

卵殻膜の微細構造に由来した機能の顕在化と応用

国立米子工業高等専門学校物質工学科・准教授 谷藤 尚貴

■ 緒言

卵殻および内皮部位の卵殻膜は化粧品や調味料の原料として、工業的なりサイクルが実現されているが、タンパク質が主成分の天然薄膜である卵殻膜については、本来有する生命の発生に関わる機能を利用することで材料に応用する点では未開拓であると言える。本研究課題では、卵殻膜においてこれまでに注目されていなかったタンパク質繊維の構造的特徴から新しい機能や成分を取り出す試みを行い、それによってこれまでに報告例の無い機能を創出することを目的として、新しい様式の食品添加物を開発する研究を実施した。

本研究を実施するにあたり、我々は食品廃棄物である卵殻に対して「殻が割れない限り生卵が常温で腐りにくいのは、卵の殻の中でも卵殻膜が中身の腐敗を守る機能を有するためである」と仮説を立て、その機能を応用する目的として加工後に着色による果肉の痛みの速い食品を対象物として用い、その作用を抑制する効果が得られれば卵殻膜の新しい応用先が見つかると考えた。具体的には、卵殻膜が食品を劣化から守る機能を示す添加物として応用できると着想し、卵殻膜を食品劣化現象の中でも見た目の価値を低下させる褐変による色素沈着に対する防止剤として応用することを目指した。この実験を実施するための食品として、我々はアボカド果肉の劣化現象に注目した。アボカドは人気食材であるが、果肉の加工直後から速やかに褐色色素が沈着する酵素的褐変が起きやすく、加工品として店頭に出すことは困難なものとして知られている。この果肉の劣化を抑制することができるならば、その他の食材の品質保持に対しても応用が期待でき、加工食材の市場拡大に寄与できる。さらには食品ロス低減の実現により、豊かかつエコな食生活の実現に繋がると考え、新しい食品添加物の開発を実施することにした。

■ 方法

(1)卵殻膜をパッチした際の果肉の着色変化に関する評価試験：1×1×0.5cm 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 130unit/0.25mL)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 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L 水溶液を調製した。0.1mol/L りん酸緩衝液 1.0mL、L-DOPA 溶液 0.4mL、試料溶液 0.2mL 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 0.05mL 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 475nm)を測定し、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 1.2mL、L-DOPA 溶液 0.4mL、DMSO 0.05mL、チロシナーゼ酵素溶液 0.05mL、ブランク測定(B)ではりん酸緩衝液 1.25mL、L-DOPA 溶液 0.4mL、DMSO 0.05mL、試料液測定(D)ではりん酸緩衝液 1.05mL、L-DOPA 溶液 0.4mL、DMSO 0.05mL、試料液 0.2mL 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。

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

(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、(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、その着色現象の抑制効果が確認された(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¹⁾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で被覆した比較試験では、色素沈着の抑制効果が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うと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。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碎を用いた手法では卵殻膜の触感を認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たものは透明な膜となり(図2)、オブラート状で舌の上で食感がほとんど感じられない素材になった。この膜を果肉に被覆する試験を行ったところ、薄膜化前の卵殻膜と同様の色素沈着の抑制を確認した。今回見出した作用は、アボカドだけでなくごぼうやりんご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(図4)。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²⁾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、本研究ではそれを対象物へ作用させていることが分かった。

卵殻膜が果肉切片に生じた着色成分を吸着する現象について、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(図5(a))を用いて、吸収スペクトルの変化(図5(b, c))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。この吸着機能は褐変生成物だけでなく、水溶性の様々な化合物を吸着することは知られている³⁾。そこで、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た後、その薄膜を用いて同様のパッチ試験を行った(図6)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機能を示すことが確認された(表1)。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(表2)。

■ 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て、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が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ある。

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すことができた。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り、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る。それによって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チロシナーゼ活性阻害のプレ評価ができる実験法を開発できたと考えている。

本研究の成果から、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。さらに、卵殻膜の吸着機能は事前に添加物を卵殻膜へ導入して、それを対象物に作用させるための機能としても応用できることを明らかにした。今後は、これらの結果を複合化させた機能を有する食品添加物として、実用化を目指していくことが可能であると考えている。

