

ナノ乳化物による機能性成分の保存性及び吸収性の向上

小泉次郎

Stability and absorption of food-derived functional ingredients in nano-emulsion particles

Jiro Koizumi

In recent years, health maintenance and promotion using food-derived functional ingredients have attracted attention. To utilize functional ingredients, it is necessary to prevent their degradation and improve their absorption. In this study, we evaluated the stability of two carotenoids as fat-soluble ingredients and one betalain as a water-soluble ingredient in nano-emulsion particles.

We found that the nano-emulsion suppressed the degradation of lutein, β -carotene, and betalain. These results showed that the nano-emulsion prevented the degradation of both fat-soluble and water-soluble ingredients.

Furthermore, cell cultures were performed to evaluate the cellular uptake of lutein in the nano-emulsions. Caco-2 emulsion cells cultured in medium supplemented with nano-emulsion accumulated the most lutein compared to emulsions using a high-pressure homogenizer and oil-containing lutein. This indicates that the incorporation of lutein into a nano-emulsion improves its absorption.

These results showed that nano-emulsification of functional ingredients not only suppresses decomposition but also improves cell absorbability.

KEY-WORDS : nano-emulsion, functional food, lutein, β -carotene, betalain

キーワード : ナノ乳化物, 機能性食品, ルテイン, β -カロテン, ベタレイン

近年、生活習慣病患者の増加を背景に、健康の維持増進を目的とした食品由来の機能性成分が注目を集めている。機能性食品は製造者から消費者に渡るまでの期間において、有効成分である機能性成分の含有量が維持される必要があるが、一部の機能性成分には熱や光などにより分解しやすい成分があるため、食品中における機能性成分の安定性が重要となる。

従来、機能性成分の分解を抑制するため、酸化防止剤の使用や遮光包装などが行われてきたが、ドレッシングなどの液体状の食品において使用できないことや、パッケージデザインの制限がある。

本研究では、従来の包材等による手法とは異なる新たな安定性向上技術の開発を目指して、機能性成分の食品中の存在形態による安定性向上を試みた。

これまでに乳化状態が脂質の酸化安定性に影響することが報告されており^{1,2)}、乳化状態を改良することで、食品中の脂質の酸化によって生じる過酸化物の生成を抑制し、過酸化物による機能性成分の分解を抑制できる可能性がある。

乳化法は、主に大型機械を使用する機械的乳化法と、乳化剤の界面化学的性質を利用した物理化学的乳化法に分類される³⁾。乳化タイプのドレッシングやホイップクリームなどの食品では高圧ホモジナイザーや攪拌機を用いた機械的乳化法で製造され、物理化学的乳化法による実用例は少ない。一般に機械的乳化法は加熱や高圧処理により物理的負荷が大きい、物理化学的乳化法は温和な条件で微細な乳化物や、高い乳化安定性を持つ乳化物を調製可能であり、機能性成分の安定性向上に有用である可能性がある。これまでに、食品原料を用いた物理化学的乳化法が報告されており⁴⁾、大型機械を用いずにナノ乳化物を作製する方法が明らかになっている。しかしながら、食品原料で作製されたナノ乳化物を用いた機能性成分の安定性を実際に検討した例は少ない。

そこで、本研究では物理的乳化法を用いた粒子径が100 nmを下回るような極めて微細な乳化物（ナノ乳化物）による機能性成分の安定性向上を検討した。

乳化物による機能性成分の安定性を検証する上で、機能性成分が水系または油系、あるいは界面のいずれに存在するかについては、ナノ乳化物による安定性向上のメカニズムを解明する上で重要な情報となる。一般に極性の高い成分は水系に、極性の低い成分は油系に局在する。そこで、機能性成分が存在する系により、安定性が異なることを考え、本研究では極性の低い脂溶性成分としてカロテノイド、極性の高い水溶性成分としてベタレイン

