

ナラワスサビノリからのポルフィラン抽出条件の検討

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	西出, 英一 大野, 光宣 安齋, 寛 内田, 直行
巻/号	54巻12号
掲載ページ	p. 2189-2194
発行年月	1988年12月

ナラワスサビノリからのポルフィラン抽出条件の検討^{*1}

西出 英一, 大野 光宣, 安齋 寛, 内田 直行

(1988年6月29日受付)

Extraction of Porphyran from *Porphyra yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURAEiichi Nishide,^{*2} Mitsunori Ohno,^{*2} Hiroshi Anzai,^{*2} and Naoyuki Uchida^{*2}

A best search for the most efficient extraction condition of sulfated polysaccharide (Porphyran) from *Porphyra yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURA was made. The highest yield was obtained by the following procedure:

Raw algal fronds were treated with 3.7% formaldehyde solution in a flask closed with a stopper at 30°C for 24 h. After addition of 2 times volume of distilled water, the suspension was heated at 100°C with stirring for 12 h. The extract was cooled at room temperature and filtered through a layer of diatom earth. The clarified filtrate was dialyzed in a Visking cellophane tube against running tap water for 24 h, and evaporated to 1/4 of its original volume under reduced pressure, to this was added 4 times volume of ethanol at room temperature. The gelatinous precipitate collected by centrifugation was washed with ethanol, and acetone, and dried at 30°C for 12 h.

Gel-filtration on Sepharose CL-2B showed that the higher molecular weight polysaccharides were extracted by treatment with a higher temperature and a lower molecular weight components which was eluted the position to the Vi increase in the amount with the length of extraction time.

日本のアマノリ属海藻の年間生産量は湿重量として 35 万 t で、その全量から約 90 億枚の板海苔が生産され、食品として国内で消費されている。¹⁾ アマノリ属海藻の生産量はここ数年大きな変動がないところから、²⁾ 板海苔としての需要は飽和していると考えられる。需要を増加させるには板海苔といった伝統的な食品形態ばかりではなく、アマノリ属海藻中の有用成分の利用技術の開発が必要となる。

四訂日本食品標準成分表によるとほしのり中には多量の糖質の存在が認められている。³⁾ この糖質は 1957 年 Nunn and von Holdt⁴⁾ によって始めて単離され、その後、多くの研究が行われた結果、⁵⁻¹⁰⁾ D- 及び L-ガラクトース、3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース、6-O-メチル-D-ガラクトースおよび硫酸基から成る硫酸多糖 (以下、ポルフィランと称する。) であることが明らかにされたが、抽出条件および性質の詳細については不明な点が多い。

そこで、本実験においてはナラワスサビノリ *Porphyra yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURA を用いて、粗ポルフィランの最適抽出条件を検討した。

実 験

試料 昭和 61 年 2 月 26 日横須賀市長井地先より採した養殖ナラワスサビノリの生藻体を -20°C に保存し、適宜実験に供した。

タンパク質の除去方法の検討 Fig. 1 に示した A, B および C の方法について検討した。

抽出液からの粗ポルフィラン析出剤の検討 Fig. 1, C 法で用いた析出剤 (エタノール) の外にメタノール、プロパン-2-オールを用い、析出温度を室温、5°C および 0°C の三段階に変化して実験を行い、粗ポルフィラン量^{*3}並びに粗ポルフィラン中のガラクトース量およびタンパク質量を求めた。

粗ポルフィランの抽出温度、抽出時間の検討 Fig. 1, C 法を用いて、抽出温度を 30~100°C、抽出時間を 2~12 時間と変化させて粗ポルフィランを抽出し、粗ポルフィラン収量並びに粗ポルフィラン中のガラクトース量およびタンパク質量を測定した。

ゲルろ過 粗ポルフィラン (ガラクトース量として 5

*1 内容の一部は昭和 62 年度日本水産学会春季大会において発表した。なお、本論文はナラワスサビノリのポルフィランに関する研究—I (Studies on Porphyran from *Porphyra yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURA……I)。

*2 日本大学農獣医学部 (Collage of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Shimouma, Setagaya, Tokyo 154, Japan)。

