

乾燥コンブからのクロロフィルの抽出と光照射による色調の改良

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
巻/号	656
掲載ページ	p. 1090-1095
発行年月	1999年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



乾燥コンブからのクロロフィルの抽出と 光照射による色調の改良

形浦 宏一, 小関 聡美, 小川 裕子, 山崎 史人, 立野 芳明

(1998年10月7日受付)

Extraction of Chlorophylls from the Brown Seaweed and Improvement of Color by Illumination of Fluorescent Light

Koichi Kataura,* Satomi Koseki,* Hiroko Ogawa,*
Fumito Yamazaki,* and Yoshiaki Tateno*

A study was made on the extraction of chlorophylls with ethanol from the dry brown seaweed Konbu, *Laminaria japonica*, and coloring under illumination with fluorescent light was investigated to improve the greenish color of the seasoning extractive from Konbu.

The results obtained were as follows: (1) The chlorophylls in the brown seaweed were effectively extracted with two-times the weight of absolute ethanol relative to that of the crushed dry material. (2) There was a negative correlation between the average particle size of dry seaweed and the extractable amount of chlorophylls with ethanol. (3) When the chlorophylls in ethanol solution were illuminated under fluorescent light, a greenish color developed. This coloring is supposed to be caused by allomelization of chlorophyll molecules. (4) It is clear that when the chlorophyll extract treated by illumination is added to the seasoning extractive of Konbu, the greenish color can be enhanced.

キーワード: 褐藻, コンブ, クロロフィル, コンブエキス, 色調, 光照射

コンブの乾燥品は昔からかつお節と並んで日本料理の基本的な「だし」として利用されてきた。¹⁾ コンブはグルタミン酸を多く含有し,²⁾ 旨味成分となっているが, そのエキス原液は日本近海で採れるマコンブ, ミツイシコンブ, ナガコンブなどの熱水抽出液を濃縮したもので, マグネシウム, カリウム, ヨウ素などのミネラル, 各種のアミノ酸, およびマンニトールを多く含んでいる。³⁾ 市販されているコンブエキスは熱水で抽出したエキス原液を水で希釈し, 腐敗防止に食塩を, 味の増強にグルタミン酸ナトリウムを, さらにでんぷん加水分解物などの増粘剤を加えて製造したものであるが, その色調は薄黄褐色である。しかし, コンブは緑色というイメージがあり, コンブエキスにも緑色のものが好ましいという需要者の要望がある。緑色色素としてはクチナシの色素⁴⁾などの利用も一案であるが, 食品のイメージとしてコンブ由来の方が好ましいと考えられる。そこでコンブに含まれているクロロフィルの利用を検討することにした。クロロフィルは脂溶性で水に溶解しにくく, メタノール, アセトン, クロロホルムなどの有機溶媒に溶解す

るが, 食品としてはエタノールが適していると考えた。⁵⁾ また, コンブエキスにクロロフィル抽出液を混合して緑色を増強させる試みをした。

本研究ではコンブのクロロフィルを有効利用することを目的とし, 先ずクロロフィルの抽出条件について検討し, 次いで光照射によるクロロフィルの色調の変化およびコンブエキスと配合したときの色調改良への評価について検討を行った。

実験方法

試料 北海道伊達産のマコンブ *Laminaria japonica* の乾燥品を使用した。

乾燥コンブの粉碎と粒度調整 乾燥コンブを粉碎機 (Super line, 三菱化工機製) にて粉碎した。径 2 mm のスクリーンを使用して粉碎したものを試料 (No. 1), 径 0.5 mm のスクリーンを通したものを試料 (No. 2) とした。続いて試料 (No. 2) を 50 メッシュの篩を用いて分級し, 通過しないものを試料 (No. 3), 通過したものを試料 (No. 4) とした。各試料の粒度分布は, 試

* 東和化成工業株式会社富士研究所 (Towa Chemical Industry Co. Ltd., Shimadacho, Fuji, Shizuoka 417-0033, Japan).

