

ノリに含まれる遊離アミノ酸の簡易抽出法

川村嘉応・鷲尾真佐人

Simple Method for Extracting Free Amino Acids from Dried and Fresh Nori

Yoshio KAWAMURA and Masato WASHIO

The present method developed by the authors was conducted as follows; Dried Nori was first grinded with homogenize in 0.2M citric acid buffer (pH2.2), crushed and then were treated with supersonic waves for 10 minutes. All solutions thus prepared are mixed for 50 minutes, and then analyzed by HPLC. Free amino acid were determined by this method were higher more than the previous method of Saito *et al.*. The present method was simple, required less time and was applicable to analyze free amino acids in fresh Nori.

まえがき

従来から乾ノリに含まれる遊離アミノ酸量の分析手法としては、斉藤らの方法¹⁾が使用されてきた。この方法は乾ノリの遊離アミノ酸をエタノールで抽出したのち分析するといった煩雑な方法であるため時間を要し、多数の試料を分析するには適当でないと思われる。

そこで、ノリに含まれる遊離アミノ酸量を簡易に抽出する方法を提案し、斉藤らの方法と比較検討したので報告する。

材料及び方法

1. 乾ノリに含まれる遊離アミノ酸の抽出、定量法

試料は、佐賀県福富町地先に位置する佐賀県有明水産振興センターの養殖試験地で1993年度に養殖されたノリ葉体を常法に従い製造したのち、冷凍庫に保存した乾ノリのうち28検体を無作為に選び実験に用いた。抽出は、乾ノリをそのまま緩衝液中でホモジナイズと超音波で物理的に粉碎する方法(図1, 以下、乾ノリ-破壊法と略す)およびエチルアルコールで抽出する斉藤らの改変法(図2, 以下、斉藤らの改変法と略す)によってそれぞれ行った。遊離アミノ酸量の定量には、カラムにAAパッカーNA(日本分光(株)製)を用い、カラム温度は60°C

試料 (乾ノリ) Sample (Dried Nori) ↓ 遊離アミノ酸測定用として乾ノリ約3gをひょう量 Weighing about 3g of dried Nori ↓ 0.2Mクエン酸緩衝液 pH2.2 (40ml) でホモジナイズする Homogenizing with 40ml of 0.2M citric acids buffer (pH2.2) ↓ 50ml トールピーカーに移し10分間超音波処理スターラーで50分間撹はん Treat with a supersonic waves for 10 minutes in 50ml torebaker. Stir up for 50 minutes ↓ No. 5Cろ紙で濾過後, 上澄み5mlを0.2Mクエン酸緩衝液で25mlにメスアップカラムガード(アドバンテック製)で濾過 Filtration by No. 5C filter paper. Filled up to 25ml with supernatant 5ml and 0.2M citric acids buffer Filtration by column gaurd (Advantec) ↓ -30°Cで凍結保存し, 解凍後分析に供する Store at -30°C in a refrigerator until use
--

図1 新しく提案した乾ノリからの抽出方法
(乾ノリ-破壊法)

Fig. 1. Method for extract from dried Nori using dried Nori-crush method.

試料
Sample (Dried Nori)
↓
300mlの三角フラスコ 乾ノリ約0.5g 精ひょう
Weighing about 0.5g of dried Nori in the erlenmeyer-flask 300ml
↓
75%エチルアルコール100ml 注加
Add to 100ml of 75% ethylalcohol.
↓
抽出15分 (沸騰浴中) 還流冷却装置を装着
No. 5B ろ紙で濾過
Extract at 15 minutes using a reflux condenser
Filtration by No. 5C filter paper. Repeat 3 times
↓
葉体を75%エチルアルコール50ml で洗浄
Washing thalli by 50ml of 75% ethylalcohol
↓
抽出液と洗浄液を合わせて300ml にメスアップ
Filled up to 300ml with extract and wash liquids
↓
50ml をホールピペットでとる
Pipette accurately 50ml using a volumetric pipet
↓
濃縮乾固
Evaporation to dryness
↓
0.2M クエン酸緩衝液で25ml にメスアップ (pH2.0)
Filled up to 25ml with 0.2M citric acids buffer (pH2.2)
↓
-30°C で凍結保存し, 解凍後分析に供する
Store at -30°C in a refrigerator until use

図2 エチルアルコールによる斉藤らの改変法

Fig. 2. Method for extract from dried Nori using modified method of Saito *et al.*.

