

氏 名 (本籍)	わ だ やす ろう 和 田 安 郎 (宮城県)
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 1 6 4 号
学位授与年月日	昭和 5 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 畜産学専攻
学位論文題目	乳清蛋白質の加熱変化に関する研究

(主 査)

論文審査委員	教授 中西 武 雄	教授 松 本 達 郎
		教授 志 村 憲 助

論文内容要旨

牛乳，乳製品の加工処理において，最も基本的で重要な工程は加熱処理である。特に工場における加熱処理工程は衛生上，欠くことができない。しかしながら，牛乳はその処理方法によっては加熱臭を発生し，ラムゼン現象による皮膜の形成，或いはアミノカルボニル反応による褐変などを生じ，それに伴い，栄養価も低下するようになる。このような変化においては，蛋白質が重要な役割を演じているが，なかでも牛乳蛋白質の15～20%を占めている乳清蛋白質の関与しているところが大きいといわれている。このような観点から，乳清蛋白質の加熱変化に関する研究は古くから行われており，加熱した際の未変性乳清蛋白質の残存量を検討した報告や，各成分組成を定量し，各乳清蛋白質の変性率を求めた報告も数多く，免疫グロブリンが最も熱に弱く， β -ラクトグロブリンおよび血清アルブミン， α -ラクトアルブミン，プロテオースペプトンの順に耐熱性が大きいといわれている。また，最近ではカゼイン，特に κ -カゼインとの相互作用や乳清蛋白質間の相互作用なども次第に明らかにされてきている。乳清蛋白質のなかでも，その約50%を占め，加熱臭の原因となる-SH基を多量に含んでいることから， β -ラクトグロブリンに関する研究が最も進んでいる。本研究では，乳清蛋白質の加熱処理に伴う風味成分の生成の面から，特に β -ラクトグロブリンに関する検討を行ない，併せて α -ラクトアルブミンの加熱変化，および各成分の加熱凝固温度を示差熱分析法を用いて検討を行なった。

1. 乳清蛋白質の加熱変化に関するポーラログラフ的検討（第1章）

ポーラログラフ蛋白波が発見されて以来，主として医学分野で応用されてきたが，乳蛋白質の研究に用いられた例は数少なく，そのほとんどはカゼインと乳清蛋白質の波形の違いなどを比較検討したもので，変性蛋白質を扱ったものは非常に少ない。また，蛋白波の第二波が-SH基と関連があるといわれていることから，蛋白質の複合系としての乳清蛋白質，および β -ラクトグロブリンの加熱変化をポーラログラフ的に検討した。加熱は硬質試験管に封入したのち，試料溶液が所定の温度に達するまでの時間を3分間とみなして加熱時間に加算した。ポーラログラフの電解液組成は1M NH_4OH ，0.1M NH_4Cl ， 2×10^{-3} M Co Cl_2 ，0.008%ゼラチン溶液とし，蛋白質濃度は0.011%とした。乳清蛋白質についての結果はFig. 1に示すとおりである。

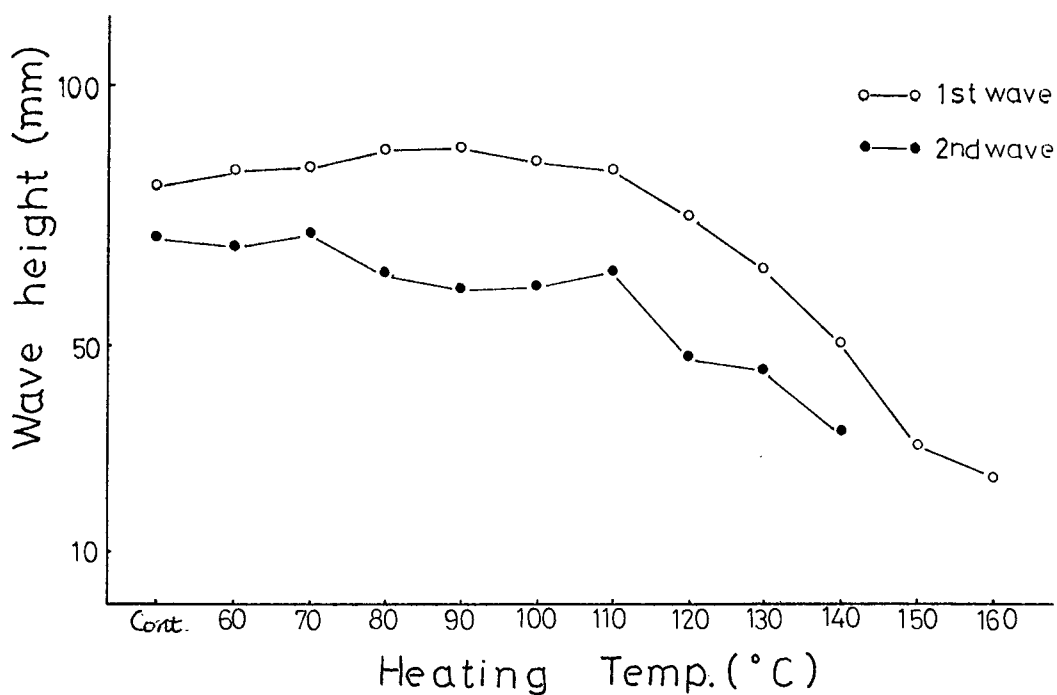


Fig. 1 Changes of heights of 1st and 2nd protein waves of whey proteins by heating at 60-160°C for 10 min.

