

紫外可視分光光度計による紅藻類及び緑藻類の識別

鳥居 洋介*, 山田 豊*, 高原 聰美*, 武藤 辰雄*^{**}

Discrimination between red algae and green algae by ultra-violet and visible spectrometry

Kosuke TORII*, Yutaka YAMADA *, Satomi TAKAHARA* and Tatsuo MUTOU*^{***}

* Nagoya Customs Laboratory 2-3-12, Irihama, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-8535 Japan

** Present address: Nagoya Customs Seibu Sub-Branch

2-15-4, Higashihama, Tobishima-mura, Ama-gun, Aichi 490-1446 Japan

A rapid and simple spectrometric determination in the UV-visible region for discriminating between red algae and green algae was examined. As a result of spectrometric analyses, chlorophyll b was detected only from the acetone extracts from the green algae samples with the absorption maximum at 455 nm, whereas mycosporine-like amino acids (MAAs) and phycoerythrin were detected only from the water extracts from the red algae samples with the absorption maxima at 335 nm and 560 nm, respectively. The analysis method was also applicable for higher processed algal products such as baked purple laver and seasoned purple laver. Since this UV-visible spectrometric analysis method, compared with DNA analysis, can differentiate between red algae and green algae rapidly and simply, it may be a useful tool for Customs to screen imported algal products that are to be controlled as import quota items.

1. 緒 言

海藻を食用にする民族は東洋に多く、我が国の歴史において、大宝律令に租税として海産物29種のうち、8種の海藻(あまのり、てんぐさ等)が記されているように、古くから食用として利用されている。食用以外の用途においても、例えば、褐藻類のぬめり成分の一つであるアルギン酸は、医薬品や化粧品などで利用されている¹⁾。

海藻は、関税率表上の分類において、第12.12項(海草その他藻類)に分類され、あまのり属及びあおのり属のものは輸入貿易管理令により輸入割当品目(以下、IQ品目と略記する。)に指定されている。両者は輸入割当の区分が異なることから、輸入通関において、あまのり属とあおのり属を識別する必要がある。

しかしながら、乾燥や焼入れ工程を経て細片化した状態のものでは、両者の外観が類似し、形態学的な識別が困難な場合もある。そのため、税関ではあまのり属及びあおのり属の識別にDNA分析を行っているが、この分析方法は日数を要する。分析時間の短縮のために、形態学的な特徴に基づく判別が困難である加工の程度の進んだのり製品についても対応できる簡易で迅速な分析法が望まれる。

海藻は、紅藻類、褐藻類及び緑藻類の3つに大別され、あまのり属は紅藻類に属し、あおのり属は緑藻類に属する。海藻には様々

な光吸収物質が含まれており、クロロフィルaはすべての海藻に含まれている。一方、紅藻類のみに含まれる光吸収物質として、マイコスボリン様アミノ酸(以下、MAAsと略記する。)及びフィコエリトリンが、緑藻類にのみに含まれる光吸収物質としてクロロフィルbが知られている²⁾。

本研究では、紅藻類及び緑藻類に含まれる光吸収物質の違いに着目し、それらを紫外可視分光光度計で確認することで、迅速かつ簡単な紅藻類及び緑藻類の識別が可能か検討を行ったので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

- ・紅藻類

あまのり(Purple laver) 8検体(国産品8検体)

- ・緑藻類

あおのり(Green laver) 3検体(国産品2検体、輸入品1検体)

あおさ(Sea lettuce) 5検体(国産品4検体、輸入品1検体)

- ・あまのり調製品

味付けのり(Seasoned purple laver) 1検体(輸入品)

焼きのり(Baked purple laver) 1検体(国産品)

