

9824 海藻が放出するポリフェノール類と環境生理活性機能： フロロタンニン類の抗菌性とグリコシダーゼ阻害

助成研究者：中村 孝 (九州大学 生物資源環境科学研究科)
共同研究者：山口 邦子 (九州大学 生物資源環境科学研究科)

【目的】春先から初夏にかけて日本沿岸では、アラメ、ホンダワラなどの大型海藻が繁茂して藻場を形成し、稚仔魚の生育の場となる。藻場には稚仔魚の隠れ場所以外の機能はないだろうか？ 海藻は稚仔魚や傷病魚にとって菌的に清浄な環境を提供しているのではないだろうか？ 本研究では、藻場形成海藻が生態系へ及ぼす生理機能を明らかにする一環として、藻場を形成する大型褐藻を中心に、抗菌性物質を探索し、その物質を分離精製、同定し、それらの抗菌活性、環境中への分泌及びグルコシダーゼ阻害活性について検討したものである。

【方法】抗菌性物質の調製：海藻乾燥物100gに対し400mlのメタノールを加え、ウルトラディスペーザー(LK-21、ヤマト科学)を用いて攪拌抽出後、さらに800mlのクロロホルムを加え再度攪拌抽出した。その後、各種の溶媒分別画分を調製し抗菌試験に供した。アラメについては、カラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて抗菌性物質を精製単離した。抗菌性試験：魚病菌6種、一般菌2種を供試菌とし、ペーパーディスク法及びTLC分画物のオートバイオグラフィーで平板上に出現した発育阻止帯の直径を測定し、活性の強さを比較した。アラメフロロタンニンの環境海水への溶出試験：採取直後のアラメを海水あるいは脱イオン水に浸し、経日的に採水し同量の酢酸エチルで抽出、濃縮後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量した。カラムにはODS-3(GL Science, 4mm×25cm)を用い、溶出剤A液30%メタノール、B液100%メタノールでグレーディエント溶出し、溶出ピークをUV290nmで検出した。内部標準物質としてn-propyl p-hydroxybenzoateを用い、フロログルシノール量に換算し定量した。

【結果】海藻抽出物画分をペーパーディスク法を用いて抗菌性試験を行った結果、アラメ、イソモク、ウミトラノオ、トゲモク、ヒジキに発育阻止帯を観察した。活性の強いアラメに的を絞り、抗菌性物質のフロロタンニン6種を精製単離し、これらがどれも抗菌活性を持つことを明らかにした。アラメを海水、脱イオン水に浸漬し、フロロタンニン類の溶出試験を行い、水中への漏出が速やかであることを観察した。フロロタンニン類の抗菌活性の機構を推定するため、サザエ中腸線抽出液を用いグリコシダーゼ阻害試験を行い、アラメのフロロタンニン類の何れもが、各種のグリコシダーゼに対し、比較的強い阻害効果を示すことを明らかにした。

9824 海藻が放出するポリフェノール類と環境生理活性機能：
フロロタンニン類の抗菌性とグリコシダーゼ阻害

助成研究者：中村 孝 (九州大学 生物資源環境科学研究科)
共同研究者：山口 邦子 (九州大学 生物資源環境科学研究科)

研究目的

春先から初夏にかけて日本沿岸では、アラメ、ホンダワラなどの大型海藻が繁茂し藻場を形成し稚仔魚の生育の場となる。夏を過ぎると流れ藻となり、同じ様に稚仔魚、小魚に生育の場を提供する。藻場には稚仔魚の隠れ場所以外の機能はないだろうか？海藻は稚仔魚や傷病魚にとって菌的に清浄な環境を提供しているのではないだろうか？

