

琉球大学学術リポジトリ

ペーパークロマトグラフィーによる泡盛醪中のアミノ酸の検索について

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学文理学部 公開日: 2011-09-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 外間, 宏三, Hokama, Kozo メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/21767

ペーパークロマトグラフィーによる
泡盛醪中のアミノ酸の検索について

外 間 宏 三

**On the Amino Acids in Awamori-Moromi
Detected by Paperchromatography**

Kozo Hokama

Résumé

The Amino acids detected in Awamori-Moromi by paperchromatography are 11 sorts on the 3rd day and 9 sorts on the 15th day after fermentation started. Among the sorts of amino acids containing in the both groups fairly differences are found. Namely, arginine, histidine, tryptophane and tyrosine are detected at the former group though they can't be detected at the latter group. The amino acids found in the both groups are 12 sorts in all. They are arginine, aspartic acid, alanine, cystine, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, methionine, tryptophane, tyrosine and valine. Generally speaking, glutamic acid and aspartic acid are richer than the another amino acids in Awamori Moromi.

Shumo (the fermented source of "sake") of Japanese wine "sake" are richer than awamori-moromi in the sorts of amino acids. Nevertheless Japanese "sake" contains 16 sorts and Awamori-Moromi contains 12 sorts of amino acids. The sorts of amino acids in Awamori-Moromi differ remarkably from those in Shumo of Japanese-Sake. Cystine and tryptophane can be found in the former but not in the latter. And phenylalanine, serine and threonine exist in the latter but not in the former.

When the existence of amino acids in fermentation process were investigated by One-Dimentional Method and Two-Dimentional Method of paperchromatography, tryptophane vanishes and cystine and valine appear in the later stage of fermentation and methionine appers in the first and later stage of fermentation.

結 言

泡盛は琉球固有の焼酎であつてシヤムより伝来したものと云われ、すでに四五百年前に琉球に産せられていたという。

原料の点から見れば南九州地方に発達した米焼酎と同じであるが、その特有なる醸造法のため独特の香味を有している。

泡盛用黒麴中の主なる微生物は *Aspergillus, luchuensis, Asp. awamori, Asp. aureus* 等である。

著者は泡盛醪中の微量成分を検索し延いてはこれら微量成分が泡盛製品に如何に影響を与え

るかについて研究を企画し、今回はペーパークロマトグラフィーを利用して醪中のアミノ酸の検索をなし、一応の実験結果を得たので、ここに報告する。

言うまでもなく泡盛麴中に含まれているアミノ酸は泡盛麴菌の重要な栄養源として、又醪の香味を支配する成分として重要な役割を持つものと考えられる。

実 験 之 部

1. アミノ酸の検索

ペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸の定性には数種の溶媒が紹介されているが、著者は展開溶媒としてフェノール (0.5%アンモニヤ水20%添加) 及び n-ブチルアルコール・醋酸・水 (4:1:2) 混液を用いた。沔紙は東洋沔紙 No. 3 を用いて上昇法二次展開を用いてアミノ酸を検出した。

標準アミノ酸は何れも市販の「味の素」製品18種を使用した。

溶媒としてフェノール (関東化学製) は混液調製後5時間を経て使用した。ブタノール (米国 Cenco製) は 5N-H₂SO₄, 5N-NaOH で順次に洗滌, 水洗後無水炭酸カルシウムで脱水後, 蒸溜に附し, b. p. 116°~117° の溜分をとり混合調製後3時間を経て使用した。

供試品としては那覇市首里喜屋武酒造所提供の泡盛醪を用いた。その仕込配合は蒸米 4.5斗, 麴 1合, 汲水 4.9升である。仕込期間は夏季において2週間であり, 15日目に蒸溜に附し製品にしている。冬季においては20日~30日の仕込期間をおいている。

同所提供の試料を各仕込経過に応じて採取し, 沔過し沔液を 250cc 容円錐フラスコに入れ, 防腐用としてトルオールを添加して試料とした。尚供試品は常に冷蔵庫中に保存し新鮮度保持に留意した。

それらの試料を夫々25cc宛をとつて減圧濃縮 (20mmHg 60°C) し 5cc とした。この濃縮液をマイクロピペットを用いて 0.005cc を沔紙につけ, 二次展開を行い, 0.2% ニンヒドリン・ブタノール溶液を撒布後 90°~100°C にて5分間加熱呈色せしめた。その結果検出したアミノ酸は第1表の通りである。

