



Title	市乳、殺菌乳、および <i>Pseudomonas fluorescens</i> 接種乳における風味変化と各種乳質検査法との関係
Author(s)	三河, 勝彦; 有馬, 俊六郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 11(4), 360-371
Issue Date	1979-11-12
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11931
Type	bulletin (article)
File Information	11(4)_p360-371.pdf



[Instructions for use](#)

市乳, 殺菌乳, および *Pseudomonas fluorescens* 接種乳 における風味変化と各種乳質検査法との関係*

三 河 勝 彦

(北海道大学農学部畜産食品製造学教室)

有 馬 俊 六 郎

(北海道大学農学部酪農科学研究施設)

(昭和54年3月26日受理)

Relationship Between Quality Tests and Flavor Deterioration of Market Milk, Laboratory Pasteurized Milk and *Pseudomonas fluorescens* Inoculated Milk (Studies on the effects of psychrotrophic bacteria on milk quality part V)

Katsuhiko MIKAWA and Shunrokuro ARIMA**

(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University; **Institute of Dairy Science,
Faculty of Agriculture, Hokkaido University,
Sapporo, 060 Japan)

牛乳中の細菌はそれが生乳中にあるか、あるいは殺菌乳中にあるかによってその発育に違いのみられることが知られている。これは生乳に含まれているある種の物質が殺菌処理によって失活または分解する一方、生乳には存在せず加熱によって生成される物質があり、こうした物質が菌の発育に影響をおよぼすためと考えられている¹⁻⁵⁾。さらに殺菌前に生乳中で増殖した細菌の数や性質によって、殺菌後の牛乳に発育する細菌が影響を受けることも明らかになっている⁶⁻⁸⁾。こうした影響の結果として、殺菌乳では菌数のあまり多くはないにも拘らず、乳質が変化する例も報告されている^{7,9)}。この原因は主として殺菌前に増殖した細菌の生成する耐熱性の酵素にあると考えられている¹⁰⁻¹³⁾。従って殺菌乳の場合は、殺菌直後に存在する細菌数からその保存可能日数 (Shelf life) を予測するのは難しいということになる^{14,15)}。

前報¹⁶⁾で著者は生乳における風味変化の時点で乳質検査法の比較を行なった。本報では生乳とは異なる反応を示すと予想される市乳, 実験室殺菌乳, およびこの殺菌乳に *Pseudomonas fluorescens* を接種したものの計3種

類の牛乳について、前報¹⁶⁾と同様の実験を行なった。

実験材料および実験方法

市乳は北海道大学附属農場畜産製造部で処理したもの (H), 札幌市内の小売店より購入した厚生省令のいわゆる「牛乳」(Y および M) の計3種類で、いずれもビン装の UHT 処理ではない殺菌乳である。

実験室殺菌および *Pseudomonas* 接種実験に用いた原料乳は北大附属農場の混合乳 (L ならびに Ps の I, II, III, H IV), 札幌市内市乳工場受入混合乳 (L ならびに Ps の S V), および同市内個人牧場生産の混合乳 (L ならびに Ps の N VI) である。

生乳はその1ℓを滅菌三角フラスコにとり、恒温水槽中で75°C 15分間殺菌を行ない、冷却の後2分した。一方は50 ml ずつ滅菌試験管 (直径30 mm) に分注して実験室殺菌試料とした。他方は先の報告¹⁷⁾と同様の方法で *Pseudomonas fluorescens* AHU 1143 (北大農学部応用菌学教室より分与) の脱脂乳培養を1,000倍希釈して、これを1%添加の後、上と同じく分注した (Ps の I~N VI)。

* 「乳質におよぼす低温菌の影響に関する研究」第V報

各 10 本宛準備した上記各試料を，市乳はビン装のまま，いずれも $6 \pm 1^\circ\text{C}$ で保存し，0 および 5 日後，続いて 8，11 と以後 3 日目毎に最高 29 日間（実験室殺菌乳では 31 日間）まで，それぞれ 1 本ずつ抜き出して風味検査および各種分析に供した。なお，保存中に試料が凝固を起した場合にはそれ以後の実験を打切った。

分析は低温菌数 (PTC)，酸度，pH，タンパク質分解度 (A_{660})，揮発性塩基態窒素 (VBN)，遊離脂肪酸 (FFA)，通常の煮沸試験 (COB)，リン酸塩を添加した煮沸試験 (COB-P)，およびアルコールテスト (AT) をそれぞれの試料について実施したが，これらはいずれもこれまでに報告した方法^{16, 18)}を用いた。

結 果

1. 市 乳

6°C に保存した市乳について，各シリーズの保存ゼロ日における各種測定値と，保存中連続して風味変化が観察される最初の時点における測定値をそれぞれ Table 1 A と 1 B に表した。PTC の平均値（菌数の場合幾何平均）は最初 $100/\text{ml}$ に満たなかったが，M II の試料のみは厚生省令の規格値 $5 \times 10^4/\text{ml}$ を越える $59 \times 10^3/\text{ml}$ を示した。風味変化時点の平均値は $18 \times 10^7/\text{ml}$ となった。酸度の平均値は最初 0.127% であったものが，風味変化と共に約 2 倍の 0.247% になった。この時点には極端な値を示す試料も見られ，最低は 0.09% と保存前のいずれの試料よりも低く，反対に高いものでは 0.548%

(M II) という値を示した。 A_{660} も風味変化時点における測定値の分布範囲が大きかった。最小 (Y I) は 0.112 で保存ゼロ日における同試料の 0.134 よりも低く，同日の最低値とほぼ等しい値であった。また別の 2 試料についても初日におけるよりも低い値が認められた。一方，最高の M I 試料では最初の値の 4 倍以上の 0.584 の吸光度となった。VBN は風味変化時点で平均 0.95 mg% と保存ゼロ日の平均値 0.54 mg% の 2 倍近い値となったが，M III 試料の 0.60 mg% という数値は同試料の最初の値よりも低かった。FFA の場合は最初の平均値 1.75 (ml アルカリ/100 g 脂肪) に比べ，風味変化に際しての測定値のばらつきが非常に大きく，その平均値 2.55 に対し標準偏差 2.12 と 83% もの変動係数を示した。最低の H III 試料の FFA は同試料の最初の値の約 1/2 であった。

