

NMRによるカゼインミセルの構造解析と その応用に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究は、乳成分の状態分析を行うことにより、乳製品の新たな品質評価方法を確立することを最終目標とした。具体的には、非破壊的測定法である液体 ^{31}P -NMR を用いて、まず、脱脂乳スペクトルを詳細に検討し、次に膜ろ過により得た分画物のスペクトルを比較することでカゼインミセルの存在状態や乳成分間の相互作用について考察した。さらに、液体 ^{31}P -NMR 測定における pH や温度条件を変化させて、乳製品の品質を考える上で重要なコロイドであるカゼインミセルの状態解析を行った。最後に、固体 ^{31}P -NMR を用いて、熱処理の異なる粉乳のスペクトルの差異を比較検討し、乳製品の新たな品質評価方法としての ^{31}P -NMR の可能性に関して論議した。

筆者は脱脂乳における液体 ^{31}P -NMR スペクトルを測定したところ、Belton ら（1985）の報告と同様に、カゼインミセルのホスホセリン残基(SerP)の幅広いピークを 4.3 ppm に、乳清の無機リン酸(Pi)の高いピークを 2.77 ppm に、およびリン脂質の低いピークを 1.49 ppm に確認するとともに、微弱であるがリン酸化糖に由来する新たなピークを 2.03 ppm に見出した。したがって、Belton らが報告したスペクトルの再現性が確認されたと同時に、本実験のサンプル供試量、パルス、積算回数などの液体 ^{31}P -NMR 測定条件は、極めて高感度に脱脂乳中のリン化合物を検出可能であることが示された。

NMR 測定に必要なサンプル量を容易に確保できる膜ろ過を用いて、脱脂乳をカゼインミセル画分と乳清画分に分画した。SDS-PAGE 解析およびそのバンド定量から、低い操作温度にて膜ろ過を行うことにより、 β -カゼインあるいは κ -カゼインの一部が減少したカゼインミセルを調製することができることが示された。カゼイン組成の異なるカゼインミセル画分、および乳清画分を液体 ^{31}P -NMR 測定に供して、カゼインの構造を調べることとした。

脱脂乳の膜ろ過分画物を液体 ^{31}P -NMR 解析に供したところ、カゼインの SerP、乳清の Pi およびリン脂質、さらにリン酸化糖のピークを極めて高感度に検出することができた。分画物スペクトルの半値幅などのピークパラメーターを比較した結果、カゼインミセルと乳清との間に強い相互作用があることが示された。カゼインミセル画分のスペクトルにおいて観察された高いピークは、ピークパラメーターから Pi と考えられた。Van Dijk (1990)に

よるミセル性リン酸カルシウム(MCP)の構造モデルによると、カゼインミセルの MCP には SerP を架橋する安定な部位とその近傍に存在する不安定な部位があり、不安定な部位が乳清中のミネラル平衡と交換反応を担うものとされている。このモデルを考慮すると、カゼインミセル画分の Pi は MCP の不安定な部位に由来する可能性があると考えられた。さらに、液体 ^{31}P -NMR の測定温度を低下させると SerP の単一ピークは分裂した形状に変化した。ピーク形状の分解解析の結果、4個のサブスペクトルがカゼインミセルの SerP を形成していることが示された。したがって、カゼインミセルにおける SerP には4種類の状態があることが明らかとなった。常温および低温の膜ろ過により得られた、カゼイン組成の異なるカゼインミセル画分の SerP のピークを比較した結果、これらのサブスペクトルは、 α_{S1} -カゼイン、 β -カゼインに起因するものがそれぞれ一個ずつ、 κ -カゼインに起因するものが2個と推察された。

低温における β -カゼインの解離現象とカゼインミセルの構造に関してさらなる解析を行うため、液体 ^{31}P -NMR 測定において、まず pH を 7.3 から 5.5 に、次に温度を 35°C から 5°C に変化させてカゼインミセル画分のスペクトルの挙動を詳細に調べた。酸性化により劇的な SerP と Pi の比率の変化があり、これは MCP の hydroxyapatite が溶解し、NMR 測定により検出可能な Pi 量が増加したことを反映していると考えられた。測定温度に関しては、pH7.3 および pH5.5 のカゼインミセル画分では 35°C から 5°C へ低下させることに対する SerP および Pi のピークの挙動に大きな違いが認められた。

以上の結果から、カゼインミセルは低温において、疎水結合力が低下し、SerP-MCP 間の架橋が弱まり、“ゆるい構造”をとるものと考察した。すなわち、筆者らの液体 ^{31}P -NMR によって洞察したカゼインミセルが示した“ゆるい構造”ど、カゼインミセルにはサブユニットは存在せず、ゲル様構造をとるとしている Holt のモデル (1994) には、カゼインミセルの柔軟性という点で相通じるものがあった。さらに、低温時における一部の β -カゼインの解離現象に関しては、ミセル表層にある β -カゼインが解離することが考えられた。

MAS ^{31}P -NMR は MCP のハイドロキシアパタイトを含めて、牛乳中の全てのリン成分を特異的に検出することができる。粉乳の品質を直接的に評価することを目標として、異なる熱処理を受けた脱脂粉乳サンプルを調製し、MAS ^{31}P -NMR により熱履歴による乳成分の変化を ^{31}P スペクトルとして捉えることができるか調べた。様々な熱処理を施された脱脂粉乳をカゼインミセルとして測定に供した場合、 ^{31}P スペクトルから熱履歴や乾燥方法を区別し得ることが示された。この手法は他の種類の粉乳、例えば、近年、日本への輸入量が増加している乳タンパク質濃縮物などへの応用が容易であると考えられた。

