

令和元年6月24日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18141

研究課題名(和文) -カゼインの解離がミセルの構造特性に与える影響およびチーズの新規製法の開発

研究課題名(英文) Effects of kappa-casein dissociation on the structural properties of micelles and development of a new process for producing cheese

研究代表者

岡 大貴 (OKA, Daiki)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：20600232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳の加熱時にホエータンパク質を加えpHを塩基性側に变化させることで、チーズカード様の凝乳が生じる。本研究ではその凝乳機構を解明し、新たなチーズ製法を確立することを目的とした。カゼインミセル表面に存在する -カゼインは、加熱時に -LgとSS結合を形成することでミセルから解離するが、この解離により、ミセル間の静電的反発が減少し、疎水性相互作用が上昇することで凝乳が生じると推察された。なお、その凝乳には -カゼインが70%程度解離することで生じることを明らかにした。さらに、得られたカードからチーズの製造を試みたが、酸性化には成功したもののチーズ様のストリング性は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カゼインミセルの構造については複雑で未解明な部分が多く、その構造特性は未だ詳細に把握されていない。本研究はそのミセル構造の特性を把握する上で重要な知見であると考えられる。また、その特性を活かした新たなチーズ製造法の確立については、未だ課題は残るが、新たな製造法の確立のための糸口が得られたと考える。本手法によりチーズ製造が可能となれば、これまでの微生物由来の酵素製剤を使用した製法と比較し格段にコストを抑えることができ、消費者イメージも良い。そこで、酵素を使用しない新たなチーズ製造法が確立されれば、乳関連分野に対し大きな貢献ができることから、本研究は非常に意義ある研究内容であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Caseous curd occurs by heating up in an alkali condition after adding whey protein. The curd mechanism was elucidated in this research, and it was intended that a new cheese procedure was established.

kappa-casein, which is present on the casein micellar surface, dissociates from micelles by forming an SS bond with -Lg when heated, and this dissociation reduces electrostatic repulsion between micelles and increases hydrophobic interaction. It was guessed that curdling would occur by doing. In addition, it was clarified that the curd is occur by dissociating about 70% of -casein. Furthermore, when cheese production was attempted from the resulting curd, although it was successfully acidified, cheese-like stringability was not obtained.

研究分野：食品化学

キーワード：凝乳 チーズ -カゼイン カゼインミセル キモシン レンネット カード

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳タンパク質のカゼインの性質は、乳製品の品質に大きく関わっている。その性質は、カゼインの構造に由来する。カゼインは、リンタンパク質である α_{S1} 、 α_{S2} 、 β 、そして糖鎖をもつ κ の4種がSS結合、疎水性相互作用などによりサブミセルを形成し、サブミセル同士はさらにリン酸カルシウム架橋により巨大分子のカゼインミセルを形成し安定的に存在している。カゼインミセルの構造は、様々な条件により変化することから、乳製品の製造においてミセルの構造特性を把握することは非常に重要である。ヨーグルトやチーズの加工においては、乳の加熱殺菌によるカゼインミセルの構造変化が起因し、加工性に影響を及ぼすことが知られている。我々はその影響機序について解析し、高加熱によってカゼインミセルの κ -カゼイン (κ -CN) がホエータンパク質 (α -La, β -Lg) とジスルフィド結合を形成し一部が解離すること、同作用によりミセル表面の負電荷 (ゼータ電位) が減少することを明らかにし、その影響により、ヨーグルトは強固なカードが形成され¹⁾、チーズにおいてはカード形成が生じないことを明らかにした²⁾。つまり、カゼインミセルからの κ -CN の解離によってミセルの構造特性が変化し、それが乳製品の品質に大きく影響を及ぼしてしまう。しかし、ミセル構造は複雑のためその詳細な構造特性は未解明である。そのため、その構造特性を明らかにすることで、新たな食品利用が期待できると考えられる。

我々は、ヨーグルトやチーズの物性改変を目的に加熱殺菌時の条件を変化させ検討を行っていたところ、加熱殺菌時にホエータンパク質を加えると κ -CN の解離が進行すること、また、pH を塩基性側に变化させても κ -CN の解離が進行することを見出し、 κ -CN の解離とヨーグルトのカード強度との関係性を検討してきた。その中で、ホエータンパク質添加および pH 変化の両処理を組合せることで、加熱時に凝乳する現象がみられた。つまり、凝固剤を加えずに加熱のみで凝乳させる方法を見出した。また、同カードはチーズカードに類似したテクスチャーを有することより、キモシンなどの酵素を利用しない、安価で簡便なナチュラルチーズが製造出来るのではないかと推論した。

