

ツルシラモ寒天質の化学的性質に関する研究

Christine A. OROSCO*・斎藤由美子*・沢村 正義*・

大野 正夫**・楠瀬 博三*

(*農学部農産製造学研究室・**海洋生物教育研究センター)

Studies on Chemical Properties of Agar from *Gracilaria chorda*

Christine A. OROSCO*, Yumiko SAITO*,

Masayoshi SAWAMURA*, Masao OHNO** and Hirozo KUSUNOSE*

*Laboratory of Chemistry and Technology of Agricultural Products,

Faculty of Agriculture ; **Usa Marine Biological Institute

Abstract : The yield of total agar polysaccharide from *Gracilaria chorda* Holmes that was extracted with boiling water was 57.6% of algal dry weight. The agar polysaccharide was fractionated into three fractions by sequential solvent extraction with 80% EtOH, 50% EtOH and H₂O (0%). The 80% EtOH fraction was discarded since the yield was below 1% of the total agar polysaccharide. The relative yield of each fraction by sequential solvent extraction were as follows : 80% EtOH fraction 0.9%, 50% EtOH fraction 72.0% and H₂O (0%) fraction 27.1%. Galactose was the only hydrolysis product detected by paper chromatography of all samples. Chemical analyses showed that the sulfate content of all samples before alkali treatment was high, while its 3, 6-anhydrogalactose content was low. After alkali treatment, sulfate content decreased while 3, 6-anhydrogalactose content increased. Total agar polysaccharide was fractionated into five fractions by a DEAE-Sephadex A-50 (Cl) column. Since H₂O, 2.5 M NaCl and 6 M urea fractions were negligible, analyses of these fractions were not made. The sum total of 0.5M and 1.0M NaCl fractions was about 96% of total agar polysaccharide, indicating that the native agar of *Gracilaria chorda* is composed mainly of charged molecules.

緒 言

寒天は紅藻類海藻の主要構成多糖類であり、日本において古くより食用、糊料あるいは医薬用として利用されてきた。荒木¹⁾によれば、その基本的化学構造は1, 3位で他の糖残基と結合するD-ガラクトース (D-Gal) および1, 4位で結合する3, 6-アノヒドロ-L-ガラクトース (3, 6-AG) が交互に連結した多糖類であるとされている。寒天の利用面に直接関係する物性は、原藻の種類、生育環境あるいは生長段階などにより差異があると共に、構成糖残基に結合する硫酸基の位置および量によっても影響されることが知られている。

本研究は未利用海藻類の有効利用を目的として行ったものであり、著者ら²⁾はまず高知県中央部の浦の内湾に分布生育する海藻類の生態調査を行ない、これまでに54種類の海藻を確認してきた。今回、これらの海藻の中から特に生育旺盛で多量に繁茂していたオゴノリ属のツルシラモ (*Gracilaria*

chorda Holmes) について、その寒天質の化学的性質を検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料 試料として高知県土佐市宇佐町の浦の内湾に生育するツルシラモを1989年5月中旬に、岩石への固着部を残して採集し、直ちに日乾した。乾燥藻体を40~60メッシュの大きさに粉碎し、室温でアセトン中に一夜浸漬後、さらに65℃で1時間加熱してアセトン可溶性成分を除去し、濾過残渣を寒天質の抽出材料とした。

2. 一般成分分析 一般成分の分析はアセトン処理藻体を試料として常法に従って行なった。なお、デンプンの定量は過塩素酸抽出法により行なわれた。

3. 寒天質試料の調製

1) アルコール水溶液による分画抽出 ツルシラモの風乾物を30倍量の80%アルコール、50%アルコールおよび水でそれぞれ2時間ずつ沸騰下で順次抽出した。各抽出操作は2回反復された。各抽出液を遠心分離後、上清を100mlに定容し、フェノール-硫酸法により寒天質含量を測定した。定容試料液の残りは減圧濃縮後、濃縮液の3倍量の無水アルコールを加えて寒天質を沈殿させた。得られたそれぞれの寒天質を以下、80% EtOH 画分、50% EtOH 画分およびH₂O画分とする。

2) 沸騰水による抽出 ツルシラモの風乾物を100倍量の水と共に沸騰下で6時間処理した。抽出液はガラス繊維濾紙で濾過し、濾液を定容後、フェノール-硫酸法で寒天質含量を測定した。残液は上記と同様に減圧濃縮後3倍量の無水アルコールを添加して寒天質の沈殿を得た(粗寒天質)。

4. ペーパークロマトグラフィー (PC)

