

カゼイン加水分解物の分析

積田優一郎*, 三浦 徹*, 岩下 伸行*, 樋野 千寿*, 辻 恵美*, 熊澤 勉*

Analysis of Casein Hydrolysates

Yuichiro TSUMITA*, Toru MIURA*, Nobuyuki IWASHITA*, Chitoshi HINO*, Emi TSUJI* and Tsutomu KUMAZAWA*

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

The degree of hydrolysis of casein hydrolysates prepared in our laboratory and those purchased from manufacturers was evaluated. The hydrolysates were prepared under controlled temperature and reaction time by using several enzymes. We determined α -amino nitrogen content, total nitrogen content, average peptide chain length (PCL) and molecular weight distribution by size exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) in casein hydrolysates and carried out qualitative examination of proteins by precipitation reaction. From the results obtained, it was found that it may possible to evaluate the degree of hydrolysis objectively by determining average peptide chain length and molecular weight distribution.

1. 緒 言

たんぱく質を酸又は酵素等により加水分解して調製したものはたんぱく質加水分解物と呼ばれる。このたんぱく質加水分解物は、その優れたアミノ酸バランスや消化吸収性、低抗原性などによりさまざまな栄養食品に用いられると共に、物性の改良材、呈味材、増量剤としても利用されている。

代表的なたんぱく質の一つであるカゼインは、関税率表第 3501.10 号（統計細分 000）に分類されるが、これを加水分解すると、分解の程度によって、第 3504.00 号（統計細分 029）、第 3504.00 号（統計細分 010）及び第 2106.90 号（統計細分 299）のいずれかに分類されるので、これらの税番への分類の決め手となる分解の程度について明確な基準とそれを評価する方法が重要となる。

現在、アミノ態窒素と全窒素の比である AN/TN 比の測定及びたんぱく質の沈殿試験により分解の程度を判断している。しかし、たんぱく質の沈殿試験は、簡易な定性試験ではあるが、実際にどの程度まで分解しているときに沈殿が生じるのかが明確ではなく、実験条件及び実験者によっても結果に差が生じる可能性があるという問題点がある。また、試料溶液が沈殿するということは、その溶液中の一部の成分が反応して沈殿していることを示しているだけであって、その結果が試料溶液の成分全体を反映しているとは限らない。

本研究では、カゼインの各種酵素分解物について、AN/TN 比の測定及び沈殿試験のほか、新たな分解程度の評価法として、TNBS 法による平均ペプチド鎖長の測定及びサイズ排除クロマトグラフ

イーによる分子量測定を試みた。これらの結果に基づいて、加水分解の程度を数量的に評価できるか否かについて検討した。

2. 実 験

2. 1 分析試料

アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、グリシン、グルタミン酸、シスチン、セリン、チロシン、トリプトファン、トレオニン、バリン、ヒドロキシプロリン、フェニルアラニン、プロリン、リジン、ロイシン、カゼイン（乳製）（純正化学）

INSULIN Chain B, Oxidized (from Bovine Insulin)（シグマ）

Neurotensin（和光純薬）

Gly-Gly、Gly-Gly-Gly、(Pro-Pro-Gly)₅・4H₂O、(Pro-Pro-Gly)₁₀・9H₂O、Angiotensin IV (Human)、Fibronectin Fragment (RGDS)（株式会社ペプチド研究所）