各試料の種名は、国産品についてはラベル表示を、輸入品につ

* 名古屋税關業務部 〒455-8535 愛知県名古屋市港区入船2-3-12

** 現在所属 名古屋税關西部出張所 〒490-1446 愛知県海部郡飛島村東浜2-15-4

いっては申告時の記載を参照した。

・試薬

- アセトン、ジメチルホルムアミド（特級、和光純薬工業）
- クロロフィル b 溶液
(1.676 mg/L-90%アセトン溶液、和光純薬工業)
- クロロフィル a 溶液
(1.613 mg/L-90%アセトン溶液、和光純薬工業)

2.2 装置及び測定条件

紫外可視分光光度計：UV-2700（島津製作所製）

波長範囲：300–580 nm

測定セル：石英セル（光路長 1 cm）

2.3 実験方法

2.3.1 クロロフィル a 及び b の測定

クロロフィルが脂溶性であることから、アセトン及びジメチルホルムアミド（以下、DMF と略記する。）の 2 種類を抽出溶媒として使用した。アセトン抽出については、田中³⁾の方法を参考に、分析試料約 10 mg を乳鉢に量り取り、アセトン約 5 mL を加え、十分にすりつぶし、溶液が着色したら、孔径 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過後、紫外可視吸収スペクトルを測定した。DMF 抽出については、齊藤⁴⁾の方法を参考に、分析試料約 10 mg を量り取り、DMF 約 10 mL を加え、冷暗所で半日程度静置して得た抽出液の紫外可視吸収スペクトルを測定した。なお、各対照液にはそれぞれアセトン及び DMF を用いた。

また、極大吸収の確認のため、試薬のクロロフィル a 溶液及びクロロフィル b 溶液の紫外可視吸収スペクトルを測定した。

2.3.2 MAAs 及びフィコエリトリンの測定（水抽出）

MAAs 及びフィコエリトリンが水溶性であることから、分析試料を約 10 mg を乳鉢に量り取り、水約 5 mL を加え、十分にすりつぶし、孔径 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過後、紫外可視吸収スペクトルを測定した。なお、対照液には水を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 クロロフィル b の確認

あおのり試料 1 及びあおさ試料 3 についてのアセトン抽出及び DMF 抽出による紫外可視吸収スペクトルを Fig.1 に示す。いずれの抽出においてもクロロフィル a 及び b 由来の極大吸収が確認された。試料調製に DMF 抽出は半日以上かかるのに比してアセトン抽出は数十分程度で行え、加えてアセトンは DMF に比べ安価であることから、以降は、アセトン抽出でクロロフィル a 及び b を抽出し、紫外可視吸収スペクトルを測定することにした。

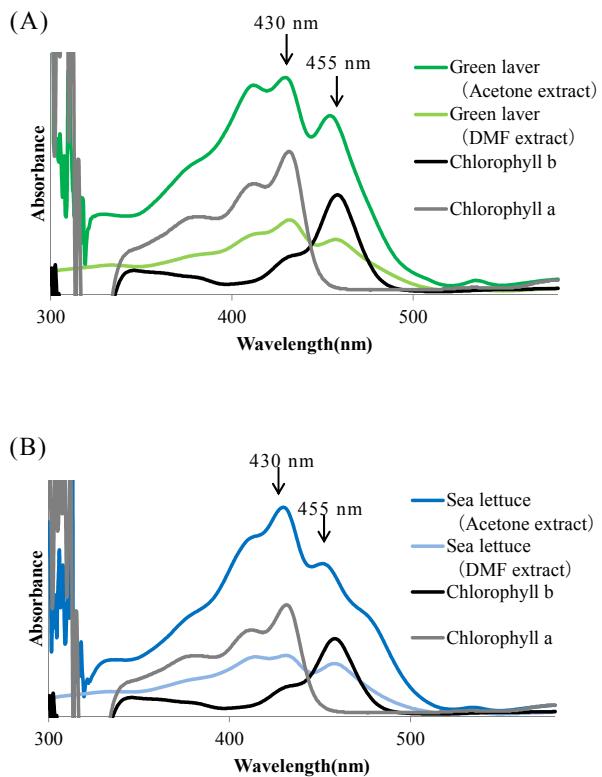


Fig. 1 UV-VIS spectra of acetone and DMF extracts from (A) green laver and (B) sea lettuce together with chlorophylls a and b.

