

修士論文

「ツルアラメ含有多糖に関する研究」

弘前大学大学院教育学研究科教科教育専攻  
家政教育専修食物学分野

08GP214 小田桐 慎一郎

## 目次

第一章	緒論	……3
第二章	異なる粉碎法により調製した粉末の冷水可溶性糖質の比較	……8
第三章	ツルアラメ含有糖質の季節変化	
第一節	冷水抽出画分の変化	……12
第一項	含有糖量の変化	……13
第二項	分子量変化	……18
第三項	ラミナリナーゼを用いたラミナラン存在の確認	……23
第二節	アルギン酸含有量の変化	……29
第四章	ツルアラメ含有アミノ酸及びポリフェノールの季節変化	……34
第一節	アミノ酸の変化	……35
第二節	ポリフェノールの変化	……39
第五章	ツルアラメ含有フコイダンの分離・精製	……48
第一節	フコイタン分離の検討	……49
第一項	第四級アンモニウム塩による分画	……49
第二項	塩化マグネシウム・エタノール沈殿法による分画	……52
第二節	粗フコイダンの精製	
第一項	ステップワイズ溶出方法	……55
第二項	濃度勾配による溶出	……57
第三項	脱塩方法と構成糖分析	……62
第六章	総合考察	……66

ツルアラメ(*Ecklonia stolonifera*)は、褐藻類コンブ目コンブ科カジメ属の多年生海藻である。生育地域は九州北部から青森周辺までの日本海に広がる<sup>1)</sup>。特徴として、カジメ属のカジメやクロメ、アラメ等の多くのコンブ目植物には見られない匍匐枝からの栄養繁殖によって新たな芽を発出する<sup>2)</sup>。これにより、匍匐枝にできる芽の生長による繁殖と、ほかのコンブ目植物と同様に年一回子嚢斑が形成され、これにより放出された遊走子が配偶体へ発達することにより、有性生殖が行われるため<sup>2)</sup>、この二つの方法により繁殖することから、非常に繁殖力が強い海藻といわれている。

青森県大間沖にはこのツルアラメが群生している。大間町ではコンブ漁が盛んに行われているが、1976年と2001年の調査を比較すると、マコンブは89%から55%に減少した一方、ツルアラメは0%から36%に増加したという報告もある<sup>3)</sup>。褐藻類を代表するコンブも多年生だが、寿命は2年<sup>1)</sup>であるのに対し、ツルアラメの寿命は5~6年であり<sup>4)</sup>、コンブより寿命が長く、いったん根付くと強固な群落が広がる。これによりコンブ漁場が狭まっていき、コンブの売上高に大きく影響を与えている。大間町ではツルアラメを採取してもその場で廃棄するか、機械等を使って駆除しているが手間もコストもかかり、機械を使うと海底そのものも傷つける恐れがある。これがツルアラメが「海の厄介者」と呼ばれる原因である。地域では若い時期のツルアラメの一部を食しているものの、駆除ツルアラメの有効活用を模索している。つまり、ツルアラメは未利用海藻、未利用資源といえる。そこで、ただ廃棄・駆除するのではなく、有効活用の検討が必要となってくる。

海藻には特有の多糖が含まれている。コンブなどにみられるぬめり成分である。このぬめり成分にさまざまな生理機能があり、多くの研究がなされている。海藻に含まれる多糖は表1に示す通りである<sup>5)</sup>。ツルアラメは褐藻類であるため、その中の海藻特有の多糖をみると、ぬめり成分である細胞間粘質多糖のアルギン酸、フコイダンがあり、そしてきのこ類にも含まれている $\beta$ -1,3-グルカン類似多糖で貯蔵多糖のラミナランがある。これらの多糖はさまざまな利用法、そして機能性が報告されている。その構造と機能性を以下に述べる。

### ＜アルギン酸＞

アルギン酸は乾燥粉末にした海藻を希硫酸で処理してから、炭酸ナトリウムや水酸化ナトリウムなどのアルカリ性水溶液で抽出する。その抽出液に、塩酸などを加えて酸性にすると白い繊維状の沈殿ができ、乾燥することで得ることができる。また、アルギン酸は図 1 に示すように、D-マンヌロン酸残基(M)からなる M ブロックと D-グルロン酸残基(G)からなる G ブロック、両残基が交互に入り混じった MMG、MGG ブロックによって構成されている<sup>7-8)</sup>。利用としては食品用途として増粘安定剤やゲル化剤、医療用途として歯形の制作・薬品の被膜剤というように食品関係・医療関係と幅広い分野で利用されている<sup>5)</sup>。また、機能性としても、血圧低下作用や整腸作用等の効果があると報告されている<sup>5-6,9)</sup>。

### ＜フコイダン＞

フコイタンはアルギン酸とは異なり、水や薄い塩酸によって抽出される粘性物質である。構造については第五章にて詳細に述べる。フコイタンの藻体内での役割に、藻体の表面が傷ついた時にそこから最近が侵入するのを防ぐ働きや、干潮の際に、空気中にさらけ出された藻体が乾燥しないように保護するなどの働きがあるとされている<sup>10)</sup>。つまり身を守るための機能であるといえる。そして生理機能をみると、抗血液凝固作用<sup>11-12)</sup>、抗ウイルス作用<sup>13)</sup>、コレステロール・血圧低下作用<sup>14-15)</sup>、そして抗ガン作用<sup>16)</sup>と多くの機能性が報告されている<sup>7)</sup>。中でもガン細胞を自殺に追い込む働き、すなわち「アポトーシス」作用があり、フコイタンの抗ガン作用は注目されている。また、この他にも高分子量のフコイタンには皮膚老化予防効果も報告<sup>17)</sup>されており、フコイタンはサプリメントや化粧品などに利用されている。

### ＜ラミナラン＞

ラミナランはきのこ類にも含まれている $\beta$ -1,3 グルカンであり、図 2 に示すような構造をしている。また、ラミナランは光合成産物であるマンニトールから生合成されることも明らかとなっている<sup>18)</sup>。コンブ属のラミナランは冷水に可溶性のものと不溶性のものとがあり、不溶性のものは $\beta$ -1,3-グルカン、可溶性のものは少量の $\beta$ -1,6 結合を有している<sup>5)</sup>。また、ラミナランはあまり利用されている例はなく、機能性としては抗血液凝固作用があることがわかっている<sup>5)</sup>。

このように褐藻類に含まれる多糖は多くの生理機能、利用法がある。ツルアラメにもこのような多糖が存在するため、ただ駆除・廃棄するのではなく、この多糖を有効利用できれば地域の新しい特産品となり、地域活性化にもつながるのではないかと考える。しかしながら、ツルアラメ含有多糖に関する知見がほとんどなく、また、当研究室の研究により、夏採取のツルアラメと冬採取のツルアラメの糖量に差が見られることがわかっている。そこで本研究ではツルアラメの多糖を中心に、季節による変化も調べることにより、より有効に利用できる時期の検討を試みた。また、多糖だけでなく、アミノ酸やポリフェノールについても検討し、ツルアラメの食品としての特性や有効活用の方向性を探ることを目的とした。

表 1 海藻含有多糖(「海藻利用の科学」より)

海藻	細胞壁骨格多糖	細胞間粘質多糖	貯蔵多糖
緑藻	<ul style="list-style-type: none"> <li>・セルロース I</li> <li>・セルロース II)</li> <li>・<math>\beta</math>-1,3-キシラン</li> <li>・<math>\beta</math>-1,4-マンナン</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・含硫酸キシロアラビノガラクトタン</li> <li>・含硫酸グルクロノキシロナムラナン</li> <li>・含硫酸グルクロノキシロラムノガラクトタン</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・アミロース</li> <li>・アミロペクチン</li> </ul>
褐藻	<ul style="list-style-type: none"> <li>・セルロース II</li> <li>・ヘミセルロース</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・アルギン酸</li> <li>・フコイダン</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ラミナラン</li> </ul>
紅藻	<ul style="list-style-type: none"> <li>・セルロース II</li> <li>・ヘミセルロース</li> <li>・<math>\beta</math>-1,3-マンナン</li> <li>・<math>\beta</math>-1,4-キシラン</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・寒天</li> <li>・カラギナン</li> <li>・ポルフィラン</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・紅藻デンプン</li> </ul>

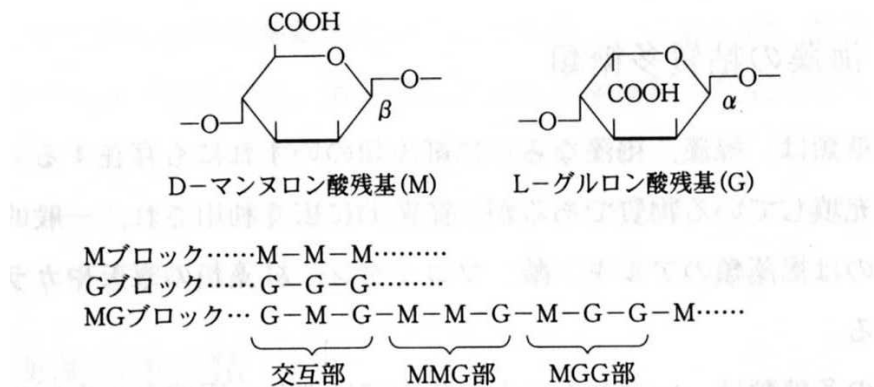


図 1 アルギン酸のブロック構造(「海藻利用の科学」より)

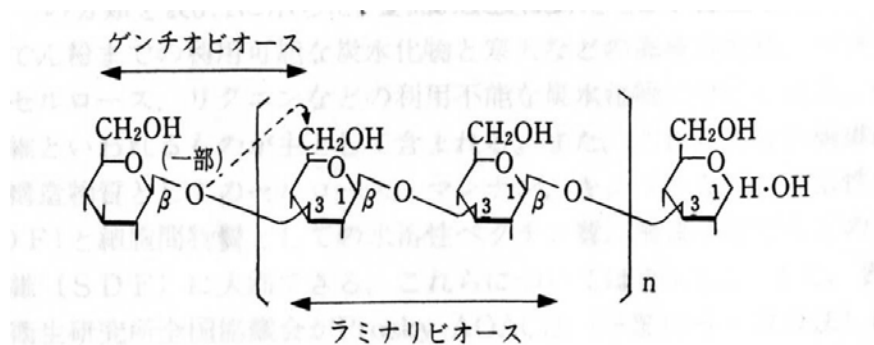


図 2 ラミナランの構造(「海藻利用の科学」より)

<参考文献>

- 1) 日本の海藻 基本 284. 著者 田中次郎, 中村庸夫. 平凡社
- 2) 能登谷正浩. 青森県沿岸のツルアラメ. 日本水産学会誌 61(1),105-106(1995)
- 3) <http://anec-2004.ftw.jp/index.html>. NPO 法人アネック
- 4) 能登谷正浩. ツルアラメ群落の年齢構成と繁殖形態. 東京大学海洋研究所大槌研究センター報告,13,57-59
- 5) 海藻利用の科学. 著者 山田信夫. 成山堂書店. 2000
- 6) 浅岡力. New Food Industry, Vol.43,13-19(2001)
- 7) 海藻フコイダンの科学. 著者 山田信夫. 成山堂書店. 2006
- 8) 青木央. コンブの健康機能成分ーアルギン酸とフコイダン. 日本味と匂学会誌 Vol.14,No.2,145-152(2007)
- 9) 浅岡力. 低分子化アルギン酸ナトリウムの効能とその効果. New Food Industry,43(2),13-19(1998)
- 10)海藻の本. 著者 西沢一俊, 村杉幸子. 研成社. 1988
- 11)西野貴司, 名雲照一. 種々の褐藻由来フコース含有硫酸化多糖画分の糖組成と抗血液凝固作用. 日本農芸化学会誌,61,3,361-363(1987)
- 12)Taichi Usui,Katsuko Asari,Takashi Mizuno.Isolation of highly purified “Fucoidan”from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. Agric.Biol.chem,44,8,1965-1966(1980)
- 13)Tomomi Hoshino,Toshimitsu Hayashi,Kyoko Hayashi,Jin Hamada, Jung-BumLee and Ushio Sankawa.An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*(Turner)C. Agardh. Biol.Pharm.Bull,21,7,730-734(1998)
- 14)Dalín Ren,HiroYuki Noda,Hdeomi Amano,Takahiro Nishino,and Kazutoshi Nishizawa.Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. Fisheries Science,60,1,83-88(1994)
- 15)Shinji Soeda, Yusuke Ohmagari, Hiroshi Shimeno,and Atsuno Nagamatsu.Preparation of aminated fucoidan and its evaluation as an antithrombotic and antilipemic agent.Biol.Pharm.Bull,17,6,784-788(1994)
- 16)石渡一夫, 静間徹, 中澤博江, 盛英三, 福山直人. 沖縄モズク由来アセチルフコイダンの癌抑制効果. 静脈経腸栄養,22,4,61-67(2007)
- 17)務 華康. 海藻エキス化粧品「とわだ」の紫外線による皮膚老化の予防と治療. FRAGRANCE JOURNAL,3,56-61(2001)
- 18)Toshijiro Yamaguchi,Tomoyoshi Ikawa and Kazutoshi Nishizawa.Pathway of mannitol formation during photosynthesis in brown algae. Plant Cell physiol,10,425-440(1969)

## 第二章 ツルアラメの異なる粉砕法により調製した粉末の 冷水可溶性糖質の比較

### 1. 目的

本研究で用いるツルアラメは各種溶媒で抽出しやすいように粉砕している。しかし、粉砕する機械により粉末の大きさは異なる。一般的により細かく粉砕することで粉末ひとつひとつの表面積が広くなり、より効率よく抽出できるとされている。

そこで本実験では、二種類の粉砕機を用いてツルアラメを粉砕した。用いたのは超遠心粉砕機（Retsch ZM-100）と一般家庭用のミルサー(Iwatani IFM-66D)である。この比較により、より抽出効率の良い粉砕機の検討を行った。

### 2. 実験材料

2007 年夏採取のツルアラメを用いた。粉末は超遠心粉砕機（Retsch ZM-100）で粉砕し、0.25 メッシュ以下のものを微粉末、一般家庭用のミルサー(Iwatani IFM-66D)で粉砕したものを粗粉末とした。



### 3. 実験方法

#### 3-1. 抽出方法及び全糖量の測定

図 1 による方法で冷水抽出した。すなわち、微粉末又は粗粉末 50mg に蒸留水を加え 12 時間攪拌する。遠心分離し、上清と沈殿とに分け、沈殿に再度蒸留水を加えて 12 時間攪拌した。遠心分離し、得られた上清を合わせて水溶性画分 (WS) とし、沈殿は水不溶性画分 (WIS) とした。

WS の全糖量はフェノール・硫酸法<sup>1)</sup>にて求めた。すなわち、試料 0.5ml を試験管にとり、5%フェノール 0.5ml と特級濃硫酸 2.5ml を加え攪拌し、室温で 30～40 分程放置した後、490nm で吸光度を測定した。盲検には蒸留水 0.5ml を用い、分光光度計は HITACHI 社の U-1500 レシオビーム分光光度計を用いた。標準物質としてグルコースを用い、試料中の糖量は全てグルコース相当量で算出した。以後の全糖量の測定も同様の方法で算出した。

また、WIS は凍結乾燥し、粉末を栓付き試験管にとり、72%硫酸に懸濁、ソニックバスにて 1 時間処理し溶解した。1.5M になるように蒸留水で希釈し、100℃で 1 時間加水分解した。これをフェノール硫酸法にて全糖量を求めた。

#### 3-2. 構成糖分析

WS を栓付き試験管に一部取り、1M になるように 2M トリフルオロ酢酸 (TFA) を加える。100℃で 3 時間加水分解し、室温にて冷ました。試験管濃縮後、乾固させ、超純水、1mg/ml の内部標準物質 (2-Deoxyglucose) を加えた。これを ultrafree-MC フィルター (MILLIPORE) で遠心濾過し、スナップバイアル (ジーエルサイエンス社) に入れ、分析試料とした。

WIS は加水分解物を炭酸バリウムで中和し、濾過した。濾液を遠心分離し、上清の一部を試験管濃縮後、乾固させ、内部標準物質を加え、上記と同様の方法で分析試料とした。

構成糖分析は本ダイオネクス社のイオンクロマト DX-300 による陰イオン交換クロマトグラフィーで行った。分離カラムは CarboPac PA1 をガードカラムに CarboPac PA1 GUARD を用いた。分析には超純水を用い、1.0ml/分の流速で行った。

#### 4. 実験結果と考察

全糖量及び構成糖分析を表 1 に示す。全糖量は各粉末 50mg から抽出された糖量を示した。微粉末及び粗粉末を比較すると、WS、WIS とともに約 6mg と大きな差はみられなかった。構成糖についても際だった差はみられなかった。全糖量に差がみられなかった原因として、試料が少量だったことが考えられる。しかしながら、超遠心粉砕機は乾燥藻体をそのまま粉砕できず、粗粉末にしたものを粉砕する必要があるため、手間がかかる。また、ある程度の量が必要となり、少量の試料の粉砕にはロスも多くなり、今回の実験には不向きであると考えた。

本実験において冷水抽出による糖量にそれほど大きな差がみられなかったこと、そして本実験で用いるツルアラメの一度に粉砕する量が少量であることから、本研究にはミルサーを用いて粉砕したツルアラメを用いることとした。

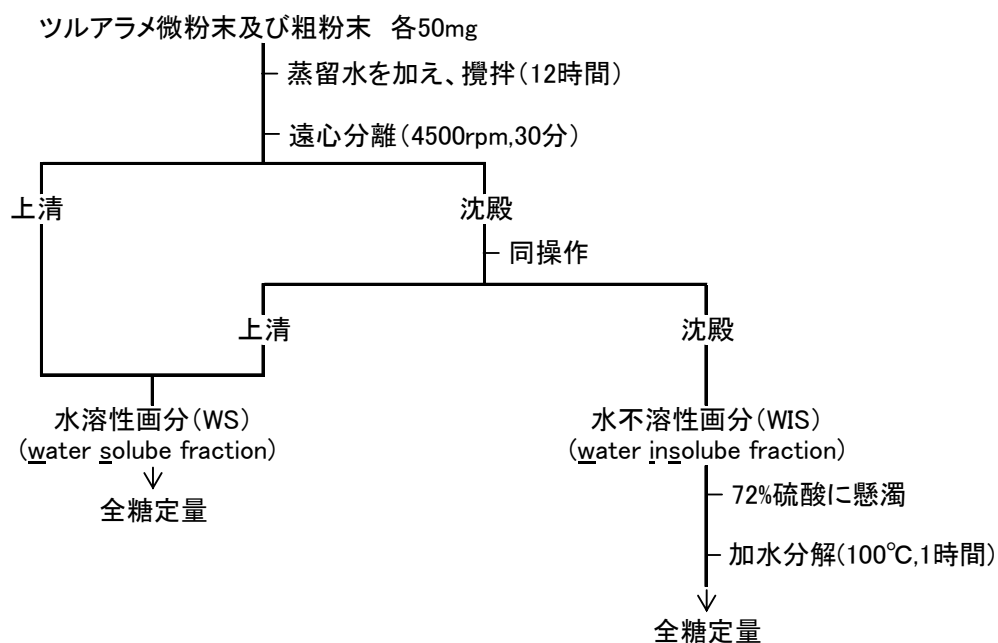


図 1 抽出方法

表 1 微粉末及び粗粉末の全糖量と構成糖(粉末 50mg 当たり)

		全糖量 (mg)	構 成 糖 (%)							
			マンニトール	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
微粉末	WS	6.06	19.6	6.9	0.1	0.1	3.3	67.6	1.6	0.8
	WIS	6.61	1.1	0.7	4.1	0.0	3.1	85.6	0.6	3.6
粗粉末	WS	6.11	28.4	7.7	0.1	0.1	2.2	59.9	1.0	0.6
	WIS	6.05	2.2	0.5	4.3	0.0	3.2	85.5	0.7	3.7

