和三盆糖の遊離アミノ酸, 有機酸, 糖†

松井年行, 山田勝治

香川大学農学部食品学科

Contents of Free Amino Acids, Organic Acids and Carbohydrates in Japanese Traditional Refined Sugar (Wasanbon-to)

Toshiyuki MATSUI and Katsuji YAMADA

Department of Food Science, Faculty of Agriculture,
Kagawa University, Miki-cho, Kagawa-ken

Since mid-19 century, Wasanbon-to has been manufactured in Japan by a unique traditional refining procedure. The Togi step is based principally upon polishing with water, and pressing-off of molasses the Oshi step. No reports have been published on the substances responsible for the unique flavor of Wasanbon-to.

In the present paper the contents and compositions of the amino acids, the organic acids and carbohydrates in Wasanbon-to were studied by chromatographic techniques. The samples were 1st press-off molasses, 5th press-off molasses and finally refined sugar.

The results are summarized as follows: Aspartic acid was the predominant free amino acid followed by asparagine and alanine. The content of γ -amino butyric acid was 0.88 mg% in the final product. Of organic acids, the content of *cis*-aconitic acid was 30.89 mg%, making 49.4% of the total organic acids excluding unidentified ones; Pyroglutamic acid was 11.4% of the total. Glucose, fructose and sucrose was detected and determined by gas-chromatography in the final product.

The refining technique remains impurities in the products, which appear to contribute to the unique flavor of this traditional sugar.

(Received April 7, 1975)

わが国における砂糖の製造は 19 世紀後半に全盛を見たが、その後外糖の増大とともに減少の一途をたどった。しかし和三盆糖は一大生産地であった四国地方で現在なお製造されている分蜜糖である。古来独特の精製法のため結晶粒子も細かく、精製白糖に比べてまろやかな風味を持つためか打物、落雁等の砂糖をそのまま使用する名菓に多く用いられている。甘シヤ糖の糖蜜、および鹿糖蜜における成分の報告は橋爪ら¹⁾、小原ら²⁾によって行なわれている。また甜菜糖については田宮ら³⁾によって検討されている。しかし和三盆糖の呈味成分についての検討はまったくなく、わずかに大庭ら⁴⁾、小坪ら⁵⁾によるキャンデーテスト、顕微鏡による結晶観察と山中⁶⁾による一般分析があるだけで、多くは歴史的考察、製造の紹介、総説⁷⁾にとどまっている。しかも和三盆糖についてのガスクロマトグラフィー、アミノ酸自動分析計、液体クロマトグラフィー等による詳細な検討は皆無である。本報は和三盆糖の独特の風味が、含有する不

純物質によるところが大であるとの考えに基づき、和三盆糖に含まれるアミノ酸、有機酸、糖の分析を行なったものである。

試料および実験方法

1. 試料

香川県大川郡引田町で 1973 年 12 月に収穫されたさとうきび汁を濃縮し白下糖が製造された。次に、この白下糖を原料として和三盆糖が作られた。その製造工程の途中の段階、すなわち第 1 日目に水で研がれ押しつぶねで圧縮分蜜された蜜（荒蜜—荒と略す）、最終日（一般に 5 日目）に研がれ分蜜された蜜（あげ）、同時にでき上がり十分乾燥して粉碎された和三盆糖（製品）を分析試料とした。

2. 一般分析

精製糖工場工程管理法⁹⁾に従い、水分は常圧 105°C 法、直接還元糖は Somogyi-Nelson 法¹⁰⁾により、グルコースとして表わした。ショ糖は 10 ml のメスフラスコに糖液 5 ml を採り濃塩酸 0.27 ml を入れ、60°C 10 分間加水分解した。さらに水酸化ナトリウムで中和し

† 和三盆糖に関する研究（第 1 報）

〒 761-07 香川県木田郡三木町池戸

10 ml に定容後、総還元糖量を Somogyi-Nelson 法で定量し直接還元糖を差引き 0.95 を乗じてショ糖とした。粗たん白質は Kjeldahl 窒素定量法により窒素を定量し、6.25 の平均係数を乗じて算定した。粗脂肪は水酸化銅沈殿法¹²⁾、滴定酸度は水酸化ナトリウムで中和滴定し酢酸として表わした。灰分は硫酸灰分⁹⁾ によった。

