

## カゼイン・ミセルの膠状性に関する研究

吉 田 繁  
(広島大学水畜産学部)

### Studies of Colloidal Aspect on Casein Micelle

Shigeru YOSHIDA

*Department of Animal Husbandry, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,  
Hiroshima University*

(Figs. 1-29; Tables 1-12; Plate 1)

#### 目 次

第1章 序 論 .....	499
第2章 カゼイン・ミセルの膠状性に関する研究 .....	500
第1節 乳汁中に分散するカゼイン・ミセルの状態 .....	500
第2節 カゼイン・ミセルの分割に関する実験 .....	502
第3節 カゼイン・ミセル構成蛋白質部分の性状に関する実験 .....	513
第3章 論 議 .....	530
第4章 結 論 .....	537
引 用 文 献 .....	538
Summary .....	539
Plate .....	529

#### 第 1 章 序 論

我々は日常の食生活において牛乳を原料とした種々の乳製品を利用している。例えば、最も原料に近い状態の市乳或いは生クリームや脱脂乳、これらを濃縮した状態の無糖練乳、加糖練乳、水分を完全に近い状態まで除去した粉乳、また多くの物理的、化学的、生物学的処理工程を受けているバター、チーズ、ヨーグルト、乳酸飲料、醗酵乳などと枚挙にいとまない。

このように栄養的に優れている牛乳を食品として食生活に利用することを知ったのは紀元前数千年にさかのぼることであろうが、それ以来、乳牛の品種改良に努力を払い、遂に現在にみられるような多量の乳量、高蛋白質、高脂肪を長期間に渡って分泌するような乳用牛を今日にあらしめたことは人類の英智によるものであろう。

しかるに、本来より乳汁の自然界における存在価値を考えてみるならば、乳汁は人類に利用されるために存在するのではなく、母牛からその仔牛への栄養伝達系であり、犢牛の發育に必要な種々の栄養分

を含有しているのである。母牛の乳腺細胞で合成された乳汁は乳房から犢牛の胃内へと直接授受されて、その胃内においては凝乳酵素であるレンニンの作用を受けて凝固しカードを生成したのち漸次各種消化酵素の作用を受けて腸管内へと移行するのであるが、この機構は牛にのみ特有のものではなくて哺乳類の各動物の全てに共通なものであろう。それ故、乳汁はその幼動物の発育に必要なほとんど全ての要素を含んでいて、生命現象における必須の因子である各種アミノ酸を充分含有しているカゼイン態蛋白質、発育に必要なカロリーの供給源としての脂肪、乳糖、体軀構成上の支柱としての Ca, P, さらには各種無機成分、 $H_2O$ 、ビタミン類の他に血清蛋白質に近似の組成を有するラクトアルブミン、ラクトグロブリンが存在している。

これらの各種組成の中でも特異的なものはカゼイン態蛋白質であろう。カゼイン態蛋白質は乳汁中のみ分布するものであるが、この蛋白質に存する特徴はカゼイン分子と  $Ca^{++}$ ,  $PO_4^{---}$  との間に非常に複雑な相互作用が存在して、膠質学的に特異なミセル構造を形成して乳汁中に分散していることである。若し栄養面だけを単純にとり上げるならば、カゼイン蛋白質はこのようなミセル構造を呈していなくとも、より単純な  $Ca^{++}$ ,  $PO_4^{---}$  を結合した状態の複合蛋白質でも良いわけで、更に極論するならば蛋白質でなくともペプチドやアミノ酸の状態であった方がより理想的であるかの如く考えられる。何故ならば、乳腺細胞中でアミノ酸より合成されたカゼイン蛋白質は結腸仔牛の腸管内で再びアミノ酸に分解されて吸収されるからである。しかし現実にはカゼイン蛋白質分子が  $10^4$  のオーダーの分子量であるのに比べてカゼイン・ミセルは  $10^7 \sim 10^9$  のオーダーの粒子量を有して存在しているので、その意義を究明することは栄養学的な面からも興味ある事実であろうし、単に静的 (static) な栄養価とそのミセル構造の解明だけの問題ではなくて、実に動的 (dynamic) な消化、吸収、及びさらに神秘的な且つ合理的な動物界における生化学的機作の関与する問題へと発展する可能性を含んでいるように思われる。

牛乳から乳製品を製造するに当たっての乳製品製造工業においては、種々の加工工程があり、殺菌、滅菌、濃縮、乾燥における加熱処理、凝乳における酵素的、微生物的処理、その他蛋白分解、酸、イオン環境の変化においてみられる種々の変化において、その現象を根本的に解明し、理解してゆくことが必要な事であろう。このような見地から、カゼイン蛋白質は乳汁中において最も重要な役割を果しているが種々処理工程中においてはカゼイン・ミセルとして挙動していると考えられるので、その構造と、挙動に際しての変化を究明することにより乳製品製造工業に幾分たりとも寄与出来るものであると考えるものである。

この論文の発表に当たり、御指導、御校閲を賜った橋本吉雄博士、有馬俊六郎博士、安井勉博士に深甚の感謝の意を表すと共に、実験に際し御協力を願った北海道大学農学部畜産学科畜産製造学第一講座の方々に衷心より謝意を表する次第である。

## 第 2 章 カゼイン・ミセルの膠状性に関する研究

### 第 1 節 乳汁中に分散するカゼイン・ミセルの状態

正常な牛乳は pH 6.5~6.7 を呈し、Ca は約 30 mM, カゼイン態蛋白質は約 2.5% 含有しているが、とくに乳汁中においてカゼイン蛋白質は非常に特異の状態であるコロイド・ミセルを形成して存在していることが知られている。乳汁を電子顕微鏡で観察すると、このカゼイン・ミセルは非常に微細な球形 (粒状) を呈していることが観察され、このカゼイン・ミセルは正常な乳汁中においては 1 ml 当り  $5 \sim 15 \times 10^{12}$  個存在すると考えられており、又その大きさは  $30 \sim 300 m\mu$  の範囲にあることが知られているが<sup>1)</sup>、その詳細な内部構造については全く不明である。このカゼイン・ミセルは比較的容易に乳汁より高速遠心分離法、或いは限外濾過法などの方法により分離することが出来るが、乳汁中に存在する全てのカゼイン態蛋白質がミセルを形成しているとは考えられず、一部には乳清中に溶解した状態で存在していて、それとミセル構造を有する懸濁した状態のものが平衡状態を保って分散しているものと

考えられている。



この事実は乳汁を高速、長時間遠心分離を行なうとき、尚且つ非常に沈澱し難い微小のカゼイン・ミセル、或いは溶液状のカゼイン蛋白質がその上澄液中に存在していることから推察出来るが実際に平衡状態にあるか否かの証明は未だなされていない。そして著者によると (§ 2.2. (1)) 30000 g, 20分の遠心分離で沈澱するミセル状カゼイン蛋白質は 83.3 % であり、上澄液中には尚 16.7 % のカゼイン態蛋白質が残存していた。

カゼイン・ミセルはカゼイン蛋白質の他に Ca, Mg, P, クエン酸塩などの塩類を包含しており、中でも Ca-カゼインとして 95.20%,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  として 4.8% からなり<sup>2)</sup>, Ca-カゼイン中にも Ca として 1.18% 含んでいるという<sup>3)</sup> 報告がある。

カゼイン・ミセルは乳汁中であってはかなりの量の水を結合しているけれども幾分、疎水性の膠質状の粒子として分散していて、特に乳汁中においてはカゼイン・ミセルと乳清とが平衡状態を保って懸濁しているので乳汁特有の強い白濁を生ずるのである。更に又、このカゼイン・ミセルにおいてはカゼイン蛋白質自体の有する電荷と  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  のような 2 荷のアルカリ土類金属イオンが強く結合しており、乳清中においては特にそのうちの可溶性塩類とカゼイン・ミセルとが不安定な平衡状態を保っている<sup>4)</sup>, カゼイン・ミセルはその分散媒である乳清中のイオン環境に強い影響を受け、特に pH の変化に対して極めて鋭敏に反応することが知られている。

乳汁中においてカゼイン蛋白質は  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  などの塩類と共に複合体粒子を、或いはミセルを形成して分散していることについては先述の通りであるが、このカゼイン・ミセルの構造、特にカゼイン蛋白質と Ca, P との間の複雑な且つ特異的關係については 2 つの相異なった意見が出されている。

その 1 つは  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  を主とする磷酸カルシウムのコロイド粒子と Ca-カゼイン粒子とが別々に存在していて、前者の磷酸カルシウムが後者の Ca-カゼインによって物理的に保護されているという意見であり<sup>5)</sup>, 他の 1 つは Ca-磷酸-カゼイン複合物の状態ではミセル構造を形成しているという説とである<sup>6)7)</sup>, しかし、今日、Ca や P がどのようにしてカゼイン蛋白質と結合しているかについてすら明確にされていない状態にあるので、これらの両意見ともに確立された学説ではなくて未だ推察の域を出ないものであると考えられる。

最近の研究によるとカゼイン・ミセルは今まで考えられていたよりもはるかに複雑なものであるといわれており、ミセルを形成する蛋白質部分のカゼインについてみても単一の蛋白質ではなくて非常に多種類のカゼインから成っていることが、電気泳動法<sup>8)</sup>, 溶解度の差異<sup>9)10)11)</sup>, 超遠心分離法<sup>12)</sup> により、或いはごく最近開発された陰イオン交換樹脂を応用したセルローズ・カラムクロマトグラフィー<sup>13)</sup> においても証明されていて、更にこれらのカゼインの相互の間に非常に複雑な関係が存在し、夫々のカゼインの間に複合物<sup>12)14)</sup> を形成しているといわれている。また他方、 $\text{Ca}^{++}$  などの塩類についての研究においては Ca, Mg, P, クエン酸塩などは全てがイオン状に溶解して存在するのではなくて、それらの間にアニオン、カチオン平衡の、或いは塩類と蛋白質間の吸着又は結合したコロイド粒子を形成して物理的平衡状態を保っているといわれている<sup>15)</sup>。



そして乳汁中では Ca の  $\frac{1}{3}$ , P の  $\frac{1}{3}$ , Mg の  $\frac{3}{4}$  とクエン酸塩の  $\frac{1}{10}$  とが溶解した状態にあるといわれていて、それ以外のはコロイド状態を呈しているとの報告がある<sup>14)</sup>。そして特に、P については無機の状態では  $\frac{1}{3}$ , コロイド状無機磷として  $\frac{2}{3}$ , 主としてカゼインと結合している蛋白質中のものが  $\frac{1}{3}$  といはれていて、この蛋白質と結合している磷は主としてカゼイン蛋白質中のセリン、スレオニンの -OH 基とエステル結合しているものと考えられている。更にコロイド状の無機磷は主として  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  として存在

するという説があるが明確な証明がなされていない。そしてカゼイン・ミセルにおいては、カルシウム：有機燐：無機燐の原子比が少なくとも、5：2：2であると報告されている<sup>16)</sup>。

このように古く1883年に MULDER が始めて牛乳から酸沈澱法によってカゼインを分離して以来<sup>17)</sup>、非常に長年に渡って深く、広く研究されてきたのであるが未だ不十分な点が多く、特にその特異的性質である膠質的性質に関する研究の面において核心にふれる仕事が始められたのはここ数年のことであると思われる。特に D.F. WAUGH<sup>18)</sup> らが  $\alpha$ -カゼインから  $\kappa$ -カゼインの分離に成功して以来、カゼイン分子間の相互関係、即ち、カゼイン複合物の問題と  $\text{Ca}^{++}$  との結合の解明に効果的努力が払われている。ただしカゼインの有する特異的性質であるカゼイン・ミセルの膠質化学的性質の究明が乳製品製造工業における種々の未解決な問題の解明に大きな糸口になることは論をまたないであろう。かかる意味においてカゼイン・ミセルの構造とその膠状性の解明に資すべく以下に述べる一連の研究を行なった。

## 第2節 カゼイン・ミセルの分割に関する実験

カゼイン・ミセルの構造を追求するに当たって先ず乳汁よりカゼイン・ミセルの分離を試み、次にそのミセルを解裂せしめ、そのカゼイン蛋白質部分及び無機成分について検討を加え、更にそのカゼイン蛋白質部分の分割を試みた。

### (1) 乳汁よりカゼイン・ミセルの分離

#### 試料及び実験方法

搾乳直後の新鮮な牛乳を  $2\sim 5^{\circ}\text{C}$  の冷室に5時間静置して、そこに生ずるクリーム層を除去したのち、2000回転 (650g) 15分遠心分離を2回繰返して、そこに生ずるクリーム層を再度除去して脱脂乳を調整した。このようにして得られた脱脂乳の pH は 6.70、蛋白濃度は 3.07%、Ca 127mg %、P 82.9mg % であった。

なお定量方法は次の通りである。

pH：日立製作所製 M-4 型ガラス電極 pH メーターで測定した。

蛋白濃度：マイクロケルダールの常法によった。

Ca：灰化後に HCl で溶解したのち柳沢法<sup>18)</sup>によって測定した。

P：硫酸による湿性灰化後に MARTIN & DOTY<sup>19)</sup> の方法によって測定した。

上記脱脂乳よりカゼイン・ミセルの分離に当っては Sharples 製超遠心分離機を用いて、 $5^{\circ}\text{C}$  において 35000回転 (30600g) 20分の遠心分離によってその沈澱物を採取する。このカゼイン・ミセル沈澱物中に存在する他の乳成分を除去する為に  $5^{\circ}\text{C}$  に冷却した脱イオン水を約50倍量加え日本精機製作所製 D II 型ホモジナイザーで充分均質化したのちこの懸濁液を東洋沝紙 No. 1 で濾過する。次にその沝液を再び超遠心分離し、これを3回繰返した。なお以下の実験に使用するカゼイン・ミセルの懸濁液の蛋白濃度を3%に脱イオン水で調整した。(第1図参照)

#### 実験結果

脱脂乳を 30600g 20分遠心分離した結果、脱脂乳中のカゼイン態蛋白質の83.3%が沈澱した。この粗カゼイン・ミセルは 1g 蛋白質当り Ca を 37.4mg、P を 22.5mg 結合して、それを洗滌するときのカゼイン・ミセル中の Ca と P との含量を測定した結果は第1表に示す通りであった。3回洗滌後のカゼイン・ミセルは 1g 蛋白質当り Ca 35.8mg、P 24.0mg であり、約 1.5kg の脱脂乳から蛋白質として約 16~18g のカゼイン・ミセルを得る事が出来た。なお脱脂乳中の全 Ca、P、N 量とその内のカゼイン・ミセル態の Ca、P、N 量を比較すると第2表に示す通りであった。

なお後述の方法による各種  $\text{CaCl}_2$  濃度に対するカゼイン・ミセル液の白濁度の変化については第2図に示す通りで、洗滌処理によるカゼイン・ミセルの変化は認められず、カゼイン・ミセル中の Ca、P 含量においても大きな変化は認められなかった。

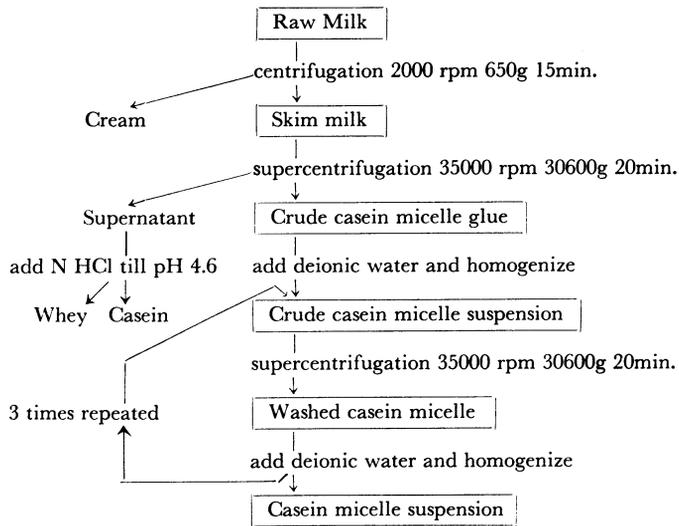


Fig. 1. Preparation of casein micelle from raw milk.

Table 1. The effect of purification on Ca and Mg content of casein micelle

	Ca (mg/l g prot.)	P (mg/l g prot.)	P/Ca
skim milk	40.5	27.0	0.667
first precipitated casein micelle	37.4	22.5	0.602
second precipitated casein micelle	34.8	24.1	0.692
third precipitated casein micelle	30.6	19.6	0.642
fourth precipitated casein micelle	35.8	24.0	0.670

Table 2. Ca, P, and N content in casein micelle and skim milk

	Ca (mg %)	P (mg %)	N (mg %)
skim milk	116.0	77.5	450.0
casein micelle	73.7	47.4	309.0

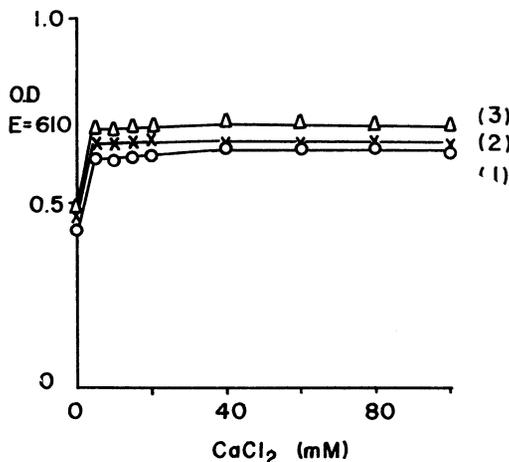


Fig. 2. Effect by purification on Ca-sensitivity of casein micelle (prot. conc. 0.2%, pH 7.0, 0.02M borate buffer, 37°C 30min. incubated).

(1) First precipitated casein micelle from skim milk, (2) Once washed casein micelle by deionized water, (3) Twice washed casein micelle by deionized water.

