HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ニンニク含硫化合物による魚油の酸化抑制効果に関する研究
Author(s)	山谷, 祥史
Citation	北海道大学. 博士(水産科学) 甲第15219号
Issue Date	2022-12-26
DOI	10.14943/doctoral.k15219
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/88332
Type	theses (doctoral)
File Information	Yoshifumi_Yamaya.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ニンニク含硫化合物による魚油の酸化抑制効果に関する研究
(Study on the effect of garlic sulfur compounds on the inhibition of fish oil oxidation)

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻
Division of Marine Life Science
Graduate School of Fisheries Sciences
Hokkaido University

山谷　祥史
Yoshifumi Yamaya

2022 年

目次

序論 ------1

第 1 章　ニンニクに含まれる水溶性含硫化合物の抗酸化作用の評価 ------7

1－1　緒言 ------7

1－2　実験 -----10

1－2－1　ニンニクの抽出液の調製 -----10

1－2－2　加温ニンニクと抽出液の調製 -----10

1－2－3　水溶性含硫化合物 -----13

1－2－4　水溶性含硫化合物の定量 -----15

1－2－5　DPPH ラジカル消去活性試験 -----16

1－2－6　褐変度の測定 -----16

1－3　結果 -----17

1－3－1　ニンニクおよび黒ニンニクの水溶性含硫化合物の含量 -----17

1－3－2　褐変度 -----20

1－3－3　水溶性含硫化合物の DPPH ラジカル消去活性 -----22

1－4　考察 -----25

第 2 章　ニンニクに含まれる脂溶性含硫化合物の抗酸化作用の評価 -----28

2－1　緒言 -----28

2－2　実験 -----30

2－2－1　脂溶性含硫化合物の合成 -----30

2－2－2　脂溶性含硫化合物の分析 -----32

2－2－3　DPPH ラジカル消去活性試験 -----33

2－2－4　魚油の前処理と添加試験 -----33
2－3　結果 -----38
2－3－1　脂溶性含硫化合物の合成 -----38
2－3－2　DPPH ラジカル消去活性試験 -----48
2－3－3　魚油に対する酸化抑制効果 -----50
2－4　考察 -----53

第 3 章　ニンニク含硫化合物によるエマルション系での
魚油酸化抑制効果の評価 -----61
3－1　緒言 -----61
3－2　実験 -----62
3－2－1　ニンニク抽出液の調製 -----62
3－2－2　魚油エマルションの調製 -----63
3－2－3　過酸化脂質の評価 -----66
3－3　結果 -----67
3－3－1　ニンニク抽出物 -----67
3－3－2　過酸化脂質 -----69
3－4　考察 -----71

第 4 章　総括 -----74

文献 -----80
付図 -----85
謝辞 ----111

序論

栄養素のなかでも脂質、糖質、タンパク質は 1 日の摂取量が多く、三大栄養素とも呼ばれる。その中で脂質は主にエネルギー源としての役割を担っている。脂質にはエネルギー源としての機能の他、抗炎症作用や抗血栓作用など様々な生理機能が報告されている[1)2)]。特に、脂質を構成する脂肪酸のなかでも、エイコサペンタエン酸(Eicosapentaenoic acid、EPA、図 1)やドコサヘキサエン酸(Docosahexaenoic acid、DHA、図 2)などの n-3 系高度不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid、PUFA)は動脈硬化予防や抗血栓作用、降圧効果、抗炎症作用など、様々な機能性が広く知られている[3)−5)]。また、その機能性を活かして健康食品はもとより、医薬品にも利用されている[5)]。これら EPA や DHA は魚油に多く含まれ、国内外で関心は高い。

トリアシルグリセロールを構成する脂肪酸の化学骨格に存在する二重結合は主にシス型で、熱や光などの因子により二重結合から水素が引き抜かれ、アルキルラジカル(R・)が発生する。これと酸素が化学反応し、ペルオキシルラジカル(ROO・)が生成する。ROO・は反応性が高く、未反応の脂肪酸を攻撃して水素を引き抜き、過酸化脂質(ROOH)となると同時に、新しく別の R・を生成し、一連の反応が連鎖的に進むことが特徴である(図 3)[1) 6) 7)]。

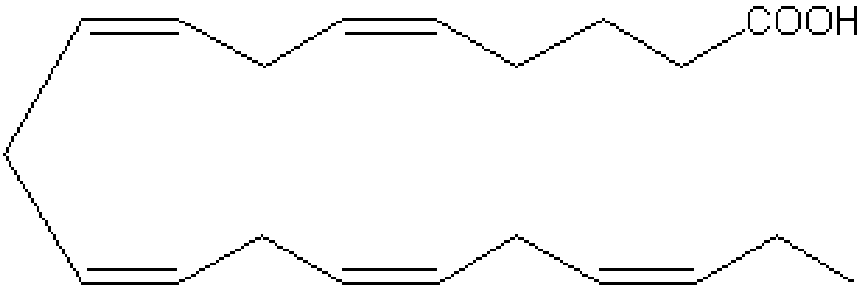


図１　エイコサペンタエン酸(Eicosapentaenoic acid、EPA)

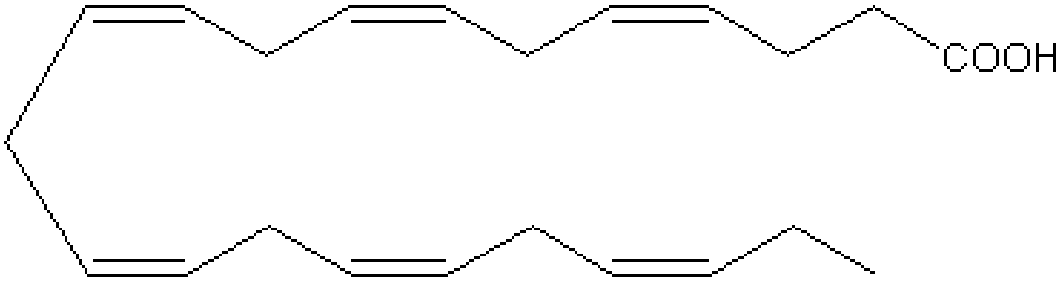


図２　ドコサヘキサエン酸(Docosahexaenoic acid、DHA)

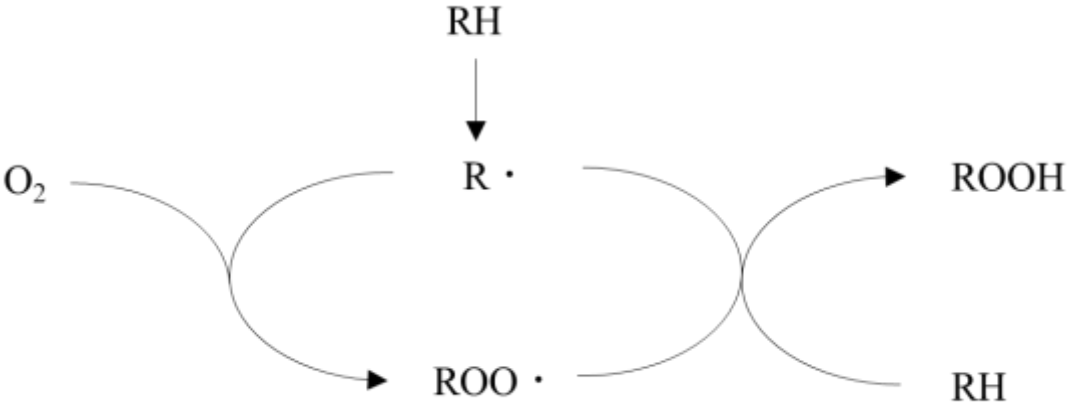


図３　脂質酸化のスキーム [1) 6) 7)]

PUFA は化学構造に二重結合を複数有し、特に EPA は 5 つ、DHA は 6 つの二重結合を有するため、過酸化脂質を形成しやすく、これらは不飽和脂肪酸の中でも化学構造的に酸化反応の影響を受けやすい。脂肪酸の酸化は風味劣化や栄養価の低下、健康機能性の低下を招き、さらには、ヘキサナールやペンタナール等の悪臭が発生する[8)9)]。このように、脂質の酸化は、加工食品への利用において、製品品質上の問題となる。この酸化安定性の低さが EPA や DHA を含む魚油を食品等に利用する際の大きな問題となっており、食品添加物としてビタミン C(アスコルビン酸)やビタミン E(トコフェロール)などの酸化防止剤の添加が必須となる。しかし、二重結合が複数存在する PUFA では、これらを添加することでの酸化防止は十分ではない。

脂溶性の酸化防止剤として使用例の多いトコフェロールについては、魚油に対しての酸化防止効果を実験した報告が多数あり、α-トコフェロールには初期のヒドロペルオキシドが増加するまでの誘導時間を遅延させ、この効果は添加量の増加に伴い向上するが、一定量以上の α-トコフェロールの添加により、抗酸化作用が低下するとされている[10)]。また、牛脂を用いた試験でも、牛脂に対して 0.01%から 0.05%に α-トコフェロールの添加量を増加させることで抗酸化作用は向上したが、0.1%添加では 0.05%添加よりも活性は低下したとされている[11)]。これらのことを考慮すると、トコフェロールの処方は脂質の酸化を完全に防止できるものではないことが理解できる。

抗酸化作用の評価系は電子スピン共鳴装置(Electron Spin Resonance、ESR)を用いた方法、スーパーオキシドディスミュターゼ(Superoxide dismutase 、SOD)様活性、活性酸素吸入能(Oxygen Radical Absorbance Capacity、ORAC)、一重項酸素消去能測定法(Singlet Oxygen Absorption Capacity、SOAC)などがある[12)]。脂質の酸化反応を抑制するためには、初期酸化で発生するラジカルを補足することが重要であると考え、本研究では抗酸化物質のスクリーニングとして、比較的安定な

ラジカルである 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)を用い、ラジカル補足能の評価を実施した。

ところで、ニンニク(*Allium sativum*)は古くから香辛料や滋養強壮食物として利用されている。ニンニクやその関連物質には抗酸化作用や抗菌性、抗がん性など様々な機能性が知られている[13]。抗酸化作用については、様々な野菜の中でも特にニンニクは活性が高いという報告があるが、水抽出液の評価に留まっている[14]。ニンニクに特徴的な成分は含硫化合物で、水溶性の物質としてはアリイン(AL)やγ-グルタミルペプチド類が挙げられる。AL は細胞破砕時にアリイナーゼ (EC4.4.1.4)の作用を受けて脂溶性のアリシンへと変化する(図 4)[13)15)16)]。アリシンは化学的に不安定であるためアリルスルフィド類、ビニルジチイン類等の脂溶性含硫化合物へと変換され、ニンニクに特徴的なにおい成分となる(図 5)[13)15)16)]。脂溶性含硫化合物に着目し、その抗酸化作用を評価したものもある[17]が、水溶性、脂溶性の含硫化合物のうち、いずれの化合物が強い抗酸化作用を有するかなどの比較報告はない。食品は水溶性、脂溶性成分が混在しており、ニンニク関連成分の抗酸化作用を評価するにあたり、水溶性成分だけでなく、脂溶性成分についても評価することが重要である。

そこで、本研究では、ニンニク関連の含硫化合物に着目し、対象の脂質を魚油として、抗酸化作用について検討した。

第 1 章では水溶性含硫化合物およびニンニク加工品の抗酸化作用を DPPH ラジカル消去法により検討した。

第 2 章では脂溶性含硫化合物の抗酸化作用を DPPH ラジカル消去法により検討した。また、脂溶性含硫化合物を魚油に添加し、魚油の過酸化物価(Peroxide Value、POV)の経時変化を測定した。

第 3 章ではモデル食品として魚油エマルションを調製し、ニンニク関連化合物の抗酸化作用を評価した。

以上の検討より、ニンニクに含まれる複数の抗酸化物質の理解をするとともに、魚油含有加工食品への有効性を明らかとすることを目的とした。

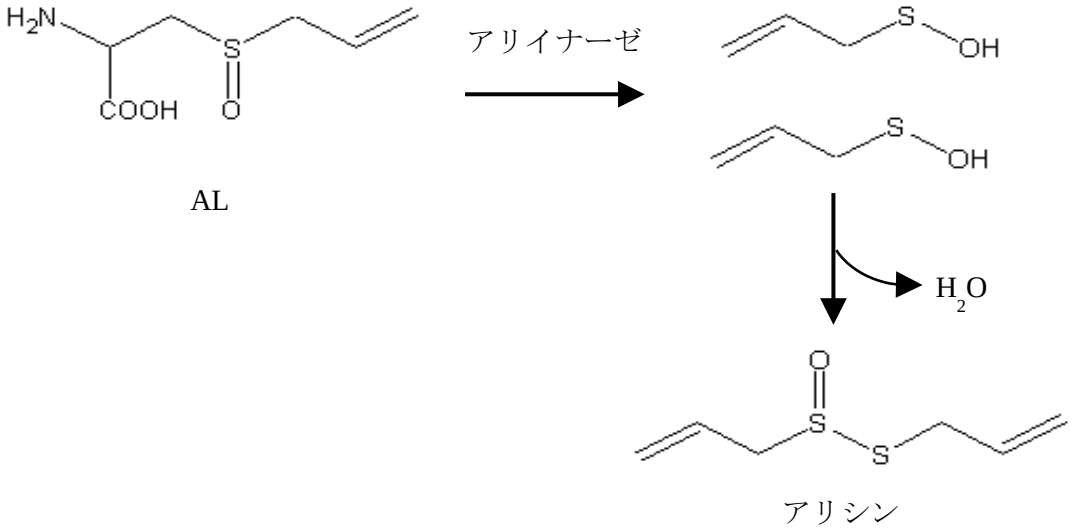


図 4　アリイナーゼによるアリインからアリシンへの反応 [13)]

AL：アリイン

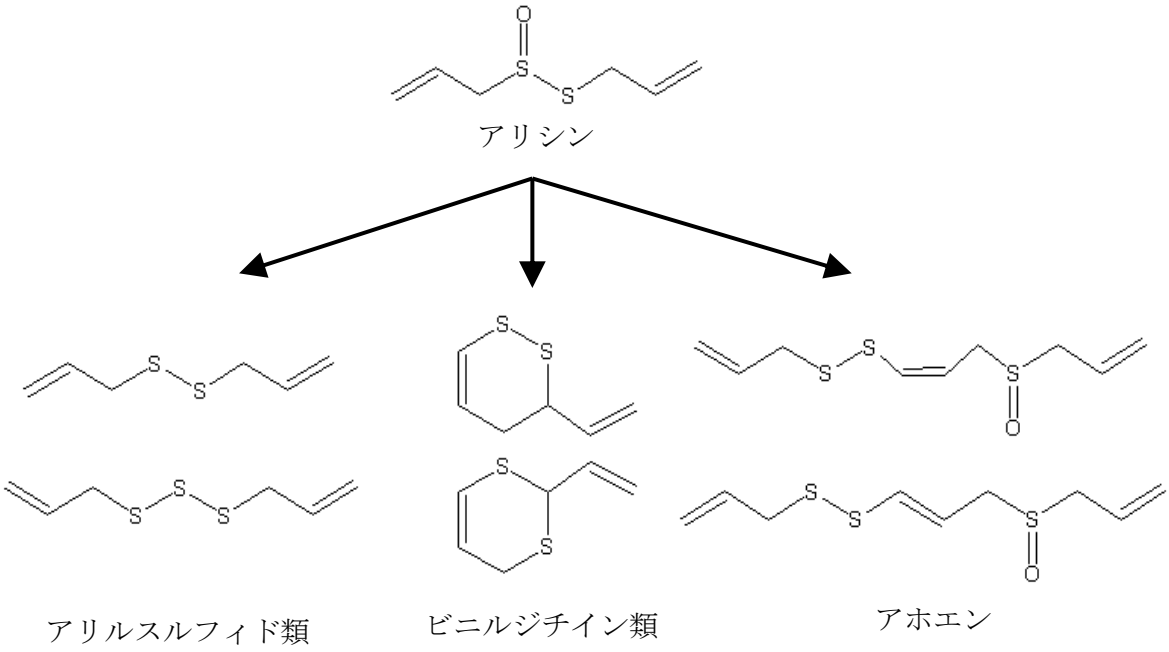


図 5　アリシンからのアリルスルフィド類、ジチイン類、アホエンへの反応 [13)]

第 1 章
ニンニクに含まれる水溶性含硫化合物の抗酸化作用の評価

1－1　緒言

脂質の酸化は水素が引き抜かれることによる R・の生成に始まり、ROO・、ROOH と反応する。一連の酸化反応により生成する ROO・は未反応の脂質より水素を引き抜くため、脂質の反応は連鎖的である。脂質の初期酸化を防止するにあたり、ラジカルを補足することでこの一連の酸化反応を抑制することが可能と考えられる。DPPH(図 6)は比較的安定なラジカルで、ラジカル補足能を評価するために用いられる。DPPH の溶媒としてエタノールが使われ、評価サンプルの抽出液調製の際の抽出溶媒は、エタノールと親和性があれば評価が可能である。水抽出液やアルコール抽出液での実験例が多いものの、サンプルの抽出溶媒に極性の低いヘキサンなどの有機溶剤を用いても評価が可能である [18)]。

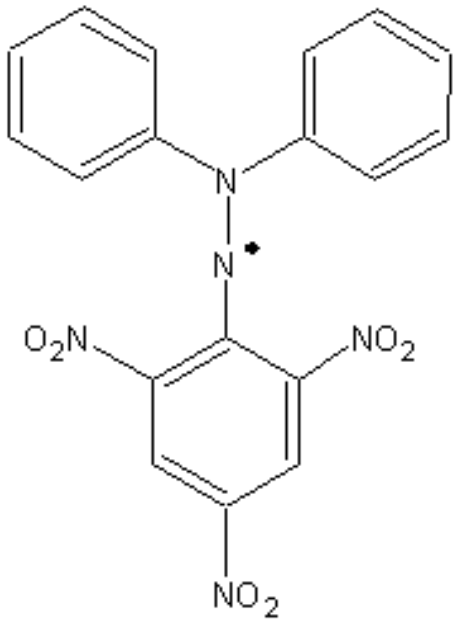


図 6　2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)

ニンニクに特徴的な成分は含硫化合物で、主なものとして AL、γ-グルタミル-S-アリルシステイン(Gu-ALC)、γ-グルタミル-S-1-プロペニル-システイン(Glu-PEC)が挙げられる [13)15)19)20)]。これら含硫化合物のうち、AL はアリイナーゼ(EC4.4.1.4)の作用を受けて脂溶性のアリシンへと変換する。アリイナーゼは AL のほか、メチイン(MT)、イソアリイン(IAL)にも作用する [15)]。ニンニクを扱う実験の場合、このアリイナーゼの作用とアリシンの不安定さを十分考慮する必要がある。すなわち、ニンニク抽出液を調製する際、単純にりん片を粉砕すると、AL からアリシンに変換する化学反応が起こり、さらにはアリシンからアリルスルフィド類、ビニルジチイン類が発生する。特に水溶性含硫化合物を対象とする実験では、アリイナーゼを作用させずにニンニクを前処理する必要がある。ニンニクの前処理として、ニンニクりん片をボイルなどして加熱することでアリイナーゼを変性、失活させてから抽出操作をする手法 [21)]や、酸性アルコール水溶液を用いることでアリイナーゼの至適条件とは異なる状態となるように前処理をする手法が考えられる [19)20)]。本研究では、アリイナーゼの至適条件を回避するため、抽出溶媒に酸性含水アルコールを用いた。また、ニンニクをはじめとするネギ属から単離した含硫化合物を用いて実験を実施した。

ニンニクは古来より滋養強壮野菜やスパイスとして利用されてきた。ニンニクの加工形態は様々で、常温や冷凍で流通しているニンニクペーストや、乾燥品であるニンニクチップ、植物油にニンニクりん片を漬けたオイルマセレートが利用されてきた。比較的新しいニンニク加工品として、黒ニンニクがある。2006 年に初めて報告 [22)]された黒ニンニクは、ニンニクを高湿条件下で 2〜6 週間低温加温を継続することで得られる。黒ニンニクは原料ニンニクとは見た目、味が全く異なるばかりでなく、低温加温することで、含硫化合物の化学変化が生じて原料ニンニクには含まれない含硫化合物が生成する [23)]。機能性の報告としては、抗酸化作用や抗ガン作用がある [13)]。

本章では、ニンニクやその加工品の抽出液を調製し、DPPH ラジカル消去法により抗酸化作用を検討した。また、ニンニクをはじめとするネギ属から 6 種類の含硫化合物を精製、単離して、標準品とした。これに 2 種の市販の含硫化合物標準品を加え、計 8 種類の水溶性含硫化合物の抗酸化作用を検討した。

1－2 実験

1－2－1　ニンニク抽出液の調製

(1)供試ニンニク

地方独立行政法人青森県産業技術センター野菜研究所で 2021 年 7 月に収穫した福地ホワイト黒石 A 系統(以下黒石 A)、白玉王(登録品種)の 2 種類を国産ニンニクとして用いた。輸入ニンニクとして、中国産、スペイン産のニンニクを、インターネットによる通信販売のものを購入して使用した(品種不明)。いずれのニンニクも 2021 年に収穫したもので、同年 9 月に入手した。ニンニクりん片を傷つけないように剝皮、盤茎ごと採取し、直ちに-60℃で 48 時間以上冷凍した。凍結りん片を室温に 5 分程度放置し、冷凍状態が解除されない状態でりん片をスライスし、再び-60℃で冷凍した。これを凍結乾燥、粉砕してニンニク凍結乾燥粉末を得た。調製したニンニク粉末は実験に供するまで-20℃で保管した。

(2)抽出液の調製

凍結乾燥粉末を室温に静置して常温とした後、250 mg 採取してメタノール/水/ギ酸(50/50/1、v/v/v)を約 8 mL 加え、60 分間超音波抽出した。これを 10 mL に定容後、遠心分離して上清を回収し、DPPH ラジカル消去活性試験および褐変度測定用の試料液とした。

1－2－2　加温ニンニクと抽出液の調製

(1)供試ニンニク

加温試験の原料ニンニクとして、地方独立行政法人青森県産業技術センター野菜研究所で 2021 年 7 月に収穫した白玉王を用いた。ニンニクりん茎を加温処理するまで-2℃に設定した冷蔵庫内で保管した。

(2)加温ニンニク

10 ヶ月間-2℃で保管したニンニクに加温処理を施した。ニンニクの加温にはポリエチレンテレフタレート製の容器と恒温器(アズワン、ETTAS MOV-450S)を用いた。容器底部に 250 mL の蒸留水加え、その上部にプラスチック製の網を、さらにその上部にニンニクりん茎約 30 個を設置し、容器に蓋をした。その容器ごと 65℃に設定した恒温器に設置して加温した(図 7)。加温処理 0 日(未加熱)、1 日、3 日、7 日、14 日、21 日、28 日でニンニクりん茎 3 個を無作為に抜き取った。処理 0 日(未加熱)、1 日については、凍結乾燥の後、粉砕して分析に供するまで-20℃で保管した。処理 3 日以降では、アリイナーゼが熱により変性し、酵素反応が進行しないと考え、可食部であるりん片を採取後、フードプロセッサーでペーストにした。得られたペーストを分析時まで-20℃で保管した。

(3)抽出液の調製

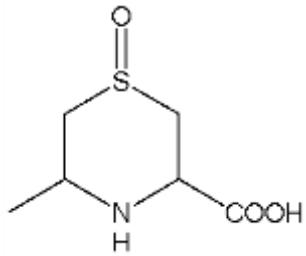
加温処理 0 日、1 日の凍結乾燥粉末では採取量を 2 g、加温処理 3 日以降のペーストでは採取量を 5 g とした。これに抽出溶媒のメタノール/水/ギ酸(50/50/1、v/v/v)を約 15 mL 加え、60 分間超音波抽出し、25 mL に定容した。定容後、遠心分離して上清を回収し、抽出溶媒で適宜希釈して DPPH ラジカル消去活性試験および褐変度測定用の試料液とした。

図 7　ニンニク加温試験の様子

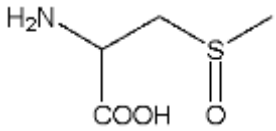
1－2－3　水溶性含硫化合物

ニンニクをはじめとするネギ属に含まれる主な水溶性含硫化合物の構造、名称、略称を図 8 に示した。Ueda ら [24]、Lawson ら [25]の報告を参考に、ニンニクから AL、Glu-ALC、Glu-PEC を、ニラより MT を、ネギより IAL を、ニラ種子より Glu-MEC を単離した。純度を高速液体クロマトグラフ(HPLC、Alliance、日本ウォーターズ株式会社)により 99%以上であることを確認した(HPLC クロマトグラムピーク面積比 99%以上、データ示さず)。化学構造を核磁気共鳴装置(JNM-ECZ500R、日本電子株式会社)で確認して標準物質とした(付図参照)。シクロアリイン(CA、富士フイルム和光純薬株式会社)および S-アリルシステイン(SAC、東京化成工業株式会社)は購入して使用した。

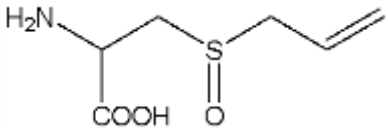
各水溶性含硫化合物を 0.1%ギ酸で 0.25 mg/mL に調製し、DPPH ラジカル消去活性試験の試料液とした。



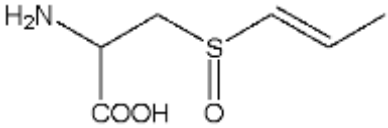
(1)



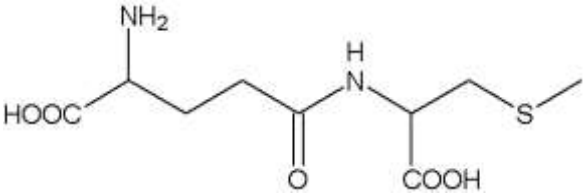
(2)



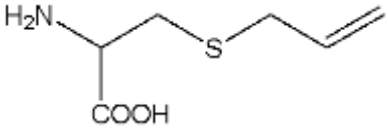
(3)



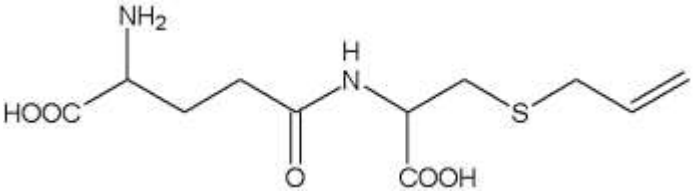
(4)



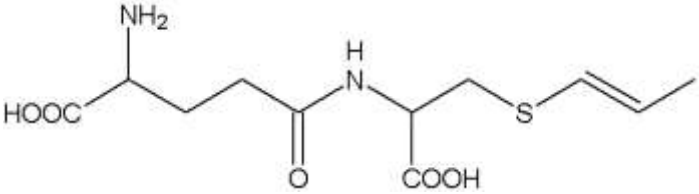
(5)



(6)



(7)



(8)

図 8　ニンニク関連の水溶性含硫化合物

(1) シクロアリイン (CA)　(2) メチイン (MT)　(3) アリイン (AL)　(4) イソアリイン (IAL)　(5) γ-グルタミル-S-メチルシステイン (Glu-MEC)　(6) S-アリルシステイン (SAC)　(7) γ-グルタミル-S-アリルシステイン (Glu-ALC)　(8) γ-グルタミル-S- (E) -1-プロペニルシステイン (Glu-PEC)

1－2－4　水溶性含硫化合物の定量

山崎らの方法[19)20)]で水溶性含硫化合物を HPLC で定量した。粉末サンプルの場合は 500 mg～2.5 g、ペーストサンプルの場合は 10 g を精秤し、そこにメタノール/水/ギ酸(50/50/1、v/v/v)をそれぞれ約 15 mL、30 mL 加え、60 分間超音波抽出した。粉末サンプルの場合は 25 mL、ペーストサンプルの場合は 50 mL に定容した。定容した液を遠心分離して抽出液を得た。

あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL の順に通液して初期化処理した Bond Elut　jr SCX(500 mg、アジレントテクノロジー株式会社)に 5 mL の抽出液を負荷し、5 mL のメタノール/水/ギ酸(50/50/0.1、v/v/v)で洗浄後、100 mM KH_2PO_4(pH4.0)で溶出させ、10 mL に定容した。これを 0.45 µm メンブレンフィルターでろ過し、HPLC に供した。HPLC 条件は、以下のとおりとした。別に 105℃乾燥減量法により求めた凍結乾燥粉末の水分値により補正し、乾物中の含量を算出した。測定は 3 反復行った。

システム　：Alliance (e2695 separation module、日本ウォーターズ株式会社)
カラム　　：Capcellpak SCX UG 80(φ4.6×250 mm、5 µm、株式会社大阪ソーダ)
カラム温度：45℃
移動相　　：10 mM KH_2PO_4 (pH2.5)
流速　　：1.0 mL/分
注入量　　：10～100 µL
検出　　：フォトダイオードアレイ(PDA)検出器
　　(解析波長 210 nm、2998PDA 検出器、日本ウォーターズ株式会社)

1－2－5　DPPH ラジカル消去活性試験

試料液 180 μL に 500 μM DPPH エタノール溶液 20 μL を添加し、20 分後に 520 nm の吸光度を測定した。測定にはマイクロプレートリーダー(SH-1200、コロナ電気株式会社)を用いた。ブランクはエタノールとし、ラジカル消去率を次式により算出した。測定は 3 反復行った。

ラジカル消去率[%] = { 1 – (AS – ASB) / (AE – AEB) } × 100

AS　試料反応液の吸光度

ASB　試料液の吸光度(サンプルブランク)

AE　エタノール反応液の吸光度

AEB　エタノールの吸光度(ブランク)

1－2－6　褐変度の測定

褐変度として試料液の 400 nm の吸光度を測定した [26)]。測定対象は、ニンニク抽出液、加温ニンニク抽出液とした。測定にはマイクロプレートリーダー(SH-1200、コロナ電気株式会社)を用いた。測定は 3 反復行った。

1－3　結果

1－3－1　ニンニクおよび黒ニンニクの水溶性含硫化合物の含量

(1)産地の異なるニンニク

国産ニンニク、輸入ニンニク、計 4 種類のニンニクの水溶性含硫化合物の定量結果を表 1 に示した。ニンニクの凍結乾燥粉末から AL および Glu-PEC が主な水溶性含硫化合物として検出され、AL および Glu-PEC 含量はそれぞれ、黒石 A で 1.51±0.20%(w/w、平均値±標準偏差、以下同じ) 、0.90±0.11%、白玉王で 1.37±0.14%、0.81±0.08%、中国産で 2.44±0.04%、0.62±0.03%、スペイン産で 3.96±0.05%、0.54±0.01%であった。輸入ニンニクと比較して、国産ニンニクで AL 含量がわずかに低く、Glu-PEC 含量が高い結果となった。また、輸入ニンニクで IAL と CA が検出された。

(2)加温ニンニク

ニンニク加温過程における水溶性含硫化合物の消長を図 9 に示した。加温 0 日(未加温)では、主に AL が検出され、次いで IAL 含量が高かった。-2℃の冷蔵貯蔵のない白玉王と比較して(表 1)、AL、IAL 含量が高く、Glu-PEC 含量が低かった。加温により AL、IAL が減少した一方で、CA が顕著に増加した。その他の水溶性含硫化合物は加温処理を継続することで減少した。

表 1　ニンニクりん片中の水溶性含硫化合物量

化合物	黒石 A	白玉王	中国	スペイン
CA	0.19±0.01	0.19±0.01	0.23±0.00	0.38±0.00
MT	0.33±0.03	0.30±0.02	0.41±0.01	0.44±0.01
AL	1.51±0.20	1.37±0.14	2.44±0.04	3.96±0.05
IAL	0.01±0.01	0.01±0.00	0.27±0.00	0.49±0.00
Glu-MEC	0.00±0.00	0.00±0.00	0.16±0.01	0.08±0.01
SAC	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.08±0.02
Glu-ALC	0.64±0.08	0.58±0.06	0.34±0.01	0.12±0.00
Glu-PEC	0.90±0.11	0.81±0.08	0.62±0.03	0.54±0.01

平均値±標準偏差 (n=3)

単位　%(w/w, dry)

CA : シクロアリイン、MT : メチイン、AL : アリイン、IAL : イソアリイン、Glu-MEC : γ-グルタミル-S-メチルシステイン、SAC : S-アリルシステイン、Glu-ALC : γ-グルタミル-S-アリルシステイン、Glu-PEC : γ-グルタミル-S-(E)-1-プロペニルシステイン

