

麴納豆（塩納豆, 浜納豆, 大徳寺納豆）に含まれる 総アミノ酸および遊離アミノ酸の分析

大槻 耕三・久保山 晶子・遠藤 英子・佐藤 健司・中村 孝志

Analyses of total and free amino acids in Koji-Natto (Shio-natto, Hama-natto and Daitokuji-natto)

KOZO OHTSUKI, AKIKO KUBOYAMA, EIKO ENDO, KENJI SATO and YASUSHI NAKAMURA

Abstract: Free amino acids and total amino acids (6N-HCl hydrolysate at 150°C for 1 hr) in koji-nattos were analyzed with an HPLC-amino acid analyzer using lithium citrate buffers and ninhydrin reagent. Amino acids in Kinako and Itohiki-natto were also analyzed under the same condition as that of koji-natto for the comparisons of the amino acid composition among the soybean products. The contents of free amino acids in Kinako was the least among the soybean products analyzed. The compositions and the contents of total and free amino acids in Itohiki-natto and Shio-natto were alike. The ratio of the free amino acid to the total amino acid was low in Kinako, and was higher in Itohiki-natto, Miso, Daitokuji-natto, Shio-natto, and Hama-natto in these order. The ratio in Hama-natto was as high as 0.24, and this high free-amino acid content should enhance the good tastes of this fermented product. (Accepted September 11, 2000)

I 緒 言

大豆加工品にはきな粉, 豆乳, 豆腐, オカラ, 油揚げ, 凍り豆腐, 湯葉などの非発酵加工食品と, 納豆, 味噌, 醤油, テンペーなどの発酵食品とに分類される。

非発酵の大豆加工品は外見上軟かく消化よく加工されていても, その化学成分中にイノシトール六リン酸(フィチン酸)を含むため食品中のカルシウム, マグネシウムなどのミネラルや鉄, 亜鉛など栄養上重要な微量元素を不動態にして大変な損失となる場合がある。一方発酵性大豆加工食品は, 組織タンパク質などを人間が消化し易い型に変えられていると考えられる¹⁾。しかし, 発酵大豆加工品のなかでも糸引納豆の場合は未だフィチン酸が残存し微量栄養摂取の際の障害になっている²⁾。その他の大豆発酵食品の味噌, 醤油, テンペーなどは発酵中に種々の微生物が作り出す酵素フィターゼが作用して, フィチン酸が分解されている^{3, 8, 9)}。

本研究では, これら各種大豆加工食品中の総アミノ酸量と遊離アミノ酸量をアミノ酸自動分析器で精密に分析

定量し, それぞれを比較検討した。各種食品中の総アミノ酸についてはすでに科学技術庁資源調査会によって日本食品アミノ酸組成表が発表されているが¹⁰⁾, 遊離アミノ酸についてはそれらの情報は得られない。遊離アミノ酸は多くの食品において, それらの味を決定する成分であって, 特に日本緑茶の煎茶, 玉露, 抹茶などの場合テアニン, グルタミン酸などが重要視されている¹¹⁾。植物性食品の場合, そのタンパク質組成中にはだいたいグルタミン酸やアスパラギン酸が多く含まれ, それが分解されて遊離状になって味覚を刺激するものである。各種の発酵食品においても, 発酵が進行するにつれてプロテアーゼが働きタンパク質が加水分解されて遊離アミノ酸が生成されて来る。大豆加工食品の場合を考えると, きな粉のように発酵過程の無いものは味があまり感じられない。また豆乳や豆腐, 高野豆腐の場合も同じく発酵過程が無く味が少ないものである。しかし発酵製品であっても糸引き納豆は, 味噌, 醤油, 麴納豆(寺納豆ともいわれる)に比べ, いわゆる旨味が少ない。糸引き納豆はいわゆる無塩発酵食品であってテンペーなどと同種で

