レンネット・カゼインの配向性形成におよぼす pH の影響†

菊池栄一*・小林秀行**・日下部功**・村上和雄**

The Effect of pH on the Orientation of Rennet Casein

Eiichi KIKUCHI*, Hideyuki KOBAYASHI**, Isao KUSAKABE**
and Kazuo MURAKAMI**

* Research Division, Snow Brand Milk Products Co., Ltd. 13 Honshio-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 160

** Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba 1-1-1
Tennohdai Tsukuba-shi, Ibaraki 305

A study on the effect of pH (4.5~6.8) was conducted to clarify the characteristics of the orientation behavior of rennet casein. As a result, the orientation of rennet casein was observed at pH 5.3~5.4 after squeezing out the casein from a syringe by shear stress. A maximum pellet volume of rennet casein at 10°C was given at about pH 5.4. On the other hand, calcium and phosphate in rennet casein tended to transfer to the serum at low pH, but the degree of their transfers decreased gradually above pH 5.4. From the relation between the change of pellet volume and the shift of protein fraction to the serum, the maximum degree of hydration of rennet casein was observed at about pH 5.3~5.4. The phenomena of the orientation of rennet casein could be explained from the behavior of hydration of rennet casein and of the transfer of calcium and phosphate to the serum. (Received Jul. 24, 1987)

チーズの製造において、レンネット・カードの性状は当然カードの構成単位であるカゼインの状態によって支配される。乳カゼインは α_{s1} -カゼイン、 β -カゼイン、 γ -カゼインおよび κ -カゼインの4種類のカゼインから構成されており¹⁾、 α_{s1} -カゼインと β -カゼインが主体を占め、それぞれ約55%、30%を占めている²⁾。これらのカゼインがカルシウムおよびリン酸と共に複合体を構成してカゼイン・ミセルを形成している³⁾。

このようなカゼインに、レンネットが作用すると、多くのカゼイン同士が凝集し、更にカゼインの塊状体を形成する。この塊状体を構成しているカゼインは、カルシウムを介して架橋し、脂肪をなかに抱き込みながら三次元の網目構造をつくる。このカゼイン塊状体に圧縮、押し出し、引張り等を加えて変形を与えると、配向して従来

の等方性のある塊状体から異方性のある塊状体に変化すると考えられる。

“さける”特性を有するチーズは、カゼインにレンネットを添加して生じたカゼイン塊状体からホエイを排出して得たカードを加熱、混練および延伸することにより製造される。

さきに、KOSIKOWSKI ら¹⁵⁾はモザレラチーズの製造のなかで、カゼインがレンネットによってジカルシウム・パラカゼイネートになり、更に生成される酸の作用によってカルシウムの一部溶解がおこり、モノカルシウム・パラカゼイネートになるといっている。このパラカゼイネートを延伸すると糸引き性のある形状を呈するとしているが、その作用機作については明らかでない。

著者らは、レンネット・カゼインの配向性に注目し、

† 担子菌産生凝乳酵素の応用に関する研究

* 雪印乳業株式会社 研究本部 (〒160 東京都新宿区本塩町13)

** 筑波大学 応用生物化学系 (〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1)

このカゼインの配向性におよぼす pH の影響を観察するとともに、カゼインの水和度の変化およびカード中のカルシウムとリンの移行・割合について検討したので、その結果について述べる。

実 験 方 法

1. レンネット・カゼイン試料溶液の調製

標準溶液を得るために、あらかじめクリス・ハンセン (CHRIS HANSEN) 社製の仔牛レンネットで調製したレンネット・カゼイン粉末を用いた。レンネット・カゼイン末 100 g にクエン酸ナトリウム溶液 (pH 3.0) を加え、200 ml に定容後、48 時間、5°C で保持し、十分にレンネット・カゼインを溶解させた。更に、400 ml に定容後 25 ml を採取し、稀 NaOH 溶液で所定の pH に調製し、100 ml に定容し試料溶液として供した。

