

ミルクたんぱく質のキャラクタリゼーション

井上 聡*, 行本 剛*, 高山 義紀*, 長井 哲也*

Characterization of Milk Proteins

Satoshi INOUE*, Takeshi YUKIMOTO*, Yoshinori TAKAYAMA*, Tetsuya NAGAI*,

*Kobe Customs Laboratory

12-1, Shinko-cho, chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0041 Japan

Protein goods classified under Chapter 35 in the Customs Tariff Schedule vary widely in their raw materials and manufacturing processes. In particular, proteins made from milk are in some cases classified under both Chapter 35 and Chapter 4 depending on differences in protein content or manufacturing process. In this study, with the purpose of using data obtained for future analysis and customs classification, we studied various analysis experiments with standard reagents and imported goods consisting of milk proteins. By characterizing the properties of these products, we found that among standard reagents and imported goods consisting of milk proteins there are some protein goods do not have usual characteristics. This indicates the actions needed for future analysis and customs classification.

1. 諸 言

たんぱく系物質には原料や成分の違いにより多種多様の製品があるが、牛乳に由来するミルクたんぱく質は組成や製造工程等の違いによっては、適用される関税率表上の所属区分や税率が異なっている。

税関分析におけるミルクたんぱく質の種類の判別は SDS 電気泳動等の実験を行い、必要に応じてたんぱく質や脂肪分の含有割合を測定しているが、近年輸入される製品の中には、溶解特性や製造方法が従来品とは異なるものが見受けられるようになった。

ここでは今後の分析に役立てるため、ミルクたんぱく質の標準試薬及び各種輸入品の特性について試験検討した結果、いくつかの知見が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試 料

全脂粉乳 2 種 (輸入品)
スキムミルク 3 種 (和光純薬、市販品等)
ホエイパウダー (輸入品)
カゼイン系製品 8 種 (和光純薬、米山薬品等)
アルブミン系製品 5 種 (和光純薬、東京化成等)
ホエイプロテイン (輸入品)

ホエイプロテインコンセントレート (輸入品) (以下、「WPC」という。)
ホエイプロテインアイソレート (輸入品) (以下、「WPI」という。)
トータルミルクプロテイン (輸入品) (以下、「TMP」という。)
ミルクプロテインコンセントレート (輸入品) (以下、「MPC」という。)
ミルクプロテインアイソレート (輸入品) (以下、「MPI」という。)
ホエイプロテイン及び TMP を 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3 の割合で混合したもの

2.1.2 試 薬

濃硫酸 (和光純薬)
0.05 mol/l 硫酸 (和光純薬)
過酸化水素水 (和光純薬)
Kjeltabs (フォス・ジャパン)
プロモクレゾールグリーン (和光純薬)
PhastGel Gradient 8-25 (GE healthcare) (以下、「泳動ゲル」という。)
PhastGel Buffer Strips SDS (GE healthcare)
PhastGel Blue R (GE healthcare)
ラウリル硫酸ナトリウム (片山化学) (以下、「SDS」という。)
2-メルカプトエタノール (和光純薬)
トリスヒドロキシアミノメタン (Pharmacia) (以下、「トリス」という。)
メタノール (和光純薬)
グリセリン (和光純薬)
酢酸 (和光純薬)

2.2 分析装置及び条件

2.2.1 ケルダール法

装置 : 2400 ケルテックオートシステム

* 神戸税関業務部 〒650-0041 兵庫県神戸市中央区新港町 12-1

Table 1 Determination of milk protein in various goods (unit:%)

