21148

もやしの成長にともなうアミノ酸の変化

要旨

植物の成長にともなうアミノ酸の変化を調べ、アミノ酸が最も含まれているのはいつかを調べることをねらいとし、今回は身近にある低価格な大豆もやしを実験材料とした。実験では、ニンヒドリン法を用い、試料の抽出には、ホモジナイズ室温抽出法を用いる。

１．目的

もやしの成長にともない、どれほどの量のアミノ酸が含まれているか、また、成長過程や保存方法の違いによる変化を調べる。

２．使用した器具・装置

遠心機、分光光度計、3mL セル、 ロータリーエバポレータ、ダイヤフラム式吸引ポンプ、ホモジナイザー

３．研究・実験の手順

［もやしを栽培する］

使用する材料、器具

大豆　ガラス製の広口ビン　ガーゼ　　輪ゴム

方法

① 大豆を流水ですすぎ洗い後、ビンに入れて、水につけ、吸水させる。

② ビンの口をガーゼでふさぎ、輪ゴムで止める。吸水させた水を、ビンを逆さにしてすてる。

③ 種を 2～3 回すすぎ洗いする。

④ 種が割れて発芽がはじまったら暗い場所に置く。

⑤ １日 2～4 回、水道の流水ですすぎ、種子の水分を切らさないようにする。

［緩衝液をつくる］

①4.0M 酢酸緩衝液:酢酸ナトリウム三水和物（$CH_3COONa \cdot 3H_2O$＝136.08）13.6g に蒸留水 10 を加えて溶かし（少し温める）、氷酢酸 2.5mL を加え、蒸留水で 25mL とする。

pH5.5±0.3 であること［概ねこの範囲に収まるが、大幅にずれた場合、pH 調節は水酸化ナトリウム（NaOH）か酢酸（CH_3COOH）で行う］。４℃保存。

②ニンヒドリン溶液:12.5mL ガラスビーカーにニンヒドリン 100mg とヒドリンダンチン 12 mgをとり、これにメチルセロソルブ 3.75mL を泡立てないように加えて溶かす。この溶液に 4.0M酢酸緩衝液 1.25mL を加える（赤色となる）。この溶液は使用の都度、調節する。

③標準アミノ酸溶液（0.1 mg/mL）:0.025g のロイシン（Leu＝131.17）に 50％エタノール 250mL を加えて溶かす。

［検量線をつくる］

①1.5mL 容マイクロチューブに試料 100μL を分取し、これに等量(100μL)のエタノールを加えて激しく撹拌し、除タンパクを行う。なお、この場合の試料は、通常の酵素活性測定用に酢酸緩衝液等で抽出したものを流用する。

②14,000rpm で 1 分間遠心分離した後、得られた上清 100μL をガラス試験管(15×105mm)に分取する。ブランクとしては、100μL の 50%エタノールを用いる。

③試験管に 100μL のニンヒドリン溶液を加えて撹拌した後、ガラス球でふたをして沸騰湯浴中で 15 分間加熱する。

④流水中で急冷した後、50%エタノールを 1.5mL 加えて撹拌する。

⑤分光光度計を用いて波長 570mm における吸光度を測定する。

⑥この際、Leu を標準アミノ酸として用いた検量線を作成し、これをレファレンスとする。あらかじめ保存されている検量線を用いる場合、0.1 mg/mL の標準アミノ酸溶液 100μL についても一連の操作を行い、検量線の正確性を確認しておく必要がある。

［ホモジナイズ室温抽出法を用いる］

①もやし約 10 g に、エタノール濃度が 75%になるように 99.5%エタノールを加え、さらに 75%エタノール 20ml を加えてから、ホモジナイザーを用いて２分高速（15000rpm）でホモジナイズし、上澄み液をろ紙でろ過する。

ついで、ろ過した後に残ったかす(残渣)に 75%エタノール 20ml を加え上記の操作を 3 回繰り返す。残渣を 75%エタノールで洗浄し、全ての抽出液を集め 100ml 定容とし、試料とする。

②ロータリーエバポレータを用いて、試料の水分をとばす。

③水分をとばした試料を 20mL の蒸留水で溶かし、遠心機に 20 分かける。

④上澄み液を駒込ピペットで抽出し、3mL セルに入れて吸光度を測定する。

［計算方法］

ロイシンを標準アミノ酸として用いた検量線を利用することにより、試料 1mL あたりのアミノ酸量(mg/mL)が得られる。この値を試料全量にして換算した後、求めたい値を算出する。

たとえば、0.5g の材料を 2mL のバッファーで抽出した試料(検量線より 0.03 mg/mL という値が得られたとする)について、1g あたりのアミノ酸含量を求めたい場合は

0.03(mg/mL)×2(mL)＝0.06(mg/2 mL)

0.06÷0.5(g)＝0.12(mg/g)

となる。ただし、①のステップでエタノール沈殿を行い、試料を本来の 1/2 濃度にしているので、最終的に２倍して、

0.12×2＝0.24(mg/g)

