

電子顕微鏡法を用いた乳・乳製品の微細構造解析

2019

神垣隆道

# 目 次

第1章 緒言 .....	1
第2章 CEMOVISによる乳のカゼインミセルの微細構造観察	
2-1 序論.....	10
2-2 試料.....	11
2-3 実験手順.....	11
2-3-1 CEMOVIS.....	11
2-3-2 さまざまな距離の測定.....	12
2-4 結果および考察.....	12
2-4-1 CEMOVISによるカゼインミセルの低倍率観察 .....	12
2-4-2 CEMOVISによるカゼインミセルの高倍率観察 .....	12
2-4-3 CEMOVISにおけるアーティファクトの可能性 .....	26
2-5 まとめ.....	28
参考文献.....	29
第3章 徳安法を用いたパニールチーズの $\beta$ -ラクトグロブリンの免疫電子顕 微鏡観察	
3-1 序論.....	32
3-2 試料.....	33
3-3 実験方法.....	33
3-3-1 樹脂包埋法（包埋後染色法） .....	33
3-3-2 徳安法（凍結超薄切片法） .....	33
3-4 結果および考察.....	34
参考文献.....	42

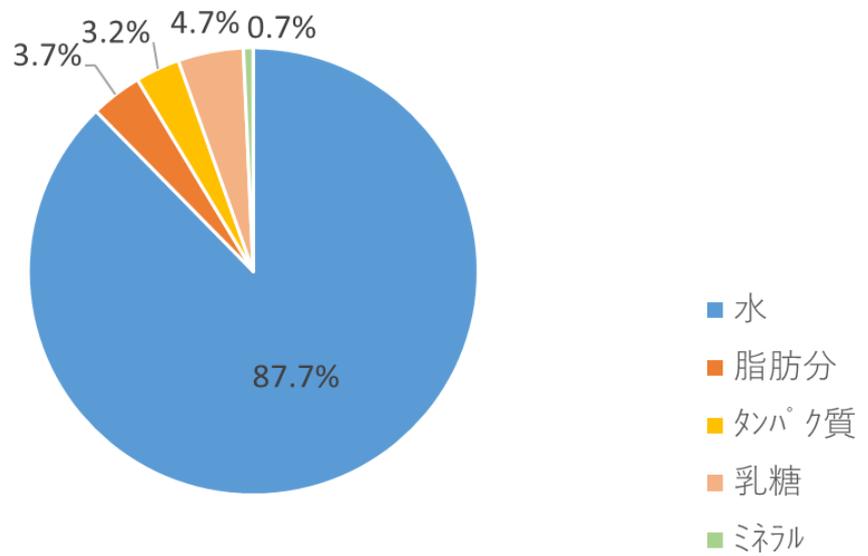
第4章 氷包埋法によるホイップクリーム構造形成メカニズムの解析	
4-1 序論.....	44
4-2 試料.....	45
4-3 実験方法.....	45
4-3-1 氷包埋法.....	45
4-3-2 クライオ TEM による観察.....	45
4-3-3 気泡中の遊離脂肪率、固形脂肪含有量、脂肪球サイズ、および占有面積率の測定.....	45
4-4 結果および考察.....	46
2-4-1 乳脂肪クリームを観察.....	46
2-4-2 ホイップによる脂肪球と気泡界面の変化.....	46
4-5 まとめ.....	65
参考文献.....	69
第5章 結論.....	70
謝辞.....	73



## 第1章 緒言

乳は、子に効率的に生命の維持および成長を促す栄養素を効率的に供給することができる。哺乳類以外の生物は卵であり、乳を利用することにより哺乳類は、子孫の成長などの生命活動を有利に進め、今日の繁栄を手にすることができたと推定される (Dosako, 2011)。乳の一例として、図1に牛 (ホルスタイン種) 由来の乳に含まれる成分を示す。牛の乳には、水分 87.7%、脂肪分 3.7%、たんぱく質は 3.2%、糖質 (乳糖) 4.7%、ミネラル 0.7%ずつ含まれる。さらに乳に含まれるタンパク質は、8割を占めるカゼインと、乳清 (ホエイ) に含まれる乳清タンパク質に大別され、表1に示すようにカゼインは、カルシウム感受性に応じて  $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、 $\beta$ -、 $\kappa$ -に細分化される (John, 2011; Sakagami, 2016)。乳清タンパク質は、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、免疫グロブリン、牛血清アルブミン、ラクトフェリンなど多数の種類がある。また骨を形成し、成長に必須のカルシウムとリンは、中性域で不溶性の状態となるが、乳にはカルシウム 110mg/100g、リン 93mg/100g を含有しながら沈殿することなく、液状で維持する機構が存在する。すなわち主要な乳タンパク質であるカゼインが、ミセル状の構造体を形成しており、その構造体にリン酸カルシウムを抱え込む構造を有している。この構造体をカゼインミセルと呼び、中性域でカルシウムを安定化し、吸収にもよい影響を与えていることが知られている。乳のイメージ図を図2に示す。乳に含まれる脂肪分は、脂肪球として球状に存在し、カゼインは、カゼインミセルとして水相に分散している。カゼインミセル内部には、リン酸カルシウムの粒子である CCP (Colloidal Calcium Phosphate) が分布している。乳清タンパク質は、乳糖と同様に、水相に分布しているが、加熱により凝集体を形成し、その一部は脂肪球界面に吸着する。また乳脂肪分は、図3の固体脂含量 (SFC) 曲線に示したように、5°C付近では固体脂含量が約 40% あるのに対し、40°C付近では 0%に低下する性質があり、温度によって固体脂と液状脂の比率が大きく変化する。

一方、人類は、乳を赤ん坊の頃に母親の母乳を摂取するというヒト本来の利用法としてだけでなく、家畜が泌乳する乳を様々な乳製品に加工して、栄養源として利用してきた。今日、発展途上国では、飢えを克服する貴重なタンパク源として、また先進国では、健康を維持するプロバイオティクスや嗜好品として、乳製品を消費している。乳製品の種類は、図4に示したとおり、殺菌処理した牛乳をはじめ、ヨーグルト、チーズ、クリーム、バター、練乳、脱脂粉乳、アイスクリームなど多岐に亘る。これらの乳製品は、乳を主原料に、乳に含まれる乳タンパク質や乳脂肪分の特性を巧みに利用した食品である。例えばヨーグルトは、乳酸菌発酵により乳の pH をカゼインの等電点 (4.6) 付近に下げる



(日本食品標準成分表 2015 年版)

図1 牛（ホルスタイン種）の乳に含まれる成分

表1 牛の乳に含まれる乳タンパク質の特性

		成分	分子量	カルシウム
		g/100g	(kDa)	感受性
カゼイン	$\alpha_{s1}$ -カゼイン	1.07	23.5	沈殿
	$\alpha_{s2}$ -カゼイン	0.28	25	沈殿
	$\beta$ -カゼイン	0.86	24	沈殿
	$\kappa$ -カゼイン	0.31	19	安定
乳清タンパク質	$\alpha$ -ラクトアルブミン	0.12	14.2	---
	$\beta$ -ラクトグロブリン	0.32	18.4	---
	その他	0.24	---	---

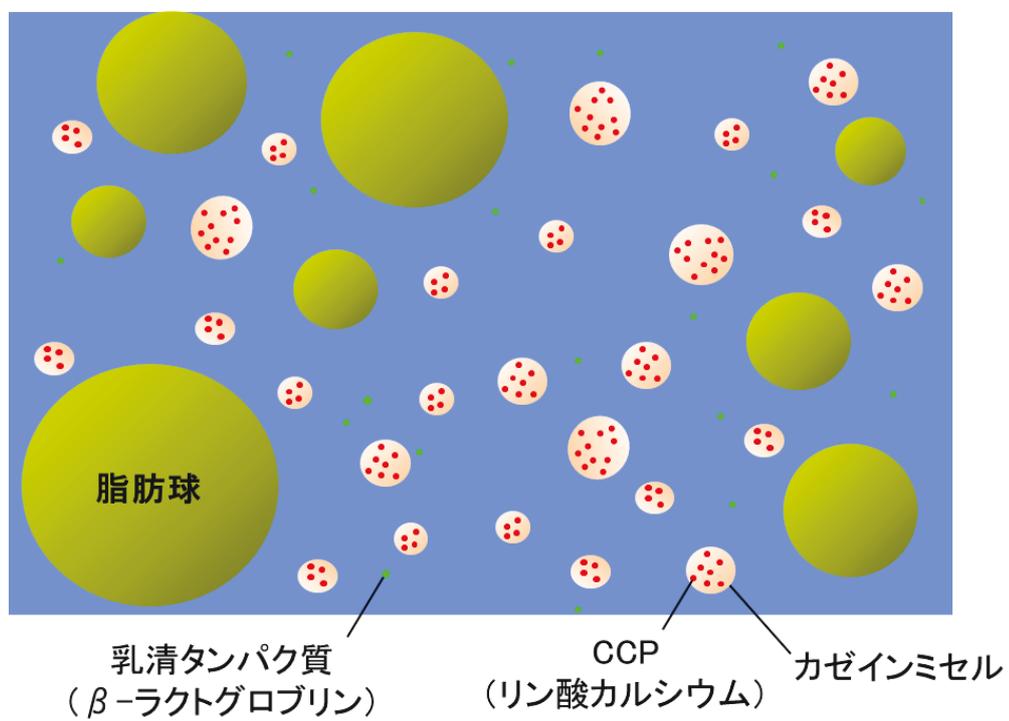


図2 乳のイメージ図

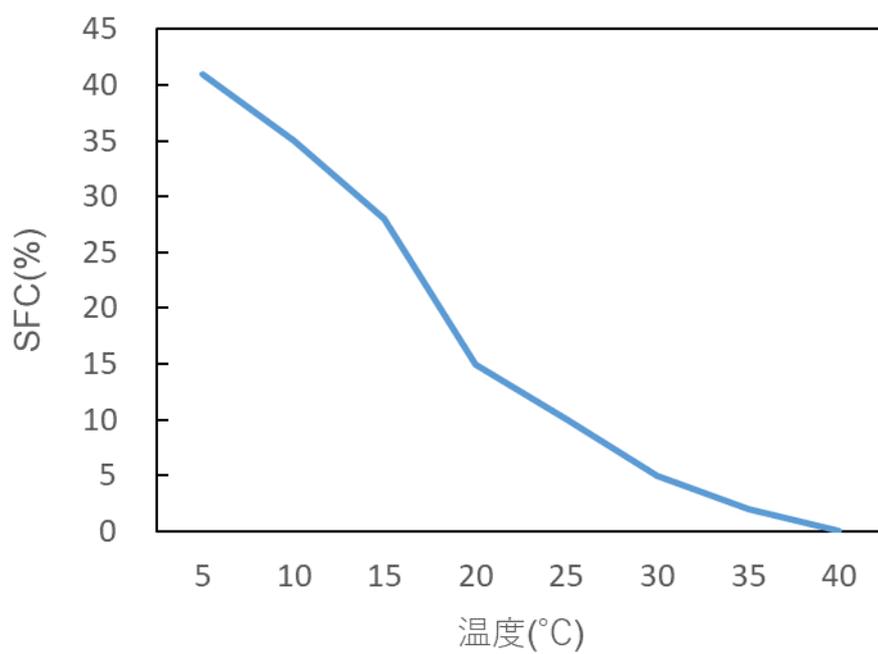


図3 乳脂肪分の固体脂含量 (SFC) 曲線

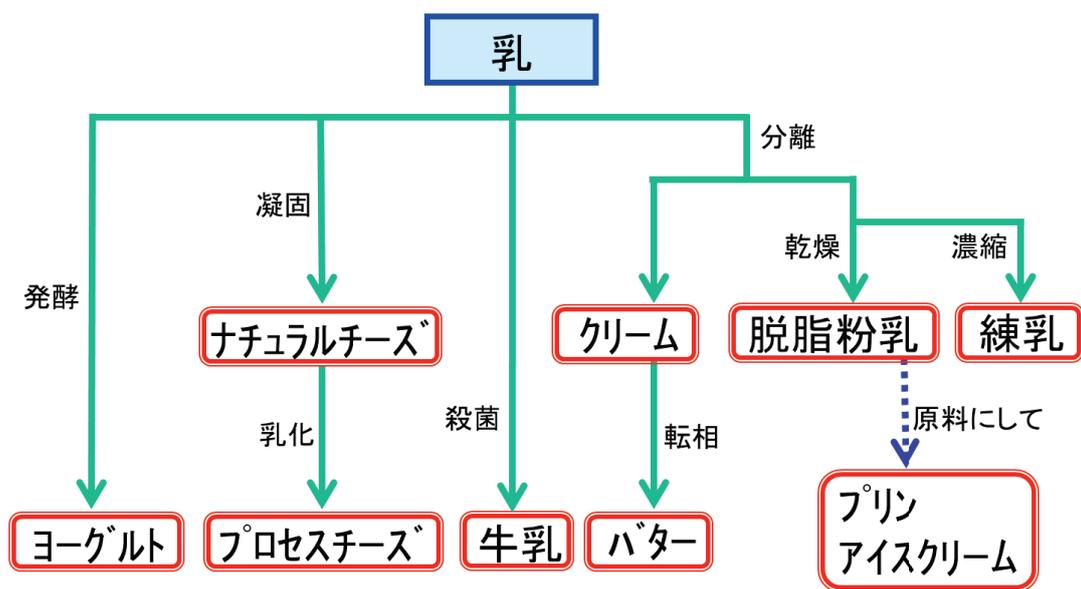


図 4 乳を原料に作られる乳製品

ことにより、カゼインミセル同士の電氣的反発を抑えて凝集させたゲル状の食品である。チーズは、カゼインミセルを酵素（レンネット）、酸により処理し、カゼインの疎水性を上げて、沈殿させて、分離することにより得られる高タンパク質食品である。またバターは、クリーム中の乳脂肪分を低温保持（エージング）して結晶化させ混練分離した食品である。後述するホイップクリームは、乳脂肪分の結晶物（油脂結晶）をホイップ時に混入させた気泡の界面を安定化することに利用した食品である。言い換えれば、乳製品の組織や物性を制御するには、乳タンパク質と乳脂肪分の特徴を把握し、如何にコントロールするかが重要なカギとなる。それ故、乳タンパク質と乳脂肪分に着目した乳製品の微細構造観察が、その特徴を評価するために、電子顕微鏡を用いて行われてきた。しかし食品分野での電子顕微鏡の活用方法は、今日でも化学固定法、超薄切片法などの伝統的な観察方法が多い傾向にある。そこで本研究では、食品分野での活用例がほとんどないクライオ電子顕微鏡法に着目した乳および乳製品の微細構造解析を行った。クライオ電子顕微鏡法とは、クライオステージやクライオトランスファーホルダーを装着した電子顕微鏡を用いる観察、または試料を凍結処理する観察法であり、乳製品のようなタンパク質と脂肪分の複雑な混合物を、アーティファクトを回避しながら可視化、解析するのに有効であると推察された。

解析の対象とした試料は、哺乳類の繁栄の礎であり、乳製品の原料でもある乳のカゼインミセルと、タンパク質を観察するためにチーズ、また脂肪分（油脂結晶）を観察するためにクリームを選定した。そこで、まず第 2 章では、牛由来の乳に存在するカゼインミセルを CEMOVIS (Cryo-electron Microscopy of Vitreous Sections) により観察することを試みた。CEMOVIS とは、凍結した試料から透過電子顕微鏡（以下、TEM と示す）で観察できる厚さ（加速電圧 200kV の TEM で、厚さ 100 nm 程度以下）の凍結超薄切片を調製して、低温に保持したクライオ TEM で観察する方法で、最も試料本来の構造を維持した状態で観察が可能である。また CEMOVIS は、氷包埋法で調製できる氷の厚みを上回るサイズの試料を薄い切片にして内部構造を観察できるため、カゼインミセル内部の CCP のサイズや分布について、詳細に把握できることが期待できた。

第 3 章では、パニールチーズを対象に、主要な乳清タンパク質である  $\beta$ -ラクトグロブリンの分布を徳安法 (Tokuyasu, 1986) により可視化することを試みた。徳安法とは、特定タンパク質の存在を可視化する免疫電子顕微鏡法の一種で、凍結した試料をスライスして得た凍結超薄切片を常温に昇温してから、免疫染色を行う。凍結超薄切片を用いることで、オスミウム酸やグルタルアルデヒドといった抗原性を低下または失括させる試薬を使用することなく、免疫染色が可能であるため、抗体の感度がよく、タンパク質や脂肪分などの構成成分

の流出が少なく、また迅速に結果を出すことができることがメリットである。パニールチーズとは、インドや中東地域で消費されているチーズで、乳を加熱殺菌した後に、酸凝固させたフレッシュチーズである。一般的にチーズはカゼインで構成されるが、パニールチーズは加熱工程があるために、乳清タンパク質である  $\beta$ -ラクトグロブリンが、カゼインと相互作用すると考えられている。加熱凝集しやすい  $\beta$ -ラクトグロブリンを含む乳清タンパク質の挙動を可視化することに加え、内在する脂肪球とその界面を観察することを目的とした。

第 4 章では、乳脂肪分由来のホイップクリームを対象に、氷包埋法を用いて脂肪球と気泡の観察を行った。氷包埋法とは、液状の試料をグリッド上に凍結させて、クライオ TEM を用いて観察する方法で、電子線の照射や、常温で溶解する乳脂肪分をよりオリジナルに近い構造で観察できる可能性がある。塩田らは、氷包埋法を用いてマーガリンに含まれる植物性油脂を構成する油脂結晶（ナノプレート）の観察に成功したことから（Shiota, 2018）、氷包埋法がクリームの油脂結晶を観察することにも適すると考えた。生クリームは液状であるが、ホイップ（攪拌）することにより、気泡を含みながら固化する。その原理は、気泡に脂肪球や遊離脂肪が吸着する為と推定されているが、クリームの脂肪球内に形成される油脂結晶が、ホイップクリームの構造安定にどのように関与するかについては、議論の余地があった。そこで氷包埋法を用いて、ホイップ過程の油脂結晶を観察することにより、その役割を推定した。

## 参考文献

Dosako, S. (2011) Casein micelles in the light of various viewpoints. *Nyuugyou Gijutu*. 61, 35-49. (in Japanese)

Fuquay J.W., McSweeney P.L.H., Fox, P.F. (2011) “Encyclopedia of Dairy Science” 2nd ed. Academic Press, Amsterdam. 518-529.

Sakagami, A. ed. (2016) The Science of Cheese. Cheese Professional Association. Saiwai Shobo., 11-27. (in Japanese)

Shiota, M., Kamigaki, T., Wakui, R., Ito, Y., Nishino, Y., Miyazawa, A. (2018) Nanostructured fat crystal and solid fat content effects on the physical properties of water-in-oil semisolid fat blends. *Journal of Oleo Science*, **67**, 829-837

Tokuyasu, K.T. (1986) Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *Journal of Microscopy*. **143**, 139-149

## 第2章 CEMOVISによる乳のカゼインミセルの微細構造観察

### 2-1. 序論

乳は、子の成長に必要な不可欠な栄養素をすべて含んでおり、人間にとっても重要な食品である。乳には、骨と筋肉の成長に不可欠な栄養素であるタンパク質、カルシウム、リンが含まれている。乳のカルシウムとリンは、カゼインミセル中のコロイド状リン酸カルシウム (CCP) としてほとんどが可溶化されている。それらの構造は、カルシウムとリンの可溶化または分散に寄与すると考えられる。したがって、CCP とカゼインミセルは1世紀以上もの間、広く研究されてきた (Holt, 1992)。カゼインミセルは、乳中に直径 20~600 nm のコロイド状粒子として存在し、4種類のカゼイン、すなわち、 $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、 $\beta$ -、 $\kappa$ -カゼイン、および CCP を構成するカルシウムやリンを含むミネラルからなる複雑な高分子集合体である。 $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、および  $\beta$ -カゼインは、 $\text{Ca}^{2+}$  の存在下で沈殿するカルシウム感受性タンパク質であるのに対し、 $\kappa$ -カゼインはこれらのカゼインと相互作用し、カゼインミセルを安定化させる。カゼインミセルは、水和した動的な構造 (Walstra, 1979 ; Snoeren et al, 1984) で、組成とサイズが不均一で多分散である (De Kruif et al, 2003)。pH の低下またはカルシウムの除去により CCP を可溶化すると、サイズが変化しながらカゼインミセルの分離が徐々に進行する (Dalgleish et al, 1989)。これまでに、カゼインミセルの生化学的または物理的性質に基づいて、2種類の代表的な構造モデルが提案されている。しかし、詳細な内部構造はまだ明らかにされておらず、今なお論争が続いている。Schmidt らによって提案された第1のモデル (サブミセルモデル) においては、カゼインミセルは、より小さなタンパク質のサブユニット (サブミセル) から構成され、それらの間に CCP が架橋している (Schmidt, 1982)。Holt らによって提案された第2のモデル (ナノクラスターモデル) においては、サブミセルはなく、CCP のナノクラスターがカゼインの均一なマトリックスにランダムに分布している (Holt, 1992)。電子顕微鏡を用いたカゼインミセルの微細構造観察もまた、構造モデルを決定するための強力なツールとして使用されてきた。TEM を用いた観察例には、シャドイング法を用いた再構成スキムミルク中のカゼインミセルの観察 (Kimura et al, 1979)、ネガティブ染色によるカゼインミセルサイズの評価 (Holt, 1978)、無染色の超薄切片を用いた人工カゼインミセルの観察 (Knoop et al, 1975) などがある。走査型電子顕微鏡 (以下、SEM と示す) を用いた観察例は、再構成スキムミルク中のカゼインミセルを化学固定、脱水、乾燥して観察した例がある (Dalgleish et al, 2004)。しかし電子顕微鏡で観察する試料の前処理中に、様々なアーチファクトが生じる。例えば、フリーズフラクチャーレプリカ法では、微細なタンパク質構造は金属でコ

ーティングされ、タンパク質表面構造を著しく変化させる。風乾工程を含むネガティブ染色は、乾燥による試料の収縮が顕著である。超薄切片法は、化学的固定によりタンパク質間の架橋が起こり、エタノールを用いた脱水中に収縮が起こり、樹脂への浸透中にタンパク質が損失することから、正確に構造を観察することが困難である (McMahon et al, 1998)。近年、アーティファクトを回避するために、試料を非晶質の氷に包埋する氷包埋法や、超小角 X 線散乱 (USAXS) などの小角 X 線散乱 (SAXS) を用いたカゼインミセルの観察が行われている。Marchin らは、カゼインミセルがカゼインポリペプチド鎖の複雑なネットワークであることを報告した (Marchin et al, 2007)。Trejo らは、電子線トモグラフィ法を用いてカゼインミセル内部の三次元画像を報告しており、カゼインミセルが水で満たされた空洞および水路からなる多孔質構造を有することを示した (Trejo et al, 2011)。カゼインミセルの内部構造は、上記の観察技術が開発されるにつれて徐々に明らかにされてきた。しかしながら、CCP がカゼインミセルにおいて重要な構造であるにも関わらず、カゼインミセル中の CCP の分布、および CCP とカゼインとの間の架橋構造は不明のままである。そこで、本研究では、乳のカゼインミセル本来の内部構造を高精度で観察するために、CEMOVIS を採用した。

## 2-2. 試料

牛 (ホルスタイン種) 由来の乳を、チーズ研究所 (雪印メグミルク株式会社) から入手した。観察前に、乳を 5°C で 1 日間保ち、次に 30°C で 1 時間恒温した。

