

牛乳およびヨーグルト中のオロット酸含量の測定

食品学研究室 齋藤 芳枝

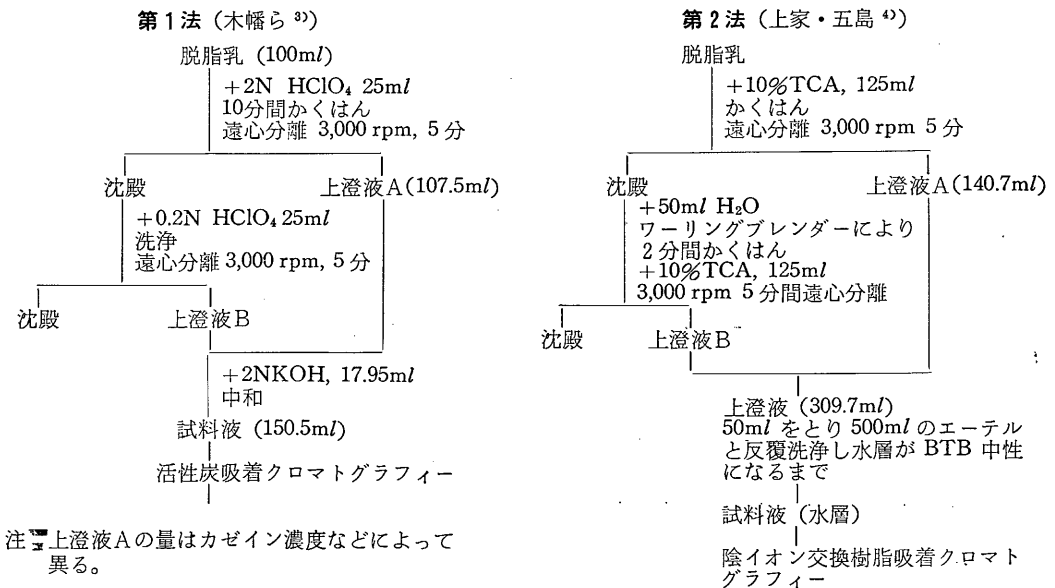
Determination of orotic acid in liquid milk and yoghurt

Yoshie Saito

前 文

オロット酸は1904年に始めて Biscargo および Belloni¹⁾ によって、発見されたものであって、ビタミン B₁₂ として B 群ビタミンに含まれている。Lactobacillus bulgaricus の生育因子の一つとして一般によく知られている、Hallanger²⁾ は微生物定量法により牛乳中のオロット酸含量を測定し、牧場乳および市販びん装乳のオロット酸含量を測定した結果それぞれ 7, 8, 9 および 10.5 mg/100ml の値を得た。びん装乳のオロット酸含量は搾乳直後よりもやや高い値を示している。

また牛乳のオロット酸含量は飼料によってはほとんど影響されないことも確められている。従って乳業用乳酸菌のオロット酸生産性および乳酸菌をスターターとして使用した発酵乳製品のオロット酸含量を測定することは栄養学的な立場からも意義の深いものと考えられる。日本においては、現在までのところでは酸可溶性ヌクレオチドおよびオロット酸の測定に関する。二つの方法が報告されている。一つは木幡ら³⁾ の1962年の報告であり、もう一つは同年に上家および五島⁴⁾ により報告されたものである。前者では脱脂乳を過塩素酸で除蛋白し、過塩素酸を中和して除去したのちに上澄液を活性炭吸着クロマトグラフィーを通過させ、最後に比色する。これらの操作は第1図に示



第1図 オロット酸の分別法

す通りである。全操作は 5°C 以下で行なわねばならない。しかしながらこれらの方法はきわめて複雑でやっかいであり、多数の試料を取扱うのに適当でない。

1961年に辻⁵⁾は p-ジメチルアミノベンズアルデヒドがオロット酸と特異的に反応して橙黄色を呈することを認め、医薬品中のオロット酸の定量に応用した。本研究ではこの反応を牛乳中のオロット酸含量の定量に応用し、詳細に検討した結果、満足すべき成績を得た。

