食品蛋白質のアミノ酸組成に関する研究 (1)

Studies on the Determination of Amino Acid Composition of Food Proteins (Part 1)

食品蛋白質の加水分解条件の検討

Establishment of the conditions of hydrolyses of food proteins

(昭和 38 年 9 月 9 日 受理)

品 川 孝 雄 垣 生 俊 夫 村 上 明 美
(Takao Shinagawa) (Toshio Habu) (Akemi Murakami)

The studies were made to establish the reliable and simplified methods of hydrolyses of several food proteins for microbial assay of the amino acids composing these proteins. Assay using the titrations of the acid produced by the test organisms gave maximum values of the amino acids when the proteins were hydrolysed in sealed-tubes at 120°C for 1 hour for glycine, 2 hours for cystine, 3 hours for tyrosine, 4 hours for lysine and serine, 6 hours for methionine, leucine, isoleucine, aspartic acid, glutamic acid, histidine and proline, 8 hours for alanine and valine, 10 hours for arginine all with 4N hydrochloric acid, while 8 hours for threonine and phenylalanine both with 3N hydrochloric acid. Tryptophan was well assayed, with minimum loss, from a hydrolysate prepared by 15-hour sealed-tube hydrolysis at 120°C with 4N hydroxide solution, and the value obtained was compared with that determined by colorimetric method. Effects of the presence of varied quantities of starch upon the assay values of several amino acids were also examined following these hydrolysis procedures.

Twenty four food proteins were analyzed by these hydrolysis methods and their amino acid compositions were determined, comparing the lysine contents with those determined as available lysine by Carpenter's method.

緒 言

蛋白質の栄養に関する今後の研究課題の一つとして、FAO蛋白質必要量委員会報告にも述べられているように、食品分析特に食品中のアミノ酸含量を種々の方法で分析するという問題がある。しかし食品蛋白質のアミノ酸組成の検索にあたっては、まず蛋白質の加水分解に対する最適の条件を設定することが必要であり、これについては今日までに内外の多くの報告^{1)~12)}が行なわれているが、特に加水分解の過程で分解し易い Cystine, Methionine, Lysine, Tryptophan などについては、未だ信頼性のある加水分解方法が確立されていないようである。

われわれは微生物法によって食品蛋白質のアミノ酸組成を検索するに当り、まずアミノ酸組成の比較的一定と考えられる牛乳 Casein を標準試料として、塩酸またはか性ソーダによる最適加水分解方法を検討し、ついで24種類の各種食品のアミノ酸組成を調べたのでこれを報告

する。

実 験 方 法

(1) 標準試料

生牛乳より定量的に Casein を分離して常法により精製し、減圧乾燥、粉細したものをを用いた。またでん粉の存在の影響の検討に際しては、この標準試料に対して一定割合の可溶性でん粉を添加した。

(2) 加水分解方法および分解液の調製方法

標準試料約0.2gをその10倍量の3N~4Nの塩酸と共に封管し、1.1kg/cm²(120°C)で種々の時間加圧分解し、分解終了後、分解液のpHを4.0に調整し、3000rpm10分の遠沈で3回傾斜洗滌して Humin を除き、その上澄液を pH6.8に調製定容して微生物定量に供した。また Tryptophan の場合には、試料の10倍量の3N~4Nのか性ソーダのほかに、保護物質として試料の40%の Cysteine 塩酸塩を加えて各時間上記と同じ温度で加圧分解した。

