

ヨーグルトにおける
発酵後の加熱処理が及ぼす
質的变化に関する研究

2021.3

宮地 一裕

目次

第 1 章 序章

1-1. 発酵乳の歴史	1
1-2. ヨーグルトの機能	1
1-2-1. ヨーグルトの一次機能	2
1-2-2. ヨーグルトの二次機能	3
1-2-3. ヨーグルトの三次機能	4
1-3. ヨーグルトの規格	8
1-3-1. 国際規格	8
1-3-2. 国内規格	9
1-4. ヨーグルトの種類	10
1-5. ヨーグルトの製造方法	11
1-5-1. 生菌タイプヨーグルトの製造方法	11
1-5-2. ロングライフヨーグルトの製造方法	13
1-6. 世界のヨーグルト市場動向	15
1-7. ロングライフヨーグルトの市場価値	16
1-8. 本研究の意義	18

第 2 章. ロングライフヨーグルトの常温長期保存によるホエイ分離の迅速

予測モデルの開発

2-1. 序	32
2-2. 材料と方法	34
2-2-1. 発酵乳試料の調製	34
2-2-2. 安定剤（ペクチン）溶液の調製	35
2-2-3. ロングライフヨーグルトの調製	35

2-2-4. ホエイ分離測定	36
2-2-5. タービスキャン測定	37
2-2-6. 沈殿物測定	38
2-2-7. 粒子径測定	39
2-2-8. 粘度測定	39
2-2-9. ゼータ電位測定	39
2-2-10. 統計解析	40
2-3. 結果と考察	40
2-3-1. ロングライフヨーグルトの物性安定性に及ぼすペクチン 濃度の影響	40
2-3-2. 長期保存後のホエイ分離を予測するモデルの開発	42
2-3-3. 一次殺菌条件がロングライフヨーグルトの物性安定性に 与える影響	43
2-3-4. 二次殺菌条件がロングライフヨーグルトの物性安定性に 与える影響	45
2-3-5. 発酵後の均質化工程実施のタイミングがロングライフ ヨーグルトの物性安定性に与える影響	47
2-3-6. 予測モデルの精度と汎用性の検証	49
2-4. 結論	50
第3章 常温保存中に発生するロングライフヨーグルトのオフフレーバー	
3-1. 序	59
3-2. 材料と方法	60

3 - 2 - 1 . 発酵乳試料の調製	60
3 - 2 - 2 . ペクチン溶液の調製	61
3 - 2 - 3 . ロングライフヨーグルトの調製	61
3 - 2 - 4 . 官能評価	62
3 - 2 - 5 . 溶剤支援フレーバー蒸発処理	62
3 - 2 - 6 . ガスクロマトグラフィー質量分析	63
3 - 2 - 7 . 重要香気成分 4-vinylguaiacol の定量	63
3 - 2 - 8 . ガスクロマトグラフィー嗅覚検査	64
3 - 2 - 9 . 色差測定	65
3 - 2 - 10 . 統計解析	65
3 - 3 . 結果と考察	65
3 - 3 - 1 . 官能評価による全体的な香調の評価	65
3 - 3 - 2 . 機器分析	66
3 - 3 - 3 . 脂肪酸の生成と分解	67
3 - 3 - 4 . Diacetyl の生成と分解	68
3 - 3 - 5 . メイラード反応による香調変化の評価	69
3 - 3 - 6 . 4-Vinylguaiacol の生成経路	72
3 - 3 - 7 . 4-Vinylguaiacol のオフフレーバーへの影響の確認	73
3 - 4 . 結論	73
第 4 章 キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析を用いたロングライフ ヨーグルトの生理機能成分の検出	
4 - 1 . 序	84
4 - 2 . 材料と方法	86
4 - 2 - 1 . 発酵乳試料の調製	86
4 - 2 - 2 . ペクチン溶液の調製	86

4-2-3. ロングライフヨーグルトの製造方法	86
4-2-4. キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析	87
4-2-5. メイラード反応生成物質の定量	87
4-2-6. 統計処理	87
4-3. 結果	88
4-3-1. キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析による代謝産物を含む微量成分の検出	88
4-3-2. 主成分分析	88
4-3-3. 二次殺菌による影響を受ける物質の選定	89
4-4. 考察	89
4-4-1. 二次殺菌により増加する可能性のある物質	89
4-4-2. 二次殺菌により減少する可能性のある物質	91
4-4-3. 二次殺菌による影響を受けない成分	92
4-4-4. 常温保存時のメイラード反応生成物質の増加	93
4-5. 結論	94
第5章 結論	
5-1. 総括	104
5-2. 今後の展望	106
謝辞	108
引用文献	110

略語一覧

ACE : Angiotensin-converting enzyme アンジオテンシン変換酵素

ADI : Acceptable daily intake 許容一日摂取量

AGEs : Advanced glycation end products 終末糖化産物

CE-TOFMS : Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry キャピ
ラリー電気泳動飛行時間型質量分析

CMV : Charm value チャーム値

DIAAS : Digestible indispensable amino acid score 消化性必須アミノ酸スコア

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations 国際連合食糧農
業機関

FD-factor : Flavor dilution factor フレーバー希釈係数

GABA : Gamma-aminobutyric acid ガンマアミノ酪酸

GC-MS : Gas chromatography-mass spectrometry ガスクロマトグラフィー質量
分析

GC-O : Gas chromatography – olfactometry ガスクロマトグラフィー嗅覚検査

HM : High methoxyl ハイメトキシル

¹H-NMR : Proton Nuclear Magnetic Resonance プロトン核磁気共鳴

HPLC : High Performance Liquid Chromatography 高速液体クロマトグラフィー

INF : Infusion

LL : Long-Life ロングライフ

MAE : Mean absolute error 平均絶対誤差

MTA : 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine

Neu5Ac : N-acetylneuraminic acid

NK : Natural killer

QOL : Quality of life 生活の質

RMSE : Root mean square error 平均平方誤差

SAFE : Solvent-assisted flavor evaporation 溶剤支援フレーバー蒸発

SDGs : Sustainable development goals 持続可能な開発目標

SIM : Selected ion monitoring 選択イオン検出

SPME : Solid phase microextraction 固相マイクロ抽出

TSI : Turbiscan stability index タービスキャンスタビリティインデックス

UHT : Ultra high temperature 超高温瞬間殺菌

UPLC-Q-TOF : Ultra Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight 四重極飛行時間型超高速液体クロマトグラフィー

第 1 章 序章

1 - 1 . 発酵乳の歴史

発酵乳の歴史は、紀元前数千年頃、西アジアのメソポタミア文化発祥の地において牛や羊が飼育され、乳を食料にするだけでなく保存するために作り出されたことから始まり、更にその製法技術が家畜の飼育法とともにヨーロッパなど周辺の各地に広まっていったと考えられている。その後、パスツール研究所の研究員となるロシア生まれのノーベル賞生物学者・メチニコフ（Élie Metchnikoff）が、1907年、ブルガリアに長寿者が非常に多いのはそこに住む人々が伝統的な発酵乳であるヨーグルトを毎日大量にとることが起因しているという説を発表し、翌年には英訳版（Metchnikoff 1908）が出版されたことで、ブルガリアで作られていたタイプのヨーグルトがヨーロッパから世界に広まっていった。工業的にも、20世紀半ば頃からフルーツヨーグルトやドリンクヨーグルト、フローズンヨーグルトなど様々なタイプのヨーグルトが製造されるようになり、ヨーグルトの普及が進み、さらに、20世紀後半になって乳酸菌の生理機能の研究が盛んに行われ、その生理機能が明らかになるにつれ、人々の健康意識の高まりから現在もなおヨーグルトを代表とする発酵乳の消費は拡大している。

1 - 2 . ヨーグルトの機能

食品には、エネルギー、タンパク質、脂質、糖質、ビタミンなど生命維持に必要な栄養素を補給する一次機能、色、味、香り、歯ごたえ、舌触りなど食べた時においしさを感じさせる二次機能、生体防御、体調リズムの調節、老化制御、疾患の防止、疾病の回復調節など健康を維持する三次機能がある。ヨーグ

ルトはこれら全ての機能を満たす重要な食品の一つとして挙げられる。

1-2-1. ヨーグルトの一次機能

ヨーグルトの一次機能は、原料である牛乳のもつ栄養素によるものが基本である。牛乳には仔牛が成長するために必要な栄養素が全て含まれており、人にとっても理想的な食品である。タンパク質、脂質、糖質、カルシウム、リン、カリウムなどのミネラル、ビタミン B 群などの微量成分がバランスよく含まれている。Table 1-1 に牛乳とヨーグルト（全脂無糖）および加糖ドリンクヨーグルトの標準的組成を示した。日本におけるヨーグルトは「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」（乳等省令）で「発酵乳」として無脂乳固形分などの成分が規定されているため、タンパク質含有量などには大きな差が生じないものの、カテゴリーによって含有する乳由来の栄養素も若干の差異がみられる。

牛乳中には 3.3% (w/w) 程度のタンパク質が含まれ、乳タンパク質は卵と並び優良なタンパク質の代表である。タンパク質の栄養学的な質については必須アミノ酸充足率を示すアミノ酸スコアによって評価されることが多く、乳タンパク質も卵も大豆タンパク質もそのスコアは 100 である。しかしながら、アミノ酸スコアは生体内での消化吸収性が反映されておらず、消化吸収率を加味した評価方法として 2013 年、FAO (Food and Agriculture Organization) 専門協議会より提唱された DIAAS (digestible indispensable amino acid score) では、乳タンパク質の消化吸収率が卵や大豆タンパク質と比べて高いことが明らかになっている (Rutherford et al. 2015)。

牛乳には 4.8% (w/w) の炭水化物が含まれており、その 99%以上が乳糖である。乳糖は小腸で β -ガラクトシダーゼ（ラクターゼ）によりグルコースとガラクトースに分解され吸収される。ヒトの β -ガラクトシダーゼ活性は乳幼児期には高いものの成長に伴い低下するため、成人で β -ガラクトシダーゼ酵素活性が

低下または消失すると、分解されない乳糖が大腸に達し、大腸内の浸透圧が高まることで下痢を引き起こしたり、腸内細菌により発酵されガスなどを発生することで腹部の不快感を呈する (Vasiljevic and Shah 2008)。これらの症状は「乳糖不耐症」と呼ばれ、有色人種に多く、世界の 7 割以上の成人が乳糖消化吸収に問題があるといわれている (De Vrese et al. 2001)。しかし、ヨーグルトでは乳糖の 2~3 割が分解されていること、乳酸菌の β -ガラクトシダーゼが腸内で働き乳糖の分解を促進することにより小腸での乳糖の吸収が高まり、乳糖不耐症の人でも摂取しやすい利点がある (Hertzler and Clancy 2003; Montalto et al. 2005)。また、乳糖は腸内のビフィズス菌の増殖やカルシウムの吸収にも関与していると考えられている。

牛乳には 100 g あたり 110 mg のカルシウムが含まれ、カルシウムの供給源としても重要な食品である。また、牛乳に含まれるカルシウムは魚や野菜より吸収率が高いことが知られており (上西ら 1998)、乳糖を含有すること、カルシウム／リン比が適切であること、カルシウムがコロイド状や可溶性で存在することがその理由であると考えられている。カルシウムの摂取量が不足しており、高齢化により骨粗鬆症の患者が多い日本においては生活に欠かすことのできない食品の一つといえる。

牛乳には脂溶性ビタミンとしてビタミン A、D、E、水溶性ビタミンとしてビタミン B₁、B₂、ナイアシン、B₆、B₁₂、葉酸、パントテン酸、ビオチンなどが含有されている。特にビタミン B₂ やビタミン B₁₂、パントテン酸の含有量が高く供給源として重要である。

1 - 2 - 2 . ヨーグルトの二次機能

ヨーグルトの二次機能としては、乳酸菌の発酵により生成された乳酸により爽やかな酸味を有すること、特有の芳香成分が生成されることで、好ましい香

りが付与され、食欲が喚起されるだけでなく、複雑な風味により嗜好性の高い食品となっていることが挙げられる。ヨーグルトに含まれる香気成分は乳原料に由来する成分に加えて、乳酸菌の発酵により acetaldehyde、acetone、acetoin、diacetyl、有機酸など、90 種類以上の成分が報告されている (Ott, Fay, and Chaintreau 1997; Cheng 2010)。また、ヨーグルトは乳酸菌が生きていることから、保存により風味が変化することでも知られている。発酵が進み、酸度の上昇、pH の低下、粘度の上昇がみられ、香気成分も変化する。冷蔵保存中のヨーグルトの風味変化の研究は数多く実施されており (Fernandez-Garcia and McGregor 1994; Ott et al. 1999)、近年では複数のスターターによる冷蔵保存中の風味変化などの応用的な研究も実施されている (Dan et al. 2017)。この変化には脂肪が大きく関わっていて、高脂肪のヨーグルトは低脂肪のものにくらべ劣化が小さいことが報告されている (Salvador and Fiszman 2004)。乳組成や乳酸菌の種類、発酵方法を工夫することで香気成分をコントロールすることや、糖類やフルーツ、香料を添加することでヨーグルトの嗜好性を飛躍的に高めることが可能である。

1 - 2 - 3 . ヨーグルトの三次機能

ヨーグルトの世界的普及のきっかけとなったメチニコフの「不老長寿説」に始まったヨーグルトの三次機能である生理機能の研究の多くは、ヨーグルトに含まれる生きた乳酸菌やビフィズス菌の効果によるもので、1989年に Fuller によってプロバイオティクス (probiotics) という定義が提唱され (Fuller 1989)、2002年、FAO/WHO によって「十分な量を摂取した際に宿主に有益な健康効果をもたらす生きた微生物」として再定義 (FAO/WHO 2002) され世界に定着している。その生理機能としては、整腸作用、免疫調節作用、血圧降下作用、血清コレステロール低下作用などが挙げられる。また、最近では脳腸相関に関する

多くの研究が報告される（Zyoud et al. 2019）など、健康に関心が高まる中、最も注目されている食品といえる。

a. 整腸作用

ヒトの腸内には 100 種類以上、40 兆個の細菌が生息している。腸内細菌には善玉菌と呼ばれる有用菌、悪玉菌と呼ばれる病原菌を含む有害菌、場合によってはどちらにもなりうる中間菌に大別される。健常な成人では正常細菌叢とよばれる安定した細菌叢が形成されている。ヨーグルトに含まれる乳酸菌やビフィズス菌は善玉菌の代表で、*Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* GG (宮澤ら 2017)、*Lb. gasseri* SBT2055 および *Bifidobacterium (B.) longum* SBT2298 (絹巻ら 2001)、*B. longum* BB536 (Yaeshima et al. 1997)、*B. animalis* subsp. *lactis* LKM512 (松本ら 2001)、*B. lactis* DN173010 (Yang et al. 2008) などを含むヨーグルトで腸内のビフィズス菌の増加や、排便回数の増加、便性の改善などがみられ、*Lb. casei* Shirota による軟便の解消 (Matsumoto et al. 2010) など腸内環境を整えることが報告されている。また、生菌だけでなく、殺菌したヨーグルトにも便秘改善作用があることも報告されている (Liu et al. 2015)。

b. 免疫調節作用

免疫調節作用は乳酸菌やビフィズス菌の生理効果として研究が進んでいる分野である。消化管は人体最大の免疫臓器であり、免疫にかかわる多くの細胞が存在しているといわれている。腸内細菌と免疫システムは互いに影響し、体全体の恒常性を保っているため、腸内細菌のバランスに影響を及ぼす乳酸菌やビフィズス菌、それらを含むヨーグルトには免疫を調整する作用があると考えられる。免疫調節作用には、免疫賦活作用の他、抗アレルギー作用が挙げられる。

b-1.免疫賦活作用

Lb. casei Shirota を含む発酵乳により Natural Killer (NK) 活性が高まること (Takeda and Okumura 2007)、マウスへの *Lb. paracasei* MCC1849 の加熱殺菌体摂取により小腸および血清、肺における非特異的 IgA 量と総 IgA 量が増加すること (前畑 and 村田 2019) など免疫賦活作用の研究は多く、乳酸菌やビフィズス菌あるいはそれらを含む発酵乳の感染防御作用も多く報告されている。免疫機能が低下している高齢者において、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 により風邪やインフルエンザなどの罹患リスクの減少 (Makino et al. 2010) や、*B. longum* BB536 によるインフルエンザの罹患者数の減少 (Namba et al. 2010) が明らかになっている。また、*Lb. casei* DN-114001 を添加した発酵乳の摂取によりインフルエンザワクチンの効果の向上 (Boge et al. 2009) や、上気道感染症に罹患した期間の短縮 (Guillemard et al. 2010) が報告されている。

b-2.抗アレルギー作用

乳幼児のアレルギー予防効果の研究としては、*Lb. rhamnosus* GG 菌末を母親と新生児へ投与することによりアトピー性皮膚炎の発症頻度の減少がみられたことが知られており (Kalliomäki et al. 2001)、また、*Lb. paracasei* F19 菌末の乳幼児への投与により湿疹の累積発症率が減少すること (West, Hammarström, and Hernell 2009) や、出産前の妊婦と生まれた乳児への *B. longum* BB536 と *B. Breve* M-16V の混合菌末を投与することによる湿疹／アトピー性皮膚炎の発症率低下 (Enomoto et al. 2014) などが報告されている。

花粉症、アレルギー性鼻炎の症状軽減効果に関しては、*Lb. acidophilus* L-92 の発酵乳を加熱殺菌した飲料によるスギ花粉症の症状改善効果 (Ishida et al. 2005)、*Lb. paracasei* KW3110 による花粉症の症状軽減効果 (Yonekura et al. 2009)、*B. longum* BB536 を含む発酵乳または菌末によるスギ花粉症の症

状軽減効果（Xiao et al. 2006a; 2006b; 2007）などが報告されている。プロバイオティクスの摂取により抗原提示細胞から Th1 サイトカインの産生を誘導し、Th1 サイトカインと Th2 サイトカインのバランスを調整することにより B 細胞から抗原特異的 IgE の産生が抑制され、アレルギー症状が軽減されることが考えられている。

c. 血圧降下作用

ヨーグルトの血圧降下作用に関しては、乳酸菌の代謝産物である γ -aminobutyric acid (GABA) による作用が報告されており（梶本ら 2004）、その作用メカニズムは GABA が神経末端のレセプターを介して交感神経伝達を抑制することによると考えられている（Hayakawa, Kimura, and Yamori 2005）。また、*Lb. helveticus* によって乳タンパク質が分解されて生成したトリペプチド、Val-Pro-Pro (VPP) や Ile-Pro-Pro (IPP) にはアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性があり、血圧降下作用を示すことが判明している（Jauhiainen and Korpela 2007）。

d. 血中コレステロール改善作用

ヨーグルトの血中コレステロール改善作用についてはコレステロールの菌体への吸着や脱抱合型胆汁酸との共沈による吸収抑制（Gilliland, Nelson, and Maxwell 1985）、乳酸菌やビフィズス菌の胆汁酸脱抱合酵素の作用による胆汁酸排泄促進（Tanaka et al. 2000）および、腸内で産生される短鎖脂肪酸によるコレステロール合成抑制などが考えられている（Kondo et al. 2009）。ヒトにおける臨床試験でも *Lb. gasseri* SP 株を含有する発酵乳や *B. longum* BL1 を含有する乳および発酵乳での血中総コレステロールや LDL コレステロールの低下などが報告されている（梶本ら 2002; Xiao et al. 2003）。

e. 脳腸相関

脳と腸は自律神経系やホルモン、サイトカインなど液性因子を介して密接に関連していることが知られ、この双方向的な関連を脳腸相関（brain-gut interaction）という。さらに、腸内細菌と脳、腸との相互作用に着目した脳－腸－腸内細菌軸（brain-gut-microbiota axis）という概念も提唱されている。2011年に germ-free および specific-pathogen-free マウスを用いて腸内細菌が不安行動に影響することが報告（Heijtz et al. 2011）されてから注目が集まり、欧米、中国を中心に研究が盛んになり、2018年には500以上の研究が報告されている（Zyoud et al. 2019）。乳酸菌やビフィズス菌による中枢神経への影響としては、*Lb. helveticus* MCC1848の加熱殺菌体による慢性的社会的敗北ストレスモデルマウスの不安・うつ様症状を改善（Maehata et al. 2019）や、*B. breve* A1（MCC1274）による、アルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能改善作用（Kobayashi et al. 2017）、軽度認知障害が疑われるヒトを対象とした総合的な認知機能を改善する結果（Xiao et al. 2020）が報告されている。作用メカニズムについては、神経解剖学的経路、神経内分泌系経路、腸管免疫システムを介する経路、腸内細菌の代謝産物を介する経路などが考えられているが、まだ完全には解明されていない（Wang, H.-X. and Wang, Y.-P. 2016）。

1－3．ヨーグルトの規格

1－3－1．国際規格

国際的な食品規格を策定するコーデックス食品規格委員会によって、ヨーグルトを含む発酵乳は以下のように定義されている（CODEX STAN 243-2003）。

a. Fermented Milk (発酵乳)

適切な微生物の作用により pH が低下する発酵によって得られる乳製品である。さらに、使用するスターターカルチャーの種類や成分組成によって、Yogurt (ヨーグルト)、Alternate culture yogurt (カルチャー代替ヨーグルト)、Acidophilus milk (アシドフィラスミルク)、Kefir (ケフィア)、Kumys (クーミス) などに分類される。その規格を Table 1-2 に示す。

b. Concentrated fermented milk (濃縮発酵乳)

タンパク質が 5.6% (w/w) 以上の発酵乳。

c. Flavored fermented milks (フレーバード発酵乳)

発酵乳を 50% (w/w) 以上含み、50% (w/w) 以下の非乳成分 (果実・果汁、糖分、香料など) を混合した複合乳製品。

d. Drinks based on fermented milk (発酵乳を基にした飲料)

発酵乳を 40% (w/w) 以上含み、60% (w/w) 以下の水やホエイ、非乳成分を混合した飲用に供する複合乳製品。

e. Heat treated fermented milks (加熱処理発酵乳)

発酵乳製品を発酵後に加熱処理したものについては、生菌数の規定は除外される。

発酵乳の規格に関し、実際には、上述したコーデックス規格とは別に、国ごとの規格が規定されている。

1 - 3 - 2 . 国内規格

日本国内においては、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」(乳等省令) によって、以下のように定義されている。

発酵乳 (cultured milk) は、乳又はこれと同等以上の無脂乳固形分を含む乳等を乳酸菌または酵母で発酵させ、糊状又は液状にしたものまたはこれを凍結

させたものである。さらに 2014 年の乳等省令改正によって、発酵後に加熱処理した殺菌タイプも発酵乳として追加された。また、乳等を乳酸菌または酵母で発酵させたものを加工し、又は主要原料とした飲料として乳酸菌飲料 (lactic acid bacteria beverage) が規定されている。それぞれの規格を Table 1-3 に示す。日本においては「ヨーグルト」を定義する規格は存在せず、通常は「発酵乳」と同義として扱われている。

これ以降の章では、発酵後に加熱殺菌処理されたヨーグルトを「ロングライフ (LL) ヨーグルト」と呼称する。

1-4. ヨーグルトの種類

ヨーグルトは、その分類方法によって様々な種類に類別することができる。以下にその一例を示す。

a. 食べ方による分類

Spoonable yogurt (スプーナブルヨーグルト) : 固形または糊状の食べるヨーグルト

Drinking yogurt (ドリンクヨーグルト) : 液状の飲むヨーグルト

b. 脂肪含有量による分類 (米国の例、21CFR-131)

Yogurt : 全脂タイプのヨーグルトで脂肪含量は 3.25% (w/w) 以上

Low-fat yogurt : 低脂肪タイプのヨーグルトで脂肪含量は 0.5~2.0% (w/w)

Non-fat yogurt : 無脂肪タイプのヨーグルトで脂肪含量は 0.5% (w/w) 未満

c. 日本国内のヨーグルト分類

日本国内では、乳等省令において発酵乳および乳酸菌飲料の規定はあるが、それ以上の細分化はなされていない。その商品特徴から以下のように分類されることが通例である。

プレーンヨーグルト：本来は、生乳、乳製品、スターターカルチャーのみを原料とし、その他原料を含まないヨーグルトを示す。現在は、その他原料（砂糖、安定剤、ヨーグルト風味の香料など）を含んでいても、「プレーン」と表現する場合もあり、その他タイプとの明確な線引きは難しい場合もある。

ソフトヨーグルト（フルーツヨーグルト）：固くセットしていない糊状のヨーグルトを示す。多くの場合フルーツと混合されているため、フルーツヨーグルトと呼称する場合もある。

ハードヨーグルト：砂糖や香料、寒天やゼラチンなどを加え、食べやすくしたヨーグルト。日本で初めて工業的に製造されたヨーグルトであり、日本に特徴的なヨーグルトである。

ドリンクヨーグルト：液状にして飲みやすくしたヨーグルト。

フローズンヨーグルト：凍結させた状態で食べるヨーグルト。

1-5. ヨーグルトの製造方法

1-5-1. 生菌タイプヨーグルトの製造方法

生菌タイプのヨーグルトの製造方法について、代表的な静置型（set-type）ヨーグルトおよび攪拌型（stirred-type）ヨーグルトの製造工程を Fig. 1-1 に示す。また、日本では、静置型ヨーグルトは容器に充填した後に発酵させるため後発酵タイプ、攪拌型ヨーグルトは容器に充填する前にタンク内で発酵させるため前発酵タイプとも呼ばれる。静置型ヨーグルトには、プレーンヨーグルト、ハードヨーグルトなどが含まれる。攪拌型で製造されたヨーグルトには、ソフトヨーグルト、ドリンクヨーグルトなどが含まれる。いずれも、

原料混合→均質化→殺菌→冷却→スターター接種→発酵→冷却

という製造工程は共通である。

ヨーグルトの殺菌工程は、危害菌による品質リスクを低減させることに加え、発酵によって形成されるヨーグルトの構造を強化する上でも重要な工程である。乳等省令においては 63°C 30 分間と同等以上の殺菌が義務付けられているが、一般的に用いられる殺菌条件は 90~95°C 5~10 分である。後者の殺菌条件には、ホエイタンパク質を効果的に変性させる目的が含まれている。Dannenberg and Kessler (1987) は、各種加熱条件によるホエイタンパク質の熱変性具合を調査した。その結果 (Fig. 1-2) より、90~95°C 5 分の殺菌条件において β -ラクトグロブリンは 90%以上変性することが分かる。熱変性したホエイタンパク質は、カゼインと結合、もしくはホエイタンパク質同士が結合して複合体を形成することが知られている (Vasbinder 2002, 33-49)。Lee and Lucey (2003) は、ローヒート脱脂粉乳を原料として、72~93°C 30 分の加熱処理を行い、pH4.6 まで発酵させたヨーグルトの物性を調査した結果、加熱処理温度が高いほど、貯蔵弾性率 (G') が高まり、保水性も高まることを報告した。いずれのタイプのヨーグルトにおいても、ホエイ分離は共通した課題であり、ホエイ分離が抑制された物性安定性の高いヨーグルトを製造するために、ホエイタンパク質を効果的に熱変性させる殺菌条件を用いることがヨーグルト製造においては一般的である。

ヨーグルトの発酵に用いられる種菌 (スターターカルチャー) として、乳酸菌・酵母が用いられるが、最も代表的な組み合わせは、*Streptococcus (S.) thermophilus* と *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* である。加えて、ビフィズス菌が追加される場合もある。発酵工程では、これら使用するスターターカルチャーに応じた至適温度で発酵を進めることとなる。発酵過程では、乳酸菌が乳糖を資化し乳酸を作り出すことによって、徐々に調乳液の pH が低下する。カゼインの等電点である pH 4.6 付近まで pH が低下すると、電氣的な反発を失ったカゼインクラスターが凝集してネットワーク (ヨーグルトカード)

が形成される。目的の pH まで発酵を進めた後は、過度な発酵の進行を抑制するために、速やかに 10～20℃に冷却される。

1-5-2. ロングライフヨーグルトの製造方法

LLヨーグルトの製造方法について、Fig. 1-3 に示す。LLヨーグルトの製造方法は、前発酵ヨーグルトの製造方法に類似するが、発酵後に LLヨーグルトに特有の以下工程が追加される点で異なっている。

a. 酸乳安定剤の混合工程

LLヨーグルトでは、特に二次殺菌工程における加熱凝集を抑制する目的およびドリンク製品では保存中のホエイ分離を防止する目的で、ハイメトキシル(HM)ペクチン、カルボキシメチルセルロースおよび大豆多糖類などの酸乳安定剤が使用される。発酵過程において酸乳安定剤が存在すると、ヨーグルトカード形成時に凝集物を生じさせるため、発酵後に酸乳安定剤を溶解した溶液を添加して混合する工程を採用するのが一般的である。酸乳安定剤として最も一般的な HM ペクチンの安定化効果のメカニズムは Fig. 1-4 に示す通り、等電点付近の pH においてプラスに荷電したカゼインクラスター表面部位に HM ペクチンが静電的に吸着することで、HM ペクチンの酸性糖の電荷による反発および乳タンパク質に吸着していない未反応部位の立体的反発力によって、カゼインクラスターの凝集が抑制される(齋藤ら 2016, 133-134)。

b. 二次殺菌工程

LLヨーグルトには、スターターカルチャーとして使用した乳酸菌等を失活させ、保存中の風味変化を抑制することを主要な目的として、発酵後のヨーグルトを再度加熱殺菌(二次殺菌)する工程が必要となる。乳等省令では 75℃以上で 15 分間加熱するか、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が規定されている。また、Bockelmann, B. and Bockelmann, I.

(1998, 193-196) は、このような酸性化飲料の殺菌条件には、85~95℃ 15~30 秒の条件がしばしば用いられることを報告している。二次殺菌に用いられる機器として、一般に、低粘度のヨーグルトにはプレート式熱交換機が、高粘度時や固形物入りのヨーグルトにはチューブラー式熱交換機が用いられる (Fig. 1-5)。

c. 均質化工程

LLヨーグルトの中でも、特に低粘度ドリンクタイプを製造する際は、物性安定性を向上させるために均質機での均質化は必須である。均質圧力 15 MPa 以上の均質化によって、ペクチンなどの酸乳安定剤のカゼインクラスター表面への吸着性が向上することが報告されている (Bockelmann, B. and Bockelmann, I. 1998, 193-196)。一方で、ソフトタイプなど高粘度を維持する必要のある LLヨーグルトを製造する際は、設備やラインからのせん断を極力抑える必要があるため、均質機による均質化は実施されない場合が多い。

d. 無菌充填工程

二次殺菌後のヨーグルトは、以降の工程での二次汚染を防止することが重要となる。特に、賞味期限が長く常温で保存される LLヨーグルトでは、無菌充填もしくはそれに準じた高い衛生レベルでの充填が必要となる。充填機例として、Fig. 1-6 に示すテトラパック社のアセプティックブリック充填機などが挙げられる。

上述した通り、LLヨーグルトを製造する工程については既に知られているが、各プロセスにおける製造条件が品質に与える影響を調査した研究はほとんどない。LLヨーグルトを製造するには二次殺菌工程が必須であるが、酸性下の乳を加熱することは過度な凝集の発生に繋がりがうる。この意味から、LLヨーグルトの製造方法には物性を不安定化させるリスクが存在しているといえ

る。物性安定性を保つために、各プロセスにおける製造条件が安定性に与える影響を定量的に評価することが非常に重要となる。

1-6. 世界のヨーグルト市場動向

TechSci Research 社によるヨーグルト市場の調査結果（TechSci Research 2020）および Tetra Pak 社による中国のヨーグルト市場データ（Tetra Pak 2019）を元に、世界のヨーグルト市場の近況を概説する。

Fig. 1-7 は、世界のヨーグルト市場における年次別の売上金額および売上容量を示す。ヨーグルト市場は全体として継続的に伸長しており、2015～2019年の市場成長率は金額ベースで 4.11%（容量ベースで 3.93%）となっている。ヨーグルトの世界市場拡大の理由としては、ヨーグルトの有する高い栄養価値と健康感によるものと考えられる。Fig. 1-8 は、世界のヨーグルト市場における 2019 年のヨーグルトの種類別シェア（販売金額ベース）を示すが、その中で、ドリンクヨーグルト（Fig.中の Yogurt drinks）が 2015 年からシェアを拡大していることが分かる。これは、アジア・太平洋、欧州、北アメリカ、南アメリカ、中東・アフリカのいずれの地域においても同じ傾向を示しており、地域差なくドリンクヨーグルト市場が拡大傾向にあるということが確認できる。次に、Fig. 1-9 は世界のヨーグルト市場における 2019 年の地域別シェア（販売金額ベース）を示す。現在、世界で最も大きなヨーグルト市場はアジア太平洋地域である。そのシェアは、2015 年から 3.9 ポイント拡大しており、数年後には世界のヨーグルト市場シェアの半分に達するものと推察される。そのアジア太平洋地域内での 2019 年の国別シェア（販売金額ベース）（Fig. 1-10）をみると、中国が 50%を占めていることが分かる。そのシェアの高さと近年の増加傾向を考慮すると、世界全体のヨーグルト市場の変化に対する中国市場の影響力の高さがデータからも示されている。なお、シェアはまだ高くないもの

の、2015年からの変化としてインドおよびアジア・太平洋地域のその他の国々もシェアを高めつつあることが分かる。続いて、Fig. 1-11は中国におけるヨーグルト市場の推移（2015～2019年、金額および容量ベース）を示す。この4年間に金額ベースで47億9千万ドル、容量ベースで192万トン拡大している。

その中国ヨーグルト市場において、短期間のうちに市場が急拡大したヨーグルト製品カテゴリーが存在する。それが常温で流通・保存可能なLLヨーグルトである。Fig. 1-12に中国におけるLLヨーグルトの販売量推移（2013～2019年、容量ベース）を示すが、この6年間で市場規模は約10倍と急成長した。2015～2019の期間中では、127万トン拡大しており、同期間中の中国ヨーグルト市場全体の伸びが192万トンであったことを考慮すると、その7割弱がLLヨーグルトによるものと考えられる。世界のヨーグルト市場の伸長に大きな影響を与える中国のヨーグルト市場において、その重要な成長ドライバーの一つがLLヨーグルトだったといえる。今後も、新興国を中心にLLヨーグルト市場の拡大が期待されている。

1-7. LLヨーグルトの市場価値

LLヨーグルトに関し、その最大のメリットは、チルドヨーグルトに比較して流通・保存時の温度制約が少ない点と長い賞味期限にあるといえる。この観点からは前述の通りチルド流通網の整わない開発途上国において、LLヨーグルトがヨーグルト市場伸長のための牽引役となり得ることは容易に想像できる。今後の人口動態の変化および経済成長を考慮すると有力な市場性を有していると予測され、原料となる乳の自国調達が難しい国々への輸出などといったLLヨーグルトの活用例が既にみられている。先の中国市場における成功例を分析すると、冷た過ぎる食品が好まれない食文化に加え、どこにでも持ち運べ

る利便性なども成功の一因と考えられる。冷やさなくても食べられることに加え、屋外やオフィスに持ち運べるという利点は、途上国に限ったことではなく、ヨーグルトの喫食機会を広げられる共通性の高いメリットといえる。これらのメリットを考慮した上で、以下のような活用例が期待できる。

a. 災害時における活用

大規模災害発生後、2週間程度の時期における消化器症状の問題点として、便秘が多発することが知られており、その原因は主として避難生活により生活パターンが変化したこと、繊維の少ない食事、水分摂取量の減少、不眠や不安により抗うつ薬を服用することなどが原因と報告されている（富永ら 2012）。大規模災害発生時およびその後しばらくの間は、平常時の流通網が遮断される場合も多く、チルドヨーグルトを入手することが難しい可能性があり、日常的にヨーグルトの喫食習慣がある方にとっては、ヨーグルトを喫食できないこと自体がストレスとなり得る可能性もある。このような災害時において、LLヨーグルトを活用することで、被災者の生活の質（QOL）改善に貢献できる可能性がある。

b. オンライン販売需要へのマッチング

近年、オンライン販売を含む電子商取引市場は拡大を続けている（経済産業省 2019）。さらに新型コロナウイルスによる世界的なパニックの発生、所謂コロナ禍においては、従来以上に実店舗からオンラインでの消費に移行する傾向が報告されている（サイバーエージェント 2020）。LLヨーグルトの賞味期限が長く、常温で保存できるというメリットは、オンライン販売時の流通および在庫管理上のハードルを下げるとともに、顧客の買い溜め需要にも対応可能であるため、LLヨーグルトのオンライン販売需要への適合性は高いと考えられる。

c. 宅配製品や施設給食への活用

世界に先駆け超高齢社会を迎えた日本においては、消費者ニーズの高まりも要因の一つとして、食品宅配市場が拡大している（矢野経済研究所 2019）。LLヨーグルトの活用により、輸送時や保存時の冷蔵対応の必要がなくなることに加え、長い賞味期限によって配送頻度の削減が可能となり、消費者側にも販売店側にもメリットがある。また、病院や介護施設の一部では冷蔵保存が難しい場合もあるが、このような施設での給食向けとしての需要が見込まれる。

d. 食品ロス削減への貢献

まだ食べられるにもかかわらず廃棄される食品（食品ロス）の量は日本においては年間 612 万トン（農林水産省 2020）、世界の食料廃棄量は年間 13 億トン（国連食糧農業機関 2011）と推計されている。食品ロスの中で、一般家庭側においても食品関連事業者側においても、一定の割合で賞味期限に由来する廃棄が発生している。食品ロス削減は、国連の持続可能な開発目標（SDGs）（United Nations 2015）の中でもその対策が求められており、チルドヨーグルトに対して賞味期限の長い LLヨーグルトは、賞味期限に由来する食品ロスの削減に貢献できる可能性がある。

1-8. 本研究の意義

ヨーグルトは栄養機能、嗜好性、生理機能から、人々の健康にとって大きく貢献できる食品の一つと考えられている。事実、世界中でその消費が伸び、特に人口の多いアジアでの伸長が著しい。生菌タイプのヨーグルトは、冷蔵保存でも発酵が進み、風味変化や菌体が死滅するため、1 ヶ月程度の賞味期限が限界となっている。一方、LLヨーグルトは半年～1年の賞味期限を有するため、食品ロス削減にも繋がる。また、生菌ヨーグルトは流通を要冷蔵で行うことが必須であるのに対して、LLヨーグルトは常温流通が可能となるため、流通イン

