

20 食品中のアミノ酸について (IV)

塩干シシャモのアミノ酸について

20 Studies on the Amino Acid component in Foods (Part IV)

On the Amino Acid in the dry salted Shishamo, *Spirinchus lanceolatus* (HIKITA)

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技師 安藤 和夫

シシャモ(柳葉魚)はワカサギに似た魚で、その習性等はサケ、マス類の性態と同じで、北海の寒冷地帯に棲息するものである。初冬の候(11月初旬より同下旬までの間)に、東部北海道の日高より釧路に至る沿岸の河川(鶴川、大津川、十勝川、釧路川など)に夜間群をなして溯上し、産卵を終えて再び海に下るが、この間は短い期間で凡そ5日乃至10日間位のものである。以上のように北海道特産の魚で生鮮魚としても消費されるが主として薄塩して乾燥し目刺、串刺にされて市場に出され、味な点で初冬の味覚として大いに賞味されている。著者は食品中のアミノ酸の研究の一環としてシシャモのアミノ酸をイオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィー法で測定した。

実験方法

1 試料

釧路近海で捕獲されたものを半乾燥した状態で現地で入手し、さらに充分乾燥後、雄と雌を各20匹宛表皮を除去し肉部のみを集めてエーテルで脱脂し、乾燥砕粉して試料とした。

2 アミノ酸定量試料の調製

a) 遊離アミノ酸試料: 一定量の試料を秤取し、これに約3倍量の80%アルコールを加え温浴上で30分間抽出し、濾過後残渣を再び抽出する。この操作を3回繰返し、それぞれの濾液を合して減圧濃縮し乾固せしめた。これにpH2.2の0.2Mクエン酸緩衝液を加えて溶解し、一定量としてアミノ酸定量の試料とした。

b) 残渣のアミノ酸: 前記遊離アミノ酸抽出残渣を乾燥後一定量を封管に取り試料の約200倍量の6N塩酸を加えて融封し110°C、24時間分解後、減圧濃縮を数回繰返して塩酸を除去せしめた後乾固した。これにpH2.2の0.2Mクエン酸緩衝液を加えて溶解し一定量として定量用試料とした。tryptophanの定量にはcysteine-Hol存在の下に5N苛性ソーダを加へ90°C、8時間分解後、塩酸で中和して試料とした。

c) 卵のアミノ酸: 卵は乾燥脱脂後b)と同様な操作で定量用試料を調製した。

3 アミノ酸定量法¹⁾

イオン交換樹脂をもちいるStein-Mooreの方法に準拠した。原報で使用されたイオン交換樹脂はAmberlite CG120, type IIであるが、これはわが国で入手できなかったので手持のDowex50×8(-400 mesh)を使用して試験を行った。

a) 樹脂粒子の選別

市販の前記樹脂の微細な粒子を除去した後、4N塩酸で洗滌し、次に中性になるまで水洗を行う。更に2N苛性ソーダ中で1時間沸騰浴上で加熱後、ガラスフィルター上に集めて中性になるまで水洗する。次に25°C±2°Cの流量の定つた流水でhydraulic fractionationを行い粒子の大きさを分別する。分別の条件は第1表の如くである。

TABLE 1
Description of Fractions by Hydraulic
Fractionation by Procedure of Hamilton^{1) 2)}

Fraction	Water flow (2 L funnel ml/min)	Use of resin	Particle diameter μ
A	50	Not used	<25
B	50~110	Automatic recoder 15 and 50cm columns.	25~30
C	110~280	Automatic recoder, 150 cm column. Fraction collector, 15 and 50 cm columns.	40±7
D	280~580	Fraction collector 150cm column.	56±9
E	Residue	Not used	>70

b) カラムの作製: 酸性および中性アミノ酸の分離はfraction Dの樹脂を用いる0.9×150cmのカラムで行う。カラムに充填する前に塩酸、苛性ソーダで洗滌して不純物を除去し、水洗の後pH4.25の0.2Nクエン酸緩衝液で洗滌、平衡に達せしめる。次に樹脂をその2倍量の緩衝液に懸濁させてカラムに注入し、カラムの上部から水銀柱30cmの圧をかけて充填し、カラムの高さを150cmとする。溶出液の流速はカラムを50°Cに保温して水銀柱20cmの圧を加えて12ml/hr.である。