## 2-3. 実験手順

### 2-3-1. CEMOVIS

試料を等量の 40% デキストラン水溶液 (Dextran from Leuconostoc, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と混合した。次いで、試料を真空デシケーター (PC-210K, As One, Osaka, Japan) に 1 時間保持して脱気した。試料を、2 つのドーム型金メッキキャリア (Leica Microsystems, Vienna, Austria) を用いて凍結固定した。キャリアの片側が容易に外れるように、一方のキャリアに卵黄由来の L- $\alpha$ -ホスファチジルコリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) をコーティングした。空気の混入を防ぐために、ピペットを用いてキャリアに試料を満たした。凍結固定には、高圧凍結装置 (EM HPM100, Leica Microsystems, Vienna, Austria) を用いた。凍結超薄切片の調製は、岡田らの報告に準じて行った (Kishimoto-Okada et al, 2010)。非晶質状氷の凍結切片は、静電気制御システム (EM CRION, Leica Microsystems, Vienna, Austria)、マイクロマニピュレーター、およびクライオスフェア (Leica Microsystems, Vienna, Austria)

を備えた凍結ウルトラマイクロトームシステム (EM UC7/FC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria) を用いて調製した。凍結した試料を、トリミングナイフ (Cryotrim 45°, Diatome Hatfield, PA, USA) を使用して、-150°C の温度で 100 μm × 200 μm にトリミングした。35° のダイヤモンドナイフ (Cryoimmuno 35°, Diatome, Hatfield, PA, USA) を用いて凍結切片 (25nm) を 6° の逃げ角で切断した。切削速度は 0.6mm/s であった。動物の毛髪で作られたプローブを使用して、イオンコーター (IB3, Eiko, Tokyo, Japan) を用いて予め親水化処理したグリッド (C-flat CF-2/2-4C, Protochios, Raleigh, NC, USA) に、切片を載せた。クライオトランスファーホルダー (914 hightilt cryotransfer system, Gatan, Pleasanton, CA, USA) を使用して、グリッドを 200kV で作動する TEM (JEM-2100: JEOL, Tokyo, Japan) に移した。非晶質の硝子状切片を -170°C に保持して観察を実施した。最小電子線量システム (MDS, JEOL, Tokyo, Japan) を使用してフォーカスエリアを探し、60,000 倍の倍率で、CCD カメラ (TemCam-F224: TVIPS, München, Germany) を使用して撮影した。

## 2-3-2. さまざまな距離の測定

CEMOVIS により得られた画像中のカゼインミセルおよび黒い粒子の平均直径を、画像解析ソフトウェア (Asahi Kasei Engineering Corporation, Tokyo, Japan) を用いて算出した。CEMOVIS 画像では、凍結超薄切片の調製過程で切断方向に沿ってしわと圧縮が発生した。そのため、粒子径は圧縮の影響がない切断方向の垂直方向の長さを測定し、粒子径とした。黒い粒子が存在しない領域および黒色粒子間の間隔も同様に測定した。

## 2-4. 結果および考察

### 2-4-1. CEMOVIS によるカゼインミセルの低倍率観察

図 1a - d に、CEMOVIS によるカゼインミセルの低倍率画像を示す。ほとんどのカゼインミセルは、ナイフマークと直交する楕円形として観察された。乳のほとんどのカゼインミセルは、球状であるため (Schmidt, 1982)、切断方向に沿った圧縮によりカゼインミセルが楕円形に変形したと推定される。図 2 は、図 1a - d の画像分析によって計算された、カゼインミセルのサイズの分析結果を示す。カゼインミセルの平均直径は約 140 nm であり、これは以前に報告されたカゼインミセルのサイズ範囲内であった (Holt et al, 1978; Schmidt, 1982)。

### 2-4-2. CEMOVIS によるカゼインミセルの高倍率観察

図 1a および図 1b にそれぞれ示した試料の高倍率画像を図 3a および図 3b に示す。カゼインミセルの断面画像には、多数の黒い粒子が存在した。TEM での観

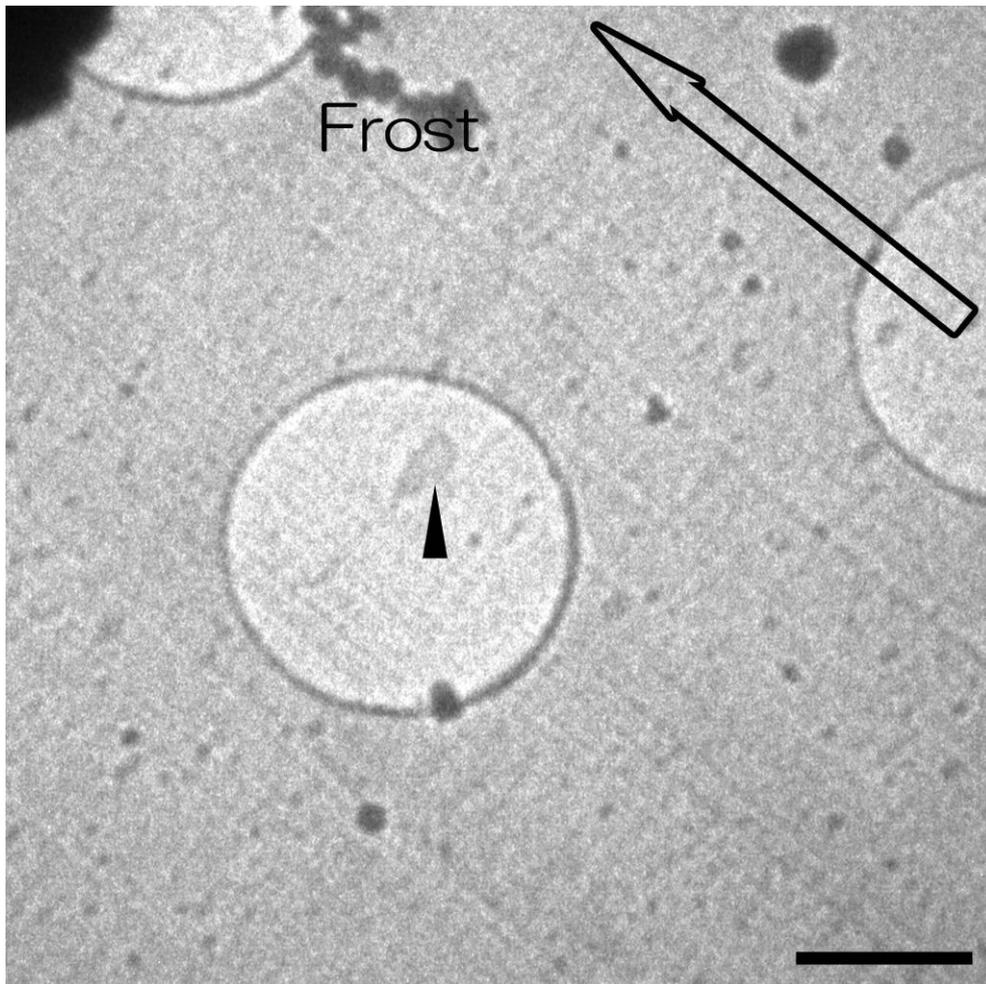


図 1a CEMOVIS を用いた生乳中のカゼインミセルの低倍率画像  
小さな高輝度の粒子はカゼインミセルである。丸い円は、グリッド (C-flat)  
に貼られた穴あきカーボンフィルムに開いた直径 2  $\mu\text{m}$  の開口部である。ナイフ  
マークは右下から左上に向かって走っている。(三角はカゼインミセル、矢印は  
切断方向、スケールバーは 1  $\mu\text{m}$ )

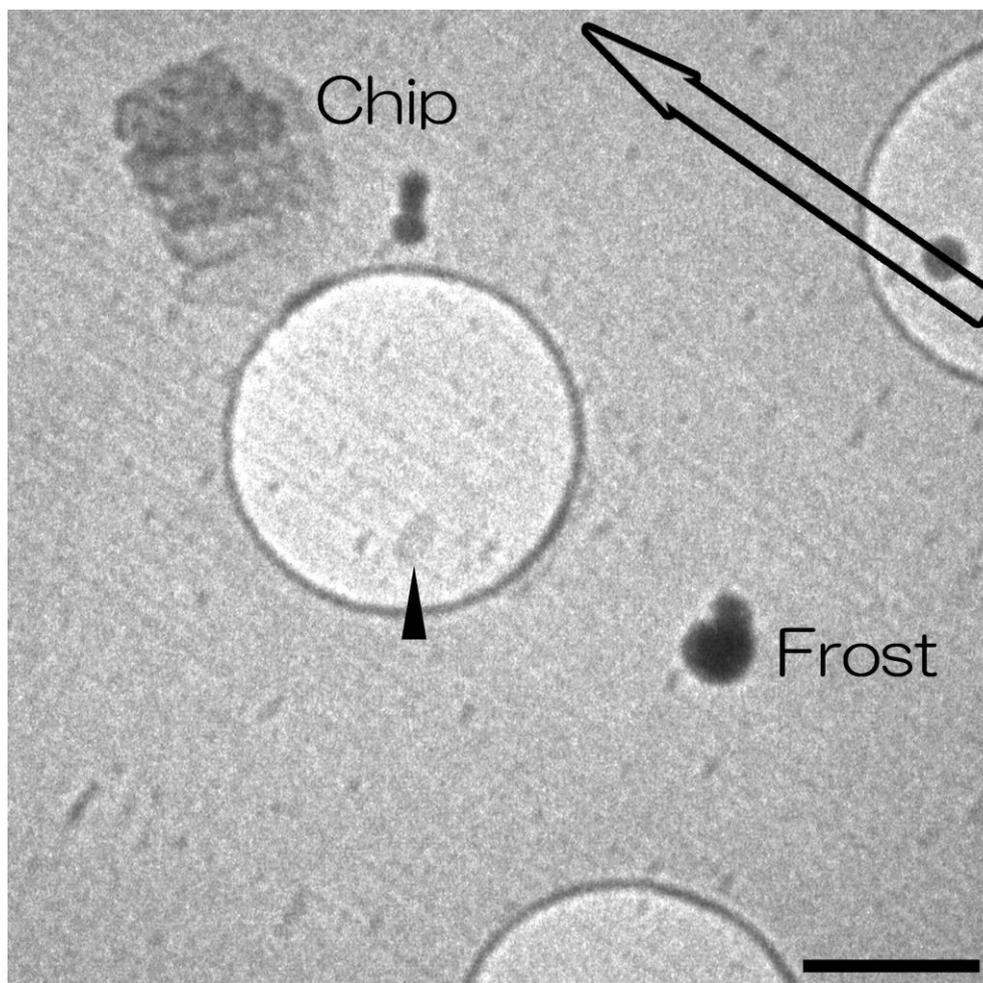


図 1b CEMOVIS を用いた生乳中のカゼインミセルの低倍率画像  
小さな高輝度の粒子はカゼインミセルである。丸い円は、グリッド (C-flat)  
に貼られた穴あきカーボンフィルムに開いた直径 2  $\mu\text{m}$  の開口部である。ナイフ  
マークは右下から左上に向かって走っている。(三角はカゼインミセル、矢印は  
切断方向、スケールバーは 1  $\mu\text{m}$ )

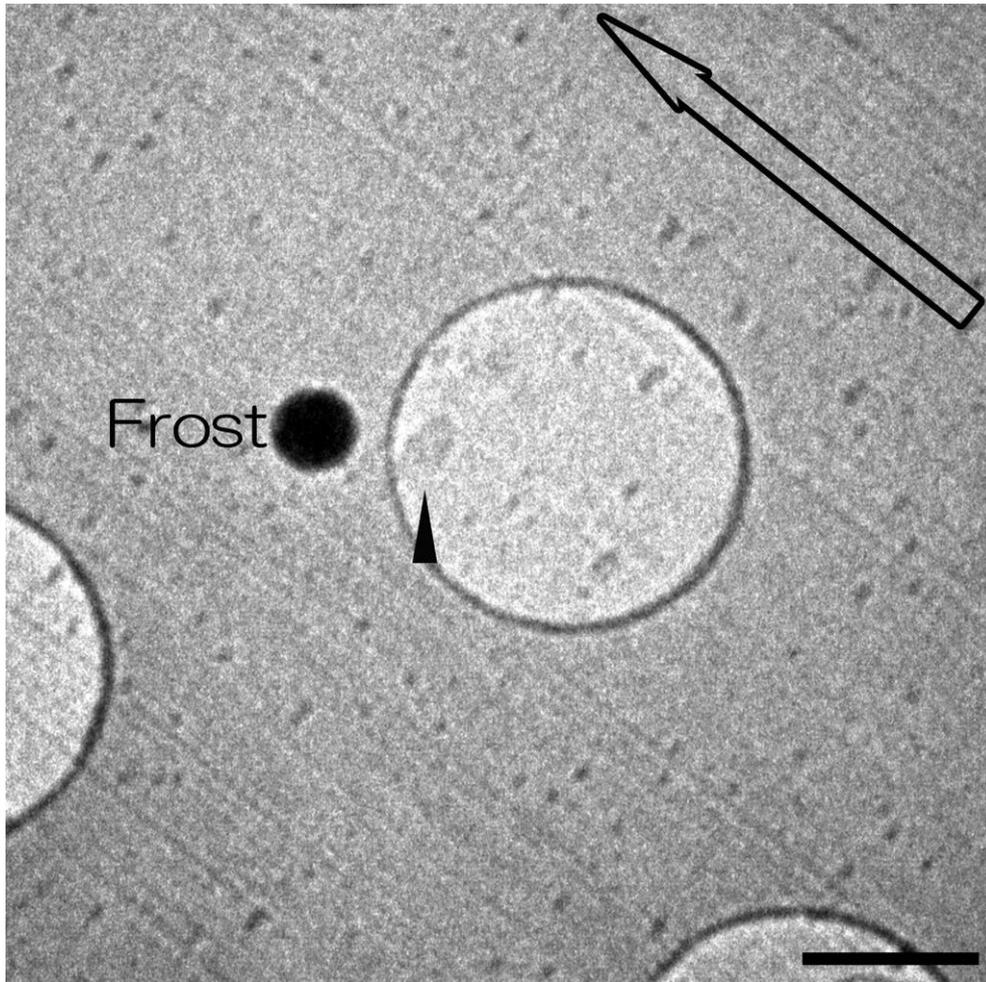


図 1c CEMOVIS を用いた生乳中のカゼインミセルの低倍率画像  
小さな高輝度の粒子はカゼインミセルである。丸い円は、グリッド (C-flat)  
に貼られた穴あきカーボンフィルムに開いた直径 2  $\mu\text{m}$  の開口部である。ナイフ  
マークは右下から左上に向かって走っている。(三角はカゼインミセル、矢印は  
切断方向、スケールバーは 1  $\mu\text{m}$ )

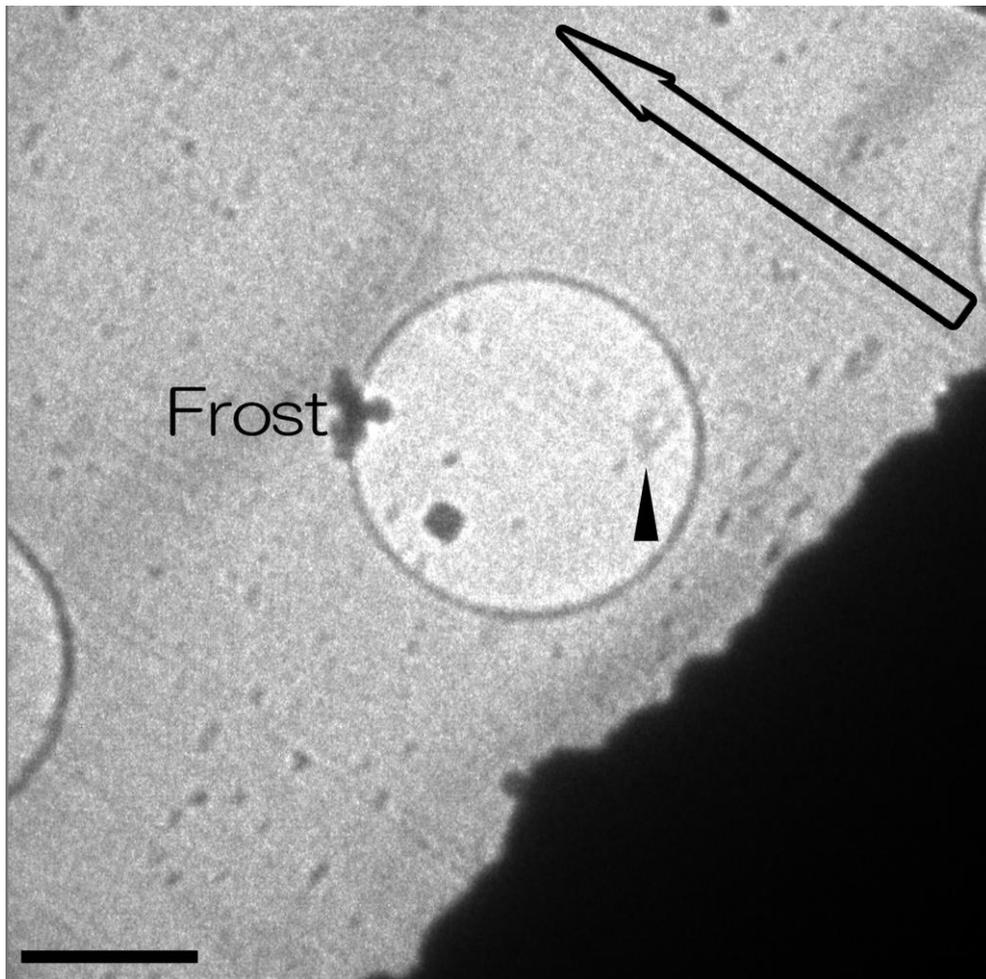


図 1d CEMOVIS を用いた生乳中のカゼインミセルの低倍率画像  
小さな高輝度の粒子はカゼインミセルである。丸い円は、グリッド (C-flat)  
に貼られた穴あきカーボンフィルムに開いた直径 2  $\mu\text{m}$  の開口部である。ナイフ  
マークは右下から左上に向かって走っている。(三角はカゼインミセル、矢印は  
切断方向、スケールバーは 1  $\mu\text{m}$ )

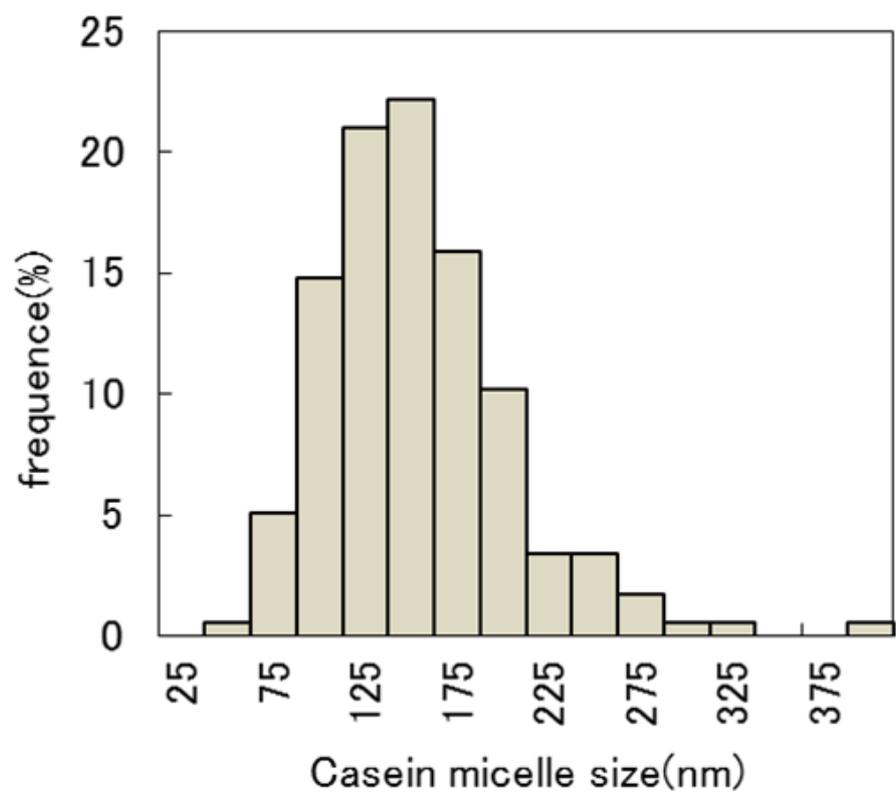


図2 図1a - dの画像分析によって算出されたカゼインミセルサイズの分布  
カゼインミセルの平均直径は、約140 nmであった。

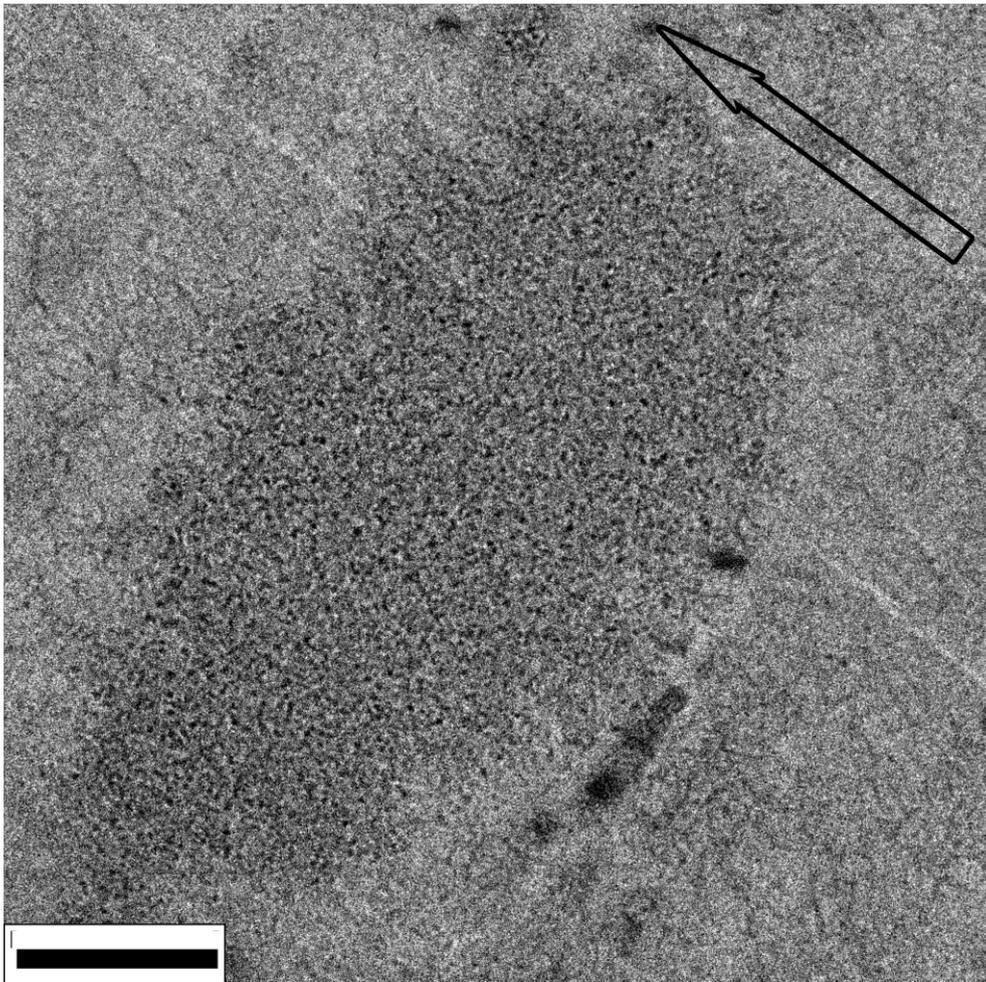


図 3a CEMOVIS による乳のカゼインミセルの高倍率画像

図 1a に示す試料の高倍率画像を示す。多数の黒い粒子 (CCP) が、カゼインミセルの内部に存在し、CCP と CCP の間隔は不均一に分布しているように見えた。  
(60,000 倍の倍率 ; 矢印、切断方向 ; スケールバー = 100 nm)

