

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境システム学専攻

2021 年度

修士論文

超臨界二酸化炭素抽出法を用いた  
ブロッコリースプラウトからの有価物の  
回収に関する研究

2022 年 1 月 20 日提出

指導教員 秋月 信 講師

47- 196779 王若瑤

## 目次

第1章 緒言 .....	4
1.1 ブロッコリースプラウトとその中の有価物 .....	4
1.2 超臨界二酸化炭素抽出法 .....	5
1.3 二相系混合溶媒 .....	8
1.4 既往研究と課題 .....	9
1.4.1 スルフォラファンの抽出、合成法 .....	9
1.4.2 二相系混合溶媒の利用 .....	10
第二章 目的と方針 .....	12
第三章 実験方法 .....	13
3.1 実験サンプルと試薬 .....	13
3.2 実験装置 .....	13
3.3 抽出実験方法 .....	13
3.3.1 サンプルの前処理 .....	14
3.3.2 CO <sub>2</sub> の抽出実験 .....	15
3.3.3 エタノールをエントレーナとして用いた抽出実験 .....	16
3.3.4 水をエントレーナとして用いた抽出実験 .....	17
3.4 抽出実験の条件 .....	18
3.5 分析方法 .....	19
3.5.1 タンパク質の定量分析 .....	19
3.5.2 糖類の定量分析 .....	22
3.5.3 抗酸化成分の測定 .....	24
第四章 実験結果と考察 .....	27
4.1 抽出率 .....	27
4.1.1 CO <sub>2</sub> のみの抽出率 .....	27
4.1.2 エタノールをエントレーナとして用いた場合の実験 .....	31
4.1.3 水をエントレーナとして用いた場合の実験 .....	34
4.2 抽出物の形態 .....	36
4.2.1 抽出物の形態 .....	36
4.3 抽出物の組成 .....	39

第五章 結言 .....	41
<参考文献> .....	42
<謝辞> .....	44

# 第 1 章 緒言

## 1.1 ブロッコリースプラウトとその中の有価物

ブロッコリーはアブラナ科の植物であり、2005 年以後、世界的な生産が約 30% 増加している<sup>[1]</sup>。主な原因は、健康的な食品に対する人間の要求が高まっているためと考えられる。ブロッコリーとそのスプラウトは栄養素が豊富に含まれ、特にブロッコリースプラウトには、二次代謝産物であるスルフォラファンが大量に含まれている。ブロッコリースプラウト中の有価物含有量を表 1.1 に示す<sup>[2]</sup>。100g あたり 424mg のスルフォラファンが含まれ、それ以外に脂質、タンパク質、ビタミン、食物繊維などの有価物も含まれている。今までのところ、ブロッコリーからの植物化学物質の抽出に関する情報はほとんどない<sup>[1]</sup>。

表 1.1 ブロッコリースプラウト中有価物の含有量<sup>[2]</sup> (100 g あたり)

水分	脂質	タンパク質	ミネラル	ビタミン	食物繊維 (可溶)	食物繊維 (不溶)	スルフォラファン グルコシノレート
87.4 g	0.7 g	4.7 g	340.15 mg	7.97 mg	0.3 g	1.8 g	424 mg

### 1.1.1 スルフォラファン

近年、スルフォラファン (SFN) は、その優れた解毒作用、抗酸化作用、さらに抗がん作用により注目されている。スルフォラファン (SFN) はブロッコリーに存在する健康促進化合物であり、その不活性な前駆体であるスルフォラファングルコシノレート (GFN) が存在することが知られている<sup>[3]</sup>。人間はスルフォラファンを含む野菜を食べる時、咀嚼などによって反応し、加水分解されることで、スルフォラファンに変化する。スルフォラファンは常温で黄色または無色の液体<sup>[4]</sup>で、有機溶剤に溶解やすく、水にもある程度溶解、高温やアルカリ性で分解しやすいことが知られている。

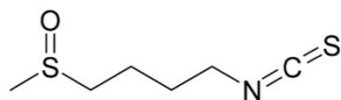


図 1.1 スルフォラファン

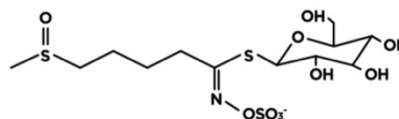


図 1.2 スルフォラファングルコシノレート

既往研究において、スルフォラファンは人体に多くの利点があることが報告されている。私たちの毎日の食事においても腫瘍形成を阻害する多くの天然化合物の存在が知られており、例えば多数のイソチオシアネート（ITC）の抗がん<sup>[5]</sup>作用が実証されており、ほとんどは植物、特にアブラナ科の野菜に含まれている。その中で最も特徴的な ITC はスルフォラファンである<sup>[3]</sup>。それ以外にも、スルフォラファンは、多くの体内および体外研究で神経保護効果があることが示され、主に Nrf2 / ARE 経路を活性化するという特別な能力を持つことの実証がある<sup>[5]</sup>。したがって、スルフォラファンは神経保護特性を持つ化合物と考えられており、神経変性を防ぐのに重要な役割を果たす可能性が期待される。このように、スルフォラファンはいろいろな領域で期待される化学予防剤である。結腸がん、皮膚がん、肺がん、胃がん、膀胱<sup>[6]</sup>がんなどのさまざまながんと戦うだけでなく、心血管疾患や神経変性疾患、糖尿病も予防することに期待が持たれている。

## 1.2 超臨界二酸化炭素抽出法

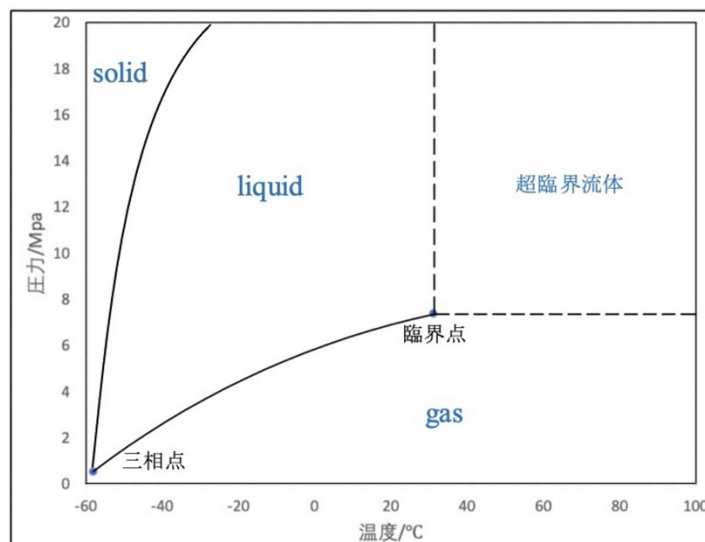


図 1.3 温度と圧力に応じた CO<sub>2</sub> の相変化

流体の温度と圧力が臨界温度と臨界圧力よりも高い場合、流体の状態は超臨界状態と呼ばれる。臨界点付近では、流体分子間の相互作用力は気体と液体分子の間にあり、液体のような密度、溶解性、良好な流動性を持つだけでなく、気体のような拡散係数も持つことが知られている<sup>[7]</sup>。CO<sub>2</sub> の温度と圧力に応じた状態を図 1.3 に示す。その臨界点は  $T=31.1^{\circ}\text{C}$ 、 $P=7.38\text{ MPa}$  であり、この温度・圧力を超えると超臨界状態になる。超臨界状態の CO<sub>2</sub> の密度は液体の密度に近いので、溶質を溶解する能力を持ち、また、拡散係数はガスに近いので流動性に優れ、抽出

分野で多く利用されている。また、超臨界 CO<sub>2</sub> 抽出法の利点として、低温での抽出が可能であり、酸化による劣化や成分の変性が起こりにくい、コストが低い、環境への汚染がなく、リサイクル可能であり、抽出と分離を同時に行うことができる<sup>18)</sup>ことが挙げられる。

超臨界流体の抽出プロセスでは、超臨界流体の溶解度とその密度の関係、つまり、その溶解度に対する圧力と温度の影響を利用する。超臨界 CO<sub>2</sub> の密度変化の例を図 1.4 と図 1.5 に示す。圧力が一定の場合、温度が上昇すると密度が低下し、特に臨界点近くの 9 MPa の条件で、温度が密度に与える影響が大きい。一方、圧力の増加に伴い、密度は大きくなる。特に臨界点に近い場合、変化率は非常に大きい。密度の計算結果により、圧力は温度よりも密度に大きな影響を及ぼすことがわかる。抽出においては、対象物を超臨界 CO<sub>2</sub> と接触させ、溶解度の差を利用して極性、分子量の異なる成分を選択的に抽出することが期待される。また、抽出後減圧することで、CO<sub>2</sub> は迅速に気体状態になるため、抽出物から容易分離することが可能である。

「グリーンケミストリー」の代表として、近年 CO<sub>2</sub> 超臨界抽出技術は工業化の道を歩み始めた。しかし、超臨界流体抽出技術は多くの領域で適用されてきたが、温度、圧力における超臨界流体抽出プロセスの基礎理論研究が不足しているため、プロセスと結果を予測することは困難である<sup>19)</sup>。また、超臨界状態では、温度や圧力などのパラメータの制御は、非線形性の特徴を持つため、従来のフィードバック制御方法では、抽出温度と圧力の正確な制御は確保できず、工業生産に困難をもたらす。現在、工業生産における超臨界抽出装置は、主に手動または半自動制御を採用しており、全体的な自動化のレベルは低い<sup>19)</sup>。したがって、抽出メカニズムと影響因子の観点からさらに改善する必要がある。同時に、抽出プロセスのコストを削減することは、超臨界抽出技術にとって非常に重要である。

