豆乳・牛乳混合系からのレンネットによるカード形成とその熟成

渡邊容子[§], 関口正勝*, 松岡博厚**

東京都立短期大学

* 川村短期大学

** 十文字学園女子大学

Curd Formation by Rennet from Soymilk Combined with Bovine Milk and its Ripening

Yoko Watanabe[§], Masakatsu Sekiguchi* and Hiroatsu Matsuoka**

Department of Food Science and Human Nutrition, Tokyo Metropolitan College,
3-6-33 Azuma-cho, Akishima-shi, Tokyo 196-8540

* Department of Home Economics, Kawamura College, 2-22-3 Mejiro, Toshima-ku, Tokyo 171-0031

** Division of Human Life, Jumonji Gakuen University, 2-1-28 Sugasawa, Niza-shi, Saitama, 352-8510

This study was carried out on coagulation and curd formation of combined milk consisting of soymilk and bovine milk by the action of calf rennet. The coagulation time of combined milk by rennet delayed with higher ratios of soymilk to skim milk. The suitable coagulation time to form curd could be obtained by the adjustment of calcium chloride concentration in combined milk by the addition of calcium chloride solution to skim milk. Lactic fermentation also accelerated the coagulation of combined milk by rennet. The curd was prepared from combined milk (soymilk : bovine milk = 1 : 1) containing 5 mM of added calcium chloride by rennet action together with lactic fermentation. The yield of curd and solid in curd were 20.7% and 68.7%, respectively. Hardness, shear stress, gumminess, chewiness etc. of the curd were lower than those of soymilk curd and combined milk curd prepared by lactic fermentation treatment only. Scanning electron microscopic observation showed the curd had partially formed coagulates, aggregates of coagulates and large empty voids. In 3 week's curd ripened with *Penicillium caseicolum*, water soluble nitrogen ratio was approximately 40% and free glutamic acid content reached to 199 mg/100 g. The ripened curd had good umami taste and palatable texture but showed off-flavor with soapy and tallowy flavors.

(Received Dec. 22, 2003 ; Accepted Jun. 4, 2004)

豆乳を乳酸発酵することによりカードを形成し, *Penicillium caseicolum* (以下 *P. caseicolum*) を熟成用スターターとして用い, チーズ様食品, いわゆる大豆チーズの製造を試み, 熟成の内容について検討してきた^{1)~4)}. しかし, 牛乳からのチーズに比し, 香気に欠け, またカルシウム含量が低い. これらの点を改良するために, 筆者らは豆乳と牛乳の混合系から乳酸発酵により共沈カードを得, カルシウム含量の高いカードが得られたことおよび風味が改善できたことを報告した⁵⁾. 牛乳タンパク質と大豆タンパク質との混合系について研究がなされており⁶⁾⁷⁾, イミテーションチーズの製造も試みられている⁸⁾. また, 牛乳を発酵させ, レンネットで凝固させたさいにカード中に大豆タンパク質がどのように取り込まれるかについての研究もなされ

ている^{9)~11)}. しかし, 豆乳と牛乳の混合系からレンネット凝固によりチーズ様食品の製造を試みた研究は少ない¹²⁾¹³⁾. そこで, 豆乳と牛乳の混合系から両タンパク質を共沈させる方法の一つとして, 牛乳の凝乳酵素剤であるレンネットが利用できないかを検討し, 共沈の条件設定してカードを形成し *P. caseicolum* を用いて熟成を行い, 熟成内容を調べたので報告する.

実験方法

1. 豆乳および脱脂乳の調製

北海道産白目大豆鶴の子 (100 g あたりの成分 : 水分 11.8 g, タンパク質 35.6 g, 灰分 4.6 g) を 1 晩低温浸漬したのち, 10 倍加水豆乳 (100 g あたりの成分 : 水分 93.8 g, タンパク質 3.2 g, 灰分 0.4 g, カルシウム 17 mg) を調製した.

脱脂乳は, 市販の脱脂粉乳 1 に対して所定濃度の塩化カルシウム溶液 9 の割合で混和・溶解したものを用いた. 精製水に溶解し得られた脱脂乳の 100 g あたりの成分は, 水

