



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	産業廃棄物の有効利用に向けた廃棄養殖ノリからの高品質寒天の抽出と応用に関する研究
Author(s)	流石, 啓司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13304号
Issue Date	2018-09-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13304">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13304</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90518">https://hdl.handle.net/2115/90518</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Keiji_Sasuga.pdf



産業廃棄物の有効利用に向けた廃棄養殖ノリ  
からの高品質寒天の抽出と応用に関する研究  
(Study on extraction and application of high-quality agar  
polysaccharides from the discard *Pyropia yezoensis* for  
effective utilization of industrial wastes)

北海道大学大学院水産科学院  
海洋応用生命科学専攻  
Graduate School of Fisheries Sciences  
Division of Marine Life Science

流 石 啓 司  
Keiji Sasuga

平成 30 年 (2018)

## 目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 通常品質スサビノリからの寒天抽出	6
1. 緒言	6
2. 材料と方法	7
2-1. 材料	7
2-2. 寒天の抽出方法	7
2-3. 寒天の物性測定方法	8
2-4. 硫酸基量の測定	9
2-5. 3,6-AG 量の測定	9
2-6. 分子量の測定	10
2-7. 微生物の培養	11
2-8. 電気泳動試験	11
2-9. 統計処理	12
3. 結果	12
3-1. 寒天収率に対するアルカリ処理の影響	12
3-2. 寒天ゲルの物理的性質	13
3-3. 寒天の化学的性質	14
3-4. スサビノリ寒天の微生物寒天培地としての有用性	17
3-5. スサビノリ寒天の DNA 電気泳動担体としての有用性	17

4. 考察	18
第3章 産業廃棄物である色落ちスサビノリからの寒天抽出	24
1. 緒言	24
2. 材料と方法	24
2-1. 材料	24
2-2. 寒天の抽出方法	25
2-3. 寒天の物性測定方法	25
2-4. 微生物の培養	25
2-5. 電気泳動試験	25
2-6. 統計処理	26
3. 結果	26
3-1. 寒天収率に対するアルカリ処理の影響	26
3-2. 寒天ゲルの物理的性質	27
3-3. 寒天の化学的性質	28
3-4. 生命科学研究への適合性	30
4. 考察	31
第4章 産業廃棄物であるノリ屑からの寒天抽出	35
1. 緒言	35
2. 材料と方法	36

2-1. 材料	36
2-2. 寒天の抽出方法	36
2-3. 測定方法	36
2-4. 統計処理	37
3. 結果	37
3-1. 寒天収率	37
3-2. ノリ屑の色彩	38
3-3. 寒天ゲルの物理的性質	39
3-4. 寒天の化学的性質	40
4. 考察	41
第5章 将来展望	43
要約	45
謝辞	48
引用文献	50

表 : Table 1 ~ Table 4

図 : Fig. 1 ~ Fig. 35

## 第 1 章 緒言

寒天は、紅藻類の細胞間隙から抽出される水溶性の多糖類で、ゲル形成能を持つ (林ら 1970 ; Kraan *et al.* 2012)。しかしながら、全ての紅藻類に寒天が含まれるのではなく、産業的にはオゴノリ属 (*Gracilaria*)、*Curdia*、*Hydropuntia* を含むオゴノリ科 (Gracilariaceae) (Orosco *et al.* 1992; Murano *et al.* 1995; Freile-Pelegrín *et al.* 1997; Falshaw *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 2001; Marinho-Soriano *et al.* 2003; Freile-Pelegrín *et al.* 2005; Meena *et al.* 2007a; Pereira-Pacheco *et al.* 2007; Arvizu-Higuera *et al.* 2008; Sousa *et al.* 2010; Vergara-Rodarte *et al.* 2010; Souza *et al.* 2012; Yarnpakdee *et al.* 2015)、テングサ目 (Gelideales) に含まれるテングサ属 (*Gelidium*) とオバクサ属 (*Pterocladia*) (Freile-Pelegrín *et al.* 1996; Sousa-Pinto *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 2001; Chiovitti *et al.* 2004; Kang *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012; Guerrero *et al.* 2014; Nil *et al.* 2016) などが寒天の主要な原料となっている (Armisen 1987)。

寒天は、アガロースとアガロペクチンから構成された多糖類の複合体である (Kraan *et al.* 2012)。アガロースは、 $\beta$ -D-galactopyranose と 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactopyranose の 2 糖が交互に連続した直鎖状のポリマーであり硫酸基をほとんど含まないが、熱水に溶解したアガロースは、冷却によって 3 次元のらせん構造から成るゲルを形成する。これが、寒天固化の主たる反応である (Rees 1969)。一方、アガロペクチンは、硫酸基やウロン酸、ピルビン酸などを含むゲル化能の低い硫酸化された酸性多糖である (Araki 1966; Duckworth 1971; Yaphe 1984; Lee *et al.* 2017a)。

寒天の主な用途は食品で、日本ではトコロテンや羊羹の原料として広く用いられている。また、他の重要な用途として、医学生物学分野に必

要な寒天培地や分子生物学分野での電気泳動用アガロースとしての用途がある。寒天培地としての利用は、1882年に細菌学者の Robert Koch が弟子の Walther Hesse から寒天の微生物培養用培地の固化剤としての可能性を示唆され、実際に微生物の培養に寒天を用いたことから始まった (Armisen 1991; Hesse 1992)。当時使用されていた細菌用の固形培地はゼラチンで作られていたが、それは細菌由来の分解酵素や 37℃での保温で溶けてしまう難点があった。しかし、寒天がゲル形成能と同時に高吸水性を併せ持つことでプレート保温中の安定性が飛躍的に向上し、しかも細菌の分解酵素に耐性を示すことから (Armisen 1991; Hesse 1992)、微生物培養用プレート培地の性能に大きな進歩を促した。

さらに、Hjertén (1962) は、寒天からアガロペクチンを除くことによりアガロースを精製し、ゲル電気泳動に使えることを確認した。これを契機に特に核酸の電気泳動におけるアガロースゲルの使用は一般的となった。このように精製寒天は、微生物培養用の培地および電気泳動用アガロースとして生物学や医学における細菌学的・分子生物学的研究の進展を支えており、多くの医学的および生物学的研究にとって不可欠な材料となっている。

これまで国内の寒天製造では、モロッコやチリなどからの外国産テングサを原料として使用してきたが、近年世界的にその供給量の減少と価格の高騰が問題となり (Callaway 2015)、今後の国内需要量を確保するのが困難になってきた。そのため、テングサの代替海藻からの寒天生産を検討することは急務となってきている。これを背景として、原始紅藻類に含まれる多糖類が着目されるようになった (藤木 1972; 小川 1994)。アマノリ属海藻 (*Pyropia* および *Porphyra*) に含まれる多糖類はポルフィランと呼ばれ、D-galactose、3,6-anhydro-L-galactose (3,6-AG)

6-O-methyl-D-galactose および L-galactose-6-sulfate から構成されている (Morrice *et al.* 1983; Bhatia *et al.* 2010)。ポルフィランには機能性があり、抗酸化作用、抗炎症作用、脂質代謝改善作用などが報告されている (Tsuge *et al.* 2004; Inoue *et al.* 2009; Isaka *et al.* 2015)。このポルフィランは寒天の前駆体であるが、多量の硫酸基を含むため、ゲル化しない。また、硫酸基を多く含むオゴノリの多糖類もそのままではゲル化しない。しかし、後者は藻体をアルカリ処理して L-galactose-6-sulfate を 3,6-AG に変換し、硫酸基を減少させることで、ゲル化能を持つようになる (Bixler *et al.* 2011; Lee *et al.* 2017a, b)。同様にアマノリ属のポルフィランも、アルカリ処理によりゲル化能を持つようになる (Bhatia *et al.* 2010; Bixler *et al.* 2011; Cao *et al.* 2015)。従って、アマノリ属の海藻は寒天の原料となり得る。そのため、中国では以前より壇紫菜 (ハイタンアマノリ, *Pyropia haitanensis*) から寒天抽出が行われてきた (Rou *et al.* 1994; Wang *et al.* 2001; Mu *et al.* 2009)。一方、日本ではスサビノリ (*Pyropia yezoensis*) からの予備的な寒天抽出試験が行われたことがあるが (小川 1994)、スサビノリ寒天についてはこれまでほとんど研究が行われていない。

以上を踏まえ、テングサの代替原料を得る手段として、日本を代表する海面水産業であるノリ養殖業に注目した。最近、国内のノリ養殖の主要養殖地では、収穫期後期の春先に海水温の低下と海水中の窒素源の不足によりスサビノリが黄褐色や緑色に変色する“色落ち”が発生している (Zhang *et al.* 2004; Nishikawa *et al.* 2007; 大山ら 2008; Kakinuma *et al.* 2008; Nishikawa *et al.* 2010; kakinuma *et al.* 2017)。このような色落ちスサビノリは商品価値が低く商品とならないため廃棄物となるが、廃棄ノリの大量発生はその処理費をめぐり、ほぼ全国に広がるノリ養殖地域の

ノリ漁師や漁業協同組合にとって大きな経済的負担となっている。しかし、スサビノリに含まれるポルフィランは、通常品質のスサビノリだけでなく、色落ちしたスサビノリからも取れることが報告されており (Isaka *et al.* 2015)、色落ちスサビノリが寒天原料として利用可能である可能性が考えられた。

また、スサビノリの生産地では、色落ちスサビノリ以外にも、ノリ加工工場の製造ラインにおいて板ノリ表面がローラーで削れることで大量のノリ屑が発生している。これは現在廃棄されるのみで何ら活用されていない。そのため、この廃棄資源としてのノリ屑から寒天を抽出する技術の開発が廃棄ノリ問題の効果的な解決につながると考えた。

以上を背景として、本研究では、廃棄ノリからの寒天製造技術の開発とノリ寒天の利用用途の開発を目的とした。なお、研究に用いる廃棄ノリの入手先は、大規模なノリ養殖の北限である宮城県とした。東北のスサビノリ養殖中心地である宮城県七ヶ浜町は、東日本大震災で壊滅的な打撃を受けたが、今日までに順調に復興してきた。しかし、春先の色落ちは他の地域に比べて深刻であり、廃棄ノリ問題は避けることのできない大きな問題になっている。これらのことから宮城県産の廃棄ノリを寒天製造に利用することができれば、地域の廃棄物処理コストを抑えることで漁業者の収入が増し、効果的に宮城県のノリ養殖の持続性を確保できる。

本論文の第2章では、スサビノリからの寒天製造方法を確立するため、通常品質のスサビノリを使って寒天抽出実験を行った。ここでは、対照として産業的に寒天の原料に使われているテングサを用い、寒天の収率、寒天の品質、寒天培地としての微生物の培養性能、電気泳動用ゲルとしての性能を検討した。第3章では、色落ちスサビノリからの高品質寒天

の抽出の可能性を検証するため、第 2 章で確立した寒天抽出方法を用い、通常品質のスサビノリと比較しながら寒天の抽出効率と品質の評価を行った。また、第 4 章では、ノリ屑を使って、寒天の製造ができるか検討した。特に収穫時期の異なるノリ屑を使い、収穫時期に応じて寒天の収率や品質に違いがあるのか調べた。最後に、第 5 章で本研究の結果を簡潔にまとめ、将来を展望した。

## 第 2 章 通常品質スサビノリからの寒天抽出

### 1. 緒言

スサビノリからの寒天抽出方法を確立するため、通常品質のスサビノリを用いてその検討を行った。すでにオゴノリ科、テングサ目および他の紅藻類からの寒天抽出方法は確立されているので、これらの方法を参考とした。オゴノリ科の海藻から寒天を抽出する際は、そのまま抽出しても寒天分に硫酸基が多くゲル化しないため、藻体を NaOH 溶液中で予め加熱処理することで寒天分にゲル化能を持たせてから抽出する (Orosco et al. 1992; Pereira-Pacheco et al. 2007)。また、NaOH 処理により、海藻のタンパク質成分が可溶化・除去できるため、アルカリ処理工程は寒天の精製効果も期待できる。

ウシケノリ綱 (Bangiophyceae) においては、*Pyropia haitanensis* (Gao et al. 1993; Rou et al. 1994; Mu et al. 2009) や *Pyropia capensis* (Zhang et al. 2005) から寒天が作られている。実際、*Pyropia haitanensis* から得られた寒天は、中国において商業的・産業的に利用されている。しかし、日本では、スサビノリが板ノリ製造のために毎年湿重量で約 300,000 トン養殖されているにも関わらず、寒天製造には使われていない。また、スサビノリからの寒天製造実験については先行事例がわずかに知られているが (小川 1994; Koo et al. 1999; Zhang et al. 2000; Cao et al. 2015)、寒天生産におけるスサビノリの有用性はほとんど示されていない。そのため、スサビノリからの寒天抽出方法を確立することは、日本で生産される巨大なバイオマスを効果的に利用するための重要なステップであり、食品用途を超えたスサビノリの新しい用途開発につながる。以上を

踏まえて、第 2 章では、スサビノリからの寒天製造方法を確立するため、通常品質のスサビノリを材料として用いて寒天抽出試験を行った。ここでは、寒天製造業において材料として使われているテングサを対照として、寒天の収率、品質、微生物の発育性能、電気泳動能を比較検討した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 材料

スサビノリは、宮城県七ヶ浜町 (Fig. 1) で 2016 年 1 月に収穫されたものを用いた。生ノリと板ノリは、宮城県漁業協同組合七ヶ浜支所から提供された。生ノリは室温で扇風機からの風を当てながら乾燥し、乾燥ノリとした。テングサはモロッコで 2013 年の 6 月から 9 月に収穫されたものを輸入購入し、実験室において室温で生ノリと同様の方法でさらに乾燥させた。通常の乾燥ノリ、通常の板ノリ、テングサの外観を Fig. 2 に示した。これら 3 種の材料はシュレッター (KPS-MX200, Kokuyo, Japan) を用いて細断し、実験に用いた。

### 2-2. 寒天の抽出方法

次のようなアルカリ処理に供した材料から寒天を抽出した。本論における「アルカリ処理」とは、材料に含まれる多糖類の L-galactose-6-sulfate を 3,6-AG に変換させゲル化能を持たせるために、アルカリ溶液中で加熱処理する操作のことを指す。

まず、抽出材料となる乾燥藻体 13 g と 4, 6, 8 および 10% (w/v) NaOH 水溶液 390 g をステンレス容器 (D 72 cm × H 180 cm, Private Brand of Shimizu Akira Inc.) に入れ、密封した後 (Figs. 3a,3b)、80°C のオイルバス

に 2 時間浸漬した (Figs. 3c, 3d)。アルカリ処理後の材料は、ろ布に集め (Fig. 3e)、流水で 17 時間水洗し、アルカリ分を除いた (Fig. 3f)。水洗後の各材料をろ布で絞って脱水し、ステンレス容器の中に入れて水 260 g (材料の 20 倍量) を加えた後 (Fig. 3g)、0.1 N の  $\text{H}_2\text{SO}_4$  または 0.1 N の NaOH 溶液で pH を 6.8~6.9 に調整した。その後、オートクレーブで 130°C で 1 時間加熱し、寒天画分を抽出した。抽出物は綿のろ布 (pore size 0.3 mm) で抽出液と残渣に分け (Fig. 3h)、抽出液をトレーに注ぎ、室温でゲル化させた。ゲルは包丁で細断した後 (Fig. 3i)、冷凍庫に一晩保管し冷凍した。翌日、流水で解凍し、沈殿した寒天分を回収した (寒天分は水に溶解しないため、寒天分のみが得られる) (Figs. 3j, 3k)。得られた寒天分の水分を布で吸水後、乾燥機 (Oven Dryer AFO-151, Iwaki, Japan) を用いて、60°C で約 7 時間乾燥し、粉砕機 (WB-1, Osaka Chemical Co., Ltd, Japan) で粉砕して粉末寒天とした (Fig. 3l)。この過程で乾燥物の重量を測定し、寒天の生産収率(以後、寒天収率(%)と称する)を寒天の乾燥重量 (g) / 材料の重量 (g)  $\times 100$  として求めた。抽出試験は N=3 で行った。

### 2-3. 寒天の物性測定方法

電子レンジで加熱溶解した 1.5% (w/v) 寒天溶液 50 mL を 100 mL のビーカーに入れ、20°C の水浴でゲル化させ、そのまま 15 時間保持した後、寒天ゲルの破断応力と破断歪率を測定した。これらはクリープメーター (RE-33005B, Yamaden Co., Japan) で直径 8 mm のプランジャーを用い、20°C で 1 mm/s のスピードでゲルの厚さの 80% まで圧縮しながら、このときにゲルが破断するまでの応力 (破断応力) と歪率 (破断歪率) を測定した。

寒天の融点と凝固点の測定は、Arvizu-Higuera *et al.* (2008) や

Vergara-Rodarte *et al.* (2010) の方法に幾分の改良を加えて行った。融点は、試験管 (直径 10 mm, 高さ 90 mm) に高さ 70 mm になるようにして固めた (凝固条件は室温で 2 時間放置) 1.5% 寒天ゲル(w/v) の表面に鉄球 (直径 5 mm, 1 g) を乗せ、水浴中に設置し、1°C/min で温度を上昇させ、ゲルが溶け、鉄球が落下した時の温度を測定した。凝固点は、加熱溶解した 1.5% (w/v) 寒天溶液を試験管 (直径 17.5 mm, 高さ 130 mm) に注ぎ、温度計 (水銀温度計 0~50°C 測定用) を取り付けたゴム栓で蓋をして、液温が 40°C に到達後、室温で放置した。そして、30 秒毎に試験管を転倒し、寒天溶液の凝固 (ゲル化) を確かめた際の温度を記録した。

対照として用いる標準的な培地用寒天の物性を調べるため、SSK セールス株式会社寒天事業部製の 18 種類の寒天について、物理的な性質 (破断応力、破断歪率、融点および凝固点) を上記と同様に測定した。

#### 2-4. 硫酸基量の測定

硫酸基量は、ICP 誘導プラズマ発光分析法 (ICP-OES; Wolnik 1988) で S 量を測定した後、SO<sub>4</sub> 量に換算して求めた (米谷ら 1994)。まず Polytetrafluoroethylen (PTFE)-TFM<sup>TM</sup> 容器 (Perkin-Elmer, Shelton, USA) に寒天 0.2 g と硝酸 (65%) 6 mL を入れマイクロウェーブシステム (Anton Paar Multiwave 3000, Graz, Austria) で分解した。その後反応液を超純水で 10 mL に希釈した。ブランクには硝酸のみを同様に処理したものを使用した。ICP 発光分析装置は ICP-OES Spectrometer (Perkin-Elmer Optima8300, Shelton, CT, USA) を用いた。

#### 2-5. 3,6-AG 量の測定

3,6-anhydrogalactose (3,6-AG) の測定は、比色定量法 (Matsuhira *et al.*

1983) を用いて行った。まず寒天 200  $\mu\text{g}$  を 2 mL の蒸留水に加熱溶解して試験管に入れ、そこに 0.5 mL の 5% チモールエタノール溶液と 5 mL の 0.5% 塩化第二鉄濃塩酸溶液を入れキャップをした。次に 80°C の水浴で 13 分加熱した後、急速に室温に冷却し、エタノール 10 mL で希釈した。その溶液の吸光度 (635nm) を分光光度計 (UV-2450 Shimadzu Corporation, Japan) で測定した。

検量線は、methyl 3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galactose (Dextra Laboratories Ltd., UK) を用いて作成した。このときの methyl 3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galactose から 3,6-AG への変換係数は 0.92 とした (Matsuhira *et al.* 1983)。

#### 2-6. 分子量の測定

ジメチルスルホキシド (DMSO) に臭化リチウムを 50 mM になるように溶かし、そこに寒天 (0.2% w/v) を加え、40°C で溶解した後、0.2  $\mu\text{m}$  の polytetrafluoroethlen (PTFE) フィルターメンブラン (DISMIC 13HP020AN, Advantec, Japan) でろ過して不溶物を除去した。その後、ろ過液を用いて重量平均分子量 ( $M_w$ )、多分散度 ( $M_w/M_n$ ,  $M_n$  は数平均分子量) を測定した。使用した装置はゲルろ過クロマトフィー (HPLC 1500 Series; Jasco Corporation, Japan) で、2 本の TSK gel GMH<sub>HR</sub>-H columns (7.8  $\times$  300 mm; Tosoh Corporation, Japan) を直列に接続、40°C、0.5 mL/min の流速で 50 mM 臭化リチウム DMSO 溶液を流した。検出器は示差屈折計 (RI-1530; Jasco Corporation, Japan) を、検量線はプルラン (Shodex Standard P-82; Showa Denko, Japan) を、そしてデータ処理は Chrom Nav GPC program (Jasco Corporation, Japan) を用いた。

## 2-7. 微生物の培養

大腸菌 (*Escherichia coli*; NBRC12713)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; NBRC13276)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*; NBRC3134) および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*; NBRC13275) を、35℃で 18 時間前培養した後、0.9% (w/v) NaCl 水溶液で菌を希釈し、1 プレート当たり一定量 (10 から 100 個) になるように接種した。

実験には 0.75% (w/v) 寒天プレート培地を用いたが、その組成は、5.0 (g/L) peptone from casein、2.5 (g/L) yeast extract、1.0 (g/L) D (+)-glucose、7.5 (g/L) 寒天とした。用いる寒天は通常の乾燥ノリ、通常の板ノリおよびテングサから調製し、破断応力が  $1.8 \times 10^5$  Pa になるようにした(通常の乾燥ノリは 8% NaOH、通常の板ノリおよびテングサは 6% NaOH でアルカリ処理した後、130℃で 1 時間抽出し寒天を得た)。試験に当たり寒天の珪藻土ろ過などの精製操作は行わなかった。それぞれの寒天を用いて 3 種類の培地を作製し、菌を接種して 35℃で 24 時間培養した後、各寒天培地の菌数を測定した。

枯草菌 (*B. subtilis*) のハロー試験では、通常の乾燥ノリ、通常の板ノリ、テングサから調製した寒天を別々に用いて、それぞれにスキムミルク 5 (g/L) と寒天 10 (g/L) を加えて 3 種類の寒天培地を作製した。この培地に枯草菌を 1 プレート当たり 30 個未満になるように接種し、35℃で 15 時間培養した後、培地の白色の背景に対し、透明になったゾーン (halos) のサイズを比較することで枯草菌が放出するプロテアーゼ活性の強度を測定した。

## 2-8. 電気泳動試験

DNA マーカーは、100 bp DNA Ladder (Takara Bio, Japan), 1 kb DNA

Ladder (New England Bio Lab, UK) の 2 種類を用いた。テングサからの未精製寒天 (テングサ寒天) 、通常の板ノリからの未精製寒天 (通常スサビノリ寒天)、アガロース (SSK セールス (株) 寒天事業部製) を用いて 1.0% w/v ゲルを作製した。材料の寒天およびアガロースは、破断応力がそれぞれ  $2.0 \times 10^5$  Pa のものを用いた (テングサは 10% NaOH, 通常の板ノリは 8% NaOH でアルカリ処理し、130°C で 1 時間抽出し寒天を得た)。TAE (Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid) buffer を用いて、100 V で 30 分間電気泳動した後、エチジウムブロマイドで DNA バンドを染色し、UV 照射して観察した。

## 2-9. 統計処理

すべての結果は、平均  $\pm$  標準偏差で示した。統計的な処理は Statcel for Windows (OMS Ltd., Saitama, Japan) で、有意差検定は、一元配置分散分析における多重比較検定 (Tukey-Kramer テスト) でそれぞれ行った。有意差は  $p < 0.05$  で示した。

## 3. 結果

### 3-1. 寒天収率に対するアルカリ処理の影響

最初にテングサからの寒天抽出を行ったが、このときの寒天収率は約 23% であり、藻体をアルカリ処理しても変化しなかった (Fig. 4)。一方、スサビノリから寒天を抽出した場合は、通常の乾燥ノリ、通常の板ノリでともに有意なアルカリ処理の影響が見られた。0% NaOH では抽出液が固まらず寒天分が得られなかった。これはノリに含まれるポルフィランが加熱抽出されたものの、硫酸基が多いポルフィランの構造に変化が無

かったため固まらなかったと推定された。スサビノリからは NaOH 濃度を上げていくと寒天分が得られるものの、収率は低下する傾向にあった (Fig. 4)。このように NaOH 濃度上昇の収率への影響がスサビノリとテングサで異なる理由として、テングサはアルカリ処理の工程において、寒天分子のアルカリ液への溶出による損失が少なかった可能性や、アルカリ処理や抽出工程で寒天分子の分解による低分子化があまり起こらなかった可能性が考えられた。通常の乾燥ノリと通常の板ノリで最大収率が得られたのは 4% NaOH で、それぞれ 12.8%と 16.8% であった。

### 3-2. 寒天ゲルの物理的性質

ゲル強度の指標である破断応力は NaOH 濃度に依存的に増加したが、テングサに比べて通常の乾燥ノリと通常の板ノリにおいて顕著であった (Fig. 5a)。特に、通常の乾燥ノリと通常の板ノリの 8% NaOH、10% NaOH で得られた破断応力の値は、テングサで観察された破断応力の値よりも上回った (Fig. 5a)。最大の破断応力値は、10% NaOH で板ノリを処理して得られた寒天ゲルで見られた。

寒天ゲルの弾力性は破断歪率で評価できる。通常の板ノリから得られた寒天ゲルは、10% NaOH までアルカリ処理濃度を上昇させると破断歪率も上昇した (Fig. 5b)。通常の板ノリの 10% NaOH 処理で破断歪率の最大値 24%が得られた。通常の乾燥ノリとテングサの破断歪率は、アルカリ濃度に影響されなかった (Fig. 5b)。

アルカリ濃度の融点と凝固点への影響は異なっていた。通常の乾燥ノリと通常の板ノリでは、アルカリ濃度が高くなると融点も高くなった (Fig. 5c)。凝固点は 6~10% NaOH で類似の値を示した (Fig. 5d)。通常の乾燥ノリと通常の板ノリにおいて、最も低い融点と凝固点は 4% NaOH

処理で確認された (Figs. 5c, 5d)。一方、テングサの融点と凝固点は、0% NaOH で最も低い値を示したが、4%から 10%の NaOH 処理で有意な影響が見られなかった (Figs. 5c, 5d)。なお、テングサは通常の乾燥ノリ、通常の板ノリよりも全体的に高い融点を示した。しかし、凝固点は 6%~10% NaOH の処理の範囲では 2 つの属で大きな違いは見られなかった (Figs. 5c, d)。

### 3-3. 寒天の化学的性質

寒天の前駆体としてスサビノリに含まれるポルフィランは、 $\beta$ -D-galactose と  $\alpha$ -L-galactose-6-sulfate が交互になった直鎖状の硫酸ガラクトタンで、それらの一部が 3,6-AG と 6-O-methyl-D-galactose に置換されている (Peat *et al.* 1961)。このように紅藻類の多糖には多量の L-galactose-6-sulfate が存在し、その硫酸基の影響でゲル化しない。しかしながら、寒天を抽出する前に海藻をアルカリ処理すると L-galactose-6-sulfate が 3,6-AG に変換され、ポルフィラン中の硫酸ガラクトタンがアガロースとなることで寒天のゲル強度が増加する (Murano *et al.* 1995; Bhatia *et al.* 2010; Souza *et al.* 2012; Cao *et al.* 2015)。以上を踏まえ、スサビノリからの寒天における物理的な性質とアルカリ処理の関係を理解するために硫酸基量と 3,6-AG 量を定量した。