(3) 試料と共存する糖の影響の検討

図1 加水分解時間とアミノ酸微生物定量値との関係

表 1 アミノ酸定量用培地と菌株

アミノ酸	使用菌株	接種濃度	培地	培養条件
Alanine ⁽¹³⁾	<i>Leuc. citrovorum</i> IAM 1215	1:100	基*+Leucovorin-VB ₆	37°C, 72hrs.
Aspartic acid ⁽¹³⁾	<i>Leuc. mesenteroides</i> IAM 1233	"	基	"
Glutamic acid ⁽¹³⁾	"	1:5	基 - Aspartic acid+Asparagine	"
Arginine ⁽¹³⁾	"	1:100	基	"
Lysine ⁽¹³⁾	"	"	基	"
Isoleucine ⁽¹³⁾	"	1:5	基 -1/4 (Leucine+Valine)	"
Leucine ⁽¹³⁾	"	1:100	基	"
Methionine ⁽¹³⁾	"	"	基	"
Proline ⁽¹³⁾	"	"	基 +L-Proline (4/tube)	37°C, 48hrs.
Phenylalanine ⁽¹³⁾	"	"	基 -1/3 Tyrosine	37°C, 72hrs.
Threonine ⁽¹³⁾	"	"	基 -1/2 Serine	"
Tyrosine ⁽¹³⁾	"	"	基 -1/2 Phenylalanine	"
Tryptophan ⁽¹³⁾	"	"	基	"
Cystine ⁽¹⁴⁾	"	"	基 -1/2 (Glucose+Na-Acetate)	37°C, 17hrs.
Serine ⁽¹³⁾	"	"	基 -VB ₆ -1/2 (Thr.+Ala.) -1/5 Gly.+CaCl ₂	37°C, 96hrs.
Glycine ⁽¹³⁾	"	"	基	37°C, 48hrs.
Histidine ⁽¹³⁾	<i>Lact. fermenti</i> IAM 1148	1:5	基 -VB ₆	37°C, 72hrs.
Valine ⁽¹³⁾	<i>Lact. arabinosus</i> IAM 1041	1:100	基	"

* 基は基本型培地⁽¹³⁾を示す

蛋白質の加水分解に対するでん粉の影響を検討するため、でん粉量がそれぞれ10%, 25%, 50%となるように標準試料に可溶性でん粉を加え、これらを試料として上記の加水分解方法により、比較的糖の影響を受け易いと思われる Cystine, Methionine, Lysine, Tryptophan のほか、Leucine, Isoleucine, Threonine についても微生物定量を行なった。

(4) 微生物定量法

使用した菌株、培地は表1に示すように一般に使用されるもの⁽¹³⁾を用いた。また定量は滴定法により各アミノ酸とも3回以上の培養定量の平均値を出した。なお培地の滅菌は110°C、10分の加圧法によったが、Cystine⁽¹⁴⁾の場合は培地、試料液およびアミノ酸標準液を別々に、120°C、3分で加圧滅菌後、無菌的に加え合せて培養した。

実験結果

蛋白質の加水分解時間と酸あるいはアルカリの濃度およびアミノ酸定量値については、図1に示すような結果が得られた。また Tryptophan については比色法⁽¹⁶⁾による定量を行ない、微生物定量値と対照した。その結果は表2に示す。

これらの結果から各アミノ酸の微生物定量のための加

表 2 微生物法と比色法による牛乳 Casein 中の Tryptophan 定量値の比較

g/N16 g		備 考
微生物法	1.20	4N-NaOH, 15 hrs. にて加水分解
比色法 ⁽¹⁶⁾	1.29	
文献値 ⁽¹⁷⁾	1.39	

水分解方法としては、表3に示すような条件で行なう場合に最高値が得られると思われる。なおこの場合、加水分解中におけるアミノ酸の破壊は、遊離アミノ酸において起こるのみでなく、すでに Peptide 結合の状態のもとで起こるということが知られているので、加水分解条件の適否の決定は回収試験によらず、標準試料たる牛乳 Casein のアミノ酸組成の文献値⁽¹⁷⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ならびに微生物定量の最高値をもって加水分解方法の適否を決めた。

また加水分解過程における試料中の糖の影響を調べるために標準試料に種々の量の可溶性でん粉を加え、前記の条件によって加水分解し、糖の影響を受けやすいと思われる Cystine, Methionine, Lysine, Tryptophan のほか、Threonine, Leucine, Isoleucine についても微生物定量を行なったが、その結果は表4の如くである。これによれば50%の糖量では無糖時に比し Cystine では約4%の低値が認められるが、その他のアミノ酸では、

表3 最適加水分解条件とアミノ酸定量値(g/N16g)

