凍結乾燥卵白の加熱による栄養価の変化 (その2)

Effect of Heat on the Nutritive Value of Freeze-Dried Egg White (Part 2)

“有効性リジン” 量ならびに *in vitro* でのプロテアーゼによる分解率の変化

Changes in Available Lysine and in *in vitro* Digestibility with Proteases

(昭和 45 年 5 月 8 日 受 理)

石原美津子* 守時圭子* 吉田 昭*
(Mitsuko Ishihara) (Keiko Moritoki) (Akira Yoshida)

When freeze dried egg white is autoclaved at 100°C, for 30 min. or at 120°C, for 30 min., its digestibility by rat remarkably decreases. Changes in DNP-available lysine and *in vitro* digestibility with several proteases were studied for the autoclaved freeze dried egg white samples. DNP-available lysine in the freeze dried egg white decreased by autoclaving but the decrease of available lysine was not sufficient to explain the severe depression of nutritive value of the freeze dried egg white in the feeding experiment with rats. Maximum digestibilities of the freeze dried egg white by several proteases *in vitro* was generally observed when the samples were autoclaved at 100°C, for 3 to 5 min., and the longer autoclaving sharply depressed the digestibilities. However, the digestibilities of the freeze dried egg white autoclaved at 100°C, for 30 min. were not lower than those of the values obtained with unautoclaved sample except for pepsin. Only digestibility by pepsin significantly decreased by autoclaving. It was discussed whether the low digestibility of autoclaved freeze dried egg white *in vivo* is mainly due to the resistance for pepsin or not.

前報¹⁾において著者らはトリプシン阻害物質の失活のために用いる蒸気処理によって凍結乾燥卵白のタンパク質の栄養価が著しく低下することを認め、その変化がタンパク質中の一部のアミノ酸の分解によるものでなく、タンパク質全体としての消化率の低下によるものであることを報告した。この蒸気加熱による栄養価の低下は比較的緩やかな条件でもかなり著しいものであり、タンパク質の変性と栄養価の関連を追求する材料として好適なものの一つと考えられるし、凍結乾燥による食品および食品材料の保存が次第に多くなり、これらの二次加工における栄養価の変化に対する基礎知識としても興味ある問題と考えられたのでタンパク分子の変化の実態をさらに詳細に調べるべく実験を行なった。前報¹⁾で蒸気加熱凍結乾燥卵白の栄養価はリジンの添加だけでは回復せず殆んど全部の必須アミノ酸の添加が必要であることを示したが食品中のリジンのε-アミノ基は不安定で、容易に糖その他と結合して生体に利用されない型になることが知られている²⁾³⁾からタンパク分子の変化の一部として有効性リジン量が上記の加熱処理によってどのように変化するかを検討した。また、消化率が低下する際に種々の

タンパク分解酵素が一樣に作用し難くなっているのか、特定の酵素の作用のみが作用し難いような構造変化を起こしているのかなどについても併せて検討したので報告する。

実 験

実験材料：市販の鶏卵から卵白を分離して凍結乾燥し実験材料とした。蒸気加熱の際には凍結乾燥卵白をあらかじめ乳鉢にて粉末にし、木綿袋に入れて滅菌用オートクレーブで所定の温度で必要な時間加熱し、加熱後室温で乾燥した。

有効性リジンの定量法：Carpenter⁴⁾のいわゆる DNP-有効性リジンの測定法を参考にした。5 mg 程度のリジンを含む試料を太試験管に秤量し、10% NaHCO₃ 3 ml を加えて振とう後しばらく放置する。2.5% のフルオロジニトロベンゼン (FDNB) のアルコール溶液を 5 ml 加え、パラフィルムでふたをして 2 時間振とう、沸とう浴中でアルコール、炭酸ガスを除き、6N-HCl 15 ml を用いて 20 ml 容のアンフル中に内容に移す。窒素ガス充填後封入し、110°C、24 時間オートクレーブで加水分解する。冷却後 100 ml の定容フラスコ中に濾過し、

* 徳島大学医学部栄養学科

Table 1. Composition of the reaction mixture for *in vitro* digestion of freeze dried egg white with various proteinases

Enzyme	Substrate		Enzyme		Reaction time	pH
	Concentration	Volume	Concentration	Volume		
Trypsin	1.0 %	2.0 ml	1.0 %	2.0 ml	20 min.	7.6
Pancreatin	1.0	2.0	1.0	2.0	20	7.6
Pronase	1.0	5.0	1.0	1.0	10	8.0
Biopraxe	1.0	5.0	1.0	1.0	10	7.4
Pepsin	2.5	5.0	2.0	1.0	10	1.8

Reaction temperature was 37°C.

