

食品のアミノ酸組成と加熱による変動

第 1 報

戸田 茂, 黒田 正清
松浦 康, 金沢 千賀子

食品中のアミノ酸については、種々、論議され、多くの定量値が報告されているが、我々は食品を構成するアミノ酸を定量すると同時に、個々のアミノ酸の熱水に対する態度を検討したので報告する。

アミノ酸の定量法は種々あるが、現在、急速に進歩しているイオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフィー法は、アミノ酸定量に際しての最も正確な方法とされている。Moore, and Stein は1952年以來、色々とその分析法を報告しているが、1958年¹⁾²⁾ に発表された Amberlite IR-120 を使った方法は、溶出液の基底線が比較的一定しているので、計算上の誤差が少なく、又分析時間も短縮できるので、この方法によってアミノ酸の定量をした。

なお、食品の蛋白質を構成するアミノ酸を定量する際に問題になるのは、蛋白質の加水分解の際に生ずるフミンである。C. Neuberg 等³⁾⁴⁾ はアミノ酸及び小さなペプチッドは、炭酸ソーダと酢酸第二水銀によって定量的に沈澱することを報告しており、Kofrányi⁵⁾ はこれを食品の蛋白質の分離に応用して良好な結果を得ている。我々も Kofrányi の結果を確かめ、この方法によって食品の蛋白質の加水分解を行なった。

実 験

食品は牛肉、アジ、ジャガイモ、ホーレン草を使った。なお、アミノ酸組成の変動を調べるため、固形のものには $2 \times 2 \times 1 \text{ cm}^3$ の大きさとし、ホーレン草は原形のまま、各々、3倍の水を加えて、15分間煮沸した。対照は未処理のものとする。

遊離アミノ酸の抽出：試料を磨碎して、60%アルコールにより抽出した。抽出液は蒸発乾涸して、pH 2.2 の緩衝液に溶かして試料とした。

蛋白質の加水分解：Kofrányi⁵⁾ の方法によった。すなわち、食品を 5 N 蟻酸と共に8時間、加熱、還流して蛋白質、澱粉を可溶性とした。水解液は炉過し、濃縮、乾燥して、蟻酸を完全に除いた後、10%炭酸ソーダと25%酢酸第二水銀により、pH を7~8の間に調節しながら、アミノ酸、ペプチッドを沈澱させ、糖質溶液から分離した。この沈澱は濃塩酸と共に3時間、加熱、還流して加水分解を完了する。なお、水銀イオンは硫化水素水により硫化水銀として取り除く。水解液は濃縮、乾燥後、pH 2.2 の緩衝液に溶かし、必要があればその溶液は pH 2.2 に調製して試料とする。

アミノ酸の定量：Moore 等の Amberlite IR-120 を使った方法に従った。酸性、中性アミノ酸は $0.9 \times 150 \text{ cm}$ カラム²⁾、塩基性アミノ酸は $0.9 \times 15 \text{ cm}$ カラム¹⁾ を使用した。樹脂は200~600メッシュのものを Hamilton⁶⁾ の方法によって分画した。

展開用緩衝液は 150 cm カラムには Na^+ の濃度 0.2 N, pH 3.25, pH 4.25 のもの、15 cm カラムには 0.35 N, pH 5.28 のクエン酸緩衝液を使用した。

カラム操作については、150 cm カラムには pH 4.25 の緩衝液に分散させた Na-型樹脂を、

20 cm Hg の加圧下に数回に分けてつめ、約 70 ml の 0.2 N のカセイソーダを重力下に流した後、pH 3.25 の緩衝液を、カラムからの流出液の pH が一定になるまで重力下に流す。約 140 ml を要す。このカラムの先端に試料をつけ、まず pH 3.25 の緩衝液で、20 cm Hg の加圧下に、30°C、11.5~12 ml/hr. の流速で展開する。「グリシン」溶出後、pH 4.25 の緩衝液に変え、外套管の水の温度は、「アラニン」溶出後 50°C とする。この方法では緩衝液の pH は特に正確を要するが、酸性側物質の分離、特に「アスパラギン酸」「スレオニン」「セリン」の分離のためには流速も又、大切である。流速は主に樹脂の大きさに調節したが、なお、遅い時は温度を 30~50°C の間で調節してもよい。「バリン」溶出後は 50°C を保たないと収率が悪くなる。15 cm カラムには特に圧力はかけず、展開用緩衝液を入れた容器の上げ下げによって流速を調節した。樹脂は 150 cm カラムのものと、ほぼ同じ分画のものを用い、50°C、30 ml/hr. の流速で展開した。溶出液はいずれの場合も 2 ml ずつの分画とした。