（ビーツ色素）を用いて検証を行った。

カロテノイドは多くの植物、海藻や一部魚類（サケなど）などの食品に含まれる脂溶性色素成分で、共役二重結合鎖であるイソプレノイド骨格の両端に環状構造を有する炭素数40（C40）を基本構造とし、この環状構造にヒドロキシル基やケト基などの官能基が付与されることで多様な構造を構成する⁵⁾。これまでに様々なカロテノイドの機能性に関して研究が行われており、抗酸化作用や抗がん作用をはじめ、多様な機能性の報告がある⁶⁾。β-カロテンは分子内に酸素原子を持たず極性が低い一方で、ルテインはヒドロキシル基を2個有するためカロテノイドのなかでは比較的極性が高いキサントフィルに分類される。

一方、ベタレインはビートなどのナデシコ目植物に特異的に含まれる水溶性の窒素含有色素で、赤紫色のベタシアニンと黄色のベタキサントニンに分類される⁷⁾。これまでに抗酸化作用やラジカルスカベンジャーとしての機能が報告されている^{8,9)}。

さらに、機能性食品として利用する際には生体内における吸収性について検証する必要がある。特に脂溶性成分の吸収は小腸上皮細胞におけるミセルの取り込みによって行われるため、あらかじめ微細な乳化状態となっているナノ乳化物によって細胞への取り込みが向上するか、細胞実験を用いて検証した。

以上から、本研究ではナノ乳化技術による機能性成分の安定化を目指して、極性の異なる機能性成分としてカロテノイド（ルテイン、β-カロテン）とベタレイン（ビーツ色素）を対象に分解抑制効果の検討を行った。さらに、ヒト結腸がん由来Caco-2細胞を用いてルテインの吸収性の検証を行った。

実験方法

1. 試料および調製方法

(1) 試験材料および試薬

食品原料はMCTオイル（日清オイリオ）、乳化剤はショ糖ステアリン酸エステル（SE）（三菱ケミカルフーズ）、ポリグリセリンエステル（PGPR）、ヘキサグリセリンラウリン酸モノエステル（PGFE）（いずれも阪本薬品）、カロテノイド色素はマリーゴールド色素（丸善製薬）を用いた。

分析用試薬として、ルテイン標品（ChromaDex, Inc.）、β-カロテン（富士フィルム和光純薬）を用いた。

(2) カロテノイド（ルテイン）の精製

安定性試験に用いたルテインは、マリーゴールド色素

からけん化・精製したものを用いた。けん化は日本農林規格「ほうれんそう中のルテインの定量-高速液体クロマトグラフ法 (JAS 0008)」を参考に行い、けん化処理後のルテイン精製はクロロホルムで置換したシリカゲルカラムを用いて精製した。その後、HPLCで純度を確認し、ピーク面積からルテイン含量が90%以上であることを確認した。

HPLC分析にはLC solution (島津製作所)を用いた。カラムはTSKgel ODS-80Ts (東ソー)を用いて、溶媒はメタノール (1.0 mL/min) で分析を行った。測定波長は433 nmで行い、標品のピークおよび吸収スペクトルで同定を行った。

精製ルテインは実験に使用する時まで遮光し、ヘッドスペースを窒素で置換後、-40°Cで保管した。

(3) 乳化物の調製

高圧乳化物は高圧乳化装置 (ホモジナイザー)を用いて、Table 1の配合で調製した。水系として水979 gにSE 1 gを溶解したものと、油系としてMCTオイル30gをそれぞれ計量した。次に、それらを55-65°Cに加温し、水系をミキサーで攪拌しながら油系を混合し、混合後15 min攪拌した。その後、混合物をホモジナイザー (A P V ゴーリン) で200 kg/cm²にて均質化した。作製した

Table 1 Composition of emulsion

Component	%	
	A*	B*
Sugar Ester	0.1	0
Emulsifier mix (PGPR/PGFE,1:1 w/w)	0	25.5
Water	96.9	71.5
Oil (MCT oil)	3.0	3.0

* A and B are the same in Fig. 1.

