食品及び飼料成分の分析法に関する研究

Studies on the Analytical Method of Composition of Foods and Fodders

(第 3 報) 澱粉質食品中の純蛋白質迅速定量法に就いて

Part 3. On the Rapid Procedure for the Determination of True Protein in Starchy Foods.

(昭和 30 年 9 月 12 日 受理)

神 立 誠 佐 藤 民 雄
(Makoto Kandatsu) (Tamio Satow)

緒 言

今日吾々が用いている食品及び飼料中の純蛋白質定量法は古く Stutzer¹⁾, Barnstein²⁾ によつて研究されたもので一般に広く行われている³⁾。この両法は試薬が安価に、そして容易に入手出来ること、及び沈澱操作の簡易なこと等の利点がある反面、沈澱の洗滌に長時間を要し、殊に穀実類等の澱粉含有量の高いものでは特に甚だしい。

文献によれば、穀類の蛋白質精製にその含有物である澱粉を可溶性とし、後除去する方法が多数報告されている。即ち、Csonka⁴⁾ は脱脂玉蜀黍粉末に 21% 冷塩酸を加えて澱粉の全部と蛋白質の一部を溶出させて、澱粉はこの抽出液に等量のエタノールを加えて沈澱させ分析に供している。又脱脂粉末 (小麦、玉蜀黍、米、燕麥) を加熱糊化してから唾液のプテアリンを作用させて澱粉を溶出させ、不溶性の蛋白質を得ている⁵⁾。筆者の一人神立⁶⁾ は粟の蛋白質の栄養価を知ろうとして、その全蛋白質の調製に市販ギアスターゼを作用させ澱粉を除く実験をして、濾液中の全窒素は原物に対し 00.9% で殆んど窒素の溶出はなかつたと報告している。Kofrányi⁷⁾ は穀類の amino 酸分析の際、フミンを含まない加水分解物を得ようとして、炭水化物と蛋白質に対する別個の加水分解を行つた。即ち、5N 蟻酸によつて澱粉を分離し、蛋白質を溶液中にとどめ、Neuberg の方法によつて沈澱させ、糖から分離後塩酸で最後までフミンを生ずることなく分解し、その加水分解液は amino 酸分析に良く適合していたと述べている。

筆者等は、穀実類の澱粉を有機酸で加水分解して可溶性となし、従来の Barnstein 法の欠点 (沈澱洗滌に要する長い時間) を除去して、澱粉質食品中の純蛋白質を迅速に定量し得る方法を見出そうとして本実験に着手し

た。その結果を次に報告する。

実 験 及 び 考 察

I. 改良法の予備実験

(1) 試料の調製: 茨城県産梗玄米 (無芒愛国) を風乾し粉碎後 60 メッシュ篩で篩つた。

(2) 澱粉水解に使用する有機酸の種類: 藪田、麻生等³⁾ の有機酸による澱粉の糖化試験結果から、一塩基性飽和有機酸の中で最も糖化率の高い蟻酸、二塩基性飽和有機酸から同様に酢酸、二塩基性不飽和有機酸からはマレイン酸、二塩基性オキシ有機酸からは酒石酸の 4 種を選び、試料 1g に 1% 有機酸水溶液 5cc を加え、130°C、3 時間オートクレーブ中で加熱し、冷却後 NaOH 溶液で微酸性になるまで中和し後 CuSO₄ 溶液 25cc、NaOH 溶液 25cc を加えて蛋白質を沈澱させ、沈澱を傾瀉法によつて Cu⁺⁺ 及び SO₄⁺⁺ の反応がなくなるまで温湯で洗滌し、後沈澱を濾紙 (東洋濾紙 No. 5A 11cm) 上に移し濾紙内容を乾燥後濾紙と共に分解瓶に入れ、Kjeldahl 法によつて窒素を定量した。その結果は第 1 表の如くである。

第 1 表

有 機 酸	濾 過 時 間 時 分	Barnstein 法 に対する比率 %	糖 化 率 %
修 酸	3. 30	49.82	87.38
蟻 酸	3. 00	68.23	17.50
酒 石 酸	4. 00	48.29	66.34
マ イ レ ン 酸	3. 50	59.79	68.19

濾過時間は沈澱濾過開始から沈澱を乾燥させる前までの所要時間とし、糖分の定量には逸見、友枝⁸⁾ 等による Bertrand 法の改良法を用い、還元糖は全部葡萄糖として算出し、その葡萄糖量を試料を直接に塩酸で水解して

