寒天からアガロースとアガロペクチンの分離*

林 金 雄**・平 光 武***

Separation of Agarose and Agarpectin from Agar

KANEKO HAYASHI and TAKESHI HIRAMITSU

Agar were prepared from the material seaweed for agar industry, i.e. *Gelidium amansii*, *Gelidium japonicum*, *Ceramium boydenii* and *Gracilaria verrucosa*, to separate agarose and agarpectin by the methods of acetylation, sodium iodide and dimethylsulfoxide.

It was found that the ratio of agarose and agarpectin varied with the kind of seaweed employed as raw material, the method of preparation of agar and the method of separation of them.

The content of D-galactose and 3,6-anhydro-L-galactose in agarose obtained was found to be 49-50% and 44-54% respectively. The infrared spectrum of agar, agarose and agarpectin was considered to be approximately identical.

寒天は中性多糖類のアガロース (AG) と酸性多糖類のアガロペクチン (AP) からなっているが、不均一なものであって、酸性成分含量の非常に少ないものから多いものへと連続的に分布した一群の多糖類の混合物である。

そして AG については荒木ら²⁾の研究によって、その化学構造が明らかになったが、AP については未解明の点が多い。

AG と AP の分離法としてはアセチル化法³⁾・ジメチルスルホキシド法⁴⁻⁶⁾・ヨウ化ナトリウム法⁷⁾および塩化セチルピリジニウム法⁸⁾などが試みられているが、分離の実施方法や実施中の変化などについては究明すべき点が少ない。

著者らは、4 種類の代表的な寒天製造原藻を用いて調製した寒天から AG および AP を分離し、これらについて比較検討したので報告する。

実験および結果

1. 供試原藻

第1表に示した4種類の原藻を使用した。

2. 寒天の調製と理化学的性質

(1) マクサ、オニクサおよびアミクサから寒天の調製
原藻 120 g を 5l の三角フラスコにとり、30 倍量の水を加えてオートクレーブ中で 1.2 ± 0.1 気圧下において、マクサ、アミクサでは 90 分、オニクサでは 120 分煮熟し、ナイロン汙布 (足立繊維製ナイロン NF 1001 汙布) 2 枚で汙過し、さらに圧搾器で圧搾する。汙液は放冷凝固させ 1 夜放置後、天然寒天製造法に従って凍結融解および脱水を行ない乾燥した。収率 (原藻無水物に対する寒天無水物%) は、マクサ 43%、オニクサ 35%、アミクサ 30%

(2) オゴノリから寒天の調製

第1表 供 試 原 藻

原 藻 名	採 取 地	採取年月	水分(%)
マクサ <i>Gelidium amansii</i>	静岡県稲取	1968・VI	16.8
オニクサ <i>Gelidium japonicum</i>	静岡県雲見	1968・VI	14.3
アミクサ <i>Ceramium boydenii</i>	石川県珠洲	1968・VIII	15.7
オゴノリ <i>Gracilaria verrucosa</i>	北海道厚岸	1967・XI	15.0

* 岐阜県における寒天製造に関する化学的研究 (第35報)

** 岐阜大学農学部農芸化学科 (岐阜県各務原市那加門前町)
Faculty of Agriculture, Gifu University. Kakamigahara, Gifu.

*** 岐阜県寒天研究所 (岐阜県恵那郡山岡町)
Gifu Research Institute of Agar-Agar. Yamaoka, Gifu.

第2表 寒天の化学分析 (対無水物%)

試料寒天	水分	灰分	全SO ₃ *
マクサ	16.9	3.1	1.6
オゴノリ	16.9	2.4	1.9
オニクサ	18.1	2.6	1.8
アミクサ	15.9	3.6	1.3

* 既報の方法⁹⁾に従って定量した

第3表 寒天の物性

試料寒天	ゲル化点 (°C)	融点 (°C)	ジュリー強度 (g/cm ²)	離漿水 (g)
マクサ	34.0	94	530	0.43
オニクサ	36.0	98	940	0.43
アミクサ	38.0	84	720	1.04

400 kg のオゴノリを 6% カセイソーダで 90°C・4 時間アルカリ処理後、酢酸 6l と塩化カルシウム 15 kg を加えて煮熟し、過した。過助剤としてパーライト 100 kg、漂白剤としてスターリット 2 kg を加えた。以下、工業寒天の圧力脱水法によって粉末寒天を調製した。

