調 査 ・ 資 料

フェリシアンイド還元法による牛乳の タンパク還元価の測定

(昭和 47 年 11 月 13 日受理)

慶田 雅 洋* 海老根 涼子* 谷 村 顕 雄*

Determination of Protein-Reducing Substance of Milk by Ferricyanide Reduction Method

Masahiro IWAIDA, Ryoko EBINE and Akio TANIMURA

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

牛乳と還元牛乳を鑑別する方法は古くから諸外国において研究されて来たが、食用の脱脂粉乳および全粉乳の品質が向上するにつれて使えなくなったものが多い。

牛乳の加熱処理の際には、タンパク質の変性によるスルフィドリル基の増加および“かっ変”反応により形成された化合物の存在により還元力の増加することが知られている。還元性物質の形成は液状乳の加熱処理の際にも認められるが、粉乳製造の際には顕著である。還元能の増加は牛乳のタンパク質区分において認められるので、牛乳よりタンパク質区分のみを分離した後、そのフェリシアン化カリウム還元力を比較することによって牛乳中の還元成分の存在を検出する方法について検討した結果を報告する。

方法の原理

牛乳 100 ml によるフェリシアン化カリウムの還元により生じたフェロシアン化カリウムの mg 数を以て当該牛乳のタンパク還元価 (protein-reducing substance; PRS) と定義する。牛乳の酢酸酸性沈殿区分を飽和尿素溶液に溶かし、pH 5~5.2 でフェリシアン化カリウムと作用させ、トリクロル酢酸で除タンパクした後、上澄液のフェロシアンイオンを第二鉄イオンと反応させて $4\text{Fe}^{3+} + 3\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} \rightarrow \text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ の反応によって形成したベルリン青の光学濃度を波長 610 mμ で測定し、PRS を求め、牛乳の還元力を比較する。

試薬・試液

使用する試薬は無水塩化第二鉄以外はすべて JIS 特級

とする。

1) 5%酢酸: 氷酢酸 50 ml を水で薄めて 1 L とする。

2) 飽和尿素溶液 (常温で 100 g は約 100 ml の水に溶ける)。

3) フタル酸緩衝液: 水酸化ナトリウム 2.0 g を水に溶かして 250 ml とする。フタル酸水素カリウム 10.2 g を水に溶かして 250 ml とする。水酸化ナトリウム溶液 159 ml とフタル酸カリウム溶液 200 ml を混ぜ、水で薄めて 800 ml とする。pH が 5.6 とならない場合には水酸化ナトリウム溶液またはフタル酸カリウム溶液を追加して調整する。

4) 1%フェリシアン化カリウム: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 g を水に溶かして 100 ml とする。用時調製する。

5) 10%トリクロル酢酸: トリクロル酢酸 100 g を

Table 1. Effect of the Added Quantity of Acetic Acid on Protein-Reducing Substance (PRS) of Milk

Quantity of 5% acetic acid added (ml)	pH	PRS
1.5	4.70	9.20
2.0	4.50	9.64
2.5	4.40	8.70
3.0	4.29	8.61

Note: Market whole milk was used as the test sample.

* 国立衛生試験所食品添加物部: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Fig. 1. Effects of heating temperature and time on the color development of Berlin blue

Fig. 2. Spectrogram of Berlin blue

Fig. 3. Stability of Berlin blue developed

水に溶かして 1 L とする。

6) 0.1% 塩化第二鉄: FeCl_3 (無水物) 0.1 g を水 100 ml に溶かす。緑変したり、青色沈殿の生じた場合は作り直す。

実験方法

おおむね Choi¹⁾ らの示した方法に基づいて行なった。

1. 標準曲線の作製

フェロシアン化カリウム三水合物 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 0.1147 g を水に溶かして 1 L とする。その 50 ml をとり、水で薄めて 100 ml とする (希釈液 1 ml は 0.05 mg の無水フェロシアン化カリウムを含む)。希釈液 0 (空試験), 0.5, 1.0, 1.5, ……4.5 または 5.0 ml をそ

