

ノート

調製食料品中のミルク成分の分析（第1報）

- 電気泳動法による乳たんぱく質と

大豆たんぱく質の分離定量 -

矢ヶ崎 国秀，加藤 時信*

Analysis of Milk Component in Food Preparations (1)

- Electrophoretic Determination of Milk Protein in
Mixture of Milk Protein and Soy Protein -

Kunihide YAGASAKI and Tokinobu KATO*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531, Iwase, Matsudo-Shi, Chiba-Ken, 271 Japan

A method of determination of milk protein in the protein mixture was studied by electrophoresis with a thirrlayer of 12% SDS polyacrylamide gel (1 mm thick) using a tris-HCl buffer. Gels were stained with 2% amido black 10 B in 50% methanol and 10% acetic acid. The electrophoretograms were traced by zig zag scan densitometry at 525 nm.

Milk protein content in the mixture of milk protein and soy protein was calculated from the relationship between the band intensity ratio of key bands (one of the band of soy protein and the bands of casein or α -lactoglobulin) on the electrophoretogram and concentration of milk protein.

The coefficients of variation for the casein, soy protein and α -lactoglobulin, soy protein was 2.3% or less, which make this precise enough to be useful in determination milk protein in imported high protein food preparations based on soy protein and milk protein.

- Received July 4, 1985 -

1 緒 言

輸入調製食料品で、関税率表第 21.07 号 - 2 に該当するもののうち、ミルクの成分である乳たんぱく質、乳脂肪、乳糖及び灰分の含有量が、乾燥状態において全重量の 30% 以上のものは原則として輸入割当対象品目となる¹⁾。したがって、調製食料品にミルク成分が含まれている場合には、その輸入者にとって税關分析による定量結果が重要な関心事になっている。

従来、関税行政における調製食料品中のミルク成分の定量法は、ミルク成分として乳糖を含む乳製品、たとえば脱脂粉乳、全脂粉乳又はホエイが単独で他の食用品と配合されている場合には、乳糖が酵素法（乳糖定量用の調製試薬が市販されている。）により選択的に精度良く定量できるので乳糖を定量し、調製食料品の乳糖の含有量と乳製品の乳糖の一般的な含有量の関係から算出する方法が採用されている。また、乳脂肪と他の油脂からなる混合調製品中の乳脂肪の定量は、直接ガスクロマトグラフィーによってトリグリセリドを分離する方法^{2,3)}が多く採用されている。

しかしながら、調製食料品は多種多様のものがあり、それらに配合されているミルク成分の定量法には画一的なものではなく、配合原料の組合せを考慮した工夫・選択を強いられている。

本報では、最近の健康食品ブームにのって輸入が増加している高たんぱく質食品、たとえば、“Protein powder”と呼ばれるもので、大豆たんぱく質または脱脂大豆とカゼインまたはラクトアルブミン（ホエイたんぱく質）の混合物をベースとした調製食料品の分析を目的として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、乳たんぱく質と大豆たんぱく質の分離定量を行う方法について検討したので、その結果を報告する。