(3) 寒天の理化学的性質

(a) 化学分析

寒天を粉砕機で粉砕し目開き直径 1 mm の篩板を通したものを試料として、第2表の結果を得た。灰分は、2.4~3.6%、SO₃ は 1.3~1.9% であった。オゴノリはアルカリ処理をしたものであるから灰分も SO₃ もあまり高い値を示していない。

(b) 物性

次のような方法によって 2・3 の物性を測定した結果は第3表のようで、試料寒天によってそれぞれの物性にかなりの差が認められた。

ゲル化点: 1.5% の寒天溶液 5 ml を内径 15 mm の試験管に入れコルク栓を付し 50°C の恒温水槽に 30 分間放置する。次に電源を切り 0.5°C 下がるごとに凝固状態を調べ、凝固して動かなくなったときの温度を求めた。

融点: 林らの方法¹⁰⁾によった。

ジュリー強度: 林らの方法¹¹⁾によった。

離漿水: 1.5% 寒天溶液 50 ml を内径 30 mm の試験管に入れ、寒天液があふれ出ない程度に水平近く傾斜させ、凝固後器壁およびゲル表面の凝縮水を脱脂綿でぬぐいとり、コルク栓を付して 20°C に3日間同じ傾斜

で静置し、離漿した水分を脱脂綿に吸着させて秤量した。

3. AG および AP の分離

供試料として寒天を粉砕機で粉砕し、これをさらに石臼で細粉としたものを用いた (粗寒天 I とする)

(1) アセチル化 (Ac) 法

粗寒天 I 10~20 g について、荒木の方法⁹⁾に従いピリジン-無水酢酸 (1.5:1) を使用してアセチル化してアセチル化寒天 (AcAgar) をつくり、この AcAgar から AcAG と AcAP を分離し、さらにそれぞれから AG と AP を分離した。しかし第5表に示したように AcAgar の収量が少なかったため、寒天の精製を試みた。すなわち 3% 寒天溶液を湯浴中で完全に加熱溶解後、40~50°C に温度を下げてから3倍量のアセトンを加えてよく攪拌すると沈澱を生じる。1夜放置後吸引し過して沈澱 (P₁) と母液 (F₁) とに分けた。沈澱 (P₁) をアセトンでよく洗浄後、さらにアルコールとエーテルで処理乾燥した (精製寒天とする) 母液 (F₁) は減圧濃縮して、再びアセトンを加えて沈澱 (P₂) と母液 (F₂) に分け、沈澱 (P₂) は沈澱 (P₁) と同様に処理した (粗寒天 II)。なお母液 (F₂) は再び減圧濃縮してから蒸発皿に移し、湯浴上で蒸発乾固した (固形物)。これらについての分析結果は第4表のようで、精製によって SO₃ 含有量のやや多い多糖類の部分およびその他の多糖類の1部が分離されるものと推定される。

精製寒天について上記の方法でアセチル化を試みたところ、第5表に示したようにアセチル化は良好となり、オゴノリでは差は認められなかったが、マクサとオニクサでは精製した場合のほうが AG の比率が高くなった。

なお同一原藻から調製した寒天でも調製法によって AG と AP の比率その他に差があることを第6表に示した。

(2) ヨウ化ナトリウム (NaI) 法

布施らの方法⁷⁾に準じて行なった。試料寒天粉末 (タ

第4表 寒天の精製と分析 (対無水物%)

供試寒天	粗寒天 I		精製寒天		粗寒天 II		全固形物	
	SO ₃	収率*1	SO ₃	収率*1	SO ₃	収率*1	SO ₃	収率*1
マクサ	1.6	59	1.2	33	2.2	1.6	4.7	
オニクサ	1.8	79	1.2	10	7.9	0.2	3.1	
オゴノリ	1.9	99	1.7	—*2	—	0.6	4.9	
アミクサ	1.3	71	1.2	27	3.1	0.6	2.2	

*1 粗寒天 I に対する %

*2 オゴノリでは分離状態が良好であったから実施しなかった

第5表 AG と AP の分離

(対無水物%)

試料寒天	AcAgar*2	AcAG*3	AcAP*3	比率*4		AG		AP	
				AG	AP	AG*5	SO ₃	AP*5	SO ₃
マクサ (粗)*1	109	45	54	45	55	34	0.6	40	2.2
〃 (精)*1	128	49	34	59	41	38	0.4	28	0.9
オニクサ (粗)	118	39	58	40	60	31	0.3	43	1.7
〃 (精)	126	57	30	66	34	39	0.5	14	0.5
オゴノリ (粗)	114	81	12	87	13	52	0.4	7	3.1
〃 (精)	134	72	17	81	19	53	0.4	15	2.9
アミクサ (精)	137	81	3	96	4	70	0.7	2	—

