

醤油中のアミノ酸に関する研究

(第4報) 各種醤油中のアミノ酸組成

石上 有造 石川 浩
藤原 耕三 上田 隆藏

Studies on Amino Acids in Japanese Soy Sauce

(IV) The Amino Acid Composition in Various Types
of Soy Sauce

Yuzo Ishigami and Hiroshi Ishikawa

Kozo Fujihara and Ryuzo Ueda

The amino acid composition of soy sauces (as free amino acid) and acid hydrolyzates of soy sauces (as total amino acid) were determined by column chromatography on an Amberlite IR 120. "Kiage" (mash prepared in April and brewed for about one year), commercial soy sauces, "Aminosan-eki" (vegetable hydrolyzate,) and "II Go-aminosan-eki" (by-product of glutamic acid manufacture) were used as samples.

In "Kiage", glutamic acid predominated, followed by aspartic acid, lysine, valine, and leucine in free amino acid contents, while methionine, tryptophan, and γ -aminobutyric acid contained less than 1 mg per 1 ml. Glutamic and aspartic acids predominated, and were followed by valine, leucine, and lysine in the acid hydrolyzate of "Kiage". The ratio of individual free amino acid contents to the corresponding total amino acid contents showed lower values in glutamic acid, threonine, aspartic acid,

and glycine, but higher values in leucine, lysine, and alanine.

Individual free amino acid content, individual total amino acid content, and ratio of the former to the latter in commercial soy sauce A and B^e were relatively similar to those in "Kiage". However, there were differences in free lysine, aspartic acid, glutamic acid, and arginine contents among three samples.

Although the composition of free amino acids in "Aminosan-eki" was relatively similar to the composition of total amino acids in "Kiage", the former was considerably different in proline, glycine, histidine, and aspartic acid from the latter.

As previously reported, free glutamic acid content in "II Go-aminosan-eki" was smaller than that in "Aminosan-eki". On the other hand, free proline content in the former was much higher than that in the latter.

緒 言

従来より著者の一人藤原が、微生物定量法を用いて、主要アミノ酸10種類について、各種醤油中の遊離アミノ酸¹⁾ および天然醸造、速醸諸味の熟成過程におけるアミノ酸の消長^{2,3)} について研究してきた。この方法は多種類のアミノ酸を同時に定量するためには多大の労力を必要とする。同時に多種類のアミノ酸を測定する目的に最も合致した方法として、カラムクロマトグラフィーによるアミノ酸の分離定量法が考えられる。すでに、日野ら⁴⁾ によって、自働アミノ酸分析器により、各種醤油中の遊離アミノ酸量およびペプチドの形態などについて報告されている。

著者らは、Moore と Stein のカラムクロマトグラフィーによるアミノ酸の分離定量法⁵⁾ を若干改良することにより、操作も容易でほぼ完全にアミノ酸を分離定量しうることを認めたので、この方法を用いて、生揚醤油、市販醤油、アミノ酸液のアミノ酸組成をしらべ、2, 3 の知見をえたので報告する。

実 験 の 部

I. カラムクロマトグラフィーによるアミノ酸定量法の吟味

Moore と Stein の方法⁵⁾ に準じて既知アミノ酸23種およびレブリン酸, システイン酸, タウリンを用いて, それぞれの呈色率, カラムクロマトグラフィーによる流出位置, 回収率を求めて定量法の吟味を行なった。

1) 呈色率

アミノ酸のニンヒドリン呈色法は Moore と Stein⁶⁾ の方法に準じて行ない, プロリン, ハイドロオキシプロリン, レブリン酸は 440m μ において測定し, それ以外の試料については, いずれも 570m μ にて日立光電比色計にて測定した。これらの結果, 試料のニンヒドリン呈色率は Moore と Stein の結果とはほぼ近い値をえたが記載されていないもので, レブリン酸はロイシンを100とした場合, 呈色率は84.1であった。

2) カラムクロマトグラフィーによる各アミノ酸の流出位置と回収率

上記の試料を単独あるいは数種類くみ合せて, 各試料の流出位置と回収率を求めた。なお流出条件は酸性および中性アミノ酸は (150cm \times 0.9cm), 塩基性アミノ酸では (15cm \times 0.9cm) のカラムを用い, 操作温度は両カラムとも50 \pm 1 $^{\circ}$ C, 流出速度は 13.5ml/hr である。

