

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：37201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500946

研究課題名(和文) 緑色食品中のクロロフィルの光による退色と活性酸素生成の抑制・防止に関する研究

研究課題名(英文) Studies on suppression and prevention of active oxygen generation and discoloration of chlorophyll in green food by light irradiation

研究代表者

安田 みどり (Yasuda, Midori)

西九州大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：20279368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：緑茶や野菜の緑色色素であるクロロフィルは、光により分解して退色することが知られている。本研究では、クロロフィルの光による退色防止を目的として、抗酸化物質の添加等について検討を行った。その結果、 $\alpha$ -トコフェロール等の脂溶性の抗酸化物質にクロロフィルの光退色を防止する効果が認められたが、根本的な解決には至らなかった。一方、クロロフィルは、溶媒や共存物質により凝集体を形成することがわかった。クロロフィルは、類似の構造である銅クロロフィリンナトリウムと相互作用を行い、水-メタノール混合溶媒の水が多い状態では、混合凝集体の形成が考えられ、クロロフィルの光照射によるダメージを軽減することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that chlorophyll which is a green pigment in green tea and vegetables discolors by light irradiation. The purpose of this study is to prevent the discoloration of chlorophyll by light. At first, we examined the effect of antioxidants. As a result, hydrophobic antioxidants like tocopherol prevented a little discoloration of chlorophyll, but did not lead to basic solution. On the other hand, it turned out that chlorophyll formed aggregate by solvent and coexistence substance. Chlorophyll interacted with sodium copper chlorophyllin which is similar structure as chlorophyll, and the water-rich condition of the water-methanol mixture solvent produced the mixture aggregation of chlorophyll and sodium copper chlorophyllin. These were suggested to reduce the damage by light irradiation of chlorophyll.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食品 クロロフィル 光退色 活性酸素 凝集

## 1. 研究開始当初の背景

植物や藻類に含まれる緑色色素クロロフィルは、太陽の光を吸収し、生きるためのエネルギーを獲得している。クロロフィルは、ポルフィリン骨格を有する化合物で、中心にマグネシウムが配位した構造をしており、自然界ではクロロフィル a~d が存在している。クロロフィルは、酸、アルカリ、酵素、光に不安定であることが知られている。特に、光照射を受けると、低分子化合物に分解され、最終的には無色になる。

近年、緑茶飲料のペットボトルの消費量が增大している。発売当初は、緑茶のイメージを考慮して緑色のペットボトルがほとんどであったが、着色容器はリサイクルシステムの障害となることから、2001 年から無色透明の容器に統一された。消費者側からも、中身を見て安全性を確認し、好みを選択できるというメリットがある。これは、緑茶飲料に限らず、海苔等の加工食品についても同様の傾向がある。しかし、容器の透明化に伴い、光による嗜好性および品質の低下が大きな問題となっている。実際、市販されているほとんどの緑茶飲料の色は茶色になっており、本来の美味しそうな緑色を呈していない。

クロロフィルは、光照射により分解して低分子化するだけでなく、光増感作用を引き起こし、活性酸素の一つである一重項酸素 ( $^1O_2$ ) を発生する。これは、非常に反応性が高く、脂質の酸化をはじめ、DNA の損傷等様々な病気の引き金となる。つまり、クロロフィルは自ら分解してなくなるだけではなく、活性酸素まで引き起こすというやっかいな物質である。

## 2. 研究の目的

緑茶や野菜の緑色色素であるクロロフィルは、光に対して不安定であり、食品の品質や機能性の低下を招いている。クロロフィルの光分解は、光を遮断することで防止できるが、容器のリサイクル化や中身を見て商品を選択したいという消費者ニーズに対応するため、透明容器にて販売されている。そのため、「緑茶の美しい緑色を保ちたい」というのは、食品業界での長年の課題である。クロロフィルの光分解には、活性酸素が関与していることから、抗酸化物質によりクロロフィルの光分解作用を防止できないか、また、クロロフィル中のマグネシウムと他の金属との置換反応により、緑色を安定化できないか等について検討を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) クロロフィルの測定

クロロフィルは、クロロフィル-a を用い、紫外線 (365 nm) を照射し、その後のクロロフィルの残存率を蛍光光度計または HPLC により調べた。また、抗酸化物質や金属イオン等により、クロロフィルの光退色を抑えるかについて検討を行った。

