2-Thiobarbituric acid(TBA) 試薬に依る牛乳及び乳製品の脂肪酸化度測定に関する研究

I 牛乳及び全脂粉乳の脂肪酸化度測定に対する TBA 法の適用性について

田 中 清 一・栗 岩 治 雄・池 上 宏

(森永乳業株式会社研究所)

Studies on the estimation of oxidized flavor index in milk and milk products with 2-thiobarbituric acid (TBA) reagent

I Adaptation of TBA method to the estimation of oxidized flavor in milk and whole milk powder

S. TANAKA, K. KURIWA and H. Ikegami

(Research Laboratory Morinaga Milk Industry Co.)

1944 年 KOHN, LIVEROEDGE 両氏は¹⁾種々の動物組織を好気培養する時生ずる Metabolite に 2-Thiobarbituric acid を反応せしめると赤色に呈色することを認め、その後 BERNHEIM 氏²⁾等は、この赤色呈色物質は磷脂質の一種であると報告した。

近年に至つて、PATTON, KURTZ³⁾は乳脂肪に対する TBA 試薬の反応性に就き探究し、次のような結論を発表した。即ち、種々の化合物につきその TBA 呈色のスペクトル分析を行い、malonic dialdehyde の TBA 呈色スペクトルが酸化乳脂肪のそれと同一であり、而も malonic dialdehyde は酸化脂質や培養動物組織中に認められる事実から、この物質が脂肪酸化の特異生成物であり、同時に TBA 試薬との反応基質ならんとした。又同氏等³⁾は TBA 試薬を用いる乳脂肪酸化度測定法は、沃素価法や Kreis 反応の如き慣例法に比して更に敏感であり、一般脂肪は勿論含脂食品に対しても広範囲に使用可能であるとしている。

由米、牛乳及び乳製品に生ずる脂肪変質臭最も一般的なのは酸化臭であつて、その判定は専ら経験豊かな特定の判定者に依る感能試験 (organoleptic judge) に委ねられて来なが、本判定特有の個人差は免れ難い唯一の支障であつた。従つてこれが尺度化 (数値化) の必要性が強く希求されている折から、TBA 法が果して、牛乳、乳製品の脂肪酸化度測定の示尺となり得るや否や、又その精度如何は誠に興味たるを失わぬ問題である。

茲に筆者等は、DUNKLEY, JENNINGS 氏等⁴⁾の提唱法に基き以下記載の如き実験を試みた。

実 験

(1) 試 薬

(a) 2-Thiobarbituric acid (TBA) 試薬

日畜会報, 26, (2)

本実験に使用した TBA 試薬は次の如き方法⁵⁾に従い研究室にて合成した。

alcohol 300g に金属ナトリウム 16g を溶解、冷却しながらチオ尿素 20g と malonic diethylester 50g を加え融閉管中で 100—115°C で 5 時間加熱、冷却後析出する TBA-Na 塩を濾集、水に溶解、HCl 酸性とすると遊離の TBA が析出する。これを時々融点を測定しつつ、mp. 235°C に至るまで水に依る再結を反復する。この TBA の 0.05M 溶液に 2M-磷酸溶液を等量に混合し、沈澱を生じた場合は濾別する。

(b) 色素抽出溶媒

c. p. isoamylalcohol と c. p. pyridine を 2 : 1 に混合調製する。

40cc の遠沈管に検体 10cc (全脂粉乳の場合は試料 1.5g を 10cc の水に溶解)、これに TBA 試薬 5cc を加えよく混合した後、管を沸騰水浴中に浸し、時々振盪しつつ 10 分間加熱、後急速に水冷する。冷却後抽出溶媒 15cc を加え密栓すくなくとも 30 秒間激しく振盪し、2000r. p. m にて最少 5 分間遠心分離する。透明な上層着色部を駒込ピペットにて採り (濁濁ある場合は濾過)、Beckman Model D. U. Spectrophotometer にて 535m μ の吸光度を測定した。

結 果

TBA 試験と併行して、風味判定を行つたが、この場合、風味試験担当者は各試料につき全然予備知識を有しない人々であつた。

(1) 乳脂肪酸化に及ぼす Vitamin C, 銅, H₂O₂ 及

び加熱処理温度の影響。生乳10ccに銅(CuSO₄)として夫々0.3p.p.m., 0.5p.p.m. 及び Vitamin C 40mg%を添加し、0—3°Cの氷室に24時間保存した後、TBAに依る吸光度並に風味判定試験結果は第1表の如くであった。

第1表 生乳の酸化臭発生とV.C.及び銅との関係

処 理 条 件	吸光度 (E=535mμ)		酸 化 臭
	開始直前	氷室24時間	
対 照	0.028	0.029	(—)
0.3p.p.m. 銅添加		0.031	(—)
0.5p.p.m. " "		0.031	(—)
V.C. 40mg% 添加		0.033	(—)

