

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00776

研究課題名(和文) 食肉の新鮮度を評価する電気化学的マイクロ分析システムの開発

研究課題名(英文) Development of electrochemical micro-total analysis system for the measurement of pork freshness

研究代表者

佐竹 隆顯 (SATAKE, Takaaki)

筑波大学・生命環境系(名誉教授)・名誉教授

研究者番号：00170712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では医療診断等への応用研究が急速に進められているマイクロ分析の概念を取り入れ、食品分析分野において初めてとなる食肉(豚肉)の新鮮度を簡易に測定可能とする電気化学的マイクロ分析システム(μ TAS)の開発を行った。試作した μ TASと合わせてUPLC法による測定を行い、測定により鮮度の評価値として求めたK値およびKi値の比較検討を行った結果、開発した μ TASは新機軸の豚肉の鮮度評価技術としての可能性を有する事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the applied research of micro analysis to medical diagnosis, etc. are advancing. In this research, the electrochemical microdevice (μ TAS) was developed which enables measurement of the freshness of the meat (pork) which becomes the first in the field of food analysis. The content of various nucleic acid related substances of pork were measured by μ TAS developed and UPLC. As a result of comparison of K value and Ki value which are estimated by μ TAS and UPLC as indexes of freshness, it was cleared that developed μ TAS has a feasibility as new evaluation technology for freshness of pork meat.

研究分野：食料プロセス工学

キーワード：電気化学的マイクロ分析システム μ TAS 鮮度評価 食肉 核酸関連物質 オンサイト分析 K値

1. 研究開始当初の背景

近年、消費者の食品に対するニーズは新鮮さ・美味しさ・機能性・栄養価・安全性など多岐にわたっており、これらのニーズに対する様々な新技術開発が行われている。これらのニーズの内、新鮮さは様々な食品に求められる主要なニーズであり、食素材の鮮度の高さが食素材購入時の大きな目安となっている。消費者の栄養面における主要なタンパク源である食肉においても同様である。屠殺後の肉は時間経過とともに細菌汚染のリスクが高まるとともに、細菌汚染の程度によっては中毒を引き起こすことがある。このため食肉の鮮度評価には大きな社会的要請がある。屠殺後の肉は種々の成分に変化が生じ、中でも、核酸は体内に存在する酵素の働きにより極めて容易に分解され、生成した種々の核酸関連物質の含有量を総合的に示すK値、Ki値、H値は食肉の鮮度指標として極めて重要な指標に位置付けられている。

従来、食肉の鮮度の測定は化学分析法、HPLC、生物センサーなどを用いて行われてきたものの、これらの従来法は、測定に時間とスキルが必要のため実験室内における測定に限られるとともに、測定装置は一般にベンチスケールのサイズのものでありオンサイトで使用することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、医療診断や創薬応用等への応用研究が急速に進められているマイクロ分析の概念を取り入れ、食品分析分野において初めてとなる食肉(豚肉)の新鮮度を簡易に測定可能とする電気化学的マイクロ分析システム(μTAS)の開発を行った。

3. 研究の方法

ビニール袋で包装した豚肉をと殺翌日から

15日間0~6°Cで冷蔵貯蔵を行う一方、豚肉を前処理したサンプルを用いて、この間に変化する核酸関連物質(アデノシン3リン酸:ATP、アデノシン2リン酸:ADP、アデノシン酸:AMP、アデノシン:AdR、イノシン:Ino、ヒポキサンチン:Hx等)の定量をUPLCにより行った。

