

固定化チラミンオキシダーゼカラム/フローインジェクション分析法によるチラミン及び類縁化合物の定量と牛肉鮮度劣化判別への応用

高, 玲媛
九州大学農学部食品分析学教室

歳島, 豊
九州大学農学部食品分析学教室

松本, 清
九州大学農学部食品管理学教室

<https://doi.org/10.15017/23441>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 47 (3/4), pp.181-185, 1993-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

固定化チラミンオキシダーゼカラム／フローイン ジェクション分析法によるチラミン及び類縁化合 物の定量と牛肉鮮度劣化判別への応用

高 玲 媛・箴 島 豊

九州大学農学部食品分析学教室

松 本 清

九州大学農学部食品管理学教室

(1992年12月7日受理)

Flow Injection Determination of Tyramine and Its Related Compounds by Use of Immobilized Tyramine Oxidase Column and Its Application to Discrimination for Decomposition of Beef

Ling Yuan GAO and Yutaka OSAJIMA

Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture,

Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

Kiyoshi MATSUMOTO

Laboratory of Food Quality Control, Faculty of Agriculture,

Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

緒 言

肉類の鮮度は官能評価、微生物数計測、微生物代謝産物の化学的測定などに基いて評価されている。微生物数計測は長時間を要し、官能的評価は経験や主観にたよる要素が多いため、これらに代わる方法として化学的評価法が種々検討されている。なかでも、肉類の品質指標としてポリアミン類やアミン類を用いる方法が、官能的評価や微生物類と良い相関を示すとして推奨されている (Mietz and Karmas, 1977, 1978; Slemr, 1981; Edwards et al., 1985)。Daher ら (1985) は、牛肉保蔵の際にプトレシンや 1, 3-ジアミノプロパンが最も初期に増加を示し、次いでカダベリン、チラミン、スベルミジン、スベルミン等の増加を認めている。一方、Yamanaka ら (1986, 1989 a) は、イワシ、カマス、マサバ、及びサンマの保蔵初期段階においてカダベリン、チラミン及びプトレシンの増大を認めている。更に、彼らは食肉の鮮度判定指標としてのポリアミン類、モノアミン類の消長を詳細に追究している (山中ら, 1989 b)。このように、ポリアミン類、アミン類を迅速に定量することは鮮度判定に重要と考えられる。これらの物質の定量には、クロマトグラフィ-

(山中ら, 1989 a, 1989 b) を主体とする各種の方法があるが、迅速性の観点からは酵素法が有効と考えられる。Todoriki ら (1988) はプトレシンオキシダーゼと酸素電極を組み合わせた方法により、プトレシン、カダベリン、スベルミジン等を定量し、鮮度判定に有効であると述べている。著者らは、チラミン及びその類縁化合物の迅速定量法として、固定化チラミンオキシダーゼを用いるフローインジェクション分析システムを構築し、これを牛肉の保蔵における鮮度劣化判定に応用することを試みた。

材料及び方法

試薬: チラミンオキシダーゼ (EC 1.4.3.4; 3 U/mg-solid, From *Arthrobacter* sp.) 及び多孔性ガラス担体 (aminopropyl-controlled pore glass, 700 Å, 80/120 mesh) は Sigma 社製を用いた。グルタルアルデヒド (25%水溶液)、チラミンはナカライテスク社製を用い、その他の試薬はすべて市販の特級試薬をそのまま用いた。

装置: クラーク型酸素電極は Yellow Springs Instrument 社製 Model No. 5331 を用いた。ポテンシostatは柳本製作所製ポーラログラフ P8-CV

型を、又、記録計は島津製作所製 R-231 型を用いた。

酵素固定化リアクターの作製：アミノプロピル化多孔性ガラス担体を乾燥状態でガラスカラム (10 cm×2 mm i.d.) に充填した。リン酸塩緩衝液 (0.05M, pH7.0) で調製した 2.5% グルタルアルデヒド溶液をマイクロチューブポンプにて 0.2 ml/min の速度で約 1 時間循環し、脱イオン水にて十分送液洗浄した。続いて、チラミンオキシダーゼ溶液 4 ml (5 U/0.05 M リン酸塩緩衝液, pH 7.0) を 4°C の低温下、0.2 ml/min の流速で 18.5 時間循環し、酵素を固定化した。反応後、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) をカラムに流して洗浄した後測定に供した。使用しない時には固定化に用いた同じ緩衝液中に浸して、冷蔵庫内で 5°C にて保存した。

