

ホタテガイ卵巣中のカロテノイド色素の抽出方法の検討

田中 彰, 佐々木茂文, 細川雅史*

Development of the Extraction Method of Carotenoid Pigments from Scallop Ovary Tissue

Akira Tanaka, Shigefumi Sasaki and Masashi Hosokawa*

Scallop ovaries are discarded as by-products of scallop processing; however, their light orange color evoked potential use as sources of edible pigments.

In this study, we investigated methods for the extraction of carotenoid pigments contained in scallop ovary tissue. High carotenoid content extract was obtained by a simple and easy method using ethanol and acetone. Since the carotenoid extract obtained by this method has advantageous property of heat and light resistance, the scallop ovary has the potential to be used as sources of food pigments..

カロテノイドは自然界に広く存在する色素で、植物や藻類など光合成を行う生物の体内で生合成されている。動物はこれらの植物を摂取することで体内に取り込み、そのままの形、代謝により変換した形で体内の組織に蓄えている¹⁾。また、カロテノイドは主に黄色～赤色を呈し、天然色素として安全なイメージから食用色素として高い需要がある。さらに、カロテノイドは抗酸化性や抗腫瘍性、紫外線による傷害の予防効果など人の健康や美容に関係する機能性を持つことが報告^{2)~4)}されており、健康食品や化粧品への利用も進められている。

一方、北海道の主要な水産物であるホタテガイは年間約44万トン生産され⁵⁾、全重量の約13%の貝柱が主に食用に、約50%の貝殻は土木資材や肥飼料、カルシウム強化剤に利用されているが、約37%の卵巣や精巣などの生殖腺、中腸腺などの軟体部はほとんど利用されず廃棄されている。

ホタテガイの卵巣は橙色から赤色を呈し、その色素成分はバクテノロンやアロキサンチンなどのアセチレン構造を有するカロテノイドであることが報告⁶⁾され、様々な機能性が報告^{2) 7) ~9)}されている。

本研究ではホタテガイ卵巣に含まれるカロテノイド色素を有効利用するため、効率的な抽出濃縮方法および得られた色素抽出物の品質特性を検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

ホタテガイの卵巣はオホーツク海沿岸の水産加工場の処理過程で生じたものを入手し、 -30°C で凍結保存した。実験には室温で解凍して用いた。試薬は特級を使用した。

2. カロテノイド色素の分析

総カロテノイド量は、総色素を抽出して測定¹⁰⁾した。すなわち、解凍試料をフードプロセッサーでホモジナイズし、その3gを乳鉢に分取し、精秤した。カロテノイドの酸化分解を抑えるために試料重量の10%量のピロガロールを添加し、エタノールを10mL、珪砂1gを加えて磨砕し、ガラスフィルターを用いて吸引ろ過し色素抽出液を得た。この操作を抽出液に色が着かなくなるまで繰り返し、抽出液を集めて定容した。抽出液を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラ

* 北海道大学大学院水産科学研究院 (〒041-8611 函館市港町3-1-1)

事業名：重点研究

課題名：食品加工副産物の有効活用のための機能性天然色素素材の開発

フ (HPLC) 装置 (SHIMADZU LC-Solution) に供して分析を行った。HPLC の分析条件は以下の通りである。分離カラム: YMCTM Carotenoid 5 μ m (ϕ 4.6mm \times 250mm, ワイエムシイ)。カラム温度: 30°C, 移動相: A液, メタノール / *t*-ブチルメチルエーテル / 超純水 (81:15:4), B液: メタノール / *t*-ブチルメチルエーテル (9:91)。濃度勾配プログラム: B液濃度を分析開始後 0% から 27 分間で 30% まで直線的に増加し, その後 3 分間で 100% まで直線的に増加。流速: 1.0mL/min。試料注入量: 20 μ L。検出器: フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器, 検出波長 470nm。標準試薬との溶出時間および吸収スペクトルを比較してカロテノイドの同定を行い, 含有量はルテイン相当量として算出した。

3. カロテノイド抽出濃縮方法の検討

試料は解凍後, 洗浄および内在性酵素の失活のため, 沸騰水中で 30 分間加熱し, フードプロセッサーでホモジナイズした。(1), (2)および(3)の試験には, 真空凍結乾燥して試験に用いた。また, (4)はホモジナイズした試料をそのまま用いた。

