

## ナチュラルチーズの脂肪酸組成分析による原料原産地判別法の検討

高嶋 康晴<sup>1</sup>, 齋藤 慎<sup>2</sup>, 上野山 智洋<sup>1</sup>, 山内 奈緒子<sup>1</sup>

Yasuharu Takashima, Makoto Saito, Tomohiro Uenoyama, Naoko Yamauchi

### 要 約

国産及び欧州産のナチュラルチーズの脂質中の 15 種類の脂肪酸組成を比較し、原料原産地判別の可否を検討した。国産（日本産）ナチュラルチーズ 49 点（ゴーダチーズ 26 点、カマンベールチーズ 23 点）及び欧州産ナチュラルチーズ 17 点（ゴーダチーズ 6 点、カマンベールチーズ 7 点、その他 4 点）を用い、脂肪酸組成を比較したところ、9 種類の脂肪酸組成に有意な差がみられた。このため、線形判別分析及びサポートベクターマシンによる判別モデルの構築を試みたが、分布が重なり十分な判別モデルの構築はできず、ナチュラルチーズにおける国産と欧州産の原料原産地判別の指標として脂肪酸組成を用いるのは困難であることが分かった。

### 1. はじめに

食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づき定められた食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）には、食品を販売する際に表示しなければならない表示事項やその表示の方法が規定されており、平成 29 年 9 月 1 日には同基準の一部を改正する内閣府令（平成 29 年内閣府令第 43 号）が施行され、それまで一部の加工食品にのみ義務付けられていた原料原産地名の表示が、輸入食品以外の全ての加工食品に拡大された（経過措置期間平成 34 年 3 月 31 日まで）。

チーズは、ウシやヒツジ等の乳を加熱、酸、凝乳酵素等の働きにより固めたものの総称だが、一般的には、レンネット（偶蹄目の哺乳期間の胃から取った乳を固める酵素）や乳酸菌などで凝固させて製造される近代ヨーロッパ型チーズを指すことが多い。日本において、この近代ヨーロッパ型チーズが製造されるようになったのは、明治 8 年（1875 年）に北海道の開拓庁の試験場で試作されたのが始まりといわれる。消費が急激に伸びたのは、食生活が洋風化し生活水準が向上した昭和 30 年代からで、昭和 50 年代のピザの普及やチーズケーキのブームなどを経てチーズの消費は増加した<sup>1, 2)</sup>。チーズは、原料乳から直接作られるナチュラルチーズとナチュラルチーズを粉砕、加熱溶解し、乳化剤等で再び固化させたプロセスチーズに大別される。平成 28 年におけるナチュラルチーズの国内生産量は 47,140 トン（プロセスチーズ原料用も含む）であるのに対して、輸入量は 246,446 トン（プロセスチーズ原料用も含む）であり、大きく海外に依存していることになる（国産割合 15.6 %）<sup>3)</sup>。しかしながら、現在のところ、国産原料を使用した旨の表示に対する有効な検査法がないため、表示の真正性を確認するための科学的検証方法が求められている。

これまでも、欧州産の原料乳、バター等の乳製品の脂肪酸組成を比較した報告があり<sup>4)</sup>、原料乳から直接製造されたナチュラルチーズであれば、原料乳の影響を大きく受けていると推測されることから、脂肪酸組成を指標とした国産ナチュラルチーズと欧州産ナチュラルチーズの判別の

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

<sup>2</sup> 農林水産省

可能性を検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

対象のナチュラルチーズの種類としては、欧州ナチュラルチーズの輸入量が多く、国産ナチュラルチーズの製造量も多い半硬質系チーズのゴーダチーズと軟質白カビ系チーズのカマンベールチーズを中心に検討した。

国産試料<sup>(注)</sup> 49点（ゴーダチーズ及びカマンベールチーズ）及び欧州産試料 17点（ゴーダチーズ、カマンベールチーズ、パルミジャーノ・レッジャーノ、グラナ・パダーノ、チェダーチーズ及びグリュイエールチーズ）を入手した。各試料は、国産試料については製造業者に、欧州産試料については輸入業者から産地を確認した上で入手した（表1）。

