

塩蔵オキアミの利用に関する研究 (第4報)

——アスタキサンチン——

河端 信・田口 邦子・大槻 耕三

Studies on Utilization of Salted Antarctic Krill (*Euphausia superba*) (IV)

——Astaxanthin——

MAKOTO KAWABATA, KUNIKO TAGUCHI and KOZO OHTSUKI

The carotenoid, which extracted with isopropanol from salted antarctic krill (*Euphausia superba*) was identified as astaxanthin in ester form, and its content in the krill lipids was 0.128%.

There is no significant deterioration of the pigment during the salted storage at -20°C for 5 years.

Astaxanthin in ethanol solution after acetone treatment of IPA extractives was more stable than that of other solvent treatment.

The stability of the pigment was improved by the saponification of astaxanthin preparation, however, ethanol solution of purified astaxanthin with silicic acid column chromatography was very unstable.

We suggested that the reason of unstability of purified astaxanthin might be the result of the elimination of naturally occurring antioxidant during the purification processes.

(Received July 20, 1983)

緒 言

オキアミに含まれるカロチノイドは、眼に集中的に分布していて¹⁾、その主成分はアスタキサンチン (Ax)²⁾で、大部分がエステル型として存在している³⁾ことが知られている。

また、アスタキサンチンは、通常の加熱処理に対しては、比較的安定である⁴⁾が、森ら⁵⁾によると、乾燥品を常温以上の温度で保管すると、急激に退色し、柳本ら⁶⁾によると、この退色は、冷凍保存もしくは脱酸素剤を封入することにより、室温保存でも防ぐことができるかと報告されている。

このアスタキサンチンは、配合飼料に添加すると、ニジマス・タイなどの体色保持用、錦ゴイの色づけな

どに、有効である⁷⁾ことがすでに確認されている。

現在、アスタキサンチンを抽出する場合には、溶媒で還流抽出を行なうため、時間がかかりすぎる難点がある。今後、食用色素として利用するためには、抽出条件の改善とともに、その精製方法の検討がとくに待たれている。

著者らは、さきに、塩蔵オキアミから、イソプロピルアルコール (IPA) 抽出法により、オキアミ濃縮たん白 (KPC)、エキスおよび IPA 層を、同時に分離した。今回は、IPA抽出画分よりアスタキサンチンを分離し、食用色素として利用するための基礎的資料を得る目的で、塩蔵オキアミのアスタキサンチンの組成、精製方法の検討、色素の安定性について実験を行ない、2、3の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. アスタキサンチンの抽出

前報⁹⁾の塩蔵オキアミから IPA により抽出された上層の IPA 抽出液を集めて、粗色素液とした。ついで IPA を減圧留去したのち、残渣を、アセトンで色のなくなるまで抽出をくりかえし、これを石油エーテル (PE) に転溶し、水洗後、無水硫酸ナトリウムで脱水を行ない、減圧濃縮を行なった。

2. アスタキサンチンの定量

石油エーテル溶液における470nmの吸光度を求め、吸光度係数 $E_{1\%}^{1cm}$ 2400⁹⁾ を用いて算出した。

3. アスタキサンチンの分別

1) ケイ酸によるカラムクロマトグラフィー

石油エーテルに懸濁したケイ酸+セライト 545 (1:1)を充填したカラム (1.0×20cm)で行なった。溶出剤は、エチルエーテル-石油エーテルの混合溶剤を用い、エチルエーテルの混合比率 (V/V) を30, 40, 60%と順次高め、それぞれ70mlを用いて溶出させ、溶出液 3 ml ずつを分取し、470nm の吸光度を測定して溶出曲線を求めた。

2) ケイ酸による薄層クロマトグラフィー⁵⁾ (TLC)

リプレート50 (5×20cm, ヤマト製)を用いて、暗所で展開を行なった。展開溶媒は、15%酢酸エチル-n-ヘキサンおよび30%エチルエーテル-石油エーテルを使用した。