(1) ホタテガイ卵巣からのカロテノイドのエタノール抽出試験

凍結乾燥試料 1g に濃度の異なるエタノールを 20mL 加えて 1 時間攪拌後, 遠心分離 (3 000rpm, 室温) して色素抽出液を得た。残さに再び, 各濃度のエタノールを加え, 同じ操作を繰り返し, 合計 3 回の抽出を行った。各抽出液のカロテノイド含有量を測定し, 卵巣中の全カロテノイド含有量に対する割合を色素抽出率として比較した。

(2) エタノール濃度に対するカロテノイドの溶解度の違いを利用したカロテノイド濃縮方法

凍結乾燥試料 1g に 40% エタノールを 20mL 加えて 30 分間攪拌後, 遠心分離 (3 000rpm, 室温) した。残さに再び 40% エタノールを加え, 同じ操作を繰り返し, 合計 3 回の操作を行った。得られた残渣に 75% エタノールを加え, 以下, (1)での抽出方法と同じ操作を行い, 3 回のカロテノイド抽出液を合わせて定容した。抽出液を HPLC で分析を行い, 検出波長には 470nm でのカロテノイド色素の検出に加え, 各溶出時間の 230 ~ 600nm の範囲で吸収が最大となった波長における吸光度で表したクロマトグラム (マックスプロット) にて, 抽出物に含まれる成分の確認を行った。

(3) アセトンによるカロテノイド濃縮方法

(2)で得られたカロテノイド抽出液の溶媒を減圧留去

し, 残留物の重量に対して 10 倍量のアセトンを加えて, 4°C で 1 時間静置した。遠心分離 (3 000rpm, 4°C) して析出した沈殿物を取り除き, 上清を定容した。抽出液を HPLC で分析を行い, カロテノイド色素の確認およびマックスプロットでの確認を行った。

(4) 原料からの製造試験

ホモジナイズした試料 1kg に 40% エタノールを 4L 加えて 30 分間攪拌し, 不織布に移して軽く絞り, 残渣を取り出した。この操作を合計 3 回行った。次に, 残渣に 75% エタノールを 4L 加えて 1 時間攪拌し, 吸引濾過してカロテノイド色素を抽出した。この操作を合計 3 回行い, 抽出液を合わせた。抽出液をエバポレーターに移して溶媒を減圧留去した。これにより得られたカロテノイド抽出物を色素素材 A とした。さらに, 色素素材 A の重量に対して 10 倍量のアセトンを加えて混合し, 4°C で 1 時間静置した。低温下で吸引濾過して析出した沈殿を除き, エバポレーターでアセトンを減圧留去した。これにより得られた抽出物を色素素材 B とした。それぞれの色素素材の重量とカロテノイド含有量を測定した。

4. 色素素材の安定性評価

(1) エタノールおよび植物油に対する溶解性

濃度の異なるエタノールおよび植物油 (なたね油) に, 2 つの素材をそれぞれ 0.1% (エタノールは体積濃度 (w/v), 植物油は重量濃度 (w/w)) 添加した混合物を調製した。分光光度計を用いて, 660nm における透過率を測定し, 濁度を算出した。

(2) 耐光性

2 つの色素素材を蛍光灯 (4 900 ルクス (lx)) 照射下, 25°C で保存した。測色色差計を用いて, 色調を L*a*b* で表し, 保存前の色調を基準とした色差 (ΔE) で評価した。

(3) 耐熱性

2 つの色素素材を植物油に 0.2% (w/w) 添加した混合物を調製した。80, 100, 120°C の各温度で加熱処理を行い, 分光光度計を用いて, 455nm における吸光度を測定し, 加熱前の吸光度に対する割合を色素残存率として表した。

結果および考察

1. ホタテガイ卵巣に含まれるカロテノイド色素の解析

図 1 にエタノール抽出により得られたカロテノイド色素の HPLC クロマトグラムを示す。今回実施した分析条件では, 少なくとも 6 つのピークが検出され, 保持時間 17 分のピーク c が最も大きかった。松野⁶⁾らは, ホ

