

アサクサノリ・ペクチン質の酸性抽出と  
カラムクロマトグラフィについて

Acid Extraction and Column Chromatography of  
Pectic Substances from Laver, *Porphyra tenera*

大 山 重 信・中 村 希求子

Shigenobu Ooyama and Kikuko Nakamura

(Received September 14, 1984)

In the previous paper, the authors tried to fractionate the pectic substances from laver, *Porphyra tenera*, into three fractions (water-soluble, sodium hexametaphosphate-soluble, and hydrochloric acid-soluble). But, in this paper, the extraction of the whole pectic substances in a lot was done under acidic condition (Scheme 1). It was found that the amount of the pectic substances prepared according to Scheme 1 was 2.18 mg (galacturonic acid eq.)/g fresh matter.

The pectic substances from laver was, then, submitted to gel filtration on a column of Sephadex G-200. But, the filtration was not successful (Fig. 1). On the other hand, column chromatography on DEAE-cellulose (DE52) proved to be effective. It gave four peaks clearly (Fig. 2).

緒 言

前報<sup>1)</sup>において筆者らは、アサクサノリからペクチン質を三区分（水可溶性、ヘキサメタリン酸可溶性、塩酸可溶性）に分けて抽出することを検討した結果、各区分の抽出される模様は陸上植物とかなり相違しており、海藻の場合は陸上植物のように必ずしも簡単でないことを知った。そのため、分画抽出法ではなく、酸性において一括して抽出する方法を検討して海藻の場合に適合するようにした。そして、得られたペクチン質の量を測定した。また、得られたものが単一成分であるかどうかを確かめるため、カラムクロマトグラフィを行ってみた。本報ではこれらのことについて述べることにする。

## 実験方法

### 1. 試料

試料として用いたアサクサノリ, *Prophyra tenera*, は鹿児島県出水市福之江の海岸でノリ養殖業者から分譲を受けたものである。このノリを人工海水で洗って水切りし、汙紙にはさんで押さえ藻体に付着している水分をできる限り除いてから、十分量の液体窒素を加えて急速凍結した。その後、乾燥を防ぐためポリエチレン袋に入れ、さらにガラス容器に入れて、 $-25\sim-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。これを必要に応じて取り出し、乳鉢に入れ、液体窒素を加えながら乳棒ですりつぶして粉末状にした。

### 2. アルコールによる前処理

粉末状にしたアサクサノリ 8g に70%エタノール 160 mlを加え、 $50^{\circ}\text{C}$ の水浴に浸して30分間スターラーで攪拌した後、11,000rpmで遠沈（以上、遠沈はすべて11,000rpmで行った）し、上澄液を除いた。この上澄液のモーリッシュ反応が陰性となるまで70%エタノールによる処理をくり返してアルコール可溶の糖や脂質を除いた。その後、無水エタノールで2回、エーテルで1回洗い、一夜室温に放置してエーテルを除いた。

### 3. ペクチン質の酸性抽出

前記のようにアルコールによる前処理をして得られたものに水40mlを加え、テフロン・ホモジナイザーで20回 up-and-down 処理してフラスコへ移し、希塩酸を用いて pH 2.8—3.0に調整した。それから、 $65\sim68^{\circ}\text{C}$ の水浴中で加温しながら90分間攪拌して遠沈し、上澄液をとった。このpH 2.8—3.0での抽出をもう1回繰り返した後、残渣を $65^{\circ}\text{C}$ 程度の熱水で洗い、洗浄液は抽出液に合わせて汙過した。汙過のpHを4に上げ、エバポレーターで外水温を $65^{\circ}\text{C}$ として約1/10容に濃縮してから、70%濃度になるようエタノールを加え、一夜放置して遠沈し、沈澱物を集めた。得られた沈澱物を70%エタノールで洗って少量の水に溶解し、凍結乾燥してから、もう一度少量の水を加え、加温して溶解した後、氷水でしばらく冷却してから遠沈した。上澄液をとり、東洋ガラス・ファイバー汙紙GA100で汙過し、汙液を凍結乾燥した (Scheme 1)。