実験方法

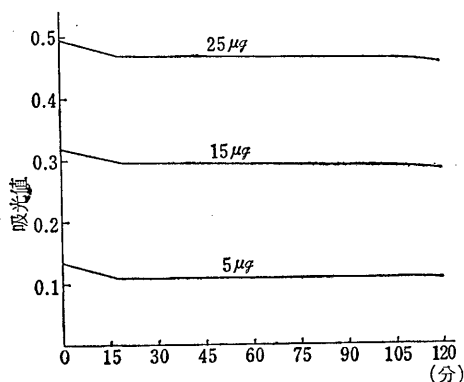
混合乳を脱脂した直後に定量操作を行なった。脱脂乳は適当量の pH2.5 の 0.2M くえん酸緩衝液(クエン酸, 第一クエン酸カリウム)で希釈して使用するが、等量のトリクロル酢酸(TCA)を添加し、12時間後に東洋濾紙 No.6 で濾過するかの何れかの方法によって処理した。ただし濾過によって得られた濾液は透明でなくてはならない。濾液は必要に応じてくえん酸緩衝液で希釈した。p-ジメチルアミノベンズアルデヒド反応にあたっては共栓試験管を使用した。試験管は長さ 17cm 以上のものでなくてはならない。短い試験管は不適當である。試料 1ml を試験管にとり、2ml のくえん酸緩衝液および 0.3ml の飽和臭素水を添加し、密栓して 4~5 回転して反応せしめたのちに過剰の臭素を還元するのに必要な量だけ 0.7%チオグリコール酸ナトリウム溶液を添加する。(通常は 0.4ml で充分である)。次に水溶液中で 50°C に加温して 2.5% p-ジメチルアミノベンズアルデヒドの n-プロパノール溶液(DAB試薬)を添加し、試験管を冷却したのちに、8ml 酢酸 n-ブチルを添加し、振とうして呈色を酢酸 n-ブチル層に移行させたのちに、伊藤超短波 QU-2 型分光光度計により 460m μ で吸光度を測定した。この場合に対照としては試料無添加物について同様の操作を行なったものを使用した。結果は光学濃度(O. D.)で示してある。

実験結果

1 呈色の安定性

オロット酸溶液 3 種類(濃度約 8.24 または 40 μ g/ml) DAB を試薬と反応させて、呈色度を測定した、結果は第 2 図に示す通りである。

呈色は酢酸 n-ブチルによる抽出後 30~120 分間は安定であった。従ってこの期間内に比色を行なえばよいわけである。



第 2 図 DAB 試薬による発色後の放置時間が吸光度に与える影響

第 1 表 オロット酸の DAB 試薬との反応に対するトリクロル酢酸の影響

実験番号	TCA 濃度(%)	吸光度
1	0	0.300
2	2	0.298
3	12	0.171

2 トリクロロ酢酸の存在の影響

TCAを除蛋白剤として添加した場合⁴⁾には木幡らは、滷液中のTCAはエーテルによる反覆抽出法で除去している。この抽出操作が本法においても必要かどうかについて確めるために下記の実験を行なった。

約 24 μ g のオロット酸を含む溶液約 5 ml に 4% または 24% トリクロロ酢酸溶液を等量添加した。同様の水を加えたものを対照とし、各 1 ml を取ってオロット酸含量の測定操作を行なった。結果は第 1 表に示す通りである。2% TCA の存在はオロット酸と DAB 試薬の反応に影響しなかったが、12% の存在は相当呈色度を減退させている。本実験より TCA 濃度が 2% 以下ならば除去操作は不要であることが認められる。

