

特別賞

卵殻膜を食品の褐変抑制用添加物
に応用する研究

東京海洋大学 海洋科学部
食品生産科学科 3 年

田中 美樹

1. 緒 言

「食」は生命活動の維持や日常生活で心の豊かさに彩りを与えるために必要不可欠であり、一般生活において高品質かつ安全な食品供給は常に求められている。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廃棄量は日本の米の生産量とほぼ同等のスケールである500～800万トンあり、このような食品ロスを削減することは大きな課題となっているが、そのロスを完全に解消することは困難である[1]。この問題に対する有効手段の一つとして食品添加物があり、それを使用して食品の保存性を高めることで廃棄量の減少は期待できる。

そこで本研究では、食品廃棄物である卵殻が本来有している「雛が孵化するまで中身を腐敗させずに生命を守る」という機能に着目して、これを「別の対象物も守る力」を有するものとして食品を劣化から守る添加物に応用できると着想をすることにより、卵殻の内皮(=卵殻膜)を、食品劣化の中で見た目の商品価値を低下させる因子である褐変を抑制する添加剤として機能させることを目指した。

2. 疑問と課題

食品添加物は、それを用いる食品の保存性および嗜好性を向上させる等の目的で使用されており、食品の品質維持には、腐敗・変敗を抑制して食中毒を減らす役割を持つものや酸化による品質劣化の抑制[2]、保存期間が短期のものの日持ちを延長させる[3]などの効果が期待されており、これらの機能をもった添加物は多岐に渡って研究され、製品化が進められている。その一方で、安全性の是非を問う議論をされる化学物質も存在しており[4]、世間一般では食品添加物を摂取することで人体に悪影響を及ぼすのではないかとという悪印象を受けがちである。しかし、安全であるというイメージを消費者に持たせている無添加食品では、品質劣化の進行が速くて食中毒のリスクが高まるほか、廃棄も速くなるために廃棄コストの増大による経済的損失にも繋がる新たな問題が生じてしまう[5]ため、人々が抵抗感を抱かない安全かつ効果の高い食品添加物の開発は必要である。我々は実験対象として、アボカド果肉の劣化に注目した。アボカドは近年人気の食材であるが、果肉の加工直後から速やかに褐色色素の沈着が起こる「褐変」という現象が起きやすい(図-1)ため、加工直後の製品と同様の色彩形状で商品を店頭に出すことは困難な作物だとされている。この果肉の劣化を抑制することができると、加工食材の市場拡大やその他の食材の品質保持に対しても応用が期待できる技術になり、それは食品ロスを抑制して豊かな食生活への貢献に繋がると考えた。

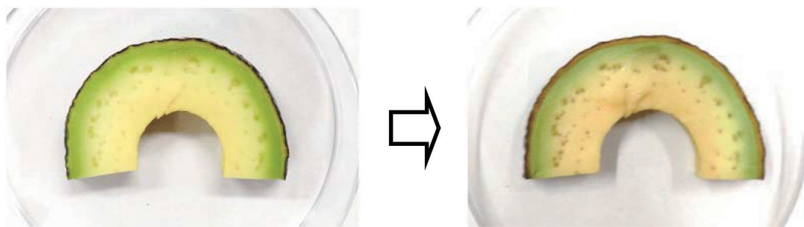


図-1. アボカド果肉の時間経過による劣化(左：切り出し直後、右：室温で6時間経過)

3. 実 験

3.1 本研究で用いた試料、試薬、装置

<食品試料>

卵殻膜(食用鶏卵から内部を除いて30%酢酸に1日浸漬させた後によく水洗したもの)、アボカド

<褐変抑制試験>

イオン交換水(栗田テクニカルサービス会社製のデミエース DX-25型で製造したもの)、株式会社製セラミック包丁青刃、イワキ株式会社製滅菌プラスチックシャーレ、ヤマト科学製恒温器 Program Incubator IN800、ツインバード株式会社製蛍光灯スタンド半導体式 LK-H483型