比色定量：ニンヒドリン改良法⁷⁾に従った。

アミノ酸の同定：まず純品を使用して流出位置を知り、次に溶出液の各ピークを集めて、酸性、中性アミノ酸は Dowex X-2 によって脱塩、塩基性アミノ酸は Amberlite IR-120 によって脱塩後、ペーパークロマトグラフィー法によって同定した。

結 果

以上のごとき方法によって得た結果を表 1, 2, 3 及び 4 に示す。表中の「—」で示した所は追求し得なかったもの、空白の箇所はデーターとして常識的に採用し得なかったものである。

溶出曲線の一例を図 1 に示す。

考 按

表 1 に示した量は蛋白質構成アミノ酸と遊離アミノ酸の和であり、(以後、総アミノ酸と呼ぶ)、煮沸による組成の変化もこの両者の動きが同時にあらわれている。表 2 は遊離アミノ酸の組成とその加熱による変化である。表中「加熱」の項の量は煮沸後、食品中に残った量であって、つま

表 1 a. 牛肉の総アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と総アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	11,476.0	8,816.8	76.9
threonine	6,327.2	5,619.6	88.8
serine	4,847.4	4,272.6	88.1
glutamic acid	14,588.4	14,262.8	97.0
glycine	11,144.0	8,156.4	73.2
alanine	11,863.2	10,764.6	90.6
valine	4,612.8	4,253.6	92.2
leucine	2,801.2	2,535.2	90.6
iso-leucine	8,642.4	—	—
tyrosine	2,923.5	2,772.7	94.4
phenylalanine	5,998.9	—	—
lysine	11,350.4	8,629.8	76.9
histidine	2,164.8	—	—
arginine	6,112.0	—	—

表 1 b. アジの総アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と総アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	13,650.0	10,510.5	77.0
threonine	6,186.0	4,698.1	76.0
serine	3,552.4	3,196.8	90.1
glutamic acid	13,338.0	10,877.3	81.5
glycine	8,889.6	6,260.5	69.3
alanine	11,546.2	1,624.3	100.1
valine	5,087.6	3,536.2	69.5
leucine	2,316.0	—	—
iso-leucine	8,142.0	5,075.9	62.3
tyrosine	5,799.2	4,617.2	79.6
phenylalanine	—		
lysine	9,628.8	9,112.8	94.6
histidine	—	2,336.3	—
arginine	763.8	563.1	73.7

表 1 c. ホーレン草の総アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と総アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	1,938.3	1,836.6	94.7
threonine	528.0		
serine	472.0		
glutamic acid	1,134.8	1,007.8	88.8
glycine	812.0	765.5	94.3
alanine	1,751.2	1,698.7	97.2
valine	477.4	369.6	94.3
leucine	137.4	101.4	73.7
iso-leucine	817.4	718.0	89.8
tyrosine	1,102.8	914.8	82.9
phenylalanine			
lysine	848.2	814.4	95.9
histidine	—	364.8	—
arginine	79.2	74.8	94.4

表 1 d. ジャガイモの総アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と総アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	726.4	536.4	73.8
threonine	238.8	238.8	90.3
serine	259.4	192.1	74.0
glutamic acid	700.8	647.4	92.0
glycine	292.6	171.2	60.0
alanine	299.6	285.2	95.2
valine	266.0	231.6	87.1
leucine	64.6	41.8	64.2
iso-leucine	227.6		
tyrosine	26.2		
phenylalanine	69.2		
lysine	597.4	491.6	82.3
histidine	99.0	94.2	95.1
arginine	89.2	73.0	82.0