## (2) カゼイン・ミセルの解裂

カゼイン・ミセルは  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  などのアルカリ土類金属原子を結合して、ミセルを形成しているの  
で、カゼイン・ミセルの分割に当っては先ず  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  を除去してミセルを解裂せねばならない。  
カゼイン・ミセルを解裂させる為には、これらの結合しているアルカリ土類金属原子を除去すればよい  
ので、これらの目的の為にキレート化合物である E.D.T.A を用いてもよいが、その際生ずる Ca-  
E.D.T.A 化合物が水溶性である為にその系より除外するのに困難であり、またカゼイン・ミセルに結合  
している  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  の定量にも難点があるので、本報においては蓚酸塩を用いてこれらの金属原子  
を除去した。即ち、 $\text{Ca}^{++}$ , や  $\text{Mg}^{++}$  は蓚酸イオンと反応して容易に不溶性の化合物を形成するのでこ  
れを遠心分離法により分別採取する事が出来る。

### イ) カゼイン・ミセルの分解

#### 実験方法

1M 濃度の蓚酸カリ溶液を既述の 3% 蛋白濃度のカゼイン・ミセル液に攪拌しながら徐々に添加し、  
0.1M 濃度にする。

蓚酸カリ添加後 1 時間、5°C の冷室に静置する。蓚酸カリを添加するときその溶液の pH は漸次アル  
カリ側に傾くので、N/10 HCl を添加して液の pH を 6.8~7.0 に保つよう注意する必要がある。

生じた沈澱物を除去するため 5000 回転 (2000g) 20 分マルサン製冷凍遠心機にて 2°C で遠心分離し、上  
澄液中になお残存する過剰の蓚酸カリを除去する為 Visking 製セルローズチューブで 2°C で 20 倍容の  
冷脱イオン水で透析し、その外液は 6 時間おきにとり換え、かくして 24 時間透析を行なう。

#### 実験結果

このようにしてカゼイン・ミセル中の蛋白質から成る透明カゼイン溶液を得る。(これを D.F. WAUGH  
らに従って、本報においては、1st-cycle カゼインと称することにする。) 試料として用いたカゼイン・ミ  
セル液は最初白濁を呈する懸濁液であり、このときカゼイン蛋白質はミセルを形成しているゲル状の疎  
水性コロイドとして分散しているがこの操作の終了後においてはカゼイン・ミセルは  $\text{Ca}^{++}$  等の 2 価の  
金属イオンを放出してゾル状の透明な親水性コロイド状蛋白質溶液へとその様態が変化する。

## ロ) カゼイン・ミセル中の Ca, Mg の定量

次に上記の方法によって解裂されるカゼイン・ミセルに結合している Ca, Mg の定量を行なった。

## 実験方法

遠心管底部に附着する白色沈澱物である蓚酸塩を定量的に蒸発皿に移し蒸発乾固した後、恒量に至るまで十分に灰化しその灰分重量を測定した。更にその組成について定量する為に十分細砕したのち HCl で溶解して先述の方法で、柳沢法により Ca, Mg の測定を行なった。

## 実験結果

その結果については第 3 表に示す通りであり、カゼイン・ミセルは蛋白質 1g 当り 90.83mg の灰分に相当する蓚酸沈澱物を結合していた。そして、その灰化物中には Ca として 30.14mg, Mg として 2.62mg 含有していた。

Table 3. Ca and Mg content precipitated with oxalate from casein micelle.

ash/1g protein	Ca/1g protein	Mg/1g protein
90.83mg	30.14mg	2.62mg

## (3) カゼイン・ミセル構成蛋白質の分割

$\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  を除去したカゼイン・ミセルを構成している蛋白質部分は単一の組成ではなく多種のカゼイン蛋白質から成っているといはれていることについては既述の通りである。D.F. WAUGH らは 1st-cycle カゼインを  $\text{CaCl}_2$  に対する溶解度の違いにより分割する方法を発表している。本報においてもこれを基として改良を加え、4種の違った溶解度を示すカゼイン区分に分割することを試みた。

## 1) 1st-cycle-カゼインより 2nd-cycle カゼインの分割

## 実験方法

1st-cycle カゼインの 2.5~3.0% 溶液を  $0\sim 2^\circ\text{C}$  に保ち 1M  $\text{CaCl}_2$  を 30mM になるように、よく攪拌しながら徐々に添加するとカゼインの一部は沈澱を生ずる。次に 1 時間静置後、この沈澱物を東洋濾紙 No. 1 で濾別し、これを F-1 カゼイン区分とする。

濾液を  $0\sim 2^\circ\text{C}$  で 10000 回転 (7000g) 20 分の遠心分離により沈澱物を分離し、これを F-2 カゼイン区分とする。

透明な上澄液を微温湯の水浴で徐々に加温し、 $37^\circ\text{C}$  に至らしめたのち、そのまま 30 分保存し、次で  $30^\circ\text{C}$  以上の温度において Sharples 製遠心分離機で 20000 回転 (9000g) 20 分遠心分離してその沈澱物を採取し、これを F-3 カゼイン区分とする。

上澄液を直ちに  $5^\circ\text{C}$  以下に冷却して、これを F-4 カゼイン区分とした。

## 実験結果

以上の結果 1st-cycle カゼインは第 4 表に示すように  $\text{CaCl}_2$  に対して 4 つの異なった性質を示すカゼイン区分に分割することが出来た。なお、これらの 4 つのカゼイン分割物を WAUGH らに従って 2nd-cycle カゼインと名付けることにする。

## ロ) 分割カゼイン区分の精製

## 実験方法

先の操作により分割した夫々のカゼイン区分は各々、Ca-カゼインの形で存在するので、この Ca-カゼイン化合物から  $\text{Ca}^{++}$  を除去しなければならないので、§ 2.2(2) の操作と全く同様にして  $\text{Ca}^{++}$  を蓚酸塩として沈澱分離し、過剰の蓚酸イオンは充分な透析により除去した。

## 実験結果

以上の操作により分割、精製したカゼイン区分の比率は F-1 カゼイン区分は 36.3%, F-2 カゼイン区

分は3.8%, F-3 カゼイン区分は33.3%, F-4 カゼイン区分は22.9%であった。(第4表参照) なお,これらの各カゼイン区分中の蛋白質 1g 当りに結合した Ca 量については第5表に示す通りである。

カゼインの  $\text{CaCl}_2$  による分割, 精製の操作を図示すると第3図に示すようである。

Table 4. Solubility and composition of fractionated casein

	solubility (at 30mM $\text{CaCl}_2$ )		composition (%)
	at 2-5°C	at 30-35°C	
F-1 casein fraction	precipitate	precipitate	36.3
F-2 casein fraction	turbid	turbid	3.8
F-3 casein fraction	soluble	turbid	33.3
F-4 casein fraction	soluble	soluble	22.9

Table 5. Ca combined with casein

	ash (mg/1g casein)	Ca (mg/1g casein)
F-1 casein fraction	29.7	11.88
F-2 casein fraction	30.06	12.02
F-3 casein fraction	28.8	11.52
F-4 casein fraction	—	—

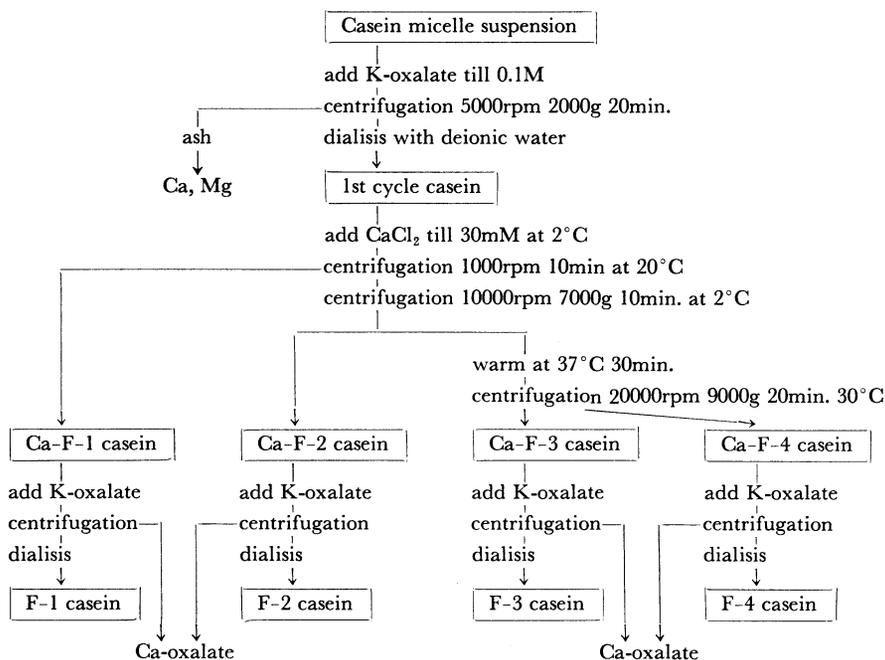


Fig. 3. Fractionation and purification of casein from casein micelle.

## (4) 各分割カゼインの電気泳動, D.E.A.E セルローズ・カラムクロマトグラフィーによる検討

カゼイン・ミセルを構成しているカゼイン蛋白質の  $\text{CaCl}_2$  に対する溶解度の違いから4つの区割に分割したのであるが、これらの4つのカゼイン区分が電気泳動的に、又 D.E.A.E セルローズ・カラムクロマトグラフィーに対して如何なる挙動を示すかにつき次のように検討を加えた。

## 実験方法

電気泳動に際しては各々のカゼイン区分1%溶液 5ml をセロファン No. 300 にとり、pH 7.0, 0.05M 磷酸緩衝液 400ml で24時間透析したのち電気泳動を行なった。用いた機械は日立 HTD-1 型、チゼリウス電気泳動装置を用い、泳動電流 10mA 40分、温度  $4^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  の条件で行なった。

D.E.A.E セルローズ・カラムクロマトグラフィーについては各々のカゼイン区分1%溶液 20ml をセルローズチューブにとり、pH 7.0, 0.02M 磷酸緩衝液 1l で24時間透析したのち、D.E.A.E セルローズに吸着せしめた。溶離に当って段階法 (step wise 法) により、第6表に示めすような pH 7.0, 0.02M 磷酸緩衝液に 0.15~1.0M の各濃度になるよう NaCl を加えた夫々の溶離液 100ml で行ない、更に 0.1 M と 0.2M NaOH で溶離せしめた。流出液は 10ml ずつ分別採取した後、その蛋白濃度を日立製 EPU-2 型分光光度計を用いて、E 1cm=280m $\mu$  の吸光度を測定した。なお、用いた樹脂筒は内径 40mm、高さ 350mm のガラス筒に乾燥重量 15g の D.E.A.E (Serva), 0.7 meq/g セルローズを高さ 55~60mm になるよう緊密に詰めたものを用いた。

Table 6. Composition of eluting buffers of D.E.A.E. cellulose column chromatography

Buffer No.	NaCl conc. (M)	pH 7.0 phosphate buffer conc. (M)	NaOH conc. (M)
1	0.150	0.02	0
2	0.175	"	"
3	0.200	"	"
4	0.225	"	"
5	0.250	"	"
6	0.275	"	"
7	0.300	"	"
8	0.325	"	"
9	0.350	"	"
10	0.500	"	"
11	1.000	"	"
12	0	0	0.1
13	0	"	0.2

## 実験結果

これらの結果については第4~13図に示す通りである。

電気泳動写真及びクロマトグラフィー展開図から、これらの分割したカゼイン区分について検討を加えてみると、F-1 カゼイン区分においてはほとんど単一の  $\alpha$ -カゼインとして電気泳動的に観察されるが、D.E.A.E セルローズ・クロマトグラフィー展開図では4つの主な成分 (p 4~p 7) と微量の P3, P9, AL 峰がみられた。主な4峰はいずれも  $\text{Ca}^{++}$  の存在で沈澱を生ずるので、 $\alpha_s$ -カゼイン群であろうと思われる。それ故に F-1 カゼイン区分は主として  $\alpha_s$ -カゼイン或いは  $\alpha_s$ -カゼイン群であると考えられる。F-2 カゼイン区分についてはほとんど F-1 カゼイン区分と同じ傾向を示しているが、電気泳動的にも、又 D.E.A.E クロマトグラフィー展開図においても F-1 カゼイン区分にくらべて、 $\beta$ -カゼイン相当峰がや

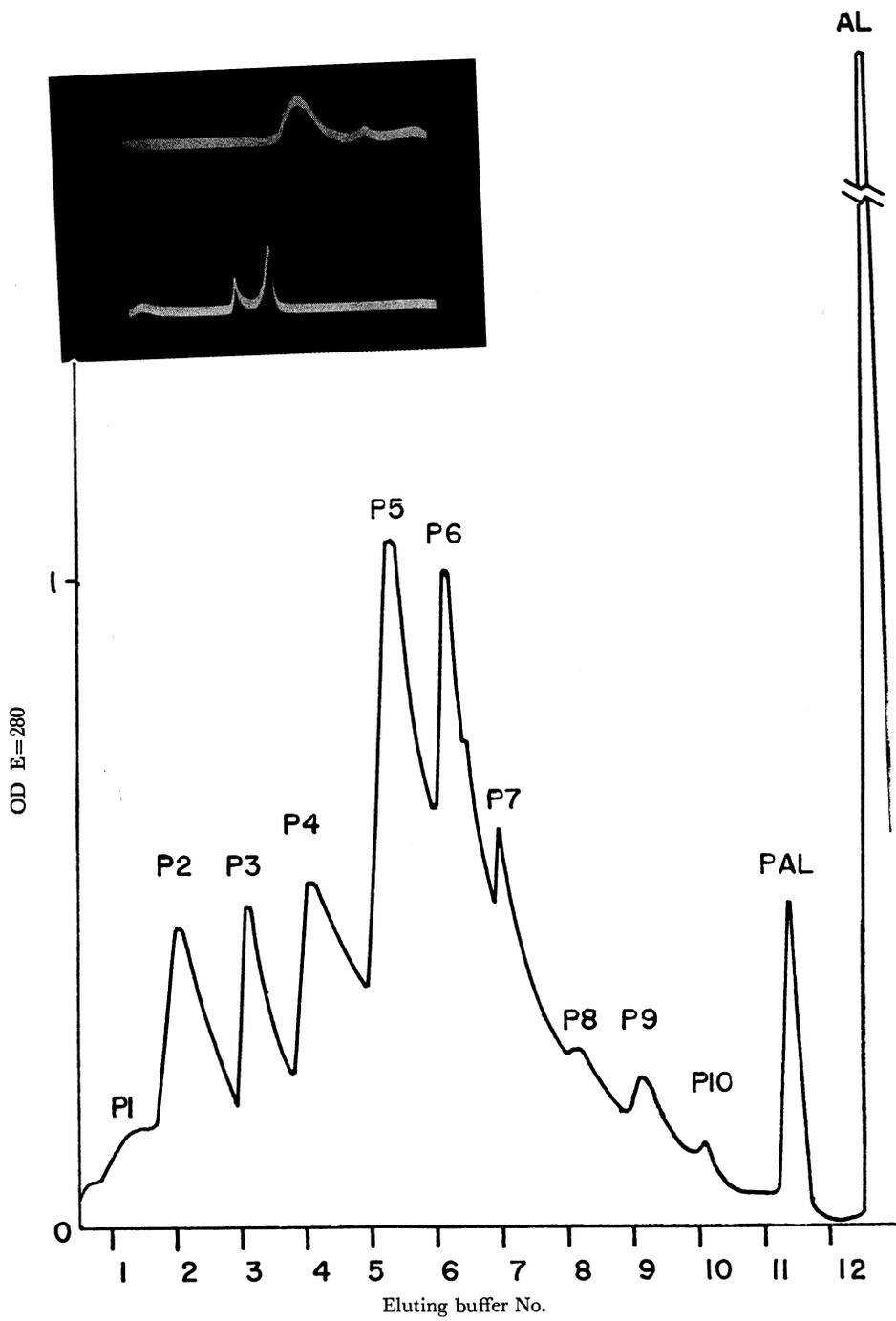


Fig. 4. Effluent diagram of chromatography and electrophoretic pattern of 1st cycle casein.

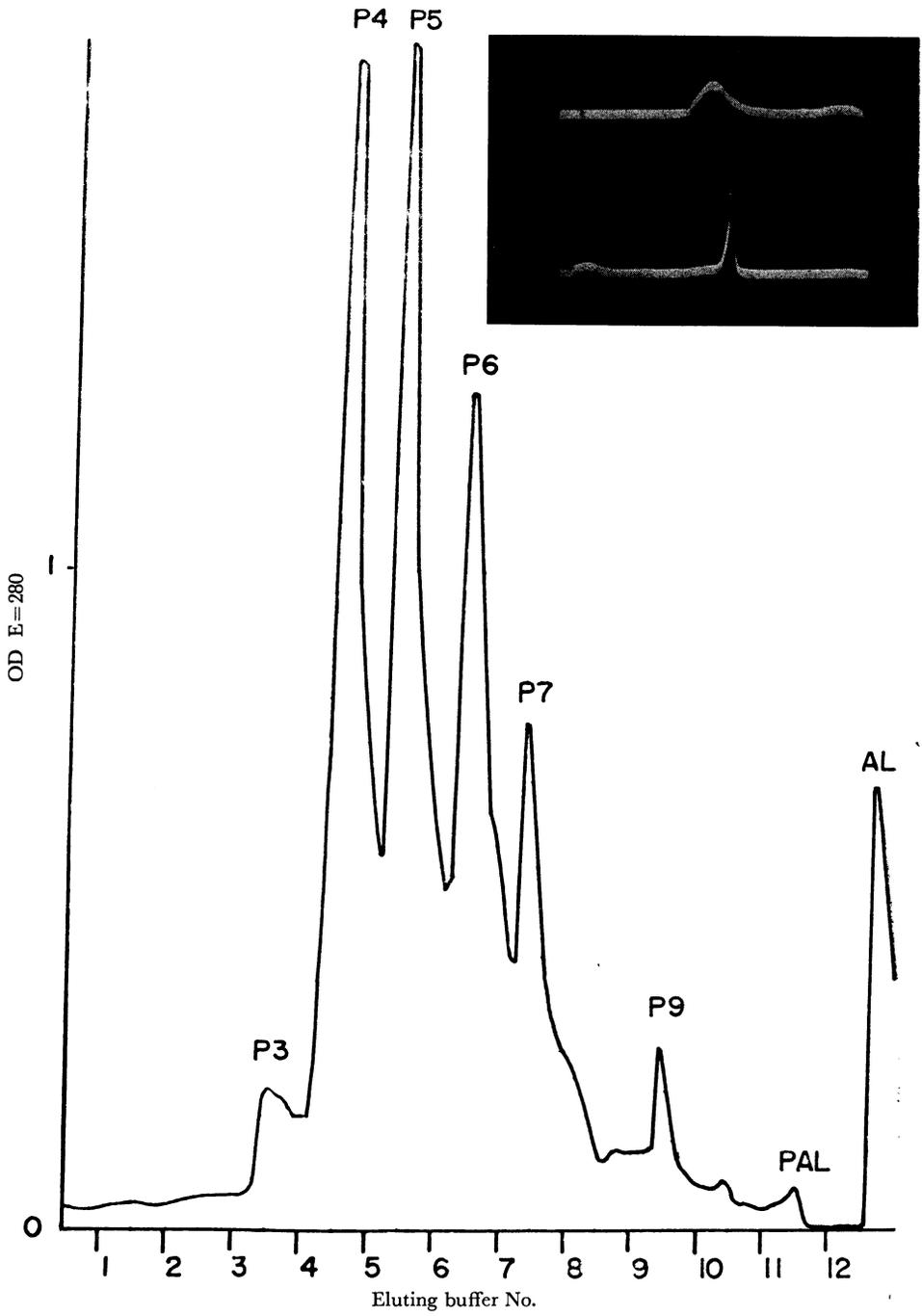


Fig. 5. Effluent diagram of chromatography and electro phoretic pattern of F-1 casein fraction.