試料中には比較的糖が多いので十分な濃縮が行われないうち、又種々な夾雑物のために試料中のアミノ酸の Rf 値が可成りずれるために正確なアミノ酸の判定が困難である。例へば第1表において仕込15日目の試料ではメチオニンとバリンの Rf 値が殆んど一致しているためにその判定に不正確さを伴い易く, その spot の大きさ及び恰好より漸く二種のアミノ酸の重なりを判定し得たに過ぎない。NEUBERG 及び KERB^{2), 3), 4), 5)} の方法は斯る際に特にすぐれていると思われるが今回は都合により本法を応用する機会がなかつた。

第1表の結果を見るに仕込3日目の所謂泡立ちの時に検出確認されたアミノ酸は9種類であり, 蒸溜前即ち15日目 (仕込16日目に蒸溜に附す) では8種類が確認されたが, 両者中に検出されたアミノ酸の種類には可成りの差異が認められる。即ち仕込3日目ではアルギニン, ヒスチジン, トリプトファン, チロシンが認められるが仕込15日目では認められない。又逆に仕込15日目では確認されたシスチン, バリン, メチオニンが仕込3日目では確認することが出来なかつた。両者を通じて検出されたアミノ酸の総数はアラニン, アルギニン, アスパラギン酸, シスチン, グルタミン酸, グリシン, ヒスチジン, ロイシン, メチオニン, トリプトファン, チロシン, バリンの12種類である。以上の外にヒスチジンの Rf 値と重つているために確認することは出来なかつたがその spot の大きさよりリジンの存在が推定される。これは表中?印にて示した。

Table 1. Detected Amino Acids.

Spot	Rf			Rf			検出したアミノ酸		
	フェノール			ブタノール・醋酸・水			相当するアミノ酸	仕込3日目	仕込15日目
	標準アミノ酸	仕込3日目	仕込15日目	標準アミノ酸	仕込3日目	仕込15日目			
1	0.55~0.65	0.59~0.65	0.62~0.68	0.40~0.50	0.37~0.41	0.36~0.38	アラニン	+	+
2	0.61~0.68	0.59~0.65	0.62~0.68	0.30~0.40	0.37~0.41	0.30~0.33	アルギニン	+	+
3	0.12~0.23	0.08~0.22	0.03~0.08	0.28~0.33	0.28~0.34	0.35~0.50	アスパラギン酸	+	+
4	0.31~0.35		0.21~0.34	0.15~0.23		0.22~0.26	シスチン	-	+
5	0.30~0.40	0.25~0.33	0.27~0.35	0.28~0.40	0.38~0.42	0.22~0.26	グルタミン酸	+	+
6	0.40~0.50	0.36~0.41	0.35~0.41	0.30~0.40	0.30~0.35	0.21~0.28	グリシン	+	+
7	0.67~0.74	0.63~0.68		0.26~0.33	0.27~0.30		ヒスチジン	+	-
8	0.60~0.67			0.20~0.25			オキシプロリン		
9	0.78~0.95	0.84~0.97	0.78~0.82	0.69~0.78	0.70~0.75	0.76~0.81	ロイシン	+	+
10	0.55~0.67	0.62~0.66	0.62~0.68	0.24~0.35	0.37~0.41	0.36~0.38	リジン	?	?
11	0.78~0.94		0.84~0.91	0.62~0.66		0.61~0.65	メチオニン	-	+
12	0.75~0.84			0.68~0.73			フェニルアラニン		
13	0.81~0.87			0.32~0.36			プロリン		
14	0.80~0.87	0.80~0.84		0.47~0.51	0.46~0.52		トリプトファン	+	-
15	0.78~0.83	0.82~0.86		0.53~0.60	0.56~0.61		チロシン	+	-
16	0.79~0.89		0.84~0.91	0.57~0.63		0.61~0.65	バリン	-	+

個々の spot の大きさ、呈色濃度等より判定すれば含有量の多いと考えられるのは仕込3日目迄はアスパラギン酸、グリシン、グルタミン酸であり、15日目ではアスパラギン酸、グルタミン酸である。