*3 粗ポルフィラン収量は乾燥藻体に対する抽出物の重量で表した。

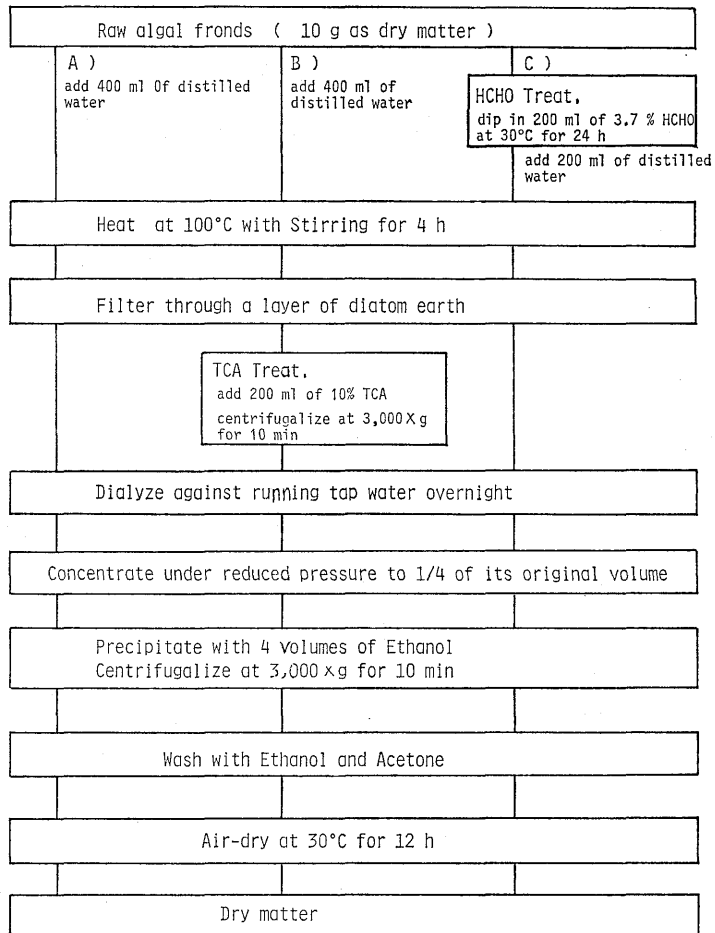


Fig. 1. Flow chart of the preparation of crude porphyran from *P. yezoensis* UEDA *F. narawaensis* MIURA with three different treatments.

mg) を 0.5 M 塩化ナトリウムに溶解し, 0.5 M 塩化ナトリウムで平衡化させた Sepharose CL-2B (Pharmacia LKB Biotechnology 社製, カラムベッド: 2.2 cm×97.6 cm) に添加し, 0.5 M 塩化ナトリウムで溶出させた。溶出液は 5 ml づつ集め, フェノール硫酸法¹¹⁾で 490 nm の吸光度を測定した。また, 対照としてデキストラン T 2.000 (M.W: 2,000,000, Pharmacia LKB Biotechnology 社製) を使用した。

分析方法 ガラクトースはフェノール硫酸法により, 3,6-アンヒドロガラクトースはレゾルシン塩酸法¹²⁾ により, タンパク質は Lowry-Folin 法¹³⁾ により, また, 硫酸基はフラスコ燃焼法¹⁴⁾ により求めた。

なお, ポルフィランそのものの定量法はないが, ポルフィランはガラクトースおよびその誘導体が主成分なので, 粗ポルフィラン中のガラクトース含量が上昇し, 一定値に近づくことは純度の上昇を意味するので, 粗ポルフィラン中のガラクトース量を測定した。

また, ほしりの中には 38.8% のタンパク質が含有されている⁹⁾ ので, このタンパク質が粗ポルフィラン中にきよう雑することは粗ポルフィランの純度低下をきたし, タンパク質含量の低下はきよう雑物の混入の少いことを意味するので, タンパク質含量の少い粗ポルフィランの抽出方法を探す必要からタンパク質を測定した。粗ポルフィラン中のきよう雑物としては, ほしり中の化学組成⁹⁾ より, タンパク質が主であって, 他の成分があっても問題になるほどの量ではないと考えられる。

