抗酸化性と乳化性を兼備したアスコルビン酸脂肪酸エステルの大量合成とその性質

安達修二（京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻）

1. はじめに

水溶性ビタミンであるアスコルビン酸（ビタミンC）は還元力をもつため，抗酸化剤などとして種々の食品に添加されている。アスコルビン酸に脂肪酸などの疎水基を導入すると，分子内に親水基と疎水基をもつ界面活性な物質となり，乳化性を発揮すると思われる。

また，アスコルビン酸は液状油脂にはほとんど溶けないが，疎水基を導入することにより油溶性を示すようになると期待される。さらに，アスコルビン酸のエンジオール基以外の位置に導入すれば，還元能は維持されると考えられる。したがって，アスコルビン酸に脂肪酸を付加したアスコルビン酸脂肪酸エステルは抗酸化性と乳化性を兼備した食品添加物として使用できる可能性があり，化学合成法によりステアリン酸やパルミチン酸を付加したアスコルビン酸脂肪酸エステルが市販されている。

本課題では，有機溶媒中での酵素反応によりアスコルビン酸のC6位に位置選択的に各種の脂肪酸を縮合したアスコルビン酸脂肪酸エステルの合成に着目し，それらの大量調製法について検討した。

なお，生成物は食品への使用を想定して，溶媒はアセトンに限定した。また，合成したアスコルビン酸脂肪酸エステルの諸性質についても検討した。

2. 酵素法によるアスコルビン酸脂肪酸エステルの大量合成

2.1 撹拌槽型反応器による半連続合成

アセトンなどの有機溶媒に対するアスコルビン酸の溶解度は高くない。しかし，脂肪酸を付加したエステルは比較的高い濃度で溶解する。そこで，固定化リパーゼ（3.0 g：乾燥重量）を含む撹拌槽型反応器に粉状のアスコルビン酸を加え，そこにアセトンに溶解した脂肪酸を所定流量で供給し，生成したアスコルビン酸脂肪酸エステルを同一流量で抜き出す操作について検討した（**図1**内図）。反応器内の液量は350 mLで，反応開始時に40 gのアスコルビン酸を投入した。供給する脂肪酸（濃度：200 mmol/L）の種類を変えて，2.0 mL/

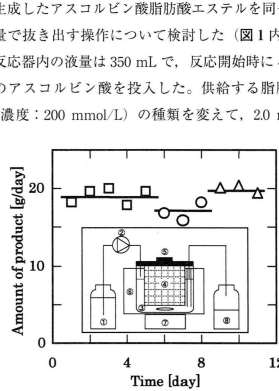

図1　連続撹拌槽型反応器によるアスコルビン酸脂肪酸エステルの半連続合成[1]。アスコルビン酸（□）ラウリン酸，（○）デカン酸および（△）ミリスチン酸エステル。内図：装置図。①脂肪酸のアセトン溶液貯槽，②ポンプ，③撹拌槽型反応器，④固定化リパーゼを保持したバスケット，⑤アスコルビン酸を投入するための蓋，⑥恒温水槽，⑦マグネチックスターラ，⑧流出液貯槽。

min の流量（平均滞留時間：175 min）で半連続操作を行った。なお，反応は50℃で行った。この間，約 10 g/ 日のアスコルビン酸が脂肪酸に変換され，またアセトンに溶解した未反応のアスコルビン酸が約 10 g/ 日の割合で反応器から流出したので，毎日 20 g のアスコルビン酸粉末を補給した。**図 1** に示すように，実験を行った 11 日間にわたって安定に操作することができ，酵素の失活は認められなかった。本操作における生産性は，生成物の分子量にも依存するが，約 57g/L·反応器·日であった。

