

未利用水産物からのグルコシルセラミドの抽出濃縮

佐々木茂文, 田中 彰, 梅田智里, 能登裕子

Extraction and Concentration of Glucosylceramide from Unused Marine Products

Shigefumi Sasaki, Akira Tanaka, Chisato Umeda and Hiroko Noto

In this study, a method for extracting and concentrating glucosylceramide, which has promising applications in cosmetics and food, from marine products was examined.

While glucosylceramide was not contained in the livers or viscera of salmon, octopus or scallop, 0.38 and 0.16 wt% of the substance was contained in starfish and sea cucumber viscera, respectively, with a structure differing from that found in cattle brain, rice bran, corn and other plants.

A concentrate containing 50% or more of glucosylceramide was created via an extraction and concentration process combining ethanol extraction and alkaline hydrolysis. These results indicate that starfish and sea cucumber viscera are promising sources of glucosylceramide.

セラミドは長鎖スフィンゴイド塩基と長鎖脂肪酸がアミド結合した構造を持ち、細胞組織の生体膜構成成分として生物全体に普遍的に存在している。特に皮膚の角質層では主要なスフィンゴ脂質で、皮膚のバリア機能や保湿機能に重要な役割を担っていることが知られている¹⁾。植物ではセラミドに単糖(グルコース、ガラクトース)が結合したグルコシルセラミド(セレブロシド)として多く存在している。これまでにグルコシルセラミドは皮膚の保湿効果²⁾やメラニンの生成抑制³⁾、大腸腺腫誘発抑制⁴⁾などの機能を持つことが報告され、様々な機能性を持った成分として注目されている。

従来からセラミドを豊富に含む牛脳が天然セラミドの抽出原料として利用されてきたが、1986年の牛海綿状脳症、いわゆる狂牛病の発生により牛脳から得た成分の利用が敬遠されるようになり、トウモロコシ、米糠、こんにゃく、タモギダケなど植物由来のセラミド、主にセレブロシドが機能性食品や化粧品素材として利用されている。

一方、ヒトデ⁵⁾やナマコ⁶⁾にもセレブロシドが含まれることが報告されており、セラミドの供給源として有望である。

北海道にはヒトデなどの未利用水産物や水産物の加工処理で生じる内臓や生殖組織が年間約10万トン生じている⁷⁾。

本研究ではヒトデや加工副産物に含まれるセレブロシドに注目して、その含量と効率的な抽出・精製方法を検討した。

実験方法

1. 実験試料

ヒトデは北海道沿岸(石狩市、厚岸町)で採取し、ナマコ内臓、サケ内臓などの水産加工副産物は北海道内の水産加工場の加工処理過程で生じたものを入手して使用した。

2. 脂質の抽出およびセレブロシド分析

それぞれの試料から Bligh & Dyer 法⁷⁾に従って脂質を抽出した。得られた脂質を HPLC(高速液体クロマトグラフィー)-ELSD(蒸発光散乱検出器)にて分析し、セレブロシド含量を求めた⁸⁾。全脂質 20 mg を 0.4 N 水酸化カリウム溶液 2 mL に溶解して 37°C で 2 時間ケン化した後、クロロホルム 4 mL、蒸留水 1.5 mL を加え攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm×10 min) した。下層(クロロ

ホルム層)を回収し、残った上層(水層)にクロロホルム 4 mL 加え攪拌し、再度遠心分離を行い、クロロホルム層を得た。それぞれのクロロホルム層を混合し、蒸発乾燥してクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 2 mL に再溶解して HPLC 分析に供した。カラムにはシリカカラム (Inertsil® SiL-100A, 5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm, GL サイエンス社製) を用い、光散乱検出器 (ELSD-LT II, 島津製作所) でセレブロシドを検出した。溶出溶媒はクロロホルムとメタノール-水 (95:5, v/v) の 2 液によるグラジエントを用いた (Table 1)。カラム温度 35°C, 流速は 1 mL/min, ドリフトチューブ温度は 70°C に設定した。セレブロシド標品はヒトデから抽出した全脂質からケン化および薄層クロマトグラフィー (TLC) による精製を行い調製した。得られたヒトデセレブロシド標品を HPLC 分析に供して検量線を作成し、セレブロシドのピーク面積からセレブロシドの含有量を求めた。

