黒米からのアントシアニン色素抽出特性

河野俊夫・北野雅治・松岡孝尚

高知大学農学部 783-8502 南国市物部乙 200

Anthocyanin Pigment Extracting Characteristics from Black Rice

Toshio KAWANO, Masaharu KITANO and Takahisa MATSUOKA

Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe 200, Nankoku, 783-8502 Japan

Abstract

Using not a toxic extracting solvent but the pure water, extracting characteristics of anthocyanin pigment from black rice were measured at solution temperatures of 20 to 50°C and an extracting process model was formulated. In measuring the anthocyanin concentration in solution, a new measuring method, which uses saturation color information from a visible image of solution, was proposed. Applying the anthocyanin concentration data obtained with this method extracting process formulations demonstrated that mass-based extracting rate coefficients, which characterized the anthocyanin extracting process, ranged between 5.55×10^{-2} and 6.51×10^{-2} ($\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$). It was also found that equilibrium extracting concentrations, which determine the anthocyanin extracting limit from a given amount of black rice, depends on solution temperature. Then the relationships were formulated as a linear regression. The formulations for the anthocyanin extraction process proposed would be useful as a basic formula in designing apparatuses for extracting anthocyanin pigment from a tower filled with a large amount of black rice.

Keywords : anthocyanin pigment, black rice, extraction, image processing, process modelling

緒 言

植物色素は食品や繊維の着色料としてかつてはよく用いられていたが、化学合成着色料により利用の範囲が狭められた。しかし近年、消費者の食品に対する安全・安心志向の高まりにより、再び天然の植物色素が注目されている (Itani, 2000)。中でもアントシアニン色素は、抗酸化性などの機能性を持つことが明らかになり (e. g. Yoshida, 1998)、今後一層の応用性が期待される天然植物色素の一つである。アントシアニン色素はブドウやシソ、ブルーベリー、穀物では黒米などに多く含まれているが、抽出量は少なく高価である。また、アントシアニ

ン色素は加工中の熱により容易に構造変化を受けるため、例えば黒米に含まれるアントシアニン色素を摩擦による研削で得ようとしても困難であるので、抽出以外の前処理は洗浄や異物除去程度である。アントシアニン色素を含め、天然色素を植物から抽出する際には塩酸やギ酸などを含むエタノールやメタノール、アセトンによる抽出が行われる (Oba, 2000)。しかし、サプリメントなどで摂取するアントシアニンの抽出は、毒性のある抽出溶媒を用いるのに対して、最近の消費者は一般にこれを忌避することから、安全性の点からは水を利用した抽出が好ましい。抽出溶媒の違いによる最終抽出量の比較に関する研究例 (e. g. Ono, 2003) は多いものの、抽出時のアントシアニン色素の移動プロセスを数量的に分析した例はない。黒米はブドウやブルーベリーなどと比べて抽出溶液に溶出しアントシアニン色素の構造変化に影響を与える共存成分が少なく、物理抽出がしやすい。

黒米からのアントシアニン抽出を物理抽出する形式と

2004年12月 3日受付

2005年 2月25日受理

Corresponding author : Toshio Kawano

(tkawano@cc.kochi-u.ac.jp)

しては充填層抽出が考えられるが、実用的な装置を設計する場合には、まず黒米表面からのアントシアニンの物質移動をモデル化することが、設計シミュレーションでの境界条件を決定する上で重要である。次のステップで小型の充填層抽出装置を組み立て、通水圧力や黒米充填層の空隙率の温度による変化や抽出層厚さなどの充填層固有の条件とアントシアニンの抽出量との関係を測定することで、スケールアップ前の設計シミュレーションに必要な充填層のモデル化に発展させることが期待できるからである。

そこで本研究では、黒米からのアントシアニン抽出特性を実験により測定し、抽出特性のモデル化を行った。消費者の安全志向を考慮して、抽出溶媒には純水を用いることとし、溶媒温度ごとの抽出特性を明らかにした。

