

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

乳化系における多価不飽和脂肪酸の酸化特性に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2016-12-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 荒井, 雄太 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1353

修士学位論文

乳化系における多価不飽和脂肪酸の
酸化特性に関する研究

平成 26 年度

(2015 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

食機能保全科学専攻

荒井 雄太

目次

序論	-3-
第1章 FAの精製と目的TAG、MAG、SFE合成	-6-
1.1 試料の純度確認と精製	-7-
1.2 AAA型TAGの大量合成	-10-
1.3 PUFAが結合したMAGの大量合成	-11-
1.4 PUFAが結合したSFEの大量合成	-13-
第2章 複数のTAGを用いた酸化安定性	-20-
2.1 DDDとEEEを混合させたときの酸化安定性	-21-
2.2 2種類のAAA型TAGを混合し酸化させ、48 h後にDDDあるいはEEE を添加した時の酸化安定性	-24-
第3章 PUFAを含む乳化剤を使用した酸化安定性	-29-
3.1 PUFA-MAGの酸化安定性	-30-
3.2 LLLを酸化させ48 h後にPUFA-MAGを添加した時の酸化安定性	-32-
3.3 PUFA-MAGを乳化剤として使用した時の酸化安定性	-34-
3.4 脂溶性の酸化開始剤を用いた時の酸化安定性	-36-
3.5 自動酸化試験	-38-
3.6 高濃度における酸化安定性	-40-
3.7 2種類のAAA型TAGを混合させたときの酸化安定性	-42-
3.8 乳化剤としてSFEを用いた時の酸化安定性	-44-
総括	-55-
謝辞	-57-
参考文献	-58-

文中の略語記号

略称	正式名称	読み方
AAPH	2,2-Azobis(2-midinopropane)dihydrochloride	2,2-アゾビス-2-アミジノプロパン二塩酸塩
AIBN	Azobisisobutyronitrile	アゾビスイソブチロニトリル
BHT	Dibutylhydroxytoluene	ジブチルヒドロキシトルエン
CDCl ₃	Chloroform-D	重水素化クロロホルム
DMAP	4-Dimethyl amino pyridine	4-ジメチルアミノピリジン
DMF	N,N-dimethylformamide	N,N-ジメチルホルムアミド
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide	1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド
FA	Fatty acid	脂肪酸
GC-FID	Gas chromatography-flame ionized detector	ガスクロマトグラフィー - 水素炎イオン化検出器
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance	親水性疎水性バランス
<i>i</i> -Pr ₂ EtN	2-(Diisopropylamino)ethanol	N,N-ジイソプロピルエタノールアミン
IPE	Isopropyl ether	イソプロピルエーテル
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁気共鳴
MAG	Monoacylglycerol	モノアシルグリセロール
ME	Methyl ester	メチルエステル
O/W	Oil in Water	オイル イン ウォーター
PV	Peroxide value	過酸化価
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	多価不飽和脂肪酸
SFE	Sucrose fatty acid ester	ショ糖脂肪酸エステル
TAG	Triacylglycerol	トリアシルグリセロール
TLC	Thin layer chromatography	薄層クロマトグラフィー
UV	Ultra violet detector	紫外吸収検出器

脂肪酸の略号

P	Palmitic acid	パルミチン酸 (C16:0)
L, LA	Linoleic acid	リノール酸 (C18:2 n-6)
Ln	α -Linolenic acid	α -リノレン酸 (C18:3 n-3)
E	Eicosapentaenoic acid	エイコタペンタエン酸 (C20:5 n-3)
D	Docosaehaenoic acid	ドコサヘキサエン酸 (C22:6 n-3)

序論

脂質はタンパク質、炭水化物とともに重要な三大栄養素の一つであり、食用から工業用途に至るまで、私たちの生活に密接な関わりをもつ重要な資源となっている¹⁾。リン脂質やコレステロールは細胞膜を構成する基本成分であり、トリアシルグリセロール(TAG)を中心とする脂質は約 9 kcal/g のエネルギーをもつ栄養素である。また脂質は食品の味に多様性をもたせることが可能となり、脂質から二次的に生成するにおい成分が食品の品質に関与する。さらに脂質は、生体調節因子と深く関係し、生体の恒常性維持に必要不可欠である。

しかし脂質は、酸化を主体とした種々の反応が進行し、外観上、実用上および栄養上に種々の変化が見られる。食品中に含まれる脂質は、TAG、コレステロールエステル、リン脂質など多岐にわたるが、おもに酸化を受けるのは各脂質の構成部位の 1 つである脂肪酸(FA)である。FA は飽和脂肪酸、モノ不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸(PUFA)に分類されるが、特に酸化を受けやすいのは分子内に二重結合を多く持つ PUFA である²⁾。代表的な PUFA には、主に植物油に多く含まれるリノール酸(LA(C18:2 n-6))、 α -リノレン酸(Ln(C18:3 n-3))や、魚油に多く含まれるエイコサペンタエン酸(EPA (C20:5 n-3))、ドコサヘキサエン酸(DHA (C22:6 n-3))などがある。n-3 系脂肪酸は、必須脂肪酸またはプロスタグランジンの前駆体として重要な物質であり、心臓病、炎症性疾患、気分障害、網膜症の予防、血液中のコレステロール値・中性脂肪値低下作用など多くの生理機能が報告されており近年注目されている³⁾⁴⁾⁵⁾。

脂質酸化は空気、光、遷移金属イオン、加熱などの影響により起こる化学変化であり、脂質が酸化すると風味やにおいの劣化の原因となる。酸化はフリーラジカルにより反応が開始し、二重結合に挟まれた活性水素が引き抜かれ、まず脂質ラジカル(L $\cdot$)が生成する。L $\cdot$ は酸素が存在すると速やかに酸素分子と反応して脂質ペルオキシラジカル(LOO $\cdot$)となる。この LOO $\cdot$ は他の脂質を攻撃して水素を引き抜き、一次酸化生成物である脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)を生成すると同時に、新たに脂質ラジカルを生成し連鎖的に酸化を繰り返す。この一連の反応をラジカル連鎖反応と呼ぶ。LOOH は無味、無臭であるが、酸化が進行するにつれ分解し二次酸化生成物、すなわち、アルデヒド、ケトン、炭化水素、アルコールを形成する(図 1)⁶⁾⁷⁾⁸⁾。

この酸化を防ぐ方法として、酸化防止剤を用いるのが一般的である。食品添加物として認可されている、BHT(ジブチルヒドロキシトルエン)や BHA(*t*-ブチルヒド

ロキシアニソール)等の酸化防止剤は、安全性について十分とは言えず使用制限がある⁹⁾。また、その様な問題のないトコフェロールには、最適添加量が存在するため、抗酸化力に限度があるという欠点がある。

ただし、これら上述した内容は油層のみのバルク系での話である。食品中には脂質だけでなく水分やタンパク質、炭水化物を含んでいるため、多成分が混ざり合っ
て乳化した O/W 型エマルジョンの状態が存在する場合が多い(図 2)。エマルジョン系とは普段は混ざり合わない二種類以上の液体の一方が小滴となって分散している状態である。油が水に分散している O/W 型エマルジョンの代表例としては、牛乳やマヨネーズ、ドレッシングなどが挙げられる。O/W 型エマルジョンは油滴が水層に分散した状態であり、エマルジョンにおける脂質酸化は油滴を取り巻く界面の影響を受ける。界面は乳化剤によって構成され、分子構造と乳化剤の層の厚さは乳化剤の種類によって大きく異なる¹⁰⁾。また、エマルジョンにおける脂質酸化はホモジナイズの圧力や pH、粒子系の大小、油滴表面の電荷、鉄イオンの有無、エマルジョンの粘度にも大きく影響を受ける¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。これまでの研究で、PUFA はバルク系では酸化に不安定であるが、逆にエマルジョン系では酸化安定性に優れているという報告が数多くある¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。さらに、PUFA は酸化防止能を持つかもしれないといった報告がある¹⁹⁾。しかし、これらの分析には過酸化価(PV)やガスクロマトグラフ・ヘッドスペース(GC-HS)が多く用いられており、試料中の脂質の総合的な酸化安定性を評価したものが多く²⁰⁾²¹⁾、PUFA の詳細な酸化機構は未だ明らかとなっていない。

そこで本研究では、酸化安定性を比較する方法として、主にガスクロマトグラフ・水素炎イオン化検出器(GC-FID)を使用した。GC-FID では FA 単位での酸化安定性の評価が可能であるため、より詳細な測定が可能であり、エマルジョン系での酸化機構の解明につながるものと考えた。また、食品という複雑な系での酸化を調べるために、まずは単純なモデル系での実験を行った。第 1 章では、実験に用いる構造既知の各種 TAG、モノアシルグリセロール(MAG)、ショ糖脂肪酸エステル(SFE)を大量に合成する方法を検討した。第 2 章では、TAG の酸化安定性、第 3 章では MAG、SFE を乳化剤として使用した時の酸化安定性を評価し、乳化系における PUFA の酸化特性に関する新たな知見を得ることを目的とした。

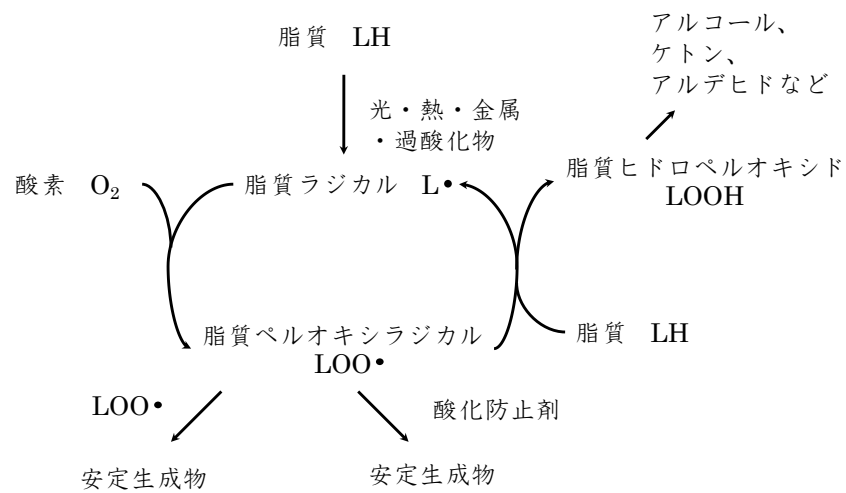


図 1 脂質の自動酸化機構

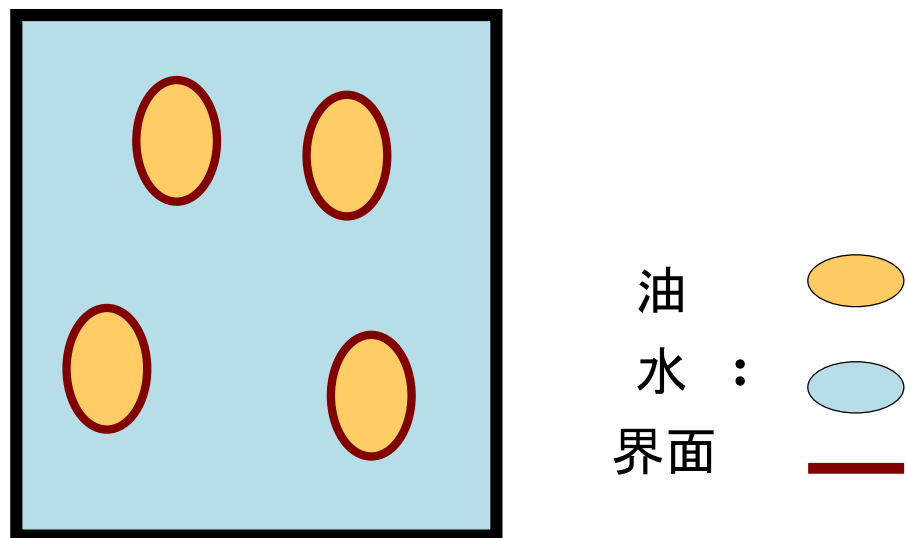


図 2 O/W 型エマルション

第 1 章 FA の精製と目的 TAG、MAG、SFE 合成

はじめに

現在までに TAG の酸化に関する研究は数多く行われ、その酸化を評価する指標は様々である。その中でも食品脂質の酸化において多く用いられている指標は酸価や過酸化物価である。酸価は脂質の加水分解で生成される遊離脂肪酸と二次酸化生成物である短鎖の有機酸、過酸化物価は脂質の一次酸化生成物である過酸化脂質の量をそれぞれ基にして算出される²⁾。しかしながら、酸価や過酸化物価は脂質の全体的な酸化を評価することはできるが、脂肪酸単位での酸化を評価することはできない。

そこで、構造が明らかである TAG、MAG、SFE を用いて調製したエマルションを酸化させ、FA の状態を調べるという方法をとることによって脂肪酸単位で酸化の評価を行えるのではないかと考えた。

そのため、本章では不飽和度の異なる様々な高純度 FA を用いて、AAA 型 TAG、PUFA が結合した MAG、SFE を大量合成する方法を検討した。

1.1 試料の純度確認と精製

【試料】

LA	(東京化成工業(株) 東京 日本)
Ln	(東京化成工業(株))
DHA-ME	(月島食品工業(株) 東京 日本)
EPA	(月島食品工業(株))

【方法】

TAG 合成に用いるそれぞれの FA をフラッシュカラムクロマトグラフィーに供して精製した後に、三フッ化ホウ素メタノール法で誘導体化を行い GC-FID で純度の確認を行った。DHA はメチルエステル(DHA-ME)として提供されたため、誘導体化を行わずに分析した。その中で純度の低かったものは HPLC-UV にて分取を行い、純度を高めた。

なお、LA、Ln においては、市販品をフラッシュカラムで精製して、そのまま合成に用いた。

フラッシュカラムクロマトグラフィー

カラムの先にガラスウールを詰め、カラムに適量の無水硫酸ナトリウムを入れたのちに、シリカゲルを溶媒とともに充填した。充填したシリカゲルの上に試料を添加し、さらに無水硫酸ナトリウムを加えた。そこに溶媒を流して 500 mL ずつのフラクションに分けて分画した。TLC で確認し、FA のみを含むフラクションを次の GC-FID による分析の試料とした。

〈フラッシュカラム条件〉

シリカゲル：60N（球状、中性） 40-50 μm (関東化学(株) 東京 日本)
溶媒：ヘキサン/酢酸エチル=90/10 (v/v)

〈TLC 条件〉

TLC プレート：5 cm $\times$ 10 cm TLC Silica gel 60
(Merck(株) ダルムシュタット ドイツ)
展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル=90/10 (v/v)

三フッ化ホウ素メタノール法

【試薬】

0.5 N 水酸化ナトリウムメタノール溶液

14%三フッ化ホウ素メタノール溶液

(SIGMA-ALDRICH Japan K.K. 東京 日本)

ヘキサン

(国産化学(株) 東京 日本)

飽和食塩水

【方法】

ねじ口試験管に試料を 1 mg 前後とり、0.5 N 水酸化トリウム溶液 1 mL を加えて激しく攪拌した。100℃温浴中で 30 秒加熱して、室温になるまで放冷した後に、14%三フッ化ホウ素メタノール溶液を 2 mL 入れ、激しく攪拌した。100℃の温浴中で 20 秒加熱して、室温になるまで放冷した。ヘキサンを 1 mL 加え激しく攪拌して、飽和食塩水 3 mL を加えて同じく激しく攪拌した。上層のみを回収して GC-FID での分析に用いた。

〈GC 分析条件〉

分析機器：ガスクロマトグラフ GC-14A ((株)島津製作所 京都 日本)

検出器：水素炎イオン検出器

カラム：キャピラリーカラム SUPELCO Omegawax 320

(SIGMA-ALDRICH Japan K.K.)