ヒトデおよびナマコ内臓から抽出、分離精製したセレブロシドの構成脂肪酸組成とスフィンゴイド塩基組成をガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS) で分析した。抽出分離精製したセレブロシド画分 5 mg を 1 N 塩酸メタノール溶液 2 mL に溶解し、70°C で 18 時間 Sweeley 分解⁹⁾ を行った。反応終了後、*n*-ヘキサンで脂肪酸および脂肪酸メチルエステルを抽出除去して、残った反応液を 6 N 水酸化カリウムで pH 9.6 以上に調整した後にジエチルエーテルでスフィンゴイド塩基を抽出した。抽出したスフィンゴイド塩基画分をメタノール 1 mL に溶解して 0.2 M メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液 1 mL を加え、室温で 2 時間酸化後に *n*-ヘキサンで酸化生成した脂肪アルデヒド誘導体を抽出して GC-MS に供した。GC-MS 分析¹⁰⁾ は CP-SIL 88 カラム (0.25 mm i.d. \times 50 m, 0.2 μ m: Varian, USA) 付き GCMS-QP 2010 (島津製作所製) で行った。カラムオープン温度は 80°C から 160°C まで 10°C/min で昇温し、その後 200°C まで 2°C/min で昇温した。注入口および検出器温度は 250°C に設定した。

3. ヒトデおよびナマコ内臓からのセレブロシドの抽出・濃縮

食品加工に用いることが可能なヘキサン、アセトン、エタノールを用いたヒトデおよびナマコ内臓からのセレブロシドの抽出および濃縮方法を検討した (Fig. 1)。

1) ヒトデおよびナマコ内臓乾燥粉末の調製

冷凍保存された抽出原料を細切し、内在性酵素を失活するために 100°C で 30 分間蒸煮した後、圧搾して水溶性成分を除去した。得られた圧搾残渣を通風乾燥 (40°C,

Table 1 Elution program for gradient system in HPLC-ELSD.

Time (min)	A (%)	B
0	99	1
15	75	25
20	10	90
25	99	1
28	99	1

Solvents: (A)chloroform; (B)methanol-water (95:5, v/v)

24 時間) し、孔径 1 mm のスクリーンを付けたクロスビーターミル SK 100 (Retsch Co., Ltd.) で粉碎し乾燥粉末を得た。

2) エタノールによる抽出

乾燥粉末 100 g にエタノール 1 L を加え、室温で 2 時間攪拌 (5,000 rpm) した後、吸引ろ過した。ろ過残渣にエタノール 1 L を再度加えて 15 時間攪拌した後、吸引ろ過した。得られたろ液をエバポレーターで濃縮してエタノール抽出物を得た。

3) エタノール抽出物からのグリセロ脂質の分離

エタノール抽出物に 0.4 N 水酸化ナトリウムエタノール溶液を 5 倍容加え、37°C で 2 時間ケン化した。反応終了後に反応液が 0.4 N 硫酸溶液になるように 50% 硫酸エタノール溶液を加え、37°C で 2 時間反応した。反応終了後に 2 N 水酸化ナトリウムエタノール溶液で中和して遠心分離 (3,000 rpm \times 10 min) 後、上清を回収した。残渣に 5 倍容のエタノールを加え遠心分離を行い、上清を回収した。これを 2 回繰り返して得られた上清を濃縮乾燥した後に *n*-ヘキサン/エタノール/水 (8:4:1, v/v) に溶解して、30 分間攪拌後に冷蔵 (5°C) で 15 時間静置した。回収したエタノール層 (下層) に再度 *n*-ヘキサンを加え攪拌静置後にエタノール層を回収濃縮してセレブロシド濃縮物を得た。

4) アセトン沈殿によるセレブロシドの精製

セレブロシド濃縮物を 10 倍容のアセトン/水 (1:1, v/v) に溶解した後に冷凍庫 (-30°C) で 2 時間静置して、アセトン溶解物と不溶物に分離してセレブロシドを精製した。

実験結果および考察

1. 未利用水産物中の脂質およびセレブロシド含量

未利用水産物に含まれる脂質とセレブロシドの含量を Table 2 に示す。脂質含量はホタテガイ中腸腺 11.6%, サケ鰓 7.8%, サケ頭部 7.2% で、その脂質組成としてはト

