

# フローインジェクション分析法による牛乳の分析

受田 浩之

高知大学農学部生物資源科学科：〒783 南国市物部乙200

---

## Flow Injection Analysis of Milk Samples

Hiroyuki UKEDA

*Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture, Kochi University,  
Monobe B-200, Nankoku 783, JAPAN*

A general review is presented concerning the need for milk analysis and the application of flow injection analysis (FIA) for the determination of milk components such as lactose, lipid, short-chain fatty acids, protein and so on and the microbial and somatic cell counting.

---

### 1 はじめに

牛乳は新生子牛の成長に必要なすべての養分を含んでおり、人間にとってもタンパク質、脂肪、炭水化物、灰分をバランスよく含み、かつビタミンA、ビタミンB、カルシウム、リンなども含む優れた栄養食品である。

乳及び乳製品の成分規格に関する省令（略して乳等省令）では、牛乳とは「直接飲用に供する目的で販売する牛の乳」と定義され、一般的には原料乳の受け入れ、検査、脂肪の標準化、均質化、加熱殺菌を経て製造される。また、乳等省令では「さく取したままの牛の乳」を生乳と称している<sup>1)</sup>。本総説で取り扱う「牛乳」及び「生乳」という用語は、以降この乳等省令に従うこととする。

原料乳となる生乳の日本農林規格に基づく1等乳の規格は、色沢・組織正常、風味正常、比重1.028～1.034、アルコール検査陰性、脂肪率2.8%以上、酸度0.18%以下とされている。しかしながら、この1等乳の規格を満たさない2等乳の発生頻度が著しく減少した現在では、1等乳であっても、

さらに脂肪、無脂固形分、細菌数、体細胞数を基に乳質を細分化することで、乳質改善の努力と成果に依拠している。同時に、これらの検査項目は生理的異常乳（初乳、末期乳）や潜在性乳房炎等の疾病による異常乳の識別を可能とする。

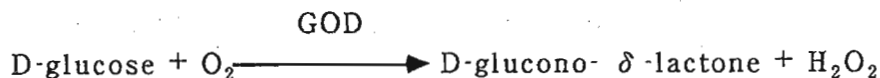
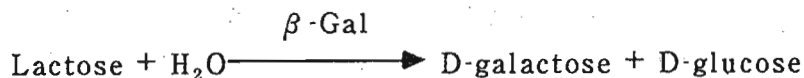
これらの項目の分析に際しては、タンクローリー乳、バルク乳、個体乳検査等に応じた、多くの試料を迅速かつ簡便に処理する方法が必要とされる。その要求に対して従来法は、煩雑な操作と高度な熟練を要することから、操作手順を自動化した装置が開発され、利用されるに至っている。一例として、生乳中の脂肪率、タンパク質率、乳糖率を赤外線分光法により自動的かつ迅速に測定するミルコスキャン（フォスエレクトリック、デンマーク）、蛍光顕微鏡により体細胞数を自動計測するフォソマチック（フォスエレクトリック）を挙げることができる<sup>1)</sup>。これらの装置は連動も可能で、1時間当たり360検体の処理能力を有する極めて迅速な分析装置である。しかしながら、これらの装置は極めて高価であるため、それらの装置に代わる簡易・迅速分析法の設定を目指して、フローインジェクション分析法(FIA)の導入が試みられている。

この総説では、上記分析項目を中心としたFIA法の開発について、興味ある例を著者らの研究も含めて紹介すると共に、今後、FIA法への展開が期待できる分析法についても述べていく。

## 2 乳糖の分析

生乳中の乳糖含量は約4.5%であり、糖質全体の99.8%を占める乳に特有の糖である。無脂固形分に対する寄与も大きく、乳房炎乳においては一般にその含量が減少するため、異常乳の検出に対しても重要な検査項目である。

これまでに報告された乳糖のFIAは、そのほとんどが酵素法に基づいたものである<sup>2-8)</sup>。酵素としてβ-ガラクトシダーゼ(β-Gal)とグルコースオキシダーゼ(GOD)とを組み合わせ、次式の反応によって生じた過酸化水素を電気化学的、もしくは分光学的に検出する方法が採用されている<sup>2-7)</sup>。



