

生乳のHTST及びUHT殺菌による遊離アミノ酸、クエン酸及びリン酸の変化

食品・化学技術室 大垣 佳寛, 大久保 紘子, 海老原 昇
技術支援室 宮崎 浩子
古谷乳業株式会社 高野 和也, 白井 寛, 三浦 みゆき

Changes of Free Amino Acids, Citric Acid and Phosphoric Acid in Raw Milk by HTST and UHT Processes

Yoshihiro OGAKI, Hiroko OKUBO, Noboru EBIHARA, Hiroko MIYAZAKI,
Kazuya TAKANO, Hiroshi SHIROI and Miyuki MIURA

本研究では、収集時期の異なる千葉県産生乳を用い、殺菌方法の異なる（HTSTとUHT殺菌）試料の殺菌前、殺菌後の遊離アミノ酸、クエン酸及びリン酸の定量分析を行った。その結果、UHT、HTST殺菌とも、殺菌前に比べて、殺菌後の遊離アミノ酸が8.0mg/100mLから7.7mg/100mLに減少し、UHT、HTST殺菌とも減少の割合はほとんど変わらなかった。クエン酸の量は、UHT、HTST殺菌とも殺菌後の減少はほとんど認められなかったが、リン酸についてはUHT、HTST殺菌とも殺菌後10%程度減少した。これらの成分の変動は、牛乳の風味や色調、品質に影響を及ぼすと考えられる。

1. はじめに

牛乳は、カルシウム等のミネラル、必須アミノ酸を豊富に含むタンパク質など栄養素に富む食品である。品質変化の防止や保存性向上のため、わが国では「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」で「保持式により摂氏63度で30分間加熱殺菌するか、又はこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌すること」と規定されている。

近年、消費者の自然志向の高まりを受けて、超高温瞬間殺菌（UHT）牛乳に加えて、高温短時間殺菌（HTST）牛乳や、低温保持殺菌（LTLT）牛乳が見直され、販売数量が伸びている。

一般に、UHT殺菌では120℃～150℃の温度で1～3秒、HTST殺菌では72℃以上15秒以上、LTLT殺菌では63℃～65℃で30分の条件で殺菌する。いずれの殺菌方法によっても牛乳の栄養素にはほとんど影響しないが、これら殺菌条件の違いが牛乳の物性や風味に影響を与える。

その大きな要因の一つが香りの変化である。牛乳の揮発成分として硫化ジメチル、種々のケトン類、ラクトン類及びアルデヒド類が報告され、加熱温度の高い牛乳ほどメチルケトン類が多く生成することが報告されている¹⁾。

一方、牛乳中には、遊離アミノ酸やクエン酸、

リン酸などの酸も含まれ、品質や風味に大きな影響を与えていると考えられる。遊離アミノ酸は風味に影響を与えていると考えられる。クエン酸は食品の代表的な酸味成分であるとともに、牛乳の緩衝系やカルシウムの溶解性に関与したり、加熱や冷却などの温度変化に対して乳タンパク質を安定化させるなど、乳質維持に大きな役割を担っていると考えられる²⁾。リン酸もまた食品中の代表的な酸味成分の一つであり、風味に大きく影響を与えていると考えられる。これらの成分は生乳の搾乳時期や殺菌工程によって影響を受けることが予想される。

本研究では、収集時期の異なる千葉県産生乳を試料として、殺菌方法（UHTとHTST）の異なる牛乳の殺菌前及び殺菌後の試料のアミノ酸分析装置を用いた遊離アミノ酸の定量分析、および、キャピラリー電気泳動法によるクエン酸、リン酸の定量分析を行ったので報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料

古谷乳業株式会社で、千葉県内で集乳した生乳について、一方をUHT殺菌、他方についてはHTST殺菌を行い、殺菌前の生乳2種類と併せて計4点の

試料を冷蔵の状態でご所に搬入し、分析直前までご所の冷凍庫にて -25°C で冷凍して保存した。また、これら4種類の試料は2016年3月から2017年2月まで毎月提供された。

