

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：37201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350112

研究課題名(和文) 光に安定なクロロフィルナノ粒子の開発と食品への応用

研究課題名(英文) Development of the chlorophyll nano-particles which are stable for light and its application to the food

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：緑色色素であるクロロフィルは光により退色されやすいことが知られている。本研究では、水-アルコール溶液中および界面活性剤を含んだ水溶液中のクロロフィルの化学種の物理化学的特性を調べ、光退色に対してどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。その結果、クロロフィルはモノマーの状態では簡単に退色されたが、ナノサイズの小さな凝集体を形成することで光退色を防ぐことが明らかになった。今後、この技術を利用することで、これまで不可能であったクロロフィルの光退色を防ぎ、きれいな緑色を保った飲料の長期保存が可能になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：It is known that chlorophyll of a green pigment is easily discolored under the light. In this study, we investigated the physico-chemical properties of chlorophyll species in water-alcohol solution and in aqueous solution containing surfactant. And we studied the effect of chlorophyll species on discoloration under UV light. As a result, chlorophyll was easily discolored in the monomer type, but it was revealed that the discoloration of chlorophyll was prevented by the formation of small aggregates of nano-size. In the future, it is thought that it is possible to prevent the discoloration of chlorophyll which was impossible so far by using this technology, and to maintain the green color of green tea and vegetable drink for a long time.

研究分野：食品学

キーワード：クロロフィル 光退色 凝集体 メタノール エタノール 界面活性剤

1. 研究開始当初の背景

緑茶や野菜に含まれる脂溶性の緑色色素“クロロフィル”は、食品の新鮮さや美味しさの重要な要素となっている。しかし、クロロフィルは、光により低分子化合物に分解し、退色することが知られている。特に、食品業界では、ペットボトル入りの緑茶飲料や野菜ジュースなどの光による退色が問題となっている。しかしながら、クロロフィルの退色防止に関する研究は、意外と少なく、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、クロロフィルの光退色に対して、カテキンやα-トコフェロールが有効であることを明らかにした⁴⁾。しかしながら、クロロフィルの光退色を少し遅延させただけで、完全に抑制することはできなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、紫外線 (UV) 照射によるクロロフィルの退色のメカニズムを明らかにし、クロロフィルの光退色を防ぐことである。本研究では、アルコール系溶媒 (メタノール、エタノール) および界面活性剤を用いてクロロフィルを溶解し、クロロフィルの溶液中の化学種に注目した。それぞれの溶液中でのクロロフィルの化学種の物理化学的特性を調べ、光退色に対してどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。

3. 研究の方法

クロロフィルは、クロロフィル-a を用い、アルコール (メタノール、エタノール) または、界面活性剤 (Triton X-100、以下、Triton X) に溶解した。これを用いて、異なるアルコール濃度 (10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%, v/v) および異なる Triton X 濃度 (0.01-0.1%) のクロロフィル溶液 (最終濃度: 1×10^{-5} M) を調製した。サンプルを調製後、それぞれメンブランフィルター (800 μm) にてろ過を行った。サンプル溶液に UV ランプ (SL-800G、フナコシ、波長: 336 nm、強度: 0.7-0.8 mW/cm²) を照射し、時間ごとにそれぞれ色差 (CM-5、コニカミノルタ)、UV-Vis スペクトルの測定を行った。また、クロロフィルの凝集状態については、UV-Vis スペクトル (Ubest-V560、日本分光)、蛍光スペクトル (F-7000、日立ハイテクノロジー)、円偏光二色性 (CD) スペクトル (J-820、日本分光) により調べた。表面張力計 (DY-300、協和界面科学) を用いて Triton X 溶液の表面張力を調べ、溶液中のミセル状態を調べた。クロロフィルの凝集体の粒径の測定は、動的光散乱式粒径分布測定システム (ゼータサイザーナノ、アルバーン) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 水-アルコール混合溶媒

水-メタノール溶液中のクロロフィルに UV

照射を行った結果、図1のように色の変化がみられた。メタノールの濃度が高い場合は、色の変化が著しかった。30-60%のときは照射前からクロロフィルの色が見られなかった。一方、10%メタノールの場合には、色の変化がほとんどなかった。

