

## カゼインの加熱によるリジンの損失について

田 中 弘・家 村 道 子

## On the Heat Stability of Lysine in Casein

Hiromu TANAKA and Michiko IEMURA

Received October 30, 1972

## 緒 言

タンパク質の加熱に際して、構成アミノ酸がどんな変化を受け、それが栄養価にどんな影響を与えるかは、加工または調理された食品の栄養価の判定上ひいては食品加工の条件を考える上に重要なことである。なかでも必須アミノ酸の安定性が問題となるが、リジンは熱に対する安定性の低いものの一つであり、トリプトファンやメチオニンなどとともにわが国民の栄養上重要なアミノ酸である。

有効性リジンという概念は Carpenter<sup>1)</sup>によって提案されたもので、消化酸素の作用によってタンパク質から容易に遊離されて栄養的に有効に摂取されるリジンを云う。タンパク質を加熱処理した際のこのリジンの損失量と、リジンの  $\epsilon$ -アミノ基の FDNB (1-フルオロ 2,4-ジニトロベンゼン) に対する反応性の減少とが密接な相互関係をもつので、実際は試料タンパク質を DNP 化<sup>2)</sup>してその  $\epsilon$ -DNP-リジンを定量して有効性リジン量とする方法がとられている。全リジンの量と有効性リジン量とは一致しないのが普通である。これはリジンの中で何らかの理由で FDNB との反応性が妨げられているもののあることを示している。この事については卵白アルブミンについて Steven<sup>3)</sup>らが報告している。

食品の有効性リジンの加熱による損失についてはすでに二三の報告があり<sup>4-6)</sup>、著者の一人も前報において卵白アルブミンの有効性リジンが加熱によりかなりの程度の損失を示すことを報告した<sup>7)</sup>。牛乳のリジンの加熱による破壊についてもよく知られているが、牛乳タンパク質の主成分であるカゼインだけについてリジンの安定性を検討した例はない。著者らは、カゼインについて単独あるいは、二三の糖類を添加した条件での加熱に際してリジンがどのように損失するかについて実験したので、以下にその詳細を述べる。

## 試料および実験方法

## 1, カゼイン

市販のカゼイン粉末 (Merck 製, Hammersten) をリン酸塩緩衝液 (pH 7.5) に懸濁攪拌

し、不溶物を遠心分離により除去した。用いた緩衝液は、M/15 リン酸塩緩衝液 (pH 7.38) を更に蒸留水で5倍に希釈したものである。この方法でカゼイン濃度 1.5~2%の溶液が得られる。カゼインの濃度は溶液の 280 m $\mu$  での吸光度より算出した。

## 2, $\epsilon$ -DNP-リジンの定量法

カゼインの  $\epsilon$ -DNP-リジン (有効性リジン) の定量は、前報<sup>7)</sup>にのべた方法に従って実施した。すなわち、カゼインを常法<sup>2)</sup>によって1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (FDNB) でDNP化してDNP-カゼインを得た。これを塩酸加水分解後、加水分解液をエーテル抽出し、得た酸可溶区分をハーフロースーパーセルを用いるカラムでクロマトグラフ分析して、 $\epsilon$ -DNP-リジンを分離し、390 m $\mu$  での吸光度測定により定量した。

## 3, 全リジンの定量法

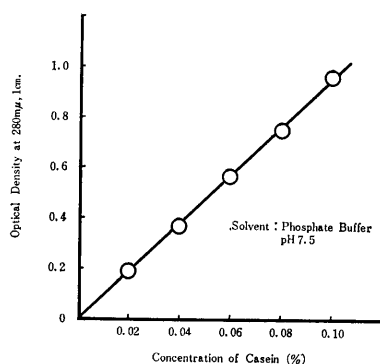
試料を定沸点塩酸で 110°C, 24時間封管中で加水分解して定量した。

# 実験および実験結果

## 1, カゼインの濃度と紫外吸光度との関係

前述のようにして調製したカゼイン溶液の濃度を乾燥重量法により定量した。この溶液を同じリン酸塩緩衝液で希釈して、種々の濃度のカゼイン溶液を調製した。これらの溶液の pH は 7.5 であった。これらのカゼイン溶液について 280 m $\mu$  で吸光度を測定した結果を図 1 に示す。この結果 pH 7.5 におけるカゼインの吸光係数は 9.46 となった。以後この吸光係数を用いて試料中のカゼイン濃度を算出した。

