

未利用食品資源の有効利用に関する研究

- アンスロン-硫酸法の応用によるポルフィランの構成糖分析 -

食品工業部

柘植圭介, 吉村臣史, 服部新, 小金丸和義

財団法人佐賀県地域産業支援センター

吉木 政弘

株式会社戸上電機製作所

阿部真一, 西野志津男, 實松正剛

アンスロン-硫酸法に基づく3,6-アンヒドロガラクトース(3,6-AnGal)の選択的定量法を確立し,ノリ由来多糖ポルフィラン(Porphyrin; POR)の構成糖分析に応用した。本法は, PORを構成するガラクトース(Gal)および3,6-AnGalに対するアンスロン-硫酸反応生成物の呈色強度が,反応条件により異なることに基づいている。Galおよび3,6-AnGalの呈色強度に及ぼす反応条件の影響を調べた結果,反応温度35~50°Cで3,6-AnGalのみがほぼ選択的に呈色することを見出した。そこで,品種の異なるノリから得られた12点のPORを用いて【反応温度/時間=45°C/15分】における3,6-AnGalの定量性を評価したところ,従来法である還元加水分解-HPLC法と高い相関関係を示していた。また,本法と,標準的な反応条件である【反応温度/時間=100°C/7分】とを併用させることにより,全糖の定量における精度向上が達成された。本法は,HPLC等を用いた構成糖分析法に比して簡便で,経済性にも優れることから,ノリからのPOR生産における品質管理やPORの構造/機能相関研究において有効な構造把握の手段になり得ると考えられた。

1. はじめに

ポルフィラン(Porphyrin; POR)は紅藻類アマノリ属の細胞間を満たす粘質多糖¹⁾であり,有明海の重要な水産資源であるスサビノリ(ノリ)に含まれている。近年,PORの摂取による脂質代謝改善^{2),3)},腸管免疫賦活⁴⁾,抗腫瘍効果^{5),6)}などの健康維持機能(生理機能)が報告され,機能性食品の素材として期待されている。佐賀県ではPORの機能性に着目し,未利用ノリの有効活用を目的としたPORの産業利用に関する産学官連携研究を進めている。

PORの基本骨格はD-ガラクトース(Gal)と3,6アンヒドロ-L-ガラクトース(3,6-AnGal)が交互に反復結合した構造で(図1),分子量は10万以上と見積もられている。テングサ等から抽出されるアガロースに類似しているが,分子内の3,6-AnGalがL-ガラクトース-6-硫酸(Gal-6-sulfate)で多数置換されている点でアガロースとは異なっている。Gal-6-sulfateの置換率,すなわち硫酸化の度合いは原料ノリの栽培海域や採取時期,栽培方法等によって大きく異なっており,収穫時期が遅くなるにつれ,含まれるPORのGal-6-sulfate置換率が低下し,3,6-AnGalの比率が上昇

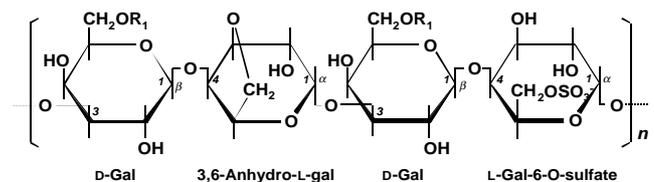


図1 PORの基本骨格

することが報告されている⁷⁾。

このようなPORの糖組成の不均一性は,物性や生理機能にも影響を及ぼす。PORの糖組成の変化と脂質吸収抑制効果や腸管免疫賦活効果などの生理作用との間に関連があることが,これまでの研究により指摘されている^{3),4)}。また,原料であるノリの産地や収穫時期によって抽出されるPORの物性が異なることから,糖組成の違いが物性にも影響を及ぼしていることが予想される。したがって,PORの製品としての品質管理や工程管理,あるいは構造/機能相関の把握といった観点から,PORの糖組成を迅速に定量することが重要である。

多糖類の糖組成を調べる手段として、ガスクロマトグラフィー (GLC)⁸⁾⁹⁾ や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)¹⁰⁾ による手法が確立されている。しかしながらこれらは高額な装置を用いることに加え、前処理が煩雑である。一方、硫酸処理等を基本とした比色定量法は、簡便ではあるが、構成糖の種類によって呈色強度が異なり、糖組成が未知であるヘテロ多糖においては定量性が低下する欠点があった。

