



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低温保存生乳の風味変化と各種乳質検査法との関係
Author(s)	三河, 勝彦; MIKAWA, Katsuhiko; 有馬, 俊六郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 11(4), 351-359
Issue Date	1979-11-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11930
Type	departmental bulletin paper
File Information	11(4)_p351-359.pdf



低温保存生乳の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 Milk Quality Tests and Flavor Deterioration of Cold Stored Raw Milk

(Studies on the effects of psychrotrophic
bacteria on milk quality part IV)

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)

生乳保存の際に起きる乳質の変化を検出する方法は、多くの種類が考案され実用化されている。しかし生乳を長期にわたり低温に保持する場合には低温菌の増殖があるために、通常の検査法ではその判定結果がしばしば乳質の真の評価を与えないことがある¹⁻⁴⁾。それゆえ、低温保存生乳の乳質検査には前培養 (Preliminary Incubation) 処理の採用されることが多く、低温菌をある程度増加させてから菌数の測定や還元試験などが行なわれる^{3,5-14)}。一方、生乳の乳質をこうした前処理なしに検定する方法のうちには、細菌の酵素活性や代謝産物を直接測定する方法がある。最も新しいもののひとつにピルビン酸の定量^{15,16)}があるが、ほかに低温菌の一般的な性質^{17,18)}としてみられるタンパク質分解力または脂肪分解力を測定することによって乳質の変化を判定するのも可能である¹⁹⁻²¹⁾。特にタンパク質分解については牛乳安定性との関連もあるため、多くの研究が行なわれている。

その二・三をあげてみると、矢野²¹⁾は冷凍や冷蔵中の生乳のアミノ酸を測定し、5°Cで冷蔵した場合、ならびに-20°Cで凍結した場合のいずれも20日目まではアミノ酸が増加しないことを示した。KACZOREKら²²⁾は生乳を5°Cで保存し、そのアンモニアを測定した結果、

3日間で1.5~2から4~5 mg/lに増加することを報告し、生乳の biological age を示すには NH₃ 含量を以て表わすのがよいと述べている。JUFPS²³⁻²⁶⁾はチロシン価 (Tyrosin Value) を低温菌によるタンパク質分解の目安とすべく詳しい検討を行なっている。

本報では、低温保存した生乳について、風味変化を生じる時点におけるタンパク質や脂肪の分解度を含むいくつかの検査法による測定結果、およびそれら相互間の関連を知ろうと試みた。

実験材料および実験方法

試料は北海道大学附属農場 (H)、札幌市内個人生産者の2牧場 (N および K)、ならびに札幌市内市乳処理工場受入乳 (S) のいずれも混合生乳である。従って実験開始時における搾乳後の経過時間はまちまちである。採取した生乳は実験室まで水冷して運搬し、到着後直ちに滅菌容器に分注して6±1°Cに保存し、最低7日間、最高29日間にわたり、原則として1~3日ごとに各試料1本ずつを取出して風味検査および各種分析に供した。

滴定酸度、アルコールテスト (70% エタノール使用: AT)、pH (pH メーター) の測定は常法で行なった。煮

* 「乳質におよぼす低温菌の影響に関する研究」第IV報

沸試験は 0.5M-KH₂PO₄ の 0.5 ml を 5 ml の牛乳に加えて行なうリン酸塩試験²⁷⁾ (COB-P) および無添加で加熱する通常の方法 (COB) の 2 通りを行ない、いずれも 5 分間煮沸して凝固の有無およびその程度を判定した。低温菌数 (PTC) は培地として Standard Methods Agar²⁸⁾ を用い、LEESMENT and DUFEU²⁹⁾ に従って 17°C 16 時間の前培養に続き 6°C で 4 日間培養する方法で測定した³⁰⁾。タンパク質分解度 (A₆₆₀)、揮発性塩基態窒素 (VBN)、および遊離脂肪酸 (FFA) は前報³¹⁾ と同じ方法を用いて測定した。風味検査は各サンプリング時点で行ない、変化の有無を記録した。

結 果

1. 各種の生化学的乳質検査法による生乳の品質測定

混合乳の 10 試料について、実験開始時点における 9 種類の検査法による測定値を Table 1 に示した。PTC は 30×10^4 以下/ml から 200×10^4 /ml まで分布しており、30 万以下のものを 30 万丁度として計算した 10 試料の幾何平均は 54×10^4 /ml であった。酸度の高い試料 (K) はその値が 0.157% と新鮮乳にしてはやや高く、一方最も酸度の低い試料 (IV H) では、その pH が 6.90 という異常乳に近い値であった。タンパク質分解度の A₆₆₀ は 0.122~0.167 の範囲で、平均 0.142 を示した。これに対し VBN は 0.32 mg% から高いものでは 0.94 mg% まで分布し、後述する風味変化に対応した推定限界値 0.60~0.75 mg% を越える試料が 2 点 (I N および II N) 認められた。ま

た FFA の平均は 2.05 ml アルカリ/100 g 脂肪であるが、これも分布は広く、1.15 から 3.21 までの値を示した。AT, COB-P, および COB テストは I H, II H, および III H を除く 7 試料について行なわれたが、いずれも陰性であった。