4. リン脂質の除去

1) アセトン沈殿法¹⁰⁾

粗色素液の IPA を減圧留去したのち、アセトン抽出をくりかえし、ついで、色素を n-ヘキサンに転溶し、水洗後、無水硫酸ナトリウムで脱水を行ない、n-ヘキサンを減圧留去したのち、残渣をエタノールに溶解する。

2) ケイ酸吸着法¹¹⁾

粗色素液の IPA を減圧留去したのち、残渣をクロロホルムに溶解し、ケイ酸(マーリンクロット製, 100メッシュ)を加えて、10分間攪拌後、5分間静置すると、リン脂質区分はケイ酸に吸着される。ついで、ガラスフィルター 1G2に円形に切ったろ紙を置き、上澄より静かに吸引ろ過を行ない、さらにクロロホルムでの洗浄をくりかえすと、ろ液および洗液中に色素および中性脂質を得る。このクロロホルムを減圧留去して残渣をエタノールに溶解する。

5. アスタキサンチンのケン化

片山ら¹²⁾の方法を改良して行なった。すなわち、IPA 抽出液から IPA を減圧留去したのち、残渣をエ

タノールに溶解し、5%濃度になるように水酸化ナトリウムを加え、60~70°Cに加温して30分間ケン化を行なう。ケン化後、水を加えて分液漏斗に移し、エチルエーテル抽出を数回行なって、色素を完全に回収する。ついで、水洗、脱水後、エチルエーテルを留去し、残渣をエタノールに溶解する。

6. リンの定量

リンは湿式分解した試料につき、Allen の中村による変法¹³⁾で測定した。

7. 安定性の測定法

15ml容ネジ付試験管 (パイレックス, 16×125mm)に色素液を口まで満たし、キャップをして、それぞれの条件下に保存して、1週間ごとに470nm の吸光度を測定する。

結 果

1. アスタキサンチンの含量と組成

塩蔵オキアミに含まれるアスタキサンチン量は、湿重量100g当り、5.0mgであった。これは、オキアミの脂質1g当りに換算すると1.28mgとなり、森ら⁵⁾、薬瀬²⁾の生凍結オキアミの値と比較して (Table 1), とくに塩蔵による減少は見られなかった。

Table 1 Astaxanthin Contents in Krill

Krill	Ax/Fat (mg/g)
Raw frozen (A)	0.97
(B)	0.92—1.39
Salted	1.28

(A) Yanase, M.²⁾

(B) Mori, M. *et al.*⁵⁾

つぎに、TLC の結果を Fig. 1に示す。4つのスポットが表われ、フロントに一番近いスポット1が、最も濃い橙赤色を示し、スポット2は黄色、スポット3は橙黄色、原点に近いスポット4は、ごく淡い黄色を示した。スポット1, 2, 3は、アスタキサンチンのジエステル、モノエステル、遊離型に相当する。また、ケン化した試料では、単一のスポットしか認められなかった。

ケイ酸カラムクロマトグラフィーの結果をFig. 2に示した。石油エーテル中のエチルエーテル濃度 (V/V) 30, 40, 60%の混液で溶出された FI, FII, FIII の吸収スペクトルの測定を行なった結果 (Fig. 3), いずれも 470nm 付近に吸収極大を示し、この3成分は、アスタキサンチンおよびそのエステルと考えられる。この3成分の比率を、吸光度の値から算出すると、エ

