総 説

水分散系における高度不飽和脂肪酸の酸化安定性

宮 下 和 夫*

Oxidative Stability of Polyunsaturated Fatty
Acids in an Aqueous Dispersion

Kazuo MIYASHITA

* Department of Chemistry, Faculty of Fisheries,
Hokkaido University, Hakodate 041

1. はじめに

高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の酸化は、生成物が食品の風味劣化の主因となる他、これらが体内に吸収されると毒性をも示し、また PUFA が生体内で過酸化されるとその生理作用は失われ、場合によっては、各種疾病の原因ともなることから、様々な角度より数多くの研究がなされてきた^{1)~4)}。

一般に、各 PUFA の酸化安定性は、分子中の二重結合数 (不飽和度) に反比例するため、不飽和度が特に高い DHA や EPA は空气中では非常に酸化されやすい⁵⁾。しかし、水溶液中に PUFA を分散させた場合には、その酸化安定性は空气中にそれらを放置した場合とはまったく逆に、不飽和度の高いものほど安定となることが見出された^{6)~10)} (図 1)。こうした現象は、DHA や EPA を含む食品の酸化安定性向上を図る上で、さらにはそれらの生体内過酸化を考える上で有用と思われる¹¹⁾。また、最近の研究により、水分散系での不飽和脂質の酸化安定性は、共存する乳化剤や分散方法によっても大きく影響されることがわかった。この結果は、水を媒体とする多成分系においては、適当な条件を設定することにより、各高度不飽和脂質の酸化安定性を、特異的に向上できることを示すものである。本稿では、水分散系での高度不飽和脂質の酸化安定性の特徴について述べる。

2. 水分散系においてはなぜ不飽和度の高い PUFA ほど安定なのか？

空气中と水溶液中の各 PUFA の酸化安定性が、まったく逆になることを初めて見出したのは、基質として遊離脂肪酸を用いた時であった⁶⁾。その後、モノグリセリド、トリグリセリド、リン脂質を用いた場合にも同様

図 1 空气中及び水分散系における各 PUFA の酸化安定性

* 北海道大学水産学部 (〒041 函館市港町 3-1-1)

の結果となることが確かめられた⁸⁾⁹⁾。しかし、水分散系と空気中とで各 PUFA の酸化安定性が異なる理由については、いまだ不明な点も多い。そこで以下に、水分散系での PUFA の酸化の特徴について述べ、なぜ、こうした系では DHA が最も酸化されにくいのか考察してみた。

1) 水分散系でのリノール酸エチルと α -リノレン酸エチルの酸化生成物の分析

水分散系での PUFA の酸化安定性が空気中と異なる理由としては、以下のことがまず考えられた⁸⁾¹¹⁾。すなわち、水溶液中では、不飽和度の高い PUFA ほど、複数の二重結合同士の相互作用によって、二重結合を外にさらさないようなコンパクトな構造をとり¹²⁾¹³⁾、そのために、ラジカルや酸素の攻撃対象となりにくいというものである。もしそのような特異的な立体構造をとっているならば、その影響は酸化生成物の構造にも反映されると推測できる。つまり、特定の位置の二重結合がラジカルの攻撃から防御されているなら、ラジカルはそれ以外の二重結合に挟まれた活性メチレンを集中的に攻撃することになり、生ずる過氧化物（ヒドロペルオキシド）は、ある種の異性体を極端に多く含むことが予想される。しかし、リノール酸エチルと α -リノレン酸エチルを乳化剤を用いて水溶液中に均一に分散させ、鉄（II）-アスコルビン酸の存在下で酸化後、生成したヒドロペルオキシドの異性体組成を分析したところ、空気中での自動酸化から得られたヒドロペルオキシドの異性体組成¹⁴⁾¹⁵⁾と大きな違いは認められなかった¹⁶⁾。酸化実験中に、ヒドロペルオキシドの異性化¹⁷⁾が起こったことも考えられ、また、DHA ヒドロペルオキシドの場合には、偏った異性体組成になることも予想できるが、現段階では、水分散系で、PUFA 分子中の特定の二重結合がマスクされていることを示すデータは得られていない。

