衛生化学
EISEI KAGAKU
32 (5) 373-378 (1986)

酵素法による魚肉練製品中のグルコース、フルクトース、ショ糖の定量

溝渕脩彦, 北田善三, 佐々木美智子, 上田保之
奈良県衛生研究所

Determination of Glucose, Fructose, and Sucrose in Fish Paste Foods by Enzymatic Method

MUNEHICO MIZOBUCHI, YOSHIMI KITADA, MICHIKO SASAKI
and YASUYUKI UEDA
Nara Prefectural Institute of Public Health
57-6 Ohmori, Nara 630, Japan

(Received April 18, 1986)

The enzymatic method was applied to the determination of glucose, fructose, and sucrose in fish paste foods such as "Kamaboko" and "Chikuwa." Ten g of the sample was homogenized with water and made up to 200 ml with water. After centrifugation, 0.1 ml of the supernatant, which was filtered through the Toyo No 5C filter paper, was used to determine by the commercially available kit.

The recoveries of the standard solution added to the sample at the concentration levels of 8 mg/g of glucose and fructose, and 16 mg/g of sucrose were 97.1%, 95.1%, and 91.3%, respectively. If the difference in the UV absorption was 0.1 on the calculation and this value could be defined as the lowest limit of the detection, their detection limits were 0.2 mg/g on glucose and fructose, and 0.4 mg/g on sucrose.

The average concentrations of sucrose, glucose, and fructose in 34 fish paste foods purchased in Nara city were 49.8 mg/g, 6.6 mg/g, and 0.6 mg/g, respectively.

The maximum concentration of sucrose was 113 mg/g.

Keywords—enzymatic method; glucose; fructose; sucrose; fish paste food

緒 言

糖類の測定方法には、化学的方法,¹⁾ ガスクロマトグラフ法 (GC 法),²⁻⁶⁾ 液体クロマトグラフ法 (HPLC 法),⁷⁻¹¹⁾ 電気化学的方法,¹²⁾ 及び酵素法¹³⁻¹⁵⁾ 等がある。GC 法, HPLC 法では装置が高価であり, 妨害物質を除くための前処理が必要であるが, 酵素法では酵素の特異性により複雑な前処理も不要で, 共存している他の糖の影響も少ない。しかし, 酵素法では, 酵素の抽出, 精製が困難であり, また均一な製品が得難い等の欠点がある。これらの欠点を補う目的で最近食品中の糖の測定用キット (酵素液) が市販されるようになった。

魚肉練製品には, 甘味料としてサッカリンナトリウム (使用基準量 0.3 g/kg) の使用が許可されているが, 魚肉ハム, 魚肉ソーセージを除くいわゆる カマボコ, 竹輪, ハンペン等にはサッカリンナトリウムはほとんど使

用されておらず, "砂糖" の使用が表示されていた。このため製品に使用されている砂糖の測定に酵素法を用いたところ, 非常に有用であったので報告する。

実験方法

1. 試料 奈良市内で市販されていた魚肉練製品 (魚肉ハム, 魚肉ソーセージを除く) を用いた。なお, 使用した試料は板かまぼこ 7 検体, 竹輪 10 検体, 揚かまぼこ 11 検体, その他 6 検体の合計 34 検体である。

2. 試薬 ベーリンガー・マンハイム山之内 (株) より市販されている F キット (ショ糖/グルコース/フルクトース) を用いた。なお, 本キットは次の 4 バイアルで構成され, 1 キットで約 20 回の測定が可能である。

溶液 I : クエン酸緩衝液 (pH 4.6), β -フルクトシダーゼ (約 720 U), 安定化剤。

溶液 II : トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.6),

NADP (110 mg), ATP (260 mg), MgSO_4 , 安定化剤.

懸濁液 I : ヘキソキナーゼ (約 320 U), G6P-DH (約 160 U).

懸濁液 II : フォスフォグルコースイソメラーゼ (PGI; 約 420 U).

