[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
 衛生 化学 学
 38 (5) 437-442 (1992)

蛍光検出器付 HPLC を用いた食品中のリゾチームの分析

柴田 正,^a 辻 澄子,^a 小林一博,^b 浅井良輝,^c 本田恒男,^d 野田勝彦,^e

慶田雅洋,^f 望月悦生,^g 菅沼 修,^g 伊藤誉志男^a

国立衛生試験所大阪支所,^a 東京農林水産消費技術センター,^b 雪印乳業㈱分析部,^c 協同乳業㈱応用研究所,^d
 明治乳業㈱中央研究所,^e ネッスル㈱,^f (株)日本国際酪農連盟^g

Determination of Lysozyme in Various Foodstuffs by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector

TADASHI SHIBATA,^a SUMIKO TSUJI,^a KAZUHIRO KOBAYASHI,^b YOSITERU ASAI,^c TSUNEO HONDA,^d

KATSUHIKO NODA,^e MASAHIRO IWADA,^f ETSUO MOCHIZUKI,^g OSAMU SUGAHARA^g

and YOSHIO ITO^a

National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch,^a 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan, Tokyo
 Center for Quality Control and Consumer Service,^b 4-4-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108, Japan, Snow
 Brand Milk Products Co., Ltd, Food Research Laboratory,^c 1-1-2, Minamidai, Kawagoe-shi, Saitama
 350, Japan, Kyodo Milk Industry Co., Ltd., Research Laboratories,^d 1-4-18, Shin-machi,
 Hoya, Tokyo 202, Japan, Meiji Milk Products Co., Ltd., Central Research Institute,^e
 1-21-3, Akae-cho, Higashimurayama-shi, Tokyo 189, Japan, Nestle K.K.,^f
 2-4-5, Azabudai, Minato-ku, Tokyo 106, Japan, The Japanese
 National Committee of International Dairy Federation,^g
 1-14-19, Kudan-kita, Chiyoda-ku, Tokyo 102,
 Japan

(Received October 11, 1991)

A high performance liquid chromatographic method for the determination of lysozyme in foods with a fluorescence detector based on measuring the fluorescence intensity of 4-methylumbelliferone (4-MU) released from 4-MU-(GlcNAc)₃ after enzymatic hydrolysis.

A reversed phase chromatographic system consisting of an ODS column and a mobile phase, acetonitrile-0.04 M glycine buffer, pH 12.0; (70:30) was used.

The optimum pH and reaction temperature were 5.2 and 45°C. After extraction with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.2), containing 2% NaCl, the lysozyme activity was measured with 0.04% substrate in sodium citrate buffer (pH 5.2) at 45°C for 60 min. Under the developed conditions lysozyme can be detected in the range of 5–100 µg/g.

The recoveries of lysozyme from five kinds of foods were in the range of 84.3–96.4%.

Keywords — lysozyme; HPLC; fluorescence; 4-methylumbelliferyl tri-*N*-acetyl-β-chitotrioside; 4-methylumbelliferone; foodstuffs

緒 言

リゾチームは細胞壁に作用して溶菌現象を起こす酵素であり、特にグラム陽性菌に作用して、菌の発育を抑制し防腐効果を表す。¹⁾

リゾチームは卵中には多量存在し、²⁾ 鶏卵を原料

に卵白リゾチームが製造され、³⁾ 経費が安く、安全性の高い天然物として医薬品として、また食品の保存料として広く利用されている。

欧米では、チーズの異常発酵防止剤として既に使用されている。⁴⁾ これは有用な乳酸菌は抑制せず、汚染菌 (*Clostridium tyrobutyricum*) に対して効力を

發揮する。その他わが国ではミリン、清酒、生鮮水産品、麺類、サラダ等の保存料として用途は広がりつつある。⁵⁾

今回、食品添加物として使用された食品中に残存する可能性のある酵素の一つとしてリゾチームの定量法を開発し、各種食品への適用を試みた。

これまでリゾチーム活性の測定には *Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体を溶解させる濁度法が用いられてきたが、⁶⁾ 基質である乾燥菌体の一定品質が保ち難く、製法、ロットが異なるとリゾチームに対する感受性が変動すること、⁷⁾ また操作が煩雑で再現性に乏しいこと⁸⁾ 等の欠点があった。

