

## 卵白アルブミンの有効性リジンの 加熱安定性について

田 中 弘, 西堀よし子

### On the Heat Stability of Available Lysine in Egg Albumin

Hiromu TANAKA and Yoshiko NISHIBORI

Received October 4, 1971

#### 緒 言

食品タンパク質の栄養評価は、一般にその生物価あるいは、正味タンパク質利用率をもってされているが、その外にタンパク質を構成しているアミノ酸組成から栄養価を判定する化学的方法の改善にも努力がはらわれている。後者の場合、基準とされるアミノ酸組成は生の食品について分析されたものが大部分であって、食品の調理加工の処理によって一部アミノ酸の損失がある事を考えると、この食品分析値を実際に摂取する食物の栄養価判定の基準とすることは、食品の種類やその状態によっては必ずしも適当ではない。

食品の加工・調理などの処理中アミノ酸の安定性にもっとも大きい影響を与えるものとして加熱処理がある。加熱によって多くのアミノ酸が破壊を受けることはよく知られている。たとえば、パンに強化されたリジンは製パン工程中にその10~24%が破壊され、さらに喫食前の加熱によっても5~10%が分解を受けるといわれている。<sup>(1)</sup>牛乳については、121°Cで20分間加熱すると塩基性アミノ酸の減少が著しく、アルギニンの70%、リジンの50%が分解したという報告がある。<sup>(2)</sup>大豆の加熱処理は、大豆油抽出の前処理としても重要であるし、大豆そのものを食物として利用する際には、その消化率を高める上で必須の処理であるが、一方ではアミノ酸がかなり破壊されることが Evans らによって明らかにされている。これらの報告によれば大豆の加熱によって損失の著しいのは、リジン・アルギニン・ヒスチジン・シスチン・トリプトファンなどのアミノ酸である。

上記の報告からも分かるように、リジンはヒトの必須アミノ酸中とくに加熱破壊を受けやすいものの一つである。リジンが加熱によって栄養価を失なうには二つの型があるといわれている。一つは、食品中または調理加工の条件によって共存する糖類などと反応して分解する場合で、いわゆる Maillard 反応としてよく知られているものである。この場合は、リジンの定量を酸加水分解と酵素加水分解との両者について行なうとその結果はよく一致する。他の一つは、タンパク質分子中のリジン側鎖が他の官能基または溶液中の他の分子と相互作用をして、

いわゆる“マスクされた”状態となり、タンパク質分解酵素の作用を受け難い場合である。この時は、酸で加水分解すると、リジン側鎖はもとの状態に戻るので、リジンの定量値は酵素加水分解後のそれと一致しない。しかし酵素による作用を受けないのであるからリジンの栄養的価値は損われたと考えるべきであろう。Carpenter<sup>(8)</sup>は“有効性リジン”(available lysine)という考え方を提案し、上記の二つのタイプのリジンの損失をあわせて定量することを考えた。すなわち、タンパク質分子中そのε-アミノ基が遊離状態にあるリジンを栄養的に有効であるとみなす考え方である。有効性リジンの定量には、Sanger<sup>(9)</sup>らの開発したDNP法を適用して、ε-アミノ基をDNP化して有効性リジンをε-DNPリジンとして分離する方法が提案されている。<sup>(10-12)</sup>

食品の有効性リジンの加熱安定性に関しては、大豆<sup>(13)</sup>・鶏卵卵白<sup>(14)</sup>・牛血清アルブミン<sup>(15)</sup>などについての報告があり、いずれも加熱によって有効性リジンの損失の大きいことが述べられている。食品にはタンパク質の外に種々の成分が存在し、これらが加熱に際して、相互に複雑な反応をするものと思われる。従って加熱によるリジンの有効性の低下の機構を詳細に検討するためには反応系をできるだけ単純化しなければならない。このため著者らは試料として結晶卵白アルブミンを用い、中性緩衝液中で加熱処理を実施して、その有効性リジンの安定性について検討した。その結果、糖類存在下はもちろん、糖類のない条件でも、かなりの有効性リジンが減少することを認めたので、以下これについて報告する。

## 試 料

### 1. 結晶卵白アルブミン<sup>(16)</sup>

鶏卵卵白より硫酸法により調製し、これを3回再結晶して精製した。その後、透析により硫酸を除去し凍結乾燥して粉末とした。

### 2. 糖類

使用した糖類は次に掲げるものである。いずれも半井化学製特級試薬である。

D(+)サッカロース、D(+)グルコース、D(-)フルクトース、D(+)ガラクトース、β-D(+)ラクトース。

### 3. ハイフロスーパースセル<sup>(10)</sup>

クロマトグラフ分析に使用したハイフロスーパースセルは市販のものを次のように精製して用いた。ハイフロスーパースセル100gに3N塩酸500mlを加え30分間攪拌した後、塩酸をガラスフィルターで濾別する。塩酸が無色となるまでこの操作をくりかえし、次いで蒸留水で中性となるまで洗浄し、105°Cで一昼夜乾燥後粉碎して、100メッシュ以下の粉末とした。

