乳製品のアミノ・カルボニル反応に関する研究 (第 2 報)

牛乳中の尿素 — その直接比色定量法と含量 —

足 立 達 (東北大学農学部畜産利用学研究室)

昭和 30 年 10 月 10 日 受 理

Studies on Amino-Carbonyl Reaction of Milk Products. Part II.

On Urea in Milk — its Direct Colorimetric Determination and Contents. —

By Susumu ADACHI (Laboratory of Animal Products Technology,

Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

高温加熱牛乳に認められる褐色化反応は所謂蛋白質性アミノ-糖系の反応以外に尿素-乳糖系反応が著しく関与していることは既に明らかにしたが^(1~3), この反応要因としての牛乳中の尿素存在の実態に就き検討を加えることは, 尿素乳糖反応系の加熱牛乳における褐色化反応への関与性を認識する上に必須であると考えられる. そこで牛乳中の尿素的定量法の確立と尿素含量の推測及び尿素含量と褐色化反応の関係が決定されねばならない.

古くから尿素的の定量に使用されて来た Urease 法⁽⁴⁾は最近著しく改良され, 或いは微量拡散法⁽⁵⁾⁽⁶⁾, 検圧法⁽⁷⁾, 或いは減圧蒸溜法⁽⁸⁾, 又微量通気法⁽⁹⁾等を採用して微量定量法への拡張を行い今尚尿素定量法の一として重用されている⁽¹⁰⁾. その定量操作の比較的繁雑にも拘らず標準法として認められて来たのは urease の尿素に対する特異的作用にあることはいうまでもない. 併しこのウレアーゼ法も試料中に酵素阻害物が存在する場合には適用されず, 又 urease 標品の一定力価のものを得難い為得られた結果が不正確となり, しばしば操作が複雑となる欠陥を有していた. そこでこれに代る定量法の確立が要請される儘に各種の重量法, 容量法及び比色法が提案されて来た. 重量法として実用されたのは Xanthohydrol 法であつた⁽¹¹⁾ この方法も容量法⁽¹²⁾, 比色法⁽¹³⁾, に改変され又尿素に過剰の NaOBr を加えた後, 未反応の NaOBr を Na_2HAsO_3 で滴定する容量法の案出があつたが⁽¹⁴⁾, 尿素そのものを分解することなしに直接比色定量する方法が近年行われている. 1939 年 FEARON が尿素は diacetylmonoxime と反応して強酸性溶液中で黄色を呈することを観察して以来⁽¹⁵⁾, この呈色反応は生体液中の尿素的の定量に使用されて⁽¹⁶⁾, 尿素的の直接比色定量試薬として知られて来たが⁽¹⁷⁾, この試薬の分解によつて生ずる hydroxylamine が呈色反応を阻害するので遊離の diacetyl の使用を賞用することもあり⁽¹⁸⁾, 反応条件の微妙が欠点と考えられている. 一方 ARCHIBALD は 1944 年 α -isonitrosopropiophenone の尿素的の定量への使用の可能性を示し⁽¹⁹⁾, 新たな尿素的の直接比色定量法を提案した⁽²⁰⁾. これは血液中の尿素的の定量に最適な方法とされて来たが⁽²¹⁾, 生理的に異常な或る鼠 (uremic rat) の血液中の定量に際してこの方法による値は標準ウレアーゼ法の与える値に比較して高値を示めることが認められて⁽²²⁾, 使用範囲が自ら限定された. 極く最近, 筆者は α -dimethylaminobenzaldehyde によるペーパークロマトグラフの半定量法を発表したが⁽²³⁾, 更に WATT と CHRISP とはこの呈色反応を定量化し, 尿素的の Spectrophotometric 測定を行つている⁽²⁴⁾. しかし, この方法には, 反応の特異性の点で問題が残されている⁽²⁵⁾⁽²³⁾.

牛乳中の尿素的の定量に從來から使用された方法は全て Urease 法であり, 直接比色定量法は試みられていない. これらの定量法は血液中の尿素的の定量法を採用したもので殆ど変更を加へていないが, これがウレアーゼ法である限り他の混在物の影響を無視し得たのでこの事は当然であつた. 併し直接比色定量法を牛乳に適用するには, 乳汁中には血液と異り乳糖, 脂肪等が含まれており, 血液に試みられた方法を検討を加えずに直ちに適用することは出来ない.