そこで、本研究は糖組成が不均一であるPORの品質管理や構造/機能相関研究に役立てることを目的として、PORの糖組成を簡便に分析する手法の確立を試みた。まず、糖質の比色定量法として多用されているアンスロン-硫酸法における、反応温度および反応時間とGalと3,6-AnGalの呈色強度との関係について検討した。さらに、異なる反応条件下でのGalと3,6-AnGalの呈色強度の差を利用して、POR中のこれらの構成糖を分別定量する可能性について検討した。

2. 実験方法

2.1 試薬類

糖標品として、D-ガラクトース (Gal)、D-マンノース (Man)、D-キシロース (Xyl)、3,6-アンヒドロ-D-ガラクトース (3,6-AnGal)、6-O-メチル-D-ガラクトース (6M-Gal) (全てSigma-Aldrich Co. 製)、*myo*-イノシトール (Ino) (Fluka Biochemica 製) およびD-グルコース (Glu) (和光純薬製) を用いた。硫酸はSigma-Aldrich Co. 製 (精密分析用)、アンスロン、トリフルオロ酢酸 (TFA)、エタノール (EtOH)、アセトニトリル (AcN, HPLC grade)、メタノール (MeOH, HPLC grade) および酢酸ナトリウムは和光純薬製のものを用いた。Borane-4-methylmorpholine complex (MMB) はAldrich Co. 製のものを用いた。

2.2 Galおよび3,6-AnGalの呈色強度に及ぼす反応時間の影響

Yaphe¹¹⁾らの方法に基づきアンスロン-硫酸試薬を調製し、Galおよび3,6-AnGalの呈色強度に及ぼす反応時間および温度の影響を調べた。希釈硫酸 (濃硫酸: 純水 = 5 : 2 (v/v)) にアンスロンを0.2% (w/v) になるように溶解させた。試験管にGal (100 μg/mL)、3,6-AnGal (100 μg/mL) および純水 (試薬ブランク) を0.2 mL 添加し、氷水中で冷却した。試験管に予め冷やしたアンスロン試薬 1.2 mL を静かに加えた。ただちに混和、ついで沸騰水浴中に投入し、1, 4, 7, 10分加熱後、水で急冷し、30分以内に吸光度 A_{620} を測定した。

2.3 Galおよび3,6-AnGalの呈色強度に及ぼす反応温度の影響

反応温度35 ~ 100°Cで反応時間を5分に固定し、2.2と同様の呈色反応を行った。

さらに、加熱温度45°Cにおける呈色挙動を、反応開始後60分まで調べた。同時に、有明海産ノリから既報⁸⁾に従って抽出したPORを1 mg/mLになるように純水に溶解させ、反応温度45°Cにおける呈色挙動を調べた。

2.4 還元加水分解-HPLC法との比較

2.4.1 PORの抽出

有明海沿岸域の異なる場所および時期で採取されたノリ加工品12サンプルを乾式粉碎器 (日本精機製作所製 ZM-1) で粉末化し、Hamaらの方法¹²⁾に若干の変更を加えてPORを抽出した。ノリ粉碎品100 mgをキャップ付き試験管に入れ、85% EtOH 5 mLを加えて密栓後、90°Cで1時間加熱した。1,500 × gで遠心して上清を除去した。この操作をさらに2回繰り返し、沈殿を減圧下で乾燥した。乾燥物に純水5 mLを加えて密栓後120°Cで30分加熱し、1,500 × gで遠心して上清を回収した。この操作を再度行い、回収した上清を0.45 μm精密ろ過フィルターで濾過した。濾過後の上清に終濃度1 Mとなるように酢酸ナトリウムを溶解させ、さらに3倍量 (v/v) のEtOHを加えて4 で一晩静置した。沈殿物を20,000 × gで遠心し、上清を除去後、同量のEtOHを加えて攪拌した。これを再度遠心し、沈殿物を減圧乾燥してPOR精製物を得た。これに、5 mLの純水を加えて水溶液とし、以後の実験に供した。

2.4.2 アンスロン-硫酸法

3,6-AnGal標準溶液 (0 ~ 100 μg/mL, 純水に溶解) を用いて45°C / 15分反応および100°C / 7分における吸光度 A_{620} を測定し、検量曲線を作成した。また、Gal標準溶液 (0 ~ 200 μg/mL, 純水に溶解) を用いて100°C / 7分における吸光度 A_{620} を測定し、検量曲線を作成した。調製したPOR水溶液12サンプルについても、併せて45°C / 15分および100°C / 7分反応における吸光度 A_{620} を測定した。