*1 粗：粗寒天 I 精：精製寒天

*2 試料寒天に対するアセチル化寒天の %

*3 アセチル化寒天に対するアセチル化アガロースおよびアセチル化アガロペクチンの %

*4 $AG = \frac{AcAG}{AcAG + AcAP} \times 100$, $AP = \frac{AcAP}{AcAG + AcAP} \times 100$

*5 試料寒天に対する %

第6表 AG と AP の分離

(対無水物%)

テングサ*1 寒天	灰分	灰分中		AcAgar		AcAG		AcAP		比率*6		AG		AP	
		SO ₃	収率*4	CH ₃ CO	収率*5	CH ₃ CO	収率*5	CH ₃ CO	収率*5	AG	AP	収率*4	灰分	収率*4	灰分
A*2	3.4	1.2	118	25	63	27	26	25	70	30	54	1.1	29	5.5	
B*3	7.6	1.3	112	25	72	27	21	23	77	23	53	1.1	33	4.4	

*1 供試原藻は高岡産マクサ

*2 原藻を 120°C・3 時間加圧抽出，電気冷凍，自然融解乾燥，アルコール精製。収率原藻に対して 28%

*3 原藻を 100°C・3 時間抽出，アセトン沈澱，自然乾燥，アセトン精製。収率原藻に対して 21%

*4 精製寒天に対する %

*5 アセチル化寒天に対する %

*6 $AG = \frac{AcAG}{AcAG + AcAP} \times 100$, $AP = \frac{AcAP}{AcAG + AcAP} \times 100$

イラー標準篩 32 メッシュ) 1.5~6 g を冷却器と攪拌棒をつけた 500 ml 三頸フラスコにとり，7N NaI 100 ml を加え，60~70°C で 7 時間攪拌しながら加温する。遠心分離 (3500 rpm・10 分) し，溶液部 (F₁) と沈澱部 (P₁) とに分ける。P₁ は少量の 2.8N NaI 溶液に懸濁して遠心分離し (沈澱 P₂)，この上澄液 (F₂) を (F₁) と合わせて 2.5 倍量の 95% エタノール中に激しく攪拌しながら注入し，生じる白色の沈澱を吸引し，冷水に懸濁させてから 2.5 倍量の 95% エタノールを加えて沈澱させ吸引し，操作を繰返して NaI を完全に除去してから，アセトンで処理吸引し，過剰真空デシケーター中で 40°C 以下で乾燥させた (AG)。また P₂ についても同様に処理した (AP)。結果は第 7 表のようである。

(3) ジメチルスルホキシド (DMSO) 法

田川らの方法⁵⁾に準じて行なった。試料粉末寒天 (タイラー標準篩 32 メッシュ，105°C で 3 時間乾燥) 5 g を前記の 500 ml 三頸フラスコにとり，DMSO 250 g を

加え 70°C で 3 時間加温したのち，遠心分離 (3500 rpm・20 分) して溶液部 (F₁) と沈澱部 (P₁) とに分けた。P₁ をもとの三頸フラスコにもどし，新たに DMSO 125 g を加えて 70°C で 1 時間加温した。同様にして溶液部 (F₂) と沈澱部 (P₂) に分離し，P₂ についてさらに DMSO 125 g を加えて 70°C で 1 時間加温し，溶液部 (F₃)

第7表 NaI 法による AG と AP の分離

(対無水物%)

試料寒天	AG			AP	比率*1	
	収率	全 SO ₃	灰分		AG	AP
マクサ	74	1.0	3.1	11	87	13
オニクサ	70	1.4	2.5	9	89	11
オゴノリ	95	1.7	4.1	2	98	2
アミクサ	81	1.1	3.3	6	93	7

*1 $AG = \frac{AG}{AG + AP} \times 100$, $AP = \frac{AP}{AG + AP} \times 100$

第8表 DMSO 法による AG と AP の分離
(対無水物%)

試料寒天	AG			AP 収率	比 率*	
	収率	全 SO ₃	灰分		AG	AP
オゴノリ	96	1.6	1.8	3	97	3
マクサ	57	0.7	1.2	37	61	39

$$* AG = \frac{AG}{AG+AP} \times 100, \quad AP = \frac{AP}{AG+AP} \times 100$$

と沈澱部 (P₃) に分離した。(F₁), (F₂), (F₃) を合わせて4倍量のアセトン中に激しく攪拌しながら加え白色沈澱をえた。これを吸引濾過しアセトンで処理して真空デシケーター中で乾燥し白色粉末 (AG) を得た。P₃ についても同様にして黄褐色粉末 (AP) を得た。結果は第8表のようである。