	最高定 量 値	最 適 条 件	文献値 ¹⁷⁾
Cystine	0.36	4 N HCl-2 hrs.	0.30~0.51
Methionine	3.38	4 N HCl-6 hrs.	3.50
Threonine	3.94	3 N HCl-8 hrs.	4.10
Lysine	8.83	4 N HCl-4 hrs.	8.60
Isoleucine	6.17	4 N HCl-6 hrs.	6.60
Leucine	8.68	4 N HCl-6 hrs.	10.5
Phenylalanine	4.67	3 N HCl-8 hrs.	5.40
Valine	6.75	4 N HCl-8 hrs.	6.70
Arginine	4.19	4 N HCl-10hrs.	4.14
Aspartic acid	7.62	4 N HCl-6 hrs.	7.77
Glutamic acid	22.7	4 N HCl-6 hrs.	23.3
Glycine	2.84	4 N HCl-1 hrs.	2.21
Histidine	3.05	4 N HCl-6 hrs.	3.37
Proline	10.2	4 N HCl-6 hrs.	11.7
Serine	5.73	4 N HCl-4 hrs.	6.35
Tyrosine	5.13	4 N HCl-3 hrs.	6.30
Alanine	4.32	4 N HCl-8 hrs.	2.0~5.7
Tryptophan	1.2	4 N NaOH-15hrs.	1.39

表4 たん白質加水分解時における糖の影響

Starch (%)	定量値 (g/N16 g)	無糖時の 定量値に 対する割 合 (%)	Starch (%)	定量値 (g/N16 g)	無糖時の 定量値に 対する割 合 (%)
Cystine			Methionine		
0	0.358	100	0	3.30	100
10	0.352	98.3	10	3.32	100.6
25	0.348	97.2	25	3.25	98.5
50	0.345	96.3	50	3.25	98.5
Lysine			Threonine		
0	8.80	100	0	3.90	100
10	8.82	100.2	10	3.90	100.0
25	8.68	98.6	25	3.88	99.5
50	8.70	98.8	50	3.88	99.5
Leucine			Isoleucine		
0	8.62	100	0	6.15	100
10	8.58	99.5	10	6.17	100.3
25	8.60	99.8	25	6.15	100.0
50	8.55	99.1	50	6.14	99.8
Tryptophan					
0	1.21	100			
10	1.20	99.2			
25	1.21	100.0			
50	1.19	98.3			

Starch 0%=Casein 200mg

" 10%= " 180mg+ Starch 20mg
 " 25%= " 150mg+ " 50mg
 " 50%= " 100mg+ " 100mg

25~50%の糖量ではその影響は無視し得る程度に小さい

また Lysine については, Carpenter¹⁸⁾¹⁹⁾の DNP 法により生物的活性 (ϵ -NH₂-Lysine を定量し, その結果を微生物定量値と対照した。なおこの場合試料として炭水化物を多く含むものでは, DNP 法による値が低く出ることが Carpenter によっても報じられているので, この場合も前記同様標準試料たる牛乳 Casein に種々の量の可溶性でん粉を加えたものについて DNP 法を行ない糖の影響を調べた。その結果は表5に示す通りでやはり10~50%の範囲の糖含量は活性 Lysine の定量値に対し, 2~6%の範囲で影響することが認められる。

表5 DPN 法による Lysine の比色定量時に
おける糖の影響

Starch (%)	ϵ -NH ₂ -Lysine定量値	無糖時の定量値 に対する割合
0	8.77g/N16g	100 %
10	8.66	98.7
25	8.46	96.5
50	8.31	94.8

Starch 0%=Casein 20mg

" 10%= " +Starch 2.22mg
 " 25%= " + " 6.67mg
 " 50%= " + " 20.00mg

以上の通り蛋白質の加水分解は, 定量せんとする各アミノ酸ごとに表3による加水分解方式が最適のものと考えられるので, この方法により24種類の動物性および植物性食品につきアミノ酸組成の微生物定量を行ない, 併せて同じ試料につき DNP 法によって活性 Lysine を定量し, 表6および表7に示すような結果を得た。これらの結果から明らかなように, DNP 法による Lysine 値は微生物法によるそれにくらべて, 穀類, 芋類では96~97.5%, 魚肉では97~99.5%, 野菜類では92~97.8%の低値となるようである。

要 約

(1) 牛乳 Casein を標準試料とし, 微生物法による食品蛋白質のアミノ酸組成を行なうのに適当な蛋白質の加水分解条件を検討して, 標準となり得る加水分解方式を決定した。その結果

i この加水分解方法によった場合, 同一試料のアミノ酸組成については, 従来報告されている文献値とよく一致する結果が得られる。

ii この加水分解方法によれば, 試料中の糖量が50%の場合には, Cystine においては, 約4%の範囲で定量値に影響が認められるが, Methionine, Lysine, Tryptophanにおいては1.7~1.2%, その他のアミノ酸では無視し得る程度の影響しか認められない。

