

プロセスチーズ製造における溶融塩が
カゼイン - コロイド性リン酸カルシウムの
相互作用に及ぼす影響の解析と利用

2017年1月

白庄司 宣明

プロセスチーズ製造における溶融塩が
カゼイン - コロイド性リン酸カルシウムの
相互作用に及ぼす影響の解析と利用

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

白庄司 宣明

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 既往の研究	7
2-1 カゼインミセル	7
2-2 コロイド性リン酸カルシウム	9
2-3 ナチュラルチーズの構造	10
2-3-1 熟成中のカゼインの分解	11
2-3-2 カルシウム量とカルシウムの状態	12
2-4 プロセスチーズ	14
2-4-1 溶融塩	14
2-4-2 クリーミング	16
2-5 チーズ中のカゼインの相互作用	17
2-6 チーズレオロジー	18
2-6-1 破壊によるレオロジー測定	19
2-6-2 動的粘弹性（非破壊によるレオロジー測定）	19
2-7 総括	23
第 3 章 pH 变化と溶融塩の種類がプロセスチーズの物理的機能性に及ぼす影響	34
3-1 序	34
3-2 材料および方法	34
3-3 結果および考察	36
3-3-1 プロセスチーズ組成	36
3-3-2 各種類の溶融塩を使用したプロセスチーズの pH 变化によるメルト性とテクスチャー特性の影響	37
3-4 第 3 章の結論	53
第 4 章 クエン酸三ナトリウム濃度と溶融保持がプロセスチーズ中のカゼイン間相互作用に及ぼす影響	54

4-1 序	54
4-2 材料および方法	54
4-3 結果および考察	61
4-3-1 プロセスチーズの組成	61
4-3-2 TSC を使用したプロセスチーズのレオロジーおよびテクスチャー特性	61
4-3-3 TSC を使用したプロセスチーズのメルト性	63
4-3-4 TSC を使用したプロセスチーズのカルシウムとリンの状態	64
4-3-5 TSC を使用したプロセスチーズの乳化状態	66
4-3-6 蛋白質構造への影響	67
4-4 第4章の結論	82

第5章 ヘキサメタリン酸ナトリウム濃度と溶融保持がプロセスチーズ中のカゼイン間相互作用に及ぼす影響	83
5-1 序	83
5-2 材料および方法	83
5-3 結果および考察	86
5-3-1 SHMP を使用したプロセスチーズサンプルの組成	86
5-3-2 SHMP を使用したプロセスチーズのレオロジーおよびテクスチャー特性	86
5-3-3 SHMP を使用したプロセスチーズのメルト性	88
5-3-4 SHMP を使用したプロセスチーズの乳化状態	89
5-3-5 不溶性カルシウムとリンの状態	90
5-3-6 酸・塩基緩衝曲線で観測する CCP の状態	91
5-4 第5章の結論	103

第6章 ピロリン酸四ナトリウム濃度と溶融保持がプロセスチーズ中のカゼイン間相互作用に及ぼす影響	104
6-1 序	104

6-2 材料および方法	104
6-3 結果および考察	107
6-3-1 TSPP を使用したプロセスチーズサンプルの組成	107
6-3-2 TSPP を使用したプロセスチーズのレオロジー、テクスチャ－特性	107
6-3-3 TSPP を使用したプロセスチーズのメルト性	108
6-3-4 TSPP を使用したプロセスチーズのカルシウムとリンの状態	109
6-3-5 酸・塩基緩衝曲線によるカルシウムの状態変化	110
6-3-6 TSPP を使用したプロセスチーズのカゼインの状態	110
6-4 第6章の結論	119
 第7章 結論	120
7-1 総括	120
7-2 製品への応用	121
7-3 最後に	122
 引用文献	129
 付記	139
 謝辞	141

第1章 緒論

チーズは乳発酵食品であり、人類が作り出した最古の高栄養食品である。ナチュラルチーズの歴史は非常に古く、一説には紀元前 12~13 世紀頃が起源とされている。かつてアラビアの旅商人が子羊の胃袋で作った水筒に乳を入れ、ラクダに乗り砂漠を旅した際に、胃袋の内側の凝乳酵素と熱で乳が凝固し、ラクダの動く振動により固液が分離したことで偶発的に発見されたともいわれている。チーズには大きく分類してナチュラルチーズとプロセスチーズがあり、一般的にナチュラルチーズは乳に乳酸菌を加え発酵させ、酸、または凝乳酵素であるレンネットを作用させることで凝固させる。その凝固物からホエイと呼ばれる液体を絞り出すことによって得られた固体物（カード）に食塩等を加え、そのままもしくは熟成させて製品になる（Fig. 1-1）。ナチュラルチーズは世界規模で様々な種類が作られ、その種類は 1,000 種類以上とも言われており、原料となる乳（牛乳、水牛乳、山羊乳、羊乳）、乳酸菌、凝乳酵素だけでなく、製造工程の条件（温度、pH、時間、最終成分組成等）の違いが異なる風味、食感を生み出している。

一部の特殊なチーズを除き、多くのナチュラルチーズは乳タンパク質の 1 つであるカゼインの凝集によりネットワークを作り、脂肪、水とその他の水溶性成分を抱き込みカードが形成される。チーズの特性（硬さ、加熱時の溶融性[メルト性]、糸引き性[ストレッチ性]など）は脂肪、水、タンパク質、食塩等の組成により異なるが、カゼイン分子間の相互作用もチーズの特性に影響を及ぼしている。カゼイン分子間の相互作用にカルシウムが大きな影響を与え、チーズの特性に影響を及ぼすことが報告されており（Lucey *et al.*, 2003）。カゼイン分子間相互作用とカルシウムの結合状態を知ることはチーズを科学的視点で見る上で必要不可欠である。

一方、プロセスチーズが誕生したのは 19 世紀、スイス軍隊の携帯長期保存食としてナチュラルチーズを缶詰にする方法が開発され、クエン酸ナトリウムを添加することで実現したのが始まりと言われている。その後、Walter Gerber と Fritz Stettler が 1912 年、James L. Kraft が 1916 年にプロセスチーズの製法特許を取得し、初めて工業的にプロセスチーズが製造された。ナチュラルチーズは通

常加熱するとチーズ中の脂肪と水分が遊離し、均一な組織を保てなくなる。溶融塩を加え、加熱攪拌することで脂肪が乳化し、均一で流動性のある状態になる。すなわち、溶融塩はプロセスチーズ製造において必要不可欠である。

プロセスチーズは(A)粉碎したナチュラルチーズに水と溶融塩を混合する工程、(B)間接加熱、または蒸気を吹き込み直接加熱し、混練、攪拌または剪断し乳化する工程、(C)溶融したチーズを成型、冷却する工程、により製造される(Fig. 1-2)。溶融塩はクエン酸ナトリウムやリン酸ナトリウム等の有機酸のナトリウム塩が主に使用されており、日本ではプロセスチーズの原料として使用される際、「乳化剤」と表記することになっており、その物質も決められている(Table 1-1)。しかしながら、ナチュラルチーズに一般的な乳化剤を添加しても均一な組織を得ることは出来ず、脂肪が遊離、タンパク質は凝集し、水分を放つ。溶融塩は親水基と疎水基に分かれたモノグリセリドや脂肪酸ナトリウムのような「界面活性剤」としての作用がなく、一般的な乳化剤のように直接油層部と水層部の境界面に効果を及ぼさない。溶融塩はカルシウムをキレートする作用を有しており、乳タンパク質であるカゼインに結合するカルシウムをキレートすることでカゼインを可溶化、分散させ、両親媒性を持つカゼインが「乳化剤」として働く。プロセスチーズは原料配合、加熱溶融温度と時間、攪拌方法、溶融保持時間、冷却方法など、様々な製造条件によりその物性やレオロジー特性が異なるため、商品形態や求められるアプリケーションによって配合、製造条件等を変えて製品開発がされている。その中でも溶融塩は物性を決定づける重要な要素であるが、その化学的メカニズムは未解明である。カルシウムをキレートし、カゼインを分散させる能力は溶融塩の種類により異なるが、その評価は統一されていない。この原因としてプロセスチーズの物性が溶融塩のみならず、原料配合、加熱溶融条件など他の多くの要因に左右されることがあげられる。さらに乳タンパク質の状態はpHに影響されやすいことが知られている。そのためpHはプロセスチーズの物性に影響を及ぼすが、溶融塩は種類によりpH緩衝能が異なるため、溶融塩自体の働きとpH緩衝能の働きが複合した条件下でプロセスチーズの状態を把握している。著者はpH緩衝能の影響がない条件下での単一溶融塩のプロセスチーズへ及ぼす影響のメカニズムを解明すれば総合的なプロセスチーズの物性コントロールが可能となり、これまでできなか

った新たなチーズの機能特性（物性、メルト性）を付与できるのではないかと発案した。高齢化社会になった現代において、食感が軟らかいが強い耐熱性を有するチーズや、高タンパク質だが滑らかな食感のチーズ等、嚥下機能が低下した高齢者向けのチーズの開発は急務である。具体的には、溶融塩を使用せずに加工できるプロセスチーズ（ナトリウムの摂取制限のある高血圧疾患者やリンの摂取制限がある腎臓疾患者も食することのできるチーズ）の開発が考えられる。

この現状を踏まえ、本研究では、プロセスチーズ製造における溶融塩の及ぼす影響とメカニズムの解明を目指し、下記の（1）～（4）について検討を試みた。

- （1）各種の溶融塩を用いたプロセスチーズの物性とメルト性にpHが及ぼす影響の解明（第3章）
- （2）同一pH条件下におけるクエン酸三ナトリウム濃度と溶融保持時間がプロセスチーズの物理化学的特性に及ぼす影響の解析（第4章）
- （3）同一pH条件下におけるヘキサメタリン酸ナトリウム濃度と溶融保持時間がプロセスチーズの物理化学的特性に及ぼす影響の解析（第5章）
- （4）同一pH条件下におけるピロリン酸ナトリウム濃度と溶融保持時間がプロセスチーズの物理化学的特性に及ぼす影響の解析（第6章）

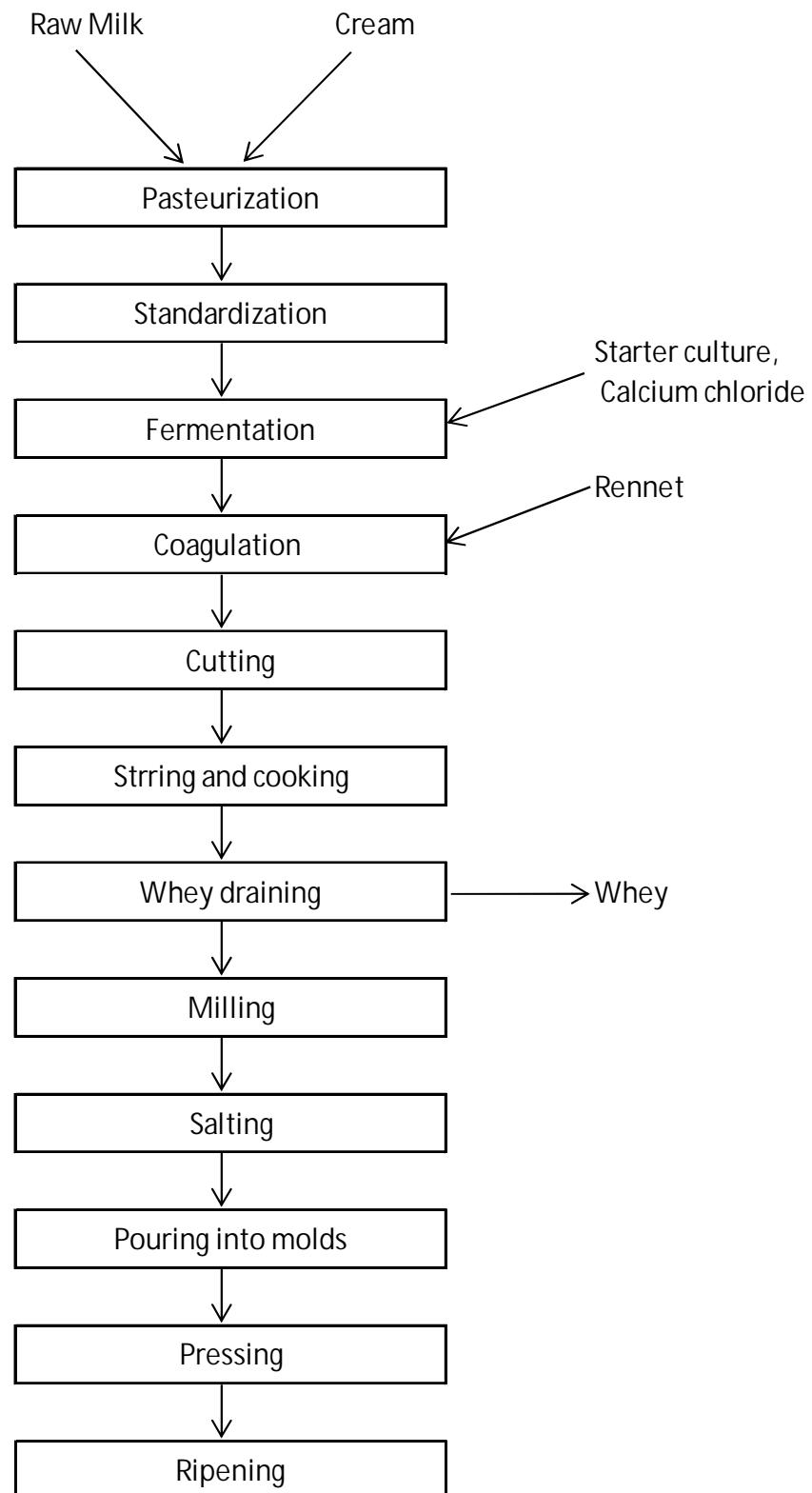


Fig. 1-1 General protocol for semi-hard/hard cheese manufacture.

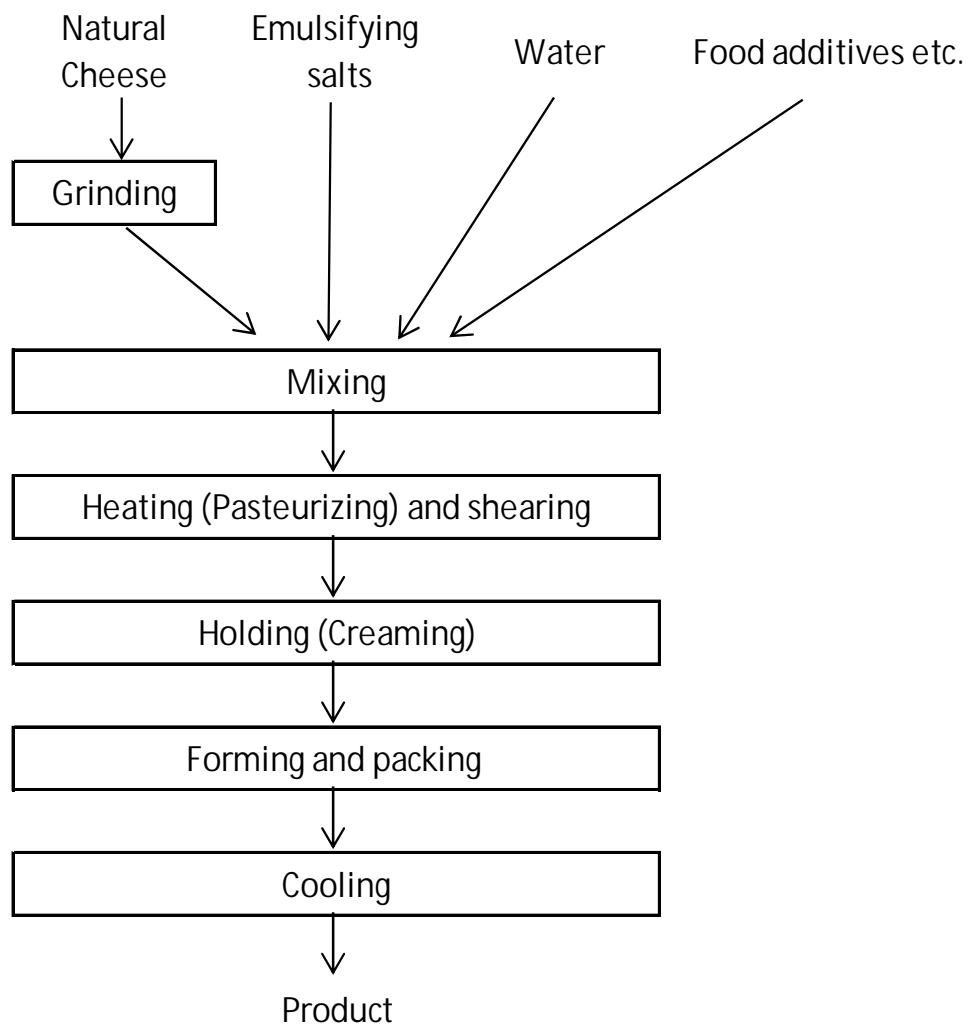


Fig. 1-2 Fundamental manufacturing process of pasteurized process cheese.

Table 1-1 Approved emulsifying salts for process cheeses (including cheese foods and process cheese like product categorized into foods using milk products as principal raw materials) in Japan.

Citrates	
Trisodium citrate	Calcium citrate
Gluconates	
Sodium gluconate	Potassium gluconate
Orthophosphates	
Monosodium phosphate	Disodium phosphate
Trisodium phosphate	
Monopotassium phosphate	Dipotassium phosphate
Tripotassium phosphate	
Monoammonium phosphate	Diammonium phosphate
Calcium monohydrogen phosphate	Calcium dihydrogen phosphate
Tricalcium phosphate	
Pyrophosphates	
Disodium pyrophosphate	Tetrasodium pyrophosphate
Monocalcium pyrophosphate	
Polyphosphates	
Sodium polyphosphate	Potassium polyphosphate
Metaphosphates	
Sodium metaphosphate	Potassium metaphosphate

第2章 既往の研究

本章では、本研究の背景となるプロセスチーズを含む乳製品の物理化学的特性や物性測定に関する既往の学術研究について概説し、本研究の意義とプロセスチーズ製造の解明すべき課題を明らかにした。

2-1 カゼインミセル

牛乳の組成は牛の品種によって大きく異なるが、標準的には水分 87%、タンパク質 3.3%、脂肪 3.8%、炭水化物 4.8%、灰分 0.7%で構成されている。牛乳中のタンパク質のおよそ 80%がカゼインで残りがホエイタンパク質である。カゼインは一般的なナチュラルチーズやプロセスチーズの物理的構造の骨格を成すもので、カゼインのアミノ酸配列から高次構造までを理解することはチーズの機能特性（加熱流動性、硬さ、レオロジー特性）を考察する上で重要である。カゼインはリントンパク質で s_1 、 s_2 、…、カゼインから成り、その存在比は 4:1:4:1 である（Walstra *et al.*, 1999）。 s_1 は 8~9 個、 s_2 は 10~13 個、…は 5 個、…は 1 個のホスホセリン残基を持ち、そのアミノ酸配列は電荷のある親水性アミノ酸が多く配列された領域と、疎水性アミノ酸が多く配列された領域に分かれしており、両親媒性を有する。これらのカゼインの等電点はほぼ差が無く pH 4.6 で沈殿するため、Mellander (1939) がチゼリウス電気泳動により…、…の三成分を見出すまでカゼインは単一タンパク質であると考えられていた。

カゼインはカルシウムイオンに対する感受性を持ち、ホスホセリン残基にリン酸カルシウムが結合する（生物学的には、リン酸カルシウムを沈殿させることなく、新生児へ届けるキャリヤーとしての役割もある [Holt *et al.*, 2013]）。カルシウムの感受性はホスホセリン残基の数が多いほど強く $s_2 > s_1 > \dots$ の順番で、高濃度のカルシウムイオン存在下で沈殿を生じる。カゼインはホスホセリン残基が 1 つのみで、カルシウム感受性が低い。カルシウムのカゼインへの結合状態は pH、温度、イオン強度によって影響される（Swaisgood, 1996）。

乳中のカゼインの 90~95% はコロイド特性を持つ自己集合体「カゼインミセル」

として存在する (Fox and McSweeney, 1998)。カゼインミセルは 50~500 nm 径の球形であり、乳中に 1 mL 当たり $10^{14} \sim 10^{16}$ 個含まれており、乳が白く見えるのはミセルの光拡散が原因である (Fox and McSweeney, 1998)。

乳製品の機能性研究においてカゼインの特性や構造を知ることは重要である。Waugh and Nobel (1965) によるコートコア (Coat-core) モデルの提唱からカゼインミセルの構造研究が行われて以降、多くの学説が提唱されているが、未だ定説はなく、議論が続いている。球状の小さなサブユニットからカゼインミセルが構造体を形成している「サブミセル」モデルが Morr (1967)、Slattery and Evard (1973)、Schmidt (1980)、Walstra and Jenness (1984)、Ono and Obata (1989) により提唱されており、現在、カゼインミセル構造として支持されている。特に Walstra and Jenness (1984) が提唱するモデルは乳業科学の基礎知識として引用されることが多い。彼らが提唱するカゼインミセルモデルは平均直径 10~15 nm のサブミセルがコロイド性リン酸カルシウム (Colloidal Calcium Phosphate; CCP) により架橋され、カゼインに富むサブミセルはミセルの外側に位置し、カゼインの少ないサブミセルはミセルの内側に位置している (Fig. 2-1a)。後に Walstra はサブミセル内に CCP が存在し、サブミセル間は疎水性相互作用により結合していると報告しているが (Walstra, 1999)、1984 年に報告されたモデルが支持されることが多い。

これらのサブミセル理論の論拠の一つは、SEM や TEM 等の電子顕微鏡写真で見られるミセル中のラズベリー状の構造体である。しかしながら、電子顕微鏡写真は試料の前処理方法で結果が異なり、乾燥や凝集後の状態の観察でしかなく *in situ* 構造を正しく把握することは難しかった。ところが、電子顕微鏡技術の進歩により、より *in situ* に近い構造を観察できるようになった。McMahon and McManus (1998) や Dagleish *et al.* (2004) は電子顕微鏡による画像においてカゼインミセル内のサブユニットは認められず、サブミセルの論拠となる過去の電子顕微鏡写真に疑問を投じている。また、ミセル表面のカゼインの存在や温度変化によるカゼインミセル中のカゼイン遊離、ミセル構造の変化、さらにエタノール、尿素、SDS といったミセル解離物質を添加した際の現象等の乳タンパク質に起こる現象についてサブミセルモデルで説明するには限度がある (Horne, 1998)。Holt (1992) はカゼインミセル中にサブミセルのような明確な構

造単位が存在することに疑問を呈し、ミセル内に毛状のサブストラクチャーが存在し、CCP は微粒子としてタンパク質マトリックスの中に埋め込まれているモデルを提案している (Fig. 2-1b)。

Horne (1998) はサブミセルモデルでは説明できない上述の現象のほか、乳腺内でのミセルの形成まで説明できるカゼインミセルモデルとして、デュアルバインディングモデル (Dual-binding model; DBM) を提唱している (Fig. 2-2)。DBM ではカゼインの持つ疎水領域同士が疎水性相互作用により重合したポリマー化状態 (Fig. 2-2a) と、カゼインの持つホスホセリン残基に結合した CCP によって介在する架橋構造 (Fig. 2-2b) からカゼインミセルは成立している。Fig. 2-2c では疎水領域 (長方形) を介して S_1 、 S_2 、カゼインが結合し CCP (三角形) がカゼインの親水領域にあるホスホセリン残基を介して架橋していることを示している。乳腺内ではこの 2 つの結合によりカゼインが重合することでミセルが成長する。ホスホセリン残基を 1 つしか持たず、カルシウム感受性の低いカゼインがその成長過程において結合することでミセルの成長が止まる、ターミネーターとしての役割がある (1 カゼイン分子当たりホスホセリン残基 3 箇所以上無いと CCP を介した架橋構造が形成されないとされている [Aoki, 1995]) それ故、何処とも重合しない カゼインの水性領域がミセルの外側に突起し、ミセル表面に毛状構造を造りミセルを安定化させる。

カゼインミセルの構造については様々なモデルが提唱されて、定説がないまま現在にいたっているが、DBM は提唱されているカゼインミセルモデルの中で乳科学における現象を議論する上で最も有効であると考えられ、本研究では DBM の概念を基に考察を行う。

2-2 コロイド性リン酸カルシウム

ミセル中には乾物量としてカゼインが約 93%、カルシウムや無機リン酸などのミネラルが約 7% 含まれている。ナトリウム、カリウム、塩素のほとんどは溶解してイオン状態で存在しているが、カルシウム、マグネシウム、無機リン酸は溶解度以上に存在し、イオン化していないものは不溶性の状態でカゼインに

結合している。これらの多くがコロイド性リン酸カルシウム (CCP) と呼ばれる状態で存在し、それはカルシウムとリンを主体とし、少量のマグネシウム、クエン酸塩等で構成されている。CCP はカゼイン親水性領域にあるホスホセリン残基に結合してカゼインミセルの安定化に寄与し、ミセル構造に影響を及ぼしている。それ故に CCP はチーズの機能特性にも多大な影響を及ぼすが、CCP の化学的構造は未だ明らかではない。CaHPO₄ の構成物 (Van Slyke and Bosworth, 1915)、非晶質の Ca₃(PO₄)₂ (Schmidt, 1980) や 3Ca₃(PO₄)₂·CaH·Citrate (Pyne and McGann, 1960)、結晶体であるブルシャイト (CaHPO₄·2H₂O) (Holt *et al.*, 1989)、またはハイドロキシアパタイト (Bak *et al.*, 2001) と諸説あり、カゼインミセルの構造同様、未だに議論がなされている。CCP の状態はマグネシウム、クエン酸塩といったイオンやタンパク質の存在によって変化する。また、牛乳を希釈するとコロイド相のリン酸カルシウムは溶出し、濃縮するとコロイド相に移行する。また pH に大きく影響し、牛乳に酸を加えると CCP は溶出し、pH 4.9 で完全に可溶化する。EDTA、クエン酸塩等の金属イオンキレート力のある製剤を添加するとカルシウムが可溶化し、CCP は崩壊する。さらに温度依存性もあり、乳中のリン酸カルシウムは温度上昇と共にその溶解性が下がることから、温度上昇により CCP の核形成が生じると考えられている (Horne, 1998)。この温度依存性は一部可逆的で冷却すれば戻るが、厳しい加熱条件下では不可逆となる。ナチュラルチーズ製造時、乳の殺菌を高温長時間保持 (例: 80 °C、30 s 以上) した場合、凝乳酵素添加後の凝乳反応が遅延する。それは溶解相のカルシウムイオンが加熱によりコロイド相に不可逆的に移動し、マイナスに荷電しているカゼインミセル表面間の斥力を中和できないことが一因とも言われている (仁木と鶴田, 1989; 斎藤, 2008)。

2-3 ナチュラルチーズの構造

ナチュラルチーズは乳のタンパク質を酵素やその他の凝固剤により凝固させた凝乳から乳清 (ホエイ) の一部を除去したもの又は熟成したものである (乳等省令, 2014)。ナチュラルチーズには凝乳酵素によって凝乳する「レンネット

「凝固」と乳酸発酵または酸の添加によりカゼインの等電点まで pH を下げることで凝乳する「酸凝固」に区分できる。プロセスチーズの主要な原料として使用されるchedarチーズはレンネット凝固に分類される。レンネット凝固のナチュラルチーズは乳を殺菌、30~40℃に冷却し乳酸菌を加えた後、レンネットと呼ばれる凝乳酵素「キモシン」(EC 3.4.23.4)を含む凝固剤を加える。凝固した乳をカットし、攪拌することでホエイと固体物(カード)に分ける。品種によってはこのカードを圧搾、熱湯に浸し混練する等を行い、食塩を加え成型する。その後熟成を行う場合は適切な温度帯で熟成させる。

Figure 2-3 に DBM を用いてキモシンによる乳凝固を図式した。キモシンによりカゼインミセルの表面を覆う カゼインの Phe105 - Met106 が切断され、カゼインミセルから カゼインの C 末端側領域であるマイナス電荷をもつ親水性領域の糖ペプチド(グリコマクロペプチド)が解離する (Fig. 2-3a and b)。これによりミセル間の静電気的斥力が弱まり、疎水性相互作用によりミセル同士が結合する (Fig. 2-3c)。カゼインは脂肪を包含しカードを形成する。カゼイン以外の水溶性タンパク質(ホエイタンパク質)とグリコマクロペプチドのほとんどはホエイへ流出する。凝乳後時間と共にミセルは融合し、カゼインの網状組織となる。製造中の発酵によりカードの pH は下がりカゼイン間を架橋する CCP は一部溶解し、水相部(serum)に移行する (Fig. 2-3d)。凝集したタンパク質は疎水性相互作用によりさらに凝集が進み、全体的にみるとチーズカードの構造体は脂肪、水相部、タンパク質(カゼイン)で構成される。

ナチュラルチーズがプロセスチーズの物性、メルト性、ストレッチ性等の機能特性に及ぼす因子としては水分、脂肪、タンパク質、pH、食塩といった基本的な構成組成だけでなく、インタクトカゼイン率(熟度)カルシウム量とその状態も重要である。

2-3-1 熟成中のカゼインの分解

ナチュラルチーズ中のタンパク質はキモシンによる カゼインの分解のほか、乳中に存在するプラスミン(EC 3.4.21.7)や添加した乳酸菌(スターター) 製造環境中から混入した乳酸菌(非スターター乳酸菌; Non Starter Lactic Acid

Bacteria, NSLAB) 等によりペプチド、アミノ酸へ分解される。特に熟成工程を有するチーズはその熟成期間にカゼインがペプチドに分解されることにより、独特のフレーバーや旨み成分等が形成され複雑かつ深みのある風味を呈する。チーズの構造骨格となるのはタンパク質であり、その主成分はカゼインである。タンパク質の量だけでなくその分解度によってもチーズの機能特性が異なり、その指標としてインタクトカゼイン量(率)を求めることがある。インタクトカゼインとはカゼインの等電点である pH 4.6 で沈殿し、酵素等によって分解されていない無傷な状態(インタクト)のカゼインである。このインタクトカゼイン量はプロセスチーズにおいても大きな影響を及ぼし、インタクトカゼインの少ない原料チーズを使用したプロセスチーズは軟らかく、溶けやすい傾向があり、インタクトカゼインが多い原料チーズを使用したプロセスチーズは固く、メルト性が乏しい(Zehren and Nusbaum, 1992; Piska and Stetina, 2003)。通常のプロセスチーズ製造において原料ナチュラルチーズのインタクトカゼイン量を測定し、それに応じた物性調整を行う必要がある(Maurer-Rothmann and Scheurer, 2005)。

2-3-2 カルシウム量とカルシウムの状態

チーズのカルシウム量は製造工程によって大きく異なる。一般的にはチーズ中のカルシウム含量が少ないと軟らかくメルト性が高い(Lucey and Fox, 1993)しかしながらカルシウム含量がほぼ同等であってもチーズの製造方法や熟成期間等によって不溶性カルシウム含量が異なるとその物性も変化する。乳中のカルシウムの状態を測定する方法は幾つかある。乳中のカゼイン結合性のカルシウムと無機リンを限外濾過(Ultrafiltration; UF)のパーミエイトから測定する方法が一般的に研究されている(White and Davies, 1958; Mizuno and Lucey, 2005)。Lucey *et al.*(1993)は酸-塩基滴定における酸性滴定時の pH 5.0 周辺に観測される緩衝曲線ピークが CCP の溶出によるものであることを報告している。Luceyらは酸により溶出した CCP は不可逆性であることから酸滴定時と塩基滴定時の緩衝能力値の差から CCP の含有量を計算できることを見出した。乳製品に対する緩衝能力に関して Lucey and Fox(1993) や Salaün *et al.*(2005) が総説にまとめ

ている。一方、チーズ中のカルシウムの状態を測定する方法として、粉碎したチーズと海砂を混ぜ、それを圧搾することで得られる液相のカルシウム量を解析するチーズジュース法 (Morris *et al.*, 1988) や水に懸濁し、濾過した濾液のカルシウム量を分析する方法 (Metzger *et al.*, 2001) がある。Hassan *et al.* (2004) はチーズジュース法と酸 - 塩基滴定における緩衝曲線からチェダーチーズの熟成期間中の不溶性カルシウムの減少を観測した。また、不溶性カルシウム含量はチェダーチーズの硬さと相関性があり、メルト性と負の相関があると報告されている (Lee *et al.*, 2005)。長年、チーズ熟成における硬度の低下はレンネット中のプロテアーゼによる ^{SI} カゼインの Phe23 - Phe24 部の加水分解によるものだと考えられていた (Creamer and Olson, 1982) が、近年、種々の研究で CCP は熟成中のチーズの物性変化に影響を及ぼすことが示唆されている。O'Mahony *et al.* (2005) はレンネット阻害剤を添加したチーズにおいても熟成中の硬度低下がみられ、それがカゼインマトリックスに結合する CCP の溶解に因ることを報告している。また、人工的なチェダーチーズ水相液に浸透させ、CCP 含量を増加させた熟成チーズにおいて、メルト性が減少し硬度が増加した報告もある (O'Mahony *et al.*, 2006)。

プロセスチーズにおいても原料ナチュラルチーズのカルシウム含量は重要な意味を持つ。Guinee and O'Kennedy (2009) はグルコノデルタラクトンを使用しカルシウム量が異なる一定 pH のチェダーチーズを作成し、これを原料にしたプロセスチーズを作成した結果、カルシウム量が多いと硬くなり、耐熱性が上がることを報告している。様々なチーズ原料を選択しプロセスチーズを作成する場合、ナチュラルチーズ中のカルシウム量に見合う溶融塩量の調整が必要である。ナチュラルチーズ中に同一量のカルシウムが含有していても CCP 含量が異なると物性が変わるが、原料ナチュラルチーズ中の CCP 含量の違いによるプロセスチーズ物性の違いについては報告がない。また、プロセスチーズのカルシウムの状態（水溶性/不溶性、カゼインとの結合状態、CCP の状態等）についても報告はなく、プロセスチーズのカルシウムの状態を解析することは重要である。

2-4 プロセスチーズ

2-4-1 溶融塩

プロセスチーズの製造において溶融塩は必要不可欠である。日本では製品原材料表示に「乳化剤」、英語圏では「emulsifier(s)」と表示されるが、厳密な意味では乳化剤ではない。溶融塩はカゼイン間を架橋する CCP 中のカルシウムをキレートすることでカゼインを拡散、水溶性のカゼインナトリウム（溶融塩がナトリウム塩の場合）に変化させる。両親媒性を持つカゼインは界面活性剤として働き、脂肪を乳化させることで、脂肪、水相部（serum）タンパク質の 3 つの位相を均一化させる。溶融塩は種類によって様々な pH 緩衝能を有し、製品の pH 調整剤としての働きもある。一般的な両親媒性の乳化剤を使用してプロセスチーズを作る研究もあるが、加熱時にカゼインが凝集し離水とオイルオフが起きる。製品の pH、乳化温度、製品水分の調整により、溶融塩を使用せずに加熱溶融を行ってもオイルオフせずに乳化する報告がある（Tatsumi and Nishiya, 1997）が、溶融塩不使用のプロセスチーズの商品化までには至っていない。これは物理上の安定性が低く、充填後の品質劣化があるためと考えられる。Table 1-1 (p. 6) に日本でプロセスチーズの溶融塩（乳化剤）として認められているものを示した。通常のプロセスチーズには 2~3% (w/w) が添加されるが、使用原料や製品用途によって適正量は異なる。Table 1-1 に表示された溶融塩以外にもリン酸アルミニウムナトリウム($\text{Na}_{15}\text{Al}_{28}(\text{PO}_4)_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$) は欧米で使用が認められている。また、EDTA、酒石酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、アジピン酸塩、フィチン酸塩等が溶融塩になるという報告もある（林, 1989）が、効果が弱いものが多く、一般的には使用されていない。代表的な溶融塩としてはクエン酸三ナトリウム(TSC)、モノリン酸二ナトリウム(DSP)、ピロリン酸四ナトリウム(TSPP)、ヘキサメタリン酸ナトリウム(SHMP)がある（Fig. 2-4）。各種の溶融塩のカルシウムキレート力やカゼイン水和力に関する研究が報告されているが、必ずしも一致しない。Heide (1966) は種々の溶融塩のカルシウムキレート力を SHMP 87%、TSPP 47%、TSC 43%、DSP 33% と解析しており、Van Wazer and Callis (1958) が報告した（ポリリン酸塩 > ピロリン酸塩 > クエン酸塩 > モノリン酸塩）に一

致している。一方、Guinee *et al.* (2004) は過去の報告から溶融塩のキレート力を（ポリリン酸塩 > ピロリン酸塩 > モノリン酸塩 > クエン酸塩）と纏めている。溶融塩と乳タンパク質との相互作用についても種々報告がある（Odagiri and Nickerson, 1964, 1965; Morr, 1967; Zittle, 1966; Nakajima *et al.*, 1975; Mohammad and Fox, 1983; Johnston and Murphy, 1992）。最新の研究では、Mizuno and Lucey (2005) が乳タンパク質溶解液に溶融塩を添加した際（pH は全て 5.8 に調整）のカゼイン結合性のカルシウムと無機リンの変化を報告している。Mizuno and Lucey (2005) の報告では TSC の添加によりカゼイン結合性のカルシウムとリンは減少、DSP の添加による変化は無かった。また、TSPP の添加によりカゼイン結合性のカルシウムとリンは増加し、SHMP の添加では 0.3% (w/w) まで増加するがそれ以上の濃度では減少することを報告している（Fig. 2-5）。Mizuno and Lucey (2005) は、これらの結果を踏まえ、TSPP はカルシウムと結合しリン酸カルシウム複合体を作成し、電気的斥力によりカゼイン分子を分散させ、SHMP はカゼイン結合性リン酸カルシウムを溶解させカゼインミセルを分解する作用機序を提唱している。

溶融塩のプロセスチーズに対する影響については Gupta *et al.* (1984) が物性と官能評価について報告している。また、Cavalier-salou and Cheftel (1991) はカゼインカルシウムと各種の溶融塩を使用してチーズアナログ（模擬的プロセスチーズ）を作成し、溶融塩濃度に対する物性、水溶性カルシウム、水溶性カゼインの変化を報告している。種々の溶融塩の及ぼす影響が顕著に出ている添加量 1% (w/w) において、硬度は SHMP > TSPP > DSP > TSC、水溶性カルシウムは TSC > SHMP > TSPP > DSP、水溶性カゼインは TSC > SHMP > TSPP > DSP であった。

Thomas *et al.* (1980) は各種の溶融塩を 3% (w/w) 使用して作成したプロセスチーズのペネトロメーターによる硬さと水溶性窒素量の比較結果を報告しており、硬さは TSC > SHMP > DSP > TSPP、水溶性窒素すなわち水溶性カゼイン量は TSPP > DSP > TSC > SHMP と結論付けている。このように種々の溶融塩を使用したプロセスチーズの物性傾向は一致していない。この原因として原料の違いや製造条件が異なることが考えられる。また、最終試料の pH が一定ではないため、得られた結果が pH による影響であるのか、溶融塩機能による影響である

のか解析し難い。**Figure 2-6** にチェダーチーズを原料としてプロセスチーズを作成する際に様々な濃度の各種の溶融塩を添加した際のプロセスチーズの pH を示した。溶融塩の緩衝能力により種類、濃度によってプロセスチーズの pH は大きく異なる。しかしながら、一定の pH 条件下において種々の溶融塩がプロセスチーズの物理化学的特性に及ぼす影響は報告されていない。この現状を踏まえ、著者は、一定の pH 条件下で溶融塩がプロセスチーズ中のカルシウム、カゼインの相互作用に及ぼす影響を物理的、化学的に解析することで、種々の溶融塩の機能をより正確に理解できると考えた。

2-4-2 クリーミング

プロセスチーズの物性、メルト性、ストレッチ性等の機能特性はナチュラルチーズ同様、製品として重要な点である。機能特性に影響を及ぼす要因として脂肪、水分、タンパク質といったプロセスチーズの組成だけでなく、配合（原料ナチュラルチーズの種類、溶融塩、その他の原材料）、製造条件（攪拌方法、加熱溶融時間、加熱温度、冷却速度）も影響を及ぼす。プロセスチーズが加熱溶融温度に達した後、攪拌し続けると溶融チーズの粘度が上昇する現象が見られる。これは「クリーミング」と呼ばれる現象であり、クリーミングにより冷却後の物性も変化する（粘度上昇と共に固くなる）。長い間、クリーミングは脂肪存在下でのみ起こる現象だと考えられていた（Berger *et al.* 1998）が、無脂肪のプロセスチーズにおいてもクリーミングが発生することが報告された。Lee *et al.* (2003) はレンネットカゼインパウダーと溶融塩を原料として 85 ℃まで加熱攪拌し 45 min 攪拌保持した際の溶融チーズの粘度変化を観察した。溶融保持 30 min まで粘度上昇が見られ、それ以降は次第に粘度低下した。Lee *et al.* (2003) は加熱エネルギーと溶融塩によって分散したカゼイン分子が露出した無極性領域を介して再会合し、網目状構造を作ることによって加熱溶融中の粘度が上昇し、それ以上の溶融保持はタンパク質のネットワークが崩壊し、局在的な凝集が起こると説明している（Fig. 2-7）。

2-5 チーズ中のカゼインの相互作用

Horne (1998) が提唱する DBM ではカゼインを疎水コロイドとして扱いカゼインミセルの状態と構造を説明している。Lucey *et al.* (2003) は DBM を基にチーズの物理化学的特性を説明している。チーズの構造体におけるカゼイン間の相互作用は静電気的斥力と分子間の引力とのバランスによって成り立つと仮定し、(2-1) 式を提唱している。本論文では (2-1) 式の概念を「バランスコンセプト」と記載する。

$$\text{相互作用エネルギー} = \text{静電気的斥力} + \left\{ \begin{array}{l} \text{疎水性相互作用} \\ \text{CCP 架橋} \\ + / - \text{電荷架橋} \end{array} \right\} \dots (2-1)$$

Lucey *et al.* (2003) はこのコンセプトを基にチーズ加熱時の状態変化すなわちチーズの加熱溶融のメカニズムを分子レベルで以下のように説明している。