フラが整備されていない発展途上国や離島など島国でも流通・販売することが可能となり、より広い地域、より多くの人々の健康に寄与できる可能性が高い。事実、冷蔵流通が全土に整っていない中国では LL ヨーグルトが急速に普及している。さらに、常温保存で賞味期限が長いことから保存食・非常食として備蓄することも可能である。日本を始めとする先進国も含め、地震や津波など従来からの災害に加え、気候の温暖化に起因すると考えられる台風の大型化、集中豪雨、山火事などの災害が増加している。加えて、COVID-19 など新たな感染症の発生した場合には、感染防止策として外出禁止を余儀なくされる場合もある。これらの非常時に備え、ヨーグルトは栄養価が高く、おいしく喫食できる食品として LL ヨーグルト、特にスプーンなしで手軽に飲めるドリンクタイプの LL ヨーグルトの有用性は高いといえる。

LL ヨーグルトでは、常温保存で賞味期限が長いこと、ホエイ分離などの物性安定性と風味変化が大きな課題となる。物性安定性を正確に評価するためには賞味期限と同じ時間を要し、長い開発期間を必要とすることから市場のニーズに適した商品をタイムリーに提供できない問題があった。本研究では、この評価において、正確かつ迅速に予測するモデルを確立することで、適切な賞味期限を決定し、安定性に影響を与える因子の分析を可能とすることを目指した。また、常温保存による風味変化の研究はほとんど実施されていないため、LL ヨーグルトを常温保存した際に発生するオフフレーバーに関与する物質、および、その生成経路の推測を行った。これらを解明することにより、より長い賞味期限をもった LL ヨーグルトの開発に寄与することが期待される。

乳酸菌やビフィズス菌は食品安全性の極めて高い微生物ではあるが、極端に免疫力の落ちたハイリスク集団などに対しては安全とはいえないとの報告 (Deshpande, Athalye-Jape, and Patole 2018) もあり、生菌を含まない LL ヨーグルトは誰でも安心して摂食できるという利点がある。さらに、ヒトにおいて便

秘症状の改善効果 (Liu 2015) や、乳糖不耐症の軽減効果 (Savaiano et al. 1984)、動物実験や細胞実験において生理機能を有することが報告されている (Ouweland and Salminen 1998)。このように、ヨーグルトの有する生理機能については、生きている微生物を対象とするプロバイオティクスだけでなく、死菌体や菌体成分を対象としたパラプロバイオティクス (Adams 2010; Deshpande, Athalye-Jape, and Patole 2018)、代謝産物も含むポストバイオティクス (Tsilingiri et al. 2012; Aguilar-Toalá et al. 2018) など、必ずしも生菌だけがもたらすものでないという考えも広がっており、LLヨーグルトにおける生理機能についても解明する必要がある。二次殺菌を経た際に、機能性に関与していると考えられる成分が受ける影響は未だに報告されておらず、生理機能の作用機序を解明するためにも詳細な解析が必要である。本研究では、分解能およびスループットが高く、同時に全ての荷電低分子化合物を測定できることから、代謝解析に最適な方法の一つだと考えられているキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析 (Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry: CE-TOFMS) により、生菌ヨーグルトと LLヨーグルトから測定された全物質を比較することで、二次殺菌による代謝産物を含む微量成分の変化を網羅的に測定し、生理機能関与物質への影響を推測することを目的とした。

本研究により、より物性が安定し、風味劣化が少なく、賞味期限が長い LLヨーグルトの製造を可能とし、LLヨーグルトがもたらす生理機能の解明が進むことで、より LLヨーグルトが世界に普及し、人類の健康維持、疾病予防への貢献につながると考える。

Table 1-1. Nutritional values of milk and yogurt (Standard Tables of Food Composition in Japan, 2015)

		Milk	Yogurt	
			Whole fat, unsweetened	Liquid, sweetened
Energy	(kcal/100 g)	67	62	65
Water	(g/100 g)	87.4	87.7	83.8
Protein	(g/100 g)	3.3	3.6	2.9
Lipid	(g/100 g)	3.8	3	0.5
Carbohydrate	(g/100 g)	4.8	4.9	12.2
Available carbohydrates	(g/100 g)	4.7	3.9	10.5
Ash	(g/100 g)	0.7	0.8	0.6
Sodium	(mg/100 g)	41	48	50
Potassium	(mg/100 g)	150	170	130
Calcium	(mg/100 g)	110	120	110
Magnesium	(mg/100 g)	10	12	11
Phosphorus	(mg/100 g)	93	100	80
Iron	(mg/100 g)	0.02	Tr ^a	0.1
Zinc	(mg/100 g)	0.4	0.4	Tr ^a
Copper	(mg/100 g)	0.01	0.01	Tr ^a
Manganese	(mg/100 g)	Tr ^a	Tr ^a	0.01
Iodine	(µg/100 g)	16	17	10
Selenium	(µg/100 g)	3	3	2
Chromium	(µg/100 g)	0	0	0
Molybdenum	(µg/100 g)	4	4	3
Retinol	(µg/100 g)	38	33	5
α-Carotene	(µg/100 g)	0	0	- ^b
β-Carotene	(µg/100 g)	6	3	- ^b
β-Cryptoxanthin	(µg/100 g)	0	0	- ^b
β-Carotene equivalents	(µg/100 g)	6	3	1
Retinol activity equivalents	(µg/100 g)	38	33	5
Vitamin D	(µg/100 g)	0.3	0	Tr ^a
α-Tocopherol	(mg/100 g)	0.1	0.1	Tr ^a
β-Tocopherol	(mg/100 g)	0	0	0
γ-Tocopherol	(mg/100 g)	0	0	0
δ-Tocopherol	(mg/100 g)	0	0	0
Vitamin K	(µg/100 g)	2	1	Tr ^a
Vitamin B ₁	(mg/100 g)	0.04	0.04	0.01
Vitamin B ₂	(mg/100 g)	0.15	0.14	0.12
Niacin	(mg/100 g)	0.1	0.1	0.1
Vitamin B ₆	(mg/100 g)	0.03	0.04	0.03
Vitamin B ₁₂	(µg/100 g)	0.3	0.1	0.2
Folate	(µg/100 g)	5	11	1
Pantothenic acid	(mg/100 g)	0.55	0.49	0.3
Biotin	(µg/100 g)	1.8	2.5	1.2
Vitamin C	(mg/100 g)	1	1	Tr ^a
Salt equivalents	(g/100 g)	0.1	0.1	0.1

^a: " Tr " indicates the value contained is 1/10 or greater of the minimum value listed yet less than 5/10.

^b: " - " indicates unmeasured.

Table 1-2. Composition of fermented milk according to Codex standard (CODEX STAN 243-2003)

	Fermented milk	Yogurt, Alternate culture yogurt and Acidophilus milk	Kefir	Kumys
Milk protein (% w/w)	min. 2.7%	min. 2.7%	min. 2.7%	
Milk fat (% w/w)	less than 10%	less than 15%	less than 10%	less than 10%
Titration acidity, expressed as % lactic acid (% w/w)	min. 0.3%	min. 0.6%	min. 0.6%	min. 0.7%
Ethanol (% v/w)				min. 0.5%
Sum of microorganisms constituting the starter culture (cfu/g, in total)	min. 10 ⁷	min. 10 ⁷	min. 10 ⁷	min. 10 ⁷
Specific starter cultures	Yogurt: Symbiotic cultures of <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . Alternate culture yogurt: Cultures of <i>Streptococcus thermophilus</i> and any <i>Lactobacillus</i> species. Acidophilus milk: <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Starter culture prepared from kefir grains, <i>Lactobacillus kefir</i> , species of the genera <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> and <i>Acetobacter</i> growing in a strong specific relationship. Kefir grains constitute both lactose fermenting yeasts (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) and non-lactose-fermenting yeasts (<i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Saccharomyces exiguus</i>).	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> and <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	
Labelled microorganisms (cfu/g, total)	min. 10 ⁶	min. 10 ⁶		
Yeasts (cfu/g)			min. 10 ⁴	min. 10 ⁴

Table 1-3. Composition of fermented dairy products in Japan according to
 “Ministerial Ordinance on Milk and Milk products Concerning Compositional standards, etc.”

	Cultured milk		Dairy lactic acid bacteria beverage		Lactic acid bacteria beverage	
	Live culture	Pasteurized	Live culture	Pasteurized	Live culture	Live culture
Milk solid non fat (% w/w)	min. 8.0%	min. 8.0%	min. 3.0%	min. 3.0%	less than	3.0%
Sum of lactic acid bacterium and yeasts constituting the starter culture (/ml, in total)	min. 10^7	—	min. 10^7	—	min. 10^6	
Coliforms	negative	negative	negative	negative	negative	negative

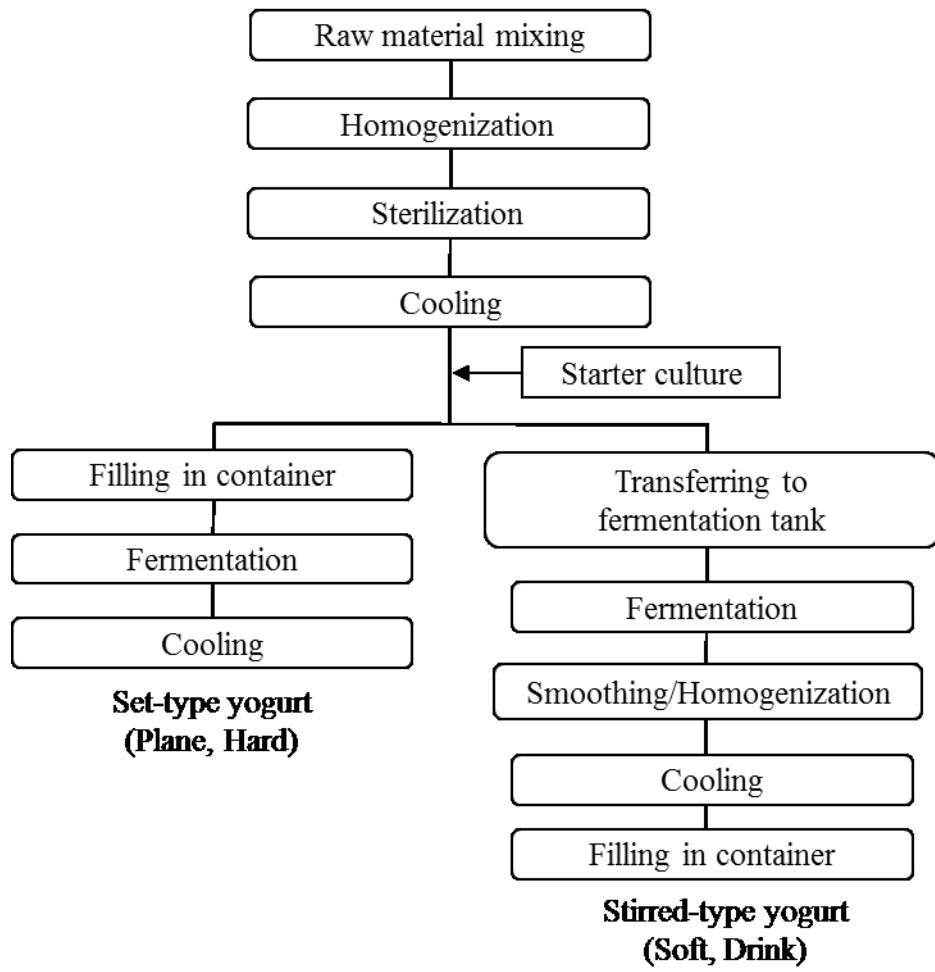


Fig. 1-1. Manufacturing process diagram of viable yogurt

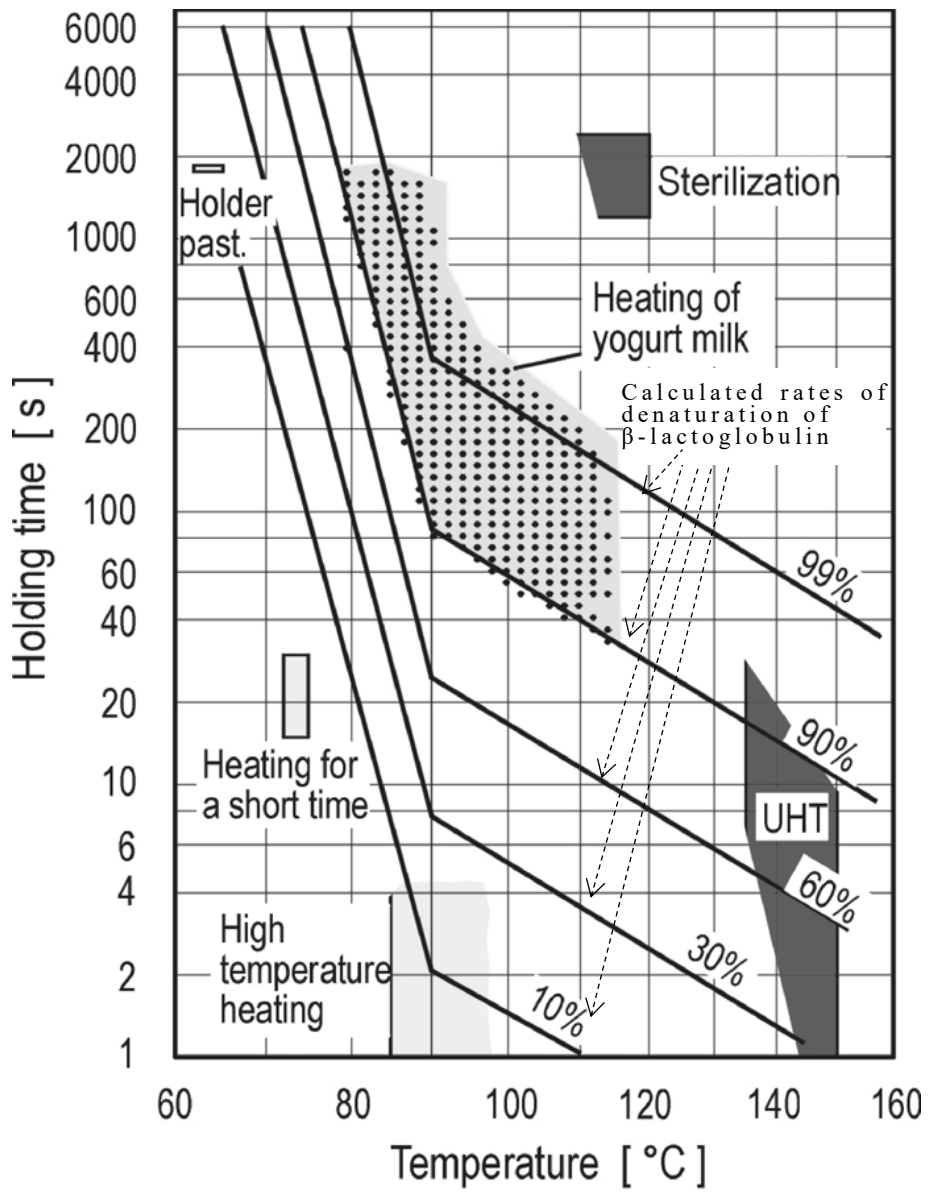


Fig. 1-2. Degree of thermal denaturation of β -lactoglobulin depending on heat treatment conditions (Dannenbergh and Kessler 1987)

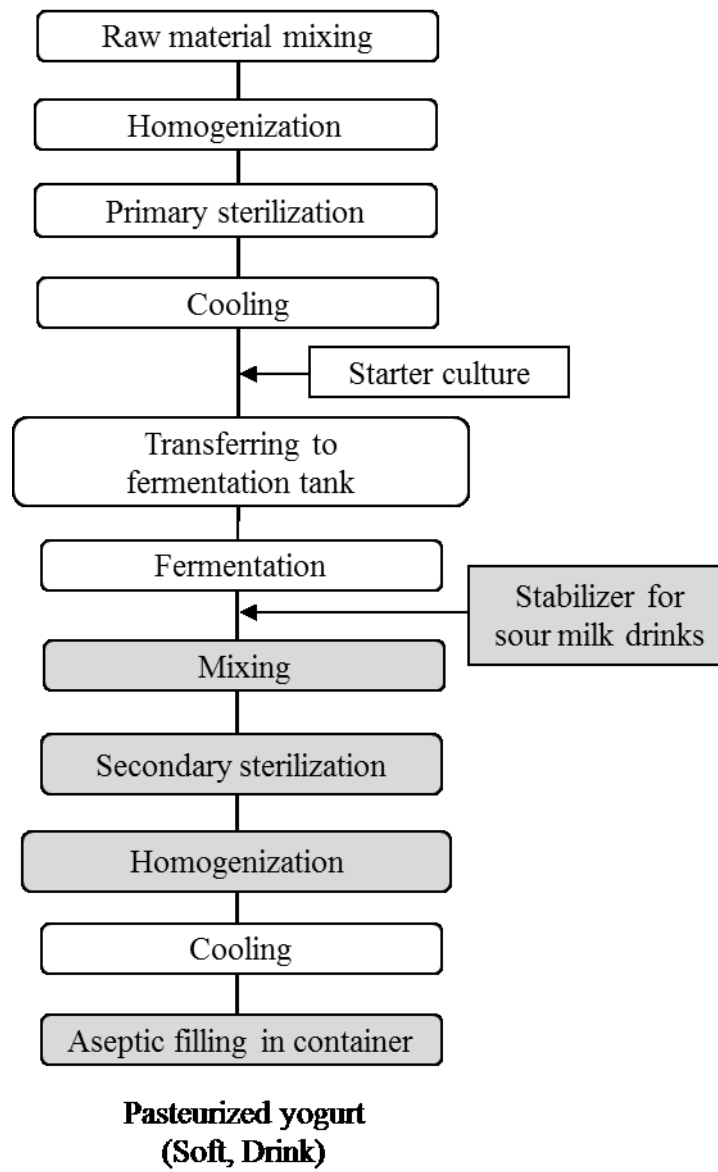


Fig. 1-3. Manufacturing process diagram of long-life yogurt

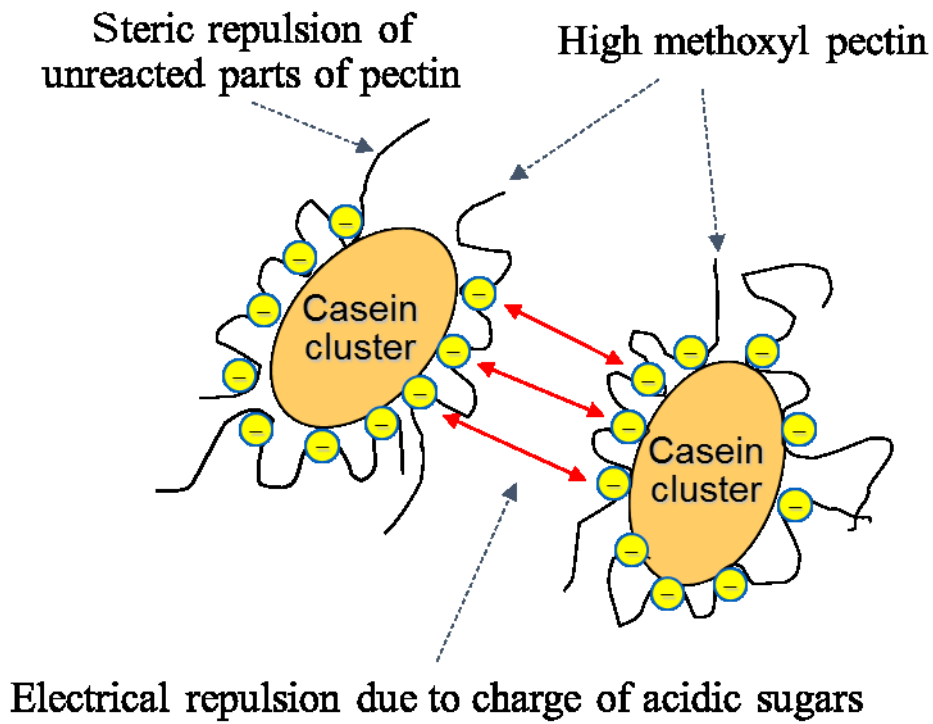


Fig. 1-4. Image diagram of acid milk stabilization mechanism of HM pectin

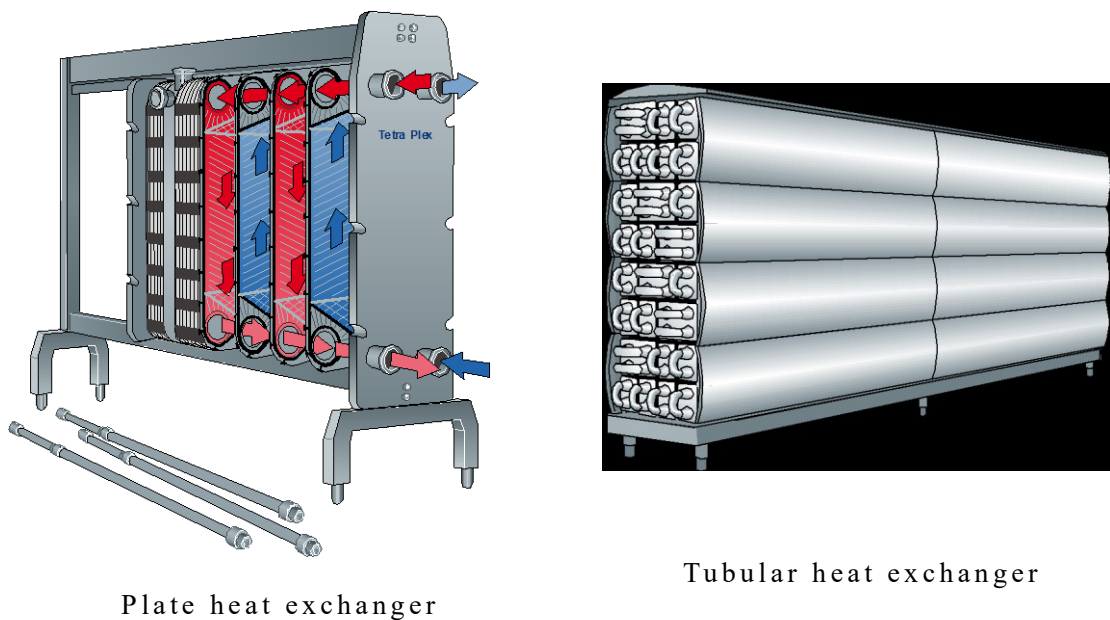


Fig. 1-5. Types of heat exchangers used for secondary sterilization of long-life yogurt (Tetra Pak 2003)



Fig. 1-6. Example of aseptic filling machine used for filling long-life yogurt (Tetra Pak A3/CompactFlex, Tetra pak International SA, Lausanne, Switzerland)

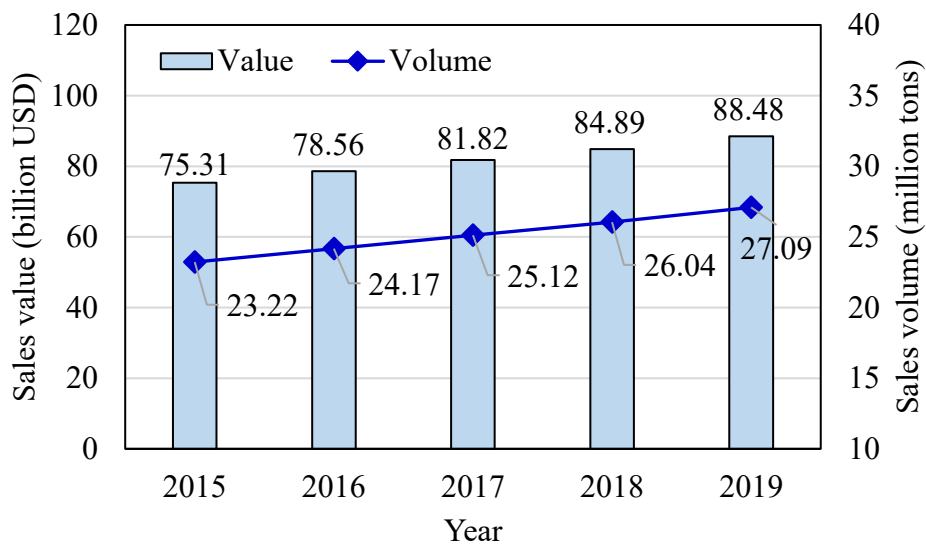


Fig. 1-7. Annual sales value and sales volume of global yogurt market by year (TechSci Research, “Global yogurt market 2015-2025” 2020, 43)

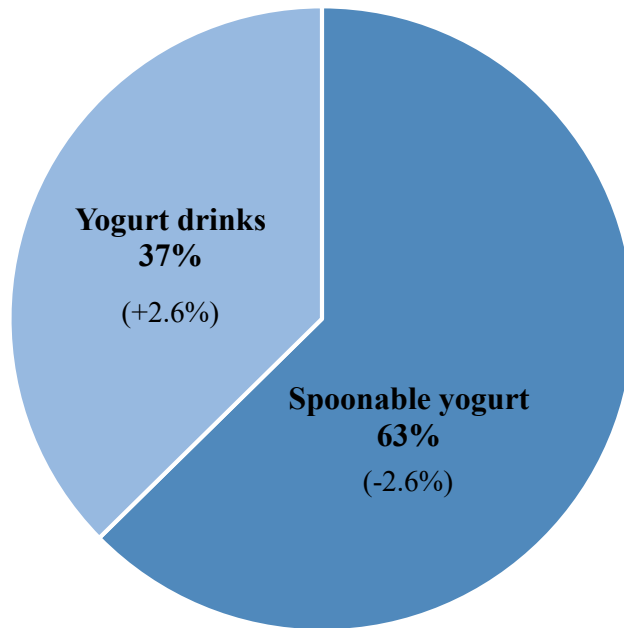


Fig. 1-8. Breakdown of yogurt types in the global yogurt market in 2019 based on sales value. The changes from 2015 are indicated in parentheses (Based on TechSci Research’s data, we made changes to integrate yogurts other than “Yogurt drinks” into “Spoonable yogurt”.) (TechSci Research, “Global yogurt market 2015-2025” 2020, 46)

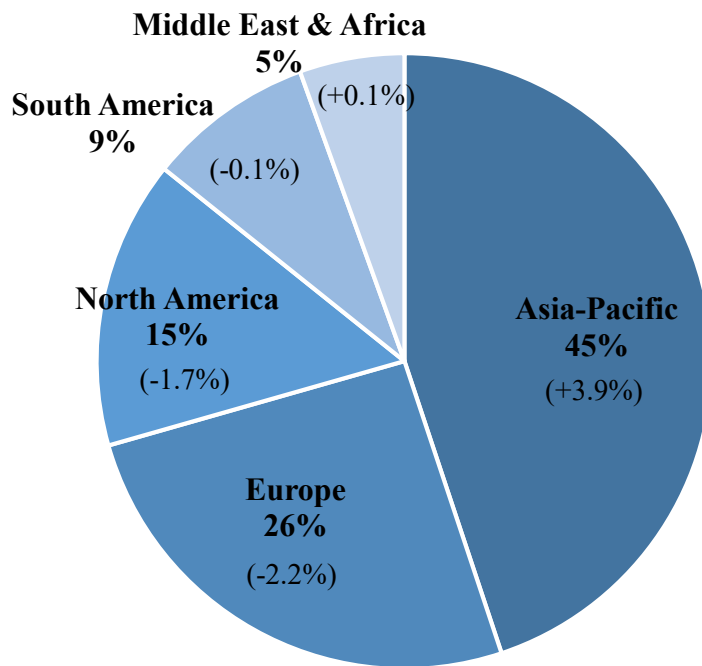


Fig. 1-9. Regional breakdown by 2019 sales value in the global yogurt market. The changes from 2015 are indicated in parentheses (TechSci Research, “Global yogurt market 2015-2025” 2020, 51)

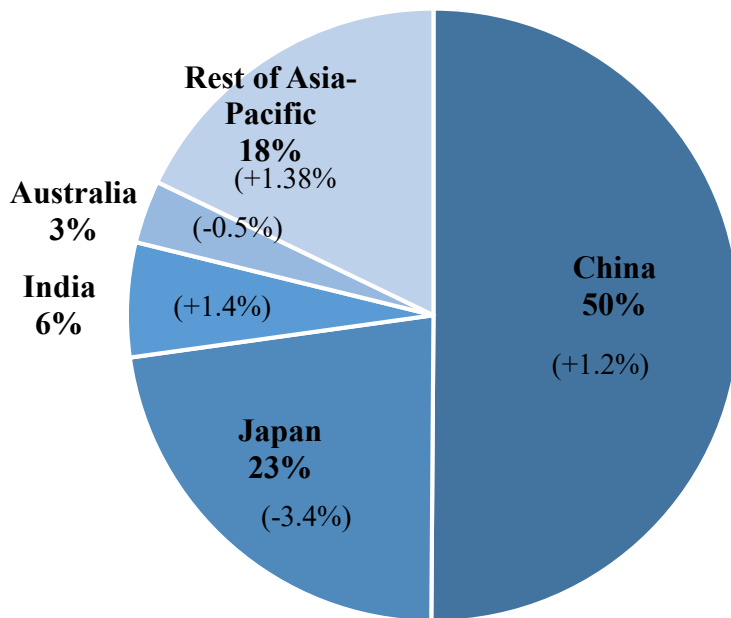


Fig. 1-10. Breakdown by country based on 2019 sales value in Asia-Pacific yogurt market. The changes from 2015 are indicated in parentheses (TechSci Research, “Global yogurt market 2015-2025” 2020, 59)

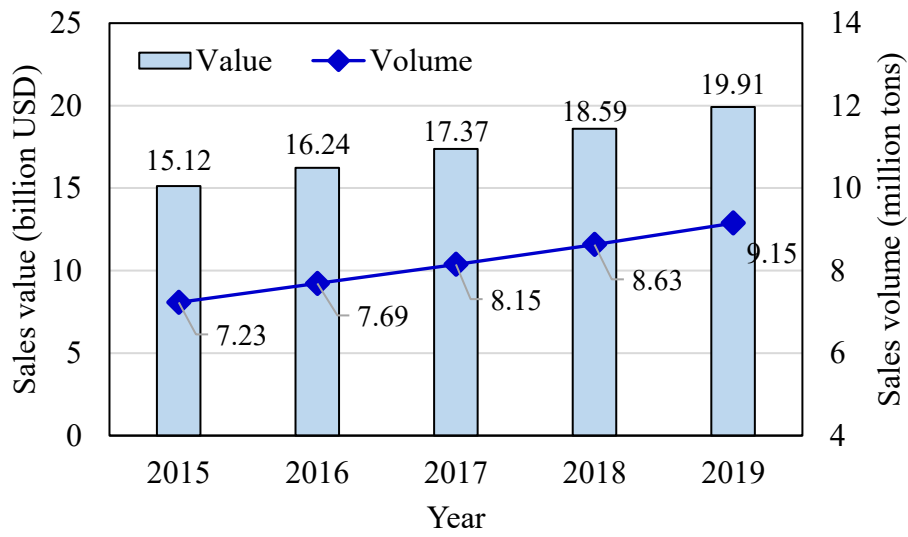


Fig. 1-11. Annual sales value and sales volume of China yogurt market by year (TechSci Research, “Global yogurt market 2015-2025” 2020, 62)

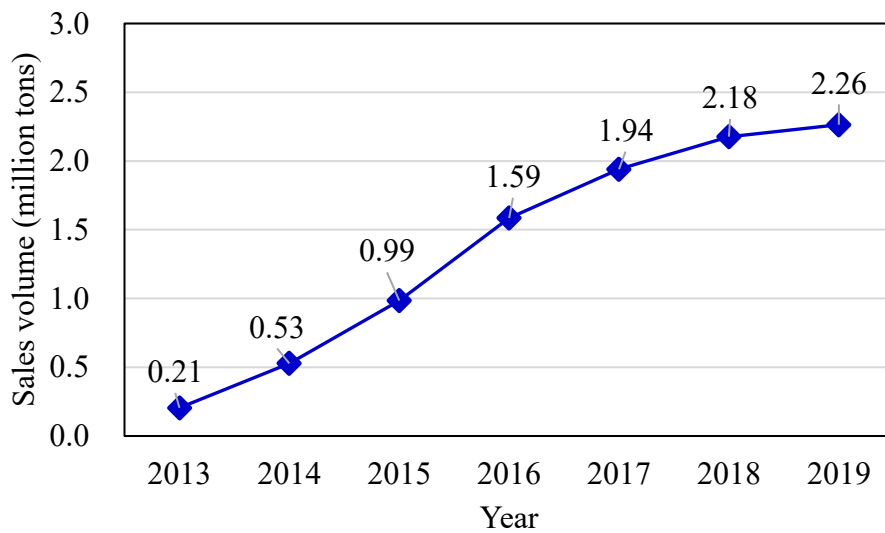


Fig. 1-12. Annual sales volume of long-life yogurt in China (Tetra Pak International S.A. 2019)

第 2 章．ロングライフヨーグルトの常温長期保存によるホエイ分離の迅速予測モデルの開発

2 - 1 . 序

LLヨーグルトには、その特徴である常温長期間保存可能であるが故に品質劣化の懸念が伴う。特徴的な品質劣化としては、物性的な面では、分離・沈降の発生、外観として組織の荒れや褐変、風味的には加熱臭の強まり、発酵臭や添加するフレーバーの弱まり、保存中のオフフレーバーの発生などが挙げられるが、それぞれについて、詳細に研究された報告は少ない。物性的な品質劣化に注目すると、特に常温保存を想定したドリンクタイプの LLヨーグルトにおいて、過度な離水の発生に注意を要する。Lucey et al. (1999) は、酸性乳飲料の保存温度が高いほど熱運動が高まり、粒子間の衝突頻度が増加するため凝集が早まると予測し、実際に 9°Cでの離水率に比較して 25°Cでの離水率が高まったことを報告している。特に低粘度のドリンクヨーグルトが好まれる日本において安定した LLヨーグルトを製造するためには、常温保存でも物性安定性を保つことができるような処方・製造方法の工夫が必要である。

ヨーグルトは、発酵過程で乳酸菌の産生する乳酸によって酸性化されるため、カゼインの等電点 (pH 4.6) 付近で電気的反発力が低下する。その結果、疎水性相互作用によってカゼイン粒子が凝集し (Lucey 2004)、ヨーグルトカードが形成される。しかし、低粘度のドリンクヨーグルトでは、保存中に容器内にヨーグルトカードが沈降した結果、容器上部に透明な水層部が分離(ホエイ分離)する。さらに、酸性化されたヨーグルトの熱処理は、カゼイン凝集物の形成を

促進する。このようなカゼイン凝集物の形成を抑制するために、エステル化度の高い HM ペクチンを配合することで物性的な安定性を高める方法が一般的に採られている (Glahn 1982; Glahn and Rolin 1994; Syrbe, Bauer and Klostermeyer 1998)。

経時的に観察される LL ヨーグルトの最も典型的な物理的劣化はホエイ分離である。従来は、ホエイ分離を観察するためにメスシリンダー法が用いられてきた (Towler 1984; Amice-Quemeneur et al. 1995; Sejersen et al. 2007)。この方法では、ドリンクヨーグルトを目盛り付きのメスシリンダーなどに入れ、規定温度で保存し、その保存期間中、ホエイの分離量を目視で測定する。しかしながら、この従来法では、賞味期限が数ヵ月以上となる常温ヨーグルトのホエイ分離を評価するのに、膨大な時間を要するという課題があった。従って、長期常温保存後のホエイ分離を正確かつ迅速に予測できれば、適切な賞味期限を決定し、LL ヨーグルトの物性安定性に影響を与える因子を分析する上で、大きなメリットとなる。

従来、酸性乳飲料の安定性評価に用いられる指標としては、粘度、粒子径 (Jensen, Rolin, and Ipsen 2010; Wu et al. 2014; Zhao et al. 2018; Yuliarti et al. 2019)、遠心沈殿法による沈降物量 (Jensen, Rolin, and Ipsen 2010; Nobuhara et al. 2014; Zhao et al. 2018)、ゼータ電位 (Sejersen et al.; Nobuhara et al. 2014; Li et al. 2018; Zhao et al. 2018; Yuliarti et al. 2019) が用いられてきた。また近年では、液中に存在する分散体の分散安定性評価に、タービスキャンが用いられる場合もある。タービスキャンは、食品分野では、レンネット乳の凝固状態のモニタリング (Blecker, Habib-Jiwan, and Karoui 2012; Zhao et al. 2014)、水中油

滴型飲料中の乳化剤の乳化安定性の評価 (Raikos, Duthie, and Ranawana 2017)、酸乳飲料中の粒子の沈殿速度の測定 (Sedlmeyer et al. 2004)、および乳酸菌による乳発酵過程のモニタリング (Raikos et al. 2018; Ni and Raikos 2019) に使用されている。しかし、長期保存中のドリンクヨーグルトの安定性の迅速評価にタービスマンが利用された例はまだ報告されていない。

本研究では、長期常温保存後の LL ヨーグルトホエイ分離の迅速評価を可能とするモデルの作成を目的とした。この目的を達成するために、タービスマンによる分散安定性測定と共に、粘度測定、粒子径測定、遠心分離による沈降量測定、およびゼータ電位測定のような種々の定量可能な物性測定を行った。各種物性測定値を説明変数とした回帰分析によって、ホエイ分離の予測モデルを作成した。さらに、モデルの精度と汎用性を、異なる製造条件で製造した LL ヨーグルトのホエイ分離予測に適用することによって評価し、最適な精度と汎用性を有するモデルを選択した。

2 - 2 . 材料と方法

2 - 2 - 1 . 発酵乳試料の調製

ハイヒート脱脂粉乳 (Morinaga milk industry, Tokyo, Japan) を脱イオン水に 14.25% (w/w) となるよう溶解することにより調乳液を調製した。調乳液を 85°C に加温し、均質機 (Sanmaru machinery, Shizuoka, Japan) を用い 15MPa で均質処理した。次いで、プレート熱交換・チューブラー保持式の間接加熱殺菌機 (Morinaga engineering, Tokyo, Japan) で、95°C 360 秒、130°C 2 秒、140°C 2 秒および 145°C 2 秒、または INF (インフュージョン) 方式の直接加熱殺菌機

(Morinaga engineering, Tokyo, Japan) で 140.6°C 5.5 秒で一次殺菌を実施した。一次殺菌条件 95°C 360 秒は、ヨーグルトの製造に用いられる一般的な殺菌条件である。間接加熱に用いられる温度 (130°C、140°C および 145°C) は、牛乳の UHT 滅菌に一般的に用いられる殺菌温度である。140.6°C 5.5 秒での殺菌条件は、145°C 2 秒の殺菌条件と同じ F 値 ($z=10^{\circ}\text{C}$) として選択した。一次殺菌後、試料を 43°C に急冷した。*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* および *S. thermophilus* からなる市販の凍結乾燥スターターカルチャー (Express1.0, Chr. Hansen, Hoersholm, Denmark) を調乳液に 0.01% (w/w) で接種し十分に攪拌した後、43°C のインキュベーター内で pH が 4.3 に達するまで発酵させた。発酵後、攪拌し、冷却槽で 10°C に冷却し、10°C で一晩保存した。

