

## 水稻 高蛋白 系統育成을 爲한 基礎的 研究

### I. 系統育成을 爲한 粗蛋白質 分析法의 比較

서울大學校 農科大學

許 文 會 · 徐 學 洙

## Basic Studies for the Breeding of High Protein Rice.

### I. Comparison of the analytical methods for the measurement of the protein content in the brown rice

*College of Agriculture, Seoul National University*

*HEU, Mun Hue and SEO, Hak Soo*

### SUMMARY

In order to compare the analytical efficiency of the Kjeldahl, Dye binding and Biuret method for the determination of nitrogen content in the brown rice, correlation coefficients were calculated with the analytical data obtained by the above mentioned 3 different methods for the brown rice of 36 varieties or lines grown at 5 different nitrogen levels (0, 7.5, 15.0, 22.5 and 30.0kg/10a). Analysis of variance were made for the data of 6 varieties among those 36, and compared the precision of the data obtained by the 3 analytical methods. The expenditure (in terms of chemicals and labour) required for the 3 methods are also compared. The results are summarized as follows;

1. The correlation between D. B. C. and Kjeldahl value were generally more significant than the correlation between the value of Biuret and the value of Kjeldahl. But, the D. B. C. method generally overestimates than the Kjeldahl method at both extreme low and extreme high nitrogen contents, and the Biuret method includes more dispersed error than other two methods, though the optical values are parallel to the Kjeldahl nitrogen values at any levels of nitrogen applied.
2. The varietal difference in nitrogen value obtained by the 3 methods were different at the different nitrogen level applied. That is the interaction between variety and analytical method, and between the nitrogen level and analytical method were significant Statistically.
3. The coefficient of variance (C. V.) was largest in the data analyzed by Biuret method and next in the data analyzed by D. B. C. method. In the data analyzed by Biuret, the C. V. increased along the increase of nitrogen applied. But, in the data obtained by D. B. C. or Biuret the C. V. increase along the decrease of nitrogen applied.
4. From the comparison of the expenditure (in terms of chemicals and labour) required for the analysis of 100 samples by 3 methods, it was noticed that, the Biuret or D. B. C. method largely curtail the chemical expenditure and labour costs. Especially the Biuret method could curtail more labour costs.

穀實作物의 高蛋白品種 育成이 보편화 되면서 蛋白質分析技術의 簡易化에 대한 必要性이 높아 가고 있다. 取扱되는 系統數가 主로 實驗室의 分析能力에 制限되므로 많은 育種場에서는 보다 더 많은 系統數를 取扱해서 育種의 效率을 높이기 위하여 보다 더 簡便한 蛋白質分析方法을 要望하고 있다. 다소 精密度가 떨어지더라도 能率의으로 大量系統을 經濟的으로 分析할 수 있다면 元來 變異가 큰 이 形質의 選拔에 크게 도움이 될 것이다. 이러한 見地에서 Dye Binding Capacity method(以下 D. B. C法이라 略함) 이 널리 쓰여 왔으나 最近에는 Biurett method가 D. B. C.法보다 더 簡便한 것으로 알려져 普及이 되어 가고 있다. 그러나 簡便한 反面에는 精密度의 犧牲이 따르게 마련이다. 따라서 우리는 分析의 能率에서 오는 選拔의 效率과 精密度의 犧牲에서 오는 選拔의 不確實性과의 均衡點에서 分析方法과 供試系統의 規模를 定해야 한다.

위와 같은 現實의인 要望에서 本人들은

- 1) Micro-Kjeldahl method. 2) D. B. C method 및
- 3) Biurett method의 精密度와 能率을 簡單히 比較하여 若干의 結果를 얻었으므로 여기에 報告하여 諸賢의 鞭撻을 받고져 한다.

### 1. 材料 및 方法

진종 외에 35계통 및 품종을 5개 수준의 질소비료조건, (O:N<sub>0</sub>, 7.5:N<sub>1</sub>, 15.0:N<sub>2</sub>, 22.5:N<sub>3</sub>, 30.0:N<sub>4</sub>kg/10a)에서 2반복으로 재배하여 각각 세가지 분석방법으로 질소 함량을 정량하였고, 그 중 대표적 고단백 계통 3, 저단백 계통 2, 그리고 중간 계통 1을 골라 별도로 세가지 방법으로 6반복하여 分析하고 各 分析法을 比較 하였다. 분석방법은 각각 다음과 같다.