海藻の生理活性物質に関する文献は1950年代から散見されるようになり、今日まで多数の化合物が抗菌性、抗付着、被食阻害物質として研究されて来た。¹⁷⁾しかし、これらの大部分は、構造上の新奇性に主眼をおいて研究されたものであったり、詳細な抗菌活性まで調べられているものは極めて少なく、ましてや、環境・生態系との関連から、具体的な化合物の抗菌活性が検討されたことはあまりなかったのではないかと考えている。森林浴ではないが、藻場、海中林の効用を菌的環境浄化の視点から探って見る価値はあると考えて研究を開始した。

海藻はC20:5酸など高度不飽和脂肪酸含量が高い⁸⁹⁾にも関わらず、乾物にしても脂質は酸化され難い。著者らは、海藻の抗酸化性物質を探索し、褐藻のイシゲが高含量のトコフェロール類を含むこと¹⁰⁾、また、アラメから抗酸化性物質として5種類のプロロタンニン類を単離し、それらの構造を決定した¹¹⁾。陸上植物のポリフェノール類であるカテキン類、フラボノイド類は古くは抗菌性、また、近年は抗酸化性物質として脚光浴びている。海藻特に褐藻のポリフェノール類はグルシノールを基本骨格とするフロロタンニン類であり、藻場や海中林形成褐藻に一般的に含まれるポリフェノールであると考えられている。しかし、これらの構造は複雑多岐で一部の構造が明らかにされているに過ぎず、生理活性もほとんど判っていないのが現状である。

本研究では、藻場を形成する大型褐藻を中心に、特に魚病菌を用いて抗菌性物質を探索し、そのうち抗菌活性の強かったコンブ目コンブ科のアラメについて、その抗菌性物質であるフロロタンニンの抗菌活性、環境中への分泌及びグリコシダーゼ阻害活性に付いて検討したので報告する。

研究方法

1. 海藻の抗菌性物質の調製

供試海藻 福岡市近郊の沿岸で採取した藻場形成褐藻であるアカモク *Sargassum horneri*、イソモク *S. hemiphyllum*、ウミトラノオ *S. thunbergii*、トゲモク *S. micracanthum*、ヤツマタモク *S. patens*、ハハキモク *S. Kjerfveianum* Yendo ヨレモク *S. siliquastrum*、ジョロモク *Myagropsis myagroides*、ヒジキ *Hizikia fusiformis*、アラメ *Eisenia bicyclis*、ワカメ *Undaria pinnatifida* の他、緑藻のアオサ *Ulva pertusa*、ボウアオノリ *Enteromorpha intestinalis*、紅藻のユカリ *Plocamium telfairiae*などを日陰干しして乾燥させた。これらは細砕後冷凍庫 (-20℃) に保管した。

抗菌性物質の抽出 海藻乾燥細砕物 100 g に 400 ml のメタノールを加えウルトラディスパーザー (LK-21、ヤマト科学) を用いて攪拌後、さらに 800 ml のクロロホルムを加え再度攪拌抽出した。吸引濾過後、得られた濾液にクロロホルム：メタノール：水の比が 8 : 4 : 3 (v/v) になるように水 300 ml を加えて振盪、静置し、上層と下層画分を得た。¹²⁾ アラメでは、更に上層に等量のエーテルを加えて振盪後、静置し、水溶性及びエーテル画分を得た。

アラメ抽出物の精製・単離 前記エーテル画分成分をカラムクロマトグラフィー (CC) および薄層クロマトグラフィー (TLC) により精製した。CC は珪酸カラム、(10 mm i.d. × 30 cm、ワコーゲル C-300、和光純薬工業)、溶媒にはクロロホルム：メタノール：水 (50 : 30 : 7, v/v) を、溶出ピークの検出は紫外検出器 (Hitachi L-400V) を用い、UV 310 nm で行った。溶出物を TLC で確認し、必要に応じて TLC を用いて単離した。薄層板には Silicagel 60 F254 (Merck 社)、展開溶媒にはクロロホルム：メタノール：水：酢酸 (70 : 30 : 2 : 1, v/v)、検出試薬にはパプリカ色素¹³⁾ および 50% - 硫酸を用いた。精製・単離したアラメ抽出物の構造は、¹³C、¹H-NMR 法、FAB-MS 法で調べた。

