

燃焼法とケルダール法によるタンパク質定量の比較

吉野功・高橋仁恵・関口昭博

Comparison of the protein quantification by the combustion method and the Kjeldahl method

Isao YOSHINO, Hitoe TAKAHASHI, Akihiro SEKIGUCHI

大豆加工製品について燃焼法とケルダール法との定量値の相関を確認するため、12種類の大豆加工製品を分析し比較したところ、良好な相関が得られ、また、ばらつきも少ない値が得られた。植物性原料、動物性原料を含む不均一食材について定量試験を行ったところ、凍結乾燥試料50mgでもばらつきの少ない定量値が得られた。米製品、肉製品でも燃焼法とケルダール法で妥当な相関のある定量値が得られ、多くの食品でタンパク質分析方法をケルダール法から燃焼法に置き換えることが可能と考えられた。

キーワード：窒素定量、タンパク質定量、燃焼法、ケルダール法

In order to compare the correlation of a quantitative value using a combustion method with that using the Kjeldahl method, when 12 kinds of soybean processed products were analyzed and compared, good correlation was acquired and the value also with little variation was acquired. When the quantitative test was done about the uneven foods containing vegetable materials and animal materials, the quantitative value even with few 50 mg of freeze-drying samples to variation was acquired. The quantitative value which has appropriate correlation with a combustion method and the Kjeldahl method was acquired, and a processed rice product and processed meat were also considered that it is possible to transpose a protein method of analysis to a combustion method from the Kjeldahl method with much food.

Keywords: Determination of nitrogen, Determination of Protein, Combustion method, Kjeldahl method

1 はじめに

タンパク質は、食品中の栄養素の中でも体を形作る上で非常に重要なものである。栄養成分の表示については、現状は任意表示であるが、すべての加工食品への表示義務づけが検討されており、今後分析事例が増大すると考えられる。タンパク質はアミノ酸から構成されており窒素を6%程度含む。この窒素の

バイオ・食品係

測定値から食品の種類にあった換算係数をかけることによってタンパク質の算出を行うことが一般的である。ケルダール法は古くから使われている測定方法で、食品を硫酸で分解することによってタンパク質を硫酸アンモニウムに変換し、蒸留してアンモニア化したものを硫酸滴定することにより窒素の定量値を求める。測定事例も多いため信頼性が高く公定法に用いられている。また試料採取量を多くすることができるため、不均一な試料でも

ばらつきの少ない分析値を得ることができると考えられている。一方で、濃硫酸や強アルカリといった危険な試薬を用い、ドラフトなどの設備が必要となる。また、測定自動化が難しく、測定時間がかかるなどの欠点が指摘されている。近年燃焼法（デュマ法）と呼ばれる窒素測定法が開発されている。この方法は食品を高温で燃焼することによって試料中の窒素をNO_xガス化した後にN₂ガスとして還元し、TCDガスクロマトグラフにより定量測定を行うものである。この方法では試料をサンプリングした後は自動で測定が可能であり、分析時間は短縮される。ただし、歴史が浅いため現時点では分析事例はケルダール法に比べて少なく、まだ文献データは少ない。また、試料採取量が少なくても分析できる反面、不均一な試料ではばらつきが大きくなることが想定される。分析条件においても、食品種により適切な酸素供給量を設定する必要があり、不足した場合は不完全燃焼を引き起こし、過剰量では還元管の消耗を早める。そのため、燃焼法の窒素分析の妥当性を確保するためには、試料採取量や酸素供給量などの適切な分析条件を見だし、またケルダール法による分析値との相関をとることが必要となってくる。今回の研究では、主として豆腐などの大豆加工製品を対象に窒素タンパク質定量測定をケルダール法から置き換えることを目標とし、分析条件の検討を行った。

2 方法

2.1 分析方法

2.2.1 燃焼法

装置：NDA701 (VELP社製)