3. 器具及び機器 1) 分光々度計: 島津製作所製 UV-240, スリット; 2 mm, 波長; 340 nm, セル; 1 cm.

2) 恒温水槽: サーマニックス社製 M-150.

3) ポリトロン: KINEMATICA CH-6010.

4) 遠心分離機: 日立製作所製 18PR-3.

4. 試料液の調製 細切した試料 10 g に蒸留水約 40 ml を加え, ポリトロンで約 30 秒間ホモジナイズした後, 蒸留水で 200 ml 定容とした. この一部を 75 ml 容遠沈管にとり, 10000 rpm で 10 分間遠心分離した後, 東洋口紙 No 5C で上澄液を口過し, 供試液とした.

5. 測定操作 本酵素キットでは, 1 検体当りキュベット 2 本を用い, グルコース (Glu), フルクトース (Fru), ショ糖 (Suc) の 3 種類の糖が測定出来る.

1) Glu, Fru の測定——1. キュベットに供試液 0.1 ml を取り, 溶液 II 1 ml 及び蒸留水を加えて全量を 3 ml とする.

2. 混和し, 約 3 分後に波長 340 nm における吸光度 (E_1) を測定する.

3. 懸濁液 I 0.02 ml を加えて混和後, 37°C で 10 分間反応させ, 吸光度 (E_2) を測定する.

4. 懸濁液 II 0.02 ml を加えて混和後, 37°C で 10 分間反応させ, 吸光度 (E_3) を測定する.

2) Suc の測定——1. キュベットに供試液 0.1 ml を取り, 溶液 I 0.2 ml を加え, 37°C で 5 分間反応させる.

2. 溶液 II 1 ml 及び蒸留水を加えて全量を 3 ml とする.

3. “Glu, Fru の測定” の 2, 3 の操作を行い, 各吸光度 (SE_1 , SE_2) を測定する.

なお, Glu, Fru, Suc のブランクは, 供試液と同様な操作をし, 各々の吸光度を測定する.

6. 濃度計算 各々の吸光度から ΔE_{Glu} , ΔE_{Fru} , ΔE_{Suc} を求める.

$$\Delta E_{\text{Glu}} = (E_2 - E_1) - \text{blank } (E_2 - E_1)$$

$$\Delta E_{\text{Fru}} = (E_3 - E_2) - \text{blank } (E_3 - E_2)$$

$$\Delta E_{\text{Suc}} = \{(SE_2 - SE_1) - \text{blank } (SE_2 - SE_1)\} - \Delta E_{\text{Glu}}$$

各 ΔE を下記の計算式に代入し, 濃度を求める.

$$C = \frac{V \times M_r \times 200}{\epsilon \times d \times v \times 1000 \times 10} \times \Delta E \text{ (mg/g)}$$

V: 反応液量, M_r : 分子量, ϵ : 吸光係数

d: セル長, v: 検体量

$$\begin{aligned} \text{Glu} &: \frac{3.02 \times 180.16 \times 200}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000 \times 10} \times \Delta E_{\text{Glu}} \\ &= 17.27 \times \Delta E_{\text{Glu}} \text{ (mg/g)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Fru} &: \frac{3.04 \times 180.16 \times 200}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000 \times 10} \times \Delta E_{\text{Fru}} \\ &= 17.38 \times \Delta E_{\text{Fru}} \text{ (mg/g)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Suc} &: \frac{3.02 \times 342.30 \times 200}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000 \times 10} \times \Delta E_{\text{Suc}} \\ &= 32.82 \times \Delta E_{\text{Suc}} \text{ (mg/g)} \end{aligned}$$

結果及び考察

1. 抽出法の検討

固形食品から糖を抽出するには 80% エチルアルコール (EtOH)⁹⁾ 温水⁸⁾ 等が用いられている. そこで市販かまぼこ 5 検体を用いて, 4 試料液の調整に示した室温での蒸留水抽出法を A 法とし, 室温での 80% EtOH による抽出法 (B 法) と還流冷却器をつけ 70°C の温水で 3 時間加温抽出する方法 (C 法) と比較した結果を Table I 及び II に示した. なお, 80% EtOH 抽出液での酵素阻害は全く認められなかった.