蛋白波高は、蛋白波の第一波および第二波からコバルトの還元波高を減じたものをmmで表わした。これによると、未加熱の乳清蛋白質の波高に比べ、60~90°Cに加熱したものではわずかに上昇しているが、120°Cからは急激に低下し、150°Cに加熱したものでは未加熱の乳清蛋白質の波高の半分以下となった。第二波に関しては120°C付近から急激に低下し、150

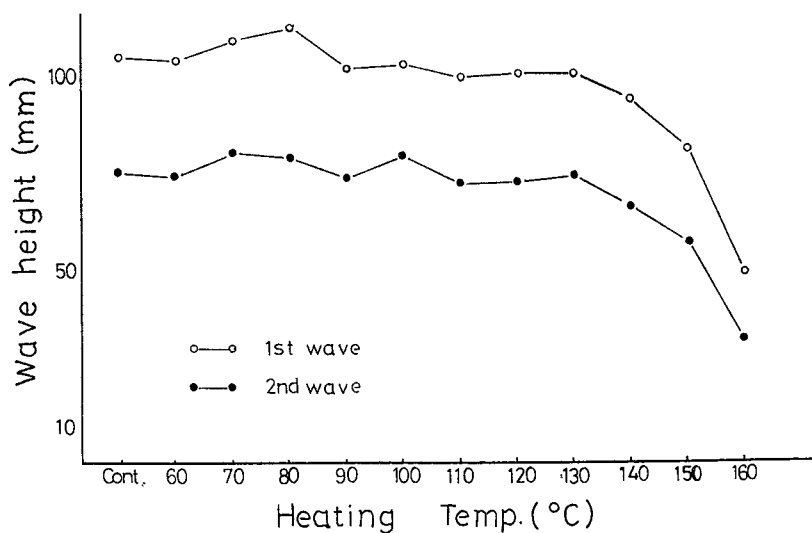


Fig. 2 Changes of heights of 1st and 2nd protein waves of β -lactoglobulin by heating at 60-160°C for 10 min.

℃および160℃では消滅している。β-ラクトグロブリンを加熱して得られた結果はFig.2に示すとおりであり、乳清蛋白質とはほぼ同様であった。80℃までは波高のわずかな上昇が見られるが、140℃から低下し、150℃および160℃で波高は急激に低下している。しかしながら、乳清蛋白質およびβ-ラクトグロブリンとも、波高のわずかな上昇は追試験の結果、有意差とは言い難いことが明らかにされた。波高の急激な低下は、両者とも加熱分解が生じたためであると推定された。

2 加熱によって活性化された-SH基の量的変化(第2章)

牛乳の加熱臭の原因だといわれる乳清蛋白質中の-SH基が、加熱処理を受けることによってどのような量的変化を生じるかに関して、5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoate (DTNB)との反応性から検討を行ない、併せて乳清蛋白質中で-SH基を最も多量に含むβ-ラクトグロブリンについても同様の分析を行なった。その結果はFig. 3および4に示す

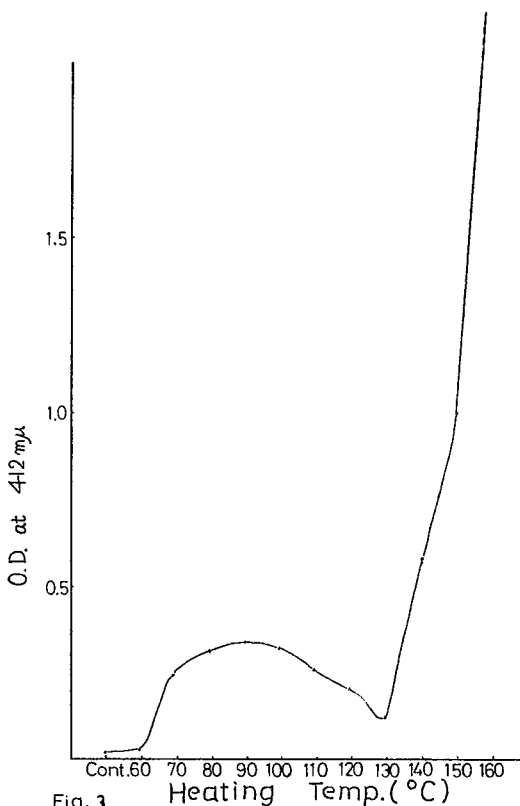


Fig. 3 Effect of heating temperature on the reactivity of DTNB and whey proteins. (heated for 10 min at various temperature.)

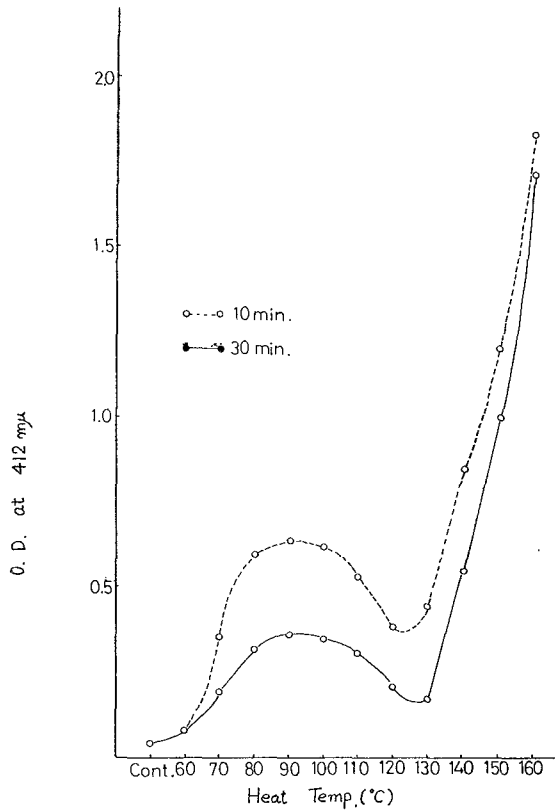


Fig. 4 Effect of heating temperature on the reactivity of FCS and β -lactoglobulin. (heated for 10 min and for 30 min at various temperature.)