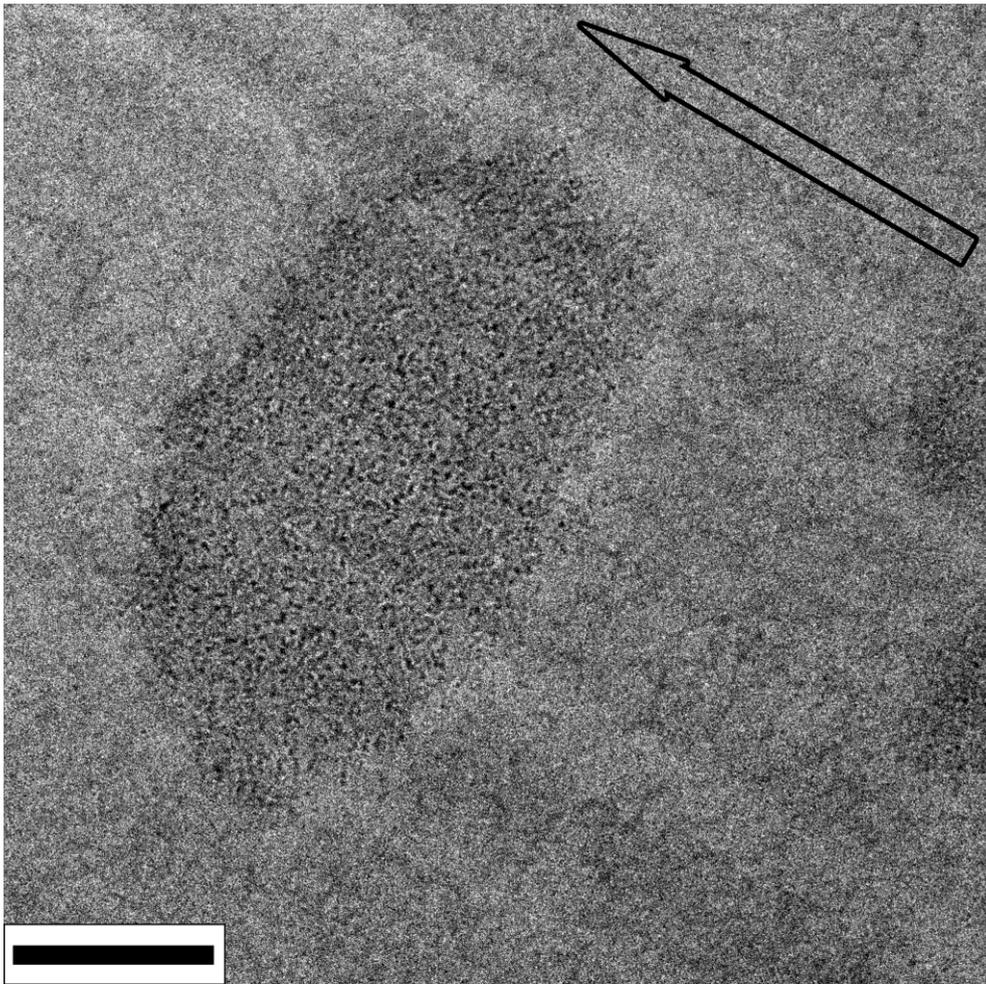


図 3b CEMOVIS による乳のカゼインミセルの高倍率画像

図 1b に示す試料の高倍率画像を示す。多数の黒い粒子 (CCP) が、カゼインミセルの内部に存在し、CCP と CCP の間隔は不均一に分布しているように見えた。  
(60,000 倍の倍率 ; 矢印、切断方向 ; スケールバー = 100 nm)

察では、重元素ほど、より暗い画像として観察される。この研究では試料に重金属による染色を行わなかったため、黒い粒子はおそらく乳タンパク質より重い元素であるリンとカルシウムのクラスターであると考えられる。したがって、黒い粒子は CCP であると推察される (Knoop et al, 1975)。図 4 は、図 3a および 3b の画像分析によって算出された CCP のサイズのデータで、平均粒子径は 2.3 nm であった。これまでも電子顕微鏡を用いて CCP の直径を測定した報告例がある。例えば Knoop らは、超薄切片法を用いて CCP 直径が 2.5 nm であると報告した (Knoop et al, 1975)。Lyster らは、1.5 nm と報告し (Lyster et al, 1984)、McGann らは 2.5 nm を報告し (McGann et al, 1983)、一方、クライオ電子顕微鏡を使用した Kuudsen と Skibsted は 2~3 nm (Knudsen et al, 2010)、また Marchin らは 2.5 nm と報告した (Marchin et al, 2007)。Marchin と McManus は、小角散乱 X 線回折装置 (SAXS) を用いて CCP 直径が 2.5 nm と報告し (McMahon et al, 1998)、小角中性子散乱 (SANS) を用いて 4.6 nm であることを報告した (Kruif et al, 2003)。従って本研究で測定した CCP のサイズが 2~3 nm であったのは、上記の報告値と同様であり、妥当な値であると考えられた。

図 5 は、図 3a および 3b の画像分析によって計算された、CCP と CCP の間隔の分布を示し、その平均は 5.4 nm 程度であった。カゼインミセルに分布する CCP と CCP の間隔は、均一でないように見えた。De Kruif と Holt は、小角中性子散乱測定を用いて CCP と CCP の間隔が 18 nm であることを報告した (De Kruif et al, 2003)。本研究では、2つの CCP が互いに最も近く、かつ切断方向の垂直軸上にある 2つの CCP の間隔を測定したために差が生じたものと推察された。

図 6a および図 6b は、図 1c および 1d にそれぞれ示した試料の高倍率画像を示す。図 6a および 6b に示したように、カゼインミセルの表面は、滑らかではなく、界面に沿っていくつかの凹状の領域が観察された。CCP を含まない領域は、図 3a、図 3b、図 6a、図 6b に示した全てのカゼインミセルで確認された。図 7 は、本観察で算出された CCP を含まない領域のサイズを示し、平均は約 19.1 nm であった。最近の研究では、カゼインミセル中に水で満たされた領域が存在することが提案されており、McMahon および Oommen はミセル内に水で満たされた空洞の存在を示唆している (McMahon et al, 2008)。一方 Trejo らは、カゼインミセル中に少なくとも直径 5 nm ある、20~30 nm の水で満たされた空洞の存在を報告した (Trejo et al, 2011)。Dalglish は、タンパク質の疎水性相互作用がミセル内部に水の不均一な分布と、水路形成をもたらすと仮定した (Dalglish, 2011)。Bouchoux らは、SAXS 分析により、水で満たされた領域を持つスポンジモデルを提唱した (Bouchoux et al, 2010)。したがって、CCP を含まない領域は、以前の報告によって予測された通り、水で満たされた空洞であると推察された。

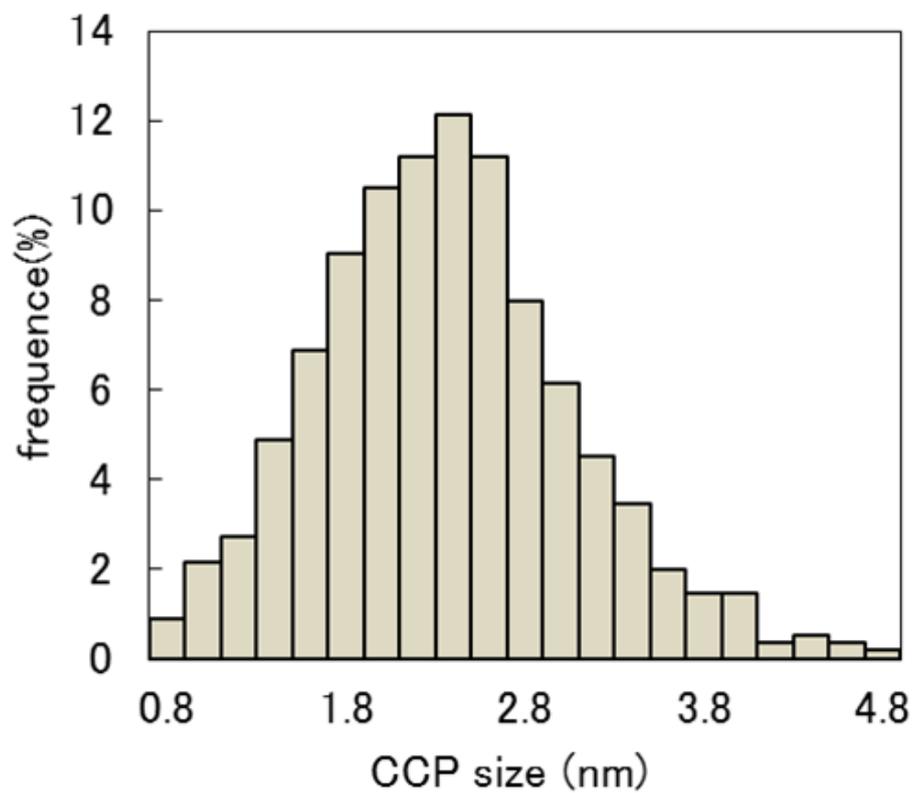


図 4. 図 3a および 3b の画像分析によって算出したカゼインミセル内部に存在する CCP のサイズ分布  
 CCP の平均径は 2.3 nm であった。

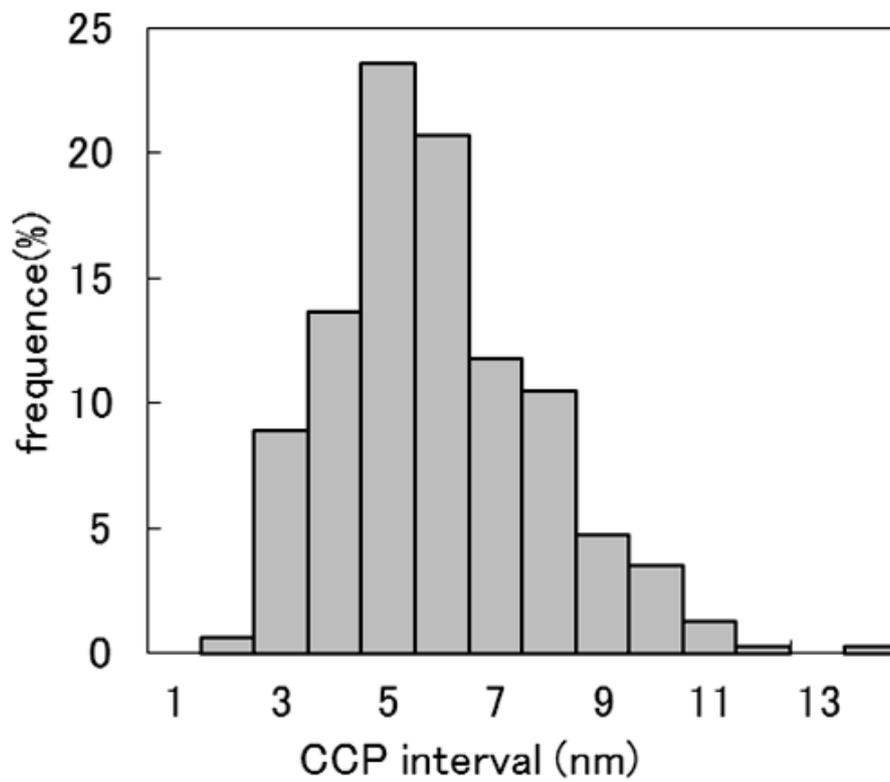


図 5. 図 3a および 3b の画像分析によって算出した、カゼインミセルに存在する CCP と CCP の間隔  
平均間隔は 5.4 nm であった。

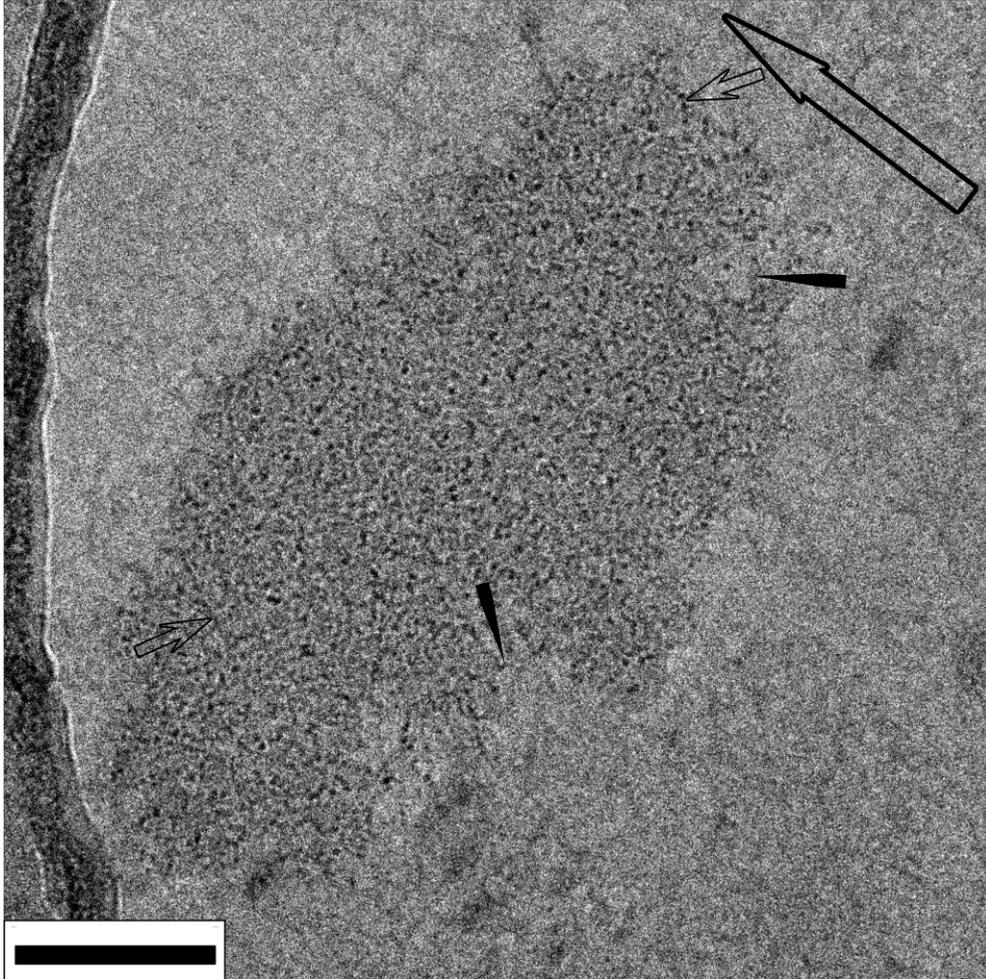


図 6a 図 1c に示す試料を拡大した画像で、カゼインミセルの表面に凹領域を有する高倍率画像

三角は、カゼインミセルの内側に CCP を含まない領域を示し、局在化した CCP によって囲まれている。(倍率、60,000 倍；小さな矢印、カゼイン会合体を含むと思われる電子密度のやや高い領域；大きな矢印、切断方向；スケールバー＝100 nm)

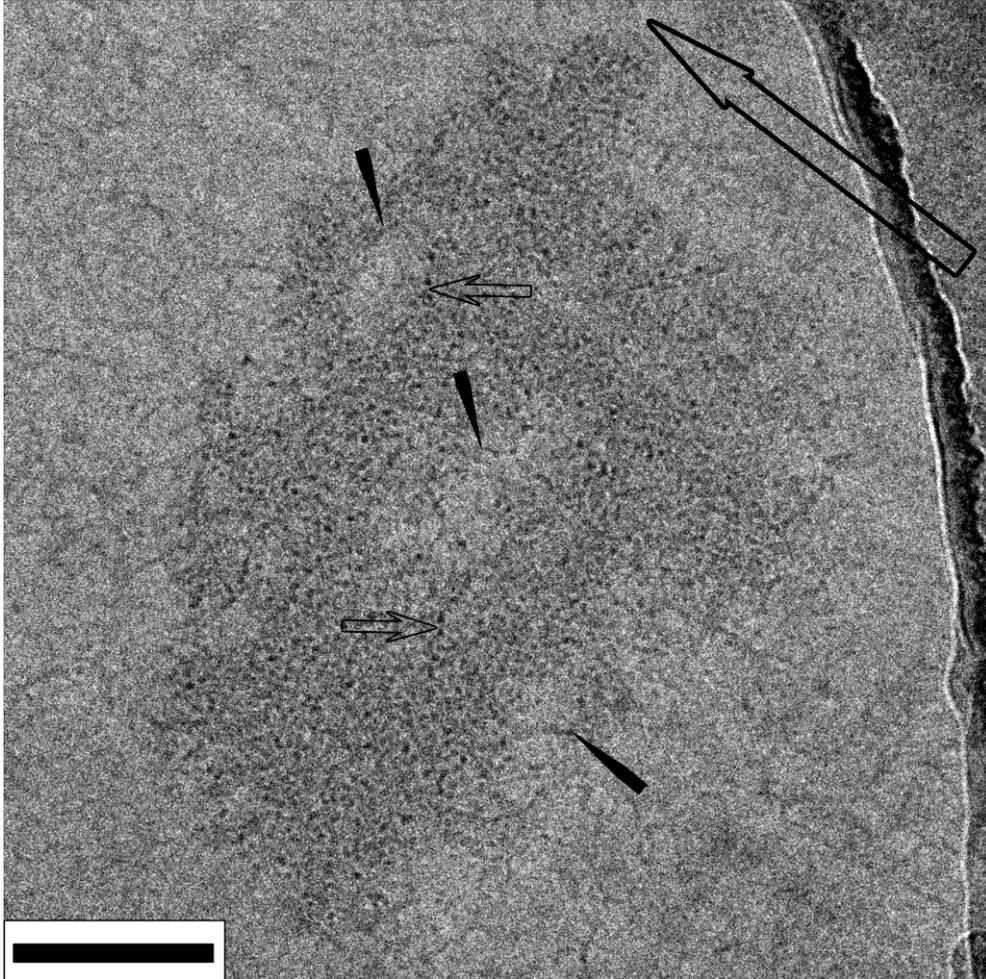


図 6b 図 1d に示す試料を拡大した画像で、カゼインミセルの表面に凹領域を有する高倍率画像

三角は、カゼインミセルの内側に CCP を含まない領域を示し、局在化した CCP によって囲まれている。(倍率、60,000 倍；小さな矢印、カゼイン会合体を含むと思われる電子密度のやや高い領域；大きな矢印、切断方向；スケールバー＝100 nm)

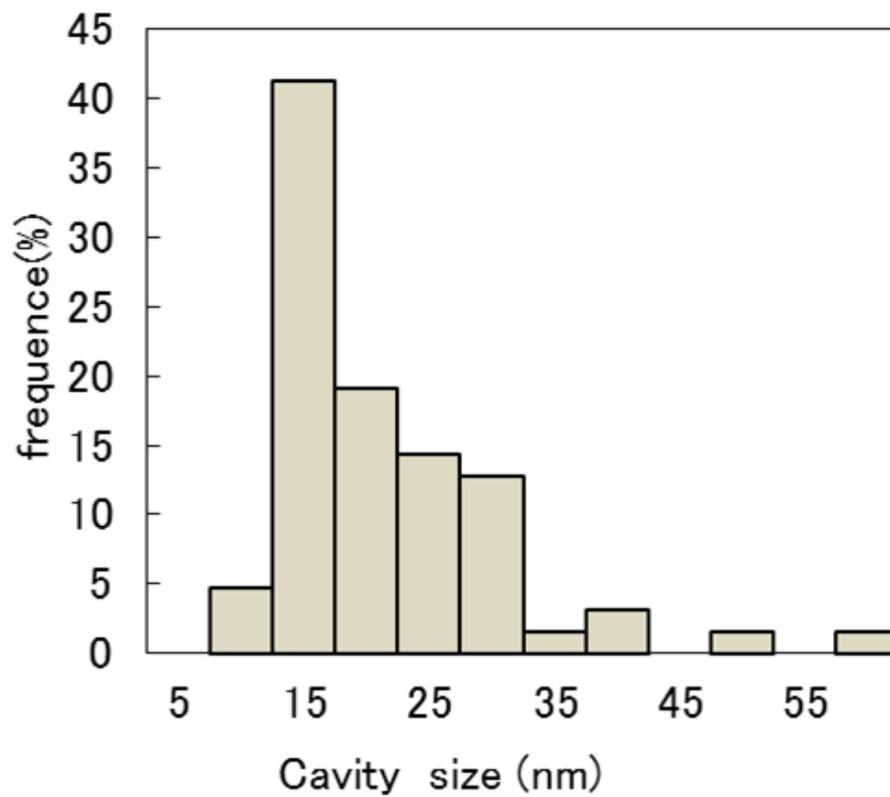


図7 カゼインミセル中の CCP を含まない領域のサイズ  
この領域の平均サイズは、約 19.1 nm であった。

またカゼインミセル中に、CCP とは異なる、電子密度がやや高い領域が存在していた。Holt らは、カゼインミセルを分解して得られたリン酸カルシウムに富む物質のアミノ酸分析を行い、CCP がカゼインのリン酸基に結合していることを示唆した (Holt et al、1986)。青木らは、カゼインは CCP のリン酸エステル基を介して架橋していることを証明した (Aoki et al、1987)。このことは、この領域が CCP と架橋したカゼイン会合体を含むことを示唆していた。

本研究は、凍結超薄切片を厚さ 25nm で調製した CEMOVIS によりカゼインミセルを観察し、カゼインミセルのサイズ、ならびに CCP のサイズおよび間隔を明らかにした。カゼインミセル中の CCP と CCP の間隔は一様ではなく、またカゼインミセルの界面に沿って空洞および凹状領域を有することから、水和した動的な構造であると推測した。以上の結果を基に、カゼインミセルの構造モデルを考案し、図 8 に示した。本観察では、カゼイン会合体を含むと思われる電子密度のやや高い領域を観察したが、微細であるため CCP との架橋構造は判別できなかった。カゼイン会合体と CCP との架橋に着目した観察は、今後検討していきたい。

#### 2-4-3. CEMOVIS におけるアーティファクトの可能性

CEMOVIS の前処理で実施した高圧凍結処理は、210 MPa の圧力下で凍結することによって氷結晶の形成を遅らせ、試料表面から深さ 200~600  $\mu\text{m}$  の領域に非晶質の氷を調製することが可能である。高圧により水の融点は $-22^{\circ}\text{C}$ に低下し、 $-90^{\circ}\text{C}$ 付近まで過冷却状態を維持する。高圧凍結法は、胃粘膜 (Sawaguchi et al、2012)、酵母 (Knomi et al、2000)、エンドウ豆の芽 (Kaneko、2000) を含む様々な生物学的分野で、積極的に活用されているが、試料に対する高圧凍結の影響はよく解っていない。Gebhardt らは、天然ミセルを 50~250 MPa の加圧処理を行うと、ミセルが小さな断片に崩壊することを報告した (Gebhardt et al、2006)。Knudsen らは、150~200 MPa の高静水圧処理により、直径 20~50 nm の大きなミセルと、多数の小さなミセルが共存し、大きなミセルの表面は滑らかで完全に球形になると報告した (Knudsen et al、2010)。図 3a、3b、6a、および 6b に示したカゼインミセルは、サイズが 340~500nm と大きく、表面が滑らかでないことから、高圧凍結の圧力により、ミセルのサイズおよび形状に影響を及ぼしていない可能性が高いと考えられる。ただし CEMOVIS では、デキストランを混合して凍結切片を作成する必要があるため、デキストラン由来のアーティファクトが生じる可能性がある。また凍結切片を調製する際に生ずるしわ、圧縮などの試料の前処理に由来する欠陥を防ぐことができない。

