

# 博士論文

流動性ヨーグルトの理化学的特性に及ぼす油脂の影響

岩手大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻 食品科学連合講座

ZHU WENRUI

2024年1月

## 目次

### 第1章 緒論

- 第1節 牛乳中に存在している脂肪球およびその表面構造 1
- 第2節 流動性ヨーグルトの品質を向上する手段およびそれに伴う内部構造の変化 2
- 第3節 脂肪球の存在と流動性ヨーグルトの品質の関連性についての仮説 7

### 第2章 乳脂肪を配合した還元乳およびそれから調製した流動性ヨーグルト

- 第1節 目的 9
- 第2節 実験方法
  - 1. 試料 9
  - 2. 還元乳の調製 10
  - 3. 流動性ヨーグルトの調製 10
  - 4. 還元乳中の脂肪球の分散状態
    - 4-1. 粒子径分布 10
    - 4-2. 還元乳の微細構造の透過型電子顕微鏡観察 11
    - 4-3. 脂肪球表面構造の原子間力顕微鏡観察 12
  - 5. 還元乳の理化学的性質の測定
    - 5-1. 見かけのゼータ電位 12
    - 5-2. タンパク質の表面疎水性 12
  - 6. 流動性ヨーグルトのメソスコピック構造 12
  - 7. 流動性ヨーグルトの理化学的性質の測定
    - 7-1. 離水率 13
    - 7-2. 流動性質 13
    - 7-3. 動的粘弾性 14
  - 8. 統計処理・解析 14
- 第3節 結果および考察
  - 1. 還元乳における脂肪球の分散状態
    - 1-1. 粒子径分布 14

1-2. 還元乳の微細構造	15
1-3. 脂肪球の表面構造	19
2. 還元乳の理化学的性質	
2-1. 界面電位	22
2-2. タンパク質の表面疎水性	22
3. 流動性ヨーグルトのメソスコピック構造	24
4. 流動性ヨーグルトの理化学的性質	
4-1. 保水性	28
4-2. 流動特性	30
4-3. 動的粘弾性	30
第4節 要約	35
第3章 植物油脂を配合した還元乳およびそれから調製した流動性ヨーグルト	
第1節 目的	36
第2節 実験方法	
1. 試料	36
2. 還元乳の調製	37
3. 流動性ヨーグルトの調製	37
4. 油脂の理化学的性質の測定	
4-1. 融解・凝固, 結晶化, 結晶転移挙動	37
4-2. 固体脂含量	37
4-3. 密度	38
4-4. 油-水界面張力	38
4-5. 定常流粘度	38
5. 還元乳中の脂肪球の分散状態	
5-1. 粒子径分布	39
5-2. 還元乳の微細構造の透過型電子顕微鏡観察	39
6. 還元乳の理化学的性質の測定	

6-1. 見かけのゼータ電位	39
6-2. タンパク質の表面疎水性	39
7. 流動性ヨーグルトのメゾスコピック構造	39
8. 流動性ヨーグルトの理化学的性質の測定	
8-1. 離水率	39
8-2. 流動性質	39
8-3. 動的粘弾性	39
9. 統計処理・解析	40
第3節 結果および考察	
1. 植物油の理化学的性質	
1-1. 融解・凝固, 結晶化, 結晶転移挙動	40
1-2. 水に対する界面張力および定常流粘度	48
2. 還元乳中の脂肪球の分散状態	
2-1. 粒子径分布	48
2-2. 還元乳の微細構造の透過型電子顕微鏡観察	53
3. 還元乳の理化学的性質	
3-1. 界面電位	56
3-2. タンパク質の表面疎水性	57
4. 流動性ヨーグルトのメゾスコピック構造	60
5. 流動性ヨーグルトの理化学的性質	
5-1. 保水性	69
5-2. 流動性質	71
5-3. 動的粘弾性	75
第4節 要約	76
第4章 結論	83
引用文献	87
謝辞	92

## 第1章 緒論

### 第1節 牛乳中に存在している脂肪球およびその表面構造

生乳中に約 2.5 ~ 5 % (w/w) の脂肪分 (平均 3.5 %) が存在しており、その含量が季節および牛の泌乳期によって変化する<sup>1)</sup>。商品名が「無脂肪牛乳」として販売される商品は、遠心分離によってその脂肪分を除去し、脂肪分含量が 0.5 % (w/w) 以下のものを指す。この脂肪分は牛乳の水相において球状の油脂滴として浮遊しており、乳脂肪球 (MFG, milk fat globule) と称する。MFG の大きさと組成は乳牛の品種や泌乳期によって異なるが、天然条件では一般的に 0.1 ~ 15  $\mu\text{m}$  であると言われる<sup>2)</sup>。MFG の表面には乳脂肪球膜 (MFGM, milk fat globule membrane) と呼ばれる複雑な膜構造が存在しており、MFG の凝集を防止する役割を果たしている<sup>3)</sup>。MFGM の組成は同様に動物の品種により異なるが、一般的には 3 層のリン脂質から構成された膜に様々なタンパク質が埋め込んでいる構造を持っている<sup>4)</sup>。その内側は小胞体から分泌される時に覆われた極性リン脂質の単層膜であり、外側では上皮細胞の頂端部細胞膜から分泌される時に覆われたリン脂質二重膜である。内側の膜と外側の膜の間に 10 ~ 20 nm の空隙が存在している。タンパク質は MFGM の 25 ~ 70 % (w/w) を占めており、主要なタンパク質としてはブチロフィリン (BYN)、キサンチンオキシダーゼ (XO)、過ヨウ素酸シッフ 6, 7 (PAS 6/7、ラクトアドヘリンともいう) およびムチン 1 などの高分子量タンパク質が挙げられる。また、加熱処理によって、 $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -LG,  $\beta$ -lactoglobulin) をはじめとした水相中の乳タンパク質が共有結合あるいは疎水性相互作用を介して、MFGM に結合して MFGM の質量を増加したと報告されている<sup>5)</sup>。一方、均質化などの機械処理によって MFG の大きさが減少し、MFGM の構造も破壊される。新しく形成した MFG の界面に水相中の乳タンパク質が吸着して新しい膜構造を形成し、MFG の界面自由エネルギーを低下させる。この新しい膜構造の 90 % (w/w) 以上がカゼインであると報告されている<sup>6)</sup>。

## 第2節 流動性ヨーグルトの品質を向上する手段およびそれに伴う内部構造の変化

ヨーグルトは、乳酸菌培養物（CODEX 委員会の規定に従って、サーモフィルス菌（*Streptococcus thermophilus*）およびブルガリア菌（*Lactobacillus bulgaricus*）の2菌種を用いたもの<sup>7)</sup>）を用いて牛乳を発酵した乳製品である。発酵過程において、これらの乳酸菌は牛乳中のラクトースを分解して乳酸を生成する。そのために牛乳のpHが低下し、カゼインミセルの等電点であるpH 3.8 ~ 4.6に達する。この条件において、カゼインミセル同士が疎水性相互作用およびジスルフィド結合によって結合し、ヨーグルトの3次元ネットワーク構造を形成し、ヨーグルトに特徴的な食品テクスチャーおよび風味を形成する<sup>8)</sup>。また、ヨーグルトの喫食は健康的な生活習慣と考えられ、既に多くの健康効果と関係付けられており、例えば心血管疾患および2型糖尿病を罹患するリスクを減らし、生活習慣による長期的な体重増加を抑制する<sup>9)</sup>。さらに、ヨーグルトの発酵過程において、乳酸菌がプレバイオティクスをはじめとする健康機能性成分を合成する。これらの機能性成分が消化を助け、生体の免疫システムを活性化させると言われている<sup>10)</sup>。近年では、消費者の健康志向が高まり、健康維持に資する食品に対する需要が上昇しつつあるために、ヨーグルトの消費量が世界的に拡大している。乳製品製造業界では、低脂肪および無脂肪の発酵乳製品が人気になりつつある。しかし、脂肪含量の減少によりヨーグルトの食品テクスチャーが劣化すると言われている。ここで、乳製品における脂肪はエネルギー源以外にも重要な役割を果たしていることが知られている<sup>11)</sup>。すなわち、①必須脂肪酸や脂溶性ビタミンを提供する、②乳製品の風味およびレオロジー特性を発現するなどである。したがって、乳製品から乳脂肪を除去すると、離水、粘度の変化および風味の消失などの乳製品の品質が劣化することが報告されている<sup>12) 13) 14)</sup>。

ヨーグルトの製造工程は、原料乳の前処理、乳酸菌培養物の接種、発酵および容器充填から構成されている。ヨーグルトはその製造方法によって主に2種類に分類されている：①接種した原料乳を容器に充填してから発酵する固形ヨーグルト（後発酵型）、②タンク内で発酵を完成したカードを破碎して容器に充填する流動性ヨーグルト（前発酵型）<sup>15)</sup>。ヨーグルトの流通・

販売関係から、4 ～ 6℃で16 ～ 21日間という品質保持期限が求められているが、ある時間を経過すると粘度の低下および離水が発生する<sup>16)</sup>。特に脂肪分を減少したヨーグルトにおいて、これらの品質劣化が著しくなる。そこで、ヨーグルトの品質向上を目指して様々な添加物および加工条件が検討されている。

## 1. 添加物

ヨーグルトでの脂肪代替物として2種類の添加物が使用されている<sup>17)</sup>：①乳由来成分である乳タンパク質の粉体またはその濃縮物、②非乳由来成分である増粘安定剤。

### 1-1. 乳由来成分

ヨーグルトに添加する乳由来成分として、①脱脂粉乳(SMP, skimmed milk powder)、②乳清タンパク質粉末(WP, whey protein-based powders)、および③カゼイン成分粉末(CP, casein-based powders)が挙げられる。これらのタンパク質の添加は、いずれもタンパク質同士の分子間相互作用およびタンパク質の相対的含量を増加させることによって、発酵後のネットワーク構造の弾性率を向上させる手段である。これによって、ヨーグルトの貯蔵・流通・販売過程における望まれない構造破壊を低減し、消費者に届く商品の食品テクスチャーを保持する。SMPは費用対効果が最も高い添加物であり、ヨーグルトの生産において一般的に使用されている。この添加によって、ヨーグルトの粘度およびゲル強度が増加したと報告されている<sup>18)</sup>。しかし、SMPの高濃度添加により強い粒子感および強い発酵臭の発生が報告されている<sup>17)</sup>。近年、WPはその栄養および加工機能が注目を集めている。その添加量が全質量に対して0.6 ～ 4% (w/w)の範囲内で離水に対する抑制効果があると報告されているが、高濃度では風味の変化および粒子感の増加が問題視され、添加量1 ～ 2% (w/w)が適切であると言われる<sup>19)</sup>。特に、濃縮乳清タンパク質(WPC, whey protein concentrates)が一般的に使用されている。CPの添加ではヨーグルトの親水性および粘度を増加して離水を減少させる。適切な添加量は全質量に対して約1 ～ 2% (w/w)であると言われる<sup>20)</sup>。これらの乳タンパク質の添加では乳清タンパク質に対するカゼインの質量比率(CP/WP)が最も重要な因子である<sup>21)</sup>。すなわち、この

比率が小さいほど、ヨーグルトの内部構造が緻密になり、離水に対する抑制効果が向上すると報告されている。

## 1-2. 非乳由来成分

ヨーグルトに添加する非乳由来成分は、主にヒドロコロイドおよび澱粉である。これらの増粘安定剤は食品テクスチャーの向上および商品寿命の延長のために様々な食品製造に使用されている。ヒドロコロイドに属している親水性の高分子化合物は、分枝する長い分子鎖が水和しやすく、水の流動を抑制するために、ヨーグルトの離水に対する抑制効果が優れている。しかし、ヨーグルトに添加されるヒドロコロイドは、その帯電性により効果が異なる。ヨーグルトのpHがカゼインミセルの等電点付近であるために、アニオン性のヒドロコロイド（例えば、キサンタンガム、 $\kappa$ -カラギーナン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース）は、カゼインミセルの表面にある正電荷部位と相互作用し、より緻密なネットワーク構造を形成する<sup>22)</sup>。一方、中性のヒドロコロイド（例えば、グアーガム、ローカストビーンガム）は、主に連続相（水相）の粘度を増加させるために、ヨーグルトのネットワーク構造に影響を及ぼさない<sup>23)</sup>。現段階では、ゼラチンがヨーグルトの離水を抑制するに最も有効なヒドロコロイドであると言われている<sup>23)</sup>。また、澱粉および加工澱粉では、澱粉粒の膨潤によってヨーグルトの粘度を増加し、離水を抑制するといわれている<sup>24)</sup>。

## 2. 加工条件

### 2-1. 加熱処理

ヨーグルトの製造過程における加熱処理の目的は、主に乳清タンパク質の変性および病原性微生物の死滅にある。その他、牛乳中の酵素（リパーゼ、プロテアーゼなど）を失活させ、脂質の酸化を抑制する効果も挙げられる。牛乳中の乳清タンパク質は主にウシ血清アルブミン（BSA, bovine serum albumin）、 $\alpha$ -ラクトアルブミン（ $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -lactalbumin）および $\beta$ -ラクトグロブリン（ $\beta$ -LG,  $\beta$ -lactoglobulin）に分類されている。これらの乳清タンパク質を加熱すると、タンパク質の高次構造が変化（アンフォールディング）してペプチド鎖間に新しい結



合が形成される。BSAは52℃からアンフォールディングし、66℃で凝集する。 $\alpha$ -LAは66℃付近でアンフォールディングするが、凝集体を形成するには高温で長時間の加熱が必要である。 $\beta$ -LGの熱変性はかなり複雑であり、加熱条件によって多段階で行う<sup>25)</sup>。生理的状态では、 $\beta$ -LGのモノマーと二量体が存在し、ある平衡（二量体が多い）を保っている。40℃以上に加熱すると、この平衡はモノマーの方向に移動する。そして、65℃になると $\beta$ -LGが可逆的に変性する。不可逆な変性を起こすためには、高い熱負荷を与える必要がある。 $\beta$ -LG単体のアンフォールディングによりCys121の遊離チオール基が露出し、他の単体のチオール・ジスルフィド結合との置換反応を繰り返す。疎水性相互作用または静電相互作用を通して自己凝集反応を行う。さらに、形成した自己凝集体は他のタンパク質（他の乳清タンパク質、カゼインミセルまたはMFGM上のタンパク質）と結合する。特に、90℃以上に加熱するとこの凝集反応の活性化エネルギーが著しく低下し、二次反応となる<sup>26)</sup>。したがって、熱変性した乳清タンパク質およびその凝集体がカゼインミセルおよびMFGの表面に結合し、これらの表面疎水性を増加し、カゼインミセルと結合する場を提供する。それによって、乳タンパク質間の相互作用が強くなり、ネットワーク構造が強くなり、粘度、保水性および粒子感が良好なヨーグルトを形成する。この加熱処理では、乳清タンパク質の変性程度を制御因子として使用し、加熱条件が85℃/30分間または95℃/5分間が最適であると言われる<sup>27)</sup>。

## 2-2. 均質化処理

均質化処理はせん断によってMFGを小さくして分散させて浮上を防止する処理である。これによってMFGの比表面積が増加し、より多くの乳タンパク質を吸着できる。したがって、乳タンパク質間の相互作用が増加し、滑らかなヨーグルト構造を形成すると言われる<sup>28)</sup>。一方、牛乳の予備加熱温度は乳清タンパク質の熱変性の程度に関わるので、MFGMと乳タンパク質間の連結に影響を及ぼす。したがって、加熱処理と均質化処理の順番が重要であるといわれるが、その詳細はいまだに解明されていない。乳製品における均質化処理は、通常10～30MPa（1段階または2段階）、55～65℃で行われている。適切な均質化処理はヨーグルトの食品テク

スチャーを向上させ、貯蔵期間中の離水を有効に抑制できるために、ヨーグルトの製造工程では原料乳を均質化処理するのが一般的である。しかし、均質化処理の強いせん断は MFGM を破壊し、MFG の界面構造をも変化させる。同時に、MFG の比表面積が増加するために、新しい脂肪球界面が発生する。水相中の乳タンパク質が新しく形成された MFG 界面に吸着し、その界面自由エネルギーを低下させる。

### 2-3. 発酵工程

発酵工程では乳酸菌が増殖し、ラクトースを乳酸に変換して原料乳の pH を低下させる工程である。この工程にかかわる因子はかなり多く、発酵の温度、時間、および乳酸菌培養物の種類、接種量、代謝活性などの全てがヨーグルトの品質に影響を及ぼす。一般的に、42 ~ 45 °C の発酵温度が採用されている<sup>29)</sup>。高い発酵温度は乳タンパク質のゲル化を加速し、コロイド状リン酸カルシウムの溶解が不十分となり、製品の離水を増加すると報告されている<sup>12)</sup>。同様の理由で、乳酸菌培養物では代謝活性が高いものを使用すると貯蔵期間での離水が増加する。また、一部の乳酸菌は細胞外多糖類 (EPS, exopolysaccharide) を合成できる。合成された EPS は天然的な増粘安定剤となり、ヨーグルトの離水を抑制し、新しい食品テクスチャー (とろみなど) を付与する効果が期待される。EPS は莢膜 EPS と粘液 EPS の 2 種類に分けられるが、粘液 EPS を合成する菌株を用いて調製したヨーグルトは、より優れた離水抑制効果を示したと報告されている<sup>30)</sup>。一方、EPS 生産菌を使用したヨーグルトは、タンパク質と多糖類の排他性 (incompatibility) により硬さが低下すると報告されている<sup>31)</sup>。

### 2-4. 冷却処理

ヨーグルトが pH 4.6 に達すると、直ちに 5 °C まで冷却して乳酸菌の活性を低下させる必要がある。最近の研究では、直接に 10 °C まで冷却するよりも、15 ~ 20 °C まで冷却してから 10 °C に冷却するという 2 段階の冷却処理の方がヨーグルトの離水を減少させるといわれている<sup>32)</sup>。また、冷却処理の条件は、分散している油脂の結晶化、乳タンパク質凝集体のネットワーク構造の冷却による収縮に伴う内部圧力の変化などにも影響を及ぼすが、これらの課題に対

する検討が欠如している。

以上のことから、ヨーグルトの本来の風味および食品テクスチャーを保ちつつ、その脂肪含量および摂取エネルギーを可能な限り減少することが現在の乳製品製造において重要な課題である。

### 第3節 脂肪球の存在状態と流動性ヨーグルトの品質の関連性についての仮説

近年では、均質化処理をはじめとする機械的処理によるカゼインミセルと MFG 間の相互作用の変化が注目を集めている。Obeid ら<sup>33)</sup>が原子間力顕微鏡を用いて、均質化処理前後の MFG とカゼインミセル間の相互作用を検討し、MFG 界面に対するカゼインミセルの接着力が著しく増加したと報告している。したがって、MFG の存在はその界面に吸着している乳タンパク質（特にカゼインミセル）を介してヨーグルトのネットワーク構造と相互作用し、これによってヨーグルトの理化学特性に影響を及ぼすと考えられるが、その詳細が十分に解明されていない。

一方、食用油脂の主成分がアシルグリセロールであり、その起源によって植物油脂、動物油脂に分類される。油脂の種類によって構成脂肪酸の種類、含量およびエステル結合位置などが異なり、物理的、化学的、栄養学的性質が変化するために、乳製品に存在する油脂は製品の理化学的性質、レオロジー的性質、食品テクスチャーおよび微生物の安定性に著しい影響を及ぼす。したがって、油脂と乳タンパク質間の相互作用に対する理解を深める観点から、植物油脂を使用して流動性ヨーグルトの理化学的性質に対する油脂の性質による影響を検討する必要がある。乳製品における植物油脂の利用は、ホイップクリームやマーガリンなどで適用されている。しかし、植物油脂の理化学的性質および加工適性が乳脂肪とは異なるために、乳脂肪を使用したものと同等な品質を有する商品の製造は困難である。

そこで、本研究では脱脂粉乳および異なる種類の食用油脂を用いて還元乳を調製し、還元乳の理化学的性質に対する油脂の種類の影響、および還元乳から調製した流動性ヨーグルトの理化学的性質と乳タンパク質の凝集構造を検討し、流動性ヨーグルトの理化学的性質に及ぼす油

脂の種類，分散状態およびヨーグルトでの乳タンパク質の凝集構造の形成過程に油脂が果たす機能の影響を明らかにすることを目的とした。

## 第2章 乳脂肪を配合した還元乳およびそれから調製した流動性ヨーグルト

### 第1節 目的

脱脂粉乳，および乳脂肪を用いて均質化条件を変化させて乳脂肪球の分散状態が異なるように調製した還元乳を使用して流動性ヨーグルトを調製した。そして、その理化学的性質と微細構造を検討して流動性ヨーグルトの理化学的性質に対する乳脂肪球の分散状態の影響および乳タンパク質の凝集過程に果たす乳脂肪球の役割を明らかにすることを試みた。

### 第2節 実験方法

#### 1. 試料

還元乳ならびに流動性ヨーグルトの調製には，脱脂粉乳（明治脱脂粉乳，(株)明治），乳酸菌培養物 (Freeze-dried non-ropy-producing yogurt culture, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* (YC-X11 Yo-Flex), Chr. Hansen A/S, Denmark) およびスクロース（試薬特級，富士フイルム和光純薬(株)）を用いた。乳脂肪には，無塩バター（明治バター，(株)明治）を 60 °C に設定した恒温水槽（NTT-1200，東京理科器械(株)）内に 20 分間静置して融解し，上層部から採取した液体乳脂を用いた。共焦点レーザー顕微鏡観察（CLSM, confocal laser scanning microscopy）のケイ光標識試薬として，FITC（Fluorescein isothiocyanate, Sigma-Aldrich Corp.）および Nile red（病理研究用，富士フイルム和光純薬(株)）をそれぞれ 0.1 % (w/w) エタノール溶液にして使用した。透過電子顕微鏡観察（TEM, Transmission electron microscopy）用試料の前処理に，還元乳の包埋材料として粉末寒天（かんでんクック，伊那食品工業(株)）を用いた。TEM の鉛染色液は，終濃度がそれぞれ 0.4, 0.3, 0.3, 2 % (w/w) になるように，クエン酸鉛，硝酸鉛，酢酸鉛およびクエン酸ナトリウムを 410 mL 蒸留水に加え，1 M 水酸化ナトリウム水溶液を 90 mL 加えて溶解した<sup>34)</sup>。

## 2. 還元乳の調製

12 % (w/w) 脱脂粉乳, 6 % (w/w) スクロースになるように脱塩水を加えて, 攪拌・溶解し, 還元脱脂乳を調製した。次に, この還元脱脂乳を 60 °C に設定した恒温水槽 (NTT-1200, 東京理化学器械(株)) 内に移し, マグネチックスターラーを用いて攪拌しながら, 全質量に対して 3 % (w/w) に相当する液体乳脂を加えた。高速せん断装置 (T.K.AUTO HOMO MIXER, プライミクス(株)) を用いて 70 °C, 1,500 rpm で 15 分間予備分散してから, バルブ式ホモジナイザー (APV LAB1000, SPX フローテクノロジー ジャパン(株)) を用いて 70 °C で 8 パスの均質化処理を経て, 乳脂肪を分散させた。なお, 乳脂肪の分散過程では, 均質化圧力が 5, 10, 15, 20, 25 MPa という 5 水準に設定した均質化条件によって乳脂肪の分散状態が異なる還元乳試料を調製した。均質化した還元乳を循環式恒温水槽 (HAAKE DC10, Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて 90 °C まで加熱し, 5 分間保持して加熱殺菌した。その後は, 直ちに氷浴で冷却した。そして, 調製した還元乳を供試まで 5 °C で保存した。

## 3. 流動性ヨーグルトの調製

還元乳に対して 0.015 % (w/w) の乳酸菌培養物を加え, 43 °C に設定したプログラム精密低温恒温水槽 (NCB-2100, 東京理化学器械(株)) 内で 5 時間培養した。発酵を停止するために, ヨーグルトを 72 °C に設定した恒温水槽に収納し, 10 分間保持して加熱殺菌した。そして, 氷浴で冷却したヨーグルトが壁面と分離するようにガラス棒で攪拌し, 攪拌機 (MAZELA NZ-1000, 攪拌子: アンカー翼(オールテフロン (イカリ型) T-1A 型, W 60 × H 40 mm), 東京理化学器械(株)) を用いて, 500 rpm で 5 分間攪拌して凝集物を解砕してから, 広口サンプル瓶 (マヨネーズ 450, φ 80 × H 129.5 mm, 日本山村硝子(株)) に充填して 5 °C で保存した。

## 4. 還元乳中の脂肪球の分散状態

### 4-1. 粒子径分布

光散乱・回折型粒度分布測定装置 (コールター L230 型, ベックマン・コールター(株)) を用いて還元乳の粒子径分布を測定した。すなわち, 分散媒である脱塩水をフローセルに充填して循

環させ、室温での PIDS (偏光散乱強度差, polarization intensity differential scattering) が 15 % 以下になってから、PIDS が 45 ~ 50 % になるように適量の試料をフローセル試料導入部に注入し、循環している分散媒に対して均質に分散したら直ちに試料の粒子径分布を 90 秒間だけ測定した。

#### 4-2. 還元乳の微細構造の透過型電子顕微鏡

透過型電子顕微鏡 (TEM JEM-2100, 日本電子(株)) を用いて、還元乳のタンパク質と脂肪球の形状、構造および分散・凝集状態を観察した。前処理では、還元乳の包埋処理 (アガーチューブ法) は Kalab の方法<sup>35)</sup>を参考にして処理した。すなわち、終濃度が 3 % (w/w) になるように粉末寒天を脱塩水に分散し、5 分間だけ沸騰浴で処理した。溶解した寒天溶液を 60 °C に設定した恒温水槽内に設置し、マグネチックスターラーによって攪拌しながら供試した。パスツールピペットに適量の試料を吸い込み、出口に少量の寒天ゾルを付着させて室温下で冷却して寒天ゲルを形成させた。次に、冷却したパスツールピペットを寒天溶液に浸漬し、ガラス表面にアガーチューブを形成させた。アガーチューブからパスツールピペットを取り出し、同時に試料をアガーチューブに注入した。最後に、余りの寒天ゲルを切除し、切断面を綺麗に拭いてから、一滴の寒天溶液で封入した。そして、アガーチューブに入れた還元乳の前処理を岩手大学電子顕微鏡室に依頼した。まず、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 2.5 % (v/v) グルタルアルデヒドに前述のアガーチューブを浸漬し、一夜かけて固定した。次に、同濃度のリン酸緩衝液で 2 回洗浄し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 2 % 四酸化オスミウムを用いて 1 時間だけ固定した。そして、濃度 50, 70, 80, 90, 95, 100, 100, 100 % (v/v) のアルコール系列を用いて化学固定された試料を脱水してからエポキシ樹脂で置換した。以上の手順で処理した試料をエポキシ樹脂に包埋し、ミクロトーム (Ultra Cut S, Leica microsystems GmbH) を用いて厚さが約 100 nm の切片にして観察に用いた。なお、観察する前に切片を 2 % (w/w) 酢酸ウラン水溶液で 15 分間染色し、続いて項目 1 に記載した鉛染色液を用いて 3 分間だけ染色した。

#### 4-3. 脂肪球表面構造の原子間力顕微鏡観察

50 °C の還元乳と 50 %(w/w)スクロース水溶液を 2 : 1(w/w)で混合し、試料の密度を調整した。次に、5 %(w/w)スクロース水溶液を 20 g 入れた 50 mL 遠心管の底部に前述した混合液を約 5 mL 緩やかに注入し、小型高速冷却遠心機 (M201-1VD7, (株)佐久間製作所) を用いて 2,600 × g, 20 °C で 15 分間遠心分離した。浮上した脂肪分を収集し、薄い脂肪層になるように、スライドガラスの表面にステンレス鋼製薬さじの平型へらを用いて塗布した。そして、シリカゲルを設置したデシケーター内にこのスライドガラスを収納し、室温で 24 時間乾燥した。乾燥したスライドガラスを適切な大きさに切断し、原子間力顕微鏡 (AFM, atomic force microscope, NX-10, Park Systems Corp.) を用いて観察した。取得した画像を画像処理・解析ソフトウェア (XEI, Park Systems Corp.) で処理・解析した。

#### 5. 還元乳の理化学的性質の測定

##### 5-1. 見かけのゼータ電位

ゼータ電位・粒径測定システム (ELSZ-1000ZS, 大塚電子(株)) を用いて還元乳 25 °C における見かけのゼータ電位を測定した。なお、試料の濃度が測定に適切になるように、脱塩水を用いて還元乳を 20 倍希釈してからフローセルに充填して測定に供した。

##### 5-2. タンパク質の表面疎水性

還元乳の表面疎水性 (PSH, Protein surface hydrophobicity) を、Bonomi らの方法<sup>36)</sup>に従って測定した。すなわち、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で 10 倍希釈した還元乳試料に 1,8-ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid, MP Biomedicals LLC,  $\lambda_{ex} = 390 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 480 \text{ nm}$ ) を終濃度が 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$  になるように添加し、分光蛍光光度計 (RF-5300, (株)島津製作所) を用いて蛍光強度を測定し、滴定曲線を作成した。1,8-ANS の滴定曲線から最大蛍光強度 [ $F_{max}$ ] と解離定数 [ $K_d$ ] を算出し、乳タンパク質の表面疎水性 [ $F_{max}/K_d$ ] を求めた。

#### 6. 流動性ヨーグルトのメソスコピック構造



流動性ヨーグルトのメゾスコピック構造を、共焦点レーザー走査顕微鏡（C2si, 株式会社ニコン）を用いて観察した。観察する前に、FITC ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$ ) を 1 % (v/v) 加えてタンパク質をケイ光染色し、次に Nile red ( $\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 595 \text{ nm}$ ) を 1 % (v/v) 加えて脂質をケイ光染色した。染色した試料をホールスライドガラスに約 30  $\mu\text{L}$  を採取し、カバーガラスで被覆して、レンズオイルを塗布した 100 $\times$  対物レンズで観察し、3 つの異なる観察領域 (H 127.28  $\times$  W 127.28  $\times$  T 4.9  $\mu\text{m}$ ) から、視野の下端から上端方向へ 0.1  $\mu\text{m}$  間隔で、それぞれの観察領域から画像 50 枚を取得した。そして、取得した顕微鏡画像を画像解析ソフトウェア (ImageJ 1.52p, National Institutes of Health, USA) を用いて 3 次元画像に合成して、画像処理・解析して、凝集粒子および脂肪球の平均体積 ( $\overline{V_{ag}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N V_{ag_i}$ , ここで、 $i$  は対象粒子の番号、 $N$  は画像認識された対象粒子の個数、 $V_{ag_i}$  は画素数から算出した  $i$  番目の対象粒子の体積)、単位体積当たりの比表面積 ( $\frac{\overline{S_{ag}}}{\overline{V_{ag}}}$ , ここで、 $\overline{S_{ag}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N S_{ag_i}$ , なお、 $S_{ag_i}$  は画素数から算出した  $i$  番目の対象粒子の表面積)、体積分率 ( $\phi_{vol} = \frac{1}{V_{Total}} \sum_{i=1}^N V_{ag_i}$ , ここで、 $V_{Total}$  が観察領域の容積 (本研究において 81,000  $\mu\text{m}^3$  を使用する)) およびフラクタル次元 ( $D_f$ ) を計算した。なお、フラクタル次元の計算にはボックスカウント法<sup>37)</sup>を適用した。

## 7. 流動性ヨーグルトの理化学的性質の測定

### 7-1. 離水率

小型高速冷却遠心機を用いて、適量のヨーグルト (約 20 g) を 100  $\times$  g (1,300 rpm), 5  $^{\circ}\text{C}$  で 15 分間遠心分離し、透明な上清液を採取した。そして、上清液の質量 [ $M_w$ ] と遠心分離前の試料質量 [ $M$ ] を秤量し、ヨーグルトの離水率 [ $M_w/M$ ] を算出した。

### 7-2. 流動特性

コーン・プレート型治具 (コーン直径: 25 mm, コーン角度: 1 deg, 先端カット量: 23  $\mu\text{m}$ , プレート直径: 25 mm) を装着した動的粘弾性測定装置 (ARES-G2, TA Instruments – Waters LLC) を用いて、5  $^{\circ}\text{C}$  でせん断速度を 0.1  $\text{s}^{-1}$  から 200  $\text{s}^{-1}$  まで 100 秒間で直線的に上昇させた後、直ちに 200  $\text{s}^{-1}$  から 0.1  $\text{s}^{-1}$  まで 100 秒間で直線的に下降させてせん断速度依存性試験をし

