

Bioassay による必須アミノ酸の定量

— 第一報三蛋白質の必須アミノ酸の定量 —

高 橋 沢 *
井 口 和 代 **

微生物定量法のすぐれた特徴は感度の高いことと、微量の試料でも出来、又試料中の微量のアミノ酸をも定量することが出来るのである。

先ず定量しようとするアミノ酸が、必須栄養素として要求する菌株を選択し、この菌株の完全合成培地から定量しようとするアミノ酸を除いた培地を基礎培地とした。これに各アミノ酸の標準液を数段階に亘り添加培養して、添加量に¹⁾対応する菌の増殖度を測定し標準曲線を作製した。次に基礎培地に一定量の試料を添加培養しその増殖度を測定 Standard Curve を用い該試料中のアミノ酸を定量した。結果三蛋白質 Albumin, Gelatin, Casein, 中11種の必須アミノ酸の含有量を測定した。

実験方法

I 定量用菌株

一般にアミノ酸定量には乳酸菌が使用される。そこで日水製薬株式会社より分与を受けた以下第1表の三種の乳酸菌を使用した。

[第1表]

Amino acid	菌 株 名
L-Arginine	Leuconostoc mesenteroides P-60
L-Isoleucine	〃
L-Lysine	〃
L-Histidine	〃
L-Methionine	〃
L-Valine	〃
L-Tyrosine	〃
DL-Tryptophan	Lactobacillus arabinosus 17-5
L-Phenylalanine	〃
L-Leucine	〃
L-Threonine	Streptococcus faecalis R

II 保存培地と菌株の保存

乳酸菌の保存を行うために日水製薬の酵母エキスを主成分とした一般乳酸菌保存用培地に炭酸カルシウムを1%加えたものを使用した。菌株の保存方法は高橋、松本¹⁾に準じた。

III 前培養培地及び接種菌液の調製

前培養培地として同じく日水製薬の一般乳酸菌接種用培地を使用した。その組成は保存培地から寒天のみを除いたもの、又接種菌体量 (inoculum size) はすべて (1:10) の菌体懸濁液を用いた。

IV 基礎培地と試料分解

基礎培地は Henderson-Snell の培地を要時調製し常に新鮮なものを使用した。組成は第2表の通りである。

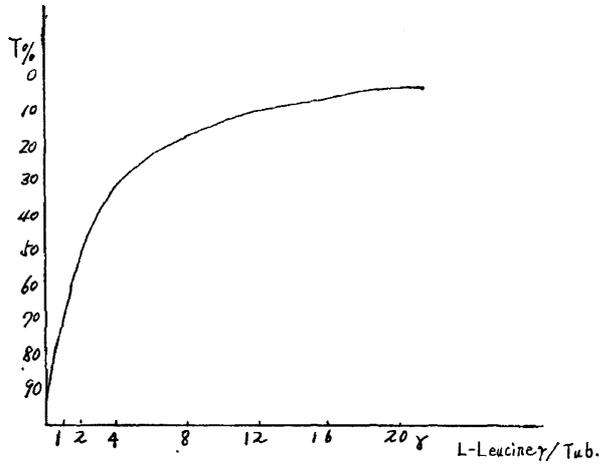
試料分解には酸分解を用い、Tryptophan のみアルカリ分解を使用した。それぞれ 120°C10 時間分解、尚 Tryptophan の分解には 40% の Cystein 塩酸塩を加えた。試料はすべて PH 6.7 に調製した。

