

牛乳カゼインミセルの保存中における変化

三上正幸・三浦弘之・中村 悟

(帯広畜産大学 畜産物保蔵学教室)

1977年5月6日受理

Degradation of Casein Micelles during Storage

Masayuki MIKAMI*, Hiroyuki MIURA* and Satoru NAKAMURA*

緒 論

カゼインは、MELLANDER¹⁾ (1939) によるチゼリウス電気泳動法によって、 α -、 β - および γ -カゼインから成ることが明らかにされた。しかし γ -カゼイン区分に関しては少量のために分離が困難であり、また一般に50%アルコールに可溶という特殊な性質を持つことから、 α - および β -カゼインとは異なった生合成機構を持つと考えられたこともあった。すなわち、LARSON and GILLESPIE²⁾ (1957) や BARRY³⁾ ら (1958) は、牛乳中に存在する乳蛋白質の起源をアイソトープなどを用いて追究した結果、 α - および β -カゼイン、 β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンは乳腺細胞で合成され、免疫グロブリン、血清アルブミンおよび γ -カゼインは血液から移行する蛋白質であると報告している。しかし、最近の急速な蛋白質化学の進歩によって、漸次各カゼインの一次構造が明らかにされてきた結果、主要な γ -カゼイン区分は β -カゼインの一部ではないかと言われるに至った。

一方牛乳中には分泌後汚染された細菌由来のものでなく、乳腺細胞由来の種々の酵素が微量ながら存在することは古くから知られており、この酵素は一次酵素または非細菌性酵素といわれている。牛乳プロテアーゼもこの一種で、WARNER and POLIS⁴⁾ (1945) は等電点沈殿で得た酸カゼインに存在することを指摘し、ZITTLE⁵⁾ (1965) は酸カゼインからプロテアーゼを分離する方法を考案した。さらに山内ら⁶⁾ (1969) や上野川ら⁷⁾ (1971) はゲルろ過法、CM-セフアデックス法を用い、比活性の高い画分を得た。これを各種カゼインに作用させると、 α - および κ -カゼインよりも β -カゼインに対する分解作用が強く、その分解物の一部が TS- および R-カゼインに類似していることを報告した (上野川・山内⁸⁾ 1972a; 山内・上野川⁹⁾, 1972)。BJÖRCK¹⁰⁾ (1973) による最近の報告においても、このプロテアーゼが β -カゼインを分解し、この時 TS-, R- および γ -カゼインと一致する PGE のバンドが増加すると述

* Laboratory of Preservation of Animal Products, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan.

べている。しかし、乳汁が乳腺細胞内で生合成される過程で γ -カゼイン区分が生ずるのか、あるいは分泌された後に牛乳プロテアーゼによって β -カゼインが分解され、 γ -カゼイン区分を生ずるのか、まだ明らかでない。

本実験はこれらの仮説に対する確証を得る一つの試みとして行った。すなわち WARNER and POLIS⁴⁾ (1945) は、牛乳中のプロテアーゼ活性のほとんどがカゼインと共に沈殿すると報告し、また山内ら¹¹⁾ (1967) は牛乳プロテアーゼ活性と牛乳中の生菌数には相関がなく、その活性は乳腺由来のもので、その大半はカゼイン区分に存在することを明らかにしている。牛乳プロテアーゼに関しては、今まで酸カゼインを使用してその作用を追究していたが、カゼインミセル溶液を用いての研究は少ない。そこで著者らは搾乳後できるだけ早く採取したカゼインミセル懸濁液を作製し、この中にプロテアーゼが存在するものと考え、乳清または pH 7.0 の緩衝液中で保存試験を行い、 γ -カゼイン区分と β -カゼイン区分の消長を調べた。

実験材料および方法

i) 牛乳塩溶液 (milk salt solution): できるだけ牛乳に近い状態でカゼインミセルを懸濁させるため、渡辺ら¹²⁾ (1973) の方法に従い、逆透析法によって牛乳塩溶液を調製し、細菌を抑えるために山内ら⁶⁾ (1969) の使用した 0.02%メルチオレイトナトリウムを添加した。

ii) カゼインミセル溶液の調製: 生乳は帯広畜産大学附属農場から得られたホルスタイン種の混合乳を用い、直ちに脱脂乳とした後 0.02%となるようにメルチオレイトナトリウムを添加した。これを 20,000 rpm (53,000×g), 20°C で 90 分間遠心分離を行い、カゼインミセルの沈殿を得た。これを牛乳塩溶液中で粉碎して懸濁した後、同条件で遠心分離、懸濁の操作を 3 回繰返して洗滌した。最後に得られた沈殿は二分して、一方は牛乳と同様な条件となるように牛乳塩溶液に、他方はカゼインミセルだけの溶液にするため 0.07 M 塩化カリを含む 0.01 M イミダゾール塩酸緩衝液 pH 7.0 に、カゼイン濃度が 2%となるようにそれぞれ懸濁した。細菌の繁殖を抑えるため両液にメルチオレイトナトリウムを添加した後、滅菌試験管に分注し、プロテアーゼの活性適温ならびに乳房内と同様の 37°C で、1 日および 3 日間、また変化の程度を詳しく知るため 10°C で 1 日、3 日、7 日および 10 日間保存して検討した。なお 37°C 3 日間の試料を細菌検査したところ生菌は存在しなかった。

iii) 非蛋白質態窒素 (NPN) の測定: 一定日数保存した試料に、4%トリクロール酢酸 (TCA) を等量加えて除蛋白し、上澄液中の NPN をマイクロキエルダール法により測定した。

iv) カゼインミセルと上澄液 (可溶性カゼイン) の調製: 一定日数保存した前記カゼインミセル懸濁液を、40,000 rpm (100,000×g), 20°C で 30 分間遠心分離を行い、カゼインミセル (沈殿部分) と上澄液に分別した (Fig. 1)。

v) DEAE-セルロースカラムクロマト法: 0.025 M トリス塩酸緩衝液 (3.3 M 尿素含有)

