

ビウレット反応の牛乳蛋白質定量への応用

川 崎 良 文

The Biuret Reaction as Applied to the Determination of Milk Proteins

Yoshifumi KAWASAKI

I. 緒 言

食品に含まれる蛋白質量をビウレット法、ローリイ法などによって直接に比色定量することは、不溶性の成分が食品中に混在するために、非常に困難である。そのため一般には、ケルダール法によって全窒素を定量し、これに係数を乗じて蛋白質量とする。ケルダール法は蛋白質定量の基準とされている方法であるが、定量操作が煩雑でしかも多数の試料を処理するのに時日を要するのが欠点である。そこで、食品蛋白質の迅速定量法の確立が要求される。とくに、乳蛋白質は栄養価が高くその乳中における含量の多少は重要な意味をもってくる。

著者は、Holden と Pirie の報告しているビウレット呈色のエタノール抽出法¹⁾を改良して、ビウレット反応の牛乳蛋白質定量への応用を試みたのでその結果について報告する。

II. 実験材料および方法

(1) 材料 市販加工乳3種を試料とした。用いた牛乳成分の分析結果を第1表に示す。カゼインは半井化学薬品社製の特級品を使用した。

第1表 牛乳の成分表

試 料	全蛋白質 (%)	純蛋白質 (%)	カゼイン (%)	乳糖 (%)	乳脂肪* (%)	無脂固形分* (%)
A. 南日本デーリィ牛乳	2.94	2.73	2.55	4.1	3.8	8.3
B. 森永ホモ牛乳	2.92	2.72	2.50	4.1	3.3	8.3
C. 雪印ミネラル牛乳	3.02	2.82	2.55	4.2	3.3	8.3

* 乳脂肪および無脂固形分の数値はメーカーの成分表示に従った。

(2) 分析法 蛋白質量はケルダール法により求めた窒素量に係数 6.38 を乗じて求めた。牛乳中の純蛋白質はバルンスタイン法²⁾、カゼインは AOAC 法³⁾によって分離後定量した。乳糖は食品衛生試験法⁴⁾に準じて定量した。

(3) ビウレット試薬 24.0 g の硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) と 96.0 g のロッシェル塩 ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) とを 800 ml の蒸留水に溶解し、70%水酸化ナトリウムを終濃度 4.8% (1.2 N) とするように加え、最後に蒸留水を加えて全容を 1 l とし、ポリエチレン製の瓶に入れて保存する。

(4) 測定法 (標準法) 1~20 mg の蛋白質を含む溶液 1 ml を 15 ml 容量の試験管にとり、1 ml のビウレット試薬を加えてよく混合する。室温 (20°C) に 30 分間放置後、4 ml の無水エタノールを加えてよく混合し、つぎに 5 ml の 14.5N 水酸化カリウムを加えて試験管の口を塩化ビニリデンのシートで密栓後、サーモミキサー Model TM-101 (サーモニクス社製) を用いて 30 秒間攪拌混合する。これを遠心分離 (2500 rpm, 10 分間) して、上清の 540 m μ における吸光度 (A_{540}) を日立 139 型分光光度計にて測定する。盲検として 1 ml の蒸留水を蛋白質溶液の代りに用いて同様の実験を行なう。

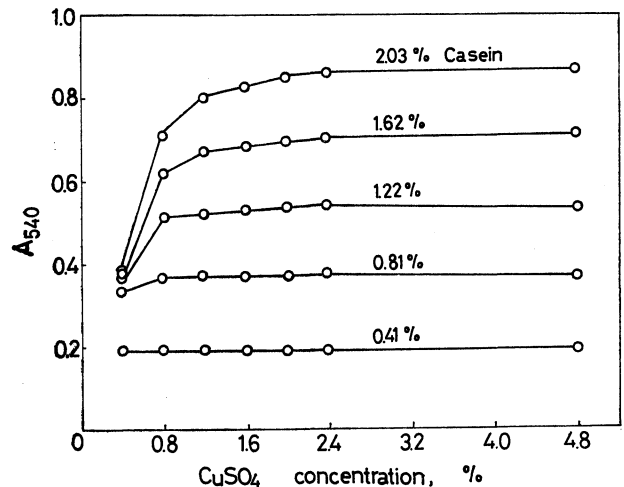
III. 実験結果および考察

1. 比色条件の検討

まず牛乳蛋白質の主成分であるカゼインを使用して比色の条件を検討した。

(1) ビウレット試薬の濃度

ビウレット試薬中の硫酸銅とロッシェル塩との比率 (1 対 4) および水酸化ナトリウムの濃度を一定に保ち、硫酸銅の濃度を種々変えたときの吸光度の変化を第 1 図に示す。この図からビウレット試薬中の硫酸銅の濃度は 2.4%，すなわち実験方法の節に書いたビウレット試薬が適当と考えられる。2% 以下の濃度では、蛋白質の濃度が増加するにつれて吸光度が低くなった。本法のビウレット試薬中の硫酸銅の濃度は Gornall らの試薬⁵⁾ の 16 倍と非常に高くなっているが、使用時の終濃度は約 2 倍高いのみである。



