〔農化 第36巻, 第2号, p.138~140, 1962〕

血清, 尿, 食品中のシスチン定量用合成培地 条件の設定について (第4報)*

味噌についての検討

一之瀬 幸男 (国立栄養研究所)

昭和36年7月11日受理

緒 言

L. M. Henderson, E. E. Snell⁽¹⁾, H. E. Sauberlich et al.⁽²⁾, 田村学造等⁽³⁾の多年の努力により, シスチン以外はアミノ酸定量用の合成培地が設定される段階にきた。

シスチン定量用合成培地の問題点は, (1) 標準曲線が低いこと, (2) 回収率の不良の2点である。著者は次のような検索過程を経て, シスチン定量用合成培地を設定してみた。出発点としては1952年田村等⁽³⁾が設定した標準合成培地を採用し, 検討の結果, 具合の悪い個所を変更していく立場をとった。

合成培地の検討

常法 (15 ポンド 10 分) で滅菌中, タイムスイッチのベルの故障のため, 15 ポンドで 29 分間も滅菌したことがあった。この時のシスチン標準曲線は完全にねてしまったので使いものにならなかったが, 滅菌時のシスチンの破壊を予感した。検討の結果, 常法滅菌 (15 ポンド 10 分) ではシスチンの1部が破壊することを見出した。さらに, 最も厳格にシスチン標準曲線を作製する際の滅菌条件である 15 ポンド 3 分間でもシスチンは一部破壊されることを見出した (第1報)⁽⁴⁾。そして, シスチンの破壊によって生成する物質をペーパークロマトグラフィによって同定したところ, システイン酸であることを知った。シスチンは加熱によって真中から2つに割れることを察知した (第2報)⁽⁵⁾。

滅菌条件を 10 ポンド 5 分間オートクレイブすることにより, シスチンの破壊は防止され, シスチンの標準曲線は正常となったが, なお測定値のばらつきは改善されなかった。ここにおいて, 標準合成培地中の各成分の量的関係に過不足があるのではないかと考え, 菌体の栄養要求を再検討し, 菌体に適合した合成培地条件を検討した結果, 最も問題となるのはメチオニン量であることを知った。すなわち現在, 最も広く用いられているシスチン定量用天然培地であるランチョナイズドカゼイン培地中のメチオニン含量は低く, 田村合成培地中のメチオニン含量の約 1/4 に過ぎない。従って, 田村合成培地中の過剰のメチオニンが, 高等動物におけるが如く 1 部シスチンに転移し, そのためシスチン測定値をあいまいなものにするのではないかと, この点について検索したが, *Leuc. mesenteroides* p-60 では, メチオニンからシスチンへの転移は認められなかった。

ランチョナイズドカゼイン培地には特に乳酸菌の発育因子である葉酸が添加されているので, 菌が最大増殖する葉酸条件を検討し, 1 cc あたり 0.3 γ 添加が適当であることを知った。

以上の検索結果から, 滅菌条件を 10 ポンド 5 分間オートクレイブすることとし, 田村合成培地中のメチオニン含量, 葉酸含量を菌体に適合するように, それぞれ培地 1,000 cc 当り DL-メチオニン 400 mg を 600 mg に, 葉酸 200 γ を 300 γ に変更してみた。この試作培地条件によって, 血清, 尿, 牛肉, 豚肉, 鶏肉, 鯨肉について検討したところ, 回収率が殆んど 100% の良好な成績を得た (第3報)⁽⁶⁾。

今回は味噌に本試作培地条件を適用し, 本法が使えるか否かを検討してみた。味噌は田村等がシスチンの標準曲線が低いこと及び回収率が悪いことを発見した材料である。

実 験 方 法

- (1) 使用菌株: シスチンに対して最も敏感とされている *Leuc. mesenteroides* P-60 を用いた。
- (2) 培養条件: 37° で 72 時間培養した。

* A Minimal Medium for Analysis of Cystein in Serum, Urine and Foods. Part IV. Studies on "Miso".

By Yukio ICHINOSE (The National Institute of Nutrition)

第1表 (1) シスチン定量用試作培地の調製法

区 分	名 称	使用量	pH 調整	処 理 法
シスチン定量 の時のみ	シスチン欠アミノ酸混液原液 葉 酸 原 液 (30 γ /cc)	40cc 1	6.8 に調整	水 (pH 6.8) を加え全量 を 100cc にする。 試験管 100 本に分注。 その後 2cc 培養 (培地 1cc + 検体或いは標準液 + 水) を行う。
他のアミノ酸 定量の時と共 通する部分	ビタミ ン 混 液 原 液	4		
	塩 基 類 原 液	20		
	塩 化 ア ン モ ン 原 液	4		
	ぶ ぶ 糖	0.4		
	酢 酸 ソ ー ダ	4g		

〔註〕 アミノ酸混液原液以外は, 田村標準合成培地の処方の 2.5 倍濃原液をあらかじめ調製し, 冷蔵庫 (4°) 中に貯蔵する。
シスチン定量の場合は, 葉酸原液を特に用意する。