Matsumotoら<sup>2)</sup>は両者の酵素をアミノシラン化したグラッシーカーボン電極

にグルタルアルデヒドと牛血清アルブミン(BSA)を介して固定化した化学修飾型乳糖電極を調製した。本電極を用いたFIAシステム(Fig. 1)においては、2本の作用電極を用いて、一方に酵素固定化電極、他方にBSAのみで酵素の含まれていない電極を用い、妨害物

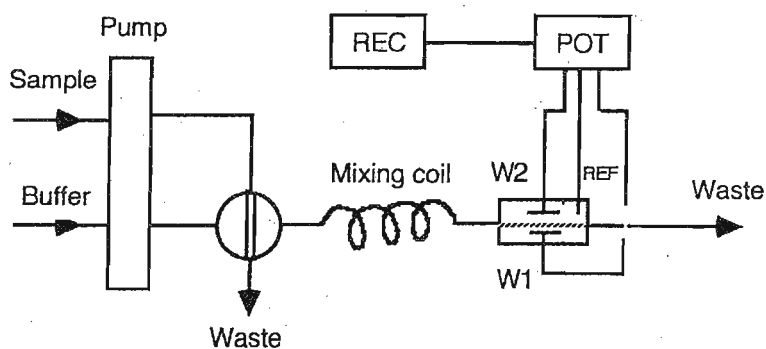
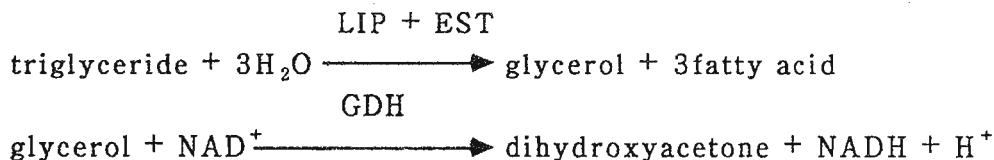


Fig. 1 Schematic diagram of the flow system for lactose determination. POT, potentiostat; REC, recorder; W<sub>1</sub>, enzyme electrode; W<sub>2</sub>, blank electrode (BSA); REF, reference electrode. Redrawn from Matsumoto *et al.* (2).

質に基づく副反応信号を差動式増幅器により除去した。本システムでは乳糖初濃度0.1~1.5mMの範囲で直線関係が成立し、100倍に希釈した牛乳の乳糖分析に対して1時間に約40検体の分析が可能であった。この他、希釈操作を含めた試料の前処理を省くために、オンライン透析器を導入したFIAシステムも報告されている<sup>5)</sup>。また、感度の向上のために、ムタロターゼを同時に固定化し $\alpha$ 型グルコースの $\beta$ 型への酵素的変換を図った例も見られるが、Narinesinghら<sup>7)</sup>によるとキャリアー溶液への高濃度(例えば0.15M)のリン酸塩の添加により、固定化ムタロターゼを利用した場合と同程度の迅速な変旋光が起こるようである。また、GODの代わりにガラクトースオキシダーゼを用いた方法<sup>8)</sup>、さらにアルカリ性メチルアミンとの反応性に基づいた化学反応によるFIAも報告されている<sup>9)</sup>。

### 3 脂肪及び脂肪酸

乳脂肪の主成分は1分子のグリセロールに3分子の脂肪酸がエステル結合したトリグリセリドであり、全脂質中の95~96%を占める。このトリグリセリドのFIAに対して、Higuchiら<sup>10)</sup>はリパーゼ(LIP)、エステラーゼ(EST)、グリセロールデヒドロゲナーゼ(GDH)を用いている。次式に従い、