第 1 図 硫酸銅の濃度と吸光度との関係

つぎにビウレット試薬中の水酸化ナトリウムの濃度のみを 0.6N, 2.4N と変えたとき

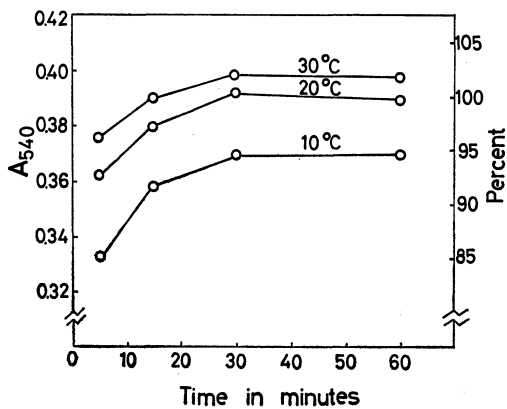
の吸光度は 1.2N における吸光度を 100% としたとき、それぞれ、98%, 100% であった。したがって、水酸化ナトリウムの濃度が 1.2~2.4N の間では吸光度は全く変化しないといえる。

(2) 水酸化カリウムの濃度

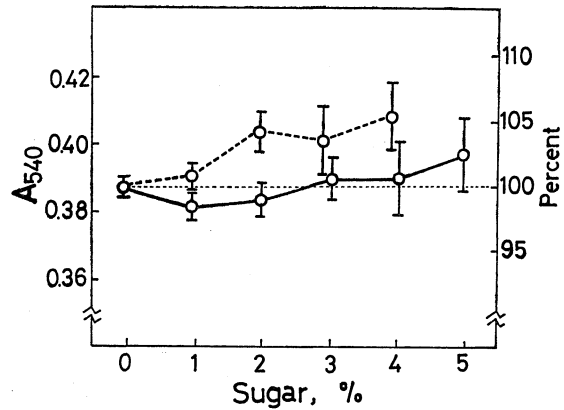
8.4 mg/ml のカゼイン溶液を使用し、水酸化カリウムの濃度のみを変えて標準法で吸光度を測定した。その結果、14.5N の水酸化カリウムを用いたときの吸光度を 100% としたとき 13.9N, 12.9N, 11.8N の水酸化カリウムを用いたときの吸光度はそれぞれ 98.5%, 96.5%, 92.5% であった。この吸光度の減少の原因は上層 (エタノール層) の容量が増加したことにある。

(3) 呈色温度と時間

8.4 mg/ml のカゼイン溶液を使用して、呈色に及ぼす温度と時間の影響を調べた (第 2 図)。そ



第2図 呈色温度と時間との関係

第3図 呈色におよぼす糖の影響
 ...○... ブドウ糖, —○— 乳糖
 縦棒は6試料の平均誤差を示す。

の結果, いずれの温度においても呈色は30分間で安定した。しかし, 吸光度は20°Cの場合に比べて30°Cでは2%高く, 10°Cでは5%低かった。また, この吸光度は一夜放置後もほとんど変化しなかった。

(4) 糖の影響

牛乳には4%前後の乳糖が含まれているので, その呈色に及ぼす影響を調べた。比較のためにブドウ糖の影響も調べた。実験は蛋白質溶液1ml中に8.4mgのカゼインと一定量の糖を含むようにして, 標準法で行った。第3図に示すように, 乳糖は呈色にほとんど影響を与えなかったが, グルコースは吸光度を3%程度上昇させた。また, 糖濃度が3%以上になると下層に酸化第一銅の赤色沈殿が生じた。さらに, いずれの糖を用いた場合にも, 糖の含量の増加に伴って測定誤差は大きくなる傾向にあった。

