

海甲 1755

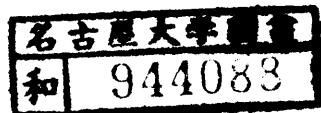
海洋における溶存炭水化物の
化学的特性とその分布及び
成因に関する研究

佐久川 弘

図・本館

主論文

海洋における溶存炭水化物の
化学的特性とその分布及び
成因に関する研究



佐久川 弘

目 次

貞

1

I 緒論

II 海水の溶存炭水化物に関する従来の研究結果

II - 1	炭水化物の定義	10
II - 2	溶存炭水化物の研究の歴史	11
II - 3	溶存炭水化物の生成、变成、 分解の過程	13

III 溶存炭水化物の濃縮・分離法

III - 1	はじめに	16
III - 2	材料と方法	
III - 2 - 1	活性炭カラム	17
III - 2 - 2	透析膜およびゲル沈過剤	18
III - 2 - 3	試薬	19
III - 2 - 4	試水	20
III - 3	結果	
III - 3 - 1	活性炭カラムによる濃縮・ 分離	

分離の結果

III - 3 - 2	透析による濃縮・分離の結果	30
III - 3 - 3	三河湾水の溶存炭水化物の濃縮・分離の結果	34
III - 4	考察	
III - 4 - 1	従来のDOMの濃縮・分離法	36
III - 4 - 2	活性炭カラムおよび透析を組み合せる方法	39
III - 5	要約	42

IV 溶存炭水化物の化学組成

IV - 1	はじめに	44
IV - 2	材料および方法	
IV - 2 - 1	試水	46
IV - 2 - 2	単糖類の分析法	48
IV - 2 - 3	少糖類の分析法	
IV - 2 - 3 - 1	標準試料の調整	49
IV - 2 - 3 - 2	少糖類の単離	52

IV - ズ - 3 - 3	少糖類のメチル化	52
IV - ズ - 3 - 4	少糖類の部分メチル化 アルジトールアセテート	53
IV - ズ - 3 - 5	少糖類のメタノリシス	53
IV - ズ - 4	多糖類の分析法	
IV - ズ - 4 - 1	カラムクロマトグラフィ	54
IV - ズ - 4 - 2	多糖類の単離	55
IV - ズ - 4 - 3	酸性多糖類の分離	55
IV - ズ - 4 - 4	多糖類の单糖類組成	56
IV - ズ - 4 - 5	多糖類のメチル化分析	56
IV - ズ - 5	G C および G C - MS	58
IV - ズ - 6	¹ H - NMR	60
IV - ズ - 7	赤外吸収法(IR)	61
IV - ズ - 8	化学分析	61
IV - 3	結果	
IV - 3 - 1	三河湾の溶存炭水化合物の 分析結果	
IV - 3 - 1 - 1	单糖類	62
IV - 3 - 1 - 2	少糖類	65
IV - 3 - 1 - 3	分子量 4,000 以下の	81

多糖類	
IV - 3 - 1 - 4 分子量 4,000 以上の 多糖類	81
IV - 3 - 2 外洋水の溶存炭水化物の 分析結果	
IV - 3 - 2 - 1 单糖類	91
IV - 3 - 2 - 2 少糖類	92
IV - 3 - 2 - 3 分子量 4,000 以下の 多糖類	97
IV - 3 - 2 - 4 分子量 4,000 以上の 多糖類	97
IV - 4 考察	102
IV - 5 要約	106
V 溶存炭水化物の沿岸および外洋に おける分布	
V - 1 はじめに	108
V - 2 定量の方法	
V - 2 - 1 单糖類	109
V - 2 - 2 少糖類	109

V - 2 - 3 多糖類	110
V - 3 結果	
V - 3 - 1 三河湾の溶存炭水化物の定量結果	110
V - 3 - 2 外洋水の溶存炭水化物の定量結果	114
V - 4 考察	118
V - 5 要約	129

VI 溶存炭水化物の成因および地球化学的意義に関する考察

VI - 1 はじめに	131
VI - 2 試料	
VI - 2 - 1 藻類	133
VI - 2 - 2 懸濁物	133
VI - 3 分析方法	
VI - 3 - 1 藻類および懸濁物試料から5の炭水化物の抽出	134
VI - 3 - 2 糖類の分析方法	136
VI - 4 結果	

VI - 4 - 1 藻類の細胞内炭水化物の 137
分析結果

VI - 4 - 2 三河湾水の懸濁態炭水化物
の分析結果

VI - 4 - 2 - 1 懸濁態炭水化物の收率 140

VI - 4 - 2 - 2 単糖類および少糖類の 140
組成

VI - 4 - 2 - 3 水溶性多糖類 144

VI - 4 - 2 - 4 水不溶性多糖類 147

VI - 5 考察

VI - 5 - 1 溶存炭水化物の成因

VI - 5 - 1 - 1 三河湾、ベーリング海、150
北部太平洋の生物環境

VI - 5 - 1 - 2 ゲルコース 151

VI - 5 - 1 - 3 グリコシルグリセロール 154

VI - 5 - 1 - 4 ラミナリビオースおよび 157
ラミナリトリオース

VI - 5 - 1 - 5 ショ糖、ラフィノース、ト 159
レハロース、メリビオース

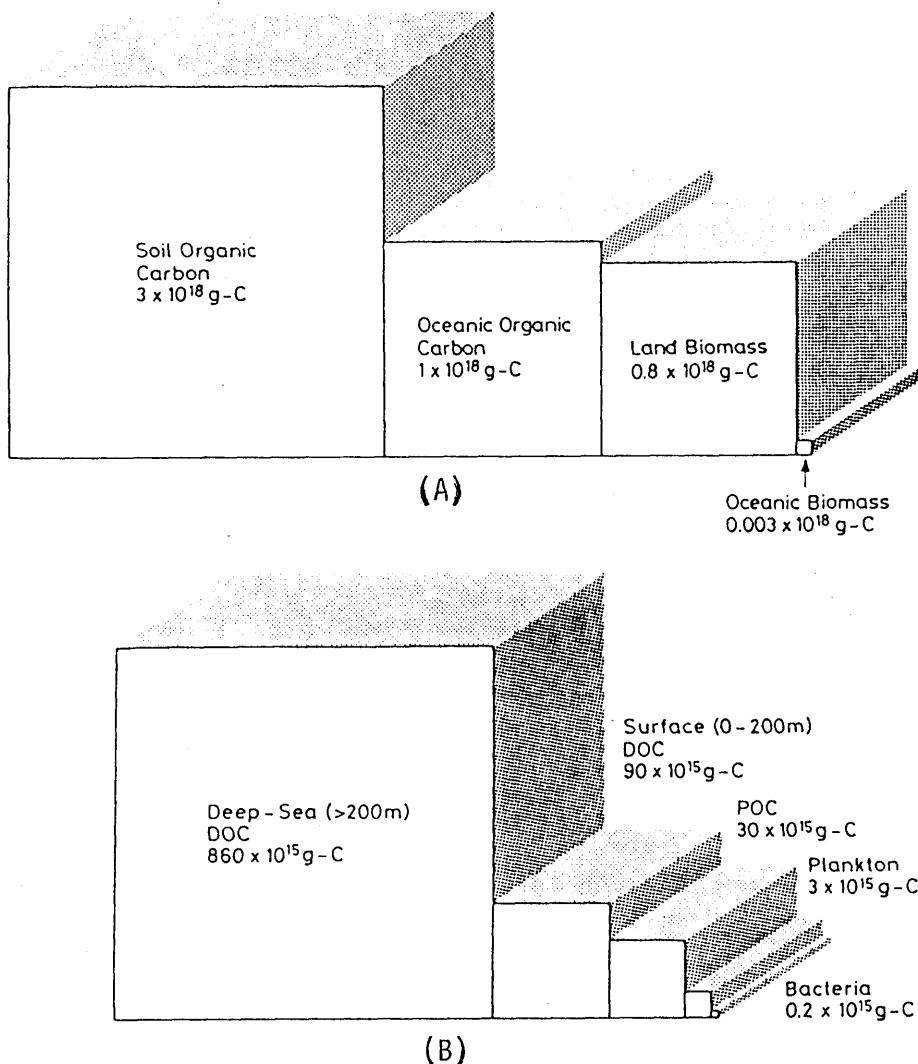
VI - 5 - 1 - 6 ヘテロ多糖類 161

VI - 5 - 1 - 7 水溶性グルカン	165
VI - 5 - 1 - 8 強アルカリ可溶性	167
グルカン	
VI - 5 - 2 溶存炭水化物の地球化学的 および生態学的意義	168
VI - 6 要約	174
VII 結論	176
謝辞	
文献	179

I - 緒論

一般に海水中の有機物は、孔径 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の沪紙を通過する溶存態有機物 (DOM, Dissolved Organic Matter) および捕捉される懸濁態有機物 (POM, Particulate Organic Matter) の二つに大別される。DOMの海水中の濃度は沿岸で $1 \sim 5 \text{ mg C/l}$, 外洋で $0.5 \sim 1.0 \text{ mg C/l}$ である (Mackinnon, 1981)。POMは沿岸および外洋の表層水で $20 \sim 200 \mu\text{g C/l}$, 外洋の深層水で $10 \sim 60 \mu\text{g C/l}$ であり (Cauwet, 1978)。これは DOM の 5% 以下である。したがって、海水中の有機物の大部分は DOM として存在することがわかる。

DOMは上述のように海水中でのその濃度は無機塩 (35 g C/l) に比べれば極めて微量であるが、その総量は莫大であり、地球上の有機物の大半をリザーバーの一つとして重要である。海水の有機物の総量は、陸上および海洋の生物量を合計した量より多く (Fig. 1),



after Mopper and Degens (1979)

Fig. 1 Distribution of organic carbon on the earth surface
 (A) Comparison of oceanic and land organic carbon pools
 (B) Distribution of organic carbon pools in the ocean

また海水の全有機物のなかで深層水(200m以深)のDOMが圧倒的に多く存在することがわかる。

海水のDOMは、海洋の生態系において重要な役割をはたしている。たとえば、海洋細菌はDOMを取り込み、エネルギー代謝の基質として利用する(Sepers, 1977)。また、DOMは海洋生物の生理活性物質として生態系の調節に深くかかわる物質を含んでいる(Provost, 1963)。

一方、DOMは無機粒子への吸着(Healy, 1971)、金属との錯体形成などのように、海水中に含まれる無機成分との相互作用をとおして、海洋における化学物質の循環に大きく関与している。また、有機物が腐植化していく過程、あるいは人類活動に起因する人工汚染物質の海洋における挙動は、地球化学的および環境化学的にも関心が持たれています。

海水のDOMの主要な生産者は植物プランクトンである(Wangersky, 1978)(Fig. 2)。

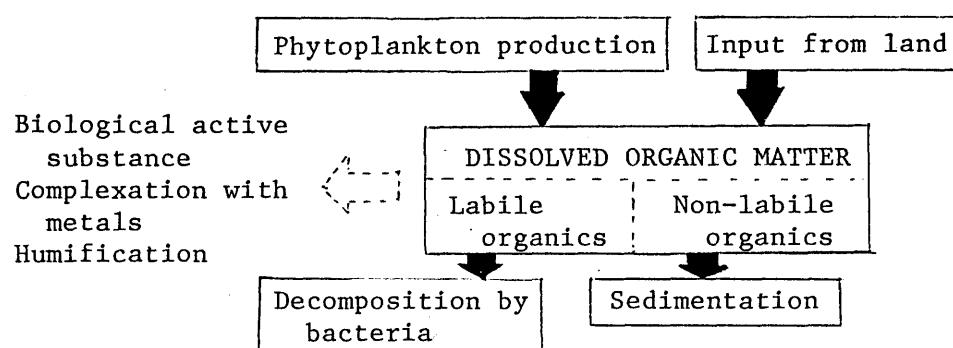


Fig. 2 Geochemical cycle of organic matter in marine environment

沿岸では、海草もまたその役割を果たしている（Mann, 1973）。植物プランクトンは光合成により有機物を生産する。生産された有機物は、生体内の代謝過程で一部体外に排出されたり、あるいは死滅した細胞の分解過程で溶存化しDOMとなる。動物プランクトンや一部の動物もDOMの生産者となりうる（Johannes and Webb, 1965）。しかし、その量は植物プランクトンによる生産に比べて無視できる程度である（Wangersky, 1978）。

海洋で生産された有機物以外に、陸上から河川や降雨によって運ばれてくるDOMも存在する。陸起源の有機物（外来性有機物）は、腐植物質、揮発性有機物、人工汚染物質で占められており、特に沿岸においては無視できない量である（Handa, 1977）。

生産されたDOMの大部分は、微生物により分解されて二酸化炭素と水になる。しかし、一部の有機物は海水中に残存して難分解性の安定な有機物に変化する（Ogura, 1975）。

海洋に供給された有機物の90%以上が、表層水の水柱で分解され、残りが深層に運ばれて安定な有機物として長期にわたり滞在すると見積られている (Williams, 1975; Skopintsev, 1981)。

DOMが海水中から除去される機構は、部分的にしか解明されていない (Morris and Eglinton, 1977)。しかし、DOMの無機粒子の表面ならびに堆積物表面への吸着が知られており (Chave, 1965)。また、DOMが凝集化し、懸濁物質に移行する現象がある (Cauwet, 1978)。したがって、おそらくこれらとの過程をへてDOMは海水中から除かれると推察される。

これまで述べてきたように、DOMの海洋における地球化学的循環は充分に明らかにされていとは言ひ難い。Fig. 2 の各移行過程の定量的見積りは、ほとんど明らかにされていない。

今日までにDOMとして存在が確認された

主な化合物群は、炭水化物 (Lewis and Rakestraw, 1955), 了ミノ酸タンパク質 (Degens et al., 1964), 脂肪酸 (Williams, 1965), 炭化水素 (Linnenbom and Swinnerton, 1970), ステロイド (Natarajan, 1970), 尿素 (McCarthy, 1970), 撥発性物質 (Giger, 1977), 有機酸 (Koyama and Thompson, 1959) である。

しかし、これらの化合物群を足し合わせても DOM の 10 ~ 20% を占める程度である (Mopper and Degens, 1979). 未解明部分は、腐植物質として総称されているのが現状である。さらに、炭水化物などの既知化合物も總量としてその存在が確認されていき場合がほとんどであり、個々の化合物の化学構造に関する情報は極めて不充分である。

DOM の化学組成が不明である最大の理由は、大量の無機塩が存在する海水から微量の DOM を濃縮・分離することが非常に困難であることに因る。このため、DOM が海洋において果たしている地球化学的、生態学的役

割を定量的に把握することが困難であった。

本研究では、DOM のなかで特に炭水化物成分に注目して研究をした。それは以下の理由による。

- a) 炭水化物は DOM の 10~20% を占め (Handa, 1966a), 既知化合物として最大である。
- b) 炭水化物は生化学物質として重要であり、海洋生物の生体成分として普遍的に存在する。
- c) 一般に炭水化物は微生物により容易に消費されるので、そのエネルギー代謝の基質としてアミノ酸タンパク質、脂質となるんで重要である。
- d) 海洋生物の生理活性物質として、あるいは金属との錯体形成物質としての働きが期待される。
- e) DOM の未解明有機物群——いわゆる腐植物質——の材料物質の一つであると考えられている (Duursma, 1965)。

したがって、本研究の目的は次の点を明らかにすることである。

- a) 海水の溶存炭水化物の化学組成を明らかにすること
- b) 沿岸、外洋における分布を調べること
- c) その生成起源を探ること

これららの研究を通じて、溶存炭水化物の地球化学的循環についてその生態学的意義の解明を試みた。

本論文は、第2章で溶存炭水化物に関する従来の研究成果を示す。第3章でその濃縮・分離の方法を、第4章で化学構造の決定方法を述べる。第5章で同定した化合物の沿岸および外洋における分布を明らかにした。第6章では、DOM以外に藻類およびPOMの炭水化物成分の分析結果を示す。これにより、溶存炭水化物の生成と起源の考察を試みた。

II-海水の溶存炭水化物に関する従来の研究結果

II-1 炭水化物の定義

炭水化物は本来 $C_x(H_2O)_y$ の実験式に相当する天然物の一群をなし、糖類ともいふ。炭水化物は、グルコース（ブドウ糖）のように糖類が1個から成る單糖類、ショ糖のように2～7個から成る少糖類、デンプンのように8個以上から成る多糖類の三つに大別される。また、分子内に水酸基（-OH）のみを含む中性糖、カルボキシル基（-COOH）を持つウロニ酸、硫酸基をエ斯特ルとしてもつ硫酸エステル化糖、アミノ基（-NH₂）をもつアミノ糖が天然界に存在する。炭水化物は、糖類以外にアルコール、フェノール類と結合して配糖体をつく。多糖類の場合、一種類の单糖類から構成される單純グリカンおよび数種類の单糖類から構成される複合グリカン（またはヘテロ多糖類）の二つに分けることができる。

本研究で対象とした炭水化物は上記の糖類である。

II-2 溶存炭水化物の研究の歴史

海水の溶存炭水化物は Collier et al. (1950) により最初に測定された。測定は、試料を濃硫酸とともに加熱して炭水化物を酸化分解し、生成物（フルフラール誘導体）を試薬と反応させて比色する方法 (*N*-ethyl carbazole 法) であった。その後、類似の方法により世界のいろいろな海域において、溶存炭水化物濃度が測定されている (Lewis and Rakestraw, 1955; Walsh, 1965)。特に、Handa (1966a, 1967) はインド洋および日本の黒潮流域における溶存炭水化物の分布をフェノール硫酸法 (Handa, 1966b) により測定をして、海域および深度による変化を調べた。比色法によれば、溶存炭水化物の濃度は沿岸において $1 \sim 5 \text{ mg C/l}$ 、外洋において $0.1 \sim 1.0 \text{ mg C/l}$ である。近年、単糖類のみを測定する方法が開発されて (Johnson and Sieburth, 1977; Hirayama,

1974)。

比色法による溶存炭水化物の測定の特徴は、
 a) 測定が迅速であり、多數の試料を短時間
 に分析できること、b) 分析過程における汚
 染が少いこと、c) 試水の量が小量(0.1~10
 ml)で済むことである。一方、その短所は
 a) 炭水化物を濃硫酸により酸化分解するた
 めに、糖類組成に関する情報が得られない。
 b) 糖類の種類により発色率が異なる。c)
 炭水化物以外の有機物も発色することがある。
 たとえば、フェノール硫酸法は腐植物質と反応
 する。したがって、この方法は海水中の溶存
 炭水化物の存在状態についての充分な情報を
 与えてくれない。

最近、種々の液体クロマトグラフィおよび
 ガスクロマトグラフィ(GC)を用いて、糖類
 を構成する各化合物に分離し、定量すること
 が試みられてる(Josefsson, 1970; Mopper,
 1977)。この方法を用いることにより、溶存
 炭水化物の化学組成を知ることができます。

実際、溶存炭水化物の一部——单糖類組成——がこの方法により解明されてい（Mopper et al., 1980）。しかし、溶存炭水化物全体の化学組成——すなわち单糖類、少糖類、多糖類の各化学組成——に関する情報はまだ得られていない。

II-3 溶存炭水化物の生成、変成、分解の過程

溶存炭水化物は、主に植物プランクトンおよび海草による排出、あるいはその死骸からの溶出に起源すると考えられて（Sieburth, 1969）。植物プランクトンから排出される有機物の化学組成に関する研究は、Fogg (1966), Hellebust (1974) らによつてまとめられた。それによると、排出される有機物は、主に炭水化物、アミノ酸タンパク質、有機酸等で構成されており、これらの有機物の量は光合成によって生産する有機物の 5 ~ 30% に相当すると見積もられて（Fogg, 1966）。しかし、排出される個々の化合物の化学構造に関する情報はほと

んど得られていな。

海水中に排出された炭水化物の大部 分は、海洋生物により利用されると考えられるが、その機構は部分的にしか明確かにされていない (Burney et al., 1979)。しかし、海洋細菌は溶存炭水化物をエネルギー基質として利用すること (Wright and Hobbie, 1966)，また植物プランクトンや無せきつい動物の一部も利用することが知られている (Sepers, 1977)。その場合、海洋細菌は多糖類を菌体外酵素により低分子に分解した後、取り込むと考えられる (Khairov, 1968)。

さて、溶存炭水化物の一部は海水中に長期間滞在し、腐植化により腐植物質を形成すると考えられてる (Duursma, 1965)。からずしも腐植化による未知化合物への変化の可能性を含めて、海洋における DOM の安定性 (特に深層水の DOM) に、溶存炭水化物が関与していると思われる。しかし、その詳細はほとんど明確ではない。

以上述べたように、溶存炭水化物の生成、
変成、分解の過程に関する情報はほとんど得
られていない。この観点から、溶存炭水化物
の化学組成に関する研究が現在必要とされる。

III - 溶存炭水化物の濃縮・分離法

III-1 はじめに

溶存炭水化物の化学組成を解明するためには、化学分析に必要な量の炭水化物を海水から濃縮・分離することが必要である。従来、溶存炭水化物の適当な濃縮・分離法が確立されていないことが、その化学組成の解明の最大の障害になっていた。

本研究で検討した濃縮・分離法は、活性炭カラム吸着および透析の二つである。活性炭カラムが单糖類および少糖類の分離に有効であることは良く知られている(Whistler and Durso, 1950). Kerr and Quinn (1975)は、海水のDOMの濃縮に活性炭カラムを用い、沿岸および外洋水のDOMの25~72%を濃縮した。Schaefer (1965)は溶存炭水化物を活性炭カラムに吸着した後、アルコールで溶出をしてカラム一人ス、シヨ糖を得た。しかし、活性炭カラムによる糖類の回収率は明ら

かではない。

透析は、生体内の高分子量有機物を精製するためには、生化学の分野で広く用いられてきた。Jeffrey and Hood (1958) は、この方法が海水の DOM を濃縮するのに有效であると指摘した。透析は操作が簡単であり、複雑な装置を必要としない。しかし、大量の海水を処理する場合、脱塩の時間が問題になること、また高分子量有機物の回収率に定量性があるか否かが問題になる。

本研究では、以上の観点からこの二つの手法を検討した。

III-1 材料と方法

III-1-1 活性炭カラム

活性炭は、カラムクロマト用活性炭 (80 ~ 100 メッシュ、西尾工業) を用いた。活性炭の表面積は $820 \text{ cm}^2/\text{g}$ 、最高容積は 0.6 ml/g 、捕集孔径は 12 \AA 、原材料は主にヤシ殻であり、灰分 ($\text{K}, \text{Na}, \text{Mg}, \text{Fe}$ 等) 5% を含んでいる。

活性炭は、電気炉で 350°C で 4 時間加熱し、不純物を燃焼した後、デシケーターに入れ乾燥・保存した。使用直前に取り出し、残留する不純物を抽出するためエタノール溶液に入れ、30 分間かくはんした。15 分静置した後、上澄み液を捨てた。このとき、沈降しない軽い粒子を取り除いた。この操作を 3 回繰り返した後、純水で同様の操作をおこない、よく洗浄した。以上の処理により精製した活性炭をカラムに充てんした。

活性炭カラムは、4.5 g の活性炭を充てんしたカラム I と、45 g の活性炭を充てんしたカラム II の両方を用いた。カラム I は内径 1 cm、長さ 30 cm の、カラム II は内径 2.5 cm、長さ 30 cm のガラスカラムである。カラムからの溶出には、すべてペリスターポンプを用い、溶出液はフラクションコレクターで分取した。
III-ス-ス 透析膜およびゲル沈過剤

透析膜はビスキングチューブを用いた。ビスキングチューブは、純水で数回煮沸（15 分

間)して不純物を除去した。

ゲル沪過剤は、セフテックス G-25 (20-80 μm , Pharmacia Fine Chemical) を用いた。セフテックス G-25 は、純水に一晩浸し膨潤させた後、カラムに充てんした。カラムは、内径 1.0 cm, 高さ 1 m のガラスカラムを用いた。セフテックス G-25 カラムからの溶出にはペリスターポンプを用い、溶出液はフラクションコレクターで分取した。このカラムに関する分子量の検定は、標準試料のグルコース(分子量 180), ラフィノース(504), ラミナラン(3,200)を用いておこなった。また、カラムの排除容量はブルーテキストランス 2000 を用いて測定した。

III-2-3 試薬

糖類の標準試料として、次の单糖類、少糖類、多糖類を用いた。

单糖類 エリスロース, ラムノース, フコース, リボース, アラビノース, キシロース, マンノース,

	ガラクトース，グルコース
少糖類	ショ糖，セロビオース，ラフィノース，セロテトラオース
多糖類	ラミナラン

セロテトラオースは Brauns (1943) の方法で、ラミナランは Handa and Nisizawa (1961) の方法で調整した。他の試薬はすべて和光純薬から購入した。ポリペプチドのバシトラシンも同社から購入した。

III-2-4 試水

試水は、三河湾の愛知県水産試験場 2.5 km 沖合の海水（水深 8 m, $34^{\circ}47'06''N$, $137^{\circ}15'00''E$ ）を用いた。試水の採水条件を Table 1 に示す。

採水した海水は実験室に持ち帰り、 $450^{\circ}C$ で加熱処理をしたガラスファイバーフィルター (Whatman GF/C) を用いて沪過をした。その際、長方形の大型沪過器 ($30 \times 12 \text{ cm}$) に沪紙を載せ、上から試水を通水して、重力差で沪過をした。沪過液は、分析に供するまで

Table 1

The water samples collected from Mikawa Bay
on May 31, 1980

Depth (m)	1	6
Volume (l)	200	20
Sampler	pump	Van Dorn
Water temperature	20.5°C	N.A.
pH	8.8	8.2

N.A. = not analyzed

-20°Cで凍結保存した。

III-3 結果

III-3-1 活性炭カラムによる濃縮・分離の結果

活性炭カラムの吸着および溶出の諸条件について標準試料の糖類を用いて検討した。溶媒は、海水と塩濃度および溶存化学種をほぼ等しくするため、3% 塩化ナトリウム溶液を用いた。

まず、グルコースの吸着および溶出実験をおこなった。0.5~25 mg/l のグルコースを溶解した塩化ナトリウム溶液(0.5~5.0 l)をカラム上に通水した。カラム通過液のグルコース濃度をフェノール硫酸法により測定をして、通水量によるグルコースの吸着率の変化を調べた。通水後、カラムに純水0.1~0.35 lを流してカラム内に残留するNaClを除き、続いで2%エタノール溶液0.15 lを通水して1 l グルコースを溶出した。また、通水速度を1.0

5.0 ml/分に変化させて同様の実験をくり返し、通水速度による吸着率および溶出率の変化を調べた。グルコースの溶出曲線をFig. 3に示す。1 mg/l の濃度のグルコース溶液をカラムに通水した場合、約 0.4 l で流出し始め、2 l も通水すると最初の負荷量の約 55% が流出した。グルコース溶液の濃度が 25 mg/l の場合、約 0.3 l で流出し始め、0.5 l でほぼ完全に流出した。一方、活性炭に吸着したグルコースは、エタノールによりその 95-98% が溶出をした。通水速度を変化させてもその吸着率 (73~80%) および溶出率 (92~99%) はほとんど変わらなかった。これらの結果から、a) カラム上にグルコース溶液を 0.3 l 以上通水すると除々に流出し始めること、特に負荷量が過大 (25 mg/l) になるとそのほとんどが流出してしまうこと、b) カラムに捕捉されたグルコースはエタノールによりほぼ完全に溶出されること、c) その吸着および溶出される割合は、通水速度に

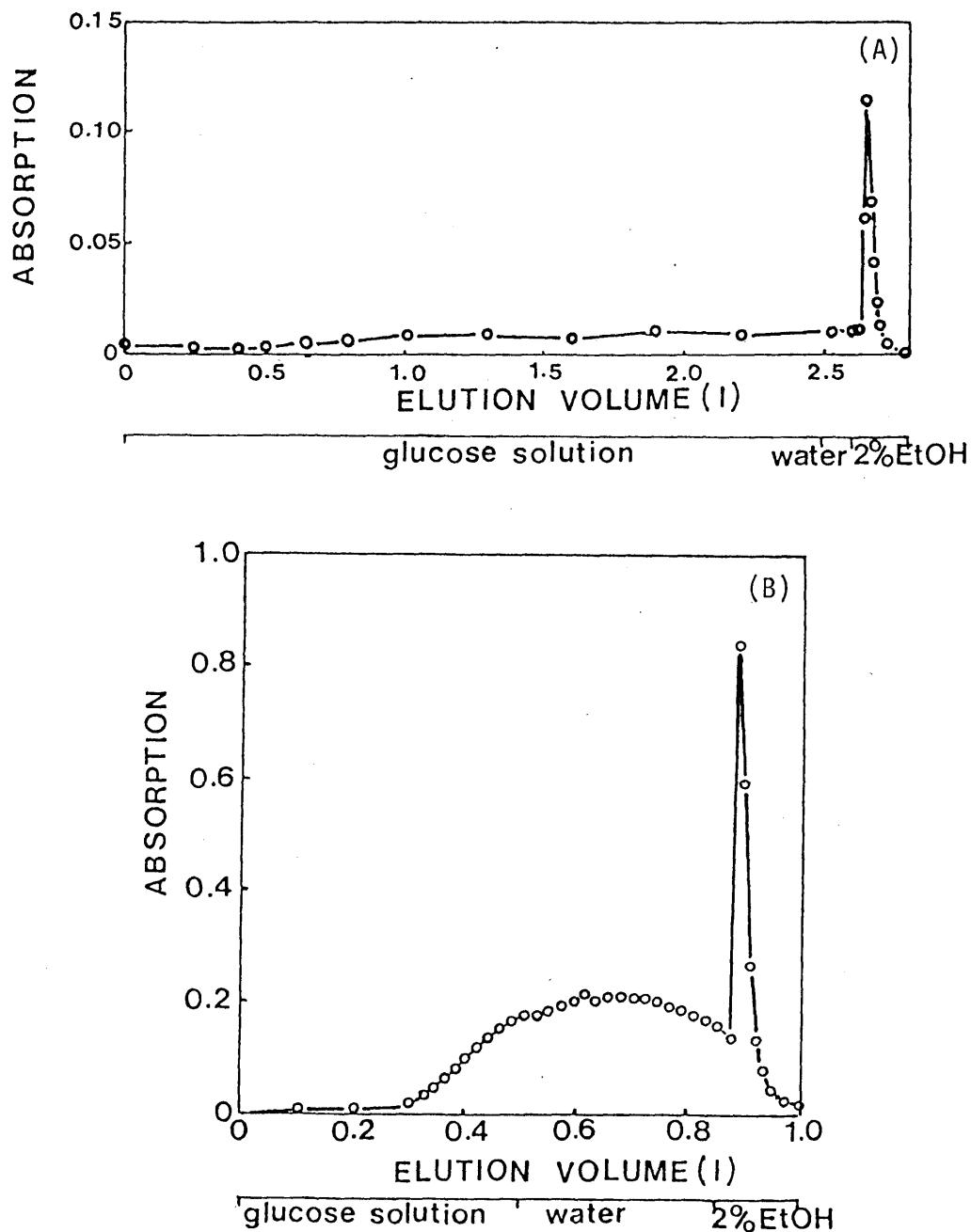


Fig. 3

Elution curves of glucose from charcoal column (I) with water and 2% ethanol. Glucose was adsorbed onto the charcoal column from the solutions of 1mg gl./l (A) and 25mg gl./l (B) prior to the elution of glucose

依存しないことがわかった。

次に、カラムⅡ（吸着容量がカラムⅠの10倍）にグルコース溶液を通水してカラムへのグルコースの吸着率および溶出率を調べた。その結果、 1 mg/l の濃度のグルコース溶液（ 2 l ）をカラムに通過させた場合、カラムから流出するグルコースの量はその負荷量の約 14% であった。また、 25 mg/l のグルコース溶液の場合では、その値が 23% であった。一方、カラムに吸着されたグルコースの約 98% がエタノールにより溶出された。これらより結果から、吸着容量の大きいカラムⅡを用いた場合の方がカラムⅠを用いた場合より回収されるグルコースの割合が大きいことがわかった。

同様の実験をキシロース、セロビオース、ラフィノース、ラミナランについてもおこなった。ただし、 α -糖類以上はエタノールで溶出するのが困難ため、2% から 80% までエタノール濃度を段階的に増加させて溶出を

した。また、ラミナランのような多糖類は元 $\sim 80\%$ エタノールでも溶出するのが難しいため、0.5Mの水酸化ナトリウム、1Mの塩酸、アセトン、メタノール、熱水を溶出液として用いた。溶出の方法も検討をした。すなわち、1) 活性炭粒子をカラムから取り出し、80%エタノールを用いてソックスレー抽出する方法、2) 80%エタノールおよび0.5M水酸化ナトリウムでかくはん抽出する方法、および3) 活性炭粒子を直接アセチル化処理をして多糖類を遊離させる方法などと試みた。その結果をTable 2に示す。

キシロースおよびグルコースなどの单糖類は、カラムIよりカラムIIに良く吸着され、溶出率も高かった。ゼロビオースおよびラフィーノースなどの少糖類は、カラムIにその大部分が吸着され、したがって回収率も高かった。一方、ラミナランのような多糖類はカラムIにほぼ完全に吸着されるが、活性炭からの脱着が困難であり、スー80%エタノールおよび

Table 2. Recoveries of standard mono-, oligo-, and polysaccharides from the charcoal column.