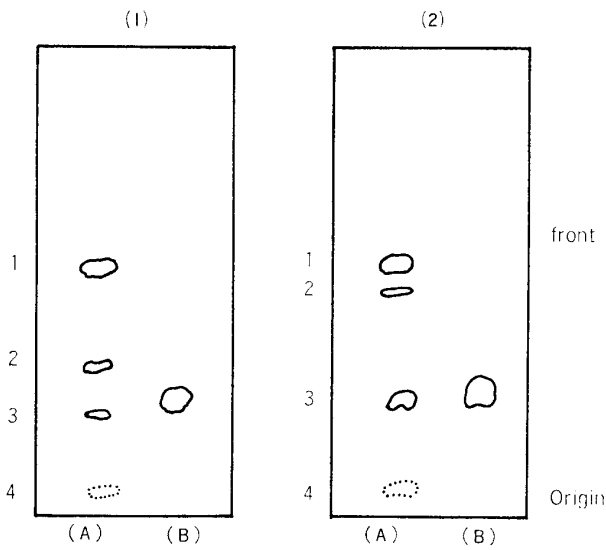


Fig. 1 Thin Layer Chromatograms of Astaxanthin from Salted Antarctic Krill
Solvent: (1) 15% Ethyl acetate-n-Hexane
(2) 30% Ethyl ether-Petroleum ether
(A) before saponification
(B) after saponification

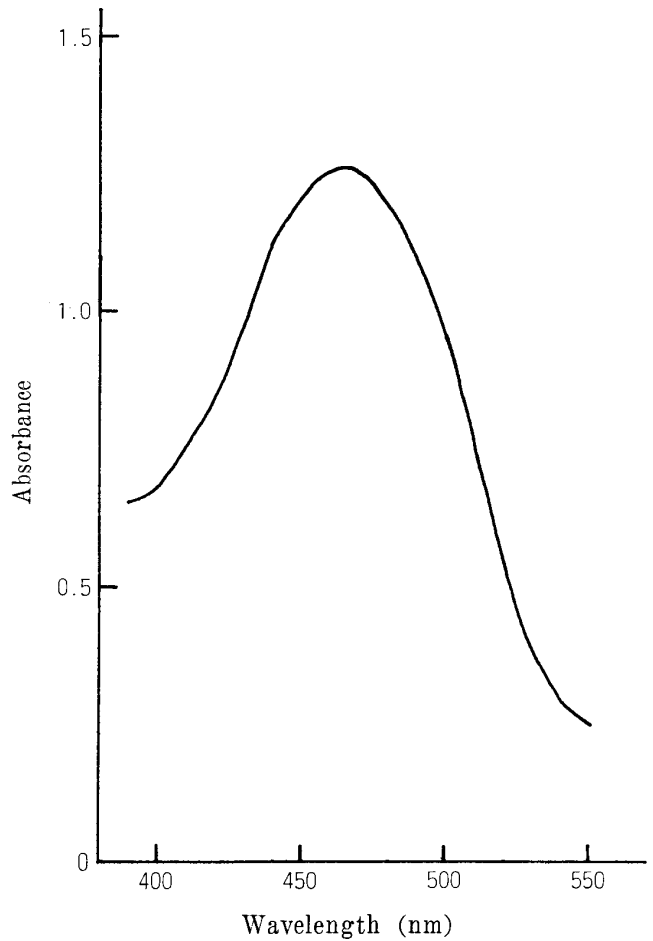


Fig. 3 Absorption Spectrum of Astaxanthin from Salted Antarctic Krill
Solvent: Petroleum ether

