

D. et al: Ibid, 19, 20, 28, 33, 44 (1954). SMITH, D. P., and ROLLIN, N. J.: Ibid, 59. SMITH, D. P.: Butter, Cheese and Milk Products J. 44, (8) 60 (1953). Smith, D. P. and ROLLIN, N. J.: Food Tech. 8, 133 (1954). 2) 芝崎, 照井: 本誌, 31, 238 (1953). 3) 野副: 薬學, 3, (2) (1949). 4) SMYTH, H. F. and CARPENTER, C. P.: J. Ind. Hyg. Toxicol. 30, 63 (1948). 5) 太田: 日醸協, 29, (9) 24 (1934). 6) 太田: 日醸協, 31, 127 (1936). 7) 東: 衛生試験所彙報, 50, 47 (昭13). 8) KRUM, J. K. and FELLERS, C. R.: Food. Tech., 6, 103 (1952). 9) 池田: 藥物致死量集, 南山堂 (1953). 10) SPENSER, H. C.: J. Pharm. Expt. Therap. 99, 57 (1950). 11) ALFREDSON, B. V. et al: J. Am. Pharm. Assoc., 40, 263 (1951). 12) 桂等: J. Med. Assoc. Formosa, 40, 1597 (1941). 13) 鈴木等: 日本大學齒學部報告. 14) 梅澤: 抗菌性物質, 培風館 (1953). BRADSHAW, C. K. et al: J. Am. Chem. Soc. 76, 2357 (1954). 15) LEWIS, M. A. et al: Food Tech. 7, 261 (1953). SCHWARZENBACH, et al: Helv. Chim. Acta., 31, 678 (1948). BERWORTH, F. C.: USP 2,474,412 (1949). MARTELL, A. E. and BERSWORTH, F. C.: Proc. Soc. Sect. Toilet Goods Assoc. 10, 26 (1948). BERSWORTH, F. C. and SINGER, J. J.: Proc. Chem. Specialties Mfrs. Assoc., June 1950, 101. RHINES, C. E.: USP 2,560,743; 2,560,744 (1951). WATTS, B. M. and WONG, R.: Arch. Biochem. 30, 110 (1951). 16) 芝崎, 照井: 本誌, 31, 28 (1953). 17) 大阪市立衛生研究所: 試第804號 (昭29). (昭和30, 1, 9 受理)

パン醸焙に関する研究 (第11報) 電流滴定による Gluten のSH基の定量

松 本 博 (大阪女子大學)

I 緒 言

パン生地 Dough は微量の酸化剤によつて改良されるが、反対に微量の還元剤によつて軟弱となり物理性質がそこなわれる。このような酸化還元機構については小麦粉の蛋白分解酵素作用の阻害又は促進に歸する説と、Gluten 分子に對する直接の作用に歸する説とがある。

後者の説に従えば酸化剤の作用は Gluten 分子の二つのSH基を S-S 結合に變化し、還元剤の作用は之と反対にS-S結合を分割してSH基に變化するために起るというのである。この説は SULLIVAN¹⁾を始めとし多くの人々に支持されているが著者²⁾も Dough の Rheological の研究に於て同じくこの説を支持するような結果を得た。

このように Gluten のSH基はその酸化還元機構を解明する上に重要な意味をもつて來たのであるが、今日までその定量法が確立されていなかったために諸説は推論の範圍を出でなかつた。このことは SULLIVAN³⁾自身もみとめている所である。

著者は AgNO₃ による電流滴定法を Dispersed gluten に應用し、滴定條件を吟味し滴定値に對して考察を加えた結果、本法によつて gluten のSH基を正確に定量しうる事を知り得たので以下報告する。

II 既往の研究

元來小麦粉又は Gluten は構成成分が複雑であるためにそのSH基の定量も多く困難を伴うのである。WORKING & MEYER⁴⁾, BAKER, PARKER & MIZE⁵⁾ は ANSON⁶⁾ の赤血鹽を用いる定量法を小麦粉抽出液又は Gluten dispersion に應用し Prussian blue 又は Nitroprussid 反應によつてSH基の存否を判定しているが、前者は Gluten dispersion にSH基を検出し得なかつた事を報告し、後者は検出には成功したが定量値は不明確であるとのべている。