筆者はこの報告に於いて, 操作の簡単, 定量値の正確性から α -isonitrosopropiophenone による尿素的の直接比色法を牛乳に就いて検討を加え, この定量法によつて個乳及び市乳中の尿素含量を測定し, 更にその含量と加熱牛乳の褐色化反応との関係を検して, 從來から加熱牛乳の褐色化反応は各牛乳によつて異るとされていたこと⁽²⁶⁾に対して一の説明を与えることが出来た.

実

験

I. 定量法の検討

(1) α -Isonitrosopropiophenone の合成 HARTUNG 及び MUNCH の方法にはほぼ準じて propionic acid から次の如くにして合成した⁽²⁷⁾. Propionic acid 50 g を phosphopentachloride 170 g 中に加えて chlorina-

tion を行い propionylchloride 55 g を得る。この propionylchloride 50 g と benzene 60 g との混合物から FRIEDEL-CRAFT 反応により propiophenone (I) (b.p. 123°/25 mm) 75 g を合成する。尚この反応時 BRADLEY 及び KENNER のいう如く⁽²⁸⁾, AlCl_3 を充分追加添加 (10 g) して好収量を納めることが出来た。次いで propiophenone 50 g を文献記載のように処理して α -isonitrosopropiophenone (II) を結晶化せしめる。得た粗結晶は淡紅色を呈しているのでトルオールから再結する。白色結晶。収量 32 g. m.p. 112~113°.

(2) 定量法及び呈色の安定性 ARCHIBALD は比較的詳細に反応条件の検討を行つているが呈色の安定性に就いては殆ど述べなかつた。ただ遮光下に操作を行い、加熱後 15 分冷却して比色すべきことを記載しているのみである⁽²⁹⁾ので、発色後の呈色の安定性を検討し比色操作中の誤差を確める必要がある。試薬の調製、定量法の大体はほぼ ARCHIBALD 法に準じた。

定量法： 試料 2 cc を大型共栓付試験管に採り、蒸溜水 5 cc 硫磷酸混液 (濃硫酸 1 容, 濃磷酸 3 容, 水 1 容の混合物) 5 cc α -isonitrosopropiophenone 液 (4 g をエチルアルコール 100 cc に溶解する) 0.4 cc を添加し、攪拌混合の後遮光し得る略密封容器内の沸水中に浸して正確に 1 時間加熱する。加熱終了後とり出して遮光下に流水中に浸漬して急冷し、15 分後完全に冷却するのを俟つて比色する。比色には Beckmann spectrophotometer DU 型を使用し 10 mm の cell により 540 μ に於ける Absorbance を求め尿素含量を算出する。牛乳が検体の場合には除蛋白せねばならず各種の除蛋白剤が使用し得られるといわれるが、本実験では SOMOGYI の水酸化亜鉛を使用した⁽²⁹⁾。牛乳 1 cc を遠心沈澱管にとり蒸溜水 7 cc を加えて稀釈し SOMOGYI 試薬計 2 cc を加えて攪拌混合し 5 分放置後、1500 r.p.m. 5 分間の遠心分離を行い上澄液 2 cc を試料とすれば便利である。

試料として牛乳を用い上記の定量法に従つて操作し、加熱冷却終了後の呈色試料を直ちに比色する外、室温 (20°) 一定時間、或いは暗所に放置し、或いは散光下に、又日光直射下に置き、試料呈色後の放置条件を変えて比色を行い、その呈色安定性に及ぼす影響を検討した。その成績は Table 1 に示めす通りである。この実験によ

Table 1. Stability of the Color Reaction of Urea formed by α -Isonitrosopropiophenone under some Leaving Conditions after Heat Treatment.

