

# 牛乳の凍結貯蔵に関する研究

## 第3報 凍結貯蔵牛乳のカゼインの消化性

本郷富士弥・大高 文男

### Studies on Frozen Storage of Milk

#### III. Digestibility of casein of frozen-stored milk

FUJIYA HONGO and FUMIO OHTAKA

牛乳の凍結貯蔵は、牛乳の品質を長期間一定に保つための最も合理的な方法の一つと考えられている。しかしこれを一般化して利用するためには、まだ経済的に、また技術的にも多くの問題があると考えられる。

牛乳の凍結貯蔵中における変化としては、乳脂肪の乳化状態の破壊現象、風味の劣化、蛋白質の不安定化などの問題のあることが指摘され、なかでも蛋白質の不安定化の現象は、各種の要因について報告されている<sup>1)</sup>。しかしなお解明すべき問題が多いようである。

先に玉手ら<sup>2)</sup>は凍結貯蔵牛乳の安定性に対する脱脂、殺菌および貯蔵温度の影響について報告したが、その時牛乳の蛋白質消化性が、凍結貯蔵によって120日まではそれ程変化しないことを述べている。

しかしその後の報告<sup>3)</sup>では、180日貯蔵のものの消化率も低下し、凍結貯蔵に伴って消化率の低下する傾向のあることが観察されている。よって凍結貯蔵時の牛乳蛋白質に生ずる諸変化について研究するにあたり、まずカゼインの消化性に対する凍結貯蔵の影響に関して実験することとした。即ち凍結貯蔵により牛乳蛋白質が不安定化して凝固する現象とカゼイン消化性との関係について検討するために、二、三の処理をした牛乳を、貯蔵温度を異にして貯蔵し、これから調製したカゼインの消化性を比較した。その結果二、三の知見を得たので報告する。

#### 実験材料および方法

供試乳として、土浦酪農協同組合牛乳処理場より購入した混合乳を、63°C、30分間殺菌して用いた。これを対照乳とし、そのほかに脱カルシウム乳(脱Ca乳と略す)およびクエン酸カリ添加牛乳を調製した。即ち脱Ca乳は、陽イオン交換樹脂(Amberlite IR 120 Na型)処理によりイオン性Caの大部分を除去した混合乳を、10%の割合に前記混合乳に加えたものである。またクエ

ン酸カリ添加乳は、クエン酸カリを0.2%の割合に、前記混合乳に添加したものである。対照乳を含めたこれら各供試乳を、約450mlずつ500ml容のポリびんに小分けして入れ、-10°Cおよび-20°Cにそれぞれ凍結貯蔵した。このうちから60日、90日、120日および150日の各期間ごとに供試乳を取り出し、解凍し、実験に供した。解凍は牛乳のはいったポリびんを流水(水道水)に浸漬して行なった。

酸カゼインの調製は、解凍した各供試乳を脱脂後、これに0.1NHClを加え、pH4.6としてカゼインを沈殿させ、水洗後、水酸化ナトリウムに溶解させ(pH7.0)、ふたたび塩酸で沈殿させてから水、アルコール、エーテルで洗滌した後、乾燥して行なった。α-カゼインは、酸カゼインよりWarnerの方法<sup>4)</sup>により、またα<sub>s</sub>-カゼインは、酸カゼインよりZittleの方法<sup>5)</sup>により分別調製し、それぞれ凍結乾燥後微粉として供試した。

凝固の程度は、解凍した供試乳50gを遠心分離(3,000 r.p.m., 15 min)し、その上澄液を除去後、残存物重量を秤量し、その重量をもって凝固度として示した。