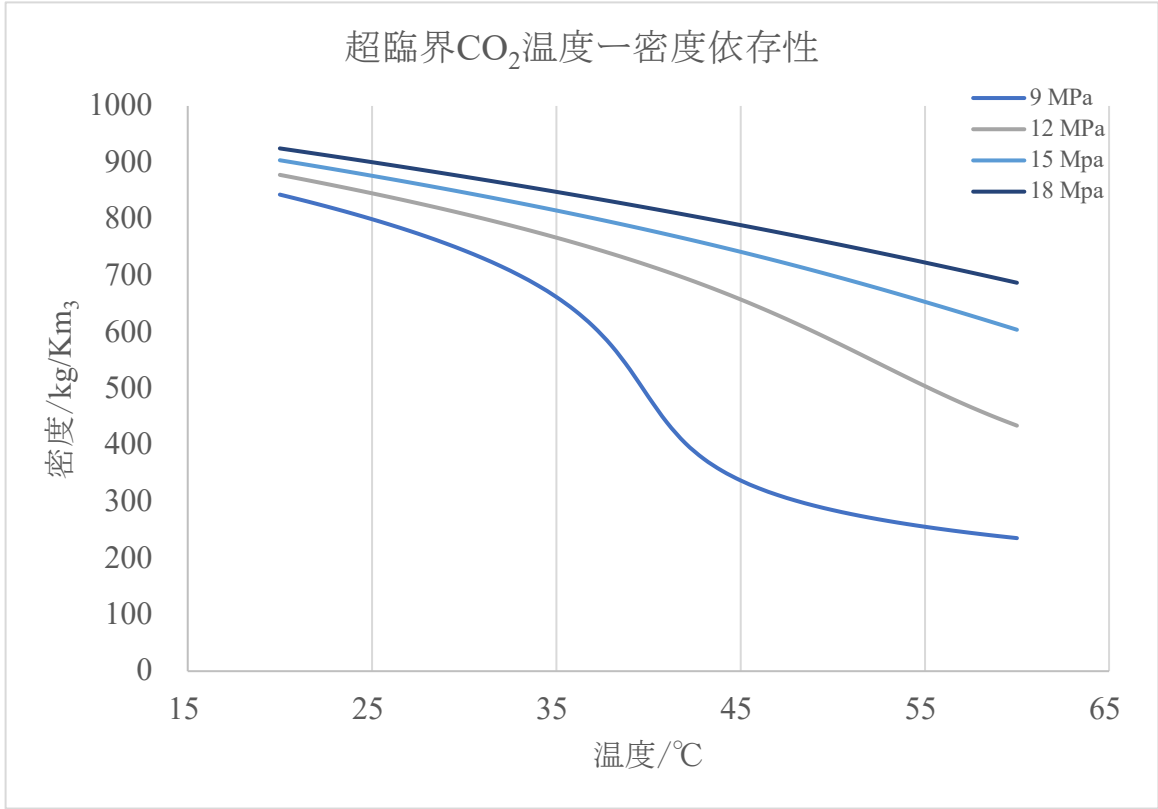


図 1.4 CO<sub>2</sub> の温度—密度依存性

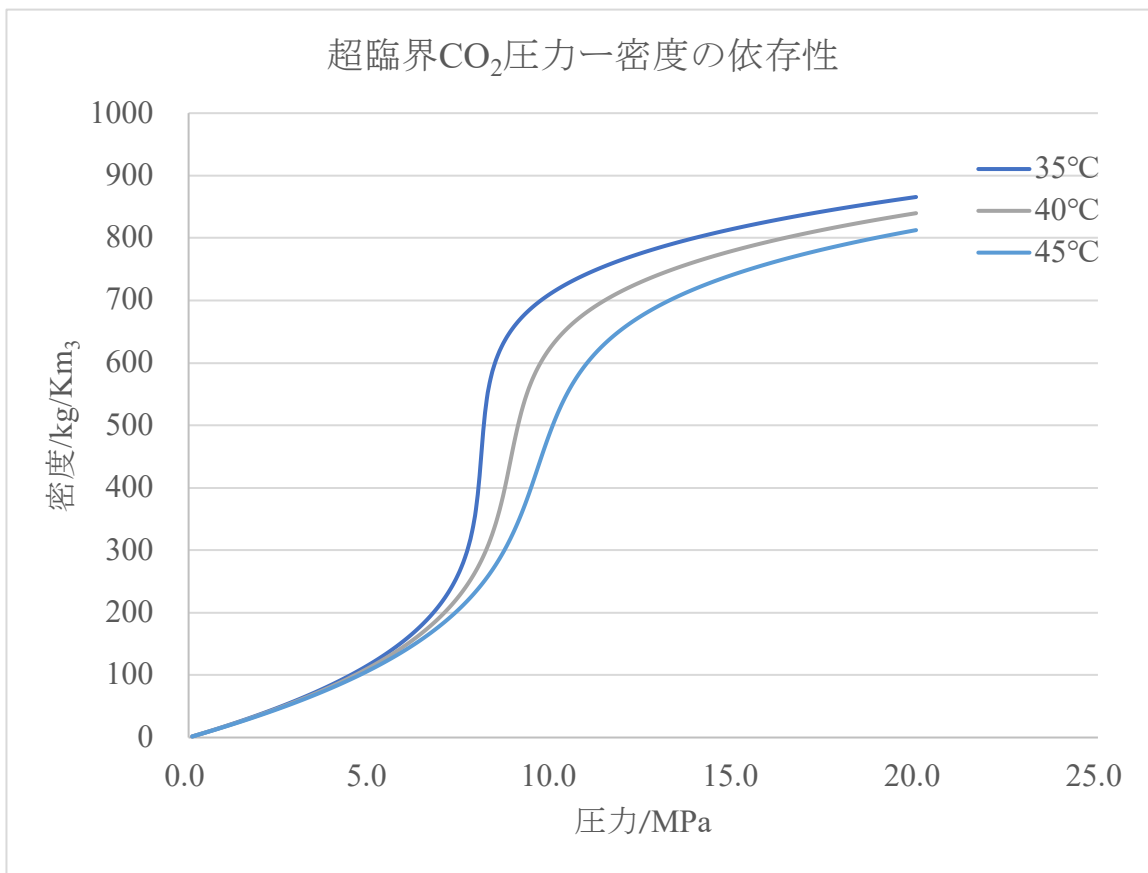


図 1.5 CO<sub>2</sub>の圧力-密度依存性

### 1.3 二相系混合溶媒

二酸化炭素は無極性に近い溶媒のため、極性物質の溶解度が小さく、十分な抽出は困難である。そのような場合、極性の添加物（エントレーナ）を用いることで、溶質の溶解度を高める方法が用いられる。既往研究から、エントレーナの代表として、エタノール、メタノール<sup>[8]</sup>が挙げられる。また近年、エントレーナとして水などの二酸化炭素と混合しないエントレーナを用いた二相系混合溶媒による抽出が提案されている。既往研究ではコーヒー生豆の抽出が検討され、成分のうち、カフェインは超臨界二酸化炭素相および水相の両相に溶解するが、クロロゲン酸は水のみで溶解することが報告されている<sup>[8]</sup>。



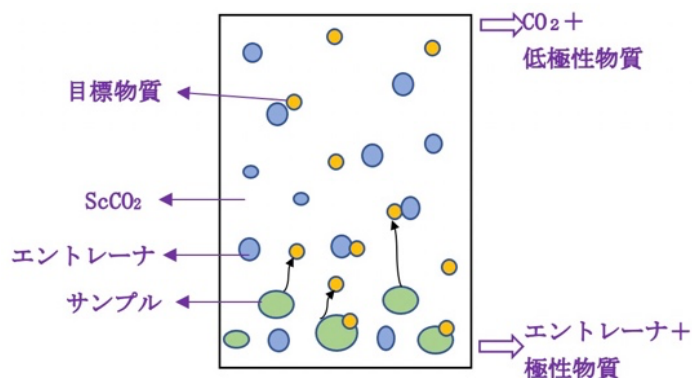


図 1.6 二相系混合溶媒の例<sup>[7]</sup>

## 1.4 既往研究と課題

### 1.4.1 スルフォラファンの抽出、合成法

スルフォラファンを製造する方法には、主に化学合成法、酵素法<sup>[10]</sup>、半合成法の三種類がある。化学合成法は、化学反応でスルフォラファンを生成するスルフォラファンの化学合成法であり、テトラヒドロチオフェン、ヨウ化メチル、テトラフルオロホウ酸ナトリウムを原料とし、S-メチルテトラヒドロチオフェニウムテトラキスを合成する。具体的なプロセスを図 1.7 に示す。フルオロホウ酸塩は、アジドナトリウムと反応して1-アジドを生成する。これは、スタウディンガーによって反応してイソチオシアネートを取得し、最後に  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって酸化されてスルフォラファンを取得する。化学合成法はプロセス中の化学反応条件の制御が難しい、工程が煩雑、コストが高いという欠点があるため、実際の製造で使用することはほとんどない。

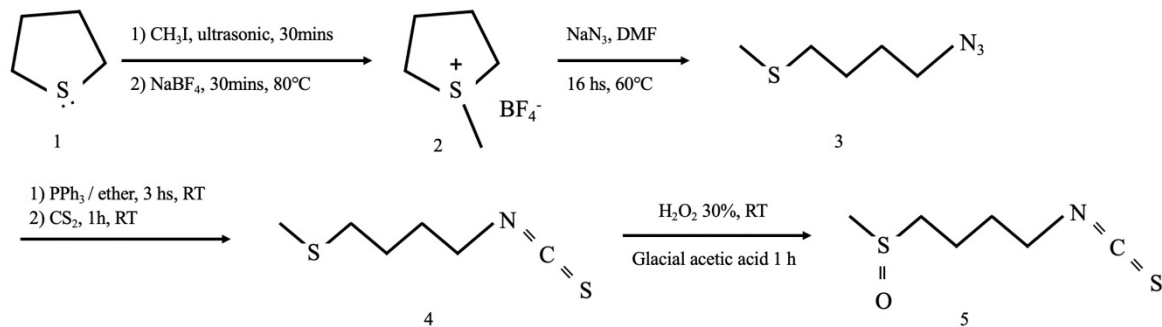


図 1.7 スルフォラファンの合成プロセス

酵素法<sup>[11]</sup>では、アブラナ科の野菜や種子を原料とし、原料中のグルコラファニンをミロシナーゼで加水分解し、最終的にスルフォラファンを生成する。調製プロセスは一般に、脱脂、酵素分解、抽出の三段階がある。ブロッコリーの種には大量の油脂が含まれており、スルフォラファン収量に影響を与える可能性がある<sup>[11]</sup>。処理後得られたスルフォラファングルコシノレートを加水分解し、スルフォラファンを得られる。一般的にアセトン、酢酸エチル<sup>[12]</sup>、ジクロロメタン<sup>[13]</sup>、少数の研究では水<sup>[14]</sup>を抽出溶媒として抽出される。しかし、ジクロロメタンは毒性が強く、抽出されたスルフォラファンを食品や医薬品として使用する場合は、他の溶媒を抽出剤として使用する必要がある。

半合成法は<sup>[15]</sup>、化学合成と酵素法を組み合わせ、グルコラファニン構造類似体を原料とし、生物学的または化学的変換法によりグルコラファニンを取得し、次に加水分解してスルフォラファンを取得する方法である。この方法の利点は、原材料が安価で入手しやすいことである。欠点は、グルコシノレートを抽出する前にグルコラファニンを酵素不活性化処理する必要があること、生成されたグルコラファニンを外因性グルコシダーゼによって加水分解する必要があることである。スルフォラファンを生成するために、化学合成法も半合成法も大量の有機溶媒を使用する必要があり、実用化には至っていないため、現在でも酵素法を用いてスルフォラファンを取得している<sup>[16]</sup>。

スルフォラファンの抽出では、ブロッコリー収穫時の副産物や廃棄された根や葉が原料として使われることは少ない。スルフォラファングルコシノレートの含有量は、発芽していない種に最も多く、新芽の成長とともに減少することがわかっている。しかし実際には、ブロッコリーの収穫後に大量の副産物が発生し、そのほとんどがそのまま廃棄されるため、廃棄物や環境汚染の原因となっている。また、有毒で有害な溶剤を使用する抽出方法とは異なり、安全で環境に配慮した方法も期待できる。近年、植物からの有効成分の抽出に超音波支援抽出法<sup>[17]</sup>が広く利用され、そのような研究は生理活性成分の抽出と利用は、実用上非常に重要である。

#### 1.4.2 二相系混合溶媒の利用

近年、エントレーナとして水などの二酸化炭素と混合しないエントレーナを用いた二相系混合溶媒による抽出が提案されている。既往研究ではコーヒー生豆の抽出が検討され、成分のうち、カフェインは超臨界二酸化炭素相および水相の両相にも溶解できるが、クロロゲン酸は水のみにも溶解できることが報告されている<sup>[8]</sup>。

Guzman, L.らは、エントレーナーとしてエタノールとイソプロパノールを使用したマンゴー種子油 (*Mangifera Indica*) の抽出とバイオディ

ーゼルの合成プロセスについて検討した<sup>[18]</sup>。Wanessaらは、超臨界CO<sub>2</sub>抽出および超臨界メタノールを用いた工業用パーム核ケーキからの残留油のエステル交換について検討した<sup>[19]</sup>。オハイオ大学での調査結果は、超臨界CO<sub>2</sub>とメタノールを使用したスピルリナとシズキトリウムからの脂質抽出に関する研究を報告している<sup>[20]</sup>。これらの報告のように、超臨界CO<sub>2</sub>は非極性であるため、抽出能力を高めるために、メタノールなどの極性有機溶媒をエントレーナとして添加する必要がある場合がある。結果として、メタノール-超臨界CO<sub>2</sub>抽出は、脂質抽出に対して高い効果を示し、超臨界CO<sub>2</sub>中のメタノール濃度が脂質抽出収率に最も強い影響を与えることが示されている。

このように、超臨界CO<sub>2</sub>は、いろいろな物質の抽出に適用することができる。超臨界二酸化炭素抽出法をブロッコリースプラウトの抽出に用いられることで、抗酸化成分を抽出しつつ、二酸化炭素またはエントレーナに溶けるほかの有価物も回収できると考えられる。そのための基礎的検討をして、適切な抽出条件やエントレーナの効果を実験的に解明する必要がある。

## 第二章 目的と方針

本研究の目的は二相系超臨界二酸化炭素抽出法を主な手法とし、ブロッコリースプラウトからの有価物を回収することとした。それぞれの抽出条件（温度、圧力、抽出時間、エントレーナの種類、エントレーナの流量：CO<sub>2</sub>流量）を変え、抽出物の量と組成を明らかにする。

ブロッコリースプラウトから抽出された抽出物中成分は、医療や食品の分野で利用できるため、抽出物中の有害物質の残留を避けるために、エントレーナとして低コスト、無毒なエタノールと水を使用した。

方法としては、まず CO<sub>2</sub>のみを用いた場合の抽出率の温度依存性、圧力依存性、時間依存性を検討した。次に異なる CO<sub>2</sub>+エントレーナー溶媒の抽出効果について検討した。最後に抗酸化成分、タンパク質、糖類を測定することにより定量分析を行なった。

## 第三章 実験方法

### 3.1 実験サンプルと試薬

実験に用いたサンプルは村上農園ブロッコリースーパースプラウトとした。

抽出実験に用いた試薬は以下に示す。

エタノール：和光特級 富士フィルム和光純薬 純度：99.8+%(CH<sub>3</sub>OH)

エタノール：和光一級 富士フィルム和光純薬 純度：99.5+%(capillary GC)

抗酸化成分測定に用いた試薬は以下に示す。

エタノール：和光特級 富士フィルム和光純薬 純度：99.8+%(CH<sub>3</sub>OH)

DPPH 抗酸化能測定キット (DPPH Reagent、Trolox Standard、Assay Buffer) 同仁化学研究所

タンパク質測定に用いた試薬は以下に示す。

タンパク質定量キット-ラピット：Dojindo Molecular Technologies

糖類測定に用いた試薬は以下に示す。

硫酸：和光一級 富士フィルム和光純薬 純度：95.0+%(Titration)

フェノール（破碎結晶）：試薬特級 富士フィルム和光純薬(株)

ブドウ糖：富士フィルム和光純薬(株) 規格含量：99.5+%(after drying)

### 3.2 実験装置

実験に用いた装置は以下に示す。

乾燥オーブン：ブロッコリースプラウトサンプルの前処理

背圧弁：実験の圧力の制御 BP-2080-M；

循環冷却装置：CO<sub>2</sub>の冷却 CH-201；

熱電対：背圧弁処の温度の測定 T-35型シース熱電対；

送液ポンプ：エントレーナの送液 NPL-5010；

ロータリーエバポレーター：抽出物からの溶媒の分離

分光光度計：抽出物の分析用

### 3.3 抽出実験方法

本研究では抽出容器として、SUS316製(外径 3/8inch,管長 12cm)チューブを用いた。

抽出実験の手順と抽出物の分析方法をそれぞれ記述する。

### 3.3.1 サンプルの前処理

ブロッコリースプラウトサンプル中の水分含有量が多いため、標的物質をよりよく抽出し、実験への水分の影響を排除するために、サンプルを乾燥させ、粉砕後に使用した。



図 3.1 処理前のサンプル



図 3.2 処理されたサンプル

### 3.3.2 CO<sub>2</sub>の抽出実験

実験では他の条件を固定し、抽出時間、温度、圧力をそれぞれ変えて実験を行った。CO<sub>2</sub>のみを用いた実験の装置は図 3.3 に示す。実験手順について以下に示す。

