

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780241

研究課題名（和文） 生乳の脂質酸化に及ぼす要因解析とその防止策の検討

研究課題名（英文） Study on occurrence factor and prevention against lipid oxidation of raw milk during preservation period

研究代表者

三谷 朋弘（MITANI TOMOHIRO）

北海道大学・大学院農学研究院・特任助教

研究者番号：80451409

研究成果の概要（和文）：

牛乳で脂質が酸化する事による品質の劣化が問題となっている。本研究では、長期冷蔵保存下での脂質酸化のメカニズムを明らかにし、その生乳段階での乳成分との関連を検討した。脂質酸化の最終段階で発生する物質（ヘキサナール）は過酸化脂質を経て生成され、その経過は脂肪酸組成の影響を強く受けた。不飽和度の高い脂肪酸（リノレン酸）を多く含む生乳は早い段階でヘキサナールの生成が確認され、リノール酸を多く含む生乳はある程度経過してからヘキサナールが生成された。生乳中の脂肪酸組成は飼料構成の影響を強く受けるため、今後は飼養条件や生乳成分の違いによる生乳の用途・流通を考慮する必要があるだろう。

研究成果の概要（英文）：

In dairy industry, a quality deterioration occurred by lipid oxidation of raw milk become a problem. This study objected to investigate an occurrence factor and prevention against lipid oxidation of raw milk during preservation period. Hexanal yielded at final step of lipid oxidation was produced from polyunsaturated fatty acids (PUFA) through a peroxide lipid. For milk containing a lot of highly-unsaturated fatty acid such as linolenic acid, hexanal was yielded at early preservation period. Conversely, for milk containing a lot of PUFA such as linoleic acid, hexanal was yielded 3 or 5 days after refrigerated storage. It is known that feeding regime for dairy cows strongly affected on fatty acid profile of milk. It would be considered usage and distribution of raw milk which is produced from different feeding regime.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：栄養・飼養、酪農生産システム、畜産学、農林水産物

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 我が国の酪農の現状

北海道は全国の約 50%の牛乳を生産する酪農生産地帯であり、土地資源が豊富であるため、我が国で自給粗飼料を主体とした酪農生産を実施できうる地域である。北海道の中でも、地域の気候条件や土壌条件の違いにより、生育できる牧草種や飼養条件など地域毎の特徴は大きく異なり、それぞれに適した酪農生産システムが存在し、そこで生産される生乳も特徴的である可能性がある。北海道においても高泌乳化に伴い、飼料自給率はかろうじて 50%維持している程度であるが、自給飼料への依存を高める事により多様な特徴を持つ生乳生産が可能となる。

### (2) 酸化による牛乳の劣化

我が国の飲用乳の消費は年々落ち込み続けている。そのカンフル剤として、各乳業メーカーで「〇〇のおいしい牛乳」と銘打った飲用乳が発売されている。その多くが溶存酸素を除去し酸化による製品の劣化を防ぐことを目的としている。しかし、生乳が工場に持ち込まれた段階で酸化している場合には、それを除去することは困難である。関連して、酪農生産現場においても風味異常による生乳の廃棄が年数回は発生し問題となっている。要因のひとつとして多価不飽和脂肪酸の酸化による脂質酸化臭が知られており、生産現場においても酸化による生乳の劣化は大きな問題である。

### (3) 生乳の脂質酸化のメカニズム

生乳段階での脂質酸化は、乳中の不飽和脂肪酸の含量と抗酸化物質含量とのバランスにより発生すると考えられている。以前から、粗飼料の種や給与量、濃厚飼料の種や給与量および環境的な要因により、乳脂肪中の脂肪酸組成や強い抗酸化作用を持つビタミンやカロチノイド類などの牛乳成分が変動することは多くの報告で確かめられてはいるものの、これら乳成分の変化と脂質酸化の程度との関係について検討した例はほとんどない。

## 2. 研究の目的

現在、我が国では殺菌充填後に流通するものだけでなく、生乳の状態でも流通し消費地の近くで殺菌充填されるものも増加しつつある。その場合、未殺菌のまま長期間冷蔵状態で保存されるため、まれに脂質の酸化が進行する事が起こる。

そこで、本研究では長期冷蔵保存における生乳段階での脂質酸化発生の要因（生乳中の脂肪酸組成および抗酸化物質含量のバランス）を明らかにし、その現場レベルでの防止策を

検討する事を目的とし、実地調査および試験条件下での試験を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 各生乳成分と過酸化脂質量 (PV) との関係