以上のように酸度， A_{660} ，FFA の 3 者においては特に風味変化時点における測定値の分布範囲が大きく，同時点の平均値と最初の平均値との間に有意差の存在するのは PTC ($P < 0.001$) と VBN ($P < 0.05$) のみであった。なお，風味変化の生じた平均保存期間は 10 日間であった (Table 1 B)。

測定値相互間の相関係数を求めた結果が Table 2 である。タンパク質分解の目安となる A_{660} と，同じくタンパク質に由来する VBN 間の相関係数が最も高く， $r = +0.718$ ($P < 0.001$, $n = 51$)，これに次ぎ VBN と FFA，酸度と FFA，酸度と PTC との間でそれぞれ +0.5 以上 ($P < 0.001$, $n = 51 \sim 54$) の r 値を示した。

Table 1. Bacterial and biochemical changes of initial (A) and at the time of off-flavor (B) in cold stored market milk

A: Initial					
Series	PTC $\times 10^{-4}$	Acidity (%)	A_{660}	VBN (mg%)	FFA (ml alkali/100 g fat)
H I	<0.003	0.131	0.144	0.61	1.32
H II	0.0067	0.131	0.192	0.60	2.26
H III	<0.003	0.133	0.135	0.42	1.20
Y I	<0.003	0.133	0.134	0.60	1.86
Y II	<0.003	0.132	0.110	0.54	1.98
Y III	<0.003	0.140	0.124	0.54	1.55
M I	<0.03	0.119	0.133	0.36	1.16
M II	5.9	0.115	0.166	0.55	2.29
M III	0.0031	0.112	0.137	0.68	2.10
Average	0.00988 ^{a)}	0.127	0.142	0.54	1.75
\pm SD		± 0.010	± 0.024	± 0.10	± 0.45

a) Geometric mean was calculated regarding <30 as 30; Logarithmic expression was 1.995 ± 1.093 .

B: At the time of off-flavor

Series	Days of flavor change	PTC $\times 10^{-4}$	Acidity (%)	A ₆₆₀	VBN (mg%)	FFA (mℓ alkali/100 g fat)
H I	17	49,000	0.223	0.129	0.82	1.54
H II	8	45,000	0.234	0.188	1.49	3.07
H III	11	10,000	0.151	0.248	0.74	0.58
Y I	11	1,100	0.090	0.112	1.33	0.55
Y II	8	3,500	0.139	0.162	0.85	1.58
Y III	8	2,600	0.149	0.216	0.83	3.49
M I	11	38,000	0.183	0.584	—	1.21
M II	8	220,000	0.548	0.238	—	3.69
M III	8	130,000	0.502	0.242	0.60	7.22
Average	10.0	18384.2 ^{b)} ***	0.247	0.235	0.95*	2.55
±SD	±3.0		±0.164	±0.140	±0.33	±2.12

b) Geometric mean; Longarithmic expression was 8.264 ± 0.800 .

* Significant at $P < 0.05$ in t-test on the difference of average values between A and B.

*** $P < 0.001$.

Table 2. Correlation coefficients between the quality tests on market milk

	Acidity	A ₆₆₀	VBN	FFA
A ₆₆₀	0.107 (54)			
VBN	0.144 (51)	0.718*** (51)		
FFA	0.535*** (54)	0.399** (54)	0.617*** (51)	
PTC ^{a)}	0.514*** (54)	0.277* (54)	0.347* (51)	0.345* (54)

* Significant at $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

a) Bacterial conut of < 30 was regarded as 30.

(): n of pairs of values.

2. 実験室殺菌乳

実験室で75°C 15分間の殺菌を行なって6°Cに保存した牛乳は平均14日間で風味変化を起した (Table 3 B)。殺菌当日の PTC は LH IV の40/mℓを除き、すべて30以下/mℓであったが (Table 3 A), 風味変化の時点では平均 13×10^5 /mℓとなった (Table 3 B)。殺菌前の原料乳において比較的 PTC の多い LI と LSV の両試料では、保存後の風味変化時点における菌数も多く、前者では 33×10^6 /mℓ、後者では 92×10^5 /mℓの PTC を示した。保存2週間を経過後、PTC がわずか 3×10^4 以下/mℓにも拘らず、風味変化を生じた試料 (L II) も存在したが、この場合、殺菌前の標準平板菌数 (SPC) を見ると、 29×10^6 /mℓと試料中最高の菌数を示すものであった (Table 3 A)。酸度と pH は風味変化の時点においても大きな変

化が認められず、上述の L II 試料の場合にも保存の前後ではほぼ同一の酸度であった。また A₆₆₀, VBN, FFA も共に測定値はあまり上昇せず、風味変化時点の値が当初より低い試料も見うけられた。特に LN VI では A₆₆₀ と FFA のいずれもが保存ゼロ日より低い値を示した。また風味変化時点の FFA で最高の測定値を見せた L II の2.18 (mℓアルカリ/100 g 脂肪) という値も殺菌直後の2.44より低く、この試料が生乳段階で既にある程度乳質に変化の生じていたことをうかがわせた。保存前と風味変化時点の平均値間に有意差の認められるのは PTC のみであり ($P < 0.001$)、市乳で有意差を見せた VBN も実験室殺菌乳においてはその差が有意性を示さなかった (Table 3 B)。

以上のように実験室殺菌乳では保存前および風味変化

Table 3. Bacterial and biochemical changes of initial (A) and at the time of off-flavor (B) in cold stored laboratory-pasteurized milk

A: Initial

Series	Bacteria in raw milk $\times 10^{-4}$		PTC $\times 10^{-4}$	Acidity (%)	pH	A ₆₆₀	VBN (mg%)	FFA (mℓ alkali/100 g fat)	Alcohol test	COB	COB -P
	SPC	PTC									
L I	480	110	<0.003	0.122	—	0.120	0.49	1.24	—	—	—
L II	2,900	41	<0.003	0.140	—	0.152	0.55	2.44	—	—	—
L III	560	32	<0.003	0.122	—	0.125	0.33	0.96	—	—	—
LH IV	62	1	0.004	0.102	6.87	0.133	0.50	1.43	(-) ^{b)}	(-)	(-)
LS V	150	200	<0.003	0.135	6.79	0.129	0.62	1.59	(-)	(-)	(-)
LN VI	75	8	<0.003	0.135	6.70	0.149	0.75	1.76	(-)	(-)	(-)
Average			0.00315 ^{a)}	0.126	6.79	0.135	0.54	1.57			
±SD				±0.014	±0.09	±0.013	±0.14	±0.51			

a) Geometric mean was calculated regarding <30 as 30; Logarithmic expression was 1.498 ± 0.051.

b) Negative reaction.