- ①. CO<sub>2</sub>の冷却循環装置を開け、温度を摂氏-2℃に設定し、温度が安定するまで待つ。
- ②. 恒温槽と熱電対をオンにして予熱する。
- ③. 処理されたブロッコリースプラウトサンプルを 1.5g 秤量し、抽出部に入れる。
- ④. CO<sub>2</sub>を流す。装置全体の気密性を検査する。
- ⑤. 温度、圧力、CO<sub>2</sub>の流量を調整し、安定した後、回収瓶で抽出物を回収する。
- ⑥. CO<sub>2</sub>を止め、総流量を記録する。
- ⑦. CO<sub>2</sub>のみを溶媒として使用した場合に、抽出物はほとんど背圧弁の出口に析出したので、全部回収するために、反応後にエタノールを流して回収した。
- ⑧. ロータリーエバポレーターを使って溶媒を完全蒸発させ、抽出物の質量を記録する。

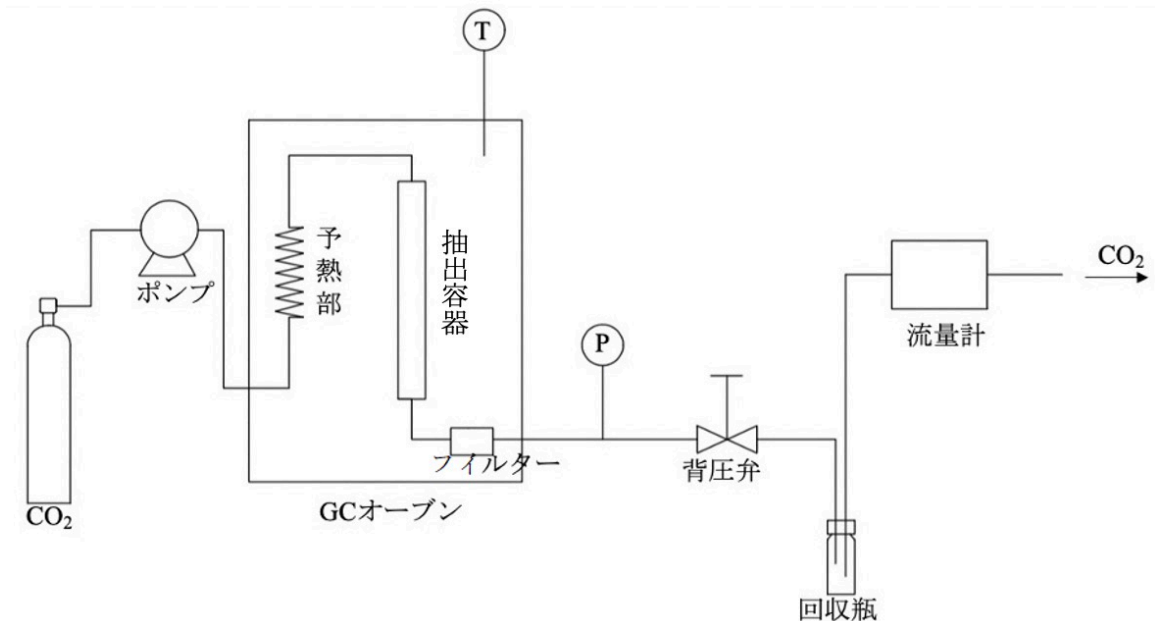


図 3.3 CO<sub>2</sub>のみの場合の実験装置

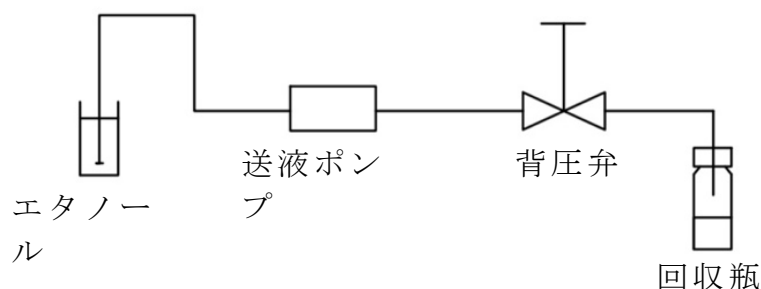


図 3.4. 実験後の抽出物回収装置

### 3.3.3 エタノールをエントレーナとして用いた抽出実験

エントレーナを使用した場合の装置は図 3.5 に示す。実験手順について以下に示す。

- ①. CO<sub>2</sub> の冷却循環装置を開け、温度を摂氏-2℃に設定し、温度が安定するまで待つ。
- ②. 恒温槽と熱電対をオンにして予熱する。
- ③. 処理されたブロッコリースプラウトサンプルを 1.5g に秤量し、抽出容器に入れる。
- ④. CO<sub>2</sub> を流し、装置全体の気密性を検査する。
- ⑤. CO<sub>2</sub> の流量を 2 ml/min に設定し、エタノールの流量を変えることにより、エタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量 = 0.1~0.5 の条件で抽出実験を行う
- ⑥. CO<sub>2</sub> なし、エタノールのみを用いて抽出実験をする。
- ⑦. 温度、圧力が安定した後回収瓶で 1 時間の抽出物を回収する。
- ⑧. CO<sub>2</sub> とエタノールを止め、CO<sub>2</sub> の総流量を記録する。
- ⑨. ロータリーエバポレーターを使って溶媒を完全蒸発させ、抽出物の質量を記録する。

次に、エタノールをエントレーナとして用いた場合に圧力に与える影響を解明するために、エタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量 = 0.5 の条件で、圧力に変化させて実験を行なった。実験手順について以下に示す。

- ①. CO<sub>2</sub> の冷却循環装置を開け、温度を摂氏-2℃に設定し、温度が安定するまで待つ。
- ②. 恒温槽と熱電対をオンにして予熱する。
- ③. 処理されたブロッコリースプラウトサンプルを 1.5g 秤量し、抽出容器に入れる。
- ④. CO<sub>2</sub> を流し、装置全体の気密性を検査する。
- ⑤. CO<sub>2</sub> の流量を 2 ml/min に設定し、エタノールの流量を 1 ml/min に設定し、エタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量 = 0.5 の条件で、圧力を 12~18MPa の条件で抽出実験を行う



- ⑥. 温度、圧力が安定した後、回収瓶で 1 時間の抽出物を回収する。
- ⑦. CO<sub>2</sub> とエタノールを止め、CO<sub>2</sub> の総流量を記録する。
- ⑧. ロータリーエバポレーターを使って溶媒を完全蒸発させ、抽出物の質量を記録する。

#### 3.3.4 水をエントレーナとして用いた抽出実験

エントレーナとして水を用いた二相系の条件で、反応の進行に伴い、含水率が高くなったサンプルが、溶媒に圧縮され続けることにより、反応器出口のフィルターで詰まり、圧力が急速に上昇する現象が見られた。水の流量/CO<sub>2</sub>の流量=0.5 の場合に、抽出時間は約 20 分で詰まりが発生し始め、圧力が急激に上昇した。正確なデータを測定するために、実験の抽出時間を 15 分とした。実験に用いた装置を以下に示す。実験手順について以下に示す。

- ①. CO<sub>2</sub> の冷却循環装置を開け、温度を摂氏-2℃に設定し、温度が安定するまで待つ。
- ②. 恒温槽と熱電対をオンにして予熱する。
- ③. 処理されたブロッコリースプラウトサンプルを 1.5g 秤量し、抽出容器に入れる。
- ④. CO<sub>2</sub> を流し、装置全体の気密性を検査する。
- ⑤. CO<sub>2</sub> の流量を 2 ml/min に設定し、水の流量が変わることにより、エタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量=0.01、0.1、0.2、0.5 の条件で抽出実験を行う
- ⑥. 温度、圧力が安定した後、回収瓶で 15min の抽出物を回収する。
- ⑦. CO<sub>2</sub> と水を止め、CO<sub>2</sub> の総流量を記録する。
- ⑧. ロータリーエバポレーターを使って溶媒を完全蒸発させ、抽出物の質量を記録する

### 3.4 抽出実験の条件

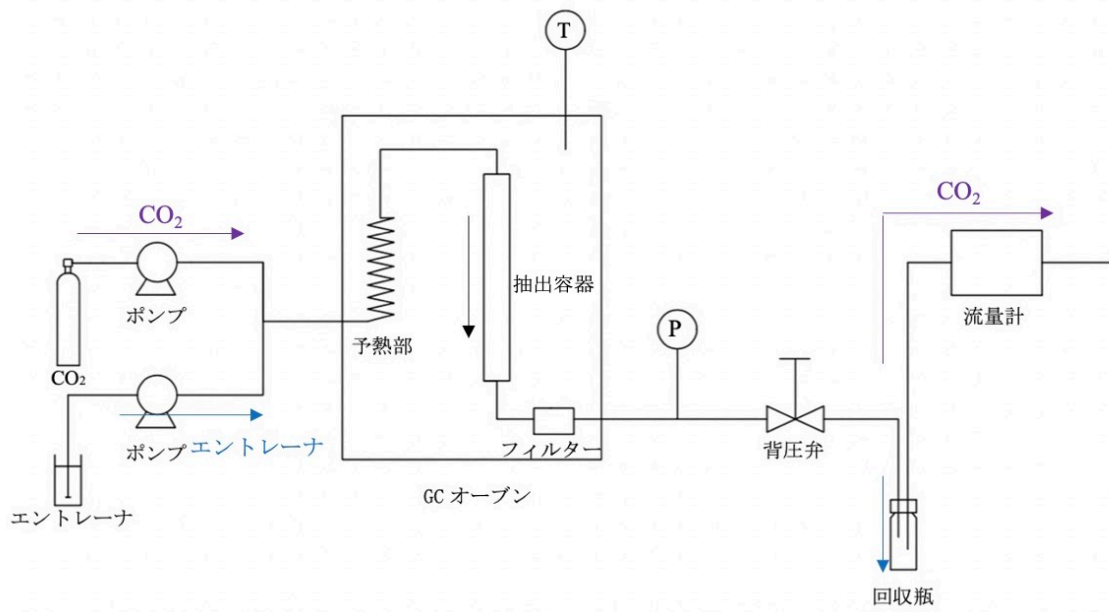


図 3.5 エントレーナを用いた場合の実験装置

各実験の条件を表 3.1 に示す

表 3.1 各実験の条件

	溶媒	温度 (°C)	圧力 (MPa)	CO <sub>2</sub> 流量 (ml/min)	エントレーナ 流量(ml/min)	抽出時間
1	CO <sub>2</sub>	40~60	12 MPa	1.5	-	1h
2	CO <sub>2</sub>	40	12~18 MPa	2	-	1h
3	CO <sub>2</sub>	40	12 MPa	2	-	
4	CO <sub>2</sub> +エタノール	40	12 MPa	2	0.2~1	1h
5	CO <sub>2</sub> +エタノール	40	12~16 MPa	2	1	1h
6	エタノールのみ	40	12 MPa	-	1	1h
7	CO <sub>2</sub> +水	40	12 MPa	2	0.02~1	15 min

### 3.5 分析方法

本研究で用いた抽出物成分の分析方法と手順についてそれぞれ記述する。

#### 3.5.1 タンパク質の定量分析

Bradford 法<sup>[21]</sup>を用いて抽出物中のタンパク質の量を測定した。Bradford 法では、Coomassie Dye がタンパク質と結合することにより、溶液の最大吸収波長が 465 nm から 595 nm（茶色から青色）にシフトすることを利用する。この色の変化は、タンパク質量に比例して起こるので、595 nm の吸光度を測定することにより、溶液のタンパク質濃度が定量できる。

測定に必要なものを以下に示す。

- ・ 試験管
- ・ 100 ml メスフラスコ
- ・ 超音波洗浄機
- ・ 分光光度計

本研究のタンパク質の測定では、サンプルを蒸留水で希釈した。抽出物サンプルのタンパク質濃度を測定する手順について以下に示す。

- ①. タンパク質標準溶液や抽出物のサンプルの希釈系列を作製する。  
1000、750、500、250、125、25、0(Blank)  $\mu\text{g/ml}$  の標準溶液を調製する。
- ②. 試験管①で作製した標準溶液の各希釈液、サンプルをそれぞれ 20  $\mu\text{l}$  分注する。各希釈液、サンプルともに 2 連 (n=2) 以上並行で測定する。
- ③. Bradford Dye Reagent を各チューブに 1ml 加え、超音波を使ってよく混合する。
- ④. 25°C前後の室温において、5 分間反応する。
- ⑤. 595 nm の吸光度を測定する。
- ⑥. ⑤Blank 値を差し引いた後、2 連 (以上) で測定したサンプルの平均値をとる。標準液の希釈系列から作成した標準曲線を用いて、サンプルの濃度を求める。