カラム温度：175℃～235℃（昇温 1℃/min）

注入温度：250℃

検出器温度：250℃

キャリアガス：ヘリウム

計算機：クロマトパック C-R6A

((株)島津製作所)

〈HPLC 分取条件〉

カラム：Inertsil ODS-3 5 μm, 7.5 mm×250 mm (ジーエルサイエンス(株))

温度：30℃

移動相：メタノール

検出器：UV (220 nm)

【結果・考察】

GC-FID による分析の結果、EPA においては 97.3%と高い純度が得られたが、DHA は 71.8%と十分な純度ではなかったため、分取 HPLC にて不純物が無くなるまでリサイクルを行い、純度を高めた。分取後の DHA-ME を GC-FID に供したところ、DHA の純度も 98.5%となった。分取の結果を図 3 に示す。

1.2 DHA-ME の加水分解

【試料】

DHA-ME	(月島食品工業(株))
水酸化ナトリウム	(国産化学(株))
エタノール	(国産化学(株))
ヘキサン	(国産化学(株))
10%硫酸水溶液	
飽和食塩水	
無水硫酸ナトリウム	(国産化学(株))

【方法】

四つ口フラスコに DHA-ME、エタノールを適量入れ、DHA-ME 1 mol に対して、水酸化ナトリウム 5 mol、水 100 mol となるようにそれぞれの試薬を加えた。70℃で還流させながらスターラーで 3 時間攪拌した後に、TLC で目的物が生成されていることを確認した。そこにヘキサンと 10%硫酸水溶液を加え、分液漏斗に移してヘキサンと飽和食塩水を用いて分液を行った。油相を無水硫酸ナトリウムで脱水しエバポレーターで溶媒除去をしたものを、一晩真空乾燥して目的物を得た。

【結果・考察】

合成確認を行った TLC の結果を図 4 に示す。TLC の結果から反応が十分に進んだことが確認できた。

1.2 AAA 型 TAG の大量合成

【試料】

グリセリン	(関東化学(株))
リノール酸	(東京化成工業(株))
DHA	(月島食品工業(株))
EPA	(月島食品工業(株))
4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)	(和光純薬工業(株) 大阪 日本)
<i>N,N</i> -ジイソプロピルエタノールアミン(<i>i</i> -Pr ₂ EtN)	(東京化成工業(株))
1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(EDC)	(東京化成工業(株))
ジクロロメタン	(国産化学(株))

【方法】

4つ口フラスコにグリセリンを入れ、グリセリン 1 mol に対して脂肪酸、DMAP、*i*-Pr₂EtN、EDC が各々 3.3 mol となるように加えた。溶媒としてジクロロメタンを適量加えて、スターラーを用いて室温で 3 時間攪拌した。反応後 TLC で目的物が生成されていることを確認してシリカゲルに担持させた後、脱溶媒した。担持させた生成物をフラッシュカラム(ヘキサン/酢酸エチル=9/1(v/v))に供して精製を行い、目的 TAG を得た。

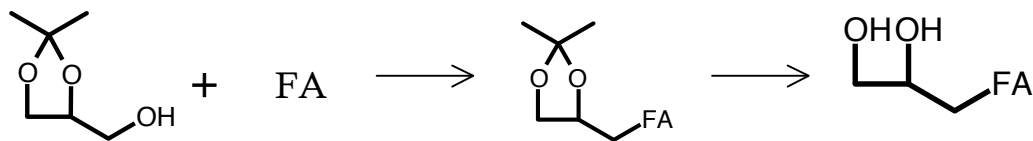
【結果・考察】

目的とする TAG の合成は、図 5 の TLC より反応が進んでいることが確認できた。また、フラッシュカラムによる精製についても他の副生成物や未反応の原料と分離でき、TAG のみを回収することができた。これにより、LA、EPA、DHA から酸化実験を行うのに十分な量の単酸型 TAG である tri-LA、tri-EPA、tri-DHA (以下 LLL、EEE、DDD) を合成することができた。

1.3 PUFA が結合した MAG の大量合成

反応①

反応②



【試料】

ソルケタール	(東京化成工業(株))
Ln	(東京化成工業(株))
EPA	(月島食品工業(株))
DHA	(月島食品工業(株))
DMAP	(和光純薬工業(株))
<i>i</i> -Pr ₂ EtN	(東京化成工業(株))
EDC	(東京化成工業(株))
<i>p</i> -トルエンスルホン酸	(東京化成工業(株))
ジクロロメタン	(国産化学(株))
メタノール	(国産化学(株))

【方法】

上記の反応式に示したように 2 回の反応で MAG を合成した。

反応① 4つ口フラスコにソルケタールを入れ、ソルケタール 1 mol に対して FA(Ln、EPA、DHA)、DMAP、*i*-Pr₂EtN、EDC が 1.2 mol となるように加えた。溶媒としてジクロロメタンを適量加えて、スターラーを用いて室温で 4 時間攪拌した。反応後 TLC で目的物が生成されていることを確認してシリカゲルに担持させた後、脱溶媒した。担持させた生成物をフラッシュカラム(ヘキサン/酢酸エチル=9/1(v/v))に供して精製を行い、反応①の目的物を得た。

反応② 4つ口フラスコに反応①で合成した化合物を入れ、化合物 1 mol に対して *p*-トルエンスルホン酸を 3 mmol となるように加えた。溶媒としてメタノールを適量加えて、スターラーを用いて室温で 2~4 時間攪拌した。反応後 TLC で目的物が生成されていることを確認してシリカゲルに担持させた後、脱溶媒した。担持させた生成物をフラッシュカラム(ヘキサン/酢酸エチル=3/7(v/v))に供して精製を行い、PUFA-MAG を得た。

<NMR 分析条件>

分析機器：JNM-ECX500

(日本電子(株) 東京 日本)

共鳴周波数： ^{13}C 125 MHz

測定溶媒：重水素化クロロホルム(CDCl_3)

(和光純薬工業(株))

測定条件：シングルパルス

【結果・考察】

PUFA-MAG の合成は、図 6、7 の TLC より目的物のスポットが確認できた。反応①では、Ln、EPA、DHA を用いた全ての反応で 95%以上の収率で目的物を得ることができた。反応②では、アセトニド基を脱保護する反応に触媒として *p*-トルエンスルホン酸を用いた²²⁾。過去の文献では、高収率で脱保護ができるとあったが、本実験では、TLC の結果から脱保護と同時に、副生成物として脂肪酸メチルエステルが生成することが確認できた。したがって、反応時間を長くすると、副生成物が多くできてしまうことが考えられたため、反応チェックをこまめに行い、反応時間を 2～4 時間として反応を停止させた。これにより、Ln-MAG、EPA-MAG、DHA-MAG の収率はそれぞれ 83.5%、70.6%、77.0%の収率で得ることができた。

また、反応①、反応②で合成した目的物を ^{13}C -NMR に供し、構造確認を行った。反応①の目的物の ^{13}C -NMR のチャートを図 8、PUFA-MAG の ^{13}C -NMR のチャートを図 9 に示す。 ^{13}C -NMR では、カルボニル炭素が 170～220 ppm にピークが出ることが知られており²³⁾、図 8 では 173.4706 ppm、図 9 では 174.3004 にピークが出ているため脂肪酸が結合されていることが確認できた。また、図 9 には 171.3340 ppm のピークが出ているが、これは 1 位に結合している脂肪酸が 2 位に転移してしまうためだと考えられた。図 8 の 109.678 ppm のピークはアセトニド基の炭素であり、図 9 ではこのピークが消失していることから、アセトニド基の脱保護ができ MAG が合成できていることが確認できた。

最終的に、酸化実験を行うのに十分な量の PUFA-MAG である Ln-MAG、EPA-MAG、DHA-MAG を合成することができた。

1.4 PUFA が結合した SFE の大量合成

【試料】

スクロース	(和光純薬工業(株))
パルミチン酸	(東京化成工業(株))
DHA	(月島食品工業(株))
EPA	(月島食品工業(株))
DMAP	(和光純薬工業(株))
<i>i</i> -Pr ₂ EtN	(東京化成工業(株))
EDC	(東京化成工業(株))
ジクロロメタン	(国産化学(株))

【方法】

4 つ口フラスコにスクロースを入れ、スクロース 1 mol に対して FA、DMAP、*i*-Pr₂EtN、EDC が 1.2 mol となるように加えた。溶媒としてジクロロメタンを適量加えて、スターラーを用いて室温で 24 時間攪拌した。反応後 TLC で目的物が生成されていることを確認してシリカゲルに担持させた後、脱溶媒した。担持させた生成物をフラッシュカラム(クロロホルム/メタノール=8/2(v/v))に供して精製を行い、SFE を得た。

【結果・考察】

図 10 に示した TLC により反応が進んでいることが確認できた。SFE を合成した目的の一つに、O/W エマルションを形成する上で乳化が安定する乳化剤を得るという目的があったため、反応混合物をフラッシュカラムに供し HLB 値が高いモノエステルを回収した。ジエステルも少量混合してしまったが、市販に乳化剤として販売されている SFE も混合物であるため、そのまま試料として後の酸化実験に使用した。D-sucrose、E-sucrose、P-sucrose の収率はそれぞれ 11.2%、15.4%、25.7%であった。収率が低かった理由として、溶媒として使用したジクロロメタンにスクロースが溶けないことが考えられた。スクロースはジメチルスルホキシド(DMSO)や *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)のような極めて高極性の溶媒にのみ完全に溶けることが知られているが、これらの溶媒を使用すると穏和な条件での脱溶媒が困難なため使用しなかった。低収率ではあるが、スクロースが溶けにくい溶

媒でも反応が進むという報告があるため²⁴⁾、本研究では脱溶媒が容易なジクロロメタンを使用した。また、反応時間を伸ばすことで収率の向上が考えられたが、モノエステルだけでなくジエステルやトリエステルが同時に生成してしまうことが懸念されたため、今回は反応時間を 24 時間とした。

収率は低いですが、最終的に酸化実験を行うのに十分な量の D-sucrose、E-sucrose、P-sucrose を合成することができた。

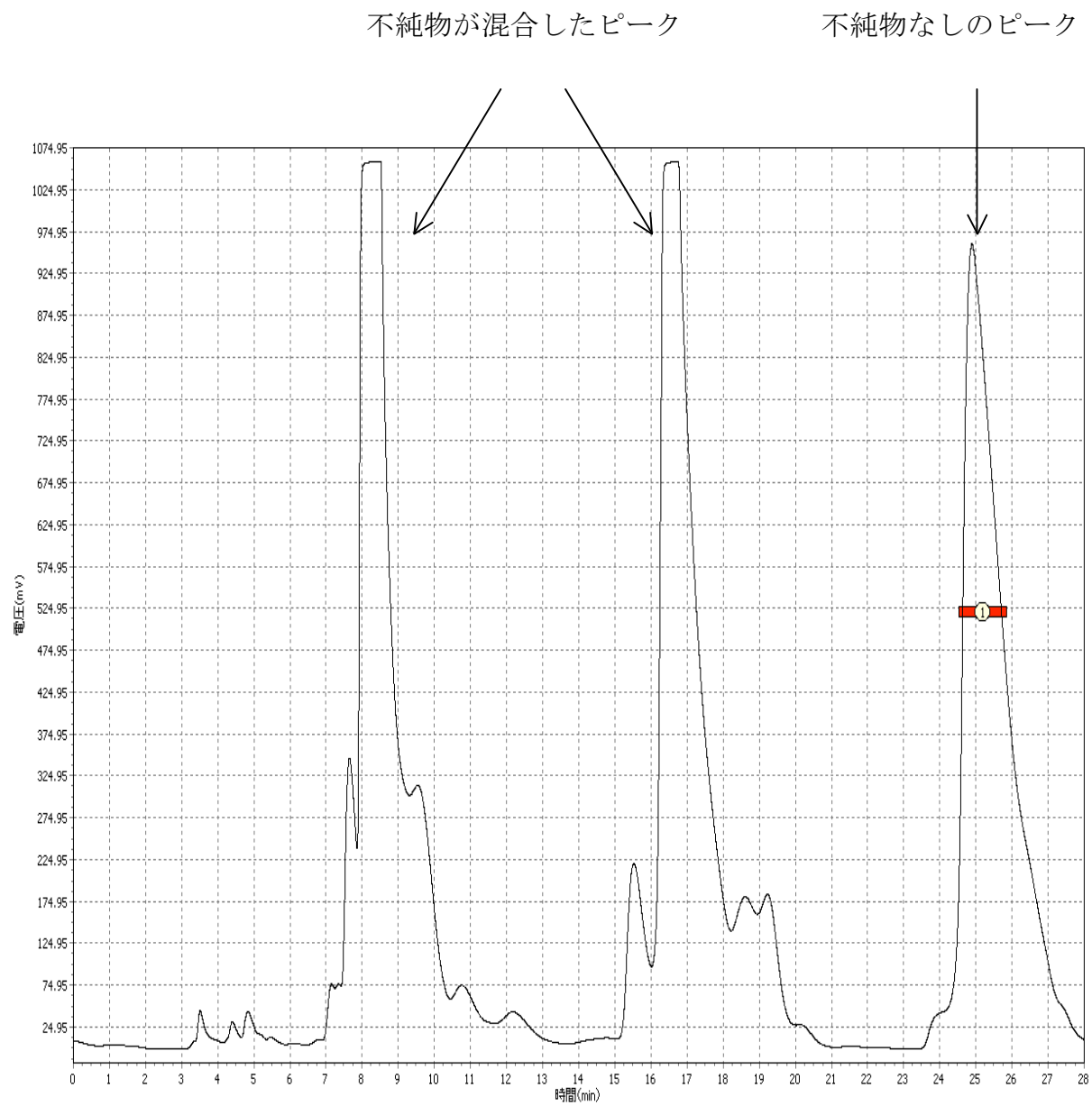


図 3 HPLC による DHA-ME の分取のクロマトグラム(分取条件：8 頁参照)

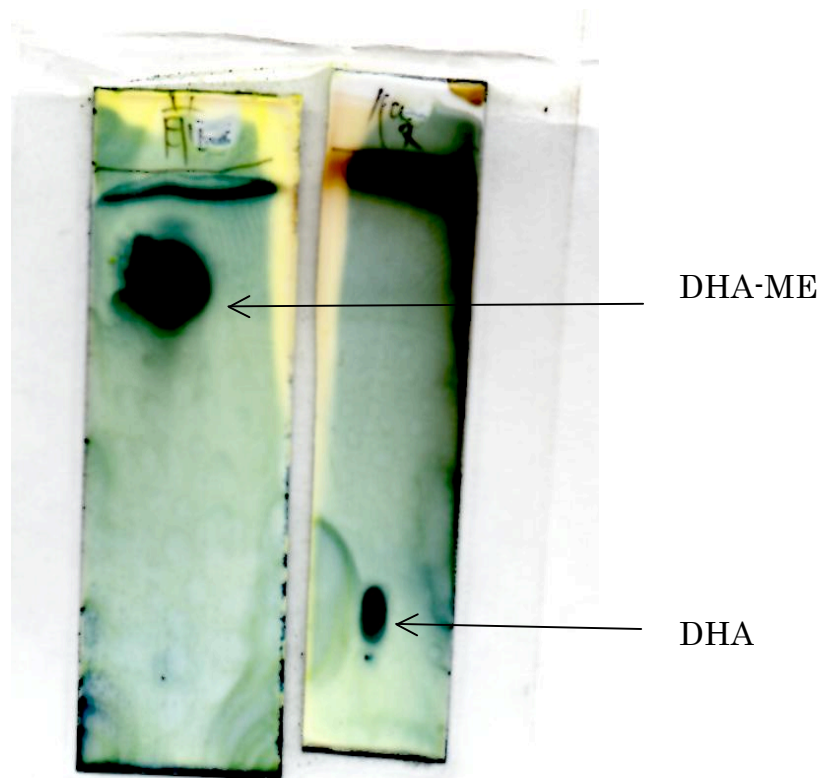


図 4 DHA-ME の加水分解の TLC による反応確認
(ヘキサン/酢酸エチル=9/1(v/v))

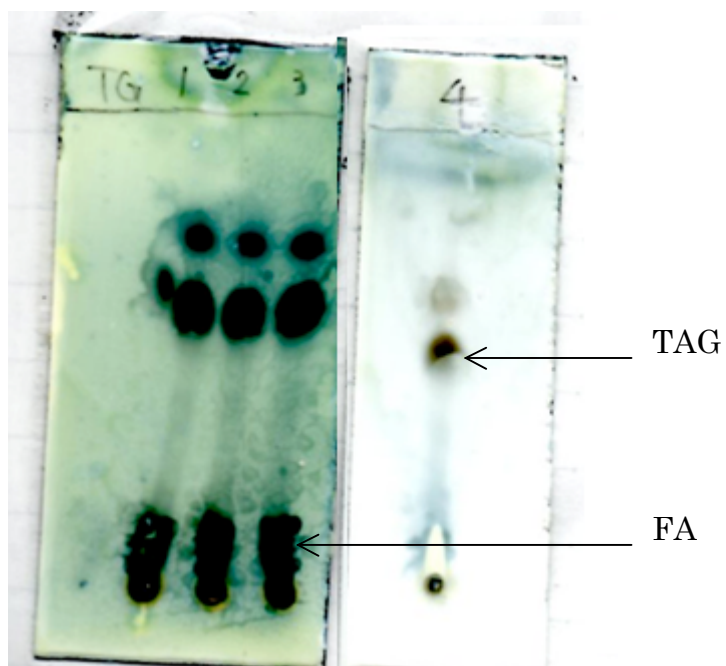


図 5 TAG 合成の TLC による反応確認
(ヘキサン/酢酸エチル=9/1(v/v))