POR水溶液中の3,6-AnGalの濃度は以下の式に従って算出した。45°C / 15分における3,6-AnGalの検量曲線は次式で表現される。

$$A^{45} = a(D_{3,6-AnGal}) + b$$

$$D_{3,6-AnGal} = (A^{45} - b) / a \quad (1)$$

ここで、 A^{45} は45°C / 15分反応における吸光度(620 nm)、 $D_{3,6-AnGal}$ はPOR水溶液中の3,6-AnGal濃度、 a および b は3,6-AnGalを用いた検量曲線(45°C / 15分反応)における傾きおよび切片である。

PORの構成糖の大半はGalおよび3,6-AnGalと考えられている。そこで、100°C / 7分反応におけるGal標準液および3,6-AnGal標準液の検量曲線を用いて、POR水溶液中の全糖濃度を算出した。

100°C / 7分における3,6-AnGalの検量曲線

$$A^{100}_{3,6-AnGal} = a'(D_{3,6-AnGal}) + b' \quad (2)$$

100°C / 7分におけるGalの検量曲線

$$A^{100}_{Gal} = a''(D_{Gal}) + b'' \quad (3)$$

$$A^{100} = A^{100}_{3,6-AnGal} + A^{100}_{Gal} \quad (4)$$

$$D_{Sugar} = D_{3,6-AnGal} + D_{Gal} \quad (5)$$

(3), (4) 式より

$$D_{Gal} = (A^{100} - A^{100}_{3,6-AnGal} - b'') / a'' \quad (6)$$

100°C / 7分反応と45°C / 15分反応における3,6-AnGal反応強度の相対比を c とすると、 c は以下の式で表現される。

$$c = a' / a$$

$$A^{100}_{3,6-AnGal} = c(A^{45}) \quad (7)$$

(6), (7) 式より

$$D_{Gal} = \{A^{100} - c(A^{45}) - b''\} / a'' \quad (8)$$

(1), (5), (8) 式より

$$D_{Sugar} = (A^{45} - b) / a + \{A^{100} - c(A^{45}) - b''\} / a'' \quad (9)$$

ここで、 $A^{100}_{3,6-AnGal}$ は100°C / 7分反応における3,6-AnGal反応生成物の吸光度(620 nm)、 A^{100}_{Gal} は100°C / 7分反応におけるGal反応生成物の吸光度(620 nm)、 D_{Gal} はPOR水溶液中のGal濃度、 D_{Sugar} はPOR水溶液中の全糖濃度、 a' および b' は3,6-AnGalを用いた検量曲線(100°C / 7分反応)における傾きおよび切片、 a'' および b'' はGalを用いた検量曲線(100°C / 7分反応)における傾きおよび切片、 c は100°C / 7分反応と45°C / 15分反応における3,6-AnGal反応強度の相対比である。

2.4.3 還元加水分解-HPLC

Jol¹⁰⁾らの方法に準じてPORの構成糖含量を測定した(図2)。PORをMMB/TFA存在下で還元-加水分解して構成糖を糖アルコールにし、イオン交換クロマトグラフィーとパルスドアンペロメトリ検出を組

み合わせたHPLC(Dionex Co.製,DXc-500)により測定した。内部標準として、Inoを用いた。2.4.2で得られたアンスロン-硫酸法による結果をHPLCで得られた結果と比較し、その相関関係について検証した。

3. 結果および考察

3.1 反応時間の影響

反応温度100°C(沸騰水浴中)におけるGalおよび3,6-AnGalの呈色挙動を図3に示す。Galは加温開始後7分で呈色がプラトーに達したのに対して、3,6-AnGalは呈色速度がきわめて速く、1分の加熱で急激に呈色した。この結果から、同じ糖質でもGalと3,6-AnGalは同一反応条件下での呈色強度が大きく異なっていることが明らかとなった。これらの呈色強度は反応温度にも依存することが予想されたため、次に反応温度の影響について検討した。

1. First reaction

- 1) Place 100 μ L of sample (~50 μ g sugar) in a screw-cap vial.
- 2) Add 50 mL of MMB (80 mg/mL) and 100 μ L of 6 M TFA.
- 3) Heat at 80 for 30 min and cool to room temperature.
- 4) Add 50 μ L of MMB and dry at 55 under N₂.

