

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：55101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550076

研究課題名(和文) 卵殻膜の未利用機能を顕在化させる新規機能性材料の開発

研究課題名(英文) Development of New Functional Materials evidencing unused resources of eggshell membrane

研究代表者

谷藤 尚貴 (Naoki, TANIFUJI)

米子工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：80423549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、燃料電池の発電の要である電解質膜の新たな材料として卵殻膜を応用するための検討を行った。固体電解質膜を作製するための最初の実験として、切り出した膜をそのまま燃料電池に導入しても発電は起こらなかった。しかし、白金コーティングを施した膜を準備して、メタノールを滴下したとき、発電することを確認した。次に、卵以外の加工食品の劣化で生じる着色劣化を抑制する食品添加物として役立つ機能を見出した。アボカド果肉の表面を卵殻膜で覆って劣化傾向を目視観察したところ結果、卵殻膜は果肉の着色劣化は抑制する作用を示した。

研究成果の概要(英文)：We introduced eggshell membrane into a fuel cell module, only to find that no electricity was generated, while we also prepared platinum coated membrane using sputter coating device. In this case, power generation was confirmed on this membrane when methanol was dripped on it. From this result, we expect that the proton conduction which was shown in the protein of natural membrane contributed to power generation. Next work showed a function as the food additive which can inhibit coloration degradation that occur due to the deterioration of the processed food except the egg. The surface of the avocado's pulps were covered with ESM, and then the degradation tendency was visually observed. As a result, the ESM showed ability of controlling coloration and deterioration of it.

研究分野：リサイクル工学

キーワード：卵殻膜 燃料電池 電解質膜 褐変 チロシナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

日本国内で消費される食料は年間約 1.2 億トンであるが、食品由来の廃棄物は 1700 万トン、そのうち可食部と考えられる量の 500~800 万トンは消費者の口に届くことなく廃棄されている。これは日本国内の米生産量とほぼ同規模であり、多くの食料を無駄にしていると言える。このような廃棄ロスは主に食品流通において全般的に起こっていて問題となっているものの、現状では食品ロスの具体的な解消法が発案できていないため、問題の克服は困難となっている。それ故に、食品廃棄物をターゲットとして有効利用する手法を新規開拓することは、食品資源のロス減らし高効率で利用できるシステムが構築できる技術へと繋げられる。

我々は卵の殻の内側に存在する薄膜(=卵殻膜)に着目して、それを応用する研究に由来から取り組んできた。卵殻膜は約 10 μm の微細な繊維が複雑に絡まってできた薄膜であり、その構造は内部成分(黄身・白身)が孵化するまでの腐敗防止と代謝活動の維持に寄与する機能を持っているが、その作用メカニズムは完全に解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、卵殻膜の機能について科学的に解明し、これを機能性膜として応用する研究を目指した。従来から企業では主成分であるタンパク質をアミノ酸等に分解・加工して再利用するリサイクルが効率的に行われている一方で、膜の機能として備わっている卵の中身を常温で長い時間腐らせない仕組みは十分な有効利用ができていないことに注目し、これを利用すれば新しい機能性材料を創製できると考えた。用途としては、一部の分紙を通さない薄膜構造を必要とする燃料電池向けのプロトン伝導膜や、卵殻膜の保護機能を用いた食品添加物等を開発する。

### 3. 研究の方法

卵が本来有する孵化までの生命活動維持に寄与する機能の一部は卵殻膜が保有していると仮定し、その化学的及び物理的な構造の特徴を活用することによって新しい機能性材料を開発することにした。機能性材料として顕在化させたい機能は、以下の 2 つに絞った。

- a) 非ナフィオン系の新規プロトン伝導膜として加工して燃料電池材料へ導入する。
- b) 申請者が見出した卵殻膜における新規成分の機能を解明して応用法を開発する。

本研究開発を期間内で達成するために、発電特性評価や酵素活性阻害等の数値で改善効果が容易に求められる実験系を用いて研究を推進する工夫をした。

### 4. 研究成果

(1) 卵殻膜を燃料電池の電解質膜として動作させる試み

#### <実験方法>

- ①卵殻膜を約 3 cm 角で切り出し(図-1)、型紙でマスキングした膜をスパッタ装置で白金コーティングしたものを燃料電池キットへ導入した(図-2)。この装置へ 3%メタノール水溶液を加えた際の発電動作を評価した。
- ②卵殻膜を両面テープ(図-3)、両面導電テープを用いて固定して、卵殻膜で生じる発電性能について起電力と I-V 特性で評価を行った。
- ③卵殻膜の電極の固定法について、電極二枚で強く挟みつける以外に両面テープ、超強力両面テープ、両面導電テープにより卵殻膜を電極へ固定し、テープ貼り付け時の形状についても検討を行った(図-4)。
- ④卵殻膜への添加物導入による電解質膜としての性能改善として、卵殻膜を食品色素および金属化合物水溶液に一日侵漬し、取り出した膜を乾燥後に白金でコーティングした後、上記と同様の条件で発電特性を評価した。