(5) 吸収スペクトル

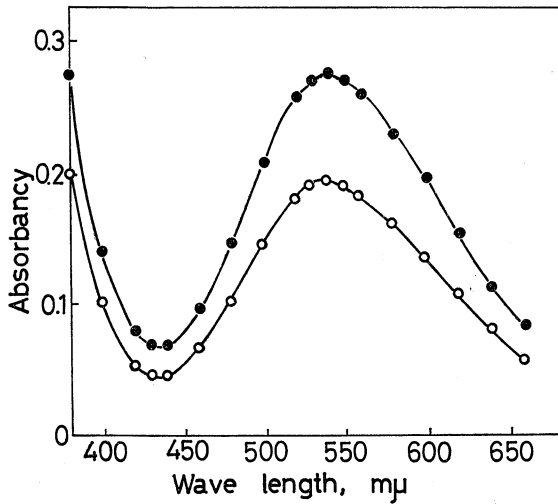
4.2mgのカゼインおよび0.2gの牛乳を含む各1mlの溶液を標準法で呈色させたときの吸収スペクトルを第4図に示す。カゼインおよび牛乳いずれの場合にも, 吸収極大は540m μ , 吸収極小は430~440m μ にあった。この吸収スペクトルは他のビウレット法によるそれとほとんど同じである。

2. 牛乳蛋白質の定量

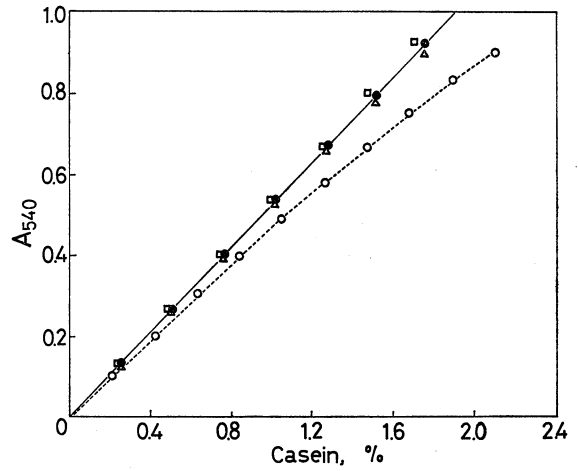
前記3種の牛乳を適当に希釈して種々の濃度の溶液を作り, カゼイン態蛋白質, 純蛋白質および全蛋白質の含量と吸光度との関係を検討した。その結果を第5~7図に示す。対照としてカゼインの標準曲線を図示した。

(1) カゼイン態蛋白質

牛乳蛋白質の主成分はカゼイン(約85%)であるが, 牛乳にはこの他にラクトグロブリン, ラクトアルブミンなどが存在する。したがって, 第5図からも明らかなように, 牛乳中のカゼイン態蛋白質を基準として標準曲線を作成した場合には, 実際に含まれるカゼイン量よりも過大評価される

