

ノート

生ノリに含まれる遊離アミノ酸の簡易抽出方法の検討

紺野 智太^{*1}・垂水 裕樹^{*1}・阿部 真紀子^{*1}・永木 利幸^{*1}

The study of simple method for extracting free amino acids from fresh nori *Neopyropia yezoensis*

Tomohiro KONNO^{*1}, Yuki TARUMI^{*1}, Makiko ABE^{*1}, Toshiyuki NAGAKI^{*1}

キーワード：スサビノリ，遊離アミノ酸，高速液体クロマトグラフィー

本県は国内におけるノリ養殖の北限であり、スサビノリ（以下、ノリ）は本県において重要な養殖種の一つである。本県の養殖生産状況は「海面漁業生産統計調査」¹⁾及び「漁業産出統計」²⁾によれば、2020年の生産枚数は407,239千枚、生産金額は約55億円であり、生産数量及びその金額はともに全国の約5%を占めている。本県では「ノリ養殖最適生産技術開発事業」として、県内各浜の特徴に応じた生産モデルの構築のために試験研究を行っている。

魚介類や藻類の組織を熱湯や、エタノール等を用いて抽出し、得られた抽出液をエキスという。エキスは低分子量の物質から構成されており、その中には生命活動に不可欠な機能を担うものや、呈味に関係するものがある。遊離アミノ酸はエキス中で遊離の形で存在し、タンパク質を構成するアミノ酸とは異なり、呈味に関係する成分である。遊離アミノ酸は生物種ごとに特定のアミノ酸に偏ることが知られており^{3,4)}、ノリに含まれる主要な遊離アミノ酸は、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸であり^{6,7,8)}、これらの含有量を分析することで見た目だけでない「おいしさ」を評価することができる。

遊離アミノ酸を分析する際は、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）等の分析装置に供する前に、前処理工程が必要である。それにはエタノール還流抽出法、トリクロロ酢酸（以下、TCA）法などがあるが⁵⁾、ノリにおいてはエタノール還流抽出法が一般的である^{6,7,8)}。エタノールを使用する際には、その性質からエキスを含む水溶性成分だけでなく、脂溶性成分を抽出してしまう

ため、これらを分画する必要があるが、分画操作は工程が煩雑であり時間が掛かる。そのため、簡易に遊離アミノ酸を抽出する方法が求められている。横関⁹⁾は、粉末状の穀類から遊離アスパラギンをTCA水溶液で抽出しており、同様の手法がノリでも応用可能か検討した。TCA水溶液を用いた前処理工程では、煩雑な分画操作は必要なく、操作は簡易で、ハンドリングによる試料の汚染や分析対象種の損失などのリスクを下げる効果が期待される。以上のことから、ノリに含まれる遊離アミノ酸を簡易に抽出する方法について考察するため、エタノール還流抽出法とTCAを用いた方法を比較検討したので報告する。

材料と方法

1 サンプル

本分析には、2021年1月17日に宮城県亶理郡亶理町荒浜で養殖された生ノリを使用した。サンプリングしたノリは、チャック付きの袋に入れ、氷温下で水産加工公開実験棟に持ち帰った後、葉体表面の塩分を除去するために十分な量の水道水で洗浄した。その後ペーパータオル等で葉体表面の水分を除去し、分析に供するまでチャック付きの袋に入れ-30°Cで凍結保管した。

2 遊離アミノ酸抽出方法の検討

抽出方法については、以下の3つの方法で検討した。試験区については、エタノール還流抽出法をエタ区、トリクロロ酢酸法をTCA区、フリーズドライ法をFD区

とした。

なお、全ての抽出方法で同じ冷凍サンプルを使用した。サンプルはチャック付きの袋に入れたまま流水解凍し、フードプロセッサーで細断後、抽出した。

(1) エタノール還流抽出法 (以下, エタ法)