第1表 (2) シスチン欠アミノ酸混液原液の調製法

アミノ酸名	原液 1 l 調 製時のアミ ノ酸量 mg	溶かし方	試作培地に調製 した際のアミノ 酸含量 mg/l
DL-アラニン	1,000	水に溶かす	400
L-アルギニン	1,000		400
DL-メチオニン	1,500		600
グリシン	500		200
L-ヒスチジン	500		200
L-プロリン	500		200
DL-セリン	250		100
L-リジン・HCl	1,000		400
DL-スレオニン	1,000		400
L-チロジン	500		200
DL-バリン	1,000	1 N-HCl 100 cc に溶かす	400
DL-フェニルアラニン	1,000		400
DL-イソロイシン	1,000		400
L-ロイシン	500		200
DL-トリプトファン	500	1 N-NaOH 50 cc に溶かす	200
L-グルタミン酸	2,500		1,000
DL-アスパラギン酸	2,000		800

第1図 標準曲線

第2表 味噌における検討

検体 番号	検 体 名	N%	田 村 合 成 培 地			試 作 合 成 培 地		
			脱脂物 0.5 mg あたり	脱脂物 0.5mg + シスチン 2 γ	回収率	脱脂物 0.5 mg あたり	脱脂物 0.5mg + シスチン 2 γ	回収率
1	日光こうじ味噌	4.52	1.8 γ	4.2 γ	120%	3.9 γ	5.9 γ	100%
2	信州味噌	5.26	1.6	4.1	125	3.5	5.4	95
3	仙台味噌	5.38	1.5	3.8	115	2.9	4.9	100
4	会津味噌	5.75	1.4	4.1	135	3.0	5.0	100
5	信州こうじ味噌	4.08	1.8	4.5	135	2.5	4.4	95
6	佐渡味噌	5.26	2.2	4.9	135	2.7	4.6	95
7	越後味噌	3.78	1.9	4.8	145	2.7	4.7	100
8	名古屋味噌	6.89	2.7	5.5	140	3.5	5.5	100

〔註〕 脱脂物 0.5 g を加水分解し, 水解物を 50 cc にメスアップする。この 50 cc 中から 5 cc をサンプリングし, pH を 6.8 に調整し, 50 cc にメスアップする。この 50 cc (pH 6.8) から 0.5 cc をサンプリングして, 各試験管へ入れる。それ故にこの 0.5 cc に対する測定値は, 脱脂物にして 0.5 mg あたりの値になる。

(3) 培地: 第1表に記す。

(4) 接種菌数: 常法通り前培養, 無菌的遠心分離後, 滅菌生理的食塩水中に懸濁し, 乾燥滅菌した注射筒より 1 滴 (0.01 cc) を滴下接種した。0.01 cc 中の総菌数は $15 \times 10^6 \sim 17 \times 10^6$ で, 生菌数は $13 \times 10^6 \sim 15 \times 10^6$ であった。

(5) 検体: 市販の 8 種類の味噌をエーテルで脱脂し, エタノールで脱水して用いた。

実 験 結 果

(1) 田村等が指摘せる如く, 田村合成培地ではシスチンの標準曲線は低く, かつ回収率が思わしくなかった (第1図, 第2表)。

(2) 本試作培地条件では, シスチンの分解は防がれ, その標準曲線は正常 (リジン, メチオニン程度の角度) の角度を示し, 回収率も 100% 前後という良好な成績を収めた。

考 案

田村合成培地でのシスチンの回収率が一樣に高くなる原因を次のように考える。すなわち、標準曲線用の試験管の中にはシスチン標準液と 17 種純品アミノ酸が入っているだけなので、加熱によってシスチン標準液は壊れやすいが、検体用の試験管の中にはシスチン添加液のほかに、検体の加水分解物（アミノ酸類、イミノ酸類、その他種々の窒素化合物）が入っているので、シスチンは破壊から比較的保護されるのではなかろうか。破壊度の大きいシスチン標準曲線で破壊度が若干少い検体添加シスチン量をグラフ上から読むので、回収量が高く出るのではないかと推定される。

酸化カゼインの加水分解物であるランチオナイズカゼイン天然培地使用時のシスチン標準曲線が比較的ねないのも、同じような理由に基づくものと思われる。

要 約

田村合成培地を一部変更（メチオニン、葉酸含量を変更）し、滅菌条件を 10 ポンド 5 分オートクレイブにすることにより、味噌の中のシスチン量が良好な回収率をもって測定できることを知った。かくて合成培地によって 18 種アミノ酸が定量できる段階に到達した。

終りに御指導を戴いた所長有本邦太郎先生、栄養化学部長速水決先生に深く感謝致します。なお本研究は昭和 34 年 7 月 18 日、日本農芸化学会関東支部会で講演した。

(1) L. M. Henderson, E. E. Snell : <i>J. Biol. Chem.</i> , 172 , 15 (1948).	本誌, 26 , 465 (1952).
(2) H. E. Sauberlich et al. : <i>ibid.</i> , 177 , 533 (1949).	(4) 一之瀬幸男 : 栄養学雑誌, 18 , 296 (1960).
(3) 田村学造, 角田俊直, 桐村二郎, 宮沢 滋 :	(5) 一之瀬幸男 : 同上, 18 , 299 (1960).
	(6) 一之瀬幸男 : 同上, 18 , 301 (1960).