〒196-8540 東京都昭島市東町 3-6-33

* 〒171-0031 東京都豊島区目白 2-22-3

** 〒352-8510 埼玉県新座市菅沢 2-1-28

§ 連絡先 (Corresponding author), watanabe@tmca.ac.jp

分 89.6 g, タンパク質 3.4 g, カルシウム 99 mg であった。

2. 配合乳の凝固について

(1) 配合割合の違いによる凝固

豆乳と 10 mM 塩化カルシウム溶液に溶解した脱脂乳との比が 5:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4 および 0:5 になるように配合乳を調製した。レンネット溶液は、Hansen 社製のレンネットを 100 mg/10 ml になるように、精製水に溶解したものをを用いた。凝固試験は、従来法の肉眼観察によるレンネットの牛乳凝固試験法に準じた¹⁴⁾。試験温度は 30℃ とし、赤く着色したガラス棒を用い、肉眼で細かい凝集物の生成が認められるに要した時間 (分) をもって凝固速度として表した。

(2) 豆乳濃度の違いと凝固

豆乳は、10 倍加水豆乳を原液とし、精製水で 2 倍、4 倍、6 倍および 8 倍に豆乳濃度を希釈した豆乳を調製した。脱脂乳は 20 mM 塩化カルシウム溶液に溶解した。配合割合は 1:1 とし、それぞれ調製した試料について凝固試験を行った。

(3) カルシウム量の違いによる凝固

脱脂乳への添加塩化カルシウムの濃度は、配合乳中の濃度が 5~25 mM になるように調製し、豆乳との配合比を 1:1 の割合で混合したものについて、凝固試験を行った。

(4) レンネット添加量と凝固

脱脂乳は、20 mM 塩化カルシウム溶液で調製した。豆乳 2.5 ml と脱脂乳 2.5 ml を混合し、レンネットを 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 および 0.5 ml ずつ加えた。反応は 37℃ にて行い、凝固時間を測定した。

(5) 乳酸発酵による凝固

脱脂乳は 15 mM または 20 mM 塩化カルシウム溶液で調製したものを豆乳に対し 1:1 に混合した。脱脂乳培地で培養した乳酸菌スターターを 2% 添加し、37℃ にて発酵を行った。発酵中の乳酸酸度、pH および凝固時間を測定した。

(6) 牛乳の殺菌条件の違いによる凝固

試料は、市販の低温殺菌乳 (100 g あたりの成分: 水分 87.3 g, タンパク質 3.7 g, 灰分 0.7 g, カルシウム 126 mg) および超高温殺菌乳を用いた。これらの牛乳試料は均質化されたものであった。カルシウム添加牛乳は、それぞれ添加した塩化カルシウム濃度が 20 mM になるよう調製し、凝固試験を行った。

3. 配合乳からのカードの製造

豆乳と低温殺菌乳を 1:1 の割合で ULTRA-TURRAX T25 (IKA 製) を用いて、8000 rpm, 2 分間攪拌混和し、配合乳を得た。この配合乳に添加塩化カルシウムの最終濃度が 5 mM になるように加えた。次に乳酸菌スターター *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (以下 *Stc. thermophilus*) 培養物を 3% 添加し、37℃ で発酵を行った。乳酸酸度が 0.16~0.17% に達したときに凝固試験を行

い、10 分間で凝固するレンネット溶液量を加えた。凝固後、カッティング・型詰め・圧搾を行いカードを得た。加塩法により *P. caseicolum* を接種し、15℃ で 3 週間熟成を行った。

4. 一般成分

水分は常圧乾燥法、タンパク質はケルダール法によって窒素を測定した。タンパク質量は、カードについては大豆のタンパク質換算係数 5.71 と牛乳のタンパク質換算係数 6.38 から配合比 1:1 に従って求めた 6.05 を乗じることにによって算出した。カードの脂質はクロロホルム・メタノール混液改良法¹⁵⁾ にて測定した。また、カルシウム量は、試料灰化後塩酸にて抽出を行い、原子吸光法により測定した。カードのフィチン酸の定量は、既報³⁾ に準じて行った。

5. 水溶性窒素の測定

カード試料の水溶性窒素の測定は、既報²⁾ に準じて行い、熟成の指標として、全窒素に対する水溶性窒素の比率を水溶化率として表した。

6. 遊離グルタミン酸

遊離グルタミン酸は、水溶性窒素試料から 75% エタノール抽出区分を調製し、このエタノール抽出液中のグルタミン酸量を酵素法¹⁶⁾ (L-グルタミン酸測定用 F-キット: Boehringer Mannheim 社製) により測定した。