チーズ中の乳脂肪は 40 以上でほぼ完全に液体化するが、実際にチーズに流動性が発現するのはそれ以上の高温度域である。これにはカゼイン分子間の相互作用が関わっている。温度上昇とともにカゼイン間の疎水性相互作用が強くなるためカゼイン粒子のサイズが小さくなり、粒子間の接触面積が小さくなる。また静電気的斥力も温度上昇と共に強くなりカゼイン粒子間に反発力が生まれ、これにより粒子間の結合が弱くなる。結果として加熱により弱いゲルとなり流動性がある「溶ける」状態となる。

Lucey *et al.* (2003) はチーズの製造工程がカゼイン相互作用とメルト性に及ぼす影響を纏めている (Table 2-1)。乳中の CCP は pH を下げると可溶化し、pH 4.9 で完全に可溶化する。これはチーズ中でも同様な挙動を示す。モツツアレラチーズは組織に纖維性を持たせるためのストレッチという熱湯で混練する工程がある。この工程に至るまでに乳酸菌発酵により乳の pH が下がり、その後、乳酸菌はストレッチ工程の熱湯により不活性化し pH の低下は止まる。通常 pH 5.2 にてストレッチしやすい物性となるが、これは CCP が溶出することによりカゼ

イン分子間の結合が緩みながらもある程度の CCP 架橋と疎水性相互作用により結合が保たれることで、ストレッチに適度なカゼインネットワークが作られるためである。pH が高すぎる (pH 約 6.5) と CCP が溶出せず、カゼイン分子間相互作用が強く、ストレッチしない。また、逆に pH 4.6 まで下げるとカゼインの等電点となり、静電気的斥力を失うことでカゼインは凝集し、その結果ストレッチ性が無くなる。このようにバランスコンセプトによりチーズの状態変化を合理的に説明できる。

一方、カルシウム、カゼイン間の相互作用はプロセスチーズの微細構造に影響を及ぼしている。Zhong and Daubert (2004) はプロセスチーズの微細構造を加熱溶融によりカルシウム - パラカゼイネイト複合体が水和し、その一部が疎水性相互作用を介して脂肪と結合、更に加熱保持と冷却時に、拡散したカゼイネートがフロックス（塊）を形成しながら連続的な網目状のゲルネットワークになると説明している。プロセスチーズの微細構造のモデルは種々提唱されているが、使用する溶融塩の種類により発現する物性の違いなど明確に説明できない現象もあり、今後もプロセスチーズの構造に関する知見が見出されることが期待される。

2-6 チーズレオロジー

レオロジー（流動学）は、物質の変形および流動一般を意味し、応力、歪み、時間によって決定づけられる。歪みは対象物質にある一定の力を加えた際の変形度合いを数値化したものである。変形性を表現する物性として「弾性」、流動性を表す物質として「粘性」がある。チーズの様な食品の物性は弾性と粘性を合わせた粘弾性で表される。

チーズレオロジーはチーズの製造工程中（加熱溶融、充填、スライス成型）のチーズや最終製品の微細構造を読み取ることができる。チーズのレオロジー特性はタンパク質、脂肪、水分といった組成だけでなく、熟度、温度、pH 等様々な要因で変化する (Walstra and van Viliet, 1986)。従ってレオロジー特性は厳密な実験条件下で測定しなくてはならない。チーズのレオロジー特性の測定方法は

試料を大きく変形または破壊する測定と微細な変形かつ非破壊の動的粘弾性測定に分けられる。

2-6-1 破壊によるレオロジー測定

チーズの物性を測定する簡便な方法としては、押し込む、引き伸ばす、捻じる等の外力を加え、そこに掛かる力を測定する手段である。一般的に使われるのがシリンジ状にカットしたチーズを押し込む垂直方向圧縮テストである。圧縮率 10~50% 程度で複数回圧縮際の抵抗を測定することで硬さ、ガム性、付着性等の口腔内の官能シミュレーションや、スプリング性、凝集性、破断性の測定ができるテクスチャープロファイル分析 (Texture Profile Analysis; TPA) がある (Fig. 2-8)。また、圧縮率 70~90% で検体を潰し、その抵抗状態を分析するユニアクチャルコンプレッション分析 (Uniaxial Compression Analysis) がある。この測定方法はチーズを圧縮した際の組織の破断点 (Fracture point) が観測できる。Torsional (捻じり) テストと言われる円柱状のサンプルの両端を捻じり破壊された時の歪みと応力を測定する手法もあり、これにより Hamann and MacDonald (1992) は様々な食品のテクスチャーマップを作成している。歪みが小さく応力も小さいものを Mushy、歪みが大きく応力が小さいものを Rubbery、歪みが小さく、応力が大きいものを Brittle、歪みも応力も大きいものを Tough と表現し、ゲル状食品の物性を分かり易く表現している。Shirashoji *et al.* (2006) はこれをプロセスチーズに応用し、異なる溶融塩を使用したプロセスチーズのテクスチャーマップを報告している。

本研究ではレオロジーでの大変形測定は TPA とユニアクチャルコンプレッション分析を使用した。

2-6-2 動的粘弾性 (非破壊によるレオロジー測定)

チーズの構造体には粘性や弾性を持つ様々な結合が存在しており、主にカゼイン分子間の結合の数、強さ、種類がチーズのレオロジー特性を構成している。また、測定する応力、歪み、観測時間、速度等によりチーズの粘性と弾性のバ

ランスが変化する (Lucey *et al.*, 2003; Udayarajan *et al.*, 2005)。物性構造を造る各々の結合を正確に研究することは困難であるが、小範囲振幅剪断 (Small Amplitude Oscillatory Shear; SAOS) を試料に供し、線形粘弾性領域 (振幅歪みに変化を与えてもレオロジー特性が一定の領域) における微小変形を分析する動的粘弾性測定は、チーズ構造の詳細な分析が可能である。

チーズの動的粘弾性の測定装置として、歪み可変型レオメーターがある。この装置を用い歪み、周波数（速度）、温度等の因子を変化させることでレオロジー特性を分析する。数ミリ厚にスライスして円形に切り取ったチーズサンプルを 2 つの平行した円形プレートに挟み、一定の振幅をかけた時のトルクを測定するが一般的に正弦振動下での剪断様式で解析される。その際、チーズサンプルは均質でプレートとサンプルに滑りが無く、変形があってはならない。動的粘弾性の解析において以下のパラメーターが用いられる。

貯蔵弾性 (Storage modulus; G') 振幅周期毎の貯蔵エネルギー

損失粘性 (Loss modulus; G'') 振幅周期毎の熱として損失するエネルギー

損失正接 (Loss tangent; $\tan \delta$) 粘性と弾性の比率

これらのパラメーターは (2-2) ~ (2-4) 式から求めることができる。

一定振幅 γ_0 と角周波数 ω の正弦剪断歪みが試料に与えられるとき時間 t における剪断歪みは次式になる。

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (2-2)$$

(t) の導関数は周期的剪断速度 ($\dot{\gamma}$) となる。

$$\dot{\gamma}(t) = \frac{d\gamma(t)}{dt} = \gamma_0 \omega \cos(\omega t) \quad (2-3)$$

ここで歪み振幅が十分小さいとき、歪みによる応力も正弦振動となる。

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \phi) \quad (2-4)$$

σ_0 は応力振幅、 δ は歪みに対する位相角である。粘弾性を表す場合、歪みに対して位相角 δ だけ進んだ振動応力が発現する。理想弾性体では $\delta = 0$ となり、エネルギーは完全に貯蔵される。理想粘性体（ニュートン流体）では $\delta = \pi/2$ となりエネルギーは変形中に損失する。粘弾性物質において $0 < \delta < \pi/2$ の領域においてエネルギーの貯蔵及び損失量が決定される (Fig. 2-9)。
 歪みを実数部、剪断速度を虚数部となる複素平面で考えた場合、(2-2)、(2-4) 式を次のように書き直すことができる。

$$\sigma(t) = \sigma_0 \exp i(\omega t - \delta) \quad (2-5)$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 \exp i(\omega t + \delta) \quad (2-6)$$

$\sigma(t)/\gamma(t)$ を複素弾性率 G^* と定義し、(2-5)、(2-6)式を使い、次のように表現できる。

$$\begin{aligned} G^* &= \sigma(t)/\gamma(t) = \sigma_0 \exp i(\omega t - \delta) / \gamma_0 \exp i(\omega t + \delta) \\ &= (\sigma_0/\gamma_0) (\cos \delta + i \sin \delta) \end{aligned} \quad (2-7)$$

この複素弾性率において正弦振動歪みに対する弾性と粘性に分離することができ、実数部が G' 、虚数部が G'' となる。

$$G^* = G' + i G'' \quad (2-8)$$

すなわち、

$$G' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cos \delta \quad (2-9)$$

$$G'' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \sin \delta \quad (2-10)$$

となる。1 周期あたりの貯蔵エネルギーに対する損失エネルギーの比を損失正接と呼び (2-11) 式で表される。

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2-11)$$

$\tan \delta$ は変形時における結合のリラクゼーションに関係し、チーズのような乳タンパク質ゲルの構造特性を示す上で有用なパラメーターである (Lucey, 2002)。近年測定装置の普及により SAOS を用いたチーズのレオロジー特性に関する研究として、異なる種類のナチュラルチーズ (Tunick *et al.*, 1990)、同種チーズの組成の違い (Ustunol *et al.*, 1995) やカルシウムの状態 (Lee *et al.*, 2005)、熟成期間の変化 (Lucey *et al.*, 2003) が報告されている。また、SAOS がチーズの官能評価 (Drake *et al.*, 1999) や TPA (Drake *et al.*, 1999)、メルト性 (Guinee *et al.*, 1999; Muthukumarappan *et al.*, 1999a) との相関についても報告されている。Lucey *et al.* (2003) はチーズのレオロジー特性の総説の中で、ナチュラルチーズを加熱した際の G' と $\tan \delta$ 値の変化はチーズ構造体のネットワークの数および強さを示していると提唱している。様々な溶融塩を使用したプロセスチーズの動的粘弾性を解析することでプロセスチーズの微細構造 (カゼイン、CCP、脂肪等) への溶融塩の影響の新たな知見を見出だすことが期待できる。

2-7 総括

上述の既往の研究を背景に考えると、本博士論文で研究対象としているプロセスチーズ製造における溶融塩のカゼイン・カルシウム相互作用に及ぼす影響とメカニズムを解明し、チーズ製造技術に応用するためには、下記の課題の研究が必須である。

- 1) プロセスチーズの製造条件を一定にし、異なる溶融塩がプロセスチーズの物性とレオロジーに及ぼす影響を評価する。
- 2) 異なる溶融塩によって製造されたプロセスチーズにおいて pH を変動させた際の物性とレオロジーに及ぼす影響を評価する。
- 3) 溶融塩としての添加するクエン酸塩およびリン酸塩の濃度と加熱溶融後の保持時間がプロセスチーズ物性に及ぼす影響を同一 pH 条件下で評価し、リン、カルシウムの状態変化を解析する。

本研究では、以上の研究の結果に Horne (1998) による DBM、Lucey *et al.* (2003) によるバランスコンセプトを適用してカルシウムの存在状態の変化に伴うチーズの物性と内部の微細構造を考察し、プロセスチーズの製造技術への適用、応用を試みた。

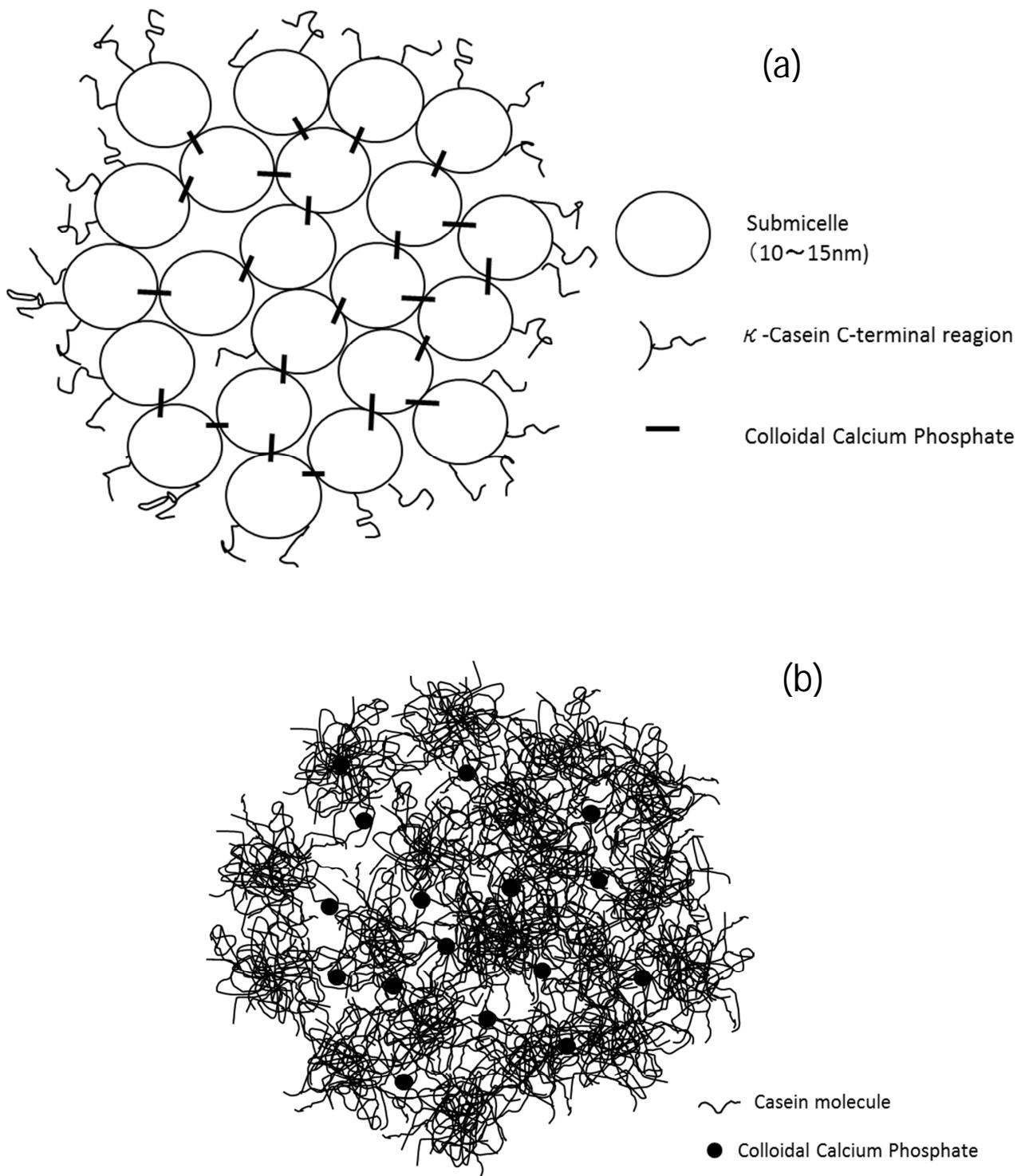


Fig. 2-1 The casein micelle structures described by Walstra and Jenness (1984) (a) and Holt (1992) (b).

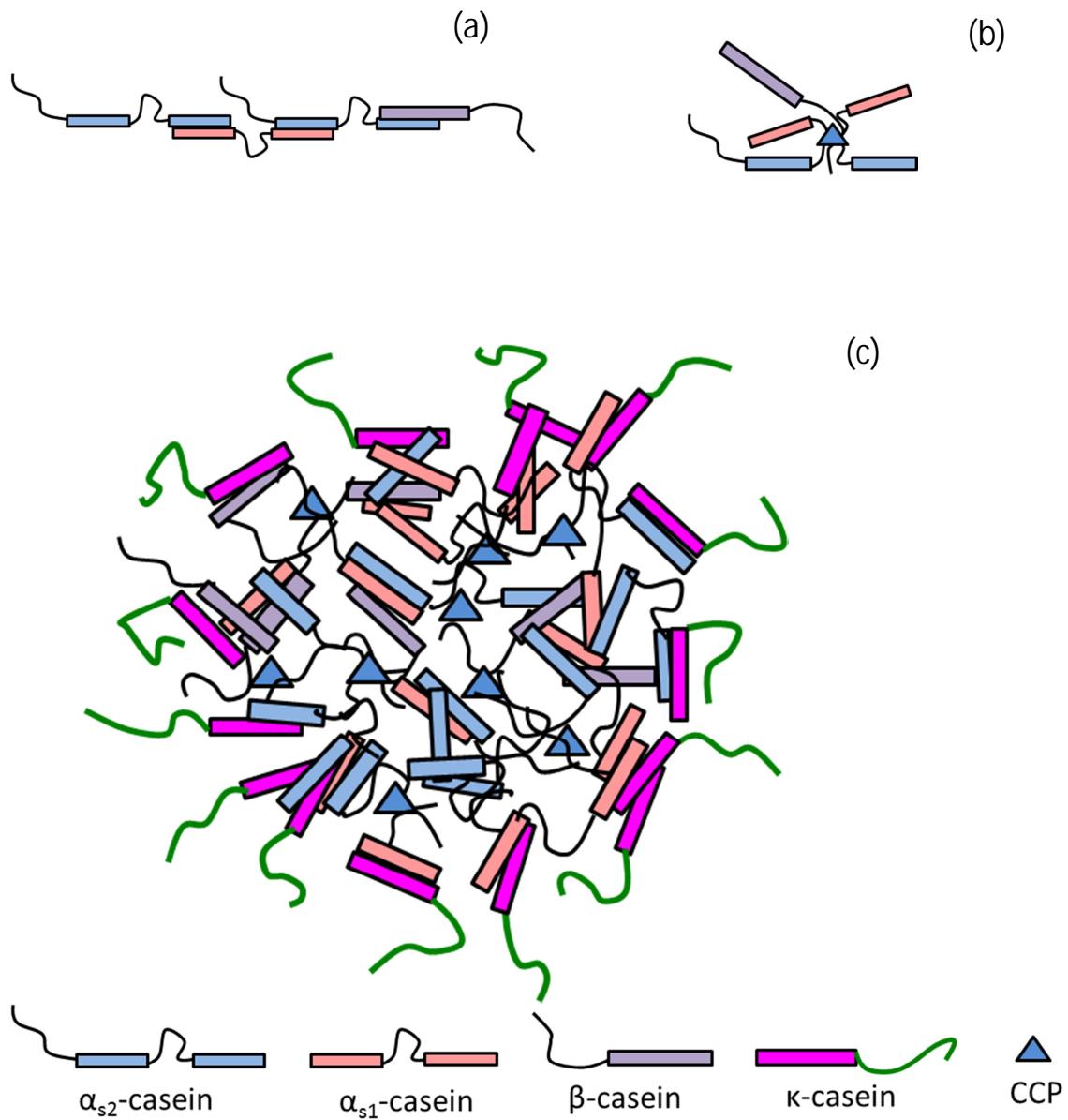


Fig. 2-2 Rectangular bars and lines represent hydrophobic and hydrophilic segments, respectively of the protein sequence. Diagrammatic representations of polymeric structures of α -caseins and β -caseins showing linkages through interaction of hydrophobic regions of the molecules (a) and bridging structures of hydrophilic regions involving colloidal calcium phosphate (CCP) (b). A schematic diagram of the dual bonding model for the casein micelle (Horne, 1998) (c).

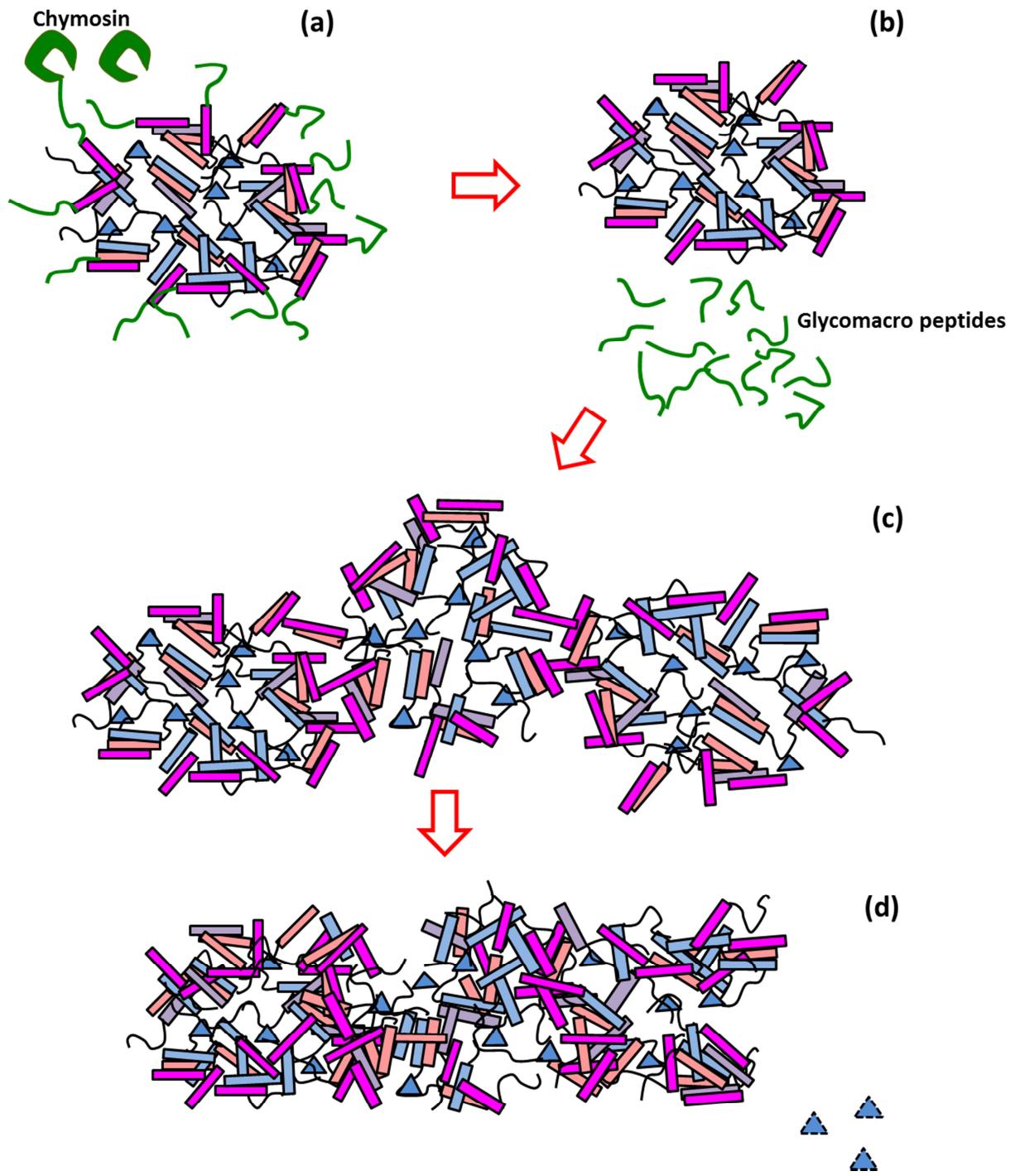
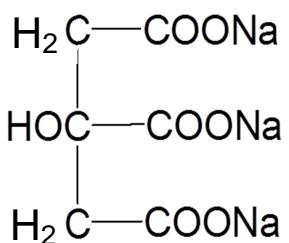
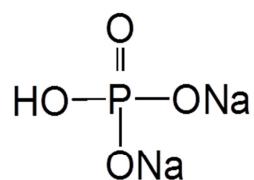


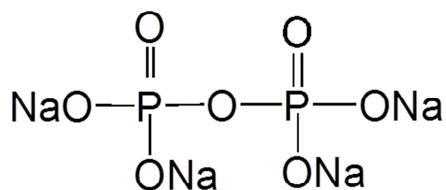
Fig. 2-3 A schematic description of the various stages in the enzymatic coagulation of caseins using dual bonding model. Rectangular bars and lines represent hydrophobic and hydrophilic segments, respectively of the protein sequence. Triangles represent CCP. The initial mixture of casein micelles and enzyme (chymosin) (a) and proceeding through proteolysis (b), initial fusion of casein micelles (c) and syneresis of the cheese curd with acidification and disrupting a part of CCP (d).



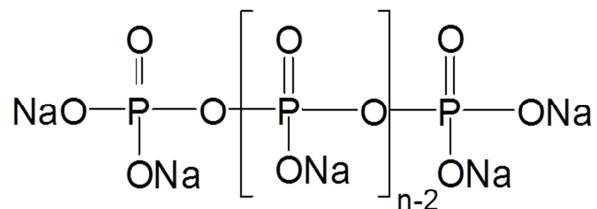
Trisodium citrate
(TSC)



Disodium phosphate
(DSP)



Tetrasodium pyrophosphate
(TSPP)



Sodium hexametaphosphate
(SHMP)

Fig. 2-4 Chemical formulae of main emulsifying salts for process cheese. Trisodium citrate (TSC), Disodium phosphate (DSP), Tetrasodium pyrophosphate (TSPP), and sodium hexametaphosphate (SHMP).

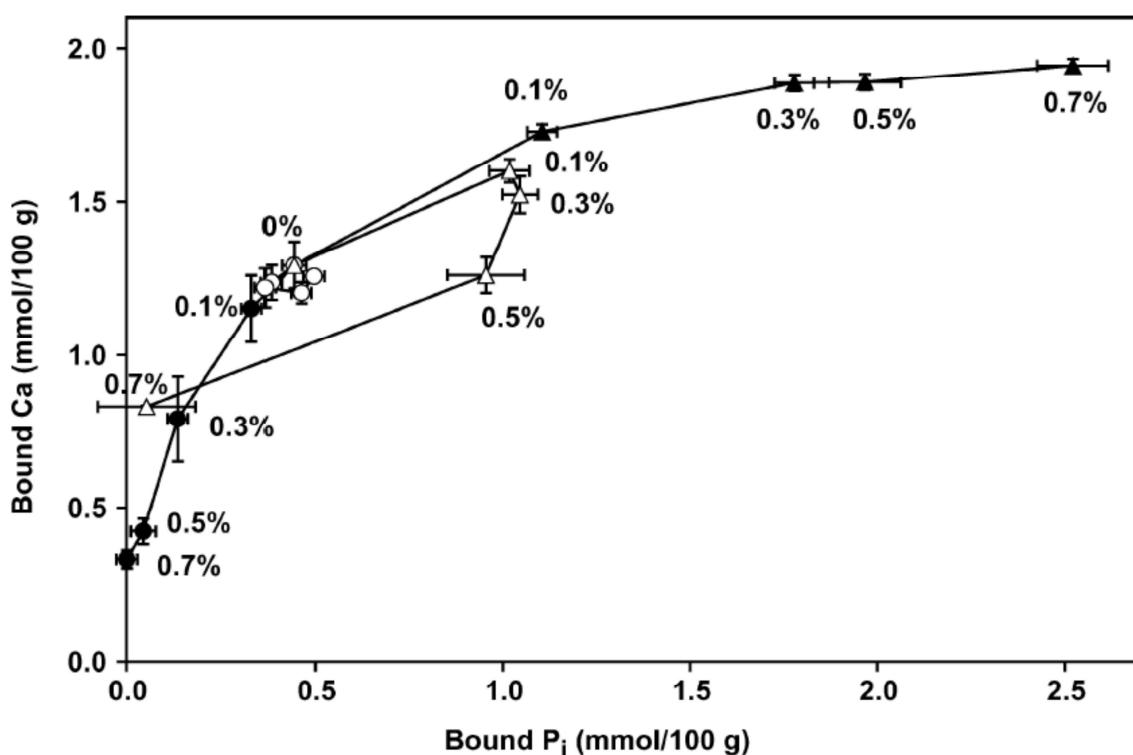


Fig. 2-5 Relationship between casein-bound calcium and inorganic phosphate (Pi) with the addition of different concentration of trisodium citrate (), disodium orthophosphate (), tetrasodium pyrophosphate (), or sodium hexametaphosphate (). Concentration of emulsifying salts added is indicated next to each symbol. (from Mizuno and Lucey, 2005)

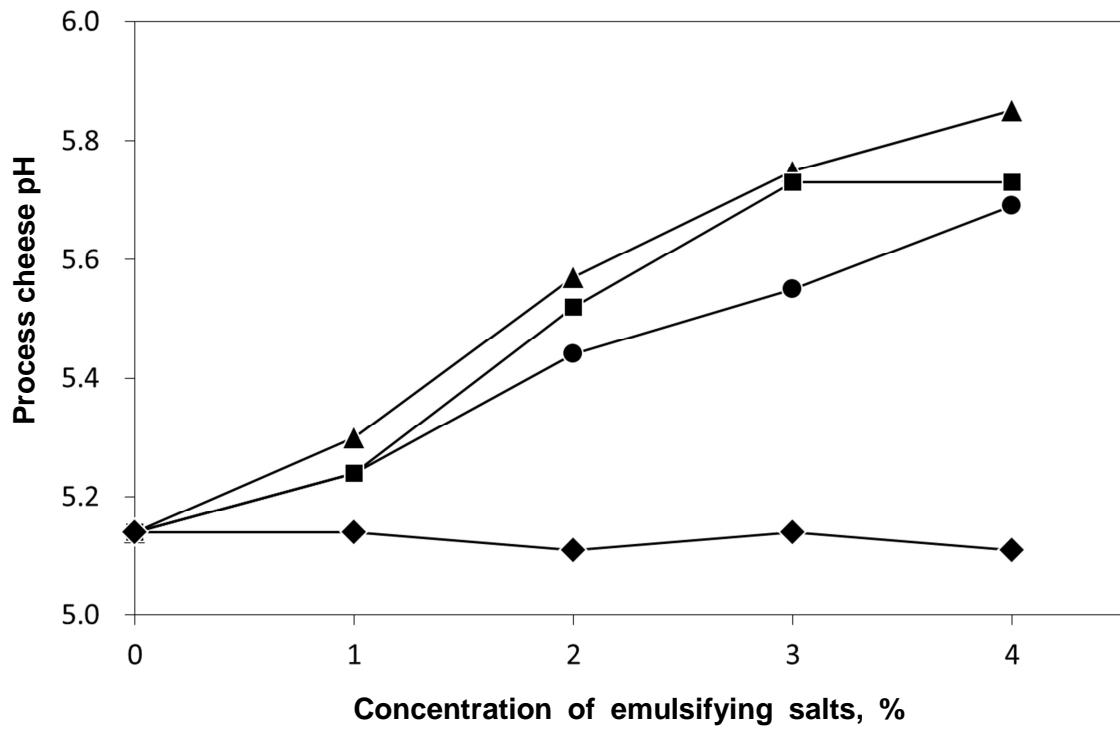


Fig. 2-6 Impact of concentrations of emulsifying salts on pH of process cheese.
Trisodium citrate (Δ), disodium phosphate (■), tetrasodium pyrophosphate (○),
sodium hexametaphosphate (◆).

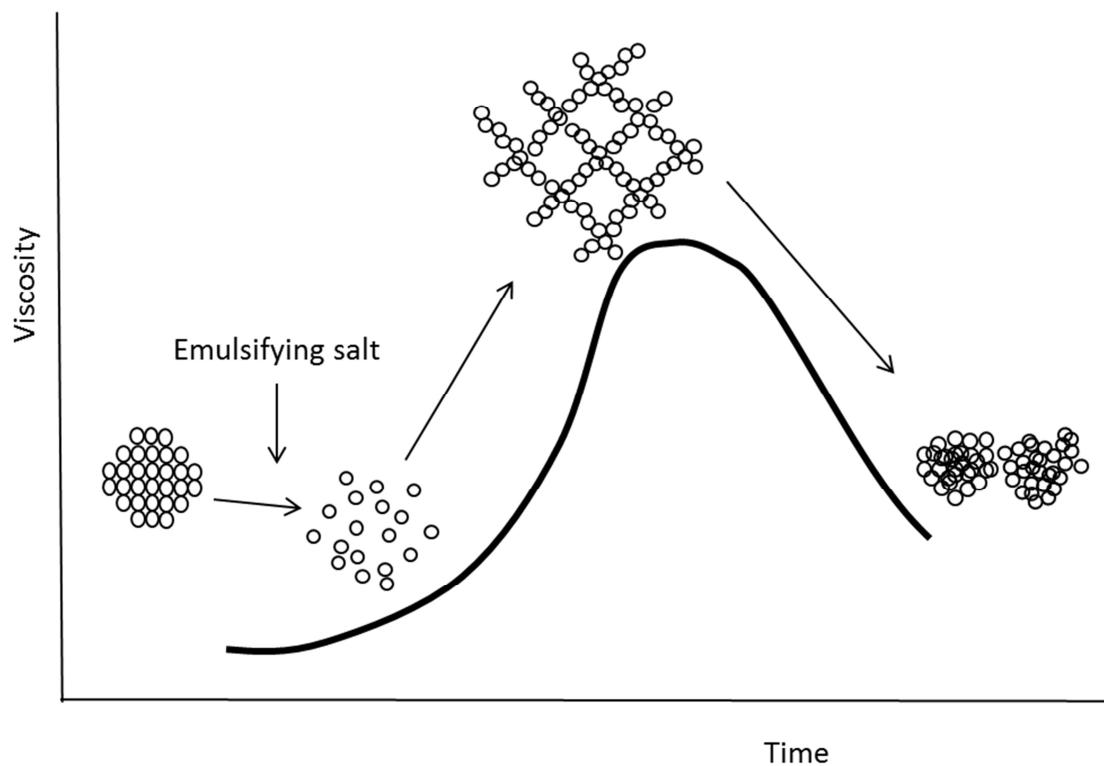
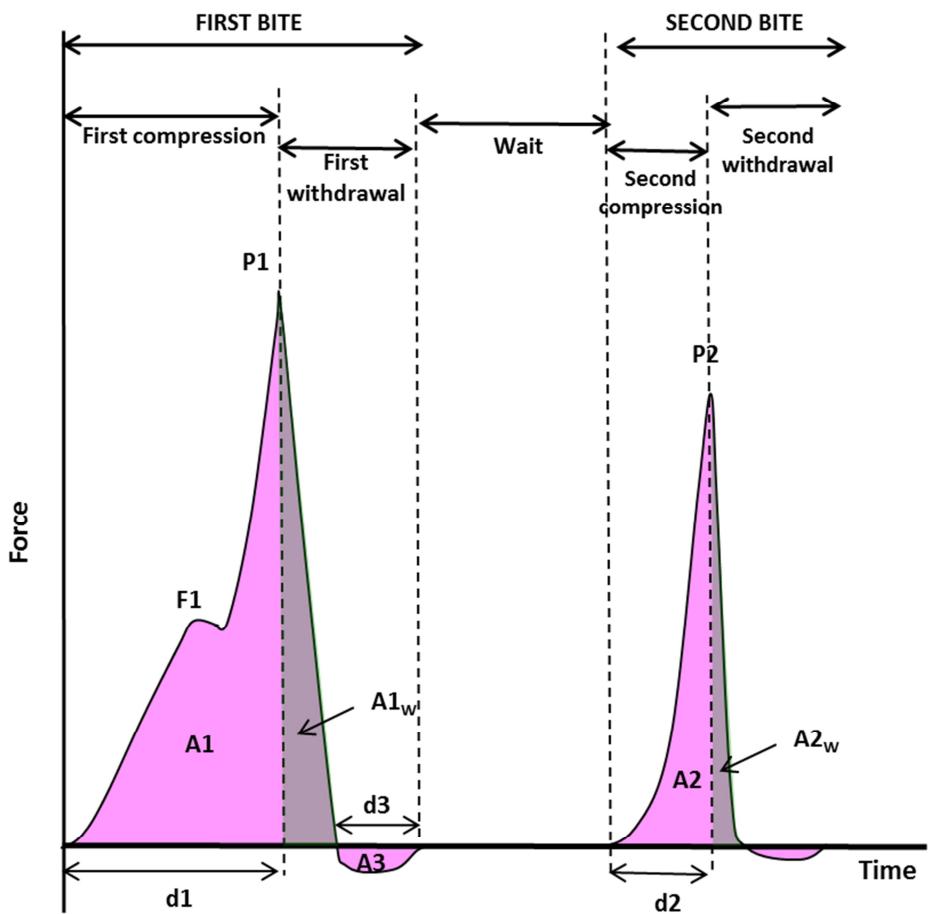


Fig. 2-7 Process cheese creaming model: protein structure and viscosity change.
(from Lee *et al.* 2003)

Table 2-1 Examples of how various cheese manufacturing conditions affect casein interactions and impact meltability (from Lucey *et al.*, 2003).

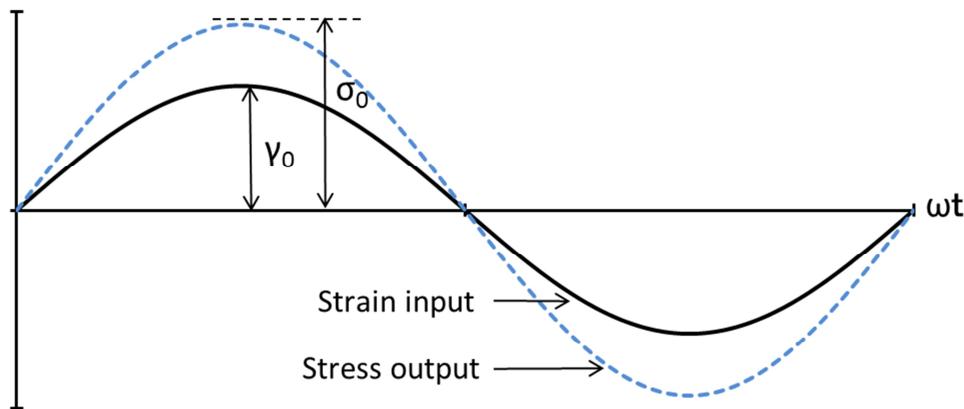
Cheese making Conditions/situation	Electrostatic repulsion	Attractive interactions	Net impact on melt
Acid production ($\text{pH} \geq 4.9$)	Loss of CCP increases localized repulsion by exposing phosphoserine residues	Decreases due to fewer CCP crosslinks	Increases
Very low pH values (<4.9)	Repulsion decreases as caseins approach their isoelectric point	Hydrophobic interactions increase with concomitant reduction, more $+/-$ charge bridges	Decreases
Proteolysis	Decreases when charged peptides are hydrolyzed	Decreases as total number of protein-protein bonds is reduced	Increases
CCP solubilization post-manufacture	Further loss of CCP increases localized repulsion by exposing phosphoserine residues	Decreases due to less CCP crosslinks (per g of casein)	Increases
Use of emulsifying salts in processed cheese	Increases due to exposure of phosphoserine residues when CCP is partly chelated, these salts can increase pH and thereby repulsion	Decreases due to less CCP crosslinks	Increases



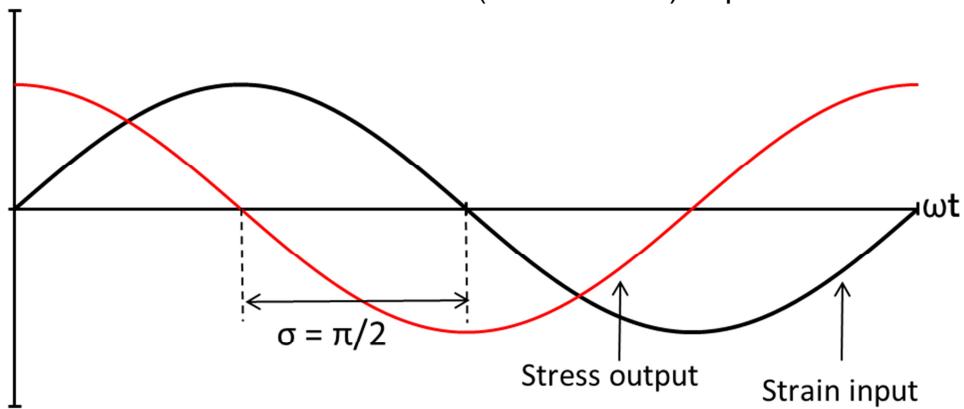
TPA Term (SI units)	How measured
Hardness (N)	Force corresponding to P1
Fracturability (N)	Force corresponding to F1
Cohesiveness (-)	A_2/A_1
Adhesiveness (J)	A_3
Gumminess (N)	Hardness \times Cohesiveness
Chewiness (J)	Gumminess \times Springiness
Springiness (m)	d_2
Stringiness (m)	d_3
Resilience (-)	A_{1w}/A_1

Fig. 2-8 Schematic diagram of texture profile analysis and definitions of the terms.

Hookean (ideal elastic) Solid



Newtonian (ideal viscous) Liquid



Viscoelastic Material

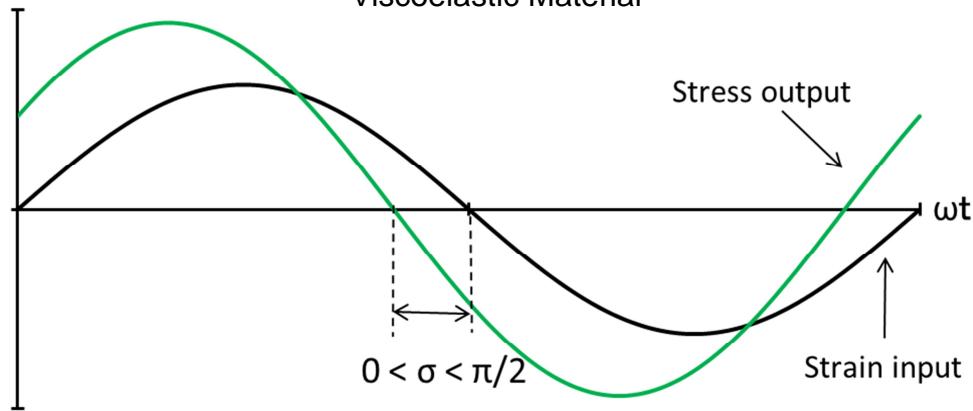


Fig. 2-9 Sinusoidal strain input and typical stress-strain responses of elastic solid, viscous liquid and viscoelastic materials.