流出位置および順序は Moore と Stein および最近発表された Zacharius の結果⁷⁾ とほぼ近似しているが, セリンとスレオニン, グリシンとアラニン, フェニルアラニンとチロシンならびにリジンとヒスチジンの分離が不完全であった。この分離をよくするために色々方法が考えられるが, 著者らはカラムの長さを前者は (157cm \times 0.9cm), 後者は (17cm \times 0.9cm) によって, 上記の分離を改善することができた。しかし, フェニルアラニンとチロシンの分離は不完全であった。いま一つの改良した点は塩基性アミノ酸の分析にあたって, 操作を簡単にするため, 新しい試料を添加して測定する方法について検討した。しかしながら, 新しい試料の添加によって 150cm カラムにおいて溶出するアミノ酸も溶出してくるゆえ, これらのアミノ酸をフェニルアラニンとチロシン区分の前に完全に溶出させてしまう必要がある。この条件を検討した結果, 初期溶出液の pH を4.40にて展開を行ない, フラクション No. 20 より

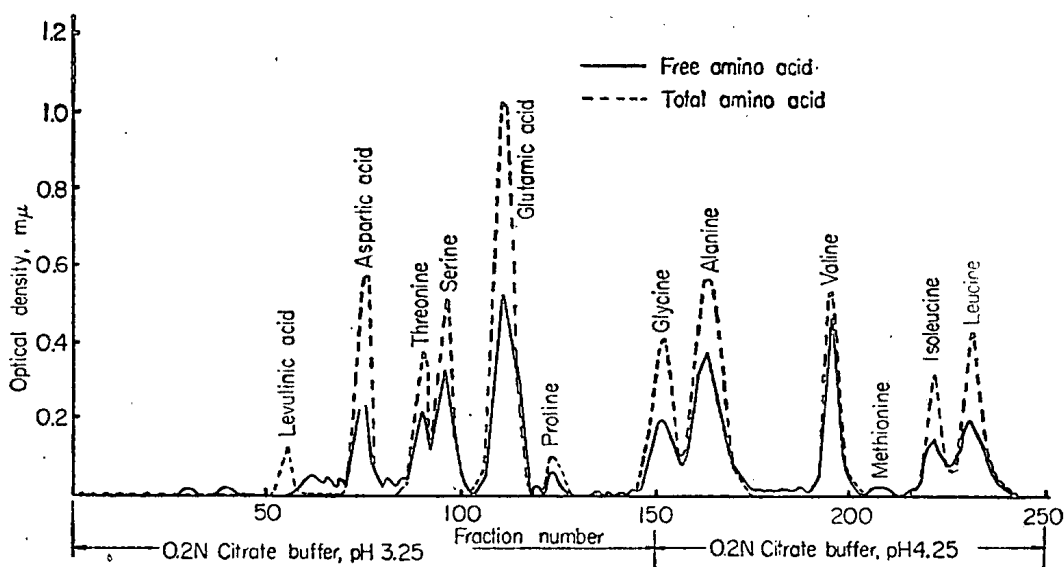


Fig. 1. Separation of free amino acids and total amino acids in commercial soy sauce B by chromatography on Amberlite IR 120. Column dimension, 0.9×157 cm; temperature of chromatography, 50°C ; fraction size, 2ml; sample, equivalent to 0.004ml of soy sauce.

pH 5.28 に変えることによりフェニルアラニンとチロシン区分の定量に影響することなく酸性、中性アミノ酸を溶出させることができた。アミノ酸の回収率はいずれの試料も 1.0mM の濃度では $100 \pm 5\%$ の範囲にあることを認めた。