料 10 g を粒度分布測定器により、30 メッシュ以下、30~50 メッシュ、50~100 メッシュ、および 100 メッシュ以上に分級し、それぞれの割合と分布を求めた。

粉碎乾燥コンブからエタノールによるクロロフィルの抽出 試料 (No. 1) 20 g を共栓付き三角フラスコに入れ、これにエタノール 200 g、エタノール 180 g と水 20 g、エタノール 160 g と水 40 g またはエタノール 140 g と水 60 g を加えて室温暗所で 24 時間抽出した。抽出液を傾斜して分取し、さらに濾紙で濾過した。また試料 (No. 1) 20 g にエタノール 200 g, 100 g, 60 g, または 40 g を加えて同様に抽出した。また粒度分布と平均粒度の異なる試料 (No. 1~No. 4) 各 20 g をエタノール 40 g で同様に抽出した。なお抽出液中のクロロフィル量は、クロロフィル *a* の最大吸収波長⁶⁾である 664 nm における吸光値に、抽出して得られた液量を掛けた値を便宜的に総抽出量とし、比較した。

クロロフィル抽出液の光照射 試料 (No. 1) 1 kg にエタノール 2 kg を加えて室温で 24 時間抽出後、東洋濾紙 No. 5C で濾過して抽出液 1.8 kg を得た。次いで、抽出液を 664 nm における吸光値が 0.25 になるようにエタノールで希釈した。これを直径 15 cm の蓋付きガラス製シャーレに 1.5 cm の厚さになるように入れ、蓋をしたままの状態 で 60 W の蛍光灯 (棒形) を使用し、20 cm の距離で 7 時間、光照射処理を行った。

コンブエキスの調製 粉碎していない乾燥コンブ 10kg に水 200 kg を蒸気ジャケット付きのタンク中で混合して 50°C で 1 時間保管後、液とコンブを分離し、次いで濾過機により濾過し、濃縮機により 60°C で 8 時間加熱して Brix 値が 40% になるまで濃縮し、9.5 kg のコンブエキス原液を調製した。次いでコンブエキス原液 6.0 g、水 6.4 g、還元でんぷん加水分解物 (東和化成工業製、PO-20)⁷⁾ 32.6 g、グルタミン酸ナトリウム 0.3 g、および NaCl 4.6 g を均質に溶解した。これに光照射を行ったクロロフィル抽出液 2~8 g を加えて攪拌しながら加熱し、90°C に達してから冷却した。

クロロフィル抽出液およびコンブエキスの色調の測定⁸⁾ コンブエキスおよび試料 (No. 1) からのクロロフィル抽出液の呈する色調を色差計 (日本電色工業製、SZ-Σ80) で測定した。また、光源としてハロゲンランプを使用し、X, Y および Z の値を測定した。 L^* , a^* , および b^* は次の式により求めた。

$$L^* = 116(Y/100)^{1/3} - 16$$

$$a^* = 500[(X/98)^{1/3} - (Y/100)^{1/3}]$$

$$b^* = 200[(Y/100)^{1/3} - (Z/118.1)^{1/3}]$$

クロロフィルの定量分析^{9,*)} 粉碎乾燥コンブからの

クロロフィル抽出液を 50°C 以下で減圧し、濃縮乾固する。次いでクロロホルム 4 ml を加えて、クロロフィルを溶解し、これを高速液体クロマトグラフィーに供して分析した。分析条件は、カラム Neopack 120-5SI (西尾工業製) と、溶出液は *n*-ヘキサン:2-プロパノール:メタノール=100:0.8:0.4 を使用した。カラム温度は 3-5°C、検出波長は 425 nm、流速は 1.2 ml/min である。