遊離アミノ酸分析の前処理に用いたスルホサリチル酸は、和光純薬工業製のスルホサリチル酸二水和物(特級)を 105°C 、3時間乾燥して無水物にして用いた。アミノ酸標準溶液は和光純薬工業製のAN-II型とB型を用いた。アミノ酸分析装置用のクエン酸リチウム緩衝液(1st~5th)およびニンヒドリン試薬セットは日本電子製のものを用いた。標準試料のクエン酸はカルボン酸分析装置用(関東化学製)のクエン酸一水和物を用い、標準試料のリシン酸はリシン酸二水素カリウム(特級:和光純薬工業製)を用い、内部標準物質としてギ酸アンモニウム(特級:和光純薬工業製)を用いた。

2. 2 遊離アミノ酸の分析

2. 2. 1 前処理

スルホサリチル酸無水物50mgを1.5mLのマイクロチューブに入れ、試料1.0mLを加えてボルテックスミキサーで5分攪拌し、遠心分離(8000rpm, 10分)して、上清をシリンジフィルター(アドバンテック Dismic-13AS, $0.45\mu\text{m}$)を通してろ過した。

2. 2. 2 標準溶液の作成

標準溶液は、和光純薬製のアミノ酸標準液(AN-II型とB型)各1.0mL、およびアスパラギンについてはメスアップ時の濃度が 0.05 mmol/L 、グルタミンとトリプトファンについては 0.1 mmol/L になるように25mLメスフラスコに入れ、 $\text{pH}2.2$ のクエン酸リチウム緩衝液でメスアップして調製した。

2. 2. 3 定量分析

アミノ酸分析は、全自動アミノ酸分析装置(JL C-500V 日本電子製)を用い、生体アミノ酸分析モードで行った。

2. 3 クエン酸、リン酸の分析

2. 3. 1 前処理

試料1.0 mLと、内部標準としてギ酸アンモニウム水溶液(ギ酸として 1000 mg/L) 1.0 mLを50 mLメスフラスコに入れ、標線まで水を入れ、その約1.0 mLをシリンジフィルター(アドバンテック Dismic-25AS, $0.45\mu\text{m}$)を通してろ過した。

2. 3. 2 標準溶液の作成

クエン酸及びリン酸二水素カリウム混合標準液(酸として各 1000 mg/L)を調製し、それぞれ5.0mL, 2.0mL, 1.0mLを100mLメスフラスコに入れ、

それぞれに内部標準物質溶液(上記のギ酸アンモニウム水溶液) 2.0 mLを加えて、標線まで水を入れて、それぞれ 50 mg/L , 20 mg/L , 10 mg/L の標準溶液を調製した。

2. 3. 3 定量分析

試料をキャピラリー電気泳動用バイアルにいれ、Sogaらの方法³⁾に準じて、キャピラリー電気泳動法で、以下の条件で酸の定量分析を行った。使用機種: G1600A(アジレントテクノロジー社製)、キャピラリー: フューズドシリカ(有効長72cm, 全長80.5cm, 口径 $75\mu\text{m}$)、緩衝液: 有機酸分析用バッファー $\text{pH}5.6$ (アジレントテクノロジー社製)、キャピラリー温度: 20°C 、電圧: 25kV、検出器: ダイオードアレイディテクター(DAD) 検出波長 350 nm 、シグナル幅 20 nm 、参照波長 200 nm 、シグナル幅 10 nm で分析した。なお、分析値は前処理を行った各サンプルについて3回分析し、平均値±標準偏差で表記した。また、クエン酸は $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ の形、リン酸は PO_4^{3-} の形として濃度を算出した。

3. 結果及び考察

3. 1 アミノ酸分析装置による乳試料中の遊離アミノ酸(遊離アミノ酸)の分析

図1に生乳のアミノ酸分析のクロマトグラムの例を示す。一般に食品中の遊離アミノ酸分析における除タンパク処理では、ピクリン酸、スルホサリチル酸、トリクロロ酢酸などが用いられるが、いずれも水に溶解し、それをさらに試料溶液に混合して攪拌して除タンパクを行う。しかし、生乳中の遊離アミノ酸はグルタミン酸を除き、各アミノ酸について $1\text{ mg}/100\text{ mL}$ 以下であり、アミノ酸分析装置の定量下限に近い。前記の方法では溶液が希釈されてしまうことから、今回はスルホサリチル酸無水物を試料にそのまま溶解して攪拌振とうした後、遠心分離を行って除タンパクを行った。

