〔農化 第 37 卷, 第 5 号, p. 278~282, 1963〕

米のアミノ酸含量に関する研究 (第1報)*

ベックマンアミノ酸分析計による白米グルテリンのアミノ酸分析

田村真八郎, 劔持久仁子 (農林省食糧研究所)

昭和 37 年 11 月 21 日 受 理

日本における重要な食糧である米のアミノ酸含量についてはこれまでにいくつか報告されている。著者らはベックマンアミノ酸分析計 (Beckman Amino Acid Analyzer, 以下 AAA と略す) を用いて, 米のアミノ酸含量について研究し, 本第1報では AAA の概略の性能と, AAA を用いて測定した白米グルテリンのアミノ酸分析の結果を報告する。

実験および結果

1. AAA の性能 著者らが食糧研究所で使用している AAA は Beckman Spinco の Model 120 型 Serial No. 228 で, この機械の概要は Spackman ら⁽¹⁾が報告している。

AAA は一定の流速 (30 cc/hour) で, イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーをおこない, アミノ酸を定量的に分離し, この溶出液に正確に半分の流速 (15 cc/hour) でニンヒドリン試薬溶液を混合し, この混液を細いテフロン管の管を通しながら 15 分間 100° に加熱して, ニンヒドリンとアミノ酸を反応させ, できた発色の 570 m μ (プロリンのみ 440 m μ) の吸収を比色計中を流しながら 18 秒ごとに測定して定速で動いている記録紙上にプロットし, 自動的に溶出曲線をえがく。この溶出曲線上で各アミノ酸のえがくピークの大きさをあらわす数値 ($H \times W$ 値という, H は高さで, クロマトグラム上で各アミノ酸のピークの高さを optical density であらわした数値である。 W は半値幅で, 各ピークの $H/2$ から上の部分にプロットされている記録計の打点の数をあらわす数値である。 $H \times W$ 値は一定の条件でクロマトグラフィーをおこない, 各アミノ酸の溶出曲線を記録した場合にそれぞれの分離されたアミノ酸がニンヒドリンと反応してつくった Ruhemann Purple の量に比例して変動する数値としてクロマトグラム上で計算し易いように採用されたもので, 単位をつけずに使用している) を計算して, 基準量 1.00 μ mol の各アミノ酸がえがくピークの $H \times W$ 値 (HW コンスタントという) との比率から試料中の各アミノ酸量を算出する。

以上のような操作で定量するので, AAA の分析機器としての性能は溶出の流速および反応槽の温度の正確なコントロールに依存しているわけであるが, 実際にはそれらの総体が, 第一に同じサンプルを数回測定した場合に $H \times W$ 値がどの程度よく一致するかということと, 第二に AAA にかけたアミノ酸の量と $H \times W$ 値はどの程度のサンプル量の範囲でどの程度に比例しているかという問題になる。

第一の点を検討したのが第1表で, 第二の点を検討したのが第2表である。

第1表では Beckman の Standard Calibration Mixture Type 1 の所定にうすめた液 2.00 cc (各アミノ酸を 1.00 μ mol ずつ含む) を, short column (15 cm, 塩基性アミノ酸およびアンモニア分離用) と long column (150 cm, 酸性および中性アミノ酸分離用) にそれぞれ3回ずつかけて各アミノ酸の $H \times W$ 値 (つまり HW コンスタント) を計算したものである。3回の測定値はよく一致し相対誤差 2% を越えるアミノ酸はなかった。

第2表では各アミノ酸 2.00 μ mol, 0.500 μ mol, 0.250 μ mol, 0.125 μ mol を含む試料溶液 (Beckman の Standard Calibration Mixture の相当量) を AAA で測定し, 第1表中の HW コンスタントの平均値を 100 とした場合の比率で示した。相対誤差 5% 以上のものは太字で示した。アンモニアを除けばアミノ酸の量と $H \times W$ 値は大体よく比例しており, プロリン, シスチンを除けば 0.250 μ mol~2.00 μ mol の範囲で相対誤差 5% 以内で測定可能であると考えられる。

第1表, 第2表中のニンヒドリン試薬 A, B はそれぞれ別に調製した one batch のニンヒドリン試薬溶液を

*Studies on Amino Acid Content of Rice. Part I. Amino Acid Composition of Polished Rice
Glutelin estimated by Beckman Amino Acid Analyzer.