	Xylose		Glucose			Celllobiose		Raffinose	Laminaran
Molecular weight	150		180			342		504	3,200
Expt. No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Column system used ^a	I	II	I	I	II	I	I	I	I
Carbohydrate solution:									
volume added (ml)	500	500	500	2,000	2,000	500	2,000	500	500
concentration (mg l ⁻¹)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Carbohydrate retained in charcoal column (%) ^b	4	78	76	17	83	90	91	98	97
Ethanol solution used for the elution of carbohydrate (%)	2	2	2	2	2	10	10	20	80
Carbohydrate eluted from charcoal column with ethanol solution (%) ^c	4	78	75	17	82	87	85	74	6
									4

^a Charcoal column using 4.5 g (I) and 45 g (II) of charcoal.^b Carbohydrate retained in charcoal column/carbohydrate added × 100.^c Carbohydrate eluted from charcoal column with ethanol and/or NaOH/carbohydrate added × 100.

0.5 M 水酸化ナトリウムを用いてもカラム I からほとんど溶出されなかつた。これらの結果は、a) 活性炭カラムは单糖類、少糖類の水溶液からの回収には適していゝが、多糖類には不適であること、b) 单糖類はカラム II に、少糖類はカラム I によく捕捉されることを示した。

以上の結果をもとに、单糖類および少糖類を二つの活性炭カラムを用ひてそれぞれ濃縮・分離する方法を検討した。その場合、カラム I と II を接続し、カラム I で少糖類を捕捉し、これから流出した单糖類はカラム II に捕捉することを試みた (Fig. 4)。

单糖類 10 種類と少糖類 3 種類を溶解した 3% NaCl 液を 4.0 ml/分 の速度でカラム I および II の系に通水した。純水 1 L で脱塩した後、カラム I と II を切り離し、カラム I は 0.75 L の 50% エタノールにより、またカラム II は 0.75 L の 10% エタノールにより溶出をした。これらのカラムに負荷する糖類の総

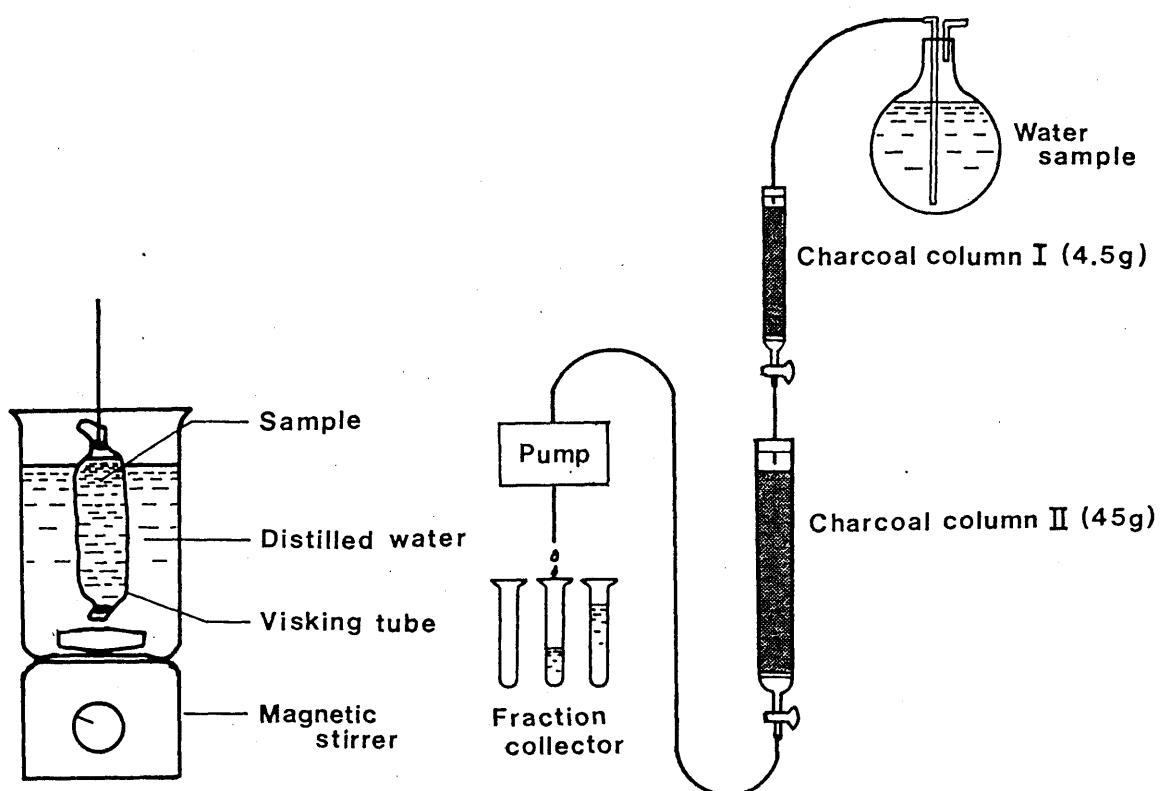


Fig. 4 Concentration of dissolved carbohydrates from seawater using charcoal column I and II, or dialysis

量を $250 \sim 2,500 \mu\text{g/l}$ の範囲で変化させ、負荷量の変化による回収率の違いを調べた。その結果を Table 3 に示す。

単糖類の場合、概して分子量の大きいグルコースなどのヘキソース（6 岐糖）は回収率がよく、エリスロースのようなテトロース（4 岐糖）は悪いことがわかった。すなわち、回収率はヘキソース = ペントース（5 岐糖） $>$ デオキシヘキソース $>$ テトロースの順であった。しかし、同じ分子量を持つ単糖類であっても回収率が大きく異なる場合があった。これは、各糖類の立体構造が異なることにより、活性炭への吸着率が変化することによるものと考えられる。少糖類の場合、カラム I から回収される割合は 2 糖 $>$ 3 糖 $>$ 4 糖の順にわかった。これは、単糖類の場合と逆に、糖類の分子量があつて活性炭に非可逆的に吸着される現象に帰因するものと思われる (Whistler and Durso, 1950)。

III-3-2 透析による濃縮・分離の結果

Table 3. Recoveries of various mono- and oligosaccharides from the charcoal column.

Compounds	Column used	Range of recovery (%)	Average recovery (%)	No. of experiments
Monosaccharide				
Glucose	I	54.2-79.1	67.5±8.3	7
Galactose	I	54.1-66.5	60.4±7.7	4
Mannose	I	32.4-52.0	46.4±6.8	7
Xylose	I	59.0-70.1	63.1±2.4	7
Arabinose	I	68.0-80.5	74.3±7.8	4
Ribose	I	7.3-18.3	16.2±5.7	5
Fucose	I	25.1-27.6	25.9±1.8	4
Rhamnose	I	11.5-17.8	14.7±4.5	3
Erythrose	I	6.1- 9.9	9.2±2.7	5
Oligosaccharide				
Sucrose	I	78.6-96.6	88.8±7.2	6
Raffinose	I	65.9-82.1	73.5±6.8	6
Cellotetraose	I	55.2-63.5	60.5±5.2	3

透析による標準試料の糖類の回収率を調べた。ラミナラン 5 mg を溶解した 3% NaCl 溶液 10 ml をビスキングチューブに入れ、かくはんしながら 2 l の蒸留水に対して透析した (Fig. 4)。数時間毎にチューブ内の溶液を一部取り出し、フェノール硫酸法により糖の濃度を測定した。透析は 50 時間おこなった。その結果を Fig. 5 に示す。グルコース、ラクトースなどの单糖類・少糖類は、24 時間後には大部分 (96~98%) が膜外に漏出するのに対し、バシトラシン、ラミナランはそれぞれ 5% より 75% が膜内に残存することがわかった。故に、この結果は透析により多糖類だけが選択的に濃縮されることを示した。また、回収率は糖類の分子量に比例して大きくなることがあり、分子量数千以上の多糖類はほぼ 100%，それ以下の多糖類は 20~100% が回収されたことが認められた。通常、生体を構成する多糖類は分子量が数千以上である場合が多いので、この方法により多糖類の大部分が回収される

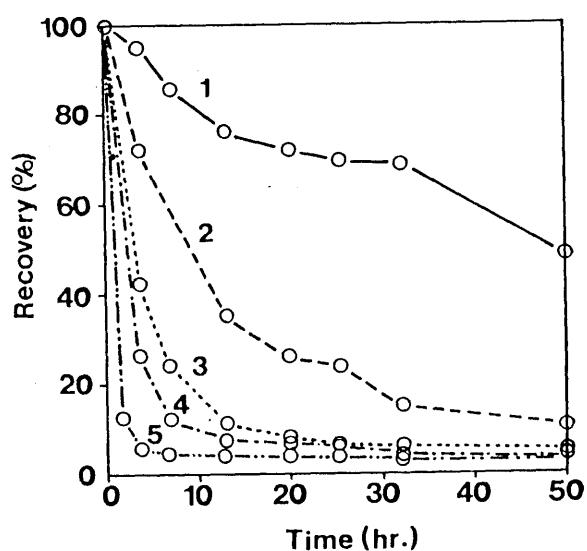


Fig. 5. Recoveries of sugars with respect to time during dialysis of a 3% NaCl solution containing a mixture of standard sugars against distilled water. 1: laminaran, 2: bacitracin, 3: raffinose, 4: glucose, and 5: NaCl.

と考えられる。

Ⅲ-3-3 三河湾水の溶存炭水化物の濃縮 ・分離の結果

実際の海水の溶存炭水化物の濃縮・分離は、活性炭カラム吸着法と透析法の二つを組み合わせておこなった。その分析の操作の順序を Fig. 6 に示す。まず、試水又々を減圧濃縮して約 200 ml にした後、"スキングチューブ"に入れ蒸留水に対して 20 時間透析をした。この操作により透析内液には多糖類が濃縮されるが、これはさらにセフ3 デックスカラムにより分子量 4,000 以下とそれ以上の二つの多糖類画分に大別した。

セフ3 デックスカラムによる多糖類の分離は次の条件でおこなった。多糖類試料を 2 ml の純水に溶解した後、カラムのゲルの頂上に載せた。これに、蒸留水を 1 ml / 分の速度で通水し、溶出液はフラクションコレクターで分取した。カラムの排除容量に相当する溶出画分 (40~80 ml) から分子量 4,000 以上

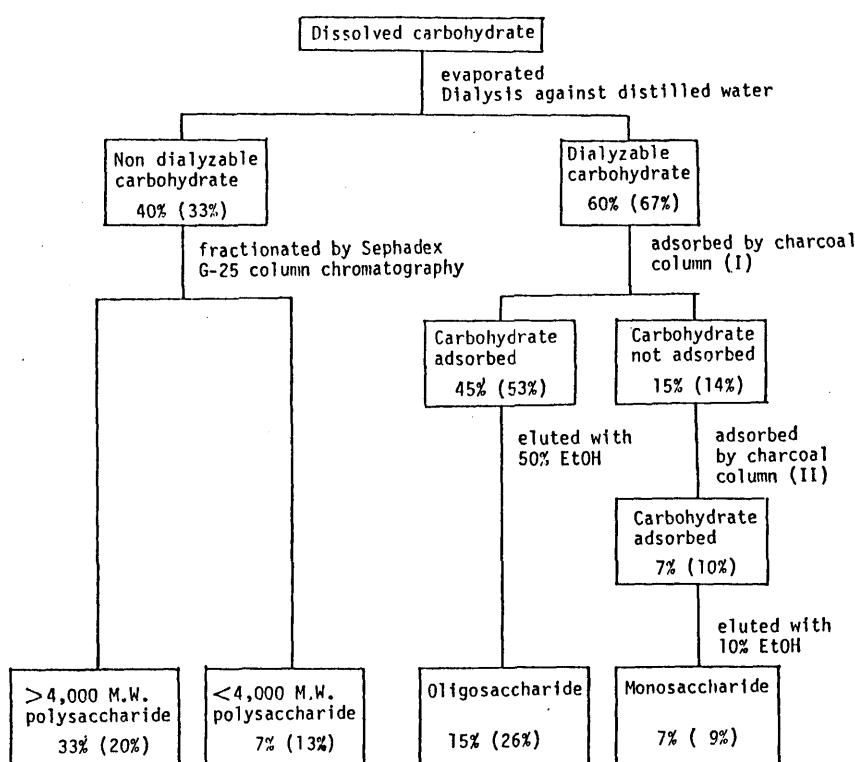


Fig. 6 Flow chart for the separation of dissolved carbohydrate from the seawater samples of Mikawa Bay by dialysis against distilled water followed by charcoal column chromatography. Carbohydrate in each of the steps of the separation was determined by the phenol sulfuric acid method and is shown as a percentage relative to total carbohydrate in the water sample from the depth of 1 m. Values from the depth of 6 m are shown in parenthesis.

の多糖類を、また溶出量 80~160 ml から分子量 4,000 以下の多糖類を得た。一方、透析外液に移った单糖類、少糖類はカラム I やカラム II によりそれぞれ濃縮・分離した。

この濃縮・分離の方法を三河湾の 1 および 6 m 層水に適用した結果を Fig. 6 に示す。溶存炭水化物の全回収率は 1 および 6 m 層水でそれぞ 62% および 68% であった。回収されなかつた炭水化物は、主に 1) カラム I に非可逆的に吸着された少糖類（および多糖類の一部）、又 2) カラム II に吸着されなかつた单糖類であると考えられる。

III-4 考察

III-4-1 従来の DOM の濃縮・分離法

今日までに、以下の方法が海水中の DOM の濃縮・分離法として検討されてきた。

- クロロホルム、n-ヘキサンなどの有機溶媒による溶媒抽出
- 透析（電気透析も含む）、限外沪過、逆

浸透などとの膜を用いて分離する方法

- c. XAD樹脂、活性炭、イオン交換樹脂、キレート樹脂などを用いたカラムクロマトグラフィ
- d. 水酸化オニ鉄などとの共沈による方法
- e. N₂ガスなどの不活性ガスを用いたガスストリッピング法

aの方法は脂質成分を、b, c, dは極性のある化合物（炭素、水素以外に酸素、窒素を多く含む）を、eは揮発性有機物をそれで濃縮・分離するために用いられてきた。したがって、炭水化合物のように 1) 極性がある有機物、2) 不揮発性物質、3) 分子量が数100—数100万の広い範囲にわたる物質、4) -COOH, -SO₃Hなどの酸性基、または-NH₂などの塩基性基を含む有機物に適用できるのは b, c, d の方法である。しかし、d の方法は 1) 定量的に有機物を海水から濃縮することが困難である、2) 沈殿物の後処理が面倒である、3) 单糖類、少糖類のような低分子

子量炭水化物の収率が悪いなどのこと (Williams and Zirino, 1964; Chapman and Rae, 1967) から実際的には適用が容易ではない。

b) のなかで、特に電気透析法は溶存炭水化物の濃縮・分離に有効であることが指摘された (Josefsson, 1970; Hirayama, 1974)。

Josefsson (1970) は数 100 ml の海水を陽イオンおよび陰イオン交換膜を用いて 20 時間電気透析をした結果、最初に負荷した ^{14}C 一グルコースの約 90% が脱塩・回収されたと報告している。しかし、この方法には a) 大量の海水を効率よく脱塩するのに適当でない、b) 装置が複雑化し、操作も面倒である、c) 酸性糖類、塩基性糖類は膜外に脱け出てしまう可能性が大きいなどの欠点がある。逆浸透、限外沪過法などの方法も D.O.M の濃縮に効果的であることが知られている。しかし、前者の方法では a) 現段階では装置が高価であり、また操作が複雑であること、b) 海水は浸透圧が高い (24 気圧) ので、

操作圧をかなり高くする必要があること、c) 無機成分の一部も一緒に濃縮される可能性が大きいなどの点が挙げられる。これに対して、後者では少量の海水(数10~数100ml)を DOM の分子の大きさにしたがって分離して濃縮することができる点は有利であるが、これもまた大量の海水を処理するには適当でない。

c) のカラムクロマトグラフィ を用いる場合、酸性アルミニウム、珪藻土、シリカゲル、炭酸カルシウムなどの無機吸着剤、活性炭、XAD樹脂、セッフ・パック樹脂などの有機吸着剤がこれまでに検討されてきた (Jeffrey and Hood, 1958; Mills and Quinn, 1981)。このなかで、活性炭が有機物分子に対して最も吸着能力がある。Kerr and Quinn (1977) は、海水の DOM の 60-80% が活性炭カラムに吸着されたと報告している。したがって、本研究でもこの方法を採用した。

III-4-2 活性炭カラムおよび透析を組み合せる方法

本研究で採用した活性炭カラム吸着法および透析法はともに、a) 装置が簡単であり、また操作も簡便であること、b) 分析過程で炭水化物が変成する恐れの少い利点がある。しかし、この二つの方法には次のような解決すべき問題があることが知られている。

- 1) 多糖類はよく吸着されるにもかかわらず溶出しにくい（友田ら, 1976）。
- 2) 活性炭から不純物を除去するのは容易ではない。
- 3) 負荷量により吸着率が変化する。

また、透析法の場合、

- 1) 単糖類、少糖類はほとんど回収されない。
- 2) 完全に脱塩するのに時間がかかる。

本研究の濃縮・分離法の特徴は、この両者の短所を相補うために二つの方法を組み合せたことにある。これにより、多糖類は透析により、単糖類、少糖類は活性炭カラムによりそれぞれ濃縮・分離することができた。

透析法の問題点又は、この方法にゲル沪過法を組み合せることにより、残留する無機塩を取り除くことで解決された。

活性炭カラムからの糖類の回収率は、全負荷量が $500 \sim 5,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲ではほとんど変化しなかった。しかし、それ以下の負荷量を加えたときに急激に回収率が低下する現象が見られた。これはおそらく、粒子表面において強い吸着能力を持つ活性基と負荷された糖類が、非可逆的に結合してしまうことに原因があると思われる。

活性炭粒子には種々の有機質の夾雑物が存在した。したがって、これを除去することが必要である。このため、活性炭粒子をあらかじめ加熱処理をし、さらにエタノールでよく洗浄した結果、有機性夾雑物のほとんどない活性炭を調整することができた。ただし、フタル酸エステルは活性炭に吸着しやすく、完全に除去するのは困難であった。しかし、糖類の同定を妨げる程ではなかった。

この方法を実際の海水に適用した結果、三河湾の溶存炭水化物の60%以上を濃縮することができた。故に、活性炭カラムと透析を組み合せる方法は、溶存炭水化物の濃縮・分離に有効であると判断される。

Ⅲ-5 要約

- (1) 活性炭カラムによる糖類の3%塩化ナトリウム溶液からの回収率を調べた結果、单糖類は容量の大きいカラムⅡに、少糖類は容量の小さいカラムⅠによく吸着し溶出されたことがわかった。しかし、多糖類はほとんど回収されなかつた。
- (2) カラムⅠとⅡを連結した系に单糖類および少糖類の混合溶液を通水した結果、单糖類の9-74%が、また少糖類の61-89%が回収された。
- (3) 透析を蒸留水に対して24時間おこなった結果、75および25%のラミナランおよびバシトランが回収された。これ

に対し、低分子量である 塩化ナトリウム、
グルコース、ラフィノース のほとんどが
(>96%) が透析膜外に除去された。こ
の結果は、透析法は多糖類のみを濃縮す
るのに 有効であることを示した。

- (4) 活性炭カラムおよび透析を組み合せる方
法を用いて、三河湾の溶存炭水化物を濃
縮、分離した結果、6m および 68% の炭
水化物をそれぞれ 1 および 6 m 層水から
分離することができた。

IV-溶存炭水化物の化学組成

IV-1 はじめに

海水の溶存炭水化物の化学組成に関する知識は現在極めて限られている。遊離態の单糖類組成が部分的に明らかにされていはだけである (Mopper et al., 1980)。今日までに、ペーパークロマトグラフィ (Degens, 1964; Schaefer, 1965), 酵素を用いる方法 (Vaccaro et al., 1968; Hanson and Snyder, 1979), GC (Josefsson, 1970; Eklund et al., 1977), 液体クロマトグラフィ (Josefsson, 1970; Mopper, 1977) などが海水の糖類組成を調べるために適用されてきた。しかし、これらの方法のみでは、溶存炭水化物の大部を占めると考えられる少糖類、多糖類の化学組成を完全に解明することは困難である。

最近、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) が地球化学試料中の有機化合物の化学構造の決定に広く用いら

れるようになった。この方法によれば、 μg (ナノグラム) の有機物分子の分子量ならびに化学構造に関する情報が得られる。したがって、この方法は微量の有機物の構造を決定するのに現在最も有力な分析手段である。

炭水化物は、異性体を数多く持つている。たとえば、単糖類のグルコース、ガラクトース、マンノースは分子量 (180) および分子式 ($C_6H_{12}O_6$) が同じであるが、その立体構造が異なる。さらに、これらの单糖類は水溶液中ではそれぞれより α および β アノマーの混合物として存在する。この立体構造の相違を識別するためには、赤外吸収法ならびに核磁気共鳴法が特に有効である。前者の方法は、有機物分子に含まれる官能基の伸縮およ^び変角振動による吸収スペクトルにより、後者は¹Hや¹³C原子の核磁気共鳴スペクトルから、それらによって構成される有機分子の構造に関する情報を得ることができる。従来、これら の方法を適用するためには、mg 程度

の有機物試料が必要とされた。しかし、フーリエ変換型の機器が開発されようになつたため数 $10 \mu\text{g}$ で分析が可能になつた。

本研究では、これらの方法を用いて溶存炭水化物の化学組成を解明することを試みた。

IV-1 材料および方法

IV-1-1 試水

試水は、三河湾水（III-2-4）をさらに外洋水である。

外洋水は、東京大学海洋研究所所属の白鳳丸 KH 78-3 次航海で採取した北部太平洋の Stn. 3 (水深 5,400 m, $47^{\circ}51'N$, $176^{\circ}21'E$) の 10 オンス, 500 m から得られた海水、ベーリング海の Stn. 4 (水深 3,920 m, $53^{\circ}30'N$, $177^{\circ}15'E$) の 1 オンス, 000 m から得られた海水試料を用いた (Fig. 7)。海水は、ポンプ (表面水) およびニスキンサンプラー (23 l. 深層水) によりそれぞれ採取した。採水後、試水は直ちにガラスファイバーフィルター (

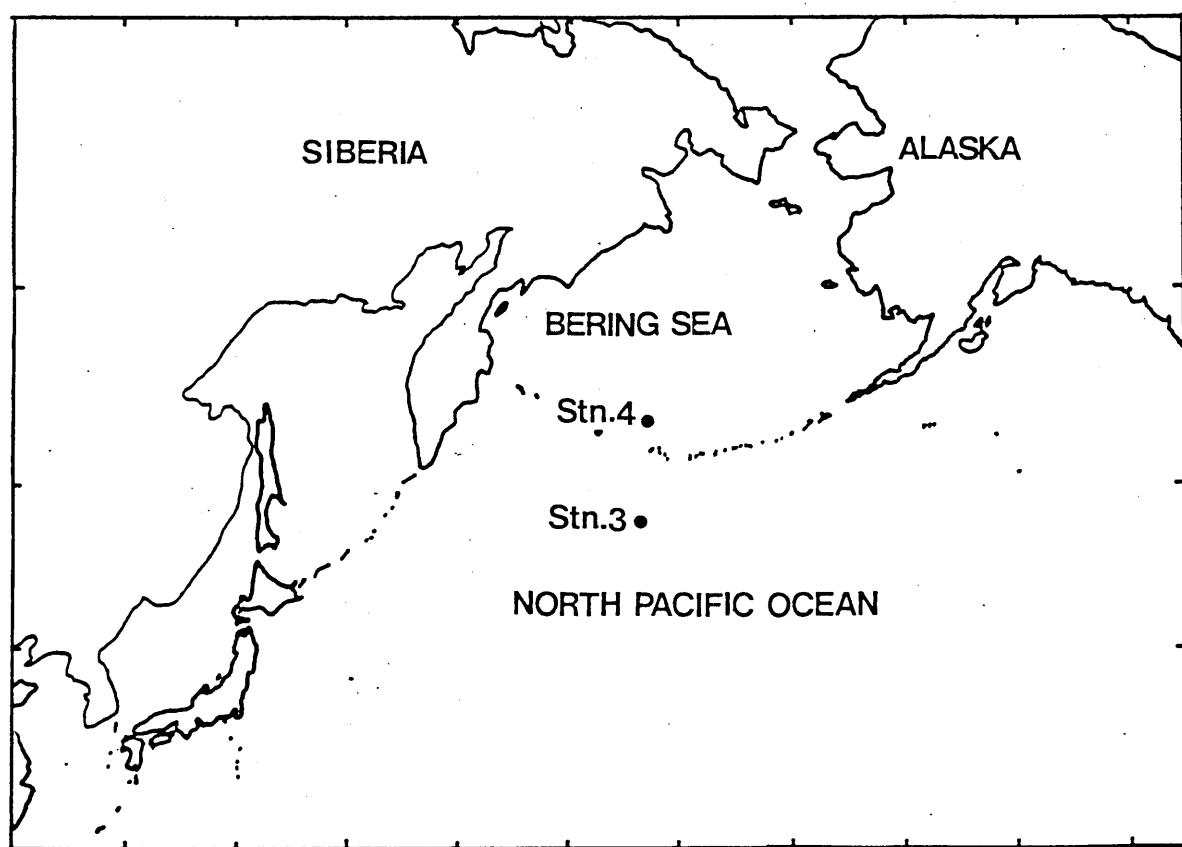


Fig. 7 Stations for the collection of the water samples during the cruise of
Hakuho-Maru (KH78-3) from June to August, 1978.