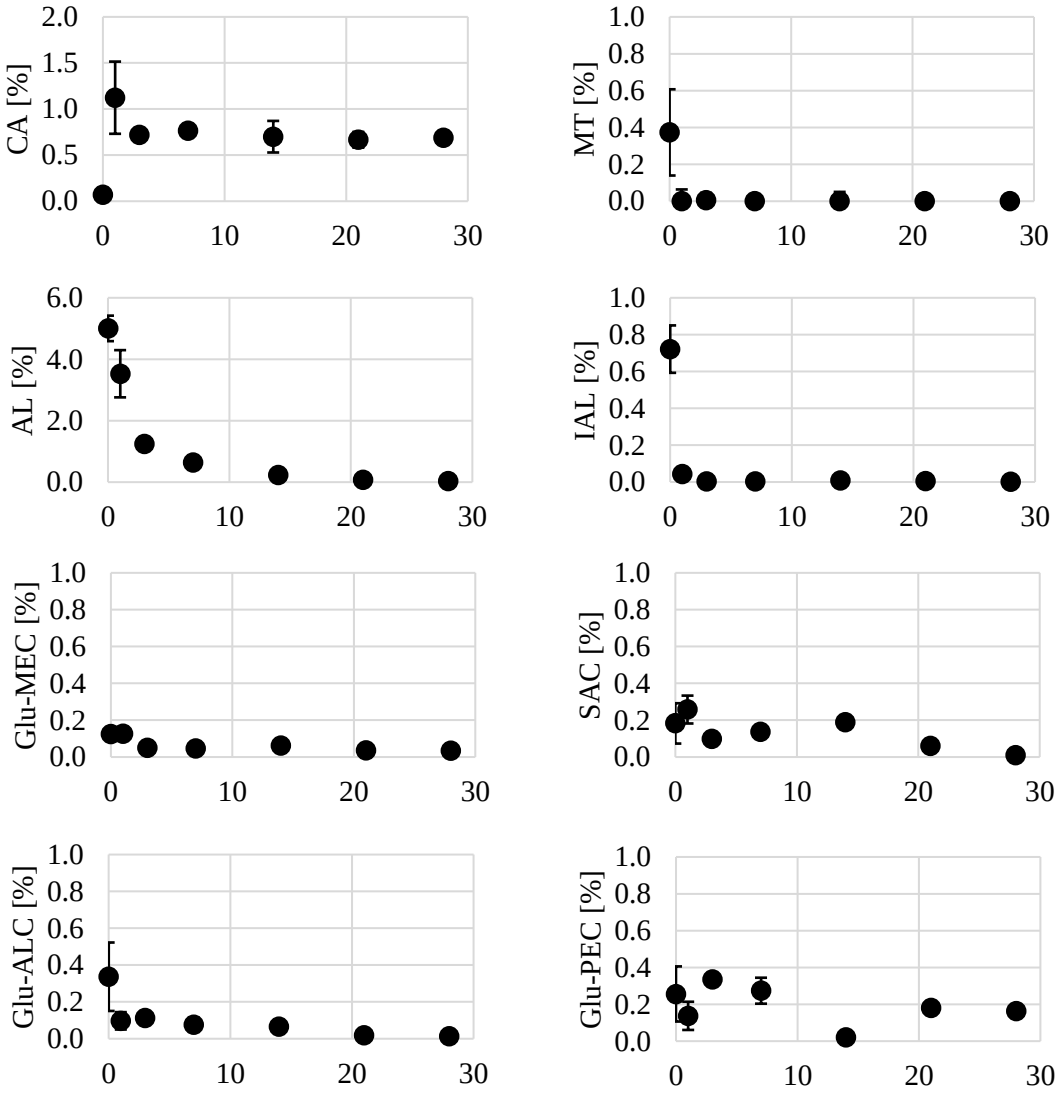


図 9　加温処理中のニンニク白玉王内の水溶性含硫化合物の変化

横軸：処理日数、単位　日

縦軸：含量、単位　%(w/w、dry)

CA : シクロアリイン、MT : メチイン、AL : アリイン、IAL : イソアリイン、Glu-MEC : γ-グルタミル-S-メチルシステイン、SAC : S-アリルシステイン、Glu-ALC : γ-グルタミル-S-アリルシステイン、Glu-PEC：γ-グルタミル-S- (E)-1-プロペニルシステイン

平均値±標準偏差(n=3)をプロットした。

1－3－2　褐変度

(1)産地の異なるニンニク

　ニンニク抽出液の褐変度の測定結果を図 10 に示した。国産ニンニクと比較して海外産ニンニクで褐変度が高かった。

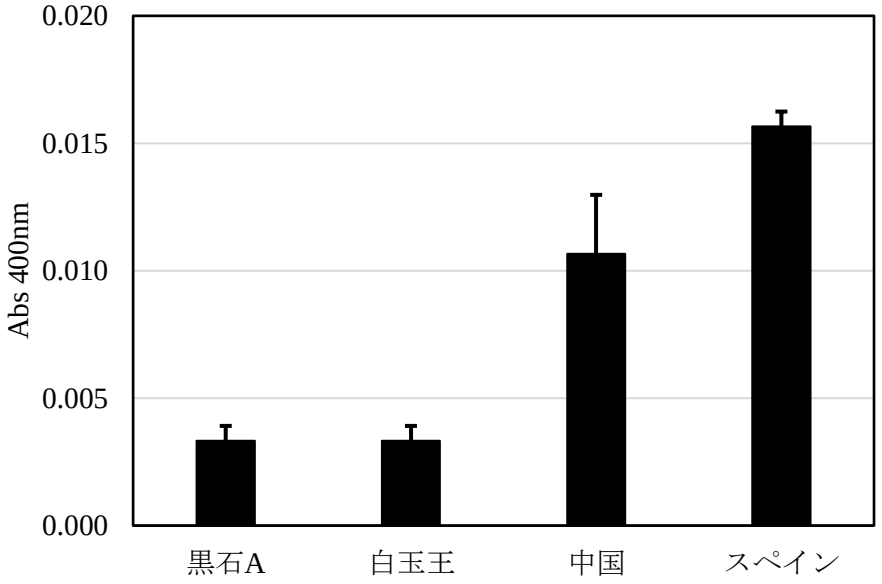


図 10 ニンニク抽出液の褐変度

評価濃度　ニンニク粉末/抽出溶媒 = 250 mg/10 mL(=25 mg/mL)

抽出溶媒　メタノール/水/ギ酸=50/50/1 (w/w/w)

平均値±標準偏差 (n=3)

(2)加温ニンニク

加温ニンニクの褐変度の変化を図 11 に示した。加温処理の継続により、褐変度が増大した。

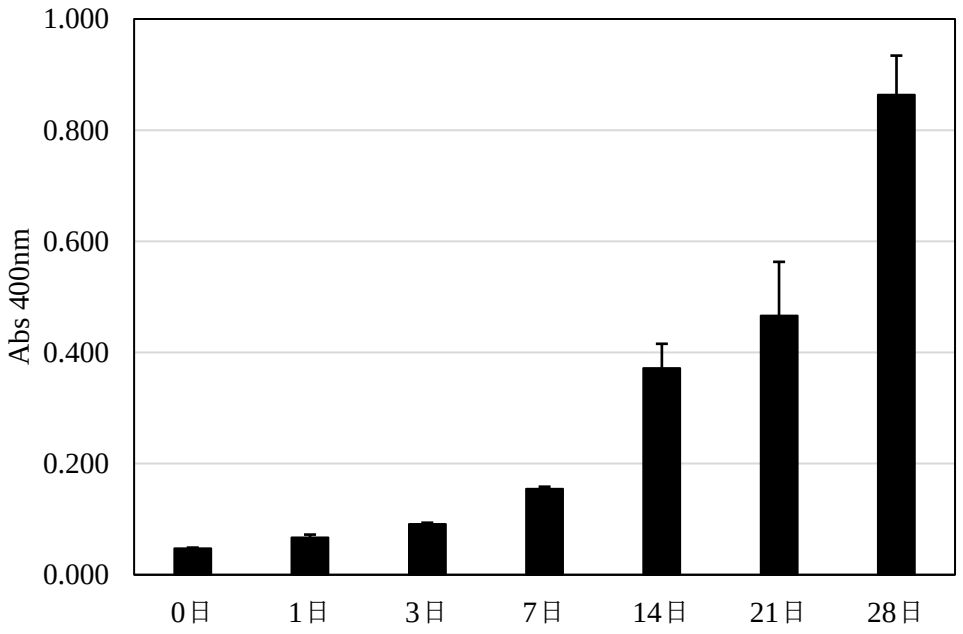


図 11　加温過程でのニンニク白玉王の褐変度の変化

評価濃度　加温ニンニク固形/抽出溶媒 = 250 mg/10 mL(=25 mg/mL)

抽出溶媒　メタノール/水/ギ酸=50/50/1 (w/w/w)

平均値±標準偏差 (n=3)

1－3－3　水溶性含硫化合物の DPPH ラジカル消去活性

ニンニク抽出液(評価濃度 25 mg/mL)のラジカル消去率はいずれも 60%以上で、黒石 A で 62.8±0.9%、白玉王で 60.4±0.5%、中国産で 69.7±3.3%、スペイン産で 68.4±0.5%となり、国産ニンニクと比較して輸入ニンニクがわずかに高かった(図 12)。

加温ニンニク抽出液(評価濃度 25 mg/mL)のラジカル消去率はいずれも 70%以上と高い値であった。加温 0 日(未加温)で 96.8±0.4%となり、1 日の加温により一度 73.6±4.5%まで低下するものの、加温 3 日で 84.5±1.6%、加温 7 日で 89.5±0.7%とその活性は上がり、加温 28 日で 97.6±0.6%となった(図 13)。

各水溶性含硫化合物 0.25 mg/mL 溶液のうち、Glu-PEC、AL の順にラジカル消去率が高く、それぞれ 43.7±1.0%、36.7±0.5%で、その他の水溶性含硫化合物のラジカル消去率は 20～30%程度であった(図 14)。

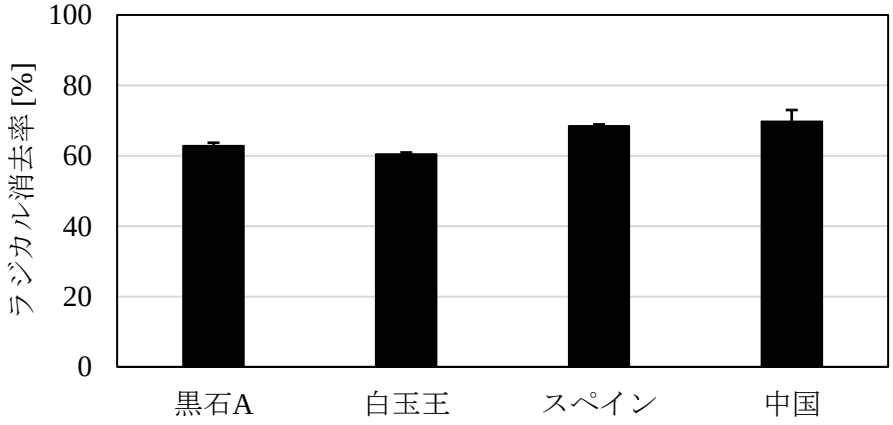


図 12　4 種類のニンニク抽出液のラジカル消去率

評価濃度　ニンニク固形/抽出溶媒=250 mg/10 mL(=25 mg/mL)

抽出溶媒　メタノール/水/ギ酸=50/50/1(w/w/w)

平均値±標準偏差 (n=3)

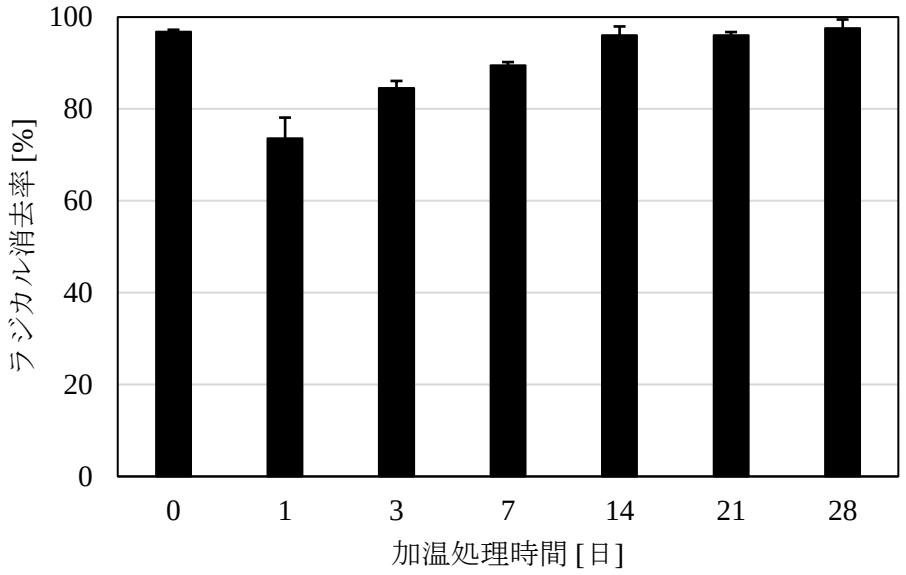


図 13　加温過程でのニンニク白玉王のラジカル消去率の変化

評価濃度　加温ニンニク固形/抽出溶媒=250 mg/10 mL(=25 mg/mL)

抽出溶媒　メタノール/水/ギ酸=50/50/1(w/w/w)

平均値±標準偏差 (n=3)

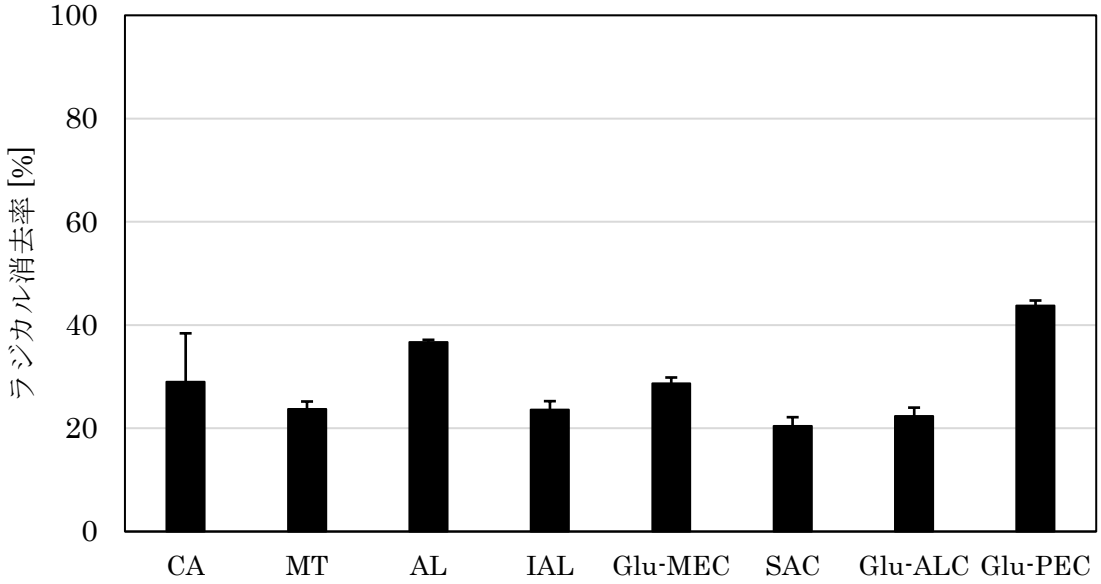


図 14　水溶性含硫化合物標準品のラジカル消去率

評価濃度　0.25 mg/mL

抽出溶媒　0.1%ギ酸

CA : シクロアリイン、MT : メチイン、AL : アリイン、IAL : イソアリイン、Glu-MEC : γ-グルタミル-S-メチルシステイン、SAC : S-アリルシステイン、Glu-ALC : γ-グルタミル-S-アリルシステイン、Glu-PEC : γ-グルタミル-S-(E)-1-プロペニルシステイン

平均値±標準偏差 (n=3)

1－4 考察

水溶性含硫化合物のうち、AL と Glu-PEC でラジカル消去率が高かったこと(図 14)、また、輸入ニンニクと比較して国産ニンニクの AL 含量は低いものの、Glu-PEC 含量が高かったことから(表 1)、国産ニンニクでラジカル消去率が高くなると推定していた。しかし、国産ニンニクよりも輸入ニンニクでラジカル消去率が高かった(図 12)。ニンニクは収穫後の貯蔵期間中に、Glu-PEC の脱グルタミル反応により IAL が生成する [27] (図 15)。本研究で用いた国産ニンニクと輸入ニンニクとでは、輸入ニンニクの Glu-PEC 含量が低く、かつ IAL 含量が高かった。すなわち、輸入ニンニクは国産ニンニクと比較して、収穫後の貯蔵が長期間であることを示している。また、IAL は熱反応により CA へと変換されることが報告されており [28](図 16)、国産ニンニクと比較して輸入ニンニクで CA 含量が高く、加えて、抽出液の褐変度が高かった(図 10)。ニンニクの輸入ではリーファーコンテナを使った保冷輸送と保冷状態を保持しないコンテナでの輸送が混在しており、日本への輸出については保冷状態にない通常のコンテナ輸送の例も多い[i)ii)]。すなわち、これらの結果は、輸入ニンニクは国産ニンニクと比較して、温度が高い状態に暴露されることを示しており、輸入ニンニクは流通過程で国産ニンニクと比較して熱が加わる可能性があるものと考えられた。

加温処理の継続により、褐変度が増加し、ラジカル消去率も増加した(図 11、図 13)。ニンニクの褐変はメイラード反応に起因するもので、加温処理して褐変したニンニクを「黒ニンニク」と称している。黒ニンニクの製造過程では、加温に伴い褐変が進み、製造過程中に抗酸化作用が増大することが DPPH ラジカル消去法や、電子スピン共鳴法(Electron Spin Resonance、ESR)の測定で示されている [26)29)30)]。一方、本実験では、加温 1 日時点で一度ラジカル消去率が減少するものの、加温の継続により再びラジカル消去率が増加することを観察した(図 13)。

水溶性含硫化合物のなかで高いラジカル消去率を示し、かつ加温 0 日(未加温)

のニンニクに主に含まれる AL は加温処理によりその含量は低下した(図 13)。そのため、加温処理過程において加温 0 日(未加温)時のラジカル消去率に AL は寄与するものの、加温処理後半では別の成分により高いラジカル消去率を示したものと考えられた。

加温ニンニク、すなわち、ニンニクから黒ニンニクへの外観上の変化はメイラード反応に起因するものである [26)29)]。メイラード化合物には DPPH ラジカル消去活性を含め、抗酸化作用が報告されている [31)32)]。加温処理後半ではメイラード反応により生成したメラノイジンが高いラジカル消去率を示したものと考えられた。また、このメラノイジンの影響は、国産ニンニクと輸入ニンニクとの比較試験でも示されていると考えた。

本実験で、輸入ニンニクにおいて IAL から熱反応により生じる CA 含量が国産ニンニクと比較して多いことを示した。また、輸入ニンニクでわずかに褐変度が高く、輸入ニンニクは国産ニンニクと比較して、温度が高い状態にあったことを実験的に示した。国産ニンニクと比較して、輸入ニンニクはメイラード反応が進み、反応により生じたメイラード化合物も抗酸化作用を示したものと推察され、この結果は、よりメイラード反応を促進させた加温ニンニクでの実験結果と一致した。ニンニク、ニンニク加工品の抗酸化作用を検討するためには含硫化合物の他、収穫してからの原料の貯蔵履歴や温度履歴、加工時の温度履歴を複合的に考慮する必要があるといえる。

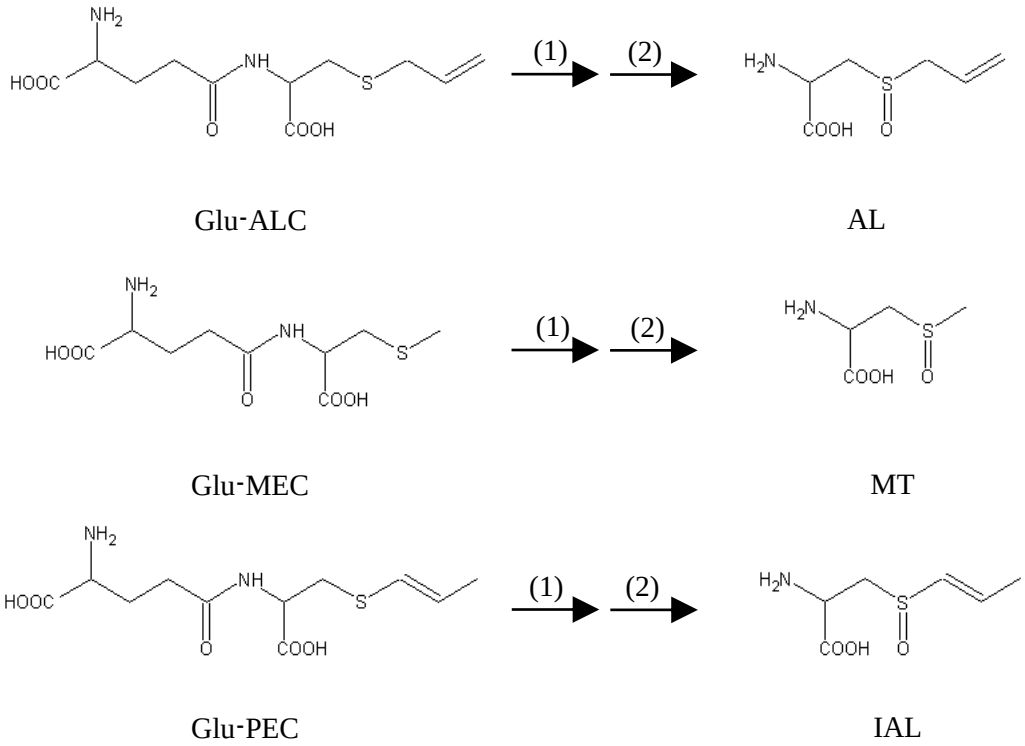


図 15　γ-グルタミルペプチド類からの代謝 [15)27)]

(1) γ-グルタミルトランスグルタミナーゼによる脱グルタミル反応

(2) 酸化反応

Glu-ALC : γ-グルタミル-S-アリルシステイン、AL : アリイン、Glu-MEC : γ-グルタミル-S-メチルシステイン、MT : メチイン、Glu-PEC : γ-グルタミル-S-(E)-1-プロペニルシステイン、IAL : イソアリイン

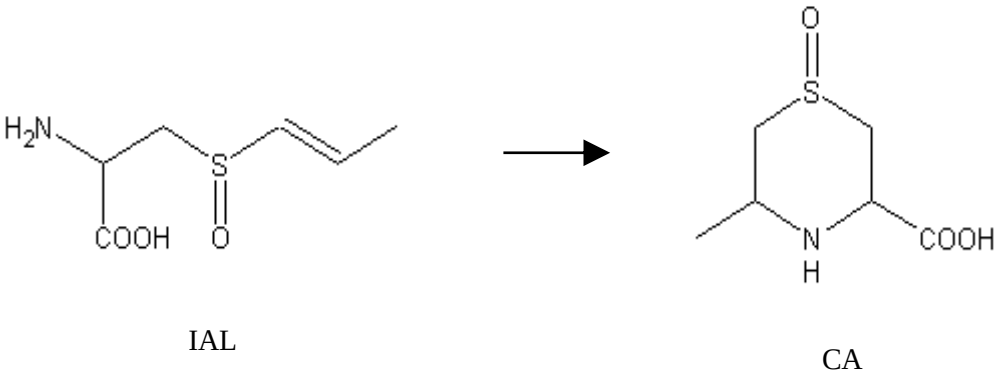


図 16 イソアリインからシクロアリインへの反応 [28)]

IAL : イソアリイン、CA : シクロアリイン

第 2 章
ニンニクに含まれる脂溶性含硫化合物の抗酸化作用の評価

2－1　緒言

元来のニンニクりん片自体には、脂溶性成分はほとんど含まれていない[13](表2)。ニンニクりん片粉砕時、アリイナーゼ (EC4.4.1.4)の作用を受けて水溶性のAL は脂溶性のアリシンへと変化する(図 4)。アリシンは化学的に不安定で、アリルスルフィド類、ビニルジチイン類等の脂溶性含硫化合物へと変換され、これら脂溶性成分はニンニクの特徴的なにおいを構成する成分である(図 5)。すなわち、ニンニクりん片の取り扱い方により、容易に脂溶性含硫化合物を得ることができる。

前章で用いた DPPH ラジカル消去活性試験では、DPPH の溶媒としてエタノールを用いる。エタノールは極性の低いヘキサンなどの有機溶剤とも親和性があり、水溶性成分のみならず、脂溶性成分も評価できる。第二章では、脂溶性含硫化合物に着目して実験するもので、この DPPH ラジカル消去法が適用できる。合成、精製により、数種の脂溶性含硫化合物を得て、それらのラジカル消去率により抗酸化作用を検討した。さらに、数種の脂溶性含硫化合物を魚油へ添加し、保管試験を実施した。経時的に魚油をサンプリングし、脂質の劣化指標のひとつである POV を測定することで、各脂溶性含硫化合物の抗酸化作用を検討した。

表 2　ニンニクの一般成分 [13)]

水分	60.3 g
タンパク質	8.4 g
脂質	0.1 g
炭水化物	29.6 g
灰分	1.6 g

2－2 実験

2－2－1　脂溶性含硫化合物の合成

ニンニクおよびニンニク加工品に含まれる主な脂溶性含硫化合物の構造、名称、略称を図 17 に示した。ジアリルジスルフィド(DADS、富士フイルム和光純薬株式会社)を用い、Ibarl らの方法 [33)34)]を参考に DADS からアリシンを、次いでアリシンからアリルスルフィド類、ビニルジチイン類を合成した。

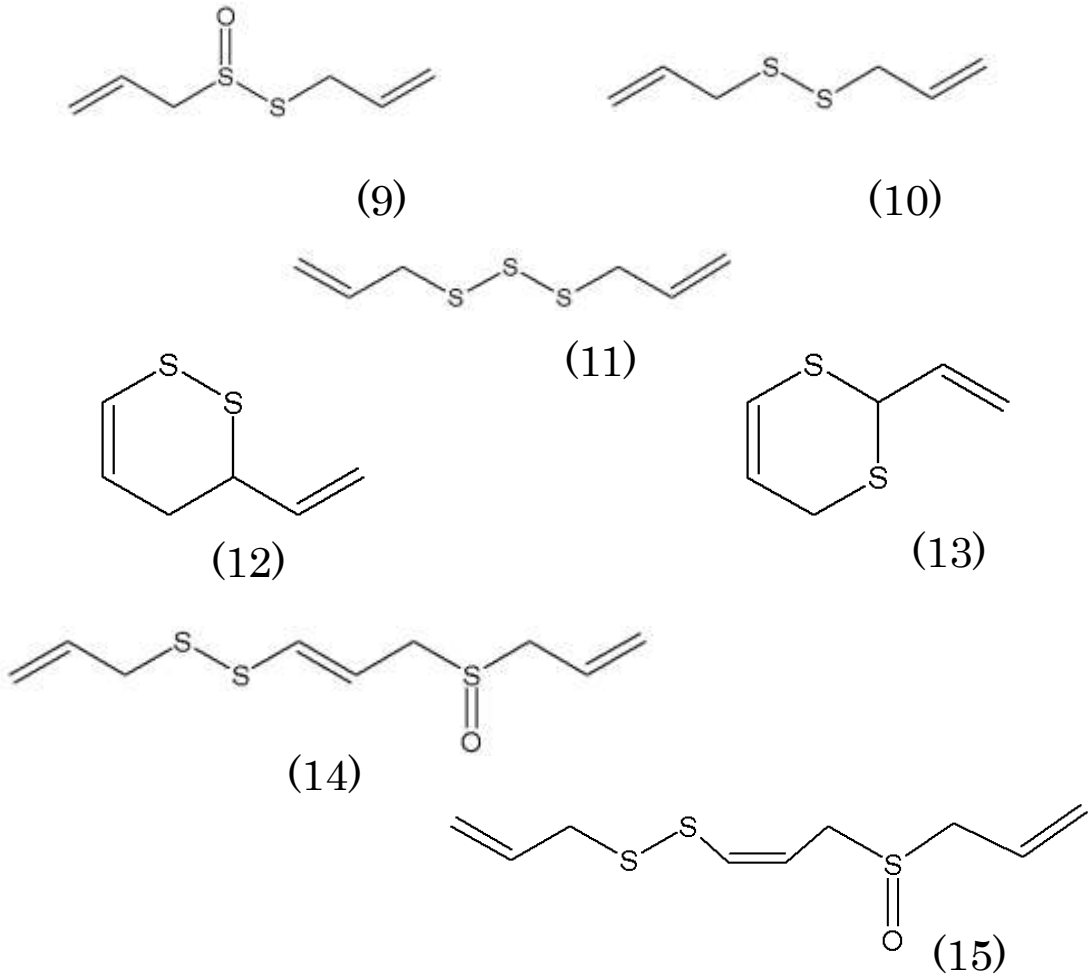


図 17　ニンニク関連の脂溶性含硫化合物

(9) アリシン (10) ジアリルジスルフィド (DADS)　(11) ジアリルトリスルフィド (DATS)　(12) 3-ビニル-4H-1,2-ジチイン (1,2-VD)　(13) 2-ビニル-4H-1,3-ジチイン (1,3-VD)　(14) E-アホエン (15) Z-アホエン

(1)アリシンの合成

DADS 7.5 g を酢酸 37.5 mL に溶解後、35%過酸化水素水 4.5 mL と酢酸 30 mL の混液を添加し、90 分間攪拌して反応させた。その後、28% (w/v)の水酸化カリウム水溶液で中和した後、蒸留水を加えて 300 mL にした。これを 1 L 容量の分液ロートに移し、ジクロロメタン 150 mL を加えて抽出してジクロロメタン層(下層)を回収した。ジクロロメタンによる抽出は 2 回繰り返した。回収したジクロロメタン層を 1 L 容量の分液ロートに移し、飽和食塩水 90 mL を加えて振とうした。下端に脱脂綿を詰めた内径 3 cm、長さ 30 cm のクロマト管に無水硫酸ナトリウムを充填して脱水用カラムを作製した。脱水用カラムに通液させながら、ジクロロメタン層(下層)を回収し、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去して 8.6 g の反応物 A を得た。

(2)ビニルジチイン類、アホエン類の合成

反応物 A 7.0 g に、60%(v/v)アセトン水溶液を 90 mL 加え、95℃湯浴で 4 時間還流した。還流後、溶媒を留去して反応物 B 4.0 g を得た。

次いで反応物 B をカラムクロマトグラフィーにより分画した。順相系シリカゲル(Sillicagel 60、0.063-0.200 mm、メルク株式会社)30 g を *n*-ヘキサンで懸濁させ、下端に脱脂綿を詰めた内径 3 cm、長さ 30 cm のクロマト管に注ぎ、カラムを作製した。カラム上端に反応物 B を 2.5 g 負荷し、*n*-ヘキサン 150 mL、*n*-ヘキサン/2-プロパノール(95/5、v/v)250 mL、*n*-ヘキサン/2-プロパノール(90/10、v/v)250 mL の順に通液し、50 mL ずつ分画して Frc.1～13 のフラクションを得た。ロータリーエバポレーターを用いて回収した画分から溶媒を留去し、回収量と回収率を求めた。回収率は次式により求めた。

回収率　＝　回収量[g]　/　反応物 B 負荷量[g]

2－2－2　脂溶性含硫化合物の分析

(1)HPLC による分析

合成原料である DADS、反応物 A、B、Frc.1～13 を対象とし、HPLC 分析を行った。少量の DADS、反応物 A、反応物 B をメタノールに溶解させたものを HPLC に供した。Frc.1～13 について、各分画液 100 µL を 900 µL メタノールに溶解させ、HPLC に供した。HPLC 条件は、以下のとおりとした。既往研究[34]を参考に、PDA 検出器で得た各ピークの UV スペクトルと HPLC 溶出パターンから脂溶性含硫化合物を同定した。

システム　：AcquityH-Class (日本ウォーターズ株式会社)
カラム　　：ACCQ-TAG ULTRA C18(φ2.1×100 mm、1.7 µm、
　　日本ウォーターズ株式会社)
カラム温度：45℃
移動相　　：メタノール/水/ギ酸(65/35/0.1、v/v/v)
流速　　：0.4 mL/分
検出器　　：PDA 検出器(スキャン 200-400 nm、解析波長 254 nm、
　　PDAeλ detector、日本ウォーターズ株式会社)

(2)GC-MS による分析

Frc.1～13 を対象とし、GC-MS による分析を行った。分画した各フラクションをそのまま GC-MS に注入した。GC-MS 条件は、以下のとおりとした。

システム　　：GC17-A(株式会社島津製作所)

気化室温度　　：250℃

カラム　　：DB-1701(30 m×0.25 mm、J&W Scientific)

カラム温度　　：60℃(10 分)　→　250℃(10℃/分)

キャリア　　：ヘリウム、100 kPa

スプリッド比　　：21

検出器　　：QP-5000(50-600 Da スキャン、トータルイオン強度を解析、株式会社島津製作所)

注入量　　：1 μL

化合物データベース：NIST

2－2－3　DPPH ラジカル消去活性試験

1 章 1－2－4　DPPH ラジカル消去活性試験と同様の方法とした。合成原料の DADS、反応物 A、反応物 B は *n*-ヘキサンを溶媒とし、0.25 mg/mL、1.0 mg/mL、10 mg/mL の溶液を調製して試験に供した。反応物 B の分画液である Frc.1～13 は希釈せずにそのまま試験に供した。

2－2－4　魚油の前処理と添加試験

魚油は、マルハニチロ株式会社より提供された精製魚油 DHA-27W を用いた。精製魚油 DHA-27W の DHA 量は 24.3 g/100 g(脂肪酸組成 29%)、EPA 量は 5.8 g/100 g(脂肪酸組成 7%)であった。

(1)　トコフェロールの除去[35)]

110℃で 1 時間半加熱して活性化させた活性炭(20-150mesh、ナカライテスク株式会社)50 g と、セライト(セライト-545RVS、ナカライテスク株式会社)50 g の混合物を *n*-ヘキサンで懸濁させ、下端に脱脂綿を詰めた内径 5 cm、長さ 50 cm のクロマト管に注ぎ、カラムを作製した。精製魚油 25 g を約 25 mL の *n*-ヘキサンに溶解させ、カラム上端に負荷した。*n*-ヘキサン 1200 mL をカラムに通液し、*n*-ヘキサン溶出画分を回収した。ロータリーエバポレーターを用いて回収した画分から溶媒を留去した。

トコフェロールが除去されていることを確認するため、溶媒を留去して得られた魚油 20 mg を *n*-ヘキサン 1 mL に溶解させ、これを以下に示した HPLC 分析により確認した。HPLC での溶出時間を確認するため、α-トコフェロールも HPLC 分析に供した。

システム　：LC-4000 EXTREMA(日本分光株式会社)

LC-4000 EXTREMA 装置構成

PU4180(ポンプ)、AS4150(オートサンプラー)、CO4060(カラムオーブン)、MD4010(PDA 検出器)、FP4020(蛍光検出器)

カラム　　：SILICA SG80(φ4.6×250 mm、5 μm、株式会社大阪ソーダ)

カラム温度：25℃

移動相　　：*n*-ヘキサン/2-プロパノール (99.2/0.8、v/v/v)

流速　　：1.0 mL/分

注入量　　：20 μL

検出　　：蛍光検出(励起波長 298 nm、蛍光波長 325 nm)

(2) 過酸化脂質の除去[35)]

