

各種溶液中で保存された牛乳 κ -カゼインの変化

金森 正雄・田中 満智子・土井 裕司

MASAO KANAMORI, MACHIKO TANAKA and HIROSHI DOI

Changes of Bovine κ -Casein Stored in Various Solutions

要旨 UHT 滅菌乳の変質改良のための基礎データの蓄積,あるいは,乳たん白質の保存特性の解明を目的として,14種類の水溶液中に牛乳 κ -カゼインを保存し,保存による κ -カゼインの諸性質の変化を検討した。即ち,10% glucose 水溶液,10% lactose 水溶液,10% maltose 水溶液,10% sucrose 水溶液,2% NaCl 水溶液,2% glycine 水溶液,蒸留水,10% glucose-4.5 M urea,10% lactose-4.5 M urea,10% maltose-4.5 M urea,10% sucrose-4.5 M urea,2% NaCl-4.5 M urea,2% glycine-4.5 M urea,4.5 M urea の各溶液に, κ -カゼインを0.25% (w/v) となるように溶解し,それらを5°C で保存した。 κ -カゼインの保存状態を, α_{s1} -カゼイン安定化能,4.5 M 尿素を含むディスクゲル電気泳動,セファアクリル S-300 ゲルろ過クロマトグラフィー,フリーアミノ基およびスルフヒドリル基の定量によって検討した。

α_{s1} -カゼイン安定化能は,経時的に低下した。10% maltose 水溶液中,6ヶ月保存では70.2%の安定化能を示したが,sucrose 溶液中では沈殿が生じた。ゲル電気泳動では, κ -カゼインの分解と高分子化が同時進行していることが示唆された。一方,ゲルろ過クロマトグラフィーでは,尿素を含まない保存液の場合は,ほとんど変化は観察されず,尿素存在下保存の場合は, self-association 能の低下が観察された。 κ -カゼインの分解や高分子化は,フリーアミノ基およびスルフヒドリル基の定量から,交互に進行し,アミノカルボニル反応やジスルフィド結合によるものと考えられた。

結 言

牛乳は,たん白質,脂肪,糖をほぼ均等に含み,しかも,各種ビタミン,ミネラル等も適度に含んでいる極めて栄養価値の高い食品であり,古くからチーズ・バター等に加工され,人類の食生活と深い関わりを持っている食品素材でもある。

近年には,滅菌技術の発達¹⁾による UHT (ultra high temperature) 滅菌乳の出現,ソフトヨーグルト等の嗜好性の強い食品の製品化など,牛乳の利用および乳製品の開発が活発に進められている。そうした中での新しい乳製品の開発には,滅菌技術の発展による保存性の向上ばかりではなく,牛乳中に含まれている個々の成分の特性に関する研究に加えて更に,牛乳成分間相互作用という観点からの研究,考察が必要であ

ると考えられる。しかしながら,そのような観点からの研究は極めて少ないのが現状であり,乳の本質を解明するに到っていない。

UHT 滅菌乳の出現は,牛乳の長期保存を可能にしたものの,一方で,貯蔵期間中の沈殿生成やゲル化という新たな問題を引き起こしてきている。UHT 滅菌乳は,レンネットによる凝固性が低下し,カードを形成しないか,しても軟弱でくずれやすいことが知られている²⁾。また,UHT 処理により,乳清たん白質の一部が変性し,特に, β -ラクトグロブリンの熱変性によってスルフヒドリル基が活性化し,硫化水素臭(いわゆるクックドフレーバー=加熱臭)を生ずる³⁾。前者は,カゼイン,特に, κ -カゼインの変化によるところが大きいと考えられる。即ち,UHT 滅菌乳の保存による沈殿生成やゲル化に関しては,たん白質の変化

京都府立大学農学部栄養化学研究室

Laboratory of Nutritional and Food Chemistry, Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University

昭和56年7月11日受理

によるところが大きいと考えられる。牛乳たん白質のうち、 κ -カゼインは、カゼインミセルを安定化させるという重要な役割を果している³⁾ばかりでなく、乳清たん白質とも相互作用を有しており^{4,5)}、これらの性質のため、牛乳の保存や加工にとって最も重要なたん白質である。その観点から、著者らは先に、各種保存条件下での牛乳 κ -カゼインの変化を検討し、長期保存によって κ -カゼインの高分子化や分解が進んでいくことを明らかにした⁶⁾。

著者らは、牛乳たん白質の食品たん白質としての重要性に着目し、特に κ -カゼインに関する基礎的研究を遂行し、報告してきている^{7~14)}。本研究は、牛乳保存上の問題点解決のため、また、新しい乳製品開発のための基礎研究としての牛乳成分間相互作用、特にたん白質間相互作用（例えば、 κ -カゼインと β -ラクトグロブリン）に関する研究への端緒として、たん白質成分中、特に κ -カゼインについて、各種の溶液中における保存性を、 α_{s1} -カゼイン安定化能、ディスクゲル電気泳動、ゲルろ過クロマトグラフィーをメルクマールとして検討し、更に、アミノ基とスルフヒドリル基の経時的变化を測定したものである。

材料および方法

1. カゼインの調製

京都市内某牧場のホルスタイン種乳牛の新鮮な個乳より常法によって得られた酸カゼインから、Zittle and Custer の方法¹⁵⁾に従って α_{s1} -カゼインを、また、尿素硫酸法を一部改良した土井らの方法⁷⁾によって κ -カゼインを調製した。 κ -カゼインは、pH 7.0 の蒸留水に対し透析後、更に、0.1% 2-メルカプトエタノールに透析して還元した後、凍結乾燥された。