B: At the time of off-flavor

Series	Days of flavor change	PTC $\times 10^{-4}$	Acidity (%)	pH	A ₆₆₀	VBN (mg%)	FFA (mℓ alkali/100 g fat)	Alcohol test	COB	COB -P
L II	14	<3	0.139	—	0.173	0.62	2.18	—	—	—
L III	14	290	0.129	—	0.147	0.55	1.15	—	—	—
LH IV	11	8.2	0.106	6.89	0.156	0.75	2.08	(-) ^{d)}	(-)	(-)
LS V	14	920	0.143	6.78	0.142	0.78	1.60	(-)	(-)	(-)
LN VI	14	220	0.139	6.73	0.123	0.81	1.50	(-)	(-)	(-)
Average	14.0	129.7 ^{c)} ***	0.134	6.80	0.146	0.66	1.68			
±SD	±1.9		±0.015	±0.08	±0.017	±0.15	±0.39			

c) Geometric mean was calculated regarding <30 as 30; Logarithmic expression was 6.113 ± 1.182.

d) Negative reaction.

*** Significant at P < 0.001 in t-test on the difference of average values between A and B.

Table 4. Correlation coefficients between the quality tests on laboratory pasteurized milk

	Acidity	A ₆₆₀	VBN	FFA	PTC
A ₆₆₀	0.270 (43)				
VBN	0.405** (43)	0.221 (43)			
FFA	0.354* (43)	0.063 (43)	0.061 (43)		
PTC ^{a)}	0.466** (40)	0.277 (40)	0.196 (40)	-0.164 (40)	
pH	-0.986*** (18)	-0.242 (18)	-0.104 (18)	-0.582** (18)	0.112 (15)

(), a), *, **, ***: See foot note of Table 2.

Table 5. Bacterial and biochemical changes of initial (A) and at the time of off-flavor (B) in cold stored *Ps. fluorescens* inoculated milk

A: Initial									
Series	PTC×10 ⁻⁴	Acidity (%)	pH	A ₆₆₀	VBN (mg%)	FFA (mℓ alkali/100 g fat)	Alcohol test	COB	COB-P
Ps I	<0.03	0.122	—	0.113	0.43	0.77	—	—	—
Ps II	0.06	0.138	—	0.163	0.60	2.33	—	—	—
Ps III	0.1	0.109	—	—	0.36	0.85	—	—	—
PsH IV	0.15	0.097	6.88	0.143	0.44	0.80	(-) ^{b)}	(-)	(-)
PsS V	0.16	0.131	6.81	0.136	0.62	1.80	(-)	(-)	(-)
PsN VI	0.2	0.135	6.71	0.118	0.62	1.33	(-)	(-)	(-)
Average	0.09759 ^{a)}	0.122	6.80	0.135	0.51	1.31			
±SD		±0.016	±0.09	±0.020	±0.12	±0.64			

B: At the time of off-flavor										
Series	Days of flavor change	PTC×10 ⁻⁴	Acidity (%)	pH	A ₆₆₀	VBN (mg%)	FFA (mℓ alkali/100 g fat)	Alcohol test	COB	COB-P
Ps I	14	44,000	0.122	—	0.248	1.68	5.60	—	—	—
Ps II	11	7,300	0.149	—	0.151	0.42	1.20	—	—	—
Ps III	11	24,000	0.152	—	0.308	0.98	2.28	—	—	—
PsH IV	8	10,000	0.122	6.88	0.195	0.84	1.99	(-) ^{d)}	(-)	(+)
PsS V	8	13,000	0.153	6.80	0.199	1.00	2.37	(-)	(-)	(+)
PsN VI	5	2,200	0.141	6.60	0.109	0.62	3.24	(-)	(-)	(-)
Average	9.5	11,408.4 ^{c)}	0.140*	6.76	0.202	0.92	2.78			
±SD	±3.2		±0.014	±0.14	±0.070	±0.43	±1.53			

a) Geometric mean was calculated regarding <30 as 30; Logarithmic expression was 2.989±0.312.

b) Negative reaction.

c) Geometric mean; Logarithmic expression was 8.057±0.448.

d) Negative reaction.

* Significant at P<0.05 in t-test on the difference of average values between A and B.

*** P<0.001.

Table 6. Correlation coefficients between the quality tests on *Ps. fluorescens* inoculated milk

	Acidity	A ₆₆₀	VBN	FFA	PTC
A ₆₆₀	0.590*** (38)				
VBN	0.419** (39)	0.794*** (38)			
FFA	0.399* (39)	0.767*** (38)	0.961*** (39)		
PTC ^{a)}	0.483** (39)	0.482** (38)	0.485** (39)	0.438** (39)	
pH	-0.660** (15)	-0.369 (15)	-0.381 (15)	-0.602* (15)	-0.378 (15)

(), a), *, **, ***: See foot note of Table 2.