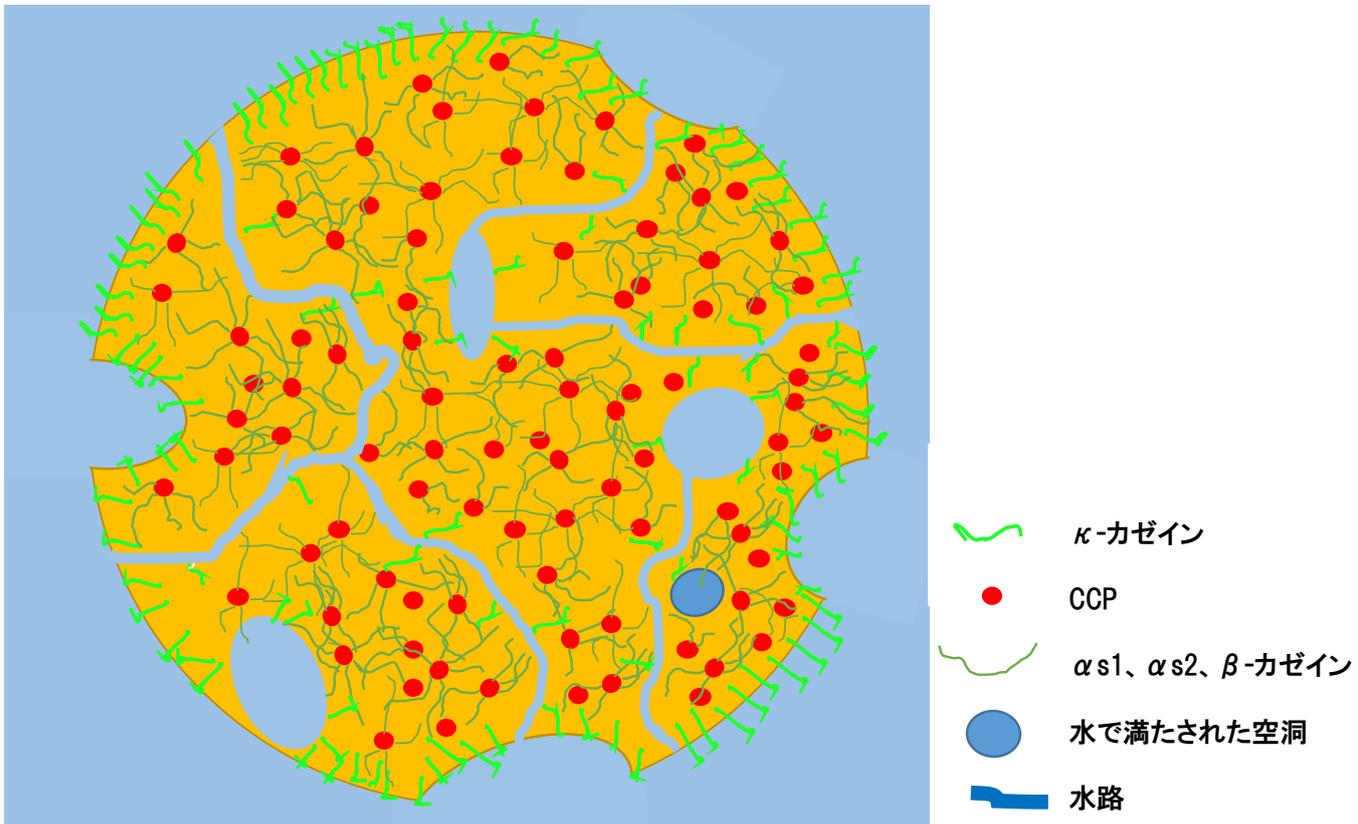


図8 想定されるカゼインミセルの構造モデル

## 2-5. まとめ

CEMOVIS を用いた電子顕微鏡観察により、乳のカゼインミセル、特に CCP の内部構造を決定した。その結果、(i) カゼインミセルの平均直径は約 140 nm であった。(ii) カゼインミセル中の CCP 直径は約 2~3 nm であり、平均直径は 2.3nm であった。(iii) カゼインミセル中の CCP と CCP の間隔は均一ではなく、平均間隔は約 5.4 nm であった。(iv) CCP を含まない領域が存在し (平均サイズ、約 19.1 nm)、以前の報告を考慮すると、水で満たされた空洞であると考えられた。

## 参考文献

- Aoki, T., Yamada, N., Tomita, I., Kako, Y., and Imamura, T. (1987) Caseins are cross-linked through their ester phosphate groups by colloidal calcium phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, **911**, 238-243.
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziu, G., Pérez, J., and Cabane, B. (2010) How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study. *Biophysical J.* **99**, 3754-3762.
- Dalgleish, D.G., and Law, A.J.R. (1989) pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *Journal of Dairy Research.* **56**, 727-735.
- Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P.A., and Goff, H.D. (2004) A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int Dairy J.* **14**, 1025-1031.
- Dalgleish, D.G. (2011) On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter.* **7**, 2265-2272.
- De Kruif, C.G, and Holt, C. (2003) Casein micelle structure, functions and interactions. *Advanced Dairy Chemistry.* **1**, 233-276.
- Holt, C., Kimber, A.M., Brooker, B., and Prentice, J.H. (1978) Measurements of the size of bovine casein micelles by means of electron microscopy and light scattering. *J. Colloid and Interface Sci.* **65**, 555-565.
- Holt, C., Davies, D.T., and Law, A.J.R. (1986) Effects of colloidal calcium phosphate content and free calcium ion concentration in the milk serum on the dissociation of bovine casein micelles. *Journal of Dairy Research.* **53**, 557-572.
- Holt, C. (1992) Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in protein chemistry.* **43**, 63-151.

- Gebhardt, R., Doster, W., Friedrich, J., and Kulozik, U. (2006) Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *European Biophysics J.* **35**, 503-509.
- Kaneko, Y. (2000) Ultrastructure of Germinating Pea Leaves Prepared by High Pressure Freezing. *Denshikennbikyoku.* **12**, 10-19. (in Japanese)
- Kimura, T., Taneya, S., and Kanaya, K. (1979) Observation of internal structure of casein submicelles by means of on beam sputtering. *Milchwissenschaft.* **34**, 521-524.
- Kishimoto-Okada, A., Murakami, S., Ito, Y., Horii, N., Furukawa, H., Takagi, J., and Iwasaki, K. (2010) Comparison of the envelope architecture of *E. coli* using two methods: CEMOVIS and cryo-electron tomography. *J. Electron Microscopy.* **59**, 419-26.
- Knomi, M., Kamasawa, N., Takagi, T., and Osumi, M. (2000) Immunoelectron Microscopy of Fission Yeast Using High Pressure Freezing. *Plant Morphology.* **12**, 20-31.
- Knoop, A. M., Knoop, E., and Wiechen, A. (1975) Synthetic casein micelles. *Neth. Milk Dairy J.* **29**, 356-357.
- Knudsen, J.C., and Skibsted, L.H. (2010) High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chem.* **119**, 202-208.
- Kruif, C. G. D., and Holt, C. (2003) Casein micelle structure, functions and interactions. In *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins*. 3rd edition Part A. 233-276. (Fox and PF. McSweeney PLH. Kluwer Academy/Plenum Publishers. New York)
- Lyster, R. L. J., Mann, S., Parker, S. B., and Williams, R. J. P. (1984) Nature of micellar calcium phosphate in cow's milk as studied by high-resolution electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **801**, 315-317.

- Marchin, S., Putaux, J.L., Pignon, F., and Léonil, J. (2007) Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering. *J. Chem. Phys.* **126**, 045101.
- McGann, T.C.A., Buchheim, W., Kearney, R.D., and Richardson, T. (1983) Composition and ultrastructure of calcium phosphate-citrate complex in bovine milk systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **760**, 414-420.
- McMahon, D. J., and McManus, W. R. (1998) Rethinking Casein Micelle Structure Using Electron Microscopy. *J. Dairy Sci.* **81**, 2985-2993.
- McMahon, D.J., and Oommen, B.S. (2008) Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *J. Dairy Sci.* **91**, 1709-1721.
- Sawaguchi, A., and Toyoshima, F. (2012) Researches today: Ultrastructural study of gastric mucosa by using high-pressure freezing technique. *Kenbikyō.* **45**, 130-132. (in Japanese)
- Schmidt, D.G. (1982) Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in Dairy Chemistry.* **1**, 61-86.
- Snoeren, T.H.M, Klok, H. J., Van Hooydonk, A. C. M., and Damman, A. J. (1984) The voluminosity of casein micelles. *Milchwissenschaft.* **39**, 461-463.
- Trejo, R., Dokland, T., Jurat-Fuentes, J., and Harte, F. (2011) Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.* **94**, 5770-5775.
- Walstra, P. (1979) The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *Journal of Dairy Research.* **46**, 317-323.

### 第3章 徳安法を用いたパニールチーズの $\beta$ -ラクトグロブリンの免疫電子顕微鏡観察

#### 3-1. 序論

乳製品の特性を評価する方法として、電子顕微鏡法が、詳細な微細構造の観察に活用されてきた。電子顕微鏡法は、従来の化学固定法を用いた観察だけでなく、低温で観察が可能なクライオ電子顕微鏡を用いる観察など、年々進歩している。中でも凍結固定法は、乳製品のほとんどが乳脂肪分を含んでいるため、化学固定の後に続く脱水過程での脂肪分の流出、また観察中に電子ビームによって溶解することを防ぐ有用な方法である。しかし電子顕微鏡画像から微細構造を定性的に分析することは、その画像が明暗のみのモノコントラストであることから困難である。そこで抗原抗体反応を用いた免疫電子顕微鏡法が、特定のタンパク質の局在を可視化するための手法として開発された。免疫電子顕微鏡法は、乳や乳製品においても、構成する乳タンパク質の分布を視覚化するために有用である。乳や乳製品を免疫電子顕微鏡で観察した例としては、超高温滅菌した乳のカゼインミセルに存在する  $\alpha_{s1}$ -カゼインの分布を免疫金コロイドを用いて観察した例 (McMahon et al, 1998)、コロイド金を用いてアイスクリーム中の  $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\beta$ -カゼインを観察した例 (Zhang et al, 2004) がある。フェリチン標識二重抗体法を用いて  $\kappa$ -カゼインを観察し、カゼインミセルの大きさと  $\kappa$ -カゼイン含有量の関係を示した報告 (Carroll et al, 1983)、低脂肪フローゼンデザート、低脂肪プロセスチーズ、サラダドレッシングに含まれる  $\beta$ -ラクトグロブリン、カゼイン、乳清タンパク質、卵白アルブミンを同定した報告 (Armbruster et al, 1993) が挙げられる。タンパク質以外にも、チェダーチーズ中の乳酸菌によって産生される多糖類 (EPS) を金コロイドで標識して観察した例がある (Dabour et al, 2005)。これらの観察の多くは、試料をエポキシ樹脂に包埋した後に超薄切片を調製し、免疫染色する樹脂包埋法 (包埋後染色法) で実施されている。そのため、樹脂の熱重合により抗原性が低減することや、切片表面に露出している抗原のみが標識されており、得られた画像の解釈は慎重に行わなくてはならない (Tamaki, 2013)。さらに、免疫電子顕微鏡法を行うにあたり、乳および乳製品に含まれる乳脂肪分が、深刻な問題を引き起こす可能性がある。通常、乳脂肪分を含む乳製品をエポキシ樹脂に包埋するには、脂肪分をオスミウム酸で固定して、その形態を保持する必要がある。しかしオスミウム酸を使用すると、タンパク質の抗原性が失活し、抗原抗体反応を用いた免疫電子顕微鏡観察は不可能になる。オスミウム酸で処理することなくエポキシ樹脂に包埋したブロックは、脂肪分が脱水および樹脂包埋過程で流出する。そこで、凍結超薄切片を用いる徳安法 (凍結超薄切片法) (Tamaki、

2013 ; Tokuyasu, 1986) により乳製品を免疫染色することを試みた。徳安法の大きな利点は、タンパク質や脂肪分の流出と、タンパク質の変性を最小限に抑えられる点と、効率的に 3 次元的な標識が可能である点にある。本研究では、徳安法と、最も一般的な免疫電子顕微鏡法である樹脂包埋法（包埋後染色法）を比較した。乳を加熱した後に酸凝固することにより得られるパニールチーズを対象に、 $\beta$ -ラクトグロブリンの分布を可視化することにより、徳安法の有用性を確認した。

### 3-2. 試料

川越工場 (MEGMILK SNOW BRAND Co., Ltd, Japan) から入手した牛由来の乳を 95°C に加熱した後、70°C に冷却し、2 倍希釈米酢 (Mizkan, Japan) を加えながら攪拌して、pH を 5.6 まで低下させた。得られた酸凝固カードを直径約 8 cm の小さなチーズモールドに入れ、4 kg の重りを用いて 2 時間圧搾して、パニールチーズを得た。

### 3-3. 実験方法

#### 3-3-1. 樹脂包埋法（包埋後染色法）

樹脂包埋法は、包埋後染色法 (Tamaki, 2013) に準じて行った。試料を 0.1M PBS を用いた 4% パラホルムアルデヒド固定液 (Taab, USA) に 5°C で一晩保存した後、エタノールを用いて脱水した。試料をエポキシ樹脂に包埋した後、ウルトラマイクロトーム (EM UC 7, Leica Macro Systems, Vienna, Austria) を用いて超薄切片（厚さ、70 nm）を調製した。下記に示した徳安法と同様の免疫染色を行った後、試料を酢酸ウラニル水溶液で電子染色した。

#### 3-3-2. 徳安法（凍結超薄切片法）

凍結超薄切片は、徳安法 (Tamaki, 2013 ; Tokuyasu, 1986) に準じて調製した。試料をサイコロ状 (1mm×1mm×1mm) に切り出し、0.1M PBS を用いた 4% パラホルムアルデヒド固定液に 5°C で一晩浸漬した。固定液を 20% ポリビニルピロリドン (PVP; Sigma-Aldrich, USA) および 1.84M スクロース (Sigma-Aldrich, USA) を含有する水溶液に入れ替えて、5°C で一晩保持した。サンプルを凍結ウルトラマイクロトーム専用のピンにセットし、液体窒素に浸漬して凍結固定した。非晶質状に凍結した試料から、静電気制御システム (EM CRION, Leica Microsystems, Austria)、マイクロマニピュレーター、クライオスフェア (Leica Microsystems, Austria) を備えた凍結ウルトラマイクロトームシステム (EM UC7/FC7, Leica Microsystems, Austria) を用いて、凍結超薄切片（厚さ、70 nm）を調製した。免疫染色は、免疫金標識法に準じて実施した (Nakajima, 1990)。

ブロッキング剤は、0.1M PBS に、3% (w/w) のウシ血清アルブミン (BSA10 bovine serum albumin, BBI Solutions, UK) を溶解して得た。超薄切片が載っているグリッドを 0.1M PBS で 5 分間 3 回ずつすすぎ、非特異反応を防ぐためにブロッキング剤に 30 分間反応させた。次にグリッドを、4°C で一晩、PBS で 200 倍希釈したウシ  $\beta$ -ラクトグロブリンに対する一次抗体、ウサギポリクローナル IgG 抗体 (A10-125A, BET, USA) に反応させ、次いで 0.1 M PBS で 3 分間 6 回ずつ濯いだ。一次抗体の位置を特定するために、PBS で 100 倍希釈した二次抗体 (anti-IgG (H+L), 10 nm gold conjugated, EMGAR10, CRL, UK) に、グリッドを室温で 2 時間反応させた。グリッドを 0.1 M PBS で 3 分間 6 回ずつすすぎ、次に 2% (w/w) のグルタルアルデヒド固定剤で 10 分間固定した。グリッドを蒸留水で洗浄し (3 分間 6 回ずつ)、次いでコントラストを高めるために 2% (w/w) 酢酸ウラニル溶液に 20 分間保持して電子染色を施した。グリッドを蒸留水の滴上に浮かべて洗浄し (室温で 3 分間 5 回ずつ)、2% (w/w) ポリビニルアルコール (PVA, Sigma-Aldrich, USA) および 0.2% (w/w) 酢酸ウラニルの水溶液に保持した。グリッドをステンレス鋼のループですくい取り、濾紙 (#50, Whatman, GE Healthcare, UK) を用いて過剰の液体を拭き取り、続いて 10 分間乾燥させ、ループから注意深くグリッドをはずした。その後、グリッドを TEM (JEM-2000FXII: JEOL, Tokyo, Japan) に移動し、倍率 1000~30,000 倍で観察した。

ポジティブコントロールとして、 $\beta$ -ラクトグロブリンを含有する Alacen WPC472 (Fonterra, New Zealand) を使用した。ネガティブコントロールとして、一次抗体の代わりに非免疫血清 (IHR-8142, IBC, USA) と反応させた。

#### 3-4. 結果および考察

調製した試料の組成を日本食品総合研究所で測定した結果、水分 61.5g/100g、タンパク質 18.4g/100g、脂肪 14.9g/100g、灰分 1.6g/100g、炭水化物 3.6g/100g であった。本試料の水分量がわずかに高かったが、標準的なパニールチーズを調製できたと判断した。図 1a および 1b に、樹脂包埋法および徳安法にて、パニールチーズの  $\beta$ -ラクトグロブリンを免疫染色した低倍率画像 ( $\times 1,000$ ) を示した。樹脂包埋法および徳安法の両方において、高輝度の構造体は、酢酸ウラニルで電子染色されたカゼインおよび乳清タンパク質などの乳タンパク質の凝集体であると考えられた。低輝度の球状の構造体は、その形状から脂肪球と考えられた。樹脂包埋法では、タンパク質への固定効果が弱いパラホルムアルデヒドのみで固定処理したため、乳タンパク質凝集体は連続的ではなく、凝集体の間に隙間があり、脂肪球はほとんど確認できなかった。グルタルアルデヒドとオスミウム酸を用いると、タンパク質と脂肪分の固定効果が期待できるが、

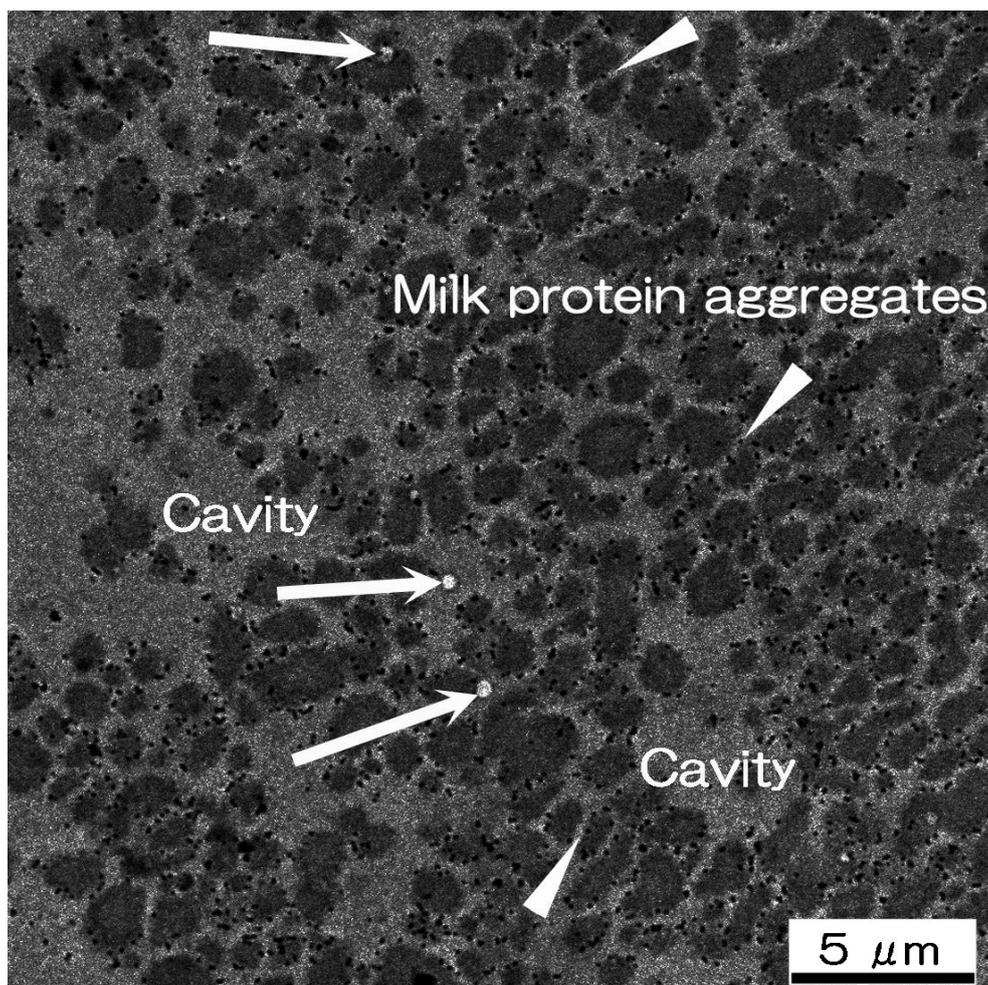


図 1a 樹脂包埋法を用いた  $\beta$ -ラクトグロブリン免疫染色によるパニールチーズの約 1,000 倍での低倍率画像 (三角、タンパク質凝集体間のギャップ; 矢印、脂肪球)

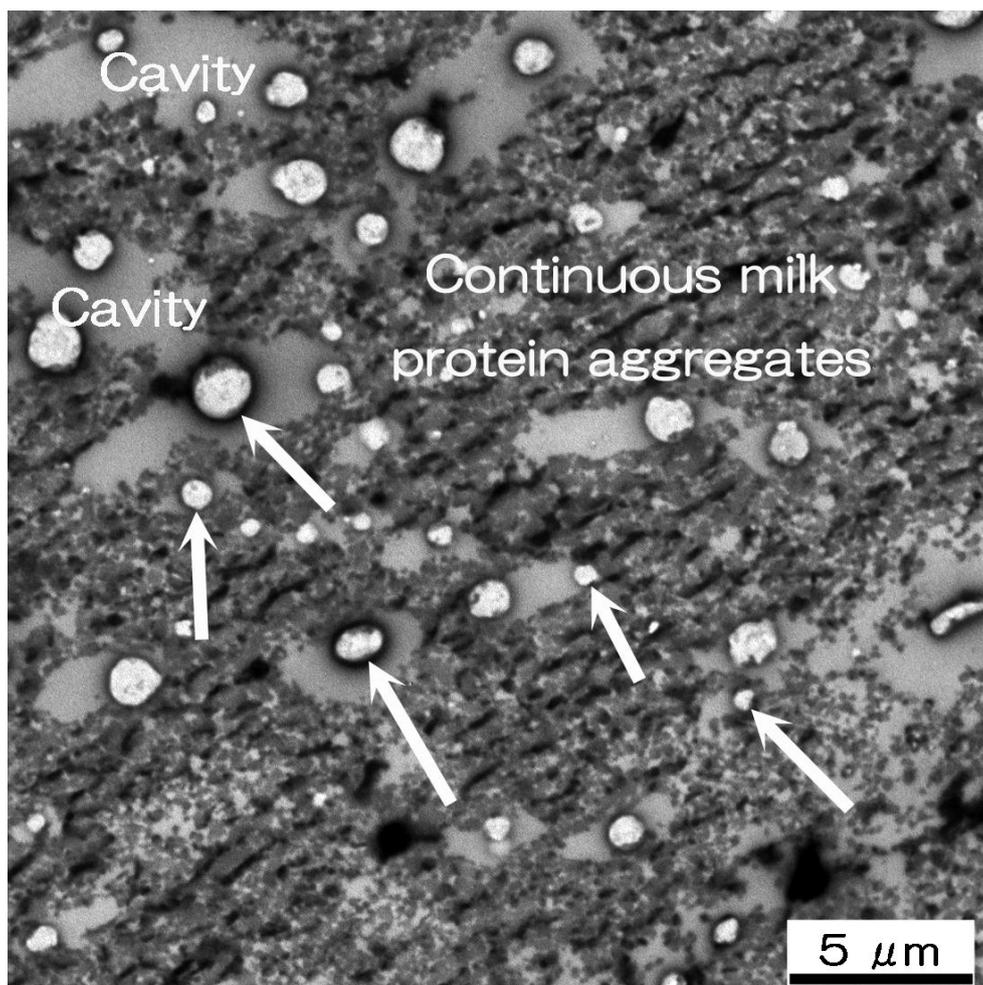


図 1b 徳安法を用いた  $\beta$ -ラクトグロブリン免疫染色によるパニールチーズの約 1,000 倍での低倍率画像 (矢印、脂肪球)