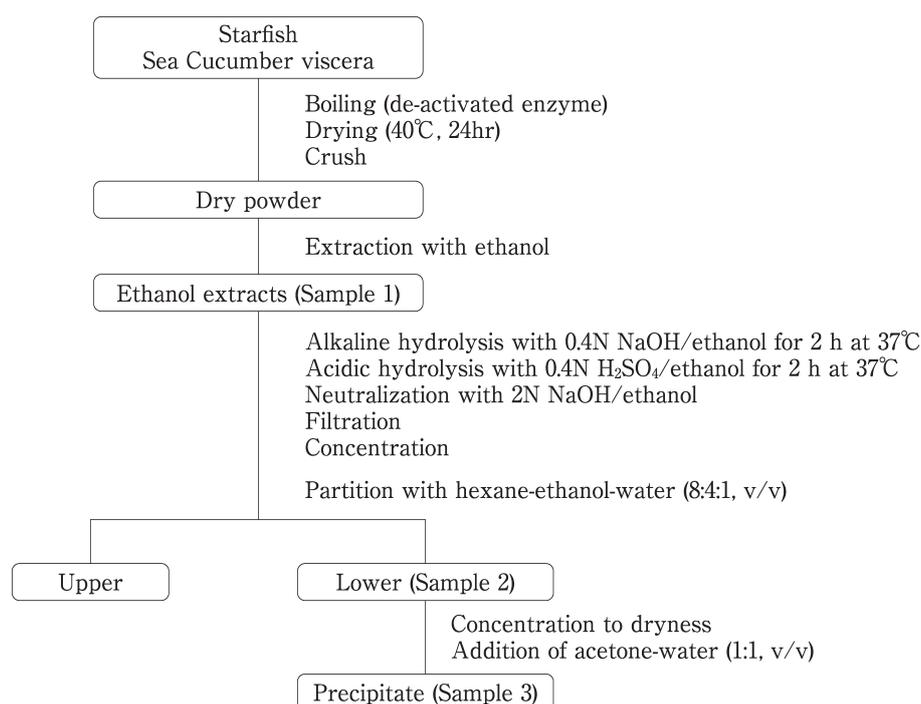


Fig. 1 Procedure for extraction and concentrations of cerebroside from starfish and sea cucumber viscera.

リアシルグリセロール (TAG) が主体であった。一方、ホタテガイ精巢は0.9%と脂質含量が低く、ホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) が主体を占めていた。また、今回分析に供したタコ、ホタテガイ、サケおよびウニの未利用組織の脂質にはセ

レブロシドが検出されなかった。

ヒトデ (石狩産) およびナマコ内臓にはそれぞれ湿重量の1.2%, 1.1%の脂質が含まれていた。それぞれの脂質を HPLC-ELSD に供すると、どちらの脂質も TAG, 遊離脂肪酸, セレブロシド, PC, PE が検出され、セレ

Table 2 Lipid and cerebroside contents in seafoods.

Sample	Organ	Lipids [wt%]	Cerebroside [wt% (% of lipids)]
Starfish I ¹	Whole	1.2	0.38 (32.0)
Starfish II ¹	Whole	1.2	0.34 (28.2)
Octopus	Liver	4.5	ND
	Viscera	1.2	ND
Scallop	Digestive gland	11.6	ND
	Ovary	2.5	ND
	Testis	0.9	ND
Chum salmon	Viscera	2.4	ND
	Head	7.2	ND
	Liver	4.2	ND
	Gill	7.8	ND
Sea-urchin	Viscera	1.7	ND
		2.5	ND
Sea cucumber	Viscera	1.1	0.16 (14.8)

ND: not detect.

¹ Starfish I and II were caught in the coast of Ishikari city and Akkeshi town in Hokkaido, respectively.

