うに考えられる。初期の反応 I-A は衝突反応、反応開始後の反応 I-A, 反応 I-B は活性水素をもつアミノ基と OH 基間の二つの水素結合を含む 4 員環錯結合の形成によるアミノ基の分極の増大、反応 II は第三アミノ基と OH 基間の水素結合による OH 基の活性化等が反応機構の主体であると考えられる。無触媒反応では、アルカリ触媒反応に比べて榊原⁸⁾が認めたような、付加物 $\text{RNH}(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_n\text{H}$ は生成しにくく、性能的にすぐれたものとなる。さらにアルカリ触媒反応で一般に誘導期間といわれているものは実際には誘導期間でなく反応速度が小さいためによるものであり、また急激な反応速度の上昇にはたとえアルカリ触媒存在下

といえども、本報で明らかにした反応機構（自触媒機構）を無視できないと思われる。高温における赤外吸収スペクトルや核磁気共鳴スペクトルならびに反応速度定数の解明によって、これらの反応機構が妥当であるかが決定されるが、いずれも測定困難であり、また著者の目的とするところでないのでこの程度の考察に止めた。しかし現在までに得た結果から、ここに述べた機構は妥当なものと思われた。

(昭和 33 年 11 月 6 日, 日化名古屋大会油脂討論会, 昭和 34 年 11 月 10 日, 同上, 昭和 35 年 4 月 5 日, 日化第 13 年会, 昭和 36 年 4 月 2 日, 同上第 14 年会にて分割発表)

照射小麦グルテンのポーラログラフ的研究

(昭和 37 年 4 月 6 日 受理)

道口 正雄*・岡田 郁之助**

さきに著者らは γ 線照射による小麦グルテンの変性について二、三の知見を報告したが、今回は更に照射グルテンのポーラログラフタンパク波の測定を中心に検討を進めた。

照射小麦グルテン粉末 ($44 \sim 1067 \times 10^4 \text{ rep}$) をそれぞれ 0.025 N 水酸化ナトリウム, 0.02 N 酢酸, 10% 尿素溶液および 60% エチルアルコールに懸濁させた液のロ液について、タンパク波、溶解度および紫外吸収スペクトルを測定した。

水酸化ナトリウム以外の抽出液では、照射量の増加につれて溶解度および吸収極大値は増加した。水酸化ナトリウム抽出液では、全試料ともほぼ 95% の溶解度を示した。

それぞれの抽出液について、タンパク波の第 1 波および第 2 波の波高には γ 線照射による相違が明確には認められず、いずれもほぼ対照試料と同じであり、また波形の様相にもほとんど変化が認められなかった。しかし、水酸化ナトリウム抽出液以外では、溶解度が異なっているため、対照および各照射試料の電解液中のタンパク質濃度には差異がある。

全抽出液についてタンパク波の第 1 波および第 2 波の極大は、それぞれ -1.4 V および -1.6 V 付近に示された。対照試料の尿素抽出液は $20 \sim 55 \text{ r/ml}$ のタンパク質濃度範囲で、その他の抽出液では $30 \sim 80 \text{ r/ml}$ の範囲では第 2 波の波高はタンパク質濃度に対しほぼ直線的に増加し、またそれぞれ Crossing point を有することが認められた。

1 緒 言

さきの報文¹⁾で著者らは γ 線照射による小麦グルテンの変性について検討し、溶解度、紫外吸収スペクトルおよびアミノグラムの性状の変化を観察したが、今回は小麦グルテンに及ぼす γ 線照射の影響をポーラログラフタンパク波測定によって検討した。

タンパク質がタンパク波を現わすためには、シスチンがその構成要素として含まれていなければならないが、幸い小麦グルテン中にはシスチンが 1.9%²⁾ ほど含有されており、タンパク波の測定は可能である。

