

穀粒食品中の蛋白質試料の一調製法 について

加 茂 新 重 郎

緒 論

近時化学的な方法と乳酸菌を利用する微生物的な方法との、両面からのアミノ酸定量法が確立するにしたがって、各種蛋白質のアミノ酸の含有量は勿論のこと、更に栄養化学の立場からも各種食品の栄養価の判定に大いに用いられて来た。即ち以前は試験動物に飼料として与えて得られた体重増加量によって、食品中の蛋白質の栄養価値が論ぜられた。

1950年に Rose¹⁾ が人体に必須のアミノ酸を決定して以後は、蛋白質の質についてそのアミノ酸組成より検討せられるようになった。例えば Oser (1951)²⁾ は卵黄蛋白質が最も優れた蛋白質であることから、その必須アミノ酸組成と次のように比較することにより、各種食品中の蛋白質の栄養評価を Egg Index として記載している。

Essential amino acid Index 又は Egg Index

$$= \sqrt[10]{\frac{100a}{a_e} \times \frac{100b}{b_e} \times \frac{100c}{c_e} \times \cdots \times \frac{100j}{j_e}}$$

a, b, c j = 評価しようとする食品中の10種の必須アミノ酸の含有量 (%)

a_e, b_e, c_e j_e = 卵黄中の10種の必須アミノ酸の含有量 (%)

また田村、角田 (1951)³⁾ は或る種の乳酸菌のアミノ酸要求が人間のアミノ酸要求とよく類似していることから、各種蛋白質の酸分解液培地における乳酸菌の繁殖の度合によって蛋白質の栄養価を測定する方法について報告している。同様な報告は Horn M. J. (1952)⁴⁾ も行っている。

蛋白質のアミノ酸組成を測定する場合に一番理想的な方法は蛋白質そのまゝの形で、即ち酸又はアルカリによって加水分解することなく、結合状態のままでアミノ酸を定量することが最も望ましいのである。然し現在のところでは次のような方法は不可能である。従って通常な蛋白質を酸又はアルカリで、加水分解して個々の構成アミノ酸まで完全に分解してし得られる、蛋白質加水分解液について目的とするアミノ酸を定量して、その値を蛋白質のアミノ酸の含有

量と帰納している。

然しこの場合に蛋白質が他の成分例えば炭水化物、脂肪等と共存するような不純な蛋白質の場合には加水分解中に生じたアミノ酸と、共存物質の間に複雑な変化が起って多量のアミノ酸が破壊される。その為にアミノ酸定量結果に大きな誤差を生ずる事は周知の事実である。Patton A. R. (1950)⁵⁾によるとこの場合に最も影響を受け易いアミノ酸は lysine, arginine, tryptophan, histidine 等であると述べている。また Horn M. J. (1955)⁶⁾ は酸分解後の微生物定量法によるアミノ酸測定値の誤差について、種々の原因を報告している。

また一方これらの誤差を生ずる酸加水分解を行う代りに、蛋白質分解酵素を用いて常温でアミノ酸にまで分解し、その分解液のアミノ酸を定量する方法も行われている。然しこの方法での難点は酵素を用いるためにアミノ酸の放出が完全に行われないことである。

あらゆる食品には蛋白質のみならず炭水化物、脂肪等が大なり少なり含まれているのが普通である。蛋白質中のアミノ酸を定量する時に誤差を生ぜしめる物質としては澱粉質と脂肪を挙げることが出来る。これ等のなかで脂肪はエーテルのような有機溶剤を用いて他の成分を害うことなく容易に分離することが出来る。然し穀粒のような場合には 80% にも及ぶ澱粉質があるために穀粒をそのまま酸加水分解したような場合には、その時に副成される還元糖のために折角遊離したアミノ酸の若干が破壊されてしまう。従ってこのような方法でアミノ酸定量を行ったのでは、必ず幾パーセントかの誤差を生じ、ひいては食品の蛋白質の栄養価の評価に誤差を生ずるのである。このために従来は穀粒のような食品中の蛋白質のアミノ酸を定量する場合には、予めその中の蛋白質を或る種の適当な溶剤。例えば食塩水或は苛性ソーダで抽出することにより、共存する澱粉質と分離してその蛋白質試料についてアミノ酸を定量して、その結果と蛋白質試料の収量とからもとの食品のアミノ酸量に帰納している。この方法の欠点は一つの食品に含まれている蛋白質にも、単に一種或は二種の溶剤で完全に抽出することは不可能であることである。従って抽出された蛋白質が完全にもとの食品の蛋白質を代表し得るものでないので、それから得られる定量値には色々の要因が含まれてくる。

