

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：37201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00840

研究課題名(和文) ナノサイズの自己凝集体形成による食品中の色素の安定化

研究課題名(英文) Stabilization of pigments in food by formation of nano-sized self aggregates

研究代表者

安田 みどり (Yasuda, Midori)

西九州大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：20279368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食品に含まれるクロロフィル、カロテノイドなどの脂溶性色素は、光に不安定で退色や変色を生じやすい。本研究では、乳化剤を用いてクロロフィルの光退色を抑えることを目的とした。その結果、親水性の高い乳化剤は、クロロフィルの光退色を著しく抑制することがわかった。これは、クロロフィルと乳化剤との相互作用が弱く、クロロフィルは密に詰まった100nm程度の小さな自己凝集体を形成したためと考えられる。そのおかげで、内側のクロロフィルを光から守り、退色を防いだのではないと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、緑茶や野菜スムージーなど健康飲料の人気の高くなっている。しかし、飲料中のクロロフィルをはじめとする脂溶性の色素は、光による退色や変色を生じることが食品業界で大きな問題となっているが、これまで解決されていない。本研究では、安全安心な乳化剤を用いることによるクロロフィルの自己凝集体の形成により、クロロフィルの光退色を抑えることが可能となった。この成果は、緑茶飲料をはじめ、様々な色素を含んだ機能性飲料の長期保蔵に応用することができる。

研究成果の概要(英文)：Hydrophobic pigments such as chlorophyll and carotenoid contained in foods are unstable to light and easily cause fading or discoloration. The purpose of this study was to suppress the discoloration of chlorophyll by using an emulsifier. As a result, it was found that a highly hydrophilic emulsifier significantly suppressed the discoloration of chlorophyll. This is probably because the interaction between chlorophyll and the emulsifier was weak and chlorophyll formed small self-aggregates of about 100 nm that were closely packed. This may have protected the inner chlorophyll from light and prevented it from discoloration.

研究分野：食品化学

キーワード：クロロフィル カロテノイド 光退色 乳化剤 自己凝集体 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

「美味しさは色から」といわれるように、食べ物の色は食品の二次機能の1つで、嗜好に大きく影響する。食品には、クロロフィル、カロテノイド、ポリフェノール、トコフェロールなど様々な色素が存在している。最近の健康ブームで、緑茶、野菜のジュースやスムージーが人気であるが、加工や保蔵によりこれらの色素が変色・退色するため、食品業界では大きな問題となっている。特に、脂溶性の色素については、光によるダメージを受けやすく、退色することが知られている。例えば、ペットボトル入りの緑茶飲料は、クロロフィルの光退色により緑茶特有の色が損なわれている。しかし、クロロフィルの退色防止に関する研究は、意外に少なく、シクロデキストリンの包接作用¹⁾、金属イオン添加による置換反応²⁾、β-カロテンを用いた方法³⁾が報告されているにとどまる。

我々は、これまで、クロロフィルの凝集状態に着目し、クロロフィルの光退色のメカニズムおよびその抑制方法について検討してきた。水-メタノールおよび水-エタノール溶液中では、クロロフィルはアルコールの割合が低いほどクロロフィルの退色が抑えられることが明らかとなった⁴⁾。溶液中のクロロフィルの溶存状態は、アルコールの濃度が高いときにはモノマー、低いときにはオリゴマー(自己凝集体)を形成することがわかった。また、このときの凝集体の粒子径は、約100 nmと非常に小さいことも明らかになった。つまり、クロロフィルは、アルコール濃度が低いときに約100 nmの大きさの凝集体を形成し、自らが密に集まることで光からのダメージを防ぐのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

以前の研究では水-アルコール系にて行った⁴⁾が、本研究では水系の条件にてクロロフィルの光退色を抑えることを目的とした。クロロフィルは脂溶性の色素であることから、界面活性剤を用いることでクロロフィルの溶解性を高めることができるのではないかと考えた。そこで、Triton X-100(以下、TXとする)さらに、食品添加物である乳化剤を用いて実験を行うこととした。先の研究でクロロフィルが凝集体を形成することが光退色の抑制につながるということがわかっている。そこで、乳化剤を用いた場合のクロロフィルの溶存状態、すなわち、クロロフィルが凝集体を形成する条件と光退色との関係を調べ、光退色を抑えるメカニズムを検討した。また、クロロフィル以外の脂溶性色素(カロテノイド類)においても、光退色の挙動とこれを抑える方法について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 用いた色素と乳化剤