第3章 pH変化と溶融塩の種類がプロセスチーズの物理的機能性に及ぼす影響

3-1 序

pHはプロセスチーズの製造時、最終製品の物性において多大な影響を及ぼす。Templeton and Sommer (1932) はpH変化によるプロセスチーズ物性の変化を報告しており、低いpH ($pH < 5.2$) のプロセスチーズは脆く、粉っぽく、硬度が低いのに対し、高いpH ($pH > 6.4$) のプロセスチーズは非常に軟らかいことを報告している。Stampanoni and Noble (1991) はpH値を6.2から5.0に下げるとプロセスチーズの硬度と弾力性が増加したと報告している。Marchesseau *et al.* (1997) はpH変化におけるプロセスチーズのタンパク質と微細構造の変化を研究し、pH変化がプロセスチーズの微細構造に及ぼす影響を明らかにした。これまでpHがプロセスチーズの物性に及ぼす影響は研究されているが、用いられる溶融塩は混合溶融塩や、1種類の溶融塩で、各種の溶融塩を使用したプロセスチーズのpH変化による影響を同条件下で比較した研究はほとんど無い。本章では、代表的な4種類の溶融塩を使用したプロセスチーズにおいて異なるpH値による物性発現を調査し、カゼイン・カルシウム相互作用の考察を行った。

3-2 材料および方法

【材料】

熟成期間4ヶ月、pH5.00、水分34%のチェダーチーズを原材料としてプロセスチーズを作成した。25% (w/w) 水酸化ナトリウム水溶液と44% (w/v) 乳酸 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) を用いてpH調整した。本研究では溶融塩としてTSC、DSP、TSPP、SHMP(すべてICL Performance Products LP, St.Louis, MO, USAより購入)の食品用製剤を使用した。

【プロセスチーズ製造】

事前実験を行い、各種の溶融塩を使用したプロセスチーズの pH 値が 5.3 (LPH) 5.6 (MPH) 5.9 (HPH) となるような pH 調整剤 (水酸化ナトリウム溶液または乳酸) の量を決定した。すべてのサンプルが同一熟成期間になるように、あらかじめ原料ナチュラルチーズをフードプロセッサー (Cuisinart, Stamford, CT, USA) により粉碎し -20 °C に保管した。プロセスチーズを作成する際、冷凍庫から取り出し、20 h、4 °C で解凍した後、チーズ製造前に常温に移し 2 h 放置した。本実験では下記に記載する小スケールのチーズクラッキング装置を使用した。粉碎ナチュラルチーズ 90 g と製品重量として 2% (w/w) の溶融塩、脱イオン水 4 g、pH 調整剤として水酸化ナトリウム溶液または乳酸を約 98 °C のウォーターバスで予め加熱しているステンレスシリンドーカップに投入し、マキシマデジタルスターラー (Fisher Scientific International Inc., Hampton, NH, USA) を使用し攪拌した。17 rpm で 1 min ミキシング後、200 rpm で 30 s、400 rpm で 7.5 min 攪拌し、チーズの溶融を行った。シリンドーは水分の蒸発を防ぐためにクラッキング中は蓋をした。74 °C になった溶融チーズを半分にカットした 10 mL シリンジ (径 16 mm) と 50 mL ポリプロピレンチューブ (径 30 mm) に注ぎ入れた。シリジとチューブをプラスティックラップでシールし、30 min 常温に放冷後 4 °C の冷蔵庫に保管した。冷蔵保管 2 日後、プロセスチーズサンプルの水分は 105 °C 直接乾燥法 (IDF, 1982) で pH は挿入式 pH meter 420A (Orion Research, Beverly, Mass., USA) を用いて測定した。

【ユニアクチャルコンプレッションによるテクスチャープロファイル】

4 °C で 2 日間保管後、シリジからプロセスチーズを取り出し、径 16 mm、高さ 17.5 mm となるように自作のワイヤーカッターでカットした。カットしたチーズサンプルはプラスティックバッグに保管し、測定前に一晩 4 °C に保管した。円柱状のチーズサンプルをテクスチャーアナライザー TA-XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) を用いてサンプル高の 20% 圧縮を行い、Bourne (1978) の方法を基に硬さと付着性を計算した。チーズの剛性に関連しているイニシャルスロープ (INS) はコンプレッションプロファイルの圧縮歪率 5% と 10% における傾きと定めた。イニシャルスロープが高いほど剛性が高く、サ

ンプルの変形難易性を示す (Gunasekaran and Ak, 2003)。テクスチャープロファイルのテストは 4 度測定し、4 回以上繰返し測定を行った。

【メルト性】

プロセスチーズのメルト特性は UW メルトプロファイル (Muthukumarappan *et al.*, 1999a) にて測定した。ポリプロピレンチューブから取り出したチーズをワイヤーカッターでカットし、径 30 mm、高さ 7 mm の円柱状サンプルを作成し、プラスティックバッグに入れ、測定前に一晩 4 度保管した。円柱状サンプルを 2 枚のアルミ製プレートに挟み、ワイヤー状の熱電対をチーズサンプル中心に挿入した。チーズが溶けている間、2 枚のアルミ製プレートの距離（チーズの高さ）が短くなってくる。この高さの変化をメルトプロファイルとして観察した (Fig. 3-1)。本章では元のチーズの高さに対するチーズの中心温度 45 度のチーズの高さの割合を加熱流動度 (Degree of flow; DOF) と定義した。DOF と同様、メルト性のもう一つの指標として軟化温度 (Softening temperature) を示した。軟化温度はチーズが流動し始める温度を示し、メルトプロファイルにおけるスタート時の接線と最大流動速度時の接線との交点の時間のチーズ温度と定義した (Muthukumarappan *et al.*, 1999a)。

【実験計画および統計分析】

チーズ製造はランダムオーダーで実施し、同条件を 3 回繰返した。4 種類の溶融塩 (TSC, DSP, TSPP, SHMP) に対し、3 段階の pH 条件下 (LPH: pH 5.3, MPH: pH 5.6, HPH: pH 5.9) のチーズを作成した。統計解析は Statgraphics program, version 5.1 plus (Manugistics, Rockville, MD, USA) を使用して行った。

3-3 結果および考察

3-3-1 プロセスチーズ組成

メルト性、テクスチャー特性における pH のみの影響を測定するために、サン

ブルの水分値は約 40%と一定にした (Table 3-3)。本研究の原料プロセスチーズはすべて同じ原料から作成しており、すべてのプロセスチーズ製造においてオイルオフ等の成分分離や不均一な外観状態は見られなかった。それを考慮するとプロセスチーズの組成差が生じてくる要因は水分のみである。水分範囲は 38.8~40.5%で一部統計的な有意差があるが水分値と各特性値の相関関係はすべて $P > 0.05$ であり、有意に影響を及ぼしていなかった。

3-3-2 各種類の溶融塩を使用したプロセスチーズの pH 变化によるメルト性とテクスチャー特性の影響

Table 3-1 に TSC、DSP、TSPP、SHMP を使用したプロセスチーズの pH 变化がプロセスチーズの機能特性に及ぼす影響の概要を示した。また、以下の考察で示したチーズ内の相互作用を Table 3-2 に纏めた。

【TSC を使用したプロセスチーズ】

TSC を使用したプロセスチーズの pH 变化によるメルト性の影響を Fig. 3-2a に示した。LPH から HPH に増加すると TSC を使用したプロセスチーズはメルト性が増加した。各 pH の DOF と軟化温度を Table 3-3 に示した。pH の増加と共に軟化温度は減少し、低い温度で流動することが分かる。また、流動し始めると pH が高いものほど流動速度は速いことがメルト曲線から観測できる。pH の増加と共に DOF が有意に増加し、軟化温度が有意に減少した。しかしながら、45 以上では pH の違いによるメルト性の差は小さくなつた (Fig. 3-2)。

各種の溶融塩で作成したプロセスチーズのテクスチャー特性値を Table 3-4 に、INS および硬度はそれぞれ Fig. 3-3、Fig. 3-4 に示した。TSC を使用したプロセスチーズが LPH から HPH に pH が増加すると INS は有意に ($P < 0.05$) 減少した。LPH から MPH の変化において硬度の増加と付着性の減少が見られた。しかしながら、MPH から HPH においては有意な変化は見られなかった。また、LPH から HPH においてコンプレッション面積と付着面積は大きな変化が見られなかつた。

プロセスチーズの製品 pH がそのレオロジー特性、テクスチャー、微細構造に多大な影響を及ぼすことが報告されている (Mulsow *et al.*, 2007)。製品の pH は溶融塩自体の pH だけでなく、その添加量によっても変化する。本章では、この複雑さを避けるためにすべての溶融塩添加量を一定 (2% [w/w]) とした。プロセスチーズの pH 増加によりカゼイン分子の負電荷が増え、カゼイン構造体の静電気的斥力が増加する。高 pH 条件下の静電気的斥力の増加によりプロセスチーズの構造が疎で弱いネットワークになり、より強い水和力とプロセスチーズ製造中の乳化力が生み出される (Fox *et al.*, 2000)。pH の増加により TSC のような溶融塩のカルシウムキレート力は増加する。それにより、カゼイン分子間を架橋しているコロイド性リン酸カルシウム (CCP) が崩壊し、より多くのカゼインが分散する (Horne 1998; Fox *et al.*, 2000)。さらに pH の増加によりカゼインの静電気的斥力が増加することでカゼイン分子間の相互作用が弱くなる (Horne 1998; Lucey *et al.*, 2003)。

TSC はカゼイン分子間にクエン酸カルシウムの架橋を形成しないと報告されている (Mizuno and Lucey, 2005)。pH が LPH から MPH に増加するとカゼイン間の静電気的斥力が増加し、プロセスチーズ製造中のカゼイン分散が増大する (Lee *et al.*, 1986; Marchesseau *et al.*, 1997; Dimitreli *et al.*, 2005)。カゼイン分散が増大することにより、冷却中にカゼインが再会合する際、細かく密なタンパク質構造を形成し、プロセスチーズに高い弾力性が付与されると考えられる。MPH から HPH の変化では TSC を使用したプロセスチーズの硬度は変化しなかった。プロセスチーズ製造時に高いカゼイン分散が発生していたが、冷却後、カゼイン間において高い負の電荷による静電気的斥力が発生することで、冷却時の構造形成の際、疎水性相互作用や水素結合が妨げられたことが推測できる。TSC の MPH、HPH におけるコンプレッションプロファイルは破断波形が観測されず、破断波形が観測される LPH と比較して粘性特性が強いこともその一因と考えられる (Fig. 3-5)。

【DSP を使用したプロセスチーズ】

DSP を使用したプロセスチーズは LPH から HPH に pH が増加すると軟化温度は減少した(Table 3-3, Fig. 3-2b), DOF は LPH から MPH において増加した(Table 3-3)。LPH のチーズサンプルは温度が 45 以上的高い温度帯でも低い加熱流動度を保っていた(Fig. 3-2b)。MPH と HPH の軟化温度と DOF は有意差が無かった。硬度は LPH のチーズが最も高く、一度 MPH で下がり、LPH で増加した。LPH から MPH の増加において INS が減少し(Fig. 3-3)コンプレッション面積、付着力、付着面積も減少した (Table 3-3)。MPH から HPH の増加において、硬度、INS の変化はほとんど無かったが、コンプレッションプロファイルにおける LPH にのみ明らかな破断波形が観測された。

DSP のようなオルソリン酸塩は比較的カルシウムキレート力が弱いとされている (Van Wazer and Callis, 1958)。これまでの研究ではピロリン酸塩や長鎖のリノ酸塩と比べ、オルソリン酸塩やクエン酸塩はカゼイン分散力も弱いと報告されている (Lee *et al.*, 1986; Molins, 1991; Dimitreli *et al.*, 2005; Mizuno and Lucey, 2005)。カゼイン分散力、カルシウムキレート力の弱い TSC は pH の増加によりカゼイン分散が増加し、硬度が増加したが、DSP を使用したプロセスチーズの硬度は LPH で最も高く、MPH で最も低かった (Fig. 3-4)。pH 増加での静電気的斥力によって相殺された可能性も考えられる。pH の増加によりリン酸カルシウムの錯体形成が起こり、pH 6 付近で沈殿が発生する (Lucey and Fox, 1993)。構造形成期間である冷却中にリン酸カルシウムの一部がカゼインに結合することで、カゼインの負の電荷を中和し、高い pH により増加した静電気的斥力の影響を減らしたため、pH 5.9 での硬度が上がったと考察される。

DSP を使用したプロセスチーズの付着性 (付着力) が最も高く (Table 3-4)、最も低い DOF (Table 3-3) を示したのは LPH である。これは DSP のカルシウムキレート力に関連があると考えられる。DSP は本章で使用した溶融塩の中で最も弱いカルシウムキレート力をもつと言われてあり、カゼイン分散が他の溶融塩に比べ弱く、ネイティブ (原料ナチュラルチーズ) に近い状態だったと考えられる。オルソリン酸塩のカルシウムキレート力はリン酸の pK_{a2} (7.2) に近づくにつれて増加すると報告されており (Visser, 1962) このために pH 増加と共に

硬度が増加したとも考えられる。

【TSPP を使用したプロセスチーズ】

TSPP を使用したプロセスチーズのメルト性は LPH から MPH の範囲では pH 増加と共にメルト性が増加したが、MPH から HPH の範囲では pH 増加と共にメルト性が減少した (Fig. 3-2c)。DOF は LPH から MPH において増加し、MPH から HPH において有意に減少した (Table 3-3)。軟化温度は LPH から MPH においては有意な変化は見られなかったが、HPH では有意に増加が見られた (Table 3-3)。INS は LPH から MPH において pH の増加と共に減少し、HPH で増加した (Fig. 3-3)。硬度も同様に LPH から MPH において pH の増加と共に減少し、MPH から HPH において増加した (Fig. 3-4)。コンプレッション面積は INS と同様な傾向を示した (Fig. 3-4)。LPH から MPH において付着力と付着面積が増加した (Table 3-4)。

TSPP は単体で使用すると製造中にオーバークリーミング (高粘度化) しやすく、物性が硬くなるため工業的な製造において単体で使用することはあまりない (Meyer 1973)。TSPP を使用したプロセスチーズにおいて HPH が最も高い硬度であった (Fig. 3-4)。最も低い硬度を示した MPH のチーズが最も高いメルト性を示した (Table 3-3)。

ピロリン酸塩はカゼイン - リン酸カルシウム複合体を形成する可能性があるという報告がある (Zittle 1966; Vujicic *et al.*, 1968; Mizuno and Lucey, 2005)。TSPP はカルシウムキレート力が強いため、LPH においても製品配合 2% (w/w) の TSPP の添加は十分なカゼイン分散を引き起こすと考えられる。よって、LPH から MPH における TSPP を使用したプロセスチーズのメルト性の増加は、カゼイン分散增加によるものではなく (LPH で既に十分なカゼイン分散が起こっているため) カゼイン間の静電気的斥力増大のためであることが推測される。TSPP における LPH の INS 値が他の溶融塩と比較して高く、破断ピークが他の溶融塩より比較的低い歪み率 (Strain) に観測される (Fig. 3-5) ことから剛性が高く、脆い物性であることが分かる。他の溶融塩に比べ TSPP は静電気的斥力を減少させる働きが強いと推測される。

ピロリン酸塩の pK は約 5.8 であり (Weast, 1970)、この pH 値近傍においてカゼイン - リン酸カルシウム複合体（架橋）の形成が増加する可能性がある。この pH 値でのカゼイン - リン酸カルシウム複合体の形成は Mizuno and Lucey (2005, 2007) によって研究されている。また、TSPP 誘導カゼインゲルは pH 値 5.4~7.0 の範囲では pH 6.0 で最も高い硬度を示したことが報告されている (Mizuno and Lucey, 2007)。従って MPH から HPH の pH 増加でのメルト性の減少、硬度の増加は強固なカゼイン - ピロリン酸カルシウム架橋の形成による密なネットワーク構造によるものと考察された。

【SHMP を使用したプロセスチーズ】

すべての pH において SHMP を使用したプロセスチーズのメルト曲線は類似しており、特に 45 以上においてはほぼ同等な加熱流動度であった (Fig. 3-2d)。LPH から MPH の pH 増加により DOF は増加し、軟化温度が減少した。一方、MPH から HPH の pH 増加においては有意な変化は無かった (Table 3-3)。LPH から MPH の增加により INS (Fig. 3-3) とコンプレッション面積 (Table 3-4) が減少したが、硬度の変化はほとんど見られなかった (Fig. 3-4)。付着面積と付着力は LPH から NPH の增加においてわずかに増加が見られた (Table 3-4)。MPH から HPH の增加において SHMP を使用したプロセスチーズの硬度に増加が見られた (Fig. 3-4) が、その他のテクスチャー特性に有意な違いは見られなかった。

高いアニオンを有するポリリン酸塩はタンパク質のような長鎖の高分子電解質のカチオンに引きつけられる (Van Wazer and Callis, 1958)。それにより、カゼインの等電点以上の pH (本研究の試料はすべて等電点以上) では、カゼイン間の静電気的斥力は増加する。SHMP はプロセスチーズの溶融塩として使用すると TSC や DSP と比較してカゼイン分散力が高いことが報告されている (Lee *et al.*, 1986; Guinee *et al.*, 2004)。SHMP は非常に強いカルシウムキレート力を持つため (Van Wazer and Callis, 1958) カゼイン間を架橋する多くの CCP を崩壊させることによりカゼインを分散させると考えられる。このように pH の増加と共にカゼイン電荷、SHMP の高分子電解質的性質、CCP 架橋の喪失の増加により、カゼイン間の静電気的斥力が強くなる可能性がある。pH 値が MPH から HPH に

増加するにつれて SHMP を使用したプロセスチーズの硬度は増加したのは、カゼイン間の静電気的斥力の増加によりクッキング中にカゼイン分散が促進され、冷却中に密な網目構造が作られるとも考えられる。Marchesseau *et al.* (1997) はポリリン酸塩を使用した異なる pH のプロセスチーズの微細構造において、pH 5.2 のプロセスチーズはタンパク質の凝集が形成され、pH 5.7 のプロセスチーズのタンパク質は均一な 3 次元網目構造を形成していることを報告している。また、SHMP を乳に添加するとある特定の条件下においてカゼイン結合性カルシウムが増加することが報告されている (Mizuno and Lucey, 2005)。さらに、Muzuno and Lucey (2005) は、SHMP が元の CCP からカルシウムをキレートすることでカゼインミセルを崩壊させるが、新しいリン酸カルシウムが分散したカゼインと結合することを報告している。同様な現象が本研究でも生じた可能性が考えられる。

Table 3-1 Summary of how changes of pH affect textural and melt properties of process cheeses made with different emulsifying salts. “L – M” indicates the change of low pH (5.3) to middle pH (5.6). “M – H” indicates the change of middle pH (5.6) to high pH (5.9). Arrows indicate magnitude of the change in the properties; increases ↑ or decreases ↓ or no difference → .

	TSC				DSP				TSPP				SHMP			
Changes of pH	L	M	M	H	L	M	M	H	L	M	M	H	L	M	M	H
DOF at 45																
Softening Temp.																
Compression area																
Adhesiveness force																
Adhesiveness area																
Hardness																
Initial slope																

DOF, degree of flow. $DOF = \frac{\text{original cheese height (mm)} - \text{Melted cheese height (mm)}}{\text{Original cheese height (mm)}} \times 100$

(see **Fig 3-1**)

Table 3-2 Summary of the proposed casein interaction in process cheese based on the cheese matrix balance concept (Lucey *et al.* 2003).

Low pH process cheese				
Interaction/repulsion	States of calcium/casein	Net impacts on texture/melt		
Electrostatic repulsion decreased as casein approach their isoelectric point	Casein molecules partially aggregated	High stiffness Low melt Fracture point was observed		
Hydrophobic interactions between individual casein molecules increased				
pH increases				
High pH process cheese				
Interaction/repulsion	States of calcium/casein	Net impacts on texture/melt		
Electrostatic repulsion increased as caseins leave from their isoelectric point	Casein molecules dispersed. A finer, harder matrix was produced as casein dispersion increased	Low stiffness High hardness		
CCP crosslinks were deleted as calcium chelating ability of an emulsifying salt increased.				
High net negative charge created additional electrostatic repulsion between caseins	There was greater formation of casein-calcium-phosphate crosslinks	Low hardness High melt		
More phosphate salts converted into calcium complexes				

Table 3-3 Moisture content, degree of flow at 45 °C, and softening temperature of process cheese made with different types of emulsifying salts with different pH values.

Type of Emulsifying salts	pH	Moisture content (%)	Degree of flow at 45 °C (%)	Softening temperature (°C)
TSC	5.24	40.1 ^a	30.2 ^a	37.1 ^a
	5.52	40.6 ^a	44.8 ^b	35.5 ^{ab}
	5.80	40.5 ^a	51.4 ^c	34.5 ^b
DSP	5.29	38.8 ^a	24.3 ^a	37.6 ^a
	5.60	40.0 ^b	35.2 ^b	36.3 ^{ab}
	5.91	40.3 ^c	35.6 ^b	35.6 ^b
TSPP	5.28	39.3 ^a	26.6 ^a	38.8 ^a
	5.61	39.8 ^a	39.1 ^b	37.1 ^a
	5.81	39.1 ^a	28.7 ^c	41.6 ^b
SHMP	5.28	40.5 ^a	29.5 ^a	39.5 ^a
	5.55	40.5 ^b	38.1 ^b	37.1 ^b
	5.85	40.1 ^a	41.1 ^b	36.1 ^b

Results are means of 4 replicates.

Superscripts with different letters within the same column in the same group of emulsifying salts were significantly different ($P < 0.05$).

Table 3-4 Textural analysis for process cheese made with different types of emulsifying salts (2% [w/w]) at different pH values.

Type of emulsifying salts	pH	Textural analysis		
		Compression area (N· s)	Adhesiveness force (N)	Adhesiveness area (N· s)
TSC	5.24	445.4 ^a	16.47 ^a	2.37 ^a
	5.52	463.6 ^a	14.55 ^b	2.13 ^a
	5.80	388.8 ^b	13.43 ^b	2.24 ^a
DSP	5.29	427.8 ^a	20.57 ^a	2.63 ^a
	5.60	388.2 ^b	14.51 ^b	1.96 ^b
	5.91	384.9 ^b	15.65 ^b	2.52 ^a
TSPP	5.28	514.6 ^a	16.29 ^a	1.90 ^a
	5.61	395.8 ^b	16.64 ^{ab}	3.12 ^b
	5.81	438.4 ^b	18.32 ^b	2.80 ^b
SHMP	5.28	447.9 ^a	14.91 ^a	1.86 ^a
	5.55	400.5 ^b	16.41 ^b	2.93 ^b
	5.85	399.7 ^b	16.44 ^b	2.78 ^b

Results are means of 4 replicates.

Superscripts with different letters within the same column in the same group of emulsifying salts were significantly different ($P < 0.05$).

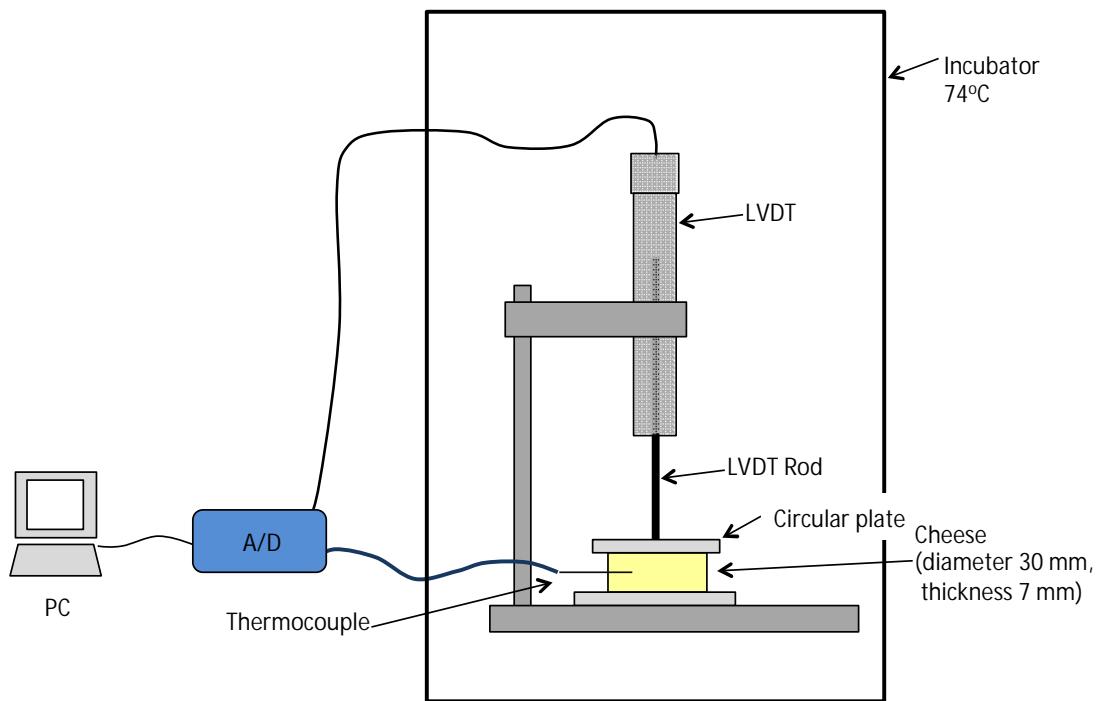
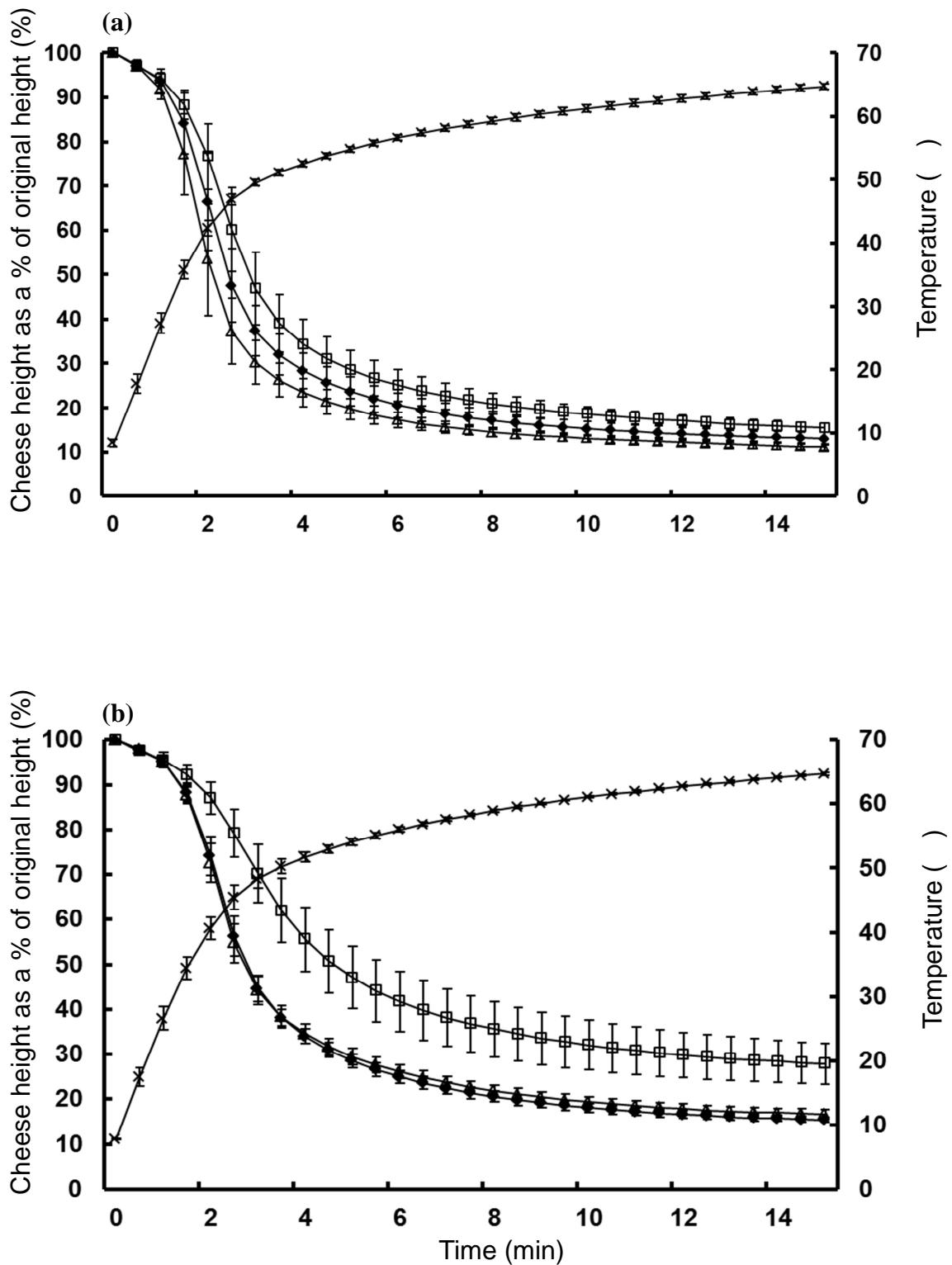


Fig. 3-1 Schematic diagram of UW-meltprofiler. A/D = analog-digital converter; LVDT = linear variable differential transformer. Degree of flow was calculated by the following equation.

Degree of flow (%) at $T^{\circ}C$ =

$$\frac{\text{Original cheese height (mm)} - \text{Melted cheese height at } T^{\circ}\text{C (mm)}}{\text{Original cheese height (mm)}} \times 100$$



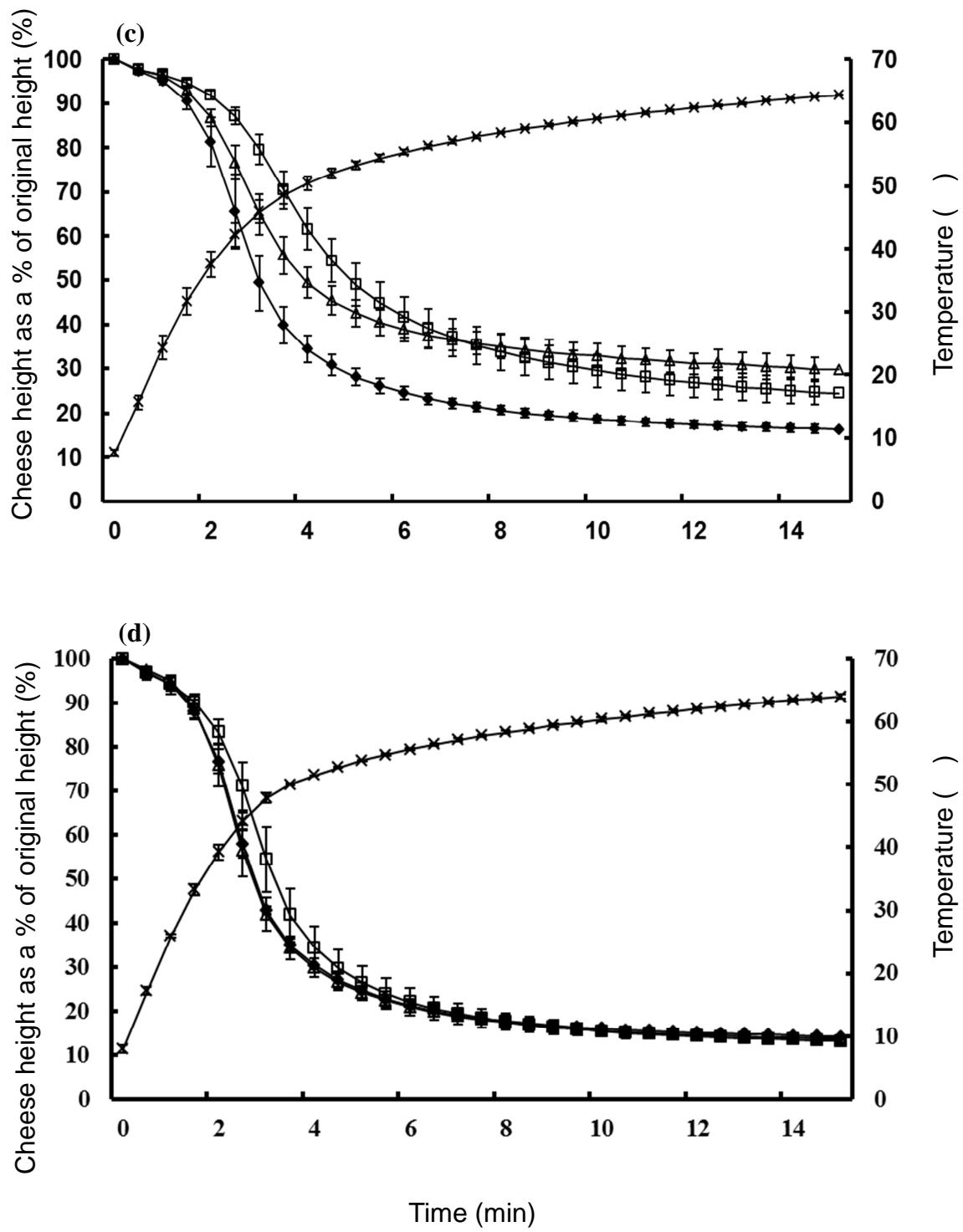


Fig. 3-2 Changes in process cheese height as percentage of its original height from UW-Meltprofiler for process cheese made with TSC (a), DSP (b), TSPP (c) or SHMP (d) with different pH values: pH 5.24 to 5.29 (●), pH 5.52 to 5.61 (□), pH 5.80 to 5.91 (◆), and temperature (✖) during test. The data represent means ($n = 4$) while the error bars represent standard deviations. Emulsifying salt was added at 2% (w/w).

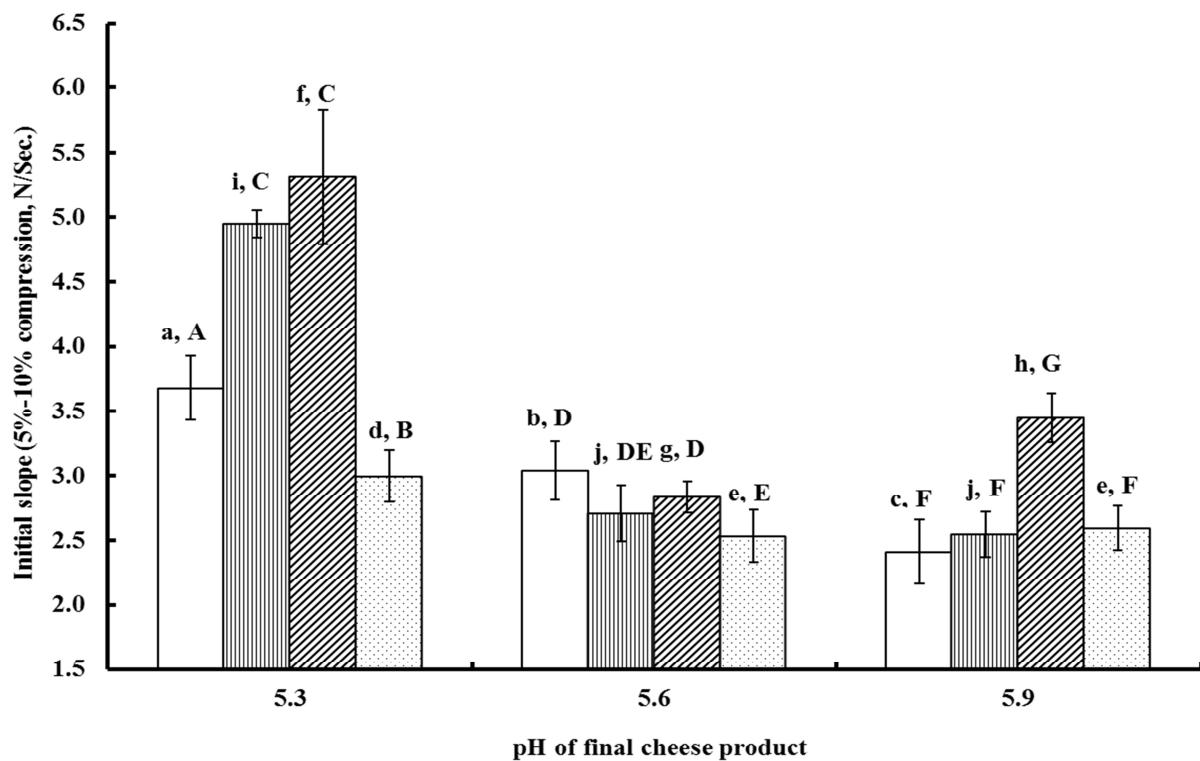


Fig. 3-3 Stiffness (initial slope from uniaxial compression curve) of process cheeses made with different pH values and different types of emulsifying salts (2% [w/w]): TSC (□), DSP (▨), TSPP (▨), SHMP (▨). The data represent means ($n \geq 4$) while the error bars represent standard deviations. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between pH values for the same type of emulsifying salts. Different capitalized letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between different types of emulsifying salts at a single pH value.

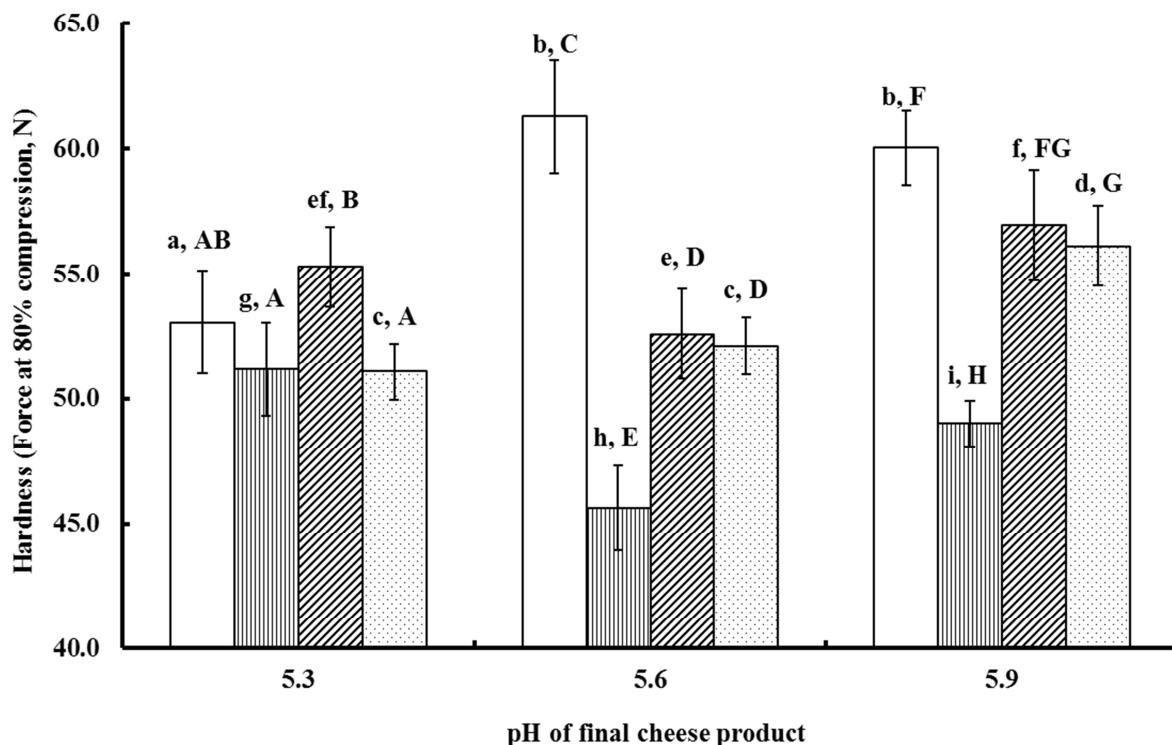


Fig. 3-4 Hardness of process cheese made with different pH values and different types of emulsifying salts (2% [w/w]): TSC (□), DSP (▨), TSPP (▨), SHMP (▨). The data represent means ($n \geq 4$) while the error bars represent standard deviations. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between pH values for the same type of emulsifying salts. Different capitalized letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between different types of emulsifying salts at a single pH value.

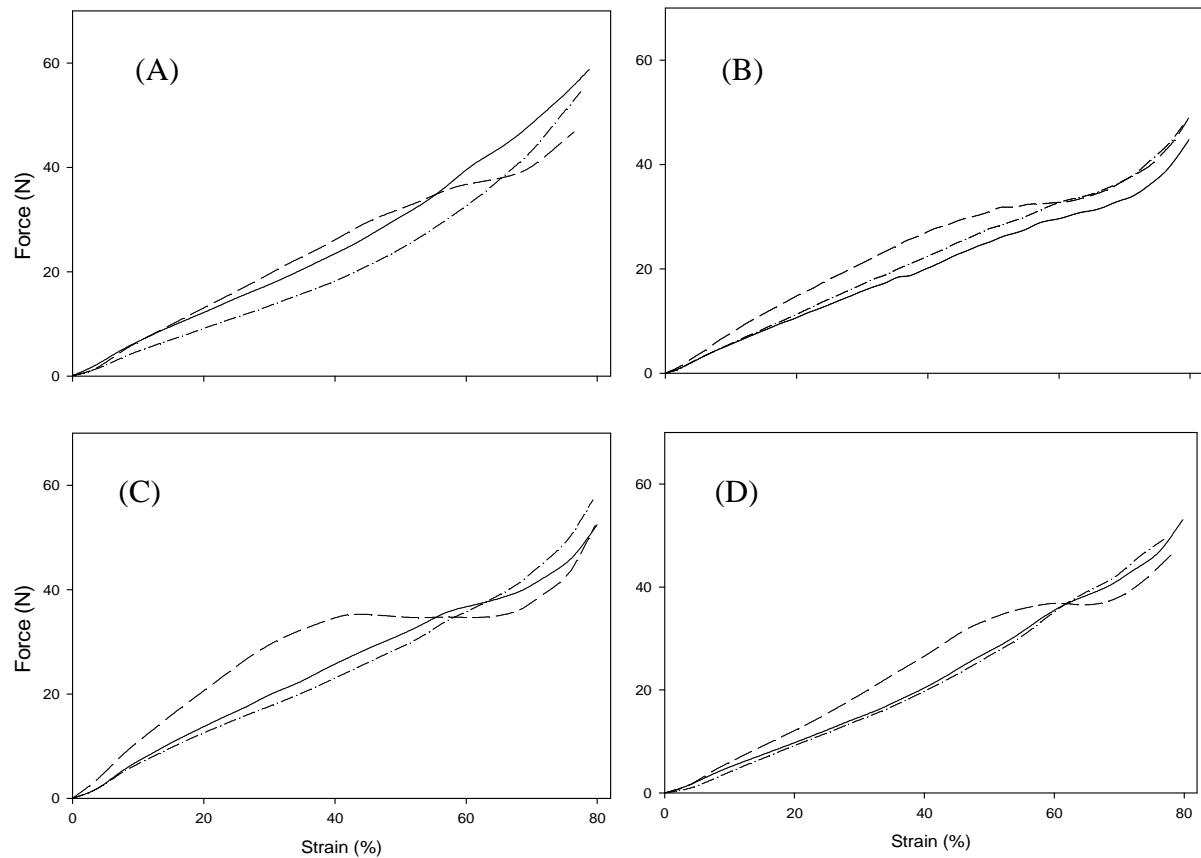


Fig. 3-5 Uniaxial compression curves for process cheese made with different pH values and different types of emulsifying salts (2% [w/w]): (A) trisodium citrate, (B) disodium phosphate, (C) tetrasodium pyrophosphate, and (D) sodium hexametaphosphate. Dashed curves were cheeses made at pH approximately 5.3 (LPH), solid curves were cheeses at pH 5.6 (MPH), and dotted and dashed curves were cheeses at pH 5.9 (HPH).

