

油脂中のリスク物質の新規分析法開発とその応用



ハウス食品グループ本社株式会社 宮 崎 紗子

はじめに

3-クロロ-1,2-プロパンジオール脂肪酸エステル類 (3-MCPDEs) 及びグリシドール脂肪酸エステル類 (GEs) は、食用油脂の精製（主に脱臭）工程において油脂の主成分であるアシルグリセロールから生成することが近年明らかになった新規リスク物質である。2007～2009年、ドイツ連邦リスク評価研究所が3-MCPDEsとGEsの健康影響評価結果を公表した当初、油脂中のこれら物質を精度良く定量できる分析法は存在しなかったため、2010年以降には各国で、食用油脂を対象とした分析法の開発が進められた。また、3-MCPDEsの位置異性体である2-クロロ-1,3-プロパンジオール脂肪酸エステル類 (2-MCPDEs) も、後に分析対象物質とされた。

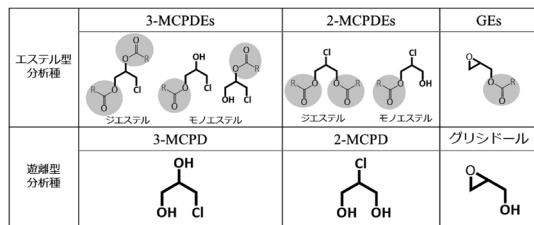


図1. エステル型分析種と遊離型分析種の構造。丸で囲んだ箇所は脂肪酸エステル類。

分析法は、直接法と間接法の2つに大別される。エステル型分析種は結合する脂肪酸の種類、結合位置・数の違いにより、数十の類縁化合物が存在する（図1）。直接法は、3-MCPDEsやGEsの各エステル型分析種について、結合する脂肪酸の種類等を区別して分析種毎に定量できる。一方の間接法は、各エステル型分析種を单一の遊離型分析種へ分解・誘導体化してGC-MSにて分析する。3-MCPD, 2-MCPD, グリシドールの遊離型相当濃度を同時に定量でき、必要な標準試薬の種類も少なく、簡便であるため、これら分析種の濃度の把握には、間接法が主に用いられている。間接法においてエステル型分析種の分解には、一般的に酸やアルカリが用いられるが、pHの変化により意図しない変換（アルカリ性pH: 3-MCPDEs→グリシドール、酸性pH: GEs→3-MCPD）も生じることが報告されていた。そのため、間接法を開発する上で重要な課題は、分析種間の意図しない変換を防いだ分解手法の確立であった。

1. 食用油脂を対象とした酵素的間接分析法の開発

ハウス食品グループでも原料油脂の安全性保証のため、食用油脂中の3-MCPDEsとGEsを精度良く定量するための分析法開発に着手した。エステル型分析種の分解時における、3-MCPDEsとGEs間の意図しない変換を防いだ分解手法を試行錯誤する中で、2つの理由からリバーゼに着目した。1つ目

の理由は穏やかな条件で加水分解を進行できることである。多くのリバーゼの最適pHは中性付近にあるため、極端な酸性、アルカリ性pHにせよともエステル型分析種の加水分解を行うことができ、意図しない変換を抑制できると考えた。2つ目の理由はエステル型分析種の分解の迅速化である。リバーゼは由来によって、結合する脂肪酸の種類や結合位置、アシルグリセロールの種類（トリ、ジ、モノ）等に対して分解特異性を有するが、3-MCPDEs, 2-MCPDEs, GEsに対する分解特異性が高いリバーゼ及びそのリバーゼに適した加水分解条件を選定できれば、迅速に加水分解を完了できるだろうと仮説をたてた。検証の結果、3-MCPDEs, 2-MCPDEs, GEsの加水分解に適した *Candida cylindracea* (*C. rugosa*) 由来リバーゼを選定し、30分以内に加水分解を完了する条件を見出すことができた。加水分解条件の確立後、他の分析操作やGC-MS条件等を選定し、酵素的間接分析法を確立した（図2）^{1,2}。

なお、*C. cylindracea*由来リバーゼはドコサヘキサエン酸（DHA）等が結合した3-MCPDEsやGEsは分解しづらいことから、上記分析法の適用範囲は『魚油を除く食用油脂』である。DHA等が結合した3-MCPDEs, GEsを含む可能性のある魚油を分析するには、加水分解に *Burkholderia cepacia* 由来リバーゼを用いた改良法を用いる必要がある³。

