

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：33904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21650194

研究課題名(和文) 野菜中グリコシダーゼ活性の一斉分析法および同酵素活性を指標とする品質管理法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for the simultaneous analysis of glycosidase activities in some vegetables and its application to food quality control.

研究代表者

小栗 重行 (OGURI SHIGEYUKI)

愛知学泉大学・家政学部家政学科・教授

研究者番号：20247597

研究成果の概要(和文): 野菜の鑑別法として、バイオメトリックス(生体認証)技術に基づくグリコシダーゼ活性プロファイリング/多変量解析法を開発した。本法を適用することで、30個のキャベツを6品種に、22種の米を5品種に鑑別でき、また、米の産地も特定された。また、毒キノコや放射線照射ニンニクにも適用することができた。

研究成果の概要(英文): We developed the method of glycosidase-activity profiling / chemometric analysis for the discrimination and characterization of some vegetables that was based on the technique named "Biometrics". In this project, it was found that this method was able to discriminate 30 heads of cabbage itemized into 6 different cultivars, 22 kinds of rice seeds itemized into 5 different varieties of rice seeds, and their rice seeds production origin. This method was also able to apply to toadstool discrimination and to detect for irradiated garlic for the first time.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	0	2,000,000
2010年度	400,000	0	400,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	120,000	3,520,000

研究分野：食生活学

科研費の分科・細目：食生活科学

キーワード：食品と貯蔵、野菜、品質管理

1. 研究開始当初の背景

生物が所有する様々な情報(特徴)は、情報元となる遺伝子DNAが様々な環境要因(例えば、温度や日照時間など)の影響を受けて発現した結果と考えられている(フェノタイプ: 遺伝子の表現型と呼ぶ)。そのため、同じ遺伝子を持った個体でも、置かれた環境下で特有な情報を表すこととなる。この性質

を利用することでヒトの体型から年齢を推定したり、メロンの表皮網目模様から産地を特定したりする新技術が開発され話題となった。これらは、バイオメトリックス(生体認証)技術と呼ばれる手法で、個体の認証技術として様々な分野で利用され始めている。

一方、食物や食品に関する諸問題が今日ほど国民の関心事になった時代はない。例えば、

米や野菜の産地偽装に関する事件がマスコミ等をしばしば賑わしているが、これら事例は氷山の一角とこの見方がある。その背景に「偽装を行っても見つからない」といった関係業者のモラルの欠如が根強く在るため、後を絶たないのが実情である。これら違法行為を未然に防ぐには、違法行為の抑止力と成りうる簡便で有効性の高い分析装置の開発が重要と思われるが、ほとんど手付かずのままとなっていた。

また、日本では毎年、秋を迎えると山菜やキノコ狩りで賑わうが、毒キノコの誤食による食中毒が跡を絶たない。本事例においても、毒キノコと食用キノコを鑑別する有効で簡便な科学的方法が開発されていないことが一因していると推測される。

食品に放射線を照射することで農産物やその加工品の「芽止め」、「殺菌」、「殺虫」などが世界各国で行われている。日本ではジャガイモの芽止め以外は認められていないため、輸入食材を含むこれら食品類の検査（検知）が必要となる。しかし、これら放射線照射食品の検知法として幾つかの方法が検討されているが、デファクトスタンダードとなりうる検知法は確立されていない。

これら食材の鑑別で最も確実な方法は遺伝子解析法（DNA鑑定）が主流であるが、操作性や特殊な施設を必要とするため食関連分野で汎用的に利用するには問題が少なくない。また、DNA鑑定を用いても産地までの特定は困難である。したがって、これまでとは異なる新しい発想に基づく簡便で有効な野菜など植物性食材の鑑別法が開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究課題では、植物性食材に広く共通して存在しているグリコシダーゼ活性に着目した。すなわち、各食材に含まれる複数種の同酵素活性値プロファイルから食材のバイオメトリクス認証を行う手法を着想した。すなわち、野菜などに含まれる8種類のグリコシダーゼ活性を一斉分析する手法を構築し、得られた個々の酵素活性プロファイルから多変量解析を行うことで、キャベツの品種鑑別、米の品種鑑別と産地特定、毒キノコと食用キノコの判別、放射線照射ニンニクの検知法への適応性を検討、検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵素活性測定法

野菜などの試料5gを0.1Mリン酸緩衝液(pH 6)でホモゲナイズしながら抽出し、全量を50 mLとする。この液を遠心分離や濾過などで不要物を取り除いた抽出液180 μ Lを96穴プレートに入れ、必要に応じて同緩衝液で

