脂質の酸化にともなう卵アルブミンの 生物価および有効性リジンの変化†

柳 田 晃 良, 菅 野 道 廣

九州大学農学部食糧化学工学科

Changes in Biological Value and Available Lysine of Egg Albumin Accompanied with Oxidation of Lipid†

Teruyoshi YANAGITA, Michihiro SUGANO

*The Laboratory of Nutrition Chemistry, Department of Food Science and
Technology, Kyushu University School of Agriculture, Fukuoka*

Experiments were performed to estimate the changes in the nutritional value of albumin accompanied with the oxidation of lipid in the system composed of egg albumin-ethyl linoleate (2 : 1, w/w, at 50°C and RH 80.4%).

Accompanied with oxidation of ethyl linoleate, browning of albumin occurred. The quantity of available lysine were decreased to one-half that of unreacted albumin at the day 7. There was a close correlation between the browning value and available lysine content ($r = -0.977$). Solubility and digestibility *in vitro* by pepsin were also decreased. The contents of histidine, lysine, arginine and methionine in the reacted albumin were reduced.

The biological value and true digestibility of albumin which had been reacted with the oxidized linoleate for 7 days decreased significantly, the extent of which being approximately 20% and 10%, respectively, in comparison to those of unreacted albumin.

These damages of egg albumin accompanied with lipid oxidation were considerably more remarkable than those of casein, thus indicating much labile properties of albumin to oxidized lipid.

(Received March 22, 1974)

脂質が酸化を受けると、それ自身劣化すると同時に、共存する他成分にも変質を引き起こす。ビタミンA、 α -トコフェロール、アスコルビン酸、ATP、核酸の酸化分解や酵素たん白質の変性が報告されている^{1)~4)}。しかし、たん白質の栄養価に及ぼす影響に関する知見は少ない⁵⁾⁶⁾。

著者ら⁷⁾⁸⁾は、先に、リノール酸エチルの酸化にともない、カゼインの有効性リジン量は低下し、構成アミノ酸中リジンに加えて、ヒスチジン、アルギニン、スレオニンの損傷が著しいこと、そのため酸化脂質と反応したカゼインの、白ネズミにおける生物価は顕著に低下し、肝臓成分にも影響を及ぼすことを報告した。

Roubal ら⁹⁾は酸化脂質と反応したたん白質の構成アミノ酸の損傷は、たん白質の種類により異なることを報

告している。Narayan ら¹⁰⁾はあらかじめ加熱酸化させた脂質と、数種のたん白質を水の存在下で反応させたとき、たん白質-酸化脂質複合体の生成量は、たん白質によって異なることを認めている。これらの結果は、脂質の酸化にともなうたん白質の栄養価の変化もまた、たん白質の種類、すなわち物理的ないしは化学的な性質の相違によって、異なる可能性を示す。

本実験では、カゼインと構成アミノ酸が著しく異なる卵アルブミンを用いて、脂質の酸化にともなう栄養価の変化を調べ、先に報告したカゼインの場合⁷⁾⁸⁾と比較検討した。

実 験 方 法

1. 試験アルブミンの調製法

卵アルブミン (Difco 製、可溶性) とリノール酸エチル (東京化成製、純度 93%) を 2 : 1 (w/w) の割合で乳鉢中で十分混合し、50°C、相対湿度 (RH) 80.4%、蛍光灯 (白色光、最大波長 580 m μ) 照射下で放置した。一定時間後、Waring blender 中で撹拌し、エチルエー

† たん白質の栄養価におよぼす酸化脂質の影響 (第3報)

† Effect of Oxidized Fats on the Nutritive Value of Proteins (Part III)

テルおよびアセトンで十分脱脂したのち、風乾して試料を調製した。対照としては、リノール酸エチル無添加のアルブミンを同様に処理して用いた⁷⁾。

2. 過酸化価およびカルボニル価の測定法

エチルエーテル抽出物について過酸化価 (POV) は AOAC 法¹¹⁾ で、カルボニル価 (CoV) は熊沢らの方法¹²⁾ に準じて測定した。

3. 有効性リジンの定量法およびアミノ酸分析法

有効性リジンは Carpenter らの FDNB 法¹³⁾ で定量し、Lys g/16 g N で示した。アミノ酸組成は各試料を 6 N-HCl 中で、105°C、48 時間加水分解後、アミノ酸自動分析機 (日本電子 6 AH) で分析した。