Fig. 6a に示したように、全ての材料においてアルカリ濃度の増加は硫酸基量の減少をもたらした。これは以前にスサビノリ (小川 1994; Koo *et al.* 1999)、*Pyropia haitanensis* (Rou *et al.* 1994; Mu *et al.* 2009)、*G. tenuistipitata* (Yarnpakdee *et al.* 2015) で観察された結果と一致した。さらに 6~10% NaOH で 2 種類のスサビノリ寒天における硫酸基量は 0.12% 未満で、テングサ寒天で示された約 1% に比べてかなり低い値であった

(Fig. 6a)。これは市販されているアガロースの硫酸基量と同等であった (Meena *et al.* 2007a)。

3,6-AG 量については、テングサ寒天でアルカリ処理により増加した (Fig. 6b)。しかし、スサビノリ寒天における 3,6-AG 量は約 44%で、すべての NaOH 濃度でテングサ寒天と同等であった (Fig. 6b)。

スサビノリを 0% NaOH で処理しても寒天がゲル化せず寒天分が得られなかったため、本研究ではアルカリ処理の有無による硫酸基量と 3,6-AG 量の変化は定量できなかった。しかし、スサビノリ由来のポルフィランにおけるこれらの値はすでに測定されており、硫酸基量は 10.5~10.7% (Isaka *et al.* 2015) および 13.0~14.2% (Koo *et al.* 1999)、3,6-AG 量は 14% (Hama *et al.* 1998; Isaka *et al.* 2015) および 7.9~10.8% (Koo *et al.* 1999) であった。これらを踏まえると、スサビノリ寒天における 3,6-AG 量は 4~10% NaOH 処理を行うことによって、通常の乾燥ノリで 44.7~48.0%に、通常の板ノリで 44.8~47.2%に増加するのに対して、硫酸基量は通常の乾燥ノリで 0.03~0.59%に、通常の板ノリで 0.03~0.60%に減少したことになる。このように、テングサの寒天における NaOH 処理による硫酸基量の減少と 3,6-AG 量の増加は (Figs. 6a, 6b)、スサビノリでも起きていると考えられ、L-galactose sulfate が 3,6-AG に変換されることで多糖類のゲル化が起こる可能性を支持するものであった。また、スサビノリ寒天において、硫酸基量と 3,6-AG 量が寒天ゲルにおよぼす影響については、4~10% NaOH 処理における 3,6-AG 量の変化量は少ないが、硫酸基量は 6% NaOH 以上の濃度で処理すると著しく減少したため (Figs. 6a, 6b)、3,6-AG 量よりも硫酸基量の影響が大きいと推定した。

分子量分布を反映する重量平均分子量 (Mw) と多分散度 (Mw/Mn)

はゲル強度に影響する重要な化学的要因である (Tashiro *et al.* 1997; Sousa-Pinto *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 2001)。Fig. 6c に示したように、テングサで NaOH 処理の有無で Mw に違いが見られ、このとき NaOH 濃度の変化は Mw に影響しなかった。これに対して通常の乾燥ノリと通常の板ノリは、NaOH 濃度の増加とともに Mw も増加した。例えば 4% から 10% NaOH 処理は、寒天の分子量は、通常の乾燥ノリでは  $1.8 \times 10^5$  から  $2.6 \times 10^5$  に、また通常の板ノリで  $1.9 \times 10^5$  から  $4.3 \times 10^5$  に増加した。ここでもスサビノリの NaOH 処理無しの場合は Mw が測定できなかった。しかし、Isaka ら (2015) はポルフィランの Mw は  $2.2 \times 10^5$  であると報告している。これを踏まえると、スサビノリではアルカリ処理によって大きな Mw の寒天が得られるようになると推測された。さらに、通常の乾燥ノリと通常の板ノリからの寒天の分子量分布曲線ではアルカリ濃度が高いほど高分子の寒天が抽出されることが確認された。しかし、分子量に対するアルカリ濃度の影響は乾燥ノリよりも板ノリの方が大きかった (Figs. 7b, 7c)。一方、テングサからの寒天における分子量分布曲線は、4~10% NaOH のアルカリ条件で差がなかった (Fig. 7a)。また、Fig. 6d に示したように、通常の板ノリでは NaOH 濃度が増加すると Mw/Mn も増加した。この傾向は Mw と一致したが、通常の乾燥ノリとテングサでは NaOH 濃度が増加しても Mw/Mn は大きくは変化しなかった。

次に、破断応力で表されるゲル強度や破断歪率 (Normand *et al.* 2000)、と化学的な性質との関係を解析した (Figs. 8, 9)。その結果、破断応力や破断歪率のようなレオロジー的な性質と Mw、Mw/Mn、3,6-AG 量との間に正の相関があった。さらに、これらのレオロジー的な性質は硫酸基量と負の相関があった。また、全ての材料において NaOH 濃度依存的に破断応力と破断歪率の測定値が上昇し、Mw、Mw/Mn、3,6-AG 量も同様に

上昇していることが確認された。つまり、NaOH 濃度の違いが寒天ゲルの物理的・化学的性質に及ぼす影響は大きいと言える。一方、硫酸基量については、NaOH濃度が高くなるにつれて顕著に減少した。特に6~10% NaOHにおいて、わずかな硫酸基量の違いが通常の乾燥ノリと通常の板ノリの破断応力に大きく影響していることが確認された (Figs. 8, 9)。

#### 3-4. スサビノリ寒天の微生物寒天培地としての有用性

テングサから得られた寒天で作製した培養プレートに対照として、通常の乾燥ノリと通常の板ノリから得られた寒天で作製した培養プレートを用いて、大腸菌 (*Escherichia coli*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の増殖能を評価した。Fig. 10に示すように、3種類の寒天プレートで全ての菌株は正常に増殖し、そのコロニー数は統計的な差は見られなかった (Table 1)。しかしながら、枯草菌のコロニーは、通常の板ノリ寒天プレートで他の寒天プレートよりも小さかった (Fig. 10)。これらの結果は、スサビノリ寒天プレートで *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* および腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の増殖を確認した小川 (1994) の結果とほぼ一致した。さらに、枯草菌のプロテアーゼ活性をスキムミルク培地でテストしたところ、作られたハローのサイズは全ての寒天プレートで同じであった (Fig. 11)。このように、スサビノリ寒天では微生物増殖における一般的な阻害効果は見られず、そのため微生物培養プレートへの利用に適していることが確かめられた。

#### 3-5. スサビノリ寒天の DNA 電気泳動担体としての有用性

通常スサビノリ寒天、テングサ寒天、アガロースを用いて作製した1%

ゲルを使って 1 kb と 100 bp の DNA マーカーを分離した。その結果、DNA マーカーは、テングサ寒天では分離が良くなかったが、通常スサビノリ寒天ではアガロースよりも良好な分離が観察された (Fig. 12)。電気泳動に用いる寒天に含まれる硫酸量が多い場合は DNA バンドの分離や移動を妨げることが知られているので (Sambrook et al. 1989)、硫酸基量の多いテングサ寒天ではバンドの移動度が少なく、分離が良くなかったと推定された。このようにスサビノリ寒天は、市販のアガロースと同じように DNA 電気泳動担体としての利用に適していることが確かめられた。

#### 4. 考察

産業廃棄物としてのスサビノリを有効利用する目的で、本研究ではまず製品グレードのスサビノリから寒天が得られるかどうか検討を行った。その結果、スサビノリをアルカリ処理することで高性能の寒天を得る方法を確立することができた。得られた寒天ゲルの物性や寒天の化学的性質は、汎用的に利用されているテングサのものと類似しており、培地用寒天としてはテングサ寒天と同等の、また電気泳動における分離能はテングサ寒天より優れた性質を示した。

通常の乾燥ノリと板ノリ由来の寒天は、4% NaOH で最も高い収率が得られ、通常の板ノリからの最大寒天収率は、通常の乾燥ノリに比べて良好であった (Fig. 4)。これらの結果は、*Pyropia haitanensis* 寒天での結果 (Mu et al. 2009) と一致した。また、小川 (1994) は板ノリからの寒天収率が 16%であると報告しており、これも本研究の結果と一致している。これらのことは、スサビノリ寒天の抽出には板ノリの利用がふさわしいことを示している。このように板ノリからの寒天収率が良い理由として、

板ノリ製造においては、全自動生産工程でスサビノリの葉状体を小さい細片に細断するため、乾燥ノリに比べてアルカリ処理する際に接する表面積が多く、アルカリ処理効率が良くなるためと考えている。そのため、乾燥ノリでもより小さいサイズに粉碎を行えば、アルカリ処理が十分に行われ、収率向上が望めると推察した。

寒天ゲルの強度の指標である破断応力は、スサビノリとテングサで共にアルカリ濃度依存的に増加した (Fig. 5a)。これは、*Gracilaria cervicornis* (Freile-Pelegrín *et al.* 2005)、*Gracilaria tenuistipitata* (Yarnpakdee *et al.* 2015)、*Gracilaria dura* (Meena *et al.* 2007a) および *Gracilaria cornea* (Freile-Pelegrín *et al.* 1997) から抽出した寒天を用いた解析結果と同様であった。また、寒天ゲルの弾力性の指標である破断歪率は、通常の板ノリでは、アルカリ処理濃度を上昇させることで上昇したが、通常の乾燥ノリとテングサではアルカリ濃度に影響されなかった (Fig. 5b)。これらのことはスサビノリ寒天の物理的および化学的性質がアルカリの濃度によって人為的に調整可能であることを示している。例えばスサビノリを 4~6% NaOH で処理することで一般的な培地用寒天と同等の物性の寒天が得られ (Figs. 5a, 5b, 13a, Table 2)、8~10% NaOH 処理で市販寒天やアガロースのような高強度および高弾力性の物性の寒天が抽出可能となった (Figs. 5a, 5b, 13a, Table 2)。

培地用に使用する寒天においては、融点と凝固点が重要な要因となる (McHugh 1991)。スサビノリを 4~10% NaOH で処理して得られた寒天と市販の培地用寒天の融点 (Fig. 13b; 78~92°C) には違いが見られなかった (Figs. 5c, 13b)。また、市販の培地用寒天の凝固点は 34~37°C の範囲であるが (Fig. 13b)、オゴノリ寒天は凝固点が 40°C 以上の場合があるため (Freile-Pelegrín *et al.* 2005; Vergara-Rodarte *et al.* 2010;

Rodriguez-Montesinos *et al.* 2013)、培地用寒天の原料としては凝固点の低いテングサが用いられている (McHugh 1991)。これらを踏まえると、スサビノリとテングサの寒天で融点と凝固点に違いがないことから (Figs. 5c, 5d, 13b)、スサビノリは培地用寒天の原料として適していると言える。

寒天の破断応力と破断歪率に影響を及ぼす因子として、寒天の重量平均分子量 (Mw)、多分散度 (Mw/Mn)、硫酸基量、および 3,6-AG 量が知られている (Lee *et al.* 2017a; Tashiro *et al.* 1997; Sousa-Pinto *et al.* 1999; Normand *et al.* 2000)。そのため、上記の因子がアルカリ処理における NaOH 濃度によって変化する可能性がある。実際にテングサ寒天の Mw は 4%から 10% NaOH 処理で大きくは変化しなかったが、スサビノリ寒天では高 NaOH 濃度で Mw の大きな寒天が得られた (Figs. 6c, 7b, 7c, 8, 9)。同様のことは田代 (2001) も報告しているが、強いアルカリ処理によって高分子量寒天の抽出量が増えるとともに寒天分子の分解が生じ、低分子量寒天も増加することも同時に示している (田代 2001; 小川 1994)。この際生じる低分子量の成分は高分子量の成分よりも水に溶けやすく流出しやすいので (Armisen *et al.* 1987)、見かけ上高分子量寒天の収量が増加した結果になったと考えられた。これらの観察結果はアルカリ濃度の増加で Mw が減少した *Melanothamnus somalensis* および *Gracilaria dura* の結果とは異なっている (Meena *et al.* 2007a; Al-Nahdi *et al.* 2015)。以上のことから、NaOH 濃度の増加に依存して大きな Mw の寒天が抽出されるのはスサビノリの独特の特徴と考えられた。興味深いことに、寒天の Mw/Mn は通常の乾燥ノリとテングサにおいては、4%から 10%の NaOH 処理で大きくは変化しなかったが、通常の板ノリの Mw/Mn では 2.02 から 2.38 に増加した (Fig. 6d)。寒天は単一の分子量に

よって構成されているのではなく、様々な分子量の寒天分子が混合している。そのため、 $M_w/M_n$  が大きいほどサンプルに含まれる分子量の分布範囲が広く、異なった分子量を持つ寒天分子の分散度が高いことを示す (Sousa-Pinto *et al.* 1999)。従って、NaOH 処理は、寒天分子の分解を促進するとともに (Al-Nahdi *et al.* 2015)、アルカリでダメージを受けた細胞壁から高分子量の寒天分子の溶出を促すことで、スサビノリの寒天において高分子量の寒天の抽出量の増加と分子量分布の拡大をもたらしたと考えることが出来る。このように、スサビノリにおいて NaOH 濃度を調節することで物性に影響を与える  $M_w$  や  $M_w/M_n$  を大きく変化できることは、テングサでは見られない特徴であった。

寒天に含まれる硫酸基量は、4%から 10% NaOH 処理によって通常の乾燥ノリで 0.59%から 0.03%に、通常の板ノリでは 0.60%から 0.03%にそれぞれ減少した。一方、テングサでは 1.54%から 1.13%に減少した (Fig. 6a)。このように、硫酸基の含有量がスサビノリ寒天においてテングサ寒天よりも低いことは注目に値する。これはおそらくアルカリ処理で硫酸基が高度に脱離しやすいポルフィランの特性 (Rou *et al.* 1994) と考えられた。この際、硫酸基量が減少したのは、硫酸化されていた多糖成分が抽出工程中で流出除去されたためではなく、藻体をアルカリ処理することでポルフィランの L-galactose-6-sulfate が 3,6-AG に変換され硫酸基量が減少したためと考えられる。実際に硫酸化多糖の損失がない条件で藻体を熱水で加熱して得たポルフィラン溶液は、アルカリ処理無しではゲル化しないが、抽出液をアルカリ処理することでゲル化する (Bhatia 2010)。このことはアルカリ処理によりポルフィランの硫酸基量が減少することを示している。さらに、寒天の 3,6-AG 量は、4% から 10% NaOH の処理によってテングサではほとんど変わらないが、通常の乾燥ノリで 44.7%か

ら 48.0%に、通常の板ノリで 44.8%から 47.2%に増加した。

これらの結果から、スサビノリのアルカリ処理は高分寒天鎖の抽出を促し、それと同時に L-galactose-sulfate から 3,6-AG に変換させるため、スサビノリ寒天のゲル化を強化させることが示された。この特徴は、オゴノリ寒天と同様であった (Meena *et al.* 2007a)。このようなゲル強度と硫酸基量の負の関係は、*Pyropia haitanensis* 寒天でも観察されているが (Mu *et al.* 2009) 本研究のような Mw と 3,6-AG 量と物性との関係については示されていない。

以上のように、スサビノリにおいては、寒天の物性に影響を与える Mw、Mw/Mn、硫酸基量および 3,6-AG 量が NaOH 濃度により変動することが明らかとなった。特に板ノリ寒天の物性が人為的に調整可能で、藻体のアルカリ処理濃度を変えることで用途に応じた物性を持つ寒天の調整が可能であると言える。

さらに、スサビノリ寒天ゲルがアガロースゲルと同等の DNA 分離能を持つことが確認された (Fig. 12)。核酸の電気泳動に用いるアガロースは、通常、EDTA、イソプロパノール、Al(OH)<sub>3</sub> または DMSO で洗浄してアガロペクチンを除くことで寒天から精製される (Jeon *et al.* 2005; Kang *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012; Efendi *et al.* 2015)。このように、アガロースの製造は複雑な工程を経るため製造コストがかかる。また、アガロースの重要な性質として、寒天と比べて低い硫酸基量であることが挙げられる (Wang *et al.* 2012)。電気泳動では、DNA は負の電荷を帯びているため、(+) 極側に移動するが、アガロース中に負電荷の硫酸基が含まれていると、正の電荷を帯びた対イオンを形成して (-) 極側への電気浸透現象を起こすことで、DNA の分離を妨げる (Sambrook *et al.* 1989)。実際に、スサビノリ寒天の硫酸基量は非常に低く、市販されているアガ

ローズと同等であることが確認されている (Fig. 6a)。

これまで、未精製の寒天を使って DNA 電気泳動に成功した報告はない。また、通常スサビノリ寒天、テングサ寒天およびアガロースから調製した 1% ゲルでは 1 kb と 100 bp の DNA マーカーがテングサ寒天では分離できなかったが、スサビノリ寒天ではアガロースよりも良好な分離が観察された (Fig. 12)。これらの結果より、スサビノリからの寒天は、アガロース精製をしなくても DNA 電気泳動の担体として適用可能であることがわかった。このことは安価で高品質の電気泳動用寒天を調製でき、経済的にも優れた特徴である。以上の結果は、スサビノリを用いることで DNA 電気泳動に使用可能な低コストで高品質な寒天を提供できることを示している。

本章の成果より、スサビノリが寒天生産のための材料として有用であることが実証された。スサビノリ寒天の物理的な性質は、材料を前処理する際の NaOH 濃度を変えることで調整でき、抽出された寒天の品質は、テングサからの寒天の品質と同等であった。これらの知見は、養殖されているスサビノリの巨大なバイオマスが、医療や生物学の分野で必須な寒天の原料に有効に利用できることを強く示している。

### 第 3 章 産業廃棄物である色落ちスサビノリからの寒天抽出

#### 1. 緒言

スサビノリは日本で養殖される主要な海藻で、湿重量で約 300,000 トンも生産され、その大半は日本の伝統的な食品である板ノリの製造に使われている。しかし、春先に海水中の窒素源の枯渇により、スサビノリの色は黄褐色や緑色に変化する (Zhang *et al.* 2004; Nishikawa *et al.* 2007; 大山ら 2008; Kakinuma *et al.* 2008; Nishikawa *et al.* 2010; kakinuma *et al.* 2017)。これは色落ちと呼ばれる現象で、板ノリの商業的な価値を低下させるため、全国のノリの産地では色落ちスサビノリの新たな有効活用の方策が探られている。一方、前章では通常品質のスサビノリが寒天の生産のための材料として有効であることが示された。このことから、色落ちノリに対して寒天生産における有効性を確かめることは有意義と考えられる。以上を踏まえ、第 3 章では色落ちスサビノリの寒天製造における有用性を実証するため、得られた寒天の収率や品質、および生物学研究への適用を通常のスサビノリ由来の寒天と比較検討した。

#### 2. 材料と方法

##### 2-1. 材料

通常品質のスサビノリは 2017 年の 2 月に、色落ちスサビノリは 2016 年の 4 月にそれぞれ宮城県七ヶ浜町 (Fig. 1) で収穫されたものを用いた。それぞれの生ノリと板ノリは宮城県漁業協同組合七ヶ浜支所から提供された。生ノリは、室温で扇風機からの風を当てながら乾燥した後、実験

に使用した。テングサは、第 2 章で使用したものと同一ものを用いた。Fig. 14 に示した乾燥ノリ、板ノリは、それぞれシュレッター (KPS-MX200, Kokuyo, Japan) で細断し実験に用いた。

#### 2-2. 寒天の抽出方法

材料からの寒天抽出と収率の算出は第 2 章と同様に行った。

#### 2-3. 寒天の物性測定方法

寒天の物理的な性質 (破断応力、破断歪率、融点、凝固点)、化学的な性質 [重量平均分子量 ( $M_w$ )、多分散度 ( $M_w/M_n$ 、 $M_n$  は数平均分子量)、硫酸基量、3,6-AG 量] の測定は第 2 章と同様に行った。対照として SSK セールス株式会社寒天事業部製の 7 種類の市販アガロースを用い、それらの物性 (破断応力、破断歪率) を同様に測定した。

#### 2-4. 微生物の培養

微生物培養試験、ハロー試験は第 2 章と同様に行った。ただし、使用した寒天は、通常の乾燥ノリ、通常の板ノリ、色落ちの乾燥ノリ、色落ちの板ノリおよび対照のテングサから得られた 5 種類の寒天を用いた。全ての寒天は破断応力が  $1.7 \times 10^5 \text{ Pa}$  のものを用いた (通常および色落ちの乾燥ノリは 8% NaOH、通常および色落ちの板ノリおよびテングサは 6% NaOH でアルカリ処理し、 $130^\circ\text{C}$  で 1 時間抽出し寒天を得た)。

#### 2-5. 電気泳動試験

電気泳動試験は、第 2 章と同様に行った。ただし、使用した寒天は、テングサからの未精製寒天 (テングサ寒天)、通常の板ノリからの未精製

寒天（通常スサビノリ寒天）、色落ちの板ノリからの未精製寒天（色落ちスサビノリ寒天）、および対照のアガロース（SSKセールス(株)寒天事業部製）の4種を用いた。全ての寒天は、破断応力が  $2.0 \times 10^5$  Pa のものを用いた（通常の板ノリは 6% NaOH、色落ちの板ノリは 8% NaOH、テングサは 10% NaOH でアルカリ処理し、130℃ で 1 時間抽出し寒天を得た）。

## 2-6. 統計処理

すべての結果は、平均 ± 標準偏差で示し、統計的な処理は Statcel for Windows (OMS Ltd., Saitama, Japan) の一元配置分散分析における多重比較検定の Tukey-Kramer テストで行った。有意差は  $p < 0.05$  で示した。

## 3. 結果

### 3-1. 寒天収率に対するアルカリ処理の影響

通常品質および色落ちスサビノリ由来の乾燥ノリと板ノリ (Fig. 14) を使って、第 2 章で確立した手法によって寒天を抽出した。その結果、0% NaOH では寒天を得ることができなかったが、アルカリ処理によって両材料から寒天を抽出することができた (Fig. 15)。寒天の収率は、通常の乾燥ノリで 10.9~12.3%、通常の板ノリで 10.7~15.3% であり、第 2 章で得られた収率 10.4~12.8% と 10.5~16.8% と同等で結果の再現性が示された。また特に注目される点として、寒天収率が通常品質よりも色落ちの方が高い点があげられる。具体的には、色落ちの板ノリでの収率は 16.8~19.7% と高く、次いで色落ちの乾燥ノリからの収率は 10.9~13.8% であった。また、最大収率は、色落ちの板ノリの 4% NaOH の条件で得られた 19.7% であった (Fig. 15)。このように寒天の材料としては寒天収

率が最も高いという点で、色落ちの板ノリが最も適していると言えた。

### 3-2. 寒天ゲルの物理的性質

破断応力、破断歪率、融点、凝固点などの寒天ゲルの物理的な性質を、通常品質と色落ちスサビノリ寒天間で比較した。寒天ゲルの破断応力は、通常の板ノリで  $0.52 \sim 2.66 \times 10^5$  Pa、色落ちの板ノリで  $0.80 \sim 2.34 \times 10^5$  Pa、通常の乾燥ノリで  $0.47 \sim 2.14 \times 10^5$  Pa、色落ちの乾燥ノリで  $0.59 \sim 1.95 \times 10^5$  Pa であり、板ノリも乾燥ノリもそれぞれ通常と色落ちの間に差は見られなかった (Fig. 16a)。破断歪率も通常の板ノリで 16.5~24.0%、色落ちの板ノリで 19.1~23.8%、通常の乾燥ノリで 12.4~18.4%、色落ちの乾燥ノリで 18.7~20.3% のように通常と色落ちで差は見られなかった (Fig. 16b)。しかし、板ノリと乾燥ノリを比較すると、通常も色落ちも板ノリの方が破断応力も破断歪率も高かった (Fig.16)。

寒天ゲルの物性に対する NaOH 濃度の影響については、アルカリ濃度の上昇に伴って破断応力は高くなったが、破断歪率は 6~10% NaOH においては有意な差はなく基本的に変わらなかった。

寒天ゲルの融点は、通常の乾燥ノリで  $79.9 \sim 90.9^\circ\text{C}$ 、色落ちの乾燥ノリで  $80.0 \sim 88.9^\circ\text{C}$ 、通常の板ノリで  $81.4 \sim 96.3^\circ\text{C}$ 、色落ちの板ノリで  $82.0 \sim 92.4^\circ\text{C}$  であり、通常と色落ちの寒天で同等であった (Fig. 17a)。凝固点は、通常の乾燥ノリで  $31.8 \sim 35.8^\circ\text{C}$ 、色落ちの乾燥ノリで  $33.2 \sim 37.8^\circ\text{C}$ 、通常の板ノリで  $31.8 \sim 36.7^\circ\text{C}$ 、色落ちの板ノリで  $33.8^\circ\text{C} \sim 37.1^\circ\text{C}$  であり、色落ちの方がわずかに高かったが、ほぼ同等であった (Fig. 17b)。

また、融点と凝固点は NaOH 濃度が増加するにつれてわずかに増加した (Fig. 17)。この理由として、破断応力が高い寒天ゲルの方がより高温にしないと溶解しにくいですが、一度溶けると高い温度でも固まりやすいた

め (Freile-Pelegrín et al. 1997; Marinho-Soriano et al. 2003)、融点と凝固点が高くなったと考えられた。

### 3-3. 寒天の化学的性質

寒天に含まれるポリマーの分子量分布は、ゲルの物性に影響を与える化学的なパラメーターである。本章でも第2章と同様に重量平均分子量 ( $M_w$ )、多分散度 ( $M_w/M_n$ ) および分子量分布曲線を測定した。アルカリ濃度変化の分子量分布への影響を調べた結果、通常および色落ちスサビノリ寒天の  $M_w$  および  $M_w/M_n$  はアルカリ濃度依存的に大きくなった (Fig. 18)。しかし、乾燥ノリと板ノリで比較してみると、 $M_w$  は通常の乾燥ノリで  $1.71 \sim 2.28 \times 10^5$ 、色落ちの乾燥ノリで  $2.41 \sim 3.06 \times 10^5$ 、通常の板ノリで  $2.33 \sim 4.44 \times 10^5$ 、色落ちの板ノリで  $2.79 \sim 3.88 \times 10^5$  であり、 $M_w/M_n$  は通常の乾燥ノリで  $1.70 \sim 1.86$ 、色落ちの乾燥ノリで  $1.72 \sim 2.07$ 、通常の板ノリで  $1.96 \sim 2.18$ 、色落ちの板ノリで  $1.91 \sim 2.36$  であったことから、通常および色落ちとも乾燥ノリよりも板ノリの方が大きな値を示した。また、両材料共に、板ノリからは乾燥ノリよりも高分子量で分子量分布が広い寒天が得られることが確認された (Fig. 18)。

アルカリ濃度変化の寒天分子量分布への影響は、分子量分布曲線でも確認され、さらに通常品質のスサビノリと色落ちスサビノリでは影響の受け方に次に示すような違いが見られた (Fig. 19)。例えば、通常の乾燥ノリと通常の板ノリでは、アルカリ濃度が高くなるほど高分子量の寒天が抽出されることが確認された (Figs. 19a, 19b)。特に、通常の板ノリでは高い NaOH 濃度において高分子量の寒天が抽出される傾向を示した (Fig. 19b)。しかし、色落ちの乾燥ノリと色落ちの板ノリでは、NaOH 濃度が上昇しても高分子量側への変化は小さかった (Figs. 19c, 19d)。これ

らのことから、分子量分布は、色落ちスサビノリよりも通常品質のスサビノリの方が NaOH 濃度の影響を受けやすいことが確かめられた。

ところが、Mw に関しては通常スサビノリ寒天よりも色落ちスサビノリ寒天の方が大きかった。具体的には、通常の乾燥ノリの Mw が  $1.71 \sim 2.28 \times 10^5$  に対し、色落ちの乾燥ノリが  $2.41 \sim 3.06 \times 10^5$  で色落ちの方が約 1.3 倍大きな値を示した (Fig.18a)。さらに、板ノリにおいても 4% NaOH では通常の板ノリよりも色落ちの板ノリの Mw の方が大きく、6%、8% および 10% NaOH では同等の値を示した (Fig. 18a)。これらのことから、色落ちの板ノリからは 4% のような低い NaOH 濃度でも高分子量の寒天が溶出されやすいことがわかる。そのため、色落ちの板ノリの 4% NaOH で寒天収率が高かったと推測された (Fig.15)。