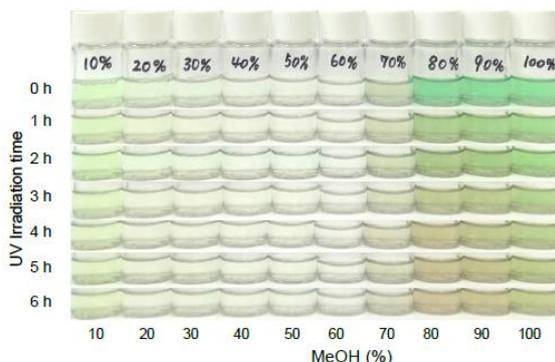


図1. UV 照射による水-メタノール溶媒中のクロロフィルの色の変化

また、色差の-a*値 (緑色度) を測定した結果を図2に示す。80-100%メタノールでは、著しい変化、つまり退色がみられたが、10%メタノールではその変化が遅くなった。

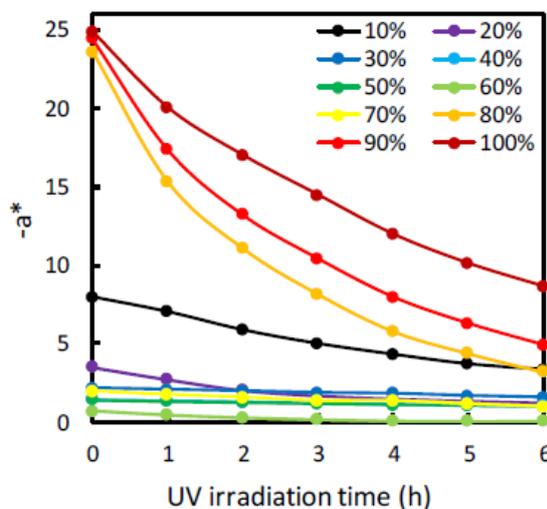


図2. クロロフィルの光照射に及ぼす色差 (-a*値) に対するメタノール濃度の影響 (図中の%はメタノール濃度を示す。)

その要因を調べるため、UV-Vis スペクトルの測定を行った (図3)。クロロフィルは、80-100%では、666 nm にピークをもつモノマー型であるが、メタノールの濃度が低くなるにつれ、そのピークは低くなり、30-60%ではほとんどピークがなくなった。10%ではピークが長波長側にシフトしたが、これは、クロロフィルが凝集体を形成していることを示している。図3中の挿入図は、666 nm の吸光度をプロットしたものであるが、メタノール濃度により、3つの化学種が存在することを示している。

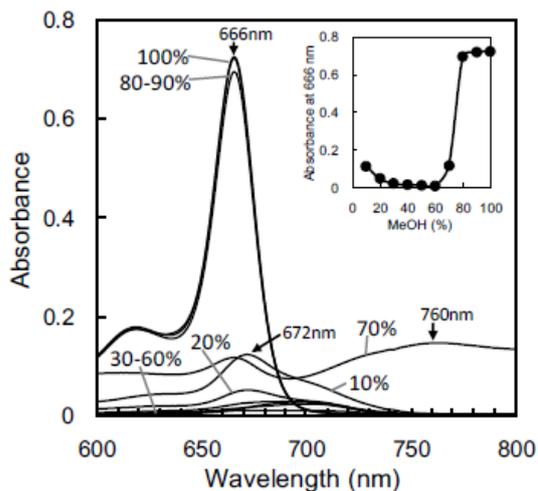


図3. クロロフィル溶液の UV-Vis スペクトル (図中の%はメタノール濃度を示す。)

UV 照射によって、100%メタノール中では、666 nm のピークが大きく減少したが、10%メタノールではその減少速度が小さかった。

さらに、クロロフィルの CD スペクトル測定を行った。その結果、クロロフィルは 60-70%メタノール中で大きな CD 強度を示したことから、これらの溶液中では、クロロフィルは規則正しい J 型の凝集体を形成していることがわかった。

凝集体の粒子径を動的光散乱システムにて測定した (図4)。30-60%のメタノール中では 140-320 nm の大きさであったが、10、20%メタノールではそれぞれ 50、90 nm と小さいことがわかった。