寒天質は5%硫酸により加水分解を行い、その生成物を一次元上昇法により既知糖のR_f値と比較し定性確認を行った。PCの条件は次の通りである。展開剤：フェノール：水(80：20)、ニトロメタン：エタノール：水(4：5：2)、ブタノール：ピリジン：水(6：4：3)。発色剤：アニリンヒドロゲンフタレート(AHP)試薬、アンモニア性硝酸銀試薬。濾紙：東洋濾紙No. 50。

5. 3, 6-アンヒドロラー ガラクトース(3, 6-AG)および硫酸基の定量 3, 6-AGはYAPHEの方法³⁾に従ってD-フルクトースを標準物質とするレゾルシノール発色法で定量した。硫酸基の定量はCRAIGIEらによるTABATABAIの濁度改良法⁴⁾に従って硫酸カリウム(K₂SO₄)を標準物質として行った。

6. アルカリ処理 各寒天質画分および粗寒天質の0.5%水溶液に寒天質重量の0.5%に相当する水素化ホウ素ナトリウムを加え15分間室温で放置した後、3.0M水酸化ナトリウム溶液を加えて1.0Mとし、30℃で3時間アルカリ処理を行った。ついで氷水中で冷却し、2.0M塩酸を徐々に加えてpHを6.5に調整した。この反応液を蒸留水中で、外液を数回交換しつつ2日間透析した。透析終了後、内液を少量に減圧濃縮し、3倍量の無水アルコールを加えて得られた沈殿をアルカリ処理寒天質とした。

7. 陰イオン交換クロマトグラフィー DEAE-Sephadex A-50 (Cl) を外套付きガラス管(2×30cm)に充填した。寒天質のゲル化を防ぐために外套に60℃の熱水を循環させた。少量の熱水

に溶解した寒天質0.5 gをカラムに保持させ、水、0.5M、1.0Mおよび2.5M塩化ナトリウム溶液で順次溶出した。溶出液は5 mlずつ分取した。分取液に寒天質の存在が認められなくなれば次の溶出剤に交換した。2.5M塩化ナトリウムによる溶出が完了した後、充填剤をガラス管から取り出し6 M尿素液50 mlと共に沸騰下で10分間加熱して残存する寒天質を溶出した。蒸留水以外の溶出液はそれぞれ流水中で一夜透析し含有される寒天質量を求め、その残液からアルコール添加法で寒天質画分を調製した。

結果および考察

1. ツルシラモの風乾試料の一般分析 灰分含量が無水物試料に対して29.6%ときわめて高かった。これは海藻採取後の水洗が不十分のためと考えられる。粗脂肪、粗蛋白質、および炭水化物含量を無水無灰物に対する割合として換算し、静岡県産のテングサの一般分析結果と比較すると、粗蛋白質ではツルシラモ10.8%、テングサ13.1%とやや低い値であった。粗脂肪では0.35%に対し0.21%、炭水化物含量は88.1%に対し86.7%と近似していた。デンプン含量は比較分析に供したオゴノリ0.32%に対し、ツルシラモは0.78%と高い値を示したが、ツルシラモ寒天質の酸加水分解生成物にD-グルコースが検出されなかったことから、寒天質へのデンプンの混入はないものと判断される。

2. 寒天質の収率 アルコール水溶液による分画抽出の結果をFig. 1に示す。収率は抽出された全寒天質に対する各画分の相対量で表した。図より明らかなようにツルシラモ風乾物から50%以下のアルコール水溶液で全寒天質の約99%が抽出されることが示された。80%アルコール水溶液で抽出される寒天質は1%以下であった。比較のために用いた *Gracilaria verrucosa* の寒天質は80% EtOH画分が約10%含まれていた点でツルシラモ寒天質と異なっていた。一方、粗寒天質を高収率で得る方法を検討した結果、風乾物試料に対し150倍の水と共に沸騰下で6時間抽出する方法が最もよく、その収率は風乾物に対し57.6%に達した。

3. 構成糖の検索 粗寒天質、50% EtOH画分およびH₂O画分についてPCで糖の検索を行なった。その結果、いずれのPC条件によってもD-ガラクトースしか検出されなかった。寒天質構成成分の一つではないかと推測されているD-キシロースおよびD-グルクロン酸の存在⁵⁾は認められなかった。

4. アルカリ処理による3, 6-AGおよび硫酸基含量への影響 アルコール水溶液による抽出法で分画した3種類の抽出物のうち、収量の少なかった80% EtOH画分以外の寒天質試料について、アルカリ処理による3, 6-AGおよび硫酸基への影響を調べた。Table 1から明らかなように、粗寒天質ではアルカリ処理により3, 6-AG含量は29.0%から33.5%に増加し、一方、硫酸基含量は3.9%から0.8%に減少した。寒天質分子を構成するガラクトース残基のC-6位またはC-3位のいずれかに結合する硫酸基はアルカリ処理により脱離すると同時に3, 6-AGに変換することが知られている⁶⁾。この事実から推察すればこのツルシラモ寒天質は硫酸基の大部分がC-6位またはC-3位のいずれかに存在しているものと考えられる。アルカリ処理後もなお残存している少量の硫酸基は、アルカリ処理に対して比較的安定な位置に結合していることが考えられる。その存在位置を寒天質分子の基本構造から推察してL-ガラクトースのC-2位にあることが考えられる。