Sample number	Under standard condition*	Optical density of color produced from urea						
		Under the dark			Under direct rays of the sun		Under scattered light of the sun	
		20 min.	60 min.	24 hrs.	3 min.	6 min.	3 min.	12 min.
1	0.287	0.287	0.287	0.283	0.157	0.065	0.287	0.282
2	0.366	0.366	0.366	0.350	—	—	—	—
3	0.315	0.315	0.315	0.310	0.168	0.082	0.315	0.300
4	0.320	0.320	0.320	0.310	—	—	—	—
5	0.180	0.180	0.180	0.175	0.071	0.024	0.180	0.175
6	0.410	0.410	0.410	0.388	0.306	0.142	0.410	0.368
7	0.693	0.693	0.693	0.599	—	—	—	—

The optical density were obtained from the reading taken in the absorbance of the Beckmann spectrophotometer set at wave-length 540 μ . The samples were left at room temperature.

* Readings are taken after 15 minutes of cooling.

れば発色冷却後遮光暗処に放置した場合呈色は極めて安定であり、30時間放置後に於いて極く微かの褪色を見るのみである。併し直射日光下では非常に不安定で日光直射の条件下では比色測定は不可能と思われる。散光下ではこの呈色も比較的安定であり、散光下での操作はこの許容範囲下に行えば差支えないであろう。

(3) 牛乳への添加尿素の回収性 牛乳中の尿素含量とその呈色測定値としての spectrophotometer の読みとの間の回帰係数を求めて牛乳中への添加尿素の回収性を検討した。先ず純尿素水溶液に就て上記の定量法を行い photometer の Absorbance の読み (X) と尿素量 (Y) との間の関係を最小自乗法によつて Y の X に対する回帰方程式を作製しその回帰係数の信頼限界を *t*-test によつて検討することによつて求めた。その成績は Table 2 に示めた。この母集団の回帰係数は 5% の危険率で 102.74 ± 2.08 であると推定することが出来る。次に同様なことを牛乳について試みる為に、800 mg % の尿素水溶液を 5~0 cc とり、これに蒸溜水を加へ

Table 2. Relation between Added Urea and Measured Readings in Beckmann Spectrophotometer.

Urea (mg %)	11.20	21.40	32.10	37.45	53.50	80.25
Reading (Absorbance)	0.107	0.215	0.320	0.370	0.520	0.785
Regression coefficient equation	$Y = 102.74X - 0.365$					
Regression coefficient with standard deviation	102.74 ± 2.0764					

Table 3. Relation between Added Urea in Milk and Measured Readings in Beckmann Spectrophotometer.

Urea (mg %)	11.50	19.50	27.50	31.50	35.50	43.50	51.50
Reading (Absorbance)	0.115	0.190	0.263	0.293	0.338	0.410	0.487
Regression coefficient equation	$Y = 107.85X - 0.792$						
Regression coefficient with standard deviation	107.78 ± 6.923						

帰係数として 104.35 を求めることが出来るので、牛乳中の尿素 (Y) と読み (X) との回帰方程式は次式の如くである。

$$Y = 104.35 X$$

(4) ウレアーゼ法と本法による牛乳中の尿素定量値の比較 尿素の定量法としての標準とされているウレアーゼ法と比較して本比色法の結果は一般に僅かに高い値を示めることが尿及び血液中の定量に際して認められているので、牛乳中の尿素定量に際しての本法の正確性をウレアーゼ法との対比に於いて検討しその差異を明らかにしようとした。標準ウレアーゼ法としては PERKINS 法⁽³⁰⁾を採用し定量は同一牛乳試料に就て 6 回行い、その値から得た統計成績は Tabel 4 に示めす通りである。これによつて比色法により得られた値はウレアーゼ法のそれより微かに高値を示めし、変異は 5% の危険率でウレアーゼ法の 2.90% に比して本法のそれは 3.68% であり大であるが、ウレアーゼ法とほぼ同程度に正確であることが判る。

Table 4. Comparison of Milk Urea by Colorimetric and Standard Urease Methods.

Method	Colorimetric method	Standard urease method*
Mean	16.395	16.182
Standard deviation	0.22	0.19
Confidence limit ($\pm$)	0.566	0.469
Coefficient of variation	3.68	2.90

Mean values of urea were calculated from the values obtained quantitatively at times with a sample.