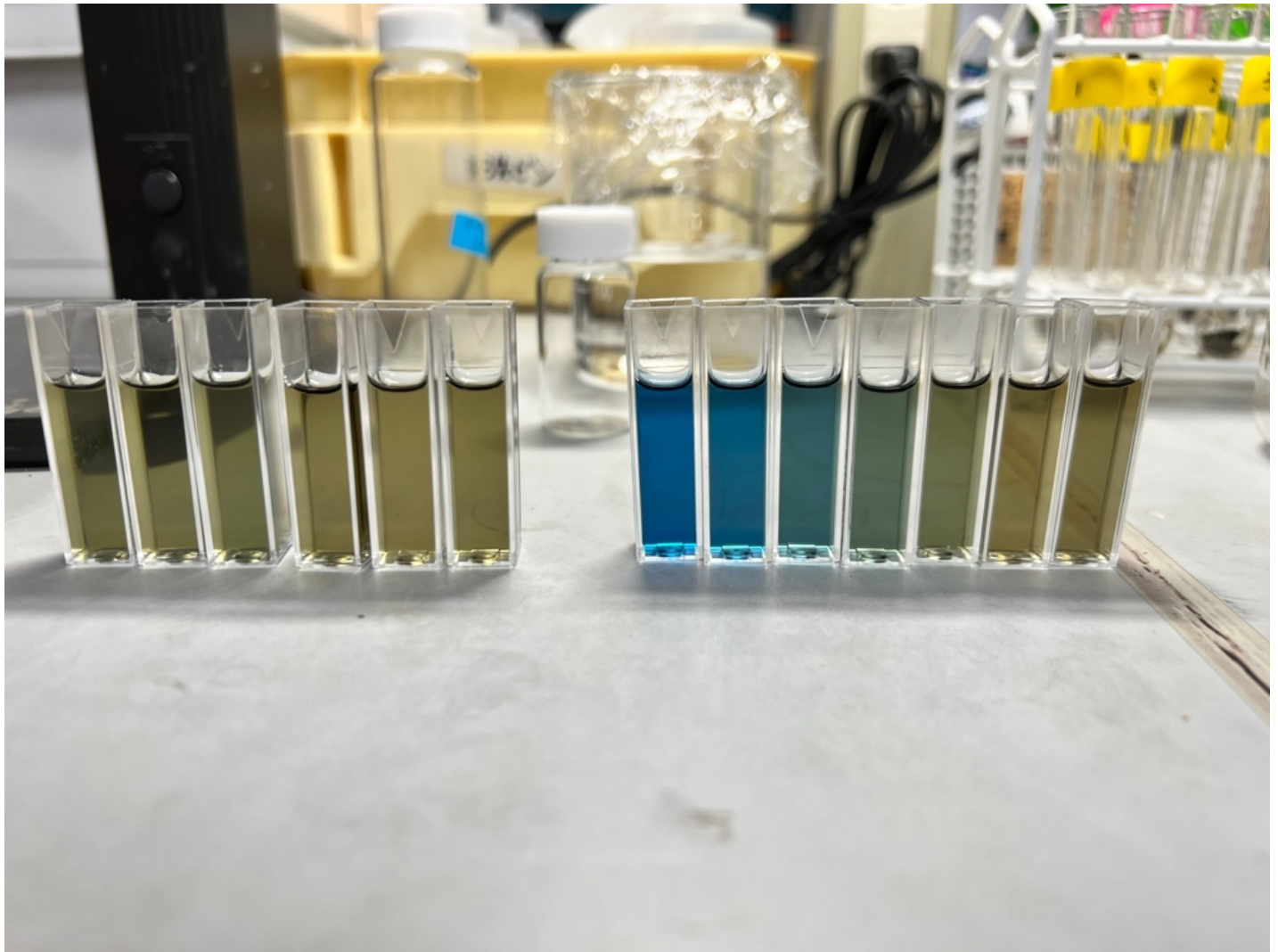


図 3.6 タンパク質濃度が異なるサンプル

表 3.2 吸光度の測定結果 (標準物)

濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	1000	750	500	250	125	25	0(Blank )
吸光度	1.562	1.325	1.074	0.829	0.672	0.658	0.559

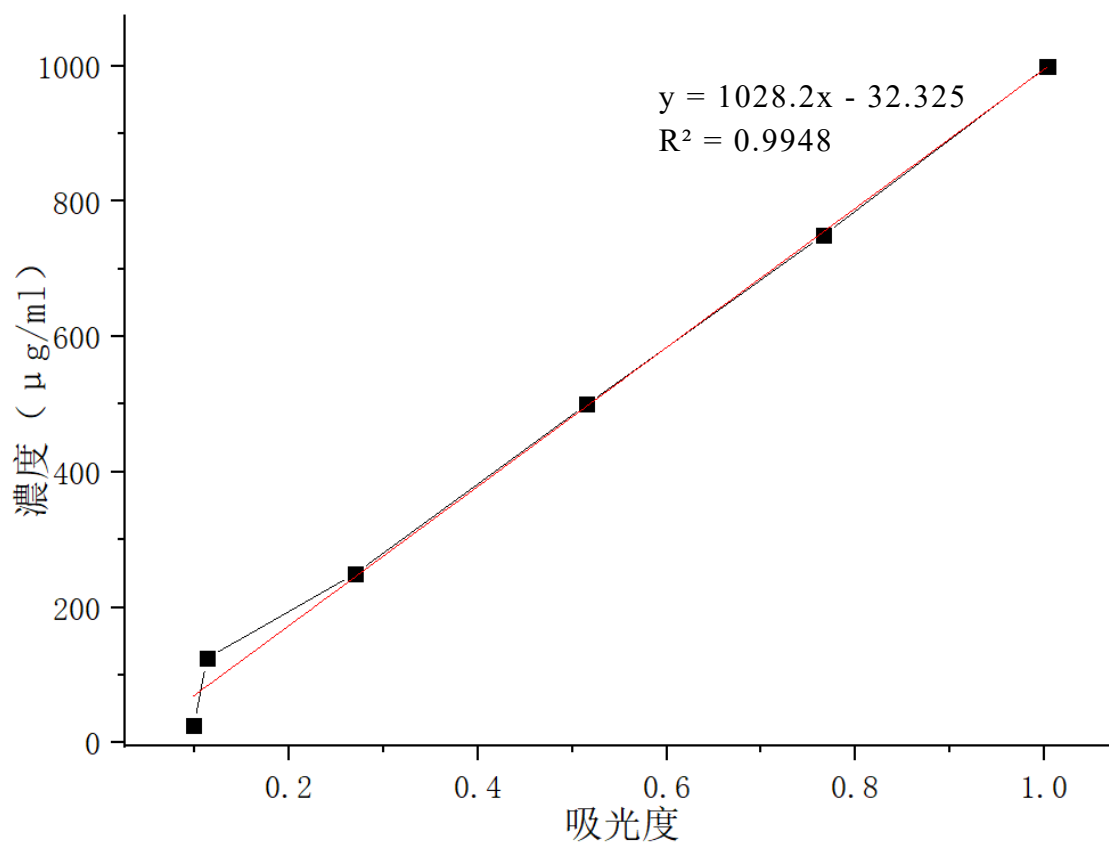


図 3.7 標準液の希釈系列から作成した標準曲線

### 3.5.2 糖類の定量分析

フェノール硫酸法<sup>[22]</sup>を用いて抽出物中の糖類含有量を測定した。

濃硫酸との反応により、糖類は加水分解され、単糖類を形成し、急速にウロン誘導体を形成する。次にフェノールと縮合してオレンジ色の化合物を形成する。このとき 490nm の波長において吸光度は多糖類の含有量に直線的に比例する。したがって、多糖類の含有量の測定に使用することができる。

測定に必要なものを以下に示す。

- ・ 試験管
- ・ 100 ml メスフラスコ
- ・ 超音波洗浄機
- ・ 分光光度計

本研究のタンパク質の測定では、サンプルを蒸留水で希釈した。抽出物サンプルの糖類濃度を測定する手順について以下に示す。

- ①. ブドウ糖標準溶液や抽出物のサンプルの希釈系列を作製する。  
20、40、60、80、100、200、0(Blank)  $\mu\text{g/ml}$  のブドウ糖標準溶液を調製する。
- ②. 試験管に、ブドウ糖または測定サンプルを 0.06 ml 加える。
- ③. 濃硫酸 3ml を各試験管に添加する。
- ④. 25°C に移し、20~30 分間静置する。
- ⑤. 分光光度計を使用して 490 nm でサンプルを測定する。
- ⑥. 標準液の希釈系列から作成した直線を用いて、サンプルの濃度を求める。



図 3.8 糖濃度が異なるサンプル

表 3.3 吸光度の測定結果 (標準物)

濃度 (mg/ml)	4	8	12	16	20	0(Blank)
吸光度	0.117	0.120	0.164	0.183	0.236	0.081

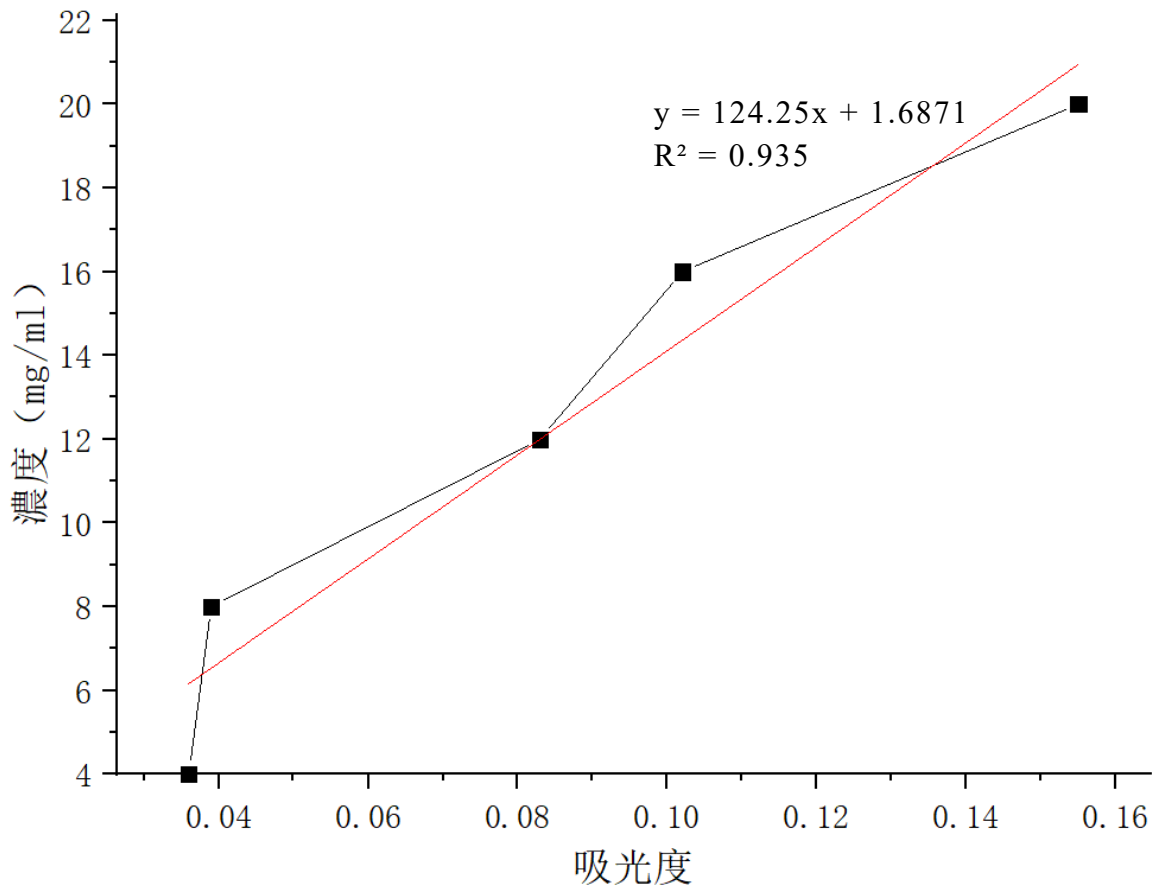


図 3.9 標準液の希釈系列から作成した標準曲線

### 3.5.3 抗酸化成分の測定

本研究では、DPPH ラジカル消去法<sup>[23]</sup>を用いた抽出物の抗酸化活性を測定した。

キットでは測定対象の抗酸化活性を抗酸化物質 Trolox を基準とした Trolox 等価活性(Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity : TEAC)として測定しする。

測定に必要なものを以下に示す。

- 恒温槽 (25℃)
- 試験管
- メスフラスコ
- 超音波洗浄機
- 分光光度計

本研究の抗酸化成分の測定では、サンプルをエタノールで希釈した。測定の手順は以下に記述する

#### ①. DPPH working solution の調製

1. DPPH Reagent 1 本に 1 ml 程度のエタノールを加え、超音波で 60 秒処理する。
2. 調製した溶液全量を 10 ml メスフラスコに移す。
3. 試験管に再度 1 ml 程度のエタノールを加え、超音波で 6 秒処理する。
4. 溶液を移した 10 ml メスフラスコにエタノールを加え 10 ml に定容する。

#### ②. Trolox Standard solution の調製

1. Trolox Standard 1 本に 1 ml 程度のエタノールを加え、超音波洗浄機を用いて内容物を完全に溶解させる。
2. 1 で調製した溶液全量を 10 ml メスフラスコに移し、エタノールで 10 ml に定容する。
3. 2 で調製した 100 µg/ml Trolox Standard solution を 80、60、40、0 µg/ml の濃度になるようにエタノールで希釈する。

#### ③. 最適濃度域の確認

1. サンプルの最高濃度を基準に 10 倍希釈を繰り返し、4 種類以上の広い濃度域でサンプルを準備する。
2. 調製したサンプルを各ウェルに 20 µl ずつ入れる。
3. Blank 1、Blank 2 の試験管にエタノールを 20 µl ずつ入れる。
4. 各試験管に Assay Buffer 80 µl を加える。
5. Blank 2 の試験管にエタノール 100 µl を加え、超音波洗浄機を用いてよく混ぜる。
6. サンプルおよび Blank 1 の試験管に DPPH working solution 100 µl を加え、超音波洗浄機を用いてよく混ぜる。
7. 全てのサンプルを 25℃、暗所で 30 分静置する。



8. 分光光度計を使用して 517 nm でサンプルを測定する。
9. 測定サンプルのラジカル消去率を下記の計算式により求める。

$$\text{サンプルのラジカル消去率 (\%)} = (A_{CS} - A_S) / A_{CS} \times 100$$

$A_{CS}$ : Blank 1-Blank 2

$A_S$ : 測定サンプルの吸光度-Blank 2

10. 横軸に測定サンプル濃度、縦軸にラジカル消去率をプロットし回帰線を算出する。
11. 求めた回帰線より測定サンプルのラジカル消去率 50%を含む最適濃度域を確認する。