フローインジェクション分析 (FIA) システムと測定原理：チラミン測定用 FIA システムの概略を Fig.1 に示した。キャリアー溶液 (0.1 M リン酸塩緩衝液, pH 7.0) はマイクロチューブポンプ (東京理化学器械製 MP-3 型) により、吸引、送液され、エアーダンパー中で無脈流化されたのち、インジェクションバルブ (日立 K-1600 型) に送られるように構成されている。インジェクションバルブを通過したキャリアー溶液はチラミンオキシダーゼ固定化リアクターに送られ、フローセルへと到達する。一方、試料はインジェクションバルブのサンプルループ (140 μ l) に別のポンプにより充填された。インジェクションバルブを回転させることにより試料はキャリアー溶液の流れに割り込む形で注入され、酵素固定化リアクターにて反応を受け、その際の溶存酸素の減少量が酸素電極によってモニターされた。フローセルは既報 (受田ら, 1989) のものを使用し、セル後方にはもう 1 台のペリスタ型マイクロチューブポンプを設置し、出液側の送液速度を入液側よりも高くした差動送液によりセル内の液面は一定のレベルに保たれた。

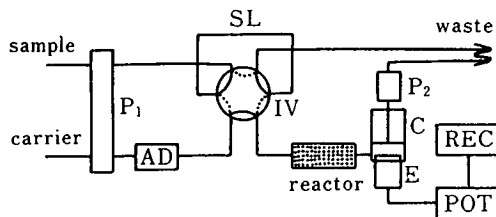


Fig. 1. Schematic diagram of FIA system
 P_1 , P_2 : micro-tube pump, AD: air-damper, IV: injection valve, SL: sample loop, E: oxygen electrode, C: flow-through cell, POT: potentiostat, REC: recorder

牛肉の性状及び保存法：雄牛 (去勢和牛, 生後 4 才令) のと殺日を指定し、と殺後ただちにその外モモ部 (2 Kg) を切り出し、0°C に保存したものを入手した。入手後、2°C の冷蔵庫に保存し、適宜その一部を取り出し実験に供した。

牛肉からの肉汁抽出法と添加回収法：細断した牛肉 (100 g) をワーリングブレンダーにて均質化した後、4 等分 (各 25 g) し以下の実験に供した。(1) トリクロロ酢酸抽出法：均質化した牛肉 (25 g) に 10% トリクロロ酢酸 25 ml を加え、ポルトロンにより最大出力で 10 分間ホモジナイズし、5 M NaOH 約 7.5 ml を加えて中和した後、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で 100 ml に定容した。この試料を 6500 rpm で 20 分間 (0°C) 遠心分離し、上澄液を ADVANTEC No.2 ろ紙にてろ過し分析試料とした。また、添加回収実験については、均質化した牛肉 (25 g) に 10 mM チラミンを 4 ml 添加し、以下同様の操作を行った。(2) 熱緩衝液抽出法：均質化した牛肉 (25 g) に 0.9% 食塩を含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 25 ml を加え、沸騰湯浴中で 5 分間加熱した後、ポルトロンにより最大出力で 10 分間ホモジナイズし、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) により 100 ml に定容した。この試料を 6500 rpm で 20 分間 (0°C) 遠心分離し、上澄液を ADVANTEC No.2 ろ紙にてろ過し分析試料とした。また、添加回収実験については、均質化した牛肉 (25 g) に 10 mM チラミンを 4 ml 添加し、以下同様の操作を行った。

