

牛乳分析用赤外分光分析器を用いた牛乳リポリシスの簡易判定法

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Lipolysis, Convenient, Detection, Milko Scan 作成者: 橘内, 克弘, 鈴木, 一郎 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001898

牛乳分析用赤外分光分析器を用いた牛乳リポリシスの簡易判定法

橋内克弘・鈴木一郎

品質開発部

要 約

牛乳分析用赤外分光分析器（ミルコスキャン 134A/B）においては、二波長による脂肪含量の測定が可能である（ $5.7\mu\text{m}$ での測定値を Fat A、 $3.5\mu\text{m}$ での測定値を Fat B と称する）。牛乳に人為的リポリシスを誘導することにより、Fat A は著しく低下し、Fat B は若干上昇した。この変化は、リポリシスにより Fat A、Fat B の各測定波長付近の赤外スペクトルが変化することが原因であった。人為的リポリシスを誘導した牛乳においては、Fat B / Fat A 値と遊離脂肪酸量の間には正の相関が認められ、また、人為的リポリシスを誘導しない個体乳においても同様の相関が認められた。以上の結果より、我々は、Fat B / Fat A 値による牛乳リポリシスの簡易判定法を確立した。

キーワード：リポリシス、簡易判定法、ミルコスキャン

緒 言

分泌されたばかりの牛乳中には、遊離脂肪酸はほとんど含まれておらず、その牛乳をしばらく放置しても、通常、遊離脂肪酸はわずかに上昇しない。しかし、時により、乳脂肪が牛乳中のリパーゼによって分解されることによって、脂肪加水分解（リポリシス）が引き起こされ、遊離脂肪酸量が著しく増加することがある。

牛乳のリポリシスにより、一般的に不快な風味とされているランシッド（酸敗）臭が発生する。これは炭素数 4～12 程度の短鎖、中鎖脂肪酸が遊離することによって引き起こされるものである⁴⁾。また、リポリシスにより生成したジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール等の界面活性成分が牛乳の界面活性を著しく低下させる⁴⁾。これにより、バター製造の際のチャーニング所要時間が遅延し⁷⁾、脂肪のバターミルクへの損失が増大すると考えられている³⁾。さらにリポリシスによる高濃度の遊離脂肪酸の存在は、レンネットのカード形成力を弱め、凝固所要時間も増大させる結果、チーズ収量の低下原因にもなる^{8,10)}。遊離脂肪酸には抗菌作用があるの

で、スターター菌（*S. lactis* 等の乳酸菌）の増殖に対し悪影響を与え、発酵乳製品の製造にも影響すると考えられている²⁾。

このようにリポリシスには乳製品製造において様々な悪影響を与えることから、ヨーロッパ諸国においては、遊離脂肪酸量が、乳質を表現する指標の一つとして導入され始めている。しかし、日本の生乳検査の現場では、リポリシスが乳質に与える影響に関しては、ほとんど顧みられないのが現状である。

リポリシスには誘導型リポリシス、自発型リポリシスの二つのタイプがある¹¹⁾。誘導型リポリシスは攪拌、均質化処理、温度変化等の物理的、化学的処理によって引き起こされるものである。また、牛乳をしばらく放置しておくだけで、一部の牛乳では自然にリポリシスを起こし、ランシッドをしめすようになる。これを自発型リポリシスと呼んでいる。これを引き起こす要因としては、乳牛の飼料、栄養状態、泌乳期、乳房炎、脂肪球膜の強度等が関与していると考えられている^{4,11)}が詳細については研究途上にある。このほかに、搾乳、乳製品の加工等の際に混入する微生物由来のリパーゼに起因するリポリシスも考えられる。

リポリシスの程度は遊離脂肪酸量によって示されるが、

その定量法として、従来はガスクロマトグラフィー、HPLC等の機器分析が用いられてきた。しかし、大量の検体を扱う生乳検査の現場では、手間のかかるこれらの方法を用いることはきわめて困難である。一方、生乳検査の現場では赤外分光分析器（ミルコスキャン等）が広く用いられ、AOACのOfficial Method¹²⁾、IDF法⁵⁾でも承認されている。1980年代後半には乳中尿素窒素、クエン酸、氷点降下度（加水検定）の測定も可能となった。そこで我々は、牛乳のリポリシスにより赤外スペクトルが変化することを見出し、この性質を応用して、ミルコスキャンを用いた牛乳リポリシスの簡易判定法を確立した。

