

## Ćwiczenie 9: Analiza jakościowa aminokwasów w sosie sojowym naturalnie fermentowanym i syntetycznym metodą chromatografii cienkowsarstwowej (TLC)

### Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie analizy jakościowej aminokwasów w wybranych sosach sojowych różniących się metodą produkcji (fermentacja naturalna oraz hydroliza chemiczna) z wykorzystaniem chromatografii cienkowsarstwowej oraz ich wizualizacja za pomocą reakcji z ninhydriną.

### Identyfikacja aminokwasów w sosach sojowych – wprowadzenie

**Sos sojowy** to jedna z najstarszych przypraw świata i ważny składnik kuchni azjatyckiej. Jego charakterystyczny smak **umami** pochodzi głównie od **wolnych aminokwasów**, które powstają podczas rozkładu białek soi. Najważniejszym z nich jest **kwask glutaminowy**, ale w sosie obecne są także inne aminokwasy, np. alanina, glicyna, walina czy leucyna. Skład aminokwasowy sosu zależy przede wszystkim od sposobu jego produkcji.

### Naturalnie fermentowany sos sojowy

Tradycyjny sos sojowy powstaje w procesie **naturalnej fermentacji** ziaren soi (często z dodatkiem pszenicy), wody i soli. Najpierw ziarna soi są moczone i gotowane, a następnie miesza się je z prażoną pszenicą. Do takiej mieszaniny dodaje się kultury mikroorganizmów, najczęściej pleśni z rodzaju *Aspergillus*. W pierwszym etapie powstaje tzw. **koji**, w którym mikroorganizmy produkują enzymy rozkładające białka i skrobię.

Następnie koji miesza się z roztworem soli i wody, tworząc masę zwaną **moromi**. W niej zachodzi właściwa fermentacja trwająca **od kilku miesięcy do nawet dwóch lat**. W tym czasie enzymy i mikroorganizmy stopniowo rozkładają białka soi do **peptydów i wolnych aminokwasów**, a także wytwarzają wiele związków aromatycznych. Po zakończeniu fermentacji mieszaninę prasuje się, filtruje i pasteryzuje, otrzymując gotowy sos o złożonym smaku i aromacie.

## Sos sojowy otrzymywany metodą chemiczną

Niektóre sosy sojowe produkuje się znacznie szybciej poprzez **chemiczną hydrolizę białek roślinnych**. W tej metodzie białka soi lub innych roślin rozkłada się przy użyciu **stężonego kwasu (najczęściej kwasu solnego)** w podwyższonej temperaturze. W wyniku reakcji białka ulegają szybkiemu rozkładowi do aminokwasów, w tym także do kwasu glutaminowego odpowiedzialnego za smak **umami**.

Proces taki trwa tylko **kilka godzin lub dni**, dlatego jest znacznie tańszy i szybszy niż fermentacja. Po hydrolizie roztwór neutralizuje się zasadą, a następnie często dodaje się **barwnik karmelowy, sól oraz aromaty**, aby poprawić smak i wygląd produktu. Sosy wytwarzane w ten sposób zawierają aminokwasy, ale zwykle mają **mniej złożony aromat** niż sosy fermentowane naturalnie.

### Które sosy są lepszej jakości?

Za wyższej jakości uznaje się **sosy naturalnie fermentowane**, ponieważ zawierają więcej naturalnych związków aromatycznych i powstają w długim procesie enzymatycznego rozkładu białek. Przy zakupie warto zwrócić uwagę na **skład produktu** – dobre sosy często zawierają tylko kilka składników: soję, pszenicę, wodę i sól, a na etykiecie bywa podana informacja o **naturalnej fermentacji**.

Sos sojowy ma ponad **2000 lat historii**, a w dobrze fermentowanym produkcie można znaleźć **kilkadziesiąt różnych aminokwasów i peptydów**. W analizie chemicznej, np. metodą **chromatografii cienkowarstwowej (TLC)**, można rozdzielić i zidentyfikować część z nich, porównując ich położenie na płytce chromatograficznej z wzorcami aminokwasów.

W niniejszym ćwiczeniu aminokwasy obecne w próbkach sosu sojowego zostaną **rozdzielone metodą TLC i wykryte reakcją z ninhydriną**, która barwi aminokwasy na kolor fioletowy. Porównując położenie plamek z wzorcami można określić, które aminokwasy występują w badanym produkcie.