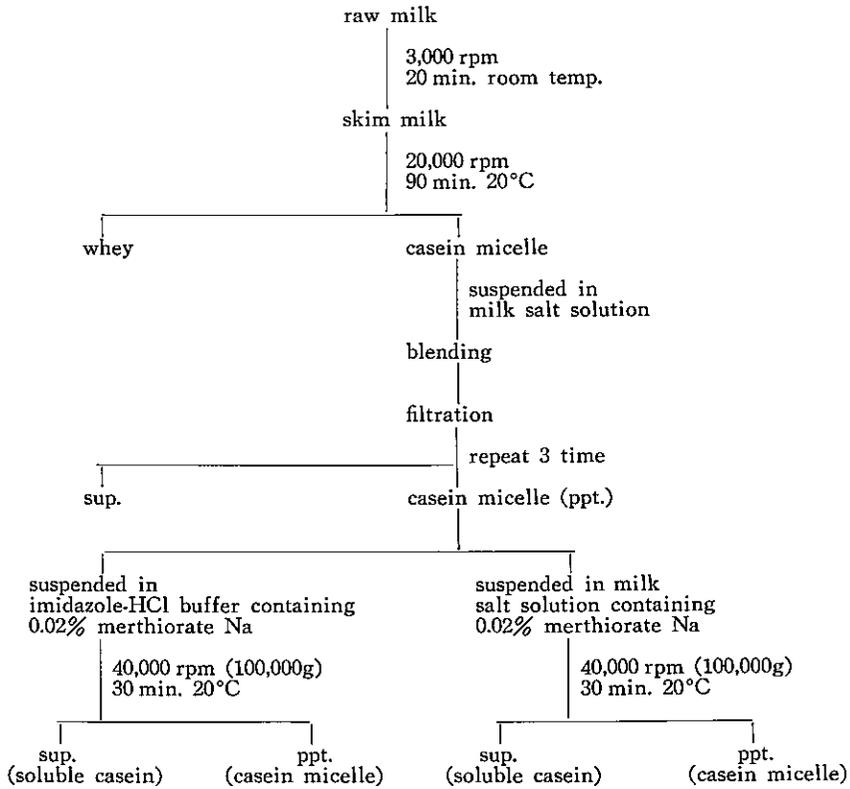


Fig. 1. Preparation of casein micelle and soluble casein.

を用い、カゼインミセルの場合は約 16 mg を同溶液に、上澄液の場合は試料 2 ml に 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (6.6 M 尿素含有) を等量加えてカラム (1.5 cm × 2 cm) に添加した。溶出方法は三上, 三浦¹³⁾ (1974) の方法を、各ピークの算出法は三上ら¹⁴⁾ (1972) の方法に従った。

vi) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PGE) 法: 4.5 M 尿素を含む pH 8.9 のトリス塩酸緩衝液を用い、三上¹⁵⁾ (1971) の方法と同様に行った。

結 果

i) カゼインミセル保存中の NPN の変化: Fig. 2 にカゼインミセル保存中に生じた 2% TCA 可溶の NPN 量を示した。この図から、37°C で 3 日間保存した牛乳塩溶液中 NPN の増加量はわずか 1.4% であるが、イミダゾール塩酸緩衝液に懸濁した場合は、12.5% と著しく増加している。10°C 保存ではイミダゾール塩酸緩衝液に懸濁した時、漸次増加し、10 日目に 4.8% まで増加するが、牛乳塩溶液の場合、NPN はほとんど増加しない。これは分解産物が比較的大きいために、2% TCA に可溶な物質が少なく、また牛乳塩溶液には種々の成分が含

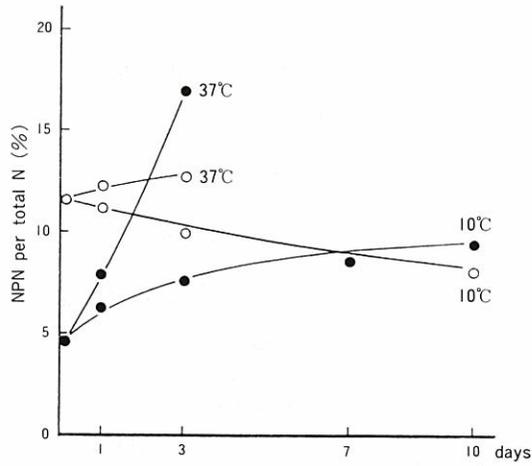


Fig. 2. 2% TCA soluble NPN from casein micelles solution by enzymatic reaction. ○—○, suspended in milk salt solution. ●—●, suspended in imidazole-HCl buffer pH 7.0.