2. 2　固定層型反応器を用いた効率的な生産システム

50℃におけるアスコルビン酸のアセトンへの溶解度は 25.8 mmol/L である。付加する脂肪酸の分子量によるが，例えばラウリン酸（分子量：200.32）を反応率 70% で縮合することができれば，生成物濃度は 6.5 g/L となる。この値は高くはないが，極端に低くもない。また，触媒である酵素の濃度に比例して反応速度は速くなる。固定化酵素を用いる場合，もっとも酵素濃度の高い状態は，固定層に充填した場合である。また，反応速度と基質濃度の関係が上に凸となる一般的な酵素反応では，反応工学的には固定層型反応器がもっとも効率がよい。そこで，**図 2** の内図に示すように[2]，粉末状のアスコルビン酸を充填したカラム（10mm i.d. × 150mm）と固定化酵素充填カラム（4.6mm i.d. × 150mm）を連結して，アスコルビン酸脂肪酸エステルを連続的に合成するシステムを構築した。すなわち，アセトンに溶解した脂肪酸（濃度：200mmol/L）をアスコルビン酸充填カラムに供給してアスコルビン酸が飽和溶解度近くまで溶解した溶液を固定化リパーゼ充填カラムに供給して縮合反応を行い，対応するアスコルビン酸脂肪酸エステルを合成した。流量は 0.5mL/min（反応器の空塔滞留時間：5 min），50℃で操作した。本装置を用いてアスコルビン酸に各種の不飽和または飽和脂肪酸を縮合して対応するエステルを合成したときの，反応器出口での生成物濃度を**図 2** に示す。不飽和脂肪酸エステルの濃度が低いのは，使用した不飽和脂肪酸の純度が95%程度であったためであり，脂肪酸の種類に依存せずほぼ一定の反応率が維持された。これらの生成物濃度は，1.6 ～ 1.9 kg/L·反応器·日の生産性に対応し，上記の撹拌槽型反応器を用いた場合の約 30 倍の高い生産性を達成した。

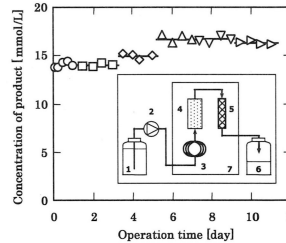

図 2　アスコルビン酸粉末を充填したカラムと固定化リパーゼ充填カラムを連結した固定層型反応器システムによる各種アスコルビン酸脂肪酸エステルの連続合成[2]。アスコルビン酸（○）アラキドン酸，（□）オレイン酸，（◇）リノール酸，（△）デカン酸，（▽）ラウリン酸，（▷）ミリスチン酸エステル。内図：装置図。①脂肪酸のアセトン溶液貯槽，②ポンプ，③予熱コイル，④アスコルビン酸粉末充填カラム，⑤固定化リパーゼ充填カラム，⑥流出液貯槽，⑦空気恒温槽。

3.　アスコルビン酸脂肪酸エステルの諸性質

3. 1　水および油脂に対する溶解度

アスコルビン酸は水にはよく溶解するが，油にはほとんど溶けない。アスコルビン酸に脂肪酸を付加すると油溶性が付与されるが，水への溶解度は低下すると思われる。そこで，アシル鎖長の異なる各種アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルの水および大豆油への溶解度を温度の関数として測定した（**図 3**）[1]。脂肪酸を付加することにより，アスコルビン酸は大豆油に mmol/L のオーダー

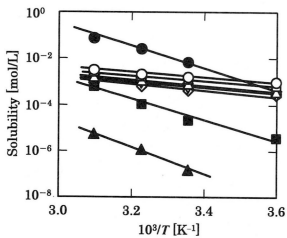

図3　アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルの水および大豆油への溶解度の温度依存性[1]。アスコルビン酸（○，●）デカン酸，（□，■）ラウリン酸，（△，▲）ミリスチン酸，（▽）パルミチン酸，（◇）ステアリン酸エステル。白抜きと黒塗りはそれぞれ大豆油および水への溶解度。

