

9553 牛乳カゼインミセルの構造と機能に及ぼす食塩の影響

助成研究者：青木 孝良（鹿児島大学 農学部）

[目的] 近年の食品工業において牛乳および乳タンパク質は最も重要な食品加工素材の一つである。代表的な乳製品であるチーズにはかなりの量の食塩が添加されているし、加工食品を製造する場合に食塩は不可欠な材料として用いられている。したがって、牛乳および乳タンパク質の特性に及ぼす食塩の影響を調べることは極めて重要なことである。最近、酸カゼインの機能特性及ぼす塩化ナトリウムの影響について報告されている。しかし、牛乳中ではカゼインはカゼインミセルと呼ばれる直径20~600 nmのコロイド粒子として存在しており、酸カゼインとカゼインミセルとはその特性が著しく異なる。本研究では、まずカゼインミセルの特性に及ぼす塩化ナトリウムの影響を調べた。次いで、限外ろ過(UF)濃縮乳からフレッシュチーズを作り、フレッシュチーズの物性に及ぼす塩化ナトリウム添加の影響を調べた。

[結果および考察] 脱脂乳およびカゼインミセル分散液(CMD)に0.3Mまでの塩化ナトリウムを添加すると、熱安定性が著しく低下した。また、塩化ナトリウムの添加は脱脂乳およびCMDのアルコール安定性も低下させた。CMDに塩化ナトリウムを添加すると、可溶性のカルシウムと無機リン酸濃度が上昇し、ミセル性リン酸カルシウム(MCP)の一部が可溶化された。塩化ナトリウムの添加によりMCP架橋カゼイン会合体含量は減少し、0.1Mの添加で未添加の54.5%から52.4%へ、0.3Mの添加で47.8%へと減少した。MCP架橋の解裂は加熱による可溶性カゼインの生成を増大させる可能性が考えられたので、加熱による可溶性カゼインの生成に及ぼす塩化ナトリウムの添加の影響を調べたところ、塩化ナトリウムの添加は加熱による可溶性カゼインの生成を著しく増大させた。加熱により生成する可溶性カゼインの主成分は κ -カゼインであり、 κ -カゼインはカゼインミセルの安定化因子であるから、加熱による κ -カゼインの遊離の増大も塩化ナトリウムの添加によるカゼインミセルの熱不安定化の一因であると考えられた。

CMDに塩化ナトリウムを添加するとレンネット凝固時間が遅延し、マクロペプチドの遊離も抑制された。限外ろ過濃縮脱脂乳からフレッシュチーズを製造し、その物性に及ぼす塩化ナトリウム添加の影響を調べたところ、2%までの塩化ナトリウム添加によりフレッシュチーズの硬度、破断エネルギーおよび弾性率が著しく低下した。走査型電子顕微鏡でフレッシュチーズの微細構造を観察したところ、塩化ナトリウムを添加したものはカゼイン粒子が小さく、繊維状に凝集した網目構造の他に房状の構造が認められた。

9553 牛乳カゼインミセルの構造と機能に及ぼす食塩の影響

助成研究者：青木 孝良（鹿児島大学 農学部）

1. 研究目的

近年の食品工業において牛乳および乳タンパク質は最も重要な食品加工素材の一つである。牛乳および乳タンパク質を食品加工素材として用いる場合、これら素材の機能を十分に発揮させるためには、加工食品の系における素材の構造と機能を把握しておく必要がある。代表的な乳製品であるチーズにはかなりの量の食塩が添加されているし、加工食品を製造する場合に食塩は不可欠な材料として用いられている。したがって、牛乳および乳タンパク質の特性に及ぼす食塩の影響を調べることは極めて重要なことである。

牛乳の主要なタンパク質であるカゼインの機能特性に及ぼすカルシウムの影響については詳細に調べられており、最近、酸カゼインの機能特性、特に溶解性に及ぼす塩化ナトリウムの影響について報告されている¹⁾。カゼインは中性溶液中でモノマーとして存在せず、分子間相互作用により会合している。牛乳中では、巨大な分子集合体であるカゼインミセルと呼ばれる直径20~600nmのコロイド粒子として存在している²⁾。カゼインミセルは直径10~20nmのサブミセル粒子が構成単位となっており、このサブミセルはミセル性リン酸カルシウム(MCP)により架橋されている。MCPは牛乳の熱安定性、冷却によるカゼインミセルからの可溶性カゼインの遊離、キモシンによる牛乳の凝固現象等に密接に関わっていると考えられている³⁾。カゼインミセルは、カルシウムや無機リン酸を結合しない形で分離される酸カゼインとは性質が著しく異なる。

