要 約

Asp. oryzae 557 の生成するアミラーゼ組成が 2 次液の pH によつて変化を受けるかどうかを検討した所、本麹菌の生成するアミラーゼは α -アミラーゼを主体とするもので pH の影響は殆ど認めることが出来なかつた。

御指導を頂いた北原覚雄先生、御鞭撻を頂いた工業技術院醸酵研究所長務台蔵人氏及びタカジアスターゼを頂いた三共株式会社岡崎浩氏に感謝致します。

(この報告は 1954 年 4 月の日本農芸化学大会において発表したものである。)

(1) 岡崎 : 本誌, 24, 88(1950); 24, 201(1951).	(6) 北原, 村田 醸工, 31, 90 (1953).
(2) 朝井, 養田 : 本誌, 26, 190 (1952).	(7) 田辺, 外村 : 本誌, 28, 227 (1954).
(3) 養田, 茂木, 中村 : 本誌, 29, 115(1955).	(8) 高山 京大食研報, 1, 1 (1949).
(4) 田辺, 島田 : 第 3 回アミラーゼ研究会にて報告 (1951).	(9) 田淵, 小林 : 本誌, 28, 171 (1954).
(5) H. N. TSUCHIYA, J. CORMAN and H. J. KOEPSELL : <i>Cereal Chem.</i> , 27, 332(1950).	(10) 蟹江, 木佐貫 : 本誌, 27, 712 (1953).
	(11) 島田, 杉田, 水本 : 醸工, 31, 498(1953).
	(12) 富金原, 村松 本誌, 27, 398 (1953).

醤油中の L-グルタミン酸の消長について (第 1 報)*

醤油中の L-グルタミン酸の形態及び生成機構について

堀 信一, 小川鉄雄, 青木良平, 近藤安弘, 太田泰弘 (味の素株式会社川崎工場)

昭和 31 年 4 月 13 日 受 理

従来醤油中の L-グルタミン酸は遊離態以外は総て不完全分解物であるペプチド中に存在するものと考えられていた。しかしながら醤油の如き酸性調味液中ではグルタミン酸は常温においても不安定であつて、その一部は次第に脱水してピログルタミン酸に変化するものであり、かつ、その平衡恒数はかなり大きいものであるから、醤油中ではグルタミン酸の一部はピログルタミン酸として存在するものと考えられる。

著者等は先ず醤油中のグルタミン酸の形態を究明し、更に各種形態のグルタミン酸の醸酵過程における消長を明かにするため研究を行つた。本報告では醤油の貯蔵中におけるグルタミン酸の経時減少を確認すると共に、醤油中のグルタミン酸を分析することによつてグルタミン酸が従来考えられていた遊離態とペプチド型との共存状態にあるのではなく、遊離態以外のペプチドが大部分ピログルタミン酸であり、このピログルタミン酸が醸酵初期に著量に存在するグルタミンより由来することが明かにされた。なお本報告における遊離グルタミン酸とはグルタミン酸の各種イオン形態を総称し、又各種グルタミン酸の形態は総て L-型であることを意味する。

実 験

1. 分析方法 本研究に採用した分析方法は次の如くである。

- (1) 全窒素の測定 ケールダール法による。
- (2) アンモニア態窒素の測定 : 酸化マグネシウムを使用した減圧蒸溜法による。
- (3) グルタミン酸の測定 : バイオアッセイ法及び酵素法による。
- (4) 全グルタミン酸の測定 : 醤油中に存在する総ての形態のグルタミン酸の総量を意味する。その測定法は先ず醤油 250 g を採り、濃塩酸を加えて pH を約 1.0 とした後、さらに濃塩酸を約 200 g 加え 110° の温度で 20 時間加水分解する。加水分解物を濾過し、濾過残渣をその 2 倍量の温水で 5 回洗滌し、この洗液を先の濾液と併せて酵素法により定量する。
- (5) ピログルタミン酸の測定 醤油 200 g に濃塩酸を注意しながら加えて pH を約 1.0 に調整し、直ちに無水芒硝 300 g と乾燥珪藻土粉末 200 g とを加えて攪拌し、粉末状抽料を調製する。これを大型ソックスレー固液抽出器を用い、混合溶剤 [ベンゼン : イソプロピルアルコール = 2 : 1 (重量比)] により抽出する。加熱は

* Studies on the Behavior of L-Glutamic Acid in Shōyu. Part. I. Studies on the Various Types of L-Glutamic Acid and Their Formation Mechanism in Shōyu.
By Shinichi HORI, Tetsuo OGAWA, Ryōhei AOKI, Yasuhiro KONDO and Yasuhiro ŌTA
(Kawasaki Factory, Ajinomoto Co., Inc.)