#### ① 酪農家バルク乳レベルでの検討 (実地調査)

北海道の3地域（道央、十勝および道北地域）で、季節毎（冬、春、夏；道北のみ初夏を加えた）に生乳サンプル採集とアンケート調査を行った。農家毎に飼養条件、一般乳成分、脂肪酸組成、抗酸化物質含量およびPV（当日、3日間および5日間冷蔵後冷凍）を測定した。季節毎の差異が小さいので道央および十勝地域は一年分をまとめ、道北については放牧時期（初夏および夏）と舎飼い時期（冬および春）に分割し、解析した。

#### ② 個体乳レベルでの検討 (試験条件下)

舎飼い時期、放牧移行時期および放牧時期に経時的に個体の生乳サンプルを採取した。採取した生乳は、冷蔵庫で0、12、24、48および96時間、断続的に攪拌しながら冷蔵保存し、経過時間毎のサンプルは-80℃で分析まで冷凍保存した。それぞれ一般乳成分、脂肪酸組成、抗酸化物質含量およびPVを測定した。

### (2) 脂質酸化臭原因物質 (アルデヒド) の HPLC による定量化

ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を用い、アルデヒドを誘導体化し HPLC で定量化できるかを検討した。

### (3) 各生乳成分と生乳中アルデヒド含量との関係

#### ① 酪農家バルク乳レベルでの検討 (実地調査)

飼料条件が異なる酪農家 30 戸から生乳サンプルを採取し、経時的に冷蔵保存（当日、3日間および5日間）後の生乳中ヘキサナール含量、PV、脂肪酸組成および抗酸化物質含量を測定した。

#### ② 加工処理による影響

原料 (n=8) および加工処理（3処理：HTST ノンホモおよびUHTホモ）が異なる牛乳をサンプルとし、生乳中ヘキサナール含量、PV、脂肪酸組成および抗酸化物質含量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 各生乳成分と過酸化脂質量 (PV) との関係

#### ① 酪農家バルク乳レベルでの検討 (実地調査)

冷蔵後日数に関わらず、道北地域の PV は道央および十勝地域より多く、特に道北地域の放牧時期が多かった (表 1)。道北地域の舎飼い時期を除き、冷蔵後日数間で PV に有意な差はなかった。

表1. 過酸化脂質量の変化

	道央		道北		S.E.	P
	十勝	道北	放牧	舎飼い		
過酸化脂質量, mM of O <sub>2</sub> /L of milk						
1日目冷凍	7.6 <sup>bc</sup>	5.7 <sup>c</sup>	15.6 <sup>a</sup>	9.3 <sup>b,xy</sup>	0.71	<0.001
3日目冷凍	7.5 <sup>bc</sup>	5.1 <sup>c</sup>	14.6 <sup>a</sup>	8.3 <sup>b,xy</sup>	0.66	<0.001
5日目冷凍	7.8 <sup>b</sup>	5.4 <sup>b</sup>	14.6 <sup>a</sup>	7.9 <sup>b,y</sup>	0.71	<0.001
S.E.	0.91	0.20	1.45	0.38		
P	0.97	0.59	0.85	0.03		

<sup>abc, xy</sup> 異符号間に有意差あり (P < 0.05)

冷蔵当日の PV と乳成分の関係を検討した結果、PV と多価不飽和脂肪酸であるリノール酸とは負の相関にあり、 $\alpha$ -リノレン酸、CLA および抗酸化物質含量とは正の相関関係にあった (表 2)。PV と正の相関関係にあった乳成分はいずれもが放牧飼養時に特徴的な乳成分であった。放牧時に特有の脂肪酸組成では PV が増加し、この程度の抗酸化物質量では脂質の酸化を抑える事は困難であるかもしれない。

表2. 1日目冷凍の過酸化脂質量とそれぞれのパラメータとの相関係数

	Total	放牧時期	舎飼い時期
N数	154	26	128
C8:0	-0.28	-0.38	-0.41
C10:0	-0.26	-0.35	-0.47
C12:0	-0.25	-0.39	-0.30
C14:0	-0.19	-0.32	0.00
C18:0	0.14	0.05	-0.06
c9,C18:1	0.17	0.10	0.03
t11,C18:1	0.54	0.31	-0.10
c9,12,C18:2	-0.49	-0.51	-0.38
c9,12,15,C18:3	0.55	0.33	0.33
c9,t11,C18:2	0.63	0.50	0.00
Retinol	0.06	0.55	0.02
$\alpha$ -Tocopherol	0.48	0.38	0.15
Lutein+Zeaxanthin	0.46	-0.08	0.38
B-Carotene	0.61	0.52	0.20

