

乾海苔が含有する光合成色素の新定量法開発

尾前 優希¹・吉田 和広²・川村 嘉応²・木村 圭^{2*}¹佐賀大学大学院農学研究科 (〒 840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1)²佐賀大学農学部 (〒 840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1)

Yuki Omae¹, Kazuhiro Yoshida², Yoshio Kawamura² and Kei Kimura^{2*}: Development of a new quantitative method for photosynthetic pigments contained in the Nori sheet. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 70: 99–108, July 10, 2022

The conventional method for quantifying photosynthetic pigments in dried Nori sheet is to grind them in a mortar and extract them in 90% acetone for fat-soluble pigments (chlorophyll *a*, carotenoids) and phosphate buffer solution for water-soluble pigments (phycoerythrin, phycocyanin). The amount of the extracted pigments was estimated from their absorption spectra. However, this manual method has complicated steps, which leads to heterogenous fragmentation. Our study aimed to develop a plane method for grinding dried Nori sheet by using zirconia beads with a bead beater. In addition, regarding chlorophyll *a*, we discussed the difference between the absorption-based and fluorescence-based values and also discussed the difference between extraction solvents; 90% acetone and *N,N*-dimethylformamide (DMF). Using our novel method, the amounts of each photosynthetic pigment were comparable to those of the conventional method. Furthermore, our novel method reduced seaweed materials, which is to one sixtieth of that used by the conventional method, and also greatly reduced the fragmentation time. For hydrophilic pigments, their standard deviation of our new method were reduced to half of those of the conventional method. The fluorescence measurement was more accurate than the absorbance, and DMF was more suitable than 90% acetone for chlorophyll *a* extraction.

Key Index Words: carotenoids, chlorophyll a, color tone, photosynthetic pigments, phycoerythrin, phycocyanin, quantitative method

¹Graduate School of Agriculture, Saga University, 1 Honjo-machi, Saga, Saga 840-8502, Japan

²Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjo-machi, Saga, Saga 840-8502, Japan

* Author for correspondence: kimurak@cc.saga-u.ac.jp

緒言

スサビノリ *Neopyropia yezoensis* (Ueda) Li-En Yang & J. Brodie は大型紅藻の一種で、栄養価の高さから日本、中国、韓国で広く養殖されている (Zhang *et al.* 2014)。日本では、養殖したノリを摘採後、細断し乾燥する加工過程を経て乾海苔が製造される。その後、検査場で品質による格付けが行われ、高品質なものから順に 1–7 等までの等級が付される。品質は色調、光沢、呈味、香りなどで評価されるが (右田 1979, 川村 2017)、このうち乾海苔の色調はノリの生育状況に応じて変動しやすいものの、外観の特徴であることから重視されている。しかしながら、色調の判断は目視による官能評価が中心であり、客観性に乏しいという現状がある (久野・川村 2007)。そのため、乾海苔の色調を客観的かつ科学的に判断する指標として、色調の主要な要因となる光合成色素量を測定することが推奨される。ノリは光合成色素として、ほとんどの植物が所有するクロロフィル *a* やカロテノイド類に加え、紅藻に特徴的なフィコエリスリン、フィコシアニンといったフィコビルン色素を含有しており、これら色素の含有量が色調に反映されている (植木ら 2010, Zhang *et al.* 2012, Kobayashi *et al.* 2020)。

乾海苔の光合成色素を定量する際、一般的には海苔片を乳棒と乳鉢で細かく破碎した後に溶媒で色素を抽出し、分光光度計で各色素の吸光度を測定する手法が用いられてきた (斎藤・大房 1974)。しかしながら、実際にこの手法で色素定量を行う過程で、以下のような課題が挙げられた。最大の課題は、海苔片の破碎に費やす時間の長さである。この手法では 1 検体当たり約 15 min を要するため、多数の試料を対象に繰り返し実験を行うに当たっては、時間の短縮が求められる。また、手作業による破碎のため、乾海苔試料の破碎具合が均一にならない点も懸念される。加えていくつかの研究報告では、斎藤・大房 (1974) の手法とは異なる光合成色素測定手法を用いている状況がある (Lee & Choi 2018, Ma *et al.* 2020, Sano *et al.* 2020, Mikami *et al.* 2021)。研究調査機関や研究者ごとに異なる手法を用いて乾海苔あるいは生ノリの光合成色素測定を行っていることから、それぞれの研究データを比較解析することは難しい。したがって、簡便で利用しやすい色素定量手法を提案することにより、今後、乾海苔や生ノリの色調を客観的かつ統一的に比較できると考える。

そこで本研究では、斎藤・大房 (1974) の手法を従来法と

称し、従来法の改善に当たって、海苔片を手作業で破碎する過程を機械化し、迅速かつ均一に破碎する手法を検討した。破碎する機器として、様々な試料作成の場で活用され、植物プランクトンの色素抽出でも実績のある細胞破碎装置を利用した (Mock & Hoch 2005, Wright *et al.* 2010)。

また、色素測定において、従来法で用いられている吸光度測定では低濃度の試料を検出しにくいことや、目的色素以外の物質も測定波長に吸収を持つ場合があり、粗抽出物では色素量の正確な定量が難しいという欠点がある。これに対して、蛍光光度測定では低濃度試料の測定に対応できるうえ、励起光と蛍光の2点で標的色素を選択できるため、目的色素に狙いを定めて測定することが可能である。そこで、色素の測定精度を吸光法と蛍光法で比較することとした。さらに、クロロフィル *a* を抽出する際には、従来法のように90%アセトンを使用することが多いが、アセトンが揮発性であること、抽出時にクロロフィル *a* が分解されやすいことなどの課題がある (Suzuki & Fujita 1986, Suzuki & Ishimaru 1990)。クロロフィル *a* の抽出では、溶媒に *N,N*-dimethylformamide (DMF) を用いる場合がある。DMF は、経口・経皮・蒸気での吸収で急性毒性や発がん性を有するが、90%アセトンに比べ、抽出後のクロロフィル *a* の安定性が高いという利点がある。そこで、抽出溶媒について90%アセトンとDMFそれぞれで色素定量を行い、測定精度と同様に両者を比較した。本研究では、ノリの破碎手法、溶媒、測定法を従来法と比較することで、より簡便で利用しやすい新手法の妥当性の評価を行った。

材料と方法

乾海苔試料

2018–2019年にかけて有明海佐賀県海域から採取された、採取場所・日時の異なるノリから加工された乾海苔を使用した (Fig. 1)。乾海苔試料は、実験で使用するまで -30°C で保

存した。各乾海苔試料を、光合成色素濃度で便宜的に分類するため、従来法 (後述) で乾海苔のクロロフィル *a* 含量を測定し、クロロフィル *a* 含量の多いものから順に3検体ずつを、濃色 (No. 1・2・3)、中濃色 (No. 4・5・6)、淡色 (No. 7・8・9) と分類した。また、佐賀県有明海漁業協同組合で等級が付された乾海苔3検体 (No. 10:5等・No. 11:6等・No. 12:7等) も試料として用いた。

従来法による乾海苔光合成色素の定量

従来の光合成色素の抽出は、秤量した乾海苔 0.3 g に対して、斎藤・大房 (1974) の手順に準じて行い、紫外可視分光光度計 (V-650, JASCO) にて各色素に対応する波長の吸光度を測定した。各光合成色素の濃度は、斎藤・大房 (1974) の計算式に基づいて算出し、乾海苔重量当たりの色素量に換算した。

