グリセロール脱水素酵素による食品中の プロピレングリコールの酵素分析法

(昭和 59 年 11 月 24 日受理)

三ツ橋幸正* 浜野 孝*
田中喜作* 松本幸夫*

Enzymatic Analysis of Propylene Glycol in Foods by the Use of Glycerol Dehydrogenase

Yukimasa MITSUHASHI, Takashi HAMANO, Kisaku TANAKA
and Yukio MATSUKI

(Public Health Research Institute of Kobe City: 4-6, Minato-
jima-Nakamachi, Chuo-ku, Kobe, Japan)

A simple and rapid enzymatic analysis is described for the determination of propylene glycol (PG) in commercial foods. The sample (smoked dried squid, fish jelly product, soft drink, noodle or other flour products) was homogenized with water, followed by filtration through filter paper. In the case of ice cream, filtration was done by the use of an ultra-filter. An aliquot of the filtrate was then subjected to enzymatic assay of PG by using commercial enzymes (glycerol dehydrogenase and glycerol kinase). This method can be applied to foods that contain glycerol because glycerol could be eliminated prior to enzymatic assay of PG through its conversion to glycerol-3-phosphate by incubation with glycerol kinase. Glycerol dehydrogenase showed no activity towards this product. Food ingredients and/or food additives tested (glucose, ethanol, sorbitol, propylene glycol monostearate and glycerol monostearate) did not interfere with this method.

Recoveries of PG (0.6~20 mg/g) from several foods examined were satisfactory, being not less than 92%. The results of determination of PG by the proposed method and by gas chromatography (GC) were compared. The PG contents in several foods measured by the proposed method agreed well with those found by GC.

(Received November 24, 1984)

Key words: グリセロール脱水素酵素 glycerol dehydrogenase; プロピレングリコール propylene glycol; 酵素分析法 enzymatic analysis; グリセロキナーゼ glycerol kinase

緒 言

プロピレングリコール (PG) は、食品添加物の溶剤として、また、生めん、ギョウザの皮などの品質保持剤として、広く用いられ、使用基準が設定されている¹⁾。一般に、食品中の PG の分析法として、ガスクロマトグラフィー (GC) による定量法^{2), 3)}がよく用いられている。

近年、クリーンアナリシス、簡便迅速などの利点から、食品関連分野において、酵素分析法^{4)~6)}が利用されている。酵素分析法は、これらの利点から、ルーチンワークの能率向上の目的に適した方法であると考えられる。そこで著者らは、PG に活性を示すグリセロール脱水素酵素 (GDH) に着目し、食品中の PG について酵素分析法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

* 神戸市環境保健研究所: 神戸市中央区港島中町 4-6

実験方法

1. 試料

中華めん、ギョウザの皮、ワントンの皮、いかくん製品、かまぼこ、アイスクリーム及び清涼飲料水はいずれも市販品を用いた。

2. 試薬

炭酸塩緩衝液 (pH 10.0): 炭酸ナトリウム 31.8 g, 炭酸水素ナトリウム 16.8 g 及び塩化マグネシウム 190 mg を水で溶かして 1 L にする。

ATP 溶液: Adenosine-5'-triphosphate disodium salt (オリエンタル酵母工業製) 303 mg と炭酸水素ナトリウム 300 mg を水 10 ml に溶解する。冷蔵庫に保存し、4 週間以内に使用する。

NAD 溶液: β -Nicotinamide-adenine dinucleotide (oxidized form) (オリエンタル酵母工業製) 1.08 g を水に溶かして 10 ml にする。冷蔵庫に保存し、4 週間以内に使用する。

硫酸アンモニウム溶液: 硫酸アンモニウム (特級) 1.32 g を水に溶かし 100 ml にする。

グリセロキナーゼ (GK) 溶液: 500 U/ml, 比活性 85 U/mg 以上, トリス緩衝液, pH 7.3 のペーリンガー・マンハイム山之内(株)製をそのまま用いる。