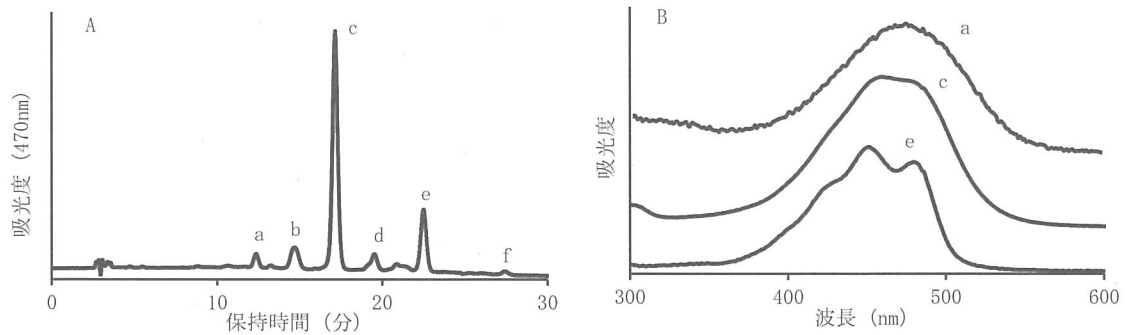


図1 エタノール抽出物のHPLCクロマトグラム
A：470nmにおけるクロマトグラム，B：各ピークにおける吸収波長スペクトル

表1 ホタテガイ卵巣に含まれるカロテノイド含量と組成比

水分 (%)	81.1
カロテノイド総量* ($\mu\text{g/g}$) **	252.2
カロテノイド組成 (%)	
ペクテノロン	58.7
アロキサンチン	19.1
アスタキサンチン	3.6
その他	18.6

* ルテイン相当量として算出

** 乾燥重量あたり

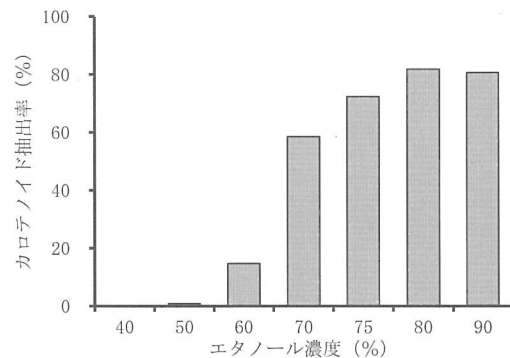


図2 カロテノイド抽出率におよぼすエタノール濃度の影響

表2 カロテノイド抽出率 (%) におよぼす抽出回数の影響

エタノール濃度 (%)	抽出回数		
	1回	2回	3回
70	58.5	77.8	84.5
75	72.4	88.3	92.1
80	81.8	96.9	99.3

タテガイ卵巣に5種類のカロテノイドが含まれていることを報告し、可視部吸収スペクトルや赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルによる解析から、ホタテガイ卵巣のカロテノイドの主成分はペクテノロンであること、その他にアスタキサンチンやアロキサンチンが含まれることを報告している。本結果の吸収スペクトルを既報の文献と比較した結果、ピークaはアスタキサンチン、ピークcはペクテノロン、ピークeはアロキサンチンと推察された。これらのカロテノイド色素の含有量をルテイン相当量として換算した結果を表1に示す。総カロテノイド含量は乾燥重量当たり $252.2\mu\text{g/g}$ で、ペクテノロンが58.7%、アロキサンチンが19.1%、アスタキサ

ンチンが3.6%で未同定のものが18.6%から成っていた。松野ら⁶⁾は、カロテノイドの含有量は卵巣100gあたり2.3mgで、ペクテノロンが73.0%、アロキサンチンが13.0%、アスタキサンチンが1.0%であり、他にジアトキサンチンが9.0%、3,4,3'-トリヒドロキシ-7',8'-ジデヒドロ- β -カロテンが3.5%と報告している。今回用いた試料のカロテノイド含有量は湿重量100gあたり4.8mgで、松野らの報告と比べて、カロテノイド含有量が約2倍であり、ペクテノロンの組成比は低い値を示したが、これは、ホタテガイの生育海域や採取時期などによる違いと推察された。

