

## 総説

# ホエータンパク質濃縮物とその機能性に関する

## 最近の研究動向

清澤 功

### Progress in Recent Researches on the Whey Protein Concentrates and their Functional Properties

Isao Kiyosawa

#### はじめに

牛乳タンパク質は、現在いろいろの形で食品加工の素材に利用されている。単に殺菌した脱脂乳を真空濃縮し、噴霧乾燥した無脂肪粉乳 (NFDM) は、おもに乳タンパク質の機能性を生かした食品素材である。また、酸カゼインや乳酸カゼインは、脱脂乳を酸または乳酸菌が産生した乳酸により pH 4.6 に調節し、沈殿してつくり、古くから食品のみならず、化粧品、医薬品、工業製品などの素材として幅広く使用されてきた。しかしながら、牛乳からチーズまたはカゼイン製造の際に排出するホエー中のホエータンパク質が、食品素材として本格的に利用されるようになったのはここ数十年来のことである。

ところで、チーズは少なくとも紀元前4,000年前からつくられていたので、ホエーの利用はその当時からいろいろ工夫されていたと思われる。古代ギリシアでは、医学の分野で健康増進と治療のためにホエーが利用されていたという<sup>1)</sup>。また、中世期には、ホエーは薬剤、火傷の鎮痛軟膏成分、皮膚軟膏、バイタリテーを鼓舞し、毛髪を回復する水薬として使われていたが、ヒトの食物に利用することはほとんどなかった<sup>2)</sup>。このため、ホエーの大部分は河川に投棄されており、多くのチーズ工場は水路の近くに建てるのが慣習になっていた。しかし、20世紀半ばになると欧米ではチーズの需要が次第に高まると、河川に投棄されたホエーは悪臭の原因になり、BOD (生化学的酸素要求量) の増加により魚の生息にも影響を及ぼし、自然環境保護の面から注視されるようになった。これらの問題を含めて、都市の汚水処理や河川の汚染防止に関する条例が定められ、チーズ工場におけるホエーの処理問題が深刻化してきた。

一方、ホエーには牛乳の栄養素が豊富に含まれており、とくにホエータンパク質の機能性についても関心が

高まってきた。このような状況の中で、1950年代には食品工業における膜分離技術が急速に進歩し、乳業ではホエーの脱塩、ホエー成分の濃縮、分離が工業規模で出来るようになった。このため、1970年代にはホエータンパク質を過度に加熱することなく、タンパク質濃度を75-80%程度まで高めたホエータンパク質濃縮物 (whey protein concentrate, WPC)、さらに90%以上に濃縮度を高めたホエータンパク質分離物 (whey protein isolate, WPI) の製造が可能になった。1982年にはわが国でも食品産業膜利用技術研究組合が結成され、牛乳、乳製品を含む食品加工への応用研究を行っている<sup>3)</sup>。また、1983年、米国酪農科学会は“ホエーおよびホエー成分の生産と利用”ならびに“ホエータンパク質の機能性評価”に関するシンポジウムを開催し、その詳細な内容が報告されている<sup>4)</sup>。

このような経緯の中で、WPC および WPI の食品素材などへの利用も次第に高まりつつある。また、実験室規模でしか分離、精製できなかったホエータンパク質の中には、ホエー、ホエータンパク質濃縮物などから工業規模での単離が可能になり、食品素材に利用されている。ホエー中の有効成分の利用にはまだいろいろの課題が残されているが、今回本誌への執筆を依頼された機会に、WPC および WPI に関連した最近の研究について概説したい。

#### 1. チーズの生産とホエーの排出

ホエーは、チーズまたはカゼイン製造の際にカードから分離される水相部分である。熟成チーズに使用する牛乳の約85-90%はホエーであり、この中には乳の栄養素の約55%が保留されている。ホエーのおもな成分は、可溶性タンパク質、ラクトース、ミネラルおよびビタミンであり、さらに量的な変動はあるが乳酸、不溶性窒素分なども含まれている<sup>2)</sup>。現在、チーズ工場ではチーズパ

表1 各国におけるチーズ生産量の推移 (千トン)

国名	1990	1995	2000	生産増加率 <sup>1)</sup>
EC 15カ国	5,252.4 <sup>2)</sup>	5,825.8	6,374.9	1.09
スイス	129.5	129.2	146.3	1.13
ロシア		217.0	220.0	1.01
チェコ		87.7	133.5	1.52
ポーランド		294.7	397.7	1.35
カナダ	252.9	289.0	330.6	1.31
メキシコ		112.9	135.0	1.20
アメリカ	2,749.3	3,122.2	3,744.2	1.36
アルゼンチン	268.5	368.9	430.0	1.60
ブラジル	233.0	360.0	445.0	1.91
オーストラリア	173.7	272.5	365.0	2.10
ニュージーランド	116.6	234.9	282.0	2.42
日本	84.0	105.4	126.2	1.50

<sup>1)</sup> 2000/1990比 (EC 15カ国および1990年統計値がない国は2000/1995比)。

<sup>2)</sup> EC 12カ国 (東ドイツを除く)。

ットから排出した新鮮な液状ホエーは、通常遠心分離により脱脂し、汚染菌の増殖や乳酸の産生を防ぐために殺菌した後、濃縮、乾燥または修飾される。

ところで、IDF 統計<sup>5)</sup>によると、世界における2000年のチーズ生産量は約1,490万トンであり、1990年の約1,318万トンよりも1.13倍の増加である。カテッジチーズを除くチーズの年間生産量が10万トン以上の国をみても、この間にいずれの国も増加の傾向を示している(表1)。ホエー排出量をチーズ製造量の約9倍とすると<sup>2)</sup>、2000年の液状ホエー排出量は約1億3千万トンになる。また、このほかにホエーはカゼイン製造の際にも排出されるので、この量を上回することは確実である。ホエーは、スイートホエー (sweet whey, SW) と酸ホエー (acid whey, AW) に分けられる。SWは熟成型チーズ製造の副産物であり、pH 5.9-6.3で甘味がある。一方、AWは非熟成、フレッシュ型チーズの製造で得られ、通常pH 4.4-4.6で酸味がある。また、カゼイン製造の際のホエーもAWである。1993年、米国ではSW 1,800万トン、AW 170万トンの排出があり、この中には約16.4万トンのホエータンパク質が含まれる<sup>6)</sup>。しかし、米国では1972年から1992年にかけて液状ホエーのわずか50%が食品や動物飼料に使用されていたに過ぎず、オーストラリア、ノルウェーなどでも40%近くのホエーは廃棄されていた<sup>7)</sup>。

SW および AW の一般成分組成は表 2<sup>2,8)</sup> のとおりであり、約93%は水分である。全固形分のうち、ラクトースは約76%を占めており、灰分含量も8-12%と高いので、直接食品への利用には問題があった。動物飼料に使用する場合も、反芻動物では乾燥物摂取量の30%までは液状ホエーを与えても問題はないが、ブタでは20%を越えると下痢が発生する<sup>9)</sup>。また、ホエーを直接

表2 スイートホエー (SW) および酸ホエー (AW) の一般成分組成 (%)

成分	液状物 <sup>1)</sup>		乾燥物 <sup>1)</sup>		乾燥物 <sup>2)</sup>	
	SW	AW	SW	AW	SW	AW
全固形分	6.35	6.5	96.5	96.0		
水分	93.7	93.5	3.5	4.0		
脂肪	0.5	0.04	0.8	0.6	0.8	1.0
全タンパク質	0.8	0.75	13.1	12.5	12.8-15.2	9.9-15.5
ラクトース	4.85	4.90	75.0	67.4	71-81	65-80
灰分	0.5	0.8	7.3	11.8	8.0	7.0-19.4
乳酸	0.05	0.4	0.2	4.2	1.8-2.2	7-10

<sup>1)</sup> 文献 2 ; <sup>2)</sup> 文献 8。

濃縮、乾燥した場合、ホエータンパク質の加熱変性による溶解性の低下、保存中の褐変化などの問題もある。しかし、栄養価の高いホエー成分の有効利用は、古くから酪農科学における重要な課題でもあった。したがって、1970年代まで家畜の飲用水へのホエー置換、飼料の栄養改善、ホエーの酵素分解によるラクトース含量の低下、ホエーを培養体とした単細胞タンパク質の生産などについて活発な研究が行われている。この頃から、膜分離技術によるホエーの濃縮により WPC および WPI の生産が可能になり、これらの機能性について幅広い研究が行われるようになった。

農林水産統計報告<sup>10)</sup>によるわが国のチーズ生産量は、1990年には84,057.6トン、2000年には124,805.4トンであり、IDF 統計と若干異なるが、この10年間に約1.5倍の増加である。また、原料用を含むナチュラルチーズの生産量は、1990年28,415トンおよび2000年33,669トンで約1.2倍増加している<sup>11)</sup>。したがって、2000年のホエー排出量は約30万トンであり、約2,400トンのタンパク質に相当する。わが国のチーズ消費量は、1人あたり1.8 kg (1999年) であり<sup>5)</sup>、ヨーロッパ15カ国の17.9 kg に比較すると格段に低い。また、わが国のホエーの輸入量は、1990年では生乳換算で95,564トン (乳製品輸入量の3.2%) であり、2000年には263,208トン (6.3%) と10年間で約2.8倍増加している<sup>12)</sup>。これらのことから、わが国のホエー排出量や WPC, WPI などのホエー製品の利用は一層高まることが予測される。

## 2. ホエーの膜処理およびホエータンパク質濃縮物の品質に及ぼす影響

膜分離技術の基本となる透析法は、19世紀中頃 Graham<sup>13)</sup> がシリンドーの底に薄い硫酸紙を張り、その中に種々の溶液を入れて純水に浸けると、低分子物質が溶液側から純水側に移行することを初めて発見したことには始まる。この現象を彼はギリシャ語の“dialyein” (分