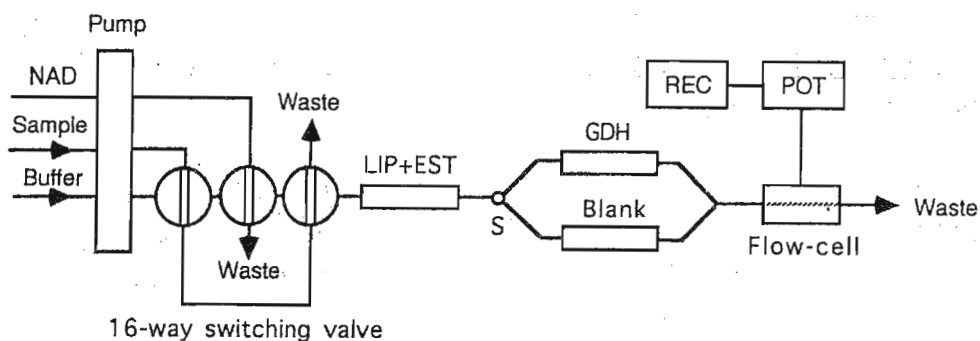


Fig. 2 Schematic diagram of the flow system for lipid determination. POT, potentiostat; REC, recorder; S, three-way switching valve. Redrawn from Higuchi *et al.* (10).

トリグリセリドはLIP及びESTの作用により、対応する脂肪酸とグリセロールに加水分解される。生じたグリセロールをGDHにより酸化し、その際に生じた還元型補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)を白金電極による電極酸化でモニターした。そのFIAシステムをFig. 2に示した。90倍に希釈された牛乳試料間にNAD溶液を挟み込んだ、いわゆるサンドウィッチ方式によりキャリア溶液中に注入された試料は、その後ガラスビーズに同時固定化されたLIP+ESTカラムに移送され、加水分解を受けた後、さらに直列に配置されたGDHカラム（セルロファインに固定化）へと運ばれた。GDHの反応で生じたNADHは下流に設置された白金電極フローセルで酸化された。尚、測定に際してはGDHカラムの代わりに、酵素の固定化されていないブランクカラムを用いて試料のブランク値を差し引いている。本システムでは、1検体当たり6分の分析時間を要し、トリオレイン換算で $1.28 \times 10^{-2} \sim 8.53 \times 10^{-2} \%$ の範囲において定量性が認められている。

一方、生乳中或いは牛乳中の乳脂肪が、乳由来または微生物由来のリパーゼにより分解を受けると、脂肪酸が遊離して脂肪分解臭（ランシッド臭）を生じる。このランシッド臭は主に炭素数が4から12の低級脂肪酸によることが知られている<sup>11)</sup>。従来まで、牛乳中の低級脂肪酸を分析し得る方法としては、煩雑な前処理と分析に長時間を要するガスクロマトグラフィー(GC)に依る方法のみであった。そこで著者らは、牛乳中の低級脂肪酸を定量する方法として、前処理操作を必要とせず、かつ短時間での分析が可能な迅速定量法の設定を目的として、*Arthrobacter nicotiana* (DSM No. 6707)を用いた微生物センサーの開発を行った<sup>12, 13)</sup>。本微生物センサーの構造をFig. 3に示した。n-酪酸を含む液体培地で培養した対数増殖期にある菌体をポリビニルアルコール膜内に包括固定化し、クラーク型酸素電極のテフロン膜上に装着した。さらに微生物膜を保護する目的と、高分子物質が微生物膜に接触

することを避けるために、透析膜で外側を被覆した。本微生物電極に基づく、低級脂肪酸のFIAシステムをFig. 4に示す。本システムでは、低級脂肪酸標準液または生乳、牛乳試料はキャリアー溶液中に直接注入され、ミキシング後、微生物電極を設置したフローセルへと移送される。本システムにより、種々の脂肪酸に対する応答を比較したところ、本電極は $C_{8:0}$ のカプリル酸を最大として

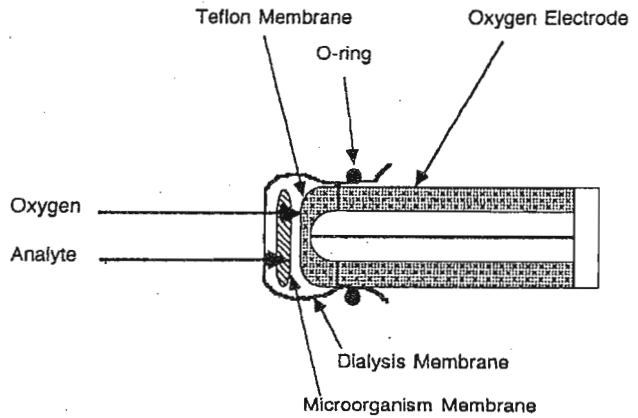


Fig. 3 Structure of the microbial electrode based on *Arthrobacter nicotiana*.<sup>12)</sup>

