セルローズアセテート膜電気泳動法による ヨーグルト中のゼラチンの定量法について

青山 敏之*・手塚みさ子*・遠藤 光春*・野田 勝彦*

Studies on the Determination of Gelatin in Yogurt by Electrophoresis on Cellulose Acetate Strips

Toshiyuki AOYAMA*, Misako TEZUKA*, Mitsuharu ENDO* and Katsuhiko NODA*

* Research Institute of Meiji Milk Products Co., Ltd. Higashimurayama-shi, Tokyo 189

General methods of detection or determination of gelatin in yogurt are the qualitative test of the AOAC and the determinative test of hydroxyproline. However, these methods are only qualitative or time consuming. The electrophoretic determination of gelatin in yogurt on cellulose acetate strips was studied as an easier method for direct detection and determination, and the following results were obtained. It was possible to determine the gelatin content accurately by the following procedure. After removal of casein from yogurt by isoelectric precipitation with sodium acetate solution, the filtrate was spotted on a cellulose acetate strip. Electrophoresis was conducted in 0.05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH buffer (pH 10) and stained by Coomassie Brilliant Blue R-250. After destaining and drying, the gelatin content was determined by densitometry at 550 nm. It was able to distinguish between alkali processed gelatin and acid processed gelatin from their electrophoretic mobilities by this method. The recoveries of gelatin added to yogurts were 80~110%. The calibration curve gave linearity in the range of 0.1~1.0% of gelatin in yogurt. (Received May 4, 1984)

ゼラチンは安定剤として、砂糖や香料、果肉などを添加したヨーグルトに用いられることが多い。ヨーグルト中のゼラチンの検出、定量法としては、Association of Official Analytical Chemists (AOAC) のピクリン酸による検出法¹⁾、あるいは試料中のヒドロキシプロリンを定量してゼラチン量に換算する方法²⁾が知られている。しかし、AOACの方法は定性的な検出のみを目的としており、また除タンパク剤として硝酸第二水銀を使用するため、廃水にあたって水銀の処理を必要とする。一方、ヒドロキシプロリンを定量する方法 (HYP 法) は、操作が煩雑であり、また一昼夜程度の時間を必要とする。これらの点から、両方法とも実用性が劣る。

そこで、ゼラチンの添加されている各種ヨーグルト中のゼラチンを簡易に検出定量できる方法として PECHA-NEK ら³⁾ もとりあげたセルローズアセテート膜電気泳動法⁴⁾について検討し、若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 試料、試薬および装置

(1) 試料

ゼラチン：市販のアルカリ処理および酸処理ゼラチン粒状試料 (新田ゼラチン(株)、ニッビ(株))。

ヨーグルト：市販品

- i) プレーンヨーグルト：砂糖や香料、安定剤などを添加しないで製造されたヨーグルト。無脂乳固形分 9.5%、乳脂肪分 3.0%、水分 87.5%。
- ii) フレーバードヨーグルト：ヨーグルトに香料や着色料、砂糖を添加したもの。無脂乳固形分 8.0%、乳脂肪分 2.0%、糖分 11.0%、水分 79.0%。
- iii) フルーツヨーグルト：ヨーグルトに果肉を添加したもの。無脂乳固形分 10.0%、乳脂肪分 1.5%、糖分 10.3%、水分 78.2%。

* 明治乳業(株) 研究所 (〒189 東京都東村山市栄町 1-21-3)

(2) 試薬

セルローズアセテート膜：SEPARAX（常光産業，6 cm×22 cm）。

染色液：クーマジープリリアントブルー R-250 1.25 g，メタノール 227 ml，酢酸 75 ml に水を加えて 500 ml とする。

脱色液：酢酸 10 ml，メタノール 200 ml に水を加えて 1 l とする。

ゼラチン標準濃度水溶液：ゼラチンを水に溶解し，0.1%，0.3%，0.5%，1.0% の濃度とする。

0.1N CH_3COOH

1M $\text{HCl}-\text{CH}_3\text{COONa}$ 緩衝液 (pH 4.6)

