

Faper Chromatography による醬油中の 遊離アミノ酸に関する研究

青山虎彦・浅川幹次

Studies on the Free Amino Acids in Soy by Paper Chromatography

TORAHIKO AOYAMA and KANJI ASAKAWA

I. 緒 論

SYNGEおよび MARTIN⁽¹⁾はアミノ酸を acetyl 誘導体の形として相互に自由に混合しない二液相間に対する分配係数の差を利用して、分離する方法を研究中従来の向流分配法は装置の製作に非常な手数を要するばかりでなく各アミノ酸の分離能がよくないので含水シリカゲルを吸着柱として partition chromatography を実施したが、acetyl 化したアミノ酸は分離しえなかつたのでアミノ酸のままの形で partition chromatography を企画し、シリカゲルの代りにこれと外見上変化なく而も相当多量の水を含みうる物質として澱粉、セルローズを試みた⁽²⁾結果遂に濾紙がアミノ酸の分離に最適なことを発見した。(澱粉を吸着柱とする Partition chromatography はその後 STEIN, MOORE⁽³⁾ によつて定量化にまで発展した)。最初は水蒸気を飽和した密閉器中で水を飽和した半円形の濾紙の中心に試料を置きクロマトグラフ展開を行う方法がとられていたが、その後実験操作法を改良し、1944年⁽⁴⁾今日広く使用されている方法が確立された。この方法はエステル法ブタノール抽出法等従来の方法に比べて経費時間が少くてすみ、操作が簡単な上に分離能がすぐれているため極めて速かに普及した。

醬油中の遊離アミノ酸に就ては、鈴木等⁽⁵⁾により alanine, leucine, proline, lysine, aspartic acid, tyrosine, cystine が有働⁽⁶⁾により glutamic acid, 金子⁽⁷⁾により alanine, leucine, phenylalanine, proline, methionine, 富安⁽⁸⁾により β -hydroxyglutamic acid がそれぞれ化学的方法又は物理的方法によつて検出されている。その他醬油中の遊離アミノ酸に関しては大村⁽⁹⁾高田⁽¹⁰⁾岩村⁽¹¹⁾等の報告がある。paper chromatography によつて市川⁽¹²⁾吉野⁽¹³⁾は以上のアミノ酸の他 glycine, valine, iso-leucine, serine, threonine, histidine, arginine を検出している。

醬油製造法には醸造法、半化学的方法⁽¹⁴⁾化学的方法があり、化学的方法は更に従来行われてきた高温分解法と BIRD 及び MINOR⁽¹⁵⁾の方法を基とし青山⁽¹⁶⁾荒川⁽¹⁷⁾等によつて工業化された低温分解法とに分けられる。著者は

アミノ酸及びアミノ酸以外の ninhydrin 反応を呈する物質(例えば低級ペプチド、アミン等)がこれらの製造法の相違に原因して生ずる差異を予想し醸造法高温分解法及び低温分解法の三者を paper chromatography によつて比較検討したのでその結果を paper chromatography に関する 1, 2 の知見と併せて報告する次第である。

II. Paper chromatography に関する実験

装置：一次元法はガラス板の上に内径 14.5cm, 高さ 30cm のガラス鐘(上部に温度計を挿入)をおきその底部に径 12cm のシャーレをおき展開剤の容器にした。ガラス板とガラス鐘の接触面はワセリンを塗り気密にした。二次元法はデシケーター(内径 21cm)を2個合せたものの底部に展開剤の容器として径 12.5cm のシャーレをおいたものを使用した。何れも上昇法によつた。

発色法及び発色剤：展開が終了した濾紙は室温にて風乾し、50~60° に乾燥し後発色剤を spray し 95~100° で約 5 分放置し発色せしめる。

発色剤は 0.2% ninhydrin 含水ブタノール溶液を用いた。

展開剤：phenol-water (4:1), *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1),

1. *n*-butanol acetic-acid-water (以下 B·A·W と記す)の使用法,

butanol と acetic acid は ester を作るために調製後時間の経過と共にその組成は次第に変化してゆきそれに伴つてアミノ酸の R_f 値にも変化が現わる。この変化は割合に大きいため文献^{(12), (13), (18), (19)}にもみられる如く展開剤の新鮮度に注意しなければならない。そのためには展開毎に新たに展開剤を調製しなおすのがよいが、かかる方法をとると展開終了後回収した展開剤は使用しえなく、その消費量は意外に多くなる。この難点は展開調製後 esterification が平衡状態に達してから用うれば防止しうる。B·A·W 調製後の時間の経過と R_f 値の変化状態を調べた結果は第 1 表の通りである。