の両時点間の差が非常に少なく，各測定値のばらつきも両時点共に FFA 以外はあまり大きくないことが特徴的であった。

相関係数を各測定値間について求めたのが，Table 4 である。酸度と pH 間の r が -0.986 ($P < 0.001$, $n = 18$) と高いのは当然とうなづけよう。しかしこれ以外にあまり高い値を示すものは少なく，FFA と pH ($r = -0.582$, $n = 18$)，酸度と PTC ($r = +0.466$, $n = 40$)，酸度と VBN 間 ($r = +0.405$, $n = 43$) がいずれも 1% 水準で続き，他に酸度と FFA 間で 5% 水準の有意相関が認められたにすぎない。全体として，市乳に比べ測定値相互間の関連がかなり低いといえよう。

3. *Ps. fluorescens* 接種乳 (Ps 乳)

実験室殺菌を行なった試料に *Pseudomonas fluorescens* AHU 1143 を接種して 6°C で保存した試料の各種乳質検査法による測定値を，保存前と風味変化時点についてそれぞれ Table 5A と 5B に表した。実験室殺菌乳における PTC (Table 3A) が殆んどすべて $< 30/m\ell$ であるので，Table 5A に見られる PTC はそのまま，添加した *Ps. fluorescens* の菌数を表わしていると考えることができ，その値は平均約 $980/m\ell$ であった。風味変化は平均 9.5 日で生じ，その時点では平均 $11 \times 10^7/m\ell$ の菌数となり，保存前の菌数との差は $P < 0.001$ で有意であった。pH は殆んど変化せず，酸度も平均値でわずかに 0.018% のみ上昇したにすぎなかったが，この差は有意 ($P < 0.05$) であった。A₆₆₀，VBN，FFA の保存前の平均値は，いずれも pH や酸度の場合と同様に実験室殺菌乳の平均値 (Table 3A) にほぼ等しいものであったが，風味変化時点では共に実験室殺菌乳よりも大きな平均値を示した (Table 5B, 3B)。しかし，その時点における測定値の試料によるばらつきはかなり大きく，変動係数¹⁹⁾は A₆₆₀，VBN，FFA がそれぞれ 35%，47%，55% もの高さに達した。生乳時に標準平板菌数 (Table 3A) の多かった Ps II 試料では，上記 3 測定値のいずれもが最初に比べて風味変化時点で低下した。Ps N VI 試料の A₆₆₀ も最初に比べて低い値を示した。

測定値間の相関係数は実験室殺菌乳におけるよりも全体に r の値が高く，VBN と FFA 間では $r = +0.961$ ($P < 0.001$, $n = 39$) となった (Table 6)。これに続く A₆₆₀ と VBN，A₆₆₀ と FFA，酸度と A₆₆₀ 間ではそれぞれ $r = +0.794$ ($P < 0.001$, $n = 38$)， $+0.767$ ($P < 0.001$, $n = 38$)， $+0.590$ ($P < 0.001$, $n = 38$) となり，他の測定値間にも有意相関の認められるものが多かった。有意でないものは A₆₆₀，VBN，PTC のそれぞれと pH の間のみで，これ

らはいずれも $n = 15$ と試料数が少ないため， -0.37 以上の r 値にも拘らず有意性を示さなかった。

4. 推定限界値の算出

前報¹⁶⁾と同様に風味変化に対応する各測定値の推定限界値を求めたのが Table 7 である。市乳 (Table 7A)，実験室殺菌乳 (同 7B)，Ps 乳 (同 7C) のそれぞれにおいて風味変化の有無との一致率が最高の値を示したのはいずれも PTC で，その推定限界値はそれぞれ 2×10^7 ， 1×10^6 ， $6 \times 10^7/m\ell$ であった。特に Ps 乳では生乳における推定限界値と全く一致した¹⁶⁾。酸度の限界値は 3 者が共に 0.140% を示し，風味変化とはいずれも 80% 以上の一致を見せた。これに対し pH の場合は試料数の少ない故もあって，信頼できる限界値の設定は不可能であった。A₆₆₀ は生乳における限界値よりもかなり低い値を示し，

Table 7. Estimated critical values corresponding to off-flavor of cold stored market milk (A), laboratory pasteurized milk (B) and *Ps. fluorescens* inoculated milk (C)

A: Market milk			
	<i>n</i>	Critical value	% Coincidence with off-flavor
PTC (/mℓ)	54	2×10^7	88.89
Acidity (%)	54	0.140	85.19
A ₆₆₀	54	0.140	77.78
VBN (mg%)	51	0.75	72.55
FFA (mℓ alkali/100 g fat)	54	2.50~3.00	70.37
B: Laboratory pasteurized milk			
	<i>n</i>	Critical value	% Coincidence with off-flavor
PTC (/mℓ)	40	1×10^6	92.50
Acidity (%)	43	0.140	79.07
pH	18	(6.00~6.60)**	77.78
A ₆₆₀	43	(0.150)*	60.47
VBN (mg%)	43	(0.60)**	67.44
FFA (mℓ alkali/100 g fat)	43	(2.60~3.00)*	60.47
Alcohol test	18	(+)**	77.78
COB	18	(+)**	77.78
COB-P	18	(+)**	77.78

()**: Not significant at $P < 0.01$.
 ()*: Not significant at $P < 0.05$.

C: *Ps. fluorescens* inoculated milk

	<i>n</i>	Critical value	% Coincidence with off-flavor	Critical value in raw milk ¹⁶⁾
PTC (/ml)	39	6×10^7	92.31	6×10^7
Acidity (%)	39	0.140	82.05	0.150~0.170
pH	15	(6.80)*	73.33	6.60 ~6.65
A ₆₆₀	38	0.150	84.21	0.250
VBN (mg%)	39	0.70~0.80	92.31	0.60 ~0.75
FFA (ml alkali/100 g fat)	39	2.40~2.80	84.62	3.30 ~3.70
Alcohol test	15	(+)**	73.33	+
COB	15	(+)**	73.33	+
COB-P	15	+	93.33	+

()**: Not significant at $P < 0.01$. ()*: Not significant at $P < 0.05$.