上述の方法は蛋白質を予め抽出することであったが、逆に穀粒のような食品から蛋白質を残して、澱粉質だけを取去ろうという実験も行われている。

Doty D. M. (1941)⁷⁾ は玉蜀黍中の蛋白質のチロゲン、トリプトファンを定量するに当って 5g の粉碎した玉蜀黍粉末を、先づソックスレー脂肪抽出器

で脂肪を完全に抽出した後に水と共に加熱して、澱粉質を糊化せしめてから pH 7.0 に調節して、唾液アミラーゼを 72 時間作用せしめて玉蜀黍粉末中の澱粉を分解溶解させた後に、濾別し残渣を蛋白質試料としてアミノ酸を定量している。Doty によれば蛋白質含有 7% の玉蜀黍から、45% の蛋白質含有の試料を得。そして原玉蜀黍中の 92% の蛋白質が試料中に移行したと述べている。

Flynn L. M. (1954)⁸⁾ も同じ方法でもって玉蜀黍のアミノ酸定量をしている。

また Block (1951)⁹⁾ は小麦、玉蜀黍、米、燕麦等の蛋白質のアミノ酸組成を定量する場合の試料調製法に唾液アミラーゼを用いている。その大略は次の如くである。

充分粉末にした穀粒をエーテルで完全に脱脂し、それを 8~9 倍容量の熱水で塊が残らないように糊状にし、それに醋酸を加えて pH を 4.5 に調節する。その懸濁液を沸騰水中で時々攪拌しながら 1 時間加熱して、穀粒中の澱粉を完全に糊化すると同時に蛋白質を熱凝固させる。内容が約 37°C に冷却してから苛性ソーダで唾液アミラーゼの最適 pH である pH 7.0 に調節する。それに遠心分離して夾雑物を除いた新鮮な唾液アミラーゼを過剰に加えて 37°C で 7 日間、澱粉の消化を行わせる。この時に防腐のためにトルエンとクロロホルムを添加して置く。7 日後に熱凝固した不溶性の蛋白質を濾別し、水でよく洗い乾燥したものをアミノ酸分析用試料として酸加水分解に供する。

Block によるとこの方法で穀物の蛋白質含有量は約 8~15% であるが、最後の分析用試料には蛋白質含有 65~75% にまで高めることが出来る。即ち澱粉質の大部分を取り去ることが可能であり、然も窒素の 90% は最後の分析用試料に残ると報告している。

以上に述べた実験は何れも食品中のアミノ酸定量に誤差を生ぜしめる炭水化物を唾液アミラーゼを用いて行ったものである。酵素を利用する場合にはその内に仮令微量でも、蛋白質分解酵素を含まないことが必要であって、Doty や Block が唾液アミラーゼを利用したのは、唾液中にはブチアリンと称する澱粉分解酵素のみであり、蛋白質分解酵素を含まないことと、それが比較的容易に入手出来るためであったものと思われる。然しながら唾液中には種々雑多の口腔細菌が含まれていることは充分考えられるところであって、これ等の細菌が澱粉を糖化中の 7 日間に増殖をして、蛋白質に作用し何等かの望ましくない変質の原因を作る可能性も当然考えられる。

従って酵素を利用する場合出来るだけ過剰の酵素を作用させて、出来るだけ短時間に澱粉質を除去することが望ましいのである。

近年に至って各種の酵素の結晶化が行われ、アミラーゼにおいても麹菌の生産するタカ、アミラーゼ。細菌の生産するバクテリア、アミラーゼ等が、比較的容易に結晶化することが出来るようになった。しかもこれ等の結晶アミラーゼには、蛋白質分解酵素は全然含まれていない。

著者は特にタカ、アミラーゼの結晶を用いることにより、唾液アミラーゼの場合よりも更に短時間に、然もアミノ酸定量用試料として、更に澱粉質の少ない適当な試料を調製出来るであろうとの考慮のもとに実験を行つた。また対象とした穀物は我が国における主食であり、近年その強化方法について色々と考えられている米粒を使用した。

実 験

使用した米粒

全窒素より測定した粗蛋白質	5.86 %
水分含有量	14.3 %

結晶タカ：アミラーゼ

三共製のタカ・ジアスターゼ原末を用い、赤堀の方法によって結晶化した。一度再結晶したものをアセトン中に懸濁せしめて、冷蔵庫中に保存した。使用に当っては M/200 醋酸カルシューム液中にアセトンと共に結晶アミラーゼを分解溶解せしめたものを酵素液として使用した。

結晶バクテリア・アミラーゼ

これは長瀬産業株式会社製のものをを用いた。使用に際しては結晶を M/10 アンモニア (pH 10 に調製) に一滴づつ落して所定量の結晶を溶解して酵素液として使用した。然しバクテリア・アミラーゼを用いた実験結果はタカ・アミラーゼを用いた実験結果と同一であつたのでその結果については省略する。