クロロフィルとして、クロロフィル-a(以下、Chl)を用いた。Chlは、乳化剤に溶けなかったため、エタノールに溶解した。乳化剤は、食品添加物として認められている以下の3つ、ショ糖脂肪酸エステル(SE)、ソルビタン脂肪酸エステル(TW)、キラヤサポニンを含んだキラヤ抽出物(QS)を用いた。また、比較としてTXを用いた。実験に用いた濃度は、自動表面張力計DY-300(協和界面科学)を用いて表面張力を測定し、臨界ミセル濃度(cmc)の前後の濃度とした。ただし、サンプル溶液中のクロロフィル、エタノールの最終濃度は、それぞれ 1×10^{-5} Mおよび0.5%であった。カロテノイドに関する実験においては、β-カロテン、α-カロテン、β-クリプトキサンチン、カプサンチン、ゼアキサンチン、ルテインをエタノールに溶解し、それぞれ5 μMとなるよう混合した。

(2) Chlの光退色試験

サンプル溶液は、各乳化剤またはTX溶液、0.01 M Tris-HCl 緩衝溶液(pH7.5)、クロロフィルエタノール溶液を加えて混合し、すぐにメンブランフィルター(800 μm)にてろ過を行い、ポリエチレンテレフタレート(PET)製の透明容器(10 ml)に入れた。これに、366 nm(0.7-0.8 mW/cm²)の紫外線を照射し、時間ごとに分光測色計CM-3500d(コニカミノルタジャパン)にて色差の測定を行った。カロテノイド溶液は、エタノールの濃度を10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%となるよう調製したが、10-50%エタノール溶液では色素の析出が生じたため、60-100%のエタノール溶液のみを実験に用いた。光照射後のそれぞれのカロテノイドの濃度は、HPLCにより分析した。

(3) 溶液中のChlの溶存状態

UV-Vis測定は、分光光度計Ubest-V560(日本分光)を用いて行った。蛍光スペクトルは、蛍光分光光度計F-4500(日立)を用いて、励起波長430 nmにおけるスペクトル測定を行った。円偏光二色分散(CD)スペクトルの測定には、円偏光二色分散計J-820(日本分光)を用いた。また、ゼータサイザーナノ(Marvern)を用い、動的光散乱法にて溶液中の粒子径の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 乳化剤によるクロロフィルの光退色の抑制作用

各乳化剤またはTXを含んだクロロフィル溶液にUV照射を行い、時間ごとに色差を測定した結果を図1に示す。横軸は、UVの照射時間で、縦軸は-a*値の残存率(UV照射前の-a*値を100%としたときの各時間での%)を示す。なお、a*値とは-aの値が大きいほど緑色、0は無色、

+の値が大きいほど赤色を示すことを数値化したものである。それぞれ比較として、エタノール中で行った結果を赤線で示している。TW と TX は、エタノールと同様の色の变化を示し、最終的にはエタノールよりも早く 0% に近付いた。一方、SE は、エタノールの場合よりも遅く退色し、エタノールでは 36 時間後に 0% となったが、0.003-0.005% の濃度では 36 時間後も約 10% 程度残存していた。QS を用いた場合は、最もクロロフィルの退色を抑制し、36 時間後でも濃度によって約 20% 残存していた。

