

## ワカメに関する研究(第1報)

—ワカメの一般組織と  $\beta$ -Carotene について—

奥田 弘 枝・請 川 琴 子

### The Study of Undaria Pinnatifida (Part 1)

—In the Case of the General Tissue of Undaria Pinnatifida and  $\beta$ -Carotene—

Hiroe Okuda and Kotoko Ukegawa

#### Abstract

Recently the nutritive and sanitary value of seaweeds began to be rated higher. Above all the production of Undaria pinnatifida is increasing rapidly, and so it is to be desired that we go deep into the study of its edible value and make full use of it. But so far little investigation has been done into the relations between the tissue of Undaria pinnatifida and its microingredients. And so We took up the variations and fading of color of the pigments, attaching importance to the tissue of Undaria pinnatifida, and made a study of the rise and fall of carotenoid pigments in connection with chlorophyll. Now We'll make a report of a little knowledge We have got.

Undaria pinnatifida used for the observation were fresh one, salted one, and dry one whose growing districts were clear. We observed them through a standard optical microscope, a fluorescence microscope, and a scanning electron microscope.

By making a few alterations to the barium hydroxide method, We calculated  $\beta$ -Carotene through the spectrophotometer of Shimazu spectronic 20A type, and the self-registering spectrophotometer of Hitachi 124 type. the results were as follows.

(1) The epidermal cells of the thallus of fresh Undaria pinnatifida were nearly discoid, between four and five microns, and consisted of tinier single-layered cells than the ones of the plants on the ground. The spaces among the cells were pretty wide. And in the epidermal cells denser chlorophyll was found through the microscope than in the cortex and the medullary layer.

(2) It was confirmed that  $\beta$ -Carotene was contained within Undaria pinnatifida, and We observed some variations by processing and storing.

#### I 緒 言

海藻の栄養・保健的価値は最近一段と高く評価されるようになった。中でもワカメは我

国において古代以来の代表的な海藻であり、最近の沿岸漁業対策、自然食品への関心の強まりなどを考え合わせると、その利用は今後ますます増加するものと推測される。生産量も1965年以來の養殖技術の進歩により急増しているので、その食品価値をより深く研究し、利用をすすめることが望まれる。しかし海藻の組織やその中に含有される成分の分布については現在充分な研究がなされていない。本報はワカメの組織を中心に成分の分布状態を観察するとともに、ワカメの製品価値に大きく影響をおよぼす色沢の要因をなしている Chlorophyll と関連性の深い Carotenoids 色素の消長についても検討を行なったので報告する。また海藻の組織や細胞学の研究が遅れている理由として細胞の固定、染色の方法が困難である<sup>1)2)</sup>といわれているので種々の染色法について比較実験を行なった。

## Ⅱ 実 験

### 1. 試料および試料の調整

#### (1) 試 料

実験に使用したワカメの産地、採取日および購入日は第1表の通りである。

採取した生ワカメは軽く淡水で水洗し汚物を除去して試料とし、情西島産のものについては天日乾燥(平均気温  $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) したものと、100%の食塩を添加して1カ月保存したものを塩蔵品として、市販の加工品との比較試料とした。

#### (2) 試料の調整

(a) 光学顕微鏡(以下、光顕)観察の試料は観察目的に応じて次の3通りの方法で調整し

第1表 試 料 に 用 い た ワ カ メ

ワカメの種類	産 地	採取日又は購入日
生	出 雲 (島 根)	昭和51年4月6日 採 取
	阿 川 (山 口)	" 4月13日 "
	情西島 (山 口)	" 5月17日 "
塩 蔵	島 原 (島 根)	昭和51年3月31日 購 入
	出 雲 (島 根)	" 4月6日 "
	鹿 島 (広 島)	" 4月10日 "
	鳴 門	" 4月26日 "
	三 陸	" 6月16日 "
干	出 雲 (島 根)	昭和51年4月6日 購 入
	尾 道	" 5月4日 "
	鳴 門	" 6月4日 "
	国 東 (大 分)	" 6月15日 "

た。今回は生ワカメを試料とした。

### ① パラフィン包埋切片法

生ワカメはその生育環境が海水であるので浸透圧の変化を考慮する必要がある。<sup>3)4)</sup> 一般組織の観察には今回は Bouin 氏固定を行ない、アルコール脱水の後、常法によりパラフィン包埋して  $10\mu$  の切片とし Caedax で封入した。

### ② 凍結切片法

主として脂質や、細胞内の Chloroplast の観察を目的とした試料調整に用い、Microtome で  $10\mu$  の切片とした。

### ③ 生切片法

Chloroplast, 核、細胞内粘質物の観察を目的とした試料調整に用いた。針又はメスで引裂くか、ピスにはさんで薄片にした。

(b) 走査電子顕微鏡 (以下、走頭) 観察の試料調整は生ワカメを  $5\text{ mm}^2$  に切り、1% グルタルアルデヒド 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.3) で20分間固定し、50~95% アルコールで順次脱水の後、酢酸 *-iso-* アミルに浸漬して臨界点乾燥を行ない、銅ブロックに固定させて Carbon 蒸着を施し、走頭 (日本電子K, K製 JSM-P15型) で観察した。