$C_{4:0}$ の酪酸から $C_{12:0}$ のラウリン酸に対して高い応答を示し、生乳、牛乳中に高い含量存在する $C_{16:0}$ のパルミチン酸等

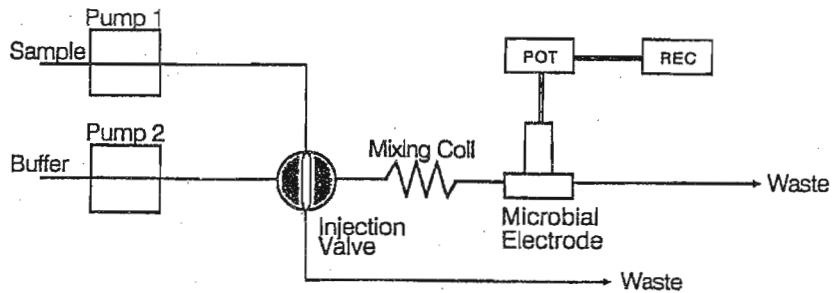


Fig. 4 Schematic diagram of the flow system for short-chain fatty acids determination.<sup>12)</sup> POT, potentiostat; REC, recorder.

の長鎖の脂肪酸にはほとんど応答を示さないことが明らかとなった。そこで10検体の生乳試料を用いて、従来法であるGC法との比較を行った。本システムでの応答とGC法で分析された全脂肪酸含量との間の相関係数は0.559であったのに対して、 $C_{4:0} \sim C_{12:0}$ の低級脂肪酸の合計値との間の相関係数は0.916であり、本システムが生乳中の低級脂肪酸に対して高い特異性を有していることが明らかとなった。本システムでは酪酸換算で0.11~1.7 mMの範囲で直線的応答を得ることができ、1時間当たり20検体程度の分析が可能であった。

#### 4 タンパク質

生乳中のタンパク質含量は平均3.25%で、その内8割程度がカゼインで

ある。タンパク質は乳糖と同様に無脂固形分に寄与する。一般的に用いられる全タンパク質の定量法としては、全窒素の測定に基づくケルダール法が挙げられるが、本法では全窒素の約5%を占めている非タンパク態窒素が分析値に正誤差を与える。著者らは、前処理操作が不要で、かつFIAへの展開可能な簡易・迅速法の設定を目的として、酵素の固定化に常用されている二官能性試薬ケルダールピロリド(GA)を用いた牛乳中のタンパク質定量法を開発した<sup>14)</sup>。本測定は、GAがアミノ基を有する化合物と反応する際に、溶存酸素を消費することに基づくものである。従って、本定量法においては、試料の着色度、濁度等によって影響を受けないウラー型酸素電極によるタンパク質のモニタリングが可能となった。牛乳を含めた乳製品を用いて、パッチ法での本GA法による酸素消費量とケルダール法により測定されたタンパク質含量との比較を行ったところ、両者の間には相関係数0.996(n=10)の良好な直線の相関が認められ、本法の牛乳及び乳製品への適用性が示された。本法のFIAへの適用においては、経済性を考慮して、同時に注入した試料とGAを合流させるワーキング方式を採用した<sup>15)</sup>。本システムでは1.0~4.0%のタンパク質濃度とピーク電流値との間に直線関係が認められ、1時間当たり12検体の分析が可能であった。

## 5 生菌数及び体細胞数

厚生省令では牛乳の細菌数検査法は標準寒天平板培養法(SPC法)とされている。しかしながら、SPC法では生菌に由来するコロニーを生育形成させるために、48時間程度を必要とすることから、それに代わる迅速分析法の開発が必要とされている。