* These values were obtained by means of PERKIN's method.

Table 5. Percentage Content of Urea and Test of Significance by the Analysis of Variance Method for Urea Content in Individual Cow's Milk.

Cow number	Percentage content of urea (mg %)						
	1st day	2nd day	3rd day	4th day	5th day	6th day	7th day
1	31.02	39.76	46.80	49.90	46.12	55.83	43.43
2	25.63	39.22	42.13	37.71	40.19	34.26	36.41
3	40.19	58.62	68.89	73.75	72.35	57.53	62.30
4	53.53	50.00	41.42	53.13	43.56	40.81	45.32

Test by analysis of variance method

Source of variation	Sum of squares	D.F.*	Mean square	F
Between class	2365.2390	3	788.413	12.44
Within class	1520.7788	24	63.3657	
Total	3886.0178	27		

Significant-exceeds the 0.1% point

* Degree of Freedom

え月別、工場別の有意性の検定を行つたが 20% の危険率をもつてしてもこれらの間に有意の差を認めることが出来ない。更に上記期間中に分析した市乳中の値と上記の値との合計 56 試料市乳から得た尿素含量値からこの期間に於ける市乳中の尿素含量の信頼判定を行うと、その含量は 5% の危険率で 14.02~18.37 mg % である。

III. 牛乳中の尿素含量とその加熱による褐色化反応

て全尿素溶液を 5cc とし更に牛乳で稀釈して 100 cc とした後充分混合して試料とし、その 1 cc を採取して定量を行つた。その成績は統計処理の結果と共に Table 3 に示めす通りであつてその回帰係数の推定値は 5% の危険率で 107.85 ± 6.92 となる。斯様な実験を 6 回繰り返へし得られた回帰係数推定値と上記の値とから 5% の危険率で平均回

II. 牛乳中の尿素含量

(1) 個乳中の尿素含量 試料の牛乳

は本農学部附近の牧場繋留の同一飼養条件にあるほぼ泌乳中期の 4 頭のホルスタイン種から得、搾乳直後の朝の混合牛乳から採取して 2 時間以内に分析した。分析は 10 月の中旬、1 週間に亘つて行われた。得られた成績は Table 5 に示めす通りで、個乳

中の尿素含量の個体による差は分散分析の結果 0.1% の危険率で有意であると認められる。

(2) 市乳中の尿素含量

試料としての市乳は仙台市内の市乳処理場からの生産乳を 9 月から 12 月に亘つて毎日 1 回採取し、比色法によつてその中の尿素を定量した成績は統計数値と共に Table 6 に示めた。ここに得られた尿素量を乱塊分散分析法によつて統計処理を加

Table 6. Percentage Content of Urea and Test of Significant by the Randomized Block Experiment for Urea Content in Market Milk.

Market milk number	Percentage content of urea (mg %)			
	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
1	45.91	20.56	18.83	18.52
2	11.07	14.20	12.15	18.73
3	9.89	15.83	13.77	14.20
4	6.76	19.59	18.73	15.93
5	7.84	19.81	19.05	17.33

Test by the randomized block experiment				
Source of variation	Sum of squares	D.F.	Mean square	F
Between raw	273.1385	4	68.2846	0.89
Between column	8.6274	3	2.8749	0.04
Error	923.8041	12	76.9836	
Total	1205.5673	19		

Significant-unexceeds the 20% point

量とその加熱褐色化度との相関々係を求めることによつて更に明確化することが出来るに違いない。そこで仙台市周辺の牧場生産乳 12 種類を試料とし、この 20cc を大型試験管中に封入して 120°, 1.5 時間加熱を行い、加熱前の牛乳中の尿素の含量を上記の方法によつて定量し、更に試料の褐色化度を測定した。

加熱牛乳の褐色化度は第 1 報に示した通り CHOI 法にほぼ準じて、牛乳 10 cc に 10% トリプシン溶液 0.5cc を加え、37° に 3 時間放置した後、20% 三塩化醋酸溶液 5 cc を加え 2 時間放置し濾過し、濾液の 500 mμ に於ける Absorbance を求めて、その数値によつて表わした。この結果によつて得られた尿素含量と褐色化度との

Fig. 1. Correlation coefficient between color of heated milk and urea content of Milk before Heating.