2 実 験

2.1 試料及び試料調製

2.1.1 試 料

- (1) - ラクトグロブリン シグマ社製
- (2) カゼイン 輸入品

(3) 大豆たんぱく質（アジプロン M2）味の素社製

(4) 輸入調製食料品 4 点（以下輸入品 A, B, C, D で記載し、具体的な商品名等は省略する。）

2.1.2 試料調製

(1) 試料のたんぱく質濃度を 5~6 mg/ml に調製するため、あらかじめ各試料の粗たんぱく質量をケルダール法により求めた。

カゼイン	88.6%
大豆たんぱく質	86.3%
輸入品 A	62.1%
輸入品 B	35.8%
輸入品 C	83.7%
輸入品 D	84.9%

（ - ラクトグロブリンはラベル表示の 98% とした。）

(2) 各輸入品はたんぱく質として 10mg になるよう採取し、試料調製液（後述）2ml に溶解し電気泳動用試料とする。

3 検量線用試料の調製

i) 次のように試料を採取し、試料調製液に溶かす。

試 料	試料採取量	試料調製液
カゼイン	56.5mg	10ml
- ラクトグロブリン	25.5mg	5ml
大豆たんぱく質	115.9mg	10ml

ii) 上記試料溶液を次のように混合し、電気泳動用試料とする。

4.1 乳たんぱく質：

大豆たんぱく質	20:80	30:70	40:60
---------	-------	-------	-------

4.2 カゼインまたは

- ラクトグロブリン	0.4ml	0.6ml	0.8ml
------------	-------	-------	-------

大豆たんぱく質	0.8ml	0.7ml	0.6ml
---------	-------	-------	-------

試料調製液	0.8ml	0.7ml	0.6ml
-------	-------	-------	-------

(4) 各電気泳動用試料に B.P.B 溶液（後述）をマイクロシリンジで 10μl 加える。

2.2 試薬及び装置

試薬の調製は主として鈴木の方法⁴⁾によった。また、使用した水はすべて蒸留水またはイオン交換水である。

(1) アクリルアミド溶液

ノート 調製食品中のミルク成分の分析(第1報) - 電気泳動法による乳たんぱく質と大豆たんぱく質の分離定量 -

- アクリルアミド 44.4g, メチレンビスアクリルアミド 1.2g を水で 100ml にする。
- (2) ゲル調製用緩衝液
- i) 分離ゲル用 (1.5M トリス塩酸緩衝液)

トリス (トリスヒドロキシアミノメタン) 18.15g を 6N 塩酸で pH8.8 に合わせて 100ml にする。
 - ii) 濃縮ゲル用 (0.5M トリス塩酸緩衝液) トリス 6g を 6N 塩酸で pH6.8 に合わせて 100ml にする。
- (3) 10%SDS 溶液
- ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 5g を水で 50ml にする。
- (4) 過硫酸アンモニウム
- 0.2g を水で 2ml にする (用時調製)
- (5) 電極槽用緩衝液
- トリス 12g, グリシン 56g, SDS 2g を水で 2l にする。
- (6) 染色液⁵⁾
- アミドブラック 10 B 10g をメチルアルコール 500ml に溶かし, 次に酢酸 100ml を加え, 水 400ml を加えてよく混合する。
- (7) 脱色液
- メチルアルコール 250ml, 酢酸 70ml に水を加えて 1l にする。
- (8) 試料調製液
- SDS 1g, メルカプトエタノール 1ml, グリセリン 20ml, 0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) 2ml に水を加えて 100ml にする。
- (9) BPB 溶液
- 少量のプロムフェノールブルー (BPB) を適量の水に溶かし, N/100 水酸化ナトリウム 1~2 滴, グリセリン 3~4 滴加える。
- (10) 3%グリセリン溶液
- グリセリン 15ml に水を加えて 500ml にする。
- (11) 電気泳動装置
- SJ-1060 型・SGD 型スラブゲル電気泳動装置(アート株式会社)
- (12) デンシトメーター
- CS910 型二波長薄層クロマトスキャナー
(島津製作所(株))

2.3 ゲルの調製

(1) 分離ゲルの調製

予備実験で, ポリアクリルアミドゲルは濃度 12%, 1mm 厚のものが最適であることが判明したので, 以後この条件のゲルを用いた。

アクリルアミド溶液 8.1ml, 1.5M トリス塩酸緩衝液 (pH8.8) 7.5ml, 水 13.8ml, 10% SDS 0.3ml, 過硫酸アンモニウム 0.3ml を混合し, 脱気後, TEMED (N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン) 0.03ml を加える。

(2) 濃縮ゲルの調製

アクリルアミド溶液 1.1ml, 0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) 2.5ml, 水 6.2ml, 10% SDS 0.1ml, 過硫酸アンモニウム 0.1ml を混ぜ, ゲル作成直前に TEMED 0.01ml を加える。