■ 要 約

卵殻膜の特異的な構造に注目した有効利用を考案する中で、食品の劣化防止剤へ応用できる新しい食品添加物を開発した。具体的な機能としては、卵殻膜を被覆させるだけで、アボカドの様に着色劣化の速い作物についてそれを明確に抑制する効果を見出した。この現象が起きた原因を明らかにするために、卵殻膜が着色の原因となる酵素へ与える影響や膜自身が有する物理特性について検証を行ったところ、チロシナーゼ活性阻害やメラニン類を速やかに吸着する特性を示していることが明らかとなった。さらには、卵殻膜の吸着作用は事前に別の添加物を吸着させて、それをリリースさせることにより機能を強化できる等、複合機能を有する素材になることを明らかにした。これらの成果は食品添加物に限らず、化粧品や医薬品の原料としての応用も可能となる知見と言える。

■ 文 献

- 1) R.C. Soliva et al., *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **1**, 261-268(2001)
- 2) 山本真二, メラニン生成抑制外用剤, 特開平 5-92916.
- 3) W.T. Tsai et al., *Bioresource Technology*, **97**, 488-493(2006).

表 1. 卵殻膜に導入した色素の違いによる 20 °C 条件でのアボカド果肉の着色劣化

	劣化開始時間
卵殻膜の被覆無し	1 h
添加物の無い卵殻膜	3 h
緑色 3 号	8 h
青色 1 号	3 h
青色 2 号	3 h
黄色 4 号	8 h
黄色 5 号	5 h
赤色 3 号	3 h
赤色 106 号	3 h
クルクミン	5 h
ケルセチン	4 h

表 2. 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%

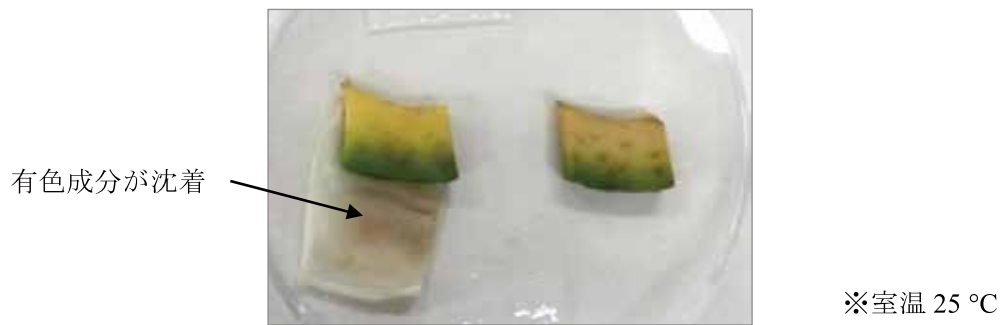


図1. 卵殻膜被覆における5時間後のアボカド果肉の変化 (左：卵殻膜被覆, 右：未処理)

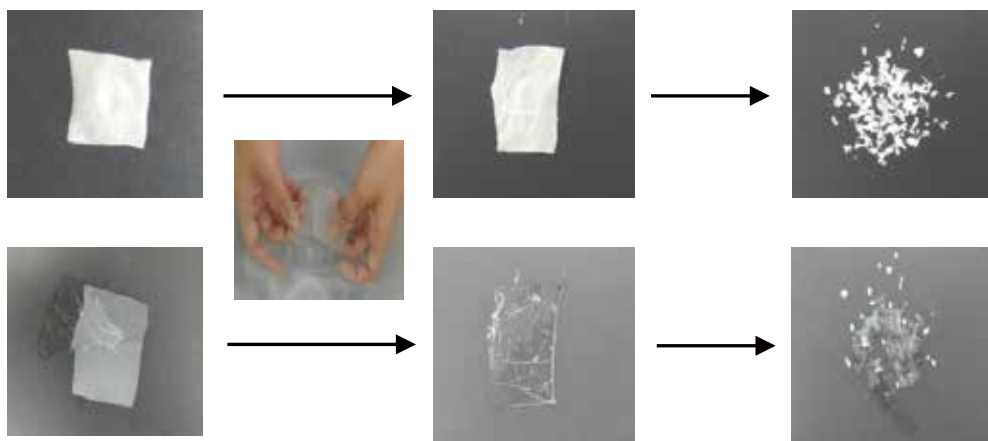


図2. 卵殻膜の薄膜化・微粉末化の工程 (上：乾燥時 下：湿潤時)