7. カードの物性

テクスチュロメーター (全研, GTX-2 型) を用いて、カードの物性の測定を既報¹⁷⁾ に準じて行った。なお、各試料の検体数は 10 とし、平均値を求めた。

8. 走査型電子顕微鏡

電子顕微鏡用試料調製および観察条件は、既報¹⁷⁾ に準じて行った。

実 験 結 果

1. 配合乳の凝固について

(1) レンネットによる凝固

豆乳と脱脂乳との配合割合が、レンネットによる凝固におよぼす影響について調べた結果を Table 1 に示す。脱脂乳のみの配合比 0:5 の試料は、今回の実験条件下では約 3 分で凝固を示した。配合比 1:4 の試料では凝固時間が約 7 分に延長された。しかし、これ以上豆乳の配合比が高くなると 2:3 の試料であっても凝固に約 5 時間を要した。豆乳の配合比が高いものはさらに長時間を要し、豆乳のみの 5:0 おいては、一晚放置後に凝固を示した。

(2) 豆乳濃度の違いと凝固

配合乳中の豆乳濃度が高くなると、凝固速度が極めて遅くなることが観察された。この原因は、豆乳中にレンネットの凝固作用を阻害する物質が入っているためではないかと考えられる。Metwalli らも、豆乳中にレンネットによる凝固を阻害する成分の存在を示唆している¹²⁾。そこで豆乳を 2~8 倍に希釈し、20 mM 塩化カルシウム溶液で溶かし

Table 1 Effect of ratio of skim milk to soymilk in combined milk on coagulation time by action of calf rennet

		Soymilk : Skim milk						
		5 : 0	4 : 1	3 : 2	1 : 1	2 : 3	1 : 4	0 : 5
Coagulation time	over night	>5 : 00'	>5 : 00'	>5 : 00'	5 : 00'	7' 02"	3' 05"

Fig. 1 Effect of dilution of soymilk on coagulation time of combined milk (soymilk : skim milk = 1 : 1) with calf rennet as a coagulant

た脱脂乳と1 : 1に混合しレンネットの添加量を前記と同様にした結果、Fig. 1にみられるように、1 : 1の希釈しなかった試料においても約18分で凝固を示した。一方、豆乳の濃度を2倍に希釈すると凝固時間は著しく短縮され、約2分で凝固し、それ以上に希釈しても凝固時間は短縮されなかった。

本実験においては、前実験で5時間以上凝固を要した配合比1 : 1の試料でもわずか18分で凝固を示した。本実験と前実験との違いは、本実験においては脱脂粉乳を溶解するのに20 mM 塩化カルシウム溶液を用いたことである。これらの結果から明らかになったことは、豆乳と脱脂乳とを配合した乳を凝固させるためには、一定量のカルシウムが必要であるということである。脱脂乳に対する豆乳の比が高くなるにつれ、脱脂乳に含まれるカルシウムが豆乳に含まれるフィチン酸と結合し、レンネット凝固においてカゼインを沈降させるためのカルシウム量が低下したため、凝固時間が遅れたものと考えられ、豆乳中に存在するレンネットの阻害物質によるものではないといえる。

(3) カルシウム量による凝固への影響

そこで次に豆乳と脱脂乳の配合比1 : 1の配合乳を用い、カルシウム量との関係を検討した。予備試験の結果、配合乳に添加した塩化カルシウム濃度10 mM 前後に最適カルシウム濃度があることが予想されたので、10 mM 付近を

中心に調べた。その結果、Table 2にみられるように塩化カルシウム濃度5 mM では凝固はしなかったが、7.5 mM では3.5時間、8.75 mM 以降は濃度が高くなるにともない凝固時間は急速に短縮され、20 mM および25 mM 溶液の添加試料では、レンネットを添加せずに凝固することが認められた。なお、20 mM 以下の塩化カルシウム濃度では、レンネット添加をしなければ、配合乳の凝固は5時間経過しても認められなかった。

(4) レンネット添加量と凝固

次にレンネットの作用によって配合乳の凝固が起こったのかを確認するために、レンネットの添加量の影響について調べた。その結果、Fig. 2にみられるように、酵素量の添加にともない凝固時間が直線的に短縮されることが認められた。この結果は、配合乳の凝固にレンネット、すなわちキモシンの凝固作用が関与していることを示すものといえる。

(5) 乳酸発酵による凝固への影響

配合乳にレンネットを加え凝固させる際に、乳酸菌 Starter による乳酸発酵を行い、凝固への影響を調べた。一般にチーズ製造においては、乳酸発酵をすることによって凝固時間が短縮される。

Table 3にみられるように、塩化カルシウム濃度10 mM の配合乳においては、未発酵の場合は約3分で凝固を示したが、発酵90分後には53秒、120分後には35秒と約1/6に短縮された。塩化カルシウム濃度7.5 mM の試料では、未発酵試料で凝固に要した時間は約15分をであったが、乳酸発酵120分後には1分33秒と約1/10に短縮された。これらのことは乳酸発酵と組み合わせた場合には、より低濃度のカルシウム塩添加でレンネットの作用により配合乳の凝固を起こさせることができることを示している。