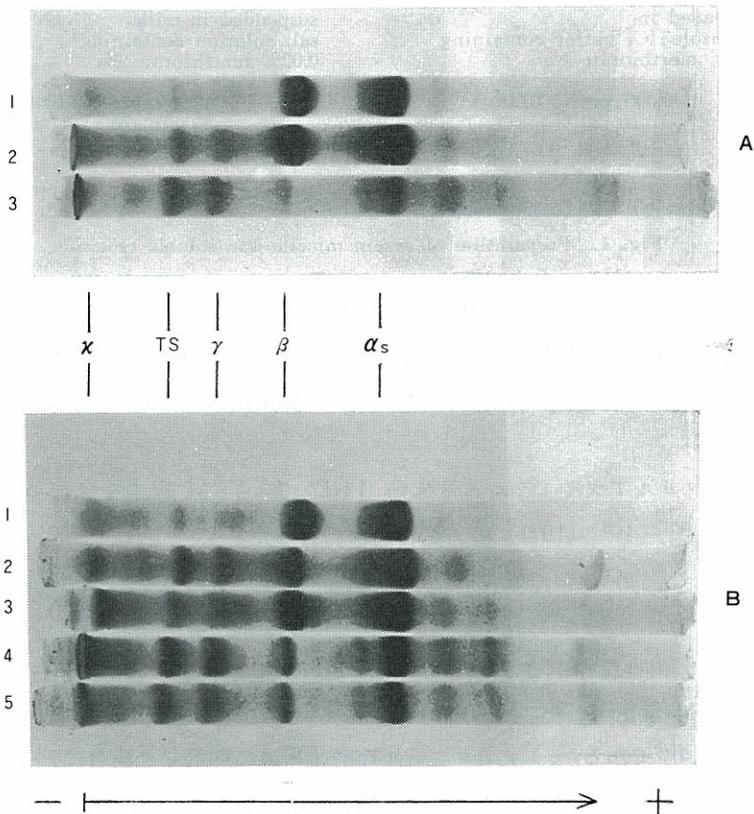


Fig. 3. PGE patterns of casein micelles. Casein micelles in milk salt solution were obtained by ultracentrifugation after several days at 37°C and 10°C. A, 37°C; B, 10°C. 1, whole casein; 2, 1 day; 3, 3 days; 4, 7 days; 5, 10 days.

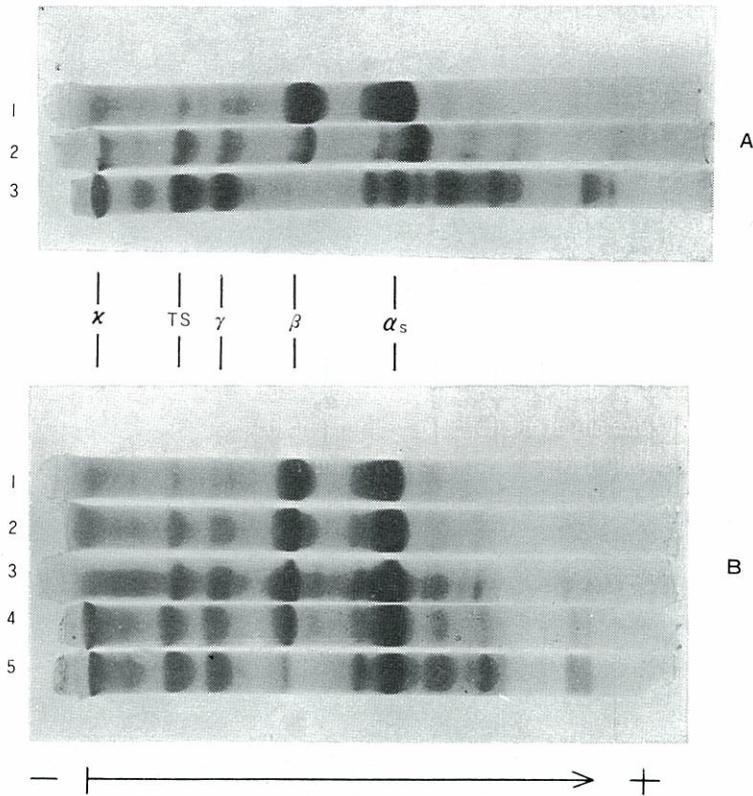


Fig. 4. PGE patterns of casein micelles.

Casein micelles in imidazole-HCl buffer were obtained by ultracentrifugation after several days at 37°C and 10°C. A, 37°C; B, 10°C. 1, whole casein; 2, 1 day; 3, 3 days; 4, 7 days; 5, 10 days.

れているため、それらの影響が出たのかもしれない。しかし詳細は本実験の範囲では不明である。

ii) カゼインミセル保存液の PGE 法による検索: a) 牛乳塩溶液にカゼインミセルを懸濁し、37°C で3日間保存した場合のカゼインミセルの PGE パターンを Fig. 3-A に示した。1日目ではその変化が顕著ではないが、3日目では α_s - および β -カゼインのバンドの減少が見られ、特に β -カゼインのバンドはほとんど消失している。これに反して TS- および γ -カゼインのバンドは著しく増加し、また α_s -カゼインより早く移動する位置のバンドの増加も見られた。同溶液 10°C で10日間保存した場合 (Fig. 3-B), NPN はほとんど増加しないが、TS- および γ -カゼインは1日目からすでに増加し始めることが観察された。7~10日目では α_s - および β -カゼインのバンドは減少し、 α_s -カゼインよりも早く移動する位置に現われるバンドは、37°C に保存した場合よりも増加し、また TS- および γ -カゼインのバンドも同様に増加して、明瞭となることがわかる。

