食品中のリゾチームの微量定量法

(昭和 54 年 10 月 20 日受理)

円谷啓子* 日高義雄*

A Sensitive Determination Procedure for Lytic Activity of Lysozyme in Foods

Keiko TSUMURAYA and Yoshio HIDAKA

(Eisai Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.: Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo)

A simple procedure for sensitive determination of the lytic activity of lysozyme is presented.

This procedure was carried out turbidimetrically at a higher temperature (60°C) and for a longer time (60 min) than in the conventional method. In order to stimulate the lytic activity of lysozyme, small amounts of nonionic surfactant and NaCl were added to *M*/15 phosphate buffer, pH 6.2. With this procedure, it was possible to determine the lytic activity of hen egg white lysozyme at a concentration of 0~15 ng/ml of reaction solution. It was also possible to determine lysozyme added at low concentration to some kinds of foods which exhibit strong turbidity.

(Received October 20, 1979)

緒 言

近年、卵白リゾチーム (以下 Lz と略す) は、食品の微生物による変質防止を目的として多くの加工食品に使用されている。Lz の定量法は、種々の方法があるが、*M. lysodeikticus* を基質とした溶菌法^{1)~3)} (比濁法) が比較的感度が高く (測定限界 Lz 0.1 µg/ml)、簡便なため広く用いられている。

しかし、食品によっては、比濁法では測定不可能な場合が多い。その理由は、1) Lz 添加量が微量 (約 20 µg/g 以下) であること、2) 特に、希釈後も濁度の高い、エマルジョン系食品では、濁度が測定に影響をおよぼすため、希釈度を増す必要がある。3) また、ある種のガム類など、Lz を吸着する成分を含む食品では、塩溶液による溶出が必要となる。しかし、この塩溶液⁷⁾ が Lz 活性を抑制してしまうので、塩濃度を低下させるよう、溶出液をさらに希釈しなければならないこと、などにより

検液中の Lz 濃度が 0.1 µg/ml 以下となるからである。したがって、食品に添加された Lz の定量には、より高感度の定量法を工夫することが必要となった。

そこで著者らは、Lz が酵素の中でも比較的熱安定性が高いことに着目し、反応温度、時間など、従来の比濁法の測定条件を変え、また、溶菌活性を高めるために緩衝液を工夫し、測定感度を従来の比濁法の20倍高く上げ得たので、以下に報告する。

実験方法

1. 試 料

使用した Lz は Alderton ら⁴⁾の方法により、ニワトリ卵白から直接結晶化し、さらに5回、再結晶を繰り返した等電点、卵白 Lz を用いた。

基質の *M. lysodeikticus* 乾燥菌体は、Worthington Biochem. Corp. より購入したものをを用いた。

2. 定量法基本操作

M/15 リン酸緩衝液で調製した Lz 検液 3 ml と、同緩衝液に菌体を懸濁した基質液 3 ml を、摺り合わせ共

* エーザイ株式会社研究所：東京都文京区小石川4丁目

栓付遠沈管 (30 ml 容量) にて混合し、振とうしつつ一定温度、一定時間反応させた後、Leitz 社製 Photrometer Model M を使用し、濁度を 640 nm にて吸光値 (E) として測定する。Lz 検液の代わりに緩衝液を用いた盲検の吸光値 (E_0) との差 ($E_0 - E$) は、Lz によって溶菌された菌体の量を表す。なお、各検体とも 2 回の繰り返しの平均値を求めた。試料中の Lz 量の計算は、Lz 標準液*1 (Lz 含量 15 ng/ml) と基質との反応後の吸光値の読みを (E_{st}) とすると、試料 1 g 中の Lz 量は、

$$\frac{E_0 - E}{E_0 - E_{st}} \times \text{標準液の Lz 濃度 (15 ng/ml)} \times \text{希釈率}$$

となる。なお食品からの Lz 溶出液は、希釈後検液としても、まだ白濁している場合が多く、その際は基質液と検液を混合後、ただちに測定した吸光値を (E_0') とし、上記の計算式の分子の (E_0) に代入して計算する。

3. 食品からの Lz 溶出方法

ある種のガム類など、Lz を吸着する成分を含む食品からの Lz 溶出について、Fig. 1 に、さらしあんを例として示した。100 g のさらしあんに対し、Lz を 8 mg を含む 100 ml の蒸留水とともに混合した後、ろ過し、ろ液の Lz 活性を測定した結果、添加量の 0.6% しか検出されなかった。蒸留水でさらに洗浄を繰り返しても、ろ液は Lz 活性を示さなかった。そこで、さらしあんのろ過残渣を 1 g 秤量し、濃度の異なる食塩水 20 ml を

Fig. 1. The effect of NaCl concentration on the recovery of lysozyme from "Azuki-an", (fresh)

One gram of "Azuki-an", (fresh) to which about 80 μ g of lysozyme was adsorbed was mixed with 20 ml of various concentration of NaCl solutions for 2 hrs.

