

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011

課題番号：23658170

研究課題名（和文）海藻製品中の H U F A はなぜ酸化されにくいのか？

研究課題名（英文）Why are highly unsaturated fatty acids in seaweed products oxidatively stable?

研究代表者

宮下和夫 (MIYASHITA KAZUO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：10182015

研究成果の概要（和文）：

褐藻には酸化されやすい高度不飽和脂肪酸(HUFA)が多く(40~60%)含まれているにもかかわらず、乾燥褐藻を長期間保存してもこれらのHUFAは酸化されないことを明らかにした。そこで、褐藻から各種脂質をクラス別に分離し、酸化促進物質や抗酸化物質を除去した後、その酸化安定性について詳細な検討を行った。その結果、糖脂質中のHUFAのみが極めて酸化されにくいことを見出した。この理由として糖脂質分子を構成する糖鎖の影響が推定できた。

研究成果の概要（英文）：

Although brown seaweeds contained high level (40-60%) of highly unsaturated fatty acids (HUFA), HUFA in dried brown seaweeds were stable during long term preservation. To make clear the characteristic oxidative stability of brown seaweed lipids, each class was separated from the seaweed lipids and removed antioxidants and prooxidants from the lipid, and then, analyzed the oxidative stability of each lipid class. The results clearly indicated that HUFA in glycolipids very stable as compared in other lipid classes. The higher oxidative stability of HUFA in glycolipids will be due to the effect of galactosyl and sulphoquinovosyl moieties of glycolipids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：食品、脂質、DHA、酸化、抗酸化

1. 研究開始当初の背景

生体の機能維持に重要な役割を担うドコサヘキサエン酸(22:6n-3;DHA)やエイコサペンタエン酸(20:5n-3;EPA)などの多価不飽和脂肪酸(HUFA)は、分子内に二重結合(不飽和結合)を多数有するため、化学構造的に極めて酸化されやすい。これらのHUFAは水産物、特に魚油に多く含まれるため、魚油は非常に酸化劣化を受けやすい。一方、海藻脂質中のHUFA含量は魚油よりも高いが、これらの海藻製品が保存中容易に酸化劣化を起こしているようには見受けられない。本研究ではこうした海藻脂質中のHUFAの酸化安定性の特徴について検討する。

2. 研究の目的

褐藻には脂質が3~8%含まれている。褐藻脂質中には、 α -リノレン酸(18:3n-3)、ステアリドン酸(18:4n-3)、EPA(20:5n-3)、アラキドン酸(20:4n-6)といった機能性に優れたHUFAが多く(40~60%)含まれている。これらのHUFAは分子構造的に酸素との反応性が高く、保存中などに容易に酸化されやすいと考えられている。しかし、褐藻類を乾燥状態あるいは塩蔵状態で長く保存しても、臭いの劣化など、脂質過酸化によって引き起こされる変化はあまり観察されない。本研究ではこの謎を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ワカメ及びアカモク中の HUFA の酸化安定性:

- ▶ 各種海藻試料の調製: 褐藻 (ワカメ、コンブ、アカモク) を採取後、これらを塩蔵または乾燥した。
- ▶ 試料の保存実験: 乾燥ワカメ並びに塩蔵アカモク、温風乾燥アカモク、凍結乾燥アカモクを 40°C 暗所で一定期間インキュベートした。
- ▶ 分析試料の調製: インキュベートした各試料から、有機溶媒を用いて脂質を抽出した。
- ▶ 酸化安定性の検討: 抽出した脂質中の酸化に伴う HUFA の減少をガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。また、脂質過酸化物質とトコフェロールなどの各種抗酸化物質の定量には HPLC を用いた。

(2) 褐藻保存中の各脂質クラス中の HUFA の酸化安定性:

- ▶ 上記 (1) でインキュベートした各褐藻から得た脂質を薄層クロマトグラフィー (TLC) により、トリアシルグリセロール (TAG)、リン脂質、糖脂質へと分別した。
- ▶ 得られた各脂質中の HUFA の組成比を GC で分析した。

(3) 海藻糖脂質中の HUFA の酸化安定性:

- ▶ 糖脂質の調製: 乾燥コンブ粉末及び乾燥ワカメ粉末からアセトンにより脂質を抽出した。ついで、活性炭-セライトカラムクロマトグラフィーにより脂質中の抗酸化物質 (カロテノイド、トコフェロールなど) と酸化促進物質 (クロロフィルなど) を除去した。また、TLC により褐藻糖脂質をさらにモノアシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジアシルジアシルグリセロール (DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) へと分画した。
- ▶ 比較に用いるその他の脂質: 褐藻糖脂質と同様の不飽和度とできるだけ近い脂肪酸組成を有する他の脂質クラスとして、リン脂質 (ホスファチジルコリン (PC)) をサケ卵脂質から、また、TAG をイワシ油から得た。その他、比較的酸化されにくい脂質として大豆油 TAG を用いた。いずれの脂質も活性炭-セライトカラムクロマトグラフィーにより抗酸化物質を除去後、TAG はケイ酸カラムクロマトグラフィーで、また、PC は TLC によりさらに精製し、過酸化物質などを完全に除去した。それぞれの酸

化安定性を褐藻糖脂質のそれと比較した。

- ▶ 酸化安定性の測定 (酸素吸収量測定): 一定量の試料をふたつきバイアル瓶にとり、恒温器中でインキュベートした。経時的にバイアル瓶上部の空気を採取し、TCD 検出器を備えた GC により、空気中の酸素と窒素の比率を計算し、酸化により脂質に吸収された酸素量を算出した。また、脂質ヒドロペルオキシドを HPLC により定量した。さらに、インキュベート中の HUFA 含量の変化についても GC を用いて分析した。

(4) 各脂質中の抗酸化物質と酸化物質の分析:

- ▶ 分光光度計や HPLC 分析により、抗酸化物質 (トコフェロール、カロテノイドなど)、酸化促進物質 (クロロフィルなど)、脂質過酸化物質の含まれていないことを確認した。

4. 研究成果

(1) ワカメ及びアカモク中の HUFA の酸化安定性:

乾燥ワカメを 40°C 暗所で 210 日間保存し、一定期間毎に乾燥ワカメ中の脂質を抽出して脂肪酸組成を分析した。一般的にワカメ脂質中に含まれる α -リノレン酸 (18:3n-3, LNA)、ステアリドン酸 (18:4n-3, SDA)、アラキドン酸 (20:4n-6, AA)、エイコサペンタエン酸 (20:5n-3, EPA) は極めて酸化されやすく、40°C 暗所でこれら脂肪酸を含む魚油などを放置すると、1 日以内にこれらの脂肪酸は酸化され減少する。しかし、図 1 に示したように、乾燥ワカメ中では酸化によるこれら HUFA の減少は見られなかった。また、脂質ヒドロペルオキシド (過酸化物質) の変化は保存期間中見られず低い値を維持した。

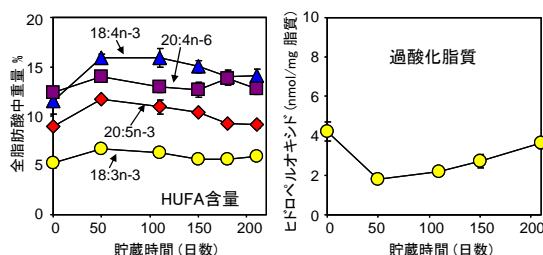


図1 乾燥ワカメ貯蔵中のHUFAと過酸化脂質の変化

同様の結果は塩蔵アカモク、温風乾燥アカモク、凍結乾燥アカモクの保存実験でも得られた (図 2)。いずれのアカモクでも、保存中の HUFA の減少はまったくなかった。また、脂質ヒドロペルオキシドの上昇も見られなかった (図 2)。さらに、抗酸化物質のトコフェロール (図 2) の変化もなかった。一般にアカモクなどの褐藻類にはフロロタンニ