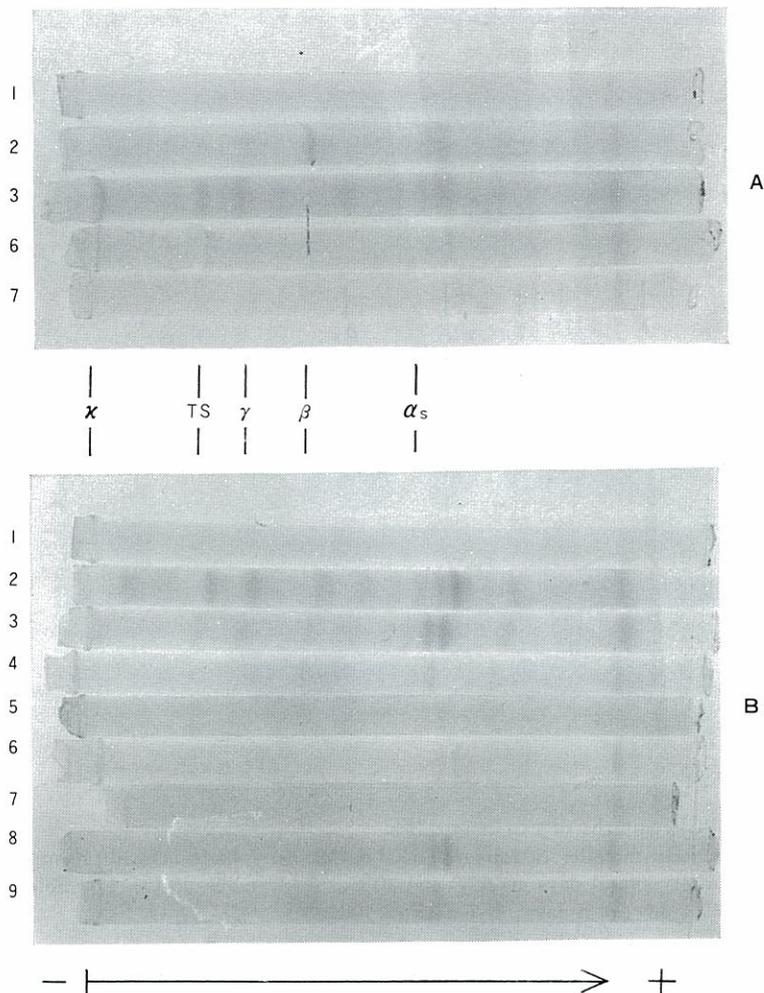


Fig. 5. PGE patterns of soluble casein.

Soluble casein in milk salt solution and imidazole-HCl buffer was obtained by ultracentrifugation after several days at 37°C and 10°C. A, 37°C; B, 10°C. 1, milk salt solution; 2, milk salt solution (1 day); 3, milk salt solution (3 days); 4, milk salt solution (7 days); 5, milk salt solution (10 days); 6, imidazole-HCl buffer (1 day); 7, imidazole-HCl buffer (3 days); 8, imidazole-HCl buffer (7 days); 9, imidazole-HCl (10 days).

b) イミダゾール塩酸緩衝液にカゼインミセルを懸濁した場合、Fig. 4-A から明らかのように、37°C で保存した時のカゼインミセルの PGE パターンは、1 日目で β - および α_s -カゼインのバンドが減少し、3 日目には β -カゼインのバンドが完全に消失した。また α_s -カゼインのバンドの減少も顕著で、数本の細いバンドが残っているにすぎない。一方 TS- および γ -カゼインのバンドは保存日数と共に太くなり、しかも明瞭になった。10°C で保存すると、 α_s -カゼインより移動の早いバンドの増加が見られるが、その理由は明らかでない。他の

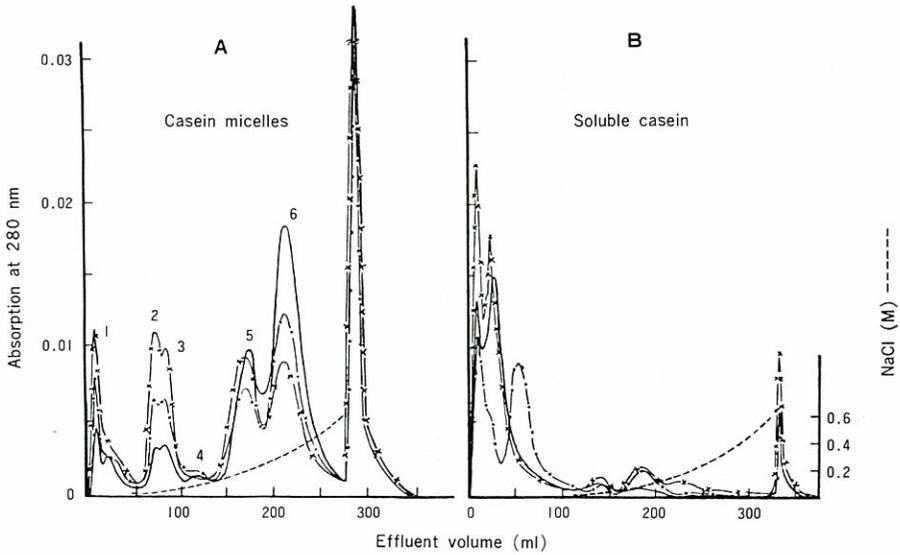


Fig. 6. DEAE-cellulose column chromatograms of casein micelles and soluble casein. Samples (casein micelles and soluble casein) in milk salt solution were obtained by ultracentrifugation after several days at 37°C. —, control; —•—, 1 day; —×—, 3 days.

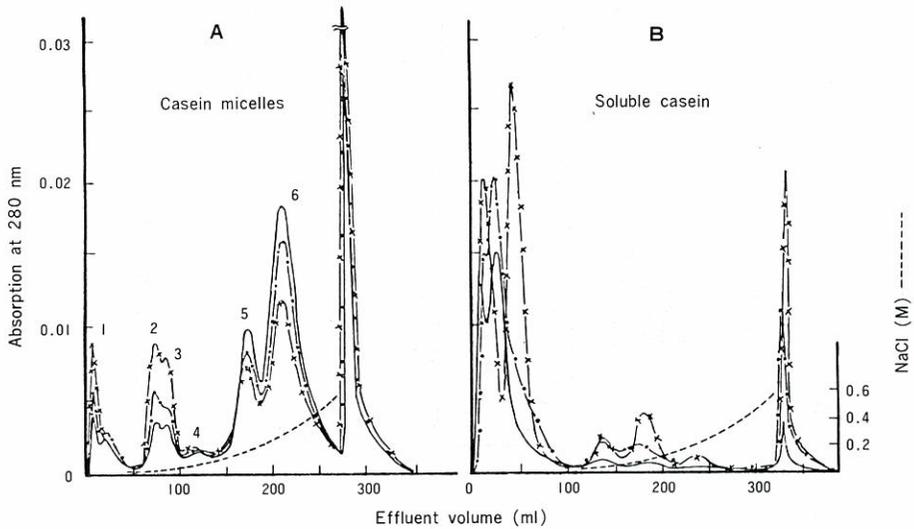


Fig. 7. DEAE cellulose column chromatograms of casein micelles and soluble casein. Samples (casein micelles and soluble casein) in milk salt solution were obtained by ultracentrifugation after several days at 10°C. —, control; —•—, 3 days; —×—, 10 days.