## 2. Carotene の分離および同定

Carotene は次の3種類の実験により同定を行なった。

### (1) TLC法による同定<sup>5)6)7)8)</sup>

#### ① 試料調整

試料1gを磨砕し、石油エーテル：アルコール溶液 (2 : 1) に色素を溶出させた後、アルコールを除去し、石油エーテル層だけを取り出す。

#### ② Carotene の分離

石油エーテル層を無水芒硝で脱水し、吸着剤は乳糖、炭酸カルシウム、活性アルミナをカラム ( $\phi 25 \times 200\text{ mm}$ ) に湿式法でつめて展開し、5 mm の Carotenoids の Zone をつくらせ、石油エーテルを除々に流下して Carotene を分離した。カラム上の Carotene を石油エーテルを基剤として再抽出しこれをA液として用いた。

#### ③ TLC法

吸着剤は Kieselgur-Aluminiumoxide (1 : 1, Merk) で、 $200 \times 200\text{ mm}$  のプレートの厚さ 0.25 mm にひいた。

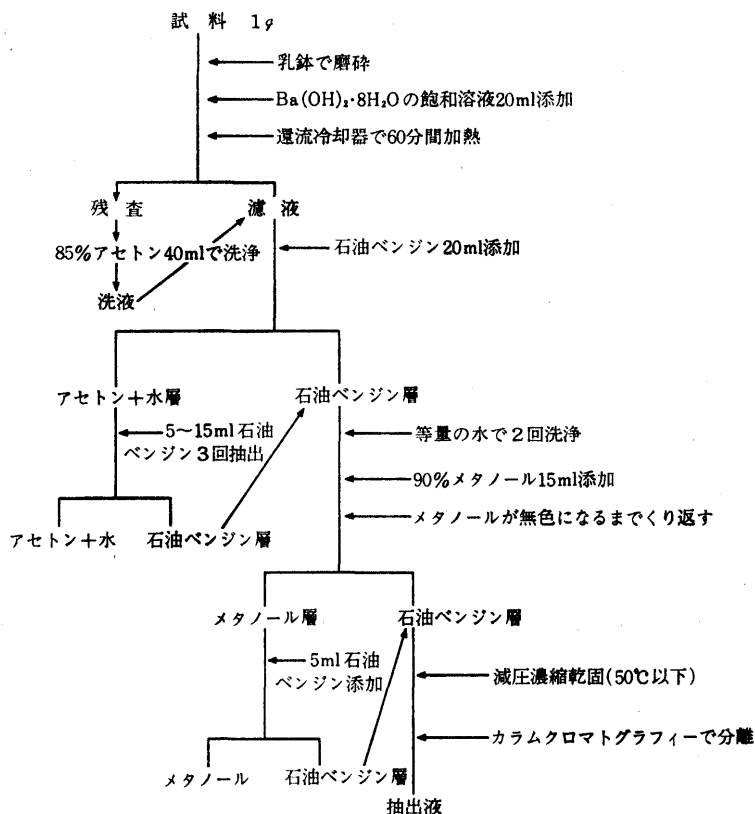
市販純品  $\beta$ -Carotene をA液と同程度の濃さに石油エーテルとアルコールに溶解し、それぞれ3ヶ所ずつ等間隔にスポットした。展開剤は石油エーテル：ペンゼン (1 : 1) を使用し、市販純品  $\beta$ -Carotene とA液のスポットの *Rf* 値を算出した。