得られる葡萄糖量に対する百分率を各表中の糖化率とした。

即ち、糖化率が高いと蛋白質の損失は大きくなるが、我々の目的は澱粉を葡萄糖まで完全に分解する必要はなく、澱粉が可溶性となつて濾過所要時間が短縮されれば充分であるので、次に糖化温度を下げて油浴中115~120℃、3時間逆流冷却管を附して前回と同一操作を行つた結果は第2表の如くなつた。尚、試料1gに有機酸溶液20ccを加えた。

第2表

有機酸	濾過時間 時.分	Barnstein法 に対する比率 %	糖化率 %
蓼酸	1. 30	78.38	34.17
蟻酸	1. 40	86.63	3.35
酒石酸	9. 50	29.41	4.30
マイレン酸	1. 00	83.12	21.11

以上の如く、4種の有機酸中で蟻酸処理がBarnstein法に最も近い値を示したので、以後蟻酸を用いて最適濃度、糖化時間及び糖化温度等を追求した。

(3) 蟻酸の濃度、糖化温度及び糖化時間：1~50%の各種蟻酸濃度で蛋白質の損失を最小限にし、実験操作の簡易化等を考慮して、湯煎中で3時間処理後、前回と同一操作を行つた結果は第3表の如くである。

第3表

酸濃度 %	濾過時間 時.分	純蛋白質 %	B.-法に 対する比率 %	糖化率 %
1	3. 10	7.57	92.57	—
3	1. 40	7.49	91.58	5.54
5	1. 20	7.15	86.76	5.53
10	1. 00	6.92	84.76	6.24
20	1. 00	7.31	89.33	16.51
30	40	6.81	83.28	27.30
40	1. 50	6.72	82.15	32.33
50	40	5.80	70.89	34.78
常法	3. 30	8.18	100.00	—

第4表

酸濃度 %	濾過時間 時.分	純蛋白質 %	B.-法に 対する比率 %	糖化率 %
0.5	7. 00	7.89	95.37	0.66
1	3. 00	7.98	97.52	—
3	1. 40	7.70	94.12	1.77
5	1. 00	7.69	94.06	3.53
20	1. 10	7.30	98.23	9.85
50	1. 00	7.04	86.06	12.74
常法	3. 30	8.18	100.00	—

以上の結果より1, 3, 5及び20%の各濃度が比較的好結果を得たので、次に糖化時間を2時間に短縮して同様に実験した。その結果を第4表に示す。尚、0.5% (3時間糖化)と50% (1時間糖化) 処理結果をも附記した。

即ち、酸濃度は3%と5%が適当と思われ、次にそれ等に就いて糖化時間を吟味した結果を第5表に示す。

第5表

酸濃度 %	糖化時間 時.分	濾過所要 時間 時.分	純蛋白質 %	B.-法に 対する比率 %	糖化率 %
3	1. 30	1. 10	7.84	95.81	1.18
	1. 00	1. 40	8.00	97.78	0.63
5	1. 30	1. 20	7.93	97.01	—
	1. 00	1. 00	7.94	97.05	—
	30	1. 50	8.10	99.10	1.59
常法	—	3. 30	8.18	100.00	—

上表の結果から、酸濃度5%、30分間処理が他に比して常法に最も近い値を示し、その差異も実験誤差範囲内にあり、しかも濾過所要時間は約 $\frac{1}{2}$ に短縮させることが出来た。その際の糖化率は1.59%で非常に低い。

II. 改良法による純蛋白質定量法操作

細粉試料約1gを100cc硬質三角フラスコに秤取し、5%蟻酸溶液20ccを加え、逆流冷却管を附して湯煎中(96~97℃)に30分間保持後、200ccビーカーに糖化液を全部移し、冷却後dil. NaOH又はdil. Na₂CO₃溶液で微酸性になる迄中和し、CuSO₄溶液(CuSO₄•5H₂O 60gを水1lに溶かす)25ccを加え、よく攪拌しながらNaOH溶液(NaOH 12.5gを水1lに溶かす)25ccを注加し、放置して蛋白質を沈澱させ、沈澱を傾瀉法によつてCu⁺⁺又はSO₄⁼⁼の反応のなくなるまでよく温湯で洗滌する。後沈澱を全部濾紙に移し濾紙内容を濾紙と共によく乾燥後分解瓶に入れKjeldahl法によつて、その窒素を定量する。

III. Barnstein法、トリクロール醋酸法、改良法による定量結果の比較

以上述べた改良法とBarnstein法及びトリクロール醋酸(T.C.A)法によつて主なる澱粉質食品及び飼料9種に就いて純蛋白質を定量比較した結果を総括して第6表に示す。

T.C.A.法は前報¹⁰⁾で報じた定量操作法によつて行い、又本法による水解、中和後T.C.A.を行つたものをT.C.A.法(処理)として附記した。

各試料の澱粉糖化率が非常に低いため、還元糖の定量は筆者等が別に報告¹¹⁾した濾過操作がなく、終点を見易くした同調指示用電子管(マジックアイ)をIndicatorとするLane & Eynon法の改良法を用いた。その糖液

