

Bioassay による食品中の Methionine, Threonine の定量

高橋 沢*
松本 信 子**

緒 言

私達日本人は蛋白源を米蛋白と大豆蛋白に依存することが多く、特に大豆蛋白は質的、量的にも優れた蛋白栄養源をなしている。この大豆蛋白を構成しているアミノ酸値を明らかにするには、簡易で然も信頼し得る精度の高い測定法 Bioassay 即ち微生物定量法があり、この方法は最近広く生化学的研究に応用されるに至った。

微生物定量法は、微生物の栄養要求を基礎としてアミノ酸を定量する方法で、定量しようとするアミノ酸を特異的に要求する乳酸菌を選ぶので、その原理は「微生物の増殖に必要なすべての栄養素を含む培地から定量しようとするアミノ酸を除くと、それを合成しない微生物即ち特異的に要求する菌株は増殖しない。この培地に除いたアミノ酸をいろいろの濃度に加えた時、一定濃度範囲での増殖度が、加えたアミノ酸の濃度に比例し、又他のビタミンやアミノ酸が、必要以上にあっても増殖が影響されない時は、増殖度をはかつてアミノ酸の定量が出来る。

1) アミノ酸の微生物定量法の研究は、1943年kuiken氏等により始められ、数種食品のアミノ酸定量が行なわれて以来、純蛋白、食品、血液、尿、汗背髄液、ホルモン、酵素、バイラス、細菌、細菌毒素、黴、植物代謝生産物、その他生物に関する物質中のアミノ酸の定量が報告された又1952年田村、角田、桐村、宮沢諸氏による乳酸菌によるアミノ酸定量法が報告されている。そこで私達は3蛋白質 Casein, Gelatin, Albumin (from Eggs) に大豆及びその加工品、湯葉、醤油、高野豆腐などの methionine, 及び threonine の定量を試みた。methionine の定量には *Leuconostoc mesenteroides* P-60, Threonine には、*Streptococcus faecalis* R を使用した。菌株は日水製薬株式会社により分与を受けた。これらの菌は合成培地によく生育する。

実 験 の 部

微生物定量法の準備及び操作

1) 使用菌株

一般にアミノ酸の定量には乳酸菌が使用される。本実験において Methionine 定量には、*Leuconostoc*

mesenteroides P-60, Threonine 定量には、*Streptococcus faecalis*R を使用した。

2) 保存培地の調製と菌株の保存

使用菌株の保存を行うために日水の一般乳酸菌保存用培地に炭酸カルシウムを入れたものを保存寒天培養基とした。その組成は第一表の如くである。

乳酸菌保存培地成分組成 60g (1L分) 中

成 分	分 量	成 分	分 量
酵母エキス	5, 5 g	リン酸二カリウム	0, 25 g
ペプトン	12, 5 g	硫酸マグネシウム	0, 1 g
ブドウ糖	11, 0 g	硫酸マンガン	5, 0 mg
リン酸一カリウム	0, 25 g	硫酸第一鉄	5, 0 mg
酢酸ナトリウム	10, 0 g	粉末寒天	20, 0 g

PH 6, 8±1

上記培地に所定の割合の蒸溜水を加え、湯浴中でよくとかし試験管に 10cc宛分注し、Koch 蒸気釜にて5分間宛 3 日間、間歇滅菌後保存しておく。菌を無菌箱中で一白金耳接種し、32°C 24 時間培養し冷所に貯え、菌株の植えつきは一週間毎に行つた。

3) 前培養培地及び接種菌液の調製

定量操作の場合は、前述の保存菌を直接接種するわけにはいかず、保存菌を一度液状培地で増殖する必要がある。前培養培地としては日水の一般乳酸菌接種用培地がある。その組成は保存用培地から寒天のみを除いたものである。即ち定量用分注の3日前、保存菌を無菌箱中で液状培地に移植し恒温器で24時間培養、これを2回くり返し、ついで液状培地1ccを煮沸済みの注射器で遠沈管にとり、遠心分離に15分間かけ上澄液をすて、0, 9% NaCl 水で菌体を洗い、この操作を2, 3回くり返し、1:10の割で生理食塩水に懸濁したものを接種菌液とした。