④ Trolox および測定サンプルのラジカル消去率の測定

1. 調製した 0, 40, 60, 80  $\mu\text{g/ml}$  Trolox Standard solution を各試験管に 20  $\mu\text{l}$  ずつ入れる。
2. サンプル溶液を 20  $\mu\text{l}$  ずつ入れる。
3. Blank 3 にエタノール 20  $\mu\text{l}$  および Blank 1、Blank 2 にサンプルの抽出・希釈に使用した溶媒を 20  $\mu\text{l}$  ずつ入れる。
4. 各試験管に Assay Buffer 80  $\mu\text{l}$  を加える。
5. Blank 2 および Blank 3 の試験管にエタノール 100  $\mu\text{l}$  を加え、超音波洗浄機を用いてよく混ぜる。
6. Trolox サンプルを入れた試験管および Blank1 の試験管に DPPH working solution 100  $\mu\text{l}$  を加え、よく混ぜる。
7. 全てのサンプルを 25 $^{\circ}\text{C}$ 、暗所で 30 分静置する。
8. 分光光度計を使用して 517 nm でサンプルを測定する。
9. Trolox および測定サンプルのラジカル消去率を下記の計算式により求める。

$$\text{Trolox のラジカル消去率 (\%)} = (A_C - A_R) / A_C \times 100$$

$A_C$ : 0  $\mu\text{g/ml}$  Std. の吸光度 -Blank 3

$A_R$ : 80-40  $\mu\text{g/ml}$  Std. の吸光度 -Blank 3

$$\text{抽出物サンプルのラジカル消去率 (\%)} = (A_{CS} - A_S) / A_{CS} \times 100$$

$A_{CS}$ : Blank 1-Blank 2

$A_S$ : 測定サンプルの吸光度 -Blank 2

10. 横軸に Trolox 濃度および測定サンプル濃度、縦軸にラジカル消去率をプロットし回帰線を算出する。
11. 求めた回帰線より Trolox および測定サンプルの  $\text{IC}_{50}$  を求める。

⑤ TEAC の算出

抽出物のサンプルの Trolox を基準とした抗酸化性 (TEAC) を下記の計算式により求める。

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の } \text{IC}_{50} / \text{サンプルの } \text{IC}_{50}$$

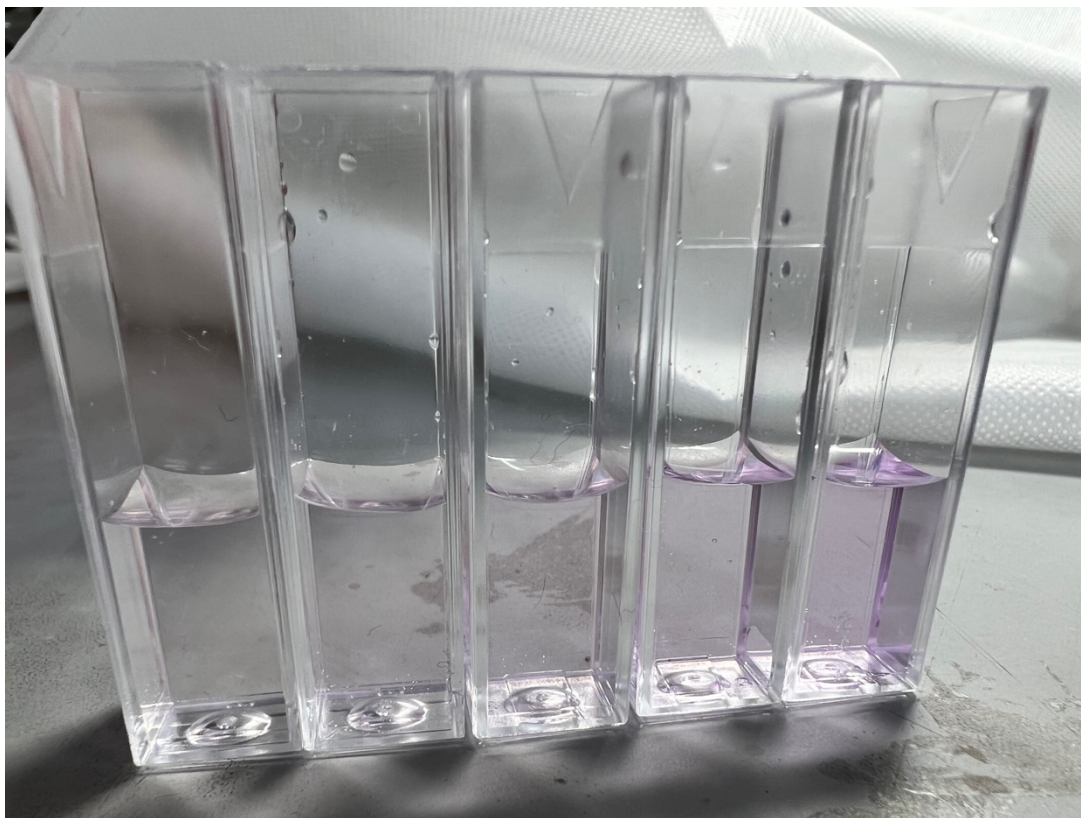


図 3.10 抗酸化性が異なるサンプル

## 第四章 実験結果と考察

### 4.1 抽出率

本研究の抽出率は、反応器に投入された総サンプルの質量に対する抽出物の質量の比率から計算した。

$$\text{抽出率} = \frac{\text{抽出物の質量}}{\text{反応器に投入された総サンプルの質量}} \times 100\%$$

#### 4.1.1 CO<sub>2</sub> のみの抽出率

CO<sub>2</sub> のみを溶媒として抽出した後、抽出物をエタノールで回収した。抽出物と溶媒の混合物は図 4.1 に示すような黄色であった。抽出圧力が高いほど、溶液の色が深い。

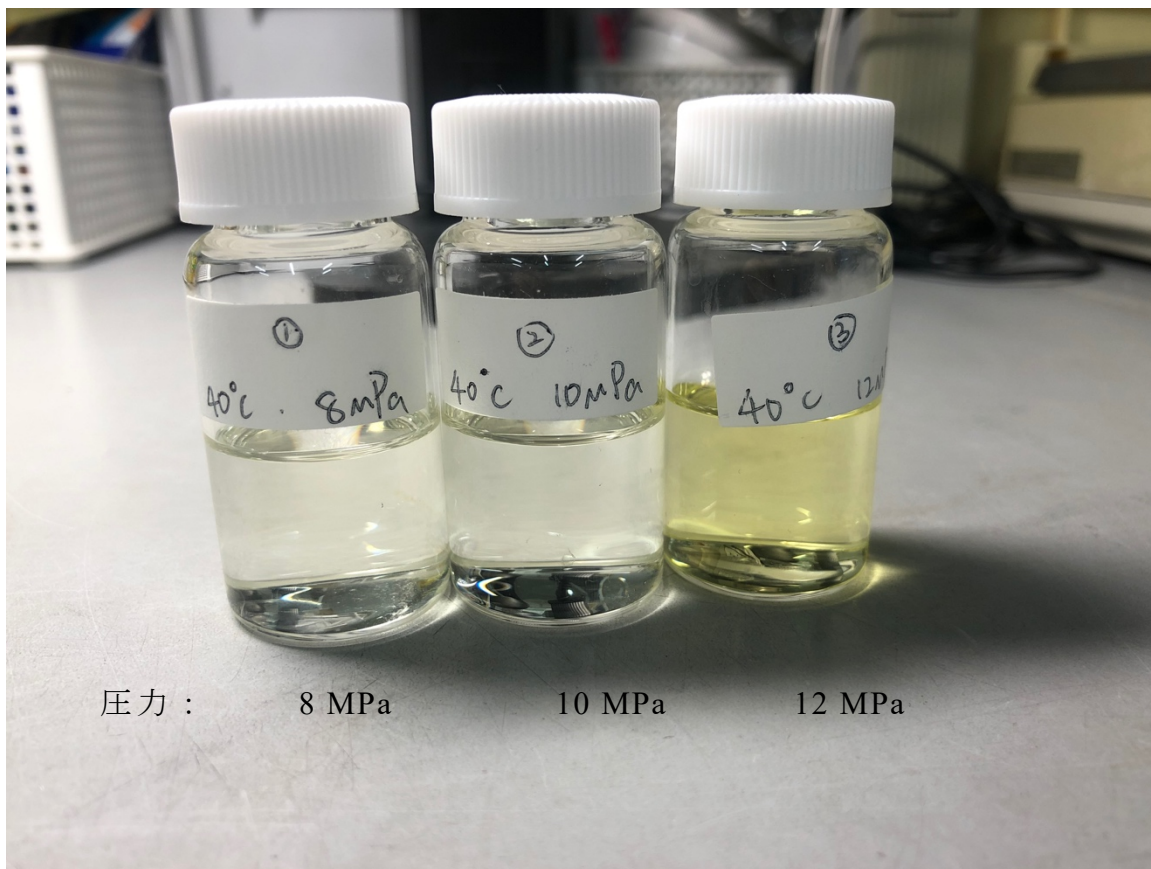


図 4.1 抽出物+溶媒の写真 (CO<sub>2</sub> のみで抽出)

表 4.1 圧力依存性実験結果 (CO<sub>2</sub>のみ)

	温度	圧力	抽出時間	CO <sub>2</sub> 総流量	m サンプル	m 抽出物	抽出率
1	40°C	8 MPa	1 h	60.9 L	1.5008 g	0.0083 g	0.55%
2	40°C	10 MPa	1 h	59.2 L	1.5012 g	0.0217 g	1.45%
3	40°C	12 MPa	1 h	65.4 L	1.5021 g	0.0287 g	1.91%
4	40°C	14 MPa	1 h	59.4 L	1.5001 g	0.0308 g	2.05%
5	40°C	16 MPa	1 h	60.0 L	1.5008 g	0.0380 g	2.53%

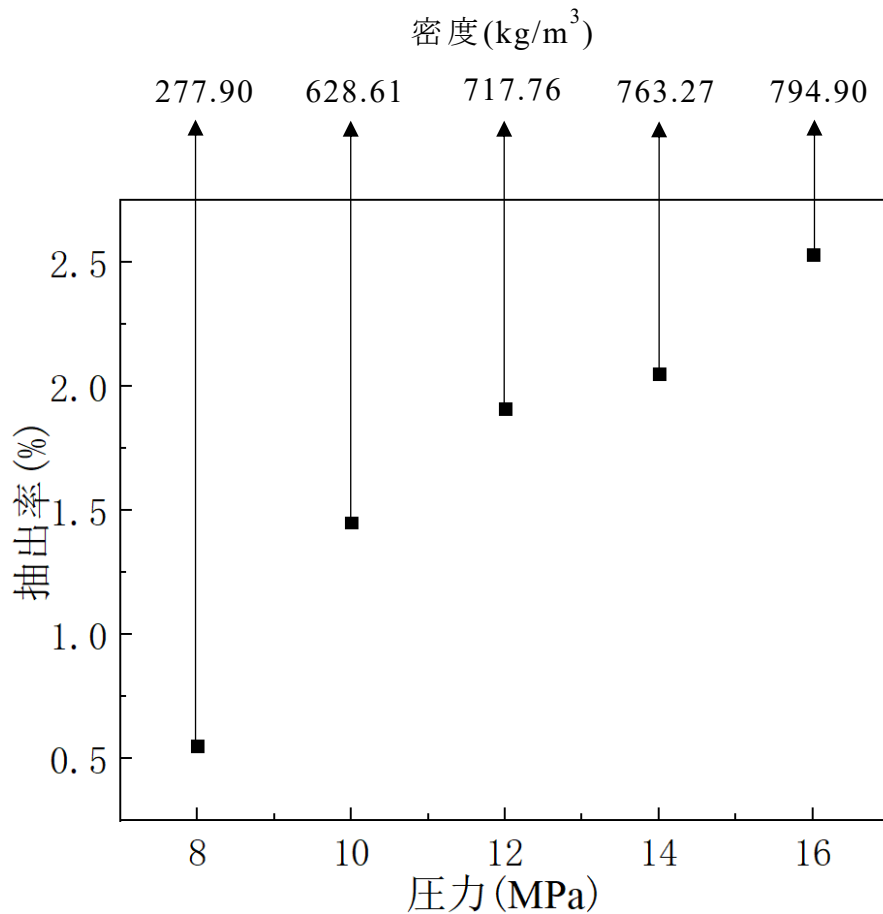


図 4.2 抽出率の圧力依存性 (CO<sub>2</sub>のみで抽出)

図 4.2 に抽出率の圧力依存性を示す。実験の温度、抽出時間を固定し、圧力のみを上昇した。図の上を示すように、圧力が上昇すると、CO<sub>2</sub>の密度が上昇する。圧力依存性結果により 8~16MPa で、圧力が高い場合、抽出率が高いことがわかった。

表 4.2 温度依存性実験結果 (CO<sub>2</sub>のみ)

	温度	圧力	抽出時間	CO <sub>2</sub> 総流量	m サンプル	m 抽出物	抽出 率
1	40℃	12 MPa	1 h	59.2 L	1.5012 g	0.0217 g	1.45%
2	45℃	12 MPa	1 h	62.2 L	1.5024 g	0.0188 g	1.25%
3	50℃	12 MPa	1 h	59.4 L	1.5002 g	0.0178 g	1.18%