表1 収集試料

(1) 国産ナチュラルチーズ			(2) 欧州産ナチュラルチーズ		
産地 (道県名)	チーズの種類	点数	産地 (国名)	チーズの種類	点数
北海道	ゴーダ	14	オランダ	ゴーダ	5
	カマンベール	12	ドイツ		1
岩手	ゴーダ	3	フランス	カマンベール	5
	カマンベール	2	デンマーク		2
秋田	カマンベール	1	イタリア	パルミジャーノ	1
宮城	ゴーダ	1		・レッジャーノ	1
新潟	ゴーダ	1		グラナ・パダーノ	1
	カマンベール	1	イギリス	チェダー	1
群馬	ゴーダ	1	スイス	グリュイエール	1
	カマンベール	1	合計		17
埼玉	カマンベール	1			
千葉	カマンベール	1			
山梨	ゴーダ	1			
	カマンベール	2			
静岡	ゴーダ	1			
長野	ゴーダ	1			
福岡	ゴーダ	1			
大分	カマンベール	1			
佐賀	ゴーダ	1			
熊本	カマンベール	1			
宮崎	ゴーダ	1			
合計		49			

### 2.2 試薬

実験に使用した水は純水製造装置（GS-200、アドバンテック東洋）により製造した蒸留水又はイオン交換水を用いた。油脂の抽出には28%アンモニア水（和光純薬工業）、エタノール（95%以上、特級、関東化学又は和光純薬工業）、ジエチルエーテル（特級、関東化学又は和光純薬工業）、石油エーテル（特級、関東化学又は和光純薬工業）及びヘキサン（特級、関東化学又は和光純薬工業）を用いた。メチルエステル化には、ヘキサン、トルエン（特級、和光純薬工業）、0.5 mol/L

(注) 国産試料の収集は著者以外に、農林水産消費安全技術センター 勝藤繁、藤本正幸、野澤慎太郎、坪根政文、荒尾祐子が担当した。

ナトリウムメトキシド・メタノール溶液 (SIGMA-ALDRICH)、酢酸 (特級、関東化学又は和光純薬工業) を 0.5 mol/L に調製したもの、硫酸ナトリウム (特級、関東化学又は和光純薬工業)、脱水メタノール (有機合成用、和光純薬工業)、炭酸水素ナトリウム (特級、関東化学又は和光純薬工業) を用いた。また、脂肪酸組成の測定では、脂肪酸メチルエステルの希釈にヘキサン、標準品として脂肪酸メチルエステル定性用混合試薬 (ジーエルサイエンス) を用いた。

## 2.3 装置

水素炎イオン化検出器 (Flame Ionization Detector; FID) を装備したガスクロマトグラフ (HP6890、Agilent Technologies) を用いて測定した。カラムはキャピラリーカラム (SUPELCO Omegawax<sup>TM</sup> 250、Sigma-Aldrich) (内径 0.25 mm×30 m、膜厚 0.25 μm) を用いた。

## 2.4 分析

### 2.4.1 試料調製・油脂の抽出

チーズの表面 (リンド) では微生物や脂質の分解等の影響により脂肪酸組成がばらつく可能性がある。このため試料の表面を除去した後に 1~2 mm 角程度に細切し、均一化したものを調製試料とした。

調製試料 1 g をトールビーカーに採取し、蒸留水又はイオン交換水 9 mL、28 % アンモニア水 1 mL を加え、40~50 °C の温浴中で加温し、ガラス棒でよくつぶして均一な乳濁液とした。次に、塩酸 11 mL を加え、ホットプレート上で加熱し、沸騰後 5 分間加熱を続け分解液とした。放冷後、分解液をマジョニア脂肪抽出管に移し、エタノール 10 mL を加えよく混合した。次に、マジョニア脂肪抽出管にジエチルエーテル 25 mL を加えて、栓をしてガスを抜きながら振とうし、石油エーテル 25 mL を追加し、同様にガスを抜きながら振とうさせた。マジョニア脂肪抽出管用の遠心分離器 (H-155、コクサン) を用いて 500~600 rpm で 1~2 分間遠心分離を行い、有機層を回収した。回収した有機層をロータリーエバポレーターにより溶媒を留去後、105 °C で 30 分間乾燥させ抽出油脂とした。

