クロレラ成分の利用研究 (I)

カロチン, クロロフィリン, フィトールの
系統的分離および利用について

(昭和 43 年 8 月 7 日 受理)

石坂 音治* 石原 英子* 新実 貞雄*

Studies on the Utilization of *Chlorella* Components Systematic Separation of Carotene, Chlorophyllin Salt and Phytol, and Their Utilization

Otoharu ISHIZAKA, Hideko ISHIHARA and Sadao NIMI

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University:
3-1, Tanabe-doori, Mizuho-ku, Nagoya)

In this paper a systematic separation of carotene, phytol and chlorophyllin salt from methanol extraction of lyophilized *Chlorella vulgaris* was investigated and the following results were obtained:

- 1) Chlorophyllin salt, phytol and carotene were obtained in relatively high yield.
- 2) Copper and iron chlorophyllin salts from *Chlorella* chlorophyll were conformed to the regulations of food additives.

On the cultivation test of *Chlorella* in Arnon medium added with copper-, iron-, cobalt or zinc-chlorophyllin salt it did not seem to have any influence directly on the multiplication.

(Received August 7, 1968)

緒 言

クロレラは従来主として食糧生産面¹⁾から重要視され、また抗微生物体の抽出分離が行なわれた例もあるが²⁾、われわれは薬品としての利用を企図し、今回は生産の見地から比較的安易な操作で、含量の多いとされているクロロフィリン、フィトールおよびカロチンを³⁾収量良く経済的に系統的分離精製することを目標に検討した^{4)~7)}。

クロロフィリンについては、そのマグネシウムを銅、鉄、コバルトおよび亜鉛で置換し^{8)~10)}銅と鉄クロロフィリン塩の食品添加物としての品質試験を行なった¹¹⁾。

* 名古屋市立大学薬学部：名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

また銅、鉄、コバルトおよび亜鉛クロロフィリン塩がアルノン培養液中でクロレラの増殖作用に及ぼす効果を追究した。

以上の結果、2, 3 の知見を得たので報告する。

実験方法

I. クロレラから色素の分離精製法

第1行程：粗クロロフィリンの分離

Chlorella vulgaris の凍結乾燥体を用いて Chart 1 に示すような操作を行なった。

第2行程：カロチン、フィトールの分離精製

第1行程で加水分解して得られた石油エーテル液について Chart 2 に示す操作を行なった。

Chart. 1. Separation of raw chlorophyllin

Chart. 2. Separation of carotene and phytol

第3行程：クロロフィリン塩の精製と金属（銅，鉄，コバルトおよび亜鉛）の置換

第1行程で加水分解して得られたメタノール性水酸化カリウム溶液を用いて Chart 3 の操作を行なった。

Chart. 1.

MeOH evapd in vacuo

the residue washed with 20% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, the excess alkali removed with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and washed with BuOH 50 ml (three times)

BuOH washed with water

regulated with AcOH and at pH 4.0

add to CuSO_4 (or FeCl_2 , CoCl_2 , and ZnCl_2) solution (30 ml), heated on the water bath for an hour

washed with water

BuOH evapd in vacuo

residue dissolved with petr. ether 20 ml

washed with water

add to water 5 ml regulated at pH 9.8-10.0 with MeOH-KOH

MeOH-water layer washed with Petr. ether

| purified potassium Cu (or Fe, Co, Zn) chlorophyllin salt

Chart. 3. Purification of chlorophyllin and its metal exchange

Table 1. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Arnon Medium on Addition of Potassium Copper-, Iron-, Cobalt- or Zinc- Chlorophyllin

	The multiplication and the condition on the cultivation				
	Standard	Copper-	Iron-	Cobalt-	Zinc-
Start	Light greenish yellowish yellow	Light greenish blue	Light brown	Light brownish black	Light greenish yellow
The 1st day	Similar	0 Similar	0 Similar	0 Similar	0 Similar
The 2nd day	Similar	+ Light blueish green	+ Light brownish green	+ Light brownish green	0 Similar
The 3rd day	Similar	+ Similar	+ Light green	+ Similar	0 Similar
The 4th day	Similar	++ Yellowish green	+ Similar	+ Similar	0 Similar
The 5th day	Light greenish yellow	++ Similar	+ Similar	0 Similar	- Similar
The 6th day	Similar	++ Similar	+ Similar	0 Similar	- Similar
The 7th day	Similar	++ Similar	+ Similar	0 Similar	- Similar

0: The same as standard

+, ++: More multiplied than standard

-: Less multiplied than standard

II. 銅, 鉄, コバルトおよび亜鉛クロロフィリンカリウム添加時のクロレラ増殖について

山本らの報文に準じ¹²⁾, つぎのような試験を行なった。アルノン培養液 50 ml に生クロレラ 0.5 ml (10^{11} cells/ml) を加え, 同型の試験管 5 本に各 10 ml を分注し, その 4 本に銅, 鉄, コバルトおよび亜鉛クロロフィリンカリウム各 1 mg を加え, 残りの 1 本を標準培養液とし, 白色ケイ光灯 (40 W) の光源 1 cm 前方に置いて 7 日間培養を行なった。