全糖量：フェノール硫酸法によりグルコース相当量で算出した

構成糖：2-DG 相当量に換算し、算出した

(以下の表も同様に算出した)

# <参考文献>

- 1) 植物細胞壁と多糖類. 著者 桜井直樹, 山本良一, 加藤陽治. 培風館. 1991

### 第三章 ツルアラメ含有糖質の季節変化

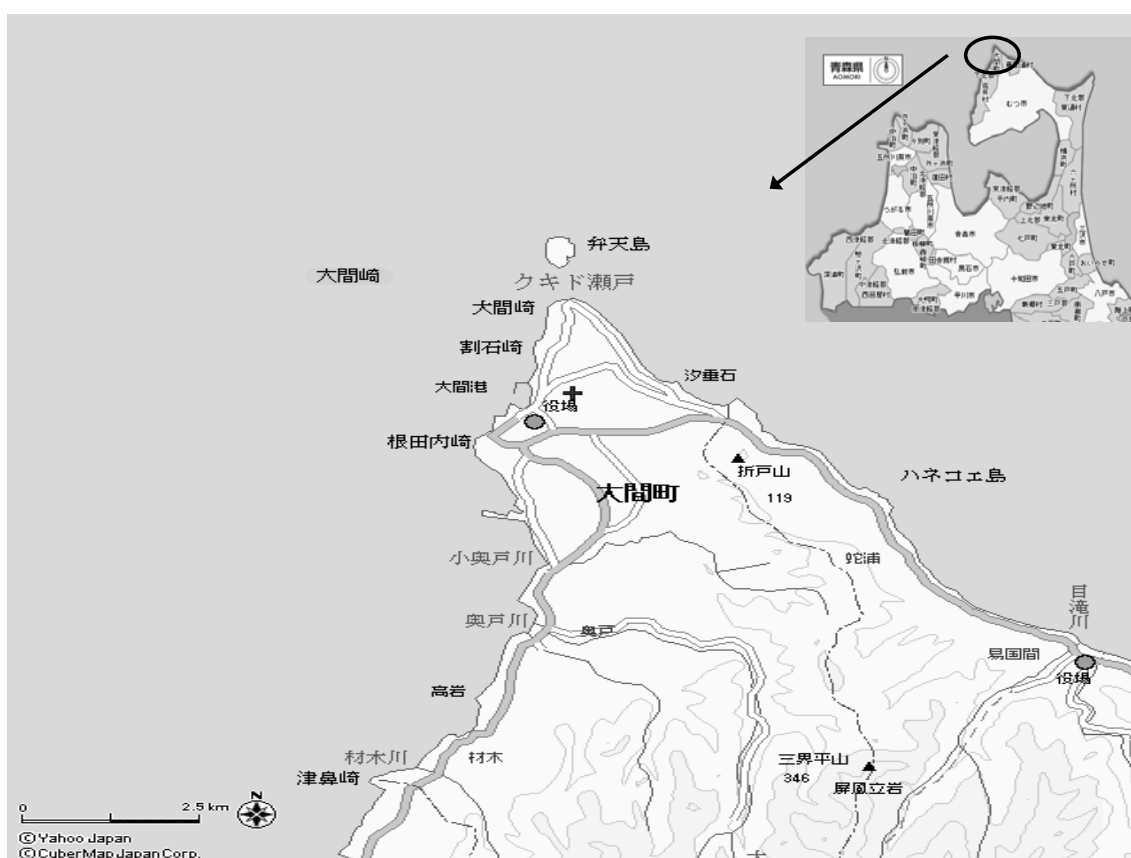
#### <目的>

今までにツルアラメ含有糖量の季節変化を調べた例はない。また、当研究室のこれまでの実験結果より、夏採取のツルアラメと冬採取のツルアラメの含有糖量に差がみられることが明らかとなっている。

そこで本実験ではツルアラメ含有糖質の季節変化をより詳細に調べることとした。季節により違いがわかればより有効利用しやすい時期を特定することが可能になると考えられる。

ツルアラメの採取場所は以下に示した。青森県の大間崎にて水深 3～4 メートルに生息しているツルアラメを採取した。

第一項では季節(生育時期)による含有糖量及び構成多糖の種類の変化を調べる。第二項では季節(生育時期)による含有糖質の分子量分布を調べ、含有多糖に関わる知見を探る。第三項ではこれまでの構成糖分析で抽出されたグルコースがラミナランに由来するか否かを確認するための実験を行った。



## 第一節 冷水抽出画分の変化

### 第一項 含有糖量の変化

#### 1. 目的

季節(生育時期)による含有糖量及び構成多糖の種類の変化を調べる。

#### 2. 実験材料

大間漁業協同組合により供与された 2008 年 3 月～2009 年 2 月に採取ツルアラメを自然乾燥後、減圧乾燥させ、ミルサー(Iwatani IFM-66D)を用いて粉末化したものを用いた。

#### 3. 実験方法

##### 3-1. 抽出方法及び全糖量の測定

図 1 による方法で冷水抽出した。すなわち、各月試料 500mg に蒸留水を加えて 12 時間攪拌する。遠心分離し、上清と沈殿とに分け、沈殿に再度蒸留水を加えて 12 時間攪拌した。遠心分離し、得られた上清を合わせて水溶性画分(W<sub>S</sub>)とし、沈殿は水不溶性画分(W<sub>IS</sub>)とした。W<sub>S</sub> の全糖量はフェノール硫酸法(グルコース相当量として)にて求めた。また、W<sub>IS</sub> は凍結乾燥し、粉末を栓付き試験管にとり、72%硫酸に懸濁、ソニックバスにて 1 時間処理し溶解した。1.5M になるように蒸留水で希釈し、100℃で 1 時間加水分解した。これをフェノール硫酸法(グルコース相当量として)にて全糖量を求めた。

##### 3-2. 構成糖分析

W<sub>S</sub> 及び W<sub>IS</sub> とともに第二章と同様の方法で調製し、分析試料とした。

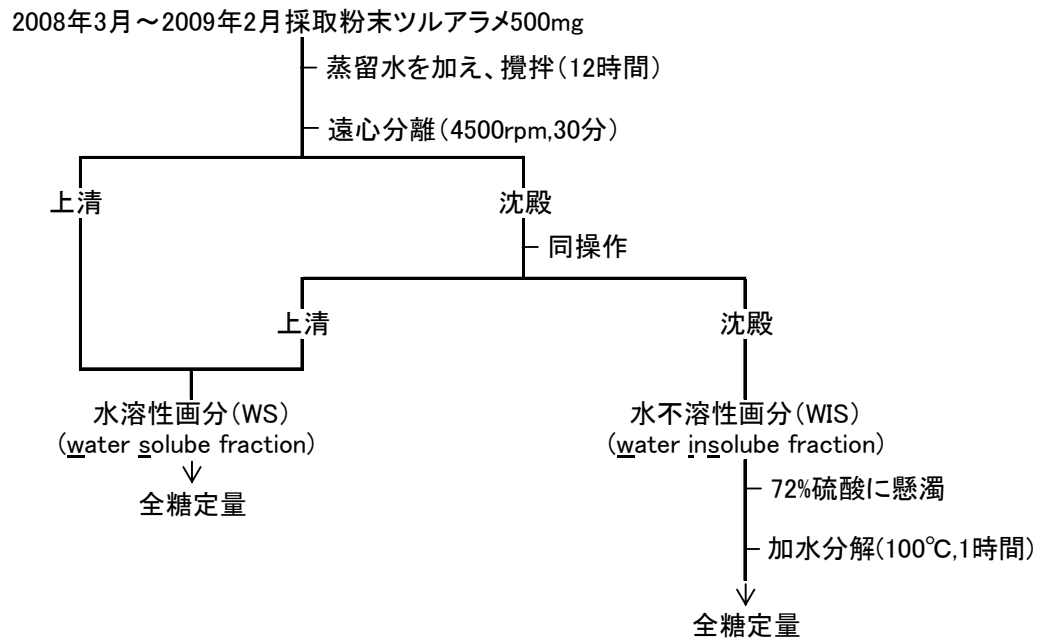


図 1 抽出方法

#### 4. 実験結果と考察

WS、WIS の全糖量及び構成糖分析結果を表 1、図 1 に示す。全糖量はツルアラメ乾燥粉末 500mg から得られた糖量を示す。

図 1 は全糖量の季節変化をグラフにしたものである。これをみると、WS は時期により大きく変動しているのに対し、WIS は大きな変動はみられなかった。WS で最も全糖量が多い時期は 8 月の 101.70mg であり、最も少ない 3 月の 6.30mg の約 16 倍に達する。全糖量は春から夏にかけて増加し、秋から冬にかけて減少している傾向がみられた。

次に表 1 の構成糖をみると、WS の 3 月・4 月・2 月はフコースの割合が多く、グルコースの割合が少ないのに対して、8 月・11 月はその逆でフコースの割合が少なく、グルコースの割合が多くなっている。つまり、時期によって糖質の占める割合が異なることがわかった。WIS は全糖量と同様、時期による大きな差はみられず、ほぼ一定であった。

図 2 には変動がみられた WS を絶対量として求めた値をグラフに示した。これをみると、季節変化がみられたのはマンニトールとグルコースであり、フコースやガラクトース等はあまり変化がみられなかった。

アルギン酸やフコイタンは季節によっての変動は少ないという報告がある<sup>1)</sup>。また、季節によって変動するのは貯蔵多糖であるラミナランと光合成産物のマンニトールとされている<sup>2)</sup>。本実験結果をみると、フコース量の変化が少なかったため、フコイタンの変動も少ないのではないかと考えられる。そして、マンニトールとグルコースに季節変化がみられ、グルコースが大きく変動していることから、グルカンであるラミナランが変動しているということが示唆された。このことから前述と同様の結果が得られたのではないかと考えられた。

また、一般的に海藻は春から夏にかけて生長・成熟し、それ以降衰退していく。ツルアラメに関しては、葉状部の大きさが 5～6 月に最大となり、それ以降末枯れによって 10～11 月最小となるが、その後再生によって次年度の生長が始まることがわかっている<sup>3)</sup>。本実験で用いたツルアラメ葉状部の大きさを調べた結果を図 2 に示す。測定方法は各月 5 検体の平均の値を求めた。この結果から前述と同じような傾向があることがわかった。図 1 と図 3 を比較すると、葉状部の大きさが最大となった 6 月が全糖量も最大となったわけではなく、それ以降の 8 月に全糖量は最大となった。つまり、葉状部の大きさが最大となった 6 月以降、生長から成熟に変わり、それに伴い貯蔵多糖であるラミナランを作っているのではないかと考えられる。しかし、まだこのグルコースがラミナランであると断定できないため、第三項で検討する。

このことから、時期によって変動しているのは水溶性糖質であり、ラミナランの可能性が示唆された。

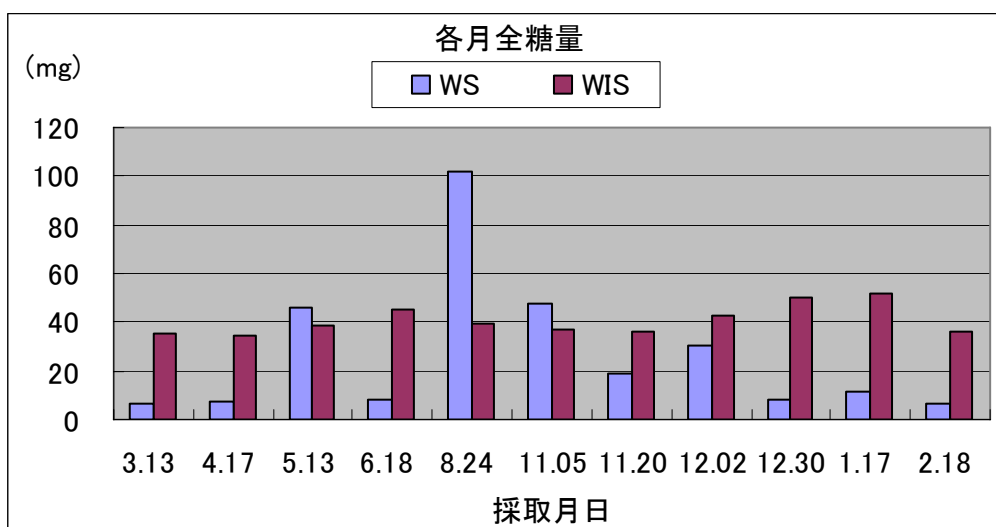


図 1 全糖量の経時変化

表 1 WS、WIS の全糖量及び構成糖

採取月日		全糖量 (mg)	構成糖(%)								
			マンニトール	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man	
WS	08	3.13	6.30	16.6	44.3	0.9	0.5	24.0	4.6	6.4	2.9
		4.17	7.20	26.9	37.5	0.7	0.5	22.0	4.5	5.6	2.3
		5.13	45.90	25.6	12.8	0.4	0.2	4.4	53.6	2.2	0.8
		6.18	7.97	37.9	23.1	0.7	0.5	12.5	19.7	4.3	1.3
		8.24	101.70	22.9	3.7	0.2	0.0	1.0	71.4	0.5	0.3
		11.05	47.30	33.3	6.8	0.2	0.1	2.5	55.5	1.0	0.6
		11.20	18.90	39.2	18.7	0.3	0.2	6.9	30.9	2.7	1.2
		12.02	30.15	37.0	11.2	0.4	0.2	4.1	44.9	1.4	0.7
		12.30	7.97	49.2	21.0	0.4	0.5	10.3	12.7	4.7	1.1
	09	1.17	11.25	39.2	22.3	0.4	0.5	8.2	24.8	3.7	0.9
	2.18	6.75	47.5	29.0	0.4	0.4	13.2	2.9	4.4	2.2	

採取月日		全糖量 (mg)	構成糖(%)								
			マンニトール	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man	
WIS	08	3.13	35.04	1.4	5.8	2.2	0.3	6.6	76.3	3.9	3.5
		4.17	34.13	1.0	4.5	1.2	0.3	6.7	79.5	2.7	4.2
		5.13	38.88	0.6	5.1	2.0	0.3	5.6	78.9	3.8	3.7
		6.18	45.12	2.1	6.0	2.0	0.3	6.3	75.2	4.4	3.8
		8.24	39.10	1.2	6.7	3.8	0.2	6.2	72.5	5.8	3.7
		11.05	37.32	2.0	7.0	1.7	0.2	6.2	74.6	4.1	4.2
		11.20	36.34	0.8	8.2	2.7	0.2	7.8	69.8	5.8	4.5
		12.02	42.90	1.7	7.8	2.1	0.2	8.5	71.0	4.8	3.9
		12.30	49.77	2.8	7.3	2.6	0.3	8.0	69.4	5.4	4.1
	09	1.17	51.69	1.5	6.3	3.6	0.2	7.1	72.7	4.7	4.0
	2.18	36.17	6.8	6.8	3.0	0.2	7.8	67.4	3.8	4.1	



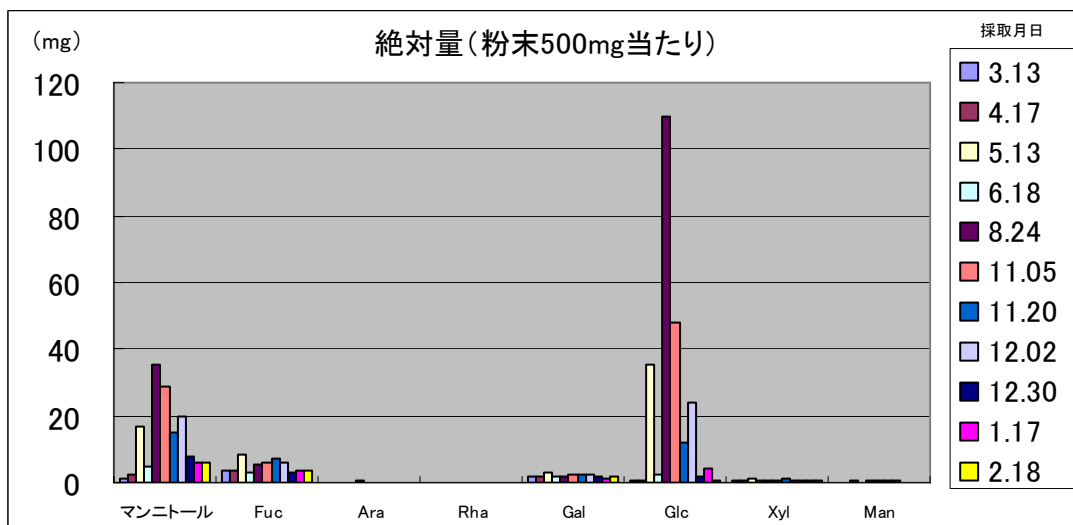


図2 各月 WS の絶対量

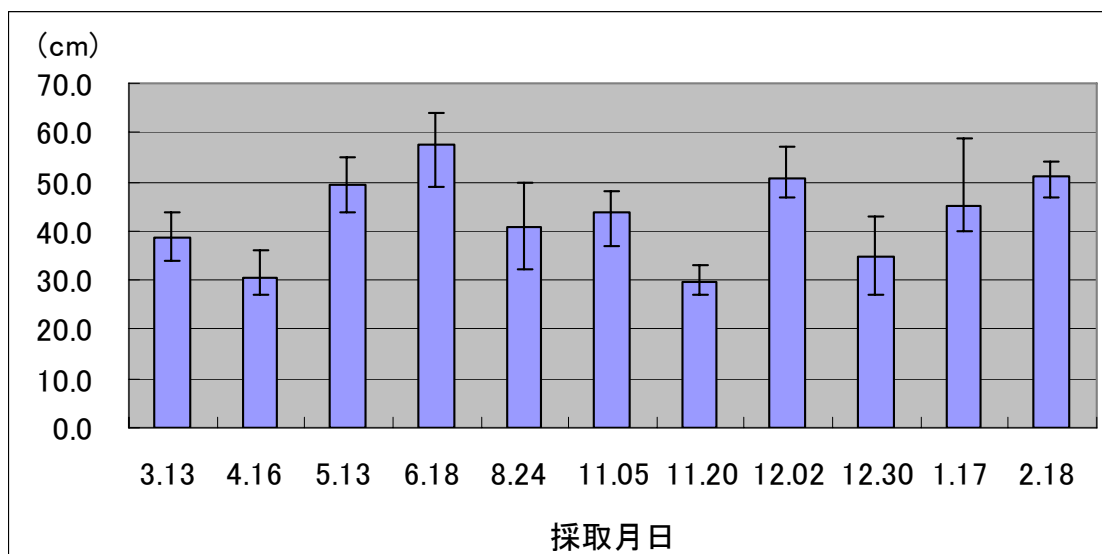


図3 各月葉状部の大きさ

## 第二項 分子量の変化

### 1. 目的

季節(生育時期)による含有糖質の分子量分布を調べ、含有多糖に関わる知見を探る。

### 2. 実験材料

第一項で抽出した各月の水溶性画分(WS)を用いた。

### 3. 実験方法

時期の違いによる分子量の変化をみるため、各月の水溶性画分をあらかじめ蒸留水で平衡化しておいた Bio Gel P-2 カラム(2cm×30cm)にのせ、蒸留水で溶出した。溶出液は 1.0ml ずつ集め、その中から一定量とり、フェノール・硫酸法にて測定した。

### 4. 実験結果と考察

各月のクロマトチャートを図 3-1~4 に示した。この結果と第一項の全糖量の結果を踏まえると、全糖量が比較的多い時期(5.13、8.24、11.05)のチャートは高分子側に鋭いピークがみられた。しかし、全糖量が少ない時期のチャートは高分子側のピークがワイドになり、また、低分子側にもピークがみられた。高分子側のピークがワイドになった原因として、カラムにのせる糖量を約 1mg に調製した試料を用いたことで、糖量が少ない時期の試料は多量に濃縮する必要があり、そのため粘性も増し、ゲルに入り込む時間が遅くなったことが考えられた。低分子側にピークがみられた原因として、藻体の生長が関係しているのではないかと考えられた。低分子側にピークがみられたのは生長期と衰退期であり、成熟期にはみられなかった。生長期の低分子が成熟に向けて高分子化し、衰退期の低分子は成熟期に作られた高分子を利用した結果生じたものはないかと考えられた。つまり、8 月に向けて全糖量が増加し、それ以降減少していること、そして 8 月のメインの糖がグルコースであることから、8 月に生成した高分子(ラミナラン)を徐々に利用しているため低分子化し、全糖量も減少しているのではないかと考えられた。次項では 8 月の高分子がラミナランであるか酵素を用いて確認する。