R_f 値は B·A·W の新鮮度により大きい開きがある。30±2°C 附近では 7 日経過すると esterification は平衡

第1表 B・A・W調製後の時間の経過とRf値との関係
 試料: glutamic acid-HCl の0.1% 溶液
 濾紙: 東洋濾紙 No.2 2×27cm
 展開温度及び展開時間: 30±2°C, 3.5~4.5時間

B・A・W 調製後の経過日数	Rf 値
0	0.31
1	0.28~0.29
2	0.26~0.28
4	0.24~0.25
7	0.20~0.22
14	0.20~0.22

に達し展開剤の組成は一定するものとみられる。尙他の実験で観察した所によると分離能は新鮮なものと殆ど異なる。濾紙に対する透過状態も全然差異が認められないので以後調製後7~10日以上経過したB・A・Wを使用することにした。

2. phenol-water (4:1) (以下P.Wと記す)に就て

Phenol は酸を添加しない場合は通常水飽和として用いるが佐竹⁽²⁰⁾によると phenol は水飽和にすると濾紙中を透過通過する際 phenol の一部が濾紙の吸着水中に溶解して今迄 phenol 中に溶解していた水が過剰となつて析出し分離能を害するので phenol は出来るだけ少量の水を以て辛うじて液化せしめて用いるのがよい。夏季の如く気温が高い場合はそれでもよいが、気温が低下すると粘度が増し展開時間が徒らに長くなり、殊に ammonia を添加 (通常 0.1%) する場合は展開時間が長くなると濾紙の着色は一層甚だしくなる不便がある。P.W でも 8°C 附近になると phenol は析出する。chromatography 用 phenol の精製法⁽²¹⁾があるが ammonia を添加しない場合は市販のものをそのまま用いて差支えない。ammonia の添加は濾紙の着色が甚だしく Rf 値の大きい leucine, proline 等は spot の存在が不明瞭になる恐れがあるので添加しないで用いた。ammonia 添加による Rf 値の差異は僅少であるが hexon base においてはその開きは大き

第2表 ammonia 添加による Rf 値の差異

濾紙: 東洋濾紙 No. 50, 2×27cm
 展開温度及び時間: 27±1°C, 7~9時間

Amino acid	NH ₃ ・0.1% 添加	無添加 (P.W)
glycine	0.40	0.41
alanine	0.58	0.58
lysine-HCl	0.80	0.43
arginine-HCl	0.87	0.57
histidine	0.79	0.72
ornithine ²⁾	0.61	0.41

い。

又 ammonia 添加による濾紙の着色を少くしようという目的で phenol を直接添加せず 14% ammonia 水を P.W. のシャーレとは別に少量展開塔中におき NH₃-gas で飽和してみたが P.W. の着色は直接添加のものより少いが濾紙の着色は全然変らなかつた。Rf 値は 0.1% 添加のものとはほぼ同じで分離能は無添加のものより若干すぐれていた。即ち spot の tailing が殆ど認められなかつた。かかる利点があるが未知の試料を展開した場合の誤判を防ぐため以後無添加の P.W. を使用した。

3. NaCl の影響

Paper chromatography によつてアミノ酸の分離を実施する場合、試料はアミノ酸が主成分である様に調製するのが理想的であるが、蛋白質の HCl 加水分解物にしても醸造醤油にしても混合物が相当量存在する。NaCl が存在する場合、これを除去するのは手数を要することである上に脱 NaCl 操作中目的物の組成を変化させる恐れがある。HCl 加水分解の場合減圧濃縮によつて HCl を除くとしても尙 1N 内外の HCl が残存するし⁽²⁵⁾これを中和しても 5~6% の NaCl が存在する。醤油を試料とすれば 18% 内外の NaCl, 2.5% の糖類が含有される。

NaCl が高濃度の場合、殊に NaCl の Rf 値とアミノ酸の Rf 値とが接近している様な場合アミノ酸の spot に何等かの影響を与えるであろうということが予想されるので、それに就て数種のアミノ酸を用い NaCl の濃度を変えて試験した。尙 NaCl の影響に就ては吉野⁽¹¹⁾の報告がある。アミノ酸の Paper chromatography に対する試料中の混合物の影響に就ての研究は展開剤に Phenol を用いた時の pH の影響⁽²³⁾, lysine に対するアルカリ性溶液の影響⁽²⁴⁾, HCl の影響⁽²⁵⁾等がある。