カゼインペプトン（カゼイン酵素分解物）（極東製薬工業）

乳ペプチド（カゼイン酵素分解物）（三栄源エフ・エフ・アイ）

カゼイン加水分解物（カゼイン硫酸分解物及びカゼイン塩酸分解物）（MP Biomedicals）

カゼイン（乳製）の各種酵素分解物（自家製）

2. 2 試薬

2. 2. 1 酵素分解

プロテアーゼ（シグマ）

パパイン、トリプシン、パンクレアチン（和光純薬）

ペプシン（ブタ胃粘膜由来）（関東化学）
りん酸水素ナトリウム十二水和物、りん酸二水素ナトリウム
二水和物（和光純薬）
りん酸（純正化学）

2.2.2 たんぱく質の沈殿試験

トリクロロ酢酸、タンニン酸、硫酸アンモニウム（和光純薬）
硫酸ナトリウム（関東化学）

2.2.3 ニンヒドリン法

ニンヒドリン、塩化すず（Ⅱ）二水和物、2-メトキシエタノール、2.25 M クエン酸緩衝液（pH 5.10）（和光純薬）*
（※すべてアミノ酸自動分析用のもの）

2.2.4 TNBS法

濃塩酸、ほう酸（和光純薬）
水酸化ナトリウム（関東化学）
ピクリルスルホン酸水溶液（シグマ）
亜硫酸ナトリウム（純正化学）

2.3 分析装置及び実験条件

2.3.1 サイズ排除クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフ：HP1090（Agilent）
カラム：TSK-GEL G2000SW_{XL}（7.8mm×300mm）（東ソー）
カラム温度：室温
検出器及び検出波長：ダイオードアレイ検出器 220nm
流速：0.5 ml/min
移動相：りん酸緩衝液(pH 2) / アセトニトリル / トリフルオロ酢酸 = 67.5 / 32.5 / 0.1

2.3.2 ニンヒドリン法

紫外可視分光光度計：Lambda 12（PERKIN ELMER）
測定条件：室温
測定波長：560 nm

2.3.3 ケルダール法

自動窒素測定装置：KJEL-AUTO（三田村理研工業）

2.3.4 TNBS法

紫外可視分光光度計：Lambda 12（PERKIN ELMER）
測定条件：室温
測定波長：425 nm

2.4 実験

2.4.1 カゼイン溶液の調製

りん酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g とりん酸水素ナトリウム十二水和物 1.79 g を水に溶解し、1000 ml として 10 mM りん酸緩衝液（pH 7.0）を調製した。

カゼイン 2 g を 500 ml 三角フラスコに秤量し、10 mM りん酸緩衝液（pH 7.0）500 ml を加えて沸騰浴中で加熱溶解した。冷却後、1000 ml メスフラスコに移し、10 mM りん酸緩衝液（pH 7.0）でメスアップしてカゼイン溶液（2 mg/ml）を調製した。

2.4.2 カゼイン溶液の酵素分解

2.4.2(1) 酵素溶液の調製

プロテアーゼ、パパイン、トリプシン、パンクレアチンを 10 mM りん酸緩衝液（pH 7.0）に溶解し、ペプシンは 100 mM りん酸緩衝液（pH 2.0）に溶解して酵素溶液とした。（すべて 1 mg/ml）

2.4.2(2) 酵素分解

カゼイン溶液（2 mg/ml）50 ml を 100 ml 共栓付き三角フラスコにとり、酵素溶液（1 mg/ml）を 1.25 ml 添加した。ペプシンについては、あらかじめカゼイン溶液にりん酸を添加して pH 2.1 に調節した。反応の停止は、沸騰水中で 10 分間加熱して酵素を失活させることにより行った。（調製した溶液を以下、「酵素分解溶液」とする）

あらかじめ予備実験を行い適当な分解程度の分解物が得られる条件を決定した。分解条件を Table 1 に示す。

Table 1 Hydrolysis condition for casein solution

	pH	0°C	15°C	25°C	37°C
Protease	7.0	1h	1h	1h	24h
Papain	7.0		1h	1h	0.5h, 24h
Trypsin	7.0		1h	1h	0.5h, 24h
Pancreatin	7.0		1h	1h	1h, 24h
Pepsin	2.1	1h	1h		0.5h, 24h

種々の酵素を用いて、反応温度及び反応時間をコントロールすることにより、分解程度の異なる種々のカゼイン加水分解物を得た。

2.4.3 たんぱく質の沈殿試験

酵素分解溶液 1 ml を別々の試験管に採り、それぞれ個別に以下の定性試験を行った。

- ① 10%トリクロロ酢酸水溶液を 100 μ l 添加する。
（単純たんぱく質の確認）
- ② 硫酸アンモニウムを添加して飽和させる。
（たんぱく質一般の確認）
- ③ 硫酸ナトリウムを添加して飽和させる。
（プロテオースの確認）
- ④ 1%タンニン酸を 500 μ l 添加する。
（ペプトンの確認）