DMF: N,N-dimethylformamide; Green laver (Aonori): green laver sample no. 1; Sea lettuce (Aosa): sea lettuce sample no. 3.

あまのり試料 1、あおのり試料 3 及びあおさ試料 2 のアセトン抽出物についての紫外可視吸収スペクトルを Fig.2 に示す。緑藻類であるあおのり試料 3 及びあおさ試料 2 は、いずれも試薬のクロロフィル b と同様に波長 455 nm 付近に極大吸収が確認されたが、紅藻類であるあまのり試料 1 には確認されなかった。また、あまのり試料 1、あおのり試料 3 及びあおさ試料 2 いずれも試薬のクロロフィル a と同様に波長 430 nm 付近に極大吸収が確認された。

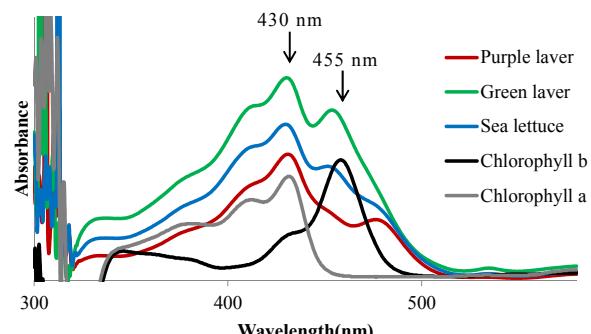


Fig. 2 UV-VIS spectra of acetone extracts from seaweed samples and of chlorophylls a and b.

Purple laver (Amanori): purple laver sample no. 1; Green laver (Aonori): green laver sample no. 3; Sea lettuce (Aosa): sea lettuce sample no. 2.

3.2 MAAs 及びフィコエリトリンの確認

あまのり試料1、あおのり試料3及びあおさ試料2の水抽出物についての紫外可視吸収スペクトルをFig.3に示す。紅藻類であるあまのり試料1には波長335 nm付近にMAAs由来の極大吸収⁵⁾が確認されたが、緑藻類であるあおのり試料3及びあおさ試料2にはいずれにも確認されなかつた。また、あまのり試料1には波長560 nm付近にフィコエリトリン由来の極大吸収⁶⁾が確認されたが、あおのり試料3及びあおさ試料2にはいずれも確認されなかつた。

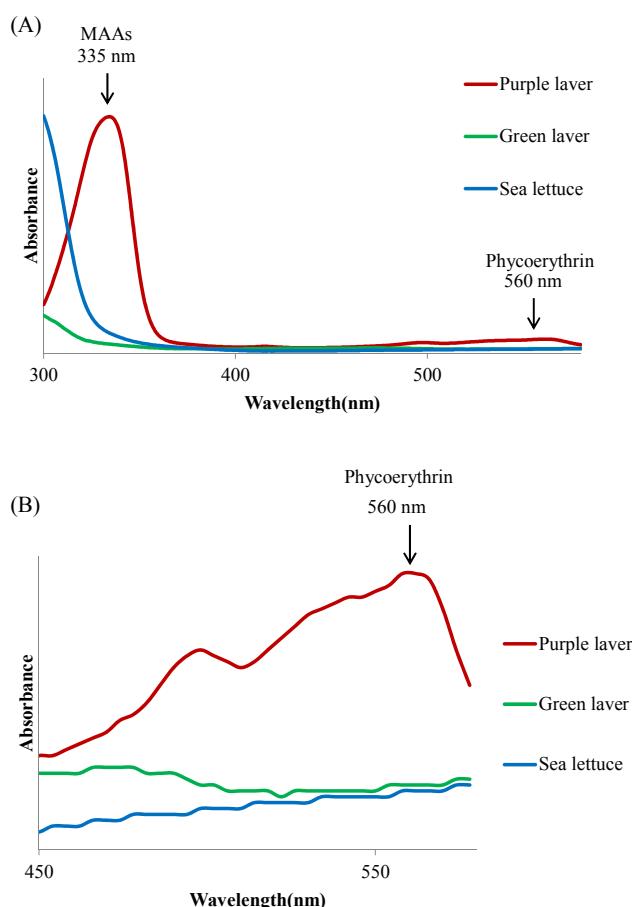


Fig. 3 UV-VIS spectra of water extracts from seaweed samples ranging from (A) 300–580 nm and (B) 450–580 nm.