た。得られたデータを統計解析ソフトウェア（Origin 2020b, OriginLab Corp.）を用いて、ベキ乗則流動方程式（ $\sigma = k\dot{\gamma}^n$ ,  $\sigma$  はせん断応力,  $\dot{\gamma}$  はせん断速度）に当てはめて、粘稠性定数（ $k$ ）および流動性指数（ $n$ ）を求めて、試料の流動性を評価した。そして、試料の流動性のヒステリシスを評価するために、流動曲線に囲まれた図形の面積（ $A_{hys} = A_{up} - A_{down}$ ,  $A_{up}$  は上向曲線の下部領域の面積,  $A_{down}$  は下向曲線の下部領域の面積）およびチキソトロピー指数（ $TI = (A_{up} - A_{down}) / A_{up}$ ）を算出した。

### 7-3. 動的粘弾性

コーン・プレート型治具を装着した動的粘弾性測定装置を用いて、5 °C における試料の動的粘弾性を測定した。まず、周波数が  $6.28 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  (1 Hz) で、ひずみを  $1.0 \times 10^{-4} \sim 2.5$  に変化させるひずみ依存性試験をし、試料の動的粘弾性の線形範囲を判断した。次に、弾性限界ひずみの 80 % に相当するひずみを試料に負荷し、角周波数 ( $\omega$ ) を  $0.1 \sim 100 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $1.59 \times 10^{-3} \sim 15.9 \text{ Hz}$ ) まで変化させる周波数依存性試験を行い、貯蔵弾性率 ( $G'$ )、損失弾性率 ( $G''$ ) および力学的損失正接 ( $\tan \delta = G''/G'$ ) を求めた。さらに、動的粘弾性の角周波数依存性をベキ乗則で解析した。

$$G' = A\omega^B \quad (1)$$

ここで、 $A$  はゲル強度を反映する臨界定数であり、 $B$  は緩和モードの分布を反映する緩和指数である。

## 8. 統計処理・解析

全ての結果を統計解析ソフトウェア（IBM SPSS Statistics Ver. 27, 日本アイ・ビー・エム株）にて統計処理・解析した。一元配置の分散分析（ANOVA, Analysis of variance）にて試料の要因効果を検討し、有意水準 5% の Tukey の多重比較を用いて平均に対する有意差を検定した。

### 第3節 結果および考察

#### 1. 還元乳における脂肪球の存在状態

### 1-1. 粒子径分布

還元脱脂乳の粒子径分布は単峰性であり、観察された  $0.1\ \mu\text{m}$  のピークはカゼインミセル ( $50\sim 500\ \text{nm}$ ) によるピークであると考えられる。一方、乳脂肪を分散させた還元乳ではいずれも多峰性であり、特徴的なピークが3つが存在した (Fig. 1)。まず、還元脱脂乳と同様に、 $0.1\ \mu\text{m}$  のピークはカゼインミセルのピークであると考えられる。次に、 $0.5\ \mu\text{m}$  のピークは5 MPaで均質化した試料を除く還元乳の粒子径分布において最も大きなピークであり、均質化した還元乳に存在している乳脂肪が主に粒子径  $0.5\ \mu\text{m}$  前後の粒子として存在していることを示唆している。一方、粒子径  $2\ \mu\text{m}$  のピークは還元乳に分散している大きい脂肪球であり、5 MPaで均質化した還元乳では主にこの粒子径で存在している。また、このピークは均質化圧力の増加と共に減少し、15 MPa以上では消失した。そして、還元乳の体積平均径は均質化圧力と負の相関があった (Table 1)。以上のことから、均質化処理した還元乳に存在している脂肪球は粒子径  $0.5\ \mu\text{m}$  前後であり、均質化圧力の増加につれて、大きな脂肪球 ( $\sim 2\ \mu\text{m}$ ) が裂断され、小さい脂肪球の割合が増加したために試料の体積平均粒子径が減少した。

### 1-2. 還元乳の微細構造

重金属で染色されたタンパク質は電子線が透過しにくいため、黒い TEM 画像になった。一方、脂肪球の内部を染色することができないため、脂肪球は白い球体に見える。還元乳に存在している多くのカゼインミセルは均質化条件にかかわらず、粒子径  $200\ \text{nm}$  前後の球体であった (Fig. 2)。一方、観察された脂肪球は、粒子径  $200\ \text{nm}$  前後のものが最も多かったが、均質化圧力が15 MPa以上の試料では、小さい脂肪球 (粒子径  $100\ \text{nm}$  以下) が多く見られた。脂肪球界面には乳タンパク質の吸着層が存在し、特に脂肪球に対するカゼインミセルの吸着様式には脂肪球の大きさによって3種類の様式があることを確認した。①粒子径が  $200\ \text{nm}$  以上の脂肪球はカゼインミセルに比べてはるかに大きかったため、多数のカゼインミセルが吸着していた。この大きさの脂肪球は球状を保持できず、粒子径分布測定における粒子径  $2\ \mu\text{m}$  のピークに相当すると思われる。②粒子径が  $100\sim 200\ \text{nm}$  の脂肪球はカゼインミセルとほぼ同じ

大きさであり、球形に近い形状であった。その大きさがカゼインミセルに近いため、吸着して

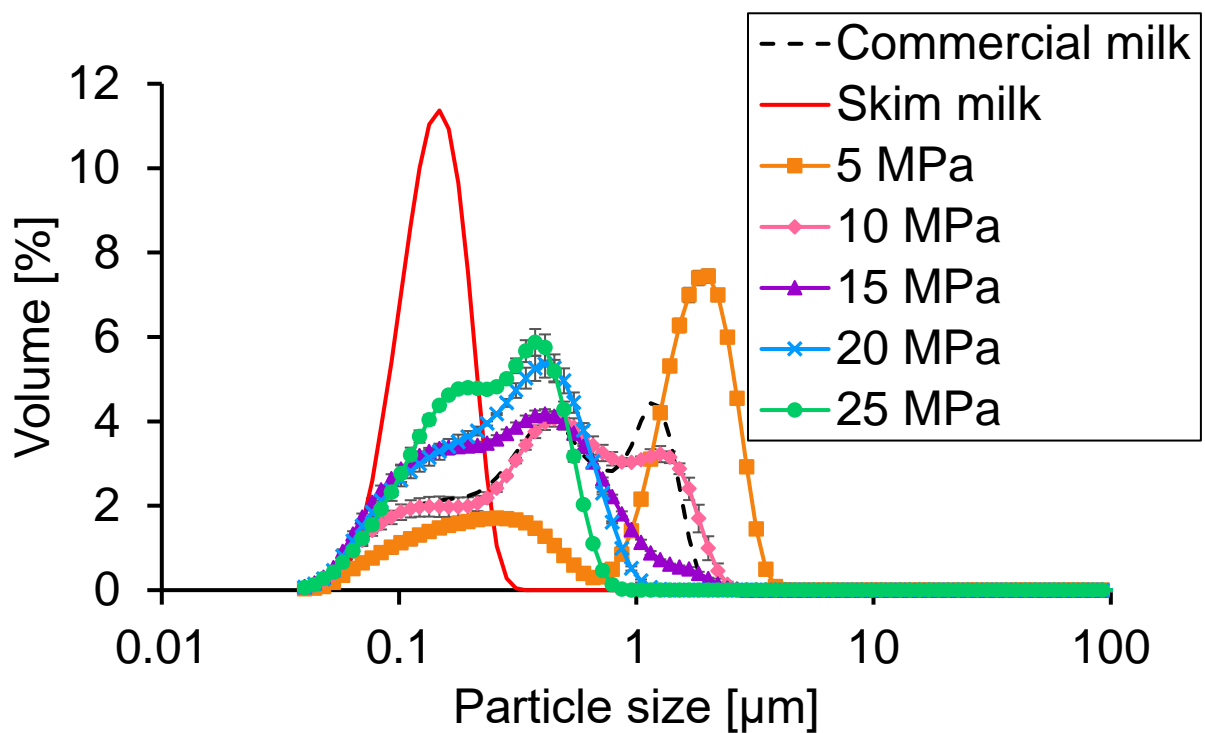


Fig. 1 Particle size distribution of milk samples: commercial milk for reference (dashed line, black), reconstituted skim milk (solid line, red), reconstituted milk with milk fat homogenized at pressure of 5 (square, orange), 10 (diamond, pink), 15 (triangle, purple), 20 (cross, blue), and 25 MPa (circle, green).

**Table 1** Physicochemical properties of reconstituted milk.

Homogenization pressure [MPa]		Mean volume diameter [ $\mu\text{m}$ ]	Zeta potential [mV]	$F_{\text{max}}$ [-]	$K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	PSH
1st stage	2nd stage					
5	<1	1.420 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>	-25.91 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	235.49 $\pm$ 20.83 <sup>a,b</sup>	53.81 $\pm$ 15.74 <sup>a</sup>	4.59 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>
10	1	0.642 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>	-28.58 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	247.80 $\pm$ 23.26 <sup>b</sup>	47.80 $\pm$ 20.34 <sup>a</sup>	5.62 $\pm$ 1.55 <sup>a,b</sup>
15	>1, <2	0.397 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	-29.23 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	192.78 $\pm$ 2.09 <sup>a</sup>	25.60 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>	7.54 $\pm$ 0.36 <sup>a,b</sup>
20	2	0.336 $\pm$ 0.006 <sup>d</sup>	-32.27 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	246.31 $\pm$ 3.46 <sup>b</sup>	47.31 $\pm$ 3.92 <sup>a</sup>	5.24 $\pm$ 0.53 <sup>a,b</sup>
25	>2, <3	0.284 $\pm$ 0.007 <sup>e</sup>	-28.56 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	239.07 $\pm$ 21.67 <sup>b</sup>	31.65 $\pm$ 7.89 <sup>a</sup>	7.80 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>

Mean  $\pm$  Standard deviations ( $n = 3$ )

$F_{\text{max}}$ , maximum of fluorescence intensity;  $K_d$ , dissociation constant PSH, protein surface hydrophobicity.

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

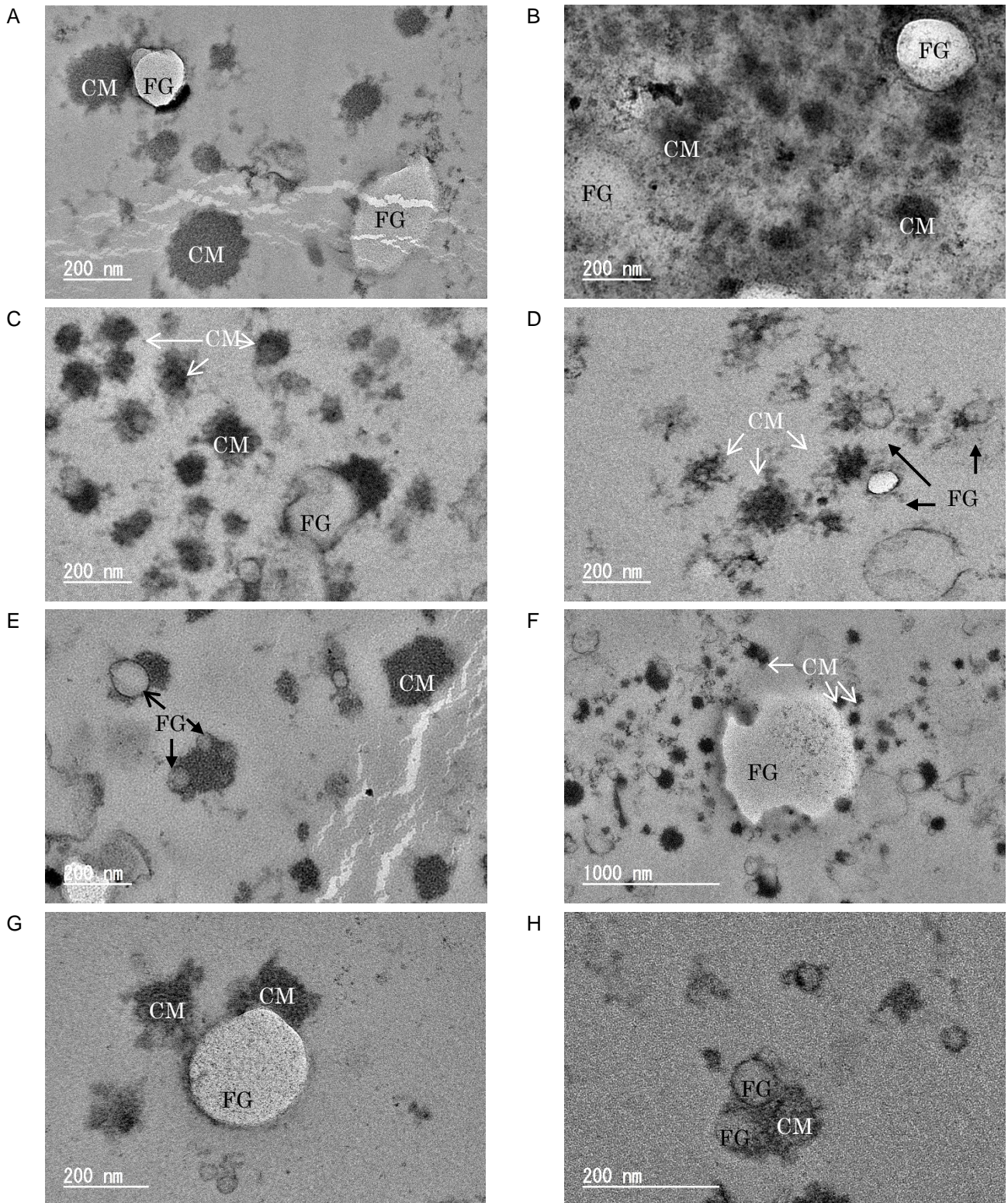


Fig. 2 Microstructure of reconstituted milk homogenized at pressure of 5 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D) and 25 MPa (E) observed by transmission electron microscope, and typical fat globules were shown in (F) to (H). CM represents casein micelles, and FG represents fat globules, respectively. Scale bars represent 200 nm in (A, B, C, D, E, G and H) and 1,000 nm in (F).

いるカゼインミセルが数個のみが観察され、粒子径分布測定における粒子径 0.5  $\mu\text{m}$  のピークに相当すると思われる。③粒子径 100 nm 以下の脂肪球はカゼインミセルの平均大きさよりも小さいため、カゼインのサブミセルや乳清タンパク質の凝集体などの小さい粒子の吸着によってその界面を維持していると思われる。この状態では 1 個のカゼインミセルの表面に複数の脂肪球が吸着し、粒子径分布測定における粒子径 0.1  $\mu\text{m}$  のピークに相当すると思われる。以上のことから、均質化圧力の増加に伴い、粒子径が 200 nm 以上の脂肪球がより小さい脂肪球に裂断され、脂肪球の単位体積当たりの比表面積が増加したために、脂肪球界面に吸着しているカゼインミセルも増加したと考えられる。その結果、比較的安定な状態である粒子径が 100 ~ 200 nm の脂肪球が増加した。このことから、還元乳中の脂肪球の分布が不連続に変化し、脂質-タンパク質複合体の構造が均質化圧力の上昇と共に変化していくことを示唆している。しかし、15 MPa 以上の均質化条件では、せん断がかなり強いために、粒子径 100 nm 以下の脂肪球も増加した。このようなカゼインミセルの表面に吸着している脂肪球の増加によって、カゼインミセル同士の相互作用が阻害される可能性が考えられた。

### 1-3. 脂肪球の表面構造

AFM 画像から直径 0.2 ~ 2  $\mu\text{m}$  の球状構造が多数観察され (Fig. 3), 項目 1-1 で述べた結果と一致した。さらに、乳脂肪球の表面には微細な突起 ( $\phi < 0.2 \mu\text{m}$ ) が観察され、乳脂肪球に吸着している乳タンパク質であると考えられた。カンチレバーを振動させながら掃引するというノンコンタクトモードで位相の遅れを測定するという手法は、プローブと試料表面との相互作用を評価する有用な手法であると言われる<sup>38)</sup>。すなわち、カンチレバーの探針が硬い表面や吸着物の少ない表面の極近傍に位置すると位相の遅れが小さくなるが、逆にそれらがなければ位相の遅れが増加するので、試料表面の弾性または吸着状態の変化を検知することができる。乳脂肪の組成は動物の品種や泌乳期により変化するが、一般的に 20  $^{\circ}\text{C}$  では固体脂含量が高い状態であり、40  $^{\circ}\text{C}$  で完全に融解する。測定条件である 20 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$  では、乳脂肪が結晶化したために、脂肪球表面の AFM 画像の位相遅れが小さいと思われる。しかし、還元乳の調



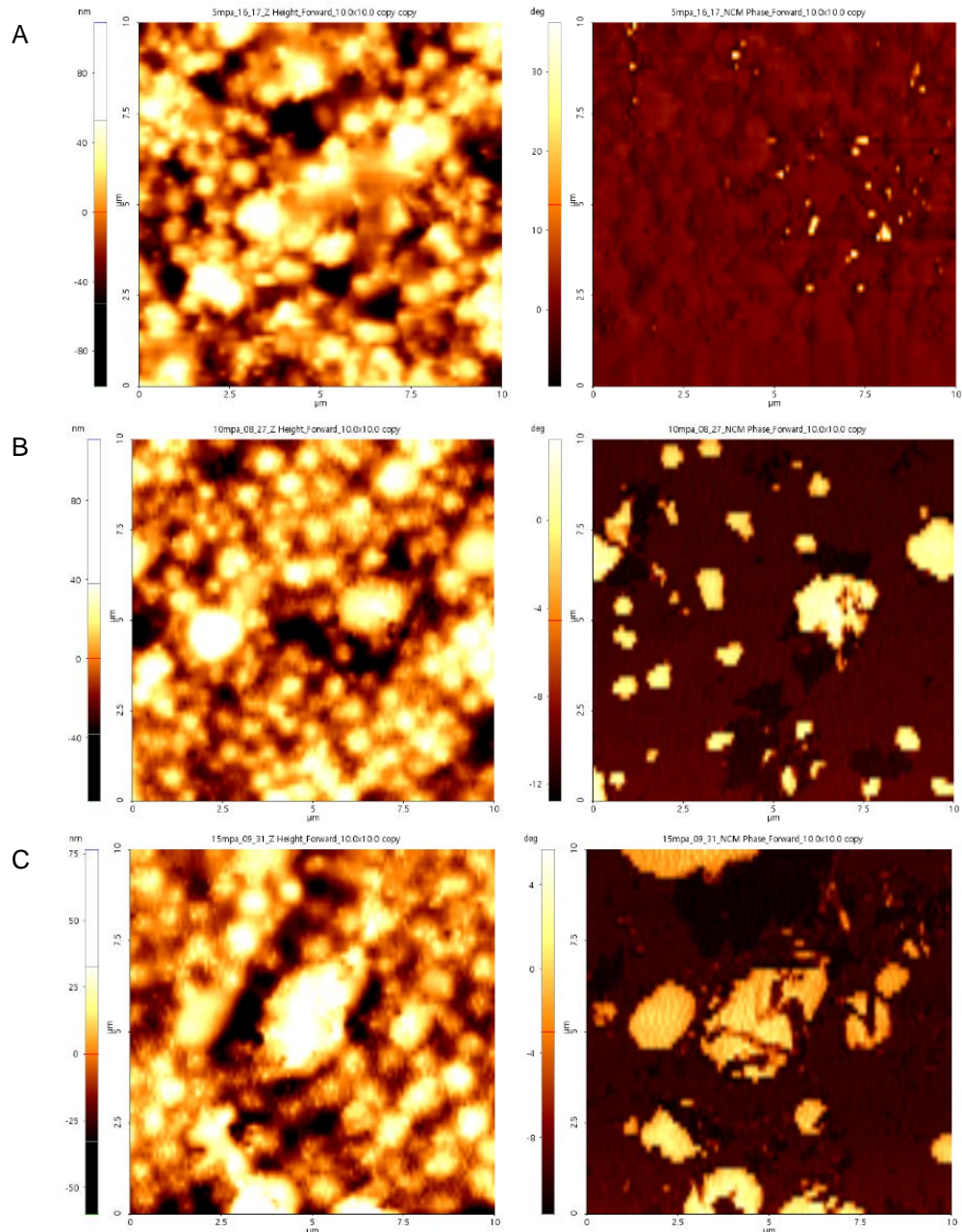


Fig. 3 Surface structure of fat globules of reconstituted milk homogenized at pressure of 5 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D), and 25 MPa (E) observed by atomic force microscope scanning forward in a  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  region. Left column shows the height difference, and right column shows the phase lag angle images.

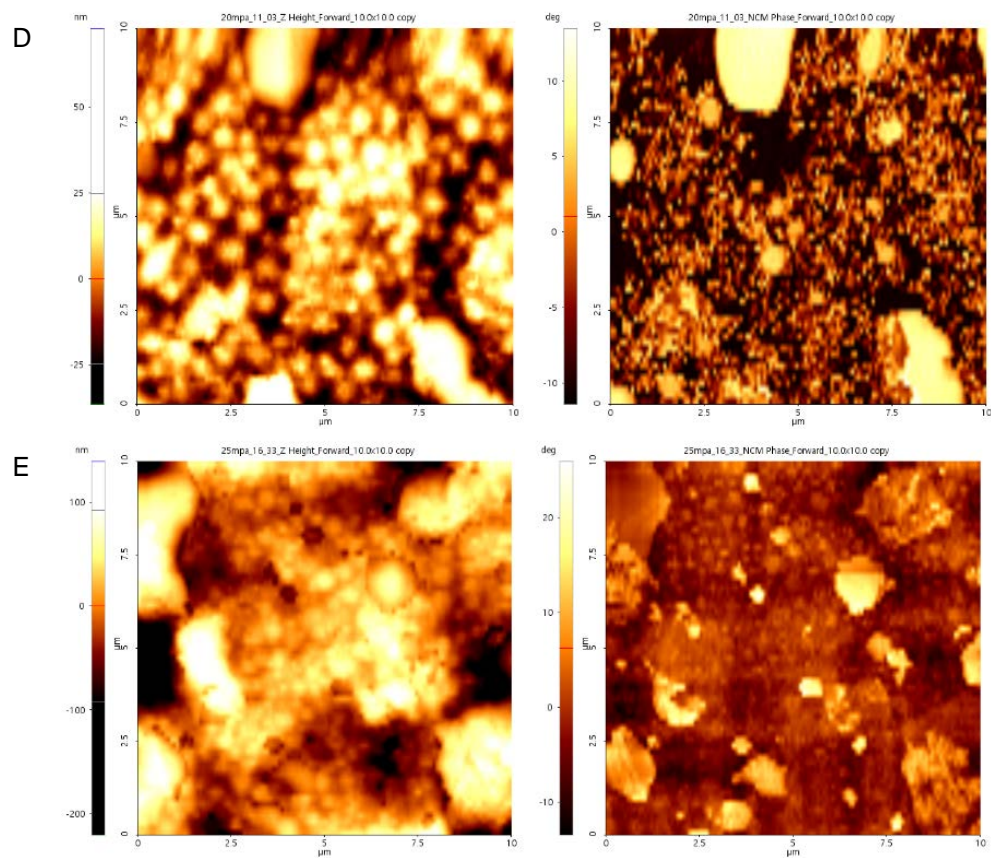


Fig 3. (Continued).

製における均質化圧力が高い場合には、大きな位相遅れを示す明るい領域が拡大した。したがって、均質化圧力の上昇につれて脂肪球表面に対する乳タンパク質の吸着が増加したと考えられる。もしくは、Gibbs-Thomson 式<sup>39)</sup>に従って、平均粒子径が減少したために、脂肪球の融点も下降したと思われる。以上のことから、還元乳の調製での均質化圧力が高くなると、より多くの乳タンパク質が脂肪球界面に強く吸着され、試料表面の位相遅れを増加したと考えられる。

## 2. 還元乳の理化学的性質

### 2-1. 界面電位

牛乳中 (pH 7 付近) に存在しているカゼインミセルは負に帯電 (-20 mV) しており、静電相互作用による斥力で水中に分散していると言われている<sup>40)</sup>。還元乳のゼータ電位はいずれも -20 mV 以下であった (Table 1)。すなわち、5 MPa で均質化した試料のゼータ電位が約  $-25.91 \pm 0.74$  mV であり、カゼインミセルの表面電位に近い値であった。試料の均質化圧力の上昇とともにゼータ電位は増加する傾向にあり、均質化圧力 20 MPa で最大値の  $-32.27 \pm 0.12$  mV になった。これは均質化処理によって脂肪球の粒子径が減少し、比表面積が増加することによって、負に帯電している乳タンパク質が乳脂肪球の界面に多く付着したからであると思われる。一方、25 MPa で均質化した試料のゼータ電位は  $-28.56 \pm 1.05$  mV であり、均質化圧力 20 MPa での試料に比べて有意に減少した。これが脂肪球界面に対するカゼインミセルの吸着状態、またはカゼインミセル構造を変化させる可能性が考えられた。

### 2-2. タンパク質の表面疎水性

加熱処理により変性した乳清タンパク質が自己凝集し、カゼインミセルおよび脂肪球界面に吸着して、表面疎水性が増加すると言われる<sup>25)</sup>。乳脂肪が分散しているいずれの還元乳の PSH が還元脱脂乳に比べて有意に高かった (Fig. 4)。多くの試料は疎水性相互作用する部位の量を反映する  $F_{max}$  が還元脱脂乳に比べて高くなったために、乳脂肪球と吸着することによって、乳タンパク質が疎水性領域を露出する構造に変わった可能性を示唆している。一方、均質化圧力

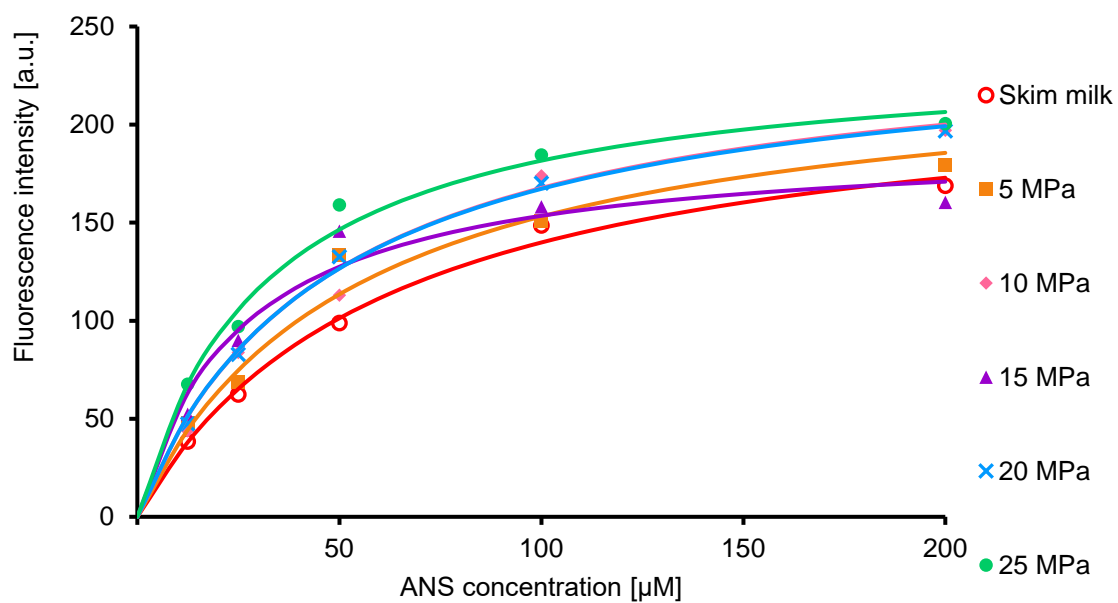


Fig. 4 Fluorescence intensity changes as a function of 1,8-ANS concentration added in reconstituted milk: skim milk (red) and milk with milk fat homogenized at pressure of 5 (orange), 10 (pink), 15 (purple), 20 (blue), and 25 MPa (green). Milk samples diluted with pH 6.8 phosphate buffer solution and fitting curves were shown as solid lines.

が 15 MPa の場合には、 $F_{max}$ が他の試料に比べて有意に低かった (Table 1)。これは、還元乳中のカゼインミセルと脂肪球との複合体の構造変化を反映している可能性が考えられる。疎水性相互作用の強さを反映する  $K_d$ には試料間の有意差が存在しなかった。試料の PSH は均質化圧力の上昇と共に増加する傾向にあり、高い均質化圧力で処理した還元乳から調製したヨーグルトがより強いネットワーク構造を形成できると思われる。したがって、界面電位と同様に、加熱変性した乳清タンパク質を吸着可能な脂肪球界面が均質化処理により増加したために、試料の PSH が増加したと考えられる。

### 3. 流動性ヨーグルトのメソスコピック構造

ヨーグルトのタンパク質凝集体はフラクタル性の糸状凝集体として分散しており、脂肪球はこれらのタンパク質凝集体の内部または表面に存在していた (Fig. 5)。均質化圧力の増加に伴い、観察された脂肪球およびタンパク質凝集体の大きさが減少し、タンパク質凝集体の分散構造が緻密になりつつあったが、均質化圧力 15 MPa で処理した還元乳から調製したヨーグルトでは、観察された構造が粗くなった。また、均質化圧力が 15 MPa 以下で調製した試料では多くの脂肪球が独立していたが、より高い均質化圧力で処理した試料では、脂肪球が連結しているように見えた。以上のことから、均質化圧力の増加によって、ヨーグルトに存在している脂肪球はタンパク質凝集体の内側に小さく分散して連結し、タンパク質凝集体の構造を支持している可能性が示唆された。

共焦点レーザー顕微鏡で観察した流動性ヨーグルトのタンパク質凝集体の平均体積は 20.23 ~ 34.07  $\mu\text{m}^3$ の範囲内で変化し、均質化圧力との相関関係が存在せず、均質化圧力が 10, 20 MPa の試料で比較的に大きかった。同様に、この 2 つの均質化圧力で処理した試料のタンパク質凝集体は単位体積当たりの表面積が他の試料に比べて有意に小さく、体積分率が有意に大きかった (Table 2)。これは、均質化処理の第 2 段階で使用された圧力の影響であると考えられる。一方、フラクタル次元は均質化圧力の上昇と共に増加する傾向に見られ、均質化圧力の増加につれてタンパク質凝集体の分布幅がより広がったことを示唆している。

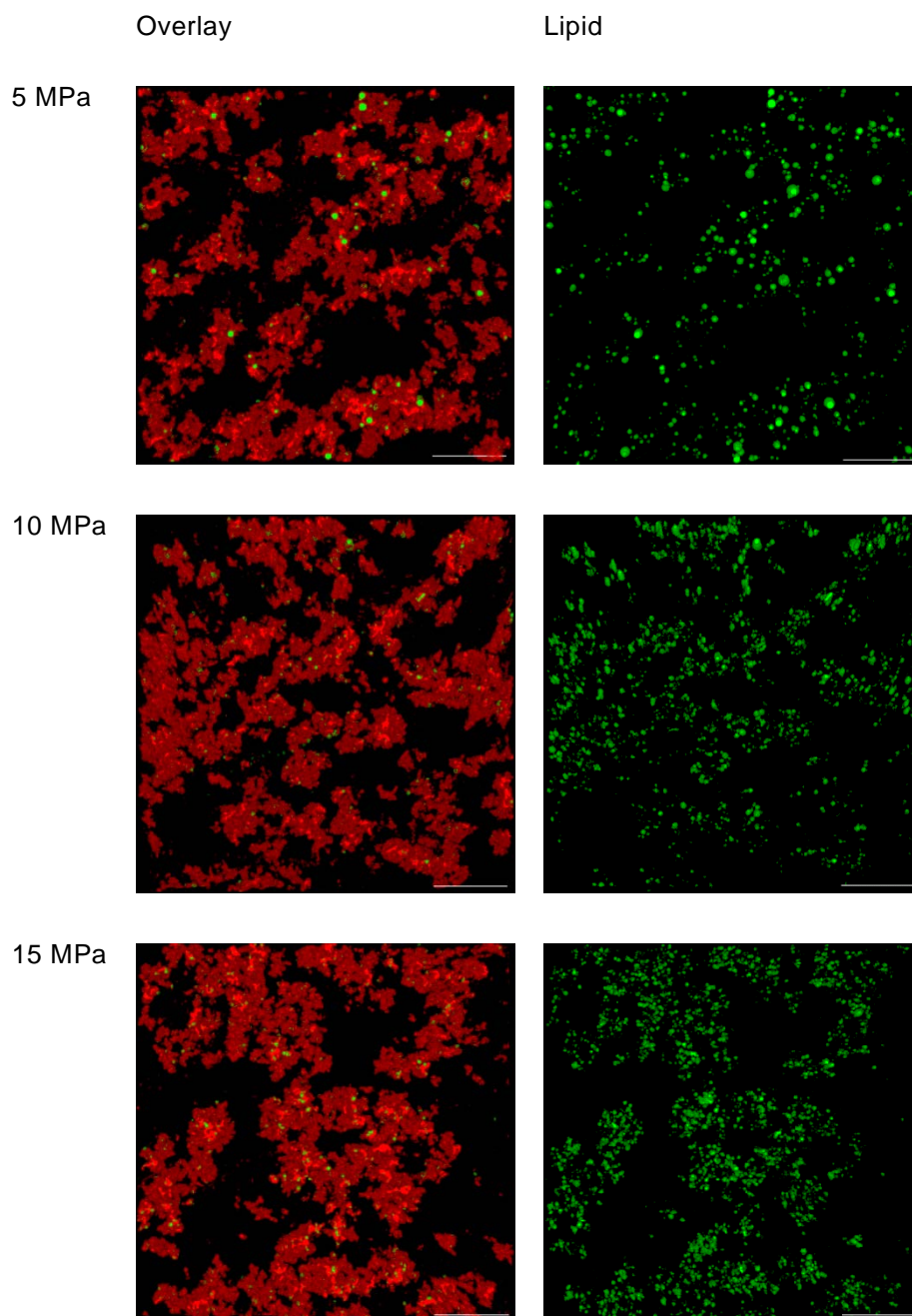


Fig. 5 Mesoscopic structure of stirred yogurts made from different reconstituted milk homogenized at pressure of 5 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D), and 25 MPa (E) observed by confocal laser scanning microscope with a 100x oil objective lens. Red represents protein, and green represents lipid, respectively. Scale bars represent 25  $\mu\text{m}$ .