(2) 蛍光顕微鏡 (以下、螢頭) による観察<sup>9)10)</sup>

飯守氏の方法により、A液を濃縮してスライドガラスに数滴落し結晶化した時点で螢頭にブルーフィルター、BV 励起を使用し、螢光色を観察した。

(3) 吸収スペクトルによる同定<sup>11)</sup>

産地の異なる生ワカメ 3 種類について Barium hydroxide 法を参考に若干の変更を加えた

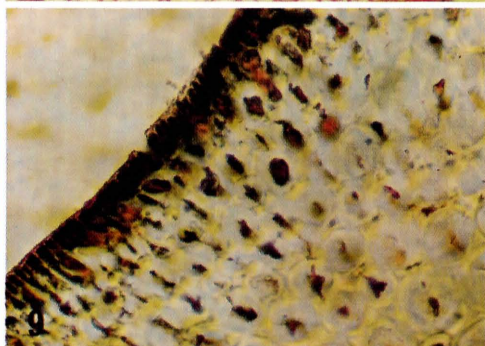
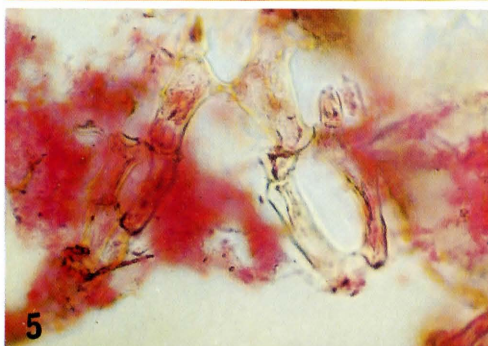
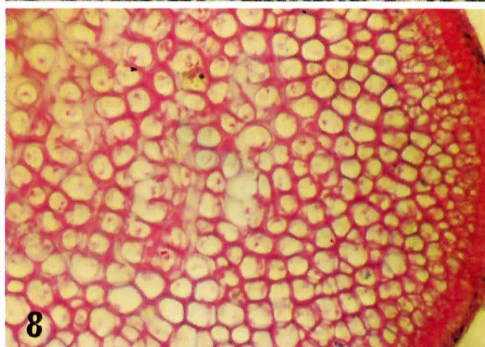
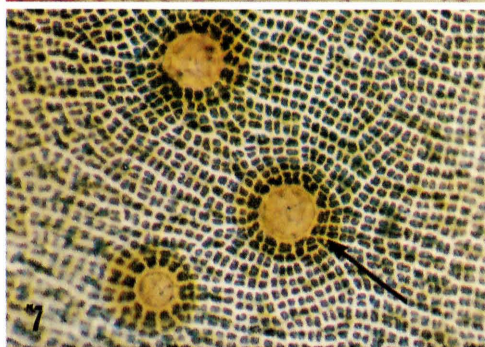
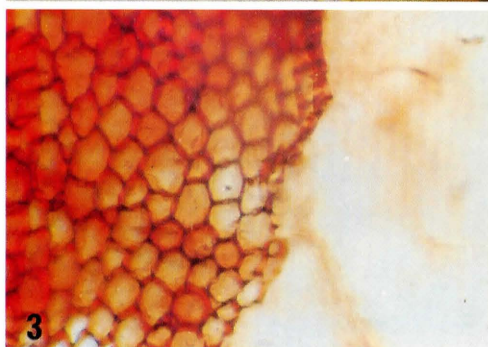
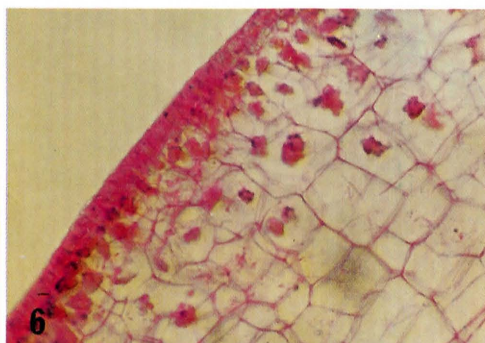
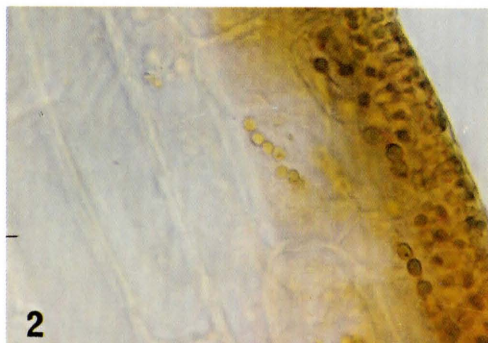


第1図 Barium hydroxide 変更法による抽出方法

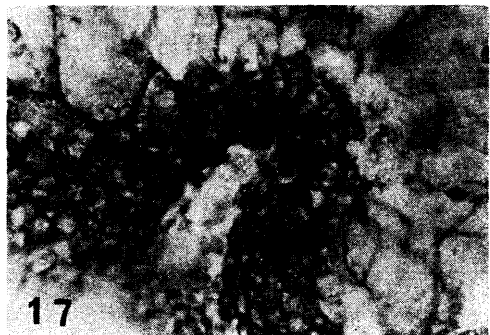
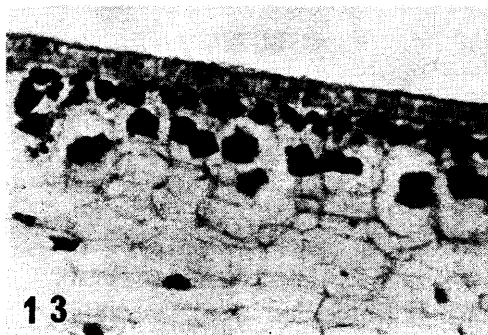
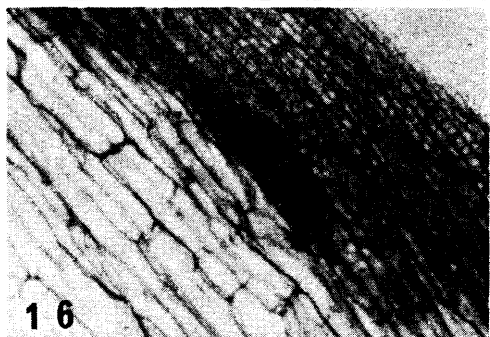
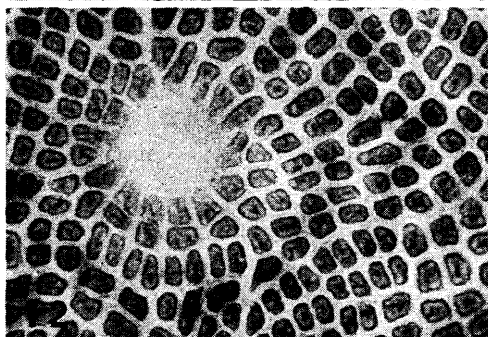
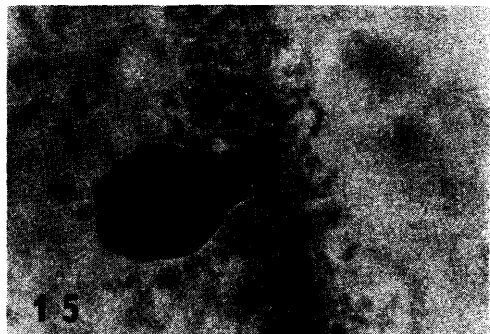
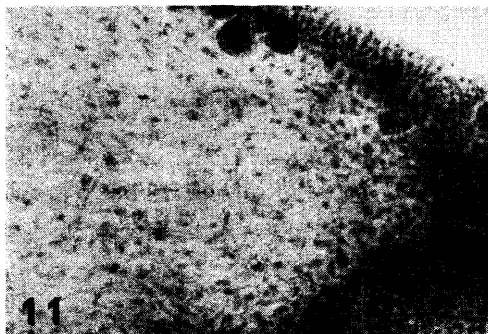
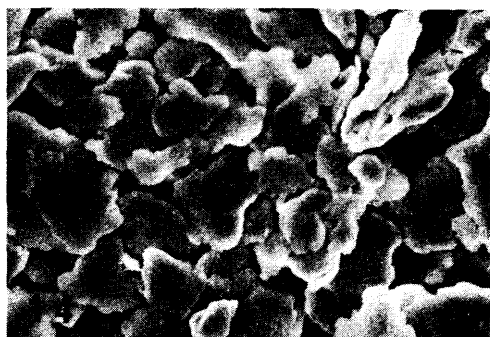
図版 1	第2図	茎状部縦断	無染色	光学顕微鏡像	×400
	第3図	茎状部横断	Safranin	"	×200
	第4図	葉状部、管状細胞	Safranin	"	×400
	第5図	茎状部、管状細胞と粘質物	Ruthenium-red	"	×200
	第6図	茎状部縦断	Acrolein-Schiff	"	×200
	第7図	葉状部表皮、矢印粘液腺	Sudan black B	"	×200
	第8図	茎状部横断	P A S	"	×200
	第9図	茎状部横断	Potassium iodide iodide	"	×200