(Whatman GF/C) により沪過した。沪過の方法は、三河湾から採集した試水の場合と同様である。沪液は分析に供するまで -20°C で凍結保存した。

IV-2-2 单糖類の分析法

試水から濃縮・分離した单糖類画分の化学組成は次の方法で決定した。試料を 2 ml の純水に溶解した後、1% 水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) を加えて 2 時間放置し、单糖類を糖アルコールに還元した。酢酸を少量 (0.1 ml) 加えた後、減圧濃縮し、さらにメタノールを加えて乾固した。この操作を数回くり返した。乾固後、減圧下で脱水した。

糖アルコールからその酢酸エチル誘導体の合成は次の方法によった。すなわち、残渣に無水酢酸ナトリウム (100 mg) および無水酢酸 2 ml を加え、 100°C で 2 時間かくはんした。反応液を冷水 (100 ml) に加え、一晩かくはんして残留する無水酢酸を加水分解した。反応液をクロロホルム (10 ml × 3 回) で抽出

した後、抽出液を小量の水でよく洗淨した。クロロホルム相をとり、無水流酸ナトリウムを加えて脱水後、蒸発乾固した。残渣にメタノール(50μl)を加え糖アルコールの酢酸エチルを溶解し、その一部を取り、ガスクロマトグラフに注入した。

IV-2-3 少糖類の分析法

IV-2-3-1 標準試料の調整

ラミナリゴースおよびラミナリトリオスは、Handa and Nisizawa (1961) の方法で調整した。すなわち、*Poria cocos* の菌核(茯苓)から抽出した β -1,3 グルカンをアセトトリシス、脱アセチル化、活性炭カラム精製により得た。イソフロリドシトは J.O. Craigie 博士 (Atlantic Regional Laboratory, Canada) から供与されたものを用いた。

$1-O-\beta-D-\text{ガラクトシルグリセロール}$ および $\alpha-D-\text{ガラクトシル}-1-O-\beta-D-\text{ガラクトシルグリセロール}$ は小麦粉から抽出したモノガラクトシルジグリセリトおよび

ジガラクトシルジグリセリドからオオゼリナトリウムメトキシド (CH_3ONa) によろけん化により調整した。

α, β - $\text{D}-\text{G}\text{lcose}-(1\rightarrow 3)-\text{O}-\text{Me}$ は CH_3ONa で室温、10時間加水分解することにより調整をした。
 α, β - $\text{D}-\text{G}\text{lcose}-(1\rightarrow 3)-\text{O}-\text{Me}$ は Fairbourne et al. (1931) の方法により合成をした。

α, β - $\text{D}-\text{G}\text{lcose}-(1\rightarrow 3)-\text{O}-\text{Me}$ は、アセトブロモグルコース 200 mg と CH_3ONa で室温、10時間加水分解することにより調整をした。

部分メチル化グルコースおよびガラクトースは、Handa and Montgomery (1969) の方法で調整した。

調整した糖類およびその誘導体は、GC, GC-MS, $^1\text{H-NMR}$ によりその化学構造を確認した。その結果を Table 4 に示す。これら

Table 4 GC, GC-MS and ^1H -NMR data for sugars and sugar derivatives prepared

Sugars and sugar derivatives prepared		Derivatives for analysis	Retention time	Characteristic fragment ions m/z	Anomeric proton(s)	
					Chemical shift ppm	Coupling constant Hz
Laminaribiose	β -anomer	Permethylated	0.48 ^a	422($M^+ - 32$), 353($M^+ - 101$), 321($M^+ - 133$), 305($M^+ - 149$)	4.67	7.8 (IIa)
	d-anomer	"	0.51 ^a	"	4.13	7.8 (IIa')
Laminaritriose	β -anomer	"	0.88 ^a	483($M^+ - 175$), 423($M^+ - 235$), 391($M^+ - 267$), 359($M^+ - 299$)	4.68	7.8 (IIa)
	d-anomer	"	0.93 ^a	"	4.84	3.4 (IIa')
Sucrose			0.44 ^a	409($M^+ - 45$), 377($M^+ - 77$), 329($M^+ - 125$), 289($M^+ - 165$)		
			0.77 ^a	483($M^+ - 175$), 355($M^+ - 303$), 263($M^+ - 395$), 233($M^+ - 425$)		
Raffinose		"	0.31 ^a	219, 187, 163, 103, 101, 88	5.00	3.9 (IIa)
1-O-d-D-galactosyl-glycerol		"	0.33 ^a	"	4.22	7.8 (IIa)
1-O- β -D-galactosyl-glycerol		"	0.29 ^a	"	5.20	3.6 (IIa)
2-O-d-D-glucosyl-1,3-di-O-methylglycerol		"	0.28 ^a	"	4.40	7.6 (IIa)
6-O-d-D-galactosyl-1-O- β -D-galactosylglycerol		"	0.67 ^a	367($M^+ - 175$), 307($M^+ - 235$), 219, 187, 163, 103, 101, 88	4.96	3.4 (IIa)
1,3-di-O-methylglycerol		"	0.19 ^b	88, 75, 71, 45	4.32	7.8 (IIa')
2,3-di-O-methylglycerol		"	0.37 ^b	89, 75, 58, 45		
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-d-D-glucoside	Alditol acetate	1.00 ^c		101 > 129 > 117 > 145 > 161		
" 2,3,4-tri- "		"	2.49 ^c	117 > 101 > 129 > 87 > 161		
" 2,3,6-tri- "		"	2.51 ^c	117 > 99 > 113 > 101 > 233		
" 2,4,6-tri- "		"	1.96 ^c	117 > 129 > 161 > 101 > 159		
" 3,4,6-tri- "		"	1.99 ^c	129 > 87 > 161 > 99 > 187		
Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-d-D-galactoside		"	1.25 ^c	101 > 129 > 117 > 145 > 161		
" 2,3,4-tri- "		"	3.42 ^c	117 > 101 > 129 > 87 > 161		
" 2,4,6-tri- "		"	2.42 ^c	117 > 129 > 161 > 101 > 159		
" 3,4,6-tri- "		"	2.51 ^c	129 > 87 > 161 > 99 > 187		

a: Relative to the mobility of permethylated vanillyl- β -D-celllobioside (1.00)

b: Relative to the mobility of d-methyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucoside (1.00)

c: Relative to the mobility of 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol (1.00)

の糖類は少糖類の標準試料として用いた。

IV-2-3-2 少糖類の単離

三河湾の海水10Lを活性炭カラム(=4ml/分)の速度で通水した。通水後、少量の水(100ml)を流して残留する無機塩を除去した。これに、50%エタノール750mlを通水して糖類を溶出した。得られた糖類は、後述するHakomori(1964)の方法でメチル化をしてメチル化糖に変えた。これを、ベンゼン-エタノール-水-アソニモニアを展開溶媒とした薄層クロマトグラフィ(TLC)に供した。3回展開をくり返して糖類を分離した後、ヨウ素蒸気にさらし、生じた黄色スポットをスパチュラでかきとった。これを、メタノール(10ml, 3回)で抽出して糖類を得た。

IV-2-3-3 少糖類のメチル化

糖類試料(500 μ g以下)は窒素気流中でジメチルスルfonyルシートによく溶解させた後、ジメチルスルfonyルカルバニオン(320 μ mol)を加え、室温、3時間反応させた。反応後、ヨ

ウ化メチル ($300\mu\text{mol}$) を加え室温で30分間かくはんした。次に、冰水 (4ml) を加え反応を停止した後、クロロホルム (5ml, 3回) を加えメチル化糖を抽出した。抽出物は、少量の水 ($15\text{ml} \times 3$) で洗った後、蒸発乾固した。

IV-2-3-4 少糖類の部分メチル化アルジトールアセテート

メチル化した少糖類は、0.5M の硫酸で 100°C , 10時間処理して加水分解し、遊離の单糖類とした。加水分解液は飽和水酸化バリウムで中和し、生ずる硫酸バリウムを除去した後、 NaBH_4 を加えてメチル化糖を糖アルコールに還元した。得られた糖アルコールを IV-2-3 の方法でアセチル化し、部分メチル化糖アルコールの酢酸エステルを得た。

IV-2-3-5 少糖類のメタノリシス

メチル化少糖類を 5% メタノール-塩化水素で 6 時間、 100°C で環流した。反応液を炭酸銀で中和し、生ずる塩化銀を除去した後、沪液を蒸発乾固した。

IV - 2 - 4 多糖類の分析法

IV - 2 - 4 - 1 カラムクロマトグラフィ

セフス デックス G-150 およびセフスロース CL-4B は、使用前に 0.05M 塩化ナトリウムと 0.05M リン酸水素二ナトリウムの混合溶液に懸濁させて一晩放置した。これを、長さ 100 cm、内径 16 mm のガラスカラムに詰めた後、上記の溶媒を一晩通水した。少量の水に溶かした多糖類試料をカラムのゲルの上層に加え、充てん剤に吸着させた。このカラムに溶媒を 20 ~ 30 ml/時の速度で流すことにより、多糖類を溶出した。各カラムの分子量検定は、ゲルコース、ラミナラン、デキストラント T-70 (分子量 70,000) および T-50 (500,000) を用いておこなった。

カラムからの溶出液はフラクションコレクターで分取した。溶出液中の炭水化物、アミノ酸タンパク質、有機炭素は、それで Handa (1966b), Menzel and Vaccaro (1964), Udenfriend et al. (1972) の方法により測定した。

IV-ス-4-2 多糖類の単離

海水試料 10g から濃縮・分離した分子量 4,000 以上の多糖類をセフ3 デックス G-150 カラムにより分子量分画した。カラムの溶出液中の糖類のピーク画分を集め、減圧濃縮し、少量にした。これをビスキシングチューブに入れ、24時間透析をして無機塩を取り除いた。透析後、エタノールを 1 容もしくはエタノール : アセトン (1:4容) を加えて、24時間 2°C で放置し多糖類を沈殿させた。沈殿物は、エタノール、酢酸エチル、エチルエーテルを順に用い、洗浄した。洗浄物は、五酸化ニリンの存在下でデシケーター内で乾燥させた。

IV-ス-4-3 酸性多糖類の分離

酸性多糖類は Teller et al. (1962) の方法によつて中性多糖類から分離した。試料(約 100 μg)を 1.0 ml の純水に溶解した。これに、5% セタブロン 6 μl を加えて 2°C, 24時間放置した。生成した沈殿物は、3000 rpm, 15 分間の遠心分離により上澄みから分離した。

この沈殿物に塩化ナトリウムで飽和した 95% エタノール 1.5 ml を加えてよく洗浄した。洗浄液は遠心分離により捨てた。この操作を 3 回くり返した。エタノールに不溶な残渣は、アセトン、酢酸乙チル、エチルエーテルの順に洗浄した後、五酸化ニリノの存在下デシケーター中で乾燥した。得られた多糖類はフェノール硫酸法によりその量を測定した。

IV-2-4-4 多糖類の単糖類組成

多糖類 ($100\text{ }\mu\text{g}$) を 0.5M の硫酸 5 ml に溶解し、 100°C 、10 時間加水分解した。加水分解物は水酸化バリウムおよび炭酸バリウムにより中和した。生成した沈殿物は、3000 rpm、15 分間の遠心分離により除去して上澄み液を得た。これを少量に減圧濃縮した後、 NaBH_4 により糖類を還元し糖アルコールに変えた。糖アルコール体はさるに IV-2-3 の方法でそのアセチル化物とした。

IV-2-4-5 多糖類のメチル化分析

多糖類のメチル化分析の概要を Fig. 8 に示す。

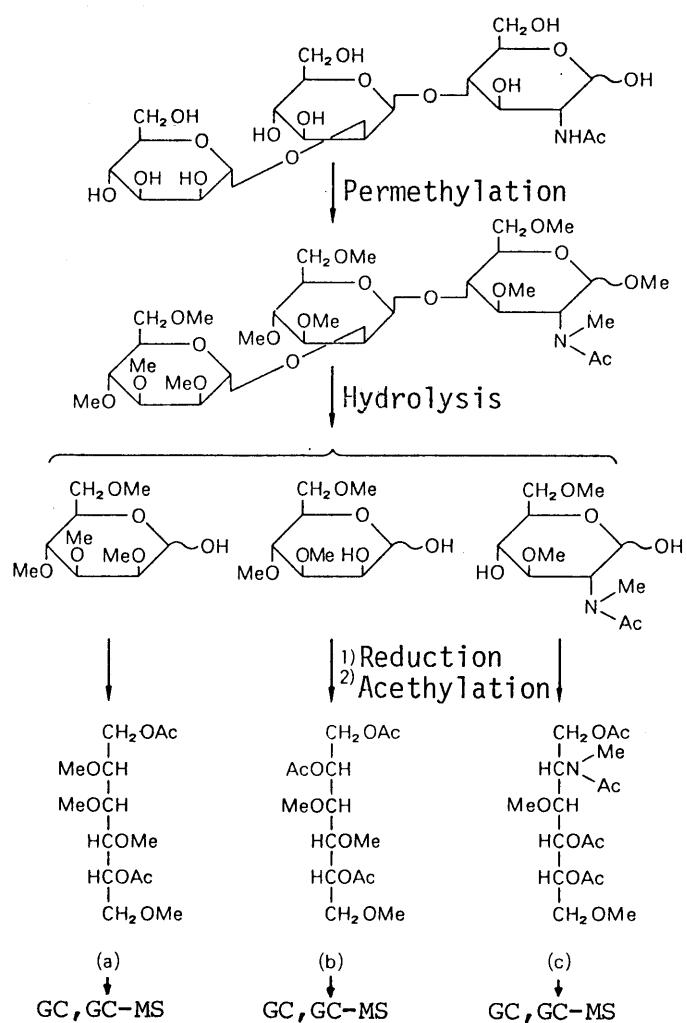


Fig. 8 Methylation study of polysaccharide isolated from the water sample

す。すなわち、小量の水に溶解した多糖類試料に 1% NaBH₄ を加えて室温で一晩放置し、還元末端を糖アルコールに変換した。この糖アルコールを IV-2-3-2 で述べたメチル化の方法でメチル化物に変えた。この操作を 3 回くり返し、完全メチル化多糖類を得た。これをクロロホルムで抽出した後、抽出物を蒸発乾固した。これに 0.5M 硫酸を加え、10 時間 100°C で環流した。加水分解物は、中和した後 NaBH₄ により糖アルコールに変換した。この糖アルコールをアセチル化をして部分メチル化アルジトールアセテートを得た。

IV-2-5 GC および GC-MS

ガスクロマトグラフはパックカラム (ECNSS-M, OV-17, PEG-20M) 分析用に柳本 G-180 を、細管カラム (SE-52, OV-1701) 分析用に島津 GC-9A を用いた。各種の糖類誘導体の GC の分析条件を Table 5 に示す。ガスクロマトグラフの注入部および検出部の温度は 250°C および 300°C であった。

Table 5 Gas chromatographic conditions of several sugar derivatives

Compound analyzed	Column used	Temperature program	Carrier gas (N_2) flow rate (ml/min)
Alditol acetate	3% ECNSS-M (Gas chrom Q)	120-210°C, 2°C/min	17
Partially methylated alditol acetate	3% ECNSS-M (Gas chrom Q)	170°C	22
	SE-52 (FS-WCOT) ^a	140-275°C, 2°C/min	0.55
	OV-1701 (FS-WCOT) ^a	140-280°C, 2°C/min	0.66
Permethylated oligosaccharide	3% OV-17 (Chromosorb W)	120-280°C, 5°C/min	30
	SE-52 (FS-WCOT)	140-275°C, 2°C/min	0.55
	OV-1701 (FS-WCOT)	140-280°C, 2°C/min	0.66
	5% PEG-20M (Chromosorb W)	60-180°C, 5°C/min	25

^a: SE-52 and OV-1701 columns are fused silica wall coated open tubular columns (length 25 m x i.d. 0.35 mm).

分離した糖類は、水素炎イオン化法により検出した。細管カラム分析の場合、溶媒カット注入システム（島津）を用いて、試料をガスクロマトグラフに注入した。また、検出した糖類の同定と定量はクロマトパック（島津）によった。

糖類の同定は、ガスクロマトグラフ-質量分析計（日本電子、JMS-D300）およびこれと結合したマスデータ分析システム（日本電子 JMA-Z000）そして MS-DK400s ディスクシステム（日本電子）によりおこなった。電子衝撃 (EI) 法および化学イオン化 (CI) 法の二つの方法を用いた。分析条件は、EI 法の場合 イオン化電圧、20 V; イオン化電流、 $300\mu\text{A}$; イオン化室温度、 250°C ; CI 法の場合は反応ガス、アンモニアもしくはイソブタン; イオン化室圧力、1 torr; イオン化電圧、200 V; イオン化電流、 $300\mu\text{A}$; イオン化室温度、 250°C であった。

IV-2-6 $^1\text{H-NMR}$

メチル化糖類の¹H-NMRスペクトルはWM360スペクトロメーター(360MHz, Brucker社)により測定した。重クロロホルムに溶解した糖類試料(50~200μg)を直径5mmのサンプル管に入れた。これに少量のテトラメチルシラン溶液を内部標準物質として加えた後、試料を分析した。測定はフーリエ変換法によりおこなった。スキャンは2秒/回である、1,000~10,000回積算をした。糖類分子内のメチンおよびメチレン基のプロトンの位置を決定するためには、それらのプロトンのデカーパリング操作をおこなった。

IV-2-7 赤外吸収法(IR)

糖類試料(50μg)のIRスペクトルは、日本分光の302型赤外分光光度計により得た。試料を少量(2mg)の臭化カリウム(KBr)とともにすりつぶし、直徑が2mmの鉛剤に詰めてその赤外吸収スペクトルを測定した。

IV-2-8 化学分析

糖類のウロノ酸残基の測定は、Blumenkrantz

and Asboe-Hansen (1973) の方法によった。ウロコン酸の量は、あらかじめ得られているグルコロン酸の検量線から求めた。

IV-3 結果

IV-3-1 三河湾の溶存炭水化物の分析結果

IV-3-1-1 単糖類

三河湾の1m層水の単糖類のマスクロマトグラムを Fig. 9 に示す。m/z 308, 394, 380, 452 のピークはそれぞれテトリトートル, 6-デオキシヘキシトール, ペンキトール, ヘキシトールの酸酸エステル誘導体の疑似分子イオン $[M + NH_4]^+$ に相当する。

ピ-ク6の化合物のEIマススペクトルを Fig. 10 に示す。単糖類のアルジトールアセテートの特徴的なフラグメントイオン, m/z 43, 73, 85, 97, 103, 115, 139, 145, 157, 170, 175, 187, 199, 212, 217 が検出された。これらのおよびに続く酢酸分子

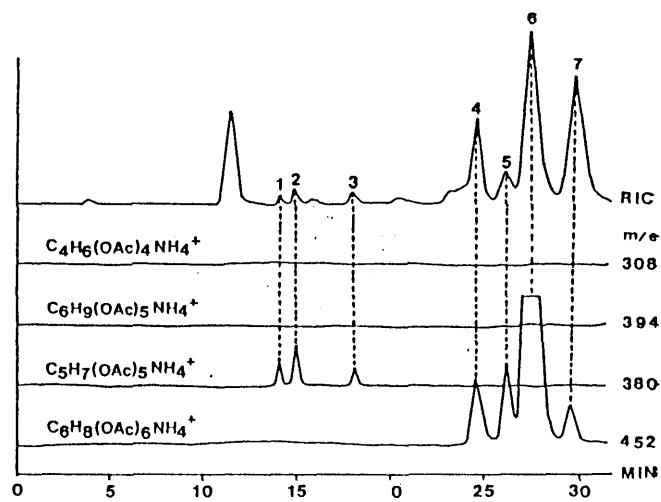


Fig. 9 Mass chromatograms of tetritol, deoxyhexitol, pentitol and hexitol peracetates- NH_4^+ .
1: ribitol, 2: arabitol, 3: xylitol, 4: mannitol,
5: galactitol, 6: glucitol, and 7: inositol (internal standard). RIC: Reconstructed ion chromatogram.

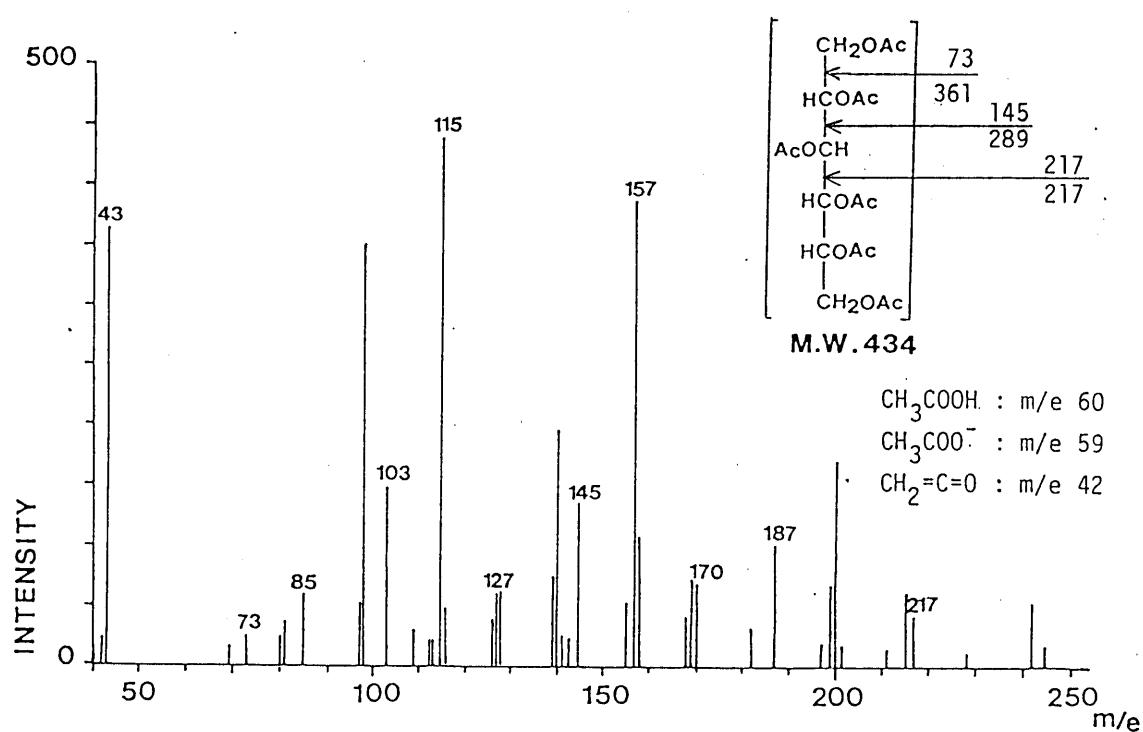


Fig.10 EI mass spectrum and the fragmentation pattern of glucitol acetate

(m/z 60), 酢酸イオン(m/z 59), ケテンイオン(m/z 42)の脱離により生成する(Golovkina et al., 1966)。たとえば, m/z 217 のイオンは第3位と第4位の炭素間の炭素-炭素結合が切断して生成する。これらのフラグメントイオンの相対強度は標準試料の糖類のそれとよく一致した。したがって, GCにおける保持時間, 分子量およびEIマススペクトルにおけるフラグメントパターンから, ピーク1~6の化合物はそれぞれリボース, キシロース, マンノース, ガラクトースおよびグルコースのアルジトールアセテートであると同定した。

IV-3-1-2 少糖類

少糖類画分のガスクロマトグラムをFig.11に示す。検出したピークの化合物を分析した結果以下のことがわかった。

ラミナリビオースおよびラミナリトリオース化合物4, 5および8, 9の化合物のGCの保持時間は、標準試料のラミナリビオース

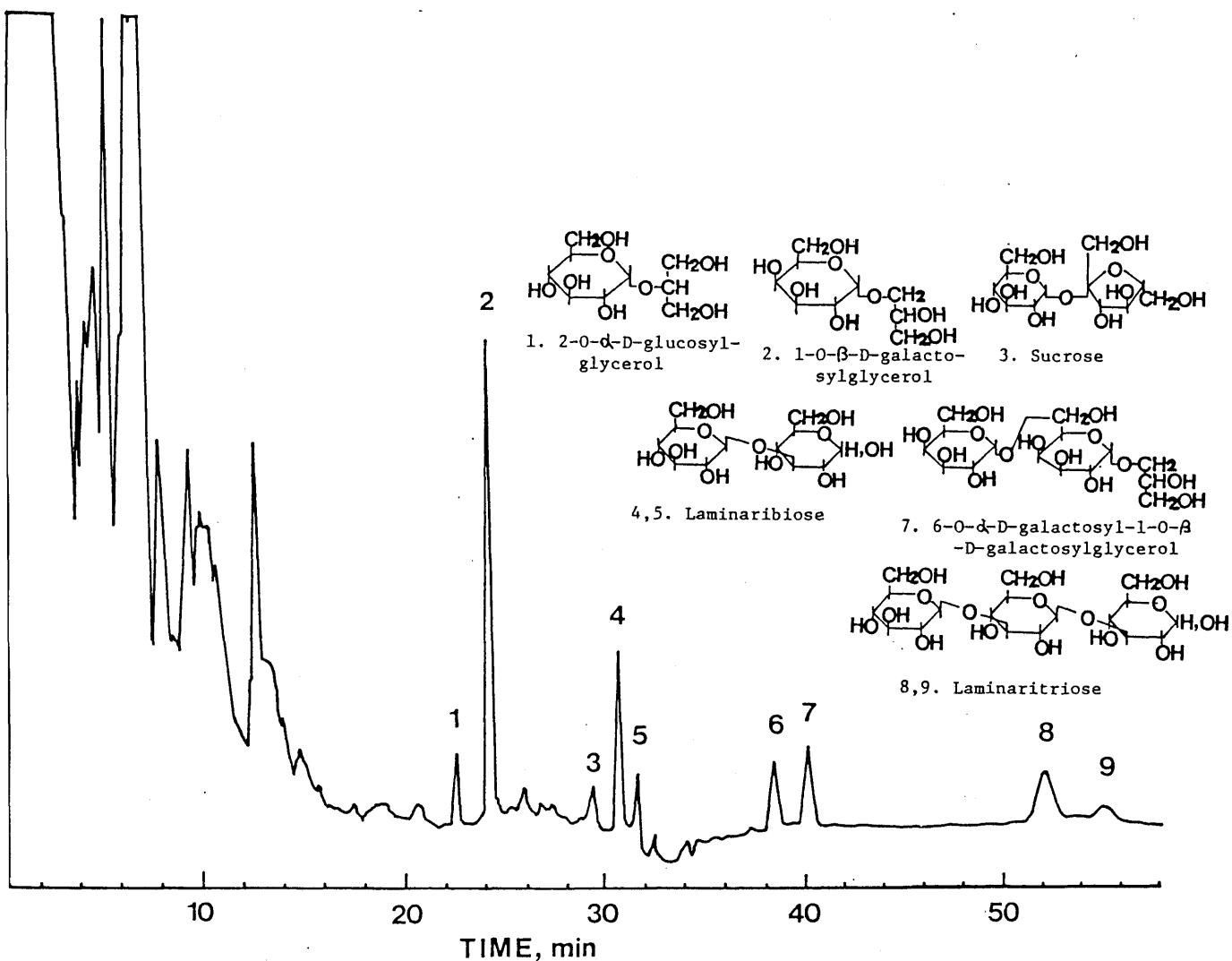


fig.11 Gas chromatogram and chemical structures of permethylated derivatives of low molecular weight carbohydrates separated from the depth of 1 m in Mikawa Bay.

およびテミナリトリオスのみおよび β 異性体のそれと良く一致した。

化合物4, 5の分子量はともに434であること(Table 6), またヘキソース2個からなる2糖類のメチル化物に特徴的なフラグメントイオン (m/z 422, 353, 321, 305 (de Jong et al., 1979) が存在することがわかった(Fig. 12)。 m/z 279, 219, 187, 159, 155, 127, 101, 88, 75 のイオンは, 分子イオンからビラニシル基の開裂, 酢酸分子, メタノール基(m/z 32)などの脱離により生成すると考えられる。フラグメントパターンをFig. 13に示す。一方, m/z 145, 155, 159 のイオンの相対強度は, ヘキソース2個からなる2糖類の結合様式を解明する貴重な鍵となる情報を与えてくれる(Table 7)。化合物4, 5のこれらのおよびのイオンの相対強度を種々の結合様式を持つグルコースの2糖類と比較した結果, これらの化合物は(1→3)結合を持つ2糖類であることを強く示唆した。一方, メチル化

Table 6 GC, GC-MS and ^1H -NMR analyses of compound 4,5,8 and 9

Compounds	Retention time ^a	Molecular ion, M ⁺ m/z	Anomeric protons		Data of constituents	
			Chemical shift ppm	Coupling constant Hz	Constituents assigned ^b	Mol. ratio
4	0.48	454	4.67 4.13	7.8(Ha) 7.8(Ha')	2,3,4,6-tetra-O-methyl- D-glucose 2,4,6-tri-O-methyl- D-glucose	1.00 0.96
5	0.51	454	4.67 4.81	7.8(Ha) 3.4(Ha')	2,3,4,6-tetra-O-methyl- D-glucose 2,4,6-tri-O-methyl- D-glucose	1.00 0.94
8	0.88	658	4.67 4.66 4.12	7.8(Ha) 7.8(Ha') 7.6(Ha")	2,3,4,6-tetra-O-methyl- D-glucose 2,4,6-tri-O-methyl- D-glucose	1.00 2.20
9	0.93	658	4.68 4.67 4.82	7.8(Ha) 7.8(Ha') 3.2(Ha")	2,3,4,6-tetra-O-methyl- D-glucose 2,4,6-tri-O-methyl- D-glucose	1.00 2.30

a: Relative to the mobility of permethylated vanillyl- β -D-celllobioside (1.00)

b: Constituents (partially methylated hexoses) were converted to partially methylated alditol acetates for GC and GC-MS analyses

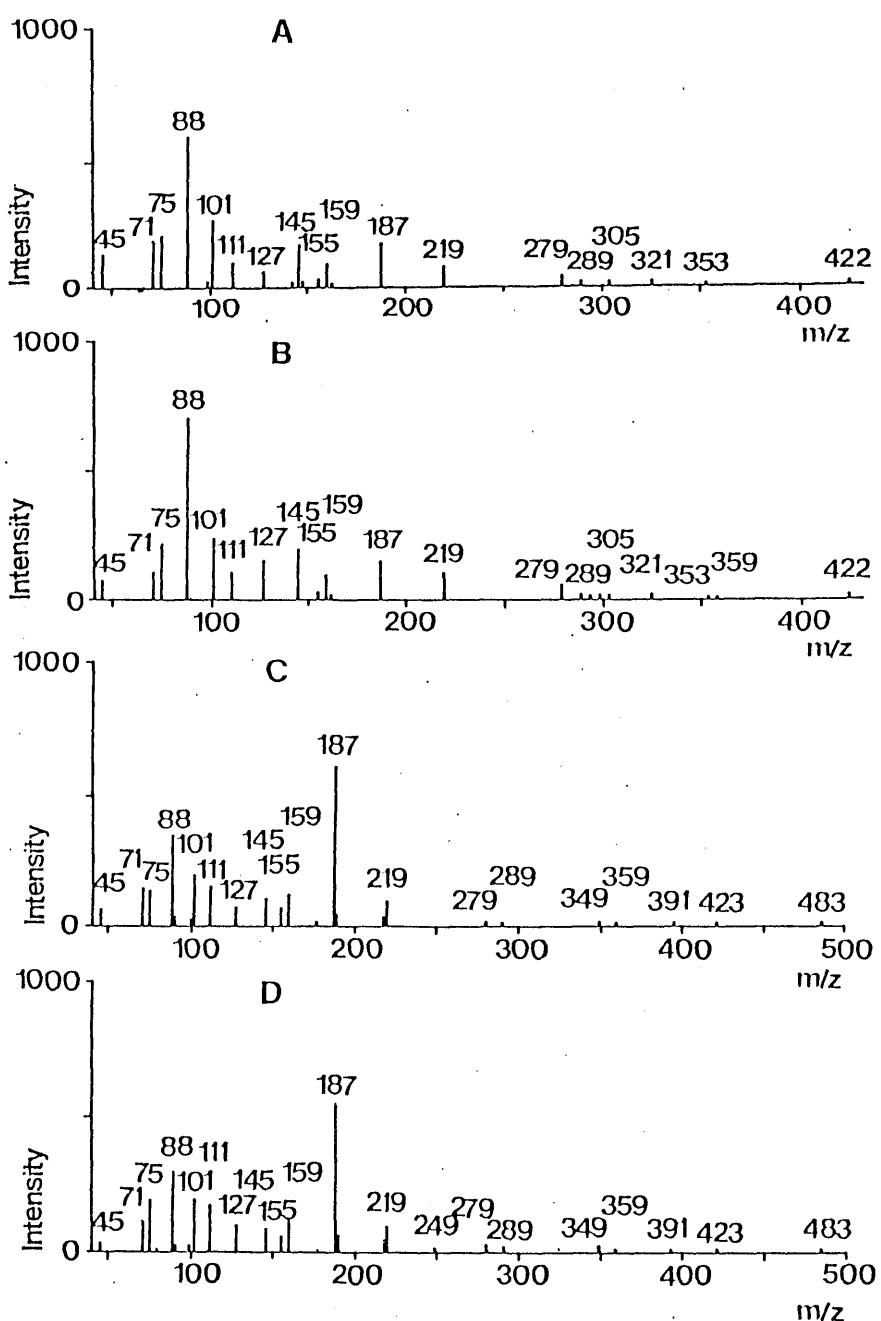


Fig.12 EI mass spectra of the compounds 4 (A), 5 (B), 8 (C) and 9 (D)