II. 醤油試料のクロマトグラム

上記実験条件で行なった市販醤油Bのクロマトグラムを示すと Fig. 1 および Fig. 2 の通りである。

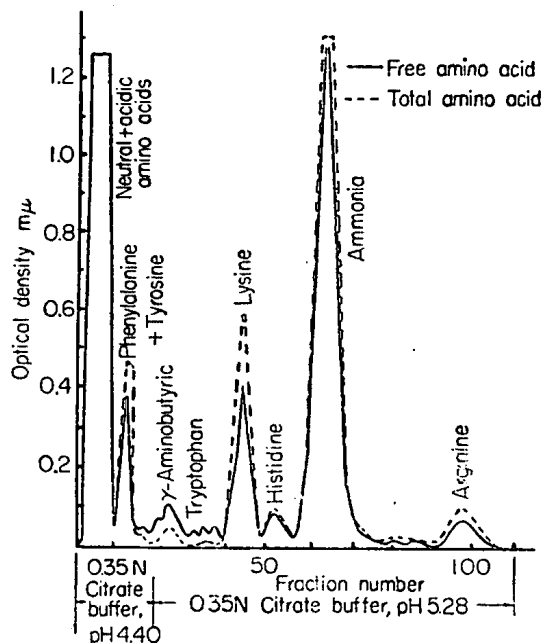


Fig. 2. Separation of free and total amino acids in commercial soy sauce B by column chromatography on Amberlite IR 120. Column dimension, 0.9×17 cm; temperature of chromatography, 50°C ; fraction size, 2ml; sample, equivalent to 0.04ml of soy sauce.

157cmカラムにおける遊離アミノ酸のクロマトグラムにおいて、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、バリン、メチオニン、イソロイシンおよびロイシンの存在を認めたが、それ以外にも、アスパラギン酸のピークの前、アスパラギン酸とスレオニン、プロリンとグリシンの間などに、量的には少ないが未知のニンヒドリン陽性物質の存在を認めた。一方塩酸加水分解後のクロマトグラムではメチオニンおよび未知のニンヒドリン陽性物質のピークのほとんどが消失し、かわって、フラクション数55にピークを持つレブリン酸の存在を認めた。未知のピークは塩酸分解によって消失することから、ペプチドであるがとが示唆せられる。

一方、17cmカラムにおける遊離アミノ酸のクロマトグラムにおいては、フェニルアラニン（チロシン）、リジン、ヒスチジン、アンモニア、アルギニンの存在を認め、またフェニルアラニンとリジンの間に6ケのピークおよびアンモニアとアルギニンの間にも数ケのピークを見出した。次に、塩酸分解後のクロマトグラムでは上記フェニルアラニン、リジン、アンモニア、ヒスチジン、アルギニンはいずれも遊離アミノ酸よりも高い値を示したが、フェニルアラニンとリジンの間のピークは3個に減少し、しかも3ケのピークは遊離アミノ酸よりも低い値を示した。トリプトファンとリジンの間のピークが塩酸分解によって消失するのは当然であるが、その他のピークの消失または減少は、ペプチドの影響であると思われる。そのうちフラクション数28のピークは γ -アミノ酪酸、トリプトファンとリジンの間のピークはオルニチンと一致している。

最近 Zacharius⁷⁾ はアミノ酸のほか、ペプチドおよびアミンなどの流出位置について詳細な報告を行なっている。醤油については日野⁴⁾らによってすでにペプチドの影響が報告されている。上述のように、本結果でも、 γ -アミノ酪酸のピークに示されるように、ペプチドの影響が相当大きい場合もあり、遊離アミノ酸の測定では多少精度が全アミノ酸の測定よりも劣ることが当然考えられる。この問題についてはさらに詳細な検討が必要と思われる。

III. 各種醤油のアミノ酸組成

1) 実験方法

前報¹⁾において、多数の試料について遊離アミノ酸の測定を行ない、各種醤油中の組成の大略を把握することができた。したがって、本実験では次のような試料を用いた。すなわち、脱脂大豆使用4月仕込の1ケ年経過の生揚醤油1種、アミノ酸液2種、II号アミノ酸液1種および市販醤油2種の計6種である。

遊離アミノ酸測定用の試料は各種醤油に pH 2.2 のクエン酸緩衝液を加えて適当に希釈して調整した。一方塩酸加水分解液すなわち全アミノ酸の測定用試料は各種醤油に等容量の濃塩酸を加え、110°C、24hr 加水分解を行ない、減圧下にて塩酸を除去後、pH 2.2 のクエン酸緩衝液にて適当に希釈した。アミノ酸液およびII号アミノ酸液は遊離アミノ酸、その他の試料については遊離アミノ酸および全アミノ酸量を測定した。

2) 実験結果

各種醤油の一般分析結果は Table 1 に示した。そのアミノ酸組成は Table 2 に示した。Table 1 の結果より明らかなように、各種醤油中の全窒素含量が

