

長野県諏訪湖産蜆の蛋白質を構成するアミノ酸の分離について

土屋 智明* 保坂 四郎**

(信州大学 教育学部化学研究室)

緒 言

軟体動物の栄養素・アミノ酸その他の成分研究は、従来から相当行われているが、蜆 *Corbicula atrata* の蛋白質を構成するアミノ酸の種類に就ては、未だ不明の点が多いので、これらを明らかにするために、この研究を行つた。本研究の目的は、蜆の栄養素特にその蛋白質を構成しているアミノ酸を分離確認することである。

軟体動物のアミノ酸に就ては、生肉エキスより分離した文献が大部分であるが、本研究では、種々のアミノ酸分離法に検討を加え、Brazier 銅塩法を用いると共に、各アミノ酸の確認には、ペーパー・クロマトグラフ法を併用した。

試料は、長野県諏訪湖産のもので、栄養素分析には、採取期日五月中旬のものを、アミノ酸分離には、同じく八月下旬のものを用いた。

前 篇 栄 養 素 分 析

I 試料の調製

試料の蜆は、水分定量を除いては、生のまま剥身にして、90~95°の恒温槽中で乾燥し、風乾状態としたものを粉碎混合して均一なものとした。

II 水 分

あらかじめ恒量値を得た秤量瓶に試料 7.1333g を採り、95~98°の恒温槽中で3時間乾燥し、30分間毎に秤量して恒量値を求めた。

$$\begin{aligned} \text{水分} &= \text{最初の重量 (試料+秤量瓶)} - \text{乾燥恒量後の重量} \\ &= 30.7196 (7.1333 + 23.5863) - 25.9496 = 4.7000 \end{aligned}$$

$$\text{水分\%} = \frac{\text{水分のg数}}{\text{試料のg数}} \times 100 = \frac{4.7000}{7.1333} \times 100 = 66.7$$

III 総窒素並びに粗・純蛋白質量

1. Kjeldahl 法の理論⁴⁾

窒素化合物に濃硫酸を加え、加熱沸騰させるとき、分解と同時に酸化還元が起り、窒素はアンモニアとなり、硫酸アンモニアの形となつて濃硫酸中に存在する。これを水で

* 信州大学助教授

** 信州大学学生

稀釈して過剰の濃苛性ソーダを加えて熱すれば、アンモニアは追い出される、このアンモニアを一定濃度の硫酸標準液に導入し、過剰の酸を標準バリタ水で滴定する。

- (a) 硫酸は有機物を脱水してこれを炭化する。
- (b) この炭素は硫酸を還元して SO_2 を生ぜしめ自らは CO_2 となる。
- (c) 有機物の分解炭化にあつては生成する水素は NH_3 の生成を大いに促進する。
- (d) NH_3 は直ちに硫酸と化合して硫酸アンモニアとなる。
- (e) 濃硫酸に酸化剤として硫酸カリを添加すれば、次の反応が起る。



しかし、この様な高温では、 H_2O 、 SO_3 は追い出されるために (e) の反応を繰返し、溶液はますます濃厚となり有機物に対する作用はいよいよ激しくなる。

2. 総窒素並びに粗蛋白質量⁵⁾

風乾粉碎した試料 0.4721g を 300cc フラスコに採り、濃硫酸 20cc、硫酸カリ 10g を加え、これをドラフト室中で徐々に加熱し、泡沫が発生しなくなつてから、更に 4 時間加熱すると液は透明になつた。放冷後、蒸留水を加えて内容物をワグナー蒸溜装置に移し、40% 苛性ソーダを加え強アルカリ性として直ちに蒸溜を行い、溜出液は 0.845N の硫酸標準液 20cc を入れた受器中に導入し、蒸溜フラスコの 2/3 を溜出した後、リトマス試薬を指示薬として 0.119N のバリタ標準液で中和滴定したところ 128.3cc 要した。

$$0.845\text{N}-\text{H}_2\text{SO}_4 20\text{cc} = 0.119\text{N}-\text{Ba}(\text{OH})_2 142\text{cc}$$