4. 褐変度、溶解度および人工消化率の測定法

褐変度および人工消化率は、前報⁷⁾ に準じて測定した。溶解度は試料約 100 mg に 3% NaCl 溶液 20 ml を加え、37°C で 1 時間振盪し、不溶性たん白質を遠心分離後、上澄液中の窒素量を測定し、対照アルブミンの溶解度を 100 としたときの相対値で示した。

5. 生物価および真の消化率の測定法

たん白質の生物価および真の消化率は、Mitchell らの方法¹⁴⁾ に準じて測定した。詳細は前報⁷⁾ のとおりである。

実験結果

1. 脂質の経時的変化

卵アルブミン・リノール酸エチル混合物を 50°C, RH 80.4% で放置したときの脂質の POV, CoV の経時的変化を Fig. 1 に示した。ヒドロパーオキシドは 2 日目で最高値 (POV, 2,500 m·eq/kg) を示し、以後漸次低下した。CoV の経時的変化も POV の場合と、ほぼ同様であった。カゼイン・リノール酸エチル系における同条件での変化⁷⁾と比較し、POV が最高値に達する時間は早く、かつその値も高かった。

Fig. 1. Time course of lipid oxidation in the albumin-ethyl linoleate mixture (2:1, w/w) at 50°C, RH 80.4%.

2. たん白質の経時的変化

Fig. 2 に示すように卵アルブミンは脂質の酸化にともない褐変し、その変化は経時的に顕著となった。有効性リジン量は逆に直線的に減少した。対照アルブミンでは 7 日目では 3.3 g/16 g N と約 50% の低下を示し、酸化脂質との反応により、顕著に損傷をうけることが認められた。褐変度と有効性リジン量の減少の間には、高い相関関係 ($r = -0.977$) が認められた。

ペプシンによる人工消化試験の結果 (Fig. 3), 消化率は 1 日後よりわずかながらすでに低下した。3 日目以降の低下は急速であり、7 日目では未反応物での値の約 20% にまで低下した。

トリプシンによる人工消化試験では、卵アルブミン中に存在するトリプシンインヒビター (オボムコイド)¹⁵⁾ のため、対照および酸化脂質と反応したアルブミンのいずれにおいてもまったく消化されなかった。すなわち、酸化脂質との反応によっても、卵アルブミン中のトリブ

Fig. 2. Changes in the content of available lysine and browning value in the albumin-ethyl linoleate mixture (2:1, w/w) at 50°C, RH 80.4%.

Fig. 3. Changes in *in vitro* relative digestibility by pepsin and solubility in 3% NaCl solution of albumin reacted with oxidized ethyl linoleate at 50°C, RH 80.4%.

Table 1. Amino acid composition of albumin reacted with oxidized lipid.

Amino acids	Control albumin	Reacted albumin ^{a)} (g/g N)	Loss (%)
Lys	0.47	0.34	28
His	0.16	0.09	44
NH ₃	0.14	0.12	15
Arg	0.37	0.34	8
Asp	0.72	0.73	0
Thr	0.29	0.29	0
Ser	0.45	0.45	0
Glu	1.06	1.06	0
Pro	0.26	0.26	0
Gly	0.24	0.25	0
Ala	0.42	0.43	0
Cys	0.09	0.08	12
Val	0.48	0.50	0
Met	0.26	0.23	16
Ile	0.37	0.38	0
Leu	0.62	0.62	0
Tyr	0.26	0.25	4
Phe	0.42	0.41	2

^{a)} Albumin-ethyl linoleate mixture (2 : 1, w/w) was incubated at 50°C, RH 80.4 % for 7 days and defatted with ethyl ether and acetone.

Table 2. Composition of diets (%).

Ingredients	Low protein diet	Control albumin diet	Reacted albumin ^{a)} diet
Wheat starch	70.85	64.85	63.75
Cellulose	1	1	1
Sucrose	10	10	10
Control albumin	—	9	—
Test albumin	—	—	10.1 ^{b)}
Egg albumin ^{c)}	3	—	—
Corn oil	10	10	10
Salt mixture ^{d)}	4	4	4
Vitamin mixture ^{d)}	1	1	1
Choline chloride	0.15	0.15	0.15

^{a)} See Table 1.

