

# アサクサノリのペクチン質について (1) —— 構成糖の種類 ——

## Pectic Substances from Laver, *Porphyra tenera* (1) Qualitative Analysis of Constituent Sugar

大山 重信・中村希求子

Shigenobu Ooyama and Kikuko Nakamura

(Received September 1, 1986)

Pectic substances which were prepared from laver, *Porphyra tenera*, were submitted to column chromatography on DEAE cellulose according to the previously reported procedure<sup>1)</sup>, and four peaks were observed. The effluent of the four peaks in chromatogram was dialyzed and freeze-dried, respectively. The obtained each material was acid-hydrolyzed, the resulting each hydrolyzate was then analyzed with a HPLC.

Arabinose, galactose and glucose were detected as the constituent sugars in the each hydrolyzate of all peaks. Xylose was detected very slightly in the hydrolyzates of two peaks.

The major peak in HPLC chromatogram was galactose, the next was arabinose, and then glucose.

<sup>1)</sup> 前報において筆者らは、アサクサノリのペクチン質を酸性下で一括抽出する方法を検討し、抽出方法を海藻の場合に適合するようにした。また、得られたペクチン質について、DEAE-セルロース (DE 52) を用いるカラムクロマトグラフィを行い、ペクチン質が4個のピークに分画されることを確かめた。本報では、これら4個のピークに含まれているペクチン質それぞれについて、酸分解した後、高速液体クロマトグラフィを行い、構成糖の種類を調べた結果を報告する。陸上植物より得られたペクチン質の構成糖については幾つかの報告がみられるが、海藻類から得られたものについての報告は少なく、数種の海藻の細胞壁から得られた水可溶性区分、ヘミセルロース区分などを酸分解し、ペーパークロマトグラフィにより数種の構成糖を検出した報告<sup>2)</sup>がある程度のものである。

## 実験方法

### 1. 試料

アサクサノリ, *Porphyra 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。このノリを直ちに実験室へ持ち帰り、人工海水で洗い、ろ紙でよく押さえて藻体に付着

している水分をできる限り除いた。その後、ビーカーに入れ、十分量の液体窒素を加え、急速に凍結してからポリエチレン袋に入れ、さらにこれをガラス密閉容器中に入れて、 $-25^{\circ}$   $\sim$   $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。この藻体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鉢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 160ml を加え、 $50^{\circ}\text{C}$  の水浴に浸して 30分間スターラーで攪はんしてから 11,000rpm で遠沈し、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上記のような 70% エタノールによる処理をくり返し、アルコール可溶の糖を除いた。その後、無水アルコールで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. ペクチン質の抽出

アルコールによる前処理をしたものから前報<sup>1)</sup>に記載したようにしてペクチン質を抽出した。すなわち、水 40ml を加え、テフロン・ホモジナイザーで up-and-down 処理してフラスコへ移し希塩酸を用いて pH 2.8 $\sim$ 3.0 に調節した。これを  $65\sim 68^{\circ}\text{C}$  の水浴中で 90分間攪はんして遠沈し、上澄液をとった。このような pH 2.8 $\sim$ 3.0 における抽出をもう1回行った後、残さを熱水で洗い洗浄液は先の上澄液に合わせてろ過した。このろ液の pH を 4 に上げ、エバポレーターで外水温を  $65^{\circ}\text{C}$  にして約 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、しばらく氷水に浸して冷却してから遠沈した。上澄液をとり、東洋ガラス・ファイバーろ紙 GA 100 でろ過し、ろ液を凍結乾燥した。

## 4. DEAE-セルロース (DE 52) によるカラムクロマトグラフィ

カラムにDEAE-セルロースを充填 (内径 2.4cm, 高さ 15.5cm) し、溶出剤として0.2M, 0.4M, 0.6Mの磷酸一ナトリウム溶液および 0.8M塩化ナトリウム溶液を記載の順序に用いて室温でstepwiseに溶出し、溶出液をフラクション・コレクターで分取した。

## 5. 透析による脱塩

DEAE-セルロースによるクロマトグラフィを行い、得られた分画の溶出液はピーク毎に集めて Visking Cellulose Tubing 24/32 (Union Carbide Corp. 製) に入れ、 $4^{\circ}\text{C}$  で蒸留水に対して一夜透析し、脱塩してから凍結乾燥した。