電気泳動用緩衝液

i) 0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{NaOH}$ (pH 10)

ii) 0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH 10)

iii) 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3-\text{H}_3\text{BO}_3-\text{KCl}$ (pH 10)

iv) 0.05M $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}-\text{NaCl}-\text{NaOH}$ (pH 10)

v) 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3-\text{NaHCO}_3$ (pH 10)

(3) 装置

電気泳動装置：東洋科学産業セルローズアセテート膜電気泳動装置 CE-24。

デンスitomーター：島津製作所二波長クロマトスキャナ CS-930。

2. 実験方法

(1) 電気泳動法によるゼラチンの定量方法

PADMOYO らの方法⁴⁾に改良を加えた。

i) 電気泳動用試験液の調製：ヨーグルト試料を良く攪拌して均質化した後，その 20 g を 50 ml 容遠沈管に秤取し，0.1N CH_3COONa により pH 4.6 に調整した。調整後，1M $\text{HCl}-\text{CH}_3\text{COONa}$ 緩衝液 (pH 4.6) により全量を 30 ml として混和し，沸騰水浴中で時々攪拌しながら 30 分間加熱した。加熱後，東洋濾紙 No. 6 を用いて濾過し，濾液を電気泳動用試験液とした。

ii) 電気泳動：泳動槽にセットしたセルローズアセテート膜に泳動用試験液およびゼラチン標準濃度水溶液各 3 μl を塗布し，0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{NaOH}$ 緩衝液 (pH 10) を用い，100 V で 1 時間泳動させた。

iii) 染色・脱色：泳動後直ちにセルローズアセテート膜を染色液に浸漬し，20 分後脱色液中へ移した。脱色液は，初め 30 分，次回からは 1 時間毎に新鮮なものに交換し，計 3 時間，室温にて脱色を実施した。

iv) 定量：脱色の終了したセルローズアセテート膜は，クロマトグラフィー用の濾紙に挟み，軽く重しを乗せて乾燥させた。乾燥後 550 nm においてデンスitom

リーを実施し，試料およびゼラチン標準濃度水溶液についてのデンスitomグラム上のピーク面積を求めた。ゼラチンの標準濃度水溶液についてのデンスitomグラム上のピークの面積と濃度の関係から検量線を作成した。この検量線を用いて，試料についてのデンスitomグラム上のピーク面積から，試料中のゼラチン濃度を算出した。

(2) 電気泳動用緩衝液の選択

あらかじめゼラチンが添加されていないことを確認したプレーンヨーグルトに酸処理ゼラチン，あるいはアルカリ処理ゼラチンを 0.3% の濃度になるように添加した。これらのゼラチン添加ヨーグルトおよび無添加ヨーグルトを試料として，2(1)i) に従って電気泳動用試験液を調製した。この試験液 3 μl を 1(2)の 5 種類の電気泳動用緩衝液を用い，100 V で 1 時間泳動させた。泳動後，2(1)iii) に従って染色および脱色を実施した。

(3) 添加回収実験方法

あらかじめゼラチンが添加されていないことを確認したプレーンヨーグルトおよびフレーバードヨーグルトにアルカリ処理ゼラチンあるいは酸処理ゼラチンを，0.1，0.3 および 0.5% の濃度になるように添加した。これらのゼラチン添加ヨーグルトを試料として電気泳動法を用いてゼラチンを定量し，回収率を求めた。

(4) AOAC のゼラチン検出法 (AOAC 法)

AOAC¹⁾ に従って実施した。すなわち，ヨーグルト試料に $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ の 5% 硝酸酸性水溶液を加えて混和後，東洋濾紙 No. 6 を用いて濾過することにより除タンパクを行った。この濾液に飽和ピクリン酸を加えて静置した。ゼラチンが存在する場合は，沈殿あるいは白濁を生じた。

(5) ヒドロキシプロリンを定量してゼラチン量を推定する方法 (HYP 法)