3-4 第3章の結論

pH がプロセスチーズの物性やメルト性（機能特性）に影響を及ぼすことは知られていたが、本章では各種の溶融塩における pH 变化による物性、メルト性に及ぼす影響を検証した。同一濃度 (2% [w/w]) の各種の溶融塩を使用したプロセスチーズは pH の変化に対し、それぞれ異なる機能特性の挙動を示すことが明らかになった。

プロセスチーズの pH の影響によるカゼイン間の相互作用（静電気的斥力、疎水性相互作用、水素結合）の変化と溶融塩の持つキレート力や冷却時に形成されるカゼイン - リン酸カルシウム複合体の状態変化をバランスコンセプト理論で考察することができた。また、プロセスチーズにおいて、クエン酸塩 (TSC) はカゼイン間を架橋する CCP のカルシウムをキレートするのみであるが、リン酸塩 (DSP, TSPP, SHMP) はカゼイン間に新たな構造体を形成する可能性を示した。

さらに、特筆すべき点として TSPP を使用したプロセスチーズ以外のプロセスチーズは静電気的斥力の増加により、pH 増加と共にメルト性が増加したのに対し、TSPP を使用したプロセスチーズは逆の傾向が見られた。ピロリン酸塩が高 pH 条件下で強いカゼイン間架橋力を発現し得ると考えられる。プロセスチーズ 製造において各種の溶融塩がチーズ中のカルシウム、カゼインに及ぼす影響を調査することにより、使用する溶融塩の違いによるプロセスチーズの物性の違いを説明できることが期待できた。

第 4 章 クエン酸三ナトリウム濃度と溶融保持がプロセスチーズ中のカゼイン間相互作用に及ぼす影響

4-1 序

第3章では小スケールのチーズ溶融設備を用いて一定濃度 (2% [w/w]) の各種の溶融塩を使用したプロセスチーズにおいて、pH 变化がプロセスチーズの物性機能に影響を及ぼし、その影響は溶融塩ごとに異なることを明らかにした。各種の溶融塩がプロセスチーズの物理的化学的特性に及ぼす影響を知る上で、溶融塩濃度がチーズの物性に及ぼす影響が報告されている (Thomas *et al.*, 1980; Gupta *et al.*, 1984; Cavalier-Salou and Chaftel, 1991) が、第2章で示したように溶融塩濃度の違いはプロセスチーズの pH に大きな影響を及ぼす (Fig. 2-6, p. 29)。溶融保持時間における各種の溶融塩の物性発現の違いに関する研究は無く、溶融保持中に発現するクリーミングと呼ばれる溶融チーズの粘性増加とクリーミングによる冷却後の物性変化のメカニズムは解明されていない。

本章では、プロセスチーズ製造においてクエン酸三ナトリウム (TSC) によるカゼイン-カルシウム間相互作用を予測することを目指し、TSC 濃度と溶融保持時間がプロセスチーズのテクスチャー、レオロジーおよびリン酸とカルシウムの状態に及ぼす影響を一定の pH 条件下で解析した。

4-2 材料および方法

【材料】

ナチュラルチーズは同じチーズ工場 (Alto Dairy Cooperative, Waupun, WI, USA) から得られる熟成期間 4 ヶ月のchedarチーズを使用した。このチーズは組成が一定であるため選んだ (水分 37%、脂肪 34%、タンパク質 26% [w/w]、カルシウム、669 mg/100 g)。クエン酸三ナトリウム二水和物および、pH 調整剤として使用した水酸化ナトリウムは Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) 乳酸は Brenntag Great Lakes, LLC (Wauwatosa, WI, USA) から購入し、実験に使用した。

【プロセスチーズの製造方法】

プロセスチーズは直接蒸気、間接蒸気の両方を装備しているブレンテックツインスクリューカッカー (Blentech Corp., Rohnert Park, CA, USA) を使用して溶融した。製造前日に原料のchedarチーズをミートグランダーModel mini-22 (Biro Manufacturing, Marblehead, OH, USA) で粉碎し、一晩室温（約24℃）でテンパリングした。チーズの溶融を開始する前にチーズカッカーを80℃、1 min 予備加熱を行い、その後粉碎したチーズ、水、クエン酸三ナトリウム（無水和ベースで0.25~2.75% [w/w]）をチーズカッカーに投入し50 rpm、40 s ツインスクリューで攪拌した（予備攪拌）。この攪拌中に50% (w/v) 水酸化ナトリウムまたは88% (w/v) 乳酸を最終製品がpH 5.6になるまで添加した。クエン酸三ナトリウム添加量に対してプロセスチーズがpH 5.6になる酸またはアルカリ pH調整剤の量を予備実験により求めた。予備攪拌後、ツインスクリューの攪拌速度を100 rpm にし、直接蒸気(87 kPa)で100 s 加熱後、間接蒸気でチーズ温度が80℃になるまで加熱した。溶融保持時間は次項の実験計画法に基づき0~20 min の範囲をとった。保持後気泡を取り除く目的で15 s 真空処理を実施した。溶融チーズはヒートシール性のあるプラスティックシートを敷いた0.9 kg (2.0 lb) 用カルトンボックスに注ぎ5℃で一晩保管した。その後、酸素非透過性バリアフィルムに移し替え、真空パック後、再度5℃に保管した。物性、レオロジー特性、組成分析は製造後7日後に実施した。

【レオロジー測定】

プロセスチーズ試料のレオロジー特性は動的小振幅振動レオロジーにて測定した。Lucey *et al.* (2005) の実験方法に従い、Paar Physica UDS200 controlled-stress rheometer (Anton Paar, Ashland, VA, USA) と直径50 mm の鋸歯形状の平面プレートを使用した。チーズディスクを厚さ3 mm、直径50 mm の形状にカットし、1°C/min の加熱速度で5~85°Cまで加熱した。振幅周波数0.08 Hzと振幅歪み0.5%を試料に与え、貯蔵弾性(G')と損失正接(LT)を測定した。

【加熱溶融直後の動的粘弾性測定】

約 300 g の溶融保持 10 min の溶融チーズを断熱加工されたステンレス容器に注ぎ込み、底面プレートと直径 50 mm の鋸歯形状プレートを、予め 80 ℃まで加熱しているレオメーターまで移送した。プラスティックスプーンを用い、溶融チーズをレオメータープレートに供した。直径 50 mm の鋸歯状プレートを高さ 1 mm まで落とし、溶融チーズを上下のプレートで挟み込んだ。上部プレートの外側にはみ出したチーズはスパチュラで掻き取り、乾燥を防ぐために外側を料理用キャノーラ油で覆った。動的粘弾性測定はチーズクラッカーから取り出して 4 min 後に測定開始した。20 min、80 ℃を保持したまま振幅周波数 0.2 Hz、振幅歪み 0.3% を試料に与え、G' と LT の変化を測定した。

【酸・塩基滴定法】

酸-塩基滴定法は Hassan *et al.* (2004) の手法で実施した。粉碎した 8.0 g のチーズサンプルを 50 ℃に加熱した蒸留水 40 mL に加え、高速ブレンダー LB10S with a MC2 mini-container (Waring Commercial, New Hartford, CT, USA) で 1 min 揚拌し懸濁液を作成した。この懸濁液をホモジナイザー Ultra-Turrax T25 Basic with S25N-18G dispersing element (IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA) を使用し、19,000 s⁻¹ で 3 min 均質化処理を行った。均質化したミックスは、滴定測定前に 25 ℃に冷却した。

コンピューター制御自動滴定装置 DL50 Titrator (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) をチーズサンプルの酸-塩基滴定に使用した。チーズ均質液をスターラーで揚拌しながら 0.5 N 塩酸を用いて pH 3.0 まで滴定し、次に pH 3.0~8.0 まで 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液で逆滴定した。滴定は 25 ℃で行い、均質液と滴下試薬が平衡になる様、30 s ごとに 0.1 mL 滴下した。

酸または塩基の添加による pH の変化 (dpH) と滴定で使用した滴下試薬量から緩衝能力指数 (dB/dpH) を Van Slyke (1922) の計算方法 (4-1)式を用いて算出した。

$$\frac{dB}{dpH} = \frac{\{ \text{酸または塩基の添加量 (ml)} \} \times \{ \text{酸または塩基の規定度 (N)} \}}{\{ \text{サンプル量 (ml)} \} \times \{ pH \text{の変化} \}} \quad (4-1)$$

Figure 4-1 にナチュラルチーズの緩衝能力指数と pH の関係を示した。酸滴定時において pH 4.8 付近に緩衝ピークが見られる。これまでの研究からチーズ中の残存 CCP が酸により溶解し、リン酸イオンおよびカルシウムイオンに変化することで pH 4.8 付近の緩衝ピークが発現することが分かっている (Hassan *et al.*, 2004)。本実験では溶融塩の濃度による緩衝能ピークの変化から CCP の状態を評価した。

【テクスチャープロファイル分析とユニアクチャルコンプレッション】

25 kg ロードセルを備えたテクスチャーアナライザー TA-XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) を用いて テクスチャープロファイル分析とユニアクチャルコンプレッションを測定した。チーズブロックからコルクボーラーを用いて直径 16 mm、高さ 17.5 mm にサンプルチーズをカットした。テクスチャープロファイル分析では直径 50 mm のアルミ製シリンダーをクロスヘッドスピード 0.8 mm/s で元の高さから 20% の位置まで押し込んだ。ユニアクチャルコンプレッションではテクスチャープロファイル分析テストと同様な速度、プローブ、クロスヘッドスピードで元の高さの 80% まで押し込んだ。すべてのサンプルは 5 で測定し、5 回以上繰り返しテクスチャー測定を行った。

【メルト性】

メルト性は Muthukumarappan *et al.* (1999a, b) に示されているシュライバーテストと UW メルトプロファイルを用いて測定した。シュライバーテストはチーズを厚さ 5 mm、直径 40 mm の円盤状にカットし、ペトリ皿の上に置き、蓋を開めた後、232 、 5 min オープンで加熱した。シュライバーテストはピザやトーストでの利用を想定したテストであり、加熱利用をするチーズの製品開発には必要不可欠なデータとなる。溶け広がったチーズを CCD カメラ(model VDC 3874; Sanyo, San Diego, CA, USA) で撮影し、コンピューター画像処理システムでその面積を計算した。UW メルトプロファイルテストではチーズを厚さ 7 mm、直径 30 mm の円盤状にカットし、メルト性を測定した。テストは 4 回繰り返し測定を行った。

【チーズ中の水溶性カルシウムとリンの量】

はじめに Morris *et al.* (1988) に記述されている技術を用いてプロセスチーズからチーズジュースを絞り出すことを試みた。0.25% (w/w) のピロリン酸ナトリウムを添加したプロセスチーズからわずかにジュースを取り出すことができたが、それ以上のピロリン酸ナトリウム濃度では取り出すことはできなかった。Morris *et al.* (1988) の手法の代替としてプロセスチーズ中のカルシウムを取り出す方法を考案した。0.25% (w/w) ピロリン酸ナトリウムで製造したチーズから Morris *et al.* (1998) の手法を用いてチーズジュースを取り出し、コントロールとし、新たな水溶物抽出法から求めるカルシウム量の比較対象とした。チーズジュース法と様々な希釈倍率で試みた新抽出法により求めたプロセスチーズ中の全カルシウム量に対する水溶性カルシウムの割合を Table 4-1 に示した。チーズジュース法とチーズ:水を 1:1 で希釈した新抽出法では水溶性カルシウム量に有意差はなかった。しかしながら 1:1 の希釈では溶融塩を 1.5% (w/w) 以上添加するとチーズジュースが一切抽出できなかった。そのため、チーズと水の比を 2:3 にすることを決定した。

12 g のチーズと 18 g の脱イオン水をストマックバッグ(31 × 18 cm; Seward Ltd., Norfolk, UK)に入れ、260 rpm、5 min 室温にて懸濁した。その懸濁液を恒温水槽で 40 、 60 min 保持した。その後、250 mL の遠心チューブ (Nalgene Brand Products, Rochester, NY, USA) に移し、 $3,000 \times g$ 、 30 min 、 4 °C で遠心分離した。遠心分離した上澄み (脂肪) を取り出した後、中澄み液を Whatman No. 113 フィルターでろ過し、5 °C で一晩保管した。中澄み液のカルシウムとリンが水溶性タンパク質に結合している可能性もあるため、それらを完全除去するために遠心式 UF ユニット (Ultrafree-MC NMWL, 5-kDa cut-off membrane, Millipore Co., Billerica, MA, USA) を使用した。250 μL の中澄み液を UF ユニットに加え、 $4,500 \times g$ 、 90 min 常温で遠心分離し、UF を透過したパーミエイト液を得た。パーミエイト液を 0.2 N の硝酸溶液で希釈した。チーズ中および UF パーミエイトのカルシウム、リン量を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 Vista-MPX Simultaneous ICP-OES (Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) を使用し測定した。カルシウムとリン量はそれぞれ 317.9、214.9 nm のプラズマ発光周波数を用いて測定した。チーズ中の全カルシウムまたはリンに対する不溶性カルシウムまたはリ

ンの割合を求める手法はチーズ中の pH 4.6 水溶性窒素を求める手法 (Kuchroo and Fox, 1982) を参考とし、以下の (4-2) 式で求めた。

全カルシウムまたはリンに対する不溶性カルシウムまたはリンの割合 (%) =

$$100 - \left[\frac{\text{moisture content of cheese}(\%)}{100} + D \right] \times \frac{M_p}{M_t} \times 100 \quad (4-2)$$

M_p はパーミエイト中のカルシウムまたはリン濃度 (mg/100 g チーズ) M_t はチーズ中の全カルシウムまたはリン量 (mg/100 g チーズ) D は希釈倍率で本実験では 1.5 である。2 回以上繰り返し測定した。

【組成分析】

チーズの水分は直接乾燥法 (IDF, 1982) λ 脂肪は酸アンモニア分解法 (IDF, 1986) λ タンパク質はケルダール法 (IDF, 1993) を用いて測定した。また、プラスティックラップで包み 3 h 常温に置いたサンプルを差込み式 pH メーター 420A (Orion Research, Beverley, MA, USA) でチーズに差込み、pH を測定した。

【蛍光顕微鏡】

Sutheerawattananonda *et al.* (1997) の方法に従い、プロセスチーズ中の脂肪小滴を観測した。チーズブロックの中心から観測するチーズをカットした。サンプルは剃刀刃を使用して薄切りにした。この切片を 0.1% (w/v) Nile Blue A (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) で 1 min 染色し、ミリ Q 水で洗い流した後、水中に置いた。染色した切片は 4 λ に保管し、3 h 以内に蛍光顕微鏡 Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Eching, Germany) の 10 倍レンズ (Achroplan 10 \times /0.25, Carl Zeiss) を用いて観察した。水銀真空アーク灯を光源とし、励起フィルターにより、450~490 nm の励起波長を照射し、サンプルを観測した。染色された脂肪は部分的に濃淡の差があり、明晰化のためグレイスケールで示した。

【実験計画と統計解析】

溶融塩濃度と溶融保持時間がプロセスチェーチーズのレオロジー的、物理的、化学的特性に及ぼす影響を調べるために中心複合計画法 (Mullen and Ennis, 1979) と応答曲面法 (Lucey *et al.*, 1998; Montgomery, 2001) を用いた。2点のスターポイント ($\gamma = 1.414$) と4回反復したセンターポイントを用い、独立変数（溶融塩濃度と溶融保持時間）の影響を研究するために2要因実験計画を選んだ (Table 4-2)。コード化された変数は(4-2)式および、(4-3)式によって求められる。

$$\text{Coded } ESC = \frac{ESC (\%) - 1.5}{0.884} \quad (4-3)$$

$$\text{Coded holding time} = \frac{\text{holding time (min)} - 10}{7.071} \quad (4-4)$$

は中心複合計画法においてセンターポイント（原点）から軸上で最も離れた観測点であり、 γ の値はこの統計デザインの独立変数の数の平方根 ($\sqrt{2} = 1.414$) である (Fig. 4-2)。 $(4-3)$ 式の、1.5 と $(4-4)$ 式の 10 はこの統計デザインのセンターポイントである。（それぞれ、溶融塩濃度 1.5% [w/w]、保持時間 10 min）。他の数値を設定するために、最低値を決定する必要がある。例えば、保持時間の最低値は 0 min である。それゆえ、 γ は実際の値で 10 となり、センターポイントから 1 の実際の値は $10/1.414 = 7.071$ ($4-4$ 式の分母値) となる。

Statgraphics プログラム (version 5.1 plus, Manugistics, Rockville, MD, USA) を用いて多重ステップワイズ回帰分析と曲面応答法により統計解析した。依存変数は2次関数モデルを使用して推定した。ステップワイズ回帰分析は有意差の無い因子 (F 値 < 4) を排除するために、モデルの全変数から一つずつ非有意因子を排除し、モデルを単純化する方法であるバックワード選択を使用した (Montgomery, 2001)。

4-3 結果および考察

4-3-1 プロセスチーズの組成

作成したプロセスチーズサンプルの pH と水分には差がなかった (pH 5.58~5.76、水分 38.2~40.1%; Table 4-3)。 pH と水分は共にプロセスチーズのテクスチャーに影響を及ぼすことが知られている (Templeton and Sommer, 1930, 1932; Lee *et al.*, 1996; Marchesseau *et al.*, 1997)。しかしながら、Sutheerawattananonda and Bastian (1998) は TSC および DSP を使用して作成したプロセスチーズにおいて水分 38.6 から 39.8% の違いがあったが、加熱時のメルト転移温度に有意差がなかったことを報告しており、本実験において得られたチーズの微小な pH や水分の違いはこの統計デザインの応答変数に大きな影響を及ぼさないことが考えられた。

4-3-2 TSC を使用したプロセスチーズのレオロジーおよびテクスチャー特性

Figure 4-3 に様々な溶融塩濃度で作成したプロセスチーズを 5~85 °C まで加熱した際のレオロジー特性を示した。比較として原料チーズとして使用したchedarチーズのレオロジー特性も示した。すべてのチーズの G' 値は温度上昇と共に減少した (Fig. 4-3a)。すべての温度帯において高濃度の溶融塩 (例 2.75% [w/w]) のチーズが高い G' 値を示し、特に、高い温度帯 (40 °C 以上) では明確であった。ナチュラルチーズの G' 値は加熱中 65 °C まで TSC 1.5% (w/w) とほぼ同様な減少傾向を示したが、その後 65~85 °C の加熱において僅かに増加した。chedarチーズで同様な傾向を Udayarajan *et al.* (2005) が報告している。

高濃度の溶融塩を使用したプロセスチーズは 40~55 °C において低い LT 値を示した (Fig. 4-3b)。しかしながら、70 °C 以上の高温条件下では高濃度の溶融塩を使用したプロセスチーズの方が LT 値は高い値を示した。TSC を使用して作成したすべてのプロセスチーズは原料として使用したchedarチーズと比較して高い最大 LT 値 (LTmax) を示した。

Figure 4-4 に 50 °C の LT 値 (a) と 70 °C の G' 値 (d) の応答局面を示す。50

の LT 値と 70 の G' 値の予測モデルの決定係数 (R^2) はそれぞれ 0.98、0.80 であった (Table 4-4)。50 の LT 値の予測モデルは溶融塩濃度と溶融保持時間に對し負に影響し、溶融塩濃度に対し 2 次関数的影響があった。70 の G' 値の予測モデルは溶融塩濃度と溶融保持時間に對し正の影響が見られた。他の温度帯での LT 値もテストしたが、最も決定係数が高かったものは 50 であった。溶融塩濃度が下がる、または溶融保持時間が短くなると 50 の LT 値は増加した (Fig. 4-4a)。70 の G' 値は溶融塩濃度と溶融保持時間の増加と共に増加した (Fig. 4-4d)。

元の高さから 20% 圧縮した際に示されるチーズの硬度は溶融塩濃度と保持時間の長さと共に増加した (Fig. 4-4c)。硬度において、高い有意性のある予測モデルが得られ、溶融塩濃度と溶融保持時間、溶融塩濃度の 2 乗項で有意で、すべて G' 値に正の影響が見られた (Table 4-4)。原料ナチュラルチェダーチーズの硬度 ($3,539 \pm 235$ g) は本研究のプロセスチーズより高かった。プロセスチーズの Chewiness は硬度とほぼ同じ傾向であった (Table 4-4)。ユニアクチャルコンプレッションの分析結果では TSC を使用したプロセスチーズは明らかな破断は認められなかった (Fig. 4-5)。しかしながら、溶融塩濃度が高くなるにつれて、わずかな変曲点が見られ、その変曲点の応力の値は高くなつた。これは圧縮の際にある程度の破断が生じたためと考えられる。

溶融塩としてプロセスチーズに使用する TSC の添加量を上げることにより硬度と 70 の G' 値が増加し、メルト性が下がった (Fig. 4-4)。Gupta and Reuter (1993) はプロセスチーズフードを造る際、高濃度の TSC を使用するとその製品は低いメルト性、高い硬度を有することが報告している (pH の変化については報告されていない)。Gupta *et al.* (1984) はプロセスチーズの TSC 添加量を増やすと硬度が高くなる (添加濃度 1.2~2.1% [w/w]、約 pH 5.8) ことを報告している。一方、Cavalier-Salou and Cheftel (1991) は TSC 濃度 0~3% (w/w) において、TSC 濃度の増加と共にプロセスチーズアナログの硬度は減少したことを報告している。このアナログチーズはカゼインナトリウム、バターオイル等で作られており、pH 値は 6.1~6.8 と大きな幅がある上に、一般的なプロセスチーズチーズ (pH 5.6~5.9) とは大きく異なつてゐる。Sutheerawattananonda *et al.* (1997) は 2% (w/w) NaCl (溶融塩なし) を使用したプロセスチーズは硬いテクスチャー

だったと報告している。本研究では TSC 最低添加量 (0.25% [w/w]) のプロセスチーズは軟らかかった。2% (w/w) NaCl のみで造られたチーズ (Sutheerawattananonda *et al.*, 1997) は恐らく pH が低く、原料ナチュラルチーズに近い pH であったことが推測される。pH がプロセスチーズのテクスチャーに大きな影響を及ぼすことが報告されている (Marchesseau *et al.*, 1997; Lee and Klostermeyer, 2001)。以上の知見を踏まえると、プロセスチーズの pH の違いは既往の研究結果の不一致の理由の一つと考えられる。

4-3-3 TSC を使用したプロセスチーズのメルト性

UW-メルトプロファイラーによって様々な TSC 濃度で作成したプロセスチーズの加熱中におけるチーズ厚の変化(メルト曲線)を測定した結果を Fig. 4-6 に示した。比較のためプロセスチーズの原料として使用したナチュラルチェダーチーズのメルト曲線も示した。最も低い溶融塩添加量 (0.25% [w/w]) のチーズは比較的低い温度での流動が観測された。一方、最も高い溶融塩添加量 (2.75% [w/w]) のチーズは低いメルト性を示した。原料ナチュラルチーズの 15 min 後の最終流動度は溶融塩濃度 1.5% (w/w) とほぼ変わらなかったが、すべてのプロセスチーズと比較してメルト曲線の変曲点「最大流動点」が起こる時間は長かった。60° の加熱流動度 (DOF) の応答曲面を Fig. 4-4b に示した。DOF は溶融塩濃度と溶融保持時間の増加と共に減少した (Fig. 4-4b)。DOF において、溶融塩濃度、溶融保持時間、溶融塩濃度の 2 乗項において有意性の高い ($R^2 = 0.94$) 予測モデルが得られた (Table 4-4)。シュライバーメルトエリアは UW メルト曲線における DOF とほぼ同じ傾向であったが R^2 はやや低い値 (0.66) であった (Table 4-4)。DOF とシュライバーメルトの予測モデルにおいて、溶融塩濃度と溶融保持時間は負の影響があり、溶融塩濃度の増加と溶融保持時間の増加によりメルト性は減少した。

UW メルトプロファイラーテストにおいてナチュラルチーズはプロセスチーズに比べ、高い温度で流動を始めている (Fig. 4-6)。この結果はナチュラルチーズがプロセスチーズに比べ強いタンパク質構造を持っていることを示唆している (ナチュラルチーズの硬度が高いことも同様な機構が考えられる)。ナチュラ

ルチーズはカゼイン間を架橋するコロイド性リン酸カルシウム(CCP)が存在しているが、TSCを添加したプロセスチーズはクッキング中にCCP架橋が失われ、カゼインが分散した状態にある。溶融保持時間を延ばすとプロセスチーズのDOFが下がり、脂肪球が小さくなることが認められた(Fig. 4-8)。溶融保持時間は脂肪の乳化、カゼインの分散を促進させ、共にメルト性の減少に潜在的に寄与している可能性が高い。

4-3-4 TSCを使用したプロセスチーズのカルシウムとリンの状態

Figure 4-4fにチーズ中の全カルシウム量に対する不溶性カルシウムの割合を示した。有意性の高い($R^2 = 0.86$)予測モデルが不溶性カルシウムにおいて見られ、溶融塩濃度、溶融保持時間、溶融保持時間の2乗項において有意性があった(Table 4-4)。溶融塩濃度が高くなるにつれて全カルシウムに対する不溶性カルシウムの割合が増加した。溶融保持時間においては複雑な傾向を示しており、短い保持時間において不溶性カルシウムの値は下がっているが、その後保持時間を長くすると不溶性カルシウムの値は上昇した。

全リン量に対する不溶性リンの割合の応答曲面をFig. 4-4eに示した。溶融塩濃度の増加と共に不溶性リン量は減少した。不溶性リン量における溶融保持時間の影響は不溶性カルシウムと同様な傾向であった。これらの結果からTSCは残存しているCCPを分散させ、リンをチーズの水相部に放出させていることが考えられた。溶融塩濃度の増加に伴う不溶性カルシウム量の増加は不溶性のケン酸カルシウムが形成されたためと推測される。不溶性リンにおいて有意性の高い予測モデルが得られ、溶融塩濃度、溶融保持時間、溶融塩濃度の2乗項において有意性が得られた(Table 4-4)。

異なる濃度のTSCを用いて作成したプロセスチーズの酸-塩基緩衝曲線の変化をFig. 4-7に示した。保持時間の影響に関しては有意性を見いだせなかった。

原料ナチュラルチーズの緩衝曲線をFig. 4-7aに示した。ナチュラルチーズにおいてpH 4.8付近にピークが観測される。これはチーズ中に残存するCCPの溶解によるものである(Lucey and Fox, 1993; Hassan *et al.*, 2004)と考えられた。塩基での逆滴定を行うとpH 4.8付近のピークは消失し、pH 6.0付近にピークが現

れた。これは不溶性リン酸カルシウムの形成によるものである(Lucey *et al.*, 1993)と考えられた。最も低い濃度の TSC を使用したチーズにおいて pH 4.8 付近の緩衝ピーク面積がわずかにナチュラルチーズのピークものより広い (Fig. 4-7b)。酸滴定で観測される pH 4.8 の緩衝ピークは溶融塩の増加と共に減少し、同時に pH 4.0 付近に新しいピークが現れた。2.38% (w/w) 以上の TSC で造られたチーズは pH 4.8 付近においてピークが見られなかつたため、チーズ中に CCP はほとんど残存していないことが推測される (Fig. 4-7e, f)。pH 4.8 のピークの消失は TSC によって CCP のカルシウムがキレートされ、クエン酸カルシウムが形成されたため生じたことが考えられた。クエン酸カルシウムの緩衝ピークが pH 3.8~4.0 であることが Mizuno and Lucey (2005) により報告されている。

クエン酸ナトリウムは効果的なカルシウムキレート剤として知られており、乳中に添加するとカゼインミセルの崩壊が起こる (Walstra and Jenness, 1984)。Mizuno and Lucey (2005) は乳タンパク質濃縮液へ添加する TSC の添加濃度を上げるとカゼイン結合性カルシウムとカゼイン結合性無機リンが減少することから、TSC はカルシウムをキレートし、カゼインと結合しないと主張している。Udayarajan *et al.* (2005) は高温域におけるナチュラルチェダーチーズの G' 値増加 (Fig. 4-3a) は、加熱によるカゼイン間を架橋する新たなリン酸カルシウムの形成であると示唆している。本研究では TSC を使用したチーズにおいてこのような G' 値の増加は認められなかった (Fig. 4-3a)。これは加えたクエン酸塩が水相部のカルシウムをキレートし、加熱によるリン酸カルシウムの形成を妨げているものと考えられる。TSC 濃度増加と共に不溶性リンが減少することによって示されるように (Fig. 4-4e) TSC はプロセスチーズ中の残存 CCP を崩壊させ、CCP から流出した水溶性カルシウムは TSC のクエン酸塩と会合する。その結果、pH 4.0 付近の新しい緩衝ピークの発現 (Fig. 4-7) 全カルシウム量に対する不溶性カルシウム量の増加 (Fig. 4-4f) が見られたと考えられる。クエン酸カルシウムは水に非常に溶けにくく (Chatterjee and Dhar, 1924) プロセスチーズ中の水相部におけるクエン酸カルシウムの溶解度を超えていたと推測される。Pastorino *et al.* (2003) は高圧処理により TSC 緩衝溶液を注入したナチュラルチーズの水溶性カルシウムとリンの測定を試みた。その結果、TSC 緩衝液の注入数を増やすにつれてチーズ中の結合性リンの減少が認められた。しかしながら

ら、水溶性カルシウム量は TSC 緩衝液の注入量を増やすにつれて減少したことが報告されている。Pastorino *et al.* (2003) はチーズ中に結晶化したカルシウムのようなものが形成されている可能性があることを示唆している。また、高 pH 条件下における高濃度 TSC の添加はプロセスチーズ中にクエン酸カルシウム結晶の塊である「ブルーム」を発生されることが報告されている (Scharpf and Kichline, 1969)。しかしながら、本研究では最も高い溶融塩濃度においても保管中の表面や内部にブルームのような結晶の成長は観測されなかった。

TSC を使用したプロセスチーズにおいておよそ 10 μm 長の針状のクエン酸カルシウム結晶の存在が報告されている (Rayan *et al.*, 1980; Caric *et al.*, 1985)。プロセスチーズ中のクエン酸塩の状態に関しては今後研究を進める必要があるが、走査型顕微鏡を用いることでしか見ることが出来ない、非常に微細な結晶としてチーズ構造内に捕捉されている可能性も考えられる。

不溶性カルシウムにおける溶融保持時間の影響 (Fig. 4-4f) は解明困難である。保持時間 10 min が最も不溶性カルシウム量が低い結果となっている。短い保持時間の場合、チーズと TSC を適切に攪拌する時間が不十分であった可能性がある。そのために CCP からカルシウムを完全にキレートできず、結果として短い保持時間において不溶性カルシウムが残ったことが推測される。10 min まで溶融保持することでチーズは十分に攪拌され、カルシウムイオンは水相部へ移行し、不溶性カルシウム量が減少する。それ以上の溶融保持によりクエン酸カルシウム複合体が形成され、水相部のカルシウム濃度は減少した可能性が考えられる。

4-3-5 TSC を使用したプロセスチーズの乳化状態

異なる TSC 濃度と溶融保持時間によって造られたプロセスチーズの脂肪球の顕微鏡写真を Fig. 4-8 に示した。脂肪が大きく合一した状態が最低濃度の TSC において観測された (Fig. 4-8a)。2.75% (w/w) 溶融塩を添加したチーズの脂肪は非常に小さく球状で良好な乳化状態にあることが分かる (Fig. 4-8c)。1.5% (w/w) の溶融塩を添加したチーズにおいて、保持時間を取りっていない (溶融チーズが 80 に達した直後チーズカッカーから取り出した) チーズでは大きな

脂肪球が観測された (Fig. 4-8d)。同濃度で長い保持時間を与えると脂肪球は小さくなつた (Fig. 4-8e)。これは Sutheerawattananonda *et al.* (1997) の報告と一致している。

高濃度の TSC が低濃度の TSC と比べ、プロセスチーズの硬度と低メルト性を付与する理由として、脂肪の乳化とカゼインの分散の 2 つが考えられる。このプロセスチーズシステムが脂肪を含んでおり、カゼイン分子の分散が脂肪の乳化を促進するためこの二つは関係している。

低濃度 (0.25% [w/w]) の溶融塩では乳化の乏しい脂肪球が観測された (Fig. 4-8a)。ナチュラルチーズクッキング中の加熱において、脂肪はチーズマトリックスから抜け出し、互いに合一する (Paquet and Kalab, 1988; Guinee *et al.*, 2000)。プロセスチーズにおいておそらく水溶性カゼインが脂肪球の周りを取り囲み、クッキング中の機械的攪拌が乳化を促進させる。カゼイン界面に覆われ乳化した脂肪は大きなタンパク質の塊のように存在し (擬似的タンパク質粒子) 積極的にカゼイン分子ネットワークに組み込まれる (Walstra and Jenness, 1984)。プロセスチーズ中の乳化した脂肪球は再加熱の際、合一が起こりにくく一般的に耐熱性がある (Guinee *et al.*, 2000)。溶融塩濃度の低いチーズでは乳化状態が悪く (Fig. 4-8a) タンパク質によって乳化安定化した脂肪球による積極的な構造強化がない組織になった。これによりチーズは硬度が低く、メルト性が高くなつた可能性がある (Fig. 4-4)。この現象は、ヨーグルトゲルにおいて、均質化により細かくなつた脂肪球表面にカゼイン分子が人工の脂肪球膜として働き、カゼインネットワークが強化され、ゲル強度や粘度が上昇する (Tamime and Robinson, 1999) ことに類似している。

4-3-6 タンパク質構造への影響

プロセスチーズ製造中に与えられる力学的、熱的エネルギーによって発生するカゼインの分散は乳化以外の重要な現象を引き起す (Glenn *et al.*, 2003)。クッキング中に様々な物理化学的反応がカゼインマトリックス中で発生し、それにより、疎水性相互作用の増加によるカゼイン粒子間の接触面の減少 (Lucey *et al.*, 2003) や水素結合などの相互作用の減少による分散を引き起し

ている。Paquet and Kalab (1988) は走査型電子顕微鏡を用いて加熱したモッツアレラチーズにおいてタンパク質ネットワークの収縮が観察されたことを報告しており、プロセスチーズのクッキング中においても類似した現象が起きていることが推測される。溶融塩を添加することによりカゼインは水溶化するため、プロセスチーズはその原料として使用されるナチュラルチェダーチーズよりも水溶性カゼイン量が多い (Templeton and Sommer, 1936)。TSC のカルシウムキレート力により CCP 架橋からカルシウムが溶出し、さらに溶融塩の多価アニオンとカゼイン間の静電気的斥力によってカゼインは水和し分散したと考えられる。

Figure 4-9 は 80 、 14 min 加熱溶融保持した後、 80 °C の溶融プロセスチーズのレオロジー特性を測定したものである。TSC 濃度の増加と共にプロセスチーズ製造中のカゼイン分散の増加を見ることができる。高濃度の TSC を用いて作成したチーズは非常に高い LT 値を示し、カゼインの高い分散により流動性を示すと考えられる。

しかしながら、それとは別のタンパク質間の相互作用がプロセスチーズのクッキング中または冷却中に起こっている可能性がある。Lee *et al.* (2003) は露出した非極性領域を介したタンパク質–タンパク質間の会合がクッキング中に発生していることを示唆している。プロセスチーズシステムにおいて力学的、熱的エネルギーが加わり溶融塩の強力な多価アニオンが水素結合のような分子内相互作用を分断し、カゼイン分子の電荷領域が露出すると考えられる。このプロセスはカゼイン分子間の新しい結合もしくは相互作用を形成する可能性がある。カゼインは冷却中に再結合または再重合し、疎水性相互作用、静電気的相互作用を介してカゼイン間に新しいネットワークをつくる。カゼインの分散または領域の露出が冷却後の硬さ、低メルト性をチーズに与えている可能性がある。TSC 濃度の高いプロセスチーズの溶融後の G' 値が低濃度のものに比べ高いことがその裏付けとして挙げられる (Fig. 4-9)。

Table 4-1 Soluble Ca as a percentage of total Ca. Comparison between the “cheese juice” method and new water extraction method with various dilution factors ($n = 2$). Cheese used was process cheese with 0.25% (w/w) tetrasodium pyrophosphate.

Cheese: water	Soluble Ca (% of total Ca)
“Cheese juice”	26.1 ^a
1:1	27.3 ^{ab}
1:1.5	30.1 ^{bc}
1:2	31.6 ^c
1:4	63.7 ^d

^{a-d}Means within the same row not sharing a common superscript are different ($P < 0.05$).

Table 4-2 Values of independent variables of each experiment in coded and actual values for each central composite experimental design.

Treatment	Coded values		Actual values	
	ES concentration	Holding time	ES concentration (% [w/w])	Holding time (min)
1	0	0	1.50	10.0
2	- 1	- 1	0.62	2.90
3	0	0	1.50	10.0
4	+ 1	+ 1	2.38	17.1
5	+ 1	- 1	2.38	2.90
6	0	+ α^*	1.50	20.0
7	0	- α	1.50	0.0
8	- α	0	0.25	10.0
9	0	0	1.50	10.0
10	+ α	0	2.75	10.0
11	- 1	+ 1	0.62	17.1
12	0	0	1.50	10.0

* $\alpha = 1.414$

ES: Emulsifying salt

Table 4-3 Composition of process cheese for each experimental treatment.

Treatment	pH	Moisture (%)	Fat (%)
1	5.63	40.14	32.52
2	5.66	38.98	32.05
3	5.62	38.72	32.54
4	5.59	38.84	31.62
5	5.58	38.77	31.45
6	5.61	39.60	31.48
7	5.76	38.72	32.20
8	5.74	39.11	32.87
9	5.73	38.80	32.06
10	5.65	38.18	31.75
11	5.75	38.51	32.73
12	5.71	38.54	32.05

Table 4-4 Second-order polynomial models describing dependent variables in physicochemical properties of process cheese made with TSC.

Dependent variables	Independent variables	Coefficient	R ² (adjusted) ¹	p-value
LT at 50°C	Constant	1.532	0.98	< 0.001
	[ES]***	-0.5296		
	Holding Time**	-0.09558		
	[ES] ² ***	0.2592		
DOF	Constant	77.81	0.94	< 0.001
	[ES]***	-4.446		
	Holding Time*	-0.8927		
	[ES] ² †	0.8539		
Hardness	Constant	1850	0.95	< 0.001
	[ES]***	401.5		
	Holding Time*	95.02		
	[ES]×Holding Time*	114.2		
	[ES] ² **	128.7		
Chewiness	Constant	1204	0.97	< 0.001
	[ES] ***	287.5		
	Holding Time*	56.55		
	[ES]×Holding Time*	80.94		
G' at 70°C	Constant	15.59	0.80	< 0.001
	[ES]***	8.370		
	Holding Time*	3.574		
Insoluble P as a % of total P	Constant	51.00	0.82	< 0.001
	[ES]***	-16.88		
	[ES] ² *	7.877		
	Holding Time ² *	8.572		
Insoluble Ca as a % of total Ca	Constant	73.04	0.86	< 0.001
	[ES]**	4.150		
	Holding Time*	1.785		
	Holding Time ² ***	4.564		
Schreiber Melt Area	Constant	26.81	0.66	< 0.005
	[ES]**	-3.897		
	Holding Time*	-2.054		

¹R² values were adjusted for the degree of freedom.

†, *, **, and *** indicate significant differences at P < 0.1, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001, respectively.

[ES]: Emulsifying salt concentration.