SULLIVAN³⁾は小麦粉に對し過剰の Iodine Brome Bromate 又は o-iodosobenzoate を作用させた後ヨード滴定によつてSH基を求める方法に對し検討を加え、滴定値がすべてSH基に基くものであるか否か不明な所に欠陥がある事を報告している。之に反し SPENCER⁷⁾⁸⁾は o-Iodosobenzoate 法に種々の改良工夫を加え小麦粉のSH基定量に應用している。又 ANDREWS⁹⁾はこの方法を電流滴定によつて Endpoint を定める様に改良して報告しているが、兩者の報告何れも SULLIVAN の認めている欠陥を除き得たものとは云えない。

然るに近來秦氏¹⁰⁾¹¹⁾は電流滴定装置を改良し白金廻轉電極を用いてSH基を正確に定量する方法を提案し、之

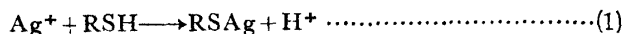
(224)

(松本) パン 醸 焙 に 関 す る 研 究 (第11報)

を各種の蛋白質中のSH基の定量に應用している。又類似の方法は BENESCH¹²⁾, WEISMAN¹³⁾, KOLTHOFF¹⁴⁾¹⁵⁾により蛋白のSH基の定量に試みられている。最近 SULLIVAN¹⁶⁾も小麦粉の水抽出物について電流滴定法によりSH基を定量し得た事を報告しているが、Gluten に対しては不成功に終つた旨をのべている。その原因は Gluten の水及び鹽類溶液への不溶解性にあつた様である。

Ⅱ 定量法の原理

蛋白質のSH基は銀イオンと次式の様に反應し安定な化合物をつくる。



(1)は中性又は酸性、(2)はアムモニヤアルカリ性における反應である。Cl⁻等の妨害を避ける爲アムモニヤアルカリ性において(2)式の反應をすゝめる事が有利とされている。

今 AgNO₃ 標準液を用い、アムモニヤアルカリ性の蛋白溶液を滴定する場合、SH基と當量以上の AgNO₃ が滴下されると始めて Ag(NH₃)₂⁺ イオンが液中に現れる事になり、このとき白金廻轉電極の電解槽にある反應液には(V)の(1)の實驗のポーログラムに示される様に一定電壓の下では Ag(NH₃)₂⁺ イオンの濃度に比例した限界擴散電流が生じ、滴定値に對し電流値を plott する事により End point を決定する事が出来る。

Ⅳ 電流滴定装置と方法

實驗裝置は Fig. 1 に示す。本裝置は特に述べる以外はすべて秦氏¹⁰⁾の裝置に従つた。たゞ電源部の簡素化と

電解液及び寒天橋に Gluten 沈澱防止劑を用いた點が異つている。即ち電源部の簡素化は Fig に示す様であるが、電壓計 V の内抵抗は之と並列に連結される部分の R に比して甚だ大きく、又 R に流れる電流は電解液に流れる電流に比して大であるから本實驗に於てはこの程度の簡素化は支障を來さない。

Gluten は0.1N醋酸に分散して實驗に使用し Fig 1 の下に示すように沈澱防止劑を加えて電解液を調製する。次に電壓計(V)を用いて白金廻轉電極に與える電壓を1規定甘汞電極に對し-0.3V に調整し、白金電極を電解液に浸漬し一定廻轉 300 r.p.m. を與えながら N/500 AgNO₃ にて滴定するのである。未漂白小麦粉から得た Gluten dispersion (調製法第9報¹⁶⁾に報告)

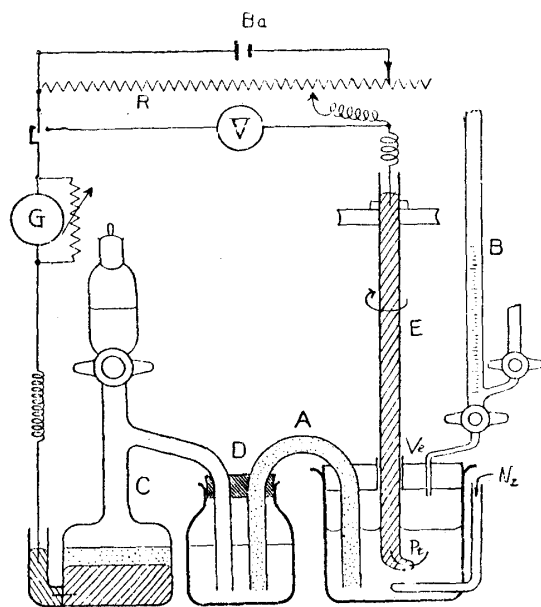


Fig 1. Apparatus of amperometric titration for the determination of SH radical in gluten.