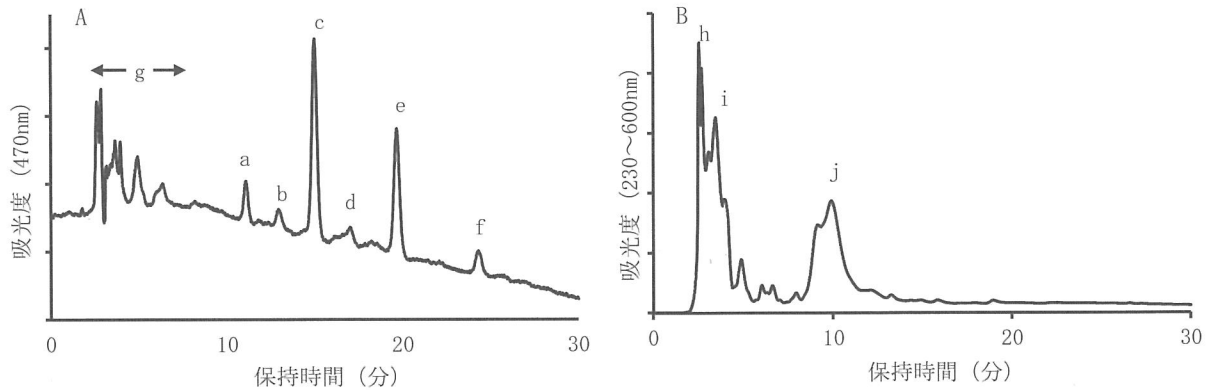


図3 75%エタノール抽出物のHPLCクロマトグラム

A：470nmにおけるクロマトグラム，B：230～600nmにおけるマックスプロットによるクロマトグラム

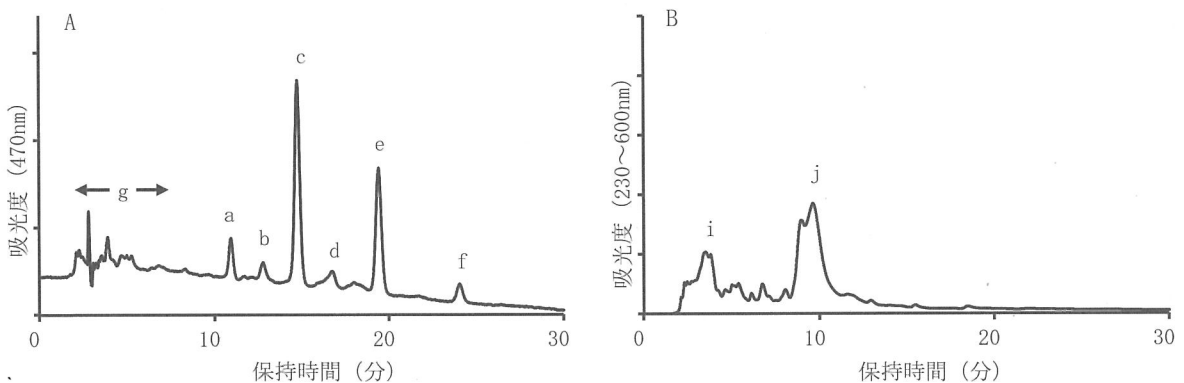


図4 40%エタノール濃縮後の75%エタノール抽出物のHPLCクロマトグラム

A：470nmにおけるクロマトグラム，B：230～600nmにおけるマックスプロットによるクロマトグラム

2. カロテノイド色素の抽出濃縮方法の検討

(1) ホタテガイ卵巣からのカロテノイドのエタノール抽出試験

図2にホタテガイ卵巣から各エタノール濃度で抽出した時のカロテノイド色素の抽出率を示す。カロテノイドはエタノール濃度40% (v/v) 以下ではほとんど抽出されなかったが、70% (v/v) を超えると抽出率が大きく上昇し、エタノール濃度70%で抽出率が約60%，80% (v/v) で81.8%と最も高かった。

次に70，75および80% (v/v) エタノールで抽出操作を繰り返した時の抽出率を表2に示す。75% (v/v) エタノールでは3回の抽出操作で92.1%，80% (v/v) エタノールでは2回の抽出操作で96.9%と90%以上の抽出率が得られた。図3にホタテガイ卵巣から75%エタノールを用いて得られた抽出液のHPLCクロマトグラムを示す。測定波長470nm (図3 A) の結果では、カロテノイドのピーク (ピーク a～f) 以外に、保持時間が2～10分くらいにピーク g が確認された。また、マックスプロットの結果 (図3 B)，主に3つのピーク

(ピーク h～j) が確認され、カロテノイド以外の成分が多く含有されている可能性が示された。この方法により、凍結乾燥物1gから475mgのカロテノイド抽出物が得られ、カロテノイド含有量は約19 μ g/gであった。

(2) エタノール濃度に対するカロテノイドの溶解度の違いを利用したカロテノイド濃縮方法

カロテノイド含有量を高めるために、色素の抽出の前に、カロテノイド色素がほとんど抽出されなかった40%エタノールを用いて、カロテノイド以外の成分を抽出して取り除くことを試みた。40%エタノールで3回抽出を行った後に75%エタノールで抽出を行った抽出液のHPLCクロマトグラムを図4に示す。測定波長470nmの結果では (図4 A)，ピーク g が図3 Aの結果より小さくなっていった。また、マックスプロットの結果 (図4 B) では、ピーク h が認められず、また、ピーク i が大幅に小さくなり、カロテノイド以外の成分が取り除かれていることが認められた。しかし、ピーク j はほとんど変化せず、40%エタノールで取り除くことができなかった。本方法を用いることで、凍結乾燥物1gから

