

有効性リジンの損失がトリプシン 消化率に及ぼす効果について

田 中 弘

Effect of Losses of Available Lysine on the Tryptic Digestion of Egg Albumin

Hiromu TANAKA

Received September 25, 1978

緒 言

一般にタンパク質をグルコースなどの還元糖とともに加熱したり、長期間、比較的高い温度で貯蔵するなどの処理をすると、アミノ酸の一部が変化を受ける。ことにリジンはこのような処理によって変化を受け易く、その栄養的意義の故に、特によく研究されている。

リジンの変化は、“有効性リジン”の減少という形で観察される。有効性リジン available lysine という概念は Carpenter¹⁾の提案によるもので、その ϵ -アミノ基が遊離状態にあるリジンは栄養的に有効であるという考えにもとづいている。Carpenter は ϵ -アミノ基をフルオロジニトロベンゼンで DNP 化して有効性リジンを定量する方法を提案した。

有効性リジンが減少するということは、リジン分子の破壊または、 ϵ -アミノ基のブロックを意味する。後者の場合は、タンパク質を酸加水分解する操作でもとのリジンに戻るのでタンパク質の総リジン量には変化をあたえない。非有効化したリジンの形として、フラクトシルリジン (ϵ -N deoxy fructosyl lysine²⁾) やリシノアラニン³⁾などが提案されている。このように ϵ -アミノ基が変化を受けると、プロテアーゼによる加水分解にも影響を及ぼし、またたとえアミノ酸や小さいペプチドまで分解されても、その特異な化学構造から、腸管からの吸収にも影響を与えるものと思われる。褐変カゼインをシロネズミに与えた時、未吸収リジン誘導体が腸管内に多量にみとめられたと云う報告がある⁴⁾。

著者は従来より卵アルブミン⁵⁾、カゼイン⁶⁾、小麦グルテンなどの有効性リジンの加熱安定性や貯蔵中の変化について研究しているが、今回は卵アルブミンについて、有効性リジンの変化とトリプシン消化との関係について実験したので、それについて以下に述べる。

試料及び実験方法

1 試料 実験に用いた卵アルブミンは、鶏卵卵白より硫酸法⁷⁾によって調製し、これを3回再

結晶して精製し、その後蒸留水に対して透析して脱塩、凍結乾燥して粉末としたものである。

2 実験方法

○有効性リジンの定量 有効性リジンの定量は Carpenter 法を一部改良した方法⁵⁾によった。

○試料の処理

(1) 加熱 M/15 リン酸塩緩衝液, pH7.8 に卵アルブミンを溶解してタンパク濃度 2% とする。この溶液 1 ml と 20% D-グルコース溶液 (同じ緩衝液を用いる) 1 ml とを混合した。この溶液は 2 ml 中卵アルブミン 20mg と D-グルコース 200mg を含む。これを一定時間沸騰湯浴中で加熱した。糖無添加の試料は, グルコース溶液に替えてリン酸塩緩衝液 1 ml を用いた。

(2) 貯蔵 上記と同じ緩衝液にとかした 2% 卵アルブミン溶液と 0.1% D-グルコース溶液とをそれぞれ 1 ml ずつ混合する。この溶液は 2 ml 中卵アルブミン 20mg と D-グルコース 1 mg を含む。これを凍結乾燥して粉末とする。この粉末を相対湿度 70% に保ったデシケーターに入れ, 37°C の恒温器中に一定期間放置した。デシケーター内の湿度は, 濃硫酸 (2:5) により調整した⁶⁾。湿度の測定は毛髪湿度計によった。

○人工消化試験 DIFCO 社製トリプシン (1:250) を用い卵アルブミンの人工消化を次のようにして実施した。前項のように処理した試料溶液 (粉末の場合は蒸留水を加えて 1% 溶液とする) に, 0.1% トリプシン溶液 (M/15 リン酸塩緩衝液, pH7.8) 0.5ml とトルエン 2 滴を加えて, 一定時間 37°C で反応させた。反応の停止は, 反応液を 10% 三塩化酢酸 2 ml と混合する事によった。停止 30 分後, 未消化タンパク質を沈殿として遠心分離 (5000r.p.m., 10 分間) した。この沈殿の窒素量をマイクロケルダール法によって定量し未消化のタンパク態窒素量とした。

