パラカゼインカードのシネレシスに関する研究 (第 1 報)

加熱による濾過性カルシウムの減少と補足効果について

佐藤 泰, 長谷佳信*

(名古屋大学農学部, 食品製造化学第 2 研究室)

(昭和 44 年 3 月 6 日 受理)

Studies on Syneresis of Paracasein-Curd

Part I. Decrease of Ultrafiltrable Calcium in Milk during Heating and Restoration by Addition of Calcium Salts

By Yasushi SATO and Yoshinobu HASE*

*Laboratory of Food Science (Animal Food), Faculty of
Agriculture, Nagoya University*

Some experiments were carried out on restoring decreased amounts of ultrafiltrable calcium in heated milk. Results obtained are as follows.

1. Errors in measured amounts of ultrafiltrable calcium by each ultrafiltrable membrane was negligible. Differences between each milk was rather significant.

2. The amounts of ultrafiltrable calcium was decreased in heated milk at 55~98°C for 30min and decreasing percentages became larger according to the increase of heating temperature, and seemed to have no relation with heat coagulated amounts of whey proteins.

3. When decreased amounts of ultrafiltrable calcium were supplied with various calcium salts, 50~70% of their additives became to be ultrafiltrable and the residue could not permeate through ultrafiltrable membrane. Amounts of required salts to restore amounts of ultrafiltrable calcium to original state were calculated in cases of heated milk at 75°C and 98°C.

4. Rennet clotting time of heated milk at 75°C for 30min could be restored to the unheated state by addition of indispensable amounts of calcium chloride or acetate, but that of heated milk (98°C for 30min) could not be restored completely.

(Received March 6, 1969)

* Present Address: Fujiya Co., Ltd., Tokyo

緒 言

1929 年に Mattick と Hallet⁽¹⁾ が加熱牛乳でレンネット凝固時間の延長が認められることを報告して Powell⁽²⁾ がこれを確かめて以来, 加熱がレンネット作用に影響するのか, レンネット作用後の凝固過程に影響するのかについて, 多くの議論が行なわれている⁽³⁾. たしかに加熱後における可溶性カルシウムの減少⁽⁴⁾, 加熱後長時間冷却による減少量の回復⁽⁵⁾, 可溶性カルシウムの減少によるレンネット凝固時間の延長は認められる. し

かし加熱後の冷却による可溶性カルシウムの回復が凝固時間の完全回復を意味しないようである⁽⁵⁾ し, 加熱乳から生成したカードの性質は, たとえカルシウム塩が補足されていても, 未加熱乳のそれとは異なるものである^(7,8). したがって, 加熱におけるホエー蛋白質の変化^(8,9)や, カゼインミセルの反応性の変化⁽¹⁰⁾, 両者の相互作用^(11,12), 両者とカルシウムとの相互作用^(9,13,14)などがレンネット凝固時間の延長との関係においてしばしば論ぜられてきた. とくに β -ラクトグロブリンと κ -カゼインとの加熱反応は濃縮乳の基礎的問題として広く研

* 現在, 株式会社不二家勤務

究が行なわれている。ともかくカゼインのレンネットによる凝固は、酵素的に生成するパラカゼインの化学的凝固であり、その際にカルシウムを必要とし凝固時間がカルシウム量による影響をうける点については、今日多くの研究者に容認されている。

このようなカゼイン凝固とは別に、牛乳から生成した均一なカードが次第に収縮し、ホエーを遊離する過程がある。この過程はチーズ製造において水分調節とチーズ組織生成に関連した重要な過程で、現象的にシネレシスと呼ばれているが、その呼び方が本質的に正しいかどうかは若干の疑問がないでもない。この過程におけるホエー排出量とカルシウムの存在量との関係については、レンネット凝固過程における前述の凝固時間とカルシウムの存在量との関係とまったく同じであるようにも思えない^(7,15-18,22)。このようなシネレシスについては、レンネット凝固に比較して、研究報告が少なく、不明の点が多い。

本研究はレンネットにより生成したカードの性質に関する知見を得る目的で計画されたもので、本報ではまず牛乳の加熱における濾過性カルシウムの減少とカルシウム塩の添加による濾過性カルシウム量の完全回復について、これまでの諸報告の再確認を行ない、著者らの今後の研究に必要で、不足する知見を得るために行なった実験の結果を報告する。