離する)を意味する“dialysis”(透析)と呼び、その後セロファン膜、コロジオン膜、動物膜などを用いてコロイドの大きさを測定したり、タンパク質の分離、精製などに利用された。しかし、透析法は単に膜を隔てた溶液の濃度差を駆動力としているので、透析に長時間を要し、タンパク質などに吸着、結合する塩類などの除去には限度があった。そこで、1920年代には電気透析(electrodialysis, ED)および限外濾過(ultrafiltration, UF)法が開発された。しかし、当時は工業規模でEDやUFの使用に耐える透析膜がなかったが、1950年代には種々の材質で透析膜がつくられ、それが契機となってその後逆浸透(reverse osmosis, RO)、精密濾過(microfiltration, MF)、ナノ濾過(nanofiltration, NF)などの膜分離技術も開発された。これらの技術は乳業にも導入され、とくにホエーの処理に用いられるようになった。このため、現在ではWPC、WPIなどのホエータンパク質濃縮物が生産され、おもに食品素材に利用されているが、さらに用途拡大のための研究が進められている。

#### (1) ホエーの膜処理

乳業における膜分離技術は、1950年代におけるホエーからの塩類除去に始まり、1952年にはEDによる脱塩ホエーについて報告された<sup>14)</sup>。ED装置は、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>などの陽イオンを透過し、Cl<sup>-</sup>、リン酸イオンなどの陰イオンを透過しない陽イオン交換膜と、これとは反対の役割をもつ陰イオン交換膜を交互に配列した脱塩室と濃縮室からなっている。濃縮室にはホエー、脱塩室には被希釈液を流入して直流電流を通電すると、ホエー中の陽イオンと陰イオンはそれぞれ脱塩室に移動する。このため、ホエーの塩濃度が低下するために脱塩ホエーが得られる。

また、溶液と溶媒を半透膜で隔離すると、溶媒は膜を通じて溶液側に移動する。ここで浸透圧が生じるが、溶液側に浸透圧以上の圧を加えると、溶液側の溶媒は逆流する。このため、溶液中の溶質濃度は高まり、濃縮される。これがROであり、これには加圧に耐える膜が必要である。セロファン膜、コロジオン膜などは、断面構造が単一な対称膜であり、濾過速度が遅く、加圧に対する寿命も短い。1960年代には緻密なセルロースアセテートフィルム(厚さ10-30 μm)が99%までNaClを保留することが見出された<sup>15,16)</sup>。これが発端になり、下層がスポンジ状で多孔性であり、緻密で薄いセルロースアセテートの非対称膜(厚さ0.1-0.2 μm)が開発された。その後、種々の性能をもつ非対称膜が開発され、1968年にはROによるホエーの濃縮が工業的に初めて行われた<sup>17)</sup>。現在、ROには溶液中の水のみを透過する非対称膜(最大細孔径3-10 Å)が使用されるので、溶液の濃

縮が可能である。

溶液中の小さい粒子と大きい粒子を篩分けするUFは、古くから実験室で使用されていたが、1968年以降脱脂乳およびホエーについてUFの性能が検討されるようになった。UFでは最大細孔径10-100 Åの非対称膜が使用され、水とともに塩類やラクトースもある程度除去される。ホエーの場合、UFによるタンパク質の濃縮限度は約80%までであり、さらにタンパク質濃度を高めるにはダイアフィルトレーション(diafiltration, DF)が行われる。これは、UF処理して得た濃縮液に加水し、さらにUFによって残留する塩類やラクトースを一層除去する技術であり、タンパク質濃度を90%以上に高めることが出来る。

NFは、ROとUFの中間領域の物質(分子量100前後-数千)を分離する技術であり、ホエー中の水および塩類の透過が可能であるが、乳業ではほとんど使用していない。また、MFはタンパク質よりも大きい成分の分離に使用し、牛乳中の菌体や脂肪球の分離に応用できる。乳業におけるこれらの膜分離技術については、最近いくつかの総説<sup>18-21)</sup>で詳細に解説されている。

このような乳業における膜分離技術の進歩の中で、平成10年3月30日厚生省令第45号で乳等省令が一部改正された。それによると、『乳清から乳糖を除去することによりたんぱく質を濃縮し、粉末状にしたものを「たんぱく質濃縮ホエイパウダー」とし、新たに乳製品として定義した』と記載されている。また、たんぱく質ホエイパウダーは、『乳固形分、乳たんぱく量、水分、細菌数及び大腸菌群の成分規格を規定し、乳たんぱく量については、乾燥重量において15.0%以上80.0%以下とした』と規定している。さらに『ホエイパウダー及びたんぱく質濃縮ホエイパウダーについては、それぞれ改正後の乳等省令第二条第三二号及び第三三号に規定する製造過程を経たものであれば、脱塩工程の有無に係わらない』とし、WPCなどのホエー製品が乳製品として扱われるようになった。膜分離技術の進歩は、古くからほとんどが廃棄されていたホエーに光明をもたらし、ホエー成分の有効利用に大きく貢献している。

#### (2) ホエーの加熱とタンパク質の変性

WPCおよびWPI製品の成分組成はSWおよびAWの起源、膜処理条件などによって異なるが、タンパク質含量は全固形分あたりそれぞれ75-80%および90%以上である。これらのタンパク質は、おもにβ-ラクトグロブリン(β-LG)、α-ラクトアルブミン(α-LA)、血清アルブミン(BSA)および免疫グロブリン(Ig)からなり(表3)<sup>22)</sup>、製品間でかなりの変動がある。WPCおよびWPIの機能性は、個々のタンパク質の総合力によるものであり、牛乳からホエータンパク質濃縮物が得られ

表3 市販 WPC および WPI のタンパク質組成 (%)

成分	WPC		WPI	
	範囲	平均±S.D.	範囲	平均±S.D.
$\beta$ -ラクトグロブリン	40.4-76.9	67.3±10.6	67.6-74.8	70.2±3.3
$\alpha$ -ラクトアルブミン	14.5-24.8	17.5±3.0	8.3-17.5	14.3±4.3
ウシ血清アルブミン	5.8-19.6	8.6±4.2	7.2-10.9	8.6±1.6
免疫グロブリン	3.8-15.4	7.2±4.4	5.9-7.5	6.9±0.7

るまでの様々な条件, さらに食品加工中の他成分との相互作用などによって大きく変化する。とりわけホエータンパク質の加熱変性は, これらの機能性に影響を及ぼす大きな要因である。

タンパク質の構造は, 加熱によりまず3次元構造が部分的に失われ, タンパク質の水和に変化が生じる。この場合, 60°Cまでの加熱では可逆的变化であり, いくつかのホエータンパク質分子は解離または会合する<sup>23)</sup>。しかし, タンパク質が変性温度を越えると, タンパク質の構造に不可逆的变化が生じる。この変化は, 加熱温度以外に pH, イオン強度, タンパク質濃度などの環境条件によっても異なる。示差走査熱量計 (DSC) により pH 6.0, 0.7 M リン酸緩衝液における各ホエータンパク質の変性温度 (Td) を求めると,  $\beta$ -LG 78°C,  $\alpha$ -LA 62°C, BSA 64°C および Ig 72°C である<sup>24)</sup>。また, pH 6.5 および 4.5 では,  $\beta$ -LG 75.9 および 81.9°C,  $\alpha$ -LA 61.0 および 61.5°C, BSA 71.9 および 74.0°C ならびに WPC 76.9 および 82.1°C<sup>25)</sup> である。また, pH 6.4 で 66°C, 60 分間加熱の場合,  $\alpha$ -LA および  $\beta$ -LG の変性度はそれぞれ 37 および 9% であり, 71°C ではそれぞれ 100 および 54% である (いずれも図から求めた値)。この場合, 市販 WPC のタンパク質変性度は 71°C で約 62-88% (3 製品) の幅があり,  $\beta$ -LG の変性は  $\alpha$ -LA よりも緩慢である<sup>26)</sup>。これらの結果では, いずれも  $\alpha$ -LA は  $\beta$ -LG よりも変性し易い。

しかし, 牛乳およびホエー中の各ホエータンパク質の変性状態は, これらの結果とは異なっている。牛乳およびホエーに  $\beta$ -LG または  $\alpha$ -LA を添加し, 80°C, 5 または 20 分間加熱後にゲル濾過すると,  $\beta$ -LG の溶出状態は  $\alpha$ -LA よりも大きく変化する,  $\beta$ -LG の変性度が  $\alpha$ -LA よりも高いことが分かる。これらの変化はホエーよりも牛乳で顕著に現れるが, これは牛乳中では  $\beta$ -LG や  $\alpha$ -LA が  $\kappa$ -カゼインと複合体を形成するからである<sup>27)</sup>。牛乳およびホエー中で  $\beta$ -LG の変性度が  $\alpha$ -LA よりも大きいことは, このほかの研究でも認められている<sup>28)</sup>。この原因の 1 つには, 一旦加熱変性した  $\alpha$ -LA が冷却すると再び未変性状態に戻ることが上げられている<sup>29)</sup>。

WPC, WPI などのホエータンパク質製品は, 溶解性, ゲル化性, 泡立ち性などの機能をもっている。これ

らの機能性は製品加工中の不可避な加熱処理によって損われる。この原因はホエータンパク質の変性および凝集によるものであり, 製品間でもかなりの変動がある。そこで, 70-90°C の加熱処理による  $\beta$ -LG を含むホエータンパク質の変性および凝集の動力学的解析を行うと, 75°C 以上の加熱では製品の塩組成がその機能性に及ぼす重要な要因である<sup>30)</sup>。また,  $\beta$ -LG 溶液を各 pH で 25°C から 96°C まで加熱し, その凝集状態を観察されている<sup>31)</sup>。この場合, 溶液の吸光値 (600 nm) を測定し, タンパク質-タンパク質相互作用が最高になる転移ピーク温度 (transition peak temperature, Tm) を求めると, pH 5.5 の Tm は 76°C であり, pH を高めると Tm は上昇する。しかし, pH 6.0 以上では転移ピークはほとんど現れず,  $\beta$ -LG の凝集は起らない。タンパク質分子間の反撥力が高まるからである。pH 5.50-6.50 でこの溶液にエチルマレイミド (N-ethylmaleimide, NEM) を添加して同様に加熱すると, pH に関係なく  $\beta$ -LG の凝集が起る。したがって, この凝集には静電的相互作用と同様にチオール反応と疎水性相互作用が関与していることが分かる。また, CaCl<sub>2</sub> および NaCl が存在すると, 加熱による  $\beta$ -LG の凝集は著しく変化する。