一般に抽出溶液中のアントシアニン色素の濃度定量には、分光光度計を用いた方法 (*e. g.* Hayashi, 1980; Ono, 2003) や液体クロマトグラフを用いた方法などが採用されて (*e. g.* Bridle, 1996; Berente 2000; Ogawa 2002) おり、これらの方法は低濃度までも検出する点で現在最も優れた色素の定量方法と考えられる。一方、今回の測定で明らかにしようとする黒米からのアントシアニン色素の抽出特性においては、抽出されたアントシアニンの濃度は、視覚的にも変化がわかるほど高濃度であり、分光光度法などの他の計測方法に比べれば測定精度は劣るが、デジタル画像による定量方法は簡便で迅速である。可視画像による定量方法には比色法が古くから知られている (*e. g.* Yamamoto, 1968; Shibata, 1976) が、この方法は標準表色系の色票との比較で濃度を定量するため、個人差により誤差を含む可能性があることが欠点である。アントシアニン色素を含む溶液の色調表現に CIELAB スケールを用いた研究 (Gonnet, 1998) で、Gonnet は飽和度 (Saturation) と明度 (Lightness) の有効性について示唆している。人の視覚よりも数値的な取扱いがしやすいデジタル画像を用い、表色系の適切な選択により、標準票色系の色票を用いた比色法の誤差を抑えた測定が可能と考えられ、デジタル画像による測定方法について検討した。黒米からのアントシアニン色素の抽出過程の濃度推定ではこの方法を用いた。

材料および方法

水浸させた黒米からアントシアニン色素が抽出される過程での濃度変化を、デジタル画像の観測から求めることができるようにするため、まず検量式を求める実験を

行った。すなわち、数段階の既知アントシアニン色素濃度でのデジタル画像を撮影し、アントシアニン色素の濃度とデジタル画像情報との関係を求める実験である。次に、一定量の黒米を純水に浸漬した場合のアントシアニン色素の抽出過程をデジタル画像により観測する実験を行い、デジタル画像から検量式に基づいてアントシアニン色素抽出濃度の変化を求め、抽出特性を分析した。

1. 色素濃度検量実験

黒米に含まれるアントシアニン色素はシアニジン 3-グルコシドであることが知られている (*e. g.* Oba 2000)。そこでシアニジン 3-グルコシド試薬 (フナコシ) を純水に溶かした溶液を作成し、ポリスチレン製のシャーレ (内径 88.5 mm, 深さ 20.0 mm, 厚さ 1.0 mm) へ注ぎ込み、バックライト (Fuji color New 5000) でシャーレの背面より光を当て、溶液の透過デジタル画像をデジタルカメラ (Sony DSC-S70) で撮影した (図 1)。透過画像は光源により影響を受けるので、バックライトは色評価用標準照明として日本印刷学会推奨規格 (色温度 5000+270, -250°K, 平均演色評価数 $R_a=90$ 以上, 平均輝度 $1400 \pm 300 \text{ cd/m}^2$, 輝度均一性 75% 以上) に準拠したものである。透過画像は溶液のシャーレ内での深さにより、溶液の色の見え方が変化するので、深さを 9~11 段階変えながら撮影した。シャーレ内での溶液深さを正確に把握するため、質量を天秤 (Mettler PM 6100) で 0.01 g まで秤量し、シャーレ内径より計算により溶液深さを求めた。溶液濃度は、シアニジン 3-グルコシド 15 mg を 100 g の純水に溶かした溶液 (濃度 150 ppm) を原液とし、希釈により順次 100, 50, 25, 12.5 ppm とした。

なお、溶液温度が透過デジタル画像に与える影響を調べるため、100 ppm の濃度において、溶液温度を 20°C と 50°C とした場合の実験も行った。

Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus for measuring anthocyanin concentration by image processing