結果と考察

粉碎乾燥コンブからのクロロフィルの抽出条件の検討 エタノールを使用して、試料 (No. 1) からクロロフィルを抽出するに当たり、エタノール濃度 (エタノール中の含水量) および試料に対して加えるエタノールの量比 (W/W) が抽出性に及ぼす影響について検討した。まず、エタノール濃度 (含水量) の及ぼす効果について調べたところ、クロロフィルの抽出性はエタノールの含水量がゼロのときに最も高く、これを対照とすると含水量が 10~20% では抽出率が数% 低下し、さらに含水量 30% では大きく減少して 53% になった。そこで乾燥コンブ原料に由来する水分の量はほとんど無視することにし、エタノールの含水量がゼロのものを以下の実験に使用することにした。続いて、試料に対して添加する抽出液の量比が抽出率に及ぼす影響について検討したところ、粉碎乾燥コンブに対して加えるエタノールの量比が 2~10 倍の間では、クロロフィルの抽出性に全く差異が無かった。それゆえ溶媒の価格を考慮して以下 2 倍量が実用的と判断した。なお粉碎乾燥コンブからのクロロフィル抽出量は、第 1 回目の抽出量で表した。ちなみに第 2 回目の抽出量は、第 1 回目の 24%、第 3 回目と第 4 回目は 17% と 12% に減少する。また抽出時間は 24 時間としたが、これを対照にすると、抽出率は 48 時間後には 15%、72 時間後には 27% の増加が認められる。

粉碎乾燥コンブの粒度とクロロフィルの抽出性の関係 通常、粉碎していない乾燥コンブから直接エタノールによってクロロフィルを抽出しようとする、抽出に時間がかかり 24 時間後でもなお抽出率は極めて低い。したがって、短時間で効率良く抽出を行うには粉碎する必要がある。しかし、細かいほどクロロフィルの抽出率が高くなることは明白であるが、粉碎に時間がかかりすぎるという難点がある。そこで、平均粒度の異なる試料についてクロロフィルの抽出性を検討することにした。まず、試料 (No. 1~No. 4) の粒度分布を測定した。その結果は Table 1 に示すように粉碎後 2 mm のスクリー

* 渡辺 正, 小林正美: HPLC によるクロロフィル分析. *Jasco Report, LC family*, 23, 1-7 (1988).

ンを通したものは、0.5 mm のスクリーンを通したものよりも粒度が粗く、50 メッシュ以下のものが大部分を占めているのに対して、0.5 mm のスクリーンを通したものは、30~50 メッシュと 50~100 メッシュの粒度が大部分を占めていた。これらの粉碎試料から 2 倍量のエタノールによって抽出されたクロロフィル量を、試料

Table 1. Particle size distribution of crushed dry brown seaweed preparations

Preparation No.	Particle size (mesh)				Average particle size (mesh)
	30	30-50	50-100	100	
	%				
1	66.0	22.8	6.3	4.8	35.8
2	1.1	50.0	34.2	14.7	72.4
3	2.0	95.3	2.5	0.2	43.6
4	0	4.6	65.8	29.6	101.0

Dry brown seaweed *Laminaria japonica* was crushed by using a grinder equipped with a screen having 2.0 mm diameter holes (No. 1) or with a screen having 0.5 mm diameter holes (No. 2).

Crushed sample collected with a screen having 0.5 mm diameter holes was further classified into two portions which the passed through (No. 4) and that remaining on (No. 3) a sieve of 50 mesh.

(No. 4) のそれを 100 として相対値で表し、Fig. 1 に結果を示した。これによると、試料の粒度が細かく、平均メッシュサイズの大きい方がクロロフィルの抽出率が高い傾向にあり、両者の間にはほぼ正の相関が成り立つことがわかった。

光照射によるクロロフィル抽出液の色調変化 光照射によってクロロフィルの色調に変化が生ずることは既に知られている。¹⁰⁾ またその際には、Fig. 2 に示すように、クロロフィルの吸収スペクトルの一部に消失や変化が起こる。本研究で得たクロロフィル抽出液の色調は、緑色と黄色の混じった色調であるが、この抽出液を室温に自然放置したり、光照射を行うと、緑色が強まることが経験的に確認されていた。そこで、本実験においても、光照射したクロロフィル抽出液の色調を、色差計を使用して測定し、光照射の前と後と比較した。その結果を Table 2 に示した。これによると、 a^* と b^* が減少しているため、抽出液の緑色が強まったことが示されている。

光照射によって抽出液中のクロロフィルに起こる変化 光照射によって色調が変化したクロロフィル抽出液を高速液体クロマトグラフィーに供し、クロロフィル分子に起こった変化を検討した。得られた高速液体クロマトグラフィーの溶出ピークと分析結果を Fig. 3 と Table 3