2.4.4 ニンヒドリン法によるアミノ態窒素の定量

2.4.4(1) ニンヒドリン試薬の調製

ニンヒドリン 0.4 g を 2-メトキシエタノール 15 ml に溶解したもの（A 液）と塩化すず（Ⅱ）二水和物 76 mg を 2.25 M クエン酸緩衝液（pH 5.10）5 ml に溶解したもの（B 液）を調製し、使用直前に A、B 液を混合したものをニンヒドリン試薬とした。なお、A 液、B 液を混合したときに、溶液が赤色になることを確認し、試薬が赤色を呈している間に試料への添加を行った。

2.4.4(2) 検量線

ロイシン約 150 mg を正確に量り取り、水で 100 ml に定容して標準液とした。この標準液 2, 4, 6, 8, 10 ml をそれぞれ水で 100

ml に定容したものを検量線作成用溶液とした。

2. 4. 4(3) 反応及び測定

試験管中で試料溶液 1.0 ml にニンヒドリン試薬 1.0 ml を添加し、沸騰浴中で 15 分間加熱した後直ちに氷冷した。これを 60 % エタノールを用いて 50 ml に定容し、 $\lambda = 570 \text{ nm}$ の吸光度を測定した。冷却による反応停止から吸光度測定までは、30 分以内に行った。

2. 4. 5 ケルダール法による全窒素の定量

常法に従って酵素分解溶液 10 ml を加熱分解した (300 °C で 60 分間、400 °C で 140 分間加熱分解)。分解溶液について自動窒素測定装置により窒素量を測定した。

2. 4. 6 TNBS 法^{1), 2)} による平均ペプチド鎖長の測定

2. 4. 6(1) 試薬の調製

ほう酸 100 mmol (6.18 g) に 2 N 水酸化ナトリウム溶液 25 ml を加え、水で 1000 ml として 0.1 M ほう酸緩衝液 (pH 9.2) を調製した。また、亜硫酸ナトリウム 0.38 g を水に溶かして 100 ml (30mM) とした。使用直前に、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 水溶液 (5 %) を 0.1 M ほう酸緩衝液で希釈 (1 : 24) して、0.2 % 溶液を調製した。

2. 4. 6(2) 測定溶液の調製

① 試料溶液 (塩酸で加水分解しないもの)

酵素分解溶液 2 ml を水で希釈し、50 ml とした。

② 塩酸加水分解後の試料溶液

酵素分解溶液 0.5 ml と水 0.5 ml をバキュームリアクションチューブに入れ、これに濃塩酸 1 ml と 2-メルカプトエタノール 40 μl を加えた。脱気後、110 °C で 24 時間加水分解した後、蒸発乾固して塩酸を除去し、水 20 ml を加えて試料溶液とした。

2. 4. 6(3) 検量線

ロイシン約 150 mg を正確に量り取り、水で 100 ml に定容して標準液とした。この標準液 1, 2, 3, 4, 5 ml をそれぞれ水で 100 ml に定容したものを検量線作成用溶液とした。

2. 4. 6(4) 反応及び測定

0.1 M ほう酸緩衝液 (pH 9.2) 7.0 ml を 10 ml 容共栓付き試験管に採り、試料溶液 1.0 ml を加えて 50 °C に加温する。これに 0.2 % TNBS 溶液 1.0 ml と 30 mM 亜硫酸ナトリウム溶液 1.0 ml を加えて、遮光して 50 °C で 25 分間静置した。その後、氷水中で冷却し、室温で 20 分間静置した後、 $\lambda = 425 \text{ nm}$ の吸光度を測定した。

検量線から試料溶液及び塩酸加水分解後の溶液のロイシン当量濃度を求め、それぞれアミノ態窒素 (プライマリーアミン) 濃度を算出した。これにより平均ペプチド鎖長を次式に従って算出した。

平均ペプチド鎖長 = (塩酸加水分解後の溶液中のアミノ態窒素濃度) / (試料溶液中のアミノ態窒素濃度)