^{b)} Nitrogen content is equal to that of control albumin.

^{c)} Prepared by repeated extraction of lipids from fresh egg with acetone and ethyl ether.

^{d)} Purchased from the Tanabe Amino Acid Research Foundation.

シンニンヒビターの損傷は、ほとんど起こらないと判断される。

たん白質の溶解度と栄養価との相関関係を示唆する報告¹⁹⁾がある。そこで、3% NaCl 溶液に対する溶解度を求めた (Fig. 3)。溶解度は3日目で約 50% に低下し、5日目以降ではとくに著しく低下し、7% 以下になった。

3. アミノ酸組成

7日間反応させた卵アルブミンのアミノ酸組成を Table 1 に示した。ヒステジン、リジンの損傷がとくに著しく、アルギニンおよび含硫アミノ酸でも、いくらかの損失が認められた。他のアミノ酸では、ほとんど変化はなかった。

4. 生物価および真の消化率

Table 2 に示す組成の飼料を Wistar 系雄白ネズミに与えた。試験アルブミンは7日間、50°C, RH 80.4% で反応させたものである。Table 3 のように、第Ⅱ期と第Ⅲ期では飼料摂取量にいくらかの差はあるが、両期の生物価には差が認められない。したがって同一白ネズミにおいて、異なった期で得られたたん白質の生物価を、直接比較することができる。このことは、たん白質の真の消化率の場合にもあてはめることができる。

第Ⅱ期と第Ⅲ期で得られた対照アルブミンと、反応アルブミンの生物価、および真の消化率の結果を Table 4 に示した。反応アルブミンの生物価 77.8% は対照アルブミンの生物価 97.4% と比較し、著しく低下した ($p < 0.01$)。真の消化率も酸化脂質との反応により、明らかに低下した。低下の割合は、生物価で約 20% であるのに対し、真の消化率で約 10% であり、前者でより顕著であった。

NPU (net protein utilization) を求めたところ、対照アルブミンは 97.1 ± 0.5 、反応アルブミンは 69.6 ± 0.9 、その差は 27.5 ± 1.0 であり低下は有意であった ($p < 0.01$)。

考 察

Narayan ら¹⁰⁾はカゼイン、ゼラチンに比べ、アルブミンは酸化脂質と複合体を形成しやすいたん白質の一種であることを報告している。本実験でも、卵アルブミンはカゼインに比べ、酸化脂質と反応しやすいたん白質であることを示した。脂質の酸化にともなう卵アルブミンの有効性リジン量の低下の割合は、カゼインの場合とほぼ同様であったが、褐変度の増加とペプシンによる消化率の減少はアルブミンでかなり著しかった⁷⁾。カゼインの場合と比較し、アルブミンと混合した脂質の酸化速度と程度は著しい。リノール酸エチルとの混合物の物理的性状が、アルブミンはカゼインの場合とかなり異なって

Table 3. Data of nitrogen balance for 4 day-periods.^{a)}

Periods diets ^{b)}	Body weight (g)		Diet intake (g)	Intake N (mg)	Fecal N (mg)	Urinary N (mg)	Biological value (%)	True digestibility (%)
	Initial	Gain						
I Low protein	47.8±1.0	-1.0±0.5	18.0±1.1	72.7±4.4	28.5±1.0	47.0±1.3		
II { Reacted albumin	48.1±1.9	3.1±0.4	22.8±1.2	267.6±14.5	56.4±3.2	109.2±7.6	76.4±1.2	88.9±0.7
	55.7±0.9	7.5±0.9	25.9±1.3	289.7±14.8	31.3±3.9	54.9±2.7	96.6±0.6	99.7±0.2
		mean	24.2±1.0			mean	86.5±3.1	94.3±1.7
III { Control albumin	57.9±1.7	10.8±0.5	31.0±0.0	346.6±0.0	33.6±1.3	57.9±4.9	97.9±0.9	99.8±0.2
	64.3±1.1	2.2±0.8	23.0±1.2	269.1±14.3	57.1±4.7	107.0±4.9	79.1±0.9	90.0±0.7
		mean	26.9±1.5			mean	88.6±2.9	94.9±1.5
IV Low protein	68.5±1.2	-0.6±0.5	23.5±1.3	94.9±5.2	30.0±0.6	49.7±1.9		

^{a)} Values are the means and SE of 6 and 12 rats at periods II and III and periods I and IV, respectively.