実験方法

1. 供試牛乳 安城市および名古屋市周辺の牧場から得た新鮮な正常乳を供試し、目的によって全乳のまま所定条件で加熱して、あるいは加熱せずに用いた。

2. 加熱方法 500 ml 三角フラスコに約 300 ml の供試牛乳をとり、還流冷却器をつけて温浴中で、それぞれ 55~98°C の範囲における所定温度で 30 分間加熱し、冷却後 3~5°C に 1 時間静置してから実験に供した。加熱による pH の変化は約 0.1 以下で、とくに調節は行なわなかった。

3. 全カルシウムの定量法 供試牛乳 5 ml に濃硝酸 10 ml を加え、加熱分解してほとんど乾固し、これに希釈硝酸 (1:1) 10 ml と 70% 過塩素酸 10 ml を加えて加熱分解する。冷却後、妨害イオンとなりうるリン酸をメタスズ酸カリウム溶液で除き、EDTA 法⁽¹⁹⁾で滴定して全カルシウム量を求め、牛乳 100 ml 中のカルシウム mg 量をもって表示した。

4. 濾過性カルシウムの定量 塩入式限外濾過装置

を用い、濾過膜としては、4% コロジオン液、エタノール、エチルエーテルを 4:1:3 の比に混合して、ガラス板上に流して乾燥させ、水中に貯えたものを使用した。牛乳の濾過条件は、減圧 20~30 mmHg、温度 3~5°C とした。この条件で約 10 時間に約 10 ml の濾液を得ることができた。濾液中のカルシウム量は全カルシウムの定量と同様に行ない、牛乳 100 ml についての濾液中カルシウム mg 量をもって濾過性カルシウム量を表示した。

5. 濾過性たん白態窒素の定量 未加熱および加熱した供試牛乳の限外濾液 5 ml に 6% トリクロル酢酸溶液の等容を加え、15 分間後に 4000 rpm で 15 分間遠心分離し、沈殿は 3.5% トリクロル酢酸溶液を加えて洗浄し遠心分離することにより 2 回洗浄を繰返す。洗浄した沈殿を硫酸で分解し、分解液中のアンモニアをネスラー法⁽²⁰⁾で定量し、牛乳 100 ml についての濾過性窒素 mg 量をもって濾過性たん白態窒素量を表示した。

6. 添加用カルシウム塩溶液 カルシウム塩は溶液として添加するため、次の濃度のものを調製した。

塩化カルシウム溶液: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の 9.2 g を脱イオン水 500 ml に溶解, pH 6.9, 実測濃度 4.5 mg Ca/ml.

酢酸カルシウム溶液: $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の 12.1 g を脱イオン水 500 ml に溶解, pH 7.0, 実測濃度 5.1 mg Ca/ml.

リン酸カルシウム溶液: $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ の 15.7 g を脱イオン水 500 ml に溶解, pH 3.0, 実測濃度 4.8 mg Ca/ml.

7. レンネットによる凝固開始時間の測定 レンネット溶液は Hansen 製のレンネット錠剤 0.5 g を 200 ml の脱イオン水に溶解し、No. 5 C の東洋濾紙で濾過したものを用了。このレンネット溶液 1 ml は、新鮮供試牛乳の 10 ml を 37°C で凝固するに要する時間が 114 ± 11 秒であった。

凝固開始時間の測定は 37°C の恒温槽中で行ない、供試牛乳あるいは加熱牛乳 10 ml にレンネット溶液 1 ml を添加し、攪拌しながらガラス壁に最初の凝固粒が認められるまでの時間を測定した。

実験結果および考察

1. 供試牛乳あるいは加熱乳の濾過性カルシウムの定量値について

作製したコロジオン膜が濾過性カルシウムの定量値におよぼす影響を知るために、5 枚のコロジオン膜を調製し、供試牛乳について濾過性カルシウムを定量し、分散

Table I. Analysis of Variance between Amounts of Ultrafiltrable Ca Due to Collodion Membrane

Factor	Sum of square	Degree of freedom	F_0	$F_{\frac{1}{2}}(0.01)$
Between membranes	870.4	4	1.69	2.74
Residual	3383.1	26		
Total	4253.5	30		