採取量：10mg-200mgをスズ箔に0.01mg単位まで精秤した。

酸素量 (O₂ファクター)：1.0-1.8ml/mg

燃焼温度：980℃、還元管温度：650℃

分析回数：2-10回繰り返し測定し、平均値、標準偏差を求めた。

2.2.1 ケルダール法

装置：ケルテック2300 (FOSS社製)

採取量：凍結乾燥試料は約200mg、生試料は約1000mgを1mg単位まで薬包紙に精秤した。

分解温度：420℃、分解時間：1時間

分析回数：2-4回繰り返し測定し、平均値、標準偏差を求めた。

2.2 測定試料

大豆製品（木綿豆腐、寄せ豆腐、絹豆腐、厚揚げ、がんもどき、油揚げ、混ぜ豆腐（アボガド、枝豆））、米製品（五目α米、わかめα米）、肉製品（ハンバーグ）、パスタソース（キムチ・トマト、肉入りソース）、標準試料（EDTA、農林水産消費安全技術センター肥料認証標準物質（高度化成肥料A・汚泥発酵試料C））について、燃焼法およびケルダール法により窒素定量を行った。一部の試料については前処理として、凍結乾燥および粉碎を行った後に分析に供した。

3 結果

3.1 燃焼法における検量線の作成

今回の研究で用いる検量線を標準物質（EDTA（エチレンジアミン4酢酸ナトリウム））を用いて作成した。窒素量として約0.1mg～30mgの範囲での検量線を図1に示す。直線で検量線を作成した場合、 $R^2 = 0.9993$ の相関が得られた。また、0.1～2.0mg、2.0～10mg、10～30mgで分割した検量直線を作成したところ、それぞれ $R^2 = 0.9998$ 、 0.9993 、 1.0000 とさらに高い直線性が得られた。標準直線として定量する場合、それぞれの濃度で検量線を用いる必要もあると考えられるが、2次曲線で検量線を作成したところ $R^2 = 0.9999$ の相関が得られており、以降の試験では、この標準曲線を用い、各測定日のEDTA定量値からファクターを求めて、補正定量した。

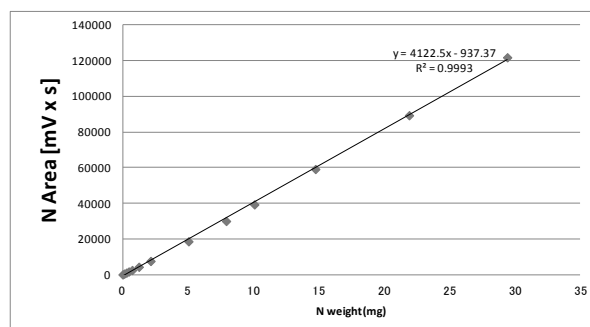


図1 EDTAによる燃焼法の検量線

3.2 分析装置の信頼性確認

燃焼法およびケルダール法で用いる窒素

定量装置の信頼性を確認するため、窒素量既知の標準試料について窒素量測定を行った。窒素量の平均値と標準偏差および標準試料の窒素保証値を図2に示す。それぞれのサンプルで両測定装置とも保証値±2.5%の範囲におさまり、いずれの分析装置も信頼性は保証されていると考えられた。