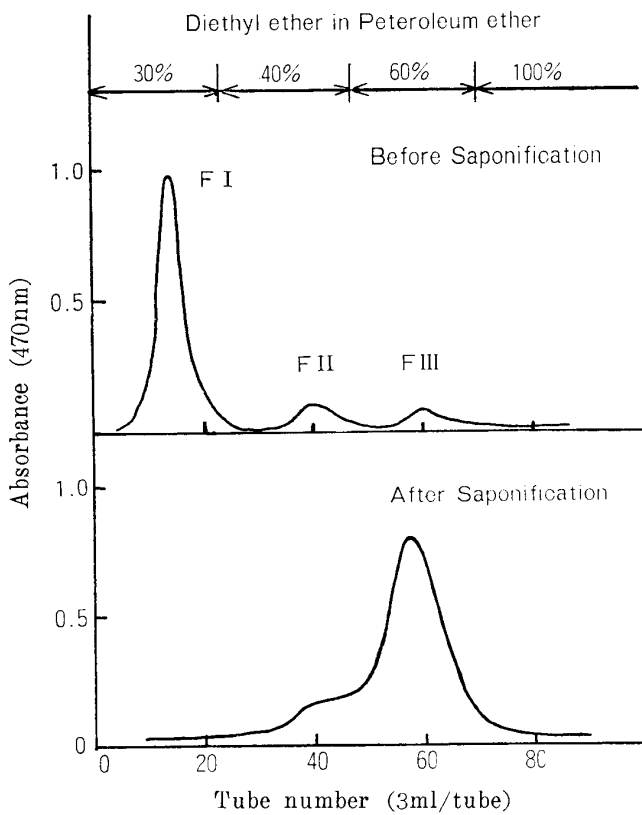


Fig. 2 Elution Curve of Astaxanthin from Salted Antarctic Krill on Silicic acid-Celite 545 (1:1) Column
A column (1.8×10cm) was equilibrated with petroleum ether

Table 2 Composition of Astaxanthin in Krill

Krill	% Astaxanthin as			
	diester	monoester	free	others
Raw frozen*	62.3 (70.1)	19.9 (22.4)	6.6 (7.4)	11.2 (—)
Salted	66.2	24.1	9.6	—

* Mori, M. *et al.*⁵⁾

ステル型が90.3%を占めている (Table 2)。この比率を、森ら⁵⁾の生凍結オキアミの値と比較すると、塩蔵による差は、とくに認められなかった。

2. 精製法の検討

1) 各種溶媒による色素抽出率

IPA抽出による粗色粗液中には、アスタキサンチン、脂質のほかに、エキスおよび食塩がかなり含まれている。これら不純物を除去する方法として、まずIPAを減圧留去したのち、その残渣を、各種溶媒、すなわち 1) n-ヘキサン、2) 石油エーテル、3) アセトン、4)

Table 3 Recovery of Astaxanthin and Phosphate from IPA Extract of Salted Krill

Treatment	A _x (470nm)		P (720nm)
	Stage 1	Stage 2	
	%	%	%
n-Hexane	84.8	93.5	36.2
Petroleum ether	79.3	92.9	34.5
Acetone	88.0	94.8	34.5
Ethanol	93.0	95.3	86.8
Benzene	91.3	97.9	46.6
Silicic acid	—	93.3	0.5

エタノール, 5)ベンゼンで抽出を行なって, アスタキサンチンの抽出率を求めた結果を Table 3 に示した.

1 回目の抽出では収量80~93%と, 抽出溶媒による差が見られたが, 2 回の抽出を合わせると, 93~98%が抽出可能で, 溶媒による差はとくに認められなかった.

2) リン脂質の除去

リン脂質に起因すると考えられるリンは, アセトン沈殿法により約65%, ケイ酸吸着法によりほぼ完全に除かれた. (Table 3)

3. 色素の安定性について

アスタキサンチンを溶液状態で保存したときの, 溶媒の種類, 光, 温度の影響について経時的に調べた.

1) 溶媒の影響

粗色素液の IPA を減圧留去したのち, 残渣を IPA, エタノールおよび石油エーテルに再溶解し, 室温, 散光下に保存して, 1, 2, 3 カ月後の 470nm の吸光度の変化を観察したところ (Fig.4), 石油エーテル溶液中では非常に不安定で, 2 カ月後には, 全く色が消失した. エタノールと IPA 溶液中では, ほぼ同じ傾向を示し, 2 カ月後で約40%に減少した.

2) 光の影響

散光下と黒色のポリエチレンで包み遮光状態とした試料について, 室温における 470nm の吸光度変化を Fig.5 に示した. 1 カ月後では, 散光下, 遮光下ともに約5%の退色が見られ, その後, 遮光下では変化がゆるやかであるが, 散光下では, 2 カ月後で約40%の退色が見られ, 明らかに, 光による影響が認められた.