Mw の測定結果が寒天ゲルの破断応力と破断歪率の結果と類似していたため (Fig. 16, Fig. 18a)、両者の間の相関を調べた。その結果、色落ちの乾燥ノリの破断応力と Mw の関係では正の相関が見られなかったが、それ以外の条件においては、寒天ゲルの破断応力と破断歪率は Mw と高い正の相関を示した (Fig. 20)。また、NaOH 濃度に依存的に破断応力、破断歪率、Mw は大きくなる傾向にあることが確認された。

寒天のゲル化特性は硫酸基量や 3,6-AG 量と関連し、硫酸基量が多いとゲル化を妨げ、逆に 3,6-AG 量が多くなるとゲル化を促す (Lee et al. 2017a)。本研究で行ったアルカリ処理は、通常品質と色落ちのスサビノリの両方からの寒天の硫酸基量を著しく減少させ、それに反して 3,6-AG 量は有意に変化しなかった (Fig. 21)。また、スサビノリ寒天における硫酸基量は 6~10% NaOH に比べて 4% NaOH での前処理で非常に高くなっており (Fig. 21a)、寒天のゲル化能力が他の NaOH 濃度の場合に比べて弱く、さらに破断応力、融点、凝固点が低かった (Figs. 16, 17)。

### 3-4. 生命科学研究への適合性

大腸菌 (*Escherichia coli*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の増殖を、通常の乾燥ノリと板ノリ、色落ちの乾燥ノリと板ノリ、対照のテングサから作製された寒天を用いた固形培地間で比較した。その結果、4種の細菌類は、全ての寒天プレート上で良好に増殖しコロニーを形成した (Fig. 22)。このときコロニー数に統計学的な差はなかったが (Table 3)、枯草菌のコロニーについては、その大きさがテングサ寒天においてスサビノリ寒天に比べて大きかった (Fig. 22)。コロニーの大きさは寒天の物性や栄養成分の微妙な違いなどにより影響を受けることが知られているので (松下 1992; 埋橋 2003)、枯草菌はその影響を受けやすいと推測された。

次に、各寒天培地の枯草菌のプロテアーゼ活性に対する阻害効果を検証した。その結果、枯草菌によって産生されたハローの大きさはスキムミルクを用いて調製した各海藻寒天培地間で同じであったことから (Fig. 23)、全てのスサビノリ寒天には阻害効果を示す因子が含まれていないことが分かった。

第2章で示したように、NaOH 処理して調製した通常スサビノリ寒天では、硫酸基量が低いため (Fig. 6a)、電気泳動用ゲルとしてアガロースと同等の有効性が認められた (Fig. 12)。これを踏まえて、同様に硫酸基量の低い色落ちスサビノリ寒天 (Fig. 21a) を用いて DNA 電気泳動試験を行い、通常スサビノリ寒天および色落ちスサビノリ寒天における DNA マーカーの分離を比較した。このとき、コントロールとしてアガロース 1%ゲルを用いた。その結果、1 kb と 100 bp の DNA マーカーが、通常スサビノリ寒天および色落ちスサビノリ寒天においてアガロースと同様に

良好に分離された (Fig. 24)。一方、テングサ寒天ではバンドの移動度および分離が良くなかった (Fig. 24)。

次に、スサビノリ寒天と7種類の市販アガロースにおける破断応力と破断歪率の関係を比較した。その結果、同じ破断応力を持つゲルでも、スサビノリ寒天は市販アガロースよりも破断歪率が大きいことが分かった (Fig. 25)。破断歪率が大きいゲルは弾力性に優れているが、実際にスサビノリ寒天は市販アガロースよりもゲルが壊れにくく、泳動後のゲルを容易に取り扱うことが出来た (data not shown)。

#### 4. 考察

本章では、産業廃棄物である色落ちスサビノリの寒天生産材料としての適格性を検証した。その結果、色落ちスサビノリからも、物理化学的性質が通常品質のスサビノリから得た寒天と同様の高性能の寒天を抽出できることがわかった。現在、テングサ寒天の生産工程では約6%のNaOH濃度が用いられているが、色落ちスサビノリはテングサと同条件で良質の寒天が得られるため (Fig. 16)、テングサの代替品として利用可能と考えられる。これについては、スサビノリ寒天が培地用寒天としてテングサ寒天と同等の細菌増殖能を示し、電気泳動能に関してはテングサ寒天よりも優れた分離能とアガロースゲルと同等の物性を示したことから支持される。以上のことから色落ちしたスサビノリは生命科学研究に必要な高品質の寒天を供給しうる優れた生物資源であると結論した。

寒天生産の材料として色落ちスサビノリが通常品質のスサビノリよりも優れている点は、寒天収率が著しく高いことであった。例えば、板ノリを使用した場合は17~20%で (Fig. 15)、これは通常品質のスサビノ

りから得られた収率 (10-15%; Figs. 4, 15) および過去の研究で示された収率 [スサビノリ (4~16%, 小川 1994) 、 *Pyropia haitanensis* (1.3-9.0%, Mu *et al.* 2009; 4-16%, Wang *et al.* 2001; 4.9-9.5%, Rou *et al.* 1994)], そして他の紅藻類 [(14.5-22.1%, Freile-Pelegrín *et al.* 1997; 13-39%, Freile-Pelegrín *et al.* 2005; 3.5-6.5%, Yousefi *et al.* 2013; 9.5-27%, Meena *et al.* 2007a; Meena *et al.* 2007b; 15-17%, Arvizu-Higuera *et al.* 2008; 12-38%, Vergara-Rodarte *et al.* 2010; 9.0-13.5%, Rodríguez-Montesinos *et al.* 2013; 9.3-11.5%, Rao *et al.* 1976; 12%, Ibrahim *et al.* 2015) ] と比較しても高い収率であった。これらのことは、色落ちスサビノリ由来の板ノリが、他の紅藻類と比べて寒天製造に適していることを示している。

色落ちスサビノリからの寒天収率が通常品質のスサビノリよりも高かった原因の解明についてはさらなる検討を要するが、現時点では少なくとも3つの理由が考えられる。1つ目は、色落ちによる細胞壁の構造の損傷が抽出率を高めること、2つ目は色落ちが進むとスサビノリに大量に存在する色素タンパク質の量が減少し、それに伴って藻体の重量も減少するため、サンプル重量当たりのポルフィラン含量が増加し、見かけ上寒天収率が上がった可能性があること、3つ目は色落ちを引き起こす条件下でポルフィランが高度に蓄積されることである。これまでに、色落ちスサビノリからのポルフィラン収率は20.6%で、これは通常品質のスサビノリからの収率(10.6%)よりも高いこと(Isaka *et al.* 2016)、スサビノリから作製された乾海苔に含まれるポルフィラン量が秋芽網と冷凍網の両方で摘採回数の増加につれて増加したこと(濱ら、2011)、また、摘採回数が増えるとノリ葉体の壁厚や細胞径が大きくなり、色落ちしたノリでは明らかに壁厚が厚い傾向にあること(増田ら、2014)、などが報告されている。細胞壁の厚みはポルフィランの量と相関があると言われ

ている(増田ら、2014)。これらのことから、色落ちスサビノリにおいてもポルフィラン量が増加し、その収量が高くなった可能性が考えられた。

ノリの生活環の中でのポルフィランの増加量が、寒天収率の上昇に対応するだけの量か確認するため、以下の条件でポルフィランの増加量と寒天収率の増加量を比較した。まず、色落ちのスサビノリにおけるポルフィランの増加量は、Isakaら(2016)のデータを基に計算すると通常品質のスサビノリに比べて約1.9倍(20.6%/10.6%)であった。一方、色落ちの板ノリにおける寒天収率の増加量は、通常の板ノリに比べて4% NaOHで約1.3倍(19.7%/15.3%)、6% NaOHで約1.5倍(18.4%/13.4%)、8% NaOHで約1.5倍(17.4%/11.6%)、10% NaOHで約1.6倍(16.8%/10.7%)であった。以上の結果から見ると寒天収率の増加量の方がやや低いが、この理由として、寒天抽出を行う際にいくつかの工程で寒天分を失う可能性が影響していると考えられる。例えば、アルカリ処理工程でのアルカリ液への溶出、抽出後にろ布で絞る際に海藻かす中に残ってしまう可能性、寒天ゲルを凍結後流水で解凍する工程で流失してしまう可能性などが挙げられる。そのため、このような損失を考慮すると、ポルフィランの増加量と寒天収率の増加量はほぼ対応していると推定された。なお、スサビノリ寒天へのポルフィランの混入の可能性については、寒天抽出工程においてアルカリ処理が不十分なポルフィランは、寒天抽出液の中に存在していたとしても硫酸基量が多いためゲル化せず水溶性が高いため、凍結後の流水解凍の工程で流失することから混入する可能性は少ないと考えられた。

さらに、色落ちの板ノリと色落ちの乾燥ノリからの寒天収率を比較すると、板ノリは、乾燥ノリに比べ高かった。これは通常スサビノリの結果と一致しており、板ノリの製造工程が寒天収率の増加に寄与すること

が示唆された。第 2 章で議論したように、板ノリの製造中にスサビノリを細片に機械的に切断することで NaOH にさらされる表面積が増加し、抽出効率が向上したと考えられる。

通常品質のスサビノリよりアルカリ処理によって調製した寒天の硫酸基量は非常に低いが (Figs. 6a, 21a)、この特徴は色落ちスサビノリ寒天でも同じであった。すなわち、Fig. 21a で示したように、色落ちの乾燥ノリで 0.03~0.09% (6~10% NaOH で前処理)、色落ちの板ノリで 0.04~0.09% (6~10% NaOH で前処理) であり、市販アガロースの中でも精製度の高い製品の硫酸基量 (0.12%以下, Meena et al. 2007a) と同等か同等以上の含有量であった。その結果を反映し、色落ちスサビノリ寒天で作製したゲルは、電気泳動においてアガロースと同等か、それ以上の高い DNA 分離能を有することが確認された (Fig. 24)。アガロースは寒天を高度に精製したものであり、製造コストが非常に高い。しかし、色落ちスサビノリから抽出した寒天は、未精製でもアガロースと同等か同等以上の性能を有していることから、低コストで電気泳動用の寒天が製造できることを強く示唆している。

以上の結果は、高い寒天収率で高強度を有する寒天が得られる色落ちスサビノリは、微生物培養用やバイオテクノロジー用の寒天を得るための優れた供給源と言える。このことは、色落ちしたスサビノリがテングサと同様に寒天資源として使用できること、またテングサの代替品として使用可能であることを示している。スサビノリの色落ちは、現在日本のノリ養殖業において大きな問題であり、商業利用できない廃棄ノリ量の増加に伴ってその処分費用が増加している。色落ちスサビノリを用いた寒天生産は、ノリ養殖産業にとって新しい魅力的な用途開発方策の 1 つになると期待される。

## 第4章 産業廃棄物であるノリ屑からの寒天抽出

### 1. 緒言

近年、日本のノリ養殖の中心地の1つである九州地方における不作により、これまで無価値であった色落ちスサビノリに値段が付くようになり、色落ちスサビノリが入手困難になっている。そのため、寒天製造材料としての色落ちノリが十分に確保できない状況が発生している。この状況は当分続くと予想されており、産業廃棄物としての色落ちノリの寒天製造への利用はここ1~2年の間に非現実的となった。

そこで注目されるのが、板ノリ製造時に表面がローラーで擦られることで生じるノリ屑である。このノリ屑は産業廃棄物として宮城県七ヶ浜町だけでも年間1,500 kg位発生しているが、全く活用されていない。これまでに佐賀県でノリ屑をバイオマスのエネルギー源として活用する試みが提案されているが、寒天の原料としての利用などはノリ屑においては検討されていない。

以上を踏まえて、本章では産業廃棄物としてのノリ屑を寒天原料として有効活用できるかどうかを検討した。抽出試験を行うにあたり参考にしたオゴノリ属と *Curdia* 属からの寒天収率は、属や収穫時期に応じて10~50%までの大きな差が見られている (Orosco *et al.* 1992; Freile-Pelegrín *et al.* 1997; Falshaw *et al.* 1998; Marinho-Soriano *et al.* 2003; Meena *et al.* 2007a; Sousa *et al.* 2010; Yarnpakdee *et al.* 2015)。従って、ノリ屑も収穫時期により寒天収率が変わる可能性が予想された。そこで、実験では、宮城県漁協から提供された収穫時期の異なるスサビノリに由来するノリ屑からの寒天抽出試験を行い、寒天の収率や品質の違

いや適切な収穫時期などを明らかとし、スサビノリの適切な収穫時期を特定することを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 材料

原料のノリ屑は、①2016年11月15日～12月31日 ②2017年1月1日～3月15日 ③2017年3月16日～3月31日 ④2017年4月1日～4月30日の異なる時期に宮城県七ヶ浜町の板ノリ工場で排出されたものを入手した (Fig. 26)。

### 2-2. 寒天の抽出方法

ノリ屑からの寒天抽出方法は、第2章と同じ方法で行った。ただし、アルカリ処理条件は、第2章と第3章の結果を踏まえて、収率や物性が良かった6% NaOH、80℃、2時間とした。抽出試験にはそれぞれの時期ごとに、ノリ屑を13gずつ用いた (N=6)。

### 2-3. 測定方法

寒天ゲルの物理的性質 (破断応力、破断歪率、融点、凝固点)、化学的性質 [重量平均分子量 (Mw)、多分散度 (Mw/Mn、Mnは数平均分子量)、硫酸基量、3,6-AG量] の測定は第2章と同様の方法で行った。また、寒天収率とノリ屑の色の関係を知るため、次のように色調を測定した。ノリ屑を測定用容器に満杯になるように入れた後、D65の測定光源の付いた分光色差計 Spectro Color Meter SE 7700 (Nippon Denshoku Industries Co., Ltd. Japan) を用いて測定し、CIE Lab (L\*値, a\*値, b\*値) を測定

した。この測定は各々のサンプルについて3回行い、平均値を採用した。

#### 2-4. 統計処理

すべての結果は平均 ± 標準偏差で示し、統計処理は Statcel for Windows (OMS Ltd., Saitama, Japan) で、一元配置分散分析における多重比較検定の Tukey-Kramer テストによって行った。有意差は  $p < 0.05$  で示した。

### 3. 結果

#### 3-1. 寒天収率

収穫時期の違いによるノリ屑からの寒天収率の変化を調べるため、第2章、第3章で収率や物性の良かった 6% NaOH、80℃2時間のアルカリ処理条件で、収穫時期の異なるノリ屑を使って寒天抽出試験を行った。その結果、収穫時期により寒天収率が有意に変化することが明らかとなった (Fig. 27)。具体的には、収率が最も低かったのは11月15日～12月31日のノリ屑で12.9%、収穫時期が遅くなるにともない収率は上昇し、1月1日～3月15日のノリ屑で14.7%、3月16日～3月31日のノリ屑で18.0%となり、最も高い収率であった。また、4月1日～4月30日のノリ屑は17.1%で3月16日～3月31日の収率と同等であった。これらのことから、漁の初めの11月15日～12月31日のノリ屑に比べ、3月16日以降に収穫されたノリ屑からの寒天収率は有意に高いことが確かめられた。そのため、春先の3月16日以降に収穫されたノリ屑が寒天原料として最も適していると考えられた。

ノリ屑と板ノリからの寒天収率を6% NaOH処理の条件で比較すると、

1月1日～3月15日のノリ屑で14.7% (Fig. 27)、1月収穫の通常の板ノリで15.5% (Fig. 4)、2月収穫の通常の板ノリで13.4% (Fig. 15)、3月16日～3月31日のノリ屑で18.0%、さらに4月1日～4月30日のノリ屑で17.1% (Fig. 27)、また4月収穫の色落ち板ノリで18.4% (Fig. 15)であった。従って、板ノリとノリ屑は形状は異なるが収穫時期が同じであれば寒天収率は同等で、ノリ屑は板ノリと同等の高い寒天収率が得られる原料であることが確認された。

### 3-2. ノリ屑の色彩

収穫時期によりノリ屑の色(L\*値, a\*値, b\*値)に違いがあるか、またノリ屑の色と寒天収率の間に関連性があるのかを調べるために、ノリ屑の色彩を分光色差計で測定した。L\*値は明るさを表し、数値が大きい程明るくなる。色相と彩度を示す色度をa\*値, b\*値で表し、a\*値がプラス方向になるほど赤が強くなり、マイナス方向になるほど緑が強くなる。また、b\*値はプラス方向になるほど黄が強くなり、マイナス方向になるほど青が強くなる。測定の結果、収穫時期が遅くなるほどL\*値が大きく、a\*値が小さく、さらにb\*値が大きくなり (Fig. 28)、ノリの収穫時期が遅くなるほどノリ屑の色は明るくなり、赤が弱くなり、黄が強くなることがわかった (Fig. 28)。これらのL\*値, a\*値, b\*値の変化は、坂口ら(2003)が報告した色落ちに伴うノリ葉体の色調変化と同じ結果であった。つまり、収穫時期が遅くなるにつれてノリ屑の色落ちが進行した。

通常品質のスサビノリよりも色落ちスサビノリで寒天収率が高いことから(第3章)、ノリ屑の色彩と寒天収率の関係を確認した。その結果、ノリ屑のa\*値と寒天収率の間には負の相関が、b\*値と寒天収率の間には正の相関がみられ (Fig. 29)、ノリ屑の色落ちが進むほど収率が高くなる

ことが確認された。この理由としては第3章で記載したように、ノリ屑においても色落ちに伴い、①細胞壁の損傷による抽出率の向上、②色素タンパク質の減少に伴うノリ重量の軽量化によるサンプル重量当たりのポルフィラン比率の上昇、③ポルフィランの高度蓄積、などが起きた可能性が考えられた。

以上のことから、ノリ屑の a\*値や b\*値を測定することでおよそその収率が推定できることが明らかとなった。

### 3-3. 寒天ゲルの物理的性質

収穫時期により寒天ゲルの物性に違いがあるかを確認するため、抽出試験でノリ屑から得られた寒天ゲルの物理的性質(破断応力、破断歪率、融点、凝固点)を測定した。その結果、破断応力、破断歪率は、11月15日～12月31日のノリ屑寒天が最も値が低く、収穫時期が遅くなるにつれて値が上昇し、4月1日～4月30日のノリ屑寒天が最も高い値を示した (Fig. 30)。このとき、破断応力は  $1.02 \times 10^5 \text{ Pa}$  から  $1.33 \times 10^5 \text{ Pa}$  まで値が上昇し (Fig. 30a)、破断歪率は 16.5%から 17.6%まで値が上昇した (Fig. 30b)。融点は、11月15日～12月31日および1月1日～3月15日のノリ屑寒天で  $86.7^\circ\text{C}$  であったが、3月16日以降のものでは  $85.5 \sim 85.7^\circ\text{C}$  まで値が低下した (Fig. 31a)。一方、凝固点は収穫時期が遅くなるにつれて  $35.4^\circ\text{C}$  から  $36.2^\circ\text{C}$  に上昇した (Fig. 31b)。このようにノリ屑の収穫時期に応じて寒天ゲルの物性に変化は見られたが、いずれも小さな変化に留まっていた。

ノリ屑から得られた寒天と市販の培地用寒天 (破断応力  $0.6 \sim 1.4 \times 10^5 \text{ Pa}$ 、破断歪率 10～20%、融点  $79 \sim 92^\circ\text{C}$ 、凝固点  $34 \sim 37^\circ\text{C}$ ; Fig. 13 参照) の物性を比較すると、すべての収穫時期でノリ屑から得られた寒天

は培地用寒天の物性と同等であることを認めた (Figs. 30, 31)。

#### 3-4. 寒天の化学的性質

寒天ゲルの物性に影響を与える因子は、寒天の分子量分布における重量平均分子量 (Mw) や多分散度 (Mw/Mn)、寒天の硫酸基量、3,6-AG 量である (Lee *et al.* 2017a; Tashiro *et al.* 1997; Sousa-Pinto *et al.* 1999; Normand *et al.* 2000)。そのため、これらの値がノリの収穫時期により変化があるのかを確認した。

ノリ屑から得られた寒天の Mw は 11 月 15 日～12 月 31 日で  $2.01 \times 10^5$ 、1 月 1 日～3 月 15 日で  $2.25 \times 10^5$ 、3 月 16 日～3 月 31 日で  $2.14 \times 10^5$ 、4 月 1 日～4 月 30 日で  $2.36 \times 10^5$  であり、Mw/Mn は 11 月 15 日～12 月 31 日で 1.89、1 月 1 日～3 月 15 日で 1.93、3 月 16 日～3 月 31 日で 1.93、4 月 1 日～4 月 30 日で 1.95 であった (Fig. 32)。このように、収穫時期が異なっても Mw、Mw/Mn に大きな変化は見られなかった (Fig. 32)。また、寒天の分子量曲線においても、収穫時期による大きな違いは認められなかった (Fig. 33)。

ノリ屑から得られた寒天の硫酸基量は 0.04%～0.05% で非常に低く、収穫時期が変わっても同等の値であった (Fig. 34a)。また、精製度の高いアガロースの硫酸基量は 0.12%未満であるが (Meena *et al.* 2007a)、ノリ屑寒天の硫酸基量はどの収穫時期も 0.1%未満で、市販のアガロースと同等の含有量であった (Fig. 34a)。この結果は第 2 章と第 3 章で得られた通常スサビノリ寒天や色落ちスサビノリ寒天の硫酸基量と類似の値を示した。

ノリ屑寒天の 3,6-AG 量は、収穫時期の後期において高くなる傾向にあった (Fig. 34b)。濱らは (2011)、収穫時期の異なるスサビノリ由来の

乾海苔に含まれるポルフィランの 3,6-AG 量を測定し、摘採回数の増加とともに 3,6-AG 量が増加すること、その理由としてポルフィラン中の L-galactose で脱硫酸とそれと同時に起こるアンヒドロ化が進行していることを挙げている。収穫時期が遅くなるにつれてノリ屑寒天中の 3,6-AG 量が高くなっていったのは、ノリ屑でも同様のことが起きているためと考えられた。

以上、明らかとなったノリ屑寒天の化学的性質と破断応力や破断歪率の関係は、これらの物性が Mw、Mw/Mn、および 3,6-AG 量と高い正の相関関係にあることが確認された (Fig. 35)。第 2 章、第 3 章でも寒天ゲルの物性と化学的性質との間に相関がみられており、これらと同様の結果であった。

#### 4. 考察

本章では、産業廃棄物として廃棄されているノリ屑が市販培地用寒天と同等の高品質な寒天生産の材料として有効であることが確認できた。また、収穫時期により寒天収率は大きく変化した (Fig. 27)。収穫時期が遅くなるほど寒天収率は高くなり、3 月 16 日～3 月 31 日に収穫されたスサビノリ由来のノリ屑において最大収率 (18%) が得られた。従って、工業的には春先に収穫されたスサビノリからのノリ屑が原料としては適していると考えられた。

第 2 章および第 3 章において、通常品質のスサビノリから得た寒天と色落ちのスサビノリから得た寒天が、テングサ寒天と同等の培養性能を持つことが示された。またスサビノリ寒天の硫酸基量は非常に少ないため、特別な精製操作を行わなくても、市販のアガロースと同等かそれ以

上の DNA 分離能を持つ電気泳動ゲルを形成できることが確認された。本章で示したように、これらの性質はノリ屑寒天でも同様に示された (Figs. 5, 6, 16, 17, 18, 21, 30, 31, 32, 34 の比較)。

以上のことから産業廃棄物であるノリ屑は、寒天生産のための原料として有用であり、入手困難なテングサの代替原料として有望と考えられた。板ノリ工場は全国で約 3500 箇所あり、全ての板ノリ工場でノリ屑が大量に発生するため、全国規模で見た場合、膨大な量のノリ屑が発生している。例えば、1つの板ノリ工場で、1日に 0.5kg の廃棄ノリ屑が生じた場合、全国的には1日で 1.75 トン排出されることになる。従って、板ノリ工場は通常年間 75 日~100 日稼働するので、国内では毎年 131 トンから 175 トンのノリ屑の排出が見込まれる。このような膨大な量のノリ屑は、現状では、廃棄されるのみで全く活用されていない。そのため、ノリ屑を寒天原料に使用することができれば、板ノリ工場の廃棄物の有効活用やテングサの代替原料の確保につながると期待できる。実用化のため、ノリ屑を集荷するための仕組み、工場規模でノリ屑から寒天を製造するための設備、市場でのニーズなどについて今後、調査検討していきたい。

## 第 5 章 将来展望

本研究により、市場価値が低く、ほとんどが廃棄されている色落ちしたスサビノリからは通常品質のスサビノリに比べて高い収率で寒天が抽出され (Figs. 4, 15)、得られた寒天がテングサ寒天と同等の微生物培養性能、およびアガロースと同等のゲル電気泳動における DNA 分離能を示すことが確認された (Figs. 10, 12, 22, 24, Tables 1, 3)。また、板ノリ製造過程で生じて廃棄されているノリ屑からも、高品質の寒天が得られることを示した (Figs. 30, 31)。このように廃棄物の再利用によって有用成分が抽出・有効利用できることは、近年重要視されている資源循環の観点からも好ましい実例である。

これらの知見は、日本の主要な海面養殖業としてのノリ養殖が抱えている廃棄物処理問題にその解決方法を提示するものである。具体的には、近い将来色落ちスサビノリやノリ屑などの廃棄スサビノリをテングサの代替原料として工場現場で活用できるようになれば、産業廃棄物を有効活用でき、全国のノリ養殖現場から発生する廃棄ノリの処理費用を軽減することにつながると考えられる。

さらに、本研究の成果は、医学、理学、農学、水産等の各分野における生命科学の進展に貢献できることに加えて、医療現場における治療行為の向上にも貢献する道筋を示すものでもある。前者については、細菌培地用寒天や電気泳動用ゲルとしての有効性により本研究で具体的に示すことができた。後者については、例えば、低濃度アルカリ処理で得られる低強度寒天が液状・ミンチ状の食品を嚼・嚥下困難者が嚥下しやすいよう柔らかく固形化できること、高濃度アルカリ処理による高強度寒天が歯科における義歯作製時に使用する歯科印象剤として利用可能なこ

と、また、透明度が極めて高いスサビノリ寒天が皮膚科におけるシミのレーザー治療時に皮膚に乗せる緩衝材として利用できること、などの可能性が考えられる。このように、廃棄物利用により得られるスサビノリ寒天の利用範囲が広い分野に及ぶことが期待される。

以上のことから、本研究で得られた知見は、日本のノリ養殖業の円滑化あるいは持続性に寄与するとともに、生命科学分野や医療への応用も可能な2つの異なる側面を持つと言える。今後はこのことを踏まえ、ノリ養殖地の廃棄ノリの有効活用や寒天事業の原料確保への貢献に実際につながるようにさらに研究を進めていきたい。

## 要約

ノリの養殖では春先の色落ちによる品質低下が問題となっており、多くの場合、色落ちノリは廃棄されている。このような廃棄ノリは、その処分をめぐる地域的、経済的に問題になっており、産業廃棄物である廃棄ノリを有効活用することは重要な課題となっている。本研究では、このような廃棄ノリに注目し、そこから高品質な寒天を抽出する方法を確立し、その有効利用への道筋をつけることを目的とした。