The supernatants of this solutions were assayed.

* 標準液の Lz の正確な量は、280 nm の吸光値を測定して算出する。すなわち、100~200 μ g/ml の濃度の標準液の 280 nm の吸光値を測定し、次の吸光係数から算出する。

$$E_{280nm}^{1\%} = 26.35^{50}$$

加え、2時間かくはんした後、3000 rpm にて 10 分間遠心分離し、上澄液を適宜希釈し Lz 活性を測定した。吸着 Lz 量が完全に溶出した場合の計算量を 100% とし、食塩濃度と Lz 溶出率の関係をプロットした結果、食塩濃度が高くなるに従って、Lz 溶出量が増加し、濃度 0.4 M ではほぼ 100% が溶出された。したがって、Lz を吸着した食品から Lz を溶出する時は、0.4 M 食塩水を加えることとした。

実験結果および考察

1. 定量操作条件の検討

1) Lz 活性に及ぼす測定温度、pH、基質濃度の影響

従来の測定温度 (35°前後) より高い 50°, 60°, 70°において、Lz の溶菌活性を測定した。Fig. 2 に示したごとく、60°で最も高い溶菌活性が得られたので、以下、測定温度を 60°とした。次に、M/15 リン酸緩衝液の pH を 5.5, 6.2, 7.2 として、60°で活性への影響を比較した結果、Fig. 3 に示したごとく、pH 6.2 において最も高い活性が得られたので、緩衝液の pH は 6.2 とした。上記実験では、基質懸濁液の濃度は透過率 10% (菌体重量約 1 mg/ml に相当) に調製したが、濃度を透過率 20% に調製した場合と比較した結果、前者の方が ($E_0 - E$) 値がより大となったので、基質濃度は透過率 10% に調製することとした。

2) Lz の活性上昇物質の影響

非イオン界面活性剤^{5),6)}、塩類⁷⁾などの添加により、Lz の溶菌活性が上昇することが既に報告されている。著者らは Lz 定量法の感度を高めることを目的とし、ま

Fig. 2. The effect of temperature on the lytic activity of hen egg white lysozyme

To 3 ml of *M. lysodeikticus* cell suspension in M/15 phosphate buffer (pH 6.2), adjusted at 10% transmittance (640 nm) with Leitz Photrometer, 3 ml of lysozyme solution (50 ng/ml) or the same buffer as blank were added. The mixture was incubated at 50°C (—▲—), 60°C (—●—), or 70°C (—■—). ($E_0 - E$) means the difference of absorbance between blank (E_0) and lysozyme solution (E) at 640 nm.

Fig. 3. The effect of pH on the lytic activity of hen egg white lysozyme

The conditions were as follows.

Substrate concentration: 10% transmittance at 640 nm. Reaction time and temperature: 60 min., 60°C. Buffer: *M*/15 phosphate buffer pH 5.5 (—▲—), 6.2 (—●—) or 7.2 (—■—).

Fig. 4. The effect of nonionic surfactant on lytic activity of hen egg white lysozyme. Nonionic surfactants were added at various concentration.

—○—, HCO-60; —□—, TO-10;
—▲—, MYS-25; —△—, BL-25;
—●—, no addition

Reaction time and temperature: 60 min 60°C. Other conditions: Same as those of Fig. 2.

た乾燥菌体の分散性が良くなることを期待して、これらの物質を *M*/15リン酸緩衝液に加え、添加濃度と *Lz* 溶菌活性との関係について検討した。

非イオン界面活性剤として、polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate, hydrogenated castor oil polyoxyethylene (60) ether, polyoxyethylene (25) ste-

Fig. 5. The effect of NaCl on lytic activity of hen egg white lysozyme in the presence or absence of nonionic surfactant

Each nonionic surfactant was added at 0.05% concentration.