γ 線を照射したタンパク質のタンパク波については、菊地らがアルブミン、グロブリンおよび魚肉について、また小原らが牛肉について一連の研究を報告している。菊地ら³⁾の研究によると $60 \times 10^4 \text{ r}$ 以上の照射量ではアルブミンもグロブリンもタンパク波の波高が減少し、特にグロブリンの波高の減少は、アルブミンより著しく、 $120 \times 10^4 \text{ r}$ 以上の照射によるグロブリンの波高の減

少はグロブリンの沈殿のためであり、 $60 \times 10^4 \text{ r}$ 以下のアルブミンおよびグロブリンの波高の減少はタンパク質の分子変化のためと推察しており、また魚肉⁴⁾については、その水抽出液のタンパク波は γ 線照射により減少するが、魚肉のタンパク波はほとんど変化しない。これは、魚肉中に存在する保護物質のためであろうと推論している。小原⁵⁾らは γ 線照射 ($70.3 \sim 259 \times 10^4 \text{ r}$) 後 0°C , 6 日間放置した牛肉の水抽出液ならびに食塩水抽出液のタンパク波はいずれの照射牛肉でも第 1 波と第 2 波の極大の位置、波高および波形とも対照とほとんど異なった変化を示さないことを報告している。

しかし $800 \times 10^4 \text{ r}$ の高線量になると、食塩水抽出液タンパク波の波高が減少することを観察している。

小麦グルテンについての著者らの実験において使用したどの溶媒による抽出液でも、対照および照射試料のタンパク波の波高、波形および極大の位置にはほとんど変化が認められなかった。

グルテンの γ 線照射による変性の機構を推察する手段としては、本報のポーラログラフタンパク波の測定によっては必ずしも十分な結論を得るに至らなかったが、 γ 線照射グルテンのポーラ

* 東京都立衛生研究所：東京都新宿区百人町。

** 東京水産大学：東京都港区芝海岸通り。

1) 道口, 横山, 岡田, 工化 62, 1883 (1959).

2) B. Sullivan, J. Agr. Food Chem. 2, 1231 (1954).

3) T. Kikuchi, T. Hiruno, I. Okada, J. Tokyo University of Fisheries 45, 89 (1959).

4) 小原, 小笠原, 農化 34, 208 (1960).

5) 小原, 小笠原, 農化 34, 795 (1960).

6) T. Kikuchi, T. Hirano, I. Okada, J. Tokyo University of Fisheries 45, 144 (1959).

ログラフタンパク波の測定結果を報告し、小麦グルテンに及ぼす γ 線照射の影響についての参考資料とした。

2 実験方法

2.1 供試試料

さきの報告に使用した試料と同一の試料を用いた。すなわち、 44×10^4 , 122×10^4 , 293×10^4 , 1067×10^4 rep 照射のもので、照射時からほぼ2年を経過しているが、溶解度および吸収スペクトル測定の結果から、経時による試料の変化は認め難かった。

2.2 各種抽出液の調製

試料 0.1 g を精秤し、それぞれ下記各種溶媒 50 ml ずつに十分懸濁させ、時々かきまぜながら 30 分間室温に放置後、東洋濾紙 No. 2 で口過し、得られた口液をタンパク波測定に供した。

- 1) 10% 尿素溶液 2) 60% エチルアルコール
- 3) 0.02 N 酢酸 4) 0.025 N 水酸化ナトリウム溶液

2.3 ポーラログラフタンパク波の測定方法

電解液の組成は 10^{-3} mol/l CoCl_2 , 0.1 mol/l NH_4Cl , 0.1 mol/l NH_4OH であり、各成分の 10 倍濃度の溶液を電解液調製の際におのおの 5 ml ずつとり、混和し、これに酢酸抽出液のタンパク波測定の場合は抽出後 3 ml を、水酸化ナトリウム抽出液の場合は 2 ml, エタノールおよび尿素抽出液の場合は 4 ml を加え、十分混和した後、蒸留水で 50 ml に定容した。電解温度は $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 加電圧範囲 $-0.8 \sim -1.75 \text{ V}$ において電解し、ポーラログラムを記録した。波高は常法⁷⁾にしたがって測定し第1波, 第2波の極大の高さを mm で表わした。使用装置は柳本自記記録式ポーラログラフ PA-102 型である。