ノリに含まれる多糖類はポルフィランと呼ばれ、寒天の前駆体となる。しかし、通常抽出されたものはゲル化しない。それをゲル化させるためにはアルカリ処理が必要なことが知られている。そのため、通常品質および色落ちスサビノリを濃度の異なる NaOH 溶液に浸して 80℃で 2 時間加熱処理し、水洗後、130℃で 1 時間寒天を抽出した。このようにして得られた両寒天の物理的性質（破断応力、破断歪率、融点、凝固点）および化学的性質（分子量、硫酸基量、3,6-AG 量）は類似していた (Figs. 5, 6, 16, 17, 18, 21)。そして、通常および色落ちスサビノリを 4 および 6% の NaOH 溶液で処理すると市販の培地用寒天と同等の物性を持つ寒天が得られ、また 8 および 10% の NaOH 溶液で処理した場合は、市販のアガロースと同等の高強度・高弾力性のゲルを形成する寒天が抽出可能であった (Figs. 5, 13, 16, 25, Tables 2, 4)。このようにスサビノリからは用途に応じた物性の寒天が人為的に調整可能であり、この特性はテングサでは見られないものであった。

通常品質および色落ちスサビノリからの寒天収率は大きく違っていた。例えば、通常の板ノリで 10.5~16.8%であったのに対し (Figs. 4, 15)、色落ちの板ノリでは 16.8~19.7% (Fig. 15) であり、色落ちノリからの寒

天収率の方が高かった。工業的にはより高い寒天収率が得られる材料が求められるため、色落ちスサビノリの方が通常品質のスサビノリよりも寒天原料として適していることが示された。

次にスサビノリ寒天の細菌培養や電気泳動における有用性を検証した。はじめに、スサビノリ寒天の微生物培養能を、4種類の微生物（大腸菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌、緑膿菌）を使ってテングサ寒天と比較した。その結果、色落ちの乾燥ノリ、色落ちの板ノリ、通常の乾燥ノリ、通常の板ノリから得られた寒天は、テングサから得られた寒天と同等の発育能を示した (Figs. 10, 22, Tables 1, 3)。また、産業面で幅広く使用され重要な酵素であるプロテアーゼ (Kasana *et al.* 2011) を検出するスクリーニングを想定して、スサビノリ寒天における枯草菌プロテアーゼ阻害活性の有無を検証した。その結果、色落ちの乾燥ノリ、色落ちの板ノリ、通常の乾燥ノリ、通常の板ノリから得られた寒天は、テングサから得られた寒天と同等のハローを形成し、酵素活性阻害は確認されなかった (Figs. 11, 23)。さらに、スサビノリ寒天の電気泳動における有効性を検証したところ、色落ちスサビノリ寒天および通常スサビノリ寒天は、未精製であるにも関わらず、核酸の電気泳動においてアガロースと同等かそれ以上の DNA 分離能を示した (Figs. 12, 24)。通常、アガロースを製造するためには寒天を高度に精製する必要があるため、手間やコストがかかり価格が高価となる。しかし、スサビノリ寒天は硫酸基量が非常に低く (Figs. 6a, 21a)、未精製でもアガロースに匹敵する性能を有するため、低コストで電気泳動用寒天の製造ができると期待される。これらのことから、色落ちスサビノリ寒天は、通常スサビノリ寒天と同様に培地用寒天や電気泳動用への利用における応用面でも有用性があることが示された。このことは産業廃棄物である色落ちノリの有効利用に向け一つ

の方向性を示すものである。

最後に板ノリ製造時に排出されるノリ屑の寒天原料としての有効性を検証した。特に収穫時期により寒天の収率や品質に差があるかどうかに着目して解析を行った。その結果、冬から春先に収穫されたノリ屑から細菌培養に適した寒天がそれぞれ得られた (Figs. 30, 31 と Fig. 13 の比較)。しかし、寒天収率は収穫時期で大きく変化し、冬よりも春先に得られたスサビノリの方が寒天収率は高くなる傾向にあった (Fig. 27)。一般的に春先にノリの色落ちが起きる。そのため、この結果は、色落ちノリから高収率で寒天が得られたことを支持する結果であった。すなわち、色落ちノリは回収されたノリ屑も含め高品質な寒天を調製できる原料となりうる。

以上の結果から、産業廃棄物である廃棄ノリは、医薬や、生物学研究に必須な寒天の原料として有効活用できることが確認された。この場合、特に色落ちの板ノリやノリ屑は寒天収率が高いので、非常に材料として優れている。これらのことは廃棄ノリがテングサの代替原料として極めて有効であることを強く示している。今後は、工場化による寒天の大量生産に向けて製造設備の検討を進めて行き、スサビノリ養殖業における廃棄物処理費用の軽減と発展、および寒天事業の持続性に貢献していきたい。

## 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の取りまとめにあたり、終始暖かいご指導と激励を賜った北海道大学大学院水産科学研究院・准教授 三上浩司博士に心から感謝申し上げます。また、本研究の論文作成に当たり校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究院・教授・佐伯宏樹博士、同教授・安井 肇博士、並びに同教授・尾島孝男博士に感謝いたします。さらに、社会人博士課程への進学の手助けを下さった株式会社鈴与総合研究所・鈴木與平社長と中山滋理事長に深く感謝いたします。

本研究における材料提供に全面的に協力して下さいました宮城県漁業協同組合の代表理事理事長・小野秀悦氏、七ヶ浜水産振興センター・星長一氏、齋藤吉勝氏や寺沢春彦氏をはじめとする七ヶ浜町漁業組合員の皆様、さらには板ノリ工場の見学、情報提供、ノリ提供でお世話になった経済事業本部・齋藤裕太氏、ならびに七ヶ浜支所の佐々木一仙支所長、赤間正巳班長代理、森永公平顧問、阿部太陽氏に厚く御礼申し上げます。実験面で多大なサポートをいただいた株式会社鈴与総合研究所・研究員・山梨智也博士、同職員・加納舞氏および後藤沙知子氏、寒天研究を始めから一緒に進めていただいた四ツ谷愛子氏、統計処理方法について手ほどきしていただいた片山知里氏、会社における研究面で世話になった株式会社鈴与総合研究所の餅田浩基所長、江口陽子課長、池呂尚美氏、および石川智子氏に感謝いたします。試験に用いた寒天やアガロースサンプルの提供や工場試験等でご協力いただいた SSK セールス(株)寒天事業部の服部靖部長、石井康史次長、北川孝和氏、および永井佑宜氏に深く御礼申し上げます。本研究を進める上でアドバイスや激励を下さった鈴与株式会社・メディカルロジスティクス事業部・氷見司氏と全

国の廃棄ノリに関する情報提供をして下さった全国漁業協同組合連合会・のり推進室・次長役・江嶋正良氏にお礼申し上げます。また、会社にて寒天研究を始めた当初、技術的な手ほどき、ご指導をして下さった元日本大学生物資源科学部・教授・西出英一博士、元東海大学海洋学部・教授・山田信夫博士に深く御礼申し上げます。さらに、北海道大学・三上研究室において研究推進のサポートや有益な議論していただき大変お世話になった須田昌宏氏、李成澤氏、岸本育也氏、田谷賢祐氏、有賀祈氏、入江隆乃介氏にお礼いたします。最後になりましたが、本研究の遂行や会社業務を常日頃から応援していただいている両親と妹に心から感謝いたします。

本研究は、宮城県漁業協同組合、榎鈴与総合研究所、SSKセールス(株)寒天事業部および北海道大学大学院水産科学研究院の産学連携に基づいて遂行したものです。

## 引用文献

- Al-Nahdi, Z.M., Al-Alawi, A., Al-Marhobi, I. and Al-Zefiti, A. (2015): Optimization of yield and chemical properties of agar extracted from *Melanothamnus somalensis* from Oman Sea. *J. Environ. Sci. Eng.* **B4**, 302–314.
- Araki, C. (1966): Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **5**, 3–17.
- Armisen, R. and Garatas F. (1987): Production, properties and uses of agar, in: McHugh, D.J. (Ed.) Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. *FAO Fish. Tech. Pap.* **288**, (189 pp), <http://fao.org/docrep/x5822e/x5822e03.htm>.
- Armisen, R. (1991): Agar and agarose biotechnological applications. *Hydrobiologia* **221**, 157–166.
- Arvizu-Higuera, D.L., Rodríguez-Montesinos, Y.E., Murillo-Álvarez, J.I., Muñoz-Ochoa M. and Hernández-Carmona G. (2008): Effect of alkali treatment time and extraction time on agar from *Gracilaria vermiculophylla*. *J. Appl. Phycol.* **20**, 515–519.
- Bhatia, S., Namdeo, A.G. and Nanda, S. (2010): Factors effecting the gelling and emulsifying properties of a natural polymer. *Sys. Rev. Pharm.* **1**, 86–92.
- Bixler, H.J. and Porse H. (2011): A decade of change in the seaweed hydrocoloids industry. *J. Appl. Phycol.* **23**, 321–335.
- Callaway, E. (2015): Lab staple agar runs low. *Nature*, **528**, 171–172.
- Cao, J., Wang, S., Xu, L., He, J. and Xu, X. (2015): Extraction of porphyran from *Porphyra yezoensis* for gel formulation preparation. *Key. Eng.*

*Mater.* **636**, 133-137.

- Chiovitti, A., McManus, L. J., Kraft, G. T., Bacic, A. and Liao, M. - L. (2004): Extraction and characterization of agar from Australian *Pterocladia lucida*. *J. Appl. Phycol.* **16**, 41–48.
- Duckworth, M. and Yaphe, W. (1971): The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**, 189–197.
- Efendi, F., Handajani, R. and Nursalam, N. (2015): Searching for the best agarose candidate from genus *Gracilaria*, *Eucheuma*, *Gelidium* and local brands. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **5**, 865–869.
- Falshaw, R., Furneaux, R. H. and Stevenson, D. E. (1998): Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* **308**, 107–115.
- 藤木寛之 (1972): フノランのアルカリ処理による構造変化. 日本農芸化学会誌, **46**, 59-66.
- Freile-Peigrín, Y., Robledo, D., Armisén R. and Garacia-Reina, G. (1996): Seasonal changes in agar characteristics of two populations of *Pterocladia capillacea* in Gran Canaria, Spain. *J. Appl. Phycol.* **8**, 239–246.
- Freile-Peigrín, Y. and Robledo, D. (1997): Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatán, Mexico. *J. Appl. Phycol.* **9**, 533–539.
- Freile-Peigrín, Y. and Murano, E. (2005): Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresour. Technol.* **96**, 295–302.

- Gao, H., Ji, M. and Cao, W. (1993): Comparative studies on structural feature of agar polysaccharides from *Porphyra hitanensis* grown in south and north China. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **11**, 25–33.
- Guerrero, P., Etxabide, A., Leceta, I., Peñalba, M. and de la Caba, K. (2014): Extraction of agar from *Gelidium sesquipedale* (Rhodopyta) and surface characterization of agar based films. *Carbohydr. Polym.* **99**, 491–498.
- Hama, Y., Nakagawa, H., Kurosawa, M., Sumi, T., Xia, X. and Yamaguchi, K. (1998): A gas chromatographic method for the sugar analysis of 3,6-anhydrogalactose-containing algal galactans. *Anal. Biochem.* **265**, 42–48.
- 濱洋一郎, 常田尚正, 杉本良子, 中川浩毅 (2011): 乾海苔に含まれる多糖含量とポルフィランの性質. 日本水産学会誌, **77**, 881-886.
- 林金雄, 岡崎彰夫 (1970): 寒天ハンドブック, 光琳書院, 235-237.
- Hesse, W. (1992): Walther and Angelina Hesse-early contributors to bacteriology. *ASM news*, **58**, 425–428 (translated by Gröschel, D.H.M.).
- Hjertén, S. (1962): A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* **62**, 445–449.
- Ibrahim, H.A.H., Beltagy, E.A., Shams El-Din, N. G., El Zokm, G. M., El-Sikaily, A. M. and Abu-Elala, G. M. (2015): Seaweeds agarophytes and associated epiphytic bacteria along Alexandria coastline, Egypt, with emphasis on the evaluation and extraction of agar and agarose. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* **50**, 545-561.
- Inoue, N., Yamano, N., Sakata, K., Nagano, K., Hama, Y. and Yanagita, T. (2009): The sulfated polysaccharide porphyran reduces apolipoprotein

- B100 secretion and lipid synthesis in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 447-449.
- Isaka, S., Cho, K., Nakazono, S., Abu, R., Ueno, M., Kim, D. and Oda, T. (2015): Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*). *Int. J. Biol. Macromol.* **74**, 68–75.
- Jeon, Y. - J., Athukorala, Y. and Lee, J. (2005): Characterization of agarose product from agar using DMSO. *Algae* **20**, 61–67.
- Kakinuma, M., Coury, D. A., Nakamoto, C., Sakaguchi, K. and Amano, H. (2008): Molecular analysis of physiological responses to changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Cell. Biol. Toxicol.* **24**, 629-639.
- Kakinuma, M., Nakamoto, C., Kishi, K., Coury, D. A. and Amano, H. (2017): Isolation and functional characterization of an *ammonium transporter* gene, PyAMT1, related to nitrogen assimilation in the marine macroalga *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). *Mar. Environ. Res.* **128**, 76-87.
- Kasana, R.C., Salwan, R. and Yadav, S.K. (2011); Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**, 262-276.
- Kang, T.-H., Lee, S.-H., Baik, J.-S., Kang, B.-S., Lee, J.-S., Lee, N.-H. and Jeon, Y.-J. (2011): Preparation of commercial agarose from Jeju Seaweed, *Gelidium amansii* using DMSO Extraction and EDTA washing. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **44**, 635–643 (Korean with English abstract).
- Koo, J.-G. and Park, J.-H. (1999): Chemical and gelling properties of alkali-modified porphyran. *J. Korean. Fish. Soc.* **32**, 271–275 (Korean

with English abstract).

- Kraan, S. (2012): Algal polysaccharides, novel applications and outlook, carbohydrates, in: C.-F. Chang (Ed.), *Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech, Rijeka, Croatia, 489–532.
- Lee, W. K., Lim, Y. Y., Leow, A. T. C., Namasivayam, P., Abdullah, J. O. and Ho, C.L. (2017a): Factors affecting yield and gelling properties of agar. *J. Appl. Phycol.* **29**, 1527-1540.
- Lee, W. K., Lim, Y. Y., Leow, A. T. C., Namasivayam, P., Abdullah, J.O. and Ho, C. L. (2017b): Biosynthesis of agar in red seaweeds: a review. *Carbohydr. Polym.* **164**, 23-30.
- Marinho-Soriano, E. and Bourret, E. (2003): Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria species* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* **90**, 329–333.
- 増田裕二, 山田秀樹, 横尾一成, 川村嘉応 (2014): 摘採回数異なるノリ葉体の厚さおよび自由水、含水率の変化. 佐有水研報, **27**, 55-59.
- Matsuhiro, B. and Zanlungo A. B. (1983): Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides from red seaweeds. *Carbohydr. Res.* **118**, 276–279.
- 松下貢 (1992): バクテリア増殖によるパターン形成. 日本物理学会誌, **47**, 441-446.
- McHugh, D. J. (1991): World distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. *Hydrobiologia*, **221**, 19-29.
- Meena, R., Siddhanta, A. K., Prasad, K., Ramavat, B. K., Eswaran, K., Thirupathi, S., Ganesan, M., Mantri, V. A. and Subba Rao, P. V. (2007a): Preparation, characterization and benchmarking of agarose from *Gracilaria dura* of Indian waters. *Carbohydr. Polym.* **69**, 179–

188.

- Meena, R., Prasad, K., Ganesan, M. and Siddhanta, A. K. (2007b): Superior quality agar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the Gulf of Mannar, India. *J. Appl. Phycol.* **20**, 397-402.
- Morrice, L. M., McLean, M. W., Long, W. F. and Williamson, F. B. (1983): Porphyran primary structure.; An investigation using -agaraseI from *Pseudomonas atlantica* and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **133**, 673-684.
- Mu, K.-F., Wu, Y.-P., Chen, Z.-H., Chen, J., Yang, F. and Zhu, P. (2009): Production process of agar from laver *Porphyra haitanensis*. *Fish. Sci. China.* **28**, 454–457 (Chinese with English abstract).
- Murano, E. (1995): Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* **7**, 245–254.
- Nil, S., Ali-Mehidi, S., Zellal, A. and Abi-Ayad, S. M. E. (2016): Effects of season on the yield and quality of agar from *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) from Mostaganem, Algeria. *Afr. J. Biotechnol.* **15**, 350–355.
- Nishikawa, T., Hori, Y., Tanida, K. and Imai, I. (2007): Population dynamics of the harmful diatom *Eucampia zodiacus* Ehrenberg causing bleaching of *Porphyra* thalli in aquaculture in Harima-nada, the Seto Inland Sea, Japan. *Harmful Algae* **6**, 763-773.
- Nishikawa, T., Tarutani, K. and Yamamoto, T. (2010): Nitrate and phosphate uptake kinetics of the harmful diatom *Coscinodiscus wailesii*, a causative organism in the bleaching of aquacultured *Porphyra* thalli. *Harmful Algae* **9**, 563-567.
- Normand, V., Lootens, D. L., Amichi, E., Plucknett, K. P. and Aymard, P.

- (2000): New insight into agarose gel mechanical properties. *Biomacromolecules*, **1**, 730–738.
- 小川廣男 (1994): アマノリの寒天様多糖類の物性と利用. 浦上財団研究報告書, **4**, 79-88
- Orosco, C. A., Anong, C., Nukaya, M., Ohno, M., Sawamura, M. and Kusunose, H. (1992): Yield and physical characterization of agar from *Gracilaria chorda* Holmes: comparison with those from Southeast Asian species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1711–1716.
- 大山憲一, 吉松定明, 本田恵二, 安倍亨利, 藤沢節茂 (2008): 2005年2月に播磨灘から備讃瀬戸に至る香川県沿岸域で発生した大型珪藻 *Chaetoceros densus* のブルーム: 発生期の環境特性とノリ養殖への影響. 日本水産学会誌, **74**, 660-670.
- Rao A. V. and Bekheet, I. A. (1976): Preparation of agar-agar from the red seaweed *Peterocladia capillacea* off the coast of Alexandria, Egypt. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 479-482.
- Rees D. A. (1969): *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.* **24**, 267-332.
- Peat, S., Turvey, J. R. and Rees, D. A. (1961): Carbohydrates of the Red Alga, *Phorphyra umbilicalis*. *J. Chem. Soc. (London)*, 1590–1595.
- Pereira-Pacheco, F., Robledo, D., Rodríguez-Carvajal, L. and Freile-Pelegri, Y. (2007): Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatán, México. *Bioresour. Technol.* **98**, 1278–1284.
- Rodríguez-Montesinos, Y. E., Arvizu-Higuera, D. L., Hernández-Carmona, G., Muñoz-Ochoa, M. and Murillo-Álvarez, J. I. (2013): Seasonal variation of the agar quality and chemical composition of *Gracilaria veleroae* and *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyceae,

- Gracilariaceae) from Baja California Sur, Mexico. *Psychol. Res.* **61**, 116–123.
- Rou, S. and Shengyao, S. (1994): Studies on the porphyran and *Porphyra* agar. *Mar. Sci.* **1**, 48–51 (Chinese with English abstract).
- 坂口研一, 落合昇, Chan Sun Park, 柿沼誠, 天野秀臣 (2003): 色落ちノリの色調評価と硫酸アンモニウム添加海水への浸漬による色調回復. 日本水産学会誌, **69**, 399-404.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press 5.7
- Sousa, A. M. M., Alves, V. D., Morais, S., Delerue-Matos, C. and Gonçalves, M. P. (2010): Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* **101**, 3258–3267.
- Sousa-Pinto, I., Murano, E., Coelho, S., Felga, A. and Pereira, R. (1999): The effect of light on growth and agar content of *Gelidium pulchellum* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia*, **398/399**, 329–338.
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Teixeira, J. A., Coimbra M. A. and Vicente, A. A. (2012): Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocoll.* **27**, 287–292.
- Suzuki, H., Sawai Y. and Takeda, M. (2001): The effect of apparent

- molecular weight and components of agar on gel formation. *Food Sci. Technol. Res.* **7**, 280–284.
- Tashiro, Y., Ogawa, H. and Iso, N. (1997): Effect of the molecular weight distribution of agar on the gel strength. *Fish. Sci.* **63**, 407–408.
- 田代有里 (2001): 寒天ゲルの構造不均一性に関する研究. 科研費 2001 年度 実績報告書, <https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-12760140/127601402001jisseki/>
- Tsuge, K., Okabe, M., Yoshimura, T., Sumi, T., Tachibana, H, and Yamada, K. (2004): Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of sprague-dawley rats. *Food Sci. Technol. Res.* **10**, 147-151.
- 埋橋祐二 (2003): 微生物培養基, 電気泳動支持体としての寒天特性. 日本衛生学会誌, **44**, J.1-J.5.
- Vergara-Rodarte, M. A., Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y. E., Arvizu-Higuera, D. L., Riosmena-Rdoríguez, R. and Murillo-Álvarez, J. I. (2010): Seasonal variation of agar from *Gracilaria vermiculophylla*, effect of alkali treatment time, and stability of Its Colagar. *J. Appl. Phycol.* **22**, 753–759.
- Wang, L., Li, L., Wang, Y-M., Yuan, Q-Y., Li, Z-E. and, Xu, Z-H. (2001): Comparative research on the structures and physical chemical properties of agars from several agarophyta. *Oceanol. Limnol. Sin.* **32**, 658-664 (Chinese with English abstract).
- Wang, T.-P., Chang, L.-L., Chang, S.-N., Wang, E.-C., Hwang, L.-C., Chen Y.-H. and Wang, Y.-M. (2012): Successful preparation and characterization of biotechnological grade agarose from indigenous

- Gelidium amansii* of Taiwan. *Process Biochem.* **47**, 550–554.
- Wolnik, K. A. (1988): Inductively coupled plasma-emission spectrometry, Methods. *Enzymol.* **158**, 190–205.
- Yaphe, W. (1984): Properties of *Gracilaria* agars. *Hydrobiologia* **116** (117), 171–186.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S. and Kingwascharapong, P. (2015): Physico-chemical and gel properties of agar from *Gracilaria tenuistipitata* from the lake of Songkhla, Thailand. *Food Hydrocoll.* **51**, 217–226.
- 米谷民雄, 邢大栄, 寺井里枝, 義平邦利 (1994): カラギナンの試験法への真空型 ICP 発光分析法の応用. 日本食品衛生誌, **35**, 631-635.
- Yousefi, M. K., Islami, H. R. and Filizadeh, Y. (2013): Effect of extraction process on agar properties of *Gracilaria corticata* (Rhodophyta) collected from the Persian Gulf. *Phycologia* **52**, 481-487.
- Zhang, J., Nagahama, T., Ohwaki, H., Ishibashi, Y., Fujita, Y. and Yamazaki, S. (2004): Analytical approach to the discoloration of edible laver “*Nori*” in the ariake sea. *Anal. Sci.* **20**, 37-43.
- Zhang, Q., Qi, H., Zhao, T., Deslandes, E., Ismaeli, N. M., Molloy, F. and Critchley, A. T. (2005): Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* **340**, 2447–2450.
- Zhang, W.-Y., Chen, H., Wang S.-J. and Tan, R. X. (2000): The isolation, purification and identification of a kind of agar polysaccharide from *Porphyra yezoensis*, Chinese. *Bull. Bot.* **17**, 429–434 (Chinese with English abstract).

**Table 1** スサビノリ寒天の微生物増殖性能

テングサ、通常の乾燥ノリ 及び 通常の板ノリからの寒天を 0.75%含むプレートにおける 4つの微生物増殖で観察されたコロニー数を示した。値は各々の 3回の試験の平均値 ± 標準偏差を示した。3種類のプレートの間にはコロニー数の有意な差 ( $P < 0.05$ ) は認められなかった。

菌種	テングサ	通常の乾燥ノリ	通常の板ノリ
大腸菌 ( <i>E. coli</i> )	59±3.0	64±4.0	56±7.2
黄色ブドウ球菌 ( <i>S. aureus</i> )	63±2.1	58±6.2	48±13.4
枯草菌 ( <i>B. subtilis</i> )	60±4.9	49±15.1	68±9.0
緑膿菌 ( <i>P. aeruginosa</i> )	22±2.9	21±2.3	26±4.7

**Table 2** スサビノリ寒天、培地用寒天およびアガロースの物性の比較

値は3回試験の平均値 ± 標準偏差を示した。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。培地用寒天は破断応力が  $0.60 \sim 1.40 \times 10^5$  Pa、破断歪率が  $10.0 \sim 20.0\%$ 、アガロースは破断応力が  $0.50 \sim 3.50 \times 10^5$  Pa、破断歪率が  $14.0 \sim 26.0\%$  の範囲に分布している。

	NaOH 濃度 (%)			
	4	6	8	10
破断応力 ( $\times 10^5$ Pa)				
通常乾燥ノリ	0.61±0.07 <sup>f</sup>	1.46±0.09 <sup>e</sup>	2.13±0.21 <sup>b</sup>	2.28±0.09 <sup>b</sup>
通常板ノリ	0.47±0.06 <sup>f</sup>	1.60±0.12 <sup>ce</sup>	2.17±0.13 <sup>b</sup>	2.80±0.13 <sup>a</sup>
破断歪率 (%)				
通常乾燥ノリ	17.7±1.0 <sup>bc</sup>	16.9±0.8 <sup>c</sup>	19.3±1.7 <sup>bc</sup>	19.7±0.2 <sup>bc</sup>
通常板ノリ	16.1±1.1 <sup>c</sup>	17.8±0.1 <sup>bc</sup>	19.9±1.0 <sup>b</sup>	23.8±1.2 <sup>a</sup>

**Table 3** スサビノリ寒天の微生物増殖性能

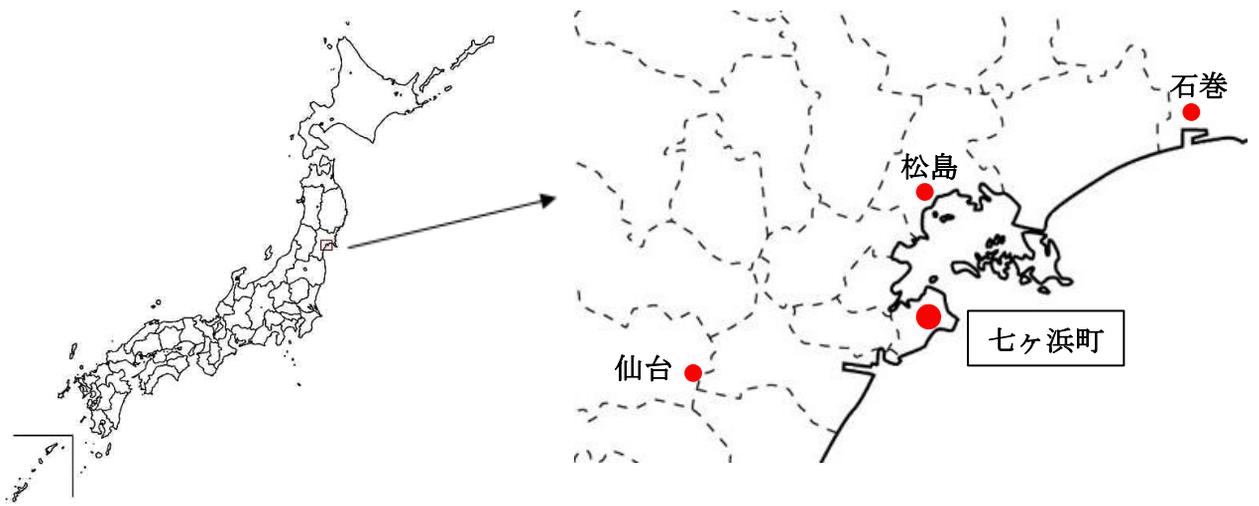
テングサ、通常の乾燥ノリ、通常の板ノリ、色落ちの乾燥ノリ、色落ちの板ノリからの寒天を 0.75%含むプレートにおける 4 つの微生物増殖で観察されたコロニー数を示した。値は各々の 3 回の試験の平均値  $\pm$  標準偏差を示している。5 種類のプレートの間にはコロニー数の有意な差 ( $P < 0.05$ ) は認められなかった。