6°C で保存中の各試料の分析は 5, 8, 11, 14 および以後 3 日目ごとに 29 日まで行なったが、I N, II S, K, V H の各試料についてはその途中 2, 4, 6, 7 日目についても測定した。残余の試料が凝固して分析不能になったものについては以後の実験を打ち切った。以上の各時点での測定結果のうちから、風味が変化し始めた時点における各試料の分析結果を Table 2 に示した。なお、一たん風味の変化が認められても次の時点の試料で正常の風味を示す例があり、この様な場合には以降連続して変化が認められる最初の時点のデータを表示した。

上に述べたような風味変化が起きる、6°C における生乳の保存日数は 4 ないし 11 日と予想より長いものがあり、10 試料の平均は 6.6 日であった。PTC はその幾何平均が 32×10^7 /ml とかなり高く、多いものでは I H が 23×10^8 /ml を示した。この I H 試料の酸度は平均値の 0.218% よりも極端に高く 0.604%, FFA も平均値の 3.95 ml アルカリ/100 g 脂肪に比べ 4.37 という高い数値であり、A₆₆₀ や VBN も平均値を上廻っていた。

タンパク質分解度 A₆₆₀ の平均値は 0.220 であったが、多いものと少ないものとは約 2 倍の開きが認められた。また酸度、pH、VBN、FFA についても平均値±標

Table 1. Initial values of various quality tests on raw milk

Series	PTC × 10 ⁻⁴	Acidity (%)	pH	A ₆₆₀	VBN (mg %)	FFA (ml alkali/100 g fat)	Alcohol test	COB	COB-P
I H	110	0.121	—	0.149	0.42	1.15	—	—	—
II H	41	0.144	—	0.167	0.44	2.66	—	—	—
III H	32	0.127	—	0.129	0.32	3.21	—	—	—
IV H	<30	0.104	6.90	0.140	0.47	1.75	(-) ^{b)}	(-)	(-)
V H	—	0.153	6.57	—	0.56	—	(-)	(-)	(-)
I S	200	0.137	6.80	0.147	0.56	1.52	(-)	(-)	(-)
II S	—	0.154	6.68	—	0.47	—	(-)	(-)	(-)
I N	<30	0.138	6.72	0.122	0.75	1.99	(-)	(-)	(-)
II N	—	0.155	6.60	—	0.94	—	(-)	(-)	(-)
K	—	0.157	6.61	—	0.38	—	(-)	(-)	(-)
Average	54 ^{a)}	0.139	6.70	0.142	0.53	2.05			
±SD		±0.017	±0.12	±0.016	±0.19	±0.76			

a) Geometric mean was calculated regarding <30 as 30; Logarithmic expression was 5.736 ± 0.351 .

b) Negative reaction.

Table 2. Values of the tests on cold stored raw milk at the time of off-flavor

Series	Days of flavor change	PTC×10 ⁻⁴	Acidity (%)	pH	A ₆₆₀	VBN (mg%)	FFA (ml alkali/100 gfat)	Alcohol test	COB	COB-P
I H	11	230,000	0.604	—	0.281	1.43	4.37	—	—	—
II H	8	37,000	0.208	—	0.281	1.94	2.46	—	—	—
III H	8	17,000	0.158	—	0.304	0.77	5.22	—	—	—
IV H	8	15,000	0.140	6.72	0.168	1.31	3.00	(+)	(-) ^{b)}	(+)
V H	7	—	0.157	6.65	—	0.66	—	(±)	(-)	(+)
I S	5	65,000	0.257	5.70	0.143	0.44	4.92	(#)	(#)	(#)
II S	4	—	0.188	6.56	—	0.75	—	(+)	(-)	(+)
I N	5	7,400	0.157	6.53	0.143	0.63	3.74	(-)	(-)	(+)
II N	5	—	0.157	6.60	—	1.06	—	(-)	(-)	(+)
K	5	—	0.155	6.68	—	0.50	—	(-)	(-)	(+)
Average	6.6	32,000 ^{a)} ***	0.218	6.49	0.220*	0.95*	3.95*			
±SD	±2.2		±0.140	±0.36	±0.076	±0.48	±1.09			

a) Geometric mean; Logarithmic expression was 8.503 ± 0.533 .

b) Negative reaction.

* Significant at $P < 0.05$ in Student's t-test on the difference of average values between Table 1 and 2.

*** $P < 0.001$.

標準偏差がそれぞれ $0.218 \pm 0.140\%$, 6.49 ± 0.36 , $0.95 \pm 0.48 \text{ mg}\%$, $3.95 \pm 1.09 \text{ ml}$ アルカリ/100 g 脂肪といずれも大きければつきが観察された。AT および COB テストにおいては、この段階に到っても未だ反応が陰性を示す試料があるのに対し、COB-P の場合には、程度の差はあれ、いずれも陽性反応を示した。