2. アントシアニン色素抽出実験

岐阜県香取町産黒米 (2003 年度産, 含水率 15.0%, d.b.) 15 g を秤量し, 100 g の純水と共に 200 ml 容積の密閉スチロール容器に入れたものを 12 本用意し, 3 本ずつ恒温槽内に入れ, 1, 2, 3, 4, 5, 9 時間後に取り出してアントシアニン抽出溶液のデジタル画像を検量実験と同じ実験装置 (図 1) で撮影した. デジタル画像の撮影の際には, 1 本につき 2 回, シャーレに注ぐ抽出溶液の量を変えて, それぞれの画像を撮影した. 恒温槽の設定温度は 20, 30, 40, 50°C の 4 段階とし, 20°C と 30°C についてはペルチェ式適温庫 (三菱電機エンジニアリング RMP-25 AW), 40°C と 50°C についてはプログラム定温乾燥器 (アズワン DO 450 PA) を恒温槽として使用した.

結果 および 考察

1. デジタル画像によるアントシアニン色素濃度の推定

デジタル画像から溶液中のアントシアニン色素の濃度を推定する方法は, デジタル画像に含まれる色情報のどの部分が濃度の推定に役立つかわからない. デジタルカメラで撮影された溶液の透過デジタル画像は RGB 表色系であるので, シャーレ全体画像 (直径 ca. 452 ピクセルの円) から 160 ピクセル×160 ピクセルの画像を切り出し, 色情報と光強度情報を分離した表色系である HSV 表色系に変換して, 25,600 ピクセルの平均の彩度 H (Hue), 飽和度 S (Saturation), 明度 V (Value) と溶液深さとの間の関係を, 濃度をパラメータとして調べた結果, 図 2 に示すように, 飽和度は溶液の透過厚さである溶液深さとの間に, アントシアニンの濃度に応じた比例関係を持つことがわかった. また, 100 ppm 濃度について行った, デジタル画像に与える溶液温度の影響は Saturation 値にはなかった. これらのことより平均飽和度 S (—) と溶液深さ D (mm) との関係を最小自乗法により次の回帰式に当てはめた結果,

$$S = \alpha D + S_0 \quad (1)$$

濃度ごとの相関係数は, 0.528 (12.5 ppm), 0.789 (25 ppm), 0.933 (50 ppm), 0.967 (100 ppm), 0.935 (150 ppm) となった. なお, パラメータ S_0 は溶液深さゼロ, すなわち溶液を入れないシャーレのみでのデジタル画像の飽和度 S の値であり, 測定の結果, 平均値として $S_0 = 2.220 \times 10^{-2}$ を得たので, (1) 式への最小自乗法による当てはめは, S_0 をこの値に固定して行っている. なお, この S_0 の値は今回の研究で用いたポリスチレン製の 1 mm 厚のシャーレに対するものであり, ガラ

Fig. 2 Relationships between saturation degree in color of anthocyanin solution and solution depth in a Petri dish

Fig. 3 Relationship between slope values and anthocyanin concentrations

スやその他の素材の場合には光の透過特性の違いにより, 異なった値となる.

回帰直線の傾きであるパラメータ α はアントシアニン色素の濃度ごとに一定の傾向を示しているので, パラメータ α とアントシアニン濃度との関係をプロットすると, 図 3 のようにパラメータ α の対数はアントシアニン色素濃度の対数に対して直線関係が得られた. すなわちパラメータ α とアントシアニン色素の濃度 C_a との間に次式が成り立つ.

$$\log \alpha = \gamma + \delta \log C_a \quad (2)$$

最小自乗法による (2) 式への当てはめの結果, $\gamma = -5.811$, $\delta = 2.301$ (ppm⁻¹), 相関係数 0.998 を得た. したがって, デジタル画像の平均飽和度 S (—) とアントシアニン濃度 C_a (ppm) との間の関係は次式で表される.