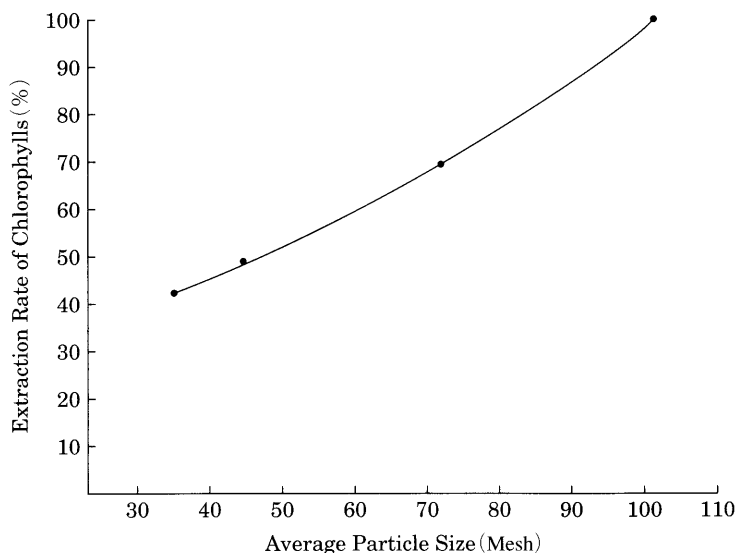


Fig. 1. Relationships between average particle size of crushed dry brown seaweed and extraction rate of chlorophylls with ethanol.

Dry brown seaweed *Laminaria japonica* was crushed by using a grinder and extracted with two-times the weight of absolute ethanol for 24 h in a dark room. The content of chlorophylls in absolute ethanol was conventionally determined by measuring an absorbance at 664 nm. The amounts of extractable chlorophylls from the crushed dry brown seaweed of different particle sizes were expressed as relative to the amount of those from the crushed dry brown seaweed (No. 1 in Table 1) as 100.

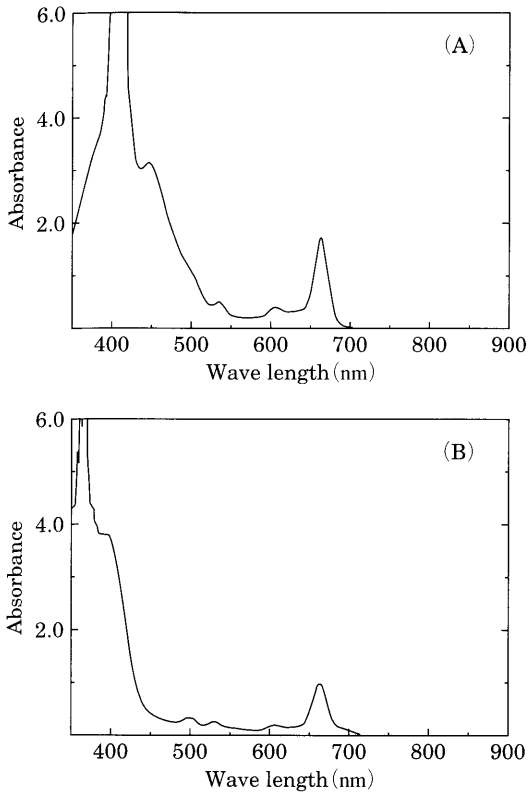


Fig. 2. Absorption spectra of chlorophylls from the brown seaweed before and after illumination.

The extraction of chlorophylls from the seaweed and the illumination with fluorescent light were made as in Table 2.

- (A) Before illumination
- (B) After illumination

Table 2. Color change of chlorophylls extracted from the brown seaweed *Laminaria* by illumination

Color scales	L^*	a^*	b^*
Before illumination	67.34	-3.22	71.34
After illumination	57.32	-15.25	59.64

The extraction of chlorophylls was done as mentioned in Table 1 and Fig. 1. The extracted chlorophylls were diluted with ethanol solution to an absorbance of 0.25 at 664 nm. The ethanol solution of chlorophylls was layered at a depth of 2.5 cm in glass ware and illuminated for 24 h at a distance of 20 cm from 60 watt fluorescent light source. The color of chlorophylls in ethanol was specified according to the procedure presented by CIE (Commission International de l'Eclairage). By employing a standard color table L^* and a^* together with b^* were determined. The L^* are the scale for the light value, and the a^* and b^* are the scales for the chromaticness.