2. 抗菌性試験

供試菌株 宮崎大学農学部水産防疫学講座から供与して頂いた魚病菌、ウナギのパラコ口病の *Edwardsiella tarda*、ブリの連鎖球菌症の *Enterococcus seriolicida*、ハマチの類結節症の *Pasteurella piscicida*、サケ科魚類のビブリオ病の *Vibrio anguillarum*、ウナギの鱭赤病の *Aeromonas hydrophila*、ブリ等のシュウドモナス病の *Pseudomonas fluorescens* の 6 種と 3 種の一般細菌、*Citrobacter freundii*、*Proteus vulgaris*、*Micrococcus luteus* を用いた。

抗菌性試験用菌液の調製 一般細菌は、保存培養 (PY 斜面寒天) から同液体培地に移植し、25℃ で 1 日間培養して菌液を調製した。魚病菌は、保存培養 (トリプトソーヤ寒天培地、ニッスイ) からトリプトソーヤ・プイオン (ニッスイ) 液体培地に移植し、*E. tarda* については 30℃、他は 25℃ で 1 日間培養した。

抗菌性試験用ディスクの作製 乾熱滅菌したペーパーディスク (ADVANTEC, 8mmあるいは6 mm) に前記の上層と下層画分濃縮物 50 μ l (10 mg/ディスク) ずつを添加し、真空ポンプで溶媒を除去した。

抗菌性試験 ペーパーディスク法¹⁴⁾ : 一般細菌、魚病菌共に、基層寒天培地 (トリプトソーヤ寒天培地) 上に供試菌株を混入した同組成の寒天培地を重層して二重寒天平板培地を作製し、20分間放置した。平板上にディスクをのせて保温 (*E. tarda* については30℃、他は25℃) 後、平板上に出現した発育阻止帯の直径を測定した。

オートバイオグラフィー¹⁴⁾ : アラメ抽出物のエーテル画分をTLC分析して、得られたポリフェノールバンドをはさみで切り取り、前記法で *M. luteus* を接種した二重寒天平板培地にのせ、出現した発育阻止帯を観察した。

最小阻止濃度 (MIC) 試験 ペーパーディスク法¹⁴⁾ : 全供試菌を接種した二重寒天平板培地に、フロログルシノール溶液 50 μ l (5mg/ディスク、3mg/ディスク、1mg/ディスク) を添加したディスクをのせ供試菌の発育を完全に阻止する最小濃度、MIC値を求めた。寒天培地希釈法^{14, 15)} : 20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/mlのフロログルシノール溶液1 mlずつを径9cmのシャーレに分注し、加温溶解した寒天培地9mlと均一に混ぜ固化した後、各供試菌を1白金耳1~2 cm画線して培養後、コロニーの出現を完全に阻止する最小濃度、MIC値を求めた。

3. アラメフロロタンニンの環境海水への溶出試験

採取直後のアラメ1.2Kgを60lの海水あるいは脱イオン水に浸し、経日的に500ml採取し同量の酢酸エチルで抽出し、濃縮後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した。カラムにはODS-3 (GL Science, 4mm i.d. \times 25cm) を用い、溶出剤A液30% MeOH, B液100% MeOHでグレーディエント溶出し、溶出ピークをUV290nmで検出した。内部標準物質として *n*-propyl *p*-hydroxybenzoate を用い、フロログルシノール量に換算し定量した。