$$S = \epsilon C_a^\delta D + S_0 \quad (3)$$

$\epsilon = 10^7 = 1.545 \times 10^{-6}$ (mm⁻¹) である. 上式を変形して,

$$C_a = \sqrt[3]{\frac{S-S_0}{\epsilon D}} \quad (4)$$

により、シャーレに注ぎ込まれた未知濃度のアントシアニン色素濃度 C_a が溶液のシャーレ内深さ D と、デジタルカメラで撮影されたデジタル画像から求められる平均飽和度 S により推定できる。

この推定方法の誤差について述べる。(4) 式によればアントシアニン色素濃度 C_a はデジタル画像の平均飽和度 S とシャーレ内深さ D の関数となっている。 S に測定誤差 dS 、 D に測定誤差 dD が生じた場合に、 C_a に dC_a だけの誤差が伝播すると考えると、この dC_a と dS 、 dD との関係は、(4) 式を両辺 δ 乗した式

$$C_a^\delta = \frac{S-S_0}{\epsilon D} \quad (5)$$

を C_a , S , D について全微分することで得られ、次のようになる。

$$\delta C_a^{\delta-1} dC_a = \frac{1}{\epsilon D} dS - \frac{S-S_0}{\epsilon} \cdot \frac{1}{D^2} dD \quad (6)$$

(6) 式を (5) 式で両辺割り算し、 S_0 が定数のため $dS = d(S-S_0)$ であることに注意すると、 dC_a/C_a は絶対値表示で

$$\left| \frac{dC_a}{C_a} \right| = \left| \frac{1}{\delta} \cdot \frac{d(S-S_0)}{S-S_0} - \frac{1}{\delta} \cdot \frac{dD}{D} \right| \quad (7)$$

を得る。右辺第一項の $d(S-S_0)/(S-S_0)$ は、計測値の S の値を S_0 を基準として測った $S-S_0$ に対する、測定誤差 $d(S-S_0)$ の相対誤差 (decimal) である。また、右辺第二項の dD/D は同様に溶液深さの測定値 D に対する、測定誤差 dD の相対誤差を示している。実験では溶液高さ D を測定する代わりに天秤により溶液の質量 W を秤量している。 D は W に比例するので、

$$\frac{dW}{W} = \frac{dD}{D} \quad (8)$$

が成り立つ。すなわち、溶液質量の計測値 W に対する計測誤差 dW の相対誤差 dW/W は溶液高さの相対誤差 dD/D に等しい。天秤は 0.01 g まで秤量でき、秤量誤差は $dW < 0.01$ g となる。最も溶液深さの誤差が大きくなるのは少ない溶液の場合で、今回の測定では 12 g が最も少ない溶液場合の質量であった。したがって、天秤を用いた溶液深さの測定時の相対誤差 dD/D は、

$$\frac{dD}{D} = \frac{dW}{W} < \frac{0.01}{12} = 8.3 \times 10^{-4} \text{ (decimal)} \quad (9)$$

となる。一方、第一項の方は、12.5 ppm の場合で、

$$\begin{aligned} \frac{d(S-S_0)}{S-S_0} &= \frac{1.084 \times 10^{-3}}{4.960 \times 10^{-3}} \\ &= 0.219 \text{ (decimal)} \end{aligned} \quad (10)$$

となっており、右辺第一項の $S-S_0$ の測定誤差に比較すればオーダーの違いにより無視できると考えて良い。

図 2 の結果から、アントシアニン濃度ごとに右辺第一項の平均値を求めると、21.6% (12.5 ppm), 8.47% (25 ppm), 5.49% (50 ppm), 3.09% (100 ppm), 2.63% (150 ppm) となる。したがって、(1) 式の最小自乗法による回帰の際に求められた相関係数の結果と、上記の推定誤差に与える飽和度の測定誤差の影響の結果より、この方法で溶液中のアントシアニン色素濃度を推定する場合には、抽出アントシアニンの測定方法の誤差自体には判断基準はないが、5% の誤差を基準とすると、ca. 50 ppm 以上の高濃度溶液を対象にするのが望ましい。分光光度計による測定方法を用いれば溶質の質量を μg オーダーで測定することが可能であり、本研究の濃度推定方法は、精度の点では分光光度法に劣るが、高濃度のアントシアニン濃度の推定には上記の推定精度の条件つきながら、利用が可能である。