## 実 験 方 法

### 1. 卵白アルブミンのDNP化<sup>(9)</sup>

卵白アルブミンの加熱処理後のDNP化は常法に準じて実施した。試料溶液は結晶卵白アルブミンを1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.38)を5倍に希釈したものに溶解して、濃度1%としたものである。卵白アルブミンの濃度(%)は280mμでの吸光度に0.1393を乗じて算出した。この溶液2mlを栓付試験管にとり、後述する加熱処理を行なった後、水酸化ナトリウムでpH 9に調整し、重炭酸ナトリウム20mg、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン20mg、

エタノール 4 ml を加え、暗所で 2 時間振とう攪拌し、その後約 20 時間室温で放置反応せしめた。塩酸で酸性として反応を停止後、DNP 卵白アルブミンの沈殿を水、エタノール、ついでエーテルで順次洗浄してデシケーター中で乾燥した。

## 2. DNP 卵白アルブミンの加水分解ならびに酸可溶 DNP-アミノ酸区分の分離

加水分解および DNP-アミノ酸の抽出はすべて常法<sup>(9)</sup>に従った。すなわち DNP 卵白アルブミンをその 100 倍量の定沸点塩酸とともに減圧封管中で 110°C, 12 時間加水分解した。加水分解液に 5 倍量の蒸留水を加えて希釈後、エーテルで数回抽出し、その残渣（水層）と、エーテル抽出液を水洗した洗液とを合併した。この水層には  $\epsilon$ -DNP-リジンの外に DNP-ヒスチジン、DNP-アルギニン、O-DNP-チロシンならびに遊離のアミノ酸<sup>(9)</sup>がふくまれる。この区分を真空デシケーター中でシリカゲルおよび粒状水酸化ナトリウム上で減圧乾固して試料とした。

## 3. $\epsilon$ -DNP-リジンの定量

$\epsilon$ -DNP-リジンの定量は Matheson らの方法<sup>(11)</sup>に従ってカラムクロマトグラフィーで実施した。

○ 展開溶媒    メチルエチルケトン 120 ml, 酢酸エチル 80 ml, 0.2 M トリスグリシン緩衝液 (pH 9.1) 40 ml を分液漏斗に入れ、振とう混和しその上層を展開溶媒とする。この下層はカラムの調製の際に用いる。

○ カラムの調整   精製したハイフロスーパーセル 6 g に展開溶媒 50 ml と下層の溶液を加えて粥状とし、これを径 1.5 cm のカラムに均一に充填してコンプレッサー（約 1.5 kg/cm<sup>2</sup>）で加圧して高さ 11 cm のカラムを調製した。

○ 展開   卵白アルブミン 1~2 mg に相当する試料を 1 ml の展開溶媒にとかしてカラムに添加し展開溶出する。溶出は 1 時間 20 ml としフラクションコレクターで 2~4 ml ずつ分取した。この溶出液の吸光度を日立 101 型分光光度計で 390 m $\mu$  で測定した。

## 4. 加熱処理

試料の加熱処理は次のようにして実施した。1% 卵白アルブミン溶液 2 ml（糖添加の際は 2% 卵白アルブミン溶液 1 ml と 20% 糖溶液 1 ml を混合したもの）を共栓つき遠沈管にとり加熱した。いずれも溶媒は pH 7.4 のリン酸塩緩衝液である。加熱は 100°C の場合は沸騰湯浴中で、それ以上の温度の場合はオートクレーブ中で実施した。

# 実験および実験結果

## 1. $\epsilon$ -DNP-リジンの吸光係数

標準  $\epsilon$ -DNP-リジン 28.8 mg を展開溶媒に溶解して 25 ml とした。さらにこれを種々な濃度に希釈して、日立 101 型分光光度計で 390 m $\mu$  における吸光度を測定した。濃度と吸光度との関係は Fig. 1 に示すとおりで、これより分子吸光係数を  $6.728 \times 10^3$  とした。以後この吸光係数を用いて  $\epsilon$ -DNP-リジンの濃度を算出した。