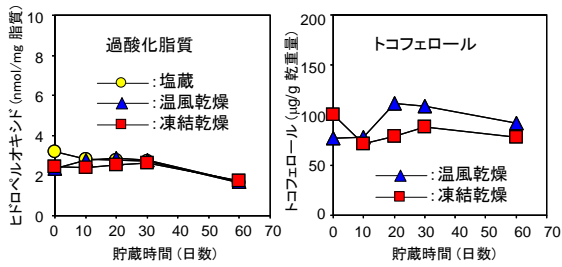


図2 アカモク製品貯蔵中の過酸化脂質とトコフェロール含量の変化

ンなどのポリフェノールが存在し、これにより脂質酸化が抑制されていることが知られている。そこで、これらポリフェノール含量についても分析したが、ポリフェノールの減少やラジカル補足能の減少など、ポリフェノールの抗酸化作用を示す結果は得られなかった。したがって、乾燥ワカメ中での HUFA の高い安定性は、共存する抗酸化物質の影響だけで説明できないことが示された。

(2) 褐藻保存中の各脂質クラス中の HUFA の酸化安定性：

褐藻脂質を構成する脂質クラスを分析したところ、褐藻の主要脂質は糖脂質で、ついで、リン脂質、中性脂質 (TAG) の順に多いことが確認できた。そこで、褐藻保存中で、褐藻脂質中の HUFA がなぜ高い酸化安定性を示すのかを明らかにするため、各脂質クラス中の HUFA の含量変化について解析したところ、糖脂質中の HUFA はまったく変化しないが、リン脂質と TAG 中の HUFA は減少することが分かった。これらの結果から、褐藻脂質中 HUFA の高い酸化安定性は、これらの HUFA が糖脂質として存在することに起因していることが予想された。そこで、次に、褐藻糖脂質の酸化安定性をその他の脂質クラス (リン脂質と TAG) と比較した。

(3) 海藻糖脂質中の HUFA の酸化安定性：

脂質の酸化安定性は、分子中に含まれる脂肪酸の二重結合 2 個には含まれたメチレン基の数 (ビスアリル位数) に比例して低下する。表 1 に実験で用いた脂質 1 分子中のビスアリル位数を示したが、表から推測すると、大豆油 TAG の酸化安定性は他の脂質と比較して高いが、その他の水産脂質は酸化されやすいことが分かる。実際、イワシ TAG や魚卵 PC では、高いビスアリル位数を示したため、極めて酸化されやすかった (図 3)。一方、比較的低いビスアリル位数を示した大豆 TAG の酸化安定性は非常に高かった。このように TAG や PC では、その脂質に結合する脂肪酸の不飽和度、すなわちビスアリル位数によって酸化安定性が左右された。一方、ワカメやコンブ由来の褐藻糖脂質の場合には、SDA (18:4n-3) や EPA (20:5n-3) といった HUFA を多く含み、ビスアリル位数が高かったにも関わらず、魚卵

PC やイワシ TAG よりも高い酸化安定性を示すことがわかった。特にマコンブ糖脂質は大豆 TAG とほぼ同等の高い酸化安定性を示した。(図 3)

表 1 実験に用いた各脂質の 1 分子あたりのビスアリル位数

大豆油 TAG	イワシ油 TAG	サケ卵 PC	ワカメ糖脂質	コンブ糖脂質
0.55	1.71	2.11	2.91	1.60

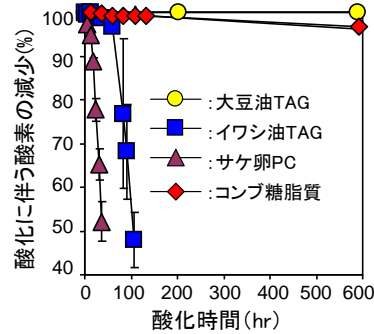


図 3 各種脂質の酸化安定性

このように GL の場合は、PUFA が多く含まれているにも関わらず一般的に酸化安定性が高い結果となった。この結果は、一定時間 (593 時間) インキュベート後の各脂質中の脂肪酸組成分析の結果からも確認された (表 2)。イワシ油 TAG とサケ卵油 PC では 593 時間インキュベートすると、酸化されやすい EPA や DHA (22:6n-3) の顕著な増大が見られた。しかし、大豆油の主な構成 HUFA であるリノール酸 (18:2n-6) にはほとんど変化が見られなかった。一方、コンブ糖脂質には酸化されやすい SDA (18:4n-3)、AA (20:4n-6)、EPA (20:5n-3) が含まれているにもかかわらず 593 時間インキュベートしてもこれらの HUFA に変化は見られなかった。