$$\text{滴定に要した Ba}(\text{OH})_2 \cdots \cdots 128.3\text{cc}$$

蒸溜による NH_3 を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ にするのに消費された H_2SO_4 …硫酸をバリタに換算… $142 - 128.3 = 13.7\text{cc}$

$$1\text{cc Ba}(\text{OH})_2 = 0.001666\text{gN}$$

$$\text{総窒素} \cdots \cdots 13.7 \times 0.001666 = 0.0228244$$

上記の如くして得た総窒素量に 6.25 を乗じて粗蛋白質量とした。(但し蛋白質中の窒素を 16% と仮定する)

$$\text{粗蛋白質量} = \text{総窒素量} \times 6.25 = 0.0228244 \times 6.25 = 0.14265270 \cdots \cdots$$

$$\text{粗蛋白質\%} = \frac{\text{粗蛋白質のg数}}{\text{試料のg数}} \times 100 = \frac{0.14265270}{0.4721} \times 100 = 30.2167 \cdots \cdots$$

3. 純蛋白質量⁶⁾

以上の総窒素量中には、非蛋白態窒素も含まれているから、純蛋白質量の定量には、試料 2.0436g を採り水 100cc を加えて沸騰するまで加熱し、Stuzer 試薬 32cc (1cc 中に 0.07679g の $\text{Cu}(\text{OH})_2$ を含み CuO 約 2g に相当する) を加えて、蛋白を沈澱せしめ濾過し、濾液には更に Stuzer 試薬を加えて濾過し、この蛋白の沈澱を kjeldahl 法にて窒素を定量して 6.25 を乗じて純蛋白量とした。

$$0.845\text{N}-\text{H}_2\text{SO}_4 10\text{cc} = 0.119\text{N}-\text{Ba}(\text{OH})_2 71\text{cc}$$

$$\text{滴定に要した Ba}(\text{OH})_2 \cdots \cdots 19.1\text{cc}$$

蒸溜による NH_3 を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ にするのに消費された H_2SO_4 …硫酸をバリタに換算し… $71-19.1=51.9\text{cc}$

純蛋白質量…… $51.9 \times 0.001666 \times 6.25 = 0.540408750$

純蛋白質% = $\frac{0.540408750}{2.0436} \times 100 = 26.4439\text{……}$

Stuzer 試薬の調製;—純 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} 10\text{g}$ を蒸溜水500ccに溶解し, グリセリン 0.25g を加えて攪拌し, 6N—NaOH を加えて微アルカリ性とする, Cu(OH)₂ の沈澱を生ずる。この沈澱を0.5%グリセリン水溶液で洗滌し, 濾液がアルカリ性を呈しなくなるまで行方。このようにして得た Cu(OH)₂ を10%グリセリンに加えて混合する。

IV 粗脂肪量⁷⁾

風乾粉碎した試料 5.6151g と石英砂大匙一杯を乳鉢で細かく磨碎して, これに大匙一杯の脱水芒硝を加えてよく攪拌し, 円筒濾紙に入れて恒温槽中で $93\sim 97^\circ$ に3時間置き充分乾燥してから Soxley 脂肪浸出器で純エーテルを用いて脂肪を浸出する。6時間後, 脂肪定量瓶中のエーテルを蒸溜しエーテルに可溶の粗脂肪を脂肪定量瓶と共に秤量し, 脂肪定量瓶の重量との差を粗脂肪量とした。

粗脂肪量 = エーテル浸出物を含む脂肪定量瓶—脂肪定量瓶 = $55.1895 - 54.5212 = 0.6683$

粗脂肪% = $\frac{\text{粗脂肪のg数}}{\text{試料のg数}} \times 100 = \frac{0.6683}{5.6151} \times 100 = 11.9018$

V 実験結果の総括

第 1 表

蜆		新 鮮 物(%)	風 乾 物(%)
水	分	66.7	—
粗	蛋 白 質	10.06	30.2
純	蛋 白 質	8.80	26.4
粗	脂 肪	3.96	11.9

