

牛乳および乳製品中の γ - カゼインに関する研究

誌名	弘前大学農学部学術報告
ISSN	0073229X
著者名	五十嵐, 康雄
発行元	弘前大学農学部
巻/号	44号
巻号補足	
掲載ページ	p. 51-94
発行年月	1985年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



牛乳および乳製品中の γ -カゼインに関する研究*

五十嵐 康 雄

農産物利用学講座

(1985年10月29日受付)

目 次

第1章 緒論	51	乳について	69
第1節 本研究の目的	51	第4章 牛乳中における γ -カゼインの消長, 並びに挙動	73
第2節 研究史	52	第1節 牛乳中のプラスミン作用: γ -カゼ インの定量に基づく分析	73
第2章 γ -カゼインの性状	54	第2節 低温貯蔵乳における γ -カゼインの 消長,並びにプロテオリシス	74
第1節 γ -カゼインの調製と理化学的性質 ..	54	第3節 牛乳中における γ -カゼインの意義・ 役割に関する一考察	78
第2節 γ -カゼインの会合	61	第5章 総括	83
第3節 γ -カゼインと他カゼイン 成分の相互作用	67	文献	85
第3章 牛乳および乳製品における γ -カゼインの定量	69	英文抄録	92
第1節 牛乳中における γ -カゼインの定量 ..	69		
第2節 乳製品中の γ -カゼインの定量, 特に UHT 滅菌乳および脱脂粉			

第1章 緒 論

第1節 本研究の目的

乳製品の製造, および製品の貯蔵による品質の変化は, 乳蛋白質の理化学的性質と密接に係する(11)。例えば, 凝乳酵素によるカゼインの凝固作用(71)がチーズの製造に役立っているのに対し, 練乳の増粘やゲル化, および粉乳の不溶化等の製品の品質低下は, 乳蛋白質の貯蔵中に起こる何らかの変化が重要な原因と考えられている(11, 95)。また近年では, UHT滅菌乳の長期貯蔵による濃厚化やゲル化が問題になり, 製品中に残存する蛋白分解酵素の作用との関連で調べられた(134)。牛乳を加工処理して利用する側から, 乳蛋白質に関する詳細な知見が求められていることを銘記すべきであろう。

乳蛋白質中の主要成分であるカゼインは, α_s -カゼイン, β -カゼイン, κ -カゼインおよび γ -カゼインに分類される(140)。 γ -カゼイン成分(γ_1 , γ_2 および γ_3)のアミノ酸配列は β -カゼイン

* 北海道大学学位審査論文

の C-末端部分と同一であり (38, 42, 43), 牛乳プロテイナーゼの作用による β -カゼインの分解物であることが明らかになった (141, 64)。さらに, UHT 滅菌乳の長期貯蔵によって γ -カゼインが増加すること (123), また, このことが牛乳の低温貯蔵中にも見られること (106) 等のように, 牛乳および乳製品中におけるプロテイナーゼ作用との関連で, しばしば γ -カゼインの消長が注目されている。しかしながら, 牛乳中における γ -カゼインの意義や役割については不明であり, この方面での検索もカゼイン研究の一環として必要と思われる。

以上の観点から, 牛乳および乳製品中の γ -カゼインに関する知見を得ることは, 牛乳の理化学的性状を解明する上で重要であると同時に, 乳製品製造上においても資する所があるものと考え, 本研究を行った。

第 2 節 研究史

γ -カゼインの研究は, MELLANDER (73) がカゼインの自由界面電気泳動において, 移動の速い成分から順に α -, β - および γ -カゼインと名付けたことから始まる。これより先, OSBORN and WAKEMAN (94) はすでにカゼインより, 50~70% アルコールに可溶なリン含量の低い成分を調製していたが, これが酸性で水に可溶であったことから, ホエー中にも存在すると考え, カゼインの一成分としては取り扱わなかった。この成分と γ -カゼインの関係は後述するが, γ -カゼインが古くから見出されていたことを, まず, 認識すべきだろう。

その後, カゼインを分画する努力が WARNER (135) および HIPP ら (47) によって行われ, 前者は 2°C (pH 4.4~4.5) における, 後者は 50% エタノールまたは尿素溶液中における溶解度の差を利用して γ -カゼインを調製した。HIPP ら (46) はカゼインの 50% エタノール溶液から, pH 5.7 で可溶な γ -カゼイン画分を分離し, 化学組成, 等電点および溶解度を調べて本成分を特徴付け, さらに前述した OSBORN and WAKEMAN (94) のアルコール可溶成分と同一であろうと述べた。初期のカゼイン研究については GORDON and WHITTIER (37) の概説の中で詳しく述べられている。

一般にカゼインの分画は, 基本的には脱脂乳より pH 4.6~4.7 でカゼインを沈殿させ (60), ホエー蛋白質を除くことから出発する。しかし, WAUGH and VON HIPPEL (138) は超遠心分離によって first cycle casein (カゼインミセル) を調製し, これを出発点として CaCl_2 を加えて沈殿を除いた後, 上澄より κ -カゼインを分離した。この外に, 硫酸を用いたカゼインの調製法がある (72)。

カゼインの研究は分析技術の進歩とあいまって多方面にわたり, これまでにカゼイン成分の会合および相互作用 (100, 98, 89, 99, 118, 101), カゼインミセルの構造 (92, 137, 97, 114, 36, 117, 120, 15), および遺伝的変異体 (8) 等に関する多くの知見が得られた。

これに対し, γ -カゼインに関しては, TOBIAS ら (130), および MURTHY and WHITNEY (81) の報告があったが, 余り関心が払われなかった。

GROVES ら (42, 43) はカラムクロマトグラフィーにより, ポリアクリルアミドゲル電気泳動においてそれぞれ均一な γ -, TS-, R- および S-カゼインを分離し, これらの遺伝的変異体と β -カゼインのそれに関連づけ, これらの成分のアミノ酸配列が RIBADEAU DUMAS ら (109) によって決定された β -カゼインの一次構造における C-末端部と同一であることを明らかにした。このことは, TS- および R-カゼインが牛乳プロテイナーゼによる β -カゼインの分解産物

であるという説 (64) と一致した。

一方、 γ -カゼイン成分が温度に依存して白濁する性質 (41) について、MIKAMI (75) は濁度と pH の関係が各成分で異なることを示した。また、Ca イオンは白濁に関与せず、疎水結合の重要性が指摘された (76, 53, 54)。EIGEL and RANDOLPH (31) は γ -カゼインの会合をゲルろ過によって研究し、温度に依存する会合は γ -カゼイン分子の疎水性に起因すると述べた。

以上の外に、 γ -カゼイン画分の調製と性質について、CERBULIS and CUSTER (14), TRIPATHI and GEHRKE (132), MIKAMI (74), および EIGEL and RANDOLPH (30) の報告があり、また、Ca に対する感受性 (32), および他カゼインとの相互作用 (79, 15, 49) についても報告されている。

GROVES ら (42, 43) の研究により、 γ -カゼイン成分の定義が明確になったが、それらの名称が複雑であるため、WHITNEY ら (140) の乳蛋白質命名委員会 (第 4 回) は、 γ -カゼイン成分を β -カゼインの C-末端部における一次構造の長さに基き、GROVES ら (42, 43) の言う γ -カゼイン (β -カゼインの 29-209) を γ_1 -カゼインと呼び、S-, および TS-A (同106-209) を γ_2 , R- と TS-B (同108-209) を γ_3 -カゼインと呼ぶことを推奨した。これらがカゼインを構成する一グループとして認識されるようになったが、同時に、このグループが完成した γ -カゼインとして生合成されるのか、あるいは生合成後に β -カゼインの酵素分解により生成するのかという問題 (140) が生じた。

牛乳中のプロテイナーゼに関しては乳製品製造上重要であり、多くの研究がある。これについて HUMBERT and ALAIS (48), FOX (33), 上野川 (63) および VISSER (134) の総説がある。牛乳プロテイナーゼの作用を有効に利用している例としてチーズの熟成があるが、この作用は主として保存中における各種製品の劣化と関係し、特に UHT 滅菌乳においては濃厚化やゲル化を引き起こすので問題となっている。SNOEREN ら (123) は直接加熱法による UHT 乳の長期貯蔵によるゲル化は残存する牛乳プロテイナーゼの作用に起因すること、さらに細菌性プロテイナーゼの関与も認めた。しかし、前者の作用は、処理条件が厳しい間接加熱法で製造された場合は認められなかった (121)。CORRADINI and PECIS (17) は UHT 滅菌乳のプロテイナーゼ活性について報告した。

加工に直接係る問題として、低温貯蔵中における原料乳の性状の変化があり、低温細菌の増殖と関連させて論じられた (144)。低温細菌性酵素が牛乳および乳製品におよぼす影響について、LAW (70), および FOX (33) の総説がある。

REIMERDES and HERLITS (106) は牛乳の 4°C における貯蔵でレンネット凝固時間が増加すること、また、48時間で γ -カゼイン含量が増加することを観察し、低温で牛乳プロテイナーゼおよび β -カゼインがカゼインミセルから解離するために、酵素作用が発現すると推論した。

牛乳のアルカリ性プロテイナーゼは、 β -カゼインを分解してその C-末端部分である γ -カゼイン成分を生成することはすでに述べた。この酵素の作用と性質はプラスミンと同じであり (65, 27), さらに、牛乳および牛血清より同じ方法で分離した両プロテイナーゼを比較した実験によって、同一であることが確かめられた (104, 105)。このことから、最近の報告中ではプラスミンに対して特異的な基質を用いて酵素活性を測定したり (111, 112, 67, 110), 電気泳動的に β -カゼインの分解と γ -カゼインの生成を観察することによって (23, 7), アルカリ性ミルクプロテイナーゼがプラスミンまたはミルクプラスミンと呼ばれて研究されている。

上記報告を始め多くの研究において、プロテイナーゼ活性の測定には遊離チロシンの測定、合成基質（ニトロアニリン誘導体等）の利用、またはゲル電気泳動を用いている（48）。最近、牛乳中におけるプロテイナーゼ活性を測定するため、hide powder azure を使用した報告（43）がある。分解産物である γ -カゼインを測定することも試みられた（25, 106）。

全カゼイン中の γ -カゼインの割合は、古くは自由界面電気泳動により（73, 47, 130, 113, 69）、また近年ではカラムクロマトグラフィー（20, 21, 9, 10）により測定され、2～10%であるが、泌乳の後期に増加すると言う（21）。これらの数値はカゼイン組成を決定する一環として γ -カゼインが測定されたものであり、少量成分であるため必ずしも十分な配慮が払われたとは言えない面もある（例えばその吸光係数は推定値が用いられた）。

三上・三浦（77, 78）はDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより、 γ -カゼインを成分別に定量した。また、ポリアクリルアミド電気泳動による定量法が提案された（103）。これらの外に、有機溶媒による抽出法（102, 106）が報告された。

γ -カゼインの起源について、WHITNEY ら（140）は β -カゼインからの分解説を支持しながらも、牛乳中にそのN-末端部分が見出されていなかったことから、乳腺中における生合成の段階で、 γ -カゼインが存在する可能性を指摘した。その後、ANDREWS（4, 5, 6）およびJENESS（59）によって、牛乳中に含まれるプロテオースペプトンの一部が β -カゼインのN-末端部と同一である、すなわち成分5、および成分8Fは、それぞれ β -カゼインの1-105, 107, および1-28であることが明らかにされた。

これにより、 γ -カゼイングループの β -カゼイン分解物説が立証されたとしても、実質的にはカゼインの構成成分であり、カゼインミセルの安定性、およびその構造を考察する上で、本成分の役割に関する知見が必要と思われる（34）。三上・三浦（78）は、カゼインミセルと可溶性カゼインを分離して γ -カゼイン成分を定量し、低温において一部が可溶化することを認めた。FOX（33）は牛乳プロテイナーゼによる分解によっても、ミセル構造はそれ程破壊されないと推定し、この方面からのカゼインミセルの研究法を示唆している。

第2章 γ -カゼインの性状

γ -カゼイン成分の一次構造は、RIBADEAU DUMAS ら（109）およびGORDON ら（38）によって、 β -カゼインのC-末端部分として明らかにされた。これによれば、 γ_1 -カゼインはリン酸基を1個持つが、 γ_2 -および γ_3 -カゼインにはリンが含まれない。また後二者のアミノ酸組成は γ_1 -カゼインに比べて疎水性アミノ酸の比率が高い。このような一次構造の特徴は分子的性質と密接に関係すると思われるが、この面での研究は少ない。本章では、 γ -カゼインに関する基礎的知識を得るために、その理化学的性質、会合、および他カゼイン成分との相互作用について研究した。

第1節 γ -カゼインの調製と理化学的性質

酸カゼインからの γ -カゼイン画分の調製法は研究者によって異なり、50%エタノールまたは尿素溶液中における溶解度の差異の利用（46, 47）、50%アルコールまたはクロロホルム-メタノール（2：1）による抽出（14）、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー（41, 42, 43, 132, 74, 75）の外、リン酸カルシウムゲルを用いたバッチ法（30）がある。本節においては、

尿素のような変性剤の使用を避け、tri-ethyl-amino-ethyl (TEAE) セルロースを用いて温和な条件で γ -カゼイン画分を調製し、その性質を調べた。

1. 材料および方法

1) 酸カゼインの調製

弘前大学農学部付属農場において、ホルスタイン種牛群から搾乳された新鮮な混合乳を用いた。遠心分離 (900×g, 10分) によってクリーム層を除いて得られた脱脂乳に 1N HCl を滴下し、pH 4.6 でカゼインを沈殿させた。遠心分離 (900×g, 10分) により沈殿を集め、2 回水洗した後、脱イオン水に分散し、1N NaOH を加えて pH 8 以下で溶解させた。再び沈殿、水洗溶解の操作を行った。

2) Temperature-sensitive fraction (TSF) の調製

2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール (AMP)-クエン酸緩衝液を用いた TEAE-カラムクロマトグラフィー (52) によって、Temperature-sensitive fraction (TSF) を調製したが、濃度勾配による溶出操作を省いた。カゼイン溶液を 0.027M AMP-クエン酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、遠心分離 (10,000×g, 30分) により混在する脂質様成分を除いた後、その 40ml (蛋白質 1.5~2 g) を 2°C において TEAE-セルロースカラム (2.8×15 cm) に添加し、同緩衝液で溶出した。カラムを素通りする蛋白質画分を集め、カラムを再生した後、同温度で再びこのカラムを通過させて室温で白濁する画分 (TSF) を得た。カラムの再生には 0.5% トリトン X-100 溶液 (0.2M クエン酸ナトリウムを含む) を用いた。通常は適当量の TSF を得るため、2 本のカラムを使用して同時に操作した。

3) γ -カゼインの調製

酸カゼイン (蛋白質 3~4 g) から分離した TSF に 0.027M AMP-クエン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した TEAE-セルロースを加え、40°C で 10 分間攪拌した後、同温度に保持されたクロマトカラムに注ぎ込み、さらに同温度で同緩衝液 100 ml を流して非吸着成分を溶出除去した。この時、ベッド容積は直径 1.8 cm×高さ 15 cm であった。溶出を止めてカラムを低温室 (2°C) に一夜放置した後、同室で 50 ml の上記緩衝液を流し、低温で解離した γ -カゼインを溶出した。

4) ゲルろ過

セファデックス G-100 カラム (2.8×47.5 cm) を用い、低温室 (2°C) 中で 0.027M AMP-クエン酸緩衝液 (pH 8.0) により溶出し、5 ml ずつ分取して 280 nm における吸光度を 10°C 以下で測定した。

5) 濁度

種々の温度において、TSF または γ -カゼイン画分の吸光度 (610 nm) を測定して、濁度とした。

6) ディスク電気泳動

GROVES and KIDDY (40) の方法により、4M 尿素存在下で泳動を行ったが、試料用ゲルの作成を省き、試料 (4M 尿素を含む 0.062M トリス-HCl 緩衝液, pH 6.7 に対して透析したもの) を直接濃縮用ゲルの上部に添加した。

7) 等電点電気泳動

VESTERBERG and SVENSSON (133) の方法により、 2°C で泳動を行ったが、密度勾配作成時に濃溶液および淡溶液に尿素を 5M になるように加えた。pH 勾配の作成はアンフォライン pH 3-10 (LKB 社) によった。吸光度は日立 034 形流動光度計、pH は流動型電極 (堀場 6901-25 T) を装着した日立 F-5 形 pH 計によった。

8) 蛋白質およびアミノ酸の定量

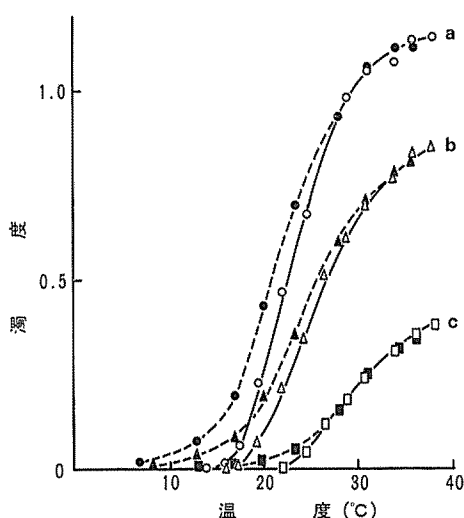
蛋白質はマイクロケルダール法によった。試料を 6N HCl 中で 110°C において 12 時間、および 24 時間加水分解を行った後、日立 034-004 形汎用液体クロマトグラフ装置を用いて、SPACKMAN ら (124) の方法によりアミノ酸の定量を行った。

2. 結果および考察

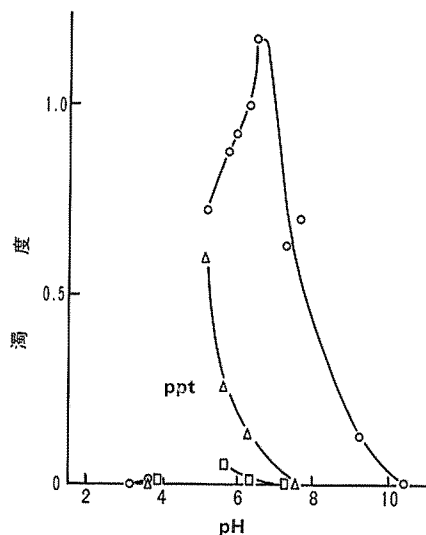
1) TSF の性質

尿素を含まない緩衝液系を用い、低温で酸カゼインのカラムクロマトグラフィーを行うことにより、低温では透明であるが室温で白濁する画分 (TSF) が得られる (41, 53, 74)。TSF の温度と濁度の関係 (53) を第 1 図に示す。濁度は濃度に依存したが、いずれの濃度においても温度の上昇と共に増加し、温度を下げると減少した。また、TSF の濁度は pH によっても影響された (第 2 図)。 25°C では pH 4~10 で白濁し、pH 6.5 付近で濁度が最大であった。これより低い温度では白濁を示す pH 域が狭く、また、pH 4.5 付近ではいずれの温度でも沈殿が生じた。pH と濁度の関係について、さらに γ -カゼイン溶液を用いて実験した結果を本章第 2 節で述べる。