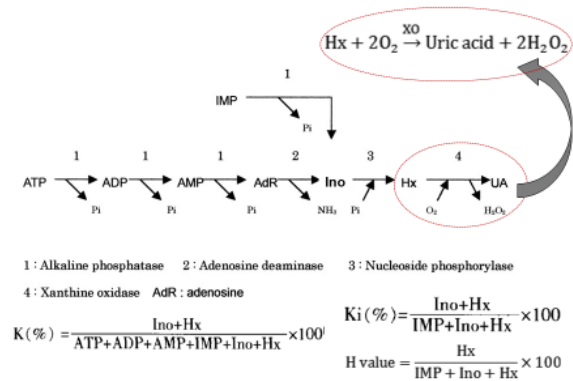


Fig. 1 The detection principle for freshness

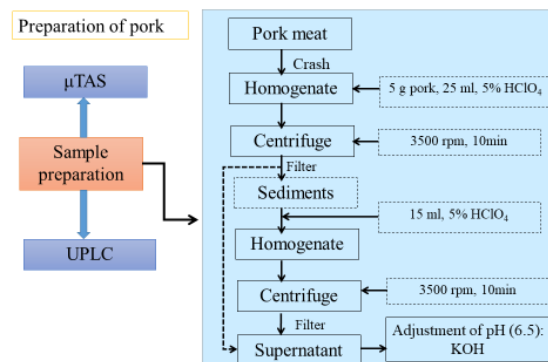


Fig. 2 The preparation of pork sample

試作したμTASのサイズはW(14mm) × L(32mm)であり、ガラス基板とポリジメチルシロキサン(PDMS)シートから構成される。PDMSシートには前処理したサンプルを受ける反応セルを4つ形成した。各セルの下部には作用・参照・補助の3つの電極(素材は白金、銀/塩化銀等)をガラス基板上に溶着して1組のセンサーとするとともに、合計4つのセンサーを構成した。各センサーの作用電極表面に測定対象核酸関連物質毎にキサンチン酸化酵素、ヌクレオシド・ホスホリラーゼ、アデノシン・デアミナーゼ等の酵素を固定した。固定に当たっては、a)クロスリンク法、b)ジ

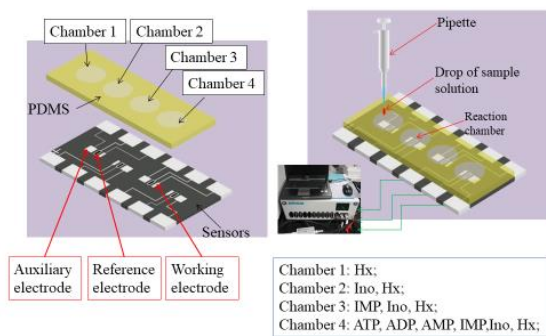


Fig. 3 The structure of developed μ TAS and the connection of microdevice and potentiostat

セル固定法、c)セルロースアセテート法等を用いて固定した。また、電極表面からの固定酵素の溶脱を抑えるためにウシ血清由来のアルブミンおよびグルタルアルデヒド溶液と各酵素を混合して用いた。各反応セルにおける核酸関連物質の検出は可溶性酵素と固定化酵素のコンビネーション法により行った。

センサー1では1種類の酵素を用いてヒポキサンチンの含有量を計測した。センサー2では2種類の酵素を用いてイノシン、ヒポキサンチンの合算量を計測した。センサー3では3種類の酵素を用いてイノシン酸、イノシン、ヒポキサンチンの合算量を計測した。センサー4では4種類の酵素を用いてATP関連化合物の総量を計測した。従ってこれら4つのセンサー出力から図1に示した各定義式によりK値、Ki値、H値を同時に求めることが可能である。なお、各反応セルの下部に設けた3つの電極を定電位電解装置(ポテンショスタット)と結び、0.7Vの印加電圧を与える一方、電流の変化を記録、酵素活性を測定し、各ATP、ADP、AMP、AdR、Ino、Hx等の定量を行った。

次に、 μ TASおよびUPLCにより定量した各核酸関連物質の含有量に基づき、鮮度指標としたK値およびKi値をそれぞれ求める一方、 μ TASにより求めたK値およびKi値とUPLCにより求めた同値の間で相関分析を行い、 μ TASによる核酸関連物質の定量ならびにK値およびKi

値の算出が実用上可能であるかの評価を行った。

4. 研究成果

(1)UPLCによる核酸関連物質の含量測定の結果、ATP、ADP、AMPはと殺後の2日間で急速に減少する事。IMPは冷蔵貯蔵後2日で最も増加するものの、以後徐々に減少する事。一方、InoとHxは増加していく事などが明らかとなった。また、冷蔵貯蔵の時間経過に伴い、鮮度指標であるK値並びにKi値ともに増加する傾向が明らかとなった。

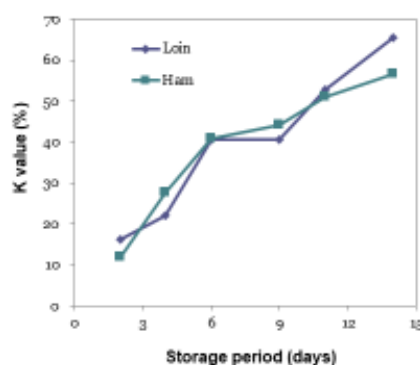


Fig.4 The change of K value of pork stored at 4°C for 3 weeks

(2) 開発した μ TASによる測定の結果、15日間の冷蔵貯蔵において、腰肉の核酸関連物質の含量はもも肉より早く減少する事が明らかとなった。この結果は、UPLCによる測定結果と一致した。

(3)開発した μ TASとUPLCによりそれぞれ得られたK値とKi値の相関分析を行った結果、両者には高い相関が認められ、その決定係数は0.878と0.924であった。