2. κ -カゼインの α_{s1} -カゼイン安定化能

κ -カゼインの最も重要な性質であるミセル安定化能は、20 mM カルシウムイオン共存下で、 α_{s1} -カゼイン安定化能として、千葉らの方法¹⁶⁾に従って測定された。

3. ゲル電気泳動

4.5 M 尿素を含むディスクゲル電気泳動および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、いずれも前報⁶⁾と同様、Davis の方法¹⁷⁾および Weber and Osborn の方法¹⁸⁾に従って行なわれた。

4. ゲルろ過クロマトグラフィー

各種保存液中で保存された κ -カゼインの、セファラクリル S-300 ゲルろ過クロマトグラフィーを行ない、 κ -カゼインの会合状態および分解過程の検討を行な

た。カラムの大きさは、 2.0×100 cm、流速は、18 ml/hr、分画体積 3.2 ml であった。試料 5 mg/2 ml をアプライシ、10 mM イミダゾール-70 mM KCl 緩衝液 pH 7.1 で溶出した。前記、ディスクゲル電気泳動では、4.5 M 尿素中での挙動を検討しているの、ここでは尿素無添加で実験を行なった。

5. アミノ基の定量

κ -カゼインの分解または高分子化、更には、アミノカルボニル反応などの進行状況に対する知見を得るため、保存された κ -カゼインのアミノ基含量を定量した。方法としては、奥山らのトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を用いた定量法¹⁹⁾が採用された。

6. スルフヒドリル基の定量

スルフヒドリル基の酸化還元状態のたん白質の諸性質に与える影響は大きく、 κ -カゼインにおいても、ミセル安定化能や self-association 能が大きく左右されるものと考えられる。本実験において、スルフヒドリル基は、5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) を用いた Schramm の方法²⁰⁾に従って行なわれた。

7. κ -カゼインの保存

前報⁶⁾では、 κ -カゼインを凍結乾燥標品として、低温で保存することが望ましいという結果を得ているが、この条件は、実際面での応用には不相当である。従って、本研究では、溶液状態での保存とし、添加物を種々選ぶことによって保存状態の良好化をはかった。添加物としては、食品に応用できるものを選択し、glucose, lactose, maltose, sucrose, NaCl, glycine を採りあげ、対照として無添加のもの、および、 κ -カゼインの会合阻止剤として、各々に尿素を添加し、比較検討した。即ち、 κ -カゼインを 0.25% となるように、10% glucose 水溶液、10% lactose 水溶液、10% maltose 水溶液、2% NaCl 水溶液、2% glycine 水溶液および蒸留水に溶解し、更に、これら水溶液に尿素を 4.5 M となるように添加したものを準備した。保存温度は、5°C であった。各種実験に際しての溶質の除去は、透析によって行なわれた。

実験結果

1. κ -カゼインの α_{s1} -カゼイン安定化能

各種の保存液中に溶解されていた κ -カゼインの、 α_{s1} -カゼインに対する安定化能を、37°C、20 mM カルシウムイオン共存下で検討した。結果は、Table 1 に示されている。 κ -カゼインの安定化能は、いずれの保存液であっても、保存期間の経過に従って低下した。また、保存液による差異の大きいことも認められた。

Table 1. Stabilizing Ability of κ -Casein Stored in Various Solutions at 5°C. (%)

symbol	solution	period (month)					
		1	2	3	4	5	6
A	10% glucose	78.7	44.4	45.5	44.9	45.2	40.7
B	10% lactose	76.9	58.0	58.4	59.3	58.3	53.9
C	10% maltose	93.0	92.1	87.4	77.9	71.3	70.2
D	10% sucrose	79.1	33.3	33.5	33.9	12.6	—
E	2% NaCl	88.6	87.4	78.7	48.2	48.7	48.3
F	2% glycine	83.1	78.8	76.7	59.0	59.5	55.6
G	distilled water	87.1	75.6	66.5	57.0	57.3	58.9
A'	10% glucose-4.5 M urea	82.1	49.1	47.9	39.7	34.3	32.8
B'	10% lactose-4.5 M urea	75.3	50.0	47.3	47.6	45.4	39.1
C'	10% maltose-4.5 M urea	92.8	68.2	64.4	57.2	53.0	53.6
D'	10% sucrose-4.5 M urea	87.3	66.8	47.8	44.2	42.5	39.7
E'	2% NaCl-4.5 M urea	77.5	42.3	36.6	37.0	33.2	30.7
F'	2% glycine-4.5 M urea	76.1	58.8	56.8	53.5	47.6	40.6
G'	4.5 M urea	88.6	74.9	64.8	58.8	56.0	53.0

Native κ -casein had 95.1% of the stabilizing ability.