(奥田弘枝・請川琴子)

図版 1



図版 2





第1図の方法で Carotene を抽出し、日立124型 自記分光光度計を用いて、市販純品  $\beta$ -Carotene の吸収スペクトルと比較検討した。

### 3. Carotene の定量

吸収スペクトルによる同定で用いた Barium hydroxide 変更法で抽出した抽出液を島津 Spectronic 20 A 型分光光度計にかけ、100V、455 nm における吸光度を測定し、その波長における標準曲線をもとに Carotene の定量を行なった。

## Ⅲ 実験結果および考察

### 1. ワカメの組織および組織における成分分布について

#### (1) 組織について

茎葉部組織は表皮層、皮層、髓層の3部分が明らかに区別される Laminaria 構造からなり、皮層はさらに外皮層、内皮層に区別される。

第10図は茎状部縦断面を、第11図は葉状部縦断面を示した。内皮層は第11図に見られるように細胞が分かれて管状細胞に移行する状態が観察され、髓層は管状の細胞が縦横に走る層で極めて複雑な組織をつくっている。

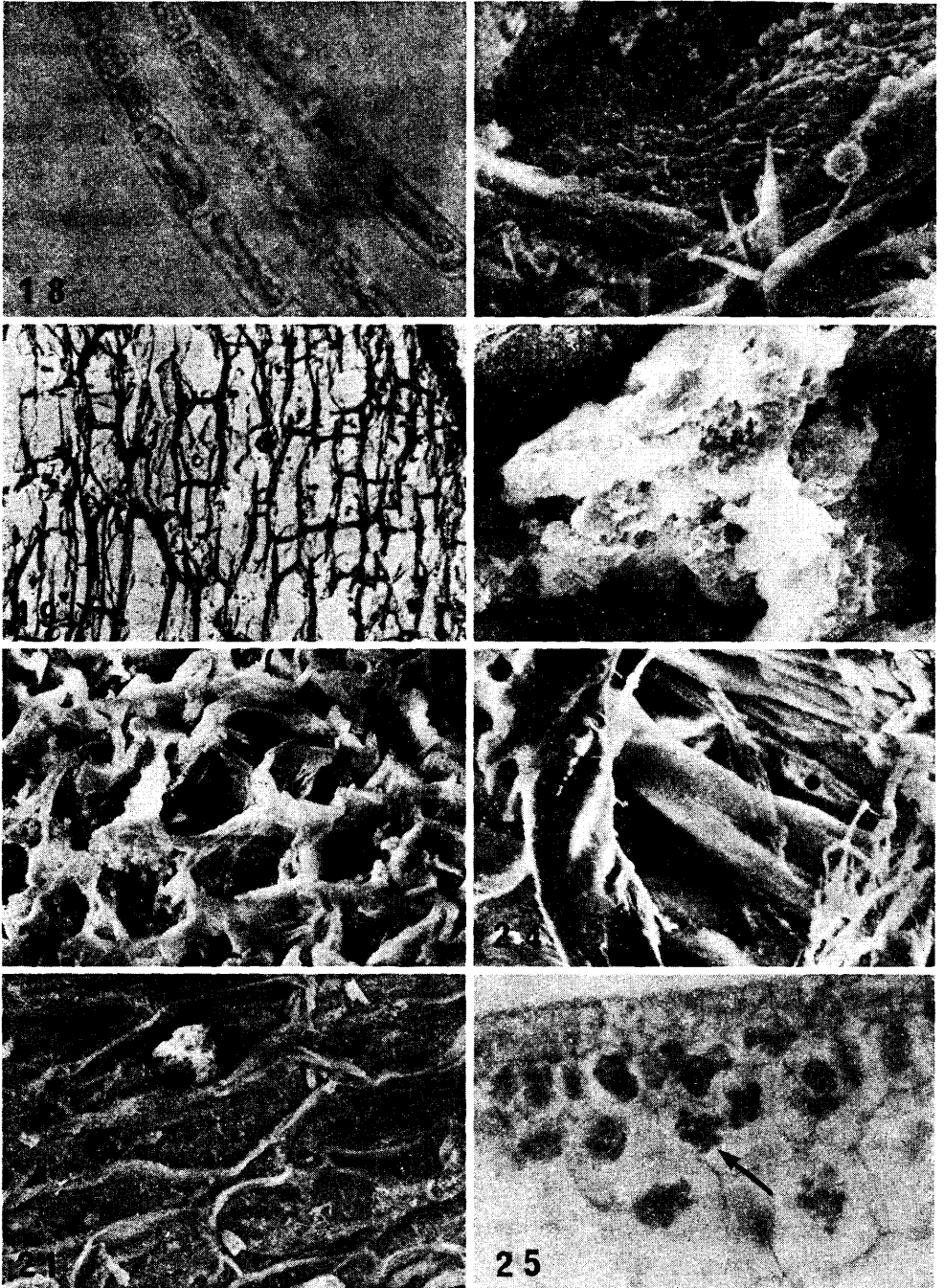
表皮層：葉状部の表皮細胞は直径  $4\sim 5\mu$  の円型の小型細胞で内に Chloroplast が存在する(第12図)。茎状部細胞は長型のやや大型で細胞周囲の間隔は広く、細胞膜の厚みに変化が見られた。