^{b)} See Table 2.

Table 4. Biological value and true digestibility of reacted albumin.^{a)}

Rat number	Biological value (%)			True digestibility (%)		
	Control albumin	Reacted albumin	Difference	Control albumin	Reacted albumin	Difference
1	95.6	77.1	18.5	100	89.8	10.2
2	94.8	78.1	16.7	100	87.9	12.1
3	96.0	82.3	13.7	99.9	91.6	8.3
4	98.7	78.7	20.0	98.7	89.0	9.7
5	97.5	81.6	15.9	100	92.3	7.7
6	97.0	77.0	20.0	99.8	89.5	10.3
7	99.8	76.6	23.2	100	88.6	11.4
8	97.6	71.1	26.5	100	91.6	8.4
9	99.6	78.7	20.9	98.8	86.5	12.3
10	97.7	77.2	20.5	100	88.6	11.4
11	94.7	75.4	19.3	100	90.3	9.7
12	99.2	79.5	19.7	100	87.8	12.2
Mean±SE	97.4±0.5	77.8±0.8	19.6±1.0 ^{b)}	99.8±0.1	89.5±0.5	10.3±0.5 ^{b)}

^{a)} See Table 2. ^{b)} Differences were significant at $p<0.01$.

おり、このことが脂質の酸化に差異をきたす原因になるかもしれない。さらに、各アミノ酸の抗酸化力は異なることから¹⁷⁾、両たん白質のアミノ酸組成の相違も影響することは十分考えられる。

たん白質と酸化脂質との反応による褐変現象は、たん白質分子内のアミノ基と酸化脂質中のカルボニル化合物、主として 2-hexenal のような不飽和アルデヒドとの反応によるものであろうと考えられている¹⁸⁾。またハイドロパーオキシドそのものによるたん白質の損傷も報告されている¹⁹⁾。しかしながら、本実験系でのハイドロパーオキシドおよびカルボニル化合物の生成量の経時的な変化 (Fig. 1) と、たん白質の褐変および消化率の低下 (Fig. 2, 3) とは、かならずしも平行しない。たん白質と脂質酸化物、とくにハイドロパーオキシド、カルボニル化合物との反応がいかなる量比で起こるかに関する知見は得られていないので断言することはできないが、これらの酸化産物に加え、他の脂質酸化中間生成物の関与も予想される。ハイドロパーオキシド説¹⁹⁾、カルボニル化合物説²⁰⁾以外に、今日までに提出されている仮説ではフリーラジカル説⁹⁾がある。Roubal ら⁹⁾は酸化脂質と反応させたたん白質の構成アミノ酸の損傷の傾向が、たん白質をイオン照射したときの損傷の傾向と類似すること、および ESR によるフリーラジカルの測定結果とアミノ酸の損傷の程度から、フリーラジカルが損傷のおもな原因であると考えている。八木ら²¹⁾はアスコルビン酸-過酸化水素-デンブロン系において、フ

リーラジカルによるデンブンの損傷を報告している。

褐変度の増加と有効性リジンの減少の間には、高い相関関係が認められた。カゼインの場合にも同様であった⁷⁾。Andrews ら²⁰⁾も、褐変化に対しリジンの ϵ -アミノ基の関与が大であると報告している。一方、アミノ酸組成の変化をみるとヒスチジン、リジン、アルギニンと含硫アミノ酸の損失が認められ、とくにヒスチジンとリジンで著しかった (Table 1)。同条件で酸化脂質と反応したカゼインでもヒスチジン、リジンおよびアルギニンの損失が著しいことを認めており⁷⁾、低水分系の場合、酸化脂質との反応でたん白質中の塩基性アミノ酸は、損傷をうけやすい性質をもつものと推察される。

酸化脂質と反応した卵アルブミンの生物価および真の消化率は、対照アルブミンと比較し低下した (Table 4)。低下の割合はカゼインの場合⁸⁾と比較し、より顕著であった。低下の原因として、酸化脂質との反応でたん白質の構造が変化し、酵素反応を受けにくくなり、あるいは遊離アミノ酸パターンの不均衡による体たん白質への合成利用率が低下することなどによるものと考えられる。酸化脂質と反応したアルブミンの溶解度、人工消化率の低下 (Fig. 3)、および反応アルブミンを摂食した白ネズミ肝臓たん白質の減少²²⁾はこの推測を支持する。

