ペーパークロマトグラフ法による大豆粒及びその発芽に伴う含有遊離アミノ酸の変化に関する研究

Studies On the free Amino Acids in the Soya Beans and the Variation of their Contents during Germination by Paper Chromatography

(昭和 29 年 7 月 12 日受理)

山 田 晃 松 下 ア ヤ 子
(Akira Yamada) (Ayako Matsushita)

緒 言

大豆の蛋白質の構成アミノ酸については既に多くの報告がある。佐々木¹⁾によれば大豆の蛋白質を加水分解して得られるアミノ酸は Glycine 0.23%, Alanine 4.12%, Valine 2.56%, Leucine 10.02%, Isoleucine 2.38%, Proline 3.94%, Phenylalanine 5.21%, Tyrosine 3.82%, Aspartic acid 5.08%, Glutamic acid 16.50%, Oxyglutamic acid 13.2% であり、大友²⁾によれば大豆の胚を加水分解して得られる窒素の分布状態は全窒素 100 分中 Arginine 態 18.64, Histidine 態 3.52, Lysine 態 7.76, Cystine 態 1.21 Mono Amino 態 54.80, である。又大豆の発芽による窒素成分の変化に関しても種類の報告がある。佐々木³⁾は暗所で発芽させた大豆の茎及び根についての一般分析をなして発芽前と比較し、小島⁴⁾は大豆 2 升を暗所で発芽させて Asparagine 63g を得ている。然しながら以上の報告はペーパークロマトグラフ法が利用される以前のもので而かも遊離の形で存在するアミノ酸に関するものではない。著者等はペーパークロマトグラフ法により熊本県産秋大豆二品種について先ず種実中の遊離のアミノ酸を確認しそれが発芽による変化について実験を行ったので此処に報告する。

実 験 の 部

(1) 供 試 材 料

試料の大豆は熊本県立農事試験場から分譲されたもので「一号早生」、「原々種一号早生」の二品種である。何れも採取後 2 カ月余を経たものを用いた。

(2) 試 料 の 調 整 法

i 種実の場合 大豆 10g をよく洗い清潔なナイフで肉部を細片に細断し、乳鉢に入れて粉状にすりつぶす。これを 100cc 入りの三角コルベンにうつし 50cc のメタノールで 24 時間以上浸出する。この間屢々振盪する。これを濾紙で濾過しその濾液を減圧下で蒸溜してメタノールを追出しその残渣を 0.5cc の再蒸溜水にとかしてこれを直ちにクロマトにかける。

ii 暗所で発芽させた莖の場合 大豆は上記の二品種で一粒の重さは平均 135mg 位であつた。発芽の方法は島崎⁵⁾の方法を参考にして次の様に行つた。

(一) 試料をよく洗い十分な水に 6 時間浸漬する。

(二) 蜜柑箱に布を敷き砂を約 40cm 厚さに平らに入れる。之に試料を蒔き微温湯をかけ 20cm 厚さに藁を粗にして覆いその上を更に藁で覆い暖くして暗い所に置く。朝夕微温湯で灌水する。温度は 15°C~17°C で約 10 日間で莖が 3cm~4cm 位に伸びる。この莖 10 本位を水洗して後乳鉢に入れてすりつぶしこれを三角コルベンにうつし直ちに 50cc 位のメタノールを入れて振盪し 24 時間以上浸出する。クロマトにかけるまでの試料の調製方法は前記同様である。

iii 日光にあてて発芽させた莖、根、芽、発芽粒子の場合 上記二品種の大豆を 6 時間浸水後、南側で暖く周囲に木のわくをした畑に蒔いた。夜は藁をかぶせて温度の降下を防いだ。大体 10°C 5 週間で莖が 2cm、芽が 0.3 cm、根が 2cm 位になり毛根がのびていた。根以外の部分は緑色になつた。以上の試料を上記同様の方法で調製し直ちにクロマトにかけた。

(3) 展 開 装 置

直径 19cm、高さ 23cm のガラス製の円筒 2 個をすり合せの部で上下に重ねた密閉器中で展開を行う。溶媒を入れたシャーレーを下方の円筒の底におき、それに濾紙を丸めて立て上をクリップでとめて後今一つの円筒をかぶせる。

