) \quad f: \text{比例定数。}$$

Fig. 2 においてセル内の濁り部分における乾板の黒化度は Fig. 3 の直線関係が成立する範囲内に入る。Fig. 3 または Fig. 1 の撮影では露出時間を一定にしているので t は一定である。そこで(1)(2)式、より Fig. 2 の D とセル内のミセル濃度との関係を示す式として、(3)式が得られる。

$$\frac{dD}{dx} = k \frac{dc}{dx} \dots \dots \dots (3)$$

Fig. 3. Relation between the Time of Exposure t and the Darkening of Photoplate.
Fuji Spectrographic plate was used.

Fig. 4-a. Concentration Gradient Curves of Casein Micelles Sedimenting in Diluted Skimmilk at pH 6.8.

Ordinate: concentration gradient, $\frac{dc}{dx}$.
Abcissa: distance from the center of rotation, x .

Fig. 4-b. Concentration Gradient Curves of Casein Micelles Sedimenting in Diluted Skimmilk at pH 5.8.

Ordinate: concentration gradient, $\frac{dc}{dx}$.
Abcissa: distance from the center of rotation, x .

Fig. 5. Sedimentation Time vs. $\log x$ Plot.

ここに x はセル内の位置を示す値で、ローターの回転の中心からの距離で与えられる。Fig. 4a, 4b に示した曲線は Fig. 2 の曲線をもとにして得られた微分曲線であるが、(3)の関係からこれはセル内におけるミセルの濃度勾配曲線とみなすことができる。

Fig. 4 の各パターンのピークの位置 x を時間に対してプロットすると Fig. 5 に示すように直線が得られ、この直線の傾斜からピークの沈降定数が求められる。その値は pH 6.8 で 440 S, pH 5.8 で 570 S であった。

次に、Fig. 4a, 4b のパターンから(4)式で与えられる沈降定数 $g(s)$ の布を求めた。

$$g(s) = \frac{dc/dx}{c_0} \left(\frac{X}{X_m} \right)^3 x \omega^2 t \quad (4)$$

ここに c_0 は初濃度、 x_m は回転の中心からメニスカスまでの距離、 ω は回転の角速度、 t は沈降の時間である。Fig. 5 で用いた沈降時間は、ローターの回転数が 13,000 回転に達したときをゼロとして測定した時間であるが、それ以前のローターの回転数がゼロから 13,000 rpm に上昇する間にもミセルの沈降はおこっている。もし、ローターが最初から 13,000 rpm で回転したとして、この沈降に匹敵する沈降をするのに要する時間は何程になるであろうか。それを Fig. 5 のプロットをメニスカスの位置まで延長することによって求めたところ、pH 6.8 と 5.8 の沈降に対してそれぞれ 2.2 分と 1.2 分という値が得られた、この時間は、ローターが実際に 13,000 rpm に達するまでに要した時間よりも短いはずである。

Fig. 6-a. Distribution of Sedimentation Coefficients of Casein Micelles at pH 6.8.

Fig. 6-b. Distribution of Sedimentation Coefficients Casein Micelles and pH 5.8.

から、仮定された沈降と実際の沈降とでは、その他の点は同じと思われるが、拡散の程度を異にしている。しかし、カゼインミセルは粒子が大きいため拡散が小さく、短時間の拡散は無視できるとと思われる。このことは後に示す実測の結果にも現われた。それゆえ以後の解析は拡散を無視してこの仮定された沈降開始時間を用いて行なわれた。

Fig. 7. Size Distribution of Casein Micelles
Solid circles: pH 6.8
Open circles: pH 5.8

(4)式を用いて $g(s)$ 分布を求めた結果を Fig. 6a と Fig. 6b に示す。時間を異にした測定がほぼ一致していることは前述したように拡散が無視できることを示している。この結果から pH 6.8 の s 分布は 250~1500 S で pH 5.8 におけるそれは 400~1600 S であった。またそれぞれの分布の極大は 440 および 570 S で得られた。pH 6.8 では全体として pH 5.8 より低い s 分布がえられた。

カゼインミセルを球体とみなすと、Stokes の法則から次式によりカゼインミセルの直径 D が算出される。

$$D^3 = \frac{18s \eta_0}{\rho - \rho_0} \quad (5)$$

ここで η_0 は媒体の粘度。 ρ および ρ_0 は分散粒子および媒体の密度である。 η_0 として乳清の粘度 0.00979 p (pH 6.8) および 0.00987 p (pH 5.8) を、 ρ としてカゼインミセルの密度 1.088 (pH 6.8), 1.110 (pH 5.8) を、 ρ_0 として乳清の密度 1.022 を用いてそれぞれの S に対応する D の値を求めると、粒子径分布を示す Fig. 7 の曲線が得られた。この結果によると pH 5.8 のカゼインミセルは pH 6.8 のミセルに比較して約 10% 程粒子径が小さくなっていることになる。