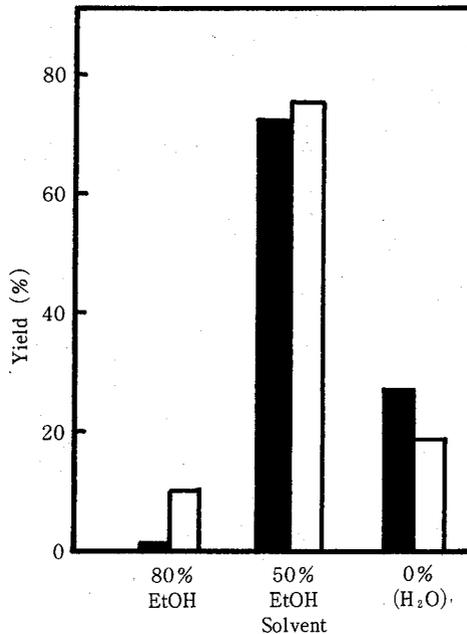


Fig. 1. Yield of agar polymers extracted from *Gracilaria chorda* Holmes and *G. verrucosa* (Huds.) Papenfuss with water at 30°C, boiling 80% and 50% ethanol-water mixtures. The yields represent percentages of the total carbohydrate extracted.

■ *Gracilaria chorda* Holmes
 □ *G. verrucosa* (Huds.) Papenfuss

Table 1. Contents of sulfate and 3, 6-anhydro-L-galactose of crude agar and agar fractions from *Gracilaria chorda* Holmes after sequential extraction with boiling 50% EtOH and H₂O

Fraction	3, 6-anhydro-L-galactose		sulfate	
	Native (%)	Alkali-treated (%)	Native (%)	Alkali-treated (%)
Crude agar	29.0	33.5	3.9	0.8
50% EtOH	25.7	32.8	8.8	1.1
H ₂ O	38.3	41.2	3.3	0.0

次に、50% EtOH 画分についても 3, 6-AG および硫酸基の含量の変化は粗寒天質とほぼ同様の傾向がみられた。なお、硫酸基含量が 8.8% とかなり高い値であるのは電荷密度の高い画分であることを示唆している。

H₂O 画分では 3, 6-AG 含量が 38.3% と他の 2 つの画分に比べてかなり高く、アルカリ処理により硫酸基はすべて 3, 6-AG に変換することが示された。したがってこの画分に含まれる硫酸基はすべて L-ガラクトースの C-6 位または C-3 位のいずれかに結合しているものと考えられる。

5. DEAE-Sephadex による分画 DEAE-Sephadex により粗寒天質をその電荷密度の程度

により5画分に分画し、各画分の相対収率をFig. 2に示した。図よりツルシラモ寒天質 (*G. chorda*) は、中性画分に相当する蒸留水溶出成分が約3%と比較的少量であり、0.5Mおよび1.0M塩化ナトリウム画分が合計して全溶出画分の約96%を占めており、この2画分が主要構成成分であることが明らかである。一方、オゴノリ寒天質 (*G. verrucosa*) は蒸留水溶出画分が約17.5%と比較的多く含まれていた。とくに0.5M塩化ナトリウム画分が全溶出画分の約73%を占め主要構成成分であった。ツルシラモ寒天質で最も多い画分である1.0M塩化ナトリウム画分(約57%)はオゴノリ寒天質では約8%と比較的少量であった。また、荷電密度が高い画分と考えられる2.5M塩化ナトリウムおよび6.0M尿素画分は両海藻とも数%でごく少量であった。これらの事実から、ツルシラモ寒天質はオゴノリ寒天質よりも相対的に荷電密度の高い成分が多いと考えられる。

