

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19780106
 研究課題名 (和文) 抗酸化性乳化剤の水系およびエマルション系における諸特性に関する研究
 研究課題名 (英文) Studies on the properties of antioxidative emulsifier in aqueous and emulsion systems
 研究代表者
 渡邊 義之 (WATANABE YOSHIYUKI)
 近畿大学・工学部・講師
 研究者番号：20368369

研究成果の概要 (和文)：水溶液中でのカテキンの安定性には、共存する抗酸化性乳化剤アシルアスコルビン酸によるミセル形成の影響が示唆された。また、クエン酸添加量が増加するにつれ、カテキンの安定性が改善された。O/W 型エマルション中では、アスコルビン酸分子の大部分がその高い親水性により水相に存在し、油水界面にて脂質酸化を抑制することが示された。一方、親油性の高いアシルアスコルビン酸は、油相内での酸化抑制に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Acyl ascorbates were synthesized by the condensation of ascorbic and fatty acids in acetone using an immobilized lipase from *Candida antarctica*. The dependency of the rate constant, k , for the degradation of catechin in aqueous solution with octanoyl ascorbate on the concentration of the ascorbate was obviously different from that with ascorbic acid. The stability of catechin was reduced by ascorbic acid or octanoyl ascorbate, although the k value for degradation decreased with increasing citric acid concentration. The oxidation process of methyl linoleate as an oil droplet in the O/W emulsion with ascorbic acid or acyl ascorbate was measured, and their antioxidative properties were examined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	330,000	2,930,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：抗酸化性乳化剤，アシルアスコルビン酸，固定化リパーゼ，カテキン，分解速度定数，O/W 型エマルション

1. 研究開始当初の背景

脂質は人の食生活に必要不可欠なばかり

でなく、化粧品・医薬品・化成品の原料として日常生活に欠くことのできない物質であ

る。しかし、脂質の主要な構成成分である長鎖不飽和脂肪酸は酸化安定性が低く、酸化脂質は生体に対して悪影響を及ぼし、様々な疾病を引き起こすため、脂質の酸化現象は品質管理の上で大きな問題になっている。特に、近年優れた生理活性が注目されているエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) を構成脂肪酸とする高度不飽和脂質類に対し、効果的な酸化防止策をいかに講ずることができるかが問題になっている。脂質の酸化を防止する一般的な方法として、抗酸化剤の添加がある。

本研究では、各種高度不飽和脂肪酸 (PUFA) にビタミン C (L-アスコルビン酸) 等の水溶性抗酸化剤を結合 (縮合反応) させることにより、その縮合生成物に含まれる PUFA 部位の酸化安定性を向上させることを目的の一つとしている。脂肪酸と水溶性抗酸化剤との縮合は、酵素 (リパーゼ) の触媒作用を利用し、簡便かつ効率的に実施する。これにより得られた生成物は、親油性基と親水性基を併せ持つ可食性界面活性剤となり得る。そして、アスコルビン酸の抗酸化性の発現に寄与する分子内のエンジオールラクトン共鳴構造がそのまま保持されるため、食用油脂等の脂質を豊富に含む食品に対し酸化防止剤として利用することが可能となる。また、生体内にて生理活性を発現する各種 PUFA を乳化剤の構成化学基として食品中に導入することができるという利点を有する。さらに、親水性物質は概して体内に吸収されにくい性質を有するが、アシル化によりその体内吸収性が向上する効果も期待される。

リパーゼを用いたアシルアスコルビン酸の合成は各国の様々な研究者により行われているが、その多価不飽和アシル基 (EPA や DHA 等) の縮合生成物の脂肪酸部位) の酸化安定性を示したのは研究代表者らが最初である。また、固定化リパーゼを充填したバイオリアクターによる連続生産についても、世界に先駆けて成果を上げ、高い生産性を示すことができている。さらに、脂質の保存安定性の向上や取り扱い性の向上を目的として考案された液状脂質の粉末化技術へアシルアスコルビン酸を適用し、その具体的かつ独創的な利用法の提案を行うとともに、抗酸化性乳化剤としての性質の解明に努めている。