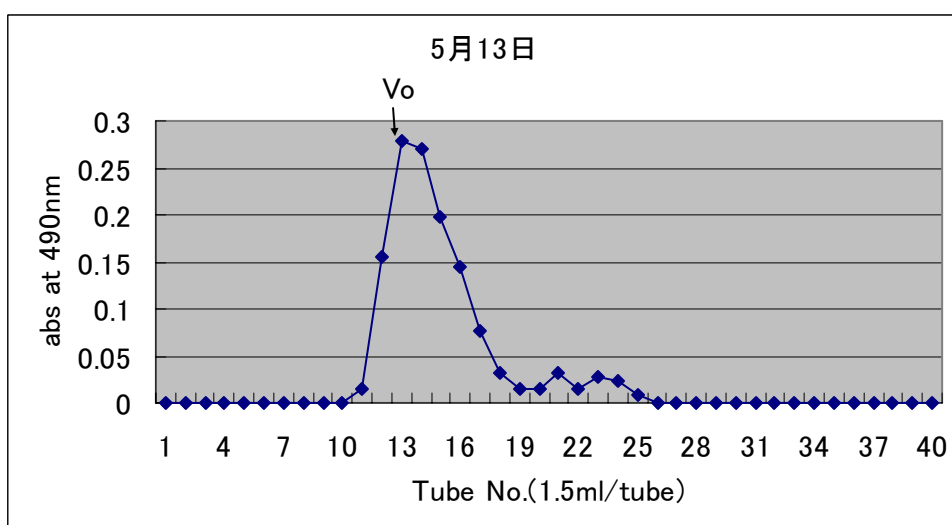
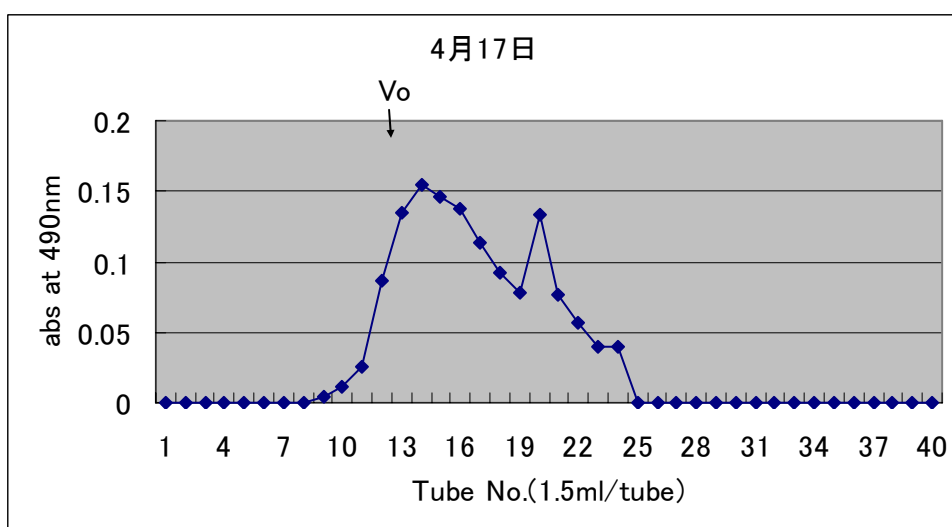
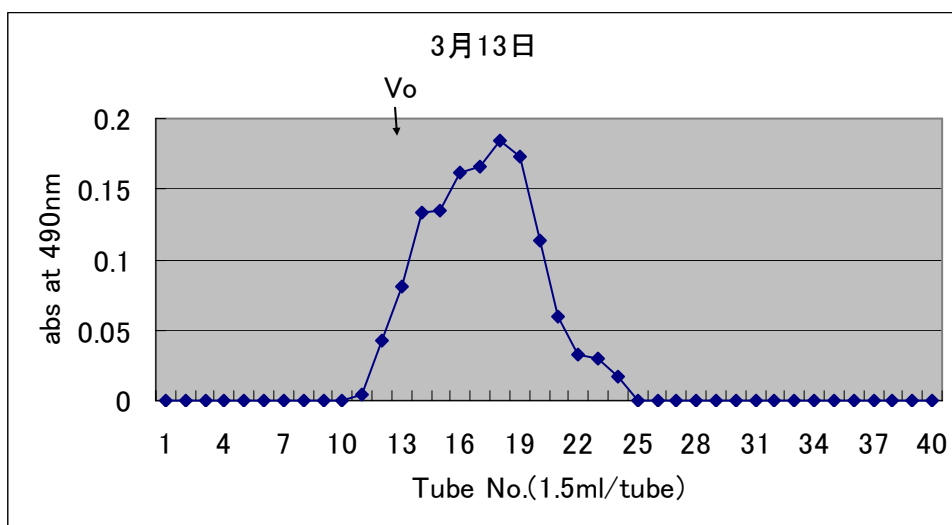


図 3-1 各月冷水抽出画分のクロマトチャート

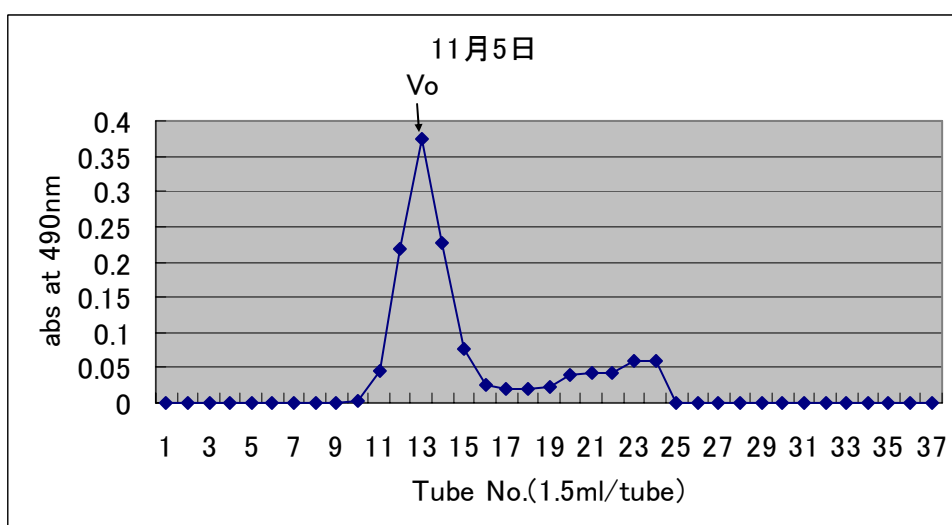
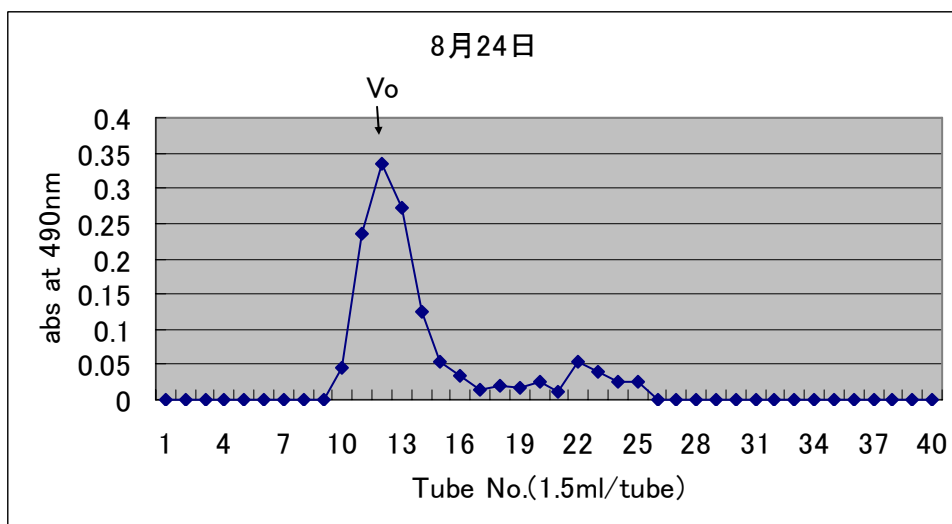
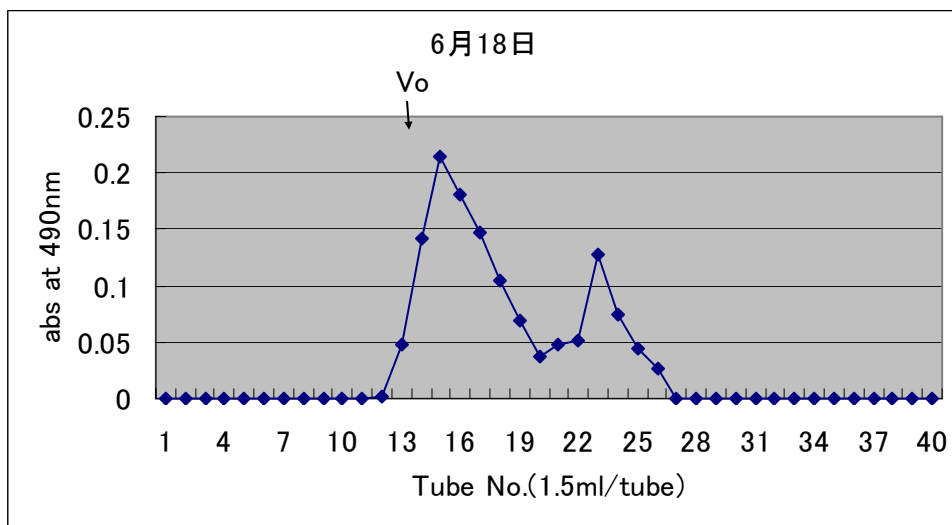


図 3-2 各月冷水抽出画分のクロマトチャート

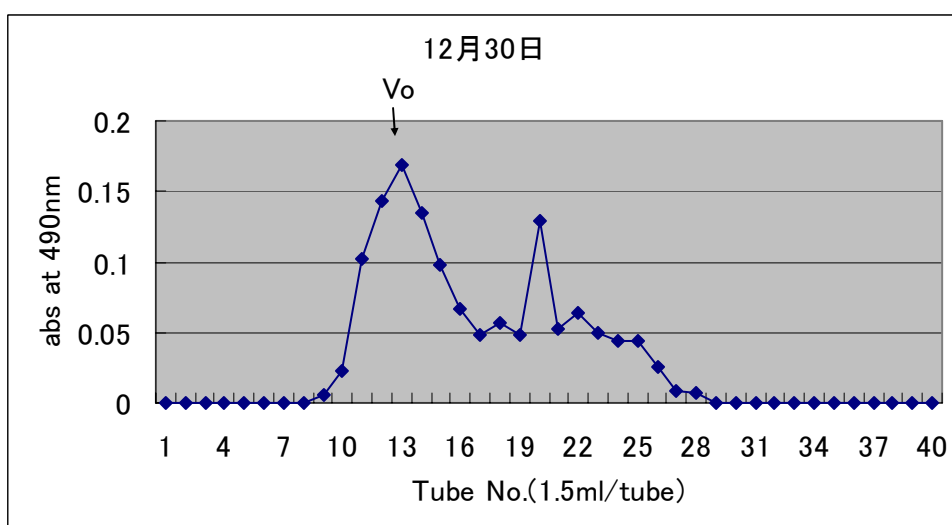
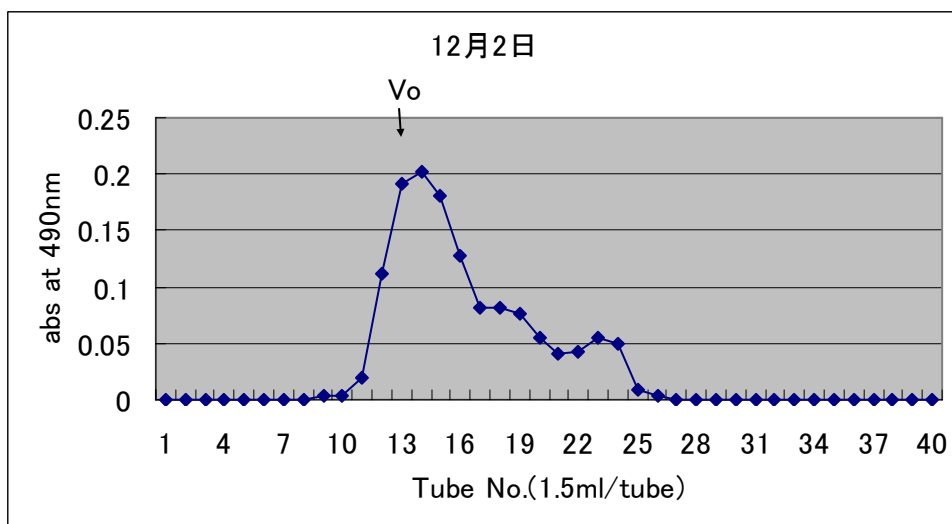
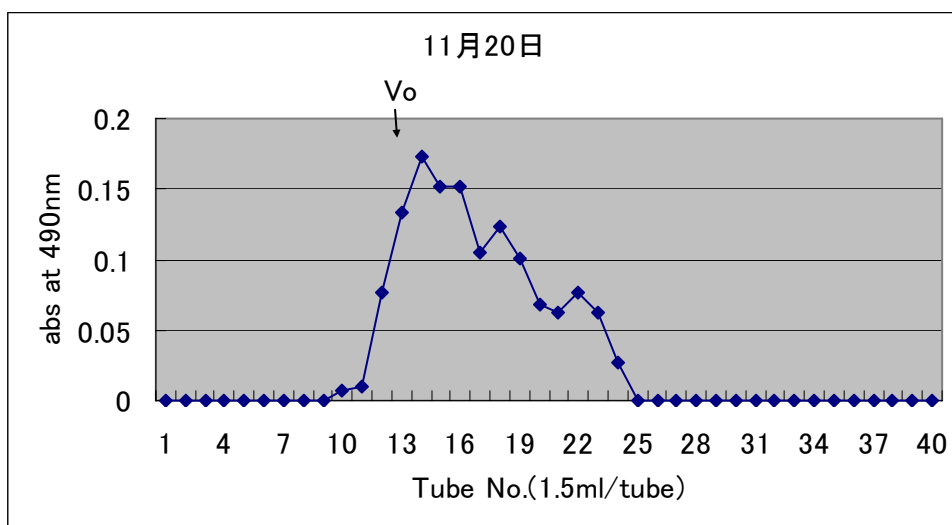


図 3-3 各月冷水抽出画分のクロマトチャート

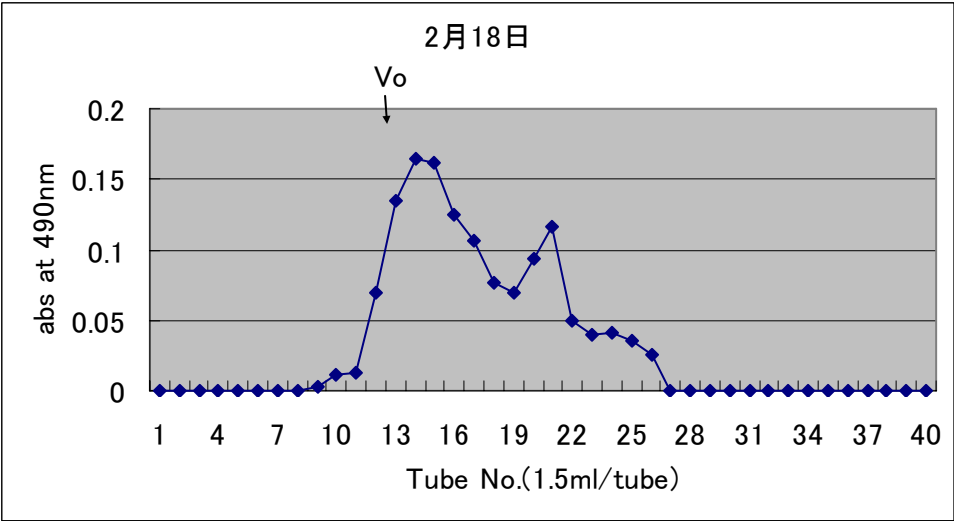
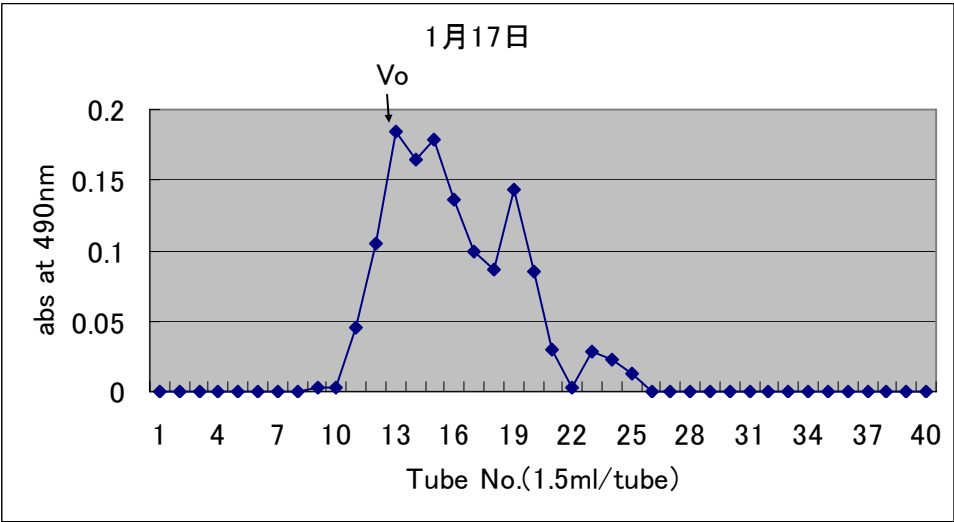


図 3-4 各月冷水抽出画分のクロマトチャート

### 第三項      ラミナリナーゼを用いたラミナラン存在の確認

#### 1. 目的

これまでの構成糖分析で検出されたグルコースがラミナランに由来するか否かを確認するための実験を行った。

#### 2. 実験材料

試料：8 月水溶性画分(W<sub>S</sub>)、シゾフィラン( $\beta$ -1,3、 $\beta$ -1,6-グルカン)

※シゾフィランは主鎖が  $\beta$ -1,3-グルカンで、そのグルコース残基 6 位にグルコースを持つ多糖

酵素：シグマ社トリコデルマ由来ラミナリナーゼ (endo-1,3- $\beta$ -glucanase)

#### 3. 実験方法

##### 3-1. 酵素作用と構成糖分析

試料を糖量 2mg になるように濃縮乾固し、20mM 酢酸ナトリウム溶液に溶解した。酵素を添加し、ウォーターバスで 40℃、24 時間反応させた。その後、沸騰水浴中で 5 分間酵素失活させた。この試料を前項と同様の方法でゲル濾過した。また、これとは別に主鎖に  $\beta$ -1,3-グルカンをもつシゾフィランも同様の方法でゲル濾過し、試料と比較した。

それぞれ得られた画分の構成糖分析を行った。

### 3-2. オリゴ糖分析

2-1 で得られた **Fr.2**、**Fr.3** 及びシゾフィラン酵素作用後の画分のオリゴ糖分析を行った。オリゴ糖分析には日本ダイオネクス社のイオンクロマト **DX-300** による陰イオン交換クロマトグラフィーで行った。分析条件は以下に示した。スタンダードにはマンニトール、単糖(グルコース)、二糖(マルトース)、三糖(マルトトリオース)を用いた。

