蔬菜の遊離アミノ酸含有量に関する研究 (第2報) Studies on the Free Amino Acid Contents in Vegetables. Part 2.

冬の緑色蔬菜類について On the Green Vegetables in Winter.

(昭和32年5月8日受理)

松下アヤコ
(Ayako Matsushita)

Quantitative separation of free amino acids occurring in green vegetables (nine kinds in total) was carried out by the combined use of ion exchange and paper partition chromatography. Total free amino acids adsorbed on the column of Amberlite-IR-120 were exhaustively eluted with aqueous ammonia (5%), and the eluate was taken to dryness *in vacuo*. The resulting residue was dissolved in 10 ml of distilled water. A quantity of amino acids contained in 0.001 ml of this solution was chromatographed on a sheet of paper by the two-dimensional development method, after which 0.1% ninhydrin solution was sprayed on the developed filter paper to confirm the precise position of the spot.

Then each spot was cut off and was steeped into 1% aqueous ninhydrin solution and 10% aqueous pyridine solution, and was boiled on the water-bath for 25 min. The colored solution thus obtained was determined by spectrophotometrically at 570 $m\mu$. (in the case of proline and hydroxyproline at 440 $m\mu$.) The results of experiments were tabulated in Table 2.

緒 言

蔬菜中の遊離アミノ酸の量的検討はその食品価値としての味及び栄養価等との関係で又植物生化学上からも興味あるものと考えられる。蔬菜類の遊離アミノ酸については武藤¹⁾、斎藤²⁾等の報告がみられるが何れも定性的なもので定量的な研究は少いようである。著者³⁾は前研究で蔬菜26種類中の遊離アミノ酸をイオン交換樹脂及びペーパークロマトグラフィーを用いて分離し、呈色斑抽出⁴⁾⁵⁾比色法により定量したが引きつづき同様の方法により緑色蔬菜9種類中の遊離アミノ酸の含有量につき研究し若干の知見を得たのでここに報告する。

実験及び結果

1. 試料 試験に用いた蔬菜は一月中旬から下旬までの新鮮市販品を用いた。

2. 試料の調製法 試料 300 g を乳鉢で圧碎しそれに3倍量の水を加え約30分間振盪後10°C前後で24時間静置する。これを圧搾濾過しその濾液に飽和の中性酢酸鉛を加えて生ずる沈澱を除きその濾液に塩基性酢酸鉛を沈澱が生じなくなるまで加えその濾液に硫化水素を通して過剰の鉛を沈澱させて除き濾液を減圧濃縮して硫化水素を除く。この濾液を次に5% HCL 液で活性化したイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 に通してアミノ酸を吸着させ、水洗し糖、有機酸を分離した後5% NH_4OH

溶液で置換溶出し、これを減圧濃縮して10 ml に容定しペーパークロマトグラフィーの試料とした。尚ヴァンスライク法によるアミノ態 N の測定にはこの濃縮液に水を加えて25 ml に容定したものを用いた。又 Amberlite IR-120 の通過液及び洗液を酢酸緩衝液で PH 4.7 に調整した Amberlite IRC-50 に通して前法で吸着されなかつたアミノ酸を吸着させ水洗後1% HCL 液で溶出しこれを前同様に10 ml に容定したものもペーパークロマトグラフィーの試料とした。

3 イオン交換樹脂によるアミノ酸の回収試験

濃度約50 mM のアミノ酸溶液10 ml を Amberlite IR-120 を用い試料の場合と同様の方法で測定した時の回収率は第1表の通りである。回収率の測定はマイクロケルダール法により全窒素の定量を行つた。尚塩基性アミノ酸の回収率は低く出るが Amberlite IRC-50 を通して得られた試料について展開及び発色操作を行つた結果ではアミノ酸のスポットをみとめなかつたのでこれについての回収試験は省略した。

4 この研究に用いたペーパークロマトグラフィー。

装置：直径19 cm、高さ23 cm のガラス製円筒2個をスリ合せの部で上下に重ねた密閉器中で二次元上昇法により実施した。

溶剤：第1次元……水15%を含むフェノール(再蒸溜したもの)