### (2) 一重項酸素の測定

一重項酸素の測定には、選択的に一重項酸素と反応する性質を示す SOSG 試薬 (Singlet oxygen sensor green) を用いた。SOSG が一重項酸素と反応した際には、 $E_x/E_m = 504/525$  nm の蛍光を発するため、このときの蛍光強度の増加量を一重項酸素の発生量とした。紫外線の照射前後にサンプリングした溶液の蛍光強度をそれぞれ測定した。

### (3) クロロフィルと銅クロロフィリンナトリウムの相互作用

クロロフィルと類似した骨格をもち、相互作用を起こしやすい食品添加物である銅クロロフィリンナトリウム (Cu-Chl-Na) について検討した。また、水とメタノールの混合溶媒を用いて、光退色に及ぼす溶媒の影響についても分光光度計、蛍光光度計および円偏光二色分散計 (CD) にて調べた。

### (4) 粒径の測定

クロロフィル-a 溶液中の凝集体の粒径は、ゼータ電位・粒径測定システム (ELSZ-1、大塚電子) を用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) クロロフィルの退色作用

様々な保存条件におけるクロロフィルの退色作用について調べた。光の影響について調べた結果、紫外線または可視光線を照射したものは、数日後にクロロフィルが消失したが、遮光により 2 か月間退色を防ぐことが可能であった。温度の影響については、4 保存では、2 か月後までほとんど変化がなかったが、25、40 と温度が高くなるに従い、クロロフィル残存率は低下した。さらに、酸素濃度の影響については、光や温度による影響ほどは強くなかったが、酸素濃度が高いものが他に比べてより退色しやすくなった。つまり、クロロフィルは、酸素 < 温度 < 光の順に影響を受けやすいことが明らかとなった。

### (2) 抗酸化物質の抗酸化性に及ぼすクロロフィルの影響

クロロフィルは、光により低分子に分解されて最終的には無色になる。これは、クロロフィルの酸化によるものであることから、この現象を防止するため、様々な抗酸化物質を添加し、クロロフィルの安定性を調べた。紫外線照射 3 時間後には、クロロフィル-a は 40% まで減少した。抗酸化物質を添加しても、クロロフィル-a のみの場合とあまり変わらなかった (図 1)。したがって、クロロフィル-a と同濃度の抗酸化物質には、クロロフィル-a の光退色抑制作用はほとんどないと考えられる。しかし、 $\alpha$ -トコフェロールと  $\beta$ -カロテンについては、濃度が高くなるほど、クロロフィル-a の高い残存率がみられたことから、脂溶性の抗酸化物質である  $\alpha$ -トコ

フェロールと  $\beta$ -カロテンにはクロロフィルの光退色抑制作用があることが分かった。しかしながら、根本的にクロロフィル-aの光退色を抑えているとは言えなかった。

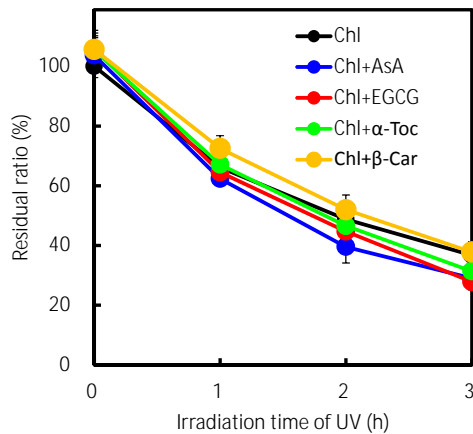


図1 クロロフィル(Chl)の光退色に及ぼす抗酸化物質の影響

### (3) クロロフィルと金属イオンによる錯体形成反応

クロロフィルは、ポリフィリン環の中心に  $Mg^{2+}$  が配位した構造を示し、照射によって  $Mg^{2+}$  が外れやすい。そこで、別の金属イオンを添加し、 $Mg^{2+}$  との置換反応により安定な金属クロロフィルを形成するかについて調べた。その結果、いずれの金属イオンについても光退色抑制効果が認められなかった。

### (4) 一重項酸素の関与

SOSG 試薬を用いて、クロロフィルが光分解する際に一重項酸素を放出することを確認した。一重項酸素は、照射時間に依存して増加した。抗酸化物質、金属イオンのうち、 $\alpha$ -トコフェロールに、一重項酸素の発生の抑制作用が認められた(図2)。特に、光増感反応は、食品の劣化に影響を及ぼすものであるため、 $\alpha$ -トコフェロールは、色の保持と食品の劣化防止に寄与する物質であると言える。