Correlation coefficient 0.446
 Confidence limit with 90% significant-level 0.0678~1.0278

Samples were heated to 120° for 1.5 hours in sealed tube. The color were determined by means of trypsin-method.

従来から牛乳のアミノ・カルボニル反応に基づく褐色化は牛乳毎に異なるといわれていたが、その原因は不明であつた。併しながら前報で明らかにしたように、この反応の主要因の一として尿素が考へられるので、その含量が上述の通り変動すれば、その変動に応じて加熱牛乳の褐色化度は変ずるであろう。この事は既に尿素の附加実験によつて示したが、各種牛乳の尿素含

相関を示めず分布図は Fig. 1 の通りであつて、相関係数 (r) は 0.45 となり相関度は必ずしも大ではないが、相関係数 $\rho=0$ の母集団に就いての帰無仮説は FISCHER によれば次式によつて

$$t = r\sqrt{(n-2)/(1-r^2)} \quad \text{df.} = n-2$$

t を検定することが出来るので⁽³¹⁾、この $r=0.45$ は $t=0.708$ より小さく、1% の有意水準で $\rho=0$ の仮説を棄却することが出来る。したがつて小標本から得られた相関係数ではあるけれども、これは抽出の偶然を示すものではなく、FISCHER が示した如く、 r を Z に変換して、この γ の信頼限界を求めれば⁽³¹⁾⁽³²⁾ 90% の信頼限界で 0.0678~1.0278 となることが明らかとなる。

考 察

以上の通り α -isonitrosopropiophenone による牛乳中の尿素の比色定量法は簡単迅速の点で優れており、十分使用に堪えるものと考えることが出来る。唯、その精度は標準ウレアーゼ法と比較してやや不十分であり、これは操作段階の多いことに依ると推定されるが、この精度低下段階の決定は別に要因分析の結果を俟たねばならぬであろう。

Table 7. Urea Content of Cow's Milk obtained by Some Investigators.

Investigators	Year	Content (mg %)	Literature
Denis and Minot	1917	19.26~21.40*	(33)
Sato and Murata	1932	13.29~24.87*	(34)
Perkins	1938	8.21~57.94	(30)
Sasaki and Tsugo	1950	4.28~17.12*	(35)
Shahani and Sommer	1951	12.84~42.80	(36)
Adachi	1954	13.28~19.12	

* These values were obtained from urea-N content.

めした様に⁽³⁰⁾、飼養条件による影響がその一因であると推定される。

従つて、前報に於て明らかにしたように、加熱牛乳のアミノ・カルボニル反応に起因する褐色化はその牛乳中に含有される尿素が主要因の一である以上、その含量の変動は褐色化度に影響を与えるが、この間の関係は両者

本法によつて得られた牛乳中の尿素含量の値を、現在迄に得られた文献値と比較すると Table 7 の通りで、従来の値と大差はないが、個乳に就ての値にはかなり大きいものが認められた。この尿素含量の増加の原因は詳かではないが、PERKINS が示

の相関係数の決定によつて再確認される。牛乳の褐色化は牛乳毎に異ると WEBB は記載しているものの⁽²⁶⁾、その原因を指摘し得なかつたが、この結果から、尿素は明らかにこの原因の一を為しているものと見做すことが出来よう。唯、この相関係数は必ずしも高度の相関を示めていないが、これは加熱牛乳の褐色化アミノ・カルボニル反応には、蛋白質、乳糖を始め、その他の要因が含まれており、これらの諸組成成分の変動による影響の合計が本現象となつて発現すると考へられるので、之等の影響を考えに入れるならば上記の結果は当然であろう。