脱脂乳に塩化ナトリウムを添加すると、MCPの一部が可溶化するものと考えられる。また、MCPの可溶化はカゼインミセルの特性に影響を及ぼすものと思われるので、本研究では、まずカゼインミセルの特性に及ぼす塩化ナトリウムの影響を調べた。次いで、限外ろ過(UF)濃縮乳からフレッシュチーズを作り、フレッシュチーズの物性に及ぼす塩化ナトリウム添加の影響を調べた。

2. 研究方法

2.1 脱脂乳およびカゼインミセル分散液の調製

脱脂乳は、鹿児島市近郊の農家から集乳された合乳を20℃、1000xgで15分間遠心分離してクリームを除去したものをを用いた。

カゼインミセル分散液(CMD)は以下のように調製した⁴⁾。タンパク質の分解を抑

制するために脱脂乳500mlにトリプシンインヒビター1mgを加え25℃で2時間保持した後、20℃、100,000xg、1時間超遠心分離を行い、カゼインミセルを沈降させた。この超遠心沈降カゼインミセルを乳鉢ですり潰した後、Jennes & Koopsの方法⁵⁾で調製した人工乳清に懸濁させ、この懸濁液を9KHz (200W, 1.5~2.0A), 20℃で18分間超音波処理を行いミセルを分散させた。1,000xgで15分間遠心分離を行い未分散のミセルを除去して、CMDを調製した⁵⁾。なお、CMDのカゼイン濃度は2.5%に調整し、防腐剤としてアジ化ナトリウムを0.05%添加した。

2.2 フレッシュチーズの製造

限外ろ過(UF)濃縮脱脂乳を用いてフレッシュチーズを製造した⁶⁾。生脱脂乳を72℃、15秒間予備殺菌した後、Alfa-Laval社の3XUFS-125-6/12型装置を用いて50℃、2kg/cm²の加圧下で、1/5の容量に限外ろ過濃縮した。濃縮脱脂乳を72℃、15秒間殺菌し、6℃に冷却後、乳酸菌スターター(*Lactococcus Lactis subsp. cremoris*)を0.5%添加し、25℃でpHが5.5に低下するまで発酵させた。これを10℃に冷却後、所定の濃度(0-3%)の食塩と0.015%のレンネットを添加してから、500ml容量のプラスチック容器に移し、カードを形成させた。その後25℃で4時間発酵させUFフレッシュチーズを製造した。出来たUFフレッシュチーズは分析に供するまで5℃で保存した。

2.3 アルコールおよび熱安定性の測定

試料乳の熱安定性は、Davies & Whiteの主観的方法により測定した⁷⁾。試料乳を内径6mm、厚さ1mm、長さ約12cmのガラス管に封入した。このガラス管を140℃の油槽中に浸し、ガラス管内の試料乳中に凝固物が観察されるまでの時間を熱凝固時間とした。なお、油槽中のガラス管は1分間8サイクルで振動させた。

塩化ナトリウムを添加した試料乳を少なくとも25℃で2時間保持し、50~100%まで2%毎に濃度を変化させたエタノールを試料乳と等量混合し、肉眼的に凝固物が観察されるエタノール濃度を求めた。

2.4 レンネット凝固時間の測定および遊離コマクロペプチドの定量

CMDに1M塩化カルシウムをカルシウム濃度が10mMとなるように添加し、30℃で1時間保持した。このCMD10mlにレンネット溶液(1mg/ml)1mlを加え、赤インクを封入したガラス管でゆるやかに攪拌しながら凝固物が肉眼で確認できるまでの時間を測定する主観的方法を用いて行った。レンネットを添加して酵素反応させたCMDに等量の15%トリクロ酢酸を加え、得られたろ液中のマクロペプチド量をLowry法により測定した。