材料及び方法

1. 牛乳

a. 個体乳

茨城県生乳検査協会の協力により、同協会において2000年6月及び11月に成分分析を実施した農家の個体乳の供与を得た。

b. 畜産草地研ホルスタイン牛群からのバルク乳

畜産草地研のホルスタイン牛群からのバルク乳は、隔週に一度、木曜日又は金曜日の夕方搾乳されたものを用いた。

2. 分析方法

a. 牛乳の成分分析

牛乳のタンパク質、脂肪（Fat A, Fat B）、乳糖の各値は、赤外分光分析器ミルコスキャン134A/B（Foss Electric, Hillerod）を用いて分析した。ミルコスキャン134A/Bでは、脂肪含量は $5.7\mu\text{m}$ 、 $3.5\mu\text{m}$ の二波長を用いて測定可能である。両者は脂肪中のカルボニルC=O二重結合及び脂肪酸側鎖のC-H結合にそれぞれ対応している（以下 $5.7\mu\text{m}$ での測定値をFat A、 $3.5\mu\text{m}$ での測定値をFat Bと称する）。酪酸臭の見られる生乳においては、Fat AがFat Bより著しく低下するという経験的観察結果が得られている。そこで、このFat AとFat Bの差異が牛乳のリポリシスに起因すると考え、以下の解析を行った。

b. 牛乳の人為的脂肪加水分解（リポリシス）

牛乳の人為的リポリシスは、 40°C に加温した畜試のバルク乳にリパーゼ（生化学工業、東京）を 50mg/l 相当量添加することによって行った。

c. 牛乳の赤外スペクトルの測定

牛乳の赤外スペクトル測定はミルコスキャンFT 120（Foss Electric, Hillerod）で行った。

d. 遊離脂肪酸量の分析

牛乳に標準物質としてヘプタデカン酸（Sigma, St. Louis）を 100mg/l 相当量添加し、4倍量のクロロホルム・メタノール（4:1）溶液を加え、よく振とう後、クロロホルム層を採取した。得られた水層に等量の1N水酸化ナトリウム溶液を加え、よく振とう後クロロホルム層を除去した。さらに等量の1N塩酸及び6倍量のヘキサンを加え遊離脂肪酸を抽出後、窒素ガスでヘキサンを除去した。これを三フッ化ホウ素メタノール溶液（GL Science, Tokyo）に溶解し、水蒸気下で遊離脂肪酸のメチル化を行った後ヘキサンで抽出し、ガスクロマトグラフィー用試料とした。ガスクロマトグラフはHP 6890 Series GC System（Hewlett Packard, Wilmington）を使用した。検出器は、FID（ 260°C ）、カラムはSP-2560（ $100\text{m}\times 0.25\text{mm ID}$, $0.20\mu\text{m film}$ ）を用い、 140°C （5分間）から $4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で 240°C まで加温することによって測定を行った。遊離脂肪酸量は、牛乳中の遊離脂肪酸総量の約80%を占める、ミリスチン酸、パルチミン酸、ステアリン酸、オレイン酸の合計量で示した。

結果及び考察

1. 人為的リポリシスによる牛乳成分分析値の変化

畜産草地研のバルク乳をリパーゼ処理したときのミルコスキャン134A/Bによる牛乳成分分析値を図1に示した。リパーゼ処理した牛乳では対照の牛乳に比べ、120分後には、Fat A値が約37%低下し、Fat B値は約6%、タンパク質値は約15%上昇した。乳糖値はほとんど変化しなかった。この変化はリパーゼ処理30分から90分間に最も顕著であった。

2. 人為的リポリシスによる牛乳の赤外スペクトルの変化

リポリシスにより牛乳中のC=O二重結合の数は変化しないにもかかわらず、Fat Aが著しく低下した原因として、リポリシスにより、牛乳の赤外スペクトルに最大吸収波長のシフト等の変化が起こったことが考えられる。そこで、Fat A及びFat Bの測定波長付近の赤外スペクトルについて、リパーゼ処理によるFat A及びFat Bの測定波長付近の赤外スペクトルの変化を調べた（図2）。リパーゼ処理の進行に伴い、Fat Aの測定波長である $5.7\mu\text{m}$ における吸光値が約30%減少したのに対し、Fat Bの測定波長である $3.5\mu\text{m}$ 付近では、リパーゼ処理の進行により吸光値が約10%増加した。このことが、図1のFat Aの大幅な低下とFat Bの小幅な上昇の理由と考えられる。

