



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クロレラに含まれるカロテノイドの定量とケン化反応による濃縮
Author(s)	加茂川, 寛之; Kamogawa, Hiroyuki; 細川, 雅史 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 62(3), 83-88
Issue Date	2012-12-14
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/51117">https://hdl.handle.net/2115/51117</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	62(3)p83-88.pdf



## クロレラに含まれるカロテノイドの定量とケン化反応による濃縮

加茂川寛之・細川 雅史・阿部 真幸・宮下 和夫

(2012年9月24日受付, 2012年9月24日受理)

### Carotenoid Contents in *Chlorella pyrenoidosa* and Concentration by Saponification

Hiroyuki KAMOGAWA, Masashi HOSOKAWA, Masayuki ABE and Kazuo MIYASHITA

#### Abstract

Carotenoids are natural pigments found in plants, seaweeds, algae and bacteria. It is well known that carotenoids have physiological effects such as provitamin A activity and antioxidative effect. Among carotenoids,  $\beta$ -carotene, lutein and zeaxanthin are popular carotenoids in green leafy vegetables and green microalgae. Furthermore, violaxanthin and neoxanthin are also contained as minor carotenoids. These carotenoids are currently expected to exhibit health beneficial effects depend on their unique structure. However, there are only a few reports of quantitative analysis of neoxanthin and violaxanthin in microalgae. In the present, we therefore investigated that the carotenoid contents in *Chlorella pyrenoidosa* and *Dunaliella salina*, which are green microalgae, comparing their contents in green leafy vegetables. *9'-cis*-Neoxanthin in *Chlorella pyrenoidosa* was high level of 120.9  $\mu\text{g/g}$  dry wt as same as that in *Brassica rapa* var. *chinensis* or *Ocimum basilicum*, while violaxanthin content was low. The content of lutein + zeaxanthin was 1,125.2  $\mu\text{g/g}$  dry wt in *Chlorella pyrenoidosa*, which was the same level as *Allium tuberosum* or *Allium fistulosum*.  $\beta$ -Carotene content in *Dunaliella salina* was approximately 100-fold compared to green leafy vegetables. On the other hand, the carotenoids in total lipid from *Chlorella pyrenoidosa* was markedly concentrated in recovered lipid after saponification with potassium hydroxide. After 24 h saponification, the concentration of *9'-cis*-neoxanthin in recovered lipid increased approximately 7.5-folds higher than that of chlorella lipid. Furthermore, total carotenoids concentration in the recovered lipid reached to 9.5-fold higher than that of chlorella lipid. These results show that chlorella lipid is a useful resource for *9'-cis*-neoxanthin. Saponification is an effective method to concentrate *9'-cis*-neoxanthin in chlorella lipid.

**Key words** : Carotenoids, Chlorella, Dunaliella, Green leafy vegetable, Saponification

#### 諸 言

カロテノイドは黄～橙色を示す脂溶性の色素成分であり、これまでに750種類以上が様々な生物から見出されている。 $\beta$ -カロテンなどの一部のカロテノイドについては、ヒトに対する生理作用や健康機能が明らかにされている(武藤, 1997)。このようなイソプレン骨格をもつカロテノイドは、光合成を行う植物や一部の微生物によってのみ生合成される。特に、光合成植物においては、生合成されたカロテノイドが、光を感受するアンテナの役割や過剰な光による組織障害からの防護機能を示すことがよく知られている(三室ら, 2006)。一方、動物はこうしたカロテノイドの生合成能をもたないため、食品成分として摂取し、吸収後に体内で代謝変換される。一般的にヒトの場合、通常は約40種類のカロテノイドを野菜や果物から摂取していると推察されており、それに関連して癌のリスク低減(Riboli and Norat, 2003)や、血管疾患のリスク低減(Cooper et al., 1999)といった機能性が多く報告

されている。

このようなカロテノイドの疾病予防機能は、その分子構造によって異なると考えられる。日常食している緑色葉野菜に含まれるカロテノイドは、主に $\beta$ -カロテン、ルテイン、ゼアキサンチンであり、含有率は低くなるがビオラキサンチンやネオキサンチンも含まれている(Fig. 1)。これらの中で広く知られる生理作用として $\beta$ -カロテンのプロビタミンA活性が挙げられる。また、Beattyら(2004)によると、目の網膜にはルテインとゼアキサンチンが特異的に蓄積されており、それらの蓄積量と網膜の加齢黄斑変性症の発症との間に負の相関関係を示すことが報告される。更に、血漿中のルテインとゼアキサンチン含量が多い人は、老人性白内障のリスクが低いとの報告(Karppi et al., 2012)もあり、光刺激を受けて誘導される目の傷害により発症する疾病を抑える効果を持つことが明らかにされている。また、ビオラキサンチンでは、マクロファージに対して抗炎症作用を示すことが、最近報告(Soontornchaiboon et al., 2012)され、新たな機能性として注目される。