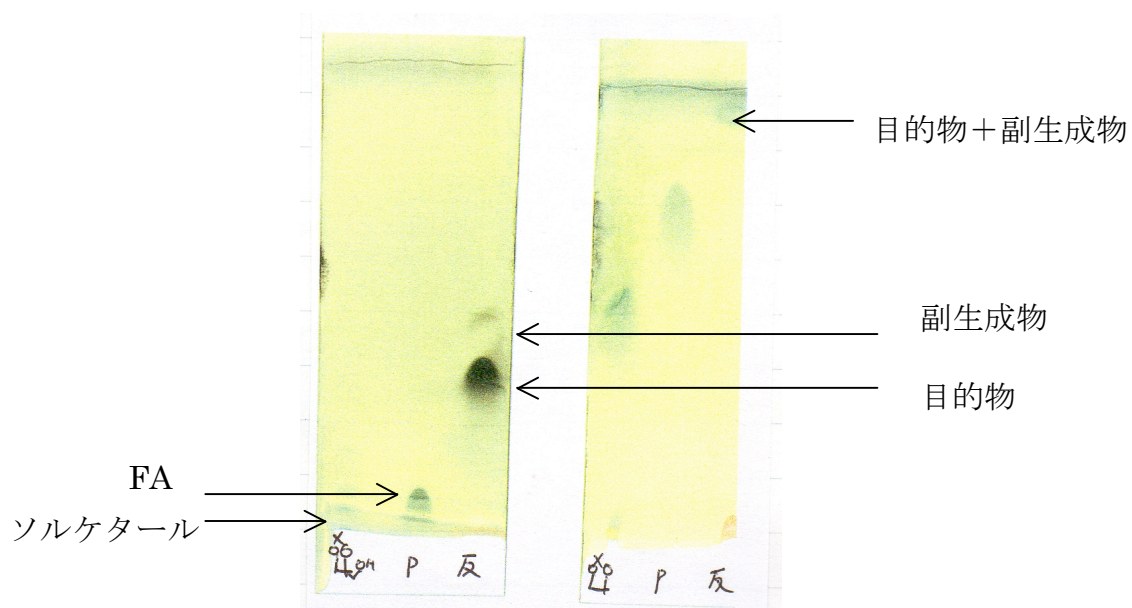


図 6 反応①の反応確認(左:ヘキサン/酢酸エチル=9/1(v/v), 右:ヘキサン:酢酸エチル=1/1(vv))

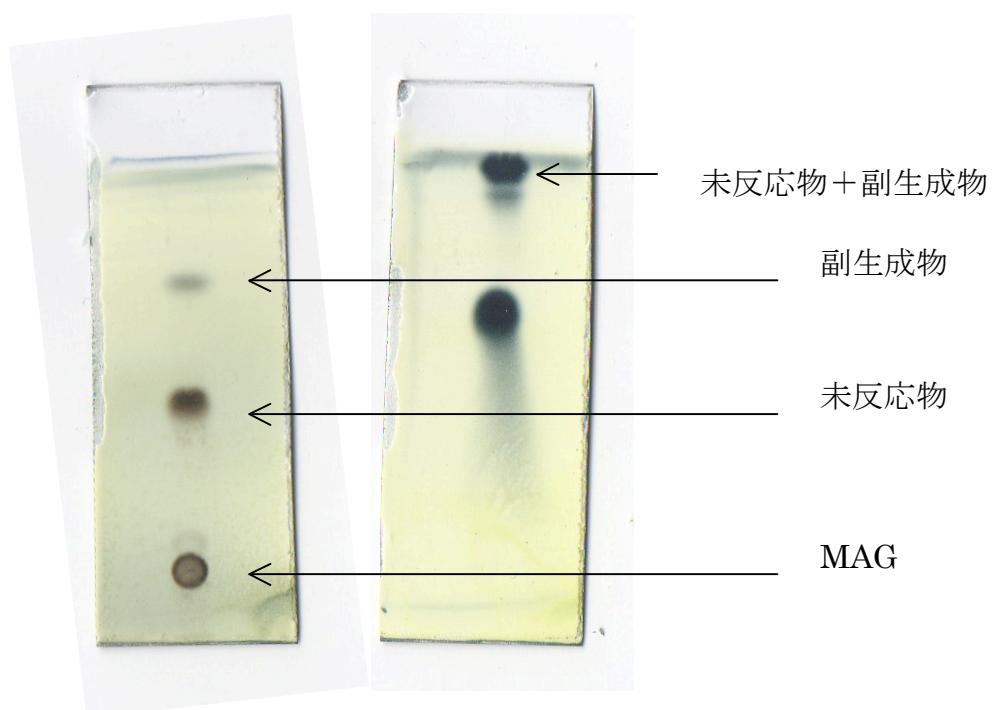


図 7 PUFA-MAG の反応確認(左:ヘキサン/酢酸エチル=9/1(v/v), 右:ヘキサン:酢酸エチル=3/7(v/v))

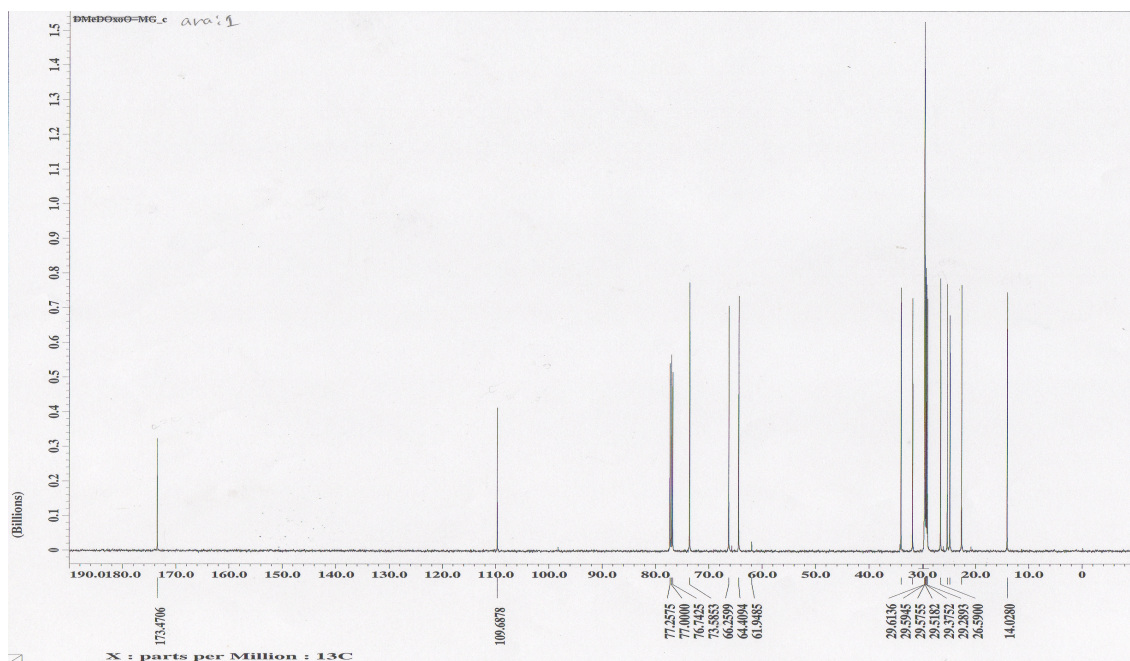


図 8 反応①の目的物の ^{13}C -NMR(分析条件：12 頁参照)

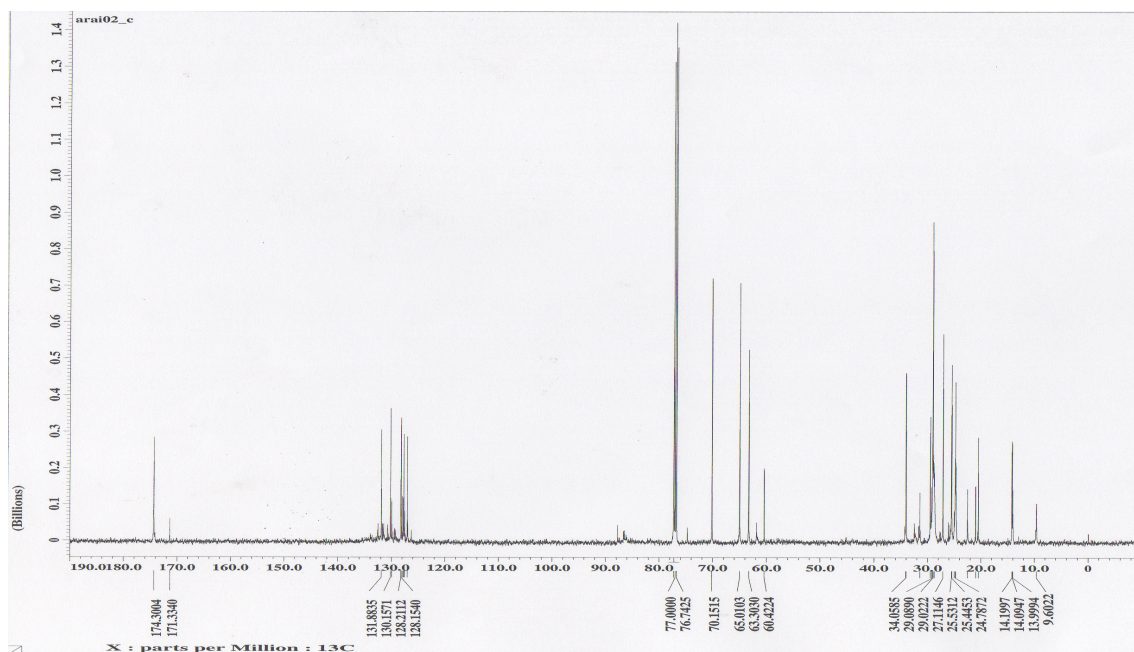


図 9 EPA-MAG の ^{13}C -NMR(分析条件：12 頁参照)

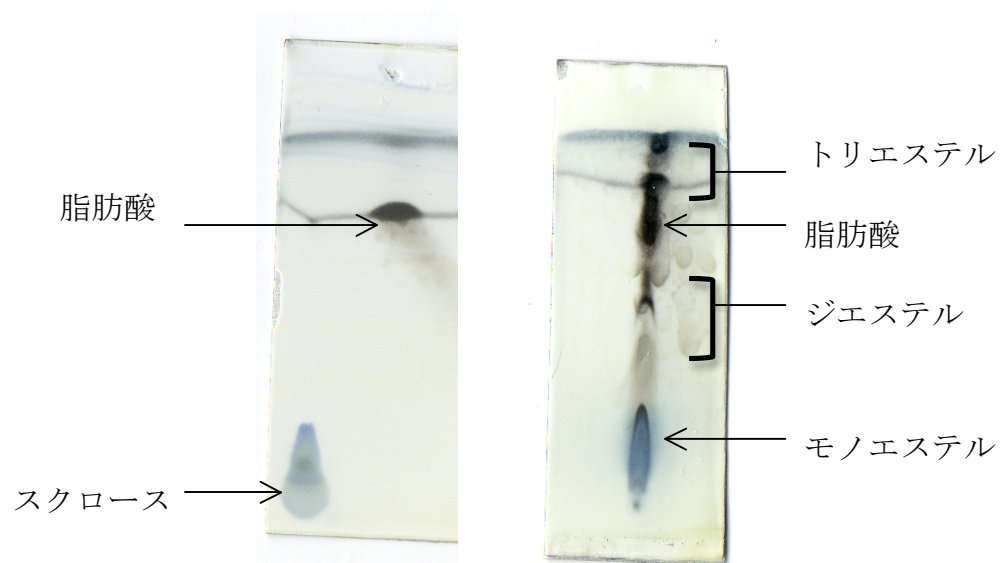


図 10 ショ糖脂肪酸エステルの TLC による反応確認
(クロロホルム/メタノール/酢酸/水=80/10/8/2(v/v/v/v))

第2章 複数の TAG を用いた酸化安定性

はじめに

現在までに、バルク系、エマルジョン系での酸化安定性試験は数多く行われており、PUFAにおいてもそれらの酸化安定性について様々な報告がなされている。油のみが存在するバルク系では、不飽和脂肪酸の酸化速度は二重結合数に比例して速くなるのに対し、エマルジョン系では必ずしも不飽和度の大きい不飽和脂肪酸の酸化速度が速くなるわけではない²⁵⁾。近年、エマルジョン系での脂質酸化は油-水の界面より始まり、その反応が内部に拡散していくことで進行すると考えられるようになった。

本研究室の過去の実験において、AAA 型の TAG である DDD、EEE は LLL と比較して酸化安定性が高いこと、さらに DDD、EEE は LLL に対して抗酸化剤として働いたという報告がある。この抗酸化剤として働くメカニズムは油-水の界面で何らかの作用が起こると考えられている¹⁹⁾。しかしこの研究は、1 種類の AAA 型 TAG で構成された非常にシンプルなエマルジョン系で報告されたもので、実際の食品中の脂質は様々な脂肪酸を含み複雑である。そこで第2章では2種類の AAA 型 TAG を用いてエマルジョンを調製し、酸化実験を行うことで PUFA の酸化特性を明らかにすることを目的とした。

2.1 DDD と EEE を混合させたときの酸化安定性

過去の研究で、不飽和度が大きく異なる AAA 型 TAG を 2 種類混合させると、不飽和度の高い FA から酸化されていくという報告があった¹⁹⁾。そこで、不飽和度が 1 つ異なる DDD と EEE を混合させ酸化実験を行った。GC-FID により残存 FA 量(%)を測定することによって酸化安定性を評価した。

【試料】

AAA 型 TAG

・ DDD

・ EEE

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

2,2-アゾビス-2-アミジノプロパン二塩酸塩(AAPH)

(和光純薬工業(株))

イソプロピルエーテル(IPE)

(国産化学(株))

リン酸緩衝液

リン酸二水素ナトリウム・2 水和物

(国産化学(株))

リン酸水素二ナトリウム・12 水和物

(国産化学(株))

TrironX-100

(SIGMA-ALDRICH Japan K.K.)

0.2 M リン酸二水素ナトリウム・2 水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) と 0.2 M リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) を 19 : 81 の割合で混合し、蒸留水で 4 倍希釈したものに、0.5%の TrironX-100 を加えて調製した。

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に DDD、EEE を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤である AAPH を加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~96 時間酸化させた。

なお試料の添加量は、DDD、EEE、トリデカン酸メチル、AAPH をそれぞれ 5 mM、5 mM、10 mM、1 mM となるように調製した。

酸化実験開始から 96 時間まで 24 時間ごとに 3 つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

エマルションの油相抽出

試料を小試験管に移しエタノールと IPE を、試料/エタノール/IPE=1/1/3 (v/v/v) となるように加えミキシングした。その後遠心分離機で油相と水相の分離を行った。

〈遠心分離条件〉

遠心機：KUBOTA テーブルトップ遠心機 2010 (久保田商事(株) 東京 日本)

回転数：3000 rpm

遠心時間：5 min

〈GC-FID 条件〉

分析機器：Yanaco G6800

((株)ヤナコ計測 京都 日本)

検出器：水素炎イオン検出器

カラム：SUPELCO SLB-IL111

(SIGMA-ALDRICH Japan K.K.)

カラム温度：140℃～260℃

(昇温 140℃～180℃：8 °C/min 180℃～260℃：5 °C/min)

注入温度：250℃

検出器温度：250℃

キャリアガス：水素

計算機：C-R8A

((株)島津製作所)

〈残存 FA 量計算方法〉

$$\text{残存 FA 量 (\%)} = \frac{\text{FA のピーク面積 / 内部標準のピーク面積}}{\text{FA のピーク面積 (t=0) / 内部標準のピーク面積 (t=0)}} \times 100$$

【結果・考察】

図 11 に各 FA の残存 FA 量を示す。EPA、DHA は継時的に減少し、96 時間後の残存 FA 量は、EPA、DHA それぞれ 68.3%、60.0%となった。

過去の研究は、同一ミセル内に LLL と EEE あるいは LLL と DDD を混合させて酸化実験を行い、まず初めに不飽和度の大きい DHA や EPA が酸化され、DHA や EPA の残存 FA 量が残りわずかになると、LA が酸化されていくという結果であった。また、同一ミセル内に DDD や EEE が 1 種類のみ存在する場合は、酸化安定性が高いという報告もある。しかし本実験で、同一ミセル内に DDD と EEE を混合させ酸化させると、DDD、EEE は同時に酸化される結果になった。ここから、PUFA が結合した AAA 型 TAG は単独でミセル内に存在する場合のみ、酸化安定性が高いことが示唆された。

2.2 2種類のAAA型TAGを混合し酸化させ、48 h後にDDDあるいはEEEを添加した時の酸化安定性

過去の研究で、まずLLLを酸化させ48 h後にDDDあるいはEEEを添加するとLLLの酸化を抑制できるという報告があった¹⁹⁾。そこで、2種類のAAA型TAGを含むエマルジョンを酸化させた後に、DDDあるいはEEEを添加するとDDD、EEEは抗酸化剤として働くかどうか精査することを目的とし、以下の条件で酸化実験を行った。

実験① LLLとEEEを含むエマルジョンにDDDのみのエマルジョンを添加

実験② LLLとDDDを含むエマルジョンにEEEのみのエマルジョンを添加

【試料】

AAA型TAG

・LLL

・DDD

・EEE

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

AAPH

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL容バイアル瓶に2種類のTAG(LLL+EEEあるいはLLL+DDD)を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤であるAAPHを加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL容褐色バイアル瓶に1 mLずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら0~216時間酸化させた。酸化開始から48時間後に、添加用TAGに0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加え同条件で乳化させ、AAPHを加えて調製したエマルジョンを1 mLずつ添加した。

なお試料の添加量は、各TAG、トリデカン酸メチル、AAPHをそれぞれ5 mM、10 mM、1 mMとなるように調製した。

酸化実験開始から216時間まで24時間ごとに3つの試料をとり、サンプルの油相

のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FIDで残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

