

## 水産系脂質の微細乳化物の調製法とその特性解明

佐々木茂文, 田中 彰, 梅田智里

### Study of an Emulsification Method for and the Physico-chemical Properties of Fine Fish Oil Emulsions

Shigefumi Sasaki, Akira Tanaka and Chisato Umeda

This study clarified a proper method to prepare fine fish oil emulsions using a high-pressure emulsification device and revealed the relationship between the particle size and the physico-chemical properties of the fine fish oil emulsions prepared.

The operation of a high-pressure emulsification device with a diamond nozzle ( $\phi 0.09\mu\text{m}$ ) under a pressure of 200 MPa for three to five cycles produced fine emulsions with a mean particle size ranging from 0.12 to 0.13  $\mu\text{m}$ .

It was found that fine emulsions prepared with the high-pressure emulsification device were significantly stable over a long term storage and against heat treatment. The study revealed that the smaller the emulsion particle size, the higher the oxidative stability of the emulsion and that oxidative stability varied with the type of emulsifiers contained in the emulsion. Emulsions of fish oil and polar lipid from salmon testis showed the best oxidative stability in the study.

In respect to the intestinal absorption of emulsions, fatty acid absorption in the intestinal tract was observed; however, no significant difference in the amount of absorption was caused by the emulsion particle size or the type of emulsifier in the emulsion.

水産物の脂質には、高い機能性を持つ EPA や DHA、アスタキサンチンやフコキサンチン、スフィンゴ脂質、高度不飽和脂肪酸がエステル結合したリン脂質などを多く含むものがあり、その高度利用が期待されている<sup>1,2)</sup>。

脂質成分の中でも糖脂質やリン脂質のような極性脂質は、分子内に脂肪酸やセラミドなどの疎水基と糖やリン酸などの親水基が結合した構造を有しており、乳化機能を持っている。卵黄や大豆に多く含まれるグリセロリン脂質や牛脳、米糠、トウモロコシ、コンニャクから抽出したグルコシルセラミドは食品用乳化剤や機能性食品素材として利用されている。ヒトデ、ナマコ内臓やホタテ外套膜などにグルコシルセラミド<sup>3)</sup>やセラミドエチル

アミノスルホン酸<sup>4)</sup>などのスフィンゴ脂質が比較的多く含まれていることが明らかになり、食品や化粧品の機能性素材としての利用が期待される。

EPA や DHA、アスタキサンチンなどの脂溶性成分を水系に分散した O/W エマルションが機能性飲料や化粧品などとして製品化されている。エマルションは「互いに溶け合わない 2 種類の液体の一方が、他方へ細粒状に分散した状態にある系」と定義されており<sup>5)</sup>、牛乳が理想的な O/W 型エマルションのモデルである。近年、O/W エマルションの分散粒子の粒子径を小さくする技術に注目が集まり、様々な微細乳化物の調製方法が検討された<sup>6)</sup>。乳化物の分散粒子径を小さくすることによ

事業名：経常研究

課題名：水産系脂質の微細乳化物の調製法とその特性解明

て、乳化物の物性改変、酸化安定性の改善、体内吸収機能の向上など多くの知見が報告されている<sup>7)~9)</sup>。

最近の乳化技術として膜乳化法、高压乳化法が注目されている<sup>5)</sup>。膜乳化法は均一な細孔径を有する多孔質膜を利用した乳化法であり、多孔質膜を介して試料を連続的に圧入分散させることによりエマルジョンを連続的に調製する。一方、高压乳化法は特殊な増圧ポンプにより押し出された試料がチャンパー内へ高压で送り込まれ、内部で剪断力・衝撃力・キャビテーションの3種類の強力な力が加えられ、単一な圧力波形を示す粒子が得られる特徴を持つ乳化法である。

本研究では水産物脂質のそれぞれの特性を生かし、品質安定性に優れ、機能性を高めた乳化物を開発するために、高压乳化装置を使用した微細乳化物の製造方法を検討し、得られた乳化物の乳化および酸化安定性、腸管吸収性などの特性について検討を行った。

## 実験方法

### 1. 試料

イワシ油 (EPA-18MN) およびサケ油は、それぞれマルハニチロ株式会社 (東京都江東区)、月島食品工業株式会社 (東京都江戸川区) から入手した。サンマ油は北海道釧路市で水揚げされたサンマ筋肉から、サメ油は北海道南部日本海で漁獲されたアブラツノザメ筋肉から、サケ精巢リン脂質は北海道標津町で漁獲されたサケの精巢から Bligh&Dyer 法<sup>10)</sup> で抽出した。また、ヒトデ糖脂質は北海道噴火湾で捕獲したマヒトデからエタノール抽出を行って得た<sup>3)</sup>。対照として用いた乳化剤は大豆レシチン (関東化学株式会社)、シュガーエステル S-1670 (HLB=16, 三菱化学フーズ株式会社) を購入した。