終りに臨み終始御懇篤な御指導を賜つた佐々木林治郎教授、中西武雄助教授に深く感謝致します。

〔附記〕 本論文脱稿後到着した文献によれば、牛乳中の尿素含量は蛋白質含量の高い飼料給与によつて増加し、低蛋白質給与の際には低下することが記載されている⁽³²⁾。

- (1) 足立 達： 科学, 24, 261 (1954).
- (2) S. ADACHI: *Tohoku J. Agr. Res.*, 4, 167 (1954).
- (3) 足立 達： 農化, 29, (1955).
- (4) D.D. VAN SLYKE: *J. Biol. Chem.*, 73, 697 (1927).
- (5) E. J. CONWAY and E. O'MALLEY: *Biochem. J.*, 36, 655 (1942).
- (6) K. BRUNFELDT and H. E. L. JACOBSEN: *Nord. Med.*, 37, 129 (1948).
- (7) K. A. KREBS and K. HENSELEIT: *Z. physiol. Chem.*, 210, 33 (1932).
- (8) R. E. RINEHART, R. D. GRONDAHL, and E. S. WEST: *Arch. Biochem.*, 2, 163 (1943).
- (9) A. E. SOBEL, C. A. HIRSCHMAN and Z. BEIMAN: *Anal. Chem.*, 19, 927 (1947).
- (10) V. E. KINSEY and P. ROBISON: *J. Biol. Chem.*, 162, 325 (1946).
- (11) FOSSE: *Compt. rend. soc. biol.*, 158, 1588 (1913).
- (12) I. CLAUDATUS and M. BOTEZATU: *Biochem. Z.*, 300, 325 (1939).
- (13) M. G. ENGEL and F. L. ENGEL: *J. Biol. Chem.*, 167, 535 (1947).
- (14) P. Sven. ZETHELIUS: *Rev. colombiana quim.*, 3, 5 (1949) (C.A., 44, 8280).
- (15) W. R. FEARON: *Biochem. J.*, 33, 902 (1939).
- (16) A. A. ORMSBY: *J. Biol. Chem.*, 146, 595 (1942).
- (17) H. S. FRIEDMAN: *Anal. Chem.*, 25, 662 (1953).
- (18) S. NATELSON, M. L. SCOTT and C. BEFFE: *Am. J. Clin. Pathol.*, 21, 275 (1951).
- (19) R.M. ARCHIBALD: *J. Biol. Chem.*, 156, 121 (1944).
- (20) R.M. ARCHIBALD: *J. Biol. Chem.*, 157, 507 (1945).
- (21) M. MURAYAMA: *J. Lab. Clin. Med.*, 39, 795 (1952) (C.A. 48, 3807).
- (22) H.O. HALVORSON and M.O. SCHULTZE: *J. Biol. Chem.*, 186, 471 (1950).
- (23) 足立 達： 科学, 23, 582 (1953).
- (24) G.W. WATT and J.D. CHRISP: *Analy. Chem.*, 26, 452 (1954).
- (25) S. ADACHI: *Tohoku J. Agr. Res.*, 4, 21 (1953).
- (26) H. B. WEBB: *J. Dairy Sci.*, 18, 81 (1935).
- (27) W. R. HARTUNG and J. C. MUNCH: *J. Am. Chem. Soc.*, 51, 2264 (1929).
- (28) G. BRADDELEY and J. KENNER: *J. Chem. Soc.*, 303 (1935).
- (29) M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, 86, 655 (1930).
- (30) A.E. PERKINS: *Ind. Eng. Chem., Analy. Ed.*, 15, 69 (1938).
- (31) G. W. SNEDECOR: *Statistical Methods—Application to experiments in agriculture and biology*, (1946).
- (32) R. A. FISCHER: *Metron.*, 1, 3 (1921).
- (33) W. DENIS and A. S. MINOT: *J. Biol. Chem.*, 37, 353 (1919).
- (34) 里 正義, 村田喜一: 札幌農林学会報, 108, 56 (1932).
- (35) 佐々木林治郎, 津郷友吉: 畜産の研究, 4, 531 (1950).
- (36) K.M. SHAHANI and H.H. SOMMER: *J. Dairy Sci.*, 34, 1010 (1951).
- (37) D. VENKATAPPAIAH and K. P. BASU: *Indian J. Dairy Sci.*, 7, 213 (1954).