## 6. ペクチン質の酸分解

脱塩して凍結乾燥したものに塩酸 2ml を加えて封管し、 $110^{\circ}\text{C}$  で加水分解後減圧乾固した。

次に蒸留水 1ml を加えて溶解し、これを高速液体クロマトにかけた。

## 7. 高速液体クロマトグラフィ

- (1) 装置： 日立製高速液体クロマトグラフ 655A 型，カラムは日立ゲル 3013-N を充填したカラム（サイズ：4.6mm $\phi$  ×150mm）を用いた。
- (2) 溶出： 溶出液としてはホウ酸緩衝液を用い，圧力 30kg/cm<sup>2</sup>，温度 60℃，溶出速度 0.4 または 0.5ml/min. で溶出した。
- (3) 検出法： 溶出された糖の検出は日立製UVモニターを用い 277nm で検出し，レコーダーに記録させた。

## 8. 糖の同定法

同定は HPLCクロマトグラムにおける保持時間を標品の場合と比較して行った。

# 結果 および 考察

## 1. ペクチン質の抽出とDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィ

アサクサノリからペクチン質を抽出し，生鮮物 4g 相当量について DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィを行い，前報<sup>1)</sup>に示したような4個のピーク，すなわち，ピーク1, 2, 3および4が得られた。これら4個のピークについてそれぞれのピーク毎に溶出液を集め，透析により脱塩して凍結乾燥した。

## 2. 酸分解条件の検討

上記のようにして得られたピーク1の凍結乾燥物の一定量，28.8mg，に対し，2N，4Nまたは6Nの塩酸を2ml 加え，110℃ で3時間加水分解した後減圧乾固した。それぞれに蒸留水1mlを加えて溶解してから 10 $\mu$ l をとって高速液体クロマトグラフィにより分析し，糖のピークの現われ方をみた。

Fig.1-Aは，塩酸による加水分解を行わずに蒸留水を加えて試料を溶解したものについてのクロマトグラムであり，Fig.1-B，-C，-Dは加える塩酸の濃度を変えて加水分解した場合のクロマトグラムである。それぞれに最も明瞭に現われたピークの溶出位置はガラクトース標品の溶出位置と一致しているので，このピークはガラクトースと判定した。このガラクトースのピークの高さが最も高いのは2N塩酸で酸分解した場合であるので，酸分解には2N塩酸を用いることにした。

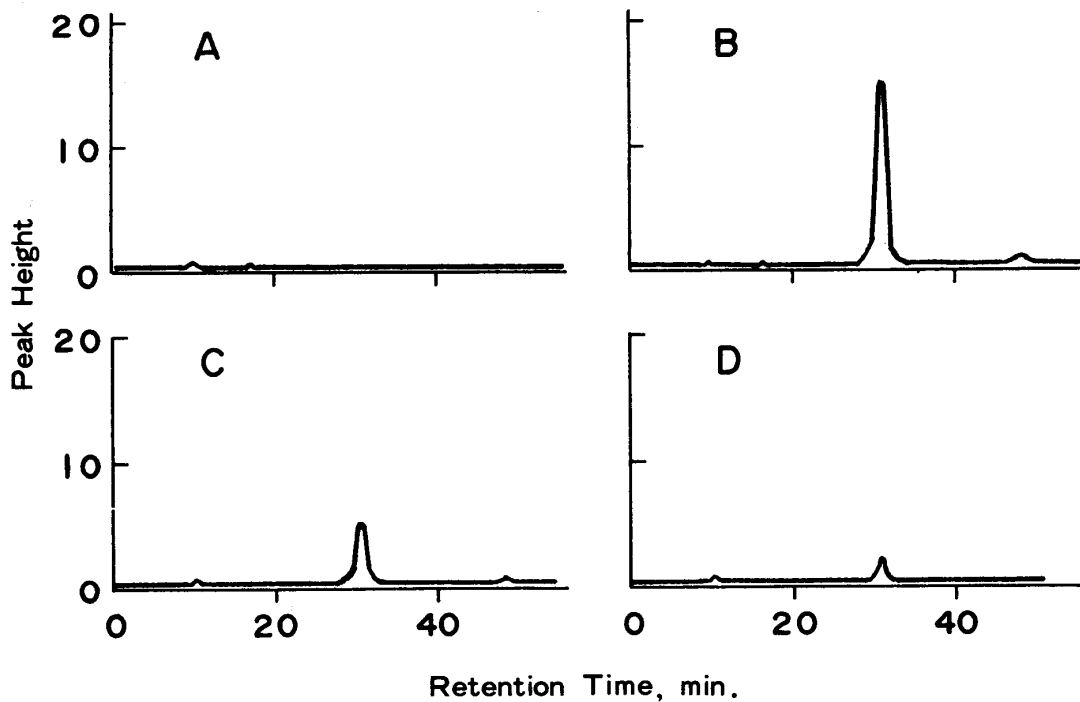


Fig. 1. Changes in HPLC pattern before and after hydrolysis of the pectic substances of peak 1\* by hydrochloric acid.