表に示したように, 各抽出法で抽出した試料について ショ糖濃度の比を求めたところ, 80% EtOH を用いた場合 1.02—0.90, 平均 0.96, 加温抽出の場合 1.03—0.92, 平均 1.00 であった. このように魚肉練製品中の糖を抽出するには上記 3 方法のいずれを用いてもほぼ同じように抽出されることがわかった. これは, ポリトロンでホモジナイズしたことにより試料が非常に細くなり, 製品中の ショ糖が蒸留水に常温で容易に溶出した. なお, 80% EtOH を用いて抽出すると, 食用色素が使用されている製品では色素が同時に抽出¹⁰⁾ され, 試料溶液に着色が見られたが, 吸光分析法に及ぼす影響はほとんど認められなかった.

2. 反応時間の検討

Glu 及び Fru の測定では, 各酵素作用により生成する NADPH 量が反応した Glu 又は Fru 量に相当するので, Glu 又は Fru 標準溶液 (1.0 mg/ml) を用い, 酵素添加後の NADPH 量を Glu 又は Fru 量とし, 反応の経時変化を求めた.

Glu の反応は酵素の添加と同時に急速に進行し, 添加後約 3 分でほぼ反応が完結した. Fru についても Glu と同様な変化をし, 反応は添加後約 3 分で完結した. 一方, Suc 標準溶液を用いて β -フルクトシダーゼの反応時間を求めたところ, 37°C で 5 分間反応させれば, Suc は Glu と Fru に分解されることがわかった.

TABLE I. Comparison of Extraction Efficiency of Sucrose in 80% Ethyl Alcohol and Distilled Water at Room Temperature

Name of sample	Conc. of sucrose (mg/ml)		Ratio (B/A)
	Method A	Method B	
Agekamaboko	1 25.9	26.2	1.01
	2 27.0	24.3	0.90
	3 47.9	49.0	1.02
	4 63.0	60.9	0.97
Chikuwa	1 45.7	42.5	0.93
	2 79.6	71.6	0.90

Method A : extract with water at room temperature.

Method B : extract with 80% ethyl alcohol.

TABLE II. Comparison of Extraction Efficiency of Sucrose in Distilled Water and hot Water at 70°C

Name of sample	Conc. of sucrose (mg/ml)		Ratio (C/A)
	Method A	Method C	
Agekamaboko	1 47.4	47.3	1.00
	2 101.1	102.0	1.01
Chikuwa	1 83.8	82.9	0.99
Others	1 31.4	28.9	0.92
	2 49.3	50.9	1.03
	3 53.4	55.1	1.03

Method A : extract with water at room temperature.

Method C : extract with hot water at about 70°C.

TABLE III. Effects of Fat in Fish Paste Foods on the Determination of Sugars by This Method

Sample	Conc. of fat (%)	Sucrose (mg/g)		Ratio (B/A)
		Non-treated sample (A)	Defatted sample (B)	
1	0.09	29.1	28.8	0.99
2	0.18	39.8	39.0	0.98
3	0.32	35.5	33.5	0.94
4	0.88	31.2	30.3	0.97
5	2.12	50.0	54.9	1.10
6	2.47	102.7	102.8	1.00
7	3.10	101.7	98.2	0.97
8	3.17	48.8	48.3	0.99

TABLE IV. Comparison of Each Sugar Concentration Calculated from the Equation Used Molar Extinction Coefficient to Those of the Standard Solution