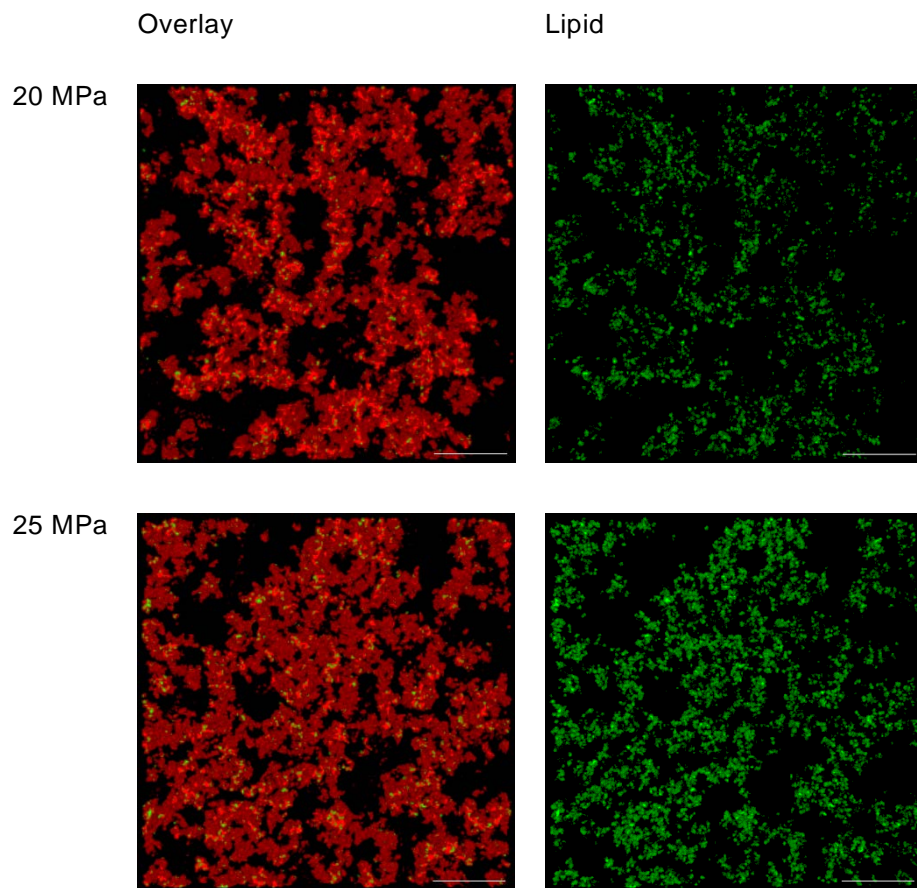


Fig. 5 (Continued)

**Table 2** Mesoscopic structural properties of stirred yogurt prepared with reconstituted milk homogenized at different pressure.

Homogenization pressure [MPa]		Protein aggregate				Fat globule		
1st stage	2nd stage	$\overline{V}_{ag}[\mu\text{m}^3]$	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}[\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}]$	$\phi_{vol}[-]$	$D_f[-]$	$\overline{V}_{ag}[\mu\text{m}^3]$	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}[\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}]$	$D_f[-]$
5	<1	20.23±6.644 <sup>a</sup>	4.27±0.246 <sup>a</sup>	0.10±0.017 <sup>a</sup>	2.56±0.019 <sup>a, b</sup>	1.16±0.098 <sup>a</sup>	3.37±0.112 <sup>a</sup>	2.02±0.066 <sup>a</sup>
10	1	24.54±9.790 <sup>a</sup>	4.15±0.261 <sup>a, b</sup>	0.10±0.025 <sup>a</sup>	2.56±0.040 <sup>a, b</sup>	0.73±0.118 <sup>b, c</sup>	3.64±0.037 <sup>a</sup>	2.20±0.090 <sup>b</sup>
15	>1, <2	34.07±1.904 <sup>a</sup>	3.97±0.064 <sup>a, b</sup>	0.11±0.002 <sup>a</sup>	2.50±0.015 <sup>a</sup>	0.49±0.069 <sup>c</sup>	3.51±0.068 <sup>a</sup>	2.22±0.009 <sup>b, c</sup>
20	2	25.21±9.318 <sup>a</sup>	4.20±0.162 <sup>a, b</sup>	0.13±0.030 <sup>a</sup>	2.63±0.056 <sup>b</sup>	0.47±0.174 <sup>c</sup>	2.81±0.361 <sup>b</sup>	2.37±0.070 <sup>c, d</sup>
25	>2, <3	32.90±1.150 <sup>a</sup>	3.76±0.088 <sup>b</sup>	0.14±0.018 <sup>a</sup>	2.58±0.044 <sup>a, b</sup>	1.04±0.173 <sup>a, b</sup>	3.37±0.118 <sup>a</sup>	2.42±0.053 <sup>d</sup>

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ );  $\overline{V}_{ag}$ , average volume of aggregates;  $\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ , specific surface area;  $\phi_{vol}$ , volume fraction;  $D_f$ , fractal dimension

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .



観察された脂肪球の平均体積は  $0.4 \sim 1 \mu\text{m}^3$  であり、均質化圧力の増加によって減少する傾向にあり、項目 1-1 で述べた結果と一致した。しかし、20 MPa 以上の均質化圧力で処理した試料では、乳脂肪球の凝集によって脂肪球の平均体積が逆に増加した。特に、単位体積当たりの比表面積は均質化圧力 25 MPa の試料で他の試料に比べて有意に小さく、脂肪球の凝集・合一を示唆している。そして、脂肪球のフラクタル次元は、タンパク質凝集体の粒子径と同様に、均質化圧力の増加と共に増加する傾向にあった。この結果から、大きい脂肪球は乳タンパク質ネットワークに局在するが、均質化圧力の増加によって脂肪球が小さくなり、乳タンパク質に吸着している乳脂肪球がタンパク質凝集構造の内部に入り込むことによって乳タンパク質のネットワーク構造を支持したと考えられる。

Krzeminski ら<sup>41)</sup>は、乳清タンパク質の添加によって無脂肪流動性ヨーグルト中のタンパク質凝集体の粒子径が大きくなり、粘度が増加し、ネットワーク構造が強固になったと報告している。しかし、乳清タンパク質を高濃度で添加した試料では、乳清タンパク質の大きい自己凝集体を形成し、タンパク質凝集体間の空隙が増加したために、メソスコピック構造が崩壊しやすい粗い構造になった。本研究では、項目 2 で述べたゼータ電位と PSH の結果から、均質化圧力の上昇に伴い、乳脂肪球の界面により多くの乳清タンパク質が吸着していると考えられた。したがって、高い圧力の均質化処理により、乳脂肪球表面に乳清タンパク質との結合部位が増加し、大きい乳清タンパク質の自己凝集体の形成を阻害したと考えられる。さらに、脂肪球界面に吸着している乳清タンパク質はカゼインミセルと共有結合する場を提供したために、乳タンパク質のより強固なネットワーク構造を形成したと思われる。

#### 4. 流動性ヨーグルトの理化学的性質

##### 4-1. 保水性

乳脂肪を用いて調製した還元乳から調製した流動性ヨーグルトの離水量は、還元脱脂乳で調製した流動性ヨーグルトに比べて著しく減少した (Fig. 6)。また、均質化圧力を増加するにつれて、流動性ヨーグルトの離水量が減少する傾向にあるため、乳脂肪球を小

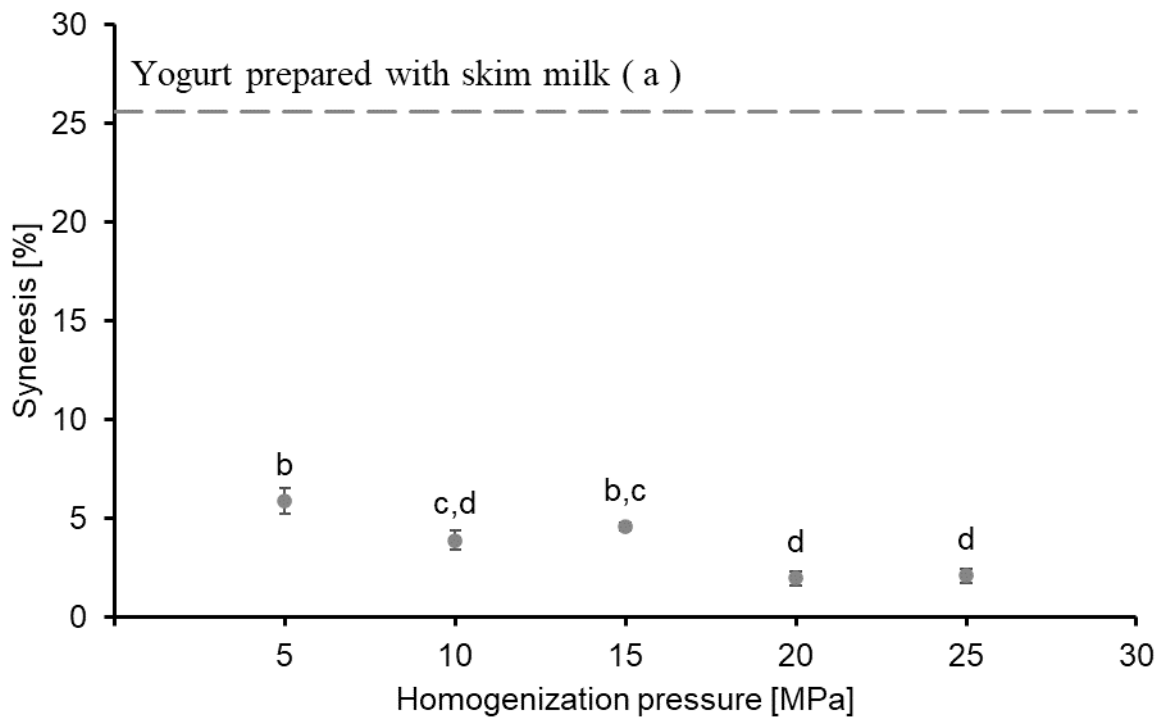


Fig. 6 Syneresis of stirred yogurt samples ( $n = 3$ ). Dotted line on the top represents the syneresis of stirred yogurt sample prepared with reconstituted skim milk. Dots with same letter represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

さく裂断することによって、保水性が高いネットワーク構造が形成されたと思われる。

#### 4-2. 流動特性

全ての流動性ヨーグルトはせん断流動化し、せん断速度の増加によって一部の凝集構造が破壊され、見かけの粘度が低下した (Fig. 7)。特に、全ての試料の上向曲線において、せん断速度  $10 \text{ s}^{-1}$  付近にせん断応力のオーバーシュートが観察され、せん断応力の増加による内部構造の崩壊を示した。また、流動性ヨーグルトの高いせん断速度領域におけるせん断応力は均質化圧力の増加に伴い増加する傾向にあった。一方、上向曲線をベキ乗則流動方程式に当てはめたところ、低いせん断速度での見かけの粘度を反映した粘稠度定数は均質化圧力と共に増加する傾向にあったが、流動性指数は試料間の有意差がなかった (Table 3)。そして、流動曲線で囲まれた面積で算出したヒステリシスは、均質化圧力の増加と共に増加したが、チキソトロピー指数 (ここでは、上向曲線下の面積に対する流動曲線で囲む図形の面積の割合と定義した) は試料間の有意差がなかった。したがって、均質化圧力を増加させた還元乳を用いて調製した流動性ヨーグルトの内部構造が強固になり、崩壊しにくくなったために、内部構造のせん断崩壊に対する抵抗から発現した見かけの粘度が均質化圧力の増加と共に上昇したと思われる。

#### 4-3. 動的粘弾性

ひずみ依存性試験では、全ての試料の弾性限界ひずみが 0.003 前後であり、有意差が認められなかった (Fig. 8)。均質化圧力の増加に伴って  $G'$  および  $G''$  が増加する傾向を示した。

周波数依存性試験では、全周波数領域で全ての試料が粘弾性固体 ( $\tan \delta \approx 0.3$ ) であった (Fig. 9)。 $G'$  および  $G''$  には試料間の有意差がなかった。 $G'$  の周波数依存性をベキ乗則方程式を適用したところ、全ての試料の緩和指数が約 0.16 であり、流動性ヨーグルトの内部構造は緩和モードが連続的に分布しているレオロジー単純性を示している弱いゲルであると思われる (Table 4)。一方、ゲル強度を反映する臨界定数は、均質化圧力の増加とともに上昇する傾向に見られた。これは、均質化圧力の増加により多くの脂肪球が乳タンパク質のネットワーク構

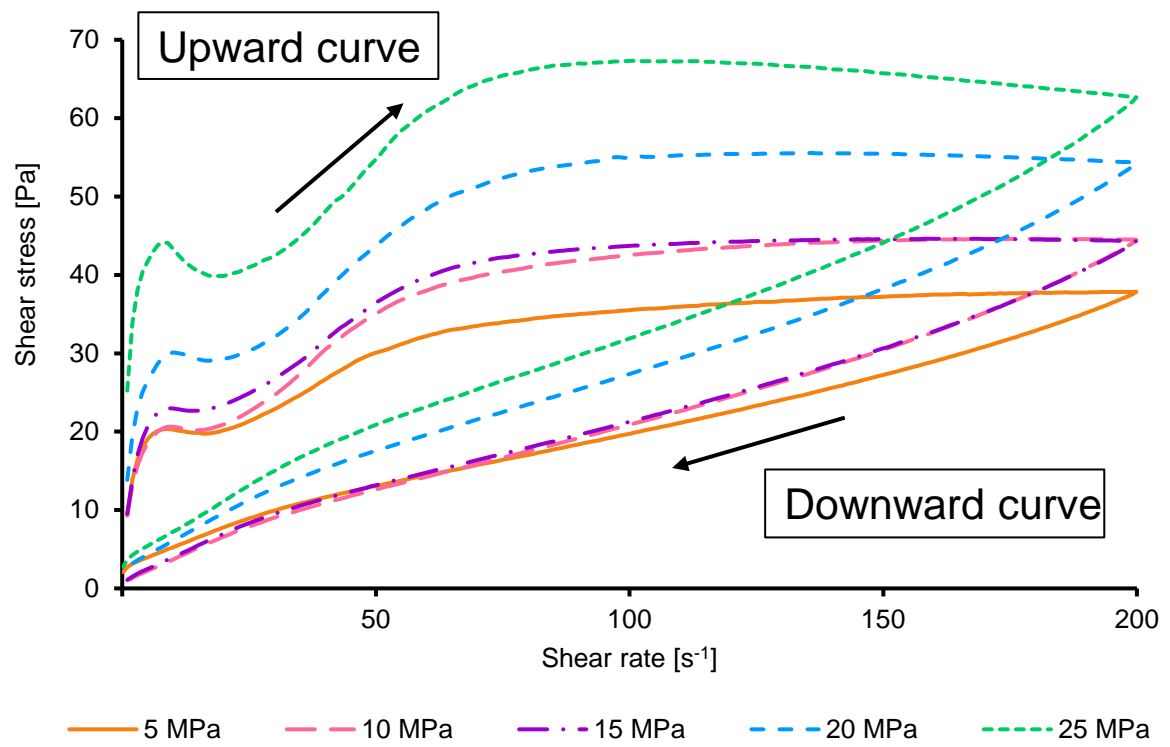


Fig. 7 Flow behavior of stirred yogurt prepared from reconstituted milk homogenized at pressure at 5 (orange), 10 (pink), 15 (purple), 20 (blue), and 25 MPa (green).

Table 3 Flow properties of stirred yogurt.

Homogenization pressure [MPa]		$k$	$n$	Hysteresis	TI
		[Pa · s <sup>n</sup> ]	[-]	[Pa · s <sup>-1</sup> ]	[%]
1st stage	2nd stage				
5	<1	11.9±0.79 <sup>a</sup>	0.229±0.0318 <sup>a</sup>	2472.3±521.78 <sup>a</sup>	37.9±5.54 <sup>a</sup>
10	1	11.8±3.17 <sup>a</sup>	0.271±0.0496 <sup>a</sup>	3277.0±349.28 <sup>a,b</sup>	43.1±3.56 <sup>a</sup>
15	>1 <2	13.9±2.81 <sup>a,b</sup>	0.238±0.0403 <sup>a</sup>	3424.7±518.36 <sup>a,b</sup>	43.8±5.39 <sup>a</sup>
20	2	18.2±12.30 <sup>a,b</sup>	0.250±0.0901 <sup>a</sup>	4099.4±1415.30 <sup>a,b</sup>	41.8±4.79 <sup>a</sup>
25	>2, <3	28.6±2.82 <sup>b</sup>	0.167±0.0084 <sup>a</sup>	5398.2±835.46 <sup>b</sup>	45.4±1.11 <sup>a</sup>

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ )

$k$ , consistency coefficient;  $n$ , flow behavior index; TI, thixotropic index.

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

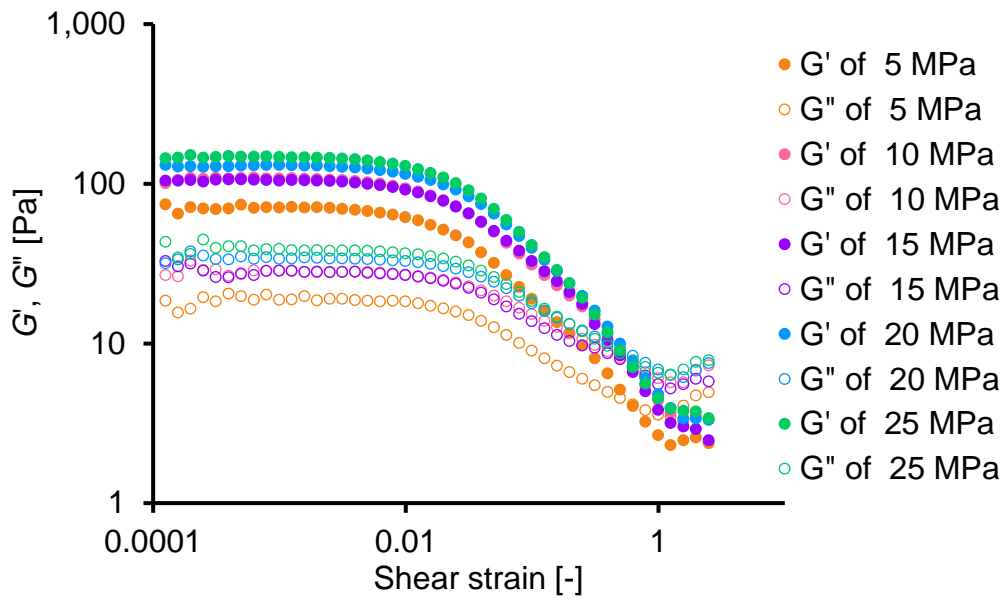


Fig. 8 Storage modulus ( $G'$ , close) and loss modulus ( $G''$ , open) of stirred yogurts made from different reconstituted milk homogenized at pressure at 5 (orange), 10 (pink), 15 (purple), 20 (blue), and 25 MPa (green) as a function of shear strain.

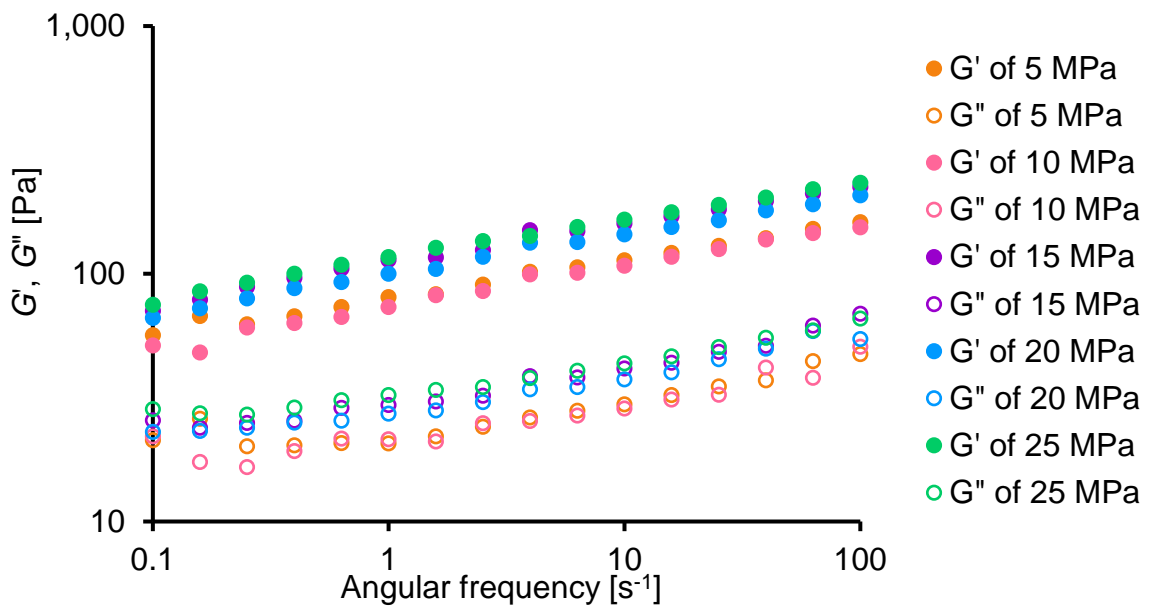


Fig. 9  $G'$  (close) and  $G''$  (open) of stirred yogurts made from different reconstituted milk homogenized at pressure of 5 (orange), 10 (pink), 15 (purple), 20 (blue), and 25 MPa (green) as a function of angular frequency.

**Table 4** Rheological properties of stirred yogurts made from different reconstituted milk.

Homogenization pressure [MPa]		$\gamma_0$	<i>A</i>	<i>B</i>
1st stage	2nd stage	[ $\times 10^{-3}$ ]		
5	<1	3.03 $\pm$ 0.994 <sup>a</sup>	80.01 $\pm$ 18.298 <sup>a</sup>	0.152 $\pm$ 0.0085 <sup>a</sup>
10	1	2.93 $\pm$ 0.374 <sup>a</sup>	74.14 $\pm$ 16.832 <sup>a</sup>	0.166 $\pm$ 0.0144 <sup>a</sup>
15	>1, <2	3.16 $\pm$ 1.606 <sup>a</sup>	110.69 $\pm$ 28.611 <sup>a</sup>	0.156 $\pm$ 0.0025 <sup>a</sup>
20	2	3.48 $\pm$ 0.845 <sup>a</sup>	99.96 $\pm$ 21.002 <sup>a</sup>	0.159 $\pm$ 0.0049 <sup>a</sup>
25	>2, <3	2.72 $\pm$ 0.374 <sup>a</sup>	115.25 $\pm$ 20.280 <sup>a</sup>	0.155 $\pm$ 0.0033 <sup>a</sup>

$\gamma_0$ , limit of linear viscoelastic range; *A*, critical constant; *B*, relaxation exponent.

Mean  $\pm$  Standard deviations ( $n = 3$ )

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

造に取り込まれることによって強固になったと思われる。しかし、動的粘弾性は、攪拌処理によってヨーグルトの凝集構造が既に小さい断片に崩壊されたために、試料間の有意差が検出できなくなったと思われる。

#### 第4節 要約

牛乳の均質化処理によって、乳脂肪球表面に存在する乳脂肪球膜が破壊され、乳清に存在している乳タンパク質がこの露出した脂肪球界面に吸着して、新しい界面構造を形成する。一方、ヨーグルトの製造過程では、製品の離水を抑制し、その食品テクスチャーを維持するために原料乳の均質化処理を行うが、そのメカニズムについては十分に解明されていなかった。そこで、本研究では脱脂粉乳を用いて調製した還元乳における乳脂肪の均質化条件を変化させることによって乳脂肪球の分散状態が異なる還元乳を調製し、還元乳および還元乳から調製した流動性ヨーグルトの理化学的性質と乳脂肪球の分散状態との関連性について検討した。その結果、均質化圧力の増加により、乳脂肪球の比表面積が増加し、乳脂肪球界面に吸着した乳タンパク質量が増加した。これによって、還元乳の界面電位と PSH が増加した。特に、20 MPa 以上の高い均質化圧力で処理した還元乳から調製した流動性ヨーグルトは、保水性および見かけの粘度が高く、緻密なメソスコピック構造を形成した。乳脂肪球とカゼインミセル間の結合が均質化圧力と共に増加する傾向が TEM および AFM の観察によって確認され、このことによって乳脂肪球がヨーグルトのタンパク質凝集構造の内部に取り込まれ、崩壊されにくい緻密なネットワーク構造を形成させたと考えられる。以上のことから、原料乳の均質化処理は乳脂肪球の大きさを制御するだけでなく、脂肪球と乳タンパク質間の相互作用を増加することによって流動性ヨーグルトの品質を維持したと思われる。



### 第3章 植物油脂を配合した還元乳およびそれから調製した流動性ヨーグルト

#### 第1節 目的

乳脂肪の代わりに4種類の植物油脂を脱脂粉乳を用いて調製した還元乳に配合し、均質化条件を変化させて脂肪球の分散状態が異なる流動性ヨーグルトを調製した。そして、その理化学的性質と微細構造を検討して流動性ヨーグルトの理化学的性質に対する植物油脂の種類および物理性質の影響を明らかにすることを試みた。

#### 第2節 実験方法

##### 1. 試料

還元乳ならびに流動性ヨーグルトの調製には、脱脂粉乳（明治脱脂粉乳，(株)明治），乳酸菌培養物（Freeze-dried non-ropy-producing yogurt culture, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* (YC-X11 Yo-Flex), Chr. Hansen A/S, Denmark）およびスクロース（試薬特級，富士フィルム和光純薬(株)）を用いた。植物油脂には、リノレン酸系油脂である大豆油（日清大豆サラダ油，日清オイリオグループ(株)），オレインーリノール酸系油脂であるトウモロコシ油（日清コーン油，日清オイリオグループ(株)），ラウリン酸系油脂であるヤシ油（精製ヤシ油，日清オイリオグループ(株)）およびオレインーリノール酸系油脂であるパーム油（精製パーム油，日清オイリオグループ(株)）を用いた。共焦点レーザー顕微鏡観察（CLSM, confocal laser scanning microscopy）のケイ光標識試薬として，FITC（Fluorescein isothiocyanate, Sigma-Aldrich Corp.）および Nile red（病理研究用，富士フィルム和光純薬(株)）をそれぞれ0.1%(w/w)エタノール溶液にして使用した。透過電子顕微鏡観察（TEM, Transmission electron microscopy）用試料の前処理に，還元乳の包埋材料として粉末寒天（かんでんクック，伊那食品工業(株)）を用いた。TEMの鉛染色液は，終濃度がそれぞれ0.4, 0.3, 0.3, 2%(w/w)になるように，クエン酸鉛，硝酸鉛，酢酸鉛およびクエン酸ナトリウムを410 mL 蒸留水に加え，1 M

水酸化ナトリウム水溶液を 90 mL 加えて溶解した<sup>34)</sup>。

## 2. 還元乳の調製

第2章実験方法項目2に記載した方法に従って還元乳を調製した。ただし、均質化処理では 5, 10, 20 MPa という3水準の均質化条件を設定した。

## 3. 流動性ヨーグルトの調製

第2章実験方法項目3に記載した方法に従って流動性ヨーグルトを調製した。

## 4. 油脂の理化学的性質の測定

### 4-1. 融解・凝固，結晶化，結晶転移挙動

-20 ~ 70 °C 間における油脂の融解・凝固，結晶化，結晶転移挙動を，示差走査熱量測定装置 (Discovery DSC, 最高感度 0.2  $\mu$ W, TA Instrument Inc.) を用いて周期 30 s, 温度振幅 $\pm$ 0.2 °C の条件で温度変調示差走査熱量測定 (TMDSC, temperature-modulated differential scanning calorimetry) して総熱流曲線，可逆熱流曲線および非可逆熱流曲線を取得した。すなわち，約 5 mg 試料をアルミニウム製簡易密封型試料容器 (Aluminum Hermetic, 10  $\mu$ L, TA Instrument Inc.) に密封して精秤し，試料を入れずに密封する空き容器を対照として用いた。試料を最初に 20 °C で 5 分間保持して温度平衡させた。次に，70 °C まで温度勾配 5 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup> で加熱した。70 °C で 10 分間保持して試料の熱履歴を解消し，-20 °C まで温度勾配 -5 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup> で冷却し，その温度で 10 分間保持して試料を完全に凝固させた。

### 4-2. 固体脂含量

100 mL 容量ガラスビーカーに入れた油脂を 60 °C に設定した恒温水槽内に 20 分間静置してから，パルス核磁気共鳴専用のガラス製試料管 ( $\phi$  8.5  $\times$  L 140 mm) に約 2 g 注入して，低温恒温器 (FMC-1000, 東京理化器械(株)) を用いて所定温度で 10 時間結晶化させて油脂試料を調製した。パルス核磁気共鳴装置 (Minispec mq20, 磁束密度 0.47 T, パルス幅 2.62  $\mu$ s, プロトンの共鳴周波数 19.950000 MHz, Bruker Corp.) を用いて，5 ~ 60 °C における油脂試料の固体脂含量 (SFC, solid fat content) を測定した。

#### 4-3. 密度

「液体比重の測定方法 JIS Z 8804」<sup>42)</sup>に従って、25 °C の脱塩水を基準にし、比重びんを用いて 70 °C における食用油脂の密度を測定した。まず、全ての食用油脂が融解状態になるように、40 °C に設定した恒温水槽内に 20 分間静置した。次に、質量を精秤した比重びんを試料で 2 回すすぎ、気泡が混入しないように試料を充填し、ふたで密封して、70 °C に設定した恒温水槽内に 20 分間静置した。そして、比重びんを常温に静置して、比重びんと試料の総質量を精秤し、式(2)で試料の密度を算出した。なお、対照試料である脱塩水を予め 20 °C の恒温水槽内に放置してから比重びんに充填し、脱塩水で充填した場合、25 °C に保持していた比重びんおよび脱塩水の質量を精秤した。25 °C における水の密度を用いて、比重びんの内容積を算出した。

$$\rho = \frac{\rho_w^{25}(M_{s+b}-M_b)}{M_{w+b}-M_b} \quad (2)$$

ここで、 $M_b$ 、比重びんの質量； $M_{s+b}$ 、常温に戻った試料と比重びんの質量； $M_{w+b}$ 、常温に戻った脱塩水と比重びんの質量； $\rho_w^{25}$ 、25 °C における水の密度 (997.047 kg·m<sup>-3</sup>)。