Nodaら⁸⁾の方法を参考に行った。サンプルを共栓三角フラスコに約5g精秤し、そこに80%エタノールを10倍量(50ml)加えた。冷却管を付け80°Cの水浴上で、還流抽出を15分間行った。その後、濾紙 (No.5B, ADVANTEC社製) で抽出液を濾過し、ナス型フラスコに回収した。上記抽出操作を合計3回繰り返した。回収した抽出液はロータリーエバポレーターで40°Cで減圧乾固し、乾固したサンプルはジエチルエーテル及び蒸留水それぞれ50mlを用いて溶解し、分液漏斗を用いて脱脂操作を行った。2層に分離後、水層を回収し、再びジエチルエーテル50mlを加えた。この脱脂操作を合計3回繰り返した。脱脂操作後、水層を回収し、ロータリーエバポレーターで40°Cで減圧乾固した。乾固したサンプルを超純水で100mlメスフラスコに定容後、0.45 μ mシリンジフィルターで濾過したものを1.5mlバイアルに充填し、分析サンプルとした。

(2) トリクロロ酢酸法 (以下, TCA法)

分析試料前処理ハンドブックの方法を参考に行った⁵⁾。サンプル約5 gを50ml遠沈管に精秤した。その遠沈管に10% TCA水溶液15mlを入れて1分間震盪後、TCA水溶液に十分溶出させるため冷暗所で1日放置した。その後、遠心分離(0°C・21,100g×5分)し、上澄みを濾紙 (No.5B) を用いて濾過しながら、100mlメスフラスコに回収した。次に、遠沈管に5%TCA水溶液10mlを加え震盪後、濾紙を用いて上澄みを同じ100mlメスフラスコに回収した。最後に、濾紙上に残った遊離アミノ酸を回収するために蒸留水30ml程度で洗い流し、同じ100mlメスフラスコに回収した。超純水で100mlメスフラスコに定容後、0.45 μ mシリンジフィルターで濾過したものを1.5mlバイアルに充填し、分析サンプルとした。

(3) フリーズドライ法 (以下, FD法)

サンプルを凍結乾燥した後にガラスホモジナイザーで摩砕し、(2)TCA法と同様に抽出した。まず、サンプル約5 gをアルミ皿に精秤し、-30°Cで凍結させた。次に、アルバック社製凍結乾燥機 (DFR-5N-B) を用いて、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、サンプル及び少量の10%TCA水溶液をガラスホモジナイザーに入れ、摩砕した。10%TCA水溶液は全量が15mlになるように摩砕した

サンプルとともに50ml遠沈管に加え1分間震盪後、TCA水溶液に十分溶出させるため冷暗所で1日放置した。その後、遠心分離 (0°C・21,100g×5分) し、上澄みを濾紙を用いて濾過しながら、100mlメスフラスコに回収した。次に、遠沈管に5%TCA水溶液10mlを加え震盪後、濾紙を用いて上澄みを同じ100mlメスフラスコに回収した。最後に、濾紙上に残った遊離アミノ酸を回収するために蒸留水30ml程度で洗い流し、同じ100mlメスフラスコに回収した。超純水で100mlメスフラスコに定容後、0.45 μ mシリンジフィルターで濾過したものを1.5mlバイアルに充填し、分析サンプルとした。

3 遊離アミノ酸定量分析

アジレント・テクノロジー株式会社製のHPLC (Agilent 1260 Infinity series) を用いて分析を行った。

アミノ酸の誘導体化は、Agilent 1260 Infinityオートサンプラーの自動プレカラム誘導体化機能を用いた。OPA (o-フタルアルデヒド) で1級アミノ酸を誘導体化した後、逆相カラムで分離し、フォトダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器を用いて定量した。分析条件は表1、移動相A及びBのグラジエントは表2のとおりとした。

各遊離アミノ酸は、市販のスタンダードを用いた絶対検量線法により、アスパラギン酸 (Asp), グルタミン酸 (Glu), セリン (Ser), ヒスチジン (His), グリシン (Gly), スレオニン (Thr), アルギニン (Arg), アラニン (Ala), チロシン (Tyr), バリン (Val), メチオニン (Met), フェニルアラニン (Phe), イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu), リジン (Lys), プロリン (Pro) を定量した。