(3) ゲル作成

分離ゲル用混合液を, ゲル作成台上にあらかじめ組立てたガラスプレートの間に八分目まで流し込む。ゲル溶液の上に水を注射器等で静かに重層し, 明所に静置する。重合が完了したら上部の水と未重合の溶液を捨て, TEMED を加える前の濃縮ゲル用混合液で洗った後, 20 検体用試料溝用コームを入れ, 濃縮ゲルを作成する。

2.4 電気泳動操作

2.3 で作成したポリアクリルアミドゲル泳動ブレートから試料溝用コームをていねいに引き抜き, 電極槽用緩衝液で試料溝を洗う。泳動ブレートを電気泳動装置にセットし, 端から 4, 5 番目の試料溝に 2.1.2 で調製した試料の 5 μl をマイクロシリジで注入する。さらに試料溝を 2 つ空けて試料を注入していくと, 同一ゲル上で 5 検体の試料が泳動できる。

電極槽に緩衝液を満たし, 26mA の定電流を通ずる。泳動先端の位置がゲル下端より 5mm 位になったとき泳動を終了する。この条件で泳動時間は約 3 時間である。

2.5 染色及び脱色

泳動を終了したゲルはアミドブラック10Bの染色液に約30分間浸漬して染色する。脱色は電気脱色(2Aで10分間)後、数時間自然脱色し十分に脱色する。脱色後3%グリセリン溶液に約30分間浸漬した後薄層クロマト用ガラス板上に乗せる。

2.6 デンシトグラムの作成

染色したゲルは二波長のデンシトメーターを用いて、試料側525nm及び対照側700nmの波長で、照射光束 $1.25 \times 1.25\text{mm}$ のジグザグスキャンによりたんぱく質の分離パターンをプロファイル曲線で記録した。

3 結果及び考察

3.1 乳たんぱく質濃度と積分強度

乳たんぱく質(カゼインまたは β -ラクトグロブリン、以下同じ)の定量は泳動像のプロファイル曲線の積分強度と乳たんぱく質の濃度との関係から得られた検量線を用いて行った。しかし、乳たんぱく質のみを泳動し、記録したプロファイル曲線の積分強度と乳たんぱく質の濃度との関係から得られる回帰直線は、良い直線性があるものの、これを検量線とし、濃度既知の乳たんぱく質-大豆たんぱく質混合物の定量を行うと、乳たんぱく質の濃度は実際の濃度より高めにでる。これは大豆たんぱく質の泳動像が、何本かのバンド及び原点から泳動先端まで、ある濃度勾配をもって連続して泳動している部分とからなっており、後者がバックグラウンドとして影響しているためと考えられる。

3.2 キーバンドの選定

大豆たんぱく質によるバックグラウンドの影響を除くため、乳たんぱく質-大豆たんぱく質混合物を泳動させ、両者のバンドのうち互いに影響し合わないバンドをキーバンドとし、このキーバンドのプロファイル曲線の積分強度比と乳たんぱく質濃度との関係を求ることにした。