とおりである。これによると、乳清蛋白質を10分間加熱した場合には60℃に加熱したものは未加熱の-SH基量とほとんど差異は認められなかったが、70℃からは急激に増加しており、90℃で極大値に達したのち減少した。また、130℃で極小値に達したのちは再び急激な増加を示した。 β -ラクトグロブリンもほぼ同様の傾向を示しており、70℃から急激な増加を示したが、10分間加熱の場合には120℃で極小値に達した。 β -ラクトグロブリンを30分間加熱すると、10分間加熱の場合よりも全体的にかなり低い値を示したが、その変化の傾向は同様であった。そこでさらに究明するために、一定の温度条件で加熱時間を変えることにより、どのような変化を生じるかについて検討を行なった。加熱温度は両者が極大値を示した90℃とした。その結果はFig.5に示すとおりである。

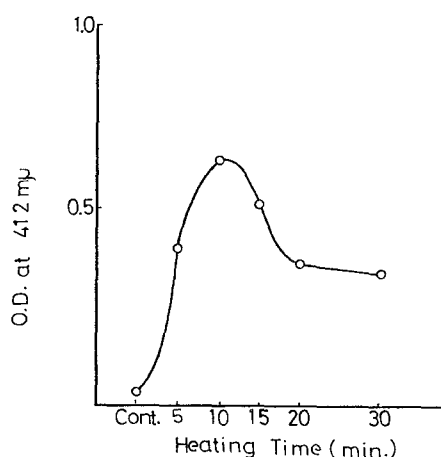


Fig. 5 Effect of heating time on the reactivity of DTNB and β -lactoglobulin. (heated for various time at 90°C.)

これによると、最初の5分間で-SH基量は急激な増加を示している。10分間の加熱までは急激な増加を示しており、10分間の加熱までは増加する傾向が認められたが、さらに加熱すると減少する傾向を示した。このことから、 β -ラクトグロブリン中の-SH基は90°C、10分間の加熱処理によって最も活性化することが推定された。以上の結果から、90°Cで極大値に達するまでの-SH基量の増加は、分子内の-SH基が加熱処理によって表面に露出したためと考えられるが、90~120°C或いは130°Cの加熱で減少するのは、分子が一部凝集して、露出した-SH基が再び分子内にたたま込まれたものと推定された。また、極小値に達したのちに急激に増加するのは、加熱分解を生じたために多量の H_2S が生成し、これがHSHとしてDTNBと反応したのではないかと考えられた。

3. β -ラクトグロブリンの加熱変化 (第3章~第5章)

β -ラクトグロブリンの凝集および分解がどの程度の加熱処理によって生じるかについて、Sephadex G-100を用いたゲル濾過法によって検討した。0.3% β -ラクトグロブリン溶液を各種温度時間加熱したのち凍結乾燥し、その30mgをpH 8.6の0.1Mホウ酸緩衝液2mlに溶解して溶出試料とした。直径3mmのカラムにゲルを6.7cmの高さに充填し、流速5ml/hrで各フラクションは4μずつ分取した。75~95°Cに30分間加熱したものの結果はFig.6に示すとおりである。

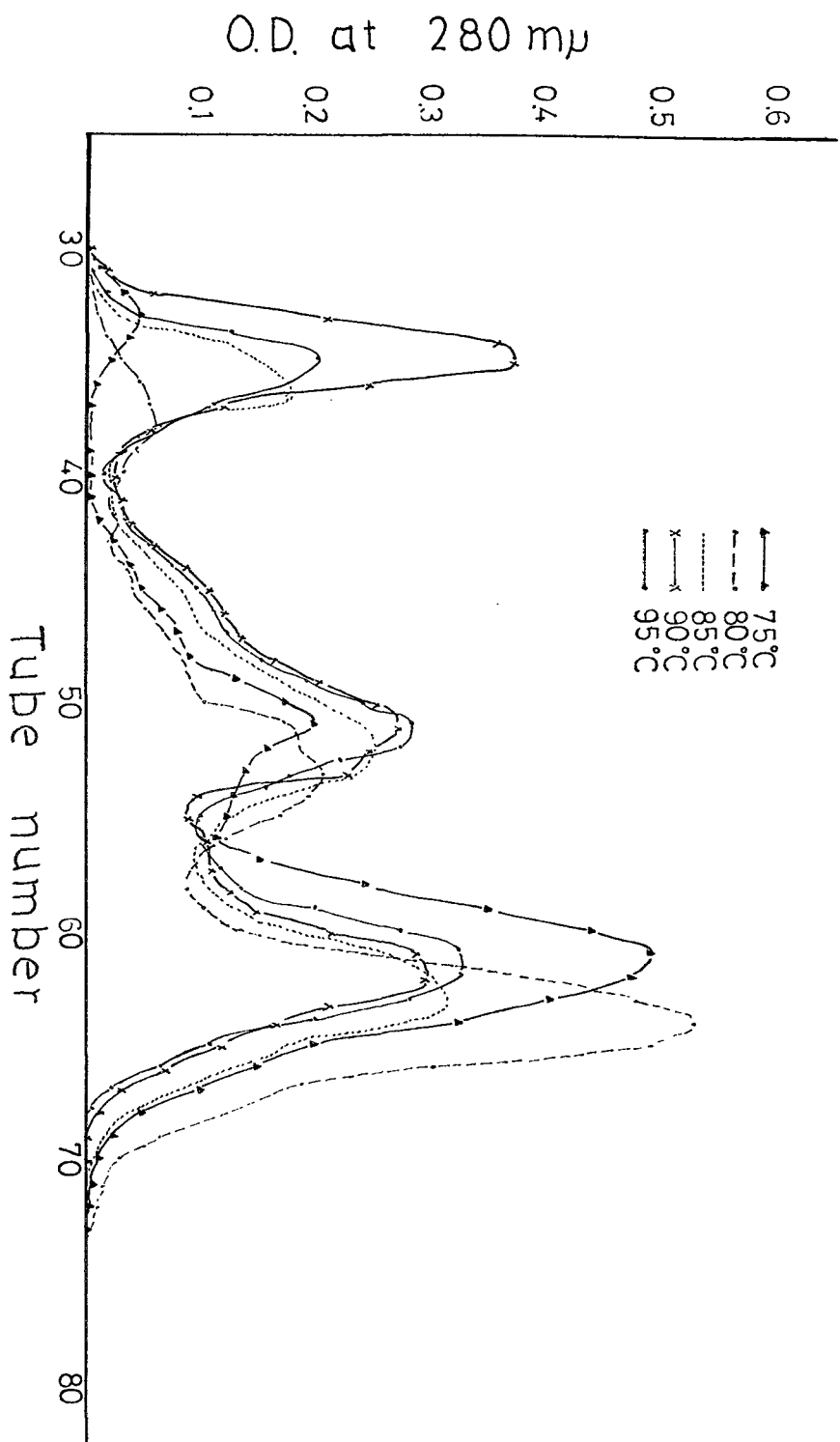


Fig. 6 Elution patterns of β -lactoglobulin heated at 75-95°C for 30 min.