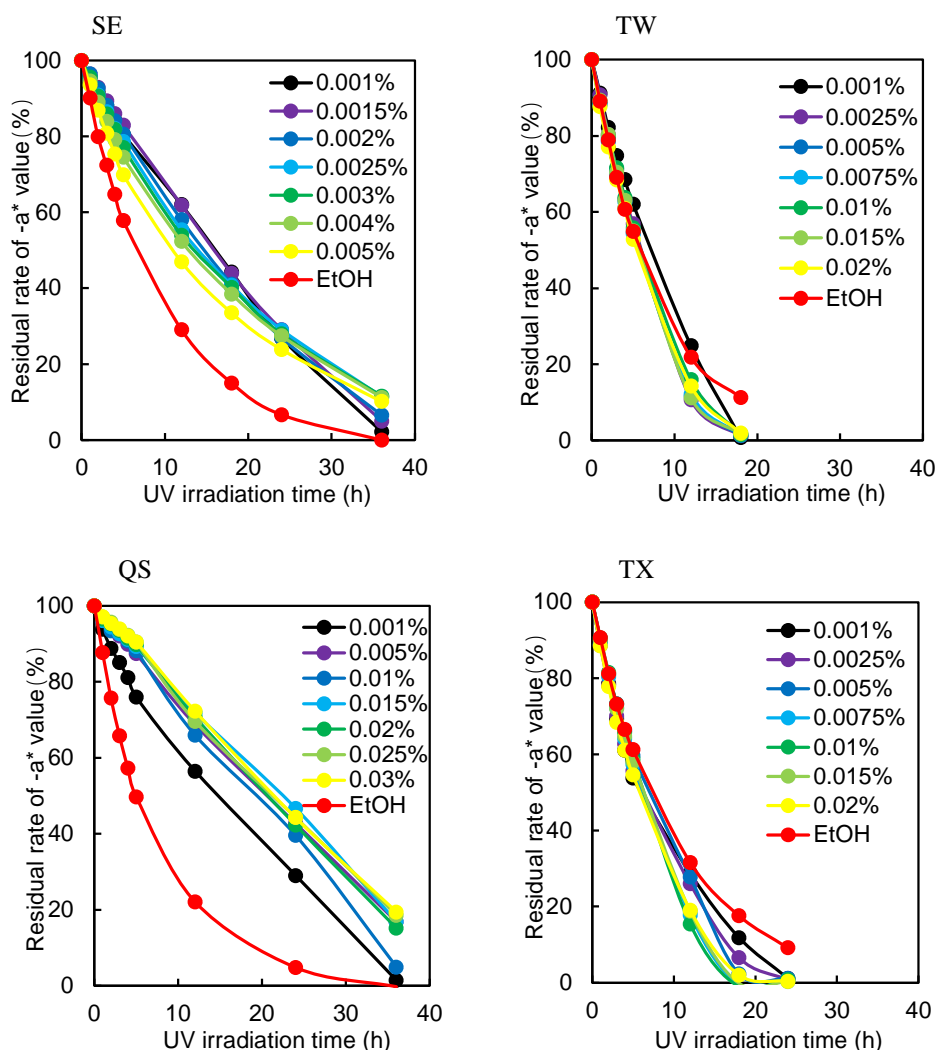


図1 UV 照射によるクロロフィルの色差の変化に及ぼす乳化剤の影響

(2) 溶液中のクロロフィルの溶存状態

UV-Vis スペクトル

クロロフィルの色差の減少が大きかった TX、一方、最も少なかった QS 中の UV-Vis スペクトルを図 2 に示す。赤線は、エタノール溶液中のスペクトルで、660 nm にピークが認められるが、これはクロロフィルがモノマーであることを示している。乳化剤溶液中では、670 nm にピークが現れ、エタノールの場合よりもブロードなピークとなった。QS はエタノールに比べて長波長側にブロードなスペクトルとなった。SE も同様の傾向であった。一方、TX の場合は、エタノールよりもやや長波長側ピークを示したが、QS や SE ほど長波長側へブロードに広がってはいなかった。TW を用いた場合も、同じようなスペクトルであった。長波長側のピークは、クロロフィル同士が相互作用した凝集