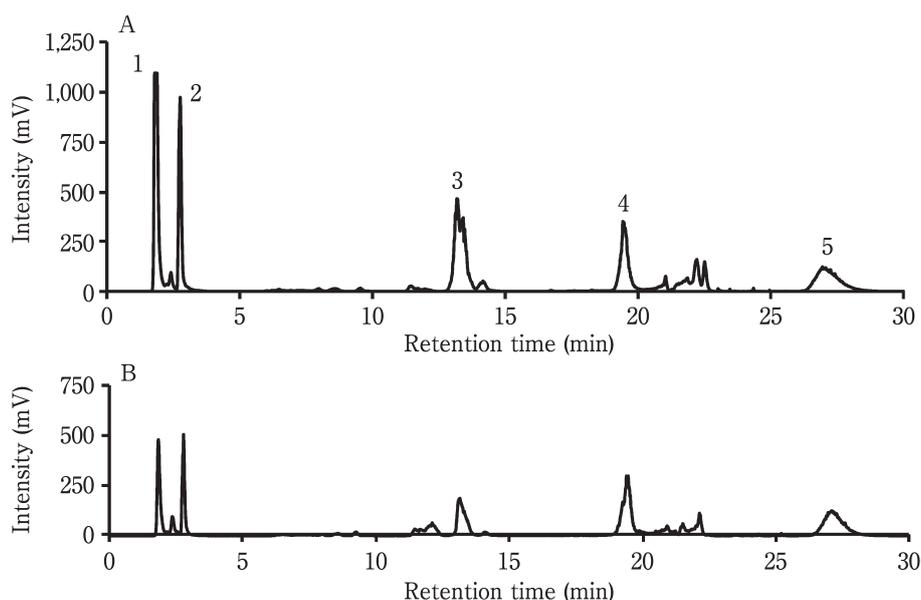


Fig. 2 HPLC of total lipids in starfish (A) and sea cucumber viscera (B).

1 triacylglycerol, 2 free fatty acid, 3 cerebroside, 4 phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, 5 unknown

プロシドは全脂質重量のヒトデで32.0%，ナマコ内臓で14.8%含まれることが明らかになった (Fig. 2)。また、ヒトデの脂質およびセレブロシド含量は石狩産と厚岸産のヒトデで大きな差は認められなかった。

高桑ら¹¹⁾は農産物およびその加工副産物のセレブロシド含量を調査し、分析した試料でリンゴ搾汁残渣が最もセレブロシド含量が高く、乾燥重量1g当たり0.94mg含まれていたと報告している。ヒトデ(水分73.6%)およびナマコ内臓(水分90.4%)にはセレブロシドがそれぞれ乾燥重量1g当たり1.5mg, 1.7mg含まれ、リンゴ搾汁残渣の1.6~1.8倍含まれており、セレブロシドの有望な供給源と考えられた。

2. ヒトデおよびナマコ内臓セレブロシドの構成スフィンゴイド塩基と構成脂肪酸

ヒトデおよびナマコ内臓から抽出精製したセレブロシドのスフィンゴイド塩基から調製したアルデヒド誘導体のGC-MS分析を行った (Fig. 3, Table 3)。ピーク5, 7, 10のマススペクトラムからそれぞれ19:1(M⁺280), 16:3(M⁺234), 20:2(M⁺292)のアルデヒドと推定された (Fig. 4)。ヒトデのセレブロシド由来のスフィンゴイド塩基は20:2など炭素数が多く、二重結合が多いものが主体であったが、ナマコ内臓由来のものでは20:2などはほとんど検出されず、ピーク1, 2, 3などが主体を占めており、ヒトデとナマコ内臓では大きく異なることが明らかになった。

また、ヒトデおよびナマコ内臓のセレブロシドの構成

脂肪酸をGC-MSで分析した (Fig. 5)。ヒトデ、ナマコ内臓共に少なくとも20以上のピークが検出され、主要なピークをTable 4に示した。ヒトデセレブロシドの構成脂肪酸はピーク8(2OH-16:0)24.6%, 7(2OH-15:0)24.1%, 6(2OH-14:0)11.9%など2-ヒドロキシ脂肪酸で全体の63.6%を占めていた。一方、ナマコ内臓では2-ヒドロキシ脂肪酸は2.5%と少なく、ピーク15(24:1 n-9)6.5%, 12(20:5 n-3)4.6%などが主要であるものの、多種類の脂肪酸で構成されていた。セレブロシドの構成スフィンゴイド塩基は動物ではスフィンゴシン(*trans*-4-sphingene, d 18:1^{4c})、植物では8-シスフィンゲニン(*cis*-8-sphingene, d 18:1^{8c})や4-トランス、8-トランススフィンガジエニン(*trans*-4, *trans*-8-sphingadiene, d 18:2^{4c, 8c})が主体であり、構成脂肪酸では動物では炭素数16, 18の飽和脂肪酸、植物では炭素数16から24の2-ヒドロキシ飽和脂肪酸が主要であることが知られている¹²⁾。したがって、ヒトデおよびナマコ内臓のセレブロシドは動物や植物(米糠, トウモロコシ, マイタケ)由来のものと異なり、共に棘皮動物であるヒトデとナマコ内臓でも異なることが明らかになった。