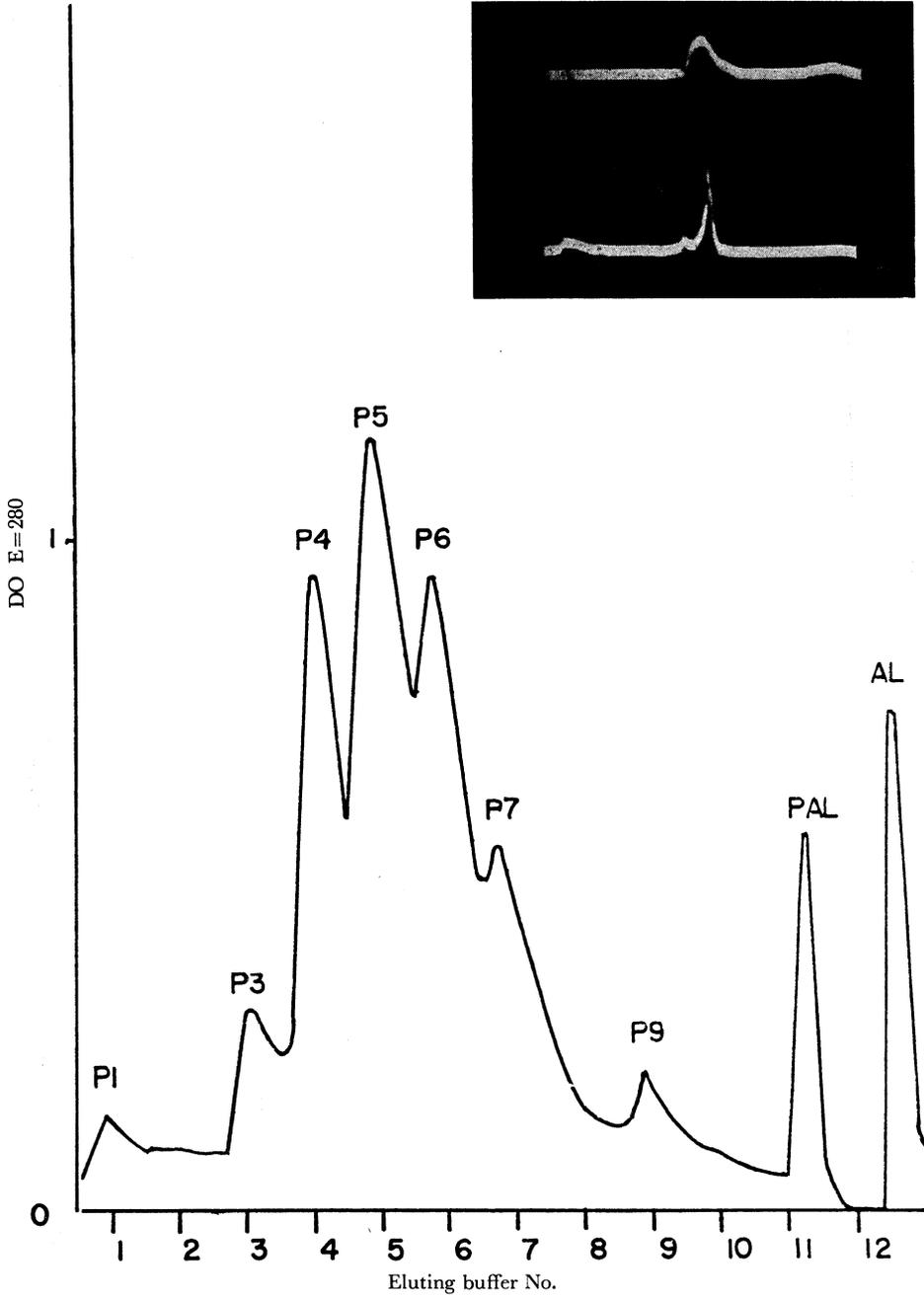


Fig. 6. Effluent diagram of chromatography and electro phoretic pattern of F-2 casein fraction.

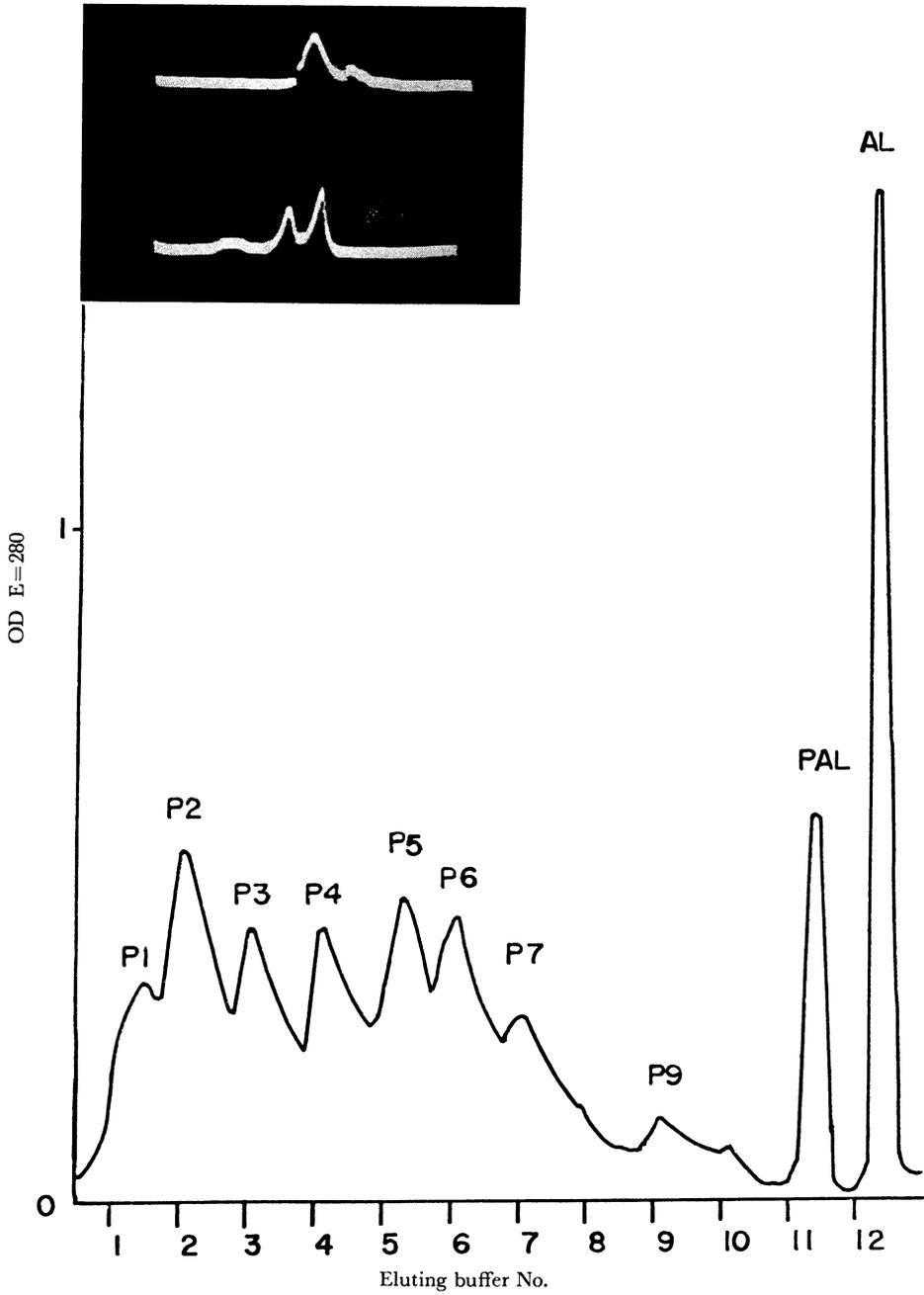


Fig. 7. Effluent diagram of chromatography and electrophoretic pattern of F-3 casein fraction.

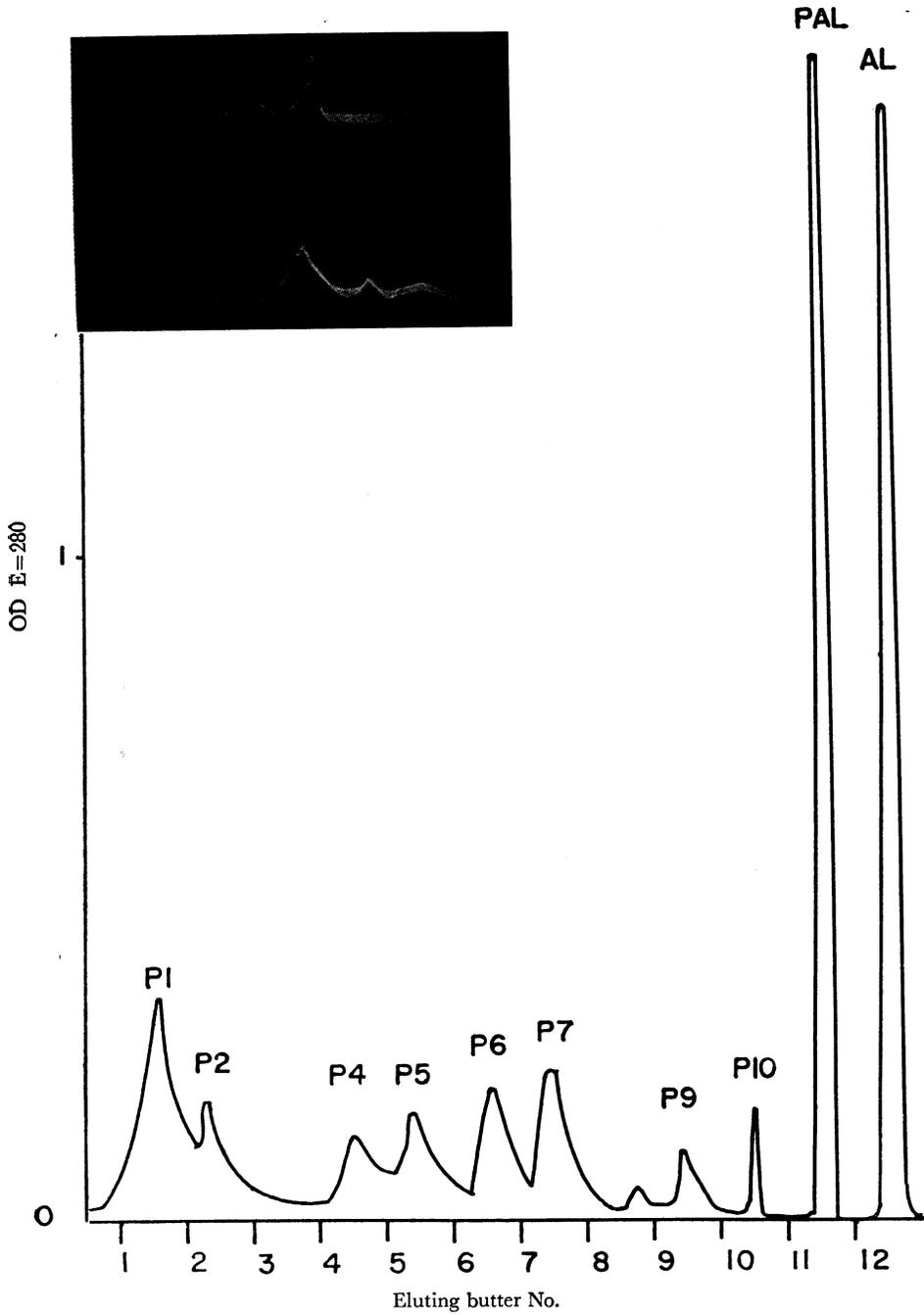


Fig. 8. Effluent diagram of chromatography and electrophoretic pattern of F-4 casein fraction.

や多くみられ、更に $\kappa$ -カゼインの量もやや多い。これらのことは P-1, P-3, P-AL, AL の峰の存在から予想出来るが、F-1 カゼイン区分と F-2 カゼイン区分の間に多少の相違がみられるが、その主な成分である P-4~P-7 はほとんど同じものと思われる。F-3 カゼイン区分は電気泳動的には多量の $\beta$ -カゼインが存在するが、これと同量以上の $\alpha$ -カゼイン相当峰がみられた。D.E.A.E 展開図においても $\beta$ -カゼインを豊富に含有していることから、また多量の $\kappa$ -カゼイン相当峰が存在することが判り、これは P-1~P-3 峰が、また P-AL, AL 峰が多量含まれていることが判る。

このことから F-3 カゼイン区分の主成分は $\beta$ -カゼイン群と $\kappa$ -カゼイン群であろうと思われる。F-4 カゼイン区分は電気泳動的には4峰からなり易動の距離から考えて、最も少量の峰は $\gamma$ -カゼインであろうと思われた、また $\beta$ -カゼインと2つに分れている $\alpha$ -カゼイン相当峰がみられた。その主成分は $\alpha$ 峰に相当する。この2つの峰でこれは $\kappa$ -カゼインであると思われる。D.E.A.E 展開図においてもその主成分は2つの P-AL と AL 峰でこれは $\kappa$ -カゼインに相当する区分でありその他に $\beta$ -カゼインに相当する峰がみられたが $\gamma$ -カゼインについては不明であった。

なおこれらの4つの分割したカゼイン区分を比較するため 1st-cycle カゼインについても同様の実験を行ない、第4図と第9図に示している。D.E.A.E カラムクロマトグラフィー展開図において P-1~P-3 が $\beta$ -カゼイン相当峰 P-4~P-7 が $\alpha$ -カゼイン相当峰、P-AL, AL 峰は $\kappa$ -カゼインに相当するものと考えられている。

### 第3節 カゼイン・ミセル構成蛋白質部分の性状に関する実験

カゼイン・ミセル、1st-cycle カゼイン、及び分割した 2nd-cycle カゼインの夫々についての性状、とくに  $\text{Ca}^{++}$  に対する挙動について検討する為に次のような実験を行なった。

#### (1) カゼイン・ミセルの $\text{Ca}^{++}$ に対する挙動について

脱脂乳からカゼイン・ミセルを分離するとき、その脱脂乳中にあらかじめ  $\text{CaCl}_2$  を添加しておくこととミセルは非常に沈澱し易くなり、ゲル状のゼラチンゼリー様の沈澱物が得られる。これは  $\text{CaCl}_2$  を添加しないで遠心分離して採取した糊状のカゼイン・ミセルグルーとはその性状が非常に異なっていることが観察される。D.F. WAUGH<sup>(12)</sup> らはこの現象を利用して脱脂乳からカゼインを遠心分離しているが、この方法によるとミセルを形成していないか、或いは遠心分離され難いようなカゼイン部分の中で、 $\text{Ca}^{++}$  と反応して沈澱を生ずるカゼイン区分も同時に沈澱してくることになるが、自然の状態のカゼイン・ミセルを採取したことにはならないと思われる。この事を実験的に確かめるため、更には  $\text{Ca}^{++}$  添加によるカゼイン・ミセルの変化について検討を加えるため前節で述べたような方法で遠心分離したカゼイン・ミセルについて次のような実験を行なった。

#### 1) $\text{Ca}^{++}$ 添加によるカゼイン・ミセルの白濁度の変化について

カゼイン・ミセル液はもともとより固有の白濁度を有しているが、このミセル懸濁液に  $\text{Ca}^{++}$  を添加するとその  $\text{Ca}^{++}$  濃度に応じて白濁度が強くなることが観察される。そこでこの現象、すなわちカゼイン・ミセルに及ぼす  $\text{Ca}^{++}$  の影響を白濁度の面から分光光電光度計を用いて、比濁法により検討を加えた。

#### 実験方法

各種濃度の  $\text{Ca}^{++}$  におけるカゼイン・ミセル液の白濁度を日立製 EPU-2 型、分光光電光度計を用いて、 $E_1 \text{ cm} = 610 \text{ m}\mu$  の吸光度で測定し、その結果を横軸に  $\text{Ca}^{++}$  濃度、縦軸に吸光度で示す図表として示した。なお吸光度の測定に当って、反応液は第7表に示す通りに従って、 $\text{Ca}^{++}$  濃度は 0~60mM, pH 7.0, 0.02M 硼酸緩衝液、蛋白質濃度 0.1% において 35°C で 30分恒温保持したのち直ちにその吸光度を測定した。

Table 7-1. Schedule of the Ca-sensitivity of casein and casein micelle solved or suspended with deionic water.

Final conc. of CaCl <sub>2</sub> (mM)	0	5	10	15	20	40	60	80	100
1M CaCl <sub>2</sub> (ml)	—	—	—	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.1M CaCl <sub>2</sub> (ml)	—	0.25	0.5	0.75	—	—	—	—	—
Deionic water (ml)	3.5	3.25	3.0	2.75	3.40	3.3	3.2	3.1	3.0
pH 7.0, 0.1M borate buffer (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2.0% casein or casein micelle with deionic water	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Table 7-2. Schedule of the Ca-sensitivity of casein and casein micelle solved or suspended with borate buffer

Final conc. of CaCl <sub>2</sub> (mM)	0	5	10	15	20	40	60	80	100
1M CaCl <sub>2</sub> (ml)	—	—	—	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.1M CaCl <sub>2</sub> (ml)	—	0.25	0.5	0.75	—	—	—	—	—
Deionic water (ml)	4	3.75	3.5	3.25	3.9	3.8	3.7	3.6	3.5
pH 7.0, 0.1M borate buffer	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.0% casein or casein micelle with 0.1M borate buffer	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## 実験結果

実験の結果は第9図に示す通りで、白濁度はCaCl<sub>2</sub>濃度の増加にしたがって漸次増加することが判った。

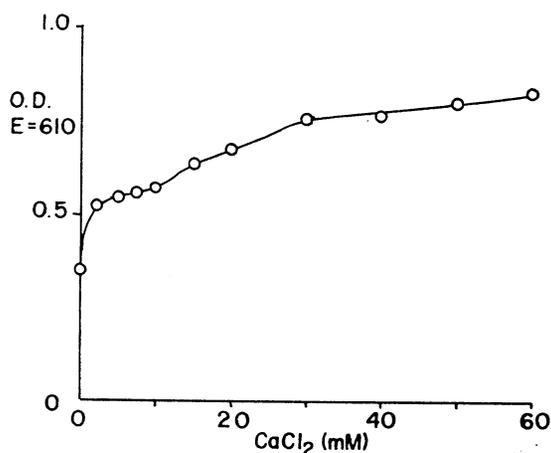


Fig. 9. Ca-sensitivity of casein micelle (prot. conc. 0.2%, pH 7.0, 0.02M borate buffer, 37°C 30min. incubated).