Summary

In order to establish a direct colorimetric method to estimate urea in milk, the α -isonitrosopropiophenone method was studied as follows:

(1) The color of urea with α -isonitrosopropiophenone was stable in the dark, slightly stable under scattered light, and unstable under the direct rays of the sun (Table 1).

(2) The regression coefficient in urea solution and milk were obtained with a 5% significance level (Tables 2 and 3). The relation between the reading in a Beckmann Spectrophotometer (X) and content of urea in milk (Y), was indicated according to the following

equation with a 5% significance level:

$$Y = 104.35 X$$

(3) The coefficient variation of this colorimetric and the standard urease method were 3.68 and 2.90, respectively, with a 5% significant level (Table 4).

Therefore, by means of the colorimetric method described above, the content of urea in milk was determined as follows:

(4) It appeared with a 0.1% significance level that the content of urea in milk is different for each cow (Table 5).

(5) The percentage of urea in market milk was 14.02~18.37 mg % with a 5% significance level obtained from 56 samples.

The correlation coefficient between the color of milk heated to 120° for 1.5 hours and the content of urea in milk before heating was 0.0678~1.0278 with a 5% significance level. It is found that the content of urea in milk is probably a factor in the browning of heated milk which is different in each milk as shown by WEBB⁽²⁶⁾ (Fig. 1 and Table 7).

麦芽 Amylase に関する研究 (第 4 報)

麦芽の自己消化に於ける Amylase 及び 2, 3 の成分の変化について (その 1)

池 宮 正 行 (京都大学化学研究所)

昭和 30 年 10 月 19 日 受 理

Studies on Malt Amylase. Part IV.

Fluctuation of Amylase Activity and Some Components during

Autolysis of Green Malt

By Masayuki IKEMIYA (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

IRVINE が 1785 年すでに麦芽による澱粉の糖化を認めて以来、麦芽アミラーゼに関する研究は多岐に亘り、その数も多い。併しアミラーゼの生成機構については他の一般の諸酵素と同様に単なる推論の域を出ない。筆者はアミラーゼの生成機構を究明する一手段として自己消化時のアミラーゼの変化と他成分との関係を考察した。

大麦を発芽させて強力なアミラーゼを有する麦芽を製するには適度の水分、温度、通気を必要とし、その一つを欠いても麦芽製造は成功しない。

今必須条件中の通気(酸素供給)をエネルギーの面から考えて見ると⁽¹⁾

呼吸作用では $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 675.6 \text{ Kal } (+30 \sim ph)$

酒精醱酵では $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH + 27.9 \text{ Kal } (+2 \sim ph)$

であり、醱酵に於ける ΔF は頗る低い。処が、植物組織は酸素の供給がないと無気呼吸(分子間呼吸)を行い酒精醱酵を起すが、この際に生じる ΔF は僅少であるから合成作用の面を考慮に入れずにアミラーゼの変化を追究出来るわけである。このような考えから先づ大麦の無気呼吸下のアミラーゼの変化を見、更に長期に亘る自己消化時のアミラーゼの変化を調べた。又その際古く FORD, GUTHRIE(1908) 以来認められた Zymogen Amylase についても特に留意した。

実 験 の 部

1. 無気呼吸下の緑麦芽

水浸漬、発芽 2 日目の緑麦芽を 30 g 宛 100 ml 容三角フラスコに入れ、ゴム栓で密栓し室温(18~20°)に放置した際の酒精の生成は 5 日目で最高に達した。穀粒磨砕水抽出液について KOLTHOFF 法で定量した結果は、緑麦芽 100 g 当り、滋賀産在来種 0.256 g(1,000 粒当り 0.142 g)、米国産二条種 0.546 g(1,000 粒当り 0.525 g)であつた。LÜERS⁽²⁾ は大麦の嫌気処理によつて 137 時間で 100 g 当り 0.170 g の酒精を得ている。又穀粒の水抽出液のアミラーゼ力は密栓後 2~4 日目迄は対照の通気麦芽と同等乃至は反つて高い activity を示したが以後低下した。併し防腐剤を添加せずに 5 日以上も放置することは、雑菌汚染の影響が多分に考えられるので