2. レンネット・カゼインのペレット容積の測定

日立分離用遠心機を用い、レンネット・カゼイン試料溶液を遠心管に採取し、所定の濃度で 1 時間保持後 10°C で 6×10^3 rpm、1 時間の遠心分離を行ない、遠心管の底部に生じたレンネット・カゼインのペレットの重量と比重を測定して、これよりペレットの容積を算出した。

ペレットの比重は、ピクノメーターに採取したペレットの重量を求め、ピクノメーターに水を加えて 10°C で定容し、このときの全重量からペレットとピクノメーターの重量とを差し引いて加えた水の重量を知り、これを容積に換算した。ピクノメーターの容積から加えた水の容積を差し引いて、ペレットの容積を求め、これより比重を算出した。

3. カルシウムの定量

レンネット・カゼインの試料溶液を 550°C で灰化後、1 N HCl で溶解し試料全体に含有されるカルシウムの総量を求めた。また、遠心分離後の上清に対して同様に分析し、pH の差異により生ずるカルシウムの移行を測定した。カルシウム定量は EDTA 逆滴定法⁹⁾により行った。

4. リンの定量

カルシウムと同じ試料を用い、ALLEN の方法で定量した⁵⁾。リンの測定においては、日立分光光度計 100-10 型を用い 10×10 mm 石英セルを使用して 720 nm の吸光度をはかることによって求めた。リン含量は KH_2PO_4 溶液を標準物質として、同様に測定して得られたリン含量の検量線を用いて求めた。

5. 上清タンパク質濃度の測定

日立分光光度計 100-10 型を用い、遠心分離 (6×10^3

rpm) によって得られた上清側のタンパク質について 280 nm の吸光度を測定することによって求めた。尚、吸光度 10 のとき、タンパク質濃度 1 % と規定した。

6. 濁度の測定

日立分光光度計 100-10 型を用い、波長 350 nm における吸光度 $\ln(I_0/I)$ の値をもって濁度とした。

実 験 結 果

1. レンネット・カゼインの配向性に関する定性的観察

pH 4.5 から pH 6.8 にわたって各 pH に調節したレンネット・カゼイン溶液を恒温調節器内において 48°C、1 時間保持した後遠心分離をして沈殿部を得た。この沈殿部を特殊ノズル (基底部内径 $\phi_1=3.5$ mm, 先端部内径 $\phi_2=1.5$ mm, 長さ 15 mm) を装着したバイレックス製シリンジ (円筒内径 $\phi_0=18$ mm, 長さ 100 mm) 中に移した後、10°C の水中に圧縮押出しを行った。この際の沈殿部中の固形濃度 (無水物換算) は、約 30% (重量) である。

観察結果を Table 1 に示した。これからわかるように、pH 5.3~5.4 において弾性のある糸状組織物が得られたが、pH 5.2 以下ではカゼイン沈殿部の配向性を有する糸状組織物の形成は認められなかった。

pH 5.6 以上では、糸状のゲル状組織物は徐々に透明さを増し、時間とともに流動し易いペースト状の傾向を示した。

2. レンネット・カゼインのペレット容積およびタンパク質移行度におよぼす pH の影響

pH 4.5 から pH 6.8 にわたる試料を 10°C に 1 時間保持した後、同温度で 1 時間遠心分離して遠沈管底部に

Table 1 Qualitative observation of the orientation of rennet casein

pH	Observation with the syringe at 35°C	Observation with the syringe at 45°C
4.5~5.0	×	×
5.2	△	△
5.3~5.4	◎	◎
5.6	×	×
5.9	×	×
6.0~6.8	×	×