後 篇 アミノ酸の分離確認

I Brazier 銅塩法の理論⁸⁾

蛋白質加水分解液中のアミノ酸を銅塩とし, 溶媒に対する溶解度の差によつて, 先ず水と処理して水溶性と不溶性銅塩とに大別し, 前者は更にメタノールと処理して, それに可溶性と不可溶性銅塩に二分し, 銅塩は更に他の誘導体として各単一アミノ酸に分離する方法である。

II 銅塩の調製⁹⁾

蜆生肉約 200g と4倍量の25%硫酸を 500cc の丸底フラスコに採り, 逆流冷却器を

つけて砂皿上に110~130°で24時間煮沸し、加水分解完了後、バリタで中和して硫酸バリウムを濾別する。沈澱は3回熱水で洗滌した。濾液及び洗液をバリタでPH 11~12として70°に温めつつ空気を通じてアンモニアを追出してから、硫酸でバリタを正確に除去し、25gの炭酸銅を加えて、しばらく煮沸した後、湯浴上に蒸発乾涸せしめた。この銅塩を水とよく振盪抽出して、可溶性銅塩と不溶性銅塩に分けた。不溶性銅塩部を更に水で二回振盪抽出を繰返し行つた。

水に可溶性銅塩を含む濾液は蒸発乾涸した後、無水アセトンと繰返し処理して粒状として、順次脱水してから濾過し、減圧乾燥器で乾燥してアセトンを除き、98°の恒温槽で乾燥してから乳鉢で細粉とした。この細粉状銅塩を繰返し無水メタノールと10分間機械的に振盪して抽出し、メタノールの色の濃度が変らなくなるまで抽出を行い、濾過してメタノールに可溶性銅塩と不溶性銅塩とに区別した。