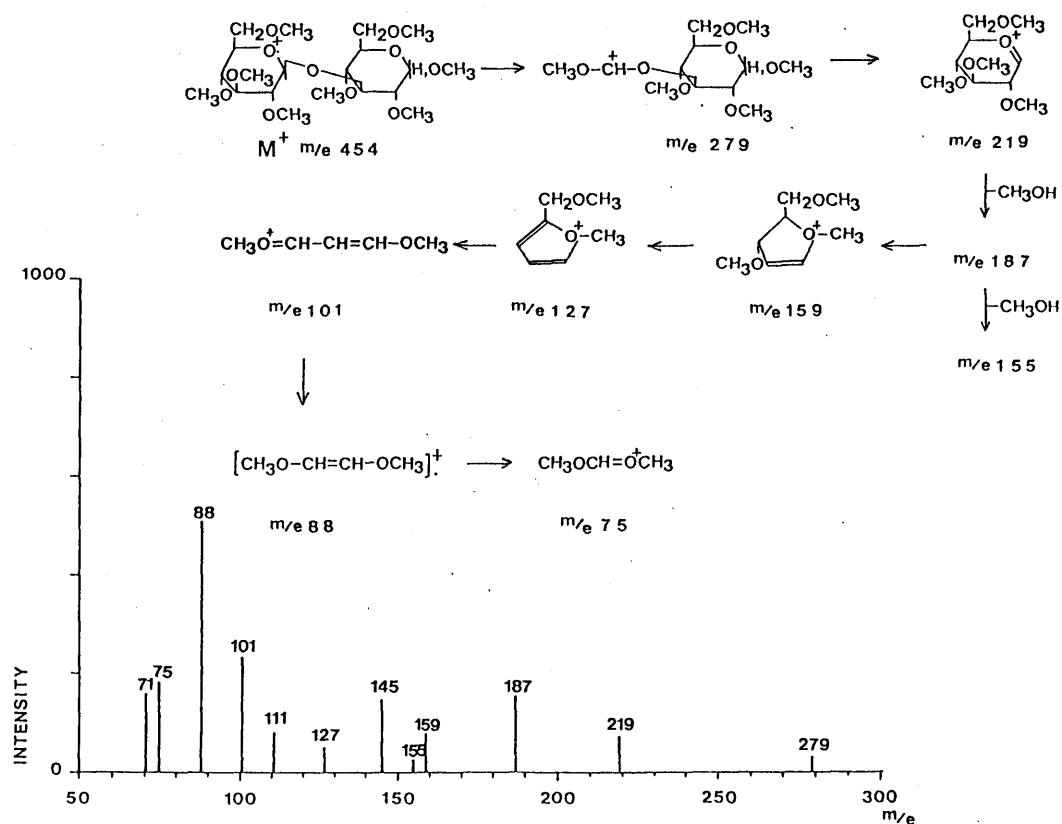


Fig.13 The fragmentation pattern of permethylated laminaribiose
(the compound 5 in Fig.11)

Table 7 The base peaks and relative intensities of the ions derived from the fragmentation of several permethylated di- and tri-saccharides and the compounds 4 and 5, 8 and 9

	Base peak m/z	Relative intensities		
		m/z 145	m/z 155	m/z 159
<u>Oligosaccharides</u>				
β -D-Glc-(1-1)-D-Glc (Trehalose)	101	500	999	100
β -D-Glc-(1-2)-D-Glc (Sophorose) ^a	88	137	226	100
β -D-Glc-(1-3)-D-Glc (Laminaribiose)	88	155	23	100
β -D-Glc-(1-4)-D-Glc (Celllobiose)	88	397	390	100
α -D-Glc-(1-6)-D-Glc (Isomaltose)	88	292	241	100
β -D-Glc-(1-6)-D-Glc (Gentiobiose)	88	254	163	100
Compound 4	88	152	23	100
Compound 5	88	146	11	100
β -D-Glc-(1-2)- β -D-Glc-(1-2)-D-Glc ^b	88	166	399	100
β -D-Glc-(1-3)- β -D-Glc-(1-3)-D-Glc (Laminaritriose)	187	69	31	100
α -D-Glc-(1-4)- α -D-Glc-(1-4)-D-Glc (Maltotriose)	88	65	350	100
β -D-Glc-(1-4)- β -D-Glc-(1-4)-D-Glc (Cellotriose)	88	85	417	100
β -D-Glc-(1-6)- β -D-Glc-(1-6)-D-Glc (Gentiotriose)	88	200	450	100
Compound 8	187	58	45	100
Compound 9	187	57	27	100

a: DE JONG et al. (1979)

b: KÄRKÄINEN (1971)

糖の分析結果はこれらの中の糖のメチル誘導体が
 $\alpha, 3, 4, 6$ -tetra-O-methylglucose と $\alpha, 4, 6$ -tri-
O-methylglucose から構成されていることを示
した。したがって、これらの化合物は 2 個の
グルコースが ($1 \rightarrow 3$) 結合をした二糖類で
あることを確認した。

4, 5 の化合物の立体構造を $^1\text{H-NMR}$ に
より調べた。一般に糖のピラノース構造で 1
位の炭素の H 原子 (アノメリックプロトン, H_a ,
Fig. 16 参照) のシグナルの化学シフト (単位
は ppm) および結合定数 (Hz) は、糖のグリ
コシド結合を知る上で重要である。二糖類の
メチル誘導体の場合、 α -型の二糖類の化学
シフトおよび結合定数は $4.9 \sim 5.5$ ppm, 2.5
 ~ 4.0 Hz であるのにに対し、 β -型のそれは
 $4.2 \sim 4.7$ ppm, $6.0 \sim 8.0$ Hz であることが
知られてる (Haverkamp et al., 1974). 化
合物 4 の還元末端のグルコースのアノメリッ
クプロトン ($\text{H}_{a'}$) の化学シフトおよび結合定
数は 4.13 ppm, 7.8 Hz であるのにに対し、化合物

5のそれは 4.81 ppm , 3.4 Hz であった。さらに、これらの値は標準試料のテミナリビオースの β および α 異性体のそれとよく一致した。故に、化合物4および5は β -D-ミナリビオース、 α -D-ミナリビオースのメチル誘導体であると同定した。

化合物8, 9のCIおよびEIスペクトルを測定した結果、これらの化合物の分子量が658であること、メチル化糖類に特徴的なフラグメントイオンが検出されたことより、ヘキソース3個から成了3糖類であることを示唆した(Table 6, Fig. 12)。化合物4, 5と同様に、(1 \rightarrow 3)結合の3糖類は、他の結合様式の3糖類とそのベースピーク(最大強度のフラグメントイオン)およびm/z 145, 155, 159の相対強度比によって識別可能である(Table 7)。メチル化糖類の分析結果は、これら5の化合物が $\alpha, 3, 4, 6$ -tetra-O-methyl glucoseと $\alpha, 4, 6$ -tri-O-methyl glucoseがモル比で1:2の割合で構成されていることを示した。さら

に、¹H-NMRの測定結果は、化合物8, 9がそれぞれ β -型、 α -型の異性体であることを示した。以上の結果から、化合物8, 9はそれぞれ β -ラミナリトリオース、 α -ラミナリトリオースであると同定した。

グリコシルグリセロール

化合物1, 2の分子イオンはm/z 542であり(Table 8), またメチル化糖に特徴的なイオン、m/z 45, 75, 88(ベースピーク), 101, 187, 219のほかにm/z 103, 163のイオンが存在した(Fig. 14)。この二つのイオンはフラグメントのパターンから判断して、分子イオンよりヘキソース部分が脱離し, さらにこれから酢酸分子が脱離して生成したと推定される(Fig. 15参照)。この開裂の様式は、一般に少糖類の糖アルコールのそれと類似している(Lönnqvist and Svensson, 1974)。

化合物7の分子イオンはm/z 542であり、またm/z 103, 163, 307, 367の特徴的なフラグメントイオンが存在した(Fig. 14)。m/z

Table 8 GC and GC-MS analyses of compound 1,2,6 and 7

Compounds	Retention time ^a	Molecular ion, M ⁺ m/z	Data of constituents		Mol. ratio
			Constituents assigned		
1	0.28	338	2,3,4,6-tetra-O-methyl-	1.00	
			D-glucose ^b		
2	0.33	338	1,3-di-O-methylglycerol	0.87	
			2,3,4,6-tetra-O-methyl-		
6	0.62	556	D-galactose ^b	1.00	
			not analyzed		
7	0.67	542	2,3,4,6-tetra-O-methyl-	0.96	
			D-galactose ^b		
			2,3,4-tri-O-methyl-		
			D-galactose ^b		
			2,3-di-O-methylglycerol	0.84	

a: Relative to the mobility of permethylated vanillyl- β -D-celllobioside (1.00)

b: Partially methylated hexoses were converted to partially methylated alditol acetates for GC and GC-MS analyses

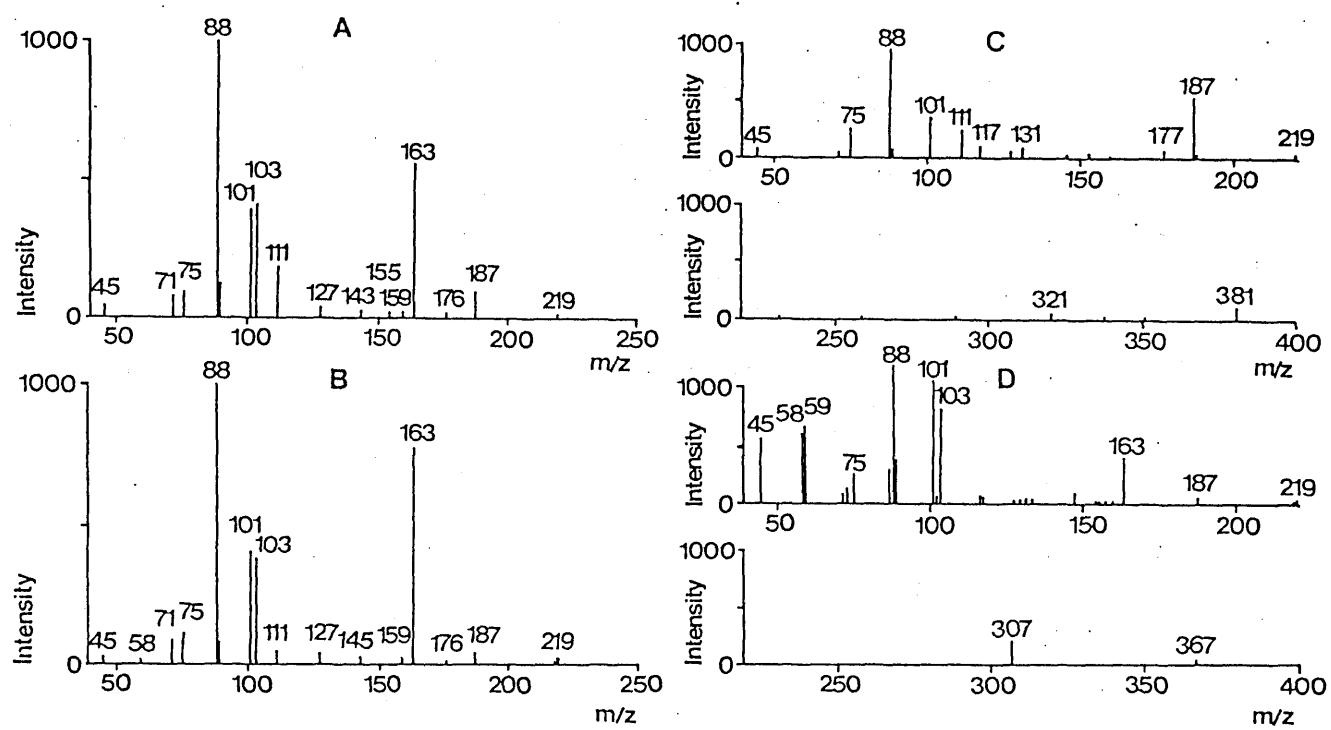


Fig.14 EI mass spectra of the compounds 1 (A), 2 (B), 6 (C) and 7 (D).

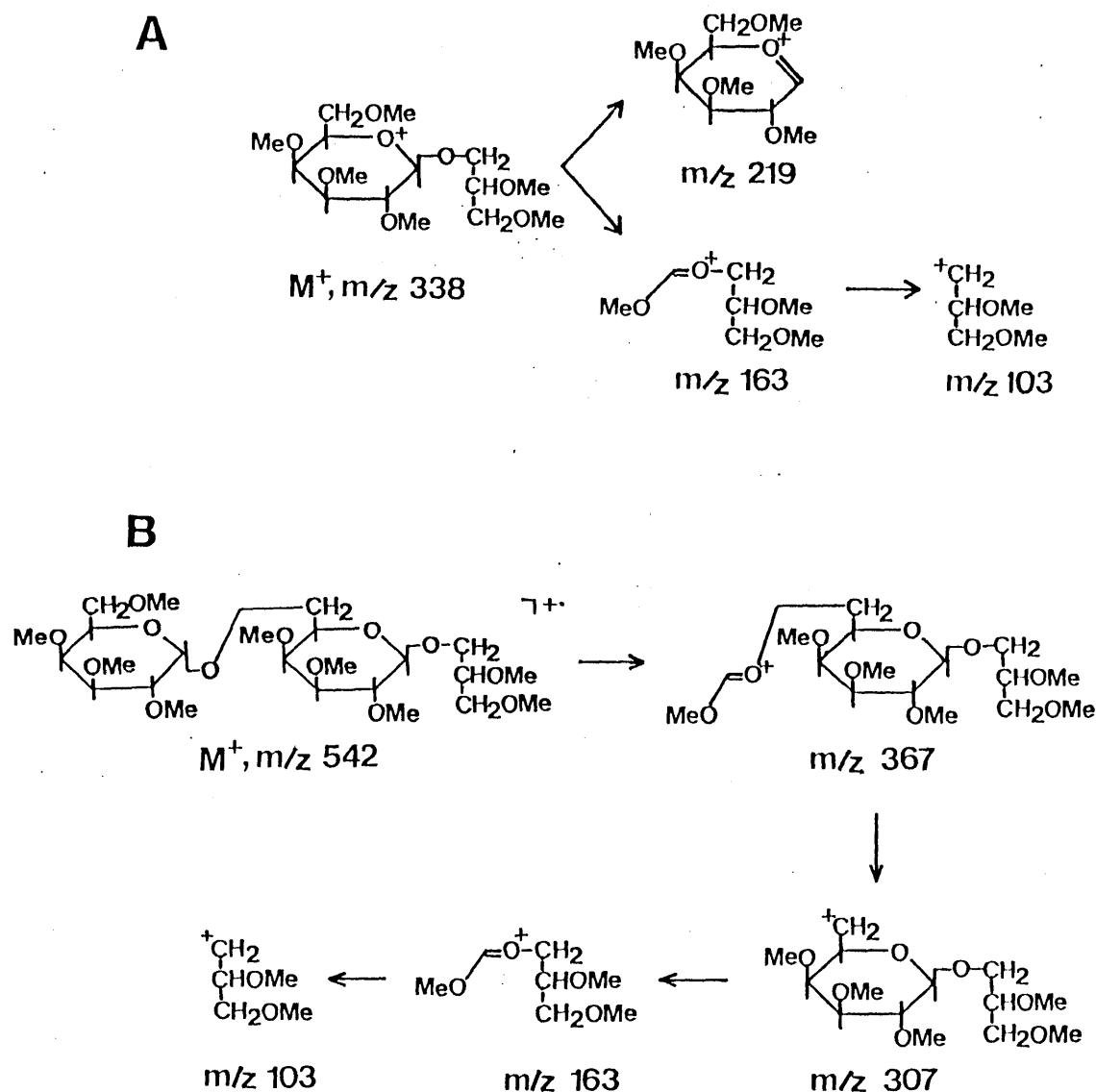


Fig. 15

Mass fragmentation patterns of the compound 2 (permethyl ether of 1-O- β -D-galactopyranosylglycerol, A) and the compound 7 (permethyl ether of 6-O- α -D-galactopyranosyl-1-O- β -D-galactopyranosylglycerol, B).

m/z 367 のイオンは、分子イオンから 1 個のヘキソースが脱離して生成し、 m/z 307 はこのイオンより酢酸分子が脱離したものであると考えられる (Fig. 15)。 m/z 307 のイオンは、さらに化合物 1, 2 と同様の過程をへて、163, 103 のイオンに断片化されたと推定される。

これらの化合物をメタノリシスした結果、グリセリンと種々のグリコシドが生成した。さらに、部分メチル化糖類を分析した結果、化合物 1 はグリセリンとグルコースが結合した物質——すなわち、グルコシルグリセロール、2 はガラクトシルグリセロール、7 はジガラクトシルグリセロールのそれぞれメチル誘導体であることがわかった。

化合物 2 の 1H -NMR を測定した結果、3 ノメリックプロトン (Fig. 16 の H_a) は他の H 原子のシグナルよりも低磁場にシフトして H_b 原子と結合した二重線として現われた。その化学シフトおよび結合定数は 4.22 ppm, 7.8 Hz であり、これは β -型の異性体であ

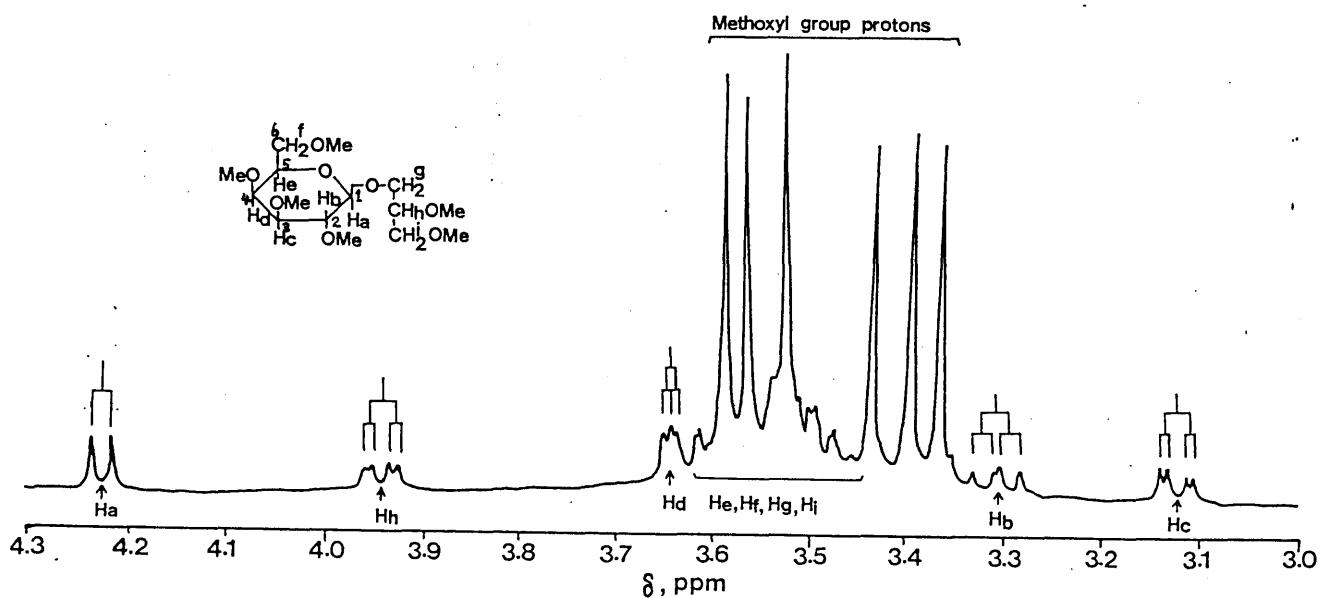


Fig.16

^1H -NMR spectrum (360 MHz) of the compound 2 (permethyl ether of 1-O- β -D-galactopyranosylglycerol) isolated from the depth of 1 m. The spectrum was obtained by the fourie transform mode, 1550 scans with a recycle time of 2.0 sec. Locations of anomeric proton (H_a) and other methyne and methylene protons (H_b - H_i) were assigned with decoupling of each of these protons.

ることを強く示唆する。実際、これらの中は
 α -型の異性体であるイソフロリトシトのそれが 5.00 ppm, 3.9 Hz であることと異なり,
逆に β -型の異性体である 1-O- β -D-ガラクトビドラクシルグリセロールのそれとよく一致した。化合物 1 は、合成した 2-O- α -D-ガラクトビドラクシルグリセロールと、7 は 6-O- α -D-ガラクトビドラクシルグリセロールとそれぞれ GC の保持時間がそれでよく一致した。

化合物 6 の分子イオンは m/z 556 であり、また m/z 117, 177, 321, 381 の特徴的なフラグメントイオンが検出された (Fig. 14)。これらの中のイオンは、いずれも化合物 7 のフラグメントイオン m/z 103, 163, 307, 367 より 14 マス単位大きい値であった。この結果は、この化合物はグリセリン部位の水酸基が 1 個カルボン酸に置きかわった化合物——すなわち、ジグリコシルグリセレートであると考えられる。しかし、得られた試料が微量だった

ため、これ以上の検討は不可能であった。したがって、この化合物の構造を完全に解明することはいたらなかった。

ショ糖およびラフィノース

化合物3のGCの相対保持時間は0.44であった。この化合物のCIおよびEIマススペクトルをFig. 17に示す。これらの結果は、化合物3がショ糖のメチル化物であることを示した。

6m層水よりラフィノースが検出された。そのCIおよびEIスペクトルをFig. 17に示す。

IV-3-1-3 分子量4,000以下の多糖類
この多糖類画分の単糖類組成を調べた結果、グルコースが1m層水の試料では61%，6m層水で54%を占めた。この結果は、この画分に何らかのグルカンが存在することを強く示唆した。しかし、試料が微量だったため詳細な分析はおこなわなかった。

IV-3-1-4 分子量4,000以上の多糖類

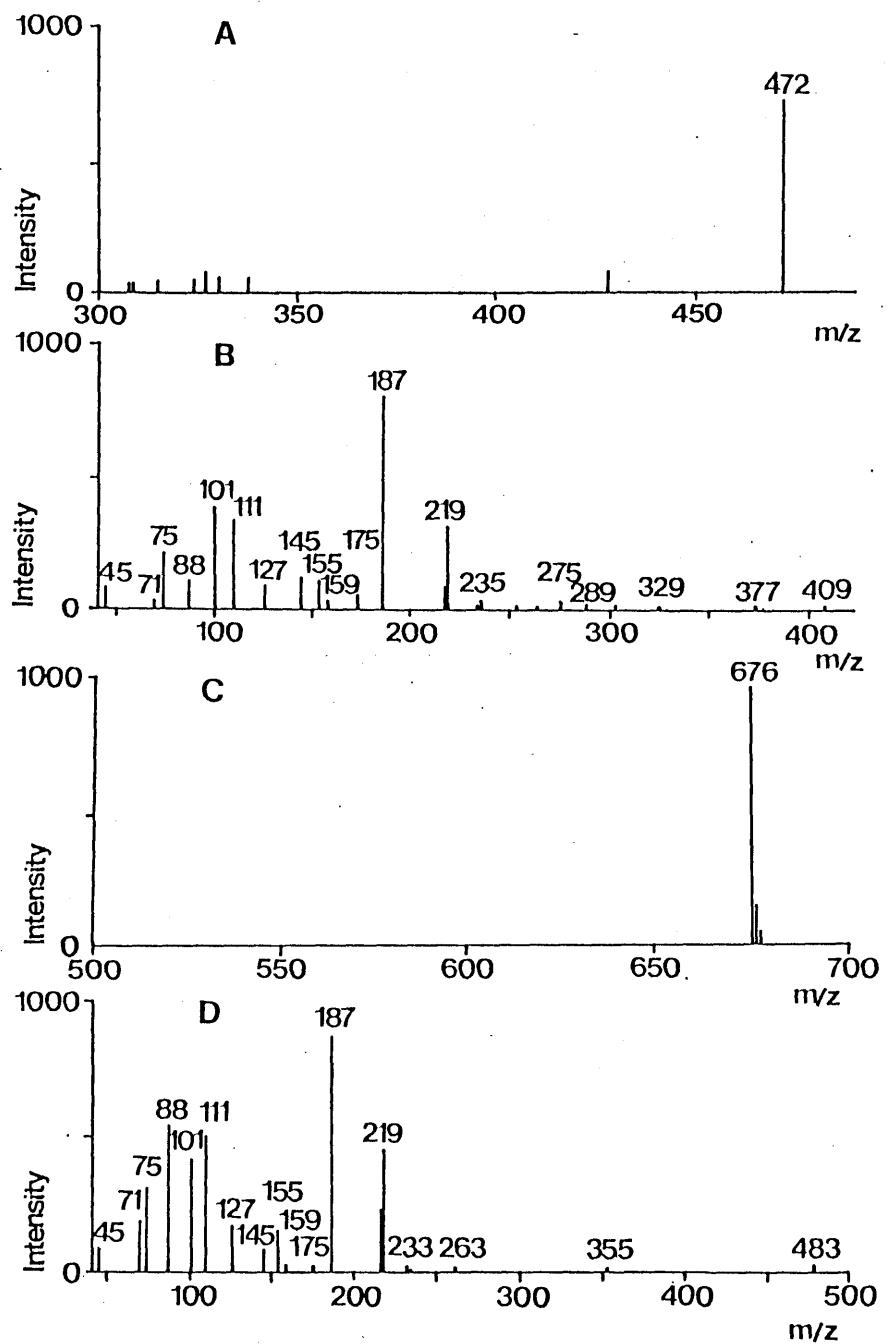


Fig.17 CI and EI mass spectra of the compound 3 (sucrose) and raffinose. Raffinose was identified in the water sample of the depth of 6 m in Mikawa Bay

1 ml オリビ 6 ml 層水の分子量 4,000 以上の多糖類のセフア デックス G-150 カラム溶出曲線を Fig. 18 に示す。各試水の多糖類試料はともにカラムの排除容量の画分（溶出量 45 - 100 ml）および低分子量画分（130 - 185 ml）に二つのピークが観察された。そこで、この二つのピークに相当する画分から多糖類を単離し、それが画分 A オリビ B または多糖類 A オリビ B とした。

多糖類 A

多糖類 A の分子量は 10^4 以上であったので、セフア デックス G-150 カラムによりその分子量を正確に測定することはできない。そこで、この多糖類 A を、分子量数万から数百万の多糖類の分画に適用されていきセフアロース CL-4B カラムにより分画した。その結果、多糖類 A はいくつかのピーク画分に分かれ（Fig. 19），单一のピークを与えるなかつた。そこで、このカラムの溶出液を溶出液 50 - 80 ml（画分 1），80 - 120 ml（画分 2），

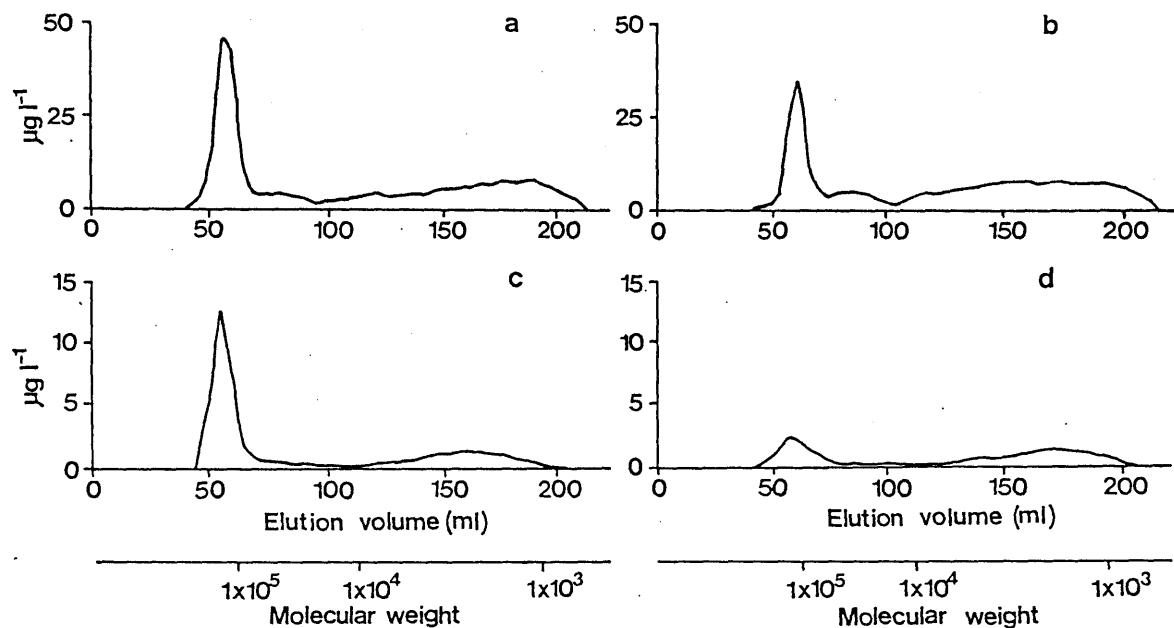


Fig.18

Sephadex G-150 column chromatograms of dissolved and particulate polysaccharides with M.W. $> 4,000$ which were separated from filtered seawater samples from the depths of 1 (a) and 6 m (b), and from the boiling water extract of particulate matter from depths of 1 (c) and 6 m (d) in Mikawa Bay. Carbohydrate content of each of the eluates (5 ml) was determined by the phenol sulfuric acid method.

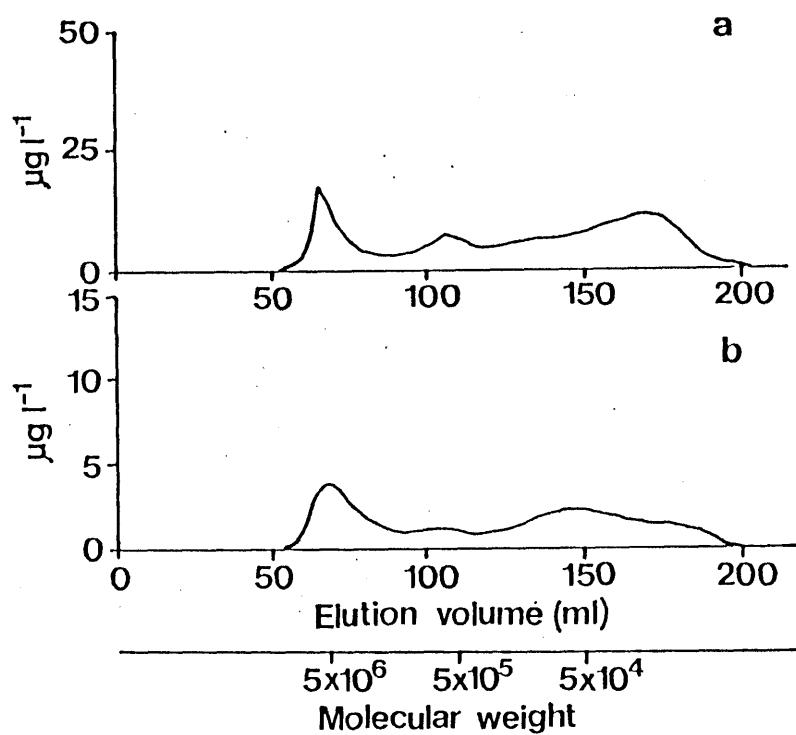


Fig.19

Sepharose CL-4B column chromatograms of dissolved and particulate polysaccharides A (a and b) separated from the depth of 1 m in Mikawa Bay. Carbohydrate content of each of the eluates (5 ml) was determined by the phenol sulfuric acid method.