全乳 (W), 脱脂乳 (S) およびバターミルク (B) を 72.5°C, 15 秒間殺菌し, これらを同じ条件下でスターターおよびレンネット処理し, ホエーを得る。これらのホエーを UF および DF 処理後噴霧乾燥し, 得た WWPC, SWPC および BWPC の各組成成分と加熱変性との関係が検討されている<sup>32)</sup>。それによると, タンパク質および  $\beta$ -LG と変性エンタルピーとの間には正の相関があり, WPC の機能性は  $\beta$ -LG によって大きく影響を受けることが示唆されている。WWPC, SWPC および BWPC の間では脂肪球膜成分組成 (タンパク質, 脂質, トリグリセリド, リン脂質および結合脂肪) が異なり, これらの成分と変性エンタルピーの間にはいずれも負の高い相関が見出される。これは, WPC に対する結合脂肪や膜結合脂質成分の割合が高いと, 加熱変性中の疎水性相互作用が起り難いからである。また, リン脂質は, 変性温度との間で正の相関があるが, これはリン脂質のホエータンパク質の加熱変性に対する安定化作用として解釈される。脂質も BSA の加熱変性に対して安定

表4 SW から調製した WPC および市販 WPC の化学組成

組 成 分	WPC-A	WPC-B	WPC-C	WPC-D	市販 WPC
水 分 (%)	3.69	3.39	3.60	3.71	4.93
タンパク質 (%)	67.4	67.5	64.0	57.6	77.0
非タンパク窒素 (%)	0.55	0.56	0.53	0.56	0.61
全脂質 (%)	3.38	3.42	3.08	2.32	7.87
脂質/タンパク質	0.050	0.051	0.048	0.040	0.102
ラクトース (%)	18.5	18.7	19.9	27.4	27.4
灰 分 (%)	7.00	7.00	9.50	9.00	9.00
遊離脂肪酸 (全脂質中%)	3.23	2.94	2.99	3.02	2.64
リン脂質 (全脂質中%)	13.35	17.40	15.09	18.90	23.00
中性脂質 (全脂質中%)	83.22	79.86	81.92	78.08	74.36
Chol-エステル (全脂質中%)	2.92	2.87	3.74	3.48	1.69

WPC-A, SW 未加熱 ; WPC-B, SW を65°C, 1 分間加熱 ; WPC-C, SW に Ca 0.2 g/L 添加, 加熱 ; WPC-D, SW に Ca 0.6 g/L 添加, 加熱。

化作用を示すことが報告されている<sup>25,33)</sup>。WPC の鉄は開始変性温度と高い正の相関があり, 卵白タンパク質のコンアルブミンが鉄結合により熱安定性を増やすことはよく知られている<sup>34)</sup>。

また, 脱塩ホエー (タンパク質12.0%, Ca 0.06%) を pH 6.5 以上で95°C, 5 分間加熱しても可溶性であるが, pH 6.0 では可溶性窒素が80% になり, pH 5.5 で50%, さらに pH 4.5 で35% まで減少する。このホエーを pH 7.0 で加熱後に Ca を添加しても溶解度には何等影響がない。しかし, 加熱前に pH 6.0-9.0 で Ca を添加すると, 低濃度の Ca では溶解度が僅かに変化するだけであるが, 高い濃度では著しく低下する。WPC のイオン組成は, 原料および加工過程の条件に大きく依存している。その中で, UF または DF 処理時の SW の pH は最も重要であり, 加熱変性に関する WPC の Ca 含量は SW の pH が低いほど減少する<sup>35)</sup>。

### (3) ホエーおよび WPC 中の脂質への影響

SW には全固形分中約8%の脂質が含まれる。この脂質は, WPC の機能性や風味を損なう原因になることが指摘されている<sup>6,36,37)</sup>。また, ホエーの脂質は UF, RO などの膜処理効率とも関係があり, ホエー中に残留脂質が多いほど膜分離中の流束速度が低下する<sup>38)</sup>。市販 WPC および WPI のタンパク質含量は, それぞれ73.8 (72.0-76.6) % および91.0 (88.6-92.7) % であり, また脂質含量はそれぞれ5.00 (3.30-7.38) % および0.57 (0.39-0.67) % である。このように, WPC と WPI の脂質含量には大きな変動がみられるが, WPI の脂質含量は WPC に比較してかなり低い<sup>21)</sup>。この脂質を完全に除去することはコスト面から困難であるが, ホエータンパク質濃縮物の脂質含量を出来るだけ減らす研究も行われている。

SW に Ca を添加した後, 調製した WPC の脂質含量

に及ぼす影響は, 次のとおり調べている<sup>39)</sup>。殺菌全乳 (3.4% 脂肪) から得たチェダータイプ SW (脂肪0.05%, タンパク質0.86%, 全固形分6.03%, pH 6.2) を遠心分離/清浄化し, pH 7.2 に調節した後 UF および DF 処理し, 凍結乾燥する (WPC-A)。また, 同じロットの SW を65°C, 1 分間加熱したもの (WPC-B), さらに SW に Ca 0.2 g/L (WPC-C) および0.6 g/L (WPC-D) を添加し, 65°C, 1 分間加熱したものを WPC-A と同様に膜処理して WPC を得る。これらの WPC の化学組成は表 4<sup>39)</sup> のとおりである。これによると, Ca の添加は WPC の脂質含量の低下に効果があることが分かる。また, 脱脂乳, 全乳およびバターミルク (脱脂乳: バターミルクを90:10 で混合) を72.5°C, 15 秒間殺菌した後, 得たチェダータイプ SW を UF/DF 処理後, 調製した WPC の脂質含量はそれぞれ4.55, 11.80 および8.35% である<sup>32)</sup>。脱脂乳から得たこれらの WPC は, 全乳から得た WPC-A-D よりも脂質含量が高い。この原因は加熱条件, SW の遠心分離/清浄化の有無などによるものであり, WPC の脂質含量は単に原料または SW の脂質含量に影響されるものではない。WPC の脂質含量の低下には, SW へのわずかな Ca の添加 (0.02%) でも効果はあるが, 脂質/タンパク質比を低下するにはさらに Ca 添加量 (0.06%) の増加が必要である。

WPC の脂質は, 約80% が中性脂質であり, そのほかにリン脂質, コレステロールエステルなども含まれる。リン脂質はホエータンパク質の溶解度を低下させるので, WPC のリン脂質含量を下げることは重要である。ホエーに塩化カルシウムを添加し, 生じた不溶性凝集物を遠心分離すると, リン脂質のほとんどが脂肪球膜タンパク質と僅かなホエータンパク質とともに除去される報告がある<sup>40)</sup>。しかし, Ca 無添加の WPC-A-B と Ca 添加の WPC-C-D を比較しても, リン脂質含量にはほとんど差がみられない。

WPCの脂質が完全に除去できないのは、牛乳またはホエー中の脂肪球または脂肪球膜(MFGM)とホエータンパク質との相互作用のためである。全乳を87°C、2.5分間以上加熱し、これらの相互作用をSDS-PAGEで観察すると、 $\beta$ -LGおよび他のホエータンパク質はMFGMおよび膜タンパク質と速やかに反応するが、72°Cではごく僅かである<sup>41)</sup>。全乳の加熱は、ホエータンパク質のMFGMへの結合にきわめて有効である。 $\beta$ -LGとMFGMとの相互作用は、ホエータンパク質が完全な変性に要する加熱時間前に起ることが観察されている<sup>42)</sup>。未加熱全乳から分離した脂肪中の $\alpha$ -LAおよび $\beta$ -LG量は、それぞれ0.048および0.201 mg/g脂肪である<sup>43)</sup>。65°Cおよび75°C、60分間加熱の全乳では、 $\alpha$ -LAの脂肪球への結合量は、加熱時間にほとんど関係なく、0.2 mg/g以下である。また、 $\beta$ -LGも同様で0.4 mg/g脂肪前後である。85°C加熱では、 $\alpha$ -LA結合量は加熱20分間までに0.22 mg/g脂肪のプラト一値に達し、その後あまり変化がない。しかし、 $\beta$ -LG結合量は0.7 mg/g脂肪と著しく変化し、完全な変性が起る前にMFGMとの十分な相互作用がみられる。

#### (4) WPCおよびWPIのプラスミン濃度への影響

WPC、WPIなどのホエータンパク質製品は、食品加工の過程で多様な機能を失われないことが重要である。しかし、ホエータンパク質に含まれるプロテアーゼは、タンパク質の機能性のみでなく、食品の品質劣化の原因にもなる。この点で、牛乳中のプラスミン(EC 3. 4. 21. 7.)が問題になっている。

プラスミンは活性部位にセリン残基をもつセリンプロテアーゼであり、プラスミノゲンとしてウシ血液から牛乳中に移行する。プラスミノゲンは乳房炎乳<sup>44)</sup>、末期乳<sup>45,46)</sup>および高齢ウシの乳<sup>47)</sup>では増加し、血液や微生物から分泌されるプラスミノゲン活性化因子によって活性型のプラスミンに転換する。初期および末期乳のプラスミン濃度は、ジャーキー乳でそれぞれ0.15および0.37 mg/L、ホルスタイン乳でそれぞれ0.27および0.53 mg/Lである<sup>46)</sup>。このように、牛乳のプラスミン活性はウシの品種や泌乳期などでも異なる。プラスミンは牛乳中ではカゼインミセルに結合しており、 $\alpha_s$ -および $\beta$ -カゼインを分解する<sup>48)</sup>。このため、チーズ製造前のプラスミンによるカゼインの分解は、チェダーチーズの組成および収量<sup>49,50)</sup>、あるいはカテッジチーズ、ヨーグルトなどの組織<sup>51)</sup>に影響を及ぼす。牛乳中のプラスミン活性(U/ml)は、カゼイン部分で48.3 U、ホエー部分では2.3 Uである。しかし、牛乳に $\epsilon$ -アミノカプロン酸を添加し、カゼインミセル結合性のプラスミンを遊離させると、カゼイン部分では5.6 U、ホエー部分では47.2 Uになる<sup>52)</sup>。また、プラスミン+プラスミノゲン活性