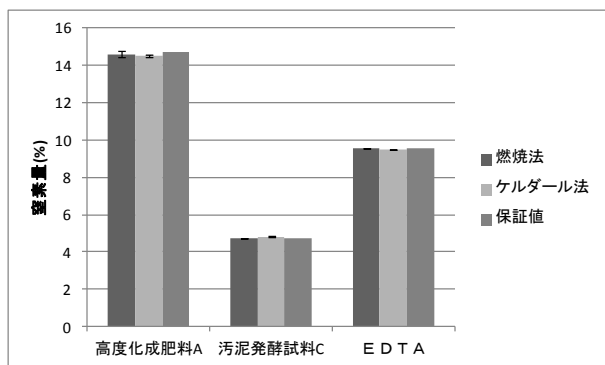


図2 標準試料のケルダール法と燃焼法の定量値と標準試料の窒素保証値の比較（誤差線は標準偏差）

3.3 燃焼法における窒素定量値の酸素量による影響

分析条件の検討に用いる試料としては大豆加工製品の一つである木綿豆腐を選定した。これは外国ではすでに大豆の窒素測定の公定法に燃焼法が用いられており、条件が確立されていること、国内においても大豆製品の一つである醤油の窒素分析公定法になっていること、また群馬産業技術センターでのタンパク質分析で多くの点数を占めることから分析対象とした。まず、燃焼式で用いる酸素量の影響により、分析方法間に窒素定量値の差があるか検討した。分析試料として凍結乾燥後粉砕した試料を用い、採取量は燃焼法では100mg、ケルダール法では200mgとした。ケルダール法で測定した窒素定量値を100としたときの燃焼法の窒素量の相対値をC/K(%)と定義し、図3に酸素量とC/K(%)との関係を表した。燃焼法の機器に設定されている原料大豆に対する酸素量は1.8ml/mgであったが、今回の試験では1.5ml/mgまではC/K(%)は100近くを保証できた。しかし、1.2mg/mlでは窒素分析値が低く測定され、完全燃焼されていない可能性があった。確実に完全燃焼されることを優先事項として、以降の試験では酸素量1.8ml/mgを分析条件として用いた。

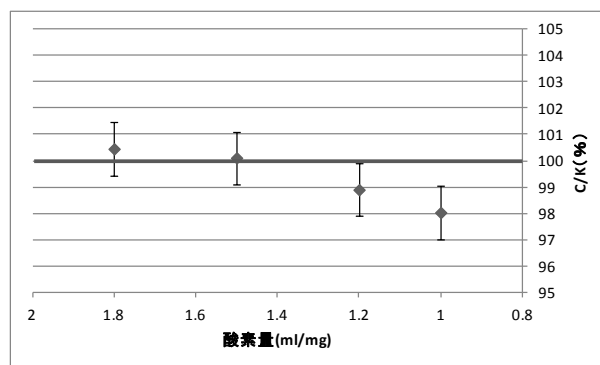


図3 燃焼法における酸素供給量の違いによる窒素定量値とケルダール法窒素定量値との比

3.4 燃焼法における窒素定量値の採取量による影響

木綿豆腐の分析標準採取量を選定するため、燃焼法において採取量の違いによる定量値やばらつきの大さの差を求め、ケルダール法で測定した窒素分析値と比較した。ケルダール法による採取量は200mg固定とした。図4にケルダール法に対する燃焼法の窒素定量値の比を示す。採取量10mg、200mgでは、ケルダールとの相対値も離れており、ばらつきも大きい。採取量20-100mgでは、ばらつきも少なく、ケルダールとの相対値も近い。消耗品コストも考え、50mgを以降の試験の標準採取量とした。

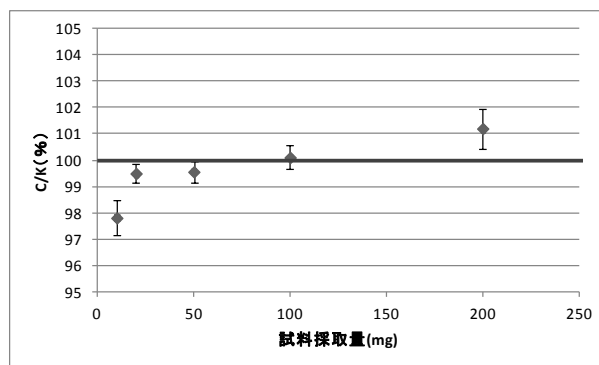


図4 燃焼法における試料採取量とケルダール法窒素定量値との比較

3.5 前処理方法の検討

燃焼法では、ケルダール法に比べて、試料採取量を多くできないため、前処理として凍結乾燥による水分の除去が有効であり、また、均質化も可能となるため、ばらつきの低減にもつながると考えられる。生試料での分析値と凍結乾燥後の試料の分析値について比較し

たものを図5に示す。生試料ではケルダール法で1000mg、燃焼法で100mg、凍結乾燥処理では、ケルダール法で200mg、燃焼法で50mgのサンプリングを行った。予想通り、凍結乾燥では定量値のばらつき、両方法の平均値の差とも良好であった。