## 2. 加熱による有効性リジンの損失

卵白アルブミン中の有効性リジンが加熱によりどのように変化するかについて検討した。すなわち pH 7.4 の 1% 卵白アルブミン溶液を前述のようにして加熱しその後有効性リジンを DNP 法により定量した。その結果を Fig. 2 に示す。これによれば、温度 100°C~115°C の間では 4 時間の加熱でも、それほどの損失がみられないが、126°C では 4 時間の加熱で有効性リ

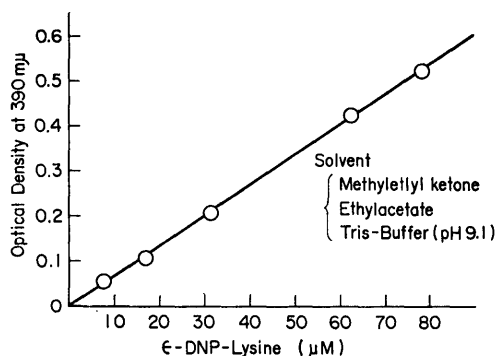


Fig. 1. Relationship between the Concentration of  $\epsilon$ -DNP-Lysine and the Optical Density at 390  $m\mu$

ジンの損失は約32.5%に達した。

### 3. 糖類添加の影響

一般の調理加工の際に添加される物質中、または食品中に共存している物質中でアミノ酸の加熱安定性にもっとも影響の大きいと思われる糖類を添加して実験した。添加した糖は非還元糖としてショ糖、還元糖としてブドウ糖、果糖、ガラクトースおよび乳糖である。添加量は調理加工の条件を考慮してタンパク質の10倍量とした。なお予備実験で、この程度の糖存在下では  $\epsilon$ -DNP-リジンの定量には何ら妨害とならないことを確かめた。糖添加実験の結果を Fig. 3 に示す。予期さ

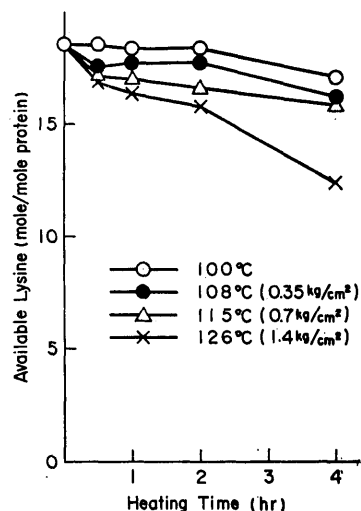


Fig. 2. Available Lysine in Heat treated Egg Albumin

| Sugars added  | Heating Temp (°C) | Available Lysine (mole/mole. protein) |    |    |    |
|---------------|-------------------|---------------------------------------|----|----|----|
|               |                   | 4                                     | 8  | 12 | 16 |
| Without Sugar | Control           | 16                                    | 16 | 16 | 16 |
|               | 108               | 15                                    | 15 | 15 | 15 |
|               | 115               | 15                                    | 15 | 15 | 15 |
|               | 126               | 12                                    | 12 | 12 | 12 |
| Saccharose    | Control           | 16                                    | 16 | 16 | 16 |
|               | 108               | 15                                    | 15 | 15 | 15 |
|               | 126               | 12                                    | 12 | 12 | 12 |
| Lactose       | Control           | 16                                    | 16 | 16 | 16 |
|               | 108               | 15                                    | 15 | 15 | 15 |
|               | 115               | 12                                    | 12 | 12 | 12 |
| Glucose       | Control           | 16                                    | 16 | 16 | 16 |
|               | 108               | 15                                    | 15 | 15 | 15 |
|               | 126               | 12                                    | 12 | 12 | 12 |
| Fructose      | Control           | 16                                    | 16 | 16 | 16 |
|               | 108               | 15                                    | 15 | 15 | 15 |
|               | 126               | 12                                    | 12 | 12 | 12 |
| Galactose     | Control           | 16                                    | 16 | 16 | 16 |
|               | 108               | 15                                    | 15 | 15 | 15 |
|               | 115               | 12                                    | 12 | 12 | 12 |

Heating Time : 4 hrs.