表 2 a. 牛肉の遊離アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と遊離アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	17.2	—	—
threonine	1.8	0.74	41.1
serine	1.2	0.24	20.0
glutamic acid	31.6	10.6	33.5
glycine	8.0 31.0	2.2	27.5
alanine	7.4	1.8	24.3
valine	19.9	1.4	7.0
leucine	146.0	56.0	38.3
iso-leucine	31.0	8.9	28.7
tyrosine	5.3	1.9	32.3
phenylalanine	8.4	3.4	40.4
lysine	22.3	—	—
histidine	—	—	—
arginine	12.0	—	—

表 2 b. アジの遊離アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と遊離アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	12.2	2.4	19.7
threonine	1.0	0	0
serine	0.8	0	0
glutamic acid	11.4	2.9	25.4
glycine	45.4	7.8	17.1
alanine	21.6	5.8	26.8
valine	4.2	2.2	
leucine	1.7	0	0
iso-leucine	2.9	0.7	23.0
tyrosine	—	1.7	—
phenylalanine	—	1.8	—
lysine	48.2	—	—
histidine	—	—	—
arginine	4.2	—	—

り残存量である。「%」の項は未処理のものに対する残存量の割合を示している。単位は 100g 湿重量中の μM であらわした。

遊離アミノ酸の量は蛋白質の量とは関係なく、大体、同じ範囲にある。従って蛋白質の多い食品程、遊離アミノ酸の占める割合が小さくなる。各食品の総アミノ酸に対する遊離アミノ酸の割合は、平均値で示すと、牛肉 4.0%、アジ 0.2%、ホーレン草 1.4%、ジャガイモ 18.6% である。遊離アミノ酸自体の残存率は 10~50% と非常に低い値であるが、総アミノ酸の変動は主として蛋白質の溶出に由来するものであると考えられる。

カラム操作中のアミノ酸の損失は「フェニールアラニン」「チロシン」が大きく、10%

表 2 c. ホーレン草の遊離アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と遊離アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	5.7	1.4	24.5
threonine	8.9	1.1	12.3
serine	11.2	3.4	30.3
glutamic acid	49.6	9.2	18.5
glycine	5.3	2.8	52.7
alanine	6.7	3.5	52.7
valine	11.8	4.8	40.7
leucine	3.0	1.3	42.0
iso-leucine	4.2	1.6	38.1
tyrosine	1.5	—	—
phenylalanine	1.6	—	—
lysine	3.4	—	—
histidine	—	—	—
arginine	3.4	—	—

表 2 d. ジャガイモの遊離アミノ酸組成 ($\mu\text{M}/100\text{g}$ 湿重量) と遊離アミノ酸の残存率 (%)

	対 照	加 熱	%
aspartic acid	80.2	65.2	81.2
threonine	7.8	—	—
serine	13.0	—	—
glutamic acid	162.0	86.2	53.2
glycine	} 67.4	} 32.2	} 47.6
alanine			
valine	242.4	106.4	43.9
leucine	28.4	8.2	28.7
iso-leucine	8.4	3.8	45.2
tyrosine	11.0	3.6	27.8
phenylalanine	—	—	—
lysine	77.8	17.6	22.7
histidine	—	—	—
arginine	58.2	13.2	22.3

表 3 試料水解物残渣の N 量 (%)

	対 照	加 熱
牛 肉	0.17	0.26
ア ジ	0.16	0.12
ジャガイモ	0.70	—
ホーレン草	0.58	0.58

表 4 糖溶液中残存 N 量 (%)