3) 温度の影響

遮光下で7, 20, 37°Cの温度で保存した試料につき, 変化を調べた結果を Fig 6に示す. 低温(7°C)では, ほとんど変化が認められず, 20°Cでは, 1 カ月後で5%, 2 カ月後で8%の退色が認められた. 37°Cで

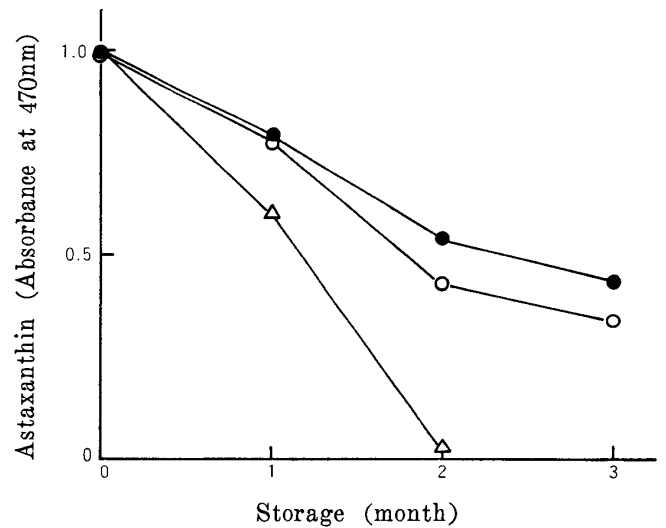


Fig. 4 Effect of Solvent on the Stability of Astaxanthin
Changes of absorbance of astaxanthin at 470nm in solvent during storage at room temperature in the shading
Solvent: EtOH (●—●), IPA (○—○) and PE (△—△)

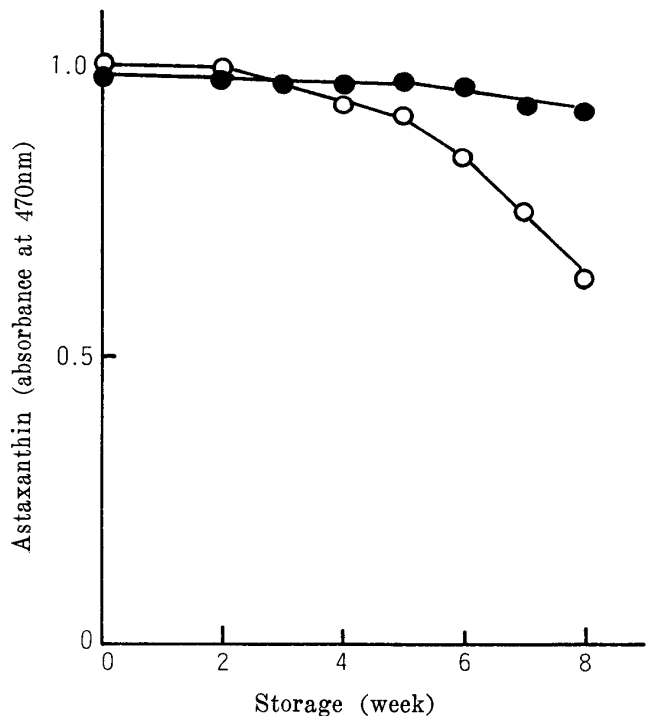


Fig. 5 Effect of Light on the Stability of Astaxanthin
stored at room temperature in the dark (●—●) and shading (○—○)
Solvent: EtOH