シリカゲル(BW-80s、富士シリシア化学株式会社)200 g を *n*-ヘキサンで懸濁させ、下端に脱脂綿を詰めた内径 5 cm、長さ 50 cm のクロマト管に注ぎ、カラムを作製した。トコフェロール除去処理済みの魚油 25 g を約 25 mL の *n*-ヘキサンに溶解させ、カラム上端に負荷した。*n*-ヘキサン 200 mL、*n*-ヘキサン/ジエチルエーテル(98/2、v/v) 200 mL、*n*-ヘキサン/ジエチルエーテル(90/10、v/v)1200 mL の順に通液し、*n*-ヘキサン/ジエチルエーテル(90/10、v/v)溶出画分を回収した。ロータリーエバポレーターを用いて回収した画分から溶媒を留去した。回収した魚油から一部をとり、POV(後述)により 1 meq/kg 以下であることを確認した。

(3)魚油への添加

トコフェロールと過酸化脂質を除去した精製魚油に、あらかじめクロロホルムに溶解させた各脂溶性含硫化合物を、精製魚油 6 g に対して 0.1%(w/w) 、0.5%(w/w)となるよう添加した。溶媒を留去後、100 mL 容量のねじ口瓶に蓋をゆるめて封入し、50℃に設定した恒温器内(DK64、ヤマト科学株式会社)で保持した。魚油を 1 g 程度ずつ経時的にサンプリングした。サンプリングした魚油を測定まで-60℃で保管した。

本実験は、以下に示した 2 つの試験を設定した。

試験 1　抗酸化作用を示す物質の選定

反応原料物質の DADS と、反応物 A、B および反応物 B の分画物 Frc.7、8、9 を対象とした。比較として、無添加区と α-トコフェロール(富士フイルム和光純薬株式会社)添加区を設定した。いずれも魚油に対して 0.1%(w/w)添加としたものを供試した。

試験区 1：無添加

試験区 2：α-トコフェロール

試験区 3：DADS

試験区 4：反応物 A

試験区 5：反応物 B

試験区 6：Frc.7

試験区 7：Frc.8

試験区 8：Frc.9

試験 2　添加量の検討

試験 1 のうち、試験区 1～5 で、添加量を 0.1%(w/w)もしくは 0.5%(w/w)として実験した。

(4)過酸化物価

各条件で調製した魚油の過酸化物価(Peroxide value、POV)の測定した[36]。

魚油 500 mg を共栓付きの 300 mL 容量の三角フラスコに精秤し、酢酸/クロロホルム (2/1、v/v)を 35 mL 加え、1 分間窒素を吹き付けながら魚油を溶解させた。三角フラスコに栓をして 3 分間静置後、飽和ヨウ化カリウム水溶液を 1 mL 加えて再び栓をし、15 分間静置した。蒸留水 75 mL と 1%(w/v)でんぷん指示薬 1 mL を加えて激しく攪拌し、0.01 N チオ硫酸ナトリウムで滴定した。なお、魚油を用いずに空試験を実施してブランク時の滴定量を測定した。POV を以下の計算式で求めた。測定は 3 反復行った。

$$\mathrm{POV}\ [\mathrm{meq/kg}] = 10 \times (A - B) \times F / C$$

A：0.01 N チオ硫酸ナトリウム滴定量 [mL]

B：0.01 N チオ硫酸ナトリウム滴定量(ブランク) [mL]

F：ファクター(F=1.0)

C：採取量 [g]

2－3　結果

2－3－1　脂溶性含硫化合物の合成

(1)反応物 A および B

DADS を酸化させて得た反応物 A には主にアリシンが含まれており、アリシンは HPLC クロマトグラムのピーク面積比で 52%を占めていた。また、反応物 A を還流して得た反応物 B にはピーク面積比が大きい順に、E/Z-アホエン、1,3-VD、DATS、DADS、1,2-VD が存在しており、そのピーク面積比はそれぞれ 35%、18%、11%、9%、6%であった(図 18)。

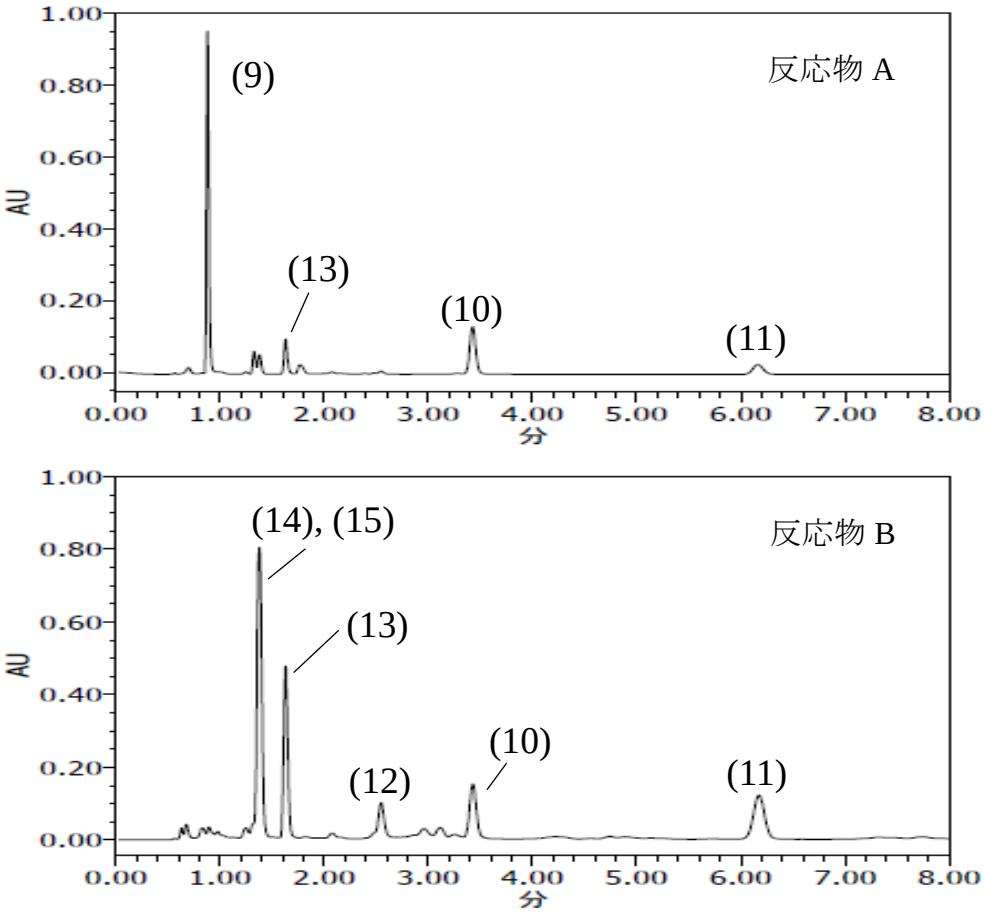


図 18　反応物 A および B の HPLC クロマトグラム

(9) アリシン (10) ジアリルジスルフィド (DADS)　(11) ジアリルトリスルフィド (DATS)　(12) 3-ビニル-4H-1,2-ジチイン (1,2-VD)　(13) 2-ビニル-4H-1,3-ジチイン (1,3-VD)　(14) E-アホエン (15) Z-アホエン

(2)反応物 B の分画液(Frc.1～13)

反応物 B の各分画液の HPLC クロマトグラムを図 19 に示した。DADS および DATS が Frc.3～5 に、1,2-VD が Frc.5、6 に、1,3-VD が Frc.7 に、E/Z-アホエンが Frc.10～12 に溶出していることを確認した。

分画液のうち、DADS、DATS が溶出した Frc.4、1,2-VD が溶出した Frc.6、1,3-VD が溶出した Frc.7、アホエンが溶出した Frc.11 の GC クロマトグラムおよび MS スペクトルを図 20～25 に示した。DADS、DATS、1,2-VD、1,3-VD の MS スペクトルは解析ソフトの化合物データベースに内臓の MS マススペクトルもしくは既往研究[37]と一致し、HPLC の定性分析結果(図 19)とも一致した。アホエンが溶出した Frc.11 の GC クロマトグラムでは、DADS、1,3-VD など、複数本のピークが確認され、アホエンと考えられるピークは確認されなかった(図 23)。また、HPLC 分析で成分を同定できなかった Frc.8 および Frc.9 を GC-MS により分析したところ、GC クロマトグラムで複数本のピークが検出された(図 24、25)。

各フラクションの溶媒を留去し、回収した重量を負荷した反応物 B の重量で除して回収率を算出したところ、1,3-VD が溶出した Frc.7 で 33%(w/w)と最も高かった(図 26)。

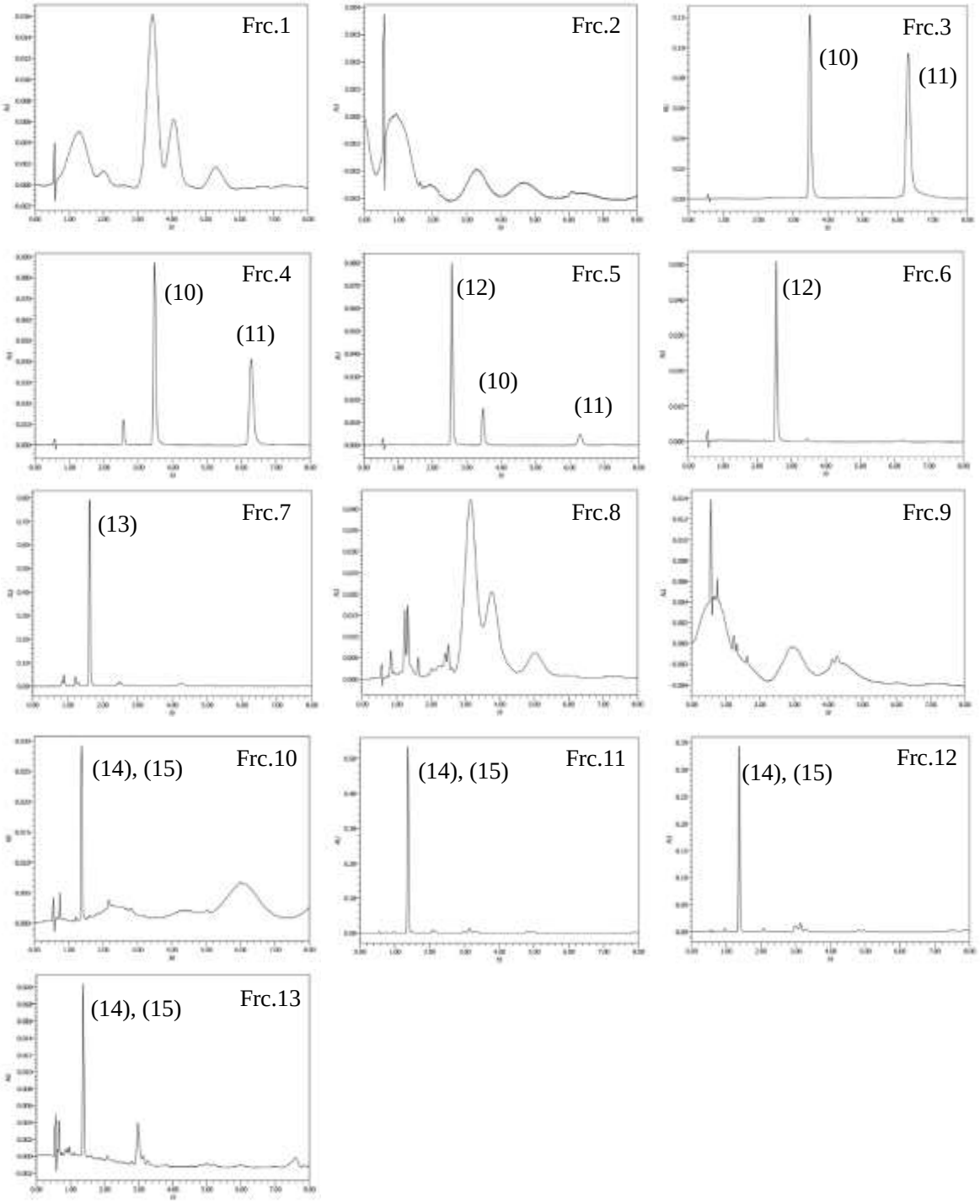


図 19　Frc.1～13 の HPLC クロマトグラム

(10) ジアリルジスルフィド (DADS)　(11) ジアリルトリスルフィド (DATS)　(12) 3-ビニル-4H-1,2-ジチイン (1,2-VD)　(13) 2-ビニル-4H-1,3-ジチイン (1,3-VD)　(14) E-アホエン (15) Z-アホエン

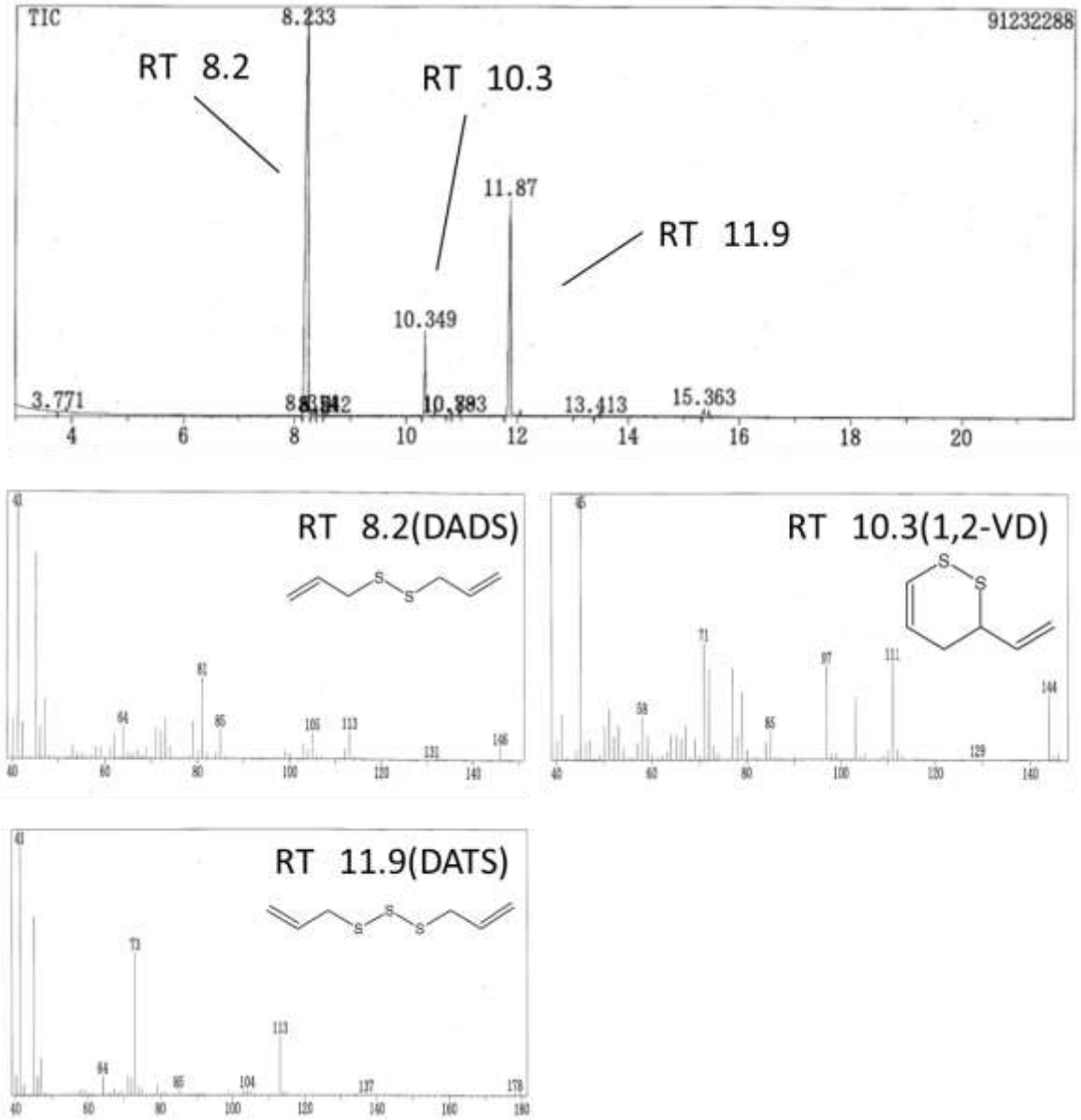


図 20　Frc.4 の GC-MS 分析結果

DADS：ジアリルジスルフィド、1,2-VD：3-ビニル-4H-1,2-ジチイン、DATS：ジアリルトリスルフィド

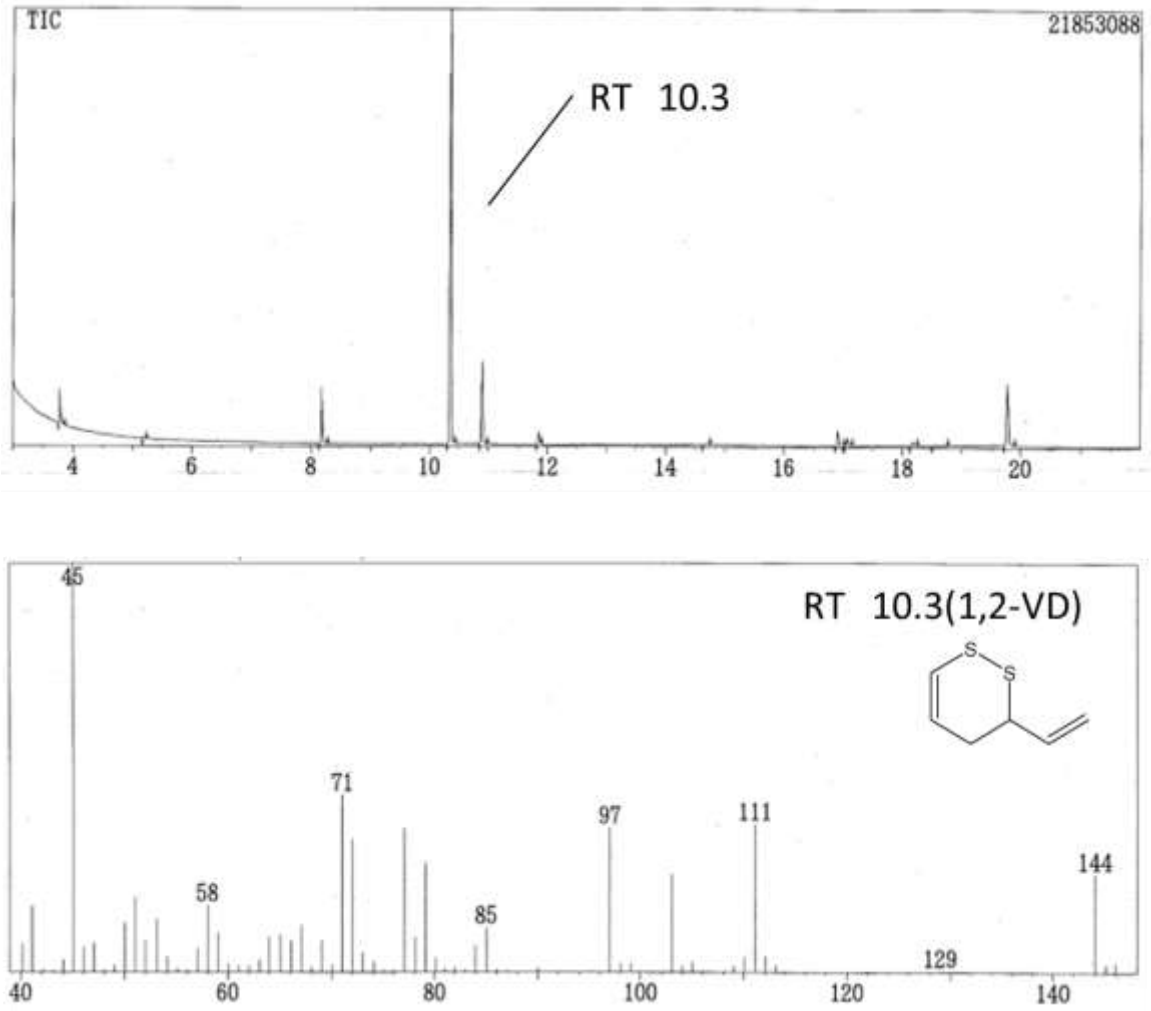


図 21　Frc.6 の GC-MS 分析結果

1,2-VD：3-ビニル-4H-1,2-ジチイン

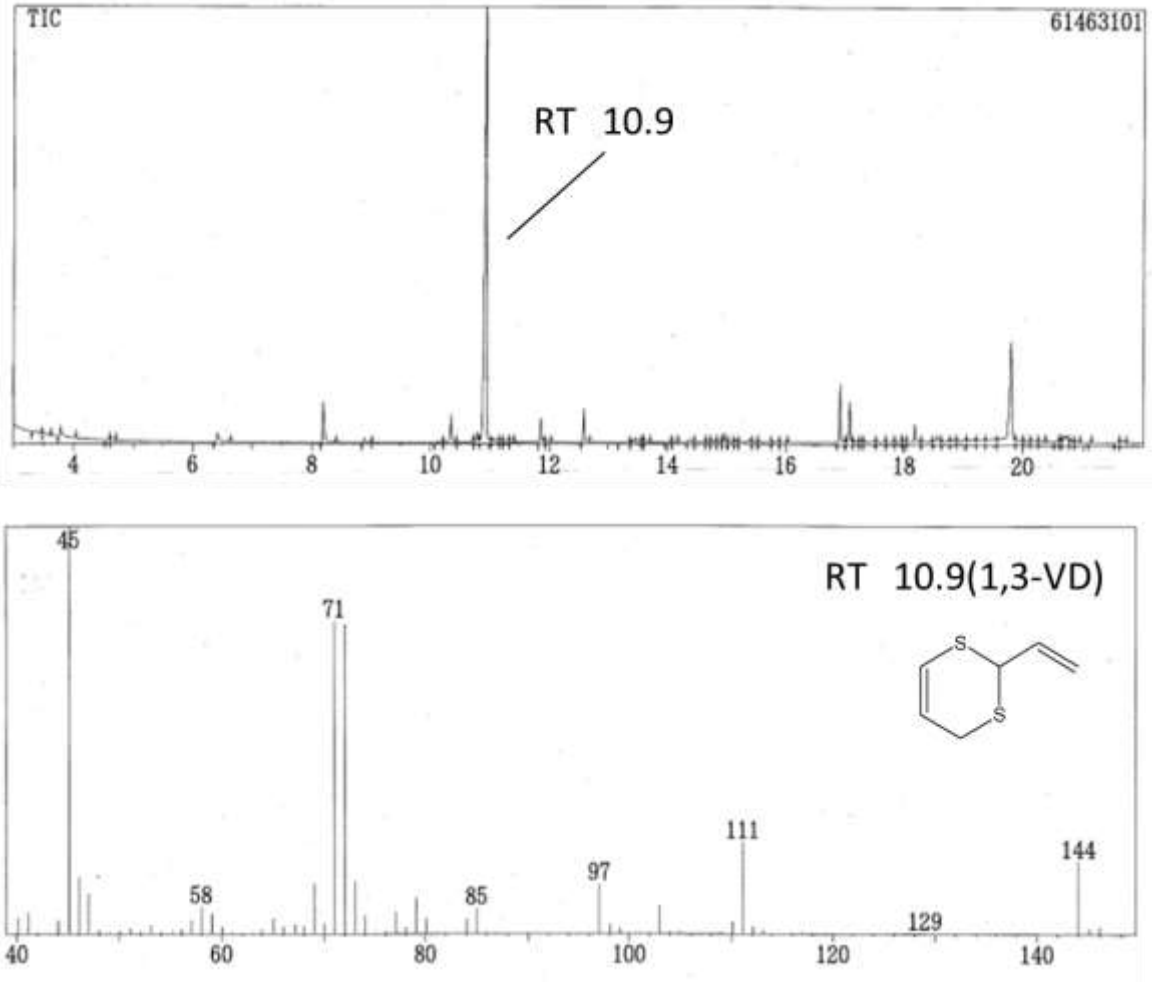


図 22　Frc.7 の GC-MS 分析結果

1,3-VD：2-ビニル-4H-1,3-ジチイン

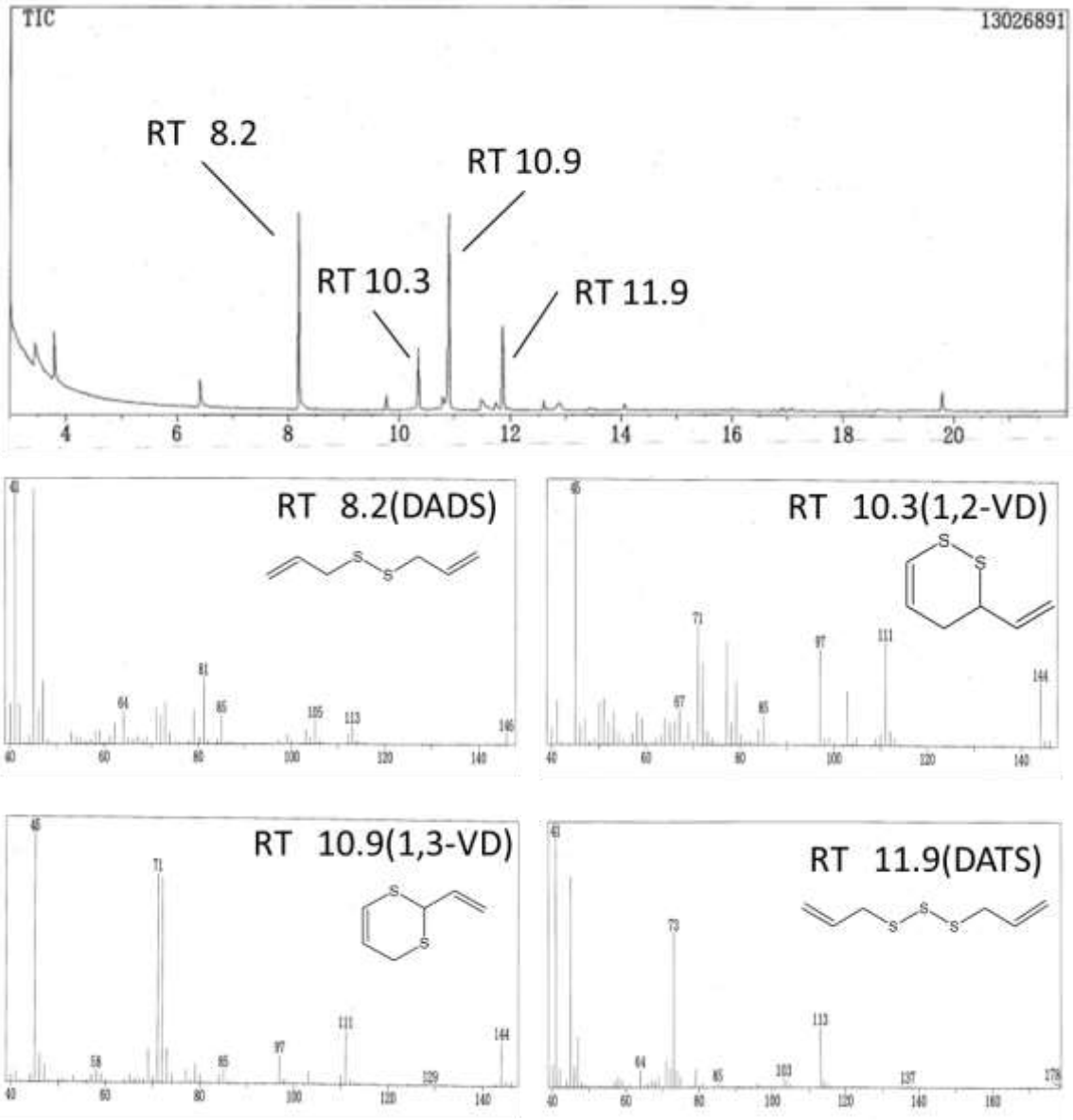


図 23　Frc.11 の GC-MS 分析結果

DADS：ジアリルジスルフィド、1,2-VD：3-ビニル-4H-1,2-ジチイン、1,3-VD：2-ビニル-4H-1,3-ジチイン、DATS：ジアリルトリスルフィド

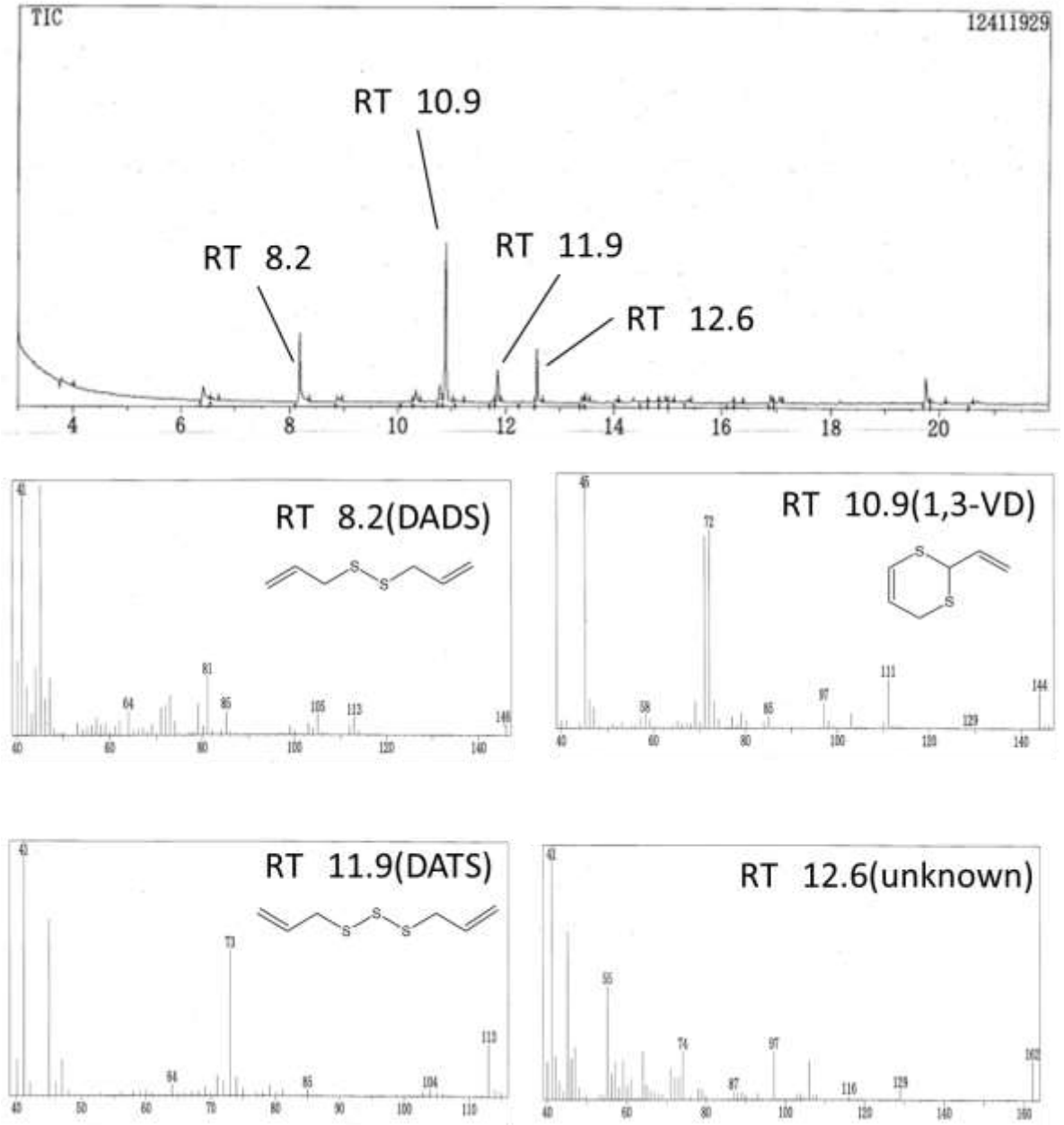


図 24　Frc.8 の GC-MS 分析結果

DADS：ジアリルジスルフィド、1,3-VD：2-ビニル-4H-1,3-ジチイン、DATS：ジアリルトリスルフィド

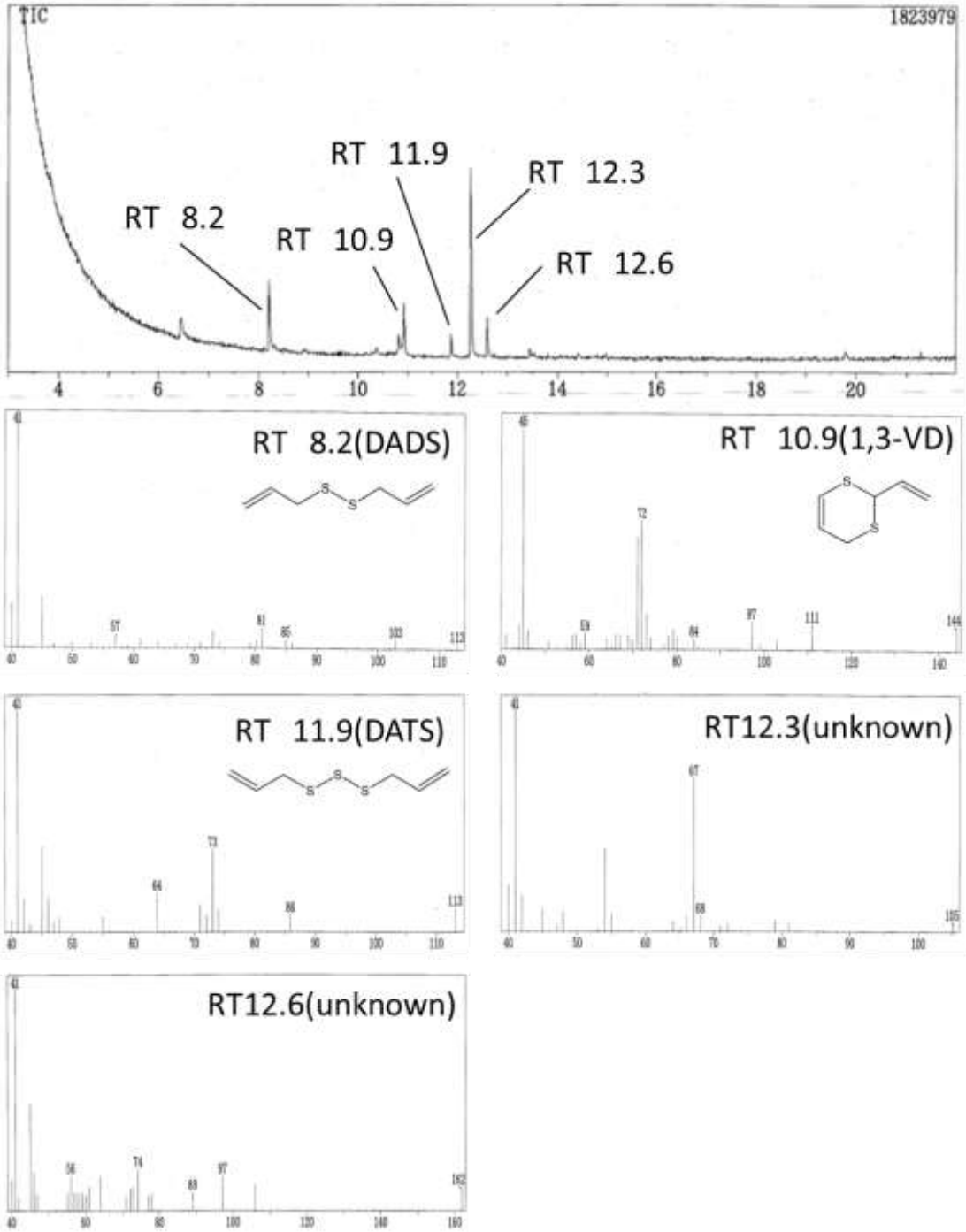


図 25　Frc.9 の GC-MS 分析結果

DADS：ジアリルジスルフィド、1,3-VD：2-ビニル-4H-1,3-ジチイン、DATS：ジアリルトリスルフィド

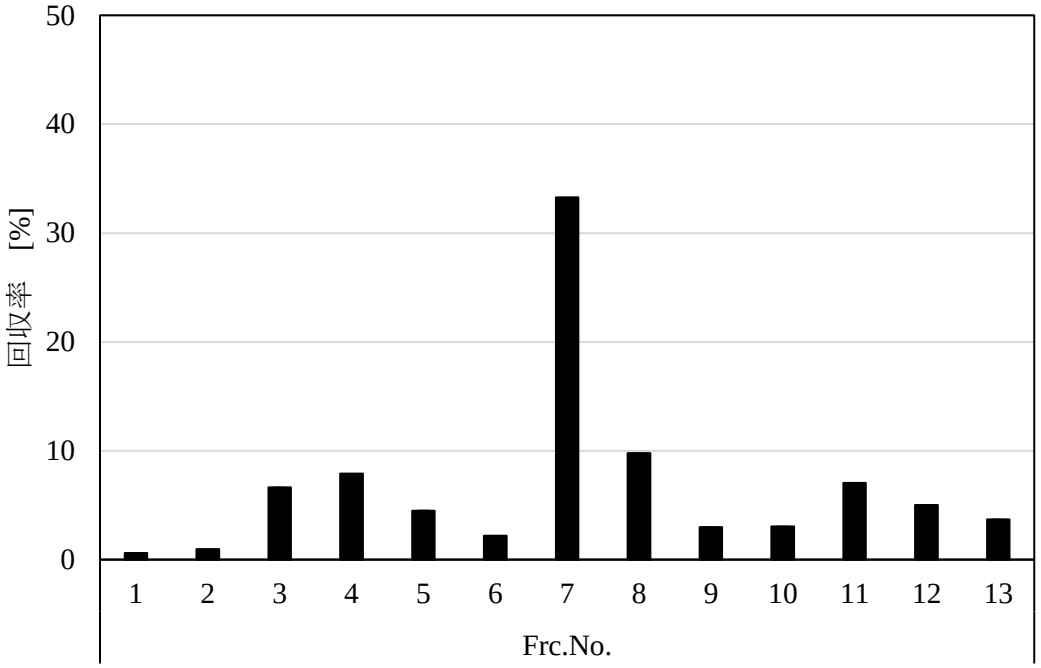


図 26　反応物 B 分画物の回収率

2－3－2　DPPH ラジカル消去活性試験

(1)DADS、反応物 A および反応物 B

反応出発物質の DADS と、それから得られた反応物 A および B のラジカル消去率を図 27 に示した。DADS は 0.25～10 mg/mL において DPPH ラジカル消去作用は見られなかった。一方で、反応物 A、反応物 B に DPPH ラジカル消去活性が認められ、特に、反応物 A では、0.25 mg/mL でも DPPH ラジカル消去率は 37.8%であった。反応物 B は濃度 10 mg/mL で DPPH ラジカル消去率 87.7±3.2%となり、濃度が高くなることで抗酸化作用が高まった。

