

## 乾海苔に含まれる光合成色素の簡易定量法

齋藤宗勝\*・大房 剛\*

MUNEKATSU SAITOH and TUYOSI OOHUSA: A simple method for estimation of photosynthetic pigment content in dried laver

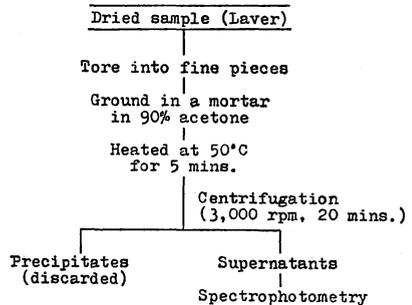
アマノリ類に含まれる光合成色素の抽出方法については、生の藻体を材料とした場合が多く<sup>1-3)</sup>、乾燥加工品である乾海苔を材料とした例は少ない<sup>4)</sup>。しかもこれ等の方法で乾海苔を分析した場合、一定の抽出率が得難いという欠点がある。また phycobilin 色素の抽出にあたっては限られた機器を必要とし、かつ多数の試料について短時間に分析を行うことが困難である。著者らは精度上多少劣るが、比較的手頃な機器を用いて多数の試料を速やかに処理できる抽出方法を得たのでここに紹介したい。

### Chlorophyll *a* と Carotenoids の抽出

乾海苔試料を極めて細かな細片とし乳鉢で完全に磨砕する。試料の細片化は磨砕を容易にするとともに色素の高い抽出率を得ることもつながるので丁寧にやねばならない。次に90%アセトンを加えさらに磨砕してから共栓付の遠心管に移す。色素および試料滓が残らないよう乳鉢と乳棒を数回少量の90%アセトンで丁寧に洗い遠心管に加える。抽出率を高めるため、ウォーターバスで5分間約50°Cに加温する。遠心操作(3,000 rpm, 20 mins.)により上澄みを得、90%アセトンを加え一定容として分光測定にかける。遠心残渣について、2, 3回抽出を繰り返したほうがよい。以上の操作は全て緑色光または弱光下で行わねばならない (Scheme 1)。

### Phycocerythrin と Phycocyanin の抽出

試料を少量の純水で湿めらせ冷蔵庫に放置する。約1時間後試料を冷やした乳鉢に移し、少量の石英砂を加えて十分に磨砕する。さらに少量の磷酸緩衝液 ( $5 \times 10^{-2}$  mol, pH 6.5) を加え磨砕を続ける。試料が完全につぶれたところで遠心管に移す。



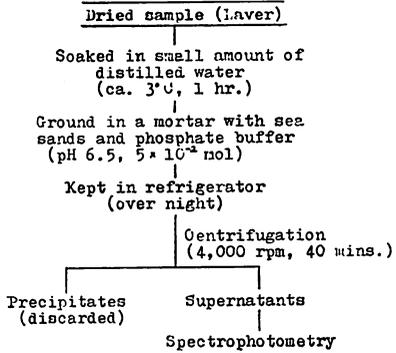
**Scheme 1** Flow-sheet of preparation for 90% acetone extract. All treatments were done under green or dim light.

\* 山本海苔研究所 (東京都大田区大森5-2-12)

乳鉢と乳棒を緩衝液で数回丁寧に洗い遠心管に加える。1晩冷蔵庫に放置後遠心操作(4,000 rpm 以上, 40 mins. 以上)によって上澄みを得、一定容としてから分光測定にかけ。遠心残渣について数回抽出を繰返すとよい。以上の操作は全て0~5°Cの低温下で行わねばならない。尚多くの報告では、長期間の autolysis で色素抽出を行っているが、乾海苔を用いた場合、結果が不安定である。また定量分析には、むしろ速やかな抽出方法を取るべきという指摘もあり<sup>3)</sup>、本法ではこの点を特に重視した (Scheme 2)。

分光測定および分析精度

分光測定による色素の定量は他書に詳しく、本報では日立 101 型分光光度計を用い、



Scheme 2 Flow-sheet of preparation for pigment extracts. All treatments were done below 5°C.

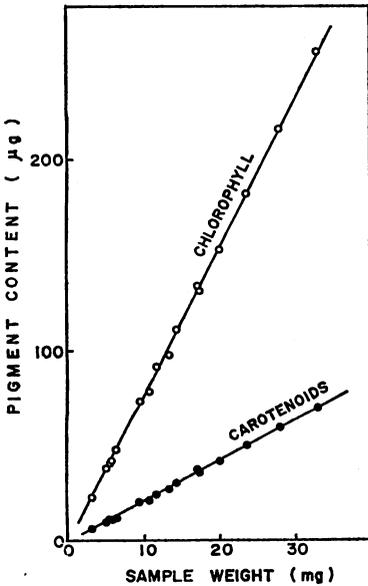


Fig. 1. Relation between sample weight and pigment content obtained by the present method. Chlorophyll a and carotenoids.