3. 遊離アミノ酸の試料調製

各試料を水で希釈し Amberlite IR-120, (H⁺型) に遊離アミノ酸を吸着させ十分水洗後、0.5 N アンモニア水で溶出させた。さらに溶出液を濃縮後 Amberlite IRA-400 (OH⁻型) に遊離アミノ酸を吸着させ、0.5 N 酢酸で脱着しエーテルで色素等を除去した。pH 2.2 のクエン酸緩衝液で定容し、遊離アミノ酸の定量用試料とした。

1) 自動分析計による定量 上記試料を日立 KLA-3B 型アミノ酸自動分析計によって分析した。 γ -アミノ酪酸とアンモニアの分離の悪いものは 15 cm カラムによる γ -アミノ酪酸の定量を行なった。なおグルタミン、アスパラギンのアミドは 6 N 塩酸、110°C、22 時間加水分解を行ないグルタミン酸、アスパラギン酸の差をもって各アミド量とした。

2) 結合アミノ酸の定量 糖が多たん白質だけを正確に定量しにくいので、アミノ酸に分解して定量した。すなわち試料に等量の濃塩酸を減圧封管し、110°C、22 時間加水分解し減圧濃縮して pH 2.2 のクエン酸緩衝液で定容し定量用試料とし、上記と同様に分析を行なった。

4. ガスクロマトグラフィーによる糖の定量

1) 糖の試料調製 各試料を水で希釈し定容した。2 ml の試験管に試料の一部と内部標準のキシリトールを加え真空凍結乾燥した。無水ピリジン 1 ml と 0.2 ml HMDS と 0.1 ml TMCS を加え密栓する Sweeley ら¹³⁾ の方法に従って TMS 化し、ガスクロマトグラフィー定量用試料とした。

2) ガスクロマトグラフィーによる糖の検出定量 ガスクロマトグラフィーにより検出された糖の定性は OV-17 (微極性)、SE-30 (無極性) の両カラムによる標準物質の保持時間、標準物質添加による面積の増大より判定した。定性の意味で試料をアビセル (5×20cm) の TLC にスポットし、二重展開後ナフトレゾルシン-リン酸試薬およびアニリン水素フタレート試薬で発色させた。スポットの色と同時に展開した標品との R_f によって判定した。展開溶媒は酢酸エチル：ピリジン：酢酸：水 = 5 : 5 : 1 : 3 とイソプロパノール：ピリジン：水：酢酸 = 8 : 8 : 4 : 1 によった。また各糖の定量は成書¹³⁾に従い、キシリトールを内部標準物質として各糖における標準曲線を作成し定量を行なった。なお、装置は日立 063 型ガスクロマトグラフによった。

5. ガスクロマトグラフィーによる有機酸の定量

1) 有機酸の試料調製 各試料を水で希釈し、Amberlite IR-120 (H⁺型) でアミノ酸を吸着させて除去し、溶出液をさらに Amberlite IRA-400 (OH⁻型) に吸着させた。十分に水洗後 6 N ギ酸で溶出させて濃縮し、メタノールで定容した。次にこの試料の一部を採り濃縮後 6 N 塩酸 0.1 ml に溶解し、10% メタノールエーテル溶液 10 ml を加えて発生する ジアゾメタンでメチルエステル誘導体とし¹⁴⁾ 有機酸定量用試料とした。装置は糖同様日立 063 型ガスクロマトグラフによった。

2) ガスクロマトグラフィーによる有機酸の検出定量 ガスクロマトグラフィーにより検出された有機酸の定性は極性 2 種類のカラムによる標準物質の保持時間、標準物質添加による面積の増減により判定した。また各有機酸の定量は、定性された有機酸の標品を同様にメチルエステル誘導体にし、標準曲線を作成し定量を行なった。

実験結果および考察

Fig. 1 に、原料の白下糖から和三盆糖までの製造工程の手順と各段階における砂糖を示した。上段は研ぎの工程で第 1 日目、新掛け、第 2 日目、つぶり研ぎ、第 3 日目、とぶ研ぎ、第 4 日目、中研ぎ、第 5 日目、上研ぎで下段は分蜜された蜜を示した。Table 1 に一般分析値を示した。また水を加えて研ぎ、圧縮して分蜜する和三盆糖の精製法では粗たん白質、粗脂肪、灰分、還元糖、滴定酸度の減少がみられた。和三盆糖では製品においても完全に分蜜されず、1.46% の蜜を定量した。市販グラニュー糖、上白糖ではおのおの 0.08%、1.05% であった。粗たん白質、滴定酸度は市販グラニュー糖、上白糖とともに 10 mg% 以下となり、和三盆糖と比べた場合に、このものの風味に与える影響は少ないと考えられ

Fig. 1. Refining process of Wasanbon-to.