あるが、無塩であるので最近流行している健康食品の一つとして再評価を受けている¹⁾。一方、加塩発酵大豆食品は食塩が多く含まれるという短所の他に発酵によりアンモニアが多くなるという問題もある²⁾。糸引き納豆や塩納豆では比較的硝酸イオンが少なく、食塩量も少なく発酵期間も短いという特徴を持つ。特に塩納豆では麴の甘みと旨味をもっていて、東北地方では冬に保存食として使用されてきたものである。

II 実験材料および方法

(1) 実験材料

本実験の材料として三種の麴納豆（山形県酒田市の塩納豆，静岡県浜松市の浜納豆，京都市の大徳寺納豆）と，比較のために市販の米味噌，糸引き納豆，非発酵大豆加工品としてきな粉を使用した。それぞれ試料の水分，食塩含量，純タンパク質含量をTable 1に示す。各種麴納豆の製造法は前報に記した²⁾。

Table 1. Composition of Soybean Products

	water	NaCl ^{*1}	Protein ^{*2}
Kinako	1.5%	0.003%	32.0%
Miso	57.5	9.5	13.4
Natto	55.4	0.1	13.6
Shio-natto	64.2	4.1	16.0
Hama-natto	34.5	27.6	34.5
Daitokuji-natto	21.3	31.5	21.8

*1. Determined by a Na-ion meter method.

*2. The sum-total values from Table 2~4.

(2) 試料の前処理

各種資料はFig. 1に示したように重量比で1:19の割合で水を加え乳針でよく磨砕し，けん濁液0.500gを分取してミニ試験管（1.0φ×5cm）に入れ，この試験管4本ごと25ml容ミニナートバルブバイアルに入れ，6N塩酸0.5mlをバイアルの底部に入れ，真空ポンプで3分間吸引しバルブを閉じる。バイアルの肩部まで150℃のヒートブロックに入れ1時間，塩酸蒸気による加水分解を行う^{3, 4, 7)}。回収率の補正を行うために内部標準物質としてのα-アミノアジピン酸の一定量を加水分解前に加えておく。

残りのけん濁液は内部標準を加え超音波（ブランソン社製220型）に5分間かけ充分抽出し，遠心分離する。上澄液をさらにアドバンテック社製メンブランフィルター（0.45μm孔，13mmφ）でろ過し，これを直接アミノ酸分析機に注入し，定量値を遊離アミノ酸量とする。PITCでアミノ酸を誘導体にしてHPLCで分析する感度が良い方法⁴⁾もあるが本研究では前処理が容易である次の方法によった。

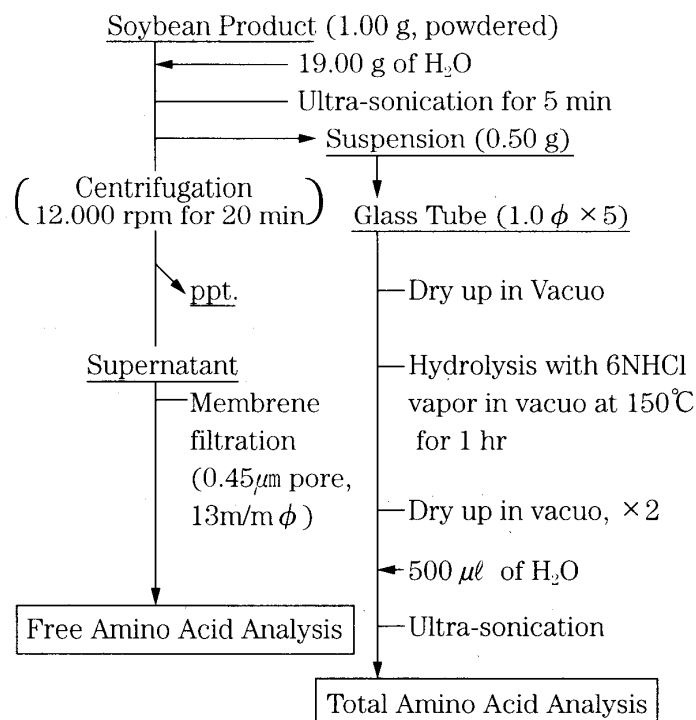


Fig. 1. Preparation of Extract and Hydrolysate of Soybean Product for the Analyses of Free Amino Acid and Total Amino Acid.