Fig. 1 Relationship between the Concentration of Casein and the Optical Density at 280m $\mu$



## 2, 加熱によるカゼイン中のリジンの損失

試料カゼインについて、単独または糖類共存の条件下で、これを加熱処理後全リジンと有効性リジンを定量した。使用した糖類は、D (+) サッカロース, D (+) グルコース, または  $\beta$ -D (+) ラクトースである。

全リジンの定量は次のようにして行なった。pH 7.5 のカゼイン溶液 (1.5~2%) 1 ml を加水分解用ガラス管にとり、糖類添加の場合はこれにタンパク質の10倍量の糖を加え、100°では沸騰湯浴中で、115°, 126°ではオートクレーブでそれぞれ 0.7 kg/cm<sup>2</sup>, 1.4 kg/cm<sup>2</sup> に加圧加熱をした。一定時間加熱後直ちに冷水で急冷し、これに濃塩酸を濃度20%となる様に加え、ガラス管を減圧封管

し、110°, 24時間加水分解した。加水分解液の塩酸の除去は水酸化ナトリウム上で蒸発乾涸することによって行なった。アミノ酸分析は常法により柳本 LC-5 型アミノ酸分析器により実施した。なお塩酸加水分解の際カゼインの10倍量の糖類が共存するので、この実験条件でのカゼインのリジンの回収率を検討した結果、糖の種類 (使用した3種の糖に限る) にかかわらず、その率は83%であった。よって、定量結果にこの補正を行なってリジンの定量値とした。

有効性リジンの定量は、前報<sup>7)</sup>の方法に準じて実施した。すなわちカゼイン1%を含む試料(pH 7.5)を2ml 共栓つき試験管にとり、糖類添加の場合はこれに糖を200mg 加え、全リジンの場合と同様に加熱処理した。ついで常法によりFDNBによるDNP化とDNP-カゼインの塩酸加水分解を行ない、 $\epsilon$ -DNP-リジンを定量した。なお共存する糖類がDNP化の反応を全く妨害しないことを別の実験で確認した。

未処理カゼインの全リジン量は定量の結果 $10^5$ g 当り59.5個であった。また有効性リジンの量は $10^5$ g 当り60.3個であった。この結果試料として用いたカゼイン中のリジンは全て有効性リジンとして定量されることが分った。次に示す表は未処理カゼインの全リジンならびに有効性リジンの量を $10^5$ g 当り60個として、加熱による損失を%で表わしたものである。

Table 1. Loss of Lysine in Casein Caused by Heating Alone or in the Presence of Sugars (Amount Lost %)

| Temperature                | 100° | 115° | 126° |
|----------------------------|------|------|------|
| a) In the Absence of Sugar |      |      |      |
| Total Lysine               | 8    | 10   | 31   |
| Available Lysine           | 11   | 18   | 30   |
| b) With Saccharose         |      |      |      |
| Total Lysine               | 13   | 11   | 23   |
| Available Lysine           | 13   | 20   | 33   |
| c) With Lactose            |      |      |      |
| Total Lysine               | 13   | 30   | 48   |
| Available Lysine           | 31   | 58   | 73   |
| d) With Glucose            |      |      |      |
| Total Lysine               | 16   | 53   | 68   |
| Available Lysine           | 43   | 70   | 86   |

Protein was dissolved in phosphate buffer (pH 7.5) and heated for 1 hour.

100°: boiling water bath

115° and 126°: autoclave

この結果、全リジンの損失よりも有効性リジンの損失の方が大きいことが分った。すなわちリジンの分子全体が破壊されるまでには至らないが、側鎖の $\epsilon$ -アミノ基がFDNBと反応し難い状態となったものの量がかなり多いことを認めた。

次に有効性リジンの熱に対する安定性と糖類添加の安定性に対する影響をさらに詳しく検討するために、加熱時間を30分間、1時間および2時間として実験した、その結果を図2、3、4および5に示す。図はそれぞれ糖無添加、糖添加(シヨ糖、乳糖、ブドウ糖)の場合である。これらによれば有効性リジンは加熱時間とともに減少し、その減少は温度の高い程激しい。カゼイン単独とシヨ糖添加の場合の有効性リジンの損失の様子はよく似ており126°、2時間の加熱でもその60~50%が残存している。100°、30分程度の加熱ではその損失は10%以下であった。しかし還元糖を添加した場合のリジンの損失は予想通り著しく、126°、2時間では乳糖添加でその18%が、ブドウ糖ではわずか7%が残存するにすぎなかった。100°、30分間という加熱条件でも、その破壊は20~35%に達した。