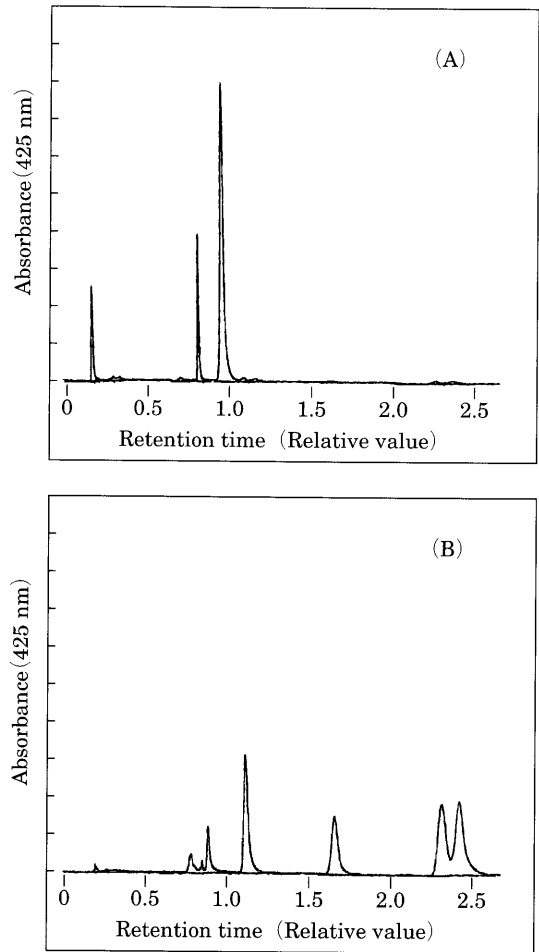


Fig. 3. High performance liquid chromatography of chlorophylls from the brown seaweed before and after the treatment under illumination.

The chlorophylls in the ethanol was dried under vacuum evaporation. The concentrate was dissolved into 4 ml chloroform, and subjected to HPLC using Neopack 120-5SI column according to the method of Watanabe and Kobayashi (1989).

Chromatographic condition
 Column ; Neopack 120-5SI.
 Solvent ; *n*-Hexane: 2-Propanol:
 Methanol=100 : 0.8 : 0.4
 Flow speed; 1.2 ml/min.

- (A) Before illumination
- (B) After illumination

に示した。これによると、光照射する前の試料(A)については、相対保持時間 (Rt) が 1.00 の位置に主要成分があり、さらに Rt 0.86, および Rt 0.18 に小さな成分が認められる。これは既報の値に比べると、それぞれクロロフィル a 、フェオフィチン a アロマー、 β -カロテン

Table 3. High performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls extracted with ethanol from the brown seaweed before and after illumination

Retention time (Relative value)	Peak area (%)	
	Before	After
0.18	10.7	0.7
0.31	1.2	0.4
0.80	0	3.4
0.86	12.2	1.1
0.90	0.5	5.7
1.00	67.8	0.6
1.13	1.2	21.1
1.67*	0.6	13.9
2.32*	0.8	21.0
2.43*	1.0	27.4

The chlorophylls in the ethanol solution were dried under vacuum evaporation. The concentrate was dissolved in 4 ml chloroform, and subjected to HPLC using a Neopack 120-5SI column according to the method of Watanabe and Kobayashi (1989).

Retention time of peaks was expressed as relative to that of chlorophyll *a* which appeared at 20.5 min. The amount of each component are expressed as the relative value (%) of peak area on the basis of sum areas.

* The components supposed to be allomers of chlorophyll according to the report by Schaber *et al.* (1984).