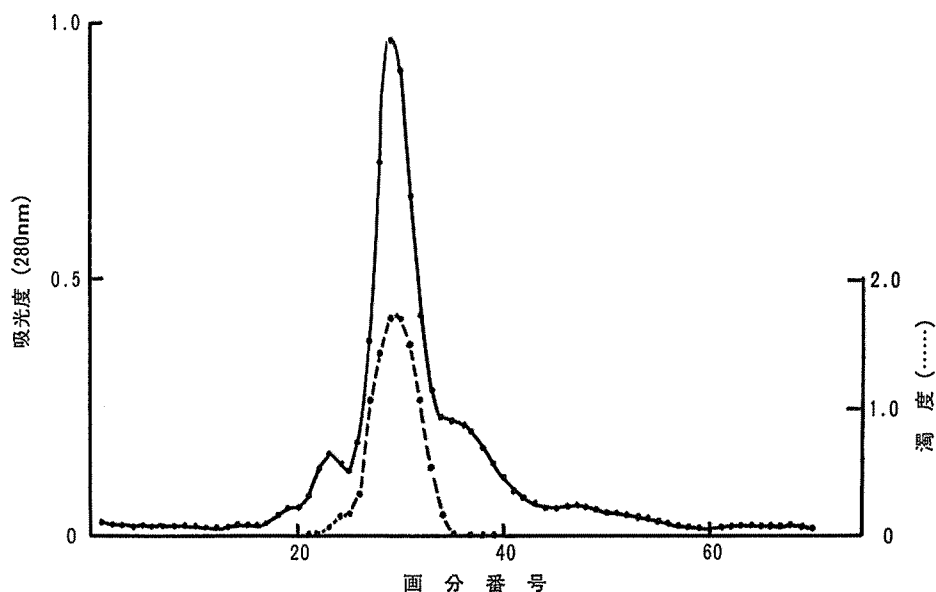
上記のような白濁は、電子顕微鏡による観察から、 γ -カゼインが直径 $100\sim 300\text{ nm}$ の球状の



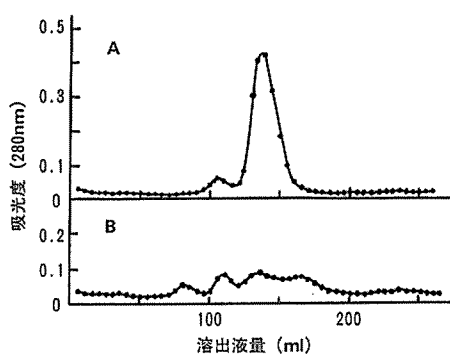
第 1 図 TSF の温度と濁度の関係
蛋白質濃度: a, 0.06%, b, 0.04%, c, 0.02%. (—), 温度上昇時. (---), 温度下降時.



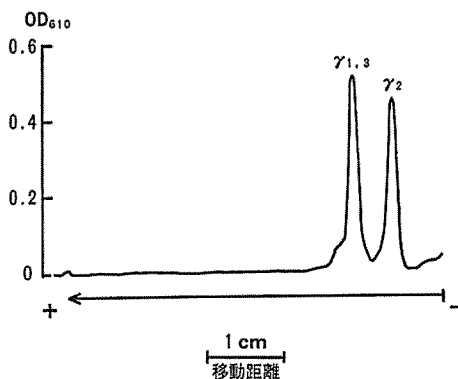
第 2 図 各温度における TSF の濁度におよぼす pH の影響
 25°C (○), 15°C (△), 8°C (□). 蛋白質濃度: 0.06%. pH 4.5 付近では沈殿が生じた。



第3図 セファデックス G-100 による TSF のゲルろ過
カラムサイズ: 2.8×47.5 cm, 緩衝液: 0.027 M AMP-クエン酸, pH 8.0,
 2°C , 27.5 ml/hr で溶出し, 5 ml ずつ分取した。



第4図 γ -カゼイン画分(A)および不純物
(B)のセファデックスG-100による
ゲルろ過
カラムサイズ: 2.8×48 cm, 緩衝
液: 0.027 M AMP-クエン酸, pH
8.0, 2°C , 24 ml/hr で溶出した。

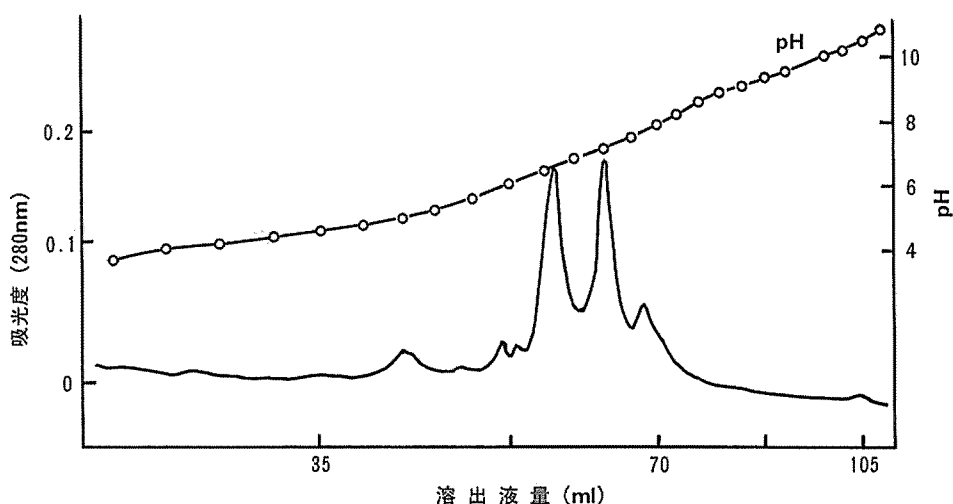


第5図 γ -カゼイン画分のディスク電気泳
動
(デンストメーターによる走査図)
蛋白質: 21 μg , 染色: アミドブ
ラック10B,

凝集体を形成することによって生じることが認められた (53)。本実験で用いた TSF と同様な画分の白濁性について MIKAMI (74) の報告がある。

2) γ -カゼインの調製

TSF 中には γ -カゼイン以外の成分が含まれることがゲルろ過の結果 (54) より考えられた



第6図 5M 尿素中における γ -カゼインのエレクトロフォーカシング

(第3図)。そこで、TSF 中の γ -カゼインを pH 8.0 の AMP-クエン酸緩衝液を用い、40°C で TEAE-セルロースに結合させ、結合しない不純物を溶出させて取除いた後、再び低温で溶出してくるものを γ -カゼイン画分とした。 γ -カゼイン画分と除去された不純物のゲルろ過を行った結果 (54) を第4図に示す。 γ -カゼイン画分 (同図A) は主ピークの外にこれより高分子側の溶出位置に小さなピークがあったが、室温以上で白濁したことから、おそらく γ -カゼインの会合体のピークと思われた。不純物 (同図B) は分子の大きさの異なる4つのピークに分離されたが、これらの成分についてはこれ以上追求しなかった。

一般には、尿素系緩衝液を用いた DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって、酸カゼイン成分が分離される (145, 108, 115, 20)。しかし、 γ -カゼインは量的に少ないので、この調製を目的とする場合、上記方法は必ずしも適当とは言えない。酸カゼイン、またはその pH 4 (2°C) における可溶画分の DEAE-クロマトグラフィー、さらに尿素を含む (または含まない) 緩衝液を用いた再クロマトグラフィーにより、 γ -カゼインの各成分 (γ_1 , γ_2 および γ_3) が分離・精製された (40, 39, 43)。MIKAMI (75) は、HIPP ら (46) のアルコール可溶画分から、3.3M 尿素を含む 0.025M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.3) を用いた DEAE-クロマトグラフィー (NaCl グラジエント法) によって、これらの成分を分離した。

本実験で調製された γ -カゼイン画分のディスク電気泳動による分析 (デンスイメトリー) の結果を第5図に示す。この画分は二つのピーク (γ_2 および $\gamma_{1,3}$) から成っていた。一方、等電点電気泳動によっても (第6図)、主として二つのピークが見られ (55)、これらの見かけの等電点は pH 6.7 および 7.3 であり、それぞれ、 γ_3 - および γ_2 -カゼインに相当すると思われたが、この値は TRIEU-CUOT and GRIPON (131) が報告した値よりもやや高かった。 γ_1 -カゼインのピークは明確ではなかったが、GROVES and GORDON (39) が得た収量から見て、少なくとも γ -カゼイン画分中の主要な成分ではないと思われた。

3) アミノ酸組成

第1表 γ -カゼインおよび酸カゼインの
アミノ酸組成*

アミノ酸	γ -カゼイン	酸カゼイン
アスパラギン酸	4.10	5.87
スレオニン	4.97	3.60
セリン	5.68	4.99
グルタミン酸	14.91	21.29
プロリン	15.00	10.89
グリシン	0.71	1.46
アラニン	1.00	2.41
シスチン	—	0.47
バリン	5.87	5.70
メチオニン	1.42	1.46
イソロイシン	0.77	4.36
ロイシン	14.06	7.72
チロシン	—	4.44
フェニルアラニン	4.58	4.89
リジン	3.56	6.33
ヒスチジン	4.60	2.06
アルギニン	0.49	2.83
分解物**	18.28	9.23

* 検出された全アミノ酸に対する重量%

** NH_3 含量から平均分子量130として算出した。

γ -カゼインと酸カゼイン中のアミノ酸を分析した結果 (54) を第1表に示す。 γ -カゼインは酸カゼインに比べ、疎水性のプロリンおよびロイシン含量が高く、それぞれ1.4倍および1.8倍であった。スレオニンおよびヒスチジンも酸カゼインより高く、逆にアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシンおよびリジン等は低かった。 γ -カゼイン中に疎水性アミノ酸の占める割合が高いことは、GROVES ら (42, 43), RIBADEAU DUMAS ら (109) および KAMINOGAWA and YAMAUCHI (64) の報告からも明らかである。

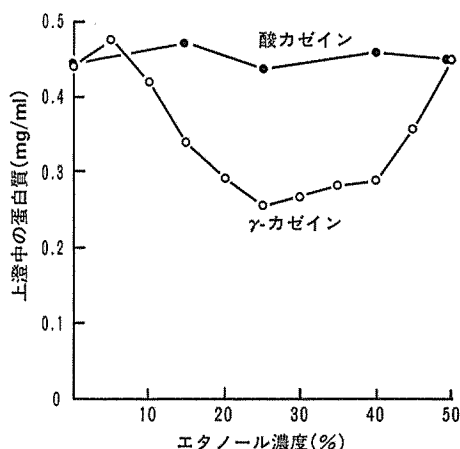
4) 白濁性

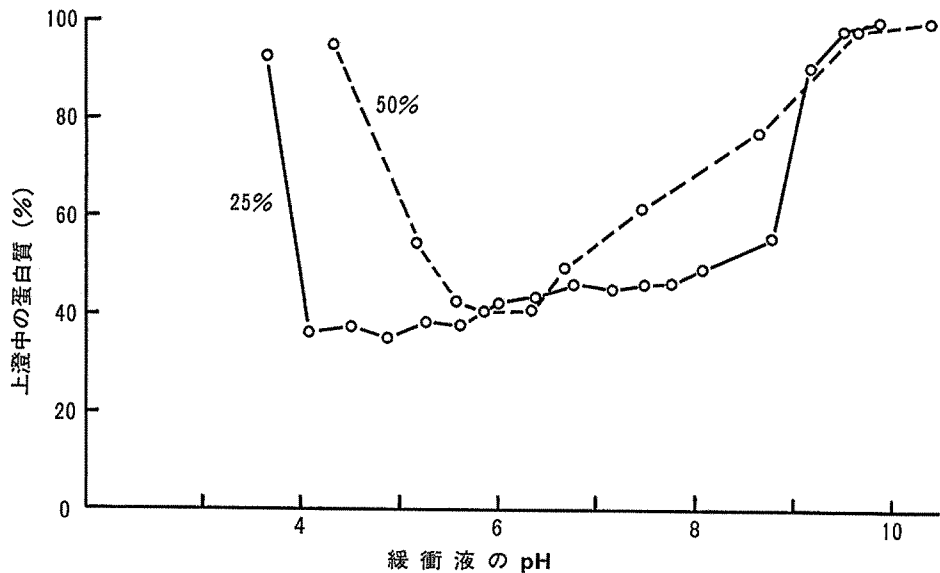
γ -カゼイン溶液 (0.02M 硼酸緩衝液, pH 7.0 中) に各種塩類等を加えた時の 30°C および 40°C における濁度 (54) を第2表に示す。いずれの試薬の添加によっても、若干の濁度の差はあったが、塩類等を加えない対照と同様に白濁した。また、濁度は NaCl によるイオン強度の違いによっても、あまり影響されなかった。このことは γ -カゼイン分子がイオン環境の変化に対し、比較的安定であることを示唆している。特に、 CaCl_2 の添加によっても濁度がそれほど影響されなかったことは、MIKAMI and MIURA (76) の報告と一致する。ホルムアルデヒド添加の場合を除き、温度の低下と共に濁度は減少し、10°C では透明になった。

γ -カゼイン溶液が、温度、pH および濃度に依存して凝集体を形成 (白濁) することは、

第2表 γ -カゼインの濁度におよぼす試
薬添加の影響

試薬	濃度 (M)	濁度*	
		30°C	40°C
対照	0	0.47	0.44
NaCl	0.01	0.49	0.44
	0.02	0.51	0.45
	0.05	0.51	0.48
	0.10	0.49	0.48
MgCl_2	0.02	0.38	0.46
クエン酸ナトリウム	0.02	0.37	0.55
CaCl_2	0.02	0.38	0.48
	0.10	0.40	0.43
2-メルカプトエタノール	0.04	0.49	0.45
ホルムアルデヒド	0.13	0.30	0.39

* 0.02M 硼酸緩衝液 (pH 7.0) 中、
蛋白質濃度、0.31 mg/ml.第7図 γ -カゼインおよび酸カゼインの溶
解性におよぼすエタノール濃度の
影響



第8図 25%および50%エタノール中における γ -カゼインの溶解性におよぼす pH の影響

TSF の項ですでに述べたが、さらに、塩類、特に CaCl_2 の有無には無関係であることと、本成分が上記のように疎水性アミノ酸残基に富むことから、蛋白質分子間の疎水相互作用が、白濁性に寄与していると思われた。また、白濁の形成が温度上昇の直後に急速に進行すること (54) も、このような非特異的相互作用に起因することを示唆している。

5) エタノール溶液中における溶解性

γ -カゼインおよび酸カゼイン溶液 (0.05M リン酸緩衝液中, pH 7.0) にエタノールを加えて24時間、 2°C に放置した後、遠心分離 ($1,000\times g$, 10分) により沈殿を除き、上澄の蛋白質を測定した (第7図)。エタノール濃度を50%まで変化させた時、酸カゼインの上澄中の蛋白質はあまり変わらず、可溶であった。これに対し、 γ -カゼインはエタノール20~40%で溶解性が低下したが、50%で再び可溶となった。エタノール25%および50%について、さらに pH を変えた時の γ -カゼインの溶解性を調べた (第8図)。25%エタノール中では pH 4.1~8.8 の広い範囲で溶解性が低く、 γ -カゼインの45~67%が沈殿した。50%エタノール中では pH 6 付近で溶解性が低かったが、それ以外の pH では、25%の時よりも溶解性が高かった。

HIPP ら (46) によれば、 γ -カゼインの溶解度は等電点付近で水および50%エタノール中で、主要カゼイン成分よりもかなり高いという。 2°C で調べた本実験では、酸カゼインはエタノール溶液中 (pH 7.0) で可溶であったが、等電点より離れていたことと、カゼイン成分間の相互作用によって安定化されたためと思われた。 γ -カゼインの溶解性は pH 7.0 で水および50%エタノール中で高く、上記の HIPP らの記述と同様な性質を認めた。

これに対し、その中間のエタノール濃度では溶解性が低かったが、このことは γ -カゼイン分子の安定性に親水基と疎水基が複雑に関与していることを示唆している。すなわち、アルコール溶液中においては、誘電率の低下により蛋白質分子間の異種イオンの吸引力が強まり、沈殿しやすくなる (119)。 γ -カゼインの場合、この現象はエタノール濃度25%前後で起こる (第7

図, 第 8 図) が, さらにエタノール濃度が高くなると, 疎水性アミノ酸の割合が高いために, 疎水基が溶媒との相互作用によって安定化されて沈殿し難くなると思われる。

3. 小 括

低温において, 酸カゼインを TEAE-セルロースカラムを用いて pH 8.0 の 0.027M AMP-クエン酸緩衝液で溶出し, 室温で白濁する TSF を分離した。この画分を用い, TEAE-セルロースに 40°C で結合, 2°C で溶出する画分 (同緩衝液中) として γ -カゼインを調製した。ディスク電気泳動によれば, この画分は γ_2 および $\gamma_{1,3}$ -カゼインより成り, また, 等電点電気泳動では, 5M 尿素中における見かけの等電点 (pI) 6.7 および 7.3 を示す二つの主要な成分が観察された。アミノ酸組成はプロリンおよびロイシン等の疎水性アミノ酸が多かった。

TSF および γ -カゼイン溶液の白濁性を濁度 (OD_{610}) の測定によって調べた結果, 温度, pH および濃度に影響され, また $CaCl_2$ 等の塩類の有無には関係しなかったことから, 主として, 疎水結合によって γ -カゼイン分子が会合する結果, 凝集体を形成 (白濁) すると思われた。 γ -カゼインの 2°C における溶解性は, 水および 50% エタノール中で高く, その中間のエタノール濃度で低下したことから, 本成分の安定性に分子中の親水基および疎水基が複雑に関与することが考えられた。

第 2 節 γ -カゼインの会合

γ -カゼインの温度依存性会合については, 濁度 (75, 76) およびゲルろ過 (31) による研究があり, 前節においても主として濁度の測定結果から考察した。一方, 超遠心や光散乱による分析では, このような白濁する溶液は不適當であり, アルカリまたは酸性側において透明になる条件下で実験しなければならなかった (58)。本節では, さらに会合に関して分子レベルでの知見を得るため, 温度, pH およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 添加の影響を濁度測定およびゲルろ過によって研究した。

1. 材料および方法

1) γ -カゼインの調製

酸カゼインから前節に従って γ -カゼインを調製した。これを脱イオン水, または実験に用いる緩衝液に対して透析して供試した。

2) 濁度

前節と同様に吸光度 (610 nm) で表わしたが, 分光光度計 (日立 124 形) に恒温セルホルダーを装着して 30°C で測定するか, または 10°C の恒温室中で日立 EPU-2 A 形分光光度計を用いて測定した。

3) SDS の添加

SDS (和光特級) を熱アルコール溶液から再結晶化して用いた (84)。この SDS (融点, 174°C) を 0.025M リン酸緩衝液 (pH 8.0 または 7.0) に 1 mM または 10 mM の濃度に溶解し, 蛋白質溶液に所定の濃度になるように加えた。