Upper row shows sugars and down row molasses at steps of refining from the almost right of starting sugar to the almost left of the final product (Wasanbon-to).

Table 1. Approximate composition of Wasanbon-to.

	"Ara" step	"Age" step	Product	Refined sugar	Granulated sugar
Moisture	38.44	35.68	0.84	0.59	0.16
Crude fat	0.09	0.08	0.04	0.03	0.02
Crude protein	2.01	0.86	0.09	0.01	0.01
Sucrose*	44.74	55.58	95.40	97.55	100.16
Reducing sugar*	14.94	4.89	1.46	1.05	0.08
Ash	4.61	1.95	0.60	0.20	0.04
Titrateable acidity**	1.01	0.40	0.11	0.01	0.01

% on wet basis, * calculated as glucose, ** calculated as acetic acid, "Ara"=1st press-off molasses, "Age"=5th press-off molasses, product=Wasanbon-to, refined sugar=an article on the market, granulated sugar=an article on the market.

Table 2. Contents of free amino acids in Wasanbon-to.

(mg% on wet basis)

	"Ara" step	"Age" step	Product
Lys	4.14	2.47	0.65
His	+	0.47	—
NH ₃	14.60	5.84	0.58
Asp	114.27	80.34	6.36
Thr	7.95	4.40	0.21
Ser	29.41	13.84	0.97
Glu	10.77	6.71	0.41
Pro	1.46	1.45	+
Gly	8.64	4.46	0.63
Ala	52.32	21.43	2.63
Val	24.57	10.78	1.41
Ile	11.39	5.41	0.66
Leu	6.53	3.47	0.38
Tyr	5.48	3.23	0.25
Phe	4.19	2.44	0.21
γ -ABA	14.56	8.60	0.88
Asp-NH ₂ *	67.95	47.60	4.79
Glu-NH ₂ *	10.43	7.04	—
Total	388.66	229.98	21.02

* Calculated from the difference of the amounts of aspartic acid or glutamic acid before and after acid hydrolysis.

Table 3. Contents of combined amino acids in Wasanbon-to.

(mg% on wet basis)

	"Ara" step	"Age" step	Product
Lys	6.42	8.58	0.45
His	+	0.84	—
NH ₃	58.82	17.38	1.12
Asp	377.22	167.06	6.45
Thr	23.29	6.21	0.21
Ser	59.72	23.85	0.97
Glu	307.90	99.37	0.69
Pro	+	2.50	—
Gly	23.43	10.92	0.93
Ala	78.66	28.54	2.37
Cys	+	1.58	—
Val	42.00	14.63	1.23
Ile	20.16	7.69	0.60
Leu	17.92	7.83	0.44
Tyr	3.98	1.97	0.17
Phe	8.06	3.59	0.22
Total	1027.58	402.54	15.85

グルタミンのアミドは減少し、含量でも上で荒の 69.7%、製品では荒の 6.0% と減少している。活性炭、イオン交換樹脂処理等をくり返していく工業的精製法でなく押しと水で研ぐ方法で不純物を除く和三盆糖の精製法では、製品でも遊離アミノ酸を除去することは困難なようである。甘シヤ糖では一般に田宮ら³⁾の甜菜糖の分析値に比べてアスパラギン量はグルタミン量より多く、白下糖より分蜜された荒で全遊離アミノ酸中アスパラギン、17.5%、グルタミン、2.7% であった。甜菜糖ではおの

る。

Table 2 に遊離アミノ酸含量を示した。表からアスパラギン、アラニン、アスパラギン酸の多いことがわかる。荒、上、製品と工程が進むに従ってアスパラギン、

おの 7%, 61% である。これは、橋爪ら¹⁾の沖縄甘シヤ糖の糖蜜分析の結果とほぼ一致する。しかし、 γ -アミノ酪酸の値は微量とされている。荒の γ -アミノ酪酸は 14.56 mg% であり、甜菜糖の場合は全体の 10% 含有と比較すると、荒で全遊離アミノ酸中 3.7% であった。

Table 3 に、結合アミノ酸の含量を示した。表から荒では全遊離アミノ酸の 1.8 倍、上で 1.2 倍であった。6N 塩酸で加水分解する方法をとると糖含量が高いため、一部のアミノ酸は糖含量の少ないときより分解が多いと考えられる。この方法で試料とほぼ同じ量のショ糖を加えたときのアミノ酸の破壊率は、平均約 30% であった。分解を考慮に入れても、工程の進行につれて逐次たん白質の著しい減少が見られた。

Fig. 2. Gas-chromatogram of carbohydrates in first press-off molasses (Ara step).

