Development of a freshness sensor with flavin-containing monooxygenase

フラビン含有モノオキシゲナーゼを用いた鮮度センサの開発

Kazuhisa YANO, Yohei KUBOTERA, Yuki HASHIMOTO, Kohji MITSUBAYASHI

Dept. of Human and Information Science, Tokai University, 1117 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan.

TEL: +81-463-58-1211(ext. 4161) FAX: +81-463-59-4014

Takeshi YOSHIKAWA, Yoshitake NISHI

Dept. of Materials Science, Tokai University, 1117 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan.

TEL: +81-463-58-1211(ext. 4206) FAX: +81-463-50-2096

Hideaki ENDO

Dept. of food science and technology, Tokyo University of fisheries, 5-7, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan.

TEL: +81-3-5463-0616 FAX: +81-3-5463-0616

(Received 19, November 2001 Accepted 26, July 2002)

A freshness sensor for fish and meat was constructed by immobilizing flavin containing monooxygenase type-3 (FMO3) as, one of drug metabolizing enzymes in human liver, to a dissolved oxygen electrode. The FMO3 immobilized sensor was calibrated against trimethylamine solutions (TMA, fish-odor substance) from 1.0 to 50.0 mmol/l. As the results of the experiments with fish and meat samples, the sensor output increased by increasing a keeping period at the room temperature for their decomposition.

Keywords: freshness sensor, trimethylamine, methyl mercaptan, flavin-containing monooxygenase

I. INTRODUCTION

魚肉や畜肉の鮮度評価は、品質や加工工程の管理において不可欠であり、迅速な鮮度の測定が求められている。これまで鮮度評価には、K 値、生菌数等が測定されてきたが、これらの測定法は操作が煩雑で計測に時間を要する等の問題があり、より簡便で短時間に魚肉・畜肉の鮮度を測定することのできるセンサが望まれている。^{1,2}

一般に、海産物や畜肉ではその死後、微生物の増殖にともなう腐敗により、海産物ではトリメチルアミン(TMA)が、また畜肉ではメチルメルカプタン(MM)が急速に増加し、腐敗臭として放出される³。このことから、この臭気成分を分析することで魚肉・畜肉を非破壊にて鮮度評価できるものと期待されている。

本研究では薬物代謝酵素であるフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 を用い生鮮食品の腐敗にともなう代謝産物(TMA・MM)を検出する「魚肉・畜肉用鮮度センサ」を開発し、実際に抽出サンプル溶液による魚肉・畜肉の鮮度評価に適用した。

II. EXPERIMENTAL

薬物代謝酵素の 1 つである FMO3(Human flavin-containing monooxygenase type-3 (FMO3); from *Adult human liver*; E.C.1. 14.13.8, P233, 30200pmol/mg・min, Gentest Corporation., MA, USA)は次式の反応に従い TMA

S: Trimethylamine, Methyl Mercaptan

をトリメチルアミンオキシド(TMAO)へと、また MM を 2 硫化ジメチルへの酸化反応を触媒する。^{4,5}

実験では FMO3 を用い酵素センサを作製した。酵素固定化膜はあらかじめ洗浄、乾燥させておいた透析膜(Dialysis membranes; 157-0144-02, thickness 15 μm, Technicon Chemicals Co., S.A.)に、FMO3 と光架橋性樹脂(PVA-SbQ; SPP-H-13(Bio), Toyo Gosei Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)の混合液(重量比 1:3)を塗布し、蛍光灯照射による光架橋にて酵素を包括固定することにより FMO3 固定化膜を作製した。

FMO3 固定化バイオセンサの構成を Fig.1 に示す。FMO3 固定化膜を市販のクラーク型酸素電極(oxygen sensor; Able Co., Ltd., Tokyo, Japan.)の感応部にナイロンネットとシリコン O-リングを用いて装着し、FMO3 固定

Fig. 1. Structure of a freshness sensor.

化バイオセンサとした。

実験では、フローインジェクション実験系を用い、FMO3 固定化センサを組み込んだ反応セルにリン酸緩衝液をペリスタポンプにより送液し、そこへ TMA 溶液または魚肉・畜肉のサンプル溶液をシリンジ(Hamilton Microliter Syringes,TYPE;710,Hamilton Company, USA)にてインジェクションし、FMO3 の酵素反応にともなう溶存酸素の減少を酸素電極にてとらえ、そのセンサ出力をポテンシオスタット、A/D 変換機を介して計測した。

次に、魚肉(アジ)・畜肉(ハム)の抽出液を用いて鮮度評価を行った。抽出液の作製は、まず、室温(25℃)にて放置したアジとハムより適宜取り出した筋肉をリン酸緩衝液にて 10 倍希釈し、乳鉢にてホモジナイズした懸濁液を 2 時間の遠心分離操作を 2 回行い、その上澄み液を計測に用いた。実験は、上記のフローインジェクション系を用いた。

III.RESULTS AND DISCUSSION

TMA 標準溶液をインジェクションした際の応答および再現性を Fig.2 に示す。実験の結果、TMA 標準液のインジェクションにともなうセンサ出力の増加が観察され、インジェクション後の反応ピーク値までの応答時間は約 30 秒であった。

Fig.2. Responses and reproducibility of the freshness sensor.

インジェクション法により得られた本センサの検量特性を Fig.3 に示す。実験の結果、TMA 標準溶液を 1-50 mmol/l の範囲で定量が可能であることが確認できた。

魚肉および畜肉の放置時間にともなうセンサ出力の変化を Fig.4 に示す。この図に示すように、魚肉の放置時間にともなうセンサ出力が急激に増加しており、このことから魚肉内における腐敗にともなう TMA 等の 2 級、3 級アミンが急激に増加したものと考察された。また、畜肉においても魚肉同様、保存時間にともなうセンサ出

$$\text{sensor output (nA)} = 26.1 + 87.2 \log [\text{TMA (mmol/l)}]$$

$$R = 0.994 \quad (1.0 < [\text{TMA (mmol/l)}] < 50)$$

Fig. 3. Calibration curve for TMA in the liquid-phase.

力の増加が観察され、畜肉の腐敗にともなう MM 等の硫黄化合物が増加したものと考察された。

Fig. 4. Change in the sensor output for extract fish and meat.

IV. CONCLUSION

本研究では、生体の肝臓に存在する薬物代謝酵素の一つである FMO3 を用いることで、新規な魚肉・畜肉用の鮮度センサを開発した。既存の多成分分析による方法と異なり、本センサ方法では魚肉・畜肉の腐敗にともなう発生する TMA・MM を腐敗評価の単一指標とすることで、簡便かつ迅速に評価することができた。

またこれら指標成分が揮発性を有することから、本センサを用いたガス計測により、腐敗臭気による非破壊法による鮮度評価の可能性も示唆された。

REFERENCES

- 1 E. Watanabe, *Chemical and Biology* (in Japanese), 38(3), (2000),171
- 2 T. Saito, K Arai, M. Matsuyoshi, *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 24, (1959), 749
- 3 The Environmental Agency in Japan, *A legal book for malodorant* (in Japanese), (1993), 414
- 4 R. Kato, T. Kamataki, *Comparison Biochemistry of drug metabolizing* (in Japanese), (1983), 277
- 5 M. Ohki, T. Ohsawa, M. Tanaka, et.al., *chemistry dictionary*, (1996), 2325

Presented at '01 SAS Intelligent Symposium