本研究の結果、 ^{31}P -NMR はカゼインミセルの構造をミクロ的あるいはマクロ的に解析する上で有益であり、本手法の測定法を発展させることにより、牛乳および乳製品の非破壊的な品質評価方法としての高い可能性も示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 浅 野 行 蔵
副 査 教 授 川 端 潤
副 査 教 授 島 崎 敬 一

学 位 論 文 題 名

NMR によるカゼインミセルの構造解析と その応用に関する研究

本論文は、図 25 枚、表 12、引用文献 38 を含み、8 章からなる総頁 107 の和文論文である。別に参考論文 7 編が添えられている。

本研究は、乳成分の状態分析を行うことにより、乳製品の新たな品質評価方法を確立することを目標に行った。具体的には、非破壊的測定法である液体 ^{31}P -NMR を用いて脱脂乳スペクトルを詳細に検討し、次に膜ろ過により得た分画物のスペクトルを比較することでカゼインミセルの存在状態や乳成分間の相互作用について考察した。また、液体 ^{31}P -NMR 測定における pH や温度条件を変化させて、乳製品の品質を考える上で重要なコロイドであるカゼインミセルの状態解析を行った。さらに、固体 ^{31}P -NMR を用いて、熱処理の異なる粉乳のスペクトルの差異を比較検討し、乳製品の新たな品質評価方法としての ^{31}P -NMR の可能性に関して論議した。

筆者は脱脂乳における液体 ^{31}P -NMR スペクトルを測定したところ、カゼインミセルのホスホセリン残基(SerP)の幅広いピークを 4.3 ppm に、乳清の無機リン酸の高いピークを 2.77 ppm に、およびリン脂質の低いピークを 1.49 ppm に確認するとともに、リン酸化糖に由来する新たなピークを 2.03 ppm に見出した。同時に、本実験のサンプル量、パルス、積算回数などの液体 ^{31}P -NMR 測定条件は、極めて高感度に脱脂乳中のリン化合物を検出可能であることが示された。

NMR 測定に必要なサンプル量を容易に確保できる膜ろ過を用いて、脱脂乳をカゼインミセル画分と乳清画分に分画した。SDS-PAGE 解析およびそのバンド定量から、低い操作温度にて膜ろ過を行うことにより、 β -カゼインあるいは κ -カゼインの一部が減少したカゼインミセルを調製することができることが示された。

脱脂乳の膜ろ過分画物を液体 ^{31}P -NMR 解析に供したところ、カゼインの SerP、乳清の Pi およびリン脂質、さらにリン酸化糖のピークを極めて高感度に検出することができ、カゼインミセルと乳清との間に強い相互作用があることが示された。カゼインミセル画分の高いピークは Pi と考えられた。van Dijk (1990)によるミセル性リン酸カルシウム(MCP)の構造モデルから、カゼインミセル画分の Pi は MCP の安定な SerP 架橋部位の近傍にある不安定な部位に存在すると考えられた。また、液体 ^{31}P -NMR の測定温度を低下させると SerP の単一ピークは分裂した形状に変化し、分解解析の結果4個のサブスペクトルがカゼインミセルの SerP を形成していることが示され、カゼインミセルにおける SerP には4種類の状態があることが明らかとなった。常温および低温の膜ろ過により得られたカゼイン組成の異なるカゼインミセル画分の SerP のピークを比較した結果、サブスペクトルは、 α_{S1} -カゼイン、 β -カゼインに起因するものがそれぞれ一個ずつ、 κ -カゼインに起因するものが2個と推察された。

低温における β -カゼインの解離現象とカゼインミセルの構造に関してさらなる解析を行うため、液体 ^{31}P -NMR 測定において、まず pH を 7.3 から 5.5 に、次に温度を 35°C から 5°C に変化させてカゼインミセル画分のスペクトルの挙動を詳細に調べた。酸性化により SerP と Pi の比率の変化が認められ、これは MCP のヒドロキシアパタイトが溶解し、NMR 測定により検出可能な Pi 量が増加したことを反映していると考えられた。測定温度に関しては、pH7.3 および pH5.5 のカゼインミセル画分では 35°C から 5°C へ低下させることに対する SerP および Pi のピークの挙動に大きな違いが認められた。

MAS ^{31}P -NMR は MCP のヒドロキシアパタイトを含めて、牛乳中の全てのリン成分を特異的に検出することができる。粉乳の品質を直接的に評価することを目標として、異なる熱処理を受けた脱脂粉乳サンプルを調製し、MAS ^{31}P -NMR により熱履歴による乳成分の変化を ^{31}P スペクトルとして捉えることができるか調べた。様々な熱処理を施された脱脂粉乳をカゼインミセルとして測定に供した場合、 ^{31}P スペクトルから熱履歴や乾燥方法を区別し得ることが示された。この手法は他の種類の粉乳、例えば、近年、日本への輸入量が増加している乳タンパク質濃縮物などへの応用が容易であると考えられた。

本研究の結果は、 ^{31}P -NMR はカゼインミセルの構造をミクロ的あるいはマクロ的に解析する上で非常に有益であり、本手法の測定法を発展させることにより、牛乳および乳製品の非破壊的な品質評価方法としての高い可能性が示され、学術的、産業的に大いに価値あるものと判断した。

よって審査員一同は、石井哲也が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。