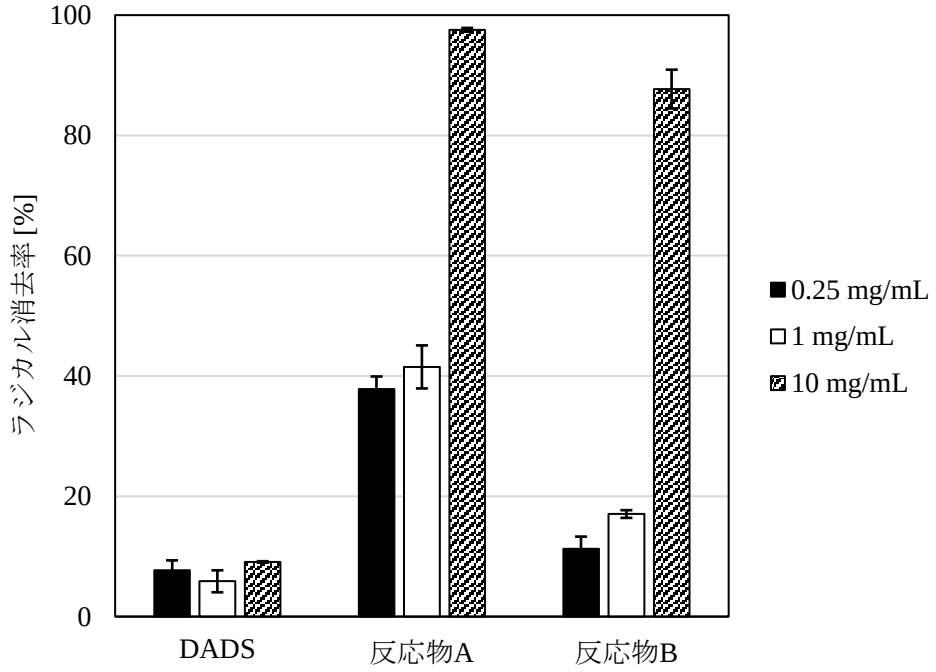


図 27　DADS、反応物 A、反応物 B のラジカル消去率

DADS：ジアリルジスルフィド

平均値±標準偏差 (n=3)

(2)反応物 B の分画液 Frc.1～13

反応物 B を分画して得られた Frc.1～13 のラジカル消去率を図 28 に示した。いずれも、分画した液をそのまま DPPH ラジカル消去試験に供した。Frc.7 に反応物 B の主な生成物である 1,3-VD が含まれ、回収率が高かった(図 26)。本実験では、各フラクションとも 50 mL ずつ回収したため、全フラクションのうち、回収率の高かった Frc.7 が最も溶質濃度が高いことになる。Frc.7 で溶質濃度が高かったためか、Frc.7 のラジカル消去率が 29.0±3.2%と全分画液のうちで、最も高い値を示した。一方、Frc.8 および Frc.9 は回収率がそれぞれ 10%(w/w) 、3%(w/w)であったが、ラジカル消去率がそれぞれ 15.2±1.2%と 11.1±5.9%で、特に Frc.9 には低濃度でも高いラジカル消去率を示す物質が含まれている可能性が示唆された。

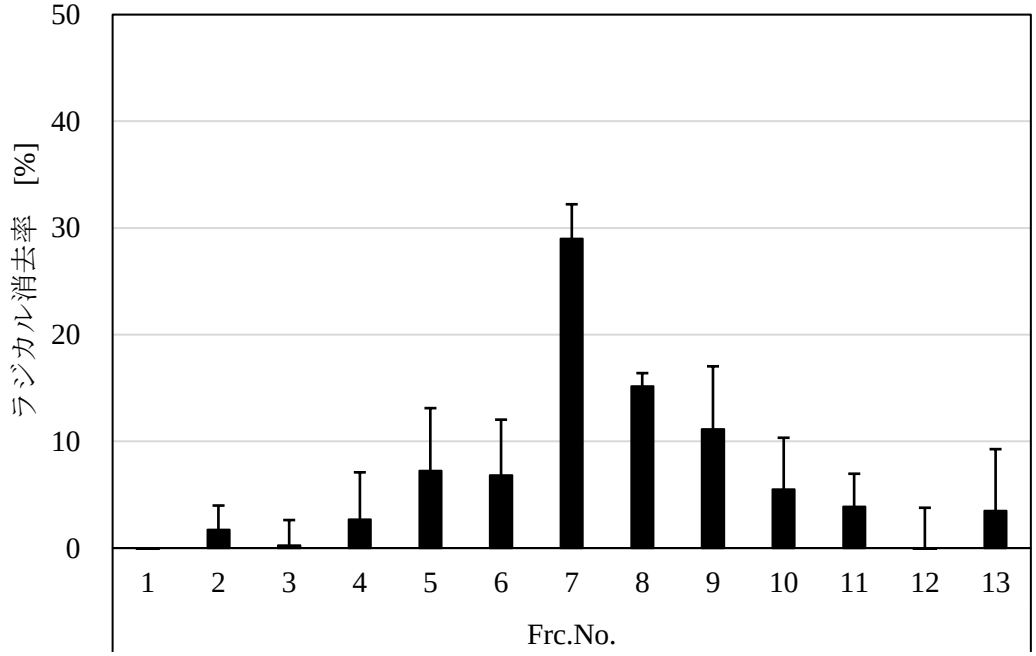


図 28　Frc.1～13 のラジカル消去率

平均値±標準偏差(n=3)

2－3－3　魚油に対する酸化抑制効果

試験 1　抗酸化作用を示す物質の選定

POV の経時変化を図 29 に示した。反応出発物質の DADS を添加した試験区は、無添加区の魚油の劣化挙動と大差はなく、POV 上昇を抑制する効果はなかった。一方で、反応物 A 添加区は 50℃、24 時間保持でも、POV が 3.6 meq/kg となり、POV 上昇抑制効果を有することが明らかとなった。本実験で設定した試験区のうち、反応物 B 添加区は反応物 A 添加区に次いで POV の上昇を抑制した。

反応物 B の分画物で、比較的高いラジカル消去率を示した(図 28)Frc.7(1,3-VD 溶出画分)、Frc.8(unknown)、Frc.9(unknown)を添加した試験区では、いずれも無添加区の魚油の酸化挙動と大差はなく、POV 上昇を抑制する効果はなかった。

α-トコフェロール添加区では、無添加区と大差ない POV 上昇を示し、抗酸化作用が確認されなかった。

試験 2　添加量の検討

POV の経時変化を図 30 に示した。DADS は魚油に対して 0.1%(w/w) 、0.5%(w/w)添加しても、POV が上昇し、酸化抑制効果は認められなかった。一方、アリシンを含む反応物 A で、いずれの添加濃度においても POV の上昇を抑制した。アリシンの代謝産物である反応物 B では、魚油に対して 0.5%(w/w)添加することで、わずかに POV の上昇を抑制したが、その効果は反応物 A より小さかった。

α-トコフェロール添加区では、0.5%(w/w)添加よりも 0.1%(w/w)添加で魚油の POV 上昇を抑制し、添加量と抗酸化作用の関係はなかった。

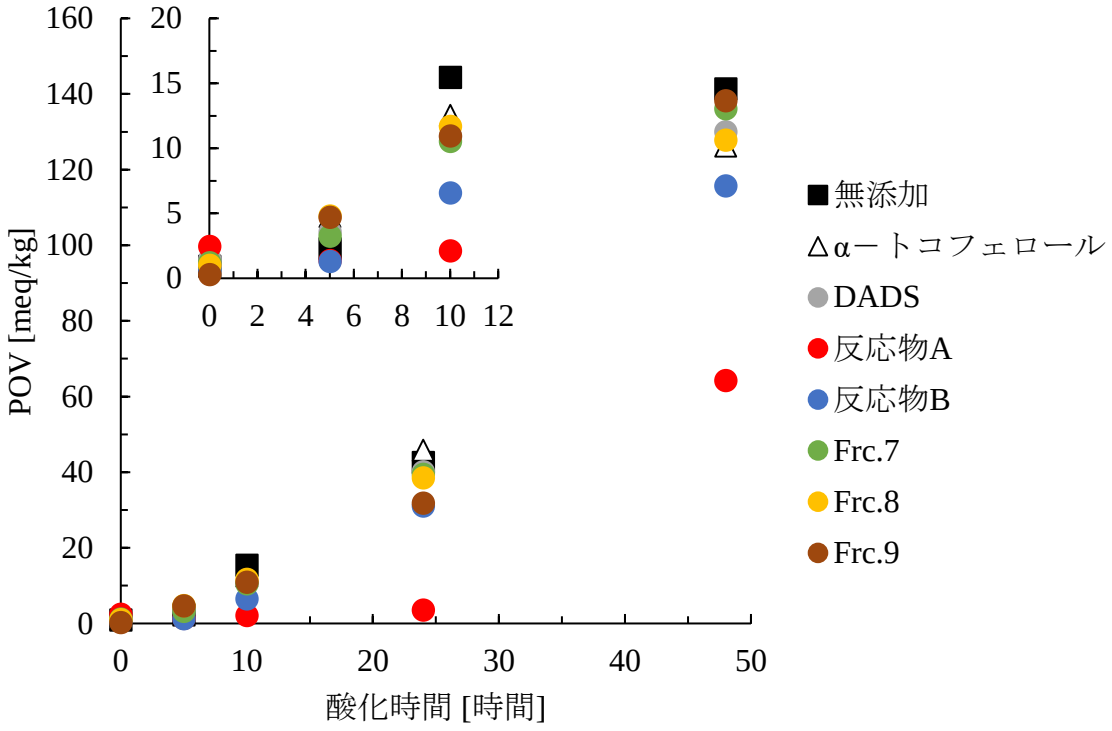
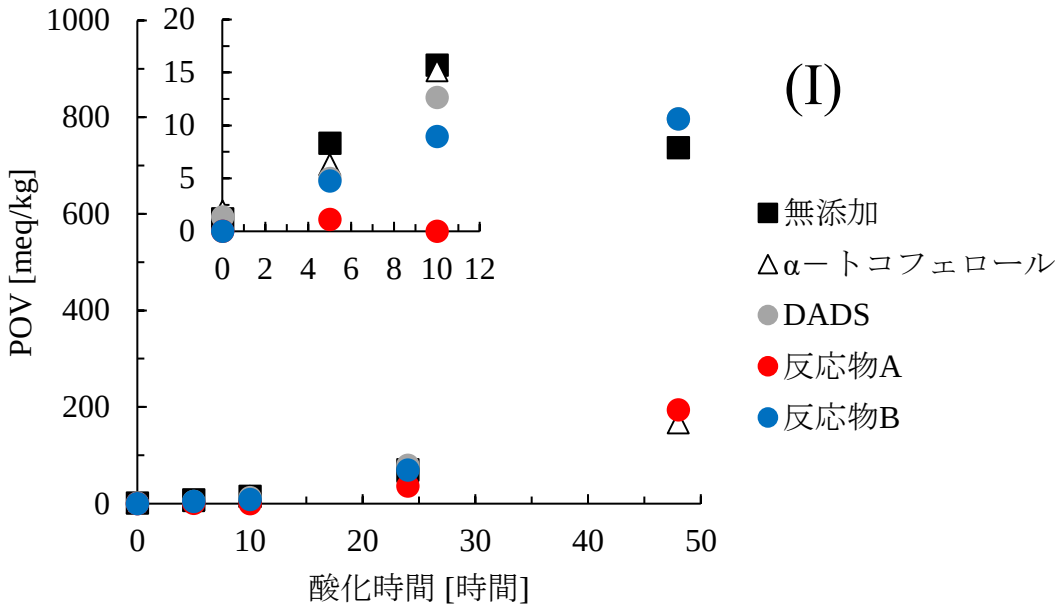


図 29　POV の経時変化(1)

各含硫化合物の添加量は魚油に対して 0.1%(w/w)とした。

図左上には酸化誘導時間 12 時間までの拡大図を示した。



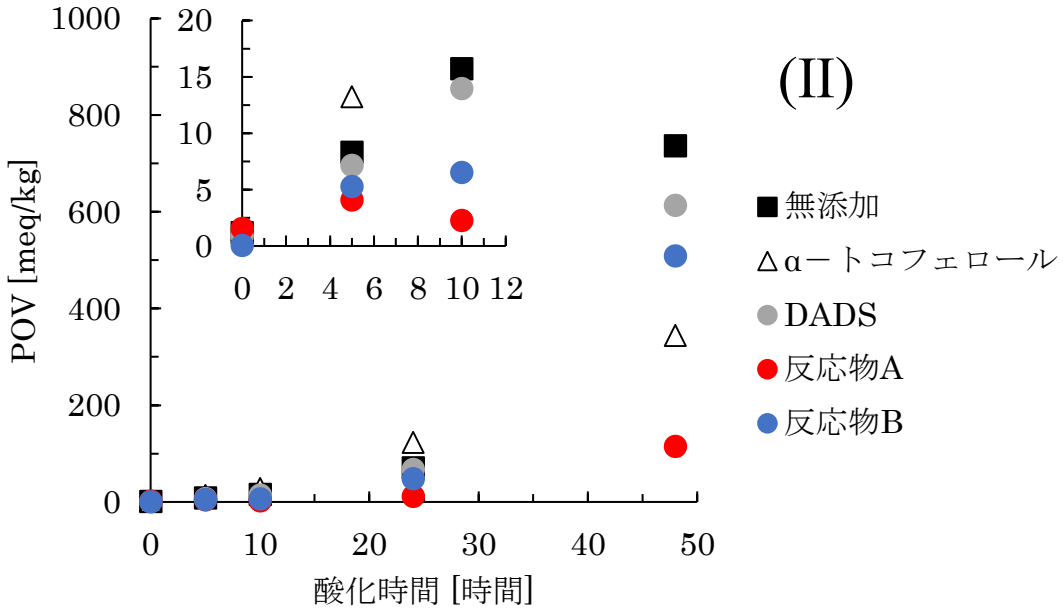


図 30　POV の経時変化(2)

各含硫化合物の添加量は魚油に対して(I)0.1%(w/w)、(II)0.5%(w/w)とした。

各図左上には酸化誘導時間 12 時間までの拡大図を示した。

2－4　考察

脂溶性含硫化合物の抗酸化作用を評価する目的で、DADS から数種の脂溶性含硫化合物の合成、カラムクロマトグラフィーにより 13 のフラクションに分画した。

DADS の酸化反応により、主な成分としてアリシンを含む反応物 A を得た。アリシンは化学的に不安定で、アホエンやビニルジチイン類に変化する。本実験では、反応物 A にアセトン水溶液を加え、還流することで反応物 B を得た。反応物 B には主な成分としてアホエンとビニルジチイン類が含まれ、他に DADS と DATS が含まれていることを HPLC による分析と、PDA データより確認した。反応物 B には数種の脂溶性含硫化合物が含まれていたため、より詳細に検討するため、カラムクロマトグラフィーにより 13 のフラクションに分画した。13 のフラクションに含まれる脂溶性含硫化合物の成分同定を HPLC により行い、一部のフラクションについては、HPLC による定性分析に加え、GC-MS 分析により質量情報を得た。アホエン溶出画分(Frc.11)について、HPLC 分析ではピークが 1 本のみで、アホエン以外の不純物は極めて少ないと判断した一方で、GC-MS 分析で複数本のピークが確認された。これらピークは DADS、DATS、1,2-VD、1,3-VD であることを MS スペクトルから確認でき、HPLC の定性分析結果と一致しなかった。これについて、アホエンは熱に不安定な物質で、80℃以上となると消失しやすくなるという報告がある [38]。アホエンよりもさらに熱に不安定な物質としてアリシンがあり、これを GC で分析する際、注入口で直ちにビニルジチイン類に変換することが報告されている [37]。アホエンでも同様に、MS 検出部に到達するまでにアリシンが分解していると考えられた。本実験とは別に合成、精製したアホエン(純度 98%、HPLC による確認)を導入しても、複数本のピークが確認されたことから、アホエンの GC-MS 分析は困難であることがわかった。

反応出発物質である DADS と、それから合成した反応物 A、反応物 B の抗酸

化作用を DPPH ラジカル消去法にて評価したところ、DADS に抗酸化作用はなかったものの、反応物 A と反応物 B に抗酸化作用がみられた。特に反応物 A でその活性は高かった。DADS の抗酸化作用については、内藤らがリノール酸を用い、ロダン鉄法にて検討している。そのなかでは、モノサルファイド類には劣るものの、DADS 等のジサルファイド類にリノール酸の酸化誘導時間を遅延させ、抗酸化作用を認めている[39]。中村らはラードに DADS を添加したものを、Active oxygen method(AOM)試験により評価し、酸化誘導時間を遅延させることを示している[40]。また、Kim らも DADS を含むニンニク抽出液をコーン油に添加した際、無添加区と比較して POV の上昇が抑制されることを報告している[17]。いずれもの報告も DADS に抗酸化作用があったとされているが、本実験で実施した DPPH ラジカル消去活性試験において、DADS は抗酸化作用を示さなかった。いずれの実験においても、抗酸化作用を評価するためのものであるが、手法および評価原理が異なるため、結果に違いが生じたものと考えられた。

反応物 A にはアリシンが含まれ、反応物 B にアリシンは検出されなかったことから、反応物 A で抗酸化作用には、アリシンが大きく寄与している可能性が考えられた。反応物 B でも評価濃度を 10 mg/mL とすることで、抗酸化作用が認められた。反応物 B の分画液を評価したところ、13 の分画液のうち、1,3-VD を含む Frc.7 で最も抗酸化作用が高かった。各分画液のうち、Frc.7 は最も回収率が高かった。すなわち、13 の分画液のうち、Frc.7 が最も分画液中の溶質濃度が高い。溶質濃度が高いため、Frc.7 で最も抗酸化作用が高かった可能性も考えられた。

Frc.7 に次いで Frc.8、Frc.9 の順で抗酸化作用があった。特に、Frc.9 は回収率 3%(w/w)とさほど高くなく、低溶質濃度でも抗酸化作用を示した。このことから、Frc.8、Frc.9 の分画液には強い抗酸化物質が含まれていることが期待された。本実験では、Frc.8、9 に解析波長である 254 nm での UV 吸収が弱く、ピークの確

認ができなかったため成分の同定には至らなかった。PDA データでは、Frc.8 には、280-300 nm 付近に UV 吸収があり、Frc.9 では、解析波長 254 nm 以外で UV 吸収が確認されなかった(図 31、図 32)。さらに、質量情報を得るために、GC-MS による分析をしたところ、いずれの分画液でも GC クロマトグラムで複数本のピークが確認された。各ピークの MS スペクトルを確認したところ、DADS、DATS、1,3-VD が検出され、これらはいずれも HPLC 分析では検出されず、HPLC と GC-MS 分析の結果に矛盾が生じた。したがって、Frc.8、9 に含まれる成分はアリシンやアホエンと同様に、熱に不安定で、GC-MS による分析では、熱分解が生じ、本来の成分の質量情報が得られないものと考えられ、Frc.8、Frc.9 を対象とする場合、測定系として GC-MS は不適である可能性が示唆された。本実験では、これら分画液に含まれる成分の同定には至らず、詳細は不明であった。これら物質の同定は今後の課題となった。

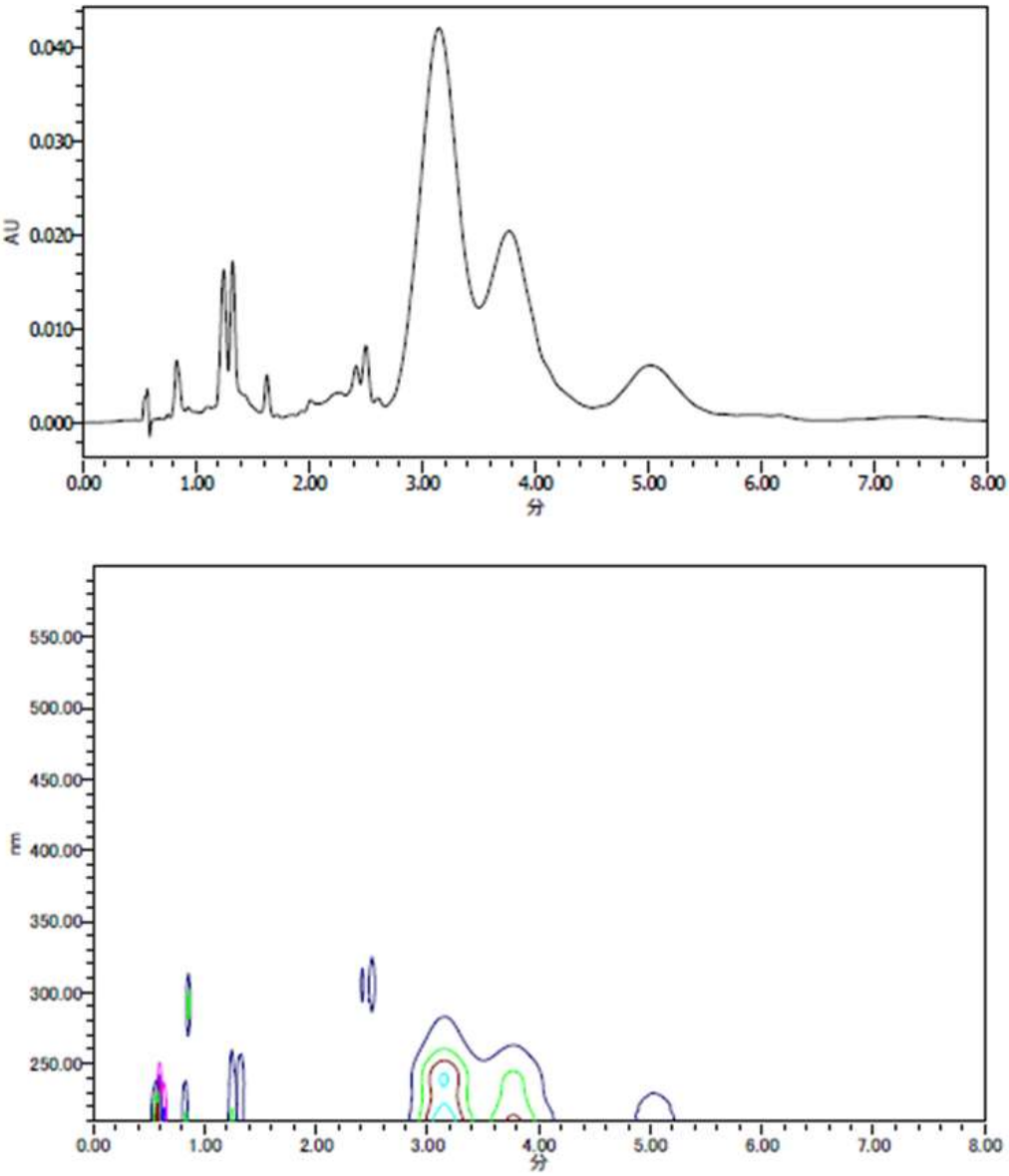


図 31　Frc.8 の HPLC-PDA データ

上：クロマトグラム(254 nm)、下：PDA データ(200-600 nm)

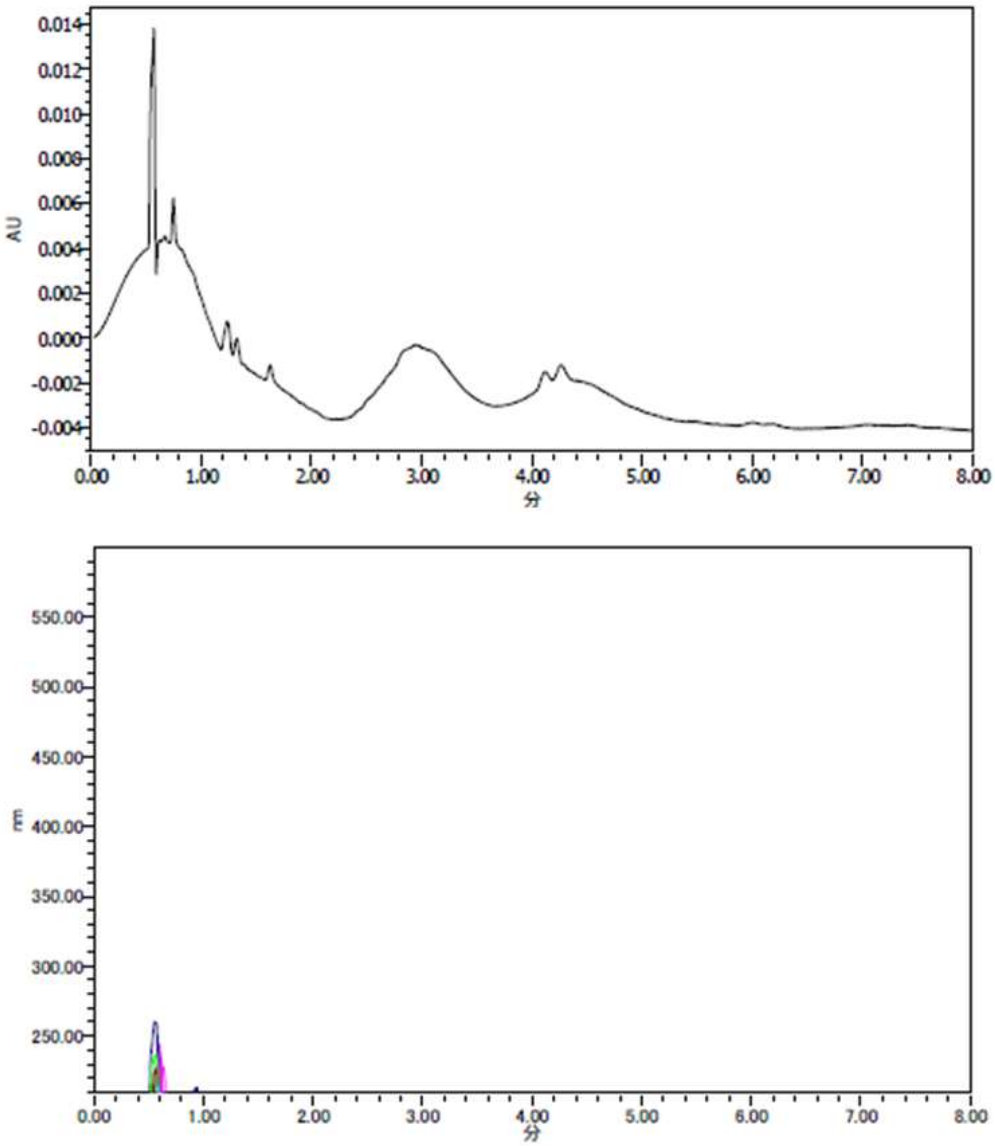


図 32　Frc.9 の HPLC-PDA データ

上：クロマトグラム(254 nm)、下：PDA データ(200-600 nm)

各脂溶性含硫化合物のうち、DPPH ラジカル消去作用のあったものを中心に選定し、これらを魚油に添加した。脂溶性含硫化合物を添加した魚油を 50℃で 48 時間保持して酸化を誘導させ、経時的に POV を測定した。まずは POV 上昇抑制効果のある成分を選定するため、各脂溶性含硫化合物を魚油に対して 0.1%(w/w)添加したところ、主な成分としてアリシンを含む反応物 A を添加した試験区で POV の上昇抑制効果があった。ビニルジチイン類、アホエンを含む反応物 B を添加した試験区で、50℃の 10 時間保持で POV の上昇を抑制する効果があったものの、その効果は反応物 A には及ばなかった(図 29)。反応物 B の分画液のうち、DPPH ラジカル消去率が高かった Frc.7(1,3-VD 含有画分)、Frc.8(unknown)、Frc.9(unknown)を添加した試験区では、無添加区と大差なく POV が上昇し、これら成分での POV 上昇抑制効果はなかった。

次いで、添加量の影響を検証するため、魚油に対する各脂溶性含硫化合物の添加量を 0.1%(w/w)と 0.5% (w/w)に設定して実験したところ、反応物 A および反応物 B 添加区で濃度依存的に魚油の POV 上昇を抑制した。反応物 A 添加区では、50℃を 24 時間保持しても POV が 0.1%(w/w)添加区で 37 meq/kg、0.5%(w/w)添加区で 12 meq/kg となり、本実験で設定した実験のうち、反応物 A 添加区に最も強い POV 上昇抑制効果がみられた(図 30)。以上より、アリシンが魚油の POV の上昇を抑制する主要な成分であることが示された。

しかし、アリシンは化学的に不安定で、アリルスルフィド類、ビニルジチイン類等へ変化する [13)15)]。Iberl らはアマニ油にアリシンを添加して室温に保持し、HPLC でアリシンの消長を研究した [33)]。それによれば、アリシンが構造を維持して存在するのは 24 時間程度で、48 時間経過時には検出されず、ビニルジチイン類、特に 1,3-VD に変化していることを示している。本研究では試料として魚油を用いているという点では異なるものの、トリアシルグリセロール中にアリシンを添加しているため、同様の化学変化が生じていると考えられた。この化学変

化は、アリシンを多く含む反応物 A から 1,3-VD や E/Z-アホエンを含む反応物 B への化学変化に類似している。反応物 A と比較するとその効果は小さいものの、反応物 B にも POV の上昇を抑制する効果が認められたことから、50℃保持の初期ではアリシンが、その消失後にはアリシンから変化した反応物 B 相当の含硫化合物が魚油の POV の上昇を抑制したものと考えられた。