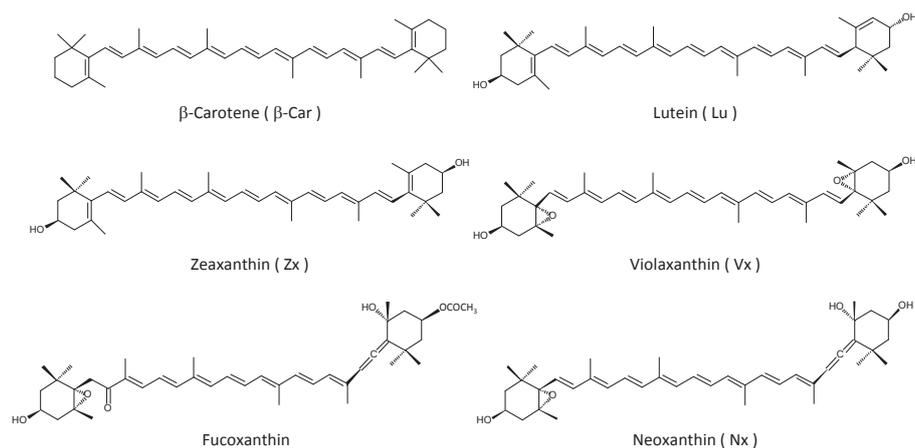


Fig. 1. Chemical structure of carotenoids.

一方、分子構造中にアレン結合をもつネオキササンチン (Fig. 1) については、その機能性に関する報告は極めて少ない。著者らはネオキササンチンと同様にアレン結合やエポキシ基をもつ褐藻由来のフコキササンチン (Fig. 1) がマウスに対して内臓脂肪の蓄積抑制効果を示すことを見出している (Maeda et al., 2005)。また、肥満の進行に関わる脂肪細胞の油滴蓄積に対して、ネオキササンチンが抑制作用を示すことを *in vitro* 試験で明らかにした (Okada et al., 2008)。これらのことから、ネオキササンチンの抗肥満作用に関わる *in vivo* の活性評価が期待される。

更に、これまでに機能性が多く報告されているルテインやゼアキササンチンに加え、新たな機能性が期待されるネオキササンチンの利用を考えた場合、それらの機能性に関わる分子機構の解明に加えて、カロテノイドの効率的な分離、濃縮、供給方法を開発することも重要な課題である。特にネオキササンチンは緑色葉野菜中に含まれているものの含量が少なく、更には抽出が容易な乾燥素材が少ない。それに対し、アオサ藻、プラシノ藻、車軸藻などの緑色植物界に属する緑藻類中にもネオキササンチンが含まれていることが知られている。その中で緑藻微細藻類の一種であるクロレラは、培養方法が確立されており、且つ安定的に乾燥物を入手することが可能である。

そこで本研究では、緑藻類であるクロレラに加え、 $\beta$ -カロテンの供給源としての利用が期待されるドナリエラのカロテノイド含量を各野菜中のカロテノイド含量と比較した。さらに、クロレラより得られるカロテノイドを脂溶性成分中に濃縮するために、水酸化カリウムを用いたケン化法について検討した。

### 材料および方法

#### 材料

クロレラ (*Chlorella pyrenoidosa*) およびドナリエラ (*Dunaliella salina*) は、サンライフ株式会社 (愛知, 日本) より乾燥粉末物を購入した。ホウレンソウ (*Spinacia olera-*

*cea*), チンゲンサイ (*Brassica rapa* var. *chinensis*), コマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis*), ミズナ (*Brassica rapa* var. *lacinifolia*), シソ (*Perilla frutescens* var. *acuta*), スイートバジル (*Ocimum basilicum*), ミツバ (*Cryptotaenia japonica*), イタリアンパセリ (*Petroselinum neapolitanum*), シュンギク (*Chrysanthemum coronarium*), グリーンレタス (*Lactuca scariola* var. *sativa*), ニラ (*Allium tuberosum*), ネギ (*Allium fistulosum*) は函館市内スーパーで生鮮物を購入した。抽出および分析に用いた試薬は、和光純薬 (株) (大阪, 日本) より特級試薬を購入し使用した。定量分析のための検量線に用いた標準カロテノイドのうち、*9'*-*cis*-ネオキササンチンとピオラキササンチンはホウレンソウから精製して用いた。ルテインは和光純薬 (株) (大阪, 日本) より、 $\beta$ -カロテンはシグマアルドリッチジャパン (東京, 日本) より購入した。