タンパク質の抗原性が低下または失活する。徳安法では、Kalab らによって報告された画像 (Kalab et al, 1988 ; Harwalkar et al, 1988) と同様に、多くの空洞と球状の脂肪球を含む連続的な乳タンパク質の凝集体を観察した。いくつかの脂肪球は空洞内に存在しており、その界面には乳タンパク質の凝集体が吸着していた。パニールチーズの製造プロセスにおいて、乳を加熱することにより  $\beta$ -ラクトグロブリンが、 $\beta$ -カゼインとスルフヒドリル - ジスルフィド交換反応を介して凝集体を形成する (Jang et al, 1990 ; Sawyer, 1969)。その後の酸凝固で、それらの凝集体と共にカゼインミセルが沈殿する。それ故、乳の加熱温度、酸を添加する温度、酸の添加量は、脂肪と無脂乳固形分の収量、そして食感に大きく影響する (Kumar et al, 2014)。

図 2a および 2b に、樹脂包埋法および徳安法を用いて、パニールチーズの  $\beta$ -ラクトグロブリンを免疫染色することによって得られた中倍率画像 ( $\times 10,000$ ) を示す。樹脂包埋法では、 $\beta$ -ラクトグロブリン抗体を標識した金コロイドが、乳タンパク質の凝集体を取り囲んでいたのに対し、徳安法では、脂肪球が乳タンパク質と凝集体を形成し、 $\beta$ -ラクトグロブリンを標識した金コロイドがこれらの凝集体を取り囲んでいた。

図 3 に、徳安法を用いてパニールチーズの  $\beta$ -ラクトグロブリンを免疫染色して得られた、空洞内に存在する脂肪球の表面を示す高倍率画像 ( $\times 30,000$ ) を示す。 $\beta$ -ラクトグロブリン抗体を標識した金コロイドは、脂肪球の表面を覆う凝集体にも吸着していた。牛由来の乳を  $60\sim 95^{\circ}\text{C}$  に加熱すると、乳脂肪球膜 (MFGM) に  $\beta$ -ラクトグロブリンが会合することが多くの報告で示されている (Dalgleish et al, 1991 ; Houlihan et al, 1992 ; Corredig et al, 1996)。Houlihan らは、 $\beta$ -ラクトグロブリンはスルフヒドリル-ジスルフィド交換反応を介して MFGM と会合することを示唆している (Houlihan et al, 1992)。Lee らは、脂肪球界面への乳タンパク質の吸着は、ジスルフィド結合反応を介して MFGM での  $\beta$ -ラクトグロブリンと  $\alpha$ -ラクトアルブミンの加熱によって生じることが示唆している (Lee et al, 2002 ; Ye et al, 2004a ; Ye et al, 2004b)。さらに、Corredig らは、脂肪球に吸着した  $\beta$ -ラクトグロブリンは、脂肪分 1g あたり約 1.0 mg 程度で、乳中の全  $\beta$ -ラクトグロブリンの 1% 程度であると報告している (Corredig et al, 1996)。したがって、本研究でも先行文献で報告された現象と同様の現象が起こったと推測した。この結果は、乳タンパク質の凝集体だけでなく、脂肪球表面に吸着した乳タンパク質の状態も評価できる可能性を示した。

本研究で調製されたパニールチーズ中の脂肪球の直径は、数百 nm から  $2\ \mu\text{m}$  の範囲であったが、観察された切片の厚さはわずか 70 nm であった。したがって、多くの脂肪球が切片の上面と下面で切断され、脂肪球界面だけでなく、脂

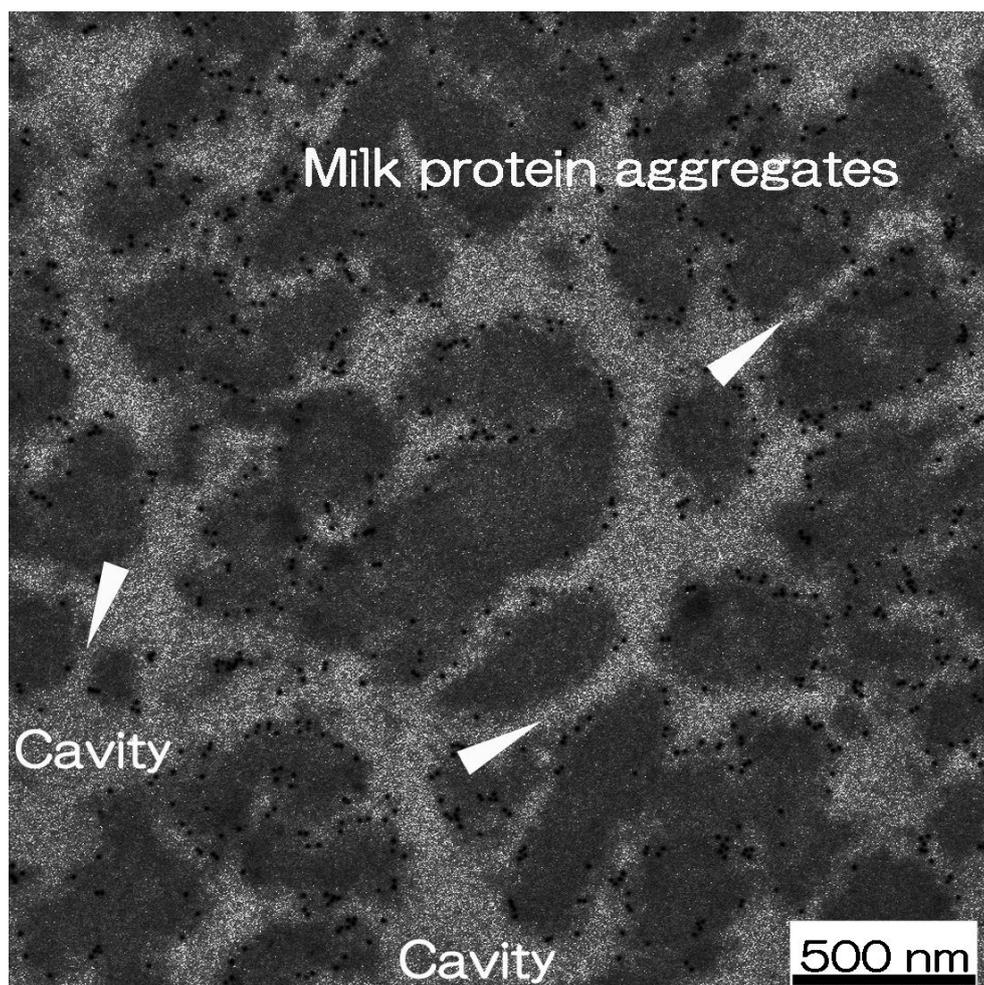


図 2a 樹脂包埋法を用いた  $\beta$ -ラクトグロブリン免疫染色によるパニールチーズの約 10,000 倍の中倍率画像 (三角、タンパク質凝集体間の間隙)

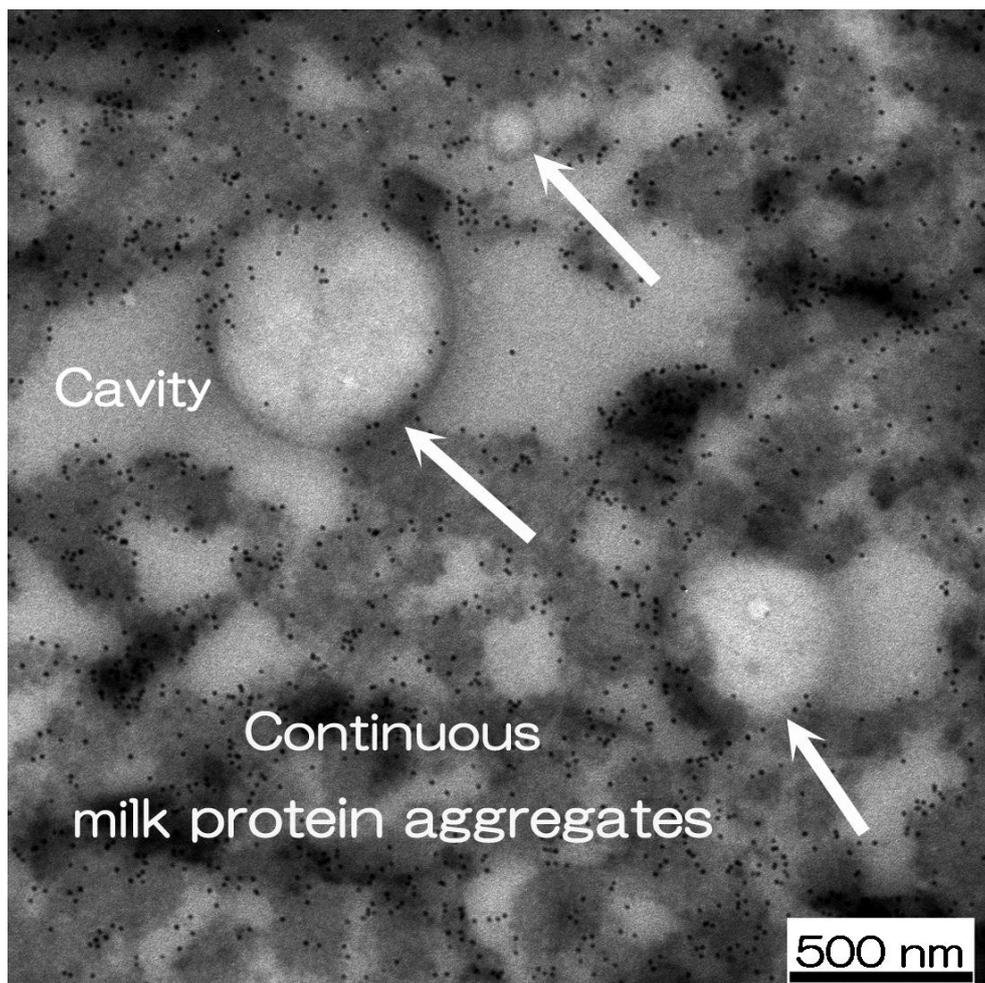


図 2b 徳安法を用いた  $\beta$ -ラクトグロブリン免疫染色によるパニールチーズの約 10,000 倍の中倍率画像 (矢印、脂肪球)

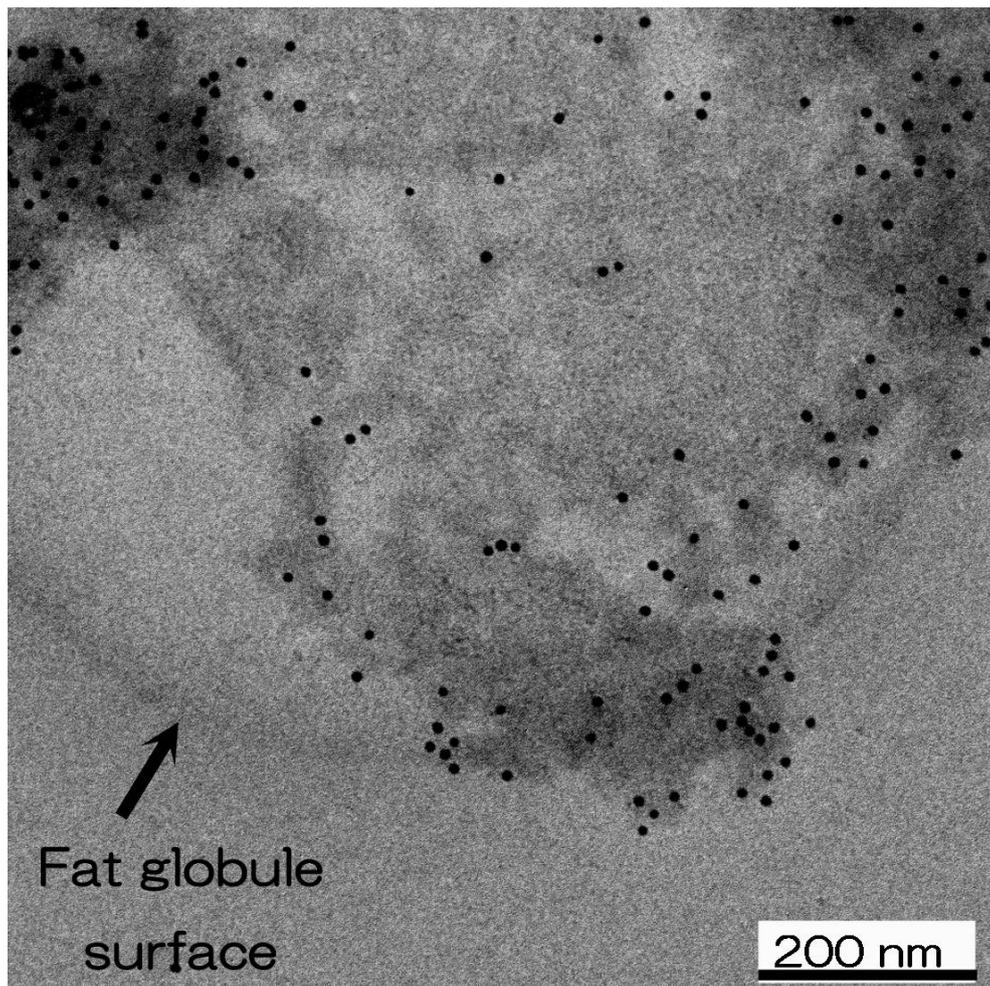


図3 徳安法を用いてパニールチーズの  $\beta$ -ラクトグロブリンを免疫染色することにより得られた空洞内に存在する脂肪球の表面の30,000倍の高倍率画像

脂肪球の内部が撮影された画像である点に注意する必要がある。図 3 は、脂肪球を切片の下部のみで切断し、脂肪球界面のみが明瞭に観察された画像を示している。

多くの乳製品は、脂肪球と水相のエマルジョンで構成されており、それらの界面構造は容易に変化する。抗原性を低下または不活性化するオスミウム酸またはグルタルアルデヒドを使用することなく、タンパク質の凝集体や脂肪球の形態を維持するためには、凍結固定を行う徳安法が有効であった。本研究では、徳安法が免疫染色後も脂肪球とタンパク質の形態を保持することを確認した。徳安法は、パニールチーズだけでなく、脂肪分を含有する他の乳製品にも広く適用可能であると期待される。さらに、抗原性がよく維持されているので、脂肪球などの脂肪分との相互作用を可視化しながら、さまざまな乳タンパク質を評価することができると考えられる。この方法は、乳製品の物理的性質および食感を改善するために使用され得る。

## 参考文献

- Armbruster, B.L., Desai, N. (1993) Identification of Proteins and Complex Carbohydrates in Some Commercial Low-Fat Dairy Products by Means of Immunolocalization Techniques. *J. Food Structure.*, **12**, 289-299.
- Carroll, R. J., and Farrell, H. M. (1983) Immunological Approach to Location of  $\kappa$ -Casein in the Casein Micelle by Electron Microscopy. *J. Dairy Sci.*, **66**, 679-686.
- Corredig, M., Dalgleish, D.G. (1996) Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *J Dairy Res*, **63**, 441-449.
- Dabour, N., LaPointe, G., Benhamou, N., Fliss, I., and Kheadr, E. E. (2005) Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *Int Dairy J.*, **15**, 1044-1055.
- Dalgleish, D.G., Banks, J.M. (1991) The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk. *Milchwissenschaft*, **46**, 75-78.
- Jang, H.D., Swaisgood, H.E. (1990) Disulfide bond formation between thermally denatured  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein in casein micelles. *J Dairy Sci.* **73**, 900-904.
- Harwalkar, V.R., and Kalab, M. (1988) The Role of B-Lactoglobulin in the Development of the Core-and-Lining Structure of Casein Particles in Acid-Heat-Induced Milk Gels. *J. Food Structure.*, **7**, 173- 179.
- Houlihan, A. V., Goddard, P.A., Nottingham S.M., Kitchen B. J., Masters C. J. (1992) Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk. *J Dairy Res*, **59**, 187-195.
- Kalab, M., Gupta, S.K., Desai, H.K., and Patil, G.R. (1988) Development

of Microstructure in Raw, Fried, and Fried and Cooked Paneer Made From Buffalo, Cow, and Mixed Milks. *Food Structure.*, **7**, 83- 91.

Kumar, S., Rai, D.C., Niranjan, K., and Bhat, Z.F. (2014) Paneer—An Indian soft cheese variant: a review. *J Food Sci Technol.* **51**, 821-831.

Lee, S.J., and Sherbon, J.W. (2002) Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *J Dairy Res.*, **69**, 555-567.

McMahon, D. J., and McManus, W. R. (1998) Rethinking Casein Micelle Structure Using Electron Microscopy. *J. Dairy Sci.*, **81**, 2985-2993.

Nakajima M. (1990) Immunogold Labeling for Electron Microscopy. *Jpn J Thromb Hemost.*, **1**, 350-356. (in Japanese)

Sawyer, W.H. (1969) Complex between beta-lactoglobulin and kappa-casein. A review. *J Dairy Sci.* **52**, 1347-55.

Tamaki H. (2013) Menekidenkenhounojissai. (ed. Integrated Imaging Research Support) Nishimura Co., Ltd., pp. 53-83. (in Japanese)

Tokuyasu, K.T. (1986) Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J Microsc.*, **143**, 139-149.

Zhang, Z., and Goff, H.D. (2004) Protein distribution at air interfaces in dairy foams and ice cream as affected by casein dissociation and emulsifiers. *Int Dairy J.*, **14**, 647-657.

Ye, A., Singh, H., Oldfield, D.J., and Anema, S. (2004a) Kinetics of heat-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. *Int Dairy J.*, **14**, 389-398.

Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., and Anema, S. (2004b) Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Le Lait.*, **84**, 269-283.

## 第4章 氷包埋法によるホイップクリームの構造形成メカニズムの解析

### 4-1. 序論

ホイップクリームは、泡立て器やハンドミキサーを用いて形成された、クリームと空気の安定した混合物であり、主にケーキを飾るために使用される。ホイップ前のクリームは、保存中や流通の際には安定しているが、ホイップすることにより急速な解乳化が起こり、気泡を安定化させる。クリームは水と油の2相で構成され (O / W エマルジョン)、主にタンパク質、乳糖、ミネラルを含む水相中に、脂肪球が存在する。一方、ホイップクリームは水、油、空気の3相で構成されている。これまでに多くの研究が行われ、3段階のホイップ形成メカニズムが推定されている (Noda, 1993; Brooker et al, 1986)。

ホイップの第1段階では、ホイップのせん断力により脂肪球界面が損傷し、脂肪球が不安定になる。遊離脂肪が脂肪球より放出されて凝集体が形成される。ホイップ初期に誘発された気泡は大きく、 $\beta$ -カゼインやホエータンパク質などの乳タンパク質が気泡界面に吸着するが、これらの気泡はすぐに消える (Brooker, 1993)。ホイップの第2段階では、気泡の直径が小さくなり、同時に、剪断による破壊と合一が繰り返される。気泡界面に吸着したタンパク質は変性して不溶性になり、遊離脂肪と共に膜を形成する (Noda and Shiinoki, 1986)。膜中の遊離脂肪は、脂肪球を気泡に吸着させる結合剤として役立つ (Brooker et al., 1986; Hotrum, 2005)。ホイップの第3段階 (終点) では、遊離脂肪量が剪断によってさらに増加し、気泡界面に吸着する脂肪球間の隙間を埋めて、連続的な三次元架橋を形成する。

一方、油脂結晶は気泡界面の挙動に著しく影響を与えると推定されているが、ホイップの形成にどのように寄与しているかについては議論の余地がある。Brooker (1993; 1990) は、凍結レプリカ法を用いて、油脂結晶が気泡界面および水相に存在することを報告した。Buchheimらは (1985)、板状の油脂結晶がホイップしたエマルジョン中の気泡界面に存在し、気泡を安定させることを報告した。しかし凍結割断レプリカ法などの従来の電子顕微鏡観察法は、凍結試料の割断面での観察に限定されるため、脂肪球の内部や水相内に存在する油脂結晶を観察することが困難である。氷包埋法を用いれば、熱に容易に融解する油脂結晶を凍結状態の透過像として観察することができ、油脂結晶の分布と大きさを定量化することができるかと推定した。そこで本研究では、氷包埋法を用いて、ホイップに伴う乳脂肪クリーム中の脂肪球および気液界面の構造変化を観察することにより、油脂結晶および液状脂がホイップ形成にどのように寄与するかを明らかにすることを試みた。

## 4-2. 試料

乳脂肪クリーム配合は、無塩バター(48.3%; Megmilk Snow Brand Co., Ltd.)、カゼインナトリウム(2.0%; Miprodan 31, Arla Foods Ingredients, Denmark)、および水(49.7%)とした。無塩バターを80°Cに加熱溶解して、油相を得た。カゼインナトリウムを80°Cの水に溶解して水相を得た。油相および水相を、TKホモキサー(Mark II, PRIMIX Co., Japan)を用いて、10,000rpmで5分間攪拌しながら混合し、次いで、二段ホモジナイザー(H20-H2, SANWA M-CHIN, Co., Inc., Japan)を用いて均質化した。均質は、1段目を40 kgf/cm<sup>2</sup>、2段目を10 kgf/cm<sup>2</sup>の圧力で処理した。得られた乳脂肪クリームを容器に密封し、5°Cの氷水で冷却し、5°Cで5日間貯蔵した。乳脂肪クリームを350gずつ、Ken Mix (KMM 770, Aicohsha Manufacturing Co., Ltd., Japan)を用いて、攪拌レベル4、クリーム温度4°Cの条件で7、14、21分間(ホイップ終点)ずつ攪拌した。調製後、直ちに観察した。

## 4-3. 実験方法

### 4-3-1. 氷包埋法

カーボン膜を貼ったグリッド(C-flat CF-2 / 1-2 C, Protochips, Raleigh, NC, USA)を氷包埋装置(EM GP, Leica Microsystems, Vienna, Austria)にセットし、ホイップ直後のクリームサンプルをグリッドに1μL滴下した。グリッドを濾紙(No. 1 and/or 2, ADVANTEC, Tokyo, Japan)で1.8秒ずつ3回吸い取り、次いで液化エタンに浸漬して凍結した。グリッドをわずかに斜めにセットし、濾紙で余分な試料を吸い取ることにより、氷の厚さを勾配させた氷薄膜を調製した。

### 4-3-2. クライオTEMによる観察

Ω型エネルギーフィルターを用いて非弾性散乱電子を除去した、ヘリウム冷却式試料ステージを装備した加速電圧300kVのクライオTEM(JEM-3000EFC, JEOL, Tokyo, Japan)に、凍結したグリッドを移した。クリームの脂肪球と気泡を-269°Cで観察した。最小電子線量システム(MDS, JEOL, Tokyo, Japan)を用いて撮影する領域を探し、CCDカメラ(Temcam-F214: TVIPS, München, Germany)を用いて5000~30,000倍の画像を取得した。

### 4-3-3. 気泡中の遊離脂肪率、固形脂肪含有量、脂肪球サイズ、および占有面積率の測定

ホイップしたクリームの遊離脂肪率は、野田および椎木が示した方法(1986)に従って測定した。抽出した遊離脂肪の10°CでのSFCは、河田らが示した方法

(1984) に従って、NMR分光法 (Minispec MQ 20, Bruker, Billerica, USA) を使用して3回ずつ測定した。ホイップ時間ごとにクリームを3回ずつ調製し、ホイップ時間毎に撮影した約200~250ショットの電子顕微鏡画像から、脂肪結晶のサイズと占有面積率を算出した。油脂結晶の大きさは、画像解析ソフトウェア (Image J, Schneider, 2012) を用いて、水相および気泡界面を含めたクリーム中に存在する油脂結晶の最長部分を測定し、その分布をヒストグラムで表した。気泡中の油脂結晶の占有面積率は、気泡に吸着した油脂結晶の面積を、観察した気泡すべての面積で割って算出した。なお気泡は球形で存在しているが、それらの湾曲は上記の計算では無視した。

