牛乳蛋白質の消化に対する Curd Tension の影響に関する研究

Studies on the Effect of Curd Tension upon Digestibility of Milk Protein

(2) Curd 蛋白質の消化について (2) On the Digestibility of Curd Protein

(昭和 33 年 7 月 29 日受理)

佐々木 林治郎 津 郷 友 吉 最 明 秀 雄
(Rinjiro Sasaki) (Tomokichi Tsugo) (Hideo Saimyo)

In vitro digestion tests with pepsin of milk treated with rennet after making its curd tension zero by adding the metaphosphate were accomplished. It was found that when the precipitation procedure of protein (casein) at the isoelectric point was applied, the sample added metaphosphate was more digested during early three hours, but became rather low digestible in later stage, as compared with the control (no metaphosphate). The low digestibility was seemed to be attributed to the effect of the metaphosphate decreasing calcium ion.

Next the similar digestion test in which digestion with pepsin was done for two hours, followed by digestion with pancreatin has been performed. As the result, it was proved that from the increasing ratio of soluble nitrogen pancreatin was also seemed to be slightly inhibited by the metaphosphate, however at the early stage the sample added metaphosphate was considerably more digested the same as the previous test owing to softening of curd, and furthermore according to the analysis of amino nitrogen the values were not affected by the metaphosphate so that the sample having soft curd showed constantly higher increasing ratio of amino nitrogen than the control, even though for the continuing digestion.

牛乳の curd は metaphosphate を添加することにより軟かになるから、いわゆる soft curd milk の性質に変化する。そこで curd tension と pepsin 及び pancreatin による curd protein の消化との関係について実験した成績をここに記す。

実 験 の 方 法

1) Pepsin 消化試験

Flask に牛乳 10 cc をとり、これに metaphosphate 溶液を加え (対照には同容の水を加える) 35°C に温め rennet 液 0.5 cc を混じ 35°C に 40 分間保つ。これに予め 37°C に温めておいた pepsin 液 10 cc と 1 N HCl の適量 (1.4~1.7 cc) を加え pH を 1.8 とした後、直ちに振盪器にのせた 37~38°C の定温器中で振盪消化を行う。振盪は 5 時間行い、振盪回数 1 分間 40~50 回とした。消化終了後 flask を 90°C の水浴中で 5 分間熱して酵素作用を破壊する。但し trichloro-

acetic acid で除蛋白するものでは、この操作は行わない。

なお消化試験において牛乳の pH は、その都度調整し、消化中には、これを再調整する必要のないこと、除蛋白のための trichloroacetic acid の濃度は 2.5% を適当とし pepsin は牛乳 10 cc につき、含糖 pepsin/1 g の割合でよいこと等を確めて実験の方法を組み立てた。

次に消化液を 50 cc measure flask に移し 30% trichloroacetic acid 4.2 cc を加えた (除蛋白剤として trichloroacetic acid を用いないときは 1 N NaOH を加えて pH を 4.6 とする) 後 50 cc となし、約 30 分後濾過し、濾液の一定量について Kjeldahl 法によつて窒素を定量する。消化試験の結果は次の如く表わした^{1,2)}。

$$\text{消 化 率} = \frac{\text{消化後濾液中の N} - \text{消化前濾液中の N}}{\text{全 N} - \text{非蛋白態 N}} \times 100$$

$$\text{可溶性 N 増 加 率} = \frac{\text{消化後濾液中の N} - \text{消化前濾液中の N}}{\text{全 N} - \text{可溶性 N}} \times 100$$

2) Pancreatin 消化試験

牛乳の pancreatin による消化については pepsin の場合と大体同様に実験を行った。

その結果, pancreatin は局方粉末品に水を加えて抽出濾過したものを用いること, その用量と消化時間は牛乳 10 cc につき pancreatin 0.03 g に相当の濾液を用い, 消化時間 5 時間 (振盪) にて本研究の目的に適すること, 牛乳の反応をはじめ NaOH で pH 8.3 (1 例によれば牛乳 10 cc について 0.1 N NaOH 2.6 cc を加える) にして消化を行うときは時間の経過と共に pH が次第に低下するから pH 8.3 に保つためには時々 NaOH を追加する必要のあること (1 時間毎に 1 N NaOH を追加した成績によれば 0.3, 0.45, 0.3, 0.15 及び 0.15 cc ずつ 5 時間目までに 1 N NaOH 計 1.35 cc を要した) を認めた。

Pancreatin の消化経過を知るには可溶性窒素のほか amino 態窒素を定量する必要がある。

実験の成績

I. Pepsin 消化試験—trichloroacetic acid による除蛋白牛乳 10 cc に対し metaphosphate は 1% 溶液 0.4 cc (4 mg) を加え, 対照にはその代りに, 0.4 cc の水を加えた。その結果は第 1 表の如くである。