ロ) カゼイン・ミセル液の白濁度と蛋白質濃度との関係について

カゼイン・ミセル液の示す白濁度とカゼインの蛋白質濃度との関係について次のような検討を加えた。

実験方法

1%蛋白濃度に調整したカゼイン・ミセル液を0.05~0.20%蛋白濃度に稀釈して、その白濁度を $E_{1cm}=610m\mu$ で測定した。なおそのとき $Ca^{++}$ 濃度が0, 10, 40mMになるよう $CaCl_2$ を添加し、更にpH 7.0, 0.02M 硼酸緩衝液に調整するため第8表に従って反応液を調整した。吸光度の測定に当っては各々の反応液を35°Cで30分恒温保持したのち、直ちに吸光度を測定した。

Table 8. Schedule of the Ca-sensitivity influenced to its turbidity by protein concentration

Final protein conc. (%)	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0	0.05	0.10	0.15	0.20
1% casein micelle (mL)	0	0.25	0.50	0.75	1.00	0	0.25	0.50	0.75	1.00
1M $CaCl_2$ (ml)	0	0	0	0	0	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Deionic water (ml)	4	3.75	3.50	3.25	3.00	3.95	3.70	3.45	3.20	2.95
pH 7.0, 0.1M borate buffer (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Final $CaCl_2$ conc. (mM)	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10

0	0.05	0.10	0.15	0.20
0	0.25	0.50	0.75	1.00
0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
3.80	3.55	3.30	3.05	2.80
1	1	1	1	1
40	40	40	40	40

実験結果

実験の結果は第10図に示す通りとなり、カゼイン・ミセルをpH 7.0の硼酸緩衝液の存在下で稀釈しても、或いはその場合10mM, 40mMの $CaCl_2$ が存在しても、カゼイン・ミセル液の白濁度と蛋白質濃度とは全く比例することが判った。

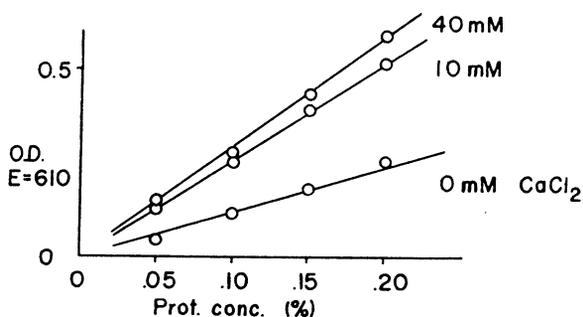


Fig. 10. The effect of prot. conc. on intensity of turbidity of casein micelle (pH 7.0, 0.02M borate buffer, 35°C 30min. incubated).

ハ) カゼイン・ミセル液の白濁度と温度の関係

カゼイン・ミセルを脱イオン水で懸濁するとき、その白濁度は稀釈によって変化を受けなくて蛋白濃度に比例することがロ)の実験で明らかとなったので、次にこの白濁度が恒温保持温度により如何なる

影響を受けるかについて次のような実験を行なった。

#### 実験方法

0.1%蛋白濃度, pH 7.0, 0.02M 硼酸緩衝液, 0, 10, 40mM  $\text{CaCl}_2$  存在の下で反応液を  $5^\circ\text{C}$  から  $35^\circ\text{C}$  までの各温度において, 30分恒温保持したのち  $E_{1\text{cm}}=610\text{m}\mu$  で生ずる白濁度を測定した。

#### 実験結果

その結果は第11図に示す通りであり, カゼイン・ミセル液に  $\text{Ca}^{++}$  を添加しない場合, すなわち第11図の 0mM  $\text{CaCl}_2$  濃度においてはその白濁度は温度によって変化を受けないが, このカゼイン・ミセル液に  $\text{Ca}^{++}$  が存在する場合には, その白濁度は温度の影響を受け, 温度が高い程白濁が増加することが判った。

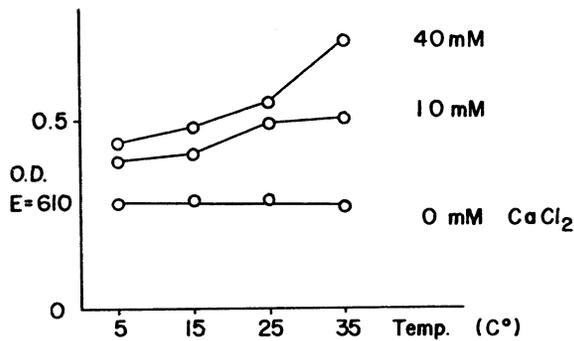


Fig. 11. The effect of temp. on intensity of turbidity of casein micelle (pH 7.0, 0.02M borate buffer, 0.1% prot. conc., 30min. incubated at  $5\sim 35^\circ\text{C}$ ).

#### ニ) カゼイン・ミセル液の白濁度と恒温保持時間の関係

カゼイン・ミセル液を各種濃度の  $\text{Ca}^{++}$  存在において  $35^\circ\text{C}$  で恒温保持するとき生じた白濁度が時間の経過によりどのような変化がみられるかについて次のような実験を行なった。

#### 実験方法

0.1%蛋白濃度, pH 7.0, 0.02M 硼酸緩衝液, 0, 10, 40mM  $\text{CaCl}_2$  存在において溶液を  $35^\circ\text{C}$  に恒温保持して, そのときの白濁度の変化を経時的に  $E_{1\text{cm}}=610\text{m}\mu$  における吸光度で測定した。

#### 実験結果

実験の結果は第12図に示す通りで,  $\text{Ca}^{++}$  の添加しないものについては恒温保持時間によりほとんど変化しないが,  $\text{Ca}^{++}$  を添加したものについてはその白濁度は最初の10分までは急激に増加するが, それ以上60分までの間はその白濁度はほとんど変化せず恒常を保っていることが判った。

#### ホ) $\text{Ca}^{++}$ 添加によるカゼイン・ミセル液の白濁度の変化とカゼイン・ミセルの遠沈性の関係について

カゼイン・ミセルと  $\text{Ca}^{++}$  が存在するとき, その白濁度は増加する事については先の実験イ) で明らかとなったが, この変化がカゼイン・ミセルにどのような影響を及ぼしているかについてカゼイン・ミセルの沈澱性の面から次のように検討を加えた。

#### 実験方法

pH 7.0, 0.02M 硼酸緩衝液, 0~100mM  $\text{CaCl}_2$  存在における0.57%蛋白濃度のカゼイン・ミセル液を  $5^\circ\text{C}$  で3時間静置したのち生じた白濁度を  $E_{1\text{cm}}=610\text{m}\mu$  の吸光度で測定した。次でその反応液を  $5^\circ\text{C}$  で5000回転 (2000g) 15分間遠心分離してその上澄液の蛋白濃度をマイクロケルダール法により測定した。

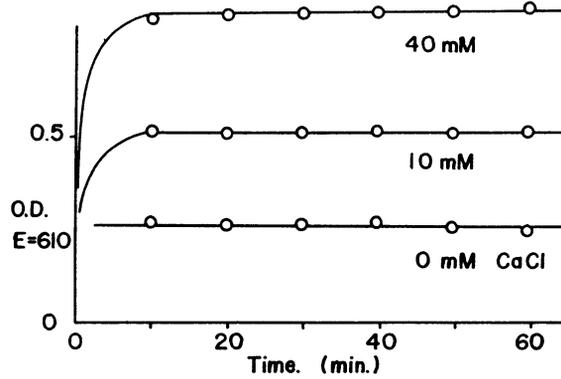


Fig. 12. The effect of incubating time on intensity of turbidity of casein micelle (pH 7.0, 0.02M borate buffer, 0.1% prot. conc., 35°C).

実験結果

実験の結果は第13図に示す通りで、カゼイン・ミセル液に CaCl<sub>2</sub> を添加すると白濁度は増加するがそれに伴ってカゼイン・ミセルは遠心分離され易くなり、遠沈性が増加することが判った。このことは、すなわちカゼイン・ミセルに Ca<sup>++</sup> を添加するとミセルの粒子が沈澱し易くなって、かつその液の白濁度の増加と比例する関係にある事が判り、ミセルの粒子の形状に変化が持たされている事を意味しているものと思われる。

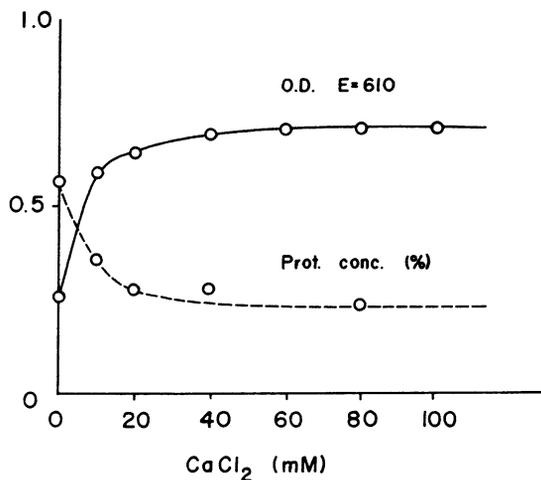


Fig. 13. Changes of turbidity and precipitation of casein micelle suspension at 0-100mM CaCl<sub>2</sub> conc. (solid line is turbidity of casein micelle at pH 7.0, 0.02M borate buffer, 0.57% prot. conc. at 5°C 3hours incubated, and dotted line is protein concentration of its supernatant of 5000rpm 2000g 15min. centrifugation at 5°C).

へ) Ca<sup>++</sup> 添加によるカゼイン・ミセル液の白濁度と粘度の関係について

カゼイン・ミセル液に Ca<sup>++</sup> を添加するとき、その液の白濁度は増加し、カゼイン・ミセルの沈澱性もそれと併行して同じく増加することが観察されたが、これらの変化がカゼイン・ミセルの粒子形の形

状或いは大きさにどのような変化を伴っているかについて粘度の面から検討を加えた。

#### 実験方法

0.2%の蛋白濃度のカゼイン・ミセル液に0, 10, 40mM  $\text{CaCl}_2$  濃度になるよう  $\text{CaCl}_2$  を添加し、そのときに生ずる粘度の変化をオストワルドの粘度計で  $20^\circ\text{C}$  において測定した。なお同時に生じた白濁度を  $20^\circ\text{C}$  で30分保持してから  $E_1\text{cm}=610\text{m}\mu$  で測定した。

#### 実験結果

実験の結果は第14図, 15図に示す通りであった。それによるとカゼイン・ミセルは  $\text{Ca}^{++}$  の添加によって白濁度の増加, 遠沈性の増加に伴って粘度が減少することが判った。

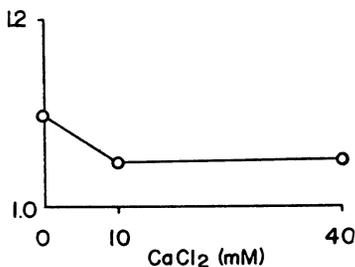


Fig. 14. Viscosity of casein micelle at some  $\text{CaCl}_2$  conc. (pH 7.0, 0.02M borate buffer, 0.2% prot. conc. at  $20^\circ\text{C}$  30 min. incubated).

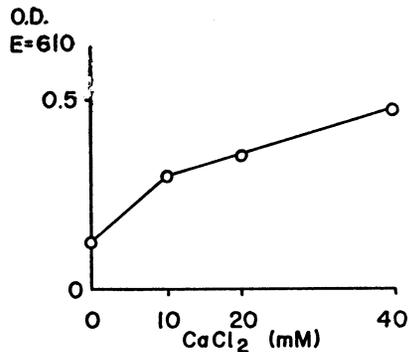


Fig. 15. Turbidity of casein micelle at some  $\text{CaCl}_2$  conc. (pH 7.0, 0.02M borate buffer, 0.2% prot. conc. at  $20^\circ\text{C}$  30 min. incubated).

## (2) 各分割カゼイン区分の溶解度について

### 1) $\text{CaCl}_2$ 存在下における溶解度

カゼイン・ミセルから2価金属イオンを除去した状態の1st-cycleカゼイン及びそれから §2.2(3) で述べた方法で分割した2nd-cycleカゼインであるF-1カゼイン区分, F-2カゼイン区分, F-3カゼイン区分, F-4カゼイン区分, 更にこれらの分割したカゼイン区分を1st-cycleカゼイン中に占めている比率に従って組み合わせて調整したカゼイン混液(本報においては3rd-cycleカゼインと称することにする)について  $\text{Ca}^{++}$  存在下における溶解度を白濁度の変化の面より検討を加えた。

#### 実験方法

実験に用いた試料は1st-cycleカゼイン, 各2nd-cycleカゼイン, 及び第16図に示すような組成の3rd-cycleカゼインを用いた。

実験に当っては0.1%蛋白質濃度, pH 7.0, 0.02M 硼酸緩衝液において, 30mM及び10mM  $\text{CaCl}_2$  濃度の存在下でその反応液を  $2^\circ\text{C}\sim 37.5^\circ\text{C}$  の温度で30分保持するときに生ずる白濁度を  $E_1\text{cm}=610\text{m}\mu$  の吸光度で測定した。

#### 実験結果

1st-cycleカゼイン, 4種の2nd-cycleカゼイン, 3rd-cycleカゼイン(3rd-cycleカゼインはF-1カゼイン, F-2カゼイン, F-3カゼイン, F-4カゼインの各カゼイン区分を蛋白質量で10:1:9:6の比率で組合せて再成する。)の6種の試料についての肉眼的観察の結果では  $\text{Ca}^{++}$  の全く存在しない状態において各カゼイン溶液はF-4カゼイン区分を除いて他の全ては透明で, 溶解した状態で存在するがF-4カゼイン区分だけはやや乳白色を呈し多少性状が異なることが想像された。これらのカゼイン区分に

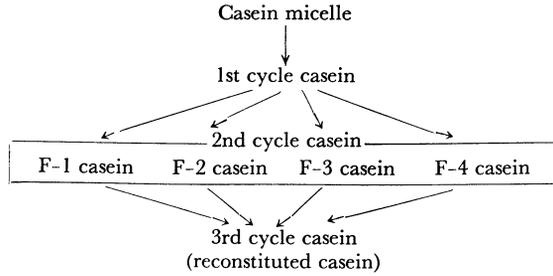


Fig. 16. Scheme of fractionation and reconstitution of casein.

30mM になるよう  $\text{CaCl}_2$  を添加すると第9表に示すようにF-1カゼイン, F-2カゼイン区分では $0^\circ\text{C}$ から $30^\circ\text{C}$ の如何なる温度においても直ちに白濁を生じ沈澱物が生成するが, F-3カゼイン区分においては $20^\circ\text{C}$ 近辺で急速に白濁が生じ, 温度が $30^\circ\text{C}$ 以上になると, なお一層その白濁度が強くなるが沈澱は生じなかった. 更にF-4カゼイン区分では $\text{Ca}^{++}$ を添加しても全く変化せず乳光色を呈したままであった.

Table 9. Solubility of fractionated casein at 30mM  $\text{CaCl}_2$

	solubility at $0-10^\circ\text{C}$	solubility at $10-20^\circ\text{C}$	solubility at $20-37^\circ\text{C}$
F-1 casein fraction	ppt	ppt	ppt
F-2 casein fraction	ppt	ppt	ppt
F-3 casein fraction	sol	slightly turbidity	centrifugable colloidal particle
F-4 casein fraction	sol	sol	sol

これらについて更に深く検討を加える為に生じた白濁度を分光光度計を用いて測定した結果は第17図に示す通りであった. それによるとF-1カゼイン, F-2カゼイン, F-3カゼイン, F-4カゼイン区分は

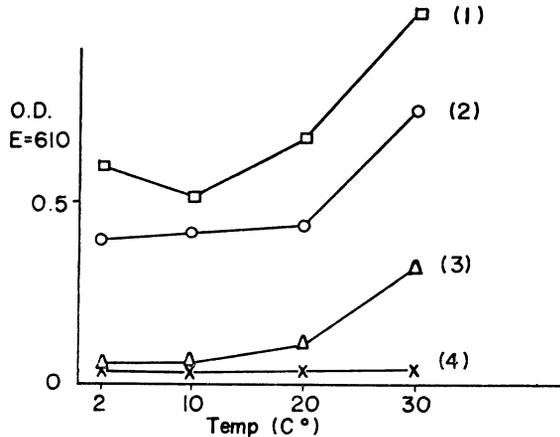


Fig. 17. Influence of temp. on turbidity of fractionated casein at 30mM  $\text{CaCl}_2$  (prot. conc. 0.1%, pH 7.0, 0.02M borate buffer).  
 (1) 3rd cycle casein, (2) 1st cycle casein, (3) F-3 casein fraction, (4) F-4 casein fraction.

前述の結果とほとんど同じで、ただ F-1 カゼイン、F-2 カゼイン区分については沈澱が生成したので吸光度の測定は出来なかった。更に 1st-cycle カゼイン及び 3rd-cycle カゼインについては 2°C における白濁度の方が 10°C におけるよりも強いことが判った。

CaCl<sub>2</sub> を 10mM 濃度になるように添加した場合の同様の実験結果については第18図に示す通りの結果が得られたが、この場合は 1st-cycle カゼイン及び 3rd-cycle カゼインにおいてはその白濁度は 20°C においてもっとも低く、その温度より低い場合においてもまたそれより高い場合においても白濁度は増加した。F-1 カゼイン区分単独の場合の白濁度は図にみられるように、非常に強く現われたが、F-2 カゼイン区分については沈澱生成の為に測定出来なかった。

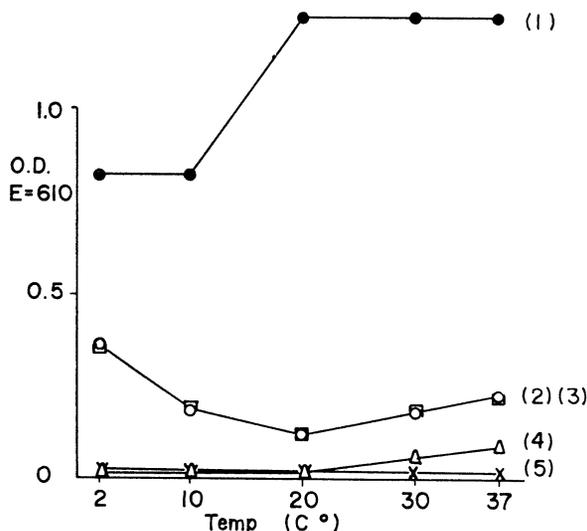


Fig. 18. Influence of temp. on turbidity of fractionated casein at 10mM CaCl<sub>2</sub> (prot. conc. 0.1%, pH 7.0, 0.02M borate buffer).  
 (1) F-1 casein fraction, (2) 1st cycle casein, (3) 3rd cycle casein, (4) F-3 casein Fraction, (5) F-4 casein fraction.