れぞれ試験管に採る。水を加えて総液量を 5 ml とする。各試験管にブランク試液 (飽和尿素溶液 3 ml を水で薄めて 15 ml とし、フタル酸緩衝液 5 ml, 1% フェロシアン化カリウム 5 ml, 10% トリクロル酢酸 5 ml を加え、混和したもの) 5 ml を加え、0.1% 塩化第二鉄 1 ml を加え、混和した後、20 分間放置する。波長 $610 \text{ m}\mu$ で空試験試料を対照として吸光度を測定し、フェロシアン化カリウムの mg 数と吸光度との関係式を求める。本実験では分光光度計は島津製作所製 UV-200 を使用した。

2. 牛乳 (その他液状乳) の試験

標準測定条件として以下の操作を定める。

試料を 40° に加温し十分に混和した後、室温まで冷却

する。50 ml の共セン遠心管 (5 ml 刻みの 目盛を付けたもの) に水 15 ml を加えた後、試料 15 ml を注入する。5% 酢酸 3 ml を加え、密せんして振り混ぜた後、1500~2500 rpm で 5 分間遠心分離する。上層液を捨て、15 ml の水で洗浄し、再び遠心分離した後、洗浄液を捨てる。さらに水 15 ml を使用して洗浄操作を繰返す。沈殿に飽和尿素溶液 3 ml を加えて溶かし、水を加えて 15 ml とし、フタル酸緩衝液 5 ml、1% フェリシアン化カリウム 5 ml を加えた後、70° で 20 分間加熱し、ただちに氷冷する。10% トリクロル酢酸 5 ml を加え、暫時放置した後、東洋濾紙 No. 5C を使用してろ過する。ろ液は最初の数 ml はこれを捨てる。水 5 ml を含む試験管にろ液 5 ml を加え、0.1% 塩化第二鉄 1 ml を加え、20 分放置した後、波長 610 mμ で空試験試料 (70°, 20 分間加熱したもの) を対照として吸光度を測定する。吸光度より求められたフェロシアン化カリウムの mg 数は試料 2.5 ml についてえられたものであるからこの値を 40 倍すれば PRS になる。

実験結果

1. PRS の測定条件の検討

本法は牛乳の前処理および比色操作の 2 段階に大別することができる。試料 15 ml の等量の水による希釈液に 5% 酢酸を 3 ml 添加した場合の pH は Table 1 に示す通りであって、3 ml の添加の場合の pH は 4.29 であってカゼインの等電点 (pH 4.55) よりもやや低いことが認められる。したがって添加する酸の量を少なくして pH を等電点附近に調整した方が沈殿するタンパク質の量は当然多くなるわけでありその結果 PRS も高くなることが Table 1 から認められる。

遠心分離の条件は 1500~2500 rpm の範囲で行なうが、脱脂乳では回転数を低く、全乳では回転数を高めに設定することが望ましい。

なお、いずれの場合にも上層液中に沈殿せずに浮遊する粒子がごく少量認められ、これらはデカンテーションの際に流出してしまうが、その組成は脂肪を主としてタンパク質よりなるクリームのような物質であって無視しても差支えない。

沈殿中に取込まれた上層液を完全に排除するために水で 2 回洗浄する。この際にガラス棒などは使わない方がよい。洗浄後の沈殿を飽和尿素溶液で溶かす場合には加熱してはならない。この溶解過程は結果に影響するので完全に溶かすように心懸けなければならない (とくに脱脂乳の場合には溶かしにくいので注意した)。

フタル酸緩衝液を添加した場合の混合物の pH は 5.0~5.2 となる。Chapman および McFarlane²⁾ は、この pH 域がフェリシアン化カリウムと還元物質の反応によるベルリン青の呈色が還元乳と新鮮乳についてもっとも大きい差を示すので、還元成分の測定に好適であることを明らかにしている。フェリシアン化カリウムと還

元性物質の反応時間の呈色度におよぼす影響について測定した結果は Fig. 1 に示す通りである。50° ではきわめて反応性は低く、70° で行なった場合には時間の増加とともに還元価は上昇する。Chapman および McFarlane²⁾ によると、この増加は 24 時間後まで継続することが知られている。したがって 70°, 20 分という反応条件は厳密に実施することが必要であり、正確に 20 分保持した後、直ちに氷冷して 25° 以下に冷却する操作を履行した。