新破碎抽出手法の検討

1. 色素抽出操作の検討

従来法の乳鉢と乳棒を用いた海苔片破碎の問題点を改善するため、機械による乾海苔の破碎を行った。5 mm 径と 0.5 mm 径のジルコニアボールそれぞれ1粒と 0.5 g を入れた細胞破碎用サンプルチューブ (TM-625S, トミー精工) に乾海苔を入れ、細胞破碎装置 (Micro Smash MS-100, トミー精工) で破碎した。乾海苔はパンチャーで 5 mm 径 (約 1.5 mg) にくり抜いた海苔片として使用し、海苔片 1, 2, 3, 6, 10 枚ずつにまとめて秤量して、それぞれ破碎用のサンプルチューブに入れた。チューブを 4,500 rpm, 20 sec の条件で高速振盪させ、1 min の氷冷を行った。この操作を2回実施し、色素に対応した抽出溶媒をチューブに 1 mL 添加して、再び同条件で振盪させるまでを破碎操作とした。破碎した後、下記2通りの抽出操作でクロロフィル *a* を抽出し、両操作の効率を比較した。この検討実験は、乾海苔重量当たりのクロロフィル *a* 含

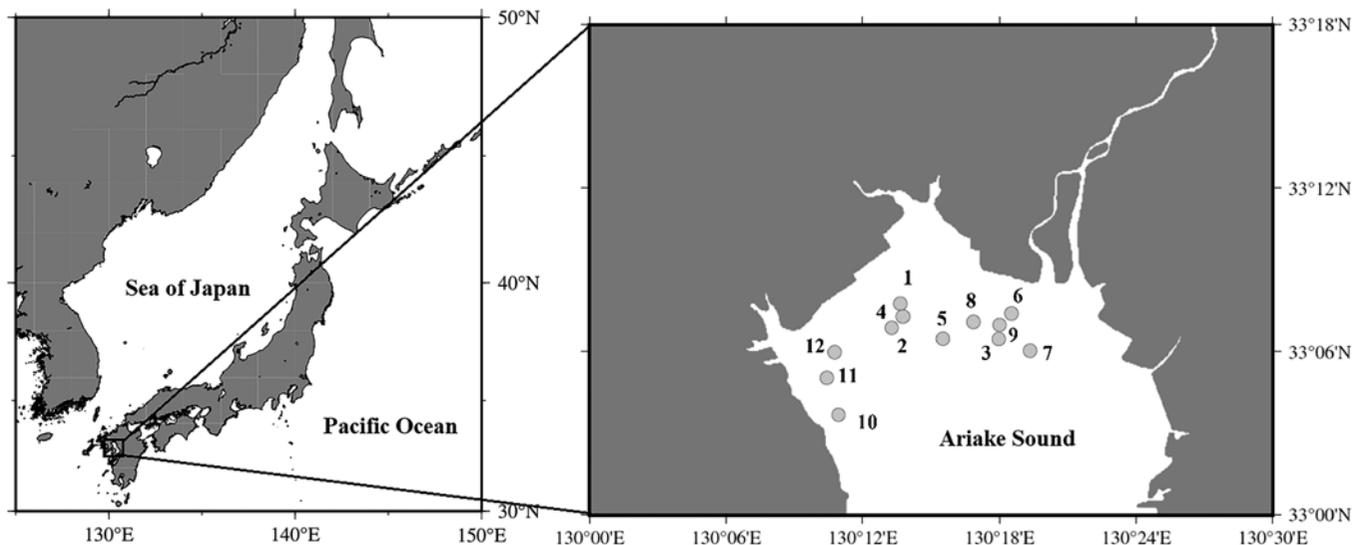


Fig. 1. Sampling sites (filled circle) of *Neopyropia yezoensis* collected from November 2018 to March 2019 in the Ariake Sound, Saga, Japan.

量が多量の No. 1 と、少量の No. 12 を代表として使用した。

操作 1 では、サンプルチューブ内の破碎乾海苔溶液を 15 mL 遠沈管に移し、再度 90% アセトン を 1 mL 添加して攪拌洗浄し、この液を遠沈管に移した。この洗い込み操作を計 3 回行った後、90% アセトンで 10 mL に定容した。その後、ウォーターバス (Thermo Minder SDmini, タイテック) で 50°C, 5 min 加温し、1,800 g で 20 min 遠心した上清を色素抽出液とした。色素抽出液の吸光度は従来法と同様の方法で測定し、同じ式で乾海苔重量当たりの色素量に換算した。

操作 2 では、破碎乾海苔溶液をサンプルチューブのままドライブロックバス (MyBL-100C, アズワン) で 50°C, 5 min 加温した。その後、21,500 g で 10 min 遠心し (himac CT15RE, 工機ホールディングス), 15 mL 遠沈管に上清 500 μ L を移した。移した上清と同量の 90% アセトンを再度サンプルチューブに添加して攪拌した後、同様の遠心操作を行い、上清を 15 mL 遠沈管に移した。この操作を計 3 回行った後、90% アセトンで 10 mL に定容したものを色素抽出液とした。色素量は操作 1 と同様の手法で測定し、算出した。

2. 使用する乾海苔量の検討

乾海苔を確実に破碎できる前項 1 で示した破碎操作と選定した色素抽出操作において、溶媒量 10 mL に対する最適な海苔片枚数を比較検討した。この検討実験は、クロロフィル *a* 含量が多量の No. 1, 中量の No. 4, 少量の No. 10 を代表として使用した。5 mm 径の海苔片を 1, 3, 5, 10 枚ずつにまとめて秤量し、それぞれ破碎用のサンプルチューブに入れた。破碎後、選定した操作で色素抽出を行い、従来法と同様の手法で測定し色素量を算出した。また、この手法で定量したクロロフィル *a* 含量と従来法で抽出したクロロフィル *a* 含量とを比較し、従来法に対して本手法でどれほど抽出できたのかを、抽出効率として算出した。

3. 乾海苔の破碎条件の検討

前項までの実験において、乾海苔に最適な色素抽出操作、海苔片枚数は決定されたため、海苔片の破碎条件の検討を行った。上述した 1 および 2 の検討では、確実に海苔片を破碎できる条件を採用したが、破碎条件が強すぎると、サンプルチューブの破損、摩擦熱や物理作用で色素の破壊等の問題が生じた。その為、本項では海苔片を破碎できる中でも可能な限り弱い条件を検討した。破碎条件の中で大きな問題となるのは振盪の回転速度であるため、これまで使用していた 4,500 rpm と、より速度を下げた 4,000 rpm とで効率を比較した。この検討実験は、クロロフィル *a* 含量が多量の No. 2, 中量の No. 5, 少量の No. 8 を代表として使用し、海苔片 3 枚で実施した。上記 1 で選定した抽出操作で色素抽出を行い、色素量を従来法と同様の手法で測定し、算出した。

従来法と新破碎抽出手法の精度比較

前項 1-3 の検討実験の結果で選定した、海苔片破碎条件、

色素抽出操作、海苔片枚数を新破碎抽出手法とし、この手法による全ての乾海苔試料の光合成色素定量を実施した。海苔片破碎後、脂溶性色素は 50°C で 5 min 加温後に 1,800 g で 20 min 遠心し、水溶性色素は 4°C で一晩静置後に 3,600 g で 40 min 遠心して、それぞれ上清を色素抽出液とした。色素抽出液の吸光度は従来法と同様の方法で測定し、同じ式で乾海苔重量当たりの色素量に換算した。この手法で定量した色素量を、従来法で定量した値と比較し精度を評価した。細胞破碎装置を用いることで繰り返し実験の定量誤差がどれほど抑えられたかの評価は、従来法での測定値の標準偏差が、新手法でどれだけ減少したのかという指標 (標準偏差の減少率) で行った。標準偏差の減少率は、乾海苔試料ごとの標準偏差から誤差伝播によって誤差の平均を求め、新手法の誤差平均が従来法と比較して何割減少したかで算出した。