実験室殺菌乳では推定限界値を決定することができなかった。VBN の場合、設定不可能な実験室殺菌乳を除き、推定限界値は市乳、Ps 乳共に生乳のそれに近く、特に Ps 乳では高い一致率 (92%) が得られた。FFA にも VBN と同様の傾向が認められたが、推定限界値は生乳に比べて低い値であった。

定性的な乳質判定法である AT, COB, COB-P では、Ps 乳における COB-P を除いて信頼できる限界値の設定は全くできなかった。しかし、この Ps 乳における COB-P の限界値で計算した風味変化との一致率は生乳¹⁶⁾の場合と同じ93%もの高い値であった (Table 7C)。

考 察

市乳やそのプラントから直接採集した殺菌乳、あるいは実験室殺菌乳、およびこれに純粋培養菌を植えつけて保存した牛乳について、菌数とフレーバーやその他乳質との関連を調べた研究は多い。風味の変化と菌数の関係はうすいという意見もあるが^{20~22)}、殆どどの研究者は殺菌乳のフレーバーと菌数の関係が深いことを認めている^{23~25)}。牛乳に風味変化を生じさせるのに必要な菌数は、菌の種類や性質、あるいは発育のスタイルによって左右されるけれども^{29,30)}、これら多くの文献から殺菌乳の風味がどの程度の菌数で変化または低下するかを拾い出してみると、その範囲は 10^5 から 10^9 /ml まで広がっており、多くは $10^6 \sim 7$ /ml となっている^{9,14,24,26,31~37)}。

本実験における市乳の風味変化は、保存開始後平均 10 日間で生じ、その時点の PTC の平均は 18×10^7 /ml とかなり高い数値であった (Table 1B)。しかし、市乳の PTC のデータ全体から風味変化の生じる推定限界値を

求めると (Table 7A)、その菌数は 2×10^7 /ml となり、生乳¹⁶⁾における 6×10^7 /ml、本実験中 Ps 乳の同じく 6×10^7 /ml にほぼ同じ値となった。このことは実験室殺菌乳という特殊例を除けば、いずれも低温菌が多かれ少なかれ関与しているとみなされるビン装市乳、生乳、あるいは *Pseudomonas* を植えた牛乳において風味変化が生じるためには $2 \sim 6 \times 10^7$ /ml の菌数が必要であることを意味している。この場合、風味変化の有無と推定限界値で区分けした試料数との一致率は 89~95% (生乳を含む) であった (Table 7A, 7C および前報¹⁶⁾)。

菌数が $2 \sim 6 \times 10^7$ の中間として 4×10^7 /ml に達する日数を PTC 増加曲線 (図は省略) でたどってみると、市乳で 5~17 日、Ps 乳では 5~8 日となり、最低 5 日間を必要としている。但し本実験では 5 日目が保存開始後の最初の検査時点となっているので、実際にはこれよりも短かい可能性がある。LANGEVELD³⁸⁾ は 5°C で保存した市乳において菌数が 10^6 /ml になるには 8~23 日かかると報告しており、これに比べると本実験の場合、6°C という温度にもよるが、菌の発育がやや早いといえよう。

実験室殺菌乳における推定限界値は 1×10^5 /ml と他 2 者よりも 1 桁低い数値を示したが、この試料中には、極端に少ない 3×10^4 /ml 以下の菌数で風味変化の認められるもの (Table 3B の LII) がある。その原料乳の SPC を見ると、 29×10^6 /ml と用いた生乳中最高の数値を示していた (Table 3A)。清水ら⁹⁾によると市乳の中には菌数の少ないにも拘らず乳質の変化するものが存在するというが、それは殺菌前の菌数の影響があるためと考えられている^{6,8)}。PATEL and BLANKENAGEL⁷⁾ は生乳に 1×10^7 /ml 以上の菌数が含まれていると、これを殺菌し

た場合、その後の汚染がなくとも、またその後の菌数が少なくとも、2週間以内に必ず苦味が生じたと報告している。L II 試料の場合、原料生乳の低温菌数は $41 \times 10^4 / \text{ml}$ とあまり多くはないので、低温菌の耐熱性酵素^{10~13)}によるというよりも、中温菌の生産する酵素または代謝産物による風味の変化と考えるべきかも知れない。本試料の PTC の増加曲線 (図は省略) が全体的に他の試料に比べて低いのは、残存菌との間における相互作用²³⁾や、生乳の段階で生じた遊離脂肪酸 (Table 3 A) による発育抑制³⁹⁾の結果とも考えられる。

Ps. fluorescens を接種した殺菌乳においては予想に反し、 A_{660} , VBN, FFA の風味変化時点での測定値分布範囲がかなり大きなものとなった。L II に *Pseudomonas* を植えた Ps II では上の3測定値が保存ゼロ日に比べ、11日後の風味変化時点ですべても低くなっている (Table 5 A, B)。これが殺菌処理に生き残った菌と *Ps. fluorescens* との相互作用によるものか否かは不明である。

市乳においてはそれに含まれる保存前の低温菌数は保存性の指標とはならないという WATROUS ら¹⁵⁾の報告や、またそれによって保存性を予測することもできないという報告¹⁴⁾は、小川ら⁴⁰⁾の結果とは異なっているが、相互作用を考慮するならば、逆に同レベルの菌数を植えつけたとしても (Table 5 A)、培地としての殺菌乳が生乳時における菌数や乳成分組成においてさまざまであれば、結果として各種乳質検査法の測定値に大きな変動の生じた今回の結果と同じ意味を持つことになるだろう。

風味変化に対応する各測定値の推定限界値を全体と比較してみると、生乳¹⁶⁾にはほぼ同じか、あるいはそれよりも低目になっている (Table 7 A, B, C)。生乳と同じレベルにあるのは PTC と VBN であるが、pH を除いた残りはいずれも低い値となっている。pH は例数の少ない故もあるが、WITTER ら²⁰⁾や DAY and DOAN³⁴⁾の結果と同様、風味変化の目安とはなり得ないものと結論することができる。

本実験における市乳や Ps 乳のように、低温菌の関与がほぼ確実または明らかである殺菌乳の場合は、生乳に比べて各種測定値があまり高くないうちに風味変化の起きることが、以上の結果から明らかである。実験室殺菌乳のように耐熱性低温菌が主体と考えられる菌叢の場合には、本実験結果からは結論をひき出すことが難しく、より多数の試料を用いて実験を行えば一定の傾向が得られるかも知れない。

実験室殺菌乳データにばらつきが多い理由について考察してみると、耐熱性低温菌とはいえ、ここで検出され

る菌は本来中温菌である可能性が大きいので、低温保存中における発育が比較的遅い (図は省略)。それ故、乳質を変化させる原因のうち、生乳に含まれる細菌由来で加熱変性をしなかった酵素群の占める割合が、保存中に増殖する比較的種類の限られた耐熱性菌の作り出す酵素群よりも他の市乳や Ps 乳に比べて大きく、従って生乳時の菌数や菌の種類に影響されるためと推定される。