2. 4. 7 サイズ排除クロマトグラフィー

2. 4. 7(1) 条件検討

実験に用いたカラムはシリカゲルを基材としたサイズ排除クロマトグラフィー用カラムである。シリカ系のカラムを用い

た場合、化合物によっては全浸透限界を超えて溶出するなど、非理想的なクロマトグラフィーとなることがある³⁾。当分析室での以前の実験においては、0.3 M 塩化ナトリウムを含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を移動相として使用した場合、芳香族アミノ酸の保持容量が大きくなり、特にトリプトファンにおいて顕著であることが示されている。これは、芳香族アミノ酸のベンゼン環等とカラム充填材との間の疎水性相互作用によるものと考えられる。

そこで、移動相に有機溶媒であるアセトニトリルを混合した場合、各アミノ酸の溶出挙動にどのような変化が生じるか検討した。このとき、特に塩基性物質の吸着を防ぐ目的でトリフルオロ酢酸を 0.1 % になるよう添加した。

2. 4. 7(2) 校正曲線

Table 2 に示す試料を用いて校正曲線を作成した。

Table 2 Molecular weight marker for calibration curve

Compound	Molecular Weight
Albumin	66000
Carbonic Anhydrase	29000
Cytochrom c	12400
Insulin Chain B	3496
(Pro-Pro-Gly) ₁₀	2530
Neurotensin	1673
(Pro-Pro-Gly) ₅	1274
Angio tensin IV	775
Fibronectin Active Fragment	433
Gly-Gly-Gly	189
Gly-Gly	132
Gly	76

3. 結果と考察

3. 1 アミノ酸の溶出挙動

アセトニトリルの混合割合と各アミノ酸の保持容量との関係を Fig.1 に示す。

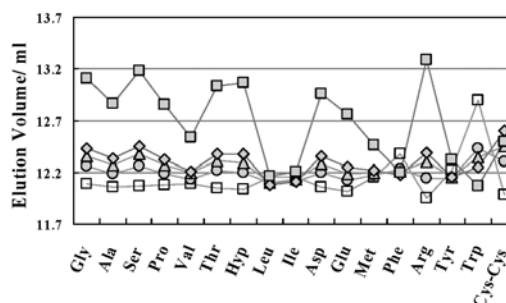


Fig. 1 Effect of acetonitrile concentration for retention volume of amino acid. Acetonitrile concentration: (□) 20%, (●) 30%, (▲) 32.5%, (◆) 35%, (■) 45%

アセトニトリルの割合が増加して移動相の極性が弱くなるにしたがってトリプトファンの保持容量は小さくなり、フェニルア

ラニンも同様の傾向を示した。それ以外のアミノ酸は、逆の傾向を示した。

理想的なクロマトグラフィーによる分離が行われている場合、アミノ酸は分子量が小さいためすべて全浸透限界付近に溶出してくることが予想される。今回検討した条件においては、アセトニトリル 32.5%のときに各アミノ酸が同程度の保持容量で溶出していたため、本実験においては、りん酸緩衝液/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸 = 67.5 / 32.5 / 0.1 の移動相を調製して使用した。

3.2 サイズ排除クロマトグラフィーの問題点

本実験のサイズ排除クロマトグラフィーによる測定で使用した検出波長 $\lambda=220$ nm は、主にペプチド結合をターゲットとするものであるが、この波長においては、アミノ酸自身にも吸収がみられ、その吸収の強さはアミノ酸の種類によって異なることが知られている⁴⁾。それぞれのアミノ酸単体について測定したところ、メチオニン及び芳香族環をもつトリプトファンやフェニルアラニン、チロシンにおいて他のアミノ酸と比較してかなり強い吸収を示した。このため、サイズ排除クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムから試料溶液について平均分子量の算出や特定の分子量の分布割合を求める際に、強い吸収を示すアミノ酸の存在によりアミノ酸の割合が大きく見積もられる可能性がある。また、ペプチド鎖の長さや分子の構成アミノ酸と $\lambda=220$ nmにおける吸収強度との関係も不明であるため平均分子量等を正確に算出することは困難である。