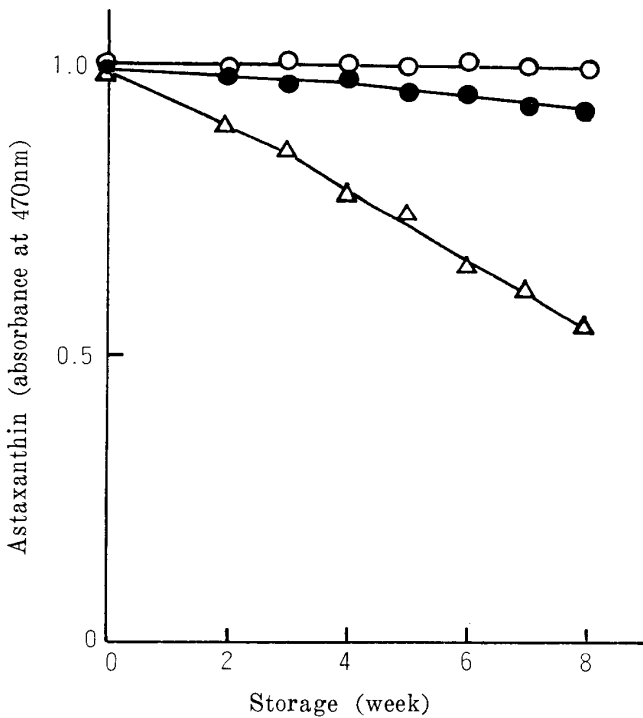


Fig. 6 Effect of Temperature on the Stability of Astaxanthin stored in the dark at 7°C (○—○), 20°C (●—●) and 37°C (△—△) Solvent: EtOH

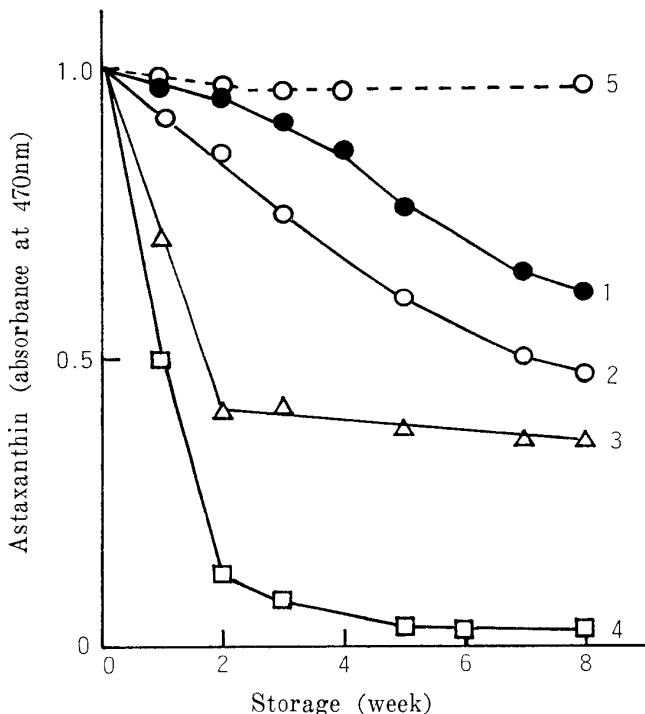


Fig. 7 Stability of Astaxanthin in Different Extraction Methods 1) Acetone (●—●) 2) n-Hexane (○—○) 3) Ethanol (△—△) 4) Silicic acid treatment (□—□) 5) Saponification (○---○) stored at 37°C in the dark Solvent: EtOH

は、変化が非常に急激であり、1カ月後で約20%、2カ月後では約45%の退色が認められ、室温以上で保存すると、遮光下でも急激に変化することがわかった。

4) 各種抽出法の影響

各方法により抽出・精製を行なったのち、エタノールに溶解した試料を37°Cに保存したときの470nmにおける吸光度の変化を調べた結果をFig.7に示す。すなわち、IPA抽出液のIPAを留去した残渣を1)アセトン、2)n-ヘキサン、3)エタノールで抽出を行ない、それぞれの不溶画分を除いたもの、4)ケイ酸吸着処理を行なったもの、5)ケン化を行なったものについて調べた。ケン化を行なったものは、3カ月経過後も、ほとんど変化が見られず、非常に安定であることがわかった。ついで、アセトン抽出を行なったものが安定であったが、1カ月で15%、2カ月で40%の減少が見られた。エタノール抽出を行なったものは、2週間後までは急激に減少したが、その後の変化はゆるやかで、ケイ酸吸着処理を行なったものは、2週間で完全に退色した。