ペプシンおよびトリプシンによる人工消化試験は、次のようにして行なった。即ち、調製した各カゼインから、それぞれ2%溶液をつくり、その1mlに緩衝液2mlおよび0.5%酵素液2mlを加え、37°Cに24時間消化させた後、10%トリクロル酢酸5mlを加えて反応を停止させた。その濾液5mlをとり、ケルダール法により窒素を定量した(a)。別にブランクとして酵素液の代りに緩衝液2mlを用い、トリクロル酢酸を加えて濾過し、同様にしてその濾液中の窒素を定量した(b)。また0.5%酵素液2mlに緩衝液3mlを加え、以下同様に処理して濾液中の窒素量を測定し、酵素液に伴う窒素量とした(c)。以上の結果より次式を用いて消化率を算出した。

$$\text{消化率} = \frac{a - (b + c)}{\text{全窒素} - b} \times 100$$

なおペプシンの消化には、pH 1.4 の塩酸-塩化カリ緩衝液を、またトリプシン消化には、pH 8.5 の硼酸塩緩衝液を用いた。

### 実験結果および考察

#### 1. 凍結貯蔵牛乳の解凍後の状態

外観 解凍は流水によった。解凍に要した時間はその時の温度にもよるが、3～8時間であった。

-10℃ に貯蔵した場合、対照乳および脱Ca乳では、90日目のものにホエーの分離が認められた。クエン酸カリ添加乳では、120日目のものに始めて同様のことが観察された。

-20℃ に貯蔵した場合は、対照乳および脱Ca乳では120日目に始めてホエーの分離が認められ、クエン酸カリ添加乳では150日目でも認められなかった。

凝固の程度 牛乳を凍結貯蔵すると、解凍後かたまり状のものが生ずるが、これはよく攪拌すればとけて元通りになる。しかし貯蔵日数が経つにつれてとけずに凝固したままのものの量が多くなっていく。これが蛋白質の不安定化に伴う現象とされているのであるが、その凝固の程度を沈殿物の重量で示すと、各供試乳の状態は第1図に示す通りであった。

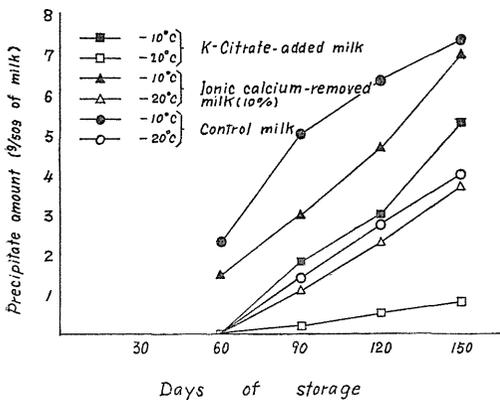


Fig. 1 Precipitate amount of frozen-stored milk after thawing

これによると-10℃ の場合、脱Ca乳および対照乳では60日にして凝固物が生じている。しかしクエン酸カリ添加乳では60日では凝固物が認められず、90日目に始めて生じている。-20℃ に貯蔵した場合は、各供試乳とも60日目には凝固物が認められず、脱Ca乳および対照乳では90日目に、またクエン酸カリ添加乳では120日目

に始めて僅かながら凝固物が認められるようになった。この凝固物は、解凍した牛乳を加温してよく攪拌すれば更にとけてくる。凝固物の量が加温の前後で変化する状況を示せば第2図の通りである。

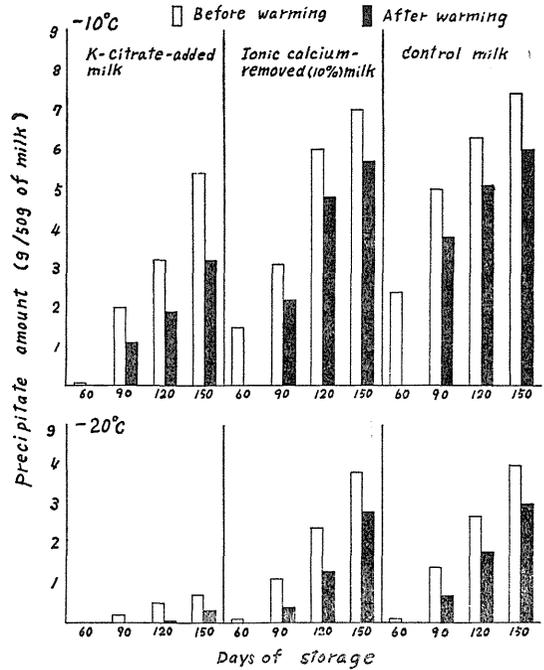


Fig. 2. Precipitate amount in thawed milk before and after warming

これは40℃ に20分間加温した場合であるが、各供試乳とも凝固物が減少し、より一層元の状態に近くなる。特にクエン酸カリ添加乳では、-20℃ に貯蔵した場合、120日目までは凝固物がほとんどなくなっていた。