以上のように分離法によって相互の間に AG と AP の比率にかなりの差が認められた。すなわち AG と AP の比率がマクサの場合は Ac 法 59:41, NaI 法 87:13, DMSO 法 61:39 で、アルカリ処理オゴノリの場合は Ac 法 81:19, NaI 法 98:2, DMSO 法 97:3 であった。これは寒天の不均一性の問題とその分離法になお研究の余地のあることを示している。すなわち寒天とくに AG および AP の化学構造の究明と、上記のような溶解性だけにもとづく分離法でなく、化学構造にもとづく分離法の研究が望まれる。

(4) AG 中の D-ガラクトース (Ga) および 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース (AnGa) の定量

YAPHE の方法¹²⁾に従って、レゾルシノールによる AnGa の定量と、アンスロンによる Ga と AnGa の同時定量とを実施した。反応は試験管 (25 mm×200 mm) を使い、80°±5°C の恒温水槽中で行ない、比色計は島津製スペクトロニック 20 を使用した。

試料溶液は AG を P₂O₅ を入れた真空デシケーター中で減圧下 40°C において 72 時間以上保って充分乾燥したものを、80°C で溶解後稀釈して 50 γ/2 ml のものを調製した。

標準 Ga としては特級品 (半井化学薬品会社) を使用し、標準溶液 50 γ/2 ml とした。

標準 AnGa としては市販粉末寒天をメルカプトリシス¹³⁾して、3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース・ジェチルメルカプタール (細い針状結晶、融点 110°C) を得、これを脱メルカプタン¹⁴⁾したものを使用し、標準溶液 36.3 γ/2 ml とした。

Ga と AnGa の計算には YAPHE¹³⁾ の提案した式を採用した。

得られた結果は第9表のようで、大略 AnGa 含有量は 44~45%, Ga 含有量は 49~50%, 灰分は 2% で、荒木¹⁵⁾が指摘した結果とほぼ同様であった。

4. 赤外線吸収スペクトル (IR) の測定

近年マクサおよびオゴノリの寒天について IR が測定

第9表 AG 中の AnGa と Ga の分析

(対無水物%)

供 試 寒 天	分 離 法	AG 中 の 含 有 量			AnGa と Ga のモル比*2	灰 分 (d)	合 計 (c)+(d)	
		AnGa (a)	Ga (b)	計 (c)				
マ ク サ	Ac	44.4	50.4	94.8	0.99	2.1	96.9	
	〃	DMSO	45.0	49.4	94.4	1.03	1.2	95.6
	〃	NaI	45.1	50.2	95.3	1.01	3.1	98.4
	〃 (精)*1	Ac	47.5	47.8	95.3	1.12	1.3	96.6
オ ニ ク サ	Ac	44.0	46.3	90.3	1.07	2.4	92.7	
	〃	NaI	45.2	49.9	95.1	1.02	2.5	97.6
	〃 (精)	Ac	46.1	50.5	96.6	1.03	2.4	99.0
オ ゴ ノ リ	Ac	44.6	49.4	94.0	1.02	1.6	95.6	
	〃	DMSO	43.9	50.2	94.1	0.93	1.8	95.9
	〃	NaI	47.8	46.5	94.3	1.16	4.1	98.4
	〃 (精)	Ac	44.8	49.7	94.5	1.01	1.8	96.3
ア ミ ク サ	NaI	45.2	47.6	92.8	1.07	3.3	96.1	
	〃 (精)	Ac	44.6	49.1	93.7	1.02	1.8	95.5

*1 精製したもの

*2 $\frac{(a)}{144} : \frac{(b)}{162}$ を求めた

されている¹⁶⁻¹⁸⁾ので、著者らも測定方法を少しかえて実験した。

測定方法：20 cm×20 cm のガラス板を蒸留水でよく洗浄したのち、この上に蒸留水中に1週間（2日に1回水をかえる）浸漬して可溶性物質を除いたセロファンをはりつけ、さらにこの上に厚さ 1.5 mm のガラス製わく（わく内は 5 cm×7 cm）をおく。約 1% 試料溶液をふちのほうから静かにこのなかに流し込み、ガラス製わくから少し盛り上がる程度にする。放置して寒天膜とし 45°C 通風乾燥器中で乾燥する。充分乾燥すると寒天フィルムはセロファンにぴったり密着する。寒天フィルムとフィルムに密着したセロファンの裏側の両方に蒸留水を吹きかけ、フィルムのふちを注意深くはがしセロファンを除く。その後紙製ホルダーに張り付け、これを P₂O₅ 入れたデシケーター中で3日間乾燥する。このようにして調製した寒天膜について赤外線分光光度計光研 DS 301 型（日本分光工業 K K）を使用して IR を測定した。