(6) 配合乳に用いる牛乳の殺菌条件による凝固への影響

豆乳と脱脂乳から成る配合乳で基本的な凝固条件を調べたが、製品を作るさいには牛乳を使用するので、選択する牛乳の殺菌条件が問題である。超高温殺菌乳ではレンネットによる凝固が起こりにくいことが知られている¹⁸⁾。Table 4にみられるように豆乳と超高温殺菌乳、低温殺菌乳との1 : 1の配合乳では、レンネット添加によっても凝固しなかった。また、牛乳のみでも超高温殺菌乳は凝固しなかったが、低温殺菌乳では16分38秒で凝固を示した。

添加塩化カルシウム濃度を20 mM にした場合は、配合乳

Table 2 Effect of added calcium chloride concentration on coagulation time of combined milk (soymilk : skim milk = 1 : 1) by action of calf rennet

	CaCl ₂ concentration (mM)								
	5	7.5	8.75	10	11.3	12.5	15	20	25
Coagulation time	NG ^(a)	3 : 30'	10' 03"	5' 16"	2' 10"	0' 16"	0' 10"	— ^(b)	— ^(b)

^{a)} ; No coagulation after overnight.^{b)} ; Coagulated without addition of rennet solution. **Fig. 2 Effect of the amount of calf rennet solution on coagulation time of combined milk (soymilk : skim milk = 1 : 1)**

では超高温殺菌乳で約 3 分、低温殺菌乳では約 1 分で凝固した。牛乳のみでは両牛乳ともこの 20 mM 塩化カルシウム濃度ではレンネットを添加せず凝固が起こった。これらのことから、超高温殺菌乳も配合乳の材料として使用可能ではあるが、今回はカルシウムの影響をより少なくすることを考え、低温殺菌乳を製造材料として用いることとした。

2. カードの収量と一般成分

前述の製造工程に従い、豆乳 4900 g と低温殺菌乳 4900 g を配合し、さらにスターター 294 g を加えて乳酸発酵し、レンネットを加えカードを作製した。その収量は 2090 g、配合乳（含スターター）に対する収率は 20.7%、固形分収率は 68.7% であった。なお、このとき得られたホエーは、透明であった。

配合乳カード 100 g あたりの一般成分は、水分 69.1 g、タンパク質 14.0 g、脂質 10.8 g、灰分 0.9 g、カルシウム 260 mg であった。

3. カードの組織

Table 5 にテクスチュロメーターで測定した配合乳カードの物性値を示した。また既報⁵⁾で報告した豆乳カードおよび乳酸発酵配合乳カードの物性値を 100 としたときの割合を示した。まず豆乳カードに対する物性値の割合で比較してみると、凝集性は約 70%、硬さは約 10%、剪断応力は

Table 3 Effect of lactic fermentation on coagulation time of combined milk (soymilk : skim milk = 1 : 1) by action of calf rennet

Add CaCl ₂ concentration		Fermentation time (min)			
		0	90	120	150
7.5 mM	pH	6.44	6.37	6.30	6.12
	Acidity (%)	0.147	0.176	0.170	0.183
	Coagulation time	14' 41"	5' 35"	1' 33"	— ^{a)}
10 mM	pH	6.33	6.24	6.11	5.94
	Acidity (%)	0.151	0.168	0.176	0.211
	Coagulation time	3' 04"	0' 53"	0' 35"	— ^{a)}

^{a)} ; Coagulated without addition of rennet solution.**Table 4 Coagulation of combined milk consisting of bovine milk and soymilk by action of calf rennet together with lactic fermentation**

Variety of bovine milk	Added CaCl ₂ concentration (mM)	Soymilk : Bovine milk	
		1 : 1	0 : 1
LTLT	0	NG ^{a)}	16' 38"
	20	1' 03"	— ^{b)}
UHT	0	NG	NG
	20	2' 59"	— ^{b)}

LTLT : low temperature long time pasteurization.

UHT : ultra high temperature heating method.

^{a)} ; No coagulation after overnight.^{b)} ; Coagulated without addition of rennet solution.