KLOSTERMEYER らの方法²⁾ に従って実施した。すなわち，まずヨーグルト中のゼラチンを含めたタンパク質を， SnCl_2 の存在下で 6N HCl により加水分解した。加水分解液を中和した後，東洋濾紙 No. 6 を用いて濾過した。濾液に CuSO_4 ， NaOH および H_2O_2 を加えて加熱し，ヒドロキシプロリンを酸化，脱炭酸した。その結果生じたピロールを *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドで発色させ，それを比色法により試料中のヒドロキシプロリンを定量した。ゼラチン量への換算は，この方法を用いてヒドロキシプロリン量を測定した 5 種類のゼラチンについての平均値 14.0% を用いて行った。

実験結果および考察

1. 電気泳動に用いる緩衝液

ゼラチンは、その製造工程における処理の違いから、アルカリ処理ゼラチンと酸処理ゼラチンに分けられる。通常、ゼラチンの等電点はアルカリ処理ゼラチンで pH 4~5, 酸処理ゼラチンで pH 8~9 であり、等電点より低い pH の溶液中では正に、高い pH の溶液中では負に帯電する⁵⁾。したがって、泳動を実施する際の緩衝液の pH をいずれのゼラチンの等電点よりも高く設定すれば、ゼラチンの種類にかかわらず陰極側からの泳動が可能であると考えられた。PECHANÉK ら³⁾ も等電点との関係にふれているがその結果と一致するものであった。

そこで、緩衝液の pH を 10 に設定し、前記の電気泳動用緩衝液、すなわち 0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ (pH 10), 0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-Na}_2\text{CO}_3$ (pH 10), 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-H}_3\text{BO}_3\text{-KCl}$ (pH 10), 0.05M $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH-NaOH}$ (pH 10) および 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH 10) を用い、ヨーグルト試料、アルカリ処理ゼラチンおよび酸処理ゼラチンを添加したヨーグルト試料について、前処理および電気泳動を実施した。

その結果、0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ 緩衝液 (pH 10) を用い 100 V で 1 時間泳動することにより、ヨーグルト由来の染色バンドとゼラチンのバンドを良好に分離することができた (Fig. 1)。ゼラチンバンドのテーリング

Fig. 1. Electrophoretic patterns of gelatin recovered from yogurts in 0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ buffer (pH 10) on cellulose acetate strip

A yogurt contains 0.3g of alkali processed gelatin (A), 0.3g of acid processed gelatin (B) or no gelatins (C) per 100g of yogurt.

Electrophoretic conditions

Cellulose acetate strip: SEPARAX (JOKOO Co., Ltd.), Voltage: 100V, Time: 1 h
Spotting volume: 3 μl , Staining reagent: Coomassie Brilliant Blue R-250

も小さかった。

一方、その他の緩衝液は次のような問題点があった。すなわち 0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaCO}_3$ についてはテーリングが認められた。0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-H}_3\text{BO}_3\text{-KCl}$ および 0.05M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ についてはバンドが不鮮明であり、歪みも著しかった。0.05M $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH-NaCl-NaOH}$ についてはヨーグルト由来物とゼラチンのバンドの分離が不十分であった。そのため、これらの緩衝液は本法に用いることができなかった。

2. アルカリ処理ゼラチンおよび酸処理ゼラチンの分別

0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ 緩衝液 (pH 10) を用いて、市販のアルカリ処理および酸処理ゼラチン、計 8 件の 0.3% 水溶液 3 μl を 100 V, 1 時間泳動し、染色、脱色を行った。その結果、酸処理ゼラチンとアルカリ処理ゼ

Fig. 2. Electrophoretic patterns of gelatin

B, D, E: Alkali processed gelatin
A, C, F, G, H: Acid processed gelatin

Each sample was spotted 3 μl of 0.3% gelatin solution.