4例いずれも変化なく、V.C.の抗酸化効果も認め得なかつた。

次に、生乳に銅各々0.3p.p.m., 0.5p.p.m., 1.0p.p.m., V.C. 40mg%及びH₂O₂処理乳(生乳100cc当0.3% H₂O₂ 2cc添加)を夫々80°C10分加熱処理後、0—3°C氷室に三日間貯蔵した結果は第2表の如くであつた。

第2表 牛乳酸化に及ぼす銅濃度V.C.H₂O₂処理及び加熱処理温度の影響

処 理 条 件	吸光度 (535mμ)		酸 化 臭
	開始直後	0—3°C3日保存後	
対 照	0.034	0.037	(—)
0.3p.p.m. 銅添加		0.076	(+)
0.5p.p.m. " "		0.092	(++)
1.0p.p.m. " "		0.103	(+++)
V.C. 40mg% 添加		0.042	(+)
H ₂ O ₂ 処 理		0.161	(+++)

銅はその濃度の増加に伴い、酸化亢進的であり、V.C.は対照に比して抑酸化的でなかつた。H₂O₂の酸化促進性は顕著であつた。

更に以上と略々同様な処置を施した試料を30°Cの恒温器中に3時間放置した後TBA結果と風味試験とを比較した結果は第3表の如くである。

第3表 牛乳酸化に及ぼす銅, V.C., H₂O₂(Peroxide)処理、及び処理温度の関係

処 理 条 件	吸光度 (535mμ)		酸 化 臭
	開始直前	30°C3時間後	
対 照	0.034	0.044	(±)
0.3p.p.m. 銅添加		0.040	(±)
0.5 " " "		0.043	(+)
V.C. 40mg% 添加		0.049	(+)
H ₂ O ₂ 処 理		0.288	(+++)

30°C 3時間程度の保存に対しては銅の酸化促進性に殆んど見るべきものはないが、H₂O₂の影響は極めて大であつて、上記氷室3日のものに比して躍進的であつた点は考慮を要する。V.C.の抗酸化性は前回同様認められなかつた。

(2) Vitamin Cの抗酸化性。 前述の実験結果に於

ては、V.C.は脂肪の酸化に対して何等抑制的效果を認め得なかつたので、更にこれを追試する実験を試みた。即ち、40mg%のV.C.を添加せる牛乳を夫々65°C30分75°C15分の加熱処理を施した後、これを(0—3°C)氷室に10日間貯え、3日後及び10日後に於ける吸光度と風味試験を行った結果は第4表の如くであつた。

第4表 ビタミンCの抗酸化性

処 理	条 件	吸 光 度			酸化臭 (10日 後)
		直後	3日後	10日後	
65°C(30分)	対 照	0.028	0.037	0.046	(—)
" "	40mg%V.C.	" "	0.048	0.052	(+)
75°C(15分)	対 照	" "	0.049	0.054	(+)
" "	40mg%V.C.	" "	0.039	0.046	(—)

上表に観られる如く、V.C.の抗酸化性には一定せる関係を見出し得なかつた。(但し本実験に使用せるV.C.全ては99%還元型のものである。)

(3) 殺菌温度と酸化臭発生の関係。生乳を各々63°C30分、75°C15分、72°C16秒(H.T.S.T.) 80°C5秒の加熱処理を行いたる後、3—6°C(平均4°C)の冷室に3日間貯え、酸化臭の発生度を検索した結果は第5表の如くである。

第5表 殺菌処理温度と酸化臭

殺 菌 処 理 法	吸 光 度			酸化臭
	1日後	2日後	3日後	
対 照	0.027	0.032	0.033	(± 腐敗臭)
63°C 30分	0.037	0.042	0.053	+
75°C 15分	0.033	0.039	0.056	+
72°C(16秒)(H.T.S.T.)	0.037	0.069	0.100	++
80°C 5秒	0.031	0.039	0.039	±

以上の如く72°C(16秒)が最も速に変質し、生乳、80°C(5秒)では殆んど大なる変化を見なかつたが、生乳には明かな蛋白質分解臭が感ぜられた。

(4) 日光照射が脂肪酸化臭発生に及ぼす影響。 日光

第1図 日光照射の乳脂肪酸化に及ぼす影響

々線と乳脂肪酸化の関係を検索した結果は略第1図の如くであつて、極めて顕著な酸化亢進性が認められた。但し実験は試料を午前10時から午後1時までの3時間直射日光に曝した結果であり、略直線の上昇率が認められた。(目下追驗中)