また、1,3-VD を含む Frc.7 や、物質同定には至らなかった Frc.8 や Frc.9 はラジカル消去率が高かったものの、魚油に直接添加した際には POV の上昇を抑制する効果は見られなかった。一方でこれらの分画前のものに相当する反応物 B では、魚油の POV 上昇抑制効果があった(図 29、30)。これらのことから、反応物 B を構成する複数の脂溶性含硫化合物の組み合わせ効果により、魚油の POV 上昇抑制効果が発揮する可能性が示唆された。実際のニンニク加工では、単品の脂溶性含硫黄化合物が生成することはなく、本実験で得た反応物 A や反応物 B のような複合物となる。実際のニンニク加工に近い条件の脂溶性含化合を評価したことは社会実装を考えると意義あるものと考える。

一方で、比較として設定した α-トコフェロール添加区において、0.5% (w/w)よりも 0.1%(w/w)の添加で魚油の POV 上昇を抑制した。魚油に対する α-トコフェロールの POV 上昇抑制効果については、イワシ油を用いた Kulas らの報告がある [10)]。それによると、α-トコフェロールには初期のヒドロペルオキシドが増加するまでの誘導時間を遅延させ、この効果は添加量の増加に伴い向上するが、一定量以上の α-トコフェロールの添加により、抗酸化作用が低下するとしている。牛脂を用いた試験でも、0.01%から 0.05%に α-トコフェロールの添加量を増加させることで抗酸化作用は向上したが、0.1%添加では 0.05%添加よりも活性は低下した [11)]。本実験でも同様の結果が得られ、α-トコフェロール 0.5% (w/w)添加区よりも 0.1%(w/w)添加区で POV の上昇を抑制したことから、既往研究の結果と矛盾はない。

以上より、DPPH 法はラジカル補足能を抗酸化作用として捉え、その強さを評価する指標ではあるが、脂質に対する抗酸化作用を評価する場合、POV などの脂質酸化指標を用い、添加濃度も含めて評価する必要があると考えられた。

本研究では化学合成により得たアリシンやビニルジチイン類を用いたが、これら脂溶性含硫化合物はニンニクをすりおろすことで生成される[13)15)17)21)]。これらは食用油に可溶で、ニンニクオイル漬けなどの加工品によっても得ることができ、実際のニンニク加工でも本研究結果を応用できるものと考えられた。

第 3 章
ニンニク含硫化合物によるエマルション系での魚油酸化抑制効果の評価

3－1　緒言

第 1 章、第 2 章で含硫黄化合物の抗酸化作用を DPPH 法にて評価した。その結果、水溶性では AL、Glu-PEC でラジカル消去率が高く、脂溶性ではアリシン、1,3-VD でラジカル消去率が高かった。また、物質の同定には至らなかったものの、反応物 B の分画液の一部(Frc.8、Frc.9)で低濃度でも DPPH ラジカル消去作用が認められた。

ニンニクの抗酸化作用については、様々な野菜の中でも特に活性が高いという報告があるが、水抽出液の評価に留まっている [14]. また、脂溶性含硫化合物に着目し、抗酸化作用を評価したものもあるが、水溶性含硫化合物との比較がない [17)21)41)]。食品は水溶性、脂溶性成分が混在しているものが多く、ニンニク関連成分の抗酸化作用を評価するにあたっても、水溶性抗酸化成分と脂溶性成分を複合的に評価し、食品としての特性を理解することが求められる。

ニンニクに含まれる AL はアリイナーゼ (EC4.4.1.4)の作用を受けて脂溶性のアリシンへと変化し、次いでアリシンはアリルスルフィド類等の脂溶性含硫化合物へと変換される(図 4、5)[13)15)]。すなわち、アリイナーゼの作用を制御することで得られる水溶性含硫化合物と脂溶性含硫化合物を制御することが可能である。アリイナーゼの至適条件とすることで AL からアリシンさらにはビニルジチイン類への反応を促すことができる。反対に、アリイナーゼの非至適条件下では、AL からアリシンの反応は進行せず、AL を保持することができる。この作用を利用し、元来ニンニクに含まれる水溶性含硫化合物を保持させたニンニク抽出液と、アリイナーゼを作用させてアリシン、ビニルジチイン類の生成を促したニ

ンニク抽出液の 2 種類を調製した。

エマルション系は水溶性、脂溶性成分の両方を含んでおり、水溶性抗酸化成分と脂溶性成分とを複合的に評価するのに適した系であると考え、本実験ではモデル食品として魚油エマルションを調製した。魚油エマルション中に 2 種類のニンニク抽出液を用い、保管試験を実施し、含硫化合物の酸化抑制効果を検証した。

3－2　実験

3－2－1　ニンニク抽出液の調製

(1)抽出液の調製

供試ニンニクは「1－2－1　ニンニク抽出液の調製(1)供試ニンニク」と同じものを用いた。

ニンニク凍結乾燥粉末 12.5 g に pH6.8 または pH2.8 の 50 mM リン酸バッファーを約 200 mL 加えて 60 分間超音波抽出後、250 mL に定容して、pH の異なるニンニク抽出液を得た。なお、抽出に用いた pH2.8 または pH6.8 の 50 mM リン酸バッファーを以下のとおり調製した。

50 mM リン酸バッファー(pH6.8)

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3.90 g とリン酸水素二ナトリウム 12 水和物 8.95 g に蒸留水を加え、1 L に定容した。

50 mM リン酸バッファー(pH2.8)

リン酸二水素ナトリウム二水和物 6.24 g とリン酸 340 μL に蒸留水を加え、1 L に定容した。

(2)抽出液の分析

水溶性含硫化合物の分析は、「1－2－3　水溶性含硫化合物の定量」に示した方法を一部改変して実施した。本実験では、抽出液を固相抽出することなく、抽出液をそのまま HPLC 分析に供した。脂溶性含硫化合物を、「2－2－2　脂溶性含硫化合物の分析」に示した方法で分析した。

3－2－2　魚油エマルションの調製

(1)魚油の精製

「2－2－4　魚油の前処理と添加試験」に示した同様の方法で、トコフェロール、次いで過酸化脂質を除去した。

(2)エマルションの調製

エマルションの配合を表 3 に示した。水溶性プレミックスとして、ニンニク抽出液(pH2.8 および 6.8)、リン酸バッファー(pH2.8 および 6.8)、ポリグリセリン脂肪酸エステル、アスコルビン酸(富士フイルム和光純薬株式会社)を混合した。なお、乳化剤として使用したポリグリセリン脂肪酸エステルは HLB 値(Hydrophilic Lipophilic Balance)の異なる 2 種類を使用した。S-28D(HLB 値 9、三菱ケミカルフーズ株式会社)と L-7D(HLB 値 17、三菱ケミカルフーズ株式会社)を使用した。脂溶性プレミックスとして、精製魚油、レシチン(SLP-レシチン、辻製油株式会社)、α-トコフェロール(富士フイルム和光純薬株式会社)を混合した。それぞれ別に調製した水溶性プレミックスと脂溶性プレミックスを混合して予備乳化した。予備乳化に攪拌機(T25 basic ULTRA TURRAX、IKA ジャパン株式会社)を用い、3000 rpm で 5 分間攪拌して乳化させた。次いで、本乳化として、高圧ホモジナイザー(Nanomaizer markII NM2-L200、吉田機械興業株式会社)で、

予備乳化液を 50 MPa で通液して処理してエマルションを得た。

エマルション 5 mL を 100 mL 容量のねじ口瓶に蓋をゆるめて封入し、50℃に設定した恒温器内(DK64、ヤマト科学株式会社)で 48 時間保持した。経時的にエマルションをサンプリングし、過酸化脂質の測定まで-60℃で保管した。

表 3　魚油エマルションの配合表

	Emulsion (emu.)											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
魚油(DHA-27W)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
レシチン(SLP-レシチン)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
α-トコフェロール			0.1						0.1			
ポリグリセリン脂肪酸エステル(S-28D、HLB 9)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
ポリグリセリン脂肪酸エステル(L-17D、HLB 17)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
5%(w/w) ニンニク抽出液(pH6.8)				17.0	34.0	85.0						
50mM リン酸バッファー(pH6.8)	85.0	84.5	84.9	68.0	51.0							
5%(w/w) ニンニク抽出液(pH2.8)										17.0	34.0	85.0
50mM リン酸バッファー(pH2.8)							85.0	84.5	84.9	68.0	51.0	
アスコルビン酸		0.5						0.5				
合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

単位 g

3－2－3　過酸化脂質の評価

過酸化脂質の評価は、Mei らが行った方法[42]を一部改変して測定した。

(1)Fe^{2+}溶液の調製

塩化バリウム二水和物(富士フイルム和光純薬株式会社)を 352 mg 精秤し、0.4 M 塩酸で 10 mL に定容して 0.144 M の溶液を調製した。次いで、硫化鉄(II)七水和物(富士フイルム和光純薬株式会社)を 400 mg 精秤し、水で 10 mL に定容して 0.144 M の溶液を得た。これらを 1 mL ずつ採取、混合し、遠心分離してその上清を回収した。

(2)チオシアン酸アンモニウム溶液の調製

チオシアン酸アンモニウム(富士フイルム和光純薬株式会社)を 3 g 精秤し、水で 10 mL に定容して 3.94 M の溶液を調製した。

(3)チオシアン酸塩-Fe^{2+}液の調製

Fe^{2+}溶液と 3.94 M チオシアン酸アンモニウム溶液を 1 mL ずつ混合した。この混合液をメタノール/1-ブタノール(2/1、v/v)で 10 倍(v/v)に希釈し、チオシアン酸塩-Fe^{2+}液を調製した。

(4)過酸化脂質の測定

20 μL のエマルションを 3 mL のメタノール/1-ブタノール(2/1、v/v)に溶解させた。このうち 200 μL を採り、チオシアン酸塩-Fe^{2+}液 20 μL を加えて混合した。20 分静置した後、510 nm の吸光度を測定した。測定にはマイクロプレートリーダー(SH-1200、コロナ電気株式会社)を用いた。測定は 3 反復行った。

3－3　結果

3－3－1　ニンニク抽出液

pH の異なるリン酸バッファーで抽出したニンニク凍結乾燥粉末の水溶性含硫化合物の HPLC 分析結果を図 33 に、脂溶性含硫化合物の HPLC 分析結果を図 34 に示した。

pH2.8 のリン酸バッファーを用いて抽出したものでは AL が残存し(図 33、pH2.8、ピーク(3))、アリシンの生成がわずかであった(図 34、pH2.8、ピーク(9))。一方で、pH6.8 のリン酸バッファーで抽出したものは AL のピークは検出されず(図 33、pH6.8)、アリシンのピークが確認された(図 34、pH6.8、ピーク(9))。

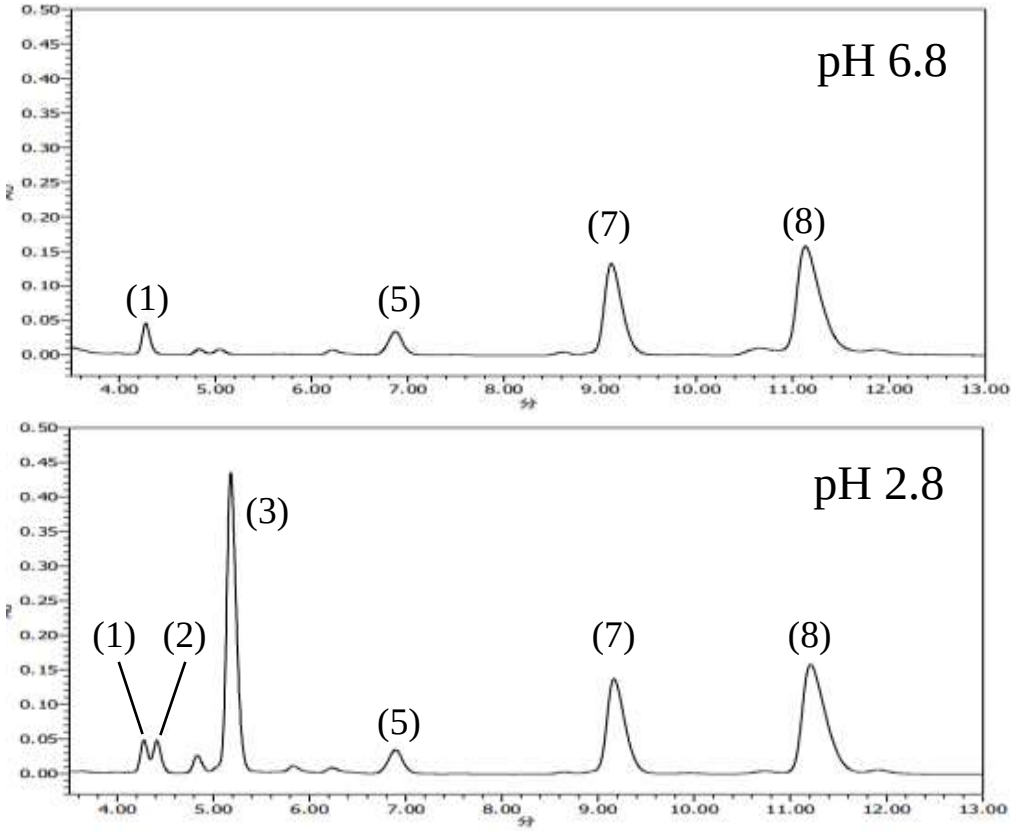
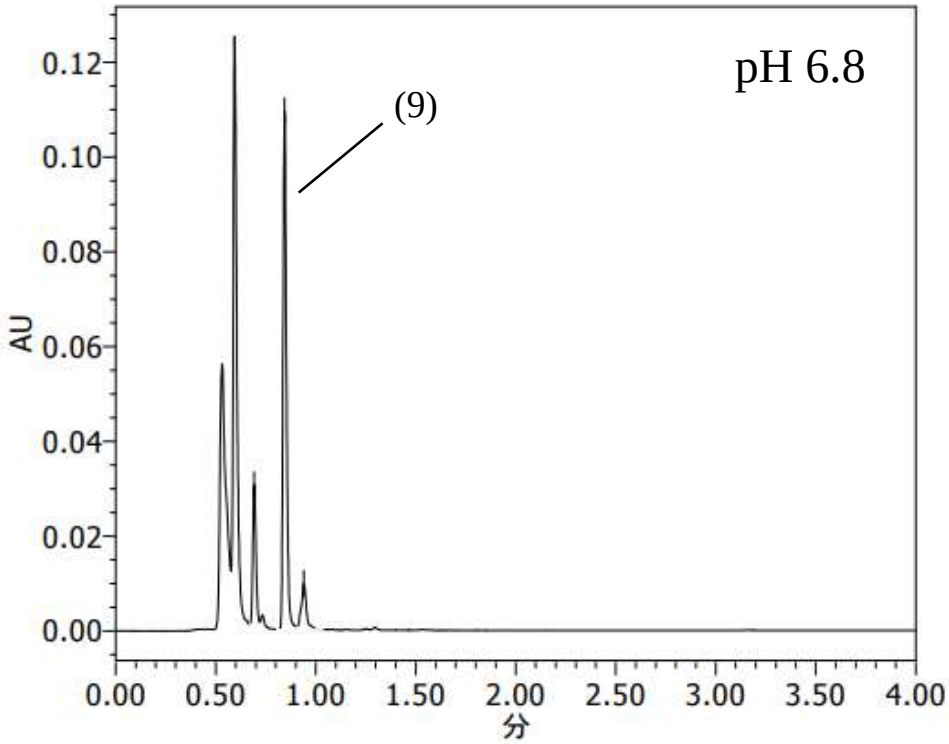


図 33　ニンニク抽出液の HPLC クロマトグラム(水溶性含硫化合物)

(1) シクロアリイン (CA)　(2) メチイン (MT)　(3) アリイン (AL)　(5) γ-グルタミル-S-メチルシステイン (Glu-MEC)　(7) γ-グルタミル-S-アリルシステイン (Glu-ALC)　(8) γ-グルタミル-S-(E)-1-プロペニルシステイン (Glu-PEC)



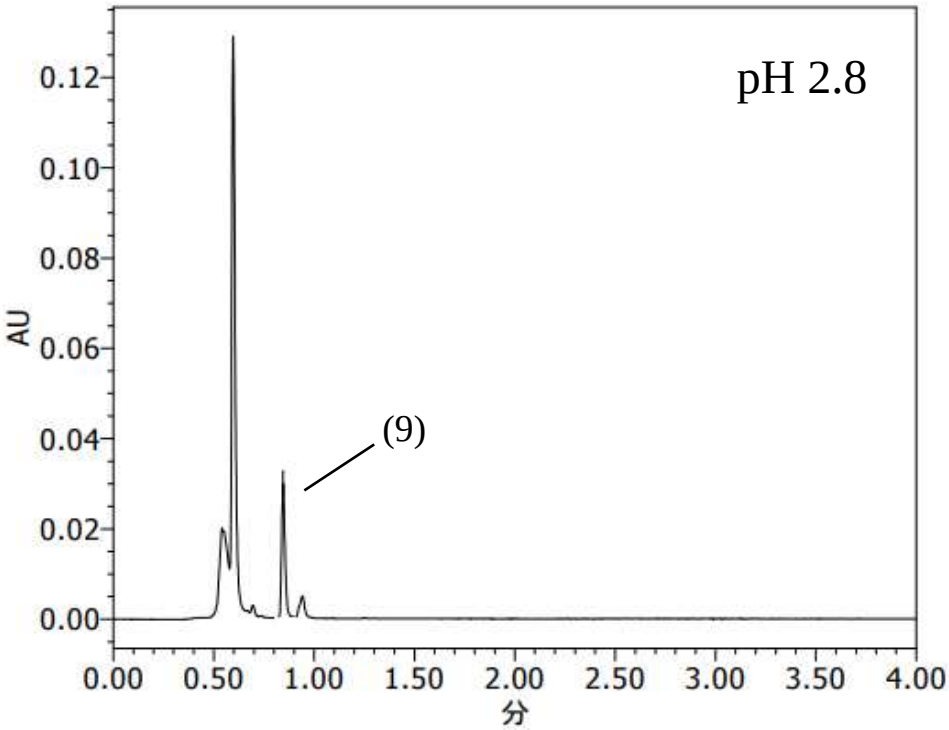


図 34　ニンニク抽出液の HPLC クロマトグラム(脂溶性含硫化合物)

(9) アリシン

3－3－2　過酸化脂質

過酸化脂質の測定結果を図 35 に示した。各エマルションの初期の吸光度を 0 とし、保持期間中の吸光度の増加量を示した。pH6.8 のリン酸バッファーで調製したエマルションについて、比較対照として設定した無添加区(emu. A)は 510 nm の吸光度が微増したのに対し、pH2.8 で調製したもの(emu. G)は吸光度が増大し、エマルションの pH を酸性とすることで脂質酸化が促進した。

エマルションを pH6.8 とした試験では、α-トコフェロールを添加したもの(emu. C)で吸光度が増大した。アスコルビン酸を添加したもの(emu. B)では、吸光度の増大を抑制した。対照として設定した無添加区(emu. A)と、ニンニク抽出液を加えた魚油エマルション(emu.D、E、F)の吸光度の増加挙動に大差はなかった。

エマルションを pH2.8 とした試験でも、α-トコフェロールを添加したもの(emu. I)で吸光度が 50℃保持試験初期から増大し、最も脂質酸化が促進した。アスコルビン酸を添加したもの(emu. H)では、吸光度の増大を抑制した。対照として設定した無添加区(emu. G)と、ニンニク抽出液を加えた魚油エマルション(emu. J、K、L)の吸光度の増加挙動を比較すると、ニンニク抽出液を加えた試験区で 510 nm の吸光度が低く、ニンニク抽出液で過酸化脂質の生成が抑えられた。

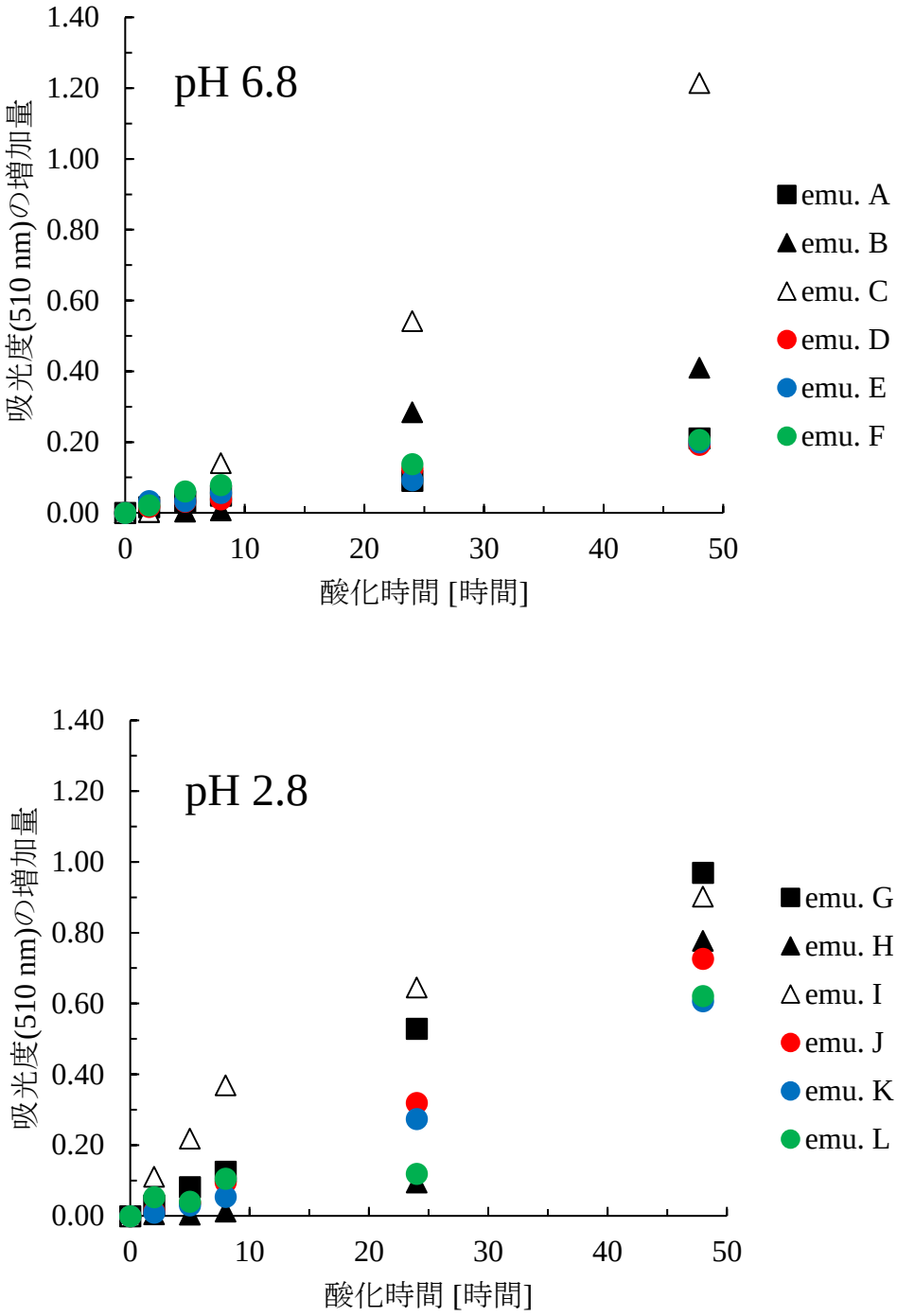


図 35　過酸化脂質測定の結果

上：pH6.8、下：pH2.8

3－4　考察

pH の異なるリン酸バッファーを用い、ニンニク抽出液を調製し、水溶性含硫化合物の分析条件と、脂溶性含硫化合物の分析条件の 2 種類の HPLC 条件で分析した。pH2.8 のリン酸バッファーによる抽出では AL のピークが確認され、わずかにアリシンのピークが確認された。一方で pH6.8 のリン酸バッファー抽出では、AL が検出されず、アリシンが多量に確認された。AL をアリシンへと変換するアリイナーゼの至適条件については、Wang らが、至適 pH が 6.5 であることを示している[43]。本実験でもこの報告と同様に、pH2.8 ではアリイナーゼの作用を抑制し、pH6.8 でアリイナーゼが作用した結果であると考えられた。以上より、水溶性含硫化合物、脂溶性化合物のいずれかを選択して加工食品へ添加する際には、pH 等で含硫化合物の組成を制御できることが示された。

pH の異なるリン酸バッファーを用いて調製したニンニク抽出液と、魚油を配合した O/W エマルションを調製した。水溶性もしくは脂溶性含硫化合物の組成が変化しないよう、すなわち、残存するアリイナーゼの作用を考慮し、エマルションの連続相を pH2.8 もしくは pH6.8 のリン酸バッファーとした。pH2.8 のリン酸バッファーを用いた魚油エマルション(emu. G)では 510 nm の吸光度が増大しやすく、pH6.8 のもの(emu. A)と比較して過酸化脂質が増加しやすいことが示された。魚油マルションの劣化挙動と pH の関連について、エマルションを酸性とすることで脂質劣化が促進されるという報告[44]や、クリーミングが生じて物理的な安定性が損なわれるという報告[45]もある一方で、中性とすることで酸化が促進する報告[42]もあり、結果がそれぞれ異なる。エマルションの劣化挙動については、pH の他、油滴径との関係[46]、処方する乳化剤[47]との関連もあり、詳細を特定することは困難である。本実験では高圧ホモジナイザーを使用しており、攪拌乳化と比較すると油滴径が比較的小さい。配合する原料やその量比、エマルションの処理方法など複雑に影響し、本結果を示したものと考える。

pH を 6.8 として試作したエマルションを用いた試験では、emu. D、E、F にはアリシンが含まれる。アリシンが魚油の POV 上昇を抑制することについては、第 2 章に記した。本実験でも、emu. D、E、F のいずれもアリシンにより脂質酸化を抑制したものと考えるが、比較対照として設定した無添加区(emu. A)の吸光度の増加挙動と大差はなかったことから、脂溶性含硫化合物の添加効果は明確にはならなかった。

一方、エマルションの pH を 2.8 とした試験では、ニンニク抽出液を添加することで吸光度の増加を抑え、脂質酸化抑制があることが示された。比較対照として設定した無添加区(emu. G)の吸光度の増加挙動と比較して、ニンニク抽出液を加えた emu. J、K、L で吸光度の増加が抑制され、ニンニク抽出液による脂質酸化抑制効果が確認できた。

エマルションの pH に関わらず、アスコルビン酸の添加は過酸化脂質の増大を招いた。アスコルビン酸は酸化防止剤として加工食品において広く使用されているが、その効果を得るには、添加量が重要である。アスコルビン酸については、抗酸化効果が得られないという報告 [48]や、過度の処方は逆に酸化を促進するという報告もあり [49]、本実験で実施した処方量ではアスコルビン酸の抗酸化効果が得られる添加濃度ではなかったものと考える。また、過度のアスコルビン酸の処方は褐変を促進する。本実験で調製したエマルションでも、アスコルビン酸を処方したエマルションで褐変が進んでいた(データ示さず)。過度のアスコルビン酸の添加は褐変を招き、色調で加工食品の商品価値の低下を招く可能性も考えられ、抗酸化作用と色調とのバランスを検討し、製品に応じたアスコルビン酸の処方量を設定する必要があると考えられた。

本実験では精製魚油に対して α-トコフェロールを 0.5%(w/w)としてエマルションを調製した。この α-トコフェロールの添加量は第 2 章に示したものと同様とした。エマルションの pH に関わらず、過酸化脂質の増大抑制効果は見られな

かった。α-トコフェロールによる脂質の酸化抑制効果については既往研究が存在し、そのなかで明確な α-トコフェロールの添加効果は確認されていない[11)]。本研究ではビタミン E のうち、α-トコフェロールを比較対象とした。本実験でも、魚油に対しては α-トコフェロール単品の処方は抗酸化作用を期待できない結果となった。

食品加工において、微生物制御の観点から殺菌工程は重要で、酸性条件は微生物の繁殖を抑制する。酸性条件下でニンニク抽出液を調製すると、ニンニク中のアリイナーゼが作用せず、AL を主な成分とする元来ニンニクに含まれる水溶性含硫硫化合物を得ることができる。本実験により、この抽出液はエマルション系において、魚油の酸化抑制することが明らかとなった。このことは、微生物の繁殖を抑えつつ、脂質の酸化を抑制することができることを示すもので、食品加工において有用な技術であると考えられた。

第 4 章
総括

栄養素のなかでも脂質は三大栄養素の一つで、エネルギー源としての役割を担っている。この役割以外にも、健康機能性を示す脂質があり、その効果を期待して利用される。そのなかでも EPA や DHA などの n-3 系 PUFA には抗炎症作用や抗血栓作用などの機能が報告され、その機能性を活かして健康食品や医薬品に利用されている。しかし、PUFA は化学構造に複数の二重結合を有しているため、酸化反応の影響を受けやすく、酸化により栄養価や健康機能性の低下を招く。この酸化安定性の低さが EPA や DHA の利用を妨げており、魚油の加工品には酸化防止剤の添加が必須となる。しかし、二重結合が複数存在する PUFA では、これらを添加することでの酸化防止は十分ではない。

ところで、ニンニクは古くから香辛料や滋養強壮食物として利用されてきた。ニンニク関連成分で抗酸化作用や抗菌、抗がん性など様々な報告がなされている。抗酸化作用については、様々な野菜の中でもニンニクは抗酸化作用が高いという報告があるが、水抽出液の評価に留まっている。ニンニク関連成分には脂溶性のものもあり、脂溶性含硫化合物に着目し、その抗酸化作用を評価したものもある。しかし、複数あるニンニク関連成分のうち、いずれの成分に抗酸化作用があるかを比較した報告はない。食品は水溶性、脂溶性成分が混在しており、ニンニク関連成分の抗酸化作用を評価するにあたり、水溶性成分だけでなく、脂溶性成分についても評価することが重要であると考えた。

ニンニクに特徴的な反応として、細胞破砕時に AL からアリシンへの変換反応と、次いで、生成したアリシンがアリルスルフィド類やビニルジチイン類へと変換する反応がある。この反応を利用することで、様々な含硫化合物の調製が可能である。そこで、抗酸化作用が高いとされるニンニクを用いた魚油の劣化防止技

術を開発することを目的とし、本研究を実施した。

第 1 章で水溶性含硫化合物およびニンニク加工品の抗酸化作用を DPPH ラジカル消去法により評価した。水溶性含硫化合物を扱う実験において、アリイナーゼの作用を考慮することは重要で、本実験ではアリイナーゼが作用しないよう、ニンニクサンプルの前処理としてニンニクりん片を凍結乾燥により処理し、抽出溶媒には酸性アルコール水溶液を用いた。また、6 種類の水溶性含硫化合物を、ニンニクをはじめとするネギ属から抽出、単離、精製してこれを標準品とし、それぞれの抗酸化作用を検証した。これに 2 種類の市販試薬を加え、合計 8 種類の水溶性含硫化合物を検証した。

水溶性含硫化合物に着目し、産地の異なる 4 種類のニンニクを評価したところ、国産ニンニクと比較して輸入ニンニクで DPPH ラジカル消去率が高かった。8 種類の水溶性含硫化合物の標準品のなかでは Glu-PEC、AL の順にラジカル消去率が高かった。これらの結果より、国産ニンニクと比較して輸入ニンニクで Glu-PEC が多いものと考えられたが、国産ニンニクの方が Glu-PEC 含量が高かった。この水溶性含硫化合物の定量試験の結果、輸入ニンニクは供試までに①収穫後からの保管期間が長期であったこと、②熱が加わったことが各水溶性含硫化合物の HPLC プロファイルより示された。②については、輸入ニンニクで褐変度が高く、メイラード反応が進行していることを示す結果を得た。メイラード化合物には抗酸化作用が報告されおり、これが輸入ニンニクで抗酸化作用が高かった理由の一因であると考えられた。そのため、ニンニク、ニンニク加工品の抗酸化作用を検討するためには含硫化合物の他、収穫してからの原料の貯蔵履歴や温度履歴、加工時の温度履歴を複合的に考察する必要があると考えられた。

第 2 章で脂溶性含硫化合物の抗酸化作用を DPPH ラジカル消去法により評価した。市販試薬の DADS から反応物 A を合成した。次いで、反応物 A を還流することで反応物 B を得た。反応物 B には複数種の脂溶性含硫化合物が含まれて

おり、カラムクロマトグラフィーにより 13 のフラクションに分画した。HPLC を用い、反応物 A にはアリシン(52%、HPLC クロマトグラム面積比)が、反応物 B にはアホエン(35%)やビニルジチイン類(1,3-VD:18%、1,2-VD:11%)が含まれていることを確認した。同様に反応物 B の各分画液についても含有する成分を同定した。

これらの抗酸化作用を評価したところ、反応物 A と反応物 B で DPPH ラジカル消去率が高く、特に反応物 A で高かった。一方で、一連の反応の出発基質である DADS には抗酸化作用が認められなかった。反応物 B の分画液のうち、1,3-VD を含む Frc.7 で DPPH ラジカル消去法が高かった。また、分画液のうちで比較的溶質濃度が低かったが、Frc.8、Frc.9 は、抗酸化作用を示した。この 2 つの分画液に含まれる成分の同定には至らず、今後の課題となった。

第 1 章、第 2 章で得た実験結果からすると、本研究で扱った含硫化合物では、Glu-PEC＞AL＞反応物 A(アリシン 52%)の順にラジカル消去率が高かった(評価濃度 0.25 mg/mL)。

合成により得た各脂溶性含硫化合物を魚油に添加し、50℃で保持した。経時的に魚油をサンプリングし、POV を測定したところ、反応物 A、反応物 B の順に POV の上昇を抑制した。特に、反応物 A は魚油に対して 0.1%(w/w)という低添加量でも充分に酸化誘導時間を遅延させ、POV の上昇を抑制した。脂溶性含硫化合物のほとんどはニンニク特有のにおいがある。低添加量でも効果を発揮するならば、ニンニク特有のにおいを低減させつつ、魚油の酸化抑制効果を得ることができる。加工食品ごとに求められる使用期限は異なるため、対象とする加工食品に応じて、反応物 A の最小の添加量を設定する必要がある。