と推定された。一方, 照射後の試料(B)においては, クロロフィル *a* に相当する成分が激減し, 照射前には見られなかった Rt 1.13 以後の位置に, 多数の少量成分が見られた。これはクロロフィル *a* が分解し, 減少したことを示唆している。Schaber らの報告¹¹⁾によると, クロロフィル *a* を大気にさらしているとアロマー化 (Allomerization) が起こり, 10-hydroxy chlorophyll *a* (10-OH-chl. *a*) とその立体異性体 10-OH-chl. *a'* が生成するが, エタノール (EtOH) 溶媒中では, 10-ethoxy-lactone chlorophyll *a* (10-EtO-chl. *a*) とその立体異性体 10-EtO-chl. *a'* を生成すること, またこの際には, 緑色が強まる事実が既に知られている。それゆえ, 本研究条件下の照射に際しても, 同じアロマー化が起こったことが推定される。現在, その推定を確かめるための実験を行っているので, 後報において成果を述べる。

照射したクロロフィル抽出液を使用したコンブエキスの色調改良 クロロフィル抽出液は照射処理によってその色調が改善され緑色が強まることから, これを利用して別に調製したコンブエキスの色調改良をする試みを行った。コンブエキスの配合表を Table 4 に示した。また Table 5 には室温での保管中における色調の変化を

Table 4. Composition of greenish seasoning extractive of the brown seaweed prepared

Preparation No.	Concentrated brown seaweed extractive*1 (g)	Extract of chlorophylls in ethanol*2 (g)	
		before illumination	after illumination
1	6	8	0
2	6	4	0
3	6	2	0
4	6	0	8
5	6	0	4
6	6	0	2

*1 Dry brown seaweed *Laminaria japonica* was mixed with 20 times weight of water and heated at 50°C for 1 h. The extractive thus obtained was concentrated to give 40% Brix value, which was used as the seasoning material.

*2 The chlorophylls in ethanol were treated under illumination in the same manner as in Table 2. For all preparations, 32.8 g PO-20*3, 6.4 g water, 0.3 g sodium glutamate, and 4.6 g NaCl were added to the mixture of the concentrated extractive and the extracted chlorophylls in ethanol.

*3 PO-20: hydrogenated starch hydrolyzate. (composed of 67~76% hydrogenated linear oligosaccharides ($n > 4$), Towa Chem. Ind. Co.)

肉眼で観察したときの評価結果を示した。これによると, 照射をしないクロロフィル抽出液を加えた No. 1~3 の試料に比べれば, 照射をしたクロロフィル抽出液を加えた試料の方がいずれも *a** や *b** が低い値を示しており, 1 週間から 1 カ月後までその傾向がほぼ保たれている。この中で特に照射したクロロフィル抽出液を 2/3 倍量加えた No. 5 の試料の場合には, 明らかに良好な緑色の色調を呈し, 1 カ月保存後でもなお良い色調を保持したが, 成分の一部が遊離することもあり, 安定性が劣ることが認められた。そこで, コンブエキス原液中のクロロフィルの安定性を高めるため, 還元でんぷん加水分解物 (東和化成工業製, PO-20) を添加しているが, その効果は不十分なため, 現在改良研究が続けている。⁷⁾

海藻は各種の光合成色素を含んでいるが, クロロフィルに関しては *a*, *b*, *c*₁, *c*₂, *d* などの存在が知られている。^{6,12)} この中でクロロフィル *a* は全ての藻類に共通の主成分であり, *a* 以外の色素の分析結果は種類によって著しく異なり, 分類学的な指標にもなりうるといわれる。⁶⁾ 褐藻は *a* と *c* をもつが, *c* は性質の異なるほぼ等量の *c*₁ と *c*₂ からなる種類 (属) もあるといわれる。池森らは,¹³⁾ ワカメには深青色と青緑色の 2 種類のクロロフィル *a* が存在すること, またワカメ以外の数種類の褐藻には吸収極大が 678 nm の長波長型のクロロフィル *a*

Table 5. Sensory evaluation for greenish coloring of seasoning extractive from the brown seaweed during storage at room temperature

Preparation No.	Color specification						Sensory evaluation	
	Storage						Storage	
	one week			one month			one week	one month
	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>		
1	54.8	-1.3	38.3	52.6	-0.7	39.6	-	-
2	50.6	-1.6	33.2	54.5	-0.6	38.2	+	-
3	52.6	-0.7	36.3	55.6	-0.4	38.5	-	-
4	53.6	-1.4	34.9	56.8	-0.8	40.2	+	-
5	60.8	-2.7	30.7	58.6	-1.9	32.8	+	+
6	58.2	-1.6	32.2	56.6	-1.2	36.6	+	-

† good, + fair, - poor.