之等の結果を従来報告されている清酒のアミノ酸組成^{5),6),7)}及び清酒の酒母中のアミノ酸組成⁸⁾と比較検討して見るに、清酒中に確認されたアミノ酸18種類、及び酒母中に確認されたアミノ酸16種類に比べて、泡盛醪の場合には僅かにその約半数に過ぎず、仕込3日目で9種類であり、仕込15日目では8種類に過ぎない。両者を通じて12種類であり、その種類が斯く少いのは仕込日数が清酒に比べて遙かに短いためではないかと思考される。

泡盛醪と清酒の酒母はそのアミノ酸組成において顕著な相違が見られる。即ち酒母中にはシスチンとトリプトファンが全く確認出来ないが、泡盛醪では、トリプトファンが醸酵前期に、シスチンが醸酵後期にそれぞれ検出確認されている。又清酒の酒母ではフェニルアラニン、スレオニン及びセリンが検出確認されているが泡盛醪では全然確認することが出来ないということも注目すべき点である。酒母でも含有量の多いアスパラギン酸、グルタミン酸が泡盛醪でも含有量が多い。含有量の少いのは、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、バリンである。

尚イソロイシンについては純アミノ酸が入手出来ず、実験出来なかつた。

第2表は第1表を更に補足するための実験結果である。実験方法は上記と全く同じであるが溶媒に於て少しくその使用方法を異にするために標準アミノ酸の Rf 値が第1表と異なる値を示している。即ち溶媒のフェノール及びブタノール（両者とも関東化学製）は夫々溶製後二週間を経て使用した。

Table 2 Detected Amino Acids in preparing process.