(4) 展 開 溶 媒

溶媒として次の二種類を用いた。

i 15% 水添加 Phenol 凝固点 -40°C, B.P. -178°C~190°C の再蒸溜品で着色してないもの。

ii n-BuOH, H₂O, AcOH の混合液 n-BuOH は竹田製薬特級品を再蒸溜したもので n-BuOH, H₂O,

AcOH の混合の割合は 4:5:1 で上層のブタノールに富む方を用いる。この混合した溶媒は長く置くとエステル化してアミノ酸の Rf 値が違ってくるので混合直後のものを使用した。

(5) 展 開 操 作

濾紙は東洋濾紙 No. 50 の 2×40 (一次元用) 及び 20×20 (二次元用) を用いた。上記試料の濃縮液をガラスの毛細管で吸上げさせ濾紙の一角 (2cm×2cm) につけるがそのスポットの拡がり直径 5mm 位になる。これを電熱器で乾かし溶媒 i を入れたシャーレー中に丸めて立て上から他の一つの円筒をかぶせる、溶媒 i は室温 15°C で 40cm のもの約 30 時間、20cm のもの約 7 時間で上端に達する。そこで濾紙を直ちに電熱器で (85°C ~ 90°C) 乾燥し直角に廻転した位置で同様の方法で溶媒 ii を上昇させる。溶媒 ii は 40cm のもの 19 時間、20

cm のもの 4 時間で上端に達する。再び乾かしてニンヒドリン溶液 (アセトンにその 0.1% のニンヒドリンをとかしたもの) を濾紙面にスプレー加温してアミノ酸のスポットを呈色させる。

実 験 結 果

(1) 純粋アミノ酸のクロマトグラム

以上の実験条件で 20 種類の純粋アミノ酸について二次元ペーパークロマトグラフ法で Rf 値を測定した結果は第 1 表の様であつて Phenol を用いた場合の Rf 値を縦軸にとり n-BuOH, H₂O, AcOH の混合液を用いた場合の Rf 値を横軸にとつてこれをグラフに示すと第 1 図の様である。アミノ酸の Rf 値は温度の変化により必ずしも一定しないがその Rf 値のずれは測定したすべての純粋アミノ酸について相対的に大となり小となるもの

第 1 図 純粋アミノ酸のクロマトグラム

註 X印は試料をつけた点

各スポットにつけた数字はアミノ酸を代する数字である

第2図 穂 実

第3図 莖 (曬所)

第4図 莖と根 (+日光)

第5図 芽 (+日光)

第6図 発芽粒子 (+日光)

1	Aspartic acid	13	Phenylalanine
2	Glutamic acid	14	Leucine
3	Cystine	15	Glutamine
4	Homocystine	16	Glucosamine
5	Asparagine	17	A (不明物質)
6	Glycine	18	B (不明物質)
7	Alanine	19	C (不明物質)
8	Arginine	20	黄色スポット
9	β-Alanine	21	Serine
10	Proline	22	Threonine
11	Valine	23	Histidine
12	Tryptophan	24	Tyrosine

註 カ 2, 3, 4, 5, 6 図の名スポットにつけた数字は上記のアミノ酸を代用する。XFDは材料をつけた並

であることを知った。

(2) 試料のアミノ酸のクロマトグラム

各試料について以上の実験条件で二次元ペーパークロマトグラフ法を行い夫々第2, 3, 4, 5, 6図の如きクロマトグラムを得た。

(3) 純粋アミノ酸による各個の確認

下図の各試料のクロマトグラムの各スポットの判定は第1図標準クロマトグラムに於けるスポットの相対的位置と Rf 値とを比較することによる外文献値^{6), 7), 8), 9), 10), 11)}を参考にした。さらに確認するために前記各試料の濃縮液に各種純粋アミノ酸を添加した混合試料を同様に展開するとそのスポットだけが大きくなる

からそのアミノ酸であることが確認される。又トリプトファンの存在を明らかにするためにアダムキューウィツ氏反応実験も行つた。尙アミノ酸の Rf 値が全般的に小さく現われる様であるが著者等の一人⁽²⁾は試料に夾雑する糖及び有機酸の量が多い時にはアミノ酸の Rf 値が小さく現われることを実験している。類似例として吉野⁽³⁾が NaCl の共存により Rf 値が小さくなるアミノ酸のあることを報告している。しかしながら溶媒、温度の条件を一定にして行つ場合にはアミノ酸の相対的位置は変わらないのでその考えで推定すれば判定を誤ることは少ない。第1表に試料の Rf 値及び基準とした純粋アミノ酸の Rf 値を示す。