Fig.1はカゼイン、 β -ラクトグロブリン及び大豆たんぱく質の電気泳動像のデンシトグラムでプロファイル曲線により示したものである。大豆たんぱ

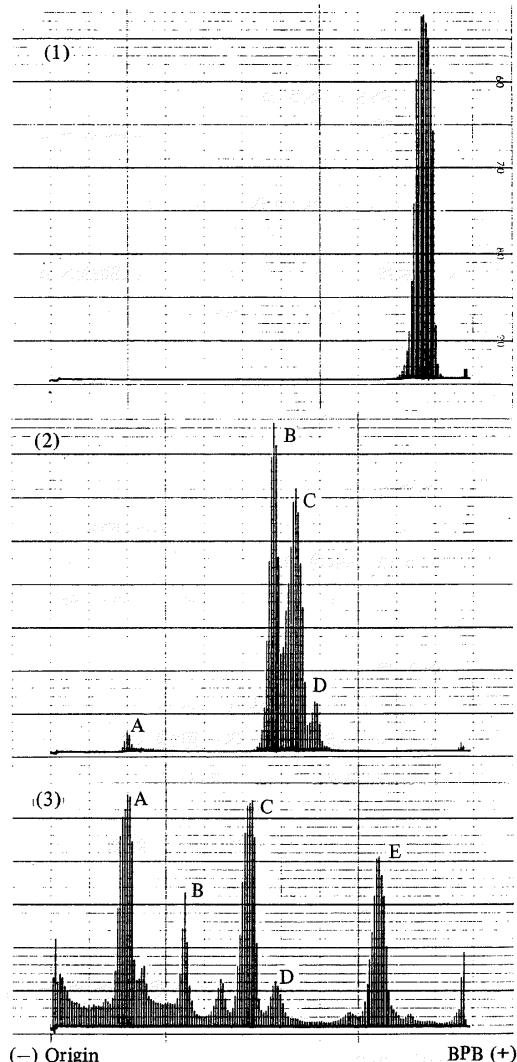


Fig.1 Profiles of electrophoretograms of protein

Wave length : Sample 525nm, Reference 700nm Zig-zag scanning densitometer with linearizer was used to trace the electrophoretogram.

- (1) β -lactoglobulin, (2) Casein,
- (3) Soy protein

く質のピークAはカゼインのピークAと重なり、大豆たんぱく質のピークC及びDはカゼインのピークBの影響を受け、大豆たんぱく質のピークEは安定

ノート 調製食料品中のミルク成分の分析(第1報) - 電気泳動法による乳たんぱく質と大豆たんぱく質の分離定量 -

したプロファイル曲線が得られにくいこと等があるので、大豆たんぱく質のキーバンドとしてピーク B のバンドを、カゼインのキーバンドとしてピーク C 及び D のバンドを選定した。 - ラクトグロブリンは一本のバンドが得られるのでこれをキーバンドとした。

3.3 検量線及び回収率

Table 1 及び 2 は検量線用試料の乳たんぱく質及び大豆たんぱく質のキーバンドより得られたプロファイル曲線の積分強度比と乳たんぱく質濃度との関係から求めた回帰直線の式と、2.1.2 に準じて調製した標準調製試料 S1(乳たんぱく質 : 大豆たんぱく質 = 35 : 65) 及び S2(同 = 25 : 75) の回収率を示したものである。

回帰直線の相関係数は 0.999 ~ 1.000 までの値が得られ直線性に優れているが、直線の傾きは異なっている。これは泳動距離、染色あるいは脱色の違い等によりゲルが一枚毎に異なった状態であることに

Table 1 Recovery of casein from standard mixtures

No.	recovery of casein (%)		Regression equations
	S1	S2	
1	99.1	98.5	$Y = 1.6526X + 0.2609$ ($r = 0.99995$)
2	102.1	100.9	$Y = 1.5333X + 0.3824$ ($r = 0.99948$)
3	100.9	99.2	$Y = 1.2240X + 0.5674$ ($r = 0.99907$)
4	100.1	99.7	$Y = 0.7850X + 0.6624$ ($r = 0.99993$)
5	101.4	101.1	$Y = 1.5911X + 0.0957$ ($r = 1.00000$)
Mean	100.7	99.9	
St. D	1.04	0.99	
C.V (%)	1.03	0.99	

Standard mixture : S1 (casein : soy protein=35 : 65)

S2 (casein : soy protein=25 : 75)

Y : concentration of casein (% or mg)

X : ratio of band intensity

r : coefficient of correlation

Regression equations were obtained from each different gel

起因していると考えられる。したがって、同一ゲル上で、輸入品等の試料と検量線用試料を泳動しなければならない。また、検量線は乳たんぱく質濃度が 3 ~ 40% の範囲で直線性があった。

回収率はほぼ 100% と良好であり、変動幅もカゼイン - 大豆たんぱく質系のものでは ± 4% で、この種のゲルから求めた値としては小さく再現性も良いといえる。