細胞膜は Delafield's hematoxylin solution, Light green solution (第13図) で好染されること、酸化銅アンモニアによる Cellulose 反応がプラスであることにより Cellulose であるといえる。また、同一部位を走査電顕で見ると、花卉の重なり合ったような立体的な構造をしており、外界の衝撃に対しても強い構造といえる(第14図)。

縦断面は円柱状の小型細胞が密着して並び、この内に2～3個の円形または楕円形をした薄円盤状の Chloroplast が存在する。これは皮層にも存在するが内皮層になるほど少ない。ボイルしたワカメの Chloroplast は凝集したかすかな赤い物質が観察された。おそらく

図版2	第10図	茎状部縦断	P A S	光学顕微鏡像	×100
	第11図	葉状部縦断	Delafields hematoxylin	〃	×200
	第12図	葉状部表皮	無染色	〃	×400
	第13図	茎状部縦断	Light green	〃	×200
	第14図	葉状部表皮		走査電子顕微鏡像	×3000
	第15図	葉状部縦断、囊	P A S	光学顕微鏡像	×400
	第16図	葉状部縦断	Delafield's hematoxylin	〃	×200
	第17図	葉状部、毛叢	P A S	〃	×400

図版 3





Carotenoids であろうと推察される<sup>12)</sup>(第2図)。

表皮下には粘液細胞(Gland)を有し、梨状あるいは卵型の囊で頂部は表皮の表面に現われている。細胞含有物は無色透明の顆粒状をしており、PAS(第15図)、Safranin solution, Acrolein-Schiff reaction で好染し、Dlelafield's hematoxylin でも染まる(第16図)。

また、表皮層には毛巢(Hair conceptacle)と称するくぼみがあり(第17図)、毛巢の基部から外に向かって束になった毛が生じている。毛は単細胞単列からなり分枝はない(第18図)。表皮層に近い細胞ほど小型で先端になるほど大型になる。細胞内にはChloroplastがあり、同化作用を行なっている。毛には色素のないうぶ毛がある。この毛はパラフィン包埋では脱落ち易い。

皮層：内皮層になるほど細胞は大型となり空隙も大きく(第19図)、細胞膜はSafranin solution で橙色に(第3図)、また、Light green solution で好染する。細胞空隙内の粘質物はRuthenium-red solution で赤く染まること、Safranin solution にも好染することからペクチンとよく似たPolysaccharide 粘質物を含む水分の多い部位といえる。

細胞膜は偏光顕微鏡(以下、偏光顕)で見ると、正六角形で金網のよじれを思わせる構造をしており、細胞の断面を走顕で見ると第20図のようであり、厚膜性の細胞である。第21図は同じく走顕の細胞縦断面の様子で細胞内物質が観察される。第22図は同部位を拡大したものである。また、細胞内には結晶物も見られる(第23図)。

髓層：ラッパ状細胞が縦横に走る層で、きわめて複雑な組織を作っている(第24図)。これを管状細胞といい、篩板(Sieve plate)を有し(第4図)、栄養の運搬をつかさどる。Safranin solution で澄んだ橙色に染まる。