The preparation of greenish seasoning extractive from the brown seaweed was the same as in Table 4. The storage of the preparations was made at room temperature in a dark.

The color change in the seasoning extractive preparations, whose compositions were as shown in Table 4, was evaluated with the progress of storage time by determining the *L**, *a** and *b** values as in Table 2 as well as by the sensory method.

の他に、674 nm の短波長型のクロロフィル *a* が認められることなどを明らかにした。これらの事実からクロロフィル *a* には2種類以上の異なる性質のものが存在することが明らかであり、その構造や光合成能との関わりについて興味を持たれる。本研究の結果から、その存在が推測されるクロロフィル *a* のアロマー化生成物（アロマー、allomerized product）は¹¹光照射によって人為的に生成した成分に相当しているが、紅藻類に含まれているクロロフィル *d* も、その抽出に伴って生成した人工産物であるともいわれている。^{6,12} しかし、今のところ両者の構造がどの程度類似しているかは不明である。以上の結果から光照射によって緑色を増強させたクロロフィル抽出液を用いてコンブエキスの色調改良することが出来た。現在、さらにコンブエキス原液中のクロロフィルの安定性を高める条件について検討中である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり懇切な御指導を賜りました東京大学生産技術研究所の渡辺 正教授、および本論文の作成にあたり校閲を賜りました酪農学園大学大学院フードシステム専攻の新井健一教授に謝意を表します。また、本研究の実施にあたり多大な御協力を頂いた東和化成工業株式会社の須賀 守、宮林華織、および千頭和友美諸氏に深謝致します。

文 献

- 1) 太田静行：こんぶ. *New Food Industry*, **34**, 38-44 (1992).
- 2) 奥平武則, 桑名好江：「昆布ミネラル」の特性とその利用. *フードケミカル*, **5**, 112-117 (1991).
- 3) 奥平武則, 桑名好江：昆布ミネラルの開発と応用. *食品と開発*, **26**, 24-25 (1990).
- 4) 夕田光治：最近の紅顔色素, クチナシ色素の技術動向. *フードケミカル*, **11**, 42-47 (1992).
- 5) 川村雄三, 延原昭男, 横島昭章：昆布様風味を有する調味料又は飲料の製法. 特公昭55-37225 (1980).
- 6) 野田宏行：色素, 「水産利用化学」(鴻巣章二, 橋本周久編), 恒星社厚生閣, 東京, 1992, pp. 312-325.
- 7) 形浦宏一, 真柄光男, 飯嶋望碩, 加藤和昭：海藻エキス含有液状組成物の製造方法. 特開昭63-301770 (1987).
- 8) 鎌田榮基, 片山 修：色の測り方, 「食品の色」, 光琳全書 (1), 東京, 1977, pp. 13-29.
- 9) 渡辺 正, 小林正美：クロロフィル類の精密分析. *油化学*, **38**, 132-141 (1989).
- 10) 野田宏行：光合成色素, 「水産食品学」(須山三千三, 鴻巣章二編), 恒星社厚生閣, 東京, 1991, pp. 315-316.
- 11) P. M. Schaber, J. E. Hunt, R. Fries, and J. J. Katz: High-performance liquid chromatographic study of the chlorophyll allomerization reaction. *J. Chromatogr.*, **316**, 25-41 (1984).
- 12) 天野秀臣：光合成色素, 「水産生物化学」(山口勝巳編), 恒星社厚生閣, 東京, 1991, pp. 189-192.
- 13) 池森雅彦, 新崎盛敏：海藻の光合成色素 I, 緑藻類と海藻類に含まれるクロロフィルとカロチノイドの二次元ペーパークロマトグラフィーによる分離. *藻類*, **25**, 54-66 (1977).