

生ホタテガイ貝柱の蛍光分光分析

菅原智明、野村保友*、加藤早苗**、吉岡武也、木下康宣、小田 功***

Fluorescence Spectroscopy in Analysis of Raw Scallop Adductor Muscle

Tomoaki Sugawara, Yasutomo Nomura*, Sanae Kato**, Takeya Yoshioka, Yasunori Kinoshita, Isao Oda***

要 旨

生ホタテガイ貝柱の非破壊かつ迅速な分析技術の開発のため、蛍光分光分析を行った。その結果、補酵素の一種であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸由来の蛍光が観測された。ホタテガイ貝柱の蛍光強度は、冷蔵保存時間とともに減少した。励起スペクトルについては、保存時間が長くなると、ピーク波長が長くなる傾向を示した。

1. はじめに

ホタテガイやイカなどの水産物は、北海道では年間100万トンを超える水揚げとなっている。近年、水産食品の鮮度を維持しながら流通・販売することが、益々要望されてきている。鮮度保持技術の研究には、水産物の品質を迅速に測定することが不可欠である。鮮度評価として、これまでにK値やアデノシン三リン酸（ATP）濃度の測定が、ホタテガイやイカで報告されている¹⁻⁴⁾。このような化学分析手法を用いることで、鮮度を精度よく評価することが可能である。しかし、分析には専門的技術が必要で、なおかつ時間がかかるといった短所がある。そのため、簡便で非破壊な鮮度測定方法の開発が望まれている。

一般的に、光学的測定法は非破壊で迅速な分析が可能である。農産物においては光を用いた分析が既に行われており、応用例として、ミカンの外傷検出、卵やキュウリの鮮度測定、メロンやスイカなどの青果物の糖度測定が知られている^{5), 6)}。

水産物に関しては、近赤外線を用いたイカ類の品質評価^{7), 8)}、生鮮魚と凍結解凍魚の判別や冷凍すり身の品質評価⁹⁾、魚フィレ中の残留小骨の検出⁹⁾、近赤外線によるホタテ貝の品質評価¹⁰⁾ などへの応用が検討されている。水産物の蛍光分光分析による鮮度評価については、冷凍 - 解凍¹¹⁾や冷蔵5日以上¹²⁾の魚について報告されている。

本報告では冷蔵保存時間100時間以内のホタテガイ貝柱について蛍光分光分析を行った。蛍光測定の結果、生鮮ホタテガイでは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸（NADH）由来の自家蛍光が観測された。NADHの蛍光スペクトルは鮮度に強く依存し、保存時間が長くなるとともに、ホタテガイ貝柱のNADH蛍光強度が減少することを明らかにした。

2. 実験方法

2.1 試料

試料には、近海産の短時間畜養したものを使用

* 前橋工科大学システム生体工学科
 ** 旭川医科大学医学部生化学講座
 *** 木更津工業高等専門学校機械工学科

した。活ホタテガイから貝柱を取り出して、3×3 mm、長さ15 mmにカットした。保存温度は10℃とし、保存時間ごとに試料を取り出して室温に15～30分程度放置した後、蛍光測定を行った。

蛍光スペクトルを比較するため、純度98%のβ型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型2ナトリウム塩水和物(β-NADH)を用いて濃度50 μMのβ-NADH溶液を作製し、蛍光スペクトル測定を行った。β-NADH溶液の濃度については、分光光度計(HITACHI社製、U-2001)を用いて吸光度を測定し、吸収係数から算出した。

2.2 蛍光分光分析

蛍光スペクトルの測定には、蛍光分光分析装置(日本分光(株)製FP-6600)と石英製三角柱セルを用いた。蛍光測定は、光電子増倍管を使用して室温で行った。分析装置の測定条件は、光学スリット幅が蛍光側で6 nm、励起側を5 nmとした。波長走査スピードは、100 nm/minに設定した。スペクトルは、300～700 nmの範囲で二次光カットフィルターを用いて測定した。スペクトル測定の励起波長と蛍光波長は、それぞれ365 nmと461 nmとした。

3. 実験結果および検討

3.1 蛍光測定に及ぼすノイズの影響

蛍光測定のノイズレベルを評価するため、空の石英セルをブランクセルとして、蛍光スペクトルを測定した。また、石英セルにサンプルを入れたものも測定し、両者の比較を行った。図1に、励