分離カラム : CarboPac PA1

ガードカラム : CarboPac PA1 GUARD

溶離液 : A液 100mM水酸化ナトリウム  
B液 100mM水酸化ナトリウム／500Mm酢酸ナトリウム

流速 : 1.0ml/min

グラジエント

	0min	20min	30min	35min
A液	100%	90%	0%	100%
B液	0%	10%	100%	0%



#### 4. 実験結果と考察

8月 WS とシゾフィランの酵素作用前と酵素作用後のクロマトチャートをそれぞれ図 4、図 5 に示す。図 4 において、高分子側に小さいピーク、低分子側に 2 つのピークが溶出された。それぞれ Fr.1~Fr.3 とし、構成糖分析を行った結果を表 2 に示す。この結果をみると、Fr.1 の大部分はフコースであることからフコイダンの可能性が示唆された。また、試験管 28 本目が単糖溶出位置であるため、Fr.3 が単糖であると考えられる。Fr.2 については溶出位置から二糖~三糖と推測できる。図 5 では、低分子側に大きなピークが一つだけ溶出された。

次にオリゴ糖分析の結果を図 6 に示す。まず、シゾフィランのクロマトグラフをみると、ピークが一つであり、単糖と同じ位置に溶出していることからシゾフィランが酵素により完全に単糖化されているのがわかった。シゾフィランは  $\beta$ -1,3-グルカンの 3 残基に 1 つ、 $\beta$ -1,6-グルカンを持つ多糖類である<sup>4)</sup>。このシゾフィランが完全に単糖化されたということは、用いたラミナリナーゼが純粋な  $\beta$ -1,3-グルカナーゼでなく、 $\beta$ -1,6 結合も切る酵素が含まれていることがわかった。

一方、Fr.2 はピークが 3 つ溶出され、それぞれマンニトール、単糖、二糖の位置と重なった。シゾフィランの酵素分解により、ラミナリナーゼは  $\beta$ -1,6 結合も切る酵素が含まれていることから、Fr.2 において二糖の位置に出てきたピークは  $\beta$ -1,3 結合と  $\beta$ -1,6 結合しているゲンチオビオースではないことが示唆された。構成糖の結果を踏まえて考えると、グルコースとマンニトールが結合していたため、ラミナリナーゼではこれを切ることができず、二糖の位置にピークが溶出したのではないかと考えられた。Fr.3 はピークが 2 つ溶出され、それぞれマンニトール、グルコースであることがわかった。このマンニトールはグルコースに結合しているのではなく、フリーで存在し、単糖の位置にグルコースとともに溶出されたと考えられた。

以上のことから、8月 WS は  $\beta$ -1,3-グルカン、ラミナランであることが明らかとなった。

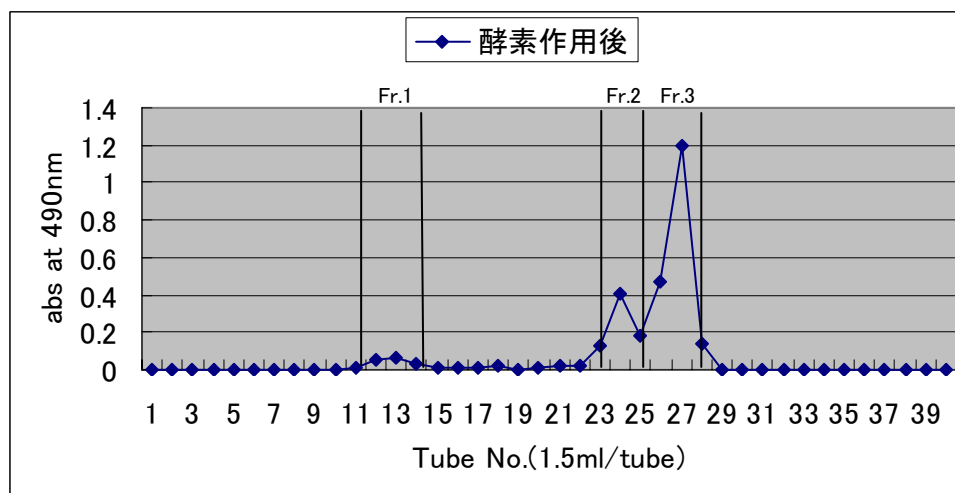
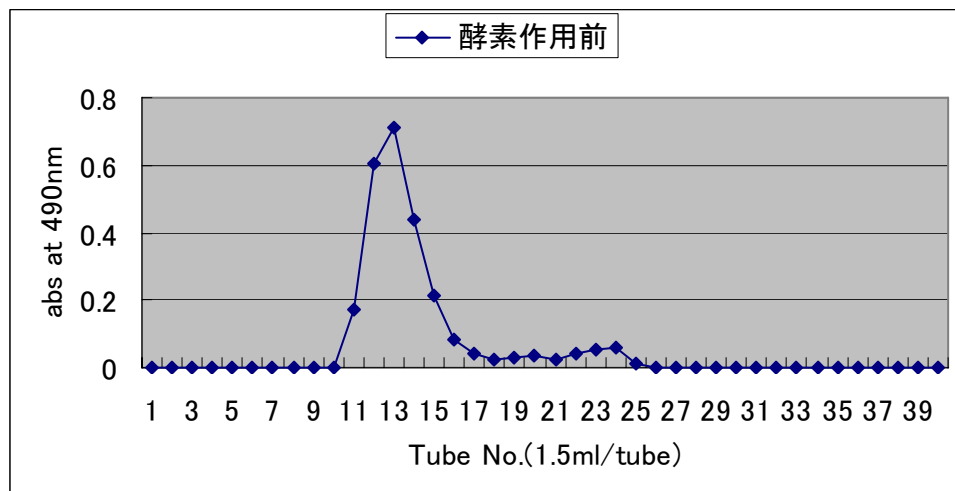


図 4 8 月採取ツルアラメ冷水抽出画分の  
ラミナリナーゼ処理前後のゲル濾過クロマトチャート

表 2 図 4 で得られた 8 月 WS 酵素作用後の Fr.1~Fr.3 の構成糖

	全糖量 (mg)	構 成 糖 (%)							
		マンニトール	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
Fr.1	0.12	—	52.5	1.3	1.5	14.8	8.2	7.9	13.8
Fr.2	0.54	33.6	—	—	—	1.0	65.3	—	—
Fr.3	1.36	20.3	—	—	—	0.2	79.5	—	—

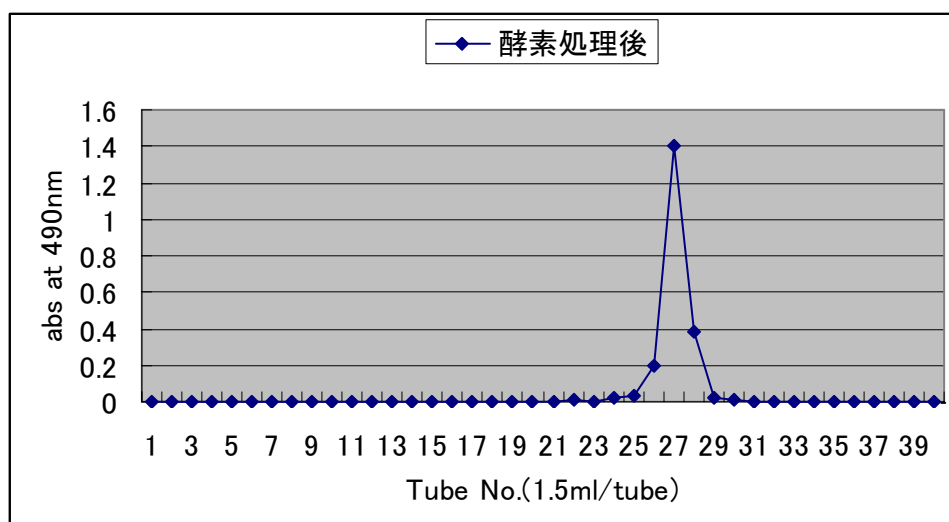
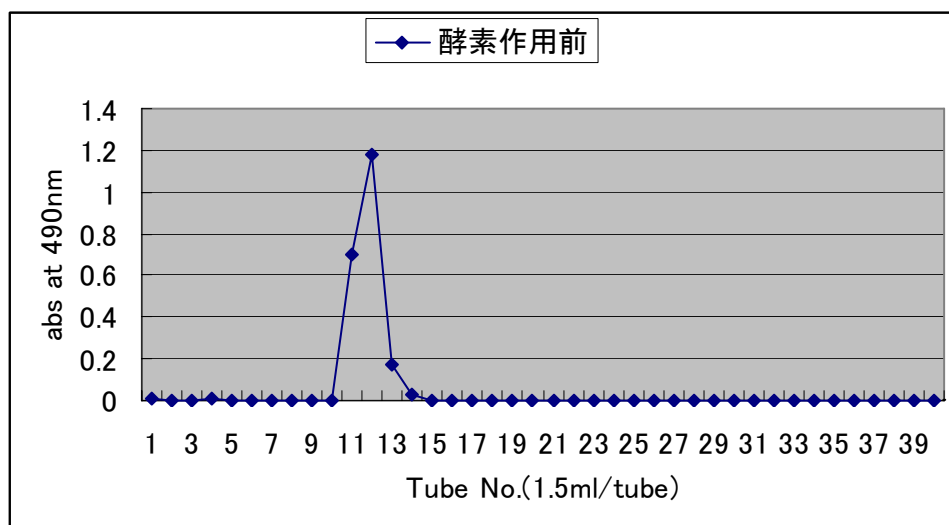
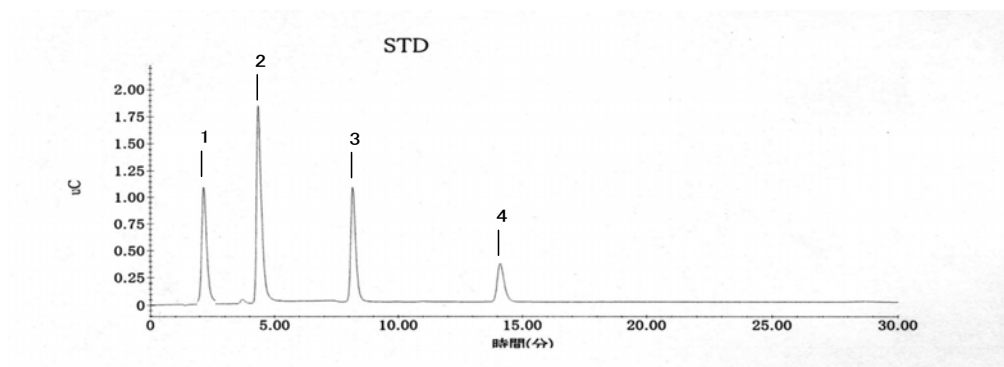


図 5 シゾフィランのラミナリナーゼ処理前後のゲル濾過クロマトチャート



1:マンニトール 2:単糖(グルコース) 3:二糖(マルトース) 4:三糖(マルトトリオース)

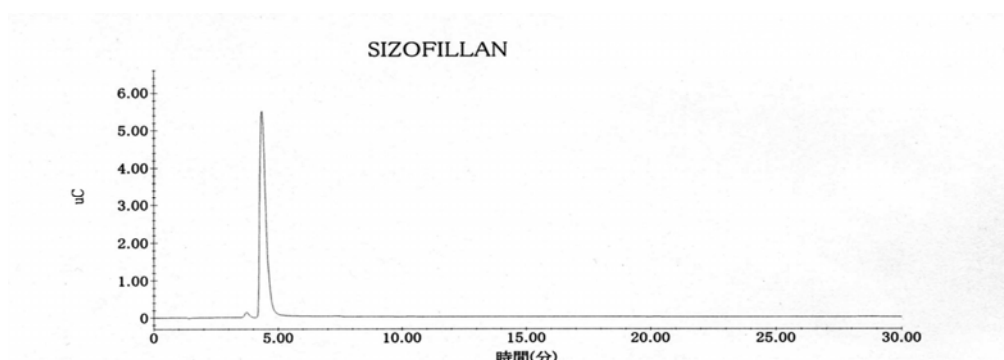
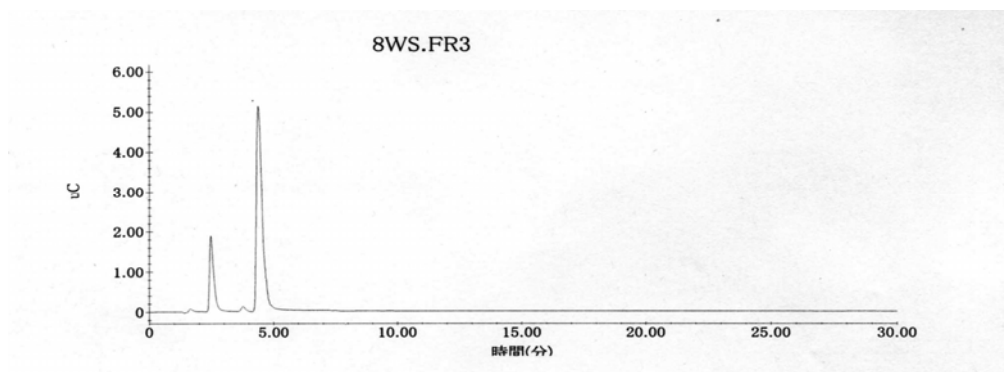
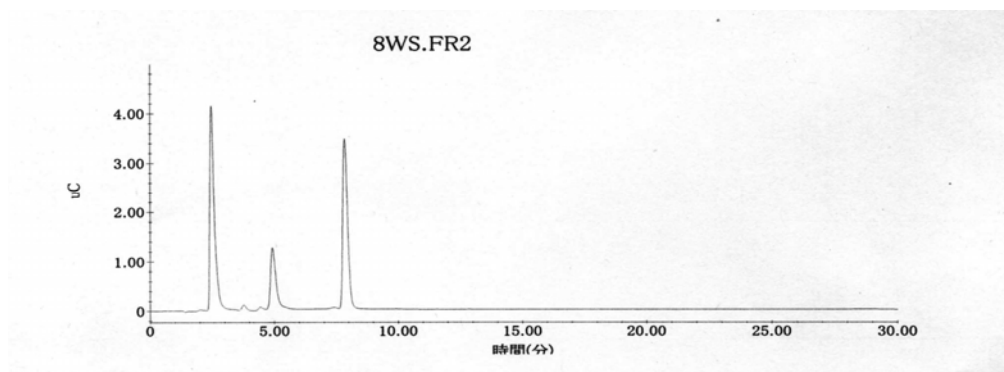


図 6 図 4 で得られた Fr.2~Fr.3 とシゾフィランのオリゴ糖分析クロマトチャート

## 第二節 アルギン酸含量の変化

### 1. 目的

ツルアラメに含まれる主要多糖の一つアルギン酸の季節変化を調べる。

### 2. 実験材料

第一節第一項と同様の試料を用いた。

### 3. 実験方法

アルギン酸の抽出は図 7 による方法で抽出した。すなわち、各月粉末ツルアラメに 1%炭酸ナトリウム溶液を加え、95℃で 60 分抽出した。その後、室温になるまで放置し、遠心分離(3000rpm,30 分)した。沈殿に再度 1%炭酸ナトリウム溶液を加え、同操作を 3 回繰り返した。得られた上清を合わせ、カルバズール・硫酸法<sup>5)</sup>にてアルギン酸相当量として算出した。アルギン酸はシグマ社(alginic acid from Brown algae)を用いた。

カルバズール・硫酸法には、四ホウ酸ナトリウム十水和物 0.95g を濃硫酸 100ml に溶解させたもの(試薬 A)とカルバズール 125mg をエタノールあるいはメタノール 100ml に溶解したもの(試薬 B)を用いた。

まず、試料 0.5ml を栓付試験管にとり、試薬 A 2.5ml を加え、栓をして攪拌し、沸騰水浴中で 10 分間静置した。そして冷水浴中で冷却した後、試薬 B 0.1ml を加え、再び沸騰水浴中で 15 分間静置した。冷水浴中で冷却した後、HITACHI 社の U-1500 レシオビーム分光光度計を用い 530nm で測定した。

### 3. 実験結果と考察

図 8 に粉末ツルアラメ 500mg から得られたアルギン酸量の季節変化を示す。この結果をみると、含有量に変化は少なく、約 100mg～150mg 含有されていることがわかった。

表 3 に褐藻類のアルギン酸含有量、図 9 にアルギン酸の主な原料を示す<sup>1)</sup>。ツルアラメは約 20～30%含有しているため、比較的多くアルギン酸を含有している種類であることがわかった。ツルアラメはアルギン酸の主な原料として使われている種類と同量程度アルギン酸を含有しているため、新たなアルギン酸原料としての可能性は十分にあるのではないかと考えられた。

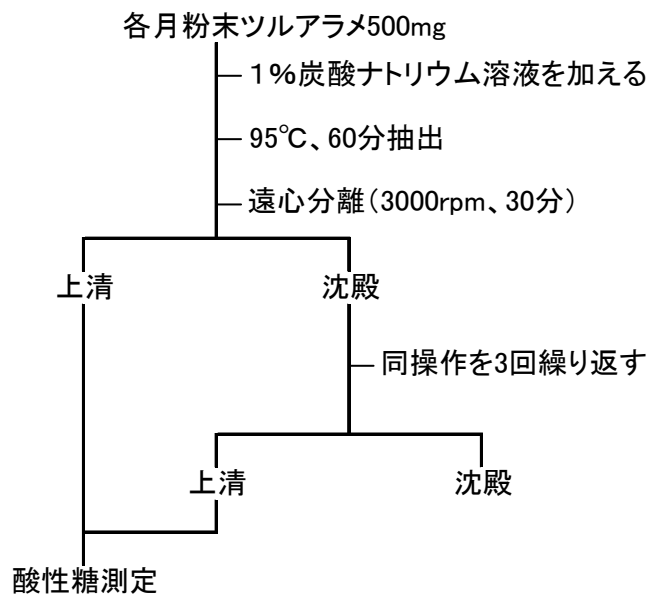


図7 アルギン酸抽出方法

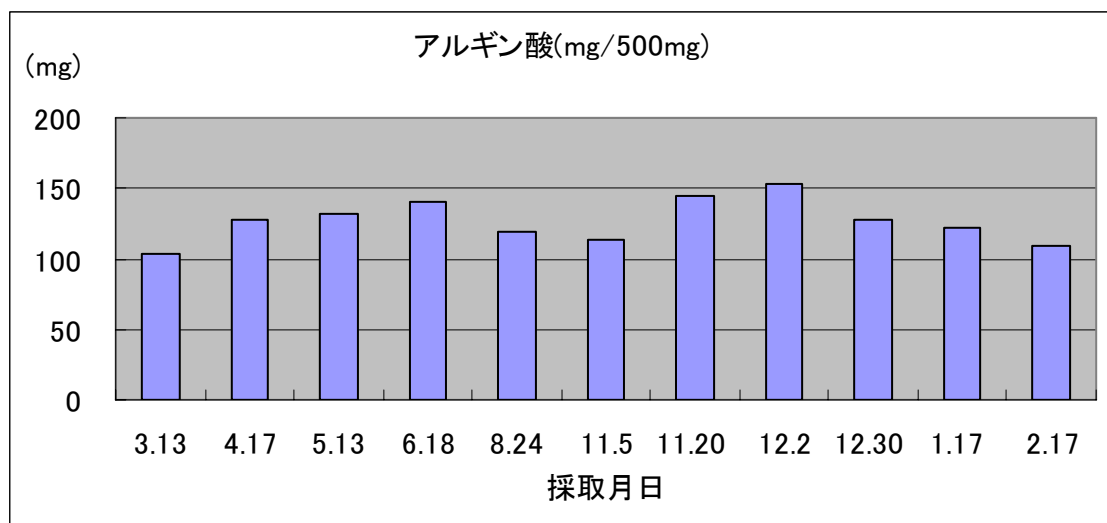
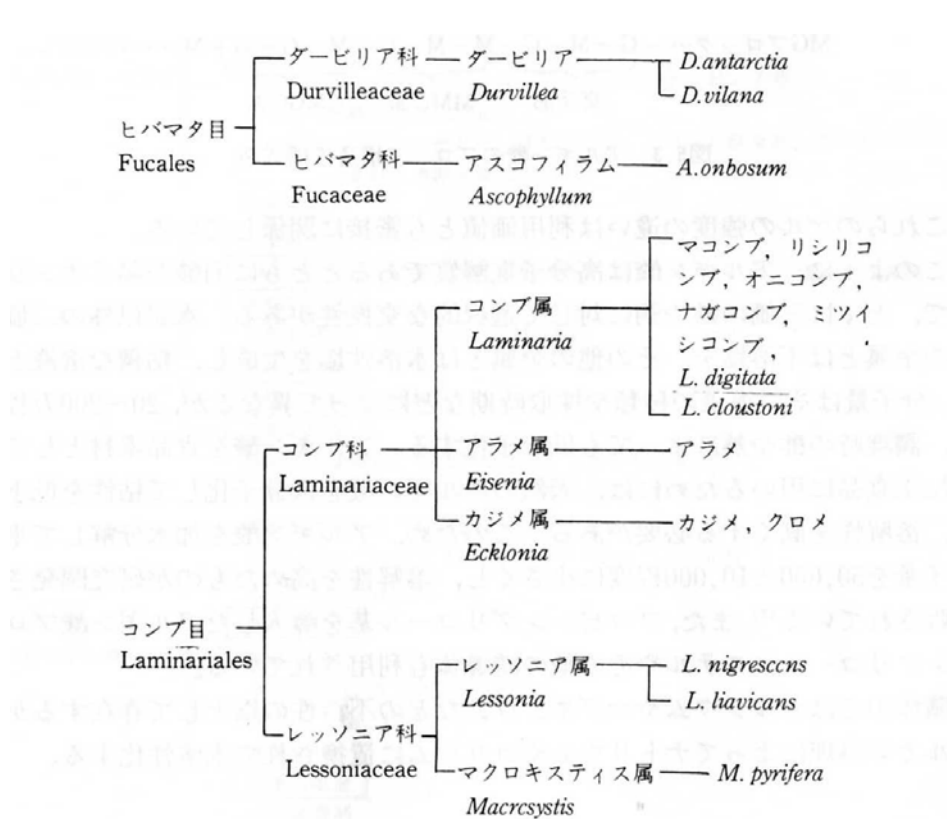