(1) 実施

展開剤: B・A・W 及び P・W

濾紙: 東洋濾紙 No. 50 4×27cm

一枚の濾紙に含 NaCl アミノ酸 0.005cc と対照として純料の 0.1% アミノ酸液 0.005cc を滴下。

発色剤: 0.2% ninhydrin 含水 *i*-butanol 溶液 0.1N AgNO₃ 溶液,

発色法: 0.2% ninhydrin 含水 *i*-butanol を spray, 加熱し、アミノ酸を発色せしめ Rf 値を算出後 0.1N AgNO₃ を spray すると濾紙は褐色に着色し NaCl 部だけ灰白色に呈色する

展開温度: 20~23°C

展開時間: B・A・W は 4~7時間, P.W は 10~15時間

(2) 実験結果

第3表 B・A・W の場合 Rf 値の変化

アミノ酸	NaCl の濃度				
	2N	1N	0.5N	0.1N	0
alanine	0.27	0.28	0.28	0.31	0.30 ~0.31
leucine	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
cystine	0.11	0.12	0.13	0.13	0.13
methionine	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
aspartic acid	0.11	0.10 0.12	0.10 0.13	0.10 0.13	0.12
glut-acid-HCl	0.14	0.19	0.19	0.20	0.20
histidine	0.05	0.06	0.08	0.09	0.10
arginine-HCl	0.13	0.13	0.13	0.16	0.19
tryptophane	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
NaCl	上端 ~0.20	0.18 ~0.20	0.17 ~0.20	0.12 ~0.18	—
	下端 ~0.03	0.05 ~0.10	0.06 ~0.12	0.07 ~0.14	—

第4表 P.W の場合 Rf 値の変化

アミノ酸	NaCl					
	2N	1N	0.5N	0.1N	0	
alanine	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	
leucine	0.90	0.89	0.90	0.89	0.89	
methionine			0.80	0.80	0.79	
aspartic acid	0.09	{0.09 0.15	0.08 0.16	0.10 0.19	0.13	
glut. acid-HCl	0.19	0.20	0.21	0.21	0.21	
arginine-HCl	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	
NaCl	上端	0.20	0.22	0.17	0.15	—
	下端	0.04	0.09	0.09	0.10	—

(3)

第3表及び第4表からみて明らかなる如く NaCl の spot と重なるアミノ酸 (aspartic acid, cystine, glut-acid-HCl, histidine, arginine-HCl), NaCl の spot の附近にあるもの (alanine) が影響をうけ特に NaCl の濃度が高いもの程大きく影響をうけている。phenol に於ける leucine の Rf に多少の差異があるが、これはその spot の輪廓の不鮮明からみて NaCl の影響とみるより展開剤によつて押上げられた濾紙中のゴミの影響と云うべきである。特に注意しなければならないのは aspartic acid で P.W, B・A・W 何れを用いた時もその spot が2つに分割されることである。2分された spot を1つの spot とみなせば Rf は control の Rf と大差はない。2N・NaCl 含有アミノ酸溶液の 0.005cc は NaCl を 580 γ 含有し、その spot の範囲は 3~4cm であるからその影響は当然考えられることであるが、B・A・W に於ける arginine-HCl の 0.1N 含有のものは 29 γ であるにも拘らず、Rf に大きく影響していることに注意を要する。

4. 各種アミノ酸の Rf 値

第5表 各種アミノ酸の Rf と ninhydrin による呈色調

濾紙：東洋濾紙 No. 50 35×35cm (一次元法)

展開温度：P.W, B・A・W...18~20°

n-butanol...11~14°

展開時間：P.W...約24時間,

B・A・W, n-butanol...約18時間

呈色：B(青), G(灰), O(橙), P(紫), R(赤), Y(黄)

アミノ酸	P.W		B・A・W		14% NH ₃ 水飽和 n-butanol	
	Rf	呈色	Rf	呈色	Rf	呈色
glycine	0.39	RP	0.15	P	0.01	P
alanine	0.58	P	0.28	P	0.01	P
valine	0.79	P	0.45	P	0.23	P
n-valine	0.79	P	0.46	P	0.23	P
α -amino-butyric acid	0.72	PB	0.35	PB	0.14	PB
leucine	0.86	P	0.62	P	1.36	P
i-leucine	0.86	P	0.61	P	0.36	P
n-leucine	0.84	P	0.67	P	0.38	P
phenylalanine	0.82	BP	0.57	BP	0.33	BP
proline	0.89	Y	0.30	Y	0.13	Y
hydroxyproline	0.70	O	0.17	OG	0.01	OG
tyrosine	0.58	GP	0.40	GP	—	—
serine	0.13	P	0.14	P	—	—
threonine	0.50	P	0.21	P	—	—
cystine	0.14	RP	0.09	RP	0.00	RP
cysteine	0.18	RP	0.09	RP	0.00	RP
methionine	0.76	P	0.47	P	0.23	P
aspartic acid	0.10	BP	0.12	BP	0.00	BP
glutamic acid-HCl	0.15	P	0.18	P	0.01	P
lysine-HCl	0.42	P	0.10	P	—	—
histidine	0.47	RP	0.11	RP	0.00	RP
arginine-HCl	0.62	P	0.14	P	0.01	P
tryptophane	0.74	P	0.48	P	0.21	P