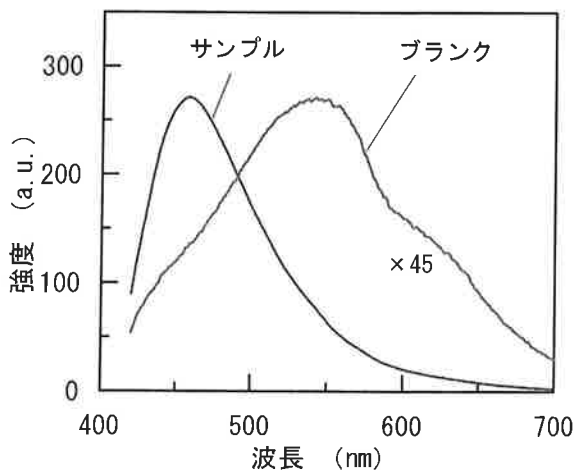


図1 ブランクとサンプルの蛍光スペクトル

起波長を365 nmとしたときのブランクとサンプルの蛍光スペクトルを示す。ブランクの蛍光強度は小さいため、図中では45倍に拡大している。ブランクセルの蛍光スペクトル測定の結果、541 nmにピークを持つ蛍光スペクトルが観測された。この微弱蛍光の原因としては、測定で使用している2次光カットフィルターによる蛍光と石英セル自身からの蛍光が考えられる。サンプルの蛍光強度と比較し、ノイズレベルは十分に小さく、本実験の蛍光測定には影響がないことを確認した。

3.2 ホタテガイ貝柱の蛍光・励起スペクトル

図2 (a) に新鮮なホタテガイ貝柱、図2 (b) にβ-NADH溶液の蛍光分光分析結果を示す。図中のEmは蛍光スペクトル、Exは励起スペクトルを示す。ホタテガイ貝柱からは、ピーク波長が458 nmの蛍光スペクトルとピーク波長が361 nmの励起スペクトルが測定された。β-NADH溶液のスペクトルと比較した結果、ホタテガイ貝柱の蛍光がNADH由来であることが分かった。ホタテガイ貝柱の蛍光スペクトルについては、β-NADHのスペクトルと一致した。一方、ホタテガイ貝柱の励起スペクトルのピーク波長は、β-NADHのスペクトルよりも長波長側にシフトした。この原因としては、励起スペクトルが生細胞のNADHの化学状態に強く依存しており、サンプルの状態によって最適励起波長が変化したことが考えられる。

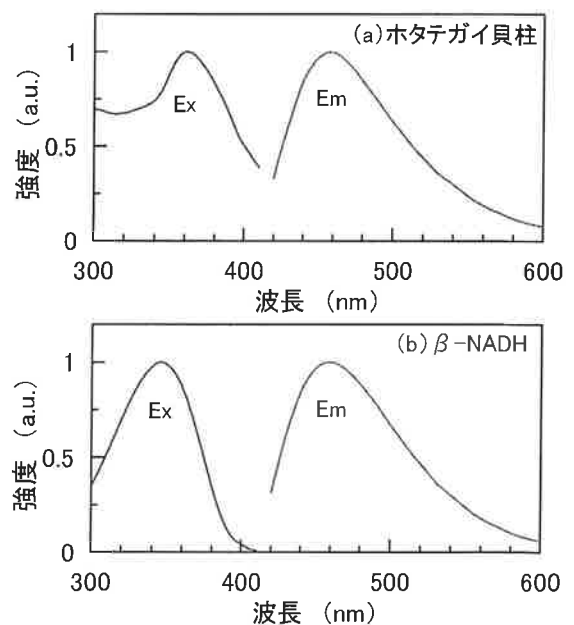


図2 ホタテガイ貝柱とβ-NADH溶液の蛍光分光分析結果

3.3 蛍光スペクトルの保存時間依存性

保存時間ごとのホタテガイ貝柱の蛍光ピーク強度を図3に示す。図中の蛍光ピーク強度は0時間の初期強度で規格化されている。蛍光強度については、48時間までは単調に減少し、50時間以降ではあまり変化しないことが分かった。発光スペクトルの減少は、NADHの濃度低下と化学的状態変化によるものが考えられる。生物におけるNADHはATPの産生に不可欠な物質の一つとして知られているが、冷蔵短期間では保存時間とともにホタテガイ貝柱の代謝が低下し、NADH濃度とATP濃度の両方が減少する。さらに保存時間が長くなってATPの産生が停止すると、NADHは消費されず、一定になったものと考えられる。蛍光スペクトルのピーク波長は、保存時間に依存せず、457~459 nmとほぼ一定であった。

3.4 励起スペクトルの保存時間依存性

図4に、励起スペクトルのピーク強度とピーク波長を示す。励起強度の挙動は、図3の蛍光強度の変化と一致している。一方、励起ピーク波長は、保存時間が長くなるに従って、361 nmから367 nmへと長波長側にシフトすることが分かった。これは、ホタテガイ貝柱の組織が徐々に壊れるとともにNADHの状態が変化することで、最適な励起エネルギーが低下したためと考えられる。励起ピーク波長は、冷蔵保存中のホタテガイ貝柱の鮮度に依存することが明らかとなった。