Column: 1% OV-17 on gaschrom Q, 3 mm i.d. $\times$ 2 m, inject. & detect. temp., 275°C, column temp. 140-250°C (5°C/min), carrier: N_2 , 30 ml/min, detector: FID.

Fig. 3. Gas-chromatogram of carbohydrates in first press-off molasses (Ara step).

Column: 3% SE-30 on chromosorb W, 3 mm i.d. $\times$ 2 m, inject. & detect. temp., 275°C, column temp. 180-300°C (5°C/min), carrier: N_2 , 30 ml/min, detector: FID.

糖のガスクロマトグラムを Fig. 2, Fig. 3 に示した。シュクロース、グルコース、フラクトースは荒、上、製品で検出された。薄層クロマトグラフィーによる発色ではナフトレゾルシン-リン酸試薬によるフラクトースの赤色スポット、グルコースの青色スポット、アニリン水素フタレート試薬によるシュクロースを検出した。Table 4 にガスクロマトグラフィーにより検出された糖の定量値を示した。荒、上、製品と工程の進むに従って蜜は減少し荒でフラクトース、グルコースがおのおの 5.50%, 8.39% から製品でおのおの 0.31%, 0.49% となった。しかし製品でもなお分蜜は完全でなく、グラニュー糖等のハードシュガーでも完全に分蜜されないことから考えて、その存在は当然であろう。

有機酸のガスクロマトグラムを、Fig. 4, Fig. 5 に示した。5% Carbowax 20 M と 5% E.G.S. の標品におけるメチルエステル誘導体の保持時間の比較を Table 5 に示した。また Fig. 4, Fig. 5 のガスクロマトグラムをもとに計算した有機酸含量を Table 6 に示した。全有機酸中 49.4% が *cis*-アコニット酸、ついでリンゴ酸、

Table 4. Contents of carbohydrates in Wasanbon-to.

	"Ara" step	"Age" step	Product
D-Glucose	8.39	2.46	0.49
D-Fructose	5.50	2.00	0.31
Sucrose	44.70	55.47	95.34
Total	58.59	59.93	96.14

% on wet basis.

Fig. 4. Gas-chromatogram of organic acids in first press-off molasses (Ara step).

Column: 5% EGS on chromosorb W, DMCS, 3 mm i.d. $\times$ 3 m, inject. & detect. temp., 290°C, A: column temp., 110-225°C (5°C/min), B: column temp., 80-150°C (3°C/min), carrier: N_2 , 30 ml/min, detector: FID.

Fig. 5. Gas-chromatogram of organic acids in first press-off molasses (Ara step).

Column: 5% Carbowax 20M on chromosorb W, DMCS, 3 mm i.d.×3 m, inject. temp., 290°C, column temp., 110-250°C (5°C/min), carrier: N₂, 30 ml/min, detector: FID.

Table 5. Relative retention times for methyl-ester derivatives of organic acids.

	5%-EGS	5%-Carbowax 20M
Lactic acid	0.39 ^a	0.43 ^c
Glycolic acid	0.52	0.60
Oxalic acid	0.61	0.60
Malonic acid	0.81	0.80
Succinic acid	1.00	1.00
Succinic acid	1.00 ^b	1.00 ^c
Malic acid	2.44	1.83
α -Ketoglutaric acid	2.82	2.07
cis-Aconitic acid	3.05	2.27
Tartaric acid	3.75	—
Citric acid	3.94	2.65
Pyroglutamic acid	4.72	3.02
Isocitric acid	5.69	
Maleic acid	7.50	

^a temperature 80°C-130°C at 3°C/min.

^b temperature 110°C-225°C at 5°C/min.

^c temperature 110°C-250°C at 5°C/min.

ピログルタミン酸、クエン酸、コハク酸であった。なお、cis-アコニット酸とクエン酸の間に現われるピークは、未知物質として計算から除外した。荒から上、製品と工程の進むに従って糖、アミノ酸同様の有機酸も減少している。またグルタミンの閉環によって生ずるといわれているピログルタミン酸は、製品においても製品全有機酸中 11.4% であった。小原ら²⁾の原糖のシリカゲルによる有機酸分析結果では、他にグリコール酸、酒石酸を

Table 6. Contents of organic acids in Wasanbon-to.