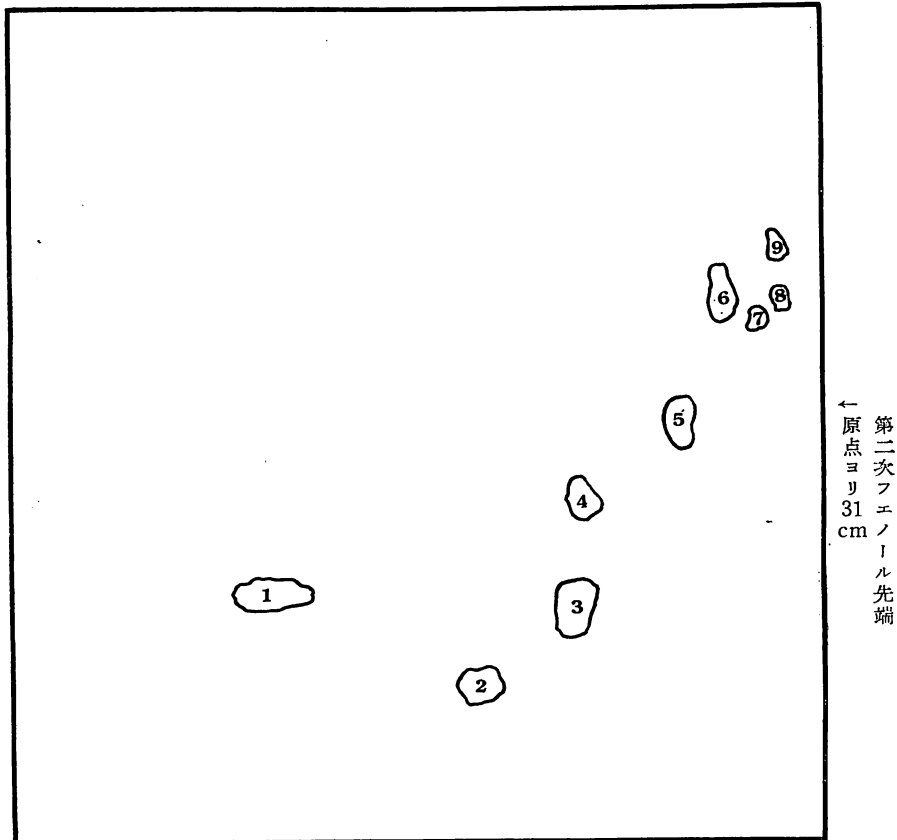
Spot	Rf						Rf						検出したアミノ酸									
	フェノール						ブタノール・醋酸・水															
	標準アミノ酸	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	標準アミノ酸	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	相当するアミノ酸	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	
1	0.60	0.62	0.61	0.59			0.58	0.25	0.23	0.26	0.28			0.28	アラニン	+	+	+			+	
	0.66	0.65	0.63	0.64			0.60	0.30	0.29	0.29	0.33			0.33								
2	0.65	0.55	0.67	0.65	0.58	0.68	0.15	0.15	0.14	0.15	0.10	0.10		アルギニン	+	+	+	+	+			
	0.70	0.60	0.71	0.69	0.62	0.74	0.18	0.18	0.18	0.23	0.12	0.15										
3	0.12		0.12	0.10	0.11	0.12	0.18		0.14	0.12	0.11	0.12	0.18	アスパラギン酸	+	+	+	+	+	+		
	0.22		0.16	0.16	0.16	0.17	0.18	0.20	0.18	0.18	0.13	0.15	0.25									
4	0.29				0.25	0.25	0.28	0.07				0.12	0.10	シスチン						+	+	+
	0.30				0.30	0.31	0.35	0.09				0.13	0.15									
5	0.32	0.27	0.32	0.29	0.25	0.35	0.33	0.23	0.26	0.17	0.20	0.12	0.08	グルタミン酸	+	+	+	+	+	+	+	
	0.38	0.36	0.36	0.34	0.30	0.41	0.39	0.26	0.29	0.19	0.26	0.13	0.10									0.27
6	0.40	0.55	0.40	0.40	0.52	0.43	0.35	0.15	0.15	0.16	0.20	0.10	0.08	グリシン	+	+	+	+	+	+	+	
	0.47	0.60	0.45	0.43	0.55	0.48	0.44	0.25	0.18	0.21	0.24	0.13	0.12									0.13
7	0.68		0.67	0.65	0.58		0.12		0.14	0.15	0.10			ヒスチジン	+	+	+					
	0.73		0.71	0.69	0.62		0.16		0.18	0.23	0.12											
8	0.60						0.20							オキシプロリン								
	0.67						0.25															
9	0.83	0.87	0.81	0.90	0.83	0.81	0.83	0.58	0.62	0.52	0.68	0.65	0.59	ロイシン	+	+	+	+	+	+	+	
	0.89	0.89	0.85	0.94	0.90	0.88	0.91	0.63	0.69	0.56	0.72	0.70	0.69									0.65
10	0.60	0.55	0.58			0.57	0.55	0.12	0.15	0.13			0.08	リジン	?	?				?	?	
	0.64	0.60	0.61			0.62	0.60	0.17	0.18	0.15			0.12									0.10
11	0.83						0.77	0.45					0.44	メチオニン							+	
	0.86						0.80	0.50					0.47									
12	0.91						0.53							フェニルアラニン								
	0.96						0.57															
13	0.81						0.32							プロリン								
	0.87						0.36															
14	0.80	0.81	0.80	0.80			0.47	0.46	0.48	0.50				トリプトファン	+	+	+					
	0.87	0.83	0.85	0.84			0.51	0.52	0.50	0.53												
15	0.61	0.69	0.67	0.67	0.69		0.42	0.39	0.42	0.44	0.41			チロシン	+	+	+	+				
	0.70	0.72	0.71	0.70	0.73		0.47	0.43	0.45	0.46	0.45											
16	0.78					0.70	0.77	0.45					0.41	バリン							+	+
	0.88					0.85	0.80	0.48					0.45									

- No. 1 仕込 1 日目醗
- No. 2 仕込 2 日目醗
- No. 3 仕込 3 日目醗
- No. 4 仕込 7 日目醗
- No. 5 仕込 10 日目醗
- No. 6 仕込 15 日目醗

試料 No. 1 のペーパークロマトグラムを第 1 図に示した。第 2 表の結果を見るに試料 No. 1 即ち仕込 1 日目の醗において検出されたアミノ酸は僅かに 7 種ではあるがその後醗酵の経過につれて、アミノ酸の種類において顕著な増加を示して居らず、仕込 2 日日以降においてアスパラギン酸とヒスチジンの二種のアミノ酸

が出現しているに過ぎない。アラニン及びトリプトファンは試料 No. 4 即ち仕込 7 日目において消失しているがアラニンは仕込 15 日目には再び出現している。ヒスチジン及びチロシンは仕込 10 日目において消失している。シスチンは醗酵中期より後期にかけて出現し、バリン及びメチオニンは醗酵後期において出現している。リジンはヒスチジンの Rf 値と重つていることがその spot の大きさより推定されるが不確実であり、第 1 表同様 ? 印で示した。