図-1. 卵殻膜の切り出し手順と約 3×3 cm に整形した膜試料

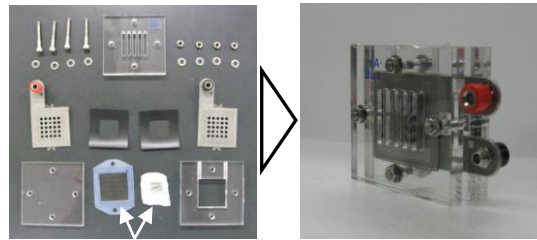


図-2. 卵殻膜の燃料電池キットへの導入  
※ナフィオン膜を卵殻膜で置き換えて装置を組み上げた。



図-3. 卵殻膜と電極の両面テープ固定



図-4. 両面導電テープの貼り方比較  
(左から、四辺、クロス、格子型)

<結果>

①卵殻膜を燃料電池の電解質膜とした直接メタノール型燃料電池の作製

卵殻膜試料に白金コーティングを行った後メタノールを滴下すると起電が生じ、20 mV~70 mV 程度の起電力が生じた。この動作が見られた理由は、燃料極側の白金による触媒作用で起こるメタノールの分解反応から生じたプロトンが、従来燃料電池に用いられていた電解質膜同様に卵殻膜を介して空気極側の白金まで運ばれる現象が生じたためであると考察している。しかしながら、初期の実験では卵殻膜を物理的に電極に挟んだだけでは燃料溶液の漏れ、起電力がすぐに低下する傾向があったが、電解質膜と電極の接触構造をテープで電極へ貼り付け固定をすると、性能は上がり安定化する効果が見出された。さらに、導電性材料が添加された両面テープを採用すると性能はさらに向上して、テープの貼り方のパターンや厚みの最適化で更に発電力を改善できることが分かった。この結果が得られた理由として考えられるのは、膜と電極間をテープで密着させることで、燃料電池キットにおける燃料の横漏れによるクロスオーバーが防げたことと、卵殻膜表面の白金による触媒作用で生じた電子が両面導電テープを介してロスなく電極に移動できたことの2点が挙げられる。また、約70 μmの薄膜一枚が両電極へしっかり接触しながらも漏れの無いよう挟まる厚みは無かったため、白金の触媒作用で生じた電子が電極へ移動する際に伝導ロスが生じていたと考えられる。これらの結果をまとめると、卵殻膜のような天然素材は燃料電池の電解質膜として機能したが、効率良く電力を取り出す際には、電極と卵殻膜における接触構造の最適化が必要とすることが分かった。

②卵殻膜への添加物導入による発電性能の改善

食品色素を吸着させた卵殻膜を電池の膜として使用すると、無添加の膜に比べて性能は改善された。未処理の膜に比べると着色処理を行った膜では電力は上がり、特に電流値が上がるということが分かった。この現象は、添加した色素が卵殻膜のタンパク質と相互作用することによって付着しただけでなく、有機分子の内部構造がタンパク質中のプロトン伝導に寄与する部位として振舞う効果を示したためであると考えている。今回検討した7種類の色素のうち、特に良い効果を示したのは赤色3号、赤色106号であり、これらの分子内にはキサンテン構造を有する共通点があった。また、色素を沈着させた卵殻膜で作製した電解質膜では、内側と外側の向きを考慮して電極を固定すると性能に差が生じる現象が確認できた。この性能差と沈着させた色素についてグループ分けして分子構造を調べると、内側を燃料極に向けた電池で性能が高かった膜ではヒドロキシ基を有する色素を使用した例が多く、外側を燃料極側に

向けた方が性能の高い電池ではヒドロキシ基を持っていない共通点があった。実際に、これらの色素で着色された卵殻膜を見ると内側と外側で染まり方の異なる例が見られた。これは卵殻膜を構成する表面の構造が異なり、吸着する色素の相互作用様式も異なっていることに由来していると考えられ、それにより生じた色素の着色量の差が燃料極または空気極に当てはめた際の性能差を生み出したと考えている。卵殻膜の裏表で色素の着色に性能の差が出ていることを活かして、今後は裏表両面へ2つの色素を裏表で染め分ける等の工夫を行えば、発電性能はさらに改善できると予想される。