表 6 各種食品蛋白質の微生物法によるアミノ酸組成定量値 (mg/N1g)

食 品 名	Try.	Thr.	Ileu.	Leu.	Lys.	含 硫 ア ミ ノ 酸			Phe.	Tyr.
						Met.	Cys.	計		
とろろ とろろ とろろ とろろ とろろ	52	215	260	766	241	124	91	215	278	181
	85	370	387	435	439	124	80	204	400	152
	91	268	334	640	422	105	113	218	331	110
	76	224	318	441	329	136	74	206	248	119
	76	302	465	450	676	142	97	239	235	206
いぐい いぐい いぐい いぐい いぐい	83	301	464	525	687	155	94	249	268	217
	97	414	663	687	884	188	120	308	371	290
	86	385	551	589	707	167	84	251	315	243
	73	293	466	482	778	138	89	227	238	201
	69	318	528	543	758	156	104	260	272	221
かこ かこ かこ かこ かこ	70	315	546	523	730	176	100	275	269	218
	73	329	540	530	766	176	98	274	268	227
	64	284	428	439	620	138	84	222	193	180
	79	339	588	528	758	164	96	260	251	209
	71	311	488	473	751	153	79	232	216	186
ま ま ま ま ま	73	335	491	539	735	171	96	267	244	202
	69	312	480	522	767	168	95	263	239	168
	71	311	447	508	683	161	96	257	267	162
	68	316	433	505	718	163	105	268	248	186
	53	218	353	488	417	62	71	133	342	200
燕 燕 燕 燕 燕	64	199	161	369	415	68	48	116	151	128
	80	275	202	533	463	95	105	200	418	188
	41	203	204	465	401	49	57	106	320	111
	47	153	245	274	239	47	79	126	241	102

食 品 名	Val.	Arg.	His.	Ala.	Asp.	Glu.	Gly.	Pro.	Ser.	粗 N%
とろろ とろろ とろろ とろろ とろろ	383	384	107	226	357	1086	234	651	286	2.06
	454	364	135	239	844	1276	242	303	332	0.28
	270	380	129	259	975	1068	324	252	333	0.22
	335	282	106	244	765	1059	191	267	244	0.29
	376	433	177	370	643	932	305	217	284	2.89
いぐい いぐい いぐい いぐい いぐい	366	448	144	373	698	984	269	213	281	2.69
	493	693	184	506	939	1348	392	311	394	2.02
	432	537	323	451	764	1074	381	289	347	3.07
	325	373	381	364	645	765	312	232	279	2.56
	372	528	165	376	730	1035	309	234	344	2.56
かこ かこ かこ かこ かこ	426	531	182	345	705	988	294	236	301	2.74
	360	551	157	293	712	1045	305	251	315	2.48
	333	347	243	319	589	673	256	190	247	3.19
	355	537	168	378	735	971	313	236	288	2.56
	368	380	282	234	627	835	285	204	266	3.06
ま ま ま ま ま	389	433	137	329	725	1004	288	181	286	2.77
	389	465	171	332	677	960	271	178	275	2.85
	393	491	153	333	584	828	320	177	299	2.80
	325	596	131	334	603	936	357	255	265	2.02
	379	565	206	251	663	1189	270	363	331	2.48
燕 燕 燕 燕 燕	349	354	122	149	427	689	308	224	235	0.10
	437	529	208	227	556	749	385	306	258	0.24
	433	399	82	281	641	534	337	316	293	0.09
	317	494	97	288	702	533	257	208	188	0.11

表7 DNP法による生物的活性 Lysine の定量

食 品 名	生物的活性Lysine 定量値 (mg/N1g)	微生物定量値 との比較(%)
とうもろこし	235	97.5
さつまいも	428	97.4
さといも	407	96.4
じゃがいも	315	95.7
あじ	665	98.3
いさき	681	99.1
ぐち	880	99.5
いわし	702	99.3
かつお	767	98.5
かれい	751	99.1
かます	721	98.7
こち	757	98.8
さば	602	97.0
さより	748	98.7
さんま	742	98.8
まだい	722	98.2
とびうお	755	98.4
ぼら	673	98.5
いか	707	98.4
えだまめ	408	97.8
蕪	397	95.6
蕪葉	450	95.6
かぼちゃ	385	96.0
キャベツ	220	92.1

iii この加水分解方法による Lysine の定量値を、DNP法によるそれと比較すると、無糖の場合は両者はよく一致するが、糖量の増加に従い後者は小となり、50%の糖量においては約4%の差が出る。