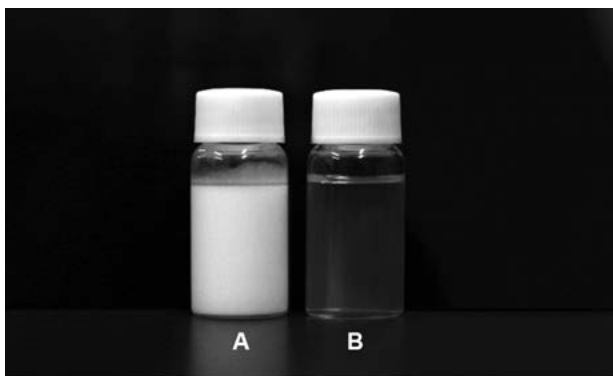


Fig. 1 Photograph of O/W emulsion prepared with the high pressure homogenizer(A), and O/W nano-emulsion(B).

乳化物は耐熱性の袋に移し、氷水で素早く冷却した。乳化物は分析まで4°Cで保管した (Fig.1)。

ナノ乳化物は物理化学的乳化法によりTable 1の配合で調製した。物理化学的乳化法はWakisakaらの方法⁴⁾を一部改変して行った。すなわち、PGPRとPGFEを1:1 (w/w) で混合し、混合した乳化剤2.55 g, MCTオイル0.30 g, 水0.15 gを秤量し、スパチュラで混合後、一晩以上静置した。混合物は使用前に再度攪拌し、水7.00 gを滴下しながらスパチュラで混合し、ナノ乳化物を調製した (Fig.1)。

機能性成分は、精製ルテイン、β-カロテンおよびビーツ色素を用いて検討を行い、高圧乳化物とナノ乳化物の各原料のうち、精製ルテインとβ-カロテンはMCTオイルに溶解し、ビーツ色素は水系に溶解した。

2. 機能性成分の分解試験

ルテイン、β-カロテンおよびビーツ色素を用いて調製したナノ乳化物と高圧乳化物をそれぞれ2 mLバイアルに2 mL分注した。その後、ヘッドスペースを窒素で置換後密封し、インキュベーター (37°C・光照射下) 内に静置した。その後経時的に各成分量をHPLCで測定した。ビーツ色素は主要な機能性成分であるベタレインを対象に分析を行った。

ルテインのHPLC条件は1. (2)と同様に行い、β-カロテンとベタレインの分析は下記の通り行った。

β-カロテンの分析には装置、カラムはルテイン分析と同様の条件で行い、溶媒はエタノール (0.8 mL/min) で分析を行った。測定波長は451 nmで行い、標品のピークおよび吸収スペクトルで同定を行った。

ベタレインの分析は装置、カラムはルテイン分析と同様の条件で行い、溶媒はリン酸二水素カリウム水溶液:メタノール = 9:1 (v/v) (0.8 mL/min) で分析を行った。測定波長は535 nmで行った。

3. 分解抑制効果に対する乳化剤濃度の影響の検証

ルテインを添加したナノ乳化物について、混合乳化剤濃度を変更して保存試験を行った。乳化剤濃度は乳化物の分離が生じなかった16.5 ~ 25.5%の範囲で行った (Table 2)。

4. 長期保存試験

ルテインを添加したナノ乳化物をドレッシング (マヨ

Table 2 Composition of emulsion

Component	I	II	III	IV
Emulsifier mix	25.5	22.5	19.5	16.5
Water	71.5	74.5	77.5	80.5
Oil(MCT oil)	3.0	3.0	3.0	3.0

ネーズタイプ)に1%添加し、2 mLバイアルに1 g分注し分解試験を行った。その後、各サンプルを25°Cで保存試験を行った。また、同様に飲料モデルとして10%スクロース水溶液に乳化物を添加し、保存試験を行った。対照として同濃度のルテインをMCTオイルに添加したサンプルで同様の検証を行った。

5. 培養細胞に対する細胞毒性試験

(1) 細胞生残率の測定

細胞生残率はWST-1法を用いて測定した。すなわち、Caco-2細胞(ヒト結腸ガン由来)を96ウェルプレートに 1.0×10^4 cells/mLで播種し、非必須アミノ酸溶液1%とFBSを10%加えたDMEMで2日または3日に1回培地交換を行い、4週間培養することで腸管モデルに分化させた。その後、ナノ乳化物、高圧乳化物および油脂(MCTオイル)(いずれもルテイン添加)をMCTオイル量が0.003%になるようにそれぞれ添加した。2日後に培地を回収し、細胞をPBSで2回洗浄した。WST-1試薬(Roche)を1ウェルあたり10 μ L加え、37°Cで4時間インキュベートした。ウェルプレートをシェーカーで攪拌後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度(測