なお、未加熱の β -ラクトグロブリンのコントロールピークはTube number 64に溶出した。これを見ると、75℃で加熱変化が顕著に現われている。すなわち、3つのピークが生じており、未加熱の β -ラクトグロブリンのピークよりも高分子側に2つのピークが溶出していることから、分子量の大きいものが生成したものと思われた。85℃に加熱したものでは、最初に溶出してくるピークが増大しており、未加熱の β -ラクトグロブリンと同位置に溶出してくるピークが相対的に低下しているのが特徴的であり、90℃になると、最初に溶出してくるピークが最大となっている。このことから、90℃においても30分間の加熱ではかなりの割合で凝集が生じているものと推定された。次に、130~160℃で10分間加熱した β -ラクトグロブリンの溶出曲線をFig. 7に示す。130℃に加熱したもので特徴的なことは、100℃

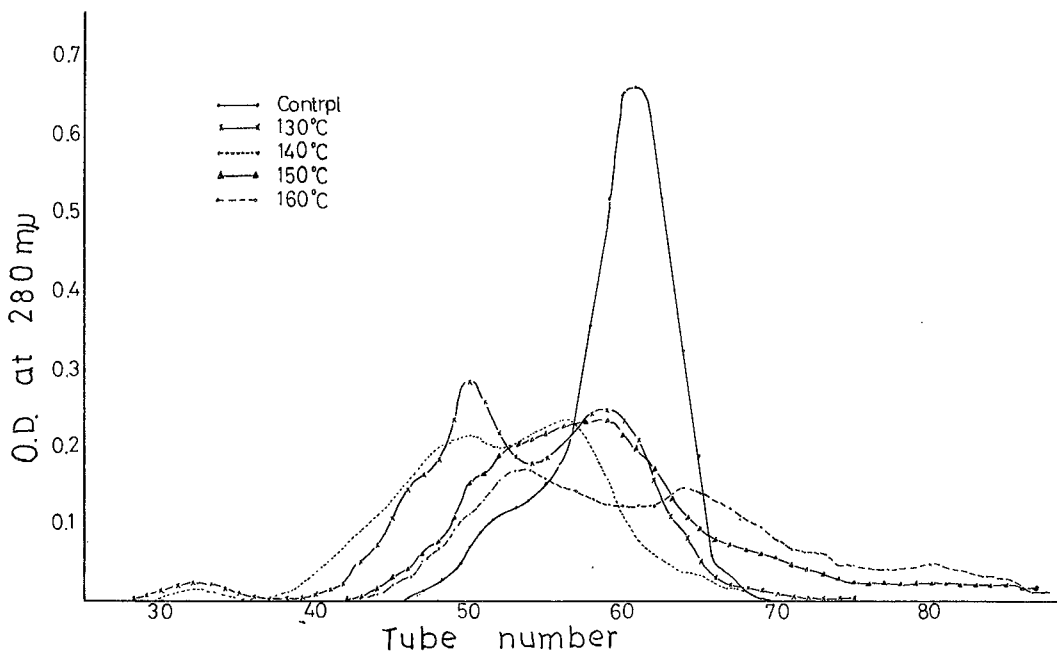
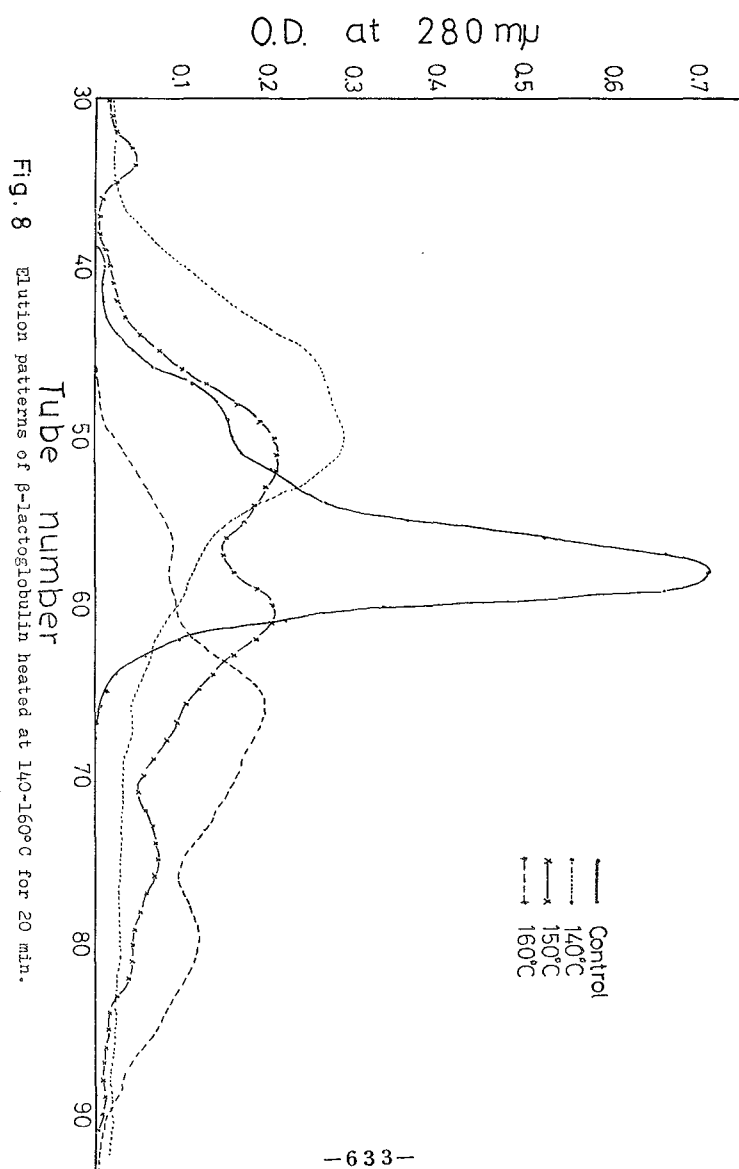


Fig. 7 Elution patterns of β -lactoglobulin heated at 130-160°C for 10 min.