#### 脂質抽出

クロレラおよびドナリエラは、乾燥粉末重量に対して 10 倍量 (v/w) のクロロホルム:メタノール (2:1, v/v) に浸漬し、24 時間静置して抽出を行った。葉野菜は茎を切除し、細切りにして冷凍庫にて一晩凍結し、細胞壁を破壊した。解凍後、サンプル重量に対し 5 倍量 (v/w) のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に浸漬し、24 時間静置しながら抽出を行った。抽出液は Whatman 2 号濾紙を用いてろ過した。この抽出操作を 2 度繰り返し、抽出液を分液ロートにて合わせた後に、溶媒比がクロロホルム:メタノール:水 (10:5:3, v/v/v) となるよう調整した。その後、よく振り混ぜて一晩室温にて遮光静置して二層分離した。脂質成分の溶解した下層のクロロホルム層を回収し、エバポレーターにて溶媒を留去した。得られた濃縮物は、総脂質として重量測定した後、HPLC 分析に供するまでクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に溶解して  $-40^{\circ}\text{C}$  にて保存した。ケン化用のクロレラ油は、乾燥重量あたり 10 倍量 (v/w) のメタノールに浸漬し、24 時間静置しながら抽出した。抽出液はブフナー漏斗を用いて Whatman 2 号濾紙にて減圧濾過した。この抽出操作を 2 回繰り返し、エバポレーター

にて溶媒を留去した。得られた濃縮物は総脂質として重量を測定した後、エタノールに溶解して $-40^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### クロレラ由来カロテノイドのケン化濃縮

ケン化を行うためにクロレラからメタノールを用いて抽出した脂質成分を濃度 $4.7\text{ g}/10\text{ mL}$ のエタノール溶液とした。次いで、それらのエタノール溶液に $50\%$  (w/v) 水酸化カリウム (KOH) 水溶液をそれぞれ $1\text{ mL}$ ,  $3\text{ mL}$ ,  $5\text{ mL}$ ,  $8\text{ mL}$  添加して、 $12$  時間ケン化反応を行った。一方、クロレラ脂質のエタノール溶液に $50\%$  KOH 水溶液を $5\text{ mL}$  添加して $1\sim 48$  時間ケン化反応を行い、経時的な変化を分析した。ケン化反応後、 $50\text{ mL}$  のジエチルエーテルを加え、更に $3\%$  (w/v) 塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液を加えることで終量 $100\text{ mL}$ となるように調整し二層分離した。ジエチルエーテル層を回収し、洗浄操作は $3\%$  NaCl 水溶液 $40\text{ mL}$ で1回、蒸留水 $40\text{ mL}$ で3回繰り返した。水洗後、pH試験紙を用いて水層のpHが $7\sim 8$ であることを確認した後、ジエチルエーテル層を回収した。ケン化反応後の二層分離で得られた水層についても、ジエチルエーテル $50\text{ mL}$ を加えてよく混合した後、同様の方法で脂質成分を抽出した。回収したジエチルエーテル層をあわせ、エバポレーターで溶媒を留去した。得られた濃縮物はケン化後の総脂質として重量測定した後、HPLC分析に供するまで、エタノール溶液として $-40^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### HPLC 分析

微細藻類あるいは野菜から抽出した脂質中に含まれるカロテノイド含量を、Garcia-Plazaola と Becerril (1999) の報告を参考にして HPLC により定量した。分析条件は、以下の通りとした。

カラム Develosil C18-UG-5 ( $4.6\times 250\text{ mm i.d.}$ ,  $5.7\text{ }\mu\text{m particle size}$ , 野村化学 (株))

移動相 A Acetonitrile/Methanol/Water, ( $84:9:7$ , v/v/v)  
B Methanol/Ethyl acetate, ( $68:32$ , v/v)

	A	B
グラジエント		
0 min	100%	0%
8 min	100%	0%
18 min	0%	100%
28 min	0%	100%

カラム温度  $25^{\circ}\text{C}$   
流速  $1.2\text{ mL}/\text{min}$

なお、野菜抽出物中のゼアキサントフェンはルテインとほぼ同じ保持時間であるため、ルテインとゼアキサントフェン

を合わせた含有量をルテインの検量線を用いて定量した。

## 結果と考察

#### 微細藻類および野菜中に含まれるカロテノイドの定量

野菜中に含まれるカロテノイドの種類と含量は、野菜の種類に加え組織や成熟度によって異なる。葉部に含まれる主なカロテノイドとしては、 $\beta$ -カロテンのほかルテイン、ゼアキサントフェン、ピオラキサントフェン、ネオキサントフェンなどが挙げられる。この中で、 $\beta$ -カロテンやルテイン、ゼアキサントフェン含量については多くの研究が見られるが、ピオラキサントフェンやネオキサントフェンの定量分析に関する報告は多くない。