### 2. 乳化装置による乳化物の調製

乳化装置は高压乳化装置 NANO300 (株式会社美粒, 大阪府大阪市)、圧力式ホモジナイザー APV15MR Laboratory Homogenizer (APV Gaulin, Inc., MA 01887 USA) を使用した。

0~10%魚油、0.2%あるいは2%乳化剤の混合物を60°Cに加熱した後、高速攪拌機泡レスミキサー NGM-0.2TB (双日マシナリー株式会社, 東京都千代田区) で6000rpm×3分間予備攪拌を行った。予備攪拌を行った粗乳化液を高压乳化装置に供して、ダイヤモンドノズル径0.09または0.13 $\mu\text{m}$ 、圧力100~200MPa、3~5 passの条件で乳化処理を行った。また、予備攪拌を行った粗乳化液を圧力式ホモジナイザーに供して設定圧

力15MPaで5分間循環して処理を行った。

### 3. 微細乳化物の物性測定

得られた乳化物の粒子径は粒度分布測定装置 LS13320 (ベックマンコールター株式会社, 東京都江東区) で液体モジュールを使用して測定し、粘度はデジタル粘度計 DVL-B III (東機産業株式会社, 東京都港区) で、乳化物10mLを少量モジュールに入れ、37°Cに加熱しながらローター HM-1, ローター回転数12rpmの条件で測定した。

### 4. 乳化および酸化安定性評価

乳化物の安定性は調製した乳化物を遠心分離処理 (1057×g, 10分間) や加熱 (100°C・30分間, 121°C・15分間) 処理を行った後に乳化粒子径を測定し、処理前後の乳化粒子径分布の変化で評価した。また、酸化安定性は調製した乳化物を30mL容スクリューキャップ付きガラスバイアルに入れ、密閉後に37°C、暗所で保存し、経時的に乳化物を採取してTBA法で酸化物を測定して評価した<sup>11)</sup>。

### 5. 微細乳化物の腸管吸収性評価の評価

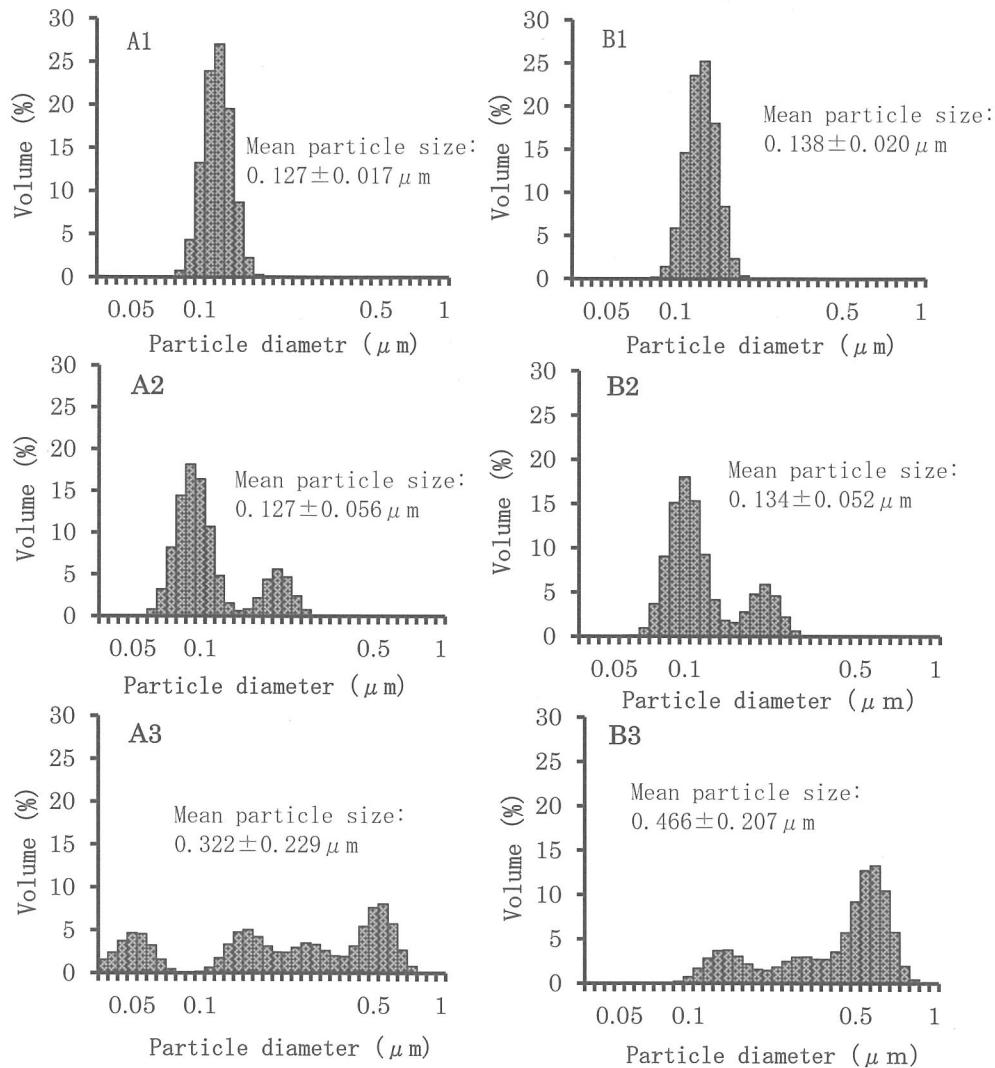
モルモット (Hartley (SPF), 雄, 5週齢, 体重約350g) を Guinea Pig Diet CG-7 (日本クレア株式会社, 東京都目黒区) を自由給餌で5日間予備飼育後, 2日間絶食した後に麻酔下で開腹して, 小腸を採取した。KBR (Modified Krebs Ringer Bicarbonate solution) 溶液で小腸内外部を洗浄し, 冷却した KBR 溶液内で空腸と回腸部分を約150mmに切断して, それぞれの腸管の内側と外側を反転し, 10mM グルコース含有 KBR 溶液 (KBR-10mM Glu) を注入した後, 両端を結紮して反転腸管サックを作製した。