125°の油浴を用い, 10 時間毎に抽出物を取り出し総計 80 時間抽出を行う. この条件での抽出におけるピログルタミン酸のラセミ化は約 1% であるから, 本研究の目的には問題とならない. 抽出物を減圧蒸溜して溶剤を追出し, 残渣を水に溶解して定容とした後, 先ずその一部について遊離グルタミン酸を酵素法によつて定量し, 更に残りの一部を (4) 項の全グルタミン酸の測定法と同様に操作してグルタミン酸を定量する. ピログルタミン酸は抽出全グルタミン酸と抽出遊離グルタミン酸との差として求められる.

(6) ペプチド態グルタミン酸の測定: 醬油 300 g に隣タングステン酸溶液 (30 g/dl) 100 cc を加えこれに塩酸を加えて pH を約 1.0 に調整した後室温で 1 夜放置してから濾過する. 濾過残渣を 8 g/dl の隣タングステン酸溶液 100 cc (pH 1.0) で 2 回洗滌し, この残渣に濃塩酸を加えて常法により加水分解する. 次に加水分解液をアミルアルコール 20, エーテル 25, エチルアルコール 1 (容量比) より成る飽水溶剤を用いて抽出し, 隣タングステン酸を除去する. 抽残液に残留する溶剤をベンゼンを用いて除去した後減圧蒸溜し, 残液より一定量を取つて酵素法によりグルタミン酸を定量する.

(7) グルタミンの測定⁽¹⁾ 乳酸菌を使用するバイオアッセイ法によるグルタミン酸の定量値には共存するグルタミンの値も包含される. しかし試料を先ず pH 6.5 として 100°, 2 時間加熱すると, グルタミンは完全にピログルタミン酸となり, 一方グルタミン酸は殆ど変化を受けることなく残留する. 故に先ず試料を pH 6.5 として 100°, 2 時間加熱処理した後 1 cc を採取し, これと基礎培地 1 cc とを混合し, 110°, 10 分間加熱滅菌してから常法に従い, バイオアッセイ法によつてグルタミン酸を定量する. この定量値を a とする. 別に未処理の試料と基礎培地とを別にゼイツ濾過器に通して除菌した後各 1 cc 宛を混合し, 常法によりバイオアッセイ法でグルタミン酸を定量する. この定量値を b とすればグルタミンは $(a-b)$ として求められる. この場合純グルタミン酸については $\pm 1.6\%$, 純グルタミンについては $\pm 4.5\%$, 又両者混合物中の純グルタミンについては $\pm 4.6\%$ の精度である.

又次の (8) 項によるアミド態窒素の測定によつてもグルタミンが定量される.

(8) グルタミンのアミド態窒素の測定⁽²⁾: 前項に述べた原理に従い, 試料を pH 6.5 において 100°, 2 時間加熱処理してその前後におけるアンモニア態窒素測定値の差を以てグルタミンのアミド態窒素とする.

(9) アスパラギンのアミド態窒素の測定⁽²⁾: タングステン酸ソーダの 10% 溶液を最終濃度が 1 g/dl になるように試料に加えてから pH を 1.2 に調整し, 析出する蛋白質及び塩基性アミノ酸を濾別した後硫酸を添加し, 硫酸の最終濃度が 1 N になるように調整する. この溶液を 100°, 3 時間加熱処理して, 処理前後におけるアンモニア態窒素を定量する. この定量値の差はアスパラギン及びグルタミンのアミド態窒素の和であるから, この値から前記 (8) 項によつて測定したグルタミンのアミド態窒素を差し引いてアスパラギン態窒素とし, これよりアスパラギンを算出する.