定波長450 nm対照波長650 nm)を測定し、細胞生残率を求めた。

(2) 培養細胞によるルテインの吸収性試験

Caco-2細胞(ヒト結腸ガン由来)を6ウェルプレートに 1.0×10^4 cells/mLの濃度で播種し、非必須アミノ酸とFBSを10%加えたDMEMで4週間培養し、腸管モデルに分化させた。その後、細胞生残率の測定と同様に、ナノ乳化物、高圧乳化物および油脂(いずれもルテイン添加)を添加した。2日後に培地を回収し、細胞をPBSで2回洗浄した。その後、トリプシンで細胞を剥離し、PBSで細胞を2回洗浄し、細胞中のルテイン量をHPLCで測定した。HPLC条件は1。(2)と同様に行った。

6. 統計解析

実験結果は平均値±標準偏差で示した。解析はTukeyの多重検定またはStudentの*t*検定により優位水準は5%未満または1%未満とした。

実験結果

1. 機能性成分の分解試験

ルテインおよび β -カロテンとビーツ色素中のベタレ

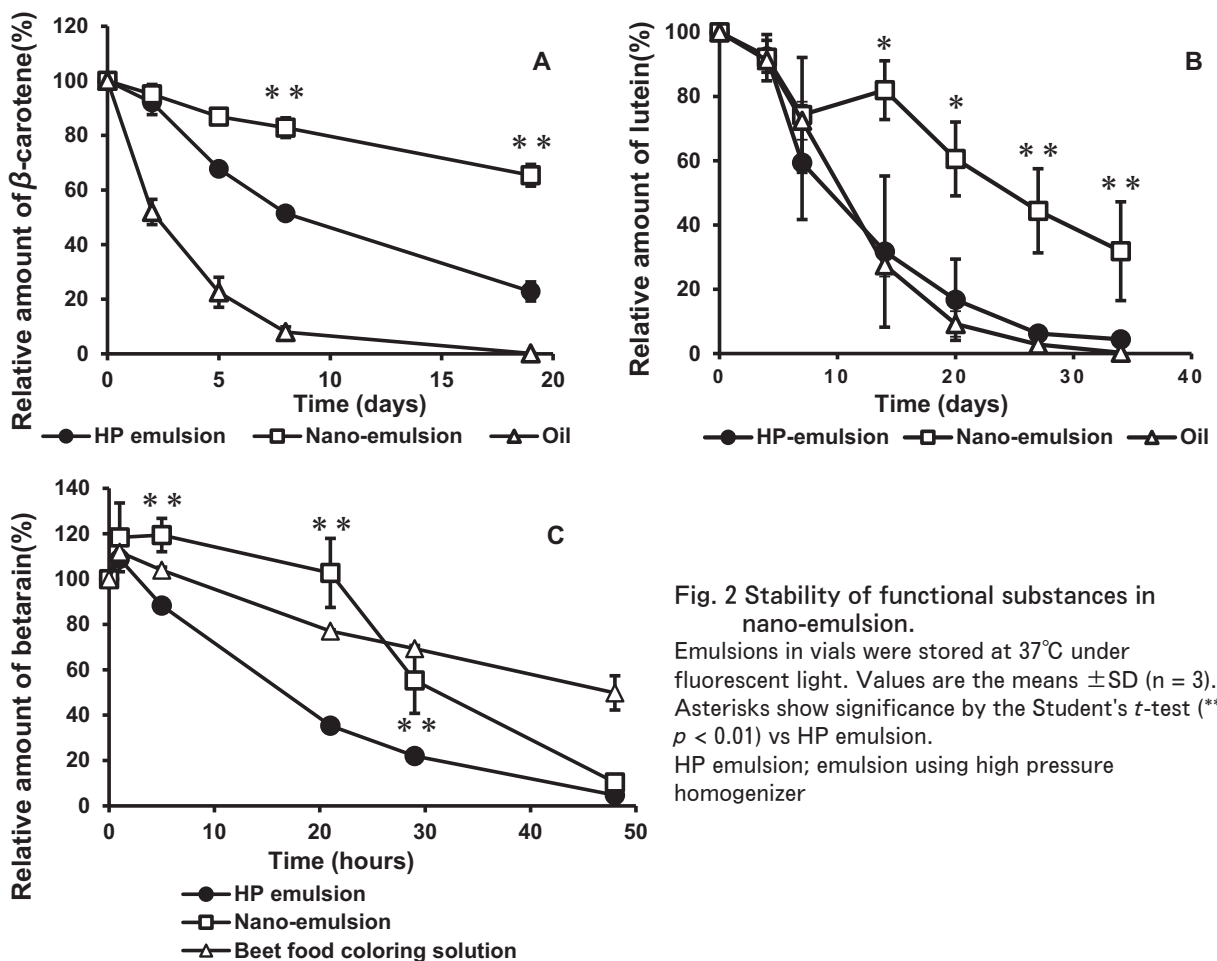


Fig. 2 Stability of functional substances in nano-emulsion. Emulsions in vials were stored at 37°C under fluorescent light. Values are the means \pm SD ($n = 3$). Asterisks show significance by the Student's *t*-test (** $p < 0.01$) vs HP emulsion. HP emulsion; emulsion using high pressure homogenizer