に設定した。カラムからのアミノ酸の溶出は、pH3.06, 4.25, 10.50のクエン酸緩衝液を用いるグラジエント溶出で、流速は0.6ml/minとした。カラムから溶出、分離するアミノ酸にオルトフタルアルデヒドを作用させ、生じた蛍光物質を蛍光検出器 (821-FP を含む HPLC800 アミノ酸分析システム, 日本分光821-FP (株)製) で検出した。励起波長 Ex および蛍光波長 Em はそれぞれ350 nm, 450nm に設定した。アミノ酸の標準物質は、アミノ酸混合標準液A型 (和光純薬工業(株)製) に濃度既知のタウリンを添加したのを用い、そのリテンション・タイムとピーク面積の比較によって試料中の遊離アミノ酸の同定と定量を行った。なお、本研究で分析の対象とした遊離アミノ酸は、以下のとおりで、その他の遊離アミノ

酸としては、総量からタウリン, L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-アラニンを除いたものの総計である。

タウリン (以下, Tau と略す), L-アスパラギン酸 (Asp), L-スレオニン (Thr), L-セリン (Ser), L-グルタミン酸 (Glu), L-プロリン (Pro), グリシン (Gly), L-アラニン (Ala), L-シスチン (Cys), L-バリン (Val), L-メチオニン (Met), L-イソロシン (Ile), L-ロイシン (Leu), L-チロシン (Tyr), L-フェニルアラニン (Phe), L-ヒスチジン (His), L-リジン

試料 (生ノリ)
Sample (Fresh Nori)
↓
①蒸留水で軽く洗う ②表面水分をふきとる
① Washing lightly by distilled water
② Wipe up water on surface
↓
含水率測定用の葉体をひょう量し, 60°C 恒温で乾燥させ含水率を測定する
Weighing accurately thalli, dring at 60°C, measure the percentage of moisture content
↓
アミノ酸測定用として葉体約3g をひょう量
Weighing about 3g of fresh Nori
↓
0.2M クエン酸緩衝液 pH2.2 (40ml) でホモジナイズする
Homoginizing with 40ml of 0.2M citric acids buffer (pH2.2)
↓
50ml トールピーカーに移し10分間超音波処理スターラーで50分間攪はん
Treat with a supersonic waves for 10 minutes in 50ml torebaker. Stir up for 50 minutes
↓
No. 5C ろ紙で濾過後, 上澄み 5ml を0.2M クエン酸緩衝液で25ml にメスアップ
Filtration by No. 5C Filter paper.
Filled up to 25ml with supernatant 5ml and 0.2M citric acids buffer
↓
カラムガード (アドバンテック製) で濾過
Filtration by column gaurd (Advantec)
↓
-30°C で凍結保存し, 解凍後分析に供する
Store at -30°C in a refrigerator until use

図3 新しく提案した生ノリからの抽出方法 (生ノリ-破壊法)

Fig. 3. Method for extract from fresh Nori using fresh Nori-crush method.

