アミノ酸分析のためのデンプン性食品からの たん白質の抽出について

団 野 源 一, 金 沢 和 樹, 名 武 昌 人

神戸大学農学部農芸化学科

Extraction of Proteins of Starch-rich Foods for Amino Acid Analysis

Gen-ichi DANNO, Kazuki KANAZAWA, Masato NATAKE

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kobe University, Nada-ku, Kobe*

A method for the quantitative extraction of proteins in cereals and beans is described. By extraction of flour with sodium dodecyl sulfate in combination with 2-mercaptoethanol, 96 to 99% of the total flour nitrogen solubilized into clear supernatant. No effect of sodium dodecyl sulfate and 2-mercaptoethanol on the recovery of amino acids during hydrolysis with 6N hydrochloric acid was observed.

(Received January 19, 1978)

たん白質の栄養価はそのアミノ酸組成と関係が深いので、食品に含まれるたん白質のアミノ酸組成を決定することは栄養学上重要な問題である。

たん白質以外の成分、とくにデンプンを多量に含む食品試料をそのまま加水分解すると、たん白質単独の場合にくらべ、アミノ酸の破壊が大きいことが知られている。しかし食品試料からたん白質を完全に抽出することが困難であるため、一般に、食品試料をそのまま加水分解してアミノ酸分析を行なっているのが現状である。剣持・田村は¹⁾、デンプンを含むたん白質の加水分解の条件を検討し、試料に対して1,000倍量の6N塩酸を用いて加水分解すると、アミノ酸の高い回収率が得られることを報告している。

多くの食品は多成分系の不均一な複合体であるので、分析試料は比較的少量に採取することが必要である。しかし、加水分解の操作の点から、試料の採取量は、ふつう、20~100mgに制限されている。デンプンを多量に含む食品試料からたん白質を定量的に抽出することができれば、グラム単位の試料からたん白質を抽出し、加水分解の操作に適する量にまで溶液状態で縮分が可能となるので、分析精度の改善と加水分解操作の簡易化が期待できる。筆者らは²⁾、先に小麦粉から、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)によって、たん白質が定量的に抽出されることを報告した。本報告では、アミノ酸分析のため

の試料とする目的で、穀類および豆類からSDSによるたん白質の抽出を試み、その定量性について検討した。

実 験 方 法

1. 材料・試薬

実験に用いた精白米、アズキ、ウズラ豆およびトウモロコシはいずれも市販品で、品種名は不明である。全粒を粉碎し、80メッシュの篩を通過させた。小麦粉(強力粉、中力粉、および薄力粉)は無漂白の市販品を用いた。各粉末材料は、無水 *n*-ブタノールで脱脂し、*n*-ヘキサンで洗浄したのち風乾した。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS, 99%)と2-メルカプトエタノール(2-ME)は半井化学薬品株式会社より、結晶牛血清アルブミンはシグマ社より入手した。

2. たん白質の抽出

脱脂試料 1.5g を 50 ml 容遠心管に直接採取し、これに 0.5% SDS 水溶液 (pH 7.0) 30 ml と 2-ME 0.25 ml を加え、ガラス棒でときどき攪拌しながら室温に1時間保ち、たん白質を抽出した。11,000 rpm で20分間遠心分離すると透明な上澄液が得られた。その残渣に 0.5% SDS 20 ml を加え、15分間攪拌後遠心分離し上澄液を得た。両上澄液を集め、水を加えて 50 ml 定容とし、これを抽出液として以下の実験に供した。

3. たん白質の定量

粉末試料、抽出液および残渣中のたん白質量は、ケルダール法で定量し、全窒素量でもって表わした。

Table 1. Total nitrogen extracted from flour by 0.5% SDS containing 2-mercaptoethanol.

		mg N/g flour		Total nitrogen extracted (%)
		Total	Residual	
Wheat flour	(soft)	11.8	0.43	96.4
	(medium)	13.7	0.33	97.6
	(hard)	21.3	0.24	98.9
	(hard)*	21.2	0.33	98.4
	(hard)**	21.3	0.28	98.7
	(hard)***	21.4	0.29	98.6
Milled rice	(80 mesh)	12.5	0.35	97.2
	(80 mesh)*	12.4	0.44	96.5
	(20 mesh)	12.1	2.1	82.6
Adzuki beans	(80 mesh)	31.6	0.93	97.1
"Uzura-mame"	(80 mesh)	30.6	1.12	96.3
Corn	(80 mesh)	19.6	0.86	95.6

* Original; ** defatted with *n*-hexane; *** defatted with acetone; no asterisk, defatted with dry *n*-butanol; Values are means of those in 3 samples.

Table 2. Total nitrogen extracted from wheat flour* with different solvents.