山本らは¹⁸⁾、EPA エチルとリノール酸エチルの水分散系での酸化安定性について検討し、EPA エチルのような不飽和度の高い PUFA は、水溶液中で分子内酸化を優先的に起こす傾向にあり、それによって生じた極性

の高い環状酸化物（エピジオキシド）は、水と脂質との界面付近に移動するため酸化が進みにくいことを報告した。しかし、もし分子内酸化が優先的に起きているならば、エピジオキシドなどの環状酸化物が多量に生成しているものと考えられるが、 α -リノレン酸エチルの水溶液中での酸化生成物について検討したところ（表 1）、エピジオキシドの生成量は、空気中での酸化¹⁹⁾に比べて、少ない傾向にあった。

2) 水分散系とクロロホルム中での酸化安定性の比較

リノール酸、 α -リノレン酸、及び DHA のエチルエステルを、Tween を用いて水溶液中に分散させ、脂溶性の酸化開始剤である AMVN の存在下で酸化させたところ、酸化による基質減少速度から明らかのように、その酸化安定性は、空気中とはまったく逆に、DHA、 α -リノレン、リノールの順に安定となった（図 2 の上段）。しかし、これらをクロロホルム中に溶かした場合には、その酸化安定性は空気中と同様に、不飽和度の低いものから順に安定となった（図 2 の下段）¹⁶⁾。水溶液中で、各エチルエステルは、乳化剤とミセルを形成して分散しているが、クロロホルム中では、各エチルエステルが単体として存在していると考えられる。したがって、ミセルの様な分子集合体として分散していることが、水系での不飽和脂質の特徴的な酸化挙動に大きく関与しているものと思われた。

3) 乳化剤の役割

脂質を水中に分散させるには、通常乳化剤を用いるが、この場合脂質は、乳化剤とミセルのような複合体を形成して分散している。不飽和度が高いにもかかわらず、DHA が水溶液中で他の PUFA よりも酸化されにくかったのは、形成される複合体が、他の PUFA と乳化剤とで作られるものより酸化されにくい構造をとっていたと考えられる。すなわち、DHA の水分散系での特徴的な酸化安定性の高さには、乳化剤の影響が大きいことが予想される。

乳化剤の影響を検討する場合、乳化剤を加えずに脂質を分散させた系との比較が必要となってくる。そこで、

表 1 α -リノレン酸の酸化で生ずるエピジオキシドとモノヒドロペルオキシドの生成比

	水分散系（酸化程度）		空気中（酸化程度）	
	酸化時間（h）		過酸化物質価（meq/kg）	
	12	16	904	1 286
エピジオキシド/モノヒドロペルオキシド	0.45	0.35	1.09	0.92

図 2 水分散系 (A) とクロロホルム中 (B) での各エチルエステルの酸化安定性

●, ○, DHA; ■, □, α-リノレン酸; ▲, △, リノール酸

各エチルエステル (1.0 mM) を AMVN (1.0 mM) の存在下, 37°C, 暗所にて酸化させた。酸化安定性は, 酸化に伴う基質の減少量で比較した。

乳化剤がなくとも水に可溶性脂肪酸ナトリウム塩を基質に選り, 乳化剤 (Tween) を添加した場合と, しない場合におけるそれぞれの酸化安定性について検討した²⁰⁾。

図 3 は, リノール酸ナトリウム塩と DHA ナトリウム塩の水分散系での酸化における Tween の効果を示したものである。リノール酸では, Tween を添加してもその酸化安定性に大きな変化は見られなかったが, DHA の酸化安定性は Tween を加えることにより飛躍的に向上し, 酸化に伴う基質の減少 (図 3 の上段; —○—) 及び過酸化物の生成²¹⁾ (図 3 の下段; —○—) はほとんどみられなかった。また, リノール酸と DHA の酸化安定性をそれぞれの条件下で比較してみると, Tween の存在及び非存在いずれの場合でも, DHA の方が酸化されに

図 3 脂肪酸ナトリウム塩の酸化に及ぼす Tween の効果

(A), 酸化に伴う基質の減少速度; (B), 過酸化物の生成量

○, DHA (Tween 添加); ●, DHA (無添加); △, リノール酸 (Tween 添加); ▲, リノール酸 (無添加)

