

## 米および米製品タンパク質の簡易定量法について

光永俊郎\*・安藤ひとみ\*\*

A Convenient Method for Rapid Determination  
of Proteins in Rices and Rice Products.

Toshio MITSUNAGA\*, and Hitomi ANDO\*\*

## Synopsis

In the biuret determination of protein in rices and rice products, starch and lipids extractable with an alkaline solution such as biuret reagent were found to interfere with the biuret method. Comparative evaluation of their effects revealed that starch, a major component of rice, has the most significant effect on the biuret method. In the presence of starch, the correlation between Kjeldahl protein and the optical density of biuret was poor.

It was found that several perhalocarbon solvents effectively retarded solubilization of rice starch in the biuret reaction mixture. By treatment of the rice samples with these solvents prior to the biuret procedure, the effect of starch was eliminated and the optical density of biuret became closely correlated with Kjeldahl protein.

## I 結 言

タンパク質の定量法には Kjeldahl 法, ビュレット法, Lawry 法, 色素結合法など種々の方法があるが, 穀類はじめ食品の分析には, 一般に Kjeldahl 法が用いられている。しかしこの方法は煩雑で操作に熟練を必要とするばかりでなく, 測定に時間を要する。そのためこの方法に代わる迅速で標準的な定量法の確立が望まれている。簡易化された定量法の 1 つとしてのビュレット法は, アルカリ性硫酸銅溶液を用いるので, この試薬で食品タンパク質の抽出と定量を同時に行うことができるため原理的に有利である。しかし食品をアルカリで処理することによりタンパク質以外の可溶性成分が溶出してビュレット反応を妨害する。妨害因子としては脂質<sup>1-4)</sup>, 種々の着色物質<sup>2,5,6)</sup>, 還元糖<sup>7)</sup>, デンプン<sup>8)</sup> が挙げられている。これらに対していくつかの改良法が提案されてい

る<sup>1-10)</sup>。

Pinckney<sup>3)</sup> は動物組織や微生物のビュレット法によるタンパク質の定量には, 妨害因子として脂質の影響が著しいことを明らかにした。この問題を解決するために, この反応系に四塩化炭素およびクロロホルムを加えて除去する方法を考察した。また満田<sup>4)</sup> らは, 小麦, 大麦およびそれら製品についてビュレット法によるタンパク質の定量に検討を加え, 妨害因子として脂質, デンプンの除去にパーハロカーボン化合物, 着色物質の除去にフェントン反応系<sup>11)</sup> が効果的であることを報告している。

そこで, 米および米製品のタンパク質の簡易定量にビュレット法の応用を考え, Kjeldahl タンパク質を標準にして, その改良法の検討を行った。その結果について報告する。

\* 食品栄養学科食品化学研究室 (Lab. of Food Chemistry, Dept. of Food and Nutrition, Kinki Univ. Nara 631 Japan)

\*\* 京都文教短期大学および本学研修員 (Kyoto Bunkyo Jr. Collage, Kyoto 611 Japan)

## II 実験材料および方法

### 1. 実験材料および試薬

玄米(うるち米, もち米), 精白米, 米製品は市販品40種類を購入し, ウィリー粉碎機で粉碎し, 20メッシュ篩で篩別して用いた。米胚乳グルテリンは沢井<sup>12)</sup>の方法により調製した。n-perfluorohexane ( $C_6F_{14}$ ), n-1,2,4,4-tetrachloro-1,1,2,3,3,4-hexafluorobutane ( $n-CF_2ClCFClCF_2CFCl_2$ ) および n-1,3,3,3-tetrachloro-1,1,2,2-tetrafluoropropane ( $n-CF_2ClCF_2CCl_3$ ) はダイキン工業㈱より提供を受けた。その他の試薬は市販特級品を用いた。

### 2. Kjeldahl 法

AOAC 法<sup>13)</sup>を用いて窒素の定量を行い, 窒素タンパク質換算係数は5.95を用いた。

### 3. ビュレット法

ビュレット試薬は蒸留水930 mlに10 M 水酸化カリウム溶液10 ml, 25%酒石酸カリウム溶液20 ml および4%硫酸銅溶液40 mlを混合し調製した。

方法(1): 米および米製品を約0.5000 g 共栓付50 ml 遠沈管に精秤取した。これにビュレット試薬50 ml 加えて, 振盪機により5分間激しく振盪した後, 3000×gで5分間遠心分離した。得られた上清の550 nm の吸光度を測定した。

方法(2): 方法(1)と同じように試料を秤取した後, 2 ml のパーハロカーボン溶媒を加えた。次にこれにビュレット試薬を50 ml 加えて方法(1)と同様の操作を行い, 550 nm の吸光度を測定した。

### 4. アルカリ可溶成分の測定

還元糖, デンプンは Somogi-Nelson 法<sup>14)</sup>, 脂質は Bragdon 法<sup>15)</sup> および着色物質はルチンを標準物質として550 nm の吸光度を測定する方法を用いた。