したがって、本実験において得られたクロマトグラムは、各試料の相対的な分子量分布の比較にのみ使用すべきものと考えられる。

3.3 分子量校正曲線

得られた校正曲線を Fig.2 に示す。分子量は、得られたプロットの直線部分を用いて算出した次式から求めた。

$$\text{M.W.} = 8.7 \times 10^6 \exp(-0.8081 X) \quad X: \text{Retention volume}$$

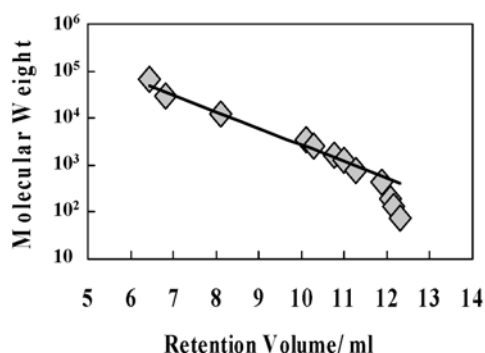


Fig. 2 Size exclusion chromatography calibration curve.

3.4 サイズ排除クロマトグラム

酵素分解溶液、カゼイン及び市販のカゼイン分解物から調製したサンプルのクロマトグラムを Fig.3-8 に示す。

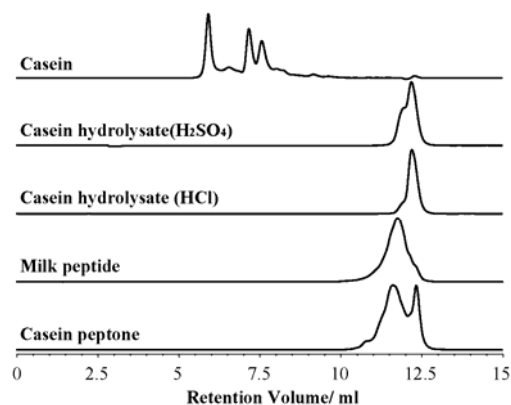


Fig. 3 SE-HPLC of commercial casein hydrolysate.

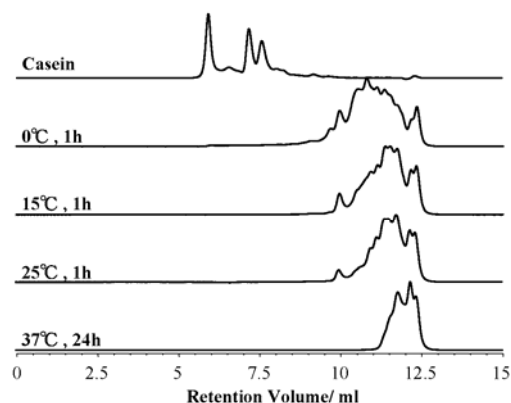


Fig. 4 SE-HPLC of casein hydrolysate. (protease)

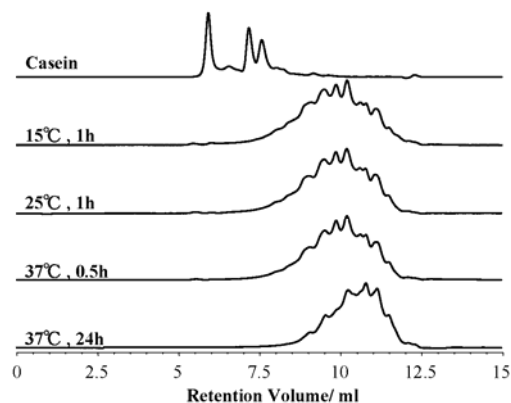


Fig. 5 SE-HPLC of casein hydrolysate. (papain)

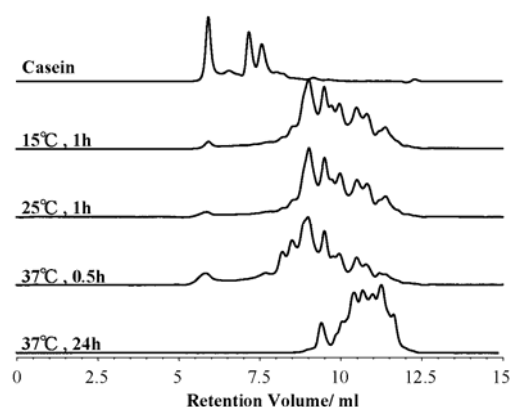


Fig. 6 SE-HPLC of casein hydrolysate. (trypsin)