第2次元……n-ブタノール・氷酢酸・水4:

第1表 Amberlite IR-120 によるアミノ酸の回収試験

	全窒素 添加量 (mg)	全窒素 回収量 (mg)	回収率 %	回収率 平均 %
アルギニン	26.95 26.55	21.56 19.55	80.0 75.1	77.5
ヒスチジン	20.00 19.52	16.02 15.63	80.1 80.4	80.3
ロイシン	7.27 7.25	7.27 7.17	100.0 98.9	99.9
バリン	7.42 7.40	7.41 7.25	99.8 97.9	98.8
アスパラギン酸	7.95 8.16	8.50 9.63	107.6 110.8	109.2
グルタミン酸	7.34 7.30	7.69 8.19	104.7 112.2	108.4

1:5の混合液で上層のブタノールに富む方を用いた。

濾紙: 東洋濾紙 No. 50

実施温度: 12°C~15°C

呈色試薬: 0.1% ニンヒドリン, アセトン溶液

検出及び同定: 展開終了後濾紙を乾燥しニンヒドリン試薬を撒布し 80°~90°C で加温発色させた。試料クロマトグラムの各スポットの判定は同条件で著者⁷⁾が実験した標準クロマトグラムに於けるスポットの R_f 値及びそれらの相対的位置とを比較することによる外文獻^{8,9)}値を参考にした。又 0.5% 標準アミノ酸溶液を試料と並べてつけて同様に展開し R_f 値が一致することによっても確認した。

5. 分離定量法 J. Awapara⁶⁾ のペーパークロマトグラフィによる呈色斑抽出比色法を用いて定量した。濾紙 (27 cm×27 cm) の原点にマイクロピペットを用いて 0.001ml の試料をつけ二次元展開を行い濾紙を風乾後ニンヒドリン試薬を撒布し 80°~90°C で加温発色させ各発色部を稍広めに略同面積に切りとり細かく切つて試験管に入れ 1% ニンヒドリン水溶液 2 ml, 10% ビリデイン水溶液 1 ml を加える。これを沸騰水浴中で 25 分加熱し抽出と発色を完全にする。次に 10 ml のメスフラスコに移し微温湯で濾紙を洗つて一定量にする。尚ブランクはクロマトグラム中の発色しなかつた部分からほぼ同一面積の濾紙を切りとり同様の操作によつて得た溶液を使用した。次に島津の Photoelectric Spectrophotometer により 570 mμ に於ける透過率を測定し同様に操作して作つた標準曲線 (第1図)(A)(B) からアミノ酸の濃度を求めた。尚ブロン及びオキシブロンは 440 mμ に於ける透過率を測定した。

第1図(A) アミノ酸標準曲線

第1図(B) アミノ酸の標準曲線

6. 遊離アミノ酸の分布及び含有量

試験蔬菜の遊離アミノ酸の分布を前記方法によつて検出しその含有量を定量した結果を第2表に表示した。

考察及び要約

1. 遊離アミノ酸の分布

緑色蔬菜9種類中の遊離アミノ酸をイオン交換樹脂及びペーパークロマトグラフィにより分離検出した。これらの蔬菜中に大体共通して存在するアミノ酸はアスパラギン酸, グルタミン酸, セリン, アスパラギン, スレオニン, グルタミン, バリン, ロイシン, プロリン, チロシン, γ-アミノ酪酸, フェニールアラニン, アラニンの13種類でその他シスチン, グリシン, リジン, オキシリジン等が見出されたがグリシン, シスチンもかなり広く分布するアミノ酸であつた。アミノ酸の種類は多いものとしてフダンソウ, キョウユ菜, カブ葉の各々に16種, 少ないものとして春菊に13種をみとめたが大体14~15種を含むものが多く大差をみとめなかつた。

栄 養 と 食 糧

第 2 表・ 蔬 菜 の 遊 離 ア ミ ノ 酸 含 有 量 (新 鮮 量 中 mg%)