図8 アルギン酸量の季節変化

表 3 褐藻類のアルギン酸含有量(「海藻利用の科学」より)

種類	産地	アルギン酸 (%)
マコンブ	函館	17.05
〃	〃	22.54
利尻コンブ	利尻	25.43
〃	元泊	22
トロロコンブ	根室	30.17
ワカメ	三重県	27.06
〃	青森県	28.76
アラメ	千葉県	17.87
ヒジキ	静岡県	20.48
〃	三重県	20.15





<参考文献>

- 1) 海藻利用の科学. 著者 山田信夫. 成山堂書店. 2000
- 2) 西沢一俊. 海藻における CO<sub>2</sub> 固定を中心とした糖質代謝. 化学と生物,5,6,329-336(1967)
- 3) 能登谷正浩. 青森県沿岸のツルアラメ. 日本水産学会誌 61(1),105-106(1995)
- 4) 則末尚志. シゾフィランの三重らせん構造と抗腫瘍活性. 生物物理 29(1),35-38(1989)
- 5) 植物細胞壁と多糖類. 著者 桜井直樹, 山本良一, 加藤陽治. 培風館. 1991

## 第四章 ツルアラメ含有アミノ酸及びポリフェノールの季節変化

### <目的>

ツルアラメの有効利用を考えたとき、最も簡単な利用法は食用として利用することである。ツルアラメと同じ仲間であるコンブは、うま味成分であるグルタミン酸を多く含有していることは周知のことである。ツルアラメにもコンブと同じようにグルタミン酸が豊富であれば、ツルアラメの食用としての利用が大きく広がると考えられる。

また、当研究室の実験により夏採取のツルアラメと冬採取のツルアラメとでは夏採取の方がえぐみが強く、ポリフェノールの影響が考えられている。

そこで、本章でツルアラメに含まれるアミノ酸、ポリフェノール量の収穫時期による変化を調べることで、より食用に適した時期を特定することとした。

## 第一節 アミノ酸の変化

### 1. 目的

ツルアラメに含まれるアミノ酸の季節変化を調べる。

### 2. 実験材料

第三章で抽出した各月の水溶性画分を用いた。また、比較対象として北海道産市販コンブを同様に抽出した水溶性画分も用いた。

### 3. 実験方法

各月ツルアラメ及びコンブから得られた水溶性画分に 4 倍量のエタノールを加え、高分子を沈殿させた。これを遠心分離にて除き、得られた各上清を一定濃度になるように濃縮乾固し、0.02N 塩酸で溶解した。これを遠心式ろ過ユニットウルトラフリーMCにて濾過し、分析試料とした。

分析機器はアミノ酸自動分析機 L-8900 (HITACHI) を使用して行った。スタンダードとしてアミノ酸混合標準 ANⅡ型、B 型を混合し、0.02N 塩酸で希釈したものを用いた。

#### 4. 実験結果と考察

粉末 100g 当たりの分析結果を表 1 に示す。主要アミノ酸はアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸であった。これらを図 1 に示した。アラニンは 5 月～6 月に最大の約 1200mg を、8 月～11 月に最小となる約 300mg という値となった。アスパラギン酸は約 300mg、グルタミン酸は約 100mg と年間を通して平均的であった。この結果から、ツルアラメのアミノ酸量はアラニンの増減により大きく変化し、時期による違いも明らかとなった。

一方、市販コンブと比較すると、市販コンブも主要アミノ酸はアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸であることがわかった。含有量をみるとアラニンは約 300mg、アスパラギン酸は約 400mg とツルアラメと同じような値であった。しかし、グルタミン酸は約 1100mg とツルアラメの 10 倍以上含有していることから、ツルアラメのコンブ代替即ち、旨味成分含有海藻としての利用可能性は極めて低いと考えられる。

表 1 各月ツルアラメ及びコンブのアミノ酸組成

	採取月日											(mg/100g)
	3.13	4.17	5.13	6.18	8.24	11.05	11.20	12.02	12.30	1.17	2.18	コンブ
Ile	17	32	37	36	26	0	29	0	32	0	33	38
Leu	9	24	30	30	29	16	25	19	24	22	25	39
Lys	17	15	7	13	9	11	12	13	16	13	15	34
Met	10	8	19	0	0	7	10	0	0	0	0	17
Cys	21	38	40	0	28	32	0	0	0	0	0	0
Phe	46	64	72	117	0	66	67	0	78	109	66	101
Tyr	0	0	0	43	35	37	35	31	35	32	36	48
Thr	30	22	51	25	9	12	11	15	26	30	25	51
Val	31	26	71	47	22	22	42	43	29	26	30	59
His	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	12
Arg	8	14	1	13	8	4	6	5	18	10	15	22
Ala	843	644	1203	1171	280	213	305	215	723	424	808	338
Asp	311	244	271	225	123	440	334	443	374	343	317	432
Glu	114	74	44	66	104	106	96	106	60	136	91	1130
Gly	23	21	25	15	12	18	16	26	18	42	17	23
Ser	23	24	12	31	19	22	21	25	28	33	30	68
Asn	27	23	0	23	22	20	25	29	29	35	32	45
Gln	110	96	31	110	97	61	66	75	47	90	69	129
合計	1641	1370	1913	1968	823	1086	1098	1044	1539	1346	1610	2586

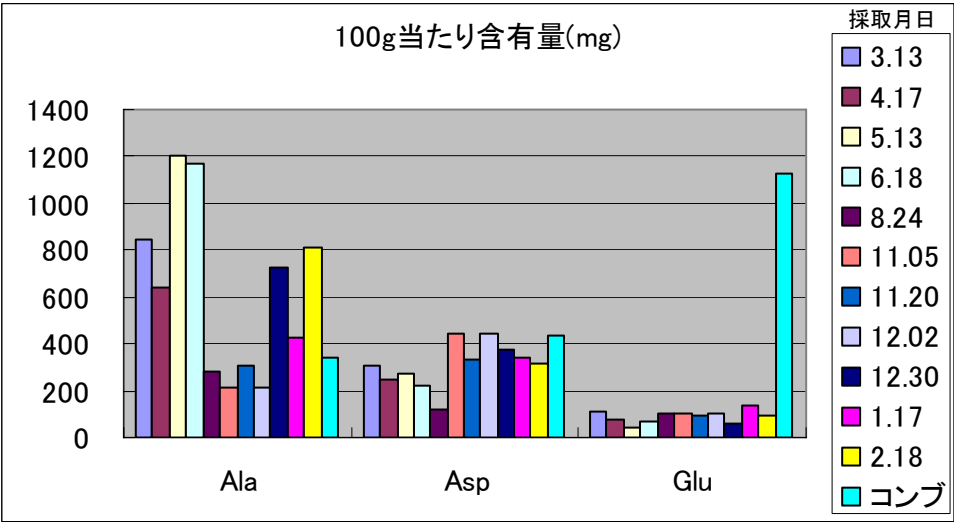


図 1 主要アミノ酸組成

## 第二節 ポリフェノールの変化

### 1. 目的

ツルアラメに含まれるポリフェノール量及びポリフェノールの季節変化を調べる。

### 2. 実験材料

第一節と同様、各月の水溶性画分を用いた。

### 3. 実験方法

#### 3-1. Folin-Ciocalteu 法

Folin-Ciocalteu 法<sup>1)</sup>を一部改良して測定した。すなわち、カテキンを 10、20、40、60、80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度になるように蒸留水に溶かし、0.5ml を試験管にとり、それぞれに 50%フォーリン・チオカルト試薬 0.5ml を加え攪拌した。3 分間放置後、0.4M 炭酸ナトリウム水溶液を 2.5ml 加え、攪拌した。これを 50°C の高温槽で 10 分間保持した後、1 時間水冷させ、765nm で吸光度を測定し、検量線を作成した。盲検には蒸留水を用い、分光光度計は HITACHI 社の U-1500 レシオビーム分光光度計を用いた。

試料は適量取り希釈した後、同様の操作で吸光度を測定し、これより得られた値を検量線式に当てはめ、カテキン相当量としてポリフェノール含量を算出した。

### 3-2. ポリフェノールの分析

各試料を 280nm 吸光度 5abs/ml 濃度になるように調製し、それぞれ 100  $\mu$ l インジェクションして分析した。分析には L-4500 Diode Array Detector(HITACHI)を用いた三次元クロマトグラフィーシステムを用いた HPLC 分析を行った。分析条件は以下に示した。

カラム : Capcellpac C18 UG120

溶離液 : A液 0.34%リン酸  
B液 0.068%リン酸を含む80%アセトニトリル

流速 : 1ml/min

カラム温度 : 40℃

検出波長 : 220～700nm

グラジエント

	0min	90min
A液	100%	75%
B液	0%	25%



#### 4. 実験結果と考察

各月と市販コンブのポリフェノール量(カテキン相当量)を図 2 に示した。この結果をみると、春～初秋にかけてポリフェノール量は増加しており、それ以降、減少していく傾向がみられた。ポリフェノールの変化も糖質と同様、藻体の生長に大きく関わっていると考えられる。

当研究室の研究結果により、夏採取のツルアラメと冬採取のツルアラメのポリフェノール量を比較すると、夏採取のツルアラメ含有ポリフェノール量は冬採取のツルアラメの約 3 倍含有していることがわかっている。本実験結果においても 8 月採取ツルアラメ含有ポリフェノール量は粉末 500mg 当たり 14.85mg であるのに対し、2 月採取ツルアラメ含有ポリフェノール量は 4.95mg であったことから同様の結果であるといえる。また、ポリフェノール量が多い時期のツルアラメにはえぐみがあり、少ない時期のツルアラメはえぐみが少なく、食されることもあるため、このえぐみの原因はポリフェノールであると考えられる。

一方、市販コンブのポリフェノール量が著しく少ないという結果が得られた。これはコンブ自体にえぐみがほとんどないこと、そして市販コンブは藻体をよく水洗していると考えられるため、ポリフェノール量が少ない結果となったのは納得できるものであった。

図 3-1~4 には各月の 280nm の吸収波長のクロマトチャートを示した。ポリフェノール量が少ない時期(3.13)に比べ、ポリフェノール量が多い時期(11.20)は 50 分以降に多くのピークがみられている。成分の特定はできなかったものの、50 分以降に溶出されるポリフェノールがツルアラメ特有のえぐみとなっているのではないかと考えられた。

谷口らによると、ツルアラメはアワビなどの植食動物に摂食されにくく、その原因としてポリフェノール化合物であるフロロタンニン類を多量に生成、蓄積して身を守っていると結論づけている<sup>2)</sup>。つまり、このフロロタンニン類がツルアラメ特有のえぐみであり、クロマトチャートの 50 分以降のピークがそれらに相応している可能性が示唆された。

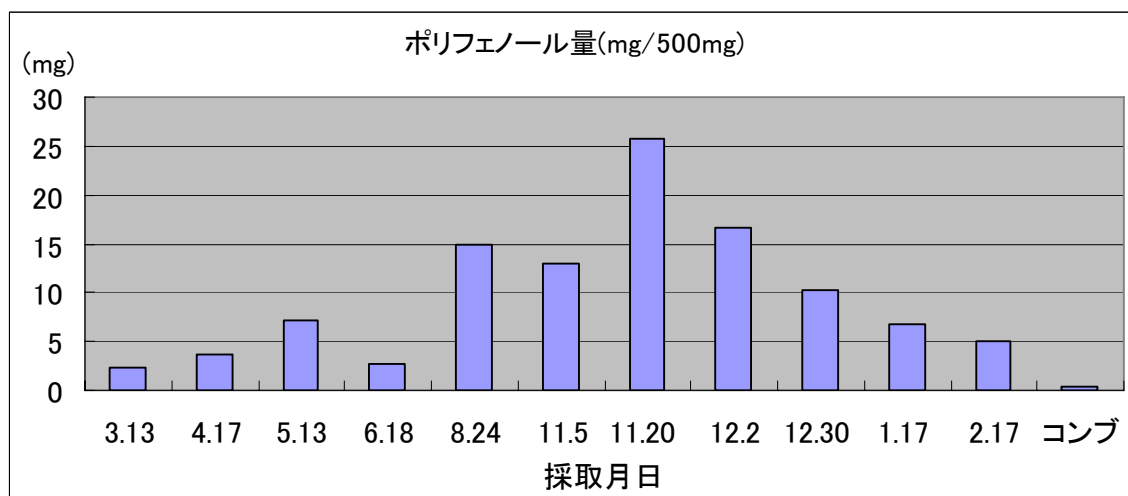


図 2 ポリフェノール量の変化

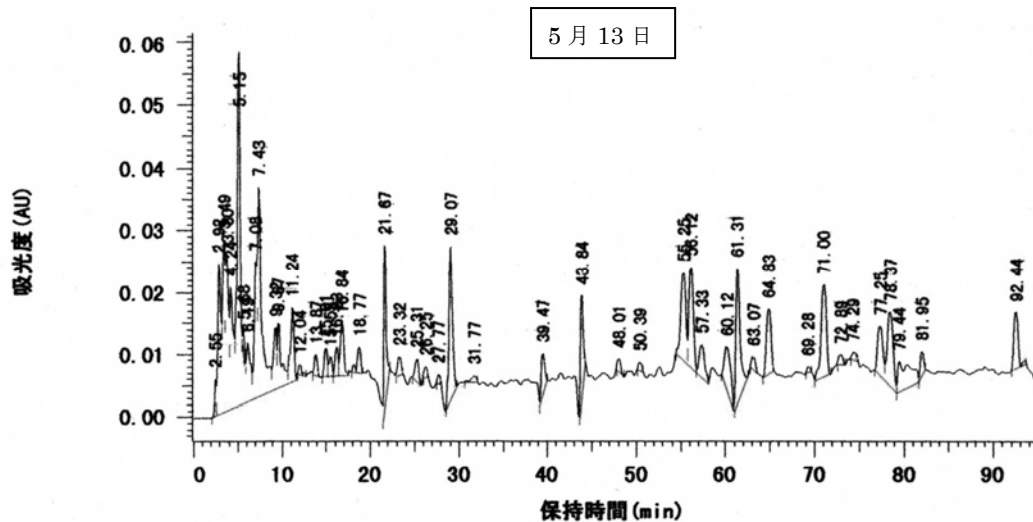
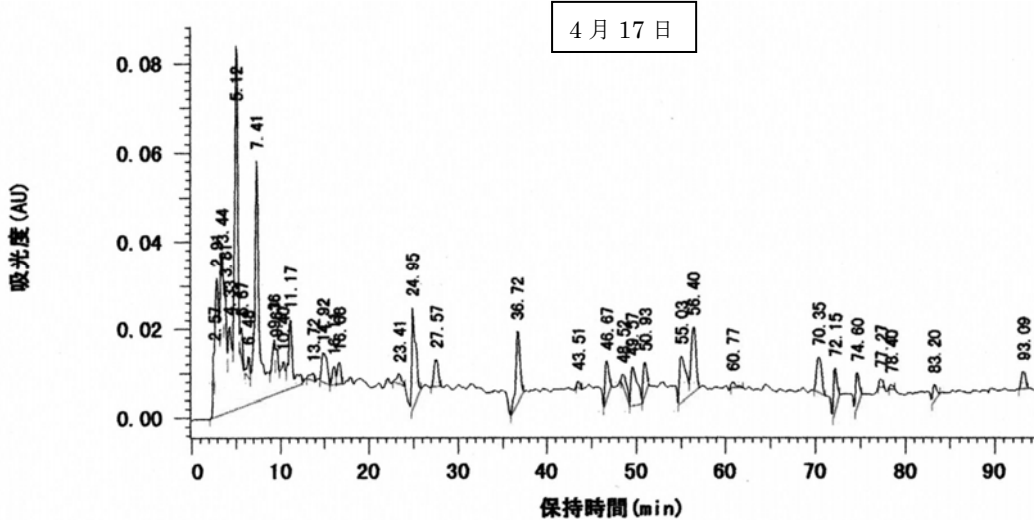
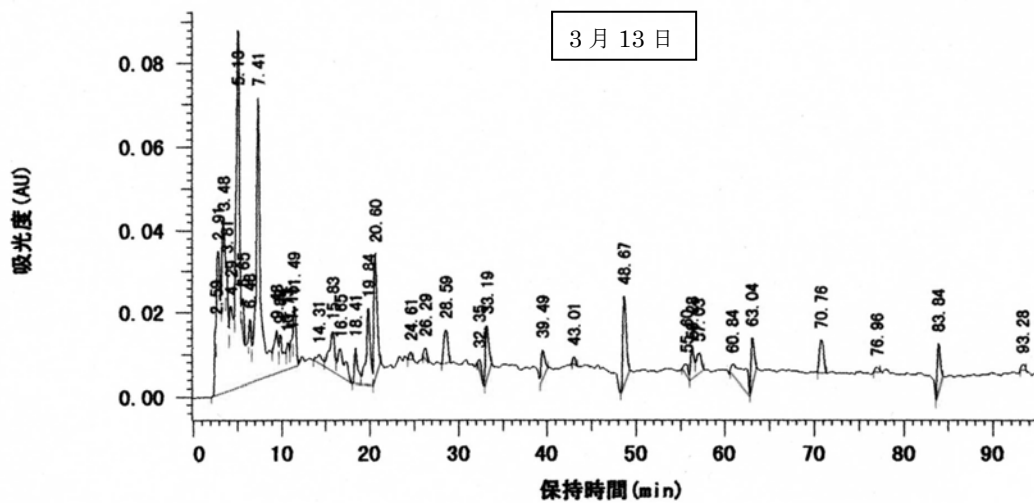