2.5 MCP架橋カゼイン会合体の定量

MCP架橋カゼイン会合体の定量は、TSK-GEL G-4000 SWカラムを用いた高速液体ゲルクロマトグラフィー法により求めた⁸⁾。試料乳1mlに尿素0.5gと2-メルカプトエタノール1μlを添加し25℃で1夜保持した後、ポアサイズ0.45μmの膜でろ過し高速

液体ゲルクロマトグラフィーに供した。HPLC分析は、島津LC-5A型装置で、溶離液として6M尿素を含む人工乳清を用いて、0.5ml/minの流速で行った。得られたチャートのピーク面積からMCP架橋カゼイン会合体含量を求めた。

2.6 可溶性カゼイン、カルシウムおよび無機リン酸の定量

試料乳を20℃, 100,000xg, 1時間超遠心分離して得られた上澄中のカゼイン量をミクロケルダール法で定量し、可溶性カゼイン量とした⁹⁾。また、上澄液の12%トリクロル酢酸ろ液のカルシウムを原子吸光法、無機リン酸をAllenn法で定量した。

2.7 フレッシュチーズの物性の測定

不動工業社製NMR-2010J型レオメーターを用いて、試料台移動速度6cm/分、チャート速度30cm/分で測定した。得られたチャート上のグラフから硬度、応力と歪から破断エネルギーと弾性率を求めた¹⁰⁾。

2.8 フレッシュチーズの電子顕微鏡観察

フレッシュチーズを10%ホルマリン溶液で固定し、1.5x1.5x5mmの大きさに細切し50%エタノールに約20分間浸漬し、フラッシュ窒素で急速凍結した後、日立S-800型走査型電子顕微鏡で観察し、加速電圧15kV, 10,000の倍率で写真撮影した。

3. 結果および考察

3.1 カゼインミセルの熱およびアルコール安定性に及ぼす塩化ナトリウムの影響

脱脂乳およびCMDに0~0.3Mまでの塩化ナトリウムを添加し、その熱安定性を調べた。脱脂乳およびCMDの熱凝固時間はそれぞれ32分56秒および7分4秒であった。CMDは脱脂乳から乳清タンパク質と乳糖が除去されたものに相当するが、CMDに乳糖が存在しないことが、脱脂乳に比べて熱凝固時間が短い主たる原因である¹¹⁾。塩化ナトリウムの添加は脱脂乳およびCMDの熱安定性を著しく低下させた(Fig. 1)。0.3Mの塩化ナトリウムの添加により熱凝固時間は、脱脂乳で2分28秒に、CMDで1分53秒にそれぞれ減少し、CMDより脱脂乳の方が塩化ナトリウム添加による熱安定性の低下が著しかった。

塩化ナトリウムの添加は脱脂乳およびCMDのアルコール安定性も低下させた(Fig. 2)。脱脂乳およびCMDは、それぞれ96%および84%のエタノールで凝固したが、0.3Mの塩化ナトリウムの添加により26~32%低いエタノール濃度で凝固した。

牛乳に塩化ナトリウムを添加すると、ナトリウムイオンや塩素イオンとMCPとの間でイオン交換反応が起き、MCPの可溶化が引き起こされると考えられる。そこで、CMDに塩化ナトリウムを添加した時のMCPの可溶化を調べるため、塩化ナトリウム添加による可溶性カルシウムと無機リン酸濃度の変化を調べた。Fig. 3に示すように塩化ナトリウムの添加により僅かに可溶性のカルシウムと無機リン酸濃度が上昇した。0.3Mの塩化ナトリウムを添加した時のカルシウムと無機リン酸の濃度上昇はそれぞ

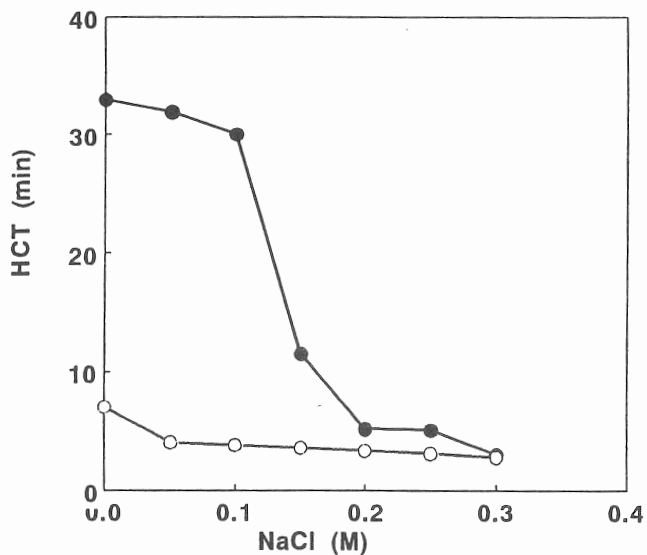


Fig. 1. Effect of NaCl on the Heat Stability of Skim Milk and Casein Micelle Dispersion (CMD).