そこで今回、構造が明らかであり、かつ一定の品質が保証される合成基質の 4-methylumbelliferyl tri-*N*-acetyl- β -chitotrioside (4-MU-(GlcNAc)₃ と略称する) を用いる蛍光分析法の検討を行った。この基質はアセチルグルコサミンの 3 量体に蛍光物質の 4-methylumbelliferone (4-MU) を化学結合したもので、医薬品製剤中のリゾチーム活性測定のために開発されたものである。本基質は蛍光を有しておらず、リゾチームにより加水分解されると 4-MU を遊離し、蛍光を発する。この蛍光強度を測定し、リゾチームの定量を行った。

なお蛍光を測定する際に、基質が共存すると 4-methylumbelliferone (4-MU) の蛍光は強くクエンチングを受けるため、⁹⁾ 蛍光検出器付 HPLC により

両者を分離し、4-MU の蛍光強度を測定することにした。

実験操作

1. 食品試料 チーズ、酒、ミリン、カスタードクリーム、白菜漬は市販品を購入して用いた。

2. 試薬 リゾチーム——「国立衛生試験所標準品 (本品 1 mg (乾燥品) は 1.0 mg リゾチーム (力価) を含む)」を使用した。

基質——4-methylumbelliferyl tri-*N*-acetyl- β -chitotrioside (4-MU-(GlcNAc)₃) (C₃₄H₄₇N₃O₁₈: MW 785.8) は Sigma 社製を用いた。

アセトニトリル——高速液体クロマトグラフ用を使用した。

4-methylumbelliferone, リン酸水素二ナトリウム, リン酸二水素ナトリウム, グリシン, 水酸化ナトリウム, クエン酸, クエン酸三ナトリウム——試薬特級品を用いた。

高速液体クロマトグラフ用溶離液——高速液体クロマトグラフ用アセトニトリルと 0.04 M グリシン・水酸化ナトリウム緩衝液, pH 12.0 を 70:30 の割合で混和し、ミリポアフィルター (0.45 μ m) で濾過したその濾液を使用した。

基質溶液——4-methylumbelliferyl tri-*N*-acetyl- β -chitotrioside (4-MU-(GlcNAc)₃) 1.5 mg を量りとり、精製水を加えて溶かし 5.0 ml とした。

Fig. 1. Principle of Lysozyme Activity Assay

リゾチーム標準溶液——リゾチーム標準品 100 mg をとり、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) を加えて溶かし、100 ml とした。

4-methylumbelliferone (4-MU) 原液——4-MU の 89.07 mg を量りとり、*N,N'*-dimethylformamide 3 ml を加えて溶かし、これを水 50 ml に滴下しながらかき混ぜて溶かし、全量を 100 ml とし、 5×10^{-3} M 濃度の溶液を調製した。

3. 装置 高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 日本分光製 880 PU, 検出器: 島津製 RF 500 LC 型 蛍光分光検出器, カラム恒温槽: 島津製 CTO-6 A 型, データ処理器: 島津製 CR-6 A 型インテグレータ, 蛍光分光光度計: 日立製 650-60 型 蛍光分光光度計。

4. 分析操作 1) 試験液の調製——(1) 液体食品 (酒, ミリン): 試料 20 ml をとり、50 °C で約 3 ml に減圧濃縮した後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) を用いて洗い込み、全量を 4.0 ml とし、試験液とした。

(2) 固体食品 (加工食品): 試料 5.0 g をとり、2.0% 塩化ナトリウム含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) 50 ml を加え、ホモジナイズ (12000 rpm × 5 min) した後、遠心分離 (3000g × 10 min) し、上清を試験液とした。

2) リゾチームの活性測定法——リゾチーム標準液又は試験液 0.1 ml をとり 2.0% グリシン含有 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.2) 0.2 ml を加え、45 °C で 3 分間予温した。これに 45 °C に予温した基質 0.04%, 4-MU-(GlcNAc)₃ 溶液 0.1 ml を加え 45 °C で 60 分間反応させた後水冷し、反応を停止させた。メンブランフィルター (0.45 μm) を用いて濾過した後、濾液 20 μl を直ちに HPLC に注入した。

4-MU に相当するピーク面積を測り、検量線からリゾチームの活性を求めた。

3) HPLC 条件——カラム: ACT-1 (Inter Action 社 (USA) 製) φ 4.0 × 150 mm, 移動相: アセトニトリル-0.04 M グリシン緩衝液 (pH 12.0) (70:30), 流速: 0.35 ml/min, カラム温度: 40 °C, 蛍光検出波長: 励起波長 324 nm, 蛍光波長 445 nm, 試料注入量: 20 μl,

