

# 海藻に適用できる新規 $\beta$ -グルカン（ラミナラン）定量法の開発

熊谷百慶

鹿児島大学水産学部食品生命科学分野

〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20

TEL:099-286-4221

## 要旨

海藻にはラミナランと呼ばれる $\beta$ -グルカンが含まれる。ラミナランには様々な生物活性が報告されており、ラミナランを含有する機能性食品の開発が望まれる。そのためには、海藻原料中のラミナランや加工食品中のラミナラン含有量を正確に定量するための方法が必要である。本研究では、既存の $\beta$ -グルカン定量法である酵素法およびSEEDアッセイ（Sodium Hypochlorite Extracting and Enzymatic Digesting Assay）が海藻のラミナラン定量に適用可能か否かを検証するとともに、より簡便な新規定量法の開発を試みた。酵素法はセルロースをはかり込むため、海藻の定量には向かないと考えられた。SEEDアッセイについて海藻（アラメ）に対するラミナランの添加回収試験を行った結果、回収率は良好であり、SEEDアッセイは海藻に適用可能であった。SEEDアッセイの欠点である操作の煩雑さと多量の試薬消費を抑えるため、SEEDアッセイの抽出部分を希塩酸による抽出へと置き換えた酸抽出法を考案した。繰り返し分析の結果、酸抽出法の室内再現精度（RSD）は1.7%であった。また、ラミナランを含有するアラメの定量値はSEEDアッセイと同等であり、アラメや加工食品への添加回収率も良好であったことより、今回開発した酸抽出法は、海藻やラミナランを添加した加工食品の定量法として有用と考えられた。最後に、本方法を用いて10種の海藻のラミナラン含有量を調べた結果、アカモクにラミナランの含有を見出した。

## 1. 緒言

$\beta$ -グルカンとはグルコースが  $\beta$ -グリコシド結合で連なったホモ多糖であり、様々な生物活性が報告されている。 $\beta$ -グルカンを含む食品素材として、酵母やキノコ、大麦などが知られており、各種健康食品への応用がなされている。特に大麦由来  $\beta$ -グルカンは我が国においても機能性表示食品として市販され注目されている。

一方、日本人の食生活になじみの深い海藻は  $\beta$ -グルカンであるラミナランを含有している。ラミナランは褐藻類に特徴的に含まれる貯蔵多糖であり、その構造はグルコースの  $\beta$ -1,3-結合を主鎖とし、 $\beta$ -1,6-結合の分岐を有する (Fig. 1)。機能性食品として注目されているキノコや酵母由来の  $\beta$ -グルカンと類似しているが、分子量がキノコや酵母由来のものに比べて小さく、水に溶けやすいという特徴がある<sup>1)</sup>。

ラミナランには食物繊維としての働きのみならず、抗酸化活性や免疫賦活活性を有するとの報告があり、ラミナランを機能性関与成分とした機能性食品の開発が望まれている<sup>2)</sup>。また、近年ラミナランが生体において  $\beta$ -グルカン受容体である Dectin1 阻害作用による興味深い作用機序を介して、炎症性腸疾患を抑制することが報告され注目されている<sup>3)</sup>。そのため、海藻中のラミナランやラミナランを添加した加工食品中のラミナラン含有量を正確に定量する方法の開発が必要である。

これまでに、 $\beta$ -グルカンの定量法としては酵母原料中のベータグルカン量を測定する方法である酵素法<sup>4)</sup>や加工食品中の  $\beta$ -グルカン含有量を測定する方法として、SEED アッセイ<sup>5)</sup> 等が報告されているが、これらの方法が海藻素材またはラミナランを添加した加工食品に適応できるか否かは明らかでない。さらに、SEED アッセイはサンプル中の夾雑成分の影響を受けにくい優れた方法である一方、実験工程が長く操作が煩雑、多量の試薬を消費するという問題点があった。

そこで本研究では、まず酵素法や SEED アッセイが海藻素材に適用可能か否かを検討するとともに、海藻にターゲットを絞った簡便な新規定量法の開発を試みた。

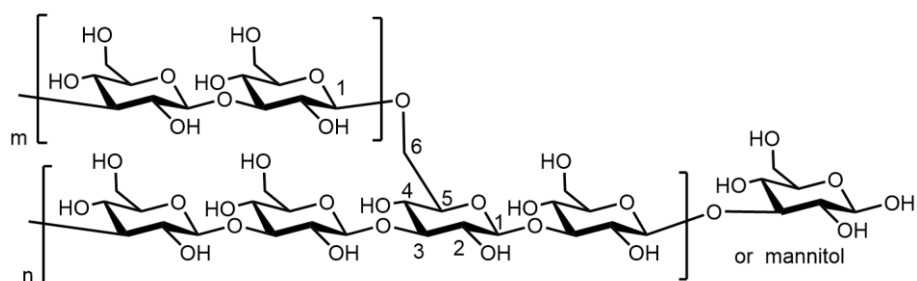


Fig. 1 Structure of laminaran

## 2. 実験方法

### 2.1 試薬・サンプル等

ラミナランはナカライテスクより購入した。実験に用いた海藻は鹿児島市沿岸にてスキューバダイビングで採集したものおよびインターネットサイトより購入したものをを用いた。

