

クリーミングに関する研究(8)

誌名	日本大學農獸醫學部學術研究報告
ISSN	00780839
著者	増田, 哲也 鈴木, 和威
巻/号	45号
掲載ページ	p. 242-248
発行年月	1988年3月

Studies on the Creaming Phenomenon—VIII

Relation between the Quantity of Globulin in Cow's Milk and the State of Creaming

Tetsuya MASUDA¹ and Kazui SUZUKI²

¹ Lab. Animal Products and ² Lab. Food Technology, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.

(Accepted Oct. 1, 1987)

ABSTRACT. As one of a series of experiment to elucidate the mechanism of creaming of milk, the present study aimed to grasp the participation of globulins in creaming of cow's milk. For this purpose, not only normal milk but also mastitic milk and colostrum were investigated because the latter two were reported to contain much more globulins than the former normal milk. Creaming was carried out by standing their raw milks for 17 hours at 5°C. Nitrogen distribution of whole milk, and cream and skimmed milk layers connecting with fat mobilization was determined quantitatively by Rowland's method. A gel filtration and a polyacrylamide gel electrophoresis were used for whey protein and globulin fractionation, respectively. The results obtained were summarized as follows.

1) The amount of fat which moved into cream layer during the standing raw milk was not proportion to the globulin content in raw milk. It was accepted that the quantity of globulin N in raw milk was not important for the fat mobilization in the creaming process.

2) Although the percentage of globulins in whey proteins of cream layer derived from normal milk, mastitic milk and colostrum was higher than that in the respective whole milk, an electrophoretic observation on the globulin fraction could not found that any one of three components detected was particularly predominant.

3) The present study indicated that any material or materials which cooperate with globulins for the fat agglutination or the fat globule clustering should be focussed to investigate.

Key words: Creaming, Mastitic milk, Cow's milk Globulins, Colostrum

クリーミングに関する研究—VIII

牛乳中のグロブリン含量とクリーミングの関連性について

増田 哲也¹・鈴木 和 威²

日本大学農獣医学部 畜産製造学研究室¹, 食品製造工学第一研究室²

(昭和62年10月1日受理)

著者らのこれまでのクリーミングに関する研究で、牛乳中の窒素化合物のうち脂肪球の集合に最も深い関係を持つのはグロブリンであることが推察され[1,2], また、このグロブリンの脂肪球凝集能は牛乳を低温に静置した場合に大きく、静置温度が高くなるに従って小さくなるという性質を示し、このことよりクライオグロブリン様の性質を示すグロブリンが主体であることも示唆され

た[3,4]。

そこで今回、正常乳に比較してグロブリン含量が多いと報告されている乳房炎乳と初乳を試料として、グロブリン含量とクリーミングの状態について Rowland 法[5], ゲル濾過法[6] および ポリアクリルアミドゲル電気泳動法[7]等で検討した。

材料および方法

試料牛乳とクリーム分離

日本大学農獣医学部附属農場で飼育されているホルスタイン種泌乳牛より搾乳した生乳（正常乳：N-1~3, 乳房炎乳：M-1~3）そして初乳：C-1~3）を使用した。その生乳を 500 ml 容分液ロートに入れ、5℃に調節した冷蔵庫に17時間静置し、クリーム部と脱脂乳部に分別した。

窒素化合物の分別定量

上記の方法で分別したクリーム部、脱脂乳部および試料牛乳（全乳）のそれぞれについて Rowland 法に準じて窒素化合物を分別定量した。定量法は前報 [1] に示したとおりである。

脂肪含量の測定

クリーム部、脱脂乳部および試料牛乳（全乳）のそれぞれについて、Milko tester M. K. III (A/SN FOSS ELECTRIC 製) を用いて脂肪含量を測定した。