2. 試料

(1) 市販醬油: 川崎市内において任意に購入した 1 升瓶詰で, 昭和 30 年 3 月に代表的 3 銘柄 (A_1 , B_1 , C_1) 3 本, 8 月に代表的 4 銘柄 (A_2 , A_3 , B_2 , C_2 , D_1) 5 本のおのおの独立した商品を試料とした. 但し A , B , C , D はそれぞれ各銘柄を示す.

(2) 純醸造試製醬油: 味の素株式会社川崎工場において試製したもので, 仕込後数日のもの 2 種類 (G_1 , G_2), 半年のもの 1 種類 (E_1), 及び 1 年半のもの 1 種類 (F_1) についてそれぞれの醪の搾汁を試料とした. その仕込条件は次の如くであつた.

19° Bé 食塩水	480 l	脱脂大豆又は原大豆	150 kg
小 麦	150 kg	種 麴	丸福種麴 (速醸用)

試料はいずれも開栓後は冷蔵庫内に保有した.

4. 実験方法

実験 (1): 市販醬油 (A_1 , B_1 , C_1) 3 種を無菌室に室温平均 22.5° で放置し, 1 カ月毎に醬油中のグルタミン酸を酵素法で定量し, 醬油中のグルタミン酸の経時変化を調べた.

実験 (2): 市販醬油 (A_2 , A_3 , B_2 , C_2 , D_1) 中の各種形態のグルタミン酸を分析した.

実験 (3): 純醸造試製醬油 (E_1 , F_1) について実験 (2) と同様分析した.

実験 (4): 仕込後 6 日及び 7 日経過した醪 (それぞれ G_1 , G_2) について実験 (2) と同様に分析した.

4. 実験結果

第 1 表 (実験 1) 醬油中のグルタミン酸の経時変化

試料	開栓直後の分析値			グルタミン酸の分析値					
	比重 (°Bé/15°)	pH	全窒素	開栓直後	1 カ月後	2 カ月後	3 カ月後	4 カ月後	5 カ月後
A ₁	22.35	4.70	1.21	0.765	0.760	0.745	0.745	0.713	0.688
B ₁	22.10	4.65	1.20	0.650	0.645	0.630	0.623	0.585	0.575
C ₁	22.00	4.60	1.19	0.695	0.688	0.680	0.680	0.643	0.590
平均	22.15	4.65	1.20	0.703	0.698	0.685	0.681	0.647	0.618
各月の平均温度 (°C)				17.0	19.5	22.0	26.0	28.5	—

第 2 表 (実験 1) 醬油中のグルタミン酸の経時変化の割合 (%)

試料	グルタミン酸の経時変化の割合					
	開栓後	1 カ月後	2 カ月後	3 カ月後	4 カ月後	5 カ月後
A ₁	100.0	99.4	97.4	96.9	93.2	89.9
B ₁	100.0	99.3	96.9	95.9	90.0	88.5
C ₁	100.0	99.0	97.9	97.9	92.5	84.9
平均	100.0	99.2	97.4	96.9	91.9	87.9

第 4 表 (実験 2) 市販醬油中に於ける各種形態のグルタミン酸の含有割合 (%)

試料	全グルタミン酸に対する含有割合				全アスパラギン酸に対するアスパラギンの含有割合
	遊離グルタミン酸	ピログルタミン酸	ペプチド態グルタミン酸	グルタミン	
A ₂	57.8	28.7	—	—	—
A ₃	52.8	37.4	—	—	—
B ₂	45.2	42.6	5.1	0	17
C ₂	45.4	47.1	3.8	0	20
D ₁	66.0	32.4	—	—	—
平均	53.4	37.6	4.5	0	19