を $\beta$ -LG A、 $\alpha$ -LAまたはBSAの存在下で測定すると、いずれにもある程度の抑制効果が認められるが、 $\beta$ -LG Bにはその効果はない<sup>52)</sup>。

この酵素は、低温発育細菌のプロテアーゼと関係があることが知られている<sup>53,54)</sup>。ほとんどの低温発育細菌は、殺菌またはUHT処理で除かれるが、加工前の牛乳の取り扱い次第では冷蔵中に生乳で増殖し、優勢な菌叢を形成する<sup>55,56)</sup>。生乳で低温発育性*Pseudomonas*が増殖すると、それと同時に熱安定な細胞外メタロプロテアーゼを産生するので、カゼインミセルからプラスミンおよびプラスミノゲンが放出する原因になる<sup>57)</sup>。また、カゼインミセルのプラスミン結合量は、チーズの加工条件によっても影響を受ける。チーズ製造の場合、牛乳への酸添加、レンネット凝固、あるいはこれら二つの組合せによってカゼインミセルが凝固する。酸添加では、カゼインミセルが著しく崩壊するので、AWへのプラスミンの放出が高まる。一方、レンネット添加ではカゼインミセルの崩壊は少なく、SWへのプラスミンの放出も少ない<sup>58)</sup>。

SWおよびAWから調製した市販WPCのプラスミン濃度は16.3-330  $\mu$ g/gタンパク質であり、製品による変動がきわめて大きい。一般にはAW-WPCのプラスミン活性の方がSW-WPCよりも高い<sup>59)</sup>。この点について、加工過程の相違にもよるが、SWにはプラスミン活性阻害物質が存在するという報告もある<sup>60)</sup>。WPIのプラスミン濃度は2.1-4.4  $\mu$ g/gタンパク質であり、WPCよりも著しく低い<sup>59)</sup>。これは、WPIの調製過程でイオン交換処理の際に、プラスミンが流出液中に失われるからである<sup>59)</sup>。

### 3. ホエータンパク質のゲル形成とその機構

食品タンパク質の中には、加熱すると3次元マトリックスまたは網目構造を形成する性質があり、食品組織のゲル化にきわめて重要である。ゲルは大部分が水で占められるが、外観的には固体のように振舞い、また液体の要素も備えている。これは、網目構造の中で大量の水が固定化されるためである。WPCおよびWPIのゲル化の問題について、最近わが国でも興味深い総説<sup>61,62,63)</sup>が学会誌に掲載されている。

#### (1) 加熱時間とタンパク質濃度

タンパク質ゲルの形成にはまずタンパク質の変性を必要とするので、ゲル化の最も重要な因子は加熱温度である。さらに、タンパク質-タンパク質間の相互作用が必要であり、タンパク質濃度も重要な因子である。ゲル化は、これらの両方またはいずれかが低すぎても起こらない。したがって、ゲル化には最低温度およびタンパク質

濃度があり、これを越えるとゲル強度が高まる。また、ゲル化時間は、温度の上昇<sup>64)</sup>およびタンパク質濃度の増加<sup>65)</sup>とともに短縮される。

ゲル化に必要な WPC のタンパク質濃度は、測定法によっても異なるが、普通 8% (w/v) 以上とされており<sup>66)</sup>、ホエータンパク質のゲル化実験は多くの場合この条件下で行われている。しかし、pH 7.0, 100°C, 10分間加熱の場合、7.7%でも強いゲルが形成され、タンパク質濃度の増加とともにゲルの不透明さが増すという<sup>67)</sup>。また、市販 WPC 溶液 (pH 7.0) を 80°C で加熱し、動的粘弾性の面から弾性成分を示す貯蔵弾性率 ( $G'$ )、粘性成分を示す損失弾性率 ( $G''$ ) および相角度 (phase angle,  $\tan^{-1}(G''/G')$ ) を求め、ゲル化点を  $G' = G''$ 、相角度 = 45° と定義すると、ゲル化濃度は 6.6% である<sup>68)</sup>。この場合も WPC 溶液のゲル化時間は、加熱温度の上昇とともに短縮される。

## (2) pH とイオン強度

WPC のゲル強度および構造は、pH が変わると大きく変化する。pH の相違による加熱ホエータンパク質ゲルの微細構造を電子顕微鏡<sup>69,70)</sup>で観察すると、2つのタイプがあり、pH 4.5–6.0 で形成される“微粒子” (particulate) ゲルと、この pH 範囲外で形成される“微線維” (fine-stranded) ゲルである。微線維ゲルの形成には、タンパク質分子が凝集前に非常に変性した状態になることが必要であり、この点から凝集は変性よりも緩慢に起こることが示唆されている。微粒子ゲルは、これとは反対にタンパク質分子の迅速な凝集が先行する。これは、タンパク質分子の実効電荷が低下するからである。加熱による  $\beta$ -LG ゲルのレオロジー的性質を調べると、 $\beta$ -LG (4%) のゲル化開始温度 (80–88°C) は、pH によって僅かに変化するだけであるが、変性温度は pH 4–8 で大きく変化する<sup>71)</sup>。一方、WPC ゲルの状態は、pH によってかなり異なる。WPC 溶液 (固形分 15%) を 80°C, 44分間加熱して形成するゲルは、pH 7.0–8.5 では微細で均一な半透明である。また、pH 4.5–6.0 では白色で小粒子がみられて、ゲルになめらかさを感じる。pH 4 近くでは、ゲルは不透明で粒子があり、ねばねばしている。pH 4 以下でも同じであるが、粘りが少なくなる<sup>72)</sup>。

WPC のゲル化は、また溶液のイオン強度 (塩濃度) によっても影響される。ゲル化時間は、ホエータンパク質の等電領域である pH 4–6 で最低になるが、NaCl または  $\text{CaCl}_2$  を少量加えただけでも著しく減少する<sup>68)</sup>。WPC 溶液 (固形分 15%, pH 7.0 または 8.0) に NaCl (イオン強度 0–0.50) および  $\text{CaCl}_2$  (0–0.060) 添加後、80°C, 44分間加熱した WPC 溶液の  $G'$  は、加熱時間とともにいずれの場合も増加する (図 1)<sup>72)</sup>。イオン強度を 0 から 0.04 に高めると  $G'$  も増加する。イオン強度があ

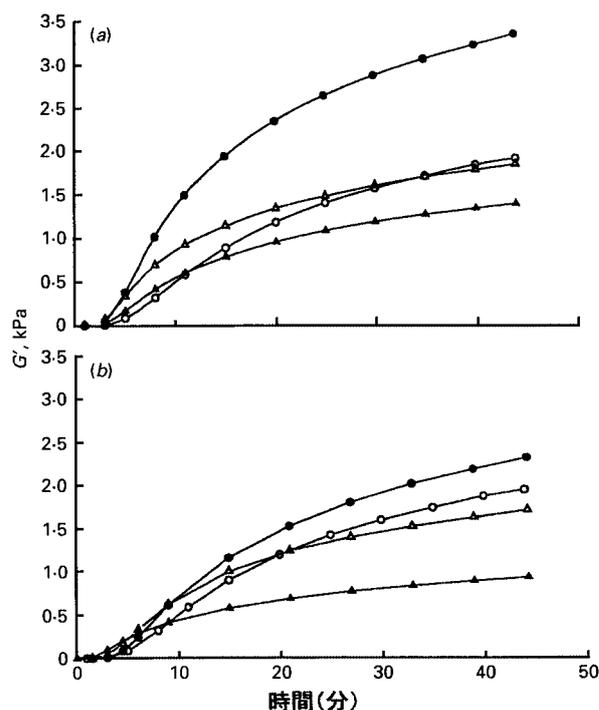


図 1 pH 7.0, 80°C で WPC 溶液 (全固形分 15%) の加熱ゲル化における時間と貯蔵弾性率  $G'$  との関係  
(a) NaCl 濃度 (イオン強度): ○, 0; ●, 0.04; △, 0.20; ▲, 0.50.  
(b)  $\text{CaCl}_2$  濃度 (イオン強度): ○, 0; ●, 0.015; △, 0.030; ▲, 0.060.

る程度高まると、 $G'$  は最高に達し、最適のゲルが形成される。タンパク質分子の実効負電荷が  $\text{Na}^+$  によって遮蔽され、タンパク質分子間の反発力が弱まり、反発力と牽引力とのバランスがよくなるからである。しかし、イオン強度がさらに高まると牽引力が着実に優位になり、無作為な凝集が増し、 $G'$  が低下して、ゲルの特性に変化が生じる。非常に高いイオン強度では、タンパク質の塩析効果が現れる。 $\text{Ca}^{2+}$  でも同じ傾向がみられるが、 $\text{Na}^+$  よりも低いイオン強度 (0.030) で  $G'$  が低下する。これは、 $\text{Ca}^{2+}$  がタンパク質分子間でカルシウム架橋をつくり、タンパク質の実効負電荷を強く遮蔽するからである。

WPI 溶液 (90 mg/ml, pH 7.0) または同溶液を 90°C, 30分間加熱後、冷却して得た改質乳清タンパク質 (process whey protein, PWP) 溶液に 25種類の塩を添加し、80°C, 60分間加熱後に形成したゲルの物性について研究されている<sup>73)</sup>。PWP が WPC に比較して特徴的なゲルを形成することは、北畠ら<sup>62,63)</sup>が総説で詳しく解説している。WPC の修飾による異なった物性をもつゲル形成は、用途面からも興味深いことである。