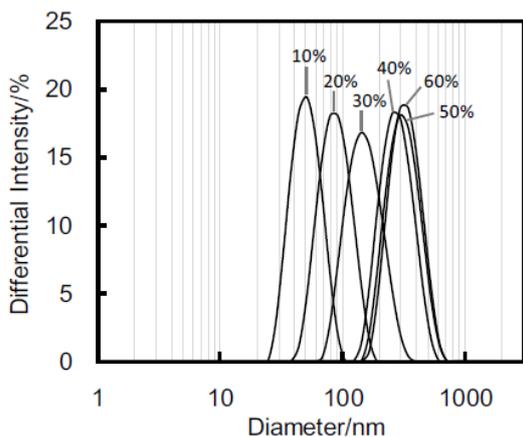


図4. クロロフィル凝集体の粒子径 (図中の%は、メタノール濃度を示す。)

このように、水-メタノール中のクロロフィルは、メタノールが高い場合はモノマーとして存在し、直接光を浴びてすぐに退色するが、メタノール濃度が低い場合はナノサイズのランダムな凝集体を形成し、光からのダメージを防ぐことが示唆された。

水-エタノールの場合も同様の実験を行ったが、水-メタノールの場合と同じような結

果が得られた。ただし、エタノールの方がメタノールよりも高い濃度 (30%以下) で凝集体を形成し、光退色を防いだ。これは、エタノールがメタノールよりも誘電率が低く、クロロフィルの溶解度を高めたためではないかと考えられる。

(2) 界面活性剤

次に、クロロフィルを界面活性剤 (Triton X) に溶解し、水系にて光退色を調べた。クロロフィルの光による退色を調べた結果、低い濃度の界面活性剤を用いた場合、クロロフィルは光に対して非常に安定であることが明らかとなった (図5)。

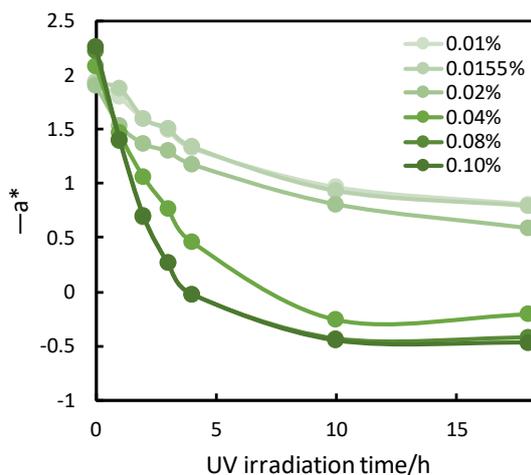


図5. クロロフィルの光照射に及ぼす色差 ($-a^*$ 値) に対する Triton X 濃度の影響 (図中の%は、Triton X の濃度を示す。)

クロロフィル溶液の吸収スペクトルを測定した結果、Triton X の濃度が高いほど 743 nm の吸光度が低くなり、669 nm の吸光度が高くなることがわかった。このことから、Triton X の濃度が高まると共にクロロフィルの凝集体が減少し、モノマーが多く形成されることが明らかになった。蛍光スペクトルや CD スペクトルの実験からも、同様の結果が確認された。また、表面張力の測定結果から、Triton X の濃度が 0.02%以上で表面張力が減少し、モノマーのクロロフィルを包み込んだ界面活性剤のミセル化が生じていることが示唆された。

さらに、クロロフィルの粒子径を調べた結果、Triton X の濃度が低い場合は粒子径が小さく、約 100 nm であることがわかった。Triton X の濃度が高まるとともに、粒子径は大きくなった。

以上のことから、クロロフィルは、モノマー分子が完全にミセル化した状態ではなく、ミセル化する前のクロロフィル同士が集合した状態で、100 nm 程度の小さな凝集体を形成することで光に対する保護効果を示すと考えられる。また、他の界面活性剤についても検討を行っている。

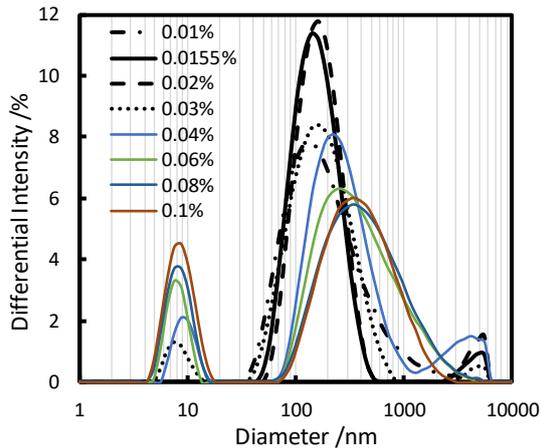


図5. クロロフィル凝集体の粒子径
(図中の%は、Triton Xの濃度を示す。)