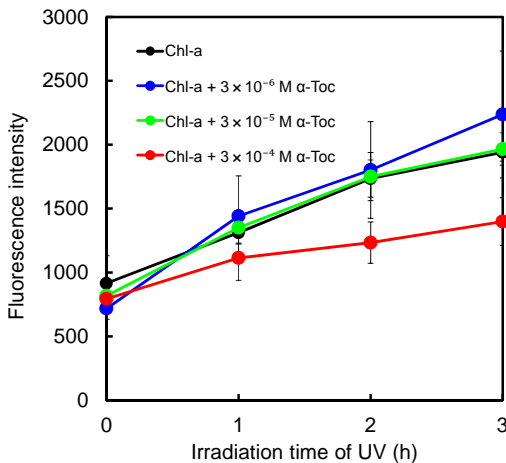


図2  $\alpha$ -トコフェロール( $\alpha$ -Toc)による一重項酸素の抑制作用

### (5) 溶媒の影響

異なる割合の水とメタノールの混合溶媒でのクロロフィルの光による影響を調べたところ、メタノールの割合が高いほどクロロフィルの光による退色が起こりやすいことが明らかとなった。さらに、水-メタノール溶媒におけるクロロフィル-aの蛍光強度、可視吸収スペクトル、円偏光二色性スペクトルを調べた。メタノールが多い溶媒では、クロロフィル-aは溶解するが、水の割合が増えると、凝集を起こすことが明らかとなった。この凝集体は、60、70%メタノールのときに最も多く形成していた。この凝集状態には規則性があり、J会合体の形成も確認された。

### (6) 銅クロロフィリンの添加

水溶性の食品添加物である銅クロロフィリンナトリウム(CuChl-Na)を添加した場合、クロロフィルの光による分解がさらに抑制された。また、クロロフィルの蛍光強度を測定した結果、水-メタノールの割合に影響されることが明らかになった(図3)。銅クロロフィリンナトリウムは、いずれの溶媒においても蛍光強度を示さなかったが、クロロフィルおよびそれらを混合したものは、60%メタノールからメタノールの割合が増すほどに蛍光強度が高まった。クロロフィルに銅クロロフィリンナトリウムを添加することで、クロロフィルの蛍光強度が減少したことから、クロロフィルと銅クロロフィリンナトリウムが相互作用していることが示唆された。

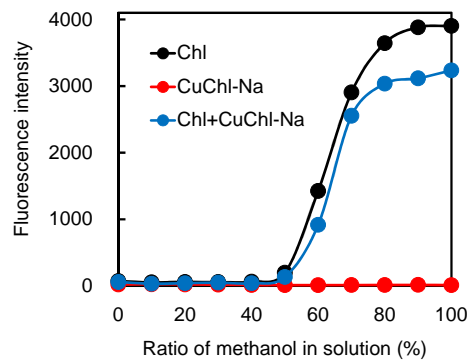


図3 クロロフィルの蛍光強度に及ぼす溶媒の影響

クロロフィルに銅クロロフィリンナトリウムを加えたものについて、動的光散乱法にて粒径を測定したところ、クロロフィルのみの場合よりも銅クロロフィリンを添加した場合の粒子径が大きくなっていた。これは、銅クロロフィリンナトリウムとクロロフィルとが疎水性相互作用し、凝集体を生成することを示唆している。そこで、クロロフィルの凝集モデルを図4のように考案した。クロロフィルは、メタノール中では、完全に分散した状態で光の影響を直接受け、光退色作用を引き起こす。60%メタノール付近では、CDスペクトルに顕著なピークがみられたこと

から、クロロフィル自身の規則的なJ会合体が形成していることが考えられる。しかし、これでは、クロロフィルの光退色を抑えることができない。一方、水がリッチな状態では、クロロフィルと銅クロロフィリンナトリウムとの混合凝集体の形成が考えられ、これはクロロフィルを銅クロロフィルナトリウムが包み込んだ状態となり、クロロフィルの光照射によるダメージを軽減すると考えられる。このように、クロロフィルの光退色には溶液中の凝集状況が大きく関与していることが示唆された。