No.	Goods Name	Protein (A)	Water (B)	Ash (C)	Color of ash	Total (A+B+C)
1	Whole Milk Powder	24.5	4.3	5.1	White	33.9
2	Whole Milk Powder	23.9	3.1	5.7	White	32.7
3	Skim Milk Powder	31.3	6.4	6.6	White	44.3
4	Skim Milk Powder (reagents)	35.8	4.5	7.9	White	48.2
5	Skim Milk Powder	35.6	5.7	7.7	White	49.1
6	Whey Powder (imports)	12.5	4.6	5.3	White	22.4
7	Casein, from Milk (reagents)	87.9	9.4	2.9	Black	100.2
8	α - Casein (reagents)	89.2	†	†	†	†
9	Casein (imports)	67.6	10.1	4.4	Gray	82.1
10	Acid Casein (imports)	86.4	11.2	2.8	Black	100.4
11	Rennet Casein (imports)	82.4	8.7	8.1	Black	99.2
12	Rennet Casein (imports)	81.7	9.4	8.2	Black	99.3
13	Casein Sodium (reagents)	84.9	10.5	3.2	White	98.6
14	Casein Sodium (imports)	84.1	8.7	3.9	White	96.7
15	LACTALBUMIN (reagents)	87.5	5.1	1.8	Black	94.4
16	Albumin(Milk) (reagents)	77.9	6.2	5.2	White	89.3
17	LACTALBUMIN (reagents)	86.8	6.2	2.1	Black	95.1
18	Lactalbumin (reagents)	84.7	†	†	†	†
19	Albumin, Bovine Serum (reagents)	88.3	†	†	†	†
20	Whey Protein (imports)	75.2	7.2	5.6	Gray	88.1
21	WPC (imports)	78.8	5.6	3.6	Gray	87.9
22	WPI (imports)	86.1	7.1	0.5	Black	93.7
23	TMP (imports)	90.7	5.3	3.4	White	99.5
24	MPC (imports)	81.7	4.4	6.3	Gray	92.4
25	MPI (imports)	80.9	9.2	6.3	Gray	96.4
26	Whey Protein 75 wt % TMP 25 wt %	78.2	7.5	4.9	Gray	90.6
27	Whey Protein 50 wt % TMP 50 wt %	82.8	7.2	4.4	Gray	94.4
28	Whey Protein 25 wt % TMP 75 wt %	86.7	6.2	3.9	White	96.8

† : no analysis

2.2.2 SDS 電気泳動

装置 : ファルマシア・ファストシステム

泳動ゲル : PhastGel Gradient 8-25 (GE healthcare)

泳動条件 : [1 段階目] 250 V, 10.0 mA, 3.0 W, 15°C, 1 Vh

[2 段階目] 250 V, 1.0 mA, 3.0 W, 15°C, 2 Vh

[3 段階目] 250 V, 10.0 mA, 3.0 W, 15°C, 65 Vh

試料調製溶液 : SDS 1.0 g、2-メルカプトエタノール 1.0 ml、グリセリン 20 ml、トリス 120 mg に精製水を加えて 100 ml にしたもの (以下、「SDS 溶液」という。)

染色液 : PhastGel Blue R タブレット 1 錠を精製水 80 ml に溶解し 5-10 分間攪拌させ、さらにメタノール 120 ml を加え 2 分間攪拌し、ろ過した溶液を原液とする。その原液に 20% 酢酸水溶液を同量加えたものを染色液とした。

洗浄液 : メタノール、酢酸、及び精製水を 3 : 1 : 6 の割合で混合した溶液

保護液 : グリセリン、酢酸、及び精製水を 5 : 10 : 85 の割合で混合した溶液

2.3 実験方法

2.3.1 水溶解試験

試料約 1.0 g に精製水 50 ml を加え攪拌後の様子を観察し、また、試料約 0.10 g に精製水 100 ml を加え攪拌後の不溶分の有無を観察した。

2.3.2 粗たんぱく質の定量

ケルダール法により全窒素量を測定し、その値に 6.38 を乗じた値を試料中のたんぱく質含有量とした。

2.3.3 SDS 電気泳動

試料調製後のたんぱく質濃度が 5-6 mg/ml になるように試料を 1.5 ml チューブに取り、それぞれに SDS 溶液 1.0 ml を加えて攪拌させ、その後沸騰浴中で 2 分間加熱した。その試料溶液 0.5 μ l をパラフィルム上に滴下し、サンプルアプリーケーターの先端に試料

を付着させた後、上記 2.2.2 の定電圧条件で電気泳動を実施した。泳動終了後、泳動ゲルを染色部位に取り付け、染色液で 50°C、8 分間染色した。染色後、洗浄液で 50°C、23 分間、保護液で 5 分間泳動ゲルを洗った。一連の操作が終了した後、105°C に設定した恒温器で泳動ゲルを乾燥させ、電気泳動像を観察した。