#### ① Micro-Kjeldahl method;

분쇄된 시료 10~30mg을 Kjeldahl flask에 평량해 넣고 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g과 H<sub>2</sub>O 40mg을 分解촉진제로 넣어 여기에 2ml의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 加하고 가열 분해 시킨다. 이것을 냉각시켜 증류수로 녹여서 증류장치에 옮기고 10ml의 NaOH+Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O를 加하여 증류하고 발생하는 암모니아 가스를 5ml의 Boric acid (4%)에 포착해서 0.01N의 HCl로 적정하여 질소량을 구하고 여기에 5.95를 곱하여 조단백함량을 계산하였다.

#### ② Dye Binding Capacity method;

試料 400mg을 4ml의 Dye 용액(Crange G. :2g, Citric acid 15.84g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O: 2.98g, Thymol: .30g을 1 l 수용액으로 만듦)으로 염색하여 3시간 동안 진탕하여 여과한 후 여과액 0.5ml를 취하여 Buffer

액(Citric acid 15.84g 과 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.98g을 1 l 수용액으로 만듦)으로 100ml가 되도록 희석하여 Spectrophotometer에서 470mμ으로 흡광도를 측정하여 이것을 Micro Kjeldahl 法과 비교하여 표준화 하였다.

#### ③ Biurett method;

200mg의 試料에 200mg의 Cupric Carbonate와 10ml의 알콜시약 (iso Propyl alcohol 600ml와 KOH 5.61g을 1 l 수용액으로 희석)을 가하여 15분간 진탕한 후 15분 후 여과하여 Spectrophotometer로 550mμ에서 흡광도를 측정하여 Micro Kjeldahl 법과 비교하여 표준화 하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 相關係數와 回歸係數

세가지 方法으로 分析한 36系統 및 品種의 分析值 即 Kjeldahl法에 依한 질소함량, D. B. C法에 依한 투과율을 log로 환산한 吸光度, 그리고 Biurett法에 依한 吸光度 相互間의 相關係數 및 回歸係數를 計算하여 表1에 표시 하였다.

Table 1. Correlation and regression coefficients for 36 lines between Kj. and D. B. C. Kj. and Biurett, and D. B. C. and Biurett.

N-level	r	b
Between Kj. and D. B. C.		
N <sub>0</sub>	-0.7702**	-0.0153
N <sub>1</sub>	-0.7041**	-0.0079
N <sub>2</sub>	-0.5680**	-0.0078
N <sub>3</sub>	-0.6073**	-0.0053
N <sub>4</sub>	-0.6813**	-0.0051
Total	-0.9020**	-0.0098
Between Kj. and Biurett		
N <sub>0</sub>	0.2879	0.0187
N <sub>1</sub>	0.6157**	0.0366
N <sub>2</sub>	0.5001**	0.0238
N <sub>3</sub>	0.5866**	0.0289
N <sub>4</sub>	0.6102**	0.0321
Total	0.7987**	0.0322
Between D. B. C. and Biurett		
N <sub>0</sub>	-0.5181**	-1.6938
N <sub>1</sub>	-0.6656**	-3.6187
N <sub>2</sub>	-0.2276	-1.1127
N <sub>3</sub>	-0.4238**	-2.4115
N <sub>4</sub>	-0.6737**	-4.6000
Total	-0.7831**	-2.8492

表1에서 보면 D. B. C. 法에 의한 分析値는 Kjeldahl 法에 의한 分析値와 大體로 잘 一致됨을 알 수 있다. Kjeldahl 測定値에 對한 D. B. C. 測定値의 回歸係數는 大體로 N 施用量의 增加에 따라 減少 하였다.

한편 Kjeldahl 法에 의한 分析値와 Biurett 法에 의한 分析値와의 사이에는 全體의 으로는 高度의 有意한 相關이 보이지만 N 水準別로 보면 相關이 不分明한 경우도 있어서 變異가 大을 알 수 있다. 따라서 D. B. C. 測定値와 Biurett 測定値와의 相關도 Biurett 測定値의

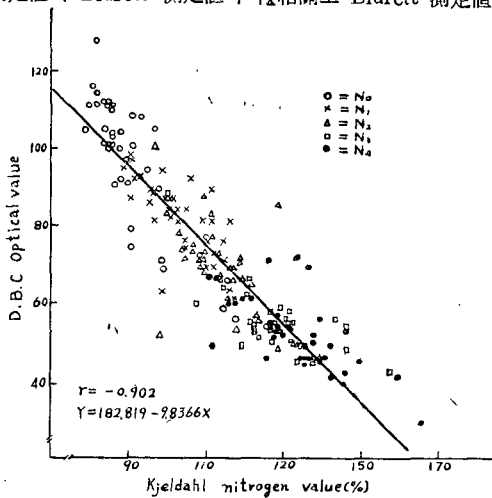


Fig. 1. Correlation between Kjeldahl nitrogen value and D. B. C. optical value.