考 察

牛乳カゼインミセルの沈降定数として、20°C における測定で、WILSON⁴⁾ らは平均 440 S なる値を、また

CHOATE³⁾らは $S_{20,w}$ として 230~980 S の値を得ている, また WAUGH⁵⁾は 37°C の測定でミセルの 97% が 530~1900 S の範囲に入りピークは 1200 S 附近にあることを示す結果を得た。著者らは 30°C で 440 なる値を得たが, これらの値を相互に比較することは測定の温度が異なるので困難である。測定の温度が異なると, 溶媒の粘度が変化するだけではなく, 著者らが前報²⁾において指摘したとおり, カゼインミセルの膨潤度も変化するので, 沈降定数に著しい影響が現われる。ただ約 40 年前に行なわれた NICHOLS⁶⁾の測定は著者らと同じ 30°C で行なわれており, 用いられた方法も基本的に著者らと同じであるが, 沈降の観察から Stokes の式を用いて求められた粒子直径はピークのところで約 800 Å で, 本報で得られた 1200 Å よりも小さかった。なお沈降以外の方法で求められた粒子直径としては電子顕微鏡による観察から NITSCHMANN⁹⁾は 1000 Å 附近, CARROL¹⁰⁾は 1500 Å 附近の値を報告しており, 最近 MORR¹¹⁾はレイザー光線による非弾性光散乱の測定から 1600 Å 前後の粒子が多いという結果を得ている。

本報で求められた s 分布のパターンからすると, pH 5.8 は pH 6.8 に比べて全体として沈降速度が速くなっているが, s 分布の形は相似しており, 各種の大きさを持ったカゼインミセルが pH の低下により様な変化を遂げたことを示している。pH 6.8 と pH 5.8 の沈降速度をピークで比較すると, pH 6.8 が 440 S であるのに対し pH 5.8 では 570 S であった。このことはカゼインミセルが pH の低下によって収縮したことを示している。沈降速度が上昇する原因としては収縮の他にミセルの集合ということも考えられるが, 前報の濁度測定の結果が示すように, 集合による濁度の上昇が見られるのは pH 5.6 以下の pH 域であって, pH 5.8 ではミセルの集合はたとえ起ったとしても微小であると判断される。

沈降の測定から求められたカゼインミセルの Stokes 半径からその容積を計算すると, pH 5.8 では pH 6.8 の約 3/4 に容積が収縮したことになる。この収縮度は前報²⁾の粘度やベレット容積の測定から求められた収縮度とよく一致している。粘度やベレット容積から求められた容積の減少には, 収縮によるものの他にミセルからのタンパク質の溶け出しによるものが加算されているおそれがある, しかし沈降速度の場合は逆に溶け出しは沈降速度を減少させ, 見掛け上容積の増加をもたらすことに

なる, 沈降速度から求めた収縮度が, 粘度やベレット容積からのそれと大体において一致することは, 容積の減少は大部分収縮によるもので溶け出しによる変化は少ないことを示している。なお, 前報²⁾で指摘したように, 乳清タンパク質濃度の測定結果も pH 6.8 と 5.8 の間で相異が認められず, 溶け出しが起ったとしても僅少であることを示している。

要 約

分析用超遠心機を用いて, 乳清中における牛乳カゼインミセルの沈降を 30°C で測定し, 濃度勾配曲線のピークの沈降定数として pH 6.8 では 440 S, pH 5.8 では 570 S なる値を得た。また濃度勾配曲線から求めた s 分布は pH 6.8 では 250~1500 S の範囲に, pH 5.8 では 390~1600 S の範囲に分布をもつ結果を得た。これより粒子直径の分布を求めると pH 6.8 で 850~2100 Å となり, 重量平均粒子直径は 1200 Å となった。また pH 5.8 で 780~1800 Å となり, 平均直径は 1100 Å となった。pH 5.8 では pH 6.8 に比して粒子径が約 10% ほど収縮していることが認められた。

文 献

- 1) 梁 逸・松本幸雄・米沢大造: 食品工業学会誌, **20**, 304 (1973).
 - 2) 梁 逸・米沢大造: 農芸化学会誌, **47**, 503 (1973).
 - 3) CHOATE, W. L., HECKMANN, F. A. and FORD, T. F.: *J. Dairy Sci.*, **42**, 761 (1959).
 - 4) WILSON, H. K., HERREID, E. O. and WHITNEY, R. L.: *J. Dairy Sci.*, **43**, 1 (1960).
 - 5) WAUGH, D. F. and TALBOT, B.: *Biochemistry* **10**, 4153 (1971).
 - 6) NICHOLS, J. B., BALLEY, E. D., HOLM, G. E., GREENBANK, G. R. and DEYSHER, E. F.: *J. Phys. Chem.*, **35**, 1303 (1931).
 - 7) SVEDBERY, T. and RINDE, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **46**, 2681 (1924).
 - 8) WILLIAMS, J. W. and SAUNDERS, W. M.: *J. Phys.* **58**, 854 (1954).
 - 9) NITSCHMANN, Hs.: *Helv. Chim. Acta.*, **32**, 1258 (1949).
 - 10) CARROLL, R. J., THOMPSON, M. P. and NUTTING, G. C.: *J. Dairy Sci.*, **51**, 1903 (1968).
 - 11) LIN, S. H. C., DEWAN, R. K., BLOOMFIELD, V. A. and MORR, C. V.: *Biochemistry*, **10**, 4788 (1971).
- (昭和 48 年 4 月 17 日受理)