#### 4-4. 油-水界面張力

自動接触角計 (DM-501, 協和界面科学株) を用いて、懸滴法で 70 °C における食用油脂と水との界面張力を測定した。すなわち、植物油を 8 分目に充填したガラスセルに脱塩水を充填したシリンジの針先 (28G, ステンレス鋼製) を挿入し、約 20  $\mu$ L 脱塩水を吐出して液滴を形成し、Young-Laplace 法より界面張力を算出した。なお、温度制御には、温度制御装置 (テンプコントローラ 401, 協和界面科学株) に接続したヒータ式ディスペンサセット (DMo/DMs, 協和界面科学株) およびヒータ式チャンバーセット (DM, 協和界面科学株) を使用した。

#### 4-5. 定常流粘度

二重円筒型治具 (外筒内径: 19.995 mm, 内筒直径: 18.598 mm, 内筒高さ: 28.01 mm, ギャップ: 3.93 mm, 充填容量: 3.7 mL (25 °C)) を装着した動的粘弾性測定装置 (ARES-G2, TA Instrument Inc.) を用いて、70 °C でせん断速度を 0.1 s<sup>-1</sup> から 200 s<sup>-1</sup> まで 100 秒間で直線

的に上昇させるというせん断速度依存性試験をした。得られたデータを統計解析ソフトウェア（Origin 2020b, OriginLab Corp.）を用いて、ニュートンの粘性法則（ $\sigma = \eta\dot{\gamma}$ ， $\sigma$ はせん断応力， $\dot{\gamma}$ はせん断速度， $\eta$ は定常流粘度）から，試料の $\eta$ を求めた。

## 5. 還元乳中の脂肪球の分散状態

### 5-1. 粒子径分布

第2章実験方法項目4-1に記載した方法に従って試料の粒子径分布を測定した。

### 5-2. 還元乳の微細構造の透過型電子顕微鏡観察

第2章実験方法項目4-2に記載した方法に従って試料の微細構造を観察した。

## 6. 還元乳の理化学的性質の測定

### 6-1. 見かけのゼータ電位

第2章実験方法項目5-1に記載した方法に従って試料の見かけのゼータ電位を測定した。

### 6-2. タンパク質の表面疎水性

第2章実験方法項目5-1に記載した方法に従って試料の表面疎水性（PSH, Protein surface hydrophobicity）を測定した。なお，ケイ光強度の測定には分光蛍光光度計（FP-8600, 日本分光株）を用いた。

## 7. 流動性ヨーグルトのメソスコピック構造

第2章実験方法項目6に記載した方法に従って試料のメソスコピック構造を観察した。

## 8. 流動性ヨーグルトの理化学的性質の測定

### 8-1. 離水率

第2章実験方法項目7-1に記載した方法に従って試料の離水率を測定した。

### 8-2. 流動特性

第2章実験方法項目7-2に記載した方法に従って試料の流動特性を測定した。

### 8-3. 動的粘弾性

第2章実験方法項目7-3に記載した方法に従って試料の動的粘弾性を測定した。

## 9. 統計処理・解析

全ての結果を統計解析ソフトウェア（IBM SPSS Statistics Ver. 28, 日本アイ・ビー・エム（株））にて統計処理・解析した。一元配置の分散分析（ANOVA, Analysis of variance）にて試料の要因効果を検討し、有意水準 5 % の Tukey の多重比較を用いて平均に対する有意差を検定した。

### 第3節 結果および考察

#### 1. 植物油の理化学的性質

##### 1-1. 融解・凝固, 結晶化, 結晶転移挙動

対照試料の乳脂肪では、冷却過程で結晶化開始温度の 16.5 °C 前後に乳脂肪の結晶化に伴う発熱ピークが観察された（Fig. 10）。このピーク範囲において、非可逆熱流曲線に 2 つの発熱ピークが観察されたため、2 種類の脂肪結晶化による発熱ピークが重なっていると思われる。このピークに伴う結晶化エンタルピー変化が  $51.66 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$  であった。加熱過程では 10 °C 以前に結晶構造の転移による発熱ピークが観察された。非可逆熱流曲線に発熱ピークが観察され、可逆熱流曲線に熱流束の段階的な変化が見られた。この温度で一部の乳脂肪が融解したが、すぐに別の結晶構造に転移した。さらに加熱すると、13 °C 付近に乳脂肪の融解による吸熱ピークが観察された。乳脂肪の TAG 組成が複雑であるため、20 °C 以降でも様々なトリアシルグリセロールが融解・結晶転移を繰り返し、40 °C 直前までの広い範囲における発熱ピークが観察され、そのエンタルピー変化が  $72.30 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$  であった。したがって、還元乳および流動性ヨーグルトの調製、均質化、発酵、殺菌などの処理過程において乳脂肪は液体油であるが、貯蔵期間内に結晶状態となり、ヨーグルトの理化学的性質に寄与する可能性が考えられる。

低融点植物油である大豆油およびトウモロコシ油では、両者ともに 0 °C 以上に凝固、融解による吸・発熱ピークが観察されなかったため、ヨーグルトの調製・貯蔵期間内において、凝固、融解などの熱力学的挙動が存在しないと思われる（Fig. 11, 12）。

ヤシ油では、冷却過程において 2 つの発熱ピークが観察された（Fig. 13）ことから 2 種類の

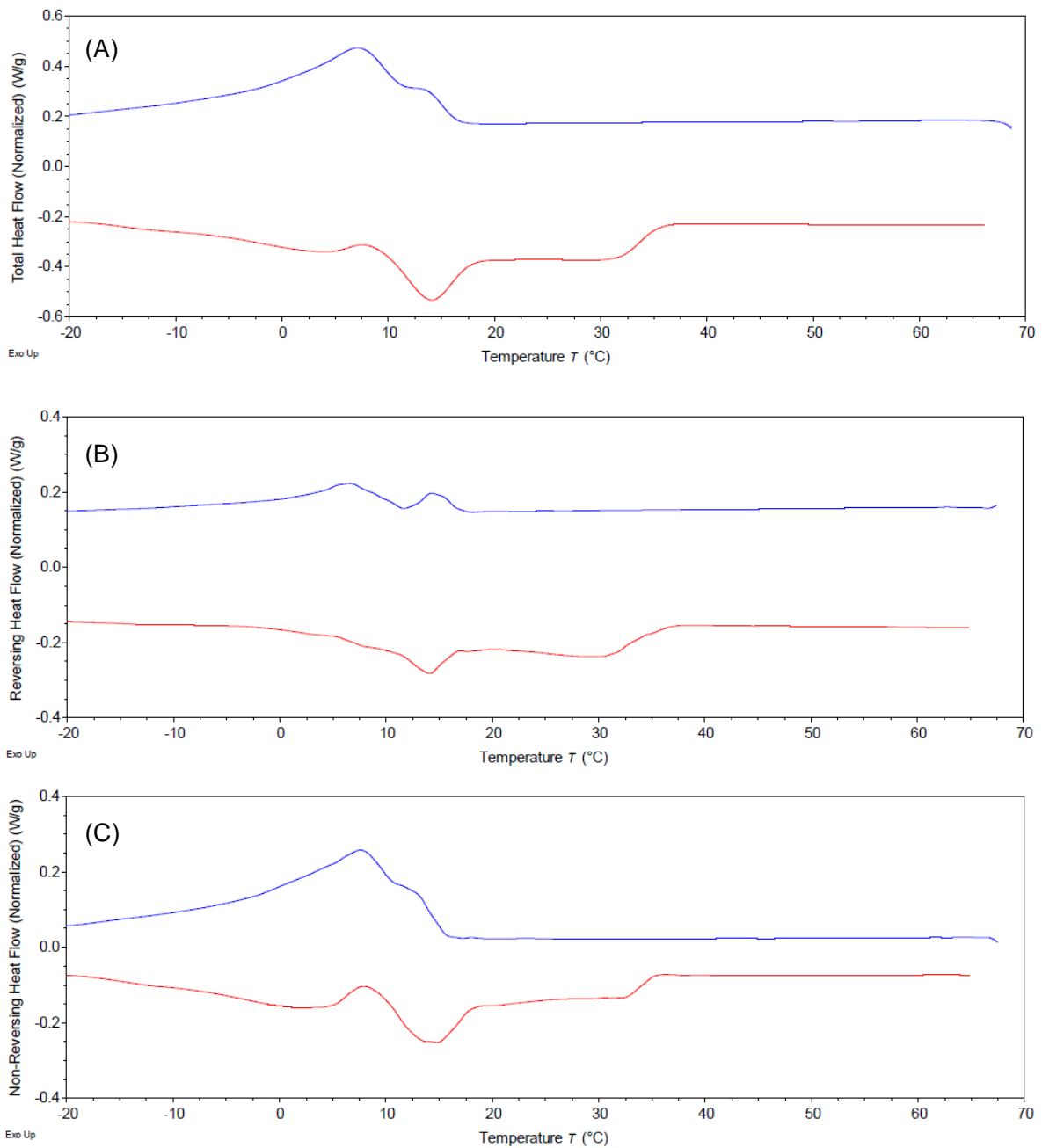


Fig. 10 DSC curves of milk fat. In each graph, heating process was shown in red curve and cooling process was shown in blue curve in total heat flow curves (A), reversing heat flow curves (B) and non-reversing heat flow curves (C).

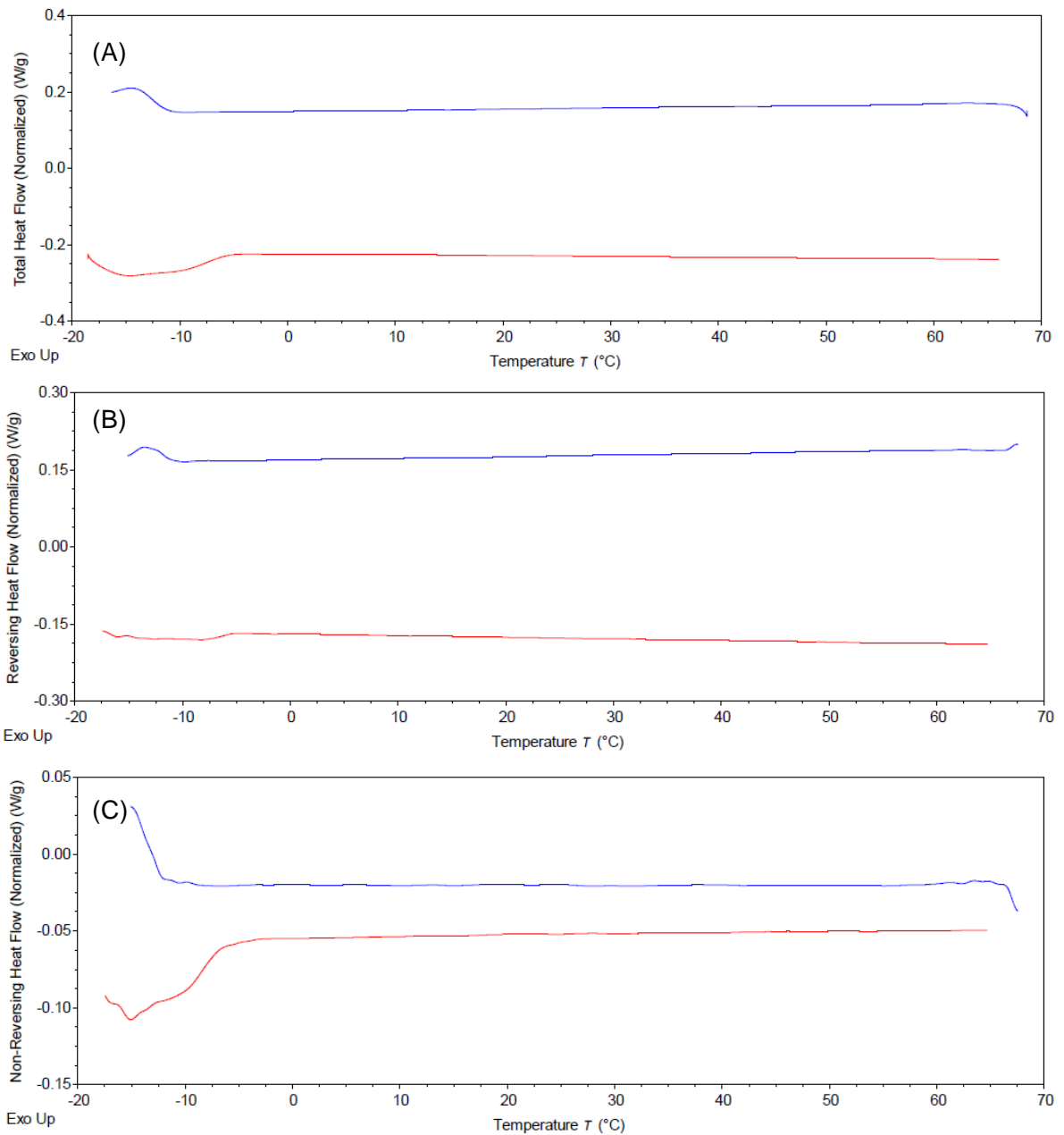


Fig. 11 DSC curves of soybean oil. In each graph, heating process was shown in red curve and cooling process was shown in blue curve in total heat flow curves (A), reversing heat flow curves (B) and non-reversing heat flow curves (C).

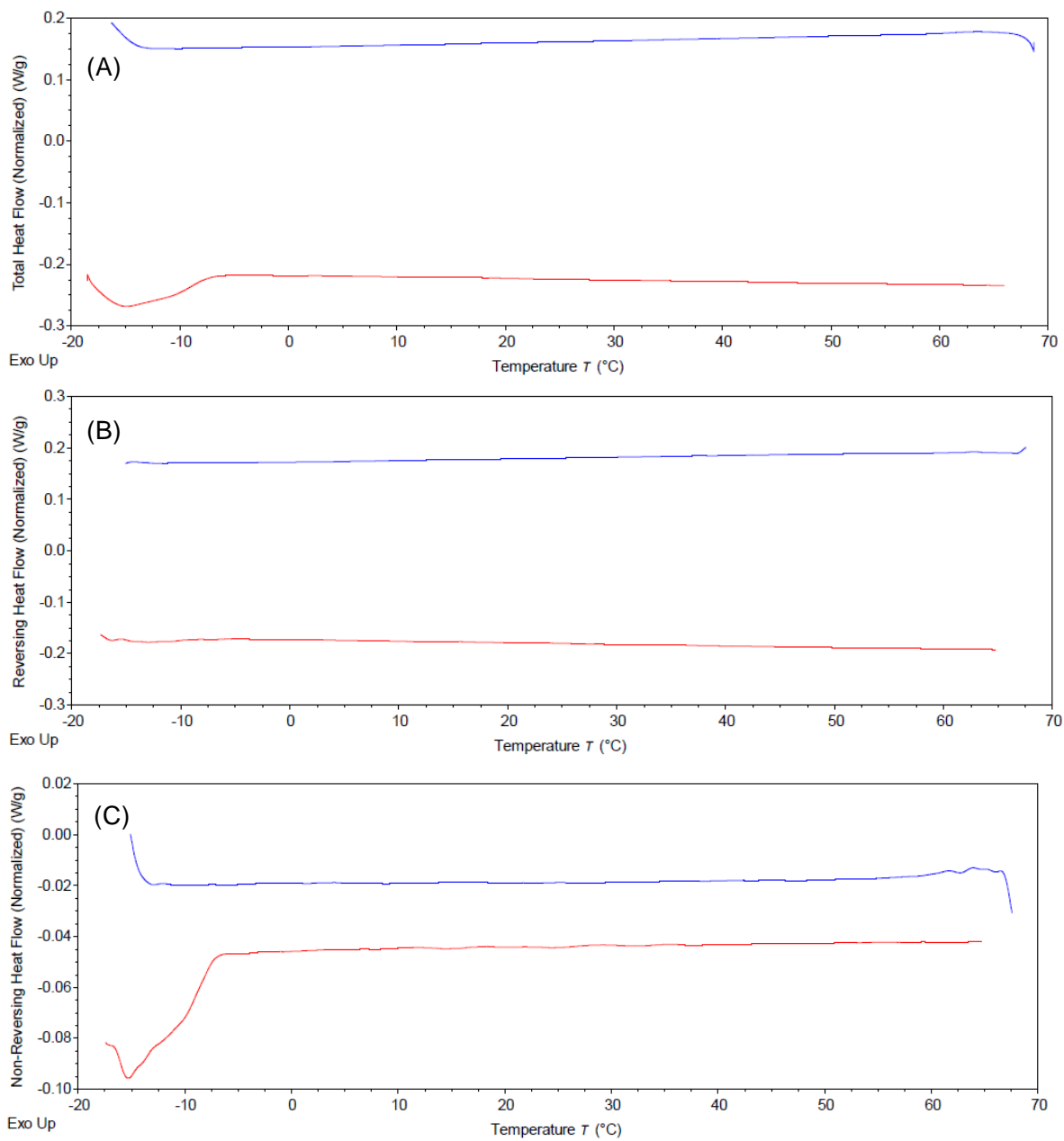


Fig. 12 DSC curves of corn oil. In each graph, heating process was shown in red curve and cooling process was shown in blue curve in total heat flow curves (A), reversing heat flow curves (B) and non-reversing heat flow curves (C).



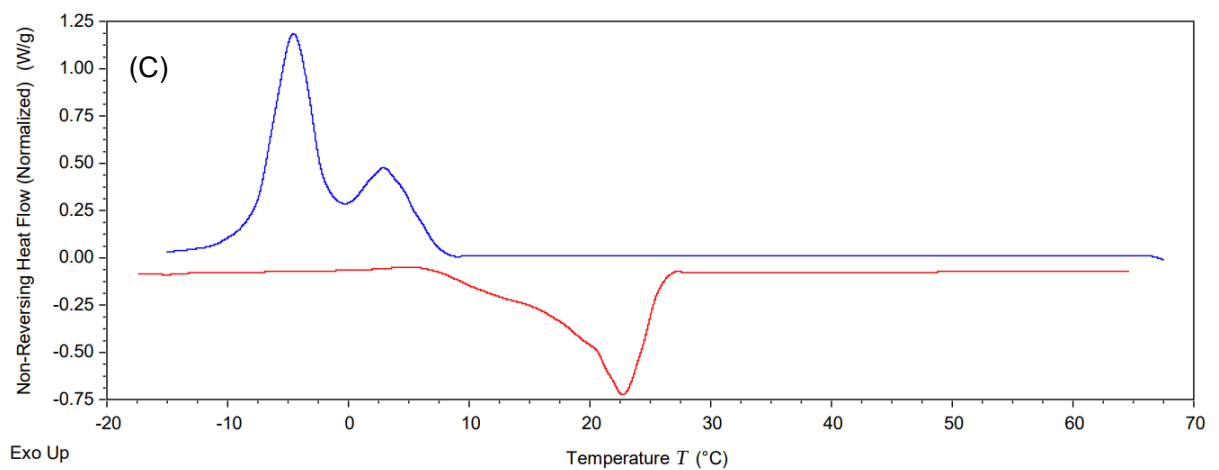
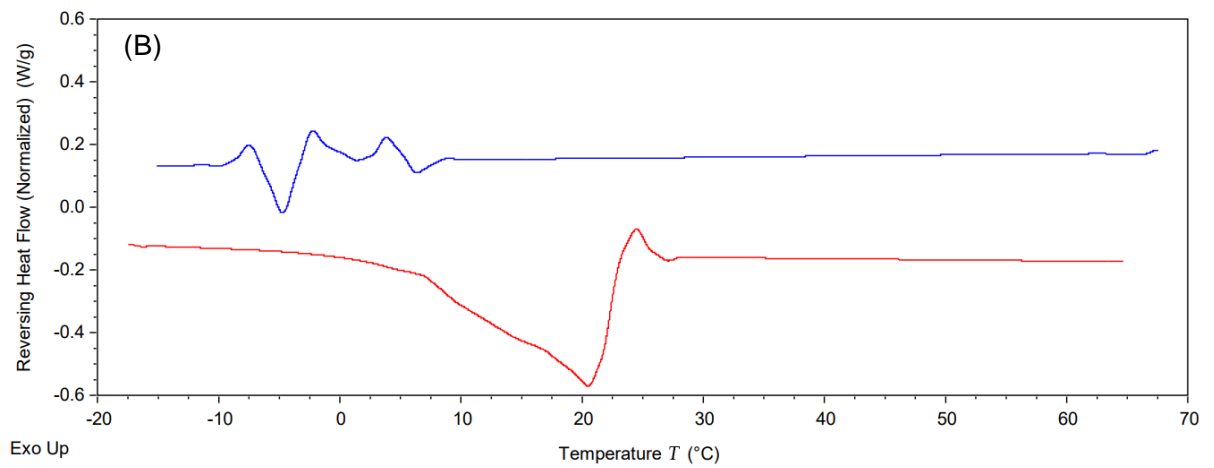
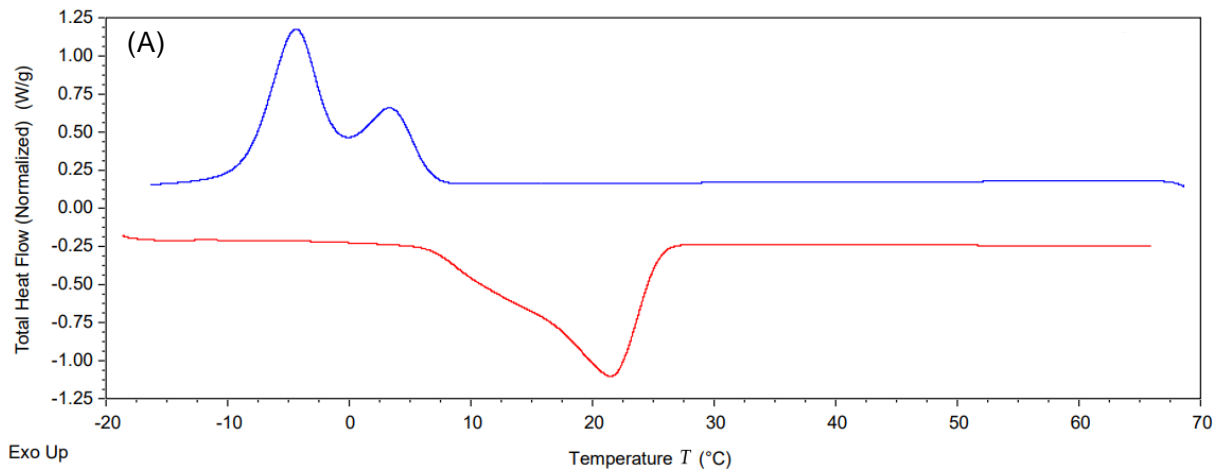


Fig. 13 DSC curves of coconut oil. In each graph, heating process was shown in red curve and cooling process was shown in blue curve in total heat flow curves (A), reversing heat flow curves (B) and non-reversing heat flow curves (C).

油脂結晶を形成していたことを示唆している。この2つの発熱ピークの結晶化温度は 6.78 °C と -0.44 °C であり、結晶化エンタルピー変化は 94.63 J·g<sup>-1</sup>であった。さらに、可逆熱流曲線には、融点が異なるトリアシルグリセロール成分が相分離・構造転移することを示すと思われる吸熱ピークが見られた。一方、加熱過程では、ヤシ油に 6.61 °C から結晶融解による吸熱ピークが観察された。この融解過程において、油脂の結晶構造が変化しつつあり、23.08 °C に結晶転移による発熱ピークが観察されたため、さらに安定している結晶形に転移したと考えられた。その結果、21.50 °C に大きい吸熱ピークが観察され、結晶融解過程のエンタルピー変化が 102.91 J·g<sup>-1</sup>であった。

パーム油はトリアシルグリセロール組成が複雑なために、冷却過程で高融点成分と低融点成分が分離し、それぞれの結晶化による発熱ピークを示した (Fig. 14)。高融点成分では結晶化温度が 18.23 °C であり、エンタルピー変化が 8.56 J·g<sup>-1</sup>であった。低融点成分では乳脂肪と類似しており、複数の成分が結晶化している挙動が観察された。この低融点成分の結晶化温度が 3.96 °C であり、エンタルピー変化が 28.33 J·g<sup>-1</sup>であった。可逆熱流曲線には結晶化過程で高融点成分が相分離する吸熱ピークを示した。加熱過程では、高融点成分と低融点成分がそれぞれの融解吸熱ピークを示したが、両方とも結晶転移による発熱ピークが観察された。高融点成分では発熱ピークの範囲が広く、結晶融解温度が 21.97 °C であり、エンタルピー変化が 15.67 J·g<sup>-1</sup>であった。低融点成分では結晶融解温度が -10.84 °C であり、エンタルピー変化が 31.54 J·g<sup>-1</sup>であった。

低融点植物油の大豆油とトウモロコシ油が測定温度範囲内 (5 ~ 60 °C) に SFC が測定されなかったが、ヤシ油、パーム油および乳脂肪では測定温度範囲で温度の上昇に伴って、SFC が減少した (Fig. 15)。5 °C での SFC は、ヤシ油で約 70 %であったが、乳脂肪で約 45 %であり、パーム油で乳脂肪に近い 45 %前後であった。温度が上昇すると、ヤシ油の結晶が融解して SFC が速やかに減少したが、組成が複雑なパーム油では SFC の減少が比較的緩やかな傾向を示し、20 ~ 40 °C の範囲ではパーム油の方が上回った。40 °C 以上では全ての試料の SFC

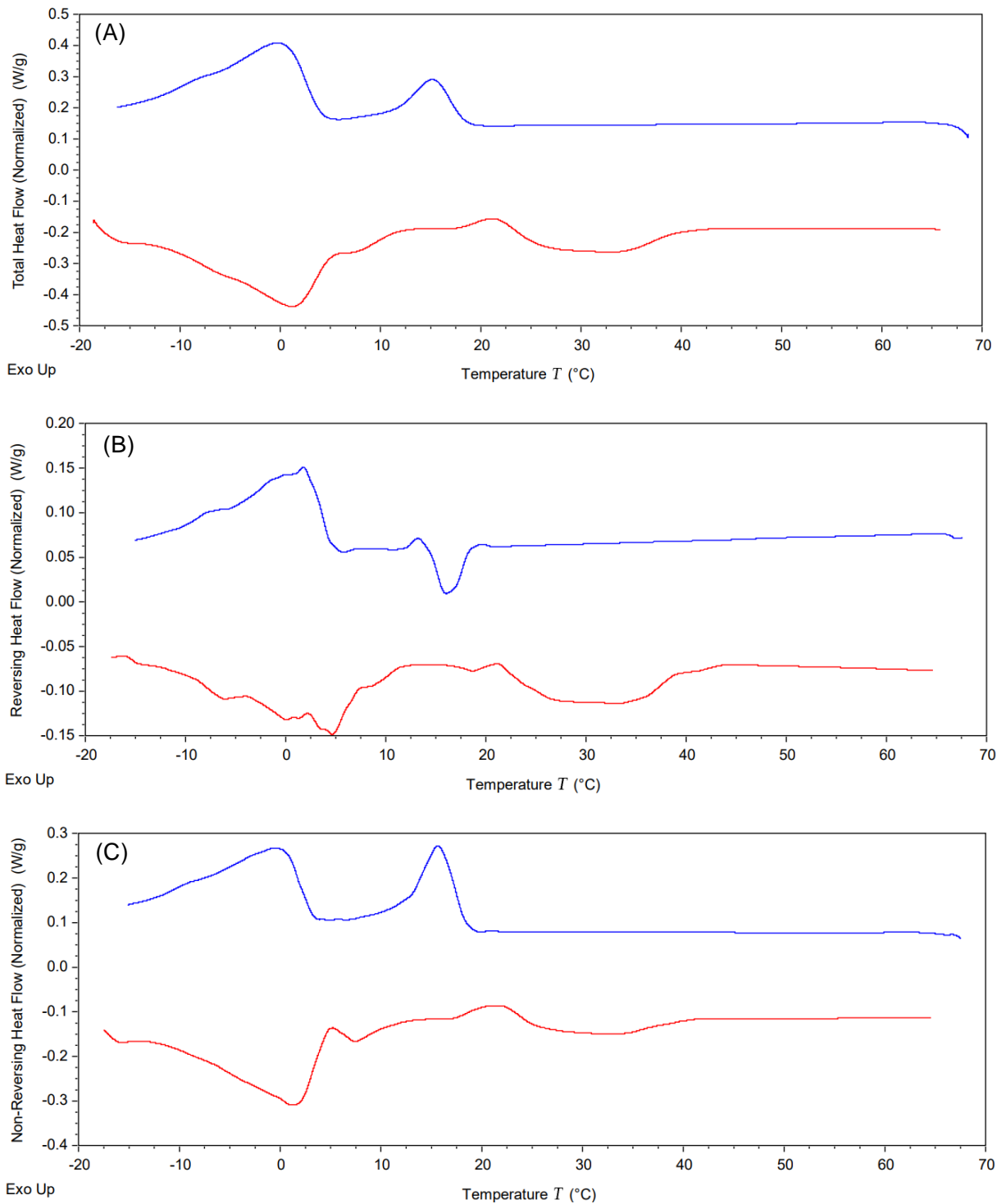


Fig. 14 DSC curves of palm oil. In each graph, heating process was shown in red curve and cooling process was shown in blue curve in total heat flow curves (A), reversing heat flow curves (B) and non-reversing heat flow curves (C).

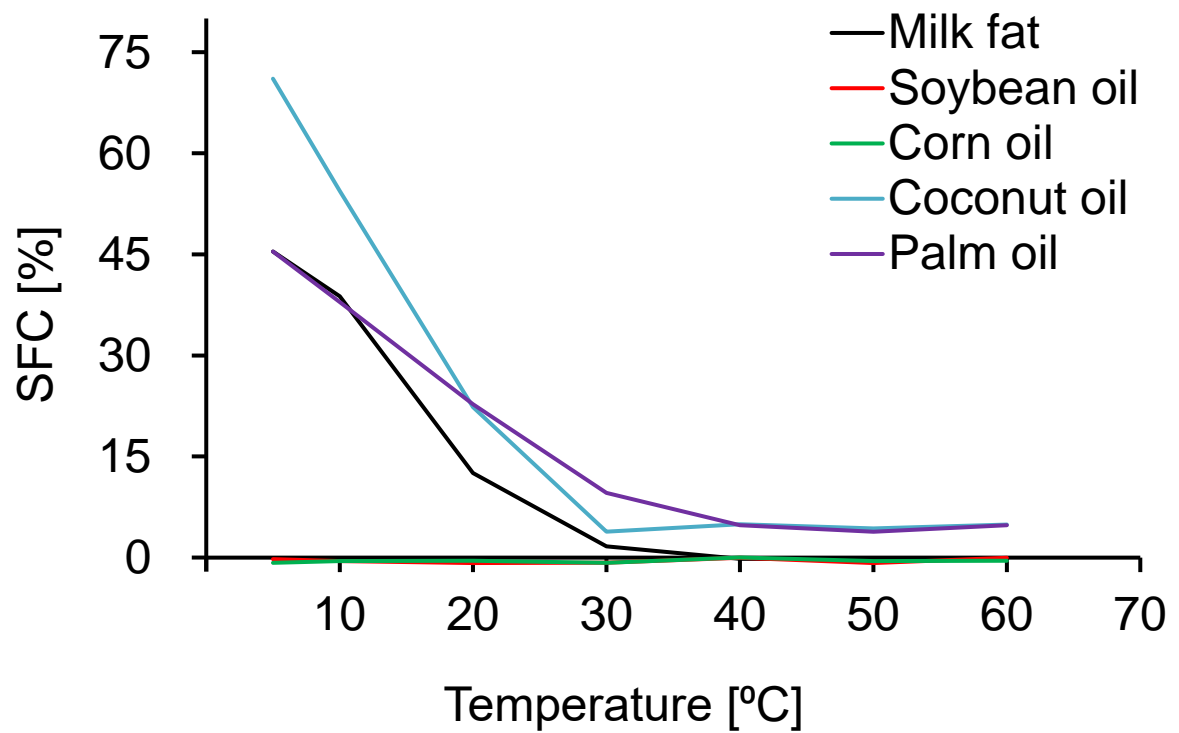


Fig. 15 SFC of fat and oils changes as a function of temperature: milk fat (black), soybean oil (red), corn oil (green), coconut oil (blue) and palm oil (purple).