結果及び考察

タンパク質除去方法の検討 四訂日本食品標準成分表によるとほしりの中には 38.8% のタンパク質が含有されている。⁹⁾ アマノリ属海藻より熱水により粗ポルフィランを抽出する際, 熱水可溶性タンパク質も一緒に抽出されるので, その除去方法として Fig. 1 に示す 2 通りの方法を検討した。結果を Table 1 に示す。

Table 1. Effect of treatment with trichloroacetic acid (TCA) or formaldehyde (HCHO) on the yield of crude porphyrin from *P. yezoensis* UEDA *F. narawaensis* MIURA

Treatment	Yield (%)	Content (%)	
		Galactose* ¹	Protein* ²
Control (Fig. 1. (A))	14.4	68.0	22.5
TCA-treat. (Fig. 1. (B))	11.9	76.0	23.5
HCHO-treat. (Fig. 1. (C))	21.9	81.5	5.6

*¹ Galactose was determined by phenol sulfuric acid method.¹¹⁾

*² Protein was determined by Lowry-Folin method.¹²⁾

同表にみられるように、代表的なタンパク質除去剤であるトリクロル酢酸を用いた場合の抽出物中のタンパク質含有量は、対照実験の抽出物を流水透析した時除去されるタンパク質量と大体同じであることがわかった。

次に、タンパク質の変性剤であるホルマリンで藻体を予め処理した後、希薄濃度のホルマリン存在下で加熱抽出を行ったところ、抽出物中のタンパク質量は激減していることがわかった。

この結果、ナラワスサビノリから粗ポルフィランを抽出する際、試料をホルマリン処理した後、ホルマリン存在下で加熱抽出を行うとタンパク質の溶出は抑制され、きょう雑物としてのタンパク質含量の少ない粗ポルフィランが得られることがわかった。

抽出液からの粗ポルフィラン析出剤の検討 アルギン酸誘導体¹⁵⁾や繊維素グリコール酸^{16,17)}を析出する際使用する有機溶剤の種類により、収量および生成物の性質が異なることが認められているので、ナラワスサビノリポルフィラン抽出液からの粗ポルフィラン析出剤としての有機溶剤の影響について検討した。

Table 2 にみられるように粗ポルフィラン収量、析出物中のガラクトース含有量、きょう雑物としてのタンパク質含有量は供試有機溶剤の種類および析出時の析出温度により異なることがわかった。特に、収量におよぼす有機溶剤の影響は顕著で、析出温度のいかんをとわずプロパン-2-オール (22~24%)≒エタノール (21~24%)>メタノール (11~14%) となり、析出剤としてプロパン-2-オール、エタノールを用いた場合はメタノールを用いた場合の 1.8 倍も収量が高い。

この結果、粗ポルフィランの収量が多く、析出物中のガラクトース含有量が多く、きょう雑物としてのタンパク質含有量が少くなるエタノールを析出剤として用い、析出温度を室温以下 (0, 5°C) とする方法より室温とする方法の方が有利であることがわかった。

粗ポルフィラン抽出条件の検討 前述の結果、Fig. 1, に示した C 法について、抽出温度について検討を行った。すなわち、抽出時間を 4 時間と一定にし、抽出温度を 30~100°C と変化させた場合の粗ポルフィラン収量の変化は Fig. 2 の通りであった。同図にみられるように、抽出温度が 30~70°C の場合、収量は 5~8% と低かったが、80~100°C では温度の上昇にしたがい収量が急増し、20% に達した。このことからナラワスサビノリポルフィランの収量は抽出温度の影響を受けることがわかった。

次に、各抽出温度で抽出した粗ポルフィラン中のガラクトースときょう雑物としてのタンパク質の含有量を Fig. 3 に示す。同図にみられるように抽出温度の上昇とともに高ガラクトース含有、低タンパク質含有の粗ポルフィランが得られることがわかった。特に、ホルマリン存在下での抽出温度の上昇は藻体に含有されるタンパク質の不溶化を促進したものと考えられる。

次に、抽出温度を 100°C と一定にし、抽出時間を 2~12 時間と変えた場合の粗ポルフィラン収量の変化は

Table 2. Effect of solvents used for precipitation of crude porphyrin on its yield from *P. yezoensis* UEDA *F. narawaensis* MIURA

	Temp. of precipitation	Yield (%)	Content (%)	
			Galactose	Protein
Methanol	Room temp.	11.0	86.5	5.76
	5°C	14.8	86.5	5.83
	0°C	13.3	83.4	6.32
Ethanol	Room temp.	24.2	86.9	3.93
	5°C	23.8	84.3	5.81
	0°C	21.9	72.3	4.85
Propan-2-ol	Room temp.	22.7	83.9	6.95
	5°C	23.5	74.0	7.95
	0°C	24.1	84.2	6.30

* Extraction method is C shown in Fig. 1 (C).