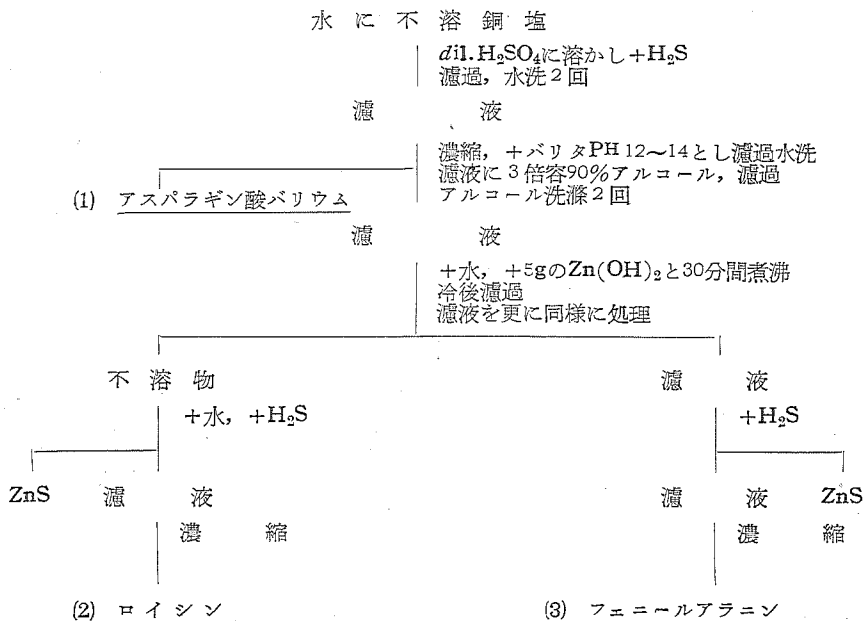
かくして得た銅塩の量は次の如くであつた。

1. 水に不溶性銅塩…………… 6.8948g
2. 水に可溶、メタノールに不溶銅塩……17.0168
3. 水に可溶、メタノールに可溶銅塩……11.8934

III 各アミノ酸の分離¹⁰⁾

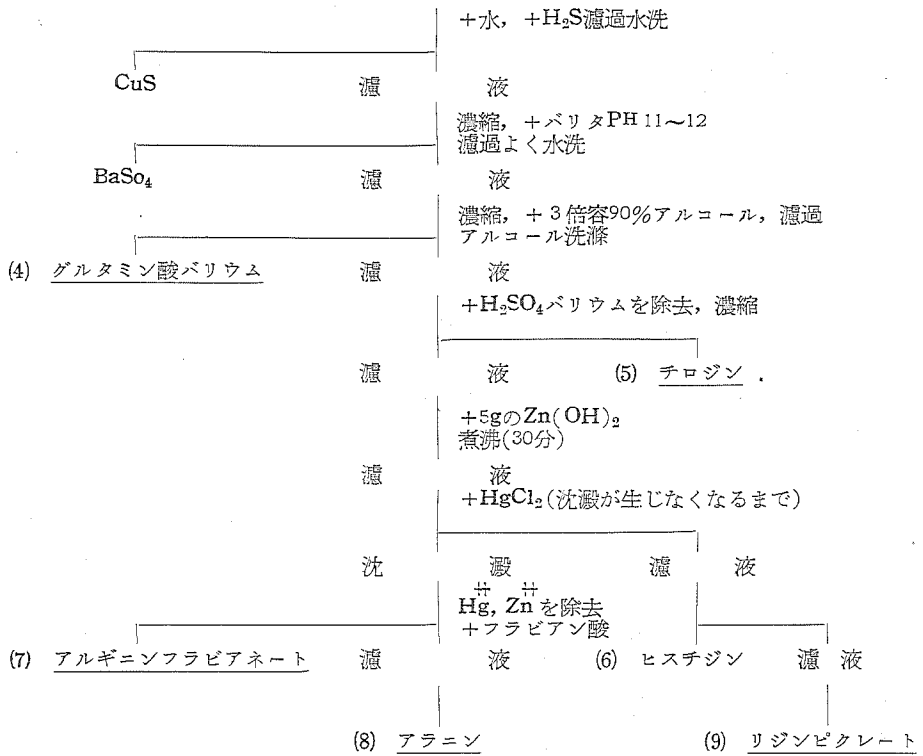
各アミノ酸の分離には、Brazierのアミノ酸の系統的分離法によつた。分離法の概要は次の如くである。

第 2 表



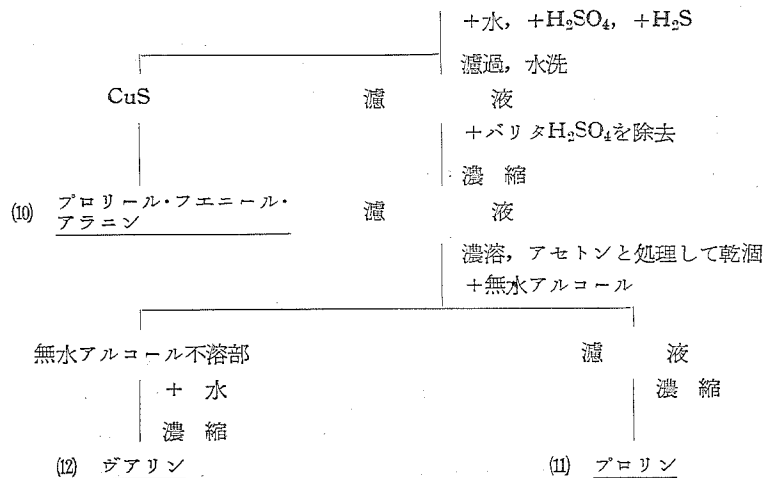
第 3 表

水に可溶, メタノールに不溶銅塩



第 4 表

水に可溶, メタノールに可溶銅塩



1. 水に不溶銅塩

(1) アスパラギン酸 Asparatic acid

水に不溶銅塩を稀硫酸に溶解せしめ、硫化水素ガスを通じて生成する硫化銅を濾別し、沈澱を熱水で2回洗滌して、濾液、洗液を合してバリタで $\text{PH}12\sim14$ として生成する硫酸バリウムを除去し、湯浴上に1/8量に濃縮してから、濃縮液の約3倍容の90%アルコールを加えると褐色油状物を生成した。この油状物は固化しないので湯浴上に温め一昼夜放置したところ、白色のアスパラギン酸のバリウム塩が沈澱した。この沈澱物を90%アルコールで洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.244g

