

殺菌方法の異なる牛乳の機能性成分に関する研究  
並びに酵素処理乳が飲用乳及び発酵乳に及ぼす影響への研究  
～凍結による乳試料中のたんぱく質の変性に関する研究～

食品技術室 大垣 佳寛, 松田 皓生  
次 長 海老原 昇  
古谷乳業株式会社 高野 和也, 白井 寛, 石出 卓也, 大野 優

Studies on Functional Ingredients in Milk Various Pasteurization Conditions  
and Effects of Enzyme-Treatment Milk on Milk and Fermented Milk  
～ Studies on the Protein Denaturation Caused by Freezing ～

Yoshihiro OGAKI, Kosei MATSUDA, Noboru EBIHARA  
Kazuya TAKANO, Hiroshi SHIRAI, Takuya ISHIDE and Yu Ono

牛乳の殺菌方法として、超高温瞬間殺菌(UHT)の他に、高温短時間殺菌(HTST)や、低温保持殺菌(LTLT)がある。

牛乳ホエイ中のラクトフェリン(LF)は加熱により変性しやすく、UHT や LTLT 牛乳ではほぼ完全に変性する。しかし、これまでの共同研究で HTST 牛乳では生乳の 1/2 程度 LF が残存することが確認された。

しかし、これらの実験は凍結した乳試料について実施したもので、凍結によるたんぱく質の変性を考慮していない問題点があった。

本研究では凍結前後の生乳と凍結前後の HTST 牛乳について LF を高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分析し、凍結による LF の変性を検討した。

## 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たんぱく質など栄養素に富む食品である。しかし、微生物による品質変化が起りやすい食品でもあり、品質劣化の防止や保存性を高めるため、わが国では食品衛生法に基づく「乳及び乳製品の成分規格等に関する命令」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。

牛乳の殺菌方法としては、超高温瞬間殺菌(UHT)が従前から広く用いられてきた。一方、最近では消費者の自然志向の高まりなどを受け、より低温の条件で殺菌する高温短時間殺菌(HTST)牛乳や、低温保持殺菌(LTLT)牛乳も販売されている。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、特にたんぱく質の変性に影響を与える。

これらのたんぱく質の中で特にラクトフェリン(LF)はホエイに含まれ、抗菌・抗ウイルス活性、ビフィズス菌増殖促進作用、免疫調節作用などの多様な機能性が知られている<sup>1,2)</sup>。しかし、LF は熱で変性しやすいたんぱく質であり、令和 4 年度～5 年度に行った「各種殺菌牛乳中の機能性たんぱく質に関する研究～牛乳中のラクトフェリンの分析～」において、UHT や LTLT 殺菌牛乳では LF はほぼ完全に変性してしまうことが確認された。一方 HTST 牛乳では生乳の 1/2 程度 LF が残存することが確認された<sup>3)</sup>。しかし、これらの実験は凍結した乳試料について実施したもので、凍結によるたんぱく質の変性を考慮していないという問題点が残されていた。

本研究では、乳試料を凍結した際の試料中のたんぱく質の変性の影響を検討することを目的として、具体的には、凍結前後の生乳と凍結前後の HTST 牛乳の 4 種類の試料について、前報<sup>3)</sup>で開発した高速液体クロマトグラフ(HPLC)による LF の分析方法を用いて分析を行い凍結における牛乳中のたんぱ

く質の変性の影響を検討することとした。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料・試薬

生乳及びこれを高温短時間殺菌(HTST)した牛乳については古谷乳業株式会社から提供された。生乳については牧場の異なる A, B の 2 種類を分析した。HTST 牛乳は A を 75°C で 15 秒殺菌した。いずれの試料も冷蔵の状態でご所に搬入した。

ラクtofelin(LF)の抽出および精製には、酢酸、酢酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、塩化ナトリウムは富士フィルム和光純薬の特級試薬を用いた。LF 標準品は同社の牛乳由来(含量 95.0%以上)を用いた。LF の分離にはイオン交換クロマトグラフィ用充填剤 Toyopearl SP-550C(東ソー製)を用いた。高速液体クロマトグラフィ(HPLC)に用いたアセトニトリル及びトリフルオロ酢酸(TFA)は富士フィルム和光純薬の HPLC 用を用いた。水は超純水(Milli-Q 水)を用いた。

### 2.2 緩衝液等の調製

#### 2.2.1 酢酸緩衝液 A(pH=4.0)の調製

0.83 mol/L 酢酸と 0.20 mol/L 酢酸ナトリウム水溶液を pH=4.0 になるように混合して(容量比でほぼ 1:1)調製した。

#### 2.2.2 酢酸緩衝液 B(pH=6.0)の調製

酢酸緩衝液 A 400 mL に 1.0 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を pH=6.0 になるまで加えて(約 160mL)調製した。

#### 2.2.3 溶出液(1.5mol/L NaCl 水溶液)の調製

塩化ナトリウム 43.83g(0.75 mol)を 500 mL ビーカーに入れ、水約 250 mL を加え沸騰させ完全に溶解させ、冷却の後 500 mL メスフラスコに入れ、水を標線まで入れて調製した。

#### 2.2.4 LF 標準溶液の調製

LF 標準品 0.020g を 1.5 mol/L NaCl 水溶液少量に溶解し、20mL のメスフラスコに入れ標線まで 1.5 mol/L NaCl 水溶液を入れ 1000 mg/L の標準溶液を調製した。

上記溶液についてそれぞれ 4.0 mL, 2.0 mL, 1.0 mL を 20 mL のメスフラスコに入れ、1.5 mol/L NaCl 水溶液を標線まで入れ、それぞれ 200mg/L, 100mg/L, 50mg/L の標準溶液を調製した。