が 0 に近い値となり、これは DSC の結果と一致している。以上の結果から、測定温度範囲において 2 種類の高融点植物油の SFC は乳脂肪より高かったが、流動性ヨーグルトの貯蔵温度である 5 ~ 10 °C の範囲内では、パーム油が乳脂肪に近い SFC を示した。

以上のことから、ヨーグルトを調製する段階ではこれらの油脂が液体油であったが、貯蔵過程において乳脂肪が結晶化して、ヨーグルトの力学的性質や食品テクスチャーに寄与する可能性が考えられる。ヤシ油に比べて、パーム油の組成がより複雑なために、加熱・冷却過程における結晶構造の変化挙動が複雑となり、乳脂肪に近い融解・凝固、結晶化、結晶転移挙動を示した。一方、ヤシ油の結晶化開始温度が乳脂肪より低く、その結晶化・融解過程におけるエンタルピー変化が大きく、相転移が発生しにくい可能性を示唆している。

#### 1-2. 水に対する界面張力および定常流粘度

水に対する油脂の界面張力は、油脂が種々のトリアシルグリセロールの混合物であるために、15 ~ 20 mN·m<sup>-1</sup>前後であった (Table 5)。本研究に用いた 4 種類の植物油脂のうち、大豆油には微量ではあるが大豆レシチンが存在しているために界面張力が最も小さかった。それに対して、ヤシ油の界面張力が最も大きかった。界面張力が高い油脂では、脂肪球の分散状態が熱力学的に不安定となり、流動性ヨーグルトの製造過程において脂肪球が凝集・合一しやすいと考えられる。

定常流粘度では、全ての植物油脂が 10 mPa·s 前後の値であり、ヤシ油の粘度が最も低く、パーム油の粘度が最も高かった。粘度高い油脂では、均質化処理で分散しにくい可能性が考えられる。

### 2. 還元乳中の脂肪球の存在状態

#### 2-1. 粒子径分布

植物油脂を配合した還元乳中の脂肪球の粒子径分布は乳脂肪を配合した場合と同様に、特徴的な 3 つのピークが存在しており (Fig. 16)、均質化圧力の増加に伴って、体積平均粒子径が減少した (Table 6)。5 MPa で均質化処理した試料では、パーム油の定常流粘度が高いために、

Table 5 Physical properties of oil samples

Oil	Density [kg · m <sup>-3</sup> ]	Interface tension against water phase [mN · m <sup>-1</sup> ]	Viscosity [ mPa · s]
Soybean	894.0±2.2 <sup>a</sup>	16.0±0.3 <sup>a</sup>	11.6±0.02 <sup>a</sup>
Corn	890.6±2.2 <sup>a</sup>	18.6±0.5 <sup>b</sup>	12.2±0.00 <sup>b</sup>
Coconut	892.5±0.6 <sup>a</sup>	21.0±1.1 <sup>c</sup>	9.6±0.00 <sup>c</sup>
Palm	887.4±3.5 <sup>a</sup>	15.3±1.5 <sup>d</sup>	13.5±0.00 <sup>d</sup>

Mean ± Standard deviations (Density and viscosity,  $n = 3$ ; Interface tension,  $n = 10$ )

Values followed by the same superscript letter within same column represent no significant different between sample groups at  $p < 0.05$ .

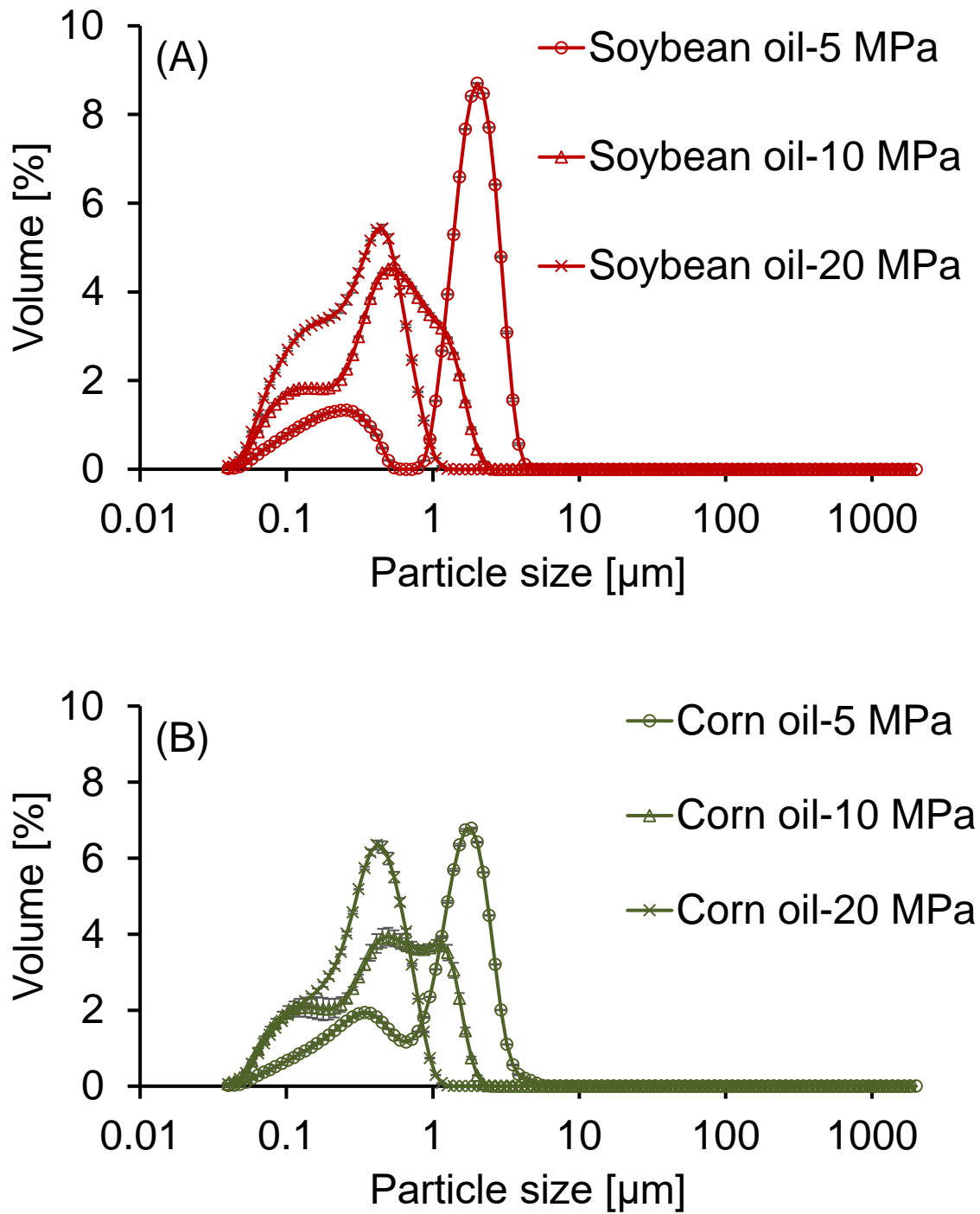


Fig. 16 Particle size distribution of reconstituted milk made with different vegetable oil: soybean oil (A), corn oil (B), coconut oil (C) and palm oil (D) changes as different homogenization pressure used: 5 (circle), 10 (triangle) and 20 MPa (cross).

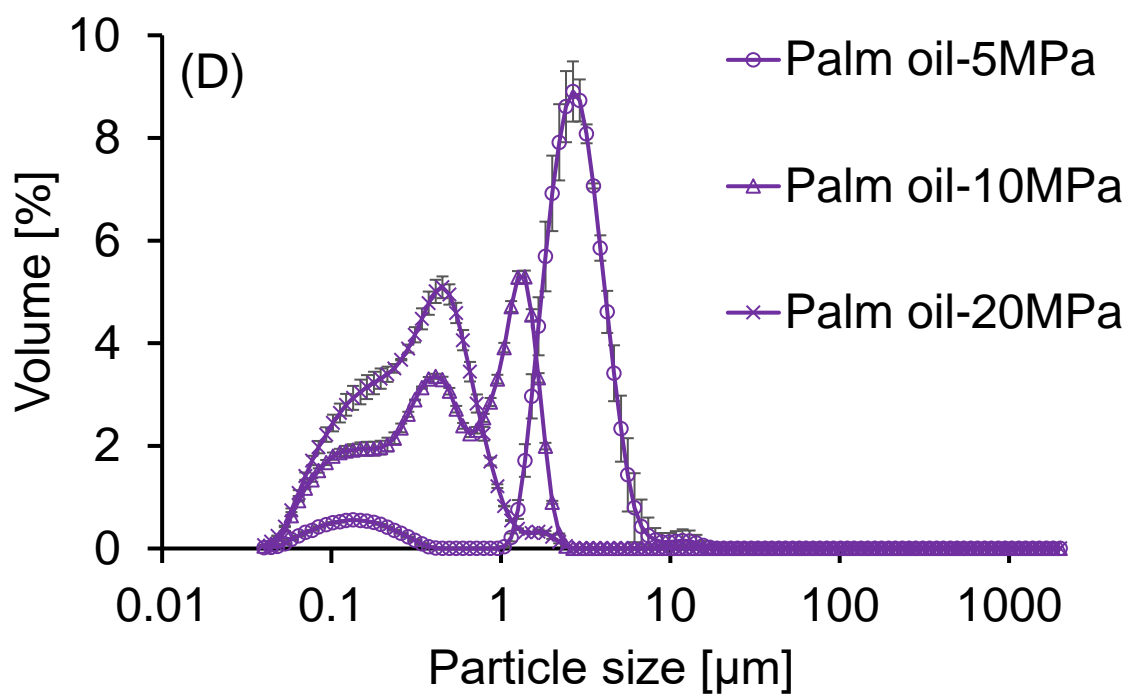
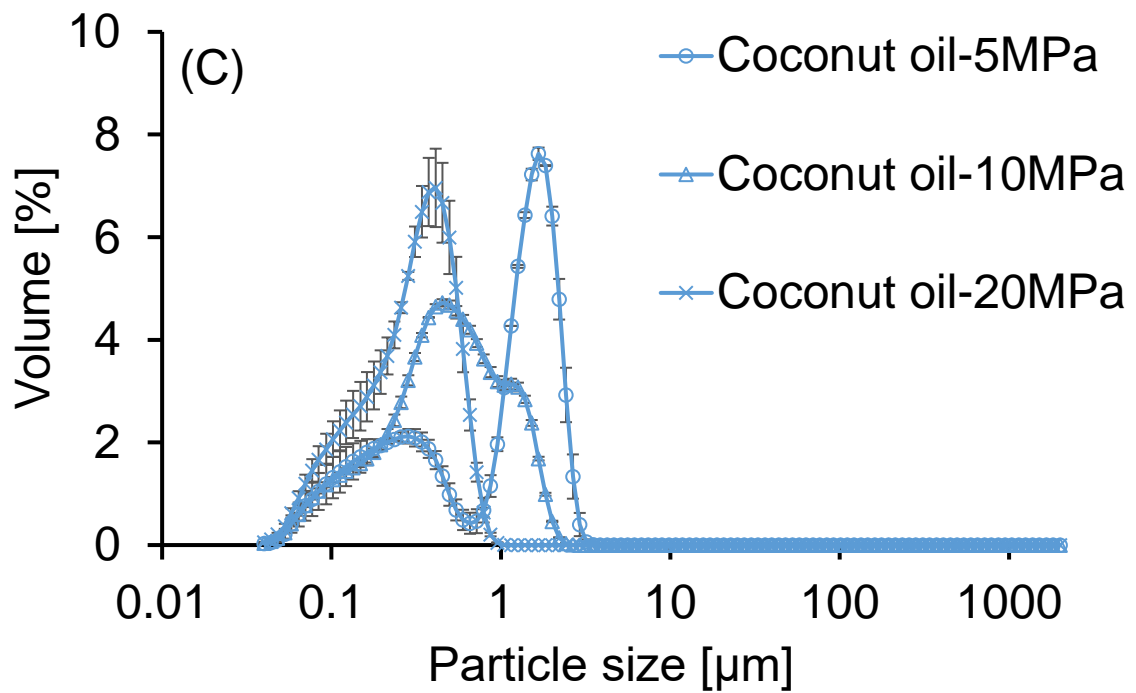


Fig. 16 (Continued).



Table 6 Physicochemical properties of reconstituted milk prepared with different oil

Oil	Homogenization pressure [ MPa]		Mean diameter [μm]	Apparent zeta potential [mV]	PSH [-]
	1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage			
	Soybean	5	<1	1.725±0.0064 <sup>a</sup>	-28.11±1.321 <sup>ac</sup>
	10	1	0.611±0.0049 <sup>b</sup>	-30.91±0.318 <sup>b</sup>	16.95
	20	2	0.342±0.0007 <sup>c</sup>	-29.73±0.067 <sup>bc</sup>	20.49
Corn	5	<1	1.360±0.0064 <sup>d</sup>	-27.68±0.730 <sup>a</sup>	12.91
	10	1	0.604±0.0212 <sup>e</sup>	-26.70±0.517 <sup>a</sup>	15.49
	20	2	0.383±0.0028 <sup>f</sup>	-31.39±0.177 <sup>b</sup>	17.78
Coconut	5	<1	1.148±0.0537 <sup>g</sup>	-26.23±1.000 <sup>a</sup>	13.20
	10	1	0.622±0.0106 <sup>b</sup>	-28.39±1.164 <sup>bc</sup>	13.84
	20	2	0.338±0.0191 <sup>c</sup>	-29.36±0.539 <sup>c</sup>	19.29
Palm	5	<1	2.921±0.2949 <sup>i</sup>	-27.50±0.706 <sup>b</sup>	15.14
	10	1	0.719±0.0134 <sup>j</sup>	-27.90±0.506 <sup>b</sup>	16.16
	20	2	0.396±0.0127 <sup>f</sup>	-30.53±0.566 <sup>d</sup>	19.19

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ )

PSH was shown as the mathematic results of fitting curves.

Values followed by the same superscript letter within same column represent no significant different between sample groups at  $p < 0.05$ .

還元乳に分散しにくく、それを配合した還元乳の体積平均径が、乳脂肪を分散した場合より大きかった。高い均質化圧力で処理した場合には、全ての試料が似ている粒子径分布を示し、体積平均粒子径も 0.4  $\mu\text{m}$  以下であった。したがって、実製造よりも高い均質化圧力を使用することで、牛乳に類似した粒子径分布にすることが可能であると考えられた。

## 2-2. 還元乳の微細構造

重金属であるウランで染色されたタンパク質は電子線が透過しにくいため、黒い TEM 画像になる。したがって、還元乳の TEM 画像ではカゼインミセルは黒い球体で観察された。一方、界面に乳タンパク質などが吸着して輪郭を形成していると思われる白色領域が存在し、これは分散している脂肪球であると判断した。全ての還元乳ではカゼインミセルが粒子径 50 ~ 500 nm の球体であり、特に 100 ~ 200 nm のカゼインミセルが多く観察された。

まず、低融点植物油である大豆油およびトウモロコシ油を配合した還元乳では、観察された脂肪球の粒子径が均質化圧力の増加に伴って全体的に小さくなったが、大きさのばらつきが大きかった (Fig. 17)。本研究で設定した低い 5 MPa ならびに高い 20 MPa で均質化処理した還元乳には、粒子径が 100 と 500 nm の脂肪球が同時に観察された。しかし、均質化圧力を増加させると 100 nm の小さい脂肪球の数が増加したために、脂肪球の体積平均粒子径が減少したと思われる。乳脂肪を配合した還元乳とは異なり、低融点植物油を用いた還元乳に存在している脂肪球が全て楕円体として存在しており、界面にカゼインのサブミセルと思われる黒い粒状物が吸着してその構造を維持していると思われる。乳脂肪を配合した場合には脂肪球同士が独立している単粒の状態を観察されたが、低融点植物油を配合した場合には脂肪球が連結している団粒状態も観察された。また、100 ~ 200 nm の脂肪球およびカゼインミセルが数個連結しているクラスターが観察された。したがって、低融点植物油の脂肪球同士が凝集・合一しやすい傾向にあると思われる。以上のことから、低融点植物油を配合した還元乳の微細構造では、脂肪球の大きさのばらつきが大きく、楕円体の団粒状態の脂肪球が多く存在しているという 2 つの特徴があり、脂肪球同士の凝集・合一が発生しやすいことを示唆している。こ

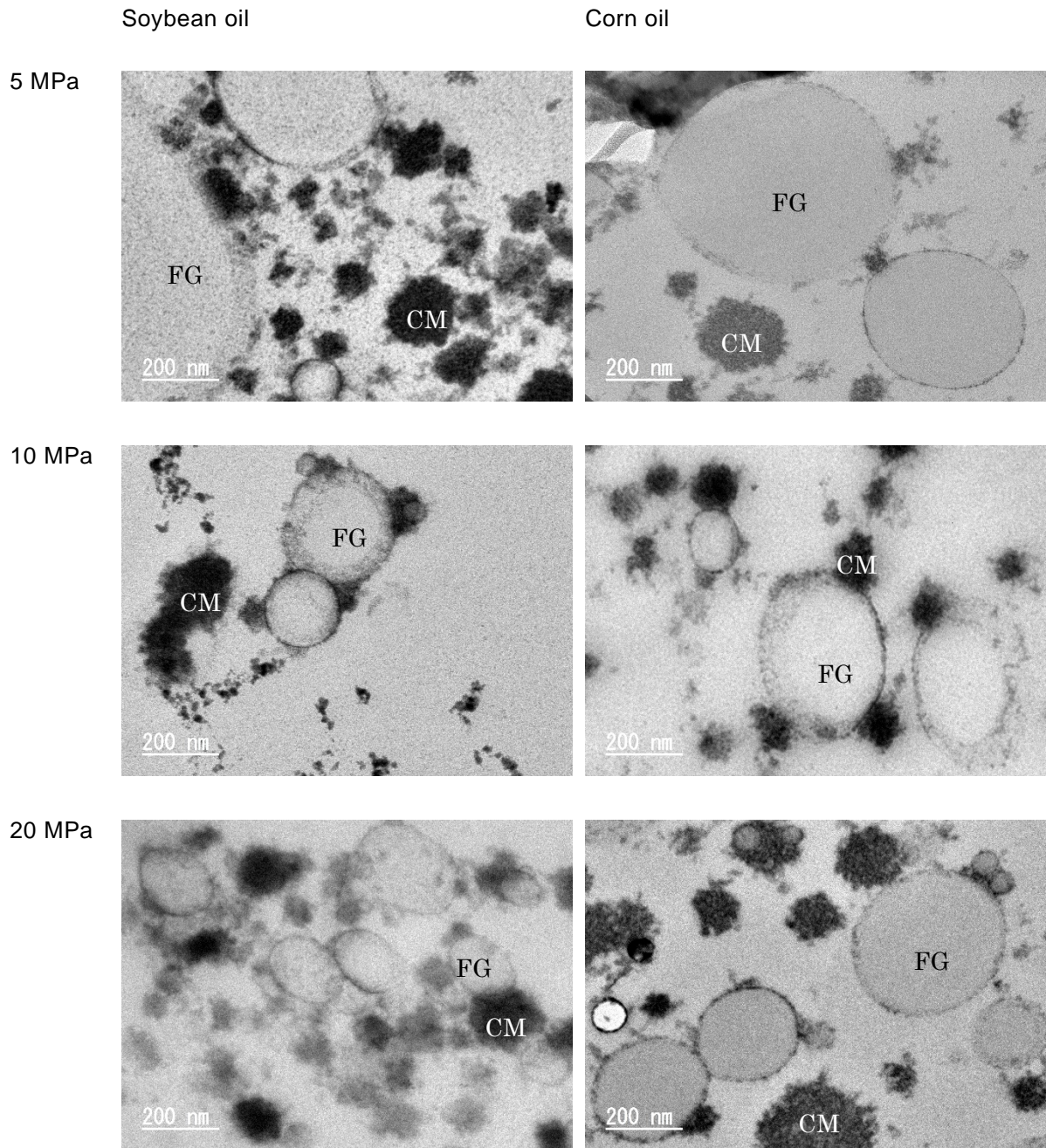


Fig. 17 Microstructure of reconstituted milk with soybean oil (left) or corn oil (right) homogenized at 5, 10 and 20 MPa observed by transmission electron microscope. CM represents casein micelles, and FG represents fat globules, respectively. Scale bars represent 200 nm.

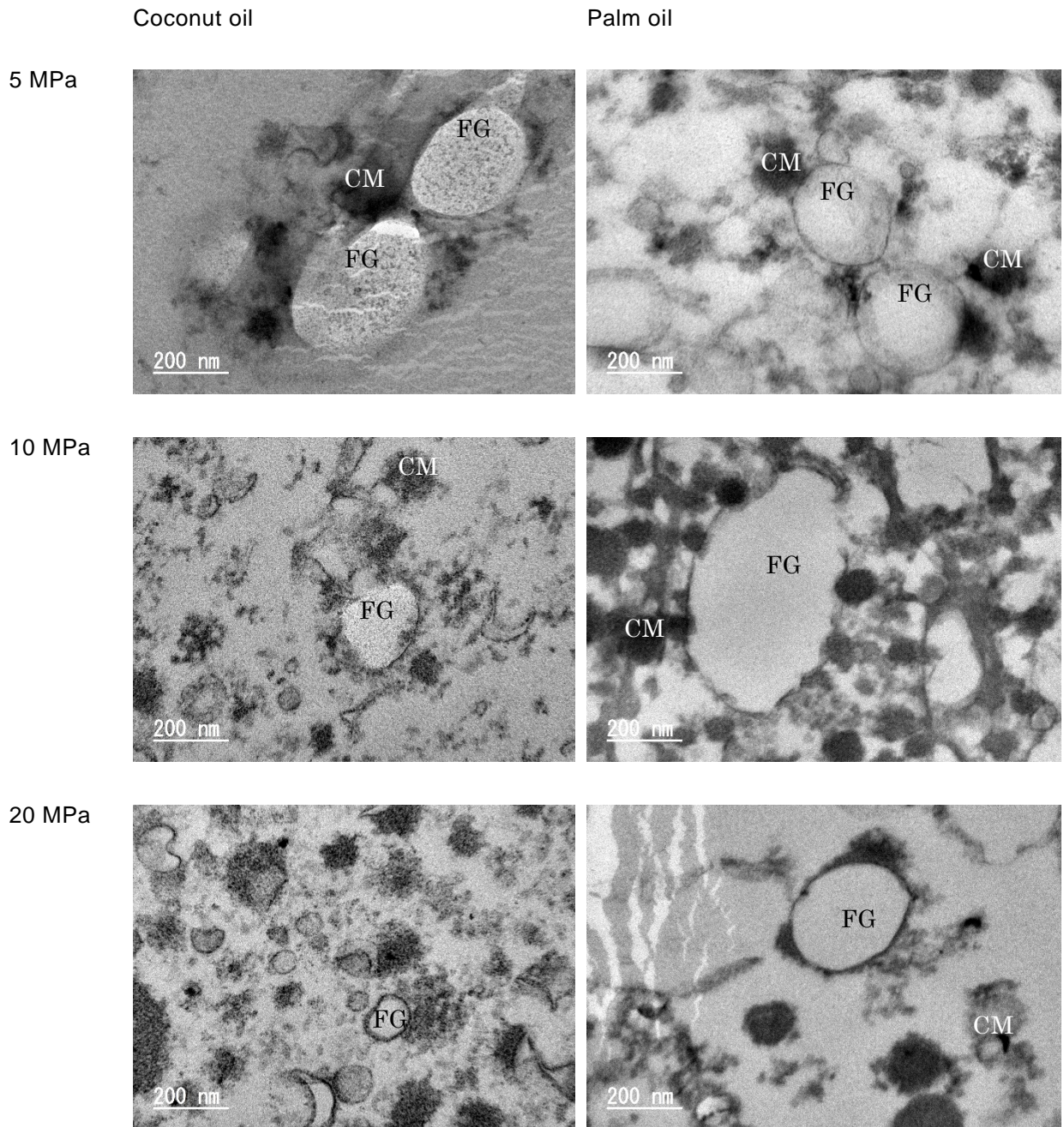


Fig. 18 Microstructure of reconstituted milk with coconut oil (left) or palm oil (right) homogenized at 5, 10 and 20 MPa observed by transmission electron microscope. CM represents casein micelles, and FG represents fat globules, respectively. Scale bars represent 200 nm.

これらのことから、乳タンパク質が凝集ネットワークを形成する時に有効な架橋結合を形成できない可能性が考えられた。

次に、高融点植物油であるヤシ油およびパーム油を配合した還元乳では、乳脂肪を配合した場合と同様に表面に凹凸がある脂肪球が観察された。ヤシ油の脂肪球には界面に乳タンパク質と思われる厚い層構造が観察され、安定性が高い界面構造を形成したと思われる。いずれの均質化圧力で処理した場合にも、粒子径 200 nm 程度の小さい脂肪球が多く観察された。一方、パーム油を配合した還元乳では、乳脂肪を用いた場合に類似した脂肪球とカゼインミセルとの複合体が観察された。また、均質化圧力の増加と共に、分散している小さい脂肪球が増加する傾向にあったが、パーム油は分散しにくい傾向にあり、粒子径 200 nm 以上の大きい脂肪球と 100 nm 以下の小さい脂肪球が数多く観察された。したがって、いずれの植物油脂を配合した試料でも、脂肪球と乳タンパク質の複合構造が観察されたが、油脂の種類によって吸着する乳タンパク質の量および種類が異なり、2 種類の低融点植物油を配合した還元乳では、カゼインのサブミセルと思われる小さい粒状物が多く吸着しており、ヤシ油を配合した還元乳では、吸着した大量のカゼインミセルが厚い層構造を形成していた。そして、パーム油を配合した還元乳では、脂肪球の界面に変性した乳清タンパク質と思われる薄い層構造が存在し、その上にカゼインミセルが吸着していた。このように、異なる界面構造が観察された。本研究で使用した 4 種類の植物油脂のうち、パーム油を配合した還元乳の脂肪球と乳タンパク質の複合体構造は乳脂肪を配合した還元乳に観察された構造に最も類似していた。

### 3. 還元乳の理化学的性質

#### 3-1. 界面電位

植物油脂を配合した還元乳のゼータ電位が $-26 \sim -32$  mV の範囲内にあり、乳脂肪を配合した場合に類似していた (Table 6)。トウモロコシ油またはパーム油を配合した還元乳は、均質化圧力が 10 MPa 以下の場合に見かけの界面電位は均質化圧力にほとんど影響されずに $-27$  mV 前後であり、20 MPa で均質化処理すると $-30$  mV まで減少した。この 2 種類の植物油脂

は還元乳中に分散しにくい傾向にあるために、均質化圧力を 5 MPa から 10 MPa に増加させても、脂肪球界面に対する乳タンパク質の吸着量が増加しなかったために、界面電位の変化が少なかった可能性が考えられる。大豆油を配合した還元乳では、見かけの界面電位が均質化圧力にほとんど影響されずに -30 mV 前後であった。一方、ヤシ油を配合した場合には、乳脂肪を用いた場合と同様に、均質化圧力の増加に伴って、見かけの界面電位の絶対値が有意に増加した。以上のことから、還元乳の界面電位に対する均質化圧力の影響は、油脂の種類によって異なることがわかった。これは、トリアシルグリセロール組成によって脂肪球界面に吸着した乳タンパク質の組成が異なる可能性を示唆している。しかし、高い均質化圧を適用した場合にほ、異なる油脂を配合した還元乳の見かけの界面電位に有意差が消失した。したがって、高い圧力の均質化処理は、油脂の種類にかかわらず、比較的に安定な脂肪球界面構造を形成させたと考えられる。

### 3-2. タンパク質の表面疎水性

植物油を配合した全ての還元乳は、表面疎水性 (PSH, protein surface hydrophobicity) が 13 ~ 20 の範囲内で変化した (Table 6)。低融点植物油である大豆油およびトウモロコシ油を配合した還元乳の PSH は、乳脂肪を配合した場合と同様に均質化圧力の増加と共に増加した。高融点植物油であるヤシ油およびパーム油を配合した還元乳の PSH にも同様な傾向が見られたが、5 ~ 10 MPa で均質化処理した場合の差が小さく、低均質化圧力の場合において高融点植物油が分散しにくいために、疎水性のタンパク質を吸着する表面積の増加が少ない可能性が考えられる。20 MPa で均質化処理した還元乳では、配合した油脂がトウモロコシ油、ヤシ油、パーム油、そして大豆油の順に PSH が減少したが、いずれの還元乳でも PSH が 20 前後であった。

分散粒子の疎水性領域の量を反映する  $F_{\max}$  はヤシ油を配合した還元乳で最も大きく、大豆油を配合した還元乳で最も小さかった (Fig. 19)。これは、界面電荷と同様に、油脂の種類によって、乳タンパク質に対する脂肪球の親和性が異なる可能性が考えられる。また、ANS との疎

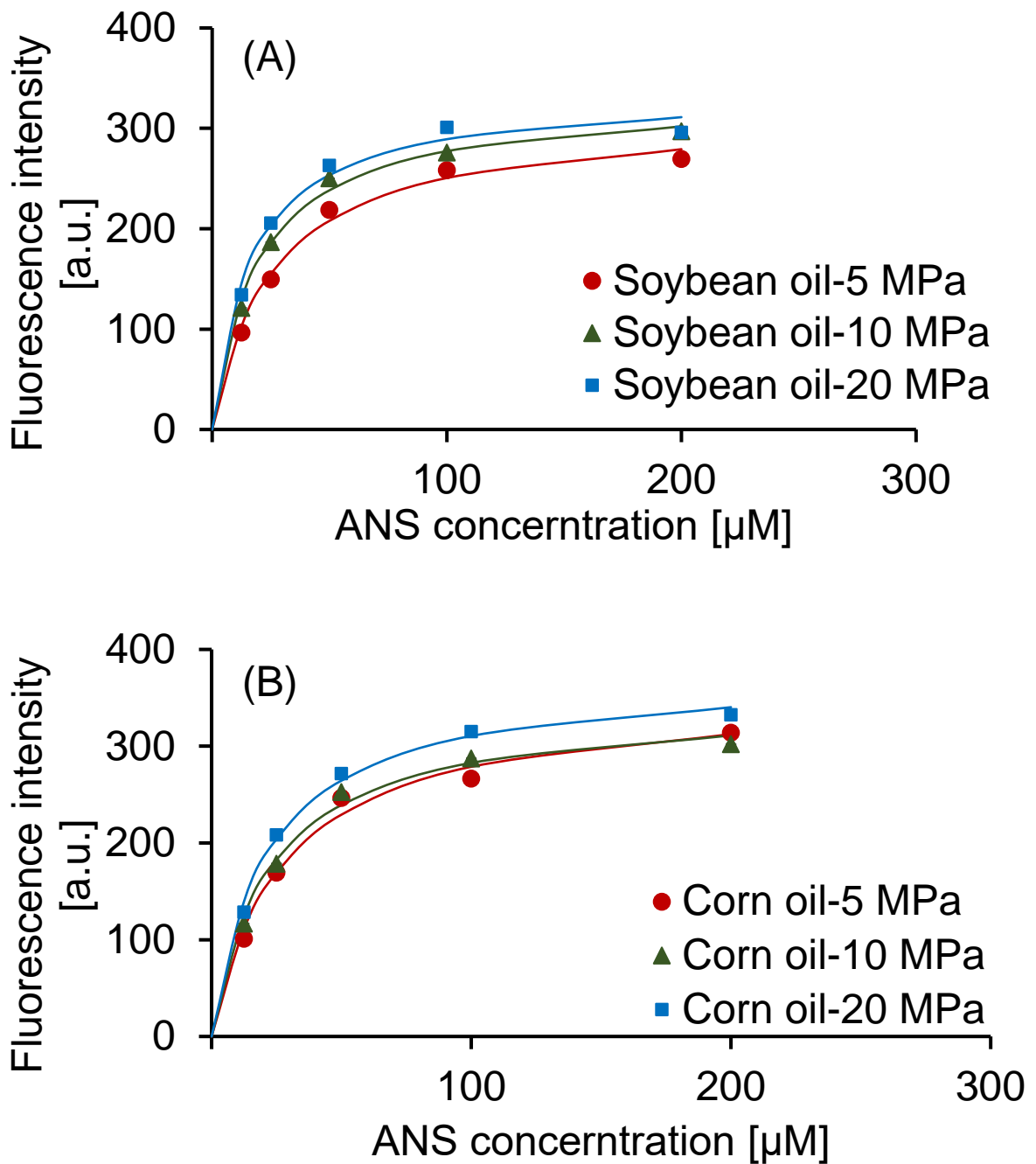


Fig. 19 Fluorescence intensity changes as a function of concentration of 1,8-ANS mixed with reconstituted milk made with soybean oil (A), corn oil (B), coconut oil (C) or palm oil (D) and homogenized at 5 (circle, red), 10 (triangle, green) and 20MPa (square, blue). Fitting curves are shown by lines in same color of data points. a.u., arbitrary unit.