Table 1. Analyses of general components in many kinds of soy sauce

| Spmles | Specific gravity (Bé) | Sodium chloride (g/100 ml) | Total nitrogen (g/100 ml) | Extact (g/100 ml) | Color intensity (570m μ) | pH | Amino nitrogen (g/100 ml) | Reducing suger (g/100 ml) | Alcohol (vol. %) |
|------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------------------|-----|---------------------------|---------------------------|------------------|
| Commercial Soy sauce A | 23.46 | 19.88 | 1.165 | 16.64 | 0.55 | 4.6 | 0.717 | 5.71 | 1.02 |
| Commercial soy sauce B | 22.75 | 18.42 | 1.415 | 17.53 | 1.29 | 4.6 | 0.864 | 3.70 | 0.64 |
| “Kiage” | 22.83 | 18.74 | 1.511 | 17.14 | 0.57 | 4.6 | 0.893 | 2.57 | 1.58 |
| “Aminosan-eki” A | 22.51 | 19.00 | 1.539 | 15.80 | 0.51 | 4.8 | 1.000 | — | — |
| “Aminosan-eki” B | 24.82 | 18.56 | 2.372 | 22.69 | 0.91 | 4.6 | 1.630 | — | — |
| “II Go-amino-san-eki” | 24.25 | 18.45 | 2.209 | 21.41 | 0.32 | 4.8 | 1.504 | — | — |

Table 2. Contents of free and total amino acids in many kinds of soy sauce (mg/ml)

| Amino acid | Commercial soy sauce A | | | Commercial soy sauce B | | | "Kiage"* | | "Amino-son-eki" | "Amino-son-eki" | "HGo-am-inosan-eki" |
|-----------------------------|------------------------|----------------------|-----------|------------------------|----------------------|-----------|---------------------|----------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| | Free amino acid (A) | Total amino acid (B) | (A)/(B) % | Free amino acid (A) | Total amino acid (B) | (A)/(B) % | Free amino acid (A) | Total amino acid (B) | Free amino acid | Free amino acid | Free amino acid |
| | | | % | | | % | | | A | B | I |
| Aspartic | 4.79 | 6.74 | 71.1 | 2.41 | 6.48 | 37.2 | 6.35 | 10.22 | 13.17 | 19.26 | 19.85 |
| Threonine | 1.71 | 2.10 | 81.4 | 2.59 | 4.20 | 61.7 | 2.51 | 4.11 | 1.97 | 3.91 | 6.61 |
| Serine | 2.97 | 3.43 | 86.6 | 3.62 | 4.69 | 77.2 | 5.52 | 6.21 | 5.04 | 6.62 | 8.19 |
| Glutamic | 7.88 | 15.67 | 50.3 | 11.83 | 16.88 | 70.1 | 13.84 | 20.24 | 16.89 | 34.34 | 17.51 |
| Proline | 2.39 | 3.80 | 62.9 | 2.21 | 4.68 | 47.2 | 2.20 | 4.78 | 1.32 | 1.17 | 11.73 |
| Glycine | 1.66 | 3.00 | 55.3 | 2.34 | 3.30 | 70.9 | 2.84 | 4.15 | 7.94 | 6.47 | 16.06 |
| Alanine | 3.06 | 3.55 | 85.2 | 5.48 | 5.61 | 97.7 | 4.74 | 5.03 | 2.43 | 11.31 | 5.92 |
| Valine | 3.38 | 3.41 | 99.1 | 4.62 | 4.72 | 97.9 | 6.28 | 7.35 | 2.10 | 6.51 | 1.25 |
| Methionine | — | — | — | 0.83 | — | — | 0.41 | 0.65 | — | — | — |
| Isoleucine | 2.40 | 3.31 | 75.2 | 2.95 | 3.92 | 75.3 | 3.70 | 5.77 | 4.39 | 3.08 | 5.63 |
| Leucine | 4.18 | 4.46 | 93.7 | 5.06 | 5.78 | 88.0 | 6.74 | 6.98 | 6.37 | 6.45 | 8.42 |
| Phenylalanine + tyrosine | 3.75 | 4.02 | 93.4 | 4.64 | 4.82 | 96.3 | 5.08 | 6.27 | 5.01 | 3.47 | 6.91 |
| α -Aminobutyric | 0.26 | — | — | 0.62 | — | — | 0.71 | — | — | — | — |
| Tryptophan | 0.28 | — | — | 0.71 | — | — | 0.64 | — | — | — | — |
| Lysine | 6.15 | 6.73 | 91.9 | 5.58 | 6.65 | 83.8 | 7.38 | 7.53 | 6.78 | 6.61 | 13.03 |
| Histidine | 2.92 | 3.74 | 78.0 | 1.29 | 1.55 | 83.2 | 2.63 | 2.95 | 0.29 | 1.80 | 0.51 |
| Arginine | 3.17 | 4.38 | 72.3 | 2.26 | 3.47 | 65.1 | 3.22 | 3.40 | 6.09 | 4.37 | 10.22 |