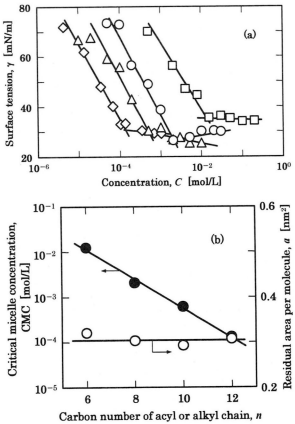

図4　各種アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルの水溶液の（a）濃度と表面張力の関係，および（b）臨界ミセル濃度と界面占有面積のアシル鎖長依存性。(a) アスコルビン酸（□）ヘキサン酸，（○）オクタン酸，（△）デカン酸，（◇）ラウリン酸エステル。(b)（●）臨界ミセル濃度，（○）界面占有面積。

で溶解するようになり，アシル鎖長の影響は顕著ではなかった。一方，水への溶解度はアシル鎖長に大きく依存し，アシル鎖長が長いほど溶解し難かった。各アスコルビン酸脂肪酸エステルの水および大豆油への溶解度の温度依存性は，いずれもvan't Hoffの式で整理することができ，水への溶解エンタルピーΔH_{dis}はアシル鎖長にかかわらず90 kJ/molであり，また大豆油へのΔH_{dis}もアシル鎖に依存せず20 kJ/molであった。

3.2　乳化剤としての基本的な性質

各種のアスコルビン酸飽和脂肪酸エステルの乳化剤としての基本的な性質の一つとして，水溶液系における各エステルの濃度と表面張力の関係を測定した。これらは以前に，回分式反応器を用いて合成したエステルを用いてWilhelmy法により測定（25℃）した結果[2]であるが，基本的な性質であるので，ここで記述する。各アスコルビン酸脂肪酸エステル水溶液の表面張力は濃度の上昇とともに低下し，明確な臨界ミセル濃度（CMC）が認められた（**図4**(a)）。CMCはアシル鎖長が長いほど低く，CMCの対数値はアシル鎖に反比例し（**図4**(b)），アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルを水相からミセル相に移動させる際のメチレン基当りのエネルギーは1.3×10^{-21} Jと算出された。一方，界面占有面積はアスコルビン酸脂肪酸エステルの種類に依存せず，ほぼ一定の0.30 nm^{2}であった。この値は，アスコルビン酸分子が球形であると仮定して算出した断面積（0.38 nm^2）より小さく，アスコルビン酸のγ-ラクトン環が親水基となっていることを示唆する。

3.3　O/W型エマルションの調製への利用

アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルが乳化剤として使用できることを検証するために，各種アシル鎖長のアスコルビン酸飽和脂肪酸エステルを用いて大豆油を油相とするO/W型エマルションを調製した[4]。また，調製したエマルションの安定性に及ぼす水相pHの影響についても検討した。なお，エマルションは，ロータ／ステータ式ホモジナイザで乳化したのち，さらに高圧ホモジナイ

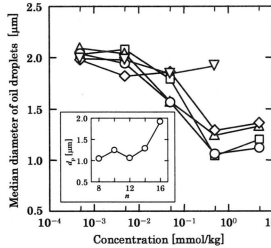

図5　アシル鎖長の異なる各種アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルを用いて調製したO/W型エマルション中の油滴のメディアン径とエステル濃度の関係[4]。アスコルビン酸（□）オクタン酸，（△）デカン酸，（○）ラウリン酸，（◇）ミリスチン酸，（▽）パルミチン酸エステル。内図：アスコルビン酸脂肪酸エステルの濃度が0.5 mmol/kgで調製したエマルション中の油滴のメディアン径に及ぼすエステルのアシル鎖長の影響。

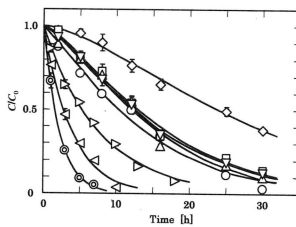

図6　アスコルビン酸デカン酸エステルの40℃，pH = （○）2，（◇）3，（□）4，（△）5，（▽）6，（▷）7，（▷）8および（◎）9における分解過程[5]。エステルの濃度はいずれのpHにおいても2.0×10^{-2} mol/L。