クロロフィル *a* の蛍光強度測定と吸光度測定と比較

クロロフィル *a* 含量を吸光度から算出していた従来法に対して (斎藤・大房 1974), 本研究では迅速かつ対象色素を直接測定できる蛍光強度からクロロフィル *a* 含量を算出し、吸光度での値と蛍光法での値を比較した。クロロフィル *a* の蛍光強度は、蛍光光度計 (Trilogy Laboratory Fluorometer, Turner Designs) とクロロフィル *a* 用モジュール (Chlorophyll *a* Non-Acidification Module, #7200-046, Turner Designs) を使用して測定した。クロロフィル *a* 標準品 (富士フイルムワコーケミカル株式会社) を DMF に溶解して 6 段階に希釈し、硼珪酸ガラスチューブに 4 mL 加えて蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度から検量線を作成しクロロフィル *a* 濃度に換算した後、従来法と同様に乾海苔重量当たりのクロロフィル *a* 含量を算出した。以降は、最終的に算出したクロロフィル *a* 含量について、吸光度での値を Chl-Abs, 蛍光法での値を Chl-Flu と称する。全ての乾海苔試料を用いて、上述した手法の精度比較で行った新破碎抽出法と同じ手順で色素を抽出した。色素抽出液は、従来法と同様に吸光度を測定するとともに蛍光強度も測定し、Chl-Abs と Chl-Flu を算出した。また、各定量値の標準偏差から、上記のように Chl-Abs と Chl-Flu それぞれ誤差の平均を求め、Chl-Flu の誤差平均が Chl-Abs の何割減少したかを示す標準偏差の減少率を算出した。

クロロフィル *a* の抽出溶媒の比較

従来法では、クロロフィル *a* などの脂溶性色素を 90% アセトンによって抽出していた (斎藤・大房 1974)。本研究では、色素安定性に利点のある DMF でクロロフィル *a* を抽出し、2 つの溶媒間で値を比較した。この検討実験は、クロロフィル *a* 含量が多量の No. 2, 中量の No. 5, 少量の No. 8 を代表として使用した。上記の新破碎抽出法で、用いる抽出溶媒を 90% アセトンから DMF に変更し、他は同じ手順で色素を抽出した。色素抽出液は吸光度と蛍光強度をそれぞれ測定し、Chl-Abs と Chl-Flu を算出してこれらの値を比較した。

統計解析

色素含量測定にかかわる多重比較解析には、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) および Tukey の検定を使用した。二元配置分散分析において、2つの因子の間に交互作用が見られた場合は、因子間の主効果が検証できないため、主効果を持つ因子を特定しなかった。

結果

新破碎抽出手法の検討

1. 色素抽出操作の検討

各抽出操作 (操作 1 および操作 2) で行った脂溶性色素抽出液について、吸光度測定から算出したクロロフィル *a* 含量を Fig. 2 に示した。そのクロロフィル *a* 含量は、試料 No. 1 が 2.5–4.4 mg/g, No. 12 が 1.1–1.8 mg/g となった。試料選抜時にクロロフィル *a* 含量で分類した色調 (以降、濃淡) の異なる両試料間のクロロフィル *a* 含量には有意な差が確認された ($p < 0.001$) が、クロロフィル *a* 含量の結果に対して、各抽出操作の影響は認められなかった ($p > 0.05$) (Table S1)。

2. 使用する乾海苔量の検討

海苔片枚数ごとに、操作 1 の方法で抽出した脂溶性色素抽出液について、吸光度測定から算出したクロロフィル *a* 含量を Fig. 3A に示した。そのクロロフィル *a* 含量は、試料 No. 1 が 3.1–4.8 mg/g, No. 4 が 2.8–6.1 mg/g, No. 10 が 2.1–3.0 mg/g となった。同じサンプルでも、海苔片枚数の違いでクロロフィル *a* 含量に差異が確認された。また、海苔片枚数ごとのクロロフィル *a* の抽出効率を Fig. 3B に示した。その値は、1枚で 76.3–140.2%, 3枚で 82.6–89.6%, 5枚で 65.5–77.5%, 10枚で 54.3–64.0% となった。最大値は海苔片 1枚の No. 4 だが、

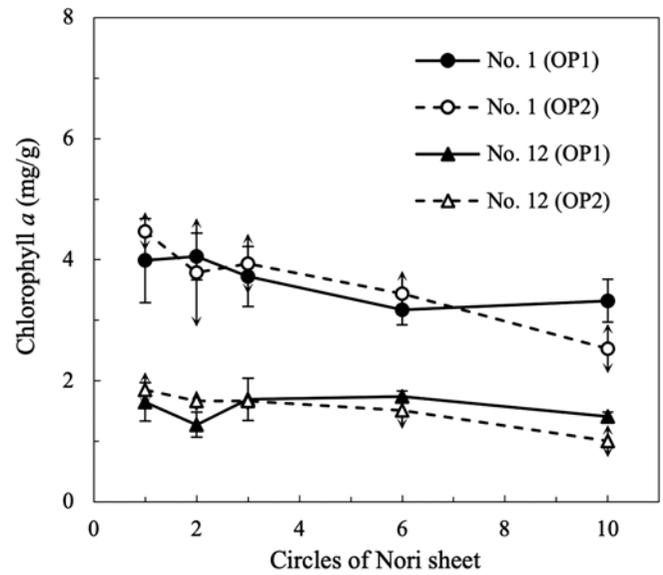


Fig. 2. Chlorophyll *a* content of each sample extracted with operation 1 (OP1) or operation 2 (OP2).

OP1: Crushed dried Nori sheet was rinsed three times with solvent and volume was fixed at 10 mL. After that, it was extracted by heating. OP2: Crushed dried Nori sheet was heated and extracted in 1 mL of solvent. The supernatant was collected by centrifugation three times, and the volume was fixed at 10 mL.

Closed and open circles show the results of sample No. 1 extracted with OP1 and OP2, respectively. Closed and open triangles show the results of sample No. 12 extracted with OP1 and OP2, respectively. Data are shown as mean \pm standard deviation ($n = 3$).

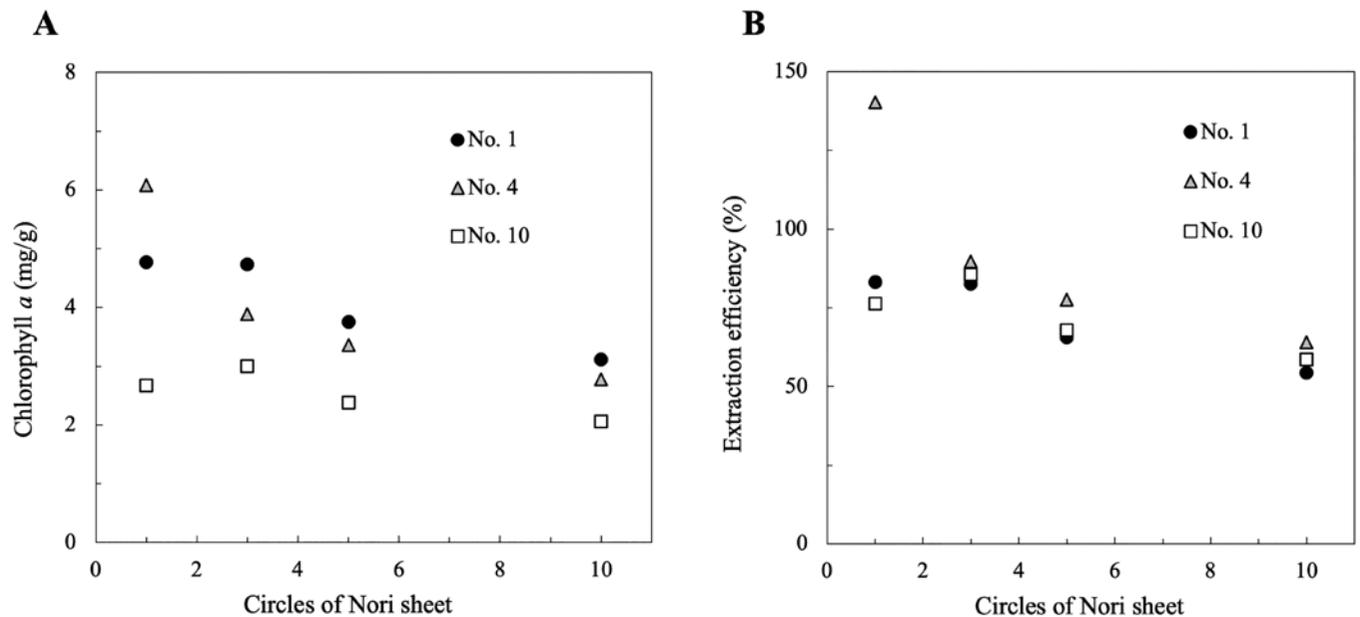


Fig. 3. Chlorophyll *a* content (A), extraction efficiency (B) of a series of Nori sheet circles ($n = 2$).