4) 定量用試料の調製

試料には Casein, Albumin (from eggs), Gelatin の三蛋白質、及び大豆とその加工品である高野豆腐、湯葉、醤油を使用した先ず加水分解して遊離アミノ酸液とした。加水分解の方法には酸分解、アルカリ分解、酵素分解等があるが本定量には全て酸分解を行つた。各試料0, 1gを正確に秤り10% HCl 2ccを加え硝子ポンペに封入し 120°C 10 時間 oil bath 中で分解した。後分解液を蒸溜水にて洗出し、活性炭を少量加え

* 本学助手 ** 本学副手

第7表 検液系列

試験管番号	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
試料名												
高野豆腐	0.25	0.5	1.0									
湯葉				0.25	0.5	1.0						
大豆							0.25	0.5	1.0			
醬油										0.25	0.5	1.0
蒸留水(cc)	0.75	0.5	0	0.75	0.5	0	0.75	0.5	0	0.75	0.5	0
培地(cc)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
計(cc)	2	2	2	2	2	2	2	2	9	2	2	2

更に試料の測定値が他の要素に影響されていないか、又実験の精度を確かめるため各試料のアミノ酸の回収率を2段階につき2本ずつ分注した。

第8表 回収用系列

試験管番号	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
試料名														
Casein	0.25	0.5												
Gelatin			0.25	0.5										
Albumin					0.25	0.5								
高野豆腐							0.25	0.5						
湯葉									0.25	0.5				
大豆											0.25	0.5		
醬油													0.25	0.5
アミノ酸添加濃度10r(cc)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
蒸留水	0.35	0.1	0.35	0.1	0.35	0.1	0.35	0.1	0.35	0.1	0.35	0.1	0.35	0.1
培地	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
計(cc)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

以上の様に全て分注が終わったらアルミキヤブをかぶせ Koch 蒸気釜で5分間滅菌し急冷した。

8) 接種及び培養

前述の接種菌液を煮沸消毒済の注射器で無菌箱中で1滴ずつ接種した。(但し0番号のものは接種しない) 接種が終わったら37°C±1°C恒温器で Threonine は24時間、Methionine は40時間培養した

9) 測定及び試料の分析

以上の様にして培養したものをコタキ製AKA光電比色計(フィルター11番)で繁殖度を比濁で測定した。まず接種していない Constant の液に100%光を透過させ、標準溶液の比濁を行った結果

第9表 Methionine標準系列測定結果

試験管番号	0	1	2	3	4	5	6	7
各アミノ酸濃度(r)	0	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	0.8	10.0
三本の平均透過率(%)	85	69	57	42	21	14	8	7

第10表 Threonine 標準系列測定結果

試験管番号	0	1	2	3	4	5	6	7
各アミノ酸濃度(r)	0	2	4	8	16	24	32	40
三本の平均透過率(%)	100	75	65	39	17	9	5	3

上述の方法によって試料及び回収率を測定した。

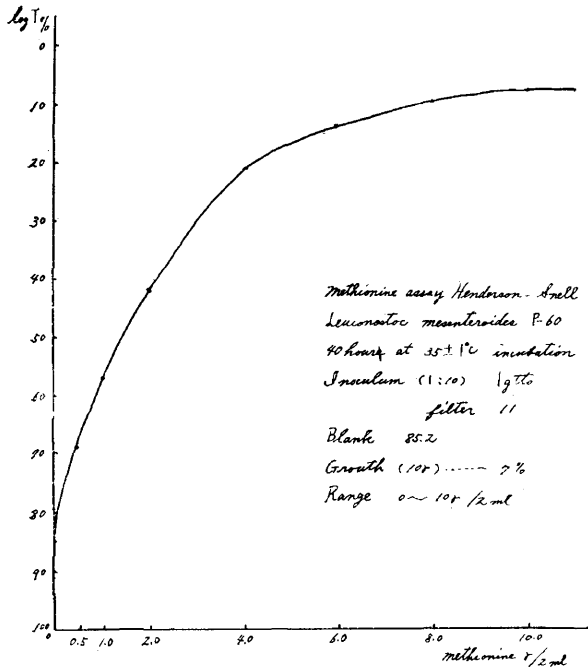
第11表 試料100mg中のアミノ酸含有量

アミノ酸中 試料名	Threonine (mg)	Methionine (mg)
Casein	6.25	0.9
Gelatin	3.5	1.6
Albumin	7.4	3.44
高野豆腐	7.2	0.64
湯葉	7.2	0.89
大豆	7.6	0.7
醬油	8.2	1.7

