緩和条件下のアミノカルボニル反応による 褐変カゼインの消化と利用について†

森 文 平, 齊 藤 進, 小 島 和 美

戸板女子短期大学食品栄養化学研究室

On Utilization and Digestion of Casein Brownd by Amino-carbonyl Reaction under Mild Conditions

Bunpei MORI, Susumu SAITO, Kazumi KOJIMA

Laboratory of food and Nutrition, Toita Women's College, Minato-ku, Tokyo

The investigation was carried out in order to clarify the reason for the reduction in nutritive value of browned protein, by using casein as a model protein. In a previous report, we found ϵ -N-deoxyfructosyl-lysine as an absorption delayed material in the small intestinal content of rats using browned ^{14}C -lysine labeled casein which was prepared under a mild condition (37°C and R.H. 70%). This study was performed to elucidate the change in amino acid composition of casein browned by amino-carbonyl reaction with glucose under the mild condition, and to determine the protein efficiency ratio (PER) and digestibility of browned casein with or without supplementary lysine. As a result, PER of browned casein was decreased, but it was recovered to the control level by addition of the equal amount of lysine to that lost by browning reaction. Therefore, the limiting amino acid of browned casein was assumed to be lysine. As the true digestibility of browned casein was not decreased, it was suggested that the reduction in its nutritive value was mainly due to the conversion of lysine in browned casein to ϵ -N-deoxyfructosyl-lysine, which remains in the small intestine as an absorption delayed material.

(Received February 17, 1977)

褐変たん白質は褐変していないものに比較して栄養価は減少することが知られている。この理由については、褐変反応をうけたたん白質の消化率の減少、あるいはたん白質構成アミノ酸の一部が修飾を受け、そのアミノ酸が体たん白質合成には利用できなくなる点などが考えられている。Henry, Kon¹⁾は一定量のカゼインとグルコースとを、恒温、恒湿下で反応させ褐変カゼインを調製し、白ネズミによる動物試験の結果、その生物価、真の消化率およびたん白効率 (PER) をそれぞれ測定し反応処理日数の増加とともに、これらの値が減少することを報告している。これらの理由については、たん白質の遊離アミノ基は還元糖やカルボニル化合物と反応し、この遊離アミノ基はリジン残基の ϵ -アミノ基または N 末端アミノ基で²⁾、反応の結果一部アミノ酸が栄養的に不活性になると考えられ、また一部たん白質の不溶化なども進むものと思われる。この中でもっとも影響をうけるアミノ酸はリジンであることが、Lea, Hannan³⁾のカゼインを用いた実験によっても認められている。加熱

たん白質の栄養価低下に関する研究は、Ford, Finot, Carpenter^{4)~6)}を始め広く研究されているが、褐変たん白質の栄養価減少の理由および機構を明らかにする目的で、もっとも影響をうけると考えられるリジンを主な対象としてリジン- ^{14}C 標識カゼインを用いた研究は従来あまりみあたらなかった。

著者らは本研究を行なうに先立ち、リジン- ^{14}C 標識カゼインを調製する目的で、L-リジン- ^{14}C -HCl を泌乳中の山羊の頸静脈に注射した後、経時的に搾乳し、その中からカゼインを分離し分析の結果、同加水分解物中全放射能の約 95% がリジン区分に存在することを確認した⁷⁾。本標識カゼインを比較のおだやかな条件下でアミノカルボニル反応を行なわせる目的で、グルコースとともに、 37°C 、湿度 70% 下で 20 日間反応させ、褐変標識カゼインを調製した。この褐変標識カゼインを用い、褐変させない標識カゼインを対照区として成長中の白ネズミによる動物試験の結果、褐変反応の結果生じたりジン誘導体はおくれて吸収され、しかも体たん白質として利用されないで排泄される部分が多いのではないかと考えられた⁸⁾。この吸収遅延物質のおもなものは ϵ -N-deoxy-

† 褐変たん白質の栄養に関する研究 (第 2 報)

fructosyl-lysine であることが認められた⁹⁾。

このようにカゼインをモデルたん白質として、グルコースとともに比較のおだやかな条件で処理して調製した褐変カゼインを成長中白ネズミに与えて実験した場合、栄養価減少の理由として、アミノカルボニル反応によりカゼイン中のリジンの一部が主として ϵ -N-deoxy-fructosyl-lysine となり、小腸においておくれで吸収され、体たん白質としては利用されず尿中に排泄されるためではないかと考えられた⁹⁾。本条件下における褐変カゼインの栄養価減少の理由をこのように説明するためには、このカゼインの第一制限アミノ酸はリジンであることを明らかにしておくことが必要であると考えて、同じ条件のもとで褐変カゼインを調製し、アミノ酸組成とその変化とを明らかにし、同褐変カゼインの白ネズミによる PER (たん白効率) および真の消化率の測定、さらにもし本褐変カゼインの第一制限アミノ酸がリジンであるならば、リジンの添加によってその PER は、対照区の値に近く回復してよいはずである。そこでアミノカルボニル反応の結果、非有効性に変化したと計算されるリジンを添加した場合の添加効果を、検討するために実験を行なった。比較のためにグルコースとともに加圧、加熱を行ない調製した褐変カゼインについても同ような実験を行なったので、これらの結果について報告する。