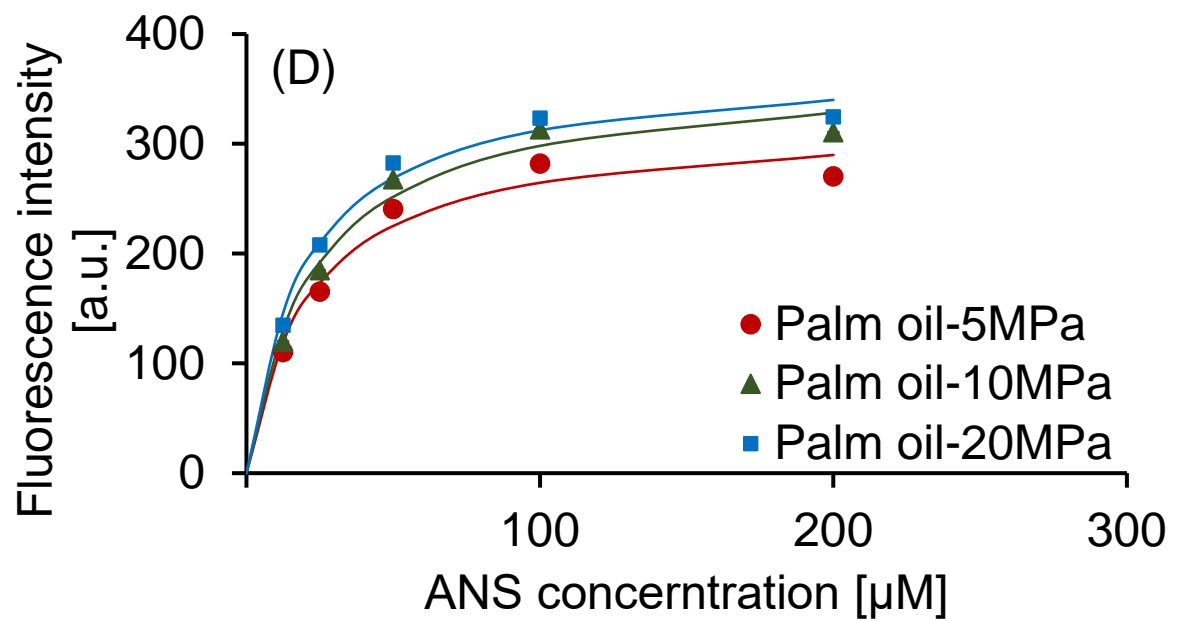
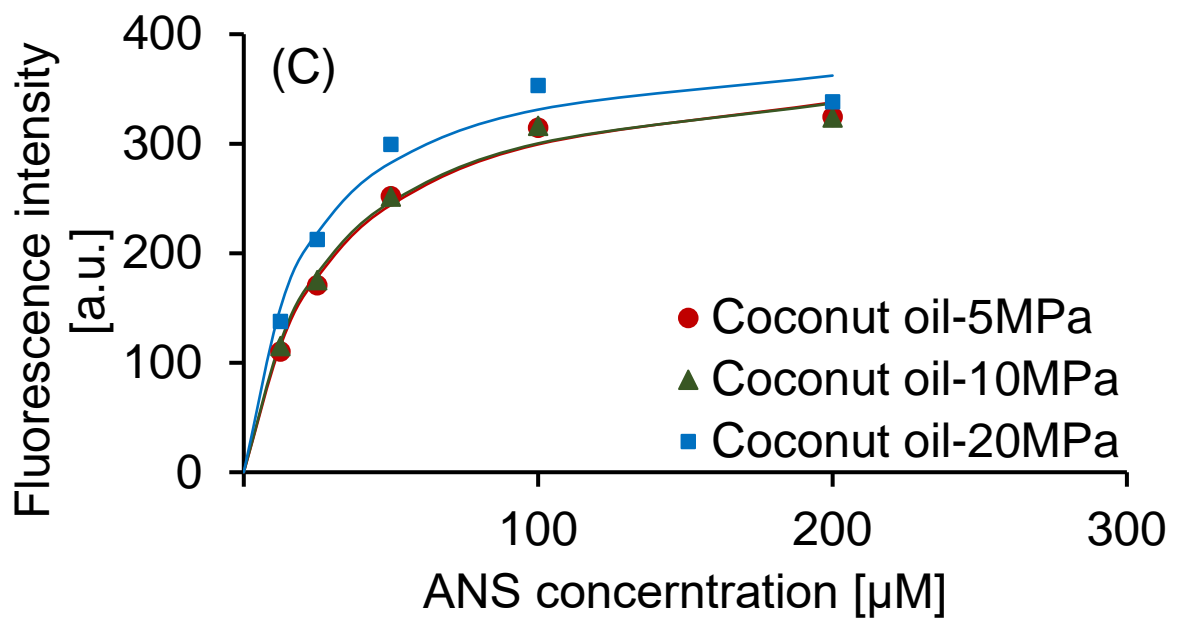


Fig. 19 (Continued)



水性相互作用の強さを反映する  $K_d$  は、乳脂肪を配合した場合と異なり、パーム油を除く植物油脂を配合した還元乳の  $K_d$  が均質化圧力の増加と共に減少する傾向にあった。

脂肪球の平均体積は、10 MPa で均質化処理した還元乳から調製した流動性ヨーグルトで 5 MPa で均質化処理した還元乳を用いた場合に比べて減少する傾向にあったが、20 MPa で均質化処理した還元乳を用いた場合にはさらに減少しなかったことから、脂肪球同士が凝集・合一していると考えられる。特に、高融点植物油を配合した流動性ヨーグルトでは、20 MPa で均質化処理した還元乳を用いた場合の脂肪球が有意に大きかった。単位体積当たりの比表面積は、低融点植物油を配合した流動性ヨーグルトでは均質化圧力が 20 MPa に増加させると減少傾向にあった。以上のことから、植物油脂の理化学的性質および乳タンパク質に対する親和性によって、PSH に対する油脂の種類の影響が異なることが考えられたが、界面電位と同様に 20 MPa で均質化処理した場合には、いずれの還元乳も同様に PSH が 20 前後に収束した。したがって、高均質化圧力により脂肪球が小さく、均一に分散させられることにより、脂肪球界面に吸着している乳タンパク質構造が同じ状態になったと考えられた。

#### 4. 流動性ヨーグルトのメソスコピック構造

乳脂肪を用いた場合と同じく、植物油脂を配合した流動性ヨーグルトのタンパク質凝集体は不規則な形状であり、脂肪球がこれらのタンパク質凝集体の内層または表層に存在していた (Fig. 20, 21, 22, 23)。いずれの流動性ヨーグルトでも、還元乳を調製する際の均質化圧力の増加と共に、観察された脂肪球の粒子径が減少し、タンパク質凝集体の表層に存在している脂肪球の数も減少した。ただし、ヤシ油を配合した還元乳では、20 MPa で均質化処理した還元乳を用いた場合にタンパク質凝集体の表層に存在する脂肪球が増加したことが確認された。

さらに、低融点植物油である大豆油およびトウモロコシ油を配合した流動性ヨーグルトでは、5 および 10 MPa で均質化処理した還元乳を用いた場合に、タンパク質凝集体の平均体積に対する均質化圧力の影響がほとんどなかったが、還元乳を 20 MPa で処理した場合にはタンパク質凝集体の平均体積が増加する傾向にあった (Table 7, 8, 9, 10)。一方、高融点植物油である

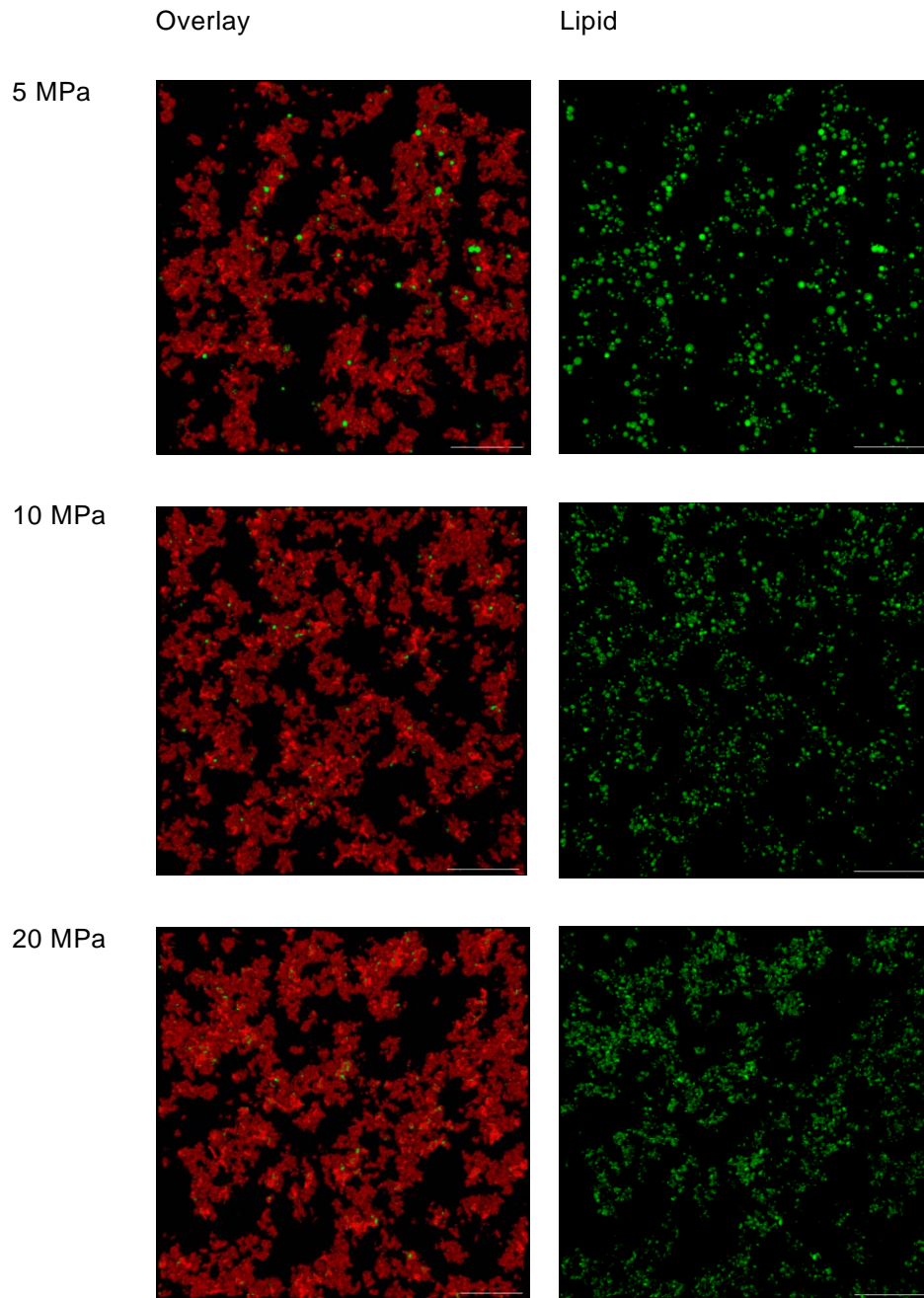


Fig. 20 Mesoscopic structure of stirred yogurts made from different reconstituted milk with soybean oil homogenized at 5, 10 and 20 MPa observed by confocal laser scanning microscope with a 100x oil objective lens. Left shows overlay images, right shows signal from lipid. Red represents protein, and green represents lipid, respectively. In addition, scale bars represent 25  $\mu\text{m}$ .

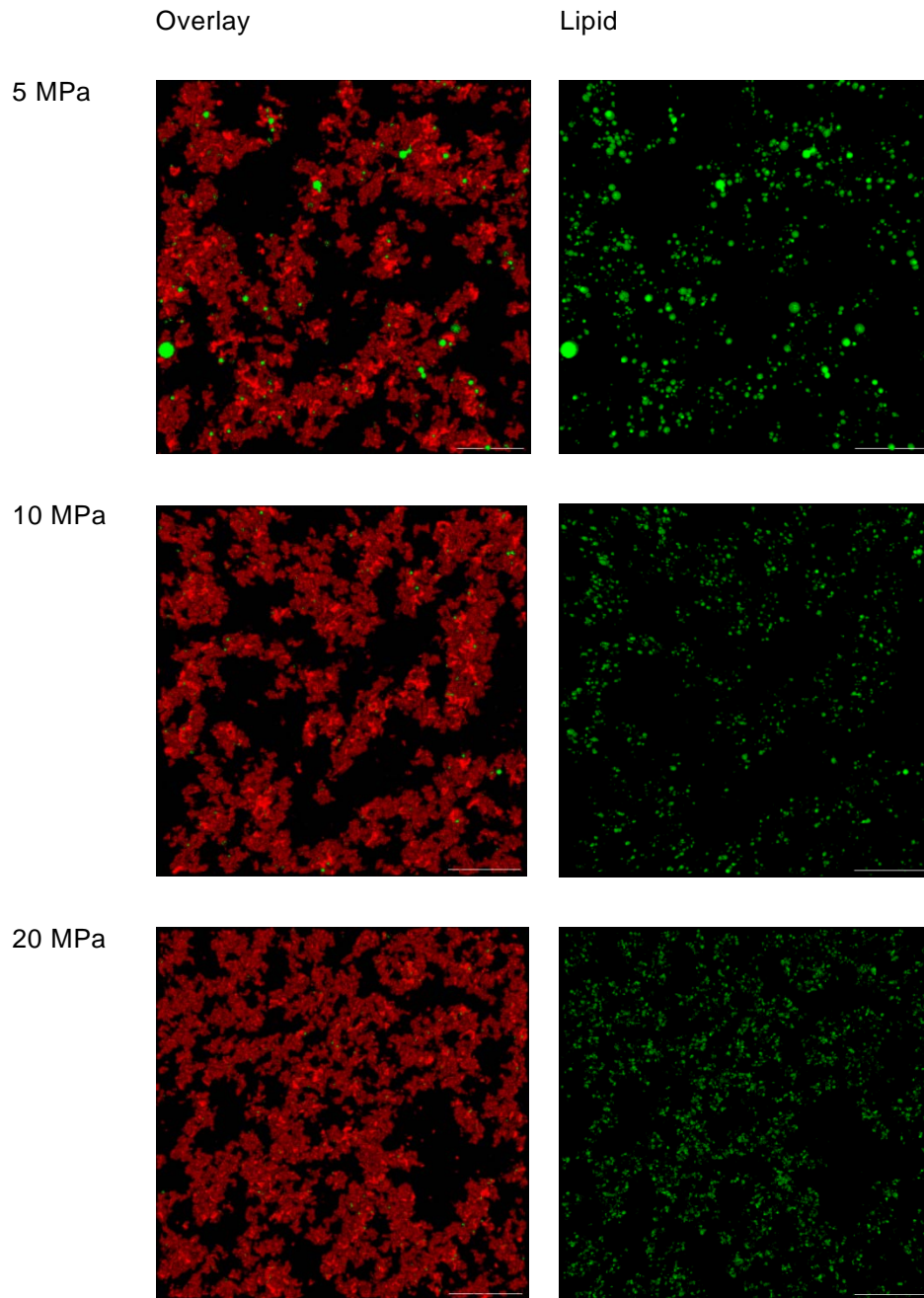


Fig. 21 Mesoscopic structure of stirred yogurts made from different reconstituted milk with corn oil homogenized at 5, 10 and 20MPa observed by confocal laser scanning microscope with a 100x oil objective lens. Left shows overlay images, right shows signal from lipid. Red represents protein, and green represents lipid, respectively. In addition, scale bars represent 25  $\mu\text{m}$ .

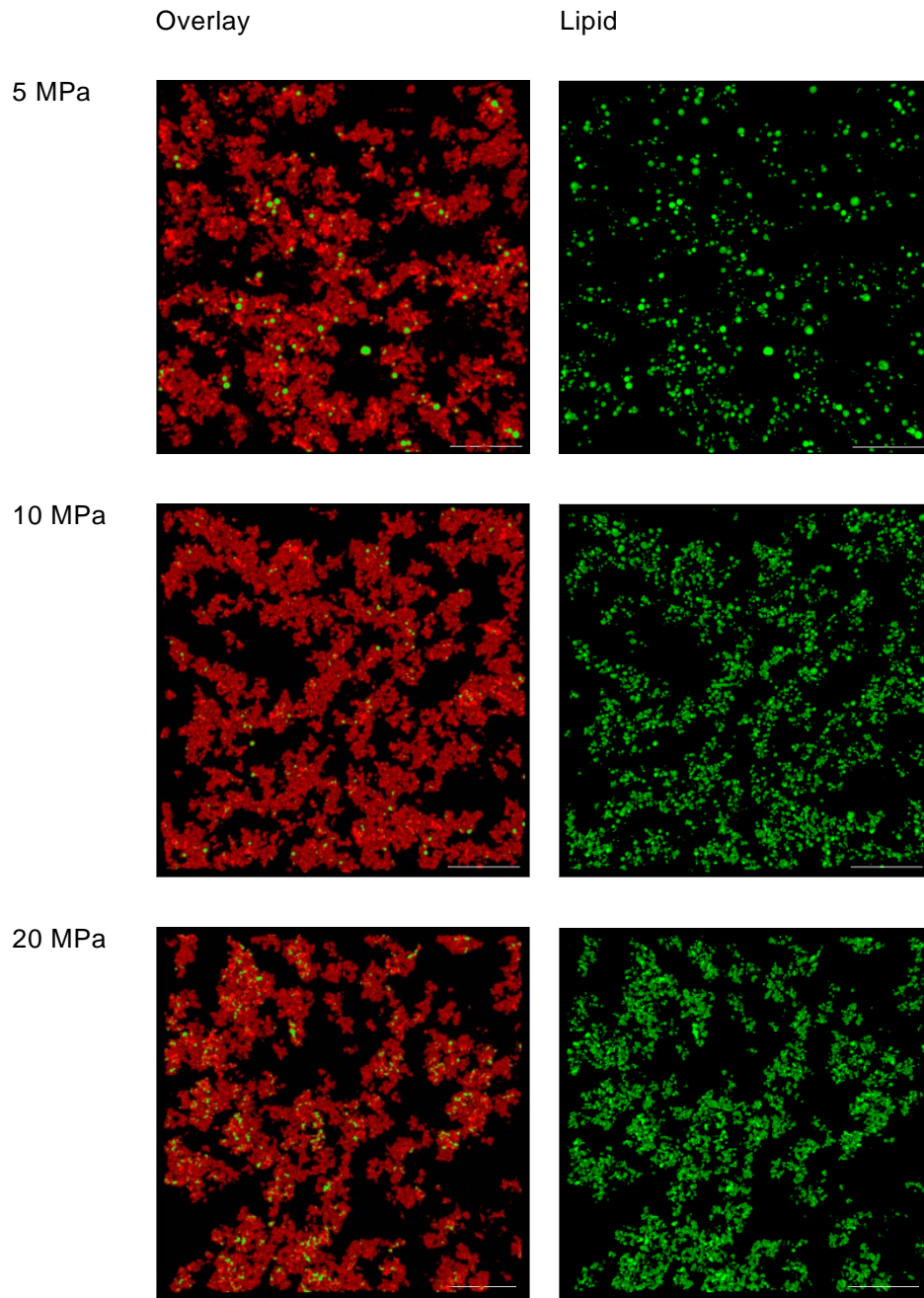


Fig. 22 Mesoscopic structure of stirred yogurts made from different reconstituted milk with coconut oil homogenized at 5, 10 and 20 MPa observed by confocal laser scanning microscope with a 100x oil objective lens. Left shows overlay images, right shows signal from lipid. Red represents protein, and green represents lipid, respectively. In addition, scale bars represent 25  $\mu\text{m}$ .

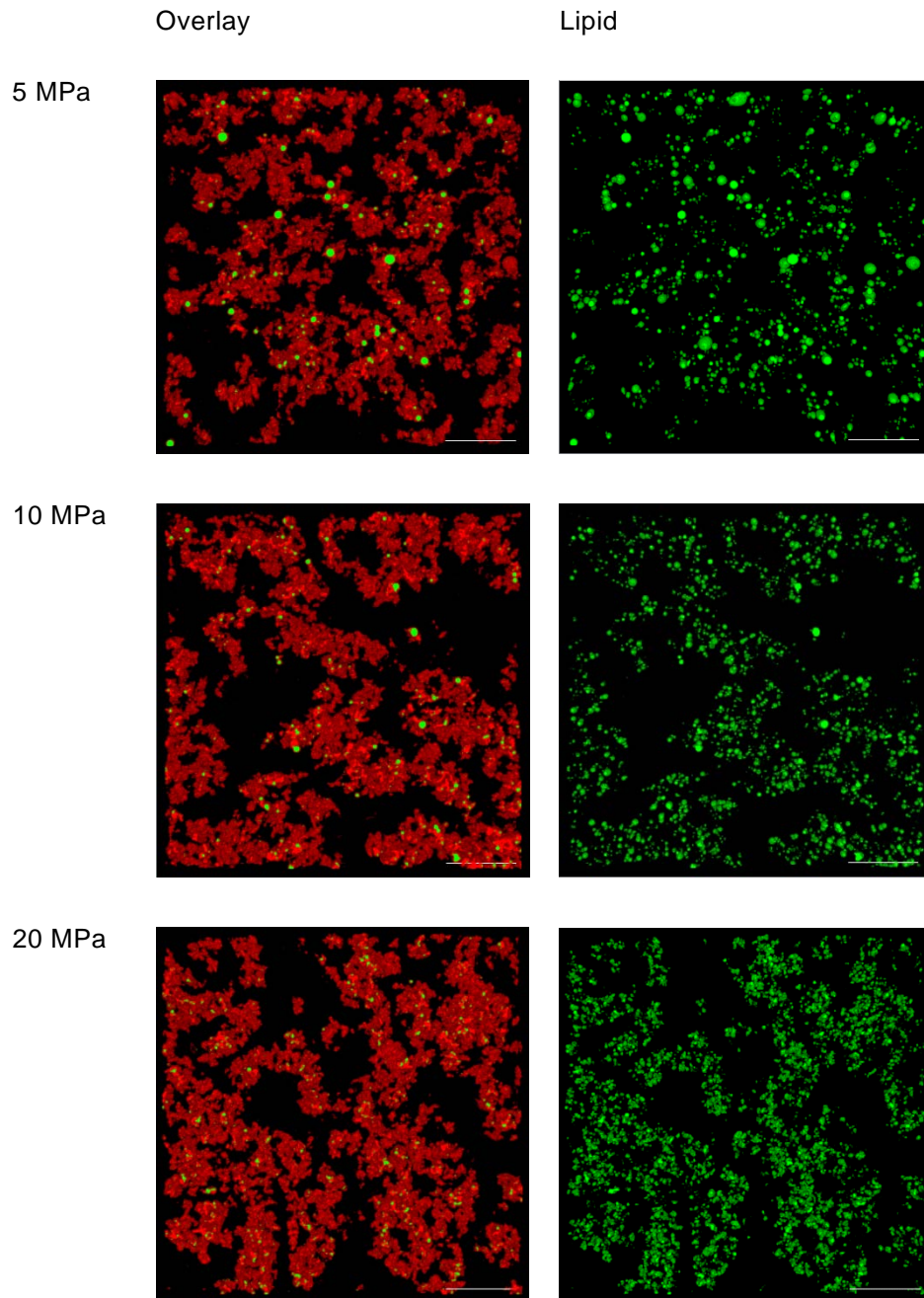


Fig. 23 Mesoscopic structure of stirred yogurts made from different reconstituted milk with palm oil homogenized at 5, 10 and 20 MPa observed by confocal laser scanning microscope with a 100x oil objective lens. Left shows overlay images, right shows signal from lipid. Red represents protein, and green represents lipid, respectively. In addition, scale bars represent 25  $\mu\text{m}$ .

Table 7 Mesoscopic structural properties of stirred yogurt prepared with reconstituted milk with soybean oil.

Homogenization pressure [MPa]		Protein aggregate				Fat globule		
1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$\phi_{vol}$ [-]	$D_f$ [-]	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$D_f$ [-]
5	<1	24.64±4.275 <sup>a</sup>	4.30±0.132 <sup>a</sup>	0.10±0.008 <sup>a</sup>	2.54±0.039 <sup>a</sup>	1.11±0.084 <sup>a</sup>	3.44±0.060 <sup>a,b</sup>	2.16±0.026 <sup>a</sup>
10	1	24.37±1.804 <sup>a</sup>	4.22±0.148 <sup>a</sup>	0.12±0.032 <sup>a</sup>	2.58±0.049 <sup>a</sup>	0.69±0.204 <sup>a</sup>	3.48±0.097 <sup>b</sup>	2.28±0.069 <sup>a</sup>
20	2	48.46±7.036 <sup>b</sup>	3.71±0.073 <sup>b</sup>	0.16±0.021 <sup>a</sup>	2.60±0.039 <sup>a</sup>	0.91±0.322 <sup>a</sup>	3.19±0.179 <sup>a</sup>	2.43±0.062 <sup>b</sup>

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ );

$\overline{V}_{ag}$ , average volume of aggregates;  $\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ , specific surface area;  $\phi_{vol}$ , volume fraction;  $D_f$ , fractal dimension.

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

Table 8 Mesoscopic structural properties of stirred yogurt prepared with reconstituted milk with corn oil.

Homogenization pressure [MPa]		Protein aggregate				Fat globule		
1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$\phi_{vol}$ [-]	$D_f$ [-]	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$D_f$ [-]
5	<1	30.86±11.366 <sup>a</sup>	4.00±0.208 <sup>a</sup>	0.11±0.022 <sup>a</sup>	2.55±0.008 <sup>a</sup>	1.16±0.087 <sup>a</sup>	3.33±0.156 <sup>a</sup>	2.06±0.075 <sup>a</sup>
10	1	36.63±17.518 <sup>a</sup>	4.10±0.303 <sup>a</sup>	0.13±0.070 <sup>a</sup>	2.55±0.088 <sup>a</sup>	0.60±0.226 <sup>a</sup>	3.73±0.259 <sup>a</sup>	2.17±0.178 <sup>a</sup>
20	2	43.75±23.827 <sup>a</sup>	3.91±0.533 <sup>a</sup>	0.17±0.050 <sup>a</sup>	2.64±0.030 <sup>a</sup>	0.53±0.410 <sup>a</sup>	3.00±0.467 <sup>a</sup>	2.31±0.266 <sup>a</sup>

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ );

$\overline{V}_{ag}$ , average volume of aggregates;  $\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ , specific surface area;  $\phi_{vol}$ , volume fraction;  $D_f$ , fractal dimension.

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

Table 9 Mesoscopic structural properties of stirred yogurt prepared with reconstituted milk with coconut oil.

Homogenization pressure [MPa]		Protein aggregate				Fat globule		
1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$\phi_{vol}$ [-]	$D_f$ [-]	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$D_f$ [-]
5	<1	16.74±3.050 <sup>a</sup>	3.81±0.112 <sup>a</sup>	0.12±0.032 <sup>ab</sup>	2.59±0.009 <sup>a</sup>	1.12±0.059 <sup>a</sup>	3.39±0.028 <sup>ab</sup>	2.09±0.026 <sup>ab</sup>
10	1	26.51±24.025 <sup>a</sup>	3.97±0.278 <sup>a</sup>	0.10±0.025 <sup>a</sup>	2.52±0.009 <sup>b</sup>	0.72±0.201 <sup>b</sup>	3.79±0.062 <sup>bc</sup>	2.27±0.113 <sup>bcd</sup>
20	2	37.62±4.461 <sup>a</sup>	3.89±0.175 <sup>a</sup>	0.14±0.011 <sup>ab</sup>	2.57±0.023 <sup>ac</sup>	1.89±0.069 <sup>c</sup>	4.22±0.559 <sup>c</sup>	2.43±0.034 <sup>c</sup>

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ );

$\overline{V}_{ag}$ , average volume of aggregates;  $\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ , specific surface area;  $\phi_{vol}$ , volume fraction;  $D_f$ , fractal dimension.

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .



Table 10 Mesoscopic structural properties of stirred yogurt prepared with reconstituted milk with palm oil.

Homogenization pressure [MPa]		Protein aggregate				Fat globule		
1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$\phi_{vol}$ [-]	$D_f$ [-]	$\overline{V}_{ag}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ [ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ]	$D_f$ [-]
5	<1	20.96±8.218 <sup>a</sup>	3.69±0.034 <sup>ab</sup>	0.10±0.010 <sup>ab</sup>	2.53±0.003 <sup>b</sup>	1.59±0.188 <sup>c</sup>	2.90±0.096 <sup>a</sup>	2.06±0.056 <sup>a</sup>
10	1	32.83±4.742 <sup>a</sup>	3.72±0.020 <sup>ab</sup>	0.12±0.007 <sup>ab</sup>	2.52±0.014 <sup>b</sup>	0.95±0.025 <sup>ab</sup>	3.59±0.063 <sup>bc</sup>	2.18±0.025 <sup>abd</sup>
20	2	53.02±24.326 <sup>a</sup>	3.31±0.153 <sup>b</sup>	0.15±0.004 <sup>b</sup>	2.54±0.010 <sup>bc</sup>	0.98±0.155 <sup>ab</sup>	3.84±0.131 <sup>bc</sup>	2.36±0.011 <sup>cd</sup>

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ );

$\overline{V}_{ag}$ , average volume of aggregates;  $\frac{\overline{S}_{ag}}{\overline{V}_{ag}}$ , specific surface area;  $\phi_{vol}$ , volume fraction;  $D_f$ , fractal dimension.