結果と考察

1. HPLC 条件の検討

4-MU の蛍光は基質 4-MU-(GlcNAc)₃ により強くクエンチングされることが知られている。これを防ぐために HPLC で 4-MU と 4-MU-(GlcNAc)₃

Fig. 2. Chromatogram of Reaction Mixture for Lysozyme Assay

を分離した後、4-MU の蛍光を測定する方法を検討した。

移動相に pH 12.0 のアルカリ性緩衝液を用いるため、ポリスチレン系逆相カラムの ACT-1 を用いた。移動相にメタノール-0.04 M グリシン緩衝液 (30:70-100:0) あるいはアセトニトリル-0.04 M グリシン緩衝液 (50:50-80:20) を用いて 4-MU と 4-MU-(GlcNAc)₃ の分離を検討した。その結果、アセトニトリル-0.04 M グリシン緩衝液 (70:30) を用いた場合に最もよい分離が得られた。そのクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

基質 4-MU-(GlcNAc)₃ は僅かに蛍光を発し、クロマトグラム上で保持時間 4.1 分のところに小さいピークが認められた。一方 4-MU は保持時間 5.8 分であった。

反応時間 0 分の反応混合液のクロマトグラムに 4-MU-(GlcNAc)₃ 中に混在する微量の 4-MU の低いピークが認められた。このことから反応後リゾチームによって基質から遊離した 4-MU のピーク面積から反応時間 0 分のピーク面積を差し引き、リゾチーム活性を求めた。

2. リゾチーム活性測定条件の検討

合成基質の 4-MU-(GlcNAc)₄ を用いたときのリゾチームの至適 pH は 5.2¹⁰⁾ と報告されている。

GlcNAc 残基の 1 個少ない 4-MU-(GlcNAc)₃ も同様に pH 5.2 を用いることとした。

反応液温度を 37℃ から 85℃ まで変化させた時の活性変化について調べた結果を Fig. 3 に示した。

いずれの温度においても反応が直線的に進行することが確認された。また反応が温度に依存することも確認され、75℃ で最大値に達した。さらに温度を高めると反応は低下した。この低下は酵素の失活によるものと考えられる。

しかしチーズ等蛋白食品では反応温度が 75℃ のとき反応液中の蛋白質が凝固し、リゾチームも共沈することがあるため、反応温度を 45℃ とし、また測定感度を上げるため、反応時間を 60 分とした。

3. HPLC を用いた反応生成物の定量

リゾチーム溶液 (5–100 µg/ml) (2.0% NaCl 含有) 0.1 ml に、基質溶液 0.1 ml 及び 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.2) 0.2 ml を加えて、45℃、60 分間反応させた。

HPLC の測定結果から検量線を作成し、Fig. 4 に示した。

定量感度は 5 µg/ml であり、5–100 µg/ml の範囲で直線関係が得られた。

Fig. 3. Effect of Incubation Temperature on Lysozyme Assay

Substrate: 0.04% 4-MU-(GlcNAc)₃ 0.1 ml, Enzyme: 100 µg/ml lysozyme 0.1 ml, Buffer: 0.1 M citric buffer (pH 5.2) 0.2 ml.

4. 食品中からリゾチームの抽出に及ぼす塩化ナトリウム濃度の影響

谷本らは医薬品のリゾチーム製剤からリゾチームを抽出する場合に、塩化ナトリウムを加えると良好な回収率が得られると報告している。¹⁰⁾ そこで塩化ナトリウム濃度が食品からリゾチーム抽出に及ぼす効果について検討した。

チーズ及びカスタードクリーム の 2 種類の試料それぞれに 100 µg/g の標準リゾチームを添加し、0–5.0% の塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) を用いてリゾチームを抽出した。

リゾチームの回収率を Fig. 5 に示した。

Fig. 4. Calibration Curve for Lysozyme by HPLC

Substrate: 0.04% 4-MU-(GlcNAc)₃ 0.1 ml, Enzyme: 5–100 µg/ml lysozyme 0.1 ml, Buffer: 0.1 M citric buffer (pH 5.2) 0.2 ml, Incubation: 45℃, 60 min.