脂質量5mg/mLになるように微細乳化物を添加した KBR-10mM Glu 溶液に反転腸管サックを浸漬し, 混合ガス (酸素95%, 炭酸ガス5%) をバブリングしながら37°C, 2時間脂質を吸収させた。インキュベート後に反転腸管サックの内液を回収し, Floch 法<sup>12)</sup> によって脂質を抽出した。得られた脂質から脂肪酸メチルエステルを調製し, ガスクロマトグラフィに供して内液1mLに含まれる脂肪酸量を算出して評価した。

## 実験結果および考察

### 1. 水産系脂質混合物の微細乳化物の調製

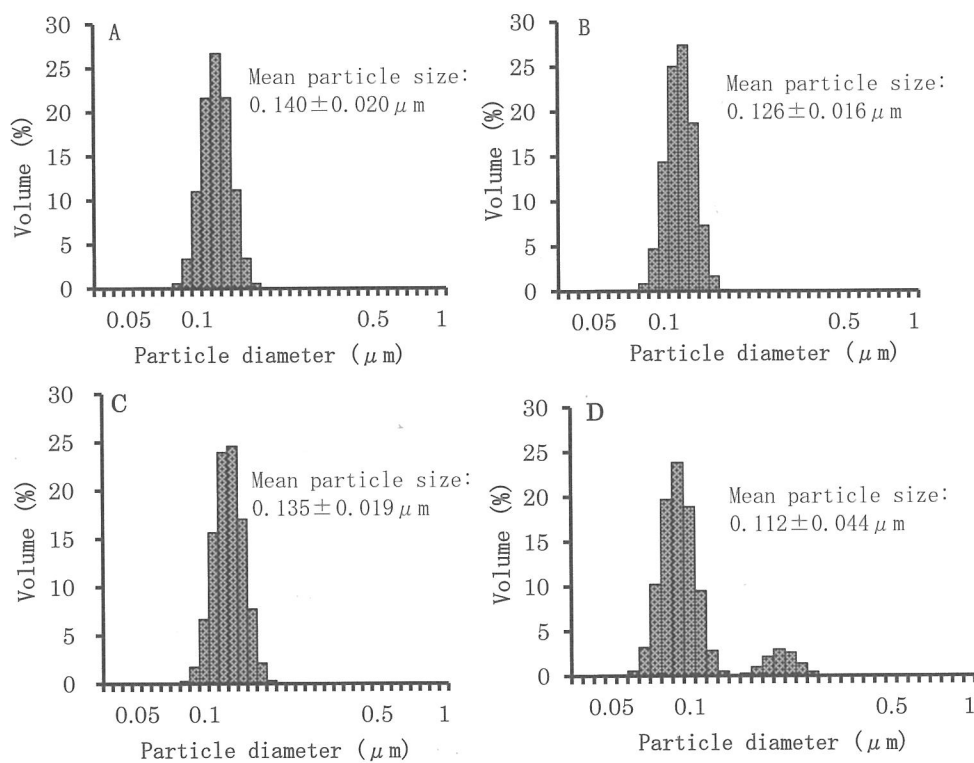
2%食用油と2%大豆レシチンからなる混合物をダイヤモンドノズル径0.09 $\mu\text{m}$ あるいは0.13 $\mu\text{m}$ を装着した高压乳化装置により処理圧力100, 150および200MPaで5 pass 処理して得られた乳化物の粒子径分



**Fig. 1 Particle size distributions of emulsions containing 2 % plant oil and 2 % soybean lecithin**  
 The inner diameter of diamond nozzle and pressure setting on the high pressure emulsification device were A1, 0.09  $\mu\text{m}$  and 200MPa; A2, 0.09  $\mu\text{m}$  and 150MPa; A3, 0.09  $\mu\text{m}$  and 100MPa; B1, 0.13  $\mu\text{m}$  and 200MPa; B2, 0.13  $\mu\text{m}$  and 150MPa; B3, 0.13  $\mu\text{m}$  and 100MPa.