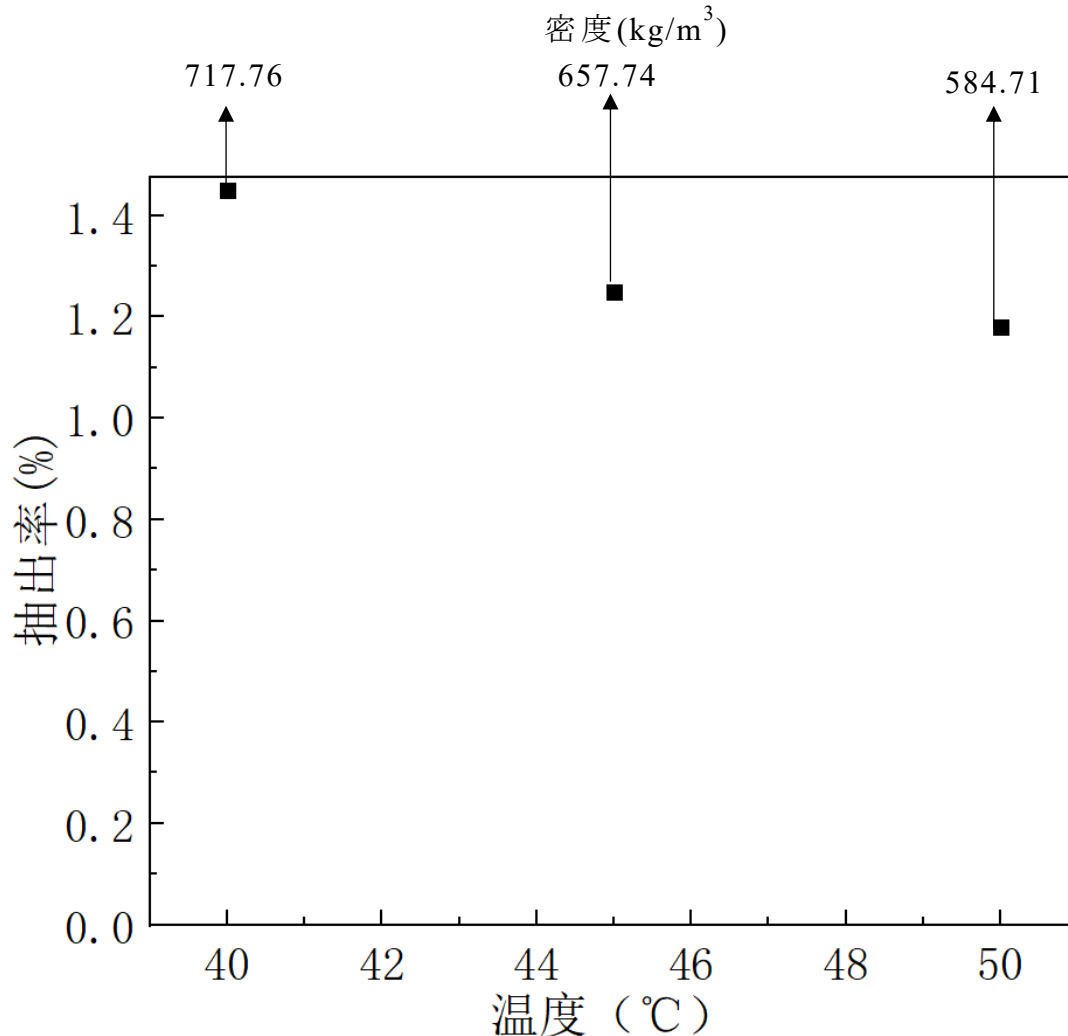


図 4.3 抽出率の温度依存性 (CO<sub>2</sub>のみで抽出)

図 4.3 には、抽出率の温度依存性を示す。実験の圧力、抽出時間を固定し、温度のみに上昇した。結果により、40℃から50℃の範囲で、温度が上昇すると抽出率が下がった。

つまり、CO<sub>2</sub>のみを抽出に使用する場合、図の上を示すように、温度が上昇すると、密度が高いほど抽出率が高い。原因として、密度の増加により CO<sub>2</sub> への溶解度が增大すると考えられる。

表 4.3 抽出時間依存性実験結果 (CO<sub>2</sub>のみ)

	温度	圧力	抽出時間	CO <sub>2</sub> 総流量	m サンプル	m 抽出物	抽出率
1	40 °C	12 MPa	0.25h	16.6L	1.5024g	0.0126g	0.84%
2	40 °C	12 MPa	0.5h	32.8L	1.508g	0.0223g	1.48%
3	40 °C	12 MPa	1h	65.4L	1.5021g	0.0239g	1.59%
4	40 °C	12 MPa	2h	126.7L	1.5008g	0.0269g	1.79%

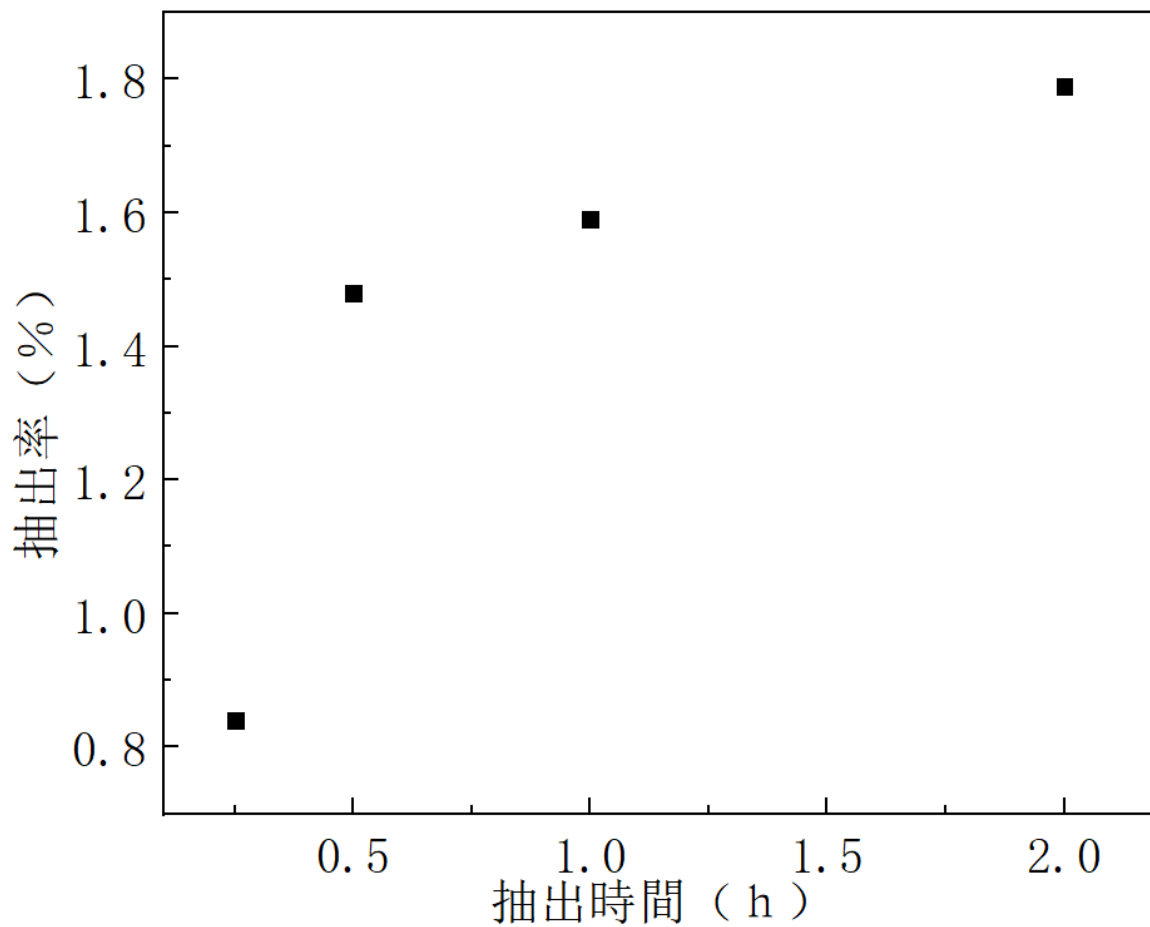


図 4.4 抽出率の時間依存性 (CO<sub>2</sub>のみで抽出)

抽出率の抽出時間の依存性実験結果により、抽出時間 30 分から反応が緩やかにした。抽出時間が 2 時間になっても、抽出率は低いため、エントレーナの使用が必要である。

#### 4.1.2 エタノールをエントレーナとして用いた場合の実験

エタノールをエントレーナとして用いた場合の抽出物と溶媒の混合物は図 4.5 に示すような緑色であった。

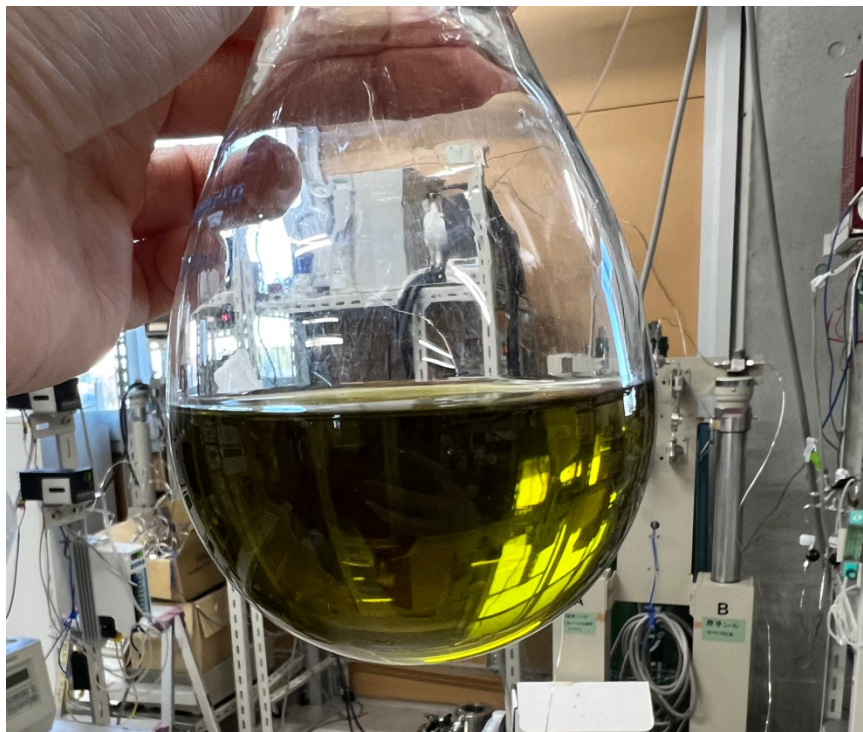


図 4.5 抽出物+溶媒の写真（エントレーナ：エタノール）

エントレーナとしてエタノールを用いた実験を行なった。図 4.6 に抽出率のエタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量依存性を示す。

表 4.4 エタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量依存性実験結果

	温度	エタノール流量/ CO <sub>2</sub> 流量	抽出 時間	CO <sub>2</sub> 総流量	m サンプル	m 抽出物	抽出率
1	40°C	0.5	1 h	51.6 L	1.5011 g	0.39 g	25.98%
2	40°C	0.4	1 h	45.1 L	1.5070 g	0.37 g	24.55%
3	40°C	0.3	1 h	47.4 L	1.5072 g	0.16 g	10.62%
4	40°C	0.2	1 h	42.9 L	1.5023 g	0.14 g	9.32%
5	40°C	0.1	1 h	39.2 L	1.5061 g	0.06 g	3.98%
6	40°C	1	1 h	-	1.5018 g	0.30 g	19.72%