○タンパク質濃度の測定 卵アルブミン溶液の濃度は, 280nm での吸光度に 0.1399⁹⁾ を乗じて算出した。

実 験 結 果

1 加熱による影響

pH7.8 の 1% 卵アルブミン溶液に D-グルコースを加えたもの及び糖無添加のものについて, 沸騰湯浴中での加熱による有効性リジンの損失と消化率の変化について実験した。加熱時間は 10 分, 60 分及び 120 分である。前述の方法で有効性リジンの定量と人工消化試験を行なった。その結果を図 1 の a と b に示す。

有効性リジン量の変化は, 10 分間加熱した試料の定量値を 100 として示した。人工消化率の算出は次のようにした。すなわち, トリプシン加水分解を前述の条件で 24 時間行なったものについて求めた三塩化酢酸不溶性窒素量を反応時間零分のときの酸不溶性窒素量から差引いたものを消化されたタンパク態窒素量とする。この窒素量の反応時間零分のときの酸不溶性窒素量に対する百分率を消化率とした。

この結果, D-グルコースの存在で, 卵アルブミンの有効性リジンは, 100°C, 60 分加熱でその約 50%, 120 分間加熱で約 70% が消失した。この実験条件で, 対照試料 (10 分間加熱した卵アルブミン) の消化率は約 75% であったが, 60 分間の加熱では約 50% に, 120 分間の加熱では約 30% に低下した。しかし糖の存在しない条件では, 有効性リジンはやや減少したが, 消化率は変化しなかった。

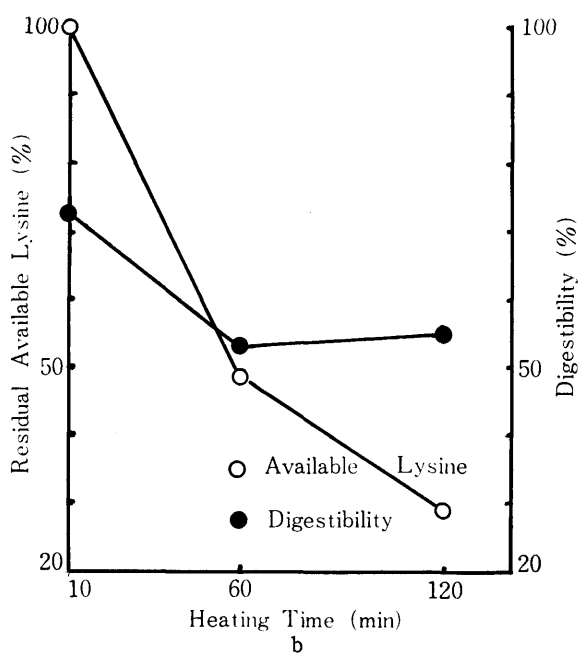
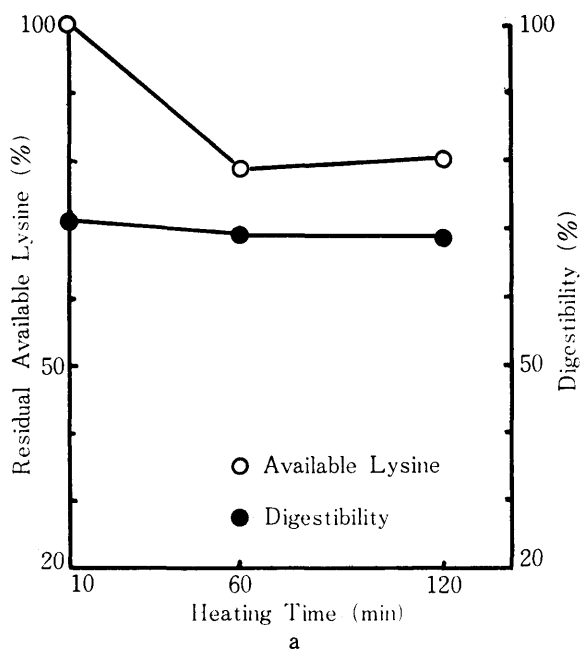


Fig. 1 Effect of Heating on Available Lysine and Tryptic Digestion of Egg Albumin
a: without Sugar b: with D-Glucose (1:10)
Protein solution: 1%, pH 7.8 phosphate buffer Temperature: 100°C
Tryptic digestion: 37°C, pH 7.8, 24hrs.