バンドの変化は上記と同様であった。(Fig. 4-B)。

c) 上澄液中のカゼインの PGE パターンを Fig. 5-A, B に示したが、37°C および 10°C で保存した時、いずれの場合もほとんどバンドが認められず、わずかに γ -カゼイン区分

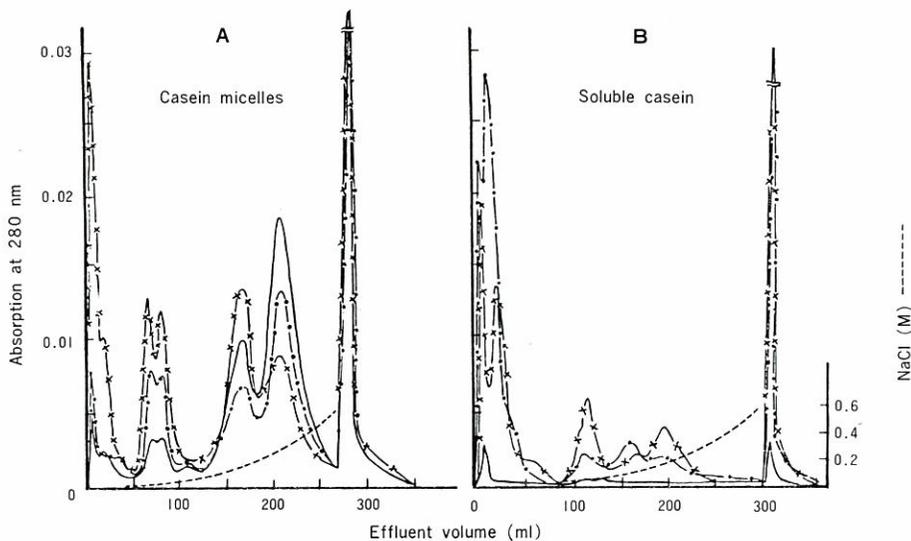


Fig. 8. DEAE-cellulose column chromatograms of casein micelles and soluble casein. Samples in imidazole-HCl buffer were obtained by ultracentrifugation after several days at 37°C. —, control; - - -, 1 day, -x-, 3 days.

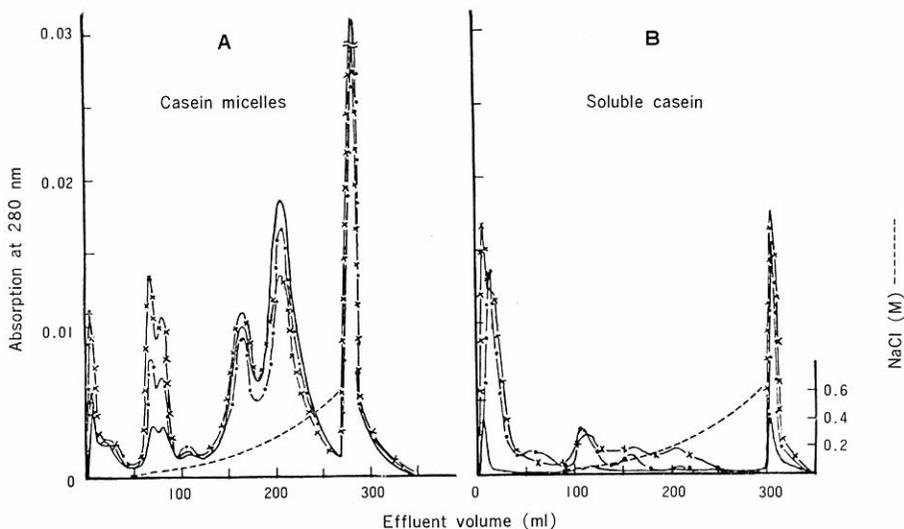


Fig. 9. DEAE-cellulose column chromatograms of casein micelles and soluble casein. Samples in imidazole-HCl buffer were obtained by ultracentrifugation after several days at 10°C. —, control; - - - 3 days; -x-, 10 days.

の位置に見られる程度である。これらのことは上澄液中に可溶性カゼインが少ないことを意味している。

iii) カゼインミセル保存液の DEAE-セルロースクロマト法による検索: a) 牛乳塩溶液にカゼインミセルを懸濁した場合, 37°C で 3 日間保存したときのカゼインミセル部分のクロ