	菌種			
	大腸菌 <i>E. coli</i>	黄色ブドウ球菌 <i>S. aureus</i>	枯草菌 <i>B. subtilis</i>	緑膿菌 <i>P. aeruginosa</i>
テングサ	42.3 $\pm$ 10.7	42.7 $\pm$ 1.5	20.7 $\pm$ 8.1	61.7 $\pm$ 6.4
通常の乾燥ノリ	39.7 $\pm$ 2.9	37.0 $\pm$ 5.0	24.7 $\pm$ 3.2	78.3 $\pm$ 4.2
通常の板ノリ	43.7 $\pm$ 7.1	45.7 $\pm$ 4.7	32.7 $\pm$ 5.1	75.0 $\pm$ 3.0
色落ちの乾燥ノリ	51.7 $\pm$ 1.2	41.0 $\pm$ 6.2	29.7 $\pm$ 9.0	63.3 $\pm$ 18.8
色落ちの板ノリ	39.7 $\pm$ 2.5	40.3 $\pm$ 3.8	35.0 $\pm$ 11.1	70.3 $\pm$ 9.9

**Table 4** スサビノリ寒天、培地用寒天およびアガロースの物性の比較

値は3回試験の平均値 ± 標準偏差を示した。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。培地用寒天は破断応力が  $0.60 \sim 1.40 \times 10^5$  Pa、破断歪率が  $10.0 \sim 20.0\%$ 、アガロースは破断応力が  $0.50 \sim 3.50 \times 10^5$  Pa、破断歪率が  $14.0 \sim 26.0\%$  の範囲に分布している。

	NaOH 濃度 (%)			
	4	6	8	10
破断応力 ( $\times 10^5$ Pa)				
通常の乾燥ノリ	0.47±0.07 <sup>h</sup>	1.50±0.12 <sup>fg</sup>	1.66±0.24 <sup>efg</sup>	2.14±0.05 <sup>cd</sup>
通常の板ノリ	0.52±0.11 <sup>h</sup>	1.95±0.23 <sup>cde</sup>	2.61±0.05 <sup>ab</sup>	2.66±0.10 <sup>a</sup>
色落ちの乾燥ノリ	0.59±0.03 <sup>h</sup>	1.35±0.16 <sup>fg</sup>	1.52±0.23 <sup>fg</sup>	1.95±0.13 <sup>cde</sup>
色落ちの板ノリ	0.80±0.08 <sup>h</sup>	1.77±0.19 <sup>def</sup>	2.18±0.14 <sup>bc</sup>	2.34±0.04 <sup>abc</sup>
破断歪率 (%)				
通常の乾燥ノリ	12.4±1.2 <sup>c</sup>	17.5±0.6 <sup>b</sup>	16.8±1.8 <sup>b</sup>	18.4±0.3 <sup>b</sup>
通常の板ノリ	16.5±2.1 <sup>b</sup>	20.2±1.8 <sup>ab</sup>	23.0±0.7 <sup>a</sup>	24.0±1.1 <sup>a</sup>
色落ちの乾燥ノリ	18.7±0.5 <sup>b</sup>	16.6±1.7 <sup>b</sup>	17.2±2.3 <sup>b</sup>	20.3±1.5 <sup>ab</sup>
色落ちの板ノリ	19.1±1.2 <sup>b</sup>	20.1±0.6 <sup>ab</sup>	21.8±1.0 <sup>a</sup>	23.8±0.9 <sup>a</sup>



**Fig. 1.** スサビノリの入手先

乾燥ノリと板ノリは両者ともに宮城県七ヶ浜町の漁業協同組合より入手した。



乾燥ノリ  
(通常)



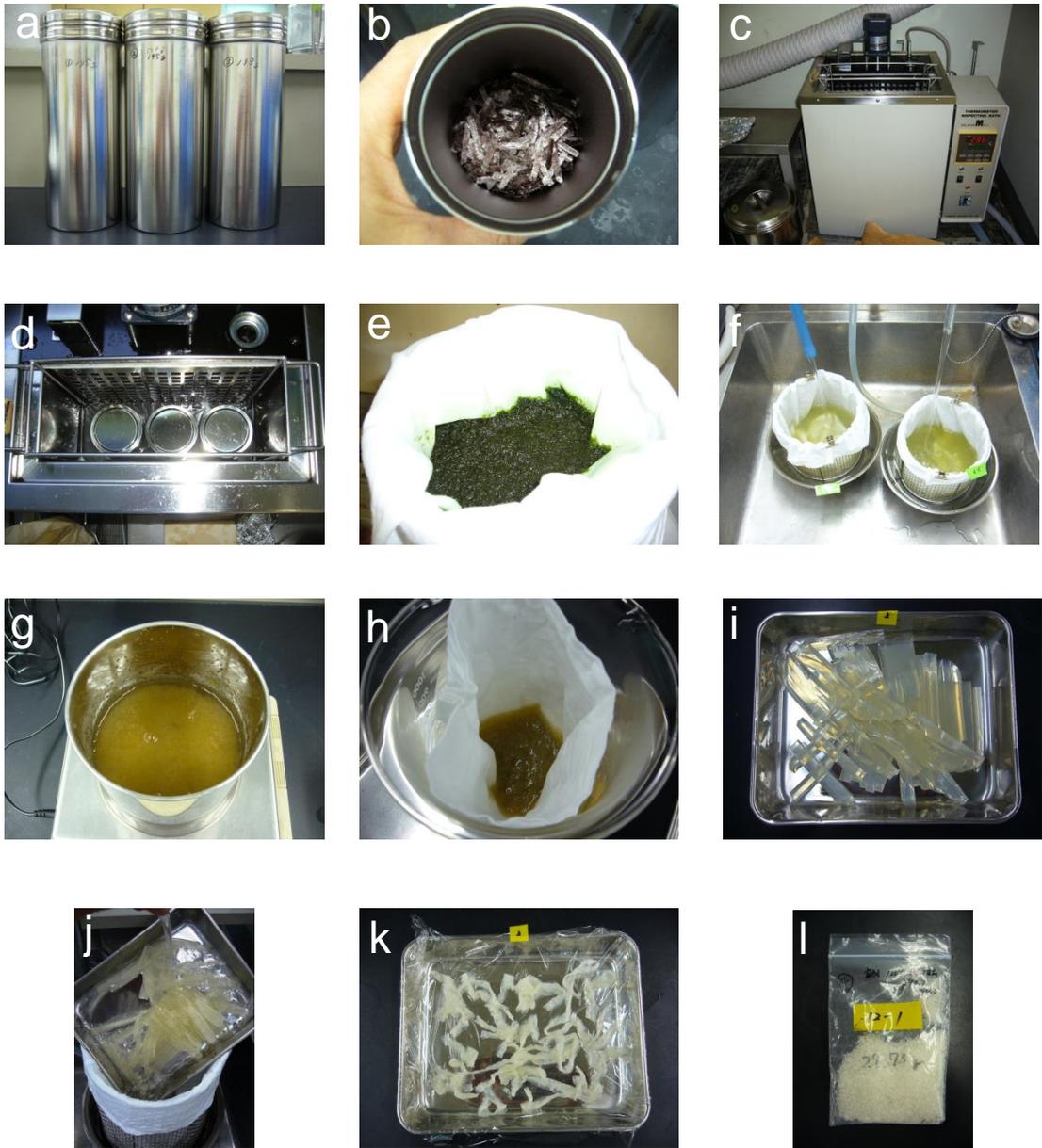
板ノリ  
(通常)



テングサ

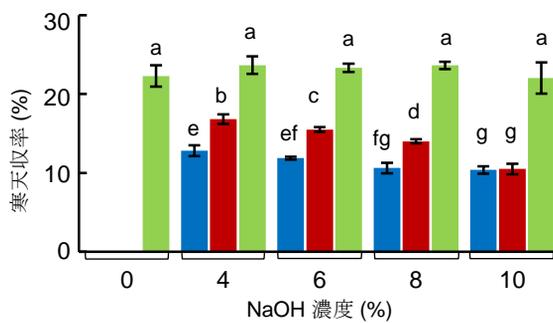
**Fig. 2. 海藻試料**

乾燥ノリと板ノリはセヶ浜町産であり、テングサはモロッコから購入した。



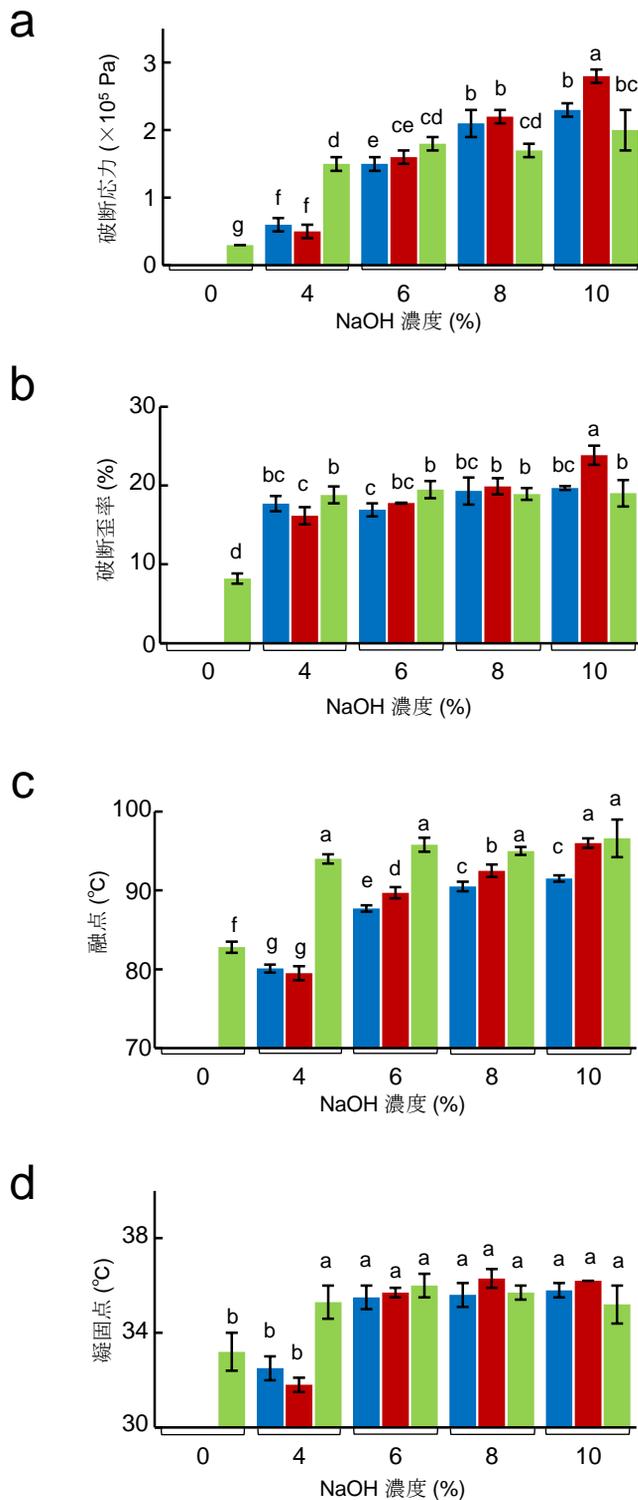
**Fig. 3.** スサビノリからの寒天製造工程

- (a) ステンレス容器
- (b) ステンレス容器に材料を入れた様子
- (c) オイルバス
- (d) 80°C 2時間保持
- (e) アルカリ処理した材料を吸引ろ過
- (f) アルカリ処理した材料を水洗
- (g) 材料をステンレス容器に入れオートクレーブ抽出
- (h) ろ布で抽出液と残渣に分離
- (i) 抽出液をゲル化後、細断
- (j) 一晩凍結後、流水で解凍
- (k) 解凍物をろ布で脱水後、60°Cで乾燥
- (l) 乾燥物を粉砕して得た粉末寒天



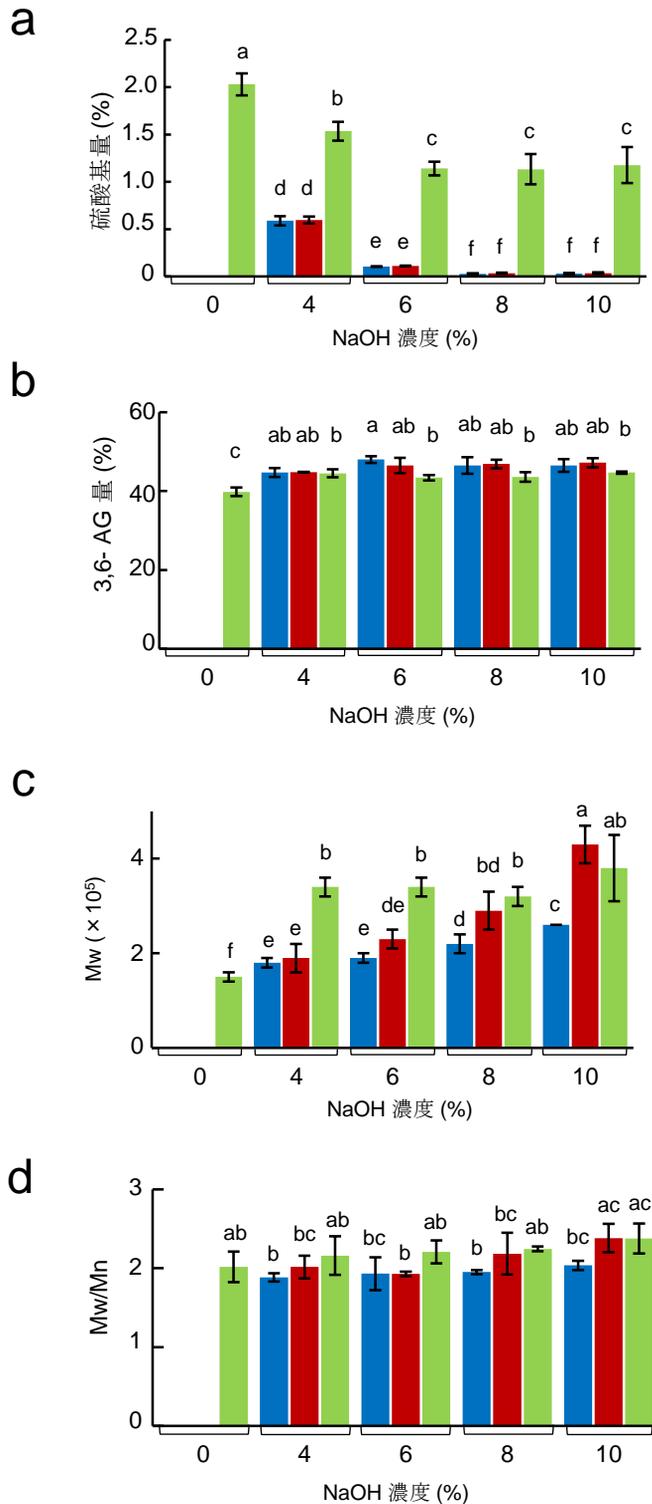
**Fig. 4. 寒天収率に対するアルカリ濃度の影響**

通常の乾燥ノリ (青), 通常 of 板ノリ (茶) および テングサ (黄緑) を4%, 6%, 8% および10% NaOHで処理して寒天を回収した (平均値 ± 標準偏差, n=3)。アルファベットの違いは、有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



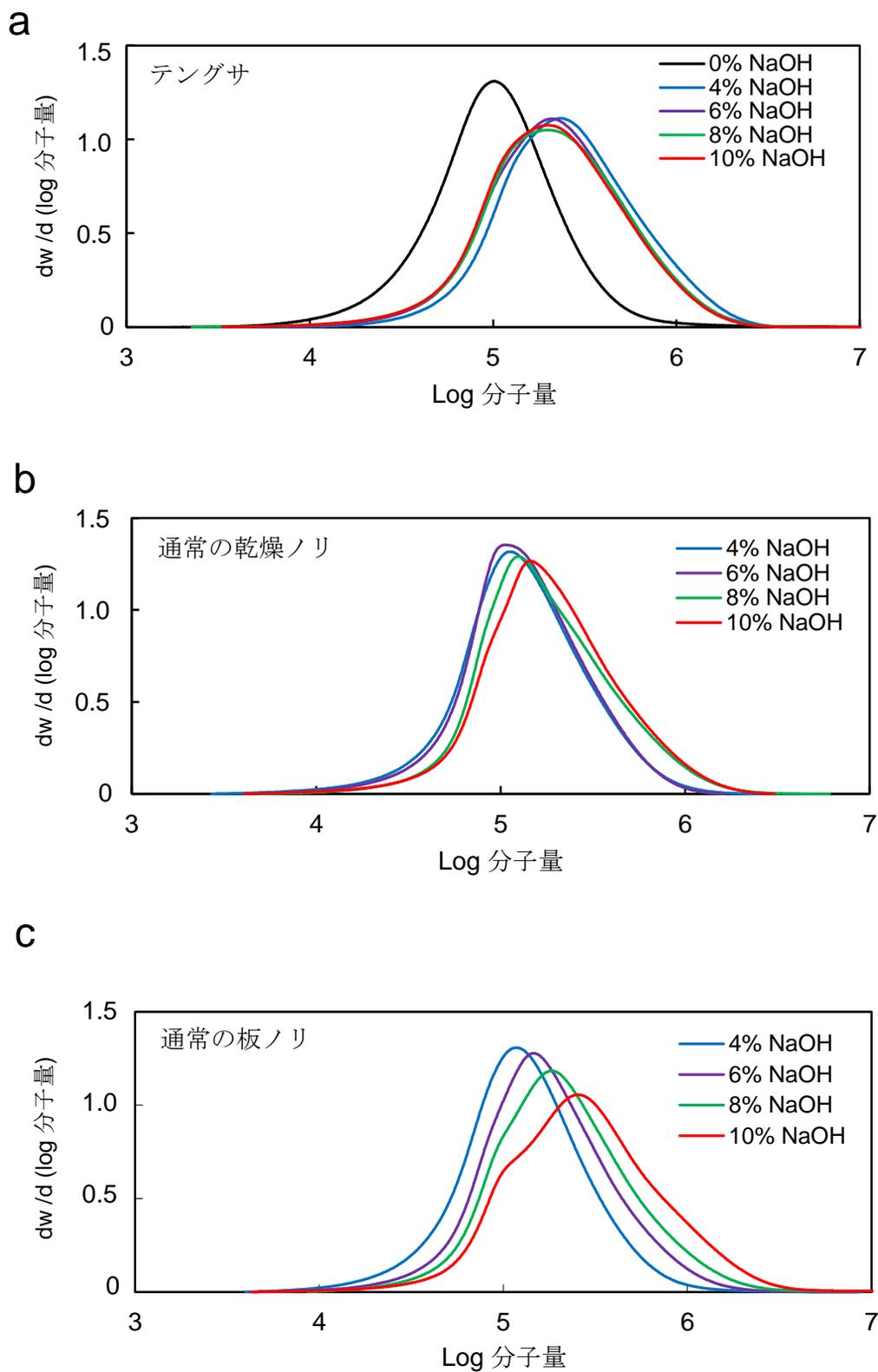
**Fig. 5.** 寒天ゲルの物理的性質に対するアルカリ濃度の影響

通常の乾燥ノリ (青), 通常の板ノリ (茶) およびテングサ (黄緑) を4%, 6%, 8% および10% NaOHで処理して寒天を回収し、破断応力 (a), 破断歪率 (b), 融点 (c) および凝固点 (d)を測定した (平均値 ± 標準偏差, n=3)。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



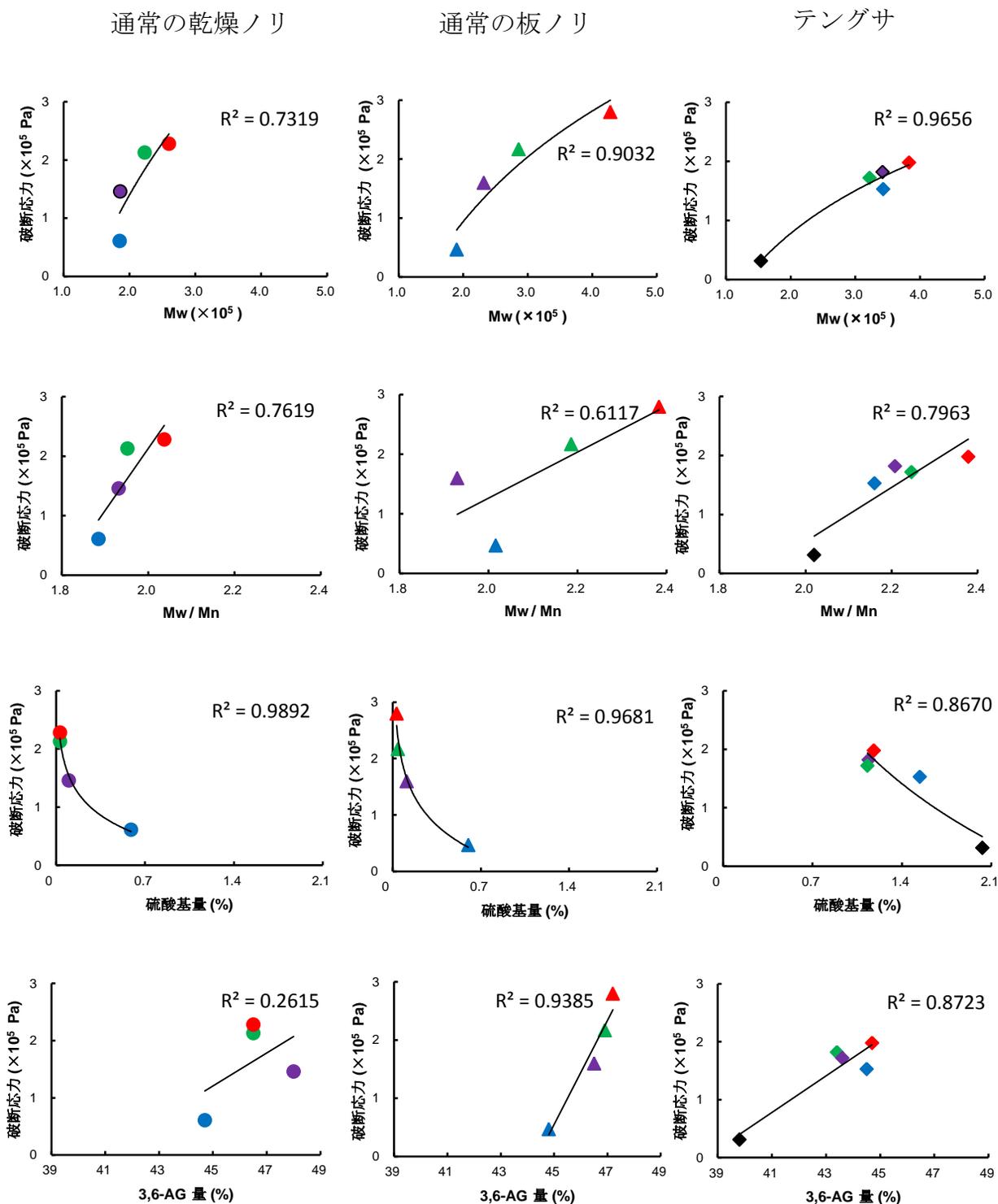
**Fig. 6.** 寒天の化学的性質に対するアルカリ濃度の影響

通常の乾燥ノリ (青), 通常の板ノリ (茶) およびテングサ (黄緑) を4%, 6%, 8% および10% NaOHで処理して寒天を回収し、硫酸基量 (a), 3,6 - AG量 (b), 重量平均分子量 (Mw) (c) および多分散度 (Mw/Mn) (d)を測定した (平均値  $\pm$  標準偏差, n=3)。アルファベットの違いは、有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



**Fig. 7. GPC分析で得られた寒天の分子量分布曲線**

テングサ (a), 通常の乾燥ノリ (b), 通常の板ノリ (c) から得られた寒天の分子量分布曲線を示した。



**Fig. 8.** 寒天の化学的性質と破断応力との関係

通常乾燥ノリ、通常板ノリおよびテングサからの寒天における重量平均分子量 (Mw)、多分散度 (Mw/Mn)、硫酸基量 および 3,6-anhydro galactose (3,6-AG) 量と破断応力との関係を示した。各点の色は0% NaOH (黒)、4% NaOH (青)、6% NaOH (紫)、8% NaOH (緑) および10% NaOH (赤) で処理して得た寒天を示す。