Milk samples were heated at 140°C. HCT, heat coagulation time; ●, skim milk; ○, CMD.

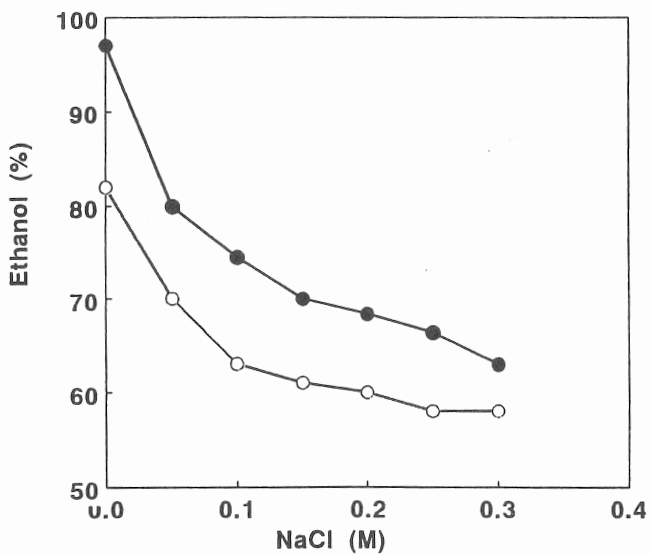


Fig. 2. Effect of NaCl on the Ethanol Stability of Skim Milk and CMD.

●, skim milk; ○, CMD.

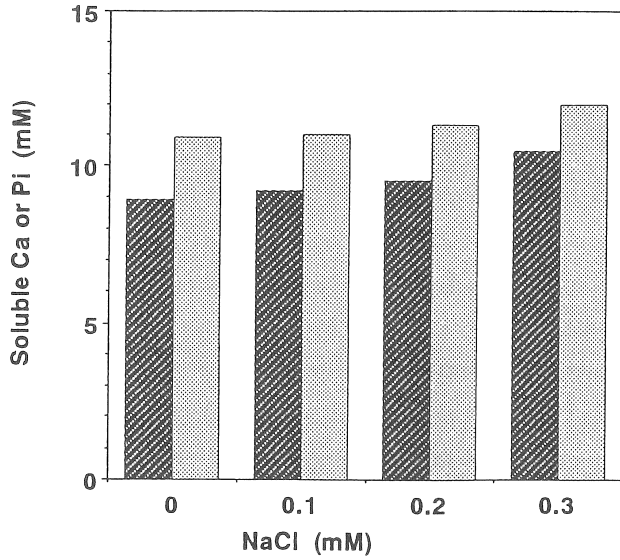


Fig. 3. Effect of NaCl on the Soluble Ca and Inorganic Phosphate (Pi) Concentrations in CMD.
Shaded column, Ca; dotted column, Pi.