#### 2. 凍結貯蔵牛乳から調製したカゼインの消化性

脱Ca乳、クエン酸カリ添加乳および対照乳を、-10℃ および-20℃ に貯蔵した場合、これらの牛乳は、処理により、貯蔵温度により、また貯蔵日数によりそれぞれ解凍後の凝固状態の異なることが分った。このように不安定化の程度の異なる牛乳の消化性を比較するため、それぞれの牛乳からカゼインを調製し、ペプシンによる人工消化試験を行なった。その結果は第3～4図に示す通りである。

第3図および第4図の結果よりすると、各供試乳とも解凍後の凝固の程度の少ないものから調製したカゼインは、その消化性がよりよかった。そして-10℃ 貯蔵の場合でも、-20℃ 貯蔵の場合でも、その傾向は同じであ

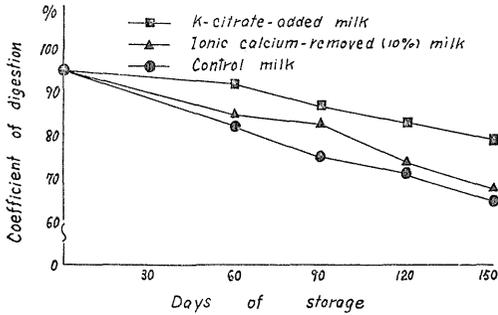


Fig. 3 Peptic digestion of casein of frozen milk stored at  $-10^{\circ}\text{C}$

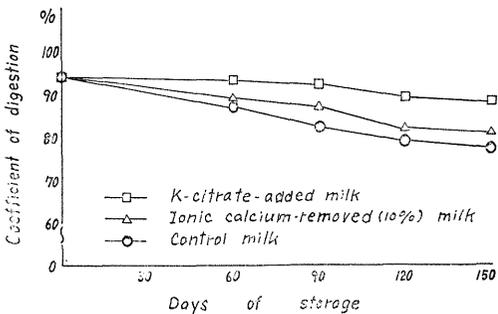


Fig. 4 Peptic digestion of casein of frozen milk stored at  $-20^{\circ}\text{C}$

った。即ち凝固の程度が比較的少なかったクエン酸カリ添加乳のカゼインの消化が一番よく、次は脱Ca乳のカゼイン、一番よくなかったのは対照の牛乳から調製したカゼインの消化率であった。その場合、第1図に示したように、凝固の程度は、対照乳で一番大きかった。例えば、 $-20^{\circ}\text{C}$ 貯蔵のクエン酸カリ添加乳から調製したカゼインの消化率は、最初は約94%であり、60日後でもほとんど変化なく、それ以後になって僅かずつ低下し、150日で約88%となっていた。これに対し $-10^{\circ}\text{C}$ 貯蔵の対照乳の場合は、60日以後の低下が大きく、150日には約78%となっていた。

凍結貯蔵すると、凝固物ができて試料の採取が不均一になるが、この場合は、解凍後の全牛乳から酸カゼインを調製しているのだから、そのことは問題にならないものと思われる。貯蔵時の牛乳の質の問題もあるかも知れないが、凝固の程度の異なる牛乳から調製したカゼインを用いたこの実験よりすると、牛乳中の主要な蛋白成分であるカゼインは、新鮮乳から得たものの方が、貯蔵乳から得たものより消化性のよいことが認められた。これからすると、牛乳を凍結貯蔵すれば、牛乳の蛋白消化率は漸次低下するものと考えられる。凍結貯蔵に伴って生ずる凝固の程度を少なくすれば、蛋白消化率の良い牛乳が得