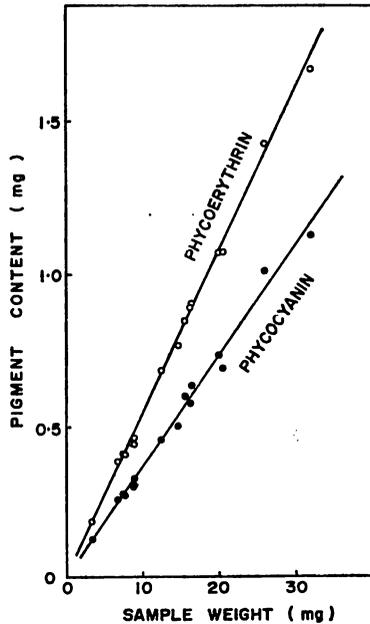


Fig. 2. Relation between sample weight and pigment content obtained by the present method. Phycoerythrin and phycocyanin.

以下の方法によって得た値について精度を検討した。chlorophyll *a* と carotenoids は色素抽出液の 665, 645, 630, 480 nm における吸光値から 750 nm における吸光値を差し引いて補正した後、次式<sup>5)</sup>で抽出液 1 ml あたりの色素量 ( $\mu\text{g}$ ) を得た。

$$\text{Chlorophyll } a = 11.6 E_{665} - 1.31 E_{645} - 0.14 E_{630} \quad (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Carotenoids} = 4.0 E_{480} \quad (\mu\text{g/ml})$$

また phycoerythrin と phycocyanin は、色素抽出液のオパール法によって得た 615, 565 nm での吸光値から 750 nm の吸光値を差し引いて補正し、土屋ら<sup>6)</sup>の吸光係数を用い次式で抽出液 1 ml あたりの色素量 ( $\mu\text{g}$ ) を求めた。土屋らは phycoerythrin の吸収極大波長を 568 nm としているが、本実験で用いた分光光度計では 565 nm に認められたので、この波長における吸光値を用いた。

$$\text{Phycoerythrin} = 119.4 E_{565} - 53.6 E_{615} \quad (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Phycocyanin} = 164.5 E_{615} - 0.14 E_{565} \quad (\mu\text{g/ml})$$

ただし、吸光値  $E$  はいずれも光路長 1.0 cm あたりの値である。

本実験では、乾海苔の乾重 3~33 mg の範囲で色素量を測定し、Fig. 1 および 2 に示すような結果を得た。Phycobilin 色素の場合には点のばらつきが多少あったが、いずれの場合にも乾重量と色素量との間にはよい直線性が認められ、分析精度は chlorophyll *a*  $\pm 2.8$ , carotenoids  $\pm 5.0$ , phycoerythrin  $\pm 3.8$ , phycocyanin  $\pm 5.6\%$  であった。

高い精度の値を要求する場合、本法は多少の変更を要する。しかし多数のサンプルについて色素量の経時的変動を相対的に把握しようとするなど、傾向をみる場合には本法でも目的は達せられるという利点を有している。また本法は乾海苔を対象としているが、生の藻体に対しても応用できる。

この報告に際し終始御指導賜わった東京大学海洋研究所の藤田善彦助教授に厚く御礼申し上げたい。

### Summary

A simple method for estimation of photosynthetic pigments in dried laver was developed. Chlorophyll *a* and carotenoids contents were spectrophotometrically estimated with 90% acetone extract. Phycoerythrin and phycocyanin contents were estimated with the quantitative extracts in phosphate buffer ( $5 \times 10^{-2}$  mol, pH 6.5). The extraction was done by grinding with sea sands the dried laver which had been soaked in a small volume of distilled water. Soaking the dried laver in distilled water is essential for the quantitative extraction of phycobilin chromoprotein. Statistical analysis of the results showed values of standard deviation,  $\pm 2.8$ ,  $\pm 5.0$ ,  $\pm 3.8$  and  $\pm 5.6\%$ , with chlorophyll *a*, carotenoids, phycoerythrin and phycocyanin, respectively. As technically simple, the present method has an advantage for estimation of pigment contents with numerous samples.

## 引用文献

- 1) 藤田善彦 (1965) 生体物質の取扱法・藻類実験法 (田宮博・渡辺篤編)・南江堂, 東京: 274-303.
- 2) 西村光雄 (1958) カロチノイド・クロロフィル・光電比色法各論 2 (化学の領域増刊 34)・南江堂, 東京: 135-141.
- 3) 服部明彦・藤田善彦 (1958) フィコビルン・光電比色法各論 2 (化学の領域増刊 34)・南江堂, 東京: 142-147.
- 4) 朴 栄浩・小泉千秋・野中順三九 (1973) 高湿下における干しのり成分の変化-I. クロロフィル・カロチノイドおよびフィコビルン. 日水誌, **39**: 1045-1049.
- 5) STRICKLAND, J. D. H. and PARSONS, T. R (1968) Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. In A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bulletin 167. Fish. Res. Bd. Canada, Ottawa: 185-192.
- 6) 土屋靖彦・鈴木芳夫・佐々木劭 (1961) 低温による乾海苔の貯蔵試験. 日水誌, **27**: 919-933.