そこで、緑藻微細藻類であるクロレラやドナリエラ中に含まれるカロテノイド含量を定量し、日常よく摂取される野菜類との比較を行った。その結果、Table 1 に示すように、 $\beta$ -カロテンは葉野菜中に比較的多く含まれているが、ドナリエラはそれらの $100$ 倍以上の含有率で含まれていた。その一方、ネオキサントフェンやピオラキサントフェンなどのキサントフィル類はあまり含まれていないことが示された。ドナリエラは緑藻類に属するが、そのカロテノイド含量や組成が生育条件により変化することが知られている (Gider et al., 1998)。ドナリエラの場合、リンと窒素欠乏の高塩分培養液での強い光と高温条件下において、 $\beta$ -カロテン含量が大きく増加することが報告されている (山口, 1992)。一方、クロレラ中には野菜と同様に、ルテイン+ゼアキサントフェンが検出されたが、葉野菜と比較して少なかった。一方、 $9'$ -*cis*-ネオキサントフェンやピオラキサントフェンも、 $\beta$ -カロテンやルテイン、ゼアキサントフェンと比較して含量は少ないものの、葉野菜中に含まれていることが知られている。本研究において種々の葉野菜類中の $9'$ -*cis*-ネオキサントフェン含量を比較した結果、シソやコマツナに多く含まれていた。一方、ピオラキサントフェンについてはハウレンソウ、ミツバ、シュンギクに多く含まれており、野菜の種類によってカロテノイドの組成が異なることが分かった。クロレラ中にも $9'$ -*cis*-ネオキサントフェンが $120.9\text{ }\mu\text{g}/\text{g dry wt}$ 含まれており、チンゲンサイ、スイートバジル、パセリと同程度の含量であった。一方、ピオラキサントフェンはクロレラ中には僅かしか検出されず、葉野菜とは大きく異なることが示された。以上のように、葉野菜中には $\beta$ -カロテンやルテイン、ゼアキサントフェンに加え、 $9'$ -*cis*-ネオキサントフェンやピオラキサントフェンが含まれているものの、通常の流通形態が生鮮状態であるとともに複数のカロテノイドが含まれているため、個々のカロテノイドを分離、利用することが容易ではない。一方、クロレラは、健康食品や飼料として乾燥物が普及していることに加え、 $9'$ -*cis*-ネオキサントフェンと極性の近いピオラキサントフェンの含量が少ないことから、その分離が容易である。そのため、ネオキサントフェンを分離する場合はクロレラが有効な供給源と考えられる。

Table 1. Carotenoid content in vegetables and green algae extraction.

Common name	Scientific name	Total Lipid (mg/g dry wt)	9'-cis-Nx <sup>*1</sup> (µg/g dry wt)	Vx <sup>*2</sup> (µg/g dry wt)	Lu + Zx <sup>*3</sup> (µg/g dry wt)	β-Car <sup>*4</sup> (µg/g dry wt)
Green leafy vegetables						
Spinach	<i>Spinacia oleracea</i>	81.8	211.7	585.2	2,101.2	834.5
Qing-geng cai	<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i>	101.6	137.1	96.0	1,728.7	737.7
Komatsuna	<i>Brassica rapa</i> var. <i>perviridis</i>	106.0	303.1	158.2	2,048.6	968.2
Mizuna	<i>Brassica rapa</i> var. <i>laciniifolia</i>	110.4	189.1	126.3	1,917.9	890.3
Perilla	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	119.0	381.7	268.6	2,191.7	1,001.5
Sweet basil	<i>Ocimum basilicum</i>	89.2	145.4	71.2	1,461.3	582.3
Mistuba	<i>Cryptotaenia japonica</i>	129.6	276.4	522.3	2,543.3	944.6
Italian parsley	<i>Petroselinum neapolitanum</i>	100.7	247.5	235.5	1,681.3	736.7
Parsley	<i>Petroselinum crispum</i>	70.9	157.7	162.7	1,425.2	485.3
Garland chrysanthemum	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	98.1	204.2	459.5	1,748.7	709.4
Lettuce	<i>Lactuca scariola</i> ver. <i>sativa</i>	103.9	226.0	337.0	2,281.7	886.1
Garlic chives	<i>Allium tuberosum</i>	61.0	64.8	70.3	1,167.2	543.7
Welsh onion	<i>Allium fistulosum</i>	68.4	85.4	49.8	1,225.2	614.9
Micro algae						
Chlorella	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	116.7	120.9	Tr <sup>*5</sup>	1,125.2	Tr
Dunaliella	<i>Dunaliella salina</i>	223.6	N.D. <sup>*6</sup>	N.D.	236.4	104,058.5