(3) アミノ酸分析法

遊離アミノ酸は，食品中では種々のアミノ酸が存在するため，ナトリウム・バッファー系のアミノ酸分析法⁵⁾より，リチウム・バッファー系のアミノ酸分析法の方がより完全に分析定量できる^{3, 6)}。分析用のカラムはカチオン交換樹脂（Mitsubishi CK-10U，0.46φ×15cm）で37℃に保温する。

第1バッファーは前回³⁾同様，塩化リチウムを含まないバッファー（0.15 NLi⁺，pH 2.75，クエン酸バッファー，Li₃C₆H₅O₇·4H₂O 12.1 g，C₆H₈O₇·H₂O 43.5 g，エタノール33ml，チオジグリコール 5 ml，カプリル酸 0.1ml/l）でスタートから57分まで流し，第2バッファーは0.25 NLi⁺，pH 3.6（Li₃C₆H₅O₇·4H₂O 9.8 g，LiCl 6.36 g，C₆H₈O₇·H₂O 12.0 g，エタノール30ml，チオジグリコール 5 ml，カプリル酸0.1ml/l）で82分まで流し，第3バッファー（0.81 NLi⁺，pH 3.40，Li₃C₆H₅O₇·4H₂O .8 g，LiCl 29.6 g，C₆H₈O₇·H₂O 12.0 g，カプリル酸0.1ml/l）は92分まで流した。その後第4バッファー（1.0 NLi⁺，pH 10.0，第3バッファー+LiOH·H₂O 7.4 g +Li₂B₄O₇ 0.422 g/l）でヒスチジン，アンモニア，リジン，アルギニンを溶出し，その後0.2N水酸化リチウムでカラムを5分間洗浄し，再び第1バッファーを15分間流して，次の分析スタート準備を完了する。各バッファーの流速は0.5ml/minでニンヒドリン溶液は反応槽の閉塞事故の少ない三塩化チタンを還元剤（25%TiCl₃ 0.68ml/400mlニンヒドリン溶液）として使用した。ニンヒドリン溶液

の流速は0.25ml/minである。

Ⅲ 結果および考察

今回の実験に使用した各種試料の水分，食塩，タンパク質の各重量をTable 1に示した。食塩量の測定は前報²⁾と同様にナトリウムイオン電極法によって行った。乾物量に対する食塩の含有率は浜納豆42.1%，大徳寺納豆40.0%で多く，次で味噌22.4%，塩納豆11.5%，で中位であり，納豆0.2%，きな粉0.003%で最小であった。

タンパク質量はTable 2から4の総アミノ酸量から計算したものでキエルダール法によるよりも，より正確な値を表わしている。これを乾物量に対する含量を計算してみると浜納豆52.7%，塩納豆44.7%，きな粉32.5%，納豆30.5%，大徳寺納豆27.7%，味噌23.3%の順になり，タンパク質，ペプチド，遊離アミノ酸を含めた総量が多い順となっている。Table 2にはきな粉と味噌の総アミノ酸と遊離アミノ酸量を示す。きな粉の遊離アミノ酸は合計で0.58mg%と少なく，Fig. 2 (B)にも示すように発酵食品と異なって大豆の貯蔵タンパク質がプロテアーゼ，ペプチダーゼ等によって加水分解を受けていないことを示している。味噌では遊離アミノ酸が総アミノ酸の17.0%もあり，これが味噌の味覚に大きく寄与しているものと考えられる。Table 3には，系引き納豆と塩納豆

Table 2. Total and Free Amino Acids in Kinako and Miso.