## 考 察

タンパク質中のリジンの側鎖がFDNBと反応するためには、その $\epsilon$ -アミノ基が溶液中に露出した状態になければならない。卵白アルブミンのリジンのうちで一部反応性を示さないものがあるのは、天然の分子では、側鎖の一部が折り畳まれたタンパク質分子の内部に深く押し込められているためと云われている<sup>3)</sup>。加熱による熱変性で分子が“unfolding”し、最初は無効性の側鎖の反応性が増加するが、引き続いて加熱されることにより、 $\epsilon$ -アミノ基の反応性は再び減

Fig. 2. Heat Stability of Available Lysine in Casein

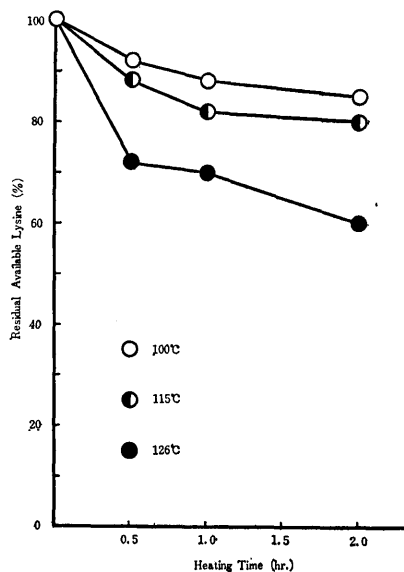


Fig. 3. Stability of Available Lysine in Casein by Heating in the Presence of Saccharose

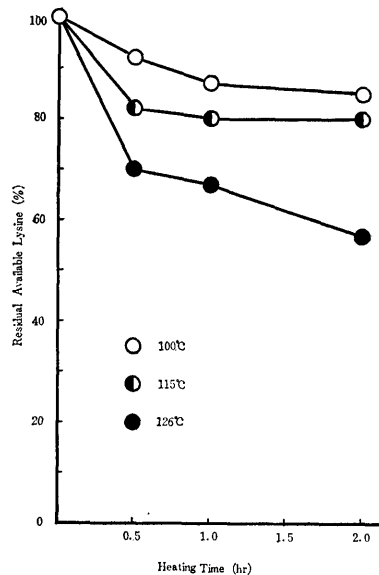


Fig. 4. Stability of Available Lysine in Casein by Heating in the Presence of Lactose

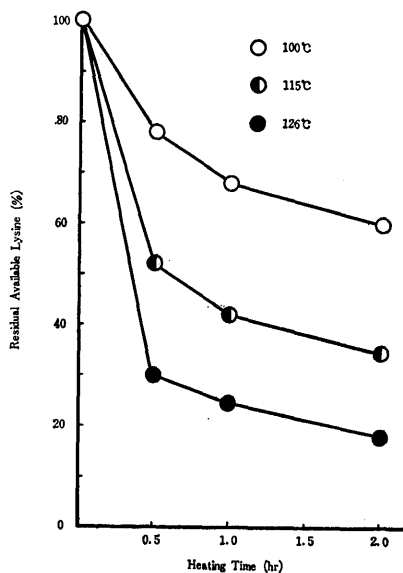
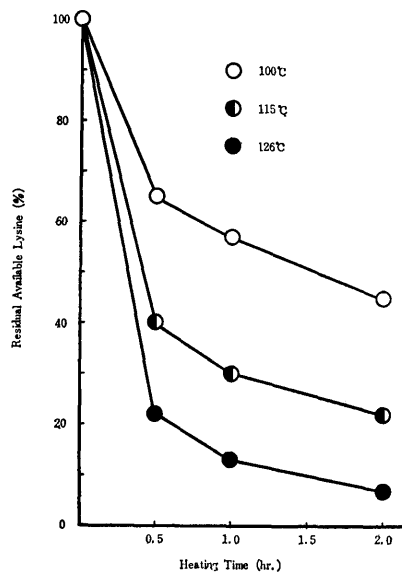


Fig. 5. Stability of Available Lysine in Casein by Heating in the Presence of Glucose



少して行くものと考えられる。この変性初期における $\epsilon$ -アミノ基やその他の側鎖の動向は、栄養学上の問題とは別に興味深い所であるが、本実験ではこの事には触れなかった。

