茶葉中の遊離アミノ酸について (第2報)*

アスパラギン及びアスパラギン酸の分別定量

長島善次, 中川致之 (静岡大学農学部)

昭和31年2月23日受理

ま え が き

茶葉中の遊離アミノ酸が茶の味に重要な関係を持つことは古くから考えられ、既に十数種の遊離アミノ酸の存在が報告されているが、その多くは定性的なもので定量的なものは殆んどない。

そこで著者は差当り高級煎茶(品種鉄北)の1種につき、bioassayにより遊離アミノ酸の量的検討を行い、これを第1報として報告した⁽¹⁾。

前報に於ては茶の浸出液を醋酸鉛で処理した液(T₁)について、各種のアミノ酸をそれぞれ bioassay により定量し、更に又 T₁ の一部を硫酸にて加水分解した液(T₂)についても同様各種のアミノ酸を定量し、T₁ 及び T₂ 両者についての定量値を比較して遊離アミノ酸の量を検討したが、この際アルギニン等14種のアミノ酸は T₁, T₂ それぞれの定量値がほぼ一致したが、アスパラギン酸は両者の値が一致せず、之はアスパラギンの存在のためと考えられる。

茶葉及び製茶中のアスパラギンの存在は ROBERTS 等により報告されているが⁽²⁻⁶⁾、L-アスパラギンはアスパラギン酸の bioassay に使用される菌株 *Leuconostoc mesenteroides* に対し或る程度の活性度を有しているので、茶葉浸出液について bioassay によりアスパラギン酸を定量する場合には予めアスパラギンを分別しておく必要がある。更にアスパラギン酸と分別したアスパラギンを加水分解してアスパラギン酸となし定量すれば、両者の分別定量が可能と考えられる。

そこで著者はアスパラギンの *Leuconostoc mesenteroides* に対する活性度、塩酸加水分解によりアスパラギン酸となし bioassay で定量する際の条件、又イオン交換樹脂によるアスパラギンとアスパラギン酸の分別等についての実験を試み、イオン交換樹脂法と微生物定量法の組合せによる両者の分別定量の検討を行つた結果、1, 2の疑点を残すが、ほぼ定量に應用出来ると思われるので第2報として報告する。

尚アスパラギン、アスパラギン酸の定量には transaminase, asparaginase, decarboxylase を併用する酵素法が KREBS 等により行われているが⁽⁷⁾、乳酸菌による定量法に比べ複雑なものと思われる。

アスパラギン、アスパラギン酸の茶葉に於ける消長、製茶工程中の量的変化の問題等も明らかにしたいが、ここでは差当り数種の製茶につきこの方法により両者の分別定量を行つたので、併せて報告する。

実験及び検討

1. アスパラギン酸の定量について

本実験に於けるアスパラギン酸の定量は bioassay により行い、菌は *Leuconostoc mesenteroides* を用いた。Bioassay の条件は前報と同じであるが、最近の改良法に徴して多少変更したところもある⁽⁸⁾。

2. Bioassay に於けるアスパラギンの活性度

アスパラギン酸の bioassay について STOKES は *Lactobacillus delbrückii* により行つたが、その際 L-アスパラギンはアスパラギン酸と同様の活性度を持つと述べている⁽⁹⁾。又 HAC, CAMIEN 等は *Leuconostoc mesenteroides* を用いて検討を行つた結果^(10,11)、L-アスパラギンは或る程度の活性度を持つが低濃度に於ては利用され難いところから、アスパラギンは一旦アスパラギン酸に変つてから利用されるのであろうと述べている。

そこで著者はアスパラギン酸を除いた基礎培地に、数段階の濃度の L-アスパラギンを添加して L-アスパラギンの活性度の検討を行つたが、第1図に示す如く HAC 等とはほぼ同様の結果を得た。従つて *Leuconostoc mesenteroides* により L-アスパラギンをその儘の形で定量する事は困難であり、酸等により L-アスパラギン酸に加水分解し、それより求める必要がある。

* Studies on Free Amino Acid in the Tea. Part II. Determination of Asparagine and Aspartic Acid.