図 3-1 各月ポリフェノールクロマトチャート

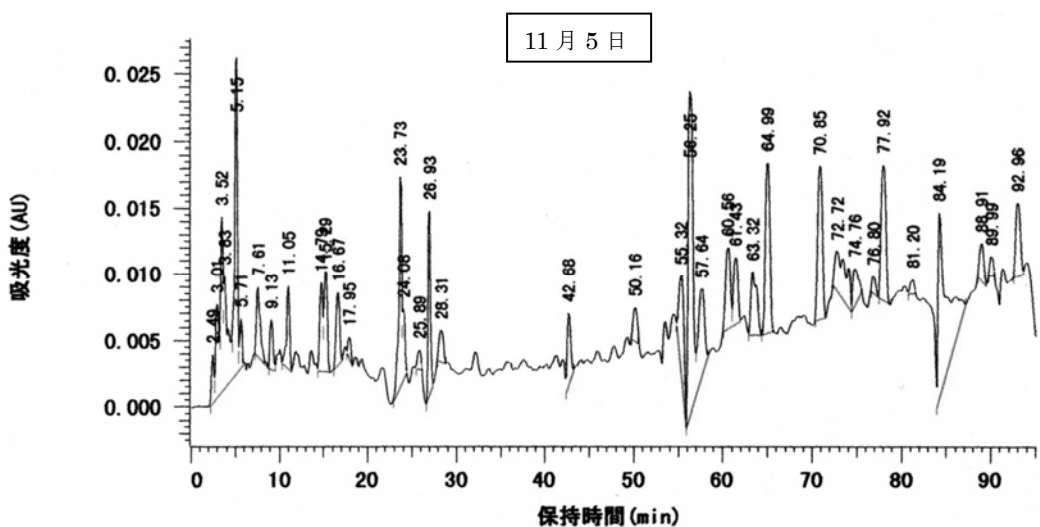
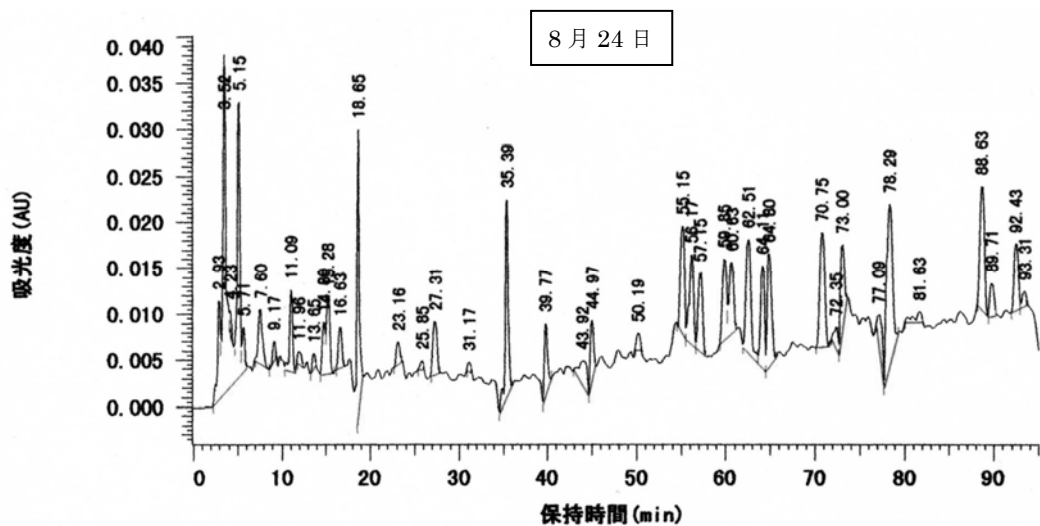
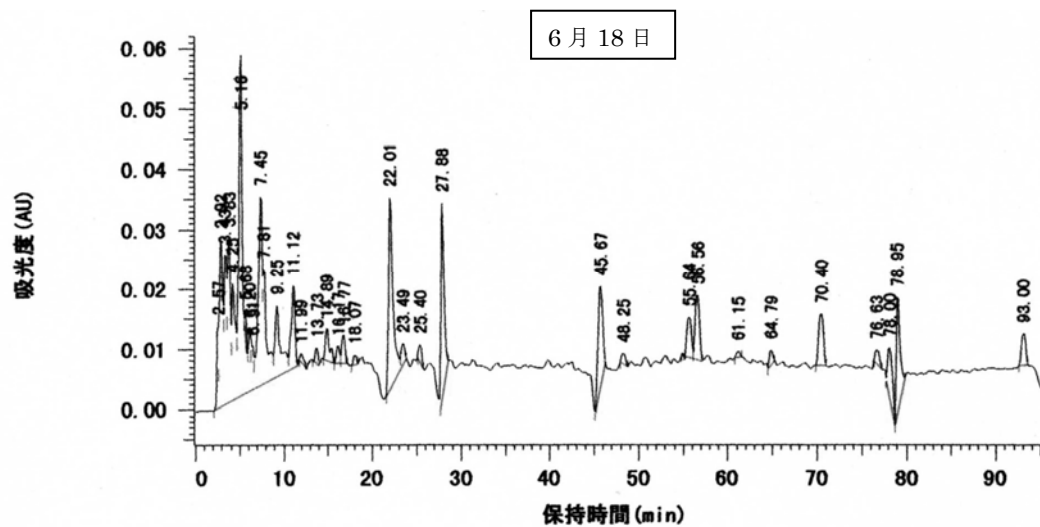


図 3-2 各月ポリフェノールクロマトチャート

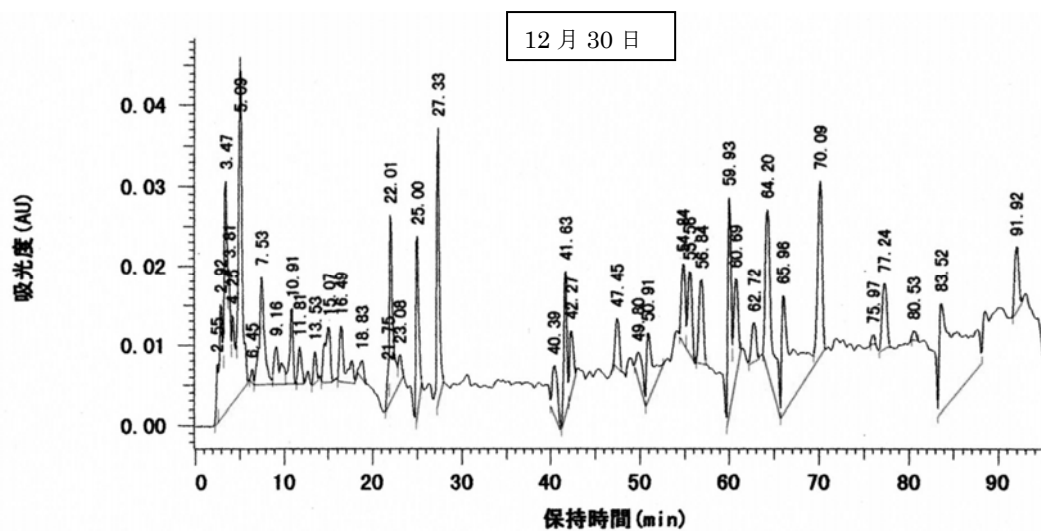
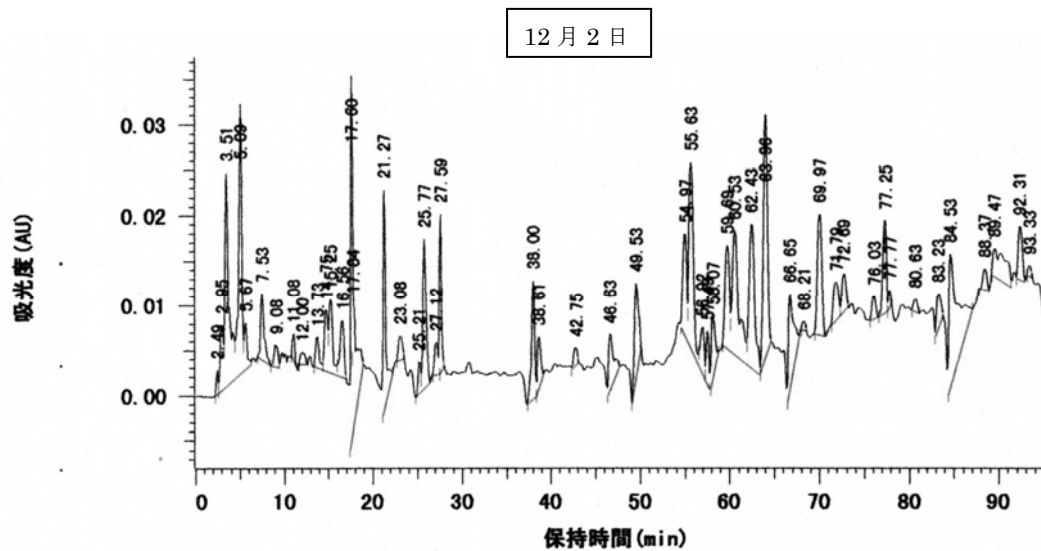
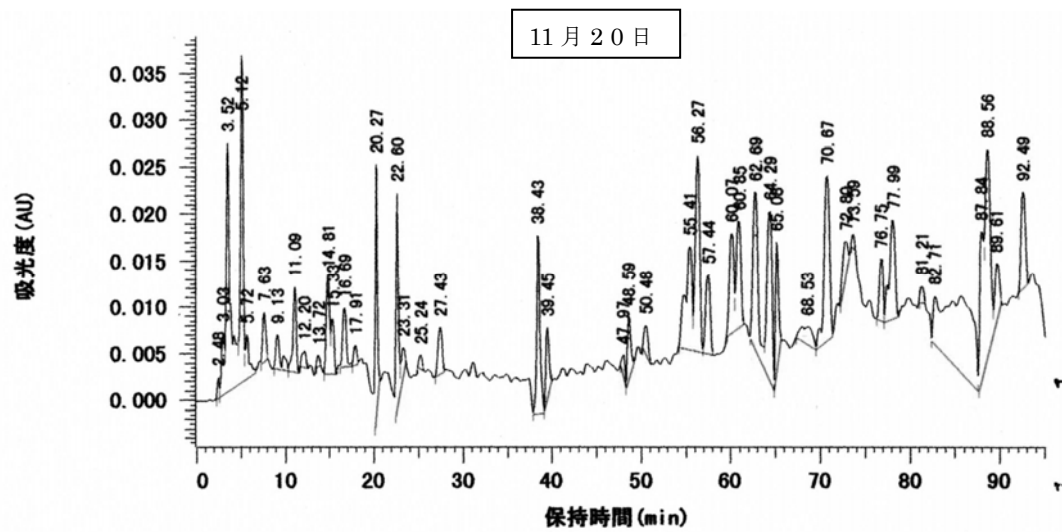


図 3-3 各月ポリフェノールクロマトチャート

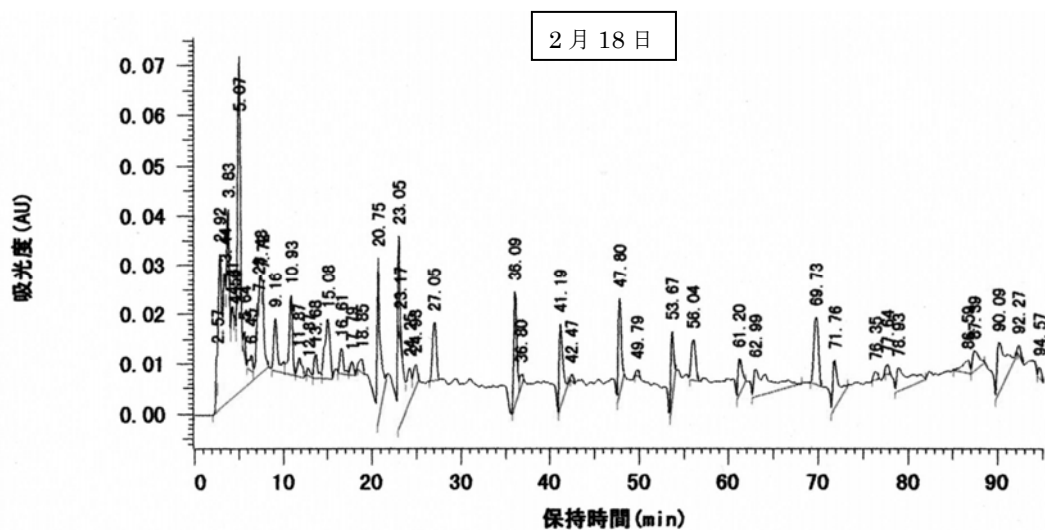
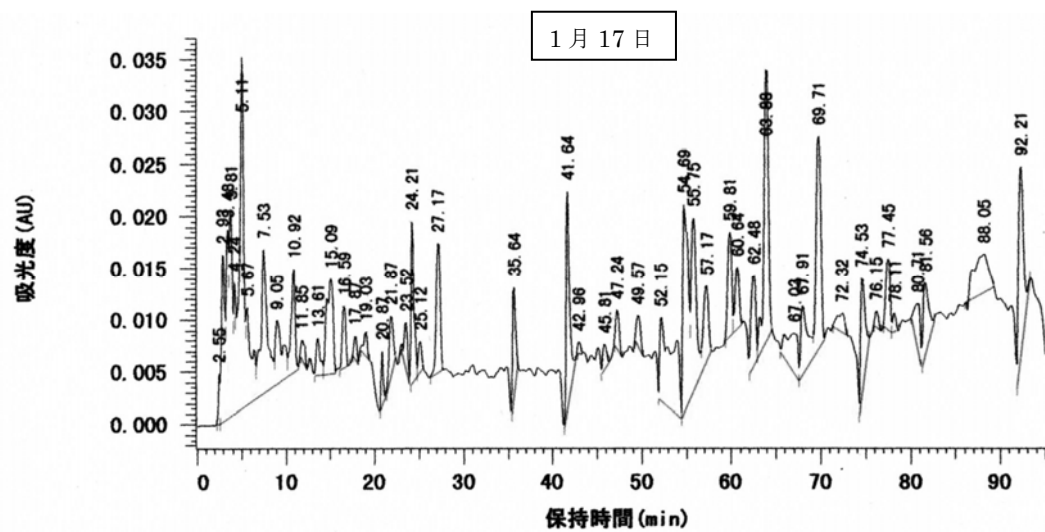


図 3-4 各月ポリフェノールクロマトチャート

<参考文献>

- 1) Sun T, Tang J, Powers JR. Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. *J.Agric Food Chem*,53,1,42-45(2005)
- 2) 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木稔. 褐藻ツルアラメのポリフェノール化合物によるエゾアワビに対する摂食阻害作用. *日本水産学会誌*,57,11,2065-2071 (1991)

## &lt;目的&gt;

褐藻類に含まれるフコイタンは海藻の種類、構造によって異なることは知られており<sup>1)</sup>、図1、表1に示す通り、さまざまなフコイタンが存在する<sup>2)</sup>。しかし、ツルアラメ含有フコイタンについては研究報告がされておらず、新しい組成をもつツルアラメ特有のフコイタンが存在する可能性も十分に考えられる。

そこで本章では、ツルアラメ含有フコイダンの分離・精製、そして組成について検討することとした。

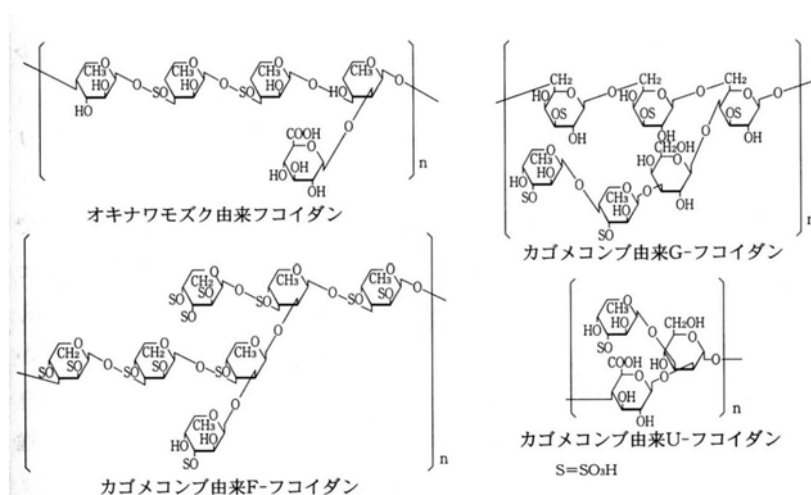


図1 フコイダンの化学構造(酒井 2003)

表1 フコイタンオリゴ糖およびフコイダンの全体像(酒井 2003)

硫酸化フコグルクロノマンナン (ガゴメ由来)	
主要オリゴ糖	$\Delta \text{GA}1-2(\text{F}(3\text{S})\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-(4\text{GA}\beta 1-2(\text{F}(3\text{S})\alpha 1-3)\text{Man})_m$ $m=0,1$
多糖の主要構造	$-(4\text{GA}\beta 1-2(\text{F}(3\text{S})\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-)_n$
硫酸化フコグルクロノマンナン ( <i>Fucus vesiculosus</i> 由来)	
主要オリゴ糖	$\Delta \text{GA}1-2(\text{Ff}(5\text{S})\alpha 1-4\text{F}(2,3\text{diS})\alpha 1-3)\text{Man}(6\text{S})$
多糖の中での存在形態	$-4\text{GA}\beta 1-2(\text{Ff}(5\text{S})\alpha 1-4\text{F}(2,3\text{diS})\alpha 1-3)\text{Man}(6\text{S})\alpha 1-$
硫酸化フコガラクトン (ガゴメ由来)	
主要オリゴ糖	$\text{Gal}(3\text{S})\beta 1-6\text{Gal}(3\text{S})\beta 1-6(\text{F}(3\text{S})\alpha 1-4\text{F}(3\text{S})\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4)\text{Gal}(3\text{S})$
多糖の中での存在形態	$-6\text{Gal}(3\text{S})\beta 1-6\text{Gal}(3\text{S})\beta 1-6(\text{F}(3\text{S})\alpha 1-4\text{F}(3\text{S})\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4)\text{Gal}(3\text{S})\beta 1-$
硫酸化フカン (ガゴメ由来)	
主要オリゴ糖	$\text{F}(2,4\text{diS})\alpha 1-3\text{F}(2,4\text{diS})\alpha 1-3(\text{F}(3\text{S})\alpha 1-2)\text{F}(4\text{S})\alpha 1-3\text{F}(2,4\text{diS})\alpha 1-3\text{F}(2,4\text{diS})\alpha 1-3\text{F}(2,4\text{diS})$
硫酸化フカン ( <i>Fucus vesiculosus</i> 由来)	
主要オリゴ糖	$\text{F}\alpha 1-(3\text{F}(2\text{S})\alpha 1-4\text{F}(2,3\text{diS})\alpha 1-)_m3\text{F}(2\text{S})$ $m=1,2,3,4$
硫酸化グルクロノフカン (オキナワモズク由来)	
主要オリゴ糖	$-(3\text{F}\alpha 1-3\text{F}(4\text{S})\alpha 1-3\text{F}(4\text{S})\alpha 1-3(\text{GA}\alpha 1-2)\text{F}(4-O-\text{acetyl})\alpha 1-)_m3\text{F}\alpha 1-3\text{F}(4\text{S})\alpha 1-3\text{F}(4\text{S})\alpha 1-3\text{F}$ $m=0,1,2$
多糖の主要構造	$-(3\text{F}\alpha 1-3\text{F}(4\text{S})\alpha 1-3\text{F}(4\text{S})\alpha 1-3(\text{GA}\alpha 1-2)\text{F}(4-O-\text{acetyl})\alpha 1-)_n$
図中略号 F,L-fucose : Ff, L-fucufuranose : GA, D-glucuronic acid: $\Delta$ GA,4,5-unsaturated D-glucuronic acid : Gal, D-galactose : Man, D-mannose : S,O-sulfate	



## 第一節 フコイダン分離の検討

### <目的>

フコイダンの抽出を第四級アンモニウム塩による分画と塩化マグネシウム・エタノール沈殿法で検討した。

### 第一項 第四級アンモニウム塩による分画

#### 1. 実験材料

2008 年 4 月、11 月、2009 年 2 月に採取されたツルアラメを自然乾燥後、減圧乾燥し、ミルサー(Iwatani IFM-66D)を用いて粉末化したものを用いた。