Ba: Battery (2V)

A : Agar bridge KCl saturated

R : Rheostatt (30Ω)

D : KCl saturated solution

G : Galvanometer (10⁻⁷A)

E : Rotating Pt electrode

V : Volt meter (300Ω)

B : Microburette (N/500 AgNO₃)

C : Normal carmel electrode

Ve: Titration vessel

The composition of Electrolyte

Gluten dispersion in 0.1N acetic acid 10ml

40% Urea sol. 6"

5M NH₄OH 2"

1M NH₄NO₃ 2"

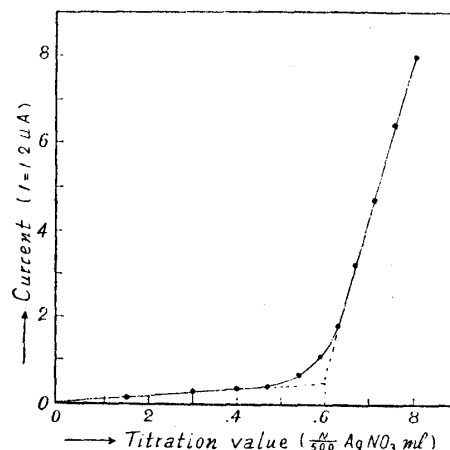


Fig 2. Amperometric titration curve for SH radical of gluten by N/500 AgNO₃.

Gluten dispersion in 0.1N acetic acid 10ml (N: content 640mg%)

によつて實驗した結果、滴定値と擴散電流のグラフは Fig 2 に示す通りで明瞭にその End point を決定し得た。

V 滴定條件の吟味

(1) Polarogram による滴定條件の吟味

Fig. 1. に示す電解液に N/500 AgNO_3 を 0~1.6ml 加え、白金迴轉電極に 300 r.p.m. を與えて測定した Polarogram は Fig. 3 に示す。

即ち AgNO_3 の加えない(I)の曲線及び AgNO_3 の添加量が Gluten のSH基に對して當量以下の場合の(II)の曲線は-0.35 Volt まで擴散電流に變化しないのに反し N/500 AgNO_3 が(III)0.8ml, (IV)1.2ml, (V) 1.6ml と増加するに従つて-0.3~-0.35Voltの間に著明な電流の増加がみとめられる。この電流の増加は明かに遊離の $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ によるものであり、しかもその濃度に比例する事がみとめられる。

本結果は秦氏¹⁰⁾の Cystein 溶液における Polarogram とよく似ており、Cystein 溶液の代りに0.1N醋酸を分散媒とする Gluten dispersion を用いても、又沈澱防止劑として尿素を用いても、電流滴定が可能である事を示すと共に、白金迴轉電極に與える電位はN甘汞電極に對して-0.3V~-0.35Vが適當である事を示すものである。

(2) 沈澱防止劑

本實驗は試料として0.1N醋酸に分散させた Gluten を用いるのであるが、之は鹽類やアルカリに接すると直ちに沈澱を生じ滴定が不能になる。こゝに沈澱防止のための Medium を必要とするのであるが、實驗の結果液中の最終濃度において尿素は12%サリチル酸ソーダは6%にて完全に沈澱を防止し得た。