By Zenji NAGASHIMA and Muneyuki NAKAGAWA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

第 1 図 *Leuconostoc mesenteroides* に対するアスパラギンとアスパラギン酸の活性度の比較

第 1 表 加水分解に用いる塩酸の濃度とアスパラギンの回収率

塩酸濃度 N	中和剤	アスパラギン 添加量 (γ/cc)	アスパラギン (換算) 定量値 (γ/cc)	回収率 %
0		500	81	16.2
0.5	苛性ソーダ	"	469	93.8
1	"	"	467	93.4
2	"	"	473	94.6
3	"	"	451	90.2
4	"	"	441	88.2
0.5	アンモニヤ	"	472	94.4
1	"	"	514	102.8
2	"	"	522	104.4
3	"	"	525	105.0
4	"	"	495	99.0

第 2 表 アスパラギン濃度と回収率

アスパラギン 濃度 (γ/cc)	アスパラギン 換算定量値 (γ/cc)	回収率 %
50	56	112.0
100	107	107.0
250	254	101.8
500	515	103.0
1250	1311	104.8
2500	2601	104.0

響されないが、茶葉浸出液の中性アミノ酸部を加水分解したものについては、pH の如何が定量値にかなりの影響をもち、中和に苛性ソーダを用いたとき殊に著しいことを知った。この理由は明らかでないが、後述の如くアンモニヤで中和 pH 6.2 に調整して良好な回収率を示すので、pH についてはこの条件をとることとした。

4. イオン交換樹脂によるアスパラギンとアスパラギン酸の分別

アミノ酸混合液より酸性アミノ酸を群別するのに WINTERS, 田中, 丸田等は弱塩基性樹脂 Amberlite IR-4 B 等の OH 型或いは Cl 型を用い⁽¹²⁻¹⁶⁾, 又 ABELSON は強塩基性樹脂 Dowex 2 の Cl 型を用いている⁽¹⁷⁾。依つてこれらを用いて茶浸出液につきアスパラギンとアスパラギン酸を定量的に分別すべく試みたが、下記の如く満足な結果が得られなかつた。そこで他の数種の樹脂を用いて試みたうち中塩基性樹脂 Amberlite XE-114 が良好であることを知った。下記実験で樹脂はいずれも 10 cc をカラムにて用い、又分別の検討には流出液を 5 cc ずつ順次捕集したものにつきペーパークロマトグラフィにより行つた。尚茶浸出液は、そのままではタンニン等による樹脂の汚染が著しいので、予め醋酸鉛でこれらを除去したものを用いる。

(1) Amberlite IR-4 B OH 型 5% HCl, 5% NaOH で交互に処理, OH 型となし, 水で流出液が中性となるまで洗う。先ずアスパラギンとアスパラギン酸の混合液 5 cc を 1 cc/分の流速で通した後水洗, 次いで

そこで次にアスパラギンを塩酸にて加水分解し, アスパラギン酸として定量する際の条件について検討を行つた。

3. アスパラギンの加水分解の条件

(1) 塩酸の濃度 500γ/cc の L-アスパラギン水溶液を 0.5 乃至 4 N 塩酸酸性とし, 封管中で 120°, 1 時間加熱後苛性ソーダ又はアンモニヤで pH 6.2 に中和して生じたアスパラギン酸を bioassay により定量, アスパラギンに換算して回収率を求め, 第 1 表に示す如き結果を得た。

塩酸濃度が 3, 4 N 以上のとき回収率が低下するのは, 中和の際生ずる食塩或いは塩化アンモンが bioassay に阻害作用をもつため, その阻害は塩化アンモンよりも食塩の方が大きいことは別の予備実験によつても確められた。