海苔片 1 枚は試料間で抽出効率の差異が大きく、測定間のばらつきが無視できなかった。海苔片 3 枚以降では、3 枚をピークとして海苔片枚数の増加に伴い抽出効率の減少が確認された。

3. 乾海苔の破碎条件の検討

細胞破碎装置の振盪回転速度を、確実に破碎できる 4,500 rpm と、より速度を下げた 4,000 rpm とし、3 枚の海苔片から操作 1 で抽出した脂溶性色素抽出液を作成した。この色素抽出液について、クロロフィル a 含量を吸光度測定によって測定、算出した結果を Fig. 4 に示した。4,500 rpm で破碎した時のクロロフィル a 含量結果は、試料 No. 2 で 4.9 mg/g, No. 5 で 3.7 mg/g, No. 8 で 1.7 mg/g となった。4,000 rpm で破碎した時は、試料 No. 2 で 4.8 mg/g, No. 5 で 3.6 mg/g, No. 8 で 1.6 mg/g となった。

従来法と新破碎抽出手法の精度比較

新破碎抽出手法を用いて測定した、全乾海苔試料の色素定量結果を Fig. 5 に示した。各色素の抽出効率は平均で、クロ

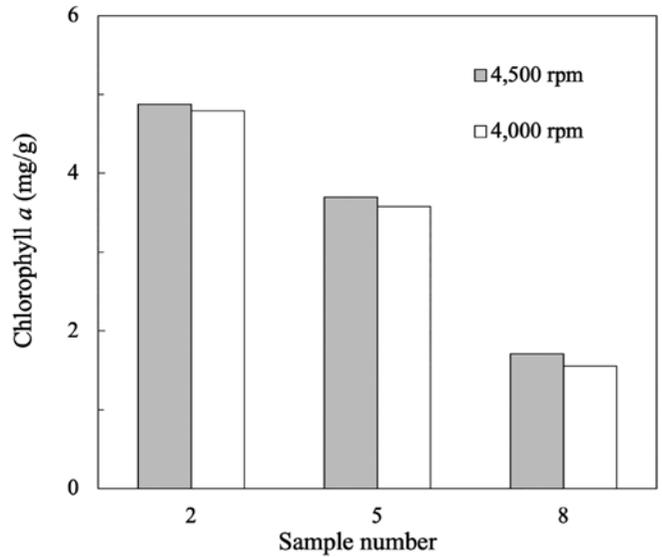


Fig. 4. Comparison of chlorophyll a content ground at rotation speeds of 4,500 rpm or 4,000 rpm (n = 2).

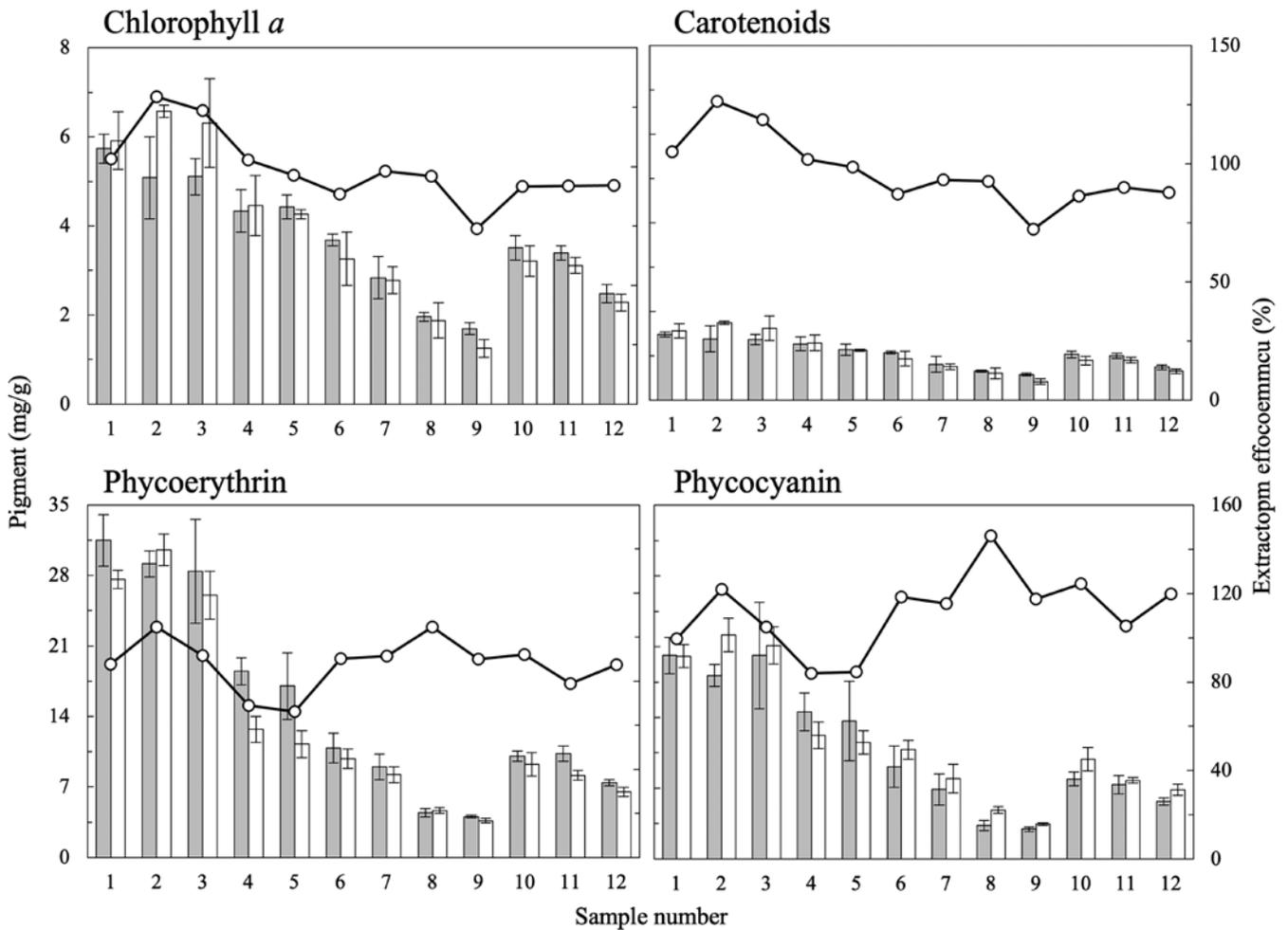


Fig. 5. Results of pigment quantification using the new method. Closed bars show the values of the conventional method, open bars show the values of the new method, and open circles show the extraction efficiency. Data are shown as mean ± standard deviation (n = 3).