4) ゲルろ過

セファデックス G-150 (Pharmacia 社) を充填した外套管付カラム (Pharmacia, K 25/45,

ゲル容積：2.5×35 cm) を用いて上昇法により溶出し、溶出液を 4 ml ずつ分取した。溶出には 0.05 M 硼酸緩衝液 (pH 9.0, 9.8), 0.05M クエン酸緩衝液 (pH 3.2, 3.6) または 0.025M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を用いた。溶出された成分の分子量を ANDREWS (3) の方法により推定した。この場合、標準蛋白質としてアポフェリチン, γ -グロブリン, 牛血清アルブミン, チトクローム C およびバシトラシン (以上 Mann Research 社) を用いた。

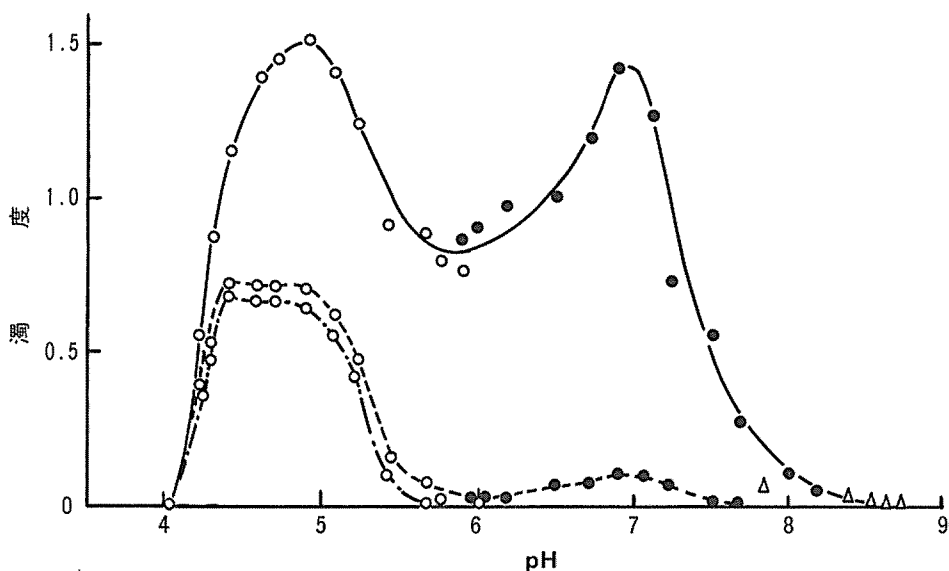
2. 結果

1) 濁度におよぼす pH の影響

γ -カゼイン溶液の濁度を種々の pH において 30°C および 10°C で測定した結果を第 9 図に示す。各種 pH の γ -カゼイン溶液を 3°C において作製してこれを 10°C で保持した時、肉眼では白濁は観察されなかった。さらに 30°C に加温した時、図のような pH 4.9 および 6.8 に極大を持つ pH-濁度曲線が得られた。pH 4 以下および pH 8.5 以上では濁度がほとんど 0 であった。これらの溶液を 10°C に 30 分冷却後、同温度で測定した場合、pH 6 以上では濁度が顕著に低下し、さらに 3°C で一夜放置後再び 10°C で測定した時、pH 6 以上の濁度は総て 0 であった。これに対し、酸性側の濁度のピークは、十分な冷却期間を経た後でも、かなりの濁度を示した。

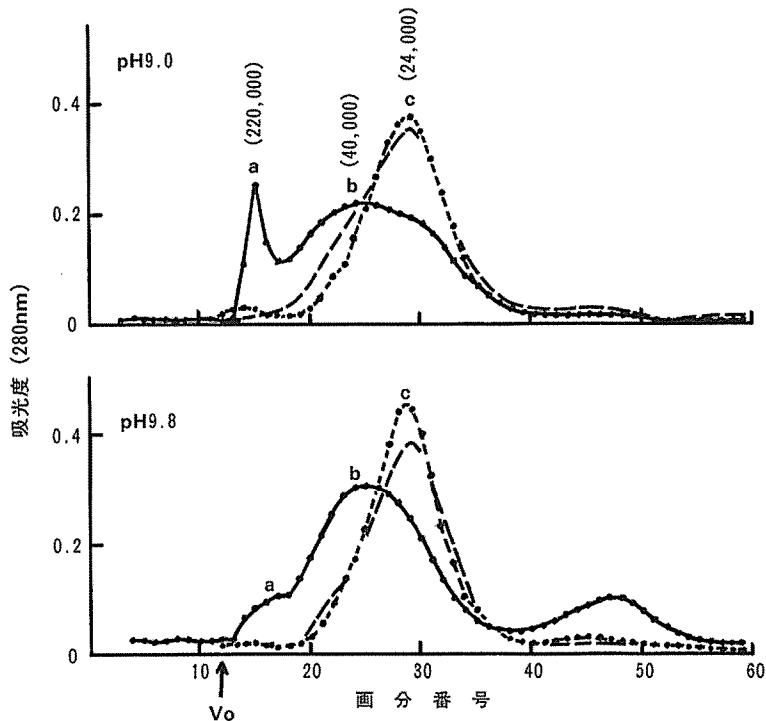
2) ゲルろ過

白濁した γ -カゼイン溶液のセファデックス G-150 カラムによるゲルろ過を試みたが、 γ -カゼインがカラムに保持されて溶出されなかった。そこで、アルカリ側で白濁が見られなくなる pH 9.0 とこれよりも高い pH 9.8 において、溶出温度を変えてゲルろ過を行った (第 10 図)。



第 9 図 γ -カゼインの濁度におよぼす pH の影響

緩衝液：0.025M クエン酸塩 (○), 0.025M リン酸塩 (●), 0.014-0.025M 硼酸塩 (△), 蛋白質濃度：0.29 mg/ml, 30°C (—) で濁度を測定後, 10°C で測定 (---), さらに 3°C で一夜保持後, 再び 10°C で測定した (— · —)。



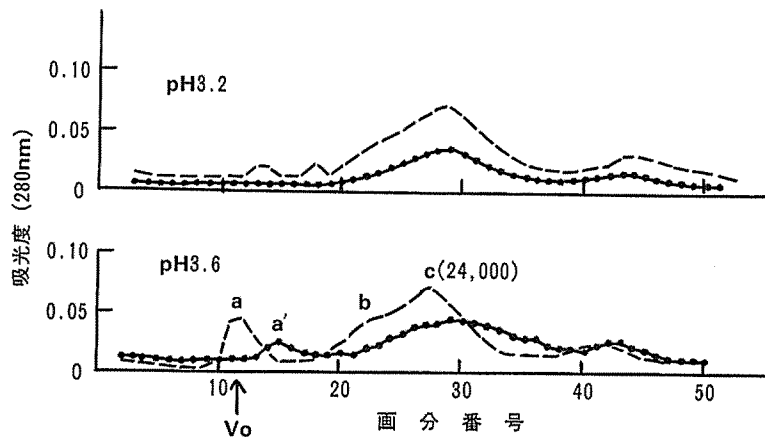
第10図 pH 9.0 および 9.8 における γ -カゼインのセファデックス G-150 におけるゲルろ過と溶出温度の影響
 温度: 30°C (—), 15°C (---), 2°C (----), Vo: Void volume.
 () 内は分子量.

2°C および 15°C ではほぼ単一のピーク (c) を示したが、pH 9.0 の場合、特に 15°C ではピークの中が高分子側にやや広がった。30°C では、ピーク c の減少とこれより前に溶出するピーク a、および b が出現し、特に、白濁が消失する pH に近い pH 9.0 においては、これらの中で最も分子量の大きいピーク a が明確に現われた。ピーク a、b および c の溶出位置は、それぞれ球状蛋白質の分子量、220,000、40,000 および 24,000 の溶出位置に相当した。

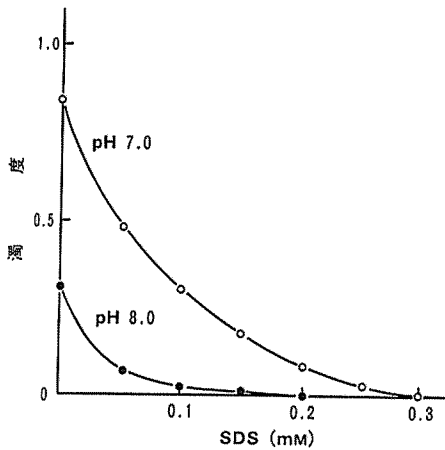
酸性側でも、白濁が見られなくなる pH 域でゲルろ過を行った。この場合、 γ -カゼインは透析中に沈殿するなど不安定であったので、あらかじめ試料の濃度を下げてゲルろ過を行った。このためあまり明確な溶出図は得られなかったが、低温でも分子の大きさが均一ではなく、pH 3.6 で会合体と思われるピーク a および b が観察された (第11図)。30°C では pH 3.6 および 3.2 における溶出図とも偏平なピークであったが、pH 3.6 において会合体と思われる小さなピーク (a') が認められた。

3) 会合におよぼす SDS の影響

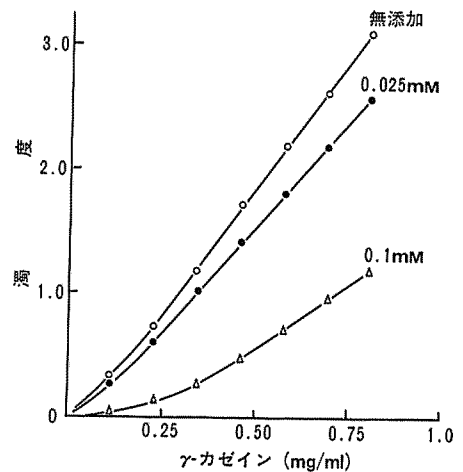
pH 7.0 および 8.0 において、 γ -カゼイン溶液 (0.025M リン酸緩衝液中) の濁度におよぼす SDS 添加の影響を調べた (第12図)。SDS の濃度が高くなると共に、濁度は減少し、pH 7.0 の時は 0.3 mM、pH 8.0 では 0.2 mM で 0 となった。また、低濃度の SDS 存在下で、 γ -カゼ



第11図 pH 3.2 および 3.6 における γ -カゼインのセファデックス G-150 によるゲルろ過と溶出温度の影響
温度: 30°C (—), 2°C (---). Vo: Void volume. () 内は分子量.



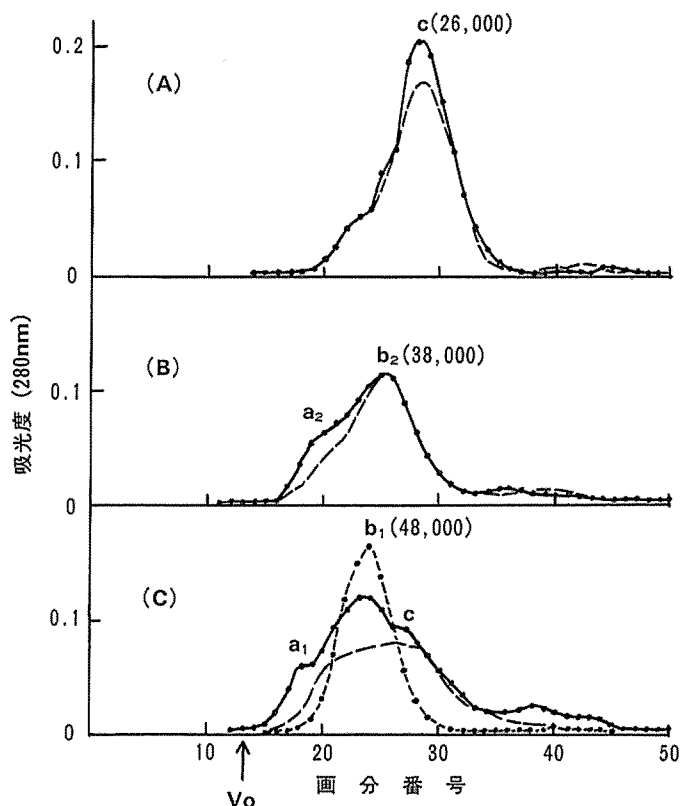
第12図 γ -カゼインの濁度におよぼす SDS の影響
緩衝液: 0.025M リン酸塩 (pH 7.0 および 8.0). 蛋白質濃度: 0.23mg/ml (○), 0.26 mg/ml (●).
温度: 30°C.



第13図 種々濃度における γ -カゼイン溶液の濁度におよぼす SDS 添加の影響
緩衝液: 0.025M リン酸塩, pH 7.0.
温度: 30°C.

インの濃度を変えて濁度を測定した (第13図)。SDS 0.1 mM の時、 γ -カゼインが低濃度の場合、SDS の濁度は抑制効果がやや大きかったが、0.025 mM の時にはほぼ一様に濁度を低下させた。

γ -カゼインに SDS を 0~5 mM 加えたものを試料とし、pH 8.0 の 0.025M リン酸緩衝液を用いて、2, 20, および 30°C でゲルろ過を行った (第14図)。なお、一部の実験では、1 mM



第14図 γ -カゼインのセファデックス G-150によるゲルろ過におよぼす温度と SDS 添加の影響
 温度および SDS 濃度：(A), 2°C. 無添加 (—), 0.2 mM (---).
 (B), 20°C. 0.2 mM (—), 0.02 mM (---). (C), 30°C. 5 mM (—), 0.2 mM (---), 試料に 2 mM 添加し, 1 mM SDS を含む緩衝液で溶出 (----). Vo: Void volume. () 内は分子量.

SDS を含む同緩衝液を溶出に用いた。2°C では、SDS 無添加試料と 0.2 mM 添加したものは同様な溶出パターンであり、解離型と思われるピーク c が観察された。このピークの前方の肩は少量の会合体の存在を示している。20°C では SDS の 0.02 mM (この場合の白濁を防ぐ最小濃度) および 0.2 mM の時ピーク c より前方のピーク b_2 として溶出し、0.2 mM では肩 (a_2) が見られた。30°C では、SDS 0.2 mM で巾の広いピークであったが、SDS 5 mM では、 a_1 , b_1 , および c の 3 つのピークが出現した。 γ -カゼインに SDS を 2 mM 添加し、1 mM SDS を含む緩衝液で溶出した時は、対称性のピーク b_1 が観察された。このピークの溶出位置は球状蛋白質の分子量 48,000 に相当した。

3. 考 察

γ -カゼイン溶液の pH と濁度の関係を調べた結果 (第 9 図), 濁度の極大が中性付近, およ

び酸性側 (pH 4.9) にあった。前者のピークを示す pH 域では、温度を下げると白濁が消失したのに対し、後者の pH 域では消失しなかった。MIKAMI (75) は γ -カゼインの各成分について、広い pH 域で沈殿することを認めた。筆者の前節に示した TSF を用いた実験でも、酸性側の pH 域で沈殿したが、本実験では、沈殿形成を防いで濁度測定を可能にするため、希薄な γ -カゼイン溶液を用いた。そのため、上記のような pH に依存する二つの濁度のピークが得られたが、この理由について以下に論じる。

アルカリ側で白濁が見られなくなる pH においては、低温で解離型であるが、温度に依存して会合体を形成することがゲルろ過によって示された。このことは超遠心と光散乱による実験 (58) とも一致する。EIGEL and RANDOLPH (30) は、pH 7.0 においてセファデックス G-100 によるゲルろ過で、 γ -カゼインの温度依存性会合を観察したが、彼らを用いた試料は γ_1 -カゼインが大部分であった。これと比較すると本実験の方が会合体の形成が明確であったが、その理由は γ_1 -カゼインよりもさらに疎水性が高い γ_2 および γ_3 -カゼインの方が会合し易い性質を持つためと思われる。このことは、これらの成分間で白濁性に差があること (75) とも関係するだろう。

酸性側の pH 4.2~5.5 における白濁は、この pH が γ -カゼインの等電点 (131) から離れているので、単なる溶解度の減少からは説明できない。EIGEL and RANDOLPH (30) は γ -カゼインの等電点 (46) よりも全カゼインの等電点において、 γ -カゼインの溶解度が低いことを示したが、その理由には言及しなかった。

極端に低い pH においては、 γ -カゼインは解離型である (58)。しかし、白濁が見られなくなる pH 付近では、低温においても完全には解離し難いことがゲルろ過によって示され (第11図)、酸性側では中性およびアルカリ側の会合と異なることが確認された。酸性側においては疎水相互作用以外にも、水素結合や静電的相互作用が関与したこと、および分子自身の構造が変化したことが考えられる。

濁度-pH 曲線 (第9図) から、二つの濁度のピークの境界がヒスチジンの pK 値に等しい pH 6 付近にあることは、 γ -カゼイン分子中のヒスチジン残基が何らかの役割を持つことを示唆しているが、この点についてさらに検討が必要であろう。蛋白質分子の会合または重合に上記の残基が関与する例として、フィブリン (125) およびインシュリン (82) が知られているが、 γ -カゼインの場合は疎水基も重要であることから、水素結合と疎水結合が協同している結合様式 (88) が想定される。

一般に、蛋白質は高濃度の SDS 溶液中で 1 g 当り 1.1~2.2 g の SDS と結合し、サブユニットから成るものは解離する (84)。本実験では、低濃度の SDS を添加することによって、 γ -カゼインの白濁を防ぐことができた (第12図)。pH 8.0 において SDS を添加した時、 γ -カゼインは低温では解離していたが、20°C 以上で会合体を形成することがゲルろ過によって認められた (第14図)。おそらく、 γ -カゼインに SDS が結合して、この陰イオンが付加されるため、たとえ数個の分子から成る会合体が形成されても、それ以上の大きさに集合する (白濁する) ことは妨げられるためであろう。この場合、 γ -カゼインの N-末端部に負に帯電したフォスホペプチドが連結した形のカゼイン分子、すなわち β -カゼインの温度依存性会合または重合 (126, 100, 98, 89, 91, 118) と類似するのかも知れない。

蛋白質中の疎水性アミノ酸残基は、通常、分子の内部に集まっているが、プロリン残基は折

り返し構造に見出される確立が高く、この部分は分子表面に露出している(44)。 γ -カゼイン中には、疎水性アミノ酸の中でも特にプロリン含量が高いため、分子の表面で疎水部分が水と接触する度合いが高いと思われる。このような疎水基は、低温では水の凝結晶構造(hydrogen-bonded ice-like clusters)によって安定化されているが、温度の上昇により不安定となって、互いに結合する(85,86,87)ことも考えられよう。なお、この点については議論の余地がある所かも知れない。等電点に近い中性付近にも濁度のピークがあった(第9図)が、これは γ -カゼイン分子の荷電が小さい時ほど、分子同士の疎水結合が容易に形成されるためと思われた。