I アミノ酸定量用蛋白質試料調製方法

調製方法は次の如くであつて凡そ Block の方法に準じた。先づ米粒を約 60 メッシュの細かい粉末にした後にソックスレー氏脂肪抽出器で、エーテルを用いて約 40 時間脂肪を完全に抽出した後に 60~70°C でエーテルを蒸発させて脱脂米粉とする。かくして得た脱脂米粉 15g (全窒素 140.7mg) を採つて M/50 醋酸緩衝液 pH 4.5 に懸濁せしめて、ホモゲナイザーで更に微粉状にする。それに澱粉濃度が約 3~4% になるように蒸留水を加えた後に約 120°C。1 時間、オートクレイブして澱粉質を完全に糊化せしめると共に、米粉中の蛋白質を完

全に熱凝固せしめる。約 40°C に冷却した後に予め溶解しておいたタカ・アミラーゼ溶液を加え、更に防腐のためにトルオール及びクロロホルムを数滴宛に加え、25°C に保持して米粉中の澱粉質の大部分が糖化溶解されるまで作用させる。この所要時間は添加する結晶タカ・アミラーゼの量により異なるが、雑菌の混入を防ぐ意味から出来るだけ短時間であるのがよい。この点に関しては後に検討する。一定時間の後に 4000 r. p. m 20 min で遠心分離して熱凝固してある蛋白質部分と、可溶性の上澄液とに分離し蛋白質部分を水、アルコール、エーテルで洗った後に真空デシケーター中で乾燥する。この方法によって得られる蛋白質試料について 次の二点について調べた。(1) 蛋白質試料の中に原料の米粒の蛋白質の幾パーセントが保留されているか。(2) 蛋白質試料中に澱粉質が幾パーセント残存しているか。

(2)に関してはタカ・アミラーゼを用いたために完全に澱粉が除かれるとは考えられない。分解中間産物或は限界デキストリン等の水に、不溶性のものが残ることは当然考えられるが、それが作用時間とどんな関係で減少するかについて実験を行った。

II 調製した蛋白質試料中の直接還元糖及び残全糖について

(1) 直接還元糖について

予め粉碎した調製蛋白質試料 1 g に蒸留水 50 cc を加えて時々攪拌しながら室温に 3 時間放置し、次に除蛋白のために 20 %トリクロール醋酸を 10 %の濃度になるように加えて沈澱する蛋白質を濾別。残渣を 10 %トリクロール醋酸で洗った後に、濾液と洗液を合せて苛性ソーダで中和した後に 100cc にする。その液の一定量（通常 2 cc）をとって、ソモギー試薬によって還元力を測定した。測定は比色法で日立製光電光度計により、グルコースとして比色した。

此の結果は還元力を示さなかった。即ち調製した蛋白質試料中には水溶性の比較的グルコース重合度の低いデキストリンのような分解中間物は含有されて居らないことを示している。

III 蛋白質試料中の残全糖について

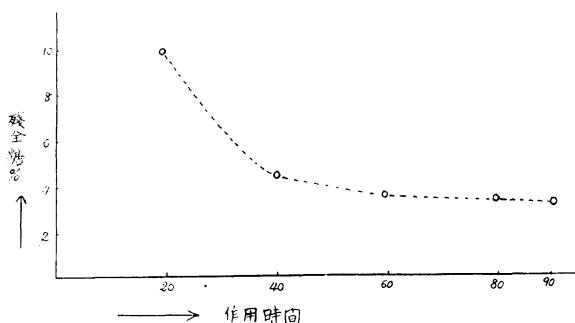
従って次に問題になるのは蛋白質試料中の残全糖である。これはタカ・アミラーゼの作用を受けなかった澱粉ないし相当重合度の大きい水に不溶性デキストリンである。寧ろ限界デキストリンに相当するものである。従って添加するタカ・アミラーゼを多くすることにより、或る程度は少くすることが出来る。

その定量方法は次の如くである。前述の直接還元糖を除いた残渣を2%塩酸で2.5時間。水浴上で酸加水分解して残存するデキストリンをグルコースまで分解する。そして直接還元糖の場合と同様にトリクロール醋酸で除蛋白した液について前と同様にその還元力を測定してグルコースとして表し残全糖とした。

残全糖はタカ・アミラーゼの作用時間が長い程減少するものであるが、或る程度以上は限界デキストリンとなって残るのである。また Block 等は活性の弱い唾液アミラーゼを7日間作用させているが、結晶タカ・アミラーゼを使用する場合には、何日間作用させるのが適当かということとその残全糖から調べた。過剰のタカ・アミラーゼを作用せしめた時の作用時間と、その時の蛋白質試料中の残全糖との関係は、下の図の如くである。

図I 作用時間と残全糖との関係

$$\text{残全糖}\% = \frac{\text{残全糖(グルコース)}mg}{\text{蛋白質試料重量}mg} \times 100$$



図の如く過剰のタカ・アミラーゼを40時間以上作用させてもそれ以上は残全糖には、変化がないことが判る。この時に残っているのは α 限界デキストリンと考えられるもので、それ以上は分解が進行しないのは当然である。