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

ヤシ油およびパーム油を配合した流動性ヨーグルトでは、タンパク質凝集体の平均体積が還元乳調製における均質化圧力の増加と共に増加する傾向にあり、20 MPa で処理したパーム油を配合した流動性ヨーグルトのタンパク質凝集体の平均体積が最も大きかった。単位体積当たりの比表面積は、ヤシ油を除く植物油脂を配合した流動性ヨーグルトで均質化圧力の増加と共に減少する傾向を示した。また、有意差がなかったが、均質化圧力の増加と共にタンパク質の体積分率が増加する傾向を示した。一方、乳タンパク質凝集構造のフラクタル次元は均質化圧力に影響されなかった。しかし、植物油脂を配合した流動性ヨーグルトの乳タンパク質凝集体の平均体積の標準偏差が大きく、凝集体の再凝集による影響であると考えられる。植物油脂を配合した場合には均質化圧力の増加と共にそれが増加する傾向を示した。そして、脂肪球のフラクタル次元は、全ての流動性ヨーグルトにおいて還元乳を調製する際の均質化圧力の増加と共に増加する傾向に見られた。

以上のことから、植物油脂を配合した流動性ヨーグルトは、還元乳を調製する際の均質化圧力が増加することによって、乳脂肪を配合した場合と同様に、脂肪球が凝集体の表層から内層に移行し、タンパク質凝集体を維持するような構造を形成したと考えられる。しかし、脂肪球の大きさが減少したものの、製造・貯蔵過程における脂肪球の凝集・合一が発生しやすい傾向が見られた。これによって、タンパク質凝集体の凝集が発生しやすく、還元乳を高い均質化圧力で処理するとタンパク質凝集体が大きくなり、粒子感を増加させることがあると思われる。

## 5. 流動性ヨーグルトの理化学的性質

### 5-1. 保水性

植物油脂を配合した流動性ヨーグルトの離水量は、還元乳を調製する際の均質化圧力の増加と共に減少する傾向を示した (Fig. 24)。これは、乳タンパク質凝集ネットワーク構造が脂肪球を取り込むことによって、乳タンパク質凝集ネットワーク構造の保水性が増加することを反映した。一方、低融点植物油を配合した流動性ヨーグルトでは、保水性に対する油脂の種類の影響がほとんどなかった。高融点植物油を配合した流動性ヨーグルトでは、低融点植物油を配

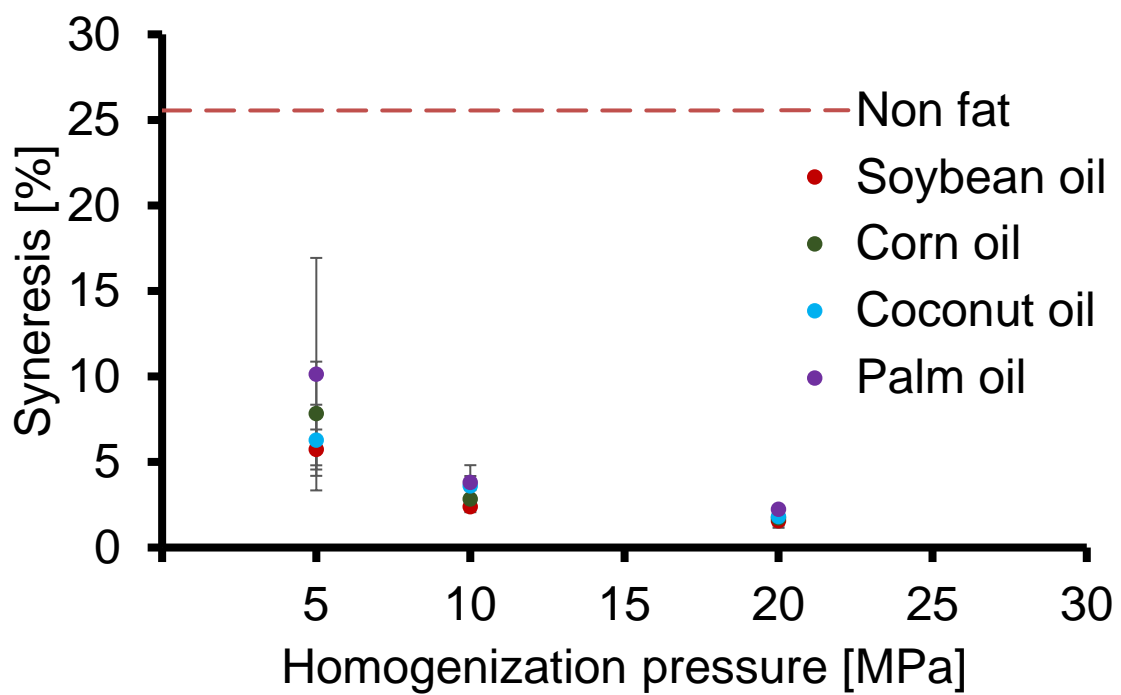


Fig. 24 Syneresis of stirred yogurt prepared from reconstituted milk with different vegetable oils: soybean oil (red), corn oil (green), coconut oil (blue) or palm oil (purple) after centrifugation at 5 °C for 15 min. Red dash line represents the syneresis of stirred yogurt prepared from reconstituted milk without fats or oils.

合した場合と同様の変化を示したが、パーム油を配合した流動性ヨーグルトが他の流動性ヨーグルトに比べて離水量が大きい傾向を示した。これは、パーム油は定常流粘度が高く、還元乳に分散しにくい傾向にあるために、それを配合した試料中の油滴が大きく、乳タンパク質凝集ネットワーク構造に取り込まれにくいことを反映していると思われる。特に、体積平均径が 3  $\mu\text{m}$  に近い 5 MPa で均質化処理した還元乳を用いた場合に、流動性ヨーグルトの離水量が他の流動性ヨーグルトに比べて著しく多かった。このことから、ある粒子径以上の大きい脂肪球は乳タンパク質凝集ネットワーク構造に取り込まれないと思われる。以上のことから、流動性ヨーグルトの保水性は主に脂肪球の粒子径に依存していると思われる。

#### 5-2. 流動特性

植物油を配合した流動性ヨーグルトの流動曲線は、乳脂肪を配合した場合と同様に、せん断流動化し、せん断速度の増加と共に見かけ粘度が低下した (Fig. 25)。全体的に、4 種類の植物油を配合した流動性ヨーグルトの高せん断速度領域におけるせん断応力が、還元乳を調製する際の均質化圧力と共に増加した。これは、高い圧力の均質化処理によって還元乳の PSH が増加し、脂肪球が乳タンパク質凝集体の内部に取り込まれるために、流動性ヨーグルトの乳タンパク質凝集構造が力学的に強化され、崩壊しにくい構造になったために、見かけの粘度が増加したと思われる。

低融点植物油である大豆油およびトウモロコシ油を配合した流動性ヨーグルトでは、還元乳を低い均質化圧力で処理した場合にトウモロコシ油を配合した方が見かけ粘度が高かったが、還元乳を調製する際の均質化圧力を増加させると 2 種類の植物油を配合した流動性ヨーグルトの流動曲線がほとんど一致していた。しかし、いずれの均質化圧力で処理した場合にも、低融点植物油を配合した流動性ヨーグルトの見かけ粘度が乳脂肪を配合している場合に比べて著しく低下した。また、流動曲線のヒステリシスは低融点植物油を配合して同条件で処理した還元乳を用いた流動性ヨーグルト間には大差がなかったが、乳脂肪を配合した場合よりも小さかった (Table 11)。高融点植物油であるヤシ油およびパーム油を配合した流動性ヨーグルトは、

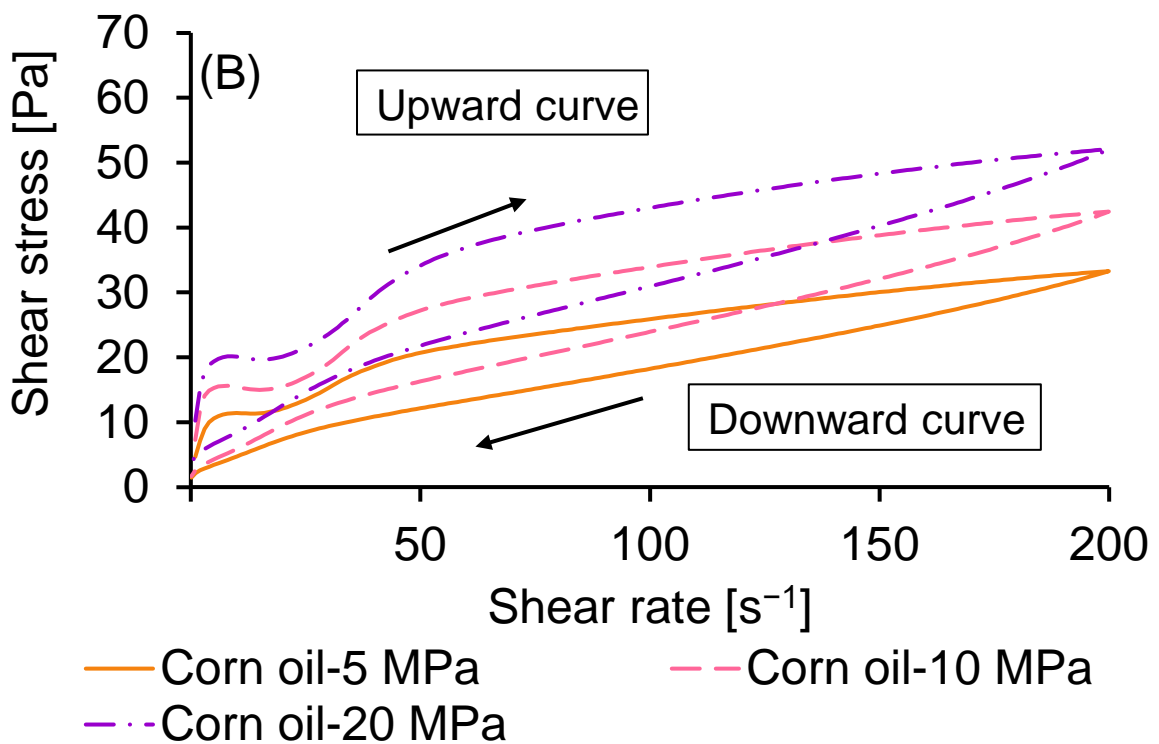
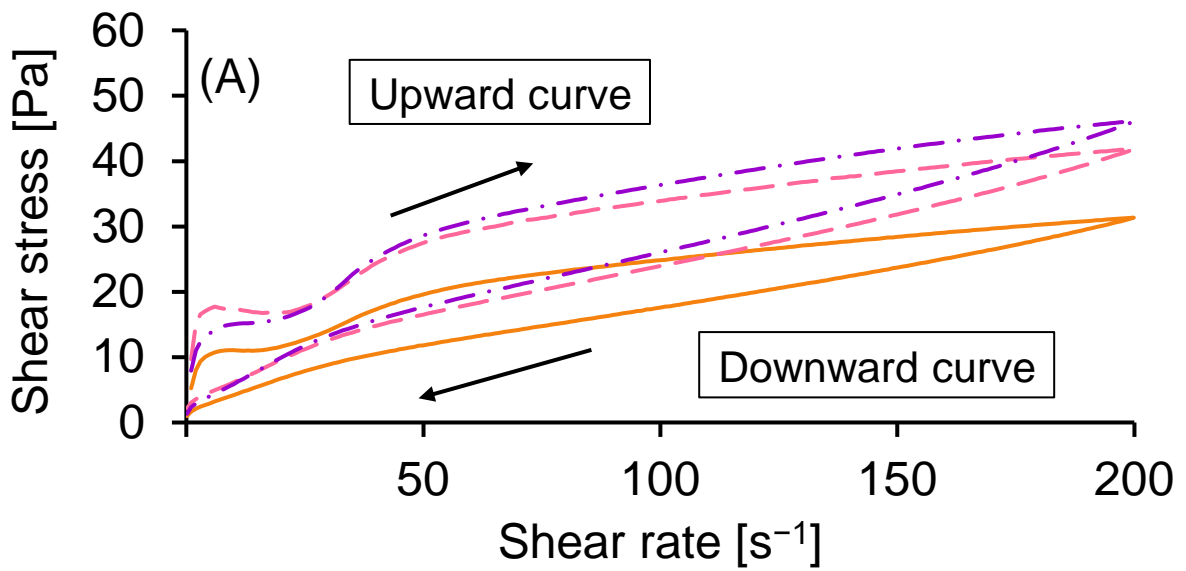


Fig. 25 Flow behavior of stirred yogurt prepared from reconstituted milk with different vegetable oils: soybean oil (A), corn oil (B), coconut oil (C) or palm oil (D).

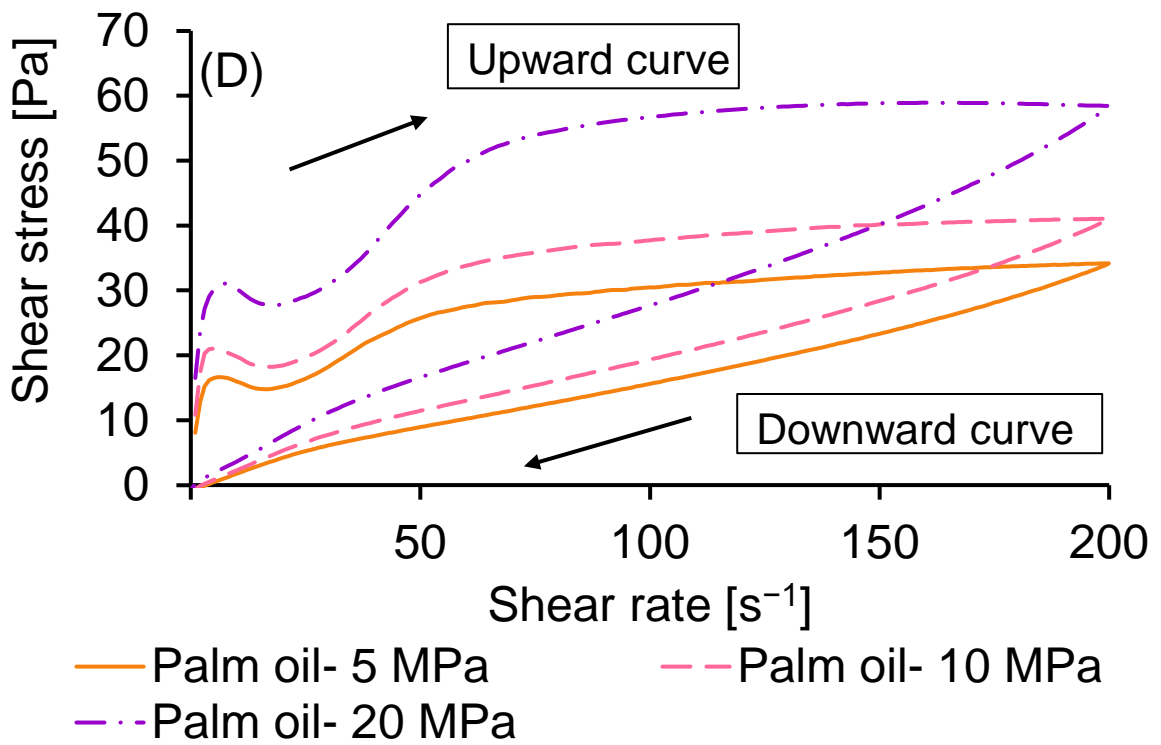
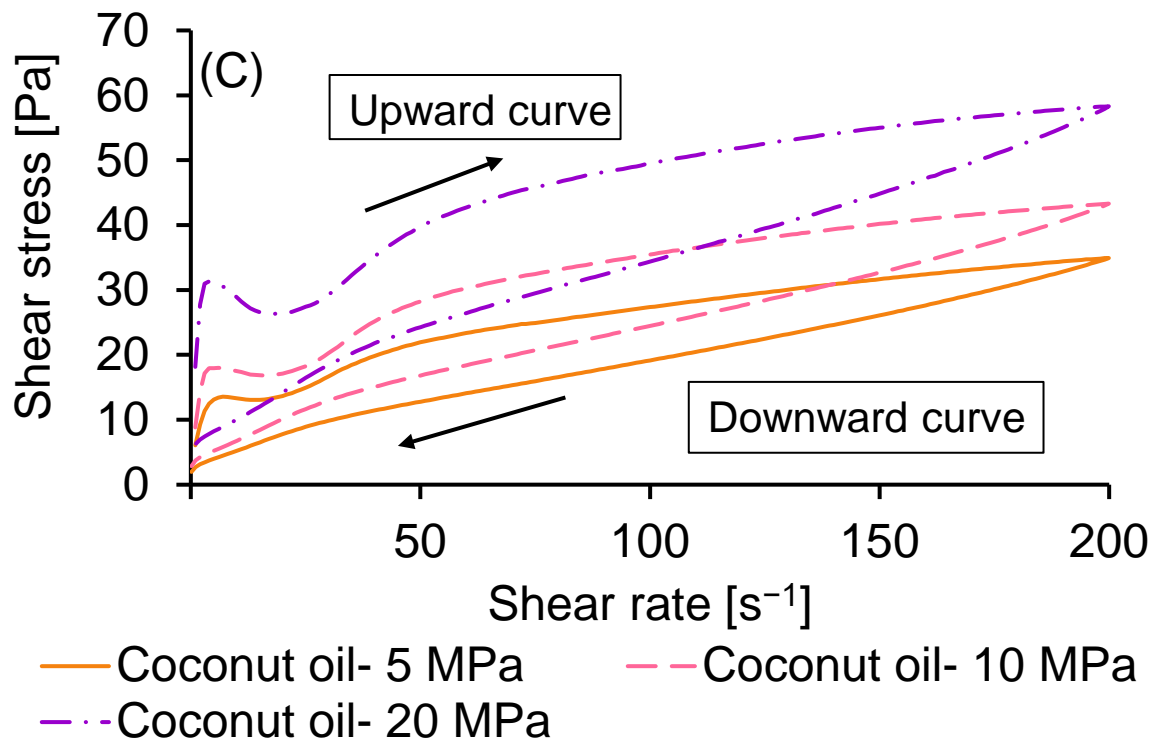


Fig. 25 (Continued).

Table 11 Flow properties of stirred yogurt with vegetable oil.

Oil	Homogenization pressure [MPa]		$k$ [Pa·s <sup>n</sup> ]	$n$ [-]	Hysteresis [Pa·s <sup>-1</sup> ]	TI [%]
	1st stage	2nd stage				
Soybean	5	<1	4.6±0.99 <sup>a</sup>	0.368±0.0406 <sup>ab</sup>	1131.9±52.05 <sup>a</sup>	24.4±0.59 <sup>a</sup>
	10	1	7.7±3.05 <sup>ab</sup>	0.330±0.0681 <sup>ab</sup>	1600.4±60.61 <sup>abc</sup>	25.3±2.84 <sup>a</sup>
	20	2	6.0±1.00 <sup>a</sup>	0.391±0.0157 <sup>b</sup>	1589.9±235.28 <sup>abc</sup>	23.5±1.21 <sup>a</sup>
Corn	5	<1	4.6±0.25 <sup>a</sup>	0.374±0.0185 <sup>ab</sup>	1201.6±211.85 <sup>a</sup>	24.6±3.48 <sup>a</sup>
	10	1	6.4±0.39 <sup>a</sup>	0.360±0.0111 <sup>ab</sup>	1566.6±215.43 <sup>abc</sup>	24.7±3.16 <sup>a</sup>
	20	2	8.7±2.53 <sup>ab</sup>	0.349±0.0397 <sup>ab</sup>	1848.6±164.80 <sup>abcd</sup>	23.5±2.54 <sup>a</sup>
Coconut	5	<1	5.5±1.95 <sup>a</sup>	0.355±0.0516 <sup>ab</sup>	1321.7±143.87 <sup>ab</sup>	25.7±2.97 <sup>a</sup>
	10	1	7.5±0.99 <sup>ab</sup>	0.335±0.0150 <sup>ab</sup>	1718.1±649.27 <sup>abc</sup>	25.6±6.93 <sup>a</sup>
	20	2	13.8±3.19 <sup>bc</sup>	0.278±0.0518 <sup>ab</sup>	2445.9±416.47 <sup>cd</sup>	26.5±4.21 <sup>a</sup>
Palm	5	<1	8.6±3.02 <sup>ab</sup>	0.274±0.0532 <sup>ab</sup>	2366.0±713.62 <sup>bcd</sup>	41.8±8.64 <sup>b</sup>
	10	1	10.7±3.42 <sup>abc</sup>	0.270±0.0420 <sup>a</sup>	2887.2±336.95 <sup>de</sup>	42.3±4.03 <sup>b</sup>
	20	2	16.0±3.26 <sup>c</sup>	0.263±0.0344 <sup>a</sup>	4404.8±536.08 <sup>e</sup>	43.8±4.94 <sup>b</sup>

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ )

$k$ , consistency coefficient;  $n$ , flow behavior index; TI, thixotropic index.

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

せん断応力が大きく、乳脂肪を配合した場合と類似した挙動を示した。したがって、分散している脂肪球が貯蔵過程で結晶化し、乳タンパク質の凝集構造を強固にしたと思われる。しかし、2種類の植物油を配合した流動性ヨーグルトの流動挙動が異なった。ヤシ油を配合した場合には、低融点植物油を配合した流動性ヨーグルトと類似している流動曲線を示し、流動曲線のヒステリシスが小さかった。一方、パーム油を配合した流動性ヨーグルトでは乳脂肪を配合した場合に類似している流動曲線を示し、見かけの粘度とヒステリシスが大きかった。ヤシ油の SFC は乳脂肪およびパーム油に比べて高かったが、TMDSC ではヤシ油よりもパーム油の方が乳脂肪に近い融解・結晶化・結晶転移挙動を示した。すなわち、ヤシ油は凝固点が低く、結晶化エンタルピー変化が大きいので、流動性ヨーグルトの冷却・貯蔵過程において、脂肪球の結晶化までかかる時間が長い可能性が考えられた。したがって、冷却過程における油脂の結晶化が流動性ヨーグルトの凝集構造に影響を及ぼして流動挙動に影響を与えたと考えられる。

以上のことから、還元乳の調製での均質化圧力の増加によって、脂肪球が乳タンパク質の凝集構造の内部に取り込まれ、乳タンパク質の凝集構造を強化し、流動性ヨーグルトの見かけの粘度を増加したと思われる。特に、高融点植物油を配合した流動性ヨーグルトでは、乳タンパク質の凝集構造に取り込まれている脂肪球が冷却・貯蔵過程で結晶化し、乳タンパク質の凝集構造を強固したと思われる。一方、低融点植物油を配合した場合には、流動性ヨーグルトの流動曲線に対する植物油の種類の影響が小さく、いずれも同条件で均質化処理した乳脂肪を配合した還元乳を用いた場合より見かけ粘度が著しく低下した。また、冷却過程での油脂の結晶化しやすさが、乳タンパク質凝集構造の冷却による収縮に影響を与え、結晶化しやすい油脂を配合した場合には冷却過程における乳タンパク質凝集構造の構造変化を抑制し、流動性ヨーグルトの流動曲線のヒステリシスを増加させた可能性が考えられる。

### 5-3. 動的粘弾性

全ての流動性ヨーグルトの弾性限界ひずみは 0.001 ~ 0.003 であり、有意差がなかった (Fig. 26, Table 12)。貯蔵弾性率は還元乳を調製する際の均質化圧力の増加と共に増大する傾向を示



したが、パーム油を除いて、配合した植物油の種類による差が小さかった。パーム油を使用した場合には、20 MPa で均質化処理した還元乳を用いて調製した流動性ヨーグルトの貯蔵弾性率が著しく増加した。凝集していた脂肪球がネットワーク構造を形成し、脂肪球の結晶化によって弾性率を発現した可能性が考えられる。周波数依存性試験では、測定周波数領域で全ての試料の力学的正接が1以下であり、流動性ヨーグルトが粘弾性固体である。パーム油を配合した場合の動的粘弾性が他の植物油を配合した場合に比べて大きい傾向にあったが、それ以外の試料間の有意差がなかった (Fig. 27, Table 8)。したがって、還元乳を調製する際の均質化圧力の増加および SFC 高い植物油脂の配合によって流動性ヨーグルトの乳タンパク質の凝集構造を強固にした可能性が考えられるが、流動性ヨーグルトの攪拌工程によって、乳タンパク質の凝集構造が小さい断片に崩壊されるために、動的粘弾性の差が消失したと思われる。

#### 第4節 要約

植物油脂の理化学性質および加工適性が乳脂肪とは異なるために、乳脂肪を使用した場合と同等な品質を有する加工食品の製造は困難であるが、油脂と乳タンパク質間の相互作用に対する理解を深める観点から、理化学性質が乳脂肪と異なる植物油脂を使用して流動性ヨーグルトの理化学的性質に対する油脂の種類の影響を検討した。そこで、本章では乳脂肪の代わりに4種類の植物油脂を用いて、脱脂粉乳から還元乳を調製し、還元乳およびそれを用いて調製した流動性ヨーグルトの理化学的性質に対する油脂の種類の影響について検討した。その結果、還元乳を調製する際の均質化圧力の増加により、乳脂肪を使用した場合に類似した粒子径分布を持つ還元乳を調製できたが、高融点植物油であるパーム油を配合した場合には油脂の定常流粘度が比較的に高いために、還元乳に分散しにくいことが分かった。しかし、TEM 画像により植物油脂の種類によって、吸着していた乳タンパク質の組成が変化し、脂肪球界面に形成した乳タンパク質層構造が異なる可能性が考えられる。特に、低融点植物油を使用した場合に脂肪球が凝集・合一しやすいと思われる。また、乳タンパク質に対する親和性が植物油脂の種類によって異なるが、20 MPa の均質化処理によって、全ての還元乳が同等な界面電位および PSH に

**Table 12** Rheological properties of stirred yogurts made from different reconstituted milk with vegetable oil.

Oil	Homogenization		$\gamma_0$	A	B
	pressure [MPa]				
	1st stage	2nd stage	$[\times 10^{-3}]$		
Soybean	5	<1	2.19±0.533 <sup>a</sup>	52.67±25.611 <sup>a</sup>	0.158±0.0090 <sup>a</sup>
	10	1	2.02±0.463 <sup>a</sup>	152.24±67.577 <sup>ab</sup>	0.160±0.0057 <sup>a</sup>
	20	2	2.02±0.462 <sup>a</sup>	84.63±17.614 <sup>ab</sup>	0.155±0.0043 <sup>a</sup>
Corn	5	<1	1.89±0.533 <sup>a</sup>	39.82±7.074 <sup>a</sup>	0.158±0.0088 <sup>a</sup>
	10	1	2.37±1.378 <sup>a</sup>	58.24±12.083 <sup>a</sup>	0.165±0.0067 <sup>a</sup>
	20	2	1.85±0.236 <sup>a</sup>	58.46±1.749 <sup>a</sup>	0.160±0.0051 <sup>a</sup>
Coconut	5	<1	2.24±0.815 <sup>a</sup>	63.54±4.613 <sup>ab</sup>	0.158±0.0011 <sup>a</sup>
	10	1	1.74±0.423 <sup>a</sup>	68.31±5.316 <sup>ab</sup>	0.159±0.0050 <sup>a</sup>
	20	2	2.55±0.582 <sup>a</sup>	89.53±30.503 <sup>ab</sup>	0.157±0.0027 <sup>a</sup>
Palm	5	<1	2.04±0.653 <sup>a</sup>	156.68±106.365 <sup>ab</sup>	0.154±0.0019 <sup>a</sup>
	10	1	1.58±0.000 <sup>a</sup>	97.89±43.966 <sup>ab</sup>	0.158±0.0026 <sup>a</sup>
	20	2	1.62±0.518 <sup>a</sup>	181.31±6.244 <sup>b</sup>	0.159±0.0025 <sup>a</sup>

$\gamma_0$ , limit of linear viscoelastic range; A, critical constant; B, relaxation exponent.

Mean ± Standard deviations ( $n = 3$ )

Values followed by the same superscript letter in the same column represent no significant difference at  $p < 0.05$ .

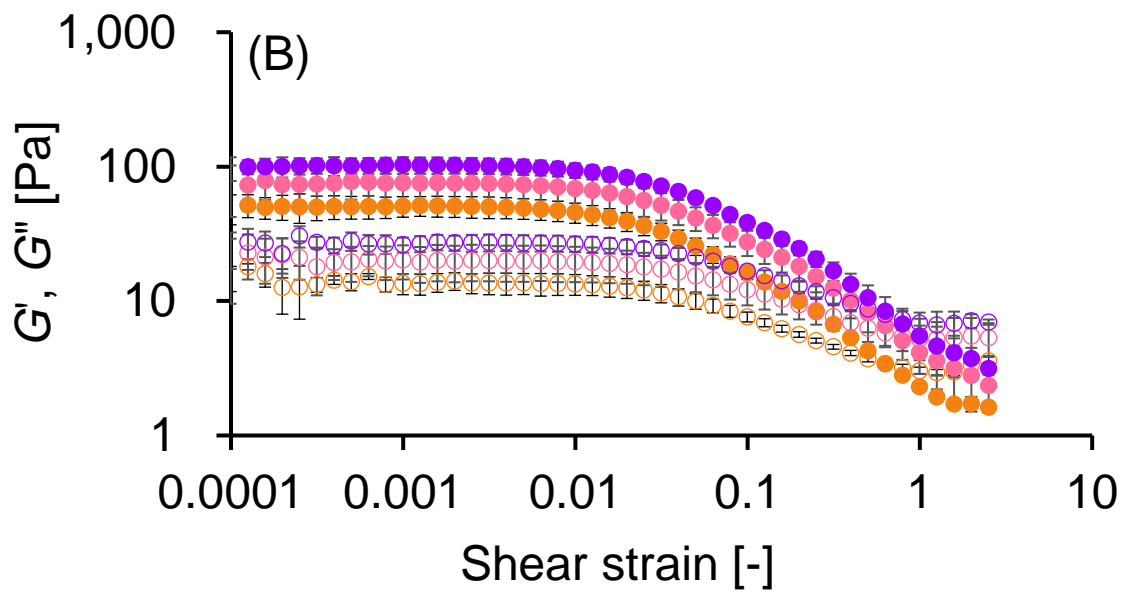
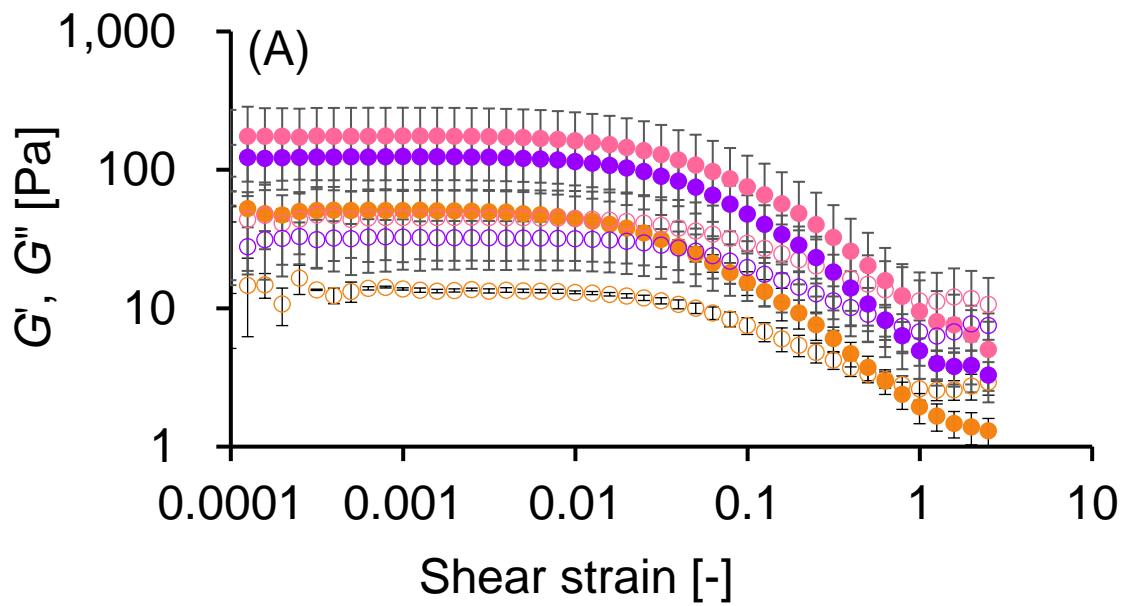


Fig. 26 Storage modulus ( $G'$ , close) and loss modulus ( $G''$ , open) of stirred yogurts prepared from reconstituted milk with different vegetable oils: soybean oil (A), corn oil (B), coconut oil (C) and palm oil (D) and homogenized at pressure of 5 (orange), 10 (pink) and 20 MPa (purple), as a function of shear strain.