アミノ酸の定量の際は、0.2N苛性ソーダを一夜自然流

下させて洗滌した後 pH3.25 の 0.2N グエン酸緩衝液で平衡に達せしめて操作する。

塩基性アミノ酸は fraction C の樹脂をもちい 0.9×15cm のカラムで行う。平衡にもいる緩衝液は pH 5.28 の 0.35N グエン酸溶液である。流速は水銀柱 5 cm の圧を加え 30ml/hr. である。

Dowex 50 を使用したカラムで混合アミノ酸を分離定量した結果、原報の場合と比較して溶出位置は多少ずれるが充分使用しうることが判明したので、この方法によつてアミノ酸を定量した。

e) アミノ酸の定量：酸性および中性アミノ酸の定量には 150 cm のカラムを使用する。もちいる緩衝液は最初 pH3.25 の 0.2N グエン酸溶液で、aspartic acid の peak が出現するまでの溶出液量の 2.15 倍溶出した所で pH4.25, 0.2N グエン酸溶液に変更し、phenylalanine が溶出した後操作を停止する。

塩基性アミノ酸の定量には 15cm のカラムを使用する。緩衝液は pH5.28, 0.35N のグエン酸溶液をもちいた。

操作中カラムは 50°C に保温する。溶出液は 2 ml 宛捕集しアミノ酸の発色並びに比色定量は前報³⁾の方法によつた。

実験結果

アミノ酸の分離状態について前報³⁾と比較すると、一般に分離は良くなり特に glutamic acid と proline, glycine と alanine, tyrosine と phenylalanine の分離が良くなつている。又時間的にいつて全操作が終了するのに前報の場合には 1 週間要したのに比べると、この方法では 3 日間で終了できることは大きな利点である。

1) 試料(乾燥物)窒素の含量

2) 遊離アミノ酸

遊離アミノ酸の溶出曲線は第 1 図、定量結果は第 3 表の如くである。

アミノ酸含量は雌雄共に glutamic acid, alanine, valine, leucine および lysine の含量が高く, cystine, arginine および tryptophan の含量は低い。雌雄間で著しい差がある

TABLE 2

Nitrogen Content in Dry Matter.
(g/dry matter 100g)

	Male	Female
Total N	12.13	12.09
80% alcohol soluble N	2.25	2.20
Spawn total N	-	11.61

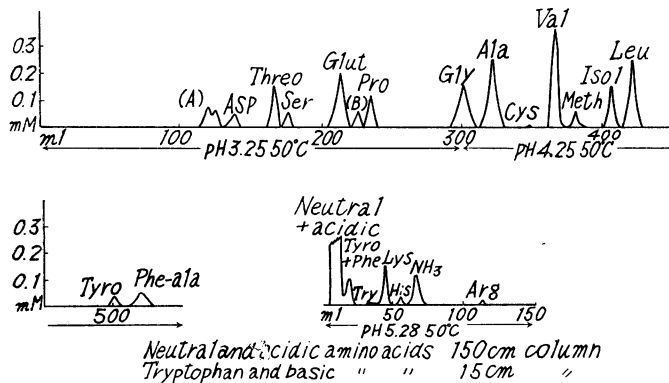
TABLE 3

Free Amino Acid of Dry Salted Shishamo

	amino acid Mg per dry matter 100 g	
	Male	Female
Aspartic acid	119.5	123.4
Threonine	311.8	245.3
Serine	100.2	98.3
Glutamic acid	667.3	553.2
Proline	201.8	41.8
Glycine	286.4	232.1
Alanine	670.7	579.1
Cystine	31.1	25.9
Valine	514.0	366.8
Methionine	232.7	181.1
Isoleucine	346.4	308.3
Leucine	623.3	579.1
Tyrosine	185.5	160.6
Phenylalanine	280.0	263.1
Tryptophan	20.6	59.6
Lysine	843.6	805.5
Histidine	174.3	198.9
Arginine	38.6	33.3
Ammonia	130.7	84.3

	m Mol (leucine equivalent)	
Unknown peak A	926.70	493.64
" " B	672.76	747.43

Fig. 1 Separation of free amino acid (Male)