以下で30分間加熱したものに比べて、Tube number 約55に現われるピークとピークの間
 のいわゆる谷の部分上昇していることであり、また分解生成物と思われる低分子側に溶出し
 てくる物質の存在が認められた。また、140℃に加熱したものではこの傾向はさらに大き
 くなっていることが認められた。150℃に加熱したものでは、谷の部分が消滅してピーク同士
 の集合が認められ、また分解生成物の量が増加した。160℃のものではピークが再び分かれ、
 Tube number 80付近に溶出してくるピークが顕著となり、分解生成物がさらに増加してい
 ることが認められた。同温度で20分間加熱したものの溶出曲線はFig. 8に示すとおりである。



20分間の加熱では140℃でピークの集合が見られ、同時に分解産物の量の増加が認められた。150℃に加熱したものではピークが再び分かれ、またTube number約75の位置に新たなピークが溶出しており、分解が激しいことを示唆しているものと思われた。160℃になると、全体的にピークが低分子側に移動しており、ほとんど分解のみが生じているものと思われた。

以上のことから、100℃以下の加熱においては未加熱のβ-ラクトグロブリンも若干残ってはいるが、かなりの割合で凝集が生じているものと思われた。100℃以上の加熱では、100℃以下のような3つの顕著なピークは認められないが、加熱温度が上昇するに従ってピークとピークとの間の谷の部分の位置が上昇している。すなわち、これは一定の凝集が起っているのではなく、加熱条件が厳しいためにいろいろな凝集が起り、凝集には規則性がないのではないかと考えられた。10分間の加熱では140～150℃、20分間の加熱では130～140℃でピークの集合が見られるが、この時点が凝集の生じるポイントではないかと思われ、またほとんど同時に分解が始まるものと推定された。このことから、-SH価の測定による推定とはほぼ一致するものではないかと考えられた。

次に、ニンヒドリン発色区分までの分解が生じているか、また生じているとすればその臨界温度が何度くらいにあるかについて検討を行なった。分析は中西と伊藤の開発したシリカゲルHとアビセルSFの混合薄層電気泳動法およびクロマトグラフィーによって行なった。加熱した試料溶液に同量の10%TCA溶液を加えて除蛋白し、エーテル洗浄後、イオン交換して薄層電気泳動に供した。泳動はピリジン：酢酸：水(3：12：485)緩衝液を用い、450Vの定電圧下で60分間行なった。泳動終了後、プレートを乾燥させてクロマトグラフィーを行なった。展開溶媒はn-ブタノール：酢酸：水(4：1：1)を用い、6時間展開させたのち、プレートを乾燥して0.5%ニンヒドリンエタノール溶液を噴霧し、110℃に5分間保持して発色させた。160℃で30分間加熱した場合の結果をFig. 9に示す。これによると明瞭な5個のスポットが検出され、それらの3個はロイシン、グルタミン酸およびアスパラギン酸であろうと推定されたが、その他は不明であった。同様に150℃で30分間、160℃および150℃で20分間加熱したものでほぼ同様の傾向を示したが、140℃で30分間加熱したものではスポットの数が3個に減少し、不明瞭となり、140℃、20分間に加熱したものではさらに不明瞭となった。160℃で10分間加熱したものでは30分間および20分間の場合と同様に5個のスポットが検出されたが、150℃で10分間加熱したものではスポットが3個に減少した。これは140℃で30分間加熱したものと同程度であった。130℃、

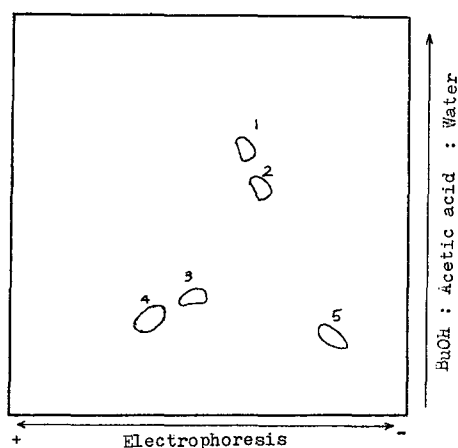


Fig. 9 Fingerprint of decomposed products of β -lactoglobulin heated at 160°C for 30 min.

Those spots were assumed as follows.

1 : unknown, 2 : Leucine, 3 : Glutamic acid, 4: Aspartic acid, 5 : unknown.

Conditions of electrophoresis were the same as for Fig.18.

Chromatography : n-butanol (4), acetic acid (1), water (1).

Detection : spraying with 0.5% ninhydrin in 95% ethanol and drying at 110 °C for 5 min.

30分間および20分間、140°C、10分間、および160°Cで1分間加熱したものではスポットはほとんど検出されなかった。以上のことから、アミノ酸までの加熱分解は、30分間加熱では130~140°C、20分間加熱では約140°C、また10分間加熱では140~150°Cにその臨界温度があるものと推定された。

次に、加熱分解産物の中にどのような揮発性物質が存在するかについて、イオウ化合物およびカルボニル化合物に関する検討を行なった。イオウ化合物は酢酸鉛と水銀塩を用いる方法、およびガスクロマトグラフィーによって分析した。酢酸鉛と水銀塩を用いる方法では硫化水素は100°Cで30分間の加熱においても検出されたが、ジメチルジサルファイドおよびメチルメルカプタンは検出されなかった。その確認のため、TCEP(1, 2, 3-Tris 2-cyano ethoxy propane) 25%をコーティングしたChromosorb GAWDMCSを充填した2mカラムを用いてガスクロマトグラフィーによる分析を行なった。なお、 β -ラクトグロブリン溶液は10%濃度とした。160°Cで30分間加熱したもののガスクロマトグラムはFig. 10に示すとおりである。