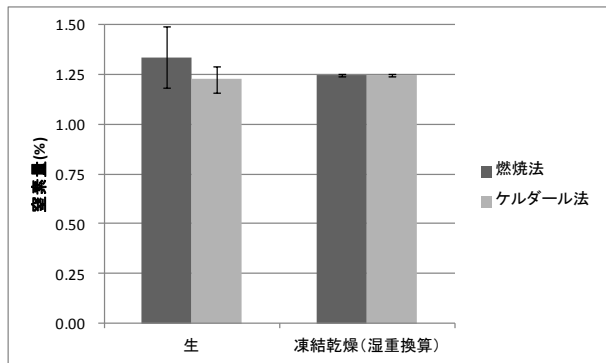


図5 凍結乾燥法と生試料での窒素量の比較

3.6 様々な大豆加工製品の窒素定量値

木綿豆腐も含めて12点の大豆加工製品について、燃焼法とケルダール法との比較を行ったものを図6に示す。乾燥重量に対する窒素量として4%~9%程度の分布となるが、窒素量の大小にかかわらず、おおむね良好な相関が得られた。

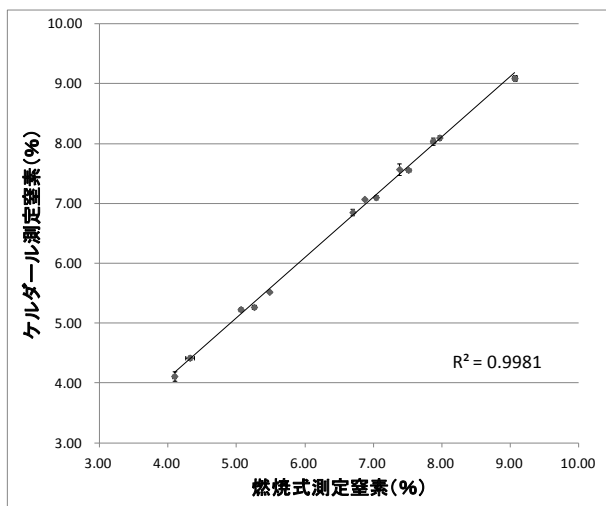


図6 様々な大豆加工製品の窒素定量値比較

3.7 米加工製品の窒素定量値比較

大豆製品以外の試料についても燃焼条件の検討をいくつか行ったので報告する。米製品として、 α 化米試料3点を分析した。原料米で設定されている酸素量は1.3ml/mgだったため、その条件を利用した。試料採取量は50mg、前処理は直接粉碎とした。定量結果を図7に

示す。燃焼法とケルダール法でおおむね近い数値が得られたが、五目ご飯では燃焼法の定量値がやや低い傾向にある。これは五目ご飯では野菜、きのこなどの原材料も含まれており、分解が不十分だった可能性もある。

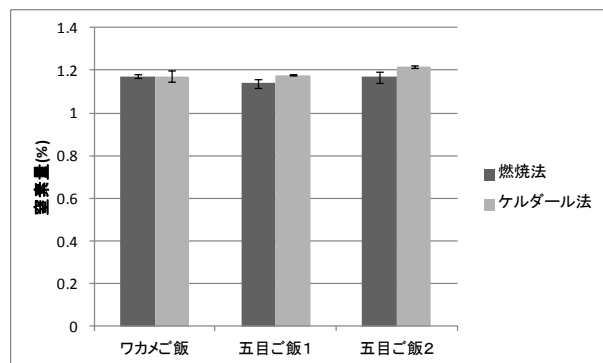


図7 米加工製品の窒素定量値

3.8 肉加工製品の窒素定量値比較

動物性タンパク質が含まれる試料として、肉加工製品について窒素定量値比較を行った。対象試料の冷凍ハンバーグを凍結乾燥粉碎後、ケルダール法は200mg、燃焼法は50mg採取し、酸素量は1.7ml/mgで分析した。結果を図8に示す。ハンバーグについても燃焼法とケルダール法では同様の定量値が得られた。今後他の種類の肉製品についても試験検討する。