以上のデータ (Table 2) は前述のように生乳保存中に毎日分析したものではないので、特に保存初期における乳質変化と風味との関連を正確に捕えているとは言いがたい。また、本実験の風味変化発生時のデータ (Table 2) を保存開始時のそれ (Table 1) と比べた場合、ばらつきが大きいので、Table 2 の数値の一部は Table 1 のデータの平均値±標準偏差の範囲に含まれたり、あるいは場合によっては Table 2 の値の方が Table 1 のそれよりも低い結果も現われた。各シリーズの牛乳中の菌叢がそれぞれ異なることを推定すれば、こうしたばらつきの大きいことは当然であろうと考えられる。そこで風味変化の時点における平均値が保存開始時に比べて有意な差を示しているか否かを t 検定により判定した。酸度と pH の場合、両方共に有意な差は認められなかったが、他の乳質検査法すなわち PTC, A₆₆₀, VBN, FFA における平均値の Table 1, 2 間の差はそれぞれ $P < 0.1\%$, $< 5\%$, $< 5\%$, $< 5\%$ の水準で有意であることが判明した

(Table 2)。

2. 風味変化に対応する各推定限界値の算出

Table 2 のデータにおいてばらつきが大きい原因は、前述した菌叢の違いという推定の他に、本実験法が同一容器から順次試料を取出す方法とは異なり、同一ロットの試料を多数の容器に分注して保存し、分析の時点でその容器を1個ずつ取出して測定を行なう方法であるためと考えられる。従って風味変化に対応する測定値の限界値をより適確に求めるため、各乳質測定法について次のような計算を行なった。

すなわち、今ある値 α でデータを2分し、 α 未満のものを(-)、 α 以上の測定値を(+)とする。風味変化を示し、かつ(+)である試料の数を A, 風味変化をせず、かつ(-)である試料の数を B とし、試料の総数を C とすれば風味変化との一致率(% coincidence) は $100 \times (A+B)/C$ で表わすことができる。そこでこの α を測定値分布における上下限範囲の1~2% (PTC については対数表示で約11%) に相当する間隔で数点設定して一致率をそれぞれ計算し、そのうちから最も高い一致率を示す α を推定限界値 (critical value) とした (Table 3)。

酸度の推定限界値は0.15~0.17% となり、pH の場合は6.60~6.65 となった。数字で表現可能な残る4種類の測定値—PTC, A₆₆₀, VBN, FFA の推定限界値はそれぞ

Table 3. Estimated critical values corresponding to the off-flavor of cold stored raw milk

Tests	<i>n</i>	Critical value	% Coincidence with off-flavor	Difference from initial data
PTC (/mℓ)	41	6×10 ⁷ (log : 7.778)	95.12	log : 2.042
Acidity (%)	68	0.150~0.170	82.35	0.031~0.011
pH	42	6.60~6.65	80.95	0.08~0.13
A ₆₆₀	41	0.250	82.93	0.108
VBN (mg %)	67	0.60~0.75	83.58	0.07~0.22
FFA (mℓ alkali/100 g fat)	41	3.30~3.70	90.24	1.25~1.65
Alcohol test	42	+	83.33	
COB	42	+	78.57	
COB-P	42	+	92.86	

Table 4. Correlation coefficients between milk quality tests

	pH	Acidity	A ₆₆₀	VBN	FFA
Acidity	-0.955*** (42)				
A ₆₆₀	-0.256 (15)	0.308* (41)			
VBN	-0.373* (42)	0.455*** (67)	0.540*** (40)		
FFA	-0.442 (15)	0.362* (41)	0.417** (41)	0.260 (41)	
PTC ^{a)}	-0.750** (15)	0.693*** (41)	0.488** (41)	0.398* (40)	0.473** (41)

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

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

(): *n* of pairs of values.

れ 6×10⁷/mℓ, 0.25, 0.60~0.75 mg%, 3.3~3.7 mℓ アルカリ/100 g 脂肪となった。これらのうちで最も風味変化の有無に対応していると考えられるのは、95.1% という数字から判定すると低温菌数ということになる。

定性的乳質判定法である AT, COB-P, および COB の推定限界値としては、いずれも反応が陽性になった時点を候補値として一致率を計算した。その結果はリン酸塩添加煮沸試験が3者の中で最もよい値を示し、定量的測定法と比較しても PTC に次ぐよい成績であった (Table 3)。

3. 検定法相互間の相関関係

定性的判定法を除く6種類の乳質検査法によるデータについて、相互間の相関関係を求めたのが Table 4 である。用いたデータのうち、PTC の測定値については $<30 \times 10^4$ を 30×10^4 丁度として計算してある。その結果、pH と A₆₆₀, pH と FFA, および VBN と FFA 間の相関係数が有意性を示さなかった以外は、すべての測定値間で有意な相関係数が得られた。中でも酸度と pH の相関係数は $r = -0.955$ (P<0.001) と非常に高く、この回

帰直線を求めると

$$Y = 7.282 - 4.177(\pm 0.206) X$$

(但し、Y は pH, X は酸度、カッコ内の数字は回帰係数の標本標準偏差) となった。タンパク質に関連した測定値である A₆₆₀ と VBN 間の相関も高く、 $r = +0.540$ (P<0.001) を示した。酸度は他のいずれの項目に対しても有意相関が認められ、その係数は 0.3~0.7 となった。とりわけ PTC との間の r は $+0.693$ (P<0.001) と高い相関を示し、長期保存乳におけるひとつの特徴とも言える現象を表わしている。一方、相対する PTC の場合もまた、いずれの項目に対しても有意な相関が存在し、その係数は 0.4~0.75 を示した。