2-2-2. 安定剤 (ペクチン) 溶液の調製

HM ペクチン (エステル化度:70~75% (w/w)、重量平均分子量:500,000、San-Ei Gen F.F.I., Osaka, Japan) を脱イオン水に 0.67、1.00、1.33、1.67 および 2.00% (w/w) となるよう溶解しペクチン溶液を調製した。ペクチン溶液を、90°C 以上のウォーターバス中で 90°C 5 分間バッチ殺菌後、5°C のウォーターバス中で 10°C に冷却した。

2-2-3. ロングライフヨーグルトの調製

LL ヨーグルトは、発酵乳試料とペクチン溶液を、ホモミキサー (PRIMIX, Osaka, Japan) を用いて重量比 7:3 で攪拌混合し、LL ヨーグルトの無脂乳固形分が 9.5% (w/w)、LL ヨーグルトのペクチン濃度が 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6%

(w/w) になるように調製した。混合物の pH を 25°C で 4.15 になるように、10% (w/w) クエン酸 (Fuso chemical, Osaka, Japan) 溶液で調整した。次いで、混合物を以下の方法のいずれかで処理した。

a) 下流均質化法: 混合物をプレート熱交換・チューブラー保持式間接加熱殺菌機 (Seika, Tokyo, Japan) を用いて以下の条件で二次殺菌を実施した。日本の乳等省令で定められた発酵乳の二次殺菌条件は、75°C 900 秒である。選択した条件である 79.8°C 300 秒、89.8°C 30 秒および 101.5°C 2 秒は、乳等省令規定条件と同じ F 値 ($z=10^{\circ}\text{C}$) となるように計算したものであった。加えて、規定条件よりも低い F 値となる 78°C 30 秒および高い F 値となる 114.6°C 2 秒を選択した。二次殺菌後、LL ヨーグルトを 45°C に冷却し、次いで均質機 (SPX, NC, USA) を用いて 15MPa で均質化した。均質化後、速やかに 25°C に冷却した。

b) 上流均質化法: 混合物を 45°C に加熱した後、均質機 (SPX) を用いて 15MPa で均質化した。均質化後、89.8°C 30 秒の二次殺菌を行い、速やかに 25°C に冷却した。

上記いずれかの方法によって得られた LL ヨーグルトを、クリーンベンチ内にて 50 mL 目盛付き無菌プラスチックボトル (Sarstedt, Numbrecht, Germany) に無菌的に 45 mL 充填し、物性測定のための試料として使用した。

2-2-4. ホエイ分離測定

25°C のインキュベーター内に 45 および 90 日間保存後、ボトル内の上部透明層の体積 (mL) を目視で測定し、総体積 (mL) で割ってホエイ分離率 (% (v/v)) を求めた。

2-2-5. タービスキャン測定

本研究では、液中の分散安定性評価装置であるタービスキャン (Turbiscan Tower, Formulaction, Toulouse, France) (Fig. 2-1(a)) を用いて、25°Cで保存中の LL ヨーグルトのホエイ分離を評価した。本機器は光源として近赤外光 ($\lambda_{air}=880\text{nm}$) の電子発光ダイオードを用い、2つの同期した光学センサーがそれぞれサンプルを透過した光 (入射光に対して 180°) とサンプルによって後方散乱した光 (入射光に対して 45°) を受光する。スキャン時、光学測定ヘッドがサンプルの高さ方向をスキャンし、スキャン幅 $40\ \mu\text{m}$ 毎に透過光と後方散乱光を測定する (Mengual et al. 1999)。透過光および後方散乱光測定結果例を Fig. 2-2 に示す。透過光測定は主に透明な試料の状態変化の評価に用いられ、後方散乱光測定は主に非透明試料の状態変化の評価に用いられる。加えて、TowerSoft (Formulaction, Toulouse, France) を用いることで、測定した透過強度と後方散乱光強度から Turbiscan Stability Index (TSI) を計算できる。TSI はサンプルに含まれる分散体すべてに起こった変化を総括するものであるため、本研究においてはサンプルの不安定性を示す指標として TSI を用いることとした。TSI は、値が高いほど分散安定性が低いことを示し、次式によって算出される。

$$TSI(t) = \frac{1}{N_h} \sum_{t_i=1}^{t_{max}} \sum_{z_i=z_{min}}^{z_{max}} [BST(t_i, z_i) - BST(t_{i-1}, z_i)] \quad \dots\dots\dots \text{Eq. (1)}$$

ここで、 t_{max} は、TSI が算出される時間 t に対応する測定点である。 z_{min} と z_{max} は、選択した垂直方向のスキャン高さの下限と上限を示す。 N_h は選択されたスキャン高さにおけるデータ数であり、 $N_h = (z_{max} - z_{min}) / \Delta h$ (Δh は 1 スキャン当たりのスキャン幅) で算出される。 BST は測定光信号を示し、 $T < 0.2\%$ の場合は BS 、

それ以外の場合は T を用いる（ここで BS は後方散乱光強度、 T は透過光強度を示す）。TSI は無次元である。測定のための試料（調製直後の LL ヨーグルト、約 20mL）をタービスキャン測定バイアル（外径 27 mm）（Fig. 2-1(b)）に充填し、測定温度 25°C、測定開始前の待機時間 5 分、測定間隔 4 時間の条件で、72 時間連続測定を実施した。バイアル内の検体上部から徐々に透明なホエイ層が増加していく特性を考慮し、バイアル上部（垂直方向に上部 20% (v/v)）の TSI 値を LL ヨーグルトの分離安定性の指標とした。Fig. 2-3 に、25°C における TSI の時間変化の例を示す。概して、TSI 曲線は傾きを変化させながら一定時間後に線形変化にシフトする傾向を示した。本研究では、長期保存中の安定性評価という観点から、線形変化に移行後の傾きで評価することが望ましいと考え、以下式で表される $TSI_{slope t}$ を安定性の指標として考案した。

$$TSI_{slope t} = \frac{TSI_t - TSI_{t-4}}{4} \quad \dots\dots Eq. (2)$$

ここで、 TSI_t は 25°C にて t 時間保存後の TSI 値、 TSI_{t-4} は 25°C に $t-4$ 時間保存後の TSI 値である。試料によって線形変化に移行するのに要する時間に変動があるという予備的検討結果（データ示さず）より、本研究では安定化に要する時間 t を 48 時間とした。

2 - 2 - 6 . 沈殿物測定

ヨーグルトの物理的安定性を評価する方法として、沈殿物の測定がしばしば用いられてきた。本研究では、従来の沈殿物測定法に従って測定を実施した。製造直後の LL ヨーグルトサンプルを 25°C で 48 時間保存後、遠心機（Koki, Tokyo, Japan）を用いて、25°C で遠心分離（2000g×20 分）し、上清を除去した。

残りの分離物を乾燥オーブン (Isuzu Seisakusho, Niigata, Japan) にて 60°C で 48 時間乾燥後、乾燥物の質量 (g) を秤量した。次に、測定した乾燥物の質量を評価試料の全固形分 (g) で除して沈降割合 (% (w/w)) を求めた。試料の全固形分は水分 - 固体分分析計 (SMART5, CEM, NC, USA) を用いて測定した。

2 - 2 - 7 . 粒子径測定

体積メジアン粒子径 (μm) をレーザ回折/散乱粒子径測定装置 (LA-950V2, Horiba, Kyoto, Japan) で測定した。製造直後の LL ヨーグルトを 25°C で 48 時間保存した試料を測定前によく混合して、粒子径測定に供した。

2 - 2 - 8 . 粘度測定

試料の粘度 ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) は、ブルックフィールド粘度計 (RB-80L, Toki Sangyo, Tokyo, Japan) を用いて、25°C、ローター回転数 60 rpm、10 秒後の条件にて、製造直後の LL ヨーグルトを 25°C で 48 時間保存後、測定した。

2 - 2 - 9 . ゼータ電位測定

ゼータ電位は、コロイド粒子のすべり面 (shear plane) に存在する電荷の大きさとして定義され、ゼータ電位の大きい粒子は、その電荷が粒子の凝集を防止し、安定性が高まると考えられている (Sejerssen et al. 2007)。本実験において、試料のゼータ電位 (mV) を、ゼータ電位/粒径測定システム (ELSZ-2000, Otuka Electronics, Osaka, Japan) を用いた電気泳動光散乱法により測定した。製造直後の LL ヨーグルトを 25°C で 48 時間保存後、Milli-Q 水で 10 倍に希釈し

た。屈折率：1.33、粘度：0.89 mPa·s、誘電率：78.3、測定温度は 25°Cを測定条件としてゼータ電位測定を実施した。

2 - 2 - 1 0 . 統計解析

すべての実験を 3 回繰り返して、データは平均値±標準偏差で示した。Tukey HSD 検定および Student's *t* 検定を用いて有意差検定を行った。ホエイ分離の予測モデルは、単回帰分析により決定した。説明変数は、「ブルックフィールド粘度」、「粒子径」、「ゼータ電位」および「TSI_{slope48}」とした。異なる製造条件で調製した LL ヨーグルトに予測モデルを適用し、決定係数 (R^2)、平均絶対誤差 (MAE) および二乗平均平方根誤差 (RMSE) を計算することで、統計的に有意なモデルを決定するためのモデルの正確性と汎用性を評価した。これらの統計解析には、IBM SPSS Statistics ver.25 for windows (IBM, NY, USA) を用いた。

2 - 3 . 結果と考察

2 - 3 - 1 . ロングライフヨーグルトの物性安定性に及ぼすペクチン濃度の影響

酸性化した乳中では、カゼインミセル間の電氣的反発力が低下することが知られている (Lucey and Singh 1998; Lucey 2004)。さらに、 κ -カゼインの毛状層の崩壊は立体反発力を低下させ、タンパク質クラスターを不安定化させ、凝集させる (De Kruif 1998; 1999)。過剰な凝集は、HM ペクチンの添加により防止できる。HM ペクチンはカゼインミセルの周りに吸着し電氣的反発および立体障害を生じることによって、過剰凝集の発生を抑制することが知られている

(Tromp et al. 2004)。一方で、吸着されなかった残りのペクチンも存在するが、本研究ではそれを「遊離ペクチン」と表記する。本セクションでは、室温での長期保存後のホエイ分離を予測するためのモデルを開発するために、異なる HM ペクチン濃度の LL ヨーグルトを調製し、ホエイ分離および様々な物性特性値を測定した。共通の製造条件として、一次殺菌:130°C 2 秒、二次殺菌:89.8°C 30 秒、発酵後の均質化:下流均質化法を用いて 15 MPa で調製した。Table 2-1 に、調製直後の LL ヨーグルトを 25°C で 48 時間保存後の各種物性測定値と 25°C で 45 および 90 日間保存後のホエイ分離率を示す。これらの結果は、以前に報告されたチルドヨーグルトの結果 (Lucey et al. 1999; Sejersen et al. 2007) と一致し、LL ヨーグルト中のペクチン濃度が高いほど、長期常温保存後のホエイ分離が有意に減少することを示した。TSI_{slope48} はペクチン濃度の増加と共に有意に減少する傾向を示した。TSI は値が小さいほど溶液の安定性が高いことを示すため、これはペクチン添加による安定性の改善を良く反映した結果と考えられる。また、ペクチン添加量の増加に伴い、沈殿率は有意に低下し、沈殿率が安定性評価の一定の指標になりうることが示唆された。ブルックフィールド粘度は、ペクチン濃度の増加と共に有意に増加する傾向を示した。この結果は、遊離ペクチンの量が増加すると、溶液の粘度が増加することを示した Jensen, Rolin, and Ipsen (2010) の研究結果と一致した。粒子径に関しては、ペクチンの添加により、有意差は認められなかったものの、値が減少する傾向を示したことから、加熱凝集が抑制される可能性が示唆された。ゼータ電位についても、ペクチンの添加で有意な変化を示さなかったが、ペクチン添加量 0.2% (w/w) から 0.5% (w/w) の範囲で、添加量に依存してマイナス側にシフトする傾向を

示した。これは、Sejersen et al. (2007) の等電点以下の正電荷をもつカゼインクラスター表面に負電荷をもつペクチンが吸着することで、ゼータ電位がマイナス側にシフトしたという結果と一致した。

2-3-2. 長期保存後のホエイ分離を予測するモデルの開発

各種物性測定値を説明変数とし、45日および90日保存後のホエイ分離量を目的変数とした単回帰分析の結果をTable 2-2に示す。なお、ブルックフィールド粘度を説明変数にした場合のみ、より高い適合性を目的に、対数変換した後に線形近似を実行したが、それ以外の説明変数については、そのまま線形近似を実施した。回帰分析の結果、粒子径(45日予測時)とゼータ電位(90日予測時)を除いて、統計的に有意なモデルとなった。45日後のホエイ分離の回帰モデルにおいて、説明変数として $TSI_{slope48}$ とブルックフィールド粘度を用いたモデルは高い R^2 (0.97および0.91)を示した。一方、沈殿率とゼータ電位を説明変数とするモデルでは、 R^2 値はそれほど高くなく(0.78および0.79)、粒子径を説明変数とするモデルは最も低い R^2 値(0.64)を示した。90日後のホエイ分離の回帰モデルにおいて、 $TSI_{slope48}$ とブルックフィールド粘度を用いたモデルは高い R^2 (0.98および0.99)を維持した。沈殿率および粒子径モデルの90日予測時の R^2 は、45日予測時の R^2 と比較して改善された(0.93および0.82)。一方、ゼータ電位の R^2 は0.67に減少した。これらの結果は、HMペクチン濃度を変化させた際のホエイ分離が $TSI_{slope48}$ とブルックフィールド粘度によって良く説明できることを示している。沈殿率の R^2 が45日予測時に低い理由は、遠心分離条件によると考えられる。本研究で用いた遠心分離条件は、静置保存

時に起こる自然なホエイ分離現象と比較して、過度な外力となった可能性がある。初期段階の頃の著しいホエイ分離変化が落ち着き、変化が停滞していると思われる 90 日予測時の沈降率モデルの R^2 改善は、過度な遠心分離条件と関連している可能性がある。Table 2-3 は、 TSI_{slope} を算出する時間が適切であるかどうかを検証するために、16、24、48 および 72 時間のタイミングで算出した TSI_{slope} を用いた回帰分析の結果を示す。予備的な研究結果（結果示さず）と同様に、算出時間が 24 時間未満である $TSI_{slope16}$ は R^2 が低かった。 $TSI_{slope24}$ の R^2 と $TSI_{slope48}$ の R^2 の比較では、 $TSI_{slope48}$ がより高い R^2 を、特に 90 日で有することを明らかにした。しかし、 $TSI_{slope48}$ と $TSI_{slope72}$ を比較すると、両者とも十分に高い R^2 を示した。以上の結果から、 TSI_{slope} 算出時間を 48 時間に設定したことは妥当であると考えられる。 $TSI_{slope48}$ を説明変数とした回帰式を以下に示す。

$$WS45 = 1.593 \cdot TSI_{slope48} - 0.033 \quad \dots\dots Eq. (3)$$

$$WS90 = 1.954 \cdot TSI_{slope48} - 0.004 \quad \dots\dots Eq. (4)$$

ここで、 $WS45$ は LL ヨーグルトを 25°C で 45 日間保存後のホエイ分離率であり、 $WS90$ は 25°C で 90 日間保存後のホエイ分離率を示す。

2-3-3. 一次殺菌条件がロングライフヨーグルトの物性安定性に与える影響

前パラグラフで作成した予測モデルの精度と汎用性を確認するために、異なる製造条件（一次殺菌条件、二次殺菌条件、発酵後の均質化を実施するタイミング）で LL ヨーグルトを調製し、各物性測定値への影響を確認した。異なる

製造条件の中で、ペクチン濃度は、いずれの場合も 0.3% (w/w) とした。Table 2-4 の上段のデータは、25°Cで 48 時間保存後の LL ヨーグルトの各種物性測定値および 45 日間および 90 日間保存後の離水率を示す。一次殺菌条件を変更した結果、45 日後のホエイ分離では、145°C 2 秒時は、95°C 360 秒時に比べて有意に増加する傾向を示した。しかし、90 日後のホエイ分離では、いずれの試料においても有意差は観察されなかった。TSI_{slope48} および沈殿率は、ホエイ分離率に相関した変化を示したが、ブルックフィールド粘度、粒子径およびゼータ電位はホエイ分離に相関した変化を示さなかった。90 日後のホエイ分離において有意差が確認できなかったことは、一次殺菌条件が LL ヨーグルトのホエイ分離に大きな影響を与えない可能性を示唆する。この結果は、生菌ヨーグルトの安定性に一次殺菌条件が有意な影響を及ぼさないことを報告した Lucey et al. (1999) の研究結果と一致している。通常、ヨーグルトに用いる牛乳の殺菌条件は、90~95°Cで 5~10 分である。この条件下では、大部分のホエイタンパク質は熱変性し、熱変性したホエイタンパク質は κ-カゼインと複合体を形成する。その結果、発酵後のヨーグルト構造が強化され、保水性も向上することが知られている (IDF 2018)。しかし、発酵後に二次殺菌と均質化処理を行う LL ヨーグルトでは、一次殺菌および発酵過程によって形成された構造が破壊されてしまう。したがって、構造形成に及ぼす一次殺菌の影響は、低減されると推察される。このことは、LL ヨーグルトの製造においては、生菌ヨーグルト製造時に一般的に使用されている一次殺菌条件に従う必要がない可能性を示唆している。

2-3-4. 二次殺菌条件がロングライフヨーグルトの物性安定性に与える影響

Table 2-4 の中段に示す通り、二次殺菌条件を変更した結果、45 および 90 日後のホエイ分離は、二次殺菌温度が上昇するにつれて有意に増加する傾向を示した。二次殺菌温度と保持時間との関係において、F 値に換算すると、75°C 900 秒、79.8°C 300 秒、89.8°C 30 秒、101.5°C 2 秒は、すべて同じ F 値となる。F 値が同じである試料群間の比較では、二次殺菌温度が高いほどホエイ分離の増加が大きいが、二次殺菌温度が一定温度以下の場合の保持時間はホエイ分離に大きく影響しない可能性があることが示唆された。カゼインの凝集には、疎水性相互作用が強く関与し (McMahon and Brown 1984)、温度の上昇は、疎水性相互作用を強めることが報告されている (Oakenfull and Fenwick 1977)。これらの結果に基づいて、疎水性相互作用が本研究の結果に影響し、二次殺菌温度が上昇するにつれて、LL ヨーグルトの物性安定性が低下したと考えられる。また、二次殺菌温度 80°C 以下の試料群内での比較では、F 値にかかわらずホエイ分離に有意差は認められなかった。75°C 900 秒時と 79.8°C 300 秒時の F 値は同じであったが、78.2°C 30 秒時の F 値は一桁低かった。したがって、特に 80°C 以下の二次殺菌温度範囲では、ホエイ分離に及ぼす保持時間の影響は顕著ではないことが分かった。TSI_{slope48}、沈殿率および粒子径はホエイ分離に相関して有意な増加を示した。一方、ブルックフィールド粘度は、二次殺菌温度の上昇と共に有意に減少する傾向を示した。通常、カゼインクラスターの粒子径が大きいほど、カゼインクラスター全体の表面積は小さくなるため、カゼインに吸着するペクチンの総量は少なくなる。従って、ペクチン濃度が十分な場合、カゼイ

ンに吸着されない遊離ペクチンの増加により溶液の粘度が増加する。しかし、本研究では相反する結果が得られた。この結果をもたらした理由の一つとして、ペクチン濃度 0.3% (w/w) では、カゼインクラスターサイズが約 5 μ m であっても、カゼインクラスター全体をカバーすることができない可能性が挙げられる。この場合、遊離ペクチン由来の粘度の上昇は見られない。一方、粒径が 2 μ m 程度のカゼインクラスターは、5 μ m 程度よりもクラスター全体の表面積が大きいいため、クラスター全体を覆うのに必要なペクチンが不足する可能性がある。その結果、電氣的反発が部分的に減少した粒子間の摩擦力により粘度が増加する可能性がある。本研究で得られた結果は、ペクチン濃度が低い際に、ペクチンがカゼインクラスターを架橋し、溶液の粘度を増加させることを報告した Marozienca and Kruif (2000) の結果と一致した。ゼータ電位の変化には有意差を認めなかったが、二次殺菌温度の上昇に伴い減少する傾向を示した。これは熱処理によるカゼイン表面からのペクチンの脱離またはペクチン分子の再配列がゼータ電位を低下させるとした Sejersen et al. (2007) の研究結果と一致した。通常、LL ヨーグルトにおいては、スターターカルチャー由来の乳酸菌や、代表的な有害微生物であるカビ・酵母を不活化するために加熱殺菌される。Puhan (1979) は、殺菌条件としては通常 70 $^{\circ}$ C で 30~60 秒の加熱で十分であるが、耐熱性好熱性乳酸菌を考えると、それより 10~15 $^{\circ}$ C 高い温度で殺菌する必要があると報告している。Bockelmann, B. and Bockelmann, I. (1998, 193-196) は、商業的に製造された LL ヨーグルトで使用されている二次殺菌条件は、85~95 $^{\circ}$ C 15~30 秒であると報告している。実際には、原料の微生物レベルや製造環境の衛生レベルに応じて殺菌温度が決定されるが、上記の結果からも明らか

に、一次殺菌工程とは異なり、二次殺菌温度が物性安定性にも大きな影響を与えることを考慮して、殺菌条件を決定する必要がある。

2-3-5. 発酵後の均質化工程実施のタイミングがロングライフヨーグルトの物性安定性に与える影響

Table 2-4 の下部のデータが示す通り、発酵後の均質化工程を二次殺菌前に実施（上流均質化法）した場合、下流均質化法と比較して、45 および 90 日後のホエイ分離が有意に減少した。TSI_{slope48} も有意な減少を示したが、沈殿率およびブルックフィールド粘度は有意に増加した。粒子径とゼータ電位の変化に有意差は確認されなかったが、粒子径は増加する傾向を示した ($p=0.07$)。興味深いことに、本実験結果では、粒子径は増加傾向であるにもかかわらず、ホエイ分離が減少することを示した。ストークスの法則によれば粒子径が大きいほど沈降速度が速まることから、ホエイ分離量が増加することが予想されるが、本実験結果はこの法則に従わなかった。下流均質化法の場合、発酵と二次殺菌により形成されたタンパク質凝集体は二次殺菌後に均質工程を経ることによって、カゼインクラスターサイズは小さくなることが推定される。上流均質化法の場合、均質化後に二次殺菌処理を行うため、タンパク質凝集がわずかに進行し、粒子径が約 $9\mu\text{m}$ に増大した可能性がある。実際のカゼインクラスターは完全な球形ではなく不規則な形をしていることを考慮する必要はあるが、Tromp et al. (2004) および Jensen, Rolin, and Ipsen (2010) は、カゼインクラスターの粒子径とそれを覆うのに必要なペクチンの量との間に一定の相関があり、カゼインクラスターサイズが小さくなると、そこに吸着するペクチン量が増加すること

を報告している。粒子径が大きくなると、ペクチンはクラスター全体を覆うことができ、過剰の遊離ペクチンを含む弱いネットワークが形成された可能性がある。実際に、本研究においてブルックフィールド粘度は増加した。しかしながら、この弱いネットワークは、遠心分離のような厳しい外力によって容易に破壊されると予想され、そのため、遠心分離による沈殿率の測定は、静置保存中のホエイ分離の評価には適していないことが考えられる。Lucey, Munro, and Singh (1998) は、メスフラスコ、ペトリ皿、および低速遠心分離を用いて、グルコノ- δ -ラクトンによる脱脂粉乳のゲル化におけるホエイ分離を評価したが、低速遠心分離はセットゲル中のホエイ分離を定量するための有用な方法ではないと結論づけた。彼らの実験においても、静置状態における自然発生的なホエイ分離を評価することを目的としていたため、遠心分離を低速 (100g \times 10 分) で実施したが、有効な結果は得られなかった訳である。この結果から、ドリンクヨーグルトの自然なホエイ分離を評価する研究においては、遠心分離条件の制御では、肯定的な結果をもたらさないかもしれない。van Hooydonk, Smalbrink, and Hagedoorn (1982) は、LL ヨーグルトの発酵後に均質化の順序を変え、その効果を評価したが、下流均質化のみを用いても、上流均質化と下流均質化を併用しても、安定化効果は変わらないことを報告し、また、McKenna (1987) は、二次殺菌温度が乳タンパク質の凝集が起こりうる 85 $^{\circ}$ C 以上の場合には、下流均質化法が有効であることを報告している。これら既存の研究で用いられた 0.5% 以上と高いペクチン濃度が、本研究と異なる結果となったことの原因の一つといえる。ペクチン濃度が低い場合、均質化順序の影響はより大きく推測される。しかしながら、使用するペクチンの種類も考慮した処方配合の違

い、均質化圧力および二次殺菌温度などの違いも考慮する必要があるため、本結果の原因を探るための更なる研究が必要である。

2-3-6. 予測モデルの精度と汎用性の検証

モデル精度と汎用性を検証するために、異なる製造条件で調製したサンプル群に、本研究で作成した統計的に有意な予測モデルを適用した。Fig. 2-4 に、適用モデルのホエイ分離の予測値と測定値、 R^2 、MAE、RMSEを示す。Fig. 2-4(a)に示すように、 $TSI_{slope48}$ を用いた予測モデルは、45日予測時で $R^2:0.93$ 、MAE:4.9%、RMSE:6.0%、90日予測時で $R^2:0.92$ 、MAE:7.6%、RMSE:9.4%となり、最も高い精度を示した。これは、 $TSI_{slope48}$ を用いたモデルは、非常に汎用性が高く、一次殺菌条件、二次殺菌条件および発酵後の均質工程の順番を変更した場合においても、良好な精度でホエイ分離を予測できることを示す結果である。Fig. 2-4(d)に示すように、沈殿率に基づく予測モデルは、45日予測時で $R^2:0.47$ 、MAE:9.5%、RMSE:19.1%、90日予測時で $R^2:0.44$ 、MAE:14.1%、RMSE:25.0%と低い精度を示した。沈殿率モデルでは、発酵後の均質化工程の順序を変更した場合のホエイ分離を予測できなかったことが、予測精度を著しく低下させた原因である。タービスクャンによる安定性評価の特徴の一つは、遠心分離による沈殿率測定と異なり、重力以外の外力を含まない自然な静置条件下において、定量的に安定性を評価できることである。また、45および90日保存後のホエイ分離を、メスシリンダー法のような視覚的にホエイ分離を評価する従来法では判別不能なLLヨーグルト調製後48時間というタイミングで予測可能であることには大きな価値があると考えられる。ブルックフィールド粘度に基づくモデル

は、ペクチン濃度のみを変更した場合には高い R^2 を示したが、一次殺菌および二次殺菌条件を変更した場合 (Fig. 2-4(c))、ホエイ分離を精度良く予測することは困難であった。加えて、粒子径 (Fig. 2-4(b)) とゼータ電位 (Fig. 2-4(e)) に基づく予測モデルは、ともに高精度で予測することが困難であった。これは、LL ヨーグルトのホエイ分離と粘度、粒子径およびゼータ電位の間には一定の相関が認められるものの、ヨーグルトの安定性をそれぞれが単独では制御していないことを示唆する。実際、ヨーグルトの物性安定性に影響を与える要因としては、加熱・殺菌条件や発酵後の均質化の順序の他に、均質化圧力、無脂乳固形分や糖濃度、ペクチンの種類など多くの要因が複雑に関係している。したがって、安定性の迅速評価が可能な予測モデルには高い汎用性が必要であり、それを用いることによって、製造条件の最適化や安定性を最大化する処方の評価が可能となる。

2-4. 結論

本研究の目的は、長期常温保存によって引き起こされる LL ヨーグルトのホエイ分離の迅速かつ精度の高い予測モデルを開発することであった。種々の定量可能な物性測定に基づく予測モデルを作成した結果、45 および 90 日間 25°C で保存した後のホエイ分離は、タービスキャンによる TSI 測定を用いて作成した予測モデルを適用することにより、製造直後から 48 時間後に、正確に予測できることを実証した。このモデルは、ドリンクヨーグルトの安定性を評価するために既に使用されている粘度、粒子径、沈殿およびゼータ電位のような物理的測定に基づく他のモデルよりも汎用性が高く、LL ヨーグルトの物性安定性に強く影響することが知られているペクチン濃度の安定性評価だけでなく、殺菌

条件および発酵後の均質化のタイミングのような製造条件が変化した際の安定性評価にも精度よく適用することができた。タービスキャンを用いた TSI 測定は、メスシリンダー法のような従来法では評価に非常に長い時間がかかる LL ヨーグルトの静置状態におけるホエイ分離について、迅速で正確な評価を可能にした。高い汎用性と高精度を有するモデルは、LL ヨーグルトの物性安定性を高めるのに最適な製造条件と最適な処方を選択するのに利用できるだけでなく、不安定化因子の作用機構を解明するための強力なツールになり得る。実際には、LL ヨーグルトの安定性に影響する因子としては、発酵後の均質圧力、均質温度、乳タンパク質濃度および LL ヨーグルトに含まれる糖含量のような、本研究で検証されていない製造条件および処方も含まれる。これらの因子は複雑に相互に関係し合い、LL ヨーグルトの安定性に影響する。モデルの汎用性をさらに検証するために、本研究で検討されていない因子についてもモデルを適用し、その有効性を確認していく必要がある。

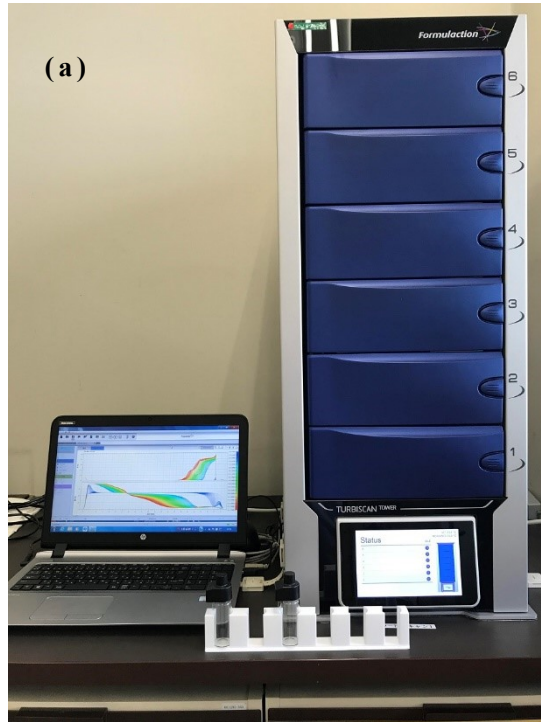


Fig. 2-1. (a) Turbiscan tower (Formulation, Toulouse, France)
(b) Turbiscan measuring vial (27mm outside diameter)

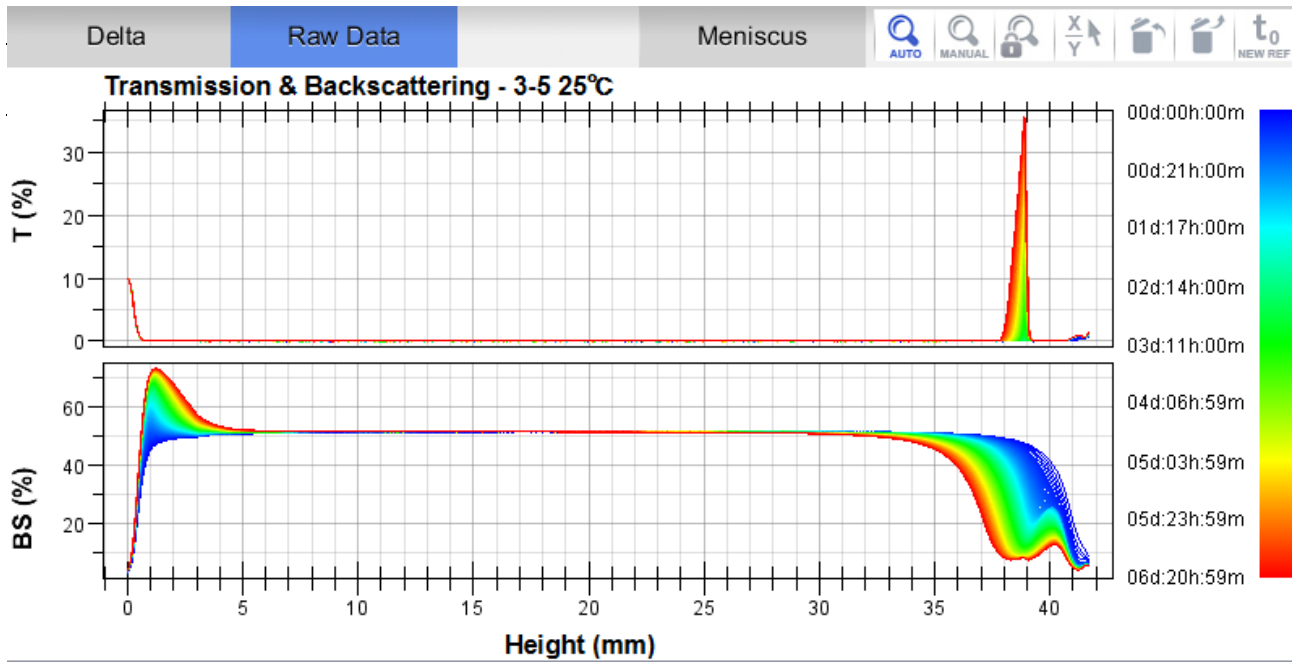


Fig. 2-2. Graphic example of measured transmitted light and backscattered light

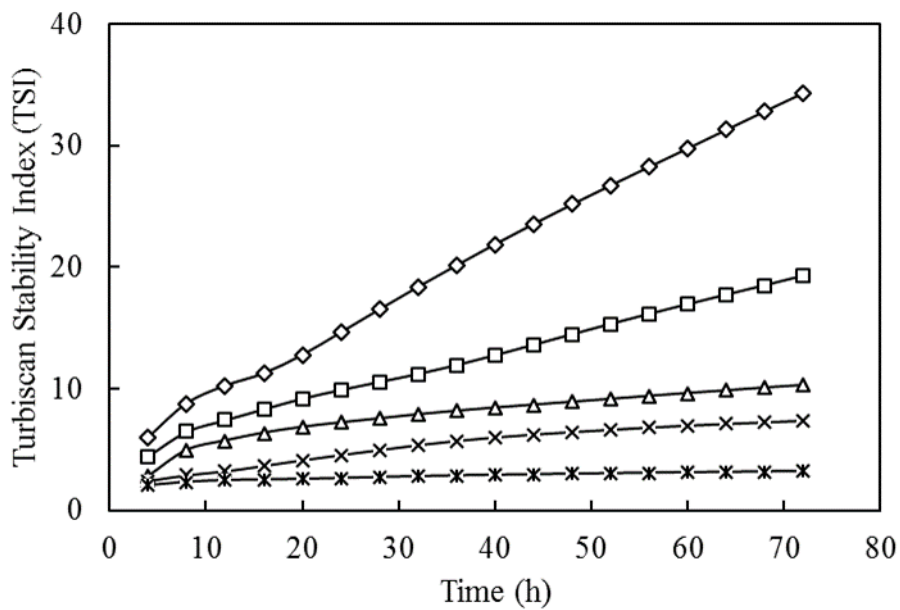


Fig. 2-3. Time course of the Turbiscan Stability Index (TSI) of long-life yogurt samples at different pectin concentrations
Pectin concentration : ◇, 0.2%; □, 0.3%; △, 0.4%; ×, 0.5%; *, 0.6%

Table 2-1. Physical properties of long-life yogurts produced using varying pectin concentrations

Pectin concentration (%)	Brookfield viscosity (mPa·s)	Particle size (μm)	Sedimentation (%)	Zeta potential (mV)	TSI _{slope48} (Dimensionless)	Whey separation	
						45th day (%)	90th day (%)
0.2	9.68 \pm 0.90 ^b	3.55 \pm 0.33 ^a	24.62 \pm 1.89 ^a	-8.65 \pm 1.28 ^a	0.41 \pm 0.083 ^a	64.20 \pm 18.65 ^a	76.62 \pm 14.30 ^a
0.3	13.72 \pm 0.77 ^b	3.58 \pm 0.53 ^a	21.38 \pm 4.35 ^a	-10.52 \pm 1.10 ^a	0.21 \pm 0.042 ^b	23.17 \pm 3.54 ^b	44.27 \pm 12.94 ^b
0.4	22.72 \pm 1.26 ^b	3.21 \pm 0.18 ^a	4.32 \pm 0.29 ^b	-11.00 \pm 0.78 ^a	0.06 \pm 0.012 ^c	10.78 \pm 2.00 ^{bc}	16.18 \pm 3.66 ^c
0.5	41.62 \pm 5.76 ^b	3.14 \pm 0.15 ^a	1.35 \pm 0.03 ^b	-11.15 \pm 1.85 ^a	0.05 \pm 0.010 ^c	2.04 \pm 0.07 ^{bc}	3.87 \pm 0.34 ^c
0.6	119.30 \pm 26.65 ^a	3.01 \pm 0.07 ^a	0.74 \pm 0.06 ^b	-10.27 \pm 1.48 ^a	0.01 \pm 0.002 ^c	0.07 \pm 0.01 ^c	0.18 \pm 0.01 ^c

Whey separation was measured after being sorted at 25 °C for 45 and 90 days.

All data, except for whey separation, were measured after being kept at 25 °C for 48 h.

The samples were manufactured under the following conditions:

primary sterilization, 130 °C 2 s; secondary sterilization, 89.8 °C 30 s; homogenization after fermentation, downstream 15 MPa.

The measured values are shown as mean \pm SD.

Means within a row with different superscripts are significantly different (Tukey-HSD test ($p < 0.05$)).

Table 2-2. Simple regression models obtained for whey separation after being kept at 25°C for 45 days and 90 days with physical property data as explanatory variables

Response variable	Explanatory variable	Coefficient	Intercept	R ²	p -value
Whey Separation after being kept at 25°C for 45 days	Brookfield viscosity	-4.267	26728.000	0.91	0.012
	Particle size	0.821	-2.506	0.64	0.106
	Sedimentation	2.011	-0.010	0.78	0.047
	Zeta potential	0.234	2.618	0.79	0.043
	TSI _{slope48}	1.593	-0.033	0.97	0.002
Whey Separation after being kept at 25°C for 90 days	Brookfield viscosity	-2.432	254.190	0.99	0.001
	Particle size	1.138	-3.472	0.82	0.033
	Sedimentation	2.672	0.002	0.93	0.009
	Zeta potential	0.263	2.993	0.67	0.091
	TSI _{slope48}	1.954	-0.004	0.98	0.001

Brookfield viscosity is linearly approximated by logarithmic conversion of the data to provide a better fit, while the remaining data are linearly approximated as they are.