第1表 純粋アミノ酸と試料のアミノ酸の Rf 値の比較

純 粋 ア ミ ノ 酸							試料のアミノ酸	
著 者	Consden ¹⁾	Satake ¹⁰⁾	Matsushita	Satake	Ichikawa ⁶⁾	Matsushita	Matsushita	
溶媒	Phenol	Phenol	Phenol +15% H ₂ O	n-BuOH: AcOH 4:1	n-BuOH: AcOH: H ₂ O 4:1:1	n-BuOH: AcOH: H ₂ O 4:1:5	Phenol +15% H ₂ O	n-BuOH: AcOH: H ₂ O 4:1:5
アミノ酸								
Aspartic acid	0.12—0.17	0.12	0.05—0.06	0.26	0.14—0.17	0.16—0.22	0.07	0.22
Cystine	0.13—0.30	0.13	0.18—0.20	0.11	0.04—0.06	0.08—0.11	0.19	0.16
Glutamic acid	0.13—0.28	0.20	0.18—0.20	0.32	0.20—0.25	0.27—0.30	0.20	0.29
Serine	0.33—0.36	0.35	0.29—0.31	0.28	0.19	0.21—0.25	0.30	0.23
Taurine	0.43	0.39		0.36	0.12—0.14			
Lysine	0.46—0.82	0.43	0.48	0.12	0.05—0.13	0.16—0.21		
Asparagine	0.44	0.42	0.38—0.39	0.36	0.12—0.14	0.15—0.21	0.38—0.39	0.15—0.17
Glycine	0.40—0.42	0.40	0.38	0.32	0.18—0.20	0.23—0.26	0.38	0.20
Threonine	0.41—0.53	0.47	0.45	0.35	0.28—0.30	0.45	0.30	
Arginine	0.59—0.89	0.48	0.64	0.14	0.19—0.21	0.23—0.26	0.64	0.25
Alanine	0.54—0.59	0.60	0.56—0.58	0.39	0.35—0.38	0.30—0.33	0.56	0.32
β-Alanine	0.71	0.71		0.45	0.29—0.41		0.65	0.38
Glutamine	0.62	0.62		0.41			0.62	0.53
Tyrosine	0.59—0.64	0.66	0.59—0.60	0.59	0.35—0.45	0.42—0.47	0.55	0.45
Histidine	0.68—0.72	0.70	0.60—0.26	0.25	0.15—0.18	0.16—0.22	0.58	0.22
Valine	0.76—0.78	0.74	0.77—0.78	0.53	0.43—0.57	0.52	0.72	0.48—0.51
Tryptophan	0.76—0.86	0.80	0.76—0.77		0.44—0.49	0.53—0.54	0.72	0.48—0.51
Methionine	0.76—0.83	0.83	0.77—0.78	0.56	0.58	0.50—0.52	0.72	0.48—0.51
Leucine	0.83—0.88	0.86	0.81—0.84	0.69	0.72—0.75	0.66—0.69	0.81	0.62
Nor Leucine	0.85—0.89		0.82—0.84			0.70	0.81	0.66
Iso Leucine	0.81—0.86	0.87	0.81—0.84	0.65		0.66—0.69	0.81	0.66
Glucosamine	0.52	0.52		0.28			0.50	0.46
Homocystine	0.38						0.27—0.28	0.36
Proline	0.85—0.91	0.89	0.83—0.86	0.42	0.26—0.38	0.36—0.38	0.85	0.38
Phenylalanine	0.86—0.90	0.90	0.83—0.86	0.74	0.61—0.70	0.61—0.64	0.81	0.60—0.61
Hydroxyproline	0.72		0.65—0.71			0.25—0.28		
A (不明物質)							0.85	0.03
B (同 上)							0.80	0.11
C (同 上)							0.90	0.84