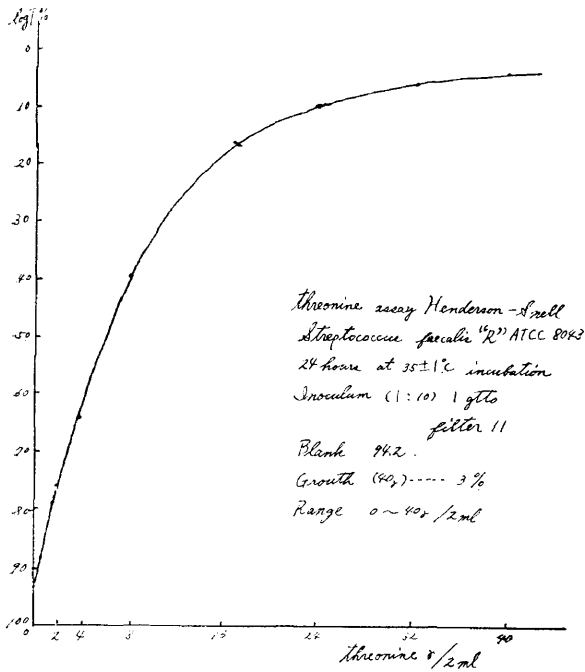
次に標準アミノ酸溶液を横軸に透過率の値を縦軸に

検量曲線をかき、検液について得た透過率を挿入して試料中の定量しようとするメチオニン、スレオニンの含有量を求めると第11表の結果が得られた。

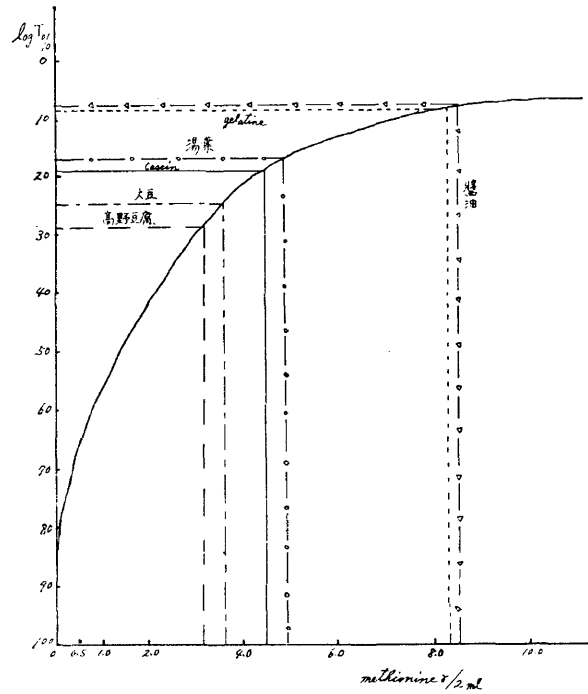
第I図 Methionine Standard Dose Response curve



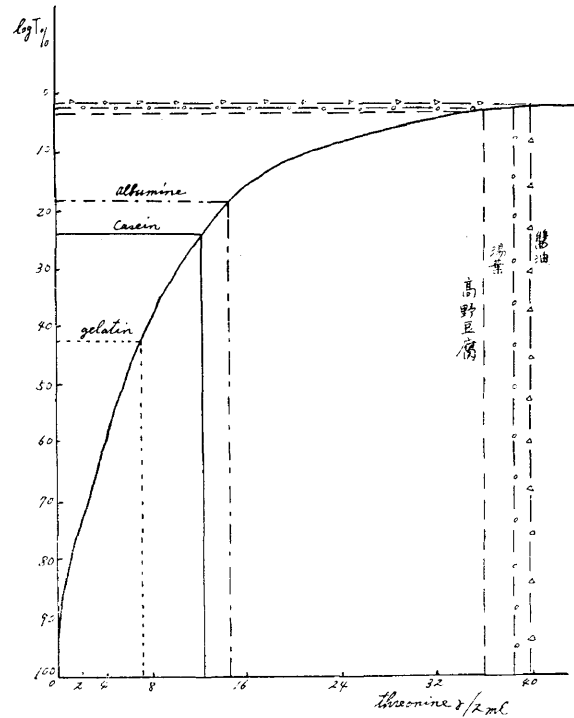
第II図 Threonine Standard Dose Response curve