	Total nitrogen extracted	
	mg N/g flour	%
<i>n</i> -Butanol (dry)	0.091	0.43
<i>n</i> -Hexane	0.065	0.31
Acetone	0.009	0.04

* Total flour nitrogen, 21.2 mg/g.

4. アミノ酸分析

抽出液 1~2 ml を加水分解用アンブルに入れ、凍結乾燥またはロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾涸したのち、定沸点塩酸 10 ml を加え、常法により減圧下封管した。110°C で24時間加水分解したものをアミノ酸分析に供した。シスチン、システインは、Moore³⁾の方法に従い、システイン酸に酸化させて定量した。アミノ酸の分析定量は、日立アミノ酸自動分析機 KLA-3B 型を用いて行なった。

実験結果および考察

小麦粉、精白米、アズキ、ウズラ豆およびトウモロコシの各粉末から、2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む 0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) によるたん白質の抽出を試みた。その結果、Table 1 に示すごとく、小麦粉および80メッシュに粉碎した試料では、各試

Table 3. Amino acid composition of bovine serum albumin with and without SDS and 2-mercaptoethanol (μ mole amino acid per mg protein).

	Water	0.5% SDS	0.5% SDS plus 0.5% 2-ME	0.5% SDS plus 0.1% 2-ME
Asp	668	670	698	672
Thr	406	406	406	402
Ser	320	330	328	316
Glu	1,060	1,090	1,090	1,070
Pro	390	378	350	390
Gly	194	200	192	196
Ala	584	590	596	598
Cys	400*		434*	
Val	430	440	436	434
Met	36	40	38	34
Ileu	160	160	164	162
Leu	698	712	700	712
Tyr	224	230	288	262
Phe	328	334	326	330
Lys	664	676	660	670
His	196	196	180	194
Arg	270	270	260	260

* Determined by the method of Moore.³⁾

Table 4. Amino acid composition of the extract from wheat flour, milled rice flour, adzuki beans flour and "uzura-mame" flour (g amino acid per g nitrogen).

	Wheat flour (hard)		Milled rice		Azuki beans		"Uzura-mame"	
	Determined Literature*		Determined Literature*		Determined Literature*		Determined Literature*	
Asp	0.255	0.25	0.546	0.67	0.693	0.67	0.735	0.61
Thr	0.169	0.16	0.201	0.22	0.207	0.22	0.251	0.25
Ser	0.297	0.30	0.283	0.23	0.322	0.32	0.354	0.33
Glu	2.71	2.0	1.07	1.1	1.11	1.1	1.09	1.1
Pro	0.687	0.80	0.263	0.32	0.248	0.22	0.207	0.24
Gly	0.219	0.20	0.274	0.27	0.227	0.24	0.222	0.21
Ala	0.182	0.15	0.337	0.37	0.263	0.27	0.303	0.17
Val	0.343	0.28	0.331	0.37	0.414	0.32	0.337	0.33
Met	0.092	0.090	0.146	0.14	0.082	0.086	0.052	0.057
Ileu	0.228	0.24	0.263	0.28	0.278	0.25	0.244	0.24
Leu	0.415	0.44	0.473	0.52	0.498	0.50	0.424	0.37
Tyr	0.250	0.19	0.317	0.38	0.272	0.26	0.232	0.17
Phe	0.355	0.29	0.327	0.29	0.396	0.35	0.314	0.33
Lys	0.120	0.13	0.181	0.21	0.412	0.50	0.387	0.32
His	0.132	0.11	0.107	0.14	0.267	0.21	0.161	0.18
Arg	0.251	0.23	0.473	0.36	0.487	0.43	0.341	0.28

* From data of "Nippon shokuhin amino-san sosei-hyo"⁴⁾

料中に含まれる総窒素量の 96~99% が抽出されており、たん白質はほぼ定量的に抽出できることが明らかとなった。抽出液は透明であり、抽出率の再現性も良好であった。2-ME はかなり過剰に添加されており、小麦粉では、抽出率の低下をきたすことなしに 2-ME の添加量を 1/5 にまで減ずることができた。

透明な SDS 抽出液を得るためには、無水 *n*-ブタノール、*n*-ヘキサン、アセトン等により脱脂した試料を用いることが必要であった。これらの有機溶媒に抽出される窒素量は、小麦粉の場合、0.5% 以下であり (Table 2)、脱脂操作時におけるたん白質の損失は無視できるものと考えられる。

抽出剤として用いた SDS と 2-ME が加水分解時のアミノ酸の回収率に影響をおよぼすか否かを、牛血清アルブミンを用いて検討した。Table 3 に示すごとく、6N 塩酸による加水分解の結果では、2-ME の存在によって、チロシンが若干高い回収率を与えた以外、他のアミノ酸の回収率は影響をうけなかった。チロシンは加水分解時破壊を受けやすいアミノ酸であるが、2-ME の存在によって保護された結果、高い回収率を与えたものと考えられ、チロシン定量のためには好都合である。なお、抽出に用いた SDS と 2-ME のみを同様な条件下で分析したブランクテストでは、アミノ酸分析チャート上

Table 5. Precipitation of protein from the SDS extracted by 7.5% trichloroacetic acid (TCA).