Fig. 5. Effect of Sodium Chloride on Extraction of Lysozyme from Various Foods

Substrate: 0.04% 4-MU-(GlcNAc)₃ 0.1 ml, Enzyme: 100 µg/ml lysozyme 0.1 ml, Buffer: 0.1 M citric buffer (pH 5.2) containing NaCl (0–5.0%) 0.2 ml, Incubation: 45℃, 60 min.

●—●: Cheese, ○—○: Custard cream.

塩化ナトリウム濃度が増加すると共に回収率は高くなり、0.3%濃度における回収率はチーズで90.4%、カスタードクリームで84.3%となり、5.0%濃度まではほとんど変化はなかった。以後、抽出に用いる0.1Mリン酸緩衝液の塩化ナトリウム濃度は2.0%とした。

5. リゾチーム活性に及ぼす塩化ナトリウム濃度の影響

食品には高濃度の塩化ナトリウムを含むものがあるため、定量時のリゾチーム活性測定に及ぼす影響について検討した。

塩化ナトリウム濃度を0.4–37.0%の範囲に変化させたリゾチーム標準液(100 μ g/ml) 0.1 ml, 基質溶液0.1 ml及び0.1Mクエン酸緩衝液(pH 5.2) 0.2 mlを加え、リゾチーム活性を測定した。その結果をFig. 6に示した。

反応液中の塩化ナトリウム濃度が2.4%までリゾチーム活性に影響を与えず、それ以上になると塩化ナトリウム濃度が増加すると共にリゾチーム活性は低下した。反応混合液中でリゾチーム標準液は基質液及び緩衝液によって4倍に希釈されるため、リゾチーム標準液の塩化ナトリウム含有量が9.6%まで活性測定に影響を与えないことになる。すなわち、食品中のリゾチーム抽出液に9.6%まで塩化ナトリウムを含有した0.1Mクエン酸緩衝液(pH 5.2)を用い得ることが認められた。

また塩化ナトリウム含量の高い液体食品、濃い口醤油(15.0%),¹³⁾ 薄口醤油(16.3%)¹³⁾は二倍希釈す

Fig. 6. Effect of Sodium Chloride Concentration on Lysozyme Activity

Substrate: 0.04% 4-MU-(GlcNAc)₃ 0.1 ml, Enzyme: 100 μ g/ml lysozyme solution, containing (0.4–37%) NaCl 0.1 ml, Buffer: 0.1 M citric buffer (pH 5.2) 0.2 ml, Incubation: 45°C, 60 min.

るとリゾチーム活性測定に影響を与えず、ウスターソース(8.6%)¹³⁾は希釈せずに測定が可能であった。

6. リゾチーム活性に及ぼす各種有機酸及びアミノ酸の影響

有機酸¹⁵⁾並びにアミノ酸¹⁵⁾がリゾチームの溶菌作用を増強するとの報告があり、食品中には各種アミノ酸が多く含まれているところから、リゾチーム活性に及ぼす各種アミノ酸の効果について検討した。

アミノ酸8種(グリシン, アラニン, ロイシン, フェニルアラニン, シスチン, グルタミン酸, アスパラギン酸, アルギニン)及び有機酸4種(乳酸, 酢酸, 酒石酸, フィチン酸)をそれぞれ1%添加して、リゾチーム活性の増強効果を測定した。そのうち効果の認められたアミノ酸2種(グリシン, アラニン)及び有機酸2種(酒石酸, フィチン酸)につき、その効果の濃度依存性を検討し、結果をFig. 7に示した。

用いた4種の化合物は濃度依存的にリゾチーム活性を増強した。その中でグリシンの増強作用が最も強く、0.5%濃度で最高になり、無添加の場合の1.48倍の活性を示した。また、グリシンと酒石酸をそれぞれ1.0%ずつを添加しても、相加作用は認められなかった。したがってリゾチーム活性測定時のグリシン濃度は1.0%とした。

Fig. 7. Effect of Amino Acids and Organic Acids on Lysozyme Activity

Substrate: 0.04% 4-MU-(GlcNAc)₃ 0.1 ml, Enzyme: 100 μ g/ml lysozyme 0.1 ml, Buffer: 0.1 M citric buffer (pH 5.2) 0.2 ml, Incubation: 45°C, 60 min.

●—●: Glycine, ○—○: Alanine, ▲—▲: Tartaric acid, △—△: Phytic acid.

