HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Einflus der Kühlung auf die Fraktionierte Caseinmicelle
Author(s)	NIKI, Ryoya; KIMURA, Takashi; ARIMA, Shunrokuro
Citation	Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 61(4), 436-444
Issue Date	1984-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/13004
Type	bulletin (article)
File Information	61(4)_p436-444.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

EINFLUSS DER KÜHLUNG AUF DIE FRAKTIONIERTE CASEINMICELLE

Ryoya NIKI, Takashi KIMURA und Shunrokuro ARIMA

Institute of Dairy Science, Faculty of Agriculture,
University of Hokkaido, Sapporo 060, JAPAN

Received November 15, 1983

Einleitung

In der Milch liegt das Casein meistens in Form von Micelle vor. Aber ihre Größe ist nicht homogen ; der Durchmesser beträgt zwischen 100 und 250 nm (8). Im allgemeinen wird gesagt, daß einige Eigenschaften der Caseinmicelle von ihrer Größe abhängen : SULLIVAN *et al.* fraktionierten zentrifugal die Caseinmicelle nach ihrer Größe und stellten fest, daß größere Micelle mehr κ-Casein enthält (15). Ferner haben EKSTRAND und LARSSON-RAZNIKIEWICZ die Caseinmicelle mit Hilfe der Chromatographie an CPG (controlled-pore glass granules) fraktioniert und eine unterschiedliche Caseinzusammensetzung der Micelle je nach ihrer Größe festgestellt (6). CREAMER *et al.* beschrieben die Verteilung des Glyko-κ-Caseins je nach Größe der Caseinmicelle (1). ROSE und COLVIN (13) und ONO *et al.* (11) zeigten, wie sich die Menge der Mineralstoff je nach Größe der Micelle ändert. Darüberhinaus ist bekannt, daß ein Teil des Caseins der Micelle in lößlicher Form in das Serum übergeht, wenn Milch gekührt wird. In dieser Arbeit sollen die Eigenschaften dieser bei tiefer Temperatur lößlichen Caseine entsprechend der Größe der Micelle untersuchen werden.

Methode

(I) Fraktionierung der Caseinmicelle

Aus der Magermilch, die aus der frisch ermolkenen und nicht gekühlten Milch erhalten wurde, wurde die Caseinmicelle mittels Differentialzentrifuge in die vier Fraktionen getrennt. Zuerst zentrifugierte man die Magermilch 70 min. lang mit der kleinsten Zentrifugalkraft ($5300 \times g$) und erhielt als Niederschlag die größte Caseinmicelle, dann wurde der Überstand mit der nächstgrößeren Drehgeschwindigkeit ($13000 \times g$) weiter zentrifugiert. Dieses

Verfahren wurde weiter zwei Mal mit noch höherer Drehgeschwindikeit (43000 und 100000 × g) wiederholt. Insgesammt fraktionierte man Caseinmicelle in vier verschiedenen Größe aus Magermilch. Die gewonnenen Fraktionen nannte man Caseinmicelle-G (5300 × g), -M (13000 × g), -K (43000 × g) und -SK (100000 × g).

(II) Chromatographie des Caseins an DEAE-Cellulose

Prinzipiell wurde die Caseinzusammensetzung der Micelle nach der Methode von DAVIS und LOW (3) bestimmt. Vorher behandelte man jedoch die Caseinmicelle mit Chelate, um die Struktur der Micelle zu zerstören, und zwar dialysierte man die 250 mg Casein enthaltenden Caseinmicellensuspension gegen 500 ml von 0.004 M EDTA-Lösung bei 2°C für 24 Stunden, wobei man die EDTA-Lösung 3 mal erneuerte. Anschließend wurde dann die Lösung des Caseins nach DAVIS und LOW (3) untersucht.

(III) Gelelektrophorese: Siehe Literatur (9).

(IV) Gelchromatographie: Siehe Literatur (10).

(V) Milchultrafiltrat: Siehe Literatur (10).

Ergebnisse und Diskussion

(I) Caseinzusammensetzung der fraktionierten Micelle

In der Abb. 1 sind die Elutionsdiagramme der zentrifugal fraktionierten Caseinmicelle sowie die rechnerisch erhaltene Caseinzusammensetzung der vier Micellefraktionen abgebildet.