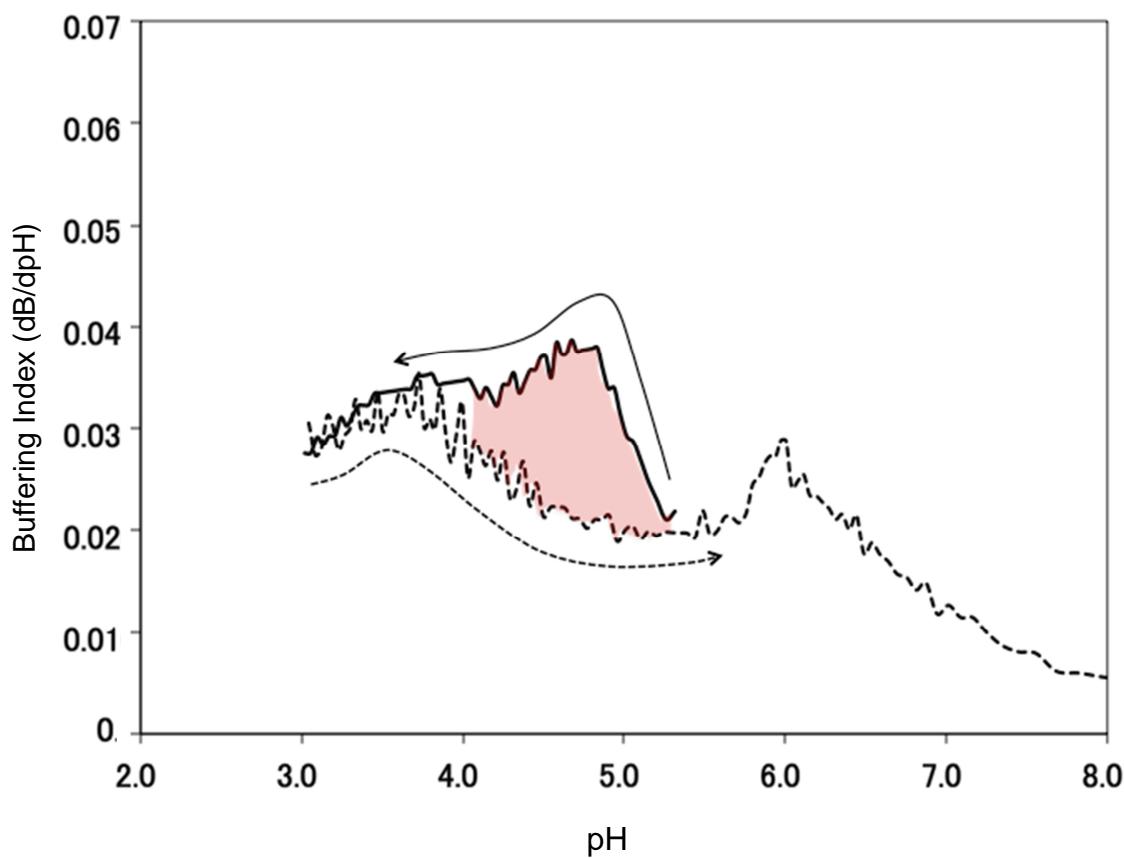
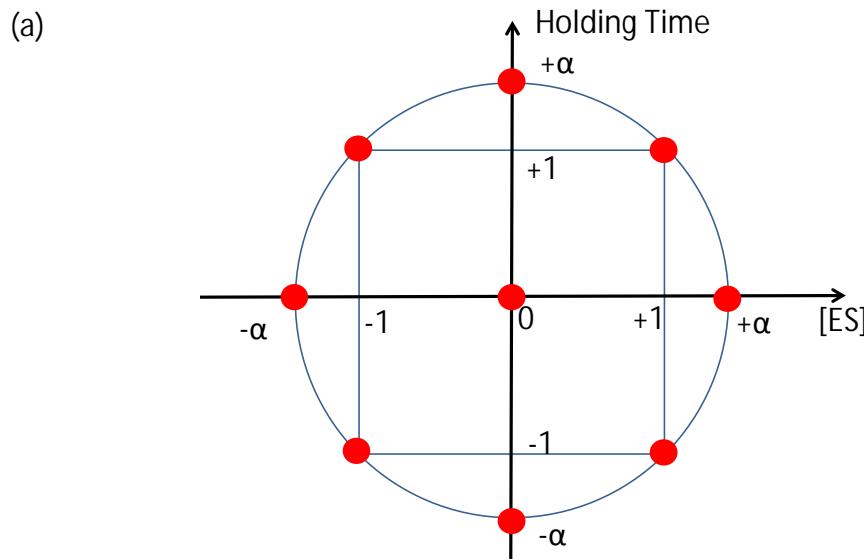


Fig. 4-1 Buffering curve for Cheddar cheese as a raw material of process cheese:
Forward titration with 0.5 N hydrochloric acid (solid line), and back titration with 0.5 N sodium hydroxide (dotted line). Red area represents the solubilization of residual CCP.



(b)

Variable	Levels				
	- α	-1	0	+1	+ α
[ES] (% [w/w])	0.25	0.62	1.50	2.38	2.75
Holding Time (min)	0	2.90	10.0	17.7	20.0

Fig. 4-2 Explanation drawing of central composite rotatable design (a) and independent variables and experimental design levels in dimensionless coded and physical units (b). [ES]: Emulsifying salt concentration.

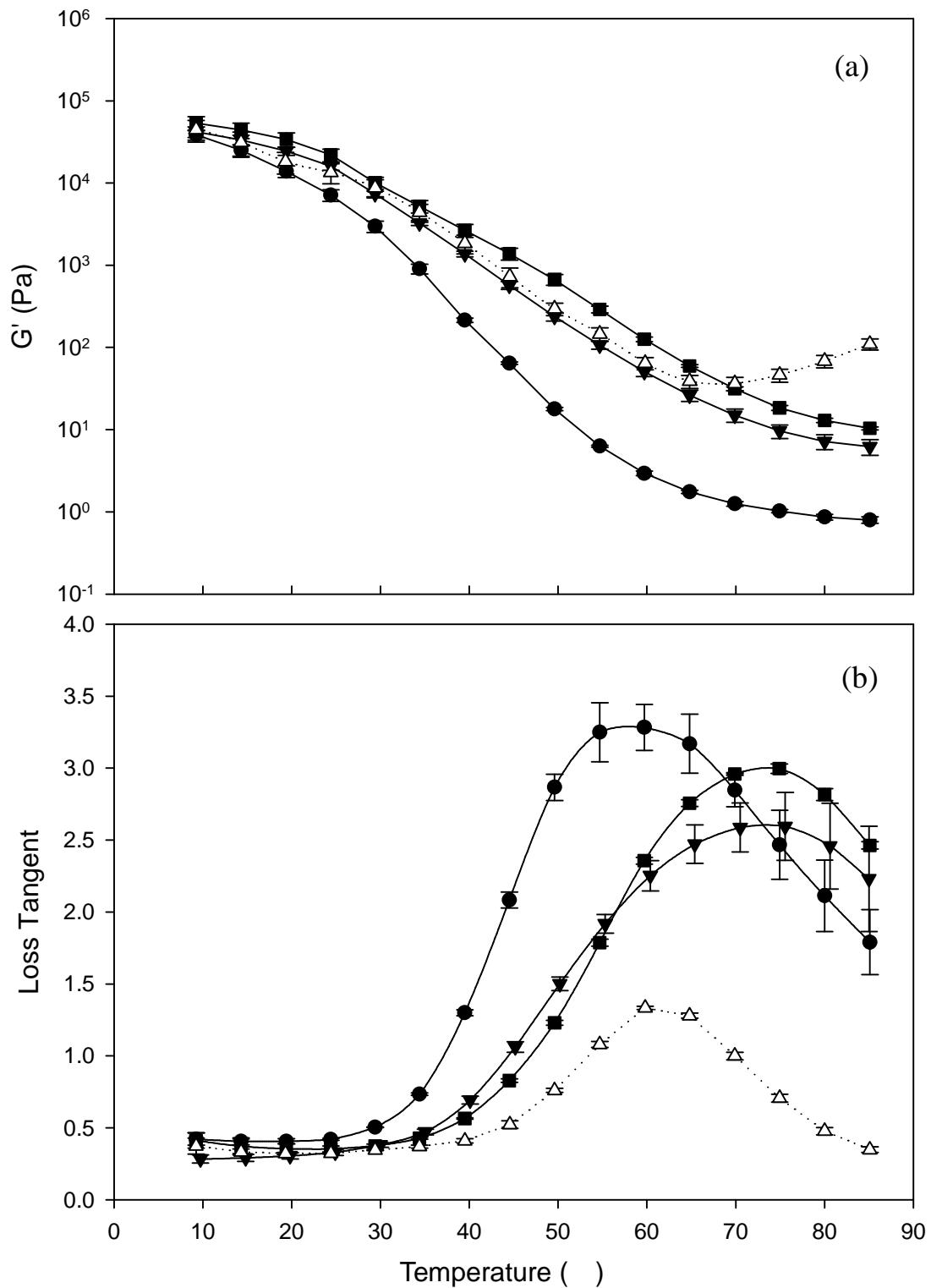


Fig. 4-3 Storage modulus, G' (a) and loss tangent (b), as a function of temperature for process cheeses made with various concentrations of TSC and the natural Cheddar cheese used as the cheese making (Δ): TSC concentrations 0.25% (w/w) (●), 1.50% (w/w) (▼), 2.75% (w/w) (■). Holding time was 10 min for all process cheese samples. Data represents means ($n = 3$) while the error bars represent the standard deviation.

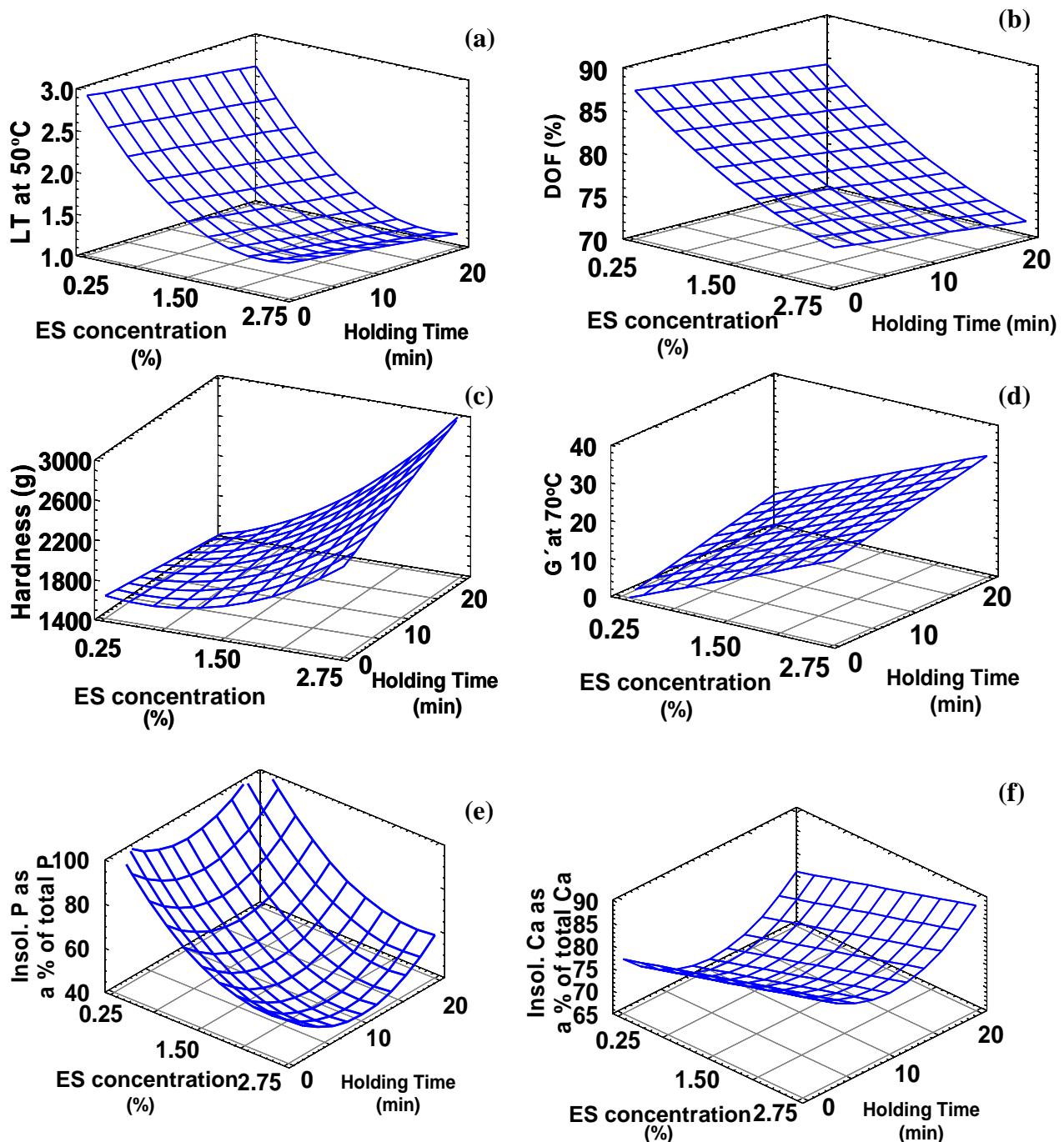


Fig. 4-4 Response surface plots for the effect of concentrations of emulsifying salts (ES) and holding times on loss tangent (LT) at 50°C (a), degree of flow (DOF) at 60°C from the UW-Meltprofiler, (b), hardness (c), storage modulus (G') at 70°C (d), insoluble P as a % of total P in process cheese (e) and insoluble Ca as a % of total Ca (f).

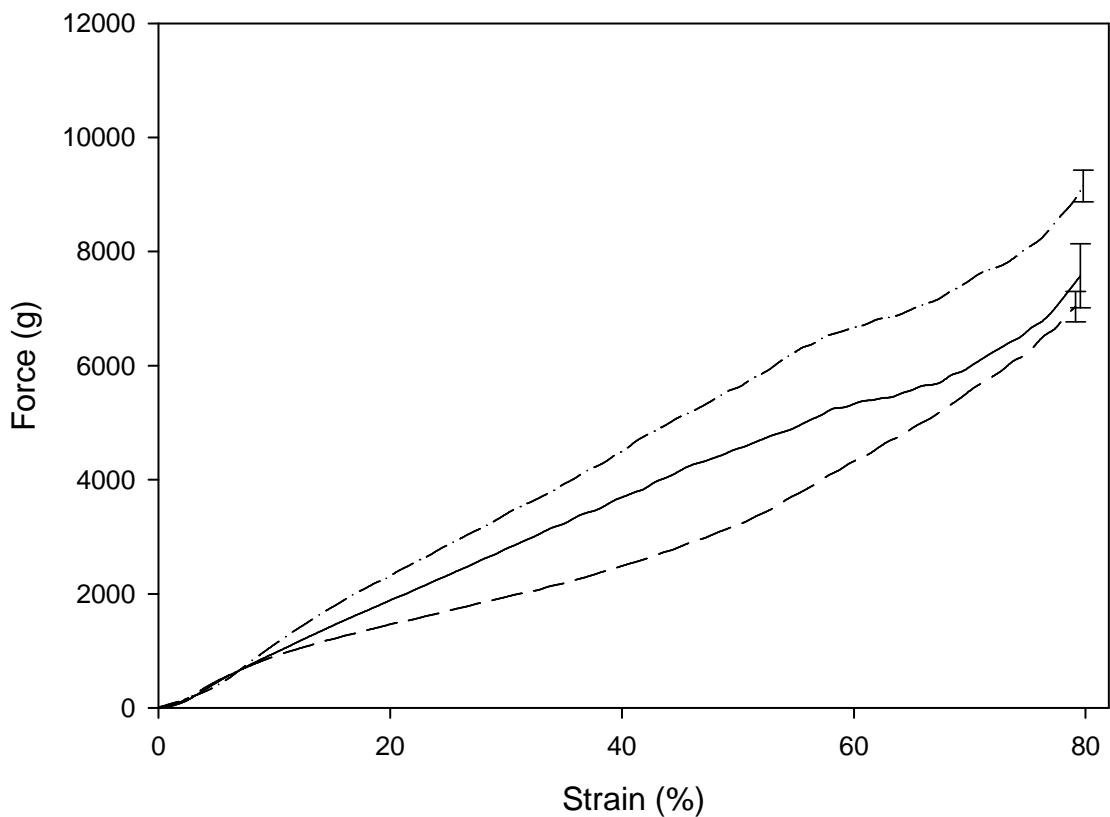


Fig. 4-5 Stress-strain curves during uniaxial compression of process cheeses to 20% of the original height of cheese made with various concentrations of TSC: TSC concentration 0.25% (w/w) (dashed line), 1.50% (w/w) (solid line), 2.75% (w/w) (dashed-dotted line). Holding time was 10 min for all process cheese samples. Data represents the means ($n \geq 5$) while the error bars represent the standard deviation.

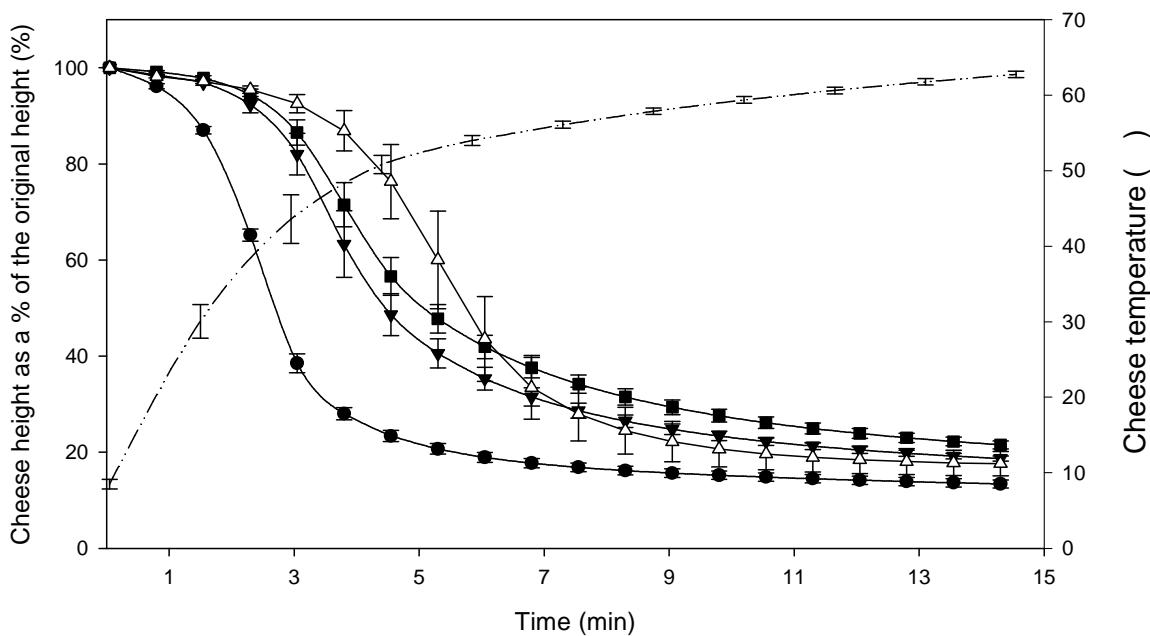


Fig. 4-6 Changes in cheese height as a % of the original height from the UW-Meltprofiler for process cheese made with various concentrations of TSC and natural Cheddar cheese used as an ingredient (Δ), TSC concentrations 0.25% (w/w) (●), 1.50% (w/w) (\blacktriangledown) and 2.75% (w/w) (■). Cheese temperature is indicated by a dashed line. The data represents the means ($n = 3$) while the error bars represent the standard deviation.

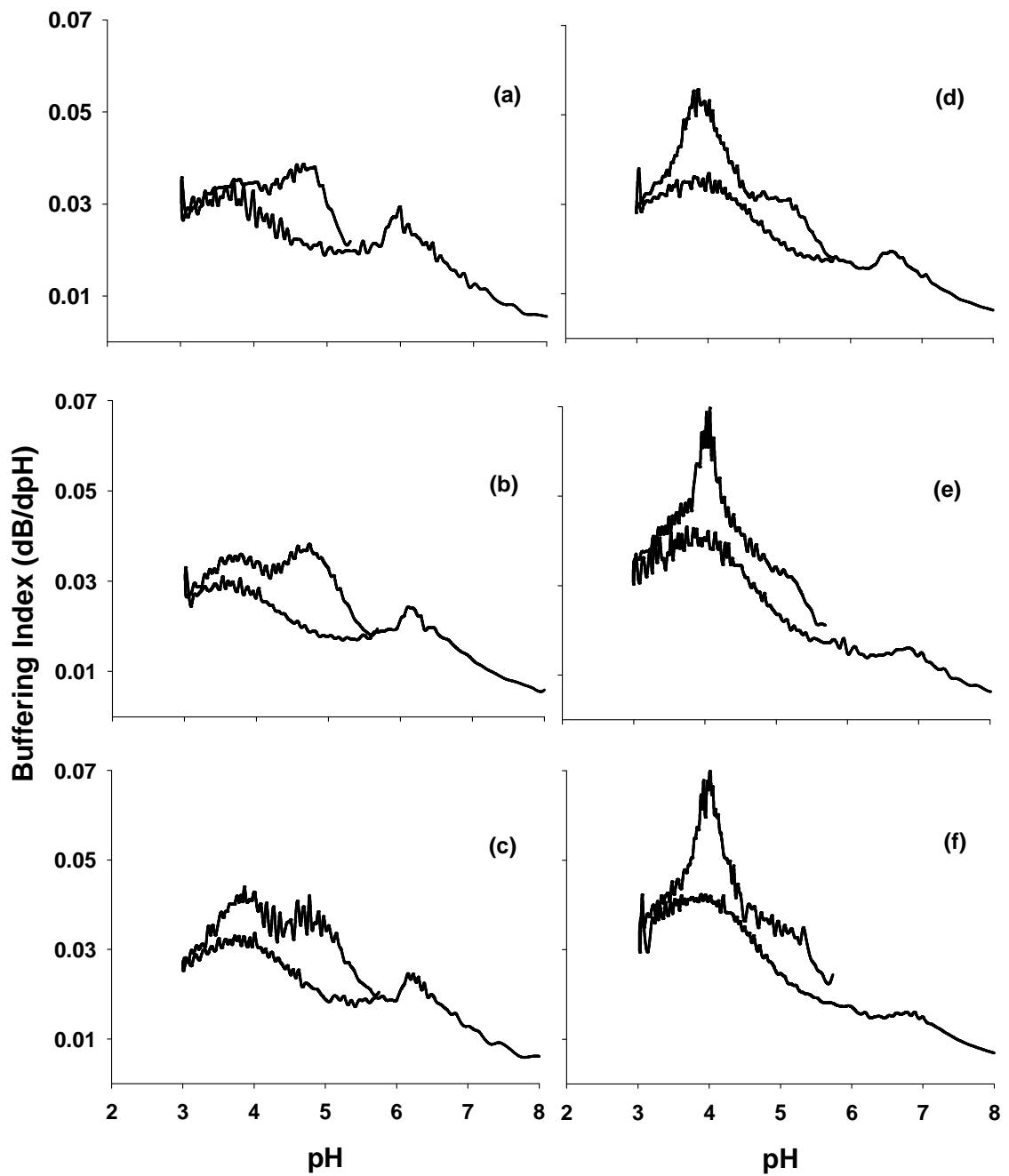


Fig. 4-7 Acid-base buffering curves for natural Cheddar cheese as the cheese making ingredient (a) and process cheeses made with various TSC concentrations 0.25% (w/w) (b), 0.62% (w/w) (c), 1.50% (w/w) (d), 2.38% (w/w) (e) and 2.75% (w/w) (f).

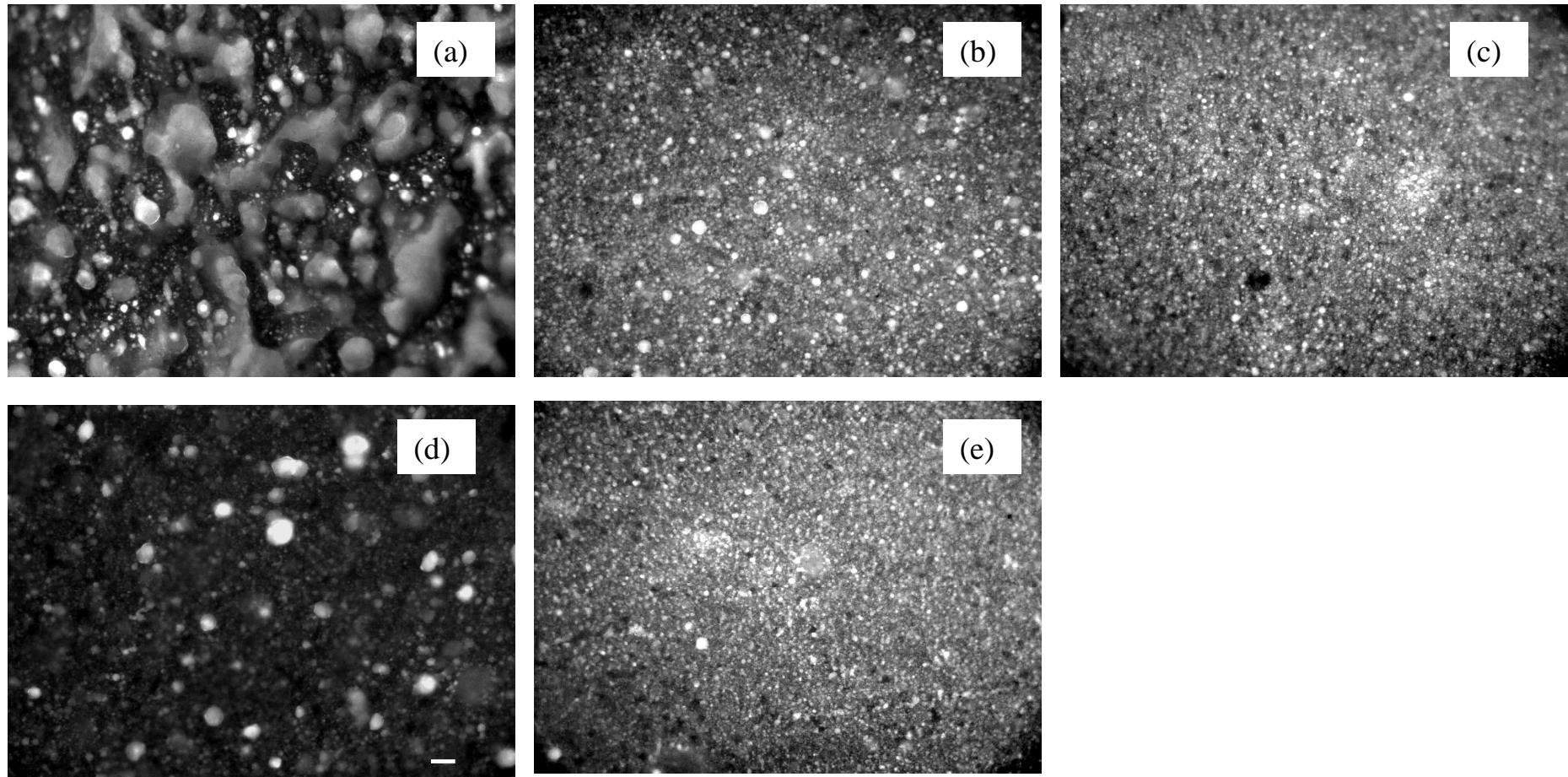


Fig. 4-8 Fluorescence micrographs showing fat droplets as light areas against a dark background (protein) for process cheese made with various concentrations of TSC and with the same holding time (10 min): TSC concentration: 0.25% (w/w) (a), 1.50% (w/w) (b) and 2.75% (w/w) (c) or cooked for various holding times and same concentration of TSC (1.50% [w/w]): Holding time, 0 min (d), 10 min (b) and 20 min (e). Scale bar = 50 μ m.

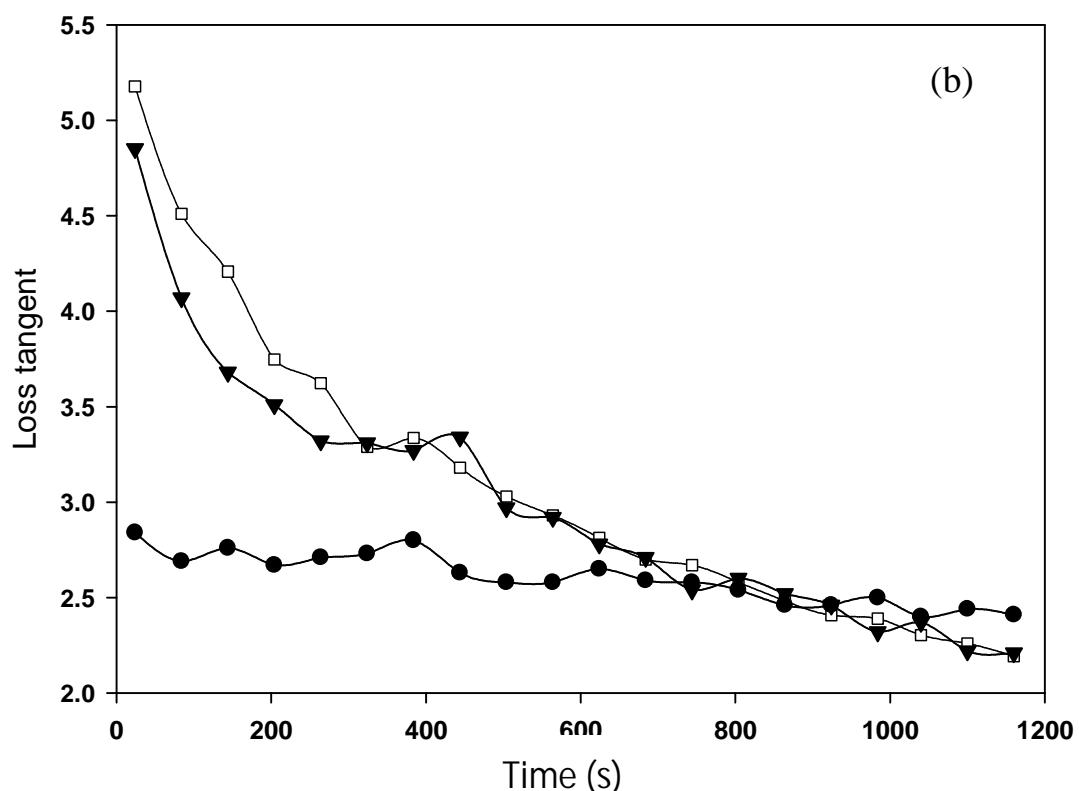
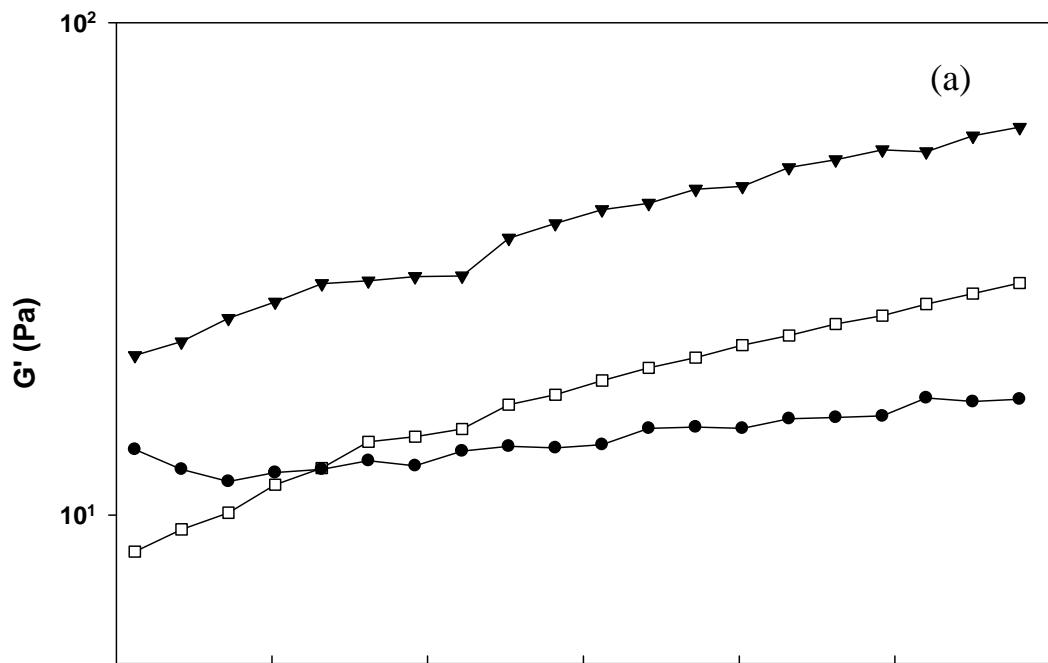


Fig. 4-9 Storage modulus, G' , (a) and loss tangent, (b) for melted process cheeses made with various concentrations of TSC 0.25% (w/w) (●), 1.50% (w/w) (□) and 2.75% (w/w) (▼) during holding at 80°C. The data for 1.50% (w/w) TSC level represents means ($n = 4$). Other curves are single tests. Rheological measurements were started 4 min after process cheese taken out from a cooker at 80°C for 10 min.

4-4 第4章の結論

プロセスチーズのテクスチャー、レオロジー特性および微細構造におけるクエン酸三ナトリウム (TSC) 濃度 (0.25~2.75% [w/w]) と溶融保持時間 (0~20 min) の影響を統計手法である中心複合計画法を用いて解析した。動的粘弾性測定で得られる LT、UW-メルトメーターから得られる DOE、シュライバーテストから得られるメルトエリアにおいて、TSC の濃度増加に伴い、プロセスチーズのメルト性減少が見られた。溶融保持時間の増加においても僅かながらメルト性減少が見られた。プロセスチーズの硬さは TSC の濃度増加とともに上昇した。蛍光顕微鏡による脂肪球の観測を行った結果、TSC の濃度増加と溶融保持時間の増加と共に脂肪球サイズが減少した。TSC の添加により、酸・塩基滴定曲線のコロイド性リン酸カルシウム (CCP) に起因する pH 4.8 付近の緩衝能ピークが減少し、水溶性リン濃度が増加した。しかしながら、TSC の濃度増加と共に不溶性カルシウム量の増加が観測された。本研究により CCP 中のカルシウムを TSC がキレートし、ナトリウム化した水溶性カゼインが分散、脂肪の乳化を促進されることが認められた。キレートされたカルシウムはクエン酸カルシウム複合体を形成し、プロセスチーズ中の不溶性分画内にトラップされていると考えられる。TSC により水溶性リンが増加したことから、クエン酸塩はカゼイン間の CCP を崩壊し、カゼインを分散することが明らかになった。分散したカゼイン間の再会合と脂肪の乳化がプロセスチーズの構造強化に作用することが示された。

第 5 章 ヘキサメタリン酸ナトリウム濃度と溶融保持がプロセスチーズ中のカゼイン間相互作用に及ぼす影響

5-1 序

ヘキサメタリン酸塩は 6 つのリン酸が環状構造を有していることを示しているが、プロセスチーズで使用されているヘキサメタリン酸ナトリウム（SHMP）は鎖状構造であり、長鎖のポリリン酸塩である。SHMP は単品ではあまり使用されず、他の溶融塩とブレンドして使用される。単品で使用すると pH が低く、食品としての適切な物性や風味をださない（Gupta *et al.*, 1984）。SHMP と他の溶融塩と混合した条件や、pH が低い状態で SHMP を単体使用した条件での研究は行われているが、一般的なプロセスチーズの pH 条件下での SHMP 単体がプロセスチーズの機能特性に及ぼす影響は未解明である。第 3 章では pH の変化による SHMP を使用したプロセスチーズのメルト性、物性の影響、第 4 章では TSC を使用した溶融塩の溶融保持時間の影響について記載した。

本章ではプロセスチーズ製造において、SHMP のプロセスチーズに対する機能性を見いだすために、すべてのサンプルを一般的なプロセスチーズの pH である pH 5.6 に調整し、溶融塩濃度と溶融保持時間がプロセスチーズの機能特性に及ぼす影響を解析した。

5-2 材料および方法

【材料】

第 4 章（p. 54）と同様に同一のチーズ工場から供給された 4 ヶ月熟成のチeddarチーズ（水分、37%；脂肪、34%；タンパク質、26% [w/w]；カルシウム、669 mg/100 g Alto Dairy Cooperative）を実験に使用した。溶融塩として本研究では SHMP（Hexametaphos, ICL Performance Products LP, St. Louis, MO, USA）を使用した。SHMP はオルソリン酸塩が重合した長鎖の縮合リン酸塩である。

本研究で使用した SHMP の平均リン鎖長を Odagiri and Nickerson (1964) の方法で測定したところ 5.6 であり、Griffith (1957) の方法で測定した結果平均鎖長が 14.4 であり、両測定法で鎖長に違いがあった。pH 調整剤として 50% (w/v) の水酸化ナトリウム (Fisher Scientific) 溶液を使用してプロセスチーズの pH を 5.6 に調整した。

【プロセスチーズ製造方法】

プロセスチーズは第 4 章 (p. 55) と同様の製造条件で、ブレンテックツインスクリュークッカー (Blentech Corp.) を使用し、実験計画法に基づき SHMP 濃度を 0.25~2.75% (w/w)、溶融保持時間を 0~20 min の範囲で溶融した。最終製品の pH が 5.6 になるようにミキシング中に水酸化ナトリウム水溶液を加えた。冷却後、プロセスチーズブロックをバキュームパックして 5 ℃ に保管した。すべての分析は製造後 7 日後に実施した。

【レオロジー測定】

プロセスチーズのレオロジー特性は動的小振幅振動レオロジーを行い、第 4 章と同様の方法 (p. 55) で測定を行った。貯蔵弾性率 (G') と損失正接 (LT) を測定する目的でチーズを 5~85 °C に 1 °C/min の速度で加熱しながら、周波数 0.08 Hz、歪み率 0.5% をプロセスチーズ試料に与えた。第 4 章と同様に (p. 56) 加熱溶融時のレオロジー測定を行った。

【酸 - 塩基滴定法】

第 4 章と同様の方法 (p. 56) で酸 - 塩基滴定を行った。8.0 g の粉碎試料に 40 mL の蒸留水を加え均質化したプロセスチーズ懸濁液を滴定に使用した。この懸濁液を 0.5 N 塩酸を用いて pH 3.0 まで滴下し、その後 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 3.0~8.0 に逆滴定した。緩衝能力指数は Hassan *et al.* (2004) の計算法で算出し、pH に対する緩衝能力指数をグラフ化した。反復測定を 3 回実施し、個々の滴定カーブが異なっていた場合は、再度測定を実施した。

【テクスチャープロファイル分析、ユニアクチャルコンプレッション、メルト性】

TA-XT2 テクスチャーアナライザー (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) を使用し、テクスチャープロファイル分析 (TPA) とユニアクチャルコンプレッションを実施した。第4章と同様に (p. 57) 高さ 17.5 mm、直径 16 mm の試料をプロセスチーズブロックからコルクボアラーで抜き取った。TPA テストでは元の高さの 80%、ユニアクチャルコンプレッションでは元の高さの 20% まで圧縮した。共に圧縮速度は 0.8 mm/s、サンプル温度は 5 °C 、5 回以上の反復測定を行った。

改良型シュライバーテスト (Muthukumarappan *et al.*, 1999a) と UW-Meltprofiler (Muthukumarappan *et al.*, 1999b) から得られる DOF によってメルト性を求めた。測定は 4 回繰り返し行った。

【蛍光顕微鏡】

Sutheerawattananonda *et al.* (1997) によって記述されたのプロセスチーズ中の脂肪小滴観測方法に従い脂肪の状態を用いた。チーズブロックの中心から観測するチーズをカットした。サンプルは剃刀刃を使用して薄切りにした。この切片を 0.1% (w/v) Nile Blue A (Sigma-Aldrich) で 1 min 染色し、ミリ Q 水で洗い流した後、水中に置いた。染色した切片は 4 °C に保管し、3 h 以内に蛍光顕微鏡 Axioskop 2 plus (Carl Zeiss) を用いて観測した。染色された脂肪は部分的に濃淡の差があり、明晰化のためグレイスケールで示した。

【組成分析】

水分は IDF 法 (1982) 脂肪は IDF 法 (1986) にて測定し、pH は差込型 pH メーター 420A (Orion Research) を使用し測定した。カルシウムおよびリンの全量、不溶性のカルシウムとリン濃度の測定は第4章と同様に (p. 58) 測定した。

【実験計画および統計分析】

第4章と同様に (p. 60) 溶融塩濃度と加熱保持時間がプロセスチーズのレオロジーと物理化学特性に及ぼす影響を調べるため、2 因子実験計画を選

択し、中心複合計画法(Mullen and Ennis, 1979)と応答曲面法(Montgomery, 2001)を使用した (Table 5-1)。データは Statgraphics program (version 5.1 plus, Manugistics) を使用し、多重ステップワイズ回帰分析を用いて統計処理した。従属変数は 2 次関数を用いて予測モデルを構築した上で、ステップワイズ回帰分析を使用して F 値 4 以下の有意差がない因子を排除し、応答曲面を作成した。

5-3 結果および考察

5-3-1 SHMP を使用したプロセスチーズサンプルの組成

チーズサンプルの pH は pH 5.50~5.63 とほとんど変わらず (Table 5-1) 水分も 37.3~38.0% (w/w) とチーズ試料間に大きな差が無かった (Table 5-1)。本研究におけるチーズ組成のわずかな違いはテクスチャー、レオロジーに大きな影響を及ぼさないと考えられる。

5-3-2 SHMP を使用したプロセスチーズのレオロジーおよびテクスチャー特性

Figure 5-1 に SHMP 濃度がプロセスチーズのレオロジー特性に及ぼす影響を示した。原料のナチュラルチェダーチーズのレオロジー特性も比較目的で示している。5~70 の温度変化において全てのチーズの G' 値は低下した。ナチュラルチーズと SHMP 濃度 1.50% と 2.75% (w/w) のプロセスチーズの G' 値は 70 以上から増加した。一方、SHMP 濃度 0.25% (w/w) のプロセスチーズは全ての温度帯で加熱することにより G' 値は下がった (Fig. 5-1a)。この高温度帯での G' 値の増加は第 4 章の TSC を使用したプロセスチーズでは見られなかった (Fig. 4-3a, p. 75)。50 以上において、LT 値は SHMP 濃度が増加すると減少した (Fig. 5-1b)。SHMP 濃度 2.75% のプロセスチーズは全温度帯において LT 値が 1 未満であった。LT 値が 1 未満のチーズサンプルは加熱流動性が見られないことが知られている (Lucey et al., 2003)。SHMP を 2.75% (w/w) 添加することにより強い耐熱性を有するプロセスチーズを作成できることが示唆された。

50 の LT 値と 70 の G' 値の応答曲面をそれぞれ Fig. 5-2a と Fig. 5-2d に示した。70 における G' 値は SHMP 濃度が増加すると共に増加し、これは溶融保持時間が長くなるほど顕著であった (Fig. 5-2a)。SHMP 濃度が高く、溶融保持時間が長いと 50 の LT 値は減少した。

TPA から得られる硬度の応答曲面を Fig. 5-2c に示した。SHMP 濃度が増加するとチーズの硬度は増加した。硬度は高い SHMP 濃度、長期保持時間において増加傾向にあり、第 4 章で示した TSC を使用したプロセスチーズと類似した傾向である。SHMP 濃度 2.75% のプロセスチーズはユニアクチャルコンプレッションにおいて、歪み率約 45% に破断ピークが観測された (Fig. 5-3)。これは原料のナチュラルチーズに類似したプロファイルであり、高濃度 SHMP のプロセスチーズが Brittle (硬く、脆い) であることを示している。一方、低濃度 SHMP には破断ピークは観測されなかった。Gupta *et al.* (1984) はユニアクチャルコンプレッションにおいて低濃度の SHMP を使用したプロセスチーズに破断点が観測されたことを報告している。しかしながら、彼らの研究ではプロセスチーズの pH 値は 5.2 以下と低い。第 3 章でも低 pH のプロセスチーズの破断点が観測されているように (Fig. 3-5, p. 52) タンパク質粒子間の強い凝集により破断点が観測されたと考えらえる。