By Sinpatirō TAMURA and Kuniko KENMOCHI (Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry)

あらわし, 十分注意して調製すれば batch 間
にあまり差がないことを示している。

アミノ酸分析の標準には, ベックマン社で
調製した Standard Calibration Mixture
Type 1 を用いている。したがってもしこの
mixture が規定どおりのアミノ酸を含んでい
ない場合は補正が必要になるわけである。こ
の mixture の完全な検定はしていないが,
アラニンの検定をおこなった結果は次のとお
りであった。GBI 社の *d,l*- α -アラニン (窒
素含量, 理論値 15.72 %, 測定値 15.53 %) の
一定量を AAA を用いて 2 回測定し, ベッ
クマンの mixture を標準として GBI のアラ
ニン標品の純度を計算したところ, 96.1%,
97.7% であり, 誤差範囲なのでベックマンの
Calibration Mixture は規定どおりのアラニ
ンを含むものと考えた。また GBI のアラニ
ンはクロマトグラム上でアラニン以外のピー
クを示さないで, アラニン以外のアミノ酸に
含まれていない。アラニン以外のアミノ酸に

ついては検定していないが, 以上のアラニンの検定よ
りベックマンの Standard Calibration Mixture が規
定量のアミノ酸を含有しているものと考え, これを以
後のアミノ酸分析の標準として計算をおこなっている。

2. 白米グルテリンの調製 実験に用いたグルテ
リンの調製は近藤, 林⁽²⁾の報告を参考として次のよう
におこなった。昭和 33 年山形県産品種農林 41 号の玄
米を 90% 精白し, 80 メッシュのフルイを通るまでボ
ールミルで細粉とした。この白米粉を原料として用い,
グルテリンの抽出法は次のようである。抽出洗滌はい
ずれも 3 l 容の三角フラスコを用い, 6 時間振とうし
たのち 1 晩放置し, 上澄ミ液を除く方法でおこなった。
まずアルブミン, グロブリンを除くために白米粉 100
g を 1 l の 3% 食塩水で 2 回抽出し, 残渣を 500 cc の
水で 2 回洗滌した。この残渣よりグルテリンを 0.2%
水酸化ナトリウム水溶液 1 l ずつで 2 回振とう抽出し,
上澄ミ液を合わせ硬質口紙でろ過し酢酸で pH 4.5 に
しタンパク質を沈澱させた。1 夜放置後上澄ミ液をサイ
フォンで除き 1 l ずつの水で 3 回洗滌し遠沈してタ
ンパク質をとった。このタンパク質からプロラミンを

除くために 70% アルコール 1 l ずつで 2 回振とう洗滌して, 残ったタンパク質をグルテリンとした。このグル
テリンを減圧デシケーター中で 40° 以下で乾燥し細粉とし, 本実験に用いた白米グルテリンの標品とした。収量
は白米粉 100 g より 2.2 g, 水分含量は 105° 乾燥法で 10.4%, 窒素含量はセミ・マイクロ・ケルダール法で 15.6
% であった。灰分含量は標品の量が不十分だったため定量できなかった。この実験ではグルテリンを得ること
を目的としたことと, 白米タンパク質中に少量しか存在しない他のタンパク質 (全タンパク質中アルブミン

第 1 表 *HW* コンスタントの側定値

測 定	1 回	2 回	3 回	平均値及び 標準偏差
15cm カラム				
ニンヒドリン試薬	A	B	B	
リ ジ ン	22.485	22.305	22.264	22.351 ± 0.096
ヒ ス チ ン	20.196	20.167	19.635	19.999 ± 0.258
ア ン モ ニ ア	21.286	21.476	21.179	21.314 ± 0.123
ア ル ギ ニ ン	19.900	19.988	19.237	19.708 ± 0.335
150 cm カラム				
ニンヒドリン試薬	A	A	B	
アスパラギン酸	17.304	17.301	16.817	17.141 ± 0.229
ス レ オ ニ ン	17.493	17.496	16.992	17.327 ± 0.236
セ リ ン	18.344	18.439	17.921	18.235 ± 0.225
グ ル タ ミ ン 酸	16.661	16.050	16.470	16.394 ± 0.255
ブ ロ リ ン	4.402	4.514	4.320	4.412 ± 0.079
グ リ シ ン	17.122	17.280	16.934	17.112 ± 0.141
ア ラ ニ ン	17.484	17.411	17.268	17.388 ± 0.089
シ ス チ ン	9.522	9.522	9.540	9.528 ± 0.010
バ リ ン	17.127	17.016	16.968	17.037 ± 0.066
メ チ オ ニ ン	17.266	17.950	17.415	17.544 ± 0.294
イ ソ ロ イ シ ン	18.860	18.966	18.699	18.842 ± 0.110
ロ イ シ ン	18.728	18.851	19.070	18.883 ± 0.141
チ ロ シ ン	17.990	17.615	17.488	17.698 ± 0.213
フェニルアラニン	18.266	18.131	17.768	18.055 ± 0.212