<添加物導入試験>

食用青色1号、食用青色2号、食用緑色3号、食用黄色4号、食用黄色5号、食用赤色3号、食用赤色106号、クルクミン、ケルセチン(全て東京化成製)

<酵素活性試験>

アズワン株式会社製 ANALOG BATH EW-100、ナカライテスク製0.1mol/L-りん酸緩衝液、SIGMA 製3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine、Tyrosinase from mushroom、日本分光株式会社製紫外可視分光光度計 V-560、アズワン社製ディスポセルセミクロタイプ

3.2 卵殻膜によるアボカドの褐変抑制機能の検証と評価

アボカドは、果肉の切片において酵素的褐変由来の色素沈着が速やかに起こることが知られている[6]。この果肉の変色を防ぐ方法として、一般的にはpHを変えて酵素の活性を下げることにより、劣化の進行を抑制しているが、これ以外の抑制方法は確立されていない。しかし、この化学的手法ではアボカドの風味や食感を変えてしまい、嗜好性が低下してしまう欠点が存在する。そこで、果肉の維管束部分で特にみられる迅速な劣化について卵殻膜の示す機能により抑制することを期待した上で、褐変抑制効果の検証試験を行うことにした。卵殻膜は化学物質を吸着する特性を持っていることから、この機能を卵殻膜が添加物を保存するための手段としても用いてみることにした。

3.2.1 卵殻膜による褐変抑制効果の検証

- 1) イオン交換水に浸漬した卵殻膜(2.5cm × 3.5cm)をシャーレに置いた。
- 2) その上にセラミック包丁で2cm × 1cm × 0.5cm 角にカットしたアボカド片をのせて、アボカドで最も色素の沈着する維管束付近を完全に覆い、シャーレ内へ入れた。
- 3) 蛍光灯照明下の室内で果肉部に生じた色彩変化を、膜で覆っていない果肉と比較しながら目視で観察した。

3.2.2 食品色素を導入した卵殻膜による褐変抑制効果の評価

- 1) 各種食品色素を 5.0×10^{-6} mol/L水溶液に調製し、そこへ卵殻膜を5~10分間浸漬させた。
- 2) 色素を吸着した卵殻膜を引き上げ、表面をイオン交換水で洗浄して実験3.2.1と同様の操作でアボカド果肉が劣化する様子を経時的に観察した。

3.2.3 卵殻膜へ沈着させた色素量に伴う褐変抑制機能の評価

＜吸着時間に伴う色素量別の評価＞

1-1) 青色1号、緑色3号をそれぞれ 5×10^{-6} mol/L に調製した水溶液へ卵殻膜を1、5、10 分間浸漬させた後、膜を引き上げた。

1-2) 1-1)の膜について実験3.2.1の2)と同様の操作を行い、20℃の恒温器内で果肉の変化を観察した。

＜浸漬させる色素水溶液の濃度別の評価＞

2-1) 青色1号、緑色3号をそれぞれ 1×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L に調製した水溶液へ10分間卵殻膜を浸漬させた後、膜を引き上げた。

2-2) 1-2)と同様の評価を行った。

3.3 チロシナーゼ阻害活性評価試験

アボカドの褐変はアミノ酸のチロシンが酸化酵素であるチロシナーゼの作用によって酸化、重合して生じる褐色の有機成分であるメラニンの沈着に由来していることが分かっている。そこで、実験3.2までは目視による変色の判定を行ってきたが、卵殻膜に導入した食品色素がチロシナーゼにもたらす影響について数値で比較するために酵素活性試験[7]を実施した。これまでの劣化抑制評価の結果は、データにばらつきがあり、それは低濃度及び短時間で色素を吸着させた卵殻膜を用いた試験において顕著に見られたため、我々はこれを卵殻膜の個体差に由来するものと予想して、卵殻膜には褐変を抑制する因子が存在するのではないかと考えた。そこで、卵殻膜から水で抽出処理をした成分についても酵素活性試験を行い評価した。