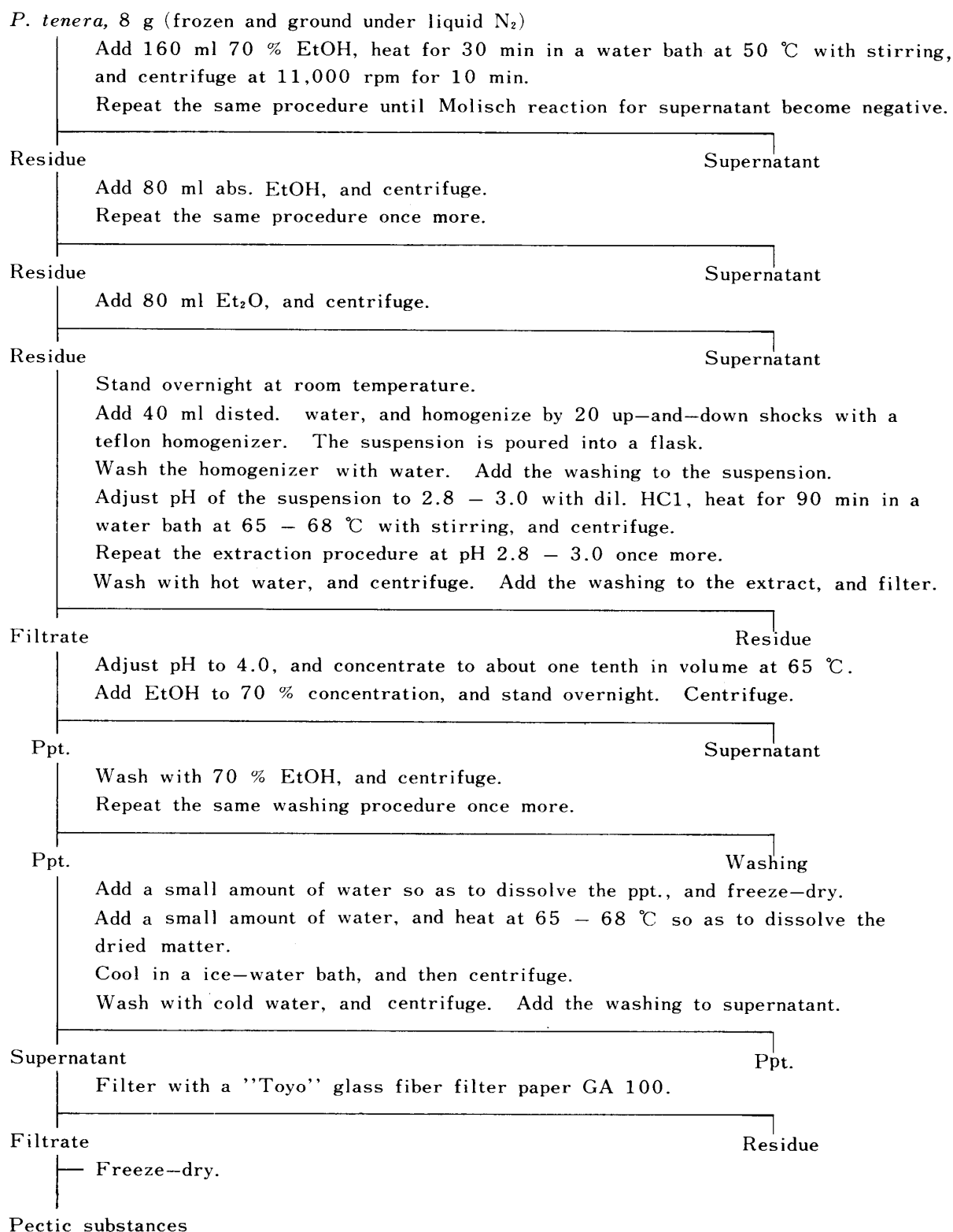
### 4. Sephadex G-200によるゲル汙過

直径1.6cm、高さ27cmに Sephadex G-200 を充填し、室温において0.1M塩化ナトリウム溶液で溶出した。

### 5. DEAE—セルロース (DE52) によるカラムクロマトグラフィ

直径 2.4cm、高さ15.5cmに DEAE—セルロースを充填し、溶出剤として0.2M, 0.4M, 0.6 Mの燐酸一ナトリウム溶液および0.8M塩化ナトリウム溶液を用い、室温で stepwise に溶出し

Scheme I The preparation of pectic substances from *Porphyra tenera*.