調製は次の如く行つた。即ち糖液の滴定値が15~50ccになるように試料を秤取し、純蛋白質定量の際の処理方法と同一条件で加水分解後、1分間4,000回転で10分間遠心分離し、沈澱は蒸留水で3回洗滌してその洗液は上澄液に混じ、dil. NaOH 溶液で微酸性になるまで中和し、糖液は45~50°Cで減圧濃縮を行つて約200ccとする。それに約4倍量の無水アルコールを加えて放置し、澱粉及びデキストリンの一部を沈澱させ、これを濾別し沈澱は数回アルコールで洗滌後洗液は前の濾液に混じて、再び減圧濃縮して250ccとなし糖定量の供試液とした。糖液中デキストリンの共存はわずかに高い定量値を示す⁽²⁾が大約の糖化率を知る目的で行つた実験である故、完全なデキストリン除去の操作は行わなかつた。

各試料は粉碎後60メッシュで篩つた。小豆のみは40メッシュで篩別を行つた。尚、甘藷は水洗後表皮を除去して輪切にし、速やかに45~50°Cで通風乾燥して後粉碎した。

濾紙は東洋濾紙 No. 6 11cm を使用し、ロートは同型のものをを用い、室温は18~23°Cの間であつた。

の95%以上の値を示し、濾過時間も多少短縮されているが、玉蜀黍、小豆、甘藷、粟では無処理よりも長時間を要し、処理の効果が見られなかつた。

T.C.A. 法は Barnstein 法より沈澱洗滌に長時間を要し、澱粉質食品及び飼料成分の分析に用いるには不適當である。

総 括

I. 澱粉質食品及び飼料中の純蛋白質を迅速定量する方法に就いて記載した。

II. 本法による時は、沈澱の洗滌所要時間を Barnstein 法の1/2~1/10に短縮することができ、且つ Barnstein 法によつて定量した結果と殆んど差は認められないので、本法は澱粉質食品及び飼料に適用されることを認めた。但し、甘藷は例外であつた。

III. 本報に提案した定量法は次の如くである。

(1) 加水分解：試料1gを三角フラスコに秤取し、5%蟻酸溶液20ccを加えて冷却管を附し、湯煎中に30分間保持する。

第 6 表

試 料	Barnstein 法		改 良 法				トリクロール醋酸法					
	純 蛋 白 質 %	濾過所 要時間 時.分	純 蛋 白 質 %	濾過所 要時間 時.分	B. 法に 対する 糖化率 %	糖化率 %	無 処 理			処 理		
							純 蛋 白 質 %	濾過所 要時間 時	B. 法に 対する 率 %	純 蛋 白 質 %	濾過所 要時間 時	無処理に 対する 率 %
玄 米 (梗)	7.94	13.	7.89	2.50	99.37	1.36	7.50	138.	94.46	7.22	59.	96.27
玄 米 (糯)	8.17	112.	8.04	4.00	98.41	1.44	7.46	94.	91.31	7.37	26.	98.79
大 麦 (押麦)	8.97	102.	8.85	4.30	98.66	2.77	7.37	184.	82.16	7.60	97.	103.12
小 麦 (全粒)	13.37	21.	13.31	2.30	99.55	3.24	11.61	76.	86.84	10.94	75.	93.37
ライ麦 (全粒)	11.10	140.	10.88	8.00	98.02	5.55	9.04	183.	86.34	8.93	85.	98.78
玉蜀黍 (黄)	9.65	7.30	9.54	7.30	98.86	2.21	8.69	32.	90.05	8.28	98.	95.28
粟 (糯)	7.89	6.	7.90	3.00	100.13	0.47	7.55	27.	95.69	7.06	79.	93.51
小 豆 (全粒)	21.37	11.	20.78	3.00	97.24	6.98	19.72	23.	92.28	17.76	146.	90.06
甘 藷 (乾)	2.48	17.	2.37	23.00	95.56	13.52	1.78	121.	71.77	1.90	190.	106.74

以上の結果を総合すると、改良法は Barnstein 法の97%以上の値を示して(例外、甘藷)殆んどその差異がなく、濾過所要時間は1/2~1/10に短縮出来る。その際の濾液も Barnstein 法の約2/3量でCu⁺⁺, SO₄^{''}の反応が消失する。但し、玉蜀黍、甘藷は澱粉粒の性質、又は他成分による影響等のためか沈澱洗滌に長時間を要した。一般に糖化率の高いもの程 Barnstein 法に対する比率は低い値を示し、甘藷は糖化率13.52%で最も高く比率は最も低かつた。即ち、本法は甘藷を除いた澱粉質食品及び飼料中の純蛋白質迅速定量法として適用し得ると認められる。