通常の乾燥ノリ

通常の板ノリ

テングサ

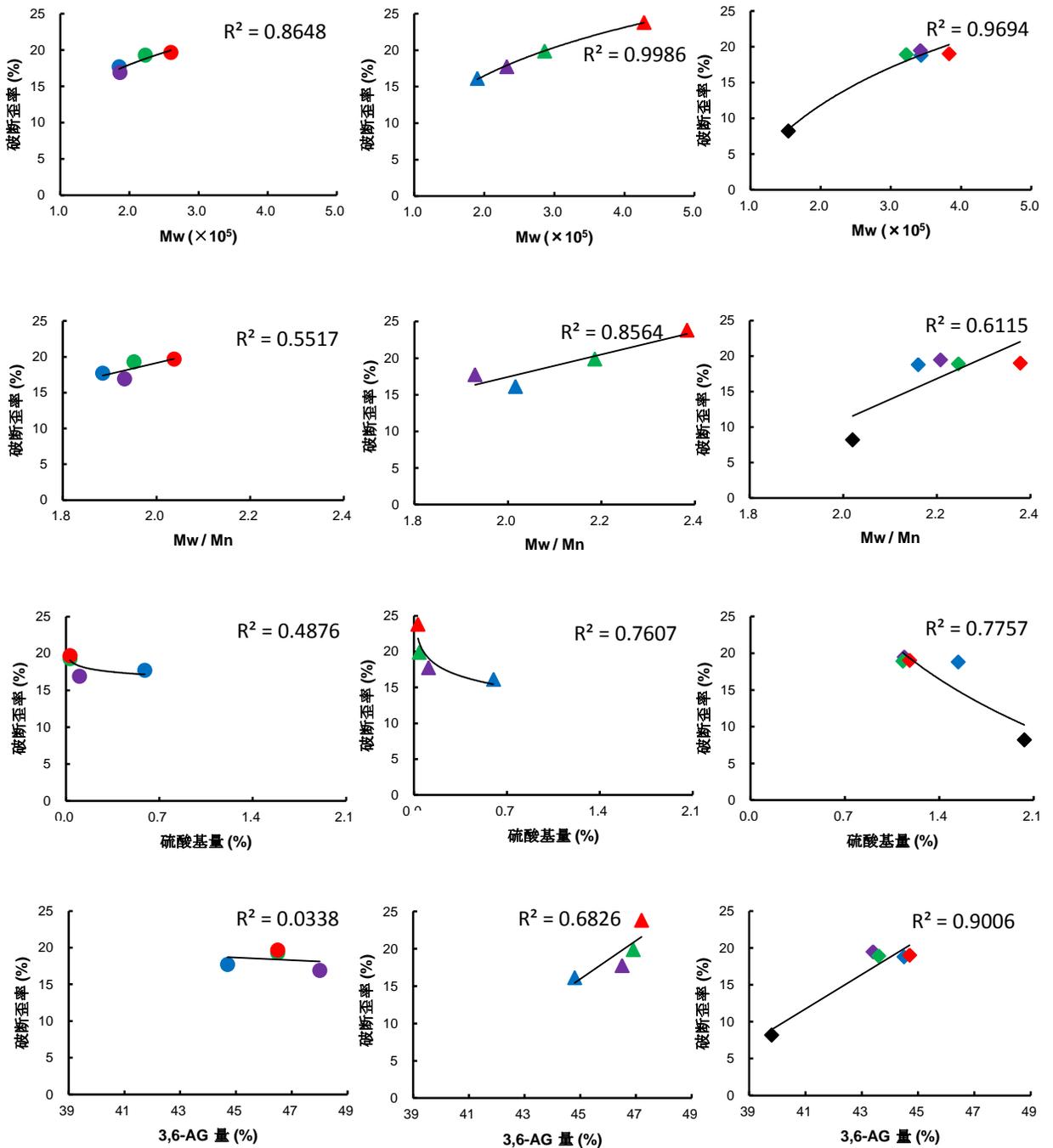
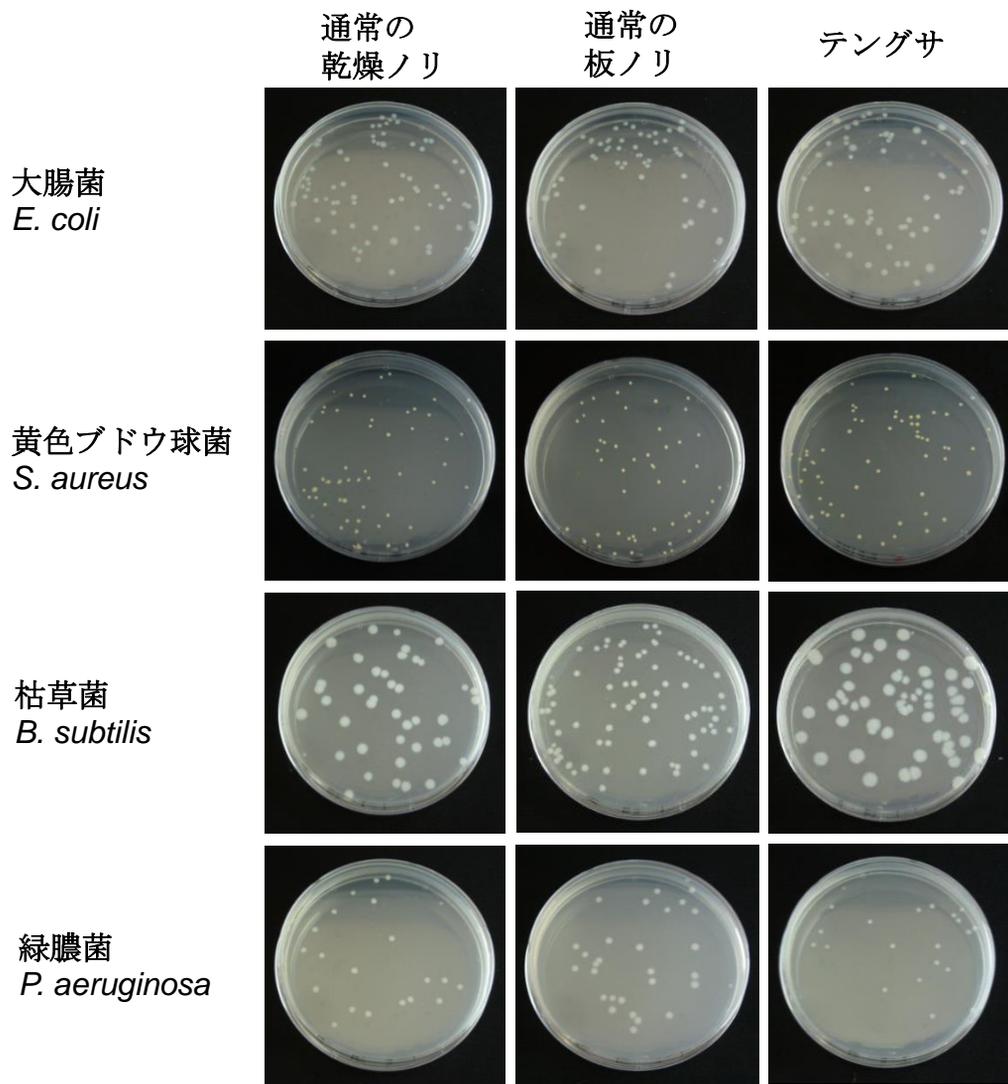


Fig. 9. 寒天の化学的性質と破断歪率との関係

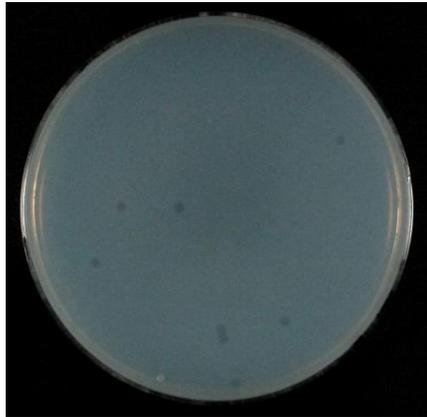
通常の乾燥ノリ、通常の板ノリおよびテングサからの寒天における寒天の重量平均分子量 ( $M_w$ ), 多分散度 ( $M_w/M_n$ ), 硫酸基量 および 3,6-anhydro galactose (3,6-AG) 量と破断歪率との関係を示した。各点の色は0% NaOH (黒), 4% NaOH (青), 6% NaOH (紫), 8% NaOH (緑) および10% NaOH (赤)で処理して得た寒天を示す。



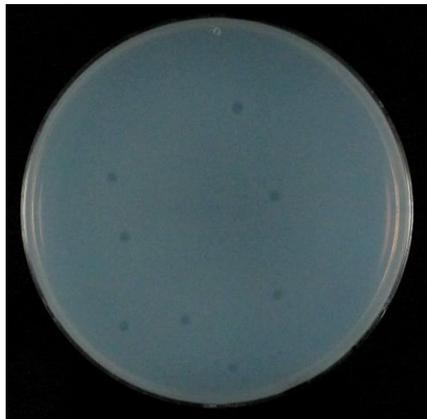
**Fig. 10.** スサビノリ寒天の微生物増殖性能

大腸菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌および緑膿菌の増殖性能を、0.75%の通常の乾燥ノリ (左), 通常の板ノリ (中央) およびテングサ (右) 寒天を含むプレートで評価した。

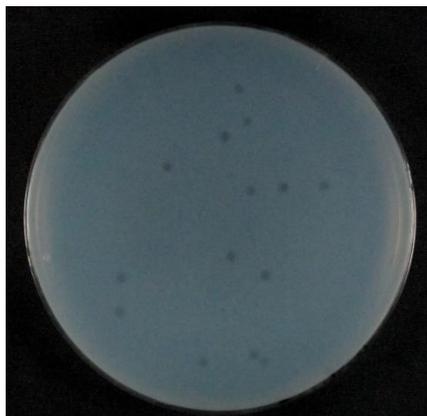
a



b

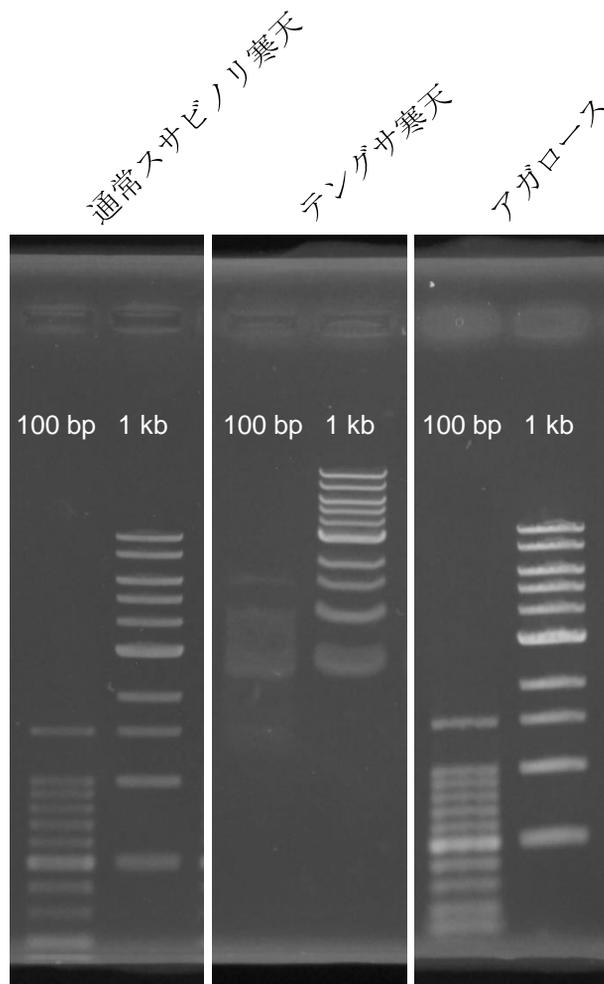


c



**Fig. 11.** スサビノリ寒天の枯草菌のプロテアーゼ活性検出における有効性

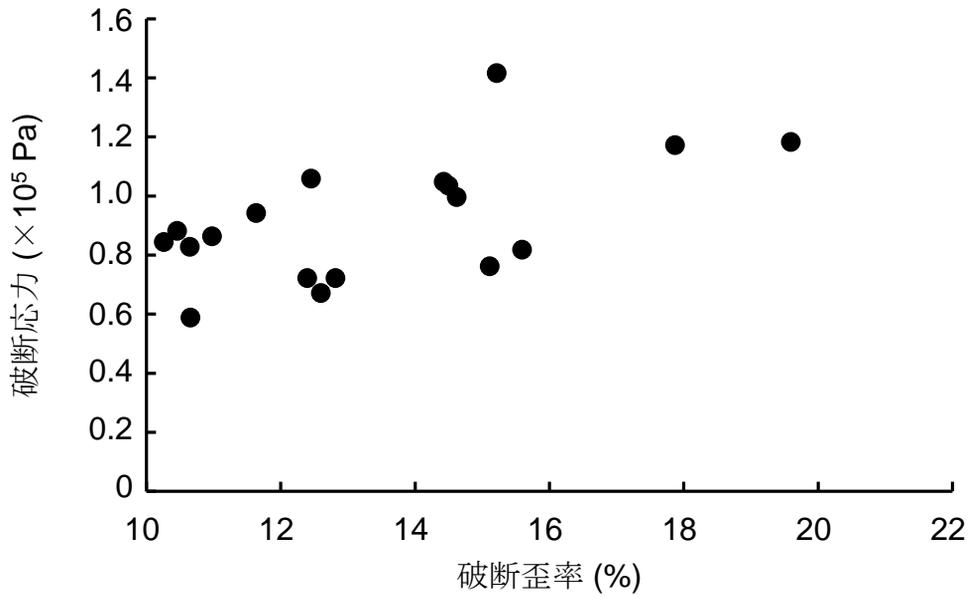
通常の乾燥ノリ (a), 通常の板ノリ (b) および テングサ (c) 由来の寒天と 0.5% スキムミルクを含むプレートにおいて, 枯草菌によって形成されたハローの様子を比較した。



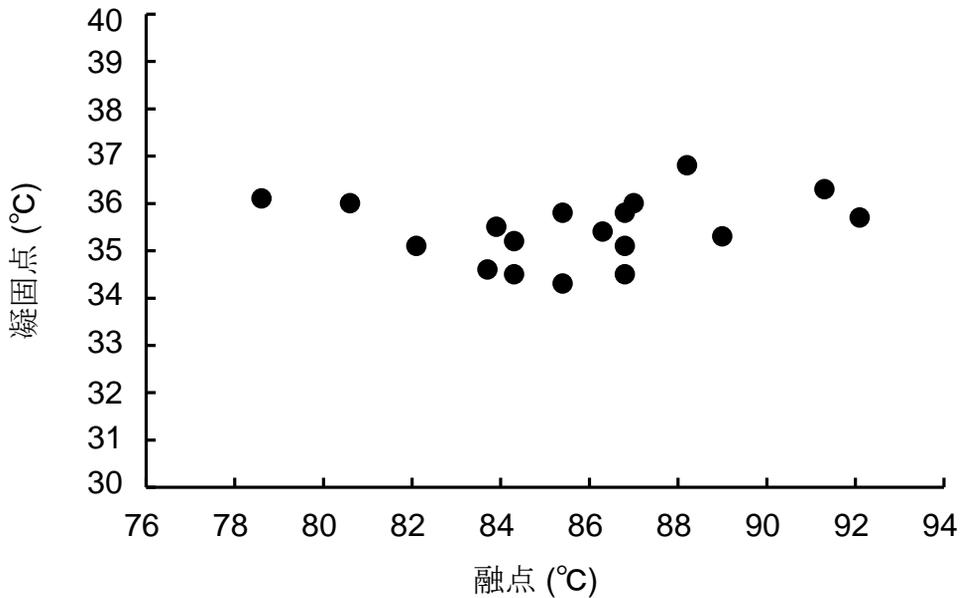
**Fig. 12.** スサビノリ寒天のDNA電気泳動における有効性

1% アガロースを対照に、1% テングサ寒天 および  
 1% 通常スサビノリ寒天 (板ノリ由来) で100 bp および  
 1 kb DNA マーカーを電気泳動し、それぞれの分離を比較した。

a



b



**Fig. 13.** 市販培地用寒天ゲルの物理的性質

18種類の市販培地用寒天ゲルにおける破断応力と破断歪率 (a) および融点と凝固点 (b) の関係を示した。

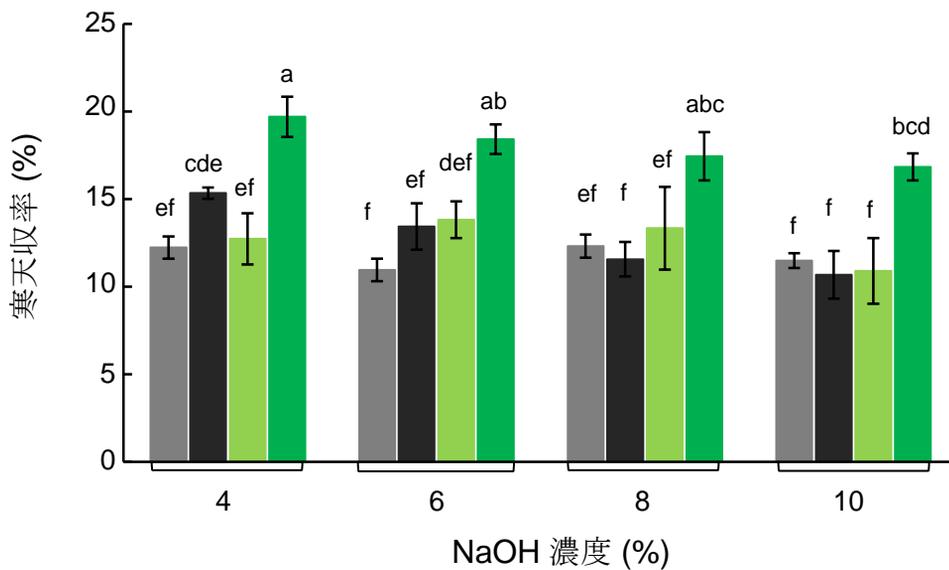


乾燥ノリ  
(通常, 色落ち)



板ノリ  
(通常, 色落ち)

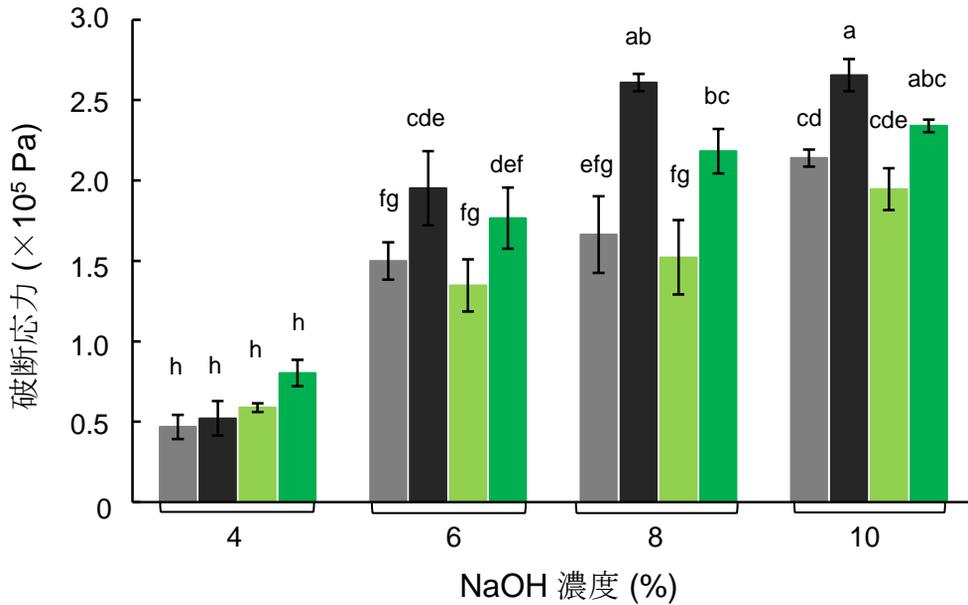
**Fig. 14. 海藻試料**  
乾燥ノリと板ノリは七ヶ浜町産である。



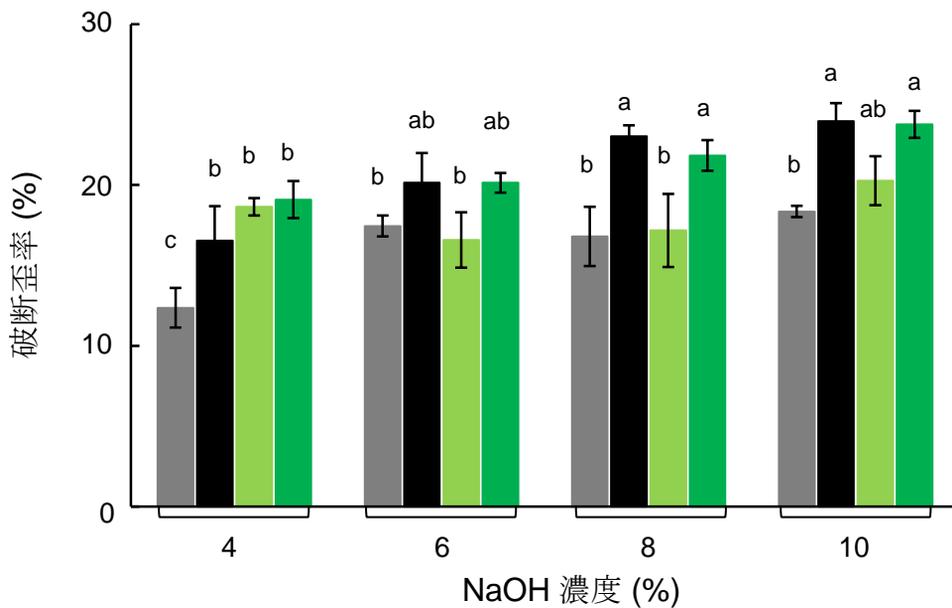
**Fig. 15.** 寒天収率に対するアルカリ濃度の影響

通常乾燥ノリ (灰色), 通常板ノリ (黒), 色落ち乾燥ノリ (黄緑) および色落ち板ノリ (緑) を4%, 6%, 8%および10% NaOHで処理して寒天を回収した (平均値±標準偏差, n=3)。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。

a

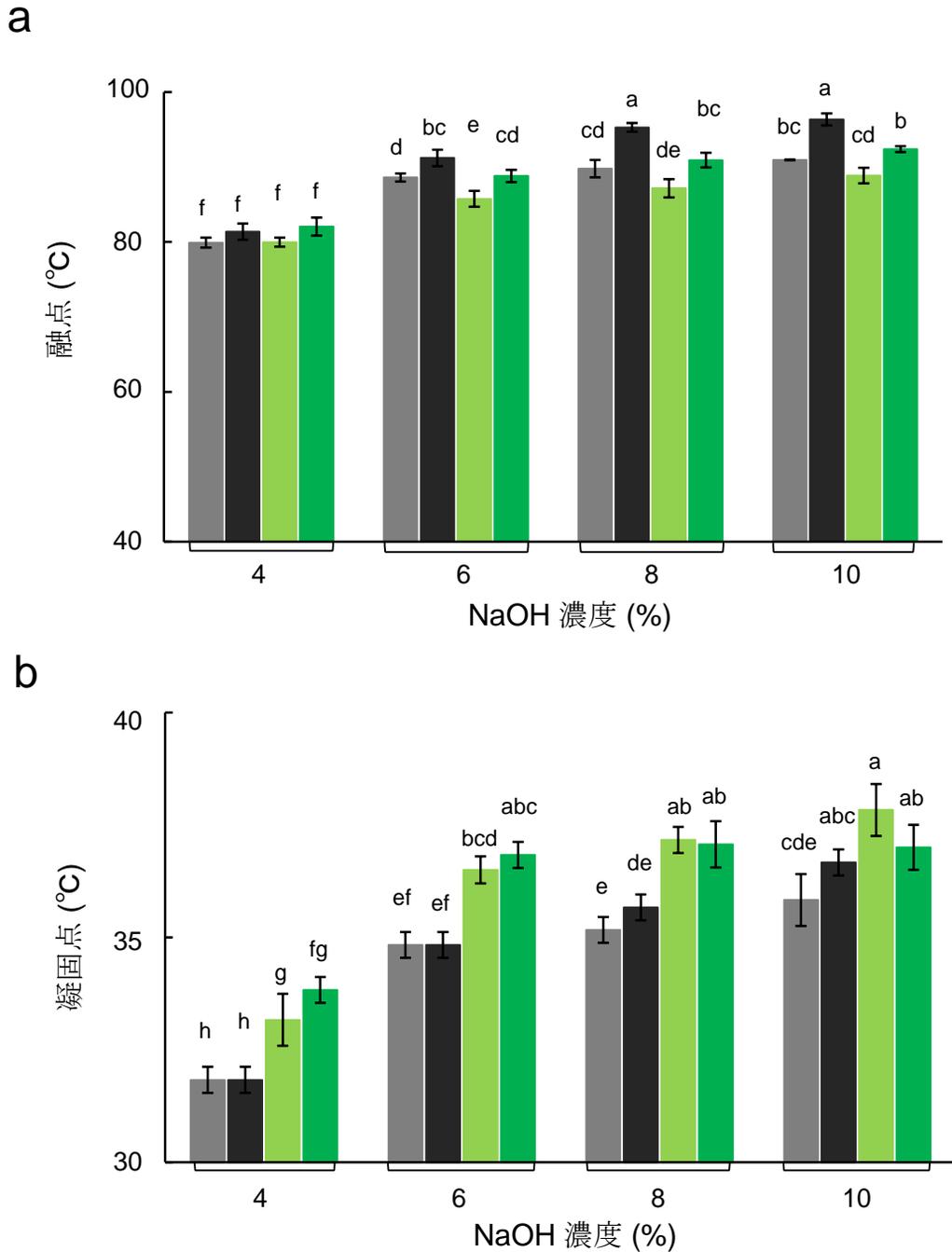


b



**Fig. 16.** 寒天ゲルの破断応力と破断歪率に対するアルカリ濃度の影響

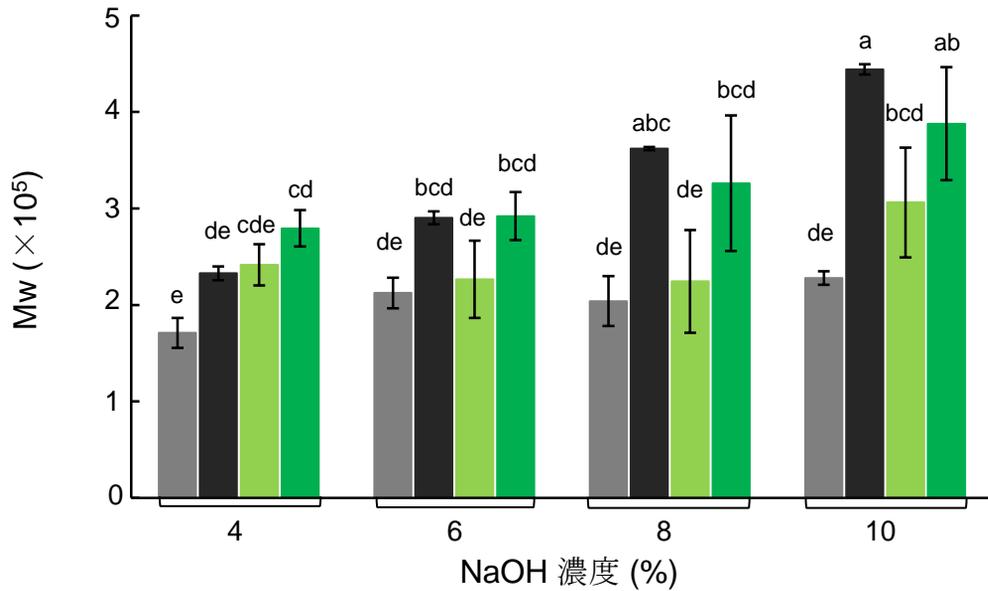
通常の乾燥ノリ (灰色), 通常の板ノリ (黒), 色落ちの乾燥ノリ (黄緑) および色落ちの板ノリ (緑) を4%, 6%, 8% および10% NaOHで処理して得た寒天ゲルの破断応力 (a) と破断歪率 (b) を示した (平均値  $\pm$  標準偏差,  $n=3$ )。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