Fig. 3. Electrophoretic patterns of 7 kinds of alkali processed gelatin and 7 kinds of acid processed gelatin

ラチンの間には、泳動距離の違いが認められた (Fig. 2)。PECHANEK⁸⁾ が指摘しているように、アルカリ処理ゼラチンの方が移動距離が大であった。

次に、製造工程における処理の同じゼラチン間の泳動距離の違いの有無を検討するため、アルカリ処理ゼラチンおよび酸処理ゼラチン各7件の0.3%水溶液3 μ lを同時に泳動させた。ゼラチンの製造工程における処理が同じであれば、泳動距離はほぼ一定となった (Fig. 3)。

3. 電気泳動法における検量線と検出限界

ヨーグルト中のゼラチンを定量するため、検量線作成用のゼラチン標準濃度水溶液とヨーグルト試料について

Fig. 4 Electrophoretic patterns of gelatin

A~D, G~J: Solutions with known concentrations

A, G: 1.0%, B, H: 0.5%, C, I: 0.3%, D, J: 0.1%
E, K: Mixture recovered from yogurt to be tested

F, L: Mixture recovered from gelatin-free yogurt (blank)

Fig. 5 Densitograms of alkali processed gelatin

Fig. 6 Densitograms of acid processed gelatin

Fig. 7 Calibration curves of gelatin

の泳動用試験液を同時に泳動し、染色、脱色、デンストメトリーを実施した (Fig. 4)。得られた標準濃度水溶液についてのデンストグラム (Fig. 5, 6) 上のピーク面積とゼラチン濃度の関係をグラフ化し、検量線とした (Fig. 7)。

得られた検量線は、アルカリ処理ゼラチン、酸処理ゼラチンとも 3~30 μ g、すなわちヨーグルト中で 0.1~1.0% の範囲において、ほぼ原点を通る直線となった。

検出限界は、泳動図上のゼラチンのバンド位置に妨害となる他の発色が現れないこと、検量線がほぼ原点を通る直線であること、およびデンストグラム上のピークの大きさから判断して、ゼラチンとして 1 μ g、ヨーグルト中で 0.03% とした。

4. 添加回収実験

ヨーグルト試料から、電気泳動用試験液を調製する前処理は試料溶液を pH 4.6 に調整後加熱し、乳タンパク質中の約 80% を占めるカゼインを沈殿除去する⁹⁾ とともに、ゼラチンを抽出することにより行った。この方法によるゼラチンの回収率を確認するために実施した添加回収実験の結果を Table 1 に示した。

Table 1 Recoveries of alkali and acid processed gelatin from yogurts by electrophoretic method

Yogurt		Added (g/100g)	Found (g/100g)	Recovery (%)
Alkali processed gelatin	Plain yogurt	0.50	0.47	94.0
		0.30	0.28	93.3
		0.10	0.10	100.0
		0	—	—
	Flavoured yogurt	0.50	0.41	82.0
		0.30	0.24	80.0
		0.10	0.08	80.0
		0	—	—
Acid processed gelatin	Plain yogurt	0.50	0.52	104.0
		0.30	0.32	106.7
		0.10	0.11	110.0
		0	—	—
	Flavoured yogurt	0.50	0.46	92.1
		0.30	0.25	83.3
		0.10	0.10	100.0
		0	—	—

—: Not detected

Plain yogurt: Natural yogurt without additives

Flavoured yogurt: Natural yogurt sweetened and flavoured with various flavourings

Table 2 Detection and determination of gelatin in market yogurts

Sample	Detection		Determination	
		AOAC method	HYP method (%)	Electrophoretic method (%)
Plain yogurt		—	0.09	—
Flavoured yogurt	1	+	0.29	0.23 (acid processed)
	2	+	0.28	0.24 (acid processed)
	3	+	0.30	0.24 (alkali processed)
	4	—	0.10	—
	5	—	0.09	—
	6	+	0.42	0.38 (alkali processed)
	7	—	0.08	—
Fruit yogurt	1	+	0.31	0.32 (alkali processed)
	2	+	0.32	0.26 (alkali processed)
	3	+	0.78	0.73 (acid processed)

+: Detected, —: Not detected

AOAC method : A method of detection of gelatin; ref.: Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis of the AOAC, 13th ed., (AOAC, Washington D. C.) p. 251 (16.109) (1980).