以上の実験より, 加水分解の塩酸濃度は 2 N, 加水分解後の中和にはアンモニヤを用いることとした。

(2) アスパラギンの濃度 数段階の濃度のアス

パラギン水溶液を 2 N 塩酸酸性とし封管中にて 120°, 1 時間加熱し加水分解後アンモニヤにて pH 6.2 に中和し, 生じたアスパラギン酸を bioassay にて定量し, これをアスパラギンに換算, その回収率を求めた結果を第 2 表に示す。

これよりアスパラギンは, 上記条件でその濃度如何に拘らずほぼ理論的にアスパラギン酸に加水分解され, これを bioassay にて定量した値をアスパラギンに換算すれば, アスパラギンは bioassay のもつ誤差の範囲内で回収されることを知る。

以上のことより, 茶浸出液をイオン交換樹脂にて中性アミノ酸部分 (アスパラギンを含む) と酸性アミノ酸部分 (アスパラギン酸を含む) に分け, 前者を上記条件で加水分解し, 両者それぞれにつきアスパラギン酸を定量することより, 茶葉中のアスパラギンとアスパラギン酸を定量することが可能である。

なお純粋のアスパラギンを用いての上記実験の際には, 中和後の調整 pH が 5.6~7.4 の範囲では, 定量値は pH により殆んど影

0.3 N HCl で溶出する。この際アスパラギンははじめの流出部に、アスパラギン酸は溶出部に、それぞれ定量的に分別された。しかし茶浸出液 (pH 4.0 に調整) について試みるにアスパラギン酸の吸着が阻害され相当量アスパラギンとともに流出するので、定量的に分別することが出来なかつた。

(2) Amberlite IR-4B Cl 型 5% NaOH, 5% HCl で交互に処理, Cl 型とし流出液が pH 3.0 となる迄洗ったものを用いる。アスパラギンとアスパラギン酸の混合液 5 cc を 0.5 cc/分の流速で通し, 次いで水で洗えば先ずアスパラギンが流出する。水洗を続ければ一旦吸着されたアスパラギン酸も漸次流出するが, 分別は可能である。しかし茶の浸出液については, アスパラギン酸の一部がアスパラギンとともに流出する。

(3) Amberlite IRA-400 Cl 型 10% NaOH, 10% HCl で交互に処理後 Cl 型とし水で流出液が中性となる迄洗う。これにつき分別を試みるにアスパラギンとアスパラギン酸との混合液及び茶浸出液いずれの場合もアスパラギン酸が一部アスパラギンとともに流出する。

(4) Amberlite IRA-400 Cl-OH 混合型 10% NaOH, 10% HCl で交互に処理した後, pH 8.5 の NH_4OH , NH_4Cl 混合緩衝液で Cl-OH 混合型とし, 水で流出液が中性となる迄洗う。これを用いるとき, アスパラギンとアスパラギン酸との混合液の場合は両者は完全に流出部, 溶出部に分別されるが, 茶浸出液については, アスパラギン酸が極く一部であるがアスパラギンとともに流出する。

(5) Amberlite IRA-400 OH 型, Amberlite IR-120 H 型, Na 型 いずれも良い結果を得られなかつた。

(6) Amberlite XE-114 Cl 型 5% HCl, 5% NaOH で交互に処理 Cl 型とした後, 流出液が pH 3.0 となる迄洗う。アスパラギンとアスパラギン酸との混合液 5 cc を 1 cc/分の流速で通じ次いで水で洗うとき, 流出液約 20 cc でアスパラギンは定量的に流出する。次いで 0.1 N HCl で溶出すれば, 溶出液約 40 cc でアスパラギン酸も定量的に溶出する。