Table 2-3. Simple regression models obtained for whey separation after being kept at 25°C for 45 days and 90 days with TSI_{slope} as explanatory variables with different measurement times

Response variable	Explanatory variable	Coefficient	Intercept	R^2	p -value
Whey Separation after being kept at 25°C for 45 days	$TSI_{slope16}$	2.720	-0.150	0.59	0.128
	$TSI_{slope24}$	1.493	-0.057	0.97	0.003
	$TSI_{slope48}$	1.593	-0.033	0.97	0.002
	$TSI_{slope72}$	1.688	-0.023	0.97	0.002
Whey Separation after being kept at 25°C for 90 days	$TSI_{slope16}$	1.980	-0.114	0.75	0.057
	$TSI_{slope24}$	1.759	-0.021	0.90	0.013
	$TSI_{slope48}$	1.954	-0.004	0.98	0.001
	$TSI_{slope72}$	2.076	0.008	0.99	<0.001

TSI_{slope} are calculated as the slopes between the TSI value at 16, 24, 48, 72 h and the TSI value 4 h before each time point.

Table 2-4. The physical property data of long-life yogurts produced under different manufacturing conditions

Condition of primary sterilization	Condition of secondary sterilization	Condition of homogenization after fermentation	Brookfield viscosity (mPa·s)	Particle size (µm)	Sedimentation (%)	Zeta potential (mV)	TSI _{slope}		Why separation	
							Dimensionless	(%)	45th day (%)	90th day (%)
95°C 360s	89.8°C 30s	Downstream 15MPa	12.52±0.47 ^{bc}	2.65±0.26 ^b	7.80±0.96 ^c	-7.43±0.04 ^b	0.085±0.017 ^b	16.15±2.63 ^b	26.13± 6.75 ^a	
(130°C 2s	89.8°C 30s	Downstream 15MPa	13.72±0.77 ^{ab}	3.58±0.53 ^a	21.38±4.35 ^a	-10.52±1.10 ^a	0.210±0.042 ^a	23.17±3.54 ^{ab}	44.27±12.94 ^a	
140°C 2s	89.8°C 30s	Downstream 15MPa	14.06±0.44 ^a	2.85±0.34 ^{ab}	14.20±3.16 ^{abc}	-10.76±0.94 ^a	0.143±0.029 ^{ab}	23.46±3.35 ^{ab}	34.31± 9.04 ^a	
145°C 2s	89.8°C 30s	Downstream 15MPa	13.08±0.28 ^{ab}	3.09±0.29 ^{ab}	17.90±5.25 ^{ab}	-9.17±0.69 ^a	0.228±0.046 ^a	27.35±4.69 ^a	42.67± 9.35 ^a	
140.6°C 5.5s(INF)	89.8°C 30s	Downstream 15MPa	11.30±0.56 ^c	2.60±0.16 ^b	9.77±1.59 ^{bc}	-10.42±1.23 ^{ab}	0.100±0.020 ^b	19.50±5.45 ^{ab}	35.16± 7.64 ^a	
130°C 2s	75°C 900s	Downstream 15MPa	16.06±0.37 ^a	2.34±0.05 ^c	3.65±0.53 ^b	-11.02±1.65 ^a	0.088±0.018 ^c	10.18±2.36 ^b	18.09± 4.17 ^c	
130°C 2s	78.2°C 30s	Downstream 15MPa	15.72±1.23 ^{ab}	2.31±0.26 ^c	3.27±0.38 ^b	-11.45±2.61 ^a	0.070±0.014 ^c	9.64±1.02 ^b	16.70± 1.64 ^c	
130°C 2s	79.8°C 300s	Downstream 15MPa	13.46±0.71 ^c	2.59±0.23 ^{bc}	5.94±0.99 ^b	-10.59±1.58 ^a	0.088±0.020 ^c	11.43±1.63 ^b	23.02± 5.92 ^{bc}	
(130°C 2s	89.8°C 30s	Downstream 15MPa	13.72±0.77 ^{bc}	3.58±0.53 ^b	21.38±4.35 ^a	-10.52±1.10 ^a	0.210±0.042 ^b	23.17±3.54 ^b	44.27±12.94 ^b	
130°C 2s	101.5°C 2s	Downstream 15MPa	12.72±0.77 ^c	5.21±0.53 ^a	33.77±7.22 ^a	-10.23±1.31 ^a	0.318±0.065 ^{ab}	54.54±8.32 ^a	75.77±10.75 ^a	
130°C 2s	114.6°C 2s	Downstream 15MPa	11.96±0.52 ^c	5.37±0.20 ^a	32.26±7.34 ^a	-9.41±0.97 ^a	0.328±0.067 ^a	61.43±7.71 ^a	81.49± 9.26 ^a	
(130°C 2s	89.8°C 30s	Downstream 15MPa	13.72±0.77	3.58±0.53	21.38±4.35	-10.52±1.10	0.210±0.042	23.17±3.54	44.27±12.94	
130°C 2s	89.8°C 30s	Upstream 15MPa	20.10±1.33 ^{**}	8.94±2.74	34.66±2.84 [*]	-9.04±0.66	0.110±0.022 [*]	10.53±0.59 ^{**}	17.43± 2.69 [*]	

The altered manufacturing conditions are primary sterilization condition, secondary sterilization condition, and the timing of homogenization after fermentation. All samples are made with 0.3% pectin. The measured values are shown as mean ± SD.

Significant differences are tested in groups with changing primary sterilization condition, varying secondary sterilization condition and changing homogenization condition, respectively. For each group, the tests are performed by adding the data at 0.3% pectin in Table 1, as shown in brackets.

Means within a row with different superscripts are significantly different by Tukey-HSD test ($p < 0.05$).

Means with asterisk are significantly different by Student's t -test (* : $P < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

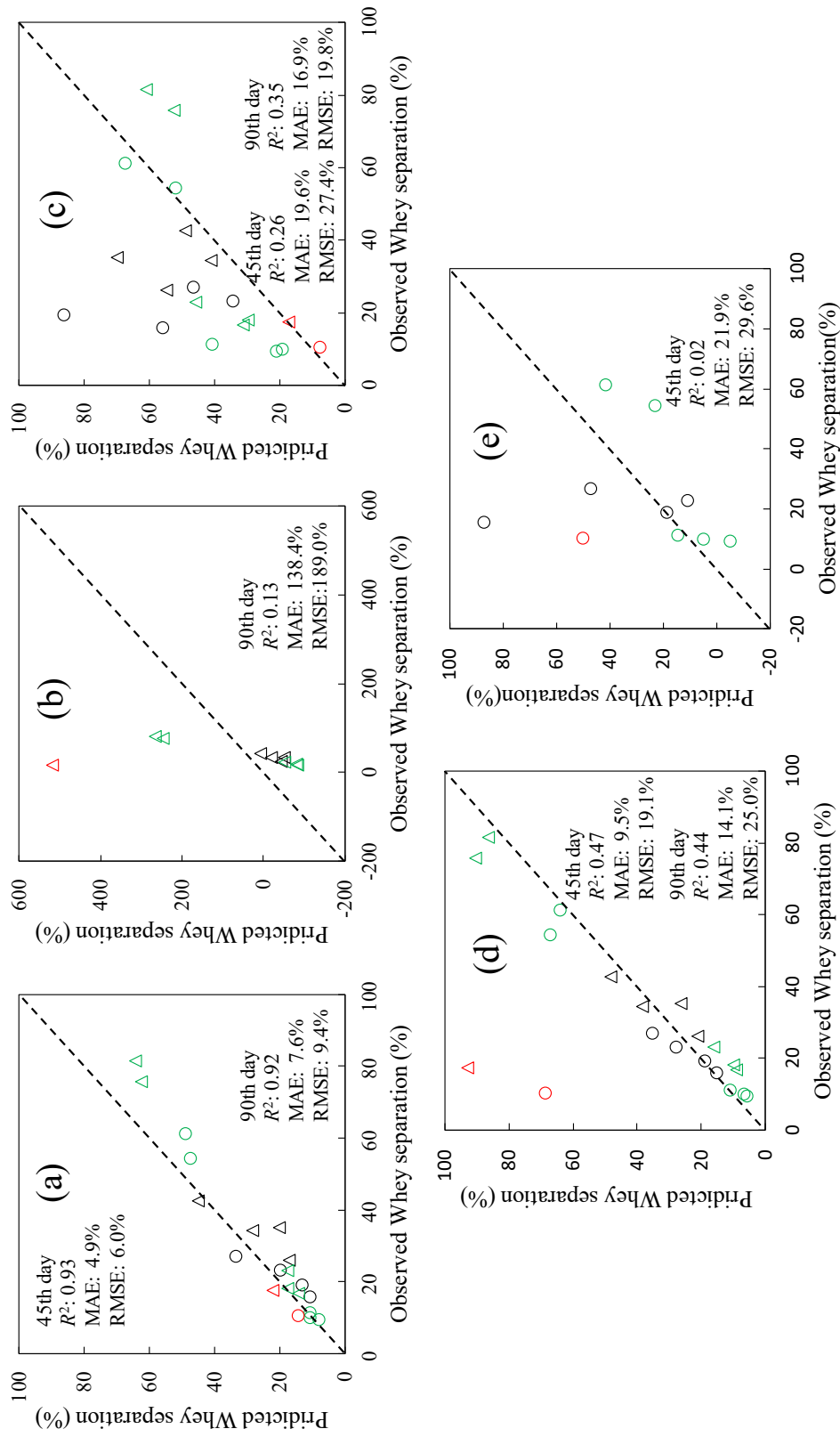


Fig. 2-4. Predictive performance of each statistically significant regression model by comparing the predicted whey separation with (a) TSI slope-48, (b) Particle size, (c) Brookfield viscosity, (d) Sedimentation, (e) Zeta potential and the observed whey separation when predictive models are applied to the samples produced under different manufacturing conditions. The circular plots indicate whey separation after being kept at 25°C for 45 days. The triangular plots indicate whey separation after being kept at 25°C for 90 days. Black symbols represent samples with changed pre-heating conditions. Green symbols represent samples with upstream homogenization. Red symbols represent samples with changed pasteurization conditions. The coefficient of determination (R^2), mean absolute error (MAE), and the root mean square error (RMSE) are shown. The dashed line indicates 1:1 relation.

第3章 常温保存中に発生するロングライフヨーグルトのオフフレーバーの研究

3-1. 序

近年、LLヨーグルトは特に新興国で大きな市場を形成している。チルドヨーグルトは生きている乳酸菌によって保存中も発酵が進み風味が変化することから、賞味期限は冷蔵で約1ヶ月程度となっている。一方で、LLヨーグルトは二次殺菌によって乳酸菌を含む微生物が死滅していることから菌体の増殖が発生せず、常温で半年～1年保存することが可能である。さらに長い賞味期限が求められているが、常温保存によって風味が劣化していくことから、前述の賞味期限設定が限界となっている。

アレニウスの法則によると、一般的に化学反応速度は10℃上がるごとに2倍になることが明らかとなっており、冷蔵で1ヶ月程度の賞味期限のチルドヨーグルトに対し、常温で半年～1年の賞味期限のLLヨーグルトは保存時の化学反応が顕著である。例えば、ultra-high temperature-processed milk (UHT牛乳)を冷蔵と常温で保存した際は、アレニウスの法則に則って風味変化が促進されることが報告されている (Sunds et al. 2018)。冷蔵保存中のヨーグルトの風味変化も数多く報告されている (Cheng 2010; Fernandez-Garcia and McGregor 1994; Ott et al. 1999; Dan et al. 2019; 2017)。また、UHT牛乳の常温保存中の風味変化の研究についても幅広く研究されており (Mottar et al. 1979; Celestino, Iyer, and Roginski 1997)、メイラード反応 (Sunds et al. 2018; Valero et al. 2001; Kokkinidou and Peterson 2014) や耐熱性酵素 (Grufferty and Fox 1988; Koka and Weimer 2001) が関与していることが報告されている。UHT牛乳における冷蔵保存と常温保存の比較と異なり、チルドヨーグルトとLLヨーグルトの場合は乳酸菌が生きている、死んでいるという違いがあるため、UHT牛乳の保存の比較

よりも大きな変化があるのは明白である。

非常に大きな市場があるにも関わらず、LLヨーグルトを常温で保存した際の風味変化の研究はほとんど実施されていない。Rychlik et al.は LLヨーグルトを常温で保存した際、耐熱性リパーゼによって脂肪が分解され脂肪酸が生成し、その脂肪酸がオフフレーバーに関与していることを明らかにした (Rychlik, Sax, and Schieberle 2006)。リパーゼによる異臭の発生は UHT 牛乳でも問題視されている。Valero et al.は無脂肪 UHT 牛乳は全脂肪 UHT 牛乳よりも風味劣化の度合いが大きいことを報告しており (Valero et al. 2001)、脂肪以外の成分についても異臭の発生に関与していることが考えられる。例えば、プラスミンは最もよく研究されている乳中に含まれる耐熱性のプロテアーゼであり、タンパク質を分解して牛乳の風味を劣化させることが報告されている (Grufferty and Fox 1988)。これらのことから、脂肪酸以外に着目した LLヨーグルトの常温保存中の風味変化の研究は必須だと考える。

そこで、本研究では、LLヨーグルトを常温で保存した際のオフフレーバーの関与物質とその生成経路の推測を目的とした。これらを解明することにより、より長い賞味期限をもった LLヨーグルトの開発に寄与することが期待される。

3 - 2 . 材料と方法

3 - 2 - 1 . 発酵乳試料の調製

ハイヒート脱脂粉乳 (Morinaga milk industry, Tokyo, Japan) を脱イオン水に 14.25% (w/w)となるよう溶解することにより調乳液を調製した。調乳液を 85℃ に加温し、ホモジナイザー (Sanmaru machinery, Shizuoka, Japan) で 15 MPa で均質処理した。次いで、プレート熱交換・チューブラー保持式の間接加熱殺菌機 (Morinaga engineering, Tokyo, Japan) で 130℃ 2 秒の条件で一次殺菌を実施した。この殺菌条件は牛乳の UHT 殺菌条件として一般的である。一次殺菌後、

調乳液を 43℃ に急冷し、市販の凍結乾燥スターターカルチャー (Express1.0, Chr. Hansen, Horsholm, Denmark) を調乳液に 0.01% (w/w) 接種し十分に攪拌した後、43℃ のインキュベーター内で pH が 4.3 に達するまで発酵させた。発酵後、攪拌し、ウォーターバス内で 10℃ に冷却し、10℃ で一晩保存した。

3-2-2. ペクチン溶液の調製

HM ペクチン (エステル化度: 70~75% (w/w) 重量平均分子量: 500,000, San-Ei Gen F.F.I., Osaka, Japan) を脱イオン水に 1.0% (w/w) 溶解することによりペクチン溶液を調製した。ペクチン溶液は、90℃ 以上のウォーターバス中で 90℃ 5 分間バッチ殺菌後、5℃ のウォーターバス中で 10℃ に冷却した。

3-2-3. ロングライフヨーグルトの調製

LL ヨーグルトは、発酵乳試料とペクチン溶液を重量比 7:3 で混合し、ホモミキサー中で攪拌して、LL ヨーグルトの無脂乳固形分が 9.5% (w/w)、LL ヨーグルトのペクチン濃度が 0.3% (w/w) になるように調製した。混合物の pH を 25℃ で 4.15 になるように殺菌済みの 10% (w/w) クエン酸 (Fuso chemical, Osaka, Japan) 溶液で調整した。次いで、混合物をプレート熱交換・チューブラー保持式間接加熱殺菌機 (Seika, Tokyo, Japan) にて 89.8℃ 30 秒の条件で二次殺菌した。なお、日本において法令で規定されている LL ヨーグルトの二次殺菌条件の下限は 75℃ 900 秒であり、F 値 (Z=10℃ 時) 換算すると 89.8℃ 30 秒に相当する。二次殺菌後、LL ヨーグルトを 45℃ に冷却し、均質機 (SPX) にて 15 MPa で均質処理した。さらに 25℃ まで冷却し、LL ヨーグルトを得た。サンプルは無菌条件下で速やかに 3 本の 1 L 容のシリコンインナーシールを備えたガラス瓶 (Sibata Scientific Technology, Saitama, Japan) に 1 L ずつ分注した。1 本のボ

トルを初検検査用 (YC) とし、サンプル調製後すぐに香気分析の前処理、官能評価、色差測定に供した。次のボトルに 2.6 mg/L の 4-vinylguaiacol 溶液を 1 mL 添加し、2.6 ng/L の濃度の 4-vinylguaiacol が付加された YC サンプル (YC+) を調製し、すぐに官能評価に供した。最後のボトルを遮光条件下で 25°C、90 日間保存し、保存期間経過後すぐに比較品 (YC D90) として、SAFE 処理、官能評価、色差測定に供した。

3 - 2 - 4 . 官能評価

それぞれのサンプル (YC、YC D90、YC+) をよくかき混ぜプラスチックカップに 30 mL ずつ分注し、5°C に温調した。訓練されたパネリスト (男性 8 名、女性 3 名、23~52 歳) にてこれらのサンプルの官能評価を実施した。それぞれのサンプルの各官能評価項目について、1~9 点 (1 点が最もその香調が弱く、9 点が最も強い) で採点を行った。官能評価項目はヨーグルトライク (sour/tangy/cheesy/buttery)、ミルクライク (creamy and rich)、オフフレーバー、加熱臭 (caramel)、ビターとした。

3 - 2 - 5 . 溶剤支援フレーバー蒸発処理

香気分析の前処理として溶剤支援フレーバー蒸発 (Solvent assisted flavor evaporation: SAFE) を用いた。100 g の YC もしくは YC D90 と、内部標準物質として 100 µg の 3-heptanol (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) と 100 µg の 4-octanol (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を 300 mL 容のガラスフラスコで混合した。その際、100 mL の dichloromethane (Kishida Chemical, Osaka, Japan) をガラスフラスコに加えた。室温で 1 時間攪拌した後、遠心分離 (10,000 rpm×10 分) を行った。得られた沈殿物に対し、anhydrous sodium sulfate (Kishida Chemical) を用いて乾燥させた。抽出物は SAFE によって揮発性成分と不揮発

性成分とに分けた (Engel, Bahr, and Schieberle 1999)。SAFE 留分は減圧下で約 1 mL まで濃縮した。

3-2-6. ガスクロマトグラフィー質量分析

ガスクロマトグラフィー質量分析 (Gas Chromatography Mass Spectrometry: GC-MS) には DB-WAX UI (60 m × 0.25 mm, 0.25 μm、Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) カラムを備えた 6890N GC、5975 inert mass selective detector を用いた (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)。He キャリアーガスの流速は 1.6 mL/min に設定した。オープン温度は初期温度 50 °C で 2 分間保持させた後、3 °C/min の昇温速度で 220 °C まで上昇させ、220 °C で 45 分間保持するように設定した。注入口温度は 250 °C に設定、注入量は 5 μL とした。また、注入口はスプリットモードに設定した (スプリット比 5:1)。

3-2-7. 重要香気成分 4-vinylguaiacol の定量

1,900 g の YC もしくは YC D90 と、内部標準物質として 100 μg の 3-heptanol および 4-octanol を 5 L ガラスフラスコに加え、更に 1,900 mL の dichloromethane を加えた後、室温で 1 時間攪拌抽出を行った。混合物を遠心分離 (10,000 rpm × 10 分) により分層させ、香気成分を含む有機層を回収した。有機層を乾燥させた後、SAFE 処理により不揮発性成分を除き、減圧下で約 1 mL まで濃縮したものを検体とした。

4-vinylguaiacol の確認には Gerstel 社製 1次元 2次元切替 GC-MS システムを用いた。1st カラムとして DB-WAX LTM カラム (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)、2nd カラムとして DB-5 LTM カラム (10 m × 0.18 mm, 0.18 μm) (いずれも Agilent Technologies) を備えた 7890A GC、5975C inert XL MSD with triple-axis detector を用いた (Agilent Technologies)。1st カラムは初期温度 50 °C で

2 分間保持させた後、3 °C/min で昇温させ、ハートカット部分を -75°C でトラップした。トラップ部分は 20°C/s で 250°C まで昇温し 2nd カラムに導入した。2nd カラムは 50°C から 20°C/min の条件で昇温した。注入口温度 250°C、注入口圧 394kPa、注入口はスプリットレスモードに設定し、注入量は 5 µL とした。また 4-vinylguaiacol の検出には選択イオン検出法 (SIM) を用いた (m/z 150, 135, 107)。算出したピーク面積と濃度既知の標準物質とのピーク面積を比較することにより、定量を行った。

3-2-8. ガスクロマトグラフィー 嗅覚検査

ガスクロマトグラフィー嗅覚検査 (Gas Chromatography Olfactometry: GC-O) 分析は CharmAnalysis™ (modified by DATU, Inc., Geneva, NY, USA) を用いて行った (Acree, Barnard, and Cunningham 1984)。抽出濃縮物を 3 倍ずつ段階希釈した (1:3~1:2187)。各サンプルにつき $n=3$ にて濃縮物および希釈品を GC-O 分析した。カラムには DB-WAX fused-silica capillary column (15 m × 0.32 mm, 0.25 µm film thickness; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用い、He キャリアーガスの流速は 3.2 mL/min に設定した。オーブン温度は初期温度が 40 °C、6 °C/min の昇温速度で 230 °C まで上昇させ、230 °C で 30 min 保持するように設定した。注入口と検出器は 225 °C、注入量は 1 µL、スプリットレスモードで測定した。GC から排出されたガスを加湿空気で誘導し、訓練されたパネリストが香り嗅ぎを行った。

GC-O 希釈分析で得られた各成分の香り特性は Charm value と香調表現にて示された (Acree, Barnard, and Cunningham 1984)。この際、香調は Phenolic、Sweet-caramel、Rancid、Sweet-fruity、Fatty-metallic、Floral-fruity、Coconut、Woody、Potato、Butter、Vinegar、Nutty、Animal、Citrus、Sulfur の中から選択した。

3-2-9. 色差測定

YC、YC D90 をよくかき混ぜた後、約 100 mL のサンプルを遮光容器に移し、NF555 spectrophotometer (Nippon Denshoku Industries, Tokyo, Japan) および ColorMate 5 color management software (Nippon Denshoku Industries, Tokyo, Japan) によって CIE-L*a*b* 色差を測定した。L* は明度を示し、L*=0 は黒を、L*=100 は白を示す。a* と b* は色度を示し、a* は負の数字が大きいほど緑を、正の数字が大きいほど赤を示し、b* は負の数字が大きいほど青を、正の数字が大きいほど黄を示す。算出された YC と YC D90 の L*a*b* を使用し、以下の式から 90 日保存中の色差の変化 ΔE^* を算出した。

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^*_{YC\ D90} - L^*_{YC})^2 + (a^*_{YC\ D90} - a^*_{YC})^2 + (b^*_{YC\ D90} - b^*_{YC})^2} \quad (1)$$

3-2-10. 統計解析

すべての実験を 3 回繰り返して、データは平均値±標準偏差で示した。官能評価、GC-MS、GC-O 分析の結果に対し、Two-tailed Student's *t*-test を用いて有意差検定を行った。有意差は*: P<0.05、**: P<0.01、***: P<0.001 で示した。

3-3. 結果と考察

3-3-1. 官能評価による全体的な香調の評価

パネリストにより、オフフレーバーの評価項目は口に含んでから飲み込む際の中盤から後半にかけて感じられる、ムレ臭 (stuffy)、酵母臭 (yeasty)、カビ臭 (moldy)、獣臭 (animal)、腐敗臭 (rotten)、金属臭 (metallic) であると結論づけた。このようなオフフレーバーはチルドヨーグルトでは報告されていない。Table 3-1 に官能評価の測定結果をまとめた。予想された通り、オフフレーバー

は常温保存の間に有意差を伴って強くなっていることから、LLヨーグルトの風味は劣化していると考えられる。加えて、加熱臭の評価項目についても有意差を伴って強くなっていることから、メイラード反応が進行していることが予想される。一方でヨーグルトライクとミルクライクの評価項目は常温保存によって有意差を伴って弱くなっていることが観察された。ビターの評価項目は有意差がなかった。

3-3-2. 機器分析

本研究では液液抽出 SAFE の手法を香気分析の前処理として実施した。SAFE によるサンプル調製は低揮発性物質の捕捉に有効であり、ヨーグルト全体の香気特徴を捉えるのに適していることが報告されている (Sarhir, Amanpour, and Selli 2019)。また、SAFE は揮発性の高い化合物の抽出を得意とする固相マイクロ抽出 (Solid Phase Microextraction: SPME) などの手法と異なり、GC-MS と GC-O 分析に対して全く同じ標品を使用することができるため、サンプルによる誤差を抑えることができるという利点も有している。

Table 3-2 に GC-MS によって捕捉された 78 物質のピーク面積を示す。Table 3-3 に捕捉された 21 物質の flavor dilution (FD) factor と charm value (CMV) を含む GC-O の結果を示す。さらに、Table 3-3 から香調別の変化を算出した結果を Table 3-4 に示した。CharmAnalysis™ においては、SAFE 抽出物の原液に対して何倍の希釈倍率で香気を捕捉できるかを FD factor で示し、その香気の持続時間を FD factor と掛け合わせて CMV を算出する。香気強度を CMV として数値化することが出来るため、一般的な GC-O 分析と比べてより詳細に香気特徴を確認することができる。これら官能評価や機器分析の測定結果を LL ヨーグルトで報告されている脂肪酸による風味劣化 (Rychlik, Sax, and Schieberle 2006)、チルドヨーグルトの冷蔵保存時の風味変化 (Cheng 2010;

Fernandez-Garcia and McGregor 1994; Ott et al. 1999; Dan et al. 2019; 2017)、UHT牛乳の常温保存時の風味変化 (Sunds et al. 2018; Valero et al. 2001; Mottar et al. 1979; Celestino, Iyer, and Roginski 1997; Kokkinidou and Peterson 2014; Grufferty and Fox 1988; Koka and Weimer 2001) などの研究と比較し、以下に LL ヨーグルトで起こっている風味変化を考察する。

3-3-3. 脂肪酸の生成と分解

LL ヨーグルトは 0.1% (w/w) の脂肪しか含まれていないが、Table 3-2 の通り脂肪酸やエタノール、ラクトンのような脂肪由来と思われる成分が検出された。牛乳やヨーグルトにおける乳脂肪や乳糖、乳タンパク質の分解経路はある程度明らかになっている (蟹沢 2010)。GC-MS 分析の結果、常温保存後に acetic acid は 1.8 倍、propionic acid は 1.9 倍、2-methylpropionic acid は 1.9 倍、butyric acid は 1.1 倍、2-methylbutyric acid は 1.8 倍、hexanoic acid は 1.1 倍、dodecanoic acid は 1.4 倍、phenylacetic acid は 1.5 倍に増加しており、Rychlik et al.による脂肪酸が増加傾向にあったという報告 (Rychlik, Sax, and Schieberle 2006) と一致する。GC-O における結果から、rancid flavor として知られる butyric acid の増加が確認された。Table 3-4 に示した通り、rancid の香調の総 CMV は 25,530 から 31,220 へと 1.2 倍に増加し、全香調の総 CMV における rancid の香調の総 CMV が占める割合は 17% から 40% へと大きく増加した。官能評価において、オフフレーバーの香調の特徴として挙げられた腐敗臭は先に挙げた脂肪酸の臭気特徴と近いと考えられる。これらのことから、Rychlick et al.の発見 (Rychlick, Sax, and Schieberle 2006) と同様に耐熱性リパーゼによって増加した脂肪酸がヨーグルトの全体的な香調に悪影響を与え、オフフレーバーに関与している可能性が高いことが示唆された。Rychlick et al.の全脂肪ヨーグルトだけでなく、本研究における無脂肪ヨーグルトでも耐熱性リパーゼの関与が示唆されたとい

える。耐熱性リパーゼ活性は UHT 牛乳ではある程度抑えられることが分かっているが、140℃で殺菌した場合でさえ、1%の活性が残り、悪影響を起こすことが知られている (Andrewes 2018)。Koka et al.は牛乳にはそもそも耐熱性リパーゼは含まれておらず、牛乳中に存在する *Pseudomonas* 属細菌などに由来するため、耐熱性リパーゼ活性を抑えるためには原料乳の品質管理が重要であることを報告している (Koka and Weimer 2001)。

Delta-lactone や gamma-lactone は脂肪酸から生成する物質であり(蟹沢 2010; Molimard and Spinnler 1996)、本研究において、4-pentanolide、4-butanolide、4-dodecanolide、(Z)-6-dodecen-4-olide の増加が確認された。なかでも、4-pentanolide と 4-butanolide は GC-MS にて有意に増加していることが確認された。これらの結果は LL ヨーグルトの全体の香調に影響を与えていると考えられる。ラクトンのもつ coconut 様の香気は oily 様の香調を強調する可能性があるが、官能評価においてオフフレーバーとして oily に近いと思われる特徴は挙げられておらず、その関与は不明である。本研究で常温保存中に増加が見られた isovaleric acid は rancid 様の臭気に関与することが挙げられている短鎖脂肪酸であり、オフフレーバーに関与している可能性があるが、GC-O における CMV の値が小さいため、影響は小さいと考える。

3 - 3 - 4 . Diacetyl の生成と分解

Acetaldehyde や diacetyl といったヨーグルトライクな香調は乳糖分解によって生成される (蟹沢 2010)。本研究では diacetyl の香気強度が GC-O で 1/3 程度に、ピーク面積が GC-MS で 1/15 程度に減少していることが確認された。これらの結果は官能評価でヨーグルトライクの項目の点数が有意に減少したことを支持している。Diacetyl のリパーゼによる分解経路は既に明らかになっており (蟹沢 2010)、常温保存によって濃度が減少したこととも整合する。一方で、

ヨーグルトを冷蔵保存した際には diacetyl の濃度が減少しないことが報告されており (Ott, Fay, and Chaintreau 1997)、冷蔵保存と常温保存の違いがあるように思われる。Diacetyl の減少度合の違いはリパーゼの活性が冷蔵保存だと減少すること (Andrewes 2018) と、チルドヨーグルトでは乳酸菌が生きており、保存中にも発酵が進むことが関与していると考えられる。Diacetyl の減少によって、ヨーグルトライクな香調が減少し、それによってオフフレーバーのマスキング能力が落ちてしまうことでより強くオフフレーバーを感じられるようになる可能性がある。

Rychlik et al. はヨーグルトライクな香調は常温保存では有意に影響を受けないことを報告しており (Rychlik, Sax, and Schieberle 2006)、本研究での結果と異なる結果となっているが、これはリパーゼの影響を受ける基質 (乳脂肪) の量が大きく異なるためではないかと考える。Rychlik et al. は全脂肪のヨーグルトであるのに対し、本研究はほぼ無脂肪のヨーグルトを使用しており、乳脂肪が豊富にある全脂肪ヨーグルトではリパーゼが優先的に脂肪を分解した可能性がある。さらに原料乳に含まれていたリパーゼの種類の違いが影響した可能性もある。最後に、異なるスターターカルチャーの場合は異なる香気成分を産生することから、異なる結果となる可能性がある点は留意が必要である。いずれにせよ、耐熱性リパーゼが風味に影響を与える可能性が示唆された。それゆえ、リパーゼ活性を抑えることは重要な課題であると考えられる。

3-3-5. メイラード反応による香調変化の評価

メイラード反応は一般的に三段階の反応に分かれる (Aalaei, Rayner, and Sjöholm 2019)。Early stage では主に乳糖と乳タンパク質中の Lys 残基がシッフ体を経由してアマドリ化合物を形成する。Advanced stage では酸度に応じてアマドリ化合物は様々な反応物を形成し、final stage ではメラノイジンと呼ばれ

る褐色の重合体を形成する。

メイラード反応は熱や長期の保存の場合に進行することがよく知られている。本研究では、GC-MS において advanced stage の物質である furfural、furfuryl alcohol、maltol などの物質が有意に増加していることが観察された。これらの物質は乳糖からの生成経路が明らかとなっており（吉田 1999; Walstra et al. 2005）、メイラード反応が進行していることが示唆された。他の advanced stage の物質としては furaneol と sotolon が常温保存後にほぼ完全に分解されていることが GC-O にて観察された。香りの高い furaneol と sotolon は、乳製品を含む食品に甘い香りを与えるために商業的に使用されているが（Schwab 2013; Slaughter 1999）、乳製品中における分解経路は明らかになっていない。Sweet-caramel 香をもつ furaneol と sotolon の分解により、LL ヨーグルトの香調バランスは顕著に変化している。Table 3-4 の通り、sweet-caramel の総 CMV は 93,754 から 470 まで減少しており、全体に占める割合は 60.9%から 0.6%まで減少した。この変化は全ての香調のなかで最も大きな変化であり、前述のように sweet-caramel はヨーグルトに適した香調である。これは常温保存中のメイラード反応の進行が全体的な香調に悪影響を与えることを示唆している。

ヨーグルトの冷蔵保存ではほとんど報告のないメイラード反応は LL ヨーグルトの常温保存中に進行し、そのメカニズムは UHT 牛乳とは異なると推測される。メイラード反応中間体は、発酵プロセス中に生成すると報告されており、例えば furaneol は *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *cremoris* によって発酵中に増加することが報告されている（Hayashida et al. 2001）。また、発酵により発生する acetic acid などの有機酸は pH の低下を引き起こすが、pH はメイラード反応に影響を与える一因である。メイラード反応によって形成された early stage のアマドリ生成物は、低 pH で 1,2-enolization を受け furfural に変化する（Boekel 1998）。さらに、メイラード反応開始時のアミノ酸の量は、反応速度に影響を

与えることが分かっており、Gly または L-Ala のいずれかを増加させるとメイラード反応生成物が増加することが報告されている (Blank et al. 1997)。ヨーグルトは、一部のタンパク質が発酵中に乳酸菌によって分解されているため、アミノ酸濃度が元の牛乳よりも高くなっている (Beshkova et al. 1998)。また、二次殺菌がタンパク質の分解に寄与するため、LLヨーグルトの初期アミノ酸濃度は牛乳よりも高いと予想される。これらのことから、LLヨーグルトの常温保存中のメイラード反応の進行は UHT 牛乳のものとは異なる可能性が高い。

官能評価の結果としては、代表的なメイラード香である加熱臭が有意差を伴って増加したが、GC-O ではその様子は観察されなかった。Table 3-5 は LL ヨーグルトの色差結果を示す。YC と比較すると YC D90 は暗く (L^* 値が小さい)、赤色が強く (a^* 値は正にシフト)、黄色が強く (正の b^* 値が増加) 変化しており、褐変化が観察された。 ΔE^* 値は 0.83 であり、識別色差を超え目視で容易に変化が確認された。この結果はメイラード反応の進行を裏づけているが、一方でメイラード反応の最終生成物であるメラノイジンは、機器分析では測定が困難な物質である。GC-O の結果は、メイラード反応生成物によるフレーバーの寄与が弱いことを示しているようにもみえるが、GC-MS で示されているように、furfural、furfuryl alcohol、maltol の濃度が大幅に増加し、色差評価で褐変化が確認されたことから、LLヨーグルトは 90 日間の常温保存で final stage まで進行しつつあることが示唆されたと考える。

メイラード反応を抑制する方法はさまざまな食品で研究されてきた (Rannou et al. 2016)。これらには、フェノール化合物の添加 (Kokkinidou and Peterson 2014) および高窒素条件下での保存 (Guerra-Hernández et al. 2002) が含まれる。保存温度を下げることは最も効果的と考えられているが、常温保存の利点を打ち消してしまう。LLヨーグルト製造におけるメイラード反応を最小限に抑える

ことで、furaneol や sotolon などの好ましい風味が残り、オフフレーバーを抑えることができる考える。

3-3-6. 4-Vinylguaiacol の生成経路

Table 3-3 に示すように、4-vinylguaiacol の CMV は 3,500 から 14,000 に増加し、測定された物質の中で最大の増加率を示した。また、4-vinylguaiacol については、LL ヨーグルト 100 g からの通常濃度濃縮の SAFE 抽出サンプルでは GC-MS で検出ができなかったため、濃縮度を 20 倍に高めて SAFE 抽出を行い、定量を実施した。結果として、YC は 0.3 ng/L、YC D90 は 2.9 ng/L と約 10 倍に濃度が増加していた。

4-vinylguaiacol は、spicy、musty、stale odors 香をもつと報告されており (Perez-Cacho et al. 2007)、官能評価にて報告されたムレ臭またはカビ臭に近い臭気である可能性がある。しかしながら、4-vinylguaiacol は UHT 牛乳とヨーグルトでは報告例がない。知る限りでは、乳製品ではゴーダチーズでのみ検出されている (Jo et al. 2018)。

以下の理由により、4-vinylguaiacol は ferulic acid から合成されていると考える。前提条件として、ferulic acid は発酵製品である山羊乳チーズ (Hilario et al. 2010) から検出されているため、ヨーグルトにも含まれている可能性があると考えている。ferulic acid から 4-vinylguaiacol が生成される一つ目の仮説として、発酵による可能性が考えられる。*Bacillus coagulans* (Karmakar et al. 2000) と *L. lactis* (古川, 平山, and 森永 2014) の発酵によって ferulic acid から 4-vinylguaiacol への変換が引き起こされることが報告されており、本研究で使用した同じ乳酸菌である *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* および *S. thermophilus* でも近い反応が生じている可能性がある。また、LL ヨーグルトに特有の二次殺菌に起因する可能性も考えられる。ビール酵母を使用した過去研究では、発酵

中に ferulic acid の含有量が増加し、その後の煮沸プロセスで ferulic acid から 4-vinylguaiacol が形成された (Coghe et al. 2004)。これは、発酵後の加熱プロセスを含む LL ヨーグルトの製造プロセスとの類似点を示している。最後に、常温保存の影響もあり得る。4-vinylguaiacol はオレンジジュースの常温保存後に検出される代表的なオフフレーバーであり、よく研究されている (Perez-Cacho and Rouseff 2008)。オレンジジュースでも冷蔵保存の場合は問題とならず、常温保存の際に問題視されることが報告されている (Perez-Cacho and Rouseff 2008)。LL ヨーグルトと同様にと酸性条件での常温保存という類似点があり、4-vinylguaiacol の生成に関与している可能性がある。ただし、LL ヨーグルトにおける 4-vinylguaiacol 形成の詳細なメカニズムを解明するには、さらに調査が必要である。

3 - 3 - 7 . 4-Vinylguaiacol のオフフレーバーへの影響の確認

先に述べた通り、YC と YC D90 では 4-vinylguaiacol について 0.3 ng/L から 2.9 ng/L へと 2.6 ng/L の濃度増加が見られたため、4-vinylguaiacol 濃度が 2.9 ng/L となるように 2.6 ng/L を付加した YC+を調製し、YC、YC+において官能評価を実施した。結果としては Table 3-6 に示す通り、オフフレーバーの評価項目について YC+は YC に対して有意に増加しており、4-vinylguaiacol がオフフレーバーに関与していることが明らかとなった。

3 - 4 . 結論

LL ヨーグルトを 25℃で 90 日間保存し、官能評価、GC-MS、および GC-O によって風味の変化を確認したところ、複数の要因によってオフフレーバーが強く感じられることが分かった。これらの複数の要因を Fig. 3-1 に、そのなかでも代表的な物質について Fig. 3-2 にまとめた。第 1 に、脂肪分解による脂肪酸

の生成により rancid 臭が増加した。第 2 に、diacetyl のようなヨーグルト様の物質の減少が見られ、オフフレーバーのマスキング能力が低下し、結果的にオフフレーバーが強く感じられるようになった可能性がある。第 3 に、メイラード反応が進行し、furanol や sotolon といった良質な香気の物質がほぼ完全に分解されていることが明らかとなり、オフフレーバーのマスキング能力が低下し、結果的にオフフレーバーが強く感じられるようになった可能性がある。本研究は furaneol と sotolon の分解と LL ヨーグルトの風味への関与に焦点を当てた最初の研究である。第 4 に、本研究においてヨーグルトで初めて検出された 4-vinylguaiacol が常温 90 日保存の間に約 10 倍に増加することがわかり、その香調、CMV の大きさ、および CMV 増加率により、オフフレーバーに寄与すると推測された。常温 90 日保存の間に増加する 4-vinylguaiacol 相当分を YC に添加して官能評価を実施したところ、有意にオフフレーバーの評価点が増加することが分かった。以上のことから、本研究では常温保存における LL ヨーグルトの風味変化を多方面から捉えることができたと考えている。これらの多くの特徴的な反応は、UHT 牛乳やチルドヨーグルトとは異なる結果を示しており、さらなる研究が必要である。

全脂肪ヨーグルトでは脂肪酸に着目した研究しかなく、本研究において脂肪酸以外の成分もオフフレーバーの一因となる可能性が示されたため、全脂肪ヨーグルトにおいても調査を進める必要がある。本研究では SAFE の手法で調査を実施したが、diacetyl 以外の発酵臭関与成分については SPME のような手法によってさらに調査を行う必要がある。さらに、ヨーグルトの消費者はその生理機能を期待して摂取しているため、LL ヨーグルトが生理機能に悪影響を与えないのか確認する必要がある。たとえば、メイラード反応生成物のうち、Advanced Glycation End Products (AGEs) が健康に悪影響を及ぼすことが

示唆されている (Rannou et al. 2016)。二次殺菌工程が LL ヨーグルトの生理機能性へ与える影響については次章で検討する。

Table 3-1. Sensory evaluation of long-life yogurt samples

Flavor attributes	Rating		Significant difference
	YC	YC D90	
Yogurt-like	2.9 ± 0.6	2.2 ± 0.5	**
Milk-like	3.6 ± 0.8	3.0 ± 0.6	**
Cooked	3.1 ± 0.6	4.7 ± 0.6	***
Off-flavor	1.7 ± 1.1	4.4 ± 0.9	***
Bitter	3.0 ± 0.7	3.0 ± 0.8	

^aFlavor attributes were rated on a nine-point scale by 11 trained panelists (1 = weakest, 9 = strongest). Ratings are expressed as mean ± standard deviation.