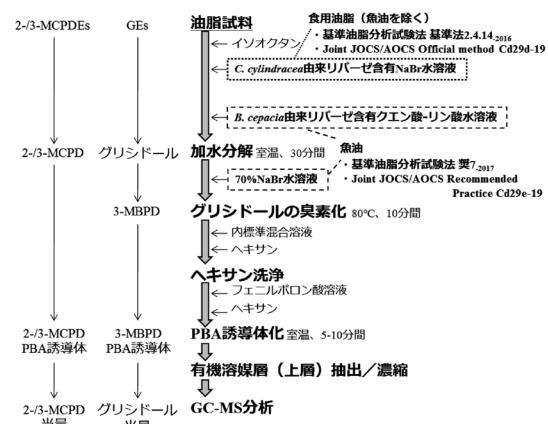


図2. 酵素的間接分析法の分析フロー

2013年には、米国油化学会（AOCS）Official Methodとして3法 [Cd 29a-13⁴, Cd 29b-13⁵, Cd 29c-13⁶] が登録された。分析種間の意図しない変換を防ぐためにCd 29a-13は弱酸性pH、Cd 29b-13は弱アルカリ性pHかつ低温と、穏やかな条件下で16時間かけてエステル型分析種の分解を行うため、GC-MS検液調製に2日間を要する。Cd 29c-13は分解に要する時間は短いが、1つの試料につき2つの方法で分析する必要がある。これら3法に対し、酵素的間接分析法の加水分解は0.5時間と迅速に完了し、操作も簡便であるという利点を有する。

2. 国内外の基準法への収載

酵素的間接分析法を市場に流通する食品の安全性保証に広く活用してもらうためには、複数機関による分析法の性能評価が必要であった。2014年、13機関に協力いただき、公益社団法人日本油化学会規格試験法委員会内にMCPD脂肪酸エステル等(間接法)小委員会を設立し、合同試験を実施した。その結果、本分析法は十分な室間再現精度を有することが認められ、2016年に日本油化学会基準油脂分析試験法基準法「2.4.14₂₀₁₆ 2-/3-MCPD脂肪酸エステル、グリシドール脂肪酸エステル(間接分析—酵素法)」として承認された^{7,8)}。基準法2.4.14₂₀₁₆では適用範囲外のDHA等を含む魚油を対象とした改良法についても、2017年に基準油脂分析試験法推奨法「奨7₂₀₁₇ 魚油中の2-/3-MCPD脂肪酸エステル、グリシドール脂肪酸エステル(間接分析—酵素法)」として承認された⁹⁾。

2019年には、米国に拠点を置く、油脂、界面活性剤等に関する国際的な専門組織であるAOCSが制定する公定法にも、Joint JOCS/AOCS Official Method Cd 29d-19及びJoint JOCS/AOCS Recommended Practice Cd 29e-19として承認された^{10,11)}。

3. 油脂含有食品への適用と応用

2017年には、「農林水産省、平成29年度安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業」の枠組みで「油脂を用いた加熱調理が、食材中の3-MCPD脂肪酸エステル類及びグリシドール脂肪酸エステル類の生成に及ぼす影響を把握するための分析法の開発」を受託した。本研究では、油脂を原料とする食品(油脂含有食品)中の3-MCPDEs、GEs濃度や加熱調理中のこれら物質の動態を把握するために、日本国内で流通する油脂含有食品に適した分析法の確立を目指した。簡易な前処理(液液分配)を追加した酵素的間接分析法¹²⁾と、欧州食品安全機関(EFSA)が報告した酸間接分析法(EFSA法)¹³⁾の性能を検証し、油脂含有食品中の3-MCPDEs、GEsの分析法を確立した。

さらに、油脂含有食品の加熱調理において3-MCPDEs、GEs生成の有無及び生成に寄与する要因を把握するため、焼き、揚げの2条件の加熱調理におけるモデル加工食品「焼きクラッカー」及び「揚げポテトスナック」を作製し、先述の前処理を追加した酵素的間接分析法を用いて分析した。配合油脂や揚げ油にはパーム油を用いた。汎用的な加熱条件で加熱したところ、焼きクラッcker(ガスオーブン、185°C、200°C)、揚げポテトスナック(フライヤー、160°C)ともに3-MCPDEs、GEsは原料油脂から新たに生成しないことが示された。揚げポテトスナックの揚げ油(バッヂ式、新油の継ぎ足し無し)においては、3-MCPDEsは経時に減少し、GEsは増減しないことを確認した。詳細な結果は文献14を参照いただきたい¹⁴⁾。