κ -カゼインを 10% maltose 溶液中で保存した場合は、保存開始後 6 ヶ月経過しても 70.2% という高い値を示し、4.5 M urea-10% maltose 溶液では、53.6% の安定化能を保持した。10% sucrose 溶液保存の場合、5 ヶ月で 12.6%、6 ヶ月では沈殿が生成しており、安定化能は完全に失われていた。しかし、4.5 M urea-10% sucrose 溶液中保存では、5 ヶ月で 42.5%、6 ヶ月で 39.7% の安定化能が認められた。

安定化能という観点からみた場合、最も保存状態が良かったのは、10% maltose 溶液中での保存であり、

最も悪かったのは、10% sucrose 溶液中保存であった。

2. ゲル電気泳動

保存開始前の native な κ -カゼインのディスクゲル電気泳動パターンは、本研究に用いられた κ -カゼインが、電気泳動的に十分均一性の高い標品であった事を示していた (Fig. 1)。

14 種類の保存液 A~G, A'~G' に溶解し、5°C で保存した κ -カゼインの保存開始後 3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月後のディスクゲル電気泳動パターンを Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

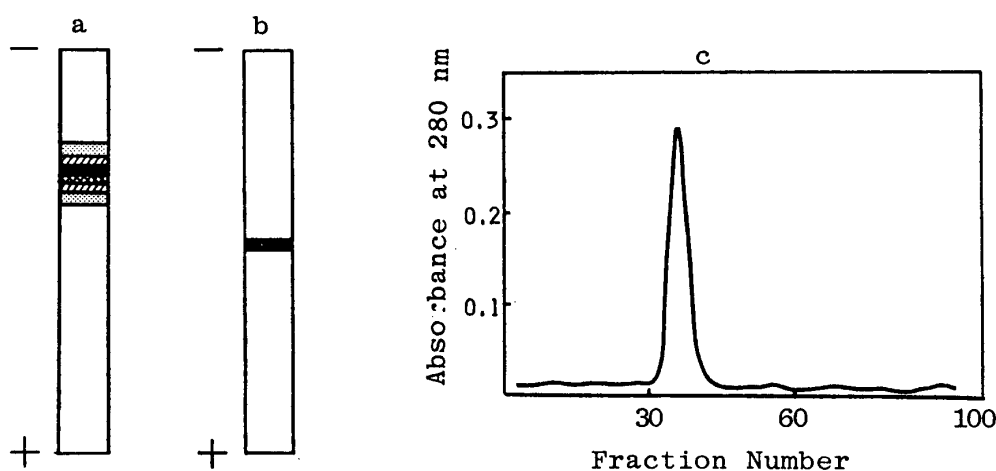


Fig. 1. Behaviors of Native κ -Casein.

- a: disc gel electrophoresis containig 4.5 M urea
- b: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
- c: Sephacryl S-300 gel filtration chromatography

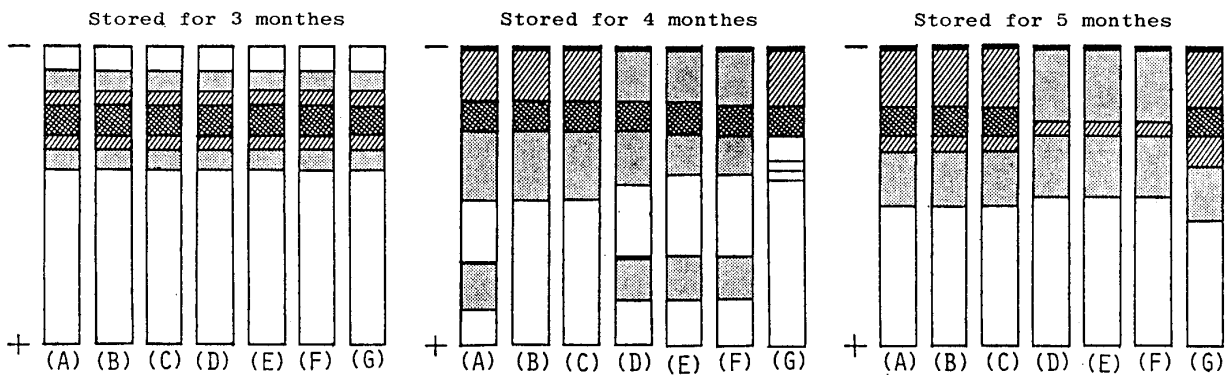


Fig. 2. Disc Gel Electrophoretograms of κ -Casein Stored in Various Solutions at 5°C.

κ -カゼインを溶液中で保存することによって、ディスクゲル電気泳動上での挙動は、バンドが広がっていくことが示された。このことは、尿素を含まない保存液に κ -カゼインを溶解した場合の方が、4.5 M 尿素を含む保存液に溶解した場合よりも顕著であった。 κ -カゼインの保存による泳動パターンの広がりや、時間の経過につれて大きくなり、4ヶ月、5ヶ月となる程著しかった。A, D, E, F の保存液では、4ヶ月後に、易動度の大きい物質の生成が認められ、A, B, C, G では易動度の小さい生成物が存在していた。また、尿素を含まない保存液中の κ -カゼインは、濃縮用ゲルの上部に濃いバンドを示した。この事は、時間経過とともに著しく、4~5ヶ月後には、更に、分離用ゲル上部にも濃いバンドが確認された。

一方、尿素を含む溶液中で κ -カゼインを保存した場合は、ディスクゲル電気泳動上では、native な κ -カゼインと大差ない挙動を示し、わずかに5ヶ月間保存した試料の場合に、ゲル上部に若干濃いバンドが出現したにすぎなかった。

ここでの結果から、尿素を含まない溶液中での κ -カゼインの保存によって、 κ -カゼインが、分解していく過程と高分子化していく過程とが併行していることが

推定され、尿素を含む溶液中での保存では、きわだった変化が認められなかった。このことは、尿素が水素結合を開裂させることによって、 κ -カゼイン間の self-association を妨げたり、 κ -カゼインと溶質との相互作用を小さくしたためと考えられる。

