

## 植物体の遊離アミノ酸測定試料の調製法

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
巻/号	438
掲載ページ	p. 303-304
発行年月	1972年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ノ ー ト

## 植物体の遊離アミノ酸測定試料の調製法

鈴木 皓\*・千葉満男\*\*

最近自動アミノ酸分析計の発達により、アミノ酸の定量分析が容易になった。植物体の遊離アミノ酸は STEWARD ら<sup>1,2)</sup>が、ペーパークロマトグラフィで同定するために、アルコール水溶液で抽出を試みて以来、アルコールによる抽出が広く行なわれようになったが、定量的な抽出条件の検討はきわめて少ない。また分析試料が多数のときは、新鮮試料をただちに抽出することが困難な場合が多く、採取植物体の保存法が、分析結果に影響をおよぼすことが当然考えられる。

WELTE ら<sup>3)</sup>は遊離アミノ酸の分析における誤差は、試料の抽出と、抽出試料の精製の過程でおこると指摘しているが、植物葉のアルコール抽出液をアミノ酸分析計で分析する場合には、一般に試料の脱塩精製をしなくても各アミノ酸の分離は良好である。したがってここでは採取試料の保存法と抽出法について検討した。

## 1. 実験方法

1) 採取試料の保存法と遊離アミノ酸組成. ポットに均一栽培した水稻から、減数分裂期に上位展開三葉を採取し、1~2 mm の細片に切って混合した後 5 g を秤取し、新鮮物抽出の場合にはただちに 80% (v/v) エチルアルコール 120 ml を加えて 80°C で 20 分間抽出し、抽出液を傾しゃ、ろ過した。残渣は再び 100 ml の、次いで 80 ml のアルコールで同様に抽出し、三回抽出の合量を分析に供試した。

ほかに上記の細片試料 5 g をとり、80°C で 24 時間熱風乾燥したもの、ディープフリーザーに 15 日間凍結保存したもの、およびただちに真空凍結乾燥したものについて、同様な抽出を行なった。

2) 試料の磨砕の有無および抽出回数とアミノ酸の抽出量. 新鮮物を 1~2 mm の細片のまま抽出した場合と、細片試料に 80% アルコールを加えて、乳鉢で磨砕した場合について、実験 1) と同様に抽出し、各回のアミノ酸量を定量した。

3) 溶媒の更新による抽出とソックスレーによる抽出

\* 農技研化学部 (東京都北区西ヶ原 2-1-7)

\*\* 岩手県農業試験場県南分場

昭和 47 年 4 月 17 日受理

日本土壤肥料学雑誌 第 43 巻 第 8 号 p. 303~304 (1972)

の比較. 上記のような溶媒更新法と並行して、新鮮物 5 g を 100 ml の 80% アルコールで、ソックスレー抽出器によって 80°C, 20 時間の連続抽出を行なった。

抽出液は減圧下 40°C でアルコールを除去し、ジクロロメタンで色素類をとった後、pH 2.2 のくえん酸緩衝液で定容とし、日立アミノ酸分析計 KLA-3B 型で分析した。分析前の試料の脱塩精製は行なわなかった。

## 2. 実験結果と考察

1) 採取試料の保存法について. 熱風乾燥試料は、当然のことではあるが、新鮮物にくらべて遊離アミノ酸組成が著しく異なっていた(第 1 表)。すなわち新鮮物に対してアスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、メチオニンは約 30~50% の量しか示さず、これらのアミノ酸は分解が著しい。

ディープフリーザーに凍結保存した場合には、凍結乾燥試料とアミノ酸組成がきわめてよく類似し、両者の間にはほとんど差を認めなかった。したがってただちに凍結乾燥の困難な場合には、フリーザーに保存することで代替できよう。この両者はいずれの場合も、新鮮物に類似したアミノ酸組成を示したが、アスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸がやや増加し、アラニンが減少するなど、アミノ酸の種類によって、新鮮物と異なる結果を得た。とくにアスパラギン酸の増加とアラニンの減少が著しく、これらのアミノ酸を分析対象とする場合には、新鮮物の抽出が望ましい。

凍結乾燥とフリーザー貯蔵試料が、いずれも同様な傾向で、新鮮物と異なるアミノ酸組成を示したことは、凍結の過程でアミノ酸の変化がおこることを示唆している。したがって液体窒素による急速な凍結が、どのような影響をおよぼすかも検討の余地があろう。

2) 試料の磨砕の有無および抽出回数について. アルコールの更新によって加熱抽出した場合に、3 回目の抽出量はきわめて少なかったため、それ以上に回数を重ね

第 1 表 抽出前の試料の保存法と遊離アミノ酸組成 (乾物 1g 中マイクロモル)

アミノ酸	新鮮物	熱風乾燥	ディープフリーザー	凍結乾燥
アスパラギン酸	2.62	0.78	6.18	5.16
スレオニン	0.82	1.28	1.20	1.05
セリン	4.51	2.34	4.89	3.94
グルタミン酸	7.52	2.86	10.40	9.95
グリシン	0.24	0.58	0.25	0.21
アラニン	9.25	14.03	5.27	4.93
バリン	1.05	1.47	1.14	1.10
メチオニン	3.66	1.93	4.09	3.53
イソロイシン	0.64	0.98	0.73	0.65
ロイシン	0.60	1.12	0.59	0.54
チロシン	0.39	0.89	0.39	0.32
フェニルアラニン	0.66	0.96	0.68	0.59