食品中の微生物数の迅速分析法を紹介したLemieuxらの1991年の総説<sup>16)</sup>には、生乳中の微生物検査法としてもいくつかの方法が紹介されている。その中には、エアーセグメント方式を用いたピルピド濃度定量値からの微生物数の推定法<sup>17)</sup>、同じくエアーセグメント方式により生乳中の *Escherichia coli* 由来のグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性を測定する方法<sup>18)</sup>等が見られる。しかしながら、現在までのところ、FIAシステムによる前処理を必要としない直接的な生乳中の微生物数計測は行われていないようである。

一方、前処理された試料に関してはFIAが有効に使われている。この方法では主に、細菌の有するATP(アデノシン三リン酸)濃度を生物発光を利用して測定することにより、間接的にその生菌数を知ろうというものである。前処理操作は、一般に膜上への集菌(菌体濃縮)、洗浄による妨害物質の除

去及び溶菌によるATPの抽出工程から成る。得られたATP抽出液は、ルシフェリンを基質とした生物発光に基づき検出される。すでに、このATPの抽出とその後のATP分析をFIAに基づいて自動化した装置が市販されているし（東亜電波、ATPA-1000）、市販のキットを用いて手動によるATP抽出を行い、その抽出液を既に報告されているATP測定用のFIAシステムにより分析することも可能であろう<sup>19, 20)</sup>。同様の原理に基づいた生乳の生菌数測定のための全自動分析装置が、バクトフォスという名称でフォスエレクトリックより市販されている。

上述のエアークセグメント方式による生菌数の測定法も原理的には、FIAへの移行が可能であると考えられる。今後は、それらの方法の原理と同様に、微生物に由来する酵素活性の測定、さらにはその酵素反応の生成物モニタリングによる間接的微生物数測定法が、FIAに展開されていくものと期待される。著者らは、そのアプローチのひとつとして、上で紹介した *Arthrobacter nicotiana* に基づく微生物センサーで測定した低級脂肪酸濃度と生乳中の微生物数との間の正の相関関係を報告した<sup>21)</sup>。

生乳中の体細胞数は乳房炎の重篤さと最も高い正の相関を有しており、異常乳の検出に対して極めて重要な検査項目である。これまでに複雑な前処理操作を自動化したエアークセグメント方式の連続流れ分析法が報告されているが<sup>22)</sup>、FIAシステムの報告例は見当たらない。一方、体細胞数以外にも、乳房炎に伴い、多くの成分濃度が変動する。従って、それらの成分の変動をモニターすることで、体細胞数の間接的測定が可能であると考えられる。著者らは、乳房炎乳が正常乳と比較して、高い脂肪分解速度を示し<sup>23)</sup>、また

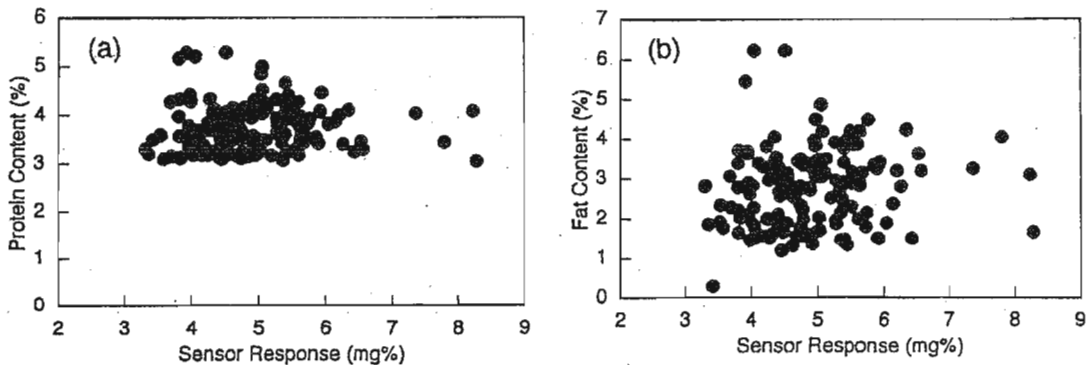


Fig. 5 Relationship between the response obtained by the microbial sensor and the protein content (a) and the fat content (b) in raw milk samples (n=150). The sensor response was represented as a butyric acid-equivalent concentration using a calibration curve of butyric acid. (Ukeda *et al.* unpublished data)