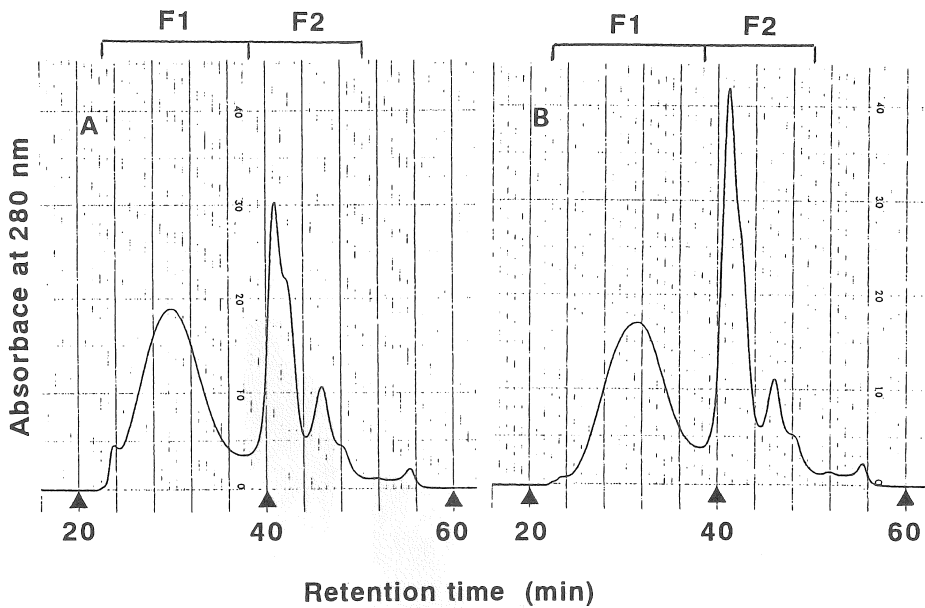


Fig. 4. Elution Patterns of Casein Micelles Disaggregated in 6 M Urea from a TSK-GEL G4000SW Column.

Flow rate was 0.5 ml/min. A, 0 M NaCl; B, 0.3 M NaCl.

れ1.7mMおよび1.1mMであった。これはMCP中のカルシウムの7.2%が可溶化されたことになる。

MCPの一部が可溶化すると、MCP架橋が解裂してカゼインミセル中のMCP架橋会合体含量が減少する^{1,2)}。そこで、カゼインミセルを6M尿素で解離させた後高速液体ゲルクロマトグラフィーを行った。その溶出パターンをFig. 4に示した。F1はMCP架橋カゼイン会合体、F2はカゼインカルシウムの単量体からなる⁸⁾。塩化ナトリウムの添加によりMCP架橋カゼイン会合体含量は減少し、0.1Mの添加で未添加の54.5%から52.4%へ、0.3Mの添加で47.8%へと減少した。

CMDに0.3Mまでの塩化ナトリウムを添加し、これを人工乳清で50倍に希釈して360nmの吸光度で濁度を測定しても変化が認められなかった。また、0.3Mまでの塩化ナトリウムの添加は可溶性カゼインを遊離させなかった。したがって、0.3Mまでの塩化ナトリウムの添加によりカゼインミセルの大きさはほとんど変化しないものと思われた。しかし、カゼインミセルのカゼイン間相互作用や塩結合の部分的解裂は加熱による可溶性カゼインの生成の増大をもたらす。すなわち、MCPの部分的可溶化やSS結合の切断は加熱による可溶性カゼインの生成を増大させる^{1,3,14)}。塩化ナトリウムの添加はMCP架橋カゼイン会合体含量を減少させたので、加熱による可溶性カゼインの生成に及ぼす塩化ナトリウム添加の影響を調べた。Fig. 5に示すように、塩化ナトリウムの添加は可溶性カゼインの生成を増大させた。

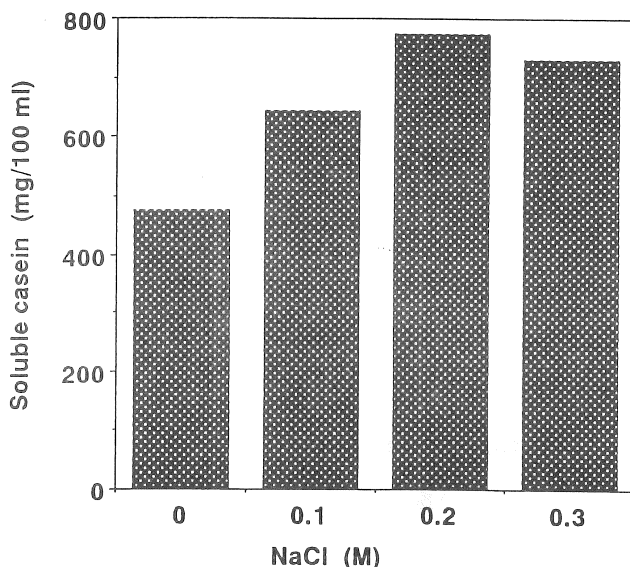


Fig. 5. Effect of NaCl on the Formation of Soluble Casein on Heating CMD at 140°C for 2.5 min.