第 3 表 (実験 1) 市販醬油中のグルタミン酸その他の分析

試料	比重 (°Bé/15°)	pH	全窒素	アンモニウム態窒素	全グルタミン酸	遊離グルタミン酸	ピログルタミン酸	ペプチド態グルタミン酸	グルタミン酸 (バイオアッセイ)		グルタミン (a)-(b)	全アスパラギン酸 (計算値)	アスパラギン
									ザイツ法 (a)	オートクレープ法 (b)			
A ₂	21.8	4.6	1.25	—	1.36	0.79	0.39	—	—	—	—	—	—
A ₃	22.0 ₅	4.6	1.22	0.156	1.43	0.76	0.54	—	0.86	0.86	0.00	—	—
B ₂	21.9	4.6	1.12	0.148	1.34	0.61	0.57	0.07	0.56	0.64	-0.08	0.46	0.08
C ₂	21.9 ₅	4.6 ₅	1.16	0.150	1.38	0.63	0.65	0.05	0.56	0.68	-0.12	0.48	0.10
D ₁	21.9	4.7 ₅	1.15	0.161	1.37	0.91	0.45	—	0.80	1.00	-0.20	—	—

第 5 表 (実験 3) 純醸造試製醬油中のグルタミン酸その他の分析

試料	仕込後経過月数	比重 (°Bé/15°)	pH	全窒素	全グルタミン酸	遊離グルタミン酸	ピログルタミン酸	ペプチド態グルタミン酸	グルタミン酸 (バイオアッセイ)		グルタミン (a)-(b)	グルタミン (アマイド法)	全アスパラギン酸	アスパラギン
									ザイツ法 (a)	オートクレープ法 (b)				
E ₁	6	22.2	4.8	1.61	2.03	0.92	0.90	—	—	—	—	—	—	—
F ₁	18	21.8	—	1.30	1.64	0.64	0.98	0.07	0.60	0.58	0.02	0.03	0.57	0.16

第 6 表 (実験 3) 純醸造試製醬油中における各種形態のグルタミン酸の含有割合 (%)

試料	全グルタミン酸に対する含有割合				全アスパラギン酸に対するアスパラギンの含有割合
	遊離グルタミン酸	ピログルタミン酸	ペプチド態グルタミン酸	グルタミン	
E ₁	45.4	44.6	—	—	—
F ₁	39.3	59.5	4.6	0.0	28.1

第 7 表 (実験 4) 醗の早期搾汁中のグルタミンの分析

試料	仕込後経過日数	比重 (°Bé/15°)	全窒素	アンモニウム態窒素	グルタミン酸 (バイオアッセイ)		グルタミン	
					ザイツ法 (a)	オートクレープ法 (b)	バイオアッセイ法 (a)-(b)	アマイド法
G ₁	6	21.7	0.86	0.047	0.94	0.37	0.57	0.44
G ₂	7	21.9	0.96	0.053	1.11	0.43	0.68	0.43

ル酸、コハク酸、乳酸及びアンモニウムイオン等はその含有量が僅少であるため、醬油中のグルタミン

酸を酵素法で測定する際のこれら夾雑物による阻害は殆ど無視してよいことを確認した。故に本実験における酵素法による定量値の信頼度はかなり高いものと考えられる。又バイオアッセイ法によるグルタミン酸の定量値は現在低級のペプチド等に対する乳酸菌の活性の程度が十分明かにされていないため多少の疑点を有しているが、しかし同一試料に対する処理前後の定量値の比較の場合には高い信頼度をもつものと考えられる。

さて、実験 (1) によつて醬油を長期間貯蔵する時にはグルタミン酸の含有量は次第に減少して行くことが判明した。この場合試料は市場において任意に求めた商品であるから、少くとも火入れ、瓶詰めを行つた後、この変化は無菌的乃至非酵素的に絶えず進行し続けたものと考えられる。然して実験 (2) により実験 (1) と同様

以上いずれの実験結果においても分析値は g/dl を以て表わし、且つ各種形態のグルタミン酸の濃度はグルタミン酸に換算して記載した。

考 察

著者等は別の研究により醬油醸造の際の代謝産物として醬油中に存在すると推定される α-ケトグルター

任意に求めた醤油の分析によつてグルタミン酸の大部分が遊離のグルタミン酸とピログルタミン酸とから成ることが明かになったので、貯蔵中減少したグルタミン酸はピログルタミン酸に変化したものと推定される。pH 4.6 ~ 4.8 では