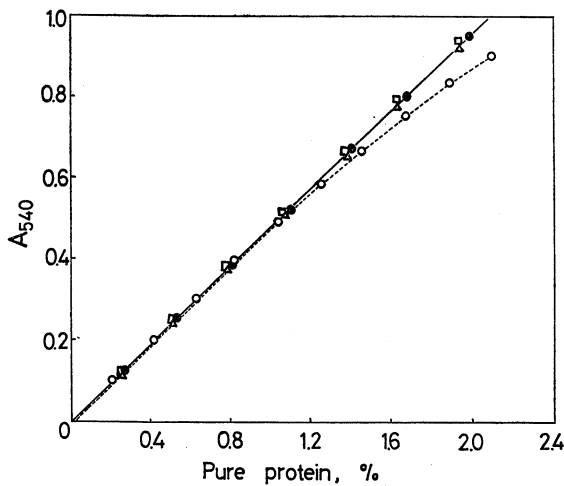


第4図 吸収スペクトル
●— 牛乳, ○— カゼイン



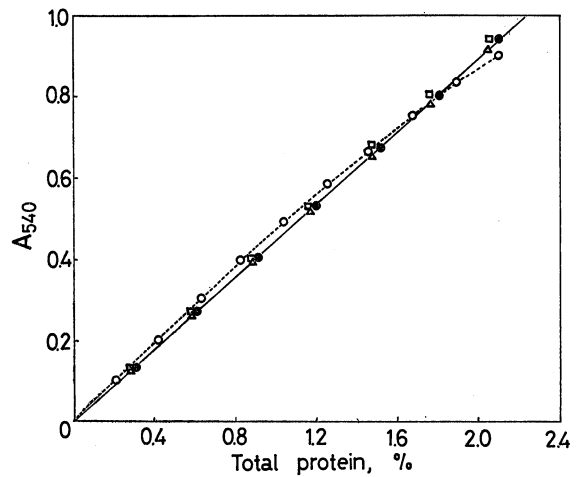
第5図 カゼイン態蛋白質と吸光度との関係

□— A牛乳, △— B牛乳
●— C牛乳, …○… カゼイン



第6図 純蛋白質と吸光度との関係

□— A牛乳, △— B牛乳
●— C牛乳, …○… カゼイン



第7図 全蛋白質と吸光度との関係

□— A牛乳, △— B牛乳
●— C牛乳, …○… カゼイン

ことになるので、不適當と考えられる。

(2) 純蛋白質

ビウレット反応は2つ以上のペプチド結合を含む物質に対する呈色反応である。この原理から推測できるように、カゼインの標準曲線は牛乳の純蛋白質の標準曲線とよく一致した(第6図)。図から明らかなように牛乳の純蛋白質と吸光度とは直線的な比例関係にあったが、カゼインでは吸光度0.5以上において純蛋白質より低い吸光度が得られた。この差違の原因については現在検討中である。いずれにせよ、吸光度0.5以下ではカゼインの標準曲線から牛乳の純蛋白質量が求められることになる。実際に定量する際は、牛乳を3~5倍に希釈して測定すればよい。本実験では吸光度と純蛋白質の含量(%)との間に次の関係式が成立した。

$$\text{純蛋白質}(\%) = A_{540} / 0.478$$

(3) 全蛋白質

ビウレット呈色は上述のように純蛋白質量に比例するが、牛乳中の純蛋白質量は約93%と一定しているため全蛋白質量にも比例した(第7図)。したがって、全蛋白質の標準曲線を作成しておけば、吸光度から全蛋白質量が求められる。本実験では、次の関係式が得られた。

$$\text{全蛋白質 (\%)} = A_{540}/0.447$$

なお(2)、(3)における測定誤差は2%以内であった。

乳蛋白質の迅速定量法としてはホルモール滴定法⁶⁾、水蒸気蒸溜法⁷⁾、蛍光分析法⁸⁾、色素結合法⁹⁻¹⁴⁾などがある。とくに色素結合法は世界各国でよく研究され、現在は実用化の段階に入っている。ここに報告したビウレット法は操作が簡単で、分析精度も高く迅速に牛乳中の蛋白質を定量できる測定法である。今後引続いて練乳、粉乳、チーズなど乳製品中の蛋白質の比色定量を行う予定である。

IV. 要 約

ビウレット呈色を濃アルカリ性のエタノールで抽出することにより、牛乳中の全蛋白質および純蛋白質を精度よく直接に比色定量する方法を確立した。

文 献

- 1) M. Holden and N. W. Pirie, *Biochem. J.*, **60**, 46 (1955)
- 2) F. Barnstein, *Landw. Vers Stat.*, **54**, 327 (1900)
- 3) AOAC, *Methods of Analysis of AOAC*, 10th ed., p. 223 (1965)
- 4) 安藤則秀著: 牛乳と乳製品の化学. p. 393, 地球出版 (1958)
- 5) A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
- 6) G. T. Pyne, *Biochem. J.*, **26**, 1006 (1932)
- 7) E. Kofranyi, *Milchwissenschaft*, **5**, 51 (1950)
- 8) S. V. Konev, I. I. Kozunin, *Dairy Sci. Abstr.*, **23**, 103 (1961)
- 9) T. Tugo, M. Iwaida, and Y. Kawaguchi, *J. Dairy Sci.*, **45**, 952 (1962)
- 10) 桑原邦介, 渡辺 正, 両木岱造, 長沢太郎: 農化, **39**, 239 (1965)
- 11) 慶田雅洋, 津郷友吉, 川口 豊: 食品工誌, **13**, 390 (1966)
- 12) J. W. Sherbon, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, **50**, 542 (1967)
- 13) J. W. Sherbon, *ibid.*, **50**, 557 (1967)
- 14) H. A. Luke, *ibid.*, **50**, 560 (1967)

Summary

A method was developed for the direct determination of milk proteins by means of the biuret reaction. It consisted of the extraction of the biuret color with ethanol after the addition of concentrated potassium hydroxide. Both the total protein and pure protein contents were proportional to the absorbancy at 540 m μ . The experimental error was less than two percent.