マクサ、オニクサ、アミクサ、オゴノリ（アルカリ処理）の4種の寒天はいずれもほぼ同様な IR を示し既報と大差はなかった。第1図および第2図にオニクサとアミクサの寒天の IR を示した。また AG と AP についても、その純度についてはその分離法とともに検討を要するが、同様にして IR を測定したところ、大体において類似していて相互に少しずつ差が認められたので、定性的ではあるが第10表にその状態を示した。

要 約

マクサ、オニクサ、アミクサおよびオゴノリから寒天を調製して、それらの寒天からアセチル化法、ヨウ化ナトリウム法およびジメチルスルホキシド法によって AG と AP を分離した。

原藻の種類、寒天の調製法および AG と AP の分離法によって、AG と AP の含有比率にかなりの差が認められた。

得られた AG の D-ガラクトースと 3,6-アノヒドロ-L-ガラクトースの含有量は、それぞれ約 49~50% およ

第1図 オニクサ寒天の赤外線吸収スペクトル

第2図 アミクサ寒天の赤外線吸収スペクトル

第10表 IR 測定結果

試料寒天	AG および AP	試料寒天の IR との差
マクサ	Ac 法	1260* やや減少
	AG { DMSO 法	1260 やや減少
	NaI 法	1260 やや減少
オニクサ	AP DMSO 法	2200 吸収なし, 1320・1200 減少, 1000~500 ピークの順変化
	AG { Ac 法	1260 やや減少
	NaI 法	ほとんど変化なし
オゴノリ	AP NaI 法	1650 附近の吸収幅増大, 1550・1260 増加, 1480・1380・1200 減少
	AG { Ac 法	1260 やや減少
	DMSO 法	ほとんど変化なし
	AP DMSO 法	1650 附近の吸収幅増大, 1470・1320 吸収なし, 1380 減少, 1260 増加

* 波数 1260 cm⁻¹

び 44~45 %であった。

寒天, AG および AP の赤外線吸収スペクトルは相互に類似していた。

終わりに臨み, 試料原藻について御配慮いただいた岐阜県寒天研究所原田典宜氏, ならびに実験に協力された市川俊治・粕淵宏和・山崎弘志の諸君に感謝する。なお本研究の一部は農林漁業試験研究費補助金の援助によって実施したので記して謝意を表する。

文 献

- 1) 泉 邦彦・平瀬 進: 第40回日本生化学大会講演(1967)。
- 2) 荒木長次: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **29**, 543 (1956)。
- 3) 荒木長次: 日化, **58**, 1338 (1937)。
- 4) 勝浦嘉久次・布施恒明・狩野和夫: 工化, **68**, 205 (1965)。
- 5) 田川昭治: 水大研報, **14**, 165 (1966)。
- 6) 田川昭治・小島良夫: 水大研報, **15**, 11 (1966)。
- 7) 布施恒明・勝浦嘉久次: 工化, **70**, 724 (1967)。
- 8) HJERTEN, S.: *Biochem. Biophys. Acta*, **53**, 514 (1961); **62**, 445 (1962); **79**, 393 (1964)。
- 9) 林 金雄・平光 武・中村武司: 農化, **43**, 699 (1969)。
- 10) 林 金雄・永田幸雄: 食品工誌, **14**, 450 (1967)。
- 11) 林 金雄・安本直人: 岐大農研報, **22**, 131 (1966)。
- 12) YAPHE, W.: *Anal. Chem.*, **32**, 1327 (1960)。
- 13) 荒木長次・平瀬 進: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **26**, 463 (1953)。
- 14) YAPHE, W.: *Nature*, **183**, 44 (1959)。
- 15) 荒木長次: *Proc. of Fifth Intern. Seaweed Symposium* (1965)。
- 16) TSUCHIYA, Y. and HONG, K. C.: *Tohoku, J. Agr. Research*, **16**, 141 (1965)。
- 17) 布施恒明・徳間洋二・勝浦嘉久次: 農化, **42**, 558 (1968)。
- 18) 田川昭治: 水産大研報, **17**, 76 (1968)。
(1970年7月29日受理)