### 2.2 酵素法

酵素法には K-EBHLG (Megazyme) キットを用いた。バイアル瓶にサンプルを採取し、2 M KOH 400  $\mu$ L を添加し、同時にスターラーバーを入れた。瓶をアイスウォーターバスに入れ、30 分スターラーで攪拌した。30 分後 1.2 M 酢酸 Na 緩衝液 (pH 3.8) 1.6 mL、Gluczyme 40  $\mu$ L を添加し、再び 2 分間氷上で攪拌した。攪拌後、40  $^{\circ}$ C で 16 h インキュベートを行なった (振盪なし)。インキュベート後室温に冷まし、ミリ Q 水 10 mL を添加して攪拌し、0.45  $\mu$ m シリンジフィルターでろ過した。ろ過後 GOPOD 法でグルコース量を測定し、換算係数 0.9 を乗じて  $\beta$ -グルカン濃度とした。

### 2.3 SEED アッセイ

SEED アッセイは、既報に準じて次のように行った<sup>5)</sup>。サンプルをポリプロピレンチューブに採取し、リン酸緩衝液を加えて沸騰浴で 10 分間処理した。室温に冷却し、1 % パンクレアチン溶液を添加して 37  $^{\circ}$ C, 16 時間振とう水浴で処理した。インキュベーション後、次亜塩素酸ナトリウム溶液 4 mL と 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加し、ボルテックスで攪拌後、2 分間超音波処理した。チューブを 4  $^{\circ}$ C で 90 分間静置し、エタノールを加えてボルテックスで攪拌後、4  $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。チューブを 5000 g で 10 分間遠心したのち上清をアスピレーターで廃棄し、ジメチルスルホキシド (DMSO) を加えた。沸騰浴中で 2 分間、その後、1 分間超音波処理し、この操作を合計 3 回繰り返した。その後、エタノールを添加し、ボルテックスで攪拌後、4  $^{\circ}$ C で 1 時間以上静置した。チューブを 4  $^{\circ}$ C、5000 g、10 分間遠心分離し、上清をアスピレーターで廃棄した。沈殿を 5 mol/L 水酸化ナトリウムで溶解し、エタノールを添加し、ボルテックスで攪拌後、チューブ即座に 4  $^{\circ}$ C、5000 g、10 分間遠心分離して上清をアスピレーターで廃棄した。チューブに 1.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 3.8)、1 mol/L 塩酸を添加し、さらにミリ Q 水を加えた。チューブにエタノールを加えて遠心分離して上清を除いたのち、60  $^{\circ}$ C の乾燥機中で残渣を乾燥させた。乾燥後の残渣に酢酸緩衝液と塩酸を添加し、westase 処理を行った。その後、 $\beta$ -1,3-glucosidase/ $\beta$ -glucanase で処理したのち、溶液中のグルコース濃度を GOPOD 法にて測定し、換算係数 0.9 を乗じて  $\beta$ -グルカン濃度とした。

## 2.4 酸抽出法

50 mL チューブにサンプルを採取後、希塩酸を添加しボルテックスで攪拌した。さらに沸騰浴で 2 分間加温したのち超音波処理を 1 分行い、遠心分離を行なった。遠心分離後上清を別の 50 mL チューブに回収し、この工程を 3 回繰り返した。回収後 EtOH を添加し、沈殿形成した。静置後、遠心分離を行い、遠心分離後の上清をアスピレーターで廃棄し乾燥させた。乾燥後 NaOH、酢酸ナトリウム緩衝液を添加し、ボルテックスで攪拌した。さらに westase で処理を行った後、 $\beta$ -1,3-glucosidase/ $\beta$ -glucanase で処理し、溶液中のグルコース濃度を GOPOD 法にて測定した。得られたグルコース量に換算係数 0.9 を乗じて  $\beta$ -グルカン濃度とした。

## 3. 結果と考察

### 3.1 酵素法の海藻への適用性

酵素法にてセルロースの測定を行ったところ、8.1 g/100 g であった。これは使用する酵素 (Gluczyme) に  $\beta$ -1,4-グルカンであるセルロースを分解する活性があるためと考えられた。よって、セルロースを含む海藻について酵素法 (K-EBHLG) は適さないと考えられた。

### 3.2 SEED アッセイの海藻への適用性

SEED アッセイについて、ラミナランを含有する褐藻アラメ (*Eisenia bicyclis*) を測定した結果を Table 1 に示した。アラメのラミナラン含有量は約 18 % であり、添加回収試験の結果、回収率は 89 % であった。以上より、アルギン酸やフコイダン等の夾雑成分を豊富に含む海藻においても SEED アッセイを適用可能であることが示唆された。

Table 1 Results of SEED assay.