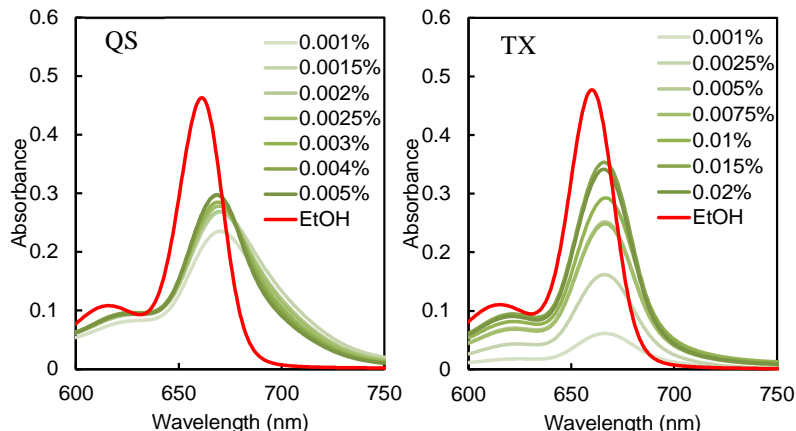


図2 . クロロフィルの UV-Vis スペクトルに及ぼす乳化剤の影響

体のピークである。このことは、SE や QS が TW や TX に比べてクロロフィルの凝集体の生成を促進していることを示している。

蛍光スペクトル

エタノール溶液中でクロロフィルは、670 nm に強い蛍光強度を示したが、これはモノマーであることを表している⁴⁾。乳化剤、SE、TW、QS が共存する場合は、670 nm 付近の蛍光強度は非常に弱かったことから、乳化剤溶液中ではモノマーのクロロフィルはほとんど存在せず、クロロフィルは凝集体として存在していることがわかった。一方、TX では、濃度の増大とともに674 nm の蛍光強度が増大した。すなわち、TX では濃度の増大とともにクロロフィルは凝集体からモノマーへと変化している。これは、クロロフィルがTX のミセルに囲まれているためではないかと考えられる。0.1%の濃度のTXでのクロロフィルの蛍光極大波長(674 nm)がエタノール溶液中のクロロフィルの蛍光極大波長(670 nm)より少し長波長側にシフトしているのは、TX ミセル中のクロロフィル(モノマー)がエタノール中のクロロフィルと溶存状態が異なることを示している。

CD スペクトル

CD スペクトルの測定の結果、SE では660 nm に谷、715 nm にピークが現れた。そのほかの乳化剤の場合は、660 nm の谷だけがみられた。CD スペクトルは、溶液中の分子の状態がわかるものであり、規則的な相互作用をするものほど大きな谷やピークを示す。SE では、濃度が低いものほどピークが大きくなったことから、cmc より低い濃度でより規則的な凝集体を形成しているのではないかとと思われる。しかし、今回の値は、我々が以前行った水-アルコール溶液の場合⁴⁾と比較すると、CD 強度が非常に小さくなった。つまり、乳化剤溶液中ではクロロフィルの凝集体は水-アルコール溶液中に比べると、ランダムな構造として存在していることが考えられる。

乳化剤溶液中の Chl 凝集体の粒子径

乳化剤やTXにクロロフィルを加えたときの溶液中の平均粒子径は、いずれの場合も約100 nmであった。これらの乳化剤およびTXは濃度にほとんど依存せず、ほぼ一定であった。つまり、乳化剤溶液中で、クロロフィルは小さな凝集体(100 nm)を形成していることがわかった。

(3) 乳化剤によるクロロフィルの光退色抑制のメカニズム

以上の結果から、乳化剤を用いたクロロフィルの光退色を抑えることができるのは、SE や QS であることが分かった。これらの乳化剤は、糖を含み、非常に親水性の高い乳化剤である。しかし、なぜ親水性の高い乳化剤がクロロフィルの光退色を抑えるのか。以前の水-アルコール系での論文では、クロロフィルの小さくランダムな凝集体を形成させることが光退色抑制につながるということがわかった⁴⁾が、今回の結果からいずれの乳化剤もランダムで小さな凝集体(約100 nm)を形成していることがわかった。UV-Vis スペクトルの高波長側のピークの存在割合が乳化剤によって異なったことから、クロロフィルと乳化剤との相互作用が異なるのではないかとと思われる。今回用いたSEやQSは、糖という高い親水性部位を持つ乳化剤であることから、クロロフィルとあまり相互作用をせず、クロロフィルの自己会合体を促進しているのではないかと考えられる。クロロフィルは、p-p 相互作用により、クロロフィル同士で凝集し、密に詰まった状態になっている。そのおかげで、内側のクロロフィルを光から守り、退色を防いだのではないかとと思われる。一方、TW や TX は、親水性部位がほとんどないため、クロロフィルのフィトール基との疎水性相互作用のみの凝集体であり、クロロフィルはTW や TX と相互作用しやすく、クロロフィル同士の凝集体をあまり形成しないために、光により退色されやすくなったと考えられる。つまり、クロロフィルとの相互作用が弱い乳化剤ほどクロロフィルの光退色抑制に効果があると言える。今後は、これらの乳化剤を実際に食品に添加することで光退色の抑制に寄与するかについて調べ、長期保存中の色の保持に役立てたいと考えている。

(4) カロテノイド色素の光安定性⁵⁾

パプリカ熱水溶液の光退色作用

佐賀県産のパプリカ(赤色および黄色)に含まれるカロテノイドを調べるため、HPLC 分析を行った結果、カプサンチン、ゼアキサンチン、ルテイン、-クリプトキサンチン、-カロテン、-カロテンが含まれ、それらの合計は、赤色パプリカが黄色パプリカよりも6.4倍多く含まれていた。これらのパプリカを熱水抽出し、その溶液についてUV照射試験を行った。赤色パプリカは、UV照射前はa*値が18であったが、UV照射2日後にはほぼ0となった。b*値もはじめは29であったが、UV照射2日後から約10となり、7日目まで6となった。なお、a*の値は大きいほど赤色、小さいほど緑色、b*の値は大きいほど黄色、小さいほど青色を示す。一方、黄色パプリカは、a*値は赤色パプリカに比べて非常に低く、UV照射前は約-1であったが、12時間後にはほぼ0となった。b*値はUV照射前には赤色パプリカと同等の25であったが、7日後には5となった。つまり、パプリカ溶液の色は、1~2日間のUV照射により著しく退色してほぼ無色になることが明らかとなった。