その結果、清澄な試料を得ることが出来、乳試料に含まれる遊離アミノ酸を定量することが出来た。

図2に2016年3月から2018年2月までの、各殺菌処理前後の総遊離アミノ酸の平均値を示した。

図2から、殺菌前の生乳には平均約 $8.0\text{ mg}/100\text{ mL}$ の総遊離アミノ酸が存在するが、殺菌後の総遊離アミノ酸の含有量は、UHT, HTST殺菌とも平均で $7.7\text{ mg}/100\text{ mL}$ であった。

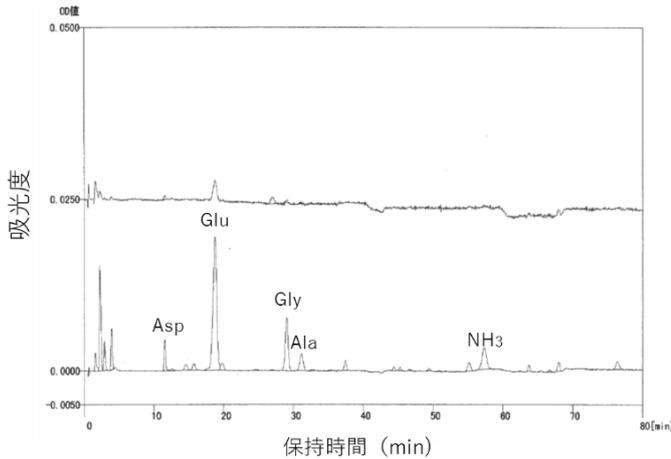


図1 アミノ酸分析装置による生乳の遊離アミノ酸分析のクロマトグラム (UHT 殺菌前生乳, 2016年3月採取試料)

表1 HTST, UHT 殺菌前後の各遊離アミノ酸 (2016年3月~2018年2月の平均)

アミノ酸	1.UHT前	2.HTST前	3.UHT後	4.HTST後
L-アスパラギン酸	0.37	0.29	0.33	0.28
L-スレオニン	0.12	0.10	0.10	0.10
L-セリン	0.11	0.12	0.10	0.12
L-アスパラギン	0.01>	0.01>	0.01>	0.01
L-グルタミン酸	4.85	3.73	3.91	3.57
L-グルタミン	0.18	0.19	0.23	0.25
グリシン	0.60	0.66	0.51	0.66
L-アラニン	0.40	0.34	0.33	0.32
L-バリン	0.22	0.19	0.17	0.16
L-システイン	0.01>	0.01>	0.01>	0.01>
L-メチオニン	0.01>	0.01>	0.01>	0.01>
L-イソロイシン	0.08	0.08	0.06	0.07
L-ロイシン	0.10	0.08	0.07	0.07
L-チロシン	0.07	0.06	0.05	0.05
L-フェニルアラニン	0.07	0.07	0.05	0.06
L-ヒスチジン	0.09	0.07	0.06	0.05
L-リジン	0.29	0.30	0.21	0.21
L-トリプトファン	0.01>	0.01>	0.01>	0.01>
L-アルギニン	0.33	0.30	0.26	0.26
L-プロリン	0.25	0.22	0.18	0.20
合計	8.12	8.06	7.75	7.72

単位:mg/100mL
0.01>:0.01mg/100mL未満

従って、総遊離アミノ酸はいずれの殺菌後の試料でもわずかに減少傾向を示した。乳中の遊離アミノ酸が加熱処理で減少することが川西らによって報告されている⁴⁾。

加熱処理によるアミノ酸減少の原因として、アミノ酸が生乳中の糖（主にラクトース）とメイラード反応などを起こすことが推定される。

表1に、HTST及びUHT殺菌前後の各試料の各遊離アミノ酸の量を示す。

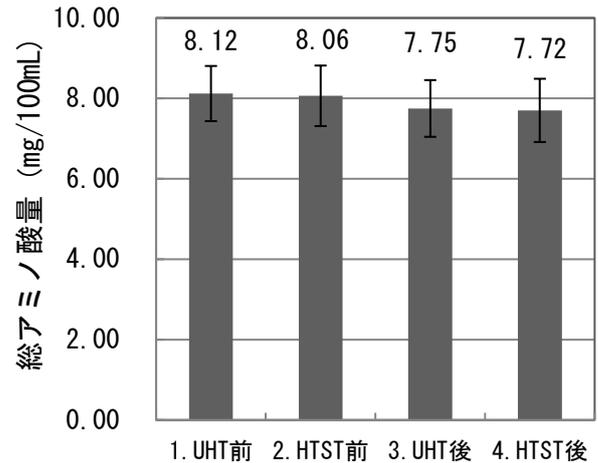


図2 HTST, UHT 殺菌前後の試料中の総遊離アミノ酸 (2016年3月~2018年2月の平均)