### 2.4.2 脂肪酸メチルエステル化

抽出油脂約 20 mg を栓付試験管に採取し、トルエン 1 mL を加えて溶解させた後に、0.5 mol/L ナトリウムメトキシド・メタノール溶液 2 mL を加えて混合後、室温で 10 分間静置する。次に、0.5 mol/L 酢酸 2 mL を加えて中和させた後にヘキサン 3 mL を加え、1 分間振とう後、有機層が完全に分離するまで静置した後、上層の有機層を回収した。水層にはヘキサン 2 mL を加え 1 分間振とう後、有機層が完全に分離するまで静置した後に、再度有機層を回収した。回収した有機層を合わせて、硫酸ナトリウム・炭酸水素ナトリウム混合物 (2:1) を少量 (スパチュラ小さじ 1 杯程度) 加えて混合し、30 分間静置後、有機層を回収したものを試験溶液とした。

### 2.4.3 脂肪酸組成の測定

試料注入口温度 250 °C、FID 検出器温度 250 °C、カラム温度は 140 °C で 5 分間保持後、4 °C/分で 250 °C まで昇温させ 10 分間保持した。キャリアーガスとしてヘリウム (1.5 mL/分)、メイクアップガスとしてヘリウム (45 mL/分) を用い、スプリット比は 1:25 とし、試験溶液の注入量は 2 μL で測定を行った。各脂肪酸メチルエステルのピーク同定には、混合脂肪酸メチルエステル標準品を試料と同様に測定し、その保持時間から各脂肪酸メチルエステルピークを同定した。同定した 15 種類の脂肪酸メチルエステル (カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、トリデシル酸、

ミリスチン酸、ミリストレイン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸) のピーク面積の総和に対する各脂肪酸メチルエステルのピーク面積の百分率を、各脂肪酸の組成とした。ピークの検出及び脂肪酸組成の計算にはクロマトデータシステム OpenLAB CDSChemStation (Agilent Technologies) を使用した。

## 2.5 判別モデルの構築

得られた 15 種類の脂肪酸組成を説明変数として、線形判別分析 (LDA) 及びサポートベクターマシン (SVM) により最適化を試みた。線形判別分析は R 3.4.1 の MASS パッケージを使用し、SVM は e1071 パッケージを使用した。解析は中村ら<sup>5)</sup>の方法に従った。構築した判別モデルの未知試料に対する的中率は、判別モデル構築用試料を用いた Leave-one-out cross validation (LOO CV) により確認した。なお、解析には各試料 2 点併行で測定した結果の平均値を用い、SVM は線形カーネルのみを検討した。できるだけ少ない脂肪酸組成で高い中率が得られるモデルを最適な判別モデルとして選択した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 北海道で製造されたゴーダチーズとカマンベールチーズの比較

チーズは乳酸菌の発酵、リパーゼによる脂質分解によりさまざまな揮発性の脂肪酸が生成され風味が形成されるが、表面 (リンド) 以外の部分では脂質の分解はほとんど見られないとされている<sup>6)</sup>。このため、チーズの種類間での脂肪酸組成の差異が生じ無いことを確認するために、北海道産のゴーダチーズ (N=14) とカマンベールチーズ (N=12) の脂肪酸組成をt検定により比較したところ、15種類の脂肪酸全てで、5%の有意水準を満たすp値は見られず (表2)、ナチュラルチーズの各脂肪酸の組成は種類によらないと推測された。