그림 1에서 보면 大體로 N<sub>0</sub>와 N<sub>4</sub> 水準에서의 D. B. C. 測定値가 Kjeldahl 測定値에 比하여 期待値 보다 높게 나타나서 Kjeldahl 測定値로 9% 以下 및 13% 以上에 있어서는 D. B. C. 測定値의 Calibration이 必要한 것으로 생각된다. 그림 2에서 보면 全般의 으로는 期待値로 부터의 分散이 大데, 特히 N<sub>0</sub>와 N<sub>4</sub> 水準에서의 偏差가 大다.

別途로 6 品種에 對하여 比較値의 信賴度를 높이기 爲하여 製粉한 試料를 가지고 6회 반복 분석한 平均値로 計算한 相關係數와 回歸係數를 表 2에 제시하였다. 表 2에서 보면 全般의 으로는 相關의 程度가 높아 졌지만 Biurett 測定値는 D. B. C. 測定値에 比하여 Kjeldahl 測定則과의 相關의 程度가 떨어진 다. 特히 N<sub>0</sub> 水準에서는 負의 係數가 나올 程度로 不分明 하다. 따라서 D. B. C. 測定値와 Biurett 測定値와의 相關도 비슷하여 N<sub>0</sub> 水準에서는 正의 數値가 나타날 程度로 不分明하였다.

## 2. 分散과 變異係數

5個 窒素水準에서 栽培된 6個 品種을 세가지 方法으로 6회 반복 分析한 成績을 分散分析한 것이 表 3인데 表 3에서 보면 分析方法에 따라 현저한 差가 있음을 알

영향으로 全體의 으로는 高度의 有意한 相關이 보이지만 各 N 水準別로는 Biurett 測定値의 變異에 따라 相關이 높고 낮게 나타났다.

D. B. C. 測定値와 Biurett 測定値와의 相關도 Biurett 測定値의 變異로 인하여 比較的 낮은 相關을 보였다.

Kjeldahl 測定値와 DBC 測定値와의 相關 및 Kjeldahl 測定値와 Biurett 測定値와의 相關을 그림으로 表示한 것이 그림 1 및 그림 2 이다.

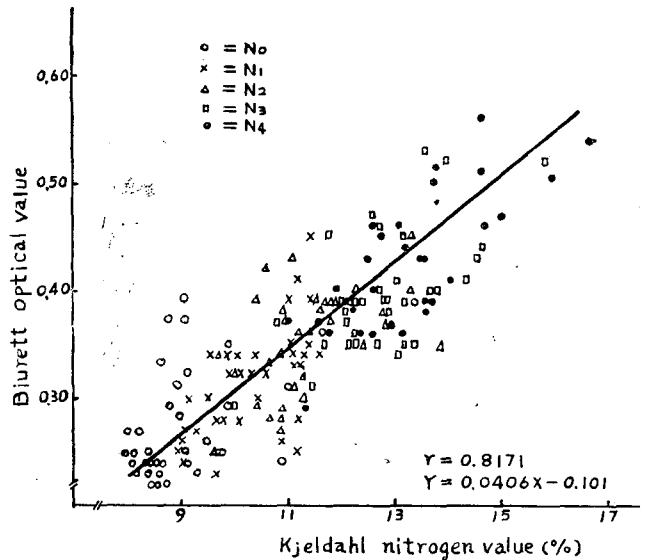


Fig. 2. Correlation between Kjeldahl nitrogen value and Biurett optical value.

Table 2 Correlation and regression coefficients between Kj. and D. B. C., Kj. and Biurett, and DBC and Biurett, for 6 lines replicated 6 times.