分析した結果は Table I に示したとおりである。

すなわち危険率 1% でコロジオン膜は濾過性カルシウムの定量値に影響をおよぼさないといえる。

また、未加熱乳の限外濾過液中にはたん白質の存在が定性的に認められたので、供試牛乳 55, 65, 70, 75, 85°C, および 95°C にそれぞれ 30 分間加熱した牛乳について限外濾過を行ない、濾液中に存在する濾過性たん白態窒素を定量した。加熱温度と濾過性たん白態窒素との関係は Fig. 1 に示したとおりである。

Fig. 1. Change of Protein Type N in Ultrafiltrate of Heated Milk at Various Temperature.

Fig. 1 に見られるように、65°C までの温度におかれた牛乳の限外濾過液中には、牛乳 100ml あたり少なくとも 13mg ぐらいのたん白態窒素が見られ、濾過性カルシウムの定量値の一部はこのたん白質となんらかの結合平衡を保って溶存する可能性がある。しかし 75°C 以上の加熱を行なった場合には、このたん白質も凝固し、定量された濾過性カルシウムはすべてたん白質と関係なく溶解していると考えられる。そしてこの濾過性たん白質は 75°C 以上で完全に凝固するホエーたん白質を主成分とするものと考えられる。

2. 牛乳の加熱による濾過性カルシウムの減少

未加熱乳および種々の温度で 30 分間加熱した牛乳の

Fig. 2. Decrease of Ultrafiltrable Ca in Milk at Various Temperature.

濾過性カルシウム量を定量し、加熱により減少した濾過性カルシウム量の、未加熱乳の濾過性カルシウム量に対する百分率（減少率と呼ぶこととする）を算出し、加熱温度との関係を示したのが Fig. 2 である。

55°C 加熱の供試牛乳は 2 試料について、60°C 以上加熱の供試牛乳は 6 試料について行なったもので、図中において、最大値と最小値と平均値が示されている。試料中の全カルシウム量平均値は 110.2mg/100ml、濾過性カルシウム量平均値は 45.4mg/100ml、55, 60, 75, 85, 98°C に加熱した場合の濾過性カルシウム量の平均値はそれぞれ 44.3, 41.9, 39.4, 37.4, 36.8mg/100ml である。

Fig. 2 から、55°C, 30 分間加熱した牛乳の濾過性カルシウム量は未加熱の場合とくらべてほとんど差がない。しかし 60°C 以上に加熱すると、加熱温度が高くなるにつれて濾過性カルシウムが減少する傾向を示している。この結果は、すでに報告された多くの研究者の実験結果⁽⁴⁾と定性的によく一致している。その値は牛乳によってかなり差が生ずることを示しており、減少率とホエーたん白の熱凝固と関係があると思われる。

3. 加熱乳に各種カルシウム塩を添加したときの濾過性カルシウム量の回復

供試牛乳の未加熱および加熱における濾過性カルシウム量、各種カルシウム塩の添加量と添加後の濾過性カルシウム量、添加量に対する添加後増加した濾過性カルシウム量の百分率（有効率と呼ぶこととする）などを示したのが Table II (98°C, 30 分間加熱の場合) と Table III (75°C, 30 分間加熱の場合) である。

Table II および Table III の実験結果から、98°C でも 75°C でも加熱した牛乳について、添加した各カルシ

Table II. Restorations of Ultrafiltrable Ca in Heated Milk (98°C, 30 min) and Solubilization Ratio of Added Salts