#### 4-4. 結果および考察

##### 4-4-1. 乳脂肪クリームの観察

図1aおよび1bに、ホイップする前の乳脂肪クリームに存在する大きな脂肪球 (直径650 nm) と小さい (直径300 nm) 脂肪球を氷包埋法にて観察した画像をそれぞれ示す。図1aおよび1bより、脂肪球界面に沿ってラメラ状の油脂結晶が観察されたことから、乳脂肪由来の脂肪球中に存在する油脂結晶が放射状またはランダムでなく、脂肪球の界面からの層状に形成されることが示唆された。しかし、図1aに示すように、大きな脂肪球の中心部は、電子ビームが透過せずに観察できず、また図1bに示すように、電子ビームが透過した小さな脂肪球でも、脂肪球の中心部に、油脂結晶は確認できなかった。したがって、乳脂肪由来の脂肪球は、中心部に結晶が存在せず、液状脂が存在していると推定された。図2にホイップ前の乳脂肪クリームの水相中に観察された長さ約1.8  $\mu\text{m}$  の脂肪結晶と思われる構造体を示す。ホイップ前の乳脂肪クリームに存在した油脂結晶と思われる構造体は、ほとんどなく、確認できた構造体は1つだけであった。このことは、ホイップを行わなければ、油脂結晶は脂肪球からほとんど剥がれないことを示唆している。観察された油脂結晶は大きく、断片化していないことから、脂肪球界面に存在する油脂結晶ラメラ本来の構造に近いと考えられた。

##### 4-4-2. ホイップによる脂肪球と気泡界面の変化

図3に、7分間ホイップした後の脂肪球および水相の画像を示す。脂肪球界面はホイップにより損傷を受け、脂肪球界面を覆っている油脂結晶が、剥がれているように観察された。Brookerらは凍結レプリカ法を用いて、脂肪球界面から剥がれるように見える脂肪結晶を観察した (Brooker, 1990) が、本観察においても、同様の脂肪球から剥がれるように見える油脂結晶を観察することができた。

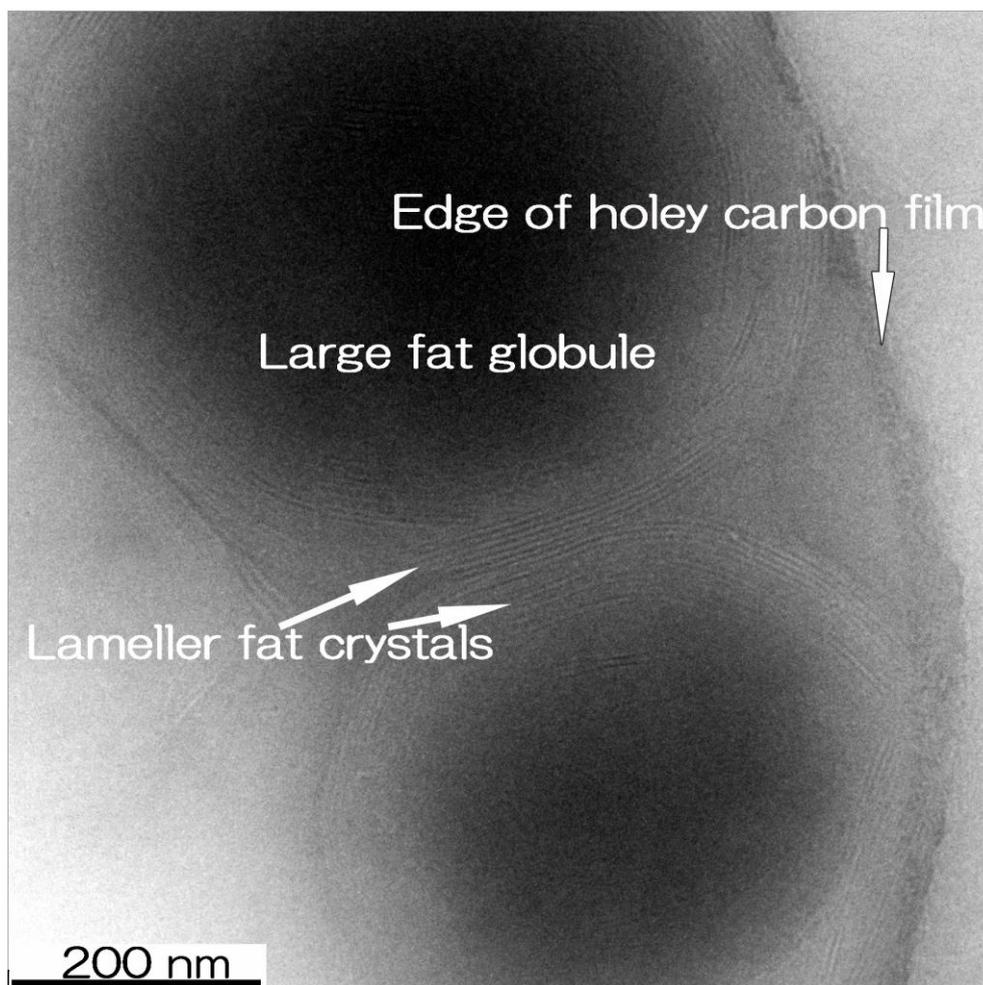


図 1a ホイップする前の乳脂肪クリーム脂肪球：  
大きな脂肪球（直径 650 nm）

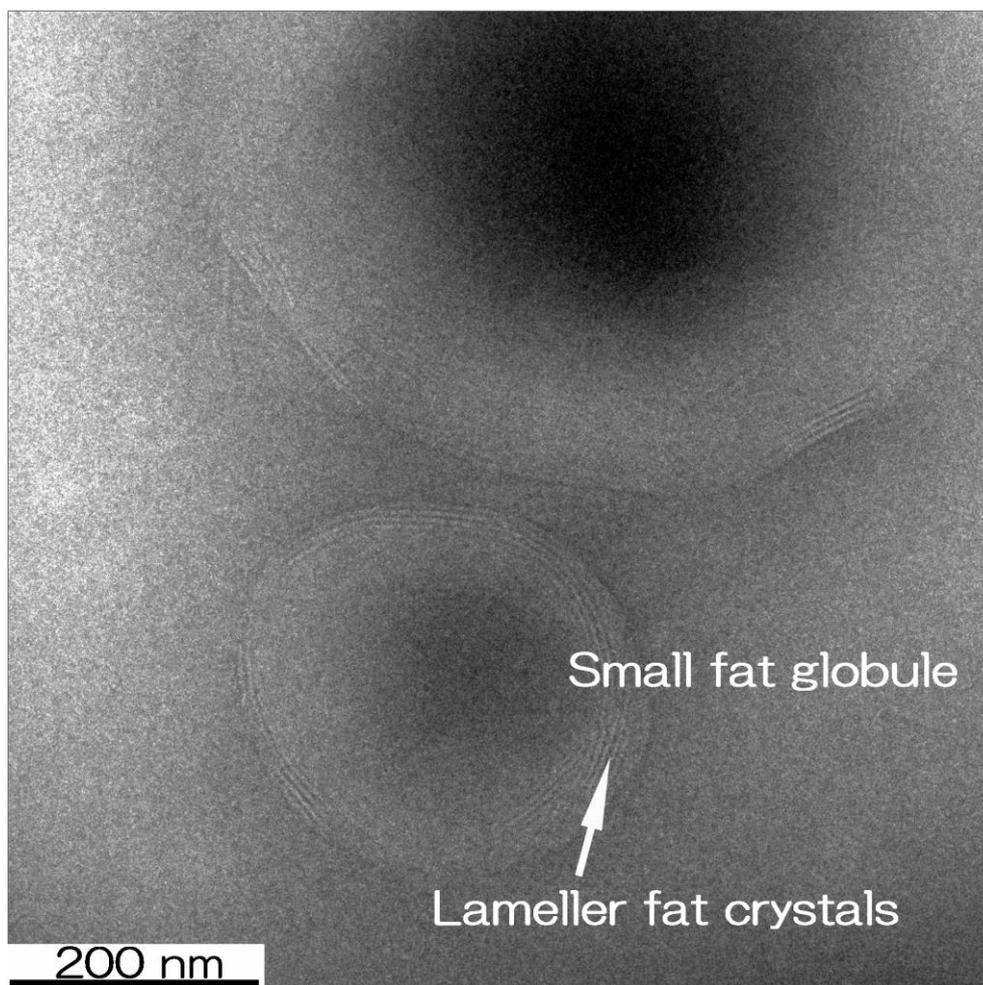


図 1b ホイップする前の乳脂肪クリーム脂肪球：  
小さな脂肪球（直径 300 nm）

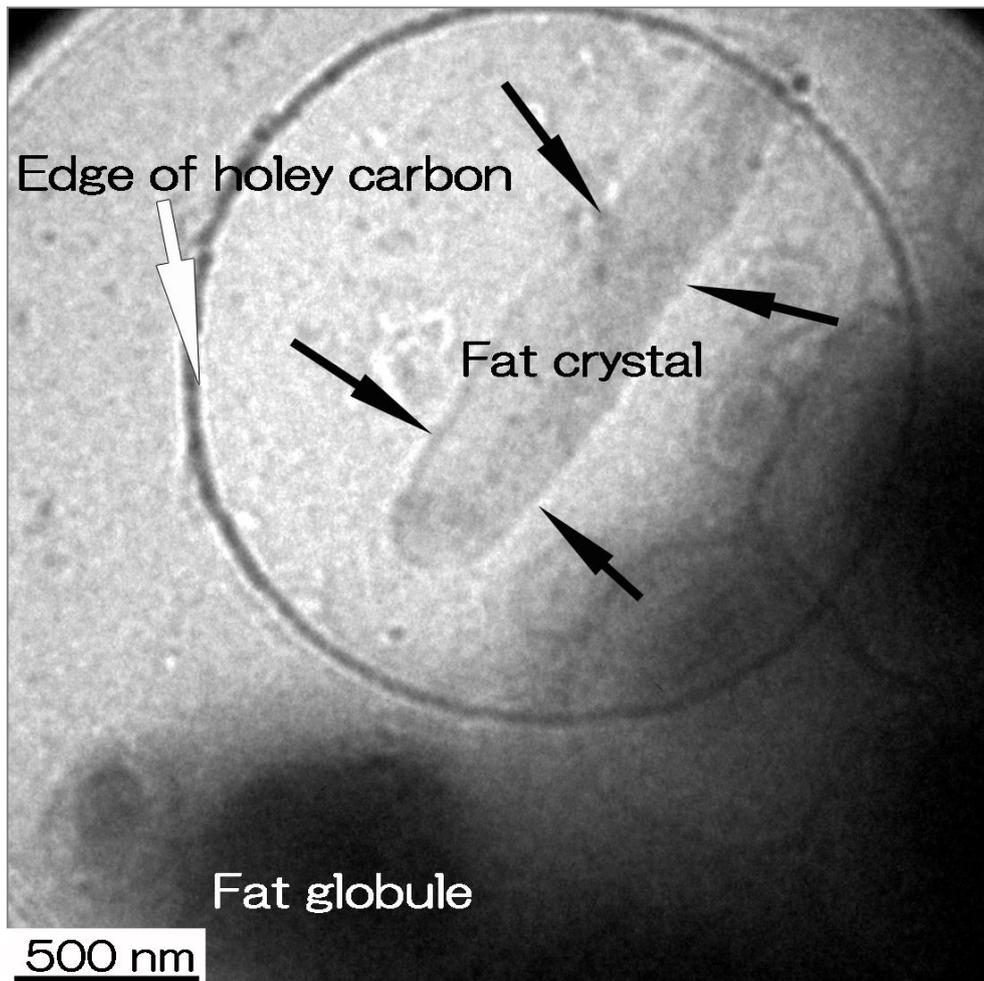


図2 ホイップする前の水相中の油脂結晶の画像  
(黒い矢印は油脂結晶と思われる構造体を示す)

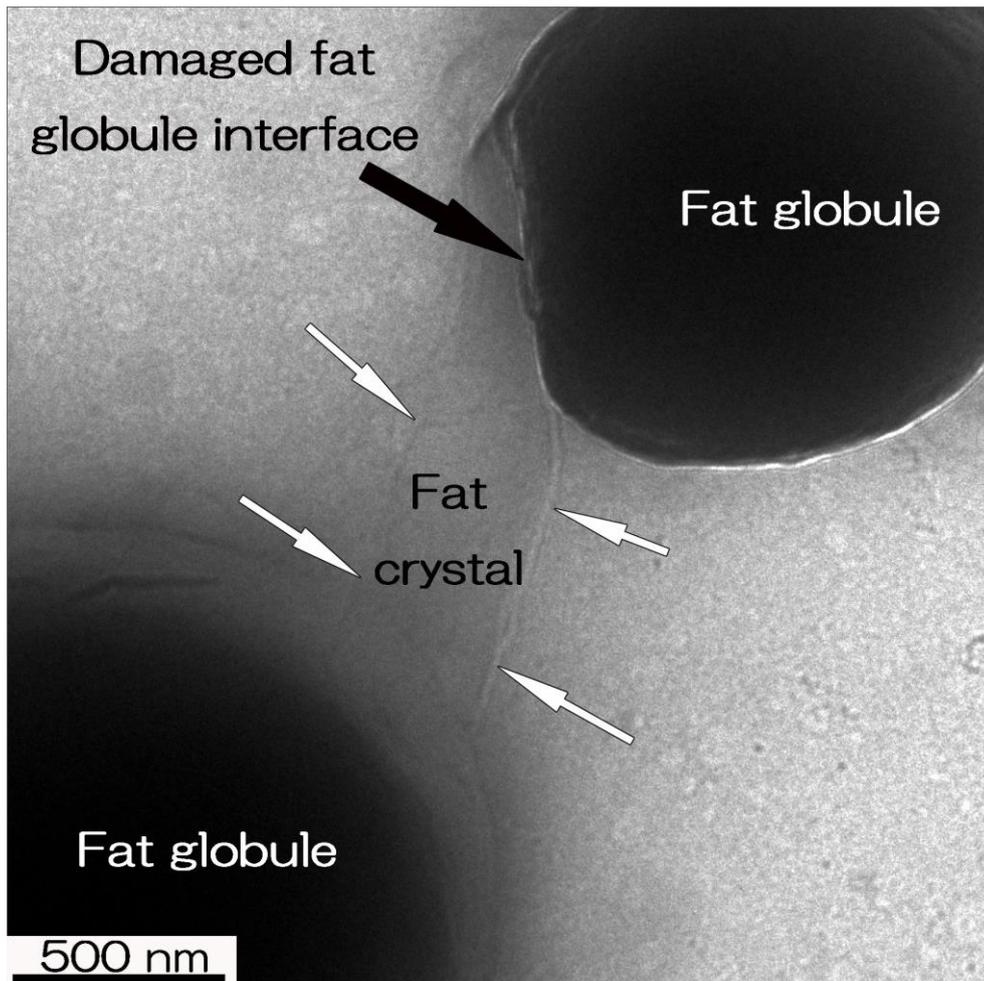


図3 7分間ホイップすることにより、脂肪球界面から乖離した油脂結晶 (白矢印は油脂結晶を示す)

図4に14分間ホイップした乳脂肪クリームの水相に存在する、損傷した脂肪球、脂肪結晶、および液体脂肪を観察したクライオ TEM 画像を示す。クライオ TEM は、脂肪のような構造体が高輝度で観察されるため、油脂結晶および液状脂は、角張った黒い構造体および黒い斑点としてそれぞれ観察された。これらの結果は、脂肪球界面がホイップによって破損し、脂肪球中の油脂結晶と液状脂が水相に放出されることを示唆していた。

図5a および 5b に、21分間ホイップした乳脂肪クリームの水相を観察したクライオ TEM 像を示す。図5aより、多くの油脂結晶と液状脂が、水相に分散していることが確認できた。また図5bは、脂肪球同士が凝集して、架橋構造を形成しているように観察された。クライオ TEM 観察(図1~5b)から、遊離脂肪がホイップによって増加すると推定されたため、ホイップ後の遊離脂肪率の推移を測定して、図6に示した。その結果、ホイップ後の遊離脂肪率は、7分間が3.3%、14分間が5.7%、21分間が21.0%となり、ホイップ時間の増加と共に増加することを確認した。野田は、ホイップと共に遊離脂肪量が増加し、特に終点付近で著しく増加すると報告し、気泡と脂肪球の結合剤として構造を支持すると推定した(Noda, 1993)。本研究では、遊離脂肪量が14分以降に急速に増加しており、終点に近づき、脂肪球の連続的な三次元架橋が形成されたものと推測した。

図7a~7fに、7、14、21分間ホイップした後の気泡を20,000倍の低倍率画像と30,000倍の高倍率画像で示した。7分間ホイップ後は、図7aおよび7bに示したように、脂肪球は気泡界面にほとんど吸着せず、また気泡界面に油脂結晶が吸着し始めていた。14分間ホイップ後では、図7cおよび7dに示すように、脂肪球が気泡界面に吸着し、また7分間ホイップ後よりも多くの油脂結晶が気泡界面に吸着していた。21分間ホイップ後では、図7eおよび7fに示すように、脂肪球が気泡界面に吸着し、14分間ホイップ後よりもさらに多くの脂肪結晶が、気泡界面に吸着していた。クライオ SEM (Schmidt and van Hooydonk, 1980; Anderson *et al.*, 1987; Anderson and Brooker, 1988) や共焦点レーザー顕微鏡 (Allen *et al.*, 2006) を用いた研究で、ホイップにより脂肪球が気泡界面に吸着することが報告されており、本研究で得られた気泡の画像によっても確認することができた。さらに、図7b、7d、7fに示すように(それぞれ7、14、および21分間ホイップした)、油脂結晶が気泡界面に存在することが確認できた。Brooker (1993)、Hotrum ら (2005)、Buchheim ら (1985) は、凍結レプリカ法を用いて気泡界面に油脂結晶が存在することを報告したが、本観察でもその存在が確認できた。

乳脂肪クリーム中の油脂結晶のサイズと、気泡界面に吸着した油脂結晶の占める面積が、7、14、21分間のホイップで異なったため、それらを定量し、図8a~8cに、7、14、21分間ホイップした後の乳脂肪クリームに内在する油脂結