2. Second reaction

- 1) Add 200 μ L of 2M TFA.
- 2) Heat at 120 for 1 h and cool to room temperature.
- 3) Add 100 μ L of MMB and dry at 55 under N₂.
- 4) Add 0.5 mL of AcN and dry at 55 under N₂.
- 5) Add 1 mL of MeOH and dry at 55 under N₂ (twice).
- 5) Add 2 mL of pure water and 250 mL of eluent (0.6 M NaOH)

3. HPLC analysis

| | |
|--------------|------------------------------------|
| Column: | Carbopac MA-1 + guard (Dionex Co.) |
| Eluent: | 600 mM NaOH, isocratic |
| Temperature: | 35 |
| Flow rate: | 0.4 mL/min |
| Detection: | Pulsed amperometric detection |
| Inj. Volume: | 25 μ L |

図2 HPLCによる構成糖の定量スキーム

3.2 反応温度の影響

反応時間5分、温度35~100°CにおけるGalおよび3,6-AnGalの呈色挙動を図4Aに示す。3,6-AnGalは反応温度35°Cで既に呈色が認められ、80°Cをピークとして、温度の上昇とともに呈色強度も増大する傾向

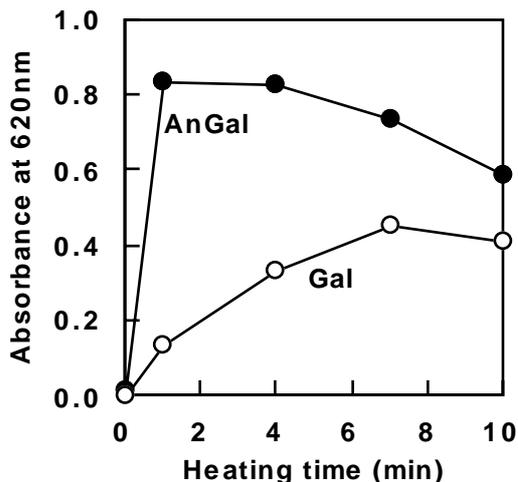


図3 Gal および AnGal の呈色強度に及ぼす反応時間の影響

Gal, ガラクトース; AnGal, 3,6-アンヒドロガラクトース

を示した。一方, Galにおいては反応温度50°C以下ではほとんど呈色が認められなかった。この結果は, 反応温度条件を50°C以下にすることによって, Gal共存下における3,6-AnGalの選択的定量ができることを示唆していた。反応温度を横軸に, 3,6-AnGal / Gal呈色強度比を縦軸にplotしてみると(図4B), 45°C反応が最も高い3,6-AnGal / Gal比を得た。そこで, 45°C反応における反応時間の影響について検討した。

3.3 3,6-AnGal 定量条件の決定

45°C反応における呈色挙動(0~60分)を図5Aに示す。3,6-AnGalは加温開始後急激に呈色強度が上昇

し, 30分でプラトーに達した。一方Galの呈色強度は3,6-AnGalに比べてかなり低かったが, 反応時間が長くなるにつれて呈色する傾向であった。PORは3,6-AnGalの呈色挙動と類似しており, POR中の3,6-AnGal成分の呈色を反映していると考えられた。

最も高い3,6-AnGal/Gal呈色強度比を示したのは反応開始後10~15分で, この条件における3,6-AnGalの選択的定量が期待された(図5B)。そこで, 【反応温度 / 反応時間 = 45°C / 15分】の条件の併用により, POR中の全糖および3,6-AnGalの定量が可能かどうかの検証を行った。

3.4 3,6-AnGalおよび全糖の定量およびHPLC法との比較

2.4.2により算出されたPOR水溶液中の全糖および3,6-AnGal濃度, 並びに2.4.3に示す方法で還元-加水分解HPLCにより得られた測定値を表1に示す。また, アンスロン-硫酸法とHPLC法との間の相関関係を図6に示す。

3,6-AnGal濃度においては, アンスロン-硫酸法とHPLC法との間に良好な相関関係($r^2 = 0.994$)を得た(図6A)。また, 全糖濃度においては, 従来条件(100°C / 7分反応)のみで得られた数値は, HPLCによる数値と比較してやや高めに出る傾向が認められたが, 45°C / 15分反応による数値で補正することにより定量精度の向上が認められた(図6B)。