実験①の結果を図 12 に示す。同一ミセル内に LLL と EEE を含むエマルションにおいて、まず不飽和度の高い EPA から酸化され、過去の研究¹⁹⁾と同様の結果になった。EPA の残存 FA 量が約 30%になると変化がなかった LA においても残存 FA 量の減少が確認された。48 h 後に DDD を添加した場合、添加直後から EPA の残存 FA 量がほとんど減少しなかったため、DDD の何らかの作用により EPA の酸化が抑制されたのだと考えられた。また DDD の構成 FA である DHA の残存 FA 量は、継時的に観察してもほとんど変化がなかったため、DHA 自身の酸化安定性も非常に高いことが確認された。これらの結果から、DDD は LLL と EEE を含むミセルに対して、抗酸化的に働くことが示唆された。

実験②の結果を図 13 に示す。同一ミセル内に LLL と DDD を含むエマルションにおいても実験①と同様に、まず不飽和度の高い DHA の残存 FA 量の減少が見られ、LA についても最初は大きな変化は見られなかったが DHA の残存 FA 量が少なくなると、減少が確認された。しかし、48 h 後に EEE を添加した場合、実験①と異なり、減少していた DHA の残存 FA 量の減少は抑制されず、EEE 無添加の場合とほとんど変わらない結果になった。また、EPA の残存 FA 量も継時的に減少していくことが確認された。これらの結果から、EEE は LLL と DDD を含むミセルに対して、抗酸化的に働かないことが示唆された。

エマルションにおける脂質酸化は油層と水層の界面から起こり、それが内部に進行していくことが知られている²⁶⁾。また、界面から酸化が進行するため乳化剤の種類や乳化剤の層の厚さ、疎水基の鎖長の長さによって酸化安定性が異なることが知られている¹⁰⁾²¹⁾²⁷⁾。今回使用した酸化開始剤である AAPH は水溶性であるため、同じく水相と油相の界面から起こったのだと考えられる。乳化剤は TritonX-100 を使用したが、何も添加していないエマルションは継時的に残存 FA 量が減少しているため、TritonX-100 が酸化防止能を持つ可能性は考えにくい。よって、実験①で DDD が酸化を抑制した理由は DDD と LLL+EEE の 2 つのミセルに何らかの相互作用が生じたのだと考えられる。DHA の分子構造は LA と比較すると、分子内に二重結合を多く含み通常シス型のため、折れ曲がりが多い構造となっている。エマルション系において、二重結合部位に酸素が反応し DHA が酸化され、DHA ペルオキシラジカルを形成した際、酸化部位の極性が高くなり、界面へ移動すると考えられている。また、ペルオキシラジカル同士はカップリングするといった報告が

ある²⁸⁾。したがって、DHA ペルオキシラジカルは、水層中に存在する酸化開始剤の AAPH、あるいは LLL と EEE 由来のペルオキシラジカルとカップリングし、その結果ラジカル連鎖反応を停止したのだと考えられた(図 14)。実験①の結果は、同一ミセル内に 1 種類の AAA 型 TAG を用いた過去の研究と同様に、2 種類の AAA 型 TAG に対しても DDD は抗酸化的に働くことが示唆された。一方で、実験②では LLL と DDD に対し EEE は抗酸化的に働かなかった。図 13 から EPA、DHA の両方が酸化されていることがわかる。さらに、図 11 から DDD と EEE が同一ミセル内に存在すると DHA、EPA の両方が酸化されるという結果が得られた。ここから考えると、実験②では、添加した DDD のミセルが LLL+EEE のミセルに結合し、その結果 DHA と EPA の両方が酸化されてしまったと考えられた。

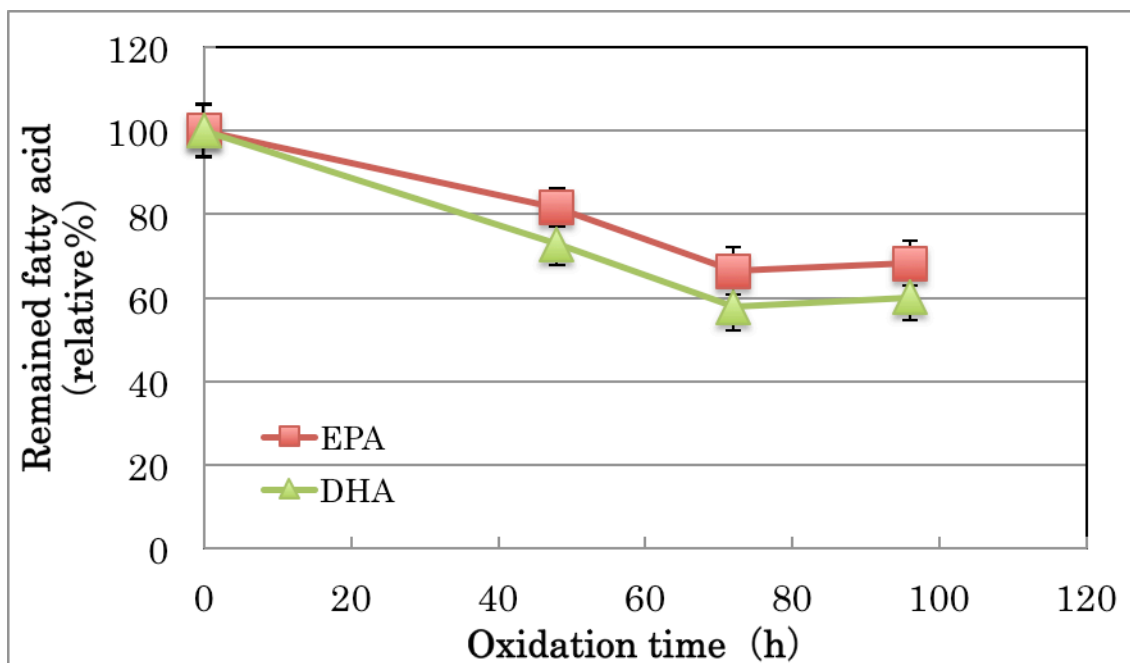


図 11 同一ミセル内に DDD と EEE を混合させた時の残存 FA 量の継時変化

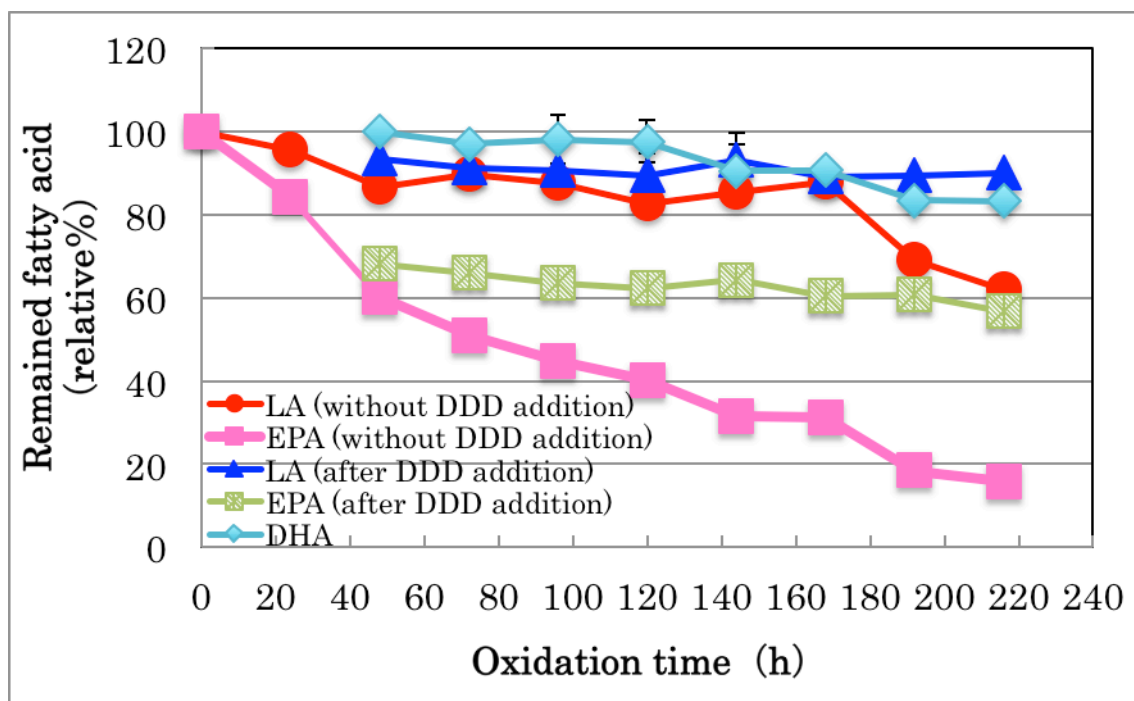


図 12 同一ミセル内に LLL、EEE を混合し酸化させ、48 h 後に DDD を加えた時の残存 FA 量の継時変化

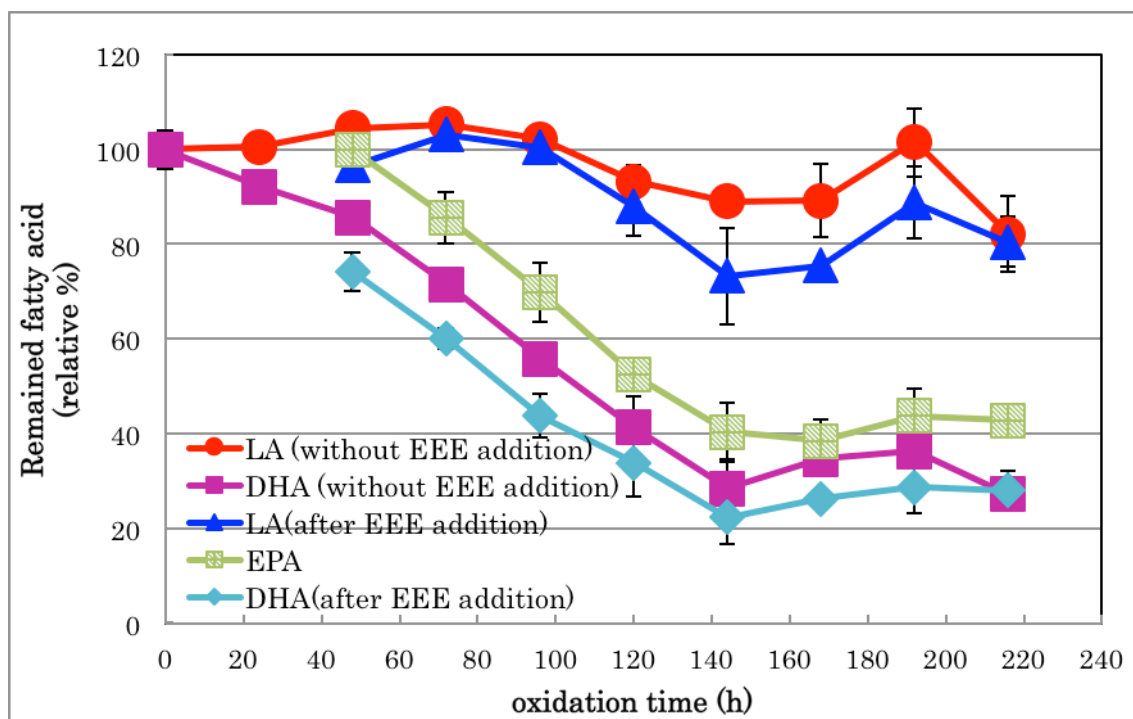


図 13 同一ミセル内に LLL、DDD を混合し酸化させ、48 h 後に EEE を加えた時の残存 FA 量の継時変化

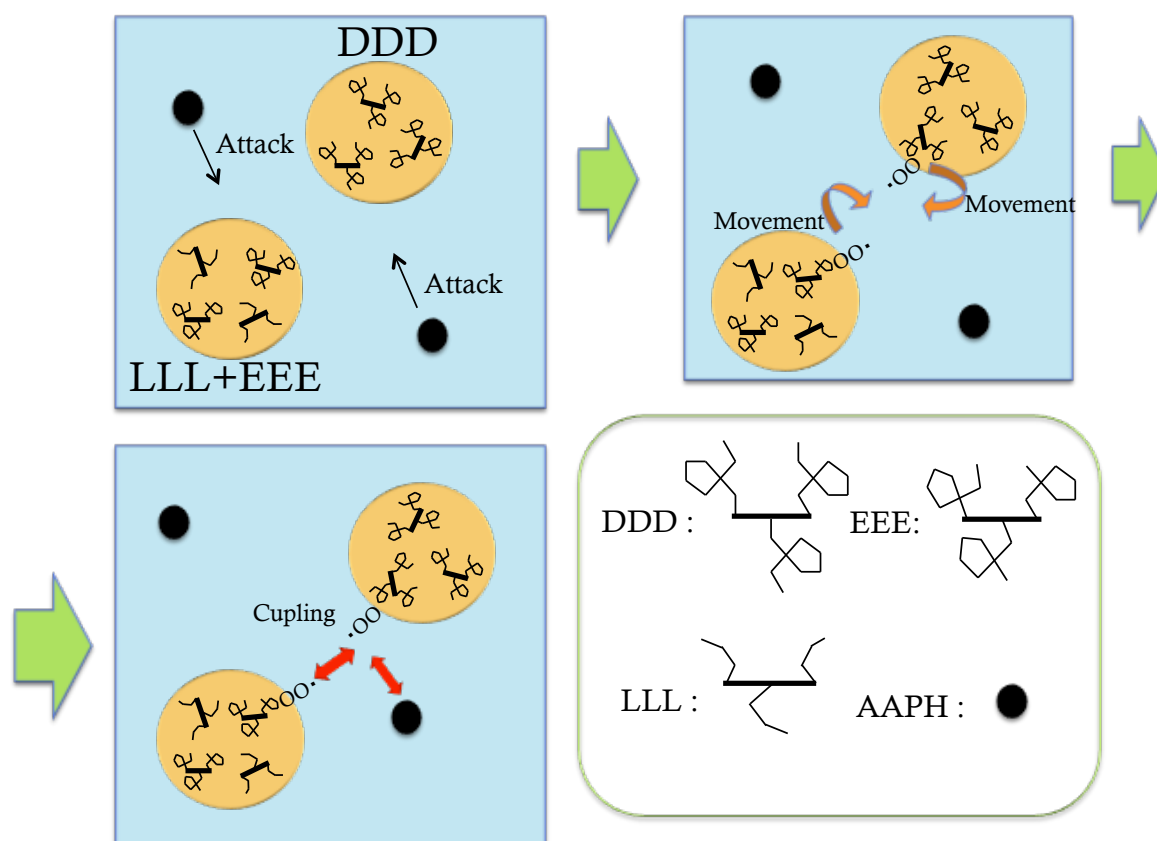


図 14 エマルション系における DDD の抗酸化機構の仮説

第 3 章 PUFA を含む乳化剤を使用した酸化安定性

はじめに

これまでの研究で PUFA が酸化防止能を持つのは、界面で何らかの作用が起こり、内部の脂質を酸化から守るといった説が有力である。また、乳化剤の種類によって酸化挙動が大きくことなることが数多く報告されている¹⁰⁾²⁹⁾。

したがって、第 3 章では PUFA が結合した MAG、SFE を用いて乳化処理し、様々な条件下で酸化実験を行うことで PUFA の酸化特性を明らかにすることを目的とした。

3.1 PUFA-MAG の酸化安定性

過去の研究より、O/W エマルションにおいて AAA 型 TAG を酸化させると DDD>EEE>LnLnLn>LLL のように、脂肪酸の不飽和度が高くなるにつれ酸化安定性が高くなるといった報告がある¹⁹⁾。そこで、PUFA は MAG の形態でも酸化安定性が高いのかどうか調査するために、各 MAG を乳化させ酸化安定性を比較した。

【試料】

PUFA-MAG

- ・ Ln-MAG
- ・ E-MAG
- ・ D-MAG

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

AAPH

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に MAG を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤である AAPH を加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~96 時間酸化させた。

なお試料の添加量は、各 MAG、トリデカン酸メチル、AAPH をそれぞれ 5 mM、10 mM、1 mM となるように調製した。酸化実験開始から 96 時間まで 24 時間ごとに 3 つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

図 15 に MAG を酸化させたときの残存 FA 量を示す。96 h 後の DHA、EPA、Ln の各残存 FA 量はそれぞれ 93.3%、78.4%、42.1%となった。最も不飽和度が高い DHA はほとんど酸化しないのに対し、不飽和度の低い Ln は継時的に減少した。この結果から、PUFA は MAG の形態でも酸化安定性が高いことが示唆された。

3.2 LLL を酸化させ 48 h 後に PUFA-MAG を添加した時の酸化安定性

2 章で DDD を 48 h 後に添加すると、添加直後から EEE+LLL の酸化を抑制することができた。そこで MAG を添加しても抑制できるかどうか酸化実験を行った。

【試料】

AAA 型 TAG

・ LLL

PUFA-MAG

・ D-MAG

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

AAPH

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に LLL を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤である AAPH を加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~96 時間酸化させた。酸化開始から 48 時間後、D-MAG に 0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて同条件で乳化させ、AAPH を加えて調製したエマルジョンを 1 mL ずつ添加した。試料の添加量は、LLL、MAG、トリデカン酸メチル、AAPH をそれぞれ 10 mM、5 mM、10 mM、1 mM となるように調製した。