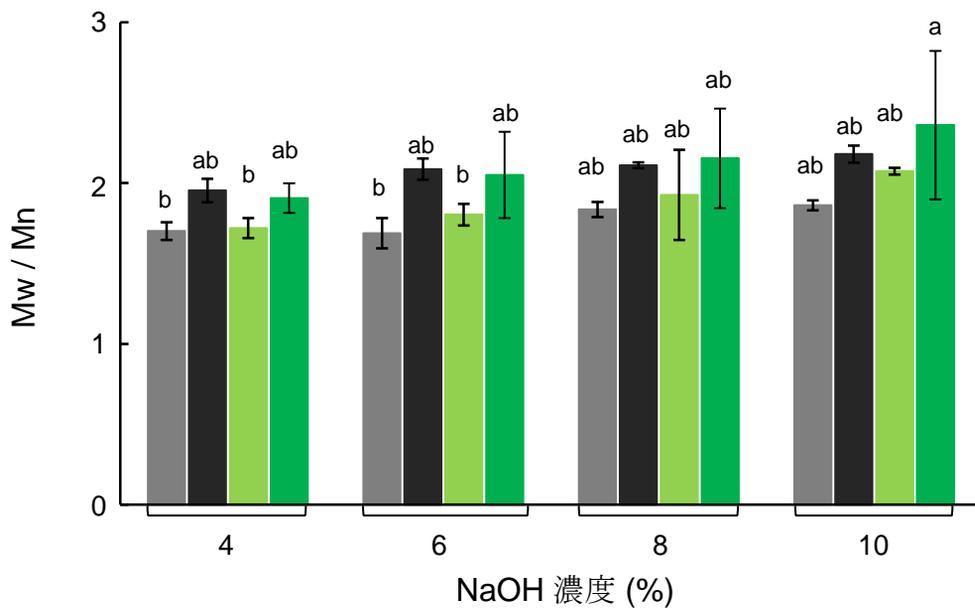
**Fig. 17. 寒天ゲルの融点と凝固点に対するアルカリ濃度の影響**

通常の乾燥ノリ (灰色), 通常の板ノリ (黒), 色落ちの乾燥ノリ (黄緑) および色落ちの板ノリ (緑) を4%, 6%, 8% および10% NaOHで処理して得た寒天ゲルの融点 (a) と凝固点 (b) を示した(平均値±標準偏差, n=3)。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。

a

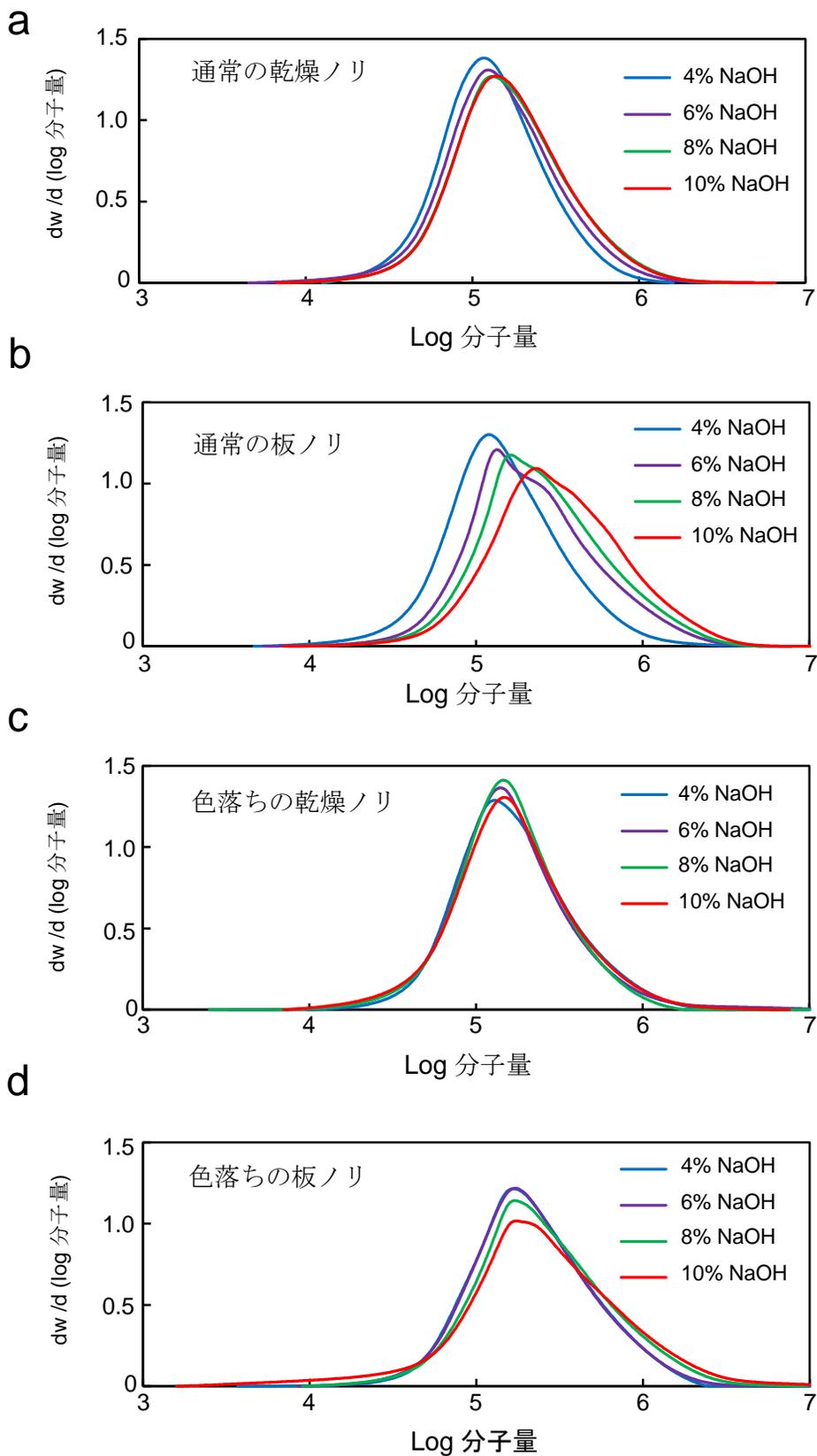


b



**Fig. 18.** 寒天の重量平均分子量 ( $M_w$ )と多分散度 ( $M_w/M_n$ ) に対するアルカリ濃度の影響

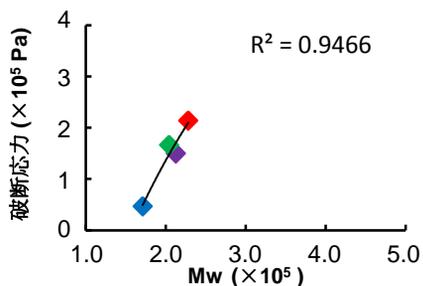
通常乾燥ノリ (灰色), 通常板ノリ (黒), 色落ち乾燥ノリ (黄緑) および色落ち板ノリ (緑) を4%, 6%, 8% および10% NaOHで処理して得た寒天の重量平均分子量  $M_w$  (a) と多分散度  $M_w/M_n$  (b) を示した (平均値±標準偏差,  $n=3$ )。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



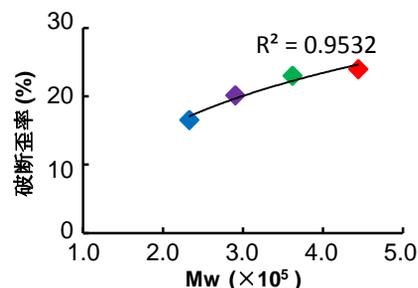
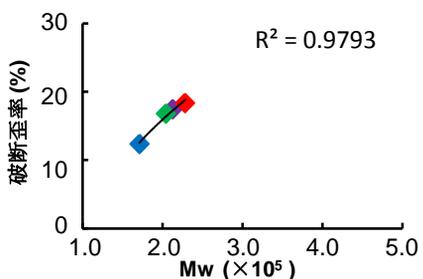
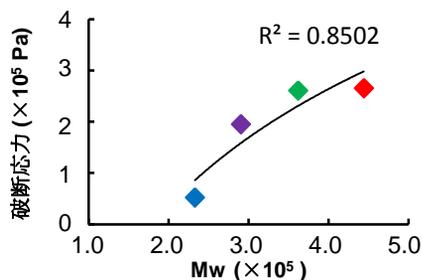
**Fig. 19. GPC分析で得られた寒天の分子量分布曲線**

通常の乾燥ノリ (a), 通常の板ノリ (b), 色落ちの乾燥ノリ (c) および色落ちの板ノリ (d) から得られた寒天の分子量分布曲線を示した。

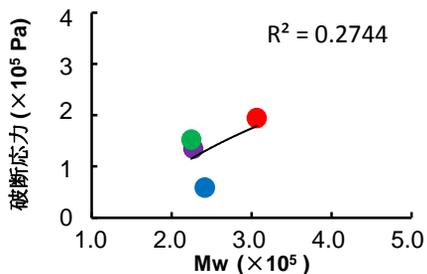
通常の乾燥ノリ



通常の板ノリ



色落ちの乾燥ノリ



色落ちの板ノリ

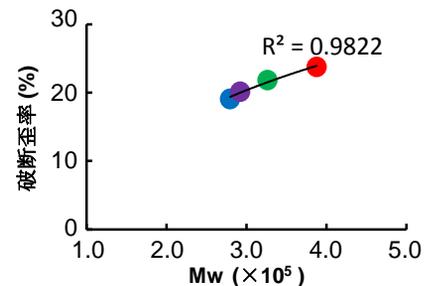
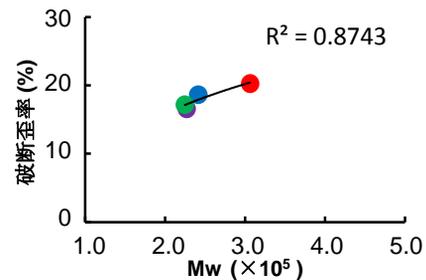
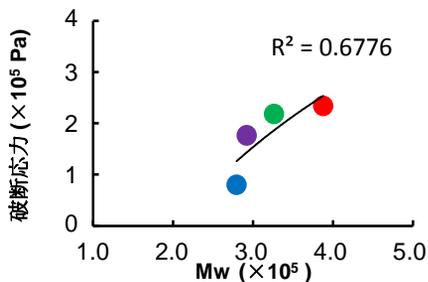
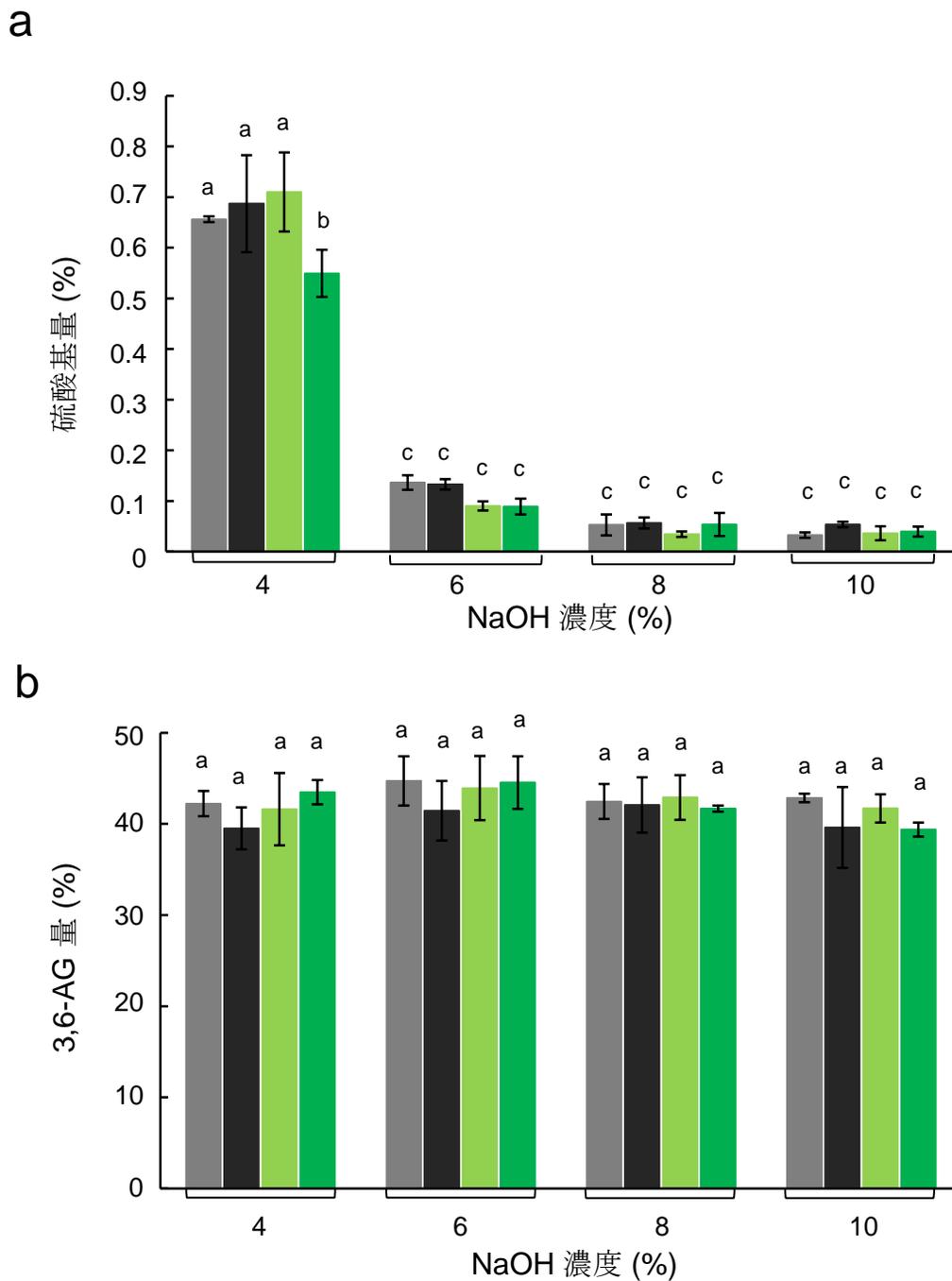


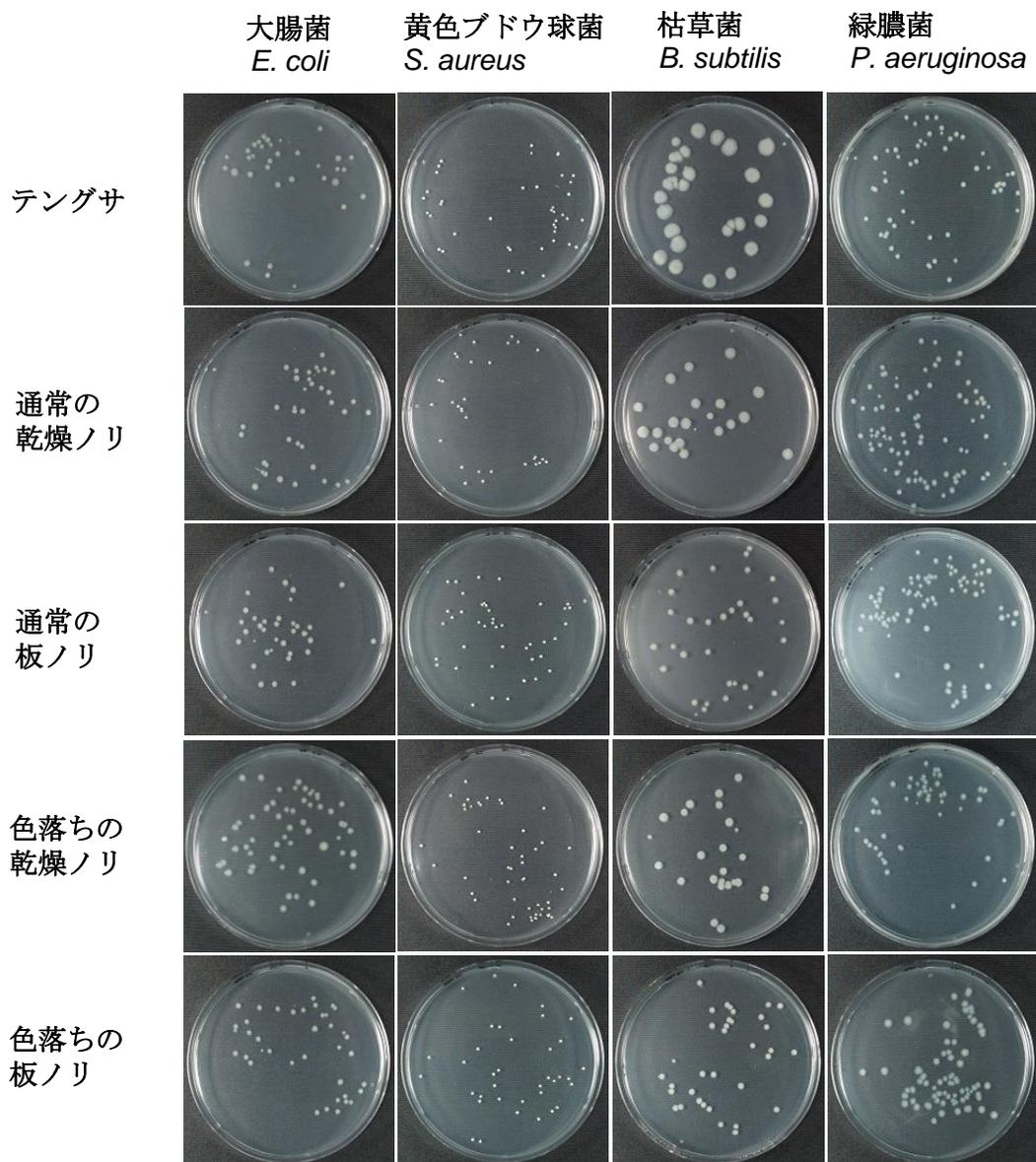
Fig. 20. 寒天ゲルの物理的性質と重量平均分子量 (Mw) との関係

通常の乾燥ノリ, 通常の板ノリ, 色落ちの乾燥ノリおよび色落ちの板ノリからの寒天ゲルの破断応力および破断歪率と重量平均分子量 (Mw) との関係を示した。各点の色は4% NaOH (青), 6% NaOH (紫), 8% NaOH (緑) および10% NaOH (赤) で処理して得た寒天を示す。



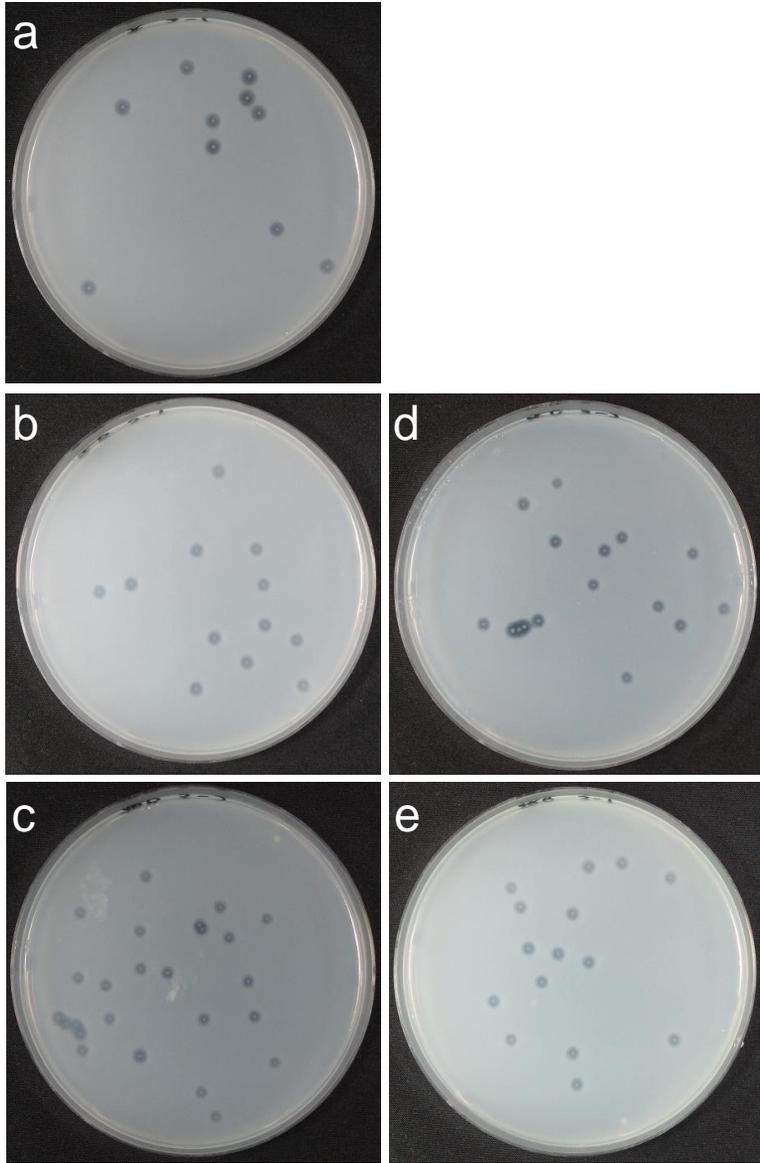
**Fig. 21. 寒天の硫酸基量と3,6-AG量に対するアルカリ濃度の影響**

通常の乾燥ノリ (灰色), 通常の板ノリ (黒), 色落ちの乾燥ノリ (黄緑) および色落ちの板ノリ (緑) を4%, 6%, 8% および10% NaOHで処理して得た寒天の硫酸基量 (a) と3,6-AG量 (b) を示した(平均値±標準偏差, n=3)。アルファベットの違いは有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



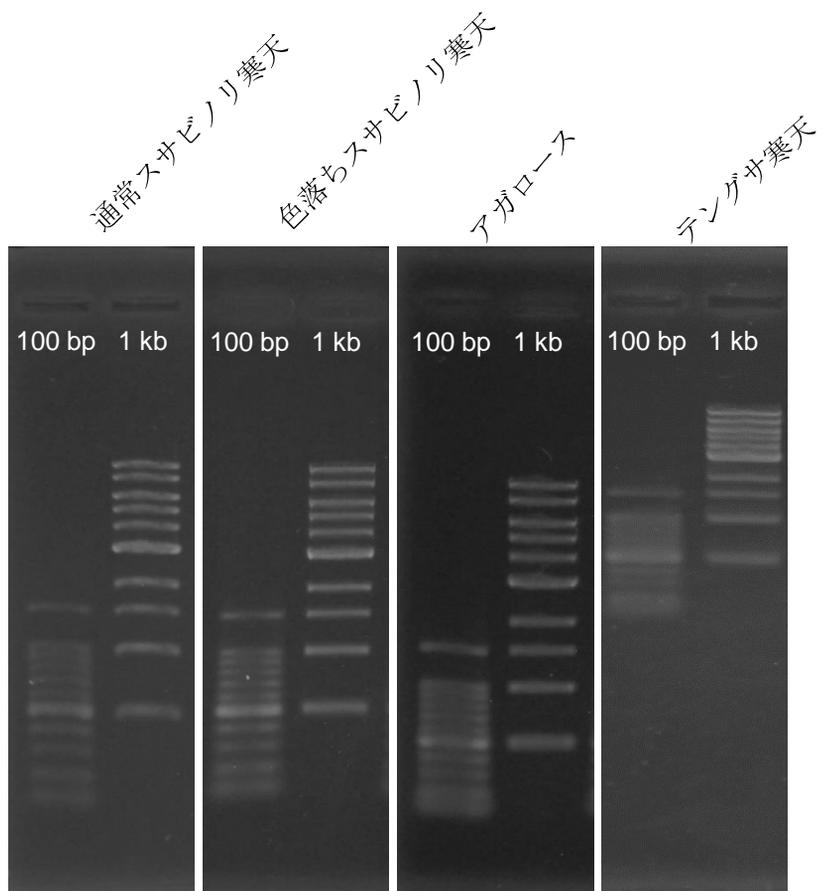
**Fig. 22.** スサビノリ寒天の微生物増殖性能

大腸菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌 および 緑膿菌の微生物増殖能を0.75%のテングサ, 通常の乾燥ノリ, 通常の板ノリ, 色落ちの乾燥ノリ および 色落ちの板ノリからの寒天を含むプレートで評価した。



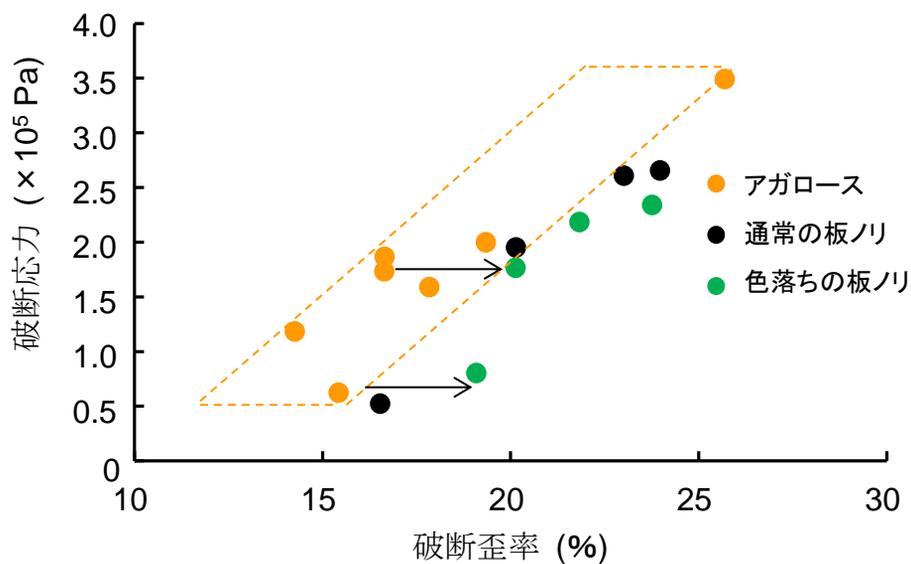
**Fig. 23.** スサビノリ寒天の枯草菌のプロテアーゼ活性検出における有効性

テングサ (a), 通常の乾燥ノリ (b), 通常の板ノリ (c), 色落ちの乾燥ノリ (d) および色落ちの板ノリ (e) 由来の寒天と0.5% スキムミルクを含むプレートにおいて枯草菌により形成されたハローの様子を比較した。



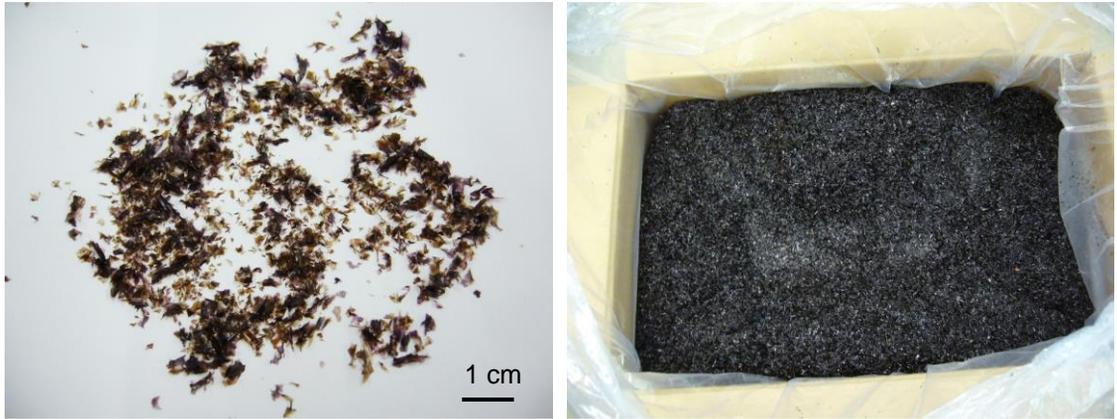
**Fig. 24. スサビノリ寒天のDNA電気泳動における有効性**

1% アガロースを対照に、1% テングサ寒天、1% 通常のスサビノリ寒天 (板ノリ由来) および 1% 色落ちのスサビノリ寒天 (板ノリ由来) で100 bp および1 kb DNA マーカーを電気泳動し、それぞれの分離の様子を比較した。



**Fig. 25.** 市販アガロースゲルとスサビノリ寒天ゲルの物理的性質

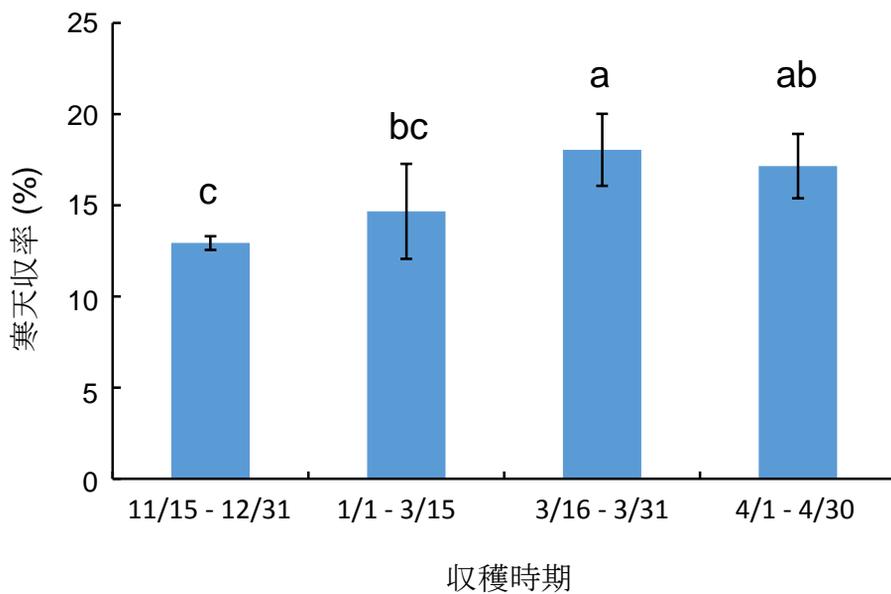
通常の板ノリ (黒) および色落ちの板ノリ (緑) 由来の寒天ゲル, 市販アガロースゲル (橙)における破断応力と破断歪率の関係を示した。市販アガロースゲルの物性範囲を橙の点線で示した。矢印でアガロースと同じ破断応力の色落ちの板ノリを指し示した。