以上の結果から、塩蔵オキアミからIPA抽出法により得られたアスタキサンチンは、アセトン抽出処理により精製を行ない、エタノール溶液として、暗所、低温に保存すれば安定である。また、ケン化を行なうと室温以上で保存しても、安定性の良いことがわかった。

考 察

Chen H.M.¹⁴⁾らは、アスタキサンチンは、たん白質と結合しているため、抽出する際、蛋白分解酵素の使用により、収率が増加したと報告しているが、塩蔵オキアミの場合は、自己のプロテアーゼの適度な分解により、抽出が容易となっているので、塩蔵法は、アスタキサンチンの抽出にとっても、非常にすぐれた方法であるといえる。

精製方法として、アセトン抽出処理を行なったものの安定性が向上したのは、アセトン可溶画分に、天然に存在する抗酸化物質が抽出された結果と考えられる。ケイ酸吸着処理を行なったものが、光・温度のいずれに対しても、非常に不安定となったのは、天然の抗酸化物質が、ケイ酸に吸着されて除去されたことによると考えられる。このことは、酸化防止剤の1つであるBHAの添加実験を行なった結果、退色防止効果が認められたことから推測される。

ケン化を行なった試料が、非常に安定性がすぐれているのは、不飽和脂肪酸が除去されたことと、不ケン化物中に、天然の抗酸化物質が、濃縮されて含まれた

結果と考えられる。

要 約

1. アスタキサンチンは、塩蔵オキアミ油脂1g当り1.28mg含まれ、塩蔵による変化はとくに認められなかった。
2. アスタキサンチンの組成は、エステル型が90.3%を占めている。
3. アセトンにより精製したアスタキサンチンは、他の溶媒で精製したものより安定性がすぐれていた。
4. ケン化により非常に安定となったが、ケイ酸吸着処理による精製では、かえって不安定となった。
5. 精製により安定性が減少するのは、精製過程で、天然の抗酸化物質が除去されたことによる。

(1983年7月20日受理)

文 献

- 1) L.R.Fisher, S.K.Kon and S.Y.Thompson : J.Mar. Biol. Ass. U.K. **34**, 81 (1955)

- 2) 築瀬正明：東海区水研報，**65**，59 (1971)
- 3) G.Lambertsen and O.R.Braekkan : J.Sci. Fd. Agric., **22**，99 (1971)
- 4) 中林敏郎，木村 進，加藤博通：食品の変色とその化学，141 (1960)，光琳書院 (東京)
- 5) 森 幹男，安田信一，長久英三：日本水産中研報，**11**，1 (1976)
- 6) 柳本正勝，小林登史夫，木村 進，吉川義夫：日食工誌，**29**，230 (1982)
- 7) 藤井 豊：食品工業，**24** (24)，20 (1981)
- 8) 河端 信，田口邦子，大槻耕三，田中敬子：京都府大学報 (理学・生活科学)，No.**29**，27 (1978)
- 9) 金光庸俊，青江 弘：日水誌，**24**，209 (1958)
- 10) 藤野安彦：脂質分析法入門 (生物化学実験法9) 62 (1978)，学会出版センター (東京)
- 11) 斎藤恒行ら編：水産生物化学・食品学実験書，86，103，(1974)，恒星社厚生閣 (東京)
- 12) 片山輝久，島谷 周，鮫島宗雄：日水誌，**39**，215 (1973)
- 13) 中村道徳：農化，**24**，1 (1950)
- 14) H.M.Chen and S.P.Meyers : J.Agric. Fd. Chem.，**30**，469 (1982)