ものは proline および valine で、その他差がみられるものは threonine, glutamic acid および alanine である。全体として両者を比較すると雄の方が多くなっている。

第1図のアミノ酸抽出曲線で peak A は aspartic acid の前の二成分が重なったと思われる部分であるが、通常この位置には蛋白質を酸分解した際に、methionine が酸化されて生成する methionine sulfoxide が出現する。しかし methionine sulfoxide がこのように大量に存在するとは考えられず、他の peptide でないかと考えられる。又 glutamic acid と proline の間に出現する peak B は、いままでにこの位置に溶出する ninhydrin positive の物質は報告されていないので不明である。

これらの不明な点について更に検討するために、雄の遊離アミノ酸液について常法の如く酸分解行つてアミノ酸を測定した。その結果は第4表の如くである。

TABLE 4
Amino Acid of Decomposed Free
Amino Acid preparation. (Male)

	amino acid Mg per dry matter 100 g
Cystic acid	24.4
Aspartic acid	493.0
Threonine	417.8
Serine	202.5
Glutamic acid	1,357.7
Proline	425.9
Glycine	628.4
Alanine	822.8
Cystine	17.6
Valine	593.9
Methionine	311.5
Isoleucine	393.4
Leucine	798.4
Tyrosine	190.3
Phenylalanine	355.5
Lysine	1,199.3
Histidine	452.3
Arginine	80.6
Ammonia	337.9
	m Mol (leucine equivalent)
Unknown peak A	105.26
" " B	627.73

測定の結果を第3表と比較すると、peak A の部分は殆んど分解されて消失していることから考えて恐らく低級な peptide でないかと推測される。peak B の測定値は遊離ア

ミノ酸の場合の測定値と殆んど差異が認められなかつたが、通常の蛋白質中のアミノ酸測定と同一の条件で分解を受けているので、この物質は強固に結合された peptide と考えるよりむしろ他の単一な ninhydrin positive の物質と考えられるが、詳細は今後更に検討したい。

酸分解後アミノ酸は殆んど増加を示している。ただ valine, isoleucine, tyrosine は増加が殆んど認められない。又 cystine は酸分解で分解され、逆に cystic acid が増加した。

3) 80%アルコール抽出残渣のアミノ酸

アルコール抽出残渣のアミノ酸の定量結果結果は第5表の如くである。

TABLE 5
Amino Acid of Alcohol Extracted Residue

	amino acid g per 100 g	
	Male	Female
Cystic acid	0.702	0.183
Hydroxyproline	0.895	0.343
Aspartic acid	10.404	10.331
Threonine	4.907	4.693
Serine	3.861	4.003
Glutamic acid	15.784	15.686
Proline	3.450	2.955
Glycine	4.370	4.299
Alanine	6.324	5.905
Cystine	0.140	0.474
Valine	5.966	5.825
Methionine	1.776	3.336
Isoleucine	4.887	5.670
Leucine	9.165	8.766
Tyrosine	2.898	3.810
Phenylalanine	4.350	4.317
Lysine	13.886	12.092
Histidine	3.416	2.734
Arginine	6.339	6.239
Tryptophan	0.744	0.926
Ammonia	1.674	1.193

定量結果をみると雌雄共に aspartic acid, glutamic acid, leucine および lysine が多く、hydroxyproline, cystine および tryptophan は特に少い。両者間で比較的差が認められるものは hydroxyproline, methionine, tyrosine および lysine である。cystine は分解条件が同一にもかかわらず、雄の方が余計分解を受けているように思われるが、その理由は明らかでない。

4) 卵のアミノ酸

アミノ酸の定量結果は第6表の如くである。

Fig. 2 Separation of amino acid of 80% alcohol extracted residue. (Male)

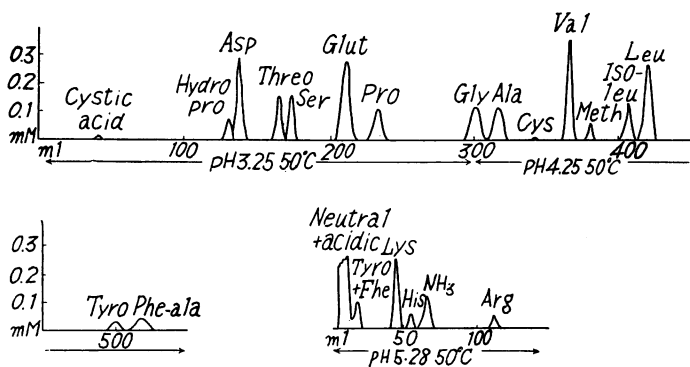


TABLE 6
Amino Acid of Spawn.