結果及び考察

1. チラミン定量の最適条件の検索

キャリアー溶液の種類として、0.05 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.3) と 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.3) を比較したところ、チラミンの応答には全く差が認められなかった。そこで、キャリアー溶液の最適 pH を求めるため、0.1 M リン酸塩緩衝液を用い、pH 6.0—8.0 における 1 mM チラミンの応答値を比較した。pH 変化に対する応答の変化は実験した範囲では全く認められず、pH 6.0—8.0 に亘って同じ応答を示した。遊離のチラミンオキシダーゼの至適 pH は 7.5 であることから、固定化チラミンオキシダーゼの至適 pH 範囲はこの値を含み、固定化により至適域が若干広がったものと考えられる。従って、以後の実験では 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) をキャリアー溶液として用いた。

キャリアー溶液の流量に対する応答依存性は 1.0 ml/min 付近にピークを持つ曲線を示したが、0.7 ml/min から 1.65 ml/min の範囲では流量の影響はさほ

ど大きなものではなかった (Fig.2). そこで、以後の実験では流量 1.0 ml/min を採用することとした。

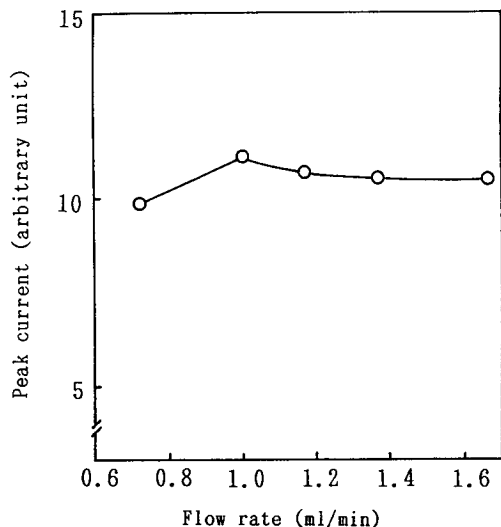


Fig. 2. Effect of the flow rate on the peak current.

2. 選択性

Table 1 は、種々のアミン類及びアミノ酸に対する本システムの選択性を示したものである。チラミン (1.0 mM) の応答を 100 とした場合、トリプトファン及びフェニルアラニンの脱炭酸生成物であるトリプタミン、フェネチルアミンは当然のことながら、チラミンと同等あるいはそれ以上の応答値を示した。また、生鮮物の腐敗と密接に関係するヒスタミンも約 57% の応答を示した。本研究では、チラミンそのものの選択的定量ではなく、生鮮物の鮮度低下に伴う第一アミン類の生成初期を捉えることを目的としたので、上記物質群の高い応答性はむしろ好ましいと考えた。アミノ酸類については、チロシン、プロリン、ヒスチジン等がわずかな応答を示したが、鮮度判断の妨害になる程度ではなかった。ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヘキサメチレンジアミン等は応答を示さなかった。これらの物質は鮮度低下の初期と言うよりもむしろ腐敗が始まってから現れる物質と考えられる。一方、Todoriki ら (1988) はプトレシン、カタペリン及びスベルミジン等ポリアミン類を酵素法により測定し、肉類の鮮度判定に有効であることを報告している。Daher ら (1985) は牛肉の鮮度低下に伴う各種アミン類の消長と微生物相を追跡し、プトリシン, 1, 3-ジ

アミノプロパンが鮮度低下の最も初期に増加すると述べている。彼らのデータによるとチラミンの増加は、これらの物質より 2-3 日遅れて増加し始めるが、チラミンも有効な鮮度判定物質である。本センサーはポリアミンを追跡するものではないが、鮮度劣化を捉え得るものも考えられた。

Table 1. Relative responses for amines and amino acids (tyramine=100)

Tyramine	100
Tryptamine	110.2
Phenethylamine	108.1
Histamine	56.8
Tyrosine	2.2
Proline	2.2
Histidine	1.5
Tryptophan	1.1
Lysine	1.1
Asparagine	0
Glutamic acid	0
Phenylalanine	0
Dimethylamine	0
Trimethylamine	0
Hexamethylenediamine	0