考 察

乳質の判定は細菌数、生化学的な変化、物理的变化、風味の変化などの検出によって行なわれるのがふつうであるが、その結果得られる評価が用いる方法によって異なるのはさげられない。従って、いかなる方法を用いれ

ば最も妥当な判定が得られるかが、従来より難しい問題のひとつとして研究されている。本報では風味の変化を軸として、これとその他の乳質判定法との関連について考察を行なった。

ROGICK and BURGWALD³²⁾は生乳の風味変化は低温菌数が $10^7/ml$ で起きることを報告している。また、バルク乳を $5^\circ C$ で保存した時、変敗が最初に認められる時点の低温菌数は $7\sim 11 \times 10^6/ml$ であるという報告³³⁾もある。SOLBERG³⁾も同様に生乳で生化学的な変化が官能的に検出可能になるためには、細菌数が $10^6\sim 7/ml$ まで増加しなければならぬと述べている。これに対し、生乳における風味の変化と細菌数との間には相関が認められないという結果も報告されている^{34,35)}。本実験の結果は、保存前で平均 $54 \times 10^4/ml$ のPTCが風味変化の時点では約600倍の $32 \times 10^7/ml$ となった(Table 1, 2)。また、その結果から風味変化の起きる限界点を推定してみると、ほぼ100倍の $6 \times 10^7/ml$ になり(Table 3)、この点で本実験のデータを区分すると、風味変化の有無で振分けた場合と一致するものが95%に達した。選出された推定限界値 $6 \times 10^7/ml$ という数字は上述の諸報告とほぼ一致しており、生乳を冷蔵した場合、風味変化は低温菌数 $10^7/ml$ のオーダーで生じることが確認された。

著者のうち三河による総説¹⁷⁾において、生乳の風味変化時点の低温菌数(総説中のTable 14: Mikawa)が $1 \times 10^8/ml$ となっているのをここに $6 \times 10^7/ml$ と訂正したい。

化学的乳質判定法としての酸度は、保存性子知の方法としては好ましくないといわれるが、これは低温菌には、酸を生成するものが少ないという理由による¹⁸⁾。Table 2に示した風味変化時点での酸度の平均は0.218%であるが、この値と保存前の平均値0.139%(Table 1)との間には有意差がない。しかし推定限界値0.150~0.170%(Table 3)でデータを振分けると、その82%が風味変化の有無と一致した。

生乳の酸度が低温に保存した場合でも僅かずつゆっくりと上昇すること^{36,37)}は、低温菌として分離される属の中に*Lactobacillus*や*Streptococcus*が含まれていることからうなづける^{18,38)}。冷蔵生乳中で乳酸菌は、低温菌による発育抑制³⁹⁾やその他の相互作用¹⁷⁾によって単独の発育とは違った発育をする可能性がある。従って乳酸菌がその活動によって、酸度上昇原因の大部分を担っていることは明らかであるが、低温保存乳における酸度の増加には、低温菌リパーゼによる脂肪の加水分解で生じた遊離脂肪酸の関与も考えられる。

酸度およびpHのTable 2における平均値とTable 1における平均値の差はそれぞれ0.079%および0.24で、これは有意ではない。酸度の推定限界値0.150~0.170%およびpHの6.60~6.65はTable 1の平均値との差が両者共さらに小さくなっている。このことから、酸度ならびにpHの場合、推定限界値0.150~0.170%と6.60~6.65を低温保存乳の乳質変化の目安とすることは、それぞれのデータの81%および82%が風味変化の有無と一致しているにも拘らず、不適當であると考えられる(Table 3)。

本実験において、生乳を $6^\circ C$ に保存した場合に風味変化を生じる日数は平均6.6日であるが、これはHAWNEY and ROYALによる実験³³⁾では $5^\circ C$ で3.5~4.5日(腐敗臭)、さらに中西ら⁴⁰⁾による $6^\circ C$ で4日、 $1.5^\circ C$ で8日(風味、アルコールテスト)という生乳保存データに比べるとやや大きな値である。Table 2における風味変化を表わす日数は、連続して変化が認められる最初の日数であり、一たん風味が変化しても、次の分析時に正常なフレーバーを示した場合にはこの日数が表示されない。また分析時点についても0, 5, 8, 11, …以後3日目毎の試料と0, 2, 4, 5, 6, 7, 8日目に分析した試料の2種類があって、保存初期の変化を適確には捕え難い。以上2つの原因により、6.6日という風味変化日数が正確な値を表わしていない可能性を否定することはできないであろう。前報³¹⁾では $+2^\circ C$ において酸度が0.17~0.18%を越えるには10~15日間かかると推定されたのに対し、今回の $6^\circ C$ では0.17%に達する日数を酸度上昇カーブ(図は省略)から推定して、その平均をとってみると、6.2(± 2.6 :標準偏差)日と $2^\circ C$ の場合の約半分になった。一方、風味変化と高い対応を示した低温菌数の増加曲線から、 $6 \times 10^7/ml$ に達する日数の平均値を同様に計算すると 4.8 ± 1.4 日となり、かなり早い時点で乳質変化の生じていることが推定される。この4.8日という数字は上述の報告に近い値であり、ほぼ正確に実態を表わすものと考えられる。