各脂肪酸ナトリウム塩 (1.0 mM) を, Tween 20 (0.5%, w/v) の存在及び非存在下, Fe (II) (1.0 μM) -アスコルビン酸 (20.0 μM) を触媒として, 37°C, 暗所にて酸化させた。

くかった。しかし, Tween を添加した場合には DHA のみが安定化されるのに対して, リノール酸では, Tween の添加により安定性が若干低下したので, この場合の両者の酸化安定性の違いは図 3 のように極めて大きくなった。

図 4 は, リノール酸ナトリウム塩と DHA ナトリウム塩の酸化に及ぼす Tween の濃度の影響を示したものである。リノール酸の場合, Tween の濃度を上げて酸化安定性はあまり変わらなかったが, DHA の場合, Tween の濃度を上げると酸化安定性はかなり向上した。

図 4 脂肪酸ナトリウム塩の酸化安定性に対する Tween 濃度の影響

(A), リノール酸 (酸化開始 12 時間後); (B), DHA (酸化開始 40 時間後)

したがって、DHA の水分散系での酸化安定性の維持において、乳化剤の果たす役割の極めて大きなことが容易に推測できた。これまで報告されている水分散系での DHA の特徴的な酸化安定性は、いずれも Tween, Triton, 及びタンパク質といった、乳化作用のある物質を添加した場合に見い出されたものであり、乳化剤と DHA の形成する複合体が、酸化に対して特異的に安定な構造をとるものと考えられた。そこで、これを説明するために、DHA ナトリウム塩、リノール酸ナトリウム塩、及びこれらに Tween を添加した場合のプロトン NMR スペクトルを測定し、酸化反応に直接関与している二重結合、あるいは活性メチレンのシグナルに何らかの変化が起こっていないか調べた。その結果、リノール酸は Tween を加えても、ケミカルシフトの位置、あるいはシグナルの大きさに変化はなかったが、DHA では、Tween を加えることにより、メチル基末端と二重結合

に挟まれているプロトンのシグナルの形状に変化が見られ、このプロトンが Tween と何らかの相互作用を起こしているのではないかと考えられた。

4) ホスファチジルコリン (PC) の酸化に及ぼすタンパク質の作用

PC は脂肪酸のナトリウム塩と同様に、乳化剤がなくても水溶液中への均一な分散が可能である。図 5 は、1-palmitoyl (PA)-2-linoleoyl (LA)-PC と 1-PA-2-DHA-PC の酸化安定性を比較したものである¹⁰⁾。両者ともアルブミンの添加によりその酸化安定性が向上したが、その効果は、LA-PC よりも DHA-PC に対しての方が大で、アルブミンを添加することにより、DHA-PC は LA-PC よりもその酸化安定性が高くなった。

アルブミンはそれ自体、抗酸化作用のあることが知られており^{22)~24)}、いずれの PC もその添加により酸化安定性が向上したが、図 5 に示されたように、その効果は DHA 含有 PC でより顕著に見られた。こうした結果は、アルブミンが、そのタンパク質として有する一般的な抗酸化作用の他に、DHA 含有 PC に特異的な抗酸化効力を持つことを示している。3) で述べたように、アルブミンと DHA-PC とで形成される複合体が、他の PC とアルブミンとで作られるものに比べ、酸化に対してより安

図 5 リノール酸 (LA) 及び DHA 含有 PC の酸化に及ぼすアルブミン (0.2%, w/v) の効果

▲, 1-PA-2-LA-PC (無添加); △, 1-PA-2-LA-PC (アルブミン添加); ●, 1-PA-2-DHA-PC (無添加); ○, 1-PA-2-DHA-PC (アルブミン添加)

PC (0.25 mM) を Fe (II) (1.0 μ M) 及びアスコルビン酸 (20.0 μ M) の存在下、37°C、暗所にて酸化。

定なことがその理由とも思われた。また、タンパク質の種類によっても、各 PC の酸化安定性に及ぼす効果は異なっており、例えば大豆 PC は大豆タンパク質を用いた時に最も安定となった。PC と食品中のタンパク質との相互作用については多くの研究があるが、PC の酸化安定性との関係で論じたものではなく、今後の研究課題と考える。