プロセスチーズに使用する SHMP の添加量を増加させることで、硬度 (Fig. 5-2c) および 70 の G' 値 (Fig. 5-2d) が増加し、50 の LT 値 (Fig. 5-2a) が減少した。SHMP 濃度の増加による硬度の増加と LT 値の減少はカゼインの分散促進とカルシウムのキレート、イオン交換能といった条件の組み合わせに起因していると考えられる。SHMP のような溶融塩の重要な機能として、ナチュラルチーズの不溶性カゼイン構造体の分散能力がある。乳製品において、長鎖のポリリン酸塩はオルソリン酸塩や TSC と比較してカゼイン分散力が高いことが示唆されている (Lee *et al.*, 1986; Molins, 1991; Mizuno and Lucey, 2005)。乳への SHMP 添加は即座にカゼイン分散を引き起こす (Vujicic *et al.*, 1968)。プロセスチーズにおいても、チーズの pH が一定条件下では無いが、TSC、オルソリン酸塩と比べ SHMP を使用するとカゼイン分散 (または水和、膨潤) がより増加することが報告されている (Lee *et al.*, 1986; Guinee *et al.*, 2004)。また、ポリリン酸塩濃度の増加に伴いプロセスチーズの水溶性窒素量が増加し、カゼイン分散

が増大することが報告されている (Lee and Alais, 1980)。本章の研究では、高濃度の SHMP を添加することにより、溶融中にカゼインが完全に分散し、その後、冷却中に密な 3 次元構造を形成したことが推測された。

Figure 5-7 に溶融直後の溶融プロセスチーズのレオロジー特性を示す。低 SHMP 濃度 (0.25% [w/w]) では、80 保持中、G' 値はほとんど変化しなかった (Fig. 5-7a)。一方、高い SHMP 濃度では、80 保持中 G' 値は直線的に增加了。低い SHMP 濃度のチーズでは LT 値も変化が僅かで低い値を示した。溶融プロセスチーズの低 LT 値はカゼイン分散が弱い状態を示していると考えられる。高い SHMP 濃度のチーズは 80 保持中に LT 値が減少しているが、測定直後は非常に高い LT 値を示した (Fig. 5-2b)。高い SHMP 濃度の溶融チーズで認められる高い LT 値は、SHMP の添加量の増加により、カゼイン分散が増加することを示唆している。Dimitreli *et al.* (2005) は SHMP を溶融塩として使用した際、プロセスチーズ中のカゼイン分散が低いことを報告している。1~3% (w/w) の SHMP をチエダーチーズに添加したプロセスチーズの pH は 5 付近であり、他の代表的な溶融塩を添加したプロセスチーズに比べ、カゼインの等電点である pH 4.6 に近い。そのために pH 無調整の SHMP を使用したプロセスチーズのカゼイン分散が低い結果となったと考えられる。本研究で使用したすべてのチーズは一般的なプロセスチーズの pH である 5.6 に調整している。そのため、SHMP によるカゼイン分散が発生し、分散したカゼイン分子はその後、冷却中に細かなゲル構造体を形成し再結合することが推測された。(カゼイン再結合の一部は Fig. 5-7 の G' 値の增加でも明らかなように加熱保持中でも再結合が起きていると考えられる) Johnston and Murphy (1992) は乳に SHMP を添加することでカゼイン分散が増え、その乳を使用した酸凝固ゲルの物性が強固になったことを報告している。第 3 章、4 章の考察と同様、カゼインの分散度が高いほど、製品が硬くなり、架橋構造が密になるとされる。

5-3-3 SHMP を使用したプロセスチーズのメルト性

Figure 5-4 に溶融保持時間 10 min における各 SHMP 濃度のプロセスチーズの加熱中のメルト曲線を示した。プロセスチーズ原料に使用したナチュラルチー

ズのメルト曲線も比較目的で同時に示した。SHMP 濃度 0.25% (w/w) のチーズは他のチーズと比較して低温で溶解、流動したのに対し、SHMP 濃度 2.75% (w/w) のチーズは流動性が著しく乏しかった。DOF の応答曲面を Fig. 5-2b に示した。SHMP 濃度が増加すると DOF が有意に低下した。この現象は溶融時に高濃度の SHMP による強いカゼイン分散が発生し、分散したカゼイン分子が冷却中に細かな構造体に再配列したために生じたと考えられた。高濃度 SHMP のチーズでは加熱保持時間が長いほど DOF が低下した (Fig. 5-2b)。加熱攪拌保持によりプロセスチーズのメルト性が減少し、硬度が増加することが報告されている (Rayan *et al.*, 1980)。加熱攪拌保持することでカゼインの分散が促進され、冷却中に形成される構造が強固になる。しかしながら、低濃度の SHMP ではカゼイン分散が十分でなく、長時間の加熱攪拌保持をしてもメルト性に変化はなく、カゼイン分子の分散と再配列は起こらないことが考察された (Fig. 5-2b)。分散しないカゼインは長時間の加熱攪拌保持により熱凝集したことが考えられる。溶融後の加熱保持 (無攪拌) のレオロジー測定では、SHMP の添加濃度を増やすと溶融直後の LT 初期値が増加したが、その後、LT 値は減少し、G' 値は増加した (Fig. 5-7)。この現象は溶融直後の SHMP によるカゼインの分散と分散したカゼインの再配列を表していると考えられる。

5-3-4 SHMP を使用したプロセスチーズの乳化状態

異なる SHMP 濃度と溶融保持時間によって造られたプロセスチーズの脂肪球の顕微鏡写真を Fig. 5-6 に示した。第 4 章で示した TSC を使用したプロセスチーズの場合 (Fig. 4-8, p. 80) と同様に、脂肪が大きく合一した状態が最低濃度の SHMP においても観測された (Fig. 5-6a)。1.50 と 2.75% (w/w) 溶融塩を添加したチーズの脂肪は良好な乳化状態であり、脂肪球のサイズに大きな差は認められなかった (Fig. 5-6b, c)。1.50% (w/w) の溶融塩を添加したチーズにおいて溶融保持していないチーズ (溶融チーズが 80° に達した直後チーズクラッカーから取り出した) では大きな脂肪球が観測された (Fig. 5-6d)。同濃度で 10 min 溶融保持すると脂肪球は小さくなるが (Fig. 5-6e) それ以上の保持時間では、第 4 章で示した TSC を使用したプロセスチーズの場合 (Fig. 4-8) に比べて脂肪球サ

イズの大きな変化は認められなかった (Fig. 5-6f)。

低濃度の SHMP (0.25% [w/w]) では脂肪の乳化状態は悪く (Fig. 5-6) 脂肪を乳化させるための分散したカゼインが十分でなかったと考えられる。そのため、プロセスチーズは比較的柔らかく (Fig. 5-2c) メルト性が高かった (Fig. 5-2d)。脂肪球の均質化による構造強化について第 4 章 (p. 66) で考察したが、本研究では SHMP 濃度 1.50% (w/w) 以上、溶融保持時間 10 min 以上では乳化状態 (脂肪球サイズ) に劇的な変化はなく (Fig. 5-6) 脂肪の均質化以外の構造変化がプロセスチーズの物性に影響を及ぼしていることが示唆された。

5-3-5 不溶性カルシウムとリンの状態

チーズ中の全カルシウム量に対する不溶性カルシウム量の割合の応答曲面を Fig. 5-2e に示した。SHMP 濃度の増加と共に全カルシウム量に占める不溶性カルシウムの割合は増加した。溶融保持時間は不溶性カルシウム量に対し、有意な影響を及ぼさなかった。SHMP 濃度の増加と共にチーズ中の全リン量に対する不溶性リン量の割合は減少した (Table 5-2)。これは添加されたリンがチーズ内の水相部に水溶性塩として留まっていることを示している。添加した SHMP はリンを含んでいるため、SHMP 濃度が増加するとリン量も増加する。水相部に留まるリンの割合が多いが、チーズ中の不溶性リンの総量としては増加していたことが分かる (Table 5-2)。カルシウムの場合と同様に、溶融保持時間が不溶性リン量に対し、有意な影響を及ぼさなかった。

ポリリン酸塩は強いカルシウムキレート力を持っており、Van Wazer and Callis (1958) は溶融塩のキレート力を 長鎖リン酸塩 > トリポリリン酸塩 > ピロリン酸塩 > クエン酸塩 > オルソリン酸塩 と順位付けている。このことから SHMP の強いカルシウム結合力によりナチュラルチーズ中の CCP 架橋構造が崩壊し、カゼインの分散が促進することが考えられる。

高電荷のアニオンであるポリリン酸イオンはタンパク質のような長鎖高分子電解質の正電荷領域を引き付ける (Van Wazer and Callis, 1958)。本章の研究で使用したプロセスチーズでは、ポリリン酸塩とカゼインが結合し、カゼイン分子間の電荷の反発力が増加したことが推測される。リン酸塩を乳に添加すること

により乳がゲル化する場合があるが、SHMP は TSPP に比べてカゼインのゲル化効果が弱いことが報告されている (Mizuno and Lucey, 2007)。カゼインのゲル化を妨げている要因の一つとして、ポリリン酸塩は TSPP と比べ多電荷 (高電解質的性質) であるため、カゼイン間に電気的反発力が働くことが考えられる。

高濃度の SHMP を使用したチーズが硬く、メルト性が低くなる他の要因の一つとしてチーズの構造体内の CCP とは異なる新たなリン酸カルシウム架橋の形成が考えられる。Taneya *et al.* (1980) は電子顕微鏡による観察の結果、長い紐状タンパク質がポリリン酸ナトリウムを使用したプロセスチーズ中に認められたのに対し、TSC を使用したプロセスチーズ中では観測されなかったことを報告している。プロセスチーズ中に見られた長い紐状のカゼインはカゼイン間を架橋している新たなリン酸カルシウムの形成によるものである可能性がある。SHMP 濃度が増えるとプロセスチーズ中の不溶性カルシウムと不溶性リン量が増加した。pH 5.8 の乳タンパク質溶液に SHMP を添加するとカゼイン結合性カルシウムが増加することが報告されている (Mizuno and Lucey, 2005)。また、ポリリン酸塩が CCP のカルシウムに結合し (それによりカゼインミセルが崩壊する) 新たなリン酸カルシウム複合体が分散したカゼインと結合する (Odagiri and Nickerson, 1965; Mizuno and Lucey, 2005)。Lee and Alais (1980) はポリリン酸塩を使用するとプロセスチーズ中の不溶性リン量が高くなることを報告している。Johnston and Murphy (1992) はポリリン酸塩を添加した脱脂乳中に高濃度の水溶性カゼインを観測している。本研究のプロセスチーズは低濃度 SHMP 以外のチーズにおいて、高温度帯 (> 70) の G' 値增加が見られた (Fig. 5-1a)。Udayarajan *et al.* (2005) は高温でのナチュラルチーズの G' 値增加は加熱によるカゼイン間の新たなリン酸カルシウム架橋形成が起因していると提唱している。これらの事象から SHMP の添加によるカゼインの分散、加熱による新たなリン酸カルシウム架橋形成が発生したことが考えられた。

5-3-6 酸 - 塩基緩衝曲線で観測する CCP の状態

ナチュラルチーズと異なる SHMP 濃度を使用したプロセスチーズの酸 - 塩基緩衝曲線を Fig. 5-5 に示した。SHMP 濃度の増加と共に酸滴定時の緩衝ピークが

増加した。更にその緩衝ピークは SHMP 濃度の増加と共に低 pH 側にシフトすることが観測された。ナチュラルチェダーチーズの pH 4.8 近傍の緩衝曲線ピークはチーズ中に残存する CCP の溶解時のリン酸イオンの溶出に起因する(Lucey and Fox, 1993)。 Mizuno and Lucey (2005) は SHMP を加えた乳タンパク質溶液の酸 - 塩基滴定において、本研究の SHMP を使用したプロセスチーズの緩衝曲線と類似した傾向を報告しており、緩衝ピークの低 pH 側へのシフトは新型 CCP の形成に起因していると提唱している。また、ナチュラルチェダーチーズの逆滴定における pH 6 近傍の緩衝ピークは既往の研究と一致している (Lucey and Fox, 1993; Hassan *et al.*, 2004) が、SHMP 濃度の増加に伴い、プロセスチーズを逆滴定した際の pH 6 近傍の緩衝ピークは消滅した。 Lucey *et al.* (1993) は乳の酸滴定における緩衝曲線ピークの pH や形状の変化は本来の CCP の構造や組成の変化に起因していると提唱している。このことは本研究のプロセスチーズの緩衝曲線が SHMP を添加することによりチーズ構造体に存在するリン酸カルシウムの状態、濃度の変化を観測できることを示唆している。 SHMP を添加することによりチーズ中の CCP のカルシウムがキレートされ、CCP が喪失するのではなく、ヘキサメタリン酸塩がキレートされた CCP のカルシウムと結合し、新型 CCP を形成すると考えられる。

加熱攪拌保持による緩衝曲線の変化は不溶性カルシウムと不溶性リン量と同様に観測されなかった (data not shown)。 SHMP は強いカルシウムキレート力を持つため、80 ℃までに達する時点で SHMP によるカルシウムのキレート反応が終了していることも考えられる。

高温 (> 60 ℃) 下の水溶液中において、ポリリン酸塩はオルソリン酸塩に加水分解すると報告されている (Maurer-Rothmann and Scheurer, 2005)。高温度でのプロセスチーズの加熱保持時間により一部の SHMP は加水分解している可能性がある (Lee and Alais, 1980)。しかしながら、加熱保持時間はプロセスチーズ中の不溶性リン濃度に有意な影響を及ぼさなかった (Table 5-2)。また、冷却保管中の数日間にプロセスチーズ中のポリリン酸塩の加水分解が発生していると報告されている (Roesler, 1966) が、第 5 章に示す TSPP や DSP (data not shown) の酸 - 塩基滴定の緩衝曲線は SHMP とまったく異なることから、プロセスチーズ中の SHMP の加水分解レベルは水溶液中に比べて低いことが考えられる。

第4章で報告したTSCを使用したプロセスチーズとSHMPを使用した本章の結果を比較すると、すべての実験条件において50°のLT値とDOFの値は低かった。またTSCを使用したプロセスチーズの硬度(1,572~2,685 g)はSHMPの硬度(1,892~4,490 g)と比べ低かった。本研究ではこの物性の違いは、脂肪の乳化力の差ではなく、SHMPとチーズ中のカルシウムが結合して加熱攪拌中、または冷却中に形成される新たなCCPがカゼイン間を架橋し、緻密な構造を付与することにより生じることを提唱する。

Table 5-1 Values of independent variables of each experiment in coded and actual values for each central composite experimental design and composition of process cheese made with SHMP for each experimental treatment.

Treatment	Coded values		Actual values			Composition	
	ES	Holding time	ES concentration	Holding time	pH	Moisture	Fat
	concentration		(% [w/w])	(min)		(%)	(%)
1	0	0	1.50	10.0	5.52	37.61	32.40
2	- 1	- 1	0.62	2.90	5.56	37.96	32.81
3	0	0	1.50	10.0	5.53	37.76	32.18
4	+ 1	+ 1	2.38	17.1	5.50	37.85	31.71
5	+ 1	- 1	2.38	2.90	5.51	37.38	32.72
6	0	+ α^*	1.50	20.0	5.53	37.67	32.63
7	0	- α	1.50	0.0	5.62	37.94	32.09
8	- α	0	0.25	10.0	5.55	37.50	32.66
9	0	0	1.50	10.0	5.60	37.66	32.45
10	+ α	0	2.75	10.0	5.53	37.60	31.25
11	- 1	+ 1	0.62	17.1	5.63	37.31	32.21
12	0	0	1.50	10.0	5.58	37.60	31.68

ES: Emulsifying salt.

Table 5-2 Second-order polynomial models describing dependent variables in physicochemical properties of process cheese made with SHMP.

Dependent variables	Independent variables	Coefficient	R ² (adjusted) ¹	p-value
LT at 50°C	Constant	0.9776	0.86	< 0.001
	[ES]***	-0.2539		
	Holding Time**	-0.1149		
DOF	Constant	73.75	0.87	< 0.001
	[ES]***	-9.445		
	Holding Time*	-2.901		
	[ES]×Holding Time*	-4.114		
	[ES] ² *	-3.490		
TPA Hardness	Constant	2517	0.96	< 0.001
	[ES]***	881.6		
	Holding Time*	134.0		
	[ES]×Holding Time*	220.8		
	[ES] ² ***	380.1		
Chewiness	Constant	1645	0.88	< 0.001
	[ES]***	601.7		
	[ES] ² †	150.5		
G' at 70°C	Constant	31.19	0.88	< 0.001
	[ES]***	50.26		
	Holding Time†	10.20		
	[ES]×Holding Time*	19.08		
	[ES] ² *	28.59		
Insoluble P (mg) per 100 g of cheese	Constant	624.5	0.87	< 0.001
	[ES]***	91.80		
	[ES] ² *	-30.27		
Insoluble P % of total P	Constant	75.48	0.98	< 0.001
	[ES]***	-8.80		
Insoluble Ca % of total Ca	Constant	80.99	0.92	< 0.001
	[ES]**	3.684		
	[ES] ² *	-1.420		
	Holding Time ² *	-0.8650		
Schreiber Melt Area	Constant	21.87	0.92	< 0.001
	[ES]***	-5.500		
	Holding Time*	-1.670		
	[ES]×Holding Time*	-2.25		
	[ES] ² ***	1.697		

¹R² values were adjusted for the degree of freedom.

†, *, **, and *** indicate significant differences at P < 0.1, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001, respectively.

[ES]: Emulsifying salt concentration.

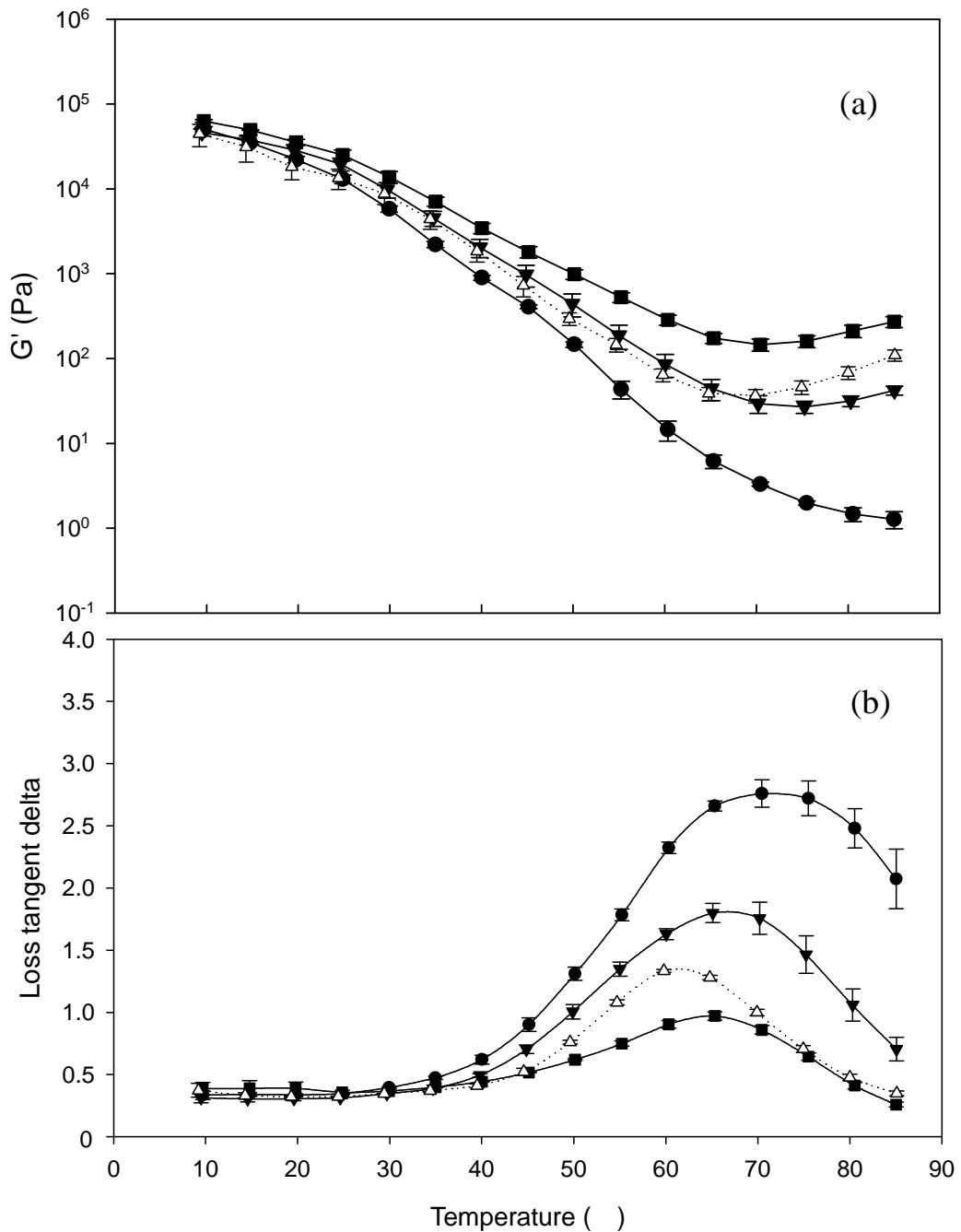


Fig. 5-1 Storage modulus, G' (a) and loss tangent (b), as a function of temperature for process cheeses made with various concentrations of SHMP and the natural Cheddar cheese used as the cheese making (Δ): SHMP concentrations 0.25% (w/w) (●), 1.50% (w/w) (▼), 2.75% (w/w) (■). Holding time was 10 min for all process cheese samples. The data represents means ($n = 3$) while the error bars represent the standard deviation.

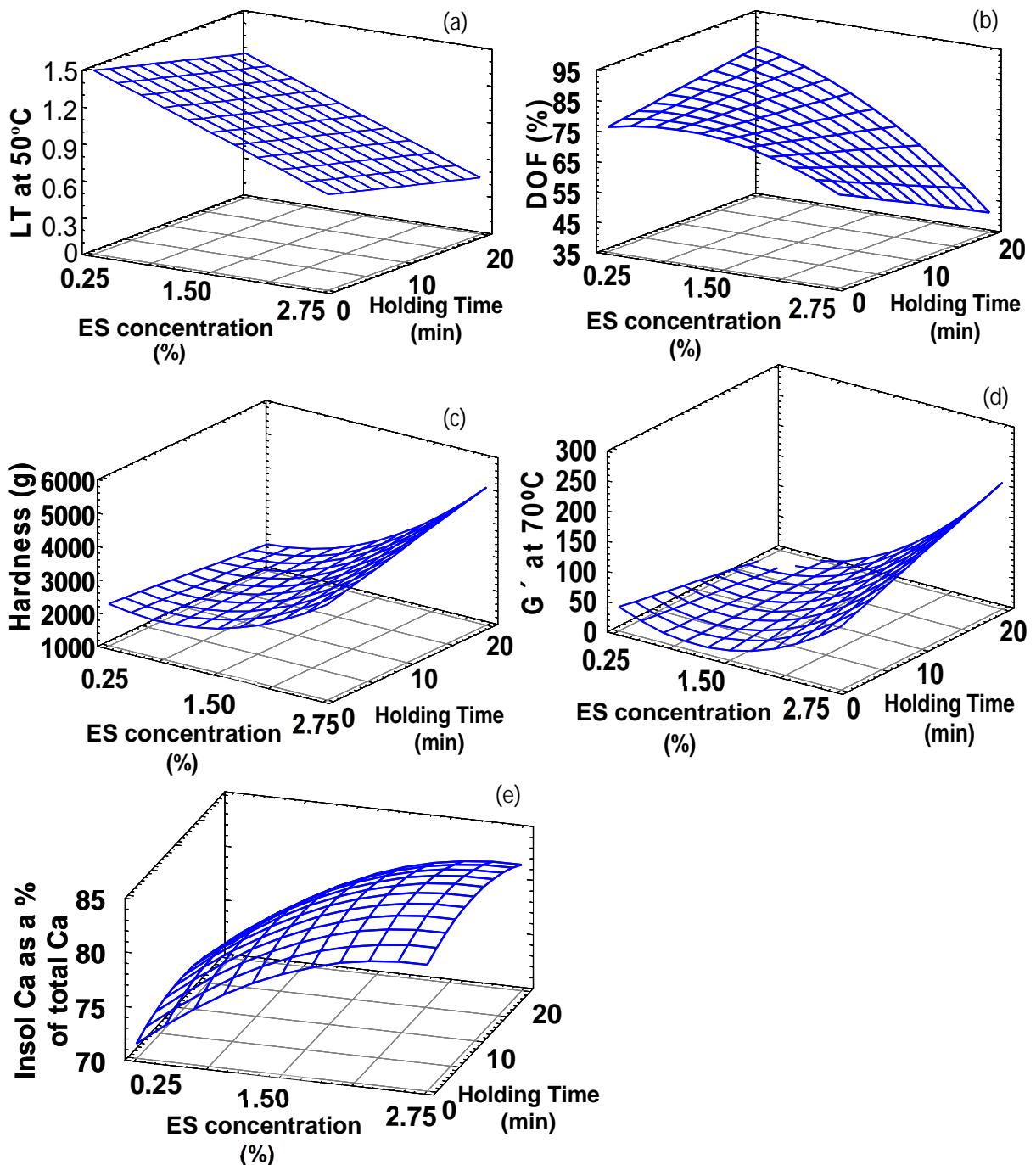


Fig. 5-2 Response surface plots for the effect of concentrations of ES and holding times on loss tangent (LT) at 50°C (a), degree of flow (DOF) at 60°C from the UW-Meltprofiler, (b), hardness (c), storage modulus (G') at 70°C (d) and insoluble Ca as a % of total Ca in process cheese (e).

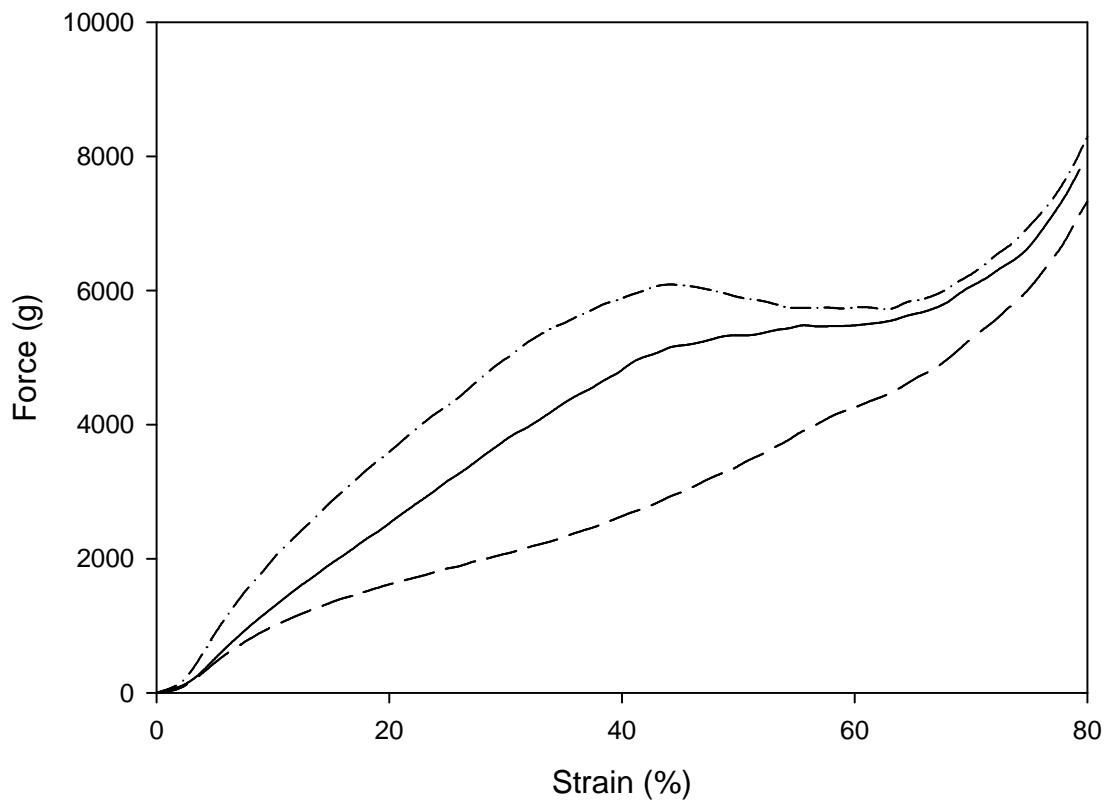


Fig. 5-3 Stress-strain curves during uniaxial compression of process cheeses to 20% of the original height of cheese made with various concentrations of SHMP: SHMP concentration 0.25% (w/w) (dashed line), 1.50% (w/w) (solid line), 2.75% (w/w) (dashed-dotted line). Holding time was 10 min for all process cheese samples. The data represents the means ($n \geq 5$) while the error bars represent the standard deviation.

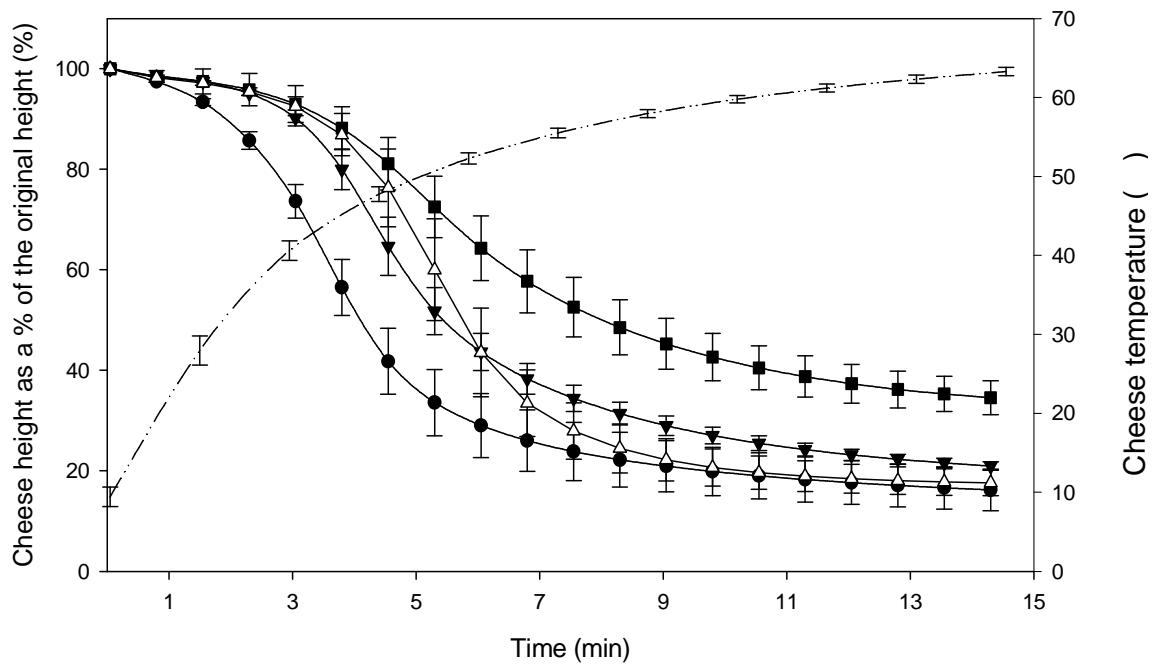


Fig. 5-4 Changes in cheese height as a % of the original height from the UW-Meltprofiler for process cheese made with various concentrations of SHMP and natural Cheddar cheese used as an ingredient (Δ), SHMP concentrations 0.25% (w/w) (\bullet), 1.50% (w/w) (\blacktriangledown) and 2.75% (w/w) (\blacksquare). Cheese temperature is indicated by a dashed line. The data represents the means ($n = 3$) while the error bars represent the standard deviation.

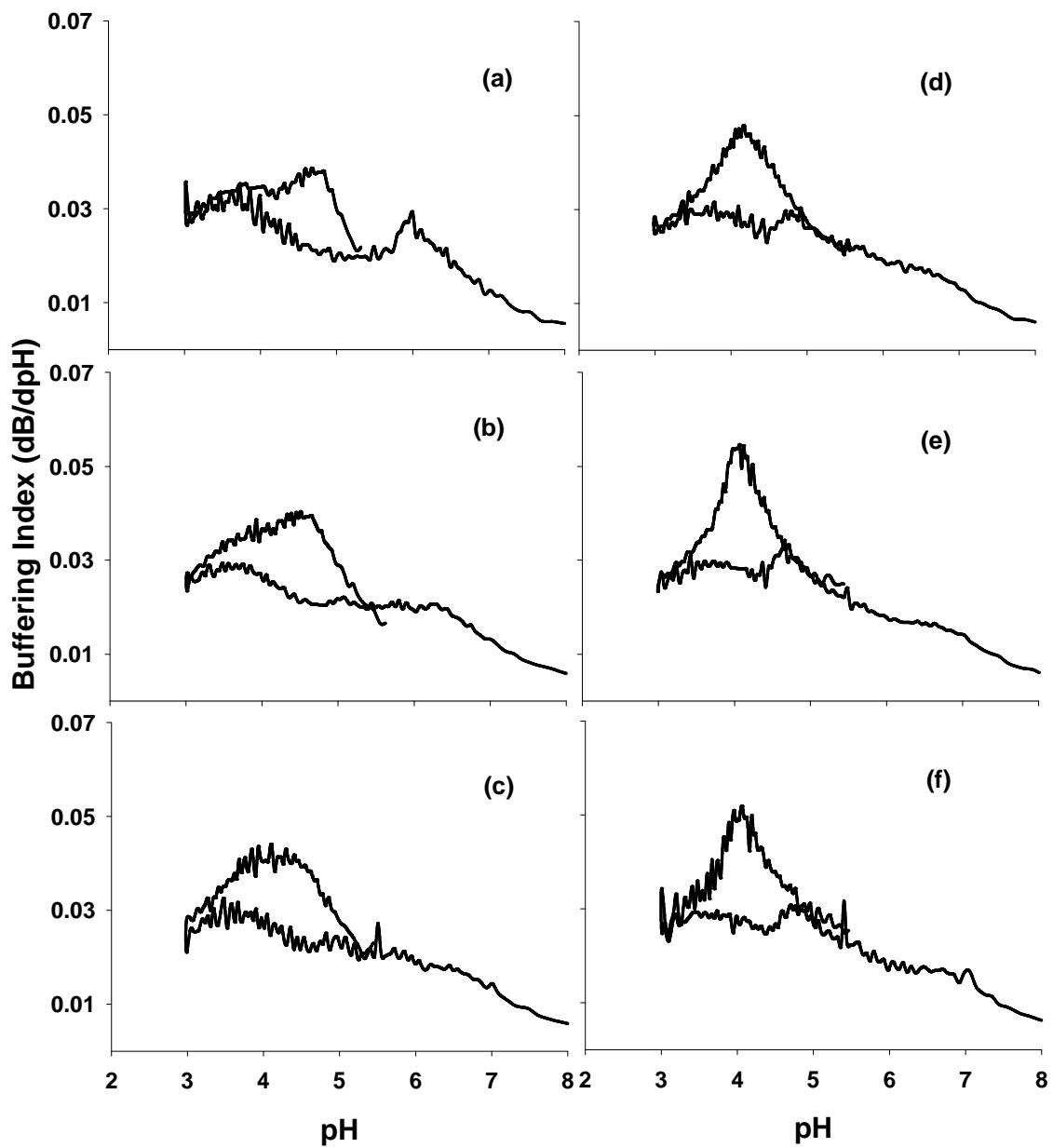


Fig. 5-5 Acid-base buffering curves for natural Cheddar cheese as the cheese making ingredient (a) and process cheeses made with various SHMP concentrations 0.25% (w/w) (b), 0.62% (w/w) (c), 1.50% (w/w) (d), 2.38% (w/w) (e) and 2.75% (w/w) (f).

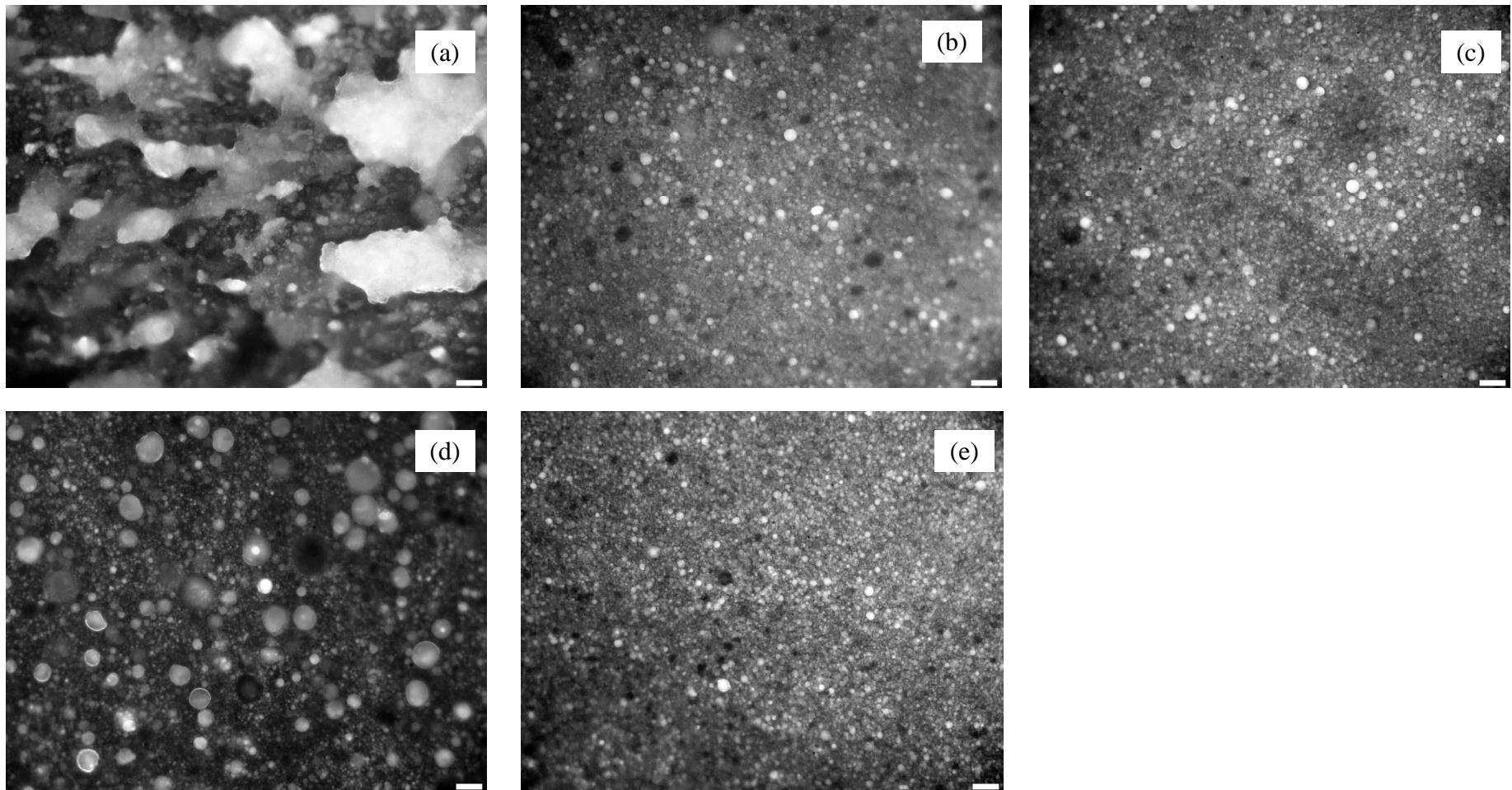


Fig. 5-6 Fluorescence micrographs showing fat droplets as light areas against a dark background (protein) for process cheese made with various concentrations of SHMP and with the same holding time (10 min): SHMP concentration: 0.25% (w/w) (a), 1.50% (w/w) (b) and 2.75% (w/w) (c) or cooked for various holding times and same concentration of SHMP (1.50% [w/w]): Holding time, 0 min (d), 10 min (b) and 20 min (e). Scale bar = 50 μ m.