ザ（約98 MPa）で微細化する方法により調製した。種々のアスコルビン酸飽和脂肪酸エステル濃度で調製したエマルション中の油滴のメディアン径を**図5**に示す。また，0.5 mmol/kgのエステル濃度で調製したエマルションの油滴のメディアン径とアスコルビン酸飽和脂肪酸エステルのアシル鎖長の関係を**図5**の内図に示す。アスコルビン酸パルミチン酸エステルを除いて，油滴のメディアン径が1.0 ～ 1.5 μmの微細なエマルションを調製できることが示された。また，各種アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルを用いて調製したエマルションは，水相のpHが高いほど安定であった。これは，水相のpHが高いほど油滴の表面電位（ζ-電位）が大きな負の値になることに起因することが示された。これらの検討から，微細で安定なO/W型エマルションを調製するには，アスコルビン酸のデカン酸またはラウリン酸エステルが適していることが示された。

3.4　水溶液中での安定性

アスコルビン酸は不安定で酸化分解などを受ける。また，エステルは高pHで加水分解され易い。そこで，アスコルビン酸脂肪酸エステルの水系での安定性について検討した[5]。アスコルビン酸デカン酸エステルの40℃，pH = 2 ～ 9での安定性を**図6**に示す。pH = 3でもっとも安定であり，それより低いまたは高いpHでは不安定になった。また，pH = 9ではエステルの加水分解が無視できなかったが，pH = 6以下では加水分解は起こらなかった。いずれのpHにおける分解過程もWeibull式で表現することができた。また，アシル鎖長が6，8，10または12のアスコルビン酸脂肪酸エステルのpH = 5で種々の温度における安定性について検討したところ，高温ほど不安定で，分解速度定数の温度依存性はいずれのエステルについてもArrhenius式で整理できた。また，アスコルビン酸脂肪酸エステルの分解過程（pH = 5）にはエンタルピー・エントロピー補償効果が成立することが示された。

3.5　培養動物細胞に対する抗酸化性

アスコルビン酸は還元力をもち抗酸化剤として作用する。アスコルビン酸を付加した多価不飽和脂肪酸は酸化に対して極めて安定になることを明らかにしていた[6,7]。そこで，アスコルビン酸脂肪酸エステルを食用に供することを想定して，小腸上皮様に分化した培養細胞（Caco-2）を用いて細胞に対する酸化抑制効果について検討した。

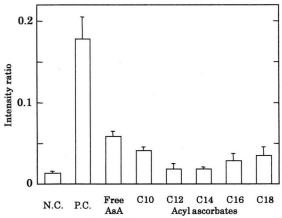

図7　鎖長の異なる各種アスコルビン酸脂肪酸エステルのCaco-2培養細胞に対する酸化抑制効果[8]。Positive control（P.C.）はアスコルビン酸またはアスコルビン酸脂肪酸エステルを加えなかった場合，また negative control（N.C.）は蛍光プローブのみを負荷した場合を示す。

Caco-2培養細胞に種々のアシル鎖長のアスコルビン酸飽和脂肪酸エステルを接触させたのち洗浄し，硫酸鉄で酸化を誘導したときの酸化の程度を蛍光プローブを用いて評価した[8]。アスコルビン酸脂肪酸エステルは遊離のアスコルビン酸に比べて高い抗酸化性を示し，ことにアスコルビン酸ミリスチン酸エステルが優れていた（**図7**）。

4. おわりに

有機溶媒中での固定化リパーゼを用いた縮合反応によりアスコルビン酸脂肪酸エステルの連続生産および生成物の諸性質について検討し，以下の成果を得た。

(1)　攪拌槽型反応器を用いて半連続的にアスコルビン酸脂肪酸エステルを合成する方法を提出した。

(2)　固定層型反応器を用いて1.6～1.9 kg/L-反応器・日という高い生産性でアスコルビン酸脂肪酸エステルを連続的に合成するシステムを確立した。

(3)　合成した各種アスコルビン酸脂肪酸エステルの水および大豆油に対する溶解度を測定し，大豆油には約1 mmol/kgの濃度で溶解することを明らかにした。

(4)　アシル鎖長の異なる各種アスコルビン酸飽和脂肪酸エステル水溶液の臨界ミセル濃度および界面占有面積を測定した。

(5)　各種アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルがO/W型エマルションの調製に使用できることを検証した。