結果

供試海藻からの抗菌性物質の探索 : 海藻をメタノール、ついでクロロホルムで攪拌抽出後、水を加えて2層に分画して得た上層 (水溶層) と下層 (脂溶層) 画分をペーパーディスク法を用いて抗菌性試験を行った結果、褐藻 6種 (アラメ、イソモク、ウミトラノオ、トゲモク、ヒジキ) の上層に発育阻止帯を観察したが、下層では観察されなかった。すなわち、一般細菌 *M. luteus*、*P. vulgaris* において全褐藻抽出物ディスクの周縁部に明瞭な透明帯が出現し、抗菌作用を有することを確認したが、魚病菌においてはアラメ抽出物にのみ透明帯が観察された。(Table 1) 全供試菌に抗菌活性を持つことを確認したアラメに的を絞り、エーテル画分 (粗フロロタンニン) を用いて研究を進め上層に含まれるアラメフロロタンニンが他の魚病菌に対しても抗菌活性を持つことが明らかになった。(Table 2)

Table 1 Inhibition of bacterial growth by brown alga extract

| Microorganisms | Marine algae | | | | |
|-----------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| | E.b | S.h | S.t | S.m | H.f |
| <i>M. luteus</i> | ++ | ++ | + | ++ | + |
| <i>P. vulgaris</i> | ++ | ++ | + | ++ | + |
| <i>E. seriolicida</i> | ++ | - | - | - | - |
| <i>E. tarda</i> | ++ | - | - | - | - |
| <i>P. piscicida</i> | + | - | - | - | - |

symbols : $- \leq 8.0 < \pm \leq 8.5 < + \leq 10.0 < ++$
(diameter of sensitive zone, mm)

E.b: *Eisenia bicyclis*, S.h: *Sargassum hemiphyllum*,
S.t: *Sargassum thunbergii*, S.m: *Sargassum micracanthum*, H.f: *Hizikia fusiformis*

Ten mg of upper layer extracts was applied on a paper disk(i.d.8mm).

Table 2 Inhibition of bacterial growth by crude phlorotannins prepared from *Eisenia bicyclis*.

| Microorganisms | Amount of phlorotannins | | |
|---------------------------|-------------------------|-----|-------------|
| | 5 | 2.5 | 0.5 mg/disk |
| <i>V. anguillarum</i> (1) | ++ | + | - |
| <i>V. anguillarum</i> (2) | ++ | + | - |
| <i>A. hydrophila</i> (1) | ++ | ++ | - |
| <i>A. hydrophila</i> (2) | ++ | ++ | - |
| <i>P. fluorescens</i> | ++ | + | ± |
| <i>C. freundii</i> | - | - | - |

symbols: $- \leq 6.0 < \pm \leq 6.5 < + \leq 8.0 < ++$
(diameter of sensitive zone, mm)

Prescribed amounts of crude phlorotannins (ether fraction) of *Eisenia bicyclis* were applied on paper disks (i.d. 6mm).

アラメ抽出物の分離および抗菌性：抗菌活性が確認されたエーテル画分の6物質は、カラムクロマトグラフィーにTLC法を併用することにより全物質を単離・精製し構造を確認した。Fig. 1に示すように、いずれもフロログルシノールを基本骨格とする多量体である。T-2は未同定であるが、分子量478で遊離水酸基を7個持った4量体であった。TLC展開後、量的に少ないフロログルシノール以外の各バンドをはさみで切り取り、オートバイオグラフィー法により抗菌性試験を行った。その結果、全バンドの周縁部に抗菌活性を示す透明帯が観察され、いずれの化合物も抗菌性を持っていることが判った。(Fig. 2)