ノリ屑

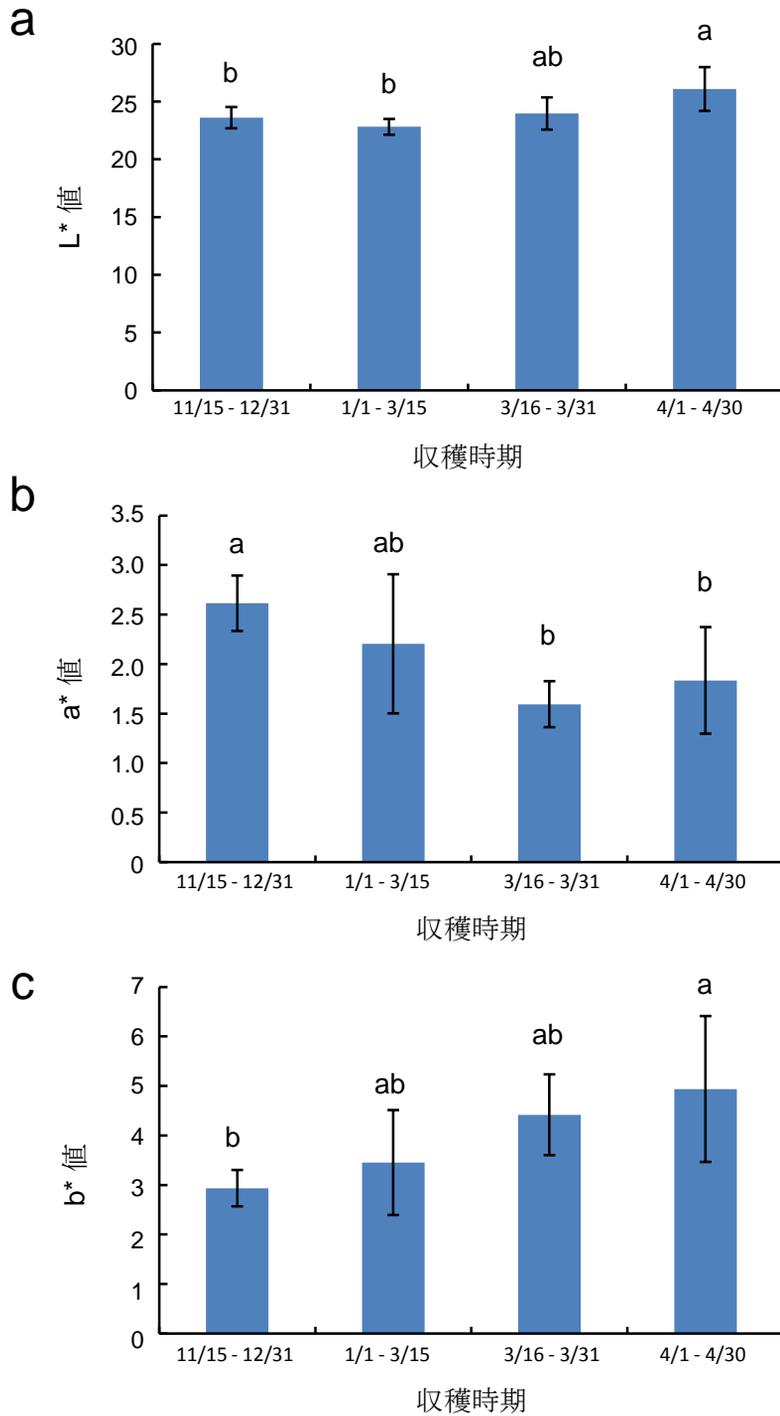
**Fig. 26.** 海藻試料

ノリ屑は七ヶ浜町産である。



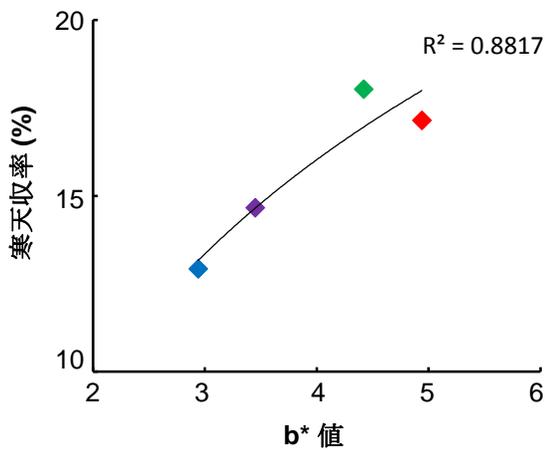
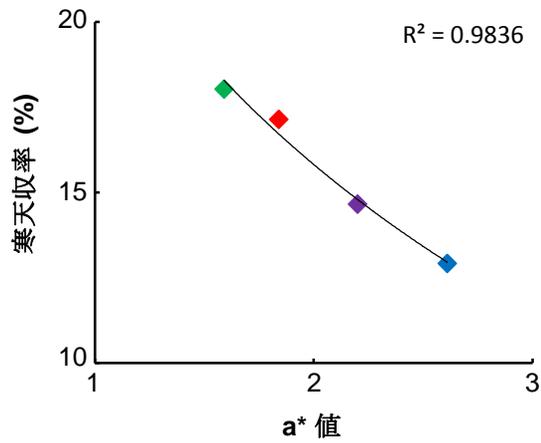
**Fig. 27.** 収穫時期の異なるノリ屑からの寒天収率

ノリ屑を6% NaOHで処理して寒天を回収した (平均値 ± 標準偏差, n=6)。アルファベットの違いは、有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



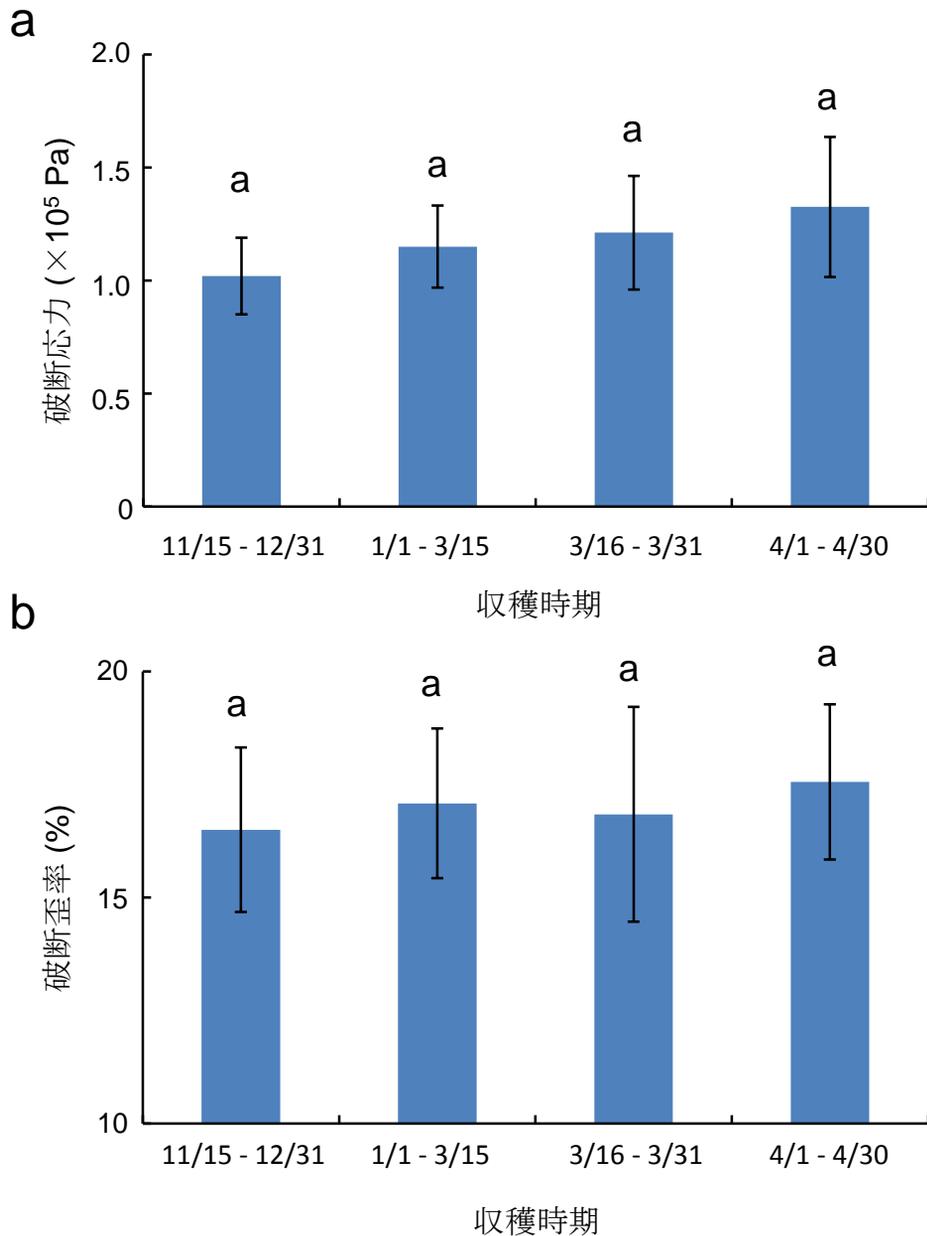
**Fig. 28. 収穫時期の異なるノリ屑の色**

ノリ屑の色をL\* 値 (a) , a\* 値 (b) および b\* 値 (c) で示した (平均値 ± 標準偏差, n=6)。アルファベットの違いは、有意差 (p<0.05) があることを示している。



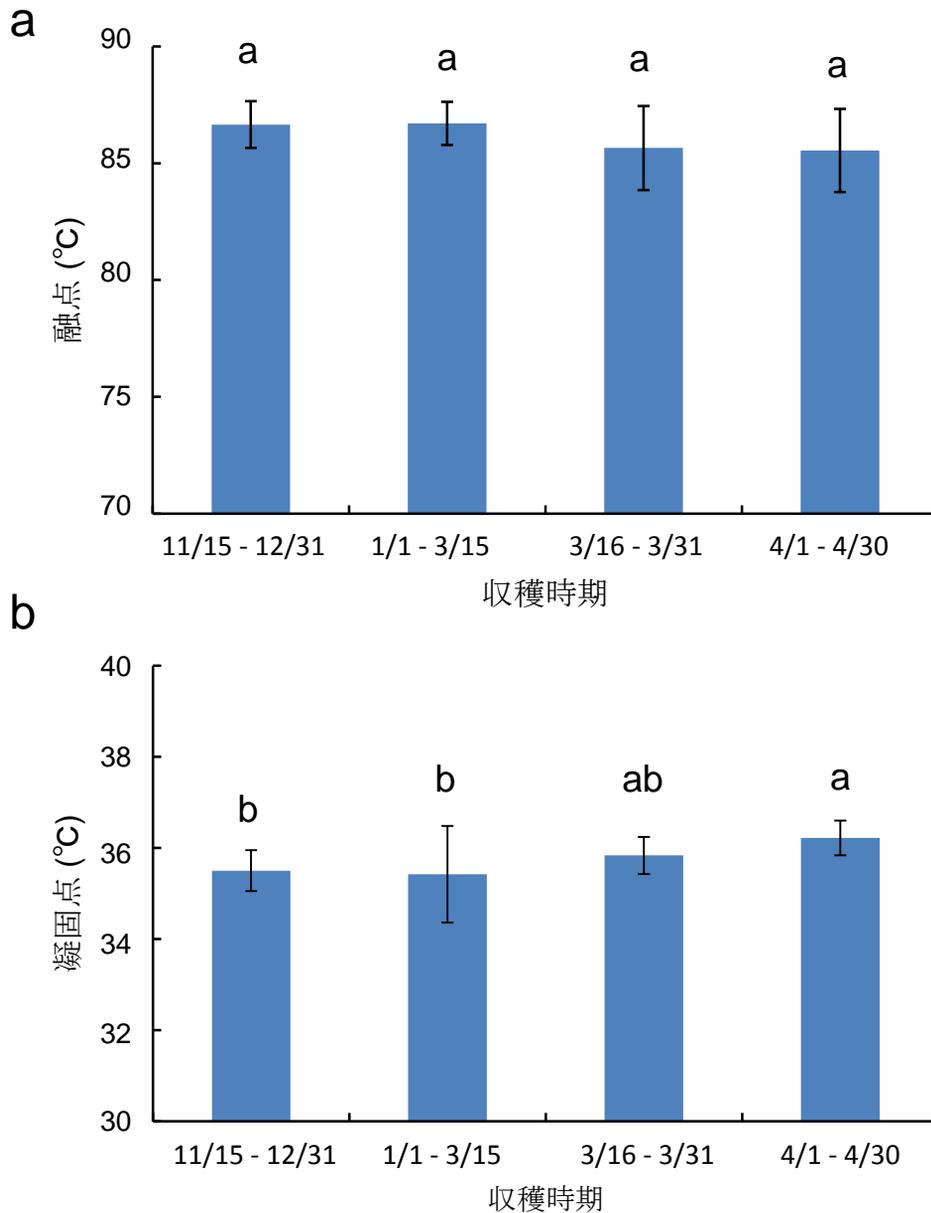
**Fig. 29. ノリ屑の色と寒天収率の関係**

ノリ屑の色（ $a^*$  値および $b^*$  値）と寒天収率の関係を示した。各点の色は11/15 ~ 12/31 (青), 1/1 ~ 3/15 (紫), 3/16 ~ 3/31 (緑), 4/1 ~ 4/30 (赤) に排出されたノリ屑を示す。



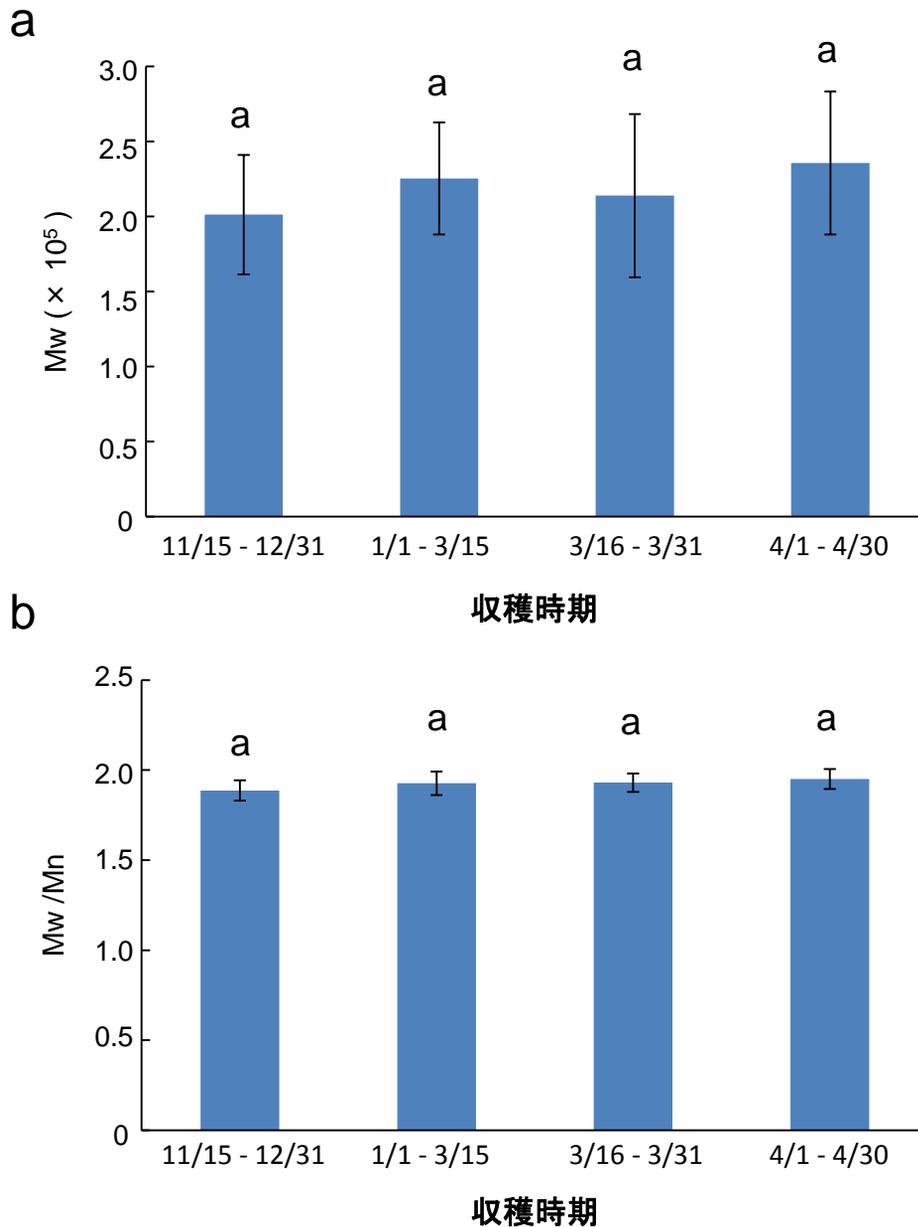
**Fig. 30.** 収穫時期の異なるノリ屑から得られた寒天ゲルの破断応力と破断歪率

ノリ屑を6% NaOHで処理して得た寒天ゲルの破断応力 (a)と破断歪率 (b)を示した (平均値  $\pm$  標準偏差, n=6)。アルファベットの違いは、有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



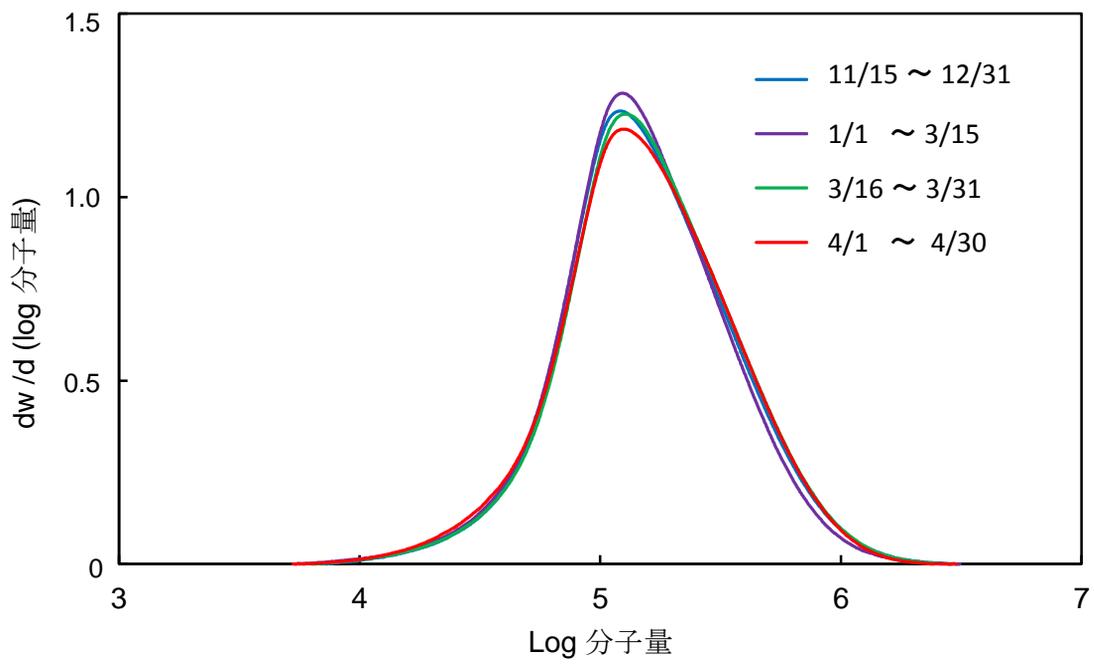
**Fig. 31.** 収穫時期の異なるノリ屑から得られた寒天ゲルの融点と凝固点

ノリ屑を6% NaOHで処理して得た寒天ゲルの融点 (a)と凝固点 (b)を示した (平均値 ± 標準偏差, n=6)。アルファベットの違いは、有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



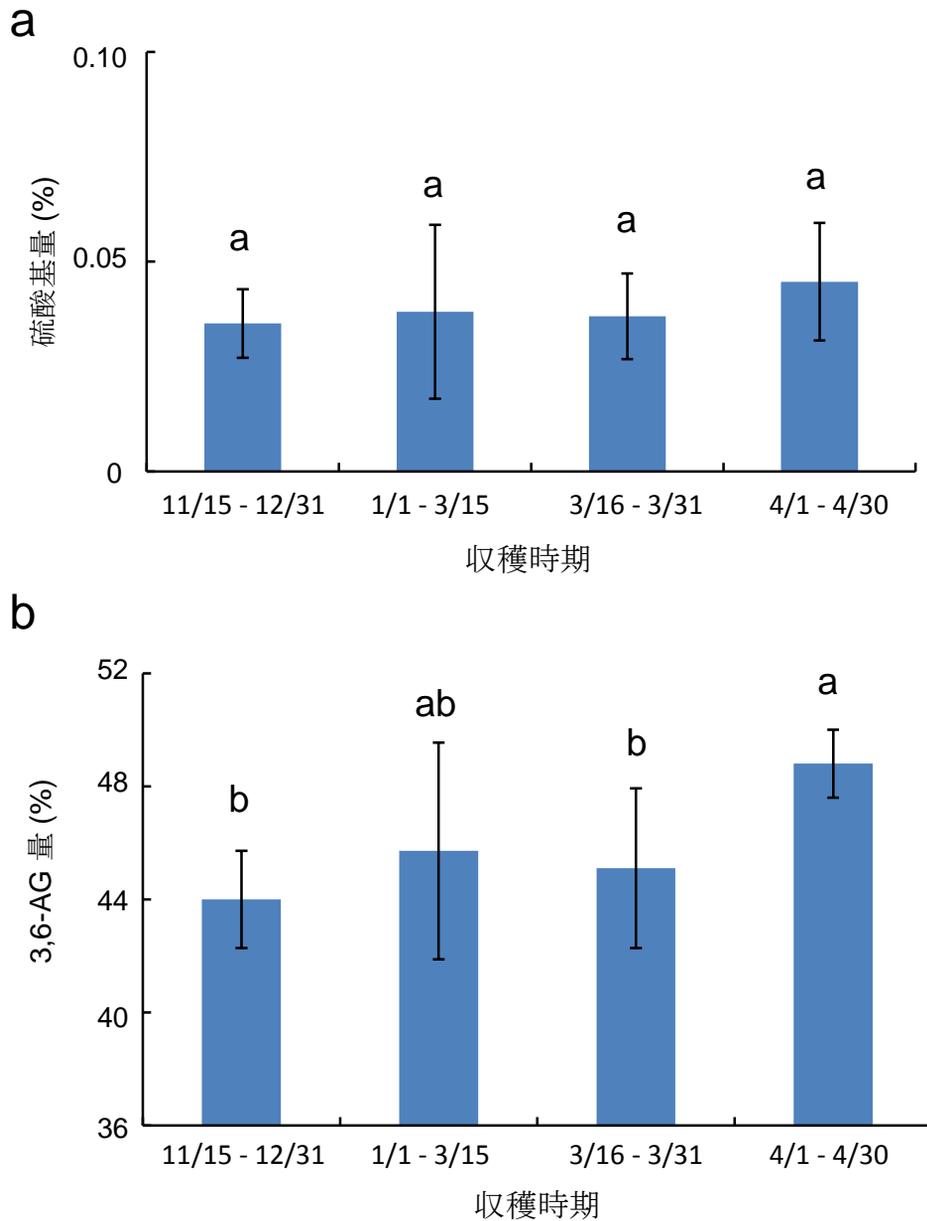
**Fig. 32.** 収穫時期の異なるノリ屑から得られた寒天の重量平均分子量 (Mw) と多分散度 (Mw/Mn)

ノリ屑を6% NaOHで処理して得た寒天の重量平均分子量 (a) と多分散度 (b) を示した(平均値 ± 標準偏差, n=6)。アルファベットの違いは、有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



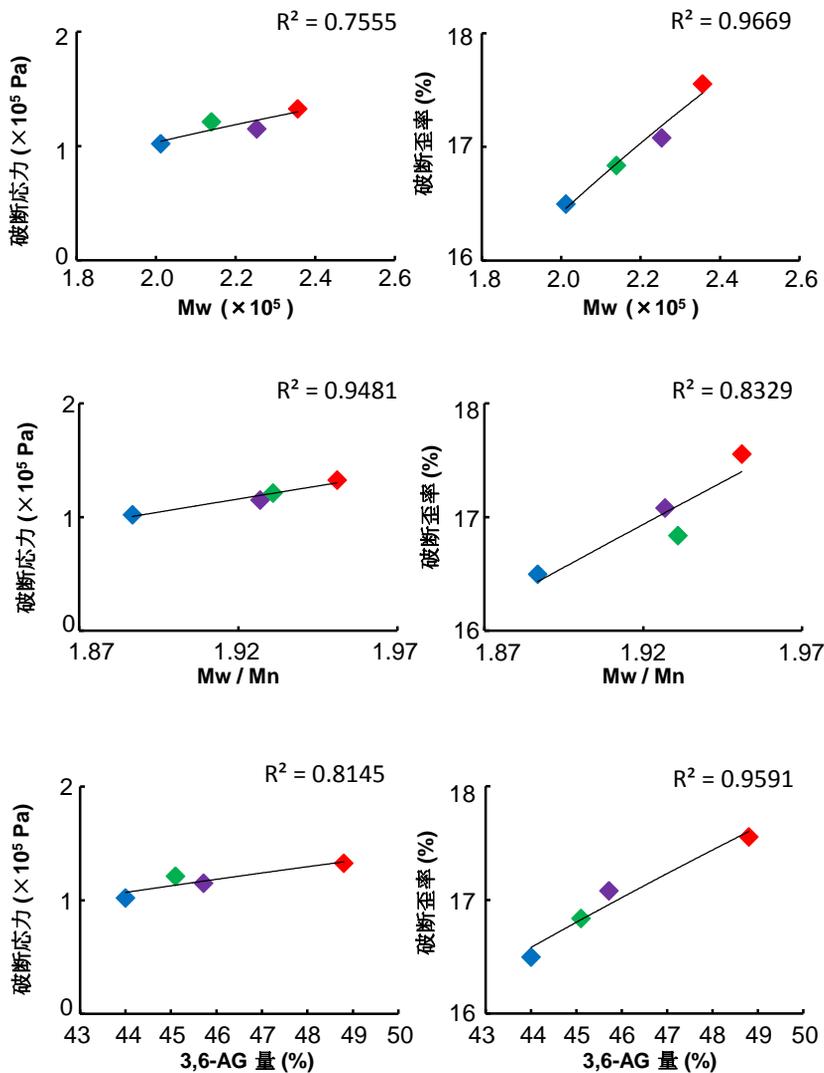
**Fig. 33. GPC分析で得られた寒天の分子量分布曲線**

収穫時期の異なるノリ屑から得られた寒天の分子量分布曲線を示した。



**Fig. 34.** 収穫時期の異なるノリ屑から得られた寒天の硫酸基量と3,6-AG量

ノリ屑を6% NaOHで処理して得た寒天の硫酸基量 (a)と3,6-AG量 (b)を示した (平均値 ± 標準偏差, n=6)。アルファベットの違いは、有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示している。



**Fig. 35.** 寒天ゲルの物理的性質と化学的性質との関係

ノリ屑からの寒天ゲルにおける物理的な性質 (破断応力と破断歪率) と化学的性質 [ 重量平均分子量 ( $M_w$ ), 多分散度 ( $M_w/M_n$ ) および 3,6-anhydro galactose (3,6-AG) 量 ] との関係を示した。各点の色は 11/15 ~ 12/31 (青), 1/1 ~ 3/15 (紫), 3/16 ~ 3/31 (緑), 4/1 ~ 4/30 (赤) に排出されたノリ屑を示す。