タンパク質の分解を表わす A_{660} とVBNの風味変化時点における平均値は前者が0.220、後者が0.95 mg%で、保存前に比べるといずれも5%水準で有意差が認められた(Table 1, 2)。またその推定限界値はそれぞれ0.250および0.60~0.75 mg%であった(Table 3)。JUFFSは本報における A_{660} に相当するチロシン価(TV)について詳細な研究を行ない、生乳を $5^\circ C$ で保存する際にTVがその変敗を検出する指標となり得ることを報告している^{23~26)}。またKACZOREKら²²⁾は本報のVBNに

相当するアンモニア含量が指標として優れていることを報告している。しかし本実験の個々のデータをみると、保存前よりも風味変化時点で数値の低い試料が A_{660} 、VBN の双方に認められ (A_{660} : IS, VBN: IS, IN), また VBN では保存前にすでに推定限界値の 0.75 mg% (Table 3) 以上の値を示す試料 (IN, II N) がある。Table 1, 2 につき平均値 \bar{x} と標準偏差 SD から変動係数 ($SD \times 100 / \bar{x}$) を計算してみると、VBN では保存前および風味変化時点においてそれぞれ 35.2% および 50.5% となった。また、 A_{660} のそれは保存前が 11.2%, 風味変化時点では 34.6% となり、JUFFS²³⁾ の新鮮乳において TV の変動が多いという結果とは反対の傾向を示した。前報³¹⁾ の凍結乳では VBN がその感度の良さによって保存限度判定の尺度となり得る結果を与えたにも拘らず、本実験の 6°C 保存の場合には、上述の様なばらつきの大さきのために A_{660} 、VBN のいずれもが乳質判定の指標としては利用し難いものと考えられる。

生乳の FFA を測定した志賀ら⁴¹⁾ は PERRIN and PERRIN の方法⁴²⁾ を用い、生乳の FFA が 1~2 mM になると酸敗臭を感じ始めると報告している。この生乳の脂肪率を 3.5% と仮定して、2 mM という値を本実験で用いた FRANKEL and TARASSUK 法⁴³⁾ による値に換算すると、約 2.9 ml アルカリ/100 g 脂肪になる。一方、斎藤ら⁴⁴⁾ は HARPER 法⁴⁵⁾ による Acid Degree (AD: 本実験の FFA の単位に殆んどそのまま対応する) で牛乳のランシッドの原因となるリパーゼ作用を表現しているが、良質乳では AD が約 2 であったという。本実験における保存前 FFA の平均値は 2.05 (Table 1) であって斎藤らの値と一致している。これが風味変化を起す時点では平均値が 3.95 となり、5% 水準で保存前の平均値との間に有意差が認められた。また風味変化に対応する推定限界値は 3.30~3.70 (Table 3) で志賀ら⁴¹⁾ の値よりもやや高い数値となった。FRANKEL and TARASSUK 法は他の FFA 測定法に比べて高い値を示すという研究²⁰⁾ があり、これによれば本法は他のいくつかの方法よりは高い値を示すが、HARPER 法とはほぼ同じ値になるという。本法と PERRIN and PERRIN 法との比較は行なわれていないが、もし、前者が後者よりも高い値を示すとすれば、本実験の推定限界値は志賀らの値に、より近づくことになろう。

非定量的な乳質判定法である煮沸試験 (COB) は方法が簡単なため、古くから用いられている。一般に生乳では酸度が 0.26% 以上になると COB 陽性になる⁴⁶⁾ といわれるが、最初の菌数の少ないものでは菌数が $10^7 \sim 8/m\ell$

になっても COB 陰性のものが存在するという報告⁴⁷⁾ もある。THOMAS⁴⁸⁾ によれば、3~5°C で保存した生乳は 8~12 日間で COB テストがプラスになるという。また中西ら⁴⁰⁾ は COB の結果は風味テストやアルコールテストの結果よりも陽性になるのがやや遅いと報告している。本実験の場合、通常の COB テストでは風味変化との対応があまり認められなかったのに対し、リン酸塩を加えたテスト (COB-P) では風味変化との一致率は 93% を示した。

各テスト間の相関を求めた結果 (Table 4)、酸度と pH 間の r が -0.95 と非常に有意性の高いものであるのは当然のことながら、酸度と低温菌数、および pH と低温菌との間にもそれぞれ +0.69 および -0.75 というかなり高い相関係数が見出された。低温菌数と化学テストとの間には相関がないという報告²²⁾ や、FFA と低温菌数間にも相関がない⁴⁹⁾、さらにはフレーバーと細菌数の間には相関関係が認められなかった^{34, 35)} というように否定的な報告が多いけれども、本実験の場合には、低温菌数と生化学的テスト間にはいずれも有意の相関があり、FFA と低温菌数との間には $r = +0.47$ という 1% 水準で有意な相関係数が認められた。