2.3.4 水分、灰分の定量

2.3.4(1) 水分の定量

試料 1.0 g を正確に量り 105°C で乾燥させ、重量が恒量になった時点で乾燥重量として測定し、水分量を計算した。

2.3.4(2) 灰分の定量

試料 1.5 g を正確に量り、磁器るつぽに入れガスバーナーで加熱燃焼し、白煙が出なくなった状態から 550°C で 2 時間灰化させ、自然冷却後の重量を測定し各試料中の灰分量を計算した。また、その状態での各試料の灰分の色について考察を行った。

3. 結果及び考察

3.1 各試料中の成分

各試料中のたんぱく質の含有量、水分及び灰分 (wt %)並びに灰分の色を Table 1 に示す。

3.2 水溶解試験

溶解試験の一例を Fig.1 及び Fig.2 に示す。各試料を 2 種類の濃度で溶解させたが、濃度差による顕著な差異は認められなかった。

一般に、牛乳に酸又はレンネットを加えることで沈殿するたんぱく質がカゼインであり、カゼインを取り除いた溶液 (ホエイ) には、水可溶性たんぱく質であるアルブミンが多く含まれている¹⁾。

しかし、本研究に用いた試料のうち、カゼインを含むと考えられる 23. TMP には不溶分が認められず、また、アルブミンから成る 15. LACTALBUMIN には沈殿が生じた。

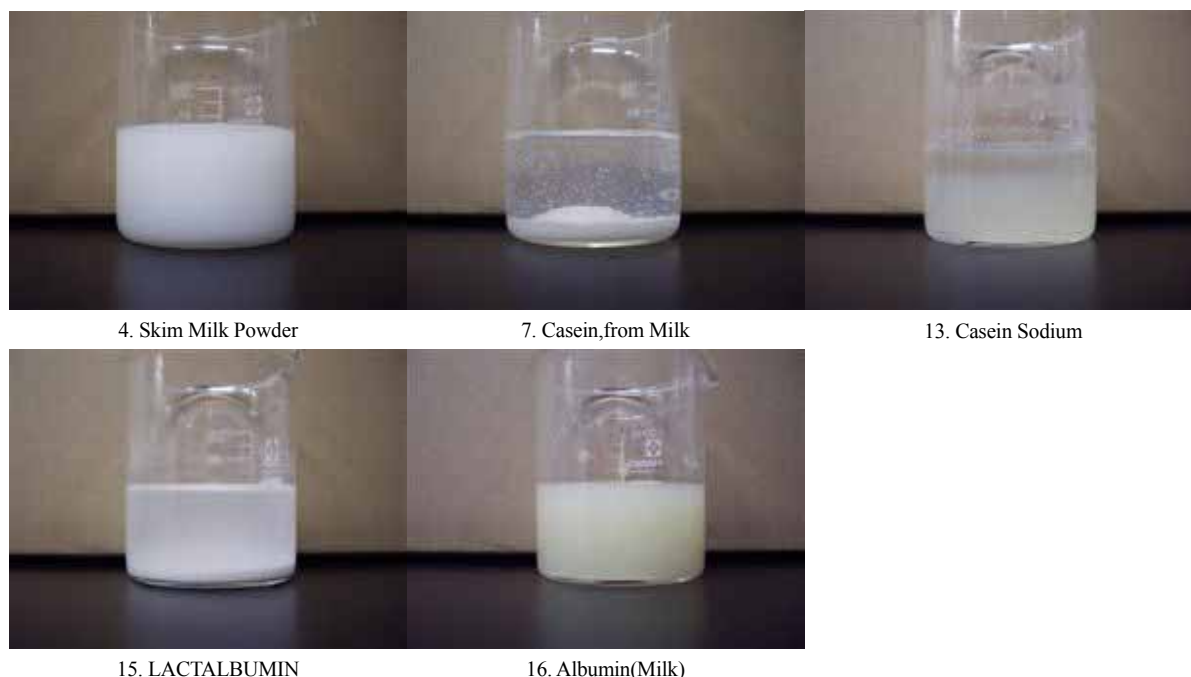


Fig.1 Reagents in solution
Albumin on the left side is precipitated in solution.