3. 安定性

チラミンオキシダーゼ固定化カラムの安定性を検討するため、1.0 mM チラミンを約 2 ヶ月に亘って測定した。なお、使用しないときは 0.1 M リン酸塩緩衝液中で 5°C で保存した。チラミンに対する応答は、作製後 2 日で約 90% に低下するが、その後約 2 ヶ月間ほぼ同等の応答を示した。約 11 週間で初期の応答の 79% にまで減少したが、各測定ごとに 1.0 mM チラミン標準液によって補正すれば約 3 ヶ月に亘って測定可能であった。

4. 検量線、再現性及び応答曲線

検量線は 0.05 mM-1.0 mM の濃度範囲で直線を示した。なお、検出下限は 0.02 mM であった。0.5 mM における 10 回の繰り返し測定の相対標準偏差は 1.8% であった。典型的な応答曲線を Fig.3 に示した。図から明らかのように、応答ピークは試料注入後速やかに上昇し、約 2 分後にベースラインに復帰した。従って、本システムでは 1 時間に 30 検体分析可能と考えられた。

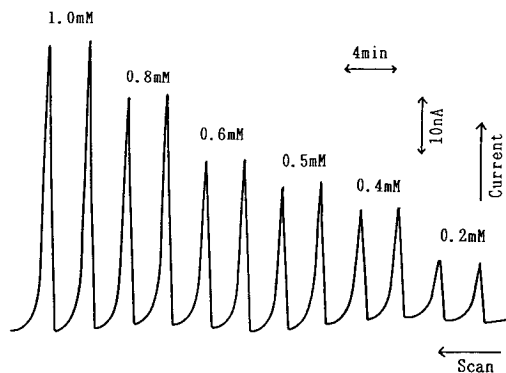


Fig. 3. Typical FIA responses for tyramine. Flow rate, 1.0 ml/min; Applied potential, -0.80V vs. Ag/AgCl.

5. 鮮度劣化判定の試み

(1) 抽出法による回収率の比較

均質化した牛肉に既知量のチラミンを添加し、トリクロロ酢酸抽出法と熱緩衝液抽出法による回収率の比較を行った。両試料とも実験方法に記載した手順により分析試料を調製した後、各試料に対して標準添加法を行い試料中のチラミン量を算出した。回収率はトリクロロ酢酸抽出法、熱緩衝液抽出法ともに94%を示した。大橋ら(1985)によれば、魚肉からのATPの抽出に際して、トリクロロ酢酸法と熱緩衝液抽出法について差がなかったという報告もあり、本結果は妥当なものと思われる。操作の観点から言えば、熱緩衝液抽出法の方が簡便であることから、以後の測定では熱緩衝液抽出法を採用することとした。

(2) 牛肉貯蔵におけるチラミン相当量の変化

冷蔵庫(2°C)に貯蔵中の牛肉を一定期間ごとに取り出し測定に供した。本センサーはチラミンのみならずトリプタミン、フェネチルアミンにも応答するが、チラミンを基準物質として応答値をチラミン相当量として表示した。貯蔵日数に対するチラミン相当量の変化をFig.4に示した。図から明らかなように、8日目から12日目まではほとんど第一アミンの増加は認められないが、その後指数関数的に増大し、18日目では 0.2mM を越え、同時に腐敗臭が感じられた(図中矢印)。この図において、チラミン相当量 0.1mM 付近が鮮度劣化判定の境界を示しているものと考えられた。

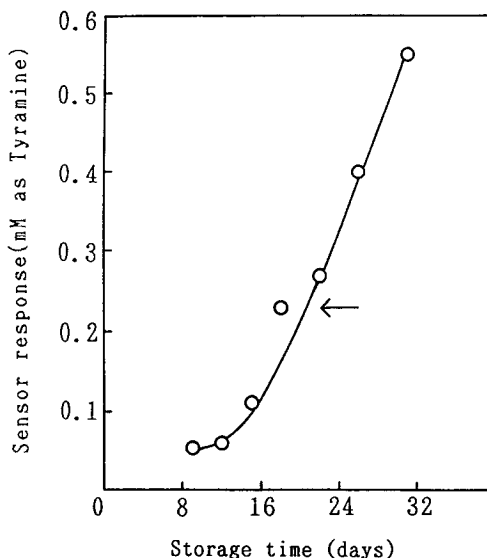


Fig. 4. Change of tyramine related compounds in beef extract with storage (2°C). The arrow indicates the appearance of spoilage odor.