クロフィル *a* が $98.9 \pm 0.05\%$, カロテノイド類が $96.6 \pm 0.05\%$, フィコエリスリンが $87.9 \pm 0.03\%$, フィコシアニンが $111.9 \pm 0.06\%$ であり, 新破碎抽出手法の抽出効率は従来法とほぼ同等であった。標準偏差の減少率は, クロフィル *a* が 22%, カロテノイド類が 2% 増加した一方で, フィコエリスリンとフィコシアニンはそれぞれ 45% および 50% と, 測定誤差が従来法の半分程度まで減少していた。

両手法による定量値を各色素で比較すると, 脂溶性色素のクロフィル *a* およびカロテノイド類の場合は決定係数 $r^2 = 0.981$ であり (Fig. 6A), 水溶性色素のフィコエリスリンおよびフィコシアニンの場合は $r^2 = 0.983$ となった (Fig. 6B)。両手法での色素定量値に対し二元配置分散分析を実施したところ, 全ての色素で乾海苔試料の濃淡 (クロフィル *a* 含量で分類) と色素量が有意に影響しており ($p < 0.001$), 濃色または等級の高い乾海苔ほど色素量が多い結果になった。脂溶性色素のクロフィル *a* とカロテノイド類については, 手法と乾海苔の濃淡とが密接に関係し互いに影響し合う作用が見られたものの, 手法に有意差は確認されなかった (クロフィル *a*: $p > 0.05$; カロテノイド類: $p > 0.05$)。水溶性色素のフィコシアニンも同様に両手法に有意差は認められなかったが ($p > 0.05$), フィコエリスリンは手法に有意差が確認されるとともに, 手法と濃淡とが密接に関わり合っていた ($p < 0.01$) (Table S2)。

新破碎抽出手法での各色素量について, クロフィル *a* 含量を基準に比較すると, カロテノイド類およびフィコシアニンの含量はクロフィル *a* 含量と比例して増加していた (Fig. 7)。一方でフィコエリスリンは, クロフィル *a* 含量が少量から中量程度である中濃色までの乾海苔試料では比例関係を持つが, クロフィル *a* 含量 5 mg/g 付近を特異点としフィコ

エリスリンが顕著に増加していることが示された。クロフィル *a* 含量とフィコエリスリン含量の比率 (PE / Chl *a*) を求めたところ, 中濃色, 淡色, 等級付き乾海苔試料の No. 4–12 ではすべて 3.0 以下であるのに対し (Table 1), 濃色の No. 1–3 では 4.1–4.7 となり濃色な乾海苔試料でフィコエリスリン含量の有意な増加が認められた ($p < 0.001$)。

クロフィル *a* の蛍光強度測定と吸光度定量法との比較

吸光法と蛍光法それぞれで測定し, 算出した全乾海苔試料の Chl-Abs と Chl-Flu の結果を Fig. 8 に示した。得られる回路

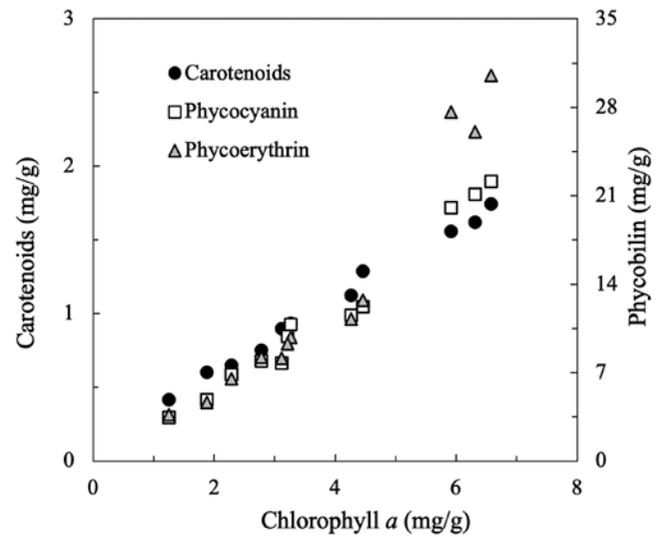


Fig. 7. Correlations of carotenoids, phycoerythrin, and phycocyanin contents with chlorophyll *a* content ($n = 3$).

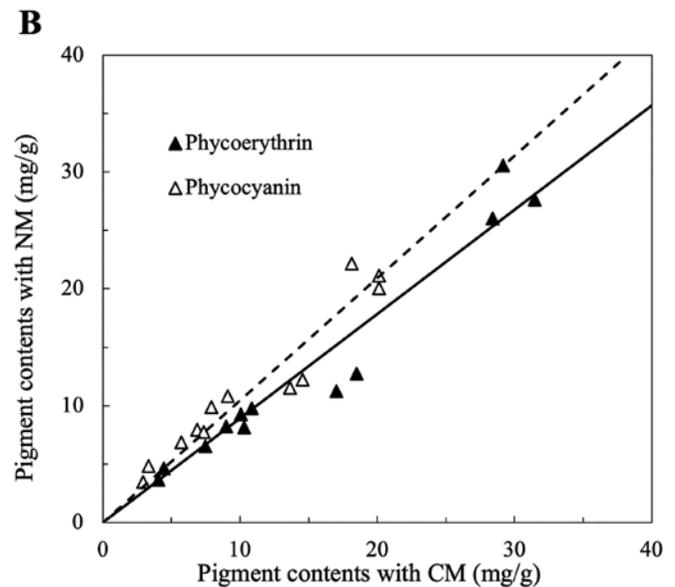
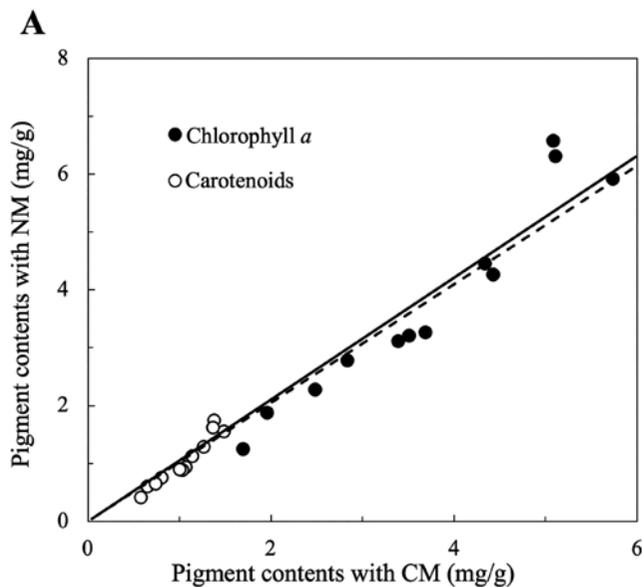


Fig. 6. Correlations of quantitative values of each photosynthetic pigment extracted by conventional (CM) and new methods (NM) ($n = 3$). (A) liposoluble pigments; (B) water-soluble pigments.

線の決定係数は $r^2 = 0.971$ であることから、両者に強い相関が見られた。乾海苔試料ごとの定量値を詳細に比較すると、クロロフィル *a* 含量の少ない淡色な乾海苔では Chl-Flu が最大で Chl-Abs の 1.5 倍となった。また、標準偏差の減少率は約 30% であり、Chl-Flu が Chl-Abs よりも繰り返し実験の定量誤差を 3 割程度抑えられた。

クロロフィル *a* 抽出溶媒の比較

90% アセトンと DMF それぞれの溶媒で新破碎抽出手法により抽出し、吸光度から算出した Chl-Abs の結果を Fig. 9A に、蛍光強度から算出した Chl-Flu の結果を Fig. 9B に示した。使用した全ての乾海苔試料において、DMF は 90% アセトンよりも高い値を示し、Chl-Abs は 1.1 倍、Chl-Flu は 1.2 倍以上であった。

考察

乾海苔光合成色素測定における従来法との比較

最適な乾海苔光合成色素の抽出操作を検討するため、本研究では破碎後の乾海苔溶液から 2 つの操作で脂溶性色素を抽出し、代表として両者のクロロフィル *a* 含量を比較した。両操作の相違点は、操作 1 では 10 mL 溶媒中で加温抽出し、1 回の遠心操作で残渣を除去するのに対して、操作 2 では 1 mL 溶媒中で加温抽出し、複数回の遠心操作で残渣を除去して 10 mL に定容する点である。測定結果には、いずれの試料でも両操作に大きな差は見られなかったが、操作 1 の方が簡便かつ短時間で行えることから、この方法を採用することとした。そこで、操作 1 を使用して予備的に 12 検体の乾海苔を用意し、5 mm 径の海苔片 10 枚を対象にクロロフィル *a* 含量測定を実施した。その結果、従来法に対する抽出効率は平均で

Table 1. PE/Chl *a* for each color tone of Nori sheet: averaged for No.1–3 for dark color, No.4–6 for medium-dark color, No.7–9 for light color, and No.10–12 for graded color, respectively.