また、Table 1 に示されているように、長期間の保存によって κ -カゼインのミセル安定化能は低下していったが、その事実と κ -カゼインのディスクゲル電気泳動上での挙動の変化との間の相関は見い出されなかった。

3. セファアクリル S-300 ゲルろ過クロマトグラフィー

κ -カゼインの保存による変化として、巨視的にミセル安定化能の測定とゲル電気泳動を行ない、その相関を検討したが、更に、5ヶ月、6ヶ月間保存後の κ -カゼインのセファアクリル S-300 ゲルろ過クロマトグラフィーをも検討した (Figs. 4 and 5)。

κ -カゼインを保存するのに 4.5 M 尿素を共存させなかった保存液 A~G では、5カ月および6ヶ月間保存ともいずれも、native な κ -カゼインとほぼ同じ溶出体積でピークを示し、どの保存液の場合であってもピークとしては、その1つだけしか観察されなかった。しかし、ピークの高さは、native な κ -カゼインの時よ

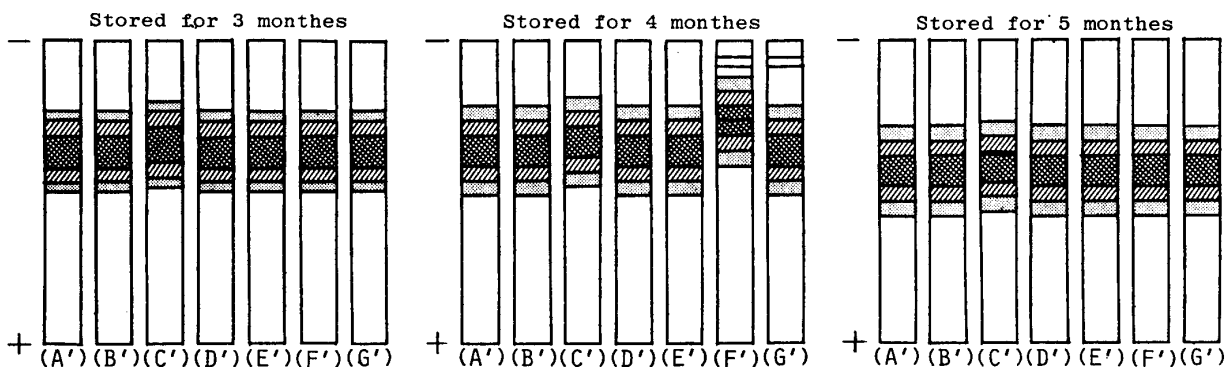


Fig. 3. Disc Gel Electrophoretograms of κ -Casein Stored in Various Solutions Containing 4.5 M Urea at 5°C.