#### 2. 実験方法

図 2 による方法で乾燥ツルアラメから粗フコイダンを抽出した。すなわち、乾燥試料 5g に脱脂、脱色素のため 80%エタノールを加え、室温で 12 時間攪拌した。その後、遠心分離を行い、残渣をエタノール、アセトンで洗浄した。得られた残渣に蒸留水を加え、6 時間攪拌し、遠心分離し、沈殿に同操作をもう一度繰り返した。得られた上清を 1 夜蒸留水中で透析を行い、濃縮後、凍結乾燥し、粗フコイダンを得た。

次に、粗フコイダンの精製方法は田幸らの方法<sup>3)</sup>を参考にした。粗フコイダンを蒸留水に再溶解し、2%CPC(塩化セチルピリジニウム)を加え、沈殿物を遠心分離後、蒸留水で洗浄して 4M 塩化カルシウムに溶解し、透析後、凍結乾燥を行い、精製フコイダンを得る方法を用いた。

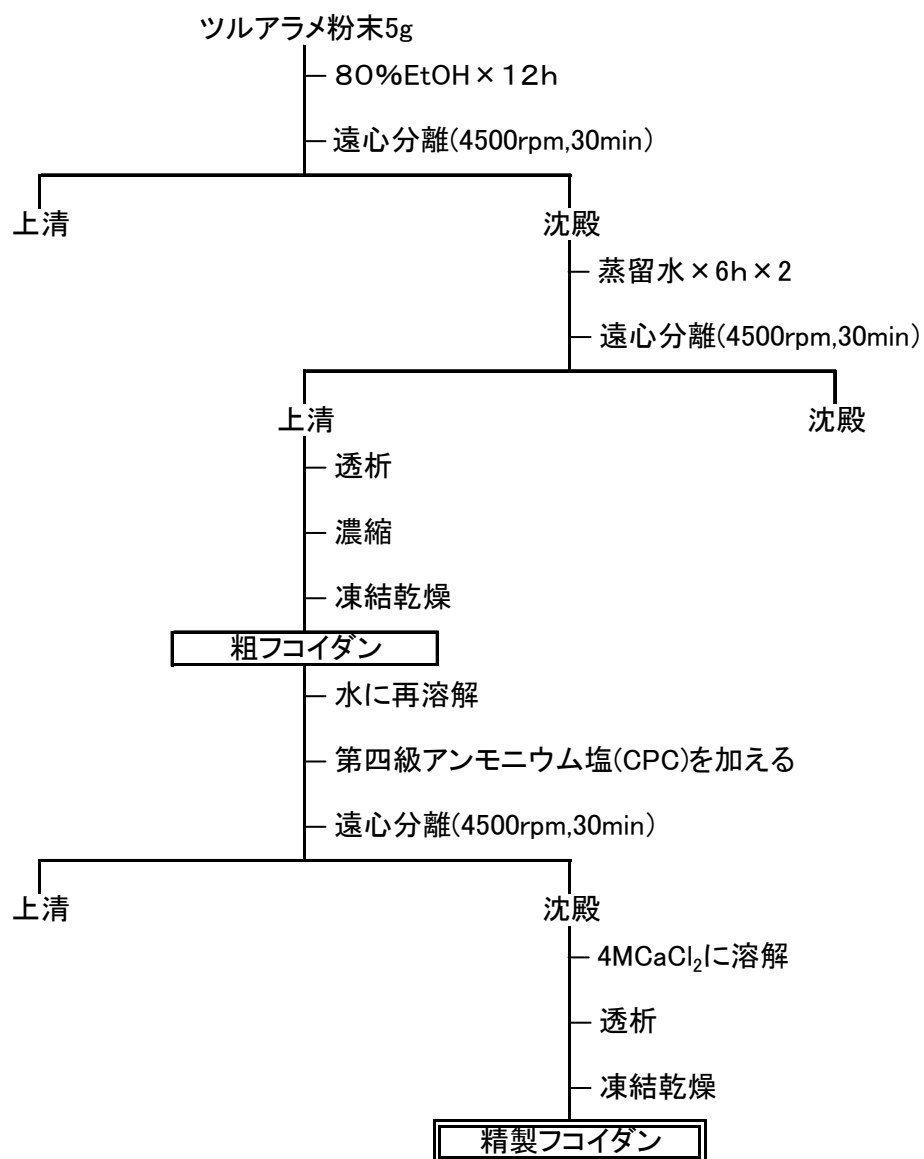


図 2 第四級アンモニウム塩による分画

### 3. 実験結果と考察

2月採取乾燥試料 5g から粗フコイタンを 0.74g(14.8%)得られた。この粗フコイタンを蒸留水に溶解し、2% CPC を加えて得られた沈殿物を 4M 塩化カルシウムに溶解するのだが、溶解できなかった。富士川らの研究<sup>6)</sup>において、この第四級アンモニウム塩を用いる方法では、フコイタン及び第四級アンモニウム塩複合体が海藻の種類によって難溶性となり、フコイタンの回収が困難になることが報告されていた。難溶性になる褐藻の海藻にはアラメやオオバモクがあげられている。この実験結果より、ツルアラメも第四級アンモニウム塩を用いる方法では難溶性になり、この方法が適さないことが明らかとなった。

## 第二項 塩化マグネシウム・エタノール沈殿法による分画

### 1. 実験材料

第一項と同じ試料を用いた。

### 2. 実験方法

西出らの方法<sup>4)</sup>を参考に粗フコイダン抽出した(図 3)。すなわち、乾燥試料 1g に蒸留水 30ml を加え、100℃で 3 時間、熱水抽出した。これを遠心分離後、上清に 4 倍量のエタノール、つまり 80%になるようにエタノールを加え、遠心分離した。沈殿物をエタノール、アセトンで洗浄後、凍結乾燥した。この乾燥物を蒸留水に溶解し、同量の 0.1M 塩化マグネシウムを加え、20%になるようにエタノールを加えた。遠心分離し、沈殿は蒸留水に溶解後、上清とともに透析し、凍結乾燥した。

**Fraction I** はフコイダンとラミナランの混合物、**Fraction II** は水溶性アルギン酸である。

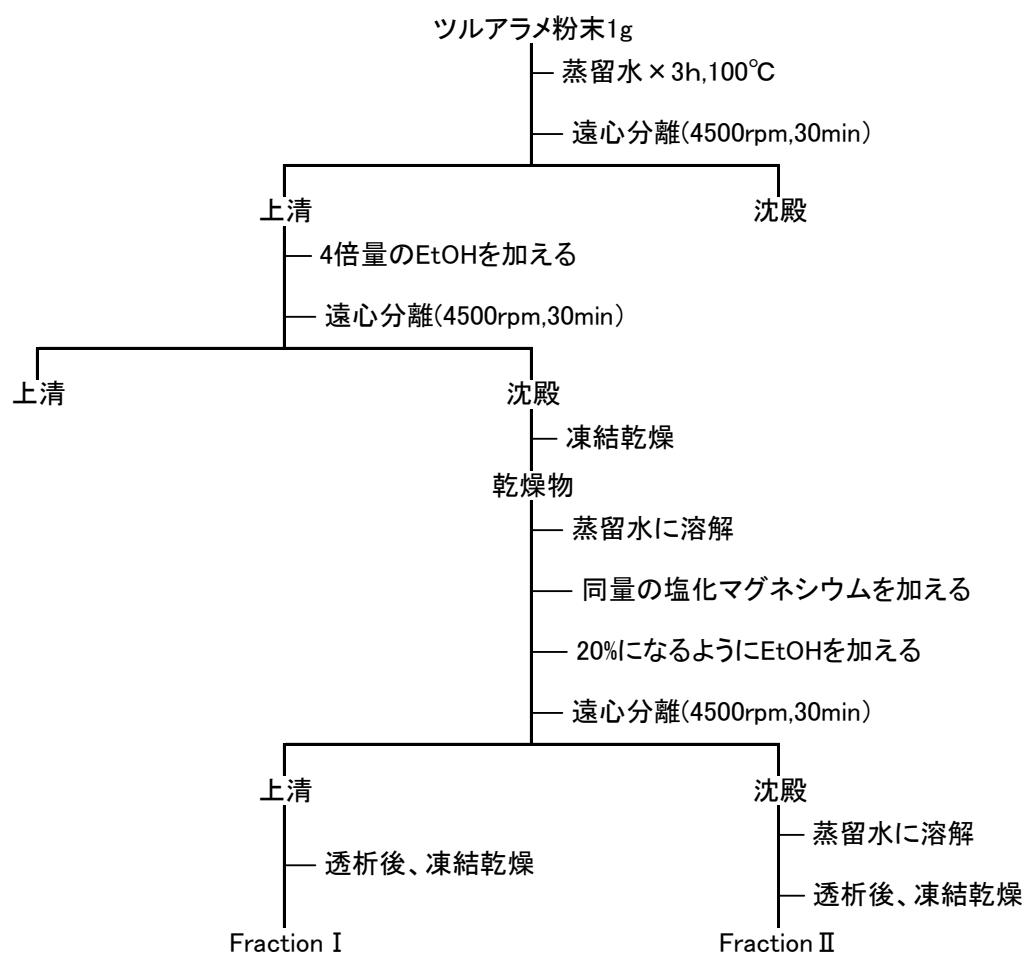


図 3 塩化マグネシウム・エタノール沈殿法

### 3. 実験結果と考察

2月採取乾燥試料 1g から粗フコイタンを 130mg(13%)得られた。この粗フコイタンからフコイタン及びラミナラン画分(Fraction I とする)を 49mg、水溶性アルギン酸画分(Fraction II とする)を 51mg 得られた。

水抽出だけでは水溶性アルギン酸も混在するため、この塩化マグネシウム・エタノール沈殿法を用いることで水溶性アルギン酸除くことができる。また、ツルアラメは第四級アンモニウム塩を用いる方法が適さないため、この塩化マグネシウム・エタノール沈殿法がフコイタンの分画に適していると考えられる。

しかし、この Fraction I にはラミナランが混在しているため、フコイタンとラミナランを分離する必要がある。

## 第二節 粗フコイダンの精製

### 第一項 DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトによる精製

#### ① ステップワイズ溶出方法

#### 1. 実験材料

第一節第二項で得られた **Fraction1** (フコイダン及びラミナラン画分)を用いた。

#### 2. 実験方法

フコイダンとラミナランを分離する方法として、西出ら<sup>5)</sup>は **DEAE-Sephadex A-25** を用いて分別しているため、この方法を参考にした。すなわち、**DEAE-Sephadex A-25** を **1.2cm×20cm** のカラムに充填し、**10mM** 塩酸溶液を用いて平衡化した。試料を **10mM** 塩酸溶液に溶解し、カラムにのせた。西出ら<sup>5)</sup>の結果より、**3M** 塩化ナトリウム濃度でフコイダンの回収率が最大となっているため、溶出は **10mM** 塩酸溶液、**3M** 塩化ナトリウム含有 **10mM** 塩酸溶液で **1ml** ずつ回収し、フェノール・硫酸法で **490nm** の吸光度を測定した。

### 3. 実験結果と考察

DEAE-Sephadex A-25 を用いて分別したクロマトチャートを図 4 に示す。A は 10mM 塩酸溶液抽出画分、B は 3M 塩化ナトリウム含有 10mM 塩酸溶液抽出画分である。ラミナランは中性多糖の為、非吸着画分である A に、フコイダン は酸性多糖の為、吸着画分(3M 塩化ナトリウムで溶出)である B に溶出される。この結果を見ると、A にはピークがほとんどなく、B において大きなピークが見られた。つまり、2 月採取ツルアラメにはラミナランがほとんど含有されていないことが明らかとなった。これは第三章の 2 月採取水溶性画分の構成糖分析結果と同様の結果となった。

また、B において試験管 No.69~72 に小さいピークの存在が確認された。これをより詳細に分離するために濃度勾配による溶出を行うこととした。

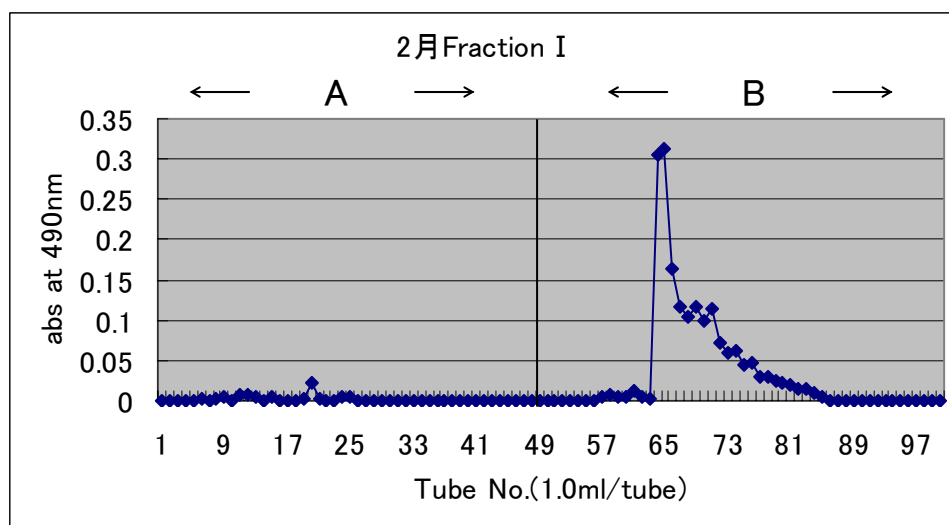


図 4 2 月 DEAE-Sephadex A-25 クロマトチャート



## 第二項 DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトによる精製

### ②濃度勾配による溶出

#### 1. 実験材料

第一節第二項で得られた 2 月の Fraction I (フコイからダン及びラミナラン画分)と 4 月、11 月採取ツルアラメ粉末から同様の方法にて得られたフコイダン及びラミナラン画分を用いた。

#### 2. 実験方法

より詳細に検討するため、0M~3.5M 塩化ナトリウム濃度で濃度勾配による溶出を行った。すなわち、濃度勾配装置(SANPLATEC 円筒型 No.5)を用いた。各チャンバーに 10mM 塩酸溶液、3.5M 塩化ナトリウム含有 10mM 塩酸溶液を同量入れ、第一項と同様のカラムを用い、1ml ずつ回収し、フェノール硫酸法で 490nm の吸光度を測定した。

### 3. 実験結果と考察

濃度勾配により分別した結果を図 5 に示す。この結果、大きく二つのピークに分けることができた。1.5M 塩化ナトリウム濃度当たりのピークを I、2.5M 塩化ナトリウム濃度当たりの後のピークを II とする。詳細に分離するため、I、II をそれぞれまとめ、脱塩後、再度同条件にてリクロマトした。その結果を図 6、7 に示す。その結果、それぞれピークが分かれたため、I を Fr.1~Fr.3、II を Fr.4~Fr.5 とした。

また、4 月の結果を図 8 に示す。2 月と比較すると同じようなピークを示した。4 月は 2 月同様、得られた画分をリクロマトし、I を Fr.1~Fr.3(図 9)、II を Fr.4~Fr.6 (図 10)に分けた。

次に 11 月の結果を図 11 に示す。2 月・4 月と比較すると、全く異なるピークを示し、ラミナランの存在が示唆された。また、11 月のフコイダン画分は糖量が少なく、リクロマトできないため、図 12 のように Fr.1~Fr.3 に分けた。図 12 は図 11 のスケールを拡大したものである。