N-level	r	b
Between Kj. and D. B. C.		
N <sub>0</sub>	-0.8561**	-0.0410
N <sub>1</sub>	-0.8953**	-0.0312
N <sub>2</sub>	-0.7167**	-0.0262
N <sub>3</sub>	-0.8562**	-0.0202
N <sub>4</sub>	-0.9701**	-0.0228
Total	-0.9120**	-0.0297
Between Kj. and Biurett		
N <sub>0</sub>	-0.2454	-0.0400
N <sub>1</sub>	0.4049*	0.0466
N <sub>2</sub>	0.7121**	0.1120
N <sub>3</sub>	0.6231**	0.1040
N <sub>4</sub>	0.3107	0.0432
Total	0.6898**	0.0980

Between D. B. C. and Biurett		
N <sub>0</sub>	0.1250	0.4285
N <sub>1</sub>	-0.5750**	-1.9163
N <sub>2</sub>	-0.4378**	-2.1052
N <sub>3</sub>	-0.4615**	-3.2727
N <sub>4</sub>	-0.3409	-2.0000
Total	-0.6586**	-2.8740

Table 3. Analysis of variance for the data of nitrogen content analyzed by three different methods.

Source of variation	DF	SS	MS	F
Total	539	2603.01		
Treatment	89	2451.37	27.54	81.74
A (variety)	5	751.49	150.30	446.01**
B(N-level)	4	1232.25	308.06	914.19**
C(Anal. Method)	2	35.86	17.93	53.20**
AB	20	188.27	9.41	27.93**
AC	10	116.39	11.64	34.54**
BC	8	34.84	4.35	12.29**
ABC	40	92.29	2.31	6.85**
Error	450	151.64	0.34	

Table 4. Coefficients of variance for the protein content of brown rice grown at the five different nitrogen levels analyzed by three different methods.

Variety	Anal. method	C. V.				
		N <sub>0</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>
IR1317-47	Kj.	2.72	0.16	1.69	1.21	2.35
	D. B. C.	0.64	0.01	0.71	0.67	1.62
	Biu.	2.45	3.18	4.58	6.07	3.37
IR1317-89-2	kj.	1.60	4.35	2.26	1.32	1.48
	D. B. C.	5.35	4.81	1.68	2.11	2.31
	Biu.	5.65	3.06	2.98	2.77	1.45
IR1317-89-3	Kj.	2.51	3.59	5.31	0.51	1.45
	D. B. C.	8.24	1.35	0.35	1.40	0.77
	Biu.	5.14	9.48	3.09	5.36	5.49
IR781B <sub>4</sub> -351	Kj.	3.54	6.06	3.19	2.59	0.25
	D. B. C.	7.49	1.87	6.61	0.24	1.78
	Biu.	5.21	2.97	5.45	13.82	4.88
Jinheung	Kj.	3.40	3.46	4.40	3.02	4.48
	D. B. C.	3.40	7.27	0.44	2.00	2.17
	Biu.	5.69	3.61	2.46	2.97	4.51
IR667-98-1-2	Kj.	2.13	2.88	2.87	1.77	1.17
	D. B. C.	7.06	1.76	1.92	1.73	2.61
	Biu.	2.33	8.34	13.24	6.74	10.09
Mean	Kj.	2.65	3.42	3.29	1.74	1.86
	D. B. C.	5.36	2.84	1.95	1.36	1.88
	Biu.	4.41	5.11	5.30	6.29	6.46

수 있고 더욱 分析方法이 品種에 따라 다르게 反應을 알 수 있다.

예를들면 N함량이 비교적 낮은 振興에 있어서는 D. B. C. 法이 Kjeldahl法 보다 높게 評價되었으며 N함량이 比較的 높은 IR1317-89-2에서는 D. B. C. 法으로 낮게 나왔다. 이와 같이 品種에 따라 分析方法에 따라 傾向이 다르다는 事實은 이제까지의 文獻에서 볼 수 없었던 事實이며 施用하는 N量과 育種目標인 Amino酸의 種類와도 關聯하여 앞으로 더 탐구되어야 할 點이라고 생각된다.

分析方法의 信賴性を 檢討하기 爲하여 品種別 N水準別로 變異係數를 計算한 것이 表 4이다. 表 4에서 보면 品種別로 보나 N水準別로 보나 뚜렷한 傾向이 보이지 않고 全品種을 N水準別로 볼 때 Kjeldahl法과 D. B. C. 法은 大體로 變異가 적으며 N<sub>3</sub>水準에서 極少로 되었는데 Biurett法은 全體적으로 變異도 크고 N水準이 높아짐에 따라 變異도 增加함을 알 수 있다.

### 3. 化學分析의 能率과 精密度

3지가 分析方法에 所要되는 試藥과 勞力을 試料 100點單位로 計算한 것이 表 5인데 表 5에서 보면 試藥消耗과 操作勞力이 Kjeldahl법 보다는 D. B. C. 法으로 현저

摘 要

Table 5. Reagents and man hours required for 100 sample analysis by three different analytical methods.