The SDS extract (2 ml) was mixed with 6 ml of 10% TCA, and centrifuged at 2,200×g for 30 min.

	mg N per 2 ml of SDS extract		Nitrogen precipitated (%)
	Soluble	Insoluble	
Wheat flour	1.25	1.12	89.6
Milled rice	0.763	0.697	91.3
Adzuki beans	1.96	1.79	91.3
"Uzura-mame"	1.91	1.64	85.9

に何らのピークも示さなかった。シスチンとシステインは、Moore の方法³⁾に従って、システイン酸として定量することができたが、その値は若干高くなる傾向を示し、それについてはさらに検討が必要である。

小麦粉、精白米、アズキおよびウズラ豆の抽出液について、アミノ酸分析を行なった結果を Table 4 に示した。抽出たん白質はアミノ酸分析の試料として満足すべきものと考えられる。

抽出液について、トリクロル酢酸によるたん白質の回

Table 6. Amino acid composition of the protein* and non-protein fractions** from wheat flour, adzuki beans and "uzura-mame" (g amino acid per g nitrogen of the extract).

	Wheat flour		Adzuki beans		"Uzura-mame"	
	Protein	Non-protein	Protein	Non-protein	Protein	Non-protein
Asp	0.20	0.034	0.70	0.066	0.80	0.084
Thr	0.15	0.016	0.21	0.020	0.21	0.020
Ser	0.26	0.025	0.32	0.023	0.31	0.021
Glu	2.5	0.20	1.1	0.13	0.84	0.20
Pro	0.65	0.049	0.24	0.020	0.19	0.019
Gly	0.19	0.025	0.21	0.022	0.20	0.017
Ala	0.16	0.018	0.25	0.021	0.20	0.020
Val	0.32	0.025	0.41	0.023	0.34	0.042
Met	0.092	0.006	0.079	0.004	0.046	0.004
Ileu	0.22	0.016	0.26	0.010	0.24	0.012
Leu	0.40	0.028	0.48	0.017	0.40	0.021
Tyr	0.21	0.022	0.23	0.016	0.21	0.016
Phe	0.34	0.023	0.40	0.013	0.31	0.010
Lys	0.12	0.010	0.46	0.023	0.40	0.025
His	0.13	0.009	0.22	0.011	0.17	0.012
Arg	0.25	0.021	0.46	0.026	0.31	0.061

* 7.5% TCA-insoluble fraction.

** 7.5% TCA-soluble fraction.

収を試みた。抽出液に3倍量の10%トリクロル酢酸を加え、生じた沈澱物の窒素量を測定した。Table 5に示すごとく、たん白質が沈澱として高収率で回収された。トリクロル酢酸沈澱物、いわゆる純たん白質と、その上澄液いわゆる非たん白態窒素成分のそれぞれについてアミノ酸分析を行なった結果をTable 6に示した。小麦粉、ウズラ豆およびアズキ、いずれも両画分のアミノ酸パターンは異なることが認められた。SDSによる抽出液は、純たん白質の分離のための出発物質としても用うることができる。

要 約

デンプン含量の高い食品試料から、たん白質の定量的な抽出を試み、そのアミノ酸分析への応用について検討した。小麦粉、精白米、アズキ、ウズラ豆およびトウモロコシの各粉末(80メッシュ、*n*-ブタノール脱脂)1.5gを遠心管に秤取し、2-メルカプトエタノール0.25mlと0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(30ml+20ml)を加

え、室温に1時間保つことにより、各試料中に含まれる総窒素量の96~99%が可溶性となり抽出された。抽出に用いた試薬はアミノ酸の分析定量に影響をおよぼさず、抽出液はアミノ酸分析用試料として満足なものであった。

本報の概要は日本栄養・食糧学会第16回近畿支部大会(1977年11月)において発表した。

文 献

- 1) 剣持久仁子, 田村真八郎: 栄養と食糧, 20, 21 (1972)
- 2) Danno, G., Kanazawa, K. and Natake, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1947 (1974)
- 3) Moore, S.: *J. Biol. Chem.*, 238, 235 (1963)
- 4) 大磯敏雄訳編: 食品のアミノ酸含量表 73, (1973), 第一出版(東京)

(昭和53年1月19日受理)