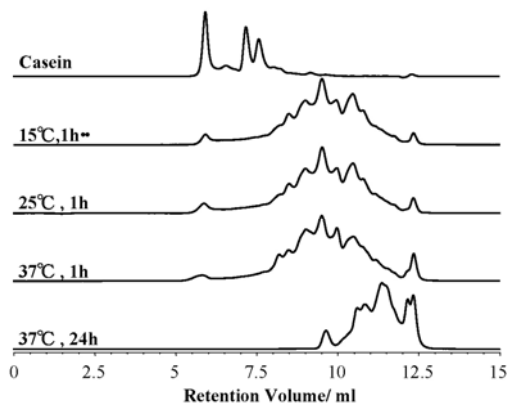


Fig. 7 SE-HPLC of casein hydrolysate. (pancreatin)

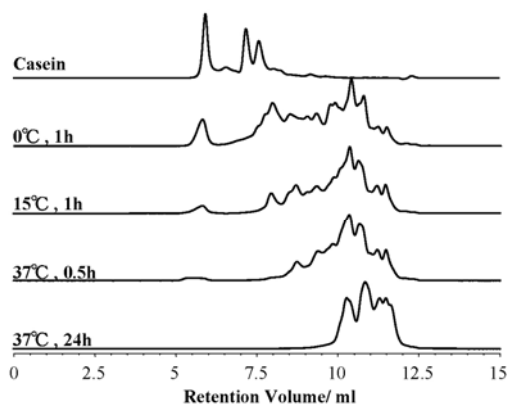


Fig. 8 SE-HPLC of casein hydrolysate. (pepsin)

3.5 たんぱく質の沈殿試験

酵素分解溶液、カゼイン及び市販のカゼイン分解物から調製したサンプルの沈殿試験の結果を Table 3, 4 に示す。本研究においては、沈殿又は白濁した場合に沈殿試験において陽性であると判定した。

Table 3 Results of qualitative examination of proteins by precipitation reaction

	TCA	(NH ₄) ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Tannic Acid	
Casein	+	+	+	+	Protein
Casein peptone	—	—	—	±	Peptone
Casein Hydrolysate (HCl)	—	—	—	—	Amino acid, Peptide
Casein Hydrolysate (H ₂ SO ₄)	—	—	—	—	Amino acid, Peptide
Milk peptide	—	—	—	+	Peptone
Protease					
0°C, 1h	—	±	±	+	Protease
15°C, 1h	—	±	±	+	Protease
25°C, 1h	—	—	—	+	Peptone
37°C, 24h	—	—	—	±	Peptone
Papain					
15°C, 1h	+	+	+	+	Protein
25°C, 1h	+	+	+	+	Protein
37°C, 0.5h	+	+	+	+	Protein
37°C, 24h	+	+	+	+	Protein

+: Precipitate ±: Turbidity —: No change

Table 4 Results of qualitative examination of proteins by precipitation reaction

	TCA	(NH ₄) ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Tannic Acid	
Trypsin					
15°C, 1h	+	+	+	+	Protein
25°C, 1h	+	+	+	+	Protein
37°C, 0.5h	+	+	+	+	Protein
37°C, 24h	—	±	+	+	Protease
Pancreatin					
15°C, 1h	+	+	+	+	Protein
25°C, 1h	+	+	+	+	Protein
37°C, 1h	+	+	+	+	Protein
37°C, 24h	—	±	±	+	Protease
Pepsin					
0°C, 1h	+	+	+	+	Protein
15°C, 1h	+	+	+	+	Protein
37°C, 0.5h	+	+	+	+	Protein
37°C, 24h	—	±	±	+	Protease