120 - 200 ml (画1分3) に分画し、それぞれの画分の单糖類組成を決定した (Fig. 20)。各画分の多糖類はいずれも7種類の单糖類で構成されており、またそれらの相対モル比にも特に大きな差異は認められなかった。この結果は、多糖類Aが分子量の異なる幾つかのヘテロ多糖類から構成されていることを示唆した。

この多糖類Aは $1245 - 1235 \text{ cm}^{-1}$ に特徴的な赤外吸収を持つている (Fig. 21a)。

これは、おそらく硫酸エステルの S-O 基の伸縮振動によるものであり、したがってこの多糖類は硫酸エステル化糖を構成成分として持つと思われる。

多糖類Aのメチル化分析をおこない、構成单糖類間の結合様式を調べた (Table 9)。

グルコース もしくはマンノース、ガラクトース、キシロース、フコース、ラムノースのいずれぞれ tetra-, tri-, di-, mono-O-メチル化糖を検出した。この結果は、この多糖類が高度に

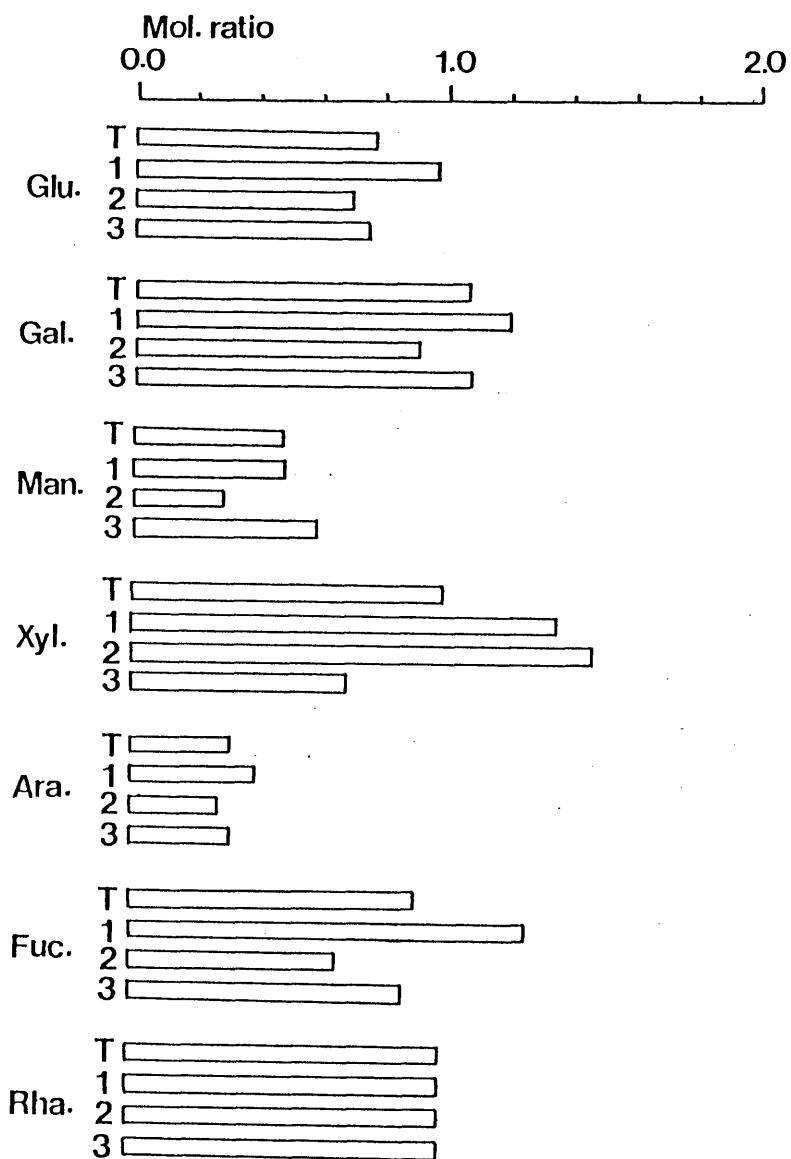


Fig. 20

Molar ratios of monomeric constituents of the dissolved polysaccharide A (T: total) from the depth of 1 m in Mikawa Bay, and of fractions 1 (elution volume, 50 - 80 ml), 2 (80 - 120 ml) and 3 (120 - 200 ml) in the eluates of the dissolved polysaccharide A from Sepharose CL-4B column. Molar ratio of each of the constituents was relative to rhamnose (1.00).

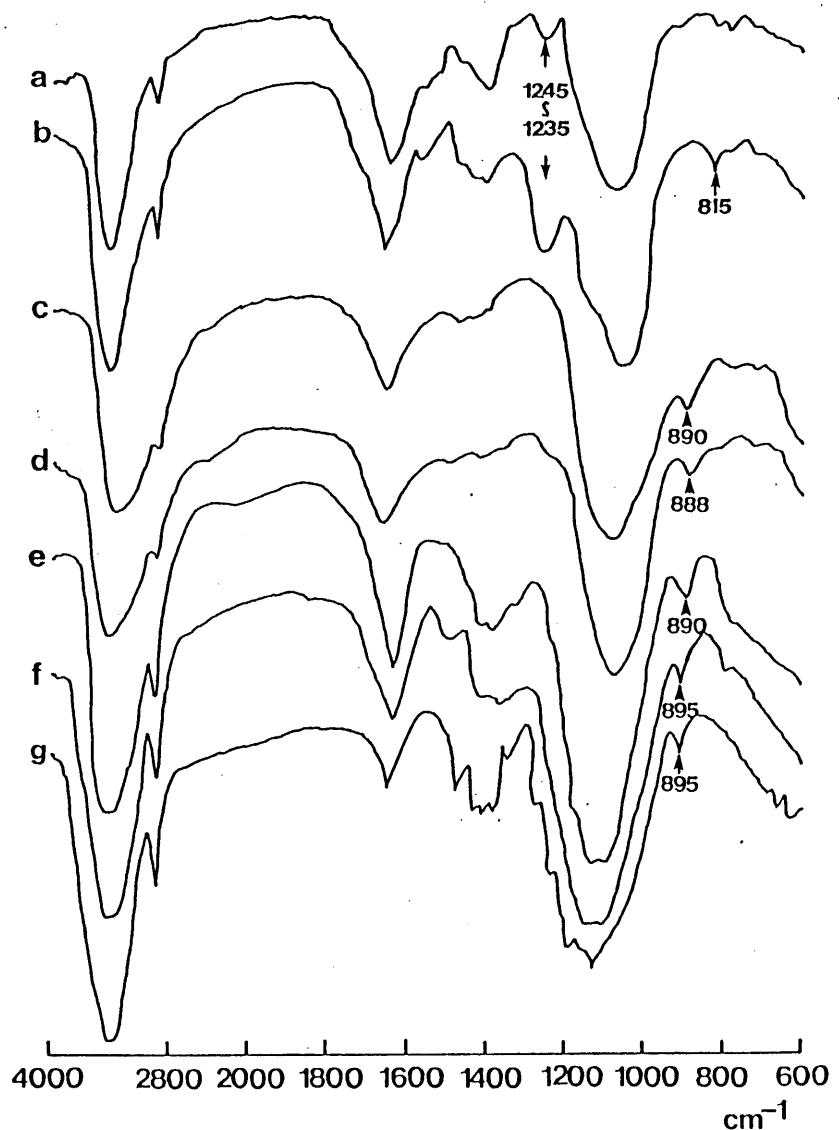


Fig. 21

IR spectra of dissolved and particulate polysaccharides isolated from the depth of 1 m in Mikawa Bay, and of authentic specimens of β -D-glucans.

a) - g) are a) dissolved polysaccharide A, b) particulate polysaccharide A, c) dissolved polysaccharide B, d) particulate polysaccharide B, e) laminaran isolated from Ecklonia cava, f) particulate polysaccharide G and g) cellulose (Toyo Roshi Kasei), respectively.

Table 9 Identifications and approximate percentages of methylated sugars from methylated dissolved and particulate polysaccharides A and B, and particulate polysaccharide G. Water samples was collected from 1 m depth of Mikawa Bay

Methyl sugars	Retention time*	Dissolved polysaccharide		Particulate polysaccharide		
		A	B	A	B	G
2,3,4-tri-O-methylrhamnose	0.45	+	-	+	tr.	-
2,3,4-tri-O-methylfucose	0.63	++	-	+	tr.	-
2,3,4-tri-O-methylxylose	0.64	++	tr.	+++	1.9	-
2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucose and/or -mannose	1.00	++	26.7	++	9.5	9.0
Di-O-methyldeoxyhexose	1.13	+	-	+	-	-
2,3,4,6-tetra-O-methyl-galactose	1.26	+	tr.	+	-	-
Di-O-methylpentose	1.38	+	tr.	+	-	-
Di-O-methylpentose	1.47	+	-	++	-	-
Mono-O-methyldeoxyhexose	1.67	+	-	+	-	-
2,4,6-tri-O-methylglucose	2.06	+	31.8	+	6.4	-
2,3,6-tri-O-methylmannose	2.24	+	-	-	-	-
2,3,6-tri-O-methylgalactose	2.46	++	-	+++	-	-
2,3,4-tri-O-methylglucose	2.56	-	25.1	-	tr.	-
2,3,6-tri-O-methylglucose	2.57	++	tr.	++	64.2	91.0
Mono-O-methylpentose	2.89	+	tr.	+	-	-
2,3,4-tri-O-methylgalactose	3.64	+	-	++	6.5	-
2,6-di-O-methylglucose	4.03	+	-	+	-	-
2,4-di-O-methylglucose	5.48	-	16.4	-	tr.	-
Di-O-methylglucose and/or -mannose	5.85	+	-	+	11.5	-
2-mono-O-methylhexose	8.52	+	-	+	-	-

*: Relative to 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol (1.00)

Peak size +++ = large, ++ = medium, + = small, tr. = trace.

The percentages of methylated sugars were calculated on the basis of the peak areas to total peak areas in GC.

枝分かれしたヘテロ多糖類であることを示している。また、この多糖類の主要な結合様式はガラクトースの1,4および1,6結合、グルコースの1,3および1,4結合であること、そしてグルコースもしくはマンノース、ガラクトース、キシロース、フコース、ラムノースなどどの非還元末端に存在することが推定された。

多糖類B

多糖類Bは、主としてグルコースから構成されていた。また、この多糖類のIRスペクトルは 890 cm^{-1} に特徴的な吸収のピーカーを持つことを示した。一般に、 β -D-グルカンの場合ピラノース環の1位の炭素原子とそれに結合するH原子、すなわちC₁-Hの変角振動に由来する吸収は $891 \pm 7\text{ cm}^{-1}$ に見られ（Spedding, 1964）。これに対し、 α -D-グルカンは $844 \pm 8\text{ cm}^{-1}$ に同様の吸収を持つ。故に、多糖類Bは β -D-グルカンであると判断された。

メチル化分析の結果は、この糖類が 2,3,4,6-tetra-, 2,4,6-tri-, 2,3,4-tri-, 2,4-di-O-methylglucose の4つのメチル化糖から構成されていることを示した。したがって、この多糖類は 1,3 および 1,6 グルコシド結合を一つの分子内に持つ β -グルカンであると判斷した。

IV-3-2 外洋水の溶存炭水化物の分析結果

北部北太平洋およびベーリング海から採集した海水試料については、三河湾の海水試料に用いた方法を適用して、単糖類、少糖類および多糖類を濃縮・分離した。そして、これららの糖類についても、化学構造の解析をおこなった。

IV-3-2-1 単糖類

単糖類画分を GC により調べた結果、グルコースの外に 6 種類の単糖類を検出した。これらの糖類の同定は三河湾試料と同様に GC の保持時間、分子量および EIS ベクトルに

おけろフラグメントパターンの解析などの方
法でおこなつた。

IV - 3 - 2 - 石 少糖類

ベーリング海 (Stn. 4) の 2,000 m 層水から分離した少糖類画分のマスクロマトグラムを Fig. 22 に示す。少糖類は NaBH_4 により還元した後、メチル化した。 $m/z 187$ のイオンはメチル化糖に特徴的なフラグメントイオンである。化合物 1 - 9 を検出した。

化合物 1, 2 は分子量が 338 であること (Table 10), またメチル化アリコシドに特徴的なイオンのほかに, $m/z 103$, 163 のイオンが存在し, したがってアリコシルアリセロールであると判断された。このうち, 化合物 2 は標準試料の 1-O- β -D-ガラクトピラノシリルアリセロールのメチル誘導体と GC の保持時間が一致した。

化合物 3 - 9 は少糖類であると推定した。しかし, OV-17 カラムを用いた GC ではこれらを完全に分離できなかつた。実際, 8 種

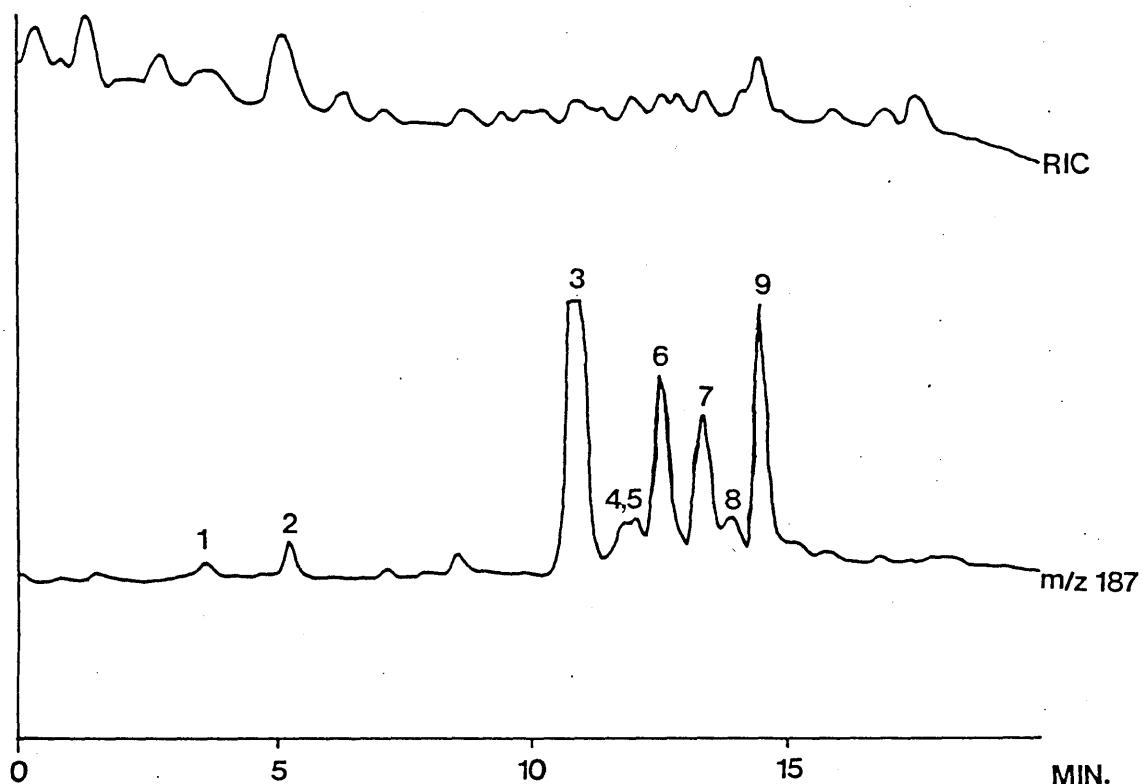


Fig. 22

Mass chromatogram of permethylated oligosaccharide-alditols in the oligosaccharide fraction which was separated from the depth of 2,000 m at Stn. 4 in the Bering Sea. The ion at m/z 187 is a characteristic fragment ion of permethylated glycosides. The compounds 1 - 9 were tentatively assigned as permethylated derivatives of 1) glycosylglycerol, 2) 1-O-- β -D-galactosylglycerol, 3) sucrose, 5) trehalose, 8) melibiose, and 4), 6), 7) and 9) hexosyl disaccharides, respectively. RIC is reconstructed ion chromatogram. Glass column packed with 3 % OV-17 on Chromosorb W was used for the gas chromatographic separation of permethylated oligosaccharide-alditols.

Table 10

GC and GC-MS data of the compounds 1 - 9. These compounds are permethylated derivatives of dissolved low molecular weight carbohydrates separated from the water sample of the depth of 2,000 at Stn. 4 in the Bering Sea

Compound No.	Structure assigned	Retention time ^a			Molecular ion, m/z
		Column I ^b	Column II ^b	Column III ^b	
1	Glycosyl-glycerol A	0.43	-	-	338
2	1-O- β -D-galactosyl-glycerol	0.54	0.63	0.63	338
3	Sucrose	1.00	1.00	1.00	454
4	Disaccharide A	1.08	-	-	470
5	Trehalose	1.09	1.06	1.06	454
6	Disaccharide B	1.13	-	-	470
7	Disaccharide C	1.20	-	-	470
8	Melibiose	1.28	1.20	1.16	470
9	Disaccharide D	1.35	-	-	470

a: Retention times relative to permethylated sucrose (1.00)

b: 3 % OV-17, OV-1701 (FS-WCOT) and SE-52 (FS-WCOT) were used as liquid phases for column I, II and III, respectively.

c: Molecular ions of permethylated low molecular weight carbohydrates were determined by CI (NH_4^+) mass spectrometry.

類の乙糖類をこのカラムにより分離することは一部の糖類を除いてほとんど不可能であることがわかった(Fig. 23)。そこで、これらの乙糖類を細管カラムを用いて分離することを試みた。用いたカラムは無極性のSE-52および微極性のOV-1701であった。OV-1701カラムを用いた場合、メリピオースとケンチオビオースを除いて他の糖類は分離された。ところが、SE-52カラムを用いた場合、逆にメリピオースとケンチオビオースは分離するが、他の糖類の一部が重なった。故に、乙糖類の同定はこの二つのカラムを併用しておこなった。

化合物3は、標準試料のショ糖とGCの保持時間およびマススペクトルが一致した。化合物5のベースピークはm/z 101のフタゲメントイオンであり、これは(1→1)結合を持つメチル化乙糖類にのみ特徴的である。この化合物のGCの保持時間はトレハロースと一致した。化合物8はメリピオースの糖アルコ

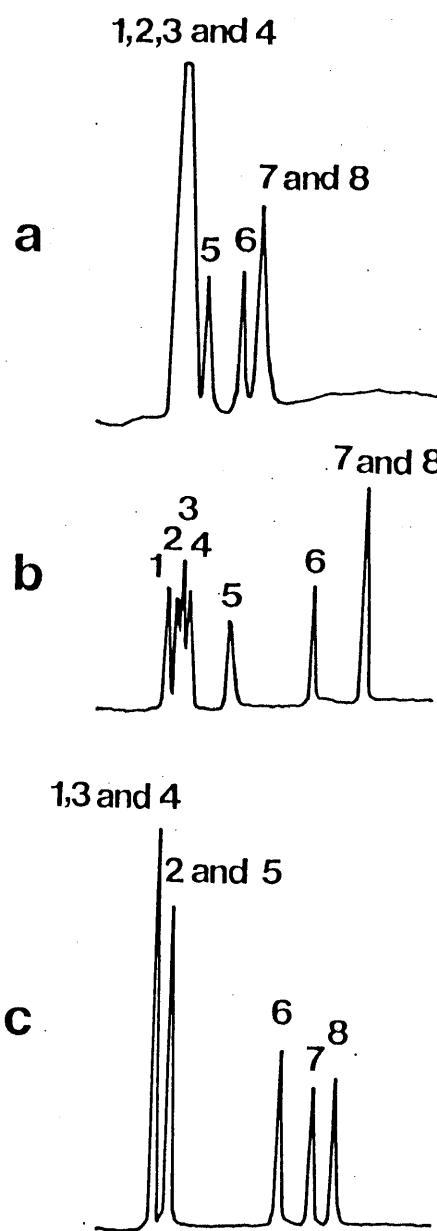


Fig.23

Separation of permethylated disaccharide-alditols by gas chromatography using three different liquid phases such as OV-17 (3 %, 2m) (a), OV-1701 (FS-WCOT, 25 m) (b) and SE-52 (FS-WCOT, 25 m) (c). The compounds 1 - 8 were permethylated derivatives of 1) trehalose, 2) cellobititol, 3) laminaribitol, 4) maltitol, 5) lactitol, 6) isomaltitol, 7) melibitol and 8) gentiobitol. Analytical conditions of GC are described in the Materials and Methods.

-1Lのメチル誘導体とGCの保持時間が良く一致した。メリピオースのような(1→6)結合を持つ多糖類はm/z 145, 177, 337の特徴的なフラグメントイオンを持つ(Fig. 24)ので、他の結合様式のそれと識別可能である(Kärkkäinen, 1970)。

化合物4, 6, 7, 9の分子イオンはm/z 470であった(Table 10)。これは、メチル化多糖類の糖アルコールの分子量に相当する。しかし、これらの化合物のGC上のピークが不純物のそれと重なること、また試料の量が不充分であったことにより正確に同定することはできなかった。

IV-3-2-3 分子量4,000以下の多糖類
三河湾水の場合と同様に、この画分に含まれる多糖類は主にグルコースで構成されていた。したがって、グルカンが存在することを強く示唆した。しかし、得られた試料が微量たため詳細な分析はおこなわなかった。

IV-3-2-4 分子量4,000以上の多糖類

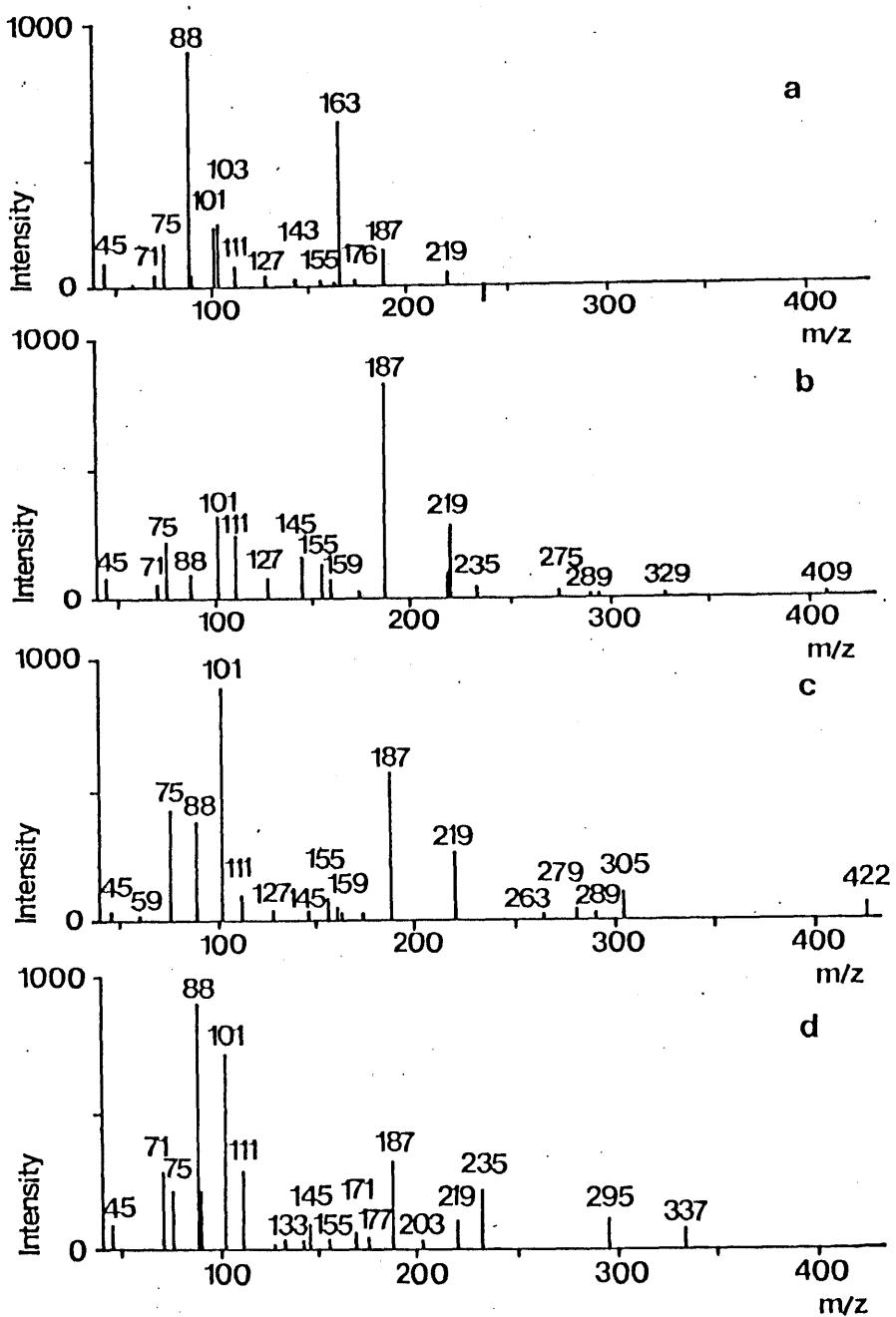


Fig. 24

EI mass spectra of the compounds 2 (a), 3 (b), 5 (c) and 8 (d).

各試水の分子量 4,000 以上の多糖類に含まれるウロニン酸の存在量は 5.4 - 8.6 $\mu\text{g/l}$ であり、全体の 11 - 30 % に相当した (Table. 11)。また、セタブロンにより分離した酸性多糖類は、全体の 11 - 43 % に相当した。これらの結果は、ウロニン酸から構成される多糖類であるポリウロニトのような酸性多糖類が、この糖類画分に存在することを強く示唆した。

この多糖類画分のセフアテックス G-150 カラムクロマトグラムを Fig. 25 に示す。各表面水の多糖類の場合、カラムの溶出量 50 - 80 ml の画分（分子量 10^5 以上）および溶出量 140 - 180 ml の画分（分子量 数千）に糖類のピークを検出した。これに対して、深層水においては分子量 10^5 以上の糖類はほとんど検出されず、また低分子量画分にも特定のピークは存在しなかった。

北部北太平洋の Stn. 3 の 10 m 層水から高分子量 多糖類を分離して化学構造を調べた。こ

Table 11

Contents of uronic acid and acidic polysaccharide (5 % Cetavlon precipitate) in the polysaccharide with MW > 4,000 fraction (total) separated from the water samples of northern North Pacific (Stn. 3) and Bering Sea (Stn. 4)

Site Depth (m)	Stn. 3		Stn. 4	
	10	2,500	1	2,000
(1) Total ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^a	67.5	18.0	57.9	19.1
(2) Uronic acid ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^b	7.1	5.4	8.6	5.7
(3) Acidic polysaccharide ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^a	14.2	3.4	24.2	2.2
(2)/(1) x 100 (%)	10.5	30.0	15.0	30.1
(3)/(1) x 100 (%)	21.0	19.1	42.5	11.4

a: Carbohydrate contents were determined by the phenol sulfuric acid method

b: Uronic acid contents were determined by the method of Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973)

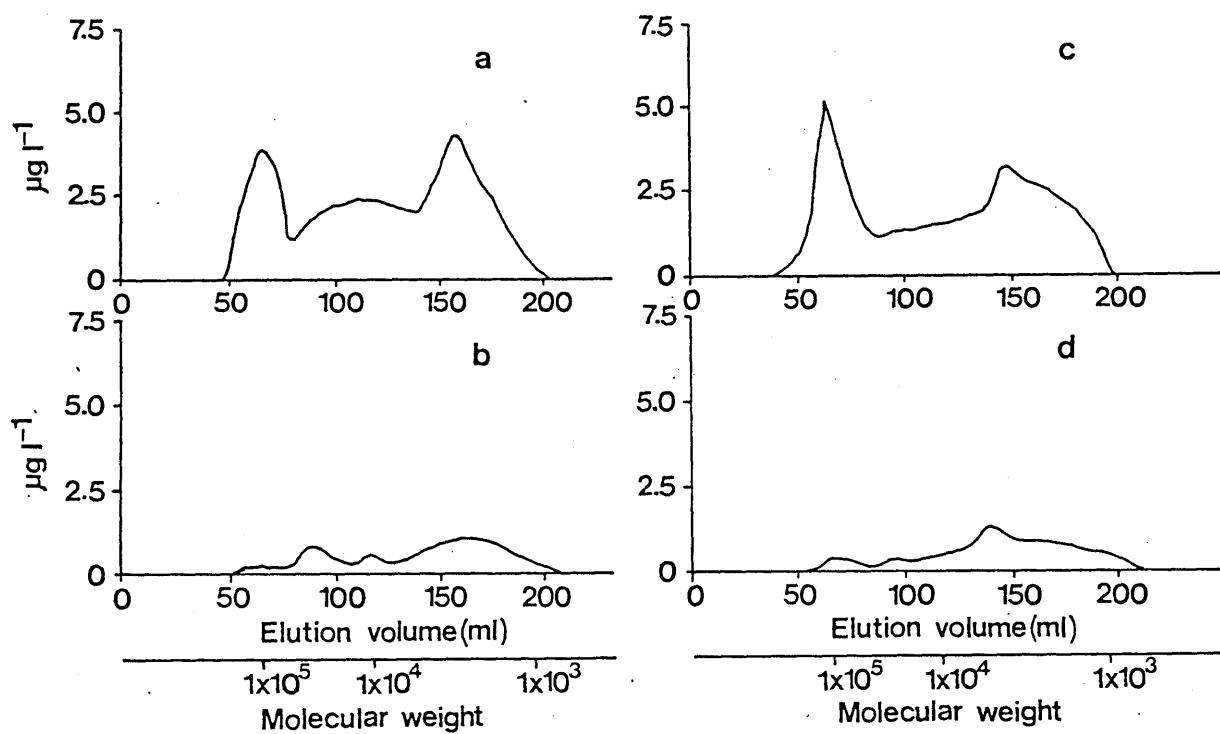


Fig. 25

Sephadex G-150 column chromatograms of polysaccharides with MW > 4,000 which were separated from the water samples. Carbohydrate content of the eluate was determined by the phenol sulfuric acid method. The chromatograms of polysaccharides a and b are from the depths of 10 and 2,500 m at Stn. 3 in the North Pacific, respectively, and c and d are from the depths of 1 and 2,000 m at Stn. 4 in the Bering Sea, respectively.

の多糖類は主にグルコースで構成されており、またメチル化分析の結果、 $\alpha, 3, 4, 6$ -tetra-, $\alpha, 3, 6$ -tri-, $\alpha, 3, 4$ -tri-O-methyl glucose が主要な部分メチル化糖として検出された (Table 12)。これらよりの結果から、この高分子量多糖類は 1, 4- および 1, 6- 結合を持つグルカンであると思われる。

ベーリング海の stn. 4 の表面水の高分子量多糖類の単糖類組成を始めた。その結果、この多糖類は、三河湾のヘテロ多糖類と同様に、グルコースなどの 7 種類の单糖類で構成されてゐることがわかった。

IV - 4 考察

本研究で用いた糖類の同定の方法は、糖類を適当な誘導体に変えた後、GC, GC-MS, $^1\text{H-NMR}$, メチル化分析により化学構造を決定することであった。この方法は、従来溶存炭水化物の分析方法として用いられたペーパークロマトグラフィー, 酶素を用いる方法,

Table 12

Approximate percentages of methylated sugars from the methylated high molecular weight polysaccharide which was isolated from the depth of 10 m at Stn. 3 in the North Pacific

Methyl sugars	Retention time ^a	Percentage (%)
2,3,4-tri-O-methylrhamnose	0.45	3.2
2,3,4-tri-O-methylfucose	0.63	2.1
2,3,4-tri-O-methylxylose	0.64	1.5
Di-O-methyldeoxyhexose	0.98	2.5
2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucose	1.00	16.9
2,3,4,6-tetra-O-methyl-galactose	1.26	2.1
Di-O-methylpentose	1.38	2.1
2,4,6-tri-O-methylglucose	2.06	tr.
3-mono-O-methyldeoxy-hexose	2.07	tr.
2,3,6-tri-O-methylglucose	2.46	58.3
2,3,4-tri-O-methylglucose	2.56	10.3
Mono-O-methylpentose	2.89	tr.
2,3-di-O-methylgalactose	3.64	tr.

a: Retention times relative to 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol (1.00)
tr.: trace

The percentages of methylated sugars were calculated on the basis of the peak areas to total peak areas in GC.