Standard solution (mg/ml)	Found (mg/ml)		
	Glucose	Fructose	Sucrose
0.20	0.20	0.20	0.18
0.40	0.40	0.39	0.35
0.60	0.60	0.59	0.61
0.80	0.76	0.75	0.80
1.00	1.00	0.98	1.11
1.20	1.22	1.25	1.18
1.40	1.41	1.44	1.40
1.60	1.63	1.69	1.60
1.80	1.84	1.85	1.45
2.00	2.00	1.94	1.96

TABLE V. Effects of High Level of Each Sugar on the Determination of Low Level of That One

No.	Glucose		Fructose		Sucrose	
	Conc. (mg/ml)	Found (mg/ml)	Conc. (mg/ml)	Found (mg/ml)	Conc. (mg/ml)	Found (mg/ml)
1	0.20	0.19	0.50	0.50	0.50	0.52
2	0.20	0.21	1.00	1.01	1.00	0.98
3	0.20	0.21	1.50	1.52	1.50	1.49
4	0.20	0.21	2.00	2.00	2.00	1.97
5	0.50	0.51	0.20	0.23	0.50	0.47
6	1.00	1.01	0.20	0.19	1.00	0.98
7	1.50	1.51	0.20	0.20	1.50	1.52
8	2.00	1.97	0.20	0.21	2.00	1.91
9	0.50	0.52	0.50	0.50	0.20	0.19
10	1.00	1.02	1.00	1.00	0.20	0.19
11	1.50	1.51	1.50	1.50	0.20	0.19
12	2.00	1.97	2.00	1.98	0.20	0.19

TABLE VI. Comparison of Analytical Results of Each Sugar in Fish Paste Foods by HPLC, GC, and This Enzymatic Method

Sample	HPLC			GC			Enzyme		
	Glu	Fru (mg/g)	Suc	Glu	Fru (mg/g)	Suc	Glu	Eru (mg/g)	Suc
1	3.5	ND	48.9	3.6	0.3	42.7	4.2	0.5	48.7
2	12.5	ND	72.2	12.4	ND	57.3	13.5	0.2	67.0
3	9.6	ND	75.3	10.1	ND	68.1	11.2	0.3	70.8
4	4.7	ND	29.3	3.8	1.0	24.7	4.7	1.4	28.6
5	9.8	ND	17.1	9.2	8.2	16.0	10.1	9.2	15.3
6	7.0	ND	23.7	6.0	4.1	18.6	6.8	4.6	21.2
7	16.9	ND	72.8	15.8	ND	59.3	17.2	0.4	69.0

ND: not detected.

以上のことから、酵素を反応させる時間は溶液 I が 5 分間、懸濁液 I, II は各々 10 分間とした。

3. 油脂の影響

魚肉練製品は、タラ、ハモ、グチ等のスリ身を原材料としているため、魚肉中に含まれている油脂はもちろんのこと、いわゆる揚げかまぼこのように製造過程で使用する油脂が製品に含まれている。このため、製品中に含まれている油脂が本測定方法に及ぼす影響を見るため、供試液調製後、供試液-エーテル (2:1) の割合で油脂を抽出し、水層中にエーテル臭がなくなるまで水浴上で減圧除去した。

市販の魚肉練製品 8 検体について、製品中に含まれていた油脂量、油脂を含んでいる場合 (A) 及び油脂を除去した場合 (B) の Suc 濃度、及び Suc 濃度の比 (B/A) を Table III に示した。

製品中に含まれていた油脂¹⁷⁾ (エーテルエキス) は揚げかまぼこでは最高 3.17% であったのに対し、竹輪等の焼かまぼこでは最高 0.32% と少なく、製造方法の違いにより油脂の含有量が約 10 倍異なっていた。

Suc 濃度の比は 1 検体が 1.09 であった以外はすべて 0.95—1.00 の範囲内にあり、食品中に含まれている油脂が測定に及ぼす影響はほとんどないものと思われる。