(Lys), アンモニア (NH₃), L-アルギニン (Arg)

2. 生ノリに含まれる遊離アミノ酸量の抽出, 定量法

試料は, 佐賀県福富町地先に位置する佐賀県有明水産振興センターの養殖試験地で1993, 1994年度の秋芽網期および冷凍網期に養殖されたノリ葉体を採集後, 1993年度には①蒸留水で軽く洗う方法, 1994年度には②表面水分をふきとる方法で処理し, 冷凍庫に保存した31検体を用いた。抽出は, 前述の乾ノリ-破壊法を改良し, 図3に示す方法(生ノリ-破壊法)により抽出し, 前述と同様に遊離アミノ酸量を測定した。

結果及び考察

1. 乾ノリに含まれる遊離アミノ酸の抽出, 定量法

乾ノリ-破壊法および斉藤らの改変法で抽出し分析して得られた遊離アミノ酸量は, 表1に示すとおりである。両方法の遊離アミノ酸量を比較すると, Tauは956, 770 mg/100g, Aspは203, 199mg/100g, Gluは1076, 797 mg/100g, Alaは808, 645mg/100g, その他は215, 338 mg/100g, 合計では3260, 2751mg/100gであった。乾ノリ-破壊法と斉藤らの改変法の結果を比較すると, その他の遊離アミノ酸量を除いて, いずれの遊離アミノ酸量も, 前者が後者よりもやや高い値を示し, とくにGluではその割合が高かった。

両方法で得られた結果の相関関係は, 表2に示すとおりである。両法の間には, Alaは1%有意水準で, Glu, その他および合計遊離アミノ酸量については, 5%有意水準で相関があったものの, Tau, Aspについては, 有意な相関は認められなかった。さらに, 合計の遊離アミノ酸量については, Tauを差し引いた値で相関を取ると, 図4に示すように相関係数0.531と相関が高くなった。

以上のようにGlu, Ala, その他及び合計の遊離アミノ酸量については, 乾ノリ-破壊法が斉藤らの改変法よりも高い値を示すことから, 抽出する過程におけるロスが前者が少ないと考えるのか, 抽出方法としてエタノールを用いる必要があるのかなど今後も検討が必要であろう。Tauを差し引くと両方法の相関が高くなることから乾ノリの遊離アミノ酸量を本法で測定する場合にはTauを差し引いた値を用いる方が, 斉藤らの改変法で測定した既報値との比較をする上では良いと思われる。なお, Tauについては, 熱水に可溶でアルコールには不溶という性状があることから斉藤らの改変法では抽出量が少なくなるのかもしれない。

抽出に必要な時間は乾ノリ-破壊法であれば, 12サンプルの抽出には8時間で十分であり, 抽出操作も斉藤らの改変法に比べて簡単であると考えられる。

従って, 本法は, 乾ノリの遊離アミノ酸量を短時間に多数のサンプルについて比較する場合には, 従来の方法

表1 乾ノリ-破壊法および斉藤らの改変法で抽出し分析して得られた遊離アミノ酸量 (28検体の平均)

Table 1. Free amino acid of dried Nori extracted using dried Nori-crush method, modified method of Saito *et al.* (means of 28 samples).

Nori-crush method						Modified method of Saito <i>et al.</i>					
Tau	Asp	Glu (mg/100g)	Ala	Others	Total	Tau	Asp	Glu (mg/100g)	Ala	Others	Total
956	203	1076	808	215	3260	770	199	797	645	338	2751
(1.24)	(1.02)	(1.35)	(1.25)	(0.63)	(1.18)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)

(), Value are expressed relative to those obtained by modified method of Saito *et al.*

表2 同一乾ノリを乾ノリ-破壊法と斉藤らの改変法で比較した時の関係

Table 2. The relationship between free amino acid of dried Nori extracted using dried Nori-crush method and modified method of Saito *et al.*

Tau	Asp	Glu	Ala	Others	Total
-0.161	0.315	0.402*	0.549**	0.416*	0.467*

*, Significant at $p < 0.05$; **, Significant at $p < 0.01$.