液体クロマトグラフィに比べて正確に糖類の化学構造を知ることができる。たとえば、液体クロマトグラフィは糖類を誘導体化せずに直接分析できる利点はあるが、化合物の保持時間についての情報しか得ることができない。これに対し、G C - M S は化合物の保持時間、分子量、部分構造について、N M R, I R は立体構造に関する情報をそれぞれ与えてくれる。

单糖類、少糖類の誘導体化の方法としてアルジトールアセテート化、メチル化を試みた。従来用いられたトリメチルシリル (T M S) 化 (Josefsson, 1970; Andrews and Williams, 1971), トリフルオロアセテート化 (Eklund et al., 1977) などの方法に比べて、これらの方法は揮発性が適度に高く、また熱に対する安定性もよかつた。アルジトールアセテート誘導体は、ピークの重なり合いがなく、同定・定量が容易におこなえた。また、メチル誘導体は一部の元糖類のピークが重な

ったが、細管カラムを用いたGCを適用することにより分離することができた。したがって、これらの方はは單糖類および少糖類のGCおよびGC-MS分析に適した方法であると結論できる。

多糖類試料の分析は容易ではなかった。問題点の一つは、多糖類を完全に単離することが困難であったこと、また得られた試料が微量（数百 μg ）のため、充分な化学分析——たとえば、過ヨウ素酸酸化法、スマス分解法——がおこなわれなかつたことである。三河湾水の多糖類AおよびBの画分にはそれぞれ主としてヘテロ多糖類、 β -1,3 および 1,6 グルカンが存在したが、このほかに微量の夾雜物が存在した。これらの大夾雜物から純粋の多糖類のみを分離することは、試料が微量のため極めて困難であった。また、同定したヘテロ多糖類およびグルカンの詳細な構造——特に、重合度、分歧の程度、たんぱく質との結合状態——については今後の検討課題である。

IV - 5 要約

1. 三河湾、北部北太平洋、ベーリング海の海水の单糖類をアルジトールアセテート誘導体に变换した後、GCとGC-MSにより分析した結果、グルコース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、リボース、ラムノースを同定することができた。
2. 三河湾水の少糖類をメチル化した後、単離してGC、GC-MS、¹H-NMR、メチル化分析等により解析した結果、3種類のグリコシルグリセロール、ショ糖、ラミナリビオース、ラミナリトリオース、ラフィノースを完全に同定することができた。また、同様の方法により外洋水から1-O-β-D-ガラクトシルグリセロール、ショ糖、トレハロース、メリビオースを検出することができた。
3. 三河湾水の分子量4,000以上の多糖類画分からヘテロ多糖類およびグルカンを單

離した。このヘテロ多糖類は 7 種類の単糖類で構成されており、分子量が 10^4 — 5×10^6 、高度に枝分かれしており、硫酸エステル化糖を含むと推定された。また、グルカンは 1,3- および 1,6- 結合から成る β -グルカンであることがわかった。一方、北部北太平洋の表面水から 1,4 および 1,6 結合から成るグルカン（分子量 $> 10^5$ ）を単離した。またベーリング海の表面水には高分子量のヘテロ多糖類が存在することがわかった。

V-1 溶存炭水化物の沿岸および外洋における分布

V-1-1 はじめに

沿岸および外洋水の溶存炭水化物の総量は比色法により測定されてきた。しかし、個々の糖類の海水中における分布についてはほとんど知られていない。Josefsson (1970) は Sweden の沿岸水の溶存单糖類の化学組成を液体クロマトグラフィにより分析し、9種類の糖類が存在することを報告した。しかし、結合型の糖類である少糖類および多糖類の沿岸および外洋における分布に関する情報は、今日までほとんど得られていない。

GCは、微量の糖類を定量するのに適した方法である。水素炎イオノ化検出器を装備したガスクロマトグラフを用いることにより、ng程度の有機物を測定可能である。また、細管カラムを充てんすることにより糖類のピーケーの重なり合いをなくすことができる。

で、同定および定量が容易である。本研究では、海水に溶存する糖類をこの方法により定量することを試みた。試料は前章と同様、三河湾、北部北太平洋、ベーリング海の海水から分離した糖類である。

IV-1 定量の方法

IV-1-1 单糖類

活性炭カラムにより分離した单糖類試料に内部標準物質としてイノシトール ($50 \sim 200 \mu\text{g}$) を加えた後、アルジトールアセテート化した。あらかじめ作製した標準試料の单糖類による検量線から糖類の濃度を求めた。この方法による糖類の検出限度は、絶対量として約 100 ng であり、再現性は $\pm 5\%$ であった。

IV-1-2 少糖類

β -ニリン- β -D-セロビオサイドを内部標準物質として用いた。この化合物は筑波大学の鈴木惣教授から供与された。この化合物は、1) 各種のトマトグリーンにおいて糖類と

類似の挙動をすること、2) GC のクロマトグラム上のピークが少糖類のそれと重ならぬこと、3) 天然界に存在しないことをなどの理由により標準物質として用いた。

少糖類試料にバニリノ- β -D-セロビオサイト ($25 \sim 100 \mu\text{g}$) を加えた後、 NaBH_4 による還元、メチル化をした。あらかじめ作製した標準試料の少糖類による検量線から糖類の定量をした。二の方法による少糖類の検出限度は 40 ng であり、再現性は $\pm 7\%$ であった。

△-2-3 多糖類

試水から分離した多糖類試料を酸加水分解した後、アルジトールアセテート化して单糖類組成を調べた。この結果から多糖類の量を見積もった。

△-3 結果

△-3-1 三河湾の溶存炭水化物の定量結果

单糖類

表面水(1m層水)においてはグルコース、次にマンノースが多く存在した(Table 13)。しかし、底層水(6m層水)においては各糖類の濃度に大きな差異はなかった。

少糖類

定量した少糖類の海水中の濃度をTable 14に示す。表面水においては1-O-β-D-ガラクトシルグリセロール、ラミナリドース、ラミナリトリオースが多く存在した。これに対し、底層水ではこれらの糖類の濃度は大きく減少し、一方ショ糖が多く存在するのが特徴的であった。

少糖類の構成単糖類の糖類組成をTable 13に示す。

多糖類

分子量4,000以下の多糖類および4,000以上の多糖類画分の单糖類組成をTable 13に示す。前章で述べたように、4,000以上の多糖類画分から多糖類A(ヘテロ多糖類)および多糖類B(グルカン)が検出された。これ

Table 13 Monosaccharide compositions of dissolved mono-, oligo- and polysaccharide fractions separated from the water samples in Mikawa Bay.

Fraction	Water sample from 1 m				Water sample from 6 m			
	Mono-saccharide ^a	Oligo-saccharide ^b	Polysaccharide with M.W. < 4,000 ^c	Polysaccharide with M.W. > 4,000 ^c	Mono-saccharide ^a	Oligo-saccharide ^b	Polysaccharide with M.W. < 4,000 ^c	Polysaccharide with M.W. > 4,000 ^c
	μg l ⁻¹ %	μg l ⁻¹ %	μg l ⁻¹ %	μg l ⁻¹ %	μg l ⁻¹ %	μg l ⁻¹ %	μg l ⁻¹ %	μg l ⁻¹ %
Glucose	40.0	69.1	110	63.6	36.7	61.4	45.4	34.1
Galactose	4.0	6.9	25.3	14.6	7.2	12.0	28.2	21.2
Mannose	11.2	19.3	8.8	5.1	2.7	4.5	9.9	7.4
Xylose	trace		6.6	3.8	3.0	5.0	15.0	11.3
Arabinose	2.7	4.7	5.3	3.1	2.0	3.3	7.0	5.3
Ribose	trace		2.0	1.2	3.3	5.5	1.1	0.8
Fucose	0.0		8.8	5.1	2.4	4.0	15.0	11.3
Rhamnose	0.0		5.9	3.4	2.5	4.2	11.7	8.8
Total	57.9	173	59.8	133	5.8	37.6	27.1	39.4

^a Each of the monosaccharides was corrected for its recovery from column II.

^b Each of the oligosaccharides was corrected for the mean recovery (74.3%) of standard sucrose, raffinose and cellobetetraose from column I.

^c Not corrected.

Table 14 Dissolved low molecular weight carbohydrates in the water samples of Mikawa Bay

Depth (m)	1	6
Compounds	— $\mu\text{g l}^{-1}$ —	
2-O- α -D-glucopyranosyl-glycerol	5.6	3.0
1-O- β -D-galactopyranosyl-glycerol	27.7	4.7
Sucrose	2.3	17.8
Laminaribiose	14.6	2.3
6-O- α -D-galactopyranosyl-1-O- β -D-galacto-pyranosylglycerol	7.3	1.2
Raffinose	0.0	1.6
Laminaritriose	25.2	0.5
Total	82.7	31.1

らの々々糖類の単糖類組成を Table 15 に示す。表面水では A は約 $70 \mu\text{g/l}$, B は $20 \mu\text{g/l}$ 存在した。一方、底層水では A は $20 \mu\text{g/l}$, B は $2 \mu\text{g/l}$ と大きく減少した。

V - 3 - 2 外洋水の溶存炭水化物の定量結果

単糖類

単糖類画分の糖類組成を Table 16 に示す。Stn. 3 の表面水ではグルコースが $69 \mu\text{g/l}$ と非常に多く存在した。三河湾の場合と同様に、各試水ともグルコース、次にマンノースが多く存在した。

少糖類

少糖類画分の単糖類組成を Table 17 に示す。各試水ともグルコースが構成単糖類として多く存在した。この糖類画分の化学組成を前章で述べた方法により分析した後、定量をした。しかし、同定した糖類の濃度は数 $100 \mu\text{g/l}$ 以下であつたので、正確に定量することは困難であった。そこで、これらの糖類のウ

Table 15 Monosaccharide compositions of polysaccharide with M.W. >4,000, and dissolved polysaccharides A and B from the filtered seawater samples collected from Mikawa Bay

Depth (m) Dissolved polysaccharide	1 Polysaccharide MW >4,000			6 Polysaccharide MW >4,000		
		A	B	A	B	
Monosaccharide						
				μg l ⁻¹		
Glucose	45.4	10.0	21.0	8.0	3.3	2.3
Galactose	28.2	13.8	1.7	7.5	3.6	0.0
Mannose	9.9	6.3	1.0	3.1	3.0	0.0
Xylose	15.0	11.1	1.7	6.0	4.2	0.0
Arabinose	7.0	3.6	0.6	3.1	2.4	0.0
Ribose	1.1	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0
Fucose	15.0	10.8	tr.	5.5	4.6	0.0
Rhamnose	11.7	11.7	0.3	5.1	4.9	0.0
Total	133	67.3	26.3	39.5	26.0	2.3

tr.: trace

Table 16

Monosaccharide compositions of the free sugar (monosaccharide) fractions separated from the water samples of northern North Pacific (Stn. 3) and Bering Sea (Stn. 4)

Site Depth (m)	Stn. 3		Stn. 4	
	10	2,500	1	2,000
<u>Compound</u> $\mu\text{g l}^{-1}$				
Glucose	69.3	2.9	5.2	14.4
Galactose	tr.	tr.	0.7	1.0
Mannose	25.9	1.3	0.9	2.4
Xylose	4.2	tr.	tr.	0.6
Arabinose	0.7	ND	tr.	tr.
Ribose	ND	ND	ND	tr.
Fucose	ND	ND	ND	ND
Rhamnose	ND	ND	tr.	ND
Total	100	4.2	6.8	18.4

tr.: trace, ND: not detected

Table 17

Monosaccharide compositions of the oligosaccharide fractions separated from the water samples of northern North Pacific (Stn. 3) and Bering Sea (Stn. 4)

Site Depth (m)	Stn. 3		Stn. 4	
	10	2,500	1	2,000
Compound				
Glucose	4.4	5.8	3.5	4.7
Galactose	1.9	0.8	1.3	tr.
Mannose	1.4	1.0	1.6	1.8
Xylose	0.8	0.8	0.9	tr.
Arabinose	0.3	0.4	1.1	tr.
Ribose	tr.	ND	0.8	tr.
Fucose	0.4	ND	0.9	ND
Rhamnose	0.5	0.5	0.9	ND
Total	9.7	9.3	11.0	6.5

tr.: trace, ND: not detected

ロマトグラム上のピークの高さから半定量的に分析した (Table 18)。各試水において、シヨ糖、トレハロースが多く存在した。メリオースは深層水のみに検出された。

多糖類

分子量 4,000 以下の多糖類画分の単糖類組成を Table 19 に示す。少糖類画分と同様に、グルコースが構成单糖類として多く存在した。

分子量 4,000 以上の多糖類画分の単糖類組成を Table 20 に示す。Stn. 3 および 4 に存在した高分子量のグルカンおよびヘテロ多糖類はオオゼリ 約 $5 \mu\text{g/l}$, $3 \mu\text{g/l}$ の濃度であった。

丁-4 考察

单糖類

三河湾、北部太平洋、ベーリング海の海水の溶存单糖類の総量は $2.1 - 100 \mu\text{g/l}$ の広い範囲にわたった。この結果を他の研究者の測定結果と比較して Table 21 に示す。Mopper

Table 18

Dissolved glycosylglycerols and disaccharides in northern
North Pacific (Stn. 3) and Bering Sea (Stn. 4)

Site Depth (m)	Stn. 3		Stn. 4	
	10	2,500	1	2,000
<u>Compound</u>				
Glycosylglycerol A	+	+	+	+
1-O- β -D-galactosyl- glycerol	++	+	+	+
Sucrose	++	+++	++	+++
Disaccharide A	+	-	+	+
Trehalose	+++	+++	++	+
Disaccharide B	-	++	++	++
Disaccharide C	-	++	++	++
Melibiose	-	+	-	+
Disaccharide D	++	++	+	++

Peak intensity, +: small, ++: medium, +++: large

Table 19

Monosaccharide compositions of the polysaccharide with MW <4,000 fractions separated from the water samples of northern North Pacific (Stn. 3) and Bering Sea (Stn. 4)

Site Depth (m)	Stn. 3		Stn. 4	
	10	2,500	1	2,000
Compound	$\mu\text{g l}^{-1}$			
Glucose	5.8	4.2	1.6	1.5
Galactose	1.0	0.5	1.0	0.4
Mannose	1.1	0.5	0.7	0.3
Xylose	1.1	tr.	0.5	0.4
Arabinose	0.6	tr.	0.4	0.3
Ribose	ND	ND	tr.	0.3
Fucose	0.6	tr.	0.4	0.4
Rhamnose	1.3	0.6	0.5	0.4
Total	11.5	5.8	5.1	4.0

tr.: trace, ND: not detected

Table 20

Monosaccharide compositions of the polysaccharide with MW_n>4,000 fractions (total), and the polysaccharide with MW >1 x 10⁵ which were separated from the water samples from northern North Pacific (Stn. 3) and Bering Sea (Stn. 4)

Site Depth	Stn. 3			Stn. 4		
	Total	10 ⁵	2,500	Total	1	2,000
Polysaccharide	Total	>1 x 10 ⁵	Total	Total	>1 x 10 ⁵	Total
<u>Compound</u> μg l ⁻¹						
Glucose	8.4	5.1	4.0	4.0	0.6	1.9
Galactose	2.3	0.3	0.7	1.8	0.8	1.2
Mannose	1.9	0.1	0.8	1.6	0.3	0.9
Xylose	2.8	0.2	0.5	1.3	0.4	0.8
Arabinose	2.1	0.1	0.4	0.9	0.2	0.4
Ribose	0.7	ND	tr.	0.4	ND	tr.
Fucose	2.4	0.2	0.7	1.0	0.4	0.9
Rhamnose	2.9	0.3	0.8	0.8	0.4	0.6
Total	23.5	6.3	7.9	11.8	3.1	6.7

tr.: trace, ND: not detected

Table 21 Summary of dissolved individual sugars in seawater

Reference	Josefsson (1970)	Mopper (1977)	Mopper et al (1980)	Liebezeit et al(1980)	In this study
Analytical method			Electrodialysis, liquid chromatography or ion exchange chromatography		Combined charcoal column and dialysis method, Gas chromatography- mass spectrometry
Location	Swedish west coast	(Black Sea North Sea	various areas	Sargasso Sea	Mikawa Bay (North Pacific Bearing Sea
Depth	2m, 35m	Surface, 500m	Various depth	3 - 1,500 m	1m, 6m Surface, Deep Sea
Compound			Concentration($\mu\text{g l}^{-1}$)		
<u>Monosaccharide</u>					
Glucose	9.3-46.5	4.5-53.5	5.7-121	17.2-118	3.4-40.0
Fructose	1.2-14.3	3.8-43.2	3.7-99.4	8.9-65.7	*
Galactose	2.7-37.8	0.5-4.0	0.5-36.6	~ 23.5	1.6-4.0
Mannose	2.7-32.6	0.7-1.1	0.7-1.1	~ 57.6	1.6-11.2
Xylose	0.2-2.7	~ 0.9	0.4-7.8	~ 20.0	~ 0.6
Arabinose	3.8-14.7	1.7-2.1	0.6-7.7	~ 28.9	0.9-2.7
Ribose	0.6-8.1	0.8-6.9	0.4-14.6	---	---
Fucose	---	0.7-1.2	0.2-3.5	---	---
Rhamnose	3.0-25.2	0.2-1.5	0.3-6.3	---	---
Sorbose	+	---	+	---	---
Lyxose	---	---	+	---	---
6-deoxyglucose	---	---	+	---	---
<u>Glycerol Glycoside</u>					
1-O- β -D-galacto-sylglycerol	---	*	*	*	4.7-27.7
2-O-d-D-glucosylglycerol	---	*	*	*	3.0-5.6
Digalactosyl-glycerol	---	*	*	*	1.2-7.3
<u>Oligosaccharide</u>					
Sucrose	+	*	*	*	2.3-17.8
Trehalose	---	*	*	*	---
Melibiose	---	---	---	+	---
Maltose	---	---	+	---	---
Laminaribiose	---	---	---	---	2.3-14.6
Raffinose	---	*	*	*	~ 1.6
Laminaritriose	---	---	---	---	0.5-25.2
<u>Polysaccharide</u>					
β -1,3 glucan (M.W. 3,000-6,000)				~ 20	---
Heteropolysaccha- ride (M.W. 10^3 - 10^6)				~ 70	+

*1: cannot be determined by this method

+ : Identified

- : not detected

et al. (1980) は、北海、黒海、北部太平洋などの海域の溶存单糖類を液体クロマトグラフィにより分析し、グルコースが $5.7 - 121 \mu\text{g/l}$ と多く存在したこと、またそれが全体の 40 - 59 % を占めたことを報告している。一方、Liebezeit et al. (1980) はサルガッソー海の溶存单糖類の 0 から 1,500 m までの鉛直分布を調べた結果、グルコースが全体の 33 - 51 % を占めたことを報告している。これらの結果は本研究の結果とよく一致しており、グルコースが海水中に多く存在する化学物質であることを示唆した。

グルコースのほかに、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、リボース、ラムノースを検出した。これら糖類の海水中の濃度は、ヘキソース、ペントース、デオキシヘキソースの順に多く存在した。この傾向は、他の研究者の結果とよく一致している (Table 21)。

フラクトース(果糖)は、グルコースとともに

もに海水中に多く存在する单糖類である (Mopper et al., 1980 ; ItteKKot et al., 1981)。Mopper et al. (1980) は、フラクトースがグルコースに匹敵する濃度で存在したことを報告している。しかし、本研究で用いた方法ではフラクトースは検出できない。これは、この方法ではフラクトースは NaBH_4 によりグルシトールとマンニトールの二つに還元されることがある。したがって、もし仮にフラクトースが海水中に存在した場合、この方法によれば等量のグルコースとマンノースとして検出される。本研究においてはグルコースのほかにマンノースがやや少量に存在することを認めたが、Mopper et al. (1980) の結果を参考にするならばそれらの値は実際の存在量よりも低い値 (5 ~ 20% 減) になると思われる。この点については、今後検討する予定である。

少糖類

少糖類の海水中における存在状態はほとん

と明らかではなかった。今日までにショ糖などの2～3の少糖類が定性的に測定されたのみである。本研究において、少糖類の化学組成を初めて明らかにすることができた。また、糖類のグリセリン誘導体が海水中に存在することを明らかにした。

同定した少糖類の濃度は、三河湾において $0.7 - 28 \mu\text{g/l}$ 、外洋水において数 100 ng/l 以下の非常に低い濃度であった。しかし、三河湾において存在した $\text{1-O-}\beta\text{-D-ガラクトシルグルセロール}$ およびショ糖が外洋水でも検出され、これららの糖類が沿岸、外洋を問わず広く分布することを強く示唆した。

多糖類

従来、海水中の懸濁態多糖類の化学構造に関する研究は2～3なされた(Handa and Tominaga, 1969)。また、結合型の溶存炭水化合物の单糖類組成につても若干の研究がおこなわれている(Ittekot, 1982)。その結果は、多くの場合グルコースが主要な構成單

糖類であることを示している。このことは、海水中に何らかのグルカンが存在することを強く示唆する。実際、三河湾および北部太平洋の Stn. 3 の海水から β -1,3 グルカン、1,4 および 1,6 グルカンを初めて単離した。これらの糖類は、分子量 4,000 以上の多糖類の 61% (三河湾)、22% (Stn. 3) を占めた。これらの結果は、グルカンが溶存する多糖類の主要成分の一つであることを示している。

7 種類の单糖類から構成されるヘテロ多糖類を三河湾およびベーリング海の海水から単離した。このヘテロ多糖類は、分子量 4,000 以上の多糖類の 51-65% (三河湾), 26% (Stn. 4) を占めた。これらの結果は、このヘテロ多糖類がグルカンと同様に、溶存多糖類の主要な成分であることを示している。従来、ヘテロ多糖類の海水中的存在状態に関する情報はまったく得られていないので、特に興味ある化合物である。

溶存炭水化物の存在量

G C で定量をした溶存炭水化物が全溶存有機炭素 (DOC) に占める割合は沿岸および外洋水において 1.0 ~ 8.6 % であった (Table 22). Handa (1966a) はインド洋の溶存炭水化物の濃度をフェノール硫酸法により測定した結果、これが DOC の 10 ~ 20 % に相当することを、また Burney et al. (1979) は MBTH 試薬 (3-メチル-2-ベンゾリノンレトラゾン塩化水素) を用いた比色法により北部大西洋の溶存炭水化物を測定した結果、DOC の 8.0 ~ 24.5 % に相当したことをそれぞれ報告している。これらの結果は本研究で得た割合に比べかなり高い値である。G C による分析では中性糖類のみが測定されたので、実際の溶存炭水化物濃度 (ウロコ酸および糖類誘導体も含む) より幾分低い値になることは事実である。しかし、この原因だけではこの大きな食い違いは説明できない。溶存炭水化物を比色法により測定する場合、腐植物質あるいは糖類と構造が類似した有機物と反応す

Table 22 Total concentration of dissolved carbohydrate (DCHO) and dissolved organic carbon (DOC) in the water samples

Sampling site	Mikawa Bay			North Pacific (Stn. 3)		Bering Sea (Stn. 4)	
Depth (m)	1	6	10	2,500	1	2,000	
(1) DCHO ($\mu\text{gC/l}$) ^a	170	44.0	57.9	10.9	13.9	14.2	
(2) DOC (mgC/l)	1.98	2.35	0.85	0.43	1.38	0.74	
(1)/(2) $\times 100$ (%)	8.6	1.9	6.8	2.5	1.0	1.9	

a: The GC value of total dissolved carbohydrate ($\mu\text{g/l}$) $\times 0.4$

ることがよく知られている。したがって、此色法は糖類の存在量を過大に評価してしまう傾向があり、これが上記の分析結果の差異の大きな原因であると考えられる。

V-5 要約

1. 試水の単糖類の濃度を G C により測定した結果、グルコースが最も多く存在し ($3 - 69 \mu\text{g/l}$)、全単糖類の 50 ~ 69 % を占めた。他の単糖類の濃度は、マンノースを除いて特に大きな差異はなかった。これらの結果は他の研究者のそれとよく一致している。
2. 三河湾の表面水においては $\text{I-O-}\beta\text{-D-ガラクトシルグルコ-$ アル, ラミナリゴース, ラミナリトリオースが多く存在した。底層水ではこれら の濃度は大きく減少し、一方ショ糖の濃度が高かった。全溶存少糖類は、1 m 層水において $83 \mu\text{g/l}$, 6 m 層水で $31 \mu\text{g/l}$ であった。外洋水

の個々の少糖類の濃度は数 100 ng/l 以下であつた。シヨ糖およびトレハロースが表面水および底層水の両方ににおいて多く存在した。

3. 三河湾の表面および底層水におけるヘリコトリ糖類およびグルカンはそれぞれ、70 および $20 \mu\text{g/l}$ 、 20 および $2 \mu\text{g/l}$ であった。外洋水の高分子量多糖類は Str. 3 で $5 \mu\text{g/l}$ 、Str. 4 で $3 \mu\text{g/l}$ の濃度で存在した。
4. 各試水の全溶存炭水化合物量は $27 - 424 \mu\text{g/l}$ の範囲であり、これは 0°C の $1.0 - 8.6 \text{ \%}$ に相当した。

VI-溶存炭水化物の成因および地球化学的意義に関する考察

VI-1 はじめに

種々の单糖類、少糖類、多糖類が海水中に存在することが本研究により明らかになった。これらの糖類の成因を明らかにすることは、地球化学的に興味がある。従来、海洋の有機物の主要な生産者は植物プランクトンであると考えられてきた。これは、藻類を培養したときに種々の有機物が培養液中に放出されることが、また天然水中の植物プランクトンブルーム時にDOMの濃度が大きく増加することの理由による。もし、植物プランクトンがDOMの生産者であるとすれば、DOMの化学組成は藻類の細胞内有機物と密接に関係していると思われる。しかし、今日まで植物プランクトンの細胞内有機物に関する情報は充分に得られていない。特に、海洋における有機物の基礎生産において重要な役割を持つ珪藻、

鞭毛藻の細胞内成分については、わずかな知識しか得られていない。これは、これらの藻類を純粋に単離して培養することがしばしば困難であったこと、また細胞内に微量に存在する有機物の化学構造を決定することが難しかったことによると考えられる。本研究では、これらの微細藻類も含めて藻類の細胞内炭水化物についてススメの分析をし、また考察をした。

三河湾の海水中に種々の糖類が比較的高い濃度で存在した。これは、外洋水の糖類の濃度が低かったことと対照的である。一般に、沿岸水においては溶存炭水化物の総量は大きい(Burney et al., 1979)。この原因として、沿岸では植物プランクトンの光合成活動が活発であることが考えられる。そこで、本研究では観場に棲息する植物プランクトンが溶存炭水化物の生産者として果す役割を調べるために、主として植物プランクトン細胞で構成されている懸濁物の炭水化物成分を分析し、

溶存態のそれと比較検討をした。

最後に、本研究で同定・定量をした溶存態の糖類の地球化学的および生態学的意義について考察をした。

VI-2 試料

VI-2-1 藻類

分析をした藻類は次のとおりである。

1. 紅藻 Porphyra tenera (アサツカノリ)
2. 紅藻 Porphyra yezoensis (スサビノリ)
3. ラン藻 Microcystis sp.
4. 鞭毛藻 Olisthodiscus sp.