次いで茶浸出液 (pH 5.0 に調整) についても, 上記と同様にして両者とも定量的に分別し得た。

尚この樹脂の -OH 型に於ては, 両者とも吸着されるので分別は困難である。

5. 茶葉中のアスパラギンとアスパラギン酸の定量

以上の結果より, 茶葉中の遊離アスパラギン, アスパラギン酸の定量を次の如く行う。

茶葉 5 g に温水 (60°) 50 cc を加え 1 時間放置後圧搾濾過, 残滓に温水 30 cc を加え圧搾濾過を 4 回繰返す。濾液を合してこれに 10% 塩基性醋酸鉛 15 cc を加え生ずる沈澱を遠心分離してのぞき, 沈澱は繰返し 3 回洗い, 合した濾液中の過剰の鉛は硫化水素で除去する。かくして得た液を減圧濃縮して 25 cc とする。この 5 cc (pH 5.0 に調整) を Amberlite XE-114 Cl 型 10 cc のカラムに 1 cc/分の流速で通し, 後水で洗い流出液 25 cc を捕集し, 次いで 0.1 N HCl を通して溶出液 45 cc をとる。

溶出液 (アスパラギン酸部) につき pH 6.2 に調整したのち *Leuconostoc mesenteroides* を用いてアスパラギン酸を定量, この値を茶の遊離アスパラギン酸定量値とする。

流出液 (アスパラギン部) に HCl を 2 N となる如く加え, 封管中で 120°, 1 時間加熱した後アンモニヤに

第 3 表 アスパラギンとアスパラギン酸混合液の分別定量的回収率

試料 番号	液中のア スパラギン (γ)	液中のア スパラギン酸 (γ)	アスパラギン		アスパラギン酸	
			定量値 (γ)	回収率 %	定量値 (γ)	回収率 %
1	111	0	110	99.1	2	
2	74	42	72	97.3	43	102.4
3	55	63	56	101.8	61	96.8
4	37	83	36	97.2	83	100.0
5	0	125	0		124	99.2

て pH 6.2 に調整, これにつき *Leuconostoc mesenteroides* を用いて生じたアスパラギン酸を定量し, 得た値をアスパラギンに換算して求めるアスパラギンの定量値とする。

6. 本法の精度

本法を検討するため, 先ずアスパラギンとアスパラギン酸の混合液について分別定量を試みた結果を第 3 表に示すが, 両者と

もほぼ 100% で回収された。

次に茶浸出液及びそれにアスパラギン, アスパラギン酸を添加したものにつき, 同様分別定量を試みた結果を第 4 表に示す。

以上により本法により茶の遊離アスパラギン, アスパラギン酸がほぼ bioassay の誤差の範囲内で分別定

第 4 表 茶浸出液のアスパラギンとアスパラギン酸の分別定量と回収率

番号	試料の内容	アスパラギン 定量値 (γ)	アスパラギン酸 定量値 (γ)
1	茶浸出液	26	61
2	1+アスパラギン 277 γ アスパラギン酸 313 γ	293	373
2-1		267	312
	回収率	96.4%	99.7%

第 5 表 各種製茶別アスパラギン及びアスパラギン酸含量 (乾物中)

製茶種別	品 種	摘採日	アスパ ラギン (mg%)	アスパラ ギン酸 (mg%)
玉露	上	30.5.11	93	128
"	下	5.14	259	259
煎茶	一番 簗	北	5.5	103
"	二番	"	6.29	72
"	三番	"	8.5	53
"	一番	在 来 種	5.—	88
番茶			5.25	68
紅茶	べにほまれ		8.19	211
"	C-19		7.9	85
煎茶	二番	不 明	7.9	51
紅茶	二番	同 一 葉		64

量されることを知る。

但し、若し浸出液中にアスパラギン酸を含むペプチド類が存在するときは、このアスパラギン酸は本定量法でアスパラギンとして算入されることとなる。しかし前報⁽¹⁾の結果にかんがみ、かかるペプチド類の存在の可能性は殆んどないと考えられる。