第 1 表 Pepsin 消化試験 (Trichloroacetic acid による除蛋白)

消化時間 (時間)	Metaphosphate 添加		対 照	
	濾液の N 増加量 (mg/10cc)	消化率 (%)	濾液の N 増加量 (mg/10cc)	消化率 (%)
0.5	22.53	58.2	23.81	61.5
1	23.96	61.9	25.98	67.1
3	28.42	73.4	30.74	79.3
5	31.13	80.4	31.86	82.3
24	34.38	88.7	34.73	89.7

牛乳: 酸度 1.80 cc 比重 1.0305, 脂肪 3.1%
全 N 45.13 mg/10 cc 非蛋白態 N 6.38 mg/10 cc

この実験によれば metaphosphate を加えたものは rennet 液を加えたときは勿論 pepsin 及び塩酸を加えても凝固を生じない。しかるに対照は rennet により凝固し, 消化試験をはじめてから 30 分後には curd の小塊が認められ 1 時間後に殆んどみられなくなった。

II. Metaphosphate の pepsin 消化に及ぼす影響

除蛋白剤として trichloroacetic acid を用いた前記, pepsin 消化試験の結果 metaphosphate を加えたものの方が僅かながら消化率の低いことが認められた。この原因を追究するために次の実験を行った。

1) Metaphosphate の添加量と消化率との関係

牛乳 10 cc に metaphosphate をいろいろの量に加

え, 各々に水を加えて全量を 15 cc となし, これを 35 °C に 40 分間保つてから pepsin 消化試験を振盪 5 時間行つた。その成績は第 2 表の如くである。

第 2 表 metaphosphate の添加量と消化率

metaphosphate 添加量 (mg/10cc)	濾液の N 増加量 (mg/10 cc)	消化率 (%)
0	33.58	82.4
2	32.46	79.7
4	32.31	79.3
10	31.11	76.4
20	27.61	67.8
50	20.81	51.1

牛乳: 酸度 2.00 cc 比重 1.0296, 脂肪 3.7%
全 N 46.88 mg/10 cc 非蛋白態 N 6.15 mg/10 cc 非蛋白態 N (metaphosphate 50 mg 添加) 3.58 mg/10 cc

第 2 表は Metaphosphate が消化率に著しい影響を及ぼすことを示している。しかるに Metaphosphate を添加したものにおいては pepsin 液を加えてから塩酸を加えるとき多量の凝固物を生ずることがみられる。この実験においては metaphosphate の蛋白沈殿作用が trichloroacetic acid の蛋白質及び分解物の沈殿作用を増強するために非蛋白態窒素の分析値が低くなる結果になるものと考えられる。

2) Metaphosphate の pepsin に対する影響

Metaphosphate の影響は trichloroacetic acid の除蛋白において, その蛋白沈殿作用が加わつて非蛋白態窒素を減少させるに過ぎないか否かを確かめるために次の実験を行った。

(a) 消化前に metaphosphate を添加する場合は牛乳 10 cc に metaphosphate 4 mg を加え 35 °C に 40 分間保つてから pepsin 消化試験 (5 時間振盪) を行う。(b) 消化後に metaphosphate を添加する場合は牛乳 10 cc に水 0.4 cc を加えて消化試験を行つてから metaphosphate 4 mg を加えて非蛋白態窒素を定量する。(c) 対照は metaphosphate を加えないで消化試験を行う。

実験の成績は第 3 表に示す通りである。

第 3 表 Metaphosphate の pepsin 消化試験に対する阻害作用

条 件	濾液の N 増加量 (mg/10cc)	濾液の N 増加量 (mg/10cc)	消化率 (%)
消化前 metaphosphate 添加	40.74	32.08	76.3
消化後 metaphosphate 添加	41.50	32.84	78.0
対 照	42.16	33.49	79.6

牛乳: 酸度 2.10 cc 比重 1.0316, 脂肪 3.6%
全 N 48.32 mg/10 cc 非蛋白態 N 6.24 mg/10 cc 非蛋白態 N (metaphosphate 4 mg 添加) 6.09 mg/10 cc

即ち metaphosphate は蛋白質沈澱作用により分析上消化率に影響するばかりでなく pepsin の消化作用に対して阻害的に影響することが認められるが、その原因を究明するために実験を計画する。

3) Pepsin 消化に対する Ca ion の影響

蛋白質分解酵素の作用は Ca ion によつて促進されるという報告³⁾によれば metaphosphate の添加量と溶液の Ca ion の関係を検討することが必要である。