4. 本分析法の活用

2018年、国際協力機構主催のタイ国別研修「水産製品における食品添加物及び汚染物質に関する検査方法」において、酵素的間接分析法の技術指導を実施した。タイ水産局の研究所を訪問し、本分析法の原理に関する講義、分析技術の指導を行った。また、水産局の研究者と協働で、タイで実施する上での課題解決を行い、本分析法をタイ水産局へ導入した。今後、タイの水産製品の品質管理への本分析法の活用が期待される。

おわりに

本研究では、エステル型分析種の加水分解の手法としてリバーゼに着目することで、食用油脂及び油脂含有食品中の2-/3-MCPDEs、GEsを精度良く、かつ、迅速に定量できる酵素的間接分析法を確立できた。当初の目的は、弊社の原料・製品の安全性保証のためであったが、社内外の多くの方々のご協力、ご支援のおかげで、本分析法は国内外の基準法として収載された。今後も、食用油脂及び油脂含有食品中の3-MCPDEs、GEs濃度の把握、低減対策、食品製造・調理中の動態に関する研究が進められるだろう。酵素的間接分析法に関する研究が、これらの研究の進歩・発展の一助になることを期待する。

お客様に安全な食品をお届けできるよう、これからも食の安全に関する研究に取り組んでいきたい。

(引用文献)

- 1) K. Miyazaki, K. Koyama, T. Hirao & H. Sasako, Indirect Method for Simultaneous Determinations of 3-chloro-1,2-propanediol Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters, Journal of the American Oil Chemists' Society, 89, 1403-1407 (2011)
- 2) 宮崎(中村)絹子, 2-/3-MCPD脂肪酸エステル類、グリシドール脂肪酸エステル類の酵素的間接分析法の開発、東京大学大学院農学生命科学研究科博士論文 (2017)
- 3) K. Miyazaki & K. Koyama, An Improved Enzymatic Indirect Method for Simultaneous Determinations of 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in Fish Oils, Journal Oleo Science, 66, 1085-1093 (2017)
- 4) AOCS Official Method, Cd 29a-13 (2013)
- 5) AOCS Official Method, Cd 29b-13 (2013)
- 6) AOCS Official Method, Cd 29c-13 (2013)
- 7) K. Koyama, K. Miyazaki, K. Abe, Y. Egawa, H. Kido, T. Kitta, T. Miyashita, T. Nezu, H. Nohara, T. Sano, Y. Takahashi, H. Taniguchi, H. Yada, K. Yamazaki & Y. Watanabe, Collaborative Study of an Indirect Enzymatic Method for the Simultaneous Analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and Glycidyl Esters in Edible Oils, J. Oleo Sci. 65, 557-568 (2016)
- 8) 日本油化学会編、基準油脂分析試験法、2.4.14₂₀₁₆ (2016)
- 9) 日本油化学会編、基準油脂分析試験法、奨7₂₀₁₇ (2017)
- 10) Joint JOCS/AOCS Official Method, Cd 29d-19 (2019)
- 11) Joint JOCS/AOCS Recommended Practice, Cd 29e-19 (2019)
- 12) K. Miyazaki & K. Koyama, Application of Indirect Enzymatic Method for Determinations of 2-/3-MCPD-Es and Gly-Es in Foods containing Fats and Oils, Journal of the American Oil Chemists' Society, 93, 885-893 (2016)
- 13) JRC Standard Operating Procedure, In-house validated by the EC-JRC (2016)
- 14) 農林水産省、H29年度安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業、研究成果報告 (2018) http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/regulatory_science/pdf/2901.pdf

謝 辞 本研究の遂行にあたり、ハウス食品グループ本社の基礎研究部メンバーや社外の多くの方にご支援いただきました。本試験法の合同試験は、MCPD脂肪酸エステル等(間接法)小委員会の委員及び合同試験試料の分析をしていただいた皆様のご尽力のおかげで成功しました。心より感謝申し上げます。基準法への収載にあたり、日本油化学会規格試験法委員会及び試験法企画小委員会の委員の皆様、AOCSのScott Bloomer博士には、多大なご助言を頂戴したことを厚く御礼申し上げます。

農林水産省の研究委託事業において、本研究課題に携わって頂いた研究推進会議メンバー及び試験研究課題運営チームの皆様のご助言、ご尽力に感謝申し上げます。