という結果になる。

４．結果

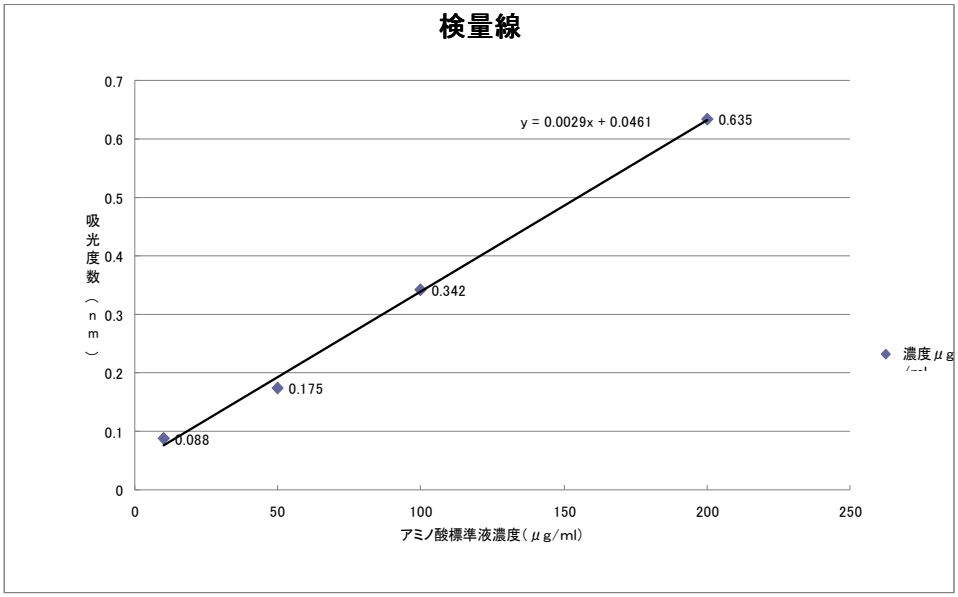

図１．アミノ酸標準濃度に対する吸光度

	吸光度(nm)
2 日目	0.258
4 日目	0.040
8 日目	0.268

表１．もやしのアミノ酸抽出液の吸光度

・2 日目の沈殿の量が少ない

・4 日目、8 日目の沈殿の量は同じだが濃さが違った

５．結果に対する考察・わかったこと

［もやしの栽培について］

もやしを市販の大豆から栽培しようと試みたが、うまく暗所が確保できず通気性も悪くなってしまった。また、発芽はしたものの、うまく成長せず一週間以上たっても、市販のもやしの長さにはならなかった。

そこで、もやしを育て販売している株式会社サラダコスモさんを見学させていただき、育て方等教えていただいた。

市販のもやしの多くは、大豆からではなく緑豆から育てるそうで、サンプルとして緑豆、さらには2日目、4日目、8日目のもやしサンプルをいただいた。

次は、いただいたサンプルの緑豆で教えていただいた栽培方法で栽培していきたい。

［検量線について］

中部大学応用生物学部に所属していらっしゃる和田俊夫教授が自分たちの研究に類似する研究を行っていらっしゃると伺ったので、連絡をさせていただき、見学、アドバイスをいただいた。和田教授がこの研究をどのように進めていくとよいか、など教えてくださった中で、研究過程として、まず検量線というものが必要だとわかった。

検量線とは、おおよその値が比例するものなのだが、実際に検量線を作った結果、比例するような値が得られず、値が小さいほうと大きいほうでグラフの傾きが異なってしまった。

これは、もやしにどれくらいのアミノ酸が含まれているかが見当つかず、とりあえず200μg/mlまでの範囲と決め、行ったためであると思われる。横軸のグラフに用いる値の範囲が定かではないので、もっと細かい値の範囲や、広い範囲での検量線を作らなければならないとわかった。

［アミノ酸抽出液の吸光度測定について］

サラダコスモさんにいただいた2日目、4日目、8日目のもやしのサンプルを用いて実験を行った。

4日目が異常に値が減少している。沈殿の色、量から、アミノ酸は水に溶け沈殿しないはずだが、沈殿している可能性がある。また、水溶液がにごっているので、不純物が混ざっており正しい結果ではない可能性もある。結果として、アミノ酸が増えているとはいえない。どのようにアミノ酸だけを溶液に溶かすか、いかに抽出したとき不純物を少なくするかが課題である。検量線も正しい値が出せていないので精度を上げる必要がある。また、自分たちでもやしを育て上げてはいないので、いただいた緑豆でもやしを安定的に栽培する。今後、助言をいただいた中部大学さんと連携をとって解明していく。

6．参考文献、引用文献

・ホモジナイズ室温抽出法
水野　卓、加藤宏治、原田政子、宮島由恵、鈴木英二郎：日本食品興業学会誌,18,319(1971).
・株式会社上原園～もやし～　ホームページ
・真部孝明：食品分析の実際，pp.7～16，幸書房，2003
・管原龍幸、前川昭男（編）：新食品分析ハンドブック，pp.24～56，建帛社，2000

7.ご協力いただいた大学、企業

・中部大学
・株式会社サラダコスモ　信州第二工場