3. ヒトデおよびナマコ内臓からのセレブロシドの抽出・濃縮

Fig. 1に示したセレブロシドの抽出・濃縮の各工程でのTLCをFig. 6に示した。ヒトデのエタノール抽出物(Aレーン1)はTAG, セレブロシド, PEおよびPCか

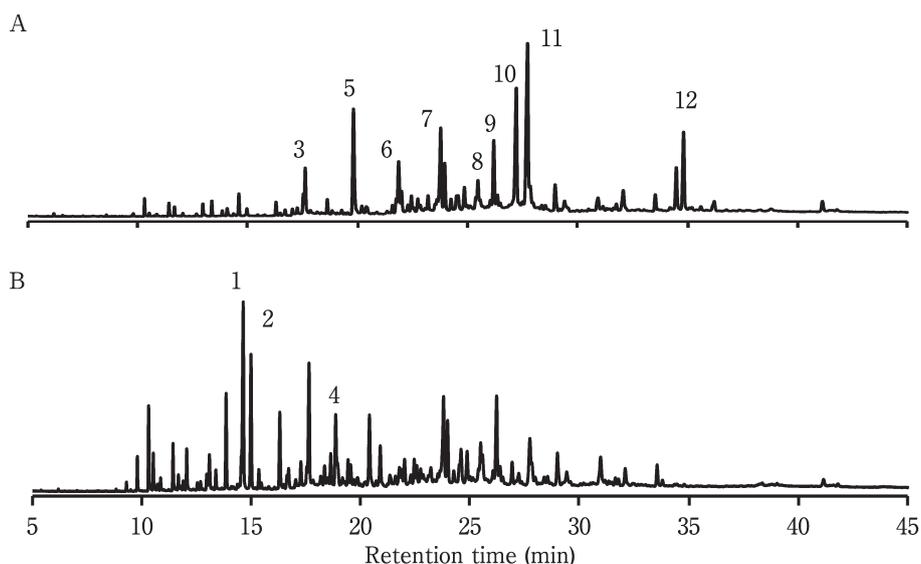


Fig. 3 Total ion chromatograms of aldehydes derived from the sphingoid bases in starfish (A) and sea cucumber viscera (B) cerebroside.

Table 3 Composition of aldehyde derivates of sphingoid base moieties in cerebroside.

Peak No. ¹	RT ²	Aldehyde ³	M ⁺	Starfish	Sea cucumber viscera
1	14.6				6.9
2	15.0				3.9
3	17.6			2.9	4.9
4	18.9				3.5
5	19.8	19 : 1	280	5.9	
6	21.9			3.5	1.5
7	23.8	16 : 3	234	6.4	5.5
8	25.5			3.9	3.7
9	26.2			4.6	3.6
10	27.2	20 : 2	292	9.1	
11	27.7	20 : 2	292	13.9	3.1
12	34.8			4.4	
		Others		45.3	63.4

¹ Peak Number indicate in Fig. 3

² Retention time on GC-MS

³ The aldehyde is designated by chain length, while the second represents the number of double bonds.

ら構成されていたが、ナマコ内臓のエタノール抽出物(Bレーン1)ではTAGはほとんどなく、セレブロシドやPE, PCなどの極性脂質からなっていた。

それぞれのエタノール抽出物をアルカリ加水分解および液-液分配してエタノール層(下層)を得た。ヒトデおよびナマコ内臓のエタノール層(下層)(A, Bレーン2)はエタノール抽出物に含まれていたTAG, PE, PCなどのグリセロ脂質が分解除去され、ケン化により生じた遊離脂肪酸が残存していた。さらにエタノール層(下層)のアセトン沈殿を行うことによって遊離脂肪酸等が除去され、セレブロシド濃縮物が得られ(A, Bレーン3),