よつて牛乳 10 cc に metaphosphate 溶液 0.5 cc (5 mg), 2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 0.3 cc (Ca 2.1 mg をふくむ、これを加えないものには同量の水を用いる) を加え、次に pepsin 消化試験を行う。但し trichloroacetic acid による除蛋白の代りに 1 N NaOH・0.9 cc を加えて pH 4.6 となし、濾過蛋白を行つた。

第4表 Pepsin 消化に及ぼす Ca ion の影響

消化時間 (時間)	Ca	Metaphosphate 不添加		Metaphosphate 添加	
		可溶性 N 増加量 (mg/10cc)	可溶性 N 増加率 (%)	可溶性 N 増加量 (mg/10cc)	可溶性 N 増加率 (%)
2	不添加	35.80	86.2	35.01	83.6
2	添加	36.33	87.5	35.27	84.3
5	不添加	37.76	90.9	36.29	86.7
5	添加	38.28	92.2	36.70	86.8

牛乳：酸度 1.90 cc 比重 1.0340, 脂肪 3.4%
全 N 51.35 mg/10 cc 可溶性 N 9.83 mg/10 cc 可溶性 N (metaphosphate 5 mg 添加) 9.49 mg/10 c.c.

実験の結果は第4表の通りで metaphosphate を加えたものも加えないものも共に Ca ion の添加により可溶性窒素が増加すること即ち Ca ion が pepsin の消化作用を促進することを示している。よつて metaphosphate の pepsin 消化に対する影響は、次の如くまとめられる。

牛乳の消化試験において除蛋白剤として trichloroacetic acid を用いると (trichloroacetic acid は 2.5 % 溶液で pH 約 1.0) きに metaphosphate があれば蛋白質及び分解物の沈澱作用が增強されるので非蛋白態窒素に相当する数値が低くなる。よつて牛乳については casein の等電点沈澱 (pH 4.6) を利用する方がよいと考える。

Metaphosphate が pepsin の消化作用を阻害するのは Ca ion に関係があり、metaphosphate の Ca 結合力により Ca ion が減少するためと考えられる。

III. Pepsin 消化試験—Casein 等電点による除蛋白

これまでの実験結果に鑑み metaphosphate を含むものは pepsin 消化試験において除蛋白のために pH を casein の等電点 4.6 に調整して沈澱濾過する方法を行うことにした。牛乳 10 cc に対して metaphosphate 5 mg

を用いた場合の実験成績は第5表に示す通りである。

第5表 Pepsin 消化試験 (Casein の等電点による除蛋白)

消化時間 (時間)	Metaphosphate 添加		対 照	
	濾液の N 増加量 (mg/10cc)	消化率 (%)	濾液の N 増加量 (mg/10cc)	消化率 (%)
0.5	26.77	75.8	14.61	41.6
1	29.05	82.3	20.06	57.1
1.5	29.32	83.1	20.41	58.1
3	29.95	84.8	29.63	84.4
5	30.60	86.7	32.03	91.2
24	31.50	89.2	32.81	93.4

牛乳：酸度 2.15 cc 比重 1.0299, 脂肪 3.95%
全 N 46.65 mg/10 cc 可溶性 N 11.54 mg/10 cc 可溶性 N (Metaphosphate 5 mg 添加) 11.35 mg/10 cc

第5表の実験において metaphosphate を加えたものは最初から凝固物を生じないが、加えない対照は、はじめ凝固物を生じ、やがて消化をはじめてから約5時間後で漸く curd の小塊を残んど認めなくなった。

Metaphosphate 添加のものは最初の3時間位までは対照よりも消化がよくなっているが5時間後からは悪くなっている。はじめは metaphosphate の作用によつて curd が軟かく酵素作用を受け易いために消化がよいのであるが、その後は metaphosphate の除 Ca ion の影響により pepsin 作用の低下及び蛋白沈澱作用のために消化率として低い数値を示すことになる。

IV. Pancreatin 消化試験

1) Pancreatin 消化試験

牛乳 10 cc に metaphosphate 5 mg を加えたものと加えない対照について rennet を加えないで消化試験を行い、濾液について可溶性窒素及び amino 態窒素を定量した。Amino 態窒素の定量は Van Slyke 法による。その成績は第6表の通りである。

第6表 牛乳の pancreatin 消化試験

消化時間 (時間)	Metaphosphate 添加		対 照	
	可溶性 N 増加率 (%)	Amino N 増加量 (mg/10cc)	可溶性 N 増加率 (%)	Amino N 増加量 (mg/10cc)
0.5	47.3	1.92	50.7	2.51
1	72.1	5.45	74.5	5.19
2	85.2	7.14	86.5	7.30
5	92.3	9.37	94.1	9.37