## (3) ゲル化機構

タンパク質のゲル化による網目構造の形成機構は十分

明らかではないが、球状タンパク質の加熱によるゲル化は次の2段階の反応式で示されていた<sup>74)</sup>:  $xPn \rightarrow xPd \rightarrow (Pd)_x$  ( $x$ , タンパク質分子数;  $Pn$ , 未変性タンパク質;  $Pd$ , 変性タンパク質)。すなわち、未変性タンパク質は加熱により変性し、次いで変性タンパク質単量体の凝集によってゲル化が起る。しかし、タンパク質分子のように分子間の結合部位数がはっきりしないバイオポリマーでは精密さに欠けることから、パーコレーション理論に基づいて次の3段階の反応式が示されている<sup>75)</sup>:  $n \rightarrow d, 2d \rightarrow d^2, d + dx \rightarrow dx + 1$  ( $n$ , 未変性タンパク質;  $d$ , 変性タンパク質;  $dx$ ,  $x$  変性タンパク質の凝集物)。これによると、第1段階は未変性タンパク質の変性 (denaturation) であり、第2段階は変性タンパク質2分子の複合体が生じるゲル化の開始 (initiation) である。第3段階は、変性タンパク質複合体に変性タンパク質が付加し、網目構造が広がる伝播 (propagation) である。これらの各反応段階はゲル化過程に対する律速段階であると考えられる<sup>75)</sup>。そこで、WPCのゲル化におけるゲル化時間とpHおよび温度との関係を調べると<sup>76)</sup>、71°C, pH 5.2では変性タンパク質2分子からの凝集物の形成 (開始) がゲル化過程の律速段階である。一方、pH 7.0では凝集物への変性タンパク質の付加 (伝播) が律速段階である。pH 5.9のゲル化過程では、開始が律速段階であり、反応速度は静電的作用によってpH 5.2よりも遅くなる。また、63–85°C, pH 5.2のゲル化時間のパーコレーション解析によると、高温 (75–85°C) では変性が抑制され、低温 (63–73°C) では凝集が抑制される。

$\beta$ -LGはWPCおよびWPIの主要タンパク質であり、全タンパク質の約50%以上を占めている。このタンパク質は加熱変性し易く、加熱による凝集は溶液の環境条件によって変化する。このため、WPCおよびWPIのゲル化機構の解明には、 $\beta$ -LGの加熱による凝集性を明らかにすることが重要である。 $\beta$ -LGは、A変異体とB変異体では凝集状態が異なる。B変異体を含むホエーでは可溶性凝集物量が多くなり、A変異体では不溶性凝集物量が多く生じる<sup>77)</sup>。また、A, B変異体ともに75°C以上で加熱するとゲルの網目構造を形成するが、A変異体ゲルの $G'$ はB変異体の $G'$ よりも高く、とくに25°Cに冷却するとその差が大きくなる<sup>78)</sup>。ゲル形成の最低タンパク質濃度 (いずれもタンパク質濃度50 g/L, pH 7.0, 0.1 M NaCl, 80°Cの場合) を増すと、 $G'$ の増加はB変異体よりもA変異体の方が高くなる。また、A変異体ゲルの $G'$ はpHの影響をあまり受けないが、B変異体はpH 3からpH 6で僅かに減少し、pH 6からpH 9にかけて増加する<sup>78)</sup>。

加熱による $\beta$ -LGの凝集性について、最近低タンパク質濃度<sup>79–81)</sup>および高タンパク質濃度<sup>82,83)</sup>のもとで多く

の研究が行われている。これらの研究から加熱によってチオール (SH)-ジスルフィド (S-S) 反応が起り、タンパク質分子間でS-S結合が形成され、これが $\beta$ -LGの凝集およびゲル化に重要である。また、10% $\beta$ -LG溶液を加熱すると、ゲル化前に安定な非共有結合凝集物の形成があることも示されている<sup>78)</sup>。

WPCおよびWPIのゲル化性は、 $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, BSAなどの各タンパク質のゲル化性とは異なる。この観点から、各タンパク質間の相互作用についても多くの研究が行われている。 $\beta$ -LG溶液にBSAまたは $\alpha$ -LAを添加すると、形成したゲルの堅さが増し、 $\beta$ -LGとBSA<sup>84,85)</sup>または $\alpha$ -LA<sup>86,87)</sup>間でS-S結合による複合体が形成される。また、 $\alpha$ -LAはBSAのゲル化を促進し<sup>88)</sup>、ゲル化の初期段階では $\beta$ -LGとBSA<sup>85)</sup>または $\alpha$ -LA<sup>87,89)</sup>の混合物が非共有結合凝集物を形成する。

また、各タンパク質間の相互作用について、 $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LAおよびBSAの各10%溶液、 $\beta$ -LG +  $\alpha$ -LAまたはBSA (2:1) 10%混合液および $\beta$ -LG +  $\alpha$ -LA + BSA (2:1:1) 10%混合液を75°Cで加熱し、SDS-PAGEで観察している<sup>90)</sup>。 $\beta$ -LG溶液では、大きな凝集物が生じ、この凝集物をSDSで部分分解すると、単量体、S-S結合した2量体、3量体、大凝集物などに分かれる。 $\beta$ -LG +  $\alpha$ -LA混合液では、S-S結合 $\beta$ -LG凝集物と $\alpha$ -LA +  $\beta$ -LG混合凝集物が生じる。 $\beta$ -LG + BSA溶液では、未変性BSAが $\beta$ -LGよりも速く減少し、30秒加熱後にはBSA単量体よりも移動が遅く薄いバンドが現れるが、90秒後には濃さが増し、さらに加熱すると、消失する。このバンドは、加熱中にS-S結合によって形成された $\beta$ -LG-BSA付加物 (1:1) である。しかし、 $\beta$ -LGとBSAが形成する中間凝集物はほとんどホモ重合体である。これは、 $\beta$ -LGとBSAでは変性温度が異なり、BSAは $\beta$ -LGの変性前に完全に変性してしまうからである。 $\beta$ -LG +  $\alpha$ -LA + BSA混合液では、 $\beta$ -LG溶液または $\beta$ -LG +  $\alpha$ -LA/BSA混合液でみられる中間凝集物は少なく、2分間加熱後にはBSAよりも移動の遅いいくつかの薄いバンドが出現する。各タンパク質のホモ重合体や付加物が形成されたためである。これらの点から、75°Cの加熱では、最初凝集物がおもにBSAの重合によって形成され、この後 $\beta$ -LGおよび $\alpha$ -LAが関与する凝集物が生じて、ゲルの網目構造形成があるものと考えられる (図2)<sup>90)</sup>。

$\beta$ -LG,  $\alpha$ -LAおよびBSA 1分子あたりの1/2シスチン残基数は、それぞれ5, 8および35個である。したがって、BSAは64°Cで変性すると、凝集物の形成が速い。 $\alpha$ -LAも約62°Cで変性するが、このタンパク質は $\beta$ -LGおよびBSAと異なり遊離SH基をもたず、一旦変性しても元に戻る性質があるので、凝集物の形成が遅い。しかし、 $\alpha$ -LAをプロテアーゼ (*Bacillus licheniformis* 由

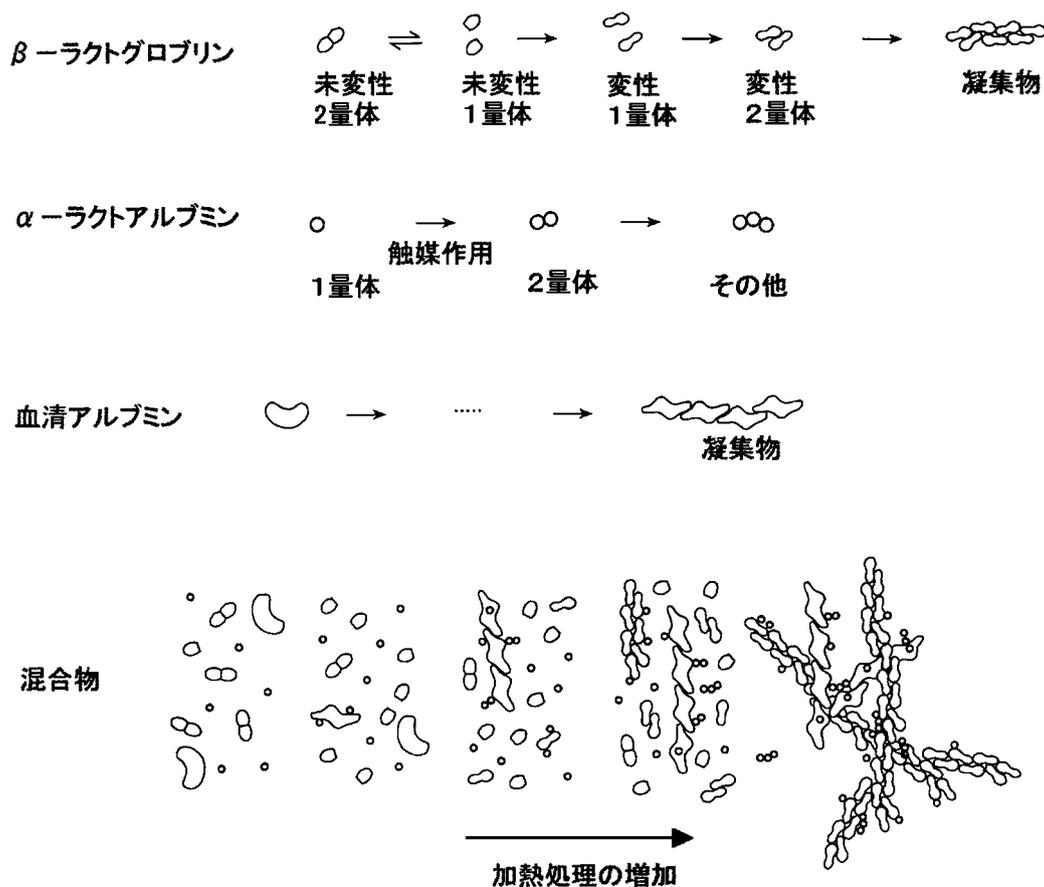


図2 加熱によるβ-ラクトグロブリン、α-ラクトアルブミンまたは血清アルブミンの凝集物形成ならびにこれらタンパク質混合溶液の加熱ゲル化による網目構造形成の模式図

来)で部分加水分解すると、同濃度のβ-LGゲルよりも20倍強いゲルを形成する<sup>91)</sup>。このゲルを透過型電子顕微鏡で観察すると、ゲルの網目構造は2μm以上の長さの線維(strand)で占めており、すべての線維は20nmに近い直径をもち、分枝せずに真っ直ぐ伸びている。これは、部分加水分解によって分子内のS-S結合が解離し、分子間で新たなS-S結合が形成されるためである。この線維の状態は、Ca濃度の相違によっても変化する。また、トリプシン、Neutrane(*Bacillus subtilis*由来)および細菌プロテアーゼ(*Bacillus licheniformis*由来)で部分加水分解したWPIのゲルを透過型電子顕微鏡で観察すると、ゲル強度の高い特徴的なゲルが形成される<sup>92)</sup>。このように、WPCおよびWPIをプロテアーゼで部分加水分解すると、未変性のものとは異なる特徴的な網目構造のゲルを形成することが注目される。