布を Fig.1 に示す。乳化物の平均粒子径は、ダイヤモンドノズル径 0.09  $\mu\text{m}$  で調製したものは 0.13  $\mu\text{m}$  で調製したものより小さかったが、粒子径分布に大きな差は認められなかった。処理圧力については、200MPa で処理したものでは平均粒子径 0.12 ~ 0.14  $\mu\text{m}$  の均一な油滴が形成されたが、処理圧力が小さくなるに従って粒子径分布が広がり、粒径 0.04 ~ 1.00  $\mu\text{m}$  の多様な粒子径を持つ乳化物が調製された。このことから、調製される乳化物の粒子径はダイヤモンドノズル径には大きな影響を受けないが、処理圧力によって粒子径分布が変化し、圧力 200MPa で処理することによって粒子径 0.13  $\mu\text{m}$  前後の均一な乳化物が得られることが明らかになった。

魚油および乳化剤の種類が調製される乳化物の粒子径分布に与える影響を明らかにするために、魚油および乳化剤の異なる乳化物を調製し、得られた乳化物の粒子径分布を比較した。4 種類（イワシ油、サケ油、サメ油、サンマ油）の 2 % 魚油と 2 % ヒトデタノール抽出物の混合物を高圧乳化装置（ダイヤモンドノズル 0.09  $\mu\text{m}$ 、設定処理圧力 200MPa、5 pass）で処理した。いずれの魚油でも平均粒子径 0.12 ~ 0.14  $\mu\text{m}$  の均一な乳化物が得られ、魚油の種類によって調製される乳化物の粒子径分布の変化は認められなかった。また、2 % イワシ油と 4 種の乳化剤（シュガーエステル HLB16、大豆レシチン、ヒトデタノール抽出物、サケ精巢リン脂質）を高圧乳



**Fig. 2** Particle size distributions of emulsions containing 2% sardine oil and various emulsifiers. The emulsifier of these emulsions were A, 0.2% sugar ester; B, 2% soybean lecithin; C, 2% starfish EtOH extracts; D, 2% salmon testis polar lipids. The emulsification device set the diamond nozzle of inner diameter  $0.09 \mu\text{m}$ , and pressure of 200MPa.

化装置で処理し、乳化物の粒子径を測定したところ、どの乳化剤を使用した乳化物でも同様な粒子径分布を示していた (Fig. 2)。

イワシ油 (0, 2, 5, 10%) と 2% 乳化剤 (ヒトデエタノール抽出物, サケ精巢リン脂質) からなる混合物を高圧乳化装置 (運転条件: ダイヤモンドノズル径  $0.09 \mu\text{m}$ , 圧力 200MPa, 5 pass) で処理して微細乳化物を調製し (Fig. 3), それぞれの乳化物の粒子径を測定した (Table 1)。乳化剤のみで高圧乳化処理した結果, ヒトデエタノール抽出物では透明な乳化物が得られたが, サケ精巢リン脂質では白濁した乳化物となった。そして, イワシ油にこれらの乳化剤を添加して高圧乳化処理すると, いずれの乳化物を用いた場合もイワシ油の添加濃度にかかわらず, 白濁した外観を呈し, 平均粒子径  $0.122 \sim 0.135 \mu\text{m}$  の粒子径の分散が狭く均一な乳化粒子を持つ乳化物が得られた。

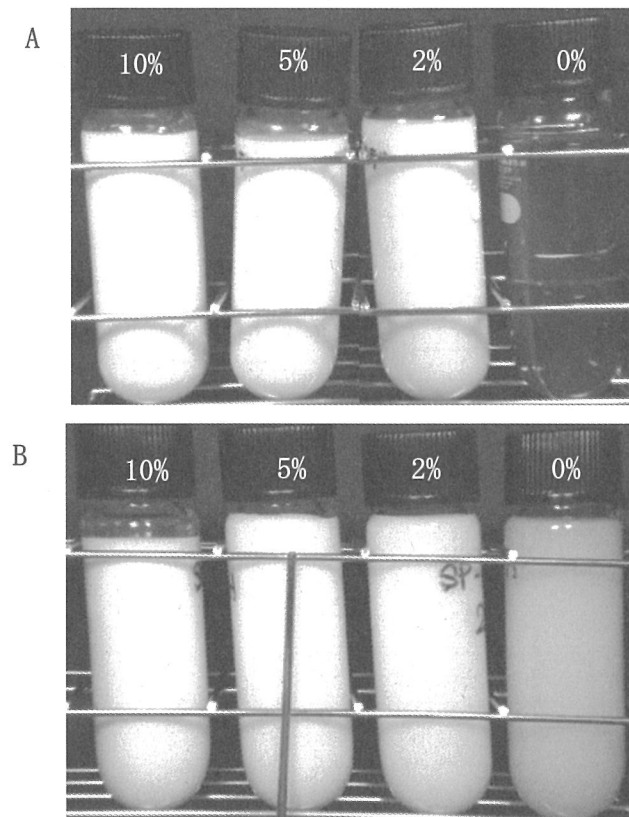
これらのことから, 2~10% 魚油, 乳化剤からなる混合物を高圧乳化装置に供し, 所定の条件 (ダイヤモンドノズル  $0.09 \mu\text{m}$ , 処理圧力 200MPa, 5 pass) で処理