× : isotropic structure

△ : intermediate structure

◎ : anisotropic structure

生じたカゼインの容積を算出した。その結果を Fig. 1 に示した。pH 5.4 付近においてカゼインは粘弾性のある密な状態となり、ペレット容積は最大に近づく。これにより pH が低下するとむしろ減少する。pH を上昇させると徐々にゲル状に変化し、少し透明感を帯びたゼリー状に近づく容積の増加は横ばい傾向となる。pH 6.4 では全体量に対するペレットの容積分率は 25% 程度であったが、pH 5.2 では 17% 位まで低下した。

更に、遠心分離後の上清側のタンパク質濃度を、280 nm における吸収測定から求め、これを Fig. 1 の右側に示した。pH 5.4 付近までは上清側へのタンパク質の移行は少ないが、更に pH の上昇に伴い移行度が進行する。一方、pH 5.4 以下の低い方では、上清タンパク質濃度の変化は顕著に認められなかった。

以上のことから、pH 5.4 付近では容積変化が大きく、かつ上清タンパク質濃度の低い範囲にあることが判明した。即ち、この範囲では水和度の高いレンネット・カゼインの回収率の高い状態にあると考えられる。

3. pH の上昇に伴うカルシウムおよびリン濃度の変化

pH 4.5~pH 6.8 の試料を 10°C、1 時間保持し、遠心分離後上清中に移行したカルシウム量を測定した。この移行量を全カルシウム量から控除してペレット中のカルシウム量を算出した。その結果は Fig. 2 に示す通りである。同様に、上清側に移行したリン含量を測定し、全リン量からこれを控除してペレット中のリン量とした

Fig. 1 The effect of pH on the pellet volume and the amount of protein transferred to the serum

(Fig. 3). Fig. 2 および Fig. 3 から、pH 5.3~5.4 ではカゼインに付着していたカルシウム量は上清側に移行をはじめる。リンについても、pH 5.3~5.4 付近を境に酸性側にすすむに伴い移行していくことを示している。

一般に、カゼインミセルのカルシウムは、リン酸基やカルボキシル基と結合してミセル内に保持されていると考えられている^{6)~9)}。しかし、pH を低下させた場合、リン酸基やカルボキシル基の負荷電が減少し、カルシウムとの結合が解かれることによって、上清側への移行が進行したものといえる。

4. カルシウム/リン比率と pH との関係

ペレット側のカゼインに含有するカルシウム/リンの比率が pH の変化によってどのようにかわるかをみた。縦軸にカルシウム/リン (mM ratio) を横軸に pH をとって、その関係をみたのが Fig. 4 である。

この図からわかるように、pH 5.3~5.4 付近にひとつの変移点がみられる。pH 5.3 以下では、カルシウム/リン比率は 9.0 以上となるが、その比率は横這い傾向をたどる。pH 5.4~pH 5.8 の間は一定の比率で急速な変化を示し、離脱、吸着の激しいことを示唆している。pH 5.8 以上ではカルシウム/リン比率は 7.0 以下とな

Fig. 2 The effect of pH on the Ca content in casein pellet

(The value in the pellet was calculated from the quantity of Ca which moved from the pellet to the serum.)

り緩慢なカーブとなる。pH 5.3~5.4 付近は、リンの移動よりカルシウムの移動が優勢となり、その比率の最も高くなった終了点と見なされる。

5. レンネット・カゼインの形態と pH との関係

上述で得られたレンネット・カゼインのカルシウム/リン比率のデータおよび 2 項で得られたカゼインの水和度を意味するペレット容積の変化との比較検討から、レンネット・カゼインの pH による形態的变化は、つぎの 3 つに大別される。すなわち、

A 領域では、イ) カルシウム離脱が緩慢であるカルシウム/リン比率 9.0 以上で、ロ) カゼインの水和度が小さい (pH 5.2 以下)。

B 領域では、イ) カルシウム、リンの離脱が一定の割合で進行し、カルシウム/リン比率 9.0~7.0 の範囲で、ロ) カゼインの水和度が最大になる (pH 5.2~pH 5.7)。

C 領域では、イ) カルシウムはむしろ取り込まれる傾向となり、カルシウム/リン比率 7.0 以下で、ロ) カゼインの水和度は平衡に達する (pH 5.8 以上)。

これらのなかで、配向可能なレンネット・カゼインの形態は B 領域の範ちゆうに属し、さきにおこなったシリジ式ノズルから得られた糸状組織物の形成する結果とよく一致する。

Fig. 3 The effect of pH on the phosphate content in casein pellet

(The value in the pellet was calculated from the quantity of phosphate which moved from the pellet to the serum.)