Table 2. Effect of autoclaving on the DNP-available lysine in freeze dried egg-white or -yolk. Available lysine was determined by Carpenter's method^{a)}

Sample	Available Lysine	
	% of Total Lys	mg/gN
A. 1) Freeze dried egg white (F. D. E. W.)	83.6	311.0
2) F. D. E. W., Autoclaved (120°C, 30 min.)	69.3	258.0
3) F. D. E. W., Glucose removed ^{b)}	99.2	369.0
4) F. D. E. W. Glucose removed ^{b)} Autoclaved (120°C, 30 min.)	87.9	326.5
5) Freeze dried egg yolk (F. D. E. Y.)	80.0	383.5
6) F. D. E. Y., Defatted ^{c)}	93.2	447.0
B. 7) F. D. E. W.	95.8	356.5
8) F. D. E. W. (Trypsin treated) ^{d)}	91.6	341.0
9) F. D. E. W. (Pepsin treated) ^{e)}	93.2	346.5
C. 10) F. D. E. W.	97.4	362.0
11) F. D. E. W.+DNP ^{f)}	92.2	343.0

^{a)} See literature cited 4).

^{b)} Traces of glucose in the egg white were removed by bacterial glucose oxidase before freeze-drying.

^{c)} Freeze dried egg white was extracted with hexane, followed by ethanol and hexane.

^{d)} Freeze dried egg white was mildly treated with trypsin.

^{e)} Freeze dried egg white was mildly treated with pepsin.

^{f)} DNP-protein sample was hydrolyzed at the presence of 1g of dinitrophenol.

溶液 2 ml を試験管 A と B に、20 ml をコニカルビーカー C に採る。試験管 A, B にはエーテル 5 ml を加えエーテル抽出後、エーテル層を除き、試験管 A は 1 N-HCl で 10 ml にして 435 mμ で比色する。ビーカー C は 10% NaOH でフェノールフタレイン指示薬を用いて中和し、滴定量の 1/10 の NaOH を試験管 B に加えて中和する。次に、10% NaHCO₃ 2 ml を加えアルカリ性にした後、クロル炭酸メチル 0.05 ml を加え 5 ~ 10 分後に濃塩酸 0.75 ml を加える。エーテル 5 ml で抽出後エーテル層を除き、水で 10 ml にして 435 mμ で比色定量する。A で得られた定量値から B で得られた値を差し引いたものを ε-ジニトロフェニルリジンとして純粋な ε-ジニトロフェニルリジン塩

酸塩の 1 N-HCl 溶液による検量線によって計算する。

なお、一部の実験では試料タンパク質を DNP 化後加水分解し、アミノ酸自動分析器によってリジン量を定量し、その時に得られるリジンを結合型リジン (Blocked lysine) として全リジン量と結合型リジン量の差で有効性リジン量を計算した⁵⁾。

In vitro におけるプロテアーゼによる分解：トリプシン (メルク社製)、パンクレアチン (ディフコ研製)、ペプシン (和光純薬製)、プロナーゼ (科研化学製)、ビオブラーゼ (長瀬産業製) に対する分解の受け易さについて測定した。何れの場合についても反応温度は 37°C 反応後、5% トリクロル酢酸で反応を止め、溶液について

280m μ における吸光を Hitachi-Perkin-Elmer VIS-UV-139型分光光度計によって測定した。基質や酵素の濃度、反応時間などは Table 1 に示される。

トリプシンインヒビターの活性測定：2 ml のカゼイン溶液（ディフコ製精製カゼイン 2 mg を pH 7.4 のリン酸緩衝液 50 ml に溶解）に種々の濃度のトリプシンインヒビター試料のリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶かしたものの 2 ml、4 mg% のトリプシン液 1 ml（結晶トリプシン、シグマ製）を加え 37°C で 10 分間反応させて後、10% 過塩素酸 10 ml を加えて反応を止め、 γ 過渡後液の 280 m μ における吸光を測定しインヒビター濃度と阻害率の関係をグラフで示し、この条件で酵素活性を 50% 阻害するインヒビターを便宜上 1 単位としてインヒビターの含量を計算した。

溶解度の測定：試料を水あるいは 3% 食塩水に室温で溶解し、 γ 過渡後ケルダール法で窒素を定量し、溶解度を計算した。

結 果

凍結乾燥卵白を蒸気処理した際の“有効性リジン”を Carpenter の方法で測定した結果を Table 2 に示す。蒸気加熱しない凍結乾燥卵白では全リジンの 84~97% がこの方法により“有効性リジン”として測定され、120°C で 30 分蒸気加熱したものでは 69% に減少した。前報に述べた如く、凍結乾燥卵白を蒸気処理した際の栄養価の低下はタンパク質全体としての消化率の著しい低下が大きな原因であると考えられるが、“有効性リジン”量も比較的わずかではあるが低下していることは明らかである。凍結乾燥する前にあらかじめバクテリアのグルコースオキシダーゼで脱糖した卵白の凍結乾燥物は、脱糖しない凍結乾燥卵白に比べて一般にやや高い“有効性リジ