約 17%、弾力性は約 28%、ガム性は約 7%、咀嚼性は約 2% で、すべての物性において低い値を示した。一方、乳酸発酵配合乳カードと比較してみると、凝集性はほとんどかわらないが、硬さは約 12%、剪断応力は約 33%、弾力性は約 28%、ガム性は約 12%、咀嚼性は約 3% と低い値を示した。

4. 電子顕微鏡

Fig. 3 にみられるように、レンネット・カルシウム添加、乳酸発酵の組み合わせにより得られたカードは、部分的には凝集物が集まりカードを形成しているが、空隙が多く、集合していない凝集物も多くみられた。これは、豆乳と牛乳の配合比が 4 対 1 と今回用いた配合乳の豆乳と牛乳

Table 5 Rheological values of curd prepared from combined milk by action of calf rennet with lactic fermentation

	Value (T.U.)	Ratio ^{a)} (%)	Ratio ^{b)} (%)
Cohesiveness	0.40 ± 0.04	66.2	102.6
Hardness	0.040 ± 0.004	9.6	11.6
Shear stress	0.076 ± 0.011	16.9	33.3
Springiness	3.80 ± 0.400	27.8	28.0
Gumminess	1.60 ± 0.286	6.3	12.0
Chewiness	6.05 ± 1.251	1.8	3.4

^{a)} Percentage of each rheological value of combined milk curd with rennet to that of soymilk curd by lactic fermentation⁵⁾.

^{b)} Percentage of each rheological value of combined milk curd with rennet to that of combined milk curd by lactic fermentation⁵⁾.

Values given are means of ten trials in each sample.

の比率とは異なるが、乳酸発酵のみで得られた配合乳カードでは、凝集物がより緻密に集合し空隙も少なかった⁵⁾のに比し、明らかに異なった組織であった。

5. カードの熟成

P. caseicolum 接種後のカードタンパク質の水溶化率は Fig. 4 にみられるようにきわめて速く、熟成 1 週目で約 37% に達した。しかし、2 週目には約 42% とこの間の水溶化率の上昇は小さく、熟成 3 週目にはやや減少する傾向にあった。熟成中の遊離グルタミン酸量は、新鮮カードではみられなかったが、熟成 1 週目で試料 100 g 当たり 55 mg に増加し、2 週目で 176 mg、3 週目には 199 mg と熟成期間中をとって上昇した。カードは熟成にともない旨味が感じられ、組織も軟らかく口触りもよかったが、脂肪の分解に由来すると思われる石けん臭、獣脂臭などのオフフレーバーが強く感じられた。

考 察

豆乳と脱脂乳を混合し得た配合乳にレンネットを作用させた結果、脱脂乳に対する豆乳の割合が高くても、添加塩化カルシウムの添加濃度を高くすることにより配合乳を凝固させることができた。牛乳がレンネットにより凝固するのは、牛乳に存在する安定なカゼインミセルがキモシンの作用によりミセルを構成する κ -カゼインがパラ κ -カゼインとマクロペプチドに解離することにより、カゼインミセルを構成する主要タンパク質である α_{s1} -カゼインと β -カゼインが κ -カゼインによりカルシウムからの保護作用が失われることによって、本来のカルシウム感受性となり沈降する。また、パラ κ -カゼインの疎水性が各タンパクの複合体形成にも関与すると考えられる¹⁹⁾。チーズ製造においてもレンネットを作用させカードを効率よく形成させるため

* Lactic fermentation curd

Fig. 3 A scanning electron micrograph of curd prepared from combined milk (soymilk : bovine milk = 1 : 1)

* Micrograph of lactic fermentation curd was shown as a reference.

Fig. 4 Changes in water soluble nitrogen ratio to the total nitrogen and free glutamic acid content during ripening of curd prepared from combined milk (soymilk : bovine milk = 1 : 1)

●, water soluble nitrogen ; ■, free glutamic acid.

には、カルシウムが牛乳 100 ml 当たり 140~160 mg 存在するのがよく、殺菌操作により不溶化したカルシウムを補うために実際チーズ製造工程では塩化カルシウムを 0.02% 位添加されている²⁰⁾。牛乳中のカルシウムの存在形態は、可溶性カルシウムと不溶性カルシウムに大別され、可溶性カルシウムは約 30% の割合で存在している。この可溶性