3 オロット酸含量の測定のための標準曲線の算定

1 ml 中に 2.5~25.0 μ g のオロット酸を含む試料液を調製し、その光学濃度を測定した結果より最小 2 乗法により直線の回帰式を得た、この回帰式は X の範囲 0.06~0.35 の間で使用することができる。

$$Y = 77.56X - 0.26$$

X : 光学濃度 (O.D.) Y : オロット酸含量 (μ g)

4 牛乳中に存在する他の酸可溶性ヌクレオチドの呈色性

酸可溶性ヌクレオチドの中では牛乳ではウシの初乳、人乳、ヒトの初乳およびヤギ乳に比較してオロット酸含量が極端に多い。山内ら⁶⁾は牛乳中の酸可溶性ヌクレオチドの 97.0% はオロット酸であり、2.0% が 5' CMP (シチジン-磷酸塩) 残りの 1.0% が 3', 5' 環状 AMP (アデノシン-磷酸塩) であると報告した。彼らはこの他にも痕跡程度のシチジン=磷酸塩-コリンを検出している。しかしグアノシン化合物は認められなかった。従ってここでは 5'-CMP および 3', 5'-環状 AMP の DAB 試薬に対する反応性について検討した結果について報告する。両者とも 250 μ g までは DAB 試薬により橙黄色の呈色を示さないことが認められた。

5 牛乳中のオロット酸含量の測定への応用

最初に TCA により除蛋白を行なった。4% の TCA 5 ml を等量の脱脂乳に添加し、滷過によって沈殿を除却したのちに、滷液の 1 ml をとって反応操作を実施した、通常は酢酸-n-ブチル溶液は少々濁りが認められるが、これは滷過によって取除かれる。この際の滷紙の種類について検討した結果は第 2 表に示す通りである。滷紙の種類の違いの光学活性におよぼす影響はごく僅かであって問題にならない。従って酢酸-n-ブチルの滷過に際してはもっとも滷過性の速やかな滷紙東洋 No.5A を使用することに定めた。もしオロット酸の 1 部が 4% TCA 添加の際に沈殿するならば、滷液のオロット酸含量は脱脂乳の場合よりも低い値を示すはずである。この点について確かめるために直接定量法と TCA 沈殿法について比較検討した。直接法の場合には脱脂乳 2 ml をくえん酸緩衝液で 25 ml に希釈し、その 1 ml を試料として使用した。結果は第 3 表に示す通りである。

No.2 と No.1 の光学濃度比は 6.20/7.29=0.8510 であり、すなわち 2% TCA 上澄液には全オロット酸の 85.10% が存在することになる。残りの 15% 近くはカゼインとともに沈殿したものと考えられる。従って 2% TCA 上澄液 (または滷液) 中のオロット酸含量脱脂乳中の全オロット酸

第2表 オロット酸の定量の際の酢酸 *n*-ブチルの
 濾過に対する濾紙の種類の影響

実験番号	濾紙	濾過性	濾液の光学濃度 (o.b)
1	東洋 No. 6 (9cm)	きわめて遅い	0.301
2	Toyo No.5B(9cm)	遅い	0.300
3	Toyo No.5A(9cm)	かなり速い	0.296

第3表 種々の方法による牛乳のオロット酸
 含量の測定

実験番号	実験方法	オロット酸 (mg/100ml)
1	直接法	7.29
2	2% TCA 上澄液*	6.20**
3	木幡ら ³⁾ の方法	4.46
4	上家, 五島の方法	7.34

* 3,000 rpm, 5分の遠心分離のかわりに濾過を行なった。

** 脱脂乳 100ml より 172.4ml の 2% TCA 上澄液を得た。従ってその比率 1.724 をかけてもとの脱脂乳中の値とした。

含量を示すものではないことが示される。木幡³⁾ および上家, 五島⁴⁾ はオロット酸を完全に回収するために沈殿の洗浄を行なっているが, この操作はやはり必要であることが認められる。木幡法³⁾ および上家, 五島法⁴⁾ によるオロット酸の回収結果を第3表に示してある。上家, 五島法⁴⁾ によれば, オロット酸をほぼ 100% 回収することができるが木幡法ではかなり低い値が得られる。いずれにせよ, 直接法は牛乳中のオロット酸を定量するのにきわめて簡単で正確な方法であることが確められ, 以下の実験では本法を採用することに定めた。