(5) 全脂粉乳の貯蔵条件が酸化臭発生に及ぼす影響。全粉を室温、氷室(3—6°C)及び孵卵器(40°C)中に1カ月間貯え、その間に於けるTBA価と酸化臭の関係を調査した結果は第6表の如くであつた。

第6表 全脂粉乳貯蔵法と酸化臭発生との関係

試料	貯蔵法	吸光度(535m μ)		酸化臭
		開始直前	1カ月後	
I	室温水フラン器	0.031	0.044	(±)
		"	0.040	(—)
		"	0.058	(+)
II	室温水フラン器	0.034	0.046	(+)
			0.045	(±)
			0.061	(++)

粉乳の品質保存上、低温貯蔵を推奨する一部原因は上表に依つて解明される。

(6) 製造法が粉乳の風味保存性に及ぼす影響。製造方法を異にする二種の全脂粉乳を各々室温及びフラン器(40°C)中に3カ月貯蔵し、そのTBA試験結果を比較して第7表を得た。但し試料A₁, A₂, A₃は何れも二重効用籠を使用せる連続式高速度乾燥に依るものであり、試料B₁, B₂, B₃は各々在来法(不連続)に依るものである。

第7表 製造法を異にせる全脂粉乳の貯蔵に依る脂肪酸化度のTBAに依る検索結果。

試料	貯蔵	吸光度(535m μ)	
		開始直後	3ヶ月後
A ₁	室温水フラン器	0.031	0.051 0.064
A ₂	室温水フラン器	0.036	0.057 0.077
A ₃	室温水フラン器	0.033	0.047 0.065
B ₁	室温水フラン器	0.042	0.058 0.085
B ₂	室温水フラン器	0.042	0.063 0.084
B ₃	室温水フラン器	0.045	0.064 0.088

在来法は新高速法に比較し、酸化度が製造直後から高いことがTBA結果より認められる。これはその後の保存に依つて更に差を持つことが上表からも認め得る。これよりして air tight short time production の品質上に於ける優位性が判然と認められた。

要 約

(1) 2-Thiobarbituric acid (TBA法)が牛乳及び全脂粉乳の酸化臭発生度と併行的呈色をなすや否やを検索した。

(2) 結果は極めて良好であり、Organoleptic Judgeとも略合致し、牛乳及び全粉の酸化臭測定の尺度として充分利用し得ることを認めた。

(3) 銅の濃度に依る酸化臭誘発作用の強さ、特にH₂O₂の乳脂肪酸化能は頗る強大であつた。又以上の酸化促進剤も、加熱処理温度に依り大きく影響される。

(4) 本試験に於ては、V.Cは乳脂肪酸化に対して殆んど抑制的效果が認められなかつた。

(5) 太陽光線の脂肪酸化能は著しきものであり殆んど直線的であつた。

(6) 全脂粉乳はその貯蔵法に依り風味保存上に大なる差があり、従来提唱せられていた低温貯蔵の効果的な事が数字的に裏づけられた。

(7) 粉乳はその製造に依り、その保存性に可成の隔りのあることが認められた。即ち出来る丈空気より遮断し短時間仕上げ程その保存性が大きいことが確認された。

(1953. 12. 4. 受付)

文 献

- 1 KOHN, H. I. and LIVERSEDGE, M. (1944): J. Pharmacol., 82, 292—300.
- 2 BERNHEIME, F., BERNHEIM, M.L.C. and WILBER, K.M. (1947): J. Biol. Chem., 174, 257—264.
- 3 PATTON S. and KURTZ, G. W. (1951): J. Dairy Sci., 34, 669—674.
- 4 DUNKLEY, W.L. and JENNINGS, W.G., (1951): J. Dairy Sci., 34, 1064—1069.
- 5 石渡三郎, 実験有機薬化学.

Résumé

1. we examined whether the 2-thiobarbituric acid (TBA) reagent assumes the coloration in parallel with the development of oxidized flavor in milk and whole milk powder.

2. The result was satisfactorily and it was also in

accordance with that of the organoleptic test by our experienced flavor judges. Therefore it was concluded that TBA method was fully available and whole milk powder.

3. Intensity of the inducing action of oxidized

flavor by the concentration of copper, especially of the oxidizing action on milk-fat by hydrogen peroxide, was extremely great and they were exceedingly influenced by the temperature in heat treatment.

4. In this studies we could not recognized that vitamin C had controlling effects on the oxidation of milk-fat.

5. Oxidizing power of the sun-ray to milk-fat was remarkably strong and the curve of oxidation was nearly linear.

6. There was a great difference between the keeping qualities of the powdered milk according to the storage circumstances. It was quantitatively proved that the low temperature was more suitable for milk powder storage.