ン”量を示した。卵黄の凍結乾燥物については“有効性リジン”量は約 80% であったのに比し、凍結乾燥卵黄をヘキサンおよびアルコールで脱脂した試料では約 93% でかなり高い値が得られたことは脂質の存在によって FDNB が作用し難いのではないかと考えられる。

タンパク質試料に FDNB を作用させる場合、タンパク質試料は溶液でなく分散状態であるため分子を小さくするので、あらかじめトリプシン、あるいはペプシンで部分的に加水分解した後、FDNB を作用させ“有効性リジン”を測定してもその値は全く増加しなかった。Blom⁵⁾ は DNP 化させたタンパク質を加水分解の際一部の ϵ -DNP リジンは分解し、加水分解の際にジニトロフェニルヒドラジンを添加しておくことと分解が少なくなると述べているので、加水分解直前にジニトロフェニルヒドラジンを添加して同様に処理したが、特に高い値は得られなかった。

つぎに、FDNB でタンパク試料を DNP 化後加水分解してアミノ酸自動分析器によりリジンを定量（この際遊離のリジンとして定量されるものは DNP 化以前には ϵ -アミノ基に何かが結合していたため DNP 化されず加水分解の時に遊離のリジンになったものと考えられる）して、全リジン量から差し引いて得た“有効性リジン”の値を Table 3 に示す。このような方法によっても全般には同様の結果が得られ、100°C 30 分、120°C 30 分の蒸気処理で“有効性リジン”量は順次低下していくことがわかった。あらかじめ脱糖した凍結乾燥卵白では 120°C 30 分の蒸気処理でも“有効性リジン”の量は殆んど低下せず卵白中の微量の糖が蒸気加熱による“有効性リジン”の低下に大きく影響していることが示された。凍結乾燥卵白を 100°C で 3、5、10、30 分蒸気加熱した時の種々のプロテアーゼによる分解の受け方を Fig. 1 に示

Table 3. Effect of autoclaving on the DNP-available lysine in freeze dried egg-white or -yolk. Available lysine was calculated from the blocked lysine determined^{a)}

Sample	Blocked Lys	Available Lys
	%	%
1) Freeze dried egg white (F. D. E. W.)	7.28	92.72
2) F. D. E. W., Autoclaving (100°C, 30 min.)	14.25	85.75
3) F. D. E. W., Autoclaving (120°C, 30 min.)	21.32	78.68
4) F. D. E. W., Glucose removed ^{b)}	2.79	97.21
5) F. D. E. W., Glucose removed ^{b)} Autoclaved (120°C, 30 min.)	7.83	92.21
6) Freeze dried egg yolk (F. D. E. Y.)	1.76	98.24
7) F. D. E. Y., Defatted ^{c)}	1.40	98.60

^{a)} See literature cited 5).

^{b)} Traces of glucose in the egg white were removed by bacterial glucose oxidase before freeze-drying.

^{c)} Freeze dried egg yolk was extracted with hexane, followed by ethanol and hexane.

Fig. 1. Effect of length of autoclaving (100°C) of freeze dried egg white on the digestibility by proteases *in vitro*

Fig. 2. Effect of length of autoclaving (100°C) of freeze dried egg white on the content of trypsin inhibitor. The unit of inhibitor was defined arbitrarily and described in the text.

Fig. 3. Effect of length of autoclaving (100°C) of freeze dried egg yolk on the digestibility by proteases *in vitro*.

す。たて軸は 280mμ における吸光度を示しているが、どのプロテアーゼについても、凍結乾燥卵白を 3～5 分蒸気加熱した時に最も分解を受け易く、それ以上の時間加熱した場合には急激に分解率が低下していた。この際トリプシン以外のプロテアーゼは 3 分の蒸気加熱で最も分解率が高くなったが、トリプシンの場合には 3 分加熱の分解率は 5 分加熱の値に比して、かなり低い値を示した。このことは卵白中のトリプシンインヒビターの残存による可能性が高いので、試料中のトリプシンインヒビターの量を測定した結果を Fig. 2 に示す。100°C に 5 分以上蒸気加熱した場合にはインヒビター活性は殆んどみられなかったが 3 分間の処理では約 50% 近くが残っていることが示された。

100°C 30 分の蒸気加熱で凍結乾燥卵白の *in vivo* での消化率はかなり低下していたにもかかわらず (前報)¹⁾、トリプシン、パンクレアチン、プロナーゼによる *in vitro* での分解は加熱しない試料に比して低下しておらず、ペプシンとビオブラーゼによる分解のみが著しく低下していることが認められた。