定性的な検査の中では Ps 乳における COB-P のみが風味変化に対応し (Table 7 C)、生乳の場合¹⁶⁾と同じ93%の一致率を示した。市乳の乳質測定では COB テストが酸度よりも変敗と一致しているという報告⁴¹⁾も見られるが、一般に COB テストでは酸度のかかなり高い所で陽性になるものが多いこと^{42,43)}、AT の方が COB よりほんの少し早く反応するという報告⁴⁴⁾、さらに風味変化の方が COB 陽性になるより2~3日も早い²¹⁾ということを考え合せると、COB-P を殺菌乳の風味変化や乳質変化の判定に利用可能か否かの結論づけは現段階では難しいものと考えられる。

市乳、実験室殺菌乳、Ps 乳の3者に共通して風味変化と最も関連の深いものは結局 PTC であり、これは前報¹⁶⁾の生乳の場合も同様である。しかし PTC の測定は時間と手間がかかり、日常の業務としてこれを行なうことは容易ではない。この意味で PTC に代り得るものとしては定性的乳質判定法としての COB-P をあげることができる。これは最も簡単なテストであり、しかも生乳において信頼性の高いことが示されており¹⁶⁾、本実験の Ps 乳では風味変化の指標になり得る可能性を有していると思われたので、この古典的な試験法の再検討を実験例を増して行なってみる必要があるだろう。

測定値相互間の相関関係において、3種類の試料のいずれにおいても有意な r が認められたのは酸度と PTC 間であり、続いて酸度と FFA 間である (Table 2, 4, 6)。殺菌乳における酸度と PTC との間の高い相関関係については BURGWARD and JOSEPHSON⁴⁵⁾も認めている。著者が前報¹⁶⁾で報告した生乳の場合も酸度と PTC 間に $r = +0.69$ ($P < 0.001$)、酸度と FFA 間に $+0.36$ ($P < 0.05$) の相関が認められたことから、酸度と PTC、または酸度と FFA 間にはいかなる種類の牛乳においても深い関係のあることがわかる。

実験室殺菌乳を除いて比べると、 A_{660} , VBN, および FFA の相互間にはいずれも比較的高い相関関係がある (Table 2, 6)。この3測定値は微生物のプロテアーゼまたはリパーゼ活性に依存しているため、一般に低温菌にはプロテアーゼおよびリパーゼを生産するものが多いこと

を考えれば^{13,28,46)}、これらの間の深い関係も低温菌によるものとして背かれよう。

Pseudomonas を使った実験によれば、牛乳のタンパク質分解や脂肪分解あるいはカゼインミセルのタンパク質分解はその数が $10^8\sim 9/m\ell$ で起るといふ^{30,47)}。またカゼイン溶液に植えた場合には、より少ない菌数でタンパク質分解の生じることが KIURU ら⁴⁸⁾ によって確かめられている。一方、VAN DER ZANT and MOOR⁴⁹⁾ は菌数とタンパク質分解度の間には関係がないと述べている。本実験の Ps 乳における A_{660} 、VBN、FFA 間の相関係数がいずれも 0.5 に近く、市乳における r はこれよりもやや低い値を示していることは、上の文献とも関連して興味深い問題である。

要 約

市販ビン装殺菌乳(市乳)、75°C 15分間処理した実験室殺菌乳、および同殺菌乳に *Pseudomonas fluorescens* を接種したもの(Ps 乳)についてこれらを 6°C で保存し、風味検査、ならびに低温菌数(PTC)、酸度、pH、タンパク質分解度(A_{660})、揮発性塩基態窒素(VBN)、遊離脂肪酸(FFA)、アルコールテスト、通常の煮沸試験(COB)およびリン酸塩添加煮沸試験(COB-P)の諸検査を経時的に行なった。

風味変化時点における各測定値の平均値を保存前のそれに比べると、市乳では PTC と VBN が、実験室殺菌乳では PTC のみが、Ps 乳では PTC と酸度がそれぞれ有意差を示した。前報と同様に各測定値について風味変化が生じる推定限界値を求めた結果、各検査法のうちで PTC が最も一致率の高い値を示した。この値は市乳では $2 \times 10^7/m\ell$ 、実験室殺菌乳では $1 \times 10^6/m\ell$ 、Ps 乳では $6 \times 10^7/m\ell$ となり、これらはいずれも 90% 前後の一致率であった。酸度の推定限界値は 3 試料共同じ 0.140% (一致率 79~85%) であった。また A_{660} では 0.140 (市乳) および 0.150 (Ps 乳)、VBN では 0.75 (市乳) および 0.70~0.80 mg% (Ps 乳)、FFA では 2.50~3.00 (市乳) および 2.40~2.80 ml アルカリ/100 g 脂肪 (Ps 乳) の推定限界値が得られた。定性的試験法では Ps 乳における COB-P テストのみ、陽性試料を風味変化したものと対応させることが可能であった。

以上の結果を全体としてみると、市乳や Ps 乳に風味変化を生じさせる時点に対応する各検査法の推定限界値は、生乳の場合と同じかまたはやや低いことが明らかとなった。しかし、実験室殺菌乳の場合は PTC と酸度を除き、信頼できる推定限界値は得られなかった。

酸度と PTC、および酸度と FFA の各測定値間には市乳、実験室殺菌乳、Ps 乳の 3 者いずれの場合にも有意な相関が認められた。低温菌の関与がほぼ確実またはそのものである市乳、Ps 乳では A_{660} 、VBN、FFA の相互間にも有意な比較の高い相関が見られた。

実験室殺菌乳および Ps 乳の試料中、生乳時に高い標準平板菌数を示した試料が、他のものとは異なった各種測定値を表わすことにつき論議された。また風味変化に最も深い関係をもつことの明らかとなった PTC は測定に手数のかかることから、それに代るべき COB-P テストの再検討の必要性が示唆された。