ここで以上の総ての結果を見渡した場合、風味変化、ひいては乳質変化を早期に適確にとらえるには、どのテストが最も望ましいかという古くからの問題が再び浮び上ってくる。本実験の結果を総合して考えると、定量的な方法では低温菌数、定性的な方法ではリン酸塩添加煮沸試験ということになる。後者は COB テストとしてはあまり一般的ではないが、方法が簡単で且つ乳質の変化をよく反映している点から、これを再認識し、より広く乳質判定に採用されてもよいものと思われる。

要 約

乳質判定に利用される 9 種類の検査法を用いて、6°C で低温保存された生乳の乳質変化を、10 試料につき特に風味変化との関連を中心として測定した。

保存前の生乳の測定値 (PTC は幾何平均、それ以外は算術平均±標準偏差) は低温菌数 (PTC) $54 \times 10^4/m\ell$ (対数値で 5.736 ± 0.351)、酸度 $0.139 \pm 0.017\%$ 、pH 6.70 ± 0.12 、タンパク質分解度 (A_{660}) 0.142 ± 0.016 、揮発性塩基態窒素 (VBN) $0.53 \pm 0.19 mg\%$ 、および遊離脂肪酸 (FFA) $2.05 \pm 0.76 ml$ アルカリ/100 g 脂肪であった。これに対し同じ生乳を 6°C に保存して風味変化の生じる日数は 6.6 ± 2.2 日で、その時点における上記の各測定値はそれぞれ $32 \times 10^7/m\ell$ (8.503 ± 0.533)、 $0.218 \pm 0.140\%$ 、 6.49 ± 0.36 ,

0.220±0.076, 0.95±0.48 mg%, および 3.95±1.09 ml アルカリ/100g 脂肪であった。これらの値は酸度と pH を除き、保存前の平均値に対して t 検定の結果、有意な差を示した。

アルコールテスト、リン酸塩添加および無添加の煮沸試験 (COB-P および COB) の結果は、保存前の全試料が陰性であったのに対し、風味変化時点では COB-P がすべて陽性を示した以外、他の 2 種のテストではまじまじの結果であった。

風味変化時点における各検査法のより適格な限界値を求めるため、測定値分布における上下限範囲の 1~2% に相当する間隔で設定した複数の数値につき、風味変化の有無による区分との一致率 (%) を計算した。これらのうちで最も高い一致率を示すものを推定限界値としたが、その値は PTC 6×10^7 /ml, 酸度 0.150~0.170%, pH 6.60~6.65, A₆₆₀ 0.250, VBN 0.60~0.75 mg%, および FFA 3.30~3.70 ml アルカリ/100g 脂肪となった。これらの数値のうち最も風味変化と対応しているのは PTC であり、95% が風味変化の有無と一致した。定性的テストのうちでは COB-P が良く対応し、風味変化との一致率は 93% に達した。

PTC と他の検査法との間、および酸度とその他のテストの間にはいずれも有意な相関関係が認められ、中でも酸度 (X) と pH (Y) 間の $r = -0.955$ ($P < 0.001$, $n = 42$) とその回帰直線 $Y = 7.282 - 4.177 (\pm 0.206 : SD) X$, および PTC と酸度間の $r = +0.693$ ($P < 0.001$, $n = 41$) が注目された。

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。また生乳試料を提供して下さった野崎牧場、永野牧場、雪印乳業札幌工場の皆様ならびに推定限界値に関して示唆をいただいた清水弘氏に感謝致します。

引用文献

- LÜCK, H.: Bacteriological quality tests for bulk-cooled milk, *Dairy Sci. Abstr.*, **34**: 101-122. 1972
- BUSSE, M.: Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der bakteriologischen Qualität kühlgelagerter Milch, *Milchwissenschaft*, **21**: 289-293. 1966
- SOLBERG, P.: Assessment of the bacteriological quality of cooled bulk milk from the farm, S 48 牛乳・乳製品の規格成分分析事業専門委員会資料, p. 153-170. 日本国際酪農連盟, 1973
- BRAZIS, A. R. and BLACK, L. A.: Some factors affecting the correlation of methylene blue reduction times and standard plate counts of raw milk, *J. Milk Food Technol.*, **29**: 255-259. 1966
- HARTLEY, J. C., VEDAMUTHU, E. R. and REINBOLD, G. W.: Bacteriological methods for evaluation of raw milk quality. A review. II. Bacterial tests used to measure milk quality, *J. Milk Food Technol.*, **32**: 4-15. 1969
- JOOSTE, P. T. and GROENEVELD, H. T.: Bacterial counts and dye reduction tests in relation to the keeping quality of South African pasteurized milk, *S. Afr. J. Dairy Technol.*, **3**: 193-201. 1971
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **34**: [3779]. 1972
- TATINI, S. R., DABBAH, R. and OLSON, J. C., Jr.: Interrelationship among some bacteriological methods used for the examination of farm bulk tank milk supplies, *J. Milk Food Technol.*, **28**: 368-371. 1965
- JOHNS, C. K.: Applications and limitations of quality tests for milk and milk products. A review, *J. Dairy Sci.*, **42**: 1625-1650. 1959
- JOHNS, C. K.: Preliminary incubation for raw milk samples, *J. Milk Food Technol.*, **23**: 137-141. 1960
- JOHNS, C. K.: Bacteriological testing of milk for regulatory purposes —Usefulness of current procedures and recommendations for change; II. Bacteriological testing of raw milk for regulatory purposes, *ibid.*, **34**: 173-180. 1971
- REINBOLD, G. W., JOHNS, C. K. and CLARK, W. S., Jr.: Modification of the preliminary incubation treatment for raw milk samples, *ibid.*, **32**: 42-43. 1969
- JOHNS, C. K. and BERZINS, I.: The value of preliminary incubation in bacteriological tests for milk, *Proc. 15th Int. Dairy Congr.*, **3**: 1293-1302. 1959
- DRUCE, R. G. and THOMAS, S. B.: Preliminary incubation of milk and cream prior to bacteriological examination: A review, *Dairy Sci. Abstr.*, **30**: 291-307. 1968
- MORSE, P. M., JACKSON, H., McNAUGHTON, C. H., LEGATT, A. G., LANDERKIN, G. B. and JOHNS, C. K.: Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk-tank