の可逆反応において平衡状態ではピログルタミン酸の存在量が 95% に達する所から、実験(2)における段階ではこの変化はなおかなりの速度をもつて右側に進行しているものと解釈される。WILSON 及び CANNAN⁽³⁾ による

$$k_1 + k_2 = \frac{1}{t} \ln \frac{k_1 a}{k_1 a - (k_1 + k_2)x} \quad \left(\text{但し } a \text{ はグルタミン酸の初濃度, } t \text{ は反応時間, } x \text{ は } t \text{ 時間後のピログルタミン酸の生成率を示す.} \right)$$

の式に従つて実験(2)に於けるグルタミン酸とピログルタミン酸との含有比率を実験(1)にも適用しうるよう仮定し、且つ活性エネルギーを平均 23 kcal/モル として速度恒数 k_1 を計算すれば次の如くなる。

	$k_1(22.5^\circ)$	$k_1'(22.5^\circ)$	即ち著者等と WILSON 及び CANNAN との両計算値
		(WILSON 及び CANNAN による)	は実験精度の検討の結果実験誤差の範囲内で一致する
A ₁	2.3×10^{-5}	5.2×10^{-6}	といいうことが明かとなつた。要するに醤油中のグル
B ₁	$(3.9 \times 10^{-5})^*$	5.6×10^{-6}	タミン酸は貯蔵中常温においても絶えず変化してピ
C ₁	2.6×10^{-5}	6.3×10^{-6}	ログルタミン酸になることは誤りがないと思われる。
平均	2.5×10^{-5}	5.7×10^{-6}	

(但し pH は平均 4.7, k は 1 時間当りの値で示す)

* pH と k_1 との関係を図表で示した場合、この数値は著しい偏倚を示したので平均値の計算から除外した。

従来醤油中のグルタミン酸は遊離態以外はこれとほぼ同量のペプチド態から成るものとせられていた⁽⁵⁻⁷⁾。然るに著者等は実験(2)においてペプチドとして存

在するグルタミン酸は極めて微量であつて、その量は全グルタミン酸の僅か 5% に過ぎず、残部は従来知られていた遊離態を除けば他は殆ど全部ピログルタミン酸として存在し、その量は醤油の種類によつて多少異なるが、遊離グルタミン酸の半量乃至は同量に達することを知つた。

この関係は実験(3)に示されるように純醸造醤油にも全く同様に適用されるが、著者等の実験例ではピログルタミン酸の存在量は市販醤油よりも遙かに高率であり、F₁ の如きは実に遊離グルタミン酸の 1.5 倍にも達している。このような差異は結局の所近代醤油工業に入取られた化学処理に原因するものと考えねばならないであろう。醸造醤油中のピログルタミン酸の含有量の高いことは火入れの条件を考慮に入れてもグルタミン酸とピログルタミン酸との平衡の反応速度論的解釈では到底納得出来ない程のものである。

ピログルタミン酸はグルタミン酸と平衡関係を保つのみでなくグルタミンからも生成される。実験(2)及び(3)においては、醤油中にグルタミンの存在を確認することが出来なかつた。然しグルタミン酸はアスパラギン酸と同様に蛋白質の酵素分解物中にはアミドとして多量に存在するので⁽⁴⁾、又事実アスパラギンは実験(2)及び(3)において明かに全アスパラギン酸の約 20% に達する存在量が確認されているので、グルタミンは恐らく醸造中に一旦生成せられ、然る後にピログルタミン酸に変化するに相異ないと考え、実験(4)を行うに至つた。本実験において仕込後 1 週間の醗の搾汁を分析した結果、予期した如くグルタミンが遊離グルタミン酸と同量乃至 1.5 倍量も存在することを知つた。これらの結果から醤油醸造の初期においてはグルタミンが大量に生成せられるが、後期においてはグルタミンは消失し、終局的には遊離のグルタミン酸とピログルタミン酸となつてしまうことが明確となつた。従つてこの場合グルタミンは醸造中次第にピログルタミン酸に変化して行くに相異ないと考えられる。