第一次ブタノール酢酸先鋒
原点ヨリ 32cm
↓室温28°~30°C



← 第二次フェニール先鋒
原点ヨリ 31cm

第 1 図 試料 No.1 二次元展開ペーパークロマトグラム

- | | | | | |
|------------------|-------------|------------|-------------|---------------|
| 1. glutamic acid | 2. arginine | 3. alanine | 4. tyrosine | 5. tryptophan |
| 6. leucine | 7. ? | 8. ? | 9. ? | |

2. 仕込経過中におけるアミノ酸の消長

(1) 一次展開によるペーパークロマトグラムの比較

醪の仕込経過中に於けるアミノ酸の変化を知るために各仕込操作時の醪試料のペーパークロマトグラムを同一沓紙上に作製して比較した。即ち各仕込操作の濃縮資料 (No. 1~6) の同量宛即ち 0.01cc をマイクロピペットにて東洋沓紙 No. 3 (40×40cm) の下辺より 7cm の所に並列して 4cm 間隔につけ、風乾後所定の如くブタノール・醋酸・水 (4:1:2) 混液を展開溶媒として一次展開を行い、風乾後 0.2% ニンヒドリンブタノール溶液を撒布して 95~100°C に 5 分間加熱呈色させた。

その結果を見るに醱酵全期間を通じてアミノ酸の種類に可成りの変動が見られる。即ち Rf 0.08~0.13附近のアミノ酸は仕込1日目より3日目頃までは増加し仕込7日目頃には逆に減少し仕込10日目頃になつて再び増加しているのが認められた。Rf 0.78~0.88附近のアミノ酸は仕込10日目頃より増加していることが認められた。総体的に仕込3日目頃よりアミノ酸の量が増加している。

(2) 二次展開によるペーパークロマトグラムの比較

著者は北条^{8),9),10)}の方法を応用して醱中のアミノ酸の仕込経過中に於ける消長を調べた。北条はアミノ酸混合溶液を倍数稀釈して滷紙上に滴下しペーパークロマトグラフィーを行つて呈色斑の消失する限界点を求め、その時の稀釈倍数の対数によつてアミノ酸相互の相対的な値を表す方法を考察し血液中の遊離アミノ酸の消長を調べている。即ち溶液の濃度は稀釈倍数の対数に比例するから、稀釈倍数の対数で溶液中のアミノ酸の濃度を表わすことが出来る。例へば稀釈倍数の

Table 3. Rise and Fall of Amino Acids in Awamori-Moromi.

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
アラニン	1	1	1	-2	-2	1
アルギニン	0	1	1	1	1	-1
アスパラギン酸	-1	1	1	0	1	2
シスチン				-1	-1	1
グルタミン酸	2	2	0	2	1	1
グリシン	1	1	1	1	1	1
ヒスチジン		0	0	1	-1	-2
オキシプロリン						
ロイシン	0	0	0	0	0	-1
リジン			?			?
メチオニン	-2	-1	-1			0
フェニルアラニン						
プロリン						
セリン						
スレオニン						
トリプトファン	-1	-2	-1			
チロシン	1	1	1	0	-1	-1
バリン				-2	0	-1

2を底とする対数で表わすとすれば或濃度を基準として倍数稀釈した時、4倍稀釈まで呈色斑が出現した時は2で表わし、基準の濃度まで出現した時は0で、2倍の濃縮の程度まで出現した時は-1で表わすことが出来る。但しこの場合のアミノ酸の濃度は絶対値ではなくて同種アミノ酸相互の相対的な値である。

本実験に於ては各仕込操作毎の醱試料(一次展開に用いた資料と同じ)を倍数稀釈し、その0.005ccをマイクロペットにて滷紙上に滴下し、常法の如く二次展開を行い、0.2%ニヒドリンのブタノール溶液を撒布し100°Cに5分間加熱呈色せしめて各アミノ酸が何倍稀釈まで出現するかという限界点を求め、その時の稀釈倍数の2を底とする対数でアミノ酸濃度を求め、仕込