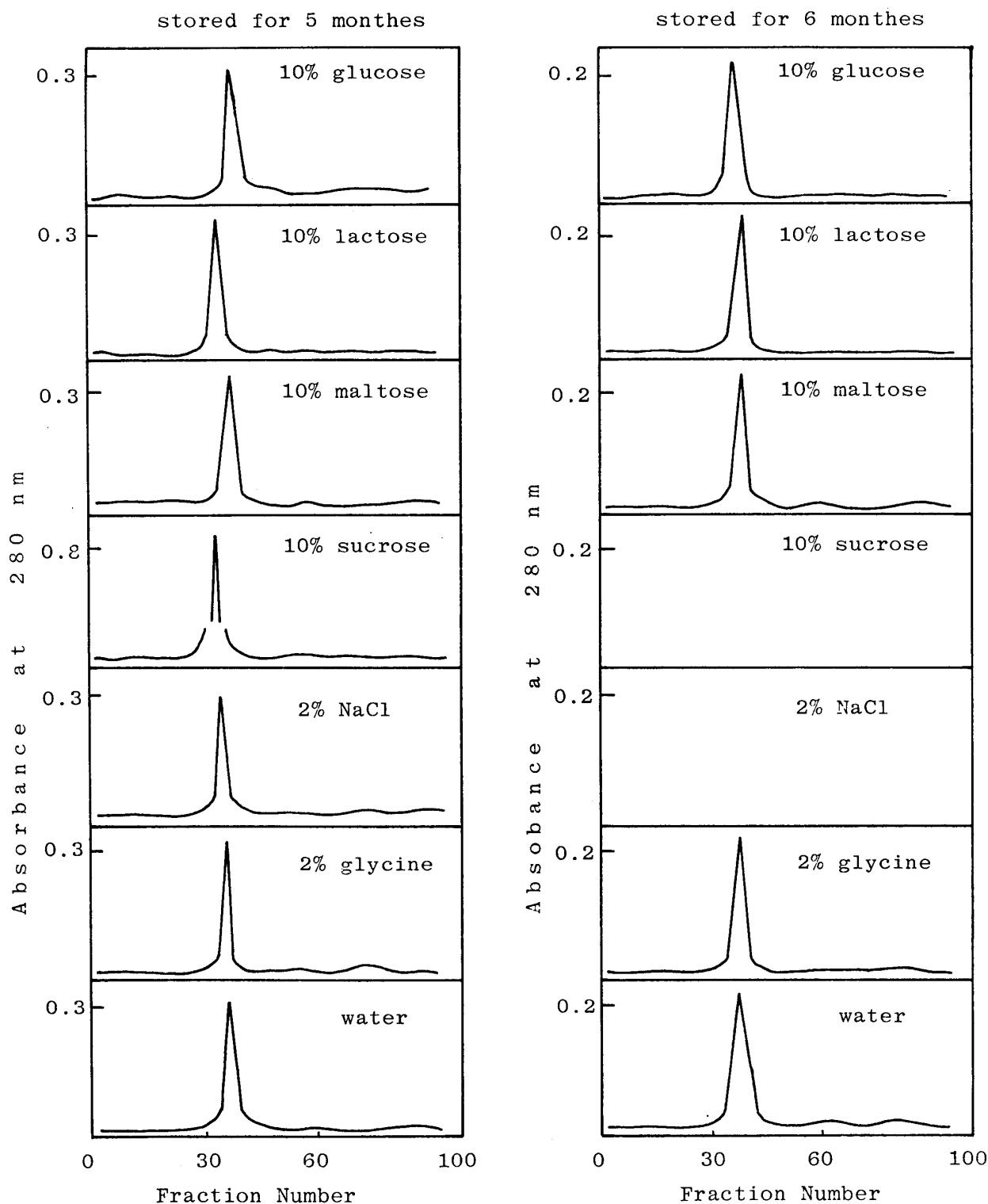


Fig. 4. Sephacryl S-300 Gel Filtration Patterns of κ -Casein Stored in Various Solutions at 5°C.

りもわずかに減少しており、形もいくぶんブロードになっていた。このことは、時間の経過とともに、self-association 能が弱くなってきていることを示しているものと考えられる。

10% sucrose 水溶液D中保存では、5ヶ月後で非常に鋭いピークを示したが、これは、試料が白濁していたためであり、更に同一試料は、6ヶ月後には沈殿を

形成していた。従って、6ヶ月後のクロマトグラムは得られなかった。試料が沈殿したのは、sucrose 水溶液中保存の場合だけであった。

κ -カゼインを保存するのに4.5M 尿素を共存させた保存液A'~F'では、5ヶ月および6ヶ月後のいずれの場合にも、第1のピークと、ややそれより大きい第2のピークの少なくとも2つのピークを示した。第1

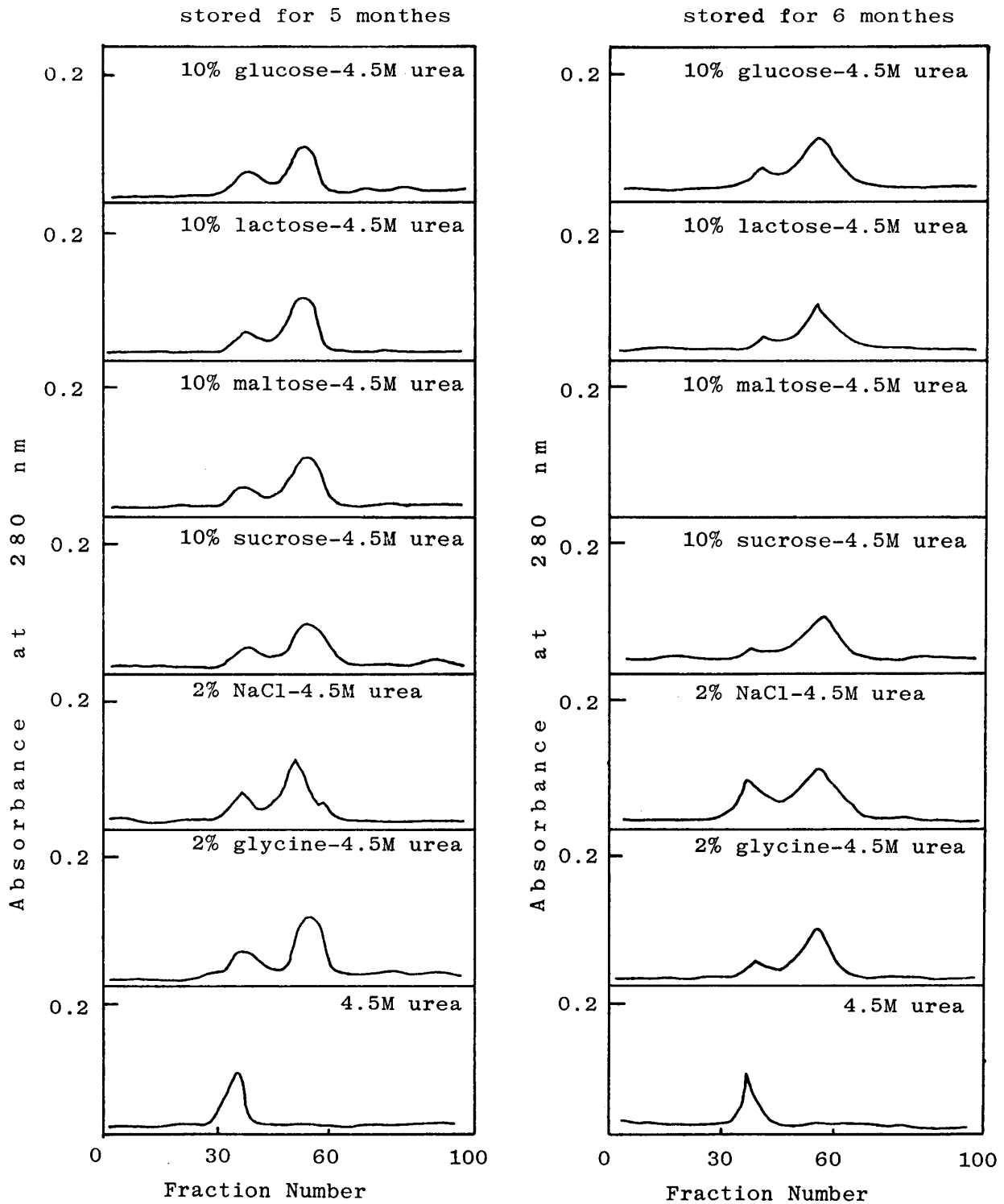


Fig. 5. Sephacryl S-300 Gel Filtration Patterns of κ -Casein Stored in Various Solutions Containing 4.5 M Urea at 5°C.

のピークの溶出位置は、nativeな κ -カゼインの溶出位置とほぼ一致した。第2のピークは、 κ -カゼインのself-association能の低下、または、分解、低分子化によるものと考えられる。

しかし一方、 κ -カゼインを保存するのに、4.5 M 尿素溶液を用いた場合は、6ヶ月後であっても、第1の

ピークと同じ溶出位置に、低いピークを1つだけ示したにすぎなかった。

尿素共存下で保存した κ -カゼインの場合、ゲルろ過クロマトグラフィー上での面積から考慮して、回収率が低下していることが考えられる。この原因の1つとして、 κ -カゼインの分解、低分子化によって、保存液

Table 2. Number of Amino Group in κ -Casein Stored in Various Solutions at 5°C (residues/mole)

symbol	period (month)					
	1	2	3	4	5	6
A	8.7	14.3	18.3	13.9	9.8	10.0
B	9.1	15.3	18.4	14.2	10.5	10.9
C	9.0	15.3	13.8	14.0	10.3	9.1
D	6.9	14.8	12.5	12.4	—	—
E	6.6	13.4	12.2	13.4	10.7	11.0
F	6.2	14.7	12.3	14.8	10.9	10.3
G	6.9	14.8	16.1	19.7	11.5	10.2
A'	6.3	12.5	17.8	14.6	8.6	8.8
B'	3.5	12.7	16.7	18.4	9.5	5.8
C'	6.3	14.0	17.3	13.6	9.7	8.4
D'	4.5	14.3	15.4	13.5	10.5	7.7
E'	6.3	13.6	20.8	13.1	9.5	9.0
F'	7.2	15.0	13.6	14.7	10.7	9.4
G'	8.7	13.3	19.3	12.8	11.0	7.3

Native κ -casein had 8.43 residues of amino group.

中の溶質除去のための透析操作の際に、分解した κ -カゼイン成分の損失が考えられる。

一方、尿素非存在下での保存では、ディスクゲル電気泳動でも認められたように、高分子化が顕著であったため、透析による損失はいくぶん少なかったものと思われる。

4. アミノ基量の変動

κ -カゼインを溶液中で保存すると、分解と高分子化とが同時進行することが、ゲル電気泳動とゲルクロマトグラフィーによって示唆された。従って、分解によるアミノ基の増加と高分子化による減少等を把握するため、TNBSを用いてアミノ基量の経時変化を検討した (Table 2)。

ABC G' 以外の保存液で κ -カゼインを保存した場合には、最初の1カ月後の時点で、保存開始時点よりも小さな分析値を示した。この時点では、高分子化はあまり起こっていないものと考えられるので、アミノ基の減少は、アミノカルボニル反応によるものと思われる。保存開始後1ヶ月から2ヶ月にかけては、いずれの場合にも、アミノ基量の増加が認められ、ペプチド結合の切断が示唆されている。従って、1ヶ月後には、initial と同じアミノ基量を示した ABC G' による保存の場合には、アミノカルボニル反応によるアミノ基の減少は、もっと早く起こっており、しかも、分解が他の保存液で起こるよりも、更に早い速度で進行していたものと考えられる。

定量可能なアミノ基は、2~4ヶ月で最大に達した。

即ち、尿素を含まない CDE での保存の場合は2ヶ月、AB は3ヶ月、G は4ヶ月であり、尿素を共存した保存液での場合、多くが3ヶ月で、アミノ基量は最大に達した。

5ヶ月、6ヶ月と保存期間が長くなると、アミノ基の量は、いずれも前月よりも減少してくる。このことは、他の反応も当然起こっているのであろうが、たん白質の重合、高分子化が顕著になってきたため、アミノ基が定量され得なかったためと考えられる。

ABC G' は、他の保存液での場合よりも、早い速度で分解が進行しているらしいことは、ゲル電気泳動でゲル上部に濃い部分が出現していることから、また、長期保存で高分子化の進行も、ゲル電気泳動の結果から、推察されている。

即ち、溶液中での保存によって、 κ -カゼインは、まず、アミノカルボニル反応によってアミノ基を減少させ、次いで2~4ヶ月頃まで分解反応が進行し、その後、高分子化していくものと思われる。

5. スルフヒドリル基量の変動

スルフヒドリル基は、たん白質中では、最も反応性の高い感応基の1つである。 κ -カゼインのスルフヒドリル基は、酸化されやすく、 κ -カゼインの重合化を引き起こすことが多い。ここでは、スルフヒドリル基を定量することによって、経時的に-S-S結合の形成を検討することを試みた (Table 3)。

native な κ -カゼインは、その一次構造上2分子のシステインを含んでいる。

Table 3. Number of Sulfhydryl Group in κ -Casein Stored in Various Solutions at 5°C (residue/mole)

symbol	period (month)					
	1	2	3	4	5	6
A	0.24	0.12	0.08	0.05	0.03	0.03
B	0.26	0.11	0.10	0.03	0.02	0.02
C	0.19	0.07	0.06	0.05	0.04	0.04
D	0.18	0.09	0.07	0.04	0.03	—
E	0.54	0.09	0.07	0.03	0.03	0.02
F	0.99	0.07	0.05	0.03	0.03	0.02
G	0.84	0.07	0.05	0.02	0.02	0.02
A'	0.30	0.05	0.04	0.05	0.03	0.02
B'	0.33	0.07	0.07	0.05	0.02	0.02
C'	0.18	0.08	0.06	0.04	0.03	0.02
D'	0.15	0.07	0.06	0.03	0.03	0.03
E'	0.39	0.07	0.06	0.04	0.03	0.02
F'	0.51	0.06	0.05	0.03	0.03	0.03
G'	0.45	0.04	0.04	0.03	0.02	0.02

Native κ -casein had 1.59 residues of sulfhydryl group.

保存開始後、1ヶ月から6ヶ月まで、スルフヒドリル基含量は、順次減少していった。このことは、保存液の種類にかかわらず、全て同じ傾向を示した。即ち、スルフヒドリル基は、保存中、順次酸化され、ジスルフィド結合を形成したものと考えられる。

尿素の存否にかかわらず、糖溶液中で保存された κ -カゼインのスルフヒドリル基の減少速度は、他に比べて早かった。また、保存開始後1ヶ月で、ほとんどのスルフヒドリル基が酸化されており、ゲル電気泳動上で早い時期に濃縮用ゲル上部に濃いバンドが観察されたことと合わせ考えると、スルフヒドリル基の酸化は、高分子化の一因にちがいない。

一方、ミセル安定化能は、保存によって徐々に低下し、スルフヒドリル基は急激に減少したことから、両者の相関は、必ずしもはっきりとしたものではないと言える。

考 察

UHT 滅菌乳の変質改良のための基礎データの蓄積あるいは、乳たん白質の保存特性の解明を目的として、glucose, lactose, maltose, sucrose, NaCl, glycine および尿素の各水溶液中に牛乳 κ -カゼインを保存し、保存による κ -カゼインの諸性質の変化を検討し、あわせて前報⁶⁾の結果を確認した。

UHT 滅菌乳の場合、保存によって β -カゼインが分解したり²²⁾、遊離アミノ酸類の増加すること²³⁾が報告

されており、アミノカルボニル反応による高分子化²⁴⁾も示唆されている。また、加糖練乳貯蔵中には、ジスルフィド結合による高分子化が観察されている²⁵⁾。

本研究において κ -カゼインのミセル安定化能を経時的に検討した結果、14種のいずれの溶液に保存された κ -カゼイン全てが、保存期間の経過とともに、ミセル安定化能を失なっていた (Table 1)。保存液としては、10% maltose 水溶液が高いミセル安定化能を保持させた反面、10% sucrose 水溶液は、 κ -カゼインを沈殿させてしまった。

尿素を含む水溶液中で保存された κ -カゼインは、ゲル電気泳動上では極だった挙動の変化を表わさなかったが、尿素を含まない水溶液中での保存は、 κ -カゼインの分解や高分子化を示唆する結果を与えた。

一方、ゲルろ過クロマトグラフィーでは、尿素非存在下で保存された κ -カゼインは、native なものと変わらない挙動を示したが、4.5 M 尿素を含む溶液中で保存された κ -カゼインは、self-association 能の低下していることが明らかにされ、いずれの場合も、溶質による差異は認められなかった。

フリーアミノ基量は、保存期間の経過に従って、減少、増加、減少と繰り返しており、このことは、アミノカルボニル反応、分解、更にアミノカルボニル反応による高分子化と主たる要因が、経時的に変化しているものと考えられる。

スルフヒドリル基は、保存開始後、急激に減少し、

保存期間最終の頃には、ほとんど検知されなくなっていた。

保存された κ -カゼインの経時的変化を電気泳動的にとらえた時、その変化は、フリーアミノ基量の変動を考慮すると、極めてよく理解される。

self-association 能と、ミセル形成能とは、密接に関連しあうものと考えられるが、ここで得られた結果は、必ずしもそうではなく、また、ミセル安定化能とスルフヒドリル基含量とも相関があるとは言えなかった。即ち、 κ -カゼインのミセル安定化能は、極めて複雑な高分子間相互作用であると言える。

保存による κ -カゼインの高分子化については、本研究から、ジスルフィド結合の形成、アミノカルボニル反応の進行が関与していることが明らかにされ、これらの反応については、山内ら^{24,25)}も言及している。しかしながら、尿素存在下で保存された κ -カゼインのゲルろ過クロマトグラフィーで観察された第2のピークの出現は、何に由来するものかは、明らかではない。

また、保存期間中の分解について、UHT 滅菌乳の場合には、わずかに残されたプロテアーゼ活性による²⁴⁾ものと考えられているが、本研究には、その要因は適用されない。電気泳動的には、見かけ上、尿素を含まない溶液中での κ -カゼインの保存の方が、また、ゲルろ過クロマトグラフィー的には、尿素を含む溶液中での保存の方が、よく分解反応が進行しているように観察された。尿素溶液の場合、尿素の分解により、生じたシアン酸による加水分解反応が起こっているのかもしれない。

UHT 滅菌乳の保存による沈殿形成やゲル化に対して、本研究でのミセル安定化能の検討から考慮すると、maltose の添加が有効のようであり、少なくとも、sucrose の添加は避けられねばならず、また、実際面はともかく、尿素などの水素結合開裂剤の添加も考慮されてよいであろう。