+: Precipitate ±: Turbidity —: No change

3.6 AN/TN 比及び平均ペプチド鎖長

AN/TN 比はケルダール法により測定した全窒素とニンヒドリン法により測定したアミノ態窒素より算出した。Fig.9 に算出した AN/TN 比と平均ペプチド鎖長をプロットしたものを示す。図から分かるように AN/TN 比、平均ペプチド鎖長及び沈殿試験の結果の間には関連性があることが確認された。

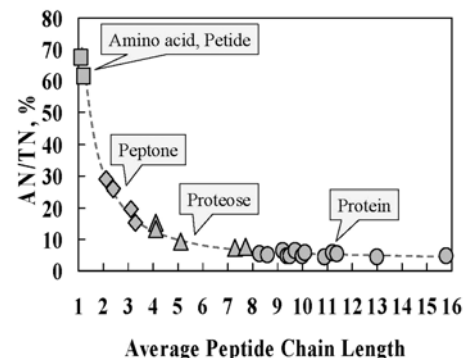


Fig. 9 Relationship between AN/TN and average peptide chain length.

3.7 分解程度の評価

Fig.10 は沈殿試験によりアミノ酸及びペプチドと判定された試料溶液のクロマトグラムである。平均ペプチド鎖長 (PCL) はほぼ 1 に近く、アミノ酸が主体のものであることが推測される。また、保持容量 11.5 ml 以降 (分子量 800 程度以下) にピークが出現した。

次に、Fig.11 は沈殿試験によりペプトンと判定された試料溶液のクロマトグラムである。平均ペプチド鎖長 (PCL) は 2 から 4 の間にあり、保持容量 10—11.5 ml (分子量 800—2700 程度) にピークが出現し、それ以降に分布が見られた。

続いて、Fig.12 は沈殿試験によりプロテオースと判定された試料溶液のクロマトグラムである。平均ペプチド鎖長 (PCL) は 4 から 8 の間にあり、保持容量 9—10 ml (分子量 2700—6000 程度) にピークが出現し、それ以降に幅広い分布が見られた。

最後に Fig.13 は沈殿試験によりたんぱく質と判定された試料

溶液のクロマトグラムである。平均ペプチド鎖長（PCL）は 8 より大きくなり、保持容量 9 ml（分子量 6000 以上）までにピークが出現し、それ以降に幅広い分布が見られた。

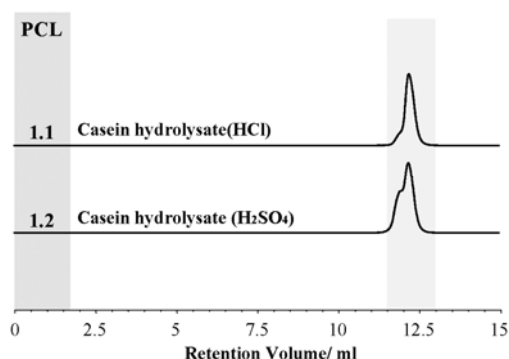


Fig. 10 SE-HPLC of casein hydrolysate. (amino acid, peptide)

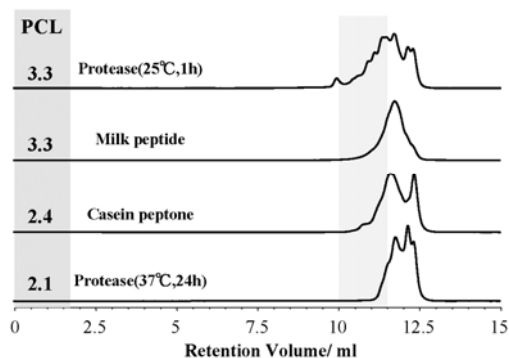


Fig. 11 SE-HPLC of casein hydrolysate. (peptone)

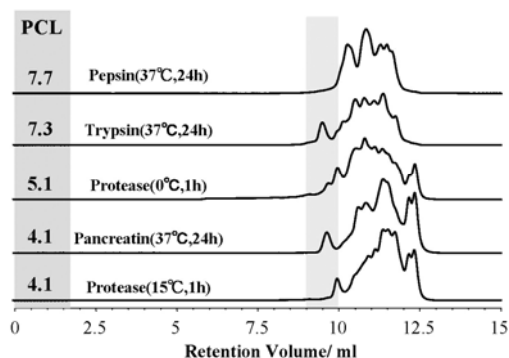


Fig. 12 SE-HPLC of casein hydrolysate. (protease)