考 察

レンネット・カゼイン溶液が、外的条件特に pH の変化に対応して起こす変化を観察し、その機構を考察しレンネット・カゼインに関する基礎的知見を得ることにより、乳加工上の諸問題の解決に寄与しようとするものである。

特にチーズの製造に際し、レンネット・カゼインの性状は pH の変化によって大きく左右される。この pH の変化によって起こるペレット容積の変化、タンパク質の溶出、カルシウム、リンの挙動等を勘案し、更にこれらの結果をもとにカゼインの水和とカルシウム、リンの離脱割合の両者を関連させながら、カゼインの配向性について検討を加えた。

レンネット・カゼイン末は、凝乳酵素によって κ -カゼインからパラ- κ -カゼインに変化しており、これを乾燥したものである。これを緩衝液で還元した溶液を pH 5.0 から 7.0 まで変化させ、10℃ におけるペレット容積の変化をみた。ペレット容積は pH の低い方では小さいが、pH を上げていくに従って増加し、pH 5.4 から 5.6 付近を境にして横ばいの傾向に入る。pH 5.4 付近を中心としたペレット容積のピークは、SNOEREN ら¹⁰⁾ によるカゼインの容媒和の結果と近似している。また、VAN HOYDONK ら¹¹⁾ はこの pH 範囲でカゼインの一部 β -カゼインが解離するとしているが、著者らの pH 5.6 の上清液にレンネットを加えると濁度が増加

Fig. 4 The relationship between Ca/P ratio and pH on casein pellet formation

する事実とも符合している。

これらの事実から、カゼインは pH の少し高い方で水和、溶解が進行し、pH が低下するとともに会合、収縮の傾向をたどることが示唆された。pH 5.4 付近のペレット容積のピークは、水和したカゼインのゆるい会合であり、pH 5.4 から低下するに伴ない容積減少がみられるのは、カゼインの密な収縮にはいったためと考えられる。

カルシウムは pH の低下とともに、上清側に移行する割合が増加し、ペレット側から上清側へカルシウム溶出が進行している。カゼインの会合には、カルシウムの離脱と深く関係している¹²⁾。また、カルシウムの離脱は溶媒の pH、イオン強度によって大きく支配されると言われている¹³⁾¹⁴⁾。即ち、レンネット・カゼイン溶液に塩化カルシウムを添加することによって、レンネット・カゼインは、酸性側で会合しやすくなる (Fig. 5)。この事実、カゼインの会合はカルシウムの離脱と密接に関係していることを裏付けている。

pH 5.6 から酸性側に移行すると、pH 5.4 付近でカゼインの水和度が高く、タンパク質の溶出の少ない状態がみられる。この状態においては、カゼイン表面の負荷電の減少、ミセル間の静電的反発が小さくなってカゼインの会合がすすみ、更にカルシウムの離脱によって一層密に重合した塊状体になったものと推察される。

一方、pH をアルカリ側に移行させた場合、カゼイン内のリン酸基、カルボキシル基によって、カルシウムな

どは内部に抱き込まれていく結果となったといえる。pH 6.0 以上のアルカリ側では、更にカルシウムのカゼイン内増加等の影響からルーズな構造となり、変易し易い状態になるとみられる。