Fig. 3. Available Lysine in Egg Albumin heated with Sugars

れたごとくいずれもタンパク質単独で加熱した場合に比べて著しいリジンの破壊がみられた。特に還元糖の場合は、その損失が78～97%に達した。これに対しショ糖の場合の損失率は108℃、4時間で17%、126℃で50%であった。

## 考 察

未変性卵白アルブミンの有効性リジンとして定量されたのは1分子中18.5個であった。結晶卵白アルブミンはその分子量を46,000として1分子中20個のリジンを含む。またN末端アミノ基は遊離ではないから完全にリジンのアミノ基がFDNBに対して反応すれば1分子当り20個の有効性リジンが検出されなければならない。実験値との差が、アミノ基が何らかの理由でマスクされて試薬と反応し難い状況にあったためか、あるいは単なる実験上の誤差であるのかは不明である。これについては、石原らの凍結乾燥卵白についての実験によると、未処理卵白で有効性リジンは全リジン中83.6%であるとの報告がある。また結晶卵白アルブミンのアミノ基はFDNBに対する反応からみて3種あり、20個のうち3個は未変性状態で容易にDNP化されるが、9個はやや変性が進んだ状態でDNP化され、残りの8個は完全に変性するに至ってはじめてDNP化されるというStevenらの報告もある。

糖類の存在下で加熱すると試料溶液は茶褐色に着色するとともに有効性リジンは著しく減少した。これはおそらく糖とアミノ基との間のMaillard反応によるものであろう。一方、糖を加えない条件でも高温ではかなりの量の有効性リジンが減少した。これがEvansらの提案による“他の成分との間に生成した酵素に対する抵抗性のある結合”によるものかも知れない。これは炭水化物の存否にかかわらず生成するといわれているが、本実験の場合がこれに該当するかどうかは、なお酸加水分解、酵素加水分解等の処理を実施してみなければ結論できない。

## 要 約

卵白アルブミンの有効性リジンの加熱安定性について実験した。その結果、タンパク質を単独で中性溶液中で加熱処理した場合は115℃まではかなり安定であるが、126℃では4時間の加熱でその33%が有効性を失なった。糖類の存在下ではリジンの破壊は著しく、特にブドウ糖、果糖、ガラクトースなどの還元糖とともに加熱すると108℃で75～92%、126℃では85～97%が損失した。

終わりに臨み本実験に御協力下さいました多嶋由里、加納佳代子、家村道子の各氏に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- (1) 岩田久敬, “食品化学, 総論” 養賢堂, 1968, p.307.
- (2) R. P. Baldwin, J. R. Lowry, R. Teiessen, *Food Research*, **16**, 107 (1951).
- (3) R. J. Evans, H. A. Butts, *Science*, **109**, 569 (1949).
- (4) R. J. Evans, H. A. Butts, *J. Biol. Chem.*, **175**, 15 (1948).
- (5) R. J. Evans, H. A. Butts, *Food Research*, **16**, 415 (1951).
- (6) R. J. Evans, S. L. Bandemer, D. H. Bauer, *J. Food Sci.*, **26**, 663 (1961).
- (7) R. J. Evans, A. C. Groschke, H. A. Butts, *Arch. Biochem.*, **30**, 414 (1951).
- (8) K. J. Carpenter, G. M. Ellinger, *Biochem. J.*, **61**, xi (1955).

- (9) F. Sanger, *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- (10) N. A. Matheson, *Biochem. J.*, **88**, 146 (1963).
- (11) N. A. Matheson, *Biochem. J.*, **100**, 389 (1966).
- (12) 京大農学部食品工学教室編, “食品工学実験書上巻” 養賢堂, 1970, P.383.
- (13) 平 宏和, 平 春枝, *食品工業*, **10**, 54 (1967).
- (14) 石原美津子, 守時圭子, 吉田 昭, *栄養と食糧*, **23**, 398 (1970).
- (15) Z. Dvorak, *J. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 71 (1968).
- (16) 近藤金助, “化学実験学第2部” 11巻, 河出書房, 昭和17年, P.741.
- (17) F. Haurowitz, “The Chemistry and Function of Proteins”, Academic Press N. Y. (1963) p. 200.
- (18) R. D. Marshall, A. Neuberger, *Biochem. J.*, **78**, 31P (1961).
- (19) F. S. Steven, G. R. Tristram, *Biochem. J.*, **70**, 179 (1958).

### Summary

Available lysine in heated egg albumin was estimated by chromatography after dinitrophenylation of its free amino groups and acidic hydrolysis.

When albumin was heated at 100°, 108°, 115° or 126°, respectively for 0.5~4 hours at pH 7.4; available lysine was diminished to varying extent. However at the temperature below 115° the losses were negligible, at 126° 33 per cent of available lysine were lost for 4 hours.

When heat treatment was carried with sugars, the losses were remarkable. To the albumin solutions glucose, fructose, galactose, succharose or lactose was added at ten times concentration of protein. In the presence of reducing sugars, the losses were reached to 75~97 per cent, but with nonreducing sugar, they were 50 per cent after 4 hours of heating at 126°.