なお、反応アルブミンは結合脂質を分析した結果、本実験の条件下では平均 4% 含有していることから²³⁾、このものが酵素作用、あるいは吸収を阻害する可能性も考慮する必要がある。

以上のように脂質の酸化にともなう卵アルブミンの栄養価の低下は著しいが、摂食した白ネズミは成長の抑制が起こるのみならず、肝臓成分にも影響を及ぼすことが認められており²²⁾、卵を主材料とする貯蔵食品、乾燥食品の需要の著しい今日、その影響は無視できないものと考えられる。

要 約

卵アルブミンとリノール酸エチル (2:1, w/w) からなるモデル系 (50°C, RH 80.4%) を設定し、脂質の酸化にともなう卵アルブミンの栄養価の変化を調べた。

たん白質の褐変度は、反応日数とともに増加した。逆に有効性リジン量は減少し、7日目で半減した。両者の増減の間には、高い相関関係 ($r = -0.977$) が認められた。ペプシンによる消化率も顕著に低下した。アミノ酸分析の結果、ヒスチジンとリジンの損傷が著しく、アルギニンおよび含硫アミノ酸でも損傷が認められた。

7日間反応させた卵アルブミンの幼若白ネズミでの生物価は、未反応の卵アルブミンと比較し約20%低下し、真の消化率も約10%低下していた。

これらの変化は、カゼイン・リノール酸エチルの場合と比べかなり著しく、卵アルブミンは、酸化脂質により損傷を受けやすいたん白質であることが認められた。

文 献

- 1) Knapp, F.W. and Tappel A.L.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **36**, 8 (1959)
- 2) Roubal, W.T. and Tappel, A.L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 402 (1967)

- 3) Little, C. and O'Brien, P.J.: *Biochem. J.*, **101**, 13 (1966)
- 4) O'Brien, P.J.: *Biochem. J.*, **103**, 32 (1967)
- 5) Vavricova, J., Pokorny, J. and Mareckova, O.: *Die Nahrung*, **12**, 661 (1968)
- 6) 堀米隆男, 柳田晃良: 栄養食品領域におけるリビドの諸問題, 農芸化学会 シンポジウム講演要旨集 (1971, 福岡)
- 7) 柳田晃良, 菅野道廣, 長 修司, 和田正太: 農化, **47**, 73 (1973)
- 8) 柳田晃良, 菅野道廣: 農化, **47**, 577 (1973)
- 9) Roubal, W.T. and Tappel, A.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **133**, 5 (1966)
- 10) Narayan, K.A. and Kummerow, F.A.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 339 (1963)
- 11) "Methods of Analysis," ed by Horwitz., p. 445 (1970), Association of Official Analytical Chemists, Washington
- 12) 熊沢 恒, 大山 保: 油化学, **14**, 667 (1965)
- 13) Carpenter, K.J.: *Biochem. J.*, **77**, 449 (1960)
- 14) Mitchell, H.H. and Garman, G.G.: *J. Biol. Chem.*, **68**, 183 (1926)
- 15) Lineweaver, H. and Murray, C.W.: *J. Biol. Chem.*, **171**, 565 (1947)
- 16) Lyman, C.M., Chang, W.Y. and Couch, J.R.: *J. Nutr.*, **49**, 679 (1953)
- 17) Marcuse, R.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **39**, 97 (1962)
- 18) 藤本健四郎, 金田尚志: 日水誌, **37**, 40 (1971)
- 19) Little, C. and O'Brien, P.J.: *Biochem. J.*, **106**, 419 (1968)
- 20) Andrews, F., Bjorksten, J., Trenk, F.B., Henick, A.S. and Koch, R.B.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 779 (1965)
- 21) 八木一文: 日本澱粉学会誌, **17**, 183 (1969)
- 22) 柳田晃良, 菅野道廣: 栄養と食糧, **27**, 281 (1974)
- 23) 柳田晃良, 高 栄泰, 菅野道廣: 未発表

(昭和49年3月22日受理)