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

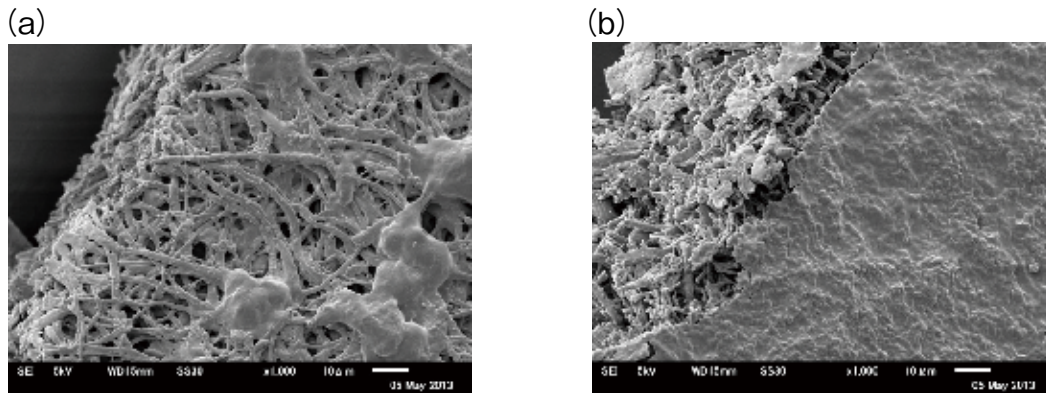


図 4. 卵殻膜表面の SEM 画像 (a) 外側 (卵殻側), (b) 内側 (黄身, 白身の側)

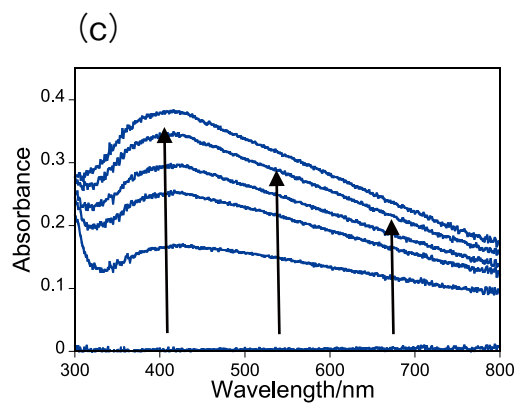
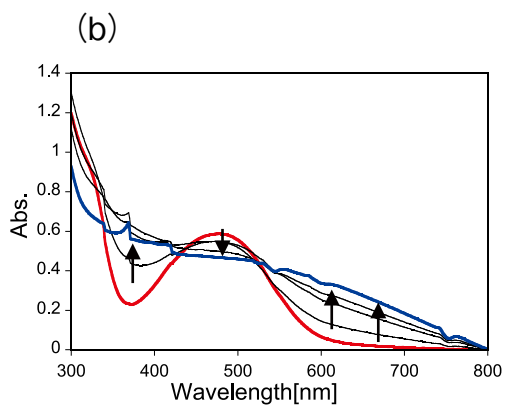
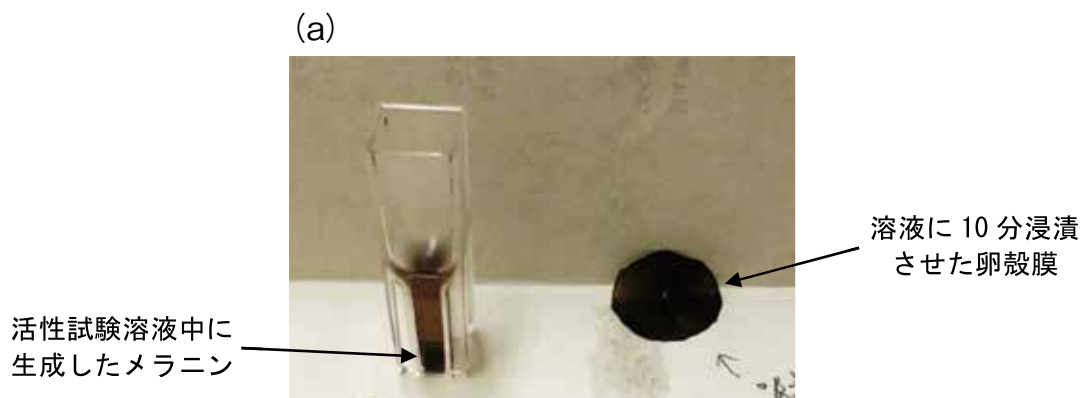


図 5. (a) チロシナーゼ活性試験後の溶液 (80 分後) と溶液中に浸漬した卵殻膜 (10 分後) の写真, (b) 同, 吸収スペクトルの経時変化 (20 分毎に測定), (c) 溶液中に浸漬した卵殻膜の拡散反射スペクトルの経時変化 (2 分毎に測定)



図 6. 食品色素を導入した卵殻膜被覆による 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)