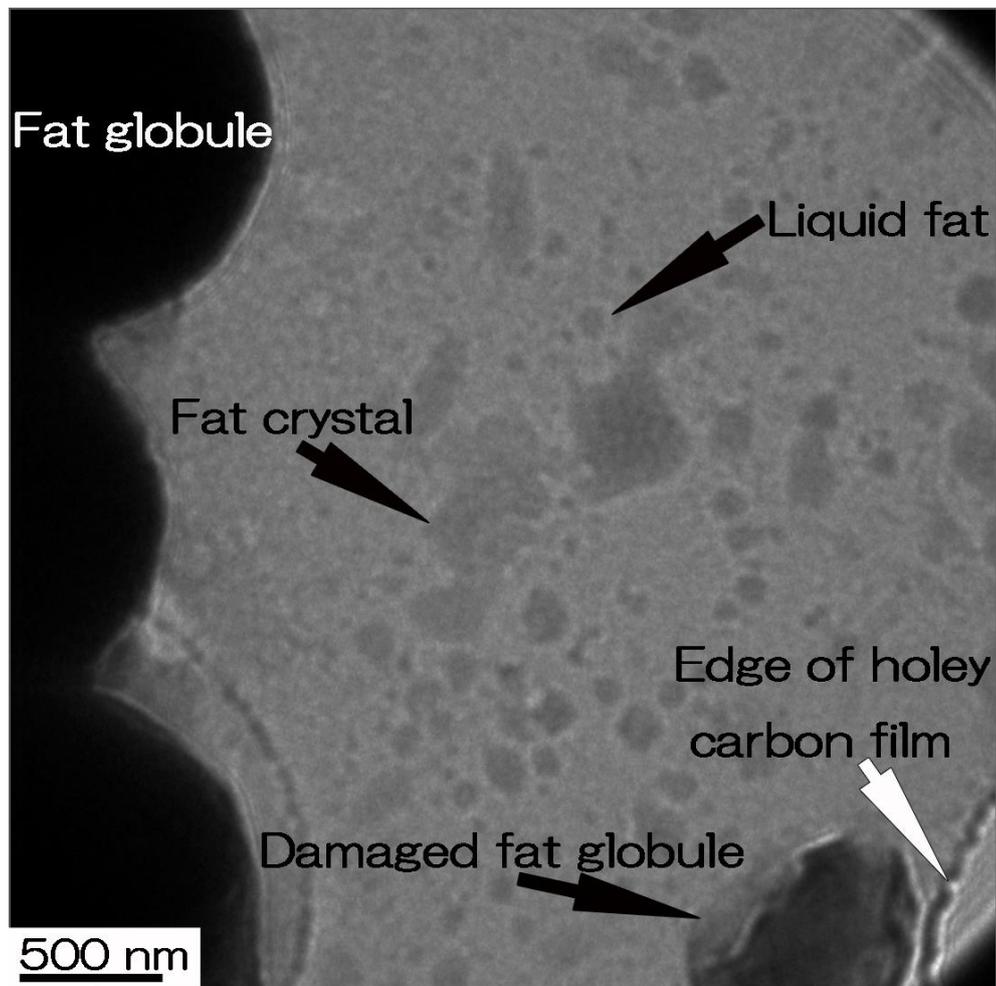


図 4 14 分間のホイップにより、損傷した脂肪球から放出された油脂結晶と液状脂の画像

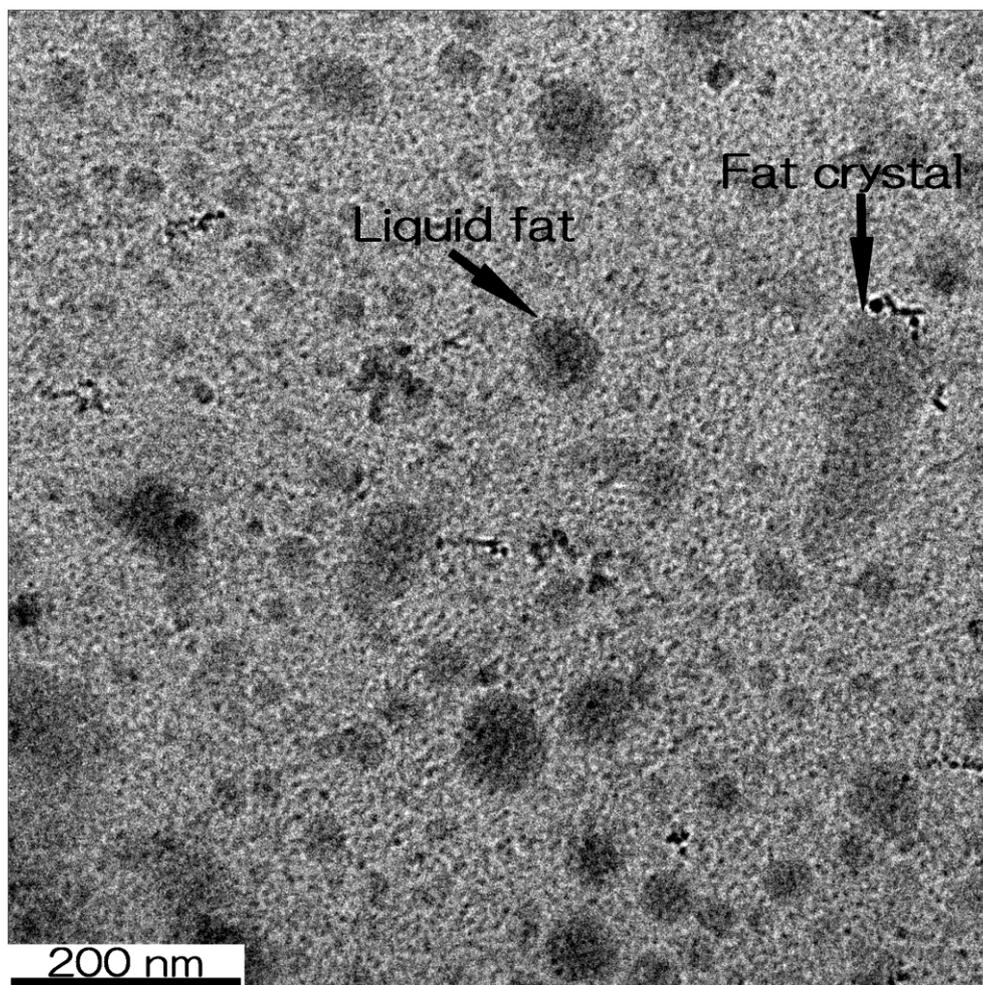


図 5a 21 分間ホイップした水相中の油脂結晶と液状脂の画像

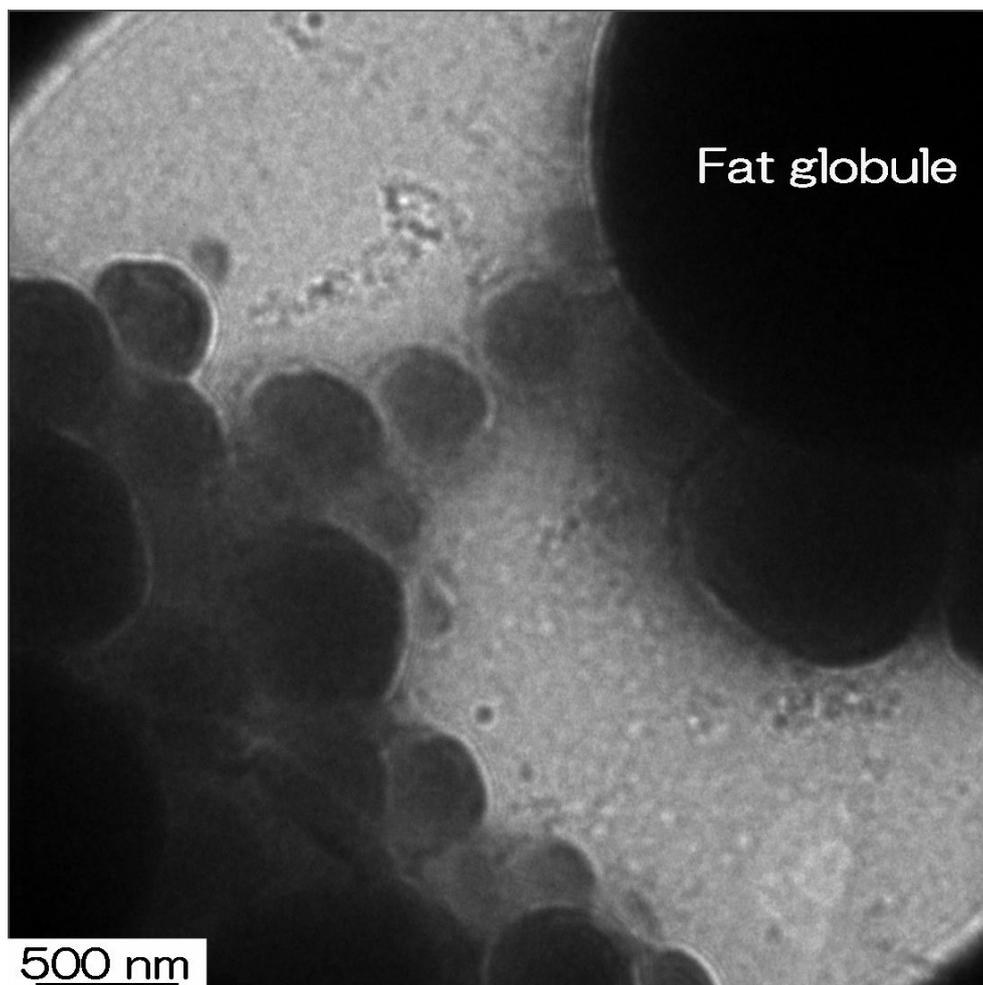


図 5b 21 分間ホイップ後の乳脂肪クリーム脂肪球が凝集した画像

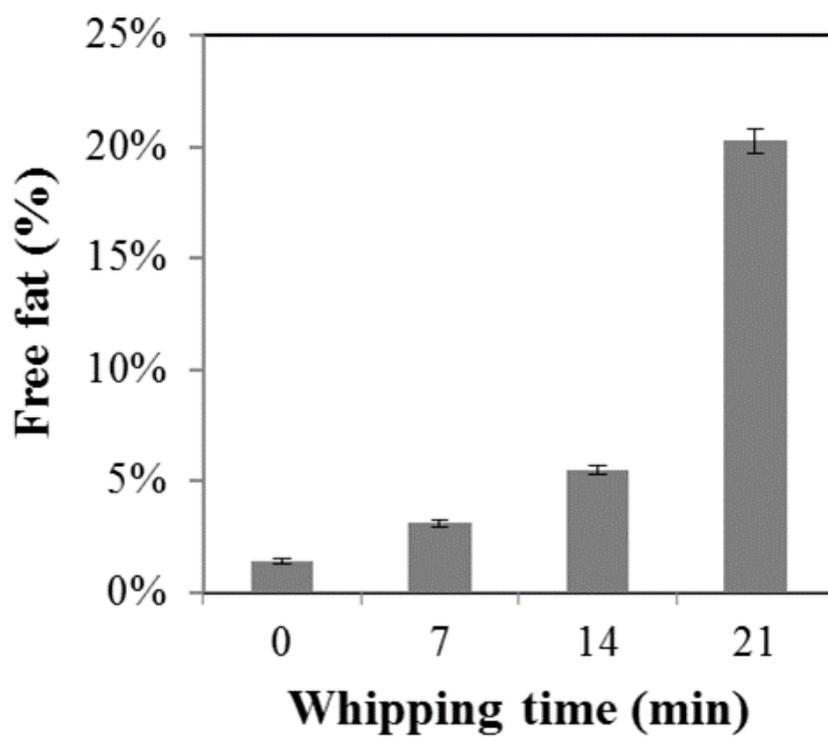


図6 ホイップ時間毎の乳脂肪クリームから抽出した遊離脂肪率の変化

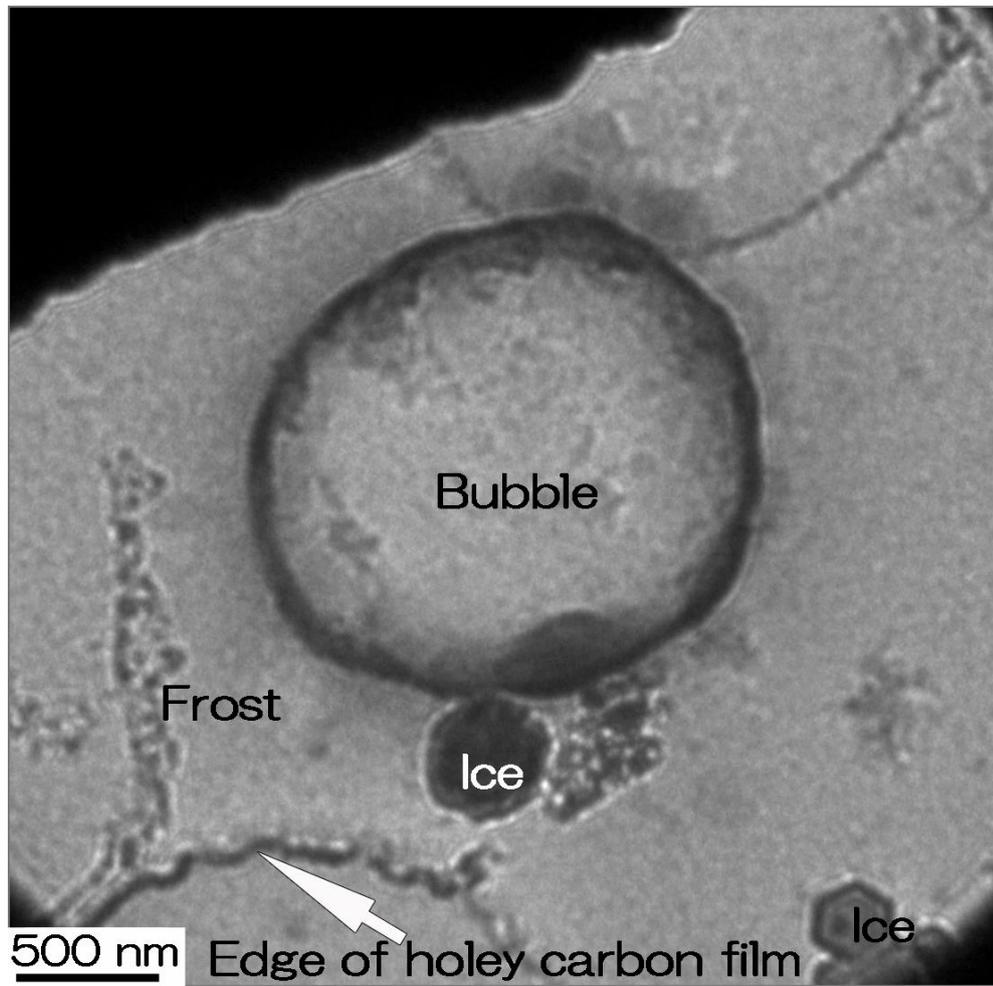


図 7a 7 分間ホイップ後の乳脂肪クリーム気泡  
低倍率 (20,000 倍)

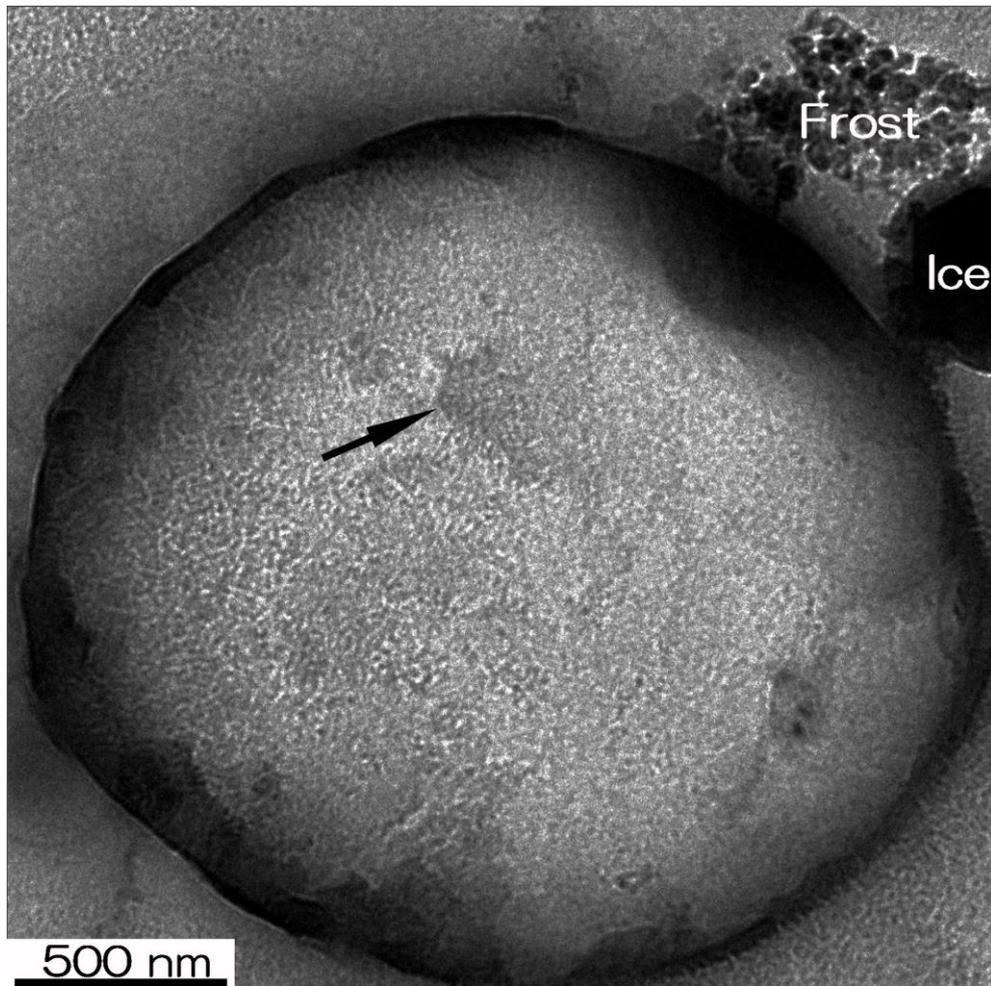


図 7b 7 分間ホイップ後の乳脂肪クリーム気泡  
高倍率 (30,000 倍) 矢印は油脂結晶を示す。

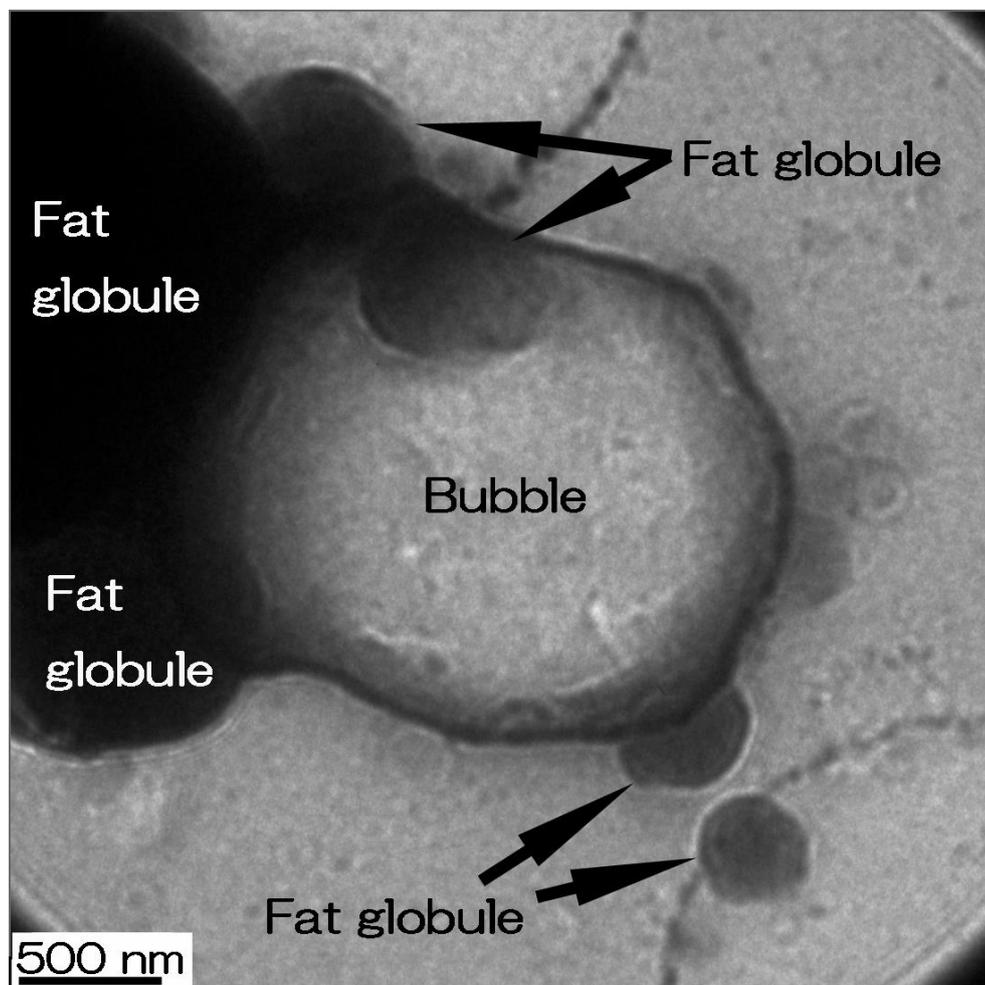


図 7c 14 分間ホイップ後の乳脂肪クリーム気泡  
中倍率 (20,000 倍)

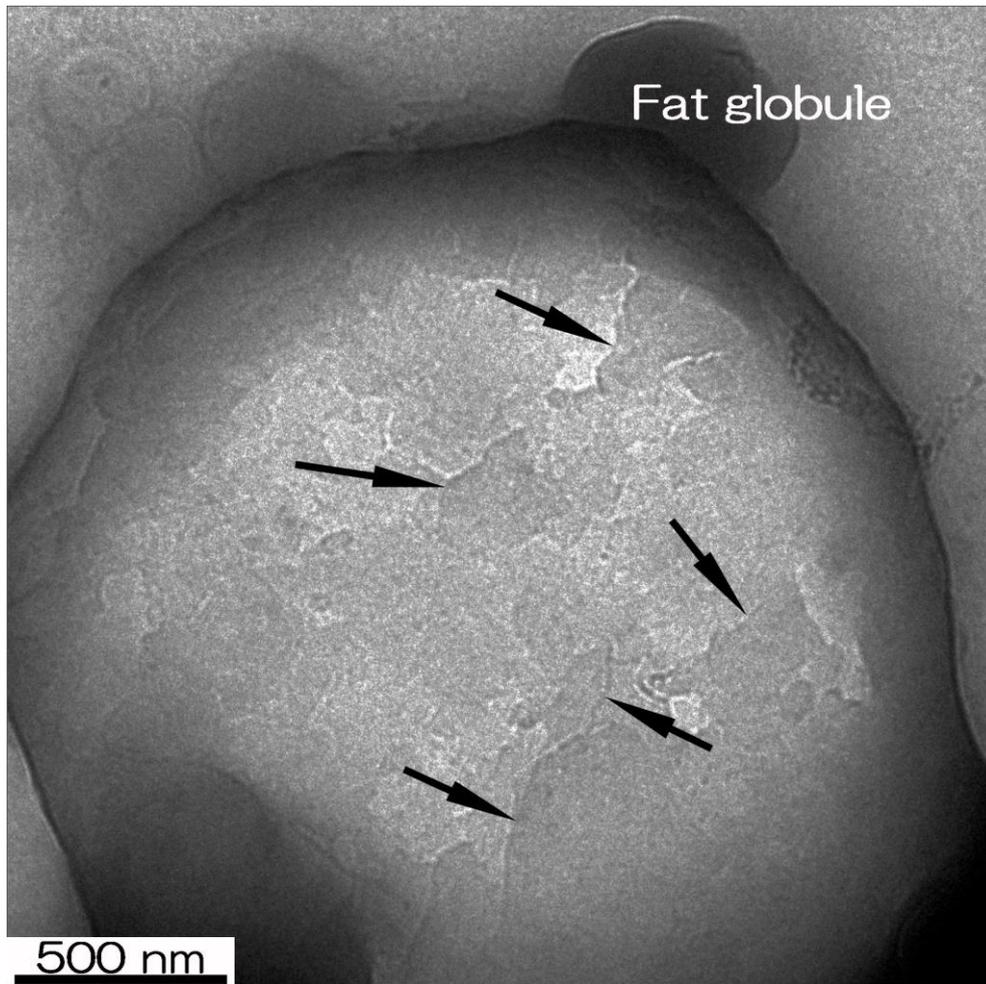


図 7d 14 分間ホイップ後の乳脂肪クリームの気泡  
高倍率 (30,000 倍) 矢印は油脂結晶を示す。

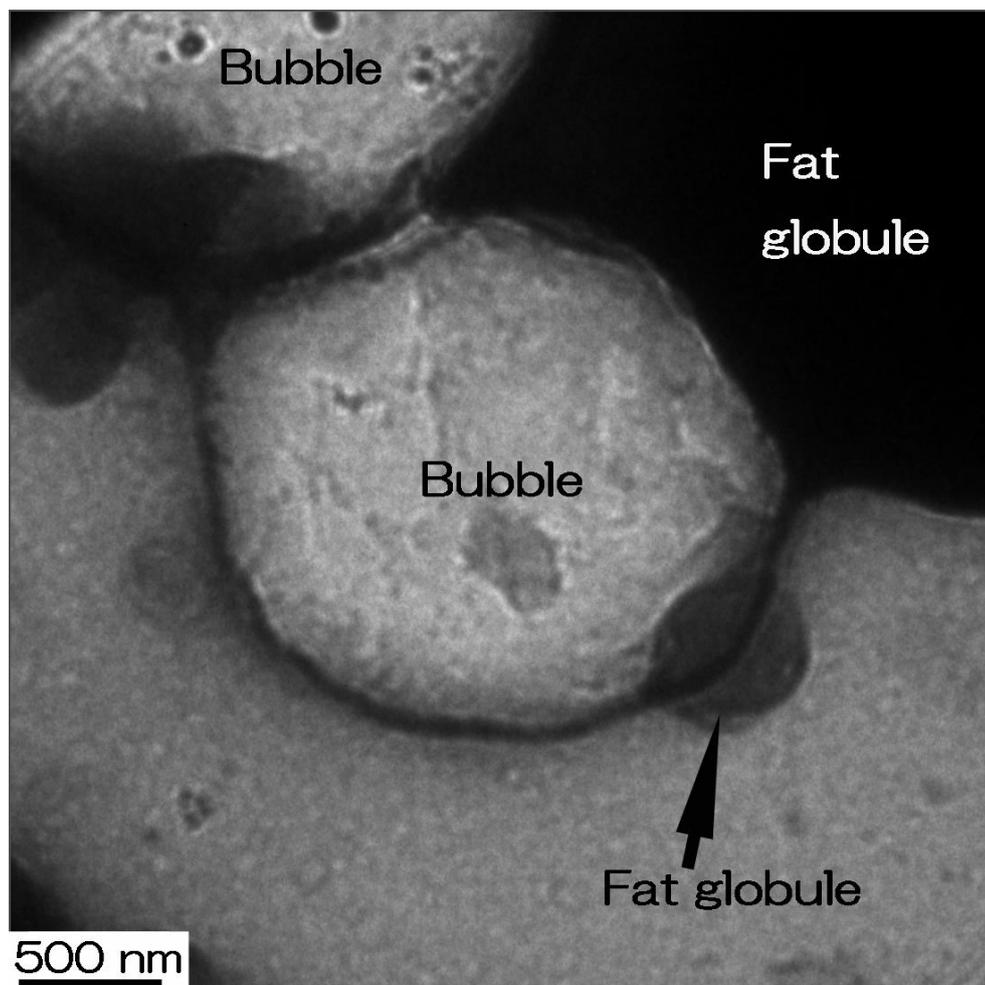


図 7e 21 分間ホイップ後の乳脂肪クリーム気泡  
中倍率 (20,000 倍)