—○—, HCO-60; —□—, TO-10;
—▲—, MYS-25; —△—, BL-25;

—●—, no addition

Reaction time and temperature: 60 min, 60°C. Other conditions: Same as those of Fig. 2.

arate, polyoxyethylene (25) lauryl ether (Nikkol TO-10®, 同じく HCO-60®, MYS-25®, BL-25®) を添加した結果 (Fig. 4), BL-25®を除いて、0.025%以上の添加で20~40%活性が上昇した。

次に塩類として、塩化ナトリウムを5~100 mM 添加した結果 (Fig. 5), 5 mM で約16%活性が上昇したが、100 mM では50%に減少した。

そこで、塩化ナトリウムと界面活性剤を同時に添加した場合の *Lz* 活性について、同様に Fig. 5 に示した。*M*/15リン酸緩衝液に HCO-60®を0.05%, 塩化ナトリウムを25 mM 添加すると *Lz* 活性は約1.6倍に上昇した。

よって本法では、HCO-60®を0.05%, 塩化ナトリウムを25 mM 添加した *M*/15リン酸緩衝液 (pH 6.2) を調製し、定量に用いることにした。

2. 検 量 線

1. 1), 2) の結果から、上記の緩衝液で調製した *Lz* 検液3 ml と同緩衝液で透過率10%に調製した基質3 ml を混合し、60°の恒温水槽で60分反応させ、検量線を作成した。Fig. 6 に示したごとく、反応液中の *Lz* 濃度が0~15 ng/ml の範囲で直線が得られた。また、反応時間が30分では ($E_0 - E$) 値は60分の測定値の約1/2となったが、0~20 ng/ml の範囲で直線が得られた。 *Lz* 濃度が

Fig. 6. Calibration curve for lytic activity of hen egg white lysozyme

The conditions were as follows.

Substrate concentration: 10% transmittance at 640 nm. Buffer: *M*/15 phosphate buffer, pH 6.2, containing 0.05% of Nikkol HCO-60 and 25 mM of NaCl. Temperature: 60°C. Time: —○—, 30 min; —●—, 60 min respectively.

Table 1. Residual Amounts of Lysozyme in Various Foods to which 20 μ g/g of Lysozyme was Added.

Foods	Residual Amounts of Lysozyme (μ g/g)
Custard cream	15.4
ditto	3.4
Flour paste	2.6
ditto	2.3
ditto	1.0
Mayonnaise sauce	13.8
Worcestershire sauce	11.9
Fresh cream	18.1

20 ng/ml の検液を、反応時間60分と30分で各10回ずつ測定した平均値に対する標準偏差は、それぞれ2.5%と7%であった。

4. 添加回収率

Lz 添加対象食品に対する添加回収率を求めるため、加工したカスタードクリームに Lz を 20 μ g/g 添加し、均一になるよう混合した後、0.4 *M* 食塩水で抽出し、本法により Lz を定量したところ、回収率は93%であった。よって本法は食品中の Lz 定量法として有用な方法と考えられる。

5. Lz 添加食品中の Lz 定量

カスタードクリーム、フラワーペーストなどの製造時に Lz を添加し、加工後、各製品の Lz 定量を行なった結果を Table 1 に示した。従来方法では検出できなかったこれらの食品中のリゾチームは本法によってその定量が可能となった。各食品により加工後の Lz 残存量に差がみられるのは、加工方法、たとえば加熱温度、加熱時間、食品構成成分などによる Lz の変性の程度が異なるためと思われる。

要 約

Lz 微量定量法は、1) 比濁法の測定温度を60°, 時間を60分とし、2) 0.05%の HCO-60® と 25 mM の塩化ナトリウムを *M*/15リン酸緩衝液 (pH 6.2) に加えることにより、従来方法に比べ、20倍感度を上げることができた。よって、エマルジョン系の食品に添加した微量の Lz 定量が可能となった。

文 献

- 1) Smolelis, A.N., Hartsell, S.E.: *J. Bacteriol.*, **58**, 731~736 (1949).
- 2) Litwack, G.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **89**, 401~403 (1955).
- 3) Gorin, G., Wang, S.-F., Papapavlou, L.: *Anal. Biochem.*, **39**, 113~127 (1971).
- 4) Alderton, G., Fevold, H.L.: *J. Biol. Chem.*, **164**, 1~5 (1946).
- 5) 松岡芳隆, 中野賢二, 日高義雄: *薬剤学*, **26**, 272~275 (1966).
- 6) Benath, F.R., Vieth, W.R.: *Biotechnology & Bioengineering*, **14**, 737~752 (1972).
- 7) Wilcox, Jr. F.H., Daniel, Louise, J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 305~312 (1954).
- 8) Sophianopoulos, A.J., Rhodes, C.K., Holcomb, D.N., Van Holde, K.E.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1107~1112 (1962).