3. 人為的リポリシスにおけるFat B/Fat A値と遊離脂

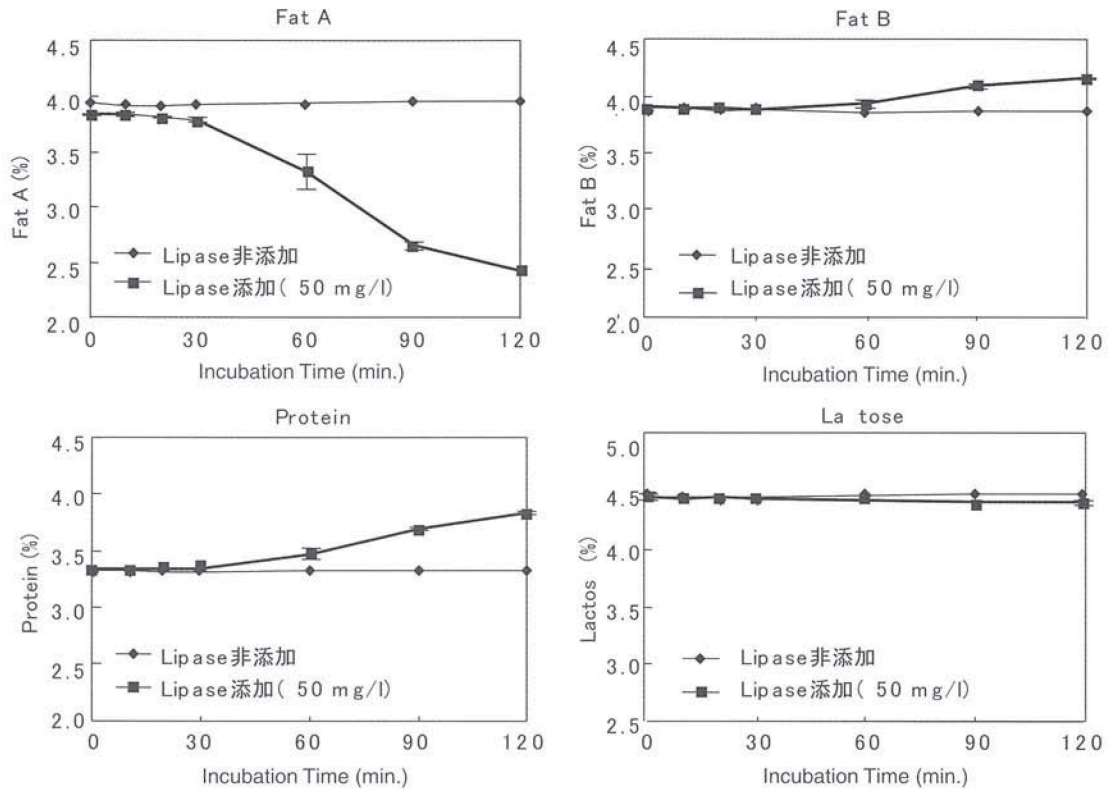


図1 リパーゼ処理による Fat A 値, Fat B 値, タンパク質値, 乳糖値の経時的変化

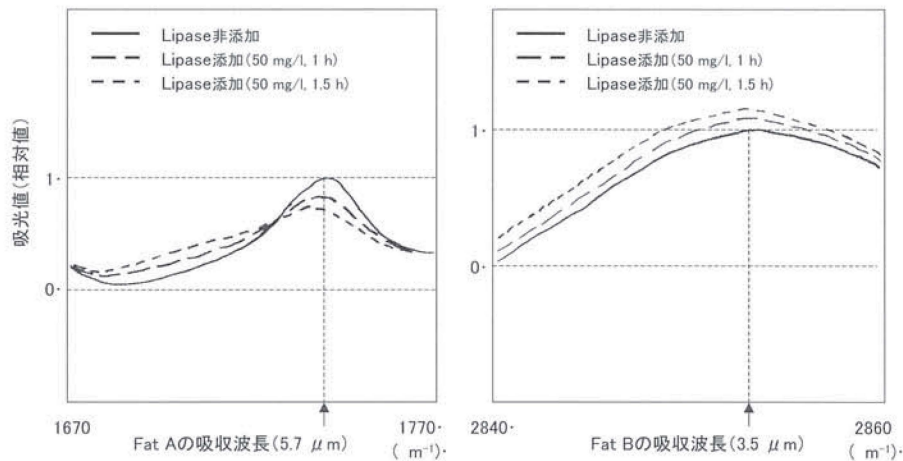


図2 リパーゼ処理による 5.7 μ m 及び 3.5 μ m 付近のスペクトルの変化

脂肪酸量の相関

脂肪含量の異なるサンプル間における Fat A, Fat B 両値の関係を表す指標として, Fat B/Fat A 値を用いた。人為的にリポリシスを誘導した牛乳の Fat B/Fat A 値と遊離脂肪酸量の関係を図3に示した。リパーゼ処理を行い酪酸臭が検知された牛乳では, 120分後に Fat B/Fat A 値は約1.7に達し, 遊離脂肪酸量は約20倍に増加した。リパーゼ処理を行わなかった牛乳では Fat B/Fat A 値, 遊離脂肪酸量とも変化は見られなかった。この結果が

ら, 人為的にリポリシスを誘導した牛乳の Fat B/Fat A 値と遊離脂肪酸量には正の相関が見られることが明らかとなった。

4. 農家個体乳における Fat B/Fat A 値と遊離脂肪酸量の相関

以上の結果より, Fat Aと Fat Bの差異の大きな原因の一つとして, リポリシスによる遊離脂肪酸量の増加があげられることが示されたが, リパーゼ処理しない通常の牛乳においても, Fat Aと Fat Bの差異がリポリシスの程

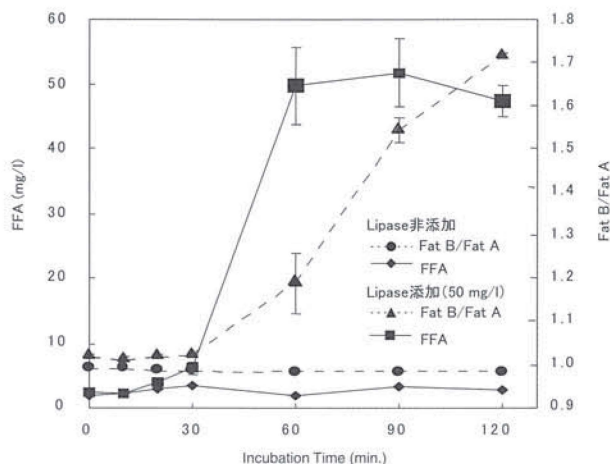


図3 リパーゼ処理による Fat B/Fat A 値、遊離脂肪酸量の経時的変化