[第2表] Henderson-Snell²⁾ の培地組成

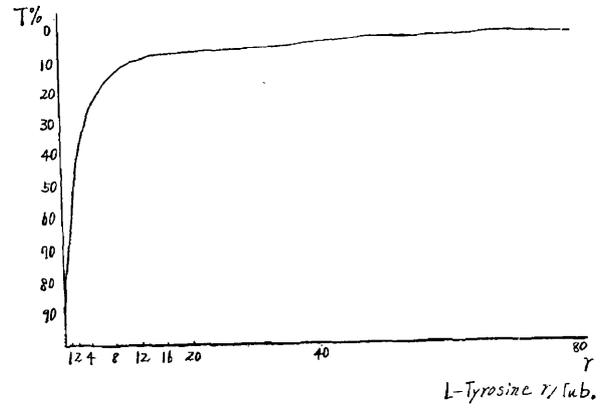
試 薬	分量	試 薬	分量
ブドウ糖	4g	塩類溶液	4cc
クエン酸ナトリウム	4g	アデニン硫酸塩	2mg
無水酢酸ナトリウム	0.2g	グアニン塩酸塩	2mg
NH ₄ Cl	0.6g	Uracil	2mg
K ₂ HPO ₄	1.0g	L-Proline	20mg
Thiamine	200r	DL-Threonine	20mg
Riboflavin	200r	L-Lysine	40mg
Pantotenic acid-ca	200r	L-Tryptophan	20mg
ピリドキザール	40r	L-Serine	20mg
パラアミノ安息香酸	40r	Glycocoll	20mg
Nicotinic acid	200r	DL-Alanine	200mg
Biotin	2r	DL-Aspartic acid	200mg
Folic acid	2r	L-Glutamic acid	200mg
L-Tyrosine	20mg	L-Arginine	40mg
L-Cystine	20mg	L-Valine	20mg
HCl-Histidine	20mg	L-Methionine	20mg
DL-Isoleucine	40mg	L-Phenylalanine	20mg
DL-Leucine	20mg		