Wie daraus hervorgeht nimmt die Menge des κ-Caseins mit der Volumenverringerung der Micelle zu. Zum Beispiel beträgt κ-Casein etwa 15 Prozent bei der Micelle-G und etwa 35 Prozent bei Micelle-SK. SULLIVAN *et al.* (15) bestimmten die Menge von κ-Casein auf Basis der Analyse von N-Azetylneuraminsäure und beschrieben, daß die kleinste Caseinmicelle etwa 28 Prozent κ-Casein enthielt. Mittels der Gelelektrophorese ermittelten ONO *et al.* (11) κ-Casein der zentrifugal fraktionierten Micelle. Nach ihren Ergebnissen beträgt κ-Casein der kleinsten Micelle etwa 38 Prozent, während die größte Micelle etwa 10 Prozent enthält. Dagegen enthählt große Micelle mehr β-Casein als kleine, was mit den Ergebnissen von EKSTRAND und LARSSON-RAZNIKIEWICZ (6) in etwa übereinstimmt.

(II) Die bei tiefer Temperatur löslichen Casein (TTL-Casein)

Viele Forscher haben schon beobachtet, daß das lösliche Casein von der Caseinmicelle in das Serum übergeht, wenn Magermilch oder die Caseinmicellsuspension gekühlt wird (2), (4) (12), (14). In der vorliegenden Arbeit

benutzte man die obigen zentrifugal fraktionierten Caseinmicelle als Ausgangsmaterial und untersucht, wie weit die Eigenschaften des TTL-Caseins von der Größe der Micelle abhängen.

Die im Milchultrafiltrat suspendierte 2 prozentige Caseinmicelle ließ man

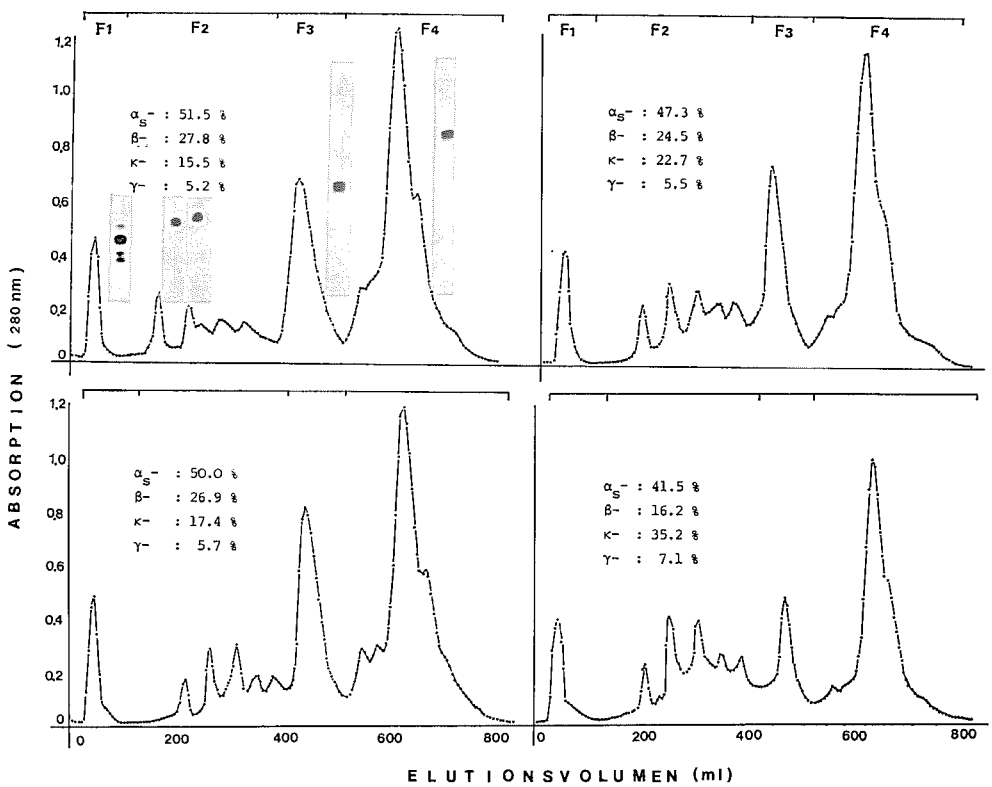

Abb. 1 Ionenaustauschchromatographie der zentrifugal fraktionierten Caseinmicelle an DEAE-Cellulose

F_1, F_2, F_3 und F_4 entsprechen γ-, κ-, β- und α_s-Casein.