することにより, 平均粒子径  $0.10 \sim 0.15 \mu\text{m}$  で均一な乳化物を安定的に調製できることが明らかになった。

## 2. 魚油微細乳化物の物性と酸化安定性

2% イワシ油と 2% サケ精巢リン脂質の混合物を高圧乳化装置で処理して調製した乳化物を遠心分離, 加熱処理, 冷凍解凍処理を行い, 処理前後の粒度分布を測定した。

Fig. 4 に高圧乳化装置で処理した乳化物の粒子径分布を示す。調製した乳化物 (A) の平均粒子径は  $0.129 \pm 0.018 \mu\text{m}$  で一峰性の粒子径分布を示し,  $37^\circ\text{C}$  で 20 日間保存, 遠心分離処理 ( $1057 \times g$ , 10 分間), 加熱処理 ( $100^\circ\text{C} \cdot 30$  分間,  $121^\circ\text{C} \cdot 15$  分間) を行っても乳化粒子径分布に大きな変化は認められず, 調製した乳化物は十分な乳化安定性を保持していた。一方, 調製した乳化物を冷凍庫 ( $-30^\circ\text{C}$ ) で 24 時間冷凍保存後, 室温で解凍すると 2 層に分離し, 上層 (白濁層) の粒子径は  $0.37 \sim 2.92 \mu\text{m}$  の多様な粒子で構成されており, 粒子径分布が大きく変化した (Fig. 4)。Lu ら<sup>9)</sup> は魚油と海洋性リン脂質からなる乳化物の安定性は乳化物の脂質組



**Fig. 3** Photographs of emulsions containing 0–10% sardine oil and 2% emulsifiers. The emulsifiers were A, starfish ethanol extracts; B, salmon testis polar lipids. The conditions of emulsification were the same as Fig. 2.

**Table 1** Particle size of emulsions containing 0–10% sardine oil – 2% emulsifiers

	Mean particle size ( $\mu\text{m}$ )	Medium size ( $\mu\text{m}$ )	Mode ( $\mu\text{m}$ )
A (Starfish ethanol extracts)			
0% Sardine oil	$0.835 \pm 0.850$	0.582	0.627
2% –	$0.135 \pm 0.019$	0.134	0.128
5% –	$0.125 \pm 0.016$	0.124	0.128
10% –	$0.127 \pm 0.017$	0.126	0.128
B (Salmon testis polar lipid)			
0% Sardine oil	$0.228 \pm 0.168$	0.164	0.088
2% –	$0.122 \pm 0.017$	0.121	0.117
5% –	$0.125 \pm 0.016$	0.124	0.128
10% –	$0.130 \pm 0.018$	0.129	0.128

Data represent means  $\pm$  standard deviation.

成, 海洋性リン脂質の品質および化学組成に強く依存し, 乳化安定性に優れた乳化物を調製するためにはリン脂質の配合割合を3% (w/w) とすることが必要であると報告している. 今回の試験ではヒトデエタノール抽出物, サケ精巢リン脂質を乳化物の2% (w/v) 添加することにより, 乳化安定性に優れた乳化物を調製することが可能であった.

乳化物の酸化安定性に対する乳化物に含まれる乳化剤および乳化粒子径の影響を明らかにするため, それぞれ調製した乳化物を37°C, 暗所で保存して, 乳化物のTBARS量を経時的に測定し酸化安定性を評価した (Fig. 5). どの試験区においても乳化物の平均粒子径が小さいもの (平均粒子径0.1 $\mu\text{m}$ ) は大きいもの (1 $\mu\text{m}$ ) よりもTBARS量が少なく, 酸化安定性に優れていた.