2. 黒米のアントシアニン色素抽出特性

図 4 は水浸させた黒米からのアントシアニン色素の抽出過程を、前項の色素濃度推定方法を利用して、溶液のデジタル画像の観測から求めたものである。穀物の乾燥やその他の物質拡散現象と同様に、アントシアニン色素の抽出濃度の変化は指数関数的に濃度を増し、十分な抽出時間の後、平衡濃度に達する特性を示している。濃度変化の特性を明らかにするため、物質拡散との特性の類似性から次式で整理することにする。

$$\frac{C_{a\infty} - C_a}{C_{a\infty}} = \exp(-\zeta t) \quad (11)$$

C_a : 抽出時間 t でのアントシアニン抽出液濃度

Fig. 4 Estimated changes of anthocyanin concentration extracted from black rice grains with time (Vertical lines indicate 3SE (n=6))

(ppm)

 $C_{a\infty}$: 抽出平衡濃度 (ppm) t : 抽出時間 (h) ζ : 抽出速度係数 (h^{-1})

図中の平均値のプロットデータ (t , C_a) をもとに, 上式の抽出平衡濃度 $C_{a\infty}$ および抽出速度係数 ζ を未知数として, 非線形最小自乗法により当てはめ求めた結果, 20°C で $C_{a\infty} = 84.89$ (ppm), $\zeta = 0.971$ (h^{-1}), 30°C で $C_{a\infty} = 111.7$ (ppm), $\zeta = 0.832$ (h^{-1}), 40°C で $C_{a\infty} = 110.7$ (ppm), $\zeta = 0.917$ (h^{-1}), 50°C で $C_{a\infty} = 132.6$ (ppm), $\zeta = 0.976$ (h^{-1}) を得た. 図4では温度が高い程, アントシアニンの抽出速度が早いように見えるが, (11) 式により整理した結果, 抽出速度の値はどの温度でもほぼ 0.9 前後の値となり, また溶液温度の高低により一定の傾向が見られないことから, 抽出速度係数 ζ は温度に依存していない.

一方, 抽出平衡濃度 $C_{a\infty}$ を溶液温度 T_s に対してプロットすると, 図5のように溶液温度 T_s が高くなるにつれて抽出平衡濃度 $C_{a\infty}$ は上昇する傾向となっている. そこで抽出平衡濃度 $C_{a\infty}$ と溶液温度 T_s の関係を, η と θ をパラメータとした次の回帰直線

$$C_{a\infty} = \eta T_s + \theta \quad (12)$$

で整理すると, $\eta = 1.422$ ($\text{ppm } ^\circ\text{C}^{-1}$), $\theta = 60.23$ (ppm), 相関係数 0.883 を得た. (11) 式を濃度変化速度 dC_a/dt の形式に変形すると,

$$\frac{dC_a}{dt} = \zeta(C_{a\infty} - C_a) \quad (13)$$

となり, この関係は両辺に抽出溶媒である純水の質量 W_w を掛け合わせれば, 黒米から溶液へ抽出されるアントシアニン色素の質量移動速度になる. 今回の実験では 100 g の純水に対して 15 g の黒米を浸漬させている. 黒米の量を増減させた場合は, 浸漬させた黒米の質量 W_b

に比例してアントシアニン色素は抽出されるから, (13) 式の関係性をアントシアニン色素質量 M (g) による関係と併せると次のように表現できる.

$$\begin{aligned} \frac{dM_a}{dt} &= -\zeta(M_{a\infty} - M_a) = -\chi W_b(M_{a\infty} - M_a) \\ &= -\chi W_b W_w (C_{a\infty} - C_a) \end{aligned} \quad (14)$$

χ : 質量基準抽出速度係数 ($\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$)

χ の値は 20°C から 50°C までの平均で, 6.16×10^{-2} ($\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$) となった. (14) 式を用いることで, 任意量の黒米からアントシアニン色素抽出する際の質量基準での抽出速度を周辺溶液のアントシアニン色素の溶液濃度から求めることができるようになる.