Purple laver (Amanori): purple laver sample no. 1; Green laver (Aonori): green laver sample no. 3; Sea lettuce (Aosa): sea lettuce sample no. 2.

3.3 調製品についてのクロロフィルb, MAAs 及びフィコエリトリンの確認

本研究で使用した市販の味付けのり及び焼きのりのアセトン抽出による紫外可視吸収スペクトル及び水抽出による紫外可視吸収スペクトルをFig.4に示す。アセトン抽出の紫外可視吸収スペクトルでは、いずれにも波長430 nm付近のクロロフィルaの極大吸収が確認され、波長455 nm付近のクロロフィルbの極大吸収が確認されなかつた。また、いずれにも水抽出法の吸収スペクトルでは波長335 nm付近にMAAs由来の極大吸収が確認されたが、

波長560 nm付近のフィコエリトリン由来の極大吸収は確認されなかつた。

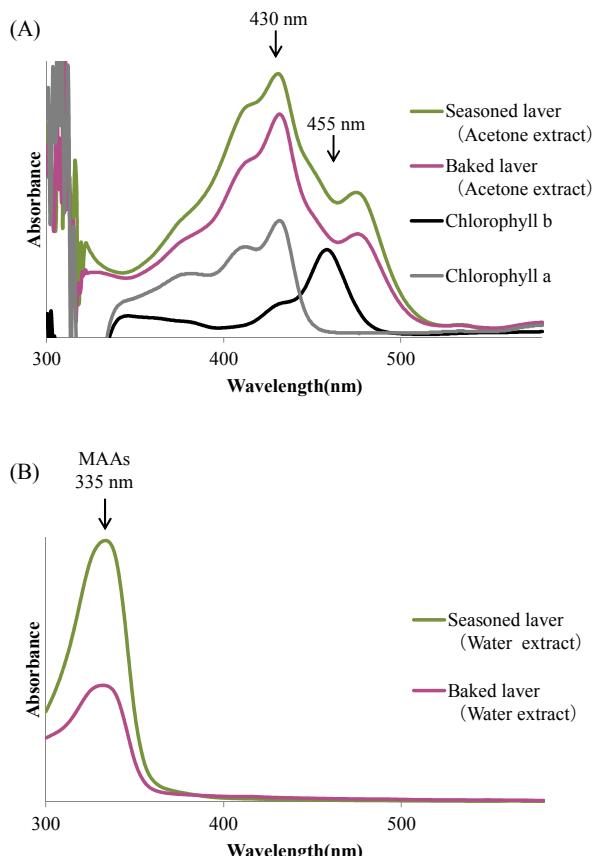


Fig. 4 UV-VIS spectra of (A) acetone extracts from seasoned purple laver (Amanori) and baked purple laver (Amanori) and of chlorophylls a and b; and (B) water extracts from seasoned purple laver and baked purple laver.