^bYC, freshly prepared long-life yogurt.

^cYC D90, long-life yogurt after 90-day storage at 25 °C in a light-shielded environment.

^dTwo-tailed Student's *t*-test was performed. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

Table 3-2. GC-MS analysis of long-life yogurt samples

No	Compound name		R ^{1a}	Peak Area / internal standard Peak Area × 1000 ^b		Factor increase after ambient storage ^e (YC D90/YC)	Significant difference ^f
	IUPAC nomenclature	Common name		YC ^c	YC D90 ^d		
	ketone						
1	2-pentanone		977	3.65 ± 0.41	4.07 ± 0.53	1.1	
2	2,3-butane dione	diacetyl	978	47.00 ± 7.40	3.17 ± 0.26	0.1	***
3	2,3-pentanedione		1055	5.27 ± 0.38	3.19 ± 0.30	0.6	**
4	3-penten-2-one		1125	0.49 ± 0.02	0.89 ± 0.09	1.8	**
5	2-heptanone		1181	2.56 ± 0.14	1.44 ± 0.17	0.6	***
6	3-hydroxy-2-butanone	acetoin	1287	4247.75 ± 131.40	4351.47 ± 112.34	1.0	
7	2,5-dimethyl-1,3-dioxolan-4-one		1323	5.32 ± 0.66	4.46 ± 0.64	0.8	
8	2-hydroxy-3-pentanone		1355	138.26 ± 1.75	144.54 ± 1.03	1.0	**
9	2-nonanone		1387	2.16 ± 0.03	1.50 ± 0.05	0.7	***
10	4-hydroxy-3-hexanone		1408	2.22 ± 0.06	2.34 ± 0.19	1.1	
11	1-(2-furanyl)-ethanone	2-acetyl furan	1499	0.80 ± 0.03	9.22 ± 0.07	11.5	***
12	2-methyltetrahydrothiophen-3-one		1524	10.10 ± 0.30	5.05 ± 1.96	0.5	**
13	3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexene-1-one	isophorone	1593	22.57 ± 3.90	23.07 ± 2.52	1.0	
14	2-undecanone		1595	3.14 ± 0.26	2.81 ± 0.17	0.9	
15	2(5H)-furanone		1747	10.32 ± 0.65	30.51 ± 1.21	3.0	***
16	2-tridecanone		1806	4.85 ± 0.24	4.93 ± 0.57	1.0	
17	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one^g	maltol	1962	62.84 ± 2.16	89.87 ± 7.19	1.4	**
18	3-hydroxy-2H-pyran-2-one		1990	15.60 ± 0.34	8.25 ± 0.65	0.5	***
19	2-pentadecanone		2018	8.75 ± 0.71	9.82 ± 2.36	1.1	
20	3-hydroxy-4,4-dimethylhydro-2(3H)-furanone		2024	12.37 ± 0.46	132.50 ± 10.19	10.7	***
21	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone^g	furaneol	2029	8.88 ± 1.19	not detected	-	-
22	4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone		2114	29.11 ± 4.09	not detected	-	-
23	3-hydroxy-4-phenylbutan-2-one		2259	11.98 ± 0.60	13.24 ± 1.29	1.1	
	aldehyde						
24	2-methylpentanal		1001	3.28 ± 0.24	1.59 ± 0.16	0.5	***
25	hexanal		1083	1.87 ± 0.03	2.19 ± 0.24	1.2	
26	heptanal		1183	0.93 ± 0.12	1.02 ± 0.06	1.1	
27	3-methyl-2-butenal		1197	1.75 ± 0.24	1.68 ± 0.12	1.0	
28	nonanal		1391	2.78 ± 0.35	2.69 ± 1.22	1.0	
29	3-(methylthio)propanal ^g	methional	1448	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.09	0.9	
30	2-furancarboxaldehyde	furfural	1456	3.30 ± 0.17	61.39 ± 0.37	18.6	***
31	decanal		1495	3.05 ± 0.80	2.56 ± 0.09	0.8	
32	benzaldehyde		1517	5.59 ± 0.54	22.34 ± 0.85	4.0	***
33	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	5-methyl-2-furfural	1554	0.55 ± 0.02	4.04 ± 0.14	7.4	***
34	dodecanal		1706	4.77 ± 1.91	3.91 ± 0.02	0.8	
35	12-methyltridecanal		1859	3.67 ± 1.26	32.44 ± 4.30	8.8	***
36	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde ^g	vanillin	2555	2.39 ± 0.55	2.57 ± 0.40	1.1	
	alcohol						
37	2-methyl-3-buten-2-ol		1039	1.39 ± 0.38	4.19 ± 0.39	3.0	***
38	1-butanol		1143	0.62 ± 0.15	3.14 ± 0.06	5.1	***
39	3-methyl-2-buten-1-ol		1319	4.79 ± 0.36	3.83 ± 0.17	0.8	**
40	1-Hexanol		1351	1.82 ± 0.03	1.70 ± 0.03	0.9	**
41	2-ethylhexanol		1487	18.11 ± 0.34	17.64 ± 0.85	1.0	
42	3,7-dimethyl-1,6-octadiene-3-ol	linalool	1543	0.84 ± 0.04	1.82 ± 0.11	2.2	***
43	1-octanol		1555	1.27 ± 0.06	1.62 ± 0.09	1.3	**
44	2-furanmethanol	furfuryl alcohol	1653	5.79 ± 0.50	13.92 ± 2.56	2.4	**
45	1-nonanol		1658	3.53 ± 0.26	3.57 ± 0.47	1.0	
46	phenethyl alcohol ^g		1907	1.52 ± 0.03	2.26 ± 0.22	1.5	**

Table 3-2 (continued)

No	Compound name		RI ^a	Peak Area / internal standard Peak Area × 1000 ^b		Factor increase after ambient storage ^e (YC D90/YC)	Significant difference ^f
	IUPAC nomenclature	Common name		YC ^c	YC D90 ^d		
	acid						
47	acetic acid		1445	163.85 ± 29.42	303.08 ± 45.76	1.8	**
48	formic acid		1484	3.70 ± 1.14	2.28 ± 0.26	0.6	
49	propionic acid		1536	5.49 ± 0.70	10.40 ± 0.62	1.9	***
50	2-methylpropionic acid		1566	5.82 ± 0.12	11.31 ± 0.60	1.9	***
51	butyric acid		1621	901.77 ± 11.18	988.77 ± 42.30	1.1	**
52	3-methylbutyric acid	isovaleric acid	1668	9.85 ± 0.40	11.78 ± 0.32	1.2	**
53	2-methylbutyric acid		1670	11.19 ± 0.27	20.67 ± 0.76	1.8	***
54	valeric acid		1736	20.94 ± 0.66	22.59 ± 0.63	1.1	**
55	hexanoic acid		1840	2043.23 ± 50.02	2162.66 ± 129.38	1.1	
56	heptanoic acid		1951	68.08 ± 1.62	61.44 ± 3.53	0.9	**
57	octanoic acid		2055	2328.49 ± 113.29	2217.78 ± 188.02	1.0	
58	cyclohexylcarboxylic acid		2088	8.74 ± 1.07	10.94 ± 0.92	1.3	
59	nonanoic acid		2160	78.69 ± 6.52	73.10 ± 9.04	0.9	
60	decanoic acid		2265	1485.32 ± 19.78	1409.80 ± 222.20	0.9	
61	9-decenoic acid		2326	688.59 ± 15.49	608.86 ± 109.56	0.9	
62	undecanoic acid		2369	29.91 ± 3.91	37.67 ± 8.60	1.3	
63	benzoic acid		2425	1390.84 ± 84.08	1460.25 ± 157.27	1.0	
64	lauric acid		2475	683.72 ± 99.42	730.35 ± 179.13	1.1	
65	dodecenoic acid		2521	27.35 ± 4.93	37.53 ± 9.14	1.4	
66	phenylacetic acid ^h		2554	32.93 ± 1.83	50.31 ± 6.18	1.5	**
67	3-phenylpropionic acid ^g		2618	16.26 ± 1.13	15.07 ± 2.87	0.9	
	lactone						
68	4-pentanolide	gamma-valerolactone	1604	1.26 ± 0.03	4.76 ± 0.13	3.8	***
69	4-butanolide	gamma-butyrolactone	1608	2.28 ± 0.13	5.04 ± 0.28	2.2	***
70	5-decanolide ^g	delta-decalactone	2200	7.54 ± 0.47	4.93 ± 0.87	0.7	**
71	4-dodecanolide^g	gamma-dodecalactone	2370	9.45 ± 1.43	13.50 ± 3.54	1.4	
72	(Z)-6-dodecen-4-olide^g	cis-6-dodecen-4-olide	2376	4.80 ± 0.27	6.27 ± 1.35	1.3	
73	5-dodecanolide ^g		2428	8.12 ± 1.72	6.54 ± 1.72	0.8	
	others						
74	1-methyl-4-propan-2-yl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane	1,4-cineole	1180	1.80 ± 0.15	0.71 ± 0.11	0.4	***
75	ethyl 2-hydroxyisobutyrate		1240	6.52 ± 0.26	2.16 ± 0.17	0.3	***
76	UK1340		1340	236.70 ± 5.65	256.89 ± 2.36	1.1	
77	1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)benzene	dehydro-p-cymene	1432	0.73 ± 0.03	0.70 ± 0.16	1.0	
78	methanesulfonylmethane	dimethyl sulfone	1893	734.29 ± 14.35	947.40 ± 58.58	1.3	**

^aLinear Retention Indices on DB-wax column (60 m×0.25 mm×0.25mm) as a homologous series of n-alkanes (C7–C32).

^bData are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3)

^cYC, freshly prepared long-life yogurt.

^dYC D90, long-life yogurt after 90-day storage at 25 °C in a light-shielded environment.

^eCalculated by dividing the average peak area of YC D90 by the average peak area of YC.

^fTwo-tailed Student's *t*-test was performed. *: *p* < 0.05, **: *p* < 0.01, ***: *p* < 0.001

^gCompounds measured in the Selected Ion Monitoring (SIM) mode.

Table 3-3. GC-O analysis of long-life yogurt samples

No	Compound name		RI ^c	Aroma descriptions	YC ^a			YC D90 ^b		Factor increase after ambient storage ^f (YC D90/YC)	Significant difference ^g
	IUPAC nomenclature	Common name			FD-factor ^d	Mean CMV ^e	FD-factor	Mean CMV ^e			
1	2,3-butane dione	diacetyl	1039	Butter	9	150 ± 34	3	54 ± 30	0.36	*	
2	3-(methylthio)propanal	methional	1431	Potato	9	200 ± 83	27	180 ± 45	0.90		
3	acetic acid		1435	Vinegar	9	77 ± 12	3	130 ± 50	1.69		
4	butyric acid		1609	Rancid	729	20,000 ± 1784	729	26,000 ± 3213	1.30		
5	3-methylbutyric acid	isovaleric acid	1656	Rancid	9	300 ± 78	9	320 ± 131	1.07		
6	hexanoic acid		1828	Rancid	243	4,300 ± 266	27	4,300 ± 1347	1.00		
7	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	maltol	1937	Sweet-caramel	1	74 ± 24	3	140 ± 24	1.89	*	
8	<i>trans</i> -4,5-epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	4,5-epoxy-2-decenal	1976	Fatty-metallic	9	280 ± 36	1	56 ± 24	0.20	**	
9	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	furanol	2010	Sweet-caramel	81	680 ± 68		not detected	-		
10	4-methyl-3-hexenoic acid		2028	Rancid	27	410 ± 147	3	150 ± 55	0.37		
11	octanoic acid		2040	Rancid	27	520 ± 166	9	450 ± 142	0.87		
12	2-hydroxy toluene	p-cresol	2063	Phenolic	81	1,200 ± 185	9	670 ± 69	0.56	*	
13	ethyl 3-phenyl-2-propenoate	ethyl cinnamate	2099	Sweet-fruity	243	4,600 ± 1344	81	2,800 ± 137	0.61		
14	4-ethenyl-2-methoxyphenol	4-vinyl guaiacol	2162	Phenolic	243	3,500 ± 781	729	14,000 ± 659	4.00	**	
15	3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone	sotolon	2175	Sweet-caramel	2187	93,000 ± 3750	3	330 ± 24	0.00	***	
16	decanoic acid		2259	Fatty-metallic	81	5,400 ± 466	81	4,800 ± 682	0.89		
17	4-dodecanolide	gamma-dodecalactone	2339	Coconut	9	560 ± 80	9	610 ± 169	1.09		
18	(Z)-6-dodecen-4-olide	cis-6-dodecen-4-olide	2359	Coconut	81	2,300 ± 386	81	2,900 ± 139	1.26		
19	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	vanillin	2523	Sweet-fruity	729	9,400 ± 1295	243	9,700 ± 1588	1.03		
20	phenylacetic acid		2530	Floral-fruity	81	5,100 ± 1435	243	8,100 ± 1497	1.59		
21	3-phenylpropionic acid		2592	Woody	27	1,900 ± 517	27	1,500 ± 324	0.79		

^aYC, freshly prepared long-life yogurt.^bYC D90, long-life yogurt after 90-day storage at 25 °C in a light-shielded environment.^cLinear Retention Indices on DB-wax column (60 m×0.25 mm×0.25mm) as a homologous series of n-alkanes (C7–C32).^dFlavor dilution (FD) factor corresponding to the dilution factor of the highest diluted sample in which the odor was detectable.^eCharm Value (CMV), index of odor intensity calculated by time length of detection and dilution factor. Data are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3).^fCalculated by dividing the average peak area of YC D90 by the average peak area of YC.^gTwo-tailed Student's *t*-test was performed. *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

Table 3-4. Composition ratio of each aroma description detected in long-life yogurt samples based on Charm Value

Aroma descriptions	YC ^b		YC D90 ^c	
	CMV	Composition ratio (%) ^d	CMV	Composition ratio (%) ^d
Butter	150	0.10	54	0.07
Potato	200	0.13	180	0.23
Vinegar	77	0.05	130	0.17
Rancid	25,530	16.58	31,220	40.45
Sweet-caramel	93,754	60.90	470	0.61
Fatty-metallic	5,680	3.69	4,856	6.29
Phenolic	4,700	3.05	14,670	19.01
Sweet-fruity	14,000	9.09	12,500	16.19
Froral-fruity	5100	3.31	8,100	10.49
Coconut	2,860	1.86	3,510	4.55
Woody	1900	1.23	1,500	1.94
Total	153,951	100.00	77,190	100.00

^aCharm Value (CMV) is index of odor intensity calculated by time length of detection and dilution factor.

^bYC, freshly prepared long-life yogurt.

^cYC D90, long-life yogurt after 90-day storage at 25 °C in a light-shielded environment.

^dRatio of CMV of each aroma descriptor to total CMV.

Table 3-5. Color evaluation of long-life yogurt samples

	L ^{*c}	a ^{*d}	b ^{*e}	ΔE ^{*f}
YC ^a	80.90 ± 0.16	-1.96 ± 0.15	2.54 ± 0.47	
YC D90 ^b	80.78 ± 0.18	-1.38 ± 0.12	2.85 ± 0.23	0.83 ± 0.09

^aYC, freshly prepared long-life yogurt.

^bYC D90, long-life yogurt after 90-day storage at 25 °C in a light-shielded environment.

^cL* represents the color brightness, where L* = 0 (black) and L* = 100 (white).

^da* represents the ratio of green (negative) to red (positive).

^eb* represents the ratio of blue (negative) to yellow (positive).

^fE* is calculated from Equation (1) in the text.

All data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

Table 3-6. Sensory evaluation of long-life yogurt samples

Flavor attributes	Rating ^a		Significant difference ^d
	YC ^b	YC+ ^c	
Yogurt-like	3.0 ± 0.9	2.8 ± 1.0	
Milk-like	3.5 ± 0.8	3.2 ± 0.7	
Cooked	2.9 ± 1.0	3.1 ± 0.9	
Off-flavor	2.1 ± 1.3	3.1 ± 1.2	**

^aFlavor attributes were rated on a nine-point scale by 11 trained panelists (1 = weakest, 9 = strongest). Ratings are expressed as mean ± standard deviation.

^bYC, freshly prepared long-life yogurt.

^cYC+, 2.6 ng/L 4-vinylguaiacol was added YC.

^dTwo-tailed student's *t*-test was performed. **: $p < 0.01$

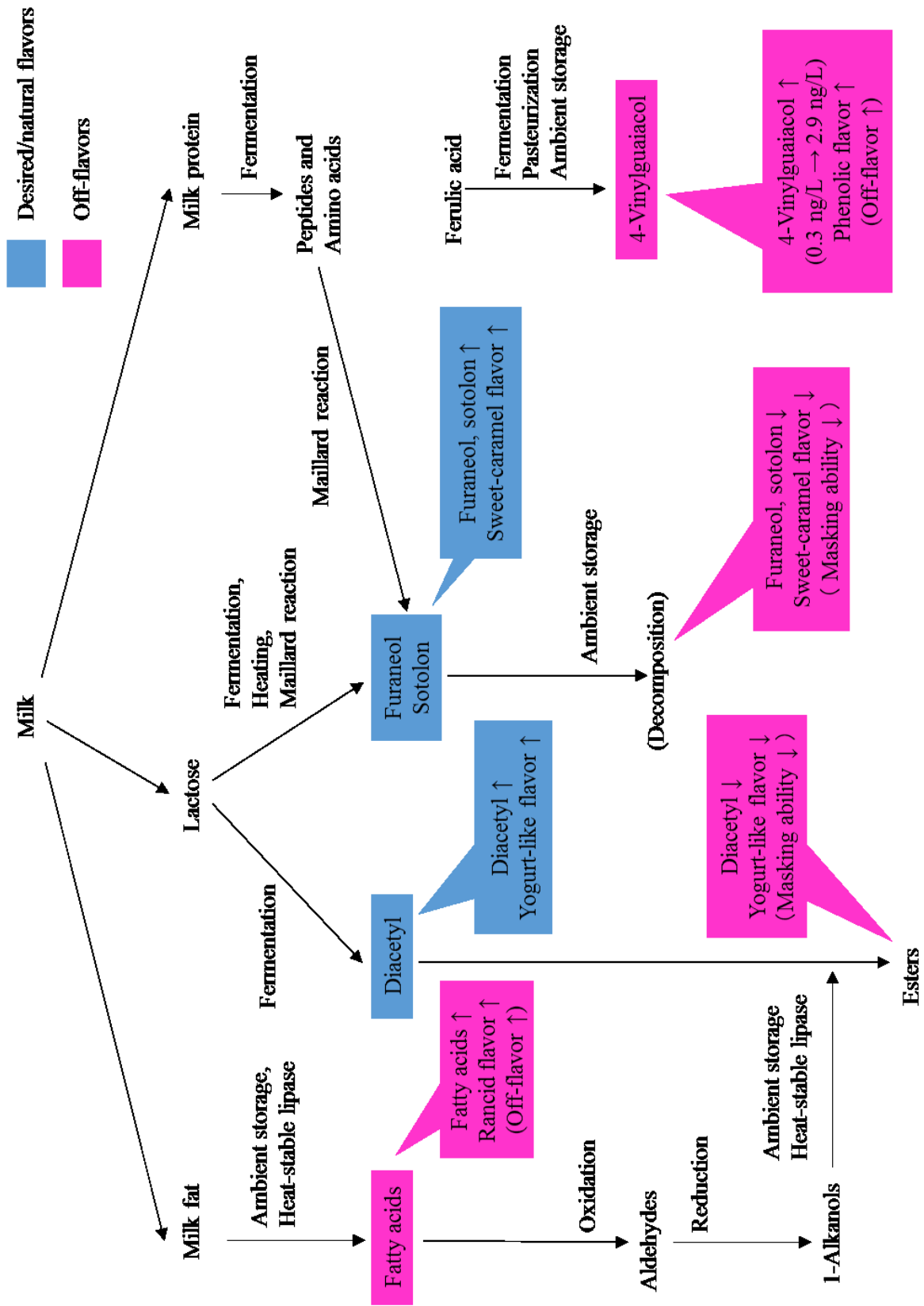


Fig. 3-1. Proposed off-flavors generation pathways during ambient storage of long-life yogurt

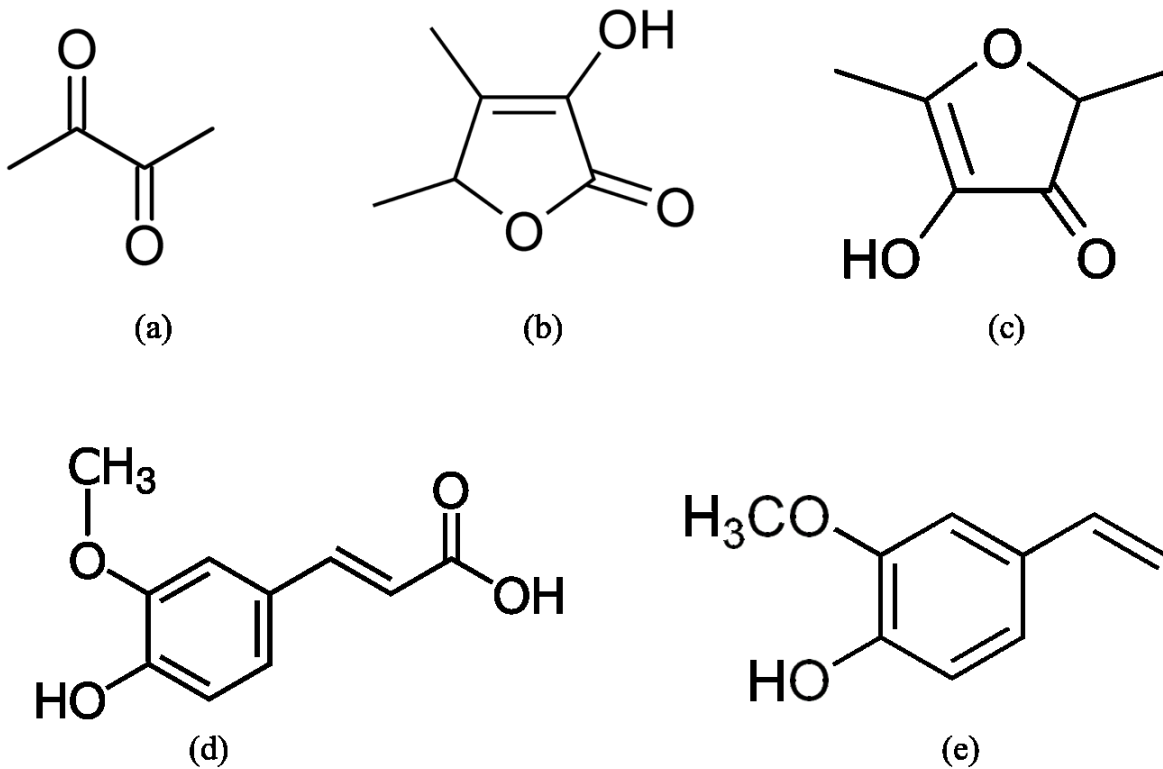


Fig. 3-2. Typical substances that appear to be involved in off-flavors
 (a) Diacetyl, (b) Sotolon, (c) Furaneol, (d) Ferulic acid, (e) 4-Vinylguaiacol.

第4章 キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析を用いたロングライフヨーグルトの生理機能の推測

4-1. 序

プロバイオティクスの生理効果には、整腸、胃腸障害の緩和、免疫調節、抗アレルギー、感染症予防、過敏性腸症候群の改善など、様々な作用とその作用機序が報告されている (Wong, Odamaki, and Xiao 2019; Ducrotté, Sawant, and Jayanthi 2012)。最も一般的なプロバイオティクス食品の一つであるヨーグルトについても生理機能の研究が進んでおり、関与物質として発酵過程にて生成される様々な代謝産物が挙げられている。乳酸や有機酸による有害菌抑制効果 (Shin, Suzuki, and Morishita 2002) やビタミンによる栄養補助 (菅原 2017)、GABA による血圧降下 (梶本ら 2004) などが報告されている。また、乳酸菌によるタンパク質分解酵素によってタンパク質の一部が分解されており、*L. helveticus* によって生成する Val-Pro-Pro (VPP) や Ile-Pro-Pro (IPP) のトリペプチドは血圧降下作用 (Nakamura et al. 1995) を示すことが判明している。

特にアジアで大きな市場を形成している LL ヨーグルトの特徴は保存温度に依らず長期間保存可能という点の他に、乳酸菌やビフィズス菌は食品安全性の極めて高い微生物ではあるが、極端に免疫力の落ちたハイリスク集団などに対しては安全とはいえないとの報告 (Deshpande, Athalye-Jape, and Patole 2018) もあり、生菌を含まない LL ヨーグルトは誰でも安心して摂食できるという利点がある。さらに、研究例は少ないながらも、整腸作用や乳糖不耐症の軽減効果など、生菌ヨーグルトで報告されているような優れた生理機能を有していることも報告されている (Liu et al. 2015; Savaiano et al. 1984; Ouwehand and Salminen 1998)。近年、生きている微生物を対象とするプロバイオティクスだけでなく、殺菌菌体を対象とするパラプロバイオティクス (Deshpande, Athalye-

Jape, and Patole 2018; Adams 2010)、さらに代謝産物も含むポストバイオティクス (Tsilingiri et al. 2012; Aguilar-Toalá et al. 2018) など、生理機能は必ずしも生菌だけがもたらすものでないという考えも広がっており、LLヨーグルトにおける生理機能の研究も同様に進める必要があると考えている。二次殺菌の工程で、機能性に関与していると考えられる成分が受ける影響は未だに報告されておらず、生理機能の作用機序を解明するためにも詳細な解析が必要である。

近年、代謝産物のような微量成分を分析する新しい手法が次々に開発され、詳細な解析が可能になってきた。ヨーグルトにおいても、GC-MS やプロトン核磁気共鳴 (Proton Nuclear Magnetic Resonance: ^1H NMR) (Settachaimongkon et al. 2015)、四重極飛行時間型超高速液体クロマトグラフィー (Ultra Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight: UPLC-Q-TOF) (Pan et al. 2018)、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) (Pastink et al. 2009)、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析 (Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry: CE-TOFMS) (Hagi, Kobayashi, and Nomura 2016) など、様々な方法で代謝産物解析がなされている。その中でも、CE-TOFMS は極めて高い分解能、高いスループット、同時に全ての荷電低分子化合物を測定できるという利点があり、代謝解析に最適であると考えられているものの (Matsumoto et al. 2012)、これまでの研究は GABA に関わる物質など (Hagi, Kobayashi, and Nomura 2016)、特徴的な部分のみに着目したものに限られており、ヨーグルトにおいて微量成分全体を確認した前例はまだない。そこで、本研究では生菌ヨーグルトと LLヨーグルトを CE-TOFMS で分析し、測定された全物質を比較することとした。二次殺菌による代謝産物を含む微量成分の変化を網羅的に測定することにより、生理機能関与物質への影響が推測できるものと考えられる。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 発酵乳試料の調製

3-2-1と同様の方法で発酵乳試料の調製を実施した。

4-2-2. ペクチン溶液の調製

3-2-2と同様の方法でペクチン溶液の調製を実施した。

4-2-3. ロングライフヨーグルトの製造方法

LLヨーグルトは、発酵乳試料とペクチン溶液を重量比 7:3 で混合し、ホモミキサー中で攪拌して、LLヨーグルトの無脂乳固形分が 9.5% (w/w)、ペクチン濃度が 0.3% (w/w) になるように調製した。混合物の pH を 25℃で 4.15 になるように殺菌済みの 10% (w/w) クエン酸 (Fuso chemical, Osaka, Japan) 溶液で調整した。続いて以下の処理を行った。

a. 二次殺菌未実施

混合後ヨーグルトを均質機 (SPX, Charlotte, NC, USA) にて 15 MPa で均質処理し、このサンプルを Y-0 とした。サンプルは無菌条件下で速やかに 1 mL 用の遠心チューブに移し、CE-TOFMS の前処理に供した。

b. 二次殺菌実施

混合後ヨーグルトを、プレート式熱交換器を含む殺菌装置 (Seika, Tokyo, Japan) にて 80℃ (Y-80)、90℃ (Y-90)、100℃ (Y-100)、110℃ (Y-110) の条件で二次殺菌を実施した。殺菌保持時間は全て 30 秒とした。なお、日本において法令で規定されている LLヨーグルトの二次殺菌条件の下限は 75℃ 900 秒であり、F 値 (Z=10℃時) 換算すると 89.8℃ 30 秒に相当する。二次殺菌後、45℃まで冷却した後、均質機 (SPX) にて 15 MPa で均質処理した。全てのサンプルは均質後、25℃まで冷却し、LLヨーグルトを得た。サンプルは無菌条件下で速やかに

1 mL 容の遠心チューブに移し、CE-TOFMS の前処理に供した。また、Y-90 は 2 本の 1 L 容のシリコンインナーシールを備えたガラス瓶（Sibata Scientific Technology, Saitama, Japan）に 1 L ずつ分注した。1 本のボトルを初検検査用とし、サンプル調製後すぐに SAFE 処理に供した。次のボトルを遮光条件下で 25℃、90 日間保存し、保存期間経過後すぐに比較品（YD90）として、SAFE 処理に供した。

4-2-4. キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析

サンプルの調製、CE-TOFMS での測定およびデータ処理は Matsumoto らの手法（Matsumoto et al. 2012）に従い、得られたピーク面積値から相対面積値を算出した。

4-2-5. メイラード反応生成物質の定量

3-2-5 と同様に Y-90、YD90 のサンプルを SAFE にて調製し、3-2-6 と同様の方法で GC-MS を実施し、Y-90 および YD90 中に含まれる furfural、furfuryl alcohol、2-acetylfuran、5-methyl-2-furfural について、算出したピーク面積と濃度既知の標準物質とのピーク面積を比較することにより、定量を行った。

4-2-6. 統計処理

各物質の相対面積値を全て使用して主成分分析を実施し、主成分第 1（PC1）、第 2（PC2）の寄与率、各物質の因子負荷量を算出した。また、Y-0 の各物質の相対面積値に対して一元配置分散分析を実施した後、Dunnnett 法を用いて有意差検定を実施した。P<0.05 の場合に有意差有りと判断し、

*: P<0.05、 **: P<0.01、 ***: P<0.001 で表した。全ての統計処理には IBM-SPSS statistics version 25 (IBM, Armonk, NY, USA) を使用した。

4 - 3 . 結果

4 - 3 - 1 . CE-TOFMS による代謝産物を含む微量成分の検出

CE-TOFMS により検出された物質名および相対面積値を Table 4-1 に示す。合計 221 物質が計測されており、代謝産物解析の評価が可能であると考えられる。GC-MS や ¹H NMR、UPLC-Q-TOF、HPLC などの他の手法では数十種類程度の検出が限界であるが、CE-TOFMS は極性の高低や水溶性の高低に依らず、低分子量の物質であれば幅広く捉えることができ、その特徴が活かされた捕捉成分数であると考えられる。現在の技術では、CE-TOFMS において、理論分子式からペプチドサーチを実施することで最大でテトラペプチドまでを測定することが可能であるが、本研究はそこまでの実施には至っておらず、アミノ酸の検出までに留まっている点は今後の検討課題である。ヨーグルトにおいて、CE-TOFMS によって検出された成分を全て開示し、比較したのは本研究が初めてである。

4 - 3 - 2 . 主成分分析

Table 4-1 の通り計測された 221 の物質全体に与える影響を確認するため、全ての物質の相対面積値を使用して主成分分析を実施した (Fig. 4-1)。主成分分析を実施することにより、221 の変数からなる測定データ全体を PC1、PC2 の 2 変数に要約した。Fig. 4-1 の通り、PC1 の寄与率は 29%と CE-TOFMS を用いた日本酒の研究 (Takahashi and Kohno 2016) と比較して近い数値であり、代謝産物解析としては十分な水準であると考えられる。また、プロット位置も各殺菌温度でグルーピングできており、再現性の高い結果が得られたと考えて

いる。なお、PC2については寄与率が9%と低いことから、本研究では二次殺菌による影響はPC1に絞って調査を実施した。

4-3-3. 二次殺菌による影響を受ける物質の選定

主成分分析 (Fig. 4-1) の PC1 を確認すると、Y-0、Y-80、Y-90、Y-100、Y-110 が順番にプロットされており、PC1 は二次殺菌温度に相関する変化を意味している。すなわち、二次殺菌工程が代謝産物に少なからず影響することを意味していると考えられる。特に影響を受けやすい物質を選定するため、PC1 の因子負荷量の確認を行った。因子負荷量の負の値が大きい上位 4 物質は、nicotinamide、cytidine、5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA)、N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) であった。一方で、正の値が大きい上位 4 物質は trans-glutaconic acid、succinic acid、malic acid、S-adenosylmethionine であった (Table 4-2)。因子負荷量の正の値が大きい物質は二次殺菌温度が高いほど相対面積値が減少し、負の値が大きい物質は二次殺菌温度が高いほど相対面積値が増加したことを示す (Fig. 4-2)。ヨーグルトでの CE-TOFMS による代謝産物解析の実績が少ないため、これらはヨーグルトで検出された実績が少ない物質である。

なお、Table 4-1 に示す一元配置分散分析の結果から、有意差のある物質は遊離アミノ酸を除けば全体の 2~3 割に過ぎず、二次殺菌による影響がない物質が大多数を占めることが示唆された。

4-4. 考察

4-4-1. 二次殺菌により増加する可能性のある物質

Nicotinamide については因子負荷量が最も大きく、ペラグラの予防と治療 (Elvehjem et al. 1937)、中枢神経の発達と維持 (Fricker et al. 2018)、統合失調

症の治療 (Hoffer and Prousky 2008) など、ヒトにおいて多様な健康増進作用を有することが報告されている。健康を維持するために必要な推奨量は日本では約 10 mg/日以上と設定されており、一般的なヨーグルトではナイアシンとして 0.1 mg/100g (香川 2016) が含まれていることが知られている。ナイアシンの含有量は脂肪の有無、砂糖の有無、セットタイプ・ドリンクタイプなどの製造方法の違いを問わず 0.1 mg/100g 程度と報告されており、本研究で使用した無脂肪のドリンクヨーグルト Y-0 でも同程度の量が含有されていると考える。本研究における増加幅を考慮に入れると、二次殺菌によって有益性を与え得る量まで増加している可能性があると考えられる。乳酸菌の加熱殺菌体の研究においてビタミン B 群がポストバイオティクスに関与する可能性が示唆されており (Aguilar-Toalá et al. 2018)、本研究においても、二次殺菌によりビタミン B₃ の一種である nicotinamide の増加が確認された。

Neu5Ac はシアル酸の一種である。ヒト母乳の中の Neu5Ac の濃度は授乳期間と関連があり、生後すぐの母乳に 0.15% (w/v) 程度と豊富に含まれ (井戸田ら 1994)、幼児の発育に影響することが示唆されている (Carlson 1985; Wang et al. 2001; Tram et al. 1997) など、Neu5Ac を含むシアル酸は極めて重要な生理機能を有する物質である。ヨーグルトにおける Neu5Ac の報告はないが、牛乳では 0.02% (w/v) 含まれていることが明らかになっており (Morrissey 1973)、ヨーグルトにおいても有益でありうる。他のシアル酸が検出されていないため詳細は不明だが、少なくとも Neu5Ac が増加傾向であることはポストバイオティクスとしての可能性を示唆する結果と考えられる。

MTA はヒトがん細胞や T 細胞の研究において、免疫系への関与が報告 (Li, Wang, and Wu 2019; Henrich et al. 2016) されており、乳酸菌の殺菌菌体で免疫機能が強化されたという見解 (前畑 and 村田 2019) を支持するものである。ただし、牛乳やヨーグルトにおける含有量の報告がなく、ヨーグルト中の含有