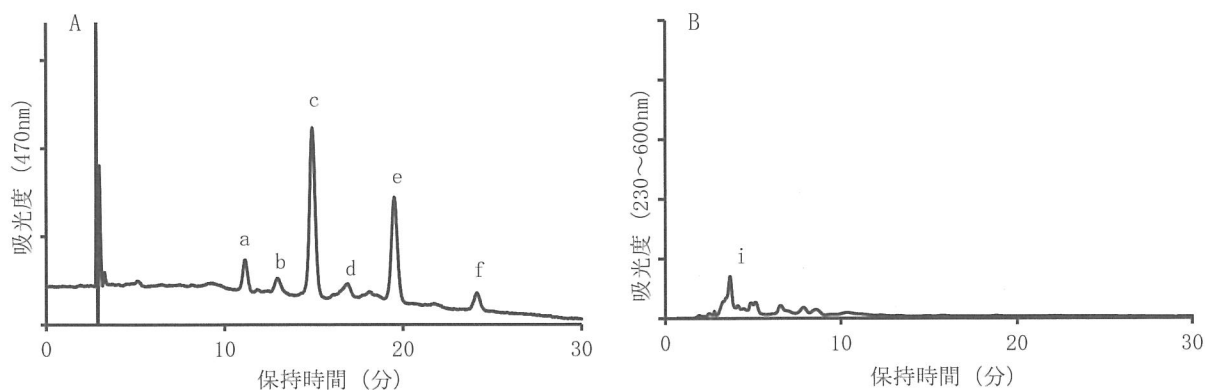


図5 アセトンによる濃縮後の75%エタノール抽出物のHPLCクロマトグラム

A : 470nmにおけるクロマトグラム, B : 230~600nmにおけるマックスプロットによるクロマトグラム

55.7mgのカロテノイド抽出物が得られ、抽出物中のカロテノイド含有量は約104 μ g/gであり、約5倍に濃縮することができた。

(3) アセトンによるカロテノイド濃縮方法

カロテノイドを濃縮するために、さらにアセトンを用いる方法を試みた。(2)の方法から得られたカロテノイド抽出物に20倍量のアセトンを加えて冷却したところ、白色の沈殿が析出した。アセトンによる分画法は主にリン脂質を色素などの単純脂質と分画する際に用いられる一般的な方法であり、カロテノイド色素とリン脂質などの成分が分離できると考えられた。この沈殿を取り除いた上清のHPLCクロマトグラムを図5に示す。測定波長470nmの結果(図5A)では、カロテノイド(ピークa~f)以外にピークはほとんど認められなかった。また、マックスプロットの結果(図5B)では、ピークjも認められず、ピークiがわずかに確認されるだけであり、カロテノイドがさらに濃縮されたことが示された。これにより、凍結乾燥物1gから21.8mgのカロテノイド抽出物が得られ、カロテノイド含有量は227 μ g/gであり、さらに約2倍に濃縮することができた。

(4) 原料からの製造試験

これらの結果から、ホタテ卵巣からカロテノイドを抽出濃縮する工程(図6)を設定し、原料1kgを用いてカロテノイド抽出物の製造を行い、得られた抽出物の収量およびカロテノイド含有量を調べた。その結果、ホタテガイ卵巣100gから得られる抽出物(色素素材A)は1.76gであり、カロテノイド含有量が1.75mg/gであった。また、カロテノイド含有量を高めた抽出物(色素素材B)は0.97gであり、カロテノイド含有量が3.07mg/gであった。原料や色素は異なるが、高橋ら¹¹⁾はカキの果皮からエタノールのみを用いて、カロテノイド色素