3.4 考察

食用として利用されている紅藻類及び緑藻類のうち、あまのり、あおのり及びあおさは細片化や焼入れ等の調製により外観が類似した製品になることが多い。あまのり及びあおのりは、前述のとおり、いずれもIQ品目として規制されており、関税率表における所属及び輸入割当区分が異なる。また、あおのり及びあおさは同じ関税率表区分であるが、あおのりのみがIQ品目である。そのため、輸入通関において、これら3種の識別が必要となる。

本研究で使用した各試料の産地情報と共に、各試料中のクロロフィルa及びb、MAAs並びにフィコエリトリンの測定結果についてTable 1に示す。3.1及び3.2で確認された結果は、Table 1に示すように、測定した全ての分析試料において確認された。このことから、調製品以外の試料について、海藻のうち紅藻類に特有のMAAs及びフィコエリトリン並びに緑藻類に特有のクロロフィルbの極大吸収を本法で確認することで、紅藻類と緑藻類の識別が可能であった。あまのり、あおのり及びあおさの3種の識別においては、本法による識別結果が紅藻類となれば、あまのり属のものであることが判明するため、迅速かつ簡便な分析法として利

Table 1 Result of UV-VIS spectrometric determination of chlorophylls a and b, MAAs and phycoerythrin in the extracts from the seaweed samples used in this study

Sample	No.	Origin	Acetone extract		Water extract	
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	MAAs	Phycoerythrin
Purple laver (Amanori)	1	Aichi	+	-	+	+
	2	Aichi	+	-	+	+
	3	Aichi	+	-	+	+
	4	Chiba	+	-	+	+
	5	Kagoshima	+	-	+	+
	6	Shimane	+	-	+	+
	7	Yamaguchi	+	-	+	+
	8	Yamaguchi	+	-	+	+
Green laver (Aonori)	1	Tokushima	+	+	-	-
	2	Tokushima	+	+	-	-
	3	Korea	+	+	-	-
Sea lettuce (Aosa)	1	Aichi	+	+	-	-
	2	Kochi	+	+	-	-
	3	Mie	+	+	-	-
	4	Mie	+	+	-	-
	5	Korea	+	+	-	-
Seasoned purple laver (Amanori)	1	Korea	+	-	+	-
Baked purple laver (Amanori)	1	Saga	+	-	+	-

MAAs: mycosporine-like amino acids.

用可能であると思料される。一方、あおのり及びあおさについては、いずれも緑藻類に属するものであるため、本法で識別することはできず、DNA分析が必要である。

また、あまのり調製品である味付けのり及び焼きのりについては、フィコエリトリンの極大吸収が確認されなかった。これは、調製の過程でフィコエリトリンが消失したためと思料されるが、MAAsの極大吸収が確認できたことから、同法による識別は可能と思料される。

今後の展開として、あおのりとあまのりが混ざった試料などに対して、それらの重量割合と極大吸収における吸光度の相関関係から組成割合を推定できる可能性があると思料される。

4. 要 約

あまのり（紅藻類）、あおのり（緑藻類）及びあおさ（緑藻類）は、輸入通関において輸入割当を適切に管理するために識別が必要である。そこで、本研究では紅藻類と緑藻類が含有する光吸収物質の違いに着目し、それらを紫外可視分光光度計で確認することで迅速かつ簡便に紅藻類と緑藻類の識別が可能か検討した。

光吸収物質であるクロロフィルb、MAAs及びフィコエリトリンの極大吸収を紫外可視分光光度計で確認することで、紅藻類及び緑藻類の識別が可能であった。一方、本法においてあおのり及びあおさ（いずれも緑藻類）の識別はできなかった。また、あまのり調製品では、フィコエリトリンの極大吸収が確認できなかつたが、MAAsの極大吸収が確認できたことから識別は可能と思料される。

文 献

- 1) 中間美砂子、中田香織：千葉大学教育学部研究紀要. I, 教育科編, **47**, 137 (1999).
- 2) 鈴木孝仁：視覚でとらえるフォトサイエンス生物図録, 170 (2014).
- 3) 田中亮一：低温科学, **67**, 315 (2009).
- 4) 齋藤宏明：日本周辺海域における低次生態系モニタリングにおける蛍光法によるクロロフィルa分析マニュアル, 2 (2007).
- 5) 横山亜紀子、原慶明：山形大学紀要 自然科学, **16(4)**, 113 (2008).
- 6) 五十嵐久尚、細谷勇治：北海道大学水産学部研究彙集, **8(4)**, 314 (1958).