表2 北海道産におけるゴーダチーズとカマンベールチーズの脂肪酸組成 (%) の比較

脂肪酸名	北海道産 ゴーダチーズ (N=14)		北海道産 カマンベールチーズ (N=12)		p値	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		
8:0	カブリン酸	1.3	0.1	1.3	0.1	0.292
10:0	カブリン酸	3.3	0.3	3.3	0.3	0.713
12:0	ラウリン酸	4.1	0.4	4.1	0.3	0.847
13:0	トリデシル酸	0.1	0.0	0.1	0.0	0.759
14:0	ミリスチン酸	13.2	0.6	13.4	0.6	0.323
14:1(n-4)	ミリストレイン酸	1.2	0.1	1.3	0.1	0.073
15:0	ペンタデシル酸	1.3	0.1	1.4	0.1	0.468
16:0	パルミチン酸	35.5	1.9	35.6	1.3	0.886
16:1(n-7)	パルミトレイン酸	1.9	0.2	1.9	0.1	0.953
17:0	マルガリン酸	0.6	0.1	0.6	0.1	0.770
18:0	ステアリン酸	11.5	1.3	11.3	0.8	0.580
18:1(n-9)	オレイン酸	22.7	1.7	22.5	1.3	0.749
18:2(n-6)	リノール酸	2.7	0.5	2.7	0.4	0.776
18:3(n-6)	リノレン酸	0.5	0.2	0.4	0.1	0.432
20:0	アラキジン酸	0.2	0.0	0.2	0.0	0.825

### 3.2 国産ナチュラルチーズと欧州産ナチュラルチーズの比較

国産ナチュラルチーズ (N=49) と欧州産ナチュラルチーズ (N=17) の脂肪酸組成を比較したところ、15種類の脂肪酸のうち9種類の脂肪酸 (ラウリン酸、ミリストレイン酸、ペンタデシル

酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸)に5%の水準で有意な差が見られ、特に、リノレン酸では0.5%の水準で有意な差が見られた(表3、図1)。中西らの報告<sup>4)</sup>では、国産牛乳の乳脂肪は、パルミトレイン酸とリノール酸以外の不飽和脂肪酸(ミリストレイン酸及びオレイン酸)がやや多いとあるが、リノール酸は国産の方がやや多い結果となったもののその差異はわずかであり、顕著な差では無いと推測された。

表3 国産ナチュラルチーズと欧州産ナチュラルチーズの脂肪酸組成(%)の差異

脂肪酸名	国産ナチュラル チーズ (N=49)		欧州産ナチュラル チーズ (N=17)		p値		
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差			
8:0	カブリン酸	1.3	0.1	1.3	0.0	0.630	
10:0	カブリン酸	3.2	0.3	3.2	0.2	0.487	
12:0	ラウリン酸	3.9	0.4	4.2	0.3	0.008	*
13:0	トリデシル酸	0.1	0.0	0.1	0.0	0.219	
14:0	ミリスチン酸	13.0	0.7	13.2	0.6	0.351	
14:1(n-4)	ミリストレイン酸	1.2	0.1	1.2	0.1	0.036	*
15:0	ペンタデシル酸	1.3	0.1	1.3	0.1	0.015	*
16:0	パルミチン酸	35.4	1.6	36.6	1.4	0.005	*
16:1(n-7)	パルミトレイン酸	1.8	0.2	1.9	0.2	0.011	*
17:0	マルガリン酸	0.6	0.1	0.6	0.2	0.772	
18:0	ステアリン酸	12.0	1.5	11.3	0.7	0.009	*
18:1(n-9)	オレイン酸	22.8	1.4	22.0	1.2	0.017	*
18:2(n-6)	リノール酸	2.8	0.5	2.4	0.6	0.008	*
18:3(n-6)	リノレン酸	0.4	0.1	0.5	0.1	0.002	**
20:0	アラキジン酸	0.2	0.0	0.2	0.0	0.106	
*	5%の水準で有意な差が見られた脂肪酸						
**	0.5%の水準で有意な差が見られた脂肪酸						