それぞれのセレブロシド含有割合はHPLC-ELSD分析でヒトデ95%, ナマコ内臓55%であった。

ヒトデおよびナマコ内臓からセレブロシド濃縮物を調製する工程毎の収量をTable 5に示した。冷凍原料1kgから最終的なセレブロシド濃縮物をヒトデで2.8g, ナマコ内臓で2.3gが得られた。ヒトデおよびナマコ内臓にはセレブロシドがそれぞれ0.38%, 0.16%含まれる(Table 2)ことから、抽出・濃縮処理によってヒトデおよびナマコ内臓のセレブロシドの70%以上を得ることが可能であることが明らかになった。

これらのことから、ヒトデおよびナマコ内臓は農産物

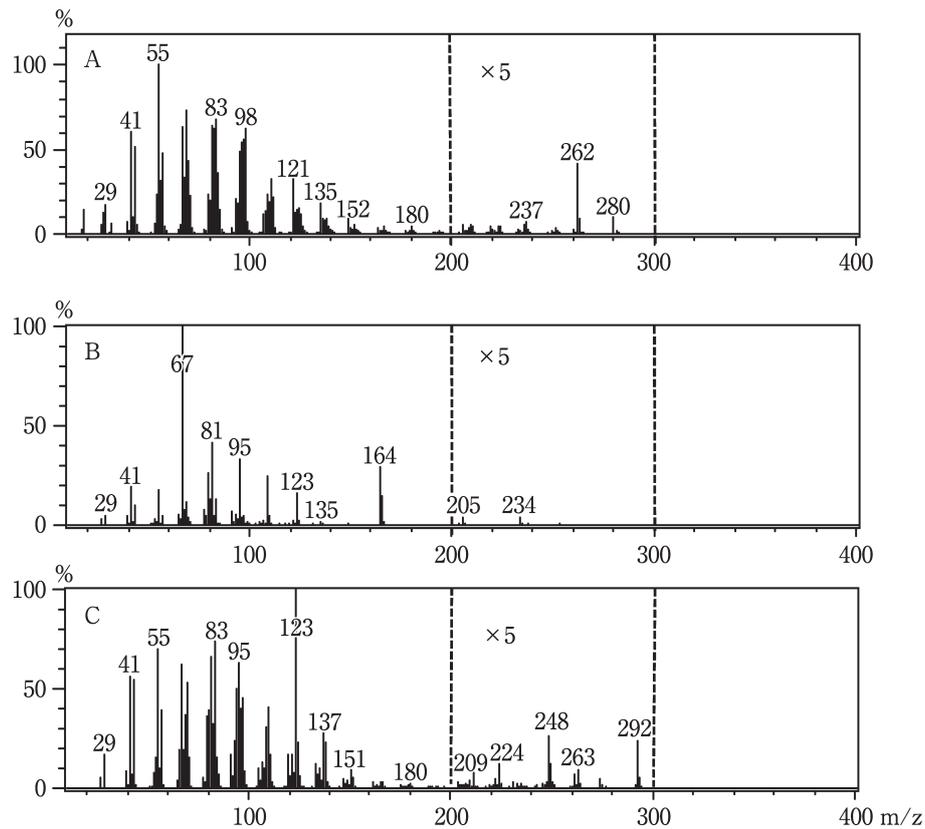


Fig. 4 Mass spectra of peak 5 (A), peak 7 (B) and peak 10 (C) in Fig. 3 A.

Table 4 Composition of fatty acid moieties in cerebrosides.

Peak No. ¹	RT ²	Fatty acid ³	Starfish	Sea cucumber viscera
1	9.2		1.5	4.0
2	11.2		1.6	4.3
3	13.7		1.2	3.5
4	16.5	18 : 0		5.5
5	17.1			2.4
6	19.0	2OH-14 : 0	11.9	1.0
7	21.1	2OH-15 : 0	24.1	1.5
8	23.3	2OH-16 : 0	24.6	
9	25.6	2OH-22 : 0	3.0	
10	26.0	18 : 1 n-9	1.2	3.3
11	26.5		1.8	2.8
12	28.5	20 : 5 n-3	1.2	4.6
13	28.9		3.8	9.3
14	29.2			4.7
15	30.4	24 : 1 n-9		6.5
16	32.1		1.8	3.2
		Others	22.4	43.3

¹ Peak Number indicate in Fig. 5

² Retention time on GC-MS

³ The fatty acid is designated by chain length, while the second represents the number of double bonds, and 2OH means 2-hydroxy fatty acid.