実験方法

1. 褐変カゼインの調製

カゼイン (田辺アミノ酸研究会) 100 g に対しグルコース 16 g の割合に加え、水を加えて攪拌し、真空凍結乾燥の後 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、相対湿度、 $70 \pm 3\%$ の恒温恒湿室に20日間おいた。その間試料はなるべくうすく拡げ、1日に1回混合を行なった。加圧加熱褐変カゼインは、カゼイン 100 g に対しグルコース 16 g の割合に加えて混合したものを、そのまま 1 kg/cm^2 、30 分間水蒸気により加圧加熱した後、乾燥して調製した。

2. 有効性リジンの定量

未褐変カゼイン、褐変カゼインおよび加圧加熱褐変カゼインそれぞれについて、有効性リジン含量を測定した。方法は Carpenter¹⁰⁾の方法をもとに稲村、堀井¹¹⁾の報告を参考にして行なった。なおグルコースを含有する試料は分析に先立ち、透析膜を用い 5°C 、48時間水で共存グルコースを除去した。

3. アミノ酸の定量

各試料それぞれを2連分析にて、 6NHCl 、 110°C 、24時間加水分解を行ない、中酸性および塩基性アミノ酸の全分析を日立アミノ酸自動分析装置 (KLA-5 型) により行なった。

4. 動物試験および飼育管理

1) PER (たん白効率)の測定

成長中の体重 50 g 前後のウィスター系白ネズミオスを1実験区10頭、内5頭ずつは同腹のものをを用いた。

実験区は対照区 (未褐変カゼイン)、褐変区 (20日間褐変)、褐変カゼイン+リジン添加区、加圧加熱褐変カゼイン区、加圧加熱褐変カゼイン+リジン添加区の計5区とした。加圧加熱褐変カゼイン区とリジン添加区との2区は都合上、各5頭の試験動物を使用した。カゼイン摂取レベルは各実験区とも12%とし、8%綿実油 (市販品)、5%無機塩混合物 (田辺アミノ酸研究会)、1%ビタミン混合物 (パンピタン粉末) および3%濾紙粉末 (東洋科学産業) とをおのおの混合し、さらに全体が100となるよう α -コーンスターチ (田辺アミノ酸研究会) を加えて実験用飼料とした。

試験動物は試験飼料給餌後28日間飼育し、その間3日ごとに午前10時に体重を測定し、摂取たん白質量を計算し、28日間の総計を求め、かつ同期間の体重増加量から PER を次式により計算した。

$$\text{PER} = \text{体重増加量 (g)} / \text{たん白質摂取量 (g)}$$

なお、リジン添加区については、アミノカルボニル反応の結果、減少した有効性リジン量を Carpenter¹⁰⁾の方法により前もって測定しておき、ほぼこの量に相当するリジンを L-リジン塩酸塩の形で補足することとし、20日間褐変カゼイン区に対しては、試験飼料 100 g 当たり L-リジン塩酸塩として 0.61 g を加え、同加圧加熱褐変カゼイン区に対しては、同 100 g 当たり同様に 0.78 g を加えた。

2) 消化率の測定

みかけの消化率および真の消化率の測定を行なった。真の消化率は糞中の内因性窒素量を前もって測定しておき、排泄量から差し引きさらにこの値を摂取量から減じて、これを吸収量とみなして計算した。試験動物はウィスター系白ネズミ、オス体重 250~300 g を用い、各実験区の設定は PER 測定の場合と同様で、実験区はいずれも5頭1区とし、飼料中カゼインレベルはいずれも5%とした。

結果および考察

Table 1 に本実験に用いた各種カゼインのアミノ酸組成および有効性リジン含量を示した。有効性リジン含量についてみると、対照区カゼインの総リジン含量を100として、 37°C 相対湿度 70% の条件で20日間処理することにより、グルコースが共存すれば約39%に減少した。加圧加熱褐変区ではさらにこの傾向が顕著となった。また総リジン含量は比較のおだやかな褐変条件のもとでも、同様に87%に減少した。このことはアミノカルボニ

ル反応によりリジンの ϵ 位に結合する修飾物質としての糖を、塩酸加水分解により遊離させても、10%以上のリジンがもとの形態にもどらないで他の物質に変化していることを示している。加圧加熱褐変区では総リジン含量は67%に減少した。Finot⁹⁾ らは、カゼインとグルコースとがアミノカルボニル反応をおこした場合にリジンか