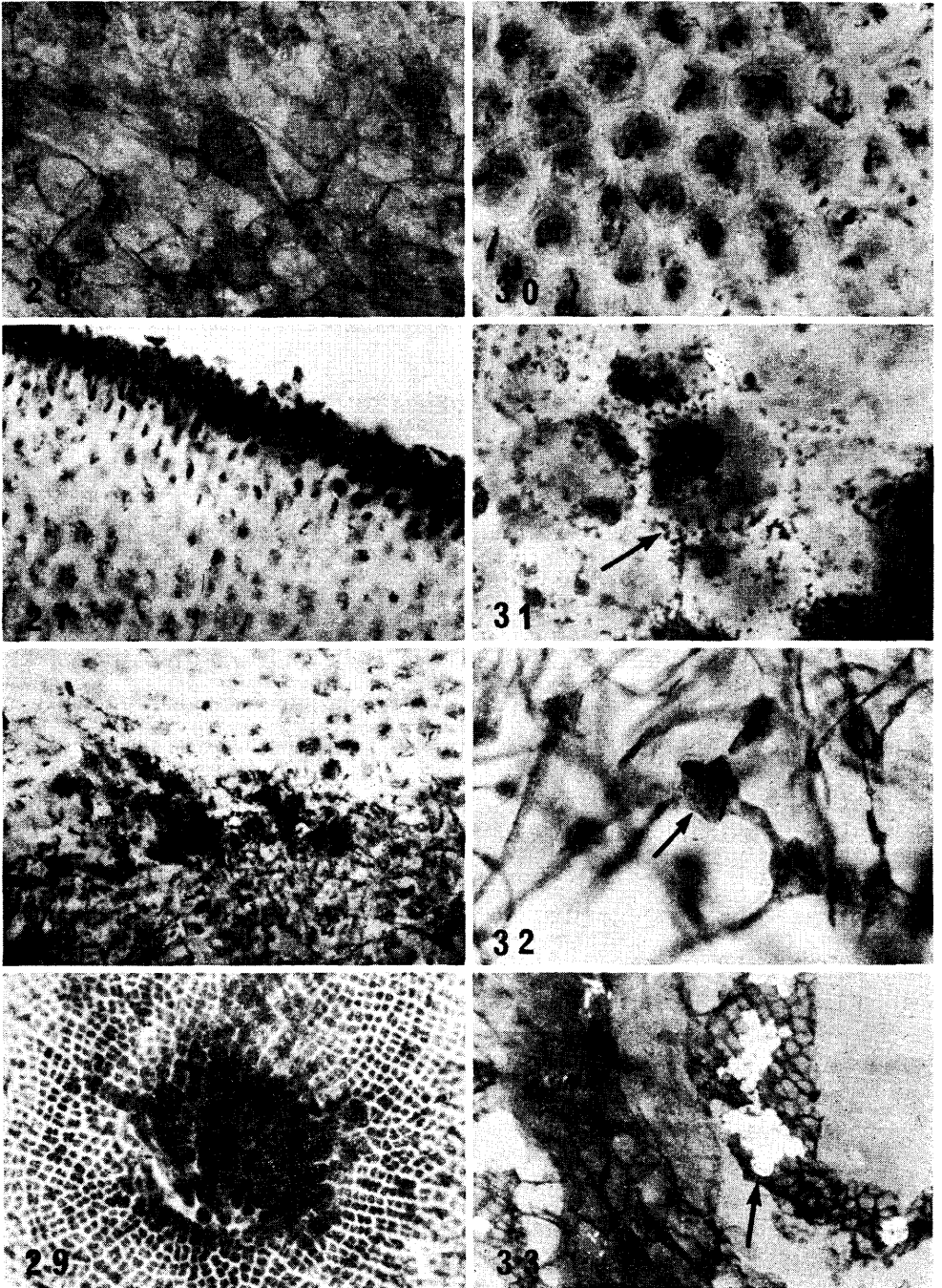
偏光顕で髓層部の横断面を見ると、篩板が偏光十字型に観察され、管状細胞の管中はPolysaccharide 粘質物で満たされており、Ruthenium-red solution で赤く染まることから(第5図)、Arginine acid であると推察できる。

## (2) 組織中における成分の分布

蛋白質：Acrolein-Schiff reaction で染め分けられ、細胞膜や細胞質にも存在しているが

図版 3	第18図	葉状部、毛	無染色	光学顕微鏡像	×400
	第19図	茎状部縦断	Pyronine-methyl green	"	×200
	第20図	茎状部横断		走査電子顕微鏡像	×1000
	第21図	茎状部縦断		"	×1000
	第22図	第21図の部分拡大		"	×8000
	第23図	第21図の部分拡大		"	×5000
	第24図	茎状部、管状細胞		"	×1000
	第25図	茎状部縦断、矢印顆粒体蛋白質	Acrolein-Schiff	光学顕微鏡像	×400

図版 4



(第6図)、Chloroplast の顆粒中にも見られる。第25図、矢印の顆粒体は Chloroplast そのものでもあり、両者は結合した一種の複合体を造っていると考えられる。また、管状細胞の細胞壁および細胞内に小顆粒物として存在している(第26図)。

脂質: Sudan III solution でも染まるが Sudan black B solution の方が判別し易い、脂質は表皮層に最も多く存在し、皮層は外皮層、内皮層とも細胞内に平均に分布している(第27図)。

髓層は表皮層について脂質が多い(第28図)、表皮層の脂質は第7図のように細胞内の Chloroplast 中に存在するのが観察された。構造上、代謝上何らかの役割を果たしているものと考えられる。<sup>13)</sup> 矢印は粘液腺を示す。なお脂質は粘液細胞には存在しないが、毛の細胞には存在している(第29図)。

第30図は内皮層の脂質である。髓層に近い部位には第31図、矢印のように小顆粒状の脂質が認められた。

観察の結果、脂質にはかたまり状と、小顆粒状の2種類があることがわかった。この違いは脂質の種類、または性質の違いによるものか現在のところ明らかでない<sup>14)</sup>。管状細胞内には小顆粒状で存在している(第32図)。