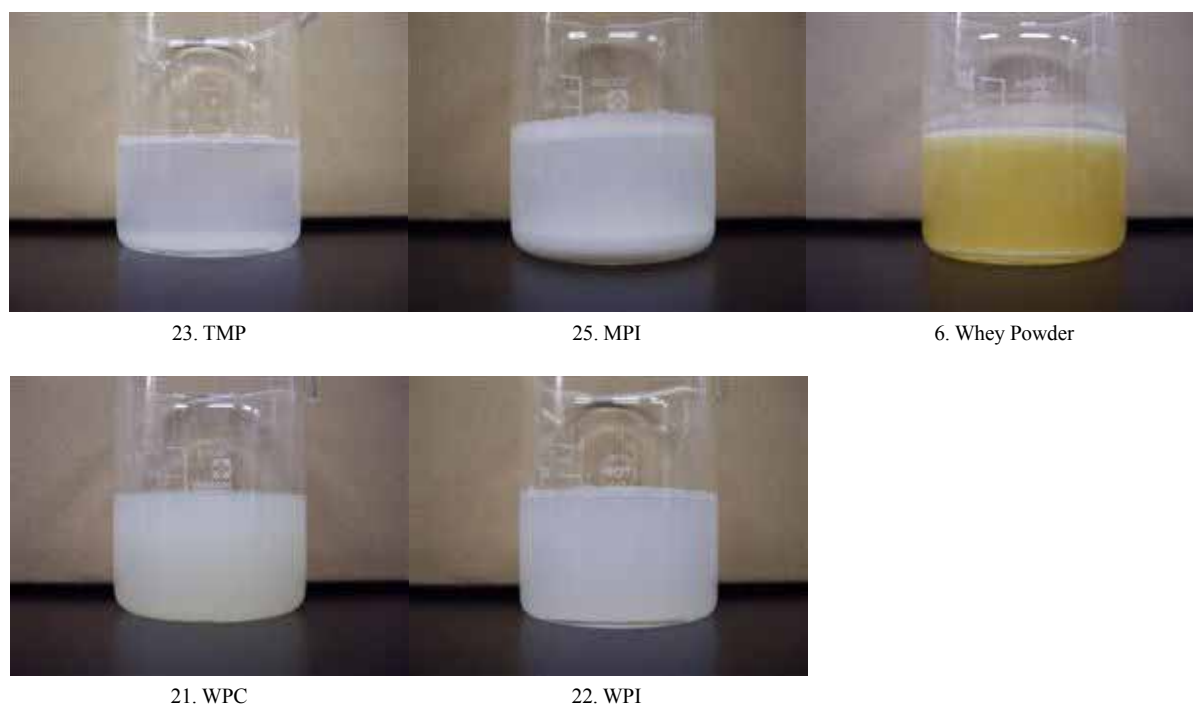


Fig.2 Imports in solution
TMP completely dissolved in solution regardless of whether casein exists.

3.3 ケルダール法によるたんぱく質の定量

たんぱく質の定量結果からでは、たんぱく質の種類による差異は認められなかった。各試料中のたんぱく質含有量が異なる原因として、製造工程や濃縮率の違いによると考えられる。

3.4 SDS 電気泳動

電気泳動図の一例を Fig.3 に示す。各試料の電気泳動を実施し、泳動像を比較した。泳動バンドの位置から、カゼイン系製品とアルブミン系製品では区別は可能であった。

しかし、トータルミルクプロテインと呼ばれる製品（23. TMP）とスキムミルク製品（4. Skim Milk Powder）では、泳動バンドの数及び位置が類似しており判別は困難であった。

また、試薬として入手したアルブミン系製品の泳動像の中には、カゼインに由来すると考えられる泳動バンドが薄く見受けられる製品（15. LACTALBUMIN や 17. LACTALBUMIN）もあり、水溶解試験で沈殿が生じたアルブミン系製品（15. LACTALBUMIN）は、カゼインを含む可能性も示唆された。