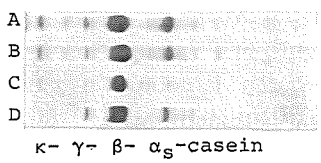

Abb. 2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese des TTL-Caseins aus Caseinmicellen

A: TTL-Casein aus Micelle-K, B: aus Micelle-M
C: aus Micelle-G, D: aus unfraktionierter Micelle

bei 4°C unter ständigem Umrühren 24 Stunden lang stehen, zentrifugierte sie (43000 × g, 70 Min.) und verwendete den Überstand als Probe für Gelelektrophorese, um die Caseinbestnadteile des TTL-Caseins festzustellen, die aus den unterschiedlich großen Caseinmicellen freigeworden waren. Die Elektrophorese des TTL-Caseins sind in Abb. 2 dargestellt. Man erkennt daraus leicht β-Casein als Hauptbestandteil des TTL-Caseins aus allen fraktionierten sowie aus der unfraktionierten Caseinmicelle. Die Bänder der anderen Caseine als β-Casein wurden mit der Volumenabnahme der Micelle deutlicher, was die Zunahme der relativen Menge an α_s-, κ-und γ-Casein im TTL-Casein bedeutet. Die Elektrophorese wird für eine einfache und günstige Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse des Proteins gehalten. Jedoch ist es nicht immer leicht, mit der Gelelektrophorese die Zusammensetzung des Caseins genau zu bestimmen, weil das Band des κ-Caseins dabei unscharf ausgeprägt ist. Deshalb wurde versucht, die Caseinzusammensetzung des TTL-Caseins mit der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose noch genau zu bestimmen. In Abb. 3 sind die Elutionsdagramme des TTL-Caseins aus Micelle-G und -K sowie ihre prozentuell Caseinzusammensetzung dargestellt. Aus den gewonnenen Ergebissen läßt sich ableiten, daß das β-Casein der Hauptbestandteil der beiden TTL-Caseine ist, der Anteil des β-Caseins im TTL-Casein großer Micelle jedoch größer ist als der in der kleinen Micelle, und zwar beträgt der β-Caseinbestandteil der Micelle-K etwa 52 Prozent, während der Micelle-G etwa 65 Prozent erreicht. Diesbezüglich haben auch andere Forscher beobachtet, daß β-Casein der Hauptbestandteil des TTL-Caseins aus Micelle ist. Nach ROSE beträgt β-Casein etwa 55 Prozent vom gesamten TTL-Casein (14). DOWNEY hat mittels der Gelchromatographie festgestellt, daß über 50 Prozent des in Micelle enthaltenen β-Casein durch Kühlung als TTL-Casein freiwerden (5).

Ferner zeigen die Ergebnisse in Abb. 3, daß das TTL-Casein aus kleiner Micelle (Micelle-K) mehr α_s- und κ-Casein als das TTL-Casein aus großer (Micelle-G) enthält.

In unserer letzten Arbeit (10) wurde gelchromatographisch festgestellt, daß TTL-Casein aus großen unterschiedlichen Partikeln besteht. Deshalb chromatographierte man das TTL-Casein aus größenunterschiedlichen Micellen an Sepharose 6B, um die Größenunterschiede der Caseinpartikel zu untersuchen. In Abb. 4 sind die Gelfiltrationen des TTL-Caseins aus Micelle-G und -K an Sepharose 6B dargestellt. In beiden Fällen stellte man zwei Peaks fest, die nach der Ordnung der Elution Peak-A und -B genannt werden. Jedoch ist Peak-A der Micellel-K, das an der Stelle des Ausschlußvolumens der Säule eluiert, viel größer als das der Micelle-G. Mit anderen Worten