Color tone of Nori sheet	PE / Chl
Dark	4.48 ± 0.30
Medium dark	2.83 ± 0.18
light	2.96 ± 0.27
Graded	2.79 ± 0.15

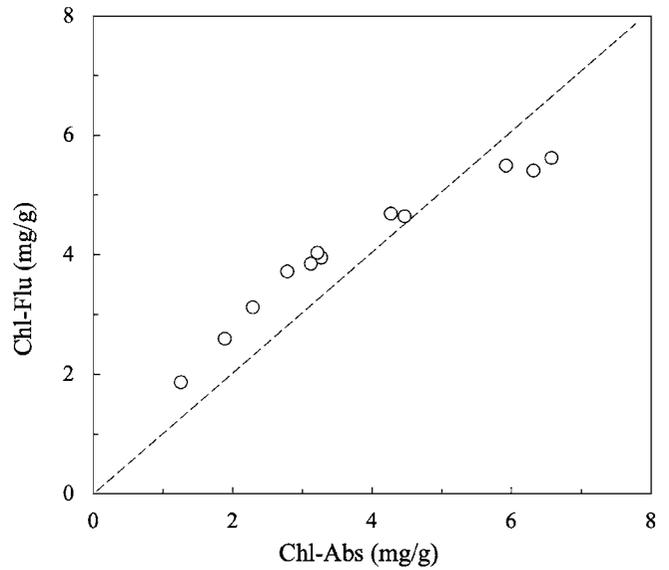


Fig. 8. A correlation between chlorophyll *a* content measured with the absorption-based method and by the fluorescence-based methods ($n = 3$).

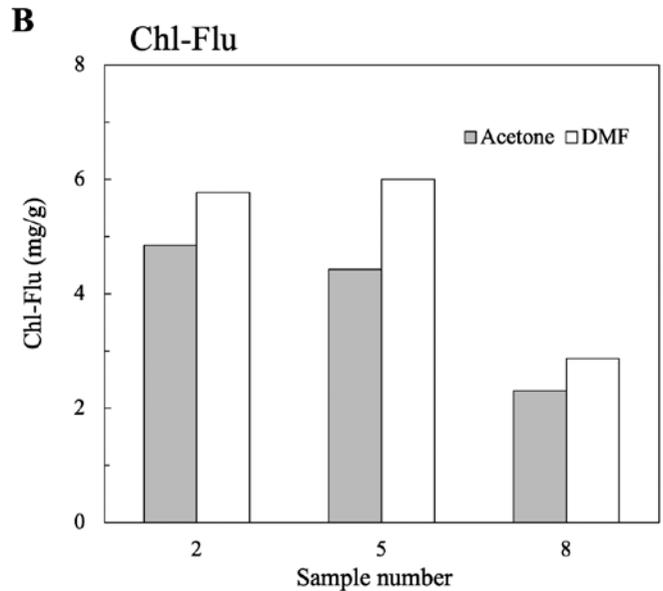
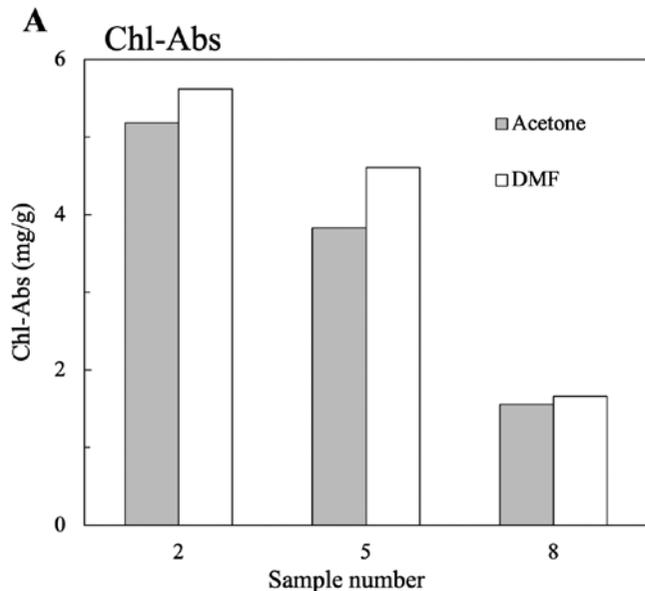


Fig. 9. Comparison of chlorophyll *a* content extracted with 90% acetone and DMF ($n = 2$). (A) Chl-Abs; (B) Chl-Flu.

56.2 ± 0.02% となり、従来法の半量程度しか色素が抽出できないことが判明した (Fig. S1)。その要因としては、3回の洗い込み操作ではサンプルチューブ内の海苔片が取り切れないこと、溶媒液量に対して海苔片量が多かったことなどが挙げられる。そこで洗い込みに関しては3回に制限せず、10 mLに定量するまで可能な限り洗い込むことがよいと考える。

海苔片枚数については、Fig. 2やFig. 3Aに示すように海苔片枚数の増加に伴ってクロロフィル *a* 含量が減少することからも、溶媒量 10 mL に対して海苔片量が多すぎることが示唆された。5 mm 径の海苔片 1, 3, 5, 10 枚でクロロフィル *a* 含量を測定した結果、海苔片 3 枚の時に最も高い効率で抽出できるが、枚数の増加に伴って抽出効率が低下する傾向が見られた (Fig. 3B)。同じ色素抽出液について蛍光法によるクロロフィル *a* 含量測定を行ったところ、さらに顕著に海苔片枚数との反比例が明示され、海苔片 10 枚では濃淡の違う乾海苔試料が全てクロロフィル *a* 含量 2 mg/g へと収束していた (Fig. S2)。すなわち、海苔片枚数を増やしてもその乾海苔量に対して十分な量のクロロフィル *a* が抽出できていないため、溶媒中でクロロフィル *a* が飽和していると考えられる。以上から、いずれの濃淡の海苔片でも抽出効率が安定しており、蛍光法でも値が飽和せずに測定できる条件として、本破碎手法で用いる溶媒量 10 mL に対して使用する海苔片は 3 枚 (約 5 mg) が良いと判断した。

確定した抽出操作と海苔片枚数で、乾海苔破碎条件の再検討を行ったところ、振盪回転速度 4,500 rpm と 4,000 rpm で同等の結果が得られた (Fig. 4)。4,500 rpm では、細胞破碎装置が推奨するサンプルチューブの速度上限に近く、破碎時の摩擦熱が生じるため色素量にも影響を与える可能性がある。実際に、4,500 rpm では破碎操作中にサンプルチューブに亀裂が入り、破損する場合もあった。これらの点を考慮して、本破碎装置を使用する場合は、推奨のサンプルチューブを使用した上で、振盪回転速度 4,000 rpm の条件で海苔片を破碎する方法が良いと判断した。