注) 数値は 2 連抽出の平均。塩基性アミノ酸は含量が少ないので省略した。

第 2 表 試料の磨砕の有無による抽出量と各回抽出率

アミノ酸	3回抽出含量 (マイクロモル/g 乾物)		無磨砕試料の各回抽出率 (%)*		
	磨砕	無磨砕	1回目	2回目	3回目
アスパラギン酸	6.43	6.19	88.0	10.5	1.5
スレオニン	2.13	2.35	94.0	5.5	0.5
セリン	5.01	5.84	93.8	5.3	0.9
グルタミン酸	17.68	17.11	91.7	7.7	0.6
グリシン	0.58	0.70	91.8	7.1	1.1
アラニン	11.87	11.48	94.5	5.1	0.4
バリン	1.07	1.36	97.1	2.9	tr
メチオニン	9.03	8.47	92.6	6.8	0.6
イソロイシン	1.07	1.12	96.4	3.6	tr
ロイシン	0.82	0.91	96.2	3.8	tr
チロシン	0.46	0.45	96.2	3.8	tr
フェニルアラニン	0.59	0.90	97.4	2.6	tr
リジン	0.31	0.35	77.1	15.8	7.1
ヒスチジン	0.25	0.29	90.5	9.5	tr
アルギニン	0.35	0.38	82.7	11.2	6.1
合計	57.65	57.90	92.6	6.7	0.7**

注) \*3回抽出の含量100をとした。\*\*総アミノ酸の抽出率。tr:こん跡。

て抽出しなかった (第 2 表)。

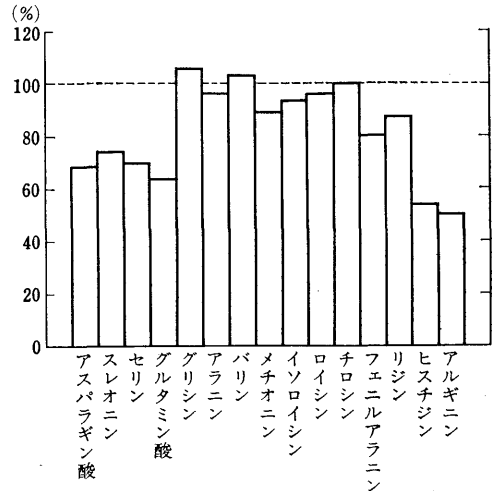
総アミノ酸で見ると、試料の磨砕の有無にかかわらず、2回の抽出によって、3回抽出含量の99%が抽出された。しかしリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸は、3回めにもかなりの抽出量があり、さらに抽出回数を重ねる必要がある。試料を磨砕してもこれらの塩基性アミノ酸は、3回の抽出では不十分であった。

3回抽出の含量で見ると、各アミノ酸とも、磨砕試料と細片試料の間に抽出量に大差がなく、水稻葉身では細片のままでも3回の抽出によって、磨砕試料と同程度に抽出されることが確かめられた。

3) 溶媒更新法とソックスレーによる抽出量の比較。アルコールの更新による抽出は簡便であり、しかも3回の抽出で十分であるようにみうけられた。しかしこれをソックスレーによる連続抽出と比較すると、かなり異なったアミノ酸組成を示した (第 1 図)。

総アミノ酸では、溶媒更新法ではソックスレーの約80%の抽出率であった。各アミノ酸のうちでもアスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、ヒスチジン、アルギニンなどの抽出率が低く、とくに塩基性アミノ酸は約50%の抽出率しか示さなかった。したがって定量分析の場合には、ソックスレーによる抽出が必要である。

この実験の実施中に報告された小麦幼植物による WELTE ら<sup>4)</sup>の実験結果も、ほぼ同様の傾向であり、リジ



第 1 図 ソックスレー抽出法に対する溶媒更新法による抽出アミノ酸量の割合

ンやヒスチジンなどの塩基性アミノ酸は、溶媒更新法ではとくに抽出されにくいことを示している。

なおソックスレーによる抽出時間と抽出量の関係は、検討しなかったが、WELTE らは  $\gamma$ -アミノ酪酸とチロシンの抽出は、不完全であるとしながらも、総体的に 10 時間の抽出ではほぼ完全であるとしている。

以上の結果は、水稻の葉身を用いて得られたものであるが、試料の磨砕の要否は、果樹葉など組織のかたい場合には、さらに検討を要するであろう<sup>2)</sup>。また供試試料はアミドの含量が少なかったが、グルタミンは抽出中に分解されやすい<sup>4)</sup>ことを考慮すれば、アミドの含量によってもアスパラギン酸やグルタミン酸の定量値が、影響されることが考えられる。

文 献

- 1) DENT, C. E., STEPKA, W. and STEWARD, F. C.: *Nature*, 160, 682 (1947)
- 2) 久保田収治ら: 四国農試土肥第 2 研究室試験研究の成績概要, p. 8 (1970)
- 3) SYNGE, R. L. M.: PAECH, K. and TRACEY, M. V. eds. *Modern Methods of Plant Analysis*, 4, p. 2, Springer-Verlag, Berlin (1955)
- 4) WELTE, von E., PRZEMECK, E. und NUH, M. C.: *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.*, 128, 243 (1971)