- milk. I. Influence of two-day storage and effect on results of preliminary incubation, *J. Dairy Sci.*, **52**: 1182-1187. 1969
15. HEESCHEN, W.: Biochemische Veränderungen von Lebensmitteln durch psychrotrophe Mikroorganismen, *Arch. Lebensmittelhyg.*, **23**: 291-298. 1972
 16. TOLLE, A., HEESCHEN, W., WERNERY, H., REICHMUTH, J. und SUHREN, G.: Die Pyruvatbestimmung—ein neuer Weg zur Messung der bakteriologischen Wertigkeit von Milch, *Milchwissenschaft*, **27**: 343-352. 1972
 17. 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
 18. WITTER, L. D.: Psychrophilic bacteria —A review, *J. Dairy Sci.*, **44**: 983-1015. 1961
 19. ZMARLICKI, S.: Contents of free volatile fatty acids in raw milk stored at different temperatures, *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Technologia Rolno-Spozywoza*, **7**: 173-183. 1971
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **35**: [2632]. 1973
 20. 日本国際酪農連盟: 第56回 IDF 年次会議報告, A-DOC 10, A-21. 1972
 21. 矢野信礼・鈴木一郎・石井徳蔵・加藤貞雄: 牛乳中の遊離アミノ酸の加熱, 冷凍および冷蔵による変化, 日本畜産学会第62回大会講演要旨, p. 81. 1973 および畜試研報, **29**: 83-88. 1975
 22. KACZOREK, W., MOLSKA, I. and PIJANOWSKI, E.: Some proteolytic and microbiological changes in cold stored raw milk, *Roczniki Technologii Chemii Żywności*, **23**: 107-117. 1973
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **36**: [1591]. 1974
 23. JUFFS, H. S.: Proteolysis detection in milk; I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors, *J. Dairy Res.*, **40**: 371-381. 1973
 24. JUFFS, H. S.: Proteolysis detection in milk; II. The effect of preincubation of raw and laboratory pasteurized bulk milk samples on tyrosine value and its relationship with bacterial populations, *ibid.*, **40**: 383-392. 1973
 25. JUFFS, H. S.: Proteolysis detection in milk; III. Relationships between bacterial populations, tyrosine value and organoleptic quality during extended cold storage of milk and cream, *ibid.*, **42**: 31-41. 1975
 26. JUFFS, H. S.: Proteolysis detection in milk; IV. Starch-gel electrophoresis and formol titration, *ibid.*, **42**: 277-283. 1975
 27. RAMSDELL, G. A., JOHNSON, WM. T., Jr. and EVANS, F. R.: A test for the detection of milk unstable to heat, *J. Dairy Sci.*, **14**: 93-106. 1931
 28. American Public Health Association: Standard methods for the examination of dairy products, 11th ed., p. 415-416. APHA, New York, 1960
 29. LEESMENT, H. and DUFEU, J.: A rapid method for determining the psychrophilic count in milk, *Proc. 16th Int. Dairy Congr.*, **C**: 392-397. 1962
 30. 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
 31. 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
 32. ROGICK, F. A. and BURGWALD, L. H.: *J. Milk Food Technol.*, **15**: 181-185. 1952
——— 矢野信礼: 畜産物の低温貯蔵, 日畜会報, **39**: 91-99. 1968
 33. HAWNEY, S. G. and ROYAL, L.: The effect of storage on the growth of psychrophilic bacteria and on the flavor of bulk collected milk, *Proc. 18th Int. Dairy Congr.*, **1E**: 502. 1970
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **32**: [4856]. 1970
 34. NILSSON, R. and BOCKELMANN, I. von: The use of the methylene blue reduction test for assessing the bacteriological quality of bulk collected milk; I. Application on milk from the Halmstad-Vallberga area, *Meddn. Svenska Mejeriern. Riksfören. produkttekn. adv.*, No. 83(I): 5-13. 1965
 35. NILSSON, R. and BOCKELMANN, I. von: The use of the methylene blue reduction test for assessing the bacteriological quality of bulk collected milk; II. Application on milk from Malmö area, *ibid.*, No. 83(II): 19-26. 1965
 36. PENNINGTON, M. E.: Bacterial growth and chemical changes in milk kept at low temperatures, *J. Biol. Chem.*, **4**: 353-393. 1908
 37. RAVENEL, M. P., HASTINGS, E. G. and HAMMER, B. W.: The bacterial flora of milk held at low temperatures, *J. Inf. Diseases*, **7**: 38-46. 1910
 38. 大高文男・井坂正勝・永山精美・清水 潮・加藤 博: 真空包装牛肉から分離した細菌の低温における増殖, 日畜会報, **46**: 515-521. 1975