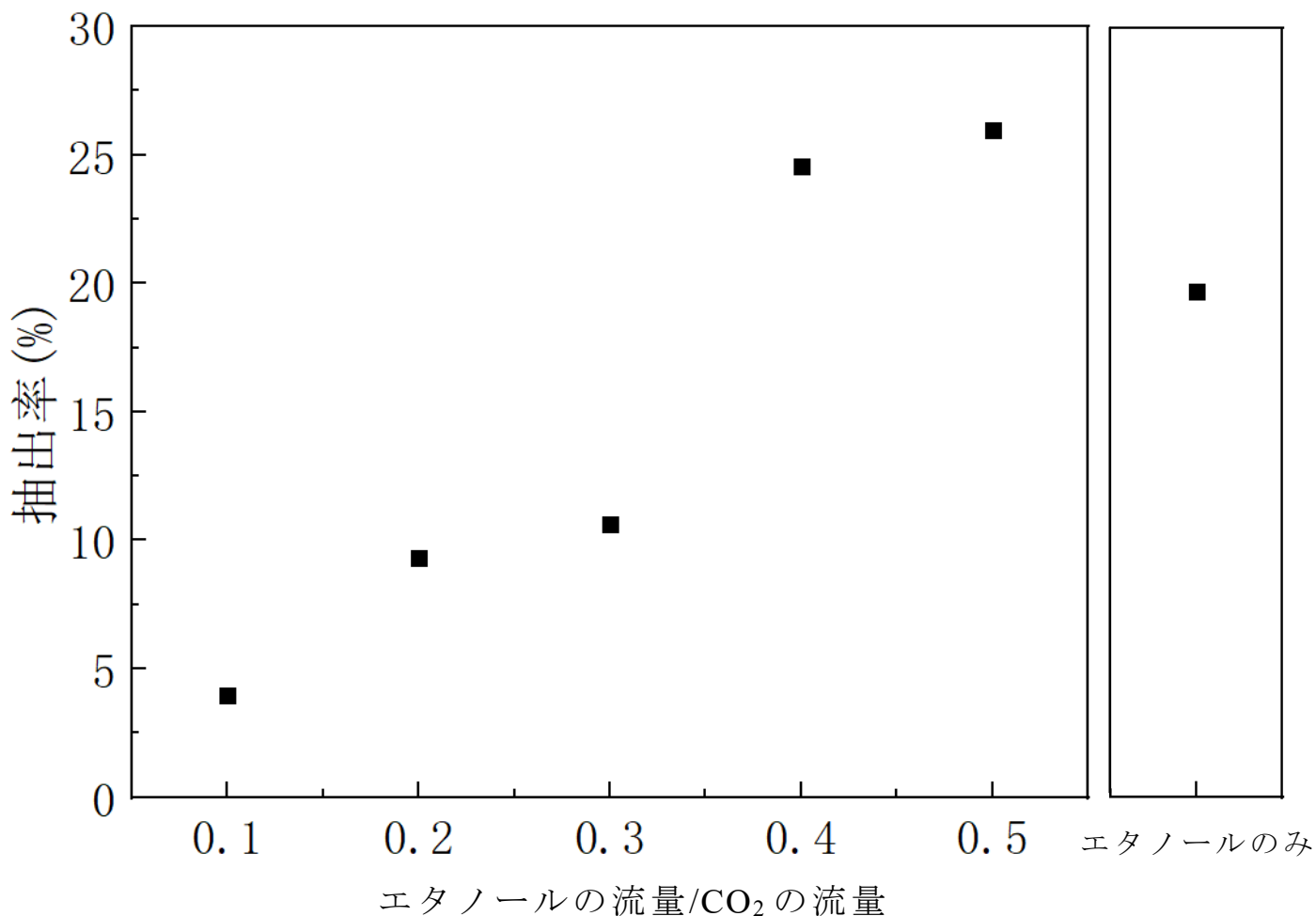


図 4.6 抽出率のエタノール : CO<sub>2</sub> 依存性

エタノールの流量/CO<sub>2</sub>の流量=0.5の場合、抽出率が最も高く、エタノールの割合の増加に伴い抽出率が上昇したことがわかった。CO<sub>2</sub>のみを溶媒として用いた場合の結果との比較することにより、エタノールを用いた場合の抽出率が大幅に上昇した。エタノールのみを使用した単一溶媒とCO<sub>2</sub>+エタノール混合溶媒の抽出効果を比較するために、エタノールを100%で実験も行なった。しかしながら、エタノールを100%で使用した場合、抽出率が19.72%となり、エタノールの流量/CO<sub>2</sub>の流量=0.5の場合より低かった。

次に、エタノールをエントレナーとして用いた場合に圧力に与える影響を解明するために、エタノール流量/CO<sub>2</sub>流量=0.5の条件で、圧力を12 MPa から14、16 MPaに変化させて実験を行なった。実験の結果を以下の表4.5と図4.7に示す。



表 4.5 圧力依存性実験結果(エタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量=0.5)

	温度	圧力	抽出時間	CO <sub>2</sub> 総流量	m サンプル	m 抽出物	抽出率
1	40°C	12 MPa	1 h	51.6 L	1.5011 g	0.39 g	25.98%
2	40°C	14 MPa	1 h	51.9 L	1.5083 g	0.41 g	27.18%
3	40°C	16 MPa	1 h	50.2 L	1.5041 g	0.33 g	21.94%

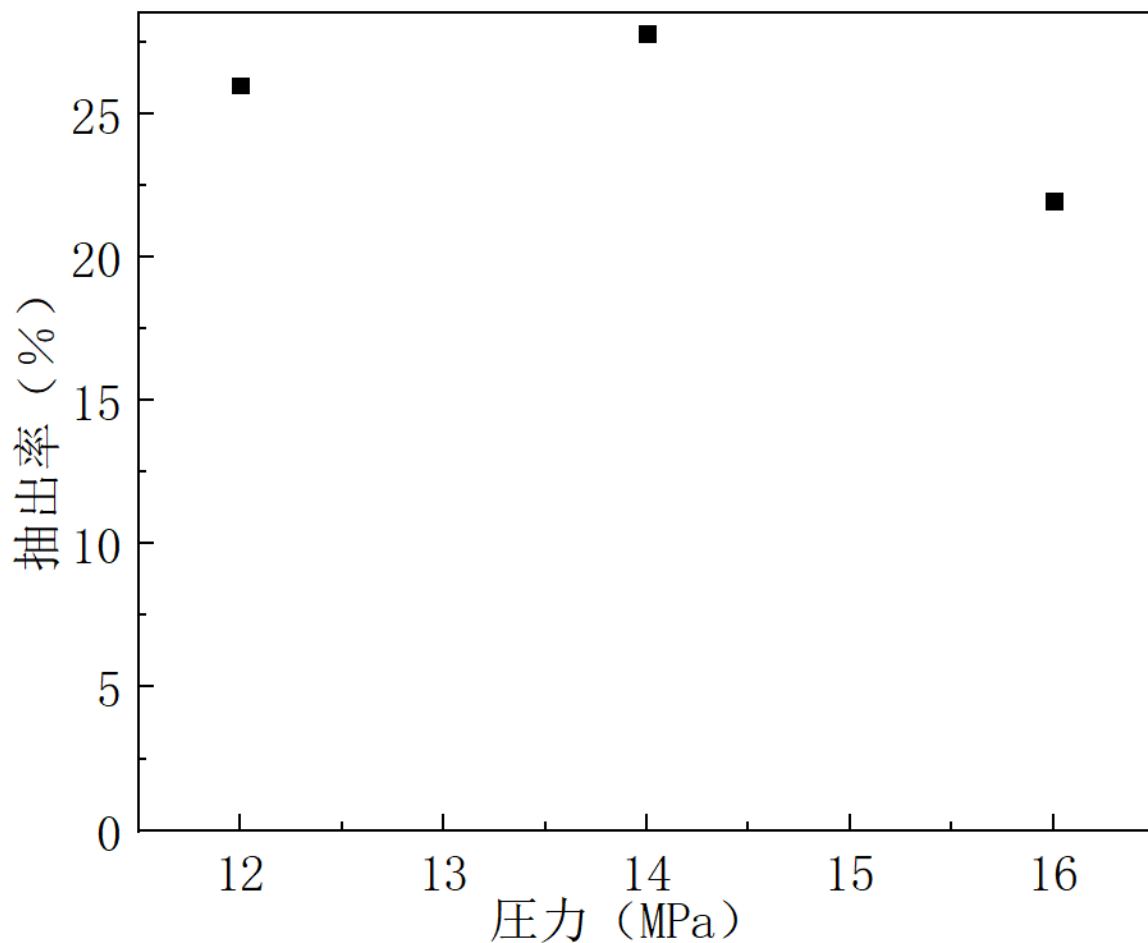


図 4.7 抽出率の圧力依存性 (エタノール流量/CO<sub>2</sub> 流量=0.5)

結果から見れば、CO<sub>2</sub>のみ使用した場合の圧力依存性と比較して、エタノールを溶媒として使用する場合、圧力が収率に対する影響が大きくないことがわかった。

#### 4.1.3 水をエントレーナとして用いた場合の実験

水の流量が高いすぎによる装置内に詰まった可能性を考え、抽出時に溶媒中の水の割合を減らしたが、水： $\text{CO}_2=0.01$ の場合でも詰まった現象が起こるといった結果が得られた。

水をエントレーナとして用いた場合の抽出物と溶媒の混合物は図 4.8 に示すような赤茶色であった。エタノールを使用した場合に比べ、抽出液がより濁った。



図 4.8 抽出物＋溶媒の写真（エントレーナ：水）

エントレーナとして水を用いた二相系の条件で、反応の進行に伴い、含水率が高くなったサンプルが、溶媒に圧縮され続けることにより、反応器出口のフィルターで詰まり、圧力が急速に上昇した現象が見られた。水の流量/ $\text{CO}_2$ の流量 $=0.5$ の場合に、抽出時間は約 20 分で詰まりが発生し始め、圧力が急激に上昇した。正確なデータを測定するために、実験の抽出時間を 15 分とした。

実験結果を表 4.6 と図 4.9 に示す。

表 4.6 水の流量/CO<sub>2</sub> 流量依存性実験結果

	温度	H <sub>2</sub> O: CO <sub>2</sub>	抽出時間	m サンプル	m 抽出物	抽出率
1	40°C	0.5	15 min	1.5062 g	0.122 g	8.03%
2	40°C	0.1	15 min	1.5036 g	0.078 g	5.18%
3	40°C	0.05	15 min	1.5002 g	0.072 g	4.80%
4	40°C	0.01	15 min	1.5008 g	0.066 g	4.40%

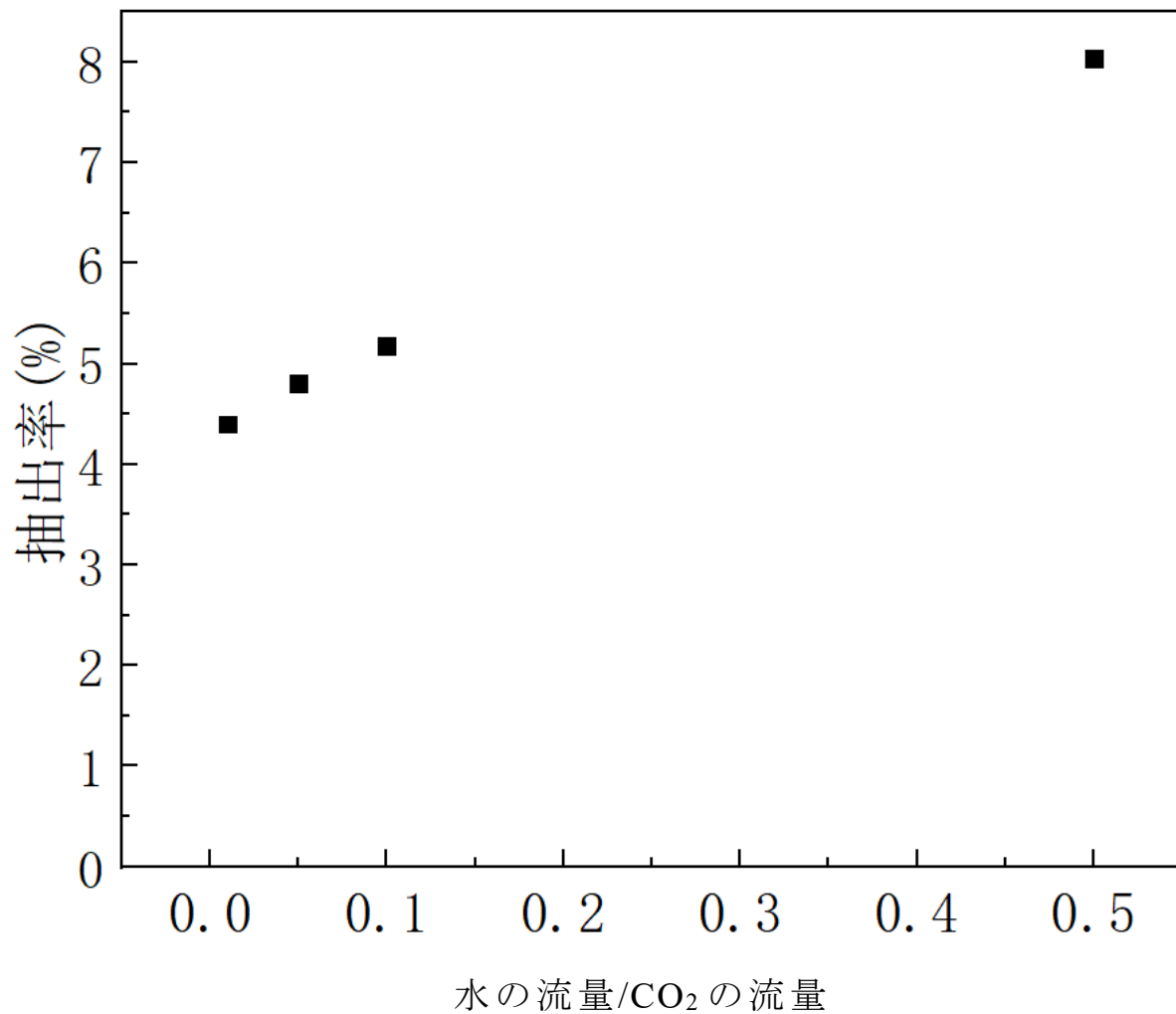


図 4.9 抽出率のエタノール : CO<sub>2</sub> 依存性

水の割合が多い場合に、高い抽出率を得ることができた。CO<sub>2</sub>のみを溶媒として用いた場合の結果と比較して、水をエントレーナとして用いた場合は、より高い抽出率が得られた。一方、エタノールをエントレーナとして使用した場合と比較して、水をエントレーナとして使用した場合の抽出率のエントレーナ流量/CO<sub>2</sub>流量依存性が小さいことがわかった。

各条件下で実験を行った結果、エタノールと水のどちらを使用しても、二酸化炭素のみを使用した場合と比較して、抽出率が大幅に向上したことがわかった。

## 4.2 抽出物の形態

### 4.2.1 抽出物の形態

エタノールと水のどちらをエントレーナとして抽出を行った場合でも、抽出物の総質量は上昇した。しかしながら、抽出率だけでは溶媒の抽出効果を評価することは難しいため、上記の実験で得られた抽出物の組成を測定した。