カルシウムは、イオン状カルシウム (Ca^{2+}) と非イオン状カルシウム (りん酸塩、くえん酸塩など) に分けられ、牛乳の Ca^{2+} 濃度は約 2.5 mM (10 mg/l) で、加熱処理によって減少し、わずかの量の Ca^{2+} の減少でもレンネットによる凝固時間が大幅に遅延することが知られている²¹⁾。チーズ製造にさいし、レンネットによる凝固を効果的にするために添加された 0.02% 塩化カルシウムは、牛乳の Ca^{2+} 濃度を 2.0 mM 高くすることになる。本実験においても脱脂粉乳の溶解に用いた塩化カルシウム濃度が配合乳のレンネットによる凝固に影響し、一定量のカルシウム (Ca^{2+}) が必要なが認められた。さらに、配合乳のレンネットによる凝固においては、添加したカルシウムが豆乳に存在するフィチン酸と結合し、凝固に影響することが考えられる。脱脂粉乳を 10 mM 塩化カルシウム溶液に溶解した脱脂乳のカルシウム濃度は 9 mM であり、豆乳のフィチン酸含量は約 0.160% (約 2.4 mM)³⁾ とすると、豆乳と脱脂乳が 1 : 4 の比率の配合乳に存在する添加カルシウム濃度は 7.2 mM、フィチン酸は 0.48 mM となる。フィチン酸とカルシウムの結合については、フィチン酸とカルシウムのモル比、pH などにより違いがみられるが、モル比が 1 : 5 以上になるとフィチン酸カルシウムの沈殿が完全に生じると報告されている²²⁾。また、10 mM Ca^{2+} の存在下でフィチン酸の濃度が 2~2.5 mM の付近で溶解度が最小になることも認められている²³⁾。これらのことから、フィチン酸とカルシウムのみの系では条件によっては、1 モルのフィチン酸に約 5 モルの Ca^{2+} が結合することが考えられる。しかし、豆乳中のフィチン酸の一部はカルシウム、マグネシウムと結合したフィチン態として存在し、タンパク質との複合体を形成していることも考えられ、豆乳中のフィチン酸が添加 Ca^{2+} とどのような比で結合するかを予測することは難しい。そこで、添加 Ca^{2+} とフィチン酸の濃度を比率でみると、豆乳と 10 mM 塩化カルシウムにて溶解した脱脂乳の比が 1 : 4 の試料では、15 : 1 (7.2 mM : 0.48 mM) であり、このときレンネットにより 7 分で凝固している。このように計算すると豆乳 : 脱脂乳の比が 2 : 3 の配合乳では 5.6 : 1 (5.40 mM : 0.97 mM) で凝固に要した時間は 5 時間、さらに 1 : 1 の配合乳では、3.7 : 1 (4.50 mM : 1.21 mM) で 5 時間以上凝固に要した。一方、豆乳と 20 mM 塩化カルシウム溶液を用いて調製した脱脂乳の比が 1 : 1 の配合乳では、 Ca^{2+} とフィチン酸の濃度比は 7.4 : 1 (9.00 mM : 1.21 mM) となり 18 分でレンネットにより凝固を示した。また、2 倍希釈豆乳と脱脂乳が 1 : 1 の配合乳では、15 : 1 (9.00 mM : 0.60 mM) となり、凝固時間は 2 分と短かった。配合比 1 : 1 の試料を用いカルシウム濃度を変えた場合をみると、5 mM 塩化カルシウム添加試料では、カルシウム : フィチン酸は 4.1 : 1 (5.0 mM : 1.21 mM) でレンネットによる凝固はみられなかった。添加カルシウムが 7.5 mM のさいには 6.2 : 1 (7.5 mM : 1.21 mM) で凝固時間は 3

時間 30 分、8.75 mM のさいは、7.2 : 1 (8.75 mM : 1.21 mM) で 10 分 3 秒、10 mM のさいは 8.3 : 1 (10 mM : 1.21 mM) で 5 分 16 秒、また 15 mM では 12.4 : 1 (15 mM : 1.21 mM)、10 秒で凝固を示した。これらから配合乳をレンネットで効果的に凝固させるためには、フィチン酸に対するカルシウム濃度比が一定以上であることが必要と考えられる。また、カルシウム濃度が同じ条件である 20 mM 塩化カルシウム溶液で調製した脱脂乳と豆乳の配合比が 1 : 1 の試料における凝固時間に比べ、豆乳を 2 倍希釈したものを用いた配合乳試料のほうが、レンネットによる凝固時間が短縮されたことも、フィチン酸による影響があることを示しているといえる。先に記したように、豆乳に存在するフィチン酸が添加した Ca^{2+} とどのように結合するかを推測することは難しいが、配合乳からの乳酸発酵カードのカルシウム量とフィチン酸量の比が 3 : 1 であった⁵⁾ ことなどを考慮し、フィチン酸 1 モルが 3 モルの Ca^{2+} と結合したと仮定すると、レンネットにより 7 分で凝固をした豆乳 : 脱脂乳比が 1 : 4 の試料では遊離型の Ca^{2+} 濃度は 5.8 mM となる。18 分で凝固した 1 : 1 の場合は 5.4 mM、2 倍希釈豆乳を用いたさいには 7.2 mM、2 分で凝固、10 分で凝固した 8.75 mM 添加試料では 5.1 mM など、10 分以内にレンネットを用いて配合乳を凝固させるには、遊離 Ca^{2+} 濃度が 5 mM 以上であることが必要ではないかと考えられる。