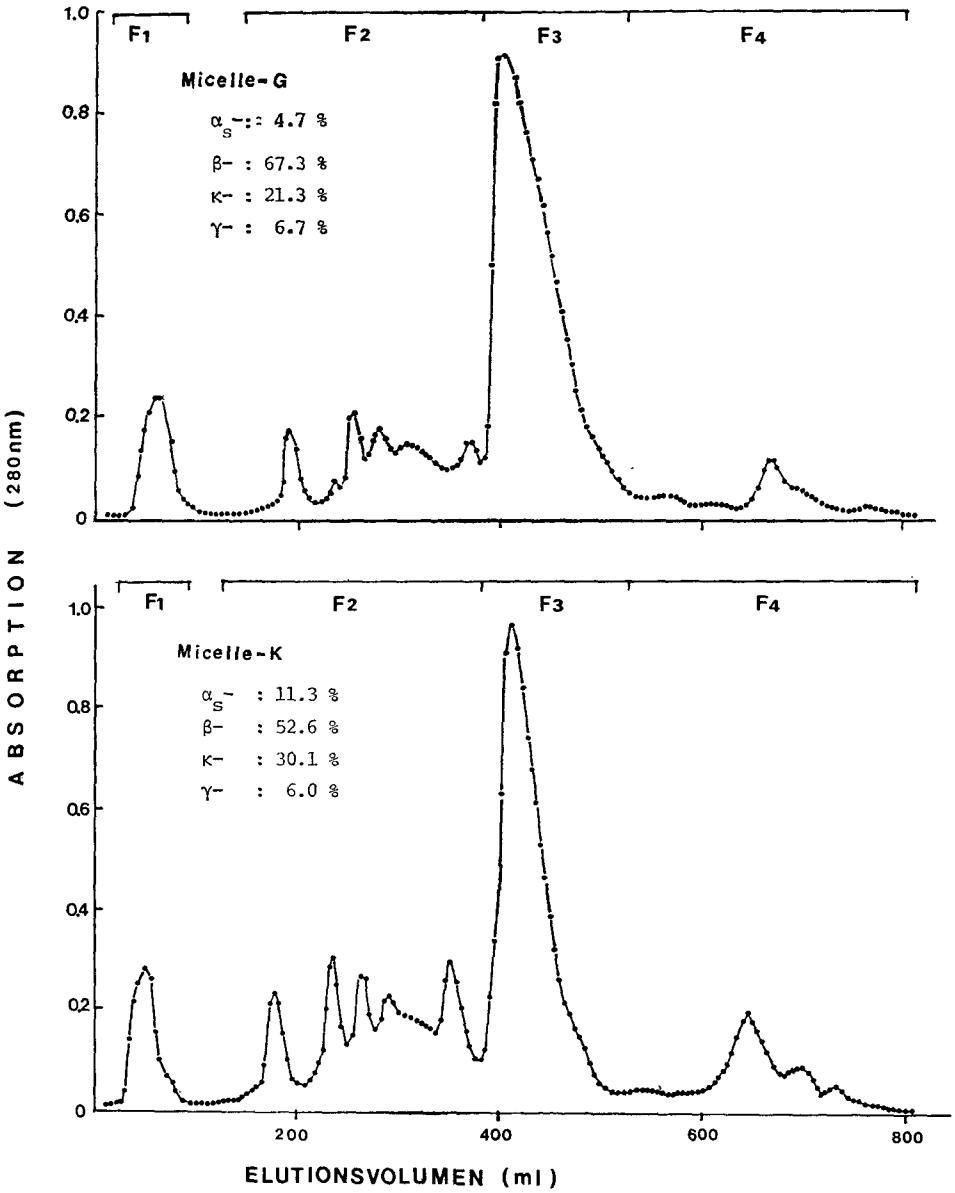

Abb. 3 Ionenaustauschchromatographie des TTL-Caseins aus Micelle-K und -G an DEAE-Cellulose