* Mash prepared in April and brewed for about one year

Table 3. Contents of free and total amino acids calculated by converting the total nitrogen in soy sauce to 1% (mg/ml)

| Amino acid | Commercial soy sauce A | | Commercial soy sauce B | | "Kiage"* | | "Aminosan-eki" A | "Aminosan-eki" B | "II Go-aminosan-eki" |
|--------------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|
| | Free amino acid | Total amino acid | Free amino acid | Total amino acid | Free amino acid | Total amino acid | Free amino acid | Free amino acid | Free amino acid |
| | Aspartic | 4.11 | 5.79 | 1.70 | 4.58 | 4.20 | 6.76 | 8.56 | 8.12 |
| Threonine | 1.47 | 1.80 | 1.83 | 2.97 | 1.66 | 2.72 | 1.28 | 1.65 | 2.99 |
| Serine | 2.55 | 2.94 | 2.56 | 3.31 | 3.65 | 4.11 | 3.58 | 2.79 | 3.76 |
| Glutamic | 6.78 | 13.45 | 8.36 | 11.19 | 9.16 | 13.40 | 11.04 | 14.48 | 7.92 |
| Proline | 2.05 | 3.26 | 1.56 | 3.31 | 1.46 | 3.16 | 0.85 | 0.47 | 5.38 |
| Glycine | 1.42 | 2.58 | 1.65 | 2.33 | 1.88 | 2.75 | 5.16 | 2.72 | 7.26 |
| Alanine | 2.63 | 3.05 | 3.76 | 3.96 | 3.14 | 3.33 | 1.58 | 4.77 | 2.68 |
| Valine | 1.93 | 2.93 | 3.27 | 3.34 | 4.16 | 4.86 | 1.36 | 2.74 | 0.56 |
| Methionine | — | — | 0.59 | — | 0.27 | 0.43 | — | — | — |
| Isoleucine | 2.06 | 2.84 | 2.06 | 2.77 | 2.44 | 3.82 | 2.85 | 1.30 | 2.56 |
| Leucine | 3.58 | 3.83 | 3.58 | 4.06 | 4.46 | 4.42 | 4.14 | 2.72 | 3.81 |
| Phenylalanine + tyrosine | 3.22 | 3.45 | 3.28 | 3.41 | 3.53 | 5.45 | 3.25 | 1.46 | 3.21 |
| γ -Aminobutyric | 0.18 | — | 0.43 | — | 0.46 | — | — | — | — |
| Tryptophan | 0.24 | — | 0.51 | — | 0.41 | — | — | — | — |
| Lysine | 5.28 | 5.74 | 3.94 | 4.70 | 4.88 | 4.98 | 4.48 | 2.79 | 5.89 |
| Histidine | 2.51 | 3.21 | 0.91 | 1.10 | 1.94 | 1.95 | 0.18 | 0.76 | 0.23 |
| Arginine | 2.72 | 3.76 | 1.60 | 2.45 | 2.13 | 2.25 | 3.95 | 1.84 | 4.62 |

* Mash prepared in April and brewed for about one year

異なっている。それゆえ、比較を容易にするため、全窒素を1%に換算した場合のアミノ酸量を示したのが Table 3 である。

生揚醤油は、春仕込の1ヶ年経過のもので標準型のものであり、遊離グルタミン酸量は0.916%、全グルタミン酸量は1.340%で、全グルタミン酸量に対する遊離グルタミン酸の比率すなわち遊離率は69.4%という高い値を示した。前報¹⁾において測定した10種類のアミノ酸以外では、遊離アスパラギン酸およびセリンが高い値を示している。一方全アミノ酸では、グルタミン酸が最も高く、アスパラギン酸、リジン、フェニルアラニン、バリン、ロイシンなどが高い値を示した。遊離チロシン量は前報¹⁾のフェニルアラニン量よりすると比較的低い値を示している。