なお、定量分析した結果はKruskal-Wallis検定後、有意差がある場合には2群ずつを比較するためSteel-Dwassの多重比較を行った。双方とも、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

表1 遊離アミノ酸定量分析におけるHPLC条件

カラム	Agilent Poroshell HPH-C18(3.0*100mm*2.7 μ m)
ガードカラム	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18(3.0*5mm*2.7 μ m)
カラム温度	40°C
サンプル温度	5°C
移動相	グラジエント分析 A) 10mM 四ホウ酸ナトリウム・リン酸水素二ナトリウム水溶液(pH8.2) B) アセトニトリル/メタノール/水(4.5:4.5:1)
移動相流量	0.7ml/min
検出器	DAD 338.0nm;10nm, Ref390nm;20nm FLD Ex230nm, Em450nm
分析時間	23.50分

表2 移動相のグラジエント

時間 (分)	移動相 A:B (v/v/v)
0	96 : 4
1.50	96 : 4
3.50	88.5 : 11.5
14.00	50 : 50
15.00	40 : 60
15.01	0 : 100
19.50	0 : 100
19.51	96 : 4
23.50	96 : 4

結果

遊離アミノ酸定量分析の結果を表3に示した。分析の結果から、既報のとおり^{6,7,8)}ノリの主要な遊離アミノ酸はAla, Glu, Aspであった。

主要な遊離アミノ酸のそれぞれの抽出量については、Aspではエタ区及びFD区が最も多く、TCA区が最も少なかった。GluではFD区が最も多く、TCA区が最も少なかった。Alaではエタ区が最も多く、TCA区が最も少なかった。遊離アミノ酸抽出量の合計では、エタ区が最も多く、TCA区が最も少なかった。Asp, Glu, Ala以外の遊離アミノ酸では、エタ区においてGly, Thrが他の試験区と比べて、有意に多かった。

標準誤差 (SE) については、主要な遊離アミノ酸であるAsp, Glu, Ala及び遊離アミノ酸抽出量の合計ではエタ区が最も小さく、データ間のバラつきが小さい結果となった。

考察

生ノリの遊離アミノ酸定量分析の抽出方法には一般的にエタノール還流抽出法が用いられている^{5,6,7,8)}が、操作量が多く煩雑であり時間が掛かるため、本実験では事前に試料を物理的に破碎し、用いる抽出溶媒を変えることで簡易かつ測定誤差が少ない方法を模索した。TCA法は液状試料の除タンパクに用いられる方法である⁹⁾が、横関ら⁹⁾は粉末化された穀類中の遊離アスパラギンの抽出に使用しており、今回は同様の手法を生ノリに応用できるか検討した。TCA法と、それを一部改良し生ノリをフリーズドライすることで摩砕しやすくしたFD法を試し、従来法であるエタ法と比較検討した。なお、分析試料前処理ハンドブック⁹⁾においては、試料にTCA溶液を加えて15分振盪するとされてい

表3 遊離アミノ酸定量分析の結果 (エタ区n=5, TCA区n=5, FD区n=5, mean±se, 異なるアルファベットは試験区間で有意差があることを示す (p<0.05))

(mg/100g)	エタ区		TCA区		FD区	
Asp	35±2	a	32±3	a	35±3	a
Glu	83±3	a	79±8	a	84±9	a
Ser	0		0		0	
His	8±0	a	6±1	a	6±2	a
Gly	3±0	a	1±1	b	0	b
Thr	2±0	a	0	b	0	b
Arg	0		0		0	
Ala	98±4	a	89±8	a	93±9	a
Tyr	0		0		0	
Val	2±0	a	2±0	a	2±0	a
Met	0		0		0	
Phe	0		0		0	
Ile	1±0	a	1±0	a	0	a
Leu	1±0	a	1±0	a	1±0	a
Lys	1±0	a	1±0	a	1±0	a
Pro	0		0		0	
合計	234±10	a	212±21	a	224±23	a