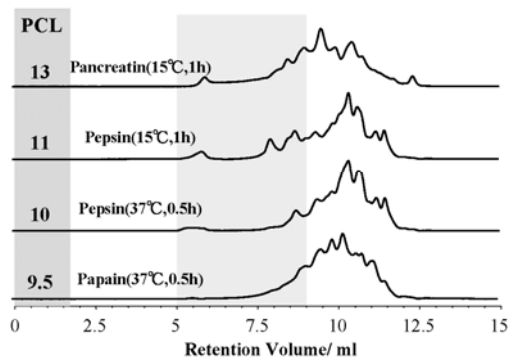


Fig. 13 SE-HPLC of casein hydrolysate. (protein)

今回測定した平均ペプチド鎖長及び分子量分布と沈殿試験の結果をまとめると Table 5 に示すようになる。

Table 5 Comparison of average peptide chain length and molecular weight distribution with results of qualitative examination

Average Peptide Chain Length	Molecular Weight	Results of Qualitative Examination
1-2	-800	Peptide, Amino acid
2-4	-2700	Peptone
4-8	-6000	Protease
8-	6000-	Protein

このように、具体的に数値化することにより沈殿試験では不明確であった加水分解の程度を明確に評価できると考えられる。

しかし、今回の分子量測定では、先に述べたように平均分子量及び特定の分子量の分布割合等の情報を正確に求めるのは困難である。そのため、試料がどの程度の分子量のものが主成分となっているかを正確に判断できないという点では、沈殿試験と同様に不明確な基準となる可能性がある。

一方、平均ペプチド鎖長は具体的な数値を算出することができるため、試料の加水分解の程度を明確に評価することが可能である。したがって、試料が単純にたんぱく質を加水分解したものであれば、平均ペプチド鎖長を測定することにより、分解の程度を明確に評価できると考えられる。

ところが、試料にたんぱく質のような高分子量のもの又はアミノ酸のような低分子量のものが添加されているような場合、平均ペプチド鎖長は添加前のものとは異なる値となることが考えられる。このとき平均ペプチド鎖長のみからは添加しているか否かを判断することは困難である。しかしながら、今回の測定結果においては、加水分解の程度とクロマトグラムのピーク形状及び分布にはある程度の相関が認められたため、これらを基準として試料が単純にたんぱく質を加水分解したものであるか、別の化合物を添加したものかを定性的に判別できると考えられる。

以上のように、サイズ排除クロマトグラフィー及び平均ペプチド鎖長測定のいずれによっても、単独では加水分解の程度を正確に評価することはできないため、従来から行っている AN/TN 比の測定及び沈殿試験の結果も考慮したうえで、加水分解の程度を総合的に判断する必要があるものと考えられる。

4. 要 約

カゼイン加水分解物の分解程度の評価法として、平均ペプチド鎖長の測定及びサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定を検討した。これらの結果に基づいて、加水分解の程度を数量的に評価できるか否かについて検討した。

試料溶液の平均ペプチド鎖長を測定することにより、数量的に分解の程度を評価することが可能であった。さらに、定性的な判断材料として、サイズ排除クロマトグラフィーにより得られるク

ロマトグラムのピーク形状及び分布を用いることで、加水分解の程度を客観的に評価することが可能であると考えられる。

ただし、加水分解の程度をより正確に判断するためには、従来から行っている AN/TN 比の測定及び沈殿試験の結果も考慮した

上で、サイズ排除クロマトグラフィー及び平均ペプチド鎖長の測定結果から総合的に判断する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 日本食品科学工学会編：“新・食品分析法”，P.512(1982)，(光琳)。
- 2) Jens Adler-Nissen：*J.Agric.Food Chem.*, **27**, 1256(1979)。
- 3) G.Brent Irvine：*J.Chromatogr.*, **404**, 215(1987)。
- 4) M.P.C.Silvestre, M.Hamon, M.Yvon：*J.Agric.Food Chem.*, **42**, 2783(1994)。