次に 0.1, 0.2, 0.3 および 0.4 mg の $K_4Fe(CN)_6$ を使用して発色させた場合に $4Fe^{3+} + 3Fe(CN)_6^{4-} \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ の反応により形成したベルリン青の吸収曲線を示すと Fig. 2 のようになる。すなわち吸光度は 500 mμ より波長の増加とともに上昇し、670~700 mμ で最大に達し、それ以上の波長ではフラットになることが認められる。したがって測定波長 610 mμ では最大吸光度の 60% 程度の値が得られることになる。なお 3 段階のフェロシアン化カリウム濃度における呈色の安定性を調べた結果は Fig. 3 に示す通りである。すなわち 0.05 mg 程度の低濃度では呈色は比較的安定であるが、0.15 mg の高濃度では吸光度は 20 分後に最高に達し、以後低下することが認められる。したがって吸光度は塩化第二鉄添加後 20±5 分の間に測定することが必要である。

2. 牛乳の処理と PRS の関係

還元性物質の測定を行なうのであるから、試料の輸送・貯蔵に際しては還元力に影響をおよぼすようなホルマリン、塩化第二水銀などの防腐剤を使用することは

Table 2. Effect of Freezing (-10°C) on the PRS of Milk

Days preserved	PRS
Before freezing	8.01
After 2 days	7.55
" 4 "	6.34
" 6 "	5.11

Note: Market whole milk was used as the test sample.

Table 3. Comparative PRS Values of Raw Whole Milk and Skimmilk

Sample	Whole milk	Skimmilk
No. 1	1.90	1.16
2	2.10	1.96
3	2.51	2.01
4	2.34	1.63

Note: Raw whole milk was skimmed in a laboratory centrifuge for 5 minutes at 2,500 revolutions per minute.

Table 4. PRS Values in Raw Milks

Prefecture	No. of samples	PRS values	
		Range	Average
Tokyo	5	3.66~3.02	3.33
Chiba	9	3.86~2.01	3.14
Kanagawa	1	3.10	3.10
Ibaragi	3	3.64~3.38	3.51
Hokkaido	1	2.80	2.80

Note: Determinations were carried out in August, 1972.

きない。試料の凍結による PRS の変化を調べた結果は Table 2 に示すとおりである。

凍結貯蔵は牛乳の PRS をかなり低下させることが認められる。これはタンパク質の物理的変性の結果、還元物質が遊離し、酸で非沈殿性となるためと考えられる。この結果、試料の保存には防腐剤を使用せずに冷蔵するのが唯一の方法であり、可及的速やかに試験することが必要である。

3. 全乳と脱脂乳の比較

生乳およびそれを毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離して調製した脱脂乳の PRS の測定結果は Table 3 に示す通りである。脱脂乳は全乳よりも PRS が 1.0 以内の範囲でやや低くなることが認められる。これは還元物質はクリーム層により多く移行するためであると考えられる。

4. 生乳の PRS の調査

1972年8月に東京地区18試料および道内の1試料について PRS を測定した結果を Table 4 に示す。

生乳の PRS は 2~4 の範囲にあることが認められる。Clay ら³⁾ はアメリカの 7 州において 1954 年 7~8 月にかけて 411 試料について調査した結果、生乳の PRS は 0.90~4.18 の範囲であって大部分は 2~3 の間に来ることを明らかにしているが、われわれの調べた値も例数は少ないが、ほぼ同じ範囲に来ることが認められた。酸度と PRS の関係については、乳酸%として 0.20% の範囲内では酸度の差は PRS に影響しないことを認めた。

5. 過酸化水素処理の PRS への影響

牛乳中に過酸化水素のような酸化剤が添加された場合の PRS におよぼす影響について検討した。試料として

Table 5. Effect of the Addition of Hydrogen Peroxide on PRS Values of Milk

Sample	Immediately after addition	After 24 hrs	After 72 hrs	After 96 hrs
Control	2.43	2.10	2.04	2.01
S ₁ (0.5% H ₂ O ₂)	1.07	1.51	1.87	2.60
S ₂ (1% H ₂ O ₂)	1.07	2.63	4.05	5.43

Note: Raw skim milk, prepared from mixed herd milk was used, to which analytical grade hydrogen peroxide was added so as to obtain final concentration of 0.5 or 1%. Milks were preserved at 7°C.