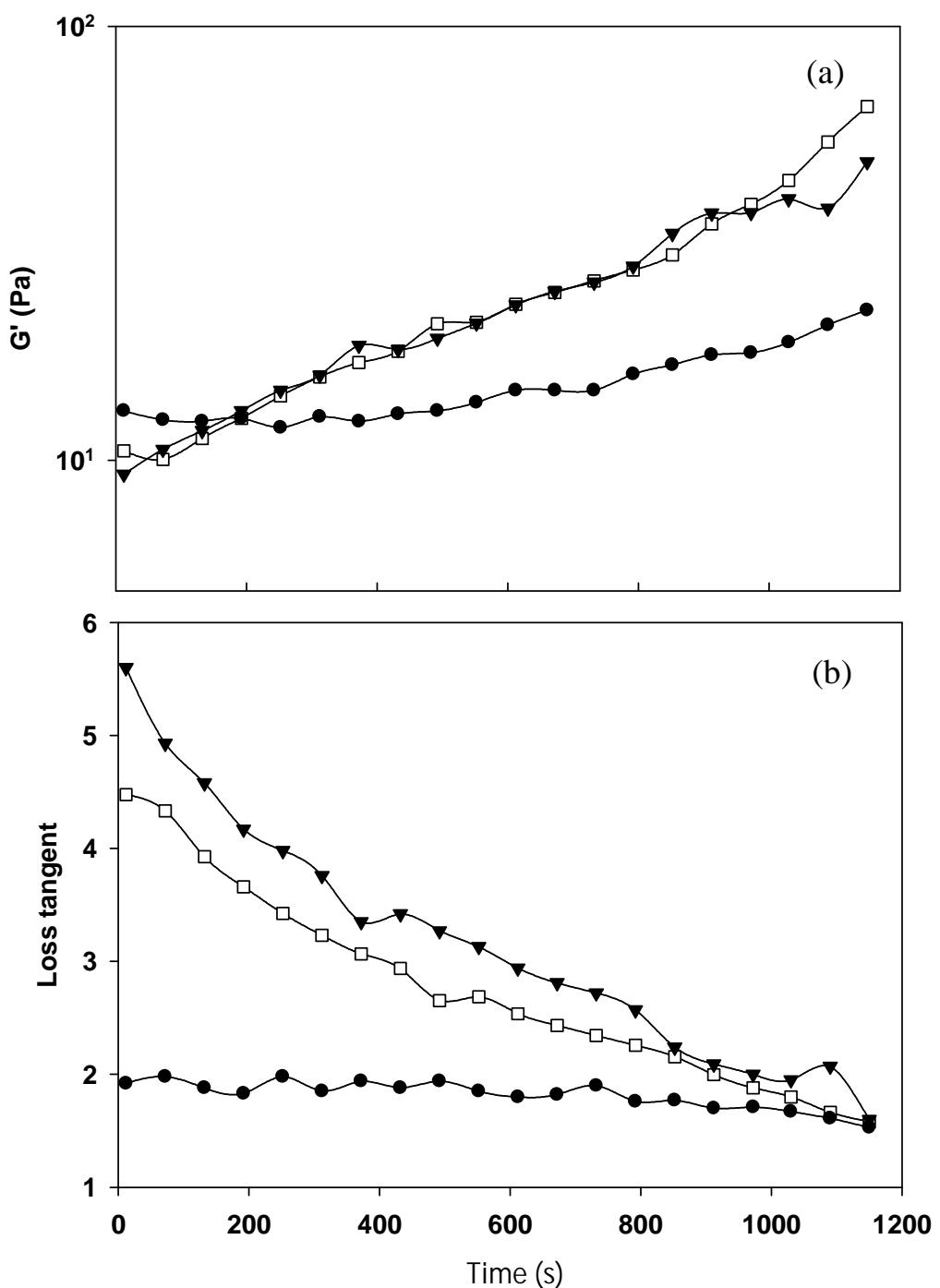


Fig. 5-7 Storage modulus, G' , (a) and loss tangent, (b) for melted process cheeses made with various concentrations of SHMP 0.25% (w/w) (), 1.50% (w/w) () and 2.75% (w/w) () during holding at 80°C. The data for 1.50% SHMP level represents means ($n = 4$). Other curves are single tests. Rheological measurements were started 4 min after process cheese taken out from a cooker at 80°C for 10 min.

5-4 第5章の結論

低濃度の SHMP は加熱攪拌保持を十分に与えてもカゼインネットワークを効果的に分散させることはできなかった。その結果、脂肪は乳化状態が弱く、プロセスチーズは柔らかくメルト性が高かった。一方、高濃度の SHMP を添加し、加熱保持時間が長いプロセスチーズは硬くメルト性が低かった。溶融中にカゼインの分散が促進し、細かなネットワークが冷却中に形成されたことが考えられる。さらに SHMP の添加によりナチュラルチーズに見られる CCP 緩衝ピークのシフトが見られ、不溶性カルシウムおよび不溶性リンの濃度が増加した。このことから、新たなリン酸カルシウム複合体がカゼイン間を架橋し、細かな紐状蛋白質のネットワーク形成することで TSC には観測できない硬さ、低いメルト性が発現したことが示唆された。

第 6 章 ピロリン酸四ナトリウム濃度と溶融保持がプロセスチーズ中のカゼイン間相互作用に及ぼす影響

6-1 序

TSPP はカルシウムキレート剤として精肉の結着剤、歯磨き粉の歯石除去剤、プロセスチーズの乳化剤等に使用されている。近年、TSPP の緩衝能力、カルシウムキレート力、カゼイン分散能力についての研究が報告されている (Dimitreli *et al.*, 2005; Cunha and Viotto, 2010), Lucey *et al.* (2011) は TSPP が強い緩衝作用、クリーミング力、中程度のカルシウム結合力を有していることを示唆している。TSPP をプロセスチーズ、アナログチーズに添加することにより pH が高くなることが報告されている (Gupta *et al.*, 1984; Cavalier-Salou and Cheftel, 1991; Dimitreli *et al.*, 2005)。Mizuno and Lucey (2007) は pH 5.8 に調整した乳タンパク質溶液を使用しカゼインの物理的特性に対する TSPP の影響を調べてあり、乳タンパク質溶液のゲル化が TSPP とカルシウムが関係していると提唱している。しかしながら、プロセスチーズに TSPP を使用した際のカルシウムの状態への影響に関する研究はほとんどない。

本章では pH 値の違いによる影響を避けるため、一定 pH に調整し、TSPP 濃度、溶融保持時間がプロセスチーズのレオロジー、テクスチャー特性に及ぼす影響とカルシウムの状態を調査した。

6-2 材料および方法

【材料】

第 4 章 (p. 54) と同様に、同一のチーズ工場から供給された 4 ヶ月熟成のチeddarチーズ (水分、37% ; 脂肪、34% ; タンパク質、26% [w/w] ; カルシウム、669 mg/100 g, Alto Dairy Cooperative) を使用した。溶融塩として TSPP (Tetrasodium pyrophosphate, ICL Performance Products LP, St. Louis, MO, USA) を

添加水投入後、固まらないように分散させながら予備攪拌時に投入した。pH 調整剤として 50% (w/v) の水酸化ナトリウム溶液と 88% (w/w) 乳酸 (Fisher Scientific) を使用した。

【プロセスチーズ製造方法】

プロセスチーズは第 4 章 (p. 55) と同様の製造条件で、ブレンテックツインスクリュークッカー (Blentech Corp.) を使用して溶融した。ミキシング中最終製品の pH が 5.6 になるように pH 調整剤を加えた。実験計画に基づき (Table 6-1) 溶融塩を添加し、溶融保持した。冷却後、プロセスチーズブロックをバキュームパックして 5 に保管した。すべての分析は製造後 7 日後に実施した。

【レオロジー測定】

プロセスチーズのレオロジー特性は動的小振幅振動レオロジーを行い、第 4 章と同様の方法 (p. 55) で測定を行った。貯蔵弾性率 (G') と損失正接 (LT) を測定する目的でチーズを 5~85 に 1 /min の速度で加熱しながら周波数 0.08 Hz、歪み率 0.5% をプロセスチーズ試料に与えた。

【酸-塩基滴定法】

第 4 章と同様の方法 (p. 56) で酸-塩基滴定を行った。8.0 g の粉碎試料に 40 mL の蒸留水を加え均質化したプロセスチーズ懸濁液を滴定に使用した。この懸濁液を 0.5 N 塩酸を用いて pH 3.0 まで滴下し、その後 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 3.0~8.0 に逆滴定した。緩衝能力指数は Hassan *et al.* (2004) の計算法で算出し、pH に対する緩衝能力指数をグラフ化した。反復測定を 3 回実施し、個々の滴定カーブが異なっていた場合は、再測定を実施した。

【テクスチャープロファイル分析、ユニアクチャルコンプレッション、メルト性】

TA-XT2 テクスチャーアナライザー (Texture Technologies Corp.) を使用し、テクスチャープロファイル分析 (TPA) とユニアクチャルコンプレッションを実施した。第 4 章と同様に (p. 57) 高さ 17.5 mm、直径 16 mm の試料をプロセス

チーズブロックからコルクボアラーで抜き取った。TPA テストでは元の高さの 80% 壓縮、ユニアクチャルコンプレッションでは元の高さの 20%まで圧縮した。共に圧縮速度は 0.8 mm/s、サンプル温度は 5 °C、5 回以上の反復測定を行った。改良型シュライバーテスト(Muthukumarappan *et al.*, 1999b)と UW-Meltprofiler (Muthukumarappan *et al.*, 1999a)から得られる DOF によってメルト性を求めた。

【成分分析】

水分は IDF スタンダード (1982)、脂肪は IDF スタンダード (1986) に定められた測定法に従い測定した。pH は差込型 pH メーター 420A (Orion Research) を使用し、カルシウムとリンの全量、不溶性カルシウムとリン濃度の測定は第 4 章と同様に (p. 58) 測定した。また、不溶性カルシウムとリンの測定の際、プロセスチーズ懸濁液を遠心分離後、発生した沈殿した不溶性分画 (ペレット) の重量をカゼイン解膠度 (水和分散) の指標として測定した (Cunha and Viotto, 2010)。

【実験計画および統計分析】

第 4 章と同様に (p. 60) 溶融塩濃度と加熱保持時間がプロセスチェダーチーズのレオロジーと物理化学特性に及ぼす影響を調べるため、2 因子実験計画を選択し、中心複合計画法 (Mullen and Ennis, 1979) と応答曲面法 (Montgomery, 2001) を使用した (Table 6-1)。得られた結果は Statgraphics program (version 5.1 plus, Manugistics) を使用し多重ステップワイズ回帰分析にて分析した。従属変数は 3 次関数を用いて予測モデルを構築し、F 値 4 以下の有意差がない因子を排除するためにステップワイズ回帰分析を使用し、応答局面を作成した。

6-3 結果および考察

6-3-1 TSPP を使用したプロセスチーズサンプルの組成

すべてのプロセスチーズサンプルにおいて製造中および保管中に脂肪遊離、水分分離は見られなかった。pH の範囲は 5.56~5.67、水分の範囲は 37.5~40.3% (w/w) であり、サンプル間の pH 幅は狭く、チーズの機能特性に大きな影響を及ぼすことはないと考えられた (Table 6-1)。Treatment No. 12 のみ高い水分値 (40.3% [w/w]) を示したが、このサンプルは実験計画における 4 回繰り返しているセンターポイントの 1 つであり、高い水分値に影響する結果のずれは統計的な因子となって結果に反映すると考えられた。

6-3-2 TSPP を使用したプロセスチーズのレオロジー、テクスチャーパラメータ

溶融塩の濃度がプロセスチーズのレオロジー特性に及ぼす影響を Fig. 6-1 に示した。すべて加熱保持時間 10 min のサンプルである。比較対象としてナチュラルチーズのレオロジー特性も同時に示した。低温度 (< 30 °C) において G' 値と LT 値に大きな差は見られなかった。35~85 °C では低溶融塩濃度 (0.25% [w/w]) のプロセスチーズが最も低い G' 値を示し、約 70 °C までナチュラルチェダーチーズの G' 値と同様な値を示した。70 °C 以上では、ナチュラルチーズの G' 値は上昇するのに対し、TSPP 0.25% (w/w) のプロセスチーズの G' 値は減少した。40 °C 以上では、TSPP 1.50% (w/w) のプロセスチーズが最も高い G' 値を示しており、他の TSPP 濃度のチーズの G' 値が低下するのに対し、温度が上がってもほとんど変化しなかった (Fig. 6-1a)。40 °C において 1.50% (w/w) の溶融塩のプロセスチーズの LT が最も低く、2.75% の溶融塩濃度のチーズが最も高い LT 値を示した。

レオロジー特性と物性における溶融塩濃度と加熱保持時間の影響の統計分析結果を Table 6-2 に示した。70 °C の G' 値と 60 °C の LT 値に高い予測モデルが得られた(それぞれ $R^2 = 0.81$ 、 $R^2 = 0.98$)。溶融保持時間は G' 値、LT 値に有意な影響を及ぼさなかった。70 °C の G' 値と 60 °C の LT 値の応答曲面プロットをそれぞれ Fig. 6-2a、Fig. 6-2b に示した。溶融塩濃度が上がるにつれ、70 °C の G' 値の応答

曲面プロットは最初増加するが、約 1% (w/w) 濃度を過ぎると 70° の G' 値は減少した (Fig. 6-2a)。60° の LT 値は逆の傾向がみられ、TSPP 濃度の増加に伴い、LT 値が下降し、溶融塩濃度 1% (w/w) 付近から上昇した (Fig. 6-2b)。これは、TSPP 1% (w/w) 付近でプロセスチーズが加熱されても弾性構造体を保っていることを示している。しかしながら、高温度域で大きな物性差が認められたにもかかわらず、TPA の硬度は統計的に有意な予測モデルが見られなかった ($R^2 = 0.51$)。Udayarajan *et al.* (2005) はナチュラルチーズのレオロジー測定において、70° 以上の高温度で G' 値の増加を報告しており、加熱による新たな CCP の形成に因ると示唆した。特定濃度 (約 1% [w/w]) の TSPP を使用したプロセスチーズが加熱時の高温度で高い G' 値を示したことは、加熱時にのみ発現する架橋構造が存在する可能性があることを示唆している。

6-3-3 TSPP を使用したプロセスチーズのメルト性

Figure 6-3 に UW メルトプロファイラーで測定した同じ溶融保持時間 (10 min) で異なる TSPP 濃度のプロセスチーズのメルト曲線を示した。比較目的でナチュラルチーズのメルト曲線も同時に示した。TSPP 0.25% のプロセスチーズは他のサンプルに比べ低い温度で軟化し、TSPP 1.50% のプロセスチーズは高温で高い耐熱性を示した。UW メルトプロファイラーにより測定した 60° の DOF ヒュライバーメルトエリアにおいて高い決定係数を有する予測モデルが得られた (それぞれ $R^2 = 0.93, 0.88$)。60° の DOF の応答曲面は TSPP 濃度約 1% (w/w) で最も低いメルト性を示した (Fig. 6-2c)。同様な傾向がシュライバーメルトエリアでも得られた (Fig. 6-2d)。Savello *et al.* (1989) はチーズの代わりにレンネットカゼインを原料としたモデルプロセスチーズにおける異なる溶融塩の影響について研究を行い、TSPP の添加によりモデルチーズの耐熱性が高くなることを報告した。一方、レンネットカゼインの代わりに酸カゼインを使用した際、TSPP を添加したモデルチーズは高いメルト性を示した。彼らは TSPP のカルシウムキレートが弱く、カゼインを分散できないためと結論づけていたが、TSPP のカルシウムキレート力の強さは多く報告されている (Van Wazer and Callis, 1958; Heide, 1966; Lucey *et al.*, 2011)。本研究では、カルシウムを含むレンネットカゼ

インを原料としたチーズでは、“カゼイン間にピロリン酸カルシウム複合体の架橋構造が形成されることにより高い耐熱性を発現し、一方カルシウム量の少ない酸力ゼインを原料としたチーズでは、架橋構造が形成されなかった”という仮説を立てた。

6-3-4 TSPP を使用したプロセスチーズのカルシウムとリンの状態

プロセスチーズの不溶性カルシウム濃度と TSPP 濃度において高い決定係数 ($R^2 = 0.79$) を有する予測モデルが得られた (Table 6-2)。全カルシウム量に対する不溶性カルシウム割合の応答曲面を Fig. 6-4b に示した。TSPP の濃度が高くなると共に不溶性カルシウム濃度は増加した。Cavalier-Salou and Chaftel (1991) はアナログチーズに TSPP を添加することによりある種の不溶性リン酸カルシウムが形成されることを示唆した。TSPP は強いカルシウム結合力をを持つことが報告されており (Van Wazer and Callis, 1958; Heide, 1966; Lucey *et al.*, 2011) 本章で示した TSPP 添加に伴う不溶性カルシウムの増加は、ピロリン酸カルシウム形成のためだと考えられる。不溶性リン量、および全リン量に対する不溶性リン割合の予測モデルの決定係数はそれぞれ $R^2 = 0.91, 0.68$ であった (Table 6-2)。不溶性リン量は TSPP 濃度と共に増加し、高い TSPP 濃度で増加速度が高くなつた (Fig. 6-4c)。不溶性リン量の増加は、ピロリン酸塩がカルシウムと結合し不溶化したためと考えられる。不溶性リンを全リン量に占める割合で表すと、TSPP 濃度の増加と共に不溶性リンの割合が減少した (Fig. 6-4d) が、これは添加した溶融塩としてのリンが水相部に溶け込んでいることを示しており、第 5 章の SHMP をプロセスチーズに添加した際に観測されたもの (Table 5-2, p. 95) と同じ傾向が見られる。1% (w/w) 以上の TSPP 添加により、プロセスチーズのメルト性が増加し、G' 値が低下した。これはアニオンである水溶性ピロリン酸塩濃度の増加はプロセスチーズ中の静電気的斥力を促進したためとも考えられる。

6-3-5 酸-塩基緩衝曲線によるカルシウムの状態変化

異なる TSPP 濃度のプロセスチーズの酸-塩基滴定曲線を Fig. 6-5 に示した。ナチュラルチーズの酸-塩基緩衝曲線も比較対象として Fig. 6-5a に示した。0.25% (w/w) の TSPP の添加により、アルカリによる逆滴定での pH 6 付近の緩衝ピークが消失した (Fig. 6-5b)。ナチュラルチーズに存在する本来の不溶性リノ酸カルシウムの状態や形状が微量の TSPP 添加によって変化したことが考えられた。TSPP 濃度が増加するにつれて、逆滴定における pH 4~5 において新たな緩衝ピークが見られた。TSPP を添加した乳タンパク質溶液においても同様な傾向が報告されている (Mizuno and Lucey, 2007; Ozcan *et al.*, 2008)。これらの研究ではこの緩衝ピークの変化は不溶性ピロリン酸カルシウムの緩衝作用によることを提唱している。溶融塩濃度の増加による全カルシウムに対する不溶性カルシウム割合の増加は、TSPP によるカルシウムのキレートとピロリン酸カルシウムの形成に起因している。TSPP 濃度の増加と共に酸-塩基緩衝曲線で見られる pH 4~5 のピークの増加 (Fig. 6-5) は不溶性ピロリン酸カルシウムの形成により生じたことが示唆される。TSPP を乳に添加することにより、ピロリン酸カルシウムが新たな CCP となり、架橋構造をカゼイン間に形成することが推測されており (Mizuno and Lucey, 2005, 2007)。本章の研究でも同様に TSPP がカルシウムと結合し、カゼイン間を架橋することが考えられた。

6-3-6 TSPP を使用したプロセスチーズのカゼインの状態

プロセスチーズ懸濁液を遠心分離処理した不溶性分画 (ペレット) 量は高い決定係数 ($R^2 = 0.96$) を有する予測モデルが得られた (Table 6-2)。ペレット量の応答曲面はおよそ 1% (w/w) の溶融塩濃度で増加していることを示しており、カゼイン解膠度が低いことを表している (Fig. 6-4a)。一方、高い溶融塩濃度ではペレット量が下がり、カゼイン解膠度が高いことを示している。Kawasaki (2008) はクリーミングによって耐熱性が高くなったプロセスチーズは不溶性分画量が高くなることを報告しており、不溶性カゼインが新たなネットワークを作ることを示唆している。1% (w/w) の TSPP 濃度ではメルト性が低く、ペレッ

ト量が高いことから、不溶性カゼインが新たなネットワークを形成したことが考えられた。

カゼイン間の相互作用は引力と斥力のバランスとしてみることができる (Horne, 1998)。チーズ中の引力には疎水性相互作用、リン酸カルシウム架橋、電荷による静電気的結合、水素結合がある (Lucey *et al.*, 2003)。チーズ中の引力と斥力のバランスは特定濃度の TSPP によって大きく変化したことが推測される。1% (w/w) 以下の TSPP の添加は十分にカゼインを分散させ、再加熱後も脂肪遊離は見られなかった。Mizuno and Lucey (2007) は乳タンパク質溶液における TSPP の影響について、特定濃度の TSPP の添加は強くカゼインを分散させるが、常温保持することによってゲル化が生じることを報告している。このゲル化のメカニズムはピロリン酸カルシウムを介したカゼイン間架橋の形成または静電気的斥力の減少によるものであると考察している (Mizuno and Lucey, 2007)。本章で示した約 1% (w/w) の TSPP 添加によるプロセスチーズの耐熱性付与は同様なメカニズムの可能性がある。分散したカゼインに結合したピロリン酸カルシウム複合体は電荷の斥力を減少させ、分散したカゼインの疎水領域間の疎水結合を促進しているとも考えられる。

第 4 章の TSC、第 5 章の SHMP の研究において、溶融塩濃度がプロセスチーズの特性に対して TSPP のような複雑な影響を及ぼすことはなかった。これら 2 つの溶融塩では溶融塩濃度の増加と共に G' の値は増加し、メルト性は減少した。一方、TSPP を使用したプロセスチーズは、他の溶融塩 (TSC, SHMP) では見られなかった高い溶融塩濃度でのメルト性増加が見られた。Mizuno and Lucey (2007) は特定濃度の TSPP の添加によりゲル化した乳タンパク質溶液が、高い濃度の TSPP ではゲル化しなかったことを報告している。これは、アニオン電荷である高濃度の TSPP が負電荷に帯電しているカゼイン分子に対し静電気的斥力が働いていると提唱した。

本章においても過剰に形成したピロリン酸カルシウムと、水相部のピロリン酸アニオンがカゼイン分子に対し静電気的斥力が働いたために、高濃度の TSPP においてメルト性が増加したことを提唱する。

Table 6-1 Values of independent variables of each experiment in coded and actual values for each central composite experimental design and composition of process cheese made with TSPP for each experimental treatment.

Treatment	Coded values		Actual values			Composition	
	ES	Holding time	ES concentration	Holding time	pH	Moisture	Fat
	concentration		(% [w/w])	(min)		(%)	(%)
1	0	0	1.50	10.0	5.56	39.65	32.40
2	- 1	- 1	0.62	2.90	5.62	39.51	32.81
3	0	0	1.50	10.0	5.65	38.43	32.18
4	+ 1	+ 1	2.38	17.1	5.67	37.50	31.71
5	+ 1	- 1	2.38	2.90	5.65	38.01	32.72
6	0	+ α^*	1.50	20.0	5.66	38.50	32.63
7	0	- α	1.50	0.0	5.60	38.89	32.09
8	- α	0	0.25	10.0	5.59	39.53	32.66
9	0	0	1.50	10.0	5.63	38.75	32.45
10	+ α	0	2.75	10.0	5.66	39.11	31.25
11	- 1	+ 1	0.62	17.1	5.61	39.93	32.21
12	0	0	1.50	10.0	5.60	40.31	31.68

ES: Emulsifying salt.

Table 6-2 Polynomial models describing dependent variables in physicochemical properties of process cheese made with TSPP.

Dependent variables	Independent variables	Coefficient	R ² (adjusted) ¹	p-value
G' at 70°C	Constant	584.1	0.81	< 0.001
	[ES]**	-663.3		
	[ES] ² *	-247.8		
	[ES] ³ *	338.7		
LT at 60°C	Constant	0.5761	0.98	< 0.001
	[ES]*	0.6352		
	[ES] ² ***	0.4761		
	[ES] ³ ***	-0.2287		
DOF	Constant	37.25	0.93	< 0.001
	[ES]***	34.50		
	[ES] ² **	15.17		
	[ES] ³ ***	-17.40		
Schreiber melt area	Constant	12.96	0.88	< 0.001
	[ES]**	7.761		
	[ES] ² *	4.084		
	[ES] ³ *	-4.949		
Pellet weight	Constant	7.791	0.96	< 0.001
	[ES]***	-7.396		
	[ES] ³ *	2.908		
	[Holding Time] ² **	-0.4284		
Insoluble Ca % of total Ca	Constant	82.87	0.79	< 0.001
	[ES]***	7.002		
Insoluble P (mg) per 100 g of cheese	Constant	570.3	0.91	< 0.001
	[ES]***	134.1		
	[ES] ² †	27.92		
Insoluble P % of total P	Constant	73.33	0.68	< 0.005
	[ES]**	-4.184		
	[ES] ² **	4.887		

¹R² values were adjusted for the degree of freedom.

†, *, **, and *** indicate significant differences at P < 0.1, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001, respectively.

[ES]: Emulsifying salt concentration.

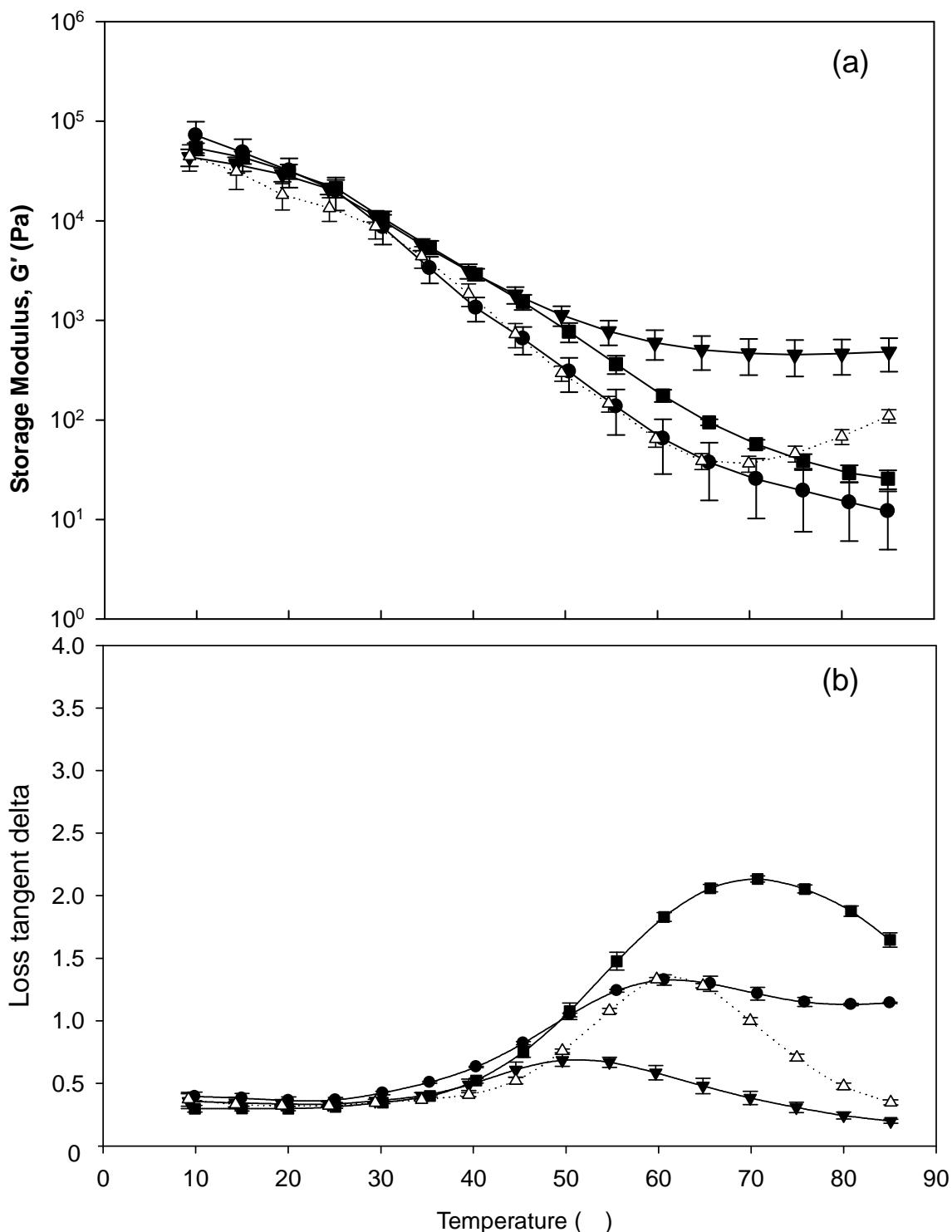


Fig. 6-1 Storage modulus, G' (a) and loss tangent (b), as a function of temperature for process cheeses made with various concentrations of TSPP and natural Cheddar cheese used as the cheese making (): TSPP concentrations 0.25% (w/w) (), 1.50% (w/w) (), 2.75% (w/w) (). Holding time was 10 min for all process cheese samples. The data represents means ($n = 3$) while the error bars represent the standard deviation.

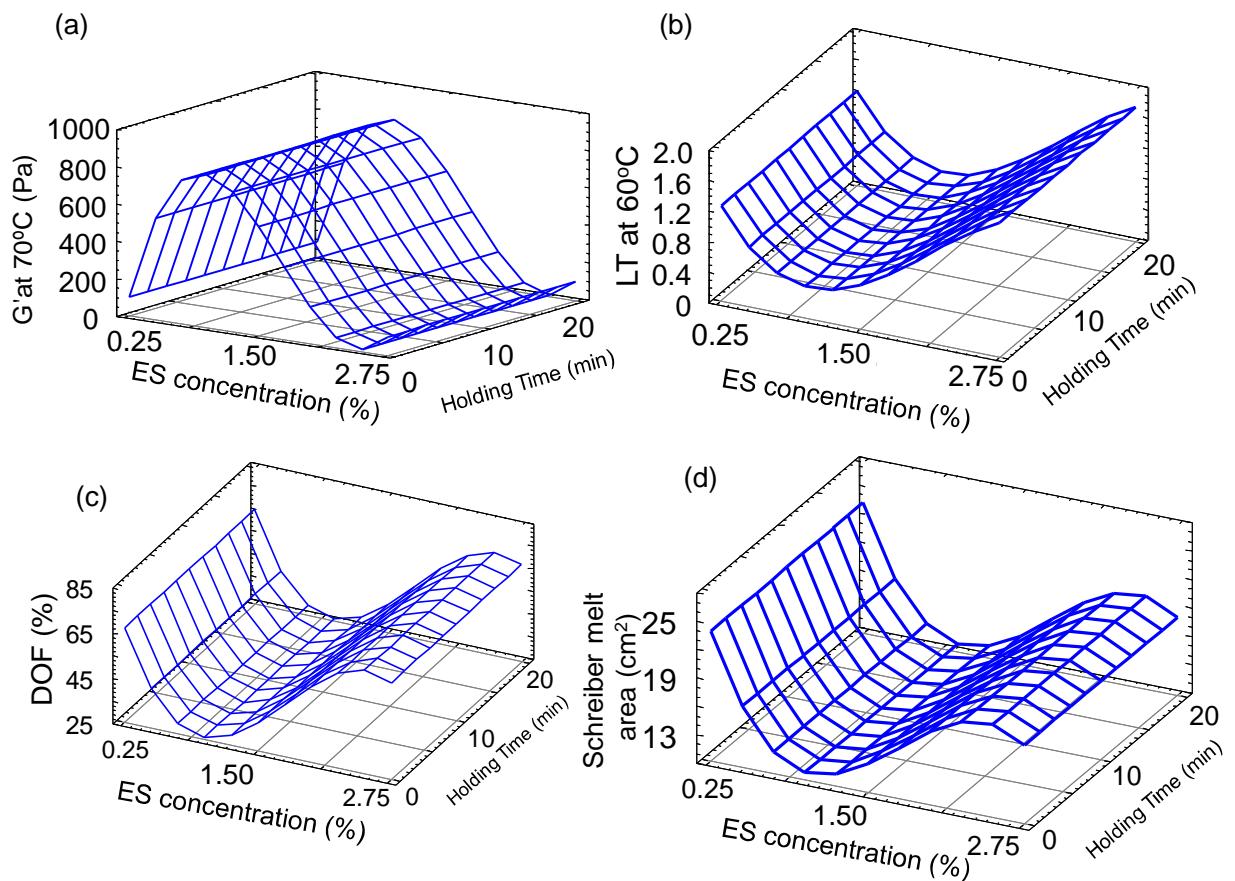


Fig. 6-2 Response surface plots for the effect of concentrations of emulsifying salts (ES) and holding times on storage modulus (G') at 70°C (a), loss tangent (LT) at 60°C (b), degree of flow (DOF) at 60°C from the UW-Meltp profiler (c), and Schreiber melt area (d).

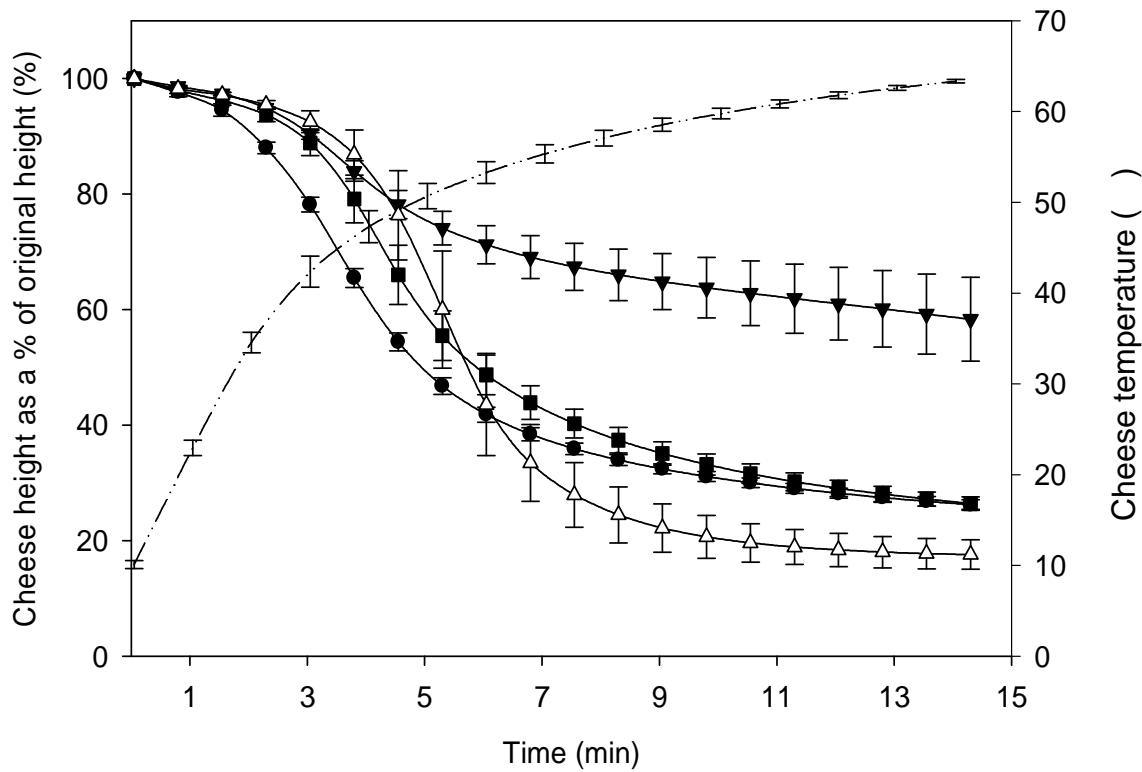


Fig. 6-3 Changes in cheese height as a % of the original height from the UW-Meltprofiler for process cheese made with various concentrations of TSPP and natural Cheddar cheese used as an ingredient (), TSPP concentrations 0.25% (w/w) (), 1.50% (w/w) () and 2.75% (w/w) (). Cheese temperature is indicated by a dashed line. The data represents the means ($n = 3$) while the error bars represent the standard deviation.

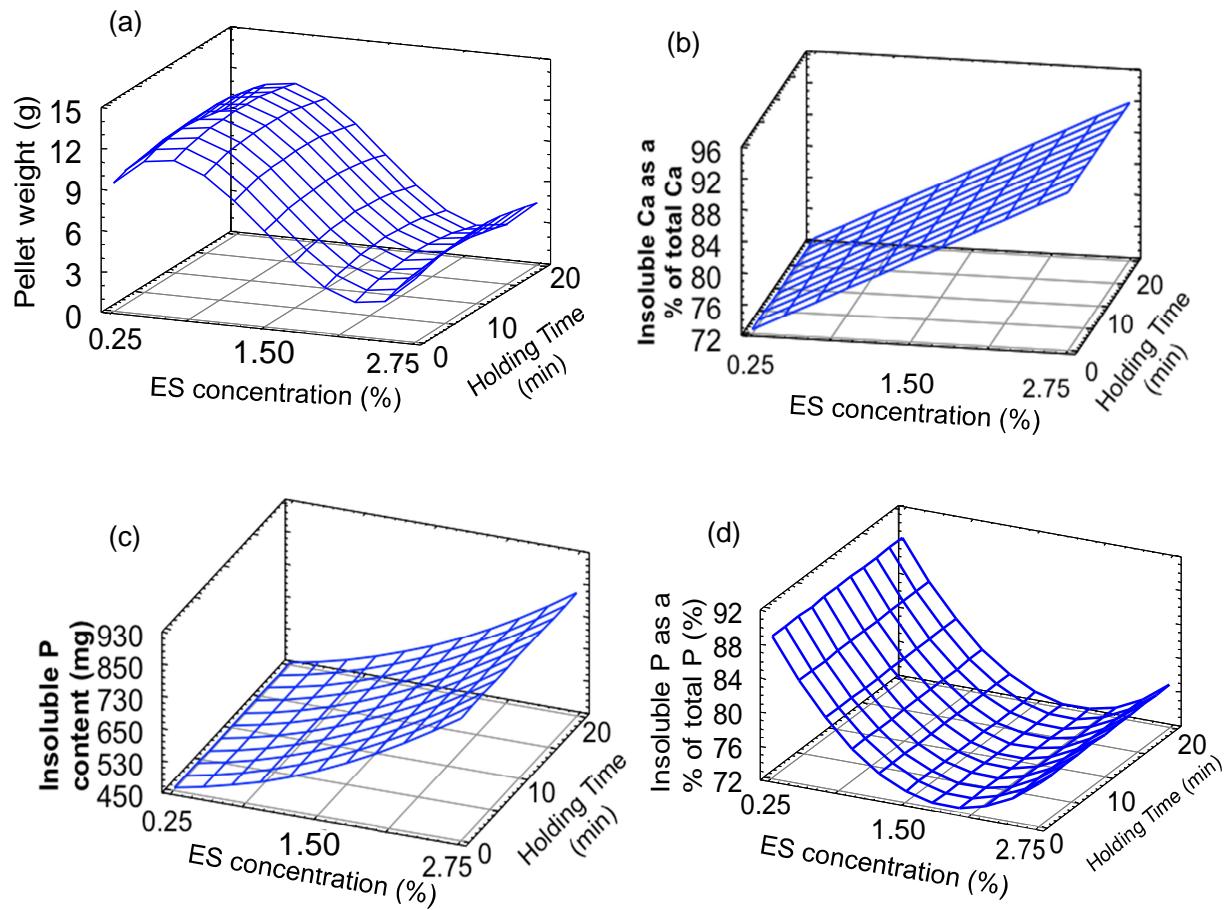


Fig. 6-4 Response surface plots for the effect of concentrations of emulsifying salts (ES) and holding times on pellet weight (a), insoluble Ca as a percentage of total Ca in process cheese (b), insoluble P content in 100 g of process cheese (c), and the insoluble P as a percentage of total P in process cheese (d).

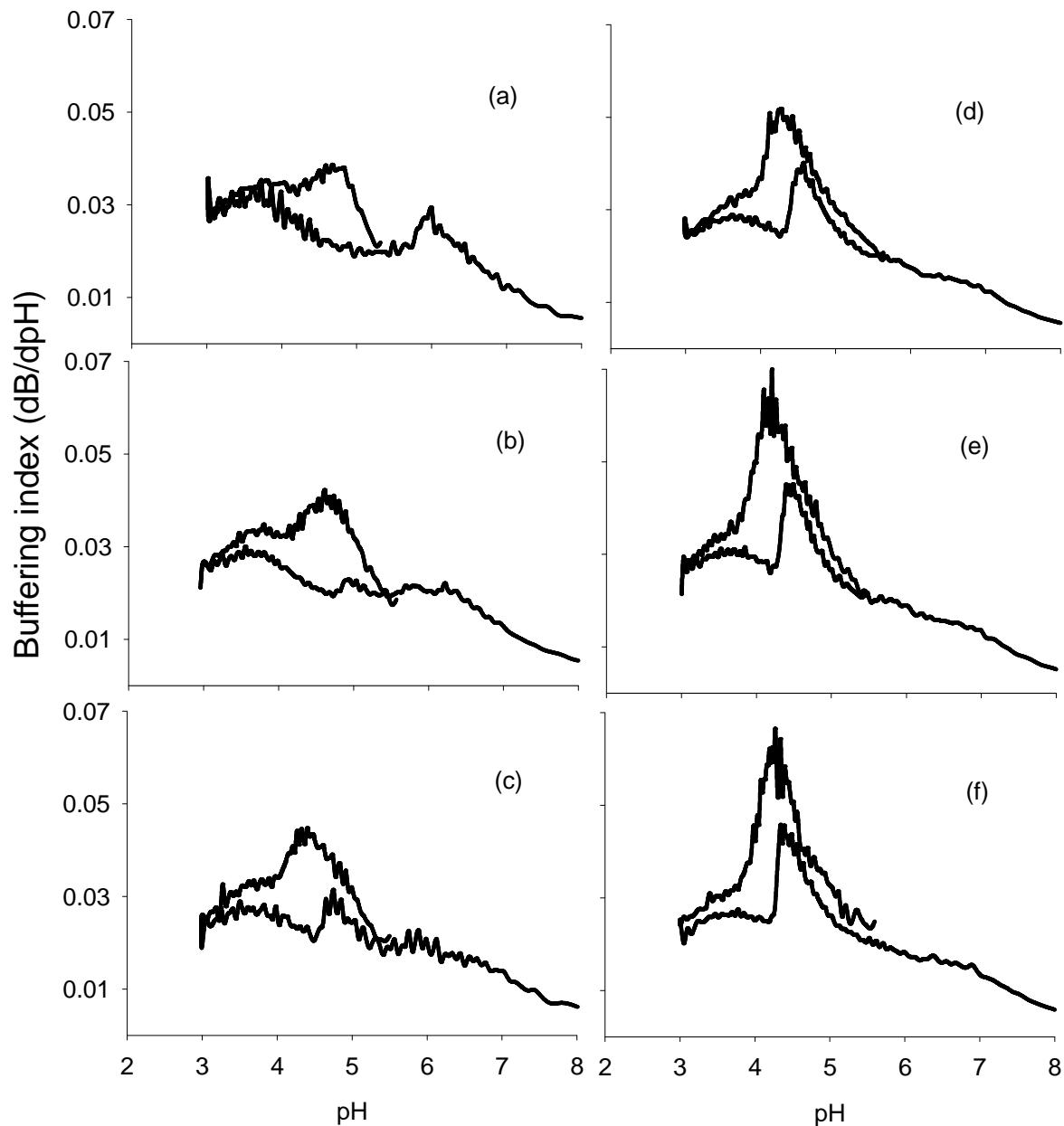


Fig. 6-5 Acid-base buffering curves for natural Cheddar cheese as the cheese making ingredient (a) and process cheeses made with various TSPP concentrations 0.25% (w/w) (b), 0.62% (w/w) (c), 1.50% (w/w) (d), 2.38% (w/w) (e) and 2.75% (w/w) (f).