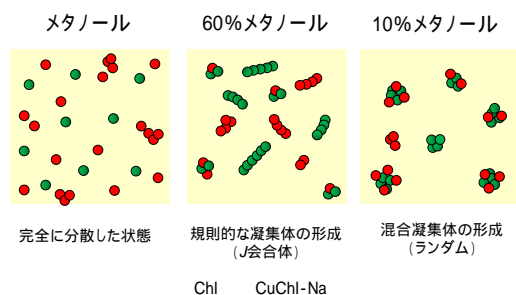


図4 クロロフィルの凝集モデル

#### (7) まとめ

以上のことより、クロロフィルの光退色を防止するためには、温度や酸素などの保存条件、抗酸化物質の添加が有効であると考えられるが、長期的な保存に対しては効果が見られず、根本的な方法とは言えない。他の有効な防止策として、凝集体の形成があげられる。今回、クロロフィルと構造が類似した銅クロロフィリンナトリウムとの相互作用や溶媒による凝集体の形成が認められた。しかしながら、凝集体の形成が不安定で、完全に防止できたとはいえない。そこで、クロロフィルを光から守るようなクロロフィルナノ粒子の開発等が効果的ではないかと思われる。今後、クロロフィルの美しい緑色を長く保持するための研究の進展に期待したい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Midori Yasuda, Chika Matsuda, Ayumi Ohshiro, Kuniyo Inouye, Masaaki Tabata, Effects of metal ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ ) on HPLC analysis of catechins, *Food Chemistry*, **133**, 2012, 518-525, DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.01.018  
 Midori Yasuda, Kenichiro Yasutake, Madoka Hino, Hitomi Ohwataria, Nozomi Ohmagaria, Kazumi Takedomi, Takashi Tanaka, Gen-ichiro Nonaka, Inhibitory effects of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on glycolytic enzymes and postprandial blood glucose elevation in mice, *Food Chemistry*, **165**, 2014, 42-49, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.083

[学会発表](計 10件)

Midori Yasuda, Chika Matsuda, Ayumi Ohshiro, Kuniyo Inouye, Masaaki Tabata, Effects of metal ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) on HPLC analysis of catechins, IUPAC International Congress on Analytical Science 2011(ICAS 2011), 2011年5月24日(京都)

大城あゆみ、安田みどり、比嘉尚希、林伊久、石川洋哉、浸透圧式抽出法による新規緑茶の開発、第48回化学関連支部合同九州大会、2011年7月9日(福岡)

安田みどり、中多啓子、大城あゆみ、石川洋哉、林伊久、相浦正文、塚本敏朗、急速加減圧式抽出技術による新規緑茶の開発、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日(京都)

安田みどり、中多啓子、大城あゆみ、田端正明、石川洋哉、林伊久、相浦正文、塚本敏朗、緑茶リキュールの保存中のクロロフィルの変化、日本食品保蔵科学会第61回大会、2012年6月22日(大阪)

織田恵輔、安田みどり、中多啓子、大城あゆみ、石川洋哉、林伊久、相浦正文、塚本敏朗、急速加減圧式抽出技術による新規緑茶リキュールの開発、第48回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日(福岡)

織田恵輔、安田みどり、中多啓子、大城あゆみ、石川洋哉、林伊久、相浦正文、塚本敏朗、クロロフィルの光退色作用に及ぼす抗酸化物質の影響、平成24年度日本農芸化学会西日本支部大会、2012年9月29日(鹿児島)

安田みどり、織田恵輔、上田敏久、田端正明、クロロフィルの光退色の抑制に関する研究、日本食品科学工学会第60回記念大会、2013年8月30日(東京)

織田恵輔、安田みどり、田端正明、上田敏久、クロロフィルの光による退色および活性酸素生成の抑制に関する研究、2013年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会、2013年9月6日(広島)

織田恵輔、安田みどり、田端正明、上田敏久、抗酸化物質によるクロロフィルの光退色及び一重項酸素の抑制作用、佐賀・茶学会第1回研究発表会、2013年11月30日(佐賀)

織田恵輔、安田みどり、田端正明、上田敏久、クロロフィルの光退色に及ぼす溶媒の影響、日本農芸化学会2014、2014年3月29日(東京)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安田 みどり (YASUDA, Midori)  
 西九州大学・健康福祉学部・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(研究院)・

研究員

研究者番号：40039285