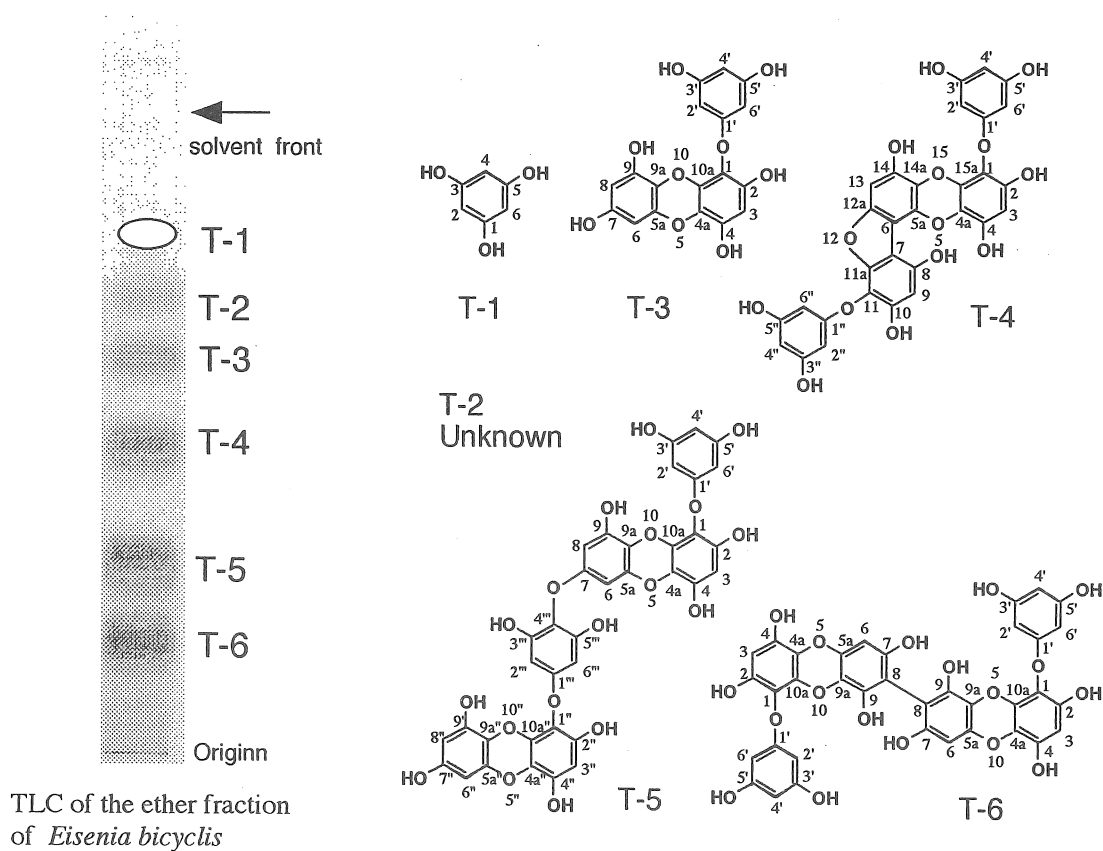


Fig. 1 Phlorotannins in *Eisenia bicyclis*

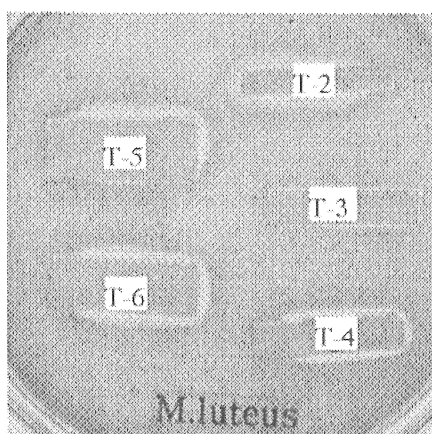


Fig.2 Autobiography of phlorotannins prepared from *Eisenia bicyclis*
After TLC -separation, phlorotannin bands were cut off and tested

フロログルシノールの抗菌力試験：フロログルシノール標品を用いて供試菌の発育を完全に阻止する最小濃度、MIC値を求めた。抗菌力試験には、ペーパーディスク法

および寒天培地希釈法を用いた。ペーパーディスク法では、一部例外があったがフロロルシノールを3mg/diskおよび5mg/disk添加したときに発育阻止帯が観察された。すなわち、MIC値は3mg/disk程度で、粗フロロタンニンでの結果(Table 2)と大差がなかった。さらに、寒天培地希釈法を行った結果、一般細菌2種においてはフロログルシノールを40、50、および60mg/シャーレ、魚病菌3種においては50、60mg/シャーレ添加したときコロニーの発現を完全に阻止した。すなわち、MIC値は一般細菌においては40mg/シャーレ、魚病菌においては50mg/シャーレで魚病菌がやや抵抗性が強い傾向が観察された。