α_{SI} -カゼインおよび β -カゼインは 1~3 mM で会合し、10 mM で凝固するといわれている¹⁹⁾。またチーズ製造において、レンネット添加後約 10 分で凝固させるのに牛乳の Ca^{2+} 濃度が約 4.0 mM がよいということと上記の結果はほぼ一致しているといえる。

低温殺菌乳の場合をみると、遊離型のカルシウム濃度は約 6 mM になり、凝固時間は 1 分 3 秒であり、上記の例と類似している。超高温殺菌乳は一般にレンネット凝固しにくいとされ、その原因は加熱変性した β -ラクトグロブリンが κ -カゼインと結合し、 κ -カゼインがキモシンの作用を受けにくいためと考えられている¹⁸⁾。本実験においては、超高温殺菌乳のみでは凝固を示さなかったが、配合乳では約 3 分間で凝固を示した。これは、加熱変性した β -ラクトグロブリンが大豆タンパク質と結合し、 κ -カゼインとの複合体形成を妨げたためと推察されるが、このことについては今後検討したいと考えている。

配合乳の凝固がレンネットの作用で誘導される結果が得られた。上記のようにレンネットにより凝固したカゼインが、酸凝固の場合と同様にフィチン酸・カルシウム・大豆タンパク質複合体と結合することによって、配合乳の凝固が起きたものと考えられるが、得られたカードの硬さは、酸凝固のカードに比し柔らかく、また電子顕微鏡による組織にも違いがみられたことから、その凝固機構についてはさらなる検討が必要と考えている。

カードは熟成によってタンパク分解は良好に進行し、結

果には示さなかったが、SDS-PAGEによりタンパク分解を調べたところ、熟成2~3週目には牛乳および豆乳タンパク質がともに良く分解することが認められた。しかし、配合乳からの乳酸発酵カードとは異なり、熟成中にオフフレーバーの生成がみられた。使用した乳酸菌スターター (*Stc. thermophilus*) とかびスターター (*P. caseicolum*) は同じなのに、本実験におけるカードがオフフレーバーを生じたのは、使用したレンネットに原因があると考えられる。レンネットに混在しているリパーゼが配合乳に含まれる乳脂肪・大豆油に作用し、加水分解した脂肪酸からの二次的生産物によってオフフレーバーが生じたものと思われる。本実験では子牛レンネットを用いたが、微生物レンネットなどと比較し、この点を改善したいと考えている。

要 約

豆乳と牛乳の混合系がレンネットで共沈するかを調べ、配合乳から乳酸発酵とレンネット併用によるカード形成を行い、*P. caseicolum* を熟成用スターターに用い熟成し、次の結果を得た。

(1) 配合乳の豆乳の比率が高くなると、レンネットによる凝固の速度は遅くなる傾向が認められた。

(2) 豆乳濃度を希釈することにより、レンネットによる凝固速度は速くなった。

(3) 豆乳と脱脂乳の配合比が1:1の配合乳を試料とした場合、添加塩化カルシウム濃度が高くなるにともないレンネットにより凝固時間が短縮され、10 mM では約5分で凝固を示した。しかし、レンネット無添加では5時間経過しても凝固はみられなかった。

(4) 配合乳のレンネットによる凝固は、レンネット添加量が増すにともない、凝固時間が直線的に短縮された。

(5) 脱脂乳の代わりに牛乳を用いた配合乳では、低温殺菌乳および超高温殺菌乳を配合した配合乳ともにレンネットにより凝固し、カード形成された。また、配合乳を乳酸発酵することにより凝固時間は著しく短縮された。

(6) 豆乳と牛乳の配合比が1:1の配合乳を用いて乳酸発酵・レンネット添加により得られたカードの物性は、豆乳カードおよび乳酸発酵配合乳カードに比べ硬さ、剪断応力、ガム性および咀嚼性とも低い値を示した。

(7) 走査型電子顕微鏡観察によるとカードの組織は、部分的には凝集物が集まりカードを形成しているが、空隙が多く集合していない凝固物も多くみられた。

(8) 熟成によるタンパク質の水溶化はきわめて早かった。また、カード中の遊離グルタミン酸量も熟成とともに増加し、旨みも感じられた。しかし、脂肪の分解に由来すると思われるオフフレーバーが強く感じられた。