#### ロ) MgCl<sub>2</sub> 存在下における溶解度

牛乳中の無機成分の中でも Mg<sup>++</sup> は Ca<sup>++</sup> と同じくアルカリ土類金属イオンとして、比較的少量に含まれているが、この Mg<sup>++</sup> がカゼイン蛋白質に対してどのように挙動するかについて Ca<sup>++</sup> と同様の実験により検討を加えた。

#### 実験方法

実験 1) と同様にして、CaCl<sub>2</sub> 30mM の代わりに CaCl<sub>2</sub> 27mM と MgCl<sub>2</sub>, 3mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM の代わりに MgCl<sub>2</sub> 10mM を用いて実験を行なった。

#### 実験結果及び考察

その結果は第19図及び20図に示す通りであった。

これらの実験の結果を Ca<sup>++</sup> と Mg<sup>++</sup> における白濁度の現われ方を比較検討する為、夫々の各カゼイン区分について同一の図上に示したものが第21図から第29図である。

それによると、1st-cycle カゼイン及び 3rd-cycle カゼインにおいては Ca<sup>++</sup> 存在においては白濁度は 10~20°C において最も低く現われて、それよりも低い温度においても、また高い温度における場合にも白濁度は強く現われると云う結果が得られた。これにくらべて、Mg<sup>++</sup> が存在する場合は温度が低い場

合が白濁度が低いという異なった結果が得られた。これらについては第23～24図，第28～29図にみられる通りである。

F-3 カゼイン区分についてはその白濁度は温度が20°C以上で増加するが，2～20°Cでは白濁は生じないで20°C以上で白濁を生じることがCa<sup>++</sup>のみ，或いはMg<sup>++</sup>が存在する場合でも同じ傾向を示す結果が得られた。またMg<sup>++</sup>単独の場合でも同じであった。これらの結果については第21図，第26図に示す通りである。

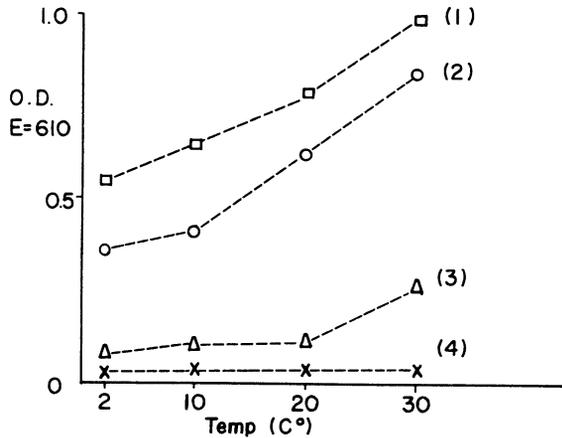


Fig. 19. Influence of temp. on turbidity of fractionated casein at 27mM CaCl<sub>2</sub> + 3mM MgCl<sub>2</sub> (prot. conc. 0.1%, pH 7.0, 0.01M borate buffer).  
(1) 3rd cycle casein, (2) 1st cycle casein, (3) F-3 casein fraction, (4) F-4 casein fraction.

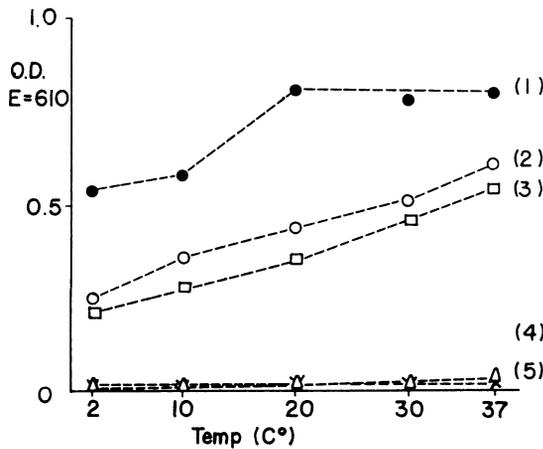


Fig. 20. Influence of temp. on turbidity of fractionated casein at 10mM MgCl<sub>2</sub> (prot. conc. 0.1%, pH 7.0, 0.02M borate buffer).  
(1) F-1 casein fraction, (2) 1st cycle casein, (3) 3rd cycle casein, (4) F-3 casein fraction, (5) F-4 casein fraction.

さらに、F-4 ケゼイン区分においては、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  或いはその両方が存在しても全く変化せず、白濁は生じないで溶解した状態を保っていた。

これらの実験結果において共通している興味あることは、F-1 ケゼイン、F-2 ケゼイン、F-3 ケゼイン、F-4 ケゼイン区分単独の場合に生ずる白濁度は  $\text{Ca}^{++}$  の方が  $\text{Mg}^{++}$  の場合よりも強く現われるが、この各ケゼイン区分の全てが存在する、1st-cycle ケゼイン、3rd-cycle ケゼインにおいては、 $\text{Ca}^{++}$  のみよりも  $\text{Mg}^{++}$  の存在する方が、また  $\text{Ca}^{++}$  単独と  $\text{Mg}^{++}$  単独を比較すると、 $\text{Mg}^{++}$  の方が、より強い白濁

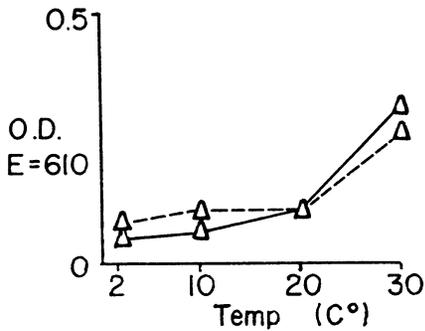


Fig. 21. Turbidity of F-3 casein fraction (solid line is 30mM  $\text{CaCl}_2$ , dotted line is 27mM  $\text{CaCl}_2$  + 3mM  $\text{MgCl}_2$ ).

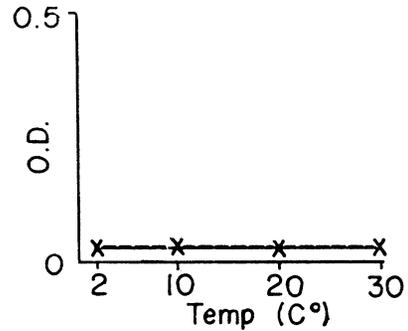


Fig. 22. Turbidity of F-4 casein fraction (solid line is 30mM  $\text{CaCl}_2$ , dotted line is 27mM  $\text{CaCl}_2$  + 3mM  $\text{MgCl}_2$ ).

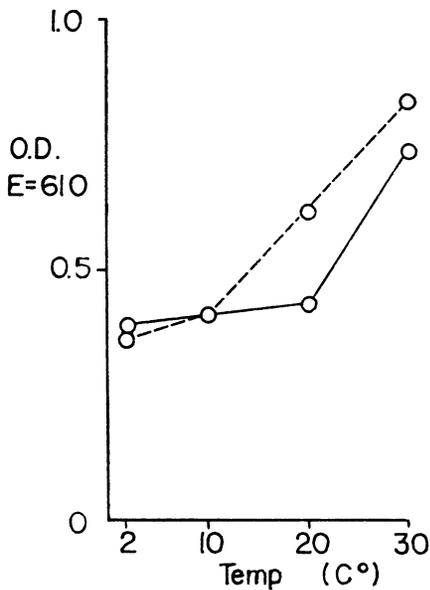


Fig. 23. Turbidity of 1st cycle casein (solid line is 30mM  $\text{CaCl}_2$ , dotted line is 27mM  $\text{CaCl}_2$  + 3mM  $\text{MgCl}_2$ ).

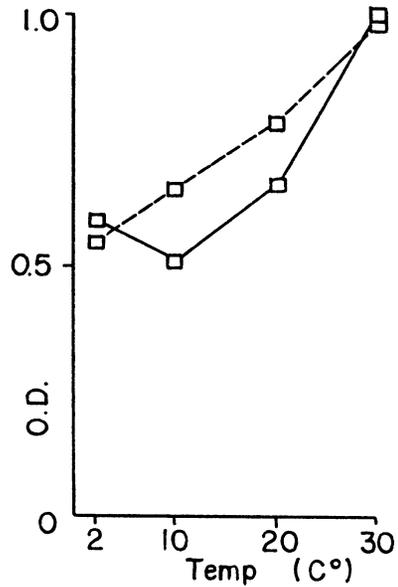


Fig. 24. Turbidity of 3rd cycle casein (solid line is 30mM  $\text{CaCl}_2$ , dotted line is 27mM  $\text{CaCl}_2$  + 3mM  $\text{MgCl}_2$ ).

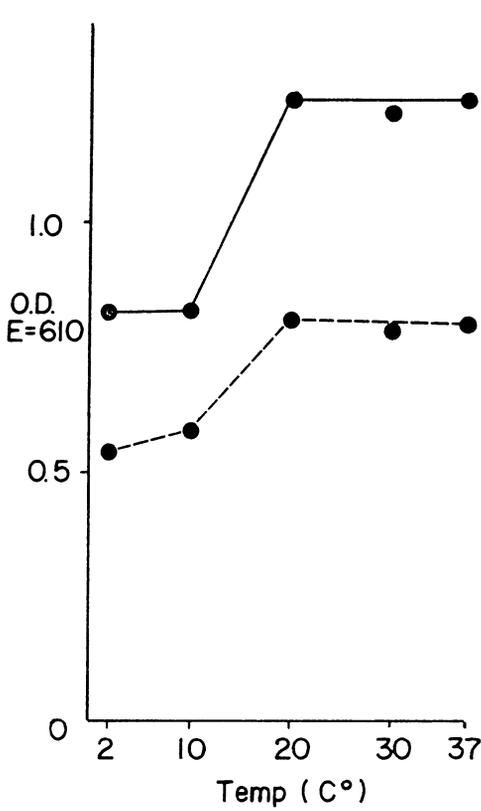


Fig. 25. Turbidity of F-1 casein fraction (solid line is 10mM CaCl<sub>2</sub>, dotted line is 10mM MgCl<sub>2</sub>).

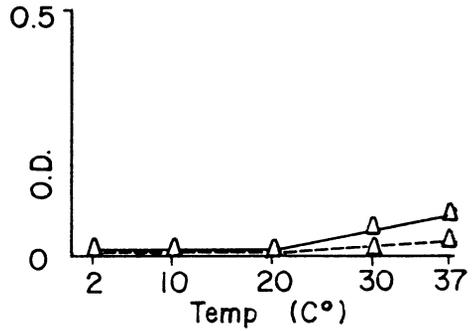


Fig. 26. Turbidity of F-3 casein fraction (solid line is 10mM CaCl<sub>2</sub>, dotted line is 10mM MgCl<sub>2</sub>).

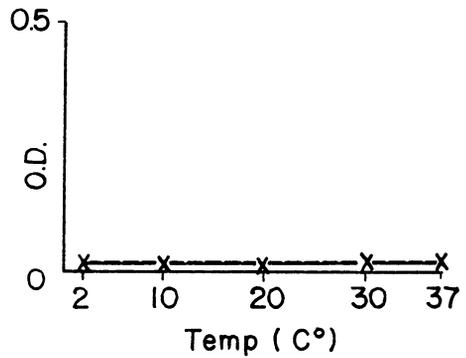


Fig. 27. Turbidity of F-4 casein fraction (solid line is 10mM CaCl<sub>2</sub>, dotted line is 10mM MgCl<sub>2</sub>).

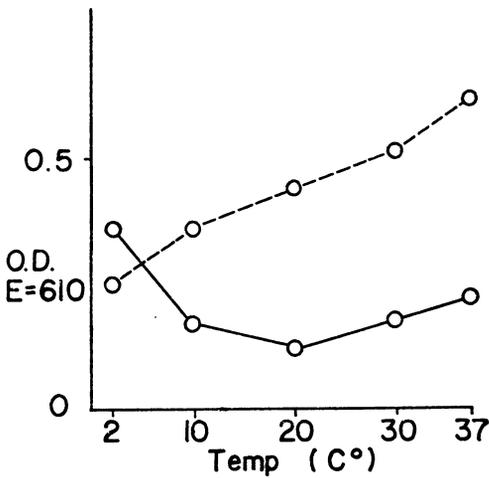


Fig. 28. Turbidity of 1st cycle casein (solid line is 10mM CaCl<sub>2</sub>, dotted line is 10mM MgCl<sub>2</sub>).

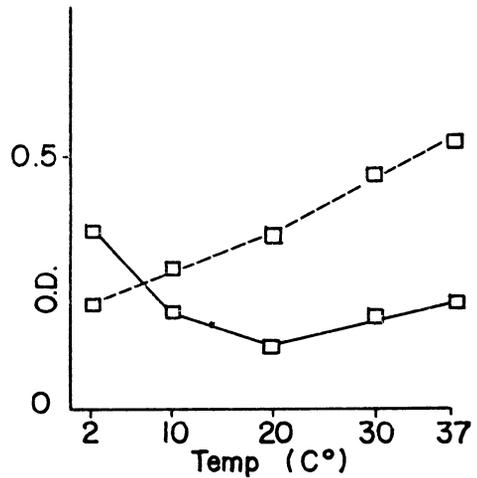


Fig. 29. Turbidity of 3rd cycle casein (solid line is 10mM CaCl<sub>2</sub>, dotted line is 10mM MgCl<sub>2</sub>).

度を示した。これらのことは  $\text{Ca}^{++}$  と  $\text{Mg}^{++}$  の存在下における、カゼイン・ミセル形成の直接関与するカゼイン蛋白質と、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  との反応性との何らかの差異に起因するものと考えられる。それ故に、 $\text{Mg}^{++}$  は  $\alpha_s$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼイン、 $\kappa$ -カゼインの全てが存在する状態での白濁度の増加、すなわち粒子の生成、沈澱物の生成において  $\text{Ca}^{++}$  と何らかの異なった作用を果しているものと思われる。

### (3) F-4 カゼイン区分の性状について

カゼイン溶液の分割を進めるとき、 $\text{Ca}^{++}$  で沈澱する全てのカゼイン区分をとり去った残りの溶液中の蛋白質部分の主成分は  $\kappa$ -カゼインであることについては先述の通りである。この  $\kappa$ -カゼインは  $\text{Ca}^{++}$  の存在下で全く沈澱を生じないし、また白濁すら生じないけれども、 $\kappa$ -カゼインが  $\text{Ca}^{++}$  と結合性を有することについてはすでに祐川<sup>20)</sup>らによって報じられている。また、PYNE<sup>21)</sup>らによっても  $\text{CaPO}_4^-$  と高い結合性を有していることが述べられている。従って  $\text{Ca}^{++}$  を加えても白濁度は生じないので一見  $\text{Ca}^{++}$  と反応しないようにみえるが、実際は他のカゼイン区分にくらべて最も  $\text{Ca}^{++}$  と結合する能力を有していると知られている。

さらにまた、 $\kappa$ -カゼインは  $\alpha_s$ -カゼイン複合物を形成したり、或いは  $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物を形成したりする特異性からカゼイン・ミセル構築の中心的役割を果しており、またレンニン凝固における重要な役割などについても非常に多くの研究がなされているが、最近の研究によると  $\kappa$ -カゼインの不均一性が電気泳動的方法によってなされている<sup>22)</sup>。

これらの研究と著者の分割した  $\text{Ca}^{++}$  で全く白濁を生じない F-4 カゼイン区分との関連性について次のような実験を行なって比較検討した。

#### イ) F-1 カゼイン区分の $\text{Ca}^{++}$ による沈澱防止効果について (その一)

F-1 カゼイン区分は  $\text{Ca}^{++}$  に対して最も鋭敏に挙動し、容易に沈澱を生ずること、及び他方 F-4 カゼイン区分は  $\text{Ca}^{++}$  に対して全く沈澱を生じないばかりか、白濁すら生じないことは先述の通りである。

これら 2 つの  $\text{Ca}^{++}$  に対して相反する性質を示すカゼイン区分の間にもどのような相関関係が存在するのかについて次のような実験を行なった。

#### 実験方法

すなわち第10表に示されるような、F-1 カゼイン区分の一定量を取り、これに F-4 カゼイン区分を蛋白質量の比で 1:0 から 1:1 までの各種割合において、0.04M pH7.0 硼酸緩衝液、10mM  $\text{CaCl}_2$  存在において 20°C で30分恒温保持したときに生ずる白濁沈澱物を比較した。

Table 10. Schedule of stability test of casein mixture (ml of 1% prot. conc. casein fraction)

	A	B	C	D	E	F	G
F-1 casein fraction	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
F-3 casein fraction	1.0	—	—	—	—	—	—
F-4 casein fraction	1.0	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	—

#### 実験結果

実験の結果は写真 (Plate 1, Fig. 1) に示す通りで、F-4 カゼイン区分の多い添加割合の方が沈澱生成量が少なく、これは F-1 カゼイン区分の  $\text{Ca}^{++}$  による沈澱が F-4 カゼイン区分により防止されている為であろうと思われる。しかし、この場合の溶液の上澄部分はほとんど透明であるので、これに F-3 カゼイン区分を添加した場合、同図の A において示されているように白濁を呈し溶液中に分散している事が判った。

ロ) F-1 カゼイン区分の  $\text{Ca}^{++}$  による沈澱防止効果について (その2)

実験 1) の観察事項をさらに深く検討する為に次のような実験を行なった。

実験方法

実験に用いた試料は、下に記す 8 種類の各種カゼイン区分の組み合せたものに夫々、pH 7.0, 0.04M 硼酸緩衝液,  $\text{CaCl}_2$  を 10mM, 5mM になるように添加して、生じた白濁度を  $20^\circ\text{C}$  で30分恒温保持したのちその白濁度を  $E_{1\text{cm}}=610\text{m}\mu$  で測定した。さらに、このとき生じた白濁生成物の性状を調べるため 1500回転15分遠心分離してその上澄液中の蛋白濃度の強さを比較した。なお、測定に当っては試料に等量の 1N NaOH を添加したのちにその吸光度を測定した。

試料

- A F-1 カゼイン+脱イオン水 2 容
- B F-3 カゼイン+脱イオン水 2 容
- C F-4 カゼイン+脱イオン水 2 容
- D 1st-cycle カゼイン+脱イオン水 2 容
- E F-1 カゼイン+F-3 カゼイン+脱イオン水 1 容
- F F-1 カゼイン+F-4 カゼイン+脱イオン水 1 容
- G F-1 カゼイン+F-3 カゼイン+F-4 カゼイン
- H F-3 カゼイン+F-4 カゼイン+脱イオン水 1 容

実験結果

白濁度の生成については Plate, Fig. 2, Fig. 3 に示す通りである。

これによると F-3 カゼイン区分、及び F-4 カゼイン区分単独か或いはその両者の混合した場合の白濁度は非常に弱いか、或いは全く生じないことが解る。それ以外の F-1 カゼイン区分の存在する全ての場合では非常に強い白濁が生じていることが観察された。なおこのことは写真における、B, C, H が夫々 F-3 カゼイン単独、F-4 カゼイン単独、F-3 カゼイン+F-4 カゼインであり、白濁度が少ないことが判る。

さらにこれら白濁度の沈澱性についての実験結果は第11表に示す通りであって、それによると  $\text{Ca}^{++}$  を 10mM になるように添加した場合に、F-3 カゼイン及び F-4 カゼイン区分のみの場合の沈澱生成量は夫々 6% 及び 0% であったが、F-1 カゼイン区分がその主成分が  $\text{Ca}^{++}$  に非常に不安定な  $\alpha_s$ -カゼインである為と考えられる。

Table 11. Precipitated F-1 casein protein at 10mM  $\text{CaCl}_2$

	F-1 casein only	F-1 casein with F-3 casein	F-1 casein with F-4 casein	F-1 casein with F-3 casein and F-4 casein
Precipitated F-1 casein by $\text{CaCl}_2$ (%)	60.7	39.1	35.8	26.2