量で有益性を発揮できるのか不明である点は留意が必要である。

Cytidine については双極性患者の病状改善機能などの有益性 (Yoon et al. 2009; Hartinger et al. 2015) が報告されているが、定量値と機能が報告されている投与量とは乖離があり、直接的に関係しない可能性がある。

以上のように、二次殺菌により増加する候補物質としては生理機能の報告されている物質が多く、二次殺菌がヨーグルトの生理機能にプラスの影響を与える可能性が示唆された。

4-4-2. 二次殺菌により減少する可能性のある物質

Malic acid についてはヒトにおいて腎結石形成の予防効果 (Rodgers et al. 2014) や口腔乾燥症の改善効果 (Niklander et al. 2018) が報告されている。また、succinic acid はヒト血小板細胞においてミトコンドリアの呼吸機能の回復および乳酸生成の低下作用が報告されている (Piel et al. 2018)。さらに、S-adenosylmethionine についてはうつ病患者において症状の改善 (Sharma et al. 2017)、ヒト乳がん細胞で腫瘍細胞増殖抑制効果 (Sharma et al. 2017) が報告されている。ただし、これら 3 物質について、機能が報告されている値と本研究における定量値とを比較して明らかに含有量が少なく、報告されている生理機能に大きな役割を果たしている可能性は低い。また、trans-glutaconic acid はラットの大脳皮質に対する神経毒性 (Schuck et al. 2013) やミトコンドリアの代謝異常 (Palmeira et al. 2000) などが報告はあるものの、有益性は認められておらず、ヒト臨床の報告はない。

本研究において、遊離アミノ酸については Table 4-1 の通り、二次殺菌温度が高くなる程減少する傾向にあることが分かった。これは、遊離アミノ酸が二次殺菌の際に乳糖などと反応してメイラード反応を引き起こしていることが一因だと考えられる。アミノ酸は様々な生理活性が報告 (森山 2007) されている有

益な物質であり、遊離アミノ酸が減少していることは LL ヨーグルトにとって多少生理機能が劣る結果となりうる。しかしながら、全タンパク質 35 g/Lのうち、遊離アミノ酸は合計で 0.1 g/L 弱と少なく、Y-0 と Y-110 で比較しても 0.01 g/L しか違いがない。発酵乳と牛乳とを比較した際、小腸でのタンパク質の吸収率は同等との報告 (Mahé et al. 1994) もあるように、乳タンパク質そのものの消化性が極めて高いことから、最終的に消化吸収されるアミノ酸の量には大差なく、生理機能への影響は大きくないと考える。また、ペプチドについては本研究では調査できていないが、IPP、VPP のトリペプチドは血圧の上昇抑制効果 (Nakamura et al. 1995) が報告されているなど、特定の配列による特別な生理機能が報告されており、ペプチドの質という点からも調査が必要になる。

以上のように、二次殺菌により減少した物質としては有益性が報告されている物質もあるものの、この変化により殺菌ヨーグルトの生理機能が失われたとまでははいえないと考える。

4-4-3. 二次殺菌による影響を受けない成分

ここまで二次殺菌による影響が大きいと思われる物質の考察を行ったが、Table 4-1 に示す一元配置分散分析の結果から、有意差のある物質は遊離アミノ酸を除けば全体の 2~3 割に過ぎず、二次殺菌による影響がない物質が大多数を占めることが示唆された。これらの有意差がなかった物質の中から、さらに生理機能への影響に関する考察を行う。

ポストバイオティクス成分としては、酵素やペプチド、菌体外多糖類 (EPS)、短鎖脂肪酸などが候補として報告されている (Aguilar-Toalá et al. 2018)。なかでも、短鎖脂肪酸は経口摂取によって肝臓や骨格筋へのグリコーゲンの補給への影響が報告されている (Nakao et al. 2001) など、高い生理機能が報告されている成分である。本研究では短鎖脂肪酸として、propionic acid、iso butyric acid、

butyric acid、hexanoic acid が検出された (iso butyric acid と butyric acid は両者の合計値)。これら短鎖脂肪酸は含有量に有意差がみられないことから、二次殺菌の影響を受けないと考えられる。ただし、短鎖脂肪酸は腸内細菌叢からの供給による生理機能が報告 (Koh et al. 2016) されており、生菌ヨーグルトと LL ヨーグルトによる腸内細菌叢への影響が同様であるかは判明していないため、生菌および LL ヨーグルトに含まれる短鎖脂肪酸による生体への生理機能を確認する更なる研究が必要である。

また、短鎖脂肪酸を除くポストバイオティクス候補成分 (Aguilar-Toalá et al. 2018) については CE-TOFMS では検出できなかったため、GC-MS や ¹H NMR、UPLC-Q-TOF、HPLC などの他の成分解析方法によって二次殺菌の影響をさらに調査していく必要がある。

4-4-4. 常温保存時のメイラード反応生成物質の増加

第 3 章において、90 日間の常温保存時にメイラード反応が進行していることが示唆された。本研究では Table 3-2 のうち、ピーク面積が倍以上に増加したメイラード反応生成物質である furfural、furfuryl alcohol、2-acetylfuran、5-methyl-2-furfural について定量を行った。メイラード反応の結果生成する AGEs による身体の糖化が健康に悪影響を与えているとして、近年注目されている (Goldin et al. 2006)。WHO の研究グループ JECFA が定めた各物質の許容一日摂取量 (ADI: 一生涯毎日摂取しても健康への悪影響がないとされる 1 日あたりの摂取量) と、Y-90、YD90 の定量値を比較した結果を Table 4-3 に示す。日本において個食のヨーグルトは 1 個 100 g 前後が一般的であるため、Y-90、YD90 は 100g あたりの値を示した。Furfural、furfurylalcohol は ADI が 0.5 mg/kg bw 以下と定められており、それに対して定量値は 0.74 mg/100g、0.34 mg/100g と小さいため、悪影響はないと考える。2-Acetylfuran は通常摂取し得る量では問題

ないと定義づけられている。5-methyl-2-furfural はまだ定義づけが行われていないが、現在のところ健康上の悪影響は報告されていないため (Abraham et al. 2011)、問題ない可能性が高いと考えている。以上のことから、常温保存時に増加するメイラード反応生成物質は健康に悪影響を与えない可能性が高い。ただし、本研究では代表的な AGEs といわれる acrylamide などの物質が定量できていないこと、一般的に LL ヨーグルトは半年から 1 年の賞味期限があることなどから、常温保存時のメイラード反応についてはさらなる調査が必要である。

4 - 5 . 結 論

LL ヨーグルト製造において必須となる二次殺菌を実施した際の代謝産物を含めた微量成分の物質変化を CE-TOFMS を用いて解析し、生理機能への影響を考察した。Table 4-1 の通り 221 物質が計測され、主成分分析 (Fig. 4-1) を実施したところ、殺菌温度に応じて増減する物質 (Fig. 4-2) が存在し、二次殺菌が代謝産物へ影響を与えることが明らかとなった。増加、減少、変化のない代表的な物質について報告されている生理機能を調査したところ、二次殺菌が代謝産物を含む微量成分全体に与える物質変化は好ましい影響を与えていると考えられる。また、殺菌温度が高いほどこの反応は顕著になったことから、今回検討した殺菌温度帯では殺菌温度が高いほど生理機能に良好な影響を与える可能性も示唆されたといえる。

しかしながら、他に推定されている生理機能をもつ代謝産物 (Aguilar-Toalá et al. 2018) について本研究では検出されなかったため、GC-MS や ¹H NMR、UPLC-Q-TOF、HPLC などの他の分析による詳細な調査が必要である。今後はさらに定量を進め、健康増進作用が報告されている物質の閾値と照らし合わせて影響を考察し、その機能がヒトでも確認されるのか研究を進める必要がある。さらに、スターターによる違いも検討すべきと考える。本研究ではヨーグルト

としては最も一般的である *Lb. delbureckii* subsp. *bulgaricus* および *S. thermophilus* からなるスターターを使用した。が、*B. longum* など、代謝産物が異なる他菌種の場合の影響も確認する必要がある。

ポストバイオティクスの研究は近年始まったばかりのテーマであり、未だに作用機序が判明していない点も多いが、本研究において明らかとなった物質変化は LL ヨーグルトが有する生理機能解明の一助になるものと考えている。

Table 4-1. Relative area values measured by CE-TOFMS

Compound name	One-way ANOVA ^a		Y-0 ^b		Y-80 ^b		Y-90 ^b		Y-110 ^b	
	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d
1-Methyl-4-methylcrotonic acid		9.7E-05 ± 1.3E-05	9.4E-05 ± 3.4E-06	1.0E-04 ± 1.0E-05	1.0E-04 ± 9.7E-06	1.0E-04 ± 9.5E-06				
1-Methylhistidine		1.4E-04 ± 1.7E-05	1.4E-04 ± 6.4E-06	1.5E-04 ± 1.7E-05	1.6E-04 ± 9.0E-07	1.6E-04 ± 9.6E-06				
3-Methylhistidine		3.9E-05 ± 5.5E-06	4.3E-05 ± 2.5E-06	3.5E-05 ± 1.1E-05	3.2E-05 ± 5.4E-06	3.7E-05 ± 5.5E-06				
11-Aminoundecanoic acid		3.9E-05 ± 5.5E-06	3.8E-05 ± 2.3E-06	4.3E-05 ± 1.2E-05	3.3E-05 ± 1.3E-06	2.7E-05 ± 2.2E-06				
2'-Deoxyadenosine	***	1.2E-05 ± N.A.	1.9E-05 ± 1.8E-06 *	1.7E-05 ± 2.4E-06 *	1.5E-05 ± 3.4E-06	3.4E-05 ± 7.4E-06 ***				
2-Deoxycytidine		1.5E-05 ± 2.3E-06	1.7E-05 ± 1.1E-06	1.4E-05 ± 1.3E-06	1.4E-05 ± 8.4E-07	1.2E-05 ± 1.1E-06				
2-Deoxyguanosine		7.3E-05 ± 3.5E-06	7.8E-05 ± 9.7E-06	7.9E-05 ± 7.7E-06	8.4E-05 ± 7.8E-06	8.6E-05 ± 1.1E-06				
2-(Creatinine-3-γ)propionic acid		3.0E-04 ± 3.0E-05	2.6E-04 ± 2.2E-05	2.9E-04 ± 2.5E-05	3.0E-04 ± 1.3E-05	3.6E-04 ± 8.1E-06 *				
2-Aminobutyric acid	**	1.2E-04 ± 1.9E-05	9.0E-05 ± 1.4E-05	1.1E-04 ± 4.6E-06	1.1E-04 ± 1.5E-05	9.6E-05 ± N.A.				
2-Deoxyglucose 6-phosphate		5.5E-03 ± 2.8E-04	5.4E-03 ± 2.8E-04	4.8E-03 ± 2.5E-04 *	4.8E-03 ± 5.6E-05 **	4.8E-03 ± 1.9E-04 *				
2-Hydroxy-4-methylvaleric acid	***	2.3 ± 0.6	9.4E-03 ± 2.6E-05	9.0E-04 ± 3.5E-05 ***	9.0E-04 ± 3.5E-05 ***	9.3E-04 ± 1.4E-05 ***				
2-Hydroxybutyric acid	***	1.6E-03 ± 5.3E-05	1.3E-03 ± 2.4E-05 ***	1.3E-03 ± 6.0E-05 ***	1.3E-03 ± 1.7E-05	1.2E-03 ± 4.6E-05 ***				
2-Methylserine		1.9E-05 ± N.A.	N.A. ± N.A.	2.1E-05 ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.				
2-Oxoglutaric acid	200 ± 3.9	9.0E-03 ± 1.7E-04	9.5E-03 ± 3.5E-04	8.9E-03 ± 5.4E-04	8.9E-03 ± 4.0E-04	8.9E-03 ± 3.5E-04				
2-Phosphoglyceric acid	20 ± 2.1	5.4E-04 ± 5.7E-05	5.8E-04 ± 4.8E-05	5.5E-04 ± 3.8E-05	5.3E-04 ± 1.7E-05	6.0E-04 ± 2.3E-05				
3-Amino-2-piperidone	***	1.9E-04 ± 1.2E-05	1.4E-04 ± 2.4E-06 **	1.7E-04 ± 1.8E-05	1.9E-04 ± 3.9E-06	1.5E-04 ± 1.2E-05 **				
3-Aminopropene-1,2-diol		1.1E-03 ± 4.2E-05	1.1E-03 ± 3.8E-05	1.0E-03 ± 5.5E-05	1.1E-03 ± 2.4E-05	1.1E-03 ± 1.1E-05				
3-Dihydroshikimic acid		9.2E-05 ± 7.3E-06	N.A. ± N.A.	9.9E-05 ± 1.8E-05	1.1E-04 ± 2.0E-05	9.6E-05 ± 4.8E-06				
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid		N.A. ± N.A.	1.7E-04 ± N.A.	1.3E-04 ± N.A.	1.4E-04 ± N.A.	1.6E-04 ± N.A.				
3-Hydroxybutyric acid	*	48 ± 2.6	1.7E-03 ± 9.5E-05	1.6E-03 ± 7.5E-05	1.6E-03 ± 3.3E-05	1.7E-03 ± 1.1E-05				
3-Methylguanine		3.5E-05 ± 7.3E-06	3.8E-05 ± 4.6E-06	3.4E-05 ± 6.5E-06	3.4E-05 ± 7.8E-07	3.7E-05 ± 7.5E-06				
3-Phosphoglyceric acid	112 ± 1.2	3.0E-03 ± 3.3E-05	3.0E-03 ± 1.4E-04	2.9E-03 ± 1.1E-04	3.0E-03 ± 1.3E-04	3.1E-03 ± 2.4E-04				
4-Aminohippuric acid		3.0E-05 ± 5.6E-06	2.3E-05 ± 1.7E-06	2.6E-05 ± 3.7E-06	2.6E-05 ± 4.1E-06	2.9E-05 ± 5.3E-06				
4-Methyl-2-oxovaleric acid	***	N.A. ± N.A.	6.3E-04 ± 6.4E-05 ***	4.8E-04 ± 2.3E-05 ***	4.8E-04 ± 2.3E-05 ***	5.1E-04 ± 4.5E-05 ***				
3-Methyl-2-oxovaleric acid		4.3E-04 ± 4.6E-05	3.9E-04 ± 1.5E-05	4.2E-04 ± 4.2E-05	4.2E-04 ± 4.3E-05	4.2E-04 ± 2.0E-05				
Pyridoxic acid	***	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	9.5E-06 ± 5.8E-08 *				
5'-Deoxy-5'-methylthiodenosine		1.7E-04 ± 7.8E-06	1.8E-04 ± 9.4E-06	1.6E-04 ± 1.8E-05	1.6E-04 ± 2.3E-05	1.8E-04 ± 3.9E-06				
5-Hydroxylysine	*	1.8E-04 ± 7.2E-06	1.3E-04 ± 3.9E-05	1.3E-04 ± 3.1E-05	1.3E-04 ± 1.7E-05	9.7E-05 ± 9.5E-06 **				
5-Methoxydoacetic acid		7.0E-06 ± N.A.	7.1E-06 ± N.A.	9.5E-06 ± 2.3E-06	N.A. ± N.A.	6.6E-06 ± N.A.				
5-Methyl-2-deoxycytidine		2.3E-05 ± 6.3E-07	1.9E-05 ± 2.4E-06	2.0E-05 ± 1.2E-06	2.0E-05 ± 7.3E-06	2.3E-05 ± 1.3E-06				
5-Methylcytosine	**	2.9E-04 ± 6.1E-05	3.4E-04 ± N.A.	3.6E-04 ± 2.1E-05	4.3E-04 ± 3.7E-05	4.9E-04 ± 2.9E-05				
5-Oxo-2-terahydrofuran-2-carboxylic acid		3.2 ± 0.07	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	3.3 ± N.A.				
6-Phosphogluconic acid		2.7E-04 ± 3.2E-05	2.7E-04 ± 1.3E-05	2.8E-04 ± 2.9E-05	2.8E-04 ± 6.9E-06	2.8E-04 ± 1.3E-05				
7-Methylguanine	***	2.8 ± 0.3	4.2E-04 ± 3.8E-05	2.2 ± 0.2	3.2E-04 ± 2.6E-05 **	1.7 ± 0.10				
Adenine	1.8 ± 0.3	3.1E-04 ± 4.7E-05	1.5 ± 0.07	2.5E-04 ± 1.1E-05	1.6 ± 0.3	2.8E-04 ± 1.4E-05 *				
Adenosine	**	3.4 ± 0.5	1.8E-04 ± 9.7E-06	8.3E-05 ± 8.0E-06	7.5E-05 ± 7.9E-06	7.4E-05 ± 2.2E-06				
Adenosine 5'-diphosphate	*	1.8E-04 ± 2.4E-05	1.7E-04 ± 1.7E-05	2.0E-04 ± 6.0E-06	1.9E-04 ± 5.4E-06	2.3E-04 ± 2.7E-05 *				
Adenosine monophosphate	**	3.0E-04 ± 8.9E-06	3.2E-04 ± 6.7E-06	2.8E-04 ± 1.0E-06	2.8E-04 ± 1.8E-05	2.9E-04 ± 1.0E-05				
Allo-Threonine		2.7E-04 ± 2.7E-05	2.9E-04 ± N.A.	2.5E-04 ± N.A.	2.5E-04 ± 2.5E-05	2.1E-04 ± 8.0E-06				
Ammoniacetone	**	7.5E-05 ± 1.2E-05	7.3E-05 ± 4.5E-06	7.0E-05 ± 4.3E-06	7.0E-05 ± 2.6E-06 *	5.3E-05 ± 3.5E-06 **				
Argininosuccinic acid		N.A. ± N.A.	1.1E-04 ± 1.2E-05	1.1E-04 ± 2.2E-05	1.1E-04 ± 3.9E-05	1.2E-04 ± 1.3E-05				
Ascorbic acid		2.0E-04 ± 8.3E-06	1.9E-04 ± 8.2E-06	1.9E-04 ± 4.7E-06	2.0E-04 ± 4.8E-06	1.9E-04 ± 1.0E-05				
Asymmetric dimethylarginine		88 ± 3.7	1.5E-02 ± 6.3E-04	1.5E-02 ± 5.3E-04	1.5E-02 ± 3.8E-04	1.5E-02 ± 3.0E-04				
Biotin		4.5E-05 ± 3.1E-06	4.3E-05 ± 1.6E-05	4.8E-05 ± 5.9E-06	4.1E-05 ± 6.0E-06	4.6E-05 ± 9.6E-06				
Carboxymethyllysine		1.7E-02 ± 8.1E-04	1.7E-02 ± 3.9E-04	1.7E-02 ± 5.4E-04	1.7E-02 ± 5.2E-04	1.7E-02 ± 5.8E-04				
Carnitine		0.6 ± 0.05	6.6E-05 ± 4.9E-06	0.7 ± 0.05	7.2E-05 ± 5.0E-06	0.7 ± 0.08				
Carnosine		2.91 ± 3.5	5.8E-02 ± 7.0E-03	2.79 ± 1.7	5.6E-02 ± 3.4E-03	2.63 ± 1.0				
Choline	*	1.02 ± 2.0	9.3E-03 ± 1.8E-04	1.01 ± 3.3	9.2E-03 ± 3.0E-04	9.1 ± 4.0				
cis-Aconitic acid	**	0.3 ± 0.04	1.1E-03 ± 3.3E-05	0.4 ± 0.05	1.3E-03 ± 1.4E-04	0.3 ± 0.02				
Citramalic acid	**	4.79 ± 2.4	8.1E-02 ± 4.0E-03	4.82 ± 1.4	7.9E-02 ± 5.7E-03	4.34 ± 1.1				
Citrulline		1.95 ± 9.8	2.6E-02 ± 1.3E-03	1.89 ± 5.6	2.5E-02 ± 7.3E-04	2.03 ± 7.0				
Creatine		1.4 ± 0.2	7.9E-05 ± 9.4E-06	1.4 ± 0.6	8.3E-05 ± 1.1E-05	1.5 ± 0.13				
Cyclic adenosine monophosphate		N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.				
Cyclohexylamine	**	9.0E-05 ± N.A.	5.3E-05 ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	9.5E-05 ± 8.1E-06 *				
Cystathionine	***	2.3 ± 0.03	3.1E-04 ± 4.7E-06	2.2 ± 0.03	3.0E-04 ± 6.2E-06 **	3.7 ± 0.08				
Cytidine	***	6.6 ± 0.8	1.9E-04 ± 2.4E-05	7.3 ± 0.8	2.2E-04 ± 2.2E-05 *	8.1 ± 0.2				
Cytidine monophosphate										

Table 4-1 (continued)

Compound name	Y-0 ⁰			Y-90 ⁰			Y-100 ⁰			Y-110 ⁰		
	One-way ANOVA ^a	Concentration (μM) ^b	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^b	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^b	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^b	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^b	Relative area values ^d	
Cytosine		1.0 ± 0.05	9.2E-05 ± 4.4E-06	1.0 ± 0.12	9.5E-05 ± 1.1E-05	1.1 ± 0.03	9.8E-05 ± 2.7E-06	0.8 ± 0.05	7.8E-05 ± 4.8E-06			
Dichlanolamine		6.0E-04 ± 2.1E-04	4.5E-04 ± 6.1E-05	4.5E-04 ± 4.9E-05	4.4E-04 ± 9.4E-05	5.6E-04 ± 1.7E-04	5.6E-04 ± 1.7E-04	4.7E-04 ± 1.3E-04	4.7E-04 ± 1.3E-04			
Dihydroxytronic acid		6.3E-04 ± 7.9E-05	5.4E-04 ± 7.9E-05	6.0E-04 ± 7.4E-05	6.0E-04 ± 7.4E-05	2.4E-04 ± 2.7E-05	2.4E-04 ± 2.7E-05	6.9E-04 ± 3.9E-05	6.9E-04 ± 3.9E-05			
Dihydroxyacetone phosphate		2.5E-04 ± 2.3E-05	2.8E-04 ± 2.2E-05	2.8E-04 ± 2.2E-05	2.8E-04 ± 2.2E-05	5.7E-04 ± 9.7E-05	5.7E-04 ± 9.7E-05	5.0E-04 ± 2.9E-05	5.0E-04 ± 2.9E-05			
Diphyllylne		6.2E-04 ± 1.1E-04	6.3E-04 ± 1.1E-04	6.9E-03 ± 4.4E-05	7.0E-03 ± 3.4E-04	7.1E-03 ± 2.9E-04	7.1E-03 ± 2.9E-04	6.8E-03 ± 2.7E-04	6.8E-03 ± 2.7E-04			
Ethanolamine		7.3E-03 ± 4.2E-04	1.9E-03 ± 1.2E-04	1.8E-03 ± 1.0E-04	1.8E-03 ± 1.0E-04	1.8E-03 ± 5.7E-05	1.9E-03 ± 5.0E-05	1.8E-03 ± 1.5E-04	1.8E-03 ± 1.5E-04			
Ethanolamine phosphate		1.9E-03 ± 1.2E-04	2.7E-04 ± 2.6E-05	2.4E-04 ± 2.7E-05	2.4E-04 ± 2.7E-05	2.6E-04 ± 1.4E-05	2.8E-04 ± 1.1E-05	2.5E-04 ± 1.6E-05	2.5E-04 ± 1.6E-05			
Ethylacetimidate		31 ± 1.0	1.5E-03 ± 4.7E-05	1.6E-03 ± 6.9E-06	1.6E-03 ± 6.9E-06	34 ± 1.1	1.6E-03 ± 4.9E-05	32 ± 0.6	1.6E-03 ± 3.1E-05			
Fructose 1,6-diphosphate	**	66 ± 2.5	2.2E-03 ± 8.4E-05	2.2E-03 ± 1.4E-04	2.2E-03 ± 1.4E-04	66 ± 4.1	2.2E-03 ± 1.4E-04	62 ± 5.6	2.1E-03 ± 1.9E-04			
Fructose 6-phosphate	***	70 ± 4.3	2.0E-03 ± 1.2E-04	2.8E-03 ± 1.7E-04	3.3E-03 ± 3.3E-04	114 ± 11	3.3E-03 ± 3.3E-04	170 ± 11	4.9E-03 ± 3.2E-04			
Fumaric acid	***	70 ± 4.3	2.0E-03 ± 1.2E-04	2.8E-03 ± 1.7E-04	3.3E-03 ± 3.3E-04	114 ± 11	3.3E-03 ± 3.3E-04	170 ± 11	4.9E-03 ± 3.2E-04			
Galactosamine		2.0E-04 ± 3.1E-05	2.0E-04 ± 3.1E-05	2.0E-04 ± 3.1E-05	2.0E-04 ± 3.1E-05	2.0E-04 ± 4.1E-05	2.0E-04 ± 4.1E-05	2.0E-04 ± 2.3E-05	2.0E-04 ± 2.3E-05			
Glucosamine		36 ± 2.4	1.6E-03 ± 1.1E-04	1.5E-03 ± 6.5E-05	1.5E-03 ± 6.5E-05	35 ± 1.5	1.5E-03 ± 6.5E-05	35 ± 0.9	1.5E-03 ± 3.9E-05			
Gluconic acid		36 ± 2.4	1.6E-03 ± 1.1E-04	5.7E-04 ± 5.1E-05	5.7E-04 ± 5.1E-05	37 ± 1.7	1.6E-03 ± 7.5E-05	35 ± 0.9	1.5E-03 ± 3.9E-05			
Glucuronolactone		40 ± 1.3	1.6E-02 ± 5.0E-04	5.8E-04 ± 4.1E-05	5.8E-04 ± 4.1E-05	428 ± 3.8	1.6E-02 ± 1.4E-04	419 ± 13	1.6E-02 ± 1.4E-04			
Glucose 1-phosphate		143 ± 4.9	5.1E-03 ± 1.8E-04	4.7E-03 ± 2.6E-04	4.7E-03 ± 2.6E-04	133 ± 3.8	4.8E-03 ± 1.4E-04	128 ± 6.8	4.6E-03 ± 2.4E-04			
Glucose 6-phosphate		2.5E-03 ± 1.7E-04	2.5E-03 ± 1.7E-04	2.5E-03 ± 6.2E-05	2.5E-03 ± 6.2E-05	2.4E-03 ± 4.3E-05	2.5E-03 ± 5.9E-05	2.4E-03 ± 4.6E-05	2.4E-03 ± 4.6E-05			
Glucuronic acid-1		2.2E-04 ± 6.5E-06	2.2E-04 ± 6.5E-06	2.0E-04 ± 2.9E-06	2.0E-04 ± 2.9E-06	2.1E-04 ± 8.7E-06	2.8E-04 ± 4.0E-05	2.5E-04 ± 1.3E-05	2.5E-04 ± 1.3E-05			
Glucuronic acid-2	**	0.7 ± 0.04	8.8E-05 ± 4.6E-06	8.8E-05 ± 4.6E-06	8.8E-05 ± 4.6E-06	0.7 ± 0.06	8.3E-05 ± 6.9E-06	0.7 ± 0.08	8.2E-05 ± 9.9E-06			
Gluathione (GSH)	**	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	0.03 ± 0.001	5.7E-06 ± 2.1E-07	0.03 ± 0.009	5.8E-06 ± 1.6E-06	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.			
Gluathione (GS(SG))_divalent		3.2E-03 ± 2.8E-04	3.2E-03 ± 2.8E-04	2.6E-03 ± 2.4E-04	2.6E-03 ± 2.4E-04	2.5E-03 ± 2.4E-04	2.5E-03 ± 2.4E-04	2.8E-03 ± 7.7E-05	2.8E-03 ± 7.7E-05			
Glyceric acid	**	2.7E-02 ± 3.5E-03	2.7E-02 ± 3.5E-03	2.2E-02 ± 4.8E-03	2.2E-02 ± 4.8E-03	2.4E-02 ± 5.9E-03	2.2E-02 ± 4.4E-03	2.3E-02 ± 5.7E-03	2.3E-02 ± 5.7E-03			
Glycerol		104 ± 5.7	3.0E-03 ± 1.6E-04	2.8E-03 ± 1.5E-04	2.8E-03 ± 1.5E-04	97 ± 5.9	2.8E-03 ± 1.7E-04	102 ± 3.4	2.9E-03 ± 9.6E-05			
Glycerol 3-phosphate		7.1E-02 ± 1.1E-03	7.1E-02 ± 1.1E-03	7.0E-02 ± 7.5E-04	7.0E-02 ± 7.5E-04	6.8E-02 ± 1.7E-03	6.8E-02 ± 1.7E-03	6.9E-02 ± 2.0E-03	6.9E-02 ± 2.0E-03			
Glycerolphosphocholine	*	1.1 ± 0.07	1.1E-04 ± 7.7E-06	8.1E-05 ± 1.2E-05	8.1E-05 ± 1.2E-05	0.9 ± 0.05	9.1E-05 ± 9.9E-06	0.9 ± 0.08	9.4E-05 ± 8.8E-06			
Guanine	***	1.0 ± 0.11	1.2E-04 ± 1.3E-05	8.5E-05 ± 7.5E-06	8.5E-05 ± 7.5E-06	0.8 ± 0.06	9.6E-05 ± 4.0E-06	0.8 ± 0.04	8.8E-05 ± 4.6E-06			
Guanosine		3.4E-04 ± 1.8E-05	3.4E-04 ± 1.8E-05	3.9E-04 ± 1.3E-05	3.9E-04 ± 1.3E-05	4.0E-04 ± 5.4E-06	3.8E-04 ± 2.0E-05	4.5E-04 ± 9.2E-05	4.5E-04 ± 9.2E-05			
Hexanoic acid		1.0E-02 ± 2.4E-04	1.0E-02 ± 2.4E-04	1.0E-02 ± 9.7E-05	1.0E-02 ± 9.7E-05	1.0E-02 ± 8.2E-05	1.0E-02 ± 8.2E-05	1.1E-02 ± 2.1E-04	1.1E-02 ± 2.1E-04			
Hippuric acid		6.3E-05 ± 4.5E-06	6.3E-05 ± 4.5E-06	6.3E-05 ± 4.5E-06	6.3E-05 ± 4.5E-06	5.7E-05 ± 2.6E-06	5.8E-05 ± 2.5E-06	5.6E-05 ± 6.3E-06	5.6E-05 ± 6.3E-06			
Homocitrulline	***	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	1.8E-05 ± 3.8E-06	4.0E-05 ± 5.6E-06	2.3E-05 ± 2.6E-06	2.3E-05 ± 2.6E-06			
Homocysteine	***	3.4 ± 0.11	4.5E-04 ± 1.5E-05	3.7E-04 ± 1.7E-05	3.7E-04 ± 1.7E-05	2.9 ± 0.3	3.8E-04 ± 3.9E-05	3.2 ± 0.07	4.2E-04 ± 9.8E-06			
Homoserine	***	2.0E-03 ± 8.5E-05	2.0E-03 ± 8.5E-05	1.4E-03 ± 9.0E-05	1.4E-03 ± 9.0E-05	1.5E-03 ± 6.1E-05	1.6E-03 ± 5.2E-05	1.2E-03 ± 4.3E-05	1.2E-03 ± 4.3E-05			
Homovanillic acid	***	5.2 ± 0.4	7.2E-04 ± 2.0E-05	7.1E-04 ± 3.3E-05	7.1E-04 ± 3.3E-05	5.2 ± 0.8	7.3E-04 ± 1.1E-04	5.1 ± 0.09	7.5E-04 ± 5.7E-05			
Hydroxyproline		4.8E-04 ± 5.2E-05	4.8E-04 ± 5.2E-05	4.5E-04 ± 6.5E-06	4.5E-04 ± 6.5E-06	4.6E-04 ± 4.7E-05	4.6E-04 ± 4.7E-05	4.5E-04 ± 4.1E-05	4.5E-04 ± 4.1E-05			
Hypotaurine		1.9E-04 ± 3.4E-06	1.9E-04 ± 3.4E-06	1.8E-04 ± 5.8E-06	1.8E-04 ± 5.8E-06	1.9 ± 0.2	1.7E-04 ± 1.7E-05	1.7 ± 0.2	1.5E-04 ± 1.7E-05			
Hyoxyanthine	*	2.1 ± 0.04	3.6E-05 ± 4.4E-06	4.0E-05 ± 4.0E-06	4.0E-05 ± 4.0E-06	3.8E-05 ± 1.0E-06	4.2E-05 ± 2.4E-06	3.4E-05 ± 3.5E-06	3.4E-05 ± 3.5E-06			
Imidazolelactic acid		3.5E-04 ± 2.9E-05	3.5E-04 ± 2.9E-05	4.2E-04 ± 1.9E-05	4.2E-04 ± 1.9E-05	4.1E-04 ± 9.0E-05	3.8E-04 ± 5.4E-05	4.1E-04 ± 9.1E-05	4.1E-04 ± 9.1E-05			
Isobutyric acid		1.9E-03 ± 4.5E-05	1.9E-03 ± 4.5E-05	1.9E-03 ± 5.4E-05	1.9E-03 ± 5.4E-05	1.9E-03 ± 4.2E-05	1.9E-03 ± 4.2E-05	1.8E-03 ± 4.9E-05	1.8E-03 ± 4.9E-05			
Isobutyrylcarbamate		233 ± 9.4	1.8E-02 ± 7.4E-04	1.6E-02 ± 7.4E-04	1.6E-02 ± 7.4E-04	219 ± 24	1.7E-02 ± 1.9E-03	229 ± 17	1.7E-02 ± 1.9E-03			
Isoelectric acid		1.0E-03 ± 6.8E-05	1.0E-03 ± 6.8E-05	1.0E-03 ± 1.8E-05	1.0E-03 ± 1.8E-05	1.0E-03 ± 6.7E-05	1.0E-03 ± 6.7E-05	1.0E-03 ± 3.7E-05	1.0E-03 ± 3.7E-05			
Isoglutamic acid		7.0E-04 ± 4.1E-05	7.0E-04 ± 4.1E-05	7.1E-04 ± 6.0E-06	7.1E-04 ± 6.0E-06	7.4E-04 ± 6.9E-05	7.2E-04 ± 6.9E-05	7.1E-04 ± 7.8E-06	7.1E-04 ± 7.8E-06			
Isoopropanolamine		1.3E-03 ± 4.5E-05	1.3E-03 ± 4.5E-05	1.2E-03 ± 2.3E-05	1.2E-03 ± 2.3E-05	1.2E-03 ± 5.9E-05	1.2E-03 ± 4.5E-05	1.2E-03 ± 3.1E-05	1.2E-03 ± 3.1E-05			
Isovalerylcarbamate		2.3E-05 ± 3.7E-06	2.3E-05 ± 3.7E-06	2.3E-05 ± 3.3E-06	2.3E-05 ± 3.3E-06	2.1E-05 ± 4.2E-06	2.2E-05 ± 1.4E-06	2.3E-05 ± 5.0E-06	2.3E-05 ± 5.0E-06			
Kynurenic acid		85.844 ± 2.402	2.7E-00 ± 7.7E-02	2.6E-00 ± 6.9E-02	2.6E-00 ± 6.9E-02	81.635 ± 1.765	2.7E-00 ± 4.3E-02	82.715 ± 794	2.6E-00 ± 2.5E-02			
Lactic acid	***	404 ± 8.6	2.7E-02 ± 5.7E-04	2.7E-02 ± 4.0E-04	2.7E-02 ± 4.0E-04	384 ± 12	2.5E-02 ± 5.9E-04	352 ± 9.3	2.3E-02 ± 6.2E-04			
Malic acid		2.5E-05 ± 5.7E-06	2.5E-05 ± 5.7E-06	3.6E-05 ± 2.2E-06	3.6E-05 ± 2.2E-06	4.4E-05 ± 7.9E-06	3.6E-05 ± 5.2E-06	4.1E-05 ± 1.6E-05	4.1E-05 ± 1.6E-05			
Mannosamine		3.9E-05 ± 6.8E-06	3.9E-05 ± 6.8E-06	3.4E-05 ± 3.3E-06	3.4E-05 ± 3.3E-06	3.2E-05 ± 4.1E-06	3.2E-05 ± 4.1E-06	2.4E-05 ± 3.5E-07	2.4E-05 ± 3.5E-07			
Methionine sulfoxide	*	1.3E-04 ± 2.4E-05	1.3E-04 ± 2.4E-05	1.5E-04 ± 2.6E-05	1.5E-04 ± 2.6E-05	1.2E-04 ± 6.6E-06	1.5E-04 ± 1.2E-06	1.2E-04 ± 1.1E-05	1.2E-04 ± 1.1E-05			
Mevalonic acid	***	8.6E-04 ± 5.0E-05	8.6E-04 ± 5.0E-05	8.3E-04 ± 2.9E-05	8.3E-04 ± 2.9E-05	9.2E-04 ± 4.7E-05	1.0E-03 ± 2.5E-05	1.1E-03 ± 2.8E-05	1.1E-03 ± 2.8E-05			
Mucic acid	*	5.4E-05 ± 9.7E-06	5.4E-05 ± 9.7E-06	4.1E-05 ± 3.4E-06	4.1E-05 ± 3.4E-06	4.8E-05 ± 4.0E-06	3.8E-05 ± 2.3E-06	4.7E-05 ± 6.2E-06	4.7E-05 ± 6.2E-06			
Muscimol		0.4 ± N.A.	6.3E-05 ± N.A.	6.3E-05 ± N.A.	6.3E-05 ± N.A.	0.5 ± N.A.	6.9E-05 ± N.A.	0.4 ± 0.08	5.7E-05 ± 1.2E-05			
N,N-Dimethylglycine		8.1E-05 ± 5.6E-07	8.1E-05 ± 5.6E-07	8.2E-05 ± N.A.	8.2E-05 ± N.A.	7.7E-05 ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	7.7E-05 ± N.A.			
N-Acetyl- β -alanine		9.9E-05 ± 9.2E-07	9.9E-05 ± 9.2E-07	7.8E-05 ± 8.0E-06	7.8E-05 ± 8.0E-06	6.5E-05 ± 9.7E-06	6.5E-05 ± 9.7E-06	5.9E-05 ± 2.3E-06	5.9E-05 ± 2.3E-06			
N-Acetylglutamine		2.8E-02 ± 2.6E-03	2.8E-02 ± 2.6E-03	2.8E-02 ± 6.1E-04	2.8E-02 ± 6.1E-04	2.8E-02 ± 3.0E-03	2.8E-02 ± 3.0E-03	2.6E-02 ± 1.6E-03	2.6E-02 ± 1.6E-03			
N-Acetylgalactosamine		4.0E-02 ± 9.3E-04	4.0E-02 ± 9.3E-04	3.9E-02 ± 1.0E-03	3.9E-02 ± 1.0E-03	4.0E-02 ± 4.4E-04	4.0E-02 ± 3.1E-04	4.0E-02 ± 6.9E-04	4.0E-02 ± 6.9E-04			
N-Acetylmannosamine		7.9E-04 ± 3.0E-05	7.9E-04 ± 3.0E-05	8.3E-04 ± 3.7E-05	8.3E-04 ± 3.7E-05	7.9E-04 ± 5.1E-05	7.6E-04 ± 3.5E-05	7.9E-04 ± 3.0E-05	7.9E-04 ± 3.0E-05			
N-Acetylglycine		N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	1.0E-04 ± N.A.	1.0E-04 ± N.A.	5.4E-05 ± N.A.	5.4E-05 ± N.A.			
N-Acetylglycine		3.0E-05 ± 6.4E-06	3.0E-05 ± 6.4E-06	3.1E-05 ± 2.3E-06	3.1E-05 ± 2.3E-06	3.0E-05 ± 4.9E-06	3.0E-05 ± 2.1E-06	3.4E-05 ± 6.1E-06	3.4E-05 ± 6.1E-06			