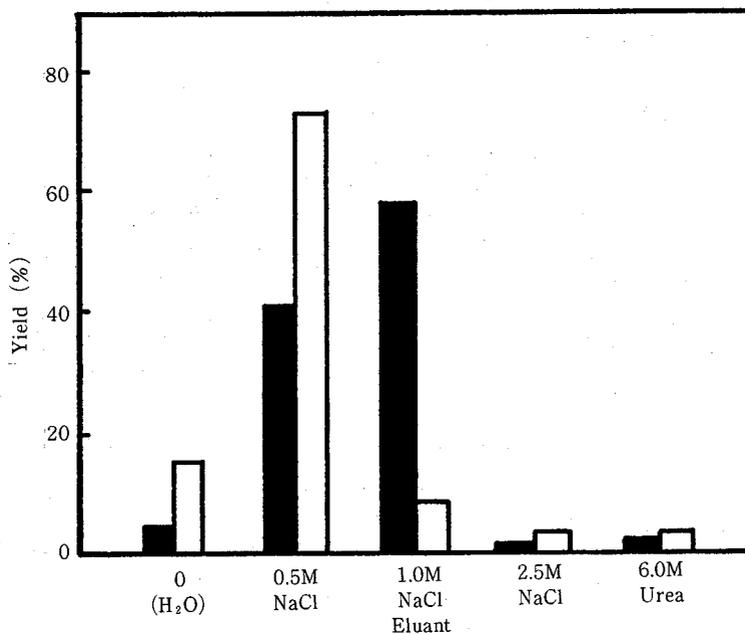


Fig. 2. DEAE Sephadex A-50 fractionation pattern of native boiling water extracts from *Gracilaria chorda* and *G. verrucosa*. The yields of polymers eluted with distilled water (0), 0.5, 1.0, and 2.5M NaCl solutions at 65°C, and recovered with 6.0M urea from the Sephadex matrix at boiling state, represent percentages of carbohydrate applied to the anion exchanger.

■ *Gracilaria chorda*
□ *G. verrucosa*

ツルシラモ寒天質において、蒸留水、2.5M塩化ナトリウムおよび6M尿素溶出画分は収量が低く、3, 6-AGおよび硫酸基の分析に供し得なかった。前記粗寒天質の約96%に相当する0.5Mおよび1.0M塩化ナトリウム画分はそれぞれ3, 6-AGおよび硫酸基の分析に供し、それらの結果をTable 2に示した。

Fig. 2およびTable 2の結果から、3, 6-AG含量の多い画分は硫酸基含量が低く、反対に3, 6-AG含量の低い画分は硫酸基を比較的多く有することが明らかとなった。また、アルカリ処理により硫酸基の約80%が3, 6-AGに変換することが明らかとなった。

Table 2. Contents of sulfate and 3,6-anhydro-L-galactose of 0.5M NaCl and 1.0M NaCl fractions of *Gracilaria chorda* eluted from a DEAE Sephadex A-50 (Cl) column

Fraction	3,6-anhydro-L-galactose		sulfate	
	Native (%)	Alkali-treated (%)	Native (%)	Alkali-treated (%)
0.5M NaCl	28.2	—	3.6	—
1.0M NaCl	4.0	—	10.3	—

— : analyses were not made.

要 約

紅藻類オゴノリ属の海藻であるツルシラモ (*Gracilaria chorda* Holmes) の寒天質について化学的性質を調べ以下の結果を得た。

- 1) ツルシラモ風乾物から熱水抽出された粗寒天質収量は57.6%であった。
- 2) 80%アルコールから抽出される寒天質は粗寒天質の0.9%であり、50%アルコール抽出画分では72.0%、蒸留水抽出画分では27.1%であった。これらの寒天質の加水分解物の構成糖はD-ガラクトースのみであった。
- 3) 粗寒天質の硫酸基含量は高く、一方、3,6-AG含量は低かった。しかしアルカリ処理により寒天質の硫酸基含量は減少し、3,6-AG含量が増加した。
- 4) DEAE-Sephadex A-50 (Cl) カラムクロマトグラフィーの結果から、0.5Mおよび1.0M塩化ナトリウム溶出画分が全寒天質の約96%を占めていたことから、本ツルシラモ寒天質は比較的電荷密度の高い分子から構成されていることが示唆された。

キーワード：紅藻類, 3,6-アノヒドロガラクトース, 硫酸基

文 献

- 1) ARAKI, C. : Structure of the agarose constituents of agar-agar. *Bull. Chem. Soc. Japan.*, 4, 543-544 (1956).
- 2) OROSCO, C. A. and OHNO, M. : Seasonal abundance and growth of *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) in southern Japan. Submitted for publication.
- 3) YAPHE, W. : Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides. *Anal. Chem.*, 32, 1327-1330 (1960).
- 4) CRAIGIE, J. S., Wen, Z. C. and VAN der MEER, J. P.: Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. *Bot. Mar.*, 27, 55-61 (1984).
- 5) 荒木長次：寒天の化学的研究 (第2報), 石花菜寒天質に就て (I). 日化, 58, 1214-1234 (1937).
- 6) REES, D. A.: Estimation of the relative amounts of isomeric sulfate ester in some sulphated polysaccharides. *J. Chem. Soc.*, 5168-5171 (1961).

(1991年9月29日受理)

(1991年12月27日発行)