表 2 593 時間インキュベート後の各脂質中の脂肪酸組成の変化

脂肪酸	大豆油 TAG		イワシ油 TAG		サケ卵 PC		コンブ糖脂質	
	酸化前	酸化後	酸化前	酸化後	酸化前	酸化後	酸化前	酸化後
16:0	11.3	11.9	8.4	11.0	16.7	24.1	12.1	12.6
18:2n-6	46.2	49.5	1.5	1.6	2.0	2.4	7.8	7.8
18:3n-3	3.2	3.2	0.7	0.7	-	-	2.9	2.9
18:3n-6	-	-	-	-	-	-	8.1	7.8
18:4n-3	-	-	2.0	2.3	0.1	0.1	18.0	17.3
20:4n-6	-	-	1.6	1.3	1.9	1.5	7.8	7.7
20:5n-3	-	-	19.5	13.1	10.3	7.5	12.8	12.5
22:5n-3	-	-	2.4	1.6	4.7	3.4	-	-
22:6n-3	-	-	12.3	6.7	29.4	17.2	-	-

糖脂質は、MGDG、DGDG、SQDG の 3 種から構成されている。コンブ糖脂質からこれらの糖脂質を分画し、その酸化安定性を比較したところ、3 種とも高い酸化安定性を示し、特に、SQDG の安定性の高いことが明らかになった (図 4)。

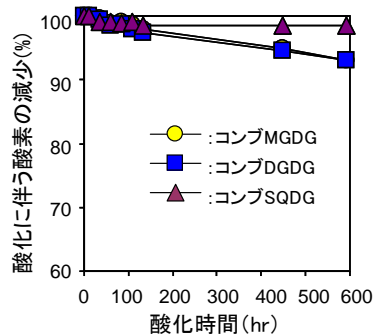


図4 各種糖脂質の酸化安定性

以上のように、褐藻から得られた糖脂質は、SDA(18:4n-3)や EPA(20:5n-3)といった HUFA を多く含んでいるにも関わらず、高い酸化安定性を示すことがわかった。本研究では、各種クロマトグラフィーによりあらかじめ基質を精製することにより、カロテノイド、トコフェロールなどの抗酸化物質や、クロロフィル、過酸化物といった脂質の酸化安定性に大きな影響を及ぼす微量成分を除去した上で検討を行った。したがって、糖脂質中の HUFA が示した高い酸化安定性は、糖脂質の分子構造に起因するものと考えられた (図5)。すなわち、糖脂質のグリセロール骨格の sn-3 位に結合した糖鎖が、sn-1 位または sn-2 に結合した HUFA の酸化を抑制しているものと推測できた。HUFA へのラジカルによる攻撃や HUFA からの水素ラジカルの引き抜き反応が、sn-3 位の糖鎖の存在により、どのようなメカニズムで抑制されているのかが今後の検討課題である。

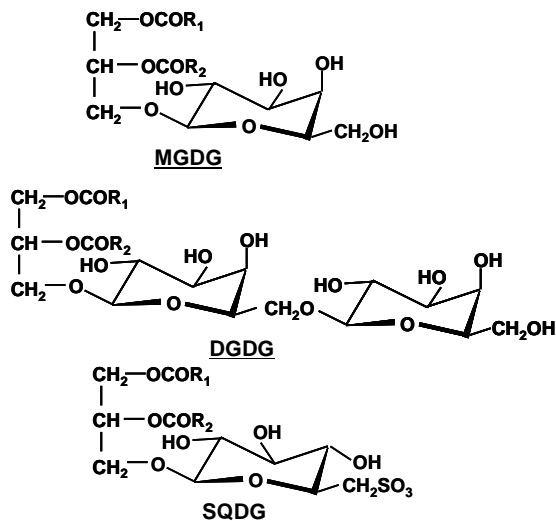


図5 各種糖脂質の構造

EPA(20:5n-3)や DHA(22:6n-3)に代表される水産物由来の HUFA は、様々な栄養機能性を示すため、その適度な摂取が推奨されているが、近年の食生活の変化により、これら水産油脂を摂取する機会が減少している点が