第 1 表, 第 2 表中のニンヒドリン試薬の A, B はそれぞれ同じパッチのニンヒド
リン試薬を用いたことを示す。

第 2 表 アミノ酸量と *H* $\times$ *W* 値の比例範囲

ア ミ ノ 酸 量	2.00	0.500	0.250	0.125
	μ mol	μ mol	μ mol	μ mol
15 cm カラム				
ニンヒドリン試薬	B	A	A	B
リ ジ ン	193	50.6	24.6	13.1
ヒ ス チ ン	193	50.1	25.1	13.6
ア ン モ ニ ア	166	54.5	28.8	19.2
ア ル ギ ニ ン	192	48.7	25.0	13.1
150 cm カラム				
ニンヒドリン試薬	B	A	A	B
アスパラギン酸	201	48.5	25.7	13.0
ス レ オ ニ ン	209	48.6	25.2	13.0
セ リ ン	204	48.9	25.3	13.0
グルタミン酸	208	49.5	25.8	13.0
ブ ロ リ ン	205	52.5	26.7	12.7
グ リ シ ン	205	49.1	25.8	13.3
ア ラ ニ ン	208	48.7	26.0	13.1
シ ス チ ン	206	48.2	22.6	12.1
バ リ ン	209	49.1	26.0	13.9
メ チ オ ニ ン	200	50.5	26.3	14.2
イ ソ ロ イ シ ン	202	49.8	25.8	13.3
ロ イ シ ン	202	48.8	25.6	13.1
チ ロ シ ン	205	49.4	25.9	13.4
フェニルアラニン	202	49.1	25.5	13.2

第 1 表の *HW* コンスタントを 100 とした場合の比率であらわした。
太文字は 5% をこえたものを示す。

第3表 AAA による白米グルテリンのアミノ酸分析値

加水分解時間	m mol/g 原物							
	6		24		72			
リ ジ ン	0.164	0.170	0.175	0.171	0.172	0.181		
ヒ ス チ ジ ン	0.123	0.132	0.132	0.130	0.134	0.136		
ア ン モ ニ ア	1.06	1.19	1.24	1.30	1.25	1.22		
ア ル ギ ニ ン	0.446	0.449	0.445	0.458	0.427	0.457		
アスパラギン酸	0.710	0.714	0.708	0.706	0.689	0.701		
ス レ オ ニ ン	0.270	0.270	0.272	0.271	0.248	0.247		
セ リ ン	0.501	0.511	0.478	0.483	0.390	0.383		
グ ル タ ミ ン 酸	1.33	1.31	1.26	1.30	1.27	1.26		
プ ロ リ ン	0.364	0.379	0.373	0.382	0.384	0.360		
グ リ シ ン	0.572	0.562	0.573	0.571	0.562	0.561		
ア ラ ニ ン	0.583	0.568	0.574	0.576	0.539	0.549		
シ ス チ ン	—	—	—	—	—	—		
バ リ ン	0.412	0.406	0.503	0.511	0.506	0.543		
メ チ オ ニ ン	0.104	0.088	0.085	0.082	0.035	0.034		
イ ソ ロ イ シ ン	0.267	0.248	0.316	0.317	0.328	0.335		
ロ イ シ ン	0.613	0.590	0.619	0.621	0.581	0.602		
チ ロ シ ン	0.292	0.289	0.285	0.287	0.185	0.205		
フェニルアラニン	0.322	0.318	0.340	0.344	0.312	0.331		

試料に対し 20 倍量の 6N 塩酸を加え 110° でそれぞれ所定時間加水分解したサンプルをそれぞれ 2 回ずつ計 6 回 AAA で測定した。

加え、110° で分解時間を 6, 24, 72 時間に变えた 3 点の加水分解試料をつくり、それぞれを 2 回ずつ計 6 回の測定を AAA でおこなった。測定値は第 3 表に示した。また第 1 図に AAA の溶出曲線の 1 例を示した。