インについて、ナノ乳化物による分解抑制効果を検証した。 β -カロテンについては保存期間が経過するに伴い、油脂中の β -カロテンが最も分解速度が速かった (Fig. 2A)。一方で、高圧乳化物とナノ乳化物中の β -カロテンの分解速度を比較したところ、有意にナノ乳化物の分解速度が遅いことが明らかになった。

次に、ルテインの分解速度については β -カロテンと異なり、油脂と高圧乳化物の分解速度はほとんど変わらなかった (Fig. 2B)。一方で、ナノ乳化物と高圧乳化物の分解速度は β -カロテンと同様にナノ乳化物の方が、有意に分解速度が遅いことが明らかになった。

さらに、ベタレインについては保存期間20時間まではナノ乳化物が最も分解が遅かったが、その後急激に分解し、30時間以降は水溶液の分解が最も遅くなった (Fig. 2C)。また、高圧乳化物とナノ乳化物の分解速度を比較したところナノ乳化物で有意に遅いことが明らかになった。

以上から、検討した3成分ではいずれのナノ乳化物においても高圧乳化物より分解が遅く、分解抑制効果が認められた。また、 β -カロテンの分解において、水系が混合されていないMCTオイル (油脂) で最も分解が速かったことから、 β -カロテンは油脂のみの系より乳化系の方が安定であることが示唆された。一方で、ベタレインは水溶性の成分であるが、脂溶性のカロテノイドと同様に高圧乳化物と比較してナノ乳化物で有意に分解が抑制された。

2. 分解抑制効果に対する乳化剤濃度の影響

1. の分解試験で認められたナノ乳化物による分解抑制能のメカニズム解明のため、乳化剤濃度を変更して検証を行った。実験に先立ち、乳化物が調製可能な下限濃

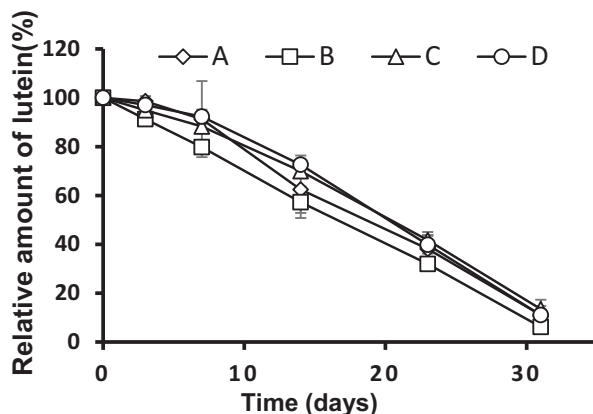


Fig.3 Effect of emulsifier concentration in nano-emulsion on lutein stability
Composition of samples(A-D) were shown in Table 2.