2.4 タンパク質濃度の測定

10% 尿素抽出液を除く他の3種の対照試料抽出液中のタンパク質含量を、ミクロケルダール法によって測定し、これに基づいて銅-Folin 呈色法⁸⁾をもちいて 500 m μ における吸光度を測定しておのおのの検量線を作製し、これから照射試料の抽出液中のタンパク質含量を求めた。なお、尿素抽出液中のタンパク質含量は 60% エタノール抽出液の検量線に基いて算出した。銅-Folin 法による検量線はエタノールおよび酢酸抽出液ではほぼ同じであるが、水酸化ナトリウム抽出液ではやや高目である。

2.5 紫外外部吸収スペクトルの測定

60% エタノールおよび 0.02 N 酢酸抽出液では 2 倍希釈液, 10% 尿素抽出液では口液原液について 240~310 m μ の波長範囲にわたる吸収スペクトルを測定した。水酸化ナトリウム抽出液はいずれも混濁が著しいので、測定は不能であった。使用装置は島津製自記式分光光度計 RS-27 型である。

3 実験結果および考察

3.1 溶解度

図1に各種溶媒に対する溶解度の変化を示す。秤取試料中の総タンパク質に対する口液中のタンパク質の百分率をもって溶解度とした。水酸化ナトリウム抽出液中には試料に含まれるタンパク質の大部分が溶解し、対照と全照射試料との間には溶解度の差が認められないが、他の溶媒においては照射量の増加につれて溶解

図1 γ 線照射による溶解度の変化

●—●: 0.025 N カゼイン抽出液 ○—○: 0.02 N 酢酸抽出液
●---●: 60% エタノール抽出液 ○- -○: 10% 尿素抽出液

度は増加した。

また γ 線照射による変性のために、照射試料の銅-Folin 呈色度に差異が生じるかどうかを確かめるために、最高線量試料の各抽出液（尿素抽出液を除く）についてケルダール法によってタンパク質量を測定してみたが、いずれも銅-Folin 法で得た値とほぼ近似的な値がえられ、照射による変性で呈色度が異なることはないようである。

水酸化ナトリウム抽出液はすべて灰白に淡く濁っており、尿素およびエタノール抽出液はすべて澄明であり、また酢酸抽出液は 293×10^4 rep 以下の試料では澄明であったが、最高線量試料の抽出液だけは灰白微淡濁で他の試料と著しく相異していた。さきの報告¹⁾でもエタノール-酢酸混液による抽出液では、最高線量試料は著しい混濁を示し、酢酸可溶性フラクションに変化が生じていることが察せられる。

3.2 紫外外部吸収スペクトル

酢酸および尿素抽出液の吸収スペクトルを図2, および図3に示す（エタノール抽出液のスペクトルは尿素抽出液と類似しているので略す）。

どれも吸収極大は 277 m μ にあり、吸収極小はエタノールおよび尿素抽出液では 255 m μ に認められたが、 293×10^4 rep 以下の酢酸抽出液では、250~255 m μ の範囲では吸光度にほとんど差異が認められず極小の位置が明確でなかった。

図2 0.02 N 酢酸抽出液の紫外外部吸収スペクトル
---: 1067×10^4 rep - - - : 293×10^4 rep —: 対照

7) 舘 勇, ポーラログラフイー p. 385~410 (1954) 岩波書店.

8) 日本化学会編, 実験化学講座 23, 生物化学 I, p. 37 (1957) 丸善

また各抽出液の D_{277}/D_{255} はエタノール抽出液では対照 1.44, 293×10^4 rep 1.41, 1067×10^4 rep 1.40 であり, 尿素抽出液ではそれぞれ 1.25, 1.21, 1.26, 酢酸抽出液では対照 1.53, $122 \times$