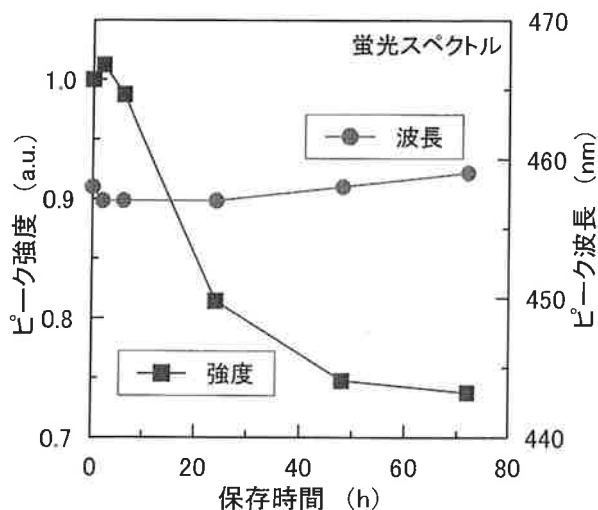


図3 蛍光強度と蛍光波長の保存時間依存性

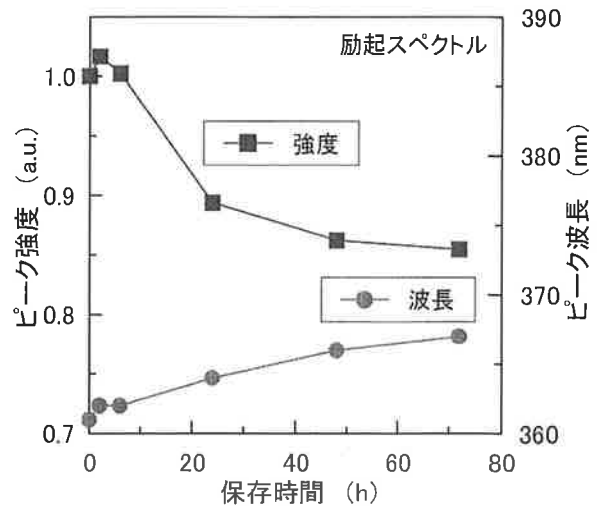


図4 励起強度と励起波長の保存時間依存性

4. まとめ

生ホタテガイ貝柱の蛍光分光分析を行った。蛍光スペクトルは試料の鮮度に強く依存し、蛍光強度は冷蔵保存時間とともに減少した。励起スペクトル測定の結果、保存時間が長くなるほど、励起ピーク波長は長くなる傾向を示した。

今後、他の自家蛍光物質についても蛍光測定を行い、非破壊で迅速に鮮度評価可能な光学的分析手法を確立するとともに、品質評価システムの開発へ応用展開する予定である。

謝辞

光学技術に関してご助言いただいた、ファインクリスタル(株)の小川健吾氏、阿部敏広氏、清野芳紀氏に感謝いたします。本研究はH20年度ノーステック財団「研究開発助成事業」、H21年度文部科学省「地域イノベーションクラスタープログラム(グローバル型)」で実施したものである。関係各位に御礼申し上げます。

参考文献

- (1)N.Seki, T.Niki, D.Ishikawa, M.Kimura and H.Nozaawa : Journal of Food Science, Vol.69, No.4(2004), pp.FCT262-FCT267
- (2)K.Kawashima and H.Yamanaka : Nippon Suisan Gakkaishi, Vol.58, No.11(1992), pp.2175-2180
- (3)T.Yoshioka, Y.Kinoshita, H.Yoshino, S.Park, K.Konno and N.Seki : Fisheries Science, Vol.69(2003), pp.408-413

- (4)Y.Kinoshita, T.Yoshioka, S.Kato and K.Konno :
Journal of Food Science, Vol.74, No.3(2009),
pp.S142-S146
- (5)河野澄夫：光を用いた農産物の品質・安全検査, OPTRONICS, No.8(2008), p.128
- (6)太田 健：光を用いた青果物内部品質の計測装置と計測実例-, OPTRONICS, No.8(2008), p.136
- (7)吉村元秀、木島 岬、辺見一男、岡本 昭、橋 勝康：近赤外光反射計測によるアオリイカの外観評価 -画像計測によるイカ類の品質評価システムの構築に向けて -, 日本工業出版「画像ラボ」, Vol.19, No.3(2008), p.21
- (8)吉村元秀、辺見一男、岡本 昭、橋 勝康：画像計測によるイカ類鮮度評価のための色情報解析, 県立長崎シーボルト大学国際情報学部紀要, Vol.8(2007), p.347
- (9)本宮 隆、ムスレ ウディン、岡崎恵美子：光センサーによる水産物の品質評価 - 近赤外分光法の実用化を目指して -, FOOD RESEARCH 2006, No.11(2006), p.16
- (10)本間稔規、高橋裕之、澤山一博、武田忠明、秋野雅樹、馬場直志、石垣 剛、根深一三、岡 邦治、熊谷康一：道産ホタテガイ品質評価システムの開発, 北海道立工業試験場報告, No.306(2007), p.17
- (11)R.Karoui, E.Thomas and E.Dufour : Food Research International, Vol.39, No.3(2006), p.349
- (12)E.Dufour, J.P.Frencia and E.Kane : Food Research International, Vol.36(2003), pp.415-423