次項ではそれぞれの構成糖分析を行った。

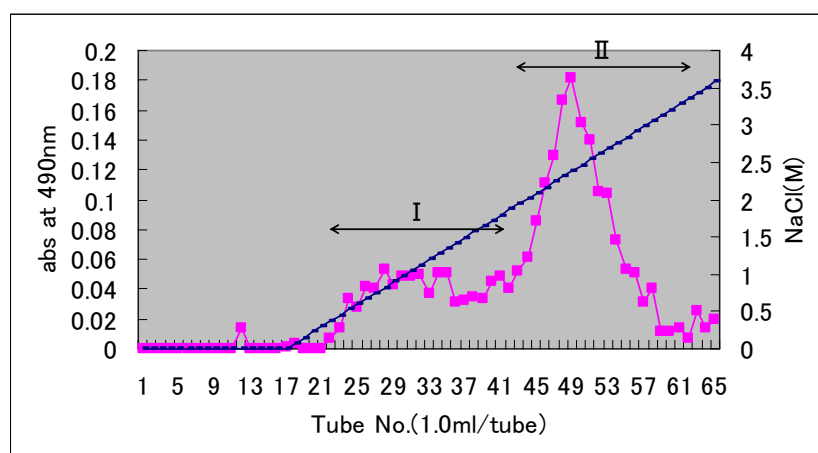


図 5 2月グラジエントクロマトチャート

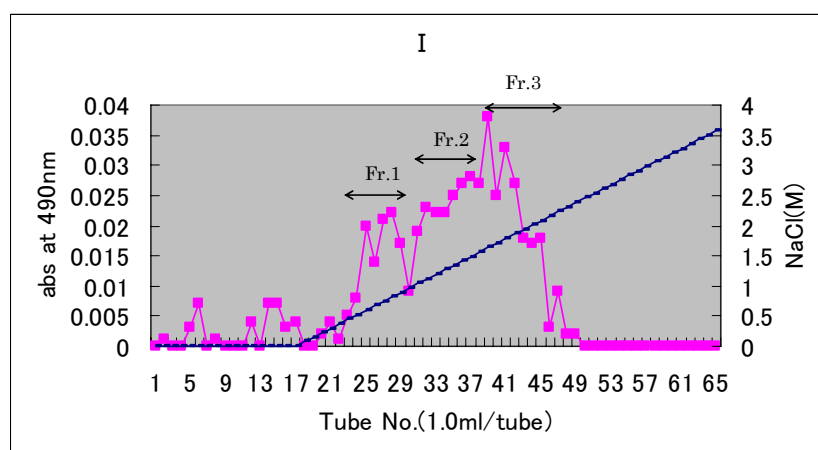


図 6 2月-I グラジエントクロマトチャート

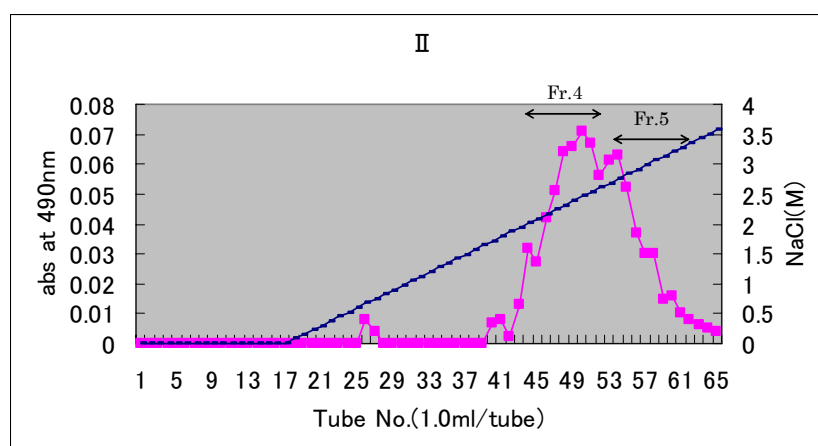


図 7 2月-II グラジエントクロマトチャート

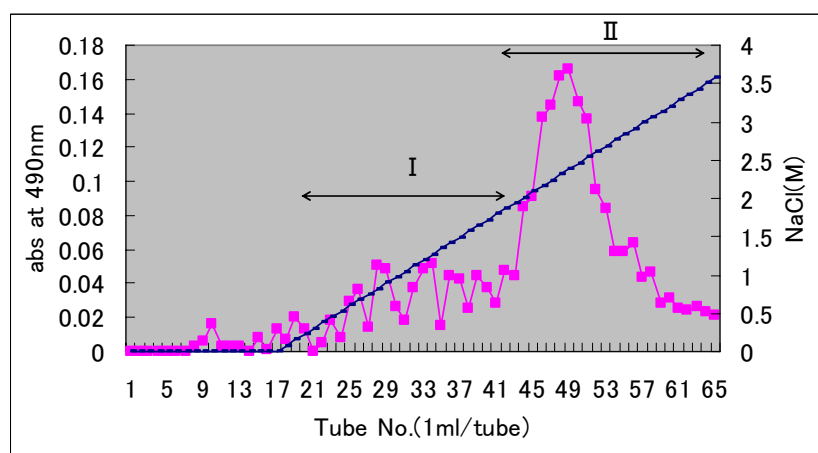


図 8 4月グラジエントクロマトチャート

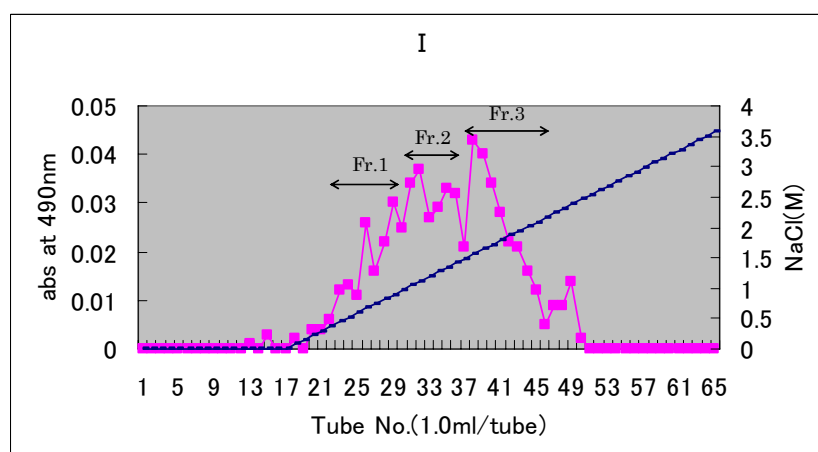


図 9 4月-I グラジエントクロマトチャート

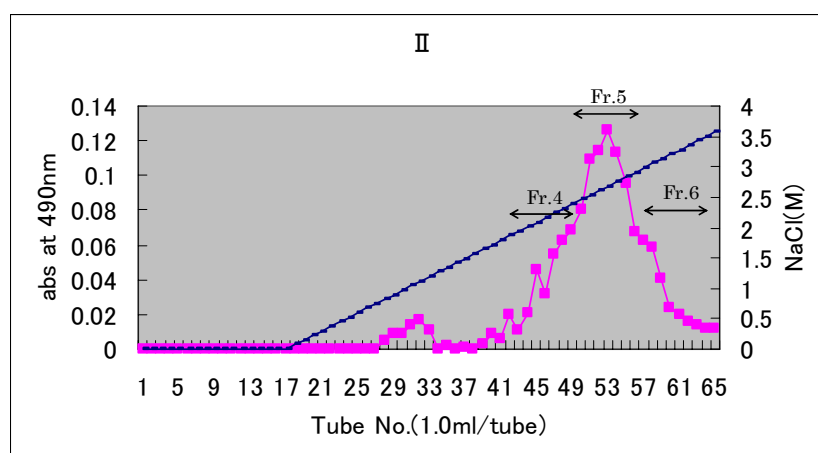


図 10 4月-II グラジエントクロマトチャート

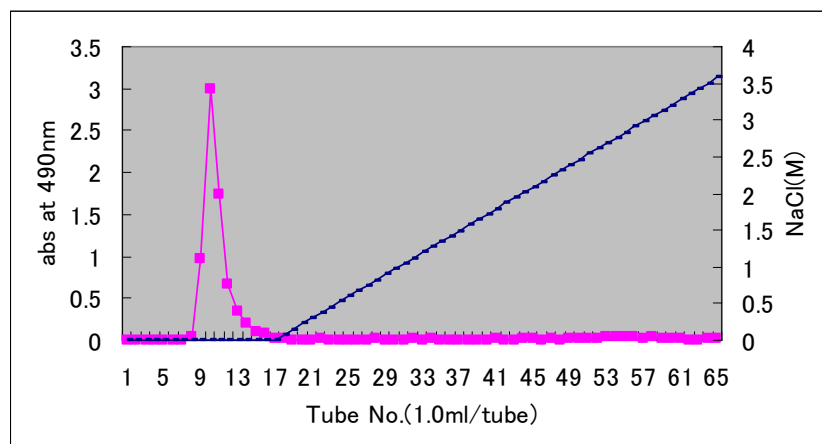


図 11 11 月グラジエントクロマトチャート

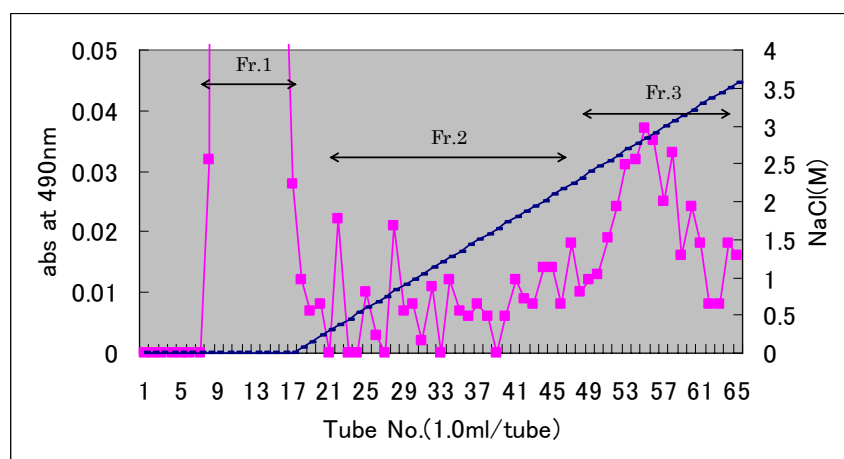


図 12 図 11 のスケール拡大

### 第三項 脱塩方法と構成糖分析

#### 1. 実験材料

第二項の得られた各画分を用いた。

#### 2. 実験方法

##### ・脱塩方法

得られた溶液には高濃度の塩化ナトリウムが含有しているため、脱塩する必要がある。セロハン膜を用いての透析では、ある程度の液量が必要となり、3.5Mと高濃度なため、透析時間が長く、多量の蒸留水を必要とする。そこで、少量の液量でも使用でき、短時間で脱塩、濃縮も可能であるフィルター付き遠心チューブ(MILLIPORE Amicon Ultra 5K NMWL device)を用いた。

##### ・構成糖分析

構成糖分析は前章と同様の方法で行った。

### 3. 実験結果と考察

図6及び7で得られた2月Fr.1~Fr.5、図9及び10で得られた4月Fr.1~Fr.6、図12で得られた11月Fr.1~Fr.3の構成糖分析を行った。その結果を2月は表2、4月は表3、11月は表4に示す。まず、図6の2月Fr.1~Fr.3、図9の4月Fr.1~Fr.3に注目すると、どちらも同じような組成であり、また、それぞれに関しても大きな差がないことから同じ成分であると考えられる。組成についてみると、フコースとキシロース、マンノースが大部分を占め、特にキシロースの割合が多いことがわかる。

また、図7の2月Fr.4~Fr.5、図10の4月Fr.4~Fr.6に注目すると、これらも同じような組成であり、また、それぞれに関しても大きな差がないことから同じ成分であると考えられる。組成についてみると、フコースとガラクトースが大部分を占めている。

これらの結果より、ツルアラメ含有フコイダンの組成を図1、表1を参考に考えると、Ⅱはガラクトースを多く含有していることからG-フコイダン(硫酸化フコガラクトン)の可能性が考えられる。また、Ⅰはフコースの他にキシロースとマンノースを含み、表1に該当するフコイタンはない。西野・名雲<sup>7)</sup>は9種の褐藻類の糖組成を調べているが(表5)、キシロースは1~16%、マンノースは1~9%といずれもⅠより低い割合であった。このことから、ツルアラメにはⅠのようなキシロース・マンノースの割合が多いフコイタンとⅡのようなG-フコイダンの2種類のフコイダンの存在が示唆された。そして、Ⅰはツルアラメ特有のフコイタンであると考えられた。

一方、11月のFr.1~Fr.3に注目すると、Fr.1はグルコースが約99%であり、ラミナランと考えることができる。Fr.2は2月・4月のⅠと、Fr.3はⅡと同じような組成を示した。このことからⅠのようなフコイタン、ⅡのようなG-フコイダンの2種類のフコイダンの存在が示唆された。時期によってラミナラン、そして2種類のフコイダンの経時変化がみられた。

表 2 2月フコイダンの糖組成(図 6,7 参照)

2月		構成糖(%)						
		Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
I	Fr.1	24.6	2.0	3.5	2.5	10.1	39.5	17.8
	Fr.2	15.3	0.9	2.1	3.9	28.2	34.3	15.2
	Fr.3	25.5	0.8	2.8	9.8	4.8	36.3	20.1
II	Fr.4	39.0	0.6	1.1	32.7	5.7	13.8	7.0
	Fr.5	63.7	0.3	0.0	25.7	3.5	4.2	2.6

表 3 4月フコイダンの糖組成(図 9,10 参照)

4月	構成糖(%)							
	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man	
I	Fr.1	29.6	0.8	3.2	2.3	3.4	41.5	19.2
	Fr.2	27.8	0.4	2.9	5.6	2.6	42.3	18.4
	Fr.3	32.7	0.7	2.8	10.9	5.0	30.5	17.4
II	Fr.4	56.4	1.2	1.0	16.6	10.1	10.6	4.1
	Fr.5	69.6	1.8	0.5	18.0	5.4	3.4	1.4
	Fr.6	53.0	0.4	0.8	35.7	1.5	6.4	2.3

表 4 11月フコイダンの糖組成(図 12 参照)

11月	構成糖(%)						
	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man
Fr.1	—	1.1	—	—	98.9	—	—
Fr.2	29.8	1.1	3.5	11.9	17.2	24.8	11.6
Fr.3	54.4	0.8	0.7	31.2	2.0	6.9	4.1

表 5 種々の褐藻由来フコース含有硫酸化多糖画分の糖組成(西野, 名雲)

各種褐藻類	構成糖(%)				
	Fuc	Gal	Glc	Xyl	Man
クロメ(熱水抽出)	70	16	Trace	8	6
クロメ	75	14	—	5	6
カジメ	53	26	Trace	12	9
ナガコンブ	36	62	Trace	1	1
ヒジキ	51	31	Trace	10	8
レソニア	40	45	Trace	9	6
ホンダワラ	42	36	Trace	16	6
ヤツマタモク	48	38	Trace	9	5
ヨレモク	44	36	Trace	12	8
ジョロモク	43	35	Trace	13	9

※第四級アンモニウム塩による抽出



<参考文献>

- 1) 海藻利用の科学. 著者 山田信夫. 成山堂書店. 2000
- 2) 酒井武, 佐川裕章, 加藤郁之進. 機能性食品としてのフコイダン: その構造と生物活性. 日本藻類学会, 51, 19-25 (2003)
- 3) 田幸正邦, 上原めぐみ, 川島由次, 知念功, 本郷富士弥. オキナワモズクからフコイダンの分離・同定. 応用糖質科学, 43, 2, 143-148 (1996)
- 4) 西出英一, 安斎寛, 内田直行. 日本産褐藻類中のフコース含有多糖量について. 日本水産学会誌, 53, 6, 1083-1088 (1987)
- 5) 西出英一, 吉原正美, 加藤正, 箱根保, 鎌田祐, 安斎寛, 内田直行. DEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィーによるラミナランとフコイダンの分別. 日本大学農獣医学部学術研究報告, 51, 103-107 (1994)
- 6) 富士川龍郎, 中島克子. 褐藻におけるフコイダン様多糖の分布. 日本農芸化学会誌, 49, 9, 455-461 (1975)
- 7) 西野貴司, 名雲照一. 種々の褐藻由来フコース含有硫酸化多糖画分の糖組成と抗血液凝固作用. 日本農芸化学会誌, 61, 3, 361-363 (1987)

### ツルアラメの季節変動

ツルアラメの藻体サイズ、ラミナラン、アルギン酸、アミノ酸、ポリフェノールの収穫時期による変化を調べた。

藻体サイズは6月が最大の約60cmとなり、11月が最小の約30cmとなった(第三章 図2)。能登谷<sup>1)</sup>によると、ツルアラメ葉状部の大きさは6月に最大、11月に最小になり、その後再生により次年度の生長が始まるとしている。本研究で用いたツルアラメも同じような傾向を示したが、ばらつきがみられた。この原因としては、ツルアラメを採取するに当たり、多年生であるため生長年度数の見分けがつかず、異なった年度の検体を採取した可能性が考えられた。

ラミナランは8月に最大となり(約200mg/g)、それ以降、減少していった。最も少ないのは3月(約12mg/g)で、16倍の差があった。乾燥重量の1~20%の間で季節による変化がみられた。種類によっても異なるが、ラミナラン含有量は成熟期には20~30%になるという報告もある<sup>2)</sup>ことから、本実験結果においても同様の結果となった。また、葉状部の大きさが最大となった6月が全糖量も最大となったわけではなく、それ以降の8月に全糖量が最大となった。つまり、葉状部の大きさが最大となった6月以降、生長から成熟に変わり、次年度の生長や冬季に備えて貯蔵多糖であるラミナランを作っているのではないかと考えられた。

アルギン酸はアルカリ抽出し、アルギン酸量として算出した。その結果、季節による含有量の変化は少なく、約200~300mg/g、つまり、乾燥重量の20~30%含有されていることがわかった。第三章の表3に褐藻類のアルギン酸含有量を示したが、これと比較してもツルアラメには多くのアルギン酸が含有されており、新たなアルギン酸原料としての可能性が示唆された。

主要アミノ酸はアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸であることがわかった。この中でも特にアラニンの含有量が多く、5月~6月に最大の1200mg/100g、8月~11月に最小となる300mg/100gという値となった。アスパラギン酸、グルタミン酸は季節による変化は少なかった。この結果と藻体サイズ、ラミナランを総合的に考えると、ツルアラメは生長の最大期である5月~6月にアラニンを多量に生成し、8月~11月の成熟期に藻体が最小になり、アラニンも大きく減少し、多量のラミナランを作っている。つまり、アラニンは成熟のために生成され、利用されているのではないかと考えられた。われわれ人間の機能のひとつにグルコース・アラニンサイクルがある。これは筋肉で利用されるグルコースが解糖系を経てピルビン酸を生じ、糖原性アミノ酸であるアラニンを生成する。このアラニンは筋肉から肝臓に移行して糖新生に用いられ、新たにグルコ

ースを生成することで運動時に持続的に糖を供給できる仕組みである<sup>3)</sup>。つまりアラニンからグルコースを生成することができるということである。推論ではあるが、海藻にもアラニンからグルコースを生成する何らかの機能があるのではないだろうか。そのため、成熟期までにアラニンを多量に生成し、貯蔵多糖であるラミナランを生成している間に、グルコースをエネルギー源にするのではなく、アラニンをエネルギー源にしているため、成熟期である8月～11月にアラニンが利用され減少しているのではないかと考えられた。

一方、ツルアラメと市販コンブのグルタミン酸量を比較したところ、ツルアラメはコンブの約1/10となり、コンブのように旨味成分含有海藻としての利用可能性は極めて低いと考えられる。

ポリフェノールは11月に最大(約50mg/g)となり、それ以降減少している。11月が最大となる原因は、8月～11月に成熟し、次年度の生長や匍匐根からの新長のためにエネルギーを蓄えるため、この時期にアワビやウニといった植食動物の摂食から身を守るためにフロロタンニン類といったポリフェノールを生成しているのではないかと考えられた。

### ツルアラメ含有フコイダン

2月採取試料から粗フコイダンを得て、精製するために第四級アンモニウム塩による分画を行った。しかし、フコイダン及び第四級アンモニウム塩複合体が難溶性となり、フコイダンの回収ができなかった。富士川らの研究<sup>4)</sup>により、アラメやオオバモクも難溶性になり、フコイダンの回収ができないと報告されている。本実験において、ツルアラメも第四級アンモニウム塩による分画が適さないことが明らかとなった。次に塩化マグネシウム・エタノール沈殿法を用いてフコイダンの精製を行った。この方法では水溶性アルギン酸を除くことができるが、ラミナランが混在しているため、DEAE-Sephadex A-25によりラミナランとフコイダンを分離した。2月にはラミナランがほとんど含まれていないことがわかった。得られたフコイダン画分において、濃度勾配による溶出を再度行った。これと同じ方法で4月、11月採取のツルアラメからラミナラン、フコイダン画分を得て、それぞれ構成糖分析を行い、比較した。4月は2月同様、ラミナラン画分においてピークがみられなかったが、11月はほぼラミナラン画分であった。構成糖をみても99%グルコースであり、ラミナランと判断するに至った。フコイダン画分については、大きく2つのピークに分けることができた。1つ目のピークの構成糖をみると、フコースとキシロース、マンノースが大部分を占め、特にキシロースの割合が多かった。2つ目のピークの構成糖をみると、フコースとガラクトースが大部分を占めた。この結果より、明らかに組成の異なる2つのフコイダンの存在が確認された。第五章の図1及び表1を参考にす

ると、2 つ目のピークはガラクトースを多く含有していることから G-フコイダンの可能性が考えられた。一方、1 つ目のピークと同じような組成のフコイダンは表 1 にはなく、西野・名雲<sup>5)</sup>が調べた(表 5)9 種の褐藻類のフコイダンとも類似のものはなかった。つまり、ツルアラメ特有のフコイダンである可能性が示唆された。ツルアラメにはキシロース・マンノースの割合が多いフコイダンと G-フコイダンの 2 つのフコイダンの存在が確認された。

ツルアラメは雑海藻として扱われ、あまり利用されていないのが現状である。本実験により、ツルアラメの独特のえぐみはポリフェノールが影響していると考えられ、また、うま味成分であるグルタミン酸量が非常に少ないことから、ツルアラメは食用としての利用は難しいと考えられた。しかし、ラミナランが多量に含まれる時期の特定や新たなアルギン酸原料としての利用可能性を見いだすことができた。また、現在注目され、多くの研究がなされているフコイダンについても、ツルアラメ特有の構造を持つフコイダンの存在が示唆された。この機能性については本実験において検証しなかったが、これまでの研究結果<sup>6)</sup>により、水溶性画分にヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用を有することが明らかとなっている。つまり、ツルアラメ特有の構造を持つフコイダンもヒト大腸ガン培養細胞増殖抑制作用を有する可能性は十分に考えられる。また、新しい機能性を見いだすことができれば、他のフコイダンとの差別化も図れ、ツルアラメの有効活用、そして地域の活性化にもつながるだろう。今後、より詳細な構造解析や生理機能の検証は必要になるが、ツルアラメの機能性食品や医薬品としての利用が大いに期待される。

本実験において、2008 年 3 月～2009 年 2 月までのツルアラメを利用してきたが、ツルアラメも生物であるため、毎年同じような結果が出るとは限らない。その年の気候、気温、海流などの影響により変動する可能性は大いに考えられる。しかしながら、ツルアラメに関する知見は非常に少ないため、この研究が今後のツルアラメの研究に活かされ、ツルアラメの有効利用の実現につながることを期待したい。

<参考文献>

- 1) 能登谷正浩. 青森県沿岸のツルアラメ. 日本水産学会誌,61,1,105-106(1995)
- 2) 海藻利用の科学. 著者 山田信夫. 成山堂書店. 2000
- 3) 馬渡一徳. シリーズ”アミノ酸”No.15 アミノ酸の生理機能. Ajico News 食と健康の情報誌,206(2002)
- 4) 富士川龍郎, 中島克子. 褐藻におけるフコイダン様多糖の分布. 日本農芸化学会誌,49,9,455-461(1975)
- 5) 西野貴司, 名雲照一. 種々の褐藻由来フコース含有硫酸化多糖画分の糖組成と抗血液凝固作用. 日本農芸化学会誌,61,3,361-363(1987)
- 6) 楊俊革. ツルアラメ水溶性糖質の生理機能に関する研究. 平成 20 年度修士論文