

乳のレンネット凝固過程およびチーズの物性発現におけるカゼイン
ミセルネットワークの近赤外分光分析による評価のための
ミセル構造解析の基礎的研究

**Basic Study on Micelles Structure Analysis for Near-Infrared Spectroscopy
Evaluation of Casein Micelles Network in Rennet-Induced Milk
Coagulation and Expression of Cheese Rheological Properties**

天羽 由知^a, 稲垣 孝二^a, 佐藤 眞直^b, 佐野 則道^b, 相澤 秀樹^c, 市川 創作^d
Yoshitomo Amo^a, Koji Inagaki^a, Masugu Sato^b, Norimichi Sano^b, Hideki Aizawa^c, Sosaku Ichikawa^d

^a森永乳業(株), ^b(公財)高輝度光科学研究センター, ^c摂南大学, ^d筑波大学
^aMorinaga Milk Industry Co., Ltd., ^bJASRI, ^cSetsunan University, ^dUniversity of Tsukuba

近赤外分光分析(NIRS)による製造工程中のチーズ物性モニタリング技術の信頼性向上を目的に、小角 X 線散乱(SAXS)測定によるチーズ中のカゼインミセル構造解析を試みた。脱脂乳のレンネット凝固過程において NIRS と SAXS の同時測定を、プロセスチーズにおいては加熱溶融処理直後の NIRS 測定と冷却固化後の SAXS 測定を実施した。凝乳の進行に伴い、NIR スペクトルと極小角領域の SAXS プロファイルが変わっていく様子が観察された。プロセスチーズについては用いた溶融塩および処理時間の違いにより、小角領域の SAXS プロファイルに明確な変化が観測された。

キーワード： チーズ、カゼインミセル、近赤外分光法、小角 X 線散乱

背景と研究目的：

プロセスチーズは、乳にレンネットと呼ばれる凝乳酵素を作用させて乳清を除去して得られる凝乳(カード)を熟成させて作るナチュラルチーズを主原料に、クエン酸塩やリン酸塩といった溶融塩を加え加熱溶融乳化させて製造される。レンネット凝固は乳中のカゼインミセルが凝集してネットワークを形成することで起こるが、適切な凝固状態で次工程に移行させることがチーズの収率、熟成の進行などにおいて重要であり、人の感覚による評価の他、様々なセンシング技術が開発・活用されつつある[1]。プロセスチーズの物性については、原料の配合に加えて溶融工程における加熱・攪拌(クッキング)条件が大きな影響を及ぼすことが知られており、クッキング中に起こるカゼイン分子の相互作用に起因したチーズの増粘(クリーミング)の制御が最終製品の物性調整の手段として重要である[2]。

我々はチーズの製造工程中における物性変化のオンライン評価手法として、近赤外分光分析(NIRS)を用いたモニタリング技術の開発を進めている。チーズの物性発現とカゼインミセルのネットワーク構造には密接な関係があることから、本研究は小角 X 線散乱(SAXS)測定によるカゼインミセル構造解析を活用することによって、このモニタリング技術の信頼性を向上させることを目的とした。SAXS 測定によるカゼインミセルの観察は、電子顕微鏡を用いた従来の手法と異なり凍結や蒸着などの試料前処理が不要なため、反応中の構造変化をその場で観察することが可能であり、測定技術の確立は大きな意義があるものと考えられる。

実験：

本研究では脱脂乳のレンネット凝固過程とプロセスチーズ製造における加熱溶融過程の 2 つを測定対象とした。

レンネット凝固については、72°C、15 s の加熱殺菌をした脱脂乳とレンネット(キモシン)を試料として用いた。凝固過程の NIR 吸収スペクトルと SAXS プロファイルの推移を連続的に同時測定するため、NIR 測定プローブを挿入することができる温調可能な SAXS 測定セル(光路長 9 mm)を作製した。各試料は測定開始前の酵素反応の進行を防ぐために氷温で混合した状態で測定セルに注入し、30°C 加温下で 40 分間測定を行った。NIR スペクトルは透過反射プローブ(光路長 1 mm)

を光ファイバーで接続した FT-NIR 分光計を用いて測定した。X 線散乱プロファイルについては BL19B2 にて小角 X 線散乱(SAXS)を X 線エネルギー 18 keV、カメラ長 3072 mm、露光時間 20 s の条件で、極小角 X 線散乱(USAXS)を X 線エネルギー 18 keV、カメラ長 41529 mm、露光時間 300 s の条件で測定して得た。カメラ長較正は SAXS にはベヘン酸銀の、USAXS にはコラーゲンの回折ピークを用いて実施した。検出器には PILATUS-2M を用いて 2 次元測定を行った。

プロセスチーズ溶融過程については、脱脂乳にレンネットを作用させて得たカードと溶融塩(ピロリン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム)を材料とした。チーズ試料の調製には加熱・攪拌と同時に連続的に見かけの粘度の変化を測定できる Rapid Visco Analyzer(RVA)を使用した。最終のチーズ重量が 20 g で水分含量が 65%程度、溶融塩濃度が 0.22 $\mu\text{mol/l}$ になるように粉碎カード、いずれかの溶融塩、イオン交換水を RVA 専用容器に計量し、85°C、500 rpm のクッキング条件で所定の時間処理をした。溶融チーズサンプルは拡散反射モードでの NIR スペクトル測定後、カプトンフィルムを窓材としたスライドマウントに挟み込み(サンプル厚 1.6 mm)、室温で冷却した後小角および極小角の X 線散乱測定を行った。測定条件はレンネット凝乳実験と同じ X 線エネルギーおよびカメラ長で、露光時間はそれぞれ 60 s および 300 s とした。