度を表しているかを調べるため、個体乳を用いて、Fat B/Fat A 値と遊離脂肪酸量の相関を調べた。農家の個体乳より Fat B/Fat A 値の分布を考慮して 37 検体を抽出し、Fat B/Fat A 値と遊離脂肪酸の相関を調べた結果を図 4 に示した。両者間には $R^2=0.4220$ の正の相関関係が見られた。このことから、Fat B/Fat A 値が遊離脂肪酸量の推定、つまりリポリシスの程度の表現に有効であるものと考えられた。ただし、Fat B/Fat A 値はトリグリセリドの脂肪酸鎖の長さにも依存することには留意する必要がある。Fat B/Fat A 値が大きいにも関わらず遊離脂肪酸量が少ない少数のサンプルについては、短鎖脂肪酸の割合が大きいものと思われる。一方、Fat B/Fat A 値が 1 よりも小さいにもかかわらず、遊離脂肪酸量が著しく多いものは存在しなかった。

前述の通り、ミルコスキャン 134A/B では脂肪含量は $5.7\mu\text{m}$ 、 $3.5\mu\text{m}$ の二波長を用いて測定可能である。しか

し、各々の吸収波長で測定された Fat A、Fat B をそれぞれ単独で用いることには欠点がある¹⁾。生乳検査の現場では、季節変化等に伴う、脂肪酸鎖の長短による影響をなるべく排除するために、Fat B を用いることが多い。Fat A は、アイスクリーム、加糖練乳のような大量の糖分を含む乳製品において、この糖分から Fat B への相互干渉を少なくするために用いられる。さらに、最近の脂肪含量の測定においては、各々測定した値を一定比率で換算することにより除外し、より正確に脂肪含量を測定することが可能となっている²⁾。その結果、Fat A、Fat B 両値を独立して用いることは少なくなった。しかし、我々は、敢えて Fat A、Fat B 両値を独立に測定し、その差異を利用することによりリポリシスの有無を判定することが可能であることを示した。