#### 4. ホエータンパク質濃縮物の乳化性および泡立ち性

食品工業では、食品の貯蔵寿命や品質を高めたり、食品中の油や脂肪を微細に分散させるため、均質化が広く行われている。このような加工食品はエマルジョンとし

て分類されており、油または脂肪と水の界面張力を低下させるために乳化剤が使用される。牛乳は天然のエマルジョンであり、牛乳中の脂肪-水界面では高度に相互作用した乳タンパク質がきわめて薄い層を形成し、脂肪球の安定化に役立っている。乳タンパク質のカゼインは優れた乳化剤として古くから使用されてきたが、WPC、WPIなどの工業的製造が可能になり、ホエータンパク質の乳化作用についても関心が高まっている。このため、WPCの加工上における加熱条件と乳化性との関係について研究されている。

牛乳は72°C、15秒間殺菌し、チェダーチーズ製造後のSWを55°Cで清浄化し、さらに48-53°CでUF処理して濃縮液(乾燥重量あたりタンパク質約80%)を得る。この濃縮液を未加熱(C)、64.5(L)または72°C(H)、15秒間加熱処理後、噴霧乾燥したWPCのヘプタン結合性(タンパク質疎水性度)およびパラナリン酸(cis-paranaric acid)結合性(タンパク質表面疎水性度)と機能性(オーバーラン、溶解度、ゲル強度、ケーキ高さ)との関係を調べている<sup>93)</sup>。それによると、表面疎水性度とこれらの機能性との間には高い相関が認められる。C-WPCとL-WPCはいずれの疎水性度もほとんど同じ

表5 各 WPC の組成および機能性

組成および機能性	SWPC	WWPC	BSWPC
タンパク質 (%)	73.31	70.75	70.31
非タンパク窒素 (%)	0.72	0.69	0.71
全脂肪 (%)	3.78	9.32	8.35
遊離脂肪 (%)	0.21	1.57	0.6
結合性脂肪 (%)	3.56	7.75	7.75
リン脂質 (%)	1.82	2.02	2.79
ラクトース (%)	8.2	6.6	6.5
灰分 (%)	3.08	2.78	2.81
Ca (%)	0.51	0.46	0.45
変性エンタルピー (cal/g)	2.71	2.12	1.94
表面疎水性度	105.0	139.4	149.9
溶解度 (%)	98.4	93.4	91.2
泡立ち容量 (%)	648.0	0	381.2
泡安定性 (min)	15.67	0	1.95
乳化力 (m <sup>2</sup> /g)	20.90	19.77	20.95
エマルジョン安定性 (%)	35.3	33.9	34.5

SWPC, 脱脂乳 WPC ; WWPC, 全乳 WPC ; BSWPC, 脱脂乳+バターミルク WPC。

であるが、これらの WPC に比較して H-WPC は明らかに低い。また、オーバーランおよび溶解度は C-WPC と L-WPC ではほとんど差がないが、ゲル強度は L-WPC の方が高い。しかし、H-WPC の機能性はいずれも低い。

また、牛乳→ホエー→濃縮液の各段階を 8 通りの組合せ (たとえば、牛乳のみ、牛乳とホエー、牛乳と濃縮液など) で 72°C, 15 秒間加熱した WPC を調製し、加熱と WPC の組成および機能性との関係を調べている<sup>94)</sup>。それによると、牛乳の加熱は、WPC の中性脂質、リン脂質、ゲル強度 (pH 6.5)、泡立ち、泡安定性およびタンパク質疎水性度と高い相関が認められる。このうち、リン脂質と泡立ち以外は、すべて負の相関を示す。加熱乳からの WPC の泡立ちがよいのは、脂質が WPC の泡立ちを阻害するので<sup>95)</sup>、中性脂質の減少によるものと考えられる。ホエーの加熱では、P, Ca および Mg がいずれも負の高い相関を示す。さらに、濃縮液の加熱は、ゲル強度 (pH 8.0)、乳化性、オーバーランおよび溶解度との間で負の相関がある。

WPC の機能性は、このように脂質含量との関係が重要である。そこで、脱脂乳 (SWPC)、全乳 (WWPC) および脱脂乳+バターミルク (90 : 10, BSWPC) から得た脂質含量の異なる SW (チェダータイプ) を用いて WPC を調製し、化学組成および機能性を比較している (表 5)<sup>37)</sup>。SWPC の組成をほかの WPC と比較すると、タンパク質含量は高く、全脂肪および結合脂肪含量が低い。また、表面疎水性度および溶解度は、WPC 間で顕著な差はないが、SWPC の泡立ち容量および泡安定性は、BSWPC に比較して顕著に高く、WWPC ではほと

んど認められない。BSWPC では脂肪含量が高く、タンパク質含量が低いので、タンパク質の疎水性相互作用が抑制されるからである。

## 5. ホエータンパク質濃縮物のフィルム形成

食用フィルム (edible film, EF) にはいくつかの利点がある。可食性で経済的であり、使用に際して廃物が減り、食品の官能的、機械的または栄養的特性を増強する。また、食品の小片または部分を保護し、不均一な食品内部での成分間バリアーとしても利用できる<sup>96)</sup>。このため、タンパク質、脂質または多糖を用いた EF の形成が注目されている。乳タンパク質 EF の機能性と応用面について、広範にわたる研究が総説に纏められている<sup>97)</sup>。

タンパク質 FM は、酵素法および加熱法でつくられる。酵素法では、トランスグルタミナーゼ (グルタミル-ペプチド  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ, EC 2. 3. 2. 13) を使用する。この酵素は、Ca<sup>2+</sup> 存在下でペプチドまたはタンパク質グルタミン残基の  $\gamma$ -カルボキシアミド基でアミノ分解を触媒し、さまざまな第 1 級アミンおよびアンモニアと交換反応を行う<sup>98)</sup>。このため、ペプチド-結合リシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基との間で  $\epsilon$ -( $\gamma$ -グルタミル) リジン架橋が形成される<sup>99)</sup>。 $\alpha_{S1}$ -カゼインにトランスグルタミナーゼを作用し、架橋形成によってつくられたフィルムは、水およびタンパク質変性剤には不溶性であり、タンパク質分解酵素で消化される<sup>100)</sup>。また、 $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, カゼイン,  $\alpha$ -カゼインなどは、Ca<sup>2+</sup> とともに pH 6.5-8.0 でこの酵素を作用すると架橋を形成して不溶性化する。しかし、ホエータンパク質では、さらに DTT (dithiothreitol) で処理してジスルフィド結合を還元し、リシンおよびグルタミン残基をこの酵素の活性部位に近づける必要がある<sup>101)</sup>。

そこで、 $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA または  $\beta$ -LG +  $\alpha$ -LA 混合物 (1 : 1) 溶液と酵素溶液を混合し、DTT またはグリセロールを加えて 37°C, 5 時間保持し、プレート上に流して乾燥し、EF がつくられている<sup>102,103)</sup>。これらの EF の厚さはほぼ同じであるが、 $\beta$ -LG EF の水蒸気透過性 (water vapor permeability, WVP) は、 $\alpha$ -LA EF よりも僅かに低く、混合物 EF はタンパク質単独の EF よりも水蒸気を透過し易い。また、 $\beta$ -LG のフィルム強度は  $\alpha$ -LA EF よりも高い。しかし、酵素法による EF の形成は、酵素使用上の制限があり、製造コストも割高であり、実用には向かないことが指摘されている<sup>97)</sup>。

ホエータンパク質は、加熱によって変性するとランダムコイル構造に変化する。 $\beta$ -LG は pH 6.5, 70°C で加熱すると、不可逆的変性が開始し、スルフィド基が関与する凝集物を生じる<sup>104)</sup>。しかし、ラクトースが存在する

表6 乳タンパク質食用フィルムおよび合成フィルムの水蒸気透過性

フィルム	厚さ mm	試験条件		透過性 $10^{14} \times \text{kg} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$	文献
		°C	相対湿度%		
WPC : Glyc (2 : 1)	0.11	23	55/74	296.1	107
WPI : Glyc (2 : 1)	0.111	23	55/76	337.6	107
WPI : Glyc (1.6 : 1)	0.11	25	0/11	7.7	103
WPI : Glyc (4 : 1)	0.13	25	0/77	81.4	103
WPI : Sor (1.6 : 1)	0.13	25	0/79	71.9	103
WPC : AM : Glyc (2 : 2 : 1)	0.11	23	55/64	110.0	107
WPI : AM : Glyc (2 : 2 : 1)	0.111	23	55/74	328.4	107
WPI : BW : Sor (3.5 : 1.8 : 1)	0.14	25	0/98	6.1	108
WPI : BW : Sor (3.5 : 1.8 : 1)	0.14	25	0/98	6.1	108
SC	0.083	25	0/86	42.6	107
CC	0.82	25	0/85	32.6	107
SC : Glyc (2 : 1)	0.109	23	55/76	359.1	107
CC : Glyc (2 : 1)	0.105	23	55/71	220.3	107
ポリ塩化ビニール	0.013	23	55/99	0.60	107
セロファン	0.025	38	90/0	8.37	107