酸化実験開始から 96 時間まで 24 時間ごとに 3 つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

LLL、D-MAG の残存 FA 量を図 16 に示す。D-MAG を無添加の LA は酸化開始から 48 h までに 35.5%まで減少し、96 h には 11.7%となった。D-MAG を添加した LA は、96 h で 27.1%となり、無添加と比較すると LA の酸化を抑制したように見える。しかし、DHA の残存 FA 量を見ると明らかに継時的に減少し、96 h では 30.0%まで減少した。

添加後の系内を考えると、LLL と D-MAG のミセルがそれぞれ独立している場合と結合してしまう場合が考えられる。過去の研究¹⁹⁾、第 2 章での実験より、同一ミセル内に不飽和度の異なる FA が存在する場合、不飽和度の高い FA から酸化されるという結果が得られている。したがって、LA の酸化速度は減少したが DHA が減少していることから、LLL と D-MAG のミセルが結合してしまったと考えられた。また、結合した場合 D-MAG は乳化剤であるため、LLL の表面に蓄積する。後の 3.3 で行った実験で、D-MAG を乳化剤として使用した場合、内部の LLL を酸化から守ること、さらに DHA も酸化されないことが明らかとなっている。このことから、本実験では LLL の表面に蓄積するが、ミセルに均一に蓄積するのではなく、不均一に蓄積したため、DHA が酸化されたのだと考えられた。

3.3 PUFA-MAG を乳化剤として使用した時の酸化安定性

3.2 では D-MAG を添加しても酸化を抑制できなかった。そこで今回は、初めから乳化剤として使用し、酸化実験を行った。また、MAG に結合する FA の不飽和度の違いによる酸化安定性を比較した。

【試料】

AAA 型 TAG

・ LLL

PUFA-MAG

・ Ln-MAG

・ E-MAG

・ D-MAG

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

AAPH

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に LLL、MAG を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤である AAPH を加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~96(144)時間酸化させた。試料の添加量は、LLL、各 MAG、トリデカン酸メチル、AAPH をそれぞれ 10mM、5 mM、10 mM、1 mM となるように調製した。なお MAG を加えず、TritonX-100 のみで乳化したものをコントロール群とした

酸化実験開始から 96(144)時間まで 24 時間ごとに 3 つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

D-MAG、E-MAG、Ln-MAG を乳化剤として使用した時の各残存 FA 量をそれぞれ図 17、18、19 に示す。図 17 から、D-MAG を使用せず TritonX-100 のみで乳化処理した場合、LA の残存量は継時的に減少していき、96 h で 29.1%、144 h で 14.1% となった。一方で、D-MAG を使用すると LA の残存量は 96 h で 102%、144 h で 89.0% となった。さらに DHA の残存量は 96 h で 96.5%、144 h で 83.9% となり、96 h までは LA、DHA 共に非常に酸化安定性が高いことが明らかとなった。図 18 から E-MAG を使用した場合も D-MAG を使用した場合と同様の酸化挙動であることが明らかとなった。しかし、図 19 から Ln-MAG を使用した場合、D-MAG、E-MAG と異なる結果となった。Ln-MAG を使用した場合も、使用しなかった場合と同様、継時的に LA、Ln の残存量は減少した。

本実験で使用する乳化剤は MAG のみの予定であったが、乳化が不安定であったため MAG と TritonX-100 の 2 種類の乳化剤を混合することによって乳化処理した。そのため MAG を使用した場合と使用しない場合で、乳化剤濃度が若干異なることを考慮する必要がある。乳化剤濃度が高いと、水層に余剰に存在する乳化剤が金属イオンの動きを止める、あるいは水層中のフリーラジカルを消去するといった報告がある³⁰⁾。だが、Ln-MAG を使用した実験で、LA の酸化が抑制されなかったということは乳化剤濃度の影響をあまり受けなかったと考えられた。このことから、D-MAG、E-MAG は抗酸化的に働くことが示唆された。D-MAG、E-MAG が抗酸化的に働く理由は、第 2 章で考察したように、DHA、EPA ペルオキシラジカルがアゾ化合物である AAPH とカップリングしたからだと考えられた。MAG の構造は水酸基を 2 つ、FA を 1 つ持つ構造であり、極性を考えると通常は水酸基が水層側になる。しかし、FA が酸化されペルオキシラジカルになると、極性が高くなりペルオキシラジカル部位が水層中に出るよう移動すると考えられた。したがって、水層中に存在する AAPH とカップリングすることによって、酸化を抑制したのではないかと考えられた(図 20)。

3.4 脂溶性の酸化開始剤を用いた時の酸化安定性

3.3 では酸化開始剤に水溶性である AAPH を使用したが、脂溶性である AIBN を使用しても D, E-MAG は抗酸化的に働くか調査した。

【試料】

AAA 型 TAG

・ LLL

PUFA-MAG

・ Ln-MAG

・ E-MAG

・ D-MAG

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5% TritonX-100 含有 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に LLL、MAG を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステル、AIBN を加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5% TritonX-100 含有 0.05 M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させ、4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、35℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~96 時間酸化させた。試料の添加量は、LLL、各 MAG、トリデカン酸メチルをそれぞれ 10mM、5 mM、10 mM、となるように調製した。なお MAG を加えず、TritonX-100 のみで乳化したものをコントロール群とした

酸化実験開始から 96 時間まで 24 時間ごとに 3 つの試料をとり、Folch 法にて油層を抽出後、BHT、トリフェニルホスフィンをそれぞれ 0.5% となるようにシクロヘキサンに溶解した溶液を 1 mL 加え酸化を停止した。溶媒除去後、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

D-MAG、E-MAG、Ln-MAG を乳化剤とし、AIBN で酸化させた時の各残存 FA 量をそれぞれ図 21、22、23 に示す。図 21 から、D-MAG を使用しない場合、LA は継時的に減少していき 96 h で 50.3% となった。一方で D-MAG を使用した場合、LA は 96 h で 100.8% となり酸化されなかった。3.3 で酸化開始剤に AAPH を使用した場合、96 h では DHA もほとんど酸化されなかったが、脂溶性の AIBN を使用すると、72 h までは酸化されなかったが 96 h では 85.6% まで減少してしまった。この結果は、酸化開始剤に AIBN を使用し、LLL を酸化させ 48 h 後に DDD を添加した過去の実験¹⁹⁾と同様の酸化挙動であった。この過去の実験も 96 h で DHA の減少が確認された。しかし、76 h では LA、DHA 共に酸化していないため、72 h までは抗酸化的にと言える。AAPH は水層に存在するため、界面に存在する MAG から攻撃を受けるが、AIBN は油層に存在するため、LA から酸化される。したがって、D-MAG が酸化を抑制したということは、DHA ペルオキシラジカルは LA ペルオキシラジカルともカップリングすることができ、その結果、酸化を抑制したと考えられた。

図 22 から E-MAG についても、72 h まで LA、EPA 共にほとんど酸化されなかったが、96 h では LA が 87.0%、EPA が 91.7% まで減少したため、D-MAG の結果と同様のことが言える。

図 23 から Ln-MAG については、酸化開始剤に AAPH を使用した時と同様に、LA、Ln 共に酸化されるという結果になった。

3.5 自動酸化試験

これまでは酸化開始剤を用いて実験を行ってきたが、実際の食品中の脂質は酸素に触れることで酸化される場合が多い。そこで 3.5 では酸化開始剤を加えずに酸化実験を行った。

【試料】

AAA 型 TAG

・ LLL

PUFA-MAG

・ E-MAG

・ D-MAG

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に TAG、MAG を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで撹拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで撹拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、40℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~21 日間酸化させた。試料の添加量は、LLL、各 MAG、トリデカン酸メチルをそれぞれ 10mM、5 mM、10 mM となるように調製した。なお MAG を加えず、TritonX-100 のみで乳化したものをコントロール群とした

酸化実験開始から 21 日間まで 7 日間ごとに 3 つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

D-MAG、E-MAG を用いて乳化させ、自動酸化試験を行った結果をそれぞれ図 24、25 に示す。図 24 から D-MAG を使用しない場合、LA は 7 日目で 2.4%まで急激に減少し、その後は徐々に減少した。一方で D-MAG を使用した場合、LA は 7 日目で 63.9%まで減少したが、使用しない場合と比較して明らかに減少速度が低下した。その後は継時的に減少していき 21 日目で 9.3%まで減少した。DHA については 7 日目で 28.3%まで減少し 21 日目では 0%となった。また、図 25 から E-MAG の場合も同様の傾向が見られ、E-MAG を使用した場合、LA は 7 日目で 88.7%、21 日目で 11.1%まで減少した。EPA については、7 日目で 64.2%、21 日目で 1.4%まで減少した。

この自動酸化試験は酸化開始剤を使用しないため、水層、油層に存在する酸素により酸化が引き起こる。酸化速度を減少させた理由は、LA が酸化されることによって生成した LA ペルオキシラジカルと DAH、EPA ペルオキシラジカルがカップリングして酸化速度を減少したのではないかと考えられた。AAPH や AIBN といったアゾ化合物を使った酸化実験より酸化防止能が劣ることが明らかとなった。したがって、DHA、EPA ペルオキシラジカルは LA ペルオキシラジカルよりアゾ化合物のほうがカップリングしやすいのではないかと示唆された。

3.6 高濃度における酸化安定性

O/W 型エマルションを形成している脂質濃度は低濃度から高濃度まで多岐にわたる。そこで、これまでの 10 倍、脂質濃度を高くして酸化実験を行った。

【試料】

AAA 型 TAG

・ LLL

PUFA-MAG

・ D-MAG

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

AAPH

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に LLL、MAG を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤である AAPH を加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~96 時間酸化させた。試料の添加量は、LLL、各 MAG、トリデカン酸メチル、AAPH をそれぞれ 100mM、50 mM、100 mM、1 mM となるように調製した。なお MAG を加えず、TritonX-100 のみで乳化したものをコントロール群とした

酸化実験開始から 96 時間まで 24 時間ごとに 3 つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

高濃度における各 FA の残存 FA 量を図 26 に示す。図 26 から D-MAG を使用しない時の LA は継時的に減少し、96 h で 66.1%まで減少した。D-MAG を使用した場合、LA は 96 h 経過してもほとんど酸化されなかったが、DHA が酸化され 70.8%まで減少した。

本実験で脂質濃度を 10 倍にしたが、乳化剤である D-MAG の濃度も 10 倍で行った。したがって、系内のミセルの数は増加するが、今までの実験と油層と乳化剤の比率、乳化剤の層の厚さ等は理論上同じである。それにもかかわらず、高濃度に行うと DHA が酸化されてしまい抗酸化的に働かなかった。これまでの実験で、不飽和度の高い FA が優先的に酸化されてしまうのは、油層内に共存する場合、あるいは 3.2 で行った実験で D-MAG がミセル表面を不均一に覆う場合であると考えてきた。高濃度にした場合、ミセルの数が増えるためミセル同士が結合しやすいと考えられた。したがって、ミセル同士が結合すると油層内部の LA、界面の D-MAG が一度混ざる。混ざった後、D-MAG の極性により界面に移動するが、表面を均一に覆わず、不均一になることが考えられた。不均一になっても乳化が安定である理由は、MAG だけでなく TritonX-100 も乳化剤として使用しているためだと考えられた。以上の理由により、D-MAG が不均一に表面に結合することによって、DHA が酸化されてしまい抗酸化的に働かなかったのではないかと考えられた。

3.7 2種類のAAA型TAGを混合させたときの酸化安定性

3.3ではD, E-MAGは1種類のAAA型TAGに対して抗酸化的に働くことが確認できた。しかし、実際の食品中の脂質は多種類のFAを含む。そこで、3.7では2種類のAAA型TAGを用いて酸化実験を行った。

【試料】

AAA型TAG

- ・ LLL
- ・ EEE
- ・ DDD

PUFA-MAG

- ・ E-MAG
- ・ D-MAG

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

AAPH

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に2種類のTAG(LLL+EEEあるいはLLL+DDD)、MAGを入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.5%TritonX-100 含有 0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤であるAAPHを加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL 容褐色バイアル瓶に1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25°Cに設定したウォーターバスで振とうさせながら0~96時間酸化させた。試料の添加量は、各TAG、MAG、トリデカン酸メチル、AAPHをそれぞれ5 mM、5 mM、10 mM、1 mMとなるように調製した。なおMAGを加えず、TritonX-100のみで乳化したものをコントロール群とした。

酸化実験開始から96時間まで24時間ごとに3つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FIDで残存FA量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

油層に LLL+EEE、乳化剤として D-MAG を使用した結果を図 27、油層に LLL+DDD、乳化剤として E-MAG を使用した結果を図 28 に示す。図 27 から D-MAG を使用しない場合、過去の実験と同様に不飽和度の高い EPA から酸化され 96 h で 34.4%、LA については 82.0%まで減少した。一方、D-MAG を使用した場合、LA の酸化安定性は高いが、EPA が酸化され 96 h で 80.8%となった。DHA も EPA と同様に継時的に酸化され、96 h で 75.0%まで減少した。図 28 から、E-MAG を使用した場合も D-MAG を使用した場合と同様の酸化挙動であった。

2 章で DHA と EPA が同一ミセル内に存在する場合、どちらも酸化されるという結果が得られた。今回の実験では、油層内部には DHA と EPA は一緒に存在しないが、どちらか一方が界面に存在する。この結果から、DHA、EPA のどちらか一方が界面に存在する場合も、どちらも酸化されること、また、2 種類の AAA 型 TAG に対して、D, E-MAG は抗酸化的に働かないことが示唆された。

3.8 乳化剤として SFE を用いた時の酸化安定性

これまで乳化剤として MAG を使用してきたが、乳化剤の種類によっても酸化安定性は異なることが知られている。そこで 3.8 では PUFA が結合した SFE を乳化剤として使用し、酸化実験を行った。

【試料】

AAA 型 TAG

- ・ LLL

PUFA-SFE

- ・ P-sucrose
- ・ E-sucrose
- ・ D-sucrose

トリデカン酸メチルエステル

(東京化成工業(株))

0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4)

AAPH

(和光純薬工業(株))

【方法】

100 mL 容バイアル瓶に LLL、SFE を入れ、さらに内部標準としてトリデカン酸メチルエステルを加えて、これらがよく混ざるようにクロロホルムに溶かし、スターラーで攪拌させながら乾固させた。その後、0.05M リン酸緩衝液を加えて、スターラーで攪拌して予備乳化を行い、超音波ホモジナイザーで乳化させた。乳化した試料に酸化開始剤である AAPH を加えて攪拌して完全に溶かした後に、4 mL 容褐色バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。バイアル瓶の蓋を閉め、25℃に設定したウォーターバスで振とうさせながら 0~96 時間酸化させた。試料の添加量は、LLL、SFE、トリデカン酸メチル、AAPH をそれぞれ 10 mM、5 mM、10 mM、1 mM となるように調製した。なお、P-sucrose で乳化させたものをコントロール群とした。

酸化実験開始から 96 時間まで 24 時間ごとに 3 つの試料をとり、サンプルの油相のみを抽出した後に、三フッ化ホウ素メタノール法にて誘導体化を行い、GC-FID で残存 FA 量(%)の変化を観察した。

【結果・考察】

D-sucrose、E-sucrose を乳化剤として使用した時の結果をそれぞれ図 29、30 に示す。図 29 から P-sucrose を使用した場合、LA は継時的に減少し 96 h で 72.4% まで減少した。一方で、D-sucrose を使用した場合、96 h で LA は 90.0%、DHA は 89.2% まで減少した。図 30 から E-sucrose を使用した場合も同様の結果になった。

これまでの実験では乳化剤として TritonX-100 をコントロールとしてきたが、今回は P-sucrose をコントロールした。LA の減少量から、TritonX-100 より P-sucrose のほうが酸化防止能はあると考えられた。P-sucrose は飽和脂肪酸であるため、これまで考えてきたペルオキシラジカルとのカップリングによる酸化防止能ではなく、物理的に油層内部を酸化から守ったのではないかと考えられた。しかし、TritonX-100 と比較した場合の話で十分な酸化防止能とは言えない。一方、D, E-sucrose についてだが、P-sucrose を使用した場合の LA と比較すると LA の減少率は少ないが、減少していることは確かである。また DHA、EPA についても減少が確認された。D, E-MAG と比較すると D, E-sucrose は抗酸化的に働かなかったことが示唆された。

D, E-sucrose が抗酸化的に働かなかった理由は、SFE の極性が考えられる。乳化剤の極性は親水性疎水性バランス(HLB)で表すことができ、値が高いほど親水性が大きいとされている。MAG と SFE(モノエステル)の HLB はそれぞれ約 4、約 16 とされている³¹⁾³²⁾。したがって、SFE はかなり親水性が大きい。MAG に DHA、EPA が結合している場合、酸化されペルオキシラジカルとなった時、MAG は水酸基を二つしか持たないため、極性的にペルオキシラジカルは水層に移動し、AAPH とカップリングすることができる。しかし、SFE に結合した DHA、EPA ペルオキシラジカルは、スクロース部位が水酸基を多数持つため極性的に移動しにくく、AAPH とカップリングできず酸化を抑制することができなかったのではないかと考えられた(図 31)。