た。

#### 6. フェノール硫酸法による糖量の測定<sup>2)</sup>

糖を含む試料液 2 ml に 3% フェノール溶液 0.5 ml を混合し、次いで濃硫酸 5 ml を速やかに加え直ちに混和し 30 分間放置した。その後、流水中で冷却し 485 nm における吸光度を測定した。

#### 7. カルバゾール・硫酸法によるウロン酸の定量<sup>3)</sup>

試料液 2 ml に 0.15N 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を加え混和して 15 分間放置した後、この 1 ml をとり 0.1% カルバゾール・アルコール溶液 0.5 ml を加えた。次いで濃硫酸 6 ml をすばやく加えて混合し、室温に約 30 分間放置した後 520 nm における吸光度を測定した。検量線はガラクトン酸 ( $C_6H_{10}O_7 \cdot H_2O$ , 半井化学薬品 K.K. 製) を用いて作製した。

### 結果および考察

Scheme 1 はペクチン質を酸性において抽出する川端らの方法<sup>4)</sup>を検討して筆者らの目的に合うように定めた方法を示すものである。すなわち pH を 2.8—3.0 にして加温抽出することを 2 回くり返すと、ペクチン質はほとんどすべてが抽出された。しかし、この抽出液からアルコール沈澱により得られたものは、温水に溶解して室温に放置すると寒天状の浮遊物を生じ、後述のカラムクロマトグラフィの障害となった。そのため、温水に溶解したものを氷水で冷却し、浮遊物を生じさせた後に遠沈して浮遊物を除くこととした。このようにすると、室温に放置しても浮遊物を生ずることはない。

Scheme 1 に従って調製したペクチン質の量は生鮮藻体 1 g 当たりガラクトン酸相当量として 2.18 mg であった。

次いで筆者らは、Scheme 1 に従って得られたものが単一成分であるかどうかを確かめるためカラムクロマトグラフィを行った。

植物のペクチン質のゲル濾過に Sephadex G-200 を用いてよい結果が得られていること<sup>5-7)</sup>を参考にし、筆者らも先ずこのゲルを用いてみた。アサクサノリ 1 g 相当量 (生鮮物) から得られたペクチン質を、Sephadex G-200 のカラムに添加して 0.1M 塩化ナトリウム溶液で溶出し、溶出液を 7.5 ml ずつ分取した時の溶出図は Fig. 1 のようになった。糖とウロン酸を測定した時の吸光度のピークは、何れも 3 本目のフラクションにあり、添加した試料はカラムを素通りしたのではないかと思われるので、ゲルの充填量を増加してみたが結果は必ずしもよいとは思われなかった。そこで、ゲルの種類を変え、Bio-Gel A-15m (100—200 mesh) を用いてみたが、やはり Sephadex G-200 の場合と同様な溶出パターンを示したので、再度充填剤を変え、DEAE-セルロース (DE52) を用いてクロマトグラフィを行ってみた。DEAE-セルロースカラムで分画すると、溶出されるペクチンのメトキシル基含量と溶出剤の燐酸一ナトリ

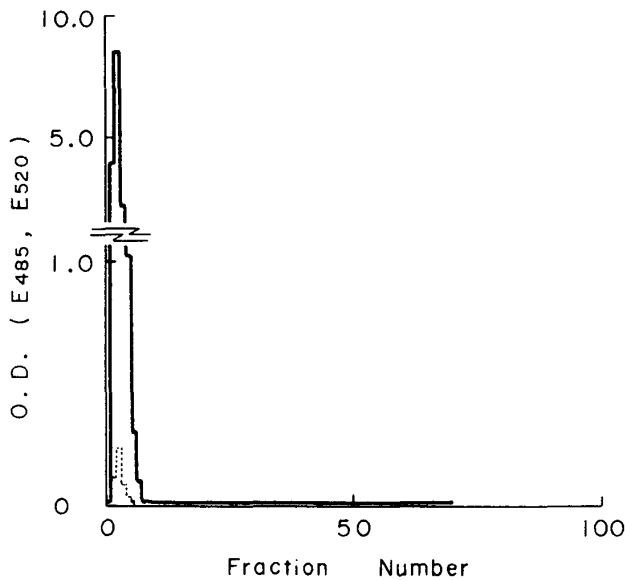


Fig. 1 Gel filtration of pectic substances extracted from laver, *Porphyra tenera*, through Sephadex G-200.