3.3.1 卵殻膜に導入した色素で生じた効果に関する酵素活性試験を用いた検証

- 1) 2.5mmol/L L-DOPA 溶液とチロシナーゼ酵素溶液(酵素15.65unit/0.25ml)を調製した。
- 2) 青色1号と緑色3号をそれぞれ 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} mol/L 水溶液に調製して試料溶液とした。
- 3) 0.1mol/L りん酸緩衝液5.0mL、L-DOPA 溶液2.0mL、DMSO 0.25mL、試料溶液1.0mLを加えて振とうし、25℃で15分間保温後、チロシナーゼ酵素溶液0.25mL 加えて25℃で5分間反応させた。
- 4) 3)の操作後、直ちに分光光度計で吸光度(測定波長475nm)を測定した。これをチロシナーゼ活性阻害活性測定(C)とした。チロシナーゼ活性測定(A)はりん酸緩衝液6.0mL、L-DOPA 溶液2.0mL、DMSO 0.25mL、チロシナーゼ酵素溶液0.25mL、ブランク測定(B)はりん酸緩衝液6.25mL、L-DOPA 溶液2.0mL、DMSO 0.25mL、試料液測定(D)はりん酸緩衝液5.25mL、L-DOPA 溶液2.0mL、DMSO 0.25mL、溶液1.0mLをそれぞれ入れ振とうしたものの吸光度をそれぞれ測定した結果を下式に代入してチロシナーゼ阻害率を計算した。

$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \{(C \text{ 吸光度} - D \text{ 吸光度}) / (A \text{ 吸光度} - B \text{ 吸光度}) \times 100\}$$

3.3.2 卵殻膜の水抽出成分における酵素阻害活性試験の評価

- 1) 卵殻膜100mgを純水10mLに一日間浸漬させた後、卵殻膜を引き上げた。これを卵殻

膜の水抽出液とした。

- 2) 1)の溶液を試料溶液として実験3.3.1と同様に酵素活性試験を行い、卵殻膜抽出成分におけるチロシナーゼ活性の阻害率を算出した。

3.3.3 卵殻膜から得られる抽出物の重量測定

- 1) 卵殻膜100mgを純水10mLに一日浸漬させた。
- 2) 1)の抽出液をホットプレートで100℃で加熱し、抽出物を析出させて真空乾燥した。
- 3) 抽出物を秤量して重量%を算出した。

3.4 卵殻膜を実用的な食品添加物とするための加工試験

これまでの結果をふまえ、最終的に卵殻膜を実際に食用として用いる場面を想定すると、殻から取り出したそのままの膜では食感に違和感があり、風味への影響が生じてしまうことで、もとの食材の味が損なわれてしまう恐れが十分に有ることから、加工処理が必要であると考えた。そこで、膜を口に入れた際の違和感を無くするための薄膜化を行うことにした。また、今回見出した機能がアボカド以外の食品の褐変にも有効であるという多様性を見出すために、アボカド同様酵素的褐変による劣化の速いリンゴとゴボウも比較対象として、先と同様のパッチ試験による劣化抑制評価を行った。

3.4.1 卵殻膜の薄膜化及び劣化抑制試験の評価(図-2)

- 1) 卵の鋭端部に穴を開けて30%酢酸に1日間浸漬させた後、膜が2層に分かれた気室から手で剥離して2層に分離した。
- 2) 分離した2層のうち、内卵殻膜を液体窒素で凍らせてピンセット等で粉碎して、微粉末化した。
- 3) アボカド切片に2)の粉末をふりかけて、実験3.2.1と同様に劣化抑制の評価を行った。また、ふりかける処理を行ったアボカドを食すことで、評価を行った。