Table 6. PRS Values of Market Milks

Prefecture	Type of pasteurization	No. of samples	PRS value
Tokyo	130°C, 2 sec	4	7.12~12.40
	120°C, 2 sec	2	8.61~ 9.60
Kanagawa	130°C, 2 sec	1	7.96
Saitama	130°C, 2 sec	1	8.36
Gumma	75°C, 15 min	1	15.92
Osaka	130°C, 2 sec	1	6.87
Iwate	130°C, 2 sec	1	12.68
Hokkaido	135°C, 2 sec	1	11.12
	130°C, 2 sec	2	7.14~ 7.43
	120°C, 2 sec	1	7.58
	75°C, 15 min	1	7.75

Note: Determinations were carried out in August, 1972.

は混合未殺菌全乳より調製した生脱脂乳を使用し、次の3検体を作製した。

C (対照区): 脱脂乳 290 ml+水 10 ml

S₁ (0.5% H₂O₂): 脱脂乳 290 ml+水 5 ml+30%

H₂O₂ 5 ml

S₂ (1% H₂O₂): 脱脂乳 290 ml+水 5 ml+30%

H₂O₂ 10 ml

脱脂乳中の過酸化水素濃度については、乳業の未発達な熱帯地方で、経済的に冷却輸送方式を導入することのできない国 (たとえば南ア連邦) における、原料乳の保存のための使用を目的とした研究⁴⁾ における乳タンパクの変性の追究の際の使用濃度に合わせて 0.5 および 1% とした。

過酸化水素添加後7°で4日間保存した場合の PRS の変化は Table 5 に示す通りである。過酸化水素の添加によって PRS は 1/2 以下に減少することが知られる。これは牛乳のタンパク成分中のカゼインの酸沈殿性が変化したためであると考えられる。4日間の貯蔵中に対照区では PRS はほとんど変わらないが、過酸化水素処理区では徐々に増加することが知られる。これは、過酸化水素処理により、乳タンパク中のホエータンパク区分のβ-ラクトグロブリンが消失し、これにかわって新しい成分が出現するとしている Schulz⁴⁾ の説も考え合わせると、この新しい成分によるものであろうと推定される。いずれにしても、Table 5 の結果から、0.5% 以下の過酸化水素の場合には、7°、3日間以内の保存中に PRS は最初の値よりも高くなならないと結論することができる。

6. 牛乳の PRS

1972年8月に東京地区9, 岩手1, 道内5, 大阪1試料の厚生省令による“牛乳”について PRS を測定した結果は Table 6 に示す通りである。ただし、殺菌条件

は表示されたものを示した。

アメリカでは市乳の殺菌は72~80°, 15秒の高温瞬間殺菌 (high temperature short time pasteurization; HTST) または低温保持殺菌 (62~65°, 30分) によって行なわれており、このような加熱条件では PRS の上昇は1以下であり、市乳の PRS は5を越えることのないことが Choi ら¹⁾ および Clay ら²⁾ によって示されている。これに対してわが国の市乳の PRS は低いものでも7.58, 高いものでは16近くもあることが示された。このようにわが国の牛乳が高い PRS を示す原因はどこにあるのかについて考えてみると、まず第一に PRS を上昇させる要因として還元乳 recombined or reconstituted milk) の使用があげられる。すなわち Table 7 に示す通り、練乳および粉乳では濃縮乾燥の際の加熱処理により還元性物質が増加し、PRS はかなり高くなっていることが知られる。とくに無糖練乳では270を越える極端に高い値を示している。一般に全粉乳よりも脱脂粉乳の方が高いことが認められる。PRS 2.0 の生乳に還元粉乳を全量の x% の割合で加えると PRS は理論的には

$$2 \times \frac{100-x}{100} + 20 \times \frac{x}{100} = 2 + 0.18x$$

になるわけであり粉乳の使用量の増加と共に PRS は増加することが推察される。

つぎにわが国で殺菌法として広く採用されている UHT 加熱の影響について実験した。UHT 加熱の際にはタンパク質を安定化させるために80~85°程度で一定時間保持した後に120~150°で瞬間加熱する方式がとられている。PRS 3.48 の生乳を80°で1.5分間保持すると PRS は3.52に上昇し、これを APV プレート式熱交換機で131°, 2秒加熱した際には8.60になることが知られた。したがって一般にわが国で採用されている UHT 加熱殺菌方式では PRS は5程度上昇することが推定される。