トリプトファンは Spies⁽³⁾ に従い、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドにより比色定量し、シスチンは Schram⁽⁴⁾ に従い過ギ酸でシステイン酸に酸化したのち加水分解し、Dowex 50, 200~400 メッシュ, 30 cm のカラムを用いて分離し、ニンヒドリン比色法で定量した。

以上の測定値からセリン、メチオニン、チロシンは加水分解時間 0 時間の値を計算し、その他のアミノ酸は各定量値のうちの最高値をとって (タンパク質の塩酸加水分解の際には、一方でタンパク質が徐々に加水分解されてアミノ酸を遊離すると同時に、他方ではアミノ酸が破壊されていく、低い測定値は短時間加水分解の場合は加水分解時間の不足、長時間の場合はアミノ酸の破壊によると考えられるので、真の含量に近い測定値として最高値を採用した) 白米グルテリンのアミノ酸含量推定値とした。アンモニアは 6 時間の値を用いた。窒素の回収率

trace, グロブリン 2~8%, プロラミン 1~5%, グルテリン 85~90% 程度と考えられている) を調製するには原料が少なすぎたのでアルブミン、グロブリン、プロラミンの調製はおこなわなかった。このグルテリン標品がアルブミン、グロブリン、プロラミンを含んでいるか否かについては充分の検討をしていないので、これらのタンパク質を微量に含んでいる可能性は完全には除かれていない。

3. アミノ酸の分析 従来タンパク質

を塩酸で加水分解する際に分解時間が短いとバリン、イソロイシンなどが完全に遊離せず、また分解時間を長くするとセリン、チロシンなどがこわれることが知られている。本実験ではこの点を考えて、試料グルテリン 30mg に対し 20 倍量の 6N 塩酸を

Standard calibration mixture (1.00 μ m of each amino acid)

Polished rice glutelin (6x-HCl 24 hrs. hydrolyzed)

第1図 AAA の溶出曲線

第4表 白米グルテリンのアミノ酸含量推定値

		m mol/g 原物			
加水分解時間	0	6	24	72	推定値
リジン		0.167	0.173	0.177	0.177
ヒスチジン		0.128	0.131	0.135	0.135
アンモニア		1.13	1.27	1.24	1.13
アルギニン		0.448	0.452	0.442	0.452
トリプトファン					0.072
アスパラギン酸		0.712	0.707	0.701	0.712
スレオニン		0.270	0.272	0.248	0.272
セリン	0.520	0.506	0.481	0.387	0.520
グルタミン酸		1.32	1.28	1.27	1.32
プロリン		0.372	0.378	0.372	0.378
グリシン		0.567	0.572	0.562	0.572
アラニン		0.576	0.575	0.544	0.576
シスチン					0.036
バリン		0.409	0.507	0.525	0.525
メチオニン	0.097	0.096	0.084	0.035	0.097
イソロイシン		0.258	0.317	0.332	0.332
ロイシン		0.602	0.620	0.592	0.620
チロシン	0.294	0.291	0.286	0.195	0.294
フェニルアラニン		0.320	0.342	0.322	0.342
窒素回収率 %		91.2	93.9	90.3	94.0

6, 24, 72 時間の数値は第3表中の値の平均値。0時間は破壊を補正した数値。
推定値に採用した数字を太文字で示した。窒素回収率は各時間とも推定値中にあるトリプトファンとシスチンの値を加えて計算した。

は 94.0% であった。以上の結果を第4表に示した。

考察および要約

バリン, イソロイシンは 72 時間加水分解が高い値を与え, Smith ら⁽⁵⁾のカルボキシペプチダーゼ, Smith ら⁽⁶⁾のパパイン, Mahowald ら⁽⁷⁾のミオキナーゼ, Noltmann ら⁽⁸⁾のアデノシン3リン酸クレアチントランスホスホリラーゼのアミノ酸分析の際に報告された事実と一致した。リジンおよびヒスチジンもこのような傾向がみられた。セリン, メチオニン, チロシンは 72 時間加水分解でかなりの破壊がみられたが, アスパラギン酸とグルタミン酸も長時間加水分解で僅かながら減少する傾向を示した。