結果および考察：

カゼインを含む脱脂乳中のタンパク質に対する X 線照射ダメージを確認するため、脱脂乳に 40 分間 X 線を照射し続けたが、変性や凝集などによる SAXS プロファイル変化は認められなかった。

図 1 に脱脂乳のレンネット凝固における USAXS プロファイルの経時変化を示す。Low- q 領域の傾きが経時的に大きくなる変化が観察され、カゼインミセルのネットワーク構築に伴う凝集体サイズの増大を反映していると推察された。NIR スペクトルについては凝固が進むに従って全波長領域で吸光度が徐々に増加する現象が観測された。凝集したミセルによって近赤外領域の波長の光が散乱され、透過率が低下したことに起因すると考えられる。

プロセスチーズについては溶融塩の種類によって得られたチーズの色調が違っており、SAXS プロファイルも大きく異なっていた。図 2 に示すように、ピロリン酸ナトリウムを用いた場合、クエン酸ナトリウムと比較してシャープなピークが観察され、クッキング処理時間によりピークのシフトや形状の変化がみられた。クエン酸ナトリウムを使用したものについても、クッキング時間の延長によりピークが明瞭になる変化が認められた。これまでの研究からクエン酸塩はカルシウムキレート作用によりカゼインを分散することで、リン酸塩はカゼイン間を架橋することで組織を形成すると推察されている[3]。また、クッキング中のクリーミング反応は、溶融塩の働きにより分散したカゼインサブミセルがタンパク質間の相互作用により再び会合するために起こると説明されている [1]。これらのことから、溶融塩間の散乱プロファイルの差はカゼイン間の結合様式の違いによる構造の差異を、クッキング処理によるプロファイルの経時変化はクリーミングによるサブミセルの会合度合いを表していると考えられる。

NIRS による溶融チーズ粘度の予測モデルではカゼイン分子の水和状態を反映していると示唆されるローディングが得られており、カゼイン分子のネットワーク構造変化と密接な関係がある分子間相互作用の差異が表れていると考えられた。

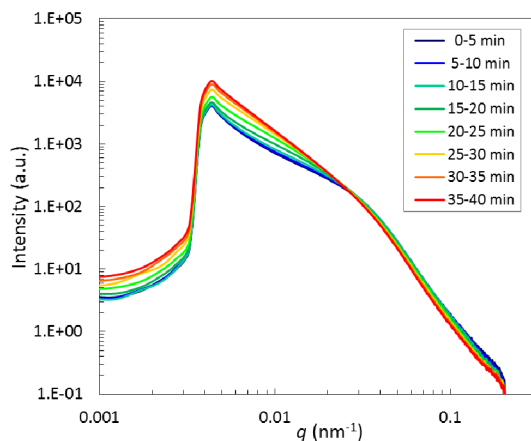


図 1. 脱脂乳のレンネット凝固過程の USAXS プロファイルの経時変化

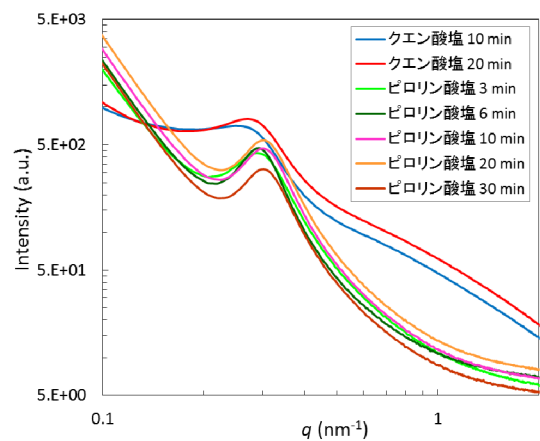


図 2. クエン酸塩およびピロリン酸塩を用いた各プロセスチーズの SAXS プロファイル

今後の課題：

今回の実験ではレンネットによるカゼインミセルの凝集およびプロセスチーズの加熱溶融工程でのカゼイン分子ネットワークの変化を捉えることができた。しかし、凝乳におけるカゼインミセルのネットワーク形成速度が速いため、今回の USAXS 測定条件ではネットワーク構造変化に十分に追従することが難しいと考えられる。解析に必要な信号強度を確保した上で露光時間を短くするなど測定条件の最適化が必要である。プロセスチーズの SAXS 測定については、冷却固化後にも構造変化が継続していることが示唆される結果となっており(SAXS と USAXS の散乱曲線が繋がらなかった)、試料の調製から測定までの取り扱いについて考慮しなければならないと考えられる。また、小角 X 線散乱のデータからネットワーク構造を類推するための解析モデルについても検討する必要がある。これらについて次回の課題申請に反映させる予定である。

参考文献：

- [1] D. J. O'Callaghan et al., *Int. J. Dairy Technol.* **55** (2), 65 (2002).
- [2] S. K. Lee et al., *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **36**, 339 (2003).
- [3] R. Mizuno, J. A. Lucey, *J. Dairy Sci.* **88**, 3411 (2005).