度を検証したところ、乳化剤濃度15.0%で乳化せずに直ちに分離が発生した (データ未掲載)。そのため乳化剤濃度を16.5%から25.5%の範囲で検証を行った (Table 2)。結果として、乳化剤濃度を変更しても、ルテインの分解抑制能は大きく変化しないことが明らかになった (Fig. 3)。このことから、ナノ乳化物によるルテイン分解抑制能は単に乳化剤の抗酸化作用による影響ではなく、乳化状態の変化による影響の可能性が示唆された。

3. 長期保存試験

乳化状態の食品であるドレッシング (O/W乳化) と水系の飲料モデルを用いて、ナノ乳化物のルテイン分解抑制効果を評価した。ドレッシングでは、開始から50日程度まではナノ乳化物の分解が遅い傾向があったがその後、コントロールと同様に急激に減少した (Fig. 4A)。一方、飲料モデルでは有意にナノ乳化物によりルテインの分解が抑制された (Fig. 4B)。

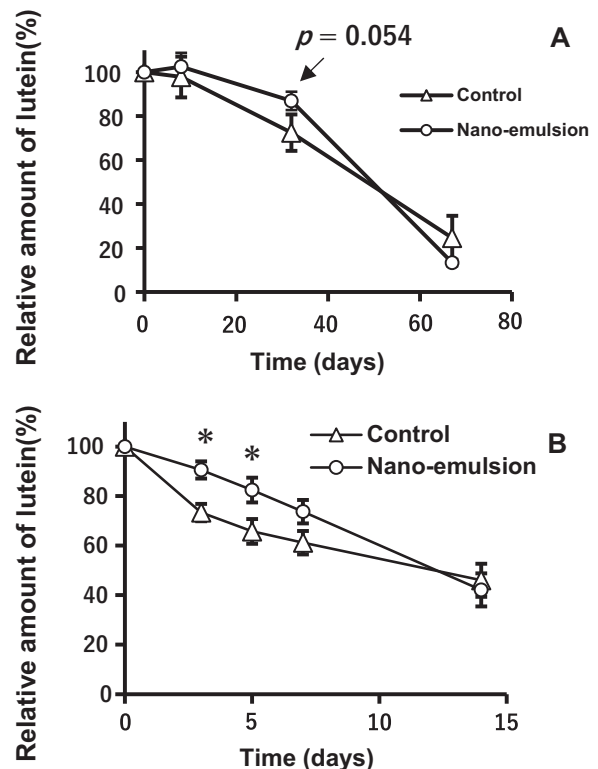


Fig. 4 Stability of lutein nano-emulsion in model food. Emulsions in O/W dressing were stored at 20°C under shade. Emulsions in beverage were stored at 37°C under fluorescent light. Control was added with the same amount of lutein dissolved in MCT oil as the nano-emulsion. Values are the means \pm SD (n = 3). Asterisks show significance by the Student's t-test (* $p < 0.05$) (A)O/W dressing, (B) beverage model
HP emulsion; emulsion using high pressure homogenizer

4. 培養細胞によるルテインの吸収性試験

ルテインの吸収性についてヒト結腸癌由来細胞Caco-2を用いて腸管モデルにおける検討を行った。まず、細胞毒性をWST-1法で確認したところ、本研究で用いた濃度ではナノ乳化物と高圧乳化物、油脂はいずれもブランクとほとんど細胞生残率が変化しなかった (Fig. 5)。そこで、高圧乳化物とナノ乳化物、油脂を分化させたCaco-2細胞に添加し、細胞中のルテイン量を評価したところ、蓄積量はナノ乳化物、高圧乳化物、油脂の順で減少することが明らかになった (Fig. 6B)。

考察

本研究では、機能性食品の開発推進を目的として、機能性成分の分解を抑制し品質を安定化させる手法の開発を試みた。本研究で用いた、カロテノイドとベタレインはいずれも食用色素として利用される一方、光や熱、酸素の影響で分解されやすい特徴をもつ^{5, 10)}。そのため本研究では、これらの成分の分解を抑制するため、これま