Sample No.	Ultrafiltrable Ca mg/100 ml			Amts. of added Ca mg/100 ml	Ultrafiltrable Ca from added salts mg/100 ml			Percent of ultrafiltrable Ca to total added Ca (%)		
	Unheated milk	Heated milk	Decreases. amounts		Ca-chloride	Ca-acetate	Ca-dihydro-genphosphate	Ca-chloride	Ca-acetate	Ca-dihydro-genphosphate
201	45.0	36.3	8.7	7.0	3.5	4.5	4.2	50	64	60
202	43.0	37.1	5.9	7.0	5.3	3.9	4.5	76	56	64
203	44.1	37.1	7.0	7.0	3.8	3.4	3.9	54	49	56
204	45.5	38.5	7.0	12.0	6.6	5.8	7.0	55	48	58
205	44.4	36.1	8.3	12.0	8.2	7.7	9.6	68	64	80
206	47.4	43.0	4.4	24.0	13.6	13.4	16.2	57	56	68
207	42.6	38.3	4.3	24.0	16.0	12.4	16.0	67	52	67
208	45.2	37.9	7.3							
209	44.6	37.3	7.3							
Mean*	44.6 (± 1.1)	38.0 (± 1.6)	6.7 (± 1.6)					61 (± 8)	56 (± 6)	65 (± 7)

* Figures in parentheses show confidential intervals in confidence coefficient of 95%.

Table III. Restorations of Ultrafiltrable Ca in Heated Milk (75°C, 30 min) and Solubilization Ratio of Added Salts

Sample No.	Ultrafiltrable Ca mg/100 ml			Amts. of added Ca mg/100 ml	Ultrafiltrable Ca from added salts mg/100 ml			Percent of ultrafiltrable Ca to total added Ca (%)		
	Unheated milk	Heated milk	Decreases. amounts		Ca-chloride	Ca-acetate	Ca-dihydro-genphosphate	Ca-chloride	Ca-acetate	Ca-dihydro-genphosphate
301	44.9	40.8	4.1	9.5	4.0	4.7	4.1	42	49	43
302	43.1	40.1	3.0	9.5	4.4	4.6	6.1	46	48	64
303	49.1	42.7	6.4	9.5	5.1	4.6	6.4	53	48	67
304	46.6	40.8	5.8	9.5	4.4	5.6	5.8	46	58	61
305	49.8	43.9	5.9	9.5	4.0	5.6	4.2	42	58	44
306	46.4	41.7	4.7	12.0	6.7	8.3	7.3	55	69	60
307	39.2	34.8	4.4	12.0	6.2	6.1	7.7	52	51	64
308	46.5	42.4	4.1	12.0	6.3	—	7.2	52	—	60
309	44.0	39.0	5.0	12.0	—	7.4	7.8	—	62	65
Mean*	45.5 (± 2.6)	40.7 (± 2.0)	4.8 (± 0.8)					49 (± 5)	56 (± 7)	59 (± 7)

* Figures in parentheses show confidential intervals in confidence coefficient of 95%.

ウム塩は一部不溶化し、濾過性カルシウムとして 100% 回収されていないことがわかる。この現象についてもこれまでの報告に見られる結果^(21,23)とよく一致する。また Table II および Table III に示されている各カルシウム塩の有効率はかなりバラツキがある。そこで各種カルシウム塩における添加量が有効率に影響をあたえているかどうかを検討するために、分散分析を行なった。その結果、98°C 加熱の場合は添加した各カルシウム塩の量が 7~24 mg/100 ml では、また 75°C 加熱の場合は 9.5~12 mg/100 ml では、いずれも有効率に有意な差を与えないことが分った。したがって、各カルシウム塩のこの範囲の添加量における有効率を区間推定して得た値が表中に示された平均値である。この平均値によれば、いずれの

加熱温度においても、リン酸カルシウムの有効率が他の塩の有効率よりやや高い傾向が見られる。しかしリン酸カルシウム添加の場合には加熱乳の pH を 0.2~0.3 低下せしめるので、さらに検討すべき問題を含んでいるが、本研究ではこれ以上追究しないこととした。また加熱温度が高いほうが、添加塩の有効率が高くなる傾向の有効性が考えられるのは、とくに塩化カルシウムの場合だけである。前述の各カルシウム塩の添加量の範囲で有効率は 50~70% とみられる。

4. 濾過性カルシウムの減少量を回復するに必要な塩の添加量の算定

牛乳を加熱して減少した濾過性カルシウム量の平均値を、各塩の有効率の平均値で除し 100 を乗じた値を、濾

Table IV. Calculated Results of Required Amounts of Ca to Restore Ultrafiltrable Ca in Heated Milk