(3) まとめ

本研究により、クロロフィルの光による退色作用について調べた。その結果、クロロフィルはモノマーまたはミセル化されたモノマーの状態では簡単に退色されることがわかった。しかしながら、ランダムでナノレベルの小さな凝集体を形成することで光退色を防ぐことが明らかになった。これは、水分子を排除したクロロフィル分子間の疎水性相互作用によるものと考えられる。私たちの研究は、クロロフィルの小さなサイズのランダムな凝集体が、光に起因するクロロフィルの退色を抑制できることを初めて示している。今後、この技術を利用することで、これまで不可能であったクロロフィルの光退色を防ぎ、きれいな緑色飲料の長期保存が可能になるとと思われる。

<引用文献>

- 1) 瀬戸美江他, 調理科学, 23, 392-396 (1990)
- 2) Wang J. et al., Ultrasonics Sonochem., 18, 1028-1034 (2011)
- 3) Chen B. H., Food Chem., 62, 299-307 (1998)
- 4) 尾崎加奈, 安田みどり他, 日本食品保蔵科学会誌, 32, 263-268 (2006)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① 安田みどり, 圧力差を利用した急速加減圧抽出法と緑茶への応用, フードケミカル, 査読有, vol.9, 2016, pp. 3-7, <https://ci.nii.ac.jp/naid/40020958585>
- ② 安田みどり, 中多啓子, 大城あゆみ, 山内良子, 相浦正文, 塚本敏朗, 林伊久, 石川洋哉, 急速加減圧抽出法による緑茶有用性成分の抽出とその抗酸化活性・保

存性評価, 食品保蔵科学会誌, 査読有, vol. 41, 2015, pp. 191-198, <https://ci.nii.ac.jp/naid/40020628911>

〔学会発表〕(計11件)

- ① 安田みどり, 田端正明, クロロフィルの光退色に及ぼす凝集体形成の影響, 日本農芸化学会2018年大会, 2018年
- ② 安田みどり, 豆野博一, 梶原健太, 田端正明, ナノサイズのクロロフィル凝集体の光安定性, 日本食品科学工学会第64回大会, 2017年
- ③ Midori Yasuda, Masaaki Tabata, Color retention of green tea using the aggregation effect of chlorophyll, The 19th ARAHE Biennial International Congress, 2017
- ④ 安田みどり, 田端正明, 界面活性剤によるクロロフィルの光退色抑制効果, 日本食品科学工学会第63回大会, 2016年
- ⑤ Midori Yasuda, Masaaki Tabata, Prevention of the photobleaching of chlorophyll using antioxidants and surfactant Triton X-100, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), 2015
- ⑥ Midori Yasuda, Masaaki Tabata, Changes in the dissolved state of chlorophyll-a in an aqueous solution using Triton X-100, 6th Asian Conference on Colloid and Interface Science (ACCIS 2015), 2015
- ⑦ 安田みどり, 田端正明, クロロフィルの凝集状態と光に対する安定性に及ぼす界面活性剤の影響, 日本食品保蔵科学会創立40周年記念大会, 2015年
- ⑧ 田端正明, 安田みどり, 織田恵輔, 志戸瑠梨, クロロフィル a の水-メタノール中の溶媒組成による溶存状態の変化, 錯体化学会第65回討論会, 2015年
- ⑨ 安田みどり, 田端正明, 界面活性剤によるクロロフィルのミセル化と光退色に対する効果, 日本農芸化学会2015年度大会, 2015年
- ⑩ 安田みどり, 織田恵輔, 田端正明, クロロフィルの凝集性に及ぼす溶媒の効果と光に対する安定性, 日本食品科学工学会第61回大会, 2014年
- ⑪ 安田みどり, 織田恵輔, 田端正明, クロロフィルの凝集状態と光に対する安定性について, 日本食品保蔵科学会第63回大会, 2014年

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

田端 正明 (TABATA, Masaaki)

佐賀大学・工学(系)研究科・研究員

研究者番号：40039285