\*; see text. See the previous paper<sup>1)</sup> for a chromatographic pattern.

Pectic substances weighing 28.8 mg was used for each hydrolysis.

Acid-hydrolysis was made for 3 hrs at 110°C with 2 ml of HCl ranging in concentration from 2N to 6N. The resulting hydrolyzate was evaporated to dryness under reduced pressuer, and dissolved in 1 ml of water.

10  $\mu$ l of the solution was analyzed with a HPLC. The big peaks in figure B, C and D were identified as galactose.

A ; no acid-hydrolysis.

B ; hydrolyzed with 2N HCl.

C ; hydrolyzed with 4N HCl.

D ; hydrolyzed with 6N HCl.

Instrument ; Hitachi HPLC 655A.

Packing material ; Hitachi gel 3013-N.

Column size ; 4.6 mm $\phi$  x 150mm.

Eluent ; Borate buffer.

Flow rate ; 0.4ml/min.

Press ; 30kg/cm<sup>2</sup>.

Temperature ; 60°C.

Detector ; UV 277 nm.

Range ; 0.16 AUFS.

Chart speed ; 2.5mm/min.

(AUFS ; Absorbance Unit of Full Scale)

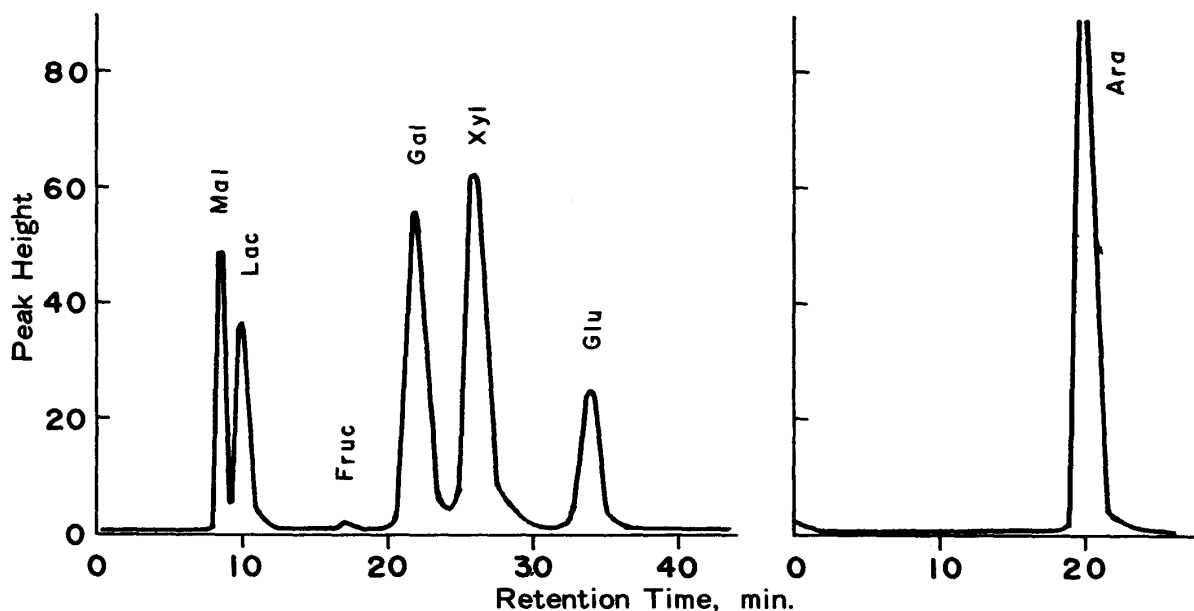


Fig. 2. HPLC patterns of standard sugars.

Mal ; Maltose.

Lac ; Lactose.

Fruc ; Fructose

Gal ; Galactose

Xyl ; Xylose.

Glu ; Glucose.

Ara ; Arabinose.

Instrument ; Hitachi HPLC 655A.