Table 2 Recovery of -lactoglobulin from standard mixtures

No.	recovery of β -lacto-globulin (%)		Regression equations
	S1	S2	
1	102.4	96.6	$Y = 0.8478X + 0.6315$ ($r = 1.00000$)
2	99.9	103.6	$Y = 1.2077X - 0.3623$ ($r = 0.99991$)
3	98.4	99.5	$Y = 1.2169X - 2.9248$ ($r = 0.99980$)
4	98.1	101.4	$Y = 1.8085X - 1.0286$ ($r = 0.99992$)
5	99.4	99.3	$Y = 0.5752X + 0.4232$ ($r = 0.99915$)
Mean	99.6	100.1	
St. D	1.53	2.33	
C.V (%)	1.53	2.33	

The compositions of standard mixture S1 and S2 are the same as cited in Table 1

Y : concentration of -lactoglobulin (% or mg)

X : ratio of band intensity

r : coefficient of correlation

Regression equations were obtained from each different gel

3.4 全乳たんぱく質の計算

この方法では単にカゼイン量または - ラクトグロブリン量が求まるのみであるが、調製食料品中のミルク成分は、たとえば、脱脂粉乳、ホエイあるいはカゼイナートとホエイの混合物など種々の形態で存在しているので、全乳たんぱく質量として求める必要がある。したがって、脱脂粉乳、全脂粉乳、ホエイ等が使用されている場合は、定量したカゼイン量または - ラクトグロブリン量と文献値等の一般的含有量との関係から全乳たんぱく質量を算出する。

となる。カゼイン量からは、使用されているミルク成分に応じて、カゼイン量またはカゼイナート量あるいは一般的含有量から脱脂粉乳等の全乳たんぱく質量が求められ、- ラクトグロブリンからは一般的含有量を用いてホエイたんぱく質量が求められる。

また、カゼイン及び - ラクトグロブリンの両者を定量することにより、たとえば、脱脂粉乳及びホエイたんぱく質が添加されているような食品中の全乳たんぱく質の定量が可能である。

Table 3 Determination of milk protein in imported food preparations

Imported food preparations	Milk protein (Added)	Content (%)		
		Casein	β -lacto-globulin	Whole milk protein (%) [*]
A	Caseinate	34.3	—	34.3
B	Skimmed milk	12.8	—	16.6
C	Whey protein	—	21.4	34.2
D	Casein/Whey protein	9.8	3.4	14.9

* Coefficient of conversion from casein content to skimm edmilk protein content and from β -lactoglobulin content to whey protein content are 0.768 and 0.629, respectively (See to Reference 6).

3.5 輸入調製食料品の分析

この方法による輸入調製食料品の分析結果を Table 3 に示した。

この方法は、たんぱく質組成が乳たんぱく質及び大豆たんぱく質からなる調製食料品中の乳たんぱく質の定量法として、十分適用できる方法であると考えられる。

4 要 約

調製食料品中の乳たんぱく質の定量に適用することを目的として、乳たんぱく質 - 大豆たんぱく質混合物中の乳たんぱく質の電気泳動法による分離定量法について検討した。

1mm 厚のスラブ型 12%ポリアクリルアミドゲル (SDS 使用) をもちいて、濃度既知の乳たんぱく質 - 大豆たんぱく質混合物を電気泳動により分離し、分離した乳たんぱく質及び大豆たんぱく質のバンドから、それぞれキー バンドを選定し、二波長デンシトメーターを用いてジグザグスキャンによりプロファイル曲線を記録する。

このプロファイル曲線の積分強度比と乳たんぱく質濃度との関係は良い直線関係にあり、これを検量線として、標準調製試料を定量すると良好な結果、回収率及び再現性が得られた。

この方法を輸入調製食料品の分析に応用したところ良好な結果が得られた。

文 献

- 1) 通商産業省：“輸入注意事項 59 第 9 号”，59 貿局第 215 号（昭 59, 7, 23）
- 2) 出来三男, 加藤時信, 蒲谷恭一: 本誌, 12, 11 (1972)
- 3) 笹川邦男, 大野幸雄: 本誌, 24, 51 (1983)
- 4) 鈴木勝彦: 遺伝, 11, 43 (1977)
- 5) 電気泳動学会編: 電気泳動実験法, 187 (1976)
- 6) 穴釜雄三: 乳学, 36 (1975) (光琳書院)