第 3 章ではモデル食品として魚油エマルションを調製し、ニンニク関連化合物の抗酸化効果を評価した。アリイナーゼの至適作用条件を活用し、ニンニク抽出液を酸性条件下、もしくは中性条件下で調製した。これにより、酸性条件下で

はアリイナーゼが作用せず、元来ニンニクに含まれる水溶性含硫化合物を得ることができ、一方で、中性条件下では AL からアリシンの反応が促進して脂溶性含硫化合物を得ることができた。

これら抽出液を分散媒として魚油エマルションを調製した。調製したエマルションを 50℃で保持し、酸化挙動を検証した。脂溶性含硫化合物の影響を検討するために設定した中性(pH6.8)処理試験区において、ニンニク抽出液添加区で過酸化脂質が増加しなかった。しかし、比較対照として設定した無添加区でも過酸化脂質がさほど増加しなかった。そのため、本実験ではエマルション系での魚油に対する脂溶性ニンニク抽出液の添加の影響は明確にはならなかった。一方で、水溶性含硫化合物の影響を検討するために設定した酸性(pH2.8)処理試験区において、ニンニク抽出液の添加量に応じて魚油の過酸化脂質の増加が緩やかとなり、水溶性含硫化合物の抗酸化作用が示された。

加工食品の製造時、微生物制御の観点から殺菌条件を酸性とすることが多い。酸性ではアリイナーゼの作用が抑制され、AL 等の水溶性含硫化合物が保持される。これより、殺菌条件を逸脱することなく、魚油の酸化を抑制できる可能性を示した。

ニンニク関連の含硫化合物で魚油の酸化防止技術を開発、研究するにあたり、まずは関連成分のスクリーニングを試みた。脂質酸化を抑制する初期酸化で生じるラジカルを補足する能力を抗酸化力とみなし、比較的安定なラジカルである DPPH を用いて多種の含硫化合物を評価した。DPPH ラジカル消去法で用いる溶媒はエタノールで、水溶性、脂溶性のいずれも評価することが可能である。本研究のように、水溶性、脂溶性の含硫化合物を対象とする場合、DPPH ラジカル消去法は有効な試験方法である。しかし、この評価法により選抜した抗酸化作用の高いものを魚油に添加しても、POV の上昇を抑制しないものもあり、DPPH ラジカル消去法での結果と矛盾したものもあった。特に、比較対照として用いた

α-トコフェロールは、濃度依存的に DPPH ラジカルを消去すると報告があるが、本実験では、実際に魚油へ添加しても抗酸化作用や、添加濃度依存性が確認されなかった。以上より、DPPH ラジカル消去法はラジカル補足能を抗酸化作用として捉え、その強さを評価する指標とはなるものの、脂質に対する酸化抑制効果を評価する場合、実際に脂質に添加し、POV などの脂質酸化指標を用い、添加濃度も含めて評価する必要がある。

本研究で取り扱った水溶性含硫化合物は全て無臭である。一方、ニンニクの有臭成分は脂溶性含硫化合物である。細胞破砕時にアリイナーゼが AL へ作用し、脂溶性で有臭のアリシンを生じる。これから、アリルスルフィド類、ビニルジチイン類、アホエンが生成し、いずれも有臭である。抗酸化作用を見出しても、ニンニク特有のにおいが強ければ、技術利用への妨げ理由の一つとなる。本研究で低添加量でも POV 上昇抑制効果のある反応物 A を合成した。反応物 A の合成に相当するものは、実際のニンニク加工では、すりおろし工程にあたるもので、産業上、反応物 A 相当を容易に得ることができる。加工食品によって、求められる賞味期限等の使用期限は異なる。そのため、反応物 A の添加量は加工食品ごとに設定する必要がある。比較的使用期限の短いものや、脂質酸化が緩やかな冷蔵、冷凍流通のものは、反応物 A 相当のものの処方量を抑えることが可能で、それに伴いニンニク臭を低減することができる。もしくは、元来有臭の加工品へ応用することで、ニンニクに特徴的なにおい成分でのマスキング効果を期待して処方することも有用であると考えられる。魚油を含む製品は水産加工品が多く、これらは加工食品のなかでもにおいが強く、ニンニクに特徴的なにおいでのマスキング効果が得られやすいものと考える。

本研究でニンニク関連の含硫化合物の魚油への酸化抑制効果を示した。ニンニクはすりおろしなどの加工操作により複雑に反応が進み、生成した成分のなかには不安定で、分解、消失するものもある。その一例がアリシンで、アリシン

から発生するアホエンもアリシンほどではないが熱に不安定な物質である。抗酸化作用の持続性を考慮して賞味期限を設定する必要がある。この点からも加工食品ごとに添加量を設定する必要がある。

本研究では無臭の水溶性含硫化合物でも酸化抑制効果が示された。ニンニクは発芽抑制のために冷蔵貯蔵にされ、通年流通が可能となっている。発芽が抑制され、外観上変化がないが、ニンニクりん片に含まれる各水溶性含硫化合物の含量は冷蔵貯蔵期間中に変化する。すなわち、収穫、貯蔵、販売の 1 年サイクルのうち、抗酸化作用が一定でないことが類推される。

ニンニク由来の含硫化合物の抗酸化作用を期待し、魚油を含む加工食品へ添加する際には、ニンニクの貯蔵、流通履歴による熱履歴や加工により生じるニンニクりん片の化学反応を複合的に考慮する必要がある。

以上、本研究では、ニンニク含硫化合物による魚油の酸化抑制効果を示した。これは、魚油、ニンニクの加工促進に貢献するものであり、農水産業の発展に寄与する意義深い成果を示した。

文献

1) 奥山治美, 菊川清見 編 (1998). 「脂質栄養学シリーズ 2　脂質栄養と脂質過酸化－生体内脂質過酸化は傷害か防御か－」, 学会センター関西 (大阪)

2) 菅野道廣, 近藤和雄, 板倉弘重, ブルース・ジャーマン (2006). 「健康と脂質吸収」, 建帛社 (東京)

3) 鹿山光 編 (1995). 「AA、EPA、DHA-高度不飽和脂肪酸」, 恒星社厚生閣 (東京)

4) 原健次 (1996). 「生理活性脂質　EPA・DHA の生化学と応用」, 幸書房 (東京)

5) 伊藤浩 編 (2013).「そうだったんだ! 脂肪酸－循環器疾患との深い関係－」, 文光堂 (東京)

6) 二木鋭雄, 島﨑弘幸, 美濃真 編 (1992). 「抗酸化物質脂質－フリーラジカルと生体防御－」, 学会出版センター(東京)

7) 川嵜敏祐, 井上圭三 編 (2001). 「糖と脂質の生物学」, 共立出版(東京)

8) Ganeko, N., Shoda, M., Hirohara, I., Bhadra, A., Ishida, T., Matsuda, H., Takamura, H. and Matoba, T. (2008). Analysis of volatile flavor compounds of sardine (Sardinops melanostica) by solid phase microextraction. *J. Food Sci.*, **73**, S83-88.

9) 高村仁和 (2007). 食品中の脂質酸化生成物による風味変化, オレオサイエンス, **7**, 231-235.

10) Kulas, E. and Ackman, R.G. (2001). Properties of α-, γ-, and δ-tocopherol in purified fish oil triacylglycerols. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **78**, 361-367.

11) 兼松弘, 守瀬恵美子, 新谷いさお, 今村正男, 松本晃, 勝井五一郎 (1972). マーガリンに対するトコフェロールの抗酸化作用について, 栄養と食糧, **25**, 343-348.

12) 渡辺純，沖智之，竹林純，山崎光司，津志田藤二郎 (2009). 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して ORAC 法の有用性と他の測定法との相関性，生物と化学, **47**, 237-243.

13) 齋藤洋監修 (2000).「ニンニクの科学新装版」，朝倉書店(東京)

14) Cao, G., Sofic, E. and Prior R. (1996). Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3426-3431.

15) Koch, H. P. and Lawson, L. D. ed. (1996). “Garlic : The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species” Williams & Wilkins(US).

16) Block, E., (2010). “Garlic and other alliums”, RSC Publishing(UK).

17) Kim, S. M., Kubota, K. and Kobayashi, A. (1997). Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1482-1485.

18) Naznin, M. T., Maeda, T. and Morita, N. (2010). Antioxidant functions of E- and Z-ajoene derived from Japanese garlic, *Int. J. Food Prop.*, **13**, 821-829.

19) 山崎賀久，徳永隆司，奥野智旦 (2005). ニンニクフレーバー前駆体 S-アルケニルシステイン誘導体の HPLC 分析，日本食品科学工学学会誌, **52**, 160-166.

20) Yamazaki, Y., Iwasaki, K., Mikami, M. and Yagihashi, A. (2011). Distribution of eleven flavor precursors, S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives, in seven alliumu vegetables, *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 55-62.

21) Locatelli, D. A., Nazareno, M. A., Fusari, C. M. and Camargo, A. B. (2017). Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition, *Food Chem.*, **220**, 219-224.

22) 濱野濱助，近松義博，須原亜澄香(2004). 発酵黒ニンニク及びこれを用いるペースト状食品並びにこれらの製造方法. 特開 2006-149325, 6 月 15 日

23) 山谷祥史，能登谷典之 (2022). 黒ニンニクの製造条件が機能性アミノ酸含量に与える影響，日本食品科学工学会誌, **69**，掲載予定

24) Ueda, U., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R. and Kimizuka, A. (1990). Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 163-169.

25) Lawson, L. D., Wang, Z. J. and Hughes, B. G. (1991). γ-Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other allium spp.:precursors of AGE-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. *J. Nat. Prod.*, **54**, 436-444.

26) Nakagawa, K., Maeda, H., Yamaya, Y. and Tonosaki, Y. (2020). Maillard reaction intermediates and related phytochemicals in black garlic determined by EPR and HPLC analyses. *Molecules*, **25**, 4578-4587.

27) Ichikawa, M., Ide, N. and Ono, K. (2006). Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4849-4854.

28) Ueda, Y., Tsubuku, T. and Miyajima, R. (1994). Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 108-110.

29) Choi, I. S., Cha, H. S. and Lee, Y. S. (2014). Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*, **19**, 16811-16823.

30) Bae, S. E., Cho, S. Y., Won, Y.D., Lee, S. H. and Park, H. J. (2014). Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment, *Food Sci. Technol.*, **55**, 397-402.

31) 早瀬文孝 (1997). メイラード反応による活性酸素の生成と消去, 日本油化学会誌, **46**, 1137-1145.

32) 大谷貴美子, 長渡麻未, 柴田満, 冨田圭子, 佐藤健司, 川添禎浩(2007). 大徳寺瑞峯院納豆の製造過程における DPPH ラジカル消去活性の変化とその関連物質について, 日本調理学会誌, **40**, 239-248.

33) Iberl. B., Winkler, G. and Knobloch, K. (1990). Products of allicin transformation:

ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. *Planta Med.*, **56**, 202-211.

34) Iberl. B., Winkler, G. and Knobloch, K. (1990). Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.*, **56**, 320-326.

35) 宮下和夫, 奈良英一, 平尾美奈子, 阿部公紀, 太田亨 (1999). 水分散系における各種トリアシルグリセリンの酸化安定性, 日本油化学会誌, **48**, 21-27.

36) 藤野安彦 (1987). 「生化学実験法 9 脂質分析法入門」, 学会出版センター(東京)

37) Abu-Lafi, S., Dembicki, W., Goldshlag, P., Hanus, L. O. and Dembitsky, V. M. (2004). The use of the 'Cryogenic' GC/MS and on-column injection for study of organosulfur compounds of the Allium sativum. *J. Food Compost. Anal.*, **17**, 235-245.

38) Naznin, M. T., Akagawa, M., Okukawa, K., Maeda, T. and Morita, N. (2008). Characterization of E- and Z-ajoene obtained from different varieties of garlics. *Food Chem.*, **106**, 1113-1119.

39) 内藤茂三, 山口直彦, 横尾良夫 (1981). ニンニクの抗酸化物質の分画, 日本食品工業学会誌, **28**, 455-470.

40) 中村まゆみ, 河村フジ子 (1996). ラードの水煮におけるショウガの抗酸化力について(第 3 報)ニンニク併用の効果, 日本家政学会誌, **47**, 237-242.

41) 内藤茂三, 山口直彦, 横尾良夫 (1981). ネギ類植物からの抗酸化物質の検索, 日本食品工業学会誌, **28**, 455-470.

42) Mei, L., McClements, D. J. and Decker, E. A. (1999). Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2267-2273.

43) Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C. and Mo, Y. (2011). Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrason. Sonochem.*, **18**, 534-540.

44) Haahr, A. M. and Jacobsen, C. (2008). Emulsifier type, metal chelation and pH affect oxidative stability of n-3-enriched emulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **110**, 949-961.

45) Zhang, T., Ding, M., Tao, N., Wang, X. and Zhong, J. (2020). Effects of surfactant type and preparation pH on the droplets and emulsion forms of fish oil-loaded gelatin/surfactant-stabilized emulsions. *Food Sci. Technol.*, **117**, 108654-108663.

46) 宮下和夫 (2006). 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.

47) 廣瀬敦司, 宮下和夫 (1999). ドコサヘキサエン酸含有トリアシルグリセロールのエマルション中での酸化安定性に及ぼすタンパク質及びその分解物の抗酸化効果, 日本食品科学工学会誌, **46**, 799-805.

48) Reinton, R. and Rogstad, A. (1981). Antioxidant activity of tocopherols and ascorbic acid. *J. Food Sci*, **46**, 970-971.

49) Rege, S., Momin, S. and Dipti, B. (2015). Effect of ascorbic acid on the oxidative stability of water-in-oil emulsion in the presence of lipophilic antioxidants. *Int. J. Food Prop.*, **18**, 259-265.

引用 URL

i) https://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm
(財務省貿易統計による調べ, 2022.07.12)

ii) https://vegetable.alic.go.jp/yasaijoho/kaigaijoho/1710_kaigaijoho02.html
(スペインにおけるにんにくの生産および輸出動向, 独立行政法人農畜産業振興機構, 2022.07.12)

付図

水溶性含硫化合物の ^{1}H NMR スペクトル

付図一覧

付図 1　メチイン(MT)

付図 2　アリイン(AL)

付図 3　イソアリイン(IAL)

付図 4　γ-グルタミル-S-メチルシステイン (Glu-MEC)

付図 5　γ-グルタミル-S-アリルシステイン (Glu-ALC)

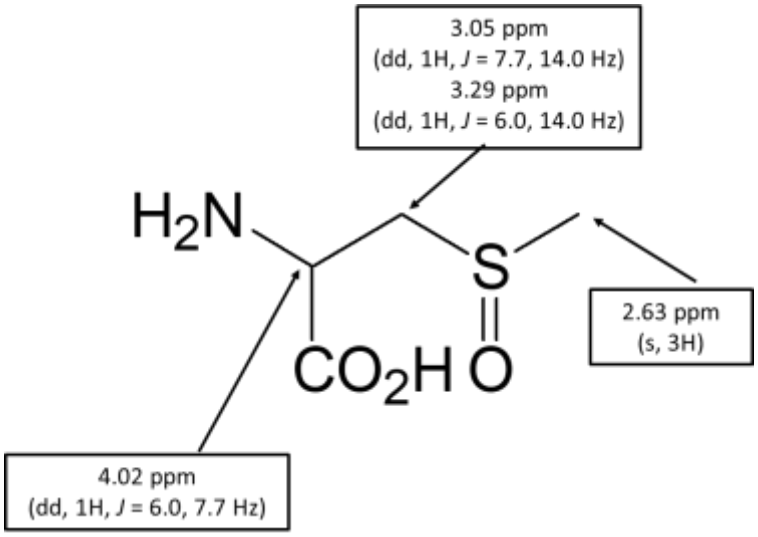
付図 6　γ-グルタミル-S-(E)-1-プロペニルシステイン (Glu-PEC)

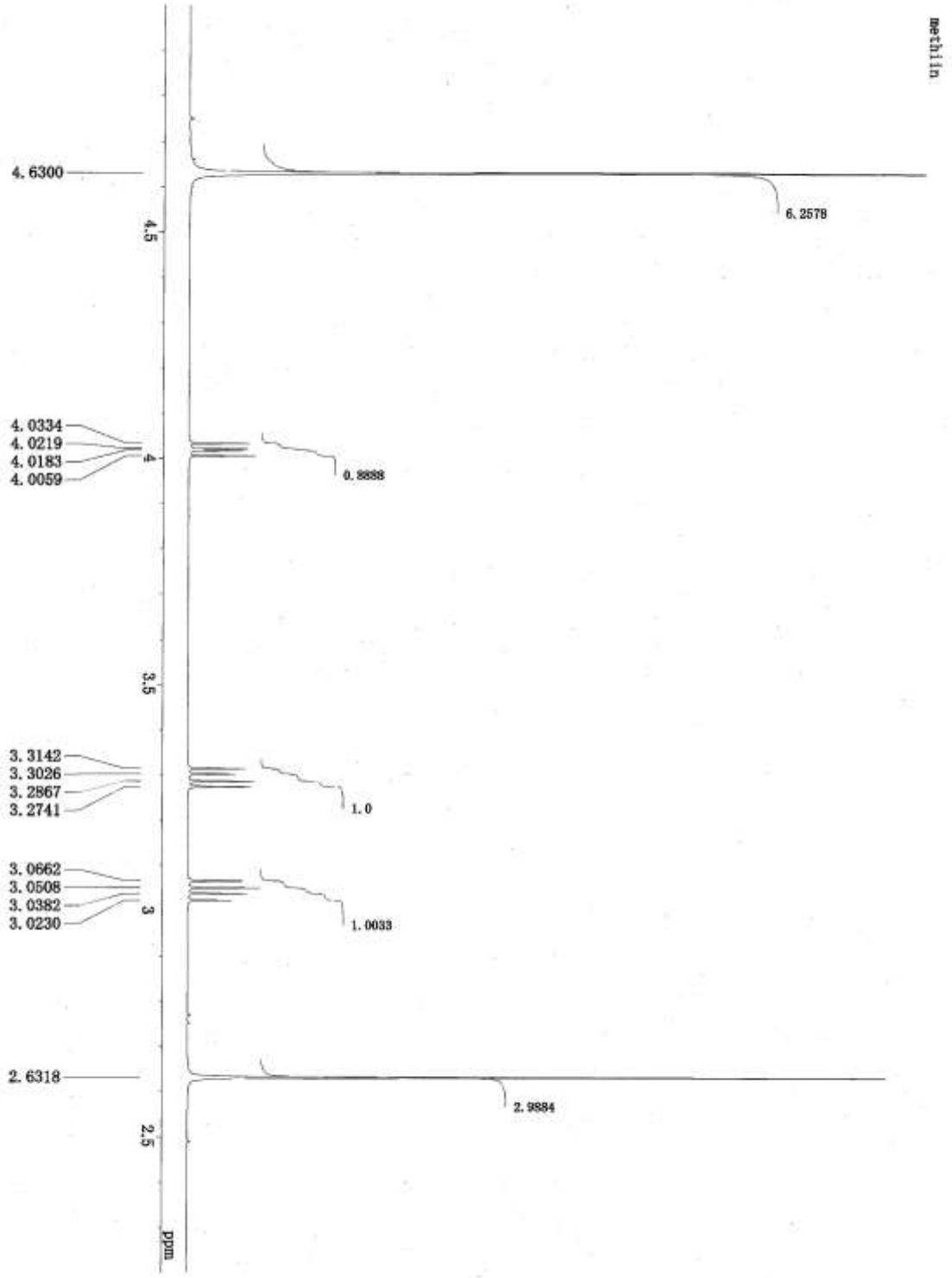
測定装置

JNM-ECZ500R（日本電子株式会社日，500 MHz）

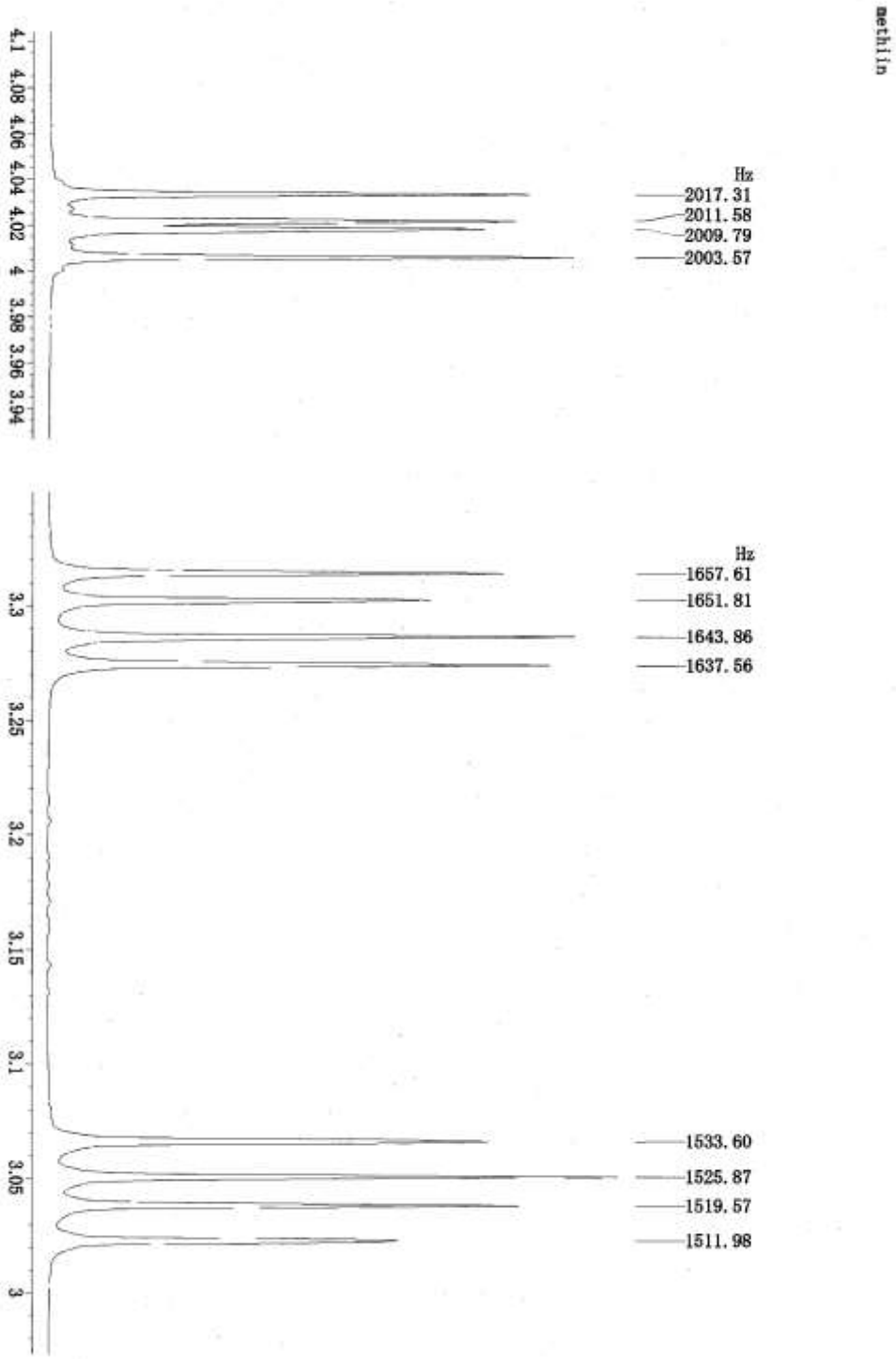
（重水の残留プロトンシグナルを 4.63 ppm の内部標準とした。）

付図 1　メチイン(S-methylcysteine S-oxide, Methiin, MT)



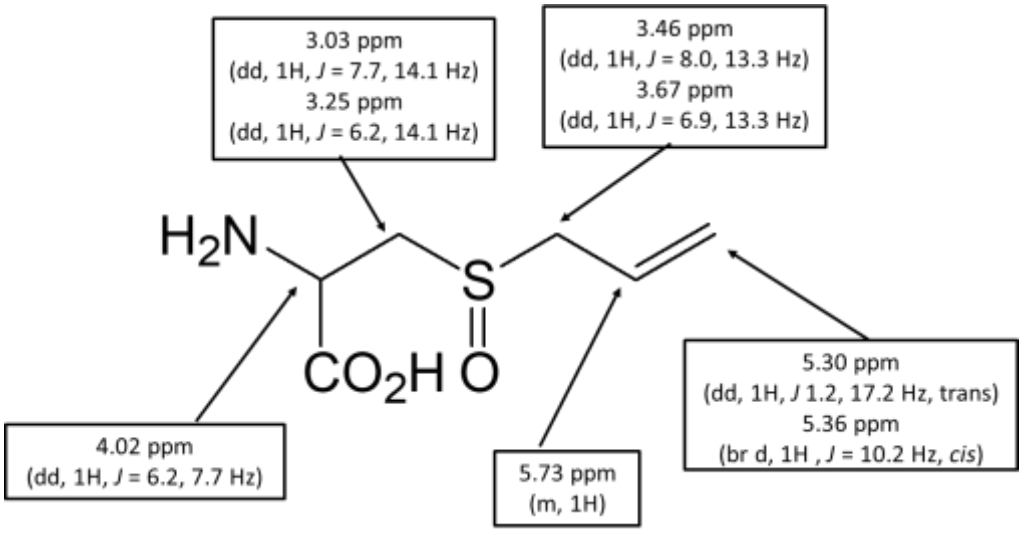

mechlin
4.6300
4.0334
4.0219
4.0183
4.0059
3.3142
3.3026
3.2867
3.2741
3.0662
3.0508
3.0382
3.0230
2.6318
6.2578
0.8888
1.0
1.0033
2.9884
4.5
4
3.5
3
2.5
ppm

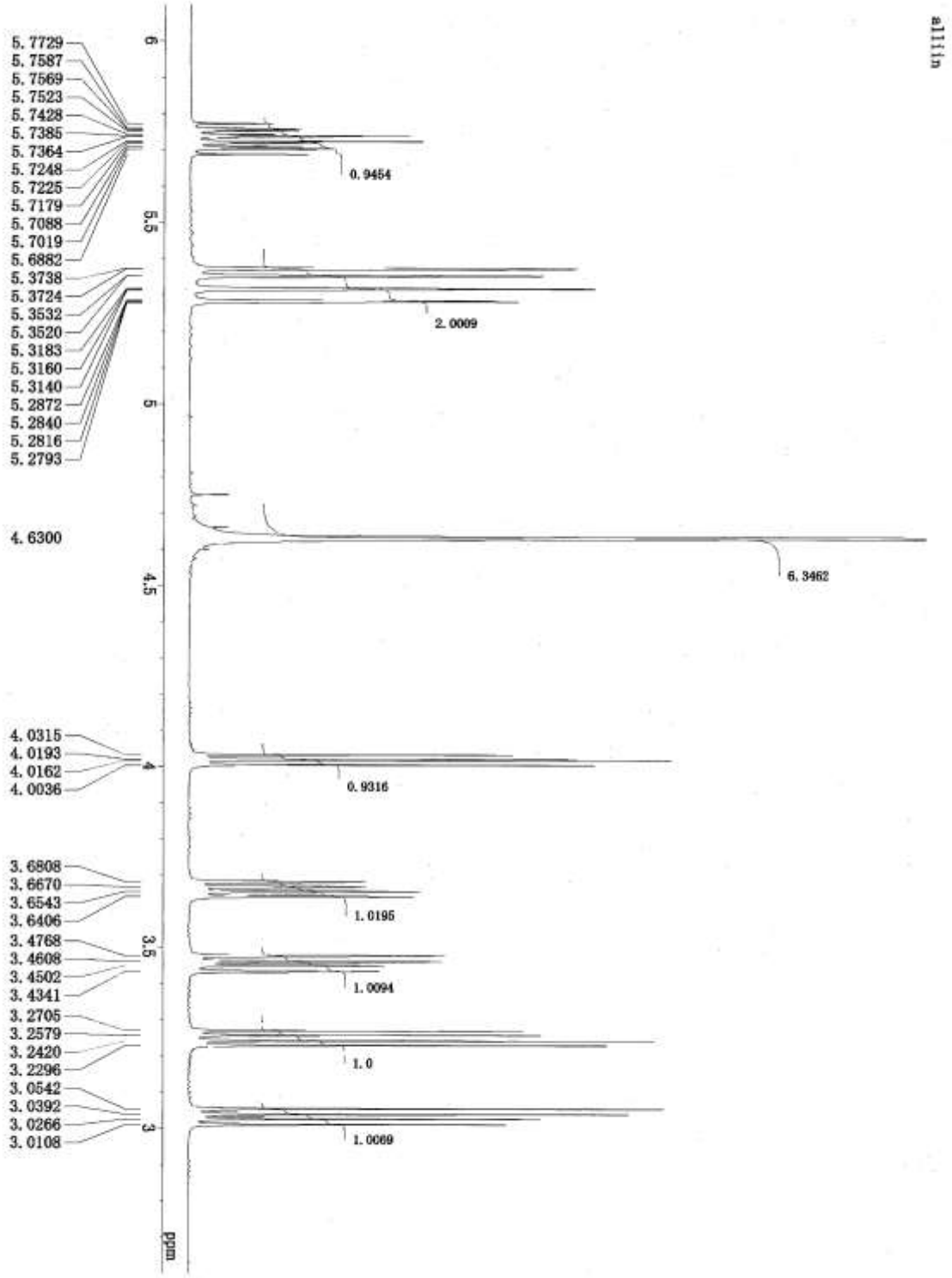
付図１　メチイン(MT)　(1)


methin
Hz
2017.31
2011.58
2009.79
2003.57
4.1
4.08
4.06
4.04
4.02
4
3.98
3.96
3.94
Hz
1657.61
1651.81
1643.86
1637.56
1533.60
1525.87
1519.57
1511.98
3.3
3.25
3.2
3.15
3.1
3.05
3

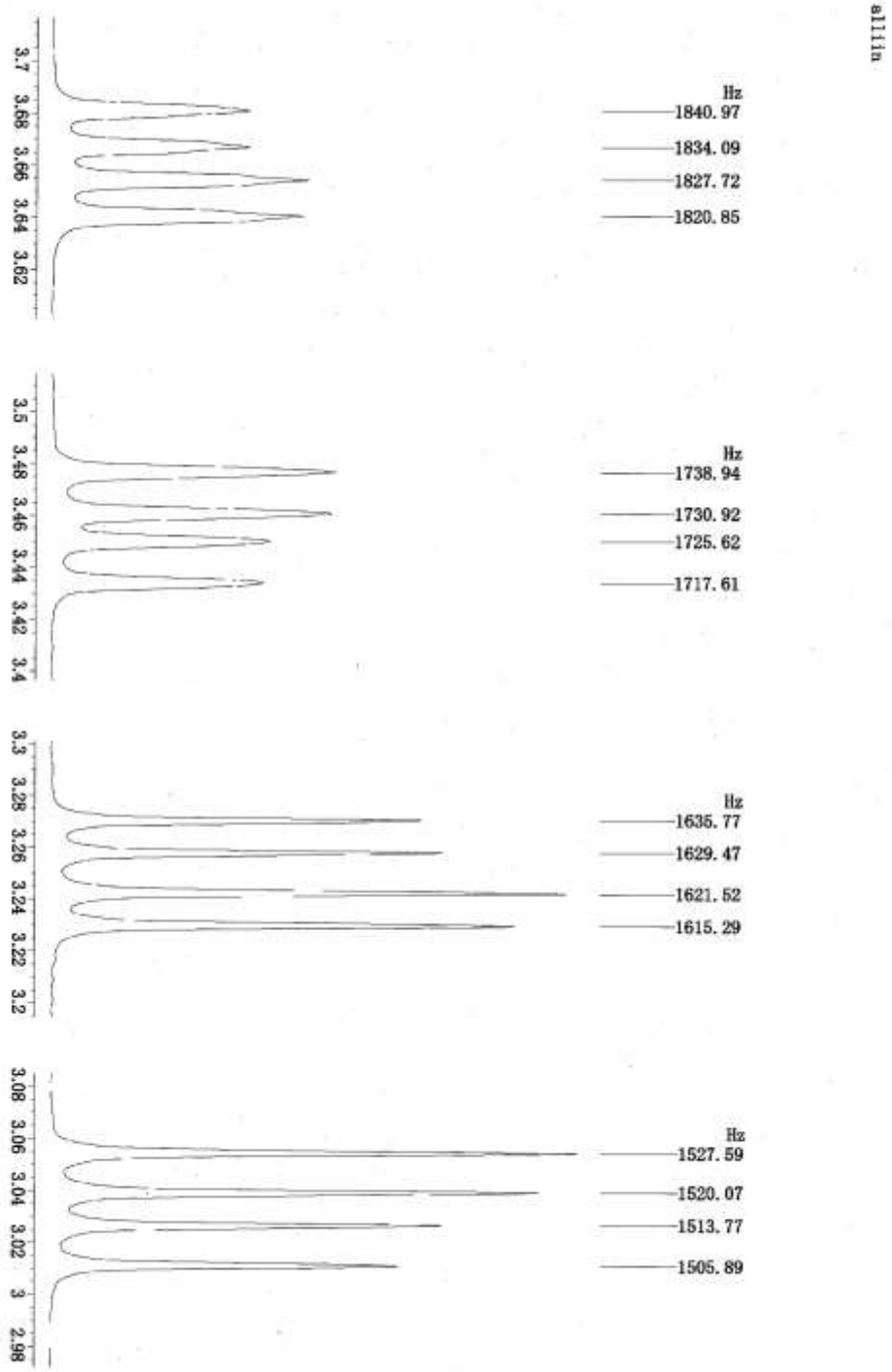
付図１　メチイン(MT)　(2)

付図 2　アリイン(S- (2-propenyl)cysteine S-oxide, alliin, AL)