(2) ロイシン Leucine

(1)の母液についてバリウムを硫酸で除去してから、約5gの水酸化亜鉛を加えて30分間煮沸、冷後濾過し、濾液は更に1gの水酸化亜鉛を加えて同様に処理した。不溶物を冷水で2回洗滌した。この不溶物に水を加え、硫化水素ガスを通じて生成する硫化亜鉛を除去し濾液を濃縮して12時間放置し析出したロイシンの結晶を90%アルコールで洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.619g

(3) フェニール・アラニン Phenyl alanine

(2)の母液に硫化水素ガスを通じて生成する硫化亜鉛を濾別し、濾液を濃縮して12時間放置して析出したフェニール・アラニンの結晶を90%アルコールで洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量1.070g

2 水に可溶メタノールに不溶銅塩

(4) グルタミン酸 Glutamic acid

水に可溶メタノールに不溶銅塩を水に溶かし硫化水素ガスを通じて生成する硫化銅を濾別し、沈澱を2回洗滌した後、濾液、洗液をバリタで $\text{PH}11\sim12$ として生成する硫酸バリウムを濾別し、湯浴上に1/8量に濃縮してから、濃縮液の約3倍容の90%アルコールを加えて、一昼夜放置し、析出したグルタミン酸のバリウム塩を90%アルコールで洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量8.664g

(5) チロジン Tyrosine

(4)の母液に1N-硫酸を滴下してバリウムを除去して、濾液を濃縮し、放冷後析出したチロジンの結晶を濾別し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.553g

(6) ヒステジン Histidine

(5)の母液に約3gの水酸化亜鉛を加えて、30分間煮沸して沈澱物を濾別し、濾液を濃縮してから飽和昇汞水(水100cc中に約6gの昇汞を含む)を沈澱が生じなくなるまで約30cc加え、 $30\sim40^\circ$ に1時間温め、放冷後沈澱を濾別し、濾液を濃縮して一昼夜放置して析出するヒステジンの水銀塩を濾別し、冷水で洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.456g

(7) アルギニン Aruginine

(6)の昇汞水による沈澱物を0.1N-硫酸に溶かし、硫化水素ガスを通じて水銀イオン、亜鉛イオンを除去し、濾液を濃縮してから2gのフラビアン酸¹¹⁾を加えて煮沸して一昼夜放置し稀薄アンモニア水を滴下して生成したアルギニン・フラビアネートの黄

色結晶を濾別し、90%アルコールで洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量1.118g

(8) アラニン Alanine

(7)の母液にバリタを加えて硫酸を除去し、濾液を濃縮して、濃縮液の3倍容のアルコールを加え、湯浴上に加温し沈澱が生じはじめて後一昼夜放置し、析出したアラニンの結晶を90%アルコールで洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.026g

(9) リジン Lysine

(6)の母液及び(7)(8)の濾液を合せて、濃縮し3gのピクリン酸を加え70~80°に温め一昼夜放置し、析出したリジン・ピクレートの黄色結晶を濾別し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.432g

3. 水に可溶メタノールに可溶銅塩

(10) プロリール・フェニール・アラニン Prolyl Phenyl Alanine

水に可溶メタノールに可溶銅塩を水に溶かし硫化水素ガスを通じて生成する硫化銅を、バリタで硫酸を除去し、濾液を濃縮し液量を元の1/4位にして放冷後析出した沈澱を濾別した。収量0.085g

(11) プロリン Proline

(10)の母液を湯浴上で順次濃縮し、シロツブ状としてからアセトンと処理して脱水し乾燥器中で乾燥した。乾燥物を無水アルコールで抽出し無水アルコールに可溶部と不溶部に分けた。可溶部を湯浴上で注意しながらアルコールを蒸発させて沈澱が生じはじめた後放冷し、プロリンの結晶を濾別して、ブタノールで洗滌し、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.087g

(12) ヴァリン Valine

(11)の不溶部に水を加えて、湯浴上で徐々に濃縮し、放冷後、一昼夜放置して、析出したヴァリンの結晶を濾別し、90%アルコールで洗滌して、減圧乾燥器中で乾燥した。収量0.188g