従ってタカ・アミラーゼを使用する時は作用を、40~50時間で停止するのが適当であることが判る。そしてその時の4%の残全糖はタカ・アミラーゼを用いる時には避け難いものであろう。

然し結晶アミラーゼを使用することにより蛋白質 5.86%, 澱粉 78.50% の米粒より蛋白質 84%, デキストリン(澱粉質) 4%の蛋白質試料を40~50時間で調製することが出来る。

III 蛋白質試料中の窒素回収率について

次に重要なことは、前述のような方法で米粒からアミノ酸分析用の蛋白質試

穀粒食品中の蛋白質試料の調製法について

料を調製した時に原料である米粒中の蛋白質のすべてが、その中に移行していることが望ましいことは勿論である。然し溶剤によって蛋白質を抽出する場合にもそうであるように完全に抽出（移行）されることは不可能である。従って出来るだけ多くの蛋白質が、蛋白質試料中に移行され得るように実験が行われなければならない。

普通の抽出法では 70~75% の蛋白質が抽出されるが、残りはその操作中に失われてしまう。従ってその蛋白質試料から得られたアミノ酸分析結果は、可成り実際とは異っているものと考えなければならない。

著者の方法による場合の窒素回収率を次のようにして測定した。

$$\text{窒素回収率 (\%)} = \frac{\text{蛋白質試料中の全窒素 mg}}{\text{原料として使用した米粉中の全窒素 mg}} \times 100$$

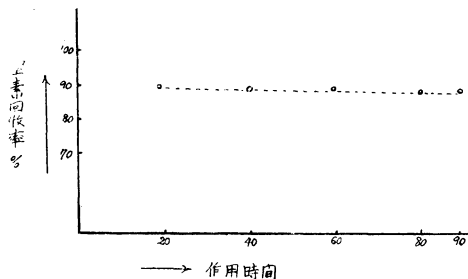
但し窒素の測定はマイクロキエーラール法の水蒸気蒸溜法によって行った。

また結晶酵素を多量に使用するので酵素蛋白の窒素も問題になるが、蛋白質試料調製法の最後の段階で、水洗いを充分することにより、蛋白質試料中には酵素蛋白は残らないものと考えた。

作用時間を異にした蛋白質試料の窒素回収率を図で表わすと、次の如くである。

図 II 作用時間と窒素回収率

$$\text{窒素回収率 \%} = \frac{\text{蛋白質試料中の全窒素 mg}}{\text{原料米粉中の全窒素 mg}} \times 100$$



上の図に示す如くタカ・アミラーゼ作用時間が長くなっても、窒素回収率は 90~85% で変化なく一定であった。このことは米粒中の蛋白質の熱凝固は不可逆的で時間によらず可溶性にならないことを示している。

以上の如き方法で米粉 15g から調製した蛋白質試料の分析結果は次の如くであった。

(1) 原料の米粉

(イ) 15g を使用

(ロ) 粗蛋白質 5.86 %

(ハ) 澱粉価 78.50 %

(ニ) 水分 14.30 %

これに 40 時間タカ・アミラーゼを作用せしめて調整した蛋白質試料の分析結果は

(2) 蛋白質試料

(イ) 重量 916 mg

(ロ) 粗蛋白質 86.2 %

(ハ) 残全糖 4.0 %

結 論

食品等の蛋白質中のアミノ酸を定量する場合に酸加水分解において起る糖—アミノ酸の反応を防ぐために結晶タカ・アミラーゼを用いて澱粉質の分離について実験を行った。

結晶タカ・アミラーゼを過剰に作用させることにより40時間で残全糖を4%まで減少することが出来た。その時の窒素の回収率は約90%であった。

御指導を賜った阪大産研二国教授、原田助教授に感謝致します。

本報告は既報の“微生物定量法による澱粉質食品中のリジン定量について” 醸酵工学雑誌 35 303 (1957) の一部をまとめたものである。

(註)

- (1) Rose W. C. J. Biol chem. 182 541 (1950)
- (2) Oser B. L. J. Amer. dietetic assoc. 27 396 (1951)
- (3) 田村, 角田等 日農化 24 422 (1951)
- (4) Horn M. J. J. Nutrition 48 231 (1952)
- (5) Potton A. R. Nutrition rev. 8 193 (1950)
- (6) Horn M. J. Cereal chem. 32 64 (1955)
- (7) Doty D. M. Ind. eng. chem. anal. ed. 13 169 (1941)
- (8) Flynn L. M. Cereal chem. 31 2 17 (1954)
- (9) Block Amino acid composition of food (1951)
- (10) 赤 堀 標準生化学実験法 p. 222