本研究を行なうにあたり有益なご指導、ご助言をいただいた安井勉教授に感謝の辞を表します。

引用文献

1. CANNON, R. Y.: Effect of pasteurization on growth response of psychrotrophs, *J. Dairy Sci.*, **54**: 756. 1971
2. SPECK, M. L.: Starter culture growth and action in milk, *ibid.*, **45**: 1281-1286. 1962
3. ASHTON, D. H. and BUSTA, F. F.: Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus*, *ibid.*, **51**: 842-847. 1968
4. VEDAMUTHU, E. R., WASHAM, C. J. and REINBOLD, G. W.: Isolation of inhibitory factor in raw milk whey active against propionibacteria, *Appl. Microbiol.*, **22**: 552-556. 1971
5. DUTTA, S. M., KUILA, R. K. and RANGANATHAN, B.: Effect of different heat treatments of milk on acid and flavor production by five single strain cultures, *Milchwissenschaft*, **28**: 231-233. 1973
6. HADLAND, G. and HOYE, T.: Bacterial activity and lipolysis in raw bulk milk during storage, as related to the keeping quality of the pasteurized milk, *Proc. 19th Int. Dairy Congr.*, **1E**: 368-369. 1974
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **37**: [2770]. 1975
7. PATEL, G. B. and BLANKENAGEL, G.: Bacterial counts of raw milk and flavor of the milk after pasteurization and storage, *J. Milk Food Technol.*, **35**: 203-206. 1972
8. OVERCAST, W. W. and ADAMS, G. A.: Growth of certain psychrophilic bacteria in pasteurized milk as influenced by previous excessive psychrophilic growth in the raw milk, *ibid.*, **29**: 14-18. 1966

9. 清水苗一・藤井伸朗・浜田泰子・池川佳子：牛乳の好冷細菌の増殖とその影響（第1報），乳技協資料，18(3)：11-22. 1968
10. MEYERHOFER, H. J., MARSHALL, R. T., WHITE, C. H. and LU, Margaret: Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P 26, *Appl. Microbiol.*, **25**: 44-48. 1973
11. WHITE, C. H. and MARSHALL, R. T.: Reduction of shelf-life of dairy products by a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* P 26, *J. Dairy Sci.*, **56**: 849-853. 1973
12. DRIESSEN, F.M.: Proteolysis in UHT-sterilized milk and milk products, *Zuivelzucht*, **68**: 514-515. 1976
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **38**: [8105]. 1976
13. 三河勝彦：牛乳の低温細菌の酵素学的研究の動向，酪農科学・食品の研究，**25**: A-205-215. 1976
14. BROITMAN, S., MALLMANN, W. L. and TROUT, G. M.: A simple test for detecting keeping quality for milk, *J. Milk Food Technol.*, **21**: 280-284. 1958
15. WATROUS, G. H., Jr., BARNARD, S. E. and COLEMAN, W. W., II: A survey of the actual and potential bacterial keeping quality of pasteurized milk from 50 Pennsylvania dairy plants, *ibid.*, **34**: 145-149. 1971
16. 三河勝彦・有馬俊六郎：低温保存生乳の風味変化と各種乳質検査法との関係，北大農邦文紀，**11**: 351-359. 1979
17. 三河勝彦・有馬俊六郎：凍結保存中における生乳および殺菌クリーム中の細菌数変化，北大農邦文紀，**11**: 336-344. 1979
18. 三河勝彦・有馬俊六郎：生乳乳質の凍結保存中における変化，北大農邦文紀，**11**: 345-350. 1979
19. SNEDECOR, G. W. and COCHRAN, W. G.: *Statistical Methods*, 6th ed., (畑村・奥野・津村共訳：統計的方法)，p. 60-62. 岩波書店，1972
20. WITTER, L. D., TRACY, P. H. and WILSON, H. K.: The keeping quality of pasteurized grade A milk offered for sale in the Chicago market, *Bull. Univ. Ill. Agr. Exp. Sta.*, **46(646)**: 1-20. 1959
21. THOMAS, S. B.: Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk, *Milchwissenschaft*, **21**: 270-275. 1966
22. ATHERTON, H. V., DOAN, F. J. and WATROUS G. H., Jr.: Observations on bacterial population and characteristics of bottled milk under refrigerated holding, *J. Dairy Sci.*, **36**: 570. 1953
23. GYLLENBERG, H., EKLUND, E., ANTILA, M. and VARTIOVAARA, U.: Contamination and deterioration of market milk. II. Significance of pseudomonads as deteriorating bacteria, *Acta Agr. Scand.*, **10**: 50-64. 1960
24. THOMAS, S. B. and DRUCE, R. G.: Psychrotrophic bacteria in refrigerated pasteurized milk, *Dairy Ind.*, **34**: 351-355, 430-433, 501-505. 1969
——— 乳技協資料，**20(3)**: 35-45. 1970
25. BOYD, J. C., SMITH, C. K. and TROUT, G. M.: The role of psychrophilic bacteria in the keeping quality of commercially pasteurized and homogenized milk, *J. Milk Food Technol.*, **18**: 32-36. 1955
26. OLSON, J. C., Jr., NIELSEN, A. J., THOMAS, E. L. and MORRIS, H. A.: Changes in bacterial counts and flavor of concentrated and recombined milks during storage at low temperatures, *J. Dairy Sci.*, **36**: 817-824. 1953
27. HANKIN, L. and ANDERSON, E. O.: Correlations between flavor score, flavor criticism, standard plate count, and oxidase count on pasteurized milks, *J. Milk Food Technol.*, **32**: 49-51. 1969
28. 三河勝彦：牛乳低温細菌の特性，酪農科学・食品の研究，**26**: A-153-163. 1977
29. GYLLENBERG, H., EKLUND, E., ANTILA, M. and VARTIOVAARA, U.: Contamination and deterioration of market milk. I. Growth characteristics of the most frequent saprophytic bacteria in milk, *Acta Agr. Scand.*, **9**: 371-389. 1959
30. GREENE, V. W. and JEZESKI, J. J.: Influence of temperature on the development of several psychrophilic bacteria of dairy origin, *Appl. Microbiol.*, **2**: 110-117. 1954
31. HAMMER, B. W.: *Dairy bacteriology*, 3rd ed., p.114-116. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1949
32. TINUOYE, O. L. and HARMON, L. G.: Growth of thermophilic psychrotrophic bacteria in refrigerated milk, *American Dairy Review*, **37(9)**: 26, 28, 30. 1975
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **38**: [2395]. 1976
33. 浜本典男・広田哲二・金内稔郎：市乳の微生物に関する研究。第1報。低温保存市乳の菌数と菌叢，食衛誌，**7**: 14-19. 1966
34. DAY, E. A. and DOAN, F. J.: A test for the