Table 3 Inhibition of bacterial growth by phloroglucinol.

| Microorganisms | Amount of phloroglucinol | | |
|-----------------------|--------------------------|----|-----------|
| | 5 | 3 | 1 mg/disk |
| <i>M. luteus</i> | ++ | + | - |
| <i>P. vulgaris</i> | ++ | + | - |
| <i>E. seriolicida</i> | ++ | + | - |
| <i>E. tarda</i> | ++ | + | - |
| <i>P. piscicida</i> | ++ | + | - |
| <i>V. anguillarum</i> | ++ | ++ | - |
| <i>A. hydrophila</i> | + | - | - |
| <i>P. fluorescens</i> | ++ | ++ | ± |
| <i>C. freundii</i> | - | - | - |

symbols: $- \leq 8.0 < \pm \leq 8.5 < + \leq 10.0 < ++$ (diameter of sensitive zone, mm)
 Prescribed amount of phloroglucinol was applied on a paper disk(i.d. 8mm).

海水中へのフロロタンニン類の溶出：アラメ生藻体1.2Kgを30 lの海水に入れ、溶出したフロロタンニンを定量した。Fig. 3に示すように、2日後に藻体に含まれる殆ど全

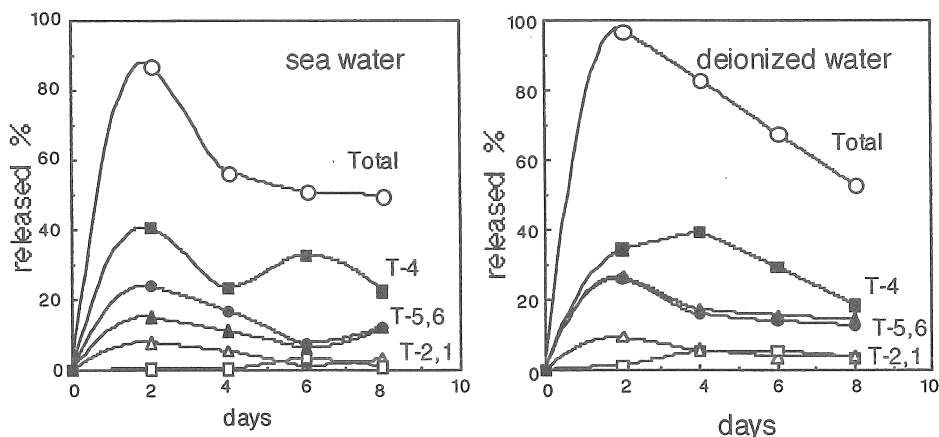


Fig. 3 Amount of phlorotannins released in enviromental water.

量 (7.6 g, 87%) が溶出し、その後は減少した。脱イオン水浸漬でも同様な傾向を示した。これらの結果は、藻体の早期の死とフロロタンニンの溶出、溶出したフロロタンニンの速やかな劣化 (酸化) を推測させた。

考 察

本研究では、アラメ藻体中から phloroglucinol (T-1)、eckol (T-3)、phlorofuocufuroeckol (T-4)、dieckol (T-5)、および8,8'-bieckol (T-6)のフロロタンニン類の存在を確認し、各々が抗菌活性を示すことを明らかにした。これまでもアラメの属する褐藻類のシワヤハズ、ホンダワラの生産するフェノール類の抗菌性物質が同定されており¹⁾、フェノール性物質と抗菌性には深いつながりがあると思われる。また、既知のフロロタンニン類以外の物質で抗菌活性を示すものがアラメ水溶性画分にも存在することを確認したが、それらの物質の同定は行っていない。これは今後の課題である。アラメのフロロタンニン類は海水中に速やかに溶出してくることは明らかになったが、藻体の生死の判別が困難で、これらがどの程度生きた藻体から放出されるかについては、明らかにすることが出来なかった。フロロタンニンの合成速度等を含め今後の検討課題である。