第5表に白米グルテリンのアミノ酸分析値を著者らの結果と文献値を対比して示した。著者らの数値は文献値にくらべてリジンがやや低い値を与えた

第5表 白米グルテリンのアミノ酸含量 (g/16 gN) 及び文献値

	著者ら	杉村ら ⁽⁹⁾ (B)	田村ら ⁽¹⁰⁾ (B)	属 ⁽¹¹⁾ (C)	平 ⁽¹²⁾ (B)	Sasaoka ⁽¹³⁾ (SC)
リジン	2.65	3.8	2.9	3.26	4.0	3.04
ヒスチジン	2.15	2.7	2.9	2.49	2.2	2.18
アンモニア	1.97	—	—	1.83	—	2.42
アルギニン	8.06	7.1	8.4	7.27	7.5	8.47
トリプトファン	1.52	1.0	1.2	1.12	1.2	1.81
アスパラギン酸	9.71	9.6	8.1	9.47	7.6	9.61
スレオニン	3.32	3.9	3.0	4.02	4.1	3.29
セリン	5.60	—	6.2	6.15	4.8	5.22
グルタミン酸	19.89	18.1	20.8	19.66	15.7	18.28
プロリン	4.45	—	3.8	7.94	5.4	4.11
グリシン	4.41	—	4.6	4.45	4.1	4.23
アラニン	5.26	—	—	6.90	5.4	5.38
シスチン	0.88	—	0.7	2.18	0.51	0.98
バリン	6.31	5.9	8.2	4.98	6.4	7.36
メチオニン	1.49	1.9	1.4	0.59	1.9	1.16
イソロイシン	4.46	5.7	4.9	4.59	5.8	4.90
ロイシン	8.35	8.2	9.3	8.61	9.3	8.37
チロシン	5.47	—	2.7	7.98	3.8	3.81
フェニルアラニン	5.80	7.0	7.4	0.93	5.6	5.86
総計	99.78	74.9	96.5	104.42	95.31	98.06
アミノ酸数	18	12	17	18	18	18

総計にはアンモニアの値を加えてない

(B): ミクロ・ビオ・アッセイ法

(C): イオン交換樹脂カラム・クロマト法

(SC): 殿粉カラム・クロマト法

が、その他のアミノ酸は大体文献値と一致した。近藤ら⁽¹⁴⁾の報告によれば、著者らが分析した白米グルテリンの標品には糖質と核酸が残存していると考えられ、これらの不純物は塩酸加水分解の際に一部のアミノ酸の破壊を起すことが知られており、未回収の窒素の一部分は核酸中の窒素および破壊されたアミノ酸に起因するものと考えられる。

日本における重要食糧である白米の、主要タンパク質であるグルテリン

のアミノ酸組成を Beckman Amino Acid Analyzer を用いて測定した。

終りにのぞみ種々御指導を受けた前農林省食糧研究所長、東京大学農学部桜井芳人教授に深い謝意を表する。

(1) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore :

Anal. Chem., **30**, 1190 (1958).

(2) 近藤金助, 林 常孟 : 本誌, **3**, 244 (1927).

(3) J. R. Spies, D. C. Chambers : *Anal. Chem.*,

21, 1249 (1949).

(4) E. Schram, S. Moore, E. J. Bigwood : *Biochem. J.*, **57**, 33 (1954).

(5) E. L. Smith, A. Stockell : *J. Biol. Chem.*,

- 207, 501 (1954).
- (6) E. L. Smith, A. Stockell, J. R. Kimmel :
ibid., **207**, 551 (1954).
- (7) T. A. Mahowald, E. A. Noltmann, S. A.
Kuby : *ibid.*, **237**, 1138 (1962).
- (8) E. A. Noltmann, T. A. Mahowald, S. A.
Kuby : *ibid.*, **237**, 1146 (1962).
- (9) 杉村敬一郎, 平 宏和, 星野直司, 蛭沢春枝 :
栄養と食糧, **10**, 43 (1957).
- (10) 田村学造, 角田俊直, 桐村二郎, 宮沢 滋 :
本誌, **26**, 480 (1952).
- (11) 属 朝浪 : 福岡医学雑誌, **51**, 1217 (1960).
- (12) 平 宏和 : 植物学雑誌, **75**, 273 (1962).
- (13) K. Sasaoka : Memories of the Res. Inst.
for Food Sci., Kyoto Univ., No. 13, p.17
(1957).
- (14) 近藤金助, 森田雄平 : 京都大学食糧科学研究
所報告, 第 15 号, 1 (1952).
-