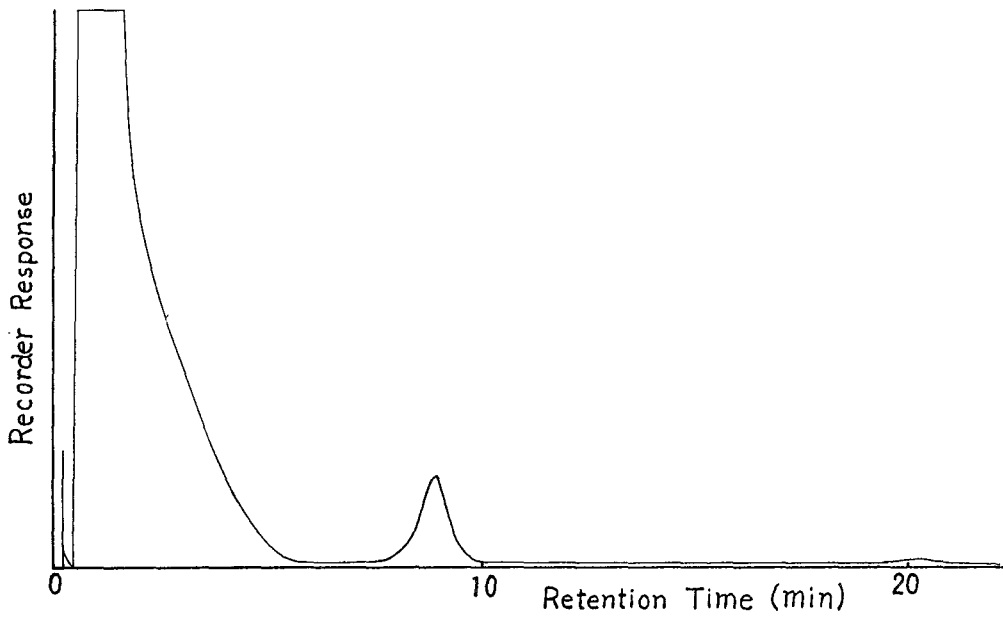


Fig. 10 Gas chromatogram of volatile sulfur compounds of 1.0% β -lactoglobulin solution heated at 160°C for 30 min.

メルカプタンと思われるピークが保持時間が約20分の位置に小さく現われたが、イオウ化合物のほとんどは約9分の位置に現われる硫化水素であることが明らかになった。

カルボニル化合物は加熱した試料を水蒸気蒸留し、溜出液を2,4-dinitrophenyl hydrazine溶液中に受けてhydrazone態とし、これを酢酸エチルで抽出してガスクロマトグラフィーに供した。ガスクロマトグラフィーはSE30の3%カラムを用いた。160°Cで30分間加熱したもののガスクロマトグラムはFig. 11に示すとおりである。これによると5

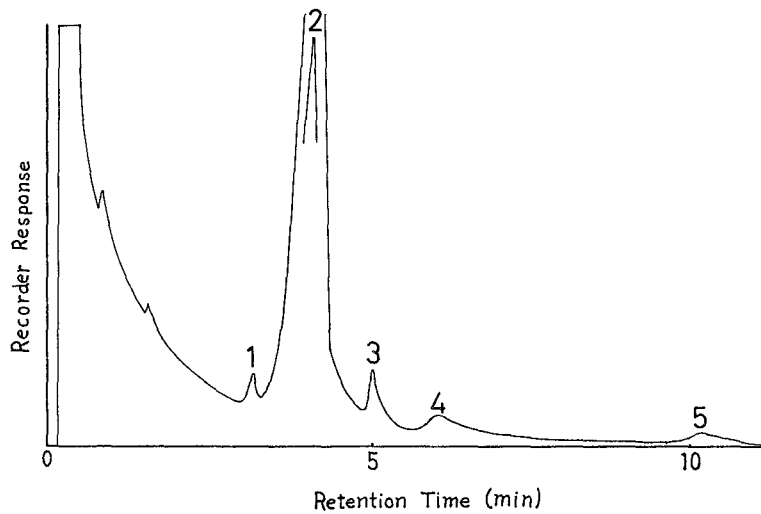


Fig. 11 Gas chromatogram of carbonyl compounds of 0.3% β -lactoglobulin solution heated at 160°C for 30 min.

1 Formaldehyde 2 Acetaldehyde 3 Acetone or Propionaldehyde
4. Butylaldehyde 5. Pentaldehyde

個のピークが得られ、これらはそれぞれフォルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アセトン或いはプロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、およびペンタアルデヒドであろうと推定された。また、 β -ラクトグロブリンの濃度を変えて加熱しても、生成するカルボニル化合物には差異は認められなかった。

4. α -ラクトアルブミンの加熱変化 (第6章)

β -ラクトグロブリンと同様の操作を用いて α -ラクトアルブミンの加熱変化を検討した。ゲル濾過を行なった結果、140℃の一部までは未加熱のコントロール曲線よりも高分子側に溶出しているが、そのほとんどは低分子側に溶出しており、分解していることを示唆している。120℃ではほとんどが高分子側に溶出しているが、一部は既に低分子側に溶出している。この結果だけからは α -ラクトアルブミンと β -ラクトグロブリンの耐熱性の比較は出来ないもので、次に薄層電気泳動およびクロマトグラフィーを用いて分解物の検討を行なった。その結果、160℃、30分間の加熱においてもロイシンおよびアスパラギン酸と思われるスポットと、不明のスポットが現われただけであり、 β -ラクトグロブリンの場合よりもスポットの数は減少した。150℃ではスポットが不明瞭となり、20分間の加熱では150℃でさらに不明瞭となった。10分間の加熱では160℃においてもスポットは検出されなかった。以上のことから、30分間加熱では140~150℃で、20分間加熱では約150℃でアミノ酸までの分解が生じているものと推定された。