T.C.A. 法(処理)は、小豆、粟、小麦を除き無処理

(2) 中和：処理液を冷却後 dil. Na₂CO₃ 溶液又は dil. NaOH 溶液で微酸性になるまで中和する。

(3) 沈澱：これに CuSO₄ 溶液 25cc を加え、よく攪拌しながら NaOH 溶液を注加し、放置して蛋白質を沈澱させる。

(4) 濾過及び洗滌：上澄液を濾紙上に傾瀉し Cu⁺⁺ 又は SO₄^{''} の反応のなくなるまで湯湯で洗滌し沈澱を全部濾紙上に移す。

(5) 分解：濾紙内容を濾紙と共に分解瓶に入れ Kjeldahl 法によつてその窒素を定量する。

(昭和29年5月第8回栄養食糧学会総会において発表)

引 用 文 献

- 1) A. Stutzer : J. f. Landw., 28, 114 (1891)
- 2) F. Barnstein : Landw. Vers.-Stat., 54, 327 (1900)
- 3) 東大農芸化学教室 : 実験農芸化学(朝倉書店), 上巻 107 (1952)
- 4) R. J. Block : Advances in Protein Chemistry, 2, 119 (1945)
- 5) R. J. Block and D. Bolling : The Amino Acid Composition of Proteins and Foods, 2nd

Ed. (THOMAS) 375 (1951)

- 6) 神 立 誠 : 畜産の研究, 4, 775 (1950)
- 7) E. Kofrányi : Z. Physiol. Chem., 287, 170 (1951)
- 8) 藪田貞次郎, 麻生清 : 日農化誌, 15, 171 (1939)
- 9) 逸見文雄, 友枝幹夫 : 日農化誌, 19, 381 (1943)
- 10) 神立誠, 保井忠彦 : 日農化誌, 25, 27 (1951)
- 11) 神立誠, 佐藤民雄 : 日農化誌, 投稿中
- 12) 松尾義之, 松井治二郎 : 醸酵工学, 30, 326 (1952) (東大・農・農芸化学科栄養化学教室)

銅 の 機 能 と 代 謝

銅は血液、血漿、細胞中にあり、赤血球銅は比較的一定である。血漿銅は変化する。銅減少血症は稀である。血漿銅は大部分が、銅蛋白(α -globulin に相当)の形で存在する。極少量がいくつかの蛋白分層と弛く結合し、輸送銅となつている。銅不足は重い低色性小血球性貧血、低鉄血症、低銅血症、中等度の白血球減少、骨髓正常赤芽球性増殖を来す。銅欠乏性豚では、鉄を充分与えても鉄の全身中含有量は少いし、銅療法は同時に鉄をやらぬと効かない。銅鉄同時に欠乏している豚では、鉄療法で血漿鉄の増加がないが、銅を追加するとすぐ増加する。これは銅は胃腸よりの鉄吸収をよくすることを示すものである。又銅は組織からの鉄動員に関係する様であ

る。即ち銅欠乏動物の身体中の鉄の減損は、主として血色素区分にあり、これは鉄の組織から血漿への動員が減少したことを示唆する。又このことは銅欠乏豚に銅投与で血漿鉄は非常に速に上昇することでも支持される。又銅欠乏では、血色素合成の際の鉄利用障害が来る。これは鉄の静脈内又は腹腔内投与では、銅不足による貧血を救うことが出来ないことでも知り得る。更に radioaktive の鉄の静注による研究で、銅欠乏豚では血色素合成のための鉄の摂取が少いことを知つた。Studies on the function and Metabolism of copper. M. M. Wintröbe, G. E. Cartwright and C. J. Gubler. J. Nutr. 60, 395 (1953) (野崎)

血 清 中 の 不 飽 和 脂 肪 酸

93 例の栄養のよい乳幼児と 57 例の栄養のわるい乳幼児について、総脂肪酸、及び二重結合を夫々 2, 3, 4, 6 個有する dienoic, trienoic, tetraenoic 及び hexaenoic acid の血清濃度を測定した。総脂肪酸量は両者の子供に差がなかったが、dienoid, tetraenoic, hexaenoic acid の濃度は栄養の悪い子の方が健康な子よりも明かに低かつた。trienoic acid 濃度は栄養不適当の子の方

が高かつた。又全例に pentaenoic acid の少量が認められた。H. F. Wiese, R. H. Gibbs and A. E. Hansen Essential fatty acids and human Nutrition, 2. Serum level for unsaturated fatty acids in poorly-nourished infants and children. J. Nutr. 52:367 (1954) (野崎)