様々な濃淡 (クロロフィル *a* で分類) の乾海苔試料 12 検体に対して新破碎抽出手法を適用した結果、この手法の抽出効率は従来法と遜色ないことに加え、従来法の測定値との回帰式の決定係数が 0.98 となり、本手法が従来法で問題となっている海苔片の破碎抽出手法を代替できるものであることが示された (Figs 5, 6)。また、従来法と本手法それぞれの色素定量値を比較解析したところ、クロロフィル *a*、カロテノイド類、フィコシアニンには有意差が見られなかったため、統計的にも本手法が従来法と同等であると言える。一方、フィコエリスリンでは手法間に有意差が確認された。全ての色素において、濃色では色素含量が高く淡色では低くなっている。つまり、色素含量は乾海苔の濃淡に強く影響を受けており、特にフィコエリスリンはその傾向が強く、濃色で顕著に多かった (Fig. 7)。手法、濃淡、手法と濃淡の相関、以上3つの要因全てで有意な差異が認められているため詳細な議論は困難であるが、フィコエリスリンで確認された手法の有意差は、濃淡の影響

に引きずられて生じたと推測される。よって、フィコエリスリンに関しても、新破碎抽出手法は従来法の代替に十分値すると言える。

光合成色素測定における吸光度測定と蛍光測定と比較

本研究では、吸光度から算出した Chl-Abs と、蛍光強度から算出した Chl-Flu を比較し、両者に強い相関が見られることを確認した (Fig. 8)。また、中濃度以下の淡い乾海苔試料 (No. 4-12) では Chl-Flu が最大で Chl-Abs の 1.5 倍も高い値を示しており、低濃度の検出力が高い蛍光法の特長が生かされている。この結果から、クロロフィル *a* 含量は蛍光強度を使用しても従来法と同程度以上に測定できることが分かった。従来法による色素測定は、複数の色素や有機物が混在する色素抽出液中の吸光度を多波長で測定し、各色素に対応した吸収波長に定数を掛ける計算式によって色素濃度を算出している (斎藤・大房 1974, Jeffrey & Humphrey 1975, Porra *et al.* 1989)。この手法では、乾海苔の吸収スペクトルからクロロフィル *a* 含量を推定しているが (土屋ら 1961, 斎藤・大房 1974)、色素抽出液中の他の植物色素や有機物による吸光を考慮する必要があり (Jeffrey *et al.* 1997, Babin *et al.* 2003, Hulatt *et al.* 2009)、多様な色素含量試料への換算式の汎用性や妥当性については十分な検証が必要である。また、乾海苔などの紅藻類、他の藻類、陸上植物など生物群や種に見合った計算式を準備する必要がある。さらにフィコエリスリンやフィコシアニンは、吸収帯が広く吸光による色素量測定は難しい (Zimba 2012)、これらの色素が低濃度の際は、吸光スペクトルに基づく色素含量推定が不正確になる (Beer & Eschel 1985)。これに対して、蛍光強度による色素測定では、各色素に応じた波長の励起光で励起し、その色素が放つ蛍光波長を検出するため、低濃度であっても、各色素の量をより精密に測定できる (Welschmeyer 1994)。蛍光法であれば、フィコエリスリンやフィコシアニンの直接定量にも対応している (Cowles *et al.* 1993, Lee *et al.* 1994)。

脂溶性光合成色素測定における抽出溶媒の検討

脂溶性色素の抽出溶媒について、従来法で使用される 90% アセトンは揮発によって溶媒の体積が変化すること、抽出時にクロロフィル *a* が分解されることなどの問題点があった (Wright *et al.* 1997)。他の抽出溶媒として DMF が用いられるが、DMF は急性毒性を有する毒物薬品であり、取り扱いには厳重な注意が必要であるため使用を避けられる場合もある。しかし、DMF は抽出効率が高く、90% アセトンに比べて抽出後のクロロフィル *a* 安定性が高いという利点がある。DMF 中のクロロフィル色素は、-25°C の暗所下で 24 日間は濃度に変化しないとの報告があることから、抽出溶媒としての DMF の能力の高さが伺える (Suzuki & Ishimaru 1990)。

本研究では、90% アセトンと DMF を抽出溶媒に使用した時の、クロロフィル *a* 含量を比較した。全ての条件で DMF 抽出の方が高い値となり、抽出効率が上昇していることが確

認められた。しかしながら、斎藤・大房 (1974) の計算式は 90% アセトンに基づいて設定されているため、DMF での値がこの計算式と合致しない可能性もある。そこで、蛍光強度でもクロロフィル *a* 含量を測定したところ、吸光法よりも高い値になることが分かった (Fig. 9)。DMF 抽出で高い値となった要因は、90% アセトンと比べてクロロフィル *a* の分解を抑えられたためと考えられる。また、色素含量を推定する換算式が、色素量を過小評価していた可能性も考えられる。一方で、DMF の使用により抽出効率が高くなったことで、濃色の No. 2 では溶媒中でクロロフィル *a* が飽和している可能性もある。そのため、色の濃い乾海苔から色素を抽出する際は、溶媒量を増すなどの対応をする必要があるだろう。これらの結果から、脂溶性色素のクロロフィル *a* は、DMF を抽出溶媒とすること、そして計算式に依存しない蛍光法で色素量を測定することが望ましいと考えられる。

乾海苔光合成色素測定の新手法提案

本研究を通して、乾海苔光合成色素測定の新手法を以下のように提案する。乾海苔片約 5 mg を細胞破碎用サンプルチューブに入れる。5 mm 径のジルコニアボールを 1 粒、0.5 mm 径のジルコニアボールを 0.5 g 加え、細胞破碎装置で 4,000 rpm、20 sec 振盪破碎する。1 min の氷冷を挟み、再び同様に破碎する。脂溶性色素のクロロフィル *a* とカロテノイド類は DMF、水溶性色素のフィコエリスリンとフィコシアニンにはリン酸緩衝液を 1 mL 添加し、再度振盪破碎する。サンプルチューブ内の乾海苔溶液を 15 mL 遠沈管に、溶媒で何度も洗い込みながら移し、10 mL に定容する。その後、脂溶性色素は 50°C で 5 min 加温後 1,800 g で 20 min の遠心、水溶性色素は 4°C の暗所で一晩静置後 3,600 g で 40 min の遠心を行い、それぞれ上清を回収して色素抽出液とする。これらの蛍光強度を測定し、色素標準品で作成した検量線によって色素濃度を算出する。

本研究で提案した新手法では、5 mm 径の海苔片 3 枚 (約 5 mg) を使用しており、従来法の約 300 mg と比較してその量は 1/60 に抑えられた。乾海苔の破碎に要する時間は、今回実施した 12 検体を全て抽出した場合、従来法で 2 h を要していたのに対し、新手法では細胞破碎装置で同時に処理できることから、1 検体あたり 1 min 程度にまで短縮された。特にフィコエリスリンとフィコシアニンでは、測定値の標準偏差を従来法の半分ほどにまで抑えられたことから、機械化により破碎程度が均一化したと考えられる。よって本研究で提案した新手法によって、従来法の問題であった非効率性と不安定性を改善することができた。さらに色素の蛍光測定、DMF による脂溶性色素の抽出の妥当性も併せて評価した。本研究では、新手法を従来法と詳細に比較して、統計解析でも有用性が実証された。今後、信頼性のある手法として本手法が活用されることを期待する。また、本研究で提案した海苔片の破碎手法は、抽出溶媒の変更によりタンパク質やビタミン等、様々な代謝産物の抽出への応用が可能である他、凍結乾燥し

た生ノリにも応用できるものである。本手法が、色素測定のみならずノリ研究の発展と海藻産業の推進に繋がることを期待する。

謝辞

本研究を推進するにあたり、乾海苔試料を御提供いただいた佐賀県有明海漁業協同組合の皆様へ深く御礼申し上げます。本研究は、佐賀大学のプロジェクト「地域の農水圏生物生産・利用技術等の高度化」の支援、JSPS 科研費 18K19235 の助成を受けて実施されました。