III. 醬油中の遊離アミノ酸の paper chromatography

1. 試料の調製

(1) 高温分解

逆流冷却管付 300cc 容フラスコに大豆粕約 10g をとり 20% HCl 30cc を加え砂浴上に 8.5 時間加水分解する。分解終了後濾過し HCl 量が原液量に稀釈した時約 6% になる迄減圧濃縮する。而る後原液量になる迄稀釈しソーダ灰にて pH 6.8~7.0 に中和する。van slyke 法にてアミノ態窒素を測定し、N 量約 0.7% に稀釈して 2 次元 paper chromatography を行う。

分解液 (未中和) : 28cc,

アミノ態 N (中和後) : 1.14%

分解残渣風乾量 : 2.3g

(2) 低温分解

長さ1mのガラス管付 1l 容フラスコに抽出大豆粕約 200g をとり 15% HCl 480cc を加え湯浴中に約72時間、75±5°にて加水分解する。分解終了後中和前に吸引濾過しその 50cc をとり HCl が原液量に稀釈した時約 6% になるまで減圧濃縮する。濃縮後原液量に稀釈しソーダ灰にて pH 6.8~7.0 に中和し 2 次元 paper chromatography を行う。

分解液 (未中和): 455cc T.N...2.31%

分解残渣風乾量: 55.5g

pH 4.8~5.0 に中和した濾液は 4~5 回後に少量の灰白色の沈澱が生じた。これは水、アルコールに不溶、10% HCl に可溶、モリブデン酸反応強く陽性、ninhydrin 反応は弱青色。

(3) 醸造醬油

X工場製醪(A), (B), Y工場製醪(C) につき paper chromatography を行つた。醪を吸引濾過し脱食塩することなく、2次元 paper chromatography を行つたが、食塩の spot 附近のアミノ酸の分離能は低下しなかつた。

(4) 小麦グルテン

小麦粉約 400g から常法により含水グルテン約 190g を得た。逆流冷却器付 1l フラスコに 22% HCl 270cc をとり上記グルテンを小片となし投入。最初の 3 時間は湯浴上にて次の 15 時間は砂皿上にて分解し、グルタミン酸を HCl 塩として分離⁽²⁶⁾後、その濾液中 HCl 量か原液量に稀釈した時約 10% になる迄減圧濃縮する。濃縮後原液量の 2 倍に稀釈し、ソーダ灰にて中和して 2 次元 paper chromatography を行つた。

2. Paper chromatography

上記の各試料に就て paper chromatography を行つた結果を第 6 表に示す。

IV. 考察及び総括

1. 考察

醬油(B)(C) 及低温分解の試料には第 7 表の如く各々 2 つアミノ酸以外の spot がみられた。第 7 表 1 と 3 及 2 と 4 は各同物質である。これは醬油中のアミノ酸が長時間微生物の作用をうけてアミンに変化したものと思われる。アミンは多く紫に呈色する⁽²⁷⁾。A.(約 4.5 年経過した醪) にみられず約 2.5 年経過した醪にかかる spot がみられるのは所謂“2 年醪”の味に関係しているのではないかと思われ、又蛋白質及アミノ酸の分解経路と関係して興味ある問題である。

低温分解における 2 つの spot はその分解条件から考えて恐らく低級ペプチドと思われる。低級ペプチドも多く紫に呈色する⁽²⁸⁾。市川⁽²⁹⁾によると大豆蛋白質の

Table. 6

Amino acid	Brewed soy			High Temp.	Low Temp.	Gluten
	A	B	C			
glycine	+	+	+	+	+	+
alanine	+	+	+	+	+	+
valine	+	+	+	+	+	+
n-valine	-	-	-	-	-	-
α-amino butyric acid	-	-	-	-	-	-
leucine	}	+	+	+	+	+
i-leucine						
n-leucine	-	-	-	-	-	-
phenylalanine	+	+	+	+	+	+
proline	+	+	+	+	+	+
hydroxyproline	-	-	-	-	-	-
tyrosine	+	+	+	+	+	+
serine	+	+	+	+	+	+
threonine	+	+	+	+	+	+
cystine	+	+	+	+	+	+
cysteine	-	-	-	-	-	-
methionine	±	±	±	±	±	±
aspartic acid	+	+	+	+	+	+
glutamic acid	+	+	+	+	+	+
lysine	+	+	+	+	+	+
histidine	-	-	-	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+	+
tryptophane	-	-	-	-	-	-

濾紙: 東洋濾紙 No. 50, 30×30cm, 35×35cm

展開温度: 高温分解 8~10°C 低温分解 11~13°

小麦グルテン及び醸造醬油 A, B, C 15~17°

展開剤: B. A. W., P. W.