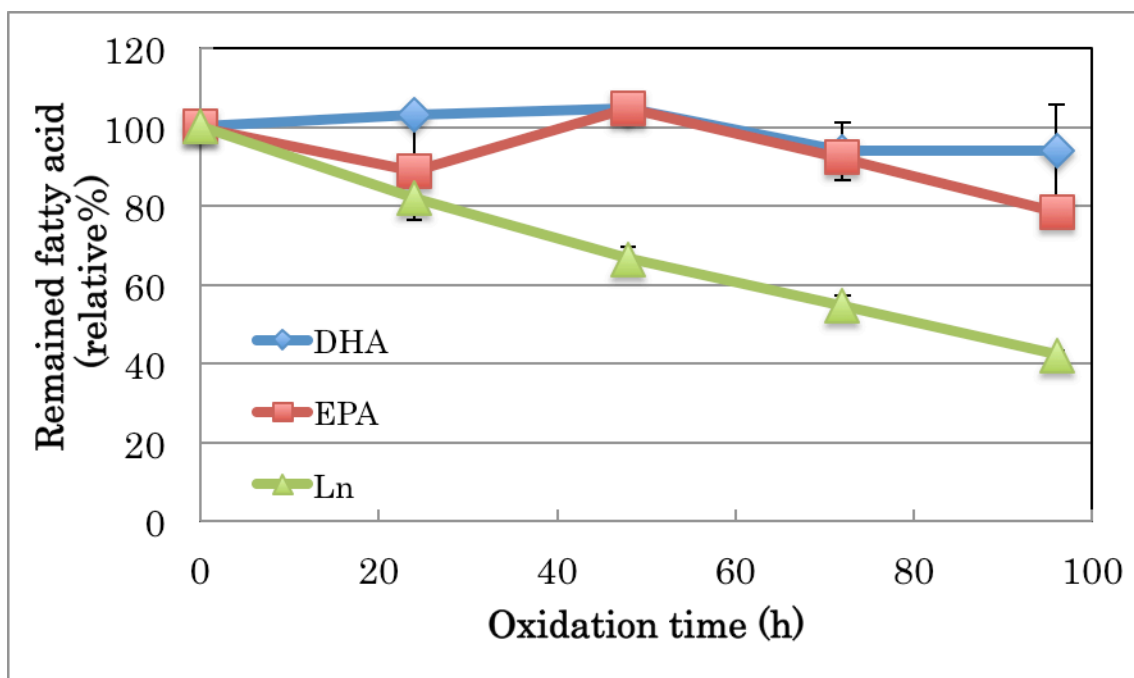


図 15 MAG のみを乳化させ、酸化させた時の残存 FA 量の継時変化

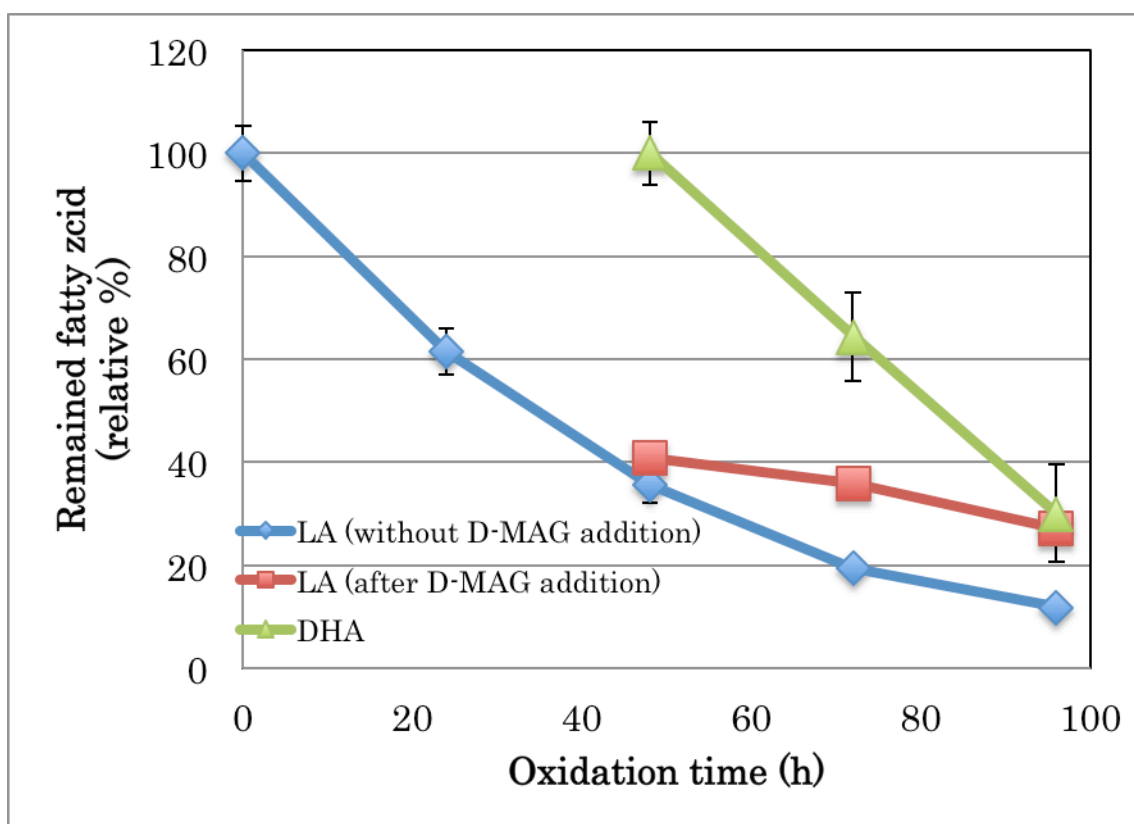


図 16 LLL を酸化させ、48 h 後に D-MAG を添加した時の残存 FA 量の継時変化

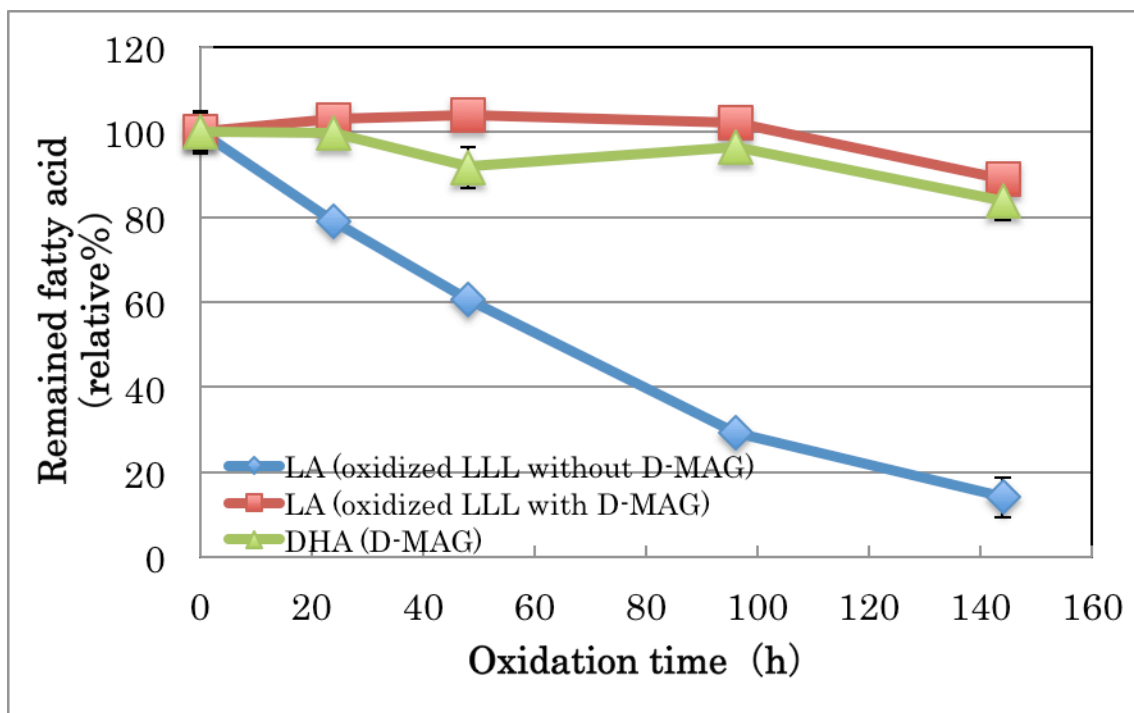


図 17 D-MAG を乳化剤として使用した時の残存 FA 量の継時変化(AAPH)

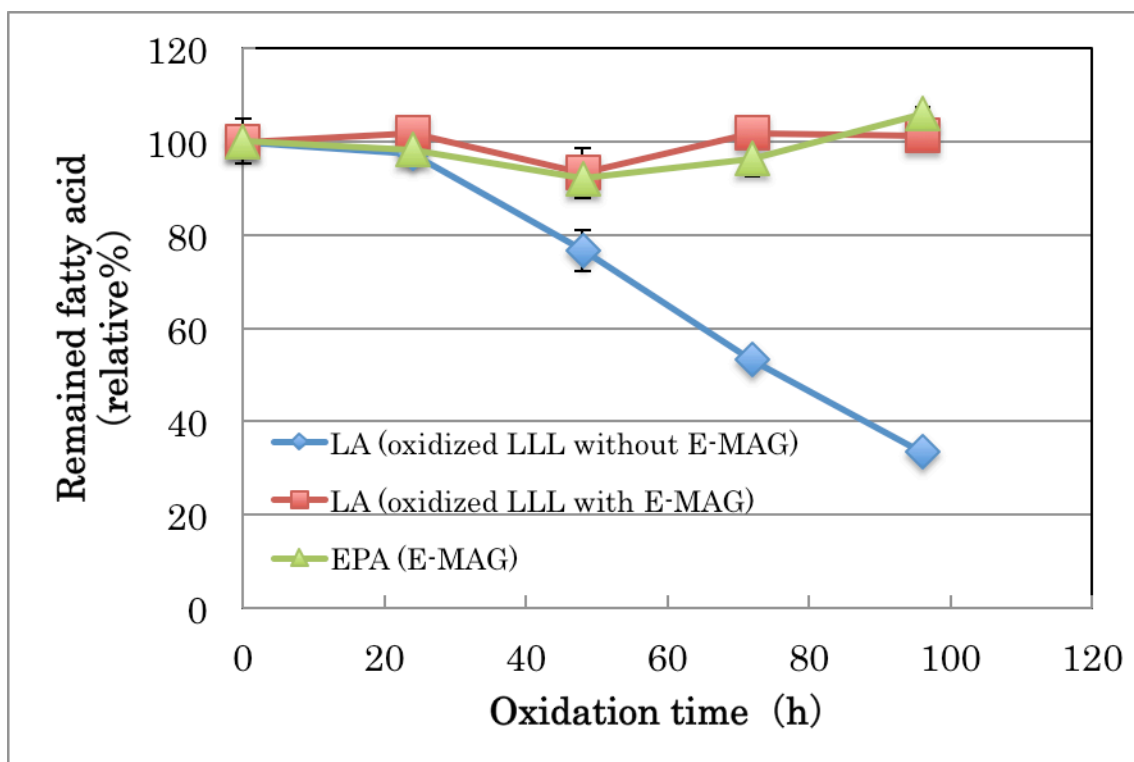


図 18 E-MAG を乳化剤として使用した時の残存 FA 量の継時変化(AAPH)

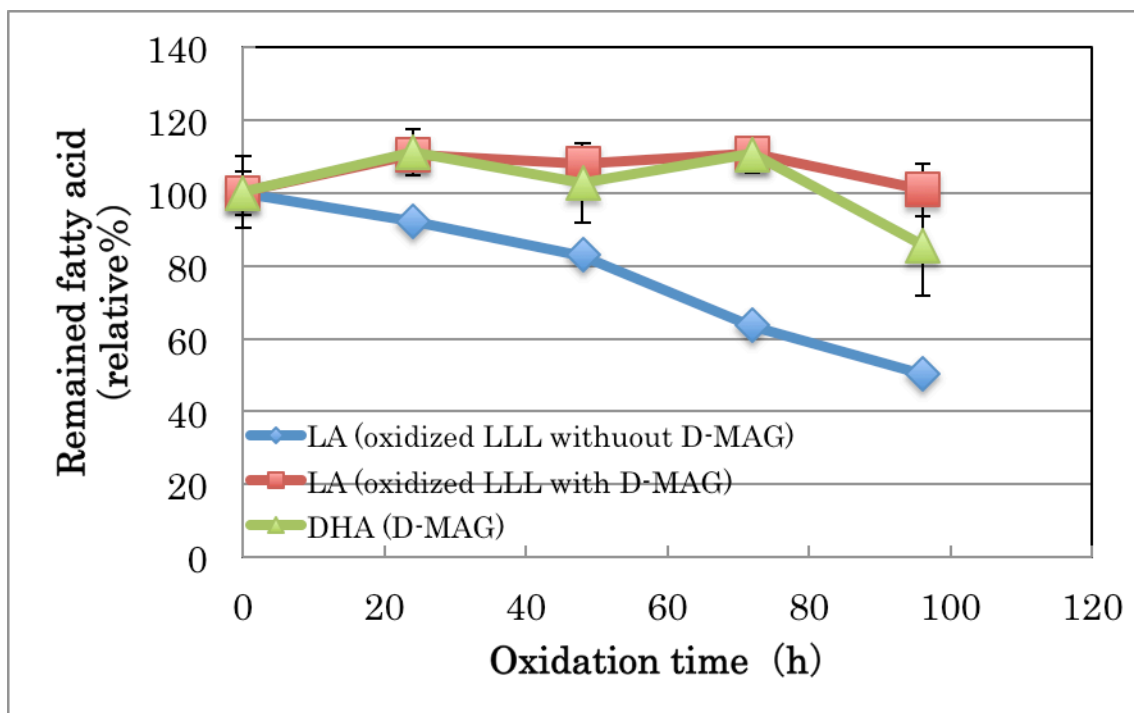


図 21 D-MAG を乳化剤として使用した時の残存 FA 量の継時変化(AIBN)

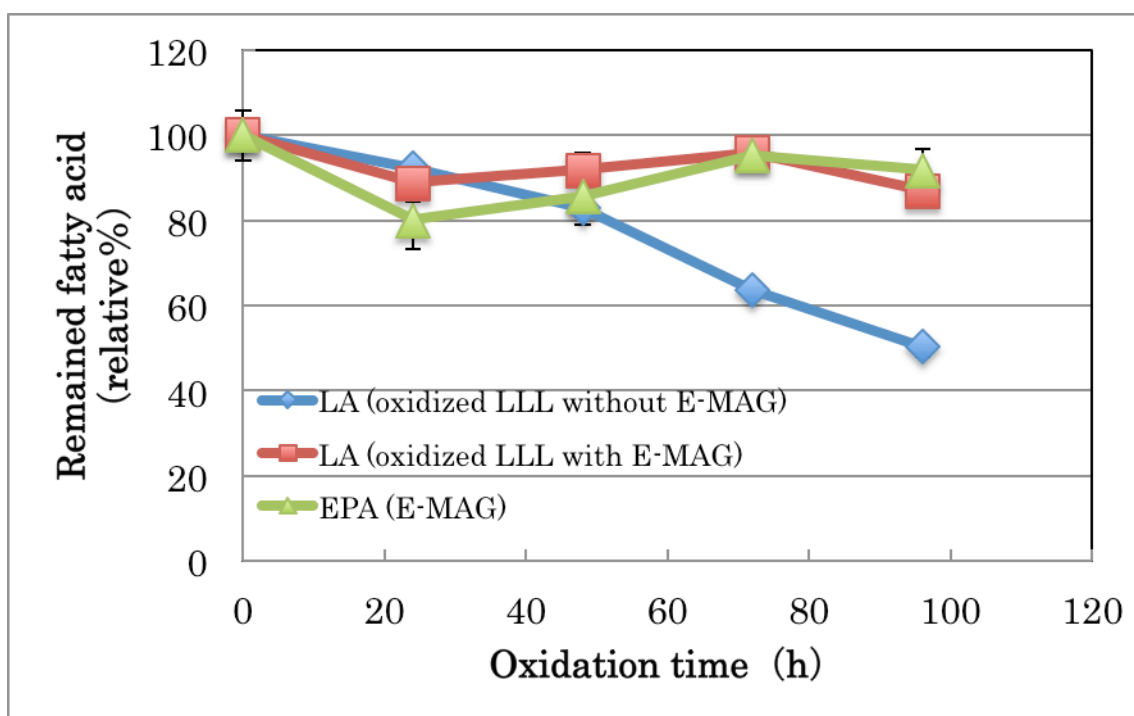


図 22 E-MAG を乳化剤として使用した時の残存 FA 量の継時変化(AIBN)