### 2.3 乳試料の冷凍試験

提供された生乳及び HTST 牛乳について 15mL 遠心チューブに小分けした後、当所の冷凍庫で

18°C以下に冷凍して、一定期間(1~6 週間)保存したのち、冷凍庫から取り出して常温の水道水を流しつつ解凍した後 LF の分析に供した。

### 2.4 前処理操作

#### 2.4.1 カラムの作成

ミニカラム(ムロマックミニカラム L 室町ケミカル製)に、20%エタノールに懸濁している Toyopearl SP-550C を樹脂の正味量として 1 mL 充填した後、酢酸緩衝液 B を 10 mL 流し、流れ去ったら、カラムの出口の栓を閉じ、さらに酢酸緩衝液 B 5 mL 加えて、ふたをつけて試験管(長さ 180 mm, 内径 15 mm)にさして試験開始まで保存した。

#### 2.4.2 LF の抽出・精製

ふた付き 15 mL 遠心チューブに試料 5.0 mL と酢酸緩衝液 A 5.0 mL を加え、ふたを閉め 1 分間上下に激しく振とうした後、800×g で 5 分遠心分離し、上澄みのホエイ 5.0 mL をマイクロピペットで試験管に回収した。

このホエイ 5.0 mL に 1.0M 水酸化ナトリウム水溶液を 1.0 mL 添加し、ボルテックスミキサーで試験管をよく振とうした。

樹脂が充填されたミニカラムの出口のキャップを取り、予め満たされていた酢酸緩衝液 B を捨て、再度試験管にさしたのち、上記ホエイ(計 6.0 mL)全てをカラムにゆっくり入れ溶出させた。さらに酢酸緩衝液 B を 4.0 mL ホエイの入っていた試験管に入れ、ボルテックスミキサーを用いホエイを洗い、これもカラムに入れ溶出させた。

その後、別の試験管にカラムを移し、カラムに 1.5 mol/L NaCl 水溶液 5.0 mL をゆっくり入れ、溶出させた。

この溶液の一部を孔径 0.20 μm のポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製シリンジフィルターでろ過して HPLC 用バイアルに入れた。この溶液は元の乳試料に対して 2 倍希釈となっている。

### 2.5 HPLC による LF の分析

上記試料溶液について高速液体クロマトグラフ(島津製作所 LCMS-8030)を用い、以下の条件で分析を行なった。カラム:Shodex Asahipak C4P-50 4D 内径 4.6 mm × 150 mm + ガードカラム Shodex Asahipak C4P-50G 4A(いずれも昭和電工製)、溶離液(A):アセトニトリル+0.1% TFA, 溶離液(B):水+0.05% TFA, グラジエント条件:0% A (0-2 分), 0%-30.0% A (2-6 分), 30.0%-31.0% A (6-11 分), 31.0%-50.0% A (11-14.8 分), 50% A(14.8-20 分),

50%-0% A(20-22分), 流速: 0.8 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出器: ダイオードアレイ紫外可視分光光度計, 波長: 280 nm, 波長幅 4 nm, 注入量: 25  $\mu$ L。

### 3. 結果及び考察

図1にそれぞれ生乳A, BとHTST牛乳について, 凍結前及び小分けして1~6週間凍結したのち解凍してLFの分析を行った際のLFの定量値の変化を示す。

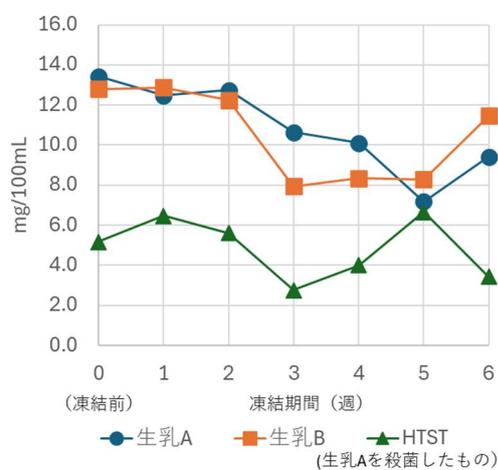


図1 凍結期間による生乳(A, B)とHTST牛乳中のLFの変化

その結果, 生乳, HTST牛乳両方とも凍結2週間までは比較的値の変動は少なかったものの, 3~6週間凍結では生乳においては値が下がり, HTST牛乳では値が大きく変動した。これは両者ともたんぱく質の変性によるものと推定した。従って, 凍結後2週間以内で分析する必要があると認識された。

### 4. まとめ

本実験結果から, 乳中のLFを正確に定量するためには, 試料受領後すぐに分析するのが望ましいが, 凍結する場合は凍結後2週間以内で分析する必要があると認識された。この結果を踏まえて今後の研究における乳中のLFの分析を行う必要がある。

### 参考文献

- 1) 山内恒治: “ラクトフェリン”, 日本食品科学工学会誌, Vol. 53, No. 3, pp. 193(2006).
- 2) 織田浩嗣: “ラクトフェリンの生体防御作用に関する研究”, ミルクサイエンス, Vol. 62, No. 3, pp. 105-109 (2013).
- 3) 大垣 佳寛, 松田 皓生, 海老原 昇, 宮崎浩子, 高野 和也, 白井 寛, 石出 卓也: “各種殺菌牛乳中の機能性たんぱく質に関する研究~牛乳中のラクトフェリンの分析~”, 千葉県産業支援技術研究所研究報告, Vol 22, pp. 1-9 (2024).