HYP method : A method of determination of gelatin by measuring hydroxyproline; ref.: KLOSTERMEYER, et al.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 162, 163 (1976).

Fruit yogurt : Stirred yogurt with fruit and other additives.

回収率は、アルカリ処理ゼラチンで 80~100%，酸処理ゼラチンで 83~110% とほぼ満足できる値が得られた。

5. 市販ヨーグルト中のゼラチン量および電気泳動法による検出定量結果と他法との比較

市販各種ヨーグルトを用いて、ゼラチンの定性および定量試験を、電気泳動法、AOAC 法および HYP 法により実施し、結果を比較した (Table 2)。

AOAC 法による定性的な検出の結果と電気泳動法の検出の有無の結果は一致した。HYP 法では、ゼラチンの添加されていないことが明らかであるプレーンヨーグルトを用いたブランクテストでも、0.09% のバックグラウンド値が得られた。全体的に HYP 法の値は、電気泳動法による定量値と比較してやや高めの値となった。HYP 法は比色法であり、ヨーグルト試料からのゼラチンの分離、精製過程が不十分であり、ゼラチン以外の妨害物質が完全に除去されていない危険性がある。それが原因となって、結果としてゼラチン分に測定されるものがあると考えられる。

要 約

ヨーグルト中に添加されたゼラチンを精度良く、簡易に定量する方法としてセルローズアセテート膜電気泳動法をとりあげて検討した。

(1) ヨーグルト試料は、糖類、果肉類などの添加の有無にかかわらず、pH 4.6 で等電点沈殿を行い、濾過して試験液とすることによりゼラチンを抽出した。

(2) 試験液をセルローズアセテート膜に塗布し、0.05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH 緩衝液 (pH 10) を用いて 100 V で 1 時間電気泳動することによりゼラチン区分を分離することができた。

(3) クーマジープリリアントブルー R-250 で染色後、デンストメトリーを行うことによりゼラチン区分の定量が可能となった。

(4) 一般に食品に利用されるアルカリ処理ゼラチン、

酸処理ゼラチンを用いて検量線を求めたところ、3~30 μg 、すなわちヨーグルト中で 0.1~1.0% の範囲において直線関係が得られた。

(5) ゼラチン無添加のプレーンヨーグルト、フレーバードヨーグルトに 0.1~0.5 g/100 g のゼラチンを添加して回収実験を行ったところ、80~110% の回収率を得た。食品成分の分析法として満足すべき回収率といえる。

(6) 電気泳動法によってアルカリ処理および酸処理ゼラチンの区分が可能となった。AOAC 法および HYP 法では、この区分は不可能である。

(7) AOAC 法と比較して電気泳動法は、定量的な測定が可能であること、HYP 法はブランク値が高いこと、および電気泳動法では、アルカリ処理ゼラチンおよび酸処理ゼラチンの区分が可能であることなどの利点を有する。

本研究の概要は、日本食品工業学会第 31 回大会 (1984, 東京) にて発表した。

文 献

- 1) Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis of the AOAC, 13th ed., (AOAC, Washington D. C.), p. 251 (16. 109) (1980).
- 2) KLOSTERMEYER, H. and BRAB, G.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **162**, 163 (1976).
- 3) PECHANÉK, U., BLAICHER, G., PFANNHAUSER, W. and WÖDICH, H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 745 (1982).
- 4) PADMOYO, M. and MISSEREZ, A.: *Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.*, **58**, 31 (1967).
- 5) COURTS, A.: *Applied Protein Chemistry*, Ed. by R. A. GRANT (Applied Science Publishers, London), p. 1 (1980).
- 6) 祐川金次郎: 乳タンパク質 (酪農技術普及学会, 東京), p. 17 (1971).

(昭和 59 年 5 月 4 日受理)