7. 各種食品への添加回収率

酒, ミリン, チーズ, カスタードクリーム, 及び白菜浅漬の加工食品 5 種につき, それぞれ有効使用量のリゾチームを添加したときの回収率を Table I に示した。

購入試料の酒, ミリン, チーズ, カスタードクリーム, 浅漬白菜からリゾチームは検出されなかった。

液体食品は回収率が高く, 酒 96.4%, ミリン 91.8% であった。一方固体食品は浅漬白菜では 93.9% と高い回収率が得られたが, 蛋白質含量が高いチーズ及びカスタードクリームでは回収率はやや低くなり, 84.3—90.4% であった。

蛍光検出器付 HPLC を用いた食品中のリゾチームの分析法を開発した。

1. リゾチーム活性測定は基質に 4-MU-(GlcNAc)₃ を用い, 反応温度は 45°C, pH 5.2 で反応させ, 蛍光検出器付 HPLC を用いて行った。

2. 各種食品からリゾチーム抽出時の塩化ナトリウム濃度の効果を検討し, 0.5% 以上加えると抽出効率が最大となることを認めた

3. 食品中の塩化ナトリウムのリゾチーム活性に

TABLE I. Recovery of Lysozyme from Various Foods

Foods	Lysozyme		
	Add ($\mu\text{g/g}$)	Found ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
Sake	0	0	
	20	19.2 $\pm$ 0.38	96.4 $\pm$ 1.7
Mirin	0	0	
	50	45.8 $\pm$ 2.9	91.8 $\pm$ 5.4
Cheese	0	0	
	100	90.4 $\pm$ 5.5	90.4 $\pm$ 5.5
Custered cream	0	0	
	100	84.3 $\pm$ 6.8	84.3 $\pm$ 6.8
Chinese cabbage (Pickles)	0	0	
	100	93.9 $\pm$ 4.2	93.9 $\pm$ 4.2

Each value represents mean $\pm$ S. D. of 5 independent experiments.

及ぼす影響を検討し, 塩化ナトリウム含量が 2.4% 濃度まで影響を及ぼさないことを認めた。

4. リゾチーム活性増強作用はグリシンが最も大きかった。

5. 5 種加工食品への添加回収率は 84.3—96.4% であった。

引用文献

- 1) M.R.J. Salton, J.G. Pavlik, *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 398 (1960); R.G. Peterson, S.E. Hartsell, *J. Infection Disease*, **96**, 75 (1955).
- 2) E.P. Abraham, R. Robinson, *Nature* (London), **140**, 24 (1937).
- 3) G. Alderton, H.L. Fevold, *J. Biol. Chem.*, **164**, 1 (1946); *Idem*, U.S. Patent 2579455 (1945).
- 4) G. Pulay, K.A. Krasz, *Tejeparı Kut. Kozlem.*, **10**, 3 (1967) [Chem. Abstr., **69**, 9840 (1968)].
- 5) 赤塚慎一郎, 月刊フードケミカル, 70 (1988).
- 6) A.L.N. Prasad, G. Litwack, *Anal. Biochem.*, **6**, 328 (1963); R.M. Parry, Jr., R.C. Chandan, M.K. Shahani, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **119**, 384 (1965); G. Gorin, S.-F. Wang, L. Papapavlou, *Anal. Biochem.*, **39**, 113 (1971).
- 7) 谷本 剛, 福田秀男, 川村次良, 医薬品研究, **15**, 942 (1984).
- 8) R.C. Davis, A. Neuberger, B.M. Wilson, *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 294 (1969); J.S. Blancard, P. Chuzel, Y. Mathieu, J. Perrot, P. Jolles, *Ibid.* **220**, 300 (1970); K.Y. Chan, C.W. Carr, *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 496 (1971).
- 9) Y. Yang, K. Hamaguchi, *J. Biochem.* (Tokyo), **87**, 1003 (1980).
- 10) 谷本 剛, 福田秀男, 川村次良, 衛生試報, **98**, 87 (1980).
- 11) 科学技術庁資源調査会編, “四訂日本食品成分表,” 第 7 版, 第一出版, 東京, 1988, pp.189—191.
- 12) Miller T.E., *J. Bacteriol.* **98**, 949 (1969).
- 13) 駒形和男, 小川博望, 福島清, 伊藤武, 食品衛生学雑誌, **9**, 289 (1968).