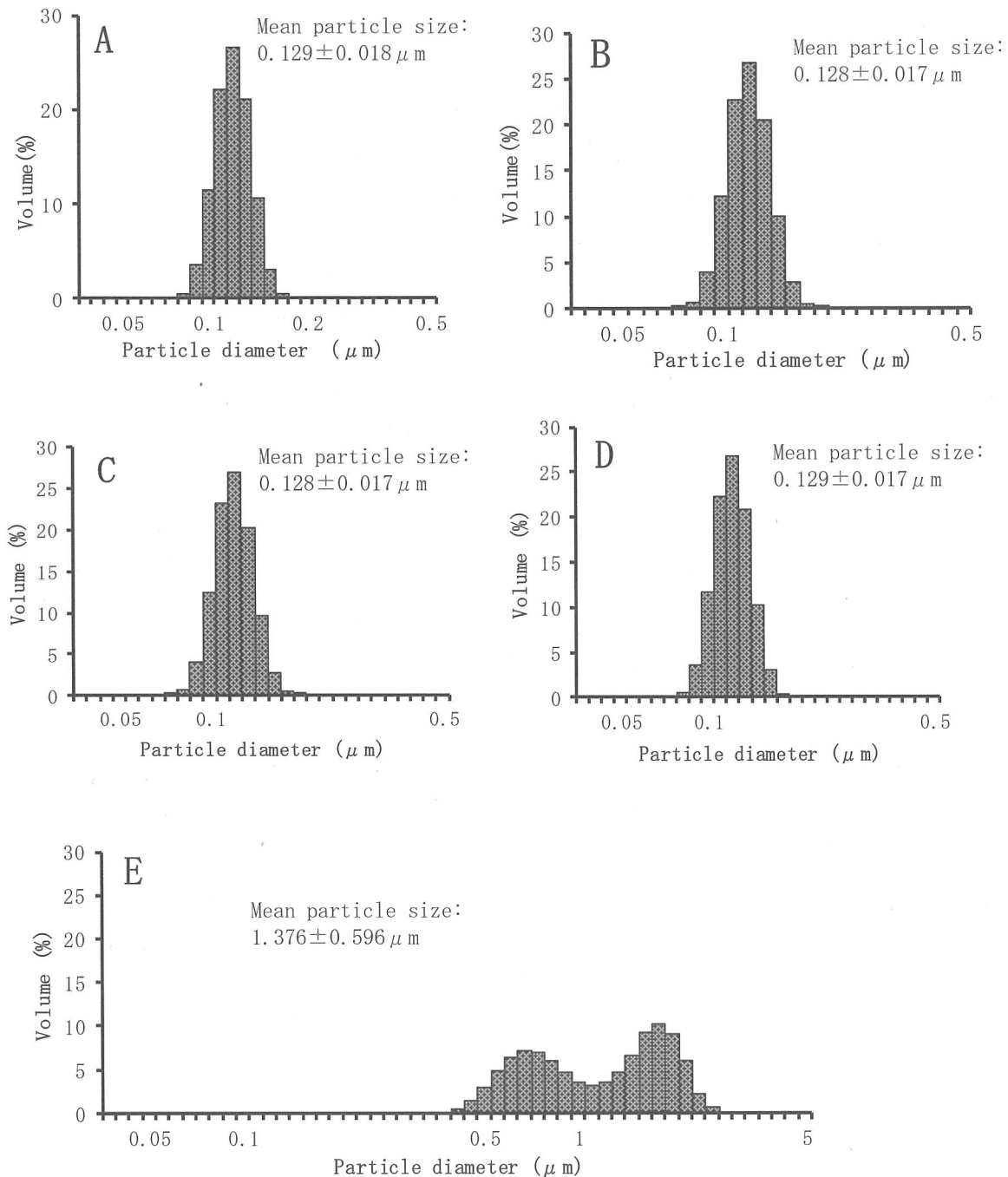


Fig. 4 Effects of various food processing treatments on the particle size distributions of emulsions formed with 2 % sardine oil and 2 % salmon testis polar lipids

The food processing treatments were as follows.

A, non treatment; B, storage for 20 days at 37°C in the dark; C, heated at 120°C for 15 minutes; D, heated at 100°C for 30 minutes; E, freeze at -30°C for 24 hours and then thaw at room temperature.

また、乳化剤によって酸化安定性が異なり、サケ精巢リン脂質 $\geq$ ヒトデ糖脂質 $\gg$ シュガーエステルの順にTBARS量が少なく推移した。Imaiら<sup>8)</sup>はO/W乳化物のリノール酸メチルの酸化において、酸化安定性はより小さな油滴を持つ乳化物が優れ、乳化剤の種類によっ