以上の結果から、若干の留意点は存在するものの、多数のサンプルを扱う生乳検査の現場において、Fat B/Fat A 値をリポリシスの有無についての一次スクリーニングの方法として用いることが可能であると考えられた。今回開発した方法は、生乳検査の現場で広く用いられているミルコスキャン以外に特別な装置を必要とせず、簡易かつ迅速に、リポリシスが発生した可能性のある牛乳を選び出すことが可能であることに最大の特徴がある。図 4 に示すとおり、個体レベルでは Fat A と Fat B の間に著しい差異が見られ、かつ著しくリポリシスが進行しているものも存在するため、自発的リポリシスのメカニズムが解明されれば、このような個体の飼養管理等にも有効となるとと思われる。

5. 畜産草地研ホルスタイン牛群のバルク乳における Fat B/Fat A 値の季節変動

最後に、バルク乳の品質管理のモデルとして、畜産草地研ホルスタイン牛群のバルク乳について、Fat B/Fat

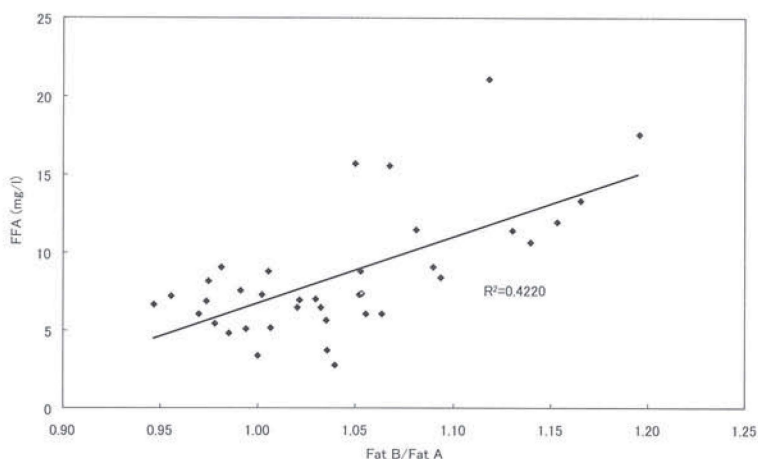


図4 農家個体乳における Fat B/Fat A 値と遊離脂肪酸量の相関

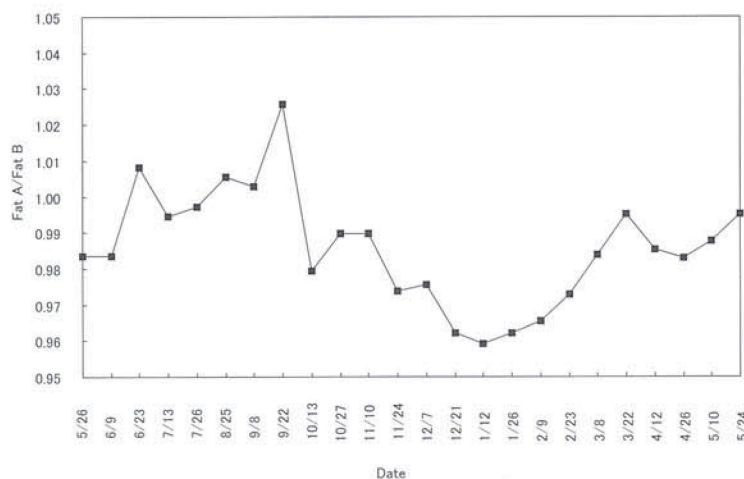


図5 畜産草地研ホルスタイン牛群のバルク乳における Fat B/Fat A 値の季節変動

A 値を 2001 年 5 月までの 1 年間にわたり調査し、結果を図 5 に示した。Fat B/Fat A 値は 6 月から 9 月の夏季において 1 を上回り、最高は 9 月 22 日の 1.026 であったのに対し、冬季には反対に低下し、最低値は 1 月 12 日の 0.962 であった。この原因としては、牛乳リポリシスが起きている個体の割合が夏期において多いことが考えられ、この点についてはさらに追跡調査が必要であると考えられる。リポリシスの季節変動については、冬季の方がリポリシス乳の出現頻度が高いとの報告があり^{4,10)}、この原因としては、冬季にはリポリシスを誘導しやすい泌乳後期の乳牛が多いこと⁹⁾、飼料もリポリシスを誘導しやすいサイレージ多給型⁹⁾となることなどが考えられてきた。しかし、本研究で得られた結果はそれとは反するものであった。畜産草地研においては通年サイレージを主体とした飼料を給与していることから、リポリシスの季節変動の要因として、飼料の変化は主要なものではないと考えられる。夏季において高温多湿である日本においては、タンパク、脂肪の含量が低下する等、一般的な乳質が低下することは広く知られた事実であるが、リポリシスの促進も、同様に暑熱による乳牛の生理的变化が最も大きい原因とである可能性があり、この点についてはさらに詳細な検討が必要であると思われる。

謝 辞

農家個体乳のサンプリングに際しましては、茨城県生乳検査協会にご協力をいただきました。また、赤外スペクトルの測定にあたりまして、富士平工業株式会社に多大のご協力を賜りました。ガスクロマトグラフの使用につきましては当所家畜生理栄養部、榎木茂彦氏、畜産草

地研バルク乳のサンプリングにつきましては業務第 1 科の諸氏、牛乳成分の測定につきましては現動物衛生研究所、三谷賢治氏及び当所畜産物衛生管理専門職、成田卓美氏にご尽力いただきました。以上諸氏に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 荒井威吉 (1997). ミルクサイエンス, 46: 201-210
- 2) Costilow, R. N. and Speck, M. L. (1951). Inhibition of *Streptococcus lactis* in milk by fatty acids. J. Dairy Sci., 34, 1104-1110
- 3) Fouts, E. L. and Weaver, E. (1936). Observation on the development of rancidity in sweet milk, cream and butter. J. Dairy Sci., 19, 482-483
- 4) Fox P. F. (1983). Developments in Dairy Chemistry-2. Elsevire Applied Science Publishers Co., Inc., London and New York
- 5) 樋口映男 (1991). IDF Standard, 社団法人日本国際酪農連盟, 東京, 846-853