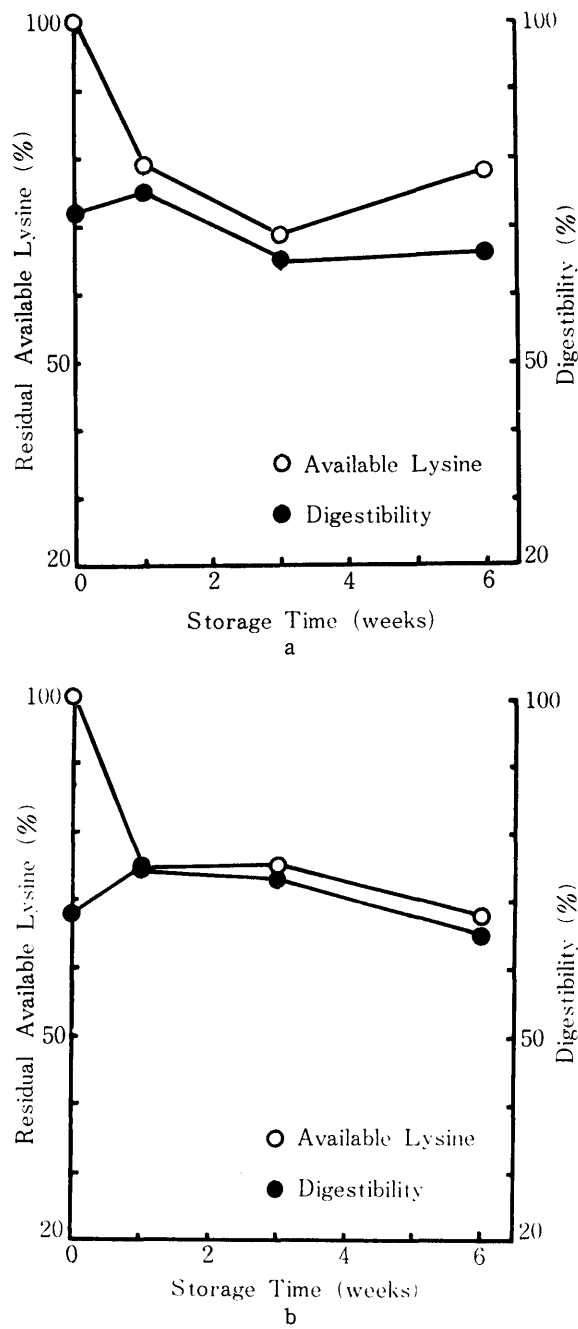


Fig. 2 Effect of Storage on Available Lysine and Tryptic Digestion of Egg Albumin
a: without Sugar b: with D-Glucose (20:1)
Protein: freeze-dried
Storage: 37°C, RH 7.8, 24hrs

2 貯蔵中の変化 温度37°C, 相対湿度70%で卵アルブミンを貯蔵した場合の有効性リジンの損失と人工消化率の変化について前記と同様にして実験を行なった。

この場合は試料は粉末であるので、これに蒸留水を加えてタンパク濃度を1%として10分間沸騰湯溶中で加熱変性してから分析した。この結果を図2のaとbに示す。6週間に及ぶ貯蔵で、有効性リジンは糖存在下では約30%減少した。糖無添加のときは約20%の減少であった。一方、消化率はこの間、殆んど変化なく、約70%にとどまった。

考 察

卵アルブミン、小麦グルテン、カゼインなどのタンパク質を水溶液中で加熱したり、相対湿度70%で37°Cの室内に長期間貯蔵すると、有効性リジンの量が減少する。特に還元糖が共存するとリジンの損失は著しい。

卵アルブミンについて、有効性リジンの減少と、消化率とがどのような関係にあるかを検討する目的でこの実験を行なった。消化率は若干低下したが、リジンの損失の程度から予想された程の影響はみられなかった。

人工消化試験にはトリプシンのみを用いた。トリプシンの作用部位がリジン残基とアルギニン残基のカルボキシル側のペプチド結合であるので、リジンの変化との対応に興味を持ったのである。

