

# 鹿児島黒豚の遊離アミノ酸の定量及び「カルノシン」測定法の確立

竹下 温子, 松下 恵子, 竹野あいこ, 瀬戸口賀子

## 要 旨

鹿児島黒豚は奄美在来の島豚と英国のバークシャー種を掛け合わせ、明治時代から何百年もの間、改良を積み重ねてきた鹿児島県独自の黒毛豚で、鼻、尾、四肢の6か所が白いことから「六白」と呼ばれ親しまれている。その肉質は筋肉繊維が多くきめ細かいため歯切れがよく、脂は他の豚肉に比べて融点が高くべとつかず、カルノシン、遊離アミノ酸が多いため、うま味・甘味に富んでいる。また、グルコースやその他の中性糖を多く含んでいるので、おいしさに深みがある<sup>1)2)3)4)</sup>。

カルノシン (Carnosine: 別名  $\beta$ -アラニル-L-ヒスチジン) は、近年、抗酸化作用や疲労回復の面から非常に注目を浴び、アルツハイマーを予防する可能性さえ示唆されている<sup>5)6)7)</sup>ジペプチドである。このカルノシンは、以前は牡蠣のうま味成分として知られていたが、現在その影は薄くなった。鹿児島黒豚肉は、この牡蠣のうま味成分のひとつと考えられていたカルノシンが非常に多く入っており、他の豚肉に比べ美味しいといわれる所以はそこにあると言われている。よって本研究では鹿児島黒豚の遊離アミノ酸およびカルノシンの測定を行うことを目的とし、OPA プレラベル法<sup>8)9)</sup>による HPLC 測定法の確立を行った。その結果、OPA プレラベル法でカルノシンの測定を行うことができ、また鹿児島黒豚肉に含まれるカルノシン含量は、他の遊離アミノ酸より非常に多いことがわかった。よって今後はこの方法を用い、多種の豚肉の遊離アミノ酸およびカルノシン含量を測定し、鹿児島黒豚肉は、旨いだけでなくアンチエイジングにも深くかかわることを示唆できれば、さらなるブランドの確立に貢献できると考えられる。

**キーワード:** 鹿児島黒豚, カルノシン, 遊離アミノ酸

## はじめに

カルノシンは  $\beta$ アラニンとヒスチジンからなるジペプチドであり、動物の脳、心臓、胃そして特に骨格筋中に多く存在する物質である。また、動物の骨格筋中の濃度は種類により異なり、カルノシンと似たような構造を持つアンセリン (Anserine:  $\beta$ -アラニル-L-メチルヒスチジン) という物質と合わせてヒスチジン含有ジペプチドと呼ばれている。ただし、人間の骨格筋ではほぼ全量がカルノシンとして存在しており、動物種によるこれら存在形態の違いの理由は現在も解明されていない。カルノシンやアンセリンは、渡り鳥、かつお、マグロなどの大型回遊魚の過酷で驚異的な運動を可能にし、哺乳動物では老化を抑え、生命維持に必要な生体組織を守る重要な機能を持っていると考えられており、現在では、アンチエイジングの一つと考えられている。鹿児島黒豚は、カルノシンを多く含む食品であると言われているが、その報告はない。よって我々は、黒毛豚肉を用いて、本当にカルノシンが多く含まれているのか、またその測定法の確立を行うことを目的とした。

## 実験材料および方法

### 1. 実験材料

実験材料は、仕入れ経由に信頼がおけ、かつ飼育先が

わかっている鹿児島市内の精肉店にて、屠殺後、急速冷凍保存してあった鹿児島黒豚肉を購入し解凍して用いた。

### 2. 実験方法

以後の実験操作に用いる、ガラス器具はすべて一昼夜 1% 硝酸につけ、蒸留水 (HPLC 用) にて繰り返し洗浄し、乾燥させたものを用いた。また蒸留水はすべて和光純薬 (HPLC 用) を用いた。

#### 2-1 遊離アミノ酸の抽出法

鹿児島黒豚肉の旨味成分であるカルノシン及び遊離アミノ酸測定のため、鹿児島黒豚肉を試料として遊離アミノ酸の抽出を行った。抽出法は OPA プレカラム誘導体化法の前処理法<sup>9)</sup>に従って行った。

### 3. 遊離アミノ酸の薄層クロマトグラフィー (TLC)

2-1 より抽出された遊離アミノ酸およびカルノシンを 1~6  $\mu$ l ずつ保存日数に従って薄層プレート (Silica gel 60 (MERCK 社)) にスポットし、n-プロパノール: 水 = 128:72 で 1 元展開し、風乾後、ブタノール: 酢酸: 水 = 150:50:50 にて 2 次元展開を行った。その後、風乾してニンヒドリン溶液 (100mg/98% エタノール 100ml) を噴霧し、90℃で 5 分加熱し発色させた。

Table 1 移動相の濃度勾配

Time	溶離液 A	溶離液 B
0.0	80	20
9.0	70	30
9.1	55	45
17.0	55	45
17.1	45	55
25.0	45	55
28.0	0	100
38.0	0	100
38.1	80	20
50.0	80	20

4. 遊離アミノ酸の高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

4-1 試薬の組成

試薬はすべて和光純薬製のものをを用いた。

・ HPLC 用 溶離液

溶離液 A (50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5)) 溶離液 B (メタノール / テトラヒドロフラン (90/10))

・ Sample 標準液

アミノ酸標準液 (10nM/ml) カルノシン標準液 (10nM/ml) MIX 標準液 (10nM/ml)

・ Sample 調整用試薬

0.4M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0)

0.1% HCL 溶液

・ OPA プレラベル用試薬

OPA 反応液：0- フタルアルデヒド / メタノール / 2-メルカプトエタノール / 0.4M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0) (用事調整)

4-2 装置

高速液体クロマトグラフ：Waters 510

蛍光検出器：Waters 470

分析カラム：CrestPak C18S

4-3 測定条件および方法

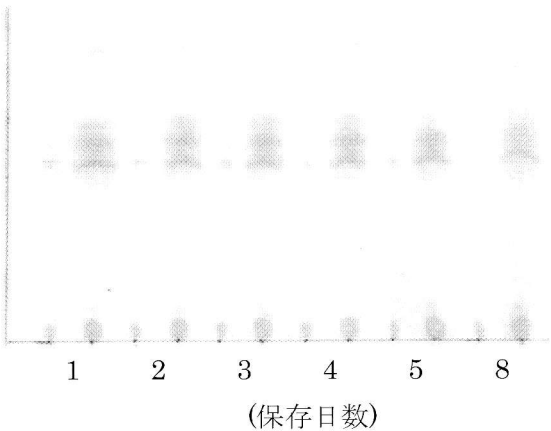
流速：1.0ml/min

注入量：10  $\mu$ l

溶離液 A を蛍光検出器が安定するまで流し、試料液をインジェクトした後は、溶離液 A と B を Table1 の条件で流した。

4-4 分析

アミノ酸標準液 (10nM/ml)、カルノシン標準液 (10nM/ml)、MIX 標準液 (10nM/ml)、および 2-1 に従い調整したサンプルを希釈し、1.5ml ファルコンチューブに 100  $\mu$ l ずつ入れ 4℃ に置いた。蛍光検出器が安定したらインジェクトする直前に調製済みの OPA 反応液を 60  $\mu$ l ずつ先のファルコンチューブに加え、正確に 30 秒～5 分間混ぜた後、マイクロシリッジにて 10  $\mu$ l インジェクトし、蛍光波長 470nm で測定した。



(保存日数ごとに、左側 1  $\mu$ l、右側 6  $\mu$ l スポット)

Fig.1 黒豚冷蔵保存日数における遊離アミノ酸量の変化

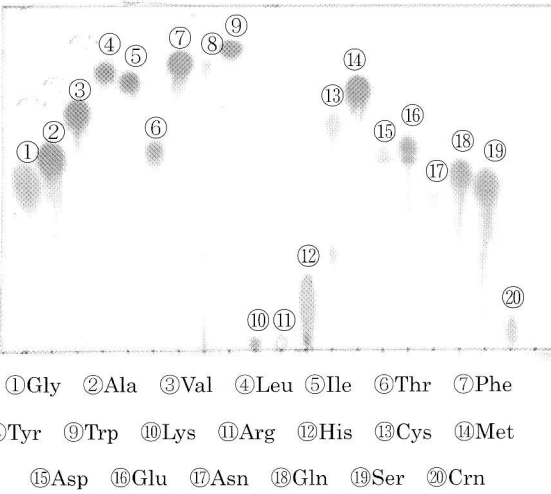


Fig.2 標準アミノ酸及びカルノシンの薄層クロマトグラフィー (TLC)

結果及び考察

1. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

1-1 豚肉保存日数と遊離アミノ酸

鹿児島黒豚肉の遊離アミノ酸測定について、購入した豚肉の保存日数と遊離アミノ酸量およびカルノシン量に変化があるか知るために、1～8日間を冷蔵保存した豚肉から遊離アミノ酸の抽出を行い、その量の違いを薄層クロマトグラフィーにて検討した (Fig.1)。その結果、購入後の冷蔵保存日数の違いによる遊離アミノ酸およびカルノシン量の変化は見られなかった。

1-2 標準アミノ酸の TLC

Rf 値より、どの遊離アミノ酸が抽出されたか検討するためにカルノシンを含めた 20 種類の標準アミノ酸をスポットし薄層クロマトグラフィーにて展開したところ、⑫番のヒスチジン、⑳番のカルノシンカルノシンが重なってスポットが現れることがわかった (Fig.2)。ヒスチジンとカルノシンが分離されなければ、カルノシン

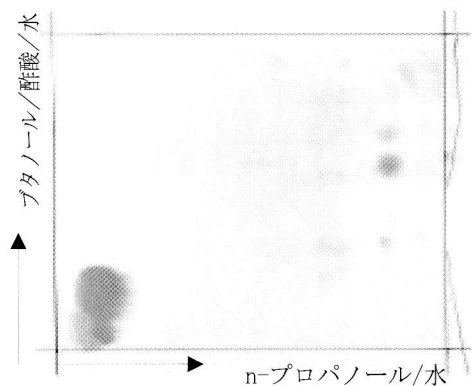
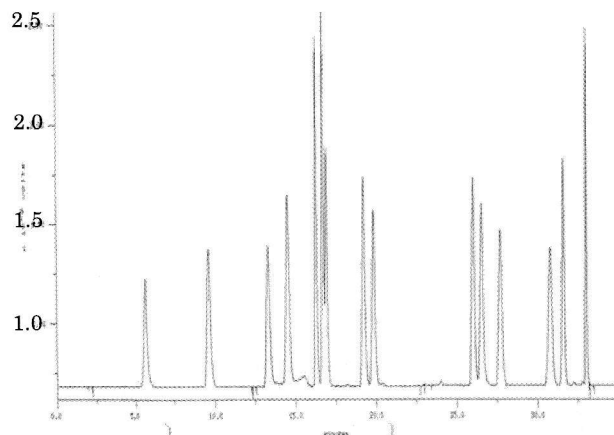
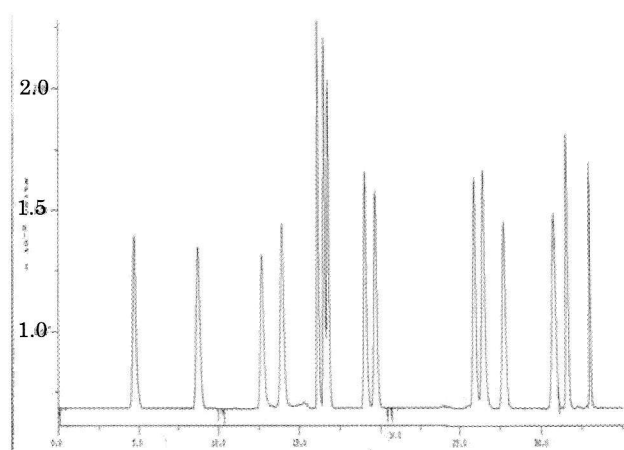


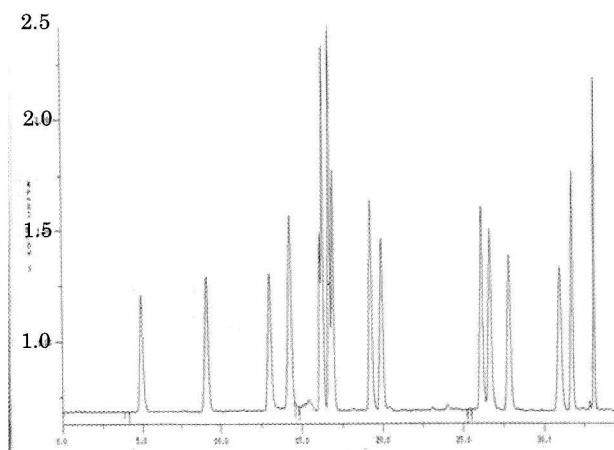
Fig.3 2次元薄層クロマトグラフィー  
(ヒスチジン+カルノシン)



(OPA 反応 : 2 分間, 溶離液 A : pH6.0)



(OPA 反応 : 30 秒, 溶離液 A : pH6.0)



(OPA 反応 : 5 分間, 溶離液 A : pH6.0)

Fig4. アミノ酸標準液 (10nM/ml) の HPLC による分離

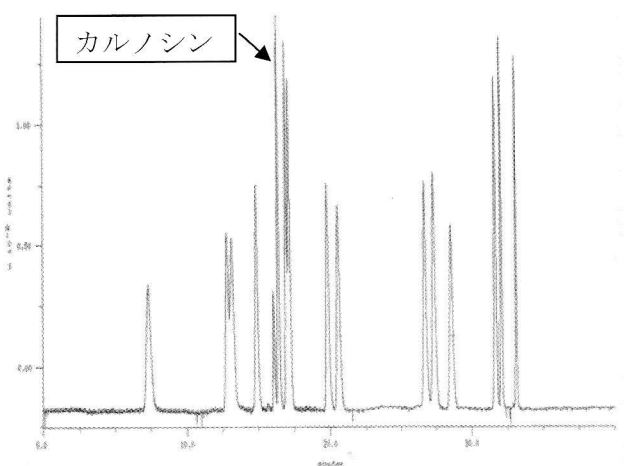


Fig5. MIX 標準液 (10nM/ml) の HPLC による分離  
(溶離液 A : pH5.5)

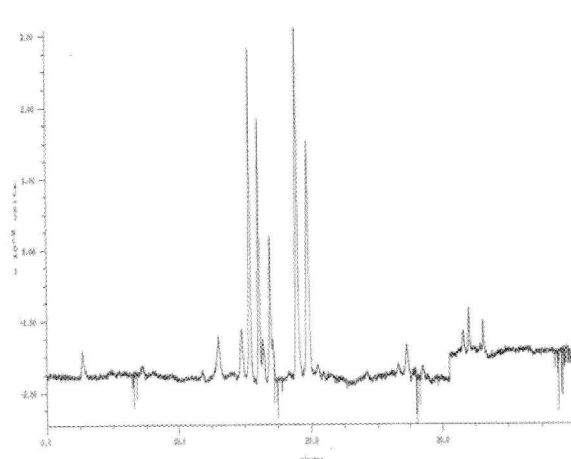


Fig6 黒豚冷蔵保存 1 日目抽出液の HPLC による分離  
(250 倍希釈, 溶離液 A : pH5.5)

が抽出されているのか判断できないため、我々はヒスチジンとカルノシンのスポットを分離させることを目的として、ヒスチジン、カルノシンの 2 次元展開を試みた (Fig.3)。しかしながら、1 次元展開と同じように、ヒス

チジン、カルノシンはほぼ同じ場所に展開されたため、薄層クロマトグラフィー (TLC) ではこの二つを分離できないことがわかった。

## 2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

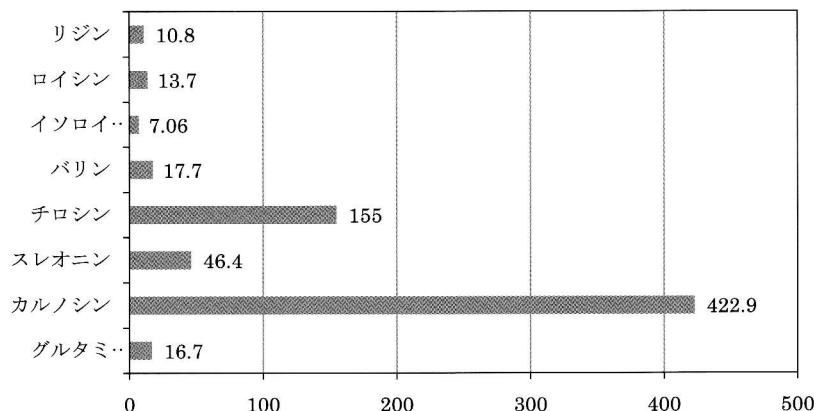


Fig.7 黒豚肉中の遊離アミノ酸 (平均)

そこで我々は、遊離アミノ酸とカルノシンを0-フタルアルデヒド (OPA) によって蛍光ラベルし、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてその量を測定すること試みた。アミノ酸標準液 (10nM/ml) を用いて0-フタルアルデヒド (OPA) 反応の反応時間の検討を行った結果、Fig.4に示す通り、OPA反応時間が30秒と2分では2分の方がピークが高く、2分と5分を比較するとほとんど差が見られないことから、HPLCにインジェクトするまでの時間の誤差を防ぎ、且つ、最も高いピークを得られる反応時間は2分間が最適であると考えた。よってOPA反応液を加えてからインジェクト終了までの時間を2分間に統一して以後の実験を行った。

また、MIX標準液 (アミノ酸標準+カルノシン: 10nM/ml) を測定した結果、溶離液A (50mM酢酸ナトリウム緩衝液) のpHが6.0ではカルノシンとヒスチジンのピークが重なってしまった為、溶離液AのpHを変更した結果、pHが5.5であればカルノシンのピークが単独で検出され、測定に最も適している条件であると考えられた (Fig.5)。よって以後、溶離液AのpHは5.5で行うこととした。

## 2-2 HPLCによるサンプル測定

以上のことから、OPA反応時間を2分、溶離液AのpHを5.5とし、黒豚冷蔵保存1日目の抽出液を250倍希釈したものを高速液体クロマトグラフィーによって測定した結果 (Fig.6)、鹿児島黒豚には、遊離アミノ酸として、グルタミン酸、カルノシン、スレオニン、チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、リジンが存在していることがわかった。黒豚冷蔵保存2日目抽出液、黒豚冷蔵保存3日目抽出液も同様に測定し、これらの結果を平均すると、グルタミン酸が1.75mg、カルノシンが42.33mg、スレオニンが4.67mg、チロシンが15.48mg、バリンが1.76mg、イソロイシンが0.71mg、ロイシンが1.37mg、リジンが1.1mg存在していることになり (Fig.7)、遊離アミノ酸の中でカルノシンが一番

多く存在していることがわかった。これらのことより、今回おこなったOPAプレラベル法で、カルノシンの測定法が確立できたため、今後は、サンプル数を増やし、鹿児島黒豚は旨いだけでなく、アンチエイジングの面からも期待できる食品であることを示唆できればと考えている。

## 文 献

- 1) 川井田博 (1999) 黒豚の産肉性と肉質 平成11年度 日本調理学会九州支部
- 2) 宮路直人 (1999) 鹿児島黒豚物語 南日本新聞社 55-58
- 3) 古賀克也・福永隆生・大木由起夫・川井田博 (1985) 系統豚および系統間雑種豚のロース、もも肉の遊離アミノ酸、カルノシン含量 鹿大農学術報告 第35号
- 4) 古賀克也・福永隆生・下玉利勉・川井田博 (1983) 甘藷粉末含有飼料で飼育された数品種の豚のロース、もも肉の遊離アミノ酸およびカルノシン含量 鹿大農学術報告 第33号
- 5) G.Munchi et al. (2003) Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease *Biochemical Society* 1397-1399
- 6) Alan R.Hipkiss (2005) Glycation ageing and carnosine : Are carnivorous diets beneficial ? *Mechanisms of Ageing and Development* 126 : 1034-1039
- 7) Alan R.Hipkiss (2007) Could Carnosin or Related Structures Suppress Alzheimer's Disease? *Journal Article* 11 : 229-240
- 8) 波多野博行・花井俊彦 (1988) 新版・実験高速液体クロマトグラフィー 株式会社 化学同人 173-183
- 9) 大沢利昭 (1989) 高速液体クロマトグラフィー 生化学実験 9 115-124

## Quantification of free amino acids of Kagoshima Kurobuta pork meat and estimation of carnosine

Haruko Takeshita, Keiko Matsushita, Aiko Takeno, Yoshiko Setoguchi

Deptment of Nursing and Nutrition, Kagoshima Immaculate Heart University

Key words : Kagoshima Kurobuta, Carnosine, Free amino acid

### Abstract

Kagoshima Kurobuta is the specific strain of black hair pig that is mix-bred with Okinawa/Amami Shimabuta and English Berkshire strains and kept as the Kagoshima original brand of pig last 100 years. This pig has 6 white spots on nose, tail and legs that is genetically fixed to make a specific pork meat of supreme taste with lots of muscle, tender fat tissue with higher melting point and increased amounts of free amino acids, carnosine, glucose and neutral sugar, all the components of deep Umami tastes.

Carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) is a dipeptide recently noticed as a potent anti-oxidant to relieve fatigue and prevent Alzheimer disease. Carnosine is famous in good taste of oyster although it is now disputed as compared with Kagoshima Kurobuta whose meat has lots of carnosine to make its supreme taste.

The present study aims to establish measurement of free amino acids and carnosine on HPLC with OPA prelabelling method. Our HPLC measurements revealed very high content of carnosine in Kagoshima Kurobuta pork meat as compared with other free amino acids. Thus, OPA-prelabelled HPLC method is useful to quantify the real content of carnosine in Kagoshima Kurobuta pork meat. By virtue of this method, we are going to evaluate chemical entity of good taste and further substantiate a new aspect of Kagoshima Kurobuta for anti-aging pork meat. Hereby, we hopefully contribute to establishment of Kagoshima Brand of Pork Meat.

---