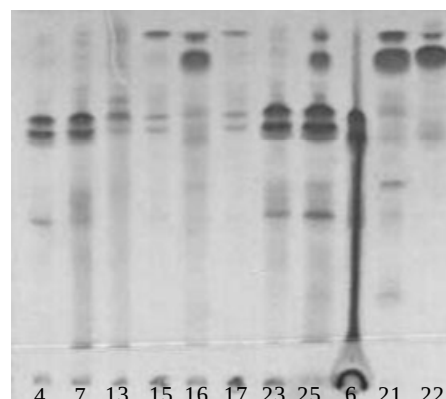


Fig.3 Electropherogram
4:Skim Milk Powder; 7:Casein,from Milk; 13:Casein sodium;
15:LACTALBUMIN; 16:Albumin(Milk); 17:LACTALBUMIN;
23:TMP; 25:MPI; 6:Whey Powder; 21:WPC; 22:WPI

3.5 灰分

各試料中の灰分量は異なっているが、たんぱく質の種類による差異は認められなかった。

しかし、灰分の色については顕著な違いが生じた。灰化後の状態を Fig.4 及び Fig.5 に示す。試薬として入手したアルブミン系製品の灰分は黒色（15. LACTALBUMIN）及び白色（16. Albumin(Milk)）のものが確認された。同様に、たんぱく質の濃縮物であるトータルミルクプロテイン（23. TMP）の灰分は白色であるのに対し、同等品と考えられるミルクプロテインアイソレート（25. MPI）の灰分は灰褐色であるのが確認された。