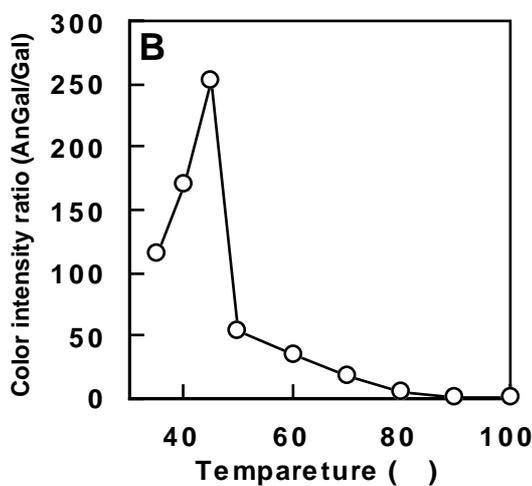
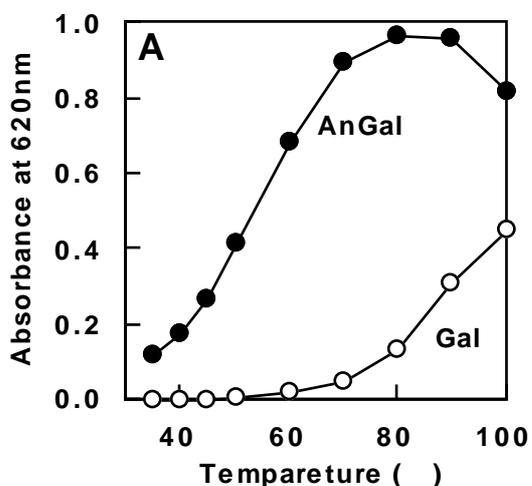


図4 Gal および AnGal の呈色強度に及ぼす反応温度の影響

A, 発色挙動; B, AnGal / Gal強度比を縦軸にplot; Gal, ガラクトース; AnGal, 3,6-アンヒドロガラクトース

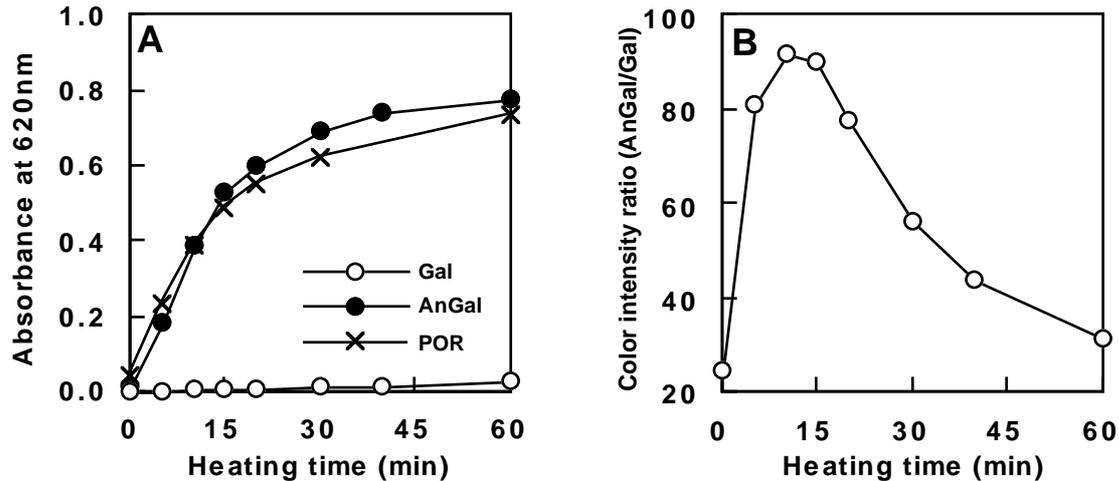


図5 Gal および AnGal の呈色強度に及ぼす反応時間の影響

A, 呈色挙動; B, AnGal / Gal 強度比を縦軸に plot; Gal, ガラクトース;
AnGal, 3,6-アンヒドロガラクトース, POR, ポルフィラン