るが、令和2年度養殖振興プラン推進事業（ノリ養殖最適生産モデル構築事業）において、乾ノリに含まれる水溶性色素を水抽出した際に、抽出に1日以上が必要であったため、それに倣い1日放置することとした。

その結果、抽出効率が最も良く、誤差が最も小さい方法はエタ区であった。TCA区及びFD区では、主要な遊離アミノ酸であるAsp, Glu, Ala及び遊離アミノ酸の抽出量の合計はエタ区と有意差がなかったが、標準誤差はエタ区より大きかった。以上から、現時点では、より信頼できるデータを得るためにはエタ法が最適であると判断される。しかし、エタ法は操作が煩雑であり、多量のサンプル数を分析するには困難である。

TCA区とFD区を比較すると、各遊離アミノ酸抽出量及び遊離アミノ酸の抽出量の合計について有意差がなかった。この理由として、凍結保管したノリ葉体を解凍した後に試料としたことで、凍結による氷結晶の生成で破壊された細胞から遊離アミノ酸がドリップとしてTCA水溶液に溶出したためと考えられる。しかし、FD区はTCA区よりも抽出量が多く、ノリ細胞の摩砕の度合いが抽出量に関わっているとことが示唆された。

川村ら⁹⁾は乾ノリ及び生ノリをクエン酸緩衝液中でホ

モジナイズと超音波で物理的に粉碎する方法で遊離アミノ酸を抽出し、アミノ酸分析計で定量分析を行った。その結果、エタノール還流抽出法よりも抽出量が多くなったと報告しており、物理的に粉碎することが遊離アミノ酸抽出に有効であることが示唆された。以上のことから、凍結・解凍ドリップを使用することや、ホモジナイザーを活用してより確実に原藻を摩砕すること、FD法と超音波処理を組み合わせること等で、簡易かつ効率的に抽出できる可能性がある。その他、遠沈管にTCA水溶液を加えて震盪、遠心分離する工程を増やすことで抽出効率や誤差が改善されるかもしれない。今後も操作性や使用する溶媒の安全性、抽出効率などを考慮しながら、簡易抽出方法について検討が必要である。

要 約

生ノリに含まれている遊離アミノ酸の抽出方法について従来法のエタノール還流抽出法と、簡易的に抽出した2方法の抽出量と抽出誤差を比較検討した。

その結果、主要な遊離アミノ酸であるAsp,Glu,Ala及び遊離アミノ酸の抽出量の合計において有意差は無いものの、従来法であるエタノール還流抽出法が最も抽出効率が良く、誤差が少ないと判断された。

謝 辞

ノリサンプルの提供にあたり、あらはま海苔合同会社 菊地幹彦代表に多大な御協力をいただいた。ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 農林水産省 (2022) 海面漁業生産統計調査, 令和2年漁業・養殖業生産統計確報
- 2) 農林水産省 (2022) 海面漁業生産統計調査, 令和2年漁業産出額確報
- 3) 島一雄・關文威・前田昌調・木村伸吾・佐伯宏樹・桜本和美・末永芳美・長野章・森永勤・八木信行・山中英明 (2012) 最新水産ハンドブック, 379-380, (株) 講談社, 東京
- 4) 吉田勉監修 (2008) わかりやすい食品化学, 56 -57, 三共出版 (株), 東京
- 5) 中村洋監修 (2002) 分析試料前処理ハンドブック, 708-710, 丸善 (株), 東京
- 6) 川村嘉応・鷲尾真佐人 (1998) ノリに含まれる遊離アミノ酸の簡易抽出法, 有明水産振興センター研究報告 第18号, 1-5
- 7) 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, 日本水産学会, **60**(1), 117-123
- 8) Hiroyuki Noda, Yoshishige Horiguchi and Shigeru Araki (1975) Studies on the flavor substance of 'Nori', the dried laver *Porphyra* spp.-II free amino acids and 5'-nucleotides, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **41**(12), 1299-1303
- 9) 横関俊昭・西川桂子・小木曾樹・藤田和弘 (2017) HPLC-UVによる穀類中の遊離アスパラギン分析法の開発, 食衛誌, Vol. 58, No.6, 247-252