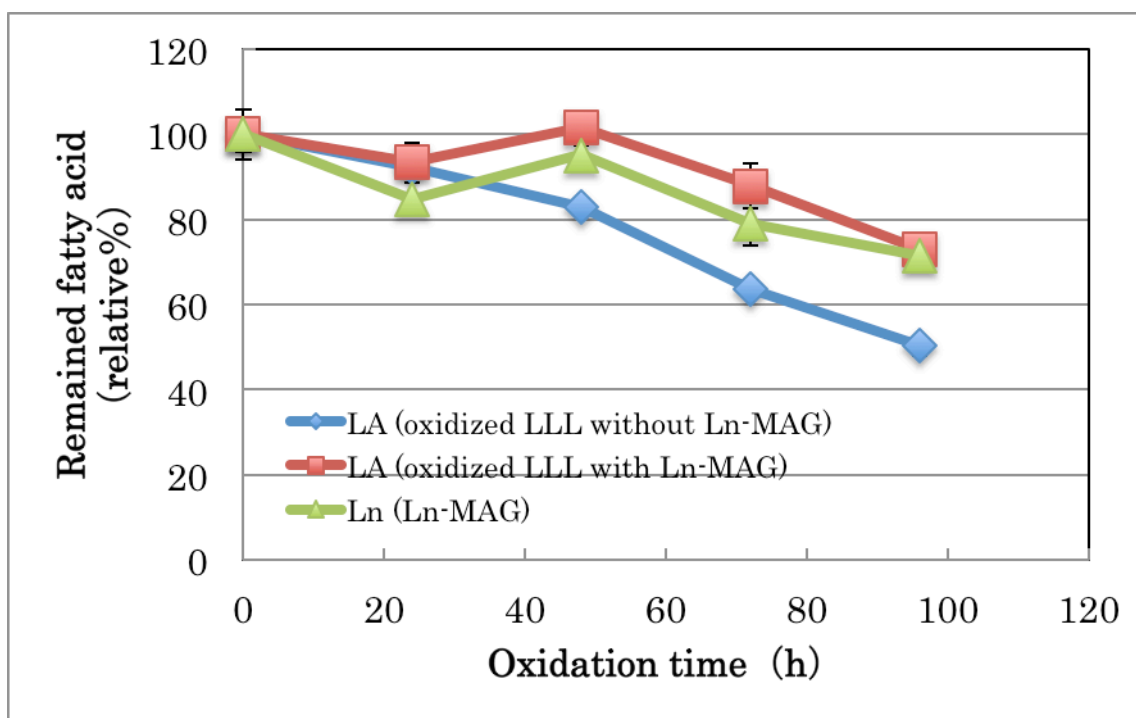


図 23 Ln-MAG を乳化剤として使用した時の残存 FA 量の継時変化(AIBN)

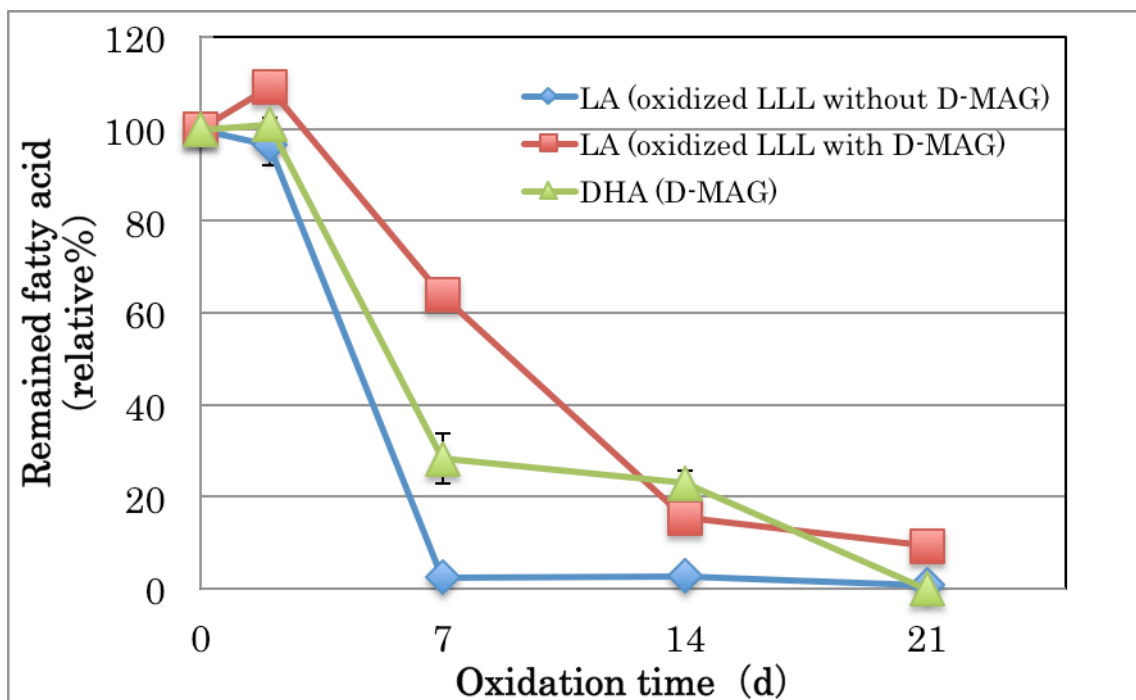


図 24 D-MAG を乳化剤として使用し、自動酸化させた時の残存 FA 量の継時変化

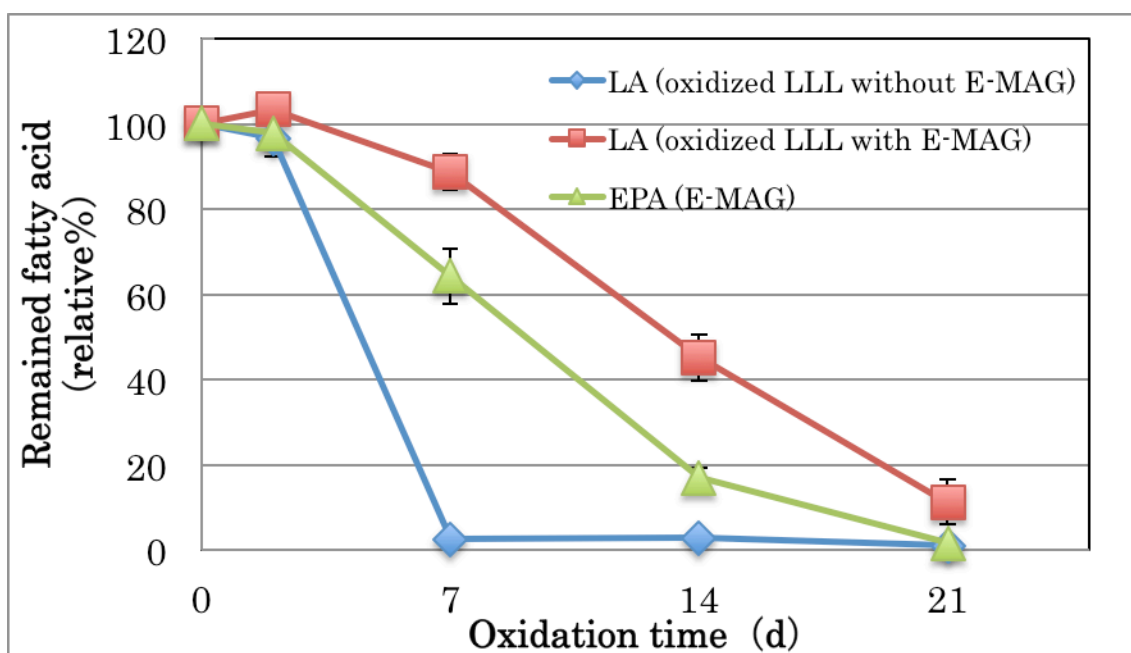


図 25 E-MAG を乳化剤として使用し、自動酸化させた時の残存 FA 量の継時変化

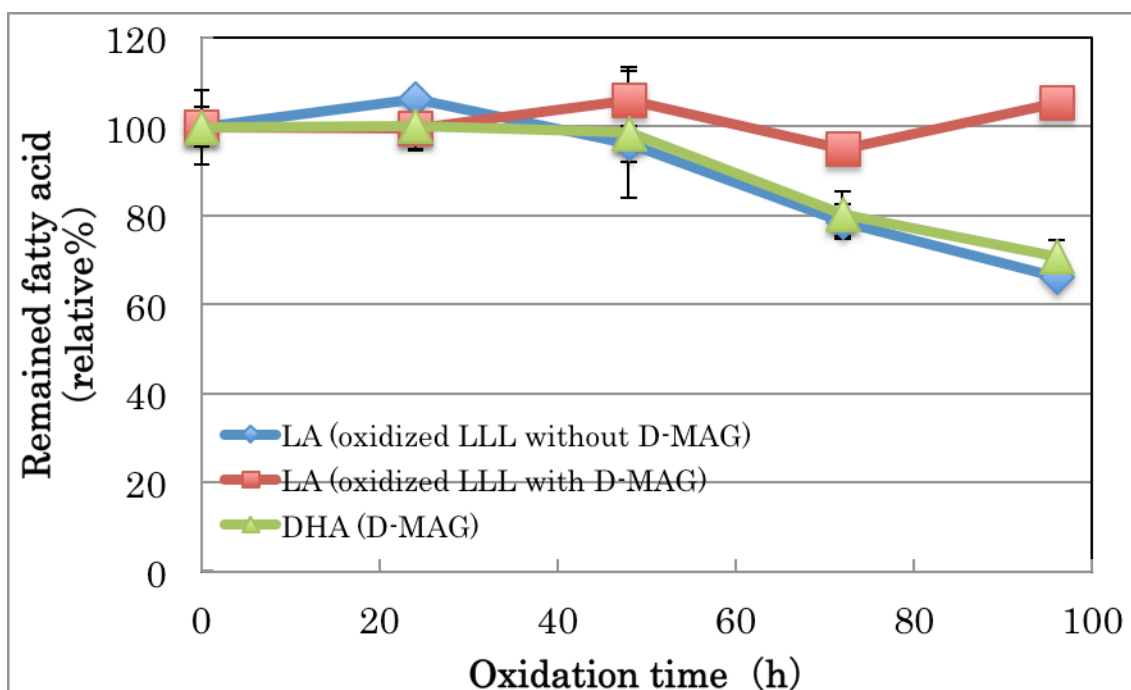


図 26 高濃度にした時の残存 FA 量の継時変化(AAPH)