考 察

牛乳の酢酸酸性で沈殿する区分の還元力を測定する方法について検討した。本法はアスコルビン酸なども含めた全乳の還元力を測定するのではなく、カゼインなどの酸沈殿性タンパク区分中の還元性物質を測定するものであるという特徴を有する。液状乳 100 ml 当りの還元力を Choi ら¹⁾ の方法によって測定し、PRS として示すと生乳では2~4の範囲にあることが認められ、これはアメリカにおける調査成績ともよく一致する。しかしながら市販の牛乳 (厚生省令によるもの) の測定値は7~16であって、アメリカにおける測定値 (5以下) よりも相当高い水準にあることが認められた。これはわが国の“牛乳”が UHT 加熱または高温長時間 (75°, 15分) 加熱により殺菌されているということも理由の一つに挙げられる。これらの加熱処理により PRS は5程度上昇す

Table 7. PRS Values of Milk Powders and Evaporated Milk

Kind	No.	PRS
Skimmilk powder*1	1	48.3
	2	43.2
	3	35.2
Whole milk powder*2	1	13.0
	2	13.1
	3	15.0
	4	22.1
	5	44.9
Evaporated milk	1	271.2

Note: *1 Measured by use of 10% (w/v) solution

*2 11.2 g was dissolved and filled up to 100 ml

ることが期待される。したがって、PRS によって粉乳または濃縮乳の添加を検出する場合には当然この影響を考慮にいれなければならない。アメリカでは PRS の測定法は A. O. A. C. 公定法⁵⁾としても採用されており、4.07が市乳の上限値と定められているが、わが国の実情を考えると PRS が10以上のものは粉乳等の添加が行なわれていると推定することができる。なお、A. O. A. C. に採用された Choi の方法では酢酸添加後の pH が約 4.3であって、カゼインの等電点 (pH 4.55) よりも低いこと、ベルリン青の測定波長が最大吸収波長ではなく、ショルダーのところの 610 m μ で測定しているなど、今後改訂を要する点もあることが示された。

また、わが国では樫本⁶⁾によって、牛乳をセファデックスゲルろ過法により分離したタンパク区分の還元価を測定すると生乳で0.6、UHT 加熱乳で1.8となることが報告されており、今後この方法との比較検討も行なうことが必要であると考えられる。

ただし、生乳の PRS は2~4であることから、PRS の測定を生産者段階における原料乳の還元成分の検出に応用することは可能であると考えられる。

また市乳についても PRS が低いものほど生乳に近いということができ、牛乳の自然度を示す指標の一つとして採用することができると思われる。

要 約

フェリシアンイド還元法による牛乳のタンパク区分の還元価の測定法について検討し、Choi らの方法は酢酸の添加量、測定波長の選択等において改良の余地のあることおよび測定値はフェリシアン化カリウム添加後の加

熱条件によってかなり異なることを認めた。酸沈殿区分のフェリシアンイド還元力を牛乳 100 ml により生成したフェロシアン化カリウム (無水) の mg 数で表わし、タンパク還元価 (PRS) として定義すると生乳では2~4の範囲にあることが認められた。市販牛乳 (厚生省令によるもの) の PRS は7~16の値であった。生乳を80°で1.5分保持した後131°で2秒間超高温加熱した場合の PRS の上昇は5.12であった。

わが国で PRS を省令牛乳中の還元乳成分の検出法として応用するためにはさらに測定法の改良を行ない、調査を実施することが必要であると考えられる。

本資料の概要は昭和47年10月13日の日本食品衛生学会第24回学術講演会で発表した。

文 献

- 1) Choi, R. P., Koncus, A. F., Cherry, G., Remaley, R. J.: J. Milk Food Tech. 16, 241 (1953).
- 2) Chapman, R. A., McFarlane, W. D.: Can. J. Research 23 Sec. B, 91 (1945).
- 3) Clay, C. L., Burke, M. B., Junker, G.: J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 38, 310 (1955).
- 4) Lück, H., Joubert, F. J.: Milchwissenschaft 10, 160 (1955).
- 5) Association of Official Analytical Chemists: "Official Methods of Analysis of A. O. A. C." 11th ed. p. 249 (1970).
- 6) 樫本 隆, 福島成彦, 小林太郎: 大阪府立公衆衛生研究所報告, 公衆衛生編 No. 7, 136 (1969).