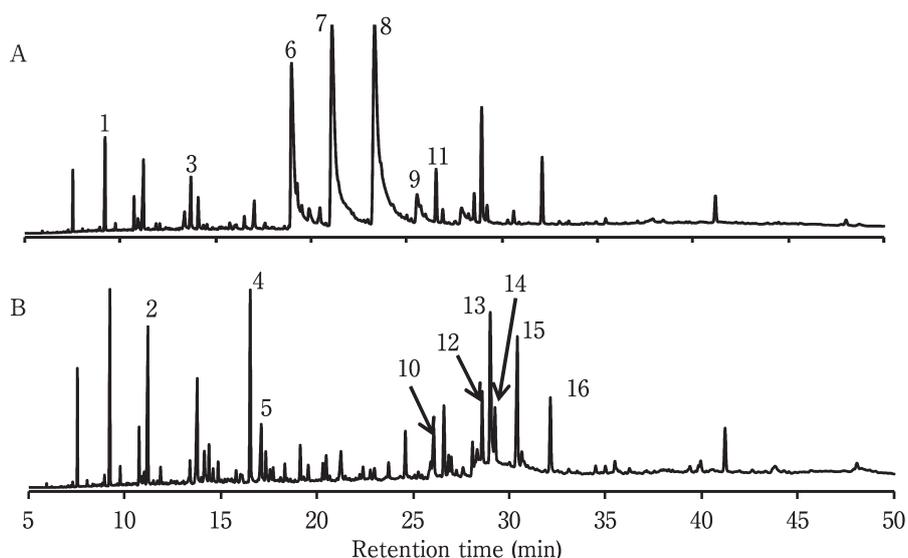


Fig. 5 Total ion chromatograms of fatty acid methyl esters derived from the sphingoid bases in starfish (A) and sea cucumber viscera (B) cerebroside.

Table 5 The yields of samples on the preparation of cerebroside concentrates.

Sample	Starfish (g)	Sea cucumber Viscera (g)
Starfish or cucumber viscera	1,000	1,000
Dry powder	187	192
Ethanol Extracts (Sample 1)	18	20
Lower (Sample 2)	9.9	10
Participate (Sample 3)	2.8	2.3

およびその加工副産物と比較して多くのセラブロシドを含有し、実験室レベルであるが、ヒトデおよびナマコ内臓 1 kg からセラブロシド濃縮物 (≧50%含有) 2 g 以上得ることが可能であることからセラブロシドの安定的、有用な供給源であると考えられた。

要 約

化粧品や食品への利用が期待されるグルコシルセラミドを未利用水産物から抽出・濃縮する方法を検討した。

サケ、タコ、ホタテガイの肝臓や内臓にはグルコシルセラミドが含まれていなかったが、ヒトデおよびナマコ内臓には 0.38 wt%, 0.16 wt% 含まれていた。ヒトデおよびナマコのグルコシルセラミドは牛脳や米糠、トウモロコシなどの植物由来のものとは異なった構造を有していた。

エタノール抽出、溶媒分画とアルカリ加水分解を組み合わせた抽出・濃縮処理によって、ヒトデおよびナマコ

内臓からグルコシルセラミド含量 50% 以上の濃縮物を調製することが可能であった。これらのことから、ヒトデおよびナマコ内臓はグルコシルセラミドの供給源として有望であると考えられた。