	Kinako		Miso ^{*1}	
	Total amino acid ^{*2}	Free amino acid ^{*3}	Total amino acid ^{*2}	Free amino acid ^{*3}
	(%)	(%)	(%)	(%)
Asp	4.49	0.083	1.77	0.19
Thr	1.29	0	0.46	0.07
Ser	1.72	0.004	0.60	0.12
Asn	—	0	—	0
Glu	7.20	0.035	2.82	0.34
Gln	—	0	—	0.01
Pro	1.87	0	0.68	0.12
Gly	1.48	0.007	0.71	0.08
Ala	1.47	0.25	0.73	0.14
Val	1.12	0.015	0.89	0.12
Cys	0.17	0.016	0.05	0.003
Met	0.31	0.007	0.04	0.03
Ile	1.53	0	0.84	0.12
Leu	2.74	0.005	1.17	0.21
Tyr	0.46	0.021	0	0.14
Phe	1.60	0.033	0.94	0.17
His	1.00	0.041	0.49	0.04
Lys	1.05	0.057	1.07	0.17
Arg	2.49	0.231	0.18	0.21
Sum Total	31.99	0.58	13.44	2.28

*1 Rice-koji miso.

*2 Hydrolysate with 6N HCl-vapor at 150°C for 1 hr.

*3 Water soluble amino acid.

Table 3. Total and Free Amino Acids in Natto and Shio-natto.

	Natto ^{*1}		Shio-natto ^{*2}	
	Total amino acid	Free amino acid	Total amino acid	Free amino acid
	(%)	(%)	(%)	(%)
Asp	1.72	0.11	1.95	0.16
Thr	0.49	0.15	0.53	0.09
Ser	0.58	0.18	0.68	0.14
Asn	—	0	—	0
Glu	3.58	0.76	3.18	0.48
Gln	—	0.03	—	0.39
Pro	0.69	0.21	1.00	0
Gly	0.60	0.14	0.73	0.10
Ala	0.58	0.18	0.82	0.14
Val	0.52	0.31	0.98	0.20
Cys	0.07	0	0.04	0.01
Met	0.14	0.12	0.16	0.06
Ile	0.71	0.34	0.91	0.22
Leu	1.10	0.69	1.50	0.33
Tyr	0.27	0.40	0.17	0.18
Phe	0.73	0.60	1.23	0.32
His	0.44	0.34	0.53	0.16
Lys	0.55	0.20	1.05	0.27
Arg	0.78	0.06	0.52	0.17
Sum Total	13.55	2.29	15.98	3.42

*1 Itohiki-natto.

*2 Koji-natto or Hishio-natto.