実験で得られたのは抽出物と溶媒の混合物であった。抽出物を溶媒から分離し、その質量を測定するためにロータリーエバポレーターを使って、溶媒を完

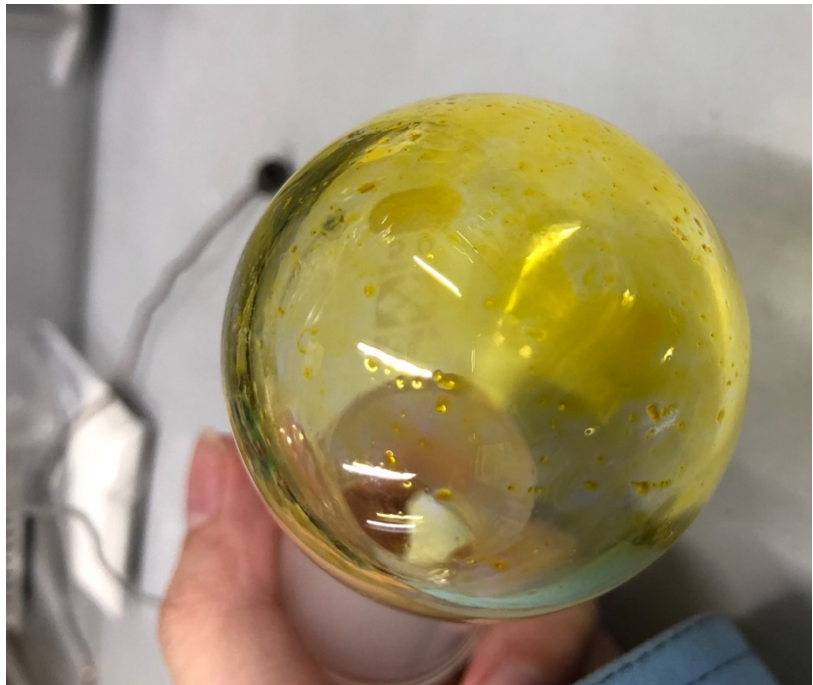


図 4.10 CO<sub>2</sub>のみを用いた実験から得た抽出物の写真

全蒸発させた。CO<sub>2</sub>のみを用いた実験から得た抽出物は図 4.10 に示すように黄色の油状物であった。この物質は水に溶けにくく、一方、エタノールに溶けやすかった。エタノールをエントレーナとして用いた場合の抽出物の写真は図 4.11 に示すように緑の固体と暗緑色の流動性物質が存在している混合物であった。エタノールに溶けやすいが、図 4.12 に示すように水に溶けにくい部分があった。水をエントレーナとして用いた場合の抽出物は図 4.13 の写真に示すように赤茶色の固体であった。この物質は水とエタノール両方にも溶けやすかった。



図 4.11 エタノールをエントレーナとして用いた実験から得た抽出物の写真



図 4.12. 水に溶ける部分と溶けない部分



図 4.13 水をエントレーナとして用いた実験から得た抽出物の写真

### 4.3 抽出物の組成

タンパク質と糖類の測定結果は選択性で示す。

$$\text{選択性} = \frac{\text{目的抽出物 [g]}}{\text{抽出物全体 [g]}} \times 100\%$$

エントレーナが添加した場合に、エントレーナの流量/CO<sub>2</sub>の流量が0.5のサンプルを採取して測定した。

表 4.7. タンパク質と糖類の測定結果

	CO <sub>2</sub> (12 MPa)	CO <sub>2</sub> + エタノール (12 MPa)	CO <sub>2</sub> + エタノール (14 MPa)	CO <sub>2</sub> +水 (12 MPa)	CO <sub>2</sub> +水 (14 MPa)	エタノールのみ (12 MPa)
タンパク質	0.74%	1.83%	1.88%	4.80%	4.99%	1.60%
糖類	3.42%	5.45%	6.54%	10.78%	10.62%	5.09%

抗酸化性の測定結果は表 4.8 に示す。

エントレーナが添加した場合に、エントレーナの流量/CO<sub>2</sub>の流量が0.5のサンプルを採取して測定した。

表 4.8. 抗酸化性の測定結果

	CO <sub>2</sub> (12 MPa)	CO <sub>2</sub> + エタノール (12 MPa)	CO <sub>2</sub> + エタノール (14 MPa)	CO <sub>2</sub> +水 (12 MPa)	CO <sub>2</sub> +水 (14 MPa)	エタノールのみ (12 MPa)
TEAC	0.40	0.97	0.97	0.55	0.52	0.47

CO<sub>2</sub>から得られた抽出物は、いずれも含有量が比較的少ない。その原因は無極性物質やビタミンなどの二酸化炭素に溶解しやすい成分が含まれていると考えられる。CO<sub>2</sub>のみを使用する場合に、抽出物中の有価物の含有量は比較的低くなったので、より多くの有価物を得るために、エントレーナを添加が必要である。

CO<sub>2</sub>+エタノールを使う場合、エタノールの流量/CO<sub>2</sub>の流量=0.5までエタノールの流量が高いほど抽出率が高いが、エタノールのみを使用した場合、抽出物中の抗酸化物質、タンパク質、糖類の含有量はすべて減少した。一方、水をエントレーナとして使用した場合、抽出物中のタンパク質と糖類の含有量が高いが、抗酸化活性が低下した。原因として、CO<sub>2</sub>とエタノールは無極性に近い溶媒のため、抗酸化成分がとけやすい、水は極性溶媒のため、極性の物質に溶解しやすいことが考えられる。

ブロッコリースプラウト中のタンパク質含有量から、実験で得られた抽出物のタンパク質の回収率を計算した。結果は表 4.9 に示す。

$$\text{タンパク質の回収率} = \frac{\text{抽出物中のタンパク質 [g]}}{\text{ブロッコリースプラウト中のタンパク質 [g]}} \times 100\%$$

表 4.9. タンパク質の回収率

	CO <sub>2</sub> (12 MPa)	CO <sub>2</sub> + エタノール (12 MPa)	CO <sub>2</sub> + エタノール (14 MPa)	CO <sub>2</sub> +水 (12 MPa)	CO <sub>2</sub> +水 (14 MPa)	エタノールのみ (12 MPa)
タンパク質 の回収率	2.98%	10.07%	11.06%	8.23%	9.22%	6.81%

タンパク質回収率の計算結果により、エタノールをエントレナーとして用いた場合の回収率が最も高かったものの、抽出時間は2時間に達した。一方、エントレナーとして水を用いた場合に、15分の抽出時間でより高い回収率を達した。ほとんどのタンパク質は水溶性であり、脂質に結合したいくつかのタンパク質はエタノールなどの有機溶媒に溶ける。要するに、水をエントレナーとして使用した場合、抽出物のタンパク質含有量はより高かった。また、温度や pH 値を調整することでタンパク質の抽出率を向上させることができる。ほとんどのタンパク質の溶解度は温度の上昇とともに増加するため、温度が高くなると可溶化が促進され、抽出時間が短縮することが期待できる。しかし、温度が上昇すると、二酸化炭素溶媒の密度が低下するだけでなく、タンパク質が変性して不活性化される可能性があるため、適切な温度を調整することは非常に重要である。

糖の抽出では、エントレナーとして水を使用すると、より高い抽出率が得た。糖類は単糖、多糖、オリゴ糖などに分類でき、抽出実験では、水やエタノールへのさまざまな糖の溶解度が異なるため、抽出物の成分も異なると考えられる。その中で、単糖類、二糖類、およびポリオールは、水およびエタノールに溶けやすく、多糖類、でんぷんなどは水に溶けやすいが、エタノールには溶けない。植物繊維はこの2つの溶媒に溶けにくいことである。

抗酸化成分の測定結果から、CO<sub>2</sub>+エタノールを溶媒として得られた抽出物は、より高い抗酸化性を持っている。抽出する時、抗酸化成分の極性が溶媒に近いほど、溶媒への溶解度が高くなる。有機溶媒としてのエタノールと安定性の高いCO<sub>2</sub>を用いることで、抗酸化成分を安全かつ迅速的な抽出することが期待できる。



## 第五章 結言

本研究では、ブロッコリースプラウトを対象とし、超臨界二酸化炭素抽出法で有価物を抽出について検討を行なった。異なる条件における抽出物の量と組成を測定することにより、特にエントレーナとしてのエタノールと水の効果を検討した。CO<sub>2</sub>を用いてブロッコリースプラウトからの有価物抽出が可能であり、溶媒を調整することで、成分が異なる抽出物が得られる。したかつて、エントレーナとしてタンパク質と糖類の抽出に有効で、エタノールをエントレーナとして抗酸化成分の抽出に顕著的効果が見られた。

また、現在でも、サイズなどの問題で利用せずに直接廃棄されているブロッコリーはたくさんあり、抽出技術でそれらのブロッコリーを利用することができる。さらに、エタノールは低コスト、低毒性で有価物の抽出に適用でき、抽出率を増加させることを目的としたプロセスの最適化を検討しつつ、スルフォラファンやほかの有価物の抽出および精製プロセスを継続的に調査および最適化することが期待できる。

## <参考文献>

- [1] Francis González ら、 Optimization of an Extraction Process to Obtain a Food-Grade Sulforaphane-Rich Extract from Broccoli Molecules. 2021, 26, 4042.
- [2] 日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）
- [3] Carmela Fimognari \*, Patrizia Hrelia Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer Mutation Research 635 (2007) 90–104
- [4] Global Sourcing Hub of Food & Agriculture. <https://www.tridge.com/>
- [5] Andrea Tarozzi ら、 Sulforaphane as a Potential Protective Phytochemical against Neurodegenerative Diseases. Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2013, 10 pages
- [6] D.T. Verhoeven, R.A. Goldbohm, G. van Poppel, H. Verhagen, P.A. van den Brandt, Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 5 (1996) 733–748.
- [7] 後藤 元信 高圧二酸化炭素・水混合流体による抽出分離 高圧力の科学と技術 Vol. 25, No. 3 (2015)
- [8] Binglin Li WenYou. Solubility Optimal System for Supercritical Fluid Extraction Based on a New Nonlinear Temperature-Pressure Decoupling Model Constructed with Unequal-Interval Grey Optimal Models and Peng-Robinson Models[J]. Mathematical Problems in Engineering
- [9] Librando V, Hutzinger O, Tringali G, et al. Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments and soil samples. [J]. Chemosphere, 2004,
- [10] López-cervantes J, Tirado-noriega L G, Sánchez-machado D I, et al. Biochemical composition of broccoli seeds and sprouts at different stages of seedling development [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 48(11): 2267-2275
- [11] Lin Y, Zhang J J, Li X X, et al. Study on extraction process of sulforaphane from broccoli seeds[J]. Chemistry & Bioengineering, 2014, 31(12): 48-50.
- [12] Zhang S, Ying D Y, Cheng L J, et al. Sulforaphane in broccoli-based matrices: Effects of heat treatment and addition of oil[J]. LWT, 2020, 128: 109443.
- [13] Campas-baypoli O N, Sanchez-machado D I, Bueno-solano C, et al. HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products[J]. Biomed Chromatogr, 2010, 24(4): 387-392

- [14] Pongmalai P, Devahastin S, Chiewchan N, et al. Enhancing the recovery of cabbage glucoraphanin through the monitoring of sulforaphane content and myrosinase activity during extraction by different methods[J]. *Separation and Purification Technology*, 2017, 174: 338-344.
- [15] Wu Y F, Xu W L, Shen Y K, et al. Preparation and purification of sulforaphane-an overview[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(19): 381-386.
- [16] Xie S Q, He J, Shu H. Leaching process research of sulforaphane with broccoli seeds[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2016, 44(8): 73-75+99.
- [17] Tang B, Ma S Y, Li S, et al. Optimization on extraction techniques of sulforaphane from broccoli with ultrasound-assisted by response surface methodology[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2015, 50(3): 171-177.
- [18] Biodiesel Synthesis from Mango (*Mangifera Indica*) Seed Oil Extracted with Supercritical Carbon Dioxide. Guzman, L., Durán-Aranguren, D. Sierra, R. 2018 China Academic Journals (CD Edition) Electronic Publishing House Co., Ltd.
- [19] Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and transesterification of the residual oil from industrial palm kernel cake with supercritical methanol
- [20] Shihong Liu, Husam A Abu Hajar, Guy Riefler, Ben J Stuart. Lipid Extraction from *Spirulina* sp. and *Schizochytrium* sp. Using Supercritical CO<sub>2</sub> with Methanol.
- [21] TaKaRa Bradford Protein Assay Kit. <http://www.takara-bio.co.jp/>
- [22] 還元糖の定量法 (福井作蔵 著, 東京大学出版会)
- [23] Applicability of the DPPH Assay for Evaluating the Antioxidant Capacity of Food Additives – Inter-laboratory Evaluation Study. T. Shimamura et al. *Anal. Sci.* 2014, 30, 717 - 721

## <謝辞>

本修士論文は東京大学大学院新領域創成科学研究科環境システム専攻 秋月研究室において、2019年9月から2022年2月までの2年半間に行なわれたものです。研究生半年と修士二年半間の勉強と研究に渡り、多くの方々にお世話になりました。

指導教員の秋月信講師には、ゼミなどの様々な場面において研究に対するご指導、ご指摘をいただきました。学生に対する親切な態度と研究に対する真摯な熱意がとても感心いたします。特に実験の実施にあたる様々な難問やトラブルも直々に対応していただき、論文をまとめる際にも修正や助言をいただき、大変助かりました。心から感謝しております。超臨界流体が専門だった大島義人教授には、ゼミで大島先生ならではの視点で自分の研究の問題点などを意識させていただきました。また、そのような問題をどのように対処すべきかと改善策をどうとるべきかを教えていただき、研究の完成度を高めさせていただきました。深く感謝いたします。副査である松島潤教授には、ご専門が違うけれど、普段に気づかない不足や説明の分かりづらい部分を意識させていただきました。また、副査面談においていつも励ましていただき、どうもありがとうございました。最後に、秋月研究室と同じゼミ体制の大島研究室の学生のみなさんにも、日頃の実験や授業などにおいてお世話になりました。何よりも、和やかな大島・秋月研究室の雰囲気と一緒に作っていただいたおかげで、修士二年間の有意義な学生生活を一緒に送らせていただくことができました。皆様どうもありがとうございました。