3. トリグリセリド (TG) の酸化安定性

TG は食品に含まれる脂質の主要形態であり、その水

分散系での酸化安定性の正確な把握は、食品の加工あるいは保存上重要である。以下に、マグロ眼窩油 TG (マグロ TG) と大豆油 TG (大豆 TG) について、そのエマルジョン中での酸化安定性の特徴について述べる。

1) マグロ TG と大豆 TG の酸化安定性

活性炭—セライトカラム及びケイ酸カラムを用い、トコフェロール並びに過酸化物のまったく含まれていないマグロ TG と大豆 TG を調製した。マグロ TG の主要 PUFA は DHA であり、一方、大豆 TG ではリノール酸が主な PUFA であったため、空気中では、マグロ TG の

図 6 空気中及び水分散系における大豆 TG とマグロ TG の酸化安定性

(A), 空気中での過酸化物の生成; (B), 空気中での PUFA の減少; (C), 水分散系での過酸化物の生成; (D), 水分散系での PUFA の減少

●, マグロ TG; ▲, 大豆 TG

空気中での酸化: TG (2 g) を, 37°C, 暗所にてインキュベート。水分散系での酸化: 図 7 の Method-2 の方法で調製した TG (2.5 mg/10 ml) を, 37°C, 暗所にてインキュベート。

酸化安定性は、過酸化物の生成量（空気中での酸化の場合には過酸化物価を測定、水分散系での酸化の場合にはロダン鉄法²¹⁾により測定）と、酸化に伴う総 PUFA の減少量より比較検討。

図 7 水溶液中への TG の分散方法

方が酸化されやすかったが、水分散系では逆にマグロ TG の方が安定となった (図 6)。水溶液中への分散方法は、図 7 の Method-2 に従ったが、この方法で分散させることにより、マグロ TG は酸化開始 70 日後も TG 中の PUFA の減少はほとんどみられず、また、過酸化物の生成も観察されなかった²⁵⁾

2) 分散方法の影響

マグロ TG と大豆 TG を図 7 に示した 4 種類の方法で水溶液中に分散させ、その酸化安定性を比較したところ、両 TG 共に、分散方法によりその酸化安定性も大きく変わることがわかった (図 8)。ただし、その傾向は両 TG で異なっていた。水溶液中に分散している TG と乳化剤の複合体形成や、その粒子径などは、分散方法により変化するものと思われ、このことが、両 TG の酸化安定性に違いが見られた要因と考えられた。Method-1 はいわゆるホモ乳化法であり²⁶⁾、ゲル乳化法で調製した他の分散方法よりその粒子径は 100 倍程大きく、濁度測定からも分散粒子の大きさがかなり違うことが明らかであった。したがって、Method-1 と他の分散方法で見られた酸化安定性の違いは、こうした粒子径の相違に影響されていると考えられた。しかし、他の調製法においては粒子径の大きな違いは観察されず、また、すべての方法において溶存酸素濃度などにも違いは見られず、粒子径だけでなく、TG と乳化剤との複合体の形態なども酸化安定性に大きく影響しているものと予想された。

水分散系での TG の酸化安定性は、乳化剤の種類によっても影響を受け、例えば Tween と Triton を比べた場合、両 TG 共に Triton で分散させた方が安定となり、特にマグロ TG においてその傾向が顕著に見られた。Triton は Tween に比べ乳化能力に優れ、また、形成されるミセルサイズも大きい²⁷⁾。さらに Triton の分子構造は直鎖状であり、分子におれ曲がりのある

図 8 大豆 TG (A) とマグロ TG (B) の酸化に及ぼす分散方法の影響

○, Method 1; ●, Method 2; ▲, Method 3; ■, Method 4

Tween に比べ、形成されるミセルがより密になっている。このようなそれぞれの乳化剤によって形成されるミセルの形態の違いが、TG の酸化安定性に影響を及ぼしているものと考えられた。

また、TG の酸化安定性は、TG 濃度や乳化剤濃度によっても変動し、特に大豆 TG がそれらの影響を強く受け、適当な TG 濃度と乳化剤濃度を選択することにより、マグロ TG と同様の酸化安定性を得ることができた。