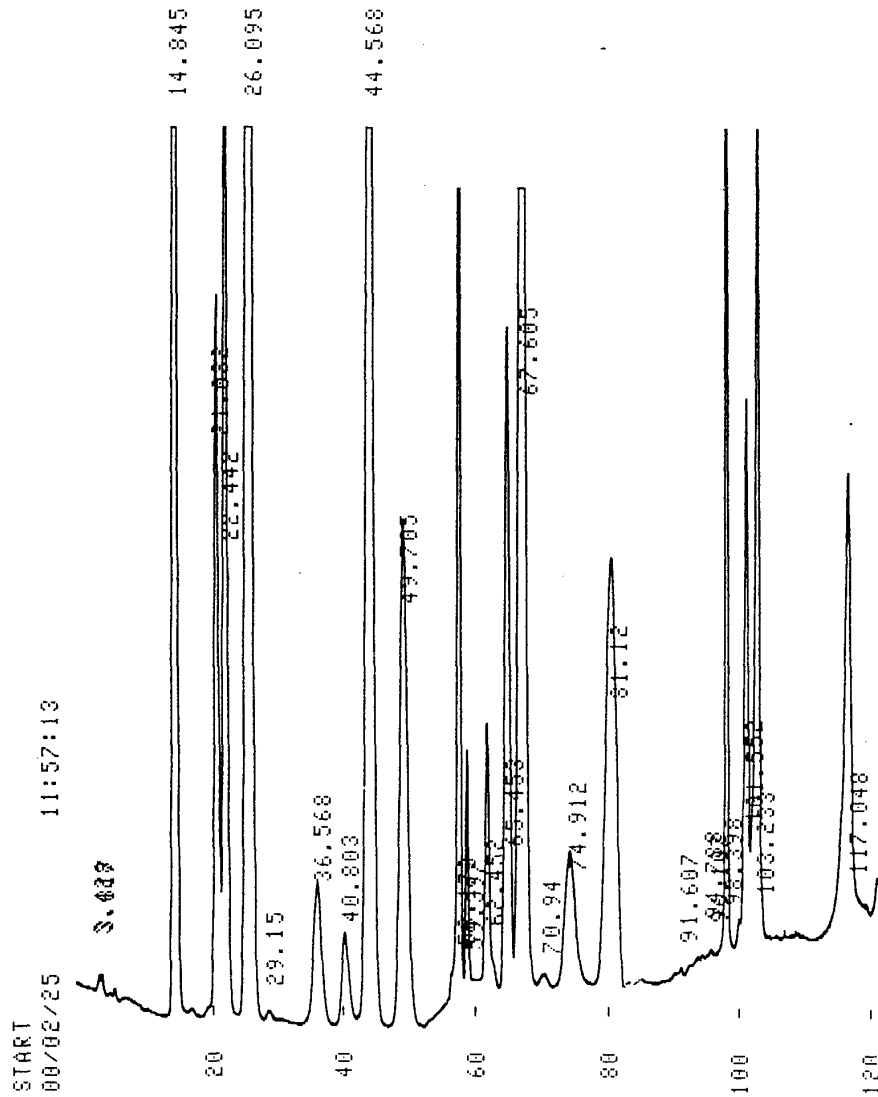
Table 4. Total and Free Amino Acids in Hama-natto and Daitokuji-natto.

	Hama-natto ^{*1}		Daitokuji-natto ^{*2}	
	Total amino acid	Free amino acid	Total amino acid	Free amino acid
	(%)	(%)	(%)	(%)
Asp	3.96	0.26	2.45	0.39
Thr	1.33	0.41	0.79	0.12
Ser	1.64	0.50	0.90	0.19
Asn	—	0	—	0.01
Glu	6.90	1.65	4.86	0.60
Gln	—	0	—	0.01
Pro	1.67	0.67	1.69	0.76
Gly	1.64	0.24	1.07	0.12
Ala	2.25	0.93	1.27	0.33
Val	2.13	0.55	1.44	0.27
Cys	0.23	0.01	0.06	0.01
Met	0.30	0.04	0.14	0
Ile	2.02	0.60	1.16	0.25
Leu	3.19	0.98	1.96	0.36
Tyr	0.59	0.16	0.39	0.17
Phe	1.88	0.48	1.37	0.29
His	0.83	0.10	0.63	0.07
Lys	1.57	0.43	0.92	0.19
Arg	2.36	0.17	0.69	0.24
Sum Total	34.49	8.18	21.79	4.09

*1 Tera-natto produced in Hamamatsu.

*2 Tera-natto produced in Kyoto.