1, 2は東京水産大学の有賀祐勝助教授より、4は農林水産省養殖研究所の本城凡夫博士の御好意により提供されたもの、また3は諫諍湖の夏の Microcystis ブルーム時に採取したものである。試料は分析に供するまで -20°C で凍結保存した。

VI-2-2 懸濁物

三河湾の懸濁物試料は、1980年5月31日に

採集した 1 m および 6 m 層の海水 (III-ズ-4 の試水) をガラスファイバーフィルターで汎過した際に、沪紙上に残った物質である。沪紙は分析に供するまで -20°C で凍結保存した。

VI - 3 分析方法

VI - 3 - 1 藻類および懸濁物試料からの炭水化物の抽出

炭水化物の抽出方法を Fig. 26 に示す。試料は、脂質およびクロロフィル成分を除くため、1 口ロホルム-メタノール (乙 : 1) により 3 回 15 分ずつ ワーレンブレンダーにより抽出をした。抽出物に少量の水を加えてよく振り、水-メタノール相とクロロホルム相の乙相に分離した。水-メタノール相は、後述する 80% エタノール抽出液と混合した。

脂質成分を除去した試料を 80% エタノールにより 30 分間、 100°C 下抽出をして低分子量炭水化物を得た。次に、沸騰水で 30 分

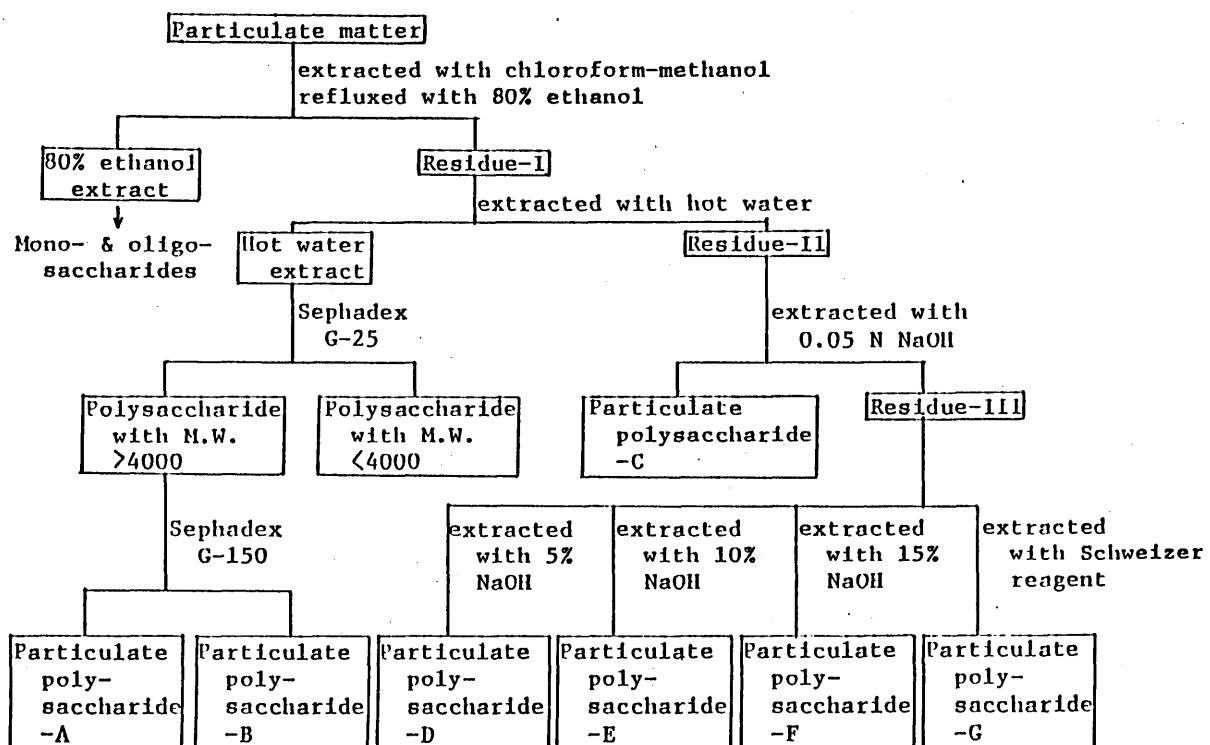


Fig.26 Procedures of extraction and separation of particulate carbohydrates

間、3回抽出をして、水溶性多糖類を得た。熱水抽出残渣は、小量の NaBH_4 を加えた後、 0.05 M の NaOH により室温で3回抽出をして希アルカリ可溶性多糖類を得た。この残渣は、さらに5, 10, 15% NaOH により30分間、室温で3回抽出をして強アルカリ可溶性多糖類を得た。同様に、シュワイツー試薬（銅一濃アンモニウム溶液）により3時間抽出をして強アルカリ可溶性多糖類を得た。得られたアルカリ抽出画分は、希塩酸による中和、透析による脱塩処理をした後、蒸発乾固した。

VI-3-2 糖類の分析方法

80%エタノール抽出画分に含まれる单糖類および少糖類は、IV-2-2およびIV-2-3の方法により同定・定量をした。

熱水抽出画分、アルカリ抽出画分に含まれる水溶性多糖類およびアルカリ可溶性多糖類は単離した後、溶存態の多糖類と同様の分析方法によりその化学構造を調べた。

VI-4 結果

VI-4-1 藻類の細胞内炭水化物の分析結果

培養した藻類の細胞内炭水化物の化学組成については、五十里（1974）の報告がある。本研究ではこれとは別に、分析があまり試みられていない少糖類画分の化学組成を詳しく調べた。

Microcystis sp. の細胞内少糖類のガスクロマトグラムを Fig. 27 に示す。ピーク 1-4 の化合物を T L C により単離した後、G C, G C - M S, ¹H - N M R の測定、メチル化分析の結果、1 は 1-O- β -D-ガラクトシルグリセロール、2 はマルトース、3 は 6-O-d-D-ガラクトシル-1-O- β -D-ガラクトシルグリセロール、4 はマルトトリオースであることがわかった。

各藻類試料の少糖類組成を同様の方法により調べた結果を Table 23 に示す。いずれの藻類からも上記の 4 個のグリコシルグリセロ

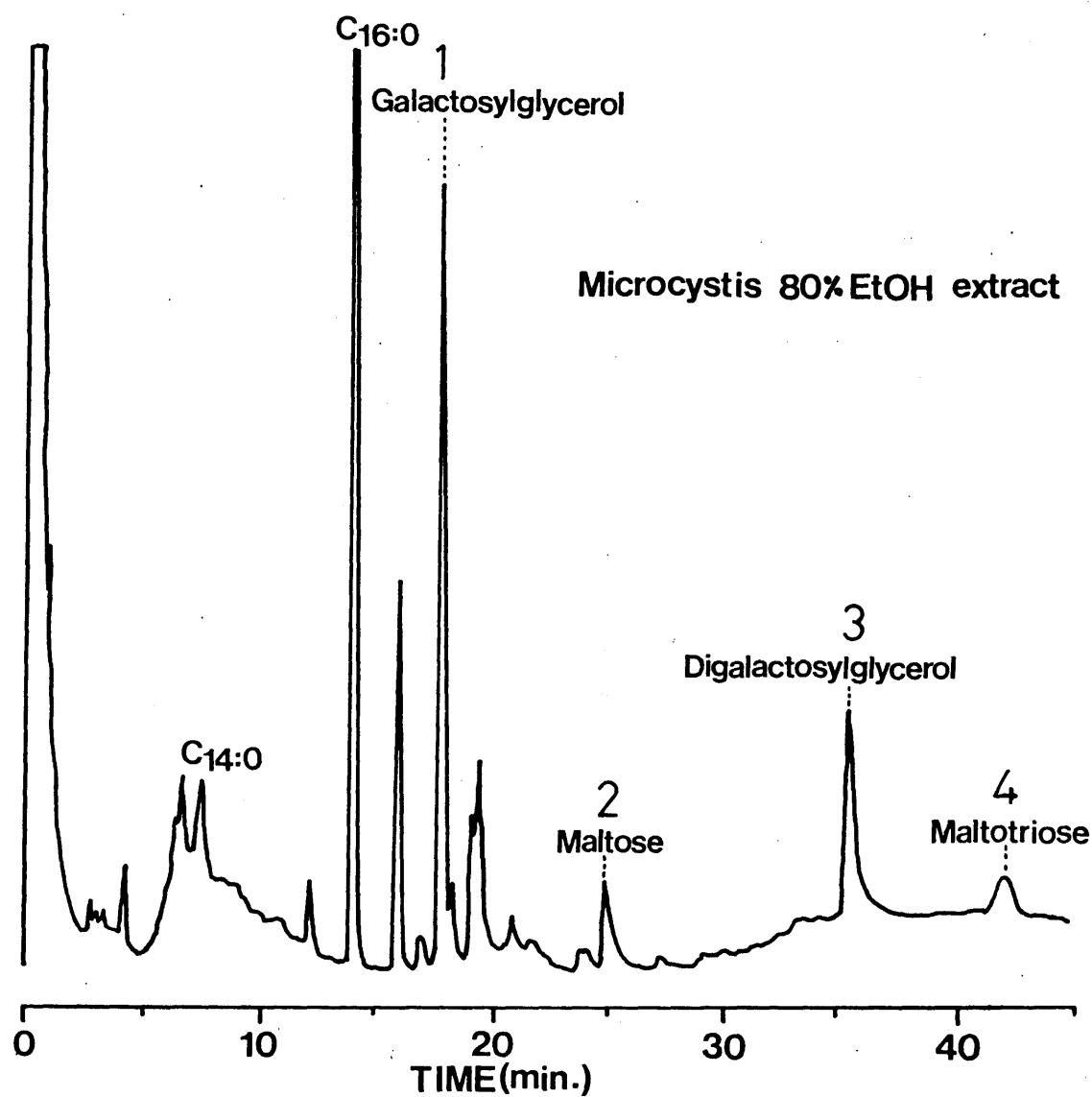


Fig. 27 Gas chromatogram of *Microcystis* 80 % EtOH extract. The extract was permethylated followed by GC analysis. C_{16:0} and C_{18:0} are fatty acids.

Table 23 Identifications of low molecular weight carbohydrates
in some algal cells

Algal species	Red Algae <u>Porphyra tenera</u>	Blue-green algae <u>Porphyra yesoensis</u>	Flagellate <u>Mycrocystis</u>	<u>Olisthodiscus</u>
<u>Compound</u>				
Mannitol	-	-	-	+++
2-O- α -D-galactosylglycerol *	+++	++	-	-
1-O- α -D-galactosylglycerol *	++	+++	-	-
1-O- β -D-galactosylglycerol	+	+	+	+++
Maltose	-	-	++	-
6-O- α -D-galactosyl-1-O- β -D-galactosylglycerol	+	+	+	++
Maltotriose	-	-	++	-

Peak size, +++ = large, ++ = medium, + = small

* 2-O- α -D-galactosylglycerol (Floridoside),
1-O- α -D-galactosylglycerol (Isofloridoside)

-1L が検出された。紅藻からはフロリトリシト、イソフロリトリシトが、また鞭毛藻からはマツニートールと思われる物質が検出された。

VI-4-2 三河湾水の懸濁態炭水化物の分析結果

VI-4-2-1 懸濁態炭水化物の收率

三河湾の1および6m層水の懸濁物から抽出した3Lコール、熱水、希アルカリ可溶性炭水化物およびその残渣の炭水化物の收率を Table 24 に示す。1m層においては、全溶存炭水化物の約80%が残渣画分に含まれていた。しかし、6m層水ではこの画分の濃度は大きく減少した。

VI-4-2-2 単糖類および少糖類の組成

80%エタノール抽出画分に含まれる遊離の単糖類組成を Table 25 に示す。溶存態の単糖類と同様に、グルコースが最も多く存在した。

少糖類組成を Table 26 に示す。ガリコシ

Table 24 Yields of carbohydrates extracted from particulate matters of the water samples collected from Mikawa Bay

Depth (m)	1	6
<u>Carbohydrate</u>	$\mu\text{g l}^{-1}$ (%)	
Alcohol soluble carbohydrates (a)	40.8(8.7)	9.7(25.5)
Water soluble carbohydrates (b)	27.9(6.0)	14.1(37.0)
Water insoluble carbohydrates (c)	399 (85.3)	14.3(37.5)
1) Dilute alkali soluble carbohydrates	28.0(7.0)*	N.A.
2) Dilute alkali insoluble carbohydrates	371 (93.0)*	N.A.
$\Sigma a + b + c$	468	38.1

*: Relative to water insoluble carbohydrates (c)
N.A.: not analyzed

Table 25 Free monosaccharides in the alcohol soluble fraction of particulate matter collected from Mikawa Bay

Compound	Depth of 1 m ($\mu\text{g/l}$)
Glucose	15.9
Galactose	0.7
Mannose	0.7
Xylose	1.5
Arabinose	1.8
Ribose	1.5
Fucose	0.9
Rhamnose	1.2
Total	24.2

Table 26 Particulate low molecular weight carbohydrates in the water samples of Mikawa Bay

Depth (m)	1	6
Compounds	$\mu\text{g l}^{-1}$	
2-O- α -D-glucopyranosyl-glycerol	1.0	<0.1
1-O- β -D-galactopyranosyl-glycerol	7.1	3.2
Sucrose	2.0	<0.1
Laminaribiose	4.2	<0.1
6-O- α -D-galactopyranosyl-1-O- β -D-galactopyranosylglycerol	6.5	0.5
Raffinose	<0.1	<0.1
Laminaritriose	<0.1	<0.1
Total	20.8	3.7

Two disaccharides, isomaltose and melibiose were identified in the depths of 1 and 6 m other than the sugars quantified

ルグリセロールが多く存在した。また、微量のトレハロース、メリピオースを検出した。

VI-4-3 水溶性多糖類

水溶性多糖類は、セフマデックス G-25 カラムにより分子量 $4,000$ 以下と $4,000$ 以上に大別した。大部分の糖類 ($> 90\%$) は、後者の画分に存在した。この画分をセフマデックス G-150 カラムにより分子量分画した結果、高分子量の多糖類 A ($> 10^4$) および低分子量の多糖類 B ($3,000 \sim 6,000$) の2つが存在した (Fig. 18)。この2つの糖類を単離した後、化学構造を解析した。

多糖類 A

懸濁態多糖類 A の单糖類組成を Table 27 に示す。7種類の单糖類により構成されていた。この多糖類は高分子量のため、セフマロース CL-4B カラムにより分子量分布を調べた (Fig. 19)。その結果、この糖類は $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^4$ の広い分子量分布を持つことがわかった。メチル化分析の結果、この多糖類は

Table 27 Monosaccharide compositions of polysaccharide with M.W. >4,000, particulate polysaccharides A and B, and residue-II from particulate matter collected from Mikawa Bay

Depth (m) Particulate polysaccharide	1			6				
	Polysaccharide MW >4,000	A	B	Residue-II	Polysaccharide MW >4,000	A	B	Residue-II
<u>Monosaccharide</u>								
Glucose	12.1	1.8	7.4	356	3.9	1.4	1.8	6.5
Galactose	4.6	2.4	0.7	13.9	2.5	0.9	0.7	2.4
Mannose	2.3	1.0	0.5	8.4	1.2	0.6	0.6	1.4
Xylose	1.7	1.1	0.3	6.2	1.5	0.7	0.7	1.6
Arabinose	1.3	0.8	0.2	2.9	1.4	0.5	0.7	0.5
Ribose	1.4	0.0	0.8	0.0	0.5	0.0	0.4	0.0
Fucose	1.4	1.0	0.2	5.2	1.1	0.7	0.5	1.0
Rhamnose	3.1	1.5	0.3	6.5	2.0	0.9	0.6	0.9
Total	27.9	9.6	10.4	399	14.1	5.7	6.0	14.3

グルコースの1,6および1,4結合を主要な結合様式として持つこと、ラムノース、フコース、キシロース、ガラクトース、グルコースもしくはマンノースの非還元末端を持つことが明らかになった。

多糖類Aはウロニン酸を6%含んでいた。また、二の化合物のIRスペクトルでは1245-1235 cm⁻¹および815 cm⁻¹にS=O結合の伸縮振動、そして赤道結合のC-O-Sの伸縮振動にもとづく特徴的な吸収の存在を認めた。これらの結果は、分子内に硫酸エーステルが存在することを強く示唆した。

以上の結果は、この多糖類Aの化学構造は溶存態多糖類Aと極めて類似していることを示した。

多糖類B

多糖類Bは主としてグルコースで構成されていた(Table 27)。しかし、その他に少量のガラクトース、マンノース、ペントース、デオキシヘキソースが存在した。メチル化分

析の結果、グルコースの1,3および1,4結合が主要な結合様式であること、また少量のガラクトースの1,6結合が存在することがわかった。この多糖類は 888 cm^{-1} に赤道結合のC-Hの変角振動に基づくIRスペクトルを持っていた(Fig. 21)。以上の結果は、明糖類Bは主として β -1,4および1,3結合から成るグルカンであること、しかしながら少量のヘテロ多糖類が夾雜物として存在することを示した。

6m層水の懸濁態多糖類Bはグルコース以外に数種類の单糖類から構成されていた。故に、この糖類画分にはグルカンのほかに、ヘテロ多糖類が存在すると考えられる。実際、この画分より純粋なグルカンを単離することは本研究で用いた方法のみではできなかった。したがって、この多糖類の化学構造に関する分析はおこなわなかった。

IV-4-2-4 水不溶性多糖類

希アルカリ可溶性多糖類Cおよび不溶性多

糖類 D, E, F, G の収率および単糖類組成を Table 28 に示す。多糖類 C はハテロ多糖類を一部含んでいたが、D, E, F, G の多糖類はグルコースのみから構成されていた。故に、アルカリ濃度を増加させていくことにより、グルカンのみを単離可能であることがわかつた。

多糖類 G は D, E, F, G のなかで最も収率がよかつた。この多糖類は、標準試料のセルロースと同様に, 895 cm^{-1} に β -D-グルカンに特徴的な赤外吸収を示した。また、メチル化分析の結果、 $\alpha, 3, 6$ -tri-O-methylglucose および少量の $\alpha, 3, 4, 6$ -tetra-O-methylglucose を部分メチル化糖として検出した。これらの結果より、この多糖類は β -1, 4 結合から成るグルカン、すなわちセルロースであると判断される。

多糖類 D, E, F, G の化学構造に関する分析はおこなわなかつた。しかし、用いた抽出方法より判断すれば、これらの多糖類は多糖

Table 28 Monosaccharide compositions of particulate polysaccharides C, D, E, F and G which were isolated from the particulate matter of 1 m depth in Mikawa Bay

Monosaccharide	Particulate polysaccharide				
	C	D	E	F	G
$\mu\text{g l}^{-1}$					
Glucose	15	100	130	210	330
Galactose	12	0.0	0.0	0.0	0.0
Mannose	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0
Xylose	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arabinose	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0
Fucose	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Rhamnose	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
Total	45	100	130	210	330

類 G と同様のものであると思われる。

VI - 5 考察

VI - 5 - 1 溶存炭水化物の成因

溶存炭水化物の成因を明らかにするため、三河湾海水から得られた懸濁態炭水化物および藻類の細胞内炭水化物の化学組成を調べた。その結果は、溶存炭水化物が現場に棲息する植物プランクトンから何らかの過程を通して排出されたことを強く示唆した。このことを、試料を採取した当時の三河湾、ベーリング海、北部太平洋の生物環境の特性をもとに、また個々の糖類の分析結果をもとに以下に論ずる。

VI - 5 - 1 - 1 三河湾、ベーリング海、北部太平洋の生物環境

三河湾は富栄養化した海域であり、近年春から秋にかけて継藻、鞭毛藻の赤潮が発生している。試料を採取した当時の三河湾では、洞鞭毛藻の *Prorocentrum minimum* の大規模な赤潮

が発生していた。この赤潮は、1980年5月26日から6月13日まで三河湾のほぼ全域にわたって発生し、6月9日に海水のクロロフィル玉濃度が $3,680 \mu\text{g/l}$ 、細胞数が $8.5 \times 10^4 \text{ セル/ml}$ に達したことが報告されている（愛知県水産試験場、1980）。

試水の溶存有機成分、クロロフィル玉濃度、栄養塩濃度をTable 29 に示す。アミノ酸・シハク質、炭水化物は、比色法によればDO Cのそれとれ10~20%を占めた。表面水のクロロフィル玉濃度は底層水の約5倍であった。

北部北太平洋のStn. 3の海域における植物プランクトン群集は主として鞭毛藻および珪藻類であった（Ocean Research Institute, University of Tokyo, 1979）。一方、ベーリング海のStn. 4の海域における優先種は珪藻であり、一部鞭毛藻が存在した。

VI - 5 - 1 - 2 グルコース

グルコースは、溶存態および懸濁態の单糖

Table 29 Profiles of dissolved organic matter,
inorganic nutrients and chlorophyll *a* in the
water samples from Mikawa Bay on 31 May
1980.

	Depth (m)	
	1	6
Dissolved organic matter		
Organic carbon (mg C l^{-1})	1.98	2.35
Amino acids and protein ($\mu\text{g C l}^{-1}$)	401	318
Carbohydrate ^a ($\mu\text{g C l}^{-1}$)	395	218
Inorganic nutrients		
$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ ($\mu\text{g atom l}^{-1}$)	15.8	1.9
$\text{NO}_2^- \text{-N}$ ($\mu\text{g atom l}^{-1}$)	0.6	0.2
$\text{NO}_3^- \text{-N}$ ($\mu\text{g atom l}^{-1}$)	3.2	1.0
$\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$ ($\mu\text{g atom l}^{-1}$)	1.3	0.7
$\text{SiO}_2 \text{-Si}$ ($\mu\text{g atom l}^{-1}$)	36	34
Plant pigment		
Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$)	12.2	2.6

^a Carbohydrate was determined by the phenol sulfuric acid method.

類のなかで最も多く存在した。グルコースは、海洋の植物プランクトンの細胞内代謝産物として生化学的に重要な物質である (Craigie, 1974)。また、この物質が種々の植物プランクトンから細胞外に排出されることが培養実験により知られている (Hellebust, 1974)。細胞内の有機物が排出される機構については充分に解明されていない。しかし、プランクトン細胞の生理学的な知見から判断して、細胞内において比較的高濃度に蓄積された低分子量有機物の一部が細胞膜を通過して外界に分泌されると考えられる (Hellebust, 1974)。また、外環境の急激な変化——たとえば、塩分、栄養塩濃度など——に対応して、無機イオンあるいは有機物を取り入れ、あるいは排出する機構があることが知られている。したがって、おそらく以上の過程を通してグルコースが外界に排出されると考えられる。

上記の過程以外に、多糖類、特にグルカンがバクテリアの体外酵素により加水分解され、

グルコースが生成する可能性が考えられる。実際、プランクトンブルーム時にグルカシビ恩われる多糖類が海水中に多く存在し、それと共にグルコース濃度が増加することが観察されている (Ittekkot et al., 1981)。この事実は、細胞外に排出された多糖類がバクテリアの作用により单糖類まで低分子化されたことを示唆する。しかし、現段階ではこの過程によりどの程度の程度のグルコースが生成するかについては定量的な見積もりは、実験的データが乏しいこともあり、ほとんどなされていない。

VI - 5 - 1 - 3 グリコシルグリセロール

グリコシルグリセロールが、三河湾の懸濁物試料および藻類の細胞内に広く存在した。これら的事実は、海水中のグリコシルグリセロールが植物プランクトンに由来することを強く示唆する。

従来、種々のグリコシルグリセロールが藻類の細胞内に存在することが報告されていい。

α -D-グルコシルグリセロールはテン藻の光合成産物として (Kollman et al., 1979), また細胞内の浸透圧を調整する物質として (Borowitzka et al., 1980) 検出された。フロリドシト (α -D-ガラクトシルグリセロール) およびイソフロリドシト (β -D-ガラクトシルグリセロール) は紅藻の低分子量貯蔵性炭水化物として広く分布している (Craigie, 1974)。また、イツフロリドシトは黄金鞭毛藻の Ochromonas malhamensis の細胞の浸透圧を調整する役割を果たしていることが知られている (Kauss, 1967)。

藻類の細胞内に含まれる糖脂質も海水中のグリコシルグリセロールの起源物質として重要である。糖脂質はグリコシルグリセロールと脂肪酸がエステル結合をした化合物である。モノガラクトシルジグリセリド (β -D-ガラクトシルジグリセリド) およびジガラクトシルジグリセリド (β -D-ガラクトシル- β -D-ガラクトシルジグリセリド) は、

珪藻，鞭毛藻，緑藻，ラン藻の主要な光合産物の一つである (Ferrani and Benson, 1961; Harrington et al., 1970; Holdsworth and Colbeck, 1976; Anderson et al., 1978; Sato et al., 1979). 近年，これらの物質と構造が類似したジガラクトシルモノグリセリドが緑藻の *Ulva pertusa* に (Fusetani and Hashimoto, 1975)，また鞭毛藻の *Prymesium parvum* (Kozakai et al., 1982) および *Amphidinium carteri* (安元健，私信) に溶血毒として存在することがわかっている。これらの糖脂質は，植物組織中に存在する種々の酵素により グリコシルグリセロールと脂肪酸の二つに容易に加水分解される (Sastry and Kates, 1964; Helmsing, 1967 and 1969; Galliard, 1970). 同じ酵素反応が植物プランクトンの細胞内で起こると仮定すれば，これらの糖脂質が海水中のグリコシルグリセロールの起源物質である可能性は大きい。

バクテリアの生体内にも種々の糖脂質が存

在する (Shaw, 1970 and 1975)。しかし、それらの糖脂質の糖類部分の単糖類組成および立体配座は藻類のそれと明らかに異なっていふ。故に、海水中のグリコシルグリセロールがバクテリアに由来する可能性は小さい。

三河湾海水中にス-O-β-D-グルコシルグリセロールが存在したのは特に興味深い。何故ならば、この物質は今までラン藻類にのみ検出されていふからである。三河湾海水中には鞭毛藻の Procentrum minimum および若干の珪藻以外の藻類は検出されなかつた。したがつて、鞭毛藻もしくは珪藻はこの物質を生産する能力があると判断された。

VI-5-1-4 ラミナリビオースおよびラミナリトリオース

ラミナリビオース、ラミナリトリオースは珪藻の Phaeodactylum tricornutum (Ford and Percival, 1965; 五十里, 1974), Chaetoceros sp., Skeletonema sp. (五十里, 1974), 鞭毛藻の Heterosigma sp. (五十里, 1974) に存在する

ことが報告されている。珪藻および鞭毛藻は、これらの中少糖類と同じ結合様式を持つ β -1,3 グルカンを貯蔵性多糖類として持つ (Craigie, 1974)。したがって、これらの少糖類は β -1,3 グルカンの中間代謝産物であると考えられる (Ford and Percival, 1965)。このことは、緑藻、ラン藻、紅藻が澱粉 (α -1,4 グルカン) を貯蔵性多糖類として持つこと、また同じ結合様式を持つマルトース、マルトトリオースなどの少糖類がラン藻の *Mycrocystis* sp. (佐久川・半田, 未発表), 緑藻 (Muscantine, 1965; Joshi, 1967; Patil and Joshi, 1970) に存在することと対照的である。これら的事実は、ラミナリビオース、デミナリトリオースが珪藻、鞭毛藻に特有な化合物であることを示唆するものである。

Jüttner and Matuschek (1978) は、湖水のラン藻 *Oschatoria redekei* の糸胞外排出有機物を ^{14}C ラベル法により調べた結果、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース

が主要な化合物として存在したことを報告している。ラノ藻は前述のようにマルトース、マルトトリオースなどの少糖類を細胞内に含むことがわかっている。したがって、これらの結果より類推すれば、三河湾海水に溶存するラミナリビオース、ラミナリトリオースは表面水に棲息していた Procentrum minimum から細胞外に排出されたものである可能性が大きい。

三河湾の底層水中のこれらの少糖類の濃度は低かった。これは、底層水のクロロフィル量の濃度が低かったこと、また透過光の強度が1%以下であったこととよく対応している。この事実は、これらの糖類が植物プランクトンの光合成活動によって生産されたものであることを示唆する。

VI-5-1-5 ショ糖、ラフィノース、トレハロース、メリヒオース
ショ糖は種々の藻類の貯藏性炭水化物として存在する (Craigie, 1974) が、ラフィノース

の存在は明らかではない。しかし、この物質は高等植物の光合成産物としてショ糖と同様に広く分布し(Dey, 1980), また三河湾の懸濁態炭水化合物としても存在した。これら的事実は、試水中のラフィースが藻類に由来することを強く示唆するものである。

外洋水において、ショ糖以外にトレハロースとメリヒオースが存在した。トレハロースはラン藻およびユーチレナの細胞内に存在することが知られている(Craigie, 1974)。また、この物質が汽水域のラン藻から細胞外に排出されることが¹⁴Cラベル法により明らかにされている(Hall and Fisher, 1983)。

メリヒオースの藻類における存在は明らかではない。しかし、この物質は高等植物の光合成産物としてショ糖やラフィースとともに広く存在する(Dey, 1980)。また、この化合物は三河湾の懸濁態炭水化合物として存在した。したがって、メリヒオースが藻類の細胞内に存在する可能性は充分に考えられる。

今後、この糖類が珪藻や鞭毛藻のよくな微細藻類に存在するかどうかを調べる必要がある。

さて、ショ糖などの乙糖類が藻類以外の海洋生物に由来する可能性も存在する。たとえば、トレハロースはバクテリア、真菌類、酵母のよくな従属栄養微生物に広く存在することが知られてはいる (Elbein, 1974)。三河湾および外洋の深層水においてショ糖が多く存在したこと (Table 14 および 18), メリルオースが深層水にのみ検出されたこと (Table 18) は、特に興味深い。これらの事実は、ショ糖などの乙糖類が深層水に棲息する従属栄養微生物によって生産された可能性を示唆する。しかし、従属栄養微生物の細胞内炭水化物成分に関する情報は今までほとんど得られない。したがって、これらの微生物の炭水化物成分を解明することは今後の検討課題である。

VI - 5 - 1 - 6 ヘテロ多糖類

三河湾海水から単離した溶存態および懸濁

熊のヘテロ多糖類（多糖類A）は7種類の单糖類で構成されていた。これら構成单糖類の相対モル比をFig. 28に比較して示す。1m以上及び6m層水の懸濁態多糖類においてガラクトースとグルコースがそれぞれ若干多く存在するのを除けば、溶存態および懸濁態の両者の单糖類組成は非常によく一致した。また、メチル化分析、IR分析の結果は、いずれも両者の多糖類の化学構造が非常によく類似していることを示した。したがって、これらの結果は両者が同一の多糖類であることを強く示唆した。

三河湾水のヘテロ多糖類と類似の構造を持つ多糖類が、植物プランクトンの細胞外排出多糖類として広く存在することが知られている。Khairov(1968)は分子量が50,000から200,000であるヘテロ多糖類が培養した渦鞭毛藻の Prymnesium parvum から細胞外に排出されたことを報告している。珪藻の細胞外排出多糖類の单糖類組成に関する情報は比較的少

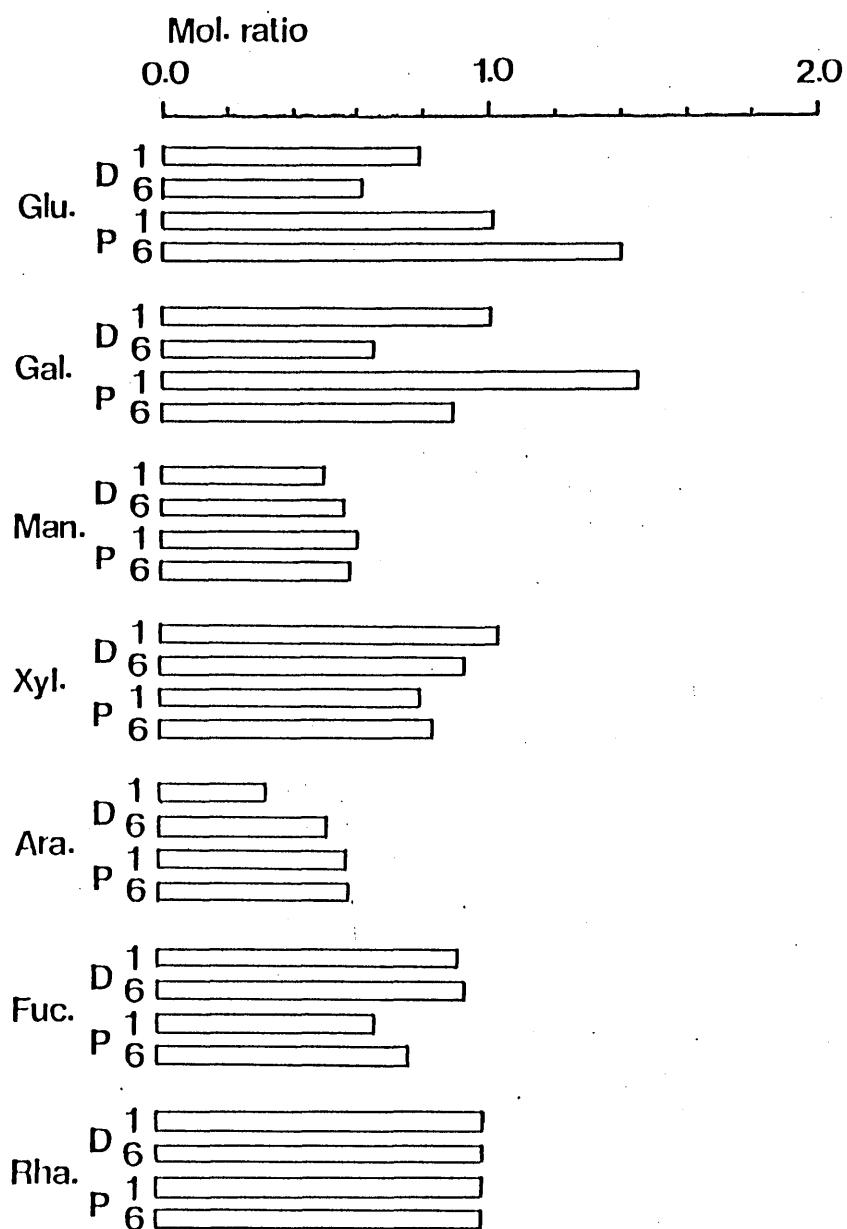


Fig. 28 Molar ratios of monomeric constituents of dissolved (D) and particulate (P) polysaccharides A from the depths of 1 (1) and 6 (6) m in Mikawa Bay. Molar ratio of each of the constituents was relative to rhamnose (1.00).