問題となっている。水産油脂、特に、魚油は独特な風味と酸化劣化を起ししやすい欠点があり、その利用範囲と保存には制限がある。これまでに、魚油を中心とした水産油脂の酸化安定性向上のために、多くの基礎的研究と応用研究が行われてきた。しかし、EPA(20:5n-3)や DHA(22:6n-3)などの HUFA の極めて低い酸化安定性が障害となり、水産油脂の酸化防止法ははまだ確立されていない。現在、魚油の酸化安定性を保つ最良の方法は、主として欧米での利用が多いカプセル化である。カプセル化された魚油は、乳製品、ジュースなどに利用されているが、長期保存できる製品に活用されているわけではない。既存の技術の応用では、魚油などの水産物油の酸化防止は限界と考えられる。そこで、新たな発想に基づく水産物油の酸化防止法が望まれている。本研究では、長期保存しても臭いの劣化が観察されない海藻製品に着目した。その結果、海藻中の HUFA は極めて酸化されにくいことを初めて明らかにできた。海藻の脂質含量は褐藻で 3~10%、主たる脂肪酸は EPA(20:5n-3)と SDA(18:4n-3)である。すなわち、海藻は重要なオメガ3 HUFA 供給源のひとつであり、我々は見えない油としてこれらの脂質を日常的に摂取していることになる。本研究で、海藻の脂質中に含まれるオメガ3 PUFA が高い酸化安定性を示すことが示されたが、この成果は、風味劣化が起こりにくい新たなオメガ3 HUFA 供給源としての海藻資源を改めて見直すきっかけにもなる。

また、褐藻や紅藻及び陸上植物葉部の葉緑体のチラコイド膜組成は特殊であり、80%が糖脂質で構成されている。海藻では、EPA(20:5n-3)、SDA(18:4n-3)、AA(20:4n-6)などが、また陸上植物葉部糖脂質では LNA(18:3n-3)が、これら糖脂質の主な構成脂肪酸である。葉緑体では光エネルギーを吸収して光合成を行うため、HUFA は酸化されやすい環境にある。本研究で得られた成果は、なぜ酸化されやすい HUFA がチラコイド膜に多いのか？ その酸化防止にはどのようなメカニズムがあるのか？ といった疑問を解明するきっかけにもなりうる。

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 Tomoyo Yamaguchi, Rumiko Sugimura, Junki Shimajiri, Masatake Suda, Masayuki Abe, Masashi Hosokawa and Kazuo Miyashita, Oxidative Stability of Glyceroglycolipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids, J. Oleo Sci., 査読有、Vol. 61、掲載予定、2012

〔学会発表〕(計5件)

- ①山口智代、細川雅史、阿部真幸、宮下和夫、高度不飽和脂肪酸含有糖脂質の酸化安定性に関する研究。平成24年度日本水産学会春季大会，2012年3月26～3月30日，東京海洋大学。
- ②K. Miyashita. Importance of seaweed as food resources. FOODS 2012, February 17-18, 2012, Chennai, India. (Keynote)
- ③T. Yamaguchi, J. Shimajiri, M. Abe, M. Hosokawa and K. Miyashita. Oxidative stability of glycolipids containing high levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids. International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2011, November 14-17, 2011, Sapporo.
- ④K. Miyashita, M. Abe and M. Hosokawa. Importance of Brown Seaweeds as Potential Biomass. 7th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, October 10-13, 2011, Kyoto. (Invited).
- ⑤須田正剛、阿部真幸、細川雅史、宮下和夫、褐藻類に含まれる機能性n-3系PUFAの酸化安定性。平成23年度日本水産学会秋季大会，2011年9月28日～10月2日，長崎大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 和夫 (MIYASHITA KAZUO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：10182015