で検討が少ない食品原料によるナノ乳化物を用いた手法を検証した。

まず、ナノ乳化物の機能性成分に対する分解抑制能を検証するため、3種の成分で保存試験を行った。結果として、いずれの成分も分解が抑制され、ナノ乳化物による分解抑制効果が脂溶性成分だけでなく水溶性成分においても認められることが示唆された。また、ナノ乳化物による分解抑制効果のメカニズムとして、乳化物中の脂質の酸化が抑制されることで油系における安定性向上が予想されたが、ベタレインで分解抑制効果が認められたことから、油系の外に存在する水系成分の分解も抑制されたと考えられる。この要因として、脂質の酸化により発生したラジカルや過酸化物が水系の成分の分解に影響したことが想定され、ナノ乳化物により脂質の酸化が抑制された結果として、水系成分の分解を抑制した可能性がある。実際に、脂質を含有していないベタレインの水溶液の分解速度は、脂質を含む乳化物より分解が遅いことから、ベタレインは油脂の酸化物により酸化分解が促

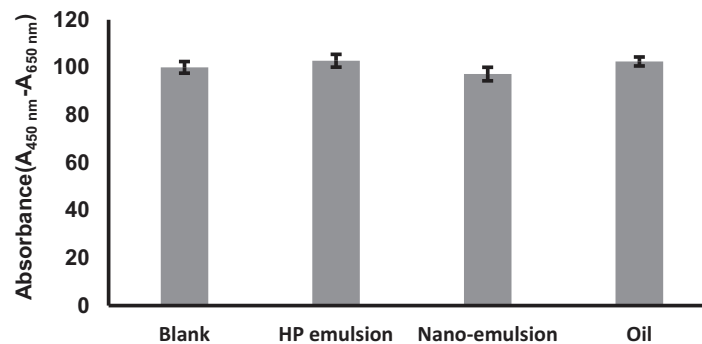


Fig. 5 Determination of the cytotoxic activity of emulsions and oil by WST-1 assay.

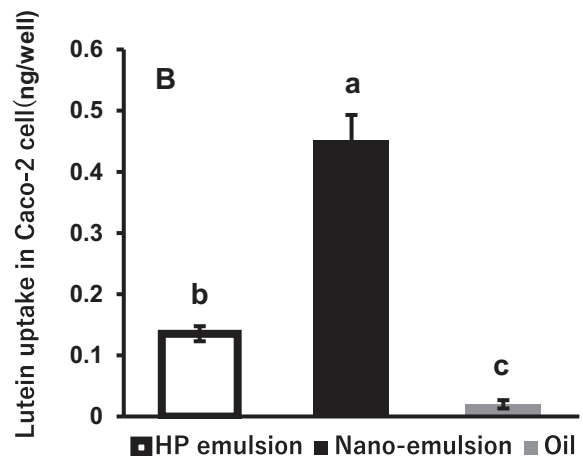
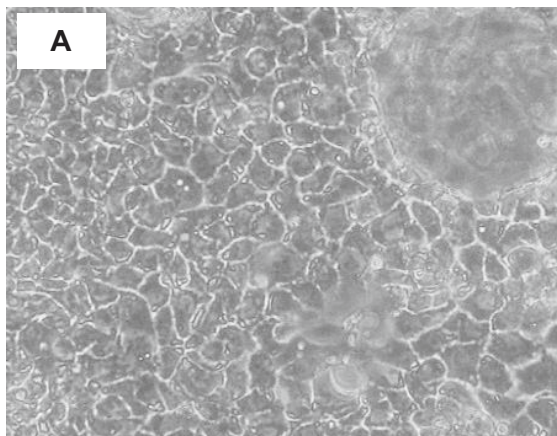


Fig. 6 Microphotographic of Caco-2 cell line(A) and cellular uptake of lutein in Caco-2 cells(B). Error bars indicate \pm SD. Bars labeled with the same letter are not significantly different (Tukey's multiple range test, $p < 0.01$)

進された可能性が示唆される。今後、機能性成分の分解抑制メカニズムの解明のため、ナノ乳化物による脂質酸化への影響を詳細に検証する必要がある。

次いで、ナノ乳化物の分解抑制能が乳化剤の濃度と相関するか検証を行った。乳化剤には抗酸化作用をもつものが知られており、本研究のナノ乳化物の分解抑制が単なる乳化剤の抗酸化作用か乳化状態による物理的性質によるものか検証を行った。結果として、乳化剤濃度に関わらず分解抑制能が認められ、その効果は濃度と関係がなかったことから、少なくとも乳化物の抗酸化作用によるものではないことが明らかになった。