第 2 表 大豆の発芽に伴う含有遊離アミノ酸の変化

種 類 大豆の品種別 アミノ酸	種 実		暗所で 発 芽		日光にあてて発芽			
	種 実		茎(白)		一 号 早 生			
	一 号 早 生	原 一 号 早 生	一 号 早 生	原 一 号 早 生	芽 (緑)	茎 (緑)	根 (白)	発 芽 粒 (緑)
Proline	++	++	++	++		++	+	++
Phenylalanine	+	+	++	++		+		++
Leucine	++	++	++	++	+	++	+	++
Iso Leucine	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)
Nor Leucine	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)
Valine	++	++	++	++	++	++	++	++
Methionine	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
Tryptophan	++	++	++	++	++	++	++	++
Serine			++	++	++	++	++	++
Arginine	++	++	+	+	+	++	+	++
Histidine			++	++	++	++	++	++
Tyrosine			+	++				++
Alanine	++	++	++	++	+	++	++	++
Asparagine	+	+	++	++	++	++	++	++
Threonine			++	++	+	+	++	++
Glycine	+	+	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
Glutamic acid	++	++	++	++	++	++	++	++
Cystine	+		+	+	+			+
Aspartic acid	++	++	++	++	++	++	++	++
Glutamine	++	++						
Glucosamine	++	++						
Homocystine	+		++	++		+	+	+
β-Alanine	+	+	++	++	++	+	++	++
A (不明物質)	+	+						
B (同 上)	+	+						
C (同 上)	+	+						
遊離アミノ酸 の総数	19	17	17	17	13	15	14	17

(+ 存在) (++) 多量存在 (++) 甚だ多量存在 () は重複

以上の方法で大豆及びその発芽に伴う含有遊離アミノ酸の変化状態を判定して第2表の様な結果が得られた。

考 察 及 び 要 約

大豆に含有される遊離のアミノ酸とその大豆を暗所で及び日光をあてて発芽させた場合の含有遊離アミノ酸の変化をペーパークロマトグラフ法でしらべた。

大豆中に遊離の形で存在するアミノ酸は種類が多く特にGlutamic acid, Alanine, Glucosamine, Glutamine, Leucine, Valineの量が多く, Aspartic acid, Arginine, Proline がこれに次ぎ, Cystine, Homocystine, β-A-

lanine, 不明物質 A, B, C は少く Asparagine は特に少い成分である。Methionine, Tryptophan, Valine はフェノールの場合もブタノール, 水, 氷醋酸の混合液の場合も Rf 値が近似しているので見分けにくい。Asparagine と Glycine, 及び Leucine, Isoleucine, Nor Leucine, の場合も同様である。

大豆を暗所で発芽させてもやしにすると含有遊離アミノ酸の種類に変化を生じる。発芽前に較べて消失するアミノ酸は Glutamine, Glucosamine, 不明物質 A, B, C の 5 成分であり逆に出現するアミノ酸は Threonine, Tyrosine, Histidine, Serine の 4 成分であり著しく量の多くなるのは Asparagine である。含有遊離アミノ酸の中で量の多いのは Asparagine, Alanine であり特に量の少いのは Cystine, Tyrosine である。

発芽後日光をうけて伸びた芽中の遊離のアミノ酸は茎に較べてその数が少く Phenylalanine, Proline, Tyrosine, Homocystine が消失し Threonine, Cystine は非常に少い成分になる。根の場合は茎の場合と大体同様である。

発芽粒子は日光をうけて緑色になるが含有される遊離のアミノ酸は元の大豆の場合と同様ではなくアミノ酸の種類は暗所で発芽させたもやしの場合と同様であるがその量はアミノ酸の種類によつて多少変動がみられる。

終りに臨み試料の大豆を分与して頂いた熊本県立農事試験場の工藤技師, 常川氏並びに色々御援助を頂いた九谷教授の方々に御礼を申し上げる。

引 用 文 献

- 1) 佐々木周都: 日農化, 11, 321 (1935)
- 2) 大友佐次郎: 南満中央試報告, 14, 55 (1929)
- 3) 佐々木周都: 日農化, 9, 115 (1933)
- 4) 小島 牛 郎: 日農化, 12, 172 (1925)
- 5) 島崎 好: 高知女子大学紀要, 1, 1 (1952)
- 6) 市川 邦介: 醸酵工学雑誌, 30, 77-80 (1952)
- 7) C. A. Knight: J. Biol. Chem., 190, 755 (1951)
- 8) Consden, Gordin, Martin: Biochem. J., 38, 224 (1944).
- 9) Williams, Kirby: Science, 107, 481 (1948).
- 10) 佐竹一夫: “クロマトグラフ” 共立出版, 東京 (1952) p. 87,
- 11) 蔵岡小太郎: 薬学, 3, 117 (1949)
- 12) 松下アヤ子, 伊勢田駿: 熊本女子大学学術紀要, 6, 1 (1954)
- 13) 吉野 宏: 日農協誌, 46, 149~147 (1951)

(熊本女子大学栄養学教室)