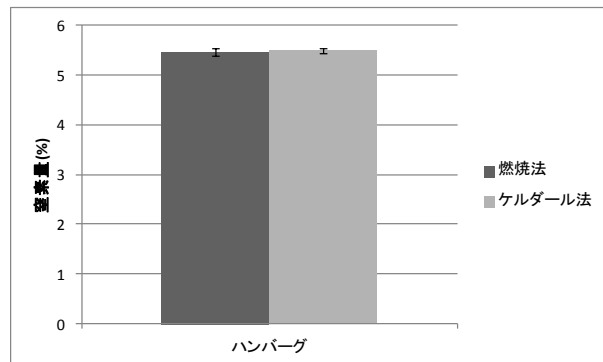


図8 肉加工製品の窒素定量値比較

3.9 燃焼法における採取量の違いによる不均一素材試料の窒素定量値比較

多くの原材料を含む食品では均質化および試料採取量が定量値の正確さに大きく影響する。植物性、動物性の原料も含む原材料の多い試料としてパスタソースを用いて、採取量の違いによる不均一素材の窒素定量値比較を行った。ケルダール法では採取量は200mgとし、燃焼法の酸素量は1.8ml/mgとした。結果

を図9に示す。燃焼法では試料採取量が多くなるにつれてばらつきは小さくなったが、150mg以上の試料では物理的な試料挿入トラブルも発生した。50mg程度の試料では、豆腐に比べれば、ばらつきが大きいものの、信頼性における定量値が得られた。

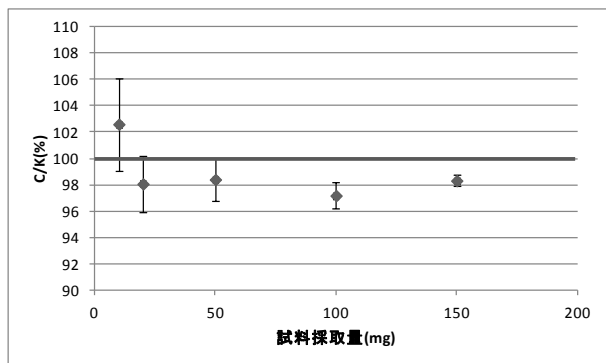


図9 パスタソースの燃焼法における試料採取量とケルダール法窒素定量値との比較

4. まとめ

燃焼法窒素タンパク質測定装置の検量線を作成したところ、窒素量として約0.1mgから30mgまでの間で、良好な相関係数をもつ検量線が得られた。窒素量既知の標準試料としてEDTA、標準肥料試料を用いて、ケルダール法と燃焼法との定量値比較を行ったところ、ど

ちらの方法も保証数値に比べて妥当な数値が得られた。大豆製品の分析に妥当な採取量を検討するため凍結乾燥品として採取量10mgから200mgまでの分析を行ったが、採取量50-100mgで、ばらつきの少ない結果が得られ、さらに少量でも信頼の置ける定量精度が得られた。豆腐を生状態で分析することも可能であったが、ばらつきは大きかった。また、生状態では最大採取窒素量が少なくなるため、前処理として、凍結乾燥は有効であった。大豆加工製品について燃焼法とケルダール法との定量値の相関を確認するため、12種類の大豆加工製品を分析し比較したところ良好な相関が得られ、また、ばらつきも少ない値が得られた。不均一食材のモデルとして、植物性原料、動物性原料を含むパスタソースについて定量試験を行ったところ、凍結乾燥品50mgでもばらつきの少ない定量値が得られた。米製品、肉製品でも燃焼法とケルダール法で妥当な相関のある定量値が得られており、窒素タンパク質測定依頼試験として受ける大部分の食材について、タンパク質分析方法をケルダール法から燃焼法に置き換えることが可能となった。通常の食品であれば、凍結乾燥品50mg、酸素量1.8ml/mgの試験条件で窒素タンパク質定量ができると考えられた。