## ② 個体乳レベルでの検討 (試験条件下)

生乳成分が特徴的な放牧時における PV の経時変動を検討した結果、PV は舎飼い時期から移行時期にかけて増加し、放牧前期には低下、放牧後半で再び上昇する変動を示した (表 3)。また、生乳中 PV は生乳中の  $\alpha$ -リノレン酸および共役リノール酸割合と正の相関があり、構造的により不安定な炭素数 18 の脂肪酸が過酸化脂質に転換されたと考えられる。しかし、冷蔵保存時間の経過に伴う PV の変化は緩慢であった。

以上より、PV は飼養条件に大きく影響をうける生乳中の脂肪酸組成と強い関係があるものの抗酸化物質含量との関連は明確ではなかった。また、長期冷蔵下における変化は

表3. 放牧移行期における過酸化脂質量 (mM of O<sub>2</sub>/L of milk)

	舎飼い時期	放牧移行期	放牧前期	放牧後期	平均
冷蔵保存時間					
当日	14.8	27.9	17.8	35.6	24.0
12h後	13.6	29.9	16.2	31.4	22.8
24h後	17.1	26.7	13.3	27.0	21.0
48h後	13.4	27.4	13.6	33.6	22.0
96h後	15.0	24.6	15.3	32.9	21.9
平均	14.8 <sup>c</sup>	27.3 <sup>b</sup>	15.2 <sup>c</sup>	32.1 <sup>a</sup>	

<sup>abcd</sup> 異符号間に有意差あり (P < 0.05)

緩慢であり、当初予測されたような増加はみられず、PV を脂質酸化の指標として用いるのは不適であると考えられた。その要因としては、PV は脂質酸化の第一段階で起こる物質のみを測定しているのに対し、実際に異常風味で問題となるのは 2 次酸化生成物であるアルデヒド等の物質であるからである。したがって、今後の検討には生乳中のアルデヒドの定量が必須であると考えられた。

## (2) 脂質酸化臭原因物質 (アルデヒド) の HPLC による定量化

脂質酸化による生成されるアルデヒドであるマロンジアルデヒド (MDA) およびヘキサナールを DNPH で誘導体化し、HPLC で定量化できた。経時的に冷蔵したサンプルの MDA およびヘキサナール含量は 96 時間後に有意に増加し、長期冷蔵保存によりこれらの 2 次酸化生成物が増加することが確認された (表 4)。一方、PV は有意ではないものの時間の経過に伴い減少し、1 次酸化生成物である過酸化脂質が酸化分解され、その結果、2 次酸化生成物であるアルデヒドが増加する事を明らかとした。

表4. マロンジアルデヒド (MDA)、ヘキサナールおよび過酸化脂質量 (PV) の経時変化

	MDA	Hexanal	PV
冷蔵保存時間			
当日	551 <sup>a</sup>	18.9 <sup>a</sup>	41.0
12h後	565 <sup>a</sup>	19.3 <sup>a</sup>	38.2
24h後	569 <sup>a</sup>	19.4 <sup>a</sup>	38.0
48h後	569 <sup>a</sup>	20.5 <sup>a</sup>	36.5
96h後	825 <sup>b</sup>	27.4 <sup>b</sup>	34.4

<sup>ab</sup> 異符号間に有意差あり (P < 0.05)

## (3) 各生乳成分と生乳中アルデヒド含量との関係

### ① 酪農家バルク乳レベルでの検討 (実地調査)

ヘキサナールの当日含量と 96h までの増加率をパラメータとしてクラスター解析を行った結果、酪農家バルク乳 (n=30) は 0h 含量が低く変化率が低い A 群 (n=20)、0h 含量が低く変化率が高い B 群 (n=5) および 0h 含量が高く変化率が低い C 群 (n=5) の 3 つの群に分類できた。多くは問題とならない A 群に分類されたが、問題となる B および C 群に分類される牛乳も存在した。