Kind of salts supplying Ca	Required amounts of Ca (mg/100ml milk)			
	in 98°C-heated milk		in 75°C-heated milk	
	Mean	Upper- and lower-limits	Mean	Upper- and lower-limits
Ca-chloride	11.0	15.0~8.0	9.8	12.7~7.4
Ca-acetate	12.0	15.8~8.8	8.6	11.4~6.3
Ca-dihydrogenphosphate	10.3	13.6~7.6	8.1	10.7~6.1

過性カルシウムの減少量を回復するに必要な各塩の添加量の平均算定量とし Table IV に示した。また減少した濾過性カルシウム量の平均値の信頼限界の上限を、各カルシウム塩の有効率の信頼限界の下限で除し 100 を乗じた量と、減少した濾過性カルシウム量の平均値の信頼限界の下限を、各カルシウム塩の有効率の信頼限界の上限で除し 100 を乗じた量を求め、濾過性カルシウムの減少量を回復するに必要な各塩の添加量の算定量上限および下限として表示した値もあわせて Table IV に示した。この場合、上限の添加量をとれば、加熱による濾過性カルシウムの減少量を十分に回復できるが、平均算定量をとれば不足する場合もありうることになる。

5. 加熱牛乳のレンネット凝固開始時間のカルシウム塩添加による回復

Table II および Table III に用いた試料数以上の供試

牛乳について同じ条件で加熱し、Table IV に示した平均算定量の各カルシウム塩を添加し、レンネットによる凝固開始時間を測定し、未加熱乳の場合のレンネットによる凝固開始時間に対する百分率を計算して示したのが Table V である。

Table V の実験結果に見られるように、75°C、30 分間の加熱の場合には、塩化カルシウムも酢酸カルシウムも Table IV に示した平均算定量の添加によりほぼ完全な凝固開始時間の回復を示しているが、リン酸カルシウムの場合には凝固開始時間は短縮されている。その理由としては、リン酸カルシウムの添加による pH の低下があることと、リン酸イオンの影響とが考えられる。98°C、30 分間の加熱の場合には、塩化カルシウムも酢酸カルシウムも平均推定量が添加されているにも拘らず、凝固開始時間が延長している。その原因としては濾過性カルシウム量の回復の不完全さがたまたま現われたことよりも、むしろ凝固カゼイン粒子の細かさあるいは凝固開始時間の測定が肉眼観察に依存していること、あるいは加熱によるカゼインミセルの変化があったことが考えられる。また、リン酸カルシウムの場合には、ほぼ完全に近い回復がなされたように見られるが、塩化カルシウムや酢酸カルシウムの場合のような凝固開始時間遅延の理由が存在しなければ、もっと短縮されたと思われるのが妥当である。

津郷⁽²³⁾は 70°C、30 分間加熱した牛乳に塩化カルシウムをカルシウムとして 9.0 mg/100 ml、90°C、30 分間加

Table V. Restorations of Clotting Time by the Addition of Ca-Salts to Heated Milk

Temp. of heat. milk		Ratios of clotting time to 100 in unheated milk						
		98°C, 30 min			75°C, 30 min			
Kinds of salts suppl. Ca		Ca- chloride	Ca- acetate	Ca-dihydro- genphosphate	Ca- chloride	Ca- acetate	Ca-dihydro- genphosphate	
Sample No.	1	135	126	83	81	84	53	10
	2	140	140	98	110	113	62	11
	3	162	154	110	92	89	53	12
	4	131	95	87	130	126	71	13
	5	195	166	92	70	72	41	14
	6	141	109	74	108	109	65	15
	7	189	125	123	103	88	58	16
	8	134	132	86	100	111	73	17
	9	117	111	80	105	124	72	18
				123	89	80	19	
				103	118	75	20	
				111	115	80	21	
				102	102	81	22	
Mean*		149(±21)	129(±17)	93(±12)	103(±10)	103(±10)	67(±8)	

* Figures in parentheses show confidential intervals in confidence coefficient of 95%.