グリセロール脱水素酵素 (GDH) 溶液: 1,000 U/667 mg, 比活性 50 U/mg のオリエンタル酵母工業製の GDH 13.4 mg を 30% シュ糖溶液 10 ml に溶解する。冷蔵庫に保存し 1 週間以内に使用する。

プロピレングリコール (PG) 標準原液: PG 10 g を水に溶かし、1 L にする。

PG 標準溶液: PG 標準原液を水で希釈し、750 μ g/ml に調製する。

3. 装置

分光光度計: 日立 200-10 型

遠心分離機: 日立 05 P-22 型

4. 実験操作

1) 試験溶液の調製

試料 5 g を精秤し、水を加え、5 分間ホモジナイズし、水で全量を 50 ml とする。ろ紙 (東洋濾紙 No. 5 A) でろ過し、ろ液を試験溶液とする。にごりのある場合、ミリポアフィルター (ポアサイズ 0.45 μ m) でろ過し、ろ液を試験溶液とする。アイスクリームの場合は、5 g を精秤し、水 45 ml を加え、よく攪拌後、セントリフロー (CF 50 A 型, アミコン・ファー・イースト・リミテッド社製) を用い、遠心 (1,000 $\times$ g, 10 分間) し、限外ろ過を行い、ろ液を試験溶液とする。

2) 測定法

炭酸塩緩衝液 2.5 ml を入れた試験管に、試験溶液 0.1~0.5 ml 及び ATP 溶液 0.1 ml を入れ、0.1~0.5 ml の水を加え全量を 3.2 ml にする。GK 溶液 0.002 ml を加え穏やかに混合後、30° の恒温槽で 20 分間反応

する。次に硫酸アンモニウム溶液 0.1 ml, NAD 溶液 0.1 ml 及び GDH 溶液 0.1 ml を加え穏やかに混合後、30° の恒温槽で 10 分間反応する。また、対照液は GDH 溶液の代りに水を入れたものを用いる。対照液に対する 340 nm の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線より、PG を定量する。

3) 検量線

PG の標準原液を水で希釈し、50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 750 μ g/ml に調製する。その各 0.1 ml を試験溶液として、前項の操作に従って検量線を作成する。

5. ガスクロマトグラフィー (GC) による定量

山田らの方法³⁾に準じて行った。

結果及び考察

1. GDH の基質特異性

GDH はグリセロール以外に PG にも活性を示す酵素であることが Tang ら⁷⁾によって報告されている。そこで市販の GDH を用いて、食品中の PG を測定するために、食品成分などに対する活性を調べた。グリセロール, PG, グルコース, エタノール, ソルビトールの各 50 mM の溶液を基質として用いた。その各 0.1 ml を試験溶液として、0.01 u の GDH で、30°, 5 分間反応させたときの活性を Table 1 に示した。グルコース, エタノール及びソルビトールに活性を示さず、しかもグリセロールより PG に対する活性がより高いことから、本酵素が食品中の PG の測定に利用できることがわかった。

2. GDH の酵素反応条件

GDH の酵素反応は可逆的であるが、pH が 10.0 以上になると逆反応がおこらないことが知られている⁸⁾。また、GDH の賦活化剤として、アンモニウムイオンが

Table 1. Substrate Specificity of Glycerol Dehydrogenase

Substrate	Relative activity (%)
Glycerol	100
Propylene glycol	178
Glucose	0
Ethanol	0
Sorbitol	0

The reaction mixture contained 0.5 M carbonate buffer (pH 10.0, 2.5 ml), 0.1 M (NH₄)₂SO₄ (0.1 ml), 150 mM NAD (0.1 ml), glycerol dehydrogenase (0.01 units) and each substrate (50 mM, 0.1 ml) in a final volume of 3.5 ml. The reaction was started by adding glycerol dehydrogenase and incubated for 5 min at 30°C.