### Odczynniki

- alkohol n-butyłowy
- stężony kwas octowy 99,9% (lodowaty)
- odczynnik ninhydrynowy
- woda demineralizowana

- 1% roztwory wzorców aminokwasów: kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, walina, tryptofan, seryna, prolina, glicyna, lizyna, alanina, leucyna, tyrozyna, arginina, fenyloalanina, metionina, histydyna, izoleucyna, treonina

### **Sprzęt laboratoryjny**

- płytki do chromatografii cienkowarstwowej TLC Silica gel 60 firmy Supelco
- komory szklane do chromatografii TLC
- pipeta automatyczna
- bagietka szklana
- pinceta
- suszarka laboratoryjna
- zlewki
- nożyczki
- kapilary szklane
- bibuła filtracyjna

### **Badane próbki**

- sos sojowy chiński: Mr. Ming i Tao Tao
- sos sojowy japoński Kikkoman
- sos sojowy tajlandzki Thin Soy Sauce
- sos sojowy Winiary

### **Wykonanie**

#### **1. Przygotowanie komór chromatograficznych z eluentem**

1. Odbierz od asystenta komorę chromatograficzną do rozdziału aminokwasów.
2. Wlej kolejno do komory:
  - 12 cm<sup>3</sup> *n*-butanolu,
  - 3 cm<sup>3</sup> wody destylowanej,
  - 3 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu octowego (lodowatego)
3. Dokładnie wymieszaj zawartość komory, aby eluent był klarowny i przezroczysty.  
**Uwaga:** Jeśli roztwór jest mętny — natychmiast poinformuj asystenta. Nie wolno używać mętnego eluentu.
4. Przyklej do węższych ścianek komory paski bibuły filtracyjnej:
  - Zwilż paski przygotowanym eluentem, aby dobrze przylegały.

- Użyj szklanej bagietki do dociskania bibuły — unikaj dotykania wnętrza komory palcami.
5. Szczelnie przykryj komorę szklaną płytką i odstaw na minimum 15 minut, aby ustabilizować warunki (równowaga fazowa).

## **2. Przygotowanie próbek sosu sojowego**

1. Odmierz pipetą automatyczną po 100  $\mu\text{L}$  sosu sojowego fermentowanego i chemicznego do oddzielnych zlewek.
2. Do każdego sosu dodaj 900  $\mu\text{L}$  wody destylowanej i dokładnie wymieszaj.

**Uwaga:** Te roztwory będą używane przez wszystkie grupy.

## **3. Przygotowanie płytek TLC**

1. Płytki łatwo adsorbują zanieczyszczenia na powierzchni, a warstwa sorbentu jest bardzo krucha. Dlatego:
  - pracuj w czystych rękawiczkach,
  - unikaj dotykania warstwy sorbentu,
  - obchodź się z płytkami ostrożnie, aby nie uszkodzić powierzchni.
2. Z płytki TLC (20 cm  $\times$  20 cm) wytnij paski o wymiarach 10 cm  $\times$  10 cm
3. W rękawiczkach zaznacz delikatnie ołówkiem:
  - linię startu,
  - punkty aplikacji próbek aminokwasów i roztworów sosów.

## **4. Nakrapianie próbek na płytki**

1. **Do każdego aminokwasu i każdego rodzaju sosu sojowego używaj osobnej, czystej kapilary!** Nigdy nie stosuj tej samej kapilary do różnych roztworów — unikniesz w ten sposób zanieczyszczeń i błędów w analizie
2. Nanieś próbki na linię startu (krople  $\leq$  2 mm średnicy).
3. Zachowaj równe odstępki pomiędzy punktami.
4. Na każdą płytkę nanieś:
  - przygotowane roztwory sosów sojowych,
  - wskazane przez asystenta roztwory aminokwasów.

## **5. Rozdział aminokwasów**

1. Wysusz płytki (suszarka do włosów, ciepły strumień) do całkowitego odparowania rozpuszczalnika.
2. Za pomocą pincety umieść płytkę w komorze:

- linia startu musi być nad poziomem eluentu,
  - sorbent skierowany do wnętrza komory,
  - płytka nie może dotykać bibuły na ściankach.
3. **Szczelnie przykryj komorę płytką szklaną, aby uniemożliwić dopływ powietrza z zewnątrz.** Dzięki temu warunki wewnątrz komory pozostaną stabilne, co zapewnia prawidłowy rozdział chromatograficzny.
  4. Nie poruszaj komory podczas rozdziału!
  5. Wyjmij płytkę, gdy front eluentu osiągnie  $\sim 1$  cm od górnej krawędzi.
  6. Natychmiast zaznacz pozycję frontu ołówkiem i wysusz płytkę **do zaniku zapachu octu.**

### **6. Wywoływanie plamek aminokwasów (wszystkie czynności wykonuj pod wyciągiem!)**

1. **Przed spryskaniem płytki ninhydriną dokładnie ją wysusz suszarką, aż zapach octu nie będzie wyczuwalny!**
2. Upewnij się, że płytka jest całkowicie sucha.
3. Skrop obszar między linią startu a linią mety ninhydriną (aerazol lub rozpylacz).
4. Oczekaj  $\sim 2$  minuty.
5. Podgrzewaj płytkę suszarką:
  - najpierw ciepłe powietrze,
  - potem gorące, aż pojawią się wyraźne barwne plamki aminokwasów.

### **7. Opracowanie wyników na ćwiczeniu 10**

1. Oblicz współczynniki  $R_f$  dla wszystkich widocznych plamek.
2. Wspólnie stwórz tabelę z wartościami  $R_f$ :
  - wzorcowych aminokwasów,
  - składników z wszystkich rodzajów sosów sojowych.
3. Porównaj wartości  $R_f$  i zidentyfikuj aminokwasy obecne w próbkach sosów sojowych.