凍結乾燥した卵黄についても同様に 100°C の蒸気で加

熱することによってこれらのプロテアーゼによる分解がどのように異なるかを検討した (Fig 3)。この場合にも 100°C 5 分前後の蒸気加熱で、いずれのプロテアーゼによっても分解され易くなったが、凍結乾燥卵白と異なって 30 分の蒸気加熱によってもペプシンやビオプラナーゼによる分解率は無処理のものに比して低下はみられず、ペプシンに対しては 30 分蒸気加熱試料の方が良好な分解率を示した。

考 察

前報¹⁾において凍結乾燥卵白を蒸気加熱したときの著しい栄養価の低下はある特定のアミノ酸の利用率の低下に起因すると考えるよりも、むしろタンパク質全体としての消化率の減少が主要な原因ではないかということを示唆したが、有効性リジン量の変化からみてもその減少は比較的わずかであり、栄養価に及ぼしている影響は少ないと考えられる。しかし、蒸気加熱によって有効性リジンの一部が減少していることも確かであり、蒸気処理温度が高い方が減少量も大きくなっている。卵白中の糖含量はごくわずかではあるが、グルコースオキシダーゼ処理によって蒸気加熱による有効性リジンの減少は少なくなっているから、少量のグルコースがタンパク質中のリジンのε-アミノ基との結合に大きく関与していることが推定される。

Carpenter の方法⁴⁾による有効性リジンの定量は同時に多くの試料を取扱える点で実用的であるが、比較的ばらつきが大きく問題のあることが指摘されている⁵⁾。著者らの経験では試料を DNP 化後、加水分解してアミノ酸分析器でリジンを測定し、ここで遊離リジンとして測定されるものを試料中の“結合型リジン”として試料中の総リジン量から差し引いて“有効性リジン”を計算することが、経済的には高価につくが、ばらつきのより少ない結果が得られた。

In vitro のプロテアーゼによる分解に対する蒸気加熱時間の影響をみると、本実験に用いたプロテアーゼ 5 標品のいずれの場合にも、凍結乾燥卵白を 100°C で 3～5 分蒸気加熱した時に分解は最大であったが、100°C 30 分処理では未処理に比して著しく分解率の低下したのはペプシンによる場合だけで、パンクレアチン、トリプシンによる分解では未処理試料に比して分解率が下がらずトリプシンの作用はむしろ未処理のものが一番受けにくかった。このような結果から考えると、蒸気加熱した凍結乾燥卵白が *in vivo* の条件で非常に消化され難いのが主としてペプシンによる分解が困難なためと考えられないこともない。他方、無処理の凍結乾燥卵白はトリプシン阻害物質の存在のために *in vitro* ではトリプシンによ

Fig. 4. Effect of length of autoclaving (100°C) of freeze dried egg white on the solubility in water and 3% NaCl

って分解され難いが、生きたネズミによる消化試験では消化率は高く、真の消化率は約 97% であった¹⁾ から、*in vitro* での消化試験結果と *in vivo* での状態の差異については十分の考慮が払われなければならないと考えられる。

凍結乾燥卵白を蒸気加熱すると溶解度が急激に減少する (Fig 4)。このような食品タンパク質の溶解度が栄養価と関連することを示す報告もあり⁷⁾、また必ずしも相関を示さないということも報告されている⁸⁾。本実験結果では 100°C 3～5 分の蒸気加熱ですでに溶解度は水に対しても食塩水に対しても著しく減少していたが、この時点では *in vitro* の消化率は最高になっており、溶解度が単純に消化率と相関を有しているとは考えられない。

今後、蒸気加熱凍結乾燥卵白の不消化性が生体において実際に主としてペプシン作用を受け難くなっているためか、その他の酵素作用をも受け難くなっているのか、検討されねばならないし、蒸気加熱によってタンパク質がどのような変性をしたのか調べる必要があると思われる。

文 献

- 1) 吉田 昭, 守時圭子, 喜来良子: 栄養と食糧, 22, 26 (1969)
- 2) Eldred, N.R., Rodney, G.: *J. Biol. Chem.*, 162, 261 (1946)
- 3) Carpenter, K. J., Ellinger, G. M., Munro, M. I., Rolfe, E. J.: *Brit. J. Nutr.*, 11, 162 (1957)
- 4) Carpenter, K. J.: *Biochem. J.*, 77, 604 (1960)
- 5) Blom, L., Hendricks, P., Caris, J.: *Anal. Biochem.*, 21, 382 (1967)
- 6) Rao, S. R., Carter, F. L., Frampton, V. L.: *Anal. Chem.*, 35, 1927 (1963)
- 7) Lyman, C. M., Chang, W.Y., Couch, J. R.: *J. Nutr.*, 49, 679 (1953)
- 8) Bolloun, S. L., Johnson, E.L., Arnold, L. K.: *Poultry Sci.*, 32, 513 (1953)