ら生ずる ϵ -N-deoxyfructosyl-lysine は塩酸加水分解によってリジンの他にフロシンおよびピリドシンを生成することを報告している。

リジン以外のアミノ酸含量の変化は、アルギニンが加圧加熱褐変カゼインで約63%と、かなりの減少を示した他は大きな変化を示さなかった。すなわちメチオニン、チロシンを除きおおよそ数%の減少を示した。37°C で20日間褐変させた場合もリジンを除いては、メチオニンが減少を示した他、変化は認められなかった。前報⁹⁾ における当研究室で等電沈澱法および真空凍結乾燥法により調製した山羊カゼインではリジンの他にアルギニンとヒスチジンとがそれぞれ数%減少を示したが今回の市販カゼインでは変化を示さなかった。しかしメチオニンについては問題があり、前回では変化を示さなかったものが、今回は大きく減少を示した。これは加水分解時の共存糖類の影響ではないかと推察され、今後加水分解前の遊離共存糖類の透析除去を完全に行ない、またメチオニンを加水分解前に過燐酸法などにより安定な化合物に変化させるなど今後の検討にまつこととしたい。

Table 2 に各実験区カゼインの PER (たん白効率) およびリジンの添加効果の結果を示す。Table 2 の結果から 37°C, 相対湿度 70%, 20日間アミノカルボニル反応をうけたカゼインは、その PER についてみると、対照区に比較して減少し、同反応により非有効性に転じたと考えられるリジン量にはほぼ相当するリジンを添加すると PER は、ほとんど回復することが認められた。したがってこの場合の第一制限アミノ酸はリジンであったと考えられる。加圧褐変カゼインでは、PER の減少割合も大きく、リジンの添加によってもその PER の回復は完全ではなく、リジン以外のアミノ酸の減少も認められることなどから、PER の完全に近い回復には、リジン以外のアミノ酸の補足も必要であることを示している。

Table 1. Amino acid composition of casein (mg/N g).

Amino acids	Control casein	Browned casein	Heat damaged casein
Lysine	535	467	361
Available lysine	433	168	125
Histidine	191	208	185
Arginine	234	253	147
Aspartic acid	479	502	455
Threonine	291	304	272
Serine	384	400	365
Glutamic acid	1,484	1,574	1,351
Proline	855	875	797
Glycine	128	131	119
Alanine	214	217	198
Valine	448	481	429
Methionine	155	94	70
Isoleucine	355	383	346
Leucine	645	671	618
Tyrosine	396	366	335
Phenylalanine	374	384	343

Control casein: Non-browned.

Browned casein: 100 g casein + 16 g glucose at 37°C and R.H., 70% for 20 days.

Heat damaged casein: 100 g casein + 16 g glucose, heated under 1 kg/cm² for 30 min.

Table 2. Body weight change and protein efficiency ratio (PER) in growing rats fed browned casein with or without supplementary lysine.

	Body weight (g)			Casein intake (g)	PER
	Initial	Final	Gain		
Control casein	44.9±2.0	161.1±8.9	116.2±8.0	50.9±1.3	2.03±*0.18
Browned casein	41.9±0.9	132.0±5.7	90.1±5.9	47.6±1.3	1.89±*0.12 ¹⁾
Browned casein+lysine (0.61 g/100 g diet)	55.3±4.3	161.5±11.8	106.2±16.3	48.4±3.0	2.21±*0.26
Heat damaged casein	61.8±1.3	138.2±7.9	76.4±6.8	50.7±4.0	1.51±**0.03 ¹⁾
Heat damaged casein+lysine (0.78 g/100 g diet)	60.3±4.3	168.6±8.8	108.3±5.7	58.0±3.7	1.87±**0.05 ¹⁾

¹⁾ Statistically significant ($p < 0.001$) by *t*-test from the control.

* Means±SE for ten rats.

** Means±SE for five rats.

Table 3. Digestibility of browned casein in adult rats. (%)

	Apparent digestibility	True digestibility
Control casein**	74.2±1.3	94.2±3.6
Browned casein**	72.9±2.6	91.6±2.7 ¹⁾
Browned casein+lysine**	75.2±7.4	94.7±3.1 ²⁾
Heat damaged casein**	50.3±4.4	77.3±5.1 ³⁾
Heat damaged casein+lysine**	58.8±4.9	82.5±4.4 ⁴⁾

¹⁾ Statistically significant ($p<0.05$) by *t*-test from the control.

²⁾ Not statistically significant by *t*-test from the control.

³⁾ Not statistically significant by *t*-test from the browned casein.

⁴⁾ Not statistically significant by *t*-test from the heat damaged casein.