6-4 第6章の結論

同一 pH 条件下での TSPP の濃度と溶融保持時間がプロセスチーズの物理的、化学的機能特性に及ぼす影響を研究した。第4章の TSC、第5章の SHMP とは異なり、TSPP を添加したプロセスチーズの機能特性は複雑な傾向を示し、3次式で示す予測モデルが高い決定係数を示した。TSPP 濃度増加と共に、メルト性を示す指標値は低濃度域で急激に下がるが、約 1% (w/w) を超えるとメルト性が増加した。一方、TSPP 濃度増加と共にプロセスチーズの G' 値は増加し、1% (w/w) を超えたところで減少した。加熱搅拌保持によるメルト性、レオロジー特性の影響は観測できなかった。TSPP 濃度の増加と共にプロセスチーズの不溶性カルシウム、不溶性リン量が増加しており、不溶性ピロリン酸カルシウム複合体形成されカゼインと結合していることを示唆している。ピロリン酸カルシウム複合体が形成されたことは酸・塩基滴定曲線によっても示された。低濃度の TSPP 添加によるメルト性の減少はタンパク質間にピロリン酸カルシウムが形成した架橋、もしくは静電気的斥力の中和に因り、高濃度の TSPP 添加におけるメルト性の増加は、過度な電荷による斥力に因ることを提唱する。また、本章で得られた結果は、耐熱性を有するプロセスチーズを開発する上で有効な知見であり、今後の新製品開発への応用が期待される。

第7章 結論

7-1 総括

チーズは一般的に栄養価が高く、日本人に不足していると言われているカルシウムを多く含むだけでなく、循環器系疾患予防、肥満抑制、血糖値上昇抑制等の健康の維持や向上に関する生体調節機能（三次機能）を有することが報告されている。食品企業はこの素晴らしい食品の健康機能性を消費者に啓蒙し、様々な食シーンに合わせた製品を提供することが求められている。チーズにおけるタンパク質、カルシウムに関わる相互作用によって発現する物理的科学的变化を理解することは、消費者が求める製品の食感、風味、色調等を開発する上で、非常に重要なポイントとなる。

本研究では、プロセスチーズ製造に使用される溶融塩に焦点を当て、各種類の溶融塩の働きを明確化し、製品への影響を調査した。

第3章では、2% (w/w) の各種の溶融塩を用いて異なるpHにおけるプロセスチーズの機能特性の変化を検証した。その結果、pH 5.2~5.9におけるpH変化により機能特性が変化し、その変化の傾向は各種類の溶融塩により異なることを明らかにした。

第4~7章では、プロセスチーズ製造における同pH条件下での各種類の溶融塩添加量と溶融保持時間によってチーズの組織の構成要素であるタンパク質と脂肪の状態が影響を及ぼすことを明らかにした。プロセスチーズ製造における各種類の溶融塩の要点は以下の通りである。

- ・ 溶融塩のカルシウムキレートにより分散したカゼインが脂肪を乳化し、冷却後にカゼインが再構築され、組織が作られる。
- ・ クエン酸三ナトリウム (TSC) のチーズへの添加により、カゼインに結合したコロイド性リン酸カルシウム (CCP) が TSC のカルシウムキレート力により崩壊し、リンが水相部に溶出したことを定量的に観測することができた。
- ・ TSC はカルシウムをキレートした後、クエン酸カルシウムを形成するが、力

ゼインと結合し、架橋構造を形成することはない。

- ・長鎖のリン酸塩であるヘキサメタリン酸ナトリウム（SHMP）はヘキサメタリン酸塩を抱き込んだ新形態のコロイド性リン酸カルシウム複合体がカゼイン間に結合することでカゼイン間の構造を強化させることを明らかにした。
- ・ジリン酸塩であるピロリン酸ナトリウム（TSPP）はカゼイン間にピロリン酸カルシウム複合体の架橋を形成するか、カゼイン間の静電気的斥力を減少させることで、特定の TSPP 濃度でプロセスチーズに耐熱性を付与することが示された。

上記の要点から、推定される溶融塩のメカニズムについて Fig. 7-1 に図示した。

7-2 製品への応用

得られた研究結果は製品の品質改善や新製品開発の知見として使用されている。本研究で得られた知見が製品開発に使用するに至るまでの流れ図を Fig. 7-2 に示した。そして、応用例の一例として次の製品改善事例を示す。

【ローフ型プレカットチーズの変形防止】

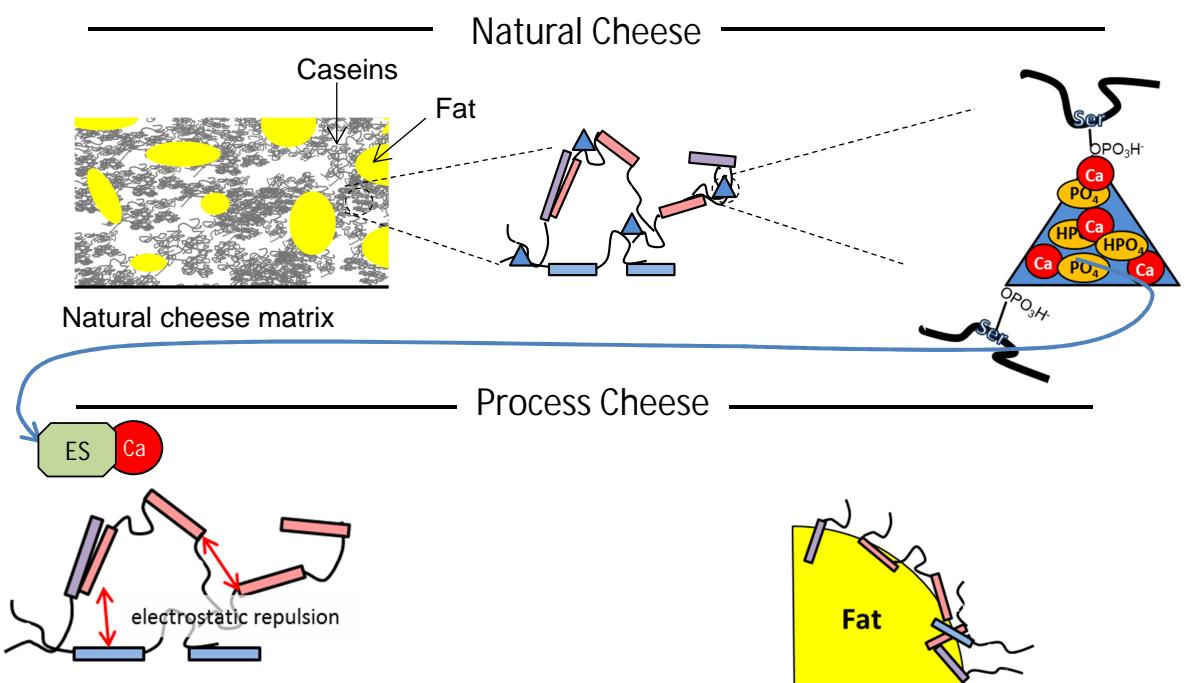
あらかじめカットされているローフ型（直方体）のチーズは夏場になると「変形」や「カットされていない（溶けて一体化してしまった）」といった問い合わせが寄せられることがある。多くの原因は消費者が小売店で購入後、すぐに冷蔵保管されず、冷房を稼働していない自家用車内等に放置されたことによる加熱変形によるものである（Fig. 7-3）。

得られた研究結果をもとに溶融塩配合を検討し、加熱変形の改善を試みた。TSPP 単体を使用することでフレーバーリリースが悪く、風味に渋み、えぐ味を感じることがあり、TSPP 単体の使用は不適であった。また、TSPP を含む市販の混合溶融塩を使用した場合、溶融直後のチーズ粘度が最適な粘性（Flowability）を有することができなく、製品充填に対する適性が不適であった。本研究により得

られた TSC、TSPP、SHMP のメカニズムの知見を元に、添加配合および pH を検討した (Table 7-1, Fig. 7-4)。そして、最適な溶融粘度と耐熱性があり、製品特性(風味、食感等)を損なわないプロセスチーズの溶融塩配合 (Table 7-1, trial Nos. 12~14) を見出し、更に食感と製造適性面から No. 13 を選択した。プレカットチーズ形態での加熱虐待テスト後において変形しにくく、剥がれやすいテスト品を得ることができた (Fig. 7-5)。

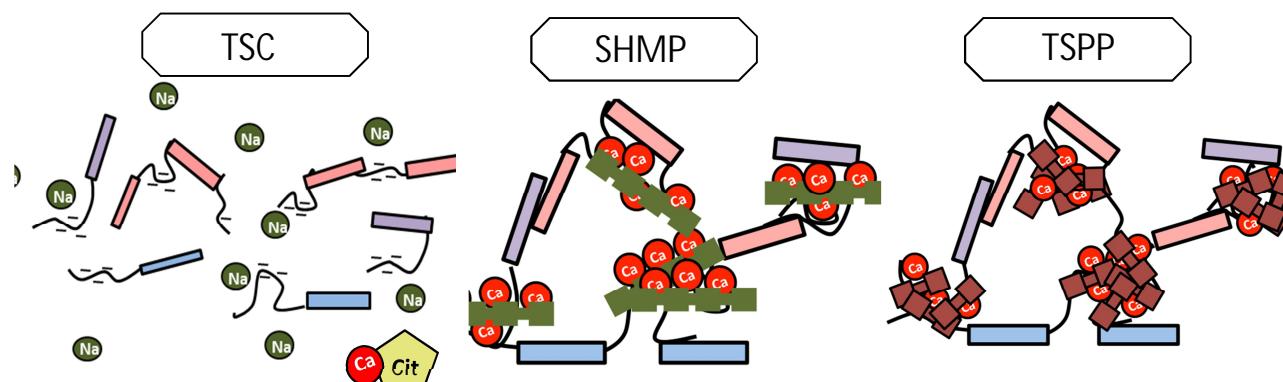
7-3 最後に

本研究で得られた結果はプロセスチーズの溶融塩の影響を科学的な理解を深めるだけではなく、チーズの製品開発、実製造・製造技術へ応用できるであろう。高齢化社会となる日本において、腎臓機能疾患者に悪影響のあるリンや高血圧障害のリスクを高めるナトリウムは低減されることが求められている。しかしながら、溶融塩の働きを解明することで溶融塩、ナトリウム塩を使用せずに安定的なプロセスチーズ製品を作る技術は未だ実用化されていない。本研究結果が完全食と呼ばれているチーズが老若、健康状態を問わず食することができ、日本の食文化に根付く礎になることを期待する。



All ES Chelates calcium from CCP and forms calcium – ES complexes. The casein molecules are dispersed because of the loss of CCP from its serine residues, and emulsify fat in cheese matrix.

Holding time enhances fat emulsification. The fine particles of the fat which is emulsified by caseins work as “pseudo-protein” particles and reinforce the structure of cheese matrix.



Calcium citrate did not form cross-link network with caseins. It precipitated to the insoluble phase of the cheese mass. Therefore the process cheese was relatively soft and meltable.

High level of SHMP resulted in the formation of new calcium phosphate-casein linkages, and a fine-stranded network was formed during cooling. Consequently, the process cheese was hard and low melt.

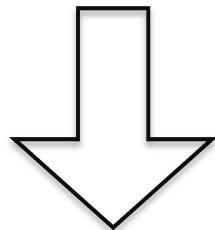
When added 1% of TSPP added, heat induced calcium pyrophosphate complex may have been formed during re-heating. High level of TSPP resulted in excessive charge repulsion among dispersed casein.



Fig. 7-1 A schematic description of possible mechanism of each emulsifying salt used in process cheese.

Chapter 3 <Effect of pH on the functional properties of process cheese>

The functional behavior of process cheese was **pH-dependent** and strongly influenced by the type of emulsifying salts (TSC, DSP, TSPP, SHMP).



Chapters 4 – 6 <Effect of emulsifying salt concentration and cooking time>

Investigated the effect of different concentrations of emulsifying salts and cooking times on the functional properties of process cheese that was made with a **constant pH (~5.6)**.

Investigated how emulsifying salts influenced the state of Ca and phosphate in process cheese.

Chapter 4 (TSC)

No cross-linking
Soft, meltable

Chapter 5 (SHMP)

Cross-linking
Hard, less meltable

Chapter 6 (TSPP)

Heat induced cross-linking
Soft, less meltable

Chapter 7 <Application to a commercial product>

The results of these studies were successfully applied to an improvement of a commercial product and will be used for new product developments of pasteurized process cheese or cheese products in the future.

Fig. 7-2 Flow chart from the understanding of the effects of emulsifying salts on process cheese to the application to a commercial product of this study.



Fig. 7-3 Thermal deformation of a process cheese product by inappropriate storage.
(a): Normal product. (b): Deformed product stored at 55 °C for 2 h in a packaging box.
Scale bar = 20 mm.

Table 7-1 Trial formulas and the results of the flowability after cooking, the degree of flow (DOF) as indexes of heat tolerance and sensory evaluation. Trials 1-10 were made with commercial blended emulsifying salts (Trials A). Trials 11-14 were made with TSPP and polyphosphate salt (SHMP), TSC and others (Trials B). Trials 15-21 were made with TSPP alone or TSPP and TSC without SHMP or others (Trials C). Trial formulas of emulsifying salts were not disclosed because of the confidential corporate information.

Trial	Emulsifying salts				Total	Results			
	No.	TSPP	SHMP	TSC		ES	Flowability	DOF (%)	Sensory evaluation
(Trials A)	Control					23.0	50.4		
	1	0.81				2.00	33.0	66.1	Same as control
	2	1.07				2.20	37.0	57.8	Same as control
	3	1.07				3.20	12.0	54.8	Same as control
	4	1.01				2.00	33.0	53.0	Same as control
	5	1.21				2.00	26.5	48.3	Same as control
	6	1.09				2.53	20.5	45.9	Same as control
	7	1.09				2.53	24.0	45.7	Same as control
	8	1.09				3.20	19.5	43.6	Same as control
	9	1.57				2.80	17.5	42.0	Same as control
	10	1.61				2.40	11.0	29.5	Slightly bitter
(Trials B)	11	1.10				2.30	35.5	32.9	Same as control
	12	1.10				2.78	29.5	29.0	Same as control
	13	1.10				2.58	24.0	27.1	Same as control
	14	1.10				2.20	24.0	23.8	Same as control
(Trials C)	15	1.20				1.60	25.5	24.0	Slightly bitter
	16	1.51				2.20	12.5	21.6	Slightly bitter
	17	1.30				1.80	21.5	20.6	Slightly bitter
	18	1.40				1.40	33.0	18.7	Bitter
	19	1.40				2.20	44.0	10.1	Same as control
	20	1.40				1.80	27.0	7.4	Slightly bitter
	21	1.60				1.60	34.0	4.5	Bitter

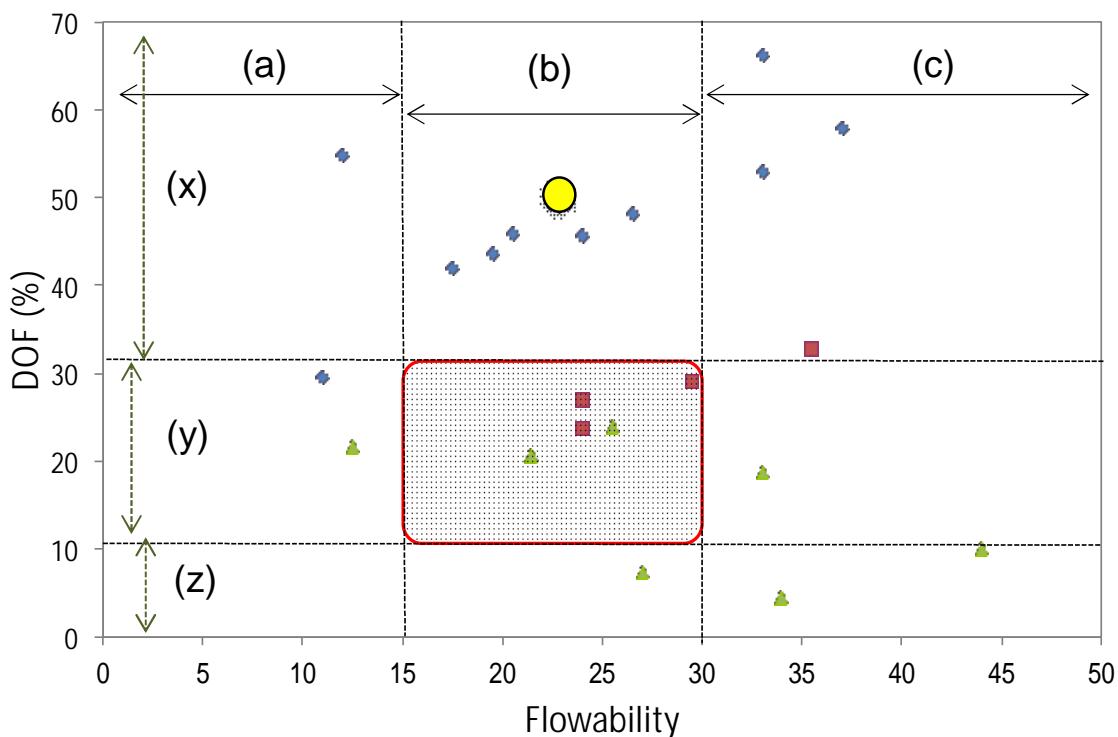


Fig. 7-4 Optimum condition of the flowability of melted cheeses right after cooking and degree of flow for the products. The samples from the control (yellow circle), Trials A (blue diamonds), Trials B (red squares), Trials C (green triangles) on the **Table 7-1** were plotted.

The ranges of the flowability of the melted cheeses represented too thick, (a); the optimum, (b), too soupy, (c) for a filling machine. The ranges of the degree of flow (DOF) for the final products represented too high meltablility resulting in the deformation defect, (x); the optimum, (y); too low meltability resulting in undesirable mouth feeling or cooking application, (z). The red area represented the optimum condition for improved products.

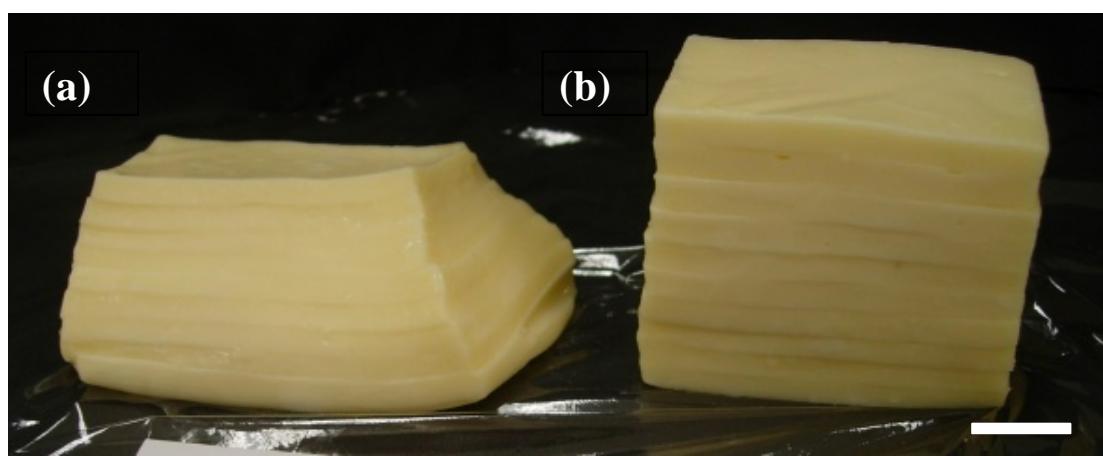


Fig. 7-5 Deformation test of precut process cheese. control (a), process cheese made with improved emulsifying salts blend (b). The cheeses were stored at 55 °C for 2 h.
Scale bar = 20 mm.

引用文献

- Aoki, T. (1995) Japanese J. Dairy and Food Sci. 44: A-1–A-7.
- Bak, M., Rasmussen, L. K., Petersen, T. E., and Nielsen, N. C. (2001). Colloidal calcium phosphates in casein micelles studied by slow-speed-spinning ^{31}P magic angle spinning solid-state nuclear magnetic resonance. *J. Dairy Sci.* 84: 1310–1319.
- Berger, W., Klostermeyer, H., Merkenich, K., and Uhlmann, G. (1998). Fundamental principles of the melting process. p. 33–62 in *Process Cheese Manufacture - A JOHA Guide*. Ladenberg, Germany. BK Guilini Chemie GmbH & Co. OHG.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technol.* 32: 62–66.
- Caric, M., Gantar, M., and Kalab, M. (1985). Effect of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese. *Food Microstruct.* 4: 297–312.
- Cavalier-Salou, C. and Cheftel, J. C. (1991). Emulsifying salts influence on characteristics of cheese analogs from calcium caseinate. *J. Food Sci.* 56: 1542–1547.
- Chatterjee, K. P. and Dhar, N. R. (1924). Studies of sparingly soluble salts, readily obtained from hot solutions of reacting substances. *J. Phys. Chem.* 28: 1009–1024.
- Creamer, L. K. and Olson, N. F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 47: 631–646.
- Cunha, C. R. and Viotto, W. H. (2010). Casein peptization, functional properties, and sensory acceptance of processed cheese spreads made with different emulsifying salts. *J. Food Sci.* 75: C113–120.
- Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., and Goff, H. D. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *Int. Dairy J.* 14: 1025–1031.
- Dimitreli, G., Thomareis A. S., and Smith P. G. (2005). Effect of emulsifying salts on casein peptization and apparent viscosity of processed cheese. *Int. J. Food Eng.* 1: 1–15.
- Drake, M. A., Gerard, P. D., Truong, V. D., and Daubert, C. R. (1999). Relationship between instrumental and sensory measurements of cheese texture. *J. Text. Stud.* 30:

451–476.

- Fox, P. F. and McSweeney, P. H. L. (1998). Milk proteins. p.146–237 in *Dairy Chemistry and Biochemistry*. New York, USA. Blackie Academic and Professional.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. H. L. (2000). Processed cheese and substitute or imitation cheese products. p. 429–441 in *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg, USA. Aspen Publishers Inc.
- Glenn, T. A., Daubert, C. R., and Farkas, B. E. (2003). A statistical analysis of creaming variables impacting process cheese melt quality. *J. Food Quality* 26: 299–321.
- Griffith, E. J. (1957). Structure and properties of the condensed phosphates. XIII. Refractometry. *J. Amer. Chem. Soc.* 79: 509–513.
- Guinee, T. P., Auty, M. A. E., and Mullins, C. (1999). Observations on the microstructure and heat-induced changes in the viscoelasticity of commercial cheeses. *Australian J. Dairy Technol.* 54: 84–89.
- Guinee, T. P., Auty, M. A. E. Mullin, C., Corcoran, M. O., and Mulholland, E. O. (2000). Preliminary observations on effects of fat content and degree of fat emulsification on the structure-functional relationship of Cheddar-type cheese. *J. Text. Stud.* 31: 645–663.
- Guinee, T. P., Caric, M., and Kalab, M. (2004). Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. p. 349–394 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2. London, UK. Elsevier.
- Guinee, T. P. and O’Kennedy, B. T. (2009). The effect of calcium content of Cheddar-style cheese on the biochemical and rheological properties of processed cheese. *Dairy Sci. Technol.* 89: 317–333.
- Gunasekaran S and Ak, M. M. (2003). Fundamental rheological methods. p. 31–112 in *Cheese rheology and texture*. New York, USA. CRC Press.
- Gupta, S. K. Karahadian, C., and Lindsay, R. C. (1984). Effect of emulsifier salts on texture and flavor properties of processed cheeses. *J. Dairy Sci.* 67: 764–778.
- Gupta, V. K. and Reuter, H. (1993). Firmness and melting quality of processed cheese foods with added whey protein concentrates. *Lait* 73: 381–388.
- Hamann, D. D. and G. A. MacDonald. (1992). Rheology and texture properties of

- surimi and surimi-based foods, p. 429-500 in Surimi Technology. New York, USA. Marcel Dekker Inc.
- Hassan, A., Johnson, M. E., and Lucey J. A. (2004). Changes in the proportions of soluble and insoluble calcium during the ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 87: 854–862.
- Heide von der, R. (1966). The binding capacity of phosphates. *Deutsche Molkerei-Zeitung* 87: 974–977.
- Holt, C. (1992). Structure and stability of the bovine casein micelle. p. 63–151 in Advances in Protein Chemistry, Vol. 43. San Diego, USA. Academic Press.
- Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., and Thorn, D. C. (2013). Caseins and the casein micelles: Their biological functions structures, and behavior in foods. *J. Dairy Sci.* 96: 6127–6146.
- Holt, C., van Kemenade, M. J. J. M., Nelson, L. S., Sawyer, L., Harries, J. E., Bailey, R. T., and Hukins, D. W. L. (1989). Composition and structure of micellar calcium phosphate. *J. Dairy Res.* 56:411–416.
- Horne, D. S. (1998). Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* 8: 171–177.
- International Dairy Federation (IDF). (1982). Cheese and processed cheese: determination of total solids content of cheese and processed cheese. IDF Standard 4A. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- International Dairy Federation (IDF). (1986). Cheese and processed cheese. Determination of fat content (Schmid-Bondzynski-Rat-zlaff method). IDF Provisional Standard 5 B. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- International Dairy Federation (IDF). (1993). Milk: determination of the nitrogen content (Kjeldahl method) and calculation of crude protein content. IDF Standard 20B. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- Johnston, D. E. and Murphy, R. J. (1992). Effects of some calcium-chelating agents on the physical properties of acid-set milk gels. *J. Dairy Res.* 59: 197–208.
- Kawasaki, Y. (2008). Influence of “creaming” on the properties of processed cheese and changes in the structure of casein during cheese making. *Milchwissenschaft*. 63: 149–

152.

- Kuchroo, C. N. and Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*. 37: 331–335.
- Lee, B. O. and Alais, C. (1980). Étude biochimique de la fonte des fromages. II. Evolution des phosphates et des métaux. *Lait* 60: 130–139.
- Lee, B. O., Paquet, D., and Alais. C. (1986). Étude biochimique de la fonte des fromages. VI. Effet du type de sels de fonte et de la nature de la matière protéique sur la peptisation. Utilisation d'un système modèle. *Lait* 66: 257–267.
- Lee, M. R., Johnson, M. E., and Lucey, J. A. (2005). Impact of modifications in acid development on the insoluble calcium content and rheological properties of cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 88: 3798–3809.
- Lee, S. K., Buwalda, R. J., Euston, S. R., Foegeding, E. A., and McKenna, A. B. (2003). Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 36: 339–345.
- Lee, S. K. and Klostermeyer. H. (2001). The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 34: 288–292.
- Lee, S. K., Klostermeyer, H., Schrader, K., and Buchheim, W. (1996). Rheological properties and microstructure of model processed cheese containing low molecular weight emulsifiers. *Nahrung* 40: 189–194.
- Lucey, J. A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci.* 85: 281–294.
- Lucey, J. A. and Fox, P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *J. Dairy Sci.* 76: 1714–1724.
- Lucey, J. A., Gorry, C., and Fox, P. F. (1993). Acid–base buffering properties of heated milk. *Milchwissenschaft* 48: 438–441.
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., and Horne, D. S. (2003). Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.* 86: 2725–2743.
- Lucey, J. A., Maurer-Rothmann, A., and Kaliappan, S. (2011). Functionality of ingredients: Emulsifying salts. p. 110–132 in *Processed cheese and analogues*. West

Sussex, USA. Wiley-Blackwell.

- Lucey, J. A., Mishra, R., Hassan, A., and Johnson, M. E. (2005). Rheological and calcium equilibrium changes during the ripening of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 15: 645–653.
- Lucey, J. A., Munro, P. A., and Singh, H. (1998). Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- δ -lactone: effects of heat treatment and gelation temperature. *J. Text. Stud.* 29: 413–426.
- Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A., and Cuq, J. L. (1997). Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *J. Dairy Sci.* 80: 1483–1489.
- Maurer-Rothmann, A. and Scheurer, G. (2005). Basis of the melting process. p. 20–36 in *Stabilization of Milk Protein Systems: A JOHA Guide*. Ladengurg, Germany. BK Giulini GmbH.
- McMahon, D. J. and McManus, W. R. (1998). Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *J. Dairy Sci.* 81: 2985–2993.
- Mellander, O. (1939). Electrophoretic studies on casein. *Biochem. Z.* 300: 240–245.
- Metzger, L. E., Barbano, D. M., and Kindstedt, P. S. (2001). Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese:III. Post-melt chewiness and whiteness. *J. Dairy Sci.* 84: 1357–1366.
- Meyer, A. (1973). The basic theory of processed cheese manufacture. p. 30-62 in *Processed cheese manufacture*. London, U.K. Food Trade Press.
- Mizuno, R. and Lucey, J. A. (2005). Effects of emulsifying salts on the turbidity and calcium-phosphate-protein interactions in casein micelles. *J. Dairy Sci.* 88: 3070–3078.
- Mizuno, R. and Lucey, J. A. (2007). Properties of milk protein gels formed by phosphates. *J. Dairy Sci.* 90: 4524–4531.
- Mohammad, K. S. and Fox, P. F. (1983). Influence of some polyvalent organic acids and salts on the colloidal stability of milk. *Dairy Tech.* 36: 112–117.
- Molins, R. A. (1991). *Phosphates in food*. Boca Raton, USA. CRC Press.
- Montgomery, D. C. (2001). *Response surface methods and other approaches to process*

- optimization. p. 427-510 in Design and analysis of experiments. 5thed. New York, USA. John Wiley.
- Morr, C. V. (1967). Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 50: 1744–1751.
- Morris, H. A., Holt, C., Brooker, B. E., Banks, J. M., and Manson, W. (1988). Inorganic constituents of cheese: Analysis of juice from one month old Cheddar cheese and the use of light and electron microscopy to characterize the crystalline phases. *J. Dairy Res.* 55: 255–268.
- Mullen, L. and Ennis, D. M. (1979). Rotatable design in product development. *Food Technol.* 33: 74–80.
- Mulsow B. B., Jaros, D., and Rohm, H. (2007). Processed cheese and cheese analogues. p. 210–235 in Structure of dairy products. Oxford, U.K. Blackwell.
- Muthukumarappan, K., Wang, Y. C., and Gunasekaran, S. (1999a). Estimating softening point of cheeses. *J. Dairy Sci.* 82: 2280–2286.
- Muthukumarappan, K., Wang, Y. C., and Gunasekaran, S. (1999b). Modified Schreiber test for evaluation of Mozzarella cheese meltability. *J. Dairy Sci.* 82: 1068–1071.
- Nakajima, I., Kawanishi, G., and Furuichi, E. (1975). Reaction of melting salts upon casein micelles and their effects on calcium, phosphorus and bound water. *Agr. Biol. Chem.* 39: 979–987.
- Odagiri, S. and Nickerson, T. A. (1964). Complexing of calcium by hexametaphosphate, oxalate, citrate, and EDTA in milk. I. Effects of complexing agents on turbidity and rennet coagulation. *J. Dairy Sci.* 47: 1306–1309.
- Odagiri, S. and Nickerson., T. A. (1965). Complexing of calcium by hexametaphosphate, oxalate, citrate, and ethylenediaminetetraacetate in milk. II. Dialysis of milk containing complexing agents. *J. Dairy Sci.* 48: 19–22.
- O'Mahoney, J. A., Lucey, J. A., and McSweeney, P. H. L. (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 88: 3101–3114.
- O'Mahony, J. A., McSweeney, P. H. L., and Lucey, J. A. (2006). A model system for studying the effects of colloidal calcium phosphate concentration on the rheological

- properties of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 89: 892–904.
- Ono, T. and Obagta, T. (1989). A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *J. Dairy Res.* 56: 453–461
- Ozcan, T., Lucey, J. A., and Horne, D. S. (2008). Effect of tetrasodium pyrophosphate on the physicochemical properties of yogurt gels. *J. Dairy Sci.* 91: 4492–4500.
- Paquet, A. and Kalab, M. (1988). Amino acid composition and structure of cheese baked as a pizza ingredient in conventional and micro-wave ovens. *Food Microstruct.* 7: 93–103.
- Pastorino, J., Hansen, C. L., and McMahon, D. J. (2003). Effect of sodium citrate on structure-function relationships of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 86: 3113–3121.
- Piska, I. and Stetina, J. (2003). Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. *J. Food Eng.* 61: 551–555.
- Pyne, G. T. and McGann, T. C. A. (1960). The colloidal calcium phosphate of milk. 2. Influence of citrate. *J. Dairy Res.* 27: 9–17.
- Rayan, A. A., Kalab, M., and Erustrom, C. A. (1980). Microstructure and rheology of process cheese. *Scanning Electron Microscopy III:* 635–643.
- Roesler, H. (1966). Verhalten der polyphosphate in schmelzkäse. *Milchwissenschaft* 21: 104–107.
- Salaün, F., Mietton, B., and Gaucheron, F. (2005). Buffering capacity of dairy products. *Int. Dairy J.* 15: 95–109.
- Savello, P. A., Ernstrom, C. A., and Kalab, M. (1989). Microstructure and meltability of model cheese made with rennet and acid casein. *J. Dairy Sci.* 72: 1–11.
- Scharpf, L. G. and Kichline, T. P. (1969). Properties and chemical characterization of a “bloom” on process cheese slices. *Food Technol.* 23: 835–837.
- Schmidt, D. G. (1980). Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.* 34: 42–64.
- Shirashoji, N., Abe, T., Takahashi, K., and Iwatsuki, K. (2006). Influence of emulsifying salts on functionality of sliced process cheese. *J. Dairy Sci.* 89 (Suppl 1): 423 (Abstr.).
- Slattery, C. W. and Evard, R. (1973). A model for the formation and structure of casein

- micelles from subunits of variable composition. *Biochem. Biophys. Acta* 317: 529–538.
- Stampanoni C. R. and Noble, A. C. (1991). The influence of fat and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs. A scalar study. *J. Text. Stud.* 22: 367–380.
- Sutheerawattananonda, M. and Bastian, E. D. (1998). Monitoring process cheese meltability using dynamic stress rheology. *J. Text. Stud.* 29: 169–183.
- Sutheerawattananonda, M., Fulcher, R. G., Martin, F. B., and Bastian, E. D. (1997). Fluorescence image analysis of process cheese manufactured with trisodium citrate and sodium chloride. *J. Dairy Sci.* 80: 620–627.
- Swaisgood, H. E. (1996). Characteristics of milk. p. 300–350 in *Food Chemistry* (3rd edition) New York, USA. Marcel Dekker Inc.
- Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. (1999). Background to manufacturing practice. p. 7–89 in *Yoghurt: science and technology*. Cambridge, UK. Woodhead Publishing Ltd.
- Taneya, S., Kimura, T., Izutsu, T., and Buchheim. W. (1980). The submicroscopic structure of processed cheese with different melting properties. *Milchwissenschaft* 35: 479–481.
- Tatsumi, K. and Nishiya, T. (1997). Processed cheese manufacturing methods without emulsifying salt. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 44: 696–702.
- Templeton, H. L. and Sommer, H. H. (1930). Some observations on processed cheese. *J. Dairy Sci.* 13: 203–220.
- Templeton. H. L. and Sommer, H. H. (1932). Factors affecting the body and texture of processed cheese. *J. Dairy Sci.* 15: 29–41.
- Templeton, H. L. and Sommer, H. H. (1936). Studies on the emulsifying salts used in processed cheese. *J. Dairy Sci.* 19: 561–572.
- Thomas, M. A., Newell, G., Abad, G. A., and Turner, A. D. (1980). Effect of emulsifying salts on objective and subjective properties of processed cheese. *J. Food Sci.* 45: 458–459.
- Tunick, M. H., Nolan, E. J., Shieh, J. J., Basch, J. J., Thompson, M. P., Maleeff, B. E., and Holsinger, V. H. (1990). Cheddar and Cheshire cheese rheology. *J. Dairy Sci.* 73:

1671–1675.

- Udayarajan, C. T., Lucey, J. A., and Horne, D. S. (2005). Use of fourier transform mechanical spectroscopy to study the melting behavior of cheese. *J. Text. Stud.* 36: 489–515.
- Ustunol, Z., Kawachi, K., and Steffe, J. (1995). Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. *J. Food Sci.* 60: 1208–1210.
- Van Slyke, L. L. and Bosworth, A. W. (1915). Condition of casein and salts in milk. *J. Biol. Chem.* 20: 135–152.
- Van Slyke, D. D. (1922). On the measurement of buffer value and on the relationship of buffer value to the dissociation constant of the buffer and the concentration and reaction of the buffer solution. *J. Biol. Chem.* 52: 525–571.
- Van Wazer, J. R. and Callis, C. F. (1958). Metal complexing by phosphates. *Chem. Rev.* 58: 1011–1046.
- Visser, S. A. (1962). Occurrence of calcium phosphates in the presence of organic substances, especially proteins. *J. Dairy Sci.* 45: 710–716.
- Vujicic, I., deMan, J. M., and Woodrow, I. L. (1968). Interaction of polyphosphates and citrate with skimmilk proteins. *Canadian Inst. Food Technol. J.* 1: 17–21.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.* 9: 189–192.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., and van Boekel, M. A. J. S. (1999). Colloidal particles of milk. p. 107–170 in *Dairy Technology Principles of Milk Properties and Processes*. New York, USA. Marcel Dekker, Inc.
- Walstra, P. and Jenness, R. (1984). Casein micelles. p. 229–253 in *Dairy chemistry and physics*. New York, USA. John Wiley & Sons.
- Walstra, P. and van Vliet, T. (1986). The physical chemistry of curd making. *Neth. Milk Dairy J.* 40: 241–259.
- Waugh, D. F. and Noble, Jr. R. W. (1965). Casein micelles. Formation and structure II. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 2246–2257.
- Weast, R. C. (1970). *Handbook of chemistry and physics*. 51st ed. p. 120–121. Boca Raton, USA. CRC press
- White, J. C. D. and Davies, D. T. (1958). The relation between the chemical

- composition of milk and the stability of the caseinate complex. I. General introduction, description of samples, methods and chemical composition of samples. *J. Dairy Res.* 25: 236–255.
- Zehren, V. L. and Nusbaum, D. D. (1992). Procurement of cheese. p. 92–103 in Processed cheese, Madison, USA. Cheese Reporter Publishing Co. Inc.
- Zhong, Q. and Daubert, C. R. (2004). Kinetics of rennet casein gelation at different cooling rates. *J. Colloid and Interface Sci.* 279: 88–94.
- Zittle C. A. (1966). Precipitation of casein from acidic solutions by divalent anions. *J. Dairy Sci.* 49: 361–364.
- 斎藤忠夫 (2003). チーズ製造の基本フロー. p. 73–91 in 現代チーズ学. Tokyo. 食品資材研究会.
- 仁木良哉、鶴田昌之 (1989). レンネットゲルの物性. p. 177–189 in 新説チーズ科学. Tokyo. 食品資材研究会.
- 林俊次 (1989) プロセスチーズの製造方法. p. 119–134 in 新説チーズ科学. Tokyo. 食品資材研究会
- 乳等省令（乳及び乳製品の成分規格等に関する省令）(2014) 厚生労働省

付記

本論文は下記の誌上並びに学会発表した内容をまとめたものである。

報文

Yanjie Lu, Nobuaki Shirashoji, and John. A. Lucey. (2008). Effects of pH on the textural properties and meltability of pasteurized process cheese made with different types of emulsifying salts. *J. Food Sci.* 73: E363–369.

Nobuaki Shirashoji, John. J. Jaeggi, and John. A. Lucey. (2006). Effect of trisodium citrate concentration and cooking time on the physicochemical properties of pasteurized process cheese. *J. Dairy Sci.* 89: 15–28.

Nobuaki Shirashoji, John. J. Jaeggi, and John. A. Lucey. (2010). Effect of sodium hexametaphosphate concentration and cooking time on the physicochemical properties of pasteurized process cheese. *J. Dairy Sci.* 93: 2827–2837.

Nobuaki Shirashoji, Hideki Aoyagi, John. J. Jaeggi, and John. A. Lucey. (2016). Effect of tetrasodium pyrophosphate concentration and cooking time on the physicochemical properties of process cheese. *J. Dairy Sci.* 99: 6983–6994.

学会発表

Nobuaki Shirashoji, John. J. Jaeggi, and John. A. Lucey. (2004). Effect of emulsifying salt on textural properties of Pasteurized process Cheddar cheese. ADSA-ASAS Joint Annual Meetings.

Nobuaki Shirashoji, John. J. Jaeggi, and John. A. Lucey. (2005). Effect of calcium on textural and rheological properties of pasteurized process Cheddar cheese. ADSA-ASAS Joint Annual Meetings.

Nobuaki Shirashoji, Tadahiro Abe, Kiyotaka Takahashi, and Keiji Iwatsuki. (2006). Influence of emulsifying salts on functionality of sliced process cheese. ADSA-ASAS Joint Annual Meetings.

Nobuaki Shirashoji, Hideki Aoyagi, Tadahiro Abe, and Michio Ikeda. (2016). Changes of the state of calcium and protein in low fat and full fat processed cheese during cheese making. ADSA-ASAS Joint Annual Meetings.

謝辞

本博士論文は筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 青柳秀紀 教授の研究指導ならびに、同研究科 生物機能科学専攻 市川 創作 教授、同研究科 生命産業科学専攻 北村 豊 教授、同研究科 生命産業科学専攻 王 碧昭 教授、の副指導のもとに作成されたものであります。先生方の多大なるご指導・ご鞭撻に心より、感謝の意を表します。

本研究は、森永乳業株式会社において実施されたものであり、全面的にご援助いただきました森永乳業株式会社 宮原道夫社長ならびに同社 大川禎一郎常務執行役員研究本部長に深く感謝いたします。本研究を進めるにあたり、適切なご指導ご助言をくださいました同社食品総合研究所 池田三知男所長に心より感謝の意を表します。開発業務を携わる中で本論文の執筆と実験の実施にあたり、同社 食品総合研究所第4開発部 阿部忠博部長、水野グループリーダーならびに開発部の皆さんから多大なるご協力を得ましたことに感謝の意を表します。

また、本論文をまとめる後押し、ご支援していただいた同社食品素材部 小石原洋部長に御礼申し上げます。

本研究の一部はウイスコンシン大学食品科学部で実施しており、本研究実施と公表論文執筆に際しご指導、ご助言をくださいましたウイスコンシン大学食品科学部教授 Dr. John A. Lucey に深く感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたりご支援、ご協力をいただきながらここにお名前を記すことができなかった多くの皆様と本研究遂行の支えとなってくれた家族に心から感謝いたします。