図-2. 卵殻膜の薄膜化・微粉末化の工程

3.4.2 その他の褐変する食材への応用

- 1) リンゴとゴボウの果肉切片を切り出し、イオン交換水で湿潤させた卵殻膜を果肉部に貼付した。
- 2) 室内照明下(25℃)で実験3.2.1と同様に経時観察を行った。

4. 結果と考察

4.1 卵殻膜によるアボカドの褐変抑制機能の検証と評価

アボカド果肉の褐変による劣化は維管束の色づきを指標として、薄茶色に着色した時点を開始とみなし(図-3)、その劣化開始時間の比較をすることで褐変抑制効果を評価した。卵殻膜を被覆したアボカド果肉は無処理の果肉と比べて3時間程度褐変が抑制されていた(表-1)ことから、果肉の表面は無処理の果肉に見られる褐色色素の沈着が抑制されていることが分かった。このとき、被覆していた卵殻膜に本来アボカド果肉で見られる褐色色素の沈着が見られたことから、果肉上で生成されたメラニン等褐色成分が卵殻膜に移動して吸着されている(図-4)ことも、劣化抑制に寄与していると予想される。

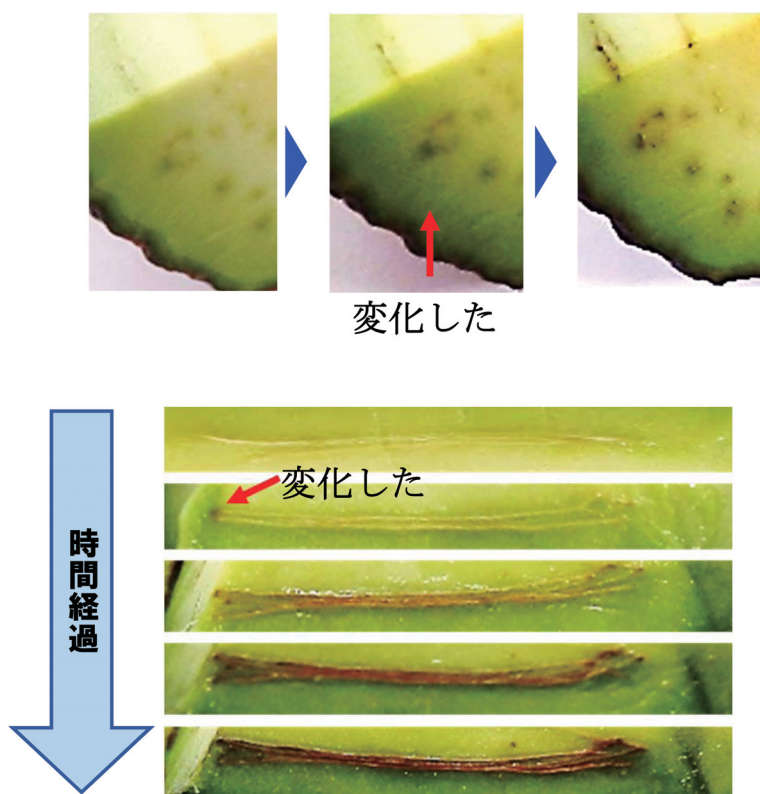


図-3. 維管束の着色による褐変開始の判断基準

表-1. 卵殻膜の被覆によるアボカド表面の着色劣化が開始する時間(25℃)

	卵殻膜有り	卵殻膜無し
劣化時間	3h	20min

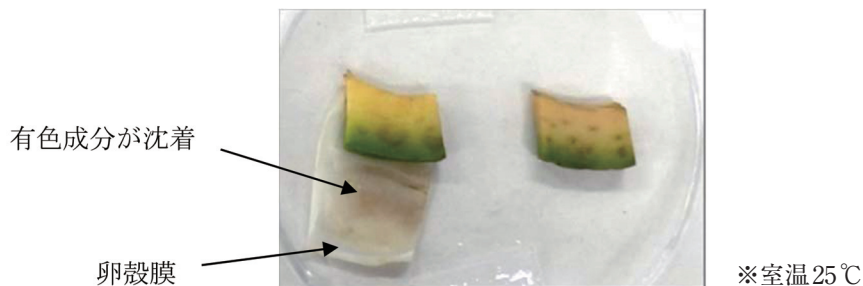


図-4. 卵殻膜被覆における5時間後のアボカド果肉の変化(左：卵殻膜被覆、右：未処理)