図 3 10% 尿素抽出液の紫外吸収スペクトル

--- : 1067×10^4 rep - · - : 293×10^4 rep — : 対照

図 4 対照試料水酸化ナトリウム抽出液タンパク波の波高と CoCl_2 濃度との関係

I : 第1波 II : 第2波

図 5 水酸化ナトリウム抽出液タンパク波の波高とタンパク質濃度との関係

I : 第1波 II : 第2波

図 6 エタノール抽出液タンパク波の波高とタンパク質濃度との関係

I : 第1波 II : 第1波

図 7 酢酸抽出液タンパク波の波高とタンパク質濃度との関係

I : 第1波 II : 第2波

図 8 尿素抽出液タンパク波の波高とタンパク質濃度との関係

I : 第1波 II : 第2波

10^4 rep 1.53, 293×10^4 rep 1.52 と皆ほぼ同じ数値を示した。最高線量試料の酢酸抽出液のスペクトルは他の試料と著しく異なっているが、これはこの抽出液が澄明でないことに由来しているものとする。

D_{277}/D_{255} にほとんど差異がないこと、およびスペクトルの図形等を考え合せて、照射による吸収極大の増加はタンパク質濃度の増加によるものであろうと考える。

3.3 タンパク波におよぼす塩化コバルト濃度の影響

対照試料の水酸化ナトリウム抽出液について塩化コバルト濃度だけを変化させ、その他の電解液組成、温度ならびにタンパク質濃度を一定にした場合のポーログラムを測定した(図4参照)。この場合の電解液 1 ml 中のタンパク質含量は 65.3 r であった。

このタンパク波の第1波と第2波の極大は、それぞれ -1.4 V と -1.6 V 付近に認められ、 $0.4 \sim 1.6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ の塩化コバルト濃度の範囲では、第1波、第2波とも波高と Co^{2+} 濃度の間にはほぼ直線関係が認められ、また $0.2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ では第2波は第1波より低くなり、ほぼ $3.15 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ 付近に Crossing point が認められた。

3.4 抽出液濃度の影響

塩化コバルト(II), 塩化アンモニウム, アンモニア濃度および電解温度をそれぞれ一定とし、電解液に加える抽出液のみを変化した場合の対照試料の各種抽出液のポーログラムを測定し(図9に

図 9 小麦グルテン(対照試料)水酸化ナトリウム抽出液タンパク波におよぼす抽出液濃度の影響

感度 $0.1 \mu\text{A/mm}$ タンパク質濃度：図5参照

表 1 各種抽出液タンパク波の波高およびタンパク質濃度

溶 媒	対 照			44×10 ⁴ rep			122×10 ⁴ rep			293×10 ⁴ rep			1067×10 ⁴ rep		
	1波 (mm)	2波 (mm)	タンパ ク質量 (γ/ml)	1波 (mm)	2波 (mm)	タンパ ク質量 (γ/ml)	1波 (mm)	2波 (mm)	タンパ ク質量 (γ/ml)	1波 (mm)	2波 (mm)	タンパ ク質量 (γ/ml)	1波 (mm)	2波 (mm)	タンパ ク質量 (γ/ml)
0.025 N NaOH	50	60	52.5	47	57	51.9	49	59	51.9	50	58	51.7	47	56	52.2
0.02 N 酢 酸	51	63	49.2	49	60	52.5	49	60	52.5	47	58	52.8	49	61	62.4
60% エタノール	52	70	61.6	52	71.5	68	53	73.5	68	52	70	72	54	74	80
10% 尿 素	48	60	37	47	58	37	48	60	40	45	56	43.6	49	63	50.9

一例を示す), その場合のタンパク質濃度 (電解液 1 ml 中のタンパク質含量) とタンパク波の波高との関係を示すと図 5~8 の通りとなる。

どの抽出液も第 1 波と第 2 波の極大はそれぞれ -1.4 V と -1.6 V 付近に認められ, 尿素抽出液以外の抽出液では 30~80 r/ml のタンパク質濃度範囲では第 2 波の波高とタンパク質濃度の間には直線関係が認められた。しかし, これ以上のタンパク質濃度になると第 2 波の波高は直線的には増加せず, 吸着曲線の形をとるようである。尿素抽出液は同一タンパク質濃度では第 1 波, 第 2 波共他の抽出液より高い波高を示し, 25~55 r/ml のタンパク質濃度範囲内では第 2 波の波高とタンパク質濃度の間に直線関係が認められた。