乳清蛋白質のゲル濾過

分離したクリーム部、脱脂乳部および試料牛乳（全乳）をそれぞれ 50 ml 容ビーカーに分取し、pH メーターで確認しながら 1/10 N HCl 溶液を加えて pH を 4.6 とした。その後 40℃ に調節した恒温槽で 10 分間加温し、5℃ の低温恒温槽内に 1 時間静置したのち濾過した（東洋濾紙 No. 5c）。その濾液（乳清区分）18 ml を 10℃ に保った 2.6×90 cm の Sephacryl S-300 カラムに添加し、流速 42.5 ml/hr の pH 8.6 ベロナール緩衝液で溶出し、その溶出曲線を 280 nm で測定した。

乳清蛋白質のディスク電気泳動

分離したクリーム部、脱脂乳部および試料牛乳（全乳）より上記と同様な方法で乳清区分を分別した。これを試料として前報 [8] と同様、Davis の変法 [9] に基づいた方法で電気泳動を行った。すなわち、分離ゲル濃度は T（単量体の総濃度）= 9.0%，C（架橋度：架橋剤混合比）= 3.0% で、濃縮ゲル、試料ゲルは T = 3.1%，C = 20.0% で、泳動用緩衝液はトリス・グリシン緩衝液（pH 8.3）を用い、10℃ に調節した低温恒温器内で泳動用ガラス管（内径 5 mm × 75 mm）1 本当たり 1 w 通電し 90 分間泳動した。泳動後、アミドブラック 10B 溶液（色素 1 g : 7% CH₃COOH 溶液 70 ml : メタノール 30 ml）で染色し、7% CH₃COOH 溶液で過剰の色素を除いた。

電気泳動パターンの観察と定量

ゲルを小試験管に入れ、7% CH₃COOH 溶液を満たしホルク栓をして、デントメーター（DCD-16 型：アトー K. K. 製）によりゲル内で蛋白質と結合している色素の 600 nm (O. D. = 3.0) における吸収曲線（電気泳

動パターン）を描くとともに、各乳清蛋白質の相対濃度（面積百分率）を測定した。なお、各乳清蛋白質の泳動位置からの同定は前報 [8] に準じた。

結果および考察

Table 1 は各試料牛乳より分離したクリーム部、脱脂乳部における窒素分布を Rowland 法で測定し、正常乳、乳房炎乳および初乳の各々 3 試料についての平均含有率を示したものである。乳房炎乳の窒素分布、特に乳清蛋白質の相対量の変化について阿部および中野 [10] は *Streptococcus* 由来乳房炎においてグロブリン画分の増加を観察したこと、Nagasawa および Tanahashi [11] は非臨床性乳房炎乳においてはグロブリンの相対量が増加するのみで、他の成分には変化が認められないこと、および急性乳房炎乳においてはグロブリンと共に血清アルブミンの相対量が著しく増加することを報告している。こふらおよびその他の研究 [12~14] から、乳房炎乳においてはいずれの場合にもグロブリンの増加があり、急性のときは血清アルブミンの増加があると認めてよいと報告されている [15, 16]。

また、初乳の窒素分布、特に乳清蛋白質の相対量について、祐川 [17]、Smith [18] はグロブリンが顕著に多く含まれていることを報告している。今回、著者らの実験結果でも、正常乳に比較して乳房炎乳、初乳でグロブリン態窒素の割合が大きいことが認められた。このようにグロブリン含量が多い乳房炎乳と初乳を冷蔵庫に静置すると、乳房炎乳の場合、グロブリン態窒素含有率は全乳で 15.71%、クリーム部で 22.15% であり、初乳の場合も同様にそれぞれ 18.91%、25.21% となり、クリーム部にグロブリン態窒素の増加が認められた。