以上のことから、レンネット・カゼイン溶液を pH 4.5 ~ pH 6.8 の範囲においてシリンジ式ノズルにより圧縮押出しをはかると、pH 5.4 付近でカゼインは配向性をもった糸状組織物となる。この pH 範囲におけるレンネット・カゼインは、イ) カゼイン・ミセルに近似した性質を一部保有しながら、水和度の高い、会合し易い状態にある。ロ) カルシウムの離脱に伴いカゼイン内の構造は変易し易い形にある。このような状態下で押出しによるずり応力を加えると、レンネット・カゼインははじめて配向し易い状態になると推察される。

要 約

pH 4.5 から pH 6.8 の範囲におけるレンネット・カゼイン溶液 (濃度約 30%) に、シリンジ式ノズルを用いて一種のずり応力を与えると、pH 5.3~5.4 付近において配向性をもった糸状組織物が得られた。この現象から、レンネット・カゼインの配向性におよぼす pH の影響を検討した。

イ) pH 4.5 から pH 6.8 の範囲にわたるレンネット・カゼインの容積変化と上清側へのタンパク質画分の移行度との関係から、レンネット・カゼインの水和度の最も大きいところは、pH 5.3~5.4 付近である。

ロ) レンネット・カゼイン中のカルシウム/リンの比率および水和度を表わすペレット容積の変化から、レンネット・カゼインの pH による形態的变化は A, B, C の 3 領域に大別される。

ハ) 上記の B 領域の範囲に入る pH 5.4 以上からアルカリ側に進むに従って、カルシウムおよびリンの上清部への移行は減少する。

ニ) レンネット・カゼインの配向性は、カゼインの水和度が高く、カゼインからのカルシウム、リンの離脱の終末点に相当する pH 5.3~5.4 とよく一致する。

文 献

- 1) McKENZIE, H.A.: Milk Proteins. 2, 87 (Academic Press Inc.) (1971).
- 2) DAVIES, D.T. and LAW, A.J.R.: *J. Dairy Res.*, 44, 447 (1977).
- 3) McMECKIN, T.L. and GROVES, M.L.: Fundamentals of Dairy Chemistry, ed. BYRON H. WEBB and ARNOLD H. JOHNSON,

Fig. 5 Effect of CaCl_2 concentration on aggregation of rennet casein at various pH

(Aggregation of rennet casein was observed by measuring absorbance at 350 nm.)

- P. 384 (The AVI Publishing Co., Inc.) (1965).
- 4) KAMEL, T.H.: *J. Agr. Food Chem.*, **8**, 156 (1960).
- 5) ALLEN, R.J.L.: *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).
- 6) FORD, T.F., RAMSDELL, G.A. and LANDSMAN, S.G.: *J. Dairy Sci.*, **38**, 843 (1955).
- 7) TER, H. and MARIA, G.: *Neth. Milk Dairy J.*, **17**, 185 (1963).
- 8) BURG, P.: *Neth. Milk Dairy J.*, **1**, 69 (1947).
- 9) PYNE, G.T. and MCGANN, T.C.A.: *J. Dairy Res.*, **27**, 9 (1960).
- 10) SNOEREN, T.H.M., KLOK, H.J., VAN HOYDONK, A.C.M. and DAMMAN, A.J.: *Milchwissenschaft*, **36**, 461 (1984).
- 11) VAN HOYDONK, A.C.M., HAGEDOORN, H.G. and BOERRIGTER, I.J.: *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 281 (1986).
- 12) WAUGH, D.F., STATERY, C.W. and CREMER, L.K.: *Biochemistry*, **10**, 817 (1971).
- 13) THOMPSON, M.P., GORDON, W.G., BOSWELL, R.T. and FARRELL Jr, H.M.: *J. Dairy Sci.*, **52**, 1161 (1969).
- 14) PAYENS, T.A.J.: *J. Dairy Sci.*, **49**, 1317 (1966).
- 15) KOSIKOWSKI, F.V.: Mozzarella cheese. In "Cheese and Fermented Milk Foods" published by Kosikowski, F.V. and Associates, Brooktondale, New York. (1977).
(昭和 62 年 7 月 24 日 受理)