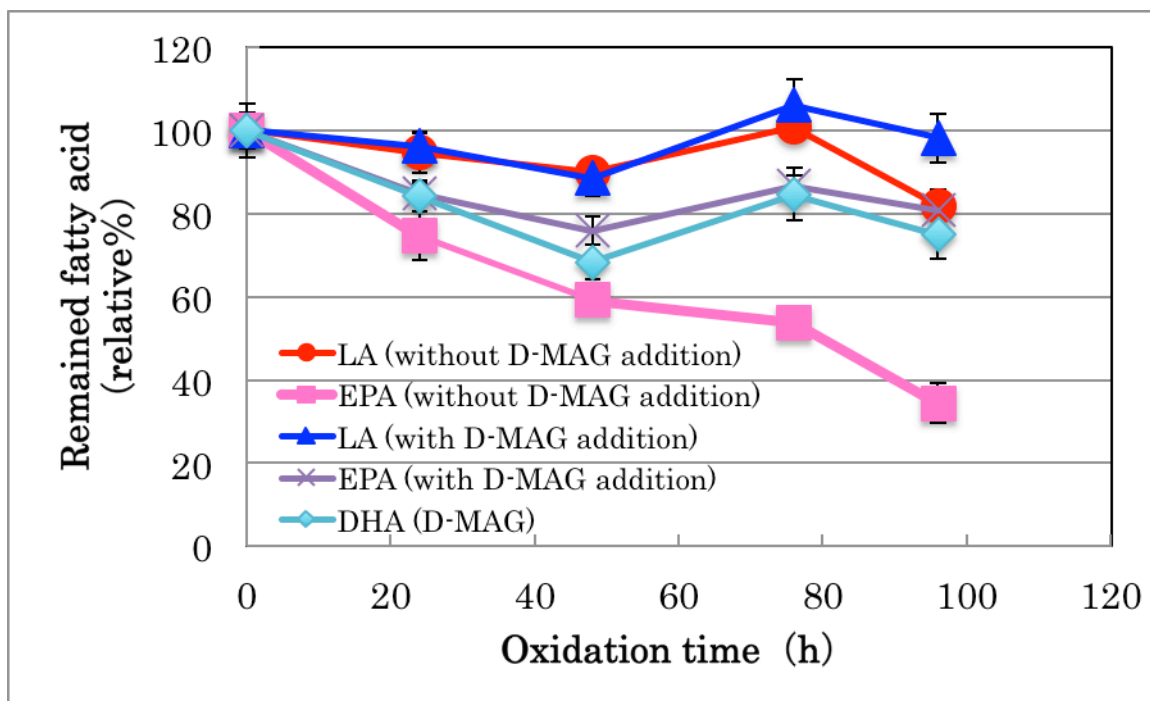


図 27 油層に LLL+EEE、乳化剤に D-MAG を使用し、酸化させた時の残存 FA 量の継時変化

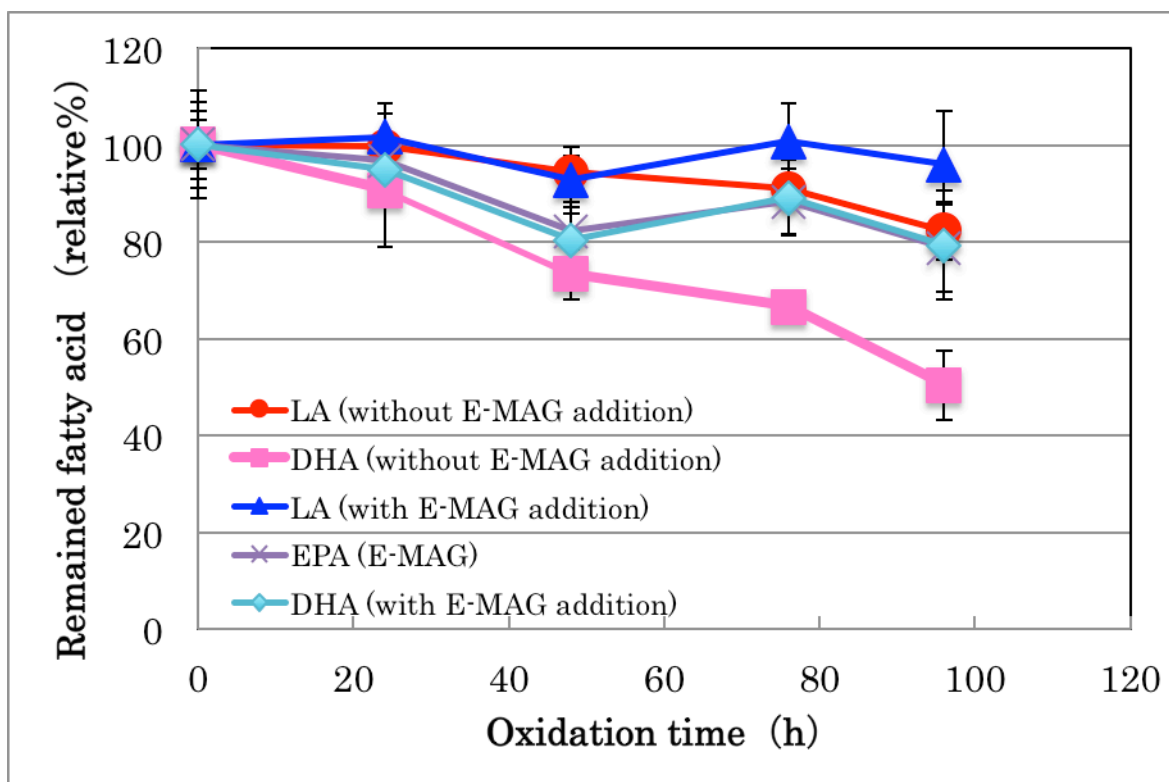


図 28 油層に LLL+DDD、乳化剤に E-MAG を使用し、酸化させた時の残存 FA 量の継時変化

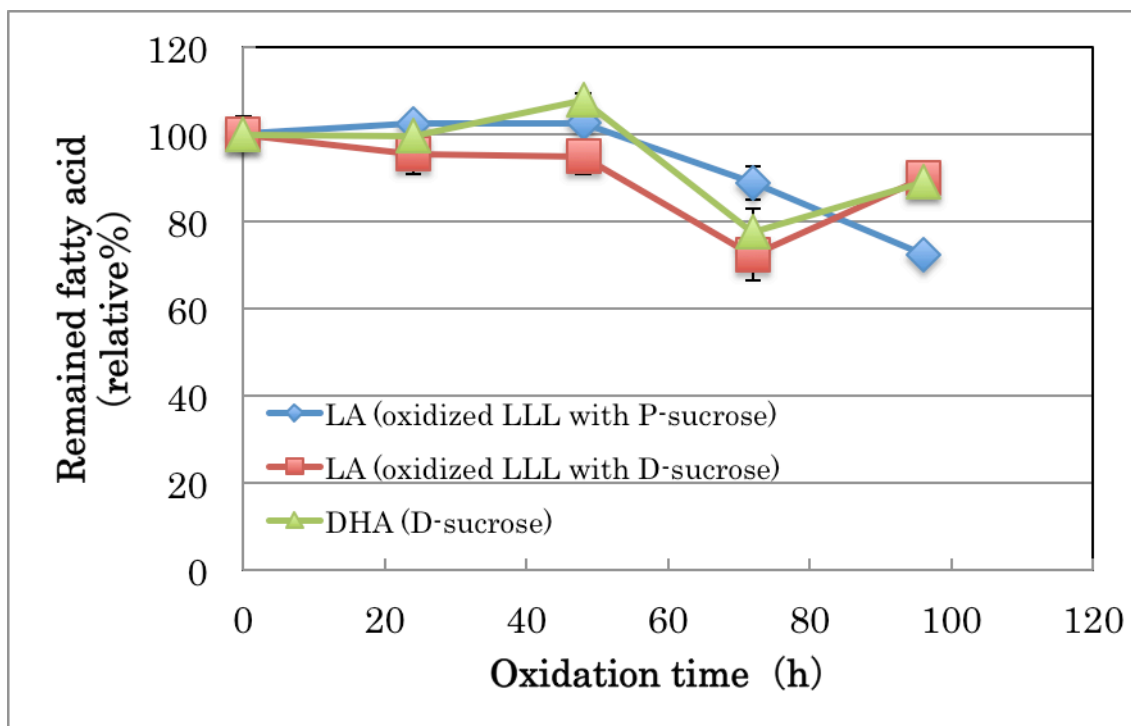


図 29 D-sucrose を乳化剤として使用した時の、残存 FA 量の継時変化

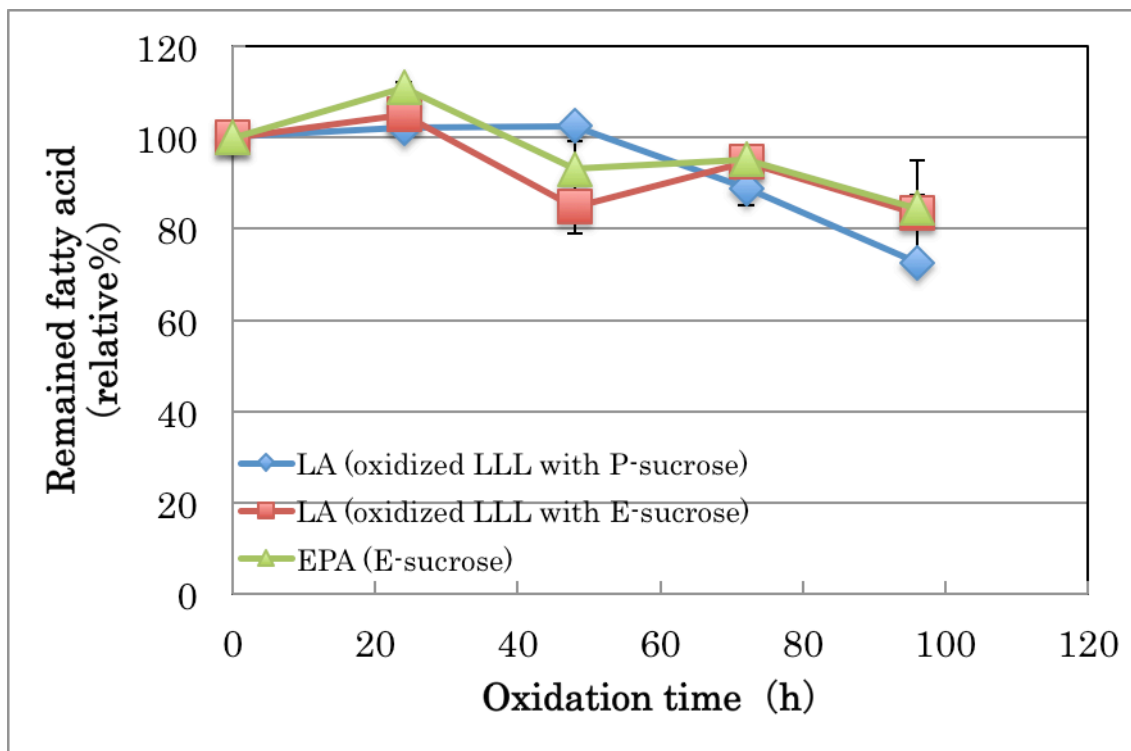


図 30 E-sucrose を乳化剤として使用した時の、残存 FA 量の継時変化

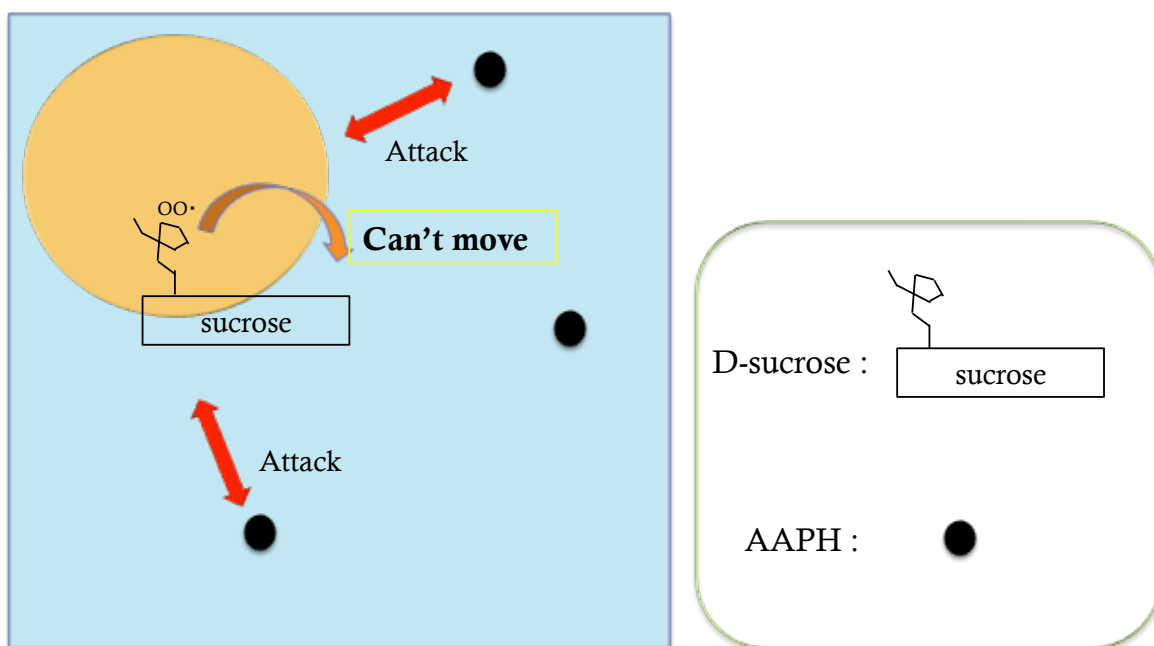


図 31 エマルション系における SFE の挙動

総括

第1章では、FAの精製と酸化実験に用いる試料TAG、MAG、SFEの大量合成法について検討した。精製ではHPLCにて分取を行い、FAの純度を95%まで高めることができた。TAG、SFE合成ではDMAP、EDCを使用し酸化実験に必要な量の構造既知TAG、SFEを合成することができた。MAG合成では2段階の反応を行い、まずDMAP、EDCを用いてソルケタールとFAをエステル化し、その後*p*-トルエンスルホン酸を用いて脱保護を行った。その結果、MAG合成においても酸化実験に必要な量の構造既知MAGを合成することができた。

第2章では、合成した試料TAGを用いた酸化実験を行った。同一ミセル内にLLLとEEEを含むエマルジョンに、DDDを添加すると顕著な酸化抑制が見られ、これよりDDDは2種類のTAGを同一ミセル内に存在するエマルジョンに対し抗酸化的に働くことが示唆された。DHAのようなPUFAが抗酸化的に働くことは、これまでに幾つかの仮説が言われてきた。DHAが酸化され、DHAペルオキシラジカルとなった際、極性が高くなり界面付近に移動し、その結果内部の脂質を酸化から守るといったことなどが挙げられる。しかし、48 h後にDDDを添加したということは、同一ミセル内にDHAが存在しないためこの仮説は成り立たない。したがって、DDDが水層中のラジカル、すなわちAAPHとカップリングすることによってLLLとEEEを含むミセルを酸化から守ったのではないかと考えられた(図14)。

同一ミセル内にLLLとDDDを含むエマルジョンに対してEEEは抗酸化的に働かなかった。また、これまでの研究では、不飽和度の異なるFAを含むTAGは不飽和度の高いTAGから酸化されるということが報告されていたが、同一ミセル内にDDDとEEEのように不飽和度が1つしか異なる場合DDDとEEEは同じように酸化していく結果が得られた。したがって、EEEが抗酸化的に働かなかった理由として、LLLとDDDを含むミセルとEEEミセルが結合してしまったため、DHAとEPAが酸化してしまったことが考えられた。

第3章では、合成したMAG、SFEを用いた酸化実験を行った。まず、MAGを乳化させMAGの形態でもPUFAは酸化安定性が高いかどうか調査した結果、TAGと同様にD,E-MAGは高い酸化安定性を有することが判明した。しかし、Ln-MAGの酸化安定性は高くなかった。次にLLLを酸化させ48 h後にD-MAGを添加した実験では抗酸化的に働かなかった。この理由としてD-MAGは乳化剤であるため、LLLのミセル表面に不均一に結合してしまったためだと考えられた。D, E, Ln-MAGを乳化剤として使用し酸化実験を行うと、D, E-MAGは抗酸化的に働くことが示唆された。これは、D, E-MAGは界面に存在するためLLLより早く酸化

が始まり、生成したペルオキシラジカルが水層に出ることで AAPH とカップリングし酸化を抑制したのではないかと考えられた(図 19)。

脂溶性の AIBN を用いた酸化実験でも同様なことが言え、AIBN とのカップリング、あるいは油層内部で酸化した LA ペルオキシラジカルとカップリングし酸化を抑制したのではないかと考えられた。

しかし、酸化開始剤を用いず自動酸化させた実験で、D, E-MAG を使用すると LA の酸化速度は減少するものの、酸化開始剤を用いた実験ほど顕著な酸化抑制は見られなかった。この結果から、DHA、EPA ペルオキシラジカルは LA ペルオキシラジカルより、AAPH、AIBN すなわちアゾ化合物とのカップリング速度のほうが早いことが示唆された。

また、高濃度にした場合や、2 種類の TAG を含むミセルに対して D, E-MAG はあまり抗酸化的に働かなかったことから、D, E-MAG は低濃度の場合、1 種類の TAG に対して抗酸化的に働くことが示唆された。

SFE を用いた実験では、抗酸化的に働かなかった。これは MAG と SFE の HLB の違いによるもので、SFE に結合した DHA、EPA ペルオキシラジカルは界面に移動しにくいと考えられた(図 31)。

以上の結果より、エマルション系における PUFA の脂質酸化は、水層と油層の界面で何らかの作用が働き、その結果 PUFA 自身の酸化安定性が高いこと、抗酸化的に働くことが示唆された。しかし、界面付近でラジカル同士がカップリングすることで酸化を抑制するといった説は未だ仮説であり、その詳細は不明である。今後、条件を変えて酸化実験を繰り返していく必要がある。

近年の健康志向により、PUFA は注目されているが酸化されやすい性質を持つため、酸化安定性に関する研究は多数行われている。このような背景のもと、本研究では構造既知の TAG、MAG、SFE を用い、FA の減少量を測定することによって PUFA の酸化特性を明らかにすることを目的に検討を行ってきた。

本研究により、エマルション系における PUFA の抗酸化作用は、界面での挙動によるものだということが明らかとなり、PUFA の酸化特性に関する新たな知見を得ることができた。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導頂きました東京海洋大学 海洋科学技術研究科 食機能保全科学専攻 食品保全化学研究室 後藤直宏准教授、別府史章助教に厚く御礼申し上げます。

本論文をご高覧およびご指導頂きました、東京海洋大学 嶋倉邦嘉助教、小山智之准教授に深く感謝申し上げます。

また、月島食品工業株式会社 溝部帆洋様、永井利治様、吉永和明様にはご指導及び技術、試料の提供をして頂き、深く感謝の意を表します。

最後に、お世話になりました諸先輩方ならびに同期生、後輩の皆様に深く感謝致します。今後研究室がますますのご発展を迎えることを心から祈念致します。

参考文献

- 1) 新谷勲, 食品油脂の科学, (株)幸書房 東京, P1-2 (1992).
- 2) 和田俊, 後藤直宏, 食品機能学 脂質, 丸善出版(株) 東京, (2004).
- 3) Arterburn L. M., Hall E. B., & Oken H., Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83,1467S–1476S (2006).
- 4) Dyerberg J., Bang H. O. & Hjerne N., Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 28, 958–966 (1975).
- 5) Ruxton C. H. S., Reed S. C., Simpson M. J. A. & Millington K. J., The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence, *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17, 449–459 (2004).
- 6) Chaityasit W., Elias R. J., McClements D. J. & Decker E. A., Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 299–317 (2007).
- 7) Osborn H. T. & Akoh C. C., Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions, *Food Chemistry*, 84, 451–456 (2004).
- 8) 油脂・脂質の応用・栄養・健康から工業まで-, (社)日本油化学会 東京, 132-134 (2009).
- 9) Williams G.M., Iatropoulos M.J. & Whysner J., Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1027-1038 (1999).

- 10) Hunt J.A. & Dalgleish D.G., Adsorption behavior of whey-protein isolate and caseinate in soya oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids*, 8, 175–187 (1994).
- 11) Sørensen A. D. M., Baron C. P., Let M. B., Brüggemann D. A., Pedersen L. R. L. & Jacobsen C., Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Oxidation linked to changes in protein composition at the oil-water interface, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1781–1789 (2007).
- 12) Hunt J. A., & Dalgleish D. G., Effect of pH on the stability and surface-composition of emulsions made with whey-protein isolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2131–2135 (1994).
- 13) McClements D. J., Food Emulsions – Principles, Practices, and Techniques, CRC Press, Boca Raton (2005).
- 14) Hu M., McClements D. J., Decker E. A., Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1435– 1439 (2003).
- 15) Mei L. Y., McClements D. J., Decker E. A., Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2267–2273 (1999).
- 16) Bruna E., Peti E., Beljean-Leymarie M., Huynh S. & Nouvel A., Specific susceptibility of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid to peroxidation in aqueous solution, *Lipids*, 24, 970-975 (1989).
- 17) Miyashita K., Tateda N. & Ota T., Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in aqueous solution, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57, 1638-1640 (1993).
- 18) Miyashita K., Hirano M., Nara E. & Ota T., Oxidative stability of triglycerides from orbital fat of tuna and soybean oil in an emulsion, *Fishers Science*, 61, 273-275 (1995).

- 19) Gotoh N., Noguchi Y., Ishihara A., Ymaguchi K., Mizobe H., Nagai T., Otake I., Ichioka K. & Wada S., Highly Unsaturated Fatty Acid might Act as an Antioxidant in Emulsion System Oxidized by Azo compound, *Journal of Oleo Science*, 59, 631-639 (2010).
- 20) Hatati I. N., Man Y. B. C. & Tan C. Pin., Monitoring peroxide value in oxidized emulsions by Fourier transform infrared spectroscopy, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 886–895 (2005).
- 21) Nielsen N. S., Horn A. F. & Jacobsen C., Effect of Emulsifier type, pH and iron on oxidative stability of 5% fish oil-in-water emulsions, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 874-889 (2013).
- 22) Van R. R., Anteunis M. J. O., Bruyn A. D., *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 51, 789 (1986).
- 23) John McMurry, Eric Simanek, マクマリー 有機化学概説 第6版, (株)東京化学同人 東京, p446-447 (2007).
- 24) Fischer F., Happe M., Emery J., Fornage A. & Schutz R., Enzymatic synthesis of 6- and 6'-O-linoleyl- α -D-maltose: From solvent-free to binary ionic liquid reaction media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 98-106 (2013).
- 25) 宮下和夫, 脂質の酸化抑制と乳化, 「機能性脂質の新展開」, (株)シーエムシー 東京, 215-223 (2001).
- 26) 宮下和夫, 水系での不飽和脂質の酸化安定性に関する研究, オレオサイエンス, 6, 585-591 (2006).
- 27) Mosca M., Cuomo F., Lopez F. & Ceglie A., Role of emulsifier layer, antioxidants and radical initiators in the oxidation of olive oil-in-water emulsions, *Food Research International*, 50, 377-383 (2013).
- 28) Yazu K., Yamamoto Y., Ukegawa K. & Etsuo N., Mechanism of lower oxidizability of eicosapentaenoate than linoleate in aqueous micelles, *Lipids*, 31,

337-340 (1996).

29) Osborn H. T. & Akoh C. C., Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions, *Food Chemistry*, 84, 451-456 (2004).

30) Ries D., Ye A., Haisman D. & Singh H., Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsion, *International Dairy Journal*, 20, 72-788 (2010).

31) 理研ビタミン株式会社ホームページ,
<http://www.rikenvitamin.jp/business/chemicals/product/004.html>, 最終アクセス2015年2月19日.

32) 三菱化学フーズ株式会社ホームページ,
http://www.mfc.co.jp/product/nyuuka/ryoto_syuga/list.html, 最終アクセス2015年2月19日.