4. 小 括

γ -カゼインの会合におよぼす温度、pH および SDS の影響を濁度およびゲルろ過によって調べた。 γ -カゼイン溶液の濁度は pH 4.9 および 6.8 付近に極大があり、前者の pH 域においては冷却した時に白濁が残ったが、後者では消失した。pH 9.0 および 9.8 においてセファデックス G-150 によるゲルろ過を行った結果、 γ -カゼインは低温で解離型であったが、15°C および、30°C では、複数の会合体の存在が観察され、温度が高い時の方が大きな会合体を形成した。pH 3.2 および 3.6 では、 γ -カゼインは低温でも完全には解離していないことがゲルろ過によって推定された。

pH 8.0 において低濃度の SDS (0.02~5 mM) を添加して γ -カゼインの白濁を防ぎ、これをゲルろ過によって調べた結果、低温では解離型であるが、温度が高いほど大きな会合体を形成することが認められた。

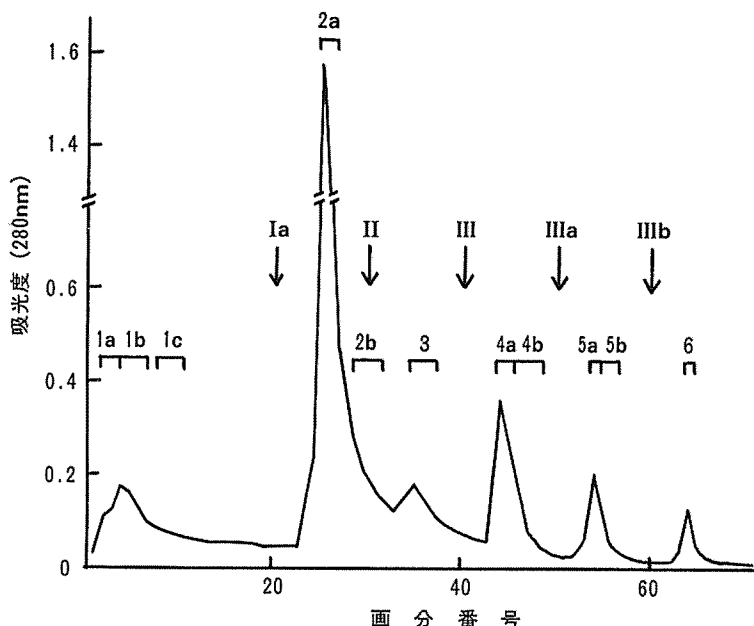
これらの結果より、 γ -カゼインは pH 6 以上では主として疎水相互作用により会合するが、pH 6 以下ではこの外に水素結合または静電的相互作用の関与と分子自身の構造変化によって結合様式が上記と異なることが考えられた。

第3節 γ -カゼインと他カゼイン成分の相互作用

主要カゼインである α_{s1} -, β - および κ -カゼインの自己会合、およびこれらの成分間の相互作用は、カゼインミセルの構造を考察する上で重要である(136,120,128)。SCHMIDT (116) は上記成分の外に α_{s2} -カゼインを加えたカゼインミセルのモデルを発表したが、どのモデルにおいても γ -カゼインに対してほとんど考慮が払われていない。 γ -カゼインが少量成分であることもあろうが、本成分の相互作用に関する知見が乏しいことも事実である。

γ -カゼインと他カゼイン成分間の相互作用に関して、濁度、および白濁成分の分析(79)カルシウム沈殿性に対する κ -カゼインの保護作用から(32)、または超遠心分析による報告がある(15)。しかし、 γ -カゼインは白濁しやすいので(本章第1節)、通常の方法では相互作用を調べるのは難しい。本節では、 γ -カゼインをセファロースに固定化して、アフィニティークロマトグラフィーによって他カゼイン成分との相互作用を調べた研究(49)の概略について述べる。

全カゼインを 1M NaCl を含む pH 7.0 の 0.05M リン酸緩衝液(I)に溶解し、 γ -カゼイン-セファロース 4B カラム (0.9×16 cm) に添加した後、I で溶出し、さらに、NaCl を含まない同緩衝液、Ia および II (pH 7.8)、0.05M トリス緩衝液、pH 8.6 (III)、2M および 4M 尿素を含む同緩衝液 (IIIa および IIIb) で溶出した。30°C における溶出図を第15図に示す。得



第15図 30°Cにおける全カゼインの γ -カゼイン-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィー

出発緩衝液: 1M NaCl を含む 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0). 溶出緩衝液: Ia, 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0), II, 同 (pH 7.6), III, 0.05M トリス-HCl (pH 8.6), IIIa, 同 (2M 尿素を含む), IIIb, 同 (4M 尿素を含む), 溶出液を 4.5 ml ずつ採取し, 1a~6 をディスク電気泳動の試料に用いた。

られた画分はディスク電気泳動にかけ、それらの成分を判別した。30°C では、全カゼインの大部分が緩衝液 I でカラムに結合したが、20°C では一部が結合せずに溶出し、さらに 2°C では、結合した部分は少なかった。

20°C および 30°C では緩衝液 Ia と II で溶出された画分に総てのカゼイン成分が含まれたが、III では α_s (minor α_s を含む)-カゼイン, IIIa では α_s - と κ -カゼイン, IIIb では κ -カゼインが溶出された。特に 30°C の場合は、全カゼイン中の γ -カゼインが III で溶出された。

β -および κ -カゼインを試料として、30°C でアフィニティークロマトグラフィーを行った時の溶出図は全カゼインを同クロマトグラフィーにかけた場合の両カゼインの溶出傾向と一致したが、 α_s -カゼインの場合は Ia でほとんど溶出した。全カゼインを試料とした時に α_s -カゼインが結合性の高い画分 (第15図, 4a, 4b, 5a) に溶出した理由として、 α_s - κ 複合体 (101) の形成によってカラムに保持されたことが考えられる。

これらの実験により、 γ -カゼインは他カゼイン成分と主として疎水的に結合し、特に κ -カゼインと強く結合することが推論された。

第3章 牛乳および乳製品における γ -カゼインの定量

近年、牛乳中のカゼイン組成に関する研究が DAVIES and LAW (20, 21) および BARRY and DONNELLY (9, 10) によって行われ、カゼインミセルの構造を考察する上でも、基本的な情報を与えている (116)。しかし、全カゼインの4%前後を占める γ -カゼインについては、乳房中または搾乳後における β -カゼインの酵素的分解物として取り扱われているにすぎない。前章で述べた諸性質に基づいて牛乳中における γ -カゼインの役割を明らかにするには、本成分の定量的研究が必要である。

一方、より現実的な問題として、牛乳のプロテオリシスを研究する上で、 β -カゼインの分解物としての γ -カゼインの定量化が急務となっている。また、酵素的蛋白分解が乳製品、特に滅菌乳の貯蔵性と密接に関係する (48) ので、この種の製品の検査にも定量方法が適用できることが望ましい。このような観点から、 γ -カゼインの定量方法を研究した (第1節)。さらに、乳製品について本成分の定量を行い、貯蔵との関係を考察した (第2節)。

第1節 牛乳中における γ -カゼインの定量

牛乳中の γ -カゼイン含量は DEAE-セルロース (20) またはヒドロキシルアパタイト (9) を用いたクロマトグラフィーによって定量できるが、測定に時間と労力を要するので、 γ -カゼインに限定した簡便な定量法が必要である。ポリアクリルアミドゲル電気泳動とデンストメトリの併用 (25, 7)、有機溶媒による抽出法 (102) がこれまでに試みられている。

筆者は酸カゼイン、および脱脂乳から塩類を含む50%エタノール中で γ -カゼインに富む画分を分離した (56, 57)。これをさらに発展させて、牛乳中の γ -カゼインの定量法を考案した (51)。本法の概略について以下に述べる。

脱脂乳 1.5 ml に 4M チオシアン酸ナトリウム 0.5 ml、エタノール 2 ml および 0.75M CaCl_2 (50%エタノール中) 1 ml を混和し、0~5°C に冷却後、遠心分離 (2,600×g, 10分, 0°C) によって γ -カゼインに富む上澄画分を得た。その後同容の4%トリクロル酢酸 (TCA) を加えて遠心分離 (500×g, 10分) を行い、沈殿部分をさらに2% TCA で2回洗った後、6M 尿素および 0.03M NaCl を含む pH 9.6 の 0.02M トリス-HCl 緩衝液 2 ml で溶解し、pH 8.0~8.6 の範囲に調整した。この溶液を DEAE-セルロースを含む小カラム (ベッド容積、約 0.5 ml) に注ぎ、pH 8.0 の緩衝液 (pH 以外は上記と同じ) で溶出して、混在する成分 (主としてホエー蛋白質) を除いた。溶出液を 5 ml に定容後、分離された γ -カゼインの濃度を 280 nm における吸光度より吸光係数6.83を用いて測定した。本法は簡便であり、加熱処理された脱脂乳にも適用できたことから、乳製品中の γ -カゼインの定量も可能と思われた。

第2節 乳製品中の γ -カゼインの定量、特に UHT 滅菌乳および脱脂粉乳について

UHT (超高温) 滅菌乳の貯蔵中におけるカゼイン成分の変化が、主として、ゲル電気泳動によって研究され、牛乳由来のプロテイナーゼ作用による γ -カゼイン成分の増加が示された (12, 17, 25, 123)。いずれの報告でも、酵素的カゼイン分解が UHT 滅菌乳の長期貯蔵で見られる増粘や凝固と関係すると述べている。この問題によりミルクプロテイナーゼについての関心が一層高まったが、牛乳中で β -カゼインを分解して γ -カゼインを生成する酵素の性質が血液中のプラスミンと同じである (65, 27, 104, 105) ことから、最近ではプラスミンと呼ばれて研

究されている。この酵素についてはさらに次章で述べる。

一方、間接加熱法で製造された UHT 乳は、上記のような直接加熱法による製品よりも残留ミルクプロテイナーゼによるカゼイン分解は少なく、前者で生ずる分解は主として耐熱性の低温細菌性プロテイナーゼの作用によると言う (121)。

我国では間接加熱法が採用されているので、貯蔵性に関して余り問題にされていないが、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（以下乳等省令と言う）中の冷蔵規定について、その要、不要に対する関心が高まっているので、この方面での検討が必要である。

脱脂粉乳に関しては、その貯蔵性が高いことから、乳製品を初め各種食品の素材として広く用いられているが、貯蔵中に不溶化し易いと言う問題がある。不溶化蛋白はカゼインが主体で、貯蔵が長いほど α_s -カゼインの割合が大きいと言う (83)。不溶化の原因として、カゼインと糖の相互作用を示唆した報告 (35) があるが、さらに研究が必要であろう。

本節では、市販の UHT 滅菌乳および脱脂粉乳中の γ -カゼインを定量し、併せて貯蔵によるカゼイン成分の変化について考察した。

1. 材料および方法

市販の UHT 滅菌乳（間接法による 140°C、2 秒処理、容量 250 ml）およびインスタントタイプ脱脂粉乳（内容量 250 g）を用いた。

1) 製品の貯蔵

UHT 滅菌乳または脱脂粉乳を 37°C（恒温器中）、10°C（恒温室中）または室温（実験室中）で貯蔵した。前者は購入日からの月数、後者は容器に記載してある製造月日からの年月を貯蔵期間とした。

2) γ -カゼインの定量

UHT 滅菌乳 1.5 ml、または、脱脂粉乳 150 mg を採り、後者の場合は脱イオン水 1.5 ml で溶解した後、前節に従って γ -カゼインを定量した。なお、脱脂粉乳については、乾物重量当りの mg 数として表わした。

3) 脱脂粉乳中の水分およびプラスミン様プロテイナーゼ活性の測定

水分含量は乾燥法 (68) によった。プラスミン様プロテイナーゼ活性は、上記の脱脂粉乳溶液にアジ化ナトリウムを 0.02% 添加し、37°C で 20 時間保持した時の γ -カゼインの増加量で表わした（第 4 章第 1 節）。

2. 結 果

UHT 滅菌乳を 10°C および 37°C で貯蔵した時の γ -カゼイン含量の推移を第 3 表に示す。貯蔵 1 か月の試料は両温度とも、貯蔵前の値よりもやや高かったが、貯蔵温度の違いによる γ -カゼイン含量の差は見られなかった。10°C で 3 か月貯蔵した時は貯蔵 1 か月より値が低く、貯蔵前とほぼ同じであった。30°C で 3 か月貯蔵した場合も貯蔵 1 か月の値よりやや低かった。

脱脂粉乳の室温における貯蔵期間と γ -カゼインおよび水分含量の関係を第 4 表に示す。貯蔵期間が長いほど、水分と γ -カゼインの値が高くなる傾向が見られたのに対し、デシケーター中で貯蔵した試料はこれらの値が低かった。さらに貯蔵条件の影響を調べるため室温および

第3表 市販 UHT 滅菌乳の γ -カゼイン含量におよぼす貯蔵の影響

試料	γ -カゼイン* ($\pm$ 標準誤差), mg/ml
貯蔵前	0.50 (± 0.019)
10°C貯蔵	
1か月	0.64 (± 0.007)
3か月	0.52 (± 0.025)
37°C貯蔵	
1か月	0.65 (± 0.021)
3か月	0.59 (± 0.025)

* 2 個の製品からそれぞれ 2 回測定した時の平均。

第4表 室温で貯蔵した脱脂粉乳の γ -カゼインおよび水分含量

試料番号	貯蔵期間	水分(%)	γ -カゼイン (mg/g 乾物量)
1*	0	4.7	4.5
	2か月	5.7	5.1
2	1年	5.6	5.7
3	2,5年	6.6	5.7
4	4年	7.5	5.9
5**	4年	4.0	4.5

* 同一包装より購入直後および 2 か月後に測定。

** デシケーター中で貯蔵。

第5表 貯蔵5年の脱脂粉乳中の γ -カゼインおよび水分含量と貯蔵条件

貯蔵条件	水分(%)	γ -カゼイン (mg/g 乾物量)
37°C	4.6	5.9
室温	6.7	7.5
37°C, デシケーター中	2.9	5.8
室温, デシケーター中	3.0	5.3

第6表 脱脂粉乳中のプラスミン様プロテイナーゼ活性におよぼす貯蔵の影響

貯蔵(年)	γ -カゼイン(mg/ml)*		活性
	保持前	保持後**	
0	0.41	0.48	0.07
	0.38	0.41	0.03
1 1/3	0.59	0.99	0.40
	0.56	1.13	0.57
2	0.54	3.10	2.56
	0.50	1.56	1.06

* 脱脂粉乳溶液 (1:10) 中の含量。

** 37°C, 20時間。

37°C で 5 年貯蔵の試料について、デシケーター中で貯蔵されたものと比較した (第5表)。37°C では水分が購入直後の試料と同程度であったことから、吸湿がなかったと思われ、この時の γ -カゼイン含量はデシケーター貯蔵の場合と大きな差はなかった。これに対し、室温ではデシケーター中で貯蔵した場合と比較して、水分および γ -カゼイン含量が高かった。

このような脱脂粉乳中の γ -カゼインの増加傾向が酵素作用に起因することが考えられたので、貯蔵 (室温) 期間が異なる脱脂粉乳を脱イオン水に溶解後、プラスミン様プロテイナーゼ活性を調べた (第6表)。購入直後の試料では活性がほとんどなかったが、貯蔵によって活性が出現し、特に貯蔵 2 年の試料で顕著であった。

3. 考 察

牛乳中のプラスミン様プロテイナーゼによって、 β -カゼインが分解された結果、 γ -カゼインが増加することが知られている (141, 64)。この酵素は UHT 滅菌処理 (直接法) によっても完全には失活されないので、UHT 乳の貯蔵中に起こる増粘や凝固との関連が指摘された (12, 17, 25, 123)。しかし、間接法による UHT 滅菌乳を初め、他の乳製品中での作用については余り知られていない。本実験では、この UHT 乳と脱脂粉乳中の γ -カゼインを測定した

が、その推移を調べることによって乳製品の貯蔵中における上記酵素の作用を研究することが可能であろう。

間接法で製造された市販の UHT 滅菌乳を 37°C および 10°C で貯蔵して γ -カゼイン含量を測定した結果、貯蔵によってもそれほど顕著には増加しなかった(第3表)。このことは同様な UHT 乳を調べた SNOEREN and BOTH (121) のゲル電気泳動による観察と一致する。また、貯蔵温度の影響も明確ではなかったことから、プラスミン様プロテイナーゼは間接法による滅菌処理でほとんど失格し、貯蔵中に作用しないと思われた。少なくとも上記酵素の作用から言えば、10°C 以下の冷蔵(68)を要しなくても品質の保持は可能であろう。しかし、これ以外にも、耐熱性の細菌性プロテイナーゼによる作用(121)が予想されるので、衛生面での乳質の向上が前提となることは言うまでもない。

粉乳製品の場合、貯蔵中に起こる蛋白質の変化として、カゼイン成分に対する糖の結合が指摘されたが(35)、その他の変化については余り知られていない。脱脂粉乳の貯蔵期間が長いほど、室温で水分と γ -カゼイン含量が多くなる傾向が見られたが(第4表)、吸湿を防いで貯蔵した試料では γ -カゼイン含量は高くはなかった(第4, 5表)。さらに、脱脂粉乳中のプラスミン様プロテイナーゼ活性は貯蔵(室温)と共に顕著になった。これらのことから、脱脂粉乳の貯蔵中に吸湿があれば、これに含まれるプロテイナーゼによる蛋白分解が起こり得ることが示唆された。すなわち、第4表のデータから水分と γ -カゼイン量の相関を計算してみると $p < 0.05$ で有意な r の値 0.897 が得られた。この原因として、貯蔵中に基質であるカゼインが変化して分解を受け易くなったこと、阻害物質が変化して効力を失ったこと、および製造によって失活したプラスミン様プロテイナーゼが再び活性を取り戻すことなどが考えられ、今後さらに研究が必要である。

本実験では、UHT 滅菌乳と脱脂粉乳を例にして、前節の方法を用いて乳製品中の γ -カゼイン含量を測定できることが示された。これにより、乳製品中のプラスミン様プロテイナーゼによる蛋白分解について、特に貯蔵中の品質の変化と関連させて研究することが可能と思われた。

4. 小 括

市販の UHT 滅菌乳(間接加熱法)およびインスタントタイプ脱脂粉乳中の γ -カゼイン量を測定し、あわせて貯蔵中におけるプラスミン様プロテイナーゼの作用について考察した。

UHT 滅菌乳を 10°C および 37°C で1か月または3か月貯蔵した時、 γ -カゼイン含量はいずれの温度においてもそれほど顕著には変化しなかった。このことから、上記酵素が間接法による加熱処理でほとんど失活し、貯蔵中にこの酵素の作用をあまり受けないと思われた。

脱脂粉乳の場合は、貯蔵期間が長いほど室温で γ -カゼイン含量が高くなる傾向があったが、吸湿を防いで貯蔵した時にはこの傾向が見られなかった。また、脱脂粉乳中のプラスミン様プロテイナーゼ活性は、購入直後の試料ではほとんどなかったが、1～2年貯蔵された試料では活性が認められたことから、脱脂粉乳の貯蔵中に酵素的蛋白分解が起こり得ることが示唆された。