4. おわりに

水分散系での脂質の酸化については、これまでも多くの研究がなされてきたが、それらはあくまでも、空気中での脂質酸化の延長線上としてとらえられていた。しかし本稿で述べたように、水分散系での高度不飽和脂質の酸化安定性は、空気中のそれとはまったく異なってお

り、このことは水分散系での脂質酸化を考察する場合に、ラジカル連鎖反応論以外の要素も加味する必要性を物語っている。

水分散系での各高度不飽和脂質の独特な酸化挙動には、不飽和脂質と乳化剤とで形成される複合体の性状が深く関わっているものと思われる。この複合体の酸化に関する感受性は、複合体を構成する脂質、乳化剤、その形成方法などによって変化し、必ずしも脂質の不飽和度のみ依存するものではない。このようなモデル系は、食品や生体といった多成分系での脂質の酸化を考察する上で重要であり、今後さらに検討すべき問題と考える。

文 献

- 1) 金田尚志：油化学，**31**, 903 (1982).
- 2) FRANKEL, E.N.: *Chem. Phys. Lipids*, **44**, 73 (1987).
- 3) 古倉 聡・吉川敏一・近藤元治：治療学，**26**, 568 (1992).
- 4) RICE-EVANS, C. and BURDON, R.: *Prog. Lipid Res.*, **32**, 71 (1993).
- 5) CHO, S.-Y., MIYASHITA, K., MIYAZAWA, T., FUJIMOTO, K. and KANEDA, T.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 876 (1987).
- 6) MIYASHITA, K., NARA, E. and OTA, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1638 (1993).
- 7) MIYASHITA, K., TATEDA, N. and OTA, T.: *Fisheries Sci.*, **60**, 315 (1994).
- 8) MIYASHITA, K., NARA, E. and OTA, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1772 (1994).
- 9) MIYASHITA, K., HIRAO, M., NARA, E. and OTA, T.: *Fisheries Sci.*, **61**, 273 (1995).
- 10) NARA, E., MIYASHITA, K. and OTA, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2319 (1995).
- 11) 宮下和夫：食品加工技術，**14**, 228 (1994).
- 12) APPLGATE, K.R. and GLOMSET, J.A.: *J. Lipid Res.*, **27**, 658 (1986).
- 13) KATO, T., HIRUKAWA, T. and NAMIKI, K.: *Tetrahedron Lett.*, **33**, 1475 (1992).
- 14) CHAN, H.W.-S. and LEVETT, G.: *Lipids*, **12**, 99 (1977).
- 15) CHAN, H.W.-S. and LEVETT, G.: *Lipids*, **12**, 837 (1977).
- 16) HIRANO, S., MIYASHITA, K., OTA, T., MARUYAMA, K. and NAKAYAMA, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, (投稿中).
- 17) CHAN, H.W.-S., LEVETT, G. and MATTHEW, J.A.: *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 245 (1979).
- 18) 矢津一正・請川孝治・山本順寛・二木鋭雄：第33回油化学討論会・研究発表会講演要旨，p. 91 (1994).
- 19) NEFF, W.E., FRANKEL, E.N. and WEISLEDER, D.: *Lipids*, **16**, 439 (1981).
- 20) 犬飼信子・宮下和夫・太田 享：日本農芸化学会1996年度大会講演要旨，p. 193 (1996).
- 21) 満田久輝・安本教博・岩見公和：栄養と食糧，**19**, 210 (1996).
- 22) YAMAMOTO, Y., SOGO, N., IWAO, R. and MIYAMOTO, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3099 (1990).
- 23) LIN C.-C., FUJIMOTO, K. and HWANG, L.S.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **40**, 602 (1993).
- 24) DASA-PETRETSKI, M., RIBEIRO, J.M.C., ATILLA, G.C., MASUDA, H. and OLIVEIRA, P.L.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 10893 (1995).
- 25) 平尾美奈子・宮下和夫・太田 享・西川正純・中山 秀：日本農芸化学会1995年度大会講演要旨，p. 327 (1996).
- 26) FUJII, N., HAMANO, M. and YUASA, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 667 (1995).
- 27) 笠毛邦弘：化学と生物，**32**, 797 (1994).

(平成8年5月23日受理)