謝辞 本研究の一部は、三島海雲記念財団学術奨励金に依った。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 津郷友吉 (1974) : 無菌牛乳の発展. 畜産の研究, **28**, 207-212.
- 2) 小笠勝啓 (1977) : LL 牛乳とは. 食の科学, **34**, 25-39.
- 3) Mackinlay, A. G. and R. G. Wake (1971) : "Milk Proteins II" ed. by H. A. McKenzie, Academic Press, New York, p. 175.
- 4) Sawyer, W. H. (1969) : Complex between β -lactoglobulin and κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **52**, 1347-1355.
- 5) Doi, H., F. Ibuki and M. Kanamori (1981) : Effect of carbohydrate moiety of κ -casein on the complex formation with β -lactoglobulin. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, (10) in press.
- 6) 土井裕司・田中満智子・伊吹文男・金森正雄 (1979) : 各種保存条件下での牛乳 κ -カゼインの変化. 京都府大学報・農, 31号, 164-169.
- 7) Doi, H., F. Ibuki and M. Kanamori (1979) : Heterogeneity of reduced bovine κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **62**, 195-203.
- 8) Doi, H., N. Kawaguchi, F. Ibuki and M. Kanamori (1979) : Susceptibility of κ -casein components to various proteases. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 33-41.
- 9) Doi, H., N. Kawaguchi, F. Ibuki and M. Kanamori (1979) : Minor components of reduced bovine κ -casein. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 95-102.
- 10) Doi, H., F. Ibuki and M. Kanamori (1979) : Interactions of κ -casein components with α_{s1} - and β -caseins. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1301-1308.
- 11) Doi, H., B. Park, F. Ibuki and M. Kanamori (1980) : Heterogeneity and composition of κ -casein from bovine colostrum. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 813-820.
- 12) Kanamori, M., N. Kawaguchi, F. Ibuki and H. Doi (1980) : Attachment sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine κ -casein from normal milk. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1855-1861.
- 13) Doi, H., H. Kobatake, F. Ibuki and M. Kanamori (1980) : Attachment sites of carbohydrate portions to peptide chain of κ -casein from bovine colostrum. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2605-2611.
- 14) Kanamori, M., H. Doi, S. Ideno and F. Ibuki (1981) : Presence of O-glycosidic linkage through serine residue in κ -casein component from bovine mature milk. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 231-241.
- 15) Zittle, C. A. and J. H. Custer (1963) : Purification and some of properties of α_s -casein and κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183-1188.
- 16) 千葉英雄・巽 清・佐々木隆造・杉本悦郎 (1970) : α_s -カゼインならびに κ -カゼインの化学修飾. 農化, **44**, 371-379.
- 17) Davis, B. J. (1964) : Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427.

- 18) Weber, K. and M. Osborn (1969): The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
- 19) Okuyama, T. and K. Satake (1960): The preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenyl amino acid and peptides. *J. Biochem. (Tokyo)*, **47**, 454-466.
- 20) Schramm, M. (1964): Unmasking of sulfhydryl groups in pancreatic α -amylase. *Biochemistry*, **3**, 1231-1234.
- 21) Mercier, J. C., G. Brignon and B. Ribadeau-Dumas (1973): Structure primaire de la caseine κ B bovine. *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222-235.
- 22) Murthy, L., E. O. Herreid and R. McL. Whitney (1958): Electrophoretic properties of casein from sterilized milk stored at different temperature. *J. Dairy Sci.*, **41**, 1324-1341.
- 23) 川西悟生・西川 勲・斉藤健輔 (1968): 滅菌牛乳の保存中における遊離アミノ酸類の変化. 日畜会報, **39**, 422-425.
- 24) 山内邦男・上野川修一・広崎裕子 (1978): UHT処理無菌充てん牛乳の貯蔵中における蛋白質の変化. 農化大会講演要旨(名古屋) p. 153.
- 25) 山内邦男・司城不二・上野川修一 (1976): 加糖練乳貯蔵中のカゼイン複合体の変化. 日畜会報, **47**, 704-710.

Summary

Changes of bovine κ -casein stored in various solutions were followed by the stabilizing ability test for α_{s1} -casein in the presence of calcium ion, disc gel electrophoresis containing 4.5 M urea, Sephacryl S-300 gel filtration chromatography, the determinations of free amino group and sulfhydryl group for the sake of accumulating the fundamental data for the improvement of denaturation of ultra high temperature sterilized milk and making clear the preservative characteristics of milk proteins. κ -Casein was stored at 5°C as the solution dissolved in the following solutions; 10% glucose, 10% lactose, 10% maltose, 10% sucrose, 2% NaCl, 2% glycine, distilled water, 10% glucose-4.5 M urea, 10% lactose-4.5 M urea,

10% maltose-4.5 M urea, 10% sucrose-4.5 M urea, 2% NaCl-4.5 M urea, 2% glycine-4.5 M urea and 4.5 M urea.

The stabilizing ability was lost with the passage of time. κ -Casein stored in 10% maltose solution for 6 months had 70.2% of stabilizing ability, while 10% sucrose for 5 months began to precipitate. The results of electrophoreses indicated that the hydrolysis and polymerization of κ -casein progress at the same time. The lowering of self-association ability was observed by the gel chromatography of κ -casein stored in solutions containing urea. It was considered that the polymerization of κ -casein was due to the disulfide bond and the amino-carbonyl reaction.