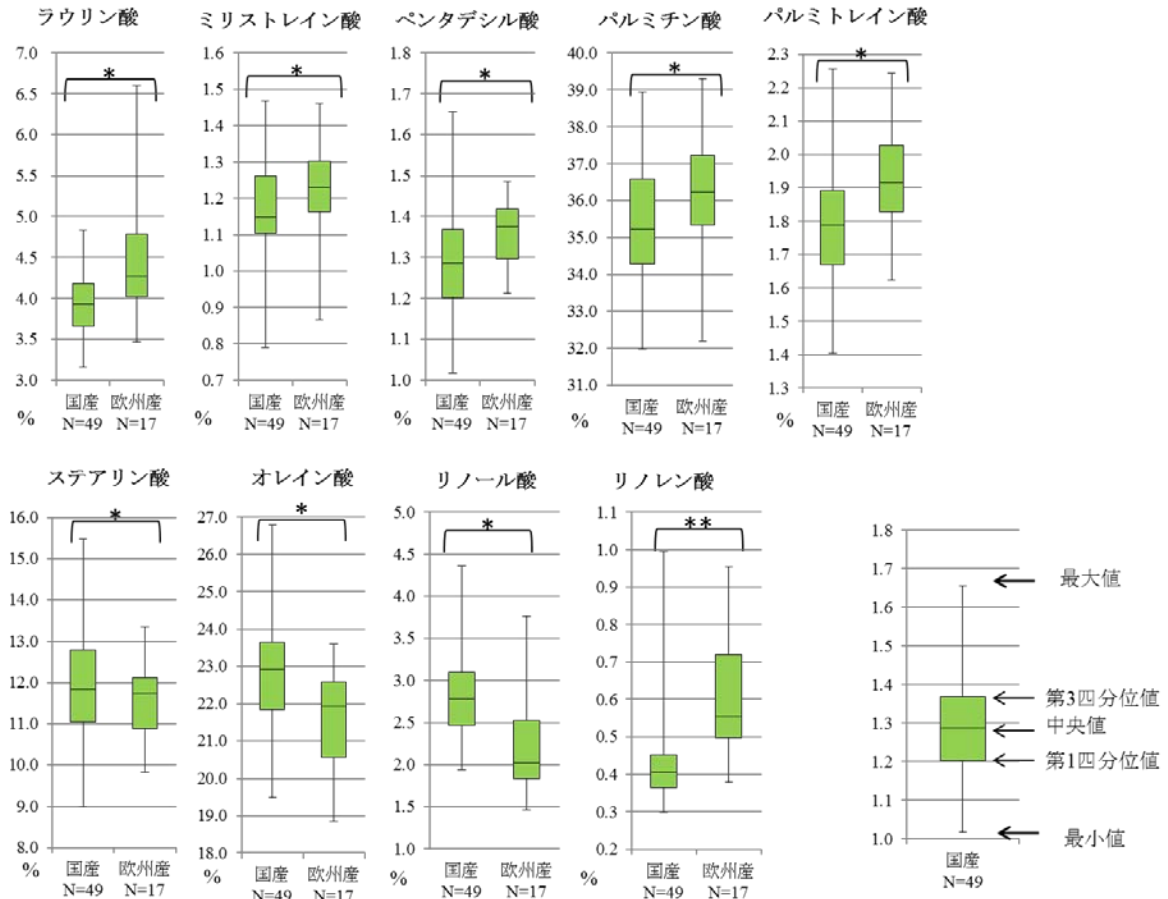


図1 国産ナチュラルチーズと欧州産ナチュラルチーズ間で有意な差が見られた脂肪酸組成(%)の箱ひげ図

\* 5%の水準で有意な差が見られた脂肪酸、\*\* 0.5%の水準で有意な差が見られた脂肪酸

### 3.3 国産ナチュラルチーズと欧州産ナチュラルチーズの判別モデルの最適化について

得られた15種類の脂肪酸組成を説明変数として、線形判別分析(LDA)及びサポートベクターマシン(SVM)により最適化を試みた(式1及び2)。しかしながら、判別得点が正の試料を国産、負の試料を欧州産と判別した場合、LDAで国産試料の77.6%、欧州産試料の82.4%、SVMで国産試料の81.6%、欧州産試料の82.4%的の中率となり、十分な中率といえなかった。このため、国産と欧州産で有意差がある脂肪酸組成はあったものの、検査に用いるには困難と推定された。