られることになる。

### 3. 凍結貯蔵牛乳から調製したカゼイン、 $\alpha$ -カゼイン、および $\alpha_s$ -カゼインの消化性の比較

脱Ca乳、クエン酸カリ添加乳および対照乳を $-10^{\circ}\text{C}$ および $-20^{\circ}\text{C}$ に貯蔵し、これから調製したカゼインの消化性を比較したところ、凝固の程度を少なくするように処理した場合の方が、消化のよいことが認められた。次に酸カゼインの中の各区分カゼインの消化性について実験し、凍結貯蔵によって生ずる影響の程度を比較した。貯蔵の条件は、前記の貯蔵試験で凝固の程度が一番大きかった無処理の対照乳の場合について行なった。即ち前回と同様に入手した混合乳を殺菌後 $-10^{\circ}\text{C}$ および $-20^{\circ}\text{C}$ に貯蔵し、60、90および120日目に解凍後各カゼインを分別調製した。消化試験はペプシンおよびトリプシンを用いて行なった。なお $\kappa$ -カゼイン区分は十分量が得られなかったので今回は、酸カゼイン、 $\alpha$ -および $\alpha_s$ -カゼインについて実験した。なお凝固物量が比較的多く

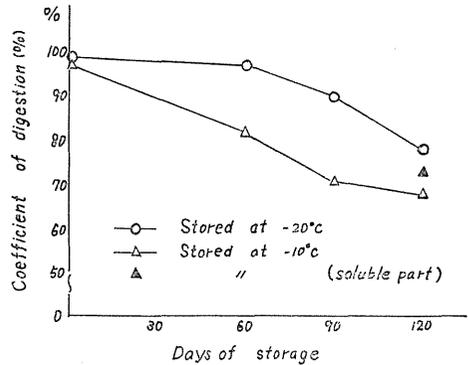


Fig. 5 Peptic digestion of acid casein prepared from frozen milk

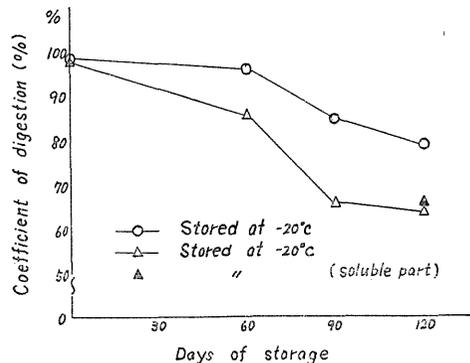


Fig. 6. Tryptic digestion of acid casein prepared from frozen milk

なる120日目の $-10^{\circ}\text{C}$ 貯蔵のものについては、上澄部分および沈降部分の両方から酸カゼインを調製した。しかし $\alpha_s$ -カゼインは、沈降部分から充分量が得られないので上澄部分から得たもののみについて行なった。

まず各凍結貯蔵牛乳から調製した酸カゼインのペプシンおよびトリプシンによる消化性を示すと、第5図および第6図の通りである。

これは前記の第3～4図に示した実験における対照乳に相当するものであるが、凍結貯蔵に伴い消化性の低下することが再確認された。 $-20^{\circ}\text{C}$ 貯蔵の方が、 $-10^{\circ}\text{C}$ 貯蔵のものよりも消化性がよく、特に60日までの変化は少く、またペプシンおよびトリプシン、何れの場合も同様の傾向であることが示された。なお120日目の場合、 $-10^{\circ}\text{C}$ 貯蔵乳の沈降部分から調製したカゼインの消化性は、上澄部分から調製したカゼインの消化性よりも劣っていた。図中の黒三角印で示したものが上澄区分からのもの、白三角印で示したものは凝固部分から調製したものの消化率である。