文 献

- 1) 松岡博厚, 福家洋子, 乳酸発酵による大豆乳カードの形成

- とその熟成, 日食工誌, **24**, 553-558 (1977).
- 2) 福家洋子, 松岡博厚, *Penicillium caseicolum* を用いた大豆乳からのチーズよう食品の熟成中における蛋白質とプロテアーゼ活性の変化, 日食工誌, **34**, 826-833 (1987).
- 3) 渡邊容子, 松岡博厚, 大豆チーズ製造・熟成中のフィチン酸の変化と *Penicillium caseicolum* のフィターゼ産生, 日食工誌, **41**, 627-632 (1994).
- 4) 松岡博厚, ダイズチーズの製造法および熟成機構, 食科工, **42**, 945-951 (1995).
- 5) 渡邊容子, 関口正勝, 松岡博厚, 豆乳・牛乳混合系からの乳酸発酵によるカード形成とその熟成, 食科工, **47**, 30-36 (2000).
- 6) 青木 宏, 白瀬好子, 加藤潤子, 渡辺雄二, 大豆タンパク質とミルクカゼインの混合系が示す粘性および乳化安定性, 日食工誌, **31**, 333-338 (1984).
- 7) 青木 宏, 白瀬好子, 加藤潤子, 渡辺雄二, 大豆タンパク質とミルク・カゼインの混合系が示す乳化安定性・超音波乳化を中心に, 日食工誌, **33**, 167-170 (1986).
- 8) 西谷昭明, 巽 清, 井門和夫, 玉置公恵, 塙 尚之, 大豆蛋白質とカゼインを混合したイミテーションモザレラチーズの機能性について, 日食工誌, **36**, 805-811 (1989).
- 9) 岡崎良生, 鬼頭 誠, 内海 成, 牛乳カードへの大豆タンパク質の取り込み, 食科工, **47**, 378-383 (2000).
- 10) 岡崎良生, 内海 成, 分離大豆タンパク質を含有する牛乳カードにおけるタンパク質間相互作用力, 食科工, **47**, 808-811 (2000).
- 11) 岡崎良生, 内海 成, 大豆7Sおよび11S グロブリンを含有する牛乳カードにおけるタンパク質間相互作用力, 食科工, **48**, 356-360 (2001).
- 12) Metwalli, N.H., Shalabi, S.I., Zahran, A.S. and El-Demerdash, O., The use of soybean milk in soft-cheese making : I. Effect of soybean milk on rennet coagulation property of milk. *J. Food. Technol.*, **17**, 71-77 (1982).
- 13) Metwalli, N.H., Shalabi, S.I., Zahran, A.S. and El-Demerdash, O., The use of soybean milk in softcheese making : II. Organoleptic and chemical properties of Domiati cheese made from a mixture of soybean milk and whole milk. *J. Food. Technol.*, **17**, 297-305 (1982).
- 14) 津郷友吉, 山内邦男, 牛乳の変化, 「牛乳の化学」, 第1版 (地球社, 東京), pp. 178-188 (1975).
- 15) 堤忠一, 平田芳明, 一般成分および関連成分, 「新・食品分析法」, 第1版, 日本食品科学工学会, 新・食品分析法編集委員会編, (光琳, 東京), pp. 51-53 (1996).
- 16) Beutler, H.-O., In "Methods of enzymatic analysis", 3rd ed., Vol. VIII, Bergmeyer, H.U., ed, pp. 369-376 (1985).
- 17) 松岡博厚, 関口正勝, プロメライン処理大豆蛋白質の加熱凝固, 日食工誌, **39**, 316-321 (1992).
- 18) 大谷 元, 牛乳の貯蔵・加工中における牛乳タンパク質の変化, 「タンパク質の科学」, 第1版, 鈴木敦士, 渡部終五, 中川弘毅編, (朝倉書店, 東京), pp. 64-66 (1998).
- 19) 千葉英雄, 吉川正明, タンパク質分子間の相互作用—カゼイン間の相互作用—, 「食品成分の相互作用」, 並木満夫, 松下雪郎編 (講談社, 東京), pp. 100-115 (1980).
- 20) 米田義樹, C. チーズ「ミルク総合辞典」, 第1版, 山内邦男, 横山健吉編, (朝倉書店, 東京), pp. 206-232 (1998).
- 21) 下野勝映, 下村正己, 牛乳の加熱変化, 特に蛋白質とカルシウムの変化について, 乳技協資料, **33**, 1-11 (1983).
- 22) Grynspan, F. and Cheryan, M., Calcium Phytate : Effect of pH and Molar Ratio on in vitro Solubility, *JAOCS*, **60**, 1761-1764 (1983).
- 23) Graf, E., Chemistry and applications of phytic acid : an overview, 「Phytic acid」, (Pilatus Press, Minneapolis), pp. 1-21 (1986).

(平成15年12月22日受付, 平成16年6月4日受理)