問題とならない A 群と問題となる B 群および C 群の乳成分を比較した。脂肪酸組成の特徴は、B 群ではステアリン酸が低くリノール

酸割合が高い特徴があり、C 群ではオレイン酸、共役リノール酸および $\alpha$ -リノレン酸割合が高い特徴があった。また、 $\alpha$ -トコフェロールの当日含量に違いはなかったが、A 群では96時間までに低下する特徴を示し、 $\beta$ -カロテン含量は、A および C 群と比較して B

表5. 各群の脂肪酸組成および抗酸化物質含量

	A群	B群	C群	P
N数	20	5	5	
脂肪酸組成, % of 総脂肪酸				
C8:0	0.88	0.89	0.90	0.90
C10:0	2.18	2.35	2.13	0.56
C12:0	2.64	2.90	2.55	0.42
C14:0	9.97	10.27	9.76	0.79
C16:0	27.2	28.1	25.4	0.35
C18:0	9.27 <sup>a</sup>	8.15 <sup>b</sup>	11.20 <sup>a</sup>	< 0.05
c9,C18:1	17.4 <sup>b</sup>	16.4 <sup>b</sup>	21.5 <sup>a</sup>	< 0.01
t11,C18:1	3.38	2.95	4.10	0.34
c9,12,C18:2	1.17 <sup>b</sup>	1.74 <sup>a</sup>	1.30 <sup>ab</sup>	< 0.01
c9,t11,C18:2	0.39 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.77 <sup>a</sup>	< 0.01
c9,12,15,C18:3	0.33 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.46 <sup>a</sup>	< 0.01
抗酸化物質含量, $\mu\text{g}/\text{dL}$				
$\alpha$ -Tocopherol				
当日含量	123.4	106.4	138.8	0.37
96h後の変化率%	-0.09 <sup>b</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	< 0.01
$\beta$ -Carotene				
当日含量	31.8 <sup>a</sup>	14.7 <sup>b</sup>	41.7 <sup>a</sup>	< 0.05
96h後の変化率%	-0.04	-0.02	-0.01	0.18

<sup>ab</sup> 異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

群で有意に少なかった。

以上より、多価不飽和脂肪酸の中でもリノール酸割合が高く、抗酸化物質含量が低い牛乳は、搾乳直後のヘキサナール含量は低いものの、長期の冷蔵保存時に増加する傾向を示した。このような特徴を持つ牛乳は、穀物を多給もしくはトウモロコシサイレージを多給した飼養条件下の特徴であり、このような飼養条件下では長期冷蔵保存時のヘキサナールの増加に留意する必要がある。

$\alpha$ -リノレン酸割合が高い場合は抗酸化物質含量が高くても搾乳直後からヘキサナール含量が高く、長期の冷蔵保存ではヘキサナールは増加しない事が明らかとなった。これらの特徴を持つ牛乳は、放牧飼養条件下で放牧依存度の高い飼養条件下で特徴的である。

## ② 加工処理による影響

飼養条件が異なる8原料を用いて、飲用乳向けの加工処理（熱処理：HTST ノンホモおよびUHT ホモ）を行った結果、ほぼ全ての生乳で加工処理によりPVは増加した（図1）。ヘキサナール含量は加工処理により増加する原料と変化しないもしくは減少する原料があった（図2）。

ヘキサナール含量が加工により増加した原料の特徴は、変化しなかった原料と比較して、C16未満の飽和脂肪酸が少なく、多価不

飽和脂肪酸割合が高い傾向にあった。抗酸化物質含量に両群に違いはなかった（表6）。

N数が少ないため、統計的な差異は明確ではなかったが、脂質段階の第1段階であるPVはいずれの加工処理においても増加するものの、全ての牛乳が2次酸化生成物であるヘキサナール含量の増加を伴わない事が明らかとなった。本試験でも多価不飽和脂肪酸が多い生乳は酸化への耐性が低い事が示唆された。