次に各凍結貯蔵牛乳から調製した前記の酸カゼインよ

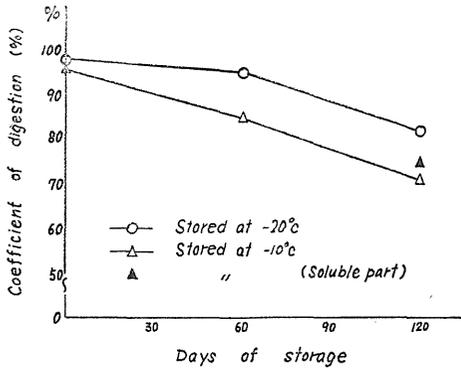


Fig. 7 Peptic digestion of  $\alpha$ -casein prepared from frozen milk

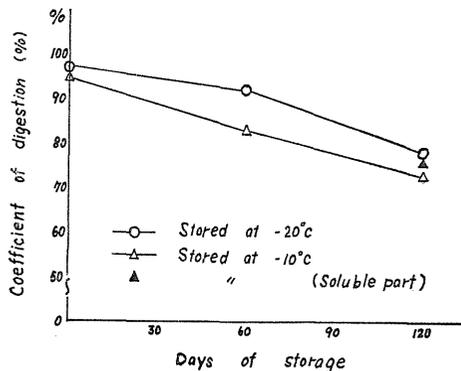


Fig. 8 Tryptic digestion of  $\alpha$ -casein prepared from frozen milk

り更に分別調製した $\alpha$ -カゼインの消化性を示すと第7図および第8図の通りである。

$\alpha$ -カゼインの区分も凍結貯蔵に伴い消化性の低下することが認められ、低下の傾向は、酸カゼインの場合と略同じようであった。

同様にして $\alpha_s$ -カゼイン区分の消化性を示すと、第9図および第10図の通りである。

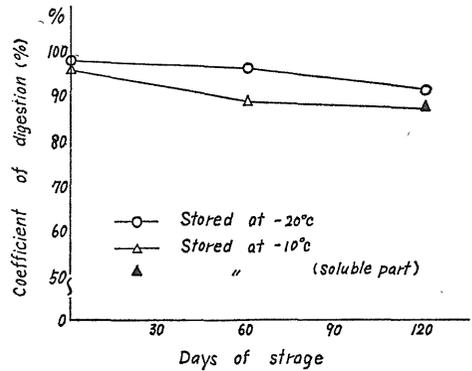


Fig. 9 Peptic digestion of  $\alpha_s$ -casein prepared from frozen milk

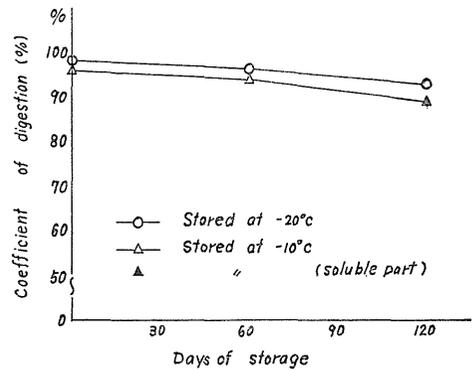


Fig. 10 Tryptic digestion of  $\alpha_s$ -casein prepared from frozen milk

この場合、酸カゼンおよび $\alpha$ -カゼインに比し、凍結貯蔵に伴う消化率の低下が少ないようである。前二者より凍結貯蔵の影響が少ないのかも知れない。即ちいずれのカゼイン区分も最初98～99%の消化率であるが、120日目では酸カゼインの場合、ペプシンによって77.5% ( $-20^{\circ}\text{C}$ )、72.3% ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 上澄区), および68.8% ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 沈降区), またトリプシンによって79.2% ( $-20^{\circ}\text{C}$ )、65.2% ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 上澄区) および64.1% ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 沈降区), 次に $\alpha$ -カゼインの場合、ペプシンによって82% ( $-20^{\circ}\text{C}$ )、75.1% ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 上澄区) および70.3% ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 沈降区), またトリプシンによって