<sup>\*1</sup> 9'-cis-Nx : 9'-cis-Neoxanthin, <sup>\*2</sup> Vx : Violaxanthin, <sup>\*3</sup> Lu + Zx : Lutein + Zeaxanthin, <sup>\*4</sup> β-Car : β-Carotene, <sup>\*5</sup> Tr : Trace,

<sup>\*6</sup> N.D. : Not Detected

### ケン化反応を利用したカロテノイドの濃縮

天然素材に含まれるカロテノイドを利用する場合、有機溶媒を用いて総脂質を抽出するため、クロロフィルやグリセロ糖脂質、グリセロリン脂質といったカロテノイド以外の脂質成分が混在する。そのため、それらを分離してカロテノイド成分を濃縮、または精製する必要がある。そのため、カロテノイドを効率的に濃縮できれば、素材としての利用はもとより個々のカロテノイドの分離操作も容易になる。そこでカロテノイドを効率よく濃縮するために、クロレラから抽出した脂質を KOH で処理することにより、エステル脂質をケン化して除去する方法について検討した。このようなケン化反応によるカロテノイドの濃縮は、マリーゴールドからルテインやゼアキサンチンを抽出、分離するために工業的にも用いられている方法であり、これをクロレラ脂質に応用した。最初に、クロレラ脂質中のカロテノイドを濃縮するための KOH の添加量について検討した (Table 2)。クロレラ脂質約 4.7 g に 0.5 g~4 g の KOH を添加してケン化処理を行った結果、KOH の添加量 2.5 g 以上で室温 12 時間にて反応を行った場合、残存した脂質量が 0.5 g 程度の一定量となり、十分にケン化反応が進んだと考えられる。ケン化後のクロレラ脂質中に含まれる 9'-cis-ネオキサンチン、ピオラキサンチン、ルテイン+ゼアキサンチン含量は、17.7~18.1 mg/g 脂質、2.5~2.7 mg/g 脂質、135.8~136.6 mg/g 脂質であった。クロレラ脂質中に含まれていたカロテノイド総量に対する、ケン化後のカロテノイド回収率は 88.4% で

あった。一方、クロレラ脂質中のカロテノイド含有量に対して、ケン化後に残存した脂質中の含有率は 9 倍まで大きく濃縮されており、カロテノイドの利用を考慮する場合、効果的な濃縮方法といえる。特に天然物中において含有量が少ない 9'-cis-ネオキサンチンを利用する場合、クロレラ脂質中の含量に対して、ケン化後の脂質中には 7 倍以上濃縮されており、有用な素材となりえる。更に、クロレラ脂質のケン化反応の経時的変化について調べた (Table 3)。クロレラ脂質約 4.7 g に対し、KOH を 2.5 g 添加したところ、1 時間以降で残存した脂質量が一定となり、短時間でも十分にケン化反応が進んだものと考えられる。残存脂質中の 9'-cis-ネオキサンチン、ピオラキサンチン、ルテイン+ゼアキサンチン量はそれぞれ、17.5~19.2 mg/g 脂質、2.3~2.5 mg/g 脂質、133.3~152.1 mg/g 脂質であった。ケン化反応によるカロテノイド全体の回収率は、48 時間のケン化反応後においても 90% 以上であり、アルカリに対して比較的安定であることが分かった。1 時間のケン化反応後に残存した脂質中のカロテノイド含量が 166.1 mg/g 脂質となり、クロレラ脂質と比較して 9.5 倍まで濃縮された。

本研究により、緑色微細藻類のクロレラとドナリエラがネオキサンチンやルテイン+ゼアキサンチン、β-カロテンの供給源として有用であることが分かった。特に、天然物中に有効な供給源のないネオキサンチンを分離する場合、クロレラ脂質をアルカリによって短時間のケン化処理をすることにより 7 倍以上にまで濃縮できることを見出した。今後、それらを用いたネオキサンチンの機

Table 2. Carotenoid concentration in chlorella lipid by saponification.