加熱により生成する可溶性カゼインの約50%は κ -カゼインである¹⁵⁾。 κ -カゼインはカゼインミセルの安定化因子であるから、加熱によるカゼインミセルからの κ -カゼインの遊離はカゼインミセル不安定化の一因であると考えられている¹⁶⁾。脱脂乳やCMDに塩化ナトリウムを添加するとカゼインミセル表面のマイナス電荷が中和されて、カゼインミセルの不安定化要因になっていると思われる。しかし、この原因の他に、加熱による κ -カゼインの遊離の増大も塩化ナトリウムの添加によるカゼインミセルの熱不安定化の一因であると考えられた。

3.2 フレッシュチーズの物性に及ぼす塩化ナトリウムの影響

まず、チーズ製造の重要な過程であるレンネット凝固に及ぼす塩化ナトリウム添加の影響を調べた。CMDのレンネット凝固時間は7分3秒であったが、0.1、0.3および0.5Mの塩化ナトリウムの添加で凝固時間はそれぞれ14分48、29分48秒および44分6秒に遅延した。 κ -カゼインの60~80%が加水分解されると凝固が起きるといわれている¹⁷⁾。マクロペプチドの遊離量からCMDの凝固時における κ -カゼインの分解率を求めると63%であった。CMDに塩化ナトリウムを添加すると、レンネット処理によるマクロペプチドの遊離が抑制された(Fig. 6)。Fig. 6から0.5M塩化ナトリウム添加CMDにおいて κ -カゼインが63%分解された時間を読み取ると、約20分である。これは実際の凝固時間の半分以下である。塩化ナトリウム添加によるレンネット凝固時間の遅延は、酵素反応の阻害とミセル間の凝集抑制の両者が原因となっているものと考えられた。

UFフレッシュチーズは製品の歩留まりが良いこと、製造工程が連続化・自動化しやすいこと等の利点を有するため日本でも一部において製造販売されている。現在、UFフレッシュチーズはケーキの素材等として用いられているため加塩されないで製造されている。将来的には加塩タイプの需要も見込まれるので、塩化ナトリウム含量の異なるUFフレッシュチーズを製造し、その物性を調べた。塩化ナトリウム添加により硬度、破断エネルギーおよび弾性率が低下した(Table 1)。特に、硬度の低下が著しかった。UFフレッシュチーズを試食したところ、塩化ナトリウム1%および2%添加したもののほうがなめらかな口触りであった。3%の塩化ナトリウムを添加したUFフレッシュチーズでは、2%までの試料に比べ発酵の進行も遅く製品のpHがやや高く、カードが形成されなかった。走査型電子顕微鏡で微細構造を観察したところ、塩化ナトリウム未添加のものは、カゼイン粒子が繊維状に凝集し網目構造を形成していた(Fig. 7 A)。塩化ナトリウム2%添加したものは網目状と房状の構造が混在し、カゼイン粒子の大きさが未添加のものより小さかった(Fig. 7 B)。

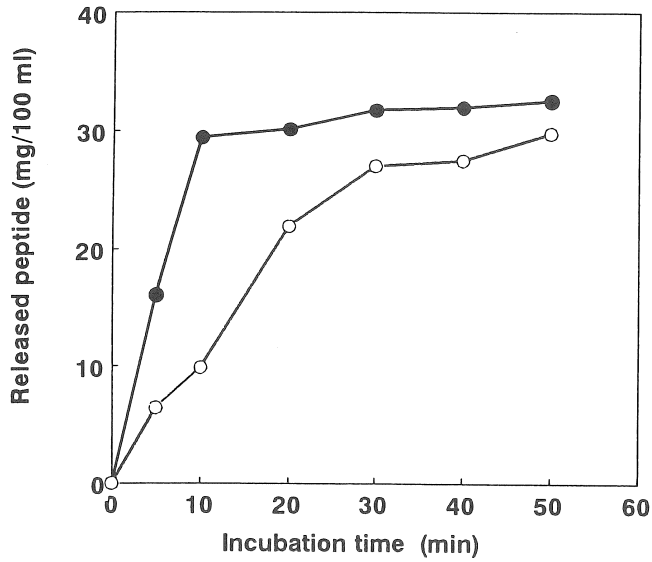


Fig. 6. Time Course Release of Macropeptide form Casein Micelles by Rennet in the Presence and Absence of NaCl.