さらに、水溶性の金属塩化物についても卵殻膜への吸着機能を検討するため、金属塩化物の水溶液へ卵殻膜を侵漬させる操作を行ったところ、卵殻膜には速やかに金属の吸着が起こった。この処理を行った卵殻膜についてこれまで同様の操作によって評価すると、未処理の膜に比べて最大で50倍程度発電性能が高くなった。

金属を吸着した卵殻膜は、未処理のものよりも脆くなっていたが、これはタンパク質内部で生じる添加物との新しい結合によって変性が生じていることに由来すると考えられる。しかし、卵殻膜へ新たに添加された金属イオンは、卵殻膜においてプロトン伝導を示す部位として動作することにより発電性能を高める現象が得られたと考えている。

(2) 卵殻膜における新規成分の探索

<実験方法>

①卵殻膜をパッチした果肉の痛みに関する評価試験：1×1×0.5 cm 角にカットしたアボカド果肉片表面を卵殻から取り出した卵殻膜を覆った後に、着色傾向の観測を経時的に行い、無処理のアボカド切片と着色が始まる時間についての比較を行った。

②卵殻膜の薄膜化：卵殻膜をそのままの状態に添加物として使用すると、膜は対象物の色彩や食感に違和感を与える。そのため、卵殻の鈍端部にある気室部分を起点として、手で膜全体を二層に分離させることによる薄膜化を行った。さらに、この膜を用いて①の試験と同様のパッチテストを行った。

③他の作物の着色への作用評価：アボカド同様に調理後の切片が着色するごぼうやリンゴなどに対しても卵殻膜で被覆した際の効果について、経時的な着色変化を目視で観測した。

④チロシナーゼ阻害活性に関する評価：卵殻膜の水抽出成分について、酵素阻害活性試験を行い、卵殻膜の成分が示すアボカドの着色劣化抑制作用について検証を行った。溶液調製として、2.5 mmol/L L-DOPA 溶液を基質、チロシナーゼ溶液(酵素 130 unit/0.25 mL)を酵素溶液、活性阻害を検証するための試料液として青色1号、緑色3号をそれぞれ $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-4}$  mol/L 水溶液を調製した。0.1

mol/L リン酸緩衝液 1.0 mL, L-DOPA 溶液 0.4 mL, 試料溶液 0.2 mL を加えて振とうし, 25 °C で 15 分間保温後, チロシナーゼ酵素溶液 0.05 mL を加えて 5 分間反応させた後, 直ちに分光光度計で吸光度 (測定波長 475 nm) を測定することで, 反応で生成するドーパクロムの定量を行った. これをチロシナーゼ阻害活性測定(C)とした. チロシナーゼ活性測定(A)ではりん酸緩衝液 1.2 mL, L-DOPA 溶液 0.4 mL, DMSO 0.05 mL, チロシナーゼ酵素溶液 0.05 mL, ブランク測定(B)ではりん酸緩衝液 1.25 mL, L-DOPA 溶液 0.4 mL, DMSO 0.05 mL, 試料液測定(D)ではりん酸緩衝液 1.05 mL, L-DOPA 溶液 0.4 mL, DMSO 0.05 mL, 試料液 0.2 mL をそれぞれ入れ, 振とうした試料溶液の吸光度をそれぞれ測定し, その結果を下式に代入することで, チロシナーゼ活性阻害率を算出した.

阻害率(%)=100-{(C吸光度-D吸光度)/(A吸光度-B吸光度)×100}

⑤卵殻膜の吸着能評価試験: (4) の試験溶液で生成するメラニン・ドーパクロム等の有色成分を卵殻膜が吸着する現象について, 紫外可視分光分析を用いて評価した.