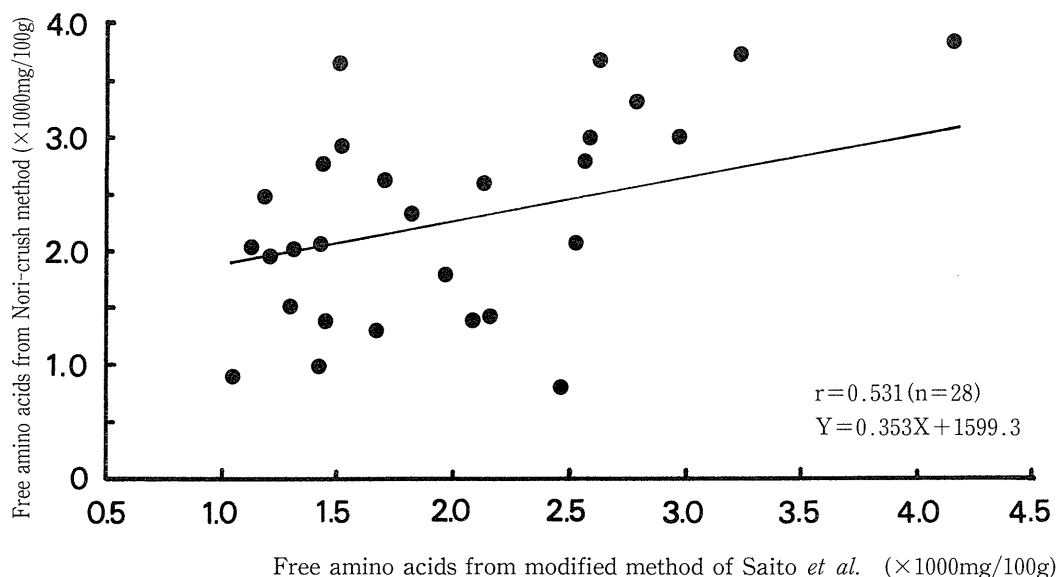


図4 破壊法とエタノール法との関係 (Tau を差し引いた値)

Fig. 4. Relationship between free amino acids in Nori-crush method and modified method of Saito *et al.* (-Tau).

にかわって有効な抽出方法のひとつとして使用できるものと思われる。今後、呈味との関係を調べる必要があろう。

2. 生ノリに含まれる遊離アミノ酸量の抽出、定量法

①採集後の前処理として表面を軽く洗う方法

生ノリの表面を蒸留水で軽く洗った生ノリおよび同一試料の乾ノリを、それぞれ破壊法で抽出した結果は、表3に示すとおりである。

生ノリと乾ノリの遊離アミノ酸量を比較すると、Tauは1156, 923mg/100g, Aspは190, 200mg/100g, Gluは

916, 1051mg/100g, Alaは1026, 790mg/100g, その他は172, 195mg/100g, 合計では3460, 3159mg/100gであった。乾ノリよりも生ノリで多かった遊離アミノ酸はTau, Alaであり、両者の差は特にAlaで著しかった。また、生ノリと乾ノリ間の相関関係を求めると、表4に示すように、Alaおよびその他については、5%有意水準で相関が認められたものの、Tau, Asp, Gluおよび合計では、相関が認められなかった。

②採集後の前処理として表面水分をふきとる方法

生ノリの表面を蒸留水で軽く洗った生ノリおよび同一

表3 生ノリの表面を蒸留水で軽く洗った生ノリおよび同一試料の乾ノリの遊離アミノ酸量 (31検体の平均)

Table 3. Free amino acid of fresh Nori washed by distilled water and same dried Nori (means of 31 samples).

Fresh Nori						Dried Nori					
Tau	Asp	Glu	Ala	Others	Total	Tau	Asp	Glu	Ala	Others	Total
(mg/100g)						(mg/100g)					
1156	190	916	1026	172	3460	923	200	1051	790	195	3159
(1.25)	(0.95)	(0.87)	(1.30)	(0.88)	(1.10)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)

(), Value are expressed relative to those obtained by modified method of Saito *et al.*.