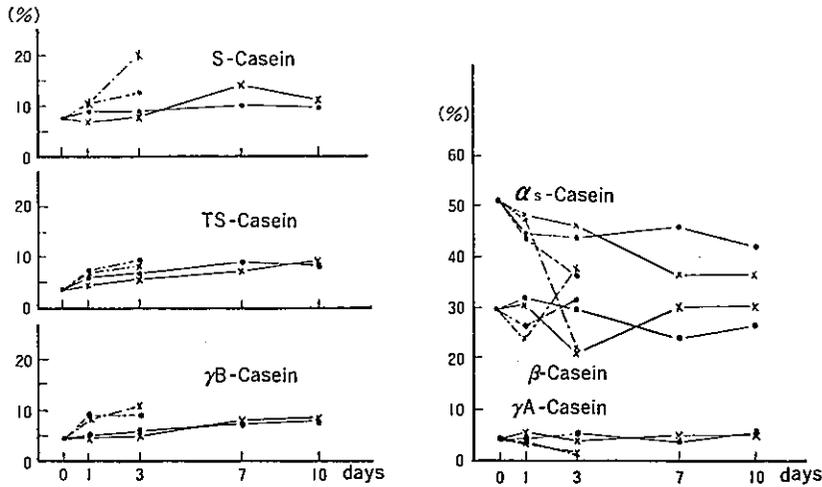


Fig. 10. content of each casein fraction in the casein micelles at DEAE-cellulose column chromatogram.
 —, milk salt solution (10°C); ·····, milk salt solution (37°C);
 - - x - -, imidazole-HCl buffer (10°C); ··· x ···, imidazole-HCl buffer (37°C).

マトグラムを Fig. 6-A に示した。1日目および3日目のものはピーク1の非吸着画分に S-カゼインおよび分解産物のわずかな増加が見られ、ピーク2の TS-カゼインおよびピーク3の γ B-カゼインも保存日数と共に増加しているのが認められた。これは PGE パターンと良く一致している。しかしピーク4に溶出される γ A-カゼインはほとんど変化が見られなかった。ピーク5は β -カゼイン溶出区分で、1日目で減少したが、3日目には増加している。しかし PGE パターンでは (Fig. 3-A), β -カゼインはほとんど消失しているの、この増加した物質は、 β -カゼインの溶出位置に現われた他のカゼインの分解物と思われる。ピーク6は α_s -および κ -カゼインで経時的に減少が認められた。Fig. 6-B はこの時の上澄液のクロマトグラムを示している。対照の場合はほとんどが非吸着性で、吸着部分にわずかに γ -および β -カゼインの小さなピークが認められたが、 α_s ・ κ -カゼイン区分はほとんど認められなかった。1日目および3日目になると、非吸着区分の占める割合は増加するが、吸着部分は少なく、わずかに γ -および β -カゼイン区分の増加が認められる程度である。 α_s ・ κ -カゼイン溶出区分には、新たにみだらかなピークが認められる程度で、上澄中における可溶性カゼインはきわめて少なく、PGE パターンと同様であった。

10°C 10日間保存したカゼインミセルの変化を Fig. 7-A に示した。1日目では対照とほとんど変化がなく (図省略)、3日目で非吸着区分、TS- および γ B-カゼイン区分はわずかに増加した。一方 β - および α_s ・ κ -カゼイン区分は共に減少し、10日目に至るまでこの傾向は持続した。37°C と 10°C の保存試験の結果を対比すると、前者における各カゼイン区分の変化の方が著しかった。上澄液のクロマトグラム (Fig. 7-B)は、非吸着区分がほとんどであり、

吸着部分はわずかに、 r - および β -カゼインの増加が見られる程度である。

b) イミダゾール塩酸緩衝液にカゼインミセルを懸濁した場合、 37°C で保存した時のカゼインミセルのクロマトグラムを Fig. 8-A に示した。そのパターンは牛乳塩溶液に懸濁した場合と同様の傾向であるが、3日目における TS - および rB -カゼイン溶出区分の増加が顕著に認められた。また非吸着性区分も同様に増加しており、PGE パターンでは β -カゼインの消失が見られたが、同じ溶出位置に分解物と思われるピークが現われた。上澄液のクロマトグラムを Fig. 8-B に示したが、他の場合より非吸着性区分のピークが大きく、分解力の強いことが明らかである。

一方吸着区分も比較的大きく、3日目で TS -, rA - および β -カゼインのわずかな増加が認められた。 10°C で保存した場合、カゼインミセルおよび上澄液のクロマトグラム (Fig. 9-A; B) の変化の傾向は、前記とほぼ同様であった。

iv) カゼインミセル中の各カゼインの分布割合: Fig. 6, 7, 8 および 9 におけるカゼインミセルのクロマトグラムから、各カゼインの経時的变化割合を Fig. 10 に示した。この場合の α -カゼイン区分は α_s - および α_r -カゼインからなっており、その割合は日数の経過と共に減少するが、その減少率は 37°C で保存した場合が大きく、特にイミダゾール塩酸緩衝液に懸濁した場合は著しい。 β -カゼイン溶出区分は一旦その割合は減少するが、 37°C 3日目または 10°C で10日目には増加している。このことは PGE の結果から、 β -カゼイン区分の位置に溶出する他のカゼインの分解物の混入によるものと思われる。 r -カゼイン区分は溶出量が少ないためみかけ上の変化は少ないが、 S -, TS - および rB -カゼインは共に増加の傾向を示した。しかし rA -カゼインはほとんど増加しなかった。

3) 考 察

牛乳プロテアーゼに関して、現在までに報告されているもののほとんどは、酸カゼインから抽出したものである。このように酸カゼインから抽出できるということは、プロテアーゼがカゼインと結合して存在していることを意味している。最近 von REIMERDES and KLOSTERMEYER¹⁶⁾ (1974) は牛乳カゼインミセルから牛乳プロテアーゼを抽出し、これを β -カゼインに作用すると、 r - および TS -カゼインに類似するものが生じると報告しており、カゼインミセルに牛乳プロテアーゼが存在していることは明らかである。上野川ら¹⁷⁾ (1969)、上野川、山内¹⁸⁾ (1972 b) によると、牛乳プロテアーゼには酸性およびアルカリ性の2種類が存在し、それぞれの至適 pH は 4.0 および 8.0 であると報告している。また DULLEY¹⁹⁾ (1972) も牛乳プロテアーゼは pH 6.5~8.5 付近で最も活性が高いと報告している。