熱した牛乳に同塩をカルシウムとして 13.5 mg/100 ml 添加し、凝固開始時間が回復することを観察している。後者の場合に添加されたカルシウムの量は本実験の結果から考えると、濾過性カルシウムの量はもとの未加熱牛乳のそれより多くなっていると考えられ、このような温度に加熱した牛乳では、レンネット凝固開始時間の回復には、未加熱牛乳の濾過性カルシウム量より多くのカルシウムが必要であるとも考えられる。

また、添加したカルシウム塩の変化については Verma⁽²¹⁾ の報告したごとく、モデル系と天然牛乳についてはまったく異なるものと考えなければならないが、添加塩の一部が不溶解化ないしはたん白質に吸着して濾過性にならなくなることが原因で、パラカゼインの生成や凝固を阻害したり促進したりすることはなさそうである。

要 約

牛乳の加熱における濾過性カルシウムの減少とカルシウム塩添加による補足効果について実験し次の結果を得た。

(1) 濾過性カルシウムの定量において限外濾過膜による誤差は無視できる程度であるが、牛乳の個体差は無視できなかった。

(2) 加熱時間 30 分間では、55~98°C で濾過性カルシウムの減少がおこり、温度が高くなると減少率も大きくなる。減少率は牛乳によって差があり、ホエーたん白質の熱凝固とは関係がないと考えられる。

(3) 減少した濾過性カルシウムをカルシウム塩で補うとき、添加したカルシウム塩の 50~70% が濾過性となり、残りは限外濾過膜を通過できない。このことから 75°C あるいは 98°C 加熱時に濾過性カルシウムを 100% 回復するのに必要な各塩の添加量を算定した。

(4) 75°C あるいは 98°C に加熱して減少した濾過性カルシウムを、算定した塩量を添加してほぼ正確に回復した場合、75°C の加熱では塩化カルシウム、酢酸カルシウムによりレンネット凝固開始時間はほぼ正確に回復したが、98°C の加熱では完全に回復できない。

本報告は日本農芸化学会中部支部例会第 43 回講演会 (昭和 42 年 12 月 2 日) において口頭発表したものの一部である。

- (1) E. C. V. Mattick and H. S. Hallet : *J. Agr. Sci.*, **19**, 452 (1929).
- (2) M. E. Powell : *J. Dairy Sci.*, **19**, 305 (1936).
- (3) D. Rose : *Dairy Sci. Abstr.*, **25**, 45 (1963).
- (4) 佐々木林治郎 : 畜産製造学—牛乳編, 地球出版, 1948, p. 143.
- (5) M. Hilgeman and R. Jenness : *J. Dairy Sci.*, **34**, 483 (1951).
- (6) C. W. Dill and W. M. Roberts : *ibid.*, **42**, 1792 (1959).
- (7) N. D. Dimov and P. Mineva : XVI Int. Dairy Congr., B. 817 (1962).
- (8) G. M. Moir : *J. Dairy Res.*, **2**, 68 (1930) ; **3**, 80 (1931).
- (9) A. Kannan and R. Jenness : *J. Dairy Sci.*, **44**, 808 (1961).
- (10) 吉田 繁 : 農化, **41**, 359 (1967).
- (11) C. A. Zittle, *et al.* : *J. Dairy Sci.*, **45**, 807 (1962).
- (12) W. A. McGugan, V. F. Zehren and V. L. Zehren : *Science*, **120**, 435 (1954).
- (13) G. T. Pyne : *Biochem. J.*, **39**, 385 (1945).
- (14) E. S. DellaMonica, J. H. Custer and C. A. Zittle : *J. Dairy Sci.*, **41**, 465 (1958).
- (15) G. C. Cheeseman : XVI Int. Dairy Congr., B. 465 (1962).
- (16) W. F. Stoll and H. A. Morris : *J. Dairy Sci.*, **49**, 698 (1966).
- (17) A. M. Sadler *et al.* : *ibid.*, **51**, 28 (1968).
- (18) O. Kirchmeier : *Milchwissenschaft*, **16**, 137 (1961).
- (19) E. R. Ling : *Analyst*, **83**, 179 (1958).
- (20) 波多野博行, 桐田智子 : 化学の領域増刊, **34**, 43 (1958).
- (21) I. S. Verma : *Milchwissenschaft*, **20**, 357 (1965).
- (22) W. Tuszynski, J. Burnett and G. W. Scott Blair : *J. Dairy Res.*, **35**, 71 (1968).
- (23) 津郷友吉 : 畜産物の科学, 3 巻, 地球出版, 1952, p. 139.