6 市販びん装乳中のオロット酸含量の測定

東京において市販されている市乳のオロット酸含量を直接法によって測定した結果は第4表に示す通りである。オロット酸含量は 6~11mg/100ml の範囲であった。殺菌条件とオロット酸含量の

第4表 市販殺菌乳のオロット酸含量

銘柄	殺菌条件*	オロット酸 (mg/100ml)
雪印 ミネラル	110°C 1秒	10.65
明治	130°C 2秒	6.52
森永	130°C 2秒	6.64
名糖	75°C 15秒	6.82
グリコ	130°C 2秒	7.85
保証	75°C 15分	6.27
全酪	80°C 15分	10.55
萩原デラックス	75°C 15分	10.73
興真	75°C 15分	6.05

* 殺菌条件はキャップに示されたものを引用した。

第5表 市販ヨーグルトのオロット酸含量

銘柄	オロット酸 (mg/100g)
雪印	4.29
明治ハネー	3.71
森永ハネー	3.58
名糖	4.22
全酪	1.26
小岩井ハネー	3.62
グリコパモナ	3.43
愛光社スイート	2.66
二幸	1.35
興真ハネー	4.18
保証(カルピス)	3.77

間には何らの関係も認められなかった。

7 市販ヨーグルト中のオロット酸含量

ヨーグルト中のオロット酸含量の測定にDAB法を応用した。10gのヨーグルトとくえん酸緩衝液 10ml をワーリングブレンダーでかくはんし、全量を 25ml となして均質な懸濁液をうる、その 1ml を採取して測定操作に移った。結果は第5表に示す通りである。市販ヨーグルトのオロット酸含量は相当の変動があることが認められる。ヨーグルト中の蜂蜜にはオロット酸の存在しないことが確かめられている。意外なことに市販ヨーグルトのオロット酸含量は市乳よりもかなり低いことが認められる。オロット酸含量の乳酸発酵による変化については別に検討する予定である。

要 約

牛乳中のオロット酸の分離に関しては1962年に過塩素酸沈殿法およびトリクロル酢酸(TCA)沈殿法の2種が存在する。しかしながら、p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを使用する場合には、除蛋白は不要であり、オロット酸は直接定量される。オロット酸のDAB試薬との反応は特異的であって牛乳中の酸可溶性ヌクレオチドによって影響されない。そのみならず、呈色は安定であり、直接法は多数の試料を取扱うのに適している。牛乳中のオロット酸の約85%は2%TCA溶液に存在する。また沈殿を10%TCAで洗浄すれば100%回収することが出来る。しかしこの方法は繁雑であり、多数の試料を取扱うのに適当ではない。市販びん装乳およびヨーグルトのオロット酸含量を直接法により測定した結果はそれぞれ6.05~10.73mg/100ml および1.26~4.29mg/100gであった。

文 献

- 1) G. Biscargo, E. Belloni : *Ann. Soc. Chim. Milano* 11, 18 (1904)
- 2) L. E. Hallanger, J. W. Laasko, M. O. Schultze : *J. biol. Chem.* 202, 83 (1953)
- 3) A. Kobata, Z. Sazuoki, M. Kida : *J. Bio. Chem.* 51 (4) 277 (1962)
- 4) J. Johke, T. Goto : *J. Dairy Sci.* 45 (6) 735 (1960)
- 5) 辻和之 : 薬学雑誌 81 (11) 1655 (1962)
- 6) 山内逸郎, 木幡 陽, 鈴置二郎 : 小児科 臨床 15 (4) 323 (1962)