表4 生ノリと乾ノリとの関係

Table 4. The relationship between free amino acid of fresh Nori washed by distilled water and same dried Nori.

Tau	Asp	Glu	Ala	Others	Total
0.077	0.273	0.086	0.366*	0.406*	0.084

*, Significant at $p < 0.05$; **, Significant at $p < 0.01$.

表5 生ノリの表面を軽くふきとった生ノリおよび同一試料の乾ノリの遊離アミノ酸量 (31検体の平均)

Table 5. Free amino acid of fresh Nori slight wipe up by distilled water and same dried Nori (means of 31 samples).

Fresh Nori						Dried Nori					
Tau	Asp	Glu (mg/100g)	Ala	Others	Total	Tau	Asp	Glu (mg/100g)	Ala	Others	Total
1116	123	840	1108	336	3496	1165	181	1220	947	440	3955
(0.95)	(0.67)	(0.68)	(1.17)	(0.76)	(0.88)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)

(), Value are expressed relative to those obtained by modified method of Saito *et al.*

表6 生ノリと乾ノリとの関係

Table 6. The relationship between free amino acid of fresh Nori slight wipe up by distilled water and same dried Nori.

Tau	Asp	Glu	Ala	Others	Total
0.357*	0.624**	0.515**	0.712**	0.045	0.615**

*, Significant at $p < 0.05$; **, Significant at $p < 0.01$.

試料の乾ノリを、それぞれ破壊法で抽出した結果は、表5に示すとおりである。

生ノリと乾ノリの遊離アミノ酸量を比較すると、Tauはそれぞれ1116, 1165mg/100g, Aspは123, 181mg/100g, Gluは840, 1220mg/100g, Alaは1108, 947mg/100g, その他は336, 440mg/100g, 合計は3496, 3955mg/100gであった。乾ノリよりも生ノリで多かった遊離アミノ酸はAlaであった。また、生ノリと乾ノリとの間の相関関係を求めると、表6に示すように、その他については相関は認められなかったものの、Asp, Glu, Alaおよび合計については1%の有意水準で、Tauは5%の有意水準で相関が認められた。

表面を軽くふきとる方法において有意な相関が認められた理由としては、生ノリでは蒸留水での洗浄による細胞内容物の溶出等がなかったこと、乾ノリでは製造過程における適度な水洗いの結果、均等に遊離アミノ酸量が流出したことが相乗的に作用したことが考えられる。一方、アミノ酸量値を比較すると、表面を軽くふき取る法では、Alaを除いていずれの遊離アミノ酸も生ノリが乾ノリよりも少ない値を示している。吉江ら²⁾は遊離アミノ酸が加工中に溶出し減少することは認められず、加工工程が呈味成分に与える影響は少ないとしている。しか

し、本研究の結果からは生ノリから乾ノリに製造する過程において遊離アミノ酸以外の水溶性成分の溶出や揮発成分の減少などがおきて、生ノリの遊離アミノ酸量が乾ノリの遊離アミノ酸量よりも相対的に少なく検出されているものと思われる。従って、ノリに含まれる遊離アミノ酸量を測定するには、生ノリを摘採後表面を軽くふき取って保存し、同じ抽出方法を用いて比較すれば良いものと思われる。

おわりに、本実験を行うに当たり、貴重な助言をいただいた味の素(株)九州工場 村山晃氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 齊藤宗勝・荒木 繁・桜井武麿・大房 剛 1974: 乾海苔における光合性色素含量および全窒素・全遊離アミノ酸・全遊離糖含量の時期的変動と産地間の相違. 日水誌, 41 (3), 365-370.
- 2) 吉江由美子・鈴木 健・白井隆明・平野敏行 1994: 乾のりの加工工程における成分変化. 日水誌, 60 (1), 117-123.
- 3) 佐賀県有明水産振興センター 1995: ノリの品質特性評価と生産管理技術に関する研究. 平成6年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 1-33.