The absorbance at 340 nm was then measured.

用いられている。従って、酵素反応溶液の pH は 10.0 に設定し、0.1 M の硫酸アンモニウム溶液を 0.1 ml 用いて、次の酵素反応条件について検討した。

1) 緩衝液濃度の影響

PG 標準溶液を試験溶液として用い、0.05~0.5 M の炭酸塩緩衝液中における GDH の酵素反応に及ぼす影響について検討した。その結果、GDH (0.2 u) で、30°, 10 分間反応させたとき、PG の酸化率が最大の値を示した炭酸塩緩衝液の使用濃度は、0.15~0.5 M であった。そこで、食品による緩衝液への影響を考慮して、本法では 0.5 M の炭酸塩緩衝液を使用した。

2) NAD の必要量

10~200 mM の NAD 溶液 0.1 ml を使用して、PG 標準溶液を用い、GDH で、30°, 10 分間反応させたときの PG の酸化率を Fig. 1 に示した。100 mM から最大の酸化率を示し、200 mM まで一定の酸化率が得られたことより、本法では 150 mM の NAD 溶液 0.1 ml を使用した。

3) GDH の必要量

PG 標準溶液を用いて、30°, 10 分間反応させたとき、PG を酸化するために必要な GDH 量について検討した。Fig. 2 に示したように、0.1 u から PG の酸化率が最大の値を示した。そこで、安全率を見込んで 0.2 u の GDH を使用した。

Fig. 1. Effect of concentration of β-nicotinamideadenine dinucleotide on the oxidation rate of propylene glycol

The reaction mixture consisted of 0.5 M carbonate buffer (pH 10.0, 2.5 ml), 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.1 ml), indicated concentration of NAD (0.1 ml), glycerol dehydrogenase (0.2 units) and propylene glycol (75 μg) in a final volume of 3.5 ml. The reaction was started by the addition of glycerol dehydrogenase and incubated for 10 min at 30°C.

The absorbance at 340 nm was then measured.

Fig. 2. Relation between the oxidation rate of propylene glycol and the amount of glycerol dehydrogenase

A 75 μg of propylene glycol was incubated with varying amounts of glycerol dehydrogenase and a fixed amount of NAD (15 μmole).

The other reaction conditions were the same as shown in Fig. 1.

Fig. 3. Phosphorylation rate of glycerol by glycerol kinase

A 200 μg glycerol was incubated with the indicated amounts of glycerol kinase in a reaction mixture (3.5 ml), which consisted of 0.5 M carbonate buffer (pH 10.0, 2.5 ml), 50 mM MgCl_2 (0.1 ml) and 40 mM ATP (0.1 ml). After 20 min incubation at 30°C, the residual glycerol was determined as described in Fig. 1 with fixed amounts of NAD (15 μmole).

3. GK 処理

試料中にグリセロールが共存する場合、GDH がグリセロールに活性を示し、PG の測定が不可能である。そこで、PG に活性を示さない GK⁹⁾ を用いて、グリセロールをリン酸化させ、グリセロール-3-リン酸に変える酵素反応を利用した。GK の酵素反応条件は、おおむね Hayashi らの方法⁹⁾ に準じて行い、0.5 M 炭酸塩緩衝液を用いて、200 μg のグリセロールをグリセロール-3-リン酸に変えるために必要な GK 量について検討した。

Fig. 4. Calibration curve of propylene glycol

Table 2. Recovery of Propylene Glycol from Foods

Food	Added (mg/g)	Found (mg/g)	Recovery (%)
Chinese noodle	0	14.2	—
	10	24.1	99.0
	20	34.0	99.0
Gyoza wrappings	0	6.4	—
	6	12.2	96.7
	12	18.3	99.2
Smoked dried squid	0	7.1	—
	10	16.8	97.0
	20	25.5	92.0
Fish jelly product	0	0	—
	0.6	0.56	93.3
Ice cream	0	0	—
	0.6	0.58	96.7

Each value is the mean of three experiments.