文 献

- 1) 芋川玄爾, 皮膚とセラミド, 「セラミド — 基礎と応用 —」, 編集 セラミド研究会, (食品化学新聞社, 東京), pp.63-73 (2011).
- 2) 宮下留美子, 柚木恵太, 小川拓也, 小野治三郎, 木下幹朗, 間 和彦, 大西正男, 日本人のスフィンゴ脂質摂取量と植物セラブロシド濃縮物による美肌効果. 脂質生化学研究, **41**, 161-164 (2007).
- 3) Kinoshita, M., Hori, N., Aida, K., Sugawara, T. and Ohnishi, M., Prevention of Melanin formation by Yeast Cerebroside in B16 Mouse Melanoma Cell. *J. Oleo Sci.*, **56**, 645-648 (2007).
- 4) Aida, K., Kinoshita, M., Tanji, M., Sugawara, T., Tamura, M., Ono, J., Ueno, N. and Ohnishi, M., Prevention of Aberrant Crypt Foci Formation by Dietary Maize and Yeast Cerebroside in 1,2-Dimethylhydrazine-treated Mice. *J. Oleo Sci.*, **54**, 45-49 (2005).
- 5) 高橋是太郎, 副次産物に含まれる健康食品, 医薬, 医療, 美容用品関連資材, 「水産資源の先進的有効利用法 — ゼロエミッションをめざして —」, 監修 坂口守彦/平田 孝, (エヌ・ティー・エス, 東京),

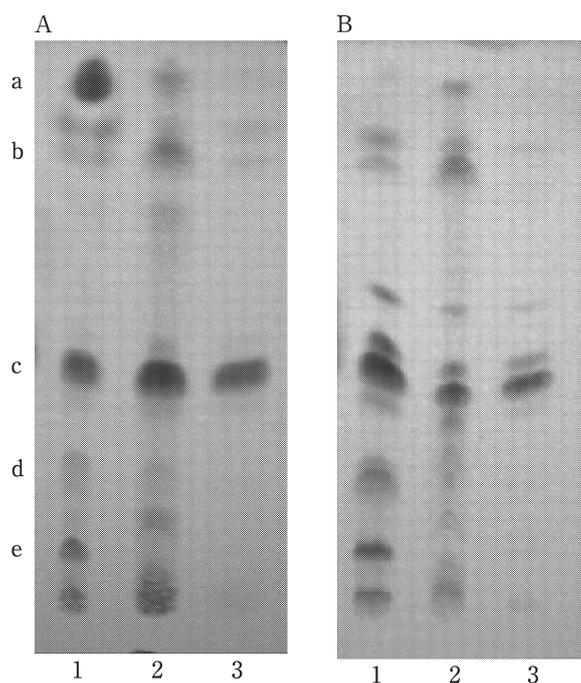


Fig. 6 TLC of neutral and complex lipids in starfish (A) and sea cucumber viscera (B). Lane 1, 2 and 3 corresponded to samples A, B and C in Fig. 1, respectively. TLC plate was developed with chloroform-methanol-water (65:16:2, v/v/v) in the direction of the arrow shown in figure. Spots a, b, c, d and e indicate triacylglycerol, free fatty acid, cerebroside, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, respectively. Detection was carried out by spraying anthrone reagent followed by a brief heating on the hot-plate.

- pp.67-76 (2005).
- 6) Xu, J., Wang, Y., Feng, T., Zhang, B., Sugawara, T. and Xue, C., Isolation and Anti-Fatty Liver Activity of a Novel Cerebroside from the Sea Cucumber *Acaudina molpadioides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1466-1471 (2011).
- 7) Bligh, G. and Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
- 8) Kashima, M., Nakagawa, K., Sugawara, T., Miyazawa, T., Murakami, C., Miyashita, R., Ono, J., Deschamps, F. S. and Chaminade, P., Method for quantitative determination of cerebroside in "plant ceramide" foodstuffs by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Oleo Sci.*, **51**, 347-354 (2002).
- 9) Gaver, R. C. and Sweeley, C. C., Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294-298 (1965).
- 10) Azad Shah, A. K. M., Kinoshita, M., Kurihara, H., Ohnishi, M. and Takahashi, K., Glycosylceramides obtained from the starfish *Asterias amurensis* Lutken. *J. Oleo Sci.*, **57**, 477-484 (2008).
- 11) 高桑直也, 齊藤勝一, 小田有二, 農産物およびその加工副産物における機能性脂質セラミドの含量, 「新しい研究成果2004年度」, (北海道農業研究センター), pp.173-177 (2004).
- 12) 間 和彦, 食品に用いられるセラミドとその構造, 「セラミド — 基礎と応用 —」, 編集 セラミド研究会, (食品化学新聞社, 東京), pp.76-80 (2011).

引用 URL

- i) <http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/ssk/grp/has-seih22.pdf> (2012.11.30)