Packing material ; Hitachi gel 3013-N.

Column size ; 4.6 mm $\phi$  x 150mm.

Eluent ; Borate buffer.

Flow rate ; 0.5ml/min.

Press ; 30 Kg/cm<sup>2</sup>.

Temperature ; 60 $^{\circ}$ C.

Detector ; UV 277nm.

Range ; 0.32 AUFS.

Chart speed ; 2.5mm/min.

### 3. 糖標品の高圧液体クロマトグラフィ

Fig.2 の左側の図は標品として、フラクトース、ガラクトース、キシロース、グルコース、マルトース、ラクトースを含む混合溶液のクロマトグラムであり、右側の図はアラビノース標品についてのクロマトグラムである。図に見られるように各糖ともよく分離された。

### 4. 高圧液体クロマトグラフィによる構成糖の検出

前述の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィにおいて得られた4個のピーク・すなわち、ピーク1, 2, 3, 4 の溶出液をそれぞれ集めて透析後に凍結乾燥させた。この試料から 23~29mg をとって酸分解し、1ml の蒸留水に溶解し、5 $\mu$ l または 10 $\mu$ l を高速液体クロマトにかけた時のクロマトグラムをFig.3, 4, 5, 6 に示すとともに、保持時間から同定した糖名をも表示した。

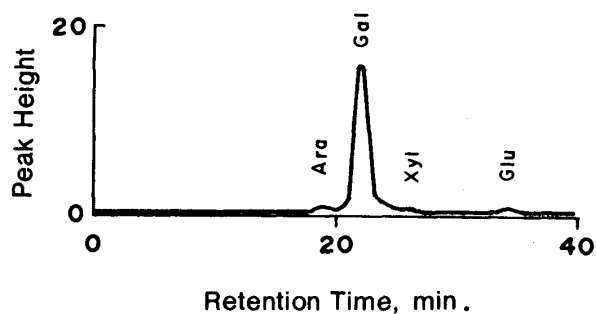


Fig. 3. HPLC chromatogram<sup>\*1</sup> of the hydrolyzate<sup>\*2</sup> of peak 1<sup>\*3</sup>.

\* 1 HPLC chromatography ; refer to the footnote of fig. 2 .

Volume injected into the chromatograph ; 5  $\mu$ l.

\* 2 Condition of acid-hydrolysis ; see the footnote of fig. 2 .

23 mg of freeze-dried matter was acid-hydrolyzed.

\* 3 Peak 1 ; see text. See the previous paper<sup>1)</sup> for a chromatographic pattern.

Ara ; Arabinose. Gal ; Galactose. Xyl ; Xylose Glu ; Glucose.

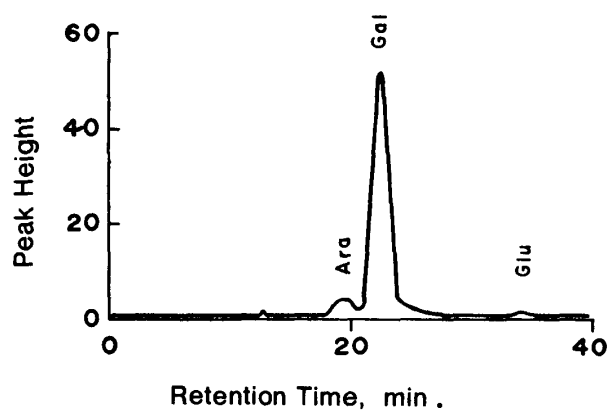


Fig. 4. HPLC chromatogram of the hydrolyzate of peak 2.

29 mg of freeze-dried matter was acid-hydrolyzed.

Volume injected into the chromatograph ; 10  $\mu$ l.

Conditions except above mentioned items ; refer to the footnote of fig. 3 .

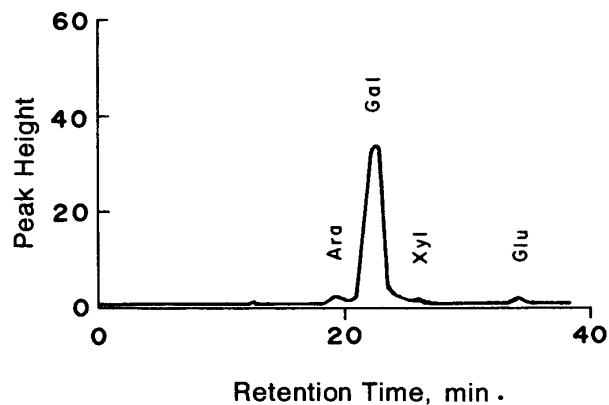


Fig. 5. HPLC chromatogram of the hydrolyzate of peak 3.  
27.4 mg of freeze-dried matter was acid-hydrolyzed.  
Volume injected into the chromatograph ; 5  $\mu$ l.  
Conditions except above mentioned items ; refer to the footnote of fig. 3.