Sample	$\beta$ -glucan (%) <sup>*</sup>	Recovery (%) <sup>*</sup>
Arame ( <i>Eisenia bicyclis</i> )	17.7 $\pm$ 1.4	89.2 $\pm$ 0.4

<sup>\*</sup>n = 3, Mean  $\pm$  Standard deviation.

### 3.3 ラミナランの新規定量法 (酸抽出法) の開発

SEED アッセイは、海藻を含め、加工食品全般の  $\beta$ -グルカン含有量を測定できる優れた手法であることが明らかとなった。一方、工程のなかでサンプル中の夾雑成分を分解・除去するためにパンクレアチン処理や次亜塩素酸ナトリウム処理等を行う必要があり、複数回のエタノール沈殿形成と残渣回収の工程を含むなど操作が煩雑かつ多量の試薬を要する欠点がある。またこの過程の中でラミナランのような低分子多糖は沈殿がうまく形成されず、失われることが懸念された。そこで、ターゲットを海藻および海藻含有加工食品に絞り、より簡便な手法の開発を試みた。

今回、以前より行われている酸抽出の手法<sup>2)</sup>と SEED アッセイの酵素処理を組み合わせ、新たな手法である酸抽出法を考案した。酸抽出法について、ラミナラン定量における採取量の適用範囲を求める目的で採取量 1 mg~200 mg としてラミナランを採取し分析した。いずれも 90%以上の回収が得られたことより、採取量 200 mg まで酵素消化可能と考えられた。

次に、定量下限付近の 1%ラミナラン水溶液を用いて繰り返し精度 (RSD) を求めた。3 日間における日替わり分析の結果、回収率はすべて 90%以上であり、RSD は 1.7%であった。以上より、酸抽出-酵素法はラミナランを精度よく分析できることが明らかとなった。

さらに、酸抽出-酵素法の海藻への適用性を明らかにするため、褐藻アラメを分析して SEED アッセイの結果と比較した。酸抽出法の定量値は 18.7 %と SEED アッセイと同等であった (Table 2)。また、添加回収試験の結果、回収率は 99 %であり、(Table 3)、酸抽出-酵素法は海藻マトリックスに適用可能であることが示唆された。

Table 2 Comparison of quantification results of *Eisenia bicyclis* on SEED assay and acid extraction method.

Sample	$\beta$ -glucan (%) <sup>*</sup>	
	SEED assay	Acid extraction method
Arame ( <i>Eisenia bicyclis</i> )	17.7 $\pm$ 1.4	18.7 $\pm$ 0.6

\*n = 3, Mean  $\pm$  Standard deviation.

Table 3 Recovery rates of laminaran on *Eisenia bicyclis* using acid extraction method.

Added amount of laminaran reagent (mg)	Arame ( <i>Eisenia bicyclis</i> )
	Recovery (%)
10	99.0 $\pm$ 1.3

\*n = 3, Mean  $\pm$  Standard deviation.

また、酸抽出法がラミナランを添加した加工食品にも対応可能かを明らかにするため、測定を妨害すると考えられる脂質、タンパクおよび炭水化物等を含むビスケットへラミナランを 1%相当添加して回収試験を行った結果、回収率は良好であり、酸抽出法は海藻素材のみならず加工食品へも適用可能であると考えられた。

最後に、酸抽出法を用いて鹿児島県沿岸にて採取した海藻および、購入した様々な海藻種についてラミナランの定量を行った (Table 4)。その結果、褐藻アラメのほかにアカモクからラミナランが検出された。アカモクについてはこれまでにラミナランの存在が報告されており、採取時期によって含有量が変動することが知られている。本方法は HPLC 等の機器を必要としない簡便な方法のため、海藻のラミナラン量の季節変動や部

位別の含有量など、海藻の有効利用や生態学的研究の進展にも寄与する可能性がある。

Table 4 Result of screening test of various seaweeds.