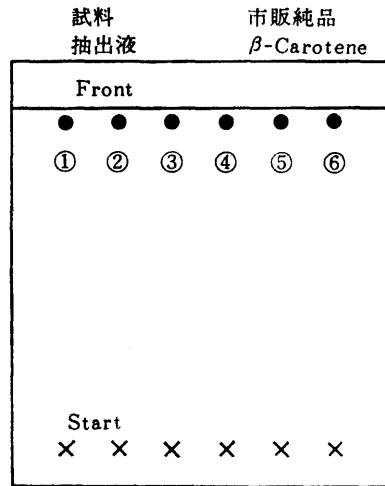
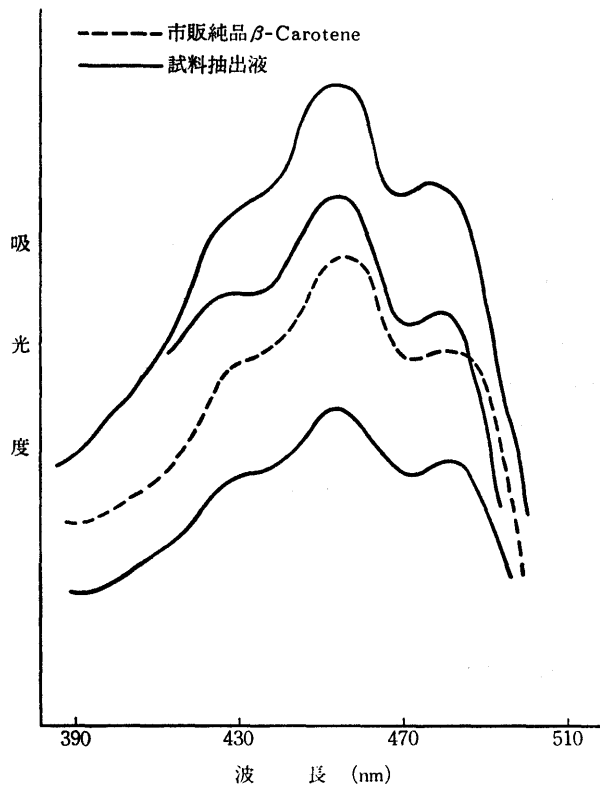
糖質: 表皮層、細胞膜、細胞内に存在することは第8図に示すようにPAS染色で明らかである。表皮層、皮層の糖質が何であるかをしらべるため、もしデンプンが存在するとすれば Chloroplast の多い部位であると推察されるので<sup>15)</sup> Potassium iodide iodide solution で染色した(第9図)。その結果、表皮層が褐色に染まることから一応 Polysaccharide 状物質ではないかと考え、なお同部位を偏光顕微鏡で見ると(第33図)表皮層に白く光る粒状物質(矢印)が観察された。しかし Hilum や層状構造は観察されなかったのでこの糖質はデンプンではなく Polysaccharide であると思われる。

以上のことからワカメ成分の分布は Chloroplast との関連性が非常に強いと考えられる。

## 2. Carotene の同定

(1) TLC による展開で第34図、第2表のような結果を得た、*R<sub>f</sub>* 値の平均値は試料抽出

図版 4	第26図	茎状部、管状細胞	Acrolein-Schiff	光学顕微鏡像	×400
	第27図	茎状部横断	Sudan black B	〃	×200
	第28図	茎状部横断、下部が髓層	〃	〃	×200
	第29図	葉状部、毛巣と毛	〃	〃	×200
	第30図	茎状部横断	〃	〃	×200
	第31図	茎状部横断、矢印小顆粒状脂質	〃	〃	×400
	第32図	茎状部、管状細胞、矢印小顆粒状脂質	〃	〃	×400
	第33図	葉状部表皮、矢印 Polysaccharide	Light green	偏光顕微鏡像	×200

第34図 試料抽出液と市販純品  $\beta$ -Carotene の TLC第35図 ワカメの  $\beta$ -Carotene 吸収スペクトル

第2表 試料抽出液と市販純品  $\beta$ -Carotene の  $R_f$  値

スポット No.	試料抽出液 $R_f$ 値	スポット No.	市販純品 $\beta$ -Carotene $R_f$ 値
①	0.99	④	0.96
②	0.96	⑤	0.96
③	0.96	⑥	0.97
平均	0.97		0.96

液0.97、市販純品  $\beta$ -Carotene 0.96とほぼ等しい結果を得た。

(2) 螢頭による観察では結晶化した試料抽出液は淡紅色を示し、飯守氏と<sup>9)10)</sup>と同一の結果を得た。

(3) 吸収スペクトルによる測定結果は第35図のように試料抽出液は市販純品  $\beta$ -Carotene 溶液の標準曲線と同じ波長に吸収極大 (453 nm, 481 nm), 吸収極小 (469 nm) が表われ、試料抽出液は  $\beta$ -Carotene であると判定した。

以上の結果から試料抽出液はほぼ純粋の  $\beta$ -Carotene であるといえる。

### 3. 生ワカメ、および加工ワカメの $\beta$ -Carotene 含有量

生ワカメ、塩蔵ワカメ、干ワカメの  $\beta$ -Carotene 含有量は第3表のような結果を得た。

(1) 生ワカメの  $\beta$ -Carotene 含有量は塩蔵ワカメ、干ワカメに比較し、圧倒的に多く平均 25.2 mg% という結果を得た。すなわち、塩蔵ワカメの約8倍、干ワカメの約17倍の  $\beta$ -Carotene を含有している。加工ワカメの  $\beta$ -Carotene 含有量の少ない原因については塩蔵ワカメは食塩の浸透作用、干ワカメは乾燥中の紫外線、空気との接触、保存中の湿度等による酸化がいちじるしく、 $\beta$ -Carotene が分解減少するためと考えられる。