揮発性カルボニル化合物のガスクロマトグラムはFig. 12に示すとおりである。これは160℃で30分間加熱したものである。これによると、 β -ラクトグロブリンの場合よりも相対的に炭素数の多いカルボニル化合物も生成しており、フォルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アセトン或いはプロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、およびペンタアルデヒドのほか、 β -ラクトグロブリンでは検出されなかったヘプタノンと思われるピークが認められた。

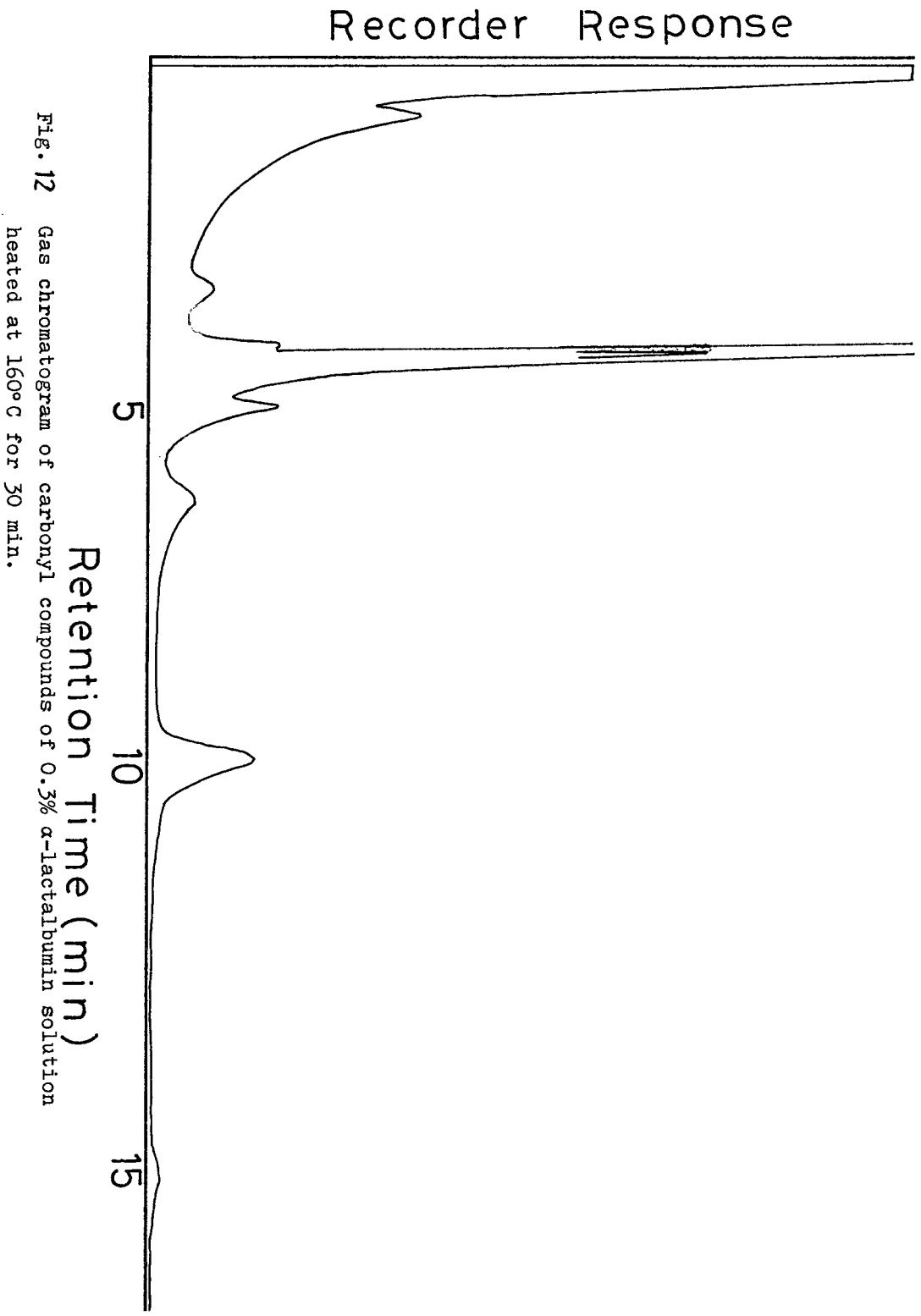


Fig. 12 Gas chromatogram of carbonyl compounds of 0.3% α -lactalbumin solution heated at 160°C for 30 min.

5. 乳清蛋白質の加熱凝固に関する示差熱分析 (第7章)

従来、加熱凝固の研究には、一定の温度で加熱した場合にどの程度の時間で凝固するかについて検討されてきた。しかし、示差熱分析法を応用し、一定の速度で温度を上昇させることによって凝固の生じる臨界温度を検討する方がより効果的であると考えられる。そこで本実験では、示差熱分析法を応用することによって各乳清蛋白質の凝固温度を検討し、同時に β -ラクトグロブリン溶液のpHを変化させた場合、糖類を加えてその濃度を変えた場合、および塩化ナトリウムを加えて、同様にその濃度を変えた場合についての凝固温度を検討した。各乳清蛋白質の凝固温度に関するサーモグラムはFig. 13に示すとおりである。比較のため、牛血清アルブミン、リゾチームおよび卵白アルブミンについても同時に分析を行なった。また、 β -ラクトグロブリンに各種糖類を加えると、糖濃度を増加させるに従って凝固温度は上昇し、なかでもグルコースが最も影響が大であることが認められた。塩化ナトリウムを加えた場合も同様に、塩濃度の増加に伴って凝固温度は上昇する傾向を示した。また、pHを5.0～9.0に変化させた場合には、溶液のpHが酸性側である方が凝固温度は上昇する傾向を示した。

以上要するに、 β -ラクトグロブリン溶液を加熱した際の-SH価の測定およびゲル濾過溶出曲線の変化から、 β -ラクトグロブリンは加熱によって変性し、90℃付近から凝集が激しくなったのち、120～130℃で加熱分解が生じること、またさらに加熱することによって、硫化水素のほか、温度によってはアミノ酸にまで分解されると同時にカルボニル化合物が生成することが明らかにされた。