この F-1 カゼイン区分に F-3 カゼイン或いは F-4 カゼインさらにはこの両者を混合した場合、すなわち先の組み合わせの E, F, G に相当する場合に生ずる沈澱量は夫々 39.1%, 35.8%, 26.2% であった。この事から F-1 カゼイン区分中の  $\alpha_s$ -カゼインの  $\text{Ca}^{++}$  による白濁物 (沈澱し易い性質) の生成量は F-3 カゼイン及び、F-4 カゼイン区分の添加によって防止されたことが判る。

これらの実験結果から、 $\text{Ca}^{++}$  の存在によって生ずる  $\text{Ca}-\alpha_s$ -カゼインはその膠質学的不安定性を  $\kappa$ -カゼインを主とする F-3 カゼイン、F-4 カゼイン区分によって保護され、それらの間に何らかの相互関係が存在する事を示唆し、カゼイン・ミセル構造における重要な性質を示しているものと考えられる。

## ハ) レンネット凝固性に関する実験

カゼイン及びカゼイン・ミセルの研究を行なうに当ってその特異的性質であるレンネット凝固について論ずる事はカゼイン・ミセルの凝集についても関連性があるばかりでなく、そのカゼイン蛋白質の性状を追求する上からも重要な事であると思われる。

## 実験方法

Han Sen のレンネット錠 $\frac{1}{4}$ を 2.5% NaCl で 200ml に溶解したレンネット酵素液を 1ml とり、それに 1.0% カゼイン 10ml と pH 6.4, 0.2M 硼酸-塩酸緩衝液 9ml を混ぜて、37°C で 20分反応させたのち、直ちに 10°C 以下に冷却して、CaCl<sub>2</sub> 10mM になるように添加してその凝固性を肉眼的に判定した。レンネット処理は分割した F-1 カゼイン、F-3 カゼイン、F-4 カゼイン区分について夫々単独で行ない、これに等量の未処理カゼイン区分を混じて、全てにおいて F-1 カゼイン、F-3 カゼイン、F-4 カゼインの夫々が等量づつ存在する状態において Ca<sup>++</sup> を添加した。

## 実験結果

次のような A~E の 5 種の各々の組み合わせによるカゼインのレンネット凝固性を観察した結果は第 12 表に示す通りである。

Table 12. Results of rennet treatment at 2nd cycle casein fractions

3rd cycle casein consist of rennet treated and nontreated 2nd cycle casein fractions	rennet coagulation with 10mM CaCl <sub>2</sub>
A) *F-1 casein + *F-3 casein + *F-4 casein	+
B) *F-1 casein + F-3 casein + F-4 casein	-
C) F-1 casein + *F-3 casein + F-4 casein	+
D) F-1 casein + F-3 casein + *F-4 casein	+
E) F-1 casein + F-3 casein + F-4 casein	-

\* marked casein fraction was treated with rennet

その結果によると、A), C), D) の各組み合わせにおいては顕著な凝固が認められた。これらの各組み合わせにおいて共通していることは A) と D) においては F-4 カゼイン区分がレンネット処理を受けているという事であり、F-4 カゼイン区分の主成分は  $\kappa$ -カゼインである事については先に述べた通りである。また、A) と C) とでは共通しているのは F-3 カゼイン区分がレンネット処理を受けていることで、この場合も凝固が生じるのは、F-3 カゼイン区分には多量の  $\kappa$ -カゼインが含有されている事についても § 2.2. (4) の所で述べているように、F-3 カゼイン区分中の  $\kappa$ -カゼインがレンネット処理を受けたためであろうと思われる。

なお、F-3 カゼイン区分、F-4 カゼイン区分の単独ではレンネット処理しても、或いはその後で Ca<sup>++</sup> を添加しても全く凝固しない事及び F-1 カゼイン区分についてはレンネット処理の有無にかかわらず Ca<sup>++</sup> を添加すると急激に白濁が生ずるが凝固は生じなかった事を付記しておきたい。

これらの実験結果から、分割した F-3 カゼイン及び F-4 カゼイン区分中に存在する  $\kappa$ -カゼインの  $\alpha_s$ -カゼインとの間に何らかの相互関係が生じてカゼイン・ミセルの膠状性の安定性に関与しているものと思われる、これがまたレンネット凝固の機構においても  $\kappa$ -カゼインがその中心的な役割を占めていて、レンネット凝固における膠状性の変化をつかさどっているものと考えられる。

## (4) F-3 カゼイン区分の性状についての実験及び考察

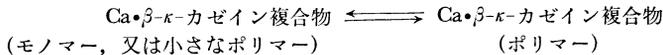
電気泳動象による F-3 カゼイン区分には多量の  $\alpha$ -峰と比較的多量の  $\beta$ -峰が存在し、前者は主として  $\kappa$ -カゼインである事については § 2.2(4) で述べた通りである。著者の実験においては  $\kappa$ -カゼインは 30

mM  $\text{Ca}^{++}$  の存在においては沈澱を生じない事が確認されているので、F-3カゼイン区分の中に  $\kappa$ -カゼインが単純に混入して、 $\text{Ca}^{++}$  で沈澱したとは考えられない事である。これは、かりに  $\beta$ -カゼインの  $\text{Ca}^{++}$  による沈澱物に付随して共沈してきたものとしても、その  $\beta$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインの間には何らかの型の比較的強固な結合が生じているものと考えなければならない。

F-3カゼイン区分の性質を白濁度について観察するとき、 $\text{Ca}^{++}$  の存在のもとにおいて  $20^\circ\text{C}$  近辺において急激にその様態変化を起している事は § 2.3(2) 第 22 図において見られる通りである。そしてこの変化は、溶解度の変化として観察されるが、この  $20^\circ\text{C}$  近辺を境として変化する現象は可逆的に変化する事が判った。すなわち、 $20^\circ\text{C}$  以下の低温においては全く透明であるが、それ以上の温度においては  $\text{Ca}^{++}$  の存在で急速に白濁を生じ、その白濁を示す粒子は  $7000\sim 10000\text{g}$  の  $30^\circ\text{C}$  以上での高速遠心分離法により採取出来る事から、このカゼイン沈澱物は急速に不溶性化して出来たものと考えられる。

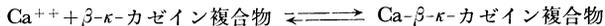
この様に遠心分離して採取した沈澱物は  $20^\circ\text{C}$  より高い温度では乳白色ゼリー様であるが、この沈澱物を  $20^\circ\text{C}$  よりも低い温度に下げると全く透明なゼリー状物質へと変化してゆく。また、この沈澱物は  $\text{Ca}-\alpha_s$ -カゼインと同じ程度の  $\text{Ca}^{++}$  を結合している事については § 2.2(3) の所で述べた通りである。

このような事実から  $\text{Ca}^{++}$  の存在において F-3カゼイン区分は  $\beta$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインの複合物に  $\text{Ca}^{++}$  を結合し、 $20^\circ\text{C}$  以上の高い温度では比較的大きなポリマーとなっていて、 $20^\circ\text{C}$  よりも低い温度においては小さな粒子量のポリマー、またはモノマーとして存在する事が推察され、この反応は可逆的であろうと思われる。これを表示するとき、次のような式を考える事が出来る。



すなわち、 $\text{Ca}^{++}$  存在下の F-3カゼイン区分の  $20^\circ\text{C}$  以上において生ずる白濁の成因物質はその溶媒中に安定な状態で分散する事も出来るようなコロイド粒子であり、しかも  $7000\sim 10000\text{g}$  の高速遠心分離法により分離することの出来る程度の大きさの粒子を形成している事になる。なお、D.F. WAUGH によると  $\text{Ca}-\beta$ -カゼインポリマーは沈澱を生ずると述べている<sup>14)</sup>。さて、 $20^\circ\text{C}$  前後において白濁を呈している  $\text{Ca}^{++}$  存在下の F-3カゼイン溶液はその結果の如く、液温の低下に伴ってその白濁度が減退し、その液は全く透明な状態の溶液へ移行する。すなわち遠心分離しても沈澱しない状態へと、また光線により乱反射を起し得る大きさの状態から全く溶解した状態へ、さらにはゲル状からブル状態へというような変化が生じているのである。この原因は結局の所、 $\text{Ca}-\beta$ -カゼイン、ポリマーからより小さな粒子或いは最少の単位であるモノマーへ移行したものであると考えなければならない。

そして、さらに反応が進んでモノマーが分解して  $\text{Ca}^{++}$  を放出するという次の式が考えられる。



この反応が若しも生じているとすれば  $20^\circ\text{C}$  よりももっと低い温度であると思われるし、またこの反応は蛋白質分子の次元で挙動する筈であるので、超遠心分離法により検討する事が出来ると思われるので、次のような実験を行なった。

#### 実験方法

$3^\circ\text{C}$  において、pH 7.0, 0.04M 硼酸緩衝液存在下の 0.5% 蛋白質濃度の F-3カゼイン区分について  $\text{CaCl}_2$  の存在しない場合と 0.03M  $\text{CaCl}_2$  存在の場合とにおいてその沈澱の程度を測定した。使用した機械は Spinco Model E 型で 56100 回転 (229000g) 38 分間遠心分離した。途中 22 分目と 38 分目に、観察した。

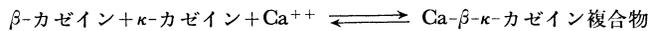
#### 実験結果

それによると  $\text{Ca}^{++}$  の存在する場合は Plate 1, Fig. 5 に、また  $\text{Ca}^{++}$  の存在しない対照においては Fig. 4 に示す通りである。

それによると  $3^\circ\text{C}$  において  $\text{Ca}^{++}$  を添加すると対照区に比較して、沈澱速度の速い 1 つの峰が出現し

ていて、これの  $S=14.3 \times 10^{-13}$  でありこれは F-3 カゼイン区分中の何らかの物質から  $\text{Ca}^{++}$  の添加によって生じた大きな粒子量を有する複合物を意味しているものと思われる。この事は  $3^\circ\text{C}$  という低温においては肉眼的には  $\text{Ca}^{++}$  を添加しても変化がみられなかったのであるが、超遠心分離によって、F-3 カゼイン区分中で  $\text{Ca}^{++}$  の添加により  $S=14.3 \times 10^{-13}$  という複合物が生成している事が認められた事になる。

この物質は恐らくは、Ca- $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物であろうと推察され、これはF-3カゼイン区分に  $\text{Ca}^{++}$  を添加する事によって生じたもので次のような式が考えられよう。



これらについては第38図、第39図、第13表に基づいて考察を加えたのであるがこれだけの実験では以上の考えを証拠づけることは出来ないであろう。ただ次のような平衡状態のいずれかが存在するのではないかと考えられる。

第13表 F-3 カゼイン区分の超遠心分離による解析

Ca <sup>++</sup> の存在しない場合 (対照)	$S=1.11 \times 10^{-13}$
30mM Ca <sup>++</sup> の存在する場合	$S=0.97 \times 10^{-13}$
	$S=14.3 \times 10^{-13}$
(1) Ca- $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物	$\text{Ca}^{++} + \beta\text{-カゼイン} + \kappa\text{-カゼイン}$
(2) Ca- $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物	$\text{Ca}^{++} + \beta\text{-}\kappa\text{-カゼイン複合物}$
(3) Ca- $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物	$\text{Ca-}\beta\text{-カゼイン} + \text{Ca-}\kappa\text{-カゼイン}$

さて、 $\text{Ca}^{++}$  の存在しない場合の  $\beta$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインの相互関係については電気泳動においても、D.E.A.E.セルローズ、クロマトグラフィーにおいても夫々が容易に分離する事が出来るので、もしもそれらの間に何らかの結合があっても、それは電氣的には非常に弱いか、或いは全く結合していないで別々の状態で存在すると思われる。両者の分子量についてはほとんど同じであると考えられているので、超遠心分離法においては分離する事が出来ないで、 $1.11 \times 10^{-13}$  或いは  $0.97 \times 10^{-13}$  の S の峰に混在しているものと思われる。

## EXPLANATION OF PLATE

- Fig. 1. Stability of  $\text{CaCl}_2$ , F-1 casein fraction and F-4 casein fraction.  
 Fig. 2. Turbidity of reconstituted casein at 5mM  $\text{CaCl}_2$ .  
 Fig. 3. Turbidity of reconstituted casein at 10mM  $\text{CaCl}_2$ .  
 Fig. 4. Sedimentation pattern of F-3 casein fraction after 22min. and 38min. at 56100rpm.  
 Fig. 5. Sedimentation pattern of F-3 casein fraction with 0.03M  $\text{CaCl}_2$  after 22min. and 38min. at 56100rpm.

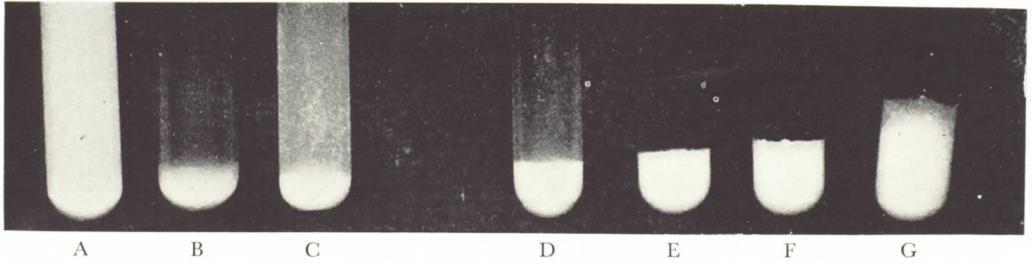


Fig. 1

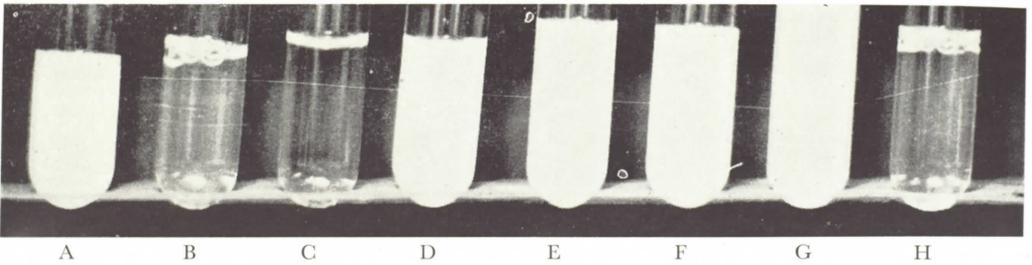


Fig. 2

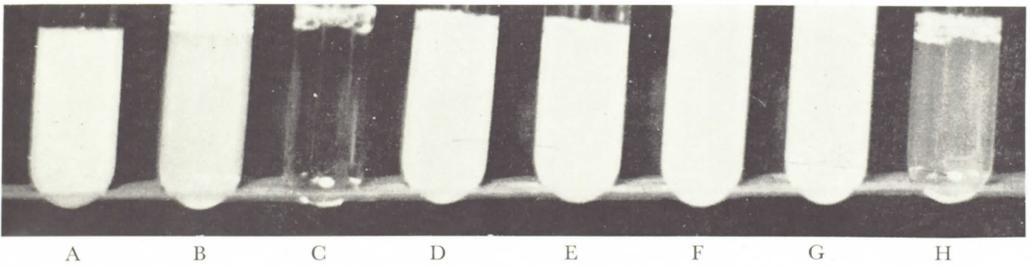


Fig. 3

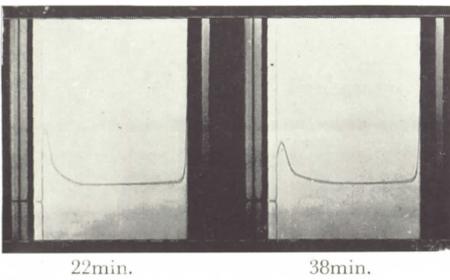


Fig. 4

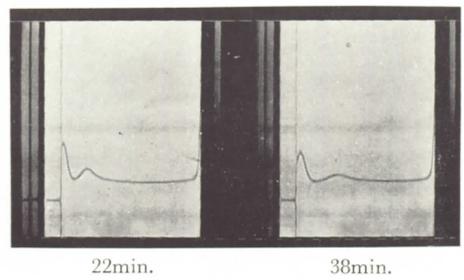


Fig. 5

## 第 3 章 論 議

1. カゼイン・ミセルにおける蛋白質と  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{---}$  の結合

カゼイン・ミセルの構造については多くの意見が出されているが、1956年以前の報告にはミセル構造上重要な意義のある  $\kappa$ -カゼインの存在については考慮されていないので、現在かりに多くの人々が通説としている学説についても、これを再検討してみる必要があると思われる。しかし、いずれにしても、カゼイン・ミセルはその中に多量の蛋白部分と  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{---}$  とが存在し、或いはまた  $\text{Mg}^{++}$  やクエン酸塩も関与するといわれているが、それらの間に何らかの物理学的、或いは化学的結合が生じてミセルという巨大な特異的構造を有しているという事は疑がう事のない事実である。

さて乳汁中においてはカゼインは、(1)比較的巨大的な粒子を形成しているカゼイン・ミセル、(2)比較的微細な  $50\text{m}\mu$  以下の粒子を形成しているカゼイン・ミセル、(3)ミセルを形成していない溶液状カゼインの各種がある事は事実である。しかし、これらの間に一種の平衡関係の存在する事が考えられている。



しかし、これらについては未だ完全に証明されていない状態である。例えば、ミセルの大きさの違いによってその成分が異なるのではないかという意見もあるし、また、ミセルを採取してその蛋白質部分について乳清中に溶解しているカゼインと比較すると、電気泳動的方法、D.E.A.E.セルローズクロマトグラフィーによる研究によって蛋白部分に相異がみられるという報告もある。著者の実験によると<sup>23)</sup>電気泳動的には  $\alpha$ -峰が、D.E.A.E.カラムクロマトグラフィーによると  $\alpha_s$ -相当峰がミセルを形成しているカゼイン部分にくらべて溶液状カゼインの方が少ないという結果を得ているし、また、N:Ca, N:P についての遊佐<sup>47)</sup>の報告によってもカゼイン・ミセルの大きなものと、小さなものによってその割合が異なっている事が述べられている。従って前述のような簡単な平衡関係が成立しているか否かについてはなお疑問の余地がある。さらに以上の考えの様に、ミセルの大きさによって組成が異なっても、ミセルの成長する事によって成分が変化する事もあり得ると考えればなおさら簡単に結論づける事は困難である。またカゼイン・ミセル中に無機の膠状性の  $\text{CaHPO}_4$ 、或は  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  が存在すると考えられているが<sup>24)</sup>、この意見についてもカゼイン・ミセルには膠状性の磷酸カルシウムが存在しないという逆の報告<sup>46)</sup>も出されている。

遊佐の発表<sup>47)</sup>によるとカゼイン・ミセルは 1g 蛋白質当り 37mg の Ca と 21mg の P を結合している事になり、これは VERMA, SAMMER<sup>27)</sup> の報告とほぼ一致した値で、ただ P において遊佐の方がやや低いように思われる。著者のカゼイン・ミセルに包含している Ca, P を測定した結果もほとんど同じ結果を得ている。このようにカゼイン・ミセルは Ca と P とを結合しているが、これらの塩類がどのような形で存在するかにしろ、カゼイン・ミセル構成の 1 つの因子であることには違いない。