水酸化ナトリウム抽出液では 35 r/ml, 尿素抽出液では 25 r/ml のタンパク質濃度に Crossing point が認められ, エタノールおよび酢酸抽出液では 30~35 r/ml のところに Crossing point があるものと推定される。

3.5 照射グルテンのタンパク波

各種溶媒の対照および照射試料の抽出液のタンパク波の波高およびタンパク質濃度を表 1 に, また, それらのポーログラムの中水酸化ナトリウムおよび酢酸抽出液のタンパク波を図 10 および 11 に例示する。

同一溶媒の抽出液については, 対照および各照射試料とも同一 ml 数の抽出液を電解液に加え, ポーログラムを測定した。しかし, 表に示されるように, 照射によって, 溶解度が増加するため, 対照および照射試料の電解液中のタンパク質濃度は異なっている。

溶媒が異なっても, 全試料とも第 1 波ならびに第 2 波の極大はそれぞれ -1.4 V および -1.6 V 付近にあり, 幾分の高低はあるが照射による波高の変化はほとんど認められないし, また波形も対照と比較してさしたる差異が認められない。

また, 対照と最高線量試料について電解液に加える抽出液量を変化させ, ポーログラムを測定してみたが, どの溶媒の抽出液についてもポーログラムには波形, 波高ともさしたる差異が認められなかった。

小原ら⁴⁾の報告でも, 照射牛肉の水抽出液では照射によるタンパク質濃度の変化も, またタンパク波の波高波形の変化も認められず, また, 食塩水抽出液では照射による波形波高の変化はないが, 対照 107.4 r/ml, 185×10⁴ r, 94.2 r/ml, 259×10⁴ r, 88.8 r/ml とタンパク質濃度が減少するという現象が観察されている。また魚肉⁵⁾についても, 照射によるタンパク波の変化はないとの報告もあり, 照射による食品のタンパク質の変性をタンパク波の測定によって評価することはむずかしいのではなからうか。1%

図 10 小麦グルテン水酸化ナトリウム抽出液タンパク波に及ぼす γ 線照射の影響

C: 対 照
1: 44×10⁴ rep 2: 122×10⁴ rep
3: 293×10⁴ rep 4: 1067×10⁴ rep

図 11 小麦グルテン酢酸抽出液タンパク波に及ぼす γ 線照射の影響

感度 0.1 μA/mm
C: 対 照
1: 44×10⁴ rep 2: 122×10⁴ rep
3: 293×10⁴ rep 4: 1067×10⁴ rep

以下のアルブミンおよびグロブリン溶液では, 照射によってタンパク波の波高の減少が観察⁹⁾されているが, このような低タンパク質濃度の溶液では, 照射された水分子より生ずる種々の Radical⁹⁾ による間接作用が強く作用し, また共存する保護物質⁶⁾がないから, 変性が肉類や穀物の場合と比較にならぬほど激烈なためであろう。

しかし, 対照と最高線量試料を比較してみると, 酢酸抽出液では約 13 r/ml, エタノール抽出液では約 18 r/ml, 尿素抽出液では約 14 r/ml ほど最高線量試料の電解液中のタンパク質濃度が高いにもかかわらず, タンパク波の波高には差異が認め難かった。照射によってタンパク質濃度が変わっているにもかかわらず, タンパク波に差異がないという現象は, 興味をもたれる問題であり, 目下これらの現象および γ 線照射によるグルテンの変性機構を更に検討するために電流滴定による SH 基の測定を行なっている。

(実験の大略は 1962 年 4 月 3 日, 日化第 15 年会講演)

当実験に御助力いただいた日本製粉中央研究所青山所長および横山義春氏, 御批判をいただいた早稲田大学武富教授および鈴木助教授に深く感謝致します。

9) Department of Scientific and Industrial Research, Food Investigation, Special Report No. 61, 16 (1955).