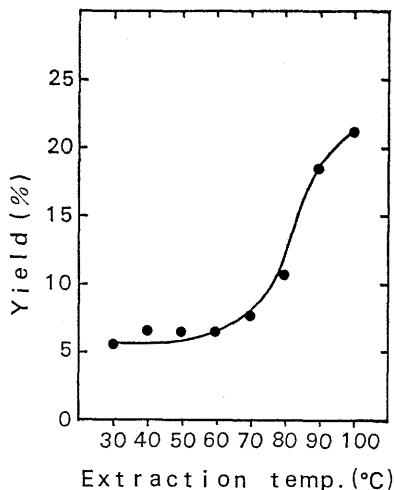


Fig. 2. Effect of extraction temperature on the yield of crude porphyran from *P. yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURA. Extraction method is C shown in Fig. 1. (C).

Extraction time: 4 h.

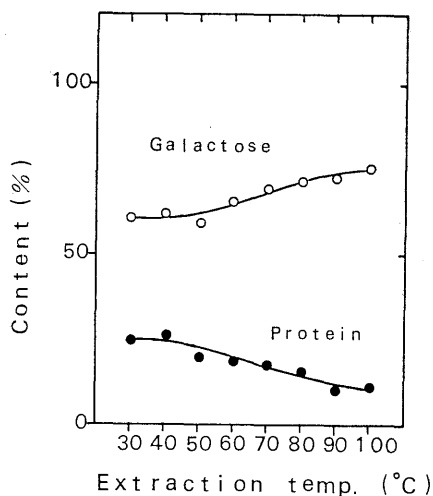


Fig. 3. Effect of extraction temperature on content of galactose and protein in crude porphyran from *P. yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURA.

Extraction time: 4 h.

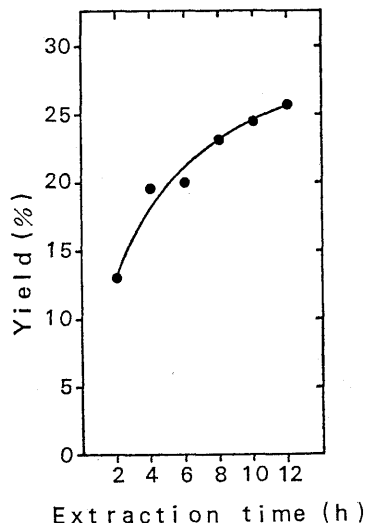


Fig. 4. Effect of extraction time on the yield of crude porphyran from *P. yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURA. Extraction method is C shown in Fig. 1. (C).

Extraction temperature: 100°C.

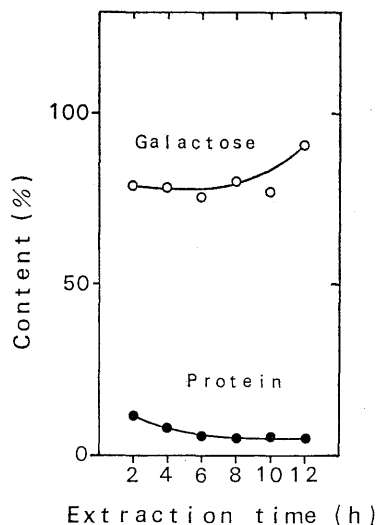


Fig. 5. Effect of extraction time on content of galactose and protein in crude porphyran from *P. yezoensis* UEDA F. *narawaensis* MIURA.

Extraction temperature: 100°C.