Table 4-1 (continued)

Compound name	Y-0 ^b		Y-80 ^b		Y-90 ^b		Y-100 ^b		Y-110 ^b	
	ANOVA ^a	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^c
N-Acetylneuraminic acid	***		3.6E-03 ± 2.3E-04	3.6E-03 ± 2.1E-04	4.0E-03 ± 1.2E-04 *	4.6E-03 ± 6.3E-05 ***				
N-Acetylputrescine			N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	1.3E-05 ± 1.7E-07				
N-Acetylserine	**		5.7E-05 ± 4.7E-06 **	6.3E-05 ± 2.7E-06 *	6.1E-05 ± 2.1E-06 **	7.1E-05 ± 3.6E-06				
N-Carboxylaspartic acid			3.5E-04 ± 1.6E-05	3.3E-04 ± 2.1E-05	3.2E-04 ± 2.3E-05	3.3E-04 ± 5.1E-06				
N-Methylalanine			N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	5.8E-05 ± N.A.	5.2E-05 ± N.A.				
N-Methylglutamic acid			3.0E-05 ± 7.6E-07	3.0E-05 ± 1.9E-06	3.0E-05 ± 9.0E-07	3.3E-05 ± 1.1E-06				
N-Methylproline			3.1E-04 ± 2.2E-05	2.9E-04 ± 1.4E-05	3.0E-04 ± 1.7E-05	2.8E-04 ± 1.7E-05				
N ⁵ -Ethylglutamine			9.4E-05 ± 5.8E-06	8.6E-05 ± 3.5E-06	9.3E-05 ± 1.0E-05	9.0E-05 ± 1.8E-06				
N ⁶ , N ⁶ -Trimethyllysine			5.3E-04 ± 7.5E-05	5.3E-04 ± 1.0E-04	5.4E-04 ± 4.1E-05	5.4E-04 ± 4.1E-05				
N ⁶ -Acetyllysine			N.A. ± N.A.	2.3E-05 ± N.A.	2.8E-05 ± 4.0E-06	N.A. ± N.A.				
1,4E-05 ± 9.0E-07			N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	1.7E-05 ± N.A.	1.7E-05 ± N.A.				
N ⁶ -Methyllysine			1.8E-04 ± 3.9E-06	1.7E-04 ± 1.0E-05	1.8E-04 ± 1.8E-05	1.8E-04 ± 8.5E-06				
NAD ⁺		4.9 ± 0.7	1.2E-04 ± 1.7E-05	1.4E-04 ± 1.2E-05	1.4E-04 ± 5.0E-06	1.3E-04 ± 1.7E-05	5.2 ± 0.5			
Nicotinamide	***		2.9E-05 ± N.A.	5.5E-05 ± 6.0E-06 **	5.5E-05 ± 6.0E-06 **	5.9E-05 ± 5.8E-06				
Nicotinic acid			6.1E-05 ± 6.2E-06	5.8E-05 ± 6.8E-06	6.4E-05 ± 3.6E-06	5.9E-05 ± 5.5E-06				
N _ω -Methylarginine			1.2E-05 ± 1.6E-07	1.4E-05 ± 9.2E-07	1.7E-05 ± N.A.	1.3E-05 ± 2.8E-06				
O-Acetylornithine			1.4E-02 ± 6.8E-04	1.4E-02 ± 3.1E-04	1.4E-02 ± 4.5E-04	1.3E-02 ± 3.3E-04				
2-Aminoadipic acid	**		6.2E-04 ± 4.2E-05	5.8E-04 ± 1.7E-05	6.2E-04 ± 4.0E-05	6.8E-04 ± 4.1E-05				
O-Acetylserine			4.0E-03 ± 2.6E-04	4.2E-03 ± 9.5E-05	3.8E-03 ± 2.7E-04	3.9E-03 ± 1.4E-04				
O-Succinylhomoserine			2.7E-04 ± 1.6E-05	2.3E-04 ± 3.1E-05	2.3E-04 ± 2.1E-05	2.4E-04 ± 1.4E-05				
Oxaloacetic acid			1.7E-04 ± 9.4E-06	1.9E-04 ± 1.9E-05	2.0E-04 ± 1.9E-05	2.0E-04 ± 6.9E-05				
Oxophthalic acid	***		2.2E-04 ± 1.1E-05	2.8E-04 ± 7.8E-06 ***	2.4E-04 ± 1.8E-05	2.6E-04 ± 8.4E-06 **				
Ornithine	***	5.5 ± 0.2	6.8E-04 ± 1.9E-05	4.7E-04 ± 1.2E-05 ***	6.3E-04 ± 3.0E-05	4.0E-04 ± 9.1E-06 ***	3.3 ± 0.07			
Orotic acid			3.0E-02 ± 1.5E-03	2.9E-02 ± 6.4E-04	2.9E-02 ± 8.8E-04	2.9E-02 ± 9.3E-04				
Pantoic acid			1.3E-03 ± 9.6E-05	1.2E-03 ± 2.6E-05	1.2E-03 ± 4.2E-05	1.2E-03 ± 2.0E-05				
Peniclovir			2.5E-05 ± 1.3E-06	2.2E-05 ± 3.1E-06	2.4E-05 ± 5.7E-06	2.5E-05 ± 3.1E-06				
Phenacetic acid	*		7.1E-04 ± 2.9E-05	6.6E-04 ± 2.4E-05	6.4E-04 ± 3.4E-05	6.9E-04 ± 2.2E-05				
Phosphoenolpyruvic acid	***	28 ± 0.5	9.1E-04 ± 1.8E-05	9.4E-04 ± 4.0E-05	8.7E-04 ± 5.6E-05	8.1E-04 ± 4.0E-05 **	23 ± 1.7			
Phosphorylcholine			1.0E-02 ± 3.9E-04	1.0E-02 ± 6.7E-04	1.0E-02 ± 6.7E-04	1.0E-02 ± 4.5E-04				
Pipicolinic acid			5.1E-04 ± 1.3E-05	4.8E-04 ± 9.2E-06	5.0E-04 ± 5.1E-05	5.1E-04 ± 7.5E-06				
Piperidine			4.0E-03 ± 3.3E-04	4.0E-03 ± 9.9E-05	3.8E-03 ± 3.1E-04	3.7E-03 ± 1.2E-04				
Propionic acid			8.8E-04 ± 1.4E-05	8.3E-04 ± 3.5E-05	7.7E-04 ± 2.8E-05	7.9E-04 ± 5.4E-05				
Putrescine		0.4 ± N.A.	3.1E-05 ± N.A.	3.6E-05 ± N.A.	3.6E-05 ± N.A.	3.4E-05 ± 1.0E-06	0.3 ± 0.014			
Pyridoxal			4.3E-04 ± 1.8E-05	4.4E-04 ± 1.8E-05	4.2E-04 ± 1.9E-05	4.4E-04 ± 2.3E-05				
Pyridoxamine			7.1E-05 ± 1.8E-05	8.4E-05 ± 4.6E-06	7.9E-05 ± 5.1E-06	8.1E-05 ± 5.4E-06				
Pyridoxamine 5'-phosphate			2.7E-05 ± 3.2E-06	2.4E-05 ± 7.5E-07	2.6E-05 ± 1.6E-06	2.6E-05 ± 9.1E-07				
Pyridoxine			N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.	N.A. ± N.A.				
Pyrophosphate			3.5E-03 ± 3.0E-04	3.4E-03 ± 1.0E-04	3.4E-03 ± 4.6E-04	3.3E-03 ± 1.2E-04				
Pyruvic acid		565 ± 20	1.0E-02 ± 3.7E-04	9.4E-03 ± 4.2E-04	9.8E-03 ± 2.9E-04	9.6E-03 ± 3.4E-04	538 ± 19			
Ribavirin	*		N.A. ± N.A.	3.3E-05 ± 4.3E-06 *	3.3E-05 ± 2.9E-04	N.A. ± N.A.				
Riboflavin			1.8E-04 ± 1.6E-05	1.8E-04 ± 2.1E-05	1.8E-04 ± 2.4E-05	1.7E-04 ± 6.9E-06				
Ribose 5-phosphate		5.9 ± 0.4	2.3E-04 ± 1.7E-05	2.3E-04 ± 2.1E-06	2.5E-04 ± 2.7E-05	2.2E-04 ± 5.8E-05	4.9 ± 0.7			
Ribulose 5-phosphate		6.2 ± 0.5	2.1E-04 ± 1.7E-05	2.5E-04 ± 2.8E-05	2.2E-04 ± 5.4E-05	1.9E-04 ± 1.7E-05	5.3 ± 1.3			
S-Adenosylmethionine	***	0.15 ± 0.03	1.1E-05 ± 2.4E-06	9.4E-06 ± 1.8E-06	9.2E-06 ± 2.6E-06	9.2E-06 ± 2.6E-06	N.A. ± N.A. ***			
Saccharopine			2.8E-05 ± 4.0E-06	2.9E-05 ± 3.5E-06	2.8E-05 ± 3.0E-06	2.8E-05 ± 2.0E-06				
Sarcosine		0.6 ± 0.13	7.6E-05 ± 1.7E-05	8.5E-05 ± 1.2E-05	7.3E-05 ± 8.4E-06	7.9E-05 ± 1.0E-05	0.7 ± 0.05			
Sedolentulose 7-phosphate		9.6 ± 1.8	3.5E-04 ± 6.4E-05	3.1E-04 ± 1.3E-05	3.3E-04 ± 2.5E-05	3.3E-04 ± 1.1E-05	8.9 ± 0.6			
Spermidine		1.6 ± 0.07	2.0E-04 ± 8.3E-06	1.6 ± 0.10	1.9E-04 ± 1.6E-05	1.6 ± 0.15	2.0E-04 ± 1.9E-05	1.6 ± 0.09		
Spermine		1.6 ± 0.2	5.1E-05 ± 6.6E-06	2.0 ± 0.3	6.4E-05 ± 9.6E-06	6.3E-05 ± 2.9E-06	2.2 ± 0.2			
Sucaldine			2.8E-04 ± 1.0E-05	2.8E-04 ± 1.1E-05	2.9E-04 ± 1.0E-05	2.8E-04 ± 3.9E-06				
Succinic acid	***	310 ± 6.6	1.4E-02 ± 9.4E-04	1.2E-02 ± 1.1E-04 ***	1.1E-02 ± 1.0E-04 ***	1.1E-02 ± 1.1E-04 ***	264 ± 4.8			
Sucrose 6'-phosphate			3.1E-03 ± 1.5E-04	3.1E-03 ± 8.2E-05	3.1E-03 ± 8.2E-05	3.2E-03 ± 7.9E-05	3.1E-03 ± 1.3E-04			
Symmetric dimethylarginine			1.2E-04 ± 1.1E-05	1.2E-04 ± 5.5E-06	1.3E-04 ± 1.5E-05	1.3E-04 ± 9.4E-06				
Taurine			6.0E-05 ± 4.0E-06	6.5E-05 ± 6.8E-06	6.7E-05 ± 2.3E-06	6.8E-05 ± 7.9E-06				
Terephthalic acid			5.0E-04 ± 1.6E-05	4.4E-04 ± 3.7E-05	4.9E-04 ± 2.1E-05	4.7E-04 ± 5.3E-05				
Thiamine			1.8E-04 ± 2.1E-05	1.9E-04 ± 1.3E-05	1.7E-04 ± 2.1E-05	1.9E-04 ± 5.0E-06				
Thiamine phosphate			3.5E-05 ± 1.3E-07	3.6E-05 ± 1.3E-07	3.4E-05 ± 3.1E-06	3.2E-05 ± 2.8E-06				
threo-β-Methylaspartic acid			4.1E-05 ± 6.3E-07	4.0E-05 ± 3.8E-06	4.0E-05 ± 3.8E-06	3.8E-05 ± 6.0E-06				

Table 4-1 (continued)

Compound name	One-way ANOVA ^a			Y-80 ^b			Y-90 ^b			Y-100 ^b			Y-110 ^b		
	Concentration (μM) ^c	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^e	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^e	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^e	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^e	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^e	Relative area values ^d	Concentration (μM) ^e	Relative area values ^d	
Threonine acid		1.0E-03 ± 3.3E-05		1.0E-03 ± 2.8E-05		1.1E-03 ± 7.7E-05		1.1E-03 ± 7.7E-05		1.1E-03 ± 7.7E-05		1.1E-03 ± 7.7E-05		1.1E-03 ± 7.7E-05	
Thymidine		3.5E-05 ± N.A.		4.3E-05 ± N.A.		9.9E-04 ± 2.8E-05		9.9E-04 ± 2.8E-05		9.9E-04 ± 2.8E-05		9.9E-04 ± 2.8E-05		9.9E-04 ± 2.8E-05	
trans-Glutaconic acid	***	1.1E-03 ± 1.5E-05		2.2E-03 ± 8.9E-05		2.1E-03 ± 8.9E-05		2.1E-03 ± 8.9E-05		2.1E-03 ± 8.9E-05		2.1E-03 ± 8.9E-05		2.1E-03 ± 8.9E-05	
Trehalose 6-phosphate		2.0E-05 ± N.A.		1.6E-05 ± N.A.		2.2E-05 ± 1.5E-05		2.2E-05 ± 1.5E-05		2.2E-05 ± 1.5E-05		2.2E-05 ± 1.5E-05		2.2E-05 ± 1.5E-05	
Triethanolamine		2.5E-05 ± N.A.		2.7E-04 ± 1.8E-06		2.4E-04 ± 2.7E-05		2.4E-04 ± 2.7E-05		2.4E-04 ± 2.7E-05		2.4E-04 ± 2.7E-05		2.4E-04 ± 2.7E-05	
Trigonelline		2.7E-04 ± 2.0E-05		2.6E-03 ± 1.7E-04		2.4E-03 ± 3.3E-04		2.4E-03 ± 3.3E-04		2.4E-03 ± 3.3E-04		2.4E-03 ± 3.3E-04		2.4E-03 ± 3.3E-04	
Trimethylamine		2.6E-03 ± 1.7E-04		7.5E-05 ± 2.8E-07		6.4E-05 ± 4.9E-07		6.4E-05 ± 4.9E-07		6.4E-05 ± 4.9E-07		6.4E-05 ± 4.9E-07		6.4E-05 ± 4.9E-07	
Trimethylamine N-oxide		N.A. ± N.A.		N.A. ± N.A.		0.06 ± N.A.		0.06 ± N.A.		0.06 ± N.A.		0.06 ± N.A.		0.06 ± N.A.	
Trimethylsulfonium		4.8E-05 ± 9.3E-06		4.4E-05 ± 1.3E-06		4.9E-05 ± 4.5E-06		4.9E-05 ± 4.5E-06		4.9E-05 ± 4.5E-06		4.9E-05 ± 4.5E-06		4.9E-05 ± 4.5E-06	
Tyramine		6.3E-03 ± 1.1E-04		6.2E-03 ± 1.9E-04		6.3E-03 ± 1.6E-04		6.3E-03 ± 1.6E-04		6.3E-03 ± 1.6E-04		6.3E-03 ± 1.6E-04		6.3E-03 ± 1.6E-04	
Tyrosine methyl ester		N.A. ± N.A.		N.A. ± N.A.		1.8 ± 0.4		1.8 ± 0.4		1.8 ± 0.4		1.8 ± 0.4		1.8 ± 0.4	
Uric acid	*	N.A. ± N.A.		8.5E-05 ± 1.1E-05		9.2E-05 ± 2.2E-05		9.2E-05 ± 2.2E-05		9.2E-05 ± 2.2E-05		9.2E-05 ± 2.2E-05		9.2E-05 ± 2.2E-05	
Uridine 5'-diphosphate	***	4.5E-04 ± 9.6E-06		3.9E-04 ± 2.2E-05		4.6E-04 ± 2.4E-05		4.6E-04 ± 2.4E-05		4.6E-04 ± 2.4E-05		4.6E-04 ± 2.4E-05		4.6E-04 ± 2.4E-05	
Uridine diphosphate glucose															
Uridine diphosphate galactose															
Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine															
Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine															
Uridine 5'-monophosphate		4.0 ± 0.3		1.6E-04 ± 1.2E-05		1.8E-04 ± 4.9E-06		1.7E-04 ± 6.6E-06		1.7E-04 ± 6.6E-06		1.7E-04 ± 6.6E-06		1.7E-04 ± 6.6E-06	
β-Hydroxyisovaleric acid		2.4E-04 ± 2.6E-05		2.5E-04 ± 1.2E-05		2.4E-04 ± 1.3E-05		2.4E-04 ± 1.3E-05		2.4E-04 ± 1.3E-05		2.4E-04 ± 1.3E-05		2.4E-04 ± 1.3E-05	
γ-Aminobutyric acid		243 ± 13		3.5E-02 ± 1.1E-03		3.5E-02 ± 1.9E-03		3.3E-02 ± 1.2E-03		3.3E-02 ± 1.2E-03		3.3E-02 ± 1.2E-03		3.3E-02 ± 1.2E-03	
γ-Butyrobetaine				3.3E-03 ± 5.3E-05		3.2E-03 ± 7.7E-05		3.3E-03 ± 7.7E-05		3.3E-03 ± 7.7E-05		3.3E-03 ± 7.7E-05		3.3E-03 ± 7.7E-05	
γ-Glu-2-aminobutyric acid	***			5.1E-05 ± 3.6E-06		5.7E-05 ± 2.3E-06		4.6E-05 ± 3.3E-06		4.6E-05 ± 3.3E-06		3.9E-05 ± 2.1E-06		4.0E-05 ± 2.0E-06	
unknown 1				N.A. ± N.A.		3.1E-04 ± N.A.		N.A. ± N.A.		N.A. ± N.A.		N.A. ± N.A.		N.A. ± N.A.	
unknown 2				2.4E-03 ± 2.0E-04		2.4E-03 ± 4.0E-05		2.4E-03 ± 4.0E-05		2.4E-03 ± 4.0E-05		2.4E-03 ± 4.0E-05		2.4E-03 ± 4.0E-05	
unknown 3				2.4E-04 ± 2.0E-05		2.3E-04 ± 1.7E-05		2.3E-04 ± 1.7E-05		2.3E-04 ± 1.7E-05		2.3E-04 ± 1.7E-05		2.3E-04 ± 1.7E-05	
unknown 4				1.4E-04 ± 1.0E-05		1.3E-04 ± 6.6E-06		1.4E-04 ± 1.1E-06		1.4E-04 ± 1.1E-06		1.4E-04 ± 1.1E-06		1.3E-04 ± 9.9E-06	
unknown 5				2.8E-05 ± 4.3E-06		2.9E-05 ± 2.4E-06		3.0E-05 ± 1.0E-06		2.9E-05 ± 2.8E-06		2.9E-05 ± 2.8E-06		2.9E-05 ± 5.8E-06	
unknown 6				1.6E-03 ± 1.2E-04		1.6E-03 ± 1.5E-05		1.6E-03 ± 1.1E-05		1.6E-03 ± 1.1E-05		1.6E-03 ± 1.1E-05		1.5E-03 ± 8.1E-05	
unknown 7				3.4E-05 ± 6.1E-06		3.6E-05 ± 2.5E-06		3.0E-05 ± 2.5E-06		3.0E-05 ± 2.5E-06		3.1E-05 ± 2.9E-06		3.1E-05 ± 2.9E-06	
unknown 8				3.9E-05 ± 3.2E-06		4.1E-05 ± 2.0E-06		4.2E-05 ± 2.7E-06		3.9E-05 ± 4.7E-06		3.9E-05 ± 4.7E-06		3.5E-05 ± 2.8E-07	
Amino acids															
Ala	***	83 ± 3.3		1.0E-02 ± 4.1E-04		67 ± 1.1		8.8E-03 ± 2.5E-04		8.8E-03 ± 2.5E-04		9.1E-03 ± 4.3E-04		9.1E-03 ± 4.3E-04	
Arg	***	21 ± 1.3		2.8E-03 ± 1.7E-04		21 ± 0.3		2.8E-03 ± 4.2E-05		2.8E-03 ± 4.2E-05		2.0E-03 ± 2.5E-05		2.0E-03 ± 2.5E-05	
Asn	**	23 ± 0.4		2.3E-03 ± 3.7E-05		22 ± 0.2		2.2E-03 ± 2.2E-05		2.2E-03 ± 2.2E-05		2.2E-03 ± 2.2E-05		2.2E-03 ± 2.2E-05	
Asp	***	13 ± 0.8		1.5E-03 ± 9.5E-05		11 ± 0.2		1.3E-03 ± 2.4E-05		1.3E-03 ± 2.4E-05		1.3E-03 ± 2.1E-05		1.3E-03 ± 2.1E-05	
Cys	***	0.3 ± 0.05		3.2E-05 ± 5.1E-06		0.4 ± 0.02		3.6E-05 ± 2.3E-06		3.6E-05 ± 2.3E-06		4.0E-05 ± 5.4E-06		4.0E-05 ± 5.4E-06	
Gln	***	11 ± 0.7		1.2E-03 ± 8.0E-05		8.6 ± 0.5		9.3E-04 ± 5.2E-05		9.3E-04 ± 5.2E-05		1.0E-03 ± 2.4E-05		1.0E-03 ± 2.4E-05	
Glu	***	43 ± 2.0		4.7E-03 ± 2.2E-04		33 ± 0.6		3.6E-03 ± 7.0E-05		3.6E-03 ± 7.0E-05		5.1E-03 ± 9.4E-05		5.1E-03 ± 9.4E-05	
Gly	***	9.1 ± 0.3		6.9E-04 ± 1.9E-05		5.8 ± 0.2		4.4E-04 ± 1.7E-05		4.4E-04 ± 1.7E-05		4.3E-04 ± 3.2E-05		4.3E-04 ± 3.2E-05	
His	***	2.6 ± 0.4		4.3E-04 ± 6.9E-05		2.0 ± 0.09		3.4E-04 ± 2.8E-05		3.4E-04 ± 2.8E-05		3.1E-04 ± 1.8E-05		3.1E-04 ± 1.8E-05	
Ile	***	51 ± 0.6		1.2E-02 ± 1.4E-04		47 ± 1.7		1.1E-02 ± 4.1E-04		1.1E-02 ± 4.1E-04		1.0E-02 ± 6.7E-05		1.0E-02 ± 6.7E-05	
Leu	*	151 ± 6.5		3.0E-02 ± 1.3E-03		145 ± 3.0		2.9E-02 ± 5.9E-04		2.9E-02 ± 5.9E-04		2.7E-02 ± 1.2E-03		2.7E-02 ± 1.2E-03	
Lys	***	23 ± 0.9		2.2E-03 ± 8.3E-05		19 ± 0.5		1.7E-03 ± 4.5E-05		1.7E-03 ± 4.5E-05		1.6E-03 ± 2.3E-05		1.6E-03 ± 2.3E-05	
Met	***	17 ± 0.7		2.1E-03 ± 9.0E-05		18 ± 0.9		2.3E-03 ± 8.3E-05		2.3E-03 ± 8.3E-05		2.3E-03 ± 8.3E-05		2.3E-03 ± 8.3E-05	
Phe	***	6.4 ± 0.2		1.2E-03 ± 3.0E-05		5.1 ± 0.13		9.3E-04 ± 4.7E-05		9.3E-04 ± 4.7E-05		9.4E-04 ± 6.0E-06		9.4E-04 ± 6.0E-06	
Pro	***	22 ± 1.0		3.7E-03 ± 1.7E-04		20 ± 0.2		3.2E-03 ± 3.7E-05		3.2E-03 ± 3.7E-05		2.9E-03 ± 4.0E-05		2.9E-03 ± 4.0E-05	
Ser	***	31 ± 0.07		6.6E-03 ± 1.6E-05		35 ± 0.6		7.5E-03 ± 1.3E-04		7.5E-03 ± 1.3E-04		5.4E-03 ± 1.3E-04		5.4E-03 ± 1.3E-04	
Thr	***														
Tyr	***														
Val	***														

^a: Significant differences were observed regarding the values of relative area of Y-0 using one-way ANOVA. Significant differences are shown as *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

^b: Y-0 are samples without the secondary pasteurization and Y-80, -90, -100, and -110 are samples with the secondary pasteurization performed at 80, 90, 100, or 110 °C for 30 seconds.

^c: Substances for which quantitative values could be measured by CE-TOFMS. Significant differences were shown as *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

^d: Relative area values ± standard deviation as measured by CE-TOFMS. Significant differences were observed using the Dunnett's test. Significant differences were shown as *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

^e: Concentration values ± standard deviation as measured by CE-TOFMS. Significant differences were observed using the Dunnett's test. Significant differences were shown as *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

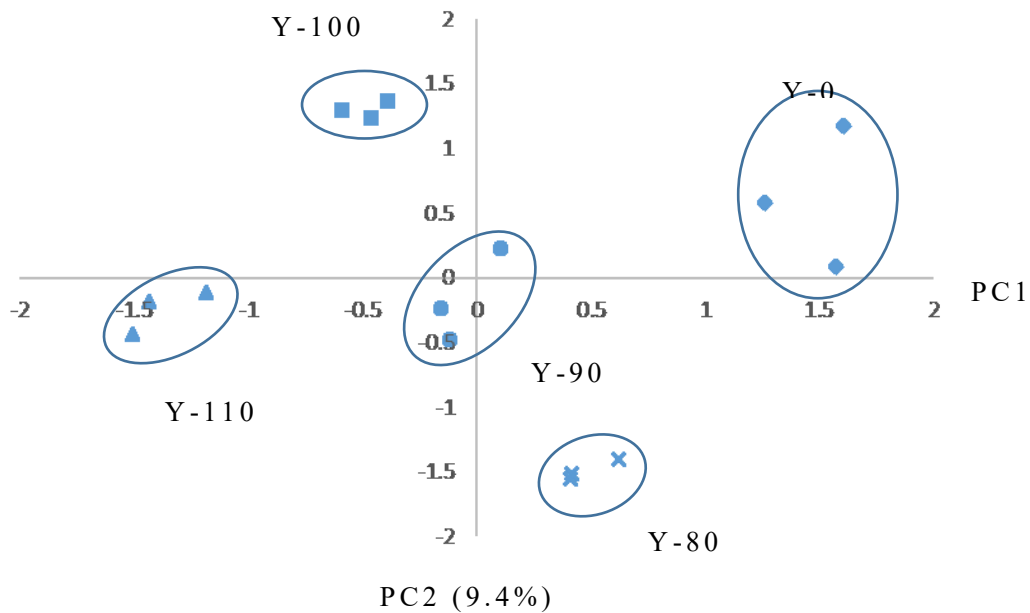


Fig.4-1. The result of principal component analysis (PCA)
 PCA was performed using the relative area values of the 221 components detected by CE-TOF/MS. Y-0 indicates samples without the secondary pasteurization and Y-80, -90, -100, and -110 are samples with the secondary pasteurization performed at 80, 90, 100, or 110 °C for 30 seconds.

Table 4-2. Top and bottom four substances in the factor loadings of PC1

Compound name	PC1 factor loading ^a
trans-Glutaconic acid	0.93
Succinic acid	0.93
Malic acid	0.90
S-Adenosylmethionine	0.84
Nicotinamide	-0.87
Cytidine	-0.84
5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine	-0.79
N-Acetylneuraminic acid	-0.77

^a: CE-TOFMS was performed on Y-0, -80, -90, -100, and -110 samples. Y-0 indicates samples without the secondary pasteurization and Y-80, -90, -100, and -110 are samples with the secondary pasteurization performed at 80, 90, 100, or 110 °C for 30 seconds. Principal component analysis was performed using the relative area values of the 221 substances measured. PC1 factor loadings are shown in this table.



Fig. 4-2. Relative changes in substance during secondary pasteurization

(a), (b), (c) and (d) show the top four substances with the highest positive factor loadings of PC1, based on principal component analysis (PCA). (e), (f), (g) and (h) show the top four substances with the highest negative factor loadings of PC1, based on PCA. (a) trans-Glutaconic acid, (b) Succinic acid, (c) Malic acid, (d) S-Adenosylmethionine (e) Nicotinamide, (f) Cytidine, (g) 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine (h) N-Acetylneuraminic acid. Y-0 indicates samples without the secondary pasteurization and Y-80, -90, -100, and -110 are samples with the secondary pasteurization performed at 80, 90, 100, or 110 °C for 30 seconds. Relative area values were measured by CE-TOFMS. Error bars represent the standard deviation. Significant differences compared to Y-0 were tested by the Dunnett's test and significant differences were shown with asterisks; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, and *** : $P < 0.001$.

Table 4-3. Quantitative value of Maillard substances included in Y-90 and YD90

Compound name	ADI ^a [mg/kg bw]	Quantitative value of Y-90 ^b [mg/100g]	Quantitative value of YD90 ^b [mg/100g]
Furfural	< 0.5 ^c	0.04	0.74
Furfuryl alcohol	< 0.5 ^c	0.14	0.34
2-Acetylfuran	No safety concern ^d	0.004	0.05
5-Methyl-2-furfural	No setting ^e	0.003	0.02

^a: Acceptable daily intake (ADI) indicated the permissible daily intake determined by FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA).

^b: Quantitative values were calculated by measuring and comparing known concentrations of individual substances by GC-MS.

^c: This substances ADI was defined as "upto 0.5 mg/kg body weight per day" by JECFA.

^d: This substances ADI was defined as "no safety concern at current levels of intake when used as a flavouring agent" by JECFA.

^e: There is no ADI setting, but it has been reported no relevance for humans concerning carcinogenic and genotoxic effects can be derived (Abraham et al. 2011).

第 5 章 結論

5 - 1 . 総括

第 1 章では、LL ヨーグルトの特徴と本研究の意義を説明した。LL ヨーグルトは特に新興国で大きな市場を持ち、その製品特徴から今後さらなる喫食頻度拡大が期待されている商品である。発酵後に加熱処理を行い、乳酸菌も含めた微生物を死滅させていることにより、常温で長期間保存が可能という特徴を有し、その特徴が故に、LL ヨーグルトではホエイ分離などの物性安定性と風味変化が大きな課題となる。物性安定性を正確に評価するためには賞味期限と同じ時間を要し、長い開発期間を必要とすることから、市場のニーズに適した商品をタイムリーに提供できないという問題があった。本研究では、物性評価において、正確かつ迅速に予測するモデルを確立することで、適切な賞味期限を決定し、物性に影響を与える因子の分析を可能とすることを目指した。また、常温保存による風味変化の研究はほとんど実施されていないため、LL ヨーグルトを常温で保存した際のオフフレーバーの関与物質とその生成経路の推測を行った。これらを解明することにより、より長い賞味期限をもった LL ヨーグルトの開発に寄与することが期待される。

第 2 章では、タービスキャンを用いた LL ヨーグルト常温長期保存時の物性安定性に関する迅速判定モデルの開発を行った。TSI を説明変数としたモデルはドリンクヨーグルトの安定性を評価するために既に使用されている粘度、粒子径、沈殿およびゼータ電位のような物理的測定に基づく他のモデルよりも汎用性が高く、25°C 48 時間保存後のタイミングにて、25°C 90 日保存後のホエイ分離状態を高精度に予測することが可能であった。本モデルは、LL ヨーグルトの物性安定性を高めるのに最適な製造条件と最適な処方を選択するのに利用できるだけでなく、不安定化因子の作用機構を解明するための強力なツールに

なり得る。また、LLヨーグルトの製造に必要な2回の殺菌について、一次殺菌は物性安定性に影響を与えないが、二次殺菌は有意に物性安定性に影響を与えるため、物性が安定したヨーグルトを製造するには二次殺菌条件の最適化が必要であることが明らかとなった。

第3章では、LLヨーグルトを常温保存した際に特異に発生するオフフレーバーの原因物質とそのメカニズムを官能評価、GC-MS、GC-Oを用いて確認した。結果として、複数の反応が複合的にオフフレーバーの香気強度増加に寄与していることが明らかとなった。第1に、耐熱性リパーゼに起因すると思われる脂肪分解による脂肪酸の生成により rancid 臭が増加すること、第2に、diacetyl のようなヨーグルト様の香気物質の減少がみられ、オフフレーバーのマスキング能力が低下し、結果的にオフフレーバーが強く感じられるようになった可能性があること、第3に、メイラード反応が進行し、furanol や sotolon といった良質な香気物質がほぼ完全に分解されていることが明らかとなり、その結果、同様にマスキング能力が低下し、オフフレーバーが強く感じられるようになった可能性がある。第4に、本研究においてヨーグルトで初めて検出され、常温90日保存の間に約10倍に増加した 4-vinylguaiacol がオフフレーバー物質の一つであることが示唆された。

第4章では、LLヨーグルトの製造に必要な二次殺菌が生理活性成分に与える影響についてキャピラリー電気泳動飛行時間型分析装置を用いて確認した。その結果、殺菌温度に応じて増減する物質が存在し、二次殺菌が代謝産物へ影響を与えることが明らかとなった。増加、減少、変化のない代表的な物質について報告されている生理機能の全体像からは、二次殺菌は好ましい影響を与えていると考えられる。殺菌温度が高いほどこの傾向は顕著になったことから、本研究で検討した殺菌温度帯では殺菌温度が高いほど生理機能に良好な影響を与える可能性が示唆された。また、常温保存した際に最も懸念されるのはメイ

ラード反応が進行することによる AGEs の影響である。本研究で増加が確認されたメイラード反応生成物質を定量したところ、増加してはいるものの、ADI の観点から健康に悪影響を与える量であるとはいえず、大きな影響がないことが示唆された。

以上のように、殺菌ヨーグルトの製造に必要な二次殺菌や常温で保存した際の影響について、物性安定性、風味、生理機能の多方面から確認を行った。その結果として、物性安定性の面からは二次殺菌温度が低いことが好ましく、生理機能としては二次殺菌温度が高い方が好ましいことが示唆された。このことから、LL ヨーグルトを市販化する際には、目的に応じた殺菌条件を選定することが重要である。また、物性安定性要求度が高く、賞味期限の長い LL ヨーグルトを開発する際には、タービスクャンを用いた本研究モデルを用いて開発サイクルを高速化することで、より安定した物性をもつ処方、工程の検討が容易になる。風味の面においては、常温保存時には特有の反応があることが明らかとなったため、本研究で明らかとなった脂肪酸や 4-vinylguaiacol をマスキングしつつ、diacetyl などの発酵臭成分を付加した風味設計が必要となるであろう。可能であれば、これらの物質が常温保存中に生成しにくい処方を検討することが望ましい。さらに、生理機能関与物質の観点からは、LL ヨーグルトは生菌ヨーグルトと同等以上の生理機能を有していることが示唆されたため、LL ヨーグルトも生菌ヨーグルトと同様に健康促進に貢献できる可能性が高い。これらのことから、本研究における成果は LL ヨーグルトの研究や品質の高い製品の開発に大いに役立つと考えている。

5 - 2 . 今後の展望

物性面としては、LL ヨーグルトの安定性に影響する因子である、発酵後の均質圧力、均質温度、乳タンパク質濃度および LL ヨーグルトに含まれる糖含

量のような、本研究で検証されていない製造条件および処方が与える影響とそれが本モデルで通用するのかを検証し、より長い期間安定した物性を保てる製品の開発に貢献したい。

風味面では脂肪や糖やスターターの種類の影響を精査する必要がある。また、25℃よりも高い温度で保存された場合に反応が促進されるだけなのか、まったく異なる反応が起こるのかを確認し、より長い期間、様々な条件で安定した風味を担保する必要がある。そのためにも、風味についての加速試験が行えるように、アレニウスの式を参考に加速モデルを研究していく必要がある。

栄養面ではキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置以外の測定法による調査を実施することや、臨床試験での効果の確認およびその作用機序を調査し、生理機能に関する知見をより深めて人々の健康増進に貢献していく必要がある。

本研究では市場の大半を占めるドリンクタイプの研究を行ったが、ソフトタイプ、ハードタイプ、濃縮タイプ、フルーツ入りなどヨーグルトには様々な種類が存在する。本研究の成果を他のタイプにも活かし、バラエティ豊かな LL ヨーグルト市場の形成にも貢献していきたいと考えている。

謝辞

宇都宮大学 農学部応用生命化学科 食品生化学研究室 東徳洋 教授には、本論文作成の機会を与えていただくと共に、論文の作成全般から審査も含めて終始ご懇切なるご指導とご高閲を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

茨城大学 農学部食生命科学科 上妻由章 教授、東京農工大学 農学研究院 応用生命化学部門 三浦豊 教授、宇都宮大学 農学部応用生命化学科 橋本啓 教授、水重貴文 准教授には、本論文をご審査いただくと共に、大変有益なご助言を多数いただきました。深く感謝申し上げます。

宇都宮大学 農学部応用生命化学科 食品生化学研究室 講師 山田潔 博士には、研究構成などでご相談させて頂き、有益なご助言を賜り深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、全面的なご理解とご支援を与えていただきました 森永乳業株式会社 宮原道夫 代表取締役社長 大川禎一郎 代表取締役副社長、常務執行役員・研究本部 阿部文明 本部長には、謹んで感謝の意を表します。

同社 執行役員・研究本部食品開発研究所 武田安弘 所長には、本研究をまとめる切っ掛けをいただき、また前健康栄養科学研究所長として多大なるご支援をいただきました。謹んで感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、以下の方々には多くのご協力をいただきました。本論文の執筆と実験の実施にあたり、同社 研究本部食品開発研究所 発酵乳グループ 井上肇 グループ長、丸山広志 マネージャー、栗野靖之 研究員、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 第二事業部香料基礎研究室 今吉有理子 課長、村上裕介 マネージャー、平田俊介 氏には、研究開始当初より甚大なるご協力をいただきました。衷心より感謝いたします。また、本研究における実

験、分析および解析において多大なご協力をいただきましたヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社 営業部 金桂花 博士、営業・マーケティング本部ヘルスケアセールス部 溝口祥子 氏、森永乳業株式会社 研究本部 研究企画部 総合管理グループ 小澤和夫 社員、山田洋志 元社員、同本部食品開発研究所 発酵乳グループ 片倉佑理子 社員他同グループの皆様、同本部フードソリューション研究所 食嗜好研究グループ 小泉玲子 グループ長他同グループ、同本部健康栄養科学研究所 瀬戸菜実子 研究員他栄養機能研究グループ、同本部素材応用研究所 機能素材開発グループおよびバイオプロセス開発グループ、品質保証本部品質管理部の関係者の方々に深く感謝いたします。

他にも、ここにお名前を記すことのできなかつた多くの方々のご支援とご協力のもとで本研究を実施し、本論文をまとめることができました。ご関係の皆様に改めて心から感謝申し上げます。

最後に、本研究遂行の支えとなってくれた家族に感謝いたします。

2021年3月 宮地 一裕

引用文献

- 井戸田正，松岡康浩，菅原牧裕，村上雄二，and 伊井直記．1994．“人乳シアル酸含量の泌乳期変化．” 日本栄養・食料学会誌 47: 357-62
- 香川芳子．2016．食品成分表2016．東京：女子栄養大学出版部
- 梶本修身，平田洋，青江誠一郎，高橋丈生，鈴木豊，and 田中博．2002．“境界域および軽度高コレステロール血症に対し*Lactobacillus gasseri*（ガセリ菌SP株）を含有する発酵乳は血清コレステロール値を低下させる．” *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria* 13 (2): 114-24
- 梶本修身，平田洋，中川聡史，梶本佳孝，早川和仁，and 木村雅行．2004．“GABA含有はっ酵乳製品の正常高値血圧者に対する降圧効果．” 日本食品科学工学会誌 51 (2): 79-86
- 蟹沢恒好．2010．香り-それはどのようにして生成されるのか-．東京：フレグランスジャーナル
- 上西一弘，江澤郁子，梶本雅俊，and 土屋文安．1998．“日本人若年成人女性における牛乳，小魚（ワカサギ，イワシ），野菜（コマツナ，モロヘイヤ，オカヒジキ）のカルシウム吸収率．” 日本栄養・食糧学会誌 51 (5): 259-66
- 絹巻明生，小原義隆，春日修，小野沢正人，三澤均，高木紀美子，千葉栄次，et al．2001．“ヒト由来の*Lactobacillus gasseri* SBT2055 および*Bifidobacterium longum* SBT2928を加えて調製した発酵乳の摂取による健常成人での便通，便性および糞便内細菌叢への影響．” *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria* 12 (2): 92-101
- 経済産業省 商務情報政策局 情報経済課．2019．“平成30年度 我が国におけるデータ駆動型社会に係る基盤整備（電子商取引に関する市場調査）報告書．”

- 国際連合食糧農業機関. 2011. “世界の食料ロスと食料廃棄.”
- サイバーエージェント 次世代生活研究所. 2020. “with コロナにおける日本人の消費行動とメディア行動の変化について.”
<https://www.cyberagent.co.jp/news/detail/id=24982>
- 齋藤忠夫, 伊藤裕之, 岩附慧二, and 吉岡俊満 編. 2016. ヨーグルトの事典. 東京: 朝倉書店
- 菅原宏祐. 2017. “ヒト常在性ビフィズス菌の生理機能に関する研究.” 腸内細菌学会誌 31: 179-85
- 富永圭一, 草野浩治, 小池健郎, 櫻井紘子, 前田光徳, and 平石秀幸. 2012. “災害医療 消化器疾患.” *Dokkyo Journal of Medical Sciences* 39(3): 259-64
- 農林水産省. 2020. “食品ロス量（平成 29 年度推定値）の公表について.”
<https://www.maff.go.jp/j/press/shokusan/kankyoi/200414.html>
- 古川壮一, 平山悟, and 森永康. 2014. “微生物の共存・共生と伝統的発酵.” *Journal of the Brewing Society of Japan* 109 (4): 228-38.
<https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan.109.228>
- 前畑葉月 and 村田麻衣. 2019. “*Lactobacillus paracasei* MCC1849の免疫賦活作用と食品への応用.” *Milk Science* 68 (3): 180-7.
<https://doi.org/10.11465/milk.68.180>
- 松本光晴, 今井哲哉, 廣中貴宏, 久米仁司, 渡辺正利, and 辨野義己. 2001. “*Bifidobacterium Lactis* LKM512株含有ヨーグルトのヒト糞便菌叢および便性改善に及ぼす影響.” 腸内細菌学会誌 14 (2): 97-102.
<https://doi.org/10.11209/jim1997.14.97>
- 宮澤賢司, 依田一豊, 原田岳, 井田恵, 平山伊知郎, 何方, and 平松優. 2017. “*Lactobacillus rhamnosus* GG株の摂取による便秘傾向な女性の排便および皮膚に及ぼす影響.” *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria* 28 (1): 12-

7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00007-0>

森山達也. 2007. アミノ酸の生理機能. 東京: 朝倉書店

矢野経済研究所. 2019. “食品宅配市場規模推移.” https://www.yano.co.jp/press-release/show/press_id/2242

吉田眞次. 1999. 味とにおいの分子認識. 東京: 学会出版センター

Aalaei, K., Rayner, M., and Sjöholm, I. 2019. “Chemical methods and techniques to monitor early Maillard reaction in milk products; A review.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59 (12): 1829-39.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1431202>

Abraham, K., Gürtler, R., Berg, K., Heinemeyer, G., Lampen, A., and Appel, K.E. 2011. “Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food.” *Molecular Nutrition & Food Research* 55 (5): 667-78.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201000564>

Acree, T.E., Barnard, J., and Cunningham, D.G. 1984. “A Procedure for the Sensory Analysis of Gas Chromatographic Effluents.” *Food Chemistry* 14 (4): 273-86. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90082-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90082-7)

Adams, C.A. 2010. “The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers.” *Nutrition Research Reviews* 23 (1): 37-46.