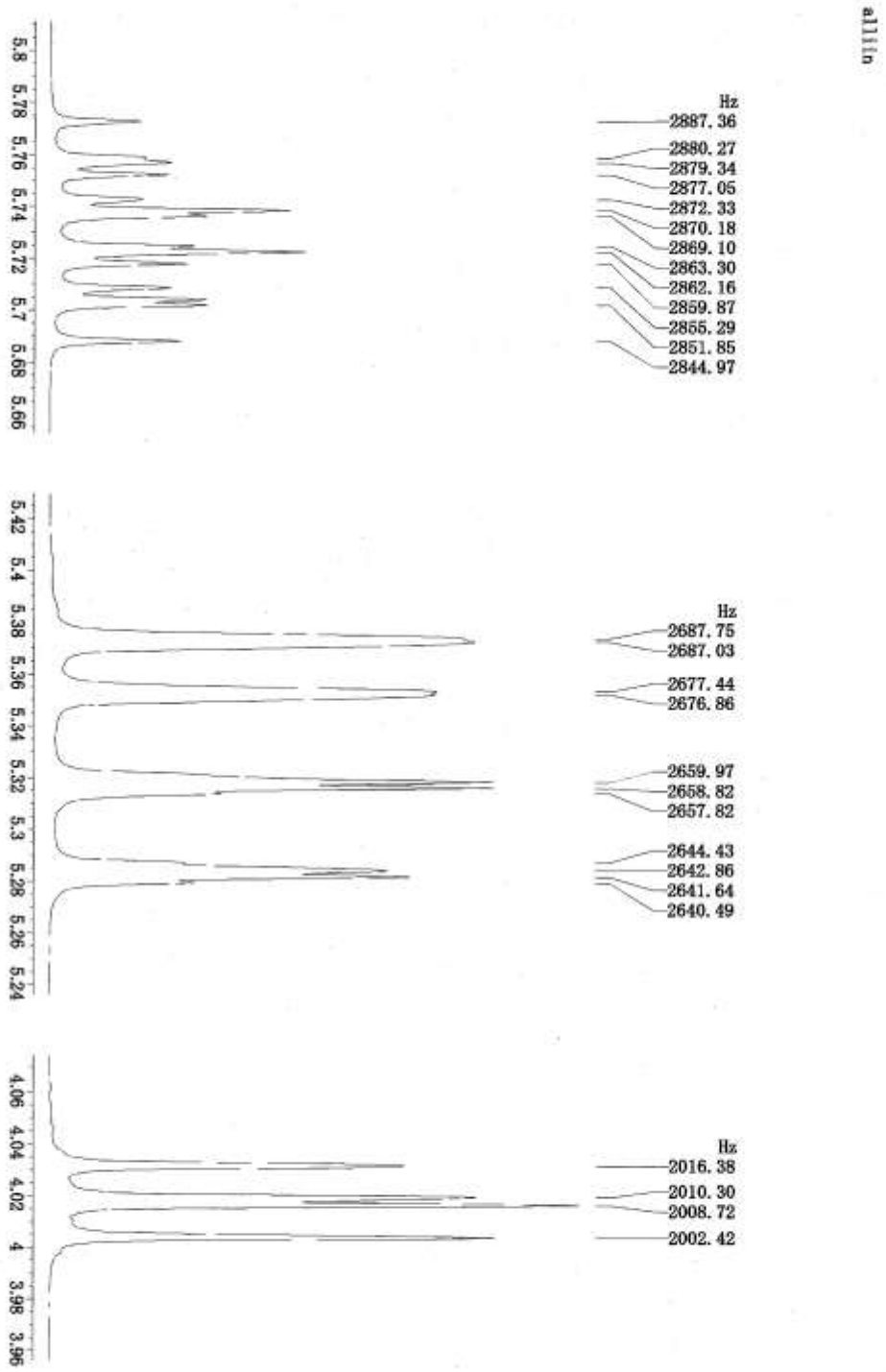



allin
6
5.5
5
4.5
4
3.5
3
ppm
5.7729
5.7587
5.7569
5.7523
5.7428
5.7385
5.7364
5.7248
5.7225
5.7179
5.7088
5.7019
5.6882
5.3738
5.3724
5.3532
5.3520
5.3183
5.3160
5.3140
5.2872
5.2840
5.2816
5.2793
4.6300
4.0315
4.0193
4.0162
4.0036
3.6808
3.6670
3.6543
3.6406
3.4768
3.4608
3.4502
3.4341
3.2705
3.2579
3.2420
3.2296
3.0542
3.0392
3.0266
3.0108
0.9454
2.0009
6.3462
0.9316
1.0195
1.0094
1.0
1.0069

付図 2　アリイン(AL)　(1)

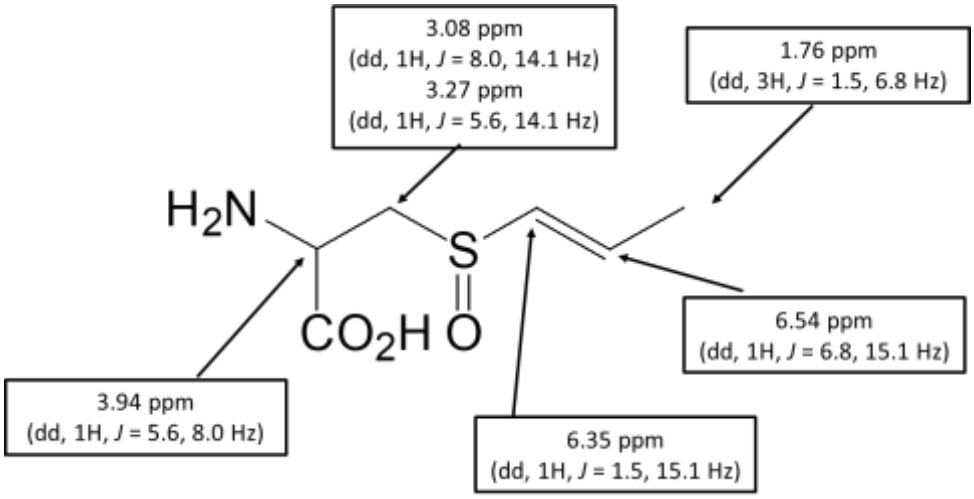

allilin
Hz
1840.97
1834.09
1827.72
1820.85
3.7
3.68
3.66
3.64
3.62
Hz
1738.94
1730.92
1725.62
1717.61
3.5
3.48
3.46
3.44
3.42
3.4
Hz
1635.77
1629.47
1621.52
1615.29
3.3
3.28
3.26
3.24
3.22
3.2
Hz
1527.59
1520.07
1513.77
1505.89
3.08
3.06
3.04
3.02
3
2.98

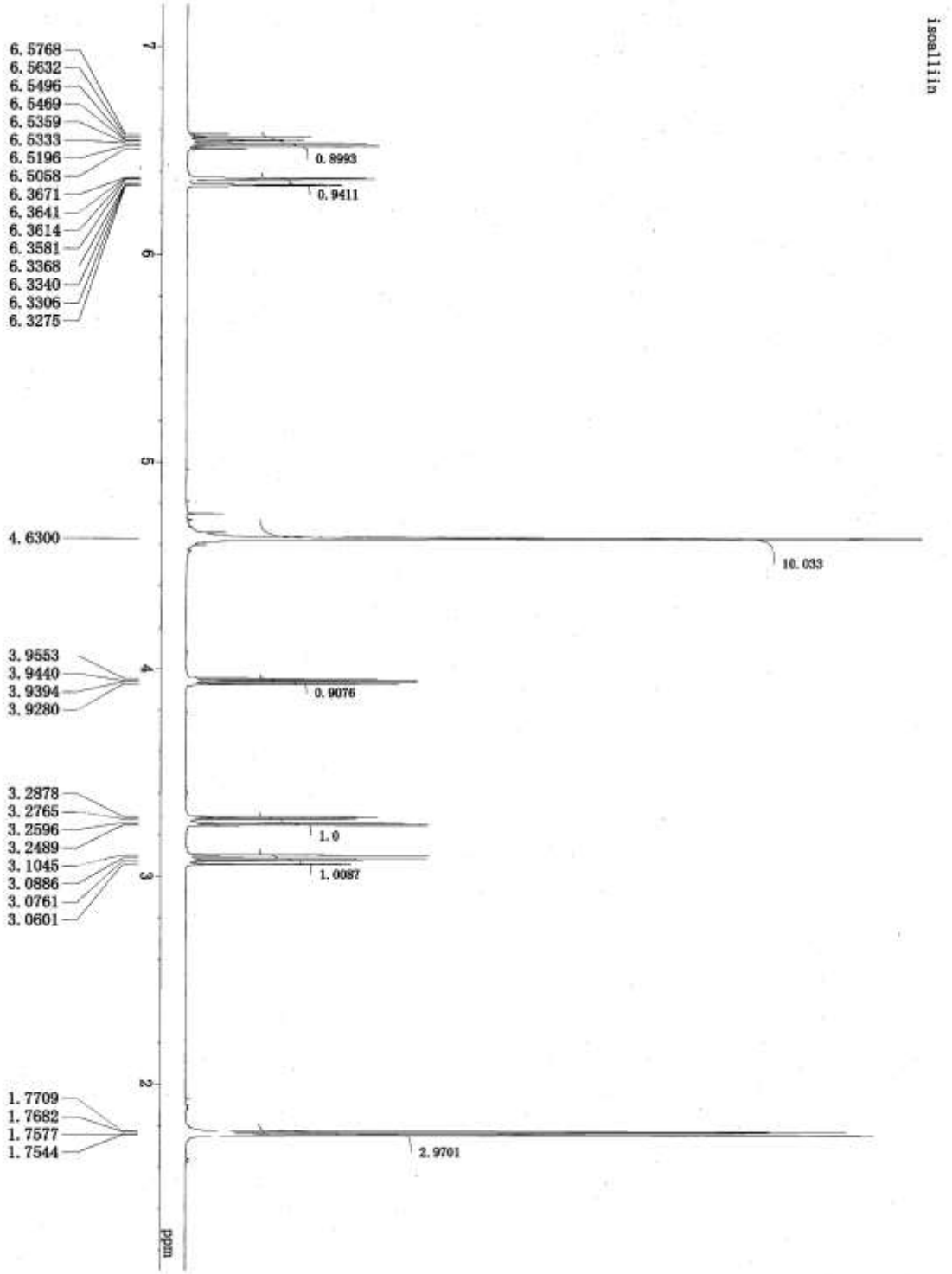
付図 2　アリイン(AL)　(2)


allin
5.8
5.78
5.76
5.74
5.72
5.7
5.68
5.66
Hz
2887.36
2880.27
2879.34
2877.05
2872.33
2870.18
2869.10
2863.30
2862.16
2859.87
2855.29
2851.85
2844.97
5.42
5.4
5.38
5.36
5.34
5.32
5.3
5.28
5.26
5.24
Hz
2687.75
2687.03
2677.44
2676.86
2659.97
2658.82
2657.82
2644.43
2642.86
2641.64
2640.49
4.06
4.04
4.02
4
3.98
3.96
Hz
2016.38
2010.30
2008.72
2002.42

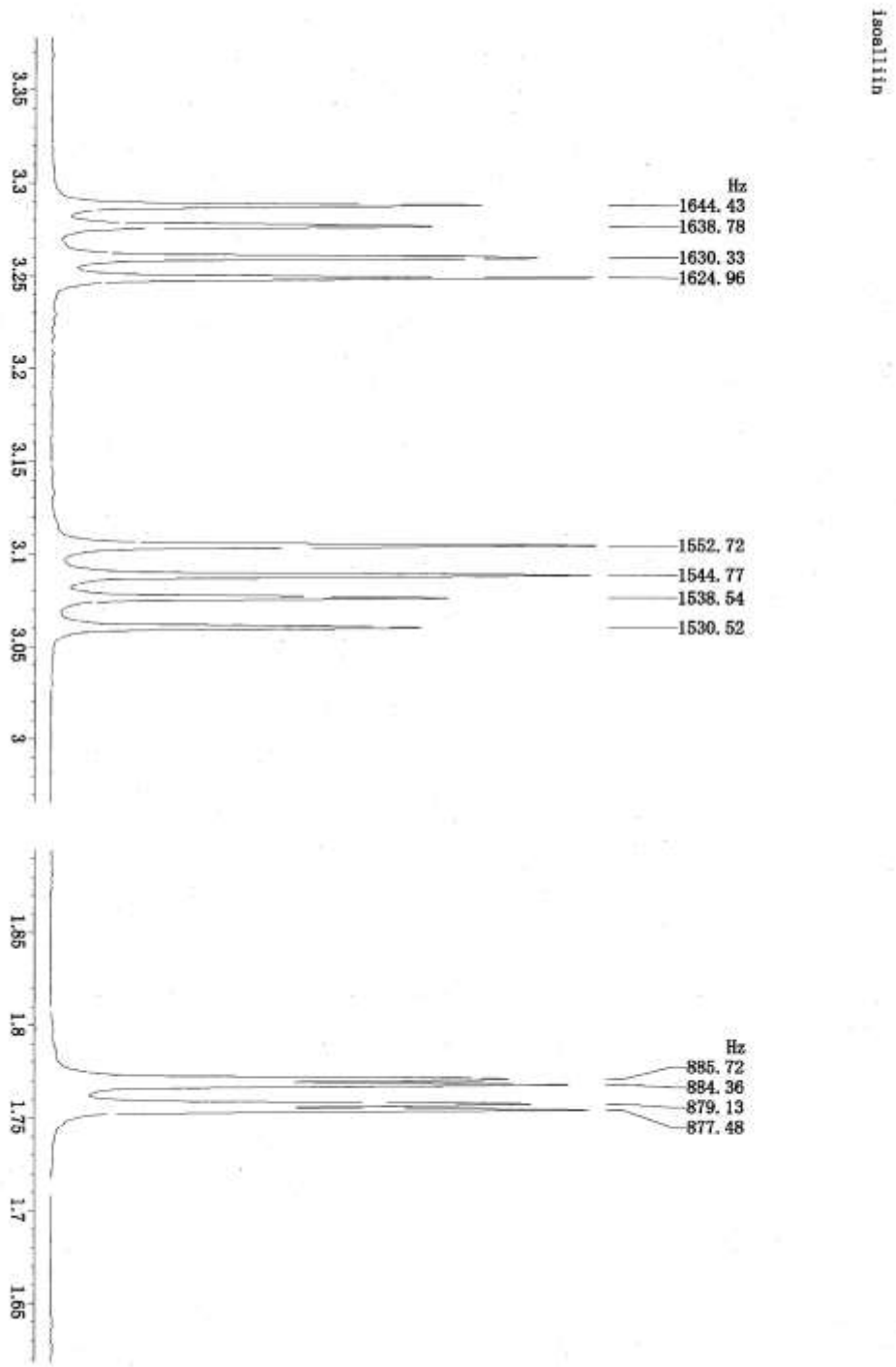
付図 2　アリイン(AL)　(3)

付図 3　イソアリイン(S- (E-1-propenyl)cysteine S-oxide, isoalliin, IAL)

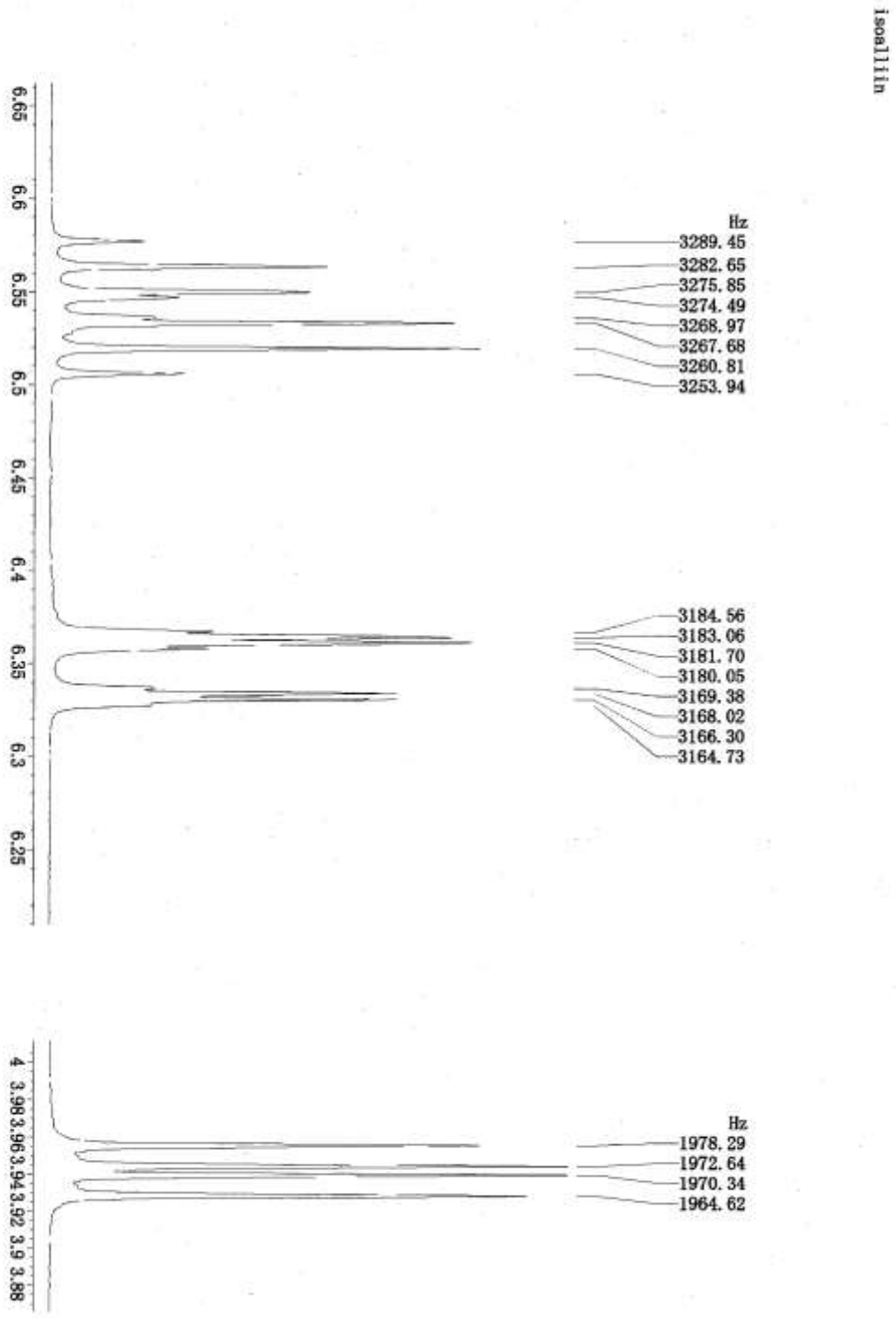




付図 3　イソアリイン(IAL)　(1)



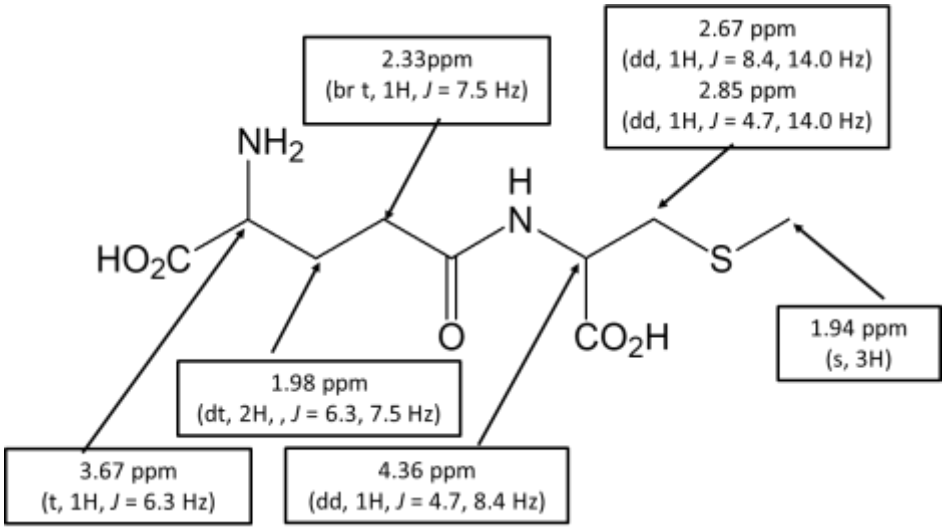
付図 3　イソアリイン(IAL)　(2)

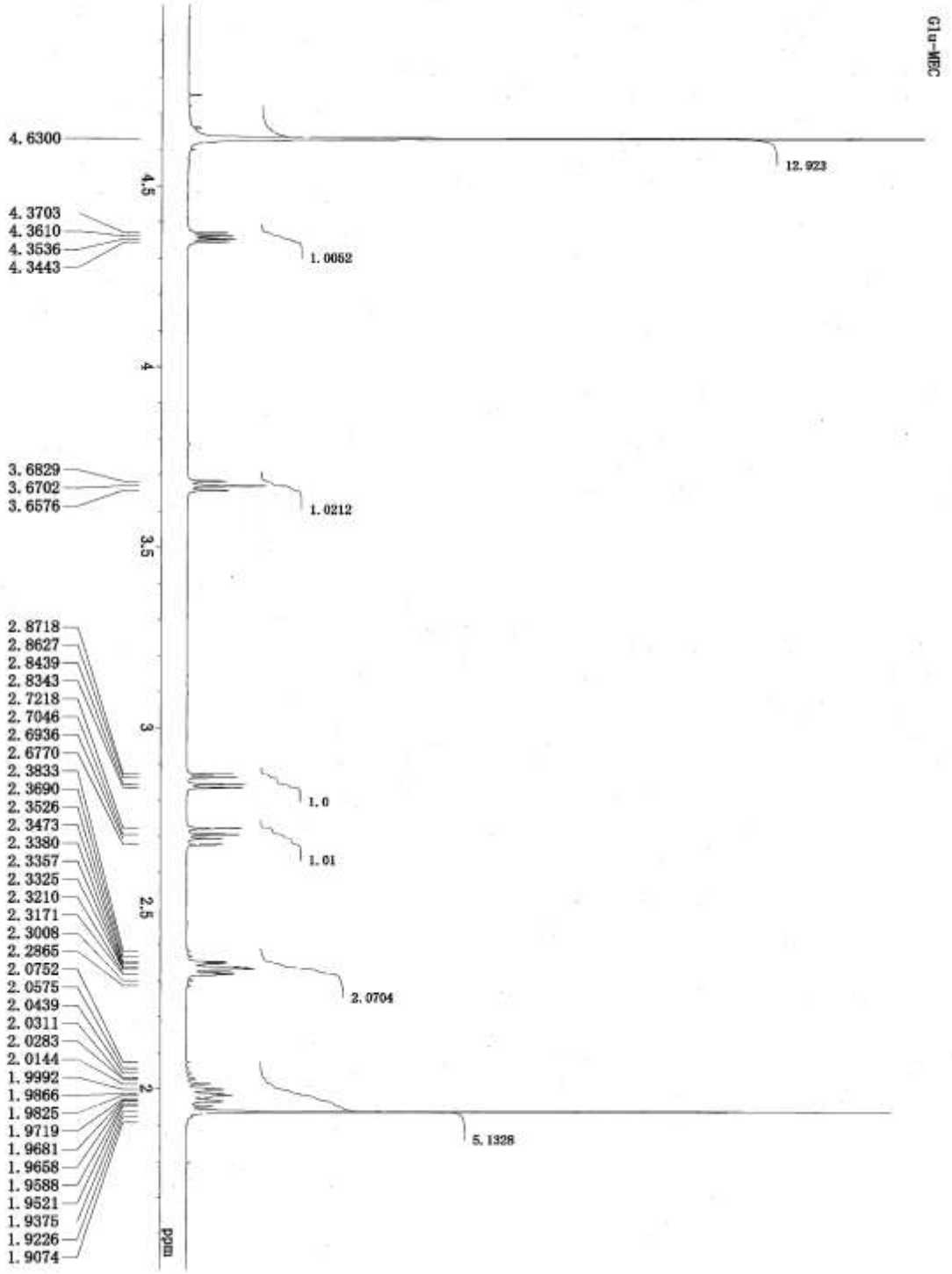


付図 3　イソアリイン(IAL)　(2)

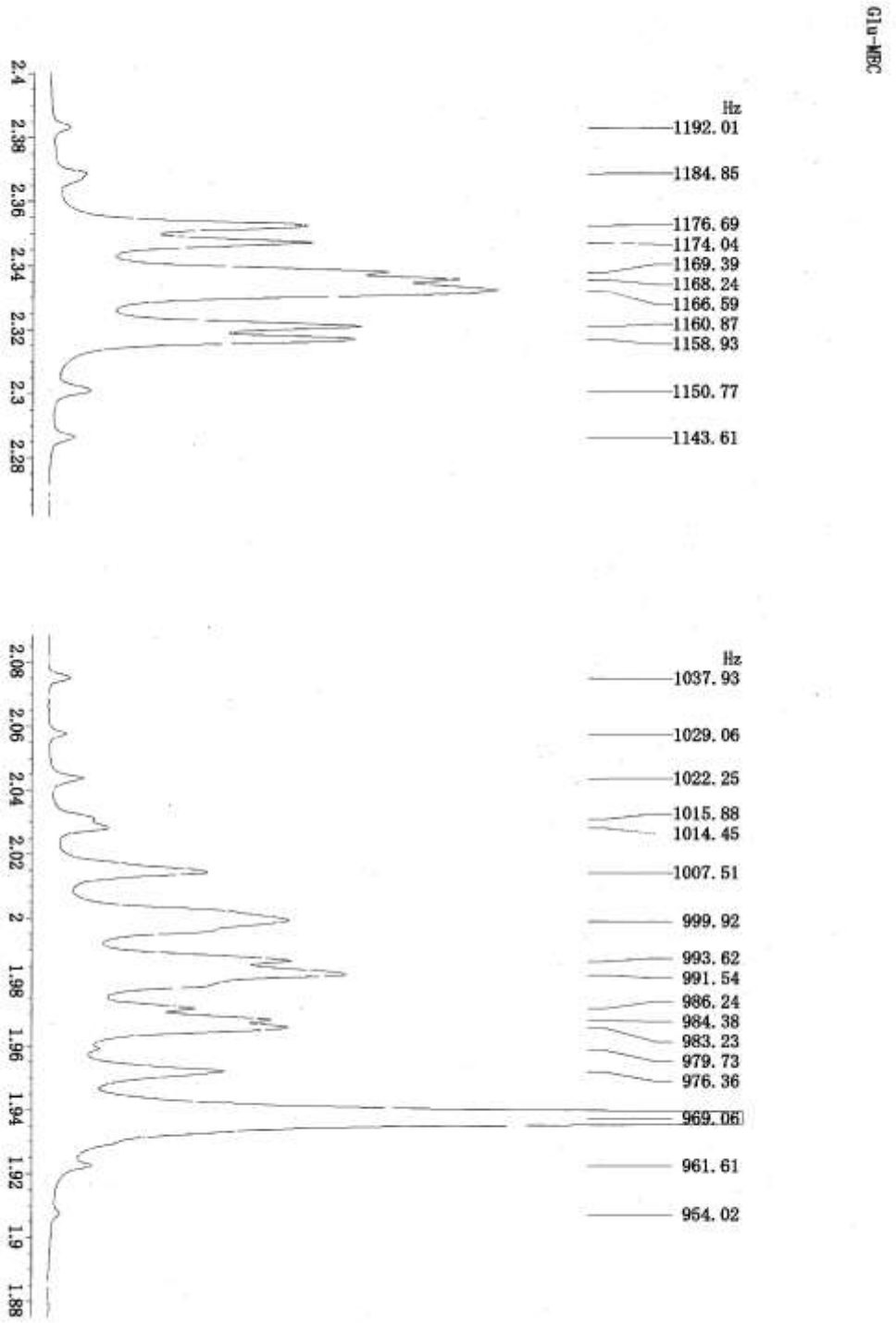
付図 4　γ-グルタミル- S-メチルシステイン

(N- (g-glutamyl)-S-methylcysteine, Glu-MEC)

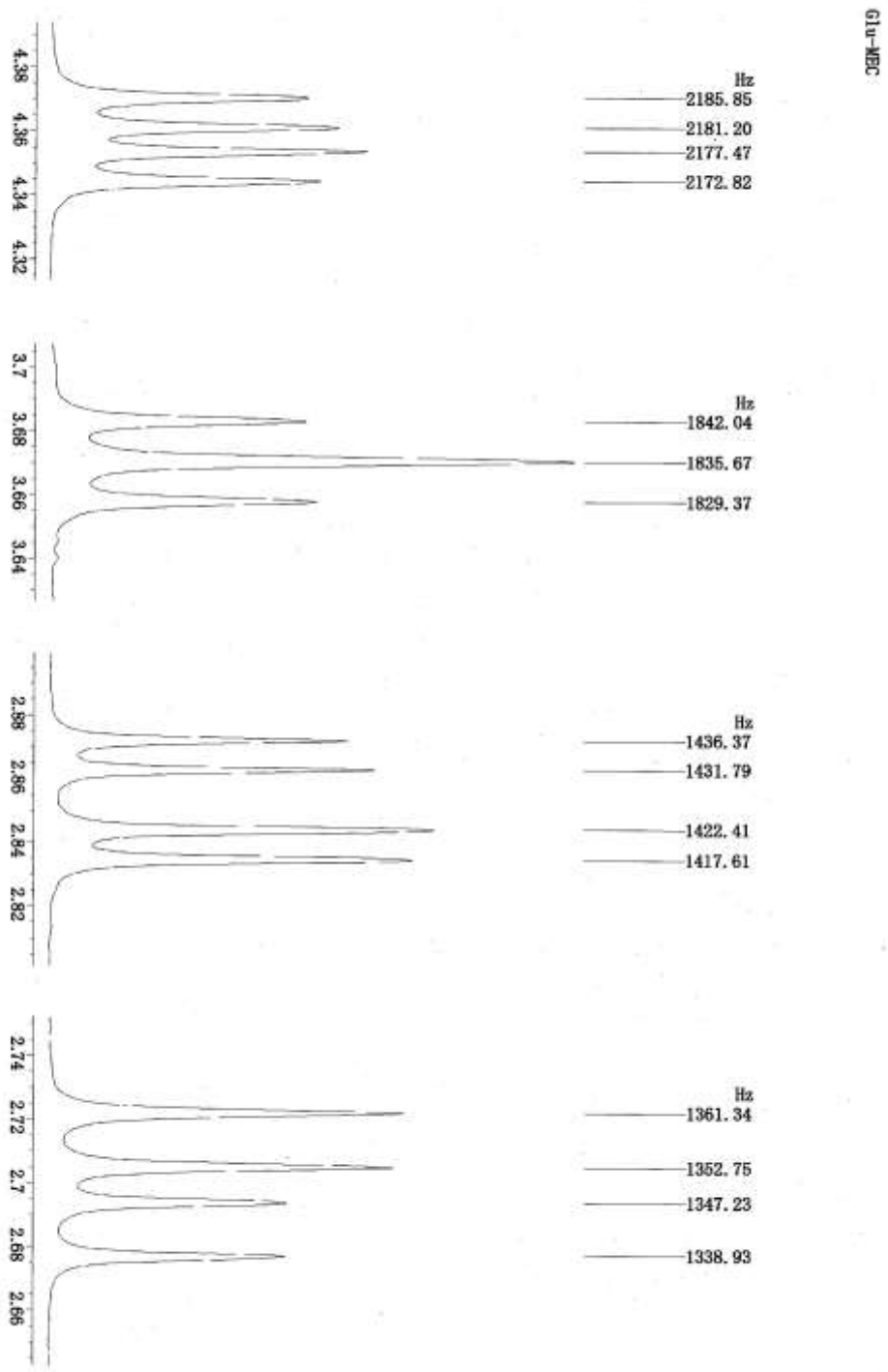




付図 4　γ-グルタミル-S-メチルシステイン (Glu-MEC)　(1)



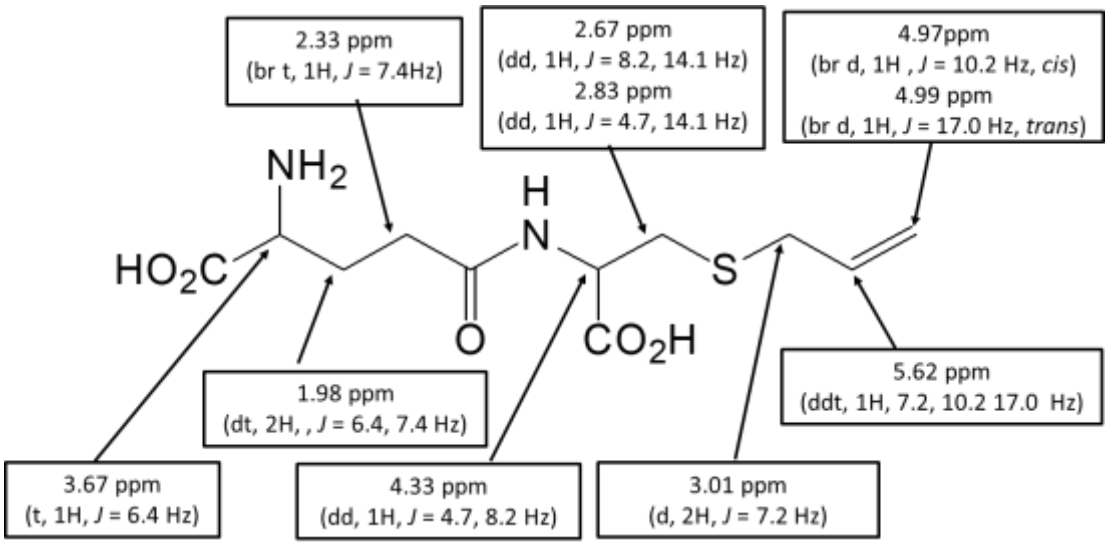
付図 4　γ-グルタミル-S-メチルシステイン (Glu-MEC)　(2)