次に、長期の保存試験をドレッシングと飲料モデルで行った。結果として、Fig. 4で認められたような乳化物単独の際の顕著な分解抑制効果は認められなかったが、いずれも分解が遅くなる傾向が認められた。分解抑制効果が食品中で弱まった原因として、ドレッシング中の酸により分離が起こった可能性が考えられ、実際に食品に添加する場合は食品の配合を考慮に入れる必要があることが明らかになった。

最後に、機能性成分の生体内における吸収性を検証した。機能性成分の吸収性は分散状態によって大きく異なることが知られており、特にカロテノイドは脂質に溶解することで吸収性が向上することが報告されている¹¹⁾。その要因として、胆汁酸による脂質のミセル化がカロテノイドの吸収性向上に寄与することが示されているが、本研究ではあらかじめ微細な乳化物であるナノ乳化物とすることで、ミセル化と同様に吸収性の向上が可能か検証を行った。培養細胞を用いて腸管モデルを作製しルテインの吸収性を評価した結果、細胞中のルテイン量はナノ乳化物で顕著に多かった。このことは、ナノ乳化物の状態で小腸に到達すれば、腸管における吸収性が向上する可能性を示している。今後、腸溶錠型機能性食品の吸収制御や、消化管における分解を検証することで一般食品への応用につながることを期待される。

本研究により明らかになったナノ乳化物による機能性成分の分解抑制技術は、機能性成分の安定化に有益な情報となり、今後、本研究で実施した機能性成分以外の機能性成分に対する効果や、実際の食品に添加した際の機能性などの検証により、機能性食品の普及に寄与する知見となる。

要約

食品由来成分で調製したナノ乳化物を用いて、カロテノイドとベタレインの分解および細胞への吸収性に与え

る影響について検証を行った。結果として、高圧乳化物と比較して、ナノ乳化物の β -カロテンとルテインおよびベタレインに対する分解抑制効果が明らかになった。このことは、機能性成分をナノ乳化物の状態に加工することで、安定性を向上できる可能性を示した。さらに、ルテインのナノ乳化物の吸収性を腸管モデルで検証した結果、高圧乳化物より吸収性が高いことが示唆され、ナノ乳化物は機能性成分の安定性に加えて吸収性向上についても有効である可能性が示された。

文献

- 1) Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 83-91.
- 2) Nakaya, K., Ushio, H., Matsukawa, S., Shimizu, M., & Ohshima, T. (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, 40(5), 501-507.
- 3) 堀内 照夫 (2010). 乳化基礎理論, 44(1), p2-22.
- 4) Wakisaka, S., Nakanishi, M., and Gohtani, S. (2014). Phase behavior and formation of o/w nano-emulsion in vegetable oil/mixture of polyglycerol polyricinoleate and polyglycerin fatty acid ester/water systems. *J. Oleo. Sci.*, 63 229-237.
- 5) 高市真一編 (2006). 「カロテノイドーその多様性と生理活性ー」, 裳華房, 東京.
- 6) Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., and Bolhassani, A. (2017). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br. J. Pharmacol.*, 174(11):1290-1324.
- 7) Strack, D., Vogt, T., and Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochem.*, 62(3) 247-69
- 8) Wang, C.Q., and Yang, G.Q., (2010). Betacyanins from *Portulac oleracea* L. ameliorate condition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine* 17 527-532
- 9) Tesoriere, L., Allegra, M., Gentile, C., and Livrea, M. A. (2009). Betacyanins as phenol antioxidants: chemistry and mechanistic aspects of lipoperoxyl radical-scavenging activity in solution and liposomes. *Free Radic. Res.*, 43 706-717

- 10) Herbach, K. M., Stintzing, F. C., and Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.*, **71**(4) 41-50.
- 11) Deming, Denise M., and John W. Erdman. (1999). Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure Appl. Chem.*, **71**(12) 2213-2223.