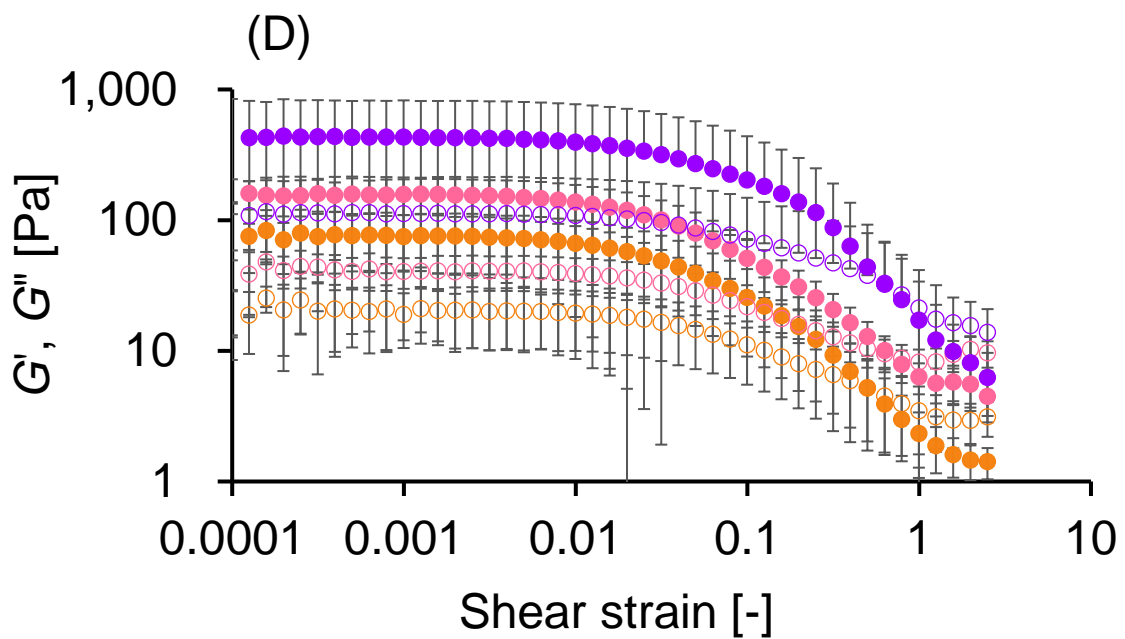
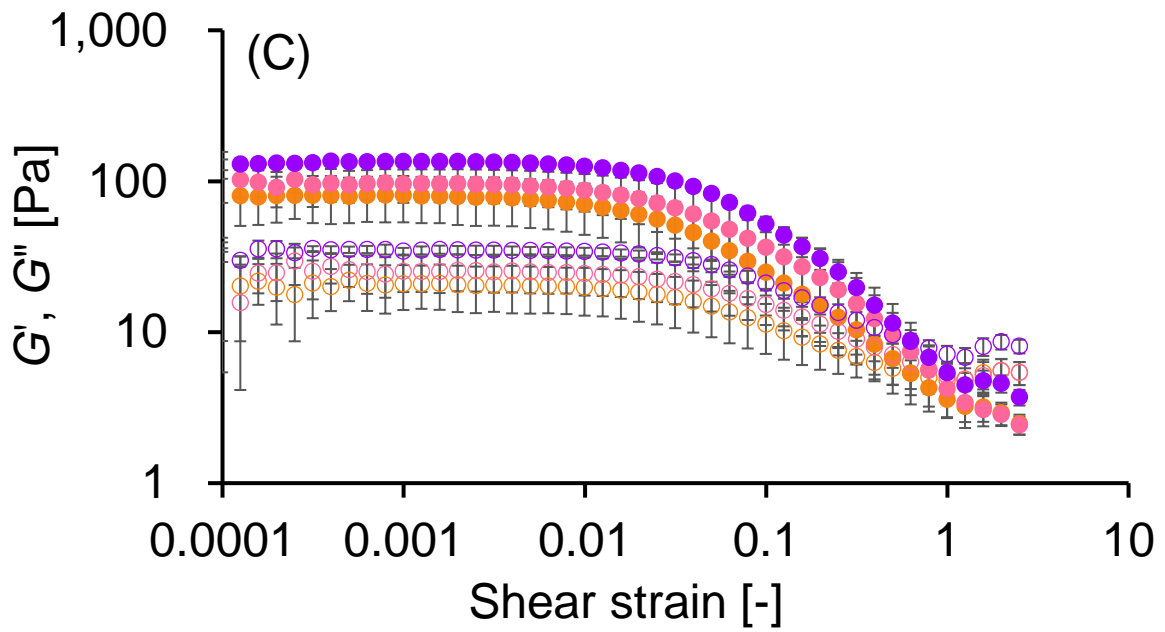


Fig. 26 (Continue).

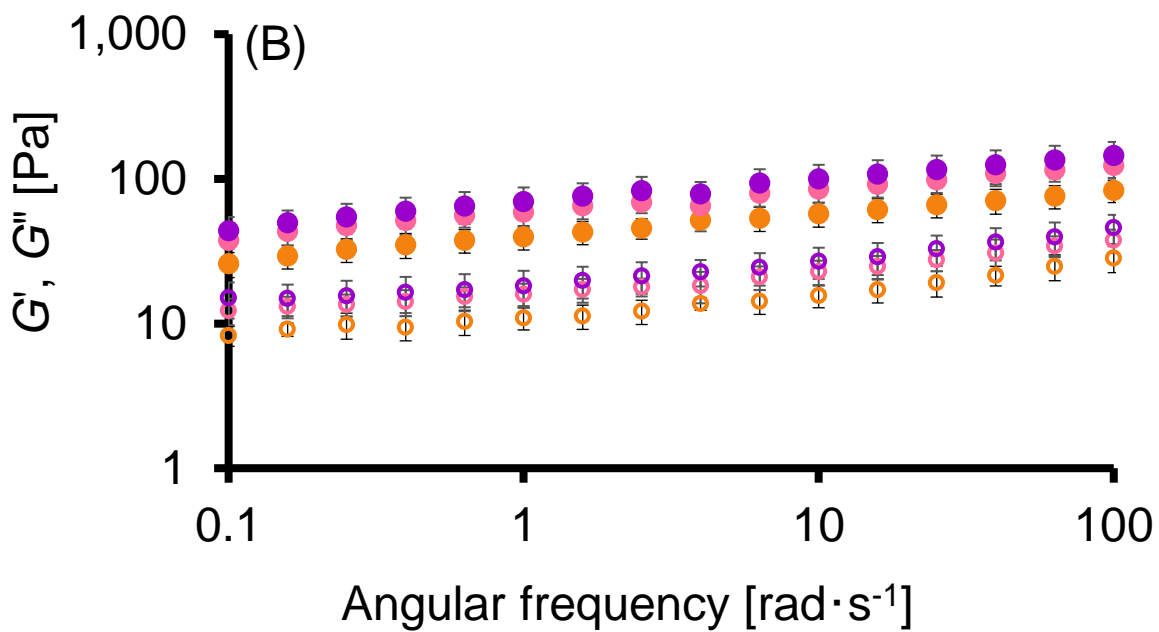
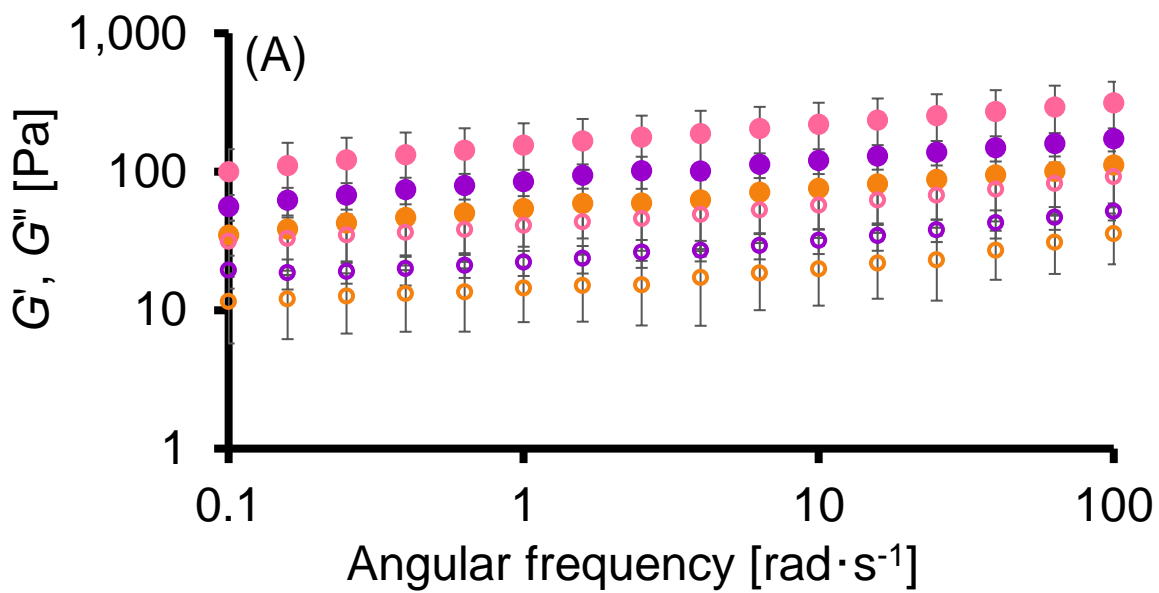


Fig. 27 Storage modulus ( $G'$ , close) and loss modulus ( $G''$ , open) of stirred yogurts prepared from reconstituted milk with different vegetable oils: soybean oil (A), corn oil (B), coconut oil (C) or palm oil (D) and homogenized at pressure of 5 (orange), 10 (pink) and 20 MPa (purple), as a function of angular frequency.

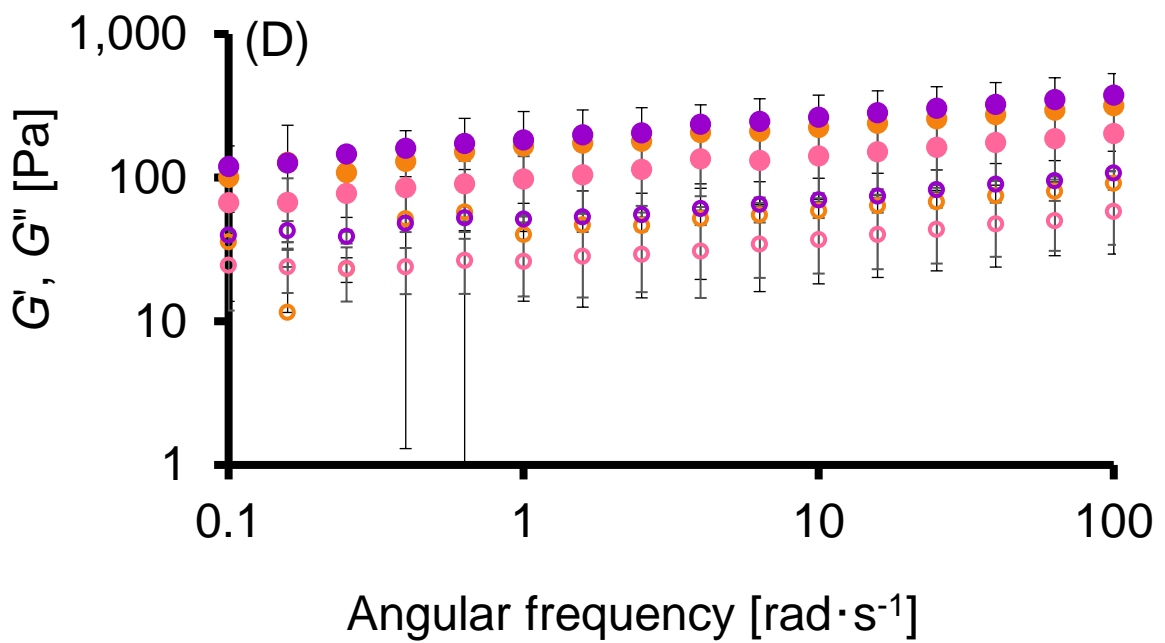
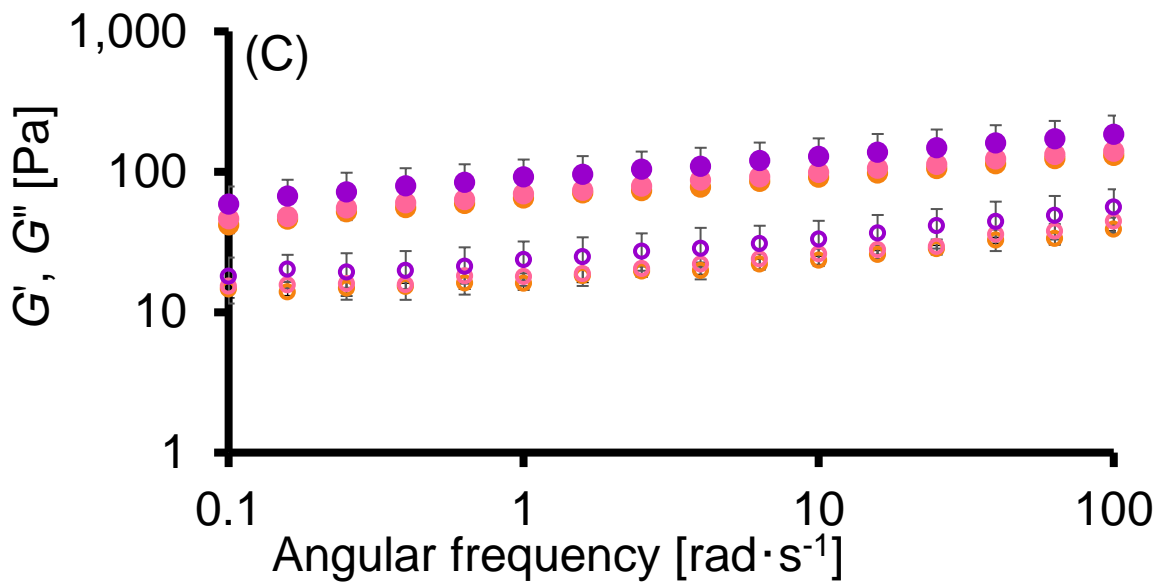


Fig. 27 (Continue).

なった。植物油脂を配合した還元乳から調製した流動性ヨーグルトは、乳脂肪を配合した場合と同様に、還元乳を調製する際の均質化圧力の増加と共に保水性および見かけの粘度が増加した。しかし、植物油脂を配合した場合に流動性ヨーグルトのメソスコープ構造から脂肪球の凝集・合一が確認された。脂肪球の凝集・合一によって、乳タンパク質の凝集構造を維持する脂肪球が減少したと思われる。また、SFCが大きく、結晶化しやすい植物油脂を使用することによって、乳タンパク質の凝集構造が強固になり、流動性ヨーグルトの粘稠性を向上した可能性が考えられる。また、流動性ヨーグルトの離水率は主に分散している脂肪球の大きさに依存していることが確認された。以上のことから、還元乳の均質化処理によって脂肪球が乳タンパク質の凝集構造の内部に取り込まれ、乳タンパク質の凝集構造を維持するために、その還元乳を用いて調製した流動性ヨーグルトの保水性および見かけ粘度が維持されたと思われる。しかし、植物油脂の理化学的性質および加工適性が流動性ヨーグルトの理化学的性質に影響を及ぼし、SFCが高く、結晶化しやすい植物油脂の方が流動性ヨーグルトの製造に適切であると考えられる。また、流動性ヨーグルトの製造過程における脂肪球の凝集・合一が植物油脂を用いた流動性ヨーグルトでの品質劣化の要因であると考えられる。

## 第4章 結論

牛乳の脂肪分は水相において乳脂肪球（MFG, milk fat globule）という0.1 ~ 15  $\mu\text{m}$ の球状の油脂滴として浮遊しており、その表面には乳脂肪球膜（MFGM, milk fat globule membrane）と呼ばれる膜構造が存在している。しかし、ヨーグルトの製造工程では、均質化処理によってMFGの大きさが減少し、MFGMの構造も破壊される。これによって、新しく形成したMFGの界面に水相中の乳タンパク質が吸着して新しい膜構造を形成し、MFGの凝集・合一を防止する。したがって、均質化処理後のカゼインミセルとMFG間の相互作用が変化する。しかし、その詳細については、いまだ十分に解明されていなかった。そこで、本研究ではMFGの存在はその界面に吸着している乳タンパク質（特にカゼインミセル）を介してヨーグルトのネットワーク構造と相互作用し、これによってヨーグルトの理化学特性に影響を及ぼすと仮説し、流動性ヨーグルトの理化学的性質に及ぼす油脂の種類、分散状態およびヨーグルトでの乳タンパク質の凝集構造の形成過程に油脂が果たす機能の影響を明らかにすることを目的とした。

第2章では脱脂粉乳および乳脂肪を用いて均質化条件を変化させて乳脂肪球の分散状態が異なるように調製した還元乳を使用して流動性ヨーグルトを調製し、その理化学的性質と微細構造を検討し、流動性ヨーグルトの理化学的性質に対する均質化圧力およびMFGの分散状態の影響について考察した。その結果、均質化圧力が高くなると、MFGが小さく裂断し、その比表面積が増加したために、乳脂肪球界面に吸着した乳タンパク質量が増加した。これによって、還元乳の界面電位とPSHが増加し、保水性および見かけの粘度が高い流動性ヨーグルトを調製できた。一方、顕微鏡観察の結果から、MFGとカゼインミセル間の結合が均質化圧力と共に増加し、MFGがヨーグルトのタンパク質凝集構造の内部に取り込まれ、崩壊されにくい緻密なネットワーク構造が形成されたと考えられる（Fig. 28）。以上のことから、原料乳の均質化処理はMFGの大きさを制御するだけでなく、MFGと乳タンパク質間の相互作用を増加することによって流動性ヨーグルトの品質を維持したと思われる。



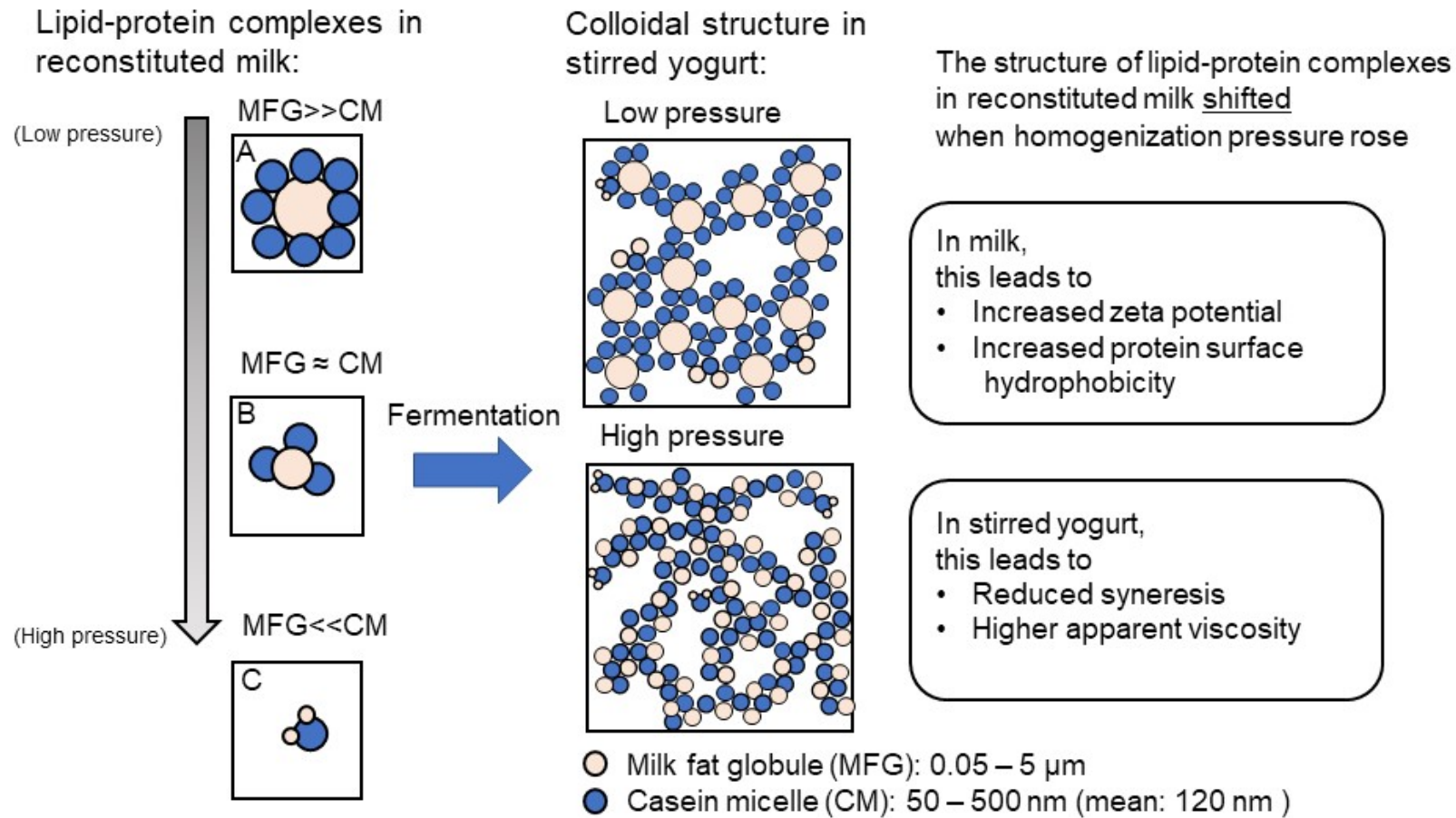


Fig. 28 The schematic diagram of stirred yogurt gel structures influenced by the milk fat globules homogenized using different pressures.

第3章では脱脂粉乳および4種類の植物油を用いて均質化条件を変化させて乳脂肪球の分散状態が異なるように調製した還元乳を使用して流動性ヨーグルトを調製し、その理化学的性質と微細構造を検討し、流動性ヨーグルトの理化学的性質に対する植物油の種類およびその物理性質の影響について考察した。その結果、脂肪球と乳タンパク質間の相互作用に対する植物油の影響は油脂の種類によって異なるが、高い均質化圧力を使用した場合には、比較的安定している脂肪球界面構造が形成された。したがって、いずれの植物油を配合した流動性ヨーグルトでも、第2章で報告した結果と同様に、均質化処理によって脂肪球が乳タンパク質の凝集構造の内部に取り込まれ、乳タンパク質の凝集構造を維持し、流動性ヨーグルトの保水性および見かけ粘度が増加した。一方、植物油の理化学的性質および加工適性が流動性ヨーグルトの理化学的性質に影響を及ぼしたことが確認された。すなわち、①定常流粘度が高い植物油が還元乳に分散しにくいために、流動性ヨーグルトの離水率が比較的に高い傾向にあった、②結晶化しやすい植物油が冷却過程における乳タンパク質凝集構造の変化を抑制し、流動性ヨーグルトの流動曲線のヒステリシスを増加させた、③固体脂含量が高い植物油が冷却・貯蔵過程で結晶化し、乳タンパク質の凝集構造をさらに強化して流動性ヨーグルトの見かけ粘度を増加させた。特に、低融点植物油を配合した試料では、脂肪球の凝集・合一が進行し、流動性ヨーグルトの理化学的性質品質が劣化したと思われる。

以上のことから、均質化処理は、MFGの大きさが乳タンパク質間と相互作用する界面積に影響を及ぼして流動性ヨーグルトの品質を制御する重要な因子であると思われる。高均質化圧力を使用した場合、安定している乳タンパク質の界面構造を形成したために、小さいMFGがヨーグルトのタンパク質凝集構造の内部に取り込まれ、崩壊されにくい緻密なネットワーク構造が形成された。この界面構造は主に粒子径50～500nmのカゼインミセルで構成されるために、均質化処理後には粒子径100～200nmの脂肪球が最も多く存在しており、カゼインミセルとの複合体構造が最も安定していた。一方、植物油を使用した場合には、乳脂肪を配合した場合と類似した界面構造を形成したが、それ以後の製造工程において、凝集・合一しやすい傾

向を示した。このことによって、乳タンパク質の凝集構造を維持できなくなり、流動性ヨーグルトの品質が劣化した。また、SFCが高く、結晶化しやすい植油脂を配合した場合に、乳タンパク質の凝集構造が強化され、流動性ヨーグルトの粘稠性が高くなる傾向を示した。以上のことから、本研究で検討した4種類の植物油脂の中、パーム油を配合した試料が乳脂肪を配合した試料に最も近い品質を示した。

本研究では、油脂の熱力学的性質が冷却・攪拌処理による流動性ヨーグルトの内部構造の変化に関連することが確認されたが、流動性ヨーグルトの構造破壊・再凝集については不明な点が多かった。今後の展開として、せん断過程および温度変化過程における流動性ヨーグルトのタンパク質凝集体の構造変化を、小角光散乱およびレオロジー性質の同時測定を行う Rheo-SALS 法を用いて検討する予定である。

## 引用文献

- 1) MacGibbon, A. (2020). Composition and Structure of Bovine Milk Lipids. In P. McSweeney, P. Fox, and J. O'Mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2* (pp. 1 – 32). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-48686-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48686-0_1).
- 2) Thum, C., Roy, N., Everett, D., and McNabb, W. (2023). Variation in milk fat globule size and composition: A source of bioactives for human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **63**, 87 – 113.
- 3) da Silva, R., Colleran, H., and Ibrahim, S. (2021). Milk fat globule membrane in infant nutrition: a dairy industry perspective. *Journal of Dairy Research*, **88**, 105 – 116.
- 4) Manoni, M., Di Lorenzo, C., Ottoboni, M., Tretola, M., and Pinotti, L. (2020). Comparative proteomics of milk fat globule membrane (MFGM) proteome across species and lactation stages and the potentials of MFGM fractions in infant formula preparation. *Foods*, **9**, 1251.
- 5) Ye, A., Singh, H., Taylor, M., and Anema, S. (2004). Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Le Lait - Dairy Science and Technology*, **84**, 269 – 283.
- 6) Jukkola, A., and Rojas, O. (2017). Milk fat globules and associated membranes: Colloidal properties and processing effects. *Advances in Colloid and Interface Science*, **245**, 92 – 101.
- 7) Mukherjee, A., Gómez-Sala, B., O'Connor, E., Kenny, J., and Cotter, P. (2022). Global regulatory frameworks for fermented foods: A review. *Frontiers in Nutrition*, **9**, 902642.
- 8) Lesme, H., Rannou, C., Famelart, M., Bouhallab, S., and Prost, C. (2020). Yogurts enriched with milk proteins: Texture properties, aroma release and sensory perception. *Trends in Food Science and Technology*, **98**, 140 – 149.
- 9) Sayon-Orea, C., Martínez-González, M. A., Ruiz-Canela, M., and Bes-Rastrollo, M. (2017). Associations between yogurt consumption and weight gain and risk of obesity and metabolic

- syndrome: a systematic review. *Advances in Nutrition*, **8**, 146S – 154S.
- 10) Ashaolu, T. J. (2020). Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **130**, 110625.
  - 11) Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., and O'Mahony, J. A. (2015). Milk lipids. In *Dairy chemistry and biochemistry* (pp. 69 – 144). Springer, Cham.
  - 12) Lee, W., and Lucey, J. (2004). Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science*, **87**, 3153 – 3164. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73450-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73450-5).
  - 13) Routray W., Mishra H. N. (2011). Scientific and technical aspects of yogurt aroma and taste: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **10**, 208 – 220. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x>.
  - 14) Laguna, L., Farrell, G., Bryant, M., Morina, A., and Sarkar, A. (2017). Relating rheology and tribology of commercial dairy colloids to sensory perception. *Food and Function*, **8**, 563 – 573. <https://doi.org/10.1039/C6FO01010E>.
  - 15) Haque, A., Richardson, R., and Morris, E. (2001). Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*, **15**, 593 – 602. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00090-X).
  - 16) Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., and Corredig, M. (2006). The stabilizing behaviour of soybean soluble polysaccharide and pectin in acidified milk beverages. *International Dairy Journal*, **16**, 361 – 369. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.014>.
  - 17) Arab, M., Yousefi, M., Khanniri, E., Azari, M., Ghasemzadeh-Mohammadi, V., and Mollakhalili-Meybodi, N. (2023). A comprehensive review on yogurt syneresis: Effect of processing conditions and added additives. *Journal of Food Science and Technology*, **60**, 1656 – 1665.
  - 18) Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2004). Comparison of texture of yogurt

- made from conventionally treated milk and UHT milk fortified with low - heat skim milk powder. *Journal of Food Science*, **69**, E276 – E280.
- 19) Sodini, I., Montella, J., and Tong, P. S. (2005). Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 853 – 859.
- 20) Damin, M. R., Alcântara, M. R., Nunes, A. P., and Oliveira, M. N. D. (2009). Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 1744 – 1750.
- 21) Zhao, L. L., Wang, X. L., Tian, Q., and Mao, X. Y. (2016). Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *Journal of Dairy Science*, **99**, 7768 – 7775.
- 22) Nguyen, P. T., Kravchuk, O., Bhandari, B., and Prakash, S. (2017). Effect of different hydrocolloids on texture, rheology, tribology and sensory perception of texture and mouthfeel of low-fat pot-set yoghurt. *Food Hydrocolloids*, **72**, 90 – 104.
- 23) Gyawali, R., and Ibrahim, S. A. (2016). Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. *Trends in Food Science and Technology*, **56**, 61 – 76.
- 24) Pang, Z., Xu, R., Luo, T., Che, X., Bansal, N., and Liu, X. (2019). Physiochemical properties of modified starch under yogurt manufacturing conditions and its relation to the properties of yogurt. *Journal of Food Engineering*, **245**, 11 – 17.
- 25) Wiking, L., Gregersen, S. B., Hansen, S. F., and Hammershøj, M. (2022). Heat-induced changes in milk fat and milk fat globules and its derived effects on acid dairy gelation—a review. *International Dairy Journal*, **127**, 105213.
- 26) Tolkach, A., and Kulozik, U. (2007). Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible

- thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Le Lait - Dairy Science and Technology*, **87**, 301 – 315.
- 27) Lucey, J. A., Munro, P. A., and Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, **9**, 275 – 279.
- 28) Tribst, A. A. L., Falcade, L. T. P., Carvalho, N. S., Junior, B. R. D. C. L., and de Oliveira, M. M. (2020). Using stirring and homogenization to improve the fermentation profile and physicochemical characteristics of set yogurt from fresh, refrigerated and frozen/thawed sheep milk. *LWT - Food Science and Technology*, **130**, 109557.
- 29) Yang, S., Yan, D., Zou, Y., Mu, D., Li, X., Shi, H., Luo, X., Yang, M., Yue, X., Wu, R., and Wu, J. (2021). Fermentation temperature affects yogurt quality: A metabolomics study. *Food Bioscience*, **42**, 101104.
- 30) Patel, A., and Prajapati, J. B. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, **1**, 1 – 7.
- 31) Lucey, J. A. (2004). Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, **57**, 77 – 84.
- 32) Tamime, A. Y., and Robinson, R. K. (1985). *Yoghurt: science and technology*. Pergamon Press.
- 33) Obeid, S., Guyomarc'h, F., Francius, G., Guillemin, H., Wu, X., Pezennec, S., Famelart, M., Cauty, C., Gaucheron, F., and Lopez, C. (2019). The surface properties of milk fat globules govern their interactions with the caseins: Role of homogenization and pH probed by AFM force spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **182**, 110363. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110363>.
- 34) Sato, T. (1968). A modified method for lead staining of thin sections. *Journal of Electron Microscopy*, **17**, 158 – 159. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a049610>.

- 35) Kalab, M. (1988). Encapsulation of viscous foods in agar gel tubes for electron microscopy. *Food Structure*, **7**, 12. Retrieved from <https://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/vol7/iss2/12>.
- 36) Bonomi, F., Iametti, S., Pagliarini, E., and Peri, C. (1988). A spectrofluorimetric approach to the estimation of the surface hydrophobicity modifications in milk proteins upon thermal treatment. *Milchwissenschaft (Germany, F.R.)*, **43**, 281 – 285.
- 37) Fazzalari, N., and Parkinson, I. (1996). Fractal dimension and architecture of trabecular bone. *The Journal of Pathology*, **178**, 100 – 105. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199601\)178:1<100::AID-PATH429>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199601)178:1<100::AID-PATH429>3.0.CO;2-K).
- 38) Ruggeri, F., Šneideris, T., Vendruscolo, M., and Knowles, T. (2019). Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **664**, 134 – 148. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.001>.
- 39) Alcoutlabi, M., and McKenna, G. (2005). Effects of confinement on material behaviour at the nanometre size scale. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **17**, R461. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/17/15/R01>.
- 40) McMahon, D., and Brown, R. (1984). Enzymic coagulation of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science*, **67**, 919 – 929.
- 41) Krzeminski, A., Großhable, K., and Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 2134 – 2140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.018>.
- 42) 日本工業標準調査会. (1994). JIS Z 8804: 液体比重測定方法. 東京: 日本産業規格.



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました岩手大学農学部教授 三浦 靖博士に心より厚く御礼申し上げます。研究内容について貴重なご助言を頂きました弘前大学農学生命科学部食料資源学科 教授 佐藤之紀博士および岩手大学農学部食料生産環境学科 教授 小出章二博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究に使用した試料を恵与して頂いた(株)明治様および日清オイリオグループ(株)様、透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡についてご指導を頂きました岩手大学電子顕微鏡室技術専門職員佐々木邦明様、共焦点レーザー顕微鏡観察についてご指導を頂きました岩手大学農学部 准教授 河村幸男博士に厚く御礼申し上げます。

また、食品工学研究室の皆様には、研究に関するご指導を頂き心より感謝しております。今回、このようにして博士論文を一つの形にすることができたのは、偏に皆様のご協力の賜物です。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

2023年12月 ZHU WENRUI