本論文の補足資料 (Fig. S1, Fig. S2, Table S1, Table S2) については、日本藻類学会の WEB サイト上で論文と同時公開の予定であり、佐賀大学機関リポジトリ (https://saga-u.repo.nii.ac.jp/?action=repository_uri&item_id=23146) でも公開している。

引用文献

- Babin, M., Stramski, D., Ferrari, G. M. *et al.* 2003. Variations in the light absorption coefficients of phytoplankton, nonalgal particles. *J. Geophys. Res.* 108: C7.
- Beer, S. & Eschel, A. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 36: 785–792.
- Cowles, T. J., Desudero, R. A. & Neuer, S. 1993. In situ characterization of phytoplankton from vertical profiles of fluorescence emission spectra. *Mar. Biol.* 115: 217–222.
- Hulatt, C. J., Thomas, D. N., Bowers, D. G., Norman, L. & Zhang, C. 2009. Exudation and decomposition of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) from some temperate macroalgae. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84: 147–153.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁, *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191–194.
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. & Wright, S. W. 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods.* UNESCO Publishing, Paris.
- 川村嘉広 2017. 新・海苔ブック基礎編. 海苔産業情報センター. 福岡.
- Kobayashi, K., Osawa, Y., Yoshihara, A., Shimojima, M. & Awai, K. 2020. Relationship between glycerolipids and photosynthetic components during recovery of thylakoid membranes from nitrogen starvation-induced attenuation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Plant Sci.* 11: 432.
- 久野勝利・川村嘉広 2007. 養殖ノリにおける生ノリと乾ノリの色調評価およびその相互関係. 佐賀県有明水産振興センター研究報告 23: 5–10.
- Lee, H. & Choi, J. 2018. Isolation and characterization of a high-growth-rate strain in *Pyropia yezoensis* induced by ethyl methane sulfonate. *J. Appl. Phycol.* 30: 2513–2522.
- Lee, T., Tsuzuki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, K. & Karube, I. 1994. In vivo fluorometric method for early detection of cyanobacterial waterblooms. *J. Appl. Phycol.* 6: 489–495.
- Ma, J., Xu, T., Bao, M. *et al.* 2020. Response of the red algae *Pyropia yezoensis* grown at different light intensities to CO₂-induced seawater acidification at different life cycle stages. *Algal Res.* 49: 1–7.

- 右田清治 1979. 乾海苔の光沢. 長崎大学水産学部研究報告 46: 11-16.
- Mikami, K., Matsumura, T. & Yamamoto, Y. 2021. Primary characterization of a life-cycle mutant akasusabi of the red alga *Neopyropia yezoensis*. *Phycology* 1: 14-26.
- Mock, T. & Hoch, N. 2005. Long-term temperature acclimation of photosynthesis in steady-state cultures of the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Phytosyn. Res.* 85: 307-317.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 975: 384-394.
- 斎藤宗勝・大房剛 1974. 乾海苔に含まれる光合成色素の簡易定量法. 藻類 22: 130-133.
- Sano, F., Murata, K. & Niwa, K. 2020. Identification, growth, and pigment content of a spontaneous green mutant of *Pyropia kinositae* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 32: 1983-1994.
- Suzuki, R. & Fujita, Y. 1986. Chlorophyll decomposition in *Skeletonema costatum*: a problem in chlorophyll determination of water sample. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28: 81-85.
- Suzuki, R. & Ishimaru, T. 1990. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using *N, N*-dimethylformamide. *J. Oceanogr. Soc. Japan* 46: 190-194.
- 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.
- 植木知佳・村上明男・加藤敏朗・嵯峨直恆・本村泰三 2010. 紅藻スサビノリの光合成色素と葉緑体微細構造における栄養欠乏応答. 日水誌 76: 375-382.
- Welschmeyer, N. A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* 39: 1985-1992.
- Wright, S. W., Jeffrey, S. W. & Mantoura, R. F. C. 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. In: Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. & Wright, S. W. (eds.) *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. pp. 261-282. UNESCO Publishing, Paris.
- Wright, S. W., van den Eenden, R. L., Pearce, I., Davidson, A. T., Scott, F. J. & Westwood, K. J. 2010. Phytoplankton community structure and stocks in the Southern Ocean (30-80°E) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 57: 758-778.
- Zhang, T., Li, J., Lu, Q., Shen, Z. & Zhu, J. 2014. Study of photosynthetic characteristics of the *Pyropia yezoensis* thallus during the cultivation process. *J. Appl. Phycol.* 26: 859-865.
- Zhang, T., Shen, Z., Xu, P. *et al.* 2012. Analysis of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence characteristics of different strains of *Porphyra yezoensis*. *J. Appl. Phycol.* 24: 881-886.
- Zimba, P. V. 2012. An improved phycobilin extraction method. *Harmful Algae* 17: 35-39.

(2021年11月22日受付, 2022年4月8日受理)
通信担当編集委員: 市原 健介



親ガメになった『有用藻譜』

仲田 崇志

現在出版されている国語辞書はそれぞれに工夫を凝らしているが、かつては盗用や剽窃が横行していた。その結果、先行辞書の誤りが後続辞書にも受け継がれ、「親ガメこけたら子ガメも孫ガメこける」(原文ママ)と皮肉られたこともあった(「国語の辞書をテストする」1971. 『暮らしの手帖』2(10): 104-114)。

古くは明治期の辞書にもカメの親子がいたようだ。筆者が海藻の和名を調べていたとき、『大辞典』(山田武太郎(美妙)1912)の海藻の説明が『有用藻譜 第一編』(陶山清猷 1890)に似ていることに気づいた。『有用藻譜』は水産上重要な藻類について、その形態や用法を示した小型の本である。

例えばカモガシラノリを見てみると、多少の言い換えはあるものの『有用藻譜』と『大辞典』の記述が酷似している。他の海藻もいくつか比較してみたが、程度の差はあれその多くが明らかに類似していた。

今とは時代背景も違うため、このような「盗用」に対する問題意識も低かったのだろうか。あるいは明記こそされていないが、許可を得て転用したのだろうか。いずれにせよ、『有用藻譜』が活用されていた実例とは言えそうだ。



- ④ 畧シテかもがしらト云フ 肥前ニテハ之ヲほふしのりト稱ス
④ 海藻ノ名。
④ 伊國 西牟婁郡 肥前國北松浦郡沿海ノ岩石ニ生シ 一所ニ數
④ 伊國 西牟婁郡 肥前國北松浦郡沿海ノ岩石ニ生スル。一所ニ數
④ 多 聚合叢生ノ 細莖ノ 長サニ二分ニシテ分岐多ク各々重疊シテ
④ 多 叢生シ、莖細ク、長サニ二分ニシテ分岐シ、互ニ重ナツテ
④ 團圓ナル塊状ヲナス 其大サ四五分アリテ 暗褐色ナリ
④ 團圓ク 塊 ヲ成ス。 色ハ暗褐。 毎年十
④ 月ヨリ翌年一月迄ノ間ヲ採取ノ季節トシ採リ乾シテ 貯フ
④ 月力カラ翌年一月頃マデ 採取ノ季節トシ 干シテ或ハ八番ヘ、
④ 之ヲ 三杯酢コシ、 又ハ吸物ニ入レ食スレハ佳味ナリ
④ スベテ三杯酢コシ、 又ハ吸物ニ入レ食スレハ佳味ナリ

『有用藻譜 第一編』(陶山清猷 1890. 左写真 2 枚。筆者蔵)、および『有用藻譜』(pp. 23-24; ④)と『大辞典』(山田武太郎 1912. p. 997; ④)におけるカモガシラノリの記述の比較。