Fig. 4 に示す通りであった。同図にみられるように、抽出温度を 100°C とした場合、抽出時間が長くなるにしたがい収量が急増している。収量は抽出時間 2 時間では 13% であったが、12 時間では 25% と約 2 倍となった。この結果、ナラウスサビノリポルフィランの収量は前述の場合と同様に抽出時間の影響も受けることがわかった。

更に、抽出時間を種々変えて抽出した時の粗ポルフィ

ラン中のガラクトースときよう雑物としてのタンパク質の含有量を調べた。結果を Fig. 5 に示す。同図にみられるように抽出時間が長くなるにしたがい、高ガラクトース含有、低タンパク質含有の粗ポルフィランが抽出されることがわかった。この結果と前述の抽出温度とガラクトース、タンパク質含有量との関係 (Fig. 3) を考えあわせると、ホルマリン存在下での高温、長時間の加熱によ

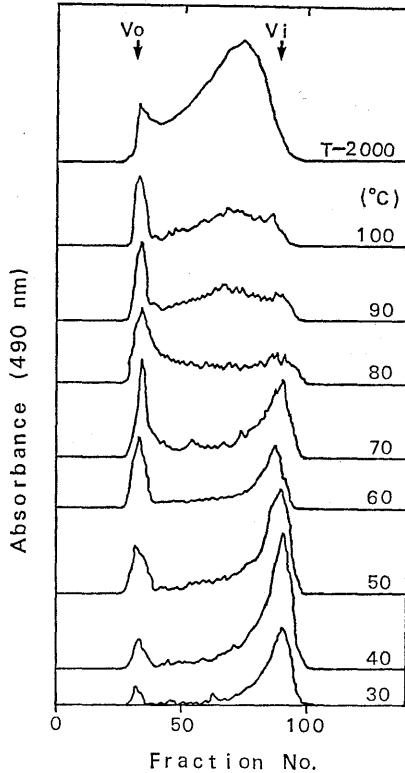


Fig. 6. Gel-filtrated performed to examine for effect of extraction temperature on molecular size of crude porphyran extracted from *P. yezoensis* UEDA *F. narawaensis* MIURA. Specimen (5 mg as galactose) was dissolved in 0.5 M sodium chloride solution was applied to a Sepharose CL-2B column (2.2×97.6 cm). The column was eluted with 0.5 M sodium chloride solution and every 5 ml of the eluate was collected. Total sugar of the each eluate was determined by the phenol sulfuric acid method¹¹⁾ and expressed as OD at 490 nm.

T-2000: Dextran T 2000 (Pharmacia LKB Biotechnology AB), Vo: Void volume. Vi: Inner volume. Extraction time: 4 h.

って藻体内に含有されるタンパク質の不溶化が一層促進されたものと考えられる。

粗ポルフィランのゲルろ過 ポルフィラン抽出時の抽出温度が粗ポルフィランにどのような影響を与えるかを、ゲルろ過溶出曲線から検討した。結果を Fig. 6 に示す。同図にみられるように、抽出温度 30°C で抽出した抽出物では、Vi 付近に溶出する成分 (便宜上低成分と呼ぶ) が大部分を占めている。抽出温度が 40°C から 70°C へと上昇するにしたがい、低分子成分の割合は減少し、代わりに Vo 付近に溶出する成分の増加が認められる。更に抽出温度が 80°C から 100°C へと上昇すると低分子成分の割合が激減し、Vo と Vi の間に溶出する成分が

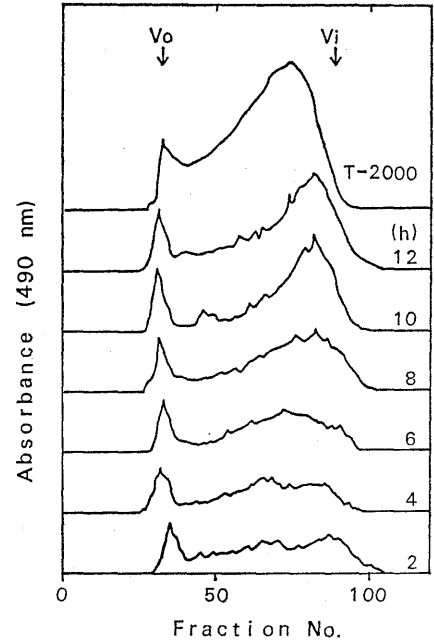


Fig. 7. Gel-filtration performed to examine for effect of extraction time on the molecular size of crude porphyran extracted from *P. yezoensis* UEDA *F. narawaensis* MIURA. Gel-filtration conditions was the same as Fig. 6. Extraction temperature: 100°C.