2. 研究の目的

本研究では、加熱殺菌時のホエータンパク質濃度と pH 変化を組合せ、どういった条件の時に凝乳が生じるのか、また、その凝乳要因について明らかにすることを目的とした。これまでに、ミセルからの κ -CN の解離が乳加工品の物性に影響を与えることを明らかにしてきたため、この凝乳反応においても、 κ -CN の解離が関与すると推察し、 κ -CN の解離量と凝乳形成能との関係性について検討することとした。さらに、そのカードを用いて、ナチュラルチーズの製造を試み、酵素を使用しない新たなチーズ製造法の確立を目的とし検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 試料および脱脂乳の調製

東京農業大学富士農場にて飼育されているホルスタイン種より生乳を搾乳後、クリームセパレーターにて脱脂し未変性脱脂乳を得た。ホエータンパク質は Fonterra 社の WPI895 (タンパク質 93.9%、脂質 0.3%、糖質 0.4%、ミネラル 1.5%) を用い、未変性脱脂乳に対し WPI を 0.5% 添加 (乳中に存在する量を添加 = 倍量になるよう調整) 後、水酸化ナトリウム溶液にて pH を 7.4 - 9.0 に調整し試料とした。

(2) 加熱凝乳試験

WPI 添加した各 pH の脱脂乳を 80 °C の湯浴中にて 30 分間処理し、目視にて凝乳の有無を確認した。また、凝乳したカードを圧縮型物性測定機 (5564 型, Instron) に供しカード強度を測定した。なお、直径 ϕ 7mm のプランジャーにて 70% 圧縮した際の最大荷重 (N) を硬さとして求めた。また、加熱後の試料を超遠心分離 (33,000 \times g, 65min) に供し得られたホエー画分のタンパク質量を Brad-ford 法にて定量し、全タンパク質量からホエー画分のタンパク質量を差し引くことで凝乳したカードのタンパク質量 (%) を求めた。

(3) DLS によるカゼインミセルサイズの測定

各 pH における加熱前後のカゼインミセルサイズを DLS (DynaPro NanoStar, Wyatt) にて求めた。なお、ホエータンパク質が存在すると凝乳が生じるため、上記同様に超遠心分離に供し得られたホエー画分を Viva flow 50R (MW: 5,000, Sartorius) にてホエータンパク質を除去し、ミネラル溶液とした。そのミネラル溶液を用いて超遠心分離後の沈殿 (カゼイン画分) を分散溶解させ、乳中に存在するカゼイン濃度 (28mg/mL) になるようタンパク質量を調整することで、ホエータンパク質が存在しないカゼインミセル溶液を得た。その後、pH 調整し加熱処理 (80 °C, 30min) 後、タンパク質量を 0.1 mg/mL になるよう調整し DLS に供した。

(4) κ -カゼインの定量

各 pH の加熱後の試料を超遠心分離に供し得られたカゼイン画分に存在する κ -カゼインの挙動を SDS-PAGE にて解析した。また、同画分を RP-HPLC に供すことで κ -カゼインを定量し、カゼインミセルから解離した κ -カゼイン量 (%) を算出した。

(5) 再構成乳の調製

超遠心分離にて得られたカゼイン画分をミネラル溶液にて分散溶解させ、乳中に存在するカゼインミセル濃度 (28mg/mL)になるよう調整後、WPI を 1.12% (乳中に存在する量の 2 倍量 = 通常の凝乳試験と同量)添加することで再構成乳を調整した。さらに、水酸化ナトリウム溶液にて pH を 9.0 に調整後、加熱処理 (80 °C、30 min)し凝乳の確認を行った。なお、ミネラル溶液とは別に純水でも同様にカゼインミセルを分散溶解させ、ミネラルの存在有無で凝乳の比較を行った。