⑥卵殻膜への色素分子導入: (5)の吸着特性を, 卵殻膜に更なる添加物成分を追加するために用い, 食品色素 (赤色 3 号, 赤色 106 号, 黄色 4 号, 黄色 5 号, 緑色 3 号, 青色 1 号, 青色 2 号, クルクミン, ケルセチン等) 水溶液に浸漬させて着色した卵殻膜を作製して,

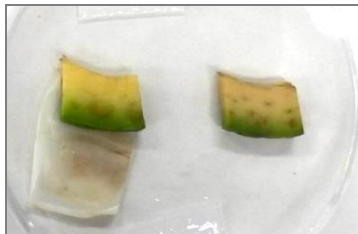


図-1. 卵殻膜被覆 5 時間後のアボカド果肉の変化 (左: 卵殻膜被覆, 右: 未処理)

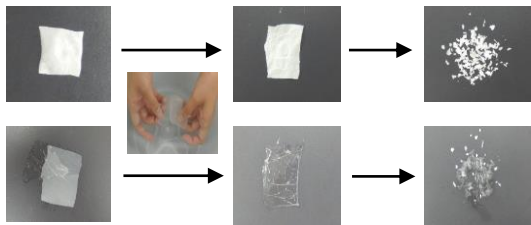


図-2. 卵殻膜の薄膜化・微粉末化の工程 (上: 乾燥時 下: 湿潤時)

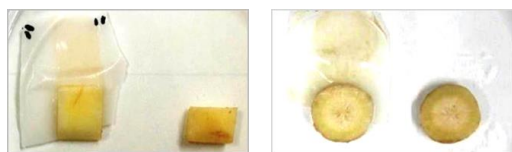


図-3. 卵殻膜によるリンゴとゴボウの着色抑制 (左: リンゴ 7 時間後 右: ゴボウ 5 時間後)

①と同様の試験を行い比較した.

<結果>

アボカドの果肉表面では維管束部分で緑色から褐色, 黒色への着色する見た目の劣化が速やかに起こるが, 卵殻膜で被覆すると目視により着色を確認するまでに要する時間が長くなることで, その着色現象が抑制される効果が確認された(図-1). この着色現象は, 基質をチロシンとしてチロシナーゼが作用して開始するメラニン生成経路 (酵素的褐変) で生じたユーメラニンが主な原因物質となっていることは既に知られているが, このパッチ試験については, ポリエチレンフィルムや紙などの素材による被覆した際に比較を行うと, 色素沈着の抑制効果は見られなかったことから, この現象は卵殻膜が示す作用に由来した現象であることが明らかとなった.

卵殻膜は直接食品として扱った場合舌における触感が強く残り, それは添加物として好まれなくなることが予想される. その問題点を解決するアプローチとして微粉末化の検討を行ったところ, ミルによる物理的破壊を用いて手法では卵殻膜の触感を完全に意識しないレベルに到達することはできなかったが, はじめに膜全体を二層に乖離させて薄膜化させると膜と水分を含んだ際に透明となり(図-2), 食感もオブラート状で舌の上でほとんど感じられない素材になった. この膜について最初の卵殻膜を果肉に被覆する試験を行ったところ, 色素沈着が抑制されることを確認した. 今回見出した作用は, アボカドだけでなくごぼうやリンゴの着色のようなアボカド同様の酵素的褐変に対しても応用できた(図-3)ことから, 今後様々な食品への適用についても可能であると考えられる.

卵殻膜は先に述べた二層分離が可能な薄膜であり, 内側の表面上にはさらにもう一層タンパク質成分由来の薄膜が存在する. この成分は水中で物理刺激を与えると溶出させることが可能であり, この抽出物についてのチロシナーゼ活性への影響を調べたところ, 22%と比較的高い阻害活性が確認された. この結果は一般的なメラニン生成阻害物質として比較されているコウジ酸)の約 1/3 の効果であり, 卵殻膜がメラニン生成を抑制する成分を有しており, 本研究ではそれを対象物へ作用させていることも明らかになった.

卵殻膜には果肉切片に生じた着色成分を吸着する性質が確認されているが, この現象についてチロシナーゼ活性試験で用いた溶液をそのまま時間経過させることで生成したメラニンを用いて, 吸収スペクトルの変化を観測したところ, 卵殻膜は活性試験で検出に用いる成分であるドーパクロムやメラニンを吸着する成分であることが明らかとなり, その作用が果肉の着色劣化を抑制する機能として寄与することが分かった. この卵殻膜が示す吸着機能は褐変の対象物だけでな

く、水溶性の様々な化合物を吸着することは知られているため、吸着現象を目視等で確認しやすい食品色素を吸着させた卵殻膜を作製して同様のパッチ試験を行ったところ、それぞれの色素において卵殻膜の着色抑制効果の有無を示す傾向が確認された。また、添加した色素についてチロシナーゼ活性阻害試験を行ったところ、パッチ試験で着色劣化の起こりにくかった色素についてはいずれもチロシナーゼ阻害活性が確認された。