相対湿度は膜外側/内側%を示す。Glyc, グリセロール; Sor, ソルビトール; AM, アセチルモノグリセリド; BW, 蜜ろう; SC, ナトリウムカゼイネート; CC, カルシウムカゼイネート。

と、熱変性に必要とする最低温度が高まるので<sup>25)</sup>, EF 形成にはラクトース含量が高い WPC よりも WPI の方が好都合である。

WPI EF は次のように調製される<sup>105)</sup>。8–12% (w/w) WPI 水溶液を75–100°C, 15–45分間加熱し、真空脱気する。pH を調節し、EF 可塑性剤としてグリセロール (Glyc), ポリエチレングリコール (PEG) またはソルビトール (Sor) を添加後、溶液をプレート上に流して23°C, 相対湿度40%で18時間乾燥すると、EF が形成される。WPI : Sor が1.6 : 1 の場合、EF の形成には75°C, 30分間の加熱が最低限必要である。加熱処理しないと、EF は乾燥の際小片に割れてしまい、また75°C加熱ではそれ以上の温度で加熱した EF よりも脆い。また、90°C, 30分間加熱の場合、WPI 8%以下では EF は形成されず、12%では EF に気泡が入るので、WVP が高くなる。pH 7.0では WVP が最も低い EF が形成される。EF の WVP は、可塑性剤の種類や濃度によっても影響される。可塑性剤濃度が同じ場合、Sor-EF は Glyc- および PEG-EF よりも WVP が低い。また、WPC, WPI, ナトリウムカゼイネート (SC), カルシウムカゼイネート (CC) などと、可塑性剤として Glyc およびアセチルモノグリセリド (AM) を用いて EF が調製されている<sup>106)</sup>。

乳タンパク質 EF の WVP を合成フィルム (ポリ塩化ビニール) およびセロファンと比較すると、表 6<sup>97)</sup>のとおりである。WPI EF の WVP は合成フィルムには及ばないが、タンパク質には親水性基が豊富に存在するからである。しかし、セロファンと同程度の水分バリアー機能があることが分かる。タンパク質 EF 形成の際に脂

質の配合は、WVP の低下にきわめて有効であることが示されている<sup>105,107)</sup>。この場合、高融点の脂質の方が低融点のものより効果的である。可塑性剤は、EF の張力性 (張力強度, 伸長性, 弾性率) にも影響を及ぼす。Sor および Glyc 濃度を増加すると、EF の張力強度は著しく減少し、伸長性は増加する。弾性率は可塑性剤濃度でも異なるが、30%濃度では Sor-EF の方が Glyc-EF よりも高い<sup>108)</sup>。また、タンパク質と可塑性剤との割合も重要である。

ホエータンパク質濃縮物がもつこのような被膜形成の機能は、またマイクロカプセル化 (microencapsulation) の応用面もある。マイクロカプセル化は液滴または固体粒子を薄膜で被覆する技術であり、被覆される物質はコア (core) といい、マイクロカプセル化する物質が形成する構造は壁 (wall) と呼んでいる。食品の場合、コア物質として揮発性調味物質, ビタミン, 精油, 微生物, 酵素, ミネラルなどが用いられる<sup>109,110)</sup>。また、壁物質は溶解し易く、風味が薄いうえ、優れたフィルム形成, 乳化性および乾燥性を必要とする。この場合、壁構造はコア物質と他成分との接触による相互の劣化を阻止したり、揮発性コア物質の放散または損失を防ぐ働きがある。マイクロカプセル化法には液中硬化被覆法, 相分離法および噴霧乾燥法があり、食品のような大量生産にはおもに噴霧乾燥法が用いられる<sup>111,112)</sup>。このため、壁溶液は濃い状態で粘性が低いことが要求される。

WPC および WPI のマイクロカプセル化について、コア物質として無水乳脂肪 (anhydrous milk fat, AMF) を用いて検討している。WPC (タンパク質50および75

%) またはこれにラクトースを混合した壁水溶液 (固形分10-30%) をつくり, これらの溶液に AMF を75%乳化させて, 噴霧乾燥後の粉末のマイクロカプセル化収量 (microencapsulation yield, MEY) およびマイクロカプセル化効率 (microencapsulation efficiency, MEE) を求めている<sup>113)</sup>。MEY は, エマルジョンに添加した AMF 量に対するカプセル化の AMF 量 (%) である。また, MEE は,  $(MEFL-EF) \times 100 / MEFL$  から算出される。但し, MEFL はマイクロカプセル化脂肪量であり, EF は石油エーテルで抽出された脂肪量である。この場合, MEY はいずれも95%以上であるが, MEE は WPI のみでは約37%に過ぎない。しかし, WPI をラクトースで5%以上置換すると, MEE を90%以上に高めることができる。また, WPI と市販マイクロカプセル剤 (マルトデキストリン, デキストロース, コーンシロップ) を混合した壁溶液の場合, MEY は95%以上である。しかし, MEE は90%以上のものもあるが, 炭水化物の種類および配合割合によって大きく変動する。これらのことから, WPC および WPI は, 炭水化物との併用を工夫すればコア物質のマイクロカプセル化が可能である<sup>114)</sup>。

#### おわりに

チーズおよびカゼイン製造の副産物として排出されるホエーは, 数十年前までは食品素材への利用がきわめて少なかった。しかし, 最近の膜分離技術の著しい進歩によりホエーからホエータンパク質濃縮物などの生産が可能になり, 現在ではさまざまな機能性を生かし, 食品素材として広く利用されている。さらに, ホエー, ホエータンパク質濃縮物などを用いて, ホエー成分の工業規模での分離, 精製ならびに各成分の機能性について活発な研究が行われている。このうち, ホエータンパク質のラクトフェリンはすでに脱脂乳やホエーから単離され, 多様な機能性が食品などの用途に向けられている。

また, WPC および WPI の栄養生理機能は本稿では触れなかったが, この面でもいろいろの特性をもつことが知られている。わが国では育粉用ホエーの輸入量が, 生乳換算で全輸入ホエー量の約15%を占めている。このホエーは脱塩ホエーなどであり, 育児用ミルクのタンパク質およびミネラル組成の調整, 栄養生理効果の改善などに欠かせない素材である。このことからホエー成分の栄養生理的意義を窺い知ることができるが, ホエー成分にはまだいろいろの課題が残されている。

今後, ホエー各成分の大規模な分離, 精製が可能になり, これら成分の機能性などの研究が一層進められるものと思われる。それに伴って, ホエーおよびホエー成分の用途に新たな展開が見出されることを期待したい。

#### 参考文献

- 1) 鶴田文三郎:「乳清」の秘密, 講談社, 東京, p. 88 (1985).
- 2) Kosikowski F. V., *J. Dairy Sci.*, **62**, 1149 (1979).
- 3) 東京大学生産技術研究所・農林水産省監修: 食品製造における膜利用技術, 食品産業膜利用技術研究組合, 東京 (1987).
- 4) C. V. Morr and N. Melachouris: *J. Dairy Sci.*, **67**, 2620 (1984).
- 5) ㈱日本国際酪農連盟: 世界の酪農情勢1990-91, p. 14 (1991). 世界の酪農情勢2001, p. 10, p. 93 (2001).
- 6) C. V. Morr and E. Y. W. Ha: *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 431 (1993).
- 7) American Dairy Products Institute: *Am. Dairy Prod. Inst.*, Chicago, IL, (1992).
- 8) S. T. Yang and E. M. Silva: *J. Dairy Sci.*, **78**, 2541 (1995).
- 9) D. J. Schingoethe: *J. Dairy Sci.*, **59**, 556 (1976).
- 10) 農林水産省統計情報部: 平成12年牛乳乳製品統計, 農林水産統計報告13-40(流通-7), p. 182 (2001).
- 11) 日刊酪農乳業速報資料特集58: ㈱酪農乳業速報, 東京, p. 188 (2001).
- 12) 日刊酪農経済通信特別号: ㈱酪農経済通信社, 東京, No. 38, 169 (1991): No. 48, 196 (2000).
- 13) J. Graham: *J. Chem. Soc.*, **15**, 216 (1862).
- 14) S. G. Wiechers: *U. S. Patent*. No. 2, 604, 403 (1952).
- 15) C. E. Reid and E. J. Breton: *J. Appl. Polymer Sci.*, **1**, 133 (1959).
- 16) S. Loeb and S. Sourirajan: *Advances in Chem. Series*, **38**, 117 (1963).
- 17) F. E. McDonough: *Food Eng.*, **40**, 124 (1968).
- 18) 小此木成夫: 日食工誌, **32**, 144 (1985).
- 19) 富田 守, 田村吉隆, 溝田輝彦: ジャパンフードサイエンス, **25**, 23 (1986).
- 20) 佐藤幾郎, 溝田輝彦, 田村吉隆, 福渡康夫: 食品膜技術(大矢晴彦, 渡辺敦夫監修), 光琳, p. 349~379 (1999).
- 21) 重松明典: 乳業技術, **50**, 145 (2000).
- 22) C. V. Morr and E. Y. W. Ha: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 431 (1993).
- 23) F. Macritchie: *J. Colloid Interface Sci.*, **45**, 235 (1973).
- 24) J. N. de Wit and G. Klarenbeek: *J. Dairy Sci.*, **67**,