表1 アンスロン-硫酸法とHPLC法の比較

| sample | Conc. of constituent sugars ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|--------|--|----------------------------------|---------------------------|-------------------|-----|
| | AnGal | | Total | | |
| | Anthrone ¹ | HPLC ² | Anthrone | | |
| | | conventional method ³ | novel method ⁴ | HPLC ² | |
| A | 65 | 65 | 363 | 323 | 296 |
| B | 31 | 33 | 279 | 260 | 232 |
| C | 42 | 43 | 357 | 332 | 328 |
| D | 59 | 62 | 301 | 265 | 244 |
| E | 54 | 57 | 337 | 305 | 295 |
| F | 50 | 52 | 234 | 204 | 204 |
| G | 30 | 31 | 266 | 248 | 248 |
| H | 26 | 25 | 210 | 194 | 189 |
| I | 42 | 43 | 266 | 241 | 245 |
| J | 23 | 22 | 153 | 151 | 152 |
| K | 22 | 20 | 164 | 139 | 135 |
| L | 29 | 30 | 162 | 144 | 146 |

¹The calibration curve for the content of AnGal was measured by the anthrone method at 45 °C for 15 min. ²Polysaccharide was reductively-hydrolysed with MMB and TFA, analysed by HPAEC-PAD. ³The calibration curve for the content of total sugar was measured by the anthrone method at 100 °C for 7 min. ⁴The calibration curve for the content of total sugar was measured by the anthrone method at 100 °C for 7 min and corrected using the content of AnGal.

4. おわりに

アンスロン-硫酸法は、還元糖が強酸共存下で脱水されて生じるフルフラールがアンスロンと反応して呈色することを利用した定量法である¹²⁾。操作が非常に簡便で多糖類にも応用できることから、糖質の比色定量法として最も権威あるものの一つである。しかしながら、先述のように糖の種類により呈色の強

度が異なっており、糖組成が不均一なPORの定量に適用するには問題があった。この糖の種類の違いによる呈色強度の違いを利用して、混合糖系中の特定の糖を選択的に定量しようとする試みが検討されてきた。Helbert¹³⁾らは、グルコースやアラビノースの共存下におけるフルクトースの定量の可能性について検討し、反応温度を50°Cにすれば混合糖系におけるフルクトース定量が可能であることを示している。

今回の知見に基づけば、アンスロン-硫酸処理における反応温度を45°Cにすることにより、POR中の3,6-AnGalの選択的な定量が可能である。全糖含量においては、Galと3,6-AnGalの両方が異なる強度で呈色するため、従来のように一種類の標準品だけでは算出値が実数値よりも高めに出る傾向にあったが、Galと3,6-AnGalの両方で検量曲線を引き、さらに45°C反応で求められた3,6-AnGal含量で補正することで、定量精度を向上させることが可能となった。分析条件を図7にまとめたが、HPLC法(図2)と比較して操作が大幅に簡略化されていることがわかる。

比色法による3,6-AnGalの簡易定量法として、これまでにレゾルシン-塩酸法の適用¹⁴⁾が知られていたが、本法はそれと比較しても簡便性及び低コスト性の点で優位性が高い。また、本法は、3,6-AnGalを構成糖成分とするPOR以外の他の海藻多糖(アガロース、カラギーナンなど)に対して適用することも可能と推察される。POR製造における品質管理および工程管理に本法を活用することにより、より効率的な製造が可能となることが期待される。さらに、PORの構造/機能相関の研究にも本法が応用可能と考えられる。

最後に、本研究にあたり御懇切なる御指導と御助言を賜りました、八代工業高等専門学校 墨 利久 助教授に深甚なる感謝の意を表します。また、試料を提供し、研究に御協力下さいました佐賀県有明海漁業協同組合連合会に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) Peat S., Turvey J. R., Rees D. A.: Carbohydrates of the red alga, *Porphyra umbilicali*, *J. Chem. Soc.* 1590-1595 (1961).
- 2) Ren D., Noda H., Amano H., Nishino T. and Nishizawa K.: Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae, *Fisheries Sci.* **60** (1), 83-88 (1994).
- 3) Tsuge K., Okabe M., Yoshimura T., Sumi T., Tachibana H. and Yamada K.: Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of Sprague-Dawley rats, *Food Sci. Technol. Res.* **10**, 147-151 (2004).
- 4) 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 墨利久, 岡部 正明, 宮本有美, 山田耕路: 食品加工残渣の高度利用に関する研究, 佐賀県工業技術センター平成14年研究報告書, **11**, 67-71 (2003).
- 5) Yoshizawa Y., Enomoto A., Todoh H., Ametani A. and Kaminogawa S.: Activation of murine macrophage by polysaccharide fractions from a marine alga (*Porphyra yezoensis*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1862-1866 (1993).
- 6) Yoshizawa Y., Ametani A., Tsunehiro J., Nomura K., Itoh M., Fukui F. and Kaminogawa S.: Macrophage

stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59** (10), 1933-1937 (1995).