(式1 : LDAによる最適化された判別式)

$$(\text{判別得点}) = -0.309 \times [\text{カブリン酸}(\%)] - 1.444 \times [\text{ミリストレイン酸}(\%)] + 1.073 \times [\text{リノール酸}(\%)] - 5.428 \times [\text{リノレン酸}(\%)] + 2.607$$

(式2 : SVM線形カーネルによる最適化された判別式)

$$(\text{判別得点}) = -0.904 \times [\text{ラウリン酸}(\%)] - 1.292 \times [\text{ミリストレイン酸}(\%)] + 0.174 \times [\text{オレイン酸}(\%)] - 6.049 \times [\text{リノレン酸}(\%)] + 4.815$$

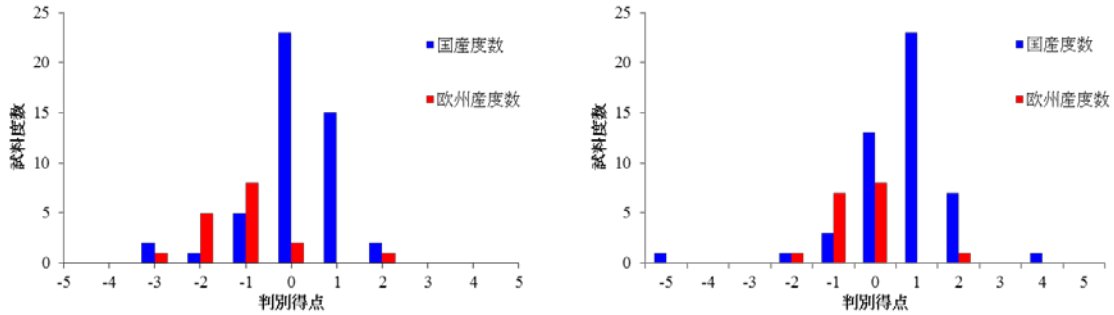


図2 判別モデルの最適化について線形判別分析 (LDA) (左) 及びサポートベクターマシン (SVM) (右) による最適化の結果による分布図

#### 4. まとめ

国産及び欧州産のナチュラルチーズの脂質中の15種類の脂肪酸組成を比較し、原料原産地判別の可否を検討した。国産ナチュラルチーズ49点及び欧州産ナチュラルチーズ17点を用い、脂肪酸組成を比較したところ、15種類の脂肪酸のうち9種類の脂肪酸組成に有意な差がみられた。このため、線形判別分析及びサポートベクターマシンによる判別モデルの構築を試みたが、的中率が90%以上の判別モデルを構築できず、ナチュラルチーズにおける国産と欧州産の原料原産地判別の指標として脂肪酸組成を用いるのは困難であることが分かった。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料の提供やご助言をいただきました農業協同組合、製造事業者、輸入業者等の皆様に心より御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 大谷元：チーズの起源と歴史（現代チーズ学），New Food Industry, 49(10)，食品資材研究会, 25-36(2007)
- 2) 牛乳・乳製品の知識，一般社団法人Jミルク，2017-09-1，<http://www.j-milk.jp/tool/kiso/berohe000004ak6-att/allpage.pdf>
- 3) 平成28年度チーズの需給表，農林水産省，2017-09-1，[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/cheese\\_zyukyu/attach/pdf/index-2.pdf](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/cheese_zyukyu/attach/pdf/index-2.pdf)
- 4) 中西武雄，中江利孝，須山征明：ガスクロマトグラフィーによる本邦産牛乳脂肪の脂肪酸組成に関する研究（第5報）北海道及び東北地方のバター脂肪の脂肪酸組成とその季節的及び地理的変動について，日本農芸化学会誌, 36(12), 994-1000(1962)
- 5) 中村哲，法邑雄司，豊田正俊：ゴボウの原産地判別の試料調製法の再検討，農林水産消費安全技術センター調査研究報告, 37, 1-10(2013)
- 6) 長沢太郎：チーズの風味上の最近の諸問題，日本畜産学会報, 34(5), 303-310(1963)