しかしながら之等 Medium の電流滴定値に對する影響が問題になるのであるが、Fig 1 に示す電解液に對し、試料として Cystein 標準液を用い、沈澱防止劑の有無による滴定値の増減を試験した所、實驗誤差の範圍で兩者よく一致した。又 Fig. 3. が示すように沈澱防止劑及び Gluten 中の不純物は $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2^+$ の電流電壓曲線を變化していない事は明かであつて、従つてこゝに使用した尿素はSH基の電流滴定に對し妨害作用を及ぼさない事がみとめられる。又 Medium としてサリチル酸ソーダを使用した場合も Fig. 4. II, IIIに示すように放置時間0の場合は尿素を用いたときの値とよく一致しており、兩 Medium は本滴定の沈澱防止劑として支障がないと考えられる。

次に兩者の優劣を吟味したが、Fig. 4. に示す安定性、Gluten に對する溶解性及び精製の容易さ等から考察して本實驗においては特に記載する以外はすべて尿素を選ぶことにした。

Mediumとして使用する尿
素の濃度が滴定値に及ぼす影
響は Table 1. に示す通りで
ある。即ちその最終濃度3~
24%までは殆んど滴定値の變
化はなく、30%以上になつて
始めて影響を及ぼしている。

よつて本滴定では溶解の容易さから尿素の最終濃度を12%と定めた。

(3) 滴定方法

本方法の欠點はアムモニヤアルカリ性において滴定値は不安定であり、放置時間と共に之が急激に減少する事である。その減少度は Fig. 4 に示す通りであるが、比較的減少度の少い Fig. 4 (I) に示した條件、即ち液温を5℃に低下し且つ滴定液の表面に石油エーテルを浮かせ軽く N_2 gas を通じる方法を採用した。又電解液の調製に當つてアムモニヤ液の添加は滴定直前に行い、しかもその添加後30秒以内に AgNO_3 液を當量點近くまで滴下し終る様に操作するとき誤差を最少に止めうる事をみとめた。

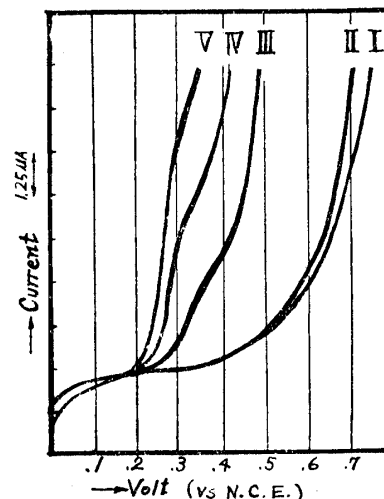


Fig 3. Polarogram at Rotated Platinum electrode in the Electrolyte shown in Fig. 1. after Adding (I) 0ml, (II) 0.4 ml, (III) 0.8ml, (IV) 1.2ml, (V) 1.6ml of N/500 AgNO_3 solution

Table 1. Titration value to various urea concentration

Urea %	3.0	6.0	12.0	18.0	24.0	30.0
Titration value	.42	.42	.42	.43	.44	.48

Gluten dispersion in 0.1N acetic acid 10ml (N: Content 446mg%)
The conditions of titration except urea concentration are shown in Fig. 1

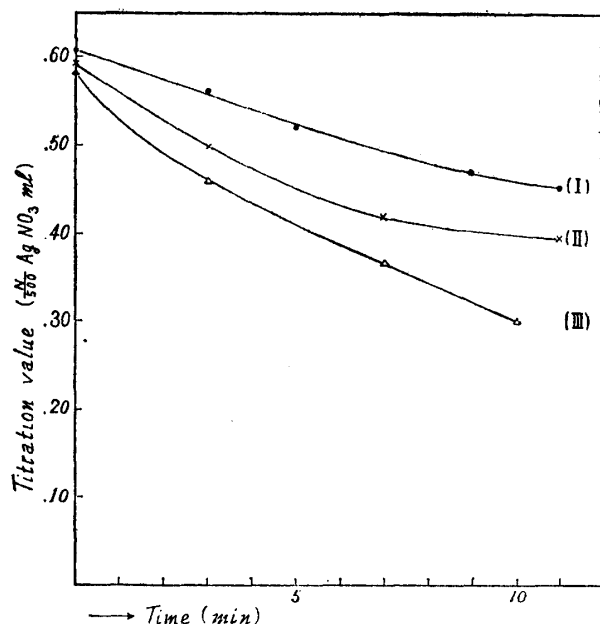


Fig. 4. The decrease of titration value to resting period of electrolyte

Medium to prevent precipitation of gluten (I), (II) Urea 12%, (III) Na-salicylate 6%
Titration & resting temperature (I) 5°C, (II), (III) 20°C
Gluten dispersion in 0.1N acetic acid 10ml (N: Content 638mg%) The other conditions of titration are shown in Fig. 1.