- 7) Araki S., Oohusa T., Saitoh M. and Sakurai T.: The quality of 'Nori', dried laver, in special reference to the contents of 3,6-anhydrogalactose in porphyran, *Jpn. J. phycol.* **25** (1), 19-23 (1977).
- 8) Hama Y., Nakagawa H., Kurosawa M., Sumi T., Xia X. and Yamaguchi K.: A gaschromatographic method for the sugar analysis of 3,6-anhydrogalactose-containing algal galactans, *Anal. Biochem.* **265**, 42-48 (1998).
- 9) Hama Y., Nakagawa H., Sumi T., Xia X. and Yamaguchi K.: Anhydrous mercaptolysis of agar: an efficient preparation of 3,6-anhydro-L-galactose diethyl dithioacetal, *Carbohydr. Res.* **318**, 154-156 (1999).

- 1) Place 200 μ L of sample (~ 20 μ g sugar) in a test tube.
- 2) Keep sample cool in an ice bath.
- 3) Add 1.2 mL of 0.2% (w/v) anthrone dissolved in sulfuric acid-water (5 : 2, v/v).
- 4) Mix well and heat at 45 for 15 min (for AnGal) or at 100 for 7 min (for total sugar).
- 5) Stop the reaction in an ice bath and measure the absorbance at 620 nm within 30 min.

図7 アンスロン硫酸法によるAnGalおよび全糖含量の定量

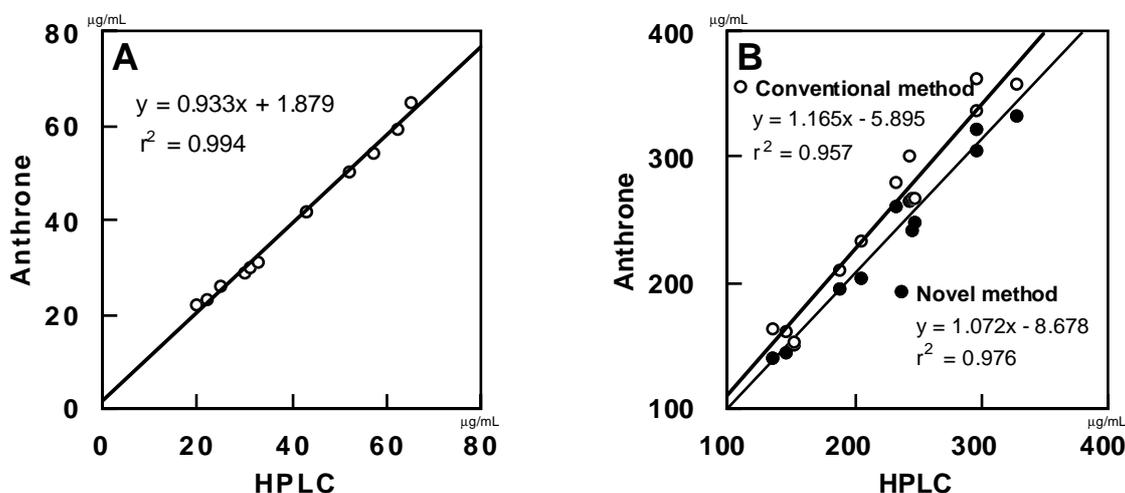


図6 アンスロン-硫酸法とHPLC法の比較
A, AnGal濃度; B, 全糖濃度

- 10) Jol C. N., Neiss T. G., Penninkhof B., Rudolph B. and De Ruyter G. A.: A novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose, *Anal. Biochem.* **268**, 213-222 (1999).
- 11) Yaphe W.: Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides, *Anal. Chem.* **32(10)**, 1327-1330 (1960).
- 12) Morris D. L.: Quantitative determination of carbohydrates with anthrone reagent. *Science* **107**, 254-255 (1948).
- 13) Herbert J. R. and Brown K. D.: Color reaction of hexuronic acids with anthrone, *Anal. Chem.* **28(7)**, 1098-1100 (1956).
- 14) Yaphe W. and Arsenault G. P.: Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides, *Anal. Biochem.* **13**, 143-148 (1965).