## III 結果および考察

### 1. ビュレット試薬のみによる定量

米および米製品粉末の各試料について, 方法(1)で550 nm の吸光度を測定し, 各試料の Kjeldahl タンパク質とを比較した結果は Fig. 1 に示されるごとくである。この場合回帰式  $Y=4.32X+7.97$ , 相関係数0.815であった。この相関関係ではビュレット法をそのまま米タンパク質の定量法として用いることはできない。

そこで蒸留水970 mlに10 mlの10 M 水酸化カリウム溶液と20 mlの25%酒石酸カリナトリウム溶液を加えたアルカリ溶液を調製した。この溶液を用いて玄米より可溶性成分を抽出し, 定量した。玄米2 g にアルカリ溶液100 mlを加えて, 混合振盪した後,

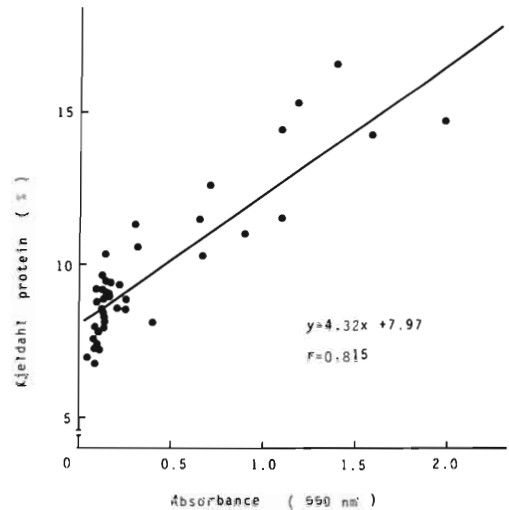


Fig. 1. Correlation between Kjeldahl Protein and Biuret Absorbance of Rice Samples.

The details of biuret procedure are given in the text.

1300×gで5分間遠心分離した。得られた上清を試料液として Kjeldahl タンパク質, 脂質, 還元糖, デンプンおよび着色物質を測定した。抽出液中には, Kjeldahl タンパク質1.4 mg/ml, 脂質0.1 mg/ml 以下, 還元糖0.082 mg/ml, デンプン4.5 mg/ml が認められた。また着色物質は検出されなかった。これらの結果とすでに報告した結果<sup>8)</sup>と比較して, 上記成分についてはデンプンのみが妨害因子と考えられる。その点についてさらに検討した。

### 2. デンプンによる影響

ビュレット法による米胚乳グルテリンに対するデンプンの影響を調べた。デンプン(0~10 mg/ml)を含む胚乳グルテリン溶液(1.0, 5.0 mg/ml)を試料液として, ビュレット試薬を加えて反応させた。デンプンを含まない試料液を基準にして吸光度を比較して, 検量線より見かけのタンパク質を測定した。その結果は Fig. 2 に示すごとくである。グルテリン5.0 mg/ml 試料液では1.0 mg/ml のデンプンの共存で30%, 2.5 mg/ml で60%, 5.0 mg/ml で70%の誤差を生じた。またグルテリン1.0 mg/ml 試料液ではさらにその影響が大きく, 1.0 mg/ml のデンプン共存下で80%, 2.5 mg/ml で150%, 5.0 mg/ml で220%の誤差を生じた。

米および米製品タンパク質をビュレット法で測定する際には, デンプンが妨害因子として顕著に影響することが明らかになった。

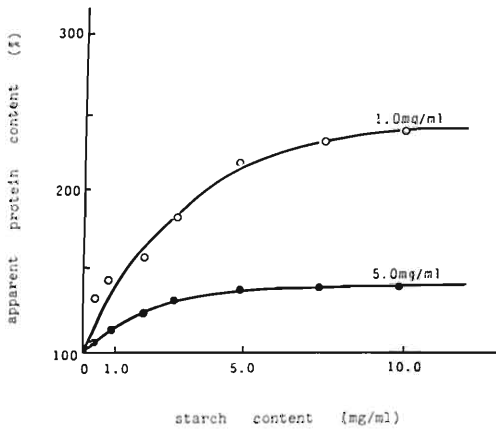


Fig. 2. Effect of Starch Content on the Biuret Absorbance Values (550 nm) for Rice Glutelin Solution.

The details of biuret procedure are given in the text.

### 3. ビュレット法でのパーハロカーボンの効果

クロロホルムなどのハロハイドロカーボンや四塩化炭素などのパーハロカーボンは、デンプンの包接化合物を作ることが知られている<sup>16)</sup>。

そこで *n*-1,2,4,4-tetrachloro-1,1,2,3,3,4-hexafluorobutane をパーハロカーボン溶媒として、方法(2)を用いてビュレット法による米および米製品のタンパク質の測定を行った。その結果は、Fig. 3のごとくである。Kjeldahl タンパク質とビュレット反

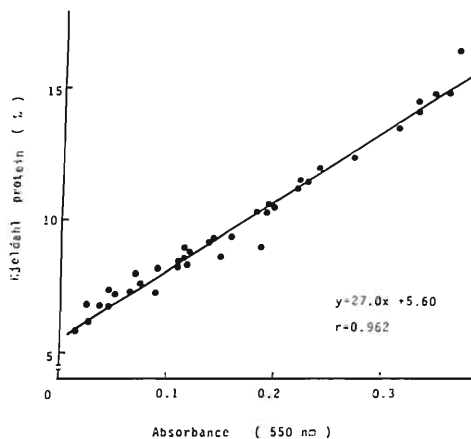


Fig. 3. Correlation between Kjeldahl Protein and Biuret Absorbance after Treatment of Rice Samples with *n*-C<sub>4</sub>Cl<sub>4</sub>F<sub>6</sub>.