第4章 牛乳中における γ -カゼインの消長、並びに挙動

γ -カゼイン成分 (γ_1 -, γ_2 - および γ_3 -) は β -カゼインの酵素的分解物であり (141, 64), その C-末端側のアミノ酸配列と同一の一次構造を持つこと (38, 42, 43) が知られている。最近, 牛乳中に分解された β -カゼインの N-末端側のペプチドが存在することが分かったので (4, 5), 分解物としての γ -カゼインの性格が明確になった。しかし, 牛乳中に γ -カゼインが存在する意義やその役割に関する知見は乏しく, この問題はカゼイン研究の一環として無視できないと思われる。

一方, 当面の課題として, 牛乳中に含まれる γ -カゼインの消長を調べることは, ミルクプロテイナーゼによる蛋白分解作用を研究する上で有効な手段となり得る。このような観点から, 本章では γ -カゼインの定量に基づいて, 牛乳中のプラスミン作用を調べると共に (第1節), 特に冷蔵中の酵素作用について研究した (第2節)。さらに第3節では, 牛乳中における γ -カゼインの挙動を第2章で述べた性質と関連付けながら, その意義・役割について考察した。なお, 本章では前章でプラスミン様プロテイナーゼと表現したものをすべてプラスミンと記すこととする。

第1節 牛乳中のプラスミン作用: γ -カゼインの定量に基づく分析

牛乳中の主要な蛋白分解酵素はアルカリ性ミルクプロテイナーゼまたは native milk proteinase と呼ばれ, 数多くの報告があるが, これらに関して HUMBERT and ALAIS (48), FOX (33), 上野川 (63) および VISSER (134) の総説がある。この酵素の働きや分子的性質が血液中のプラスミンと同じであることから (65, 27, 104, 105), 最近ではプラスミン (またはミルクプラスミン) とも呼ばれている (110, 23, 112, 67, 7)。

プロテイナーゼ活性の測定法は研究者によって異なり, 遊離チロシンの測定, アゾカゼインやニトロアニン誘導体等の発色性基質の利用, および電気泳動法等が用いられた (48)。最近ではプラスミンに対して特異的な合成基質が用いられているが (111, 112, 67, 110), 脱脂乳中の蛋白質の変化を直接ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した研究もある (23, 7)。

プラスミンは β -カゼインを分解して, γ -カゼイン (65, 27), およびプロテオースペプトン成分 5 と 8F (4, 5, 29) を生成するが, 同様に α_{s2} -カゼインも分解する (122)。 α_{s1} -カゼインの分解は遅く (65, 93), κ -カゼインは分解されない (28)。このような酵素の特異性を利用し, 上記の分解産物をゲル電気泳動とデンシトメトリーの併用によって定量することも行われている (25, 7)。

分離されたミルクプロテイナーゼの至適温度は 37°C であるが (66, 26, 107), 牛乳中では低温貯蔵中に容易に酵素作用を受けるという報告もある (106)。また, 至適 pH は 8 付近とされているが (65, 107), 牛乳中でのカゼイン分解の場合も同様であるという確証はない。牛乳中でプラスミンは大部分が前駆体であるプラスミノゲンとして存在し (111, 112, 23, 7, 67), さらにアクチベーターおよびインヒビターが関与するので (67), 実際に牛乳中で起こる蛋白分解の機構は複雑であろう。

ミルクプロテイナーゼ (プラスミン) は比較的高い耐熱性を持ち, 殺菌処理によっても完全に失格しない (45, 26, 19)。NOOMEN (93) は牛乳を 63°C で 30 分, または 72°C で 15 秒間の殺菌を行うことにより, 蛋白分解活性が増加すると報告し, DE RHAM and ANDREWS (23)

および ANDREWS (7) も 72°C, 18秒間の処理で同様なことを確認した。この殺菌条件におけるプロテイナーゼ活性の増加はプラスミンの作用機構を解明するためばかりでなく、乳製品製造に直接係りを持つので重要である。

筆者は、牛乳中のプラスミンによる蛋白分解を、 γ -カゼインの定量(第3章第1節)に基づき、特に温度、pH および加熱処理の影響について調べた(51)。以下に得られた結果の概略を述べる。

脱脂乳(防腐剤を含む)を一定温度で保持した時の γ -カゼイン含量の増加から、牛乳中のプラスミン作用を研究した。温度を変えて48時間まで保持した時、増加量は37°Cで高く、25°C, 11°Cと温度の低下とともに低くなり、3°Cではほとんど増加しなかった。また、インキュベーションの初期には γ -カゼイン含量の変化がなく、この期間は温度が低くなるほど長かったことから、プラスミノーゲンの活性化が酵素作用の発現に重要と思われた。

脱脂乳のプラスミン活性(37°C, 20時間保持後の γ -カゼイン増加量)はpH 8付近で最大であったが、これ以外にpH 7付近に活性のピークがあった。酸性側では活性が減少したが、pH 5.5でも最大活性の20%前後の活性を示した。

脱脂乳を70°C以上で10分間加熱した時、プラスミン活性は低下し、90°Cではほとんど消失したが、比較的耐熱性が高かった。一方、55~63°C, 10分間の加熱では活性の増加(10~80%)が観察され、60~72°C, 15秒間で約20%の増加が見られた。低温殺菌法(63°C, 30分)では活性の変化はなく、HTST法では75°C(15秒)の場合は活性が半減したのに対し、72°Cでは活性の低下はなかった。このことから乳製品(特にチーズ)の製造において、殺菌温度の違いが製品の品質に影響をおよぼすことが考えられた。

牛乳中のプラスミンによる蛋白分解の作用機構を解明する上でも、本研究で示した γ -カゼインの定量に基づく分析が有効と思われた。

第2節 低温貯蔵乳における γ -カゼインの消長、並びにプロテオリシス

低温管理の普及に伴い、隔日集乳や長距離輸送により牛乳が低温で長時間保持される傾向にある。このため、低温細菌の増殖による乳質への影響が指摘された(144)。低温細菌性プロテイナーゼの多くは耐熱性が高く、加工後の乳製品の品質にも影響するので(70)、低温貯蔵乳の蛋白分解をこの方面から調べた報告が多い(61, 1, 78, 16, 62)。

一方、REIMERDES and HERLITZ (106)は牛乳の低温貯蔵中に γ -カゼインが増加することを観察し、牛乳由来のプロテイナーゼ(プラスミン)がこの時のカゼイン分解に関与することを示した。これに対し、本研究における前節の結果では低温保持(3°C, 48時間)による γ -カゼインの増加はほとんど認められなかった。

本節では、さらに貯蔵期間を延長して調べるとともに、低温細菌性プロテイナーゼの作用にも留意しながら、低温貯蔵乳のプロテオリシスについて研究した。牛乳中のプラスミンは血液中のそれと同様にセリン酵素であり、大豆トリプシンインヒビター(STI)によって阻害されること(65)から、本実験では阻害剤としてSTIを用いた。一方、血液中のプラスミンは前駆体であるプラスミノーゲンから、尿から得られるウロキナーゼのような活性化因子の作用によって生成されることが知られている。そこで一部の実験では、ウロキナーゼを脱脂乳に添加した時の蛋白分解について調べた。なお、本研究の一部についてはすでに報告した(50)。

1. 材料および方法

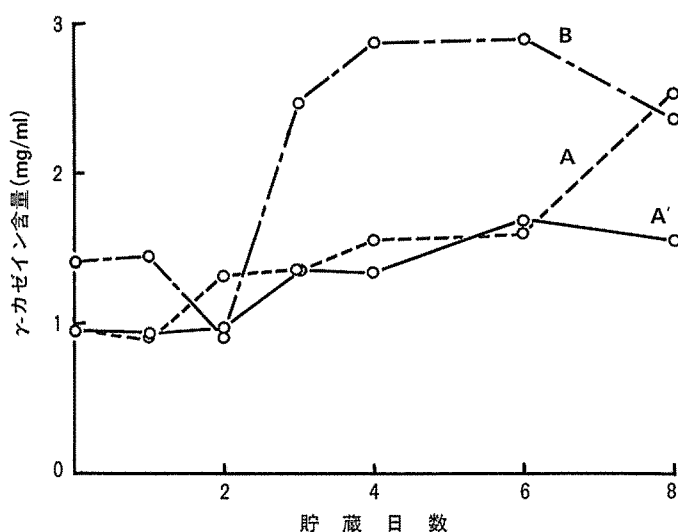
弘前大学農学部付属農場において夕乳（混合乳）を採取し、一夜 2°C で保存した。この牛乳から遠心分離（ $500\times g$, 10分）により脱脂乳を調製して実験に供した。また、一部の実験で、 5°C で8日間貯蔵した脱脂乳を新鮮な脱脂乳に1/40容混合して用いた。添加物としてアジ化ナトリウム（0.02%）、Sigma 社ウロキナーゼ（ $1\mu\text{g/ml}$ 脱脂乳）、同社プラスミン（ $20\mu\text{g/ml}$ 脱脂乳）およびSTI（ $100\mu\text{g/ml}$ 脱脂乳）を用いた。ウロキナーゼおよびプラスミンは使用直前に脱イオン水1ml当りそれぞれ $50\mu\text{g}$ および 1mg 、STIは0.05M トリス-HCl 緩衝液（pH 7.0）1ml当り 5mg を溶解し、脱脂乳1ml当りにそれぞれ $20\mu\text{l}$ を加えた。これらの試料を 5°C で1～8日貯蔵し、STI（ $100\mu\text{g/ml}$ 脱脂乳）を加えた後、第3章第1節に従って γ -カゼインを定量した。

低温細菌数は標準寒天平板を用い、 $6^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ で7日間培養後のコロニー数から求めた(2)。

2. 結果

1) 脱脂乳の低温貯蔵と γ -カゼインの消長

脱脂乳 A, A'（防腐剤添加）および B（A に 5°C 8日間貯蔵乳を1/40容添加）を 5°C で貯蔵した時の γ -カゼイン含量の変化(50)を第16図に、また、低温細菌数の推移を第7表に示す。脱脂乳Aは貯蔵2日後に γ -カゼイン含量の増加が見られ、その後も増加傾向を示した。貯蔵8日間では、最初の値の2.6倍であったが、この時の低温細菌数の増加も顕著であった。脱脂乳Aに防腐剤（ NaN_3 ）を添加したA'では、貯蔵2日後まで γ -カゼイン含量は変化しなかったが、その後増加し、6日後で初めの値の1.75倍になった。

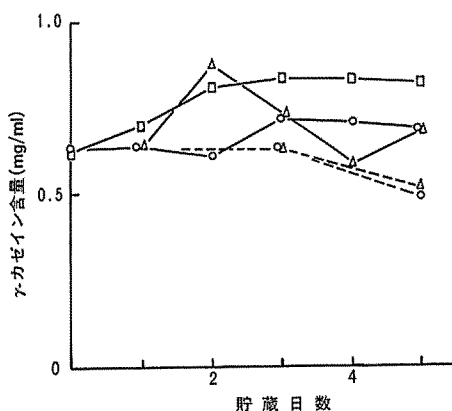


第16図 低温貯蔵（ 5°C ）中における脱脂乳の γ -カゼイン含量の推移
A, 無添加, A', アジ化ナトリウム添加, B, 5°C で8日貯蔵された脱脂乳を1/40容添加。文献50の図の一部（貯蔵8日）に誤りがあった。訂正して再掲する。

第7表 5℃で貯蔵された脱脂乳(第16図)中の低温細菌数

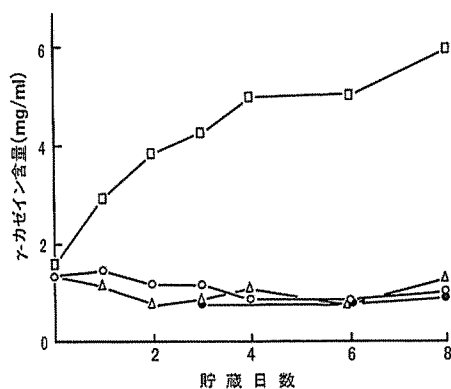
脱脂乳*	貯 蔵 日 数			
	0	3	6	8
A	<300	<300	3.1×10^6	1.4×10^7
A'	—	—	<300	—
B	1.3×10^6	1.3×10^7	4.5×10^7	1.3×10^8

* A, 無添加; A', アジ化ナトリウム添加; B, 貯蔵脱脂乳(5℃, 8日) 1/40容添加.



第17図 5℃貯蔵中における脱脂乳の γ -カゼインにおよぼすウロキナーゼおよび大豆トリプシンインヒビター (STI) 添加の影響

実線: 無添加 (○), ウロキナーゼ, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加 (△), ウロキナーゼ添加後37℃で30分活性化処理 (□). 点線: STI, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加 (○), STI およびウロキナーゼを添加 (△). 防腐剤: 0.02% NaN_3 .



第18図 5℃貯蔵中における脱脂乳の γ -カゼイン含量におよぼすプラスミン添加の影響

NaN_3 を含む脱脂乳 (○) にプラスミン, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加 (□), STI, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加 (●). NaN_3 を含まない脱脂乳 (△) も図に示した.

貯蔵乳を加えて細菌数を高めた脱脂乳 B の場合, γ -カゼイン含量の変化は上記の結果と異なった。すなわち, 貯蔵 3 日後に急速な増加があり, 4~6 日で最高値 2.9 mg/ml を示した。貯蔵 8 日後の減少は γ -カゼインがさらに分解を受けたためと思われる。

2) ウロキナーゼおよび STI 添加の影響

脱脂乳(防腐剤を含む)にプラスミノゲンアクチベーターとしてウロキナーゼ, およびプラスミンに対する阻害剤として STI を添加して 5℃ で貯蔵し, γ -カゼイン含量の変化を調べた(第17図)。無添加の場合, 2 日までほぼ一定で 3 日後に増加したことは第16図中の防腐剤を含む脱脂乳 A' と同様であった。ウロキナーゼ添加試料は, 貯蔵 2 日で増加後減少に転じ, 5 日後で再び増加した。これに対して, ウロキナーゼを添加して脱脂乳中のプラスミノゲンに対する活性化処理(37℃, 30分保持)を行った試料は, 貯蔵 1 日から増加し始め, その後も漸増した。STI 添加脱脂乳, および, STI とウロキナーゼを同時に加えた試料では, γ -カゼインの増加は見られず, 貯蔵 5 日後で若干の減少を示した。

3) プラスミン添加の影響

防腐剤を含む脱脂乳, およびこれにプラスミンまたは STI を添加した試料を 5°C に貯蔵した時の γ -カゼイン含量の変化を第18図に示す。また, 防腐剤を含まない脱脂乳の結果も同図に示した。プラスミン添加試料は貯蔵の初期から γ -カゼイン含量が著しく増加した。無添加の場合は, 防腐剤の有無にかかわらず, やや減少傾向を示し, この場合は第16図および第17図中の同様な試料の結果とは異なった。STI 添加脱脂乳は無添加試料と同じか, これより若干低い値を示した。

3. 考 察

牛乳の低温貯蔵中にミルクプロテイナーゼ (プラスミン) の作用により, γ -カゼインが生成されること (106) が本実験で確認された。しかし, γ -カゼイン含量は貯蔵の初期にはあまり変化がなく, 2~3 日後に増加した点で上記研究者の結果と異なった。一方, 牛乳によっては貯蔵中にやや減少する場合もあり (第18図), 牛乳のプロテオリシスが必ずしも一様でないことにも留意すべきである。また, 本実験ではプラスミンに対する阻害剤として STI を用いたが, STI を含む脱脂乳の低温貯蔵中に γ -カゼインの減少が見られたことから, プラスミン (またはトリプシン様プロテイナーゼ) 以外の蛋白分解酵素の存在も考えなければならない。

不活性型のプラスミノーゲンを活性型のプラスミンに変換する因子 (プラスミノーゲンアクチベーター) の一つとして, 人尿から精製されるウロキナーゼが知られている。このウロキナーゼによるヒトプラスミノーゲンの活性化機構はプラスミノーゲン分子の酵素的な切断を伴い, 分子中の Arg-Val の部分が切断されるという (127)。脱脂乳にプラスミンを添加した時, およびウロキナーゼを加えてから脱脂乳中のプラスミノーゲンに対する活性化処理 (37°C で 30分間保持) を行った時には, 貯蔵 (5°C) の初期から γ -カゼインが増加した。このことは活性型プラスミンの存在下では, 低温でも蛋白分解が進行することを示している。

これに対し, ウロキナーゼを加えて活性化処理を行わなかった時, および無添加試料では貯蔵の初期には増加が見られなかった。おそらく, 新鮮な牛乳中の活性型のプラスミンの量は無視できる程度である (23) ためであろう。しかし, このような場合でも, 貯蔵 2~3 日後には γ -カゼインの増加が観察された。このことは低温貯蔵中に不活性型のプラスミノーゲンが牛乳中のアクチベーター (67) によって徐々にプラスミンに変換されたためと思われる。アクチベーター (ウロキナーゼ) 添加試料が 2 日後に γ -カゼインの顕著な増加を示した (第17図) ことから支持できよう。しかし, この試料におけるその後の減少の理由は不明である。NaN₃ を加えてある試料のため, 低温細菌が原因でないことだけは確かであろう。

脱脂乳に防腐剤を添加しなかった時は, 添加した時よりも低温貯蔵中の γ -カゼイン含量が高くなる傾向があり, 特に貯蔵 8 日後では顕著で, この時低温細菌は 1.4×10^7 /ml に増殖していた (第16図, 第7表)。また人為的に低温細菌数を高めた脱脂乳 (B) では, 貯蔵 3 日以降で γ -カゼイン含量が著しく高くなった。

牛乳中の低温細菌性プロテイナーゼによって β -カゼインが分解されるという報告 (18) があるが, その分解産物については不明である。KALOGRIDOU-VASSILIADOU and LAW (62) は *Ps. fluorescens* を加えた牛乳の低温貯蔵を行い, ゲル電気泳動により, 主要な分解産物としてバラ κ -カゼインの生成を観察したが, この外に γ -カゼインと思われる成分がやや増加するこ

とを認めた。柳谷ら (143) はカゼイン溶液に低温細菌を接種して 5°C で培養した時、7 日目以降に γ -カゼイン様成分の増加を認めたが、同様なカゼイン分解が牛乳中でも起こるのかについては余り明らかでない。

本実験での脱脂乳中における低温細菌の増殖が γ -カゼイン含量を著しく増加させた原因として、低温細菌性プロテイナーゼによる直接的なカゼイン分解作用を考えなければならないのは当然であろう。しかし他方では、*Streptococcus* の培養濾液がヒトプラスミノーゲンを活性化する (129) という事実がある。この種のアクチベーター (ストレプトキナーゼと呼ばれる) が低温細菌の増殖中に産出されて、牛乳中のプラスミノーゲンを活性化する可能性も考えられる。今後の課題として残されよう。