本実験では、新鮮な牛乳から分離されたカゼインミセルを、直ちに牛乳塩溶液およびイミダゾール塩酸緩衝液に懸濁し、 37°C および 10°C で保存試験を行った。牛乳プロテアーゼに

より分解されたと考えられる NPN の増加量を見ると、37°C 牛乳塩溶液で1日および3日間懸濁した場合、それぞれ0.6および1.4%で、イミダゾール塩酸緩衝液中で保存した場合の3.4および12.5%と比較すると1/4~1/10にすぎない。これは牛乳塩溶液中にプロテアーゼ活性を阻害する物質が存在していると推定され、10°C 10日間の保存でも、緩衝液中では4.8%のNPNが生ずるが、牛乳塩溶液ではほとんど増加しない。このことについて KIERMEIER and SEMPER^{20,21,22} (1960, a; b; c) は、牛乳中にはトリプシン阻害物質があり、もしこれが存在しなければ、牛乳中のプロテアーゼ活性はさらに強いただろうと報告している。牛乳のプロテアーゼ活性は分娩後直ちに高まるが、トリプシン阻害物質は初乳中に多いと言われている。(LASKOWSKI and LASKOWSKI²³ 1951; LASKOWSKI 氏²⁴, 1952)。このように牛乳塩溶液に懸濁して37°Cで3日間保存するとNPNの増加率は低い、未分解で大部分が残っているはずの α_s -および β -カゼインのバンドはほとんど消失している。したがって α_s -および β -カゼインの分解は比較的高分子の状態に留まっているものと思われ、これは同じ温度条件で緩衝液に懸濁した場合でも、PGEパターンにみられるように β -カゼインは完全に消失し、また α_s -カゼインの減少が大きいかかわらず、NPNの増加量は12.5%にすぎないことから類推される。これらのことから、牛乳プロテアーゼによる α_s -および β -カゼインの分解は、比較的分子量が大きなものに切断されるため、2% TCA 可溶性物質が少ないものと考えられる。これらの変化をDEAE-セルロースクロマト法で見ると、 α_s - κ -カゼインが減少し、 γ -カゼイン区分の増加が見られ、これはPGEパターンと一致する。 β -カゼインは37°C 3日間または10°C 10日間保存すると、日数と共に一時減少するが再び増加し、PGEパターンにおける β -カゼインの挙動と相反する。したがってクロマトグラムにおいて β -カゼイン区分に溶出されるものは、同じ電気的性質を持つ α_s -または κ -カゼインから由来する分解物であると考えられ、このことについて、柳谷氏²⁵ (1973) も α_s -カゼインなどの分解物の混入を報告している。クロマトグラムにおける非吸着性区分の経時的な増加はPGEパターンの結果から、S-カゼインばかりでなく、低分子の分解産物またはプラス荷電の物質も含まれると思われる。この外に苛性ソーダ溶出区分の増加も見られるが、この吸着性の強い物質は、 α_s -カゼインより早い位置に泳動するものと考えられる。保存中のカゼインミセルにおいて、 γ -カゼイン区分はS-および γ -カゼインを除いて明らかに増加が認められ、 β -カゼインのバンドの消失から考えて、 β -カゼインの分解物と関係があるものと思われる。

上野川氏¹⁷ (1969) は、牛乳プロテアーゼを酸カゼイン溶液に作用させ、PGE法で追究したところ、 α_s -カゼインよりも β -カゼインが分解されて、TS-およびR-カゼインに相当するバンドが生じることを報告し、その際 α_s -カゼインよりも移動の早いバンドの生成を示した。LEDFORD and CHEN²⁶ (1967) および CARINI 氏^{27,28} (1970, 1971) も β -カゼインまたは酸カゼイン溶液を保存した時、プロテアーゼによって β -カゼインが最初に、ついで α_s -カゼインが

分解され、その際 γ -カゼイン区分に類似した成分が増加すると述べている。しかし細菌を接種した場合またはレンニンおよび他の蛋白質分解酵素のカゼインに対する作用は、一般に κ -カゼインを含む α -カゼイン区分の分解が顕著で、本実験のように β -カゼインを選択的に分解するパターンを示さない。上野川ら²⁰⁾ (1972) は血液中に存在するプラスミンをカゼインに作用させると、 γ -カゼイン区分が増加し、牛乳プロテアーゼと同様な性質を有すると報告している。

本実験では、細菌由来のプロテアーゼ作用を除くため、防腐剤に 0.02%メルチオレイトナトリウムを添加し、生菌数を 0 とし実験を開始しているため、細菌による影響は考えられない。なお γ A-カゼインは他の γ -カゼイン区分を構成するカゼインの消長とはいく分異なった挙動を示し、その出現の由来は明らかでないが、これらのことから牛乳プロテアーゼおよびカゼインの一次構造に関する文献と併せ考えると、 γ -カゼイン区分の出現増加は、 β -カゼインからのものであらうと考えられる。しかし牛乳塩溶液すなわち牛乳中におけるプロテアーゼ活性はそれほど強いとは考えられないので、ホルスタイン乳中に存在する γ -カゼイン区分の、すべてが牛乳プロテアーゼにより生じたか否かは不明であった。