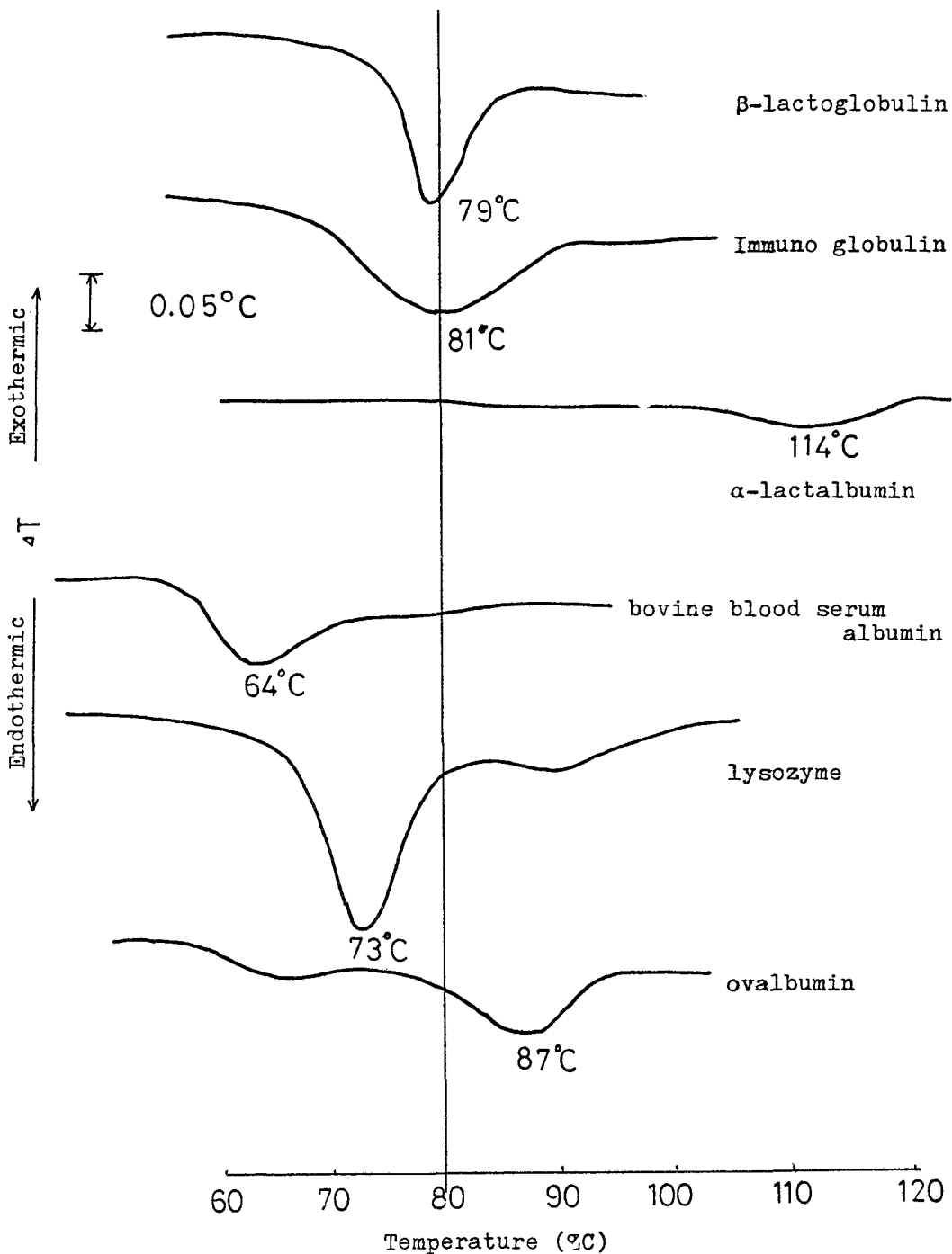


Fig. 13 DTA thermograms of whey proteins and other some proteins.
 (a 20% solution of proteins in 0.1 M phosphate buffer,
 pH 7.0)

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は乳清蛋白質の加熱処理に伴う風味成分の生成の面から、とくに β -ラクトグロブリンに関する検討を行ない、併せて α -ラクトアルブミンの加熱変化および各成分の加熱凝固温度を示差熱分析法によって調べたものである。

まず、 β -ラクトグロブリン溶液を加熱した際の変化を調べたが、SH 価の測定およびゲル濾過溶出曲線の変化から β -ラクトグロブリンは75℃以上で変性し、SH 価が上昇するが、90℃付近から凝集が激しくなったのち、120～130℃で加熱分解が生じ始め、140℃30分以上では分解して、SH 価は著しく高くなり H_2S 、アミノ酸、カルボニル化合物を遊離し、それらが牛乳の加熱による風味変化に関係することを推定した。同様に、 α -ラクトアルブミン溶液を加熱した際の変化を検討したが、 α -ラクトアルブミンは30分間の加熱では、140～150℃で、20分間の加熱では約150℃でアミノ酸までの分解を生じていると推定した。揮発性カルボニル化合物は160℃30分間加熱によって、 β -ラクトグロブリンの場合よりも相対的に炭素数の多いものを生じ、 β -ラクトグロブリンでは検出されなかったヘプタノンと思われるものが認められた。

次いで、 β -ラクトグロブリン、免疫グロブリン、 α -ラクトアルブミン溶液の凝固温度を調べたが、 β -ラクトグロブリンは79℃、免疫グロブリンは81℃、 α -ラクトアルブミンは114℃で凝固し、従来の報告よりもやや高い凝固温度を示した。

以上要するに、著者は乳清蛋白質溶液を加熱する場合、70℃付近で変性し始め、90℃付近から凝集を生じ、120～130℃で加熱分解が生じ、さらに加熱することによって、硫化水素のほか、温度によってアミノ酸にまで分解されると同時にカルボニル化合物が生成し、乳、乳製品の風味に影響することを明かにした。この成果は酪農科学ならびに乳業に寄与するところ大である。よって、審査員一同は著者が農学博士の学位を授与される資格を有するものと判定した。