要 約

チラミンオキシダーゼを多孔性ガラス担体に固定化したリアクターを用いて、牛肉の鮮度劣化をモニターするFIAシステムを構築した。キャリアー溶液に 0.1M リン酸塩緩衝液($\text{pH} 7.0$)を用い、チラミンオキシダーゼの酵素反応に伴う酸素減少量をモニターした。チラミンの検出限界は 0.02mM 、定量範囲は $0.05-1.0\text{mM}$ 、相対標準偏差は 1.8% (0.5mM , $n=10$)であり、1時間当たり30検体の測定が可能であった。本酵素カラムはトリプタミン、フェネチルアミンにも応答するが、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヘキサメチレンジアミンには応答を示さなかった。本システムを貯蔵牛肉(2°C)の鮮度劣化判定に適用したところ、12日目から18日目までに急激な応答の増大が認められ、鮮度劣化判定に利用できるものと考えられた。

文 献

- Daher, N. S. el and R. E. Simar 1985 Putrefactive Amine Changes in Relation to Microbial Counts of Beef During Storage. *J. Food Protection*, 48: 54-58
- Edwards, R. A., R. H. Dainty and C. M. Hibbard

- 1985 Putrescine and Cadaverine Formation in Vacuum Packed Beef. *J. Appl. Bacteriol.*, **58** : 13-19
- Mietz, J. L. and E. Karmas 1977 Chemical Quality Index of Canned Tuna as Determined by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Food Sci.*, **43** : 155-158
- Mietz, J. L. and E. Karmas 1987 Polyamine and Histamine Content of Rockfish, Salmon, Lobster, and Shrimp as an Indicator of Decomposition. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61** : 139-145
- 大橋 実・宇津木義雄・荒井 珪 1985 食品加工原料用鮮度計の開発. 食品産業センター技研報, **8** : 75-90
- Slemr, J. 1981 Biogene Amine als Potentieller Chemischer Qualitätsindikator für Fleisch. *Fleischwirtsch.*, **61** : 921-926
- Todoriki, S., M. Tajima and M. Senda 1988 Enzymatic Oxygen Electrode Method for Determination of Polyamines in Food. *Anal. Sci.*, **4** : 583-585
- 受田浩之・松原美保・松本 清・箴島 豊 1989 ビタミン K₃をメディエーターとして用いた酸素消費型酵素センサーによるエタノールの定量, 分析化学, **38** : T160-T169
- Yamanaka, H., K. Shimakura, K. Shiomi and T. Kikuchi 1986 Changes in Non-volatile Amine Contents of the Meats of Sardine and Saury Pike during Storage. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **52** : 127-130
- 山中英明・松本美鈴 1989 a 高速液体クロマトグラフィによる赤身魚中のポリアミン類の同時定量及び鮮度の判定. 食衛誌, **30** : 396-400
- 山中英明・松本美鈴・矢野幸男 1989 b 食肉の鮮度判定指標としてのポリアミンに関する研究. 食衛誌, **30** : 401-405

Summary

A flow injection analytical system for monitoring the decomposition of beef was developed. The system included an immobilized enzyme reactor, in which tyramine oxidase was immobilized on controlled pore glass supports. Oxygen consumption involved in tyramine oxidase enzyme reaction was monitored. The carrier solution used was 0.1 M phosphate buffer (pH7.0). The detection limit was 0.02 mM, and the range for determination was 0.05-1.0 mM. The relative standard deviation was 1.8% for 10 successive determinations at 0.5 mM level. The determination frequency was 30 tests per hour. The immobilized enzyme also responded to tryptamine and phenethylamine, but did not show any reaction to dimethylamine, trimethylamine and hexamethylenediamine. When the system was applied to monitoring of the decomposition of beef, a steep increase of the response was observed between the storage period (2°C) of 12 days and 18 days. The system appeared to be useful for monitoring the decomposition of beef meat.