(A) Total amino acid, Kinako



(B) Free amino acid, Kinako

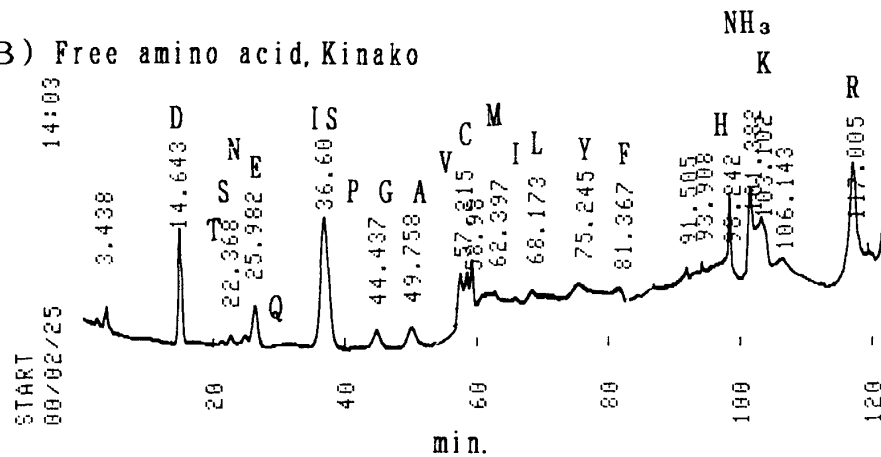
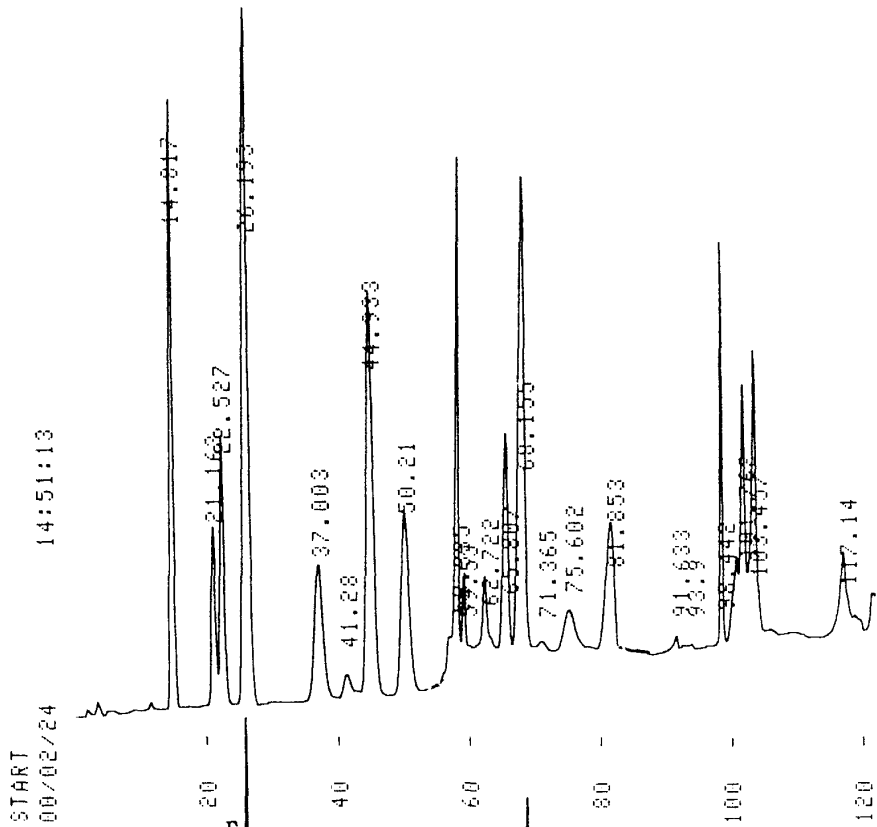


Fig. 2. Chromatogram of Total and Free Amino Acids in Kinako.

(A) 6N-HCl vapor hydrolysate.

(B) Water-extracted and filtered with ADVANTEC membrane filter (Cellulose Nitrate, 0.45 μ m pore, 13m/m ϕ). D, Asp. T, Thr. S, Ser. N, Asn. E, Glu. Q, Gln. IS, Internal Standard (α -amino adipic acid). P, Pro. G, Gly. A, Ala. V, Val. C, Cys. M, Met. I, Ile. L, Leu. Y, Tyr. F, Phe, H, His. L, Lys. R. Arg.