4. 小 括

脱脂乳を 5°C で 8 日間貯蔵し、その間の γ -カゼイン含量および低温細菌数を調べた。また、プラスミン、および、プラスミノーゲンアクチベーターとしてウロキナーゼ、または、プラスミンに対する阻害剤として大豆トリプシンインヒビター (STI) を添加した脱脂乳中の γ -カゼイン含量の推移から、低温貯蔵中における牛乳のプロテオリシスについて研究した。

脱脂乳中の γ -カゼイン含量は貯蔵 1～2 日後まで変化しなかったが、その後増加し、8 日後には 2.6 倍 (低温細菌数: $1.4 \times 10^7/\text{ml}$) になったのに対し、防腐剤を添加した脱脂乳の最高量は初めの値の 1.75 倍 (6 日後) であった。低温細菌数を高めて貯蔵した脱脂乳の場合は貯蔵 3 日後に γ -カゼインが著しく増加した。

脱脂乳にウロキナーゼを添加した後、活性化処理 (37°C, 30 分) を行った場合は貯蔵 1 日後から γ -カゼインが増加したのに対し、同処理を省いた場合は 2 日後に増加した。プラスミンを添加した時は貯蔵の初期から γ -カゼインの増加が明らかであった。

これらの結果から、牛乳の低温貯蔵中に不活性型のプラスミノーゲンが活性型のプラスミンに変換され、この酵素作用によってカゼイン分解が行われると推定された。

第 3 節 牛乳中における γ -カゼインの意義・役割に関する一考察

本節では、脱脂乳中の γ -カゼイン含量とプラスミン活性の関係、および γ -カゼインの分布におよぼす温度の影響を調べることにより、牛乳中における γ -カゼインの意義とその役割について考察した。

1. 材料および方法

弘前大学農学部付属農場において、個乳および混合乳を採取し、一夜 2°C で保存した後、遠心分離 (500×g, 10 分) により脱脂乳を調製して用いた。

1) 添加物

防腐剤として NaN_3 (0.02%), プラスミンに対する阻害剤として大豆トリプシンインヒビター (STI, Sigma 社, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脱脂乳), およびプラスミン (同社, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脱脂乳) を用いた。

2) カゼインミセルおよびセラム画分

脱脂乳 (0.02% NaN_3 を含む) に STI またはプラスミンを添加し、無添加試料とともに

第8表 個乳および混合乳から得た脱脂乳中の γ -カゼイン含量とプラスミン活性

脱脂乳 (n)	γ -カゼイン (mg/ml)		プラスミン活性		r
	最小—最大	平均(S.D.)	最小—最大	平均(S.D.)	
個乳 (12)	0.29—1.95	0.93 (0.45)	0.09—2.61	1.26 (0.63)	0.4254 (n=10)
混合乳 (11)	0.39—0.91	0.62 (0.18)	0.87—1.75	1.24 (0.25)	-0.0725 (n=11)
全体 (23)	0.29—1.95	0.78 (0.38)	0.09—2.61	1.25 (0.53)	0.2420 (n=21)

n, 試料の数 S.D., 標準偏差 r, 相関係数

30°C で3時間, または5°C で1日および4日間保持した。これらの試料 (STI 添加試料を除く) に STI (200 μ g/ml) を加えた後, 同温度で 77,000 $\times$ g, 1時間超遠心分離を行い, 沈殿をカゼインミセル, 上澄をセーラム画分とした。

3) γ -カゼインの定量およびプラスミン活性

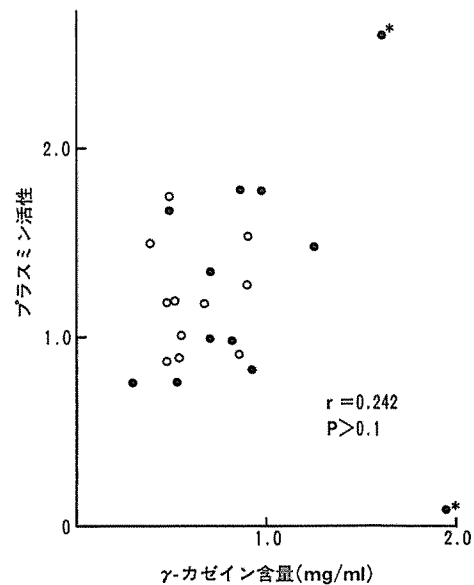
脱脂乳およびセーラム画分中の γ -カゼインを第3章第1節に従って定量した。脱脂乳とセーラムの値の差をカゼインミセルの値とした。プラスミン活性の測定法は第4章第1節に従った。

4) ディスク電気泳動

ディスク電気泳動は第2章第1節に従ったが, クーマシーブリリアントブルーGによる染色法 (13) を用いた。カゼインミセルはもとの脱脂乳の容量 (プラスミン添加試料, 5°C 4日貯蔵の場合はもとの容量の1/10) の脱イオン水に分散させた後, 4M 尿素を含む 0.062M トリス-HCl 緩衝液 (pH 6.7) で40倍, セーラムは5倍に希釈してそれぞれ 30 μ l を泳動に用いた。

2. 結果および考察

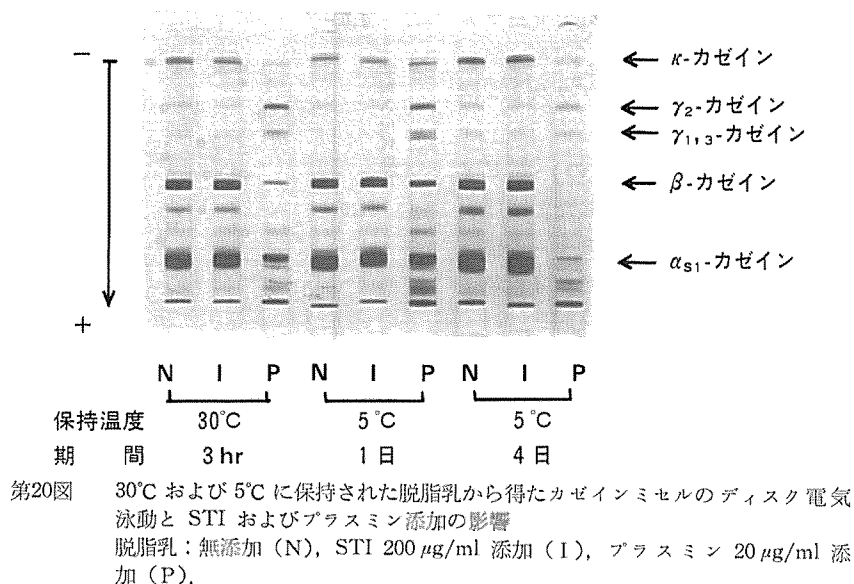
個乳および混合乳を用いた時の脱脂乳中の γ -カゼイン含量とプラスミン活性を調べた結果を第8表および第19図に示す。全体の γ -カゼイン含量の範囲は0.29~1.95mg/mlであったが, 特に個乳で変動が大きい点で DAVIES and LAW (21) および BARRY and DONNELLY (9) の結果と同様であった。また, プロテイナーゼ活性は個乳間で異なること (142) が本実験のプラスミン活性からも認められた。 γ -カゼイン含量またはプラスミン活性が異常に高かった2点を除いて, 両者の相関係数を求めた結果 (第8表), 個乳, 混合乳および全体のいずれの場合も有意な相関があるとは言えなかった。BARRY and DONNELLY (9) は γ -カゼイン含量の



第19図 脱脂乳中の γ -カゼイン含量とプラスミン活性
混合乳 (○), 個乳 (●), 2試料 (*) を r の計算から除外した。

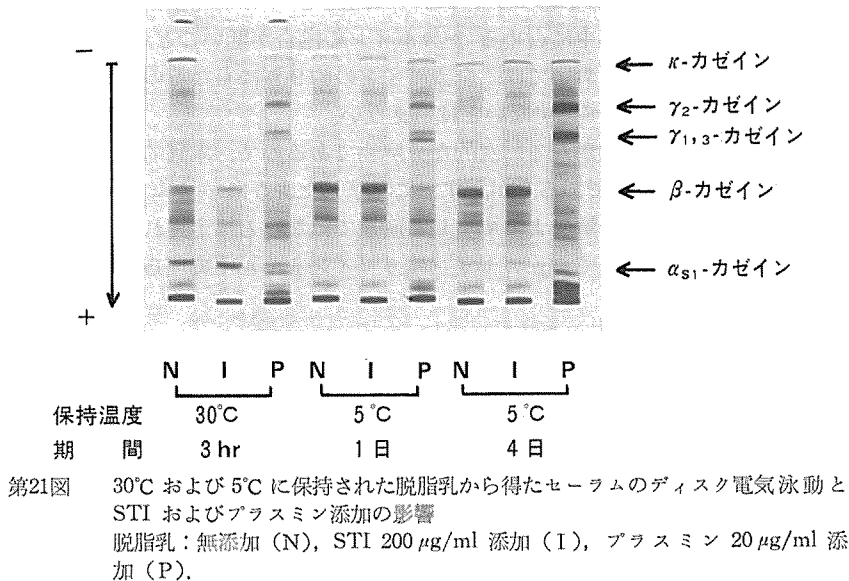
第9表 30°Cおよび5°Cに保持した時の脱脂乳，カゼインミセルおよびセーラム中の
γ-カゼイン量と STI およびプラスミン添加の影響

温度， 保持期間	処理	γ-カゼイン (mg/ml)			CM/脱脂乳
		脱脂乳	カゼインミセル (CM)	セーラム	
30°C， 3 時間	STI 添加	0.59	0.55	0.04	0.93
	無添加	1.13	1.09	0.04	0.97
	プラスミン添加	4.57	3.07	1.50	0.67
5°C， 1 日	STI 添加	0.44	0.21	0.23	0.48
	無添加	0.64	0.41	0.23	0.64
	プラスミン添加	3.25	1.66	1.59	0.51
5°C， 4 日	STI 添加	0.88	0.60	0.28	0.68
	無添加	1.30	0.92	0.38	0.71
	プラスミン添加	6.48			



変動の原因が搾乳前後のプラスミンによる蛋白分解であると推定したが，本実験ではプラスミン活性と γ-カゼイン量との間に有意な相関が認められなかったので，彼らの説を支持することはできない。

脱脂乳を 30°C で 3 時間，または 5°C で 1 日および 4 日保持した後，カゼインミセルとセーラム画分中の γ-カゼイン含量を調べた結果を第 9 表に示す。また，それらのディスク電気泳動図を第 20 図および第 21 図に示す。5°C で 4 日間保持した時の STI 添加脱脂乳中の γ-カゼイン含量は同温度で 1 日保持した時の 2 倍であり，酵素作用が完全には阻害されていなかった。この理由として，牛乳中のプラスミノゲンおよびプラスミノゲンアクチベーターがカゼインミセルに分布する (67) ことから，添加された STI がカゼインミセルの内部まで浸透できなかったことも考えられるが，さらに検討すべきであろう。しかしながら，STI の添加によっ



て、低温におけるカゼインミセルとセラム間の平衡を達成するまでに、酵素作用によって受ける γ -カゼイン量への影響をある程度減少させることができた。

30°C では、 γ -カゼインの大部分はカゼインミセルに分布した (第 9 表)。DAVIES and LAW (22) は 20°C においてこのことを認めている。低温では、STI 添加の有無によって、カゼインミセル中の γ -カゼイン含量に差が認められたが、セラム中の含量が同じであったことから、低温保持中にプラスミン作用によって生じた γ -カゼインはカゼインミセル中に保持されていたのかも知れない。この傾向はプラスミンを添加した試料についても言えるが、この場合は脱脂乳中の約 1/3 の量の γ -カゼインがセラム中に含まれた。低温でカゼインミセルから遊離した β -カゼインが添加されたプラスミンによって分解されたことも考えられる。

STI 添加脱脂乳を 5°C で 1 日間保持した時、約半分の γ -カゼインがセラム中に分布した (第 9 表)。この時のセラム画分の電気泳動図 (第 21 図) から、低温において β -カゼインがカゼインミセルから遊離すること (24, 90) が認められた。DAVIES and LAW (22) は 20°C よりも 4°C において、セラムカゼインの量がかなり多く、この増加はほとんどが β -カゼインによるとしながらも、 γ -カゼインの増加も明らかにその一因であることを定量的に示した。これらのことから、 γ -カゼインは β -カゼインのように低温でカゼインミセルから遊離する性質を持つことが明らかである。

一方、5°C で 1 日間保持した時、 γ -カゼインの約半分がカゼインミセルに含まれたが、4 日後ではカゼインミセル中の含量も増加した。このことは、低温においても、カゼインミセル中で蛋白分解が行われることを示唆しており、 β -カゼインと酵素がカゼインミセルから遊離した後、 β -カゼインが分解されて γ -カゼインが生成されるという REIMERDES and HERLIT (106) の考えは支持できない。

カゼインミセルの構造に関しては多くの研究があり、種々のモデルが提案された (114, 139,

96, 36, 116)。しかしながら、いずれのモデルにおいても γ -カゼインの役割に関しては論議されていない。ミセル構成カゼイン中に占める γ -カゼインの割合が低いことがその第一の理由であろう。しかし、特に末期乳においては、全カゼインの約9%にもなるので(9)、この場合は κ -および α_{s2} -カゼインに比べて少ないとは言えない。

第二の理由は、 γ -カゼインが単なる二次的な分解物であるので、本質的なカゼイン成分ではないという認識(134)のためであろうが、すでに考察したように γ -カゼインは少なくとも搾乳前後における経時的な蛋白分解によって生じる産物ではないと推定されたことから、この理由には賛成できない。したがって、 γ -カゼインはカゼインミセル中で何らかの役割を持つことが推測される。

最近のSCHMIDT(116)によるカゼインミセルのモデルでは、コロイド状リン酸カルシウムがサブミセル間を埋めて、これらの結合を維持している。カゼインミセルの中心に位置するサブミセルほど κ -カゼインの割合が少なく、外側ほどこの割合が大きい。各サブミセルの内部は疎水部分(hydrophobic core)であり、外側は α_{s1} -, α_{s2} - および β -カゼインのフォスフォペプチド部分と κ -カゼインの親水性部分より成り、後者は局在していて全体としてカゼインミセルは κ -カゼインの親水部分で覆われている。

γ -カゼインはミセルの大きさによっても含量比がほとんど変わらないことから(22)、どのサブミセル中にも、ほぼ均一に含まれるだろう。上記のモデルで含まれる場所は、疎水性残基の割合が高い γ -カゼインの一次構造(109)から推定すると、各サブミセルの“hydrophobic core”であると思われる。この場合、カゼイン分子間の間隙を埋める形で存在し得ることは、本成分の分子量(43)が小さいことから推測できよう。

プロテオリシスによる γ -カゼインの増加がなければ、室温以上でカゼインミセルに含まれる γ -カゼインの約半分が、低温でカゼインミセルより遊離することが本実験結果から推定されたので、サブミセルの内部における γ -カゼインと他カゼイン成分の結合に疎水結合(85, 86, 87)が重要な役割を果していると思われる。

これに対し、低温でも遊離せずにカゼインミセル中に含まれていた γ -カゼインの部分は、単にミセルの構造中に物理的に閉じ込められていたことも考えられるが、例えば水素結合と疎水結合が協同する結合(88)のように強固にサブミセル中のカゼイン成分と結合していた可能性もあろう。

以上のように、 γ -カゼインは各サブミセル中に分布することによって、その内部構造の形成に寄与し、それらの集合体としてのカゼインミセルの安定性を保つ役割の一端を担っていると思われる。

3. 小 括

個乳および混合乳を用い、脱脂乳中の γ -カゼイン含量とプラスミン活性を調べた。 γ -カゼイン含量は個乳で $0.93 (\pm 0.45)$ mg/ml、混合乳で $0.62 (\pm 0.18)$ mg/ml、また、プラスミン活性は個乳、 $1.26 (\pm 0.63)$ 、混合乳、 $1.24 (\pm 0.25)$ であり、 γ -カゼイン、プラスミン活性の両測定値とも変動が大きく、特に個乳の場合に顕著であった。両者の間には相関があるとは言えなかったことから、 γ -カゼイン含量の変動の理由は搾乳前後の二次的な蛋白分解のためではないことが示唆された。

脱脂乳を 30°C で 3 時間、または 5°C で 1 日および 4 日間保持した後、カゼインミセルとセラム画分中の γ -カゼイン含量を調べるとともに、ディスク電気泳動によって分析した。 γ -カゼインは 30°C でカゼインミセル画分に含まれたが、5°C では約半分がセラム画分に移行した。また、保持中にプロテオリシスによって、ミセル中の γ -カゼイン含量が増加する傾向を示した。

SCHMIDT (116) が提案したカゼインミセルのモデルを例にして、 γ -カゼインの役割を考察した。本成分はサブミセルの内部（疎水部分）で他カゼイン分子間の間隙を埋める形で配置し、その内部構造の形成に寄与することによって全体のカゼインミセルの安定性を保つ役割の一端を担っていると思われた。

第 5 章 総 括

牛乳および乳製品中の γ -カゼインに関する知見を得るため、本研究を行った。本成分の性状を理化学的性質（第 2 章第 1 節）、会合（同第 2 節）、および他のカゼイン成分との相互作用（同第 3 節）の面から研究したが、これらの知見は本成分に関しての理解を深めるばかりでなく、 γ -カゼインの定量法（第 3 章第 1 節）、さらに、牛乳中における本成分の役割（第 4 章第 3 節）を研究する上でも有用であった。

γ -カゼインの定量法を一部の乳製品に適用することにより、製品の貯蔵中におけるカゼイン成分の変化をプロテイナーゼ作用の点から研究する手段となり得ることが示された（第 3 章第 2 節）。このことは、 γ -カゼインがアルカリ性ミルクプロテイナーゼ（プラスミン）による β -カゼインの分解の結果、生成されることに基づいているが、この酵素作用を牛乳中で直接調べることが、 γ -カゼインの定量によって可能となった。これにより、牛乳中のプラスミン作用について研究するとともに（第 4 章第 1 節）、低温貯蔵乳のプロテオリシスについても調べた（同第 2 節）。

これらの研究を通じ、新鮮な牛乳中ではプラスミンの大部分は不活性型（プラスミノゲン）であることが推測され、さらに、牛乳中に当初含まれる γ -カゼインの量とプラスミン活性（ γ -カゼインの増加量）との間に相関があるとは言えなかったことから、 γ -カゼイン含量の変動のすべてが搾乳前後におけるプロテオリシスの結果であるという見解が否定された（第 4 章第 3 節）。また、カゼインミセルを構成する一成分としての γ -カゼインの役割を二・三の実験をもとに考察した。得られた結果の概略は以下の通りである。