2. 研究の目的

これまでの研究で研究代表者らは、固定化リパーゼを用いてアスコルビン酸と EPA や DHA といった各種 PUFA を縮合させて

種々のアシルアスコルビン酸を合成し、その PUFA 部位の酸化安定性、バルク系脂質に添加した場合の抗酸化効果、およびその界面科学的特性等について検討してきた。しかし、一般に食品は様々な成分から構成される複雑な状態にあり、それらの中でアシルアスコルビン酸のような抗酸化性乳化剤がどのような挙動を示すのかを理解する上で、解明を要する課題が多く存在する。特に、乳化剤としての利用を意識した場合、その水溶液中やエマルション系での作用を無視することはできない。

そこで、本研究では以下の項目に着目し、抗酸化性乳化剤 (主としてアシルアスコルビン酸) の水系およびエマルション系での諸特性に関する基礎的知見を蓄積し、系内にて生起する現象の解明を目的とする。

(1) 抗酸化性乳化剤の水溶液中での抗酸化性と界面科学的特性との関係

緑茶の渋味成分であり、酸化分解による変色・劣化が問題視されているカテキンに着目し、水溶液中でのその安定性に及ぼす抗酸化性乳化剤の影響について検討する。カテキン濃度、保存温度、pH および抗酸化性乳化剤添加量等の種々の異なる環境下における (+) カテキンの安定性を速度論的に評価する。そして、水溶性抗酸化剤とミセル形成が生じ得る抗酸化性乳化剤との作用の相違を見出す。

(2) 他の水溶性食品成分が共存した場合の水系での抗酸化性乳化剤の挙動

一般的に食品は多成分で構成されていることを考慮して、水溶性有機酸やアミノ酸等が共存した多成分系でのカテキンの安定性に及ぼす抗酸化性乳化剤の影響について検討する。

(3) O/W型エマルション系での抗酸化性乳化剤の外水相および内油相成分への影響

抗酸化性乳化剤を用いて O/W 型エマルションを調製した場合の外水相成分 (カテキン) や内油相成分 (不飽和脂質) の安定性に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) 抗酸化性乳化剤の酵素合成と精製

7.5mmol のアスコルビン酸、22.5mmol の飽和脂肪酸、0.5g の *Candida antarctica* 由来の固定化リパーゼおよび 150mL のアセトンまたはアセトニトリルを茶褐色バイアル瓶に入れ、60°C の恒温水槽に浸漬し、24 時間激しく振盪させた。反応期間中にアスコルビン酸が酸化分解することを防ぐために、ヘッドスペースに窒素を封入した後、反応を開始

した。反応終了後、ろ過により固定化リパーゼを除き、減圧濃縮した。これにヘキサンを加えて未反応の脂肪酸洗い流し、不溶物を2-ブタノン/水系での液液分配に用いてアシルアスコルビン酸を分取した。アシルアルブチンについても同様な操作にて合成および精製した。示差屈折計および ODS カラムを用いた HPLC にて抗酸化性乳化剤の純度を確認した。

(2) 水系でのカテキン安定性の測定

所定量のカテキン、オクタノイルアスコルビン酸を様々な pH に調整した 5mL のリン酸緩衝液に溶解させ、茶褐色バイアル瓶に加えて 60°C の恒温水槽に浸漬し振盪させた。有機酸の共存効果を検証する際には、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、ソルビン酸、アミノ酸または抗酸化性ペプチドを添加した。所定の間隔でカテキン溶液を採取し、HPLC にてカテキンの定量分析を行った。分析カラムは ODS カラム、溶離液はメタノール/水/リン酸 = 20/80/0.5 (v/v/v)、流量は 1.0mL/min、検出器は波長 280nm の紫外可視分光光度計を用いた。