このようなカゼイン・ミセルの懸濁液に  $\text{CaCl}_2$  を添加するか、或は  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を添加すると、これらの中に次の現象が見られる、すなわち、カゼイン・ミセルはこれに  $\text{CaCl}_2$  を添加するときミセルはさらに多くの  $\text{Ca}^{++}$  と結合し、成長してより巨大な粒子になり沈澱性が増加する。この事は本報の実験結果からも明らかな事実であり、また遠心分離法によるカゼインの採取のときに  $\text{CaCl}_2$  を加えておこなっている方法<sup>13)</sup>もこの現象を利用しているが非常に沈澱性が増加し、カゼインを分離し易い。また牛乳に無機磷酸、例えば  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  の形で牛乳に添加するとその乳汁の  $\text{Ca}^{++}$  濃度は急激に低下し、乳汁中の非沈澱性カゼインの量が増加する<sup>14)</sup>。磷酸塩以外の sequester として作用する E.D.T.A. の添加によってもカゼイン・ミセルは解裂するし、本報において用いているように脛酸イオンを用いてもミセルを解裂せしめる事が出来る。

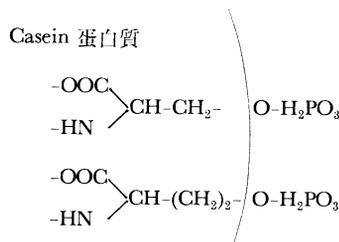




このようにカゼイン・ミセルの成長や解裂の方向に  $\text{Ca}^{++}$  や  $\text{PO}_4^{---}$  が作用する事は、そこに何らかのカゼイン・ミセルとの反応が生じていなければならない、すなわち  $\text{Ca}^{++}$  の添加は(1)カゼインと直接結合する。(2)カゼインに結合している  $\text{PO}_4^{---}$  と反応して不溶性の磷酸カルシウムを形成して系より除外されてゆく事を、また、 $\text{PO}_4^{---}$  の添加は(3)カゼインに結合している  $\text{Ca}^{++}$  と反応して不溶性の磷酸カルシウムになり系より除外されてゆく。(4)カゼインに直接結合する、という場合が考えられる。

乳汁から  $\text{PO}_4^{---}$  を除去するという事は實際上、おこなわれていないが、 $\text{Ca}^{++}$  を添加するという事はチーズ製造においてレンネット凝固促進のため添加されるのが普通である。反対に  $\text{Ca}^{++}$  を除去したり  $\text{PO}_4^{---}$  を添加したりという操作はしばしば乳汁の濃縮、或は加熱処理における乳蛋白の熱凝固の防止、さらには製品の膠質の安定性のために、実際面で応用されている。前者のように  $\text{Ca}^{++}$  の除去という操作は陽イオン交換樹(例えば Amberlite I R. 120)の Na 型を用いて、 $\text{Na} \rightleftharpoons \text{Ca}^{++}$  の置換をはかってソフトカードミルクの製造に利用されているし、また、 $\text{PO}_4^{---}$  を添加するという操作は無糖練乳製造、脱脂粉乳製造のときに  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  の形でときには磷酸塩の代りにクエン酸塩の形で日常工程に利用されている。このように  $\text{Ca}^{++}$  の添加、除去や  $\text{PO}_4^{---}$  の添加がしばしば乳製品製造工程の加工中に或は最終製品中の蛋白の膠状性の安定化を目的として用いられていることは非常に興味ある問題であると思われる。

それでは、このような  $\text{Ca}^{++}$  や  $\text{PO}_4^{---}$  がカゼインとどのような状態で結合しているのであろうか、従来カゼイン蛋白中のセリン・スレオニンの  $-\text{OH}$  基と  $\text{H}_3\text{PO}_4$  とがエステル状であるという<sup>47)</sup>。そして残りの P は無機の形、とくに磷酸カルシウムで存在し、コロイド状を呈して物理的に吸着して存在すると考えられてきた。



また、 $\text{Ca}^{++}$  については主に  $\text{CaHPO}_4$  或は  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  のコロイド状で存在すると考えられていたが、これらの磷酸カルシウムのコロイドの存在は前野<sup>24)</sup>及び McGANN, PYNE<sup>26)</sup>によって否定されている。そして PYNE<sup>28)</sup>は  $\alpha$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼイン、中でも  $\kappa$ -カゼインがその結合量が最も高く、磷酸カルシウムと結合する事が出来ると発表している。それではこのような  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{CaPO}_4^-$  とのカゼインの結合はどのような形態であろうか、おそらくそこに直接の結合が存在するとすればカゼイン蛋白質分子の表面に存在する遊離の反応基であろう。 $\text{Ca}^{++}$  の結合出来るのは多分  $-\text{COOH}$  基と  $-\text{PO}_4$  基であろうし、これらは末端  $-\text{COOH}$  基かグルタミン酸、アスパラギン酸の  $\varepsilon$ - $\text{COOH}$  基であり、セリン・スレオニンにエステル状で結合している  $\text{PO}_4$  基であろう<sup>29)</sup>。また  $\text{PO}_4^{---}$  或は  $\text{CaPO}_4^-$  の結合出来るのはおそらく末端  $-\text{NH}_2$  基<sup>30)</sup>か、リジン・アルギニンの  $-\text{NH}_2$  基、或はその他の塩基性アミノ酸の反応基であろう。MARIA, HORST<sup>31)</sup>らによると、1g カゼイン当りの陰イオン結合量はリジンとして 0.582mM、アルギニンとして 0.333mM 存在し、また陽イオンとしてはその結合容量は 2mg eq であろうという。さらに彼らは、 $\text{CaPO}_4^-$  の形でリジンに結合していると述べている。

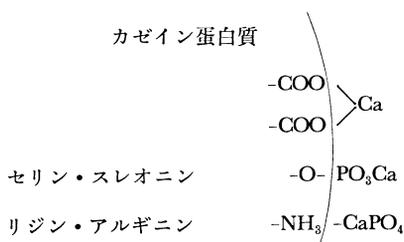


ロイシン<sup>48)</sup>、或はグルタミン酸であるという報告がある。α-ラクトアルブミンに関しての報告は見当たらないがオボアルブミン<sup>35)37)</sup>は“なし”コンアルブミン<sup>38)</sup>はアラニンという報告がなされていて、他蛋白質に比較してわずかにパンクレアティック・トリプシンインヒビター蛋白とカゼイン蛋白質のみとがアルギニン、或はアルギニンリジンの N 末端基を有している事が注目される。

N末端アミノ酸	α-カゼイン	β-カゼイン <sup>39)</sup>
Arg.	7	2
Lys.	1	1

さらに後者のセリン燐酸、スレオニン燐酸の疑問についてはあまり報告を見ないが、乳汁中の蛋白質の中で乳線細胞中では主としてカゼイン蛋白質のみが生成されるという説があるので蛋白質生成に関する生化学的機作が違うためかも知れないが現在の段階では全く推察の域を出ないのが残念である。

以上のような論議を通して考えられる事はカゼイン蛋白と  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{---}$  が結合する状態は  $\text{CaHPO}_4$  或は  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  がコロイド状で存在して蛋白質に物理的に吸着しているのではなくて、PYNE らが述べているようなカゼインの末端  $-\text{COOH}$  基への  $\text{Ca}^{++}$  の結合、WAUGH らのカゼイン・ミセルの模型にみられるようなカゼイン中のセリン燐酸、スレオニン燐酸を介しての  $\text{Ca}^{++}$  の結合、或は MARIA, HORNST の説のような末端  $-\text{NH}_2$  基これはリジン、アルギニンに由来するものであるがその  $-\text{NH}_3^+$  と  $\text{CaPO}_4^-$  の化学的結合が最も論理的であるように思える。



## 2. カゼイン・ミセルにおけるカゼイン複合物の問題

カゼイン蛋白質と  $\text{Ca}^{++}$  や  $\text{PO}_4^{---}$  或は  $\text{CaPO}_4^-$  の結合状態を中心として今まで論議を進めてきたのであるが、それでは次の問題、すなわち、各種カゼイン区分の相互間に存在するカゼイン複合物について考察を加えてみよう。

カゼイン・ミセルにおける最も重要な問題は、如何なる構造を有しているカゼイン分子が  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{---}$ ,  $\text{CaPO}_4^-$  を結合し、カゼイン・ミセルのような巨大な粒子へと成長し、乳清中に特異的膠状性をもって懸濁して分散しているのか、或は分散出来るのかという点に帰すると思われる。

近年までカゼインは α, β, γ, カゼインの 3 つの構成成分であると考えられていたが、1956年に WAUGH が κ-カゼインを発見して以来、さらに現在ではもっと多くの構成成分から成っていると考えられるようになった。

すなわち、最近の研究方法の発展から、とくに α<sub>s</sub>-カゼインと κ-カゼインの不均一性<sup>40)41)42)43)44)45)</sup>が云々されていて、本報においても述べた通りである。しかし、これら各カゼイン区分の分子量、沈降恒数、P 含量その他については全く解っていない。ここで論議を進めてゆく上で  $\text{Ca}^{++}$  に対して特異的に挙動する α<sub>s</sub>-カゼイン群と κ-カゼイン群の間に存在する相互関係について検討を加えてみたい。多くの研究者の報告に共通している事は、

- (1) α<sub>s</sub>-カゼインは  $\text{Ca}^{++}$  の存在で Ca-α<sub>s</sub>-カゼインの沈澱を生じる。

(2)  $\kappa$ -カゼインは  $\text{Ca}^{++}$  の存在で  $\text{Ca}$ - $\kappa$ -カゼインが生じたとしても沈澱を生じない。という事実である。そしてこの  $\text{Ca}^{++}$  で沈澱を生ずる  $\alpha_s$ -カゼイン中の  $\alpha_{s-1}$ -カゼイン  $\alpha_{s-2}$ -カゼインの存在,  $\text{Ca}^{++}$  で沈澱を生じない  $\kappa$ -カゼイン中の  $\kappa_1$ -カゼイン,  $\kappa_2$ -カゼインの存在について意見が述べられている。しかし, これらのカゼイン群は  $\text{Ca}^{++}$  に対する溶解性の面から 2 つの全く異なった性質を有するカゼイン群であると考えられる。なおここで  $\kappa$ -カゼインについてももう少しその性質について付け加えるならば, 全てのカゼイン構成成分中にある最も反応性に富んだ蛋白質であり, この事は D.E.A.E. セルローズと非常に強固に吸着する事や, その結合を溶離させるには溶離液をアルカリ性にせねばならない事からも推定出来る。

このような  $\alpha_s$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインの両者を同一の系におくときも  $\text{Ca}^{++}$  の存在のもとでは次のような興味ある事実が見られる。すなわち, 著者の実験によると § 2.3. (3) で示めたように  $\kappa$ -カゼイン区分が  $\text{Ca}^{++}$  と  $\alpha_s$ -カゼインとによって生ずる沈澱防止作用があることで, これは恐らく,  $\text{Ca}$ - $\alpha_s$ - $\kappa$ -カゼイン複合物が生成しているものと解釈する事が出来る。その他, WAUGH の説によると  $\alpha_s$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインとが  $\text{Ca}^{++}$  の存在でその分子比が 3:1 で複合物を形成し, これがカゼイン・ミセルの基本的な形態であるように述べている<sup>14)</sup>。しかし, 彼のミセル模型には後に述べるような  $\kappa$ -カゼインと密接な関係ある  $\beta$ -カゼインについての考察が払われていないし, また  $\alpha_s$ -カゼインや  $\kappa$ -カゼインの多元性の論ぜられる以前の説でもあるので, これをそのままり上げる事は出来ないが  $\alpha_s$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインの間における相互関係の説明には欠かす事の出来ない説であると思われる。 $\text{Ca}^{++}$  の存在する時の  $\alpha_s$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインの間に存在する  $\text{Ca}$ - $\alpha_s$ - $\kappa$ -カゼイン複合物についてはこのように  $\text{Ca}$ - $\alpha_s$ -カゼインの沈澱防止の形で観察せられるが,  $\text{Ca}^{++}$  のない場合のこれらの関係についてはどのような状態におかれているであろうか。このような蛋白質と蛋白質の結合においては, 水素結合やさらに弱い極性基間の結合, 或は無極性基間の結合が考えられるが PERMANN<sup>16)</sup> の実験によるとカゼインに存在する  $\text{PO}_4$  の形から考えると  $\text{PO}_4^{---}$  が結合のつなぎ目になっている事が考えられる。すなわち,  $\text{Ca}^{++}$  の存在しない場合でもカゼインから次のような磷酸エステルが存在が報じられている。彼女は磷酸エステル結合に働く酵素をカゼインに作用させて,  $\alpha$ -カゼインの  $\text{PO}_4^{---}$  の 40% がモノエステルとして, 他の 40% がジエステルとして, 20% がピロ磷酸エステルとして存在し, また  $\beta$ -カゼインの 72% がジエステルとして存在する事を述べている。その他にも磷酸アミド, 磷酸アミドジエステル結合の存在が予想されていて, カゼイン相互間の結合を構成しているかも知れない。

- |                |               |
|----------------|---------------|
| (1) モノエステル     | R-O-P         |
| (2) ジエステル      | R-O-P-O-R     |
| (3) ピロ磷酸エステル   | R-O-P-O-P-O-R |
| (4) 磷酸アミド      | -NH-P         |
| (5) 磷酸アシドジエステル | -NH-P-O-R     |

本報で述べた興味ある実験結果によると, このような  $\alpha_s$ - $\kappa$ -カゼイン複合物が温度依存性ではないかと思われる事である。これは第 22 図と第 23 図に示されている事から予測される事で, 全区分の存在する状態であるが, カゼイン溶液はこれに  $\text{Ca}^{++}$  を添加するとき生ずる白濁度—これは  $\text{Ca}$ -カゼインの不溶性と関係があつて粒子が大きな場合ほど白濁度が強くなる—が温度依存性である事で, とくに 10°C 以下の低温において白濁度が強くなるのは  $\text{Ca}$ - $\alpha_s$ -カゼインによるものと思われる。これはカゼインより  $\alpha_s$ -カゼインを分割する方法で応用されている。低温において  $\alpha_s$ -カゼインや  $\kappa$ -カゼインと複合物を形成していないのではないかと思われる。この事は 10°C~20°C で白濁度がもっとも弱くなっているが, これはおそらく,  $\alpha_s$ -カゼインと  $\kappa$ -カゼインの間に, 或はそれに  $\beta$ -カゼインが参加して比較的小きな粒子の  $\text{Ca}$ -カゼイン複合物を形成していて, 高温になるに従つてその粒子が大きくなってミセルの成長が見られ, 白濁度が再び増加するのであると思われる。

この白濁度の温度による変化に  $\beta$ -カゼインが関与している事が,  $\text{Ca}^{++}$  存在下における  $\beta$ -カゼイン

の可溶性の減少として観察される事が報じられているので、ここでさらに論議を深めるため、 $\beta$ -カゼインと $\kappa$ -カゼインの相互関係についてふれてみよう。今まで多くの $\beta$ -カゼインの分割方法が考察されてきたが、ほとんどの場合 $\alpha$ -カゼインの混入が報じられている。これは恐らく $\kappa$ -カゼインであろうと思われ、 $\beta$ -カゼインと $\kappa$ -カゼインの間に非常に分割し難い密接な結合状態が存在する事については以前より知られていた。WAUGHによると、 $\beta$ -カゼイン単独の場合において、その温度によってモノマーと、ポリマーとに可逆的に変化すると報じられており<sup>14)</sup>、 $18^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  辺りで急激にポリマーへと変化すると考えられていた。そして $\text{Ca}^{++}$ の存在するとき、 $\text{Ca}-\beta$ -カゼインとして沈澱を生ずると述べている。

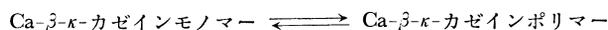
$\text{Ca}^{++}$  存在せず



$\text{Ca}^{++}$  存在する



WAUGH<sup>14)</sup>の説によると $\kappa$ -カゼインは常にモノマーが16~37個の結合したポリマーとして存在していて、 $S_{20}=13.5\text{S}$ でpH,  $\text{Ca}^{++}$ 存在の有無、温度に無関係であると述べているのであるが、 $\beta$ -カゼインは温度依存性であるので、これによると $\beta$ -カゼインと $\kappa$ -カゼインの相互関係が説明し難いのである。著者の実験によると $\text{Ca}^{++}$ 存在において $\text{Ca}-\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物モノマーが生成しているように思われるし、これは温度が高くなるに従って $\text{Ca}-\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物ポリマーへと成長する事が判った。しかし低温に $\text{Ca}^{++}$ の存在の有無にかかわらず、 $\kappa$ -カゼインポリマーの存在の証明は得られなかった。



この事はカゼイン及びカゼイン・ミセル懸濁液に $\text{Ca}^{++}$ を添加するとき生ずる白濁度の増加が温度依存性である事と密接な関係があると思われる。

これらの間の結合がどのようなものであるかについては定かでないが、 $\beta$ -カゼインの $\text{PO}_4^{---}$ 結合がジエステルで存在するという事と $\kappa$ -カゼインが $\text{Ca}^{++}$ と非常に結合力があるという事からその結合が考えられるし、また $\text{Ca}^{++}$ が存在しない場合でも $\beta$ -カゼインの分割を困難にしている $\beta$ -カゼインと $\kappa$ -カゼインの間に強固な結合が存在する。おそらく $\alpha_s$ -カゼインよりも強い結合力が、 $\beta$ -カゼインと $\kappa$ -カゼインにある為だろうと考えられる。この説明の一端として、 $\kappa$ -カゼインは非常に反応性に富んでいて陰性に帯電しやすく、 $\beta$ -カゼインは陽性に帯電し易いという事がD.E.A.Eセルローズクロマトグラフィーの展開図から予想されるので、それらの間に密接な結合の生ずることになるのかも知れない。そして少なくとも、カゼイン相互関係を論ずるに当っては $\alpha_s$ -カゼインと $\kappa$ -カゼインの結合以上に強い関係のある $\beta$ -カゼインと $\kappa$ -カゼインの結合の方がカゼイン相互関係の中で重要で、すなわち、カゼイン・ミセルの基礎となるのではないかと思われる。恐らくその $\text{Ca}-\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物の上にならば、 $\text{Ca}-\alpha_s$ - $\kappa$ -カゼイン複合物、 $\text{Ca}-\alpha_s$ - $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物が生成してゆくのではないだろうか。これらは共に $37^{\circ}\text{C}$ では、より低い温度よりも大きな粒子へと重合を起し、 $\text{Ca}^{++}$ の存在でミセルへと成長してゆくのであろう。

### 3. カゼイン・ミセルの構造とその膠状的安定性

それでは結局、カゼイン・ミセルはどのような構造を有していると考えることが出来るのであろうか。カゼイン・ミセルにおける内部構造の基礎となるものは今までに述べてきたような2つの結合方式、すなわち、

- (1) 蛋白質の相互関係
- (2) 蛋白質と塩の関係

であろう。これらのうちの前者についてはカゼイン区分における $\kappa$ -カゼインの役割がその最も重要な要素となるものであろうと考えられる。そして他のカゼイン区分、例えば $\alpha_s$ -カゼイン群や $\beta$ -カゼインは $\kappa$ -カゼインを中心として相互関係が存在し、3次元的立体構造が組み立てられてゆくのであろうと考えられている。この事は、カゼイン複合物が $\kappa$ -カゼインを介して生ずる事が認められているし、 $\kappa$ -カゼインを加熱処理するとミセル生成能が低下する事や、また、 $\kappa$ -カゼインをレンネット処理するとミセルはさらに3次元的網様構造へと成長してゆく事からも明らかである。そして、これらの、 $\kappa$ -カゼインを中心としたカゼイン蛋白質の相互関係は蛋白質の非極性基による場合もあるし、水素結合や、塩類様結合、 $\text{Ca}^{++}$ を介してのキレート形成による場合も考えられているが、これについては未だ明らかでない。

とにかく、37°Cでミセルを構成しているという事実は、 $\text{Ca}-\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物に何らかの形で $\text{Ca}-\alpha_s$ -カゼインが $\kappa$ -カゼインを介して結合していると考えるのが正しいと思われる。そしてこの $\text{Ca}^{++}$ の結合については、(1)カゼイン蛋白質のセリン、スレオニンにエステル状で結合している $\text{PO}_4$ と、(2)カゼイン蛋白質のC末端基である $-\text{COOH}$ と、(3)カゼイン蛋白質のN末端であるリジン、アルギニンの $\epsilon\text{-NH}_3^+$ 基と $\text{CaPO}_4^-$ の形で結合しているものと思われる。このように、カゼインミセルの構造は反応性に富んだ $\kappa$ -カゼインを中心としてその周囲に $\alpha_s$ -カゼインと $\beta$ -カゼインが配列し、それらのC末端、N末端に直接 $\text{Ca}^{++}$ と $\text{CaPO}_4^-$ が結合して疎水性のコロイド粒子を形成して存在し、ミセル全体としてみるとやはり疎水性を保ちながら安定な状態で乳汁中に分散しているものと思われる。

このようなカゼイン・ミセルの安定性を考察してみると、 $\text{Ca}^{++}$ がその系に多いとき、或は $\text{CaPO}_4^-$ が多量存在する時、カゼイン・ミセルは疎水性のコロイド粒子へと変化する事が考えられるし、また一方そこに存在する $\text{Ca}^{++}$ をとり込んで $\text{Ca}^{++}$ 橋を形成してミセルが成長してゆくものと思われるので、結局、カゼイン・ミセルの成長と膠質的安定性は反比例の関係にあるように考えられる。

すなわち、カゼインミセルの遠心分離性は $\text{Ca}^{++}$ を添加した場合の方が高いという事実はこの推察と全く一致すると考えられる。

さらにカゼイン・ミセルの加熱処理は、或はレンネット処理はその膠状性にどのような変化が生ずるかについて考察しよう。加熱処理による乳汁の変化において、とくにそのカゼイン及び塩類の関係について考えてみると、カゼイン蛋白質について明らかに60°C 10分の加熱処理によって $\text{Ca}^{++}$ との反応性に変化が生じている事が§3.3の実験によって明らかである。他方、加熱処理による塩類の不溶化とくに $\text{Ca}^{++}$ の不溶化があるがこれは単純な不溶性リン酸カルシウムが生成の為であるという説もあるが、しかしカゼイン・ミセルの $\text{Ca}^{++}$ との反応性に変化が生ずるという事は $\text{Ca}^{++}$ が直接カゼイン蛋白質に結合するためと考えるべきであり、その結果としてカゼイン・ミセルは凝固会合を生じてより大きなミセルになり、より強く $\text{Ca}^{++}$ と結合するし、さらには乳清中の $\text{Ca}^{++}$ とも反応してカゼインに結合される結果不溶性化されると考えられる。そして、これはカゼイン蛋白質の変化が $\text{Ca}^{++}$ との反応性の増加という形で変性しているものと思われる。すなわち、加熱処理を受けたカゼインのCa-感度が低下するという事は、加熱によりカゼインが $\text{Ca}^{++}$ と反応し易くなって一定の $\text{Ca}^{++}$ 濃度において疎水性のコロイドミセルになり難く、そのために未処理の場合の白濁度より低い数値になるものと考えられる。従って乳汁を加熱すると乳中の $\text{Ca}^{++}$ はカゼイン蛋白質の変性によってカゼイン蛋白質に結合され不溶性になるのであろう。

次にレンネット凝固性について述べよう。レンネット凝固においては、カゼイン・ミセルがレンニンの作用を受けて非常に急激にその反応性を増加し、 $\text{Ca}^{++}$ を結合してこれらのレンニン作用を受けたミセルとミセルとの間に強固な結合が生じ、ミセルの重合による3次元の網様構造が形成されるのであろうと考えられる。これはミセルの成長を意味するものでこそあれ、分解を意味するものではないと考えられる。この場合のカゼイン・ミセルにレンニンを作用せしめても $\text{Ca}^{++}$ が充分にないときにはミセルの会合、すなわち乳汁中においては clotting、もっと単純なカゼイン-Ca系においては coagulation が生じない事になる。加熱殺菌乳においては遊離の $\text{Ca}^{++}$ の一部は既にカゼイン蛋白質と結合して不活

性な状態にあるのでレンネット凝固の生じ難い状態になり正常の凝固を生じさせるにはさらに  $\text{Ca}^{++}$  を添加する必要が生ずるものと思われる。

そしてさらに重要な事は、これらの加熱変性において、或はレンネット凝固においてもミセルの膠状性の維持に重要な働きを演じている  $\kappa$ -カゼインが熱処理においても、レンネット処理においても最も顕著な変性を受け、この  $\kappa$  のカゼインの変性がカゼイン・ミセルの膠状性の変化の“引きがね”の役割を果しているものと考えられる。

それで乳の濃縮に当って、例えば無糖練乳製造において  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を安定剤として添加する方法はいま述べたような  $\text{Ca}^{++}$  によるミセルの成長を阻止させるような方面に反応を進行させるために必要だし、その他  $\text{Ca}^{++}$  を除去し不溶化させるためイオン交換樹脂を用いたり、磷酸塩を添加することも同様な意味であろう。先に述べたようにミセルの成長と膠質学的安定性とは一致しないで反対の性質のものであるという意見と一致するもので、これらの操作は乳汁系の膠質学的安定性を第1義としている事を意味しているものであろう。

これらの変化に対して、酸による等電点沈澱は全くその機構を異にするものであって、等電点におけるカゼイン分子内の等イオン状態による疎水性沈澱である。この時においてはもはや  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{PO}_4^{---}$  との反応は考えられず、 $\text{Ca}^{++}$  の全てとエステル結合の  $\text{PO}_4^{---}$  を除いた全ての磷が放出されるので、この状態においてはカゼイン・ミセルは完全に解裂したものと理解出来るのである。なお pH 4.7 近辺においては  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$  とともに可溶性である事を付加しておこう。

#### 第 4 章 結 論

カゼイン・ミセルの膠状性の究明の為、第 2 章に述べる様な実験を行なった結果、総括すると次に記す如くである。

- (1) 脱脂乳中のカゼイン態蛋白質はその 83.3% がカゼイン・ミセルを形成し、他の 16.7% は乳清中に非沈澱性の状態で分散している。
- (2) カゼイン・ミセルは 90.83mg/g 蛋白質の磷酸で沈澱する灰分を結合していて、そのうち Ca は 30.14mg, Mg は 2.62mg であった。
- (3) カゼイン・ミセルは 35.8mg/g 蛋白質の Ca, 24.0mg/g の P を結合している。
- (4) カゼイン・ミセルに  $\text{Ca}^{++}$  を添加するとその白濁度が増加し、遠沈性が増加し、粘度が低下した。この事はカゼイン・ミセルの粒子の会合、または粒子の大型化を意味している。
- (5) カゼイン・ミセルの白濁度は 2~37°C の温度、10~60分の時間では変化せず蛋白質濃度に比例するが、これに  $\text{Ca}^{++}$  を添加すると、白濁度は増加し、0~10分の間で急激に増加し、これは 0~37°C の温度範囲では高温ほど白濁度が強くなるが、生じた白濁度は蛋白質濃度に比例し、10~60分の時間内では一定であった。
- (6) カゼイン・ミセルの膠状性の変化を比較するため、各種処理を受けたカゼイン・ミセルを温度一定、蛋白質濃度一定、pH 一定において各種  $\text{Ca}^{++}$  濃度にて生ずる白濁度を 10~60分の間で分光光度計を用いて、 $E_{1\text{cm}}=610\text{m}\mu$  で測定する事が出来る事が判明し、これをカゼイン・ミセルの  $\text{Ca}^-$  感度と称する事にした。
- (7) この  $\text{Ca}^-$  感度はカゼイン蛋白質一般に使用出来る事が判り、その膠状性の比較に應用出来る。なおこの場合は、カゼインのミセル生成態の比較になる。
- (8) カゼイン・ミセルから蛋白質部分を分離し、これを 1st-cycle カゼインとし、さらに 30mM  $\text{Ca}^{++}$  濃度に対する溶解度の差から、2nd-cycle カゼインを分割した。夫々の組成と性質は下表の通りである。

	1st-cycle カゼイン中の比率	30mM CaCl <sub>2</sub> における性状	主 成 分
F-1 カゼイン区分	36.3 %	2~35°C で凝固	$\alpha_s$ -カゼイン
F-2 カゼイン区分	3.8	2~35°C で凝固	$\alpha_s$ -カゼイン
F-3 カゼイン区分	33.8	2~5°C で溶解 30~35°C で白濁粒子	$\beta$ -カゼイン $\kappa$ -カゼイン
F-4 カゼイン区分	22.9	2~35°C で溶解	$\kappa$ -カゼイン

(9)  $\kappa$ -カゼインの性状の1つに、Ca- $\alpha_s$ - $\kappa$ -カゼイン複合物を形成して  $\alpha_s$ -カゼインの膠状的安定性に関与している。

(10)  $\kappa$ -カゼインと  $\beta$ -カゼインは pH 7.0, 3°C において 30mM Ca<sup>++</sup> 存在で可溶性の S=14.3 の Ca- $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物を形成していて、これは 20°C 以上では不溶性の複合物を形成し溶媒中に安定なミセルの状態で分散していて、これらは温度の変化で可逆的に移行する事が判明した。F-3 カゼインはこの Ca- $\beta$ - $\kappa$ -カゼイン複合物に相当する。

(11)  $\kappa$ -カゼインの性状に、レンニンの作用を持異的に受けて、カゼイン・ミセルの凝固を生じさせる機能がある事が判った。なおこの時、Ca<sup>++</sup> は必須因子としてミセルの凝集に関与している。

(12) カゼインに Ca<sup>++</sup> と Mg<sup>++</sup> を夫々に添加すると異なった性質の白濁が生じた。これは Ca<sup>++</sup> と Mg<sup>++</sup> とでは作用機構に差異がある事を意味している。

#### 引 用 文 献

- 1) NITGHIMAN, H.: Helv. Chim. Acta, **32**, 1258 (1949)
- 2) RAMSDELL G.A. & WITTER, E.U.: J. Biol. Chem., **154**, 413 (1944)
- 3) WITTER, E.O. & WEBB, E.B.: Byproducts from Milk, 6, Waverly press, New York (1950)
- 4) SOMMER, H.H. & HERT, E.B.: Wis. Agr. Exp. Sta. Res. Bull., **67** (1926)
- 5) ROTCHER, C.: Chem. and Indust., **19**, 589 (1928)
- 6) PYNE, G.T.: Biochem. J., **28**, 940 (1934)
- 7) PYNE, G.T.: J. Dairy Sci. Abst., **17**, 532 (1955)
- 8) MELLANDER, O.: Biochem. Z., **300**, 240 (1939)
- 9) LINDERSTROM-LANG: C.R. Lab. Carlsberg, **17**, 9 (1939)
- 10) WARNER, R.C.: J. Amer. Chem. Soc., **66**, 725 (1952)
- 11) HIPP, N.J.: J. Dairy Sci., **35**, 272 (1952)
- 12) WAUGH, D.F. & Von HIPPEL, P.H.: J. Amer. Chem. Soc., **75**, 4576 (1956)
- 13) TRASSUK, N.P. & YAGUCHI, M.: J. Dairy Sci., **44**, 589 (1961)
- 14) WAUGH, D.F.: Discus. Faraday Soc., **25**, 200 (1961)
- 15) VERMA, I.S. & SOMMER, H.H.: J. Dairy Sci., **40**, 331 (1957)
- 16) FORD, T.F. RAMSDELL, G.A. & LANDSMANN, S.G.: J. Dairy Sci., **35**, 843 (1955)
- 17) MULDER, H.: Off. Org. K. Ned. Zuivelv., **13**, 200 (1937)
- 18) 柳沢 文正: 化学の領域 増刊 光電比色法 各論 I
- 19) MARTIN, J.B. & DOTY, D.M.: Anal. Chem., **21**, 965 (1949)
- 20) 祐川金次郎: 雪印乳業研究所報告 64号 (1959)
- 21) PYNE, G.T.: J. Dairy Res., **29**, 101 (1960)
- 22) MAKENZIE, H.A. & WAKE, R.G.: Biochim. Biophys. Acta, **47**, 240 (1961)

- 23) 吉田繁, 有馬俊六郎, 橋本吉雄: 農化会誌 **39**, 71 (1965)
- 24) 前野 正久: 寒地農学 **1**, 1 (1946)
- 25) SCHIPPER, C.J.: Landbouwhogeschool, wageningen: Thesis, (1961)
- 26) MCGANN, T.C.A. & PYNE, G.T.: J. Dairy Res., **27**, 9 (1960)
- 27) VARMA, I.S. & SOMMER, H.H.: J. Dairy Sci., **40**, 331 (1957)
- 28) PYNE, G.T.: 14 Int. Dairy Cong. D187, (1962)
- 29) ARGEN, G. VERDIER, C.H. & GLONSET, J.: Acta Chem. Scand., **5**, 324 (1951)
- 30) MULDER, H. & SCHIPPER, C.J.: 14 Int. Dairy Cong., B529 (1962)
- 31) TER HORST M.G.: Neth. Milk & Dairy J., **17**, 185 (1963)
- 32) GORDON, W.G. & ZIEGLER, J.: Arch. Bioch. Biophys., **57**, 80 (1955)
- 33) WAUGH, D.F.: Disc. Farad. Soc., **25**, 186 (1958)
- 34) GORDON, W.G. SEMMETL, W.F. GABLE, R.S. & MORIS, M.: J. Amer. Chem. Soc., **67**, 1524 (1945)
- 35) FRANKEL-CONRAT, H. & FRANKEL-CONRAT, J.: Acta Chem. Scand., **5**, 1409 (1951)
- 36) PORTER, R.R.: Biochem. J., **46**, 473 (1950)
- 37) FRANKEL-CONRAT, H. & FRANKEL-CONRAT, J.: Biochem. J., **49**, 128 (1950)
- 38) GREEN, N.M. & WORK, E.: Biochem. J., **49**, 37 (1951)
- 39) MELLON, E.F. KARM, A.K. & HOOVER, S.R.: J. Amer. Chem. Soc., **75**, 1675 (1953)
- 40) WAUGH, D.F.: J. Amer. Chem. Soc., **84**, 4929 (1962)
- 41) THOMPSON, M.P. KIDDY, C.A. PEPPER, L. & ZITTLE, C.A.: Nature, **195**, 1001 (1962)
- 42) THOMPSON, M.P. & PEPPER, L.: J. Dairy Sci., **45**, 794 (1962)
- 43) WAKE, R.G., & HALDWIN, R.L.: Biochim. Biophys. Acta, **47**, 225 (1961)
- 44) NEELIN, J.M.: Canad. J. Biochem. & Physiol., **40**, 693 (1962)
- 45) GARNIER, J: Biochim. Biophys. Acta, **38**, 246 (1960)
- 46) PERMANN, G.E.: Advances of Protein Chem., **10**, 1 (1955)
- 47) 遊佐 孝五: 日畜会報, **27**, 197 (1957)
- 48) DESNUELLE, P. & GASAL, A.: Biochim. Biophys. Acta, **2**, 64 (1948)
- 49) BRAND, E. SAIDAL, L. J. GOLDWATER, W. H. KASSALLE, B. & RYAN, E. J.: J. Amer. Chem. Soc., **67**, 1524 (1945)

## SUMMARY

Casein micelle is the state of the dispersion in milk whey as suspension of colloidal particle containing 35.8mg calcium and 24.0mg phosphorus per gram of casein protein. This casein micelle's suspension shows the strong turbidity on account of existing the colloidal particle which scatter visible light.

When calcium ion was added, casein micelle was aggregated each other, and destabilized in a centrifugal field, and decreased in its viscosity.

The intensity of this turbidity was measured by its optical density at 610m $\mu$  wave length by spectrophotometer. This turbidity showed a constant optical density at under 37°C. But when Ca<sup>++</sup> was added to this casein micelle suspension, its turbidity increased suddenly and influenced remarkably with the temperature of this suspension. At the time of measurement of its turbidity, casein concentration, Ca<sup>++</sup> concentration, pH, ionic strength, and temperature must be corrected.

The protein portion of this casein micelle was prepared by addition of potassium oxalate, separation of calcium oxalate, and dialysis against deionized water. These procedures mean the destruction of

casein micelle structure. This protein was fractionated to 4 parts by difference of solubility at 30mM calcium chloride without pH change or urea treatment. The estimation of the 4 casein fractions was provided with Tiselius Electrophoresis and D.E.A.E. cellulose column chromatography.

F-1 casein fraction, 36.3%, precipitated by 1000rpm, 200g, 10min., centrifugation with 30mM  $\text{CaCl}_2$  at 2°C, main component was  $\alpha_s$ -casein.

F-2 casein fraction, 3.8%, precipitated by 10000rpm, 7000g, 10min., centrifugation at 2°C, after F-1 casein was precipitated, main component was seemed probably to be  $\alpha_s$ -casein.

F-3 casein fraction, 33.3%, precipitated by 20000rpm, 9000g, 20min., centrifugation at 37°C after F-1 casein and F-2 casein were removed, main components were  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein.

F-4 casein fraction, 22.9% remained in supernatant after calcium sensitive casein fractions were precipitated, main component was  $\kappa$ -casein.

$\alpha_s$ -casein,  $\kappa$ -casein and  $\text{Ca}^{++}$  make a complex which is  $\text{Ca}-\alpha_s-\kappa$ -caseinate. This complex shows a stable state at colloidal aspect, because  $\kappa$ -casein prevent the precipitation of  $\text{Ca}-\alpha_s$ -caseinate.  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein and  $\text{Ca}^{++}$  make a complex of  $\text{Ca}-\beta-\kappa$ -caseinate. This complex polymerized to  $\text{Ca}-\beta-\kappa$ -caseinate polymer at more than 20°C.

Rennin clotting is occurred only when  $\kappa$ -casein is treated with rennin.