Table 4 Glycosidase inhibition of phlorotannins in *Eisenia bicyclis*

| Substrates | Enzymatic activity *1 | Inhibition ratio*2 | |
|---|-----------------------|--------------------|-------------|
| | | 5mg/ml*2 | 2.5mg/ml *2 |
| pNp- α -D-galactopyranoside | + | (+) | (+) |
| pNp- β -D-galactopyranoside | + | + | |
| pNp- α -L-fucopyranoside | + | ++ | + |
| pNp- β -L-fucopyranoside | - | | |
| pNp- α -D-xylopyranoside | - | | |
| pNp- β -D-xylopyranoside | + | + | + |
| pNp- α -D-glucopyranoside | - | | |
| pNp- β -D-glucopyranoside | + | ++ | ++ |
| pNp- α -D-glucuronide | - | | |
| pNp- β -D-glucuronide | + | + | + |
| pNp- α -D-mannopyranoside | + | (+) | (+) |
| pNp- β -D-mannopyranoside | + | ++ | + |
| pNp- α -L-arabinopyranoside | + | +++ | +++ |
| pNp- α -L-rhamnopyranoside | + | (+) | (+) |
| pNp-N-acetyl- α -D-galactosaminide | + | + | + |
| pNp-N-acetyl- β -D-galactosaminide | + | + | + |
| pNp-N-acetyl- α -D-glucosaminide | - | | |
| pNp-N-acetyl- β -D-glucosaminide | + | + | + |

*1 Enzyme activity in viscera of top shell.

*2 Inhibition ratio : $0 < + \leq 30\% < ++ \leq 60\% < +++ \leq 90\%$, (-) : enhancement. Prescribed amounts of crude phlorotannins (ether fraction) of *E. bicyclis* were applied.

本研究で、フロロタンニン類の抗菌活性は強いものではなかったが、藻体内で次々に合成され、分泌されればその物自身の抗菌活性は弱くてもその効果が期待出来る。いずれにしても実際の藻場環境への寄与の程度は今後の研究を待たねばならない。また、フロロタンニン類の抗菌性の機構については現在研究中であるが、一つの可能性として、グリコシダーゼ阻害が考えられる。Table 4に示すように、海藻の構成多糖を分解する酵素に対して比較的強い阻害活性を示した。このことは、海産生物の摂食阻害とも深い関係があると思われる。また、ウーロン茶ポリフェノールが虫歯誘発の原因菌である、ミュータント連鎖球菌に対して、抗菌活性を示さないが、連鎖球菌がグルコシルトランスフェラーゼを使って生成する歯垢を介する歯への付着を阻害するという報告¹⁵⁾もあることから、アラメ中のフロロタンニン類が細菌に対して抗菌活性を示すだけでなく、酵素阻害を利用して藻体への付着を阻害する物質ではないかということも考えられる。これらのことについては、今後の研究課題としたい。