- keeping quality of pasteurized milk, *J. Milk Food Technol.*, **19**: 63-66. 1956
35. OVERCAST, W. W. and SKEAN, J. D.: Growth of certain lipolytic microorganisms at 4°C. and their influence on free fat acidity and flavor of pasteurized milk, *J. Dairy Sci.*, **42**: 1479-1485. 1959
36. OVERCAST, W. W.: Psychrophilic microorganisms and keeping quality of milk and its products, *ibid.*, **51**: 1336-1338. 1968
37. PUNCH, J. D., OLSON, J. C., Jr. and THOMAS, E. L.: Psychrophilic bacteria. III. Population levels associated with flavor or physical change in milk, *ibid.*, **48**: 1179-1183. 1965
38. LANGEVELD, L. P. M.: Keeping quality under cold storage conditions of normally and aseptically packaged pasteurized milk, *Koeltech.-Klimaat*, **64** (7): 136-138. 1971
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **34**: [620]. 1972
39. SWARTLING, P.: 牛乳の性質におよぼす生乳低温(0°~5°C)貯蔵の影響, 第51回 IDF 年次会議報告, p. III-6-17. 日本国際酪農連盟, 1966
40. 小川益男・久井伸次・近藤順子・吉田拓郎・池田修・田代安司・中野竜雄: 牛乳中における低温菌の発育態度と牛乳の保存温度. IV. 滅菌乳に純培養菌を接種した場合, 日本公衛誌, **15**: 629-636. 1968
41. ALEXANDER, H. and HIGGINBOTTOM, C.: Bacteriological studies on pasteurized milk, *J. Dairy Res.*, **20**: 156-176. 1953
42. SINHA, R. N., Singh, I. P. and NAMBUDRIPAD, V. K. N.: Studies on the keeping quality of pasteurized milk, *Indian J. Dairy Sci.*, **21**: 1-5. 1968
43. KIRCHHÜBEL, W. and REINSCH, G.: Keeping quality of pasteurized market milk, *Nahrung*, **20**: 661-667. 1976
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **38**: [8141]. 1976
44. GARVIE, E. I. and ROWLANDS, A.: The role of micro-organisms in dye-reduction and keeping-quality tests, *J. Dairy Res.*, **19**: 263-274. 1962
45. BURGWALD, L. H. and JOSEPHSON, D. V.: The effect of refrigerator storage on the keeping quality of pasteurized milk, *J. Dairy Sci.*, **30**: 371-383. 1947
46. WITTER, L. D.: Psychrophilic bacteria—a review, *ibid.*, **44**: 983-1015. 1961
47. 笹野 貢・岡田迪徳・長南隆夫・大浦義教: 冷温保存乳より分離した低温細菌の乳蛋白質分解作用, 日畜会報, **48**: 403-409. 1977
48. KIURU, K., EKLUND, E., GYLLENBERG, H. and ANTILA, M.: Die proteolytische Aktivität der psychrotrophen Mikroorganismen in der Hofbehältermilch, *Milchwissenschaft*, **26**: 138-141. 1971
49. VAN DER ZANT, W. C. and MOORE, A. V.: The influence of certain factors on the bacterial counts and proteolytic activities of several psychrophilic organisms, *J. Dairy Sci.*, **38**: 743-750. 1955

Summary

During the course of storage at 6°C of pasteurized bottled milk (market milk), laboratory pasteurized milk (75°C, 15 min: lab. past. milk), and milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* after pasteurization (Ps. milk), several milk quality tests were examined periodically: flavor test, psychrotrophic count (PTC), acidity, pH, proteolysis (A_{660}), volatile basic nitrogen (VBN), free fatty acidity (FFA), alcohol test, and clot-on-boiling test with and without addition of phosphate (COB-P and COB).

Comparing mean values, obtained from the respective tests at the time of the occurrence of off-flavor during storage, with those before storage; the significant difference were recognized in PTC and VBN on market milk, in PTC on lab. past. milk, and, in PTC and acidity on Ps. milk.

The critical values of PTC on three kinds of milk, calculated as in the previous paper¹⁶⁾, exhibited the highest reliability for the flavor evaluation among the tests examined. These values were 2×10^7 , 1×10^6 , and $6 \times 10^7/\text{ml}$ for market milk, lab. past. milk, and Ps. milk, respectively. Their coincidences (%) with off-flavor were around 90%. An identical critical value with 79-85% of the coincidences (%) of acidity, 0.140%, which was lower than that of raw milk reported previously¹⁶⁾, was obtained from three kinds of milk. On market milk, the critical values of A_{660} , VBN, and FFA were 0.140, 0.75 mg%, and 2.50-3.00 ml alkali/100 g fat, respectively; and, on Ps. milk, were 0.150, 0.70-0.80 mg%, and 2.40-2.80 ml alkali/100 g fat, respectively. Among three qualitative tests examined, only COB-P on Ps. milk showed a higher coincidence (%) with flavor deterioration though the number of the samples was small. These results showed that the critical values of the respective tests for a flavor defect in market milk

and in *Ps.* milk were the same as or lower than those in raw milk¹⁶⁾.

The significant correlations between acidity and PTC, and, between acidity and FFA were recognized in three kinds of milk. Relatively high correlation coefficients were obtained between A_{660} , VBN, and FFA in market milk, which is thought to be involved with psychrotrophs, and in *Ps.* milk.

The peculiarity was discussed on the data from the samples of lab. past. milk and *Ps.* milk that had shown high standard plate count at raw state. Though PTC has been proved to have the highest relationship to flavor deterioration of the milks, it can not be used routinely as a measure of off-flavor because of the time consuming procedure. Accordingly, the simpler test such as COB-P will have to be studied further in detail.