<考察>

卵殻膜は通気性を持ちながら内部の水分放出を一定期間抑制し、内部構造を保持する機能を有する天然膜であることは、卵の孵化の過程から予想が可能である。この膜は電子顕微鏡による観測から微細なタンパク質繊維でできた薄膜であることが確認されており、その特異的な膜構造は先に述べた機能の発現に寄与していることが考えられる。特に本研究において慎重な操作で取り出した膜で観測された内側表面に存在する密で薄い層状構造や、その物理特性などはこれまでに報告されておらず、この部位が卵殻による内部構造の保持に影響している可能性は高い。今後は、この部位の詳細な分析を行うことで機能等について明らかにしていく必要が有る。

アボカド果肉切片の着色劣化は、果肉中のチロシンが基質としてチロシナーゼが作用することで生じるメラニン類が表面に沈着する現象に由来しており、この現象は多くの加工された食品において見られる現象である。それぞれの作物全てについて添加物を用いる必要性は無いが、卵殻膜がメラニンによる沈着を抑制する効果は食品業界だけに留まらず、化粧品や医薬品などへの応用が可能であると考えている。また、今回のパッチ試験と酵素活性試験の結果には相関が見られたことから、今後はチロシナーゼ活性への阻害作用を有する物質のスクリーニングにアボカド果肉を用いたパッチ試験を活用できる可能性を示唆することができた。この試験方法は、約100円/個のアボカドから試験用の果肉切片を100個以上取り出すことが可能であることから、一回の試験あたり1円以下でチロシナーゼ阻害活性を有する素材のスクリーニングが可能であり、実験室外で特別な技術を有しなくても卵殻膜へ試料を吸着させて果肉へパッチさせるだけで短時間のうちに評価ができる点において汎用性の高い実験法を確立したと考えている。

これらの成果から、卵殻膜はチロシナーゼの阻害活性とメラニン等の着色に由来する成分の吸着特性の双方の機能によって果肉の劣化を抑える作用を示すことを明らかにした。今後は、これらの結果を応用した複合機能を有する食品添加物として、機能をさらに高めていくことが可能であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) 谷藤尚貴, 小西那奈, 小林周平, 可知佳晃, 卵殻膜の構造的特徴を活用した有機系電解質材料の開発, 査読無, 57巻, 2014年, 10-16頁.

〔学会発表〕(計7件)

(1) 田中美樹, 小西那奈, 小林周平, 可知佳晃, 谷藤尚貴, 卵殻膜の利活用による発電デバイス材料の開発, 第26回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2015年9月2日, 福岡県福岡市.

(2) 田中美樹, 小西那奈, 谷藤尚貴, Effect of Eggshell Membrane on Limiting Food Discoloration, 第26回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2015年9月2日, 福岡県福岡市.

(3) 谷藤尚貴, 田中美樹, 小西那奈, 田原中央利, 卵殻膜によるチロシナーゼ活性阻害とその応用, 日本農芸化学会2015年大会, 2015年3月27日, 岡山県岡山市.

(4) 井田健太郎, 大江ひかる, 西尾幸祐, 谷藤尚貴, 卵殻膜を用いた新しい燃料電池材料の提案, 第25回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2014年9月15日, 広島県広島市.

(5) 大江ひかる, 安部希綱, 谷藤尚貴, 卵殻膜を用いた色素増感太陽電池の開発, 第25回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2014年9月15日, 広島県広島市.

(6) 田中美樹, 大江ひかる, 谷藤尚貴, 卵殻膜を用いた新しい食品添加物の提案, 第25回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2014年9月15日, 広島県広島市.

(7) 小林周平, 小西那奈, 可知佳晃, 谷藤尚貴, 食品廃棄物を用いた天然薄膜の高付加価値利用, 平成26年度廃棄物資源循環学会春の研究発表会, 2014年5月29日, 神奈川県川崎市.

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: 卵殻膜を用いた褐変又は色素沈着抑制方法、卵殻膜を用いた褐変又は色素沈着抑制剤、色素が吸着した卵殻膜、及び色素が吸着した卵殻膜粉末

発明者: 谷藤尚貴

権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構

種類: 特開

番号: 2015-084725

取得年月日: 2015年5月7日

国内外の別: 国内

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷藤尚貴 (Naoki TANIFUJI)

米子工業高等専門学校・物質工学科・准教

授

研究者番号：18750034

(2) 研究分担者

吉川浩史 (Hirofumi YOSHIKAWA)

関西学院大学・理工学部・先進エネルギー  
ナノ工学科・准教授

研究者番号：60397453