Solid line shows  $E_{485}$  for sugar by phenol-sulfuric acid reaction and dotted line indicates  $E_{520}$  for uronic acid by carbazole-sulfuric acid reaction.

Column size : 1.6 $\phi$  x 27 cm. Eluent : 0.1 M NaCl.

Volume of one fraction : 7.5 ml.

ウムの濃度とは逆の関係にあるという。<sup>8)</sup> Fig. 2 はアサクサノリ2g 相当量のペクチン質を DEAE-セルロースカラムに吸着させて、溶出剤として燐酸一ナトリウム溶液と塩化ナトリウム溶液とを用い、stepwise に溶出し、溶出液を14.5ml ずつ分取した時の溶出図である。図に見られるように4個のピークに完全に分離された。糖量の回収率は99%であった。溶出されたもののうち9.8%が1番目のピーク、27.8%が2番目のピーク、16.7%が3番目のピーク、46.2%が4番目のピークに存在しており、4番目のピークが最も大きかった。

今後はこれらのピークごとにウロン酸とメトキシル基の割合や、構成糖の種類などを調べることにしたい。

(本研究は昭和57年度日本家政学会九州支部大会で発表した。)

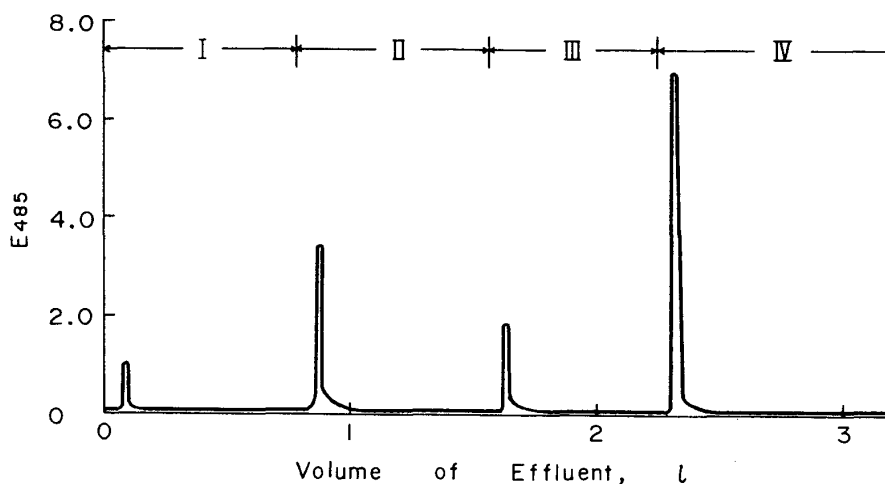


Fig. 2 Ion exchange chromatogram for pectic substances extracted from laver, *Porphyra tenera*.

Exchanger : DEAE cellulose (DE 52). Column size : 2.4 $\phi$  x 15.5 cm.  
Flow rate : 0.27 ml/min. Volume of one fraction : 14.5 ml.  
Eluents : I ; 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . II ; 0.4 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .  
III ; 0.6 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . IV ; 0.8 M NaCl.  
Sugar ( $E_{485}$ ) was determined by phenol-sulfuric acid reaction.

文 献

- 1) 大山重信, 中村希求子: 鹿児島県立短大記要 (自然科学篇)., 印刷中。
- 2) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamiltom, P. A. Robers and F. Smith : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 3) J. H. Dietz and A. H. Rouse : *Food Res.*, **18**, 169—177 (1953).
- 4) 川端晶子, 沢山茂: 栄養と食糧, **28**, 395—402 (1975)。
- 5) A. Kawabata : *Mem. Tokyo Univ. Agr.*, **XIX**, 115—200 (1977).
- 6) 飯野久栄, 小曾戸和夫: 日本食品工業学会誌, **27**, 350—356 (1977)。
- 7) 東野哲三, 藤田修三: 佐大農彙報., **49**, 17—25 (1980)。
- 8) C. J. B. Smith and E. F. Bryant : *J. Food Sci.*, **32**, 197—199 (1967).