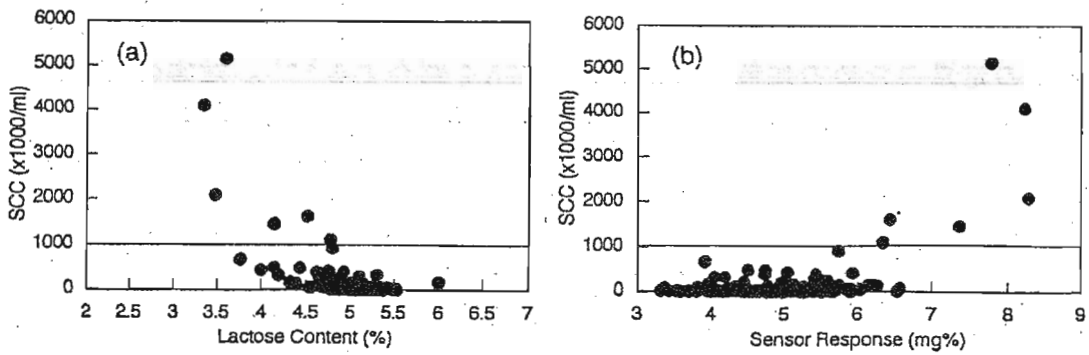


Fig. 6 Relationship between the somatic cell count (SCC) and the lactose content (a) and the sensor response (b). (Ukeda *et al.* unpublished data)

その分解により生じる脂肪酸の中でも、低級脂肪酸濃度が顕著に増加している<sup>24)</sup>ことに着目して、前述の微生物センサーによる生乳試料(150検体の分房乳)の低級脂肪酸濃度と、その体細胞数との比較を行った<sup>25)</sup>。Fig.5は微生物センサーの応答に対して、各試料のタンパク質(a)及び脂肪含量(b)をプロットしたものである。明らかにこれらの中に相関は認められず、本センサーの応答が生乳試料のタンパク質並びに脂肪含量により影響を受けないことが明らかとなった。Fig.6(a)は用いた試料の体細胞数と乳糖含量との相関を示したものである。両者の相関係数は-0.6程度で、これまでに報告されている両者の間の相関係数にはほぼ一致していたことから、用いた試料は乳房炎乳の検出指標に対して一般的挙動を示す典型的な試料群であったと考えられた。それらの試料の体細胞数と微生物センサーの応答とのプロットをFig.6(b)に示した。両者の間に、直線的相関関係が成立するとは言い難いものの、一定の体細胞数、例えば $10^6$ /ml以上の体細胞数を有する乳房炎の疑いのある試料に対しては、センサー応答は急激に増加する傾向を示した。それ故、本センサーは $10^6$ /ml以上の体細胞数を有する試料の検出に適用可能であり、FIA法に基づいた体細胞数の間接的定量が可能であることが示唆された。

## 6 塩類

塩類は体液や乳のpHの維持、浸透圧の調節などにとって非常に重要であり、乳腺の生理状態によりその組成、濃度が変化する。例えば、乳房炎乳でナトリウム、塩素などが増加し、カルシウム、リン、カリウム、マグネシウムなどが減少することが知られている。



ここでは、Herreroらにより報告された牛乳のカルシウム、リン酸、塩素イオンの定量のための比色法に基づいたFIAを紹介する<sup>26)</sup>。彼等の用いたFIAシステムをFig.7に示した。全カルシウム及びリン酸の定量にはオンライン透析器の使用は困難であり、除タンパク操作を含む試料の前処理が必要であった。スパイクテストによる回収率の測定から、最適な前処理法として酢酸を用いた除タンパク法が採用されている。カルシウムの定量は*o*-クレゾールフタレインコンプレクソン(CPC)に、またリン酸の定量はモリブデンブルー発色に基づいて行われた。最適条件では、本FIAシステムを用いて、0~15ppmの範囲のカルシウム並びに50~150ppmの範囲のリン酸の定量が、1時間当たり50並びに90検体の速度で可能であった。一方、塩素イオンの定量は、チオシアン酸水銀(II)吸光光度法に基づいて行われている。そのFIAシステムとしては、オンライン透析器の利用が可能であったが、他のイオンの前処理に用いられた酢酸による除タンパク試料についても、同様の結果が得られている。最適条件では、5~100ppmの範囲の塩素イオンの定量が可能であり、1時間当たり50検体の分析が可能であった。