文 献

- 1) J.M.Sieburth and J.T.Conover : Sargassum tannin, an antibiotic which etards fouling. *Nature*, 208, 52-53 (1965).
- 2) P.D.Steinberg : Algal chemical defense against herbivores : Allocation of compounds in the kelp *Alaria marginata*. *Science*, 223, 405-407 (1984).
- 3) 谷口和也, 秋元義正, 蔵多一哉, 鈴木稔 : 褐藻アラメの植食動物に対する化学的防御機構. *日本水産学会誌*, 58(3), 571-575 (1992) .
- 4) 越智雅光 : 抗菌性成分. 「海藻の生化学と利用」(日本水産学会編, 恒星社厚生閣, 東京, 1983, pp.101-119.
- 5) 大石圭一 : 海藻成分の機能性. 「海藻の科学」, 朝倉書店 東京, 1993, pp.160-164.
- 6) 西澤一俊, 千原光雄 : 抗菌性物質. 「藻類研究法」, 共立出版, 東京, 1979, pp.670-679.
- 7) Glombitza, K.W. : Antibiotics from algae, in “Marine algae in pharmaceutical science” (H.A.Hoppe, eds.) , 1979, pp.303-342.
- 8) 中村孝 : 魚介類筋肉成分の特徴と栄養生理作用
Food & Food Ingredient J. 171, 4-11 (1997).
- 9) T. Nakamura, M. Fukuda, and R. Tanaka : A simple method for identification of lipids from aquatic organisms using thin-layer chromatography on a plain silica gel plate. *Lipids*, 31(4), 427-432 (1996).
- 10) T. Nakamura, K. Nagayama : High tocopherol contents in a brown alga *Ishige okamurae*. *Fisheries Science* 60(6), 793-794 (1994).
- 11) T. Nakamura, K. Nagayama, K. Utida , and R. Tanaka: Antioxidant

- Activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*,
Fisheries Science 62(6), 923-926 (1996).
- 12) J.Folch, M.Lees, and G.H.Sloane Stanley : A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509 (1957).
 - 13) T.Nakamura, T.Mukaiyama, and K.Nagayama : A rapid and simple method to detect antioxidative substances on a thin-layerer chromatography plate. J. Fac.Agr., Kyushu Univ., 36, 93-98 (1991).
 - 14) 池川信夫, 丸茂晋吾, 星元紀 : 生理活性物質のバイオアッセイ, 講談社, 東京, 1984, pp.17-29.
 - 15) 東京大学医科学研究所学友会編 : 微生物学実習提要, 丸善, 東京, 1988, pp.108-112.
 - 16) K.Nakahara, S.Kawabata, H.Ono, K.Ogura, T.Tanaka, T.Ooshima, and S.Hamada : Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of *Mutans Streptococci*. Applied and Enviromental Microbiology , Vol.59, No.4, 968-973 (1993).

Bioenvironmental Activity of Polyphenols in Brown Algae: Inhibitory effects of phlorotannins on Bacterial Growth and Glycosidases

Takashi Nakamura and Kuniko Yamaguti
Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science,
Kyushu University

Summary

Antibacterial activity of brown algae growing in shallow water was investigated by paper-pad antibacterial assays using fish-pathogenic bacteria. Among the brown alga tested, chloroform-methanol extract of *Eisenia bicyclis* has the strongest activity. The components of the extract were separated and isolated by column chromatography (30×1cm i.d., Wakogel C-300, CHCl₃/MeOH/H₂O 50:30:7 v/v) and thin-layer chromatography (Silicagel 60 F254 Merck, CHCl₃/MeOH/H₂O/AcOH 50:25:4:3 v/v). The each component, phloroglucinol, eckol (trimer of phloroglucinol), phlorofucofuroeckol (pentamer), dieckol (hexamer), 8,8'-bieckol (hexamer) and unidentified tetramer has antibiotic activity. Minimum inhibition concentration (MIC) of phloroglucinol was estimated to be 3mg/disk.

After Immersion of freshly collected *Eisenia bicyclis* in sea water or fresh water, release of the phlorotannins was estimated by HPLC (ODS column 25×0.45, gradient elution of A: 30% MeOH to B: MeOH). Nearly all amount (87%) of phlorotannins exuded into the water during 2 days after death of the cell.

In order to elucidate the inhibitory mechanism, glycosidase inhibition of phlorotannins were tested using visceral enzymes of top shell and their inhibitory activity was estimated.