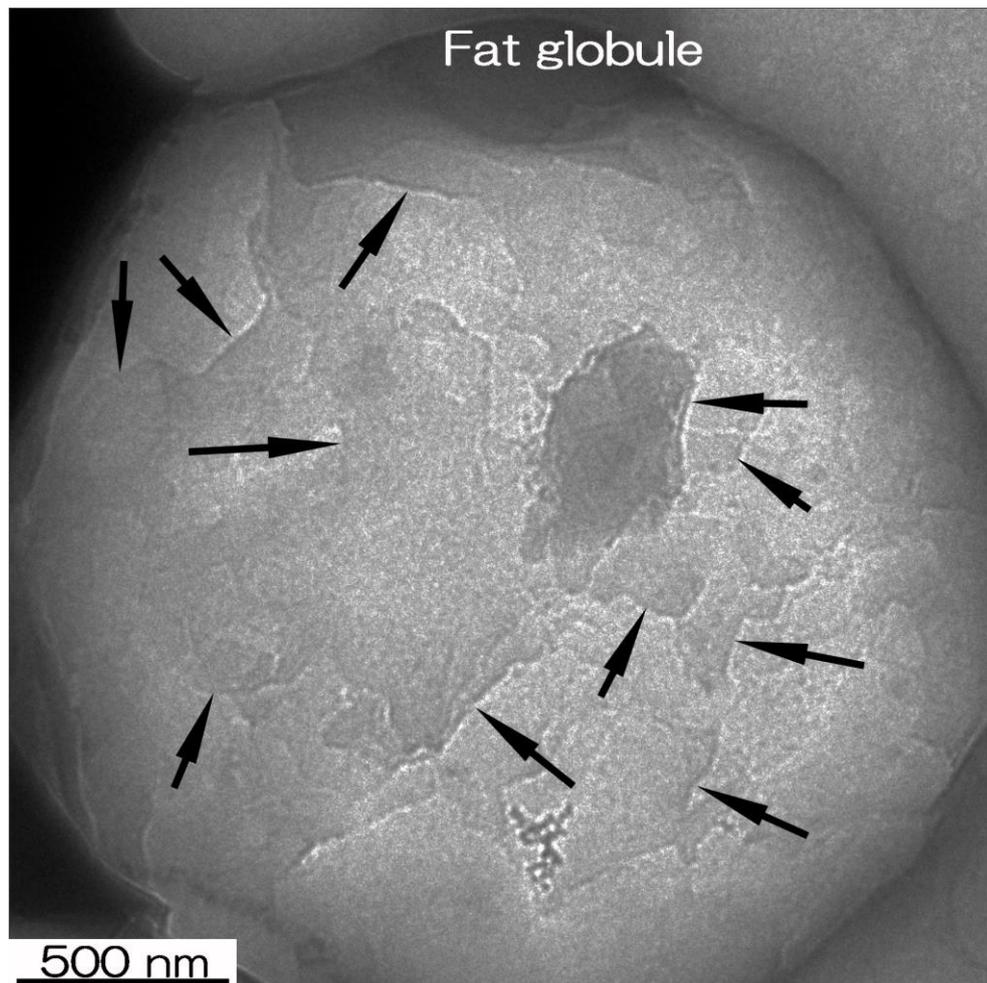


図 7f 21 分間ホイップ後の乳脂肪クリーム気泡  
高倍率 (30,000 倍) 矢印は油脂結晶を示す。

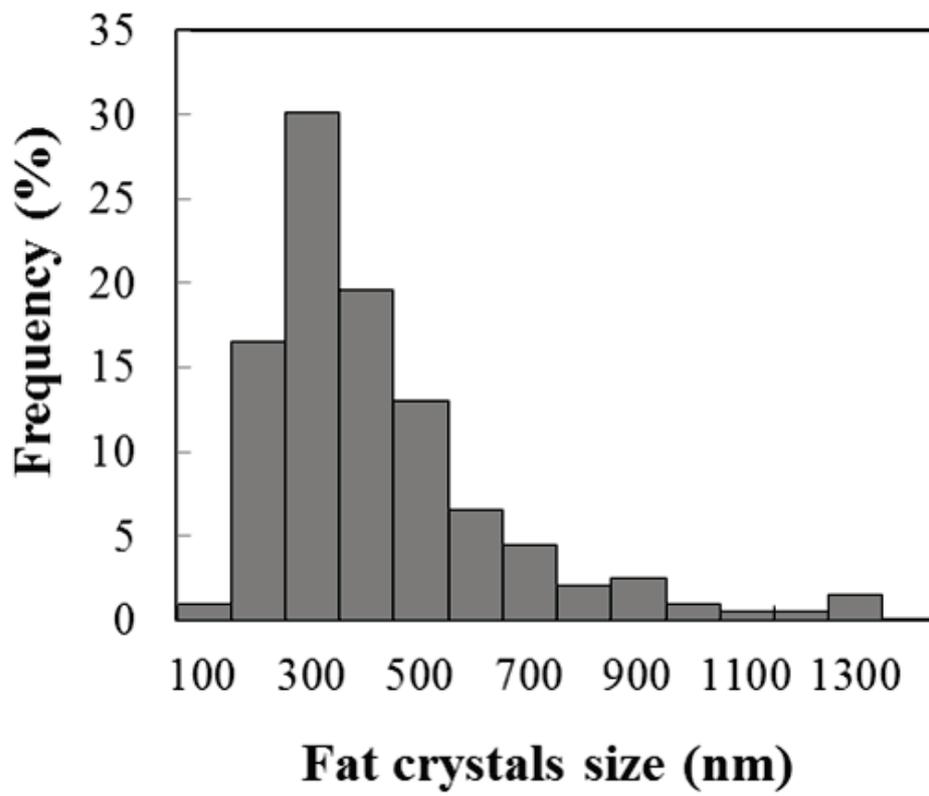


図 8a 7分ホイップ後の乳脂肪クリームのお脂結晶のサイズ分布

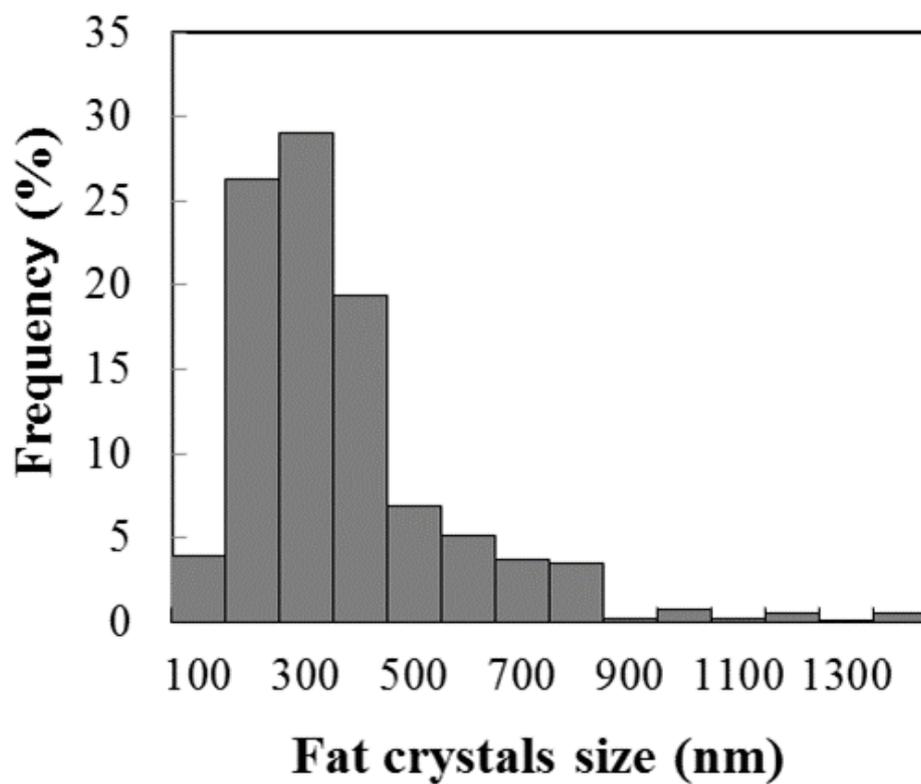


図 8b 14分ホイップ後の乳脂肪クリームのお脂結晶のサイズ分布

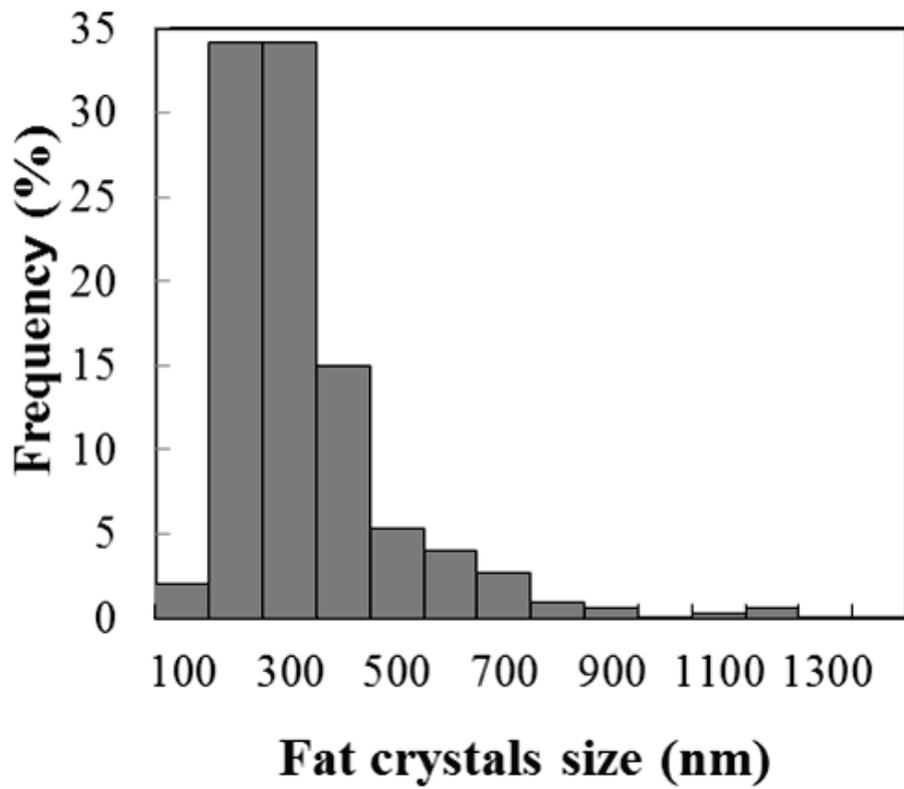


図 8c 21 分ホイップ後の乳脂肪クリームのお脂結晶のサイズ分布

晶のサイズ分布を示した。表 1 に、水相および気泡界面を含む乳脂肪クリームに内在する油脂結晶の平均サイズ、ならびに気泡界面に吸着した油脂結晶が占める面積率を示した。油脂結晶の平均サイズは、7、14、および 21 分間後にそれぞれ 378、309、278 nm となり、ホイップの経過とともに小さくなった。さらに、気泡中に占める脂肪結晶面積率は、7、14、21 分後に、それぞれ 25.6%、48.9%、68.7% となり、ホイップ時間の経過と共に増加した。これらの結果は、油脂結晶がホイップにより徐々に断片化しながら気泡界面に吸着したことを示唆している。

図 9 に、21 分間ホイップした後の脂肪球が凝集した様子を示す。脂肪球間のギャップは、電子密度が高い物質で覆われているようであった。Schmidt and van Hooydonk (1980) によれば、気泡は、液状脂に包まれた脂肪球に囲まれていると報告し、Buchheim らは (1985)、液状脂が脂肪球の間の空隙に存在することを報告した。さらに野田と椎木 (1986) は、水相中の脂肪球が遊離脂肪によって結合して、骨格構造を形成すると報告した。図 10 はホイップ後の遊離脂肪中の 10°C での SFC を示しており、固体脂が 11.6%~15.2% の範囲であり、遊離脂肪の 80% 以上が液状脂であった。以前の文献、およびホイップクリーム中のほとんどの遊離脂肪が液状脂であることを示した本研究の結果は、脂肪球間の間隙で確認した物質が液状脂であることを示唆していた。

本研究では、氷包埋法を用いて乳脂肪クリームに内在する油脂結晶を観察し、脂肪結晶の大きさと気泡界面における脂肪結晶の吸着面積を定量した。しかし、透過能力の優れた加速電圧 300kV の電子顕微鏡を使用したにもかかわらず、電子ビームは厚い脂肪球を透過することができず、電子ビームが貫通した比較的薄い部分のみを観察し、厚い部分の視野は観察できなかったことに留意する必要がある。

#### 4-5. まとめ

氷包埋法を用いて、ホイップに伴う乳脂肪クリームの変化を観察し、ホイップによる油脂結晶および液状脂の役割を明らかにした。ホイップする前の乳脂肪クリームの脂肪球は、脂肪球界面に形成されたラメラ状の油脂結晶と、脂肪球の中心部に存在する液状脂で構成されるが、ホイップすることにより、油脂結晶と液状脂が脂肪球から解離することが示唆された。ホイップが進行するにつれて、油脂結晶は小さな破片となり、気泡界面に吸着し、気泡に吸着する油脂結晶が占める面積が徐々に増加した。この挙動が、乳脂肪のホイップクリームの気泡の安定性に寄与すると推定された。また、脂肪球から放出された液状脂は、脂肪球間の隙間を占めると推測された。

表 1 ホイップ後の乳脂肪クリーム<sup>o</sup>の油脂結晶サイズおよび気泡中の油脂結晶面積比

	Average sizes of fat Crystals (nm)	Fat crystal area ratio in bubble (%)
Whip for 7min	378	25.6 ± 1.3 (n=3)
Whip for 14min	309	48.9 ± 14.5 (n=6)
Whip for 21min	278	68.7 ± 10.2 (n=8)

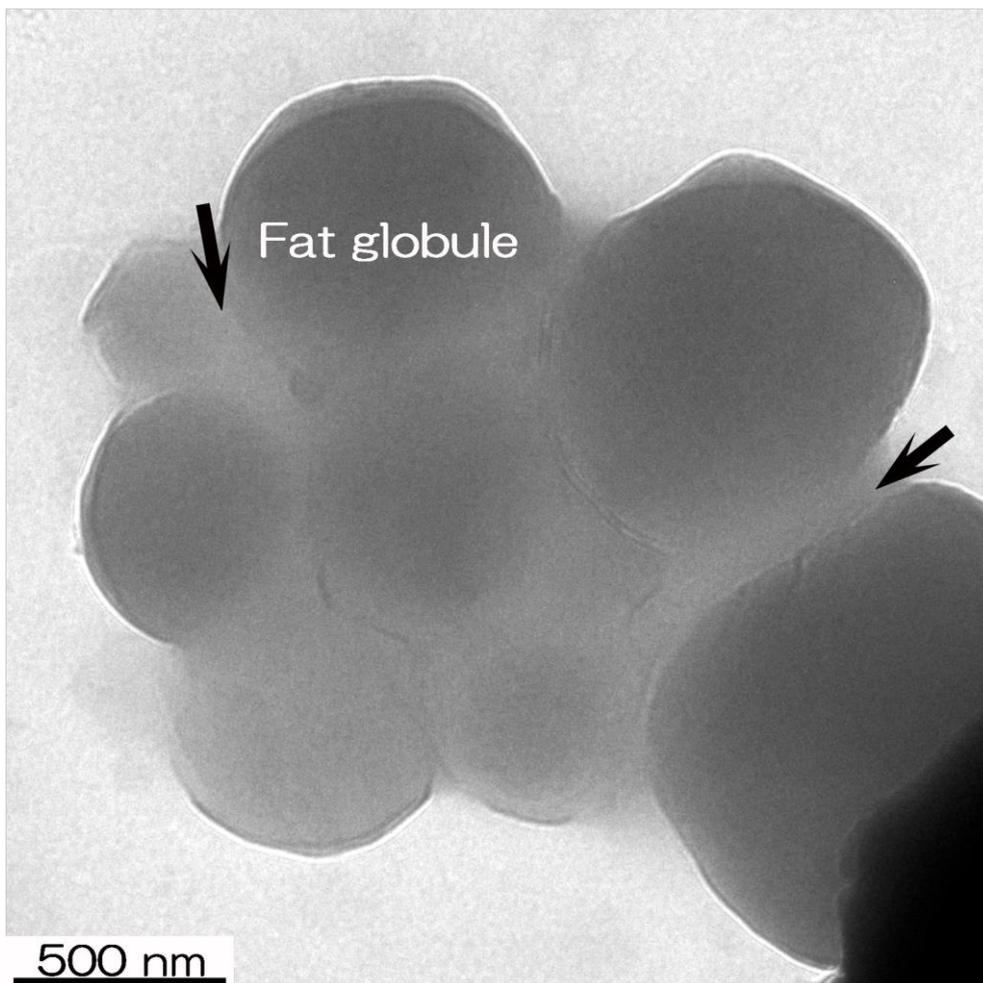


図9 21分間ホイップした後の凝集した脂肪球の画像  
矢印は、電子密度が高い物質を示す。

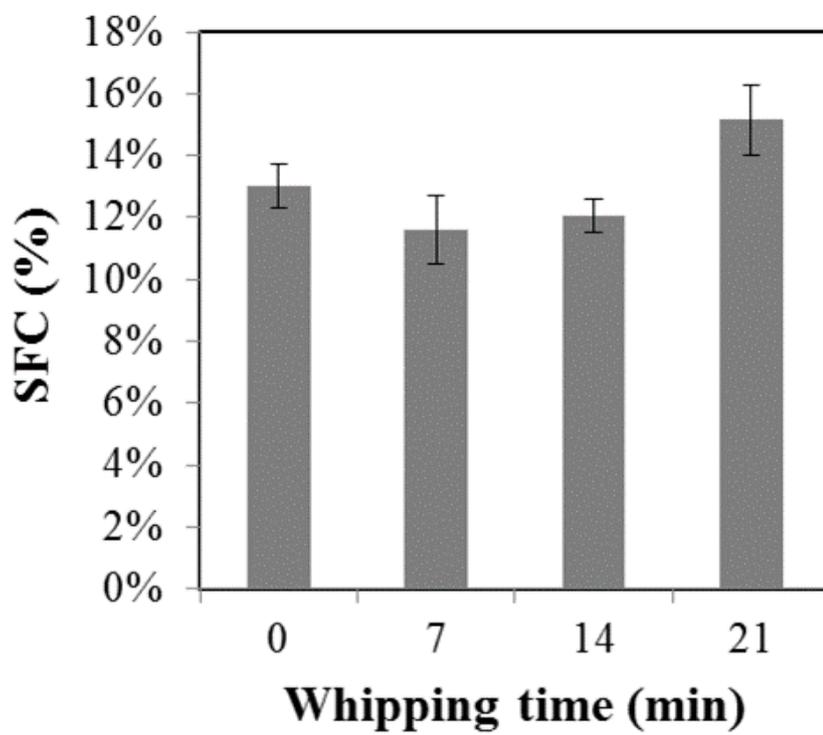


図 10 ホイップ時間毎の遊離脂肪に含まれる 10°C 固形脂肪含有量 (SFC)  
(n = 3)

## 参考文献

- Allen, K.E., Dickinson, E., and Murray, B. (2006) Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. *LWT - Food Sci. Technol.*, **39**, 225-234.
- Anderson, M., Brooker, B.E., and Needs, E.C. (1987) The role of proteins in the stabilization/destabilization of dairy foams, In “Food emulsions and foams” ed. by E. Dickinson. Royal Society of Chemistry, London, pp. 100-109.
- Anderson, M. and Brooker, B.E. (1988) Dairy foams. In “Advances in food emulsions and foams” ed. by E. Dickinson and G. Stainsby. Elsevier Applied Science, London, pp. 221-255.
- Brooker, B.E., Anderson, M., and Andrews, A.T. (1986) The Development of Structure in Whipped Cream. *J. Food Struct.*, **5**, 277-285.
- Brooker, B.E. (1990) The Adsorption of Crystalline Fat to the Air-Water Interface of Whipped Cream. *J. Food Struct.*, **9**, 223-229.
- Brooker, B.E. (1993) The Stabilisation of Air in Foods Containing Fat - A Review. *J. Food Struct.*, **12**, 115-122.
- Buchheim, W., Barford, N.M., and Krog, N. (1985) Relation Between Microstructure, Destabilization Phenomena and Rheological Properties of Whippable Emulsions. *J. Food Microstruct.*, **4**, 221.
- Hotrum, H.E., Cohen Stuart, M.A., van Vliet, T., and van Aken, G.A. (2005) Elucidating the relationship between the spreading coefficient, surface-mediated partial coalescence and the whipping time of artificial cream. *Colloids Surf., A.*, **260**, 71-78.
- Kawada, T., Kato, C., Suzuki, K., Kanematsu, H., Abeshima, T., Shikama, T., Kako, M., Hirata, Y., Mori, H., and Sakata, M. (1984) Determination

of Solid Fat Content by NMR Collaborative Study, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **33**, 162-165 (in Japanese)

Noda, M. and Shiinoki, Y. (1986) Microstructure and rheological behavior of whipping cream. *J. Texture Stud.*, **17**, 189-204.

Noda, M. (1993) Foaming Properties of Imitation Whipping Cream. *J. J. Oleo Sci.*, **42**, 784-791 (in Japanese).

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 671-675.

Schmidt, D.G. and van Hooydonk, A.C.M. (1980). A scanning electron microscopical investigation of the whipping of cream. *Scanning Electron Microscopy*, III, pp. 653-658.

## 第5章 結論

乳および乳製品の微細構造は、それら自体の物理化学的な性質や食品としての風味に直接的に関係している。本論文ではクライオ電子顕微鏡法を駆使して、乳タンパク質および油脂結晶の微細構造を乳および乳製品毎に解析した。まず、乳に含まれるカゼインミセルの構造は徐々に明らかになってきているが、カゼインミセル内の CCP の分布や、CCP とカゼインとの架橋構造は未だ解明されていない。そこで CEMOVIS によりカゼインミセルの内部構造を観察した。その結果、カゼインミセルの平均直径は約 140 nm で、CCP の直径は約 2~3 nm (平均 2.3 nm) であることを確認した。カゼインミセル中の CCP と CCP の間隔は均一でなく (平均間隔 5.4 nm)、CCP を含まない領域 (平均 19.1nm) が存在し、水で満たされた空洞であると考えられた。

また乳製品の多くは、乳脂肪分が含まれるため、試料調製時にオスミウム酸固定が行われているが、免疫電子顕微鏡法での抗原性失活が課題となっていた。そこでオスミウム酸を用いずに、徳安法によるパニールチーズの観察を行った。その結果、脂肪球と乳タンパク質の連続相が保持され、 $\beta$ -ラクトグロブリンに対する免疫標識が、脂肪球と乳タンパク質の凝集体、および空洞部に存在する脂肪球の界面に分布していることを明らかにした。

さらに、ホイップクリーム中の気泡界面における油脂結晶の影響についても、不明な点が多く残されている。そこで氷包埋法を用いて、ホイップに伴う水相および気泡界面の変化を油脂結晶に着目して観察を行った。その結果、ホイップ前のクリームは、脂肪球界面に沿って油脂結晶がラメラ層を形成し、脂肪球の中心に液状脂が存在していた。ホイップにより脂肪球から剥がれた油脂結晶は小さな破片となって気泡界面に吸着し、気泡中に占める油脂結晶の面積が徐々に増加していた。また脂肪球から放出された液状脂は、水相だけでなく、脂肪球間の隙間にも存在していた。これらの挙動が、乳脂肪のホイップクリーム中の気泡安定性に寄与することが明らかとなった。

本研究では、タンパク質の観察として、CEMOVIS を用いた乳のカゼインミセルの観察と、徳安法を用いたパニールチーズの観察を行った。得られた基礎的知見は、牛乳、チーズ、発酵乳への応用に繋げることができる。また氷包埋法によりホイップクリームの油脂結晶を観察して得た知見は、ホイップメカニズムの解明だけでなく、油脂結晶の観察方法を応用することで、クリーム、バター、マーガリンの製品設計に役立てることができる。本研究で用いたクライオ電子顕微鏡法を活用することにより、様々な乳製品、しいては食品分野でのブレイクスルーに繋がる新たな発見や知見を積み重ねることが期待できる。電子顕微

鏡による微細構造観察を活かした製品設計を通じて、社会に貢献する乳製品作りに役立てることが望まれる。

## 謝辞

2013～2017年度の5年間に、兵庫県立大学教授 宮澤淳夫先生、同特任教授 伊藤喜子先生、同助教 西野有里先生との共同研究で得た成果を基に、本論文を執筆しました。クライオ電子顕微鏡法を用いた観察を通じて、懇切丁寧なるご指導と御教示を賜りましたこと、謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、格別のご配慮を頂きました雪印メグミルク株式会社常務執行役員 川崎功博博士、同執行役員ミルクサイエンス研究所長 芹澤篤氏、同ミルクサイエンス研究所副所長 安藤信幸氏に心から御礼申し上げます。さらに終始暖かい御支援と御鞭撻を賜りました雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所主幹 内田俊昭氏、同ミルクサイエンス研究所主査 岡崎正典氏、同札幌研究所長 塩田誠博士に心から御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行ならびに本論文執筆にあたり、絶えず支えてくれた家族に深く感謝します。