つぎに、測定した3種類のアミノ酸液はそれぞれ異なった遊離アミノ酸の組成を示している。アミノ酸液 A はⅡ号アミノ酸液にくらべて、遊離グルタミン酸が相当高い値を示し、その他のアミノ酸はバリンを除いてほぼ同じ値かまたは若干低い値を示している。アミノ酸液 B はアミノ酸液 A よりもさらに遊離グルタミン酸量が高く、またアラニンを除いて、いずれの遊離アミノ酸も他の2試料にくらべて相当低い値を示していることが特徴である。また、Ⅱ号アミノ酸液は遊離プロリン量においてアミノ酸液よりも圧倒的に高い値を示している。

市販醤油の2試料は優良銘柄の製品である。アスパラギン酸、リジン、アルギニン、グルタミン酸は遊離アミノ酸および全アミノ酸ともに若干差が認められた。たとえば市販醤油 B のアスパラギン酸の遊離率は37.2%であるに対し、A では71.1%と高い値を示し、逆にグルタミン酸では70.1%、A では50.1%と低い値を示している。その他のアミノ酸の遊離アミノ酸、全アミノ酸および遊離率は比較的近似した値を示している。グルタミン酸の相違は天然醸造と速醸あるいは春仕込と夏仕込の相違、アルギニンでは諸味中でのアルギニンの資化率が異なるためと考えられる。^{2,3)} リジン、アスパラギン酸の相違については現在のところ明瞭な原因を把握するまでには至っていない。市販醤油は生揚醬

油と比較的近似した値を示したが、これは使用原料が近似し、またアミノ酸液の添加率が少ないのが原因しているのではないかと推察される。

要 約

各種醤油中の遊離アミノ酸および全アミノ酸（酸加水分解物のアミノ酸）含量を Amberlite IR 120 を使用するカラムクロマトグラフィーにより測定した。

グルタミン酸は生揚醤油（4月仕込諸味を1ケ年熟成）中に存在する最も主要な遊離アミノ酸であり、次いでアスパラギン酸、リジン、バリンおよびロイシンが多い。メチオニン、トリプトファンおよび γ -アミノ酪酸は1 ml 当り1 mg 以下の値であった。またグルタミン酸およびアスパラギン酸は主要な全アミノ酸であり、次いでバリン、ロイシンおよびリジンが多い。個々の遊離アミノ酸量に対する全アミノ酸量の比は、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸およびグリシンが低く、一方ロイシン、リジンおよびアラニンが高い値を示した。

市販醤油 A と B における個々の遊離アミノ酸、全アミノ酸および前者の後者に対する比は生揚醤油のそれと比較的近似している。しかしながら、これら3つの試料間では遊離リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびアルギニン含量に差が認められた。

アミノ酸液中の遊離アミノ酸の組成は生揚醤油中の全アミノ酸の組成に比較的近似しているけれども、プロリン、グリシン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸量は相当異なった。

前報¹⁾において報告したように、II号アミノ酸液中の遊離グルタミン酸はアミノ酸液よりも低かった。また、II号アミノ酸液中のプロリン含量はアミノ酸液よりもずっと高い値であった。

終りに臨み終始御指導賜った寺本教授に深謝するとともに、発表を許可された浅井専務に御礼申し上げます。なお、本報告は昭和37年4月日本農芸化学大会にて講演済。

文 献

- 1) 藤原, 田中, 藤田: 本誌, **40**, 321 (1962)
- 2) 藤原, 徳田, 難波: 本誌, **40**, 327 (1962)
- 3) 藤原, 石川, 難波: 本誌, **40**, 384 (1962)
- 4) 日野, 伊藤, 阿部, 三浦: 調味科学, **9**, 1 (1961)
- 5) Moore, S., Stein W. H.: *Anal. Chem.*, **30**, 1191 (1958)
- 6) Moore, S., Stein, W. H.: *J. Biol* **211**, 907 (1954)
- 7) Zacharius, R. M., Talley, E. A.: *Anal. Chem.*, **34**, 1551 (1962)

(昭39. 11. 11 受付)