

微生物定量法による必須アミノ酸の定量

—第二報— 牛肉各部位の必須アミノ酸の定量

高橋 沢* 井口 和代**
大野 富士子**

The Microbiological Determination of essential Amino acid.
Part2 The Determination of essential Amino acids in each part of Beef.

By
Sawa, Takahashi, Kazuyo Inokuchi, Fuziko Ōno.

牛肉は肉類中世界を通じて最も消費量が多く、広く一般に賞味されているが、肉質は赤褐色を呈し、組織が硬く弾力があり、栄養が良好なものは組織間に白色脂肪を夾雑していわゆる霜降肉と云われ最上とされている。化学的組成についてみると、水分70~77%、蛋白質20%、脂肪3~10%で極めて栄養価の高い蛋白質給源である。

肉牛の肉質は、種類、産地、年齢、飼育時の栄養状態、又同一肉牛であってもその体の部位で異なり、概して鞍下と臀部の肉が最上といわれ、脚及び腹の肉が劣る。

そこで私達は牛肉各部位、tongue (舌), neck (首) chuck (肩), ribs (背), liver (肝臓), aitchbone (尻), plate (アバラ), round (腿肉), tail (尾) 以上九種類について必須アミノ酸の含有量を比較検討した。実験方法は、本誌第16号第一報¹⁾に準じた。

実験方法

1. 試料調製

牛肉の各部位の肉を均一にするためミンチにし、一昼夜 エーテルで脱脂後、60°C の送風乾燥器で約7時間乾燥を行ない、その後乳鉢で粉碎し粉末試料とした。次に試料を遊離のアミノ酸液にするため加水分解を行なった。加水分解には、酸分解と Tryptophan のみアルカリ分解を行ない40%のCystein 塩酸塩を加えた、方法は各試料200mg を秤り硝子ボンベに入れ 4N—HCl, アルカリ分解は 4N—NaOH 各 10ml を加え封管後、120°C, 8時間加水分解を行なった。分解後液を蒸留水にて洗出し、活性炭を少量加え脱色、濾過後熱水で濾紙附着物を洗い濾液と合わせ、稀アルカリで pH—4 に調製し試料液とした。

II. 定量方法

1) 菌株と定量範囲と培養時間

日水製薬株式会社より分与を受けた乳酸菌を使用した。以下表 I の三種を用いた。定量範囲は 0~40γ とし、培養時間は48時間から72時間培養した。

表1 定量用菌株名と定量範囲, 培養時間

アミノ酸	菌株名	定量範囲	培養時間
L-Arginine	Storeptococcus faecalis R	0~40γ	72
L-Histidine	〃	0~20γ	48
L-Threonine	〃	0~20γ	48
L-Isoleucine	Leuconostoc mesenteroides P-60	0~20γ	72
L-Methionine	〃	0~10γ	67
L-Lysine	〃	0~30γ	48
L-Valine	Lactobacillus arabinosus 17-5	0~20γ	72
DL-Tryptophan	〃	0~20γ	72
L-Phenylalanine	〃	0~5γ	48
L-Leucine	〃	0~20γ	48

*本学講師

**本学教務員

2) 保存培地と菌株の保存

乳酸菌の保存を行なうために日水製菓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。菌株の保存方法は第1報に準じた。

3) 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菓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。

4) 基礎培地

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。組成は表2の通りである。

表2 Henderson-Snell の培地組成

試 薬	分量	試 薬	分量
ブドウ糖	4.0g	塩類溶液	4 cc
クエン酸ナトリウム	4.0g	アデニン硫酸塩	2 mg
無水酢酸ナトリウム	0.2g	グアニン塩酸塩	2 mg
NH ₄ Cl	0.6g	Uracil	2 mg
K ₂ HPO ₄	1.0g	L-Proline	20mg
Thiamine	200γ	DL-Threonine	20mg
Riboflavin	200γ	L-Lysine	40mg
Pantotenic acid-Ca	200γ	L-Tryptophan	20mg
ピリドキザール	40γ	L-Serine	20mg
パラアミノ安息香酸	40γ	Glycocoll	20mg
Nicotinic acid	200γ	DL-Alanine	200mg
Biotin	2γ	DL-Aspartic acid	200mg
Folic acid	2γ	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		