く存在する。それらの構成单糖類は、ガラクトース、キシロース (Huntsman and SloaneKer, 1971), フコース、ラムノース、アラビノース, ガラクトース (Myklestad et al., 1972), フコース、キシロース、マンノース、グルコース, グルコン酸 (Percival et al., 1980) であるとの報告がある。これらの事実は、珪藻の細胞外排出多糖類が比較的限られた单糖類で構成されていことを示している。したがって、三河湾の溶存態のヘテロ多糖類が珪藻より由来することは考えにくく、一方、鞭毛藻の細胞外排出多糖類は数種類以上の单糖類で構成されている。たとえば、それらの单糖類組成はグルコース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、ラムノース (Marker, 1965), グルコース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、リボース、ラムノース、フラクトース (Khailov, 1968) であるとの報告がある。したがって、おそらくヘテロ多糖類の生成起源は鞭毛藻であると考ふられる。

ベーリング海の表面水から単離したヘテロ多糖類は三河湾水のそれと類似の化学構造を持つていた。この海域の優先プランクトン種は珪藻および鞭毛藻であり、おそらくこれらの中植物プランクトンから由来すると考えられる。

微生物（バクテリア、菌類など）も種々のヘテロ多糖類を持つ（Stacey and Barker, 1960）。しかし、微生物のヘテロ多糖類は、高等植物、藻類のそれと異なる单糖類組成ならびに結合様式を持つことが知られていく。故に試水中のヘテロ多糖類が微生物に由来する可能性は少ない。

VI-5-1-7 水溶性グルカン

三河湾水から単離した β -グルカンは高度に枝分かれした化学構造を持っていた。これに対して、褐藻に広く分布するラミナラン(β -1,3グルカン)の枝分かれの程度は小さい（Craigie, 1974）。近年、 β -1,3および1,6結合を持つ比較的枝分かれしたグルカン(ウ

リツラミナラン) が種々の珪藻に存在することが明らかになつた (Ford and Percival, 1965; Handa, 1969; 五十里, 1974; Percival et al., 1980)。同様の構造を持つ β -グルカンが鞭毛藻にも存在する (五十里, 1974)。これら的事実は、この β -グルカンが他の溶存糖類と同様に、株水当時優先種であった Prorocentrum minimum により生産されたものであることを強く示唆した。しかし、この鞭毛藻の細胞内炭水化物成分に関する情報は、従来ほとんど得られていないので、今後培養実験をおこない解明する必要がある。

β -グルカンは三河湾の懸濁物質の水溶性画分 (多糖類B) にも存在した。この水溶性 β -グルカンは 1,4 および 1,3 結合から成ることがメチル化分析によりわかった。もし、この多糖類が一つの分子内に 1,4 および 1,3 結合を持つならば、部分メチル化糖として 6-ジ-O-メチルグルコースが検出されなければならない。ところが、この部分メチル化糖

は検出されなかった。したがって、この多糖類はそれで β -1,4 および β -1,3 結合を持つ二つの β -グルカンの混合物であると考えられる。このなかで、 β -1,4 グルカンはおそらく強アルカリ可溶性多糖類（多糖類 D～F）の部分分解物である可能性が大きい。一方、 β -1,3 グルカンは溶存態の β -1,3 グルカンと同様にクリソラミナラン様物質であると思われる。

VI-5-1-8 強アルカリ可溶性グルカン
 一般に、植物プロラントンの細胞壁を構成する多糖類は水、希酸に不溶であり、強アルカリにのみ可溶である。鞭毛藻は、強アルカリ可溶性グルカン、すなわちセルロース様物質を細胞壁多糖類として持つことが知られていい（Nevo and Sharon, 1969）。したがって、三河湾水から単離した強アルカリ可溶性グルカンは *Prorocentrum minimum* の細胞壁多糖類であると推定される。

このグルカンは水に不溶のため、溶存炭水化物の直接の起源物質であるとは考えにくいい。

しかし、もしこのグルカンが部分的に加水分解され、低分子量化したならば、水に可溶化する可能性が考えられる。北部北太平洋の表面水に存在したグルカンは、この海域の優先する植物プランクトンである鞭毛藻から上記の過程を経て、海水に可溶化したものであるかも知れない。

VI-5-2 溶存炭水化物の地球化学的および生態学的意義

今日まで、海水中のDOMの化学組成が明らかではなかつたため、海洋微生物がどのような有機物をエネルギー代謝の基質として利用するかほんゞ明らかではなかつた。本研究で種々の单糖類や少糖類が海水中に存在することを明らかにした。これらの化学構造から判断して、溶存糖類は生物学的に極めて不安定な物質であり、バクテリアのエネルギー代謝の基質として容易に利用可能であると考えられる。実際、¹⁴Cでラベルしたグルコ

ースを海水に加え、バクテリアによる分解速度を調べた結果、数時間から數十日という比較的大きい速度で分解されたことがわかつている（Joint and Morris, 1982）。この事実は、溶存する単糖類や少糖類が海洋の生態系において一つの基礎的な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

これららの糖類が外洋の深層水にも微量であるが、存在したのは特に興味深い。従来、外洋の深層における生物学的活動は極めて不活発であると考えられてきた。したがって、その場所における微生物の活動も極めて低調であり、深層水の DOM の大部分は分解されずに安定に存在すると予想された。しかし、近年現場における微生物活動の測定実験、セディメントトラップ実験などを通して、深層水においても微生物による有機物の分解が観察されている。この観点から、本研究で同定した種々の単糖類および少糖類の生態学的意義は大きいと考えられる。

一方、多糖類がバクテリアのエネルギー基質としてどの程度重要であるかは明らかでない。何故ならば、バクテリアは多糖類のような高分子量有機物を直接取り込むことはできず、いったん单糖類や少糖類にまで分解する必要があるからである。しかし、海水中にはセルロース、寒天、でんがん、キチンなどの多糖類を分解する能力のあるバクテリアが棲息することが明らかになつてゐる（奥谷、1974）。したがつて、本研究で検出したヘテロ多糖類および種々のグルカンも充分に分解可能な物質であると考えられる。特に、三河湾水中に存在した β -1,3 グルカンはこの点で興味ある物質である。

Handa and Tominaga (1969) は、水溶性 β -1,3 グルカンが相模灘沖の海水の懸濁物質に存在したことを報告している。彼らは、懸濁態炭水化物およびアミノ酸タンパク質の鉛直分布を測定した結果、 β -1,3 グルカンが他の懸濁態炭水化物およびアミノ酸タンパク質に比

べて、深度とともに速やかに消失することを確かめた。この結果は、このグルカンが微生物により容易に利用される化合物であることを強く示唆する。本研究においても、底層水における β -1,3 グルカンの濃度は表面水に比べて $1/10$ 程度であり、分解されやすい有機物であることが推定された。また、 β -1,3 グルカンはバクテリアや真菌類、あるいは植物アラントクトン細胞に存在する β -1,3 グルカナーゼにより容易に分解されることが知られていて（Bull and Chester, 1966; Myklestad et al., 1982）。これらの事実は、 β -1,3 グルカンが海洋環境において微生物のエネルギー代謝の基質として重要な役割を果たしていることを示すものである。

三河湾および外洋の海水に存在した種々のグリコシルグリセロールは、いずれも藻類に特有な化合物であることが明らかになった。この化合物が外洋の深層水および北部北太平洋の海底堆積物に微量存在したこと（佐久川

・半田, 未発表) は特に興味深い。この事実は、外洋の表層において植物プランクトンにより生産されたグリコシルグリセロールが、微生物による分解を受けずには、何らかの過程を通して深層および海底に運ばれたことを強く示唆する。この化合物が北部太平洋の深層水に設置したセディメントトラップの捕集物中に存在したこと(佐久川・半田, 未発表)から判断すれば、沈降粒子により下方に供給される過程が重要であるかも知れない。とにかく、この糖類は海洋環境において広く分布していると思われるるので、藻類の指標物質の一つとして有用であると判断される。従来、藻類の指標物質として種々のクロロフィル誘導体、脂質などが考えられてきた。しかし、これらの有機物は表層水から深層水にいたるまで広く分布することは限らず、また存在量も少ないため分析上いろいろ問題がある。これに対して、グリコシルグリセロールは数100 ng ~ 数 μg/l の濃度で存在し、また分析も

容易である。この糖類の沿岸および外洋におけるさらに詳細な分布を解析することにより、その地球化学的意義を明らかにすることができると期待される。

三河湾およびベーリング海の表面水に存在したヘテロ多糖類は、植物プランクトンの細胞外排出多糖類であると推定した。この多糖類は、高分子量であること、硫酸エステル化糖を含むことなどの理由から考えて、植物プランクトンの細胞壁の囲りを包む粘着質の物質に由来すると考えられた。一般に、藻類は粘着物質で細胞を保護し、外環境の変化（たとえば乾燥化）に対応し、またバクテリスの攻撃を防いでいる(O'Colla, 1962)。この粘着物質はまた、藻類にとって必要な元素(Fe, Mn等)を取り込み、あるいは毒性を持つ元素(Cu)の働きを弱めたためのキレート物質として重要な役割を持つことが期待されている。Steeman-Nielsen et al. (1969)は、珪藻により排出された粘着物質が銅イオンの毒性を

弱めた作用をすることを示している。また、褐藻類の粘着物質であるアルギン酸（ポリウロニド多糖類）が Sr, Cd, Zn などの重金属の上へ結合剤であることが明らかになつてゐる (Tanaka et al., 1972)。

従来、炭水化物など の polyhydroxy 化合物は種々の金属の配位子になりうることが示されつゝある (Briggs et al., 1981)。上記の事実から判断して、ヘテロ多糖類が藻類のキレート物質としての役割を果たしている可能性が示唆される。これは今後の検討課題である。

VI - 6 要約

- 三河湾水の懸濁態炭水化物ならびに藻類の細胞内少糖類を分析した結果、溶存炭水化物成分として検出したグルコース、グリコシルグリセロール、ラミナリビオース、ヘテロ多糖類、 β -グルカンが同様に存在した。これらの結果は、三河湾の溶存炭水化物が試水を採水当時優先種

であるたる渦鞭毛藻 Prorocentrum minimum により生産されたものであることを強く示唆した。

2. 試水中に存在した $1-O-\beta-D$ -ガラクトシルグリセロール, $6-O-\alpha-D$ -ガラクトシル- $1-O-\beta-D$ -ガラクトシルグリセロールは、おそらく藻類細胞内に存在する糖脂質が酵素作用により加水分解して生成したものであると推定した。
3. 本研究で同定した種々の糖類は、その化学構造から判断して生物学的に分解されやすい化合物であり、海洋微生物のエネルギー代謝の基質として重要である。
4. 本研究で検出したグリコシルグリセロールは海洋環境において藻類の指標物質としての役割が、またヘテロ多糖類は藻類のキレート物質としての働きがそれぞれ期待される。

VII - 結論

1. 活性炭カラムおよび透析を併用することにより、海水の溶存炭水化物の大部分（60%以上）を濃縮し、さらに単糖類、少糖類、多糖類の3つに分離することができた。
2. 三河湾、北部北太平洋、ベーリング海の溶存炭水化物の糖類組成をGC, GC-MS, IR, $^1\text{H-NMR}$, メチル化分析などの方法により調べた結果、グルコース、グリコシルグリセロール、ラミナリ少糖類、ショ糖、トレハロース、メリヤース、ラフィノース、ヘテロ多糖類、 β -1,3 グルカンなどが存在することがわかった。
3. 同定したこれらの糖類の総量は、三河湾において $110 \sim 425 \mu\text{g/l}$ 、外洋水において $27 \sim 145 \mu\text{g/l}$ であり、DOC の $1.0 \sim 8.6\%$ を占めた。概算して、表

面水でそれらの濃度は高く、深層水で低かった。

4. 三河湾の懸濁態炭水化物の化学組成を調べた結果、同試水の溶存炭水化物のそれと極めて類似することがわかった。試水を採水当時の三河湾では渦鞭毛藻、*Procentrum minimum* の赤潮が発生していたことから判断すれば、溶存する糖類はこの植物プランクトンから何らかの過程を通して細胞外に排出されたものであると考えられる。

5. 本研究で同定・定量をした糖類は、沿岸および外洋に棲息する微生物のエネルギー代謝の基質として生態学的に重要であることが示唆された。また、種々のグリコシルグリセロールは海洋環境において藻類に特徴的な物質であり、指標物質としての役割が、一方ヘテロ多糖類は金属との錯体形成物質としての役割がそれぞ期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、有益な助言ならびに観測の援助をいたしました名古屋大学水圈科学研究所大気水圏有機化学部門の各位に感謝の意を表します。

三河湾における観測の便宜を与えてくださいました愛知県水産試験場の所員各位の御好意に深謝します。

¹H-NMRによる試料の測定を引き受けたいたいた文部省岡崎研究機構、基礎生物学研究所分析センターの服部宏之氏に謝意を表します。

文 南大

愛知県水産試験場 (1980) : 業務報告書

- Allan, G.G., J. Lewin and P.G. Johnson (1972): Marine polymers. IV. Diatom polysaccharides. *Botanica Mar.*, 15, 102-108.
- Anderson, R., B.P. Livermore, M. Kates and B.E. Volcani (1978): The lipid composition of the non-photosynthetic diatom Nitzschia alba. *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 77-88.
- Andrews, P. and P.J. leB. Williams (1971): Heterotrophic utilization of dissolved organic compounds in the sea. III. Measurement of the oxidation rates and concentrations of glucose and amino acids in sea water. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 51, 111-125.
- Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 54, 484-489.
- Borowitzka, L.J., S. Demmerle, M.A. Mackay and R.S. Norton (1980): Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of osmoregulation in a blue-green alga. *Science*, 210, 650-651.
- Brauns, G. (1943): Cellobiose. In: *Organic Synthesis*, ed. by A.H. Blatt, Wiley, p. 122-123.
- Briggs, J., P. Finch, M.C. Matulewicz and H. Weigel (1981): Complexes of copper (II), calcium, and other metal ions with carbohydrates: thin-layer ligand-exchange chromatography and determination of relative stabilities of complexes. *Carbohydr. Res.*, 97, 181-188.
- Bull, A.T. and C.G.C. Chesters (1966): The biochemistry of laminaran and the nature of laminarase. *Adv. Enzymol.*, 28, 325-364.

- Burney, C.M., K.M. Johnson, D.M. Lavoie and J.McN. Sieburth (1979): Dissolved carbohydrate and microbial ATP in the North Atlantic: concentrations and interactions. *Deep-Sea Res.*, 26, 1267-1290.
- Cauwet, G. (1978): Organic chemistry of sea water particulates. Concepts and developments. *Oceanol. Acta*, 1, 99-105.
- Chapman, G. and A.C. Rae (1967): Isolation of organic solutes from sea water by co-precipitation. *Nature*, 214, 627-628.
- Chave, K.E. (1965): Carbonates: association with organic matter in surface sea-water. *Science*, 148, 1723-1724.
- Collier, A., S.M. Ray and A.W. Magnitzky (1950): A preliminary note on naturally occurring substances in seawater affecting the feeding of oysters. *Science*, 111, 151-152.
- Craigie, J.S. (1974): Storage products. In: *Algal Physiology and Biochemistry*, ed. by W.D.P. Stewart, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 206-235.
- Degens, E.T., J.H. Reuter and K.N.F. Shaw (1964): Biochemical compounds in offshore California sediments and sea waters. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 28, 45-66.
- Dey, P.M. (1980): Biochemistry of α -D-galactocidic linkages in the plant kingdom. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37, 283-372.
- Duursma, E.K. (1965): The dissolved organic constituents of sea water. In: *Chemical Oceanography*, ed. by J.P. Riley and G. Skirrow, Academic Press, p. 433-475.
- Eklund, G., B. Josefsson and C. Roos (1977): Gas-liquid chromatography of monosaccharides at the picogram level using glass capillary columns, trifluoroacetyl derivatization and electron-capture detection. *J. Chromatogr.*,

- 142, 575-585.
- Elbein, A.D. (1974): The metabolism of α,α -trehalose. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 30, 227-256.
- Fairbourne, A., G.P. Gibson and D.W. Stephens (1931): LX. --- The partial esterification of polyhydric alcohols. Part XI. The five methyl ethers of glycerol and related compounds. J. Chem. Soc., 445-458.
- Ferrari, R.A. and A.A. Benson (1961): The path of carbon in photosynthesis of the lipids. Arch. Biochem. Biophys. 93, 185-192.
- Fogg, G.E. (1966): The extracellular products of algae. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 4, 195-212.
- Ford, C.W. and E. Percival (1965): The carbohydrates of Phaeodactylum tricornutum. Part I. Preliminary examination of the organism, and characterization of low molecular weight material and of a glucan. J. Chem. Soc., 7035-7046.
- Fusetani, N. and Y. Hashimoto (1975): Structures of two water soluble hemolysins isolated from the green alga Ulva pertusa. Agric. Biol. Chem., 39, 2021-2025.
- Galliard, T. (1970): The enzymic breakdown of lipids in potato tuber by phospholipid- and galactolipid-acyl hydrolase activities and by lipoxygenase. Phytochem., 9, 1725-1734.
- Giger, W. (1977): Inventory of organic gases and volatiles in the marine environment. Mar. Chem., 5, 429-442.
- Golovkina, L.S., O.S. Chizhov and N.F. Vul'fson (1966): Mass spectrometer investigation of carbohydrates communication 9. Acetates of polyols. Bull. Acad. Sci. U.S.S.R. Div. Chem. Sci (English Translation), 1853-1863.

- Hakomori, S. (1964): A rapid permethylation of glyclipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, 55, 205-208.
- Hall, S.L. and F.M.Jr. Fisher (1983): Organic compounds released from a natural population of epibenthic bluegreen algae. *J. Phycol.*, 19, 365-368.
- Handa, N. (1966a): Distribution of dissolved carbohydrate in the Indian Ocean. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 22, 50-55.
- Handa, N. (1966b): Examination on the applicability of the phenol sulfuric acid method to the determination of dissolved carbohydrates in sea water. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 22, 1-8.
- Handa, N. (1967): The distribution of the dissolved and particulate carbohydrates in the Kuroshio and its adjacent areas. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 23, 115-123.
- Handa, N. (1969): Carbohydrate metabolism in the marine diatom Skeletonema costatum. *Mar. Biol.*, 4, 208-214.
- Handa, N. (1977): Land sources of marine organic matter. *Mar. chem.*, 5, 341-359.
- Handa, N. and K. Nisizawa (1961): Structural investigation of a laminaran isolated from Eisenia bicyclis. *Nature*, 192, 1078-1080.
- Handa, N. and R. Montgomery (1969): Partial methylation of methyl α -D-manno-pyranoside. Preparation and distribution of mono-, di-, and tri-methyl ethers of D-mannose. *Carbohydr. Res.*, 11, 467-484.
- Handa, N. and H. Tominaga (1969): A detailed analysis of carbohydrates in marine particulate matter. *Mar. Biol.*, 2, 228-235.
- Hanson, R.B. and J. Snyder (1979): Enzymatic determination of glucose in

- marine environments: improvement and note of caution. *Mar. Chem.*, 7, 353-362.
- Harrington, G.W., D.H. Beach, J.E. Dunham and G.G.Jr. Holz (1970): The poly-unsaturated fatty acids of marine dinoflagellates. *J. Protozool.*, 17, 213-219.
- Haverkamp, J., M.J.A. de Bie and J.F.G. Vilegenthart (1974): ^{13}C - and ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy of permethylated disaccharides. *37*, 111-125.
- Healy, T.W. (1971): Selective adsorption of organics on inorganic surfaces. In: *Organic Compounds in Aquatic Environments*, ed. by S.J. Faust and J.V. Hunter, Marcell Dekker Inc, p. 187-212.
- Hellebust, J.A. (1974): Extracellular products. In: *Algal Physiology and Biochemistry*, ed. by W.D.P. Stewart, Blackwell Acientific Publications, Oxford, p. 838-863.
- Helmsing, P.J. (1967): Hydrolysis of galactolipids by enzymes in spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, 144, 470-472.
- Helmsing, P.J. (1969): Purification and properties of galactolipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 519-533.
- Hirayama, H. (1974): Fluorimetric determination of carbohydrates in sea water. *Anal. Chim. Acta*, 70, 141-148.
- Holdsworath, E.S. and J. Colbeck (1976): The pattern of carbon fixation in the marine unicellular alga Phaeodactylum tricornutum. *Mar. biol.*, 38, 189-199.
- Huntsman, S.A. and J.H. Sloneker (1971): An exocellular polysaccharide from the diatom Gomphonema olivaceum. *J. Phycol.*, 7, 261-264.
- 五十里良生(1974):藻類ケルカソの研究.名古屋大学理学研究科修士論文
- Ittekkot, V., U. Brockmann, W. Michaelis and E.T. Degens (1981): Dissolved

- free and combined carbohydrates during a phytoplankton bloom in the northern North Sea. 4, 299-305.
- Ittekkot, V., E.T. Degens and U. Brockmann (1982): Monosaccharide composition of acid-hydrolyzable carbohydrates in particulate matter during a plankton bloom. Limnol. Oceanogr., 27, 770-776.
- Jeffrey, L.M. and D.W. Hood (1958): Organic matter in sea water: an evaluation of various methods for isolation. J. Mar. Res., 17, 247-271.
- Johannes, R.E. and K.L. Webb (1965): Release of dissolved amino acids by marine phytoplankton. Science, 150, 76-77.
- Johnson, K.M. and J.McN. Sieburth (1977): Dissolved carbohydrates in seawater. I. A precise spectrophotometric analysis for monosaccharides. Mar. Chem., 5, 1-13.
- Joint, I.R. and R.J. Morris (1982): The role of bacteria in the turnover of organic matter in the sea. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 20, 65-118.
- de Jong, E.G., W. Heerma, J. Haverkamp and J.P. Kamerling (1979): Electron impact mass spectrometry of permethylated disaccharides. Biomed. Mass Spectrom., 6, 72-77.
- Josefsson, B.O. (1970): Determination of soluble carbohydrates in sea water by partition chromatography after desalting by ion-exchange membrane electro-dialysis. Anal. Chim. Acta, 52, 65-73.
- Joshi, G.V. (1967): Studies in photosynthesis in marine plants of Bombay. In: Proc. Seminar Sea, Salt & plants, ed. by V. Krishnamurthy, Catholic Press, Ranchi, India, p. 256-264.
- Jüttner, F. and T. Matuschek (1978): The release of low molecular weight compounds by the phytoplankton in an euphotic lake. Water Research, 12,

251-255.

Kärkkäinen, J. (1970): Analysis of disaccharides as permethylated disaccharide alditols by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, 14, 27-33.

Kärkkäinen, J. (1971): Structural analysis of trisaccharides as permethylated methyl glycosides by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*, 17, 1-10.

Kauss, H. (1967): Metabolism of isofloridoside ($O-\alpha-D\text{-galactopyranosyl}\text{-(1}\rightarrow\text{1)}$ -glycerol) and osmotic balance in the fresh water alga Ochromonas. *Nature*, 214, 1129-1130.

Kerr, R.A. and J.G. Quinn (1975): Chemical studies on the dissolved organic matter in seawater. Isolation and fractionation. *Deep-Sea Res.*, 22, 107-116.

Khailov, K.M. (1968): Extracellular microbial hydrolysis of polysaccharide dissolved in sea water. *Mikrobiologia*, 37, 518-522.

Kollman, V.H., J.L. Hanners, R.E. London, E.G. Adame and T.E. Walker (1979): Photosynthetic preparation and characterization of ^{13}C -labelled carbohydrates in Agmenellum quadruplicatum. *Carbohydr. Res.*, 73, 193-202.

Koyama, T. and T.G. Thompson (1959): Organic acids of sea water. AAAS Pre-prints of Int. Oceanogr. Congr., 925-926.

Kozakai, H., Y. Oshima and T. Yasumoto (1982): Isolation and structural elucidation of hemolysin from the phytoflagellate Prymesium parvum. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 233-236.

Lewis, G.J. and N.W. Rakestraw (1955): Carbohydrate in sea water. *J. Mar. Res.* 14, 253-258.

Liebezeit, G., M. Böltner, I.F. Brown and R. Dawson (1980): Dissolved free

- amino acids and carbohydrates at pycnocline boundaries in the Sargasso Sea and related microbial activity. *Oceanol. Acta*, 3, 357-362.
- Linnenbom, V.J. and J.W. Swinnerton (1970): Low molecular weight hydrocarbons and carbon monoxide in sea water. In: *Symposium on Organic Matter in Natural Waters*, ed. by D.W. Hood, Univ. of Alaska, p. 455-467.
- Lönngren, J. and S. Svensson (1974): Mass spectrometry in structural analysis of natural carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 29, 41-106.
- Mackinnon, M.D. (1981): The measurement of organic carbon in sea water. In: *Marine Organic Chemistry*, ed. by E.K. Duursma and R. Dawson, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, p. 415-443.
- Mann, K.H. (1973): Seaweeds: Their productivity and strategy for growth. *Science*, 182, 975-981.
- Marker, A.F.H. (1965): Extracellular carbohydrate liberation in the flagellates Isochrysis galbana and Prymnesium parvum. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 45, 755-772.
- McCarthy, J.J. (1970): A urease method for urea in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 15, 309-313.
- Menzel, D.W. and R.F. Vaccaro (1964): The measurement of dissolved organic and particulate carbon in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 9, 138-142.
- Mills, G.L. and J.G. Quinn (1981): Isolation of dissolved organic matter and copper complexes from estuarine waters using reverse-phase liquid chromatography. *Mar. Chem.*, 10, 93-102.
- Mopper, K. (1977): Sugars and uronic acids in sediment and water from the Black Sea and North Sea with emphasis on analytical techniques. *Mar. Chem.*, 5, 585-603.

- Mopper, K. and E.T. Degens (1979): Organic carbon in the ocean: nature and cycling. In: The Global Carbon Cycle, ed. by B. Bolin et al., John Wiley & Sons, p. 293-316.
- Mopper, K., V. Ittekkot, R. Dawson and G. Liebezeit (1980): The monosaccharide spectra of natural waters. Mar. Chem., 10, 55-66.
- Morris, R.J. and G. Eglinton (1977): Fate and recycling of carbon compounds. Mar. Chem., 5, 559-572.
- Muscatine, L. (1965): Symbiosis of hydra and algae---III. Extracellular products of the algae. Comp. Biochem. Physiol., 16, 77-92.
- Myklestad, S., A. Haug and B. Larsen (1972): Production of carbohydrates by the marine diatom Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. J. exp. mar. Biol. Ecol., 9, 137-144.
- Myklestad, S., R. Djurhuus and A. Mohus (1982): Demonstration of exo-(β-1,3)-D-glucanase activity in some planktonic diatoms. J. exp. mar. Biol Ecol., 56, 205-211.
- Natarajan, K.V. (1970): Distribution and significance of vitamin B₁₂ and thiamine in the Subarctic Pacific Ocean. Limnol. Oceanogr., 15, 655-659.
- Nevo, Z. and N. Sharon (1969): The cell wall of Peridinium westii, a non cellulosic glucan. Biochim. Biophys. Acta, 173, 161-175.
- O'Colla, P.S. (1962): Mucilages. In: Physiology and Biochemistry of Algae, ed. by R.A. Lewin, Academic Press, p. 337-356.
- Ogura, N. (1975): Further studies on decomposition of dissolved organic matter in coastal seawater. Mar. Biol., 31, 101-111.
- 奥谷康一 (1974): 有機物の分解に関する微生物. 海洋学講座 11 海洋微生物, (多賀信夫編), 東京大学出版会, p 155-161.

- Patil, B.A. and G.V. Joshi (1970): Photosynthetic studies in Ulva lactuca.
Botanica mar., 13, 111-115.
- Percival, E., M.A. Rahman and H. Weigel (1980): Chemistry of the polysaccharides of the diatom Coscinodiscus nobilis. Phytochem., 19, 809-811.
- Ocean Research Institute, Univ. of Tokyo (1979): Preliminary Report of The Hakuho Maru Cruise KH-78-3, ed. by A. Hattori, 87 p.
- Provasoli, L. (1963): Organic regulation of phytoplankton fertility. In: The Sea, ed. by M.N. Hill, Interscience, p. 165-210.
- Sastray, P.S. and M. Kates (1964): Hydrolysis of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by specific enzymes in runner-bean leaves. Biochem., 3, 1280-1287.
- Sato, N., N. Murata, Y. Miura and N. Ueta (1979): Effect of grown temperature on lipid and fatty acid compositions in the blue-green algae, Anabaena variabilis and Anacystis nidulans. Biochim. Biophys. Acta, 572, 19-28.
- Schaefer, H. (1965): Isolierung von gelösten kohlenhydraten aus dem Meerwasser. Helgoländer Wiss. Meeresunters., 12, 253-259.
- Sepers, A.B.J. (1977): The utilization of dissolved organic compounds in aquatic environments. Hydrobiologia, 52, 39-54.
- Shaw, N. (1970): Bacterial glycolipids. Bacteriological Reviews. 34, 365-377.
- Shaw, N. (1975): Bacterial glycolipids and glycophospholipids. Advances Microbiol. Physiol., 12, 141-167.
- Sieburth, J.McN. (1969): Studies on algal substances in the sea. III. The production of extracellular organic matter by littoral marine algae. J. exp. mar. Biol. Ecol., 3, 290-309.

- Skopintsev, B.A. (1981): Decomposition of organic matter of plankton, humification and hydrolysis. In: Marine Organic Chemistry, ed. by E.K. Duursma and R. Dawson, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, p. 125-177.
- Spedding, H. (1964): Infrared spectroscopy and carbohydrate chemistry. Adv. Carbohydr. chem., 19, 23-49.
- Stacey M.F.R.S. and S.A. Barker (1960): Polysaccharides of microorganisms. Oxford Univ. Press, 228 p.
- Steeman-Nielsen, E., L. Kamp-Nielsen and S. Wium-Andersen (1969): The effect of deleterious concentrations of copper on the phytosynthesis of Chlorella pyrenoidosa. Physiol. Plant., 22, 1121-1133.
- Tanaka, Y., A.J. Hurburt, L. Angeloff and S.G. Skoryna (1972): Application of algal polysaccharides as in vivo binders of metal pollutants. In: Proceedings of the Seventh International Seaweed symposium, ed. by K. Nisizawa, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, p. 602-604.
- Teller, W.M., E.C. Burke, J.W. Resevoir and B.F. MacKenzie (1962): Urinary excretion of acid mucopolysaccharides in normal children and patients with gargoyleism. J. Labo. & Clin. Med., 59, 95-101.
- 友田正司, 古賀正憲, 鶴見月琴一 (1976) : オリゴ糖・生化学実験講座 4 糖質の化学(上) (日本生化学会編), 東京化学同人, p 47-79.
- Udenfriend, S., S. Stein, P. Böhen and W. Dairmar (1972): Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. Science, 178, 871-872.
- Vaccaro, R.E., S. Hicks, H.W. Jannasch and F.G. Carey (1968): The occurrence and role of glucose in sea water. Limnol. Oceanogr., 13, 356-360.
- Walsh, G.E. (1965): Studies on dissolved carbohydrate in Cape Cod waters. II.

- Diurnal fluctuation in Oyster Pond. Limnol. Oceanogr., 10, 577-582.
- Wangersky, P.J. (1978): Production of dissolved organic matter. In: Marine Ecology, ed. by O. Kinne, John Wiley, p. 1-211.
- Whistler, R.L. and D.F. Durso (1950): Chromatographic separation of sugars on charcoal. J. Am. Chem. Soc., 72, 677-679.
- Williams, P.M. (1965): Fatty acids derived from lipids of marine origin. J. Fish. Res. Bd Can., 22, 1107-1122.
- Williams, P.M. (1975): The distribution and cycling of organic matter in the ocean. In: Organic Compounds in Aquatic Environments, ed. by S.J. Faust and J.V. Hunter, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 145-163.
- Williams, P.M. and A. Zirino (1964): Scavenging of "dissolved" organic matter from sea-water with hydrated metal oxides. Nature, 204, 462-464.
- Wright, R.T. and J.E. Hobbie (1966): Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic systems. Ecology, 47, 447-464.