	"Ara" step	"Age" step	Product
Lactic acid	+	+	+
Glycolic acid	—	—	—
Oxalic acid	—	—	—
Malonic acid	+	+	+
Succinic acid	89.50	19.25	11.42
Malic acid	267.12	94.78	9.12
cis-Aconitic acid	893.04	149.47	30.89
Citric acid	61.63	22.60	3.97
Pyroglutamic acid	182.32	116.14	7.14
Total	1493.61	402.24	62.54

mg% on wet basis, calculated neglecting unknown components.

検出している。酒石酸は試料に酒石酸メチルの添加による面積の増大を現わさないことから含有されないと判断した。またメサコン酸、イタコン酸も酒石酸と同様の方法によったが検出されなかった。Bruijn ら¹⁵⁾によればグリコール酸と乳酸はシュクロース、グルコース、フラクトースの存在でアルカリ加熱分解でも生成するとしている。しかし和三盆糖では、中性ないし微酸性で加熱濃縮するためか、痕跡以上は検出されなかった。一般分析による灰分 0.6% の存在は、砂糖の味に与える影響において無視できないと考えられるので、今後検討する予定である。

要 約

精製白糖に比べ和三盆糖の独特の風味が含有する不純物質によるところが大であるという考えをもとにアミノ酸、有機酸、糖の分析を行ない、あわせて精製工程中の成分変化を見て以下のことを明らかにした。

1) 製品において遊離アミノ酸ではアスパラギン酸、アスパラギン、アラニンが多く、 γ -アミノ酪酸は 0.88 mg% であった。

2) 製品において、除たん白はほぼ完全であると考えられる。しかし、共存するショ糖の影響が考えられる加水分解法は今後検討を要する。

3) 糖ではシュクロース、フラクトース、グルコースを定量した。

4) 有機酸では cis-アコニット酸が製品において全有機酸の 49.4% を占めており、ピログルタミン酸は全有機酸の 11.4% であった。

5) 市販グラニュー糖、上白糖を和三盆糖と比べた場

合に、一般分析値から推定して市販精製糖の有機酸、遊離アミノ酸が風味に与える影響は少ないと考えられる。

6) 和三盆糖の独特の精製法である「押し」と「研ぎ」をくり返す方法では、精糖工業で古くからいわれている有害性窒素成分および夾雑物を完全に除去しえない。逆にこのことが幸いして、特徴的な風味を作り出していると考えられる。

本研究を行なうに当り、試料の提供と説明を願った引田の三谷友義氏、アミノ酸分析にご便宜を賜った四国農業試験場の久保田収治氏、同土肥2研の赤尾勝一郎氏に謝意を表し、また指導を賜った故檜崎丁市教授、ご校閲願った大阪府立大学北岡正三郎教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Hashizume, T., Higa, S. and Sasaki, Y. : *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 319 (1966)
- 2) 小原潤一, 岩倉達也 : 精糖技研, **7**, 32 (1958)
- 3) 田宮久彰, 霜 三雄 : 精糖技研, **16**, 98 (1965)
- 4) 大庭景利, 柳田文雄 : 食品工誌, **9**, 252 (1962)
- 5) 小坪政恵, 上柳富美子 : 高知大学術報, **4**, 35 (1953)
- 6) 山中 啓 : 食品工誌, **21**, 438 (1974)
- 7) 山中 啓 : 調理科学, **5**, 123 (1972)
- 8) 松井年行 : 食品工業, **17**, 31 (1974)
- 9) 精糖技術研究会編 : 製糖便覧, 精製糖工場工程管理法, **4** (1962), 朝倉書店 (東京)
- 10) 福井作蔵 : 生物化学実験法, 還元糖の定量法, 156 (1969), 東京大学出版会 (東京)
- 11) 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治 : 食品分析法, 112 (1968), 柴田書店 (東京)
- 12) Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita and Wells, W.W. : *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963)
- 13) 蛋白質, 核酸, 酵素編集部編 : 生物化学実験法, 54 (1968), 共立出版 (東京)
- 14) 舟阪 渡, 池川信史編 : ガスクロマトグラフィー II. 応用編, 649 (1970), 広川書店 (東京)
- 15) Bruijn, J. and Vanis, M. : 食品工業技術情報, **5**, 83 (1973)

(昭和50年4月7日受理)