増加している。この結果から、80°C を境に低温側と高温側とでは、抽出物の組成が異なったパターンを示すことがわかった。藻体からの抽出量が 80°C 以上で急激に増加する (Fig. 2 参照) ことから、80°C 以上で抽出される成分が、より低温で抽出される成分と異なっていることがわかり、このことは、低温では低分子成分が、高温では高分子成分が、多く抽出されたことを示唆している。

抽出時間を変化させた時の粗ポルフィランをゲルろ過に付した。溶出曲線を Fig. 7 に示す。同図にみられるように、Vo 付近の溶出曲線は抽出時間の違いによって変化しないが、抽出時間が長くなるにしたがい、Vi 付近に溶出する低分子成分が増加することがわかった。このことは、抽出条件が厳しくなると低分子化することが考えられる。

粗ポルフィランの化学的組成 最適条件で抽出した粗ポルフィランの組成はガラクトース 72.2%, 3,6-アンヒドロガラクトース 19.0%, タンパク質 5.8%, および硫酸基 30.9% であった。

要 約

ナラワササビノリから粗ポルフィランを抽出する際の抽出条件を検討した結果、生藻体を 3.7% ホルマリン溶

液で 30°C, 24 時間浸漬した後, ホルマリンの存在下で 100°C, 12 時間, 加熱抽出し, 室温まで冷却後, 珪藻土を用いて吸引ろ過する。得られたろ液を流水に一夜透析後体積で 1/4 まで減圧濃縮し, 室温で 4 倍量のエタノールを加えて生成した析出物を遠心分離する。析出物をエタノール, アセトンで洗浄後, 30°C で 12 時間, 乾燥(風乾)によって, 粗ポルフィランが乾燥藻体に対して 25% の収量で得られた。その組成はガラクトース 72.2%, 3,6-アンヒドロガラクトース 19.6%, タンパク質 5.8%, および, 硫酸基 30.9% であった。抽出物のゲルろ過溶出曲線の検討の結果, 抽出温度が高くなるに従って, 高分子成分が増加し, 低分子成分が減少した。また, 低分子成分は抽出時間が長くなるに従って増加した。

終りに臨み, 本研究を進めるにあたり, 種々ご教示を賜った前日本大学農獣医学部教授(東京教育大学名誉教授)西澤一俊先生に厚くお礼申し上げます。また, 試料採集にご協力いただいた山本海苔研究所, 荒木 繁氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省経済局統計情報部編: 昭和 60 年漁業・養殖業生産統計年報, 農林統計協会, 東京, 1986, pp. 18-19.
- 2) 農林水産省経済局統計情報部編: 昭和 60 年漁業・養殖業生産統計年報, 農林統計協会, 東京, 1986, pp. 164-165.
- 3) 科学技術庁資源調査会: 四訂日本食品標準成分表, 大蔵省印刷局, 東京, 1982, pp. 262-263.
- 4) J. R. Nunn and M. M. von Holdt: *J. Chem. Soc.*, 1094-1097 (1957).
- 5) S. Peat, J. R. Turvey, and D. A. Rees: *J. Chem. Soc.*, 1590-1595 (1961).
- 6) Jong-Ching Su and W. Z. Hassid: *Biochemistry* **1**, 468-474 (1962).
- 7) D. A. Rees and E. Conway: *Biochem. J.*, **84**, 411-416 (1962).
- 8) N. S. Anderson and D. A. Rees: *J. Chem. Soc.*, 5880-5887 (1965).
- 9) L. H. Villarreal and A. B. Zanlungo: *Carbohydr. Res.*, **88**, 139-145 (1981).
- 10) L. M. Morrice, M. W. McLean, W. F. Long, and F. B. Williamson: *Hydrobiologia* **116/117**, 572-575 (1984).
- 11) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 12) W. Yaphe and G. P. Arsenault: *Anal. Biochem.*, **13**, 143-148 (1965).
- 13) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 14) 太田茂輝: 分析化学, **17**, 1322-1324 (1968).
- 15) 高橋武雄, 笠原文雄, 西出英一: 工化, **65**, 1420-1422 (1962).
- 16) 渡辺鋼市郎, 中村亦夫: 工化, **68**, 1590-1593 (1965).
- 17) 渡辺鋼市郎, 中村亦夫: 工化, **69**, 777-778 (1966).