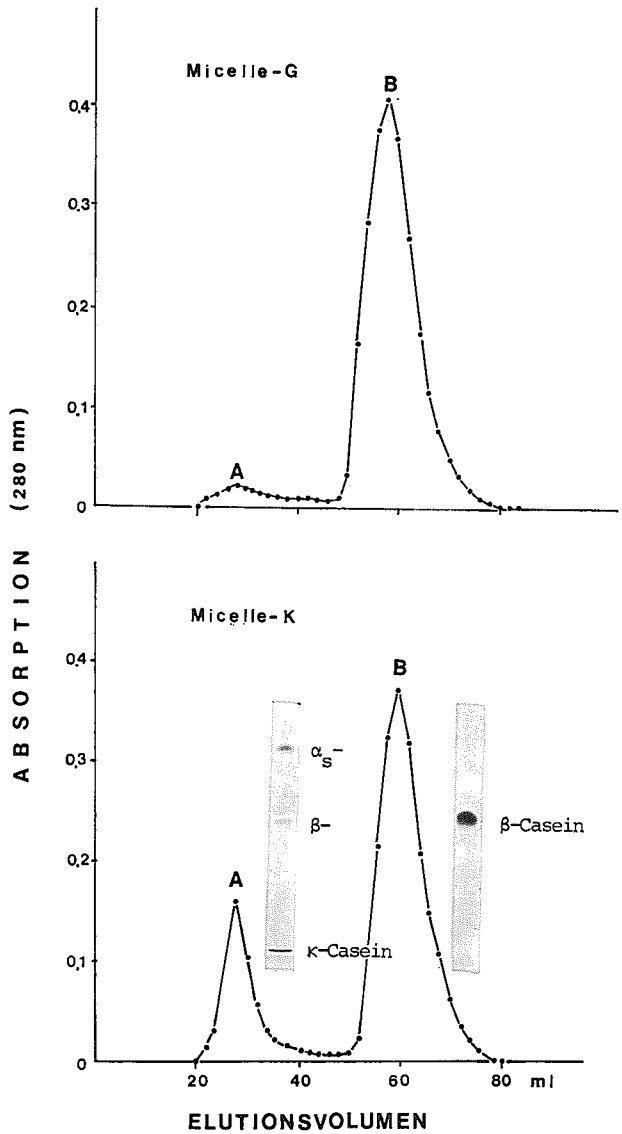

Abb. 4 Gelifiltration des TTL-Caseins aus Micelle-K und -G an Sepharose CL-6B
2 ml von TTL- Casein Lösung wurden auf eine Säule (1 cm×50 cm) von Sepharose aufgetragen.
Elutionslösung: Milchultrafiltrat.
Durchlaufgeschwindigkeit: 15 ml/Std.

enthält das TTL-Casein aus Micelle-K mehr größere Partikel, deren Molekulargewicht auf über 4×10^6 aus den Gelfiltrationseigenschaften von Sepharose 6B errechnet wird, als TTL-Casein der Micelle-G. Ferner wurden die beiden Peaks der Micelle-K mittels der Gelelektrophorese bestimmt (Abb. 4). Der Peak-A besteht hauptsächlich aus α_s-Casein und β-Casein, während nur β-Casein der Hauptbestandteil des Peak-B ist.

Im allgemeinen kann man annehmen, daß die Caseine, die mit abnehmender Temperatur aus Micelle entfernt werden, an oder in der Nähe der Micellenoberfläche locker durch hydrophobe Bindungen verbunden sind, weil abnehmende Temperatur (bei 4°C) die hydrophoben Bindungen schwächt, ohne die Hauptstruktur der Micelle zu zerstören. Dieses TTL-Casein scheint einen Tiel der Micellenoberfläche aufzubauen, was darauf hindeutet, daß die Eigenschaften des TTL-Caseins teilweise die der Micellenoberfläche reflektieren.

Über die Struktur der Caseinmicelle gibt es viele Modelle. In fast allen nimmt man an, daß κ-Casein, das stark hydrophilen Molekülanteil besitzt, an der Micellenoberfläche vorliegt. Dies wird dadurch erklärt, daß das in der Micelle enthaltene κ-Casein sehr schnell durch Lab abgriffen wird, daß es bei Erhitzung der Milch mit β-Laktoglobulin leicht reagiert, usw. Jedoch ist fraglich, ob nur κ-Casein die Micellenoberfläche aufbaut.

α_s-Casein und β-Casein enthalten viele hydrophobe Aminosäurereste. Besonders wird β-Casein als ein Protein der höchsten BIGELOW'schen Hydrophobizität klassifiziert (7). Betrachtet man die Primärstruktur von β-Casein, so kann man annehmen, daβ es eine typisch amphiphile Struktur hat, und zwar ist der hydrophile Anteil an der N-terminalen Seite lokalisiert, der hydrophobe Anteil dagegen an der C-terminalen Seite. Aufgrund dieser Struktur besteht die Möglichkeit, daß der hydrophile Teil des β-Caseins an der Oberfläche der Caseinmicelle lokalisiert ist und zur Bildung der Micellenoberfläche beiträgt, während der hydrophobe Anteil im Inneren sitzt. Damit kann auch erklären werden, daß sich β-Casein durch Kühlung leicht von der Micelle entfernt (Abb. 2 und Abb. 3). Ferner bestätigen Abb. 3 und Abb. 4, daß die Zusammensetzung des TTL-Caseins (Abb. 3) und das Ausmaß der Größenheterogenität (Abb. 4) von der ursprünglichen Micellengröße abhägen. Dies spricht dafür, daß der Oberflächenbau je nach Micellengröße unterschiedlich ist.