*本学助手 **本学教務員

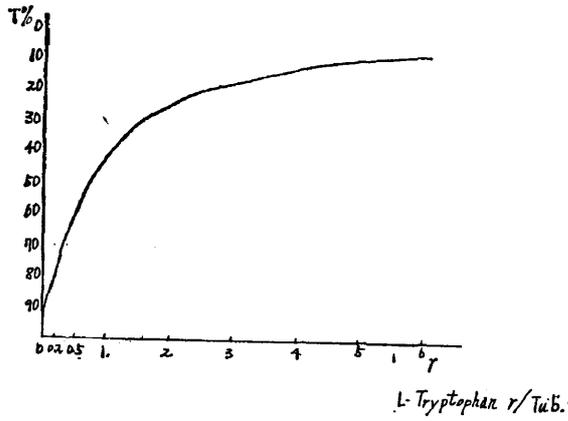
第1図 L-Leucine Standard Curve



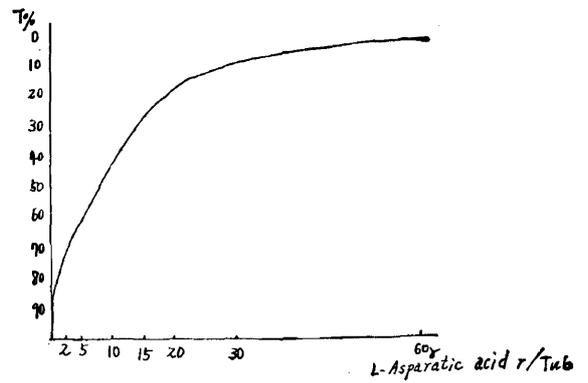
第4図 L-Tyrosine Standard Curve



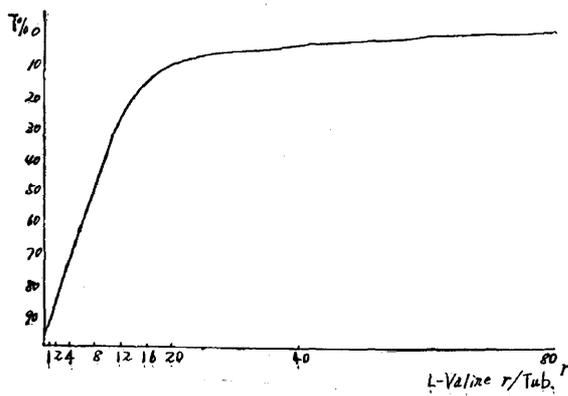
第2図 L-Tryptophan Standard Curve



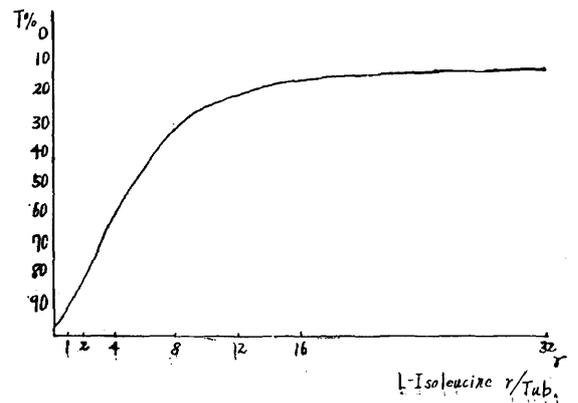
第5図 L-Asparatic acid Standard Curve



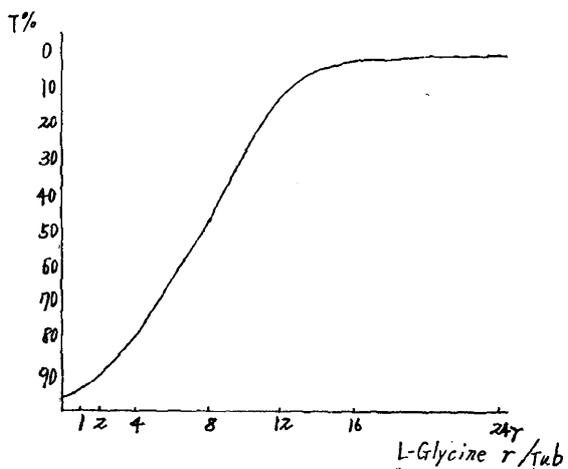
第3図 L-Valine Standard Curve



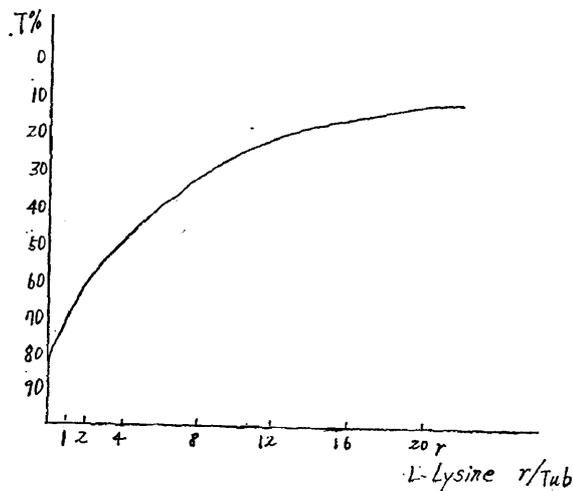
第6図 L-Isoleucine Standard Curve



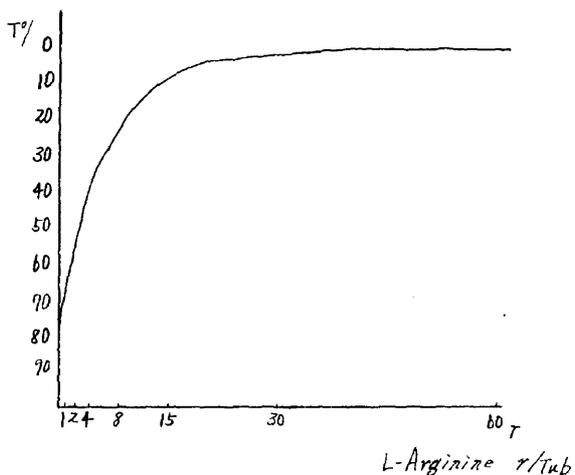
第7図 L-Glycine Standard Curve



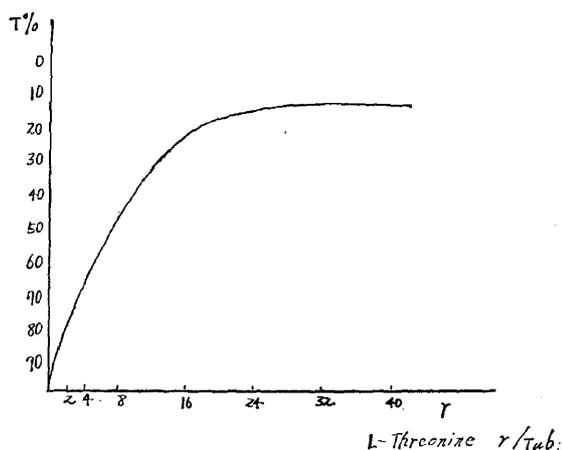
第10図 L-Lysine Standard Curve



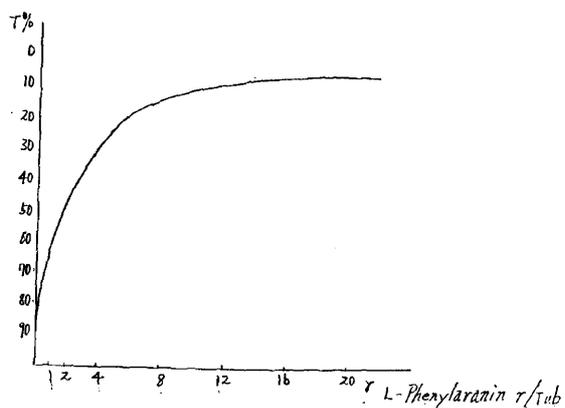
第8図 L-Arginine Standard Curve



第11図 L-Threonine Standard Curve



第9図 L-Phenylalanine Standard Curve



V 接種と培養

分注の操作は高橋³⁾、松本と同様培養液量は内径内則 14 ± 1.3 mm の試験管を使用、全量 2ml とし $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 24 時間 ~ 43 時間培養した。接種していない Constant の液に 100% 光を透過させ、増殖度を AKA 光電管比色計 (F=11) を用い比濁、測定を行った。又測定誤差を少なくするために三本づつ用意し更に試料の測定値が他の要素に影響されていなか、又実験の精度を確かめるために各試料のアミノ酸の回収率を求めた。

VI 標準曲線の作製

[第 3 表]

アミノ酸	定量範囲	培養時間
L-Arginine	0~60	20
L-Isoleucine	0~40	24
L-Lysine	0~20	43
L-Histidine	0~30	43
L-Methionine	0~10	40
L-Valine	0~80	14
L-Tyrosine	0~80	15
DL-Tryptophan	0~6	22