(A) Total amino acid, Hama-natto



(B) Free amino acid, Hama-natto

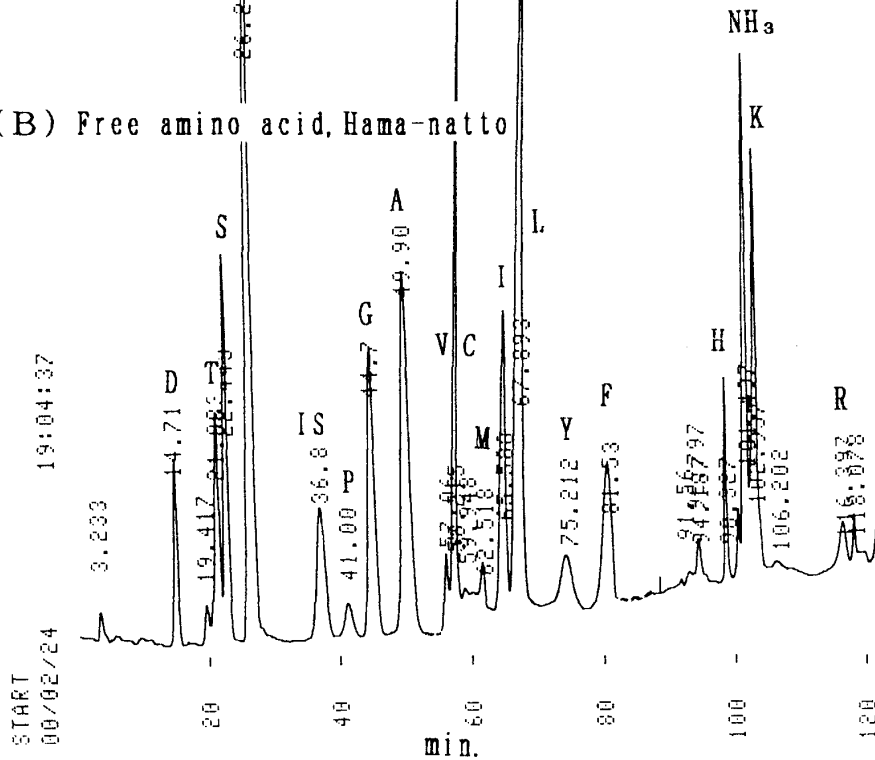


Fig. 3. Chromatogram of Total and Free Amino Acids in Hama-natto.

(A) 6NHCl vapor hydrolysate.

(B) Water-extracted and filtered with ADVANTEC membrane filter (Cellulose Nitrate, 0.45 μm pore, 13m/m φ).

のアミノ酸分析の結果を示した。糸引き納豆ではほぼ味噌と同程度の遊離アミノ酸が生成しているが、塩納豆では21.4%にも遊離アミノ酸が生成している。糸引き納豆それだけで味覚試験した限りでは、味噌や塩納豆ほど旨味を感じない。これは糸引き納豆には食塩又はナトリウムイオンがかなり少ないため遊離グルタミン酸が0.76%と多いにもかかわらず旨味を引き出せていないとも考えられる。Fig. 3には浜納豆のアミノ酸分析チャートを示した。この図の(B)から観察されるようにほとんどの種類のアミノ酸が発酵により生成していることがわかる。図(A)と比べると、アミノ酸組成がよく似ているが、(B)のそれには、アスパラギン酸とグリシンの生成が少ない。Table 4の合計から、浜納豆の遊離アミノ酸の総アミノ酸に対する割合は約24%にもなり、今回分析した試料のうちでもっとも高い値であった。またこの浜納豆のグルタミン酸の遊離率も0.24であって他の試料(最低はきな粉の0.005)よりも最も高い値であった。他の試料のグルタミン酸遊離率は納豆0.21, 塩納豆0.15, 大徳寺納豆0.13, 味噌0.12であったが、これら試料は全て市販品であったので、化学調味料のMSGが加えられている可能性もある。また、塩納豆の場合は昆布の細切りが少量加えてあったので遊離グルタミン酸が多く定量された可能性も否定できない。これらの点を明確にするには麴納豆を自作することにより、条件をそろえ発酵のみによる遊離アミノ酸生成量を分析する必要があると思われる。