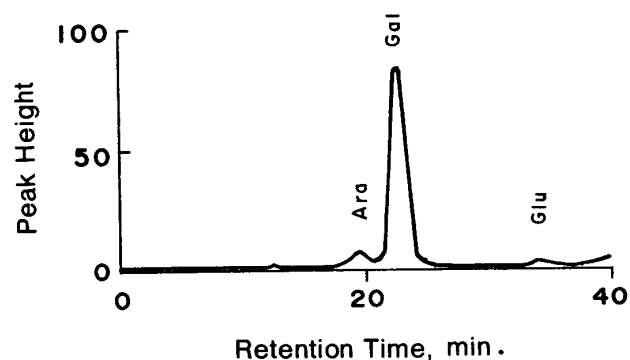


Fig. 6. HPLC chromatogram of the hydrolyzate of peak 4.  
25.5 mg of freeze-dried matter was acid-hydrolyzed.  
Volume injected into the chromatograph ; 5  $\mu$ l.  
Conditions except above mentioned items ; refer to the footnote of fig. 3.

ピーク1(Fig.3) についてはアラビノース, ガラクトース, キシロース, グルコース,  
ピーク2(Fig.4) にはアラビノース, ガラクトース, グルコース,  
ピーク3(Fig.5) にはアラビノース, ガラクトース, キシロース, グルコース,  
ピーク4(Fig.6) にはアラビノース, ガラクトース, グルコース, がそれぞれ構成糖として検出  
された。

アラビノース, ガラクトース, グルコースはどのピークにも共通して検出され, 中でもガラクトースは, 他のいずれの糖よりも遙かに大きなピークとして検出された。ガラクトースに次いでアラビノースが比較的明瞭に検出された。キシロースはピーク1と3に極めて僅かに痕跡程度検出されたに過ぎなかった。

Cronshaw<sup>2)</sup>らは *Porphyra sp.* の水可溶区分 (ペクチン相当の区分) の構成糖をペーパークロマトで調べ, ガラクトースを最も強く検出しているのがアラビノースについては記載がない。

川端<sup>4,5)</sup>らは市販ペクチンを構成する中性糖の分析を行った結果, いずれのペクチンも, ガラクトースの含量が高く, つづいてアラビノース, ラムノースが含まれ, キシロースは僅少であったと報告している。

Gonzalez-Charrire<sup>3)</sup>らは, 一般にペクチン物質を構成する中性の主要な糖分はアラビノースとガラクトースであり, その他僅かに含まれる糖分はキシロース, ラムノースとグルコースであるとしている。

筆者らは本実験においてはラムノースを標品中に加えなかったため, HPLC分析においてその存在を確認することはできなかったが, 構成糖の種類傾向としては, アサクサノリの場合も Gonzalez-Charrire などが述べる所と略一致しているようであった。ガラクトースのピークが顕著で, この糖の含量が多いと判断される点では市販ペクチン<sup>4,5)</sup>の場合と同様であった。

本報においては, アサクサノリから調製したペクチン質の構成糖について定性的に述べるに止めるが, 定量的なことは現在検討中であるので, 次の機会に報告することにしたい。

## 謝 辞

HPLC分析には, 日立製作所那珂工場応用技術センターのご協力をいただいた。記載して心から深く謝意を表す。

## 文 献

- 1) 大山 重信, 中村希求子: 鹿児島県立短大紀要 (自然科学篇) . . 35, 39—44 (1984)
- 2) J. Cronshaw, A. Myers and R. D. Preston: *Biochimica et Biophysica Acta*, 27, 89—103 (1958)
- 3) R. Gonzalez-Charriere and R. Petit (大沢 勲訳): 食品工業 8 下—1974, 90—96 (1974)
- 4) A. Kawabata: *Mem. Tokyo Univ. Agric.*, XIX, 115—200 (1977)
- 5) 川端 晶子, 沢山 茂: 栄養と食糧, 28, 395—402 (1975)