ても異なると報告している。これらのことから、乳化物を構成している乳化剤の種類や乳化粒子径によって乳化物の酸化安定性が異なると考えられた。

### 3. 微細乳化物の腸管吸収

Table 2 にイワシ油とヒトデエタノール抽出物の混合

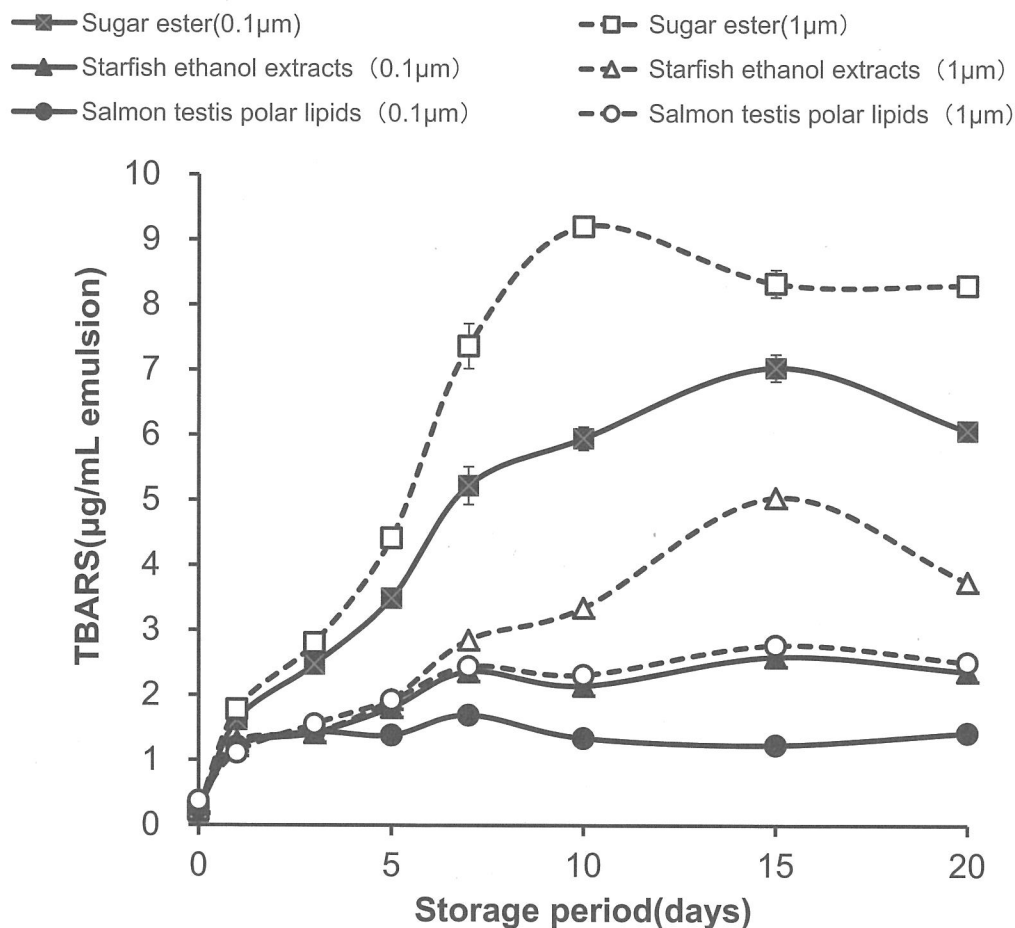


Fig. 5 Changes of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in sardine oil in water emulsions stored at 37°C in the dark  
Data represent means  $\pm$  standard deviation.

物から調製した乳化物の反転腸管サックへの脂質吸収量を示す。浸漬液に2時間浸漬することによって全脂肪酸量で642～832 $\mu$ g吸収され、EPA77～94 $\mu$ gおよびDHA29～52 $\mu$ gが吸収された。乳化物の平均粒子径の小さなものから順に吸収した全脂肪酸量が少なくなったが、反転腸管サック毎の吸収量のバラツキが大きく有意な差は認められなかった。

Table 3にイワシ油と乳化剤からなる3種の乳化物の反転腸管サックへの脂質吸収量を示す。いずれの乳化物でも吸収された脂肪酸量に大きな違いは見られず、反転腸管サックの脂肪酸吸収に乳化物の乳化剤の違いは、ほとんど影響しないと考えられた。

Sugasiniら<sup>13)</sup>は乳化剤としてGum acacia(平均粒子径1.09 $\mu$ m)、Whey protein(平均粒子径0.70 $\mu$ m)、Lipoid S75-3(平均粒子径0.25 $\mu$ m)を使用した乳化物の反転腸管サックにおける脂質吸収を測定した。そ

の結果、lipoidを乳化剤として調製した乳化物のみEPAおよびDHAの吸収が認められ、乳化剤によって乳化物の腸管吸収が大きく異なると報告しているが、この試験で調製した乳化物の平均粒子径が乳化剤の種類によって異なっていることから、乳化物の粒子径の違いが腸管吸収に影響した可能性が考えられる。今回の実験では調製した乳化物の粒子径は0.12～0.14 $\mu$ mであり、粒子径に違いがないことから、反転吸収サックにおける乳化物の腸管吸収には乳化剤の影響はないと考えられた。

## 要 約

水産物由来の脂質の混合物を高圧乳化装置で処理して乳化物を調製する処理条件を明らかにした。水産物脂質混合物をダイヤモンドノズル径0.09 $\mu$ mを装着した高圧乳化装置に処理圧力200MPaで3～5回通すことに



**Table 2** Effects of particle size of emulsions on the absorption of total fatty acids, EPA and DHA from sardine oil-starfish ethanol extracts emulsion on the intestinal everted sac model

Emulsion	Fine particle	Mid particle	Large particle
Number of sac model	3	4	3
Mean particle size ( $\mu\text{m}$ )	0.12 $\pm$ 0.02	10.18 $\pm$ 8.74	50.20 $\pm$ 55.11
Total fatty acids ( $\mu\text{g}$ ) *	832 $\pm$ 95	740 $\pm$ 356	642 $\pm$ 209
EPA ( $\mu\text{g}$ ) *	85 $\pm$ 28	94 $\pm$ 53	77 $\pm$ 25
DHA ( $\mu\text{g}$ ) *	43 $\pm$ 7	52 $\pm$ 32	29 $\pm$ 15

Data represents means  $\pm$  standard deviation.