	時 季									
	(1 中)	(1 下)	(1 下)	(1 下)	(1 下)	(1 下)	(1 下)	(1 下)	(1 下)	(1 下)
	バセリー	フダン ソウ	キョウ菜	カツラ菜	春 菊	ミツバ	セ リ	カ プ		ホウレン ソウ
								葉	根	
アスパラギン酸	11.79	1.48	4.87	7.33	3.23	2.17	3.33	2.40	4.80	4.11
グルタミン酸	8.40	1.91	3.27	11.18	2.39	1.08	0.81	0.31	5.70	3.85
セ リ	7.08	0.83	2.82	4.99	2.95	1.22	0.78	3.99	10.38	2.26
アスパラギン	28.62	12.23	2.52	6.96	11.13	7.87	11.04	3.82	2.04	5.04
スレオニン	6.66	0.87	2.10	3.60	1.35	2.17	0.84	2.31	+	2.04
アラニン	9.42	2.00	6.10	9.04	2.82	6.19	3.85	7.22	3.00	4.83
グルタミン	40.11	12.02	22.84	54.62	13.27	24.98	15.94	19.72	23.37	26.46
バリ	17.85	3.65	6.42	13.46	7.20	8.57	6.90	9.40	6.57	5.24
ロイシン	5.55	3.65	4.12	10.24	4.49	3.64	3.68	3.49	2.79	9.10
プロリン	+	2.07	18.80	9.20	7.16	11.83	10.15	13.36	11.04	4.23
チロシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
γ-アミノ酪酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
シスチン	+	+	+			+	+	+		+
リ ジ	+	+								
フェニールアラニン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1.35
オキシリジン			+					+		
グリシン		+	+	+		+	+	+		2.47
アミノ N 計	135.48	40.71	73.86	130.62	55.99	68.72	57.32	71.02	69.69	66.75
アミノ態 N	137.00	39.00	56.73	121.74	49.05	59.13	48.58	59.33	62.52	66.79

注 1. 各蔬菜 100 g 中の各遊離アミノ酸の α-アミノ-N (プロリンはイミノ-N) の mg 数で表わした。+ は存在するが少量のもの。
2. アミノ態 N の測定はヴァンスライク法による。

2. 遊離アミノ酸の含有量

アミノ酸の量的差異を求めるために上記アミノ酸のクロマトグラムについて呈色斑抽出比色法により定量を行った。アミノ酸の含有量はバセリー、カツラ菜、等に著しく多く、フダンソウ、春菊、セリ等に少く検出された。グルタミンは試験蔬菜に共通して含有量の著しく多いアミノ酸であつたがこれはカツラ菜、バセリー等に目立つて多かつた。其の他含有量の多いアミノ酸としてバリン、アスパラギン、アラニン、プロリン等があげられるがバリンはバセリー、カツラ菜にアスパラギンはバセリーとフダンソウに、アラニンはバセリーとカツラ菜にプロリンはキョウ菜とカブ菜等に特に多く検出された。又スレオニン、チロシン、フェニールアラニン等は試験蔬菜に共通して含有量の少いアミノ酸であつた。

3. アミノ態 N の含有量

アミノ態 N の含有量はバセリー、カツラ菜等に多く、フダンソウ、セリ等に少く検出された。

本実験に際し終始御懇篤な御指導を賜つた山田教授、又 Photoelectric Spectrophotometer 使用にあたり

御援助を戴いた熊本通信病院の竹屋博士の方々に厚く御礼を申し上げる。

文 献

- 1) 武藤：農化，24，7，(1951).
- 2) 斎藤，渡辺：栄養と食糧，5，6，(1953).
- 3) 松下，山田：日本農芸化学会 西日本支部大会に於て発表 (1956，11. 10).
- 4) 赤堀，水島：蛋白質化学 1. p. 209 (1954) 共立出版。
- 5) 丸田：農化，28，10，(1954).
- 6) J. Awapara: J. Biol. Chem. 178, 113. (1949).
- 7) 松下，山田：栄養と食糧，9，4，(1956).
- 8) Consden, Gordin, Martin: Biochem. J., 38, 224 (1944).
- 9) 佐竹一夫：クロマトグラフィ p. 105 (1955) 共立出版。

(熊本女子大学栄養学教室)