褐変抑制効果をさらに強化する試みとして、あらかじめ食品色素を吸着させた卵殻膜でも同様の抑制試験を行った。その結果、導入した色素の種類によっては褐変をより強く抑制する効果が見られた(図-5、表-2)。無添加の卵殻膜と比較して褐色色素の沈着量は少なく、果肉部分全体の保存にも好影響を及ぼすことから、食品色素は単に見た目を良くするだけでなく、褐変に関する反応自体を抑制する効果が有ることが予想された。さらに色素の分子構造を見直すと、抑制効果の有る色素はフェノール性水酸基という共通の構造を有していることに気付いた。青色1号と緑色3号は、OH基の有無以外は全く同じ分子構造である(図-6)が、OH基を有する緑色3号に抑制効果があった。褐色成分のメラニン、アミノ酸のチロシンが酸化酵素であるチロシナーゼの作用によって酸化、後に重合して生成される。このチロシンはフェノール性水酸基を持っており、この部分構造が酵素の活性部位と相互作用するために、フェノール性水酸基を有する緑色3号はチロシンと競合して、チロシン→DOPA→ドーパキノンへと変換される化学反応[8]を妨げることで最終生成物のメラニンへの重合を抑制し、結果としてアボカド果肉の褐変を抑制したと考えている。この現象は、卵殻膜に蓄えられた色素が長時間にわたり少量ずつ果肉へ浸透したために、長期間の品質保持が可能になったと考えている。しかしながら、この実験で抑制効果が認められた緑色3号、黄色4号は有害性が指摘されている人工色素であることから、天然で無害の色素であるカレーの色素のクルクミンと茶葉の成分であるケルセチンについても検討したところ、これも褐変抑制効果を示すことが分かった。両色素の分子構造には緑色3号同様にフェノール性水酸基が含まれていることから、先と同様の作用を示したと考えられる。



図-5. 食品色素を導入した卵殻膜被覆における6時間後のアボカド果肉の変化
(左から赤色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)

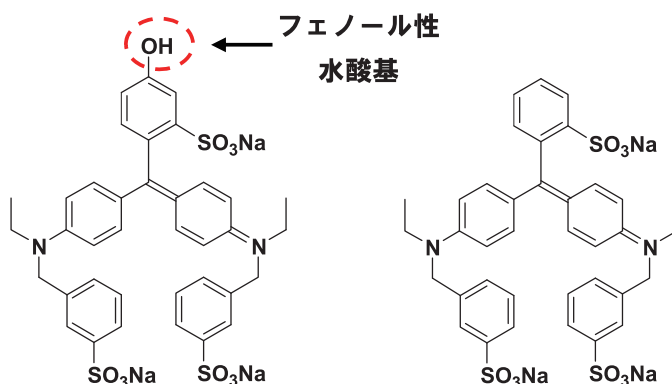


図-6. 食品色素の分子構造(左：緑色3号、右：青色1号)

表-2. 卵殻膜に導入した色素の違いによるアボカドの劣化開始時間の変化

劣化開始時間	
卵殻膜無し	1h
添加物なし	3h
緑色3号	<u>8h</u>
青色1号	3h
青色2号	3h
黄色4号	<u>8h</u>
黄色5号	5h
赤色3号	3h
赤色106号	3h
クルクミン	5h
ケルセチン	4h