Fig. 1 は正常乳 (Sample: N-1)、乳房炎乳 (Sample: M-1) および初乳 (Sample: C-1) を 5℃ の冷蔵庫に静置して得たクリーム部、脱脂乳部の乳清区分のゲル濾過法 [19~21] による溶出パターンを示したものであるが、正常乳、乳房炎乳および初乳のいずれの場合においても、クリーム部乳清区分で最初に溶出してくるピーク（図中 ▼ の印のピーク）が脱脂乳部、全乳のそれと比較して多く、このピークを構成している蛋白質がクリーミングに関与していることが示唆された。そこで、このピークを分取し限外濾過器（ミニモジュール NM-3: 旭化成 K. K. 製）で濃縮した後、ディスク電気泳動法で解析したところ、Smith の方法 [22] で得たグロブリン分画と泳動距離、泳動パターンが近似しており、この溶出ピークを構成している蛋白質はグロブリンであることが明らかとなった。

Fig. 2 は正常乳 (Sample: N-2)、乳房炎乳 (Sample: M-2) および初乳 (Sample: C-2) を 5℃ の冷蔵庫に 17

Table 1 Nnitrogen distribution in whole milk, and in cream and skimmed milk layers separated by standing raw milk normal milk, mastitic milk and colostrum for 17 hours at 5°C

	Normal milk			Mastitic milk			Colostrum		
	W ¹⁾	S ²⁾	C ³⁾	W	S	C	W	S	C
	%								
Casein N	78.90	78.06	77.41	62.44	58.32	60.02	67.48	65.28	62.62
Globulin N	5.77	5.68	8.13	15.71	15.24	22.15	18.91	18.61	25.52
Albumin N	2.96	4.13	1.88	11.30	15.89	7.19	6.52	9.12	4.56
Proteose-Peptide N	5.34	5.47	5.78	5.13	5.42	5.50	3.07	3.22	3.38
Non-Protein N	7.03	6.66	6.85	5.42	5.13	5.14	4.02	3.77	3.92

¹⁾ Whole milk

²⁾ Skimmed milk layer

³⁾ Cream layer

(Percentage of each Total N)

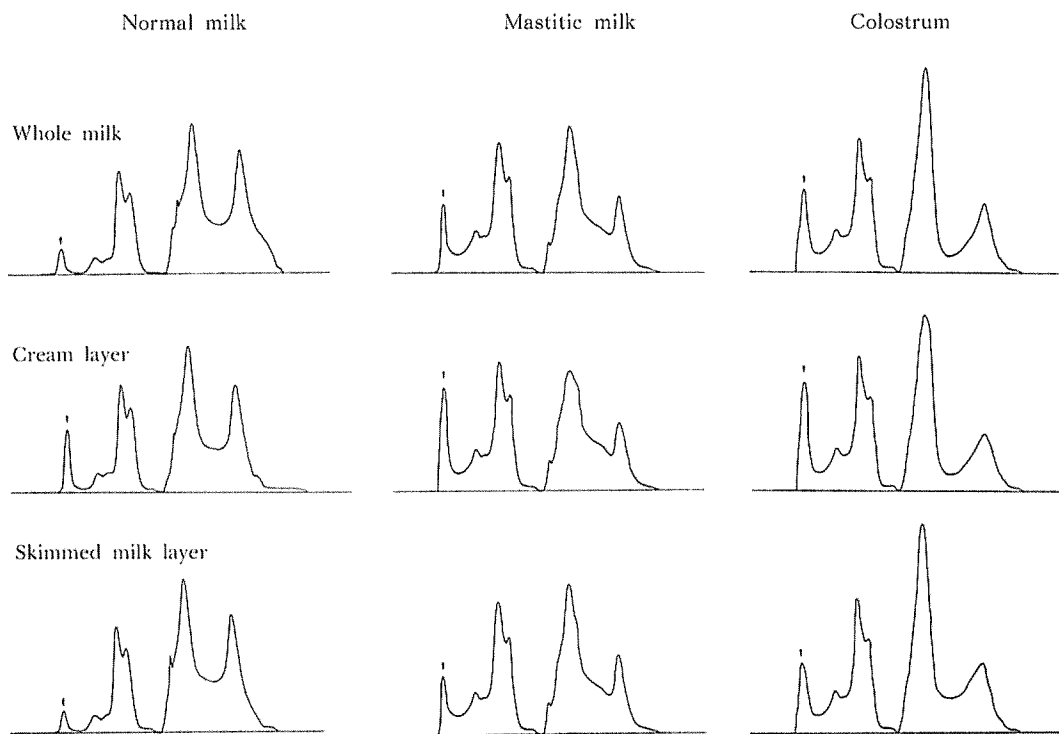


Fig. 1 Gel filtration patterns of whey proteins prepared from whole milk, and from cream and skimmed milk layers separated by standing normal milk, mastitic milk and colostrum for 17 hours at 5°C.

