

關於皮蛋成份及營養價值之研究

Lysinoalanine之鑑定與分離

李水源

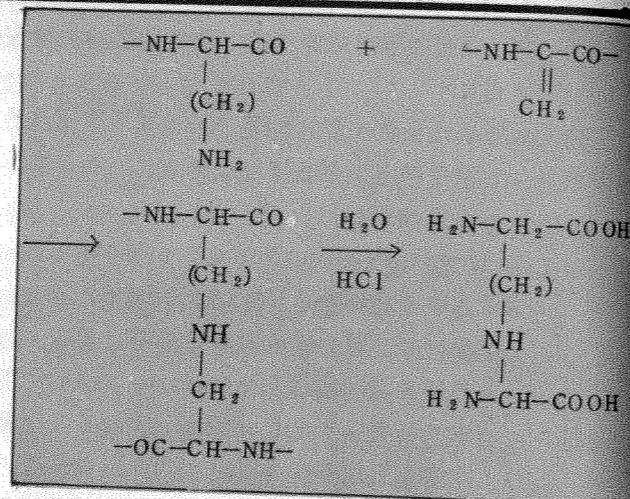
摘要

皮蛋蛋白部份 (Egg white) 之酸水解液以氨基酸自動分析器之短柱分析其鹼性氨基酸時，在 lysine 之前面出現兩種不明之氨基酸，其中較靠近 lysine 者，其位置與合成的 lysinoalanine 相同。此氨基酸另以較多量皮蛋蛋白粉末為材料予以酸水解，並以 Dowex 50 column 分離後，以薄層及濾紙色層分析法鑑定確為 lysinoalanine。皮蛋蛋白部份的 lysinoalanine 含量以分割曲線 (fractionation curve) 中對應 Peak 之面積估計，為總皮蛋量之 1.5%。

一、緒論：

1964 年 Sokolovsky & Patchornik¹ 發現 S-dinitrophenylated reduced R Nase 以 alkali 處理再經 acid hydrolysis 後以 Spinco automatic amino acid analyzer 之 Short column 分析，結果在 lysine 之前出現一個 new amino acid，其量為每一分子 R Nase 得了 mole，而 Lysine 只有 6.5 mole (native R Nase 為 10 mole) dehydroalanine 只有 5.5 mole (native R Nase 為 8 mole) 而 fully acetylated S-DNP-R Nase (Lysine 之 ϵ -H₂ group 均被 block) 則不產生 new amino acid，且 Lysine residue 成爲 9.4，dehydroal- amine 成爲 7.6。

因此推測可能 3 mole 之 unprotected Lysine residue 與 3 mole 之 dehydroalanine residue 反應形成 3 mole 之 new amino acid，而假定 Lysine Residue 之 ϵ -NH₂ group 與 dehydroalanine 反應形成 DL- α -amino- β (- ϵ -N-L-Lysine) propionic acid。



1964 年 Z. Bohak² 合成 DL- α -amino- β (- ϵ -N-L-Lysine) propionic acid，確立 alkali-treated RNase 所得之 new amino acid 為 DL- α -amino- β (- ϵ -N-L-Lysine) propionic acid 而給予 trivial name "Lysinoalanine"。

1967 年 Woodard³ 發現飼以含 alpha protein (註 1) diet 之 rat 可產生 renal lesion，其特徵為：在 proximal tubule 之 straight portion 產生 nephrocalcinosis 及 cytomegalic change 這種 lesion 並不能因增加 choline, methionine 或 Vitamine B₁₂ 之每天攝取量而改善，而飼以 methionine-deficient casein diet 並不能引起 cytomegalic change renal tubule cytomegalic change 之特徵為增加 cell 之 nucleus 及 cytoplasmic portion，nuclear portion 之增加與 nuclear enlargement 成直線關係，且 large unclear 常增加 deoxyribonucleic acid 含量。

1968 年 De Groot & Slump⁴ 以 PH 12.0, 40°C 4 小時處理之相當高蛋白之飼料，飼以 rat 並無 Clin-

ical 或 biological abnormalities，只見有些 females 之 nephrocalcinosis 增加，此種變化可因加入 dietary calcium 防止之。

1969 年 Woodard⁵ 以含 20% 之 alpha protein 每天給予斷乳老鼠，只一週，即有 biological effect 開始時，在 kidney cortex 之 inner stripe 之 mitotic activity 增加，在第二週末時，達至最大，以後則降低。隨著 mitotic activity 之增加 inner stripe 之 polyploid nuclei 之數目亦增加，直至第四週時，亦見 cytomegalic change 測定 deoxyribonucleic acid (DNA) 及 protein bound sulfhydryl group (chromosomal proteins) 之結果顯示在 low mitotic activity 之期間有許多 nuclei 之 chromosome 含量不正常，normal 及 enlarged nuclei 之 DNA 合成速率並無不同，且 cytomegalic cell 在 DNA 合成開始之後並不進行 numerous cell divisions，體積增加之 nuclei 有 DNA 之合成，但核之脹大在 DNA 合成停止之後，仍繼續進行，結果導致 cytoplasm 之 invagination 而形成 "intranuclear inclusions" proximal tubules 之 Fatty metamorphosis。在實驗飼料開始給予之後，很快即出現而在整個實驗過程中持續不斷。

1973 年 Woodard⁶ 將 alpha protein 以水、methanol、chloroform、Hexane 抽取後，飼以老鼠，結果 100% 之實驗動物有 megalocytic change 此表示負責 cytomegalia 及 pharmacologic agent 為 indigenous to soybean，水洗過之 alpha protein 以 pronase 水解得，amino acid 及小分子量之 peptide 再以 organic solvent 抽掉放出之 alkaloid Bioassay 之結果顯示 toxicity residue 在 amino

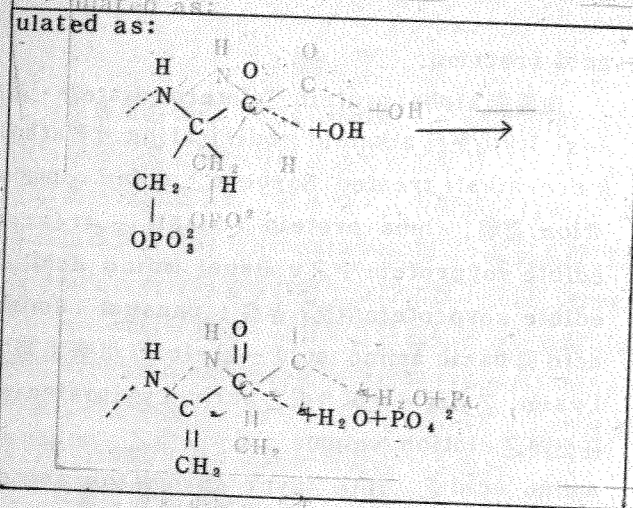
acid fraction.

由製造 alpha protein 之 intermediate 看，證明 toxicity 係來自 alkaloid modification。比較 alkali 及 non-alkali treated Soybean 之 amino composition，證明：alpha protein 及 alkali-treated edible soyprotein 中之 unusual amino acid 在 edible soyprotein 中並不存在，unusual amino acid 與 basic amino acid 一起 elute 出來出現在 Lysine 之前面，且與合成之 pure Lysinoalanine 在相同之 elution volume 出現。分離之 unusual amino acid 之 thin layer chromatographic properties 亦與合成之 pure lysinoalanine 相同。這些證據證明：cytomegalic change 之 toxicity 係由 Lysinoalanine 所生。

1974 年 De Groot⁷ 以含 20% alpha protein 之 diet 飼以老鼠，結果在一般外觀，生長，食物效率，血液學，血液生化學，腎臟機能，尿成分，器官重量與 control 組並無不同，且無大體及組織上之病理發現。

(Dephosphorylation of casein by alkalis, Laurens Anderson; John J. Kelley; J. Am. Chem. Soc. 81: 2275, 1959) Phosphoprotein 如 casein 及 vitellin 之 phosphate 可被 alkali cleaved. phosphate 以 ester linkage attach 於 phosphoprotein 之 serine residue，而 phosphate ester 對 alkali 為 resistance. Mecham 及 Olcott 證明 phosphate 之移除乃經由 β -elimination 而非 hydrolysis. Anderson & Kelley (本篇) 亦證明 β -elimination hypothesis.

The β -elimination of phosphate from a serine residue in a protein would be form-

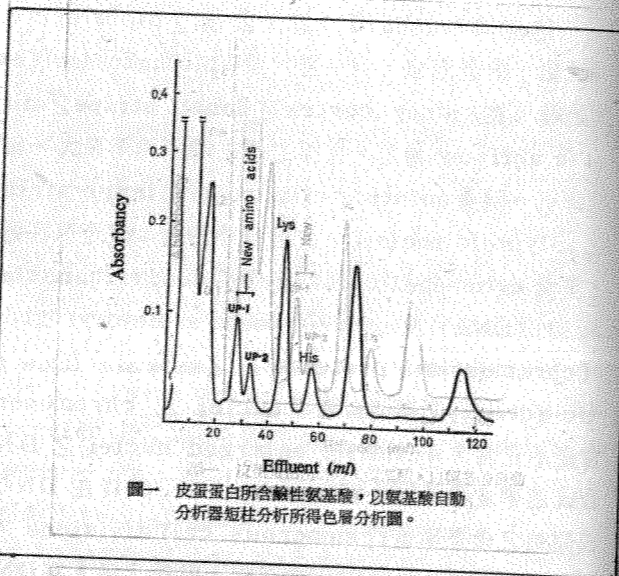


實驗步驟與結果

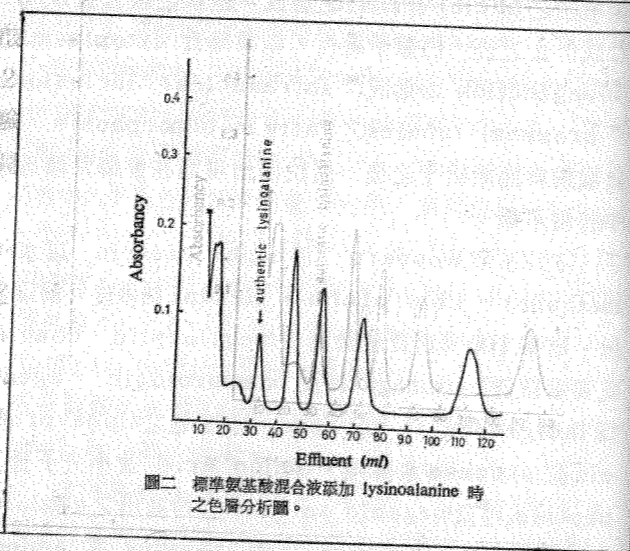
一、皮蛋蛋白中Lysinoalanine之鑑定：

皮蛋蛋白 (Egg white) 之酸水解液以氨基酸自動分析器作分析，在 lysine 之前出現兩個不明氨基酸 (圖一)，流洗體積 22ml (UP-1) 及 30ml (UP-2) 處，後者與合成的 lysinoalanine 出現之位置 (圖二) 相同。又加入合成 Lysinoalanine 的皮蛋蛋白酸水解液，以相同方法分析的結果，相當於圖一中 UP-2 之 Peak 升高，以外無其他變化 (圖三)。由此等實驗可推想，UP-2 部份之氨基酸為 lysinoalanine。因圖二已知各氨基酸量，又圖一與圖三的 lysinoalanine (UP-2) 以外各氨基酸實際含量相同，所以比較各 Peak 面積即可算出皮蛋蛋白酸水解液中 Lysinoalanine 之含量與百分比，示於表一。在圖三實驗中注入 Column 的 lysinoalanine 量為 0.027 μM，但換算每 mg 酸水解物 (乾重) 中所含 lysinoalanine 的量為 0.05 μM (表一)，結果顯示皮蛋蛋白酸水解物之 lysinoalanine 含量為 0.064 μM/mg，添加 0.05 μM/mg lysinoalanine 之後測得的量為 0.107 μM，與估計值 (0.064 μM + 0.050 μM = 0.114 μM) 相當接近。皮蛋蛋白中之 lysinoalanine 含量估計為 1.5%。

oalanine 之後測得的量為 0.107 μM，與估計值 (0.064 μM + 0.050 μM = 0.114 μM) 相當接近。皮蛋蛋白中之 lysinoalanine 含量估計為 1.5%。



圖一 皮蛋蛋白所含鹼性氨基酸，以氨基酸自動分析器短柱分析所得色層分析圖。

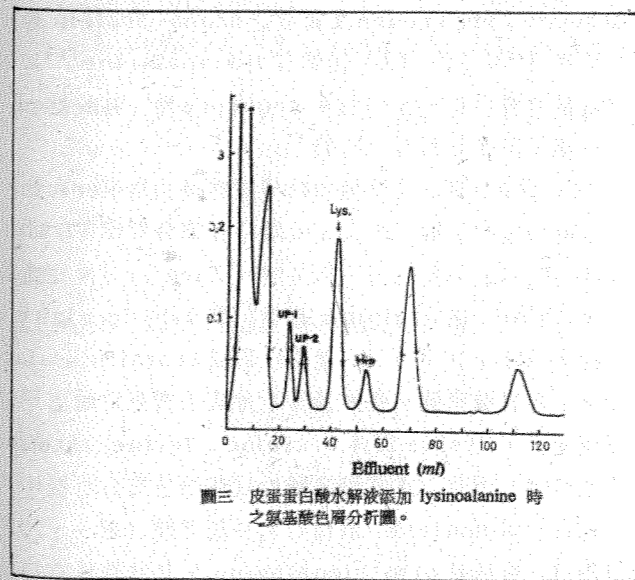


圖二 標準氨基酸混合液添加 lysinoalanine 時之色層分析圖。

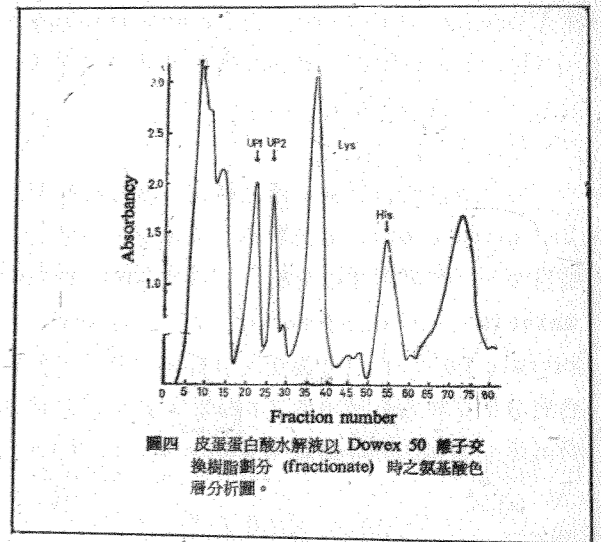
表一 皮蛋蛋白之 Lysinoalanine 含量
Table 1 Lysinoalanine content of pidan egg white

Sample	Lysinoalanine content (μmole / mg)	Percent of LAL in the sample (%)
Pidan egg white	0.064	1.5
Authentic LAL added	0.050	—
Pidan egg white+LAL	0.107	2.3

註：用於分析的皮蛋蛋白樣品含有 = 0.53 mg 蛋白質，所加入 LAL 為 0.27 μM。表中數字是換算為 μM/mg 者。LAL : Lysinoalanine



圖三 皮蛋蛋白酸水解液添加 lysinoalanine 時之氨基酸色層分析圖。



圖四 皮蛋蛋白酸水解液以 Dowex 50 離子交換樹脂劃分 (fractionate) 時之氨基酸色層分析圖。

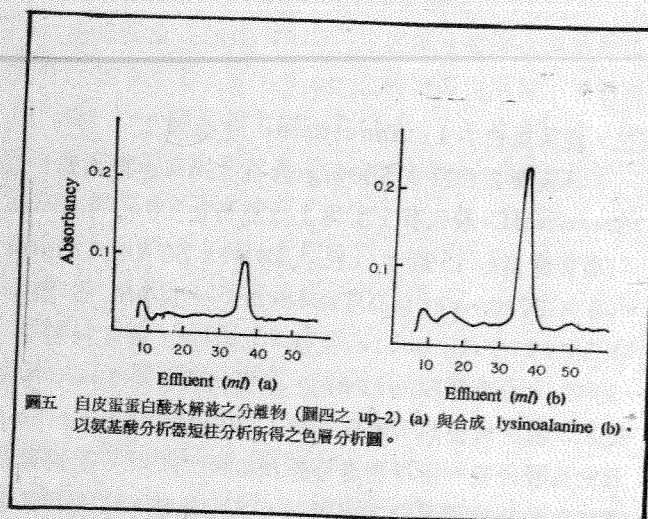
二、皮蛋蛋白中 Lysinoalanine 之分離：

稱皮蛋蛋白粉末 500 mg (含有 350 mg 蛋白質) 以 3 ml 6 N HCl 酸水解，所得上清液再加 300 mg Sucrose (最後濃度約 15%)，注入 Dowex 50 X 12 Column (2 × 20 cm, resin 高度為 18 cm)，以 pH 5.28 0.35 N citrate buffer 流洗。Column 溫度保持在 50°C，流速為 60 ml/hr，每根試管收集 5 ml，共收集 80 根。每根試管取 0.1 ml，以 ninhydrin method 測氨基酸含量。所得色層分析圖如圖四所示。此圖與氨基酸自動分析器所得者 (圖一、二) 比較，以鑑別各峰，再以濾紙色層分析法，利用 ninhydrin - cupric nitrate 溶液為顯色劑，核對 lysine 及 histidine 位置。上述分離操作反覆四次，收集 lysine 前面之 fraction (UP-2) 減壓濃縮至約 5 ml。把此濃縮液再

注入 Dowex 50 Column, 以 1 N ammonia 溶液流洗後, 將流洗液減壓濃縮, 放入硫酸乾燥器中乾燥即得淡棕色粉末, 供進一步鑑定。

三、分離物之鑑定:

1 以氨基酸自動分析器之鑑定: 取分離物溶於 pH 2.2 citrate buffer 後離心, 取部份上清液注入氨基酸自動分析器之短柱中分析。另取 0.2ml lysinoalanine 溶液 (0.658 $\mu\text{mole/ml}$) 與 0.6ml 的 pH 2.2 citrate buffer 混合後注入分析器中分析, 比較所得色層分析圖如圖五。兩者之 peak 同在流洗體積 36ml 時出現; 顯示此分離物為 lysinoalanine。



圖五 自皮蛋蛋白酸水解液之分離物 (圖四之 up-2) (a) 與合成 lysinoalanine (b) 以氨基酸分析器短柱分析所得之色層分析圖。

2 以薄層色層分析法之鑑定: 取上述淡棕色分離物及合成的 lysinoalanine 之溶液分別點在 silica gel 薄層板上, 以 butanol : acetic acid : water (BAW) (= 4 : 1 : 2, v/v/v) 或 acetone : urea :

water (AUW) (= 60:0.5:40, v/w/v) 混合液為展開劑做薄層色層分析。所用顯色劑為 0.2% ninhydrin 的 acetone 溶液。分離物及合成的 lysinoalanine 先以 BAW 展開 (4 小時, 展開距離 17 cm) 其 R_f 值皆為 0.06; 再以 AUW 展開 (4 小時, 展開距離 17.5 cm), 前者 R_f 值為 0.39, 後者為 0.40。此值皆為果亦進一步提供分離物為 lysinoalanine 的有力證據。

3 以濾紙色層分析法鑑定: 分離物及合成的 lysinoalanine 再以 whatman No. 1 濾紙 (8.4 x 30 cm) 做色層分析。以 BAW 為溶劑展開 6 小時, 展開距離為 29 cm, 再以 0.2% ninhydrin 溶液顯色, 結果兩者之 R_f 值皆為 0.03。

討論

Ribonuclease, lysozyme, papain, serum albumin, phosphovitin 及黃豆之 alpha-protein 等以鹼處理 (pH 12-13) 後皆有 lysinoalanine^{12,4} 產生。當蛋白質中有 -cys-lys-sequence 時, 在鹼性 pH 下可能易形成此種新氨基酸¹²。

Ziegler 等¹² 又發現由絹分離的蛋白質 Sericin, 以鹼處理後酸水解, 再以氨基酸分析器分析時在 lysinoalanine 之前面有另一氨基酸。Ziegler 等推測此為 ornithine (由 arginine 產生) 與 dehydroalanine (由 cystine 或 serine 產生) 形成的 ornithinoalanine。本實驗室何、張、黃等¹³ 曾報告鴨蛋以鹼處理製成皮蛋後, lysine 以外 arginine, serine, threonine 等也減少。因此上述實驗之鹼性氨基酸色層分析圖中, 出現在 lysinoalanine 前面的另一氨基酸 (圖一、四之 UP-1) 可能是 ornithinoalanine, 其真實性有待進

一步之證明。

皮蛋是否因含有 lysinoalanine, 若大量食用對動物腎臟有毒性亦有待進一步研究。

參考文獻

1. A. Patchornik, and M. Sokolovsky, J. Am. Chem. Soc., 86:1859 (1964)
2. Z. Bohak, J. Biol. Chem., 239:2878 (1964)
3. K. I. Ziegler, J. Biol. Chem., 239:PC2713 (1967)
4. J. C. Woodard and M. R. Alvarez, Arch. Pathol., 84:1153 (1967)
5. J. C. Woodard and D. Short, J. Nutr., 103:569 (1973)
6. J. C. Woodard, Lab. Invest., 20:9 (1969)
7. A. P. De Groot and P. Slump, J. Nutr., 98:45 (1969)
8. V. J. Feron, A. P. De Groot, L. Van. Beek. Nutr. rev. 32:190 (1974)
9. J. L. Bailey, In "Technique in protein chemistry" P. 26 (1972)
10. D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore, Anal. Chem. 30:1190 (1958)
11. S. Moore and W. H. Stein, J. Biol. Chem., 211:907 (1954)
12. K. L. Ziegler, I. Melchert, C. Lurken. Nature, 214:404 (1967)
13. 何威德、張鈺美、黃伯超: 中國農化會誌, 13:58 (1975)

迦南餐屋

CANAAN

銘謝賜顧

家園式自助餐

舒潔 寧靜

飲料

歡迎光臨

中國醫藥學院後面斜對面

台中市育德路 45 號

電話: 261903