78.4% (−20°C), 76.3% (−10°C, 上澄区) および 72.9% (−10°C, 沈降区) であるが、これに対し  $\alpha_s$ -カゼインでは 120 日目には、ペプシンによって 92.7% (−20°C) および 88.3% (−10°C, 上澄区), またトリプシンによって 92.7% (−20°C) および 88.9% (−10°C, 上澄区) であった。これは、これら各区分カゼインの調製法の異なるためなのか (例えば尿素その他の試薬の使用など), 相互的な作用に基づくものなのか, または元来各区分カゼインの消化性に対する凍結貯蔵の影響に差があるためなのか分らない。更に  $\kappa$  カゼインを調製して実験を進め, この点を検討したい。

## 要 約

牛乳を凍結貯蔵すると, 蛋白質の不安定化が起り, 解凍した時に凝固物を生ずる。この不安定化の程度と牛乳蛋白質の消化性との関係をみるために, 各種条件で凍結貯蔵した牛乳から酸カゼインを調製し, その消化性を比較した。

凍結貯蔵に伴う不安定化の程度を凝固度で比較すると, 0.2% クエン酸カリ添加乳が一番小さく, 次いで 10% 脱Ca乳区であって, 無処理の対照乳区は最も大きい凝固度を示した。また−20°C貯蔵の場合の凝固度は, −10°C貯蔵の場合よりも小であった。そしてこれら各区の牛乳から調製した酸カゼインは, 凝固度の低いものか

ら得られた方が, より良好な消化率を示した。即ち同じ処理区の牛乳間では, 貯蔵日数の短いほど, また貯蔵温度の低いほど高い消化率を示した。また処理の異なるもの間では, クエン酸カリ添加乳から調製したカゼインの消化率が最も高く, 対照乳のそれは最も低かった。

さらに酸カゼインから $\alpha$ -および $\alpha_s$ -カゼイン区分を調製して消化率を比較した。この場合, 貯蔵に伴い消化率の低下する傾向は, 酸カゼインおよび $\alpha$ -カゼインでは大体同じであったが,  $\alpha_s$ -カゼイン区分では前二者に比し, 凍結貯蔵による影響がいくぶん少ないようであった。

この研究を行うにあたって, 実験に協力された杉山安彦・佐藤元昭の両君に対し厚く感謝の意を表す。

なお本研究の一部は, 森永奉仕会研究奨励金の補助によって行なわれたものであり, 併せて謝意を表す。

## 文 献

- 1) 伊藤敏敏：酪農科学の研究, 12 (5), A-211 (1963)
- 2) 玉手六朗・大高文男・由良武：茨大農学術報告, No. 14, 55 (1966)
- 3) 玉手六朗：酪農科学の研究, 投稿中
- 4) Warner, R.C.: J. Am. Chem. Soc., 66, 1725 (1944)
- 5) Zittle, C.A. et al.: J. Dairy Sci., 42, 1897 (1959); 46, 1183 (1963)

## Summary

Destabilization of milk proteins, and the resulting flocculation or precipitation when thawed, during frozen storage of milk was observed by many investigators.

In the present paper, the peptic or tryptic digestion of casein prepared from frozen-stored milk was conducted to determine whether destabilization of milk proteins resulting from frozen storage would influence the digestibility of milk proteins.

The following milk samples were used; milk containing 10% of milk treated with Na-type Amberlite IR 120 resin (10% ionic calcium-removed milk), milk containing 0.2% of potassium citrate (0.2% K-citrate-added milk), and untreated normal milk (control milk). These milk samples were frozen and stored at −10°C and −20°C, respectively.

Precipitate formation was more evident in milk stored at −20°C than in milk stored at −10°C when thawed. And the destabilizing effect was least in 0.2% K-citrate-added milk, and was the most remarkable in control milk. The digestibility of acid casein prepared from frozen milk decreased with destabilization of milk proteins.

Changes in digestibility of  $\alpha$ -casein fractionated from acid casein during frozen storage were almost similar to those in digestibility of the acid casein. But, it would appear that the decrease of digestibility of  $\alpha_s$ -casein fractionated from acid casein was not so much as that of digestibility of the acid casein during frozen storage.