- 2701 (1984).
- 25) V. Bernal and P. Jelen: *J. Dairy Sci.*, **68**, 2847 (1985).
- 26) C. M. Hollar, N. Parris, A. Hsieh and K. D. Cockley: *J. Dairy Sci.*, **78**, 260 (1995).
- 27) A. A. Elfagm and J. V. Wheellock: *J. Dairy Sci.*, **61**, 159 (1978).
- 28) M. Donovan and D. M. Mulvihill: *Ir. J. Food Sci. Technol.*, **11**, 87 (1987).
- 29) M. Ruegg, U. Moor and B. Blanc: *J. Dairy Res.*, **44**, 509 (1977).
- 30) J. N. de Wit: *J. Dairy Sci.*, **73**, 3602 (1990).
- 31) Y. L. Xiong, K. A. Dawson and L. Wan: *J. Dairy Sci.*, **76**, 70 (1993).
- 32) M. T. Patel, A. Kilara, L. M. Huffman, S. A. Hewitt and A. V. Houlihan: *J. Dairy Sci.*, **73**, 1439 (1990).
- 33) J. N. de Wit, G. Klarenbeek and E. Hontelez-Backx: *Neth. Milk Dairy J.*, **37**, 37 (1983).
- 34) J. W. Donovan and K. D. Ross: *J. Biol. Chem.*, **250**, 6026 (1975).
- 35) O. de Rham and S. Chanton: *J. Dairy Sci.*, **67**, 939 (1984).
- 36) J. N. de Wit, G. Klarenbeek and M. Adamse: *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 41 (1986).
- 37) M. T. Patel and A. Kilara: *J. Dairy Sci.*, **73**, 2731 (1990).
- 38) J. N. de Wit and R. de Boer: *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 198 (1975).
- 39) M. Vaghela and A. Kilara: *J. Dairy Sci.*, **79**, 1172 (1996).
- 40) J. L. Maubois, A. Pierre, J. Fauquant and M. Piot: *IDF Bull.*, **212**, 154 (1987).
- 41) H.-H. Y. Kim and R. Jimenez-Flores: *J. Dairy Sci.*, **78**, 24 (1995).
- 42) D. G. Dalgleish and J. M. Banks: *Milchwissenschaft*, **46**, 75 (1991).
- 43) M. Corredig and D. G. Dalgleish: *J. Dairy Res.*, **63**, 441 (1996).
- 44) J. Schaar and H. Funke: *J. Dairy Res.*, **53**, 515 (1986).
- 45) J. Schaar: *J. Dairy Sci.*, **52**, 369 (1985).
- 46) B. C. Richardson: *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **18**, 247 (1983).
- 47) E. D. Bastian, R. J. Brown and C. A. Ernstrom: *J. Dairy Sci.*, **74**, 3677 (1991).
- 48) T. H. M. Snoeren and J. A. M. van Riel: *Milchwissenschaft*, **34**, 528 (1979).
- 49) D. M. Barbano, R. R. Rasmussen and J. M. Lynch: *J. Dairy Sci.*, **74**, 369 (1991).
- 50) I. Politis and K. F. Ng Kwai Hang: *J. Dairy Sci.*, **71**, 1711 (1988).
- 51) P. F. Fox: *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 233 (1981).
- 52) I. Politis, B. Zavizion, D. M. Barbano and R. C. Gorewit: *J. Dairy Sci.*, **76**, 1260 (1993).
- 53) K. L. Kohlman, S. S. Nielsen and M. R. Ladisch: *J. Dairy Sci.*, **74**, 4125 (1991).
- 54) I. Politis, D. M. Barbano and R. C. Gorewit: *J. Dairy Sci.*, **75**, 1402 (1992).
- 55) S. J. Collins, B. H. Bester and A. E. McGill: *J. Food Prot.*, **56**, 418 (1993).
- 56) D. J. Fairbairn and B. A. Law: *J. Dairy Res.*, **53**, 139 (1986).
- 57) C. Fajardo-Lira and S. S. Nielsen: *J. Dairy Sci.*, **81**, 901 (1998).
- 58) B. C. Richardson and P. D. Elston: *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **19**, 63 (1984).
- 59) K. D. Hayes and S. S. Nielsen: *J. Dairy Sci.*, **83**, 387 (2000).
- 60) L. Chianese, S. Caira, P. Ferranti, P. Laezza, A. Malorni, G. Mucchetti, G. Garro and F. Addeo: *Lait*, **77**, 699 (1997).
- 61) 勝田啓子: 日食工誌, **37**, 73 (1990).
- 62) 杵川洋一, 後藤茂男, 北島直文: 日食工誌, **44**, 599 (1997).
- 63) 北島直文, 杵川洋一: ミルクサイエンス, **50**, 107 (2001).
- 64) J. A. Dunkerley and J. G. Zadow: *Aust. J. Dairy Technol.*, **39**, 44 (1984).
- 65) J. Plock, H.-J. Beyer and H.-J. Kessler: "Protein Interactions" (J. Visser ed.), VCH, Weinheim, p. 167 (1992).
- 66) R. M. Hiller and G. C. Cheeseman: *J. Dairy Res.*, **46**, 113 (1979).
- 67) R. H. Schmidt: "Protein Functionality in Foods" (J. P. Cherry ed.), American Chemical Society, Washington DC, p. 131 (1981).
- 68) Q. Tang, O. J. McCarthy and P. A. Munro: *J. Dairy Res.*, **60**, 543 (1993).
- 69) V. R. Harwalker and M. Kalab: *Milchwissenschaft*, **40**, 665 (1985).
- 70) M. Stading and A.-M. Hermansson: *Food Hydrocolloids*, **5**, 339 (1991).
- 71) M. Paulsson, P. Dejmek and T. van Vliet: *J. Dairy Sci.*, **73**, 45 (1990).
- 72) Q. Tang, O. J. McCarthy and P. A. Munro: *J. Dai-*

- ry Res., **62**, 469 (1995).
- 73) Y. Kinekawa, T. Fuyuki and N. Kitabatake: *J. Dairy Sci.*, **81**, 1532 (1998).
- 74) J. D. Ferry: *Adv. Prot. Chem.*, **4**, 1 (1948).
- 75) A. J. Steventon, L. F. Gladden and P. J. Fryer: *J. Text. Stud.*, **22**, 201 (1991).
- 76) S. M. Taylor, L. F. Gladden and P. J. Fryer: *J. Dairy Res.*, **61**, 71 (1994).
- 77) N. Parris, S. G. Anema, H. Singh and L. K. Creamer: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 460 (1993).
- 78) M. McSwiney, H. Singh, O. H. Campanenella and L. K. Creamer: *J. Dairy Res.*, **61**, 221 (1994).
- 79) U. M. Elofsson, P. Dejmek and M. A. Paulsson: *Int. Dairy J.*, **6**, 343 (1996).
- 80) J. I. Boye, C. Y. Ma, A. A. Ismail, V. R. Harwalkar and M. Kalab: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1608 (1997).
- 81) M. A. M. Hoffmann and P. J. J. M. van Mil: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2942 (1997).
- 82) J. E. Matsuura and M. C. Manning: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1650 (1994).
- 83) X. L. Qi, C. Holt, D. McNulty, D. T. Clarke, S. Brownlow and G. R. Jones: *Biochem. J.*, **324**, 341 (1997).
- 84) N. Matsudori, T. Oshita and K. Koayashi: *J. Dairy Sci.*, **77**, 1487 (1994).
- 85) J. Gezimati, H. Singh and L. K. Creamer: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 804 (1996).
- 86) N. Matsudori, T. Oshita and K. Kobayashi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1697 (1992).
- 87) J. Gezimati, L. K. Creamer and H. Singh: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1130 (1997).
- 88) N. Matsudori, T. Oshita, K. Kobayashi and J. E. Kinsella: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1053 (1993).
- 89) D. G. Dalgleish, V. Senaratne and S. Francois: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3459 (1997).
- 90) P. Havea, H. Singh and L. K. Creamer: *J. Dairy Res.*, **68**, 483 (2001).
- 91) R. Ipsen, J. Otte and K. B. Qvist: *J. Dairy Res.*, **68**, 277 (2001).
- 92) J. Otte, Z. Y. Ju, A. Skriver and K. B. Qvist: *J. Dairy Sci.*, **79**, 782 (1996).
- 93) M. E. Mangino, L. M. Huffman and G. O. Regester: *J. Food Sci.*, **53**, 1684 (1988).
- 94) M. E. Mangino, Y. Y. Liao, N. J. Harper, C. V. Morr and J. G. Zadow: *J. Food Sci.*, **52**, 1522 (1987).
- 95) F. E. McDonough, R. E. Hargrove, W. A. Mattingly, L. P. Posti and J. A. Alford: *J. Dairy Sci.*, **57**, 1438 (1974).
- 96) S. Guilbert: "Food Packaging and Preservation" (M. Mathlouthi ed.), Elsevier Appl. Sci. Publ. Co., London, p. 371 (1986).
- 97) H. Chen: *J. Dairy Sci.*, **78**, 2563 (1995).
- 98) J. E. Folk: *Adv. Enzymol.*, **54**, 1 (1983).
- 99) J. E. Folk and J. S. Finlayson: *Adv. Protein Chem.*, **31**, 1 (1977).
- 100) M. Motoki, H. Aso, K. Seguro and N. Nino: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 993 (1987).
- 101) R. Aboumahmoud and P. Savello: *J. Dairy Sci.*, **73**, 256 (1990).
- 102) R. Mahmoud and P. Savello: *J. Dairy Sci.*, **75**, 942 (1992).
- 103) R. Mahmoud and P. Savello: *J. Dairy Sci.*, **76**, 29 (1993).
- 104) O. E. Mills: *Biochim. Biophys. Acta*, **434**, 324 (1976).
- 105) T. H. McHugh, J.-F. Aujard and J. M. Krochta: *J. Food Sci.*, **59**, 416 (1994).
- 106) R. Banerjee and H. Chen: *J. Dairy Sci.*, **78**, 1673 (1995).
- 107) R. J. Avena-Bustillos and J. M. Krochta: *J. Food Sci.*, **58**, 904 (1993).
- 108) T. H. Mchugh and J. M. Krochta: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 841 (1994).
- 109) J. D. Dziezak: *Food Technol.*, **42**, 135 (1988).
- 110) L. S. Jackson and K. Lee: *Lebensm. Wiss. Technol.*, **24**, 289 (1991).
- 111) G. A. Reineccius: "Flavor Encapsulation" (G. A. Reineccius and S. J. Risch eds.), Am. Chem. Soc., Washington, D. C., Am. Chem. Soc. Symp. No. 370, p. 45 (1988).
- 112) 福島正義: *New Food Industry*, **32**, 47 (1990).
- 113) S. L. Young and M. Rosenberg: *J. Dairy Sci.*, **76**, 2868 (1993).
- 114) S. L. Young, X. Sarda and M. Rosenberg: *J. Dairy Sci.*, **76**, 2878 (1993).