4) 要 約

カゼインミセルを、牛乳塩溶液およびイミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、37°C および 10°C で保存した場合、カゼインに内在すると言われる牛乳プロテアーゼのカゼインミセルに対する作用、特に β -カゼインと γ -カゼイン区分の消長を検討した。

i) 各種条件の下でカゼインミセルを保存した時、2% TCA 可溶性の NPN の増加量は、10°C 10日間よりも 37°C 3日間の場合が多く、また牛乳塩溶液よりもイミダゾール塩酸緩衝液中で保存した場合が多い。しかしこの時の増加量は最高でも 12.5% であった。本実験は防腐剤として、0.02%メルチオレイトナトリウムを加え、細菌の発育を抑えているので、これらのことはカゼインミセル中に存在する牛乳プロテアーゼによるものと考えられる。

ii) カゼインミセルの PGE パターンによると、 α_s - および β -カゼインは経時的に減少しており、特に β -カゼインは 37°C 3日間保存で、ほとんど消失した。一方 γ -カゼイン区分では、TS- および γ -カゼインのバンドが経時的に増加した。DEAE-セルロースクロマト法によると、TS- および γ B-カゼインが増加していた。

iii) 上澄液の PGE パターンおよび DEAE-セルロースクロマトグラムから、カゼインはほとんど存在せず、このため可溶性のカゼインおよび分解産物の変化は検索できなかった。

iv) 牛乳プロテアーゼによる分解産物は比較的高分子であり、カゼインミセル中に存在した。この酵素の活性は、イミダゾール塩酸緩衝液中よりも、牛乳塩溶液中において NPN 増加量が少ないことから、牛乳中ではさほど高くはないが、 γ -カゼイン区分の形成に関与している可能性が考えられる。

文 献

- 1) MELLANDER, O. (1939): *Biochem. Z.*, **300**, 240.
- 2) LARSON, B. L. and GILLESPIE, D. C. (1957): *J. Biol. Chem.*, **227**, 565.
- 3) BARRY, J. M. (1958): *Proc. Roy. Soc.*, B **149**, 380.
- 4) WARNER, R. C. and POLIS, E. (1945): *J. Ame. Chem. Soc.*, **67**, 529.
- 5) ZITTLE, C. A. (1965): *J. Dairy Sci.*, **48**, 771.
- 6) YAMAUCHI, K., KAMINOGAWA, S. and TSUGO, T. (1969): *Jap. J. Zootech.*, **40**, 551.
- 7) KAMINOGAWA, S., SATO, F. and YAMAUCHI, K. (1971): *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1465.
- 8) KAMINOGAWA, S. and YAMAUCHI, K. (1972 a): *ibid*, **36**, 255.
- 9) YAMAUCHI, K. and KAMINOGAWA, S. (1972): *ibid*, **36**, 249.
- 10) BJÖRCK, L. (1973): *Milchwissenschaft*, **28**, 291.
- 11) 山内邦男, 上野川修一, 津郷友吉 (1967): 日農化大会 (昭和42年度)
- 12) 渡辺益光, 加藤 勲, 島崎敬一, 仁木良哉, 有馬俊六郎 (1973): 日畜会報, **44**, 148.
- 13) 三上正幸, 三浦弘之 (1974): 日農化誌, **48**, 585.
- 14) 三上正幸, 仙頭達典, 三浦弘之 (1972): 酪農科学の研究, **21**, A-157.
- 15) MIKAMI, M. (1971): *Jap. J. Zootech.*, **41**, 44.
- 16) Von REIMERDES, E. H. and KLOSTERMEYER, H. (1974): *Milchwissenschaft*, **29**, 517.
- 17) KAMINOGAWA, S., YAMAUCHI, K. and TSUGO, T. (1969): *Jap. J. Zootech. Sci.*, **40**, 559.
- 18) KAMINOGAWA, S. and YAMAUCHI, K. (1972 b): *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2351.
- 19) DULLEY, J. R. (1972): *J. Dairy Res.*, **39**, 1.
- 20) KIERMEIER, F. and SEMPER, G. (1960 a): *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **111**, 282.
- 21) KIERMEIER, F. and SEMPER, G. (1960 b): *ibid*, **111**, 373.
- 22) KIERMEIER, F. and SEMPER, G. (1960 c): *ibid*, **111**, 483.
- 23) LASKOWSKI, M. Jr. and LASKOWSKI, M. (1951): *J. Biol. Chem.*, **190**, 563.
- 24) LASKOWSKI, M. Jr., MARS, P. H. and LASKOWSKI, M. (1952): *ibid*, **198**, 745.
- 25) 柳谷孝幸, 三上正幸, 三浦弘之 (1973): 日農化誌, **47**, 259.
- 26) LEDFORD, R. A. and CHEN, J. H. (1967): *J. Dairy Sci.*, **50**, 947.
- 27) CARINI, S. and BOZZOLATI, M. (1970): *Sci. E. Techni. Lattiero-Casearia.*, **21**, 277.
- 28) CARINI, S., LODI, R. and TODESCO, R. (1971): *ibid*, **22**, 391.
- 29) KAMINOGAWA S., MIZOBUCHI, H. and YAMAUCHI, K. (1972): *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2163.

Summary

In this experiment, degradation of casein micelles, especially digestion of β -casein and appearance of γ -casein fraction, was investigated when casein micelles were suspended in a milk salt solution or imidazole-HCl buffer (pH 7.0) at 10°C and 37°C. Merthiorate Na (0.02%) was used as a preservative.

The 2% TCA soluble NPN increased to a max. 12.5% during the storage of casein micelles suspended in imidazole-HCl buffer for 3 days at 37°C. It was thought that this phenomenon was caused by the action of milk protease.

The band of α_s -casein decreased and that of β -casein almost disappeared from the PGE pattern of casein micelles after 3 days at 37°C. On the other hand γ -casein fraction (TS- and γ B-casein) gradually increased.

Comparatively large molecules which did not exist in the supernatant were obtained

from degradation of casein micelles.

It seemed that the activity of milk protease was higher in the imidazole-HCl buffer than the milk salt solution from the rate of increase of NPN.