4. 検量線

F キットを用いる酵素法では測定した吸光々度値より計算により Glu, Fru, Suc の各濃度を求めることが出来る。このため各糖濃度が 0.2 mg/ml から 2.0 mg/ml までの 10 段階の標準溶液を作成し、計算により求めた各糖濃度を Table IV に示した。糖濃度が 1.8 mg/ml の時、Suc の濃度が 1.45 mg/ml と約 20% 低い値であった以外は、各糖とも標準溶液の濃度と測定値が非常によく一致した。

一方、糖濃度が 1.0 mg/ml 以上になると吸光々度値

が 2 を超えるので、吸光々度値が 2 以下になるように希釈して測定した。このように 3 種類の高濃度の糖が含まれていても十分直線性があり、しかも吸光々度値が 2 以上になった時には、希釈して測定しても糖濃度値に対し何ら影響がなかった。

なお、同一検体内で 3 種類の糖濃度が大きく異なる場合には、高濃度の糖が低濃度の糖の測定値に及ぼす影響が考えられる。このため、各糖濃度が異なる試料を作成し、測定値に及ぼす影響を求めた結果を Table V に示した。表より Glu, Fru, Suc の 3 種類の糖が混合し、そのうちの 2 種類の糖濃度が 10 倍高くても、低濃度の糖が精度よく測定出来た。

5. 添加回収

揚げかまぼこ (ひらてん) に Glu, Fru 各 8 mg/g, Suc 16 mg/g になるように標準溶液を添加し、回収率を求めた。各糖の平均回収率 ($n=5$) は Glu 97.1%, Fru 95.1%, Suc 91.3% で、変動係数はそれぞれ 1.5, 1.4, 2.3% であった。Glu, Fru の添加回収率が 95% 以上と高かったのに対し、Suc は 91% と低くしかも変動係数が 2.3% と大きかった。これは Suc の測定が β -フルクトシダーゼにより Glu と Fru に分解した後、従来含まれていた Glu と分解により生成した Glu の含量より、これとは別に従来含まれていた Glu 量を測定し、その差から Suc 量を求めている。一方、1.0 mg/ml の Suc のみを含む溶液を用いて添加回収率を求めたところ、平均回収率 ($n=6$) は 98.5%, 変動係数 1.3% であった。このように Suc 量は Glu 量の差より求めているため、それらの誤差が加算され、Suc の変動係数が Glu, Fru より大きくなったものと思われる。

6. 定量限界値

本酵素法では同一キューベット当り 2—3 回吸光々度を測定し、各吸光々度値より計算により各糖濃度を求めて

TABLE VII. Analytical Results of Each Sugar Concentration in Commercially Available Fish Paste Foods Purchased in Nara City

Sample name		Conc. of sugar (mg/g)		
		Glucose	Fructose	Sucrose
Itakamaboko	1	6.6	ND	29.9
	2	8.2	ND	20.8
	3	2.8	ND	22.5
	4	ND	ND	31.8
	5	3.8	ND	39.8
	6	4.3	ND	42.7
	7	10.3	ND	63.9
Chikuwa	1	10.1	ND	55.4
	2	8.1	4.9	31.2
	3	8.7	ND	29.1
	4	9.0	3.6	28.9
	5	7.2	ND	38.3
	6	10.6	ND	51.7
	7	8.6	ND	49.3
	8	8.0	ND	83.8
	9	6.5	ND	45.4
	10	8.3	ND	77.8
Agekamaboko	1	8.2	ND	53.0
	2	11.3	ND	48.8
	3	11.6	ND	102.7
	4	4.1	8.4	50.0
	5	9.8	ND	101.7
	6	4.6	2.1	53.4
	7	13.8	ND	101.1
	8	5.7	ND	47.4
	9	ND	ND	29.9
	10	12.6	ND	113.4
	11	3.9	ND	55.3
Others	1	2.7	ND	19.5
	2	8.6	ND	35.5
	3	ND	ND	26.2
	4	3.5	2.3	31.4
	5	3.9	ND	55.3
	6	ND	ND	29.4

ND: not detected.