	Added potassium hydroxide (g)				
	0	0.5	1.5	2.5	4
Total lipid (g)	4.7 ± 0.2	2.2 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
9'-cis-Nx (mg/g lipid) <sup>*1</sup>	2.5 ± 0.1	4.7 ± 0.0	12.1 ± 3.7	18.1 ± 0.4	17.7 ± 1.0
Vx (mg/g lipid) <sup>*2</sup>	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.5 ± 0.5	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.2
Lu+Zx (mg/g lipid) <sup>*3</sup>	14.2 ± 1.2	31.7 ± 0.4	94.9 ± 28.5	136.6 ± 2.6	135.8 ± 6.6
Total carotenoid (mg/g lipid)	17.4 ± 1.4	37.2 ± 0.4	108.4 ± 32.6	157.5 ± 3.1	156.0 ± 7.7
Recovery yield (%) <sup>*4</sup>	100	100.8	85.2	93.9	88.4
Rate of concentration <sup>*5</sup>	1	2.1	6.2	9.0	9.0

Saponification was conducted for 12 h.

means ± standard deviation ( $n = 3$ ).

<sup>\*1</sup> 9'-cis-Nx : 9'-cis-Neoxanthin

<sup>\*2</sup> Vx : Violaxanthin

<sup>\*3</sup> Lu + Zx : Lutein + Zeaxanthin

<sup>\*4</sup> Yield (%) = (total carotenoid in recovered lipid after saponification / total carotenoid in chlorella lipid used for saponification) × 100

<sup>\*5</sup> Rate of concentration = carotenoid content in recovered lipid after saponification / carotenoid content in chlorella lipid used for saponification

Table 3. Time course of chlorella lipid saponification.

	Reaction time (h)					
	0	1	3	12	24	48
Total Lipid (g)	4.7 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
9'-cis-Nx (mg/g lipid) <sup>*1</sup>	2.5 ± 0.1	18.1 ± 0.3	17.5 ± 1.9	19.0 ± 0.8	19.1 ± 0.6	19.2 ± 0.1
Vx (mg/g lipid) <sup>*2</sup>	0.8 ± 0.0	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.0
Lu + Zx (mg/g lipid) <sup>*3</sup>	14.2 ± 1.2	144.6 ± 3.6	133.3 ± 14.2	144.9 ± 7.7	148.3 ± 6.2	152.1 ± 0.9
Total carotenoid (mg/g lipid)	17.4 ± 1.4	166.1 ± 4.0	153.2 ± 16.5	166.4 ± 8.4	169.9 ± 6.8	173.6 ± 1.0
Recovery yield (%) <sup>*4</sup>	100.0	95.5	93.8	93.0	92.2	93.9
Rate of concentration <sup>*5</sup>	1.0	9.5	8.8	9.6	9.8	10.0

means ± standard deviation ( $n = 3$ ).

<sup>\*1</sup> 9'-cis-Nx : 9'-cis-Neoxanthin

<sup>\*2</sup> Vx : Violaxanthin

<sup>\*3</sup> Lu + Zx : Lutein + Zeaxanthin

<sup>\*4</sup> Yield (%) = (total carotenoid in recovered lipid after saponification / total carotenoid in chlorella lipid used for saponification) × 100

<sup>\*5</sup> Rate of concentration = carotenoid content in recovered lipid after saponification / carotenoid content in chlorella lipid used for saponification

能性の解明が期待される。

## 参 考 文 献

- Asai, A., Terasaki, M. and Nagao, A. (2004) An epoxide-furanoid rearrangement of spinach neoxanthin occurs in the gastrointestinal tract of mice and in vitro: formation and cytostatic activity of neochrome stereoisomers. *J. Nutr.*, **134**, 2237-2243.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1984) beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **224**, 569-573.
- Beatty, S., Nolan, J., Kavanagh, H. and O'Donovan, O. (2004) Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **430**, 70-76.
- Calvo, M.M. (2005) Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 671-696.
- Cooper, D.A., Eldridge, A.L. and Peters, J.C. (1999) Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular Degeneration: A Review of Recent Research. *Nutr. Rev.*, **57**, 201-214.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E. and Sies, H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids and thiols. *J. Am. Clin. Nutr.*, **53**, 194S-200S.
- Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants — a review. *J. Photochem. Photobiol. B*, **41**, 189-200.
- Foote, S.C. and Denny, W.R. (1968) Chemistry of singlet oxygen. VII. quenching by beta-carotene. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6233-6235.
- Garcia-Plazaola, I.J. and Becerril, M.J. (1999) A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Anal.*, **10**, 307-313.
- Geider, J.R., Macintyre, L.H., Graziano, M.L. and McKay, L.R.M. (1998) Responses of the photosynthetic apparatus of

- Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *Eur. J. Phycol.*, **33**, 315-332.
- Granado, F., Olmedilla, B. and Blanco, I. (2003) Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Brit. J. Nutr.*, **90**, 487-502.
- Gross, J. (1991) "Pigments in Vegetables", Van Nostrand Reinhold, New York.
- Karppi, J., Laukkanen, A.J. and Kurl, S. (2012) Plasma lutein and zeaxanthin and the risk of age-related nuclear cataract among the elderly Finnish population. *Br. J. Nutr.*, **108**, 1, 148-54.
- Khachik, F., Spangler, J.C. and Smith, C.J.Jr. (1997) Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal. Chem.*, **69**, 1873-1881.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.T. and Bone, R.A. (2003) Biologic-mechanism of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Ann. Rev. Nutr.*, **23**, 171-201.
- Li, W., Gao, Y., Zhao, J. and Wang, Q. (2007) Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of chinese marigold. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8478-8484.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H. and Truscott, T.G. (2001) The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch. Biochem. Biophys.*, **385**, 13-19.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K. and Miyashita, K. (2005) Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 392-397.
- 三室 守・高市真一・富田純史 (2006) カロテノイド—その多様性と生理活性—. 真興社, 東京.
- 武藤泰敏 (1997) レチノイド・カロテノイド—体内代謝と発癌予防—. 南山堂, 東京.
- 大嶋俊二 (2003) 抗肥満剤, 特許公開 2003-95930.
- Okada, T., Nakai, M., Maeda, H., Masashi, H., Sashima, T. and Miyashita, K. (2008) Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells. *J. Oleo. Sci.*, **57**, 345-351.
- Miyashita, K. (2009) "Function of Marine Carotenoids" In *Food Factors for Health Promotion*. Karger, Basel.
- Mares-Perlman, A.J., Millen, E.A., Ficek, L.T. and Hankinson, E.S. (2002) The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. *J. Nutr.*, **132**, 518S-524S.
- Prebble, J. and West, S. (1975) Carotenoids of cauliflower bud tissue. *Ann. Bot.*, **39**, 1097-1102.
- Raju, M., Varakumar, S., Lakshminarayana, R., Krishnakantha, P.T., Baskaran, V. (2007) Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chemistry*, **101**, 1598-1605.
- Riboli, E. and Norat, T. (2003) Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *J. Am. Clin. Nutr.*, **78**, 559S-569S.
- 柴田慎也・石原知代子 (2002) ルテインおよび高純度ルテインの取得方法. 特許公開 2002-223787.
- Soontornchaiboon, W., Joo, S.S. and Kim, S.M. (2012) Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 macrophages. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1137-1144.
- Takagi, S. (1985) Determination of green leaf carotenoids by HPLC. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1211-1213.
- Takayanagi, K., Morimoto, S., Shirakura, Y., Mukai, K., Sugiyama, T., Tokuji, Y. and Ohnishi, M. (2011) Mechanism of visceral fat reduction in tsumura suzuki obese, diabetes (TSOD) mice orally administered  $\beta$ -cryptoxanthin from satsuma mandarin oranges (*Citrus unshiu* Marc). *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 12342-12351.
- 山口勝己 (1992) 微細藻類の利用. 日本水産学会, 東京.
- Yim, M., Hosokawa, M., Mizushima, Y., Yoshida, H., Saito, Y. and Miyashita, K. (2011) Suppressive effects of amarouciaxanthin A on 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of PPAR  $\gamma$  and C/EBP  $\alpha$  mRNA expression. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 1646-1652.

北海道大学  
水産科学研究彙報

第62卷

**BULLETIN  
OF  
FISHERIES SCIENCES,  
HOKKAIDO UNIVERSITY**

**Vol. 62**

**2012**

北海道大学大学院水産科学研究科

函館市

**RESEARCH FACULTY OF FISHERIES SCIENCES,  
HOKKAIDO UNIVERSITY  
HAKODATE, JAPAN**

# 北海道大学水産学部研究彙報

## 第 62 卷

### 総 目 次

#### 第 1 号 (2012 年 3 月)

胎子期におけるトド ( <i>Eumetopias jubatus</i> ) の成長様式と形態的特徴 ..... 條野真奈美・小林 由美・浅沼 武敏・坪田 敏男・桜井 泰憲	1
噴火湾における球形シャットネラ <i>Chattonella globosa</i> の初報告 ..... 夏池 真史・金森 誠・馬場 勝寿・山口 篤・今井 一郎	9
沿岸域海底泥中に存在する珪藻類休眠期細胞の凍結耐性 ..... 板倉 茂・長崎 慶三・河村 知彦・今井 一郎	15
和歌山県下芳養湾における海水中およびアオサに付着する赤潮藻殺菌細菌の分布 ..... 今井 一郎・岡本 悟・西垣 友和・吉永 郁生・竹内 照文	21