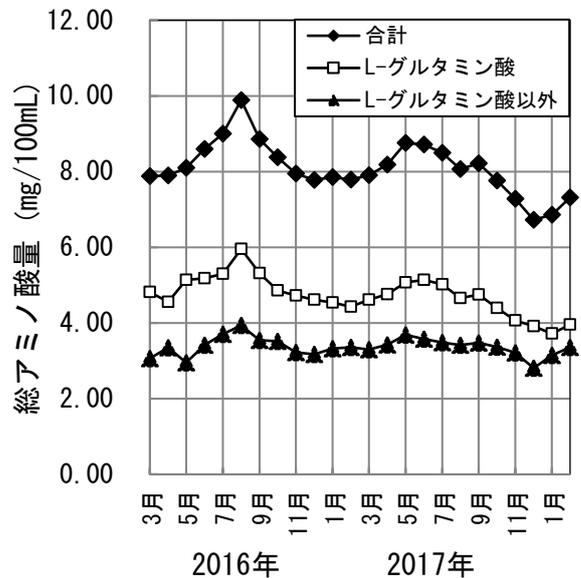


図3 生乳中の遊離アミノ酸の年次変化 (HTST, UHT 殺菌前の生乳の分析値の平均)

遊離アミノ酸の約半分はグルタミン酸であり、次いでグリシン、アラニンの順となった。

また、図3に生乳の回収時期の違いによる、遊離アミノ酸の量の変化を示す。生乳中の遊離アミノ酸は、夏の時期に増加し、冬の時期に減少する傾向が示された。乳牛の生理的な要因によるものと考えられるが、牛乳の味にはほとんど影響しないと考えられる。また、最も生乳中に多く含まれるグルタミン酸の量の変化の影響が大きいと考えられる。

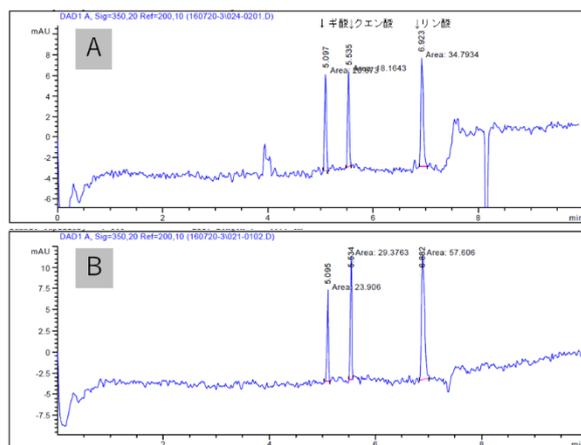


図4 キャピラリー電気泳動法による生乳中の酸(A)と標準溶液(クエン酸, リン酸各50mg/L, ギ酸(内部標準)20mg/L)(B)のエレクトロフェログラム

3. 2 キャピラリー電気泳動による試料中の酸の分析

図4にキャピラリー電気泳動による生乳中の酸の分析と標準溶液(各50mg/L)のエレクトロフェログラムを示す。主にクエン酸とリン酸が検出された。本分析法は、紫外吸収のあるバッファーを用い、間接吸光度法で検出することを特徴としており、紫外吸収のないクエン酸、乳酸、酢酸等の有機酸やリン酸等の無機酸を検出することが出来る³⁾。食品中の酸の分析は、一般にイオンクロマトグラフや有機酸分析専用のHPLCを用いることが多いが、この方法では希釈とろ過のみで装置に導入することが出来た。

牛乳中の有機酸はクエン酸が大部分を占めている。牛乳中にはこのほかにもオロト酸、ピルビン酸、乳酸、コハク酸、酢酸、尿酸の存在が報告されているが⁵⁾、今回の分析ではこれらの酸の含有量はクエン酸に比べると微量であったため分析は行わなかった。