経過中における各試料のアミノ酸の変化を比較した。その結果を第3表に示した。第3表の結果を見るにアラニンは仕込7日~10日目頃に急激に減少しその後再び出現している。標準アミノ酸のRf値と近以しているためにリジンと推定されるものが仕込3日目と15日目に出現しているが前記した通り不確定であり検討の要がある。トリプトファンは含有量は僅少なながらも醱酵初期に出現しているが後期においては完全に消失している。

メチオニンは醱酵初期において存在し、中期で消失し、後期では再び存在している。シスチンとバリンはその含有量は少く醱酵後期においてのみ見られる。第1表と第2表では醱酵後期において検出確認出来なかつたアルギニン、ヒスチジン、チロシンが第3表では確認されて居り、試料が濃縮されて始めて存在が確認されることよりその含有量は僅少であることが分る。

第3表を通観するに醱酵の経過と同一アミノ酸の含有量とは比例関係が維持されて居らず、断続的に出現しているアミノ酸が多い。検出されたアミノ酸の種類は増加は認められず各試料を通

して、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、シスチン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、チロシン、バリンの12種類である。リジンの存在も推定されるが前記した通り不確実である。

要 約

(1) ペーパークロマトグラフィーによつて琉球産泡盛醪のアミノ酸の検索及びそれらの仕込経過中における消長について研究した。

(2) 仕込3日目において9種類、仕込15日目(蒸溜前日)において8種類のアミノ酸が検出確認されたが両者中に検出されたアミノ酸の種類には可成りの差異が認められる。即ちアルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、チロシンは醱酵初期即ち仕込3日目においては検出されたが醱酵後期即ち仕込15日目においては検出されなかつた。又シスチン、バリン及びメチオニンは醱酵前期において検出されなかつたが、醱酵後期においては検出された。

(3) 両者ともに検出されたアミノ酸はアラニン、アルギン、アスパラギン酸、シスチン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、チロシン、バリンの12種類である。そのほかにその Rf 値よりリジンの存在が推定される。

(4) 一般的に云つて泡盛醪中においては、グルタミン酸、アスパラギン酸の含有量が多く、ロイシン、メチニン、トリプトファン、バリンはその含有量が少い。

(5) 泡盛醪のアミノ酸組成と清酒の酒母中のアミノ酸組成とを比較するに泡盛醪は清酒の酒母に比べてその含まれるアミノ酸の種類が少く、清酒の酒母16種類に対して泡盛醪の場合には仕込の初期において9種類、後期においては8種類に過ぎず、両者を通じても12種類である。

(6) 泡盛醪と清酒の酒母はそのアミノ酸組成において顕著な相違が見られる。即ち酒母中には、シスチンとトリプトファンが確認出来ないが泡盛醪では、トリプトファンが醱酵前期に、シスチンが醱酵後期にそれぞれ確認された。又清酒の酒母ではフェニールアラニン、スレオニン、セリンが確認されているが、泡盛醪ではそれらのアミノ酸を確認することが出来ない。

(7) 仕込経過中におけるアミノ酸の消長を一次元及び二次元ペーパークロマトグラムによつて比較した結果、醱酵の経過と同一アミノ酸の含有量とは比例関係が維持されて居らず断続的に出現しているアミノ酸が多い。最も著しい特長はトリプトファンは醱酵初期にその存在が確認されるか後期においては確認されない。メチオニンは醱酵初期と後期に確認され中期では確認されない。シスチンとバリンは醱酵後期においてのみ見られる点である。

終りに臨み試料を気持よく提供して下さつた首里喜屋武酒造所及び本実験に協力して下さつた森巖氏に深甚なる謝意を表する次第である。

文 献

- 1) 黒野：酒精及び焼酎。 2) NEUBERG, KERB: Biochem. Z., 40, 998 (1912); 67, 117 (1934). 3) 麻生・紫崎・松田・山内・森・関口：醸工誌, 29, 167 (1951). 4) 赤堀：アミノ酸及蛋白質, 148.
- 5) 大高：農化, 24, 366 (1951). 6) 田村, 角田, 桐村・宍沢：農化, 26, 480 (1952). 7) 坂口：醸協誌, 9, 1 (1951). 8) 梅津：醸工誌, 32, 267 (1954). 9) 北条：医学と生物学, 17, 85 (1950).
- 10) 北条：医学と生物学, 17, 235 (1950).