第III図 試料の分析 Methionine



第IV図 試料の分析 Threonine



$$6\gamma : 5.9\gamma = 100\% : x\% \quad x\% = 98.3\%$$

同様にして各試料につき計算した結果(第12表, 第13表の如くになった。

又回収率を出す為には理論値を100%として計算する。例えばスレオニン定量のゼラチン0.5ccの理論値は $2\gamma + 4\gamma$ (検液系列の値+4 γ)であり、実測値は5.9 γ である、従って回収率を求めると

第12表 Threonine 平均回収率

		理論値	実測値	回収率
Casein	0.25cc	6.5 γ	5.5 γ	84%
	0.5cc	9.0 γ	8.7 γ	90%
Gelatin	0.25cc	5.0 γ	5.0 γ	100%
	0.5cc	6.0 γ	5.9 γ	98.3%
Albumin	0.25cc	8.0 γ	11.0 γ	—
	0.5cc	10.5 γ	9.7 γ	92.3%
高野豆腐	0.25cc	14.0 γ	12.0 γ	—
	0.5cc	21.5 γ	20.0 γ	93%
湯葉	0.25cc	14.5 γ	13.9 γ	95%
	0.5cc	23.5 γ	27.0 γ	104%
大豆	0.25cc	6.0 γ	6.2 γ	103%
	0.5cc	16.5 γ	16 γ	97%
醬油	0.25cc	18.5 γ	32.0 γ	—
	0.5cc	32.0 γ	32.0 γ	100%

第13表 Methionine 平均回収率

		理論値	実測値	回収率
Casein	0.25cc	4.5 γ	5.0 γ	111%
	0.5cc	—	—	—
Gelatin	0.25cc	6.25 γ	6.0 γ	96%
	0.5cc	8.1 γ	8.0 γ	98.7%
Albumin	0.25cc	8.6 γ	8.0 γ	93%
	0.5cc	—	—	—
高野豆腐	0.25cc	4.8 γ	4.9 γ	102%
	0.5cc	5.5 γ	5.9 γ	107%
湯葉	0.25cc	8.8 γ	8.9 γ	101%
	0.5cc	7.0 γ	7.0 γ	100%
大豆	0.25cc	4.75 γ	4.7 γ	98%
	0.5cc	6.9 γ	6.5 γ	94%
醬油	0.25cc	6.1 γ	6.2 γ	101%
	0.5cc	8.5 γ	8.5 γ	100%

要 約

[1] Bioassay により3蛋白質 Casein, Gelatin, Albumin (from Eggs) 及び大豆とその加工品高野豆腐, 湯葉醬油の Methionine, Threonine の含有量を明らかにした。

[2] 定量範囲としては, それぞれの説があるが本定量には Methionine, 10r, Threonine40r 以下をその範囲とした。

[3] 回収率については三蛋白質, 試料共100±10%程度のものが得られた。

[4] 微生物定量法は試料が少量でよい事, 又反面微生物を使用するので, 微生物自身の条件のよい時, 菌株の選択, 培地の組成, pH, 温度等がびつたり一致した好条件の下で定量すると精度の高い定量値を得ることが出来る。特に雑菌の混入を注意する事が大切である。

参 考 文 献

- 1) KA, KuiKen J, Biol Chem 15, 615
- 2) 田村他 農化 26 464 (1652)
乳酸菌によるアミノ酸定量法
- 3) 鈴木友二, 村岡三郎著: ビタミン, アミノ酸の微生物定量法。
- 5) ビオアッセイ第1~5, 1954~1956年
- 4) Micro Bioassay NO2, NO3
- 6) 栄養と食糧 第12巻昭34~35年
- 7) 栄養と食料第6巻昭和28年
- 8) 栄養と食糧 第7巻昭30年
- 9) 日産研究所編 微生物学的定量法
- 10) 蛋白質化学, 赤堀四郎, 水島三一郎編集