(3) O/W 型エマルジョンの調製

1.0%(w/v)のデカグリセリンモノラウリン酸エステル ML-750 水溶液 5mL にリノール酸メチル 5mL を加え、氷冷しながらロータステータ式ホモジナイザを用いて予備乳化した (10,000 rpm, 5 分間)。この粗エマルジョンを孔径 0.8 μ m の親水性セルロースアセテート膜に供して膜乳化を実施し、O/W 型エマルジョンを得た。なお、水溶性酸化促進剤として 2,2'-アゾビス (2-メチルプロピオンアミジン) 二塩酸塩 (AAPH) を使用する場合は ML-750 水溶液に、油溶性酸素促進剤として 2,2'-アゾビス (2,4-ジメチルバレロニトリル) (AMVN) を利用する際にはリノール酸メチルに、それぞれ 1.0 % (w/v) となるように添加した。抗酸化剤を添加する場合、1, 10 または 100 μ mol/L のアスコルビン酸、オクタノイル、ラウロイルまたはパルミトイルアスコルビン酸を添加した。得られた O/W 型エマルジョンは、暗所中 40°C にて 200 rpm で攪拌しながら保存した。経時的に採取した O/W 型エマルジョンを用いて、遠心沈降式粒度分布測定装置にて油滴粒子径の測定し乳化安定性を確認した。

(4) O/W 型エマルジョン系での外水相および内油相成分の安定性 経時的に O/W 型エマルジョン液 100 μ L を

採取し、これにクロロホルム/メタノール溶液 (2/1(v/v)) を 300 μ L 加え、よく混ぜた。15,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、油相を 50 μ L 取り出し、溶媒を蒸散させた。その後、ヘキサン/ミリスチン酸メチル混合液 (100/2 (v/v)) を 300 μ L 添加して GC 分析用試料とした。GC 分析には、水素炎イオン化検出器およびキャピラリーカラム (0.32 ϕ mm \times 15m, 0.2 μ m ポリエチレングリコール) を用いた。キャリアガスには窒素を用い、流量 1.8mL/min にて測定した。カラム温度は 180°C とし、インジェクタおよびディテクタ温度はいずれも 200°C であった。なお、ミリスチン酸メチルを内部標準物質として利用した。

4. 研究成果

(1) 抗酸化性乳化剤の水溶液中での抗酸化性とその界面科学的特性との関係

温度および pH が高いほどカテキンの酸化分解が速く進んだ。オクタノイルアスコルビン酸濃度が 0.01mmol/L 以下の場合、オクタノイルアスコルビン酸はカテキンの酸化分解を抑制する作用を示したが、0.1mmol/L 以上ではその酸化分解を促進した。得られた結果に一次反応速度式を適用してカテキンの分解速度定数 k を決定し、 k 値のオクタノイルアスコルビン酸またはアスコルビン酸濃度依存性について検討した。オクタノイルアスコルビン酸を添加した場合、オクタノイルアスコルビン酸濃度が高くなるにつれ k 値が急激に増大する傾向が認められた。一方、界面活性を有しないアスコルビン酸添加の場合には k 値はアスコルビン酸濃度に依存せず、ほぼ一定の値を示した。このためオクタノイルアスコルビン酸の界面活性に起因する特有の作用が生じていることが示唆された。したがって、オクタノイルアスコルビン酸のミセル形成により、水溶液中のカテキンがミセル相に分配している可能性を検討した。オクタン酸メチルをミセル相と想定し、水-オクタン酸メチル系におけるカテキンの分配係数 P を測定した。カテキン濃度が高いほどミセル相への分配が高くなる傾向を示したが、カテキンの安定性測定において使用したカテキン濃度は 1.0mmol/L であったため、 P 値は約 0.04 となり、ミセル相への分配の影響は小さいことが明らかとなった。