Column : Sephacryl S-300 (26×90mm) at 10°C

Flow rate : 42.5ml/h

Buffer for elution : pH 8.6 Veronal Buffer

Detector : UV-monitor (280nm)

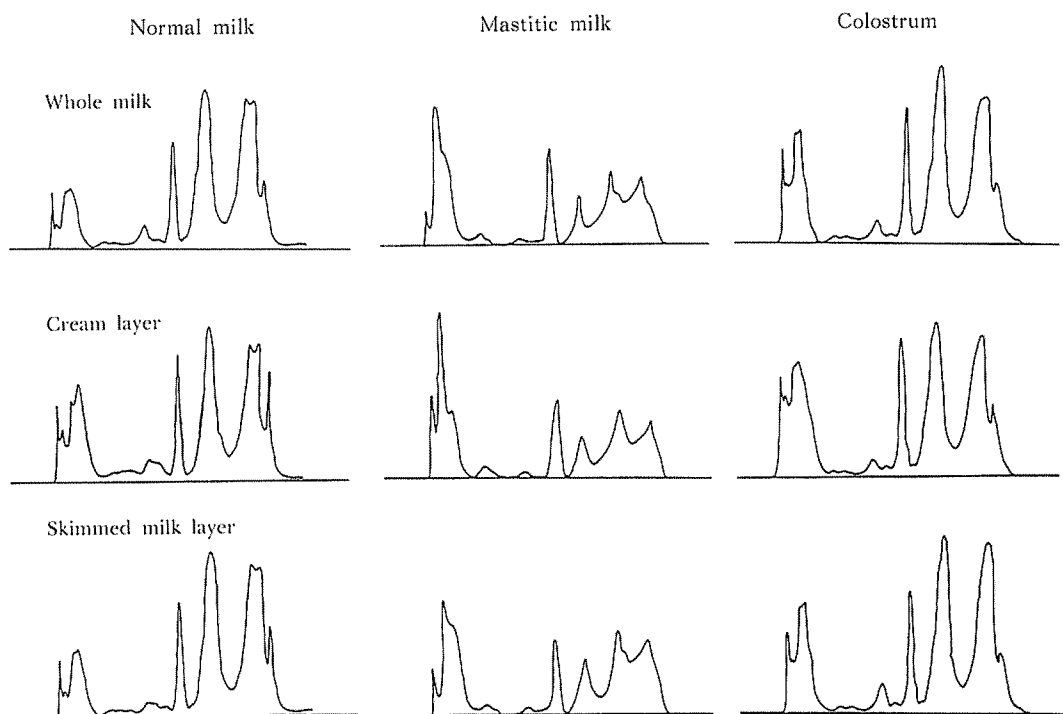


Fig. 2 Electrophoretic patterns of whey proteins prepared from whole milk, and from cream and skimmed milk layers separated by standing normal milk, mastitic milk and colostrum for 17 hours at 5°C.

Table 2 Composition (%) and relative ratio of whey proteins prepared from whole milk, and from cream and skimmed milk layers which separated by standing normal milk, mastitic milk and colostrum for 17 hours at 5°C

		Lactoglobulin	Serum albumin	α -lactalbumin	β -lactoglobulin	Proteose-peptone
Normal milk	W ¹⁾	17.80 ⁴⁾	8.71	22.67	34.40	16.37
	C ²⁾	22.33	9.06	21.76	33.41	13.44
	S ³⁾	16.89	8.45	22.44	33.72	18.45
Mstitic milk	C/W	1.254	1.040	0.960	0.971	0.821
	W	36.48	8.67	13.32	29.50	12.03
	C	43.11	9.19	11.90	26.32	9.48
	S	35.98	8.32	13.59	29.21	12.90
Colostrum	C/W	1.183	1.060	0.893	0.892	0.788
	W	34.92	15.13	20.36	19.87	9.71
	C	41.17	15.89	17.74	17.29	7.91
	S	33.87	15.14	17.73	22.37	10.89
	C/W	1.178	1.050	0.871	0.870	0.814

¹⁾ Whole milk

²⁾ Cream layer

³⁾ Skimmed milk layer

⁴⁾ Mean of three determination

時間静置して得たクリーム部と脱脂乳部の乳清区分のディスク電気泳動パターンを示したもので、乳房炎乳、初乳でもクリーム部グロブリン分画の吸光度が全乳、脱脂乳部に比較して増大している。その相対濃度（面積百分率）はM-2の場合、クリーム部41.53%、全乳36.43%、脱脂乳部35.24%、そしてC-2の場合はクリーム部50.23%、全乳46.08%、脱脂乳部45.14%となりクリーム部のグロブリン分画が増加したことを示した。Table 2は今回供試した正常乳、乳房炎乳および初乳の各々3試料における各乳清蛋白質分画についての平均相対濃度を示したもので、各乳清蛋白質の相対濃度は供試牛の個体差、特に初乳については分娩後の搾乳回数、乳房炎乳については臨床性、潜在性といった乳房炎の種別などの要因によって左右されるため変動は大きかったが、クリーム部のグロブリン分画の相対濃度は平均値でも増加が認められた。

このように乳房炎乳と初乳においても、生乳を静置して得たクリーム部でグロブリンが増加し、グロブリンが脂肪球を凝集して脂肪球の浮上を促進したことが示唆された。

そこで、グロブリン含量が正常乳よりも多いこれらの乳房炎乳と初乳において、そのクリーミングが特異的な様相をもつかどうか問題となるが、クリーム層が確認されるまでの所要時間、クリーム層の厚みなど肉眼的には差異は認められなかった。乳中のグロブリン含量とクリーミングの状態に着目して検討してみると、Fig. 3に示したようにグロブリン含量が多い乳房炎乳、初乳でクリーム部へのグロブリンの移行率が高いというわけではなく、クリーム部へ移行した脂肪量も Fig. 4に示したように乳房炎乳、初乳で多くなるという傾向がない。また乳房炎乳、初乳においてクリーム部の重量が多い、つまりクリーム形成量が増える状況も認められなかった (Fig. 5)。更に電気泳動の結果でもクリーム部と全乳におけるグロブリンの相対濃度比は、正常乳、乳房炎乳および初乳で大きな差異がないことが認められた (Table 2)。したがって、クリーミングへのグロブリンの寄与は全乳のグロブリン含量が多ければ多い程、クリーミングが促進されるといったものではなく、ローランド法でグロブリン態窒素として定量されるグロブリンのある特定区分が特異的に関与するのではないかという前報 [4]での推察が一層強まった。

しかし、個々の試料についてクリーム部のグロブリン分画の泳動パターンを実線で、点線でもとの全乳のグロブリン分画の泳動パターンを描き両者を重ね合わせてみると (Fig. 6)、N-2ではb, cの部分が、そして乳房炎乳であるM-1ではa, b, cのすべての部分、また同じ

く乳房炎乳であるM-2ではa, bの部分が全乳に比べて増加する様相を示した。この事実はクリーム部で増加するグロブリンが必ずしも特定のグロブリン分画の増加によるものではないことを示唆した。

今回得られた結果を中心にクリーミングについて考察

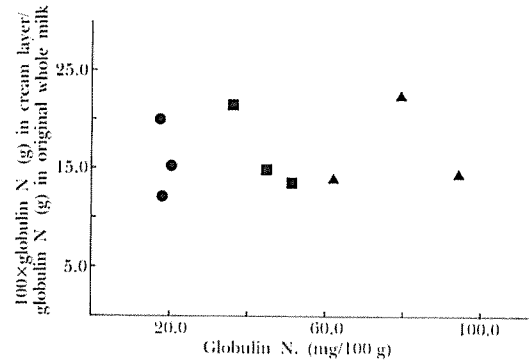


Fig. 3 Relation between globulin N content of original whole milk and the ratio of globulin N transferred from whole milk to cream layer in three kinds of milk.

● : Normal milk ■ : Mastitic milk
▲ : Colostrum

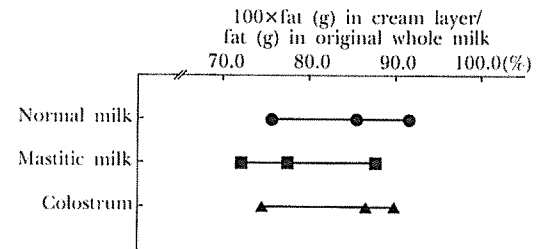


Fig. 4 The ratio of fat moved from whole milk into cream layer after standing of normal milk, mastitic milk and colostrum for 17 hours at 5°C.

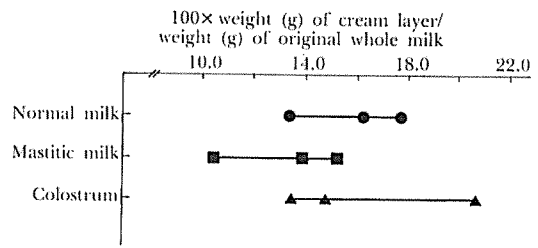


Fig. 5 The ratio of weight of cream layer to original whole milk after standing normal milk, mastitic milk and colostrum for 17 hours at 5°C.

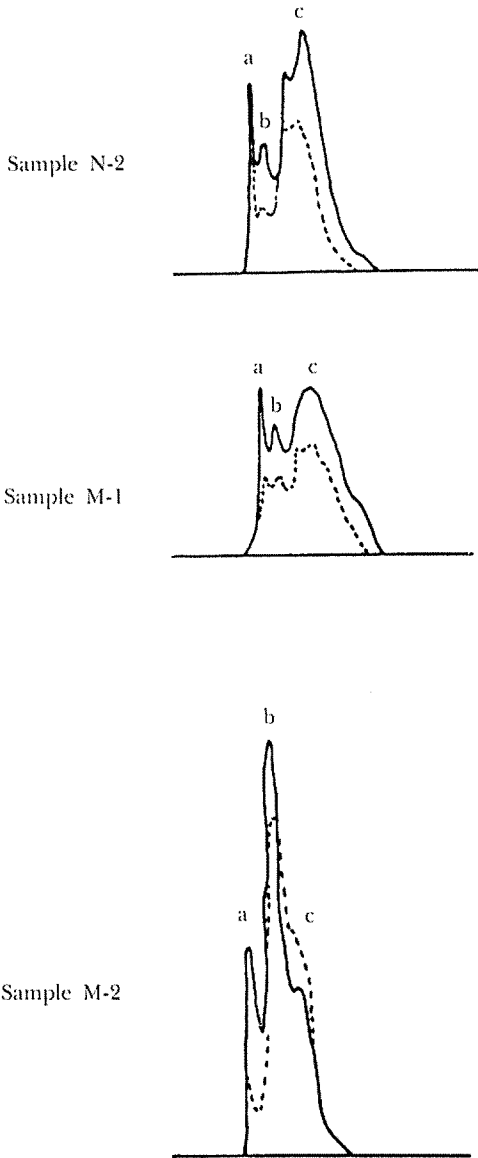


Fig. 6 Electrophoretic patterns of globulin fraction prepared from whole milk (.....), and from cream layer (—) separated by standing normal or mastitic milk for 17 hours at 5°C.
 N-1 : Normal milk
 M-1 and M-2 : Mastitic milk

してみると、乳中のグロブリン含量が多い程、クリーミングが促進される事実は見いだされなかったことと、生乳を静置した際、クリーム部で増加するグロブリン分画構成成分は必ずしも特定ではなかった事実の二つの結果より、クリーミングにはグロブリン以外の物質も関与しているとみるのが妥当であろう。言い換えればグロブリンの脂肪球凝集を助長する成分が存在するのではないか

と思われる。

また、クリーミングに関与するグロブリンとして、低温下でクリーミングが著しく促進されるため [2, 23, 24] クライオグロブリン様の性質を示すグロブリン [25~28]、しかも五量体であるため他のグロブリンに比較して細菌の凝集能が大きいという島崎ら [29] および Payens [30] の報告を併せ考えて IgM に着目してきたが、生乳を静置した際にクリーム部で増加するグロブリン分画構成成分は試料により差異があるという今回の実験結果、更に IgM だけではなく時として IgG, IgA もクライオグロブリン様の性質を示すという Brouet ら [27] の報告より検討してみると、脂肪球を凝集する能力には差異があるものの数種類のグロブリンが生乳を静置した際に起こるクリーミング現象に関与可能ではないかと考えられる。

更にグロブリンによる脂肪球凝集について生乳を遠心分離してクリーム部と脱脂乳部に分別し、分別したクリーム部のみ 80°C 15 分加熱し冷却後、分別した脱脂乳部に分散させ冷蔵静置した場合、未処理の生乳を静置させた場合と同様なクリーミングが確認される。したがってグロブリンによる脂肪球凝集が抗原抗体反応を介して起こるものであれば、その抗原は耐熱性の物質である可能性が十分考えられ、脂肪球皮膜上の糖類ではないかと推察される。このような観点から、更にクリーミングへのグロブリンの関与状況、クリーミングへのグロブリンの関与を助長する物質の検索、更に脂肪球皮膜上の受容体の研究が求められる。

要 約

牛乳のクリーミングに関する研究の一環として、クリーミングへのグロブリン関与の状況について把握することを目的として、正常乳に比較してグロブリン含量が多い乳房炎乳と初乳におけるクリーミングについて Rowland 法、ゲル濾過法そしてディスク電気泳動法で検討した。実験結果を要約すれば次の通りである。