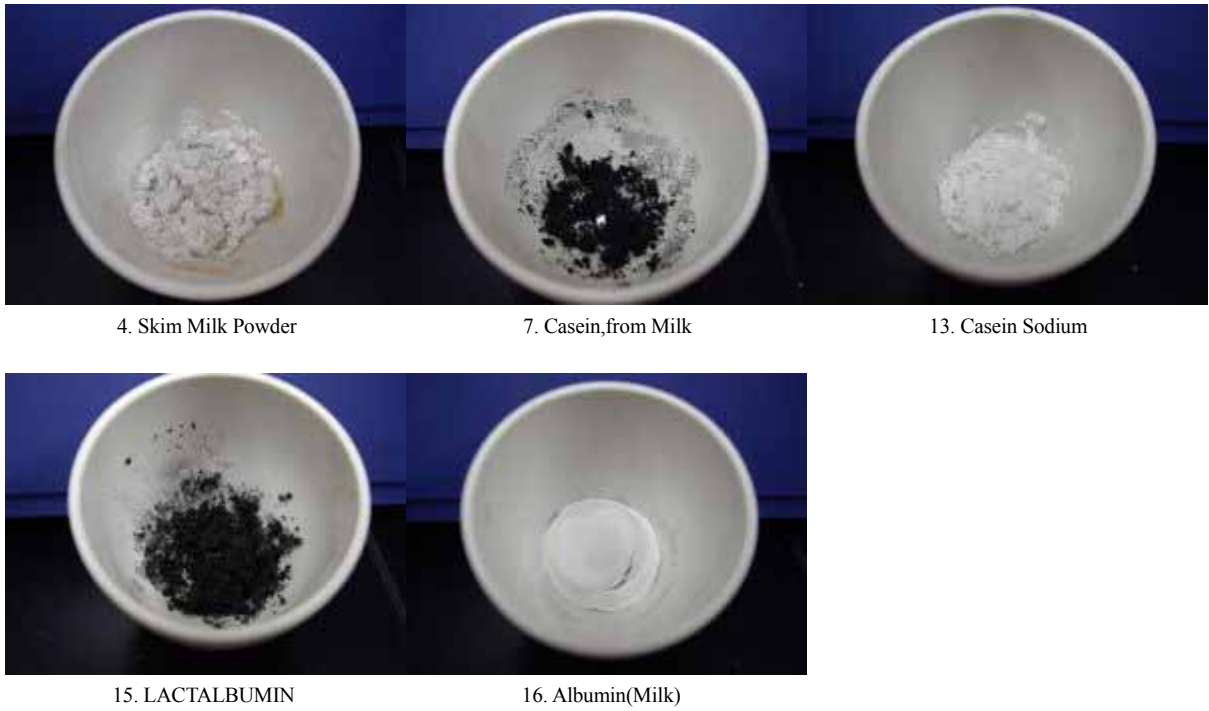


Fig.4 Color of ash from reagents

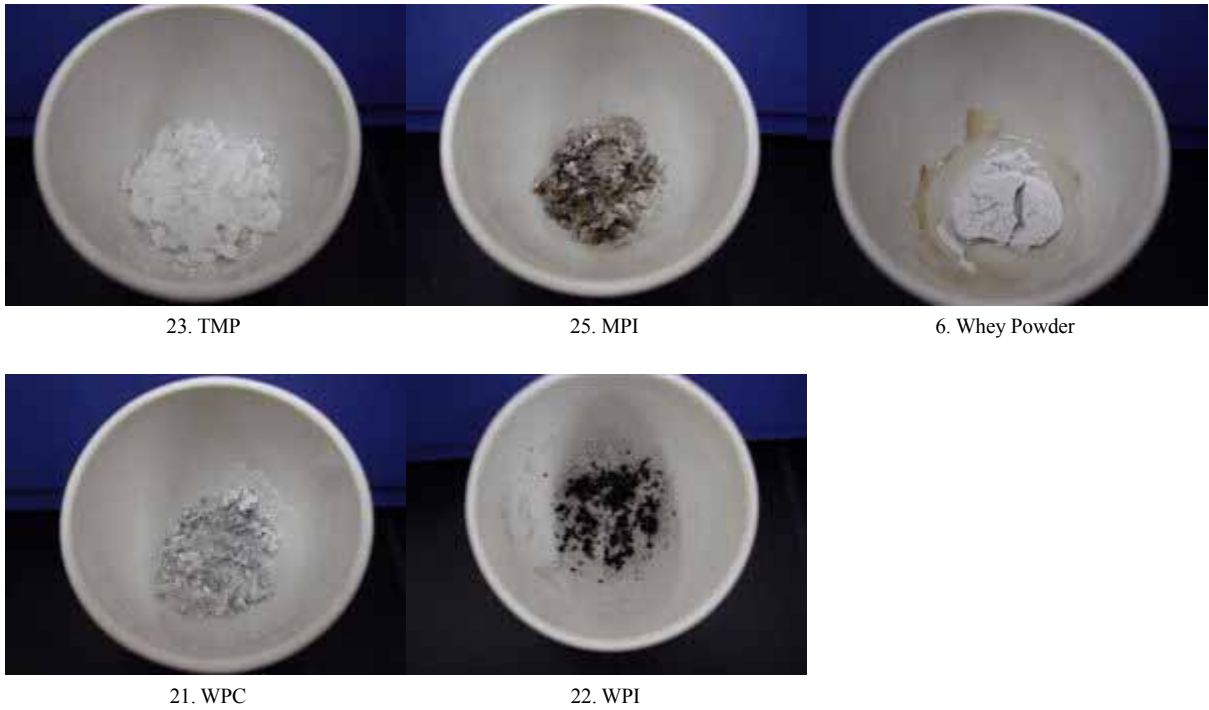


Fig.5 Color of ash from imports

4. 要 約

今回実験したミルクたんぱく質の大部分は、水溶解試験、SDS電気泳動等の測定を行うことで、従来通りの分析及び関税分類が可能である。

しかし、水に不溶とされるカゼインを含有している製品が水に溶解し、一方で水溶性とされるアルブミンを含有する製品に沈殿

が生じるという事例が確認され、また、同種のたんぱく質を含む製品でも灰分の色を比較したところ、白色、黒色、灰色と各製品で異なっていることも確認された。

今後、これらのミルクたんぱく質の関税分類を的確に行うためには、本来のミルクたんぱく質の性質と異なる製品を入手し、その製造工程について調査するとともに、さらなる分析データの収集を行い、その分析方法を確立する必要がある。

文 献

- 1) 佐々木林治郎 監修：“牛乳・乳製品ハンドブック”，P.10 (1958), (朝倉書店)。