IV 要 約

各種、麴納豆(塩納豆, 浜納豆, 大徳寺納豆)に含まれる総アミノ酸(6N塩酸, 150°C, 1時間加水分解物)および遊離アミノ酸(水抽出アミノ酸)をクエン酸 Li 緩衝液イオン交換樹脂法とニンヒドリン発色法によるHPLC-アミノ酸分析機で分析, 定量した。麴納豆のアミノ酸組成の比較のために, きな粉, 味噌, 糸引納豆も同じ前処理条件で操作しアミノ酸分析した。総アミノ酸分析のための加水分解には1.0φ×5cm試験管に各試料を入れ, 6N塩酸0.5ml入れたミニナートバルブ容器(25ml)中にその試験管を2本入れ真空にし, 150°C, 1時間加熱した。きな粉はこれら大豆加工食品中で最も加工度が低いものであるが, 他の発酵食品より水分, 食塩などの含量が低いにもかかわらず遊離アミノ酸含量が0.58%程度であった。きな粉の総アミノ酸量はほぼタンパク質由来と考えられる。糸引き納豆と塩納豆は製造法が似ているものであるが総アミノ酸含量, 遊離アミノ酸含量とも各アミノ酸の組成が類似していた。

総アミノ酸合計量に対する遊離アミノ酸合計量の比率はきな粉, 糸引き納豆, みそ, 大徳寺納豆, 塩納豆, 浜納豆の順に高くなり, 加工度, 発酵度合に比例して増加していた。また, 総グルタミン酸量に対する遊離グルタ

ミン酸量の比率は浜納豆の24%が最高で風味に強く影響を与えていた。

本研究は平成10~12年度文部省科学研究費基盤研究(c)の御援助によって行われた。

文 献

- 1) 相田 浩, 上田誠之助, 村田希久, 渡辺忠雄編, アジアの無塩発酵大豆食品, STEP (1985)
- 2) 大槻耕三, 久保山晶子, 佐藤健司, 中村孝志, 「各種の麴納豆中に含まれる総カルシウム, 遊離カルシウム, りん酸, フィチン酸および硝酸の分析」, 京都府大・学術報告, 人環・農, 第51号, p.1~4, (1999)
- 3) 大槻耕三, 奥野 忍, 谷田恭子, 佐藤健司, 中村孝志, 「抹茶の総アミノ酸および遊離アミノ酸のHPLC-アミノ酸分析機による分析」, 京都府大・学術報告, 人環・農, 第50号, p.27~32, (1998)
- 4) K. Sato, Y. Tsukamasa, C. Imai, K. Ohtsuki, Y. Shimizu, M. Kawabata, 「Improved Method for Identification and Determination of ϵ -(γ -Glutamyl) Lysine cross-Link in Protein Using Proteolytic Digestion and Derivatization with PITC followed by HPLC Separation」, J. Agric. Food Chem., **40** #5, p.806~810, (1992)
- 5) S. Moore, D.H. Spackman and W.H. Stein, 「Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins」, Anal. Chem., **30**, p.1185 (1958)
- 6) K. Ohtsuki, M. Kawabata, H. Kokura and K. Taguchi, 「Simultaneous Determination of S-Methylmethionine, Vitamin U and Free Amino Acids in Extracts of Green Tea with an HPLC-Amino Acid Analyzer」, Agric. Biol. Chem., **51**, 2479 (1987)
- 7) 小林龍二, G.E. Tarr, 「マニュアル・エドマン分解による蛋白質の一次構造決定法」, 蛋白質, 核酸, 酵素, **17**, p.911 (1986)
- 8) 渋谷直美, (河端 信, 佐藤健司, 大槻耕三), 「オカラを固体培地として培養したR. Oligosporusの産生するフィターゼの精製と性質」, 京都府大, 生活科学部食物学科卒業論文 (1993)
- 9) 荒木俊江, 岡本淳子, (河端 信, 佐藤健司, 大槻耕三), 「おからTempeh中のフィターゼの抽出, 精製及び高食物繊維食品への利用」, 京都府大, 生活科学部食物学科卒業論文 (1994)
- 10) 科学技術庁資源調査会編「四訂, 食品成分表」, 日本食品アミノ酸組成表