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, III-DOC 35, p. III-6-17. 日本国際酪農連盟, 1966
40. 中西武雄・伊藤敏敏・田辺忠裕: 原料乳の低温貯蔵中における蛋白質の変化, 酪農科学の研究, **17**: A-48-53. 1968
41. 志賀勝治・吉野正純・染谷幸男: 生乳の低温貯蔵における品質変化, 畜試研報, **23**: 1-6. 1970
42. PERRIN, D. R. and PERRIN, D. D.: The determination of free fatty acids in milk, *J. Dairy Res.*, **25**: 221-227. 1958
43. FRANKEL, E. N. and TARASSUK, N. P.: An extraction-titration method for the determination of free fatty acids in rancid milk and cream, *J. Dairy Sci.*, **38**: 751-763. 1955
44. 斎藤善一・五十嵐康雄・三上秀子: 牛乳の異常風味に関する研究 I. ランシッド発現に關与する諸因子, 弘前大農報, No. **13**: 37-43. 1967
45. HARPER, W. J., SCHWARTZ, D. P. and EL-HAGARAWY, I. S.: A rapid silica gel method for measuring total free fatty acids in milk, *J. Dairy Sci.*, **39**: 46-50. 1956
46. 乳業技術講座編集委: 牛乳・乳製品検査, p. 70. 朝倉書店, 1965
47. 小川益男・高橋久・田中博・佐藤平吉・木下駿・近藤貢・竹村和男・久井伸次・中野竜雄: 原料乳の低温菌汚染とその乳質におよぼす影響について, 酪農科学の研究, **16**: A-168-176. 1967
48. THOMAS, S. B.: Psychrophilic bacteria in refrigerated raw milk, *Dairy Eng.*, **77**: 5-9, 24. 1960
49. MAGNUSSON, F.: The relationship between hydrolytic rancidity in milk and design and management of milking equipment, *Proc. 19th Int. Dairy Congr.*, **1E**: 19-20. 1974
——— *Dairy Sci. Abstr.*, **37**: [2962]. 1975

Summary

Nine tests for estimating milk quality in connection with flavor deterioration were applied to 10 lots of cold stored raw milk at 6°C. Data (PTC: geometric mean, others: arithmetic mean \pm SD) obtained from the raw milk before storage were as follows: psychrotrophic count (PTC), $54 \times 10^4/\text{m}\ell$ (log: 5.736 ± 0.351); acidity, $0.139 \pm 0.017\%$; pH, $6.70 \pm$

0.12 ; proteolysis (A_{660}), 0.142 ± 0.016 ; volatile basic nitrogen (VBN), $0.53 \pm 0.19 \text{ mg}\%$; and free fatty acidity (FFA), $2.05 \pm 0.76 \text{ m}\ell$ alkali/100 g fat. After 6.6 ± 2.2 day-refrigeration of the raw milk, off-flavor could be detected, and the above mentioned values at this time were $32 \times 10^7/\text{m}\ell$ (log: 8.503 ± 0.533), $0.218 \pm 0.140\%$, 6.49 ± 0.36 , 0.220 ± 0.076 , $0.95 \pm 0.48 \text{ mg}\%$, and $3.95 \pm 1.09 \text{ m}\ell$ alkali/100 g fat, respectively. There were the significant differences between these values, except acidity and pH, and the values of raw milk before storage.

Although all results of qualitative tests; alcohol test (AT), conventional clot-on-boiling test (COB), and the modified COB in which phosphate was added into milk sample (COB-P); were negative for any samples before cold storage, only COB-P in these tests became positive upon the development of off-flavor.

The percentage of coincidence with off-flavor ($[(A+B) \times 100/C]$, where A: the number scoring positive in both flavor test and another test in which the sample having higher value than the arbitrary value was described as (+) and lower value was as (-); B: the number scoring negative in both flavor test and another test; C: the total number of the sample) was calculated on the several arbitrary values setting at 1-2% intervals between the highest and the lowest values in the distribution range of the data obtained. Among these values, one which showed the highest coincidence was selected for the critical value. The critical values on PTC, acidity, pH, A_{660} , VBN, and FFA were $6 \times 10^7/\text{m}\ell$, 0.150-0.170%, 6.60-6.65, 0.250, 0.60-0.75 mg%, and 3.30-3.70 mℓ alkali/100 g fat, respectively. PTC gave the highest percentage of coincidence (95%). In qualitative tests COB-P exhibited a 93% coincidence with off-flavor.

Correlation coefficients were significant between PTC and the other biochemical tests and were also significant between acidity and the others. The highest correlation coefficient obtained was $r = -0.955$ between acidity (X) and pH (Y) ($P < 0.001$, $n = 42$, with regression equation $Y = 7.282 - 4.177 [\pm 0.206; \text{SD}] X$) and the second highest was $r = +0.693$ between PTC and acidity ($P < 0.001$, $n = 41$).