である β -クリプトキサンチンを抽出する簡便な方法の検討を行い、カキ果皮2007gから得られた β -クリプトキサンチンは78.4mgで果皮に含まれる β -クリプトキサンチンの約47%の回収率であることを報告している。本研究の結果では、ホタテガイ卵巣2007gから得られる総カロテノイド色素量は色素素材Aが61.6mg、色素素材Bが60.0mgであり、ホタテガイ卵巣からのカロテノイド色素の回収率はそれぞれ約65%、64%であり、 β -クリプトキサンチンの回収率と比較して回収率は高かった。また、小川ら¹²⁾は、ウンシュウミカン搾汁後の加工副産物から複数の溶媒の混合溶液とケン化によるアルカリ分解法を用いて、高純度の β -クリプトキサンチンを精製する方法を検討し、得られた抽出物は、原料からの β -クリプトキサンチンの回収率は42%であるが、純度96%と高濃度であることを報告している。本結果では、濃度を高めた色素素材Bの総カロテノイド色素の純度は約0.3%と非常に低い結果となった。純度が低い原因の1つとして、脂質中のカロテノイド含有量が考えられる。ウンシュウミカン加工副産物の場合、脂質(ヘキサノ抽出物)中の β -クリプトキサンチン含有量は約4%であったが、ホタテガイ卵巣では、トリグリセリドやリン脂質、糖脂質などの脂溶性成分が多く含まれており、脂質中のカロテノイド含有量は0.3%と低かった。有機溶媒を用いた抽出方法では、カロテノイドとともにこれらの脂溶性成分が抽出物中に多く混在し、カロテノイドの純度が低くなる一因と考えられる。これらの成分を取り除くには、ケン化により不ケン化物とするか¹³⁾、分子量の違いを利用してゲルろ過カラムで除去する¹⁴⁾などの方法を組み合わせることが考えられたが、予備的に行ったケン化の試験ではカロテノイドの存在を示す橙色が消えてしまい、HPLCによる分析でもカロテノ