●, 0 M NaCl; ○, 0.5 M NaCl.

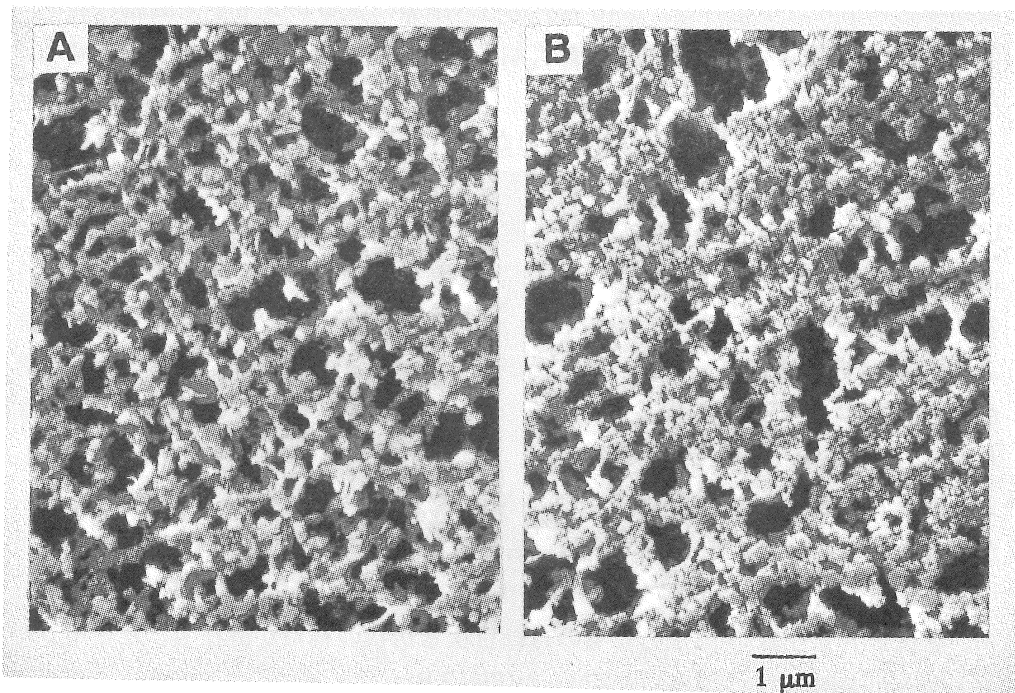


Fig. 7. Scanning Electron Micrograph of Flesh Cheese.

A, 0 M NaCl; B, 2% NaCl.

Table 1. Effect of NaCl on the Physical Properties of Fresh Cheese.

Values of physical properties were means \pm S.D. for five determinations.

Added NaCl (%)	pH	Hardness (g)	Breaking energy ($\times 10^3$ dyn/cm ²)	Elastic modulus ($\times 10^5$ dyn/cm ²)
0	4.85	60.0 \pm 2.2	7.42 \pm 0.71	9.80 \pm 0.18
1	4.85	5.8 \pm 0.1	1.48 \pm 0.32	5.72 \pm 1.36
2	5.05	5.3 \pm 0.2	1.16 \pm 0.08	3.69 \pm 0.10
3	5.40	-	-	-

4. 今後の課題

脱脂乳に通常食品に添加される程度の塩化ナトリウムを添加するとカゼインミセルの熱安定性が著しく不安定になった。塩化ナトリウムの添加によってMCPの一部が可溶化し、MCP架橋の解裂が起きていることが明らかになった。このMCP架橋の解裂は加熱によるカゼインミセルからの κ -カゼインの遊離を促進し、熱不安定化の一因と考えられた。塩化ナトリウムの添加はカゼインミセル表面の電位差にも影響を及ぼしていると思われるので、この点が解明が必要であろう。

UFフレッシュチーズに塩化ナトリウムを添加すると、硬度が低下し、口触りもなめらになった。また、走査型電子顕微鏡観察でも塩化ナトリウム添加と未添加もののあいだで明らかに微細構造の違いが認めれた。フレッシュチーズの物性と微細構造との関係の解明は今後の課題である。本研究では原料乳として脱脂乳を用いたが、全乳を用いたフレッシュチーズの物性及ぼす塩化ナトリウムの影響を調べる必要がある。また、チーズの物性は酸度によって著しく影響をうけるので、酸度の異なるチーズについても試験する必要があるであろう。