これらの結果から、卵殻膜には添加物を貯蔵して放出できる仕組みが有り、それも有効に作用させられることが確認できたので、次に色素水溶液に浸漬させる時間とその水溶液濃度の違いで吸着させる食品色素量の違いによる褐変抑制効果量の影響を検証した。色素の種類、予想される吸着量を変える方法で比較実験を行ったところ、吸着時間が長く、色素水溶液濃度が濃い溶液で処理した試料ほど抑制効果が強いことが確認できた(表-3、表-4)。この結果は、卵殻膜へ吸着されてからリリースされた色素分子がメラニンの生成抑制に作用していることと、その作用の強さは前処理で吸着されたであろう色素の量に影響していることが考えられる。

表-3. 色素を添加した濃度別水溶液の卵殻膜を用いたアボカドの劣化開始時間の変化

色素・濃度	1×10^{-6} mol/L	5×10^{-6} mol/L	1×10^{-5} mol/L
緑色3号	6h	7h	8h
青色1号	1h	1h	1.5h

表-4. 色素を添加した水溶液の浸漬時間別の卵殻膜を用いたアボカドの劣化開始時間の変化

色素・浸漬時間	1min	5min	10min
緑色3号	3h	6h	7h
青色1号	2h	4h	3h

4.2 チロシナーゼ阻害活性評価試験

目視によるアボカド果肉の劣化に関する判定結果をふまえた上で、複数の色素についてチロシナーゼ活性の阻害率を比較したところ、濃度の低い順に緑色3号が3.6%→5.0%→12%、青色1号が0%→0%→0.5%となり、緑色3号が良好な阻害活性を示すことが分かった(表-5)。また、同じく濃度の薄い順にクルクミンでは19%→24%→26%、ケルセチンでは5.9%→17%→23%となり、これも良好な阻害活性を示した。

表-5. 食品色素によるチロシナーゼ阻害活性試験の阻害率

	10^{-6} mol/L	10^{-5} mol/L	10^{-4} mol/L
緑色3号	3.6%	5.0%	12%
青色1号	0%	0%	0.5%
クルクミン	19%	24%	26%
ケルセチン	5.9%	17%	23%

また、卵殻膜そのものが褐変を抑制する機能を有するかについての確認として、卵殻膜の水抽出成分についての酵素活性試験を行ったところ、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[9]の約1/3程度の性能であることから、卵殻膜自体もメラニン生成を抑制する成分を有していることが分かった。抽出液から得られた成分の重量%は0.69%であり、この成分はSEMイメージ(図-7)で観測される最表層の薄膜部分[10]であると予想される。この層は水中に膜を漬け込んでおくと次第に消失する成分であり、SEMで観測されなくなる成分である。この部位の存在が実験的に確認されたことと、今回目的とした食品の劣化抑制に寄与していることは完全に新しい知見である。

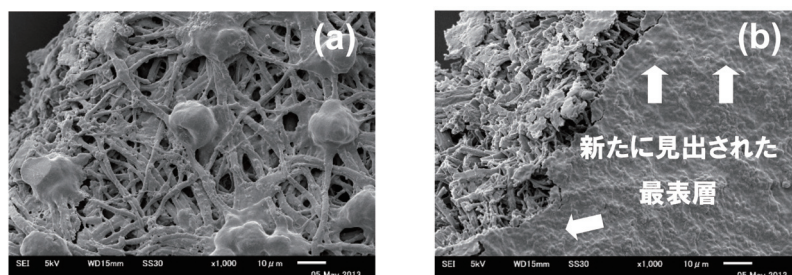


図-7. 卵殻膜表面のSEM像 (a)外側(卵殻側)、(b)内側(黄身、白身の側)