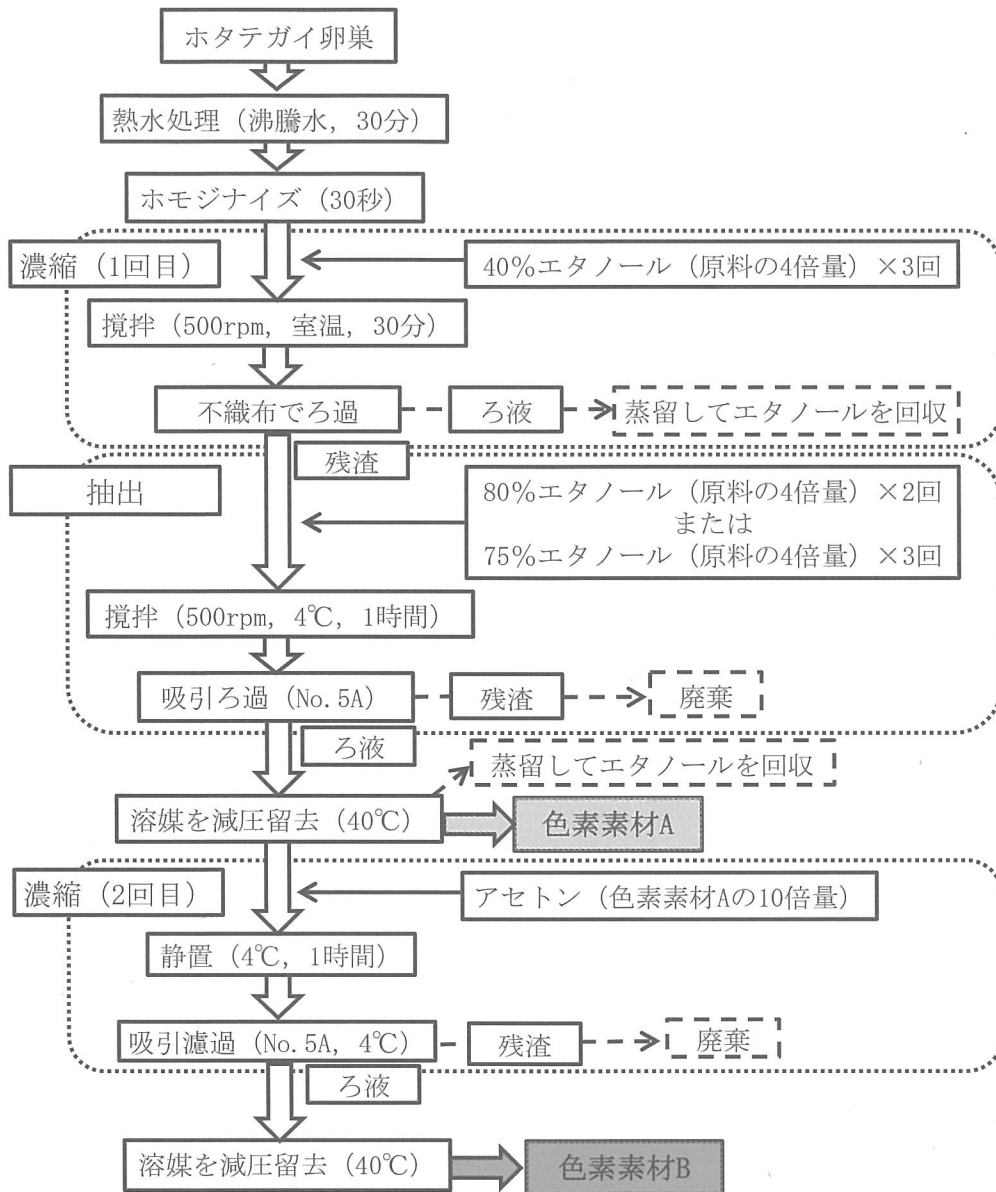


図6 ホタテガイ卵巣からのカロテノイド色素抽出濃縮工程

イド色素のピークが消失することから、本方法は適用できなかった（データ未掲載）。ホタテガイ卵巣に含まれるカロテノイドの主成分であるペクテノロンについて、詳細に研究された報告は少なく、その特性は不明な部分が多い。さらに純度を高めるには、抽出の際の前処理方法や複数の溶媒による抽出など、さらに検討が必要と考えられた。

3. 色素素材の安定性評価

エタノールおよび植物油に対する溶解性を図7に示す。色素素材A、Bともに80% (v/v) エタノール、99.5% (v/v) エタノールおよび植物油で濁度が低く、溶解度が高かった。

色素素材の耐光性を図8に示す。色素素材Aは光を照射した試験区、遮光した試験区ともに保存前に対して ΔE の変化はわずかだったが、色素素材Bは光照射により大きく ΔE が増加し、8時間後には色が消失していた。色素素材Aはリン脂質などが混在しており、これらの成分が魚油の酸化を抑える働きがあることが報告¹⁵⁾されている。カロテノイドの退色は紫外線による酸化劣化が原因とされており、色素素材Aはリン脂質等の成分がカロテノイドの酸化を抑えることで、耐光性を高めていると推察された。

色素素材A、Bの耐熱性を図9に示す。色素素材Aは60分間の加熱による色素の減少はほとんど認められ

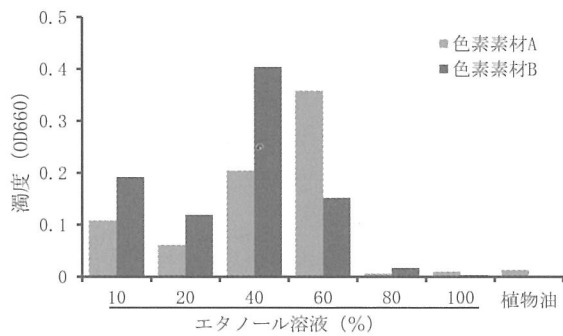


図7 色素素材のエタノールと植物油に対する溶解性

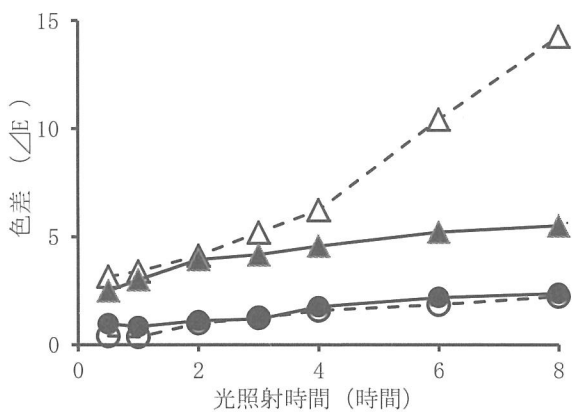


図8 色素素材の耐光試験 (蛍光灯4 900lx)
○：色素素材A, ●：色素素材A (遮光)
△：色素素材B, ▲：色素素材B (遮光)

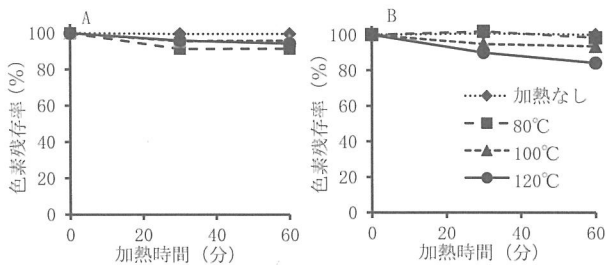


図9 色素素材の耐熱試験
A：色素素材A, B：色素素材B

なかった。色素素材Bは80°Cで60分間加熱では減少は見られなかったが、100°Cと120°Cでは時間の経過とともに残存率が低下した。しかしながら、色素の残存率は80%以上であり、外観的な退色は認められなかった。食品の加工や流通において、調理や殺菌を目的とした加熱や蛍光灯などによる光の暴露による品質の変化は、色素素材を食品に活用する上で注意すべき問題である。特にカロテノイド成分の色は光による影響を受けやすく、色