(6) カルシウムイオン量の測定

各 pH における加熱前後のカルシウムイオン量 (ppm) をカルシウムイオン電極計 (LAQUAtwin Ca²⁺、HORIBA) にて測定した。

(7) 加熱凝乳カードを利用したチーズ製造のための酸性化処理

得られた加熱凝乳カードのストリング性を確認するため、GDL を 1.5% 添加し、酸性化の検討を行った。その後、ストリング性をもたせるために、80 °C で加温し脱水処理後、混捏を行うことでストリング性の有無を確認した。なお、用いたカード試料は凝乳点である pH 8.6 および pH が最も高い pH 9.0 で実施した。

4. 研究成果

(1) 加熱凝乳が生じる条件検討

脱脂乳を pH 7.4 - 9.0 に調整し加熱処理を行うことで凝乳の確認を行った。その結果、WPI 無添加の場合はいずれの pH においても凝乳が確認出来なかったが、WPI を 0.5% 添加することで凝乳が確認された。なお、pH 未調整 (pH6.6) および pH 7.4 - 8.5 までは特に変化はみられなかったが、pH 8.6 から加熱凝乳がみられた。また、pH が高くなるにつれて凝乳したカードの体積が減少し、凝乳が強まった様子が確認された (図 1)。そこで、凝乳したカードの強度を

測定したところ、pH 8.6 では 15.9 mN、pH 8.7 では 13.7 mN、pH 8.8 では 15.1 mN、pH 8.9 では 19.5 mN、pH 9.0 では 17.3 mN を示し、pH 依存的な変化はみられず pH とカード強度に特に関係性はみられなかった。そこで、凝乳したカードのタンパク

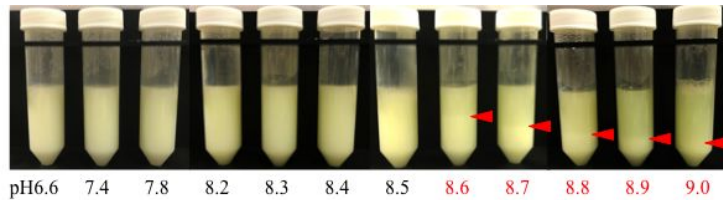


図1 各pHにおける加熱凝乳の観察

質量を求めたところ、脱脂乳全体のタンパク質量に対して pH 8.6 では 17.0% が凝乳していた。一方、pH 8.7 では 17.2%、pH 8.8 では 14.2%、pH 8.9 では 3.3%、pH 9.0 では 2.6% を示し、pH が高くなるにつれて凝乳したタンパク質量が減少した。このことから、高 pH 条件による加熱処理によりカゼインミセルが崩壊しているのではないかと推察された。

(2) 高 pH の加熱処理におけるカゼインミセルサイズの変動

高 pH 条件による加熱によりカゼインミセルが崩壊するのではないかと推察されたため、DLS にてミセルサイズ (粒子半径) を測定した。その結果、非加熱試料においては、pH 6.6 で 64.7 nm、pH 調整乳でも 62 - 66nm を示し、pH による変化はみられなかった。また、加熱試料においても、58 - 74nm を示し大きな違いはみられなかった。このことから、カゼインミセルは崩壊していないことが示された。

(3) カゼインミセルからの κ-CN の解離と加熱凝乳の関係

凝乳に関わる要因を明らかにするため、κ-CN の解離量との関係性について検討した。各 pH にて加熱処理した試料を超遠心分離し得られたカゼイン画分を SDS-PAGE に供した結果、κ-CN および β-Lg のバンドの濃淡が pH 依存的に薄くなっている様子が確認された (図 2)。また、各 pH における κ-CN 解離量を RP-HPLC にて求めたところ、pH 未調整の pH 6.6 では、30.8% が脱離していることが示された。一方、pH を塩基性側に变化させると、κ-CN 解離量は増大し凝乳手前の pH 8.5 においては 67.2%、凝乳点である pH 8.6 においては 69.9% が解離していた。さらに、その後も増大傾向を示し pH 9.0 では 72.6% も解離していた。なお、原料乳が異なる試料においても同様に κ-CN が約 70% 解離することで凝乳が生じたことから、κ-CN の解離量と凝乳に