Anal. method	Reagent	Quantity (g or ml)	Man hour
Micro Kjeldahl	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	18.7×2
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	
	H <sub>2</sub> O	4	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	20	
	N <sub>2</sub> OH	500	
	N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	50	
	Methyl red	0.04	
	Brome cresol green	0.2	
	HCl	0.44	
D. B. C.	Orange G	0.8	13.0×1
	Citric acid	164.7	
	N <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30.05	
	Thymol	0.12	
	Filter paper	100	
Biurett	Cupric carbonate	20	10.5×1
	iso-Propyl alcohol	600	
	KOH	5.61	
	Filter paper	100	

하게節約될 수 있고 簡便함을 알 수 있다. 消費된 試藥과 勞力을 費用으로 換算하는데는 關與되는 條件에 따라 相當한 變異를 內包할 것이겠지만 一般的으로 말해서 試藥에서는 D. B. C. 法과 Biurett法이 Kjeldahl法에 比하여 현저하게節約될 수 있지만 D. B. C. 와 Biurett法 사이에는 큰 差가 없으며 勞力面에서는 Kjeldahl法에 比하여 D. B. C. 法이 현저하게節約될 수 있으며 D. B. C. 法에 比하여 Biurett法은 若干 더節約될 수 있다고 할수 있다.

育種上 系統選抜의 效率을 爲해서는 普通栽培의 窒素水準에서 D. B. C. 나 Biurett法을 쓰는 것이 有利하나 高蛋白系統들의 精密比較에는 위에서본 偏差를 考慮해야 할 것이다. D. B. C. 法을 쓸 때에는 높은 窒素水準에서의 Calibration이 考慮되어야 하겠으며 Biurett法을 利用할 경우에는 操作上的 誤差를 減少시킬 수 있는 勞力이 必要하다고 하겠다.

水稻 高蛋白 系統選抜을 爲한 米粒內 窒素含量 檢定 方法을 初步 檢討하기 爲하여 豫備選抜된 36系統 및 對照品種을 5가지 窒素水準(0, 7.5, 15.0, 22.5, 30.0, kg/10a)에서 栽培하여 그 玄米를 Kjeldahl법, Dye binding법 및 Biurett법으로 分析하여 3가지 方法에 依한 分析值間의 相關을 檢討하였으며 그 中 6個品種에 對하여 同一試料를 3가지 分析法으로 6回 反復한 分析值의 分散을 檢討하였고 3가지 方法으로 試料 100點當 所要된 試藥과 勞力을 比較하였다. 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. D. B. C. 법에 依한 分析值는 Biurett법에 依한 分析值보다 Kjeldahl 법과의 相關이 높았으나 D. B. C. 법에서는 極度로 높은 窒素水準에서와 極度로 낮은 窒素水準에서의 分析值는 Kjeldahl법에 依한 分析值에 比하여 過大評價되는 傾向이 있다. Biurett법은 比較的 誤差가 커서 Kjeldahl 법과의 相關이 떨어지지만 모든 窒素水準에서 平行인 傾向이었다.

2. 品種에 따라 施用된 窒素水準에 對한 反應도 달랐지만 品種과 窒素水準에 따라 3가지 分析方法의 反應도 달랐다.

3. 3가지 分析方法別 分析值의 變異係數를 比較하면 Biurett법이 가장 크며 다음은 D. B. C. 법인데 Biurett법에서는 各窒素水準에서 모두 높았지만 窒素水準이 높아짐에 따라 變異係數도 커졌는데 Kjeldahl 법이나 D. B. C. 법에서는 窒素水準이 낮아짐에 따라 變異係數가 커졌다.

4. 3가 分析方法에서 所要되는 藥品과 勞力을 調査하여 Kjeldahl법에 比하여 D. B. C. 법이 현저하게節約되며 D. B. C. 법 보다 Biurett법은 더욱節約될 수 있음을 알았다.

參 考 文 獻

1. IRRI (1969); Annual Report pp 36-37
2. Kim, S. K., C. Y. Lee, and H. Park (1971); Korean J. Food Sci. Technl. 31(2), :101-104
3. Osone, K. and T. Takagi (1970); Jap. J. Breeding. 20:301
4. Parial, L. C., L. W. Rooney, and D. B. Weiff (1970); Cereal chem., 47:33
5. Heu, M. H., C. Y. Lee, J. Y. Choe, and S. I. Kim (1969); Korean J. crop. Sci. 7:79-84