要するに醤油中に多量に存在するピログルタミン酸はグルタミン酸からのみならずグルタミンからも生成せられるものと推定されるが、これを図にて示すと次のようになる。

この式においてグルタミン酸とピログルタミン酸との平衡における k_1 , k_2 を実験(1)の資料から、又グルタミンからピログルタミン酸へ進む反応における k_3 を VICKERY 等の資料⁽²⁾からそれぞれ pH 4.7, 温度 20°, 1 時間当りという条件で計算すると

$$k_1 = 3.8 \times 10^{-6}, \quad k_2 = 2.1 \times 10^{-7}, \quad k_3 = 2.7 \times 10^{-4}$$

$$\therefore k_3/k_1 \approx 72$$

となる。これから推定すると、醤油の醸造及び貯蔵中に生成されたグルタミン酸のピログルタミン酸への移行は 1 年経過しても約 15% であるのに対し、同期間に生成されたグルタミンのピログルタミン酸への移行は僅か数カ月を経過するのみで殆ど完結するということになる。従つて一般の市販醤油中にグルタミンの存在を認め得ないことは当然であり、又含有されるピログルタミン酸の大部分はグルタミンに由来するという事も出来る。

以上の検討によつて、従来醤油醸造における経過はグルタミン酸に関する限り

の如く考えられていたのに対し、著者等はこれに補足して次の如き経過を辿るものと推定するに至つた。

醸造中には恐らくグルタミナーゼも存在するに相異ないと考えられるから上図に示す如くグルタミンよりグルタミン酸の酵素反応も予想される。然し一般にグルタミナーゼの至適 pH は 7~8 であるから、醸造中の pH 4.6 ~ 4.8 におけるこの反応の速度は極めて微弱であり、果してグルタミンがグルタミン酸の生成に大きく寄与しているかどうかは疑問である。第 2 報においてはこの問題も含め、醸造中における各種型態のグルタミン酸の消長を追跡して著者等の見解を確認してみる予定である。

要 約

(1) 市販醤油並びに純醸造醤油について各種型態のグルタミン酸を分析し、これら相互間の関係を明かにした。

(2) 醤油中に存在する全グルタミン酸の中、遊離態とピログルタミン酸態とは併せて 90% 以上に達し、ペプチド態として存在する量は僅か数%に過ぎない。

(3) 仕込醗の醗酵初期においてはグルタミンが多量に生成され、その量は遊離グルタミン酸の量と大差がない。

(4) 醤油中のピログルタミン酸は醸造過程中に大部分グルタミンより非酵素的作用によつて生成されるが、又一部はグルタミン酸より同様の作用によつても生成される。

(5) 醤油中のグルタミン酸は貯蔵中も絶えずピログルタミン酸への変化を続け、次第に減少する。

(6) グルタミン酸に関する限り、醤油醸造中における変化は次の如く考えられる。

(7) 醤油中には遊離のアスパラギン酸の外にアスパラギンも存在する。

終りに本研究について種種御指導を戴いた東京大学教授坂口謹一郎先生、並びに実験に種種御援助を戴いた角田俊直、日野哲雄、成井喜久子の 3 氏に深甚な感謝を捧げると共に、本研究の発表を許可された味の素株式会社に対して敬意を表する次第である。

(本研究の要旨は昭和 31 年 2 月の日本農芸化学会関東支部例会にて発表した。)

(1) H. A. HARPER : *Arch. Biochem.*, 15, 433 (1947).

(2) H. B. VICKERY, G. W. PUCHER, H. E. CLARK, A. C. CHIBNALL, R. G. WESTALL : *Biochem. J.*, 29, 2710 (1935).

(3) H. WILSON, R. K. CANNAN : *J. Biol. Chem.*, 119, 309 (1937).

(4) M. DAMODARAN, G. JAABACK, A. C. CHIBNALL : *Biochem. J.*, 26, 1704 (1932).

(5) 角田俊直, 石塚善太郎, 宮沢 滋, 田村学造 : 本誌, 26, 477 (1952).

(6) 市川邦介 *醸工*, 33, 198 (1955).

(7) 高田亮平 *醸造学*, 12, 497 (1934).