	amino acid g per dry matter 100 g
Cystic acid	0.315
Hydroxyproline	2.821
Aspartic acid	5.192
Threonine	3.813
Serine	3.755
Glutamic acid	8.270
Proline	3.203
Glycine	2.686
Alanine	5.134
Cystine	0.476
Valine	3.978
Methionine	1.285
Isoleucine	2.981
Leucine	5.071
Tyrosine	1.984
Phenylalanine	2.686
Lysine	5.923
Histidine	1.916
Arginine	3.552
Tryptophan	1.019
Ammonia	1.500

定量結果からみると特に多いのは glutamic acid で、その他比較的多いとみられるのは aspartic acid, alanine, leucine および lysine である。少ないのは cystine, methionine および tryptophan であつた。

考 察

全窒素および 80% アルコール可溶性窒素の量では雌雄間の差は殆んど認められなかつた。遊離アミノ酸の定量結果をみると、総遊離アミノ酸量では雄の方が多かつた。こ

の原因については、捕獲後乾燥中に受けた分解度の差によるか、或は雌雄間の差であるかは不明である。ただ雄の場合しか行わなかつたが、遊離アミノ酸液を酸分解してアミノ酸を測定した結果、酸分解を行わないものに比較して著しい増加を行つた所から考えると、可溶物中にかなりの量の蛋白質、或は peptide が存在することが明確となつた。

可溶性窒素は全窒素に比較すると約 1/2 位となつている。味という問題では可溶性物質の量の大小に影響を受けることは容易に想像され、又旨味の問題では inosinic acid は別として、l-glutamic acid の他に l-glycine, l-alanine, l-serine および l-proline が関係するといわれている。この点塩干しシヤモの場合でも、かなりの量が可溶性となつており、又遊離アミノ酸の量についてみても相当程度条件を満たしているので、美味であることにうなずける面があると思われる。

ただ内部のみについて雄の方が雌より美味であるといわれるが、この測定結果からは判断が困難である。

遊離アミノ酸の溶出曲線で aspartic acid の前に出現する peak A は、酸分解の結果相当量の消失がみられたので恐らく低級な peptide と考えられる。

peak B は酸分解の結果でもその測定値は未分解の場合と殆んど変化が認められなかつたので、一応単純な物質と考えられるが、この物質を究明するために現在分離中である。尚この物質はアルコール抽出残渣および卵には全く存在が認められなかつたので、すべて試料の筋肉中に抽出可能な遊離の形で存在すると考えられるが、新鮮な筋肉中でもこのような状態で存在しているかは不明であり、更に研究を進める予定である。

アミノ酸の測定結果、共通して多量に存在するアミノ酸は glutamic acid, alanine, leucine および lysine で、少ないのは含硫アミノ酸および tryptophan であつた。尚 hydroxyproline はアルコール抽出残渣および卵に認められた。

摘 要

- 1) 塩干しシヤモのアミノ酸をイオン交換樹脂法によ

つて定量した。定量法は Stein-Moore の新方法に準拠した。樹脂は Amberlite CG 120 の代わりに Dowex 50 を使用したが、測定値は同一であつた。

2) アミノ酸の測定値をみるといずれの場合でも雌雄共通して glutamic acid, alanine, leucine および lysine が高く、含硫アミノ酸および tryptophan は低い。尚 hydroxyproline は遊離アミノ酸中に認められなかつた。

3) 遊離アミノ酸の溶出曲線で見出された peak A は低級 peptide と推測されたが、peak B は恐らく単一の物質と考えられるが不明である。

文 献

- 1) Moore, S. : Spackman, D. H. and Stein, W. H, Anal. chem. **30**, 1185 (1958)
- 2) Hamilton, P.B. : *ibid* **30**, 914 (1958)
- 3) 安藤 : 本誌, 11, 114 (1960)