第 7 表 アミノ酸以外の spot の R_f 値及び呈色調

区分	No.	[P. W]	[B. A. W]	呈色調
[B]	1	0.30	0.09	紫
	2	0.13	0.09	〃
[C]	3	0.29	0.08	〃
	4	0.12	0.09	〃
低温分解		0.92	0.63	〃
		0.12	0.13	赤橙

塩酸加水分解経路中芳香族アミノ酸及複素環式アミノ酸の分解生成は分解が相当進んでからみられるというからこれもそれに属するペプチドかも知れない。富安⁽⁵⁾の指摘する β-hydroxy glutamic acid は標準アミノ酸がないため確認しえなかつた。

methionine は valine の spot と殆ど重なるため分離確認できなかつた。leucine と *i*-leucine も同様である。

醤油中に histidine, tryptophane が検出されないのはその存在を否定しえないが (histidine の最小検出量は 2.5 γ tryptophane は 2 γ ²⁰) 醤油が栄養学的に充分でないアミノ酸組成であるということが分る。

酸分解の試料に tryptophane が検出されないのは、分解中酸によつて破壊されたためである。

2. 総括

(1) *n*-butanol acetic acid water (4:1:1) の調製後時間の経過による *Rf* 値の変化を調べた。

(2) phenol water (4:1) に NH₃ を添加した場合としない場合の *Rf* 値を比較した。

(3) アミノ酸の paper chromatography に対する NaCl の影響について *Rf* の変化を調べた。

(4) 醸造醤油 3 種、高温分解法、低温分解法による化学醤油及び小麦グルテン加水分解液の 6 種につきアミノ酸組成を paper chromatography により定性した。

文 献

- (1) Syngé and Martin: Biochem. J., 35, 1358 (1941).
- (2) Elsdén, Syngé: Biochem. J., 33, 9 (1944).
- (3) Stein, Moors: J. Biol. Chem., 176, 337, 367 (1948), 178, 53 (1949).
- (4) Conseden, Gordon, Martin: Biochem. J., 38,

224 (1944).

- (5) 鈴木: 東化誌, 28, 363.
- (6) 有働: 農化, 7, 322 (昭6).
- (7) 金子: 日化, 60, 539 (昭14).
- (8) 富安: 農化, 15, 871 (昭14).
- (9) 大村: 醸学, 9, 91 (昭6).
- (10) 高田: 醸学, 11, 764 (昭8).
- (11) 岩村: 農化, 12, B89 (昭11).
- (12) 市川: 醸工誌, 29, 48 (1951).
- (13) 吉野: 日醸協誌, 46, 149 (1951).
- (14) 六所: 特許 No. 88694 (昭5).
- (15) Bird, and Minor: Food Industry, 2, 118 (1948).
- (16) 青山: アミノ酸調味料に関する講演集 (関西化学醤油工業会) 2, 116 (昭25).
- (17) 荒川: 同上, 1, 49 (昭23).
- (18) 穂積: 日醸協誌, 45, (1950).
- (19) 松本: 同上, 46, (1951).
- (20) 佐竹: 化学の領域, 3, 264 (1949).
- (21) Draper et al: Science, 109, 448 (1949).
- (22) 改編有機化学実験学, 有化篇, 一般操作法: p 304.
- (23) Bull et al: J. Am. Chem. Soc., 71, 550 (1949).
- (24) Arronff: Science; 110, 590 (1949).
- (25) 安藤・石井: 化学の領域, 4, (1950).
- (26) 京大: 農芸化学実験書による。
- (27) Bremner, Kenten: Biochem. J., 49, 651 (1951).
- (28) Knight: J. Biol. Chem., 190, 753 (1951).
- (29) 市川: 醸工誌, 30, 34 (1952).

Summary

The author investigated the free amino acids in the three brewed soy, two acid-hydrolysates of soy-bean protein (high temp. and low temp.) and one acid-hydrolysate of wheat-gluten by paper chromatography.

These results were given in Table 6.