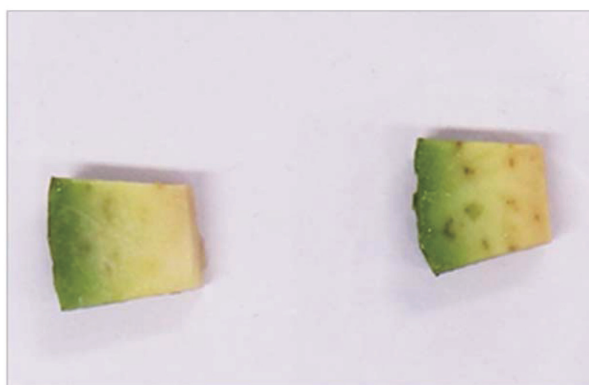
以上の結果から、卵殻膜は「メラニンの吸着除去 (3.2.1)」「卵殻膜に貯蔵された添加物の劣化抑制機能 (3.2.2)」「卵殻膜の成分が示すチロシナーゼ活性阻害 (3.3.2)」の3つの作用が特に作用して食品のメラニン沈着防止剤として有効に働くことは明らかとなった。

4.3 卵殻膜を実用的な食品添加物とするための加工試験

無処理の卵殻膜をそのまま食べようとするゴワゴワとした食感や風味が残って食品添加物としては適さない。その問題に対して、我々は卵殻の鈍端部に気室と呼ばれる卵殻膜が既に二層に分かれている部位に着目し、膜の二層を分離すると光の透過性は高くなり、それを粉末状にして果肉にふりかけると視認できない状態になった。この状態の卵殻膜でも、アボカド果肉の劣化が抑制される機能は発現し (表-6および図-8)、さらにこの加工品を食べたところ、添加物の違和感は全く無かった。

表-6. 薄膜化および微粉末化した卵殻膜の添加におけるアボカドの劣化開始時間の変化

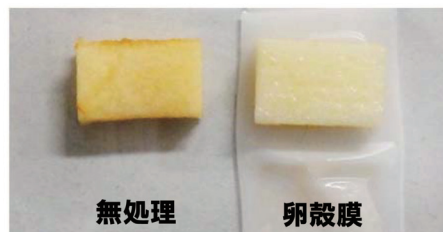
	微粉末化した薄膜を添加	卵殻膜無し
劣化時間	3h	1h



※室温 25℃

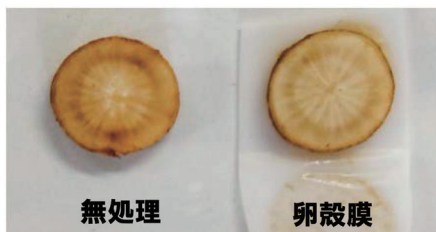
図-8. 薄膜・微粉末化した卵殻膜を用いた3時間後のアボカド果肉の保存状態
(左：卵殻膜粉末をふりかけた、右：未処理)

褐変が生じる他の作物に対する卵殻膜の効果を評価するために、リンゴとゴボウでアボカドの試験と同様の実験を行ったところ、果肉上で生成された褐色成分は卵殻膜に吸着され移動する現象が見られた (図-9) ことから、アボカド以外の酵素的褐変由来で劣化する作物にも応用は可能であることが分かった。



無処理

卵殻膜



無処理

卵殻膜

※室温 25℃

図-9. 卵殻膜によるリンゴとゴボウの果肉の変化 (左：リンゴ4h 後 右：ゴボウ5h 後)

5. 結 論

本研究では、卵殻膜をアボカド果肉に添加して果肉の劣化を観測することで、卵殻膜が食品の酵素的褐変による劣化抑制する作用を有することを見出した。さらに、この膜はアボカドで生成した褐色成分のメラニン进行吸着しただけでなく、膜に含まれる水溶性成分や、事前に卵殻膜に吸着させた色素等を酵素阻害活性剤として保存性を高めたい試料側へリリースすることで複合的な褐変抑制効果を発現していることが分かった(図-10)。そして、薄膜化や微粉末化により食感・風味ともに無処理の果肉と遜色なく食することが出来るようにしたことにより、実用的な添加物の試作品の開発に成功した。今回見出した機能は、酵素的褐変が起りやすい他食品に対しても変色を防いでいることから、食品添加物としての多様性が示されており、将来的にはこの機能を食品だけにとどまらずに、対象を人にも向けて化粧品に応用できると、メラニンの生成を抑制するだけでなく吸着もできる、新型の高機能美白化粧品の創製が可能になり、卵殻膜における未利用機能の活用はさらに進展していくと考えている。