カロテノイド溶液の光退色作用

パプリカ熱水抽出溶液の光退色の要因を調べるため、カロテノイド溶液にUV照射を行った。その結果、エタノール100%の溶液中では照射4日目まで色差が著しく減少した(図3)。特に、b*値の変化が大きかった。HPLC分析の結果、炭化水素類であるβ-カロテンやγ-カロテンがヒドロキシル基を持つキサントフィル類(カプサンチン、ゼアキサントニン、ルテイン、クリプトキサントニン)の色素より速く退色することがわかった。この理由として、キサントフィル類は、ヒドロキシル基を有するためにカロテン類よりも抗酸化性が強く、光照射に対して酸化分解反応を受けにくくなるためではないかと考えられる。この退色作用は、エタノール濃度が低い場合に起こりやすく、逆にエタノール濃度が高いほど退色が遅くなった。この要因についてはまだ不明であるため、今後、溶解度や凝集体の形成などについて詳しく調べ、退色を防ぐ方法についても検討することとしている。

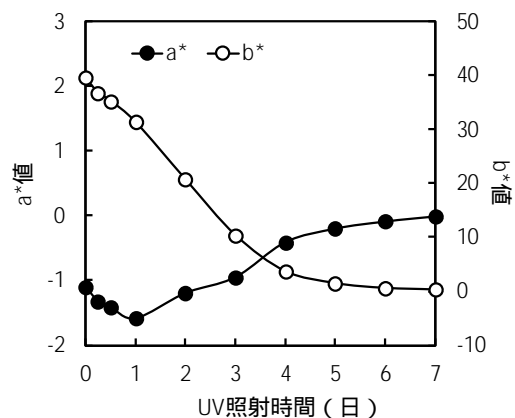


図3. UV照射によるエタノール溶液中のカロテノイドの色差の変化

<引用文献>

- 1) 瀬戸 美江、中西 洋子、佐伯 俊子、梶田 武俊、調理科学、**23**、1990、392-396
- 2) Wang J., Guo Y., Gao J., Jin X., Wang Z., Wang B., Li K., Li Y., *Ultrasonics Sonochemistry*, **18**, 2011, 1028-1034
- 3) Chen B. H., Huang J. H., *Food Chemistry*, **62**, 1998, 299-307
- 4) Yasuda Y., Oda K., Ueda K., Tabata M., *Food Chemistry*, **277**, 2019, 463-470
- 5) 安田みどり、児島百合子、田端正明、西九州大学健康栄養学部紀要、**4**、2018、1-10

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 安田みどり、児島百合子、田畑正明	4. 巻 4
2. 論文標題 紫外線照射によるパブリカ中のカロテノイドの退色作用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 西九州大学健康栄養学部紀要	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda M., Oda K., Ueda T., Tabata M.	4. 巻 277
2. 論文標題 Physico-chemical chlorophyll-a species in aqueous alcohol solutions determine the rate of its discoloration under UV light	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 463-470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2018.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安田みどり、田端正明
2. 発表標題 クロロフィルの光退色に及ぼす凝集体形成の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田みどり、田端正明
2. 発表標題 UV照射に伴う脂溶性色素の退色作用に及ぼす凝集体形成の影響について
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会第67回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田みどり、児島百合子、斎木まど香、田端正明
2. 発表標題 パブリカに含まれるカロテノイド色素の光退色作用
3. 学会等名 日本家政学会九州支部第64回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田みどり、田端正明、澁谷茉希、城下友花
2. 発表標題 乳化剤によるクロロフィルの光退色抑制作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田みどり、田端正明
2. 発表標題 クロロフィルの凝集体形成による光退色抑制効果
3. 学会等名 日本清涼飲料研究会第29回研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuda Midori, Tabata Masaaki
2. 発表標題 Prevention of Chlorophyll Discoloration through Nanoparticle Formation
3. 学会等名 The 18th Asian Chemical Congress (18th ACC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	田端 正明 (TABATA Masaaki) (40039285)	佐賀大学・理工学部・客員研究員 (17201)	