いる。このため定量限界値の設定には、測定に用いる供試液量を 1.0 ml とし、糖濃度計算式での吸光々度の変化 (4E) を 0.1 以上とした。この変化量は製品中の Glu 0.2 mg/g, Fru 0.2 mg/g, Suc 0.4 mg/g に相当する。

7. 他方法との比較

市販の魚肉練製品 7 検体を用い、本酵素法、HPLC 法,¹⁸⁾ GC 法,⁶⁾ の 3 方法による定量値の比較を Table VI に示した。酵素法は GC 法に比べ、一様に高い値であったが、HPLC 法とは比較的よく一致した。

8. 市販食品中の糖濃度

昭和 61 年 2 月—3 月に奈良市内大手スーパー 3 店で市販されていた魚肉練製品中の Glu, Fru, Suc 濃度結果を Table VII に示した。板かまぼこ、竹輪、揚げかまぼこ 34 品について測定したところ、Suc の最高値は 113 mg/g、平均 49.8 mg/g であった。なお、Glu, Fru の最高値はそれぞれ 14 mg/g、10 mg/g 以下であった。

ま と め

魚肉練製品中に使用されている砂糖の使用量を見るために市販酵素キットを使用したところ、有用な測定方法であることがわかった。なお、魚肉練製品中にはショ糖が平均 49.8 mg/g 含有されており、最高値は 113 mg/g であった。

謝辞 本研究を行うにあたり、HPLC 法による糖類の測定に御協力いただいた奈良県工業試験場山中信介主任研究員に深謝致します。

引 用 文 献

- 1) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解,” 金原出版, 東京, 1980, p.169.
- 2) 正田芳郎, 橋本圭二, 井上武久, 沢田徳之助, 薬学雑誌, **89**, 734 (1969).
- 3) 岩田有三, 佐々木義幸, 折口和範, 小島 炳, 日食工誌, **20**, 60 (1973).
- 4) 兼松 弘, 丸山武紀, 新谷 助, 今村正男, 栄養と食糧, **31**, 413 (1978).
- 5) 伊達ちぐさ, 田中平三, 吉川賢太郎, 植田 豊, 馬場昭美, 林 正幸, 田中ゆかり, 島田豊治, 山本博司, 大和田国夫, 岡崎邦夫, 石井隆一郎, 庄司博延, 日衛誌, **37**, 516 (1982).
- 6) 日本薬学会第103年会 公衆衛生協議会資料, 1983, pp.47—50.
- 7) 安井 健, 吉川 剛, 長谷 幸, 日食工誌, **27**, 358 (1980).
- 8) 岡崎邦夫, 田中平三, 伊達ちぐさ, 吉川賢太郎, 馬場昭美, 林 正幸, 田中ゆかり, 島田豊治, 大和田国夫, 石井隆一郎, 庄田博延, 食衛誌, **23**, 331 (1982).

- 9) P.S. Vora, R.M. Tuorto, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 529 (1984).
- 10) N. Watanabe, M. Inoue, *Anal. Chem.*, **55**, 1016 (1983).
- 11) A.W. Wight, P.J. van Niekerk, Niekerk, *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 282 (1983).
- 12) 野村孝一, 受田浩之, 松本 清, 嵯島 豊, 日食工誌, **32**, 916 (1985).
- 13) M. Mason, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 981 (1983).
- 14) 日本薬学会第104年会 公衆衛生協議会資料, 1984, pp.17-21.
- 15) 三輪一智, 斉藤真理, 奥田 潤, 石原英子, 手島節三, 衛生化学, **30**, 238 (1984).
- 16) 谷村顕雄編, “食品添加物の分析Ⅱ,” 講談社, 東京, 1970, p.33.
- 17) 日本薬学会編, “衛生試験法注解1980,” 金原出版, 東京, 1980, p.177.
- 18) 山中信介, 川西祐成, 奥井一義, 奈良県工業試験場研究報告, No 5, 21 (1979).