\* Values are weights contained in 1mL of mucosal medium of the intestinal everted sac model

**Table 3** Intestinal absorption of total fatty acids, EPA and DHA from sardine oil encapsulated in various emulsifiers on the intestinal everted sac model

Emulsion	Fine particle	Mid particle	Large particle
Number of sac model	3	3	3
Mean particle size ( $\mu\text{m}$ )	0.14 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02
Total fatty acids ( $\mu\text{g}$ ) *	733 $\pm$ 710	966 $\pm$ 303	687 $\pm$ 171
EPA ( $\mu\text{g}$ ) *	55 $\pm$ 61	53 $\pm$ 20	42 $\pm$ 15
DHA ( $\mu\text{g}$ ) *	30 $\pm$ 28	25 $\pm$ 8	25 $\pm$ 6

Data represents means  $\pm$  standard deviation.

\* Values are weights contained in 1mL of mucosal medium of the intestinal everted sac model

より、平均粒子径 0.12 ~ 0.13  $\mu\text{m}$  の均一な乳化物を調製することが可能であった。

高圧乳化装置で調製した乳化物は乳化安定性に優れ、遠心分離、長期保存、加熱処理を行っても乳化粒子の分解や凝集は認められず、粒子径分布もほとんど変化しなかった。また、乳化物の酸化安定性は乳化粒子径が小さいものの方が高く、魚油とサケ精巢リン脂質からなる乳化物が最も酸化されなかった。

乳化物の腸管吸収は腸管上での脂質の吸収は認められたが、乳化物の粒子径や乳化物を構成する乳化剤の違いによる吸収量の有意な差は認められなかった。

モルモット小腸の反転腸管サックによる微細乳化物の吸収評価を行っていただいた酪農学園大学獣医学ユニット横田博教授、翁長教授、安井由美子准教授に深謝します。

## 文 献

- 1) 日比野英彦, 海産物由来脂溶性素材開発, 「水産資源の先進的有効利用法—ゼロエミッションをめざして—」, (株式会社エヌ・ティー・エス, 東京), pp.133-148 (2005).
- 2) Ackman, R.G., Fatty acids In Marine biogenic lipids, Fats, and Oils, Vol.1 ed., Ackman, R.G. CRC Press, pp.103-137 (1989) .
- 3) 佐々木茂文, 田中 彰, 梅田智里, 能登裕子, 未利用水産物からのグルコシルセラミドの抽出濃縮, 北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告, **10**, 1-8 (2013).
- 4) 齊藤洋昭, セラミド資源としての海産物, 「セラミド—基礎と応用—」, (株式会社食品化学新聞社, 東京), pp.115-120 (2011)
- 5) 小久保貞之, 桜井一美, 乳化技術の進歩, 日本油化学会誌, **48**, 217-224 (1999).
- 6) McClements, D.J. and Rao, J., Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.*, **51**, 285-330 (2011) .
- 7) Polychniatou, V. and Tzia, C., Study of formation and stability of co-surfactant free water-in-olive



- oil nano- and submicron emulsions with food grade non-ionic surfactants. *J.Am.Oil Chem.Soc.*, **91**, 79-88 (2014) .
- 8) Imai, H., Maeda, T., Shima, M. and Adachi, S., Oxidation of methyl linoleate in oil-in-water micro- and nanoemulsion systems. *J.Am.Oil Chem. Soc.*, **85**, 809-815 (2008) .
- 9) Lu, F.S. H., Nielsen, N.S., Baron, C.P. and Jacobsen, L.H.S., Physico-Chemical properties of marine phospholipid emulsions. *J.Am.Oil Chem. Soc.*, **89**, 2011-2014 (2012) .
- 10) Bligh, G.E. and Dyer, W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959) .
- 11) McDonald, R.E. and Hultin, H.O., Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *J.Food Sci.*, **52**, 15-21 (1987) .
- 12) Folch, J. and Stanley, L.M., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol.Chem.*, **226**, 497-509 (1957) .
- 13) Sugasini, D. and Lokesh, B.R., Uptake of  $\alpha$ -linolenic acid and its conversion to long chain omega-3 fatty acids in rats fed microemulsions of linseed oil. *Lipids*, **47**, 1155-1167 (2012) .