5) 接種と培養

分注の操作は第一報と同様、培養液量は内径14±1.3 mmの定量用試験管を使用、全量2mlとし37°C±1°C 48~72時間培養した。

6) 標準曲線の作成

標準アミノ酸溶液を横軸に0.05N NaOHの滴定値を縦軸に検量曲線を求めた。

7) 増殖度測定及び試料の分析

増殖度の測定には滴定法と比濁法があるが、本実験では滴定法を用いた。培養終了後コッホ蒸気殺菌釜にて10分間滅菌し菌の発育を止め、BTBとNRの混合液を指示薬として、0.05N NaOHで酸滴定を行なった。

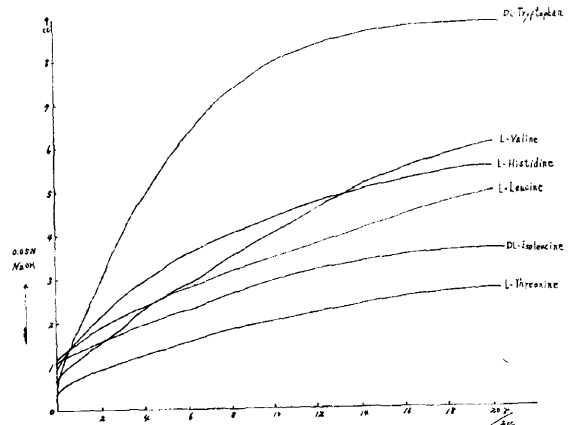


図1 Standard Curve

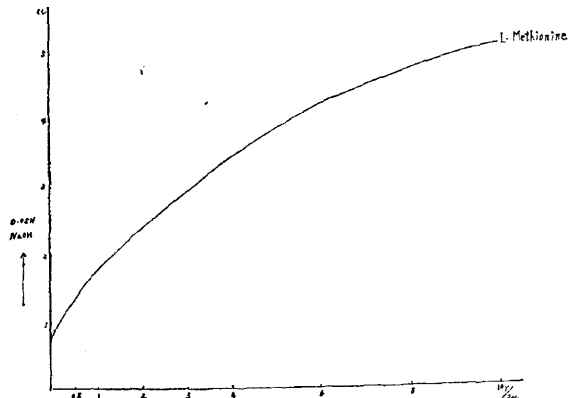


図2 L-Methionine Standard Curve

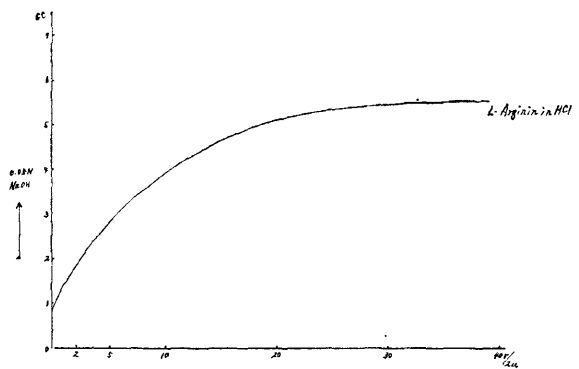


図3 L-Arginine HCl Standard Curve

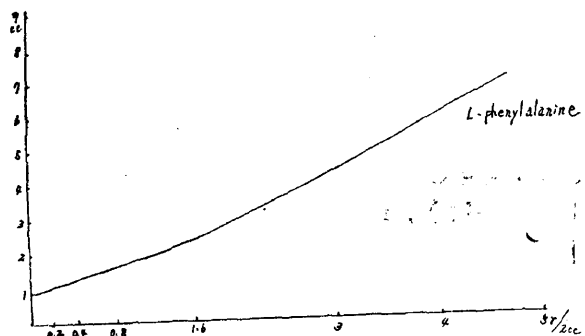


図4 L-Phenylalanine Standard Curve

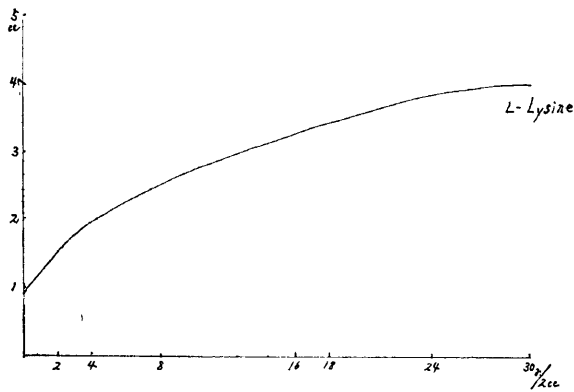


図5 L-Lysine Standard Curve

次いで検液について得た滴定値を標準曲線に挿入して試料中の定量しようとするアミノ酸の含有量を求め、表3の結果を得た。

又測定誤差を少なくするため検液を3本ず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いか、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。表4のごとくである。