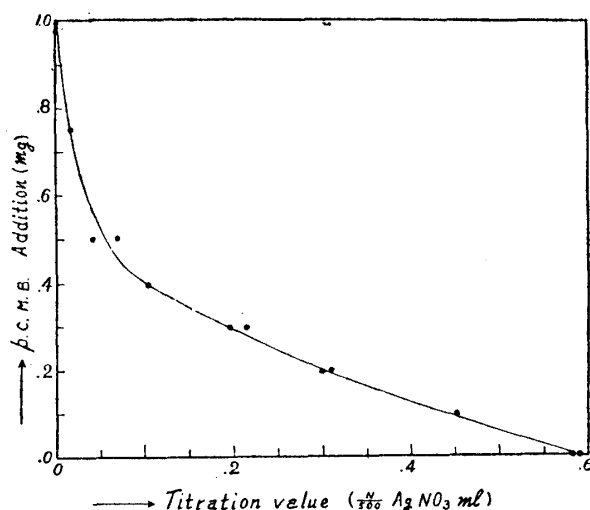


Fig. 5. Titration value to residual SH radical after treatment with various amounts of p. C.M.B.

Gluten dispersion in 0.1N acetic acid 10ml (N: Content 621mg%) The other conditions are shown in Fig. 1.

Dispersed gluten のSH基の増減作用を研究対象とする実験においては、常に対照定量を併せて行えば、本法によつて所期の結果を得られるであろう。

Ⅶ 滴定値に対する吟味

本実験における滴定値がすべて Gluten の遊離SH基に基因するものであるか否かを明かにする事は、実験の意味を左右する重要事項である。よつてSH基に対する特異試薬である p-chloromercuribenzoate (p. C.M.B.) を種々の割合に添加して行つた実験結果 Fig. 5. について吟味してみれば次の如くである。

即ち p. C.M.B. の添加量と滴定値の減少との関係は曲線の右端においては直線関係にあり、この部分の勾配をとると 1.35ml N/500 AgNO₃/1mg p. C. M.B.であつて理論値の1.40と近似しており、この部分では p. C.M.B.は定量的にSH基に結合しAgNO₃ 滴定値を減少している事になる。曲線は左に進むにつれて彎曲するが p. C.M.B. が1mgに達すると完全に滴定値が0となる。即ちこれによれば本法による滴定値は Gluten のSH基に基因する事が確かである。

Ⅶ 考 察

N/500 AgNO₃ による電流滴定法を0.1N醋酸に分散させた Gluten に應用し、そのSH基を定量する本方法は、微量の滴定値であるにかゝらずその End point を明かに掴み得る點において BAKER, PARKER & MIZE⁴⁾の Nitroprusside 呈色反應による方法に比べ、はるかに勝つてゐる。同氏等の方法は赤血鹽によるSH基の酸化を定量の原理となし、又 SPENCER⁶⁾の方法は o-iodosobenzoate によるSH基の酸化を原理としているが、小麦粉の複雑な組成を考察すれば、SH基以外の還元基の酸化の影響もないとは云えない。しかるに N/500 AgNO₃ を用いる本滴定方法においては過剰の p. C.M.B. の添加によつてSH基は完全に固定せられ、しかも p. C.M.B.の添加量が少いときにはその添加量とN/500 AgNO₃ の滴定値の減少は計算的に平行する。この事實を考察すれば Dispersed gluten のSH基を本法によつて正確に定量し得ると認められる。

しかしながら沈澱防止剤として使用する尿素が Dispersed gluten を變性し滴定されるSH基量に影響を與える事は考慮すべきであらう。これに對し Table 1. に示した結果は著者が沈澱防止の目的のもとに撰用する濃度の尿素は Gluten を殆んど變性せしめない事を示している。但しこの點については更に實驗を反復して確めなければならない。