本実験によると、有効性リジンが20~30%減少してもトリプシン消化率には影響が少なく、リジンの減少が50~70%に達してはじめて消化率の低下がみられた。

卵アルブミンのトリプシン消化率を抑制する要因について考えてみると、実験はすべて10分間以上の加熱変性を行なったアルブミンについて実施しているので、トリプシン阻害因子の作用は除外できる。消化率低下の要因としては、(1) リジン側鎖の変化：卵アルブミンには1分子中20個のリジンが存在するが、すべての残基に様に酵素作用が及ぶとは考えられない。分子の内部深く埋めこまれたリジンと表面近くにあるリジンとでは酵素作用を受けるのに難易があらうと思われる。反応を受け易いリジン残基が変化を受ければ、酵素作用に対する影響は大きいと考えられる。これに反して、そのままでも反応を受け難い部分にあるリジンが変化をしても、酵素作用に対する影響は少ないであろう。(2) アルギニン側鎖の変化：アルギニンはリジンと同様に加熱によって損失を受け易い。しかも、トリプシンの作用部位である。従ってリジンの場合と同様の影響が考えられる。卵アルブミン1分子中アルギニンは15個含まれている。(3) 卵アルブミンの熱凝固：加熱変性により高次構造がゆるむが、これが更に進んで分子が凝固するに至ると消化作用は抑制される。などが考えられる。

一方、消化率を増大する要因としては、加熱や乾燥（凍結乾燥）による分子の高次構造の変化（ゆるみ）が、本実験の場合、取り上げる事ができよう。

タンパク質溶液を糖無添加で加熱した場合有効性リジンは20%減少したが消化率は変化しなかった。リジンの変化による酵素作用の抑制効果以上に、高次構造のゆるみによる消化率の増大効果が大きく、見掛けの消化率には変化があらわれなかったであろう。D-グルコースを添加して加熱するとリジンは60分で50%, 120分で70%が損失（非有効化）した。この場合は、リジンの変化による酵素作用抑制効果が大きく、見掛けの消化率の低下は20%に達した。

乾燥卵アルブミンを相対湿度70%, 37°Cの条件で貯蔵した場合6週間で、20%の有効性リジンが損失し、糖を添加した場合は30%の損失がみられた。しかしいずれの場合もトリプシンによる消化率に対する影響はみられなかった。糖の存在する場合は試料の褐変がみられ、これはMaillard反応によるものと推定される。一方、糖無添加の場合は、例えばリシノアラニンのようなイソペプチドが生成してε-アミノ基がブロックされたものと思われる。

消化率に見掛け上変化がみられなかったのは、消化試験直前の水溶液化と加熱変性による消化率増大の効果が一部のリジンの変化による抑制効果を凌駕したためと思われる。

要 約

- 1) 卵アルブミンをD-グルコースと共に加熱(100°C)または長期間貯蔵(相対湿度70%, 35°C)すると有効性リジンが一部減少した。
- 2) 有効性リジンの減少が30%あるいはそれ以下の場合には、卵アルブミンのトリプシンによる消化率には影響しなかった。しかし、減少が50%またはそれ以上に達すると、消化率の低下がみられた。

終りに臨み、本実験に協力された富岡令子、村上くみの両氏に謝意を表する。

文 献

- 1) K. J. Carpenter, G. M. Ellinger, *Biochem. J.*, **61**, xi (1955).
- 2) P. A. Finot, J. Mauron, *Helv. chim. Acta*, **52**, 1488 (1969).
- 3) Z. Bohak, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2878 (1964).
- 4) B. Mori, H. Nakatsuji, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 345 (1977).
- 5) 田中弘, 西堀よし子, 京都教育大学紀要 B, **40**, 21 (1972)。
- 6) 田中弘, 家村道子, 京都教育大学紀要 B, **42**, 15 (1973)。
- 7) 近藤金助, 化学実験学第2部11巻, 河出書房, 昭和17年, p. 741。
- 8) 真島正市, 松川哲哉, 家政学実験講座4, 被服材料学・機構学, 岩崎書店, (1956) p. 15。
- 9) 田中弘, 米沢大造, 農化誌, **37**, 1 (1963)。

Summary

The available lysine of egg albumin was diminished remarkably on heating or storage with D-glucose. The protein solution was heated at pH 7.8 in boiling water bath for 120 minutes; or freeze-dried protein was incubated at 37°C, RH 70% for 6 weeks.

On tryptic hydrolysis of the treated albumin, it was observed that until the amount of loss of available lysine was reached to 30%, tryptic digestibility did not vary, but in the case of loss amount of 50% or more, the digestibility was decreased significantly.