Zusammenfassung

(I) Aus der Magermilch fraktionierte man vier Caseinmicellen mittels der Differenzialzentrifuge. Die Caseinzusammensetzung der fraktionierten

Caseinmicelle wurde mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose bestimmt. Die Menge des κ-Caseins nimmt mit der Volumenverringerung der Micelle zu. Umgekehrt enthält große Micelle mehr β-Casein als kleine.

(II) Die Suspension der fraktionierten Micellen ließ man bei 4°C stehen und untersuchte, wie weit die Eigenschaften des bei tiefer Temperatur lößlichen Caseins (TTL-Casein) von der Größe der Micelle abhängen. β-Casein ist immer der Hauptbestandteil des TTL-Caseins. Je nach der ursprünglichen Micellengröße variieren jedoch die Zusammensetzung des TTL-Caseins und das Ausamaß seiner Größenheterogenität, die gelchromatographisch festgestellt wurde.

Literature

1. CREAMER, L. K., J. V. WHEELOCK und D. SAMUEL: The distribution of glyco-κ-casein and carbodhydrate-free κ-casein between large and small bovine casein micelles, and its implication in micelle structure, *Biochim. Biophys. Acta*, 317, 202–206. 1973
2. CREAMER, L. K., G. P. BERRY und O. E. MILLS: A study of the dissociation of β-casein from the bovine casein micelle at low temperature, *NZ. J. Dairy Technol.*, 12, 58–66, 1977
3. DAVIES and A. J. R. LAW: An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography, *J. Dairy Res.* 44, 213–221, 1977
4. DOWNEY, W. K. und R. F. MURPHY: The temperature-dependet dissociation of β-casein from bovine casein micelle and complexes, *J. Dairy Res.*, 37, 361, 1970
5. DOWNEY, W. K.: Structure of bovine casein micelles, *Neth. Milk Dairy J.* 27, 218, 1973
6. EKSTRAND, B. und M. LARSSON-RAZNIKIEWICZ: The monomeric casein composition of different size bovine casein micelles, *Biochim. Biophys. Acta*, 536, 1, 1978
7. MERCIER, J. C., F. GROSCLAUDE, und B. RIBADEAU-DUMAS, *Milchwissenschaft*, 27, 402, 1972
8. MORR, C. V.: Functionality and protein structure, American Chemical Society, Washington D. C., Seite 65, 1979
9. NIKI, R., H. J. LEE und S. ARIMA: Einfluß der Kühlung auf die Caseinmicelle der Kuhmilch, *Milchwissenschaft*, 33, 473, 1978
10. NIKI, R. T. KIMURA und S. ARIMA, Eigenschaften des bei niedriger Temperatur löslicher Casein, *Milchwissenschaft*, 35, 202, 1980
11. ONO, T., Y. HAYAKAWA und S. ODAGIRI: The changes of the constituents of bovine micelles by calcium complexing agents, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 49, 417, 1975
12. REIMERDES, E. F. und H. KLOSTERMEYER: Temperaturabhängige Veränderungen in Milch und Milchprodukten I. Änderungen im Verhältnis Milcheiweiß/Serum-

eiweiß bei der Kühlung von Milch, *Kieler Milchwirt. Forsch. Ber.* 28, 17, 1976

13. ROSE, D. und J. R. COLVIN: Appearance and size of micelles from bovine milk, *J. Dairy Sci.*, 49, 1091, 1966
14. ROSE, D.: Relation between micellar and serum casein in bovine milk, *J. Dairy Sci.*, 51, 1897, 1963
15. SULLIVAN, R., M. FRITZPATRICK und E. STANTON, Distribution of kappa-casein in skim milk, *Nature*, 183, 616, 1959