IV ペーパー・クロマトグラフ法による各アミノ酸¹²⁾の確認

30×2cmの濾紙(東洋濾紙のNo.2)の下端から3cmのところ約1mgのアミノ酸((1),(4)は脱バリウム,(6)は脱水銀,(7),(9)を除く)を一滴の温蒸溜水に溶解し、3mm以内の円形に付け、乾燥後、n-ブタノール・醋酸(4・1)混合液50ccを溶媒として、展開を行つた。原点より25cm近くに溶媒が達した後、乾燥し濾紙上に、0.2%エンヒドリンのブタノール溶液を霧吹きで吹きつけ、95°の恒温槽中で加温し発色検出して、そのRfによつて各アミノ酸を確認した。各Rfは第5表の如くであつた。

$$Rf = \frac{\text{アミノ酸の移動距離}}{\text{溶媒の滲透距離}}$$

第 5 表

アミノ酸	Rf	
	本研究	文献*
Aspartic acid	—	0.26
Leucine	0.691	0.69
Phenyl alanine	—	0.74

Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	薄板状	303遊離	0.188	0.063	0.201
--------	---	-----	-------	-------	-------	-------

* 捕取量は捕集形態量である

分離した各アミノ酸の種類, 捕取形態, 捕取量等は第6表に一括して挙げる。捕取したアミノ酸の総量は, 蜆生肉中の総窒素量の約92%である。

尙, 参考のために軟体動物の蛤の研究に於けるアミノ酸の分離種類, 捕取形態, 捕取量等を第7表に挙げる。

第 7 表

杉野他四氏の結果		(蛤生肉9000g)		鈴木・大嶽氏の結果 (3265g)	
確認物質名	分子式	捕取形態	量(g) *	捕取形態	量(g)
ベタイン	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$	ピクレート	52.7	遊離塩基	4.4
トリメチルアミン	$\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$	定性	—	定性	稍多量
L-アルギニン	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_4$	フラビアネート	1.24	デピクレート	2.1
ヒスチジン	$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3$	少量存在を認め た	—		存在
アデニン	$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_5$	ピクレート	0.26		
ヒポキサンチン	$\text{C}_5\text{H}_4\text{ON}_4$	ピクレート	0.99		
タウリン	$\text{C}_2\text{H}_7\text{O}_3\text{SN}$	遊離	2.43		
カリウム	K	ピクレート	少量		

* 結晶量は全量に換算した値である。

総 括

1. 長野県諏訪湖産蜆の栄養素分析を行った。
2. 蜆の蛋白質を構成するアミノ酸に就て Brazier 銅塩法に依る系統的分離を行い、その結果アスパラギン酸等12種のアミノ酸を分離確認した。
3. 従来分離され難かつたヒスチジンの分離に成功した。
4. アミノ酸の定性確認にはペーパー・クロマトグラフ法を用いた。

文 献

- 1) 杉野・大戸・関根・市川・渡辺; 日化 72 252(1951)
- 2) 鈴木・大嶽; 蛋白化学の研究 141
- 3) 4) 5) 7) 京大農学部; 農芸化学実験書中 503, 505, 507, 509
- 6) 東大農学部; 農芸化学分析書上 151
- 8) 9) 10) 化学実験学 天然物取扱法Ⅱ 498, 499, 500
- 11) 後藤; 合成有機化学 568
- 12) 佐竹; クロマトグラフ 65

**On the Separation of Amino Acids in Proteins of
Corbicula atrata living in Lake Suwa at Nagano
Prefecture.**

By

Chiaki TSUCHIYA* Shiro HOSAKA**

(Chemical Laboratory, Faculty of Education Shinshu University)

Summary

1. Authers did quantitative analysis for nutrient in *Corbicula atrata* living in Lake Suwa of Nagano prefecture.
2. Authers separated amino acids into twelve kinds (for instance:- Aspartic acid etc.) through systematic quantitative analysis by Brazier's copper salt method for amino acids in proteins of *Corbicula atrata*.
3. Histidine, which is generally considered very difficult to be separated, was done successfully.
4. Separated amino acids were confirmed by the paper chromatographic method.

* Assistant Professor of Shinshu University, Faculty of Education.

** Student of Shinshu University, Faculty of Education.