	対 照	加 熱
牛 肉	2.01	1.36
ア ジ	0.70	0.50
ジャガイモ	6.65	—
ホーレン草	6.05	5.31

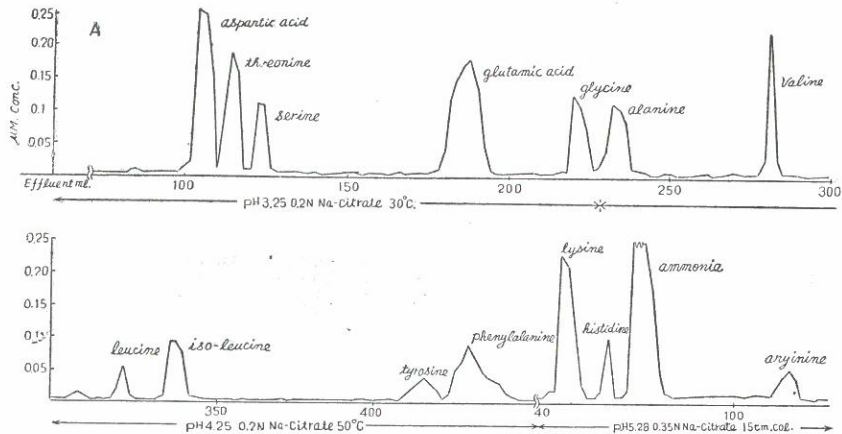


図 1 Amberlite IR-120 column によるジャガイモ 0.261 g 中の蛋白質加水分解物の溶出曲線
 A: 15 cm column 酸性・中性アミノ酸
 B: 15 cm column 塩基性アミノ酸

以内であるが、他はほとんど Moore 等の記載と変わらず 3% 内外である。

蛋白質分解の際の窒素の損失は表 3, 4 のとおりである。表 3 は蟻酸による加水分解の際、可溶性とならない物質の窒素である。又、表 4 はアミノ酸、ペプチッドを水銀塩として沈澱させた際、糖溶液中に残る窒素の量である。この窒素分にはアミノ酸、ペプチッド以外の水銀によって沈澱しない物質の窒素も含まれる。窒素の定量は総て、ケールダール法によった。

蛋白質の最終加水分解液は、肉、アジでは透明な茶色を呈し、ホーレン草、ジャガイモでは透明な褐色を呈した。

結 論

牛肉、アジ、ホーレン草、ジャガイモの遊離アミノ酸と総アミノ酸を定量した。

上記食品の遊離アミノ酸と総アミノ酸の加熱による変動を調べた。

遊離アミノ酸は残存率を平均値で示すと、牛肉 26.8%、アジ 22.5%、ホーレン草 29.8%、ジャガイモ 37.2% と低い値を示すが、遊離アミノ酸量の総アミノ酸に対する割合が非常に小さいので、その変化は無視してもさしつかえないと考える。

固形のものについては総アミノ酸の残存は大体、同じ傾向を示し、「アスパラギン酸」は牛肉 76.9%、アジ 77.0%、ジャガイモ 73.8%、「グリシン」については牛肉 73.2%、アジ 69.3%、ジャガイモ 60.0% といずれも他と較べて低い値を示す。反対に「グルタミン酸」、「アラニン」は高い残存率を示し、「グルタミン酸」については牛肉 97.0%、アジ 81.5%、ジャガイモ 92.0%、アラニンについては牛肉 90.6%、アジ 100.1%、ジャガイモ 95.2% である。なお、ホーレン草は一般に高い残存率を示し、「アスパラギン酸」、「グリシン」、「グルタミン酸」、「アラニン」についても特に変わらず平均した値となっている。

なお、上記結果の意義については今後の研究にまたねばならない。

文 献

- (1) Moore, S., Spackman, D. H., Stein, W. H.,: Anal. Chem., 30, 1185 (1958)
- (2) Spackman, D. H., Stein, W. H., Moore, S.,: Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
- (3) Neuberg, C. und Kerb, J.: Biochem, Z, 40, 498 (1912)
- (4) Neuberg, C. und Kerb, J.: Biochem, Z, 67, 119 (1914)
- (5) Kofrányyi, E.: Z, physiol, Chem, 287, 170 (1951)
- (6) Hamilton, P. B.,: Anal. Chem, 30, 914 (1958)
- (7) Moore, S., Stein, W. H.,: J. Biol. Chem, 211, 907 (1954)
- (8) Moore, S., Stein, W. H.,: J. Biol. Chem, 211, 907 (1954)