5. 文献

- 1) E.D. Strange, D.L. Van Hekken, and V.H. Holsinger, *J. Dairy Sci.*, **77**, 1216 (1994).
- 2) D.G. Schmidt, "Developments in Dairy Chemistry." Vol. 1, Proteins, ed. by P.F. Fox, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1982, pp. 61-86.
- 3) 青木孝良: 酪農科学・食品の研究, **44**, A1 (1995).
- 4) T. Aoki, T. Umeda and Y. Kako, *J. Dairy Res.*, **57**, 349 (1990).
- 5) R. Jenness and J. Koops, *Neth. Milk Dairy J.*, **16**, 153 (1962).
- 6) 農新介, 長田貞之, 大橋登美男, 山内清, 原田宏, 江藤望: 日畜会報, **65**, 685 (1994).

- 7) D.T. Davies and J.C.D. White, *J. Dairy Res.*, **33**, 67 (1966).
- 8) T. Aoki, Y. Kako, and T. Imamura, *J. Dairy Res.*, **53**, 53 (1986).
- 9) T. Aoki and Y. Kako, *J. Dairy Res.*, **50**, 207 (1983).
- 10) 大橋登美男, 芳賀聖一, 藤野博史, 谷山茂昭, 山内清, 秋山露子 : 日食工誌, **25**, 586 (1978).
- 11) H. Singh and L.K. Creamer, "Advanced Dairy Chemistry." Vol. 1, Proteins, ed. by P.F. Fox, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1992, pp. 621- 656.
- 12) T. Aoki, N. Yamada, Y. Kako, and T. Imamura, *J. Dairy Res.*, **55**, 189 (1988).
- 13) 青木孝良, 今村経明 : 農化, **50**, 99 (1976).
- 14) T. Aoki and T. Imamura, *J. Dairy Res.*, **51**, 439 (1984).
- 15) T. Aoki, H. Suzuki, and T. Imamura, *Milchwissenschaft*, **30**, 30 (1984).
- 16) P.F. Fox, "Developments in Dairy Chemistry." Vol. 1, Proteins, ed. by P.F. Fox, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1982, pp. 189-228.
- 17) D.G. Dagleish, "Advanced Dairy Chemistry." Vol. 1, Proteins, ed. by P.F. Fox, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1992, pp. 579- 656-619.

Effect of Salt on the Structure and Function of Bovine Casein Micelles

Takayoshi Aoki

Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University

Summary

Bovine milk and milk proteins are important materials for food processing in recent food industry. Considerable amount of salt is added to cheese and salt is essential in food processing. Accordingly, it is important to investigate the effect of salt on the structure and function of milk and milk proteins. Recently the effect of sodium chloride on the properties of acid casein was examined. However, casein occurs in colloidal particles of 20-600 nm diameter called casein micelles, and acid casein and casein micelles differ greatly from one another in their characteristics. In the present study, at first we examined the effect of sodium chloride on the characteristics of bovine casein micelles, and then the effect of sodium chloride on the physical properties of the fresh cheese made from skim milk concentrated by ultrafiltration.

Addition of 0.1-0.3 M sodium chloride to skim milk and casein micelle dispersion (CMD) decreased their heat stability and ethanol stability. The soluble calcium and inorganic phosphate concentrations increased slightly and the content of casein aggregates cross-linked by micellar calcium phosphate decreased from 54.2 to 47.8% when 0.3 M sodium chloride was added to CMD. Addition of sodium chloride to CMD markedly increased the formation of soluble casein on heating CMD at 140°C. The increase in formation of soluble casein was considered to be one of the reasons for destabilization of casein micelles because κ -casein is stabilizer of casein micelles and the main component of the soluble casein formed on heating.

Addition of sodium chloride to CMD retarded rennet coagulation of CMD, and inhibited the release of macropeptide from casein micelles. Addition of 2% sodium chloride to the fresh cheese lowered hardness, breaking energy and elastic modulus. The fine structure of the fresh cheese was observed by scanning electron microscopy. Casein particles in sodium chloride-added fresh cheese were smaller than those in the fresh cheese without added sodium chloride, and formed clusters as well as fibrous network.