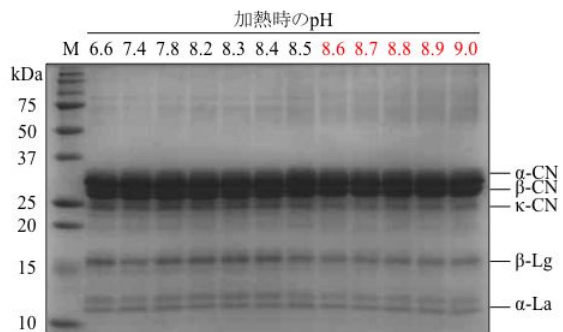


図2 各pHにおける加熱時の沈殿画分のSDS-PAGE

関係があることが示唆された。これまでに、 κ -CN が解離することにより、ミセル表面の負電荷が減少し表面疎水性度が上昇することを明らかにしてきた²⁾。このことから、 κ -CN が 70% も解離することで、これまで反発して分散していたカゼインミセルが反発力を失うとともに、疎水性相互作用により凝集するのではないかと推察された。但し、凝乳手前の pH 8.5 と凝乳点の pH 8.6 の解離量の差は僅か 2.7% であることから、凝乳には κ -CN の解離以外に他の要因もあると推察された。

(4) 加熱凝乳に関わるミネラルの影響

凝乳に関わる要因として、 κ -CN の解離以外にミネラルの影響が考えられた。加熱および pH の変化によりミネラルの形態は変動するため、乳中の代表的なミネラルであるカルシウムに着目し、加熱時のカルシウムイオン量をイオンメーターにて測定した。その結果、pH 6.6 では 50 ppm、凝乳手前の pH 8.5 では 9 ppm を示し減少傾向を示した。しかし、凝乳点である pH 8.6 では 8 ppm を示し、凝乳手前と比較し大きな変化はみられなかったことから、凝乳にはカルシウムイオンは影響しないのではないかと考えられた。しかし、再構成乳においては、ミネラルの非存在下では凝乳が確認できなかったが、ミネラル存在下では凝乳が生じたことから、ミネラルが凝乳に関わることが明らかになった(図 3)。しかし、カルシウムイオンにおいては凝乳点で大きな変動がなかったことから、リンやマグネシウムなどのミネラルもしくはコロイド状のカルシウムなどが関与しているのではないかと考えられた。今後は、ミネラルの組成および形態についても検討を行い、より詳細な凝乳機構を明らかにしていきたい。

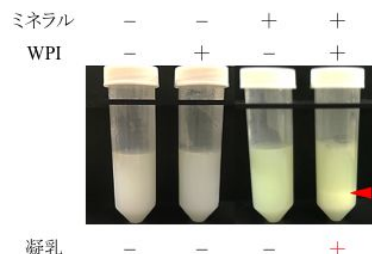


図3 再構成乳 (pH 9.0) の加熱凝乳の確認

(5) 凝乳したカードを用いたチーズ製造の検討

得られた加熱凝乳カードに GDL を 1.5% 添加し、酸性化の検討を試みたところ、GDL 添加 30 分経過後で、pH 8.6 および pH 9.0 のカード試料は pH 7.3 および pH 7.4 を示した。その後、24 時間後では両者ともに pH 3.4 を示し酸性化に成功した。そこで、ストリング性が生じるか検討を行ったところ、加温や脱水処理を行ってもストリング性は生じなかった。今後、チーズ特有のストリング性を持たせるために、さらなる検討が必要ではあるが、酸性化を行うことが出来たため凝固剤を使用しない新たなチーズが出来たと考えられる。

< 引用文献 >

- 1) Wataru Ono, Daiki Oka, Akihisa Hamakawa, Tomohiro Noguchi and Katsumi Takano, Effects of κ -Casein Dissociation from Casein Micelles on Cheese Curd Formation. *Food Science and Technology Research*, 2017, 23, 743-748.
- 2) Daiki Oka, Wataru Ono, Shintarou Ohara, Tomohiro Noguchi and Katsumi Takano, Effect of heat-induced κ -casein dissociation on acid coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, 2018, 85, 104-109

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

寺内広行, 岡大貴, 野口智弘, 高野克己, 乳の高 pH における加熱凝乳に与えるミネラルの効果, 日本食品保蔵科学会第 68 回大会, 2019 年 6 月, 中村学園 (福岡県福岡市)

寺内広行, 岡大貴, 野口智弘, 高野克己, 乳のアルカリ条件における加熱凝乳機序, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年 3 月, 東京農業大学 (東京都世田谷区)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。