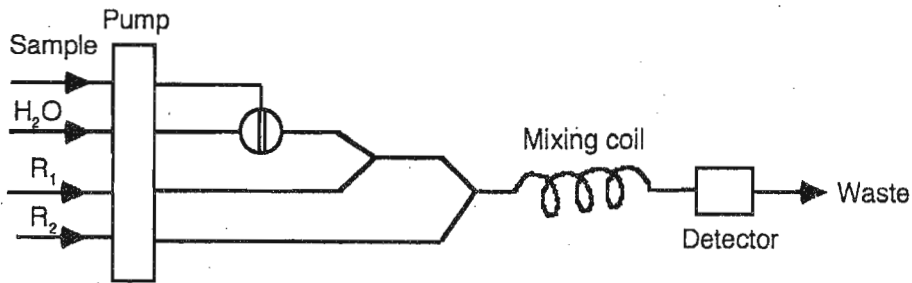


Fig. 7 Schematic diagram of the flow system for the individual spectrophotometric determination of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ .  $R_1$ , *o*-cresolphthalein complexone for  $\text{Ca}^{2+}$  and molybdate solution for  $\text{PO}_4^{3-}$ ;  $R_2$ , 2-amino-2-methylpropan-1-ol and 4-amino-3-hydroxynaphthalene-1-sulfonic acid, respectively. Redrawn from Herrero *et al.* (26).

## 7 その他の成分

上記以外でFIAによる分析が報告されている牛乳及び生乳中の成分としては、乳酸<sup>27)</sup>、酸化型ケトン体<sup>28)</sup>、ラクチュロース<sup>29)</sup>等がある。この中でラクチュロース定量用のFIAについて簡単に触れておきたい。

ラクチュロースは牛乳の製造工程において、加熱処理により生成する乳糖由来の二糖類である。近年、このラクチュロース濃度は牛乳の加熱処理の程度を示すマーカーとして有用であることが指摘され、その迅速かつ選択的分

析は牛乳製造の工程管理に有効であると考えられている。ラクチュロースは乳糖と同様に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの作用を受け、ガラクトースとフルクトースへ加水分解される。そこで、Mayerらはその生じたフルクトースをフルクトースデヒドロゲナーゼとヘキサシアン酸鉄塩(II/III)をメディエーターとして電気化学的に定量した。本検出法では、牛乳中に電極を劣化させる物質が存在したため、透析膜を用いたオンライン透析器が用いられた。1検体の分析に要する時間は6分程度であり、従来の酵素分析法(12時間程度)と比較して格段に分析時間を短縮することが可能であったが、現時点でその安定性は十分とは言えないようである。

## 8 おわりに

以上、生乳の品質検査並びに牛乳の工程管理に有用であると考えられるFIAシステムを紹介してきた。

牛乳、生乳の各試料は非常に複雑な多成分共存系であり、各成分はお互いに絶えず変化し合い、動的な平衡状態を形成している。さらに、原乳の受け入れにおける品質検査の様に、多数の試料を短時間で処理する必要性がしばしば生じることから、その分析法には優れた選択性と共に、極めて高い迅速性が要求される。上に示したいくつかの例からも明らかのように、このような要求に対して、FIA法は理想的な分析手法の一つであると考えられる。さらに、オンライン透析器を巧みにシステムに組み入れることで、妨害物質の影響の除去や目的とする成分の抽出、さらには適当な濃度範囲への試料の希釈が行え、前処理操作を全く必要としないシステムの構築も可能である。今後、ここで紹介した成分以外に対しても、FIAが積極的に利用され、その方法が国際酪農連盟等で標準分析法として採用されていくことを期待する。