(2) 上記の加水分解方法に従い24種類の動物性および植物性食品につき微生物法によりアミノ酸組成を定量し併せて DNP 法による生物的活性 Lysine を定量したがその値は微生物定量法による Lysine の値にくらべて動物性食品では97.0~99.5%、植物性食品では92~97.8%の低値を示した。

考 察 と 結 論

酸またはアルカリによる蛋白質の加水分解液につきアミノ酸を定量する場合、加水分解条件が定量値にかなり大きい影響をもつ。ことに試料の糖含有量が高い場合、Cystine, Methionine, Lysine, Tryptophan などの定量にはその影響は無視し得ないことが知られている。われわれは加水分解時における加熱条件と試料の糖含有量との影響につき検討した結果、アミノ酸の定量に際して最も短い時間内に蛋白質の加水分解を完了せしめ、かつ

アミノ酸の損失を最小にとどめるためには、個々のアミノ酸ごとに最適の加水分解条件に従って試料を加水分解する必要を認めた。このことは表3によって、各試料につき18種のアミノ酸の定量には9種の加水分解液を作る必要があることを意味し、一見きわめて複雑な方法と考えられる。しかしこれは蛋白質の完全加水分解と、アミノ酸の最少損失を期すために必要な条件であって、実際問題としてそれぞれのアミノ酸の定量値について、定量可能な最高値からの偏差の認め方如何によってはこの条件を厳守する必要性は変わるものと思われる。

この研究に使用した菌株はいずれも東京大学応用微生物研究所から、また Leucovorin は醗酵研究所児玉礼次郎氏から分譲されたものであり、また試料の調製には東雲栄養学園中島敏彦氏の労を煩わした。誌上から厚く謝意を表する。

(本研究の要旨は昭和38年4月第17回日本栄養・食糧学会において報告した。)

文 献

- Horn, M. J. and Blum, A. E. : *Cereal Chem.*, **33**, 18 (1950)
- Balasubramanian, S. C. and Ramachandran, M. : *Food Research*, **23**, 119 (1958)
- Miller, B. S. et al: *Cereal Chem.*, **27**, 96 (1950)
- Wolfe, M. and Fowden, L. : *Cereal Chem.*, **34**, 286 (1957)
- Hepburn, F. N., Lewis, E. W. and Elvehjem, C. A. : *Cereal Chem.*, **34**, 312 (1957)
- Berssani, R. and Mertz, E. T. : *Cereal Chem.*, **35**, 227 (1958)
- Kuiken, K. A., Lyman, C. M. and Hale, F. : *J. Biol. Chem.*, **171**, 551 (1947)
- Fry, J. L. and Stadelman, W. J. : *J. Agr. Food Chem.*, **8**, 243 (1960)
- 宮本悌次郎外：栄養と食糧，**12**, 265 (1959)
- 松下アヤコ：栄養と食糧，**12**, 166 (1959)
- 西原綾子外：栄養学雑誌，**17**, 119 (1959)
- 杉村敬一郎外：栄養と食糧，**10**, 141 (1957)
- 赤堀・水島編：蛋白質化学，第1巻
- 鈴木・村岡：ビタミン，アミノ酸の微生物定量法，その技術と応用，p. 94
- 化学の領域，増刊11号，推計学の化学及び生物学への応用，第二集，Bioassayと推計学，p. 100
- 化学の領域，増刊33号，光電比色法，p. 77
- Steel, B. F. et al: *J. Biol. Chem.*, **177**, 533 (1949)
- Carpenter, K. J. et al: *Biochem. J.*, **61**, xi-xii (1955)
- Bruno, D. and Carpenter, K. J. : *Biochem. J.*, **67**, 13p (1957)
- Block, R. J. and Weiss, K. W. : *Amino Acid Handbook, Methods and Results of Protein Analysis*, 1956.
- Block, R. J. and Bolling, D. : *The Amino Acid Composition of Proteins and Foods, Analytical Methods and Results*, 1951. (愛媛大学農学部)