30°, 20' 分間反応させたときの残存グリセロール量を Fig. 3 に示した。0.4 u 以上の GK で、ほぼ 100% のリン酸化率が得られた。本法では、安全率を見込んで、1 u の GK を使用した。なお、グリセロール-3-リン酸が GDH の酵素反応に影響を与えないこともわかった。

4. 検量線

実験操作 2 に従って、検量線を作成した結果、5~75 μg の範囲で良好な直線性が得られた (Fig. 4)。

5. 試験溶液の調製の検討

中華めん、かまぼこなどの食品の場合、ろ紙またはミリポアフィルターでろ過することにより、透明な試験溶液が得られたが、乳化剤を含むアイスクリームの場合、これらの方法では試験溶液に、にごりが生じ、吸光度に影響を及ぼすことがある。そこで、セントリフローを用いた限外ろ過を採用したところ、満足すべき結果が得られた。また、プロピレングリコールステアレート、モノステアリン酸グリセロールの乳化剤が GDH の酵素反応に影響を与えないこともわかった。

Fig. 5. Comparison of gas chromatography and enzymatic analysis for determination of propylene glycol in various foods

6. 食品からの添加回収

中華めん、ギョウザの皮、いかくん製品、かまぼこ及びアイスクリームの各種試料に PG を 0.6~20 mg/g 添加し、回収率を求めた。Table 2 に示すように、92.0~99.2% の回収率が得られた。なお、本法による定量限界は 100 μg/g である。

7. GC³⁾ との比較

中華めん 6 試料、ギョウザ及びワンタンの皮 7 試料、いかくん製品 2 試料及び清涼飲料水 2 試料について、GC と本法の分析値の比較を行った。Fig. 5 に示すように、相関係数 $r=0.998$ と良好な相関が得られ、分析値による差は認められなかった。また、中華めん、ギョウザ及びワンタンの皮以外の食品において、ときどき、グリセロールの存在が GC で確認された。しかし、本法では GK 処理で、グリセロールの影響を除くことができるので、このような食品に十分適用できることがわかった。

まとめ

ルーチンワークの能率向上を目的として、市販の GDH 及び GK を用いて、PG の酵素分析法を検討した。

- 1) GK でグリセロールを処理することにより、GDH による PG の定量が可能となった。
- 2) 本法による添加回収率は 92% 以上の良好な結果が得られ、また、本法による実測値は GC と良く一致した値が得られたことより、実用に供し得ることがわかった。
- 3) 本法は操作が簡単で、一度に多量の試料を分析することができることから、分析時間の短縮が可能となった。

文献

- 1) 丹治敏英：食品衛生研究 31, 623~629 (1981)。

- 2) 厚生省環境衛生局食品化学課編: “食品中の食品添加物指針 (その2)” p. 218~222 (1981) 厚生省.
- 3) 山田利治, 長田幸郎, 中岡正吉, 伊藤和敏: 食衛誌, **24**, 340~343 (1983).
- 4) 金田吉男, 慶田雅洋: 食品衛生研究 **31**, 839~862 (1981).
- 5) 本田恒男, 中野良一, 青野博之, 金田吉男, 慶田雅洋: 食衛誌, **24**, 314~318 (1981).
- 6) 山中英明, 久能昌郎, 塩見一雄, 菊池武昭: 同上, **24**, 454~458 (1981).
- 7) Tang, C. T., Ruch, F. E., Lin, E. C. C.: J. Bacteriol. **140**, 182~187 (1979).
- 8) McGregor, W. G., Phillips, J., Suelter, C. H.: J. Biol. Chem. **249**, 3132~3139 (1974).
- 9) Hayashi, S., Lin, E. C. C.: *ibid.*, **242**, 1030~1035 (1967).