この結果は黒米からのアントシアニン色素の抽出を, 消費者の安全嗜好を考慮して塩酸などを入れたエタノールやメタノールなどの有機抽出剤などを使わず, 安全な水により大量に抽出する装置を設計するような場合に役立つものと考えられる. たとえば黒米の充填層に通水を行いながらアントシアニン色素を抽出する装置であれば, 本研究で明らかにしたアントシアニン色素抽出原理の適用が可能と思われる.

アントシアニン色素は高温では構造変化を生じる. 摩擦熱を生じる研削方式で黒米の表皮部分を削る方法を採用することは難しいので抽出溶媒による抽出方法を採用することになるが, 毒性のある有機溶媒を使わず, 安全な純水のみで黒米に含まれるアントシアニン色素をより効率よく抽出するには, 充填層式の抽出方法の採用のみでなく, 黒米の側にも抽出効率を高めるために, 超音波作用による抽出促進を行うなどの方法も考えられ, 今後の検討課題である.

摘 要

毒性のある抽出溶媒を用いず純水を抽出溶媒として, 溶媒温度 $20 \sim 50^\circ\text{C}$ の温度範囲について黒米からのアントシアニン色素の抽出特性を測定し, 抽出過程のモデル化を行った. 溶液中のアントシアニン色素の濃度定量では, デジタル画像の飽和度を利用した新たな測定方法を提案した. この方法により得た濃度データを, アントシアニン色素抽出モデルに最小自乗法により当てはめた結果, 黒米からのアントシアニン色素の抽出過程を特徴づける質量基準での抽出速度係数は $5.55 \times 10^{-2} \sim 6.51 \times 10^{-2}$ ($\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$) の範囲となることがわかった. また黒米からのアントシアニン色素の抽出限界を規定する平衡抽出濃度は, 溶液温度依存性が認められ, 依存関係を線形回帰式で整理した. 得られたアントシアニン抽出モデル

Fig. 5 Relationship between equilibrium anthocyanin concentrations and extracting solution temperatures

は、黒米の充填層からアントシアニン色素を抽出する装置を設計する際の基礎式として有用である。

引用文献

- Berente, B. Garcia, D. D. C., Reichenbacher, M. and Danzer, K. 2000. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wine by means of multivariate statistical methods. *J. Chromatography A* : 871(1-2) : 95-103.
- Bridle, P. and Viguera, C. G. 1996. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. -A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry* 59(2) : 299-304.
- Gonnet, J. F. 1998. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited - 1. A colorimetric definitions using the CIELAB scale. *Food Chemistry* 63(3) : 409-415.
- Hayashi, K. 1980. *Plant pigment*, Yokendo, Tokyo, 1-500.
- Itani, T. 2000. Red rice, black rice and flavor rice, Nosangyosonbunkakyokai, Tokyo, 1-160.
- Oba, R., *et al.* 2000. *Anthocyanin*, Kenpakusha, Tokyo, 1-245.
- Ogawa, T. 2002. Quality of purple-black colored grain rice cultivar "Murasakinomai". *Kinki sakuiku kenkyu* (47) : 19-23.
- Ono, K., Sugihara, N., Hirose, Y. and Katagiri, K. 2003. *Gifu city women's college research bulletin* (52) : 135-138.
- Shibata, K. 1976. *Introduction to spectrometry*, Kyoritsu, Tokyo, 1-167.
- Takeuchi, Y. 2000. *Adsorption separation*, Baihukan, Tokyo, 1-181.
- Yamamoto, Y. 1968. *Colormetric Analysis*, Kyoritsu, Tokyo, 1-154.
- Yoshida, T. 1998. *Medical science on flavonoid*, Kodansha scientific, Tokyo, 1-200.