(1) 乳中のグロブリン含量とクリーミングの状態の関係は、グロブリン含量が多ければ多い程、クリーミングが促進されるというような比例的な関係ではない。

(2) 生乳を静止した際、クリーム部で特に増加するグロブリン分画構成成分 (ディスク電気泳動法) は一様ではない。

(3) これらの事実よりクリーミングへのグロブリンの関与を助長する物質の存在が推察された。

謝 辞

本研究は昭和61年度日本大学学術研究助成金 (奨励) によるものであり謝意を表する。なお本報告の一部は第

79回日本畜産学会(昭和62年4月1日, 岐阜)において講演したものである。

文 献

- 1 増田哲也, 小山 進 1982: クリーミングに関する研究-I. 日大農獣報, 39, 147-155.
- 2 増田哲也, 小山 進 1983: クリーミングに関する研究-II. 日大農獣報, 40, 50-57.
- 3 増田哲也, 小山 進 1983: クリーミングに関する研究-III. 牛乳の温度とクリーミングの関係, 日大農獣報, 40, 58-64.
- 4 増田哲也, 鈴木和威 1986: クリーミングに関する研究-VI. グロブリンの挙動とクリーム層形成の関連性について, 日大農獣報, 43, 79-83.
- 5 S. J. Rowland 1938: The determination of nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Sci.*, 9, 42-46.
- 6 J. Porath and P. Flodin 1959: Gel filtration: Method for desalting and group separation. *Nature*, 183, 1657-1659.
- 7 S. Raymond and L. S. Weintraub 1959: Acrylamide gel, a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130, 711-714.
- 8 増田哲也, 鈴木和威 1987: クリーミングに関する研究-VII. クリーム層及び脱脂乳層乳清蛋白質のディスク電気泳動法による解析, 日大農獣報, 44, 58-67.
- 9 B. J. Davis 1964: Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321-325.
- 10 阿部恒夫, 中野好志 1972: 牛乳中の血清アルブミンおよび免疫グロブリンGの免疫学的定量, 日畜会報, 43, 493-498.
- 11 T. Nagasawa and A. Tanahashi 1963: Electrophoretic studies on proteins in the milk of cows with mastitis. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 33, 461-469.
- 12 有馬俊六郎, 斎藤善一, 中川雅郎, 遊佐孝五 1958: いわゆる Subclinical Mastitis の乳成分について, 日畜会報, 28, 358-361.
- 13 E. J. Carroll 1961: Whey proteins of drying-off secretions, mastitic milk, and colostrum separated by ion-exchange cellulose. *J. Dairy Sci.*, 44, 2194-2211.
- 14 大島正尚, 浦立孝一 1958: 分房乳の Na, Cl 濃度の増加に伴う牛乳中の血清アルブミンおよび免疫グロブリン濃度の変化について, 日畜会報, 46, 81-89.
- 15 伊藤敏敏 1965: 異常乳に関する最近の研究, 酪農科学の研究, 14, A-235-A-2 44.
- 16 津野友吉, 山内邦男 1975: 乳の化学 (地球社, 東京), 146-150.
- 17 祐川金次郎 1979: 牛乳のホエー蛋白質について, 酪農科学・食品の研究, 28, A-13-A-21.
- 18 E. L. Smith 1948: The isolation and properties of the immune proteins of bovine milk and colostrum and their role in immunity: A review. *J. Dairy Sci.*, 31, 127-138.
- 19 J. R. Duncan, B. N. Wilkie, F. Hiestand and A. J. Winter 1972: The serum and secretory immunoglobulins of cattle: Characterization and quantitation. *J. Immunol.*, 108, 965-976.
- 20 J. E. Butler and C. F. Maxwell 1972: Preparation of bovine immunoglobulins and free secretory component and their specific antisera. *J. Dairy Sci.*, 106, 552-563.
- 21 J. P. Mach and J. J. Pahud 1971: Secretory IgA, a major immunoglobulins in most bovine external secretions. *J. Immunol.*, 106, 552-563.
- 22 E. L. Smith 1946: Isolation and properties of immune lactoglobulins from bovine whey. *J. Biol. Chem.*, 165, 665-676.
- 23 S. Orla-Jensen 1929: A new investigation concerning the low temperature pasteurization of milk and a reaction for controlling the pasteurizing temperature. *Proc. World's Dairy Congress*, 107-123.
- 24 P. F. Sharp and V. N. Krukovsky 1939: Differences in adsorption of solid and liquid fat globules as influencing the surface tension and creaming of milk. *J. Dairy Sci.*, 22, 743-751.
- 25 T. A. J. Payens 1968: Recent research on milk proteins. *Milchwissenschaft*, 23, 325-330.
- 26 T. A. J. Payens and P. Both 1970: Cryoglobulins from milk and a mechanism for the cold agglutination of milk fat globules. *Immunochemistry*, 7, 869.
- 27 J. C. Brouet, J. P. Clauvel, F. Danon, M. Klein and M. Seligmann 1974: Biologic and clinical significance of cryoglobulins. *Am. J. Med.*, 57, 775-778.
- 28 J. Stadhouders and G. Hup 1970: Complexity and specificity of euglobulin in relation to inhibition of bacteria and to cream rising. *Neth. Milk & Dairy J.*, 24, 79-95.
- 29 島崎敬一, 青山英俊, 祐川金次郎 1981: 乳房炎乳中の各免疫グロブリンのブドウ球菌に対する凝集能の比較, 日畜会報, 52, 368-375.
- 30 T. A. J. Payens, J. Knoops and M. F. K. Mogot 1965: Adsorption of euglobulin on agglutinating milk fat globules. *Biochim. Biophys. Acta.*, 94, 576-578.