Sample <sup>a</sup>	Habitat	$\beta$ -glucan (%) <sup>b</sup>
Hijiki ( <i>Sargassum fusiforme</i> )	Kagoshima (Sakurajima)	nd
Hijiki ( <i>Sargassum fusiforme</i> )	Unknown	nd
Hijiki ( <i>Sargassum fusiforme</i> )	Kagoshima (Yojiro)	nd
Aonori	Unknown	0.2
Wakame ( <i>Undaria pinnatifida</i> )	Unknown	0.4
Kombu	Hokkaido	nd
Kombu	Hokkaido	nd
Umiuchiwa ( <i>Padina arborescens</i> )	Kagoshima (Yojiro)	nd
Unknown ( <i>Sargassaceae</i> sp.)	Kagoshima (Yojiro)	nd
Fukurinamiji ( <i>Dilophus okamurae</i> )	Kagoshima (Yojiro)	nd
Kurome ( <i>Ecklonia kurome</i> )	Oita	nd
Funori	Mie	nd
Akamoku ( <i>Sargassum horneri</i> )	Mie	3.1
Akamoku ( <i>Sargassum horneri</i> )	Ehime	0.2

<sup>a</sup>Japanese name

<sup>b</sup>nd; not detected

#### 4. 結論

本研究では海藻の機能性多糖として注目されるラミナランについて、既存の定量法が適用可能かを明らかにするとともに、さらに優れた新規定量法を開発した。既存の定量法である SEED アッセイは海藻に適用可能であったが、操作が煩雑かつ多量の試薬を消費する欠点があった。そこで今回、SEED アッセイの抽出工程を酸抽出処理に置き換えることにより、分析精度を保ちながら分析工程を大幅に短縮した酸抽出法を確立するに至った。本方法は海藻のみならず、ラミナランを添加した多種類の加工食品の定量に適用できると考えられ、ラミナランを機能性関与成分とした新たな機能性食品開発に寄与するものと期待できる。また、ラミナラン含有海藻のスクリーニングの結果、アカモクにラミナランが含まれることが明らかとなった。本方法は海藻に含まれるラミナランを簡便に分析する手法として、海藻の生態学的研究を進めるうえでも有用と考えられる。

#### 5. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人サンケイ科学振興財団に心より感謝申し上げます。

## 6. 引用文献

- 1) Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, Ishibashi-Ohgo N, Suzuki K.  $\beta$ -Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **64**, 8–17 (2018).
- 2) Kadam SU, O'Donnell CP, Rai DK, Hossain MB, Burgess CM, Walsh D, Tiwari BK. Laminarin from Irish brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: Ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity. *Marine Drugs*, **13**, 4270–4280 (2015).
- 3) Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, Hattori M, Takeshita K, Kanai T, Saijo S, Ohno N, Iwakura Y. Inhibition of dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing lactobacillus-mediated regulatory T cell expansion in the intestine. *Cell Host and Microbe*, **18**, 183–197 (2015).
- 4) Danielson ME, Dauth R, Elmasry NA, Langeslay RR, Magee AS, Will PM. Enzymatic method to measure  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6-glucan content in extracts and formulated products (GEM assay). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 10305–10308 (2010).
- 5) Ide M, Okumura M, Koizumi K, Kumagai M, Yoshida I, Yoshida M, Mishima T, Nakamura M. Novel Method to Quantify  $\beta$ -Glucan in Processed Foods: Sodium Hypochlorite Extracting and Enzymatic Digesting (SEED) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 1033–1038 (2018).

## Development of analytical method of lamimaran

Momochika Kumagai

Faculty of Fisheries

4-50-20 Shimoarata, Kagoshima, Kagoshima, Japan, 890-0056

TEL: +81 099-286-4221

Seaweeds are known to have  $\beta$ -glucan called laminaran. Various biological activities have been reported for laminaran, and the development of functional foods containing laminaran is attracting attention. For that purpose, a method for accurately quantifying the laminaran content in the seaweed and the processed food to be important. Here, author verified whether the existing  $\beta$ -glucan quantification methods, enzymatic method (K-EBHLG kit) and SEED assay (Sodium Hypochlorite Extracting and Enzymatic Digesting assay), can be applied to the laminaran quantification in seaweed. Furthermore, author tried to develop a more concise quantitative method. Author revealed that the enzymatic method digested cellulose, and it is not suitable for the quantification of seaweed containing cellulose.

The recovery test of laminaran in the SEED assay showed high recovery rate. In order to reduce the complexity of the operation and the consumption of a large amounts of reagents of the SEED assay, we devised an acid extraction method. Validation test revealed that RSD of the acid extraction method was 1.7 %. In addition, the quantitative value of *Eisenia bicyclis* was equivalent to that of the SEED assay. Furthermore, the result of the recovery test to *Eisenia bicyclis* was higher than 90 %. The recovery rate to processed foods by the acid extraction method was also good. These results suggested that acid extraction method is useful for the laminaran quantification of processed foods and seaweed raw material.