(4) μ TASにより測定した各核酸関連物質含量に基づいて算出したK値とKi値ならびにK値と同じく鮮度指標であるH値の相関をそれぞれ求めた結果、K値とKi値の間では決定係数が0.992と高い相関が認められたものの、K値とH値の間の相関は決定係数が0.723とやや低いものであった。

(5)開発した μ TASの核酸関連物質含量の分析に要する時間は2分であるのに対して

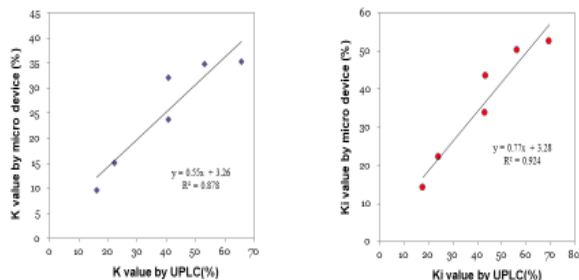


Fig.5 Correlations between K value and Ki value measured by developed μ TAS and UPLC on pork samples

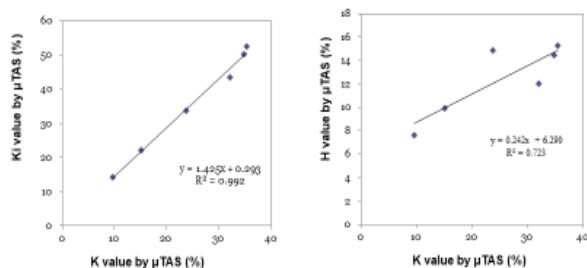


Fig.6 Correlations between K value and Ki value, H value measured by developed μ TAS

UPLC の分析時間は 10 分を要し、肉の鮮度評価における UPLC に対する μ TAS の利便性が明らかとなった。

以上の結果を総合し、開発した μ TAS は肉の鮮度評価の従来技術である UPLC と同等の精度を有するとともに、測定コスト・迅速測定・測定の簡便性等の面で優れた先端技術であると判断された。

<引用文献>

- ① Agui, L., Manso, J., Yanez-Sedeno, P. and Pingarron, J. M. (2006). Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes. *Sensors and Actuators B : Chemical*. 113(1), 272-280
- ② Volpe, G. and Mascini, M. (1996). Enzyme sensors for determination of fish freshness. *Talanta*. 43, 283-289.
- ③ Kaminishi, Y., Nakaniwa, K. I., Kunimoto, M. and Miki, H. (2000).

Determination of k-value using freshness testing paper and freshness prediction of the finfishes stored at some different temperatures by the kinetic parameters. *Fisheries Science*. 66, 161-165

- ④ Hernández-Cázares, A. S., Aristoy, M.-C. and Toldrá, F. (2010). Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness. *Food Chemistry*. 123, 949-954.
 - ⑤ Vázquez-Ortiz, F. A., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E. and Villegas-Ozuna, R. E. (1997). Application of the freshness quality index (k value) for fresh fish to canned sardines from northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10, 158-165.
 - ⑥ Park, I. S., Cho, Y. J. and Kim, N. (2000). Characterization and meat freshness application of a serial three-enzyme reactor system measuring ATP-degradative compounds. *Anal. Chim. Acta*. 404, 75-81.
 - ⑦ Ozogul, F., Anthony Taylor, K. D., Quantick, P. C. and Özogul, Y. (2000). A rapid HPLC-determination of ATP-related compounds and its application to herring stored under modified atmosphere. *International Journal of Food Science and Technology*. 35, 549-554.
 - ⑧ Watanabe, E., Tamada, Y. and Sato, N. H. (2005). Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on Ki value. *Biosensors and Bioelectronics*. 21, 534-538.
 - ⑨ Mulchandani, A., Male, K. B. and Luong, J. H. T. (1990). Development of a biosensor for assaying postmortem nucleotide degradation in fish tissues. *Biotechnology and Bioengineering*. 35, 739-745.
5. 主な発表論文等
[雑誌論文](1件)
- ① Qiu, X., Itoh, D., Satake, T. and Suzuki, H., Microdevice with integrated multi-enzyme sensors for the measurement of pork freshness,

Sensors and Actuators B: Chemical, 235,
535-540 (2016) (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐竹 隆顕 (SATAKE, Takaaki)

筑波大学・生命環境系 (名誉教授)・名誉
教授

研究者番号 : 0 0 1 7 0 7 1 2

(2) 研究分担者

阪田 治 (SAKATA, Osamu)

東京理科大学・工学部電気工学科・准教
授

研究者番号 : 3 0 3 9 1 1 9 7