クロレラの増殖の判定は, クロレラの藻体数と培養液の緑色度と比例するので, 培養液の緑色度の比較観察を行なった。

実験結果

I. 精製色素類の収量 (原料: クロレラ凍結乾燥藻体 10 g)

カロチン	0.011 g
フィトール	0.042 g
銅クロロフィリンカリウム	0.356 g
鉄クロロフィリンカリウム	0.362 g

上記標品の吸収曲線はそれぞれ銅および鉄クロロフィリンカリウム, フィトール¹³⁾の吸収曲線と一致し, また食品添加物の規格基準に適合した。

II. 銅, 鉄, コバルトおよび亜鉛クロロフィリンカリウム添加時のクロレラ増殖について

Table 1 に示すように, 銅および鉄クロロフィリンカリウムは標準に比して緑色度を増したが, コバルトおよび亜鉛クロロフィリンカリウムは変化がなく, 増殖が悪く。

考察および結論

従来報文によれば, 各色素についての分離法が散見され, たとえばカラム・クロマトグラフィーを用いた場合¹⁴⁾, 分離能はよいが, 多量処理には時間的および経済的にも不利である。

葉緑素はクロロフィリンとフィトールの原料として重要であるが, わが国では現在粉茶や蚕糞を処理して工業的に得ている。

上記の方法に比して, 本法はクロレラ (葉緑素含量 4%) を用い, メタノール抽出を初行程とする系統的分離法であり, また分離後の脱色クロレラはタンパク源として利用できる点で有利である。

速水らは¹⁵⁾, クロロフィル処理は加熱温度が低く時間も短いほど収率が良く, またクロロフィルの抽出に 96% メタノールが最適であると報告した。本法は抽出溶媒として 96% メタノールを用い, 全操作を 70° 以下で行なった結果, クロレラからの銅および鉄クロロフィリンカリウムの収率はそれぞれ 3.56%, 3.62% であった。

岩田らは¹⁶⁾, クロレラ不ケン化物の成分研究を行ない, フィトール, α -, β -カロチン等 12 種類を得た。また速水らは¹⁷⁾, 生クロレラ 30 kg を用いて精製し, フィ

トール 74.6 g, ステロール 13.3 g, オキシカロチン 11.7 g を得たが, これに比し本法のカロチン, フィトールの収率は前述のごとく良好であった。

クロレラ, カロチンについては, 岩田らは¹⁸⁾, カラム・クロマトグラフィーにより 14 種類を分離した。また T. W. Goodwin は¹⁹⁾, β -カロチン 10%, ルテインとピオラキサンチン 75~80%, ネオキササンチン 10~15% になると報告した。今回は混合カロチン色素類を得る行程にとどめた。

クロレラの増殖に対するクロロフィリン塩の試験では, 銅および鉄クロロフィリンカリウムは促進作用を示したが, コバルトおよび亜鉛クロロフィリンカリウムは増殖作用が見られなかった。このことは, アルノン培養液の無機組成に鉄と銅が必要なため²⁰⁾, クロロフィリンそのものは増殖作用に影響しないと思われる。

文 献

- 1) 武智芳郎: “クロレラの話” p. 1 (昭和 35 年) 誠文堂新光社。
- 2) 中山大樹, 他: 山梨大農研, No. 10 Nov. p. 49 (1963).
- 3) 速水 決, 他: 必須アミノ酸研究報告昭和 34 年 p. 107 必須アミノ酸研究委員会。
- 4) H.M. Jennison, L.M. Cooley: J. Tenn. Acad. Sci. 9, 273 (1934) [C. A. 29, 5142 (1935)].
- 5) M. Ogawa, Y. Sakai: Japan Patent 2478 ('51), May 19 [C. A. 47, 5078 (1953)].
- 6) A. A. Svishchik, B. G. Savinov: Ukrain. Khim. Zhur. 22, 518 (1956) (in Russian) [C. A. 51, 4653 (1957)].
- 7) Merck Index VIII p. 829 (1968).
- 8) H. Yamashina: Japan Patent 95 ('53), Jan. 9 [C.A. 48, 10776 (1954)].
- 9) O. Gisvold: U. S. 2,713,584, July 19, 1955 [C. A. 49, 14278 (1955)].
- 10) N. Kasugai: Japan 8329 ('59), Sept. 17. [C. A. 54, 7078 (1960)].
- 11) 食品添加物公定書注解編: 第一版 食品添加物公定書注解 p. 411, 421 金原出版。
- 12) 山本 栄, 他: 食衛誌, 8, 396 (1967).
- 13) 勝井五一郎, 他: “ビタミン学の進歩” ビタミン E の化学 p. 117 (昭和 36 年) ビタミン学会。
- 14) J. M. Anderson: UCRL-8870, p. 1 (1959).
- 15) 速水 決, 他: 必須アミノ酸研究報告昭和 34 年 p. 105, 109 必須アミノ酸研究委員会。
- 16) 岩田伊平: 必須アミノ酸研究 (1962) 10. p. 17 必須アミノ酸研究委員会。
- 17) 速水 決, 他: 同上 p. 17.
- 18) I. Iwata, et al.: Agr. Biol. Chem. 25, 377 (1961).
- 19) T. W. Goodwin: Experientia 10, 213 (1953) [C. A. 48, 10132 (1954)].
- 20) 田宮 博, 他: “藻類実験法” p. 85 (昭和 40 年) 南江堂。