酸カゼインから γ -カゼイン画分を調製した。この画分は低温では透明で室温で白濁したので、この性質を濁度を指標として調べた結果、温度、pH および濃度に影響されたが、CaCl₂ および NaCl 等の塩類の添加には影響されなかったこと、また本画分中の疎水性アミノ酸含量が高かったことから、 γ -カゼイン分子は会合し易く、この会合には分子間の疎水結合が重要であると思われた。さらに、低温においては水および 50% エタノールに可溶で、25% エタノール中で溶解性が低下したことは、 γ -カゼイン分子の安定性にその疎水性側鎖と溶媒との相互作用が一部関与するためと考察した（第 2 章第 1 節）。

γ -カゼインの会合をゲル化過程によって調べた結果、アルカリ側（pH 9.0）では温度に依存して会合体が形成されたが、酸性側（pH 3.6）では低温でも会合体が一部見られた。低濃度の SDS の添加により、凝集（白濁）を防いだ時にも温度依存性会合体が観察された。この温度

依存性会合または白濁は pH 6 以上で見られ、主として疎水相互作用に起因すると思われた。これ以下の pH では、会合（または白濁）が低温でも観察されたことから、酸性においては分子の構造が変化したことや疎水相互作用の外にも、例えば分子中のヒスチジン残基が寄与する様な水素結合も関与することが考えられた（第 2 章第 2 節）。

γ -カゼインをセファロースに固定化し、アフィニティークロマトグラフィーによって他のカゼイン成分との相互作用を調べた結果、低温では 1M NaCl を含む緩衝液（pH 7.0）中で少量の α_s -カゼインがカラムに結合する程度であったが、30°C では全カゼインの大部分がカラムに結合した。緩衝液の組成を変えて溶出した時、 κ -カゼインが最後に溶出されたことから、 γ -カゼインは他のカゼイン成分と主として疎水的に相互作用し、特に κ -カゼインと強く結合すると思われた（第 2 章第 3 節）。

脱脂乳中の γ -カゼイン定量法を確立した（第 3 章第 1 節）。これにより、従来ゲル電気泳動における γ -カゼインバンドの濃さから判定していたミルクプラスミンによる牛乳および乳製品中の蛋白分解については、より詳細な実験結果を得ることが可能となった。乳製品に関しては、市販の間接加熱法による UHT 滅菌乳（LL 牛乳）が長期間の貯蔵によってもプラスミンによる蛋白分解の点では問題がないという従来の知見を確認するとともに、脱脂粉乳の貯蔵中に本酵素による蛋白分解が起こり得るという新しい知見が得られた（第 3 章第 2 節）。脱脂粉乳の貯蔵による品質低下、特に不溶化が従来糖と蛋白質の化学的な反応として取り扱われてきたが、今後は酵素作用の点からの検討が必要であろう。

牛乳中では、その中で起こるプラスミンによる蛋白分解作用を γ -カゼインの定量によって直接追跡できた。これによって得られた新しい知見として、牛乳中のプラスミン活性は二つの至適 pH を持つことが示され、従来報告された単純な酵素と基質より成る系と実際の牛乳中で起こる蛋白分解作用との相違が明らかになった。この理由についてはアクチベーターやインヒビターが関与していることが考えられるが、今後さらに究明されなければならない。

牛乳の低温貯蔵中にプラスミンの作用により γ -カゼインが増加するという点で REIMERDES and HERLITS (106) の報告と一致したが、異なる部分もあった。第一にプラスミン活性の温度依存性であり、第二には低温で γ -カゼインが増加する時期である（第 4 章第 2 節）。防腐剤の有無など実験条件が異なる点もあろうが、本研究で得た温度との関係の方が一般的な酵素の性質から見て妥当であり、また低温において γ -カゼインが増加する時期が彼らの結果より遅かったことは、不活性型のプラスミノーゲンが活性型のプラスミンに変換するのに時間を要することで説明できよう。低温細菌が増殖した時、 γ -カゼインの増加が顕著であったが、細菌性プロテイナーゼがプラスミノーゲンの活性化因子として働くかどうかは今後の問題として残されよう。

個乳および混合乳の γ -カゼイン含量とプラスミン活性を調べた結果、両測定値とも、特に個乳の場合、変動が大きかったが、両者の間に相関関係があるとは言えなかった。このことから、牛乳中の γ -カゼイン含量の変動の理由は、少なくとも搾乳前後の蛋白分解によって生じる二次的な産物によるのではないと推論した。5°C および 30°C でカゼインミセルおよびセラム画分間の γ -カゼインの分布を調べた結果、30°C ではそのほとんどがカゼインミセル中に含まれたが、低温ではカゼインミセルから一部が遊離することが認められた。このことと第 2 章で述べた γ -カゼインの性質から、本成分はカゼインミセルを構成する各サブミセルの内部（疎

水部分)に他のカゼイン分子との相互作用によって配置し、サブミセルの内部構造の形成に寄与することが考えられた(第4章第3節)。

牛乳中の γ -カゼインに関する問題が、単に β -カゼインの酵素的分解の結果であるということだけで簡単に解決されてしまうことが少なからずあるように思われる。しかし、このことによって見落とされる知見があるかも知れないので、本成分の取扱いには十分な注意が必要であろう。本研究の中で γ -カゼインの測定を通じ、牛乳中のプラスミンによる蛋白分解は、本来、制御されているという考え方を支持できる実験結果が得られた。この点については、その制御機構に関与すると思われるプラスミンの関連因子(前駆体、活性化因子および阻害因子等)に関する研究の進展が期待される。また、 γ -カゼインが β -カゼインの分解により生成される時期を含め、 γ -カゼインの意義や役割をさらに明確にする上でも、乳腺中におけるカゼインの生合成に関する研究の進歩が待たれる。

近年、蛋白分解酵素による乳製品の品質への影響について関心が高まりつつあるが、この方面でも γ -カゼインを一つの指標として、牛乳および乳製品の品質を向上させるための理論と技術が発展することを切望する。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、懇篤な指導と助言を賜わり、さらに校閲の労をとられた九州東海大学有馬俊一郎教授(北海道大学名誉教授)、北海道大学農学部斎藤善一教授、安井勉教授、並びに仁木良哉助教授に心から拝謝する。また、三河勝彦助手には多くの教示を頂き、厚く感謝の意を表する。

本研究は弘前大学農学部農産物利用学講座において行われた。多くの助言と援助を賜った中村信吾教授に謹んで感謝の意を表する。なお、畑島武夫氏、岡崎正昭氏、並びに山脇久雄氏には学部在籍中に一部の実験に協力して頂いた。また、牛乳試料の採取には本学部付属金木農場、論文のとりまとめに際しては教育研究協力室の方々にお世話になった。併せて謝意を表する。

文 献

1. ADAMS, D. M., J. T. BARACH and M. L. SPECK: Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.* **58**: 828-834, 1975.
2. American Public Health Association: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 11th ed., pp.47, 148, American Public Health Association, New York, 1960.
3. ANDREWS, P.: Estimation of molecular weights of proteins by gel filtration. *Nature* **196**: 36-39, 1962.
4. ANDREWS, A. T.: The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. *Eur. J. Biochem.* **90**: 59-65, 1978.
5. ANDREWS, A. T.: The composition, structure and origin of proteose-peptone component 8F of bovine milk. *Eur. J. Biochem.* **90**: 67-71, 1978.
6. ANDREWS, A. T.: The formation and structure of some proteose-peptone components. *J. Dairy Res.* **46**: 215-218, 1979.
7. ANDREWS, A. T.: Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* **50**: 45-55, 1983.
8. ASCHAFFENBURG, R.: Inherited casein variants in cow's milk. *Nature* **192**: 431-432, 1961.
9. BARRY, J. G. and W. J. DONNELLY: Casein compositional studies. I. The composition of casein from Frisian herd milks. *J. Dairy Res.* **47**: 71-82, 1980.

10. BARRY, J. G. and W. J. DONNELLY : Casein compositional studies. II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. *J. Dairy Res.* **48** : 437-446, 1981.
11. BEEBY, R., R. D. HILL and N. S. SNOW : Milk protein research and milk technology. H. A. MCKENZIE (editor) : *Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology Vol. II*, pp. 457-459, Academic Press, New York, 1971.
12. BJÖRCK, L. : Modifications of casein in Ultra-High-Temperature treated milk during storage. *Milchwissenschaft* **28** : 291-293, 1973.
13. BLAKESLEY, R. W. and J. A. BOEZI : A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* **82** : 580-582, 1977.
14. CERBULIS, J. and J. H. CUSTER : Casein components soluble in chloroform-methanol (2 : 1) and in fifty per cent aqueous ethanol. *J. Dairy Sci.* **50** : 1356-1359, 1967.
15. CHIBA, H. and M. YOSHIKAWA : Studies on the casein micelle formation. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* **110** : 1-29, 1977.
16. CLIFF, A. J. and B. A. LAW : A new method for the detection of microbial proteolytic enzymes in milk. *J. Dairy Res.* **49** : 209-219, 1982.
17. CORRADINI, C. and P. P. PECIS : Proteolytic activity in UHT-sterilized milk. *J. Dairy Res.* **46** : 227-229, 1979.
18. COUSIN, M. A. and E. H. MARTH : Changes in milk proteins caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft* **32** : 337-341, 1977.
19. CREAMER, L. K. : β -Casein degradation in Gouda and Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **58** : 287-292, 1975.
20. DAVIES, D. T. and A. J. R. LAW : An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography. *J. Dairy Res.* **44** : 213-221, 1977.
21. DAVIES, D. T. and A. J. R. LAW : The composition of whole casein from the milk of Ayrshire cows. *J. Dairy Res.* **44** : 447-454, 1977.
22. DAVIES, D. T. and A. J. R. LAW : Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *J. Dairy Res.* **50** : 67-75, 1983.
23. DE RHAM, O. and A. T. ANDREWS : The roles of native milk proteinase and its zymogen during proteolysis in normal bovine milk. *J. Dairy Res.* **49** : 577-585, 1982.
24. DOWNEY, W. K. and R. F. MURPHY : The temperature-dependent dissociation of β -casein from bovine casein micelles and complexes. *J. Dairy Res.* **37** : 361-372, 1970.
25. DRIESSEN, F. M. and C. B. VAN DER WAALS : Inactivation of native milk proteinase by heat treatment. *Neth. Milk Dairy J.* **32** : 245-254, 1978.
26. DULLEY, J. R. : Bovine milk protease. *J. Dairy Res.* **39** : 1-9, 1972.
27. EIGEL, W. N. : Formation of γ_1 -A², γ_2 -A² and γ_3 -A caseins by in vitro proteolysis of β -casein A² with bovine plasmin. *J. Biochem.* **8** : 187-192, 1977.
28. EIGEL, W. N. : Effect of bovine plasmin on α_{s1} -B and κ -A caseins. *J. Dairy Sci.* **60** : 1399-1403, 1977.
29. EIGEL, W. N. : Identification of proteose-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of bovine β -casein. *Int. J. Biochem.* **13** : 1081-1086, 1981.
30. EIGEL, W. N. and H. E. RANDOLPH : Preparation of whole γ -casein by treatment with calcium phosphate gel. *J. Dairy Sci.* **57** : 1444-1447, 1974.
31. EIGEL, W. N. and H. E. RANDOLPH : Effect of temperature and pH on solubility and aggregation of whole γ -casein. *J. Dairy Sci.* **58** : 306-310, 1975.
32. EIGEL, W. N. and H. E. RANDOLPH : Comparison of calcium sensitivities of α_{s1} -B, β -A², and γ -A² caseins and their stabilization by κ -casein A. *J. Dairy Sci.* **59** : 203-206, 1976.
33. FOX, P. F. : Proteinases in dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.* **35** : 233-253, 1981.
34. FOX, P. F. and P. A. MORRISSEY : Reviews of the progress of Dairy Science : the heat stability of milk. *J. Dairy Res.* **44** : 627-646, 1977.

35. 古川 徳・山中良忠：粉乳の貯蔵中の変化に関する研究。第2報 粉乳の不溶化蛋白質の電気泳動的性質について。東京農大農学集報 18 : 206-209, 1974.
36. GARNIER, J. and B. RIBADEAU DUMAS : Structure of the casein micelle. A proposed model. *J. Dairy Res.* 37 : 493-505, 1970.
37. GORDON, W. G. and E. O. WHITTIER : Proteins of milk. B. H. WEBB and A. H. JOHNSON (editors) : *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 1st ed., pp. 54-90, AVI Publ. Co., Westport, 1965.
38. GORDON, W. G., M. L. GROVES, R. GREENBERG, S. B. JONES, E. B. KALAN, R. F. PETERSON and R. E. TOWNEND : Probable identification of γ -, TS-, R- and S-caseins as fragments of β -casein. *J. Dairy Sci.* 55 : 261-263, 1972.
39. GROVES, M. L. and W. G. GORDON : Evidence from amino acid analysis for a relationship in the biosynthesis of γ - and β -caseins. *Biochim. Biophys. Acta* 194 : 421-432, 1969.
40. GROVES, M. L. and C. A. KIDDY : Polymorphism of γ -casein in cow's milk. *Arch. Biochem. Biophys.* 126 : 188-193, 1968.
41. GROVES, M. L., T. L. McMEEKIN, N. J. HIPPI and W. G. GORDON : Preparation of β - and γ -caseins by column chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 57 : 197-203, 1962.
42. GROVES, M. L., W. G. GORDON, E. B. KALAN and S. B. JONES : Composition of bovine γ -caseins A¹ and A³, and further evidence for a relationship in biosynthesis of γ - and β -caseins. *J. Dairy Sci.* 55 : 1041-1049, 1972.
43. GROVES, M. L., W. G. GORDON, E. B. KALAN and S. B. JONES : TS-A² TS-B, R-, and S-Caseins : Their isolation, composition, and relationship to the β - and γ -casein polymorphs A² and B. *J. Dairy Sci.* 56 : 558-568, 1973.
44. 浜口浩三：タンパク質の高次構造。蛋白質核酸酵素（臨時増刊，タンパク質とは何か）27 : 714-730, 1982.
45. HARPER, W. J., J. A. ROBERTSON, JR. and I. A. GOULD : Observations on milk protease. *J. Dairy Sci.* 43 : 1850-1851, 1960.
46. HIPPI, N. J., M. L. GROVES, J. H. CUSTER and T. L. McMEEKIN : Separation of γ -casein. *J. Am. Chem. Soc.* 72 : 4928-4931, 1950.
47. HIPPI, N. J., M. L. GROVES, J. H. CUSTER and T. L. McMEEKIN : Separation of α -, β - and γ -casein. *J. Dairy Sci.* 35 : 272-281, 1952.
48. HUMBERT, G. and C. ALAIS : Review of the progress of dairy science : The milk proteinase system. *J. Dairy Res.* 46 : 559-571, 1979.
49. IGARASHI, Y. : Interactions of casein components with immobilized γ -casein. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 53 : 56-63, 1982.
50. IGARASHI, Y. : Increase in γ -casein content in bovine milk stored at low temperature. *Proc. Vth World Conference on Animal Production Vol. 2*, 661-662, Jpn. Soc. Zootech Sci., Tokyo, 1983.
51. IGARASHI, Y. : in preparation.
52. IGARASHI, Y. and Z. SAITO : Column chromatography of skim milk and buttermilk on triethylaminoethyl cellulose. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 13 : 44-50, 1967.
53. IGARASHI, Y. and Z. SAITO : Separation and some properties of temperature sensitive fraction in casein. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 39 : 78-84, 1968.
54. IGARASHI, Y. and Z. SAITO : Some properties of temperature-sensitive casein in cow's milk. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 41 : 262-269, 1970.
55. IGARASHI, Y. and Z. SAITO : Properties of TS-casein in aqueous alcohol solutions. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 43 : 31-38, 1972.
56. 五十嵐康雄・斎藤善一：牛乳および加熱乳カゼインの部分的分画。第71回日畜大会講演要旨, 131頁, 1980.
57. 五十嵐康雄・斎藤善一：牛乳および加熱乳における γ -, κ -カゼイン画分の分離。第72回日畜大会講演要旨, 174頁, 1981.
58. IGARASHI, Y., R. NIKI and S. ARIMA : Studies on TS-casein by light scattering and ultracentrifugal analyses. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 23 : 18-20, 1974.

59. JENNESS, R : Comparative aspects of milk proteins. *J. Dairy Res.* **46** : 197-210, 1979.
60. JENNESS, R., B. L. LARSON, T. L. MCMEEKIN, A. M. SWANSON, C. H. WITNAH and R. M. WHITNEY : Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.* **39** : 536-541, 1956.
61. JUFFS, H. S. : Proteolysis detection in milk I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. *J. Dairy Res.* **40** : 371-381, 1973.
62. KALOGRI DOU-VASSILIADOU, D. and B. A. LAW : Sensitivity of proteinase detection in milk with Hide Powder Azure : comparison with direct observations of casein proteolysis. *J. Dairy Res.* **49** : 511-514, 1982.
63. 上野川修一 : 蛋白分解酵素によるカゼイン分解の機構. 日畜会報 **52** : 627-638, 1981.
64. KAMINOGAWA, S. and K. YAMAUCHI : Decomposition of β -casein by milk protease. Similarity of the decomposed products to temperature-sensitive and R-casein. *Agr. Biol. Chem.* **36** : 255-260, 1972.
65. KAMINOGAWA, S., H. MIZOBUCHI and K. YAMAUCHI : Comparison of bovine milk protease with plasmin. *Agr. Biol. Chem.* **36** : 2163-2167, 1972.
66. KAMINOGAWA, S., K. YAMAUCHI and T. TSUGO : Properties of milk protease concentrated from acid-precipitated casein. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **40** : 559-565, 1969.
67. KORYCKA-DAHL, M., B. RIBADEAU DUMAS, N. CHENE and J. MARTAL : Plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.* **66** : 704-711, 1983.
68. 厚生省 : 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令, 別表2, 項(7), 1979.
69. LARSON, B. L. and K. A. KENDALL : Protein production in the bovine. Daily production of the specific milk proteins during the lactation period. *J. Dairy Sci.* **40** : 377-386, 1957.
70. LAW, B. A. : Reviews of the progress of dairy science : Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Res.* **46** : 573-588, 1979.
71. MACKINLAY, A. G. and R. G. WAKE : κ -Casein and its attack by rennin (chymosin). H. A. MCKENZIE (editor) : *Milk Proteins, Chemistry and Molecular Biology Vol. II*, pp. 175-215, Academic Press, New York, 1971.
72. MCKENZIE, H. A. : Milk proteins. ANFINSEN, C. B. JR., M. L. ANSON, J. T. EDSALL and F. M. RICHARDS (editors) : *Advances in Protein Chemistry. Vol. 22*, pp. 55-234, Academic Press, New York, 1967.
73. MELLANDER, O. : Elektrophoretische Untersuchung von Casein. *Biochemische Zeitschrift* **300** : 240-245, 1939.
74. MIKAMI, M. : Studies on gamma-casein. I. Fractionation of gamma-casein on DEAE-cellulose column chromatography. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **41** : 44-50, 1970.
75. MIKAMI, M. : Studies on gamma-casein. II. On the isolation and the properties of γ -casein components. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **42** : 281-288, 1971.
76. MIKAMI, M. and H. MIURA : Studies on gamma-casein. III. On the calcium sensitivity of γ -casein components. *Res. Bull. Obihiro Univ.* **8** : 71-77, 1973.
77. 三上正幸・三浦弘之 : 初乳におけるカゼインミセルおよび可溶性カゼイン中の各種カゼイン区分について. 日畜会報 **45** : 73-76, 1974.
78. 三上正幸・三浦弘之 : 常乳におけるカゼインミセルおよび可溶性カゼイン中の各種カゼイン区分について. 日畜会報 **45** : 67-72, 1974.
79. 三上正幸・三浦弘之 : γ -カゼイン画分と他のカゼインの相互作用について. 農化 **48** : 585-590, 1974.
80. 三河勝彦・有馬俊六郎 : 市乳, 殺菌乳, および *Pseudomonas fluorescens* 接種乳における風味変化と各種乳質検査法との関係. 北大農学部紀要 **11** : 360-371, 1979.
81. MURTHY, G. K. and R. M. WHITNEY : A comparison of some of the chemical and physical properties of γ -casein and immune globulins. *J. Dairy Sci.* **45** : 1-12, 1958.
82. NAKAJIMA, A. and H. A. SCHERAGA : Thermodynamic study of shrinkage in fibers from insulin. *J. Am. Chem. Soc.* **83** : 1585-1589, 1961.