けれども次報にてのべるような NaHSO₃ による

尙試みに著者が定量した Gluten のSH量から小麦粉中の SH 量を算出すれば 0.24×10^{-6} equivalent/g. flour となつて Spencer⁶⁾の定量値 1.0×10^{-6} equivalent/g. flour に比べて低い。著者の場合は Dispersed gluten の SH基の定量値から算出したものであり、後者にありては小麦粉中の Gluten 以外の蛋白質のSH基並びにその他の還元物質を共に定量した結果であるので両結果に差の生ずるのは當然であろう。又 SULLIVAN が小麦粉水抽出液にて得た値は Cystein として 0.0012% であつて、著者の値を同様な換算を行うと 0.006% となり遙かに大きい値になつてゐる。前者の値は Gluten を含まない水抽出物の値であるから比較の對象とはならないが参考のため例示した。

尙本實驗にて使用した小麦粉は日清製粉製商標青蟬の無漂白、製粉直後のもので原麥の品種は明かではないが水分13.8%、灰分0.41%、粗蛋白11.90%のものであつた。

Ⅶ 要 約

(1) 電流滴定法を 0.1N 醋酸に分散された Gluten に應用し、アムモニヤアルカリ性において N/500 AgNO₃ にて滴定しそのSH基の定量を試みた。

(2) 滴定條件を Polarograph によつて検討した所下記の電解液の組成において、白金廻轉電極のN甘汞電極に對する電位を -0.3V とするのが適當である事及び尿素は滴定に對して妨害作用がない事をみとめ、又滴定を低温ですみやかに行ふ必要性を明かにした。

電解液の組成

Gluten dispersion in 0.1N Acetic acid	10ml
40% Urea	6ml
5M NH ₄ OH	2ml
1M NH ₄ NO ₃	2ml

(3) SH基に特異試薬である p-chloromercuribenzoate (p. C.M.B.) を用いて滴定値を吟味した結果、電流滴定値はすべてSH基に基因することを確かめ得た。

終りに當り本研究に對し終始御懇篤な御指導を賜つた京大近藤金助教授、秦忠夫教授、及阪大恩師寺本四郎教授に對し深甚の謝意を表す。尙試料小麦粉を特に調製し實驗に提供された日清製粉神戸工場に深謝する。

(本報告は昭和29年10月大阪醸造學會大會に於て講演す)

文 献

- 1) SULLIVAN, B., HOWE, M., SCHMALZ, F. D. & ASTLEFORD, G. R.: Cereal. Chem. 17, 507 (1940).
- 2) 松本: 本誌, 33, 65 (1955).
- 3) SULLIVAN, B.: Presentation of Osborn medal A.A.C.C. (1948).
- 4) MEYER, H.S. & WORKING, E.B.: Ibid. 21, 32 (1944).
- 5) BAKER, J. C., PARKER, H. K. & MIZE, M. D.: Ibid. 21, 97 (1944).
- 6) ANSON, M.L.: J. Gen. Physiol. 24, 399 (1941).
- 7) NORDIN, P. & SPENCER, E.Y.: Cereal. Chem. 29, 29 (1952).
- 8) HOLME, J. & SPENCER, E.Y.: Ibid. 29, 251 (1952).
- 9) SMITH, D. E., KELLER, H. M. & ANDREWS, J. S.: Baker's Digest P. 35 1953. June.
- 10) 秦: 食糧科學研究, No. 2, 13 (1949).
- 11) 秦, 松下: 京大食研報告, No. 4, 46 (1951).
- 12) BENESCH, R. & BENESCH, R.E.: Arch. Biochem. 19, 35 (1948).
- 13) WEISSMAN, N., SCHOENBACH, B.E. & ARMISTEAD, E. B.: J. Biol. Chem. 187, 183 (1950).
- 14) STRICKS, W., KOLTHOFF, I. M. & TANAKA, N.: Anal. Chem. 26, 299 (1954).
- 15) KOLTHOFF, I. M., STRICKS, W. & MORREN, L.: Ibid. 26, 366 (1954).
- 16) SULLIVAN, B.: J. Agr. Food. Chem. 2, 1281 (1954).
- 17) 松本: 本誌, 32, 489 (1954).

(昭和30, 1, 12受理)