- 6) Johnson, P. E. and Von Gunten, R. L. (1961). Effect of feeding sorghum silage on the lipolytic activity in milk. J. Dairy Sci., 44, 969
- 7) Krukovsky, V. N. and Sharp, P. F. (1936). Effect of lipolysis on the churnability of cream obtained from the milk of cows in advanced lactation, J. Dairy Sci., 19: 279-284
- 8) McDonald, S. T. et al (1981). The effect of rancid milk on the flavor and other properties of cheddar cheese. J. Dairy Sci., 64 (Suppl. 1): 54
- 9) Palmer, L. S. (1922). Bitter milk of advanced lactation.

- J. Dairy Sci., 5: 201-211
- 10) Palmer, L. S. and Hankinson, C. L. (1941). Effect of free fatty acids of milk on curd tension of milk. Relation to milk esterase, temperature, use of CaCl_2 , kind of fat acid, milk lipase and churning. J. Dairy Sci., 24: 429-443
- 11) 清水 誠 (1994). ミルクのサイエンス, (上野川 修一ら 編), 社団法人全国農協乳業プラント協会, 東京, 251-256
- 12) William Horwitz (2000). Official Methods of Analysis 16th Ed., A. O. A. C. International, Maryland, Chap. 33: 23-26

Convenient Detection of Lipolyzed Milk by Infrared Milk Analyzer

Katsuhiro KITSUNAI and Ichiro SUZUKI

Department of Animal Products

Summary

We developed a noble method for detection of lipolyzed milk by using infrared milk analyzer (Milko Scan 134A/B, which can determine the content of fat by two wavelength. The contents measured on $5.7\ \mu\text{m}$ and $3.5\ \mu\text{m}$ are named as Fat A and Fat B, respectively). The method is based on the observations as follows.

1) Treatment of milk with lipase decreased Fat A and slightly increased Fat B. 2) This change was due to the change of spectrogram by lipolysis of milk. 3) The value of Fat B/Fat A on lipolysis-induced milk positively correlated with the content of free fatty acid. 4) The value of Fat B/Fat A on individual milk collected from farms also positively correlated with the content of free fatty acid.

Key words: Lipolysis, Convenient Detection, Milko Scan