この実験で未処理カゼインのリジンがすべて有効性リジンとして定量されたが、この事は、試料として用いたカゼインが市販の酸カゼインであって、牛乳より新たに調製したような天然カゼインでないためと考えられる。表1には、加熱処理した際の全リジンの減少と、有効性リジンの損失の様子を示した。有効性リジンの定義ならびにその定量法から考えて、ここにあげた有効性リジンの損失量中には、側鎖の反応性を失なったものだけではなく、リジン残基が全く破壊されてしまったための損失（全リジン量の損失）も含まれている。従って、有効性リジンの損失量の方が全リジン量の損失より大きいまたは両者同じであるかのいずれかとなる。この両者の差は側鎖の反応性だけを失なったリジンの量に相当する。表1において、単独加熱とショ糖存在下の加熱では両リジンの差は少なく、時には一致した場合もある。この事は、この条件でのリジンの損失は主として分子そのものの破壊によるものであることを示している。一方、還元糖存在下での加熱では両損失の差はかなりあり、分子の破壊による損失も大きい、 $\epsilon$ -アミノ基の反応性低下による損失もかなり多いことを示している。この値を実際の数に換算すると、ブドウ糖とともに加熱した場合、 $10^5$  g 中60個のリジンのうち  $100^\circ$  では10個が破壊され、さらに16個が側鎖の反応性を失なったことになる。後者の数値はそれぞれ  $115^\circ$ 、 $126^\circ$  では10個、11個となる。

図2～5に有効性リジンの加熱による損失の様子を示したが、これにも上に述べたようにリジン残基そのものの破壊による損失が含まれている。しかし加熱によってカゼインのリジンの利用が減少する様子はこの図から推察することができる。加熱時間の長さの増加や、加熱温度の上昇に伴って有効なリジン量は減少するが、その様子は共存する物質の性質によって大きい影響を受ける。実験したのは二三の糖類だけであるが、この実験で還元糖存在下での損失が特に甚だしく、 $100^\circ$ 、30分間の加熱でもその20～35%が有効性を失なった。高温での破壊は更に甚だしく、 $126^\circ$ では2時間でその80～90%が失なわれた。これらの損失の原因の一つは糖とのMallard 反応であろうが、先に述べたように単に側鎖のみの変化による無効化も含まれている。後者の反応の機構は不明であるが、カゼインにおいても、消化酵素によるリジンの遊離と有効性リジン量との相関がみられるかどうかについて更に研究を続けたい。

## 要 約

- 1, カゼインのリジンの加熱による損失について実験した。その結果有効性リジンの損失は、加熱時間の経過、加熱温度の上昇とともに増大し、特に還元糖とともに加熱した場合に著しく、 $100^\circ$ 、30分間の加熱でもその損失は20～35%に達した。
- 2, カゼインの有効性リジンの損失とリジン分子そのものの破壊とは一致しないことを認めた。

終わりに臨み本実験の遂行に協力された今西悦子、福井幸子の両氏に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) K. J. Carpenter, G. M. Ellinger, *Biochem. J.*, **61**, xi (1955).

- 2) F. Sanger, *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- 3) F. S. Steven, G. R. Tristram, *Biochem. J.*, **70**, 179 (1958).
- 4) 平 宏和, 平 春枝, 食品工業, **10**, 54 (1967).
- 5) 石原美津子, 守時圭子, 吉田 昭, 栄養と食糧, **23**, 398 (1970).
- 6) Z. Dvorak, *J. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 71 (1968).
- 7) 田中 弘, 西堀よし子, 京都教育大学紀要 B, **40**, 21 (1972).

### Summary

An investigation was undertaken to determine the effect of heat treatment on stability of lysine in casein. Casein preparation was heated in the absence or presence of sugars at 100°, 115° and 126° respectively for 0.5—2.0 hours at pH 7.5. Total lysine content of casein was estimated after hydrolysis with hydrochloric acid, while amount of available lysine was determined chromatographically after dinitrophenylation of free amino groups.

When heat treatment was carried with sugars (saccharose, lactose and glucose) at ten times concentration of protein, the losses of available lysine were remarkable. In the presence of reducing sugars, after 30 minutes heating at 100°, the losses were reached to about 20—35 per cent, but in the absence of sugars or with saccharose they were only about 8 per cent. The losses increased with the rise of heating temperature and with the passage of heating time.

The lost amount of available lysine included the losses caused by complete break-down of lysine residues.