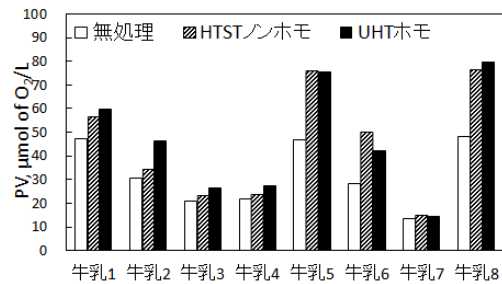


図1. 加工処理による過酸化脂質量の変化

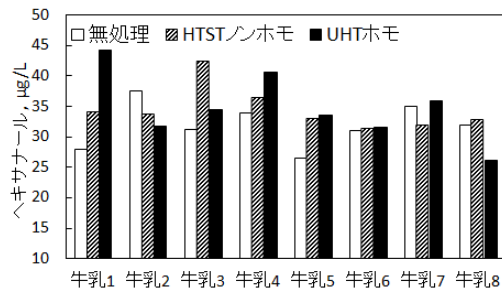


図2. 加工処理による生乳中ヘキサナール含量の変化

表6. 加工処理によるヘキサナール含量の違い毎の脂肪酸組成および抗酸化物質含量

脂肪酸組成, % of 総脂肪酸	ヘキサナール含量の変化		P
	変化なし N=4	増加 N=4	
C18:0	8.59 ± 0.67	9.44 ± 0.67	0.40
C18:1, c9	17.9 ± 3.0	13.1 ± 3.0	0.30
C18:1, t11	3.10 ± 0.71	3.54 ± 0.71	0.68
C18:2, c9,12	1.13 ± 0.23	1.24 ± 0.23	0.75
C18:2, c9,t11	0.76 ± 0.16	0.43 ± 0.16	0.18
C18:3, c9,12,15	0.43 ± 0.09	0.48 ± 0.09	0.69
≤ C16	22.5 ± 0.9	18.1 ± 0.9	0.02
C16	34.1 ± 1.6	33.5 ± 1.6	0.81
> C16	35.6 ± 1.7	38.9 ± 1.7	0.23
飽和脂肪酸	63.0 ± 2.3	56.5 ± 2.3	0.10
一価不飽和脂肪酸	27.8 ± 1.1	30.7 ± 1.1	0.10
多価不飽和脂肪酸	4.04 ± 0.62	5.82 ± 0.62	0.09
抗酸化物質含量, $\mu\text{g}/\text{dL}$			
$\alpha$ トコフェロール	137 ± 27	128 ± 27	0.81
$\beta$ カロテン	38.2 ± 9.1	39.6 ± 9.1	0.91

以上より、牛乳中脂質の酸化は多価不飽和脂肪酸の酸化により進行し、第1段階である過酸化脂質の生成を経て、第2段階であるアルデヒドが生成される事を確認した。脂質酸化臭は第2段階で生成されるアルデヒドが問題であるが、その生成過程は原料乳の成分組成

により影響を受け、比較的酸化の影響を受けやすい高度多価不飽和脂肪酸であるリノレン酸を多く含む生乳は冷蔵保存のかなり早い段階で酸化が完了するのに対して、リノール酸を多く含む生乳では長期保存時に徐々に増加する事が明らかとなった。長期輸送時に問題となる生乳は後者であり、そのような特徴を持つ生乳の長期冷蔵保存には注意を要するだろう。脂肪酸組成は飼養条件からある程度予測可能な成分であり、自給飼料が比較的多い北海道では地域毎に明確な特徴がみられる。今後は、北海道においても生乳の成分に着目した生乳の用途・流通を考慮する必要があるかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 三谷朋弘、佐藤悠二、上田宏一郎、高橋誠、中辻浩喜、近藤誠司、舎飼い飼養から放牧飼養への移行時期における牛乳成分の変動、北海道畜産学会報、査読有、53巻、2011、29-34

[学会発表] (計2件)

- ① 堀井美緒、三谷朋弘、近藤誠司、木村俊範、上田靖子、朝隈貞樹、乳牛の飼養法の違いが乳成分と乳中脂質の酸化に与える影響、農業機械学会、2011年9月28日、弘前大学
- ② 三谷朋弘、堀井美緒、小林国之、近藤誠司、矢島高二、北海道における酪農家バルク乳中の乳成分と過酸化脂質量との関係、日本畜産学会、2011年8月26日、北里大学

[図書] (計1件)

- ① 三谷朋弘、牛乳の脂肪酸組成-舎飼いと放牧での比較、農産漁村文化協会、最新農業技術 畜産 vol. 3、2010、231-239

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三谷 朋弘 (MITANI TOMOHIRO)

北海道大学・大学院農学研究院・特任助教

研究者番号：80451409