<https://doi.org/10.1017/S0954422410000090>

Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., and Hernández-Mendoza, A. 2018.

“Postbiotics: An evolving term within the functional foods field.” *Trends in Food Science & Technology* 75: 105-114.

<https://doi.org/10.1016/J.tifs.2018.03.009>

- Amice-Quemeneur, N., Haluk, J.-P., Hardy, J., and Kravtchenko, T.P. 1995.
“Influence of the Acidification Process on the Colloidal Stability of Acidic Milk Drinks Prepared from Reconstituted Nonfat Dry Milk.” *Journal of Dairy Science* 78 (12): 2683-90. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76899-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76899-0)
- Andrewes, P. 2018. “Indirect detection of lipase in UHT milk by measuring methyl ester formation.” *International Dairy Journal* 79: 1-4.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.012>
- Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I., Simov, Z.I., and Adilov, E.F. 1998. “Production of Amino Acids by Yogurt Bacteria.” *Biotechnology Progress* 14 (6): 963-5. <https://doi.org/10.1021/bp980082j>
- Blank, I., Fay, L.B., Frederick, F., Lakner, J., and Schlosser, M. 1997.
“Determination of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 2(or 5)-Ethyl-4-hydroxy-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone in Pentose Sugar-Based Maillard Model Systems by Isotope Dilution Assays.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (7): 2642-8. <https://doi.org/10.1021/jf960997i>
- Blecker, C., Habib-Jiwan, J.-M., and Karoui, R. 2012. “Effect of heat treatment of rennet skim milk induced coagulation on the rheological properties and molecular structure determined by synchronous fluorescence spectroscopy and turbiscan.” *Food Chemistry* 135 (3): 1809-17.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.035>
- Bockelmann, B. and Bockelmann, I. (1998). *Long-Life Products: Heat-Treated, Aseptically Packed: A Guide to Quality*. Sweden: Tetra Pak
- Boekel, M.A.J.S. 1998. “Effect of heating on Maillard reactions in milk.” *Food Chemistry* 62 (4): 403-14
- Boge, T., Rémiguy, M., Vaudaine, S., Tanguy, J., Bourdet-Sicard, R., and van der

- Werf, S. 2009. "A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials." *Vaccine* 27 (41): 5677-84.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.094>
- Carlson, S.E. 1985. "N-Acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation." *American Journal of Clinical Nutrition* 41 (4): 720-6. <https://doi.org/10.1093/ajcn/41.4.720>
- Celestino, E.L., Iyer, M., and Roginski, H. 1997. "Reconstituted UHT-treated Milk: Effects of Raw Milk, Powder Quality and Storage Conditions of UHT Milk on its Physico-Chemical Attributes and Flavour." *International Dairy Journal* 7 (2-3): 129-40. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(96\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00042-8)
- Cheng, H. 2010. "Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50 (10): 938-50.
<https://doi.org/10.1080/10408390903044081>
- CODEX STAN 243-2003. "CODEX STANDARD FOR FERMENTED MILKS"
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., and Delvaux, F.R. 2004. "Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (3): 602-8.
<https://doi.org/10.1021/jf0346556>
- Dan, T., Chen, H., Li, T., Tian, J., Ren, E., Zhang, H., and Sun, T. 2019. "Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on Fermented Milk Flavor and Storage Stability." *Frontiers in Microbiology* 9. 3133: 1-14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03133>
- Dan, T., Wang, D., Wu, S., Jin, R., Ren, W., and Sun, T. 2017. "Profiles of

Volatile Flavor Compounds in Milk Fermented with Different Proportional Combinations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*.” *Molecules* 22 (10): 1633.

<https://doi.org/10.3390/molecules22101633>

Dannenberg, F. and Kessler, H.G. 1987. “Untersuchungen zur Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung und deren technologischer Bedeutung.” *Chemie Ingenieur Technik* 59 (7): 575-7. <https://doi.org/10.1002/cite.330590708>

De Kruif, C.G. 1998. “Supra-aggregates of Casein Micelles as a Prelude to Coagulation.” *Journal of Dairy Science* 81 (11): 3019-28.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75866-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75866-7)

De Kruif, C.G. 1999. “Casein micelle interactions.” *International Dairy Journal* 9(3-6): 183-8. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00058-8)

Deshpande, G., Athalye-Jape, G., and Patole, S. 2018. “Para-probiotics for Preterm Neonates -The Next Frontier.” *Nutrients* 10 (7): 871-9.

<https://doi.org/10.3390/nu10070871>

Ducrotté, P., Sawant, P., and Jayanthi, V. 2012. “Clinical Trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) Improves Symptoms of Irritable Bowel Syndrome.” *World Journal of Gastroenterology* 18 (30): 4012-8.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i30.4012>

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J. 2001. “Probiotics - compensation for lactase insufficiency.” *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2): 421-9.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.421s>

Elvehjem, C., Madden, R., Strong, F., and Woolley, D. 1937. “Relationship of Nicotinic Acid and Nicotinic Acid Amide to Canine Black Tongue.” *Journal of*

the American Chemical Society 59: 1767-8

- Engel, W., Bahr, W., and Schieberle, P. 1999. "Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices." *European Food Research and Technology* 209: 237-41. <https://doi.org/10.1007/s002170050486>
- Enomoto, T., Sowa, M., Nishimori, K., Shimazu, S., Yoshida, A., Yamada, K., Furukawa, F., et al. 2014. "Effects of Bifidobacterial Supplementation to Pregnant Women and Infants in the Prevention of Allergy Development in Infants and on Fecal Microbiota." *Allergology International* 63 (4): 575-85. <https://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0683>
- FAO/WHO. 2002. "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food." https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Fernandez-Garcia, E. and McGregor, J.U. 1994. "Determination of Organic Acids During the Fermentation and Cold Storage of Yogurt." *Journal of Dairy Science* 77 (10): 2934-9. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77234-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77234-9)
- Fricker, R.A., Green, E.L., Jenkins, S.I., and Griffin, S.M. 2018. "The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System." *International Journal of Tryptophan Research* 11: 1-11. <https://doi.org/10.1177/1178646918776658>
- Fuller, R. 1989. "Probiotics in Man and Animals." *Journal of Applied Bacteriology* 66 (5): 365-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R., and Maxwell, C. 1985. "Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*." *Applied and Environmental Microbiology* 49 (2): 377-81. <https://doi.org/10.1128/aem.49.2.377-381.1985>

- Glahn, P.E. 1982. "HYDROCOLLOID STABILIZATION OF PROTEIN SUSPENSION AT LOW pH." *Progress in Food Nutrition Science* 6: 171-7
- Glahn, P.E. and Rolin, C. 1994. "Casein-Pectin Interaction in Sour Milk Beverages." *Food Ingredients Europe Conference Proceedings*: 252-6
- Goldin, A., Joshua B.A., Beckman, A., Schmidt, M.D.A.M., and Mark, A.M.D. 2006. "Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury." *Circulation* 114 (6): 597-605.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854>
- Grufferty, M.B. and Fox, P.F. 1988. "Milk alkaline proteinase." *Journal of Dairy Research* 55 (4): 609-30. <https://doi.org/10.1017/S0022029900033409>
- Guillemard, E., Tondou, F., Lacoïn, F., and Schrezenmeir, J. 2010. "Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial." *British Journal of Nutrition* 103 (1): 58-68.
<https://doi.org/10.1017/S0007114509991395>
- Guerra-Hernández, E., Leon, C., Corzo, N., García-Villanova, B., and Romera, J.M. 2002. "Chemical changes in powdered infant formulas during storage." *International Journal of Dairy Technology* 55 (4): 171-6.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00049.x>
- Hagi, T., Kobayashi, M., and Nomura, M. 2016. "Metabolome analysis of milk fermented by γ -aminobutyric acid-producing *Lactococcus lactis*." *Journal of Dairy Science* 99 (2): 994-1001. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9945>
- Hartinger, J., Veselý, P., Netíková, I., Matoušková, E., and Petruželka, L. 2015. "The Protective Effect of Pyrimidine Nucleosides on Human HaCaT Keratinocytes Treated with 5-FU." *Anticancer Research* 35 (3): 1303-10

- Hayakawa, K., Kimura, M., and Yamori, Y. 2005. "Role of the renal nerves in γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats." *European Journal of Pharmacology* 524 (1-3): 120-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.020>
- Hayashida, Y., Hatano, M., Tamura, Y., Kakimoto, M., Nishimura, K., Igoshi, K., Kobayashi, H., and Kuriyama, H. 2001. "4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone (HDMF) Production in Simple Media by Lactic Acid Bacterium, *Lactococcus Lactis* subsp. *cremoris* IFO 3427." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (1): 97-9. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80121-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80121-3)
- Heijtz, R.D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., et al. 2011. "Normal gut microbiota modulates brain development and behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (7): 3047-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- Henrich, F.C., Singer K., Poller, K., Bernhardt, L., Strobl C.D., Limm, K., Ritter, A.P., et al. 2016. "Suppressive effects of tumor cell-derived 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine on human T cells." *OncoImmunology* 5 (8). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1184802>
- Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. 2003. "Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion." *Journal of the American Dietetic Association* 103 (5): 582-7. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50111>
- Hilario, M.C., Puga, C.D., Ocaña. A.N., and Romo, F.P.-G. 2010. "Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing." *Journal of Dairy Research* 77 (1): 20-6. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990161>

- Hoffer, A. and Prousky, J. 2008. "Successful Treatment of Schizophrenia Requires Optimal Daily Doses of Vitamin B₃." *Alternative Medicine Review* 13 (4): 287-91
- IDF 2018. *Heat Treatment of Milk - Overview*. IDF Factsheet 001/2018-02. Brussels, Belgium: International Dairy Federation
- Ishida, Y., Nakamura, F., Kanzato, H., Sawada, D., Yamamoto, N., Kagata, H., Oh-Ida, M., et al. 2005. "Effect of Milk Fermented with *Lactobacillus acidophilus* Strain L-92 on Symptoms of Japanese Cedar Pollen Allergy: A Randomized Placebo-Controlled Trial." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69 (9): 1652-60. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1652>
- Jauhiainen, T. and Korpela, R. 2007. "Milk Peptides and Blood Pressure." *Journal of Nutrition* 137 (3): 825-9. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.825s>
- Jensen, S., Rolin, C., and Ipsen, R. 2010. "Stabilisation of acidified skimmed milk with HM pectin." *Food Hydrocolloids* 24 (4): 291-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.004>
- Jo, Y., Benoist, D.M., Ameerally, A., and Drake, M.A. 2018. "Sensory and chemical properties of Gouda cheese." *Journal of Dairy Science* 101 (3): 1967-89. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13637>
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13637>
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., and Isolauri, E. 2001. "Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial" *Lancet* 357: 1076-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04259-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04259-8)
- Karmakar, B., Vohra, R.M., Nandanwar, H., Sharma, P., Gupta, K.G., and Sobti, R.C. 2000. "Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin

- by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*.” *Journal of Biotechnology* 80 (3): 195-202. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00248-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00248-0)
- Kobayashi, Y., Sugahara, H., Shimada, K., Mitsuyama, E., Kuhara, T., Yasuoka, A., Kondo, T., et al. 2017. “Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer’s disease.” *Scientific Reports* 7 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13368-2>
- Koka, R. and Weimer, B.C. 2001. “Influence of growth conditions on heat-stable phospholipase activity in *Pseudomonas*.” *Journal of Dairy Research* 68 (1): 109-16. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004647>
- Kokkinidou, S. and Peterson, D.G. 2014. “Control of Maillard-Type off-Flavor Development in Ultrahigh-Temperature-Processed Bovine Milk by Phenolic Chemistry.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (32): 8023-33. <https://doi.org/10.1021/jf501919y>
- Kondo, T., Kishi, M., Fushimi, T., and Kaga, T. 2009. “Acetic Acid Upregulates the Expression of Genes for Fatty Acid Oxidation Enzymes in Liver to Suppress Body Fat Accumulation.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (13): 5982-6. <https://doi.org/10.1021/jf900470c>
- Koh, A., Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Backhed, F. 2016. “From Dietary Fiber to Host Physiology : Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites.” *Cell* 165: 1332-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- Lee, W.-J. and Lucey, J.A. 2003. “RHEOLOGICAL PROPERTIES, WHEY SEPARATION, AND MICROSTRUCTURE IN SET-STYLE YOGURT: EFFECTS OF HEATING TEMPERATURE AND INCUBATION TEMPERATURE.” *J. Texture Studies* 34(5-6): 515-36
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2003.tb01079.x>

- Li, Y., Wang, X., Meng, Y., Zhang, F., Shao, Z., and Hu, L. 2018. "Effect of the modified high methoxly pectin on the stability of the fermented milk beverage." *International Journal of Food Properties* 21 (1): 2075-86.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1485029>
- Li, Y, Wang, Y. and Wu, P. 2019. "5'-Methylthioadenosine and Cancer: old molecules, new understanding." *Journal of Cancer* 10 (4): 927-36.
<https://doi.org/10.7150/jca.27160>
- Liu, Z., Xu, Z., Han, M., and Guo, B.-H. 2015. "Efficacy of pasteurised yoghurt in improving chronic constipation: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *International Dairy Journal* 40: 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.009>
- Lucey, J.A. and Singh, H. 1998. "Formation and physical properties of acid milk gels: a review." *Food Research International* 30 (7): 529-42.
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5)
- 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." *Journal of Texture Studies* 29 (4): 413-26. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1998.tb00813.x>
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., and Munro, P.A. 1999. "STABILITY OF MODEL ACID MILK BEVERAGE: EFFECT OF PECTIN CONCENTRATION, STORAGE TEMPERATURE AND MILK HEAT TREATMENT." *Journal of Texture Studies* 30 (3): 305-18.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1999.tb00219.x>
- Lucey, J.A. 2004. "Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties." *International Journal of Dairy Technology* 57 (2-3): 77-

84. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00142.x>

Maehata, H., Kobayashi, Y., Mitsuyama, E., Kawase, T., Kuhara, T., Xiao, J.Z., Tsukahara, T., et al. 2019. "Heat-killed *Lactobacillus helveticus* strain MCC1848 confers resilience to anxiety or depression-like symptoms caused by subchronic social defeat stress in mice." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 83 (7): 1239-47.

<https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1591263>

Mahé, S., Marteau, P., Huneau, J.F., Thuillier, F., and Tomé, D. 1994. "Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man." *British Journal of Nutrition* 71 (2): 169-80.

<https://doi.org/10.1079/bjn19940124>

Makino, S., Ikegami, S., Kume, A., Horiuchi, H., Sasaki, H., and Orii, N. 2010. "Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1." *British Journal of Nutrition* 104 (7): 998-1006.

<https://doi.org/10.1017/S000711451000173X>

Marozienka, A. and de Kruif, C.G. 2000. "Interaction of pectin and casein micelles." *Food Hydrocolloids* 14(4): 391-4.

[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00019-9)

Matsumoto, K., Takada, T., Shimizu, K., Moriyama, K., Kawakami, K., Hirano, K., Kajimoto, O., and Nomoto, K. 2010. "Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on defecation frequency, intestinal microbiota, and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110 (5): 547-52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.05.016>

- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y., and Benno, Y. 2012. "Impact of Intestinal Microbiota on Intestinal Luminal Metabolome." *Scientific Reports* 2: 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep00233>
- McKenna, A.B. 1987. "Effects of Homogenization Pressure and Stabilizer Concentration on the Physical Stability of Longlife Laban." *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 22:167-74
- McMahon, D.J. and Brown, R.J. 1984. "Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review." *Journal of Dairy Science* 67 (3): 499-512
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81332-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81332-6)
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., and Snabre, P. 1999. "TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis." *Talanta* 50 (2): 445-56. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0)
- Metchnikoff, É. 1908. *The prolongation of life: Optimistic studies*. New York: G.P. Putnam's Sons
- Molimard, P. and Spinnler, H.E. 1996. "Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties." *Journal of Dairy Science* 79 (2): 169-84. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Montalto, M., Nucera, G., Santoro, L., Curigliano, V., Vastola, M., Covino, M., Cuoco, L., et al. 2005. "Effect of exogenous β -galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study." *European Journal of Clinical Nutrition* 59 (4): 489-93.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602098>
- Morrissey, P.A. 1973. "The N-acetyl neuraminic-acid content of the milk of

various species.” *Journal of Dairy Research* 40 (3): 421-5.

<https://doi.org/10.1017/S0022029900014795>

Mottar, J., Waes, G., Moermans, R., and Naudts, M. 1979. “Sensory changes in UHT milk during uncooled storage.” *Milchwissenschaft* 34 (5): 257-62

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., and Takano, T. 1995. “Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It That Are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme.” *Journal of Dairy Science* 78 (6): 1253-7.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76745-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76745-5)

Nakao, C., Yamada, E., Fukaya, M., Tayama, K., Tsukamoto, Y., and Sato, Y.

2001. "Effect of acetate on glycogen replenishment in liver and skeletal muscles after exhaustive swimming in rats." *Scandinavian journal of medicine and science in sports*: 11: 33-7

Namba, K., Hatano, M., Yaeshima, T., Takase, M., and Suzuki, K. 2010. “Effects of *Bifidobacterium Longum* BB536 Administration on Influenza Infection, Influenza Vaccine Antibody Titer, and Cell-Mediated Immunity in the Elderly.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74 (5): 939-45.

<https://doi.org/10.1271/bbb.90749>

Ni, H. and Raikos, V. 2019. “Lactic-acid bacteria fermentation-induced effects on microstructure and interfacial properties of oil-in-water emulsions stabilized by goat-milk proteins.” *LWT—Food Science and Technology* 109: 70-6.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.002>

Niklander, S., Fuentes, F., Sanchez, D., Araya, V., Chiappini, G., Martinez, R., and Marshall, M. 2018. “Impact of 1% malic acid spray on the oral health-related quality of life of patients with xerostomia.” *Journal of Oral Science*

60 (2): 278-84. <https://doi.org/10.2334/josnusd.17-0164>

- Nobuhara, T., Matsumiya, K., Nambu, Y., Nakamura, A., Fujii, N., and Matsumura, Y. 2014. "Stabilization of milk protein dispersion by soybean soluble polysaccharide under acidic pH conditions." *Food Hydrocolloids* 34: 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.022>
- Oakenfull, D. and Fenwick, D.E. 1977. "Thermodynamics and Mechanism of Hydrophobic Interaction." *Australian Journal of Chemistry* 30(4): 741-52
- Ott, A., Fay, L.B., and Chaintreau, A. 1997. "Determination and Origin of the Aroma Impact Compounds of Yogurt Flavor." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3): 850-8. <https://doi.org/10.1021/jf960508e>
- Ott, A., Germond, J.-E., Baumgartner, M., and Chaintreau A. 1999. "Aroma Comparisons of Traditional and Mild Yogurts: Headspace Gas Chromatography Quantification of Volatiles and Origin of α -Diketones." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (6): 2379-85. <https://doi.org/10.1021/jf980650a>
- Ouwehand, A.C. and Salminen, S.J. 1998. "The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-Viable Bacteria." *International Dairy Journal* 8 (9): 749-58. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00114-9)
- Palmeira, C.M., Rana, M.I., Frederick, C.B., and Wallace, K.B. 2000. "Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Vitro by Short-Chain Carboxylic Acids." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272 (2): 431-5. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2797>
- Pan, L., Yu, J., Mi, Z., Mo, L., Jin, H., Yao, C., Ren, D., and Menghe, B. 2018. "A Metabolomics Approach Uncovers Differences between Traditional and Commercial Dairy Products in Buryatia (Russian Federation)." *Molecules* 23 (4): 735. <https://doi.org/10.3390/molecules23040735>

- Pastink, M.I., Teusink, B., Hols, P., Visser, S., de-Vos, W.M., and Hugenholtz, J. 2009. "Genome-Scale Model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for Metabolic Comparison of Lactic Acid Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (11): 3627-33. <https://doi.org/10.1128/AEM.00138-09>
- Perez-Cacho, P.R. and Rouseff, R. 2008. "Processing and Storage Effects on Orange Juice Aroma: A Review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (21): 9785-96. <https://doi.org/10.1021/jf801244j>
- Perez-Cacho, P.R., Mahattanatawee, K., Smoot, J.M., and Rouseff, R. 2007. "Identification of Sulfur Volatiles in Canned Orange Juices Lacking Orange Flavor." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (14): 5761-7. <https://doi.org/10.1021/jf0703856>
- Piel, S., Ehinger, J.K., Chamkha, I., Frostner, E.Å., Sjövall, F., Elmér, E., and Hansson, M.J. 2018. "Bioenergetic bypass using cell-permeable succinate, but not methylene blue, attenuates metformin-induced lactate production." *Intensive Care Medicine Experimental* 6 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0186-1>
- Puhan, Z. 1979. "Heat Treatment of Cultured Dairy Products." *Journal of Food Protection* 42 (11): 890-4. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-42.11.890>.
- Rannou, C., Laroque, D., Renault, E., Prost, C., and Sérot, T. 2016. "Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods." *Food Research International* 90: 154-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.037>
- Raikos, V., Duthie, G., and Ranawana, V. 2017. "Comparing the efficiency of different food-grade emulsifiers to form and stabilise orange oil-in-water beverage emulsions: influence of emulsifier concentration and storage time."

International Journal of Food Science and Technology 52: 348-58.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.13286>

Raikos, V., Grant, S.B., Hayes, H., and Ranawana, V. 2018. "Use of β -glucan from spent brewer's yeast as a thickener in skimmed yogurt: Physicochemical, textural, and structural properties related to sensory perception." *Journal of Dairy Science* 101 (7): 5821-31. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14261>

Rodgers, A.L., Webber, D., Charmoy, D.R., Jackson, G.E., and Ravenscroft, N. 2014. "Malic Acid Supplementation Increases Urinary Citrate Excretion and Urinary pH: Implications for the Potential Treatment of Calcium Oxalate Stone Disease." *Journal of Endourology* 28 (2): 229-36.

<https://doi.org/10.1089/end.2013.0477>

Rutherford, S.M., Fanning, A.C., Miller, B.J., and Moughan, P.J. 2015. "Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats." *Journal of Nutrition* 145 (2): 372-9.

<https://doi.org/10.3945/jn.114.195438>

Rychlik, M., Sax, M., and Schieberle, P. 2006. "On the role of short-chain free fatty acids for the development of a cheese-like off-note in pasteurized yoghurt" *LWT - Food Science and Technology* 39 (5): 521-7.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.03.014>

Salvador, A. and Fiszman, S.M. 2004. "Textural and Sensory Characteristics of Whole and Skimmed Flavored Set-Type Yogurt During Long Storage." *Journal of Dairy Science* 87 (12): 4033-41.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73544-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73544-4)

Sarhir, S.T., Amanpour, A., and Selli, S. 2019. "Characterization of Ayran Aroma

Active Compounds by Solvent-Assisted Flavor Evaporation (SAFE) with Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Olfactometry (GC-MS-O) and Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA).” *Analytical Letters* 52 (13): 2077-91.

<https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1594244>

Savaiano, D.A., AbouElAnouar, A., Smith, D.E., and Levitt, M.D. 1984. “Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals.” *American Journal of Clinical Nutrition* 40 (6): 1219-23. <https://doi.org/10.1093/ajcn/40.6.1219>

Schuck, P.F., Busanello, E.N.B., Tonin, A.M., Viegas, C.M., and Ferreira, G.C. 2013. “Neurotoxic Effects of trans -Glutaconic Acid in Rats.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* : 607610.

<https://doi.org/10.1155/2013/607610>

Schwab, W. 2013. “Natural 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Furaneol®).” *Molecules* 18 (6): 6936-51. <https://doi.org/10.3390/molecules18066936>

Sedlmeyer, F., Brack, M., Rademacher, B., and Kulozik, U. 2004. “Effect of protein composition and homogenisation on the stability of acidified milk drinks.” *International Dairy Journal* 14 (4): 331-6.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.09.009>

Sejersen, M.T., Salomonsen, T., Ipsen, R., Clark, R., Rolin, C., and Engelsen, S.B. 2007. “Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks.” *International Dairy Journal* 17: 302-7.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.03.003>

Settachaimongkon, S., Valenberg, H.J.F., Winata, V., Wang, X., Nout, M.J.R., Hooijdonk, T.C.M., Zwietering, M.H., and Smid, E.J. 2015. “Effect of sublethal preculturing on the survival of probiotics and metabolite formation

in set-yoghurt.” *Food Microbiology* 49: 104-15.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.011>

Sharma, A., Gerbarg, P., Bottiglieri, T., Massoumi, L., Linda, L., Carpenter, L., Lavretsky, H., Muskin, P.R., Brown, R.P., and Mischoulon, D. 2017. “S-Adenosylmethionine (S-AMe) for Neuropsychiatric Disorders: A Clinician-Oriented Review of Research.” *Journal of Clinical Psychiatry* 78 (6): e656-67.
<https://doi.org/10.4088/JCP.16r11113>

Shin, R, Suzuki, M., and Morishita, Y. 2002. “Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.” *Journal of Medical Microbiology* 51: 201-6.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-3-201>

Slaughter, J.C. 1999. “The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food.” *Biological Reviews* 74 (3): 259-76.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00187.x>

Standard Tables of Food Composition in Japan (Seventh Revised Edition). 2015. Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.
https://www.mext.go.jp/en/policy/science_technology/policy/title01/detail01/sdetail01/sdetail01/1385122.htm

Sunds, A.V., Rauh, V.M., Sørensen, J., and Larsen, L.B. 2018. “Maillard reaction progress in UHT milk during storage at different temperature levels and cycles.” *International Dairy Journal* 77: 56-64.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.08.008>

Syrbe, A., Bauer, W.J., and Klostermeyer, H. 1998. “Polymer Science Concepts in Dairy Systems-An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction.” *International Dairy Journal* 8 (3): 179-93.

[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00041-7)

- Takahashi, K. and Kohno, H. 2016. "Different Polar Metabolites and Protein Profiles between High- and Low-Quality Japanese Qinjō Sake." *PLoS ONE* 11 (3): 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150524>
- Takeda, K. and Okumura, K. 2007. "Effects of a Fermented Milk Drink Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota on the Human NK-Cell Activity." *Journal of Nutrition* 137 (3): 791-3. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.791s>
- Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J., and Mierau, I. 2000. "Bile Salt Hydrolase of *Bifidobacterium longum* - Biochemical and Genetic Characterization." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6): 2502-12. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2502-2512.2000>
- TechSci Research. 2020. "Global yogurt market 2015-2025. Forecast and opportunities."
- Tetra Pak. 2003. *Dairy processing handbook. Second revised edition*. Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB
- Tetra Pak International S.A. 2019. "Tetra Pak Compass Data."
- Towler, C. 1984. "Sedimentation in a Cultured Milk Beverage." *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 19: 205-11
- Tram, T.H., Brand Miller, J.C., McNeil, Y., and McVeagh, P. 1997. "Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants." *Archives of Disease in Childhood* 77 (4): 315-18. <https://doi.org/10.1136/adc.77.4.315>
- Tromp, R.H., de Kruif, C.G., van Eijk, M., and Rolin, C. 2004. "On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin." *Food Hydrocolloids* 18 (4): 565-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.09.005>

- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., and Rescigno, M. 2012. "Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model." *Gut* 61 (7): 1007-15. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300971>
- United Nations. 2015. "Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015."
- Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., and Martínez-Castro, I. 2001. "Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk." *Food Chemistry* 72 (1): 51-8. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00203-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00203-X)
- van Hooydonk, A.C.M., Smalbrink, L., and Hagedoorn, H.G. 1982."De bereiding van drinkyoghurt. 1 De invloed van procesfactoren." *Voedingsmiddelentechnologie* 15 (17): 23-5
- Vasbinder, A. J. 2002. *Casein - whey protein interactions in heated milk*. Netherlands: Uni. Utrecht
- Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2008. "Probiotics-From Metchnikoff to bioactives." *International Dairy Journal* 18 (7): 714-28. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
- Walstra, P., Jan T., Wouters, M., and Geurts, T.J. 2005. *Dairy Science and Technology Second Edition*. FL: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420028010>
- Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P., and Petocz, P. 2001. "Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas." *American Journal of Clinical Nutrition* 74 (4): 510-5. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.510>

- Wang, H.-X. and Wang, Y.-P. 2016. "Gut Microbiota-brain axis." *Chinese Medical Journal* 129 (19): 2373-80. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190667>
- West, C.E., Hammarström, M.-L., and Hernell, O. 2009. "Probiotics during weaning reduce the incidence of eczema." *Pediatric Allergy and Immunology* 20 (5): 430-7. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2009.00745.x>
- Wu, J., Du, B., Li, J., and Zhang, H. 2014. "Influence of homogenisation and the degradation of stabilizer on the stability of acidified milk drinks stabilized by carboxymethylcellulose." *LWT—Food Science and Technology* 56 (2): 370-6. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.029>
- Wong, C.B., Odamaki, T., and Xiao, J.Z. 2019. "Beneficial Effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on Human Health: Modulation of Gut Microbiome as the Principal Action." *Journal of Functional Foods* 54 (January): 506-19. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.002>
- Xiao, J.Z., Kondo, S., Takahashi, N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., et al. 2003. "Effects of Milk Products Fermented by *Bifidobacterium longum* on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers." *Journal of Dairy Science* 86 (7): 2452-61. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73839-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73839-9)
- Xiao, J.Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Iwatsuki, K., et al. 2006a. "Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial." *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 16 (2): 86-93
- Xiao, J.Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N.,

- Miyaji, K., et al. 2006b. "Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial." *Clinical & Experimental Allergy* 36 (11): 1425-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02575.x>
- Xiao, J.Z., Kondo, N., Yanagisawa, K., Miyaji, K., Enomoto, T., Sakoda, K., Iwatsuki, K., et al. 2007. "Clinical Efficacy of Probiotic *Bifidobacterium longum* for the Treatment of Symptoms of Japanese Cedar Pollen Allergy in Subjects Evaluated in an Environmental Exposure Unit." *Allergology International* 56 (1): 67-75. <https://doi.org/10.2332/allergolint.O-06-455>
- Xiao, J.Z., Katsumata, N., Bernier, F., Ohno, K., Yamauchi, Y., Odamaki, T., Yoshikawa, K., et al. 2020. "Probiotic *Bifidobacterium breve* in Improving Cognitive Functions of Older Adults with Suspected Mild Cognitive Impairment: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Journal of Alzheimer's Disease* 77 (1): 139-47. <https://doi.org/10.3233/JAD-200488>
- Yaeshima, T., Takahashi, S., Matsumoto, N., Ishibashi, N., Hayasawa, H., and Iino, H. 1997. "Effect of Yogurt Containing *Bifidobacterium longum* BB536 on the Intestinal Environment, Fecal Characteristics and Defecation Frequency: A Comparison with Standard Yogurt." *Bioscience Microflora* 16 (2): 73-7
- Yang, Y.-X., He, M., Hu, G., Wei, J., Pages, P., Yang, X.-H., and Bourdu-Naturel, S. 2008. "Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173010 on Chinese constipated women." *World Journal of Gastroenterology* 14 (40): 6237-43. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.6237>
- Yoon, S.J., Lyoo, I.K., Haws, C., Kim, T.S., Cohen, B.M., and Renshaw, P.F. 2009. "Decreased Glutamate/Glutamine Levels May Mediate Cytidine's

Efficacy in Treating Bipolar Depression: A Longitudinal Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study.” *Neuropsychopharmacology* 34: 1810-8.

<https://doi.org/10.1038/npp.2009.2>

Yonekura, S., Okamoto, Y., Okawa, T., Hisamitsu, M., Chazono, H. Kobayashi, K. Sakurai, D., et al. 2009. “Effects of daily intake of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 on Japanese cedar pollinosis.” *Allergy and Asthma Proceedings : The Official Journal of Regional and State Allergy Societies* 30 (4): 397-405. <https://doi.org/10.2500/aap.2009.30.3256>

Yuliarti, O., Mei, K.H., Kam Xue Ting, Z., and Yi, K. Y. 2019. “Influence of combination carboxymethylcellulose and pectin on the stability of acidified milk drinks.” *Food Hydrocolloids* 89: 216-23.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.040>

Zhao, L., Zhang, S., Uluko, H., Liu, L., Lu, J., Xue, H., Kong, F., et al. 2014. “Effect of ultrasound pretreatment on rennet-induced coagulation properties of goat’s milk.” *Food Chemistry* 165: 167-74.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.081>

Zhao, R.-X., Qi, J.-R., Liu, Q.-R., Zeng, W.-Q., and Yang, X.-Q. 2018. “Fractionation and characterization of soluble soybean polysaccharide esterified of octenyl succinic anhydride and its effect as a stabilizer in acidified milk drinks.” *Food Hydrocolloids* 85: 215-21.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.023>

Zyoud, S.H., Smale, S., Waring, W.S., Sweileh, W.M., and Al-jabi, S.W. 2019. "Global research trends in microbiome-gut-brain axis during 2009-2018: a bibliometric and visualized study." *BMC Gastroenterology* 19: 158.
<https://doi.org/10.1186/s12876-019-1076-z>

21CFR-131. United States Code of Federal Regulations Part 131-MILK AND
CREAM