L-Phenylalanine	0~20	24
L-Leucine	0~20	24
L-Threonine	0~40	19

結果と考察

1) (三蛋白質 Albumin, Casein, Gelatin) の分析 (含有量), [第 4 表]

Amino acid	Albumin	Casein	Gelatin
L-Arginine ⁴⁾	3.75mg	3.00	5.0
L-Isoleucine ⁵⁾	6.25	6.75	1.66
L-Lysine	0.063	0.058	0.047
L-Histidine	2.29	2.84	0.76
L-Methionine	0.034	0.009	0.016
L-Valine ⁶⁾	8.20	12.79	5.08
L-Tyrosine ⁷⁾	1.95	3.20	0.117
DL-Tryptophan ⁸⁾	1.05	1.15	0.98
L-Phenylalanine	0.019	0.025	0.036
L-Leucine	0.054	0.054	0.039
L-Threonine	0.082	0.076	0.026

2) 回収率

Amino acid	Albumine	Caseine	Gelatin
L-Arginine	103.9%	95.9%	108.9%
L-Isoleucine	91.5	99.5	101.5
L-Lysine	102.0	104.0	99.3
L-Histidine	99.6	103.0	94.0
L-Methionine	93.0	111.0	98.7
L-Valine	98.3	101.0	98.5
L-Tyrosin	113.4	92.5	115.4
DL-Tryptophan	102.5	101.0	98.3
L-Phenylalanine	102.0	99.0	101.0
L-Leucine	77.0	99.5	96.0
L-Threonine	100.0	90.4	97.0

要 約

- 1) Bioassayにより蛋白質 Cacein, Gelatin, Albumin の11種の必須アミノ酸値を明らかにした。
- 2) 定量範囲は平均 10~50 r を範囲として定量を行った。
- 3) 回収率は 100±10% のものが得られた。
終りにこの研究のために種々御助言, 御指導を賜りました平先生並びに, 後藤文子, 林照子, 藤沢伸江, 山本尚子嬢の御協力に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 高橋, 松本: 本誌 13, (1993)
- 2) 鈴木友二, 村岡三郎: ビタミン, アミノ酸の微生物定量法
- 3) 高橋, 松本: 本誌 13, (1963)
- 4) 後藤文子: 本誌 卒業論文要旨集 (1964)
- 5) 林 照子: /
- 6), 7) 藤沢伸江: /
- 8) 山本尚子: /