検量線の直線性と原試料中のクエン酸とリン酸の濃度を考慮して、この分析では試料を50倍に希釈した。また、乳試料はタンパク質や脂質を多く含むため、なるべく直径の大きなフィルターを用いてろ過した方が良く考えられたため、直径25mmのシリンジフィルターでろ過を行った。

なお、検量線の直線性はクエン酸、リン酸とも $R^2=0.998$ 以上であった。検出下限はノイズレベルから計算すると5mg/L(実サンプルで250mg/L)と計算された。

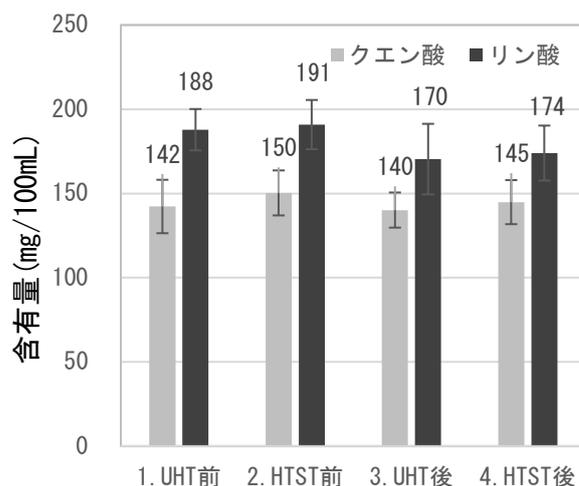


図5 HTST, UHT 殺菌前後の試料中のクエン酸及びピリン酸(2016年3月~2017年9月の平均)

図5に、この方法を用いてHTST及びUHT殺菌前、殺菌後の各試料中のクエン酸と乳酸の分析を行った結果を示す。クエン酸についてはほとんど各サンプルとも平均で140–150 mg/100mLの範囲であり、HTST及びUHT殺菌による明確な差は見られなかったのに対し、リン酸は平均で170–190 mg/100mLの値を示し、さらに殺菌後のサンプルが殺菌前のサンプルよりリン酸濃度が10%程度低い傾向を示した。また、HTST及びUHT殺菌による減少の程度の違いは認められなかった。加熱によりカルシウムとリン酸は、溶解相からカゼインミセルを含むコロイド層に移ることが報告されており⁶⁾、これが原因と考えられ、牛乳の酸味に影響を与えるものと考えられる。

4. まとめ

本研究では、アミノ酸分析装置を用いて、殺菌前と殺菌後の乳試料のアミノ酸分析を行い、キャピラリー電気泳動法を用いて、乳試料のクエン酸、リン酸の定量分析を行った。その結果、UHT, HTST殺菌とも、殺菌前に比べて、殺菌後の遊離アミノ酸が、8.0mg/100mLから7.7mg/100mLに減少し、UHT, HTST殺菌とも減少の割合はほとんど変わらなかった。また、夏期に生乳の遊離アミノ酸の量が増大することが見出された。

また、クエン酸の量はUHT, HTST殺菌とも殺菌後の減少はほとんど認められなかったが、リン酸は、UHT, HTST殺菌ともに殺菌後10%程度減少した。これらの成分の変動は、牛乳の風味や色調、品質に影響を及ぼすと考えられる。

参考文献

- 1) 岩附慧二, 溝田泰達, 久保田哲夫, 西村修, 増田秀樹, 外山一吉, 富田守, 日本食品科学工学会誌, 46, (9) 587-597, 1999
- 2) 佐藤博, 黒澤隆, 及川伸, 遠藤幸子, 須藤聖子, 鈴木久子, 日本畜産学会報, 69, (4) 381-386, 1998
- 3) Soga, T., Hewlett Packard Application Note Publication Number 12-5965-5744E, 1996
- 4) 川西悟生, 阿部宣明, 斉藤健輔, 日本畜産学会報, 39, (8) 353-357, 1968
- 5) 島崎敬一, 島真平, 池滝 孝, 浜村欣二, 長谷川富夫, 帯広畜産大学学術研究報告, 15, (2) 101-105, 1987
- 6) 青木孝良, 日本暖地畜産学会報, 53, (1) 9-16, 2010.