#### 第 2 号 (2012 年 8 月)

函館市近郊に生息するニホンザリガニにおける繁殖形質の個体群間比較 ..... 阿部 峻太・田代 慧・竹下 文雄・和田 哲	29
マナマコ種苗の放流初期における発見率低下要因 ..... 植草 亮人・吉田 奈未・柏尾 翔・戸梶 裕樹・浅見 愛 中原功太郎・五嶋 聖治	43

#### 第 3 号 (2012 年 12 月)

漁業権制度に関する沿岸集落住民の意識調査 (北海道知内町小谷石地区及び中の川地区) ..... 村上 祐一・倉西 森大・Sawitree CHAMSAI・岡本純一郎	51
Geographical variations in abundance and body size of the hydromedusa <i>Aglantha digitale</i> in the northern North Pacific and its adjacent seas ..... Tomoya SHIOTA, Atsushi YAMAGUCHI, Rui SAITO and Ichiro IMAI	63
培養条件下で観察された赤潮ラフィド藻 <i>Chattonella marina</i> の高い増殖速度 ..... 今井 一郎	71
Fishery Income Fluctuation with Changing Social Situation and Selecting Fishing Ground, in the Japanese Coastal Squid Jigging Fishery (1975-2008) ..... Osamu TAMARU, Kazushi MIYASHITA, Nobuo KIMURA, Yasuzumi FUJIMORI, Hideo TAKAHARA and Teisuke MIURA	75
クロレラに含まれるカロテノイドの定量とケン化反応による濃縮 ..... 加茂川寛之・細川 雅史・阿部 真幸・宮下 和夫	83

BULLETIN  
OF THE  
FISHERIES SCIENCES,  
HOKKAIDO UNIVERSITY

Volume 62

No. 1 (March 2012)

Manami JONO, Yumi KOBAYASHI, Taketoshi ASANUMA, Toshio TSUBOTA and Yasunori SAKURAI : Allometric growth and morphology of Steller sea lion fetuses .....	1
Masafumi NATSUIKE, Makoto KANAMORI, Katsuhisa BABA, Atsushi YAMAGUCHI and Ichiro IMAI : First observation of <i>Chattonella globosa</i> in Funka Bay, Hokkaido, Japan .....	9
Shigeru ITAKURA, Keizo NAGASAKI, Tomohiko KAWAMURA and Ichiro IMAI : Cryopreservation tolerance of Marine Diatom Resting Stage Cells in the Coastal Sea Bottom Sediments .....	15
Ichiro IMAI, Satoru OKAMOTO, Tomokazu NISHIGAKI, Ikuo YOSHINAGA and Terufumi TAKEUCHI : Distribution of algicidal bacteria against red tide phytoplankton in seawater and on the surface of the green alga <i>Ulva pertusa</i> in Shimo-Haya Bay, Wakayama Prefecture .....	21

No. 2 (August 2012)

Shunta ABE, Satoshi TASHIRO, Fumio TAKESHITA and Satoshi WADA : Comparison of reproductive traits among local populations of the freshwater crayfish <i>Cambaroides japonicus</i> near Hakodate .....	29
Ryoto UEKUSA, Nami YOSHIDA, Sho KASHIO, Hiroki TOKAJI, Ai ASAMI, Koutaro NAKAHARA and Seiji GOSHIMA : Low discovery rate of sea cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> juveniles after seed release in the field .....	43

No. 3 (December 2012)

Yuichi MURAKAMI, Morio KURANISHI, Sawitri CHAMSAI and Junichiro OKAMOTO : Sentiment of Coastal Villagers about the Coastal Fisheries Right System .....	51
Tomoya SHIOTA, Atsushi YAMAGUCHI, Rui SAITO and Ichiro IMAI : Geographical variations in abundance and body size of the hydro-medusa <i>Aglantha digitale</i> in the northern North Pacific and its adjacent seas .....	63
Ichiro IMAI : High growth rates of the red tide flagellate <i>Chattonella marina</i> (Raphidophyceae) observed in culture .....	71
Osamu TAMARU, Kazushi MIYASHITA, Nobuo KIMURA, Yasuzumi FUJIMORI, Hideo TAKAHARA and Teisuke MIURA : Fishery Income Fluctuation with Changing Social Situation and Selecting Fishing Ground, in the Japanese Coastal Squid Jigging Fishery (1975–2008) .....	75
Hiroyuki KAMOGAWA, Masashi HOSOKAWA, Masayuki ABE and Kazuo MIYASHITA : Carotenoid Contents in <i>Chlorella pyrenoidosa</i> and Concentration by Saponification .....	83