* Means ±SE for four rats.

** Abbreviations are shown in Table 2.

Table 3 に同じ実験区についての見かけの消化率および真の消化率の値を示す。結果として、20日間褐変カゼイン区の消化率は対照区と比較して大きな変化は認められなかった。しかし加圧加熱褐変区では減少が認められた。この点は、主に有効性リジン含量のみが減少する比較のおだやかな褐変条件下では、その PER の減少は認められても、対照区に比較して消化率が減少するまでには、いたらなかったものと考えられる。一方加圧褐変カゼインでは消化率の減少が認められた。これは褐変反応が進行するとともに、カゼインの消化液に対する不溶化などが進み、消化酵素の作用もうけにくくなり、消化率の低下を示したものと推察される。また消化率に対するリジン添加の影響は認められなかった。

先の ¹⁴C-リジン標識カゼイン⁷⁾を用いた実験結果から、著者らの実験条件のもとでアミノカルボニル反応により修飾をうけたカゼインの構成アミノ酸としてのリジンは、その約70%が非有効性リジンに変化したと考えられ、褐変させたカゼインを通じて摂取された ¹⁴C-リジン放射能を 100 として、その約26%にも及ぶリジンの ¹⁴C放射能が、食後3～7時間にわたり白ネズミの小腸内に認められ、この値は対照区に比較して約11倍であった⁸⁾。そしてその約65%は吸収のおくれるリジン誘導体としての、ε-N-deoxyfructosyl-lysine であった⁹⁾。22時間後の尿中排泄割合は、対照区に比較して約9倍にも及び、一方糞中割合はわずかに対照区と比較しても、変化は認められなかった⁸⁾。しかし本実験の結果からも消化率には変化が認められないことおよび前報⁸⁾の白ネズミ小腸内容物トリクロロ酢酸沈澱区分の ¹⁴C放射能残存割合が、いずれも低く対照区と褐変区とではほとんど差が認められなかったところから、消化管内での消化作用による褐変カゼインからの ε-N-deoxyfructosyl-lysine の遊離は対照区のリジン遊離と比較してもおくれることなく

行なわれたと推察される。このことは、カゼインの構成アミノ酸としてのリジンのα位アミノ基側のペプチッド結合は、同じ分子内ε位のアミノ基が、フラクトースを結合していても、遊離ε位のアミノ基を持つ対照区のカゼインとはほぼ同様に、白ネズミ消化管内では消化作用により分解をうけたと推定される¹²⁾。

緩和条件下でのアミノカルボニル反応による褐変カゼインの消化率の減少は認められず、また第一制限アミノ酸はリジンであることから、本カゼインの栄養価減少は褐変カゼインのリジンが ε-N-deoxyfructosyl-lysine に変化し、これが吸収遅延物質として小腸内に滞留し、22時間以内には尿中に排泄される⁸⁾ ことがおもな理由の一つと考えられる。このことは、本実験でも示されるように褐変カゼインの PER 減少になって示され、非有効性に変化したリジンにほぼ相当する量を添加すれば、小腸内では ε-N-deoxyfructosyl-lysine よりも先に添加リジンは吸収され、カゼインより遊離したアミノ酸とともに同時に体たん白質生合成にも利用され、結果として PER 低下が阻止されたと考えられる。

有効性リジンの定量は本研究室の山口光子助手によって記して謝意を表する。

本研究の要旨は本学会第29回総会（昭和50年5月）にて講演した。

文 献

- 1) Henry, K.M. and Kon, S.K.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 5, 455 (1950)
- 2) 中林敏郎, 木村 進, 加藤博通: 食品の褐変とその化学, p. 251 (1967), 光琳書院 (東京)
- 3) Lea, C.H. and Hannan, R.S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 5, 433 (1950)
- 4) Ford, J.E.: Protein in Human Nutrition (Porter, J.W.G. and Role, B.A. ed.), p. 515 (1973)

Academic Press (New York)

- 5) Finot, P.A.: *ibid.*, p. 501
- 6) Carpenter, K.J.: *ibid.*, p. 531
- 7) Ehata, F., Ishibashi, T., Kametaka, M., Saito, S. and Mori, B.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1967 (1973)
- 8) Mori, B. and Nakatsuji, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 345 (1977)
- 9) Mori, B.: 10th International Congress of Nutrition, Abstracts paper, No. 5228 (1975) Kyoto, (Japan)
- 10) Carpenter, K.J.: *Biochem. J.*, **77**, 604 (1960)
- 11) 稲神 馨, 堀井正治: 九州大学農学部学芸雑誌, **22**, 191 (1966)
- 12) 森 文平: 第75回必須アミノ酸研究協議会報告, 昭和51年2月(東京)
(昭和52年2月17日受理)