(2) 生ワカメ、塩蔵ワカメ、干ワカメそれぞれの間にも含有量の差がみられる。その傾向は塩蔵および干ワカメの方にいちじるしい。同じ加工法でも含有量の差異が認められるのは

第3表 ワカメ葉状部の  $\beta$ -Carotene 含有量

ワカメの種類	生 mg%	塩 蔵 mg%	干 mg%
自家製(情西島)	26.8	2.1	1.4
市 販 品	20.8 (出 雲)	1.3 (島 原)	3.0 (出 雲)
	28.1 (阿 川)	2.8 (出 雲)	1.8 (尾 道)
		1.6 (鹿 島)	0.8 (鳴 門)
		2.2 (鳴 門)	1.6 (国 東)
		4.3 (三 陸)	

( ) は産地

生育時期、生育場所、天然、養殖等による違い、また加工処理条件の相違、採取時、加工時からの経過期間などが関係しているものと考えられる。

## IV 要 約

1. ワカメの表皮層は円柱状をした一層の小型細胞が密着して並びこれは糖質、蛋白質からなる Cellulose の細胞である。この中に2~3個の円形または楕円形の薄円盤状の Chloroplast が存在している。ボイルしたワカメの Chloroplast には凝集した数個の赤い物質が観察され、おそらくこれが Carotenoids であろうと考えられる。Chloroplast は表皮層に最も密に存在し、内皮層になるに従い減少する。

細胞膜は Safranin solution, light green solution, Delafield's hematoxylin solution で好染し、糖質は P A S、蛋白質は Acrolein-Schiff reaction でそれぞれよく染まる。

脂質は表皮層に最も多く存在し、細胞内の Chloroplast 中にある。構造上、代謝上何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。脂質は Sudan black B で好染する。

2. 表皮下にある粘液細胞は無色透明で顆粒状の物質を持つ梨状、あるいは卵型の囊である。囊の含有物は糖質、蛋白質からなり脂質は存在しない。P A S、Safranin solution, Delafield's hematoxylin solution, Acrolein Schiff reaction で染まる。

3. 表皮層には毛巢 (Hair conceptacle) と称するくぼみがあり、毛巢の基部から外に向かって束になった毛が生じている。毛は単細胞単列からなり、分枝はない、表皮層に近い細胞ほど小型で先端になるほど大型になる。細胞内には Chloroplast があり、同化作用を行っており、蛋白質と脂質が存在する。毛には色素のないうぶ毛がある。

4. 皮層は厚膜性の細胞で、内皮層になるほど大型細胞となり、空隙も大きい。細胞空隙内のペクチン様粘質物は Arginine acid であり、Ruthenium-red solution で赤く染まる。Safranin solution でも好染する、水分を多く含む部位である。

脂質は外皮層、内皮層とも細胞内に平均に分布しているが髄層に近い内皮層には小顆粒状脂質が多く見られる。

5. 髄層の管状細胞は篩板を有し、細胞内には糖質や小顆粒状の蛋白、脂質があり、Arginine acid が充満している。

6. 生ワカメは平均 25.2 mg% の  $\beta$ -Carotene を含有しているが塩蔵、干ワカメの順序に減少が著るしい。すなわち、塩蔵ワカメは食塩の浸透作用、干ワカメは乾燥中の紫外線、酸素、湿度等により酸化が促進されたためと考えられる。また生ワカメ、加工ワカメそれぞれの間でも含有量の差異が認められるのは生育時期、生育条件、天然、養殖等の違いや、加工処理条件の相違、採取時、加工時からの経過期間などが原因と考えられる。



終りに本実験に終始御懇切な御指導を下さいました広島大学教授 黒崎敏晴先生、広島女学院大学教授 辰野誠次先生に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 広瀬弘幸：藻類学総説、20、(1967)
- 2) 熊野 茂：遺伝、28、No. 9、13、(1974)
- 3) 西林長朗、猪野俊平：藻類、11、No. 1、30、(1963)
- 4) 西林長朗、猪野俊平：藻類、11、No. 2、31、(1963)
- 5) 梅田圭司、川嶋浩二：食品工誌、18、No. 4、155、(1972)
- 6) 梅田圭司：食品工誌、21、No. 1、26、(1974)
- 7) 小林邦彦、長尾和夫、24、No. 7、357、(1977)
- 8) 小原哲二郎：食品分析ハンドブック、621、(1969)
- 9) 飯守三郎：樟蔭東女短大研究論集、2、83、(1975)
- 10) 飯守三郎：樟蔭女大論集、8、91、(1970)
- 11) 高木誠司：定量分析の実験と計算、37、(1965)
- 12) L. Porter: Introduction to the fine structure of plant cells, 137, (1970)
- 13) M. D. Kamen: 光合成の物理化学、30、(1968)
- 14) 安藤英彦、金田尚志：栄養と食糧、21、No. 4、22、(1968)
- 15) W. Bonner : Plant biochemistry, 49、(1955)