7. 本法による数種製茶中のアスパラギン及びアスパラギン酸の定量

上記の方法を用いて数種の茶につきアスパラギン及びアスパラギン酸の定量を試みた。結果を第 5 表に示す。なお試料は全部東海近畿農試茶業部製のものである。

以上の定量の結果より、一般に摘採期の早いもの及び品質の良いものが、両者の含量が多い傾向があると考えられる。しかしその関係は余り明確でなく詳細は次回の検討に譲る。

要 約

茶中にはアスパラギン、アスパラギン酸の両者が存在するが、アスパラギンはアスパラギン酸の定量菌株 *Leuconostoc mesenteroides* に対し或る程度の活性度を有しているので、bioassay によりアスパラギン酸を定量する場合には、予めアスパラギンを分別しておく必要がある。更に分別したアスパラギンを加水分解してアスパラギン酸となし定量すれば、両者の分別定量が可能と考えられるので、これにつき検討を行った。

(1) L-アスパラギンは *Leuconostoc mesenteroides* に対し或る程度の活性度を有しているが、低濃度に於いては利用され難い。

(2) アスパラギンは 2N 塩酸酸性とし封管中で 120°, 1 時間加熱すれば、ほぼ理論的にアスパラギン酸に加水分解される。

(3) 茶浸出液中のアスパラギン及びアスパラギン酸の分別の検討を、種類のイオン交換樹脂を用いて行つたが、中塩基性 Amberlite XE-114 の Cl 型が最良の結果を与え両者が定量的に分別される。

(4) 以上の結果より、茶中の遊離アスパラギン及びアスパラギン酸の分別定量法として次の方法を提案する。茶葉を温水で浸出、塩基性醋酸鉛で処理、脱鉛減圧濃縮して得た液の一部を Amberlite XE-114 Cl 型のカラムに通し水にて洗い流出液をとり、次いで 0.1N HCl にて溶出、溶出液をとる。溶出液は pH 6.2 に調整した後、アスパラギン酸を定量、アスパラギン酸の定量値とする。又流出液は 2N 塩酸酸性とし、封管中で 120°, 1 時間加熱した後アンモニヤにて pH 6.2 に調整、アスパラギン酸を定量し換算してアスパラギンの定量値とする。このとき両者はそれぞれ bioassay の誤差の範囲内で定量される。

(5) 上記の方法により、数種の製茶につきアスパラギン、アスパラギン酸の分別定量を行つた。

本実験にあたり、茶試料を御配慮いただいた農林省東海近畿農試茶業部鳥井技官に深甚の謝意を表する。

- (1) 長島： 静岡大学農学部研究報告, 2, 211 (1952).
- (2) E. A. H. ROBERTS and D. J. WOOD: *Current Sci.* (India), 20, 151 (1951).
- (3) 橋爪： 本誌, 25, 508 (1952).
- (4) 大島, 中林, 坂本： 本誌, 28, 264 (1954).
- (5) 坂本： 茶業研究報告, 2, 58 (1953).
- (6) 坂本： 茶業研究報告, 3, 50 (1954).
- (7) H. A. KREBS: *Biochem. J.*, 47, 605 (1950).
- (8) 田村等： 本誌, 26, 464 (1952).
- (9) J. L. STOKES and M. GUNNES: *J. Biol. Chem.*, 157, 657 (1945).

- (10) L. R. HAC and E. E. SNELL: *J. Biol. Chem.*, 159, 251 (1945).
- (11) M. N. CAMIEN and M. S. DUNN: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 75, 74 (1950).
- (12) J. C. WINTERS and R. KUNIN: *Ind. Eng. Chem.*, 41, 460 (1949).
- (13) 田中, 香月, 江頭： 日化, 74, 53 (1953).
- (14) 丸田, 鮫島, 田中： 本誌, 28, 775 (1954).
- (15) B. DRAKE: *Nature*, 160, 602 (1947).
- (16) R. CONSDEN, et al.: *Biochem. J.*, 42, 443 (1948).
- (17) P. H. ABELSON, et al.: *J. Biol. Chem.*, 198, 165 (1952).