(6)　各種アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルの水系での安定性に及ぼすpHおよび温度の影響を明らかにした。

(7)　アスコルビン酸飽和脂肪酸エステルは培養細胞の酸化も効果的に抑制することを明らかにした。

これらの基礎的な成果をもとに，食品への応用についてさらに検討する必要がある。一例として，既に粉末化油脂への応用について検討し，脂質に対する酸化抑制効果はアシル鎖長に大きく依存することを明らかにしている[9]。今後も応用のための基礎的な検討を行い，各種アスコルビン酸脂肪酸エステルの食品添加剤としての機能を明らかにして行きたい。

謝　辞

本研究課題に対してご助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団に深甚の謝意を表します。

文　献

1) Watanabe, Y., Kuwabara, K., Adachi, S., Nakanishi, K., and Matsuno, R.: Production of saturated acyl L-ascorbate by im- mobilized lipase using a continuous stirred tank reactor. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4628-4632 (2003).

2) Kuwabara, K., Watanabe, Y., Adachi, S., Nakanishi, K., and Matsuno, R.: Continuous Production of acyl L-ascorbates using a packed-bed reactor with immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 895-899 (2003).

3) Watanabe, Y., Adachi, S., Fujii, T., Nakanishi, K., and Matsuno, R.: Surface activity of 6-*O*-hexanoyl, octanoyl, decanoyl and dodecanoyl ascorbates. *Japan J. Food Eng.*, **2**,

73-75 (2001) .

4) Kuwabara, K., Watanabe, Y., Adachi, S., Nakanishi, K., and Matsuno, R.: Emulsifier properties of saturated acyl L-ascorbates for preparation of O/W emulsions. *Food Chem.*, **82**, 191-194 (2003) .

5) Kuwabara, K., Watanabe, Y., Adachi, S., and Matsuno, R.: Stability of saturated acyl L-ascorbates in aqueous solution. submitted to *J. Food Sci.*

6) Watanabe, Y., Adachi, S., Nakanishi, K., Shimada, Y., and Matsuno, R.: Lipase- catalyzed synthesis of 6-*O*-eicosapentaenoyl L-ascorbate in acetone and its autoxidation. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 637-640 (2000) .

7) Watanabe, Y., Adachi, S., Nakanishi, K., and Matsuno, R.: Lipase-catalyzed synthesis of unsaturated acyl L-ascorbate and its ability to suppress the autoxidation of polyunsaturated fatty acid. *J. Am.Oil Chem. Soc.*, **78**, 823-826 (2001) .

8) Kimura, Y., Kanatani, H., Shima, M., Adachi, S., and Matsuno, R.: Anti-oxidant activity of acyl ascorbates in interstinal epithelial cells. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1723-1727 (2003) .

9) Watanabe, Y., Fang, X., Minemoto, Y., Adachi, S., and Matsuno, R.: Suppressive effect of saturated acyl L-ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrin or gum arabic by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3984-3987 (2002) .

Continuous Synthesis of Acyl Ascorbates with Antioxidative and Emulsifying Abilities and Their Properties

Shuji Adachi

(Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Two systems were proposed for continuously producing L-ascorbates with various acyl chains through immobilized-lipase-catalyzed condensation in acetone. One system was constructed using a continuous stirred tank reactor, and the other using a plug-flow reactor. In the later system, a high productivity of 1.6 to 1.9 kg/L-reactor/day was realized. The introduction of acyl group into ascorbic acid significantly increased in the oil solubility. The surface activity, emulsifier ability and stability in water of various acyl ascorbates were measured. Antioxidative ability of the ascorbates to epithelial cells was also estimated. These results showed that the acyl ascorbates were promising food additives possessing both the antioxidative and emulsifying abilities.