83. NAKANISHI, T. and T. ITOH : Studies on the changes of the milk casein by various treatment. Part 3 : The properties of insoluble protein occurred in dried milk during storage under humid conditions. *Milchwissenschaft* **21** : 635-637, 1966.
84. NELSON, C. A. : The binding of detergents to proteins. *J. Biol. Chem.* **246** : 3895-3901, 1971.
85. NÉMETHY, G. and H. A. SCHERAGA : Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid water. *J. Chem. Phys.* **36** : 3382-3400, 1962.
86. NÉMETHY, G. and H. A. SCHERAGA : Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons. *J. Chem. Phys.* **36** : 3401-3417, 1962.
87. NÉMETHY, G. and SCHERAGA, H. A. : The structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III. The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins. *J. Phys. Chem.* **66** : 1773-1789, 1962.
88. NÉMETHY, G., I. Z. STEINBERG and H. A. SCHERAGA : Influence of water structure and of hydrophobic interactions on the strength of side-chain hydrogen bonds in proteins. *Biopolymers* **1** : 43-69, 1963.
89. NIKI, R. and S. ARIMA : Über den Einfluß des pH-Werts auf die temperaturabhängige Polymerisation von β -Casein. *Agr. Biol. Chem.* **33** : 826-833, 1969.
90. NIKI, R., H. J. LEE and S. ARIMA : Einfluß der Kühlung auf die Caseinmicellen der Kuhmilch. *Milchwissenschaft* **33** : 473-477, 1978.
91. NIKI, R., I. KATO and S. ARIMA : Über den Einfluß von Natriumdodecylsulfat auf die Polymerisation von β -Casein. *Milchwissenschaft* **26** : 141-146, 1971.
92. NOBLE, R. W. JR. and D. F. WAUGH : Casein micelles. Formation and structure. I. *J. Am. Chem. Soc.* **87** : 2236-2245, 1965.
93. NOOMEN, A. : Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.* **29** : 153-161, 1975.
94. OSBORN, T. B. and A. J. WAKEMAN : Some new constituents of milk. Third paper. A new protein, soluble in alcohol. *J. Biol. Chem.* **33** : 243-251, 1918.
95. PARRY, R. M. JR. : Milk coagulation and protein denaturation. B. H. WEBB, A. H. JOHNSON and J. A. ALFORD (editors) : *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 2nd ed., pp. 603-661, AVI Puble. Co., Westport, 1974.
96. PARRY, R. M. JR. and R. J. CARROLL : Location of κ -casein in milk micelles. *Biochim. Biophys. Acta* **194** : 138-150, 1969.
97. PAYENS, T. A. J. : Association of caseins and their possible relation to structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci.* **49** : 1317-1324, 1966.
98. PAYENS, T. A. J. : Self-association and complex-formation of α_{s1} - and β -casein. *Biochem. J.* **108** : 14 P, 1968.
99. PAYENS, T. A. J. and H. NIJHUIS : Electrophoresis of interacting proteins. I. Complex formation of α_{s1} - and β -casein. *Biochim. Biophys. Acta* **336** : 201-212, 1974.
100. PAYENS, T. A. J. and B. W. VAN MARKWIJK : Some features of the association of β -casein. *Biochim. Biophys. Acta* **71** : 517-530, 1963.
101. PEPPER, L. : Casein interaction as studied by gel chromatography and ultracentrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* **278** : 147-154, 1972.
102. REIMERDES, E. H. : β -Casein fragments in milk : analysis and preparation. *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie* **32** : 13-14, 1978.
103. REIMERDES, E. H. : Model proteolysis of β -casein by immobilized trypsin. *J. Dairy Res.* **46** : 223-226, 1979.
104. REIMERDES, E. H., I. HALPAAP and H. KLOSTERMEYER : Milchproteinasen 8. Vergleichende charakterisierung von Plasmin aus Rinderblut mit einer Serinproteinase aus Kuhmilch. *Milchwissenschaft* **36** : 19-22, 1981.
105. REIMERDES, E. H., I. HALPAAP and H. KLOSTERMEYER : Milchproteinasen, 10. Enzym-

- kinetischer Vergleich bei Rinderplasmin mit zwei Milchproteinasen. *Milchwissenschaft* **36** : 73-79, 1981.
106. REIMERDES, E. H. and E. HERLITZ : The formation of γ -caseins during cooling of raw milk. *J. Dairy Res.* **46** : 219-221, 1979.
 107. REIMERDES, E. H., G. MROWETZ and H. KLOSTERMEYER : Milchproteasen IV. Differenzierung der micellenassoziierten Aktivität mit Aminosäure-4-nitroaniliden. *Milchwissenschaft* **30** : 271-274, 1975.
 108. RIBADEAU DUMAS, B. : Fractionnement de la caséine par chromatographie sur colonne de diéthylaminoéthyl-cellulose en milieu uré. *Biochim. Biophys. Acta* **54** : 400-402, 1961.
 109. RIBADEAU DUMAS, B., G. BRIGNON, F. GROSCLAUDE and J. -C. MERCIER : Structure primaire de la caseine β bovine sequence complete. *Eur. J. Biochem.* **25** : 505-514, 1972.
 110. RICHARDSON, B. C. and K. N. PEARCE : The determination of plasmin in dairy products. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* **16** : 209-220, 1981.
 111. ROLLEMA, H. S., S. VISSER and J. K. POLL : On the determination, purification and characterization of the alkaline proteinase from bovine milk. *Neth. Milk Dairy J.* **35** : 396-399, 1981.
 112. ROLLEMA, H. S., S. VISSER and J. K. POLL : Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine milk. *Milchwissenschaft* **38** : 214-217, 1983.
 113. ROLLERI, G. D., B. L. LARSON and R. W. TOUCHBERRY : Protein production in the bovine. Breed and individual variations in the specific protein constituents of milk. *J. Dairy Sci.* **39** : 1683-1689, 1956.
 114. ROSE, D. : A proposed model of micelle structure in bovine milk. *Dairy Sci. Abstr.* **31** : 171-175, 1969.
 115. ROSE, D., D. T. DAVIES and M. YAGUCHI : Quantitative determination of the major components of casein mixtures by column chromatography on DEAE-cellulose. *J. Dairy Sci.* **52** : 8-11, 1969.
 116. SCHMIDT, D. G. : Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.* **34** : 42-64, 1980.
 117. SCHMIDT, D. G. and W. BUCHHEIM : Elektronenmikroskopische Untersuchung der Feinstruktur von Caseinmicellen in Kuhmilch. *Milchwissenschaft* **25** : 596-600, 1970.
 118. SCHMIDT, D. G. and T. A. J. PAYENS : The evaluation of positive and negative contributions to the second virial coefficient of some milk proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **39** : 655-662, 1972.
 119. 島尾和男・沈殿生成・阿南功一・紺野邦夫・田村善蔵・松本重一郎, 編 : 基礎生化学実験法 2. 抽出・分離・精製, 57-74頁, 丸善, 東京, 1974.
 120. SLATTERY, C. W. and R. EVARD : A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochim. Biophys. Acta* **317** : 529-538, 1973.
 121. SNOEREN, T. H. M. and P. BOTH : Proteolysis during the storage of UHT-sterilized whole milk. 2. Experiments with milk heated by the indirect system for 4 s at 142°C. *Neth. Milk Dairy J.* **35** : 113-119, 1981.
 122. SNOEREN, T. H. M. and J. A. M. VAN RIEL : Milk proteinase, its isolation and action on α_{s2} - and β -casein. *Milchwissenschaft* **34** : 528-530, 1979.
 123. SNOEREN, T. H. M., C. A. VAN DER SPECK, R. DEKKER and P. BOTH : Proteolysis during the storage of UHT-sterilized whole milk. 1. Experiments with milk heated by the direct system for 4 seconds at 142°C. *Neth. Milk Dairy J.* **33** : 31-39, 1979.
 124. SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN and S. MOORE : Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* **30** : 1190-1206, 1958.
 125. STURTEVANT, J. M., M. LASKOWSKI, JR., T. H. DONNELLY and H. A. SCHERAGA : Equilibria in the fibrinogen-fibrin conversion. III. Heats of polymerization and clotting of fibrin monomer. *J. Am. Chem. Soc.* **77** : 6168-6172, 1955.
 126. SULLIVAN, R. A., M. M. FITZPATRICK, E. K. STANTON, R. ANNINO, G. KISSEL and F. PALERMITI : The influence of temperature and electrolytes upon the apparent size and

- shape of α - and β -casein. *Arch. Biochem. Biophys.* **55** : 455-468, 1955.
127. SUMMARIA, L., B. HSIEH and K. C. ROBBINS : The specific mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *J. Biol. Chem.* **242** : 4279-4283, 1967.
128. THOMPSON, M. P. and H. M. FARRELL, JR. : The casein micelle-the forces contributing to its integrity. *Neth. Milk Dairy J.* **27** : 220-239, 1973.
129. TILLET, W. S. and R. L. GARNER : The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **58** : 485-502, 1933.
130. TOBIAS, J., R. M. WHITNEY and P. H. TRACY : Electrophoretic properties of milk proteins. II. Effect of heating to 300 F by means of the mallory small-tube heat exchanger on skim milk proteins. *J. Dairy Sci.* **35** : 1036-1045, 1952.
131. TRIEU-CUOT, P. and J. -C. GRIPON : Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dairy Res.* **48** : 303-310, 1981.
132. TRIPATHI, K. K. and C. W. GEHRKE : Chromatography and characterization of γ -casein. *J. Chromatog.* **43** : 322-331, 1969.
133. VESTERBERG, O. and H. SVENSSON : Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem. Scand.* **20** : 820-834, 1966.
134. VISSER, S. : Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Neth. Milk Dairy J.* **35** : 65-88, 1981.
135. WARNER, R. C. : Separation of α - and β -casein. *J. Am. Chem. Soc.* **66** : 1725-1731, 1944.
136. WAUGH, D. F. : Formation and structure of casein micelles. H. A. MCKENZIE (editor) : *Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology Vol. II*, pp. 3-85, Academic Press, New York, 1971.
137. WAUGH, D. F. and R. W. NOBLE, JR. : Casein micelles. Formation and structure. II. *J. Am. Chem. Soc.* **87** : 2246-2257, 1965.
138. WAUGH, D. F. and P. H. VON HIPPEL : κ -Casein and the stabilization of casein micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **78** : 4576-4582, 1956.
139. WAUGH, D. F., L. K. CREAMER, C. W. SLATTERY and G. W. DRESDNER : Core polymers of casein micelles. *Biochemistry* **9** : 786-795, 1970.
140. WHITNEY, R. M., J. R. BRUNNER, E. K. EBNER, H. M. FARRELL, JR., R. V. JOSEPHSON, C. V. MORR and H. E. SWAISGOOD : Nomenclature of the proteins of cow's milk ; Fourth revision. *J. Dairy Sci.* **59** : 795-815, 1976.
141. YAMAUCHI, K. and S. KAMINOGAWA : Decomposition of milk proteins by milk protease. *Agr. Biol. Chem.* **36** : 249-254, 1972.
142. YAMAUCHI, K., S. KAMINOGAWA and T. TSUGO : Separation of milk protease fraction from casein. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **40** : 551-558, 1969.
143. 柳谷孝幸・三上正幸・三浦弘之 : 低温性細菌による牛乳タンパク質の変化. *農化* **47** : 259-266, 1973.
144. 矢野信礼 : 牛乳の低温細菌. 乳業科学新説編集委員会編 : 乳業科学新説, 146-155頁, 朝倉書店, 東京, 1966.
145. ZITTLE, C. A. : Column chromatography of casein on the adsorbent diethylaminoethyl (DEAE) cellulose. *J. Dairy Sci.* **43** : 855, 1960.

STUDIES ON γ -CASEINS IN MILK AND MILK PRODUCTS

Yasuo IGARASHI

Laboratory of Utilization of Agricultural Products

SUMMARY

This article deals with γ -caseins, a minor group of caseins which has long been an arguable subject with respect especially to their origin. This study is based on the concept that apart from this problem, their occurrence in milk itself is significant and should not be neglected for evaluating chemical aspects of milk and its processing. Properties of γ -caseins including self-association and interaction, a method of quantification in milk and its application to milk products, proteolysis in milk including cold-stored raw milk as studied from the increase in γ -caseins, and their possible role in casein micelles were studied.

Preparation and properties of a γ -casein fraction.

A γ -casein fraction was prepared from whole casein using TEAE-cellulose in 0.027 M 2-amino-2-methyl-1-propanol-citric acid buffer (pH 8.0). The fraction eluted at 2°C from a TEAE-cellulose column (Temperature sensitive fraction) was mixed at 40°C with TEAE-cellulose. The cellulose was recovered into a column and the γ -casein fraction was obtained at 2°C by eluting with above buffer. This fraction was clear at low temperature, but turbid at room temperature. This property was studied by measuring turbidity (absorbance at 610 nm). Turbidity was influenced by temperature and pH, but not much influenced by the addition of salts such as CaCl_2 or NaCl. These facts seemed to be attributed to the high content of hydrophobic amino acids in the proteins. Thus, it was concluded that γ -caseins easily undergo association mainly by inter-molecular hydrophobic binding. Another experiment showed that γ -caseins were soluble at 2°C and at pH 7.0 both in water and in 50% ethanol, but the solubility decreased at intermediate ethanol concentrations. The higher solubility in 50% ethanol may be due to hydrophobic protein-solvent interaction.

Self-association

Self-association of γ -casein molecules was studied by Sephadex G-150 gel chromatography both at alkaline and acidic pH. High molecular associates were observed at 30°C in a 0.025 M phosphate buffer of pH 9.0, but the degree of association was lower at pH 9.8. Monomeric form was predominant at lower temperature. Such temperature dependence was not recognized at pH 3.6. Temperature-dependent polymer formation was also observed by gel chromatography, when a turbid γ -casein solution of pH 8.0 was cleared by addition of a low concentration of sodium dodecyl sulfate. The results of pH-turbidity curves showed that γ -caseins aggregated reversibly at pH above 6.0 possibly owing to hydrophobic binding of protein molecules, whereas at pH below 6.0 irreversible aggregation was observed possibly owing to the conformational change of protein molecules or different manner of protein binding.

Interactions of γ -caseins with other casein components

This section was summarized in this article. For details, refer to ref. 49.

Affinity chromatography of whole casein, α_s -, β - and κ -caseins on γ -casein coupled Sepharose 4B showed that γ -casein interacted with casein components and most strongly with κ -casein possibly by hydrophobic binding.

Quantitative determination of γ -caseins in milk

A method of determining γ -casein content of skim milk (51) was briefly described. The method includes rapid separation of γ -casein-rich fraction in a solvent system (0.4 M NaSCN, 0.15M CaCl_2 and 50% ethanol), removal of other protein moiety by passing through a thin layer of DEAE-cellulose, and the determination of protein concentration from absorbance at 280 nm. Experiments for heated skim milk led to the conclusion that this method might be applicable to milk products.

γ -Casein content of milk products and effect of storage

Commercial sterilized milk by indirect ultra-high temperature heat treatment (UHT milk) and instant-type skim milk powder were stored, and changes in γ -casein content were studied. γ -Casein content was not much changed in UHT milk stored both at 10°C and 37°C after 3 months of storage. It was suggested that the degradation of casein by plasmin-like proteinase in UHT milk processed by the indirect heating method was negligible. When skim milk powder stored at room temperature was analyzed, γ -casein content tended to increase with increasing the period of storage. This was parallel to the increase in moisture content. Besides, a considerable level of plasmin-like proteinase activity was found in old skim milk powder as estimated from an increase in γ -casein content during the incubation at 37°C for 20 hours after reconstitution. The possibility that the quality of powdered milk products might be influenced by residual milk proteinases was suggested.

Plasmin activity in skim milk as studied from the increase in γ -casein content

Summarized results were presented. Details are in preparation. γ -Casein content of skim milk preserved with 0.02% NaN_3 increased with time depending on the temperature of incubation. An increase during the incubation at 37°C for 20 hours was used as a measure of plasmin activity. pH Optima of the plasmin activity in skim milk were found to be at pH 8.0 and pH near 7. Plasmin in skim milk was relatively heat-stable although heating at 90°C for 10 min caused almost complete loss of activity. The increase in the activity was observed by heating skim milk at 55~63°C for 10 min or at 60~72°C for 15 sec.

Increase in γ -casein content of milk and proteolysis during cold storage

Proteolysis in skim milk during cold-storage was investigated by observing the change in γ -casein content. No change was detected after 1~2 days of storage at 5°C. However, longer storage of both skim milk samples with and without preservative resulted in increase in the value. Especially, the rate of the increase was high for the skim milk which was initially rich in psychrotrophs. From the experiments in which skim milk was added with urokinase (plasminogen activator), it was shown that the activation of plasminogen in milk might be involved in the casein degradation also at low temperature.

A proposal for the significance and role of γ -caseins in milk

The significance and role of γ -casein in milk was considered from the knowledge already described and from the results of some experiments. In spite of the fact that γ -casein content of individual and pooled milks and their plasmin activity varied among the samples, there was no significant correlation between both values. This suggests that the variation of γ -casein content is not entirely attributed to the plasmin

action recieved at a pre- or post-milking stage. In another experiment, the distribution of γ -caseins between casein micelles and milk serum was examined quantitatively and also observed by gel electrophoresis. The results showed that most part of γ -casein occurred in the casein micelle fraction at 30°C, whereas their considerable part dissociated into serum at 5°C. These facts as well as their hydrophobic property suggest the possibility that γ -caseins are located in the inner part (hydrophobic core) of sub-micelles mainly by hydrophobic binding with the hydrophobic parts of other caseins.

Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ. No. 44 : 51—94, 1985.