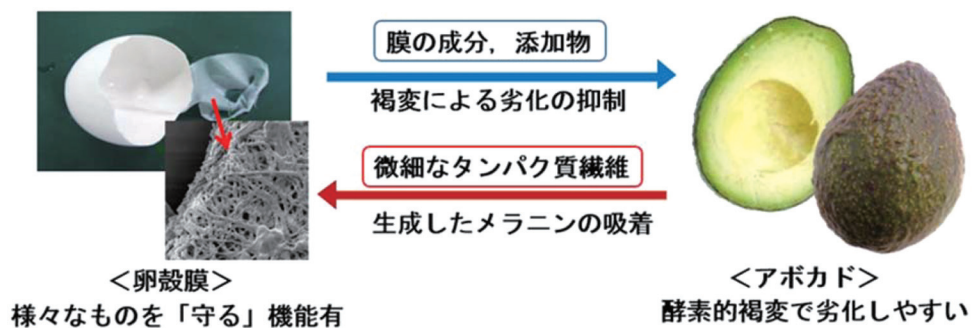


図-10. 本研究成果の概略図

6. 謝 辞

本レポートは米子工業高等専門学校 B&C 研究同好会の活動で主に行われた内容をまとめたものである。研究活動において以下の先生、同好会 OB および企業のご指導ご協力を得て遂行することができた。ここに名前を挙げて謝意を表す。

- ・谷藤尚貴准教授(指導教員、米子工業高等専門学校物質工学科)
- ・安部希綱、西尾幸祐、井田健太郎、大江ひかる、小西那奈(米子工業高等専門学校 B&C 研究同好会メンバー)
- ・株式会社アルマード

7. 参考文献

- [1] 農林水産省食料産業局バイオマス循環資源課食品産業環境対策室、食品ロス削減に向けて～「もったいない」を取り戻そう～(2013)、http://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syoku_loss/pdf/0902shokurosu.pdf
- [2] 五十嵐脩、概説食品学第2版、pp54-55(2006)

- [3] 本間清一、村田容常、スタンダード栄養・食物シリーズ7 食品加工貯蔵学第2版、p.157 (2011)
- [4] 種村安子ら、イラスト食べ物と健康、pp.271-280(2008)
- [5] NPO 法人くらしとバイオプラザ21 メディアの方に知っていただきたいこと ～食品添加物～ (2012), http://www.life-bio.or.jp/topics/pdf/topics502food_additives.pdf#search='%E3%83%A1%E3%83%87%E3%82%A3%E3%82%A2%E3%81%AE%E6%96%B9%E3%81%AB%E7%9F%A5%E3%81%A3%E3%81%A6%E3%81%84%E3%81%9F%E3%81%A0%E3%81%8D%E3%81%9F%E3%81%84%E3%81%93%E3%81%A8+%E9%A3%9F%E5%93%81%E6%B7%BB%E5%8A%A0%E7%89%A9'
- [6] 八重樫拓也(株式会社セイワテクニクス)、アボカドの果肉練砕加工品の変色防止方法及び変色防止剤、特開2011-250776
- [7] 増田勝己、多田千明、食用植物及び香辛料の褐変阻害について、仁愛女子短期大学研究紀要、42巻、pp.57-64(2010)
- [8] 宮澤陽夫、五十嵐脩、新訂食品の機能化学、pp.140-142(2010)
- [9] 山本真二(三省製薬株式会社)、メラニン生成抑制外用剤、特開平5-92916
- [10] 現在、文献(学術雑誌、特許)検索により新規性の確認を済ませている。