## 文献

- 1) 崎浦誠治、鈴木省三 監修：“酪農大百科”(1990)(デーリイマン)
- 2) K. Matsumoto, O. Hamada, H. Ukeda and Y. Osajima, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2131 (1985).
- 3) T. Yao, R. Akasaka and T. Wasa, *Electroanalysis*, **1**, 413 (1989).
- 4) J. Abdul Hamid, G.J. Moody and J.D.R. Thomas, *Analyst*, **114**, 1587 (1989).
- 5) R. Puchades, A. Maquieira and L. Torro, *Analyst*, **118**, 855 (1993).
- 6) R. Pilloton, M. Mascini, I.G. Casella, M.R. Festa and E. Bottari, *Anal. Lett.*, **20**, 1803 (1987).

- 7) D. Narinesingh, V.A. Stoute, G. Davis and T.T. Ngo, *Anal. Biochem.*, **194**, 16 (1991).
- 8) H. Lundback and B. Olsson, *Anal. Lett.*, **18**, 871 (1985).
- 9) D. Narinesingh, V.A. Stoute, G. Davis, D. Persad and T.T. Ngo, *Anal. Chim. Acta*, **258**, 141 (1992).
- 10) S. Higuchi, K. Matsumoto and Y. Osajima, *J. Flow Injection Anal.*, **8**, 136 (1991).
- 11) P. Walstra and R. Jenness, "Dairy Chemistry and Physics" , p.350 (1984), (John Wiley & Sons).
- 12) H. Ukeda, G. Wagner, U. Bilitewski and R.D. Schmid, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2324 (1992).
- 13) H. Ukeda, G. Wagner, G. Weis, M. Miller, H. Klostermeyer and R.D. Schmid, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **195**, 1 (1992).
- 14) H. Ukeda, E. Miyazaki, K. Matsumoto and Y. Osajima, *Anal. Chem.*, **58**, 2975 (1986).
- 15) H. Ukeda, S. Tanaka, K. Matsumoto and Y. Osajima, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2835 (1987).
- 16) L. Lemieux, R. Puchades and R.E. Simard, *Lebensm. -Wiss. u.-Technol.*, **24**, 189 (1991).
- 17) W. Heeschen, H. Wernery, G. Suhren and A. Tolle, *Milchwissenschaft*, **29**, 394 (1974).
- 18) J.W. Moran and L.D. Witter, *J. Food Sci.*, **41**, 165 (1976).
- 19) 羽毛田靖、本橋亮一、梶原一人、松永直樹、権田金治、分析化学、**38**, T183 (1989).
- 20) 辻章夫、前田昌子、*J. Flow Injection Anal.*, **7**, 87 (1990).
- 21) H. Ukeda, Y. Fujita, M. Sawamura and H. Kusunose, *Anal. Sci.*, **10**, 683 (1994).
- 22) W. Heeschen, A. Tolle, J. Reichmuth and H. Zeidler, *Milchwissenschaft*, **27**, 745 (1972).
- 23) C.H. Fitz-Gerald, H.C. Deeth and B.J. Kitchen, *J. Dairy Res.*, **48**, 253 (1981).
- 24) F. Atroshi, A. Rizzo, T. Osterman and J. Parantainen, *J. Vet. Med.*, **A36**, 321 (1989).
- 25) 受田 浩之、R.D. Schmid、日本農芸化学会関西支部大会第376回講演会講演要旨集、p.52 (1992).
- 26) M.A. Herrero, J. Atienza, A. Maquieira and R. Puchades, *Analyst*, **117**, 1019 (1992).
- 27) B.A.A. Dremel, G. Trott-Kreigeskorte, B.P.H. Schaffar and R.D. Schmid, *GBF*

*Monogr. Ser.*, **13**, 225 (1989).

28) P. Marstorp, T. Anfalt and L. Andersson, *Anal. Chim. Acta*, **149**, 281 (1983).

29) M. Mayer, M. Genrich, W. Kunnecke and U. Bilitewski, Abstracts Book of 6th International Conference on Flow Analysis, p. 200 (1994).