The details of the *n*-C<sub>4</sub>Cl<sub>4</sub>F<sub>6</sub> treatment of the samples and subsequent biuret procedure are given in the text.

応液の吸光度とでは、回帰式  $Y = 27.0X + 5.60$ 、相関係数 0.962 という高い相関関係が認められた。

さらに四塩化炭素、*n*-Perfluorohexane、および *n*-1,3,3,3-tetrachloro-1,1,2,2-tetrafluoropropane についてデンプンの妨害抑制効果を調べた (Table 1)。米の場合に四塩化炭素は相関係数 0.846 と余り効果は認められなかったが、他の 2 つは *n*-1,2,4,4-tetrachloro-1,1,2,3,3,4-hexafluorobutane とほぼ同じ相関係数が得られた。

以上米および米製品を炭素数 3~6 のパーハロカーボンで前処理後、ビュレット試薬でタンパク質の抽出と反応を行うと、ビュレットの吸光度と Kjeldahl タンパク質の間に 0.94 以上の高い相関係数をもつ直線関係が成立した。この条件で米および米製品タンパク質の簡易定量法としてビュレット法が用いられることが明らかになった。

Table 1. Statistical Summary of the Biuret Determination of Rice Protein with the Use of Organic Solvents

| Solvent   | N  | Regression Eq.     | r     |
|---|----|--------------------|-------|
| —   | 28 | $y = 4.32x + 7.97$ | 0.815 |
| CCl <sub>4</sub>  | 28 | $y = 23.2x + 7.24$ | 0.846 |
| C <sub>6</sub> F <sub>14</sub>                          | 28 | $y = 24.3x + 7.95$ | 0.944 |
| CF <sub>2</sub> CICFCICF <sub>2</sub> CFCl <sub>2</sub> | 28 | $y = 27.0x + 5.60$ | 0.962 |
| CF <sub>2</sub> CICF <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>      | 28 | $y = 22.1x + 5.74$ | 0.973 |

## IV 要 約

米および米製品のタンパク質の簡易定量法としてビュレット法を検討した。

1. 米試料を直接ビュレット試薬で抽出、反応する方法では、Kjeldahl タンパク質とビュレット吸光度の相関係数は 0.815 であった。
2. 米試料のアルカリ抽出液についてビュレット法の妨害因子を調べた結果、デンプンが顕著な妨害効果を示した。
3. デンプンの妨害因子抑制には炭素数 3~6 のパーハロカーボンが効果的であった。
4. 米試料をパーハロカーボンで前処理して、ビュレット法でタンパク質を定量すると、その吸光度と各試料との Kjeldahl タンパク質との間には、0.944 以上の高い相関係数が認められた。

## 引用文献

- 1) A.J. PINCKNEY: *Cereal Chem.*, 26, 423

- (1949).
- 2) A.C. JENNINGS: *ibid.*, **38**, 467 (1961).
  - 3) A.J. PINCKNEY: *ibid.*, **38**, 501 (1961).
  - 4) P.C. WILLIAMS: *J. Sci. Food Agr.*, **12**, 58 (1961).
  - 5) R.M. JOHNSON and C.E. CRANEY: *Cereal Chem.*, **48**, 276 (1971).
  - 6) H. MITSUDA and T. MITSUNAGA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2265 (1974).
  - 7) C.E. OHARA: *J. Sci. Food Agr.*, **19**, 117 (1968).
  - 8) H. MITSUDA and T. MITSUNAGA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1649 (1974).
  - 9) D. RACCUSEN and D.B. JOHNSTONE, *Nature*, **191**, 492 (1961).
  - 10) M. RAMACHANDRAN, A. GROVER, B.D. HUSSAIN and Q.Z. HUSSAIN: *J. Food Sci. Technol.* **21**, 99 (1984).
  - 11) H.J.H. FENTON: *J. Chem. Soc.* **65**, 899 (1894).
  - 12) S. SAWAI and Y. MORITA: *Agric. Biol. Chem.* **32**, 76 (1968)
  - 13) "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," 11th ed. by W. Horwitz, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 1970, p. 16.
  - 14) M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
  - 15) J.H. BRAGDON, *J. Biol. Chem.*, **190**, 513 (1951).
  - 16) D. FRENCH, A.O. PULLEY and W.J. WHELAN: *Starke*, **15**, 349 (1963).