表3 生試料 100mg 中のアミノ酸含有量 (mg%)

アミノ酸	ネック	リブス	タ	ン	チャック	テ	ル	イチボ	プレート	ラウンド	レバー
N-Arginine ⁴⁾	0.97	0.95	1.19	1.00	0.72	0.94	0.88	1.25	0.98		
L-Isoleucine ⁵⁾	1.57	1.19	1.72	1.59	1.04	1.68	1.71	2.44	1.27		
L-Lysine	0.89	0.46	1.19	0.83	0.65	1.08	0.87	1.21	0.97		
L-Histidine ⁶⁾	0.54	0.48	0.50	0.55	0.32	0.59	0.40	0.75	0.43		
L-Metionine	0.41	0.39	0.43	0.40	0.23	0.43	0.34	0.49	0.38		
L-Valine	0.61	0.71	0.88	0.80	0.62	0.63	0.67	1.08	0.96		
L-Threonine	2.05	1.93	2.11	1.88	1.57	1.97	1.84	2.17	1.80		
DL-Tryptophan ⁷⁾	0.005	0.017	0.024	0.002	0.008	0.02	0.007	0.005	0.006		
L-Phenyl alanine	1.72	1.77	1.42	0.68	1.36	0.71	0.44	1.83	1.95		
L-Leucine	0.99	0.90	1.14	0.87	0.95	1.22	0.99	1.13	0.95		

表4 各試料の回収率 (%)

	ネック	リブス	タ	ン	チャック	テ	ル	イチボ	プレート	ラウンド	レバー
L-Arginine	98.4	100	99	101	100	100	104	100	99.2		
L-Isoleucine	95.3	99.3	103	96.2	94.1	96.8	92.6	94.5	107.5		
L-Lysine	110	94	96	100	97	94	96	96	104		
L-Histidine	102	104	100.5	98.6	102	99	101	91	100		
L-Metionine	102	102	90	102	97	102	100	92	95		
L-Valine	94.8	100	98.7	100	99.5	100	99	98.3	100		
L-Threonine	100	102	98	100	99.5	100	99	98.3	100		
DL-Tryptophan	97	100	98.7	95	101	100	104	110	94		
L-Phenyl alanine	100	100	97.7	96	97.7	100	100	99	104		
L-Leucine	100	100	100	100	100	103	96	104	104		

総括及び考察

1) 牛肉各部位tongue (舌), neck (首), chuck (肩), ribs (背), liver (肝臓), aitchbone (尻) plate (アバラ), round (腿), tail (尾), 以上九種類の必須アミノ酸の含有量と分布状態を、微生物定量法で明らかにした。

2) 次にアミノ酸量の多いものから, round, tongue, neck, liver, aitchbone, ribs, chuck,

plate, tailでtongue, liverが以外に多く、一般に美味とされている round (ロース) はアミノ酸量も多量である事が解った。

3) アミノ酸量の多いものから列記するとL-Threonine, L-Isoleucine, L-phenylalanine, L-leucine, L-Arginine, L-lysine で約半量しか含有されていなかったL-Histidine, L-Methionine, 又極く微量であったDL-Tryptophanの順であった。

4) 更に本法の精度を確めるために回収率を求めた結果93~110%の値を求めた。

5) 米国農務省編, 食品アミノ酸含有量表とほぼ同程度の値を得られた。

終わ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, 池田ひろ, 大橋紀子, 大崎敬子, 熊谷偉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) 高橋, 井口; **本誌16**, (1994)

3) 鈴木友二, 村岡三郎; ビタミン, アミノ酸の微生物定量法

4) 池田ひろ; **本誌**, 卒業論文要旨集 (1965)

5) 大橋紀子; **本誌** /

6) 大崎敬子; **本誌** /

7) 熊谷偉子; **本誌** /

8) 米国農務省編, 食品アミノ酸含有量表