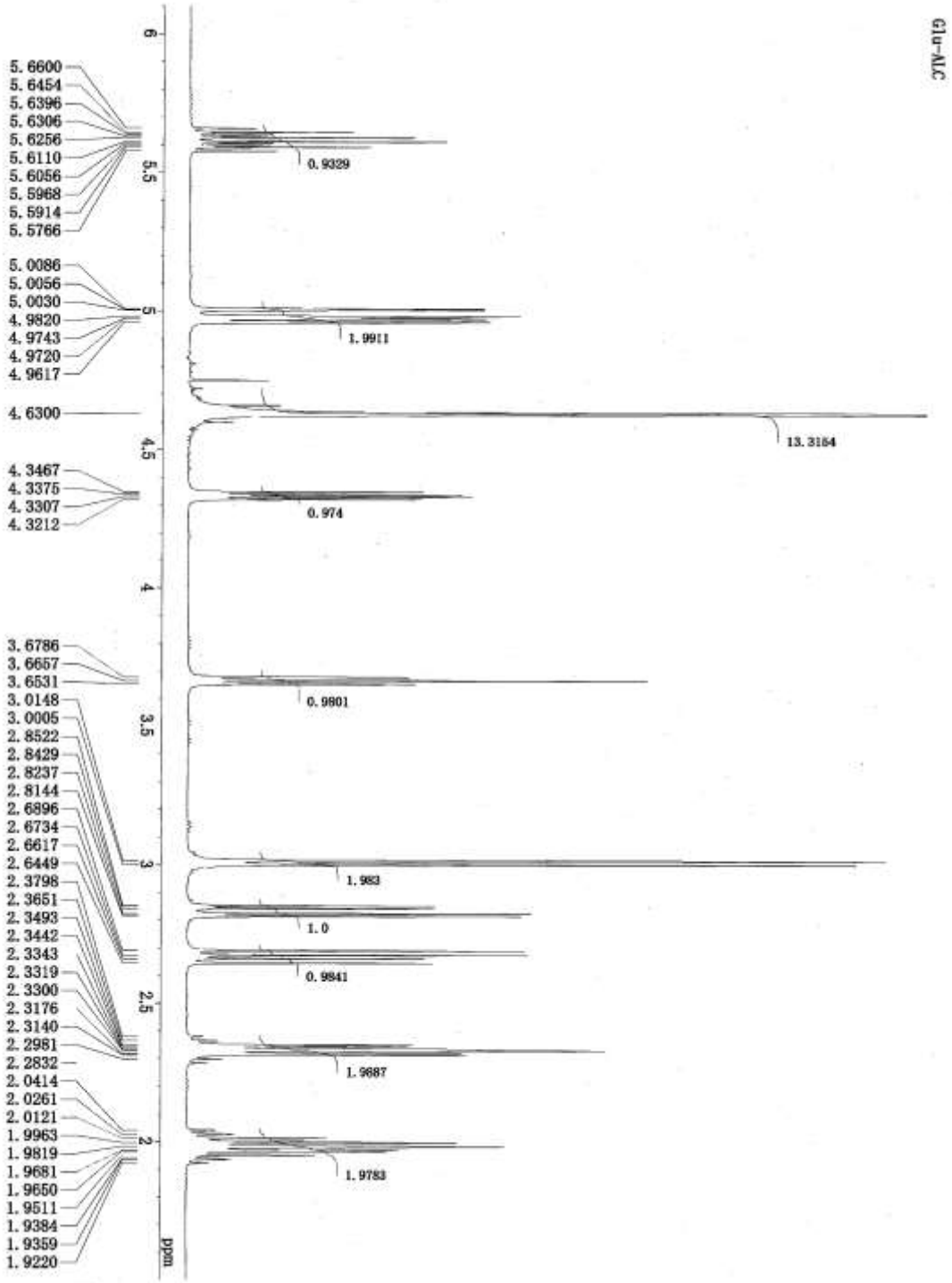


付図 4　γ-グルタミル-S-メチルシステイン (Glu-MEC)　(3)

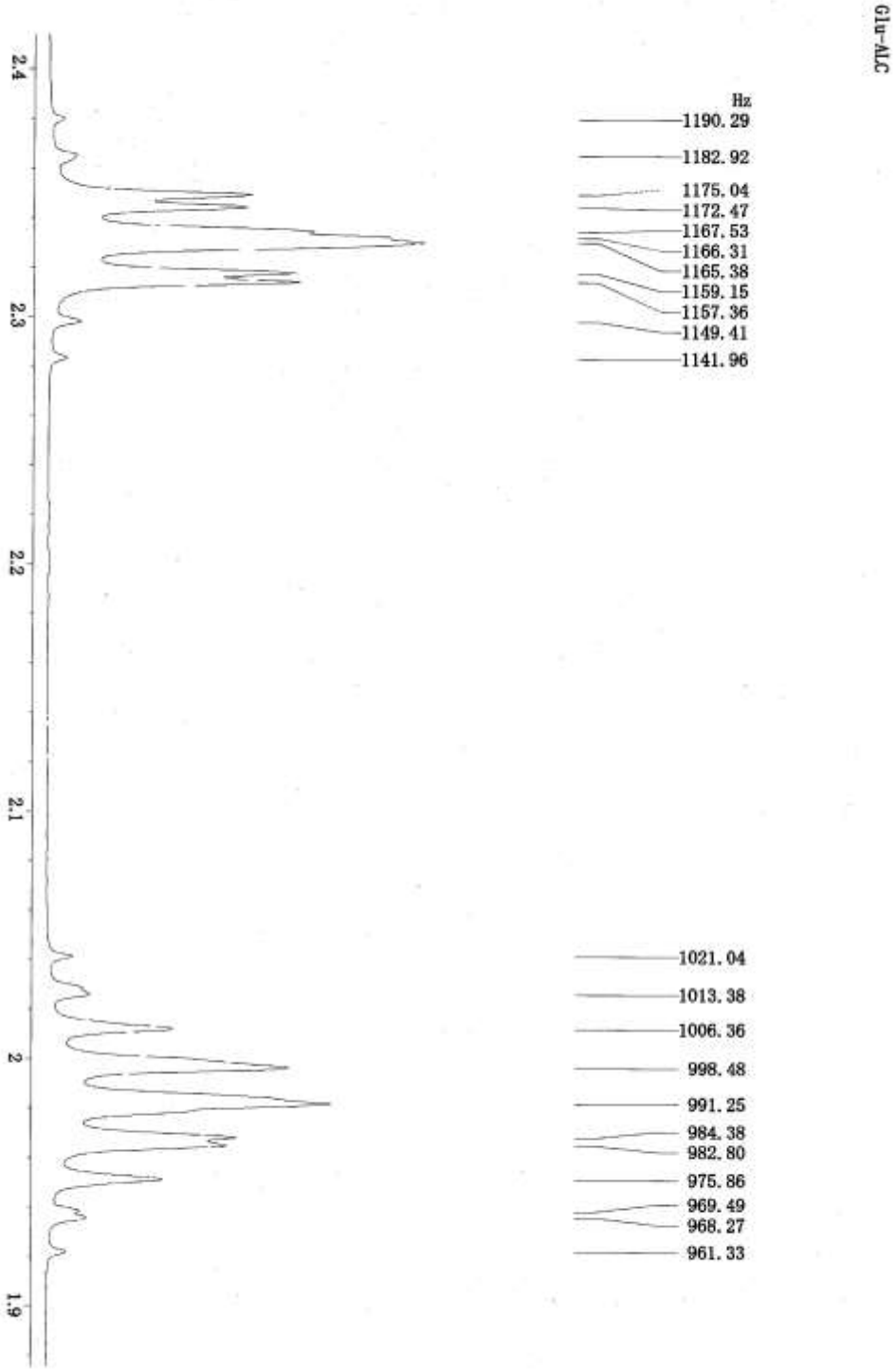
付図 5　γ-グルタミル- S-アリルシステイン

(N- (g-glutamyl) -S-allylcysteine, Glu-ALC)

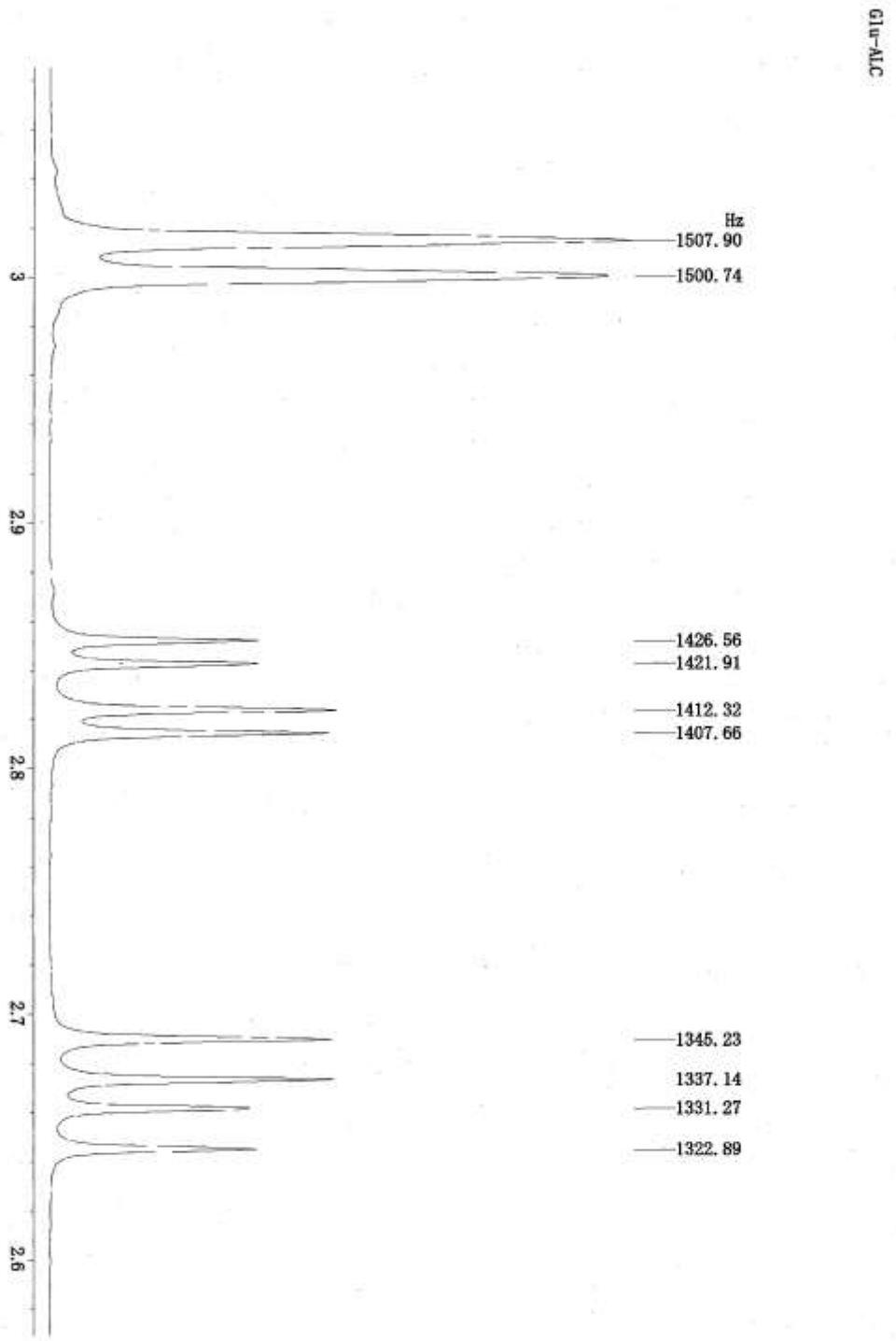




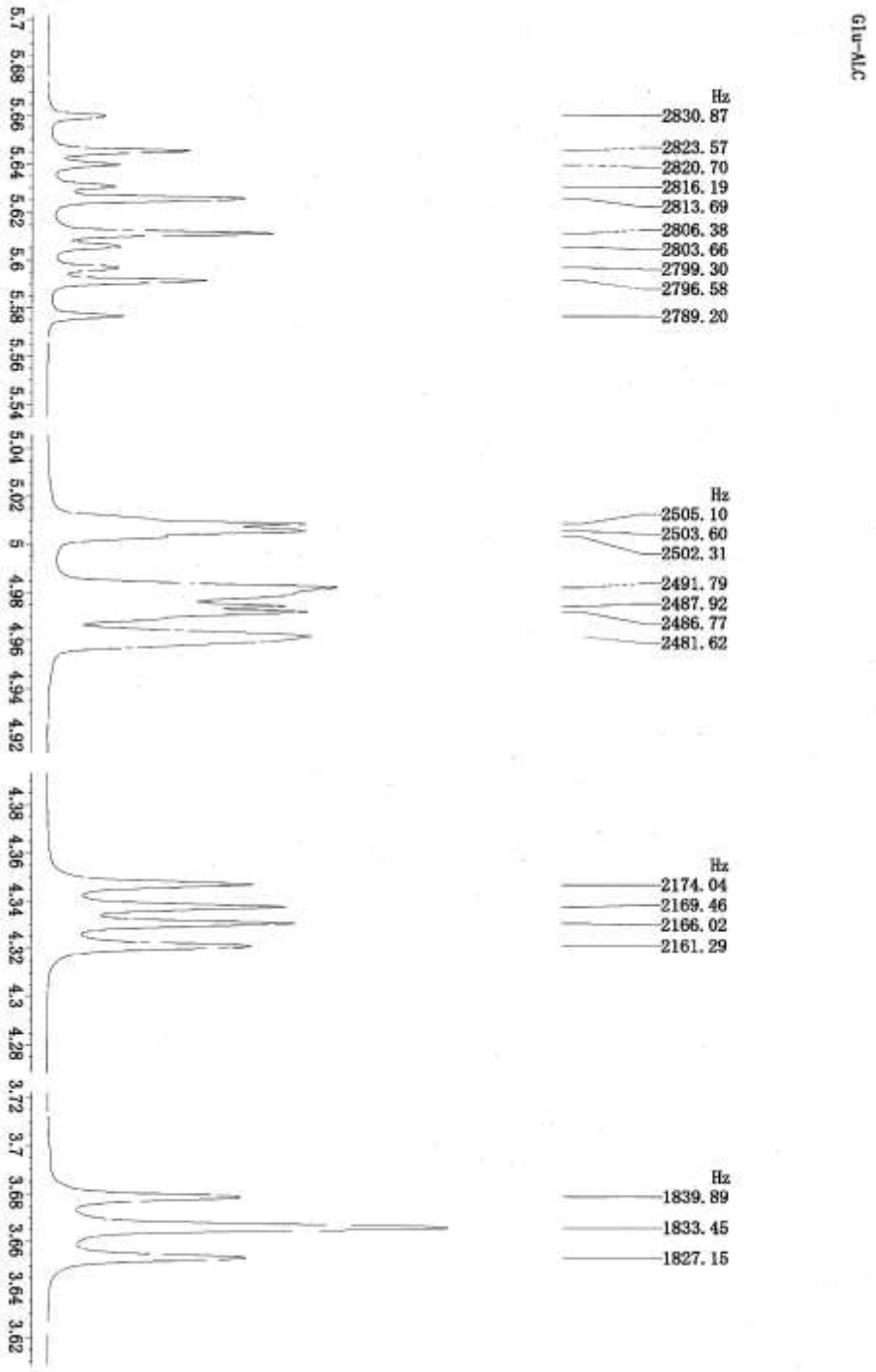
付図 5　γ-グルタミル-S-アリルシステイン (Glu-ALC)　(1)



付図 5　γ-グルタミル-S-アリルシステイン (Glu-ALC)　(2)



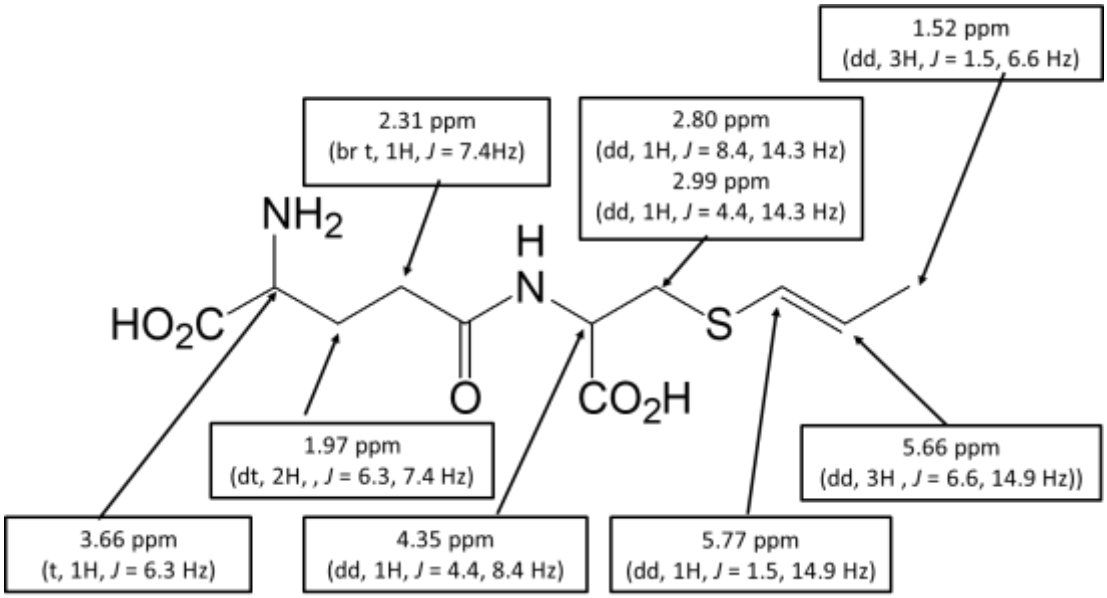
付図 5　γ-グルタミル-S-アリルシステイン (Glu-ALC)　(3)

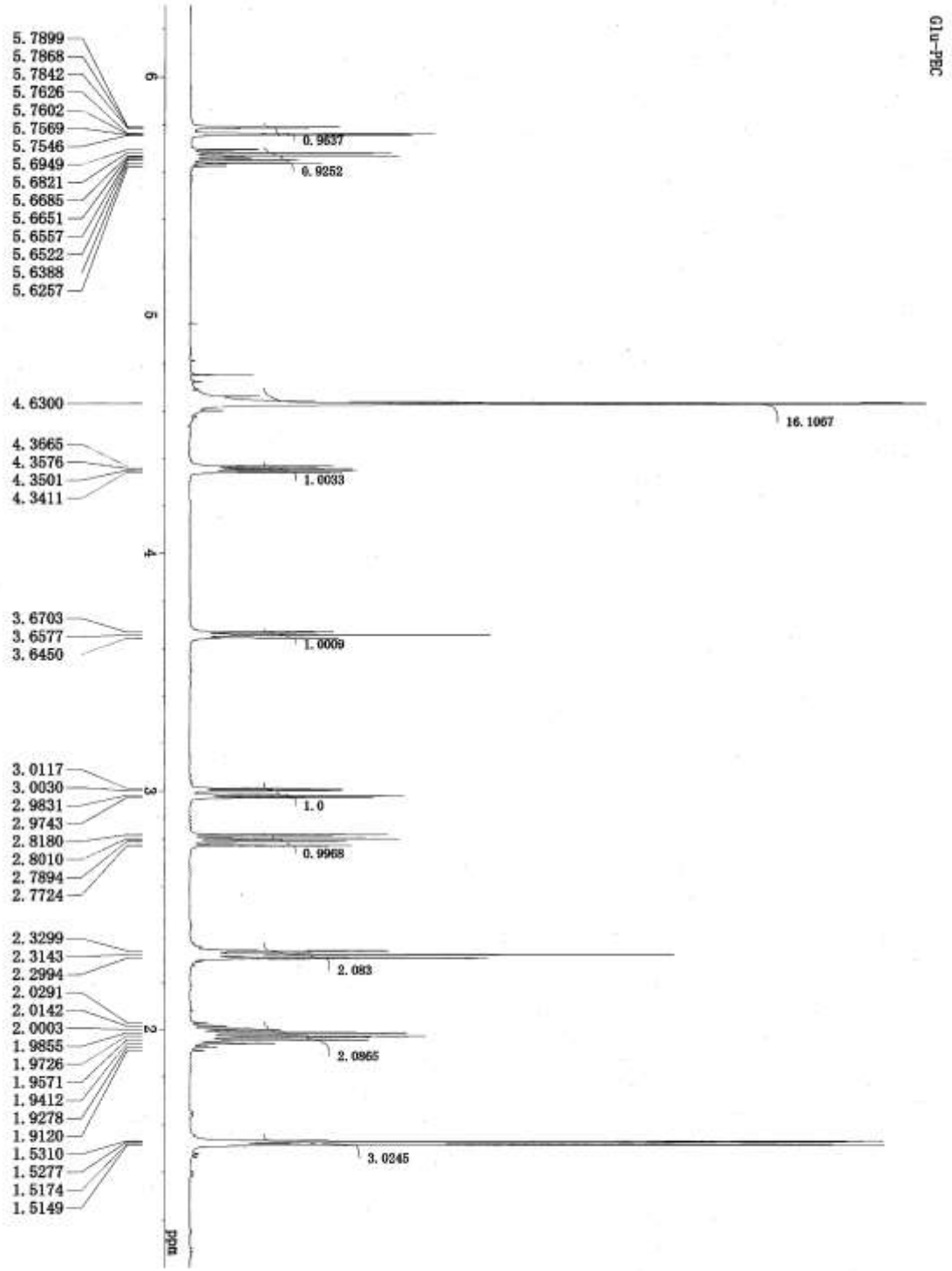


付図 5　γ-グルタミル-S-アリルシステイン (Glu-ALC)　(4)

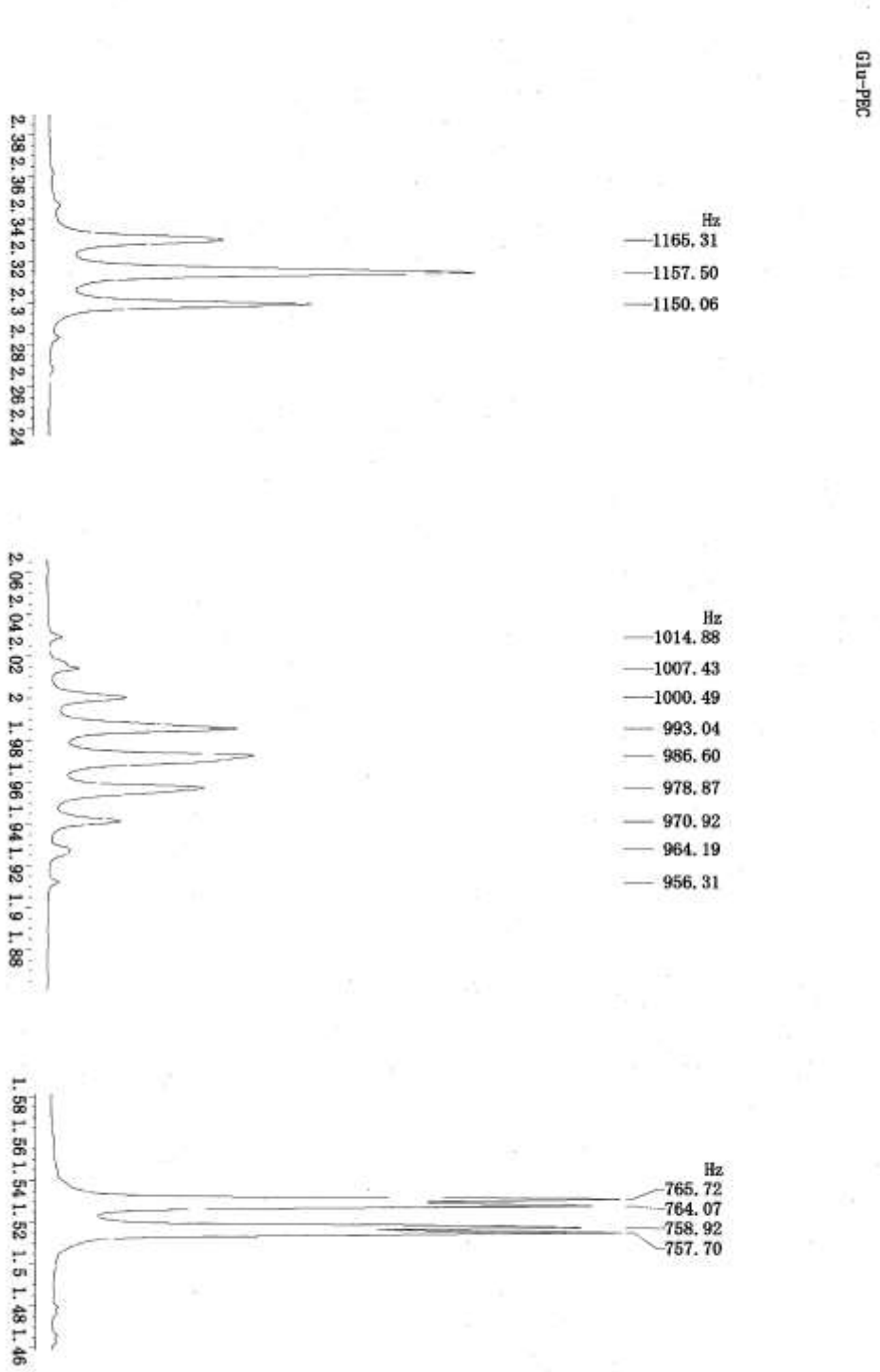
付図 6　γ-グルタミル-S- (E) -1-プロペニルシステイン

(N- (g-glutamyl) -S- (E-1-propenyl)cysteine, Glu-PEC)

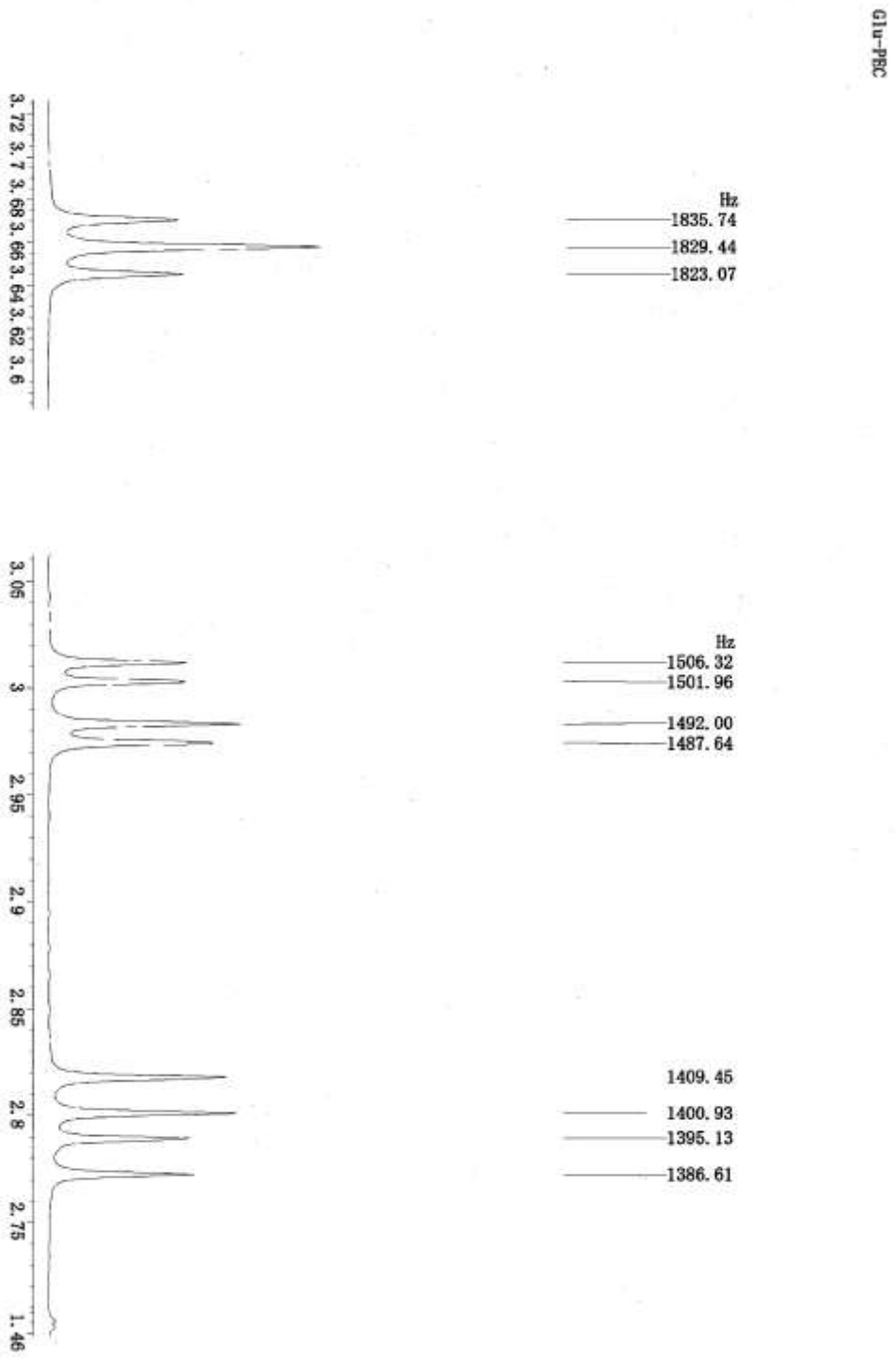




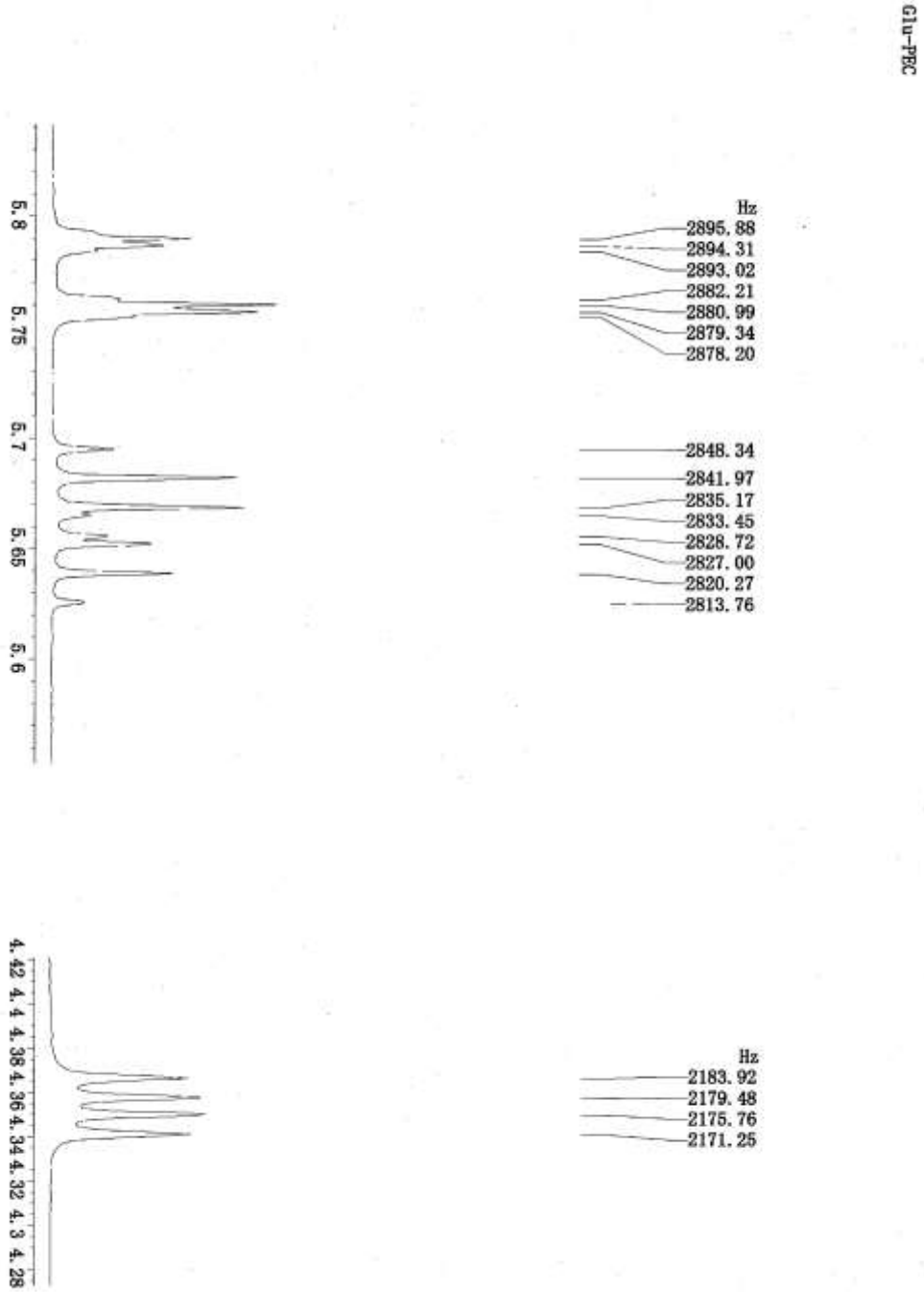
付図 6　γ-グルタミル-S- (E) -1-プロペニルシステイン (Glu-PEC)　(1)



付図 6　γ-グルタミル-S- (E) -1-プロペニルシステイン (Glu-PEC)　(2)



付図 6　γ-グルタミル-S- (E) -1-プロペニルシステイン (Glu-PEC)　(3)



付図 6　γ-グルタミル-S- (E) -1-プロペニルシステイン (Glu-PEC)　(4)

謝辞

本研究を進めるにあたり終始御指導頂いた北海道大学水産科学研究院 細川雅史教授、宮下和夫教授(現 帯広畜産大学産学連携センター 特任教授)に深く感謝の意を表します。

本論文の御高閲と御教示を頂きました北海道大学水産科学研究院 栗原秀幸教授、別府史章准教授に心より感謝します。

本研究の実施にあたり、実験の御指導、御教示を頂きました地方独立行政法人青森県産業技術センター 農産物加工研究所 前所長 山崎賀久博士に深く感謝の意を表します。

サンプルをご提供頂きましたマルハニチロ株式会社 大栗智昭様、荒木徹様、山口政昭様に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、実験の御助言を頂きました弘前大学農学生命科学部前多隼人准教授、地方独立行政法人青森県産業技術センター 農産物加工研究所能登谷典之総括研究管理員に深く感謝の意を表します。

最後に、本研究の遂行にあたり、ご理解とご協力を賜りました全ての皆様に心より感謝します。