(2) 他の水溶性食品成分が共存した場合の水系での抗酸化性乳化剤の挙動 オクタノイルアスコルビン酸またはアス

コルビン酸のような抗酸化物質とクエン酸を添加した系では、それらの濃度が低い領域（混合物濃度 10 μ mol/L）での k 値はオクタノイルアスコルビン酸添加時よりアスコルビン酸を添加した場合の方が高かった。 k 値はクエン酸濃度及び pH に依存しなかった。高濃度領域（1~10mmol/L）での k 値はアスコルビン酸添加時よりオクタノイルアスコルビン酸を添加した場合の方が高くなった。 k 値はクエン酸濃度に依存し、クエン酸濃度が高いほど k 値は低くなる傾向が示された。つまり、pH が低いほど k 値は低くなった。カテキン水溶液の安定性に及ぼすオクタノイルアスコルビン酸またはアスコルビン酸とリンゴ酸、乳酸およびソルビン酸などの各種有機酸またはアミノ酸や抗酸化性ペプチド (β -アラニルヒスチジン) の添加量比による顕著な影響は認められなかった。また、多糖を含んだカテキン水溶液の粘性と安定性の間には顕著な傾向が認められなかった。共存する有機酸によってオクタノイルアスコルビン酸の抗酸化挙動の pH 依存性がアスコルビン酸の場合と異なることが明らかとなった。したがって、物質間の相互作用の相違がカテキンの安定性の違いに寄与したものと考えられる。

(3) O/W型エマルジョン系での抗酸化性乳化剤の外水相および内油相成分への影響

カテキンと抗酸化性乳化剤アシルアスコルビン酸（アシル鎖長8または16）を用いて、ラウリン酸メチルを油相としたO/W型エマルジョンを調製し、40 $^{\circ}$ Cでのカテキンの安定性について検討した。Weibull式を適用してカテキンの分解速度定数 k を算出した結果、1~100 μ mol/Lのアシルアスコルビン酸濃度では k 値に大きな差異が認められなかった。一方、1.25mmol/L以上では濃度が高くなるほど k 値が高くなりカテキン安定性が低下する傾向が認められ、水系に似た挙動が確認された。この傾向はアスコルビン酸添加系においても観察されたため、アスコルビン酸の高濃度領域でのカテキン分解促進能が水系よりも高いことが示された。

リノール酸メチルを油相とし、アシルアスコルビン酸（アシル鎖長8、12または16）を用いて調製したO/W型エマルジョン中の油相の酸化安定性を測定した。AAPHまたはAMVNを利用して速度論的解析を実施した結果、アスコルビン酸は油水界面からの酸化に対して、アシルアスコルビン酸は油相内部での酸化に対して抑制効果を示したため、ア

スコルビン酸は水相に、アシルアスコルビン酸は油水界面および油相内に主に局在化していることが示唆された。概ね同様な傾向がアシルアルブチンを用いたエマルジョン系においても観察された。

これまでの知見を含めて考察すると、O/W型エマルジョン系でのアシルアスコルビン酸の水相中カテキンへの抗酸化挙動は水系と似ているものの、局在化の観点から水系でのミセル形成の可能性が強くなったといえよう。

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3件）

- ① Yoshiyuki Watanabe, Kana Idenoue, Mizuka Nagai, Shuji Adachi, Stability of catechin in aqueous solution with coexistent ascorbic acid or octanoyl ascorbate and organic acid, Food Science and Technology Research, 査読有, 2010, 16(2), in press.
- ② Yoshiyuki Watanabe, Tatsunori Okayasu, Kana Idenoue, Shuji Adachi, Degradation kinetics of catechin in aqueous solution in the presence of ascorbic acid or octanoyl ascorbate, Japan Journal of Food Engineering, 査読有, 2009, 10(2), 117-124.
- ③ Mizuka Nagai, Yoshiyuki Watanabe, Masato Nomura, Synthesis of acyl arbutin by an immobilized lipase and its suppressive ability against lipid oxidation in a bulk system and O/W emulsion, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 査読有, 2009, 73(11), 2501-2505.

〔学会発表〕（計1件）

- ① 後藤夏希, 大塚恭輔, 木村亮, 渡邊義之, 安達修二, O/W型エマルジョン系での親油性および親水性酸化促進剤による脂質酸化へのアシルアスコルビン酸の作用特性, 第9回日本食品工学会年次大会, 2008年8月5日, 東京海洋大学

〔図書〕（計1件）

- ① Yoshiyuki Watanabe, Shuji Adachi, Nova Science Publishers Inc., Biochemical Engineering, 2009, 41-74.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 義之 (WATANABE YOSHIYUKI)

近畿大学・工学部・講師

研究者番号：20368369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし