銅-タンパク質複合体に関する研究

梶 本 五 郎・吉 田 弘 美

神戸学院大学栄養学部 (神戸市垂水区伊川谷町有瀬)

Studies on the Copper-Protein Complex

Gorō KAJIMOTO and Hiromi YOSHIDA

College of Nutrition, University of Kobe Gakuin (Arise, Ikawadani, Tarumi-ku, Kobe)

The authors observed that in the case of frying, especially whale meat, the frying-oil was colored and deteriorated by substances cozed out from the whale meat, for instance, by nitrogen compounds (protein, pyrrole substance) and metals (iron and copper, etc.) due to the decomposition of blood, etc. and whale oil. Also, the copper and iron in these frying oil were very often observed to be decreased during the storage.

In this paper, for making clear the reason of decrease of copper and iron in frying oil, a model test on the reaction between protein and copper in the system of aqueous solution and oil was carried out. Thus the copper of different stages in the concentration was mixed with casein in water, or, mixture of casein, copper (copper sulfate) and soybean oil was heated for 1 hour at 180°C, and the amount of adduct formed with these materials was measured.

The results obtained were as follows:

It was confirmed that the amount of copper adduct to casein increased with the storage days in both system of aqueous solution and oil, namely, it became clear the easy formation of copper-protein complex.

1 緒 言

フライ油の変質は加熱以外に揚げ物よりの無機質、窒素化合物¹⁾および油脂 (たとえば鯨肉揚げで鯨油)^{2),3)} などがフライ油へ移行し、これらの移行物はフライ油の変質を促進した。ことに銅^{4)~10)} は酸化触媒活性が著しく、したがって、油脂の変質上大きな問題であった。ところで、鯨、魚介肉を揚げたフライ油をフライなべ (鉄製) のまま、あるいはびんに移し貯蔵したものを経時的に取り出し、口過した油脂について Cu および Fe を測定すると、フライなべ貯蔵のものは Fe は増加するが、Cu は減少し、びん貯蔵は Fe および Fe いずれも減少することをしばしば経験してきた。鉄なべ貯蔵による油脂中の Cu の増加は、油脂中の遊離脂肪酸が鉄なべ中の Fe を溶出させることに起因することがわかったが¹¹⁾、Cu の減少、さらにびん貯蔵では、Cu および Fe の減少理由については不明であった。その減少理由として油脂中の他成分 (移行物) と反応することが推察される。そこで、減少原因を検討しようと考えた。Cu と他成分との反応については、ミルク中で Cu とタンパク質が付加することが認められており^{10),11)}、Samuelsson¹²⁾ はミ

ルク中に添加した Cu は、その 90% がミルク中のタンパク質と結合したと報告している。フライ油については検討されていない。

そこで、フライ油中の Cu が揚げ物より移行してきた窒素化合物と付加するかを検討するため、Cu とカゼインとの付加反応についてモデル実験を行なった。その結果、Cu とカゼインは水溶液および油脂中でも容易に複合体を形成することを認めたので、それらの結果を報告する。

2 実 験

2.1 試料およびその調製

2.1.1 油 脂

合成酸化防止剤を含まない大豆油を用いた。その性状は過酸化価 2.0 meq/kg, 酸価 0.05, カルボニル価 8.6, ヨウ素価 131.4, ケン化価 189.5 で、Cu および Fe はそれぞれ 0.1 ppm, 1.4 ppm 含有されていた。なお Cu の定量法は後述するが、原子吸光分析法と Borchardt¹³⁾ らの方法、Fe は α -フェナントロリン比色法で求めた。

2.1.2 鯨 肉

油脂含有量 3.0% の市販冷凍赤鯨肉を用いた。なお、油脂量は解凍後、鯨肉を細断し、ソックスレーを用い、エチルエーテルで 20 hr 抽出後、エチルエーテルを減圧除去、残分を油脂として生鯨肉に対する百分率で表わした。

2.1.3 銅

特級硫酸銅を選び、蒸留水で再結晶させたものを Cu 濃度として 2, 1, 0.2 および 0.04 ppm/ml になるよう再蒸留水 (pH 6.95) に溶解し調製した。

2.1.4 カゼイン

市販乳製カゼインを選び、エチルエーテルで 10 hr 抽出後、20 mesh のふるいを通したものをを用いた。なお、カゼイン中には Cu はほとんど含有されていなかった。

2.2 実験方法

2.2.1 揚げ方

2 l 容鉄なべ中に大豆油 500 g を入れ、室内に 2 hr 放置し解凍させた鯨肉を 5×1.3 cm、厚さ 1.3 cm、重さ約 20 g に切ったものを 5 枚 1 組として、180°C で 2 min 揚げ、その後同操作を繰り返し、鯨肉量が 500, 1000, 1500 および 2000 g ごとにフライ油をヒョウ取りし、フライ油中の Cu および Fe と窒素量を測定した。同様、加熱のみの対照実験を併行した。なお、鯨肉揚げ量が 500 g 目をフライ回数 1 回目、以下 500 g 増すごとに 2~4 回目と呼んだ。Cu, Fe および窒素量測定時のフライ油は、いずれも 3G3 ガラスろ過器でろ過したものをを用いた。

2.2.2 フライ油の貯蔵

2.2.1 の方法で鯨肉 2 kg を揚げ、得られたフライ油を、①フライなべのまま放置、②フライ油をカッ色びんに移し貯蔵した。①、②それぞれの貯蔵フライ油を経時的に取り出し、ろ過したフライ油について Cu と Fe を求めた。

2.2.3 Cu および Fe の定量

予備実験では、フライ油中の Cu が微量のためか、従来の比色定量法では誤差を生じやすかったので原子吸光分析法を用い、Cu-タンパク複合体中の Cu 量は、添加モデル実験を行なったため比較的 Cu 量が多いことと、燃焼が容易なこと、および一度に数多く測定する場合、比色法が便利で、かつ、ほとんど誤差がみられなかったの、比色定量法を用いた。

2.2.3.1 原子吸光分析法

日本ジャーレル・アッシュ社製の原子吸光分析装置 AA-1 型を使用し、試料油 30 g を白金蒸発ザラにとり、電気炉内で灰化、残分を HCl (1:1) 30 ml で溶解、再蒸留水を加え 100 ml としたものを下記の条件で測定した。

2.2.3.2 Cu の比色定量法¹³⁾

Metals	Cu	Fe
Model	A A-1	A A-1
Source	3247 Å	2483 Å
Grating	3000 Å	3000 Å
PM	R 106	R 106
Damping	4	3
Burner slit	10 cm	10 cm
Fuel	C ₂ H ₂ , 2 l/min	C ₂ H ₂ , 2 l/min
Current	10 mA	10 mA
Blaze slit	100 μ, 150 μ	100 μ, 150 μ
Chart speed	40 mm/min	40 mm/min
Sens	90	80
Oxidant air	8 l/min	8 l/min

Cu-タンパク質複合体を灰化後、下記の検量線作成時と同様の方法で発色させ、日立分光光度計 124 型を用い、425 mμ の吸光度を測定し、検量線と比較求めた。なお、同時に空試験を行なった。

(1) 検量線の作成

精製した硫酸銅 0.1965 g を再蒸留水で溶解し、500 ml とし、この溶液 10 ml を 1 l に希釈し標準溶液とした (Cu として 1 ml 中に 1 ppm)。この標準溶液から 5, 10, 15 および 20 ml を 100 ml メスフラスコにとり、2 N-HCl 80 ml を加え蒸留水で標線まで希釈する。これよりそれぞれ 50 ml を 100 ml メスフラスコにとり、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液 (50 g を蒸留水で 1 l とする) 20 ml を加え、アンモニア水で pH 9.0~9.2 になるよう調製し、蒸留水で標線まで希釈した。これを 100 ml 分液漏斗に移し、さらに 10 ml の蒸留水でメスフラスコ中を洗浄し、洗液は分液漏斗に加える。これにジエチルアンモニウム・ジエチルジチオカルバメート試薬 (東京化成工業特級試薬、10 g をクロロホルムに溶解し 1 l とする) 5 ml を加え、5 min 激しく振とうした後、無水硫酸ナトリウムを詰めたガラスろ過器で吸引ろ過、クロロホルム溶液は吸光度測定用 1 cm ガラスセルに移し、10 min 後、425 mμ の吸光度を測定した。

検量線は Fig.-1

のとおりである。

2.2.3.3 窒素量

ケルダール法によった。

2.2.4 Cu-カゼイン複合体の調製とその分別法

Cu とカゼインの付加有無を検討するため、モデル実験を行なった。

Fig.-1 Calculation curve of copper.

2・2・4・1 水溶液中での反応

Cu 濃度の異なる水溶液をそれぞれ 50 ml ずつ用い、1 g 精ヒョウしたカゼインと混合、ときどき振とうしながら常温で放置した。経時的に試料を取り出し、3G3 ガラスろ過器で吸引口過、再蒸留水で残分を充分洗浄し、遊離の Cu を除去した。残分を 40°C で減圧乾燥後、一定量を灰化させ、2・2・3・2 の比色法で Cu を定量した。洗浄水についても一定量にした中から Cu 量に同じ適宜ヒョウ取りし Cu 量を求めた。また、対照に Cu を含まない水溶液にカゼインを浸セキし、同操作を行ないカゼイン中の Cu を求めた。

なお、反応液中の Cu 量が経時日数の経過とともに減少し、カゼインの方に Cu 量が増加することから、Cu がカゼインに付加し、複合体を形成したものと考え、便宜上、Cu-タンパク質複合体と称し取り扱った。

2・2・4・2 油脂中での反応

100 ml 容試験管に大豆油 10 g をとり、カゼイン 200 mg と Cu として 1 ppm (10 ppm/ml のものを使用) になるよう 0.1 ml の硫酸銅溶液を添加し、かくはんしながら 180°C で 1 hr 加熱した。加熱直後のものと放置したものを経時的に取り出し、エチルエーテルを加え、

3G3 のガラスろ過器で吸引口過、油脂がなくなるまでエチルエーテルで洗浄、続いて水洗を行ない、上記同様、残分中の Cu 量を求めた。なお、油脂使用時に加熱したのは、できるだけ揚げ物時の条件にあわせるために行った。

3 実験結果

3・1 鯨肉揚げとフライ油中の無機質および窒素量

揚げ物とフライ油中の無機質および窒素量¹⁾についてはすでに報告したが、今回、そのフライ油の貯蔵と Cu

および Fe 量の変化を検討するため、まず、鯨肉を揚げ、その揚げの回数とフライ油中の無機質および窒素量を求めた。結果は、Fig-2~3 のとおりである。

鯨肉の揚げ物量が多くなるにしたがい、フライ油中には無機質および窒素量がいずれもわずかに増加した。おそらく、鯨肉よりフライ油へ移行してきたものと考えられる。

3・2 フライ油の貯蔵と Fe および Cu 量の変化

揚げ物よりフライ油へ移行した Fe および Cu が無機の形（遊離金属）なのか、塩（脂肪酸および他成分との結合）なのか、その存在形態あるいは貯蔵中の変化などについても不明確である。そこで、鯨肉揚げ後のフライ油をフライなべのままおよびびんに移し、経時日数と油脂中の Cu および Fe について検討した。結果は、Fig-4 のとおりである。

びん貯蔵のフライ油は、経時日数の経過とともに Cu および Fe はいずれも減少した。フライなべ貯蔵のものは Cu は減少したが、Fe はほとんど減少せず、むしろわずかながら増加の傾向にあった。Fe の増加傾向は、先に報告¹⁾したように、フライ油中の遊離酸が容器中の鉄を溶出した結果と考えられ、Fig-2 の対照油でもわずかに Fe の増加が認められ、逆にびん貯蔵では増加がみられないことからでも明らかである。Cu の減少については、ろ過したガラスろ過器上の残分の方に Cu 量が増加することから、これらの成分とフライ油中の Cu および Fe などが反応し複合体を形成するのではないかと考えられる。残分について定性試験を行なうと窒素があり、かつビュレット反応が陽性であった。したがって、Fig-2 にみられるようにフライ油に窒素量が増加していることと考えあわせ、鯨肉からフライ油へ移行してきた窒素化合物（タンパク質など）と Cu および

Fig-2 Relationship between the minerals contained and nitrogen in frying oil and frying of whale meat.

Fig-3 Relationship between the iron and copper in frying oil and frying of whale meat.

Fig.-4 Changes of iron and copper in frying oil and storage days.

Storage period (day)	1	2	4	6
Percent of Cu recovery (%)	98.5	92.9	96.5	97.6

Fig.-5 Reactions between copper and protein.

Fe が容易に複合体を形成するものと推察される。そこで、その点を確かめるため、酸化触媒活性の高い Cu とタンパク質について複合体形成有無のモデル実験を行った。

3.3 Cu-カゼイン複合体の形成について

Cu とカゼインの反応について水溶液系と油脂系とについて検討した。

3.3.1 水溶液中での反応

50 ml の硫酸銅溶液 (Cu として 100 ppm) とカゼインを混合し、経時的に試料を取り出し、2・2・4・1 の方法

Fig.-6 Relationship between percent of aduct formation and different stages of copper quantity.

で分別、その分別カゼインとロ過液について Cu 量を求めた。結果は、Fig.-5 のとおりである。

ついで、Cu 濃度の異なる溶液 (Cu として 2, 1, 0.2 および 0.04 ppm/ml) 50 ml とカゼインを混合し、経時日数と分別カゼイン中の Cu 量を求め、Cu の付加率を算出した。結果は、Fig.-6 のとおりである。

なお、付加率の求め方は、それぞれ使用した Cu 量を基準とし、カゼイン中の Cu 量を求め、その割合を百分率として表わした。

Fig.-5 に示すように、経時日数の経過とともにロ液中の Cu 量 (free Cu) が減少し、カゼイン中に Cu (complex Cu) が増加した。なお、Cu の回収率 (free Cu と complex Cu) は、各回とも $95 \pm 2\%$ であった。したがって、同法による Cu の定量および Cu-カゼイン複合体の分別法が可能であると考えた。Cu とカゼインは水溶液中で容易に複合体を形成することがわかった。Cu-カゼイン複合体の形成能は、Cu 濃度の低いものほど付加率が高い。なお、Fig.-6 の実験時も Cu の回収率は $97 \pm 1\%$ であった。

Table-1 Relationship between percent of aduct formation and quantity of casein.

Casein (g)	Cu (ppm)	Copper-protein complex		Residual copper		Percent of Cu recovery (%)
		Volume of Cu (ppm)	Percent of aduct formed (%)	Volume of Cu (ppm)	Percent of non-aduct formed (%)	
0.5	50	35.4	70.8	13.2	26.4	97.3
1.0	50	36.8	73.6	12.0	24.0	97.6
2.0	50	33.8	67.6	14.0	28.0	95.6

ついで、Cu 濃度を一定 (50 ppm/50 ml) とし、カゼイン量を 0.5, 1.0 および 2.0 g とかえた場合の Cu-タンパク質複合体形成量について検討した。結果は、Table-1 のとおりである。なお、放置日数は 1 日である。

カゼイン量の多少にかかわらず、Cu-タンパク質複合体形成量にはほとんど差がみられなかった。したがって、Cu と反応するのに必要なカゼイン量があればよいものと思われる。

3.3.2 油脂中での反応

水溶液中では Cu とカゼインが容易に複合体を形成することを認めた。油脂中でも同様、複合体を形成するかを検討した。油脂中での反応条件は、Fig.-4 に示したように、貯蔵に伴ないフライ油中の Cu が減少しており、その理由をあわせ考察するため、大豆油 10 g に 1 ppm の Cu とカゼイン 1 g を良く混合し、ただちに 180°C で 1 hr 加熱した。なお、大豆油中に 0.1 ppm の Cu が既存しているので、Cu 量はその相加量となる。対照にカゼインのみを加え同様、1 hr 加熱後、経時日数と Cu 量の変化を調べた。結果は、Fig.-7 のとおりである。

Fig.-7 Reactions between copper and protein in oil.

放置開始時にすでに対照カゼインで約 7%, 添加した Cu の場合は、10% 程度の Cu がカゼインに付加していた。おそらく加熱操作中に付加したのであろう。放置日数の経過とともに対照カゼインでも Cu 量が増加した。それは大豆油に既存の Cu と複合体を形成したものと思われる。添加した Cu の場合も放置日数の経過とともに遊離の Cu が減少し、カゼインに Cu が増加した。したがって、油脂中でも容易に Cu-カゼイン複

合体を形成するといえる。このことから Fig.-4 の鯨肉を揚げたフライ油中の Cu の減少は、鯨肉より移行してきた窒素化合物おそらくタンパク質と複合体を形成した結果と考察される。

一方、タンパク面からみた場合、油脂に添加したカゼインあるいは鯨肉よりフライ油へ移行してきたタンパク質は、加熱により変性あるいは分解などが起こっているものと考えられ、Cu との反応は熱変性タンパク質が主体をなすものと思われる。フライ油中のタンパク質については逐次検討していく。

4 考 察

揚げ鯨肉よりフライ油へ移行した Cu, Fe などの存在形態については金属イオンあるいは脂肪酸塩の形態が考えられるが、それぞれの分別法と割合については今回検討しなかった。もし、二つの金属の存在形態があるとすれば、その割合はフライ油の変質度（遊離脂肪酸量）によって相違するであろうし、タンパク質との付加反応も金属イオンおよび塩のいずれの形で付加するかを検討する必要がある。

フライ油中の窒素量は揚げ物の種類によって異なり、ジャガイモおよびピーマンなどは、鯨、魚肉揚げに比べ非常に少なく、また、貯蔵フライ油脂中の Cu, Fe の減少割合も鯨肉揚げのフライ油に比べ少ないことを確かめた。したがって、窒素量と Cu, Fe の減少との間には一定の比例関係が考えられ、窒素化合物が付加の主体であることは事実のようである。ところで、フライ油中の窒素化合物については、フライ油に溶解分散（ガラスろ過器を通過したもの）しているものと、鯨、魚肉からはずれた微細粒子がフライ油に浮遊している形（ガラスろ過器上に残留）とが考えられ、そのいずれの形のものに付加しやすいかは、ろ過フライ油では Cu, Fe が減少し、残留物の方に Cu, Fe が増加することから、浮遊しているタンパク粒子の方が金属との反応に至大なる関係を有するのではないと思われる。もちろんこれに関連し、金属との結合形態あるいは Cu-タンパク質複合体の分別法の適否が問題になることはいうまでもない。油脂に溶けている窒素化合物と金属との結合物、あるいは脂肪酸塩ではガラスろ過器を通過してしまうだろうし、これらの結合物は現行法では確認できず見落としてしまう。しかし、本実験からしてろ過フライ油ではかなり多量の Cu および Fe が減少することから、油脂に溶けている窒素化合物あるいは脂肪酸と Cu, Fe の形成能より、浮遊しているタンパク質との反応の方が大きいものと思われる。

フライ油中の Cu-タンパク質複合体の分別法として、著者らの行なった方法は、油脂分をエチルエーテルで完全に除き、ついで蒸留水で遊離の Cu を洗浄した。遊離

の Cu を除去したのにもかかわらず、なおかつ残留タンパク質に Cu があり、経時日数の経過とともに増加することから、Cu-タンパク質複合体が形成され、また、その分別法が可能であると考えた。Cu-タンパク質複合体の形成機構は物理的結合か、イオン結合なのかについては不明である。中島ら¹⁴⁾は、チーズカゼインの Ca^{++} 結合力を山内ら¹⁵⁾の方法で測定していることから、Cu、Fe とカゼインの結合は、イオン結合が主体であると推測される。

水溶液中のカゼインは放置日数が長くなるにしたがい、カゼインの腐敗変性の可能性が考えられ、また、フライ油中のタンパク質は熱変性が当然起こっているものと思われる。したがって、フライ油脂中では熱変性タンパク質と Cu の付加反応ともいえる。ところで、タンパク質変性の有無および変性度合と Cu との付加率、あるいはタンパク質の熱変性がさらに進んで分解した物と Cu との付加有無については検討しなかった。今後、フライ油中のタンパク質の形態と金属との付加反応、さらに金属の種類とタンパク質との付加速度、複合体形成量などについて検討したい。(昭和 46 年 6 月 2 日受理)

文 献

- 1) 梶本, 栄養と食糧, **15**, 221 (1962)
- 2) 梶本, 吉田, 栄養と食糧, **23**, 255 (1970)
- 3) 梶本, 吉田, 栄養と食糧, **23**, 443 (1970)
- 4) H.T. Spannuth, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **26**, 618 (1949)
- 5) C.D. Evans *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **29**, 61 (1952); *ibid*, **28**, 68 (1951)
- 6) N.M. Emanuel, T.N. Lyaskovskaya "The Inhibition of Fat Oxidation", p. 79 (1967), Pergamon
- 7) A.E. King *et al.*, *Oil & Soap*, **10**, 204 (1933)
- 8) J.C. Cowan "Autoxidation and Antioxidants," **2**, 593 (1962), Interscience; *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **43**, 300 A (1966)
- 9) A.L. Tappel, *Food Res.*, **18**, 560 (1953)
- 10) A.L. Tappel, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **32**, 252 (1955)
- 11) A. Patron, 第 9 回油脂国際会議講演要旨 (1968)
- 12) E.G. Samuelsson, *Milchwissenschaft*, **21**, 335 (1966)
- 13) L.G. Borchardt, J.P. Butler, *Anal. Chem.*, **29**, 414 (1957)
- 14) 中島ら, 日本農芸化学会全国大会講演 (1971)
- 15) 山内ら, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 54 (1967)

EDTA 滴定法による洗剤中の炭酸ナトリウムの分析

永 井 敏 雄・二本木 恒 夫

ライオン油脂株式会社研究部 (東京都江戸川区平井 3-2, 397)

Determination of Sodium Carbonate in Household Detergents by the Method of EDTA Titration

Toshio NAGAI and Tsuneo NIHONGI

Research Laboratory, Lion Fat and Oil Co. (Hirai Edogawa-ku, Tokyo)

Ordinarily, Schloetter's method is usual for the determination of sodium carbonate to be detected about 1~6 wt% in the household detergents.

However, its analytical preciseness is not enough satisfactory.

A determination of sodium carbonate in household detergents has been developed, in which sodium carbonate is absorbed in barium chloride as carbon dioxide and excess barium is titrated with EDTA.

The carbon dioxide produced by decomposition of the sample using 30 vol/vol% sulfuric acid is absorbed in a barium chloride in 0.1 N-sodium hydroxide. The precipitate of barium carbonate is filtrated and the excess of barium ion in the solution is titrated with standard solution of EDTA using Eriochrome Black T as the indicator and the amount of sodium carbonate is calculated.

The time required for the analysis of sample was about 1~1.5 hrs with recovery more than 96.9 wt% and precision of recovery was 2% in coefficient of variation.

Furthermore, sodium carbonate in aqueous solution could be detected by the same method.