調を長期間保持できることが重要となる。本研究で得られた色素素材を植物油やドレッシングに添加して1ヶ月間保存した結果(25°C, 4 900lx), 退色はわずかであった(データ未掲載)。色素素材を利用する上で、食品の性質や加工条件により退色の程度はそれぞれ異なることから、個々の食品での十分な検討が必要となるが、食品への活用が期待できると考えられた。

要 約

加工副産物として廃棄されるホタテ卵巣から、ペクチノロンを主成分とするカロテノイド色素を食用可能な条件で抽出濃縮する方法を検討した。エタノールだけを用いた簡便な方法でカロテノイド色素を含む抽出物が得られた。また、アセトンを用いることでカロテノイド含有量を高めた抽出物が得られた。さらに、得られた色素抽出物の食品への利用適性を評価したところ、特に色素素材Aは耐光性及耐熱性が高いことが示され、健康食品などに用いる色素素材として有用と考えられた。

文 献

- 1) 眞岡孝至, カロテノイドの多様な生理作用, 食品・臨床栄養, 2, 3-14 (2007).
- 2) 西野輔翼, 癌細胞増殖抑制活性, 「海洋生物のカロテノイドー代謝と生物活性ー」, 幹渉編, (恒星社厚生閣, 東京), 105-112 (1993).
- 3) 富田純史, 動物における機能と生理活性, 「カロテノイドーその多様性と生理活性ー」, 第1版, 高市真一編, (裳華房, 東京), 67-86 (2006).
- 4) 宮下和夫, カロテノイドの機能, 「カロテノイドの科学と最新応用技術」, 第1刷, 宮下和夫監修, (シーエムシー出版, 東京), 107-210 (2009).
- 5) 平成22年北海道水産現勢, (北海道水産林務部), 3-5 (2010).
- 6) 松野隆男, 平岡勝行, 眞岡孝至, ホタテガイ卵巣のカロテノイド, 日水誌, 47, 385-390 (1981).
- 7) Konishi, I., M. Hosokawa, M., Sashima, T., Maoka, T. and Miyashita, K., Suppressive Effects of Alloxanthin and Diatoxanthin from *Halocynthia roretzi* on LPS-induced Expression of Pro-inflammatory Genes in RAW264.7 Cells. *J. Oleo. Sci.*, 57, 181-189 (2008).
- 8) 細川雅史, 安井由美子, 海洋性カロテノイドの抗炎症をターゲットとした生活習慣病予防機能の解明, 科研費助成事業研究成果報告, <http://kaken.nii>

- ac.jp/pdf/2010/seika/jsps/10101/20380117seika.pdf (2014. 9. 16).
- 9) Yasui, Y., Hosokawa, M., Mikami, N., Miyashita, K. and Takuji Tanaka., Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Chemico-Biological Interactions*, **193**, 79-87 (2011).
- 10) 田中彰, 太田智樹, 吉川修司, 錦織孝史, 褐藻に含まれるカロテノイドの腫瘍細胞に対する増殖抑制効果, 北海道立食品加工研究センター研究報告, **8**, 1-6 (2009).
- 11) 高橋英史, 稲田有美子, 井土良一, カキ果皮から β -クリプトキサンチン含有物の抽出と食品への応用, 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告, **27**, 29-36 (2009).
- 12) 小川一紀, 尾崎嘉彦, 杉浦実, ウンシュウミカン加工副産物の抽出物から溶媒への溶解性の差を利用して β -クリプトキサンチンを精製する方法, 日食誌, **60**, **9**, 498-508 (2013).
- 13) 高市真一, 分離・分析方法, 「カロテノイドーその多様性と生理活性ー」, 第1版, 高市真一編, (裳華房, 東京), 157-199 (2006).
- 14) 眞岡孝至, カロテノイドの分析と構造研究, 「カロテノイドの科学と最新応用技術」, 第1刷, 宮下和夫監修, (シーエムシー出版, 東京), 15-26 (2009).
- 15) 石原賢司, リン脂質の抗酸化能の発現機構, 中央水研研報, **8**, 139-146 (1996).