牛乳：酸度 2.00 cc 比重 1.0299, 脂肪 3.7%, 全 N 46.08 mg/10 cc 可溶性 N 11.00 mg/10 cc 可溶性 N (metaphosphate 5 mg 添加) 10.8 mg/10 cc Amino 態 N 0.89 mg/10 cc Amino 態 N (Metaphosphate 5 mg 添加) 0.89 mg/10 cc

2) Pepsin-Pancreatin 消化試験

Pepsin の消化につづいて pancreatin の消化が行われるような組合せにより人工消化試験を行う。即ち牛乳 10 cc に対し metaphosphate 5 mg を加え、前記所定の pepsin 消化試験法に従い 2 時間の消化を行い、引きつづき pancreatin 液 10 cc 及び 1 N NaOH 1.90 cc を加えて pH 8.3 において振盪消化を行つた。Pancreatin を加えてから 0.5, 1, 2, 3.5 時間毎に 1 N NaOH を加えて pH 8.3 に調節した。

次に消化酵素作用を止め 1 N HCl を加えて pH を 4.6 となし casein の等電点沈澱による除蛋白法を行い濾過する。濾液について可溶性窒素及び amino 態窒素を定量した成績は第 7 表の通りである。

第 7 表 Pepsin-Pancreatin 消化試験

消化時間 (時間)	Metaphosphate 添加		対 照	
	可溶性 N 増加率 (%)	Amino N 増加量 (mg/10cc)	可溶性 N 増加率 (%)	Amino N 増加量 (mg/10cc)
1	72.1	2.74	41.5	1.30
2	85.4	3.52	75.2	2.78
2.5	93.0	5.67	84.2	5.07
3	94.1	8.67	93.1	7.62
4	95.0	9.58	97.4	9.15
7	97.0	12.37	99.3	12.01

牛乳： 酸度 2.10 cc 比重 1.0296, 脂肪 3.8%, 全 N 44.13 mg/10 cc 可溶性 N 10.96 mg/10 cc 可溶性 N (metaphosphate 5 mg 添加) 10.47 mg/10 cc Amino 態 N 1.30 mg/10 cc Amino 態 N (metaphosphate 5 mg 添加) 1.30 mg/10 cc

第 7 表の実験によれば metaphosphate を加えることにより curd の軟かくなっているものは対照にくらべて消化の初期に消化され易いことを示している。可溶性窒素の増加率において pepsin 及び pancreatin の蛋白加水分解作用は metaphosphate によつて幾らか阻害されるにもかかわらず、その影響を超えていることは消化に対して Ca ion の関係よりも curd の軟かいことの効果が大きいことを示すものと考えられる。

また pancreatin による amino 態窒素の増加量は metaphosphate によつて影響を受けないことは第 6 表の実験によつて、既に認められているが、そのため、この実験においては消化 7 時間に至るまで metaphosph-

ate を添加したものが対照よりも amino 態窒素の増加割合が高いことは全く curd の硬軟の差によるものと思われる。

以上の実験の結果最も著しいことは消化の初期に特に curd の硬軟が影響するということである。

要 約

牛乳に metaphosphate を加えて curd tension を 0 としたものを rennet 処理し pepsin 人工消化試験により metaphosphate を加えないものと比較した。

このときに除蛋白剤として trichloroacetic acid を用いれば metaphosphate を添加したものが、僅かに消化率の低いことを示す。その原因について検討した結果 metaphosphate の蛋白質及びその分解物に対する沈澱作用が trichloroacetic acid の除蛋白作用を必要以上に増大すること及び metaphosphate の pepsin 阻害作用は metaphosphate により Ca ion の減少するためになるものであることを確めた。よつて trichloroacetic acid 法の代りに casein 等電点沈澱法を適用して実験した結果、牛乳に metaphosphate を添加すれば、はじめ 3 時間位までは消化がよくなるが、更に消化を続けると反つて悪くなるのは Ca ion の関係であると考えた。

Pepsin 消化を 2 時間行い引続き pancreatin 消化を行つた。実験結果によれば可溶性窒素の増加率からみて pancreatin もまた metaphosphate の添加により、僅かに阻害されるようであるが、消化の初期においては metaphosphate 添加により curd の軟かくなっているものは、かなり消化され易いことを認めた。この場合 amino 態窒素の増加については metaphosphate の Ca ion 除去による阻害作用が認められない。従つて消化を続けても curd の軟かい方が、常に対照よりも amino 態窒素の増加割合が大なることを示した。

文 献

- 1) 大島幸吉, 板谷真一: 農化 14, 507 (1938)
- 2) 富山哲夫及石川 策: 農化 14, 987 (1938)
- 3) L. Gorini: Biochem. et Biophys. Acta 6, 237 (1950)

(東京大学農学部農芸化学科)