希釈する($\times 10$ 、 $\times 100$ 、 $\times 1,000$)。プレートを蛍光プレートリーダー(FLx800型、BIO-TEC)にセットし、38 $^{\circ}$ Cで5分間予備加熱する。基質として0.1 mM クマリン(4MU:4-methylumbelliferone)配糖体溶液40 μ Lを加えプレートリーダー内で10秒間振盪し、引き続き38 $^{\circ}$ Cで60分間加温する。その後、5 M水酸化ナトリウム溶液20 μ Lを加え10秒間振盪した後、蛍光強度(励起フィルター360 nm、蛍光フィルター460nm)を測定する。比較対象として、抽出液の変わりに1 μ M 4MU溶液180 mLを用い、以下、試料抽出液と同様に操作し、蛍光強度を測定する。同測定値を基準に各酵素活性値
 α -D-glucosidase (-Glc)、
 β -D-glucosidase (-Glc)、
 β -D-galactosidase (Gal)、 α -D-mannosidase (Man)、
 β -D-xylosidase (Xyl)、
 β -D-glucuronidase (GA)、
N-acetyl- β -D-glucosamidase (GlcNAc)、
 α -L-arabinosidase (Ara)を算出する。なお、酵素活性測定用蛍光基質4MU- β -D-xylosideと4MU- α -L-arabinosideは当研究室で化学合成したものを、その他は和光純薬(大阪)から購入したものをそれぞれ使用した。

(2) 多変量解析

試験で得られた各酵素活性は、統計解析ソフト「SPSS Statistics 17.0」にて判別分析処理を行った。

(3) 試験に用いた試料

キャベツ(愛知県豊橋産):金春(5検体)、ふゆき(5検体)、若女将(5検体)、長野中性(5検体)、Y R S E(5検体)、夏いち(5検体)

米(コシヒカリ):愛知県産(20検体)、福井県産(20検体)、岐阜県産(20検体)、宮城県産(20検体)、きぬひかり(5検体)、こしいぶき(2検体)、あさひの夢(2検体)あいちのかおり(2検体)

キノコ:クサウラベニタケ(毒)15検体、ウラベニホテイシメジ(食)11検体、オオワライダケ(毒)5検体、コガネダケ(食)4検体、ツキヨタケ(毒)5検体、ムキタケ(食)2検体

ニンニク(ホワイト六片:愛知県岡崎市産1.6 kg)

その他、試験に用いた試薬試液類は理科研(株)(名古屋)より入手した物を使用した。

(4) 試験結果および考察

1) キャベツの品種鑑別

平成21年、愛知県豊橋市内の農家で栽培された6種類各5検体のキャベツ30個の酵素活性値(プロファイル)を表-1に示した。また、同酵素活性値より得られて多変量解析

結果を図-1 に示した。

表 - 1 キャベツの酵素活性値プロファイル

番号	分類	ASic	UGc	Gd	Man	GA	GcNAc	Xyl
1	1	188.8	382.6	1002.9	335.4	1.2	87.9	27.0
2	1	206.2	409.7	931.1	214.5	1.7	66.2	26.6
3	金巻	186.4	397.9	1075.7	300.7	1.0	82.14	29.0
4	1	201.4	402.9	982.7	299.3	1.0	89.35	32.4
5	1	146.4	360.7	1094.3	395.7	1.4	88.00	33.3
6	2	92.0	362.8	622.7	219.7	1.6	98.4	33.0
7	2	106.0	324.6	641.8	193.0	1.6	60.75	31.7
8	心伊巻	124.5	329.5	617.3	147.5	1.7	96.40	29.8
9	2	133.3	299.3	607.4	195.6	1.3	95.56	38.9
10	2	139.9	272.3	514.9	114.9	1.7	62.84	48.7
11	3	136.3	327.2	693.9	223.3	1.4	98.9	25.6
12	3	94.3	251.4	626.8	216.6	1.7	60.61	23.4
13	若女巻	116.0	302.0	629.7	228.4	1.6	61.91	31.1
14	3	99.3	304.3	709.3	197.4	1.8	63.10	39.2
15	3	164.3	342.2	813.8	227.6	1.8	67.67	51.9
16	4	255.3	319.4	1044.7	266.0	2.0	153.0	51.5
17	4	242.7	337.9	941.7	228.2	2.1	130.0	47.8
18	中野中生	197.6	367.1	1077.6	250.6	2.2	164.71	55.1
19	4	188.2	425.3	1113.3	269.9	2.4	157.3	68.0
20	4	159.0	300.0	760.8	169.6	2.2	140.4	46.7
21	5	165.0	248.3	603.3	175.8	1.8	1015.0	41.2
22	5	194.2	263.3	760.0	170.8	1.8	1278.0	42.5
23	YRSE	122.5	228.3	673.3	160.8	1.8	1055.0	42.5
24	5	144.0	245.0	605.5	104.6	1.5	1067.9	35.2
25	5	183.2	339.8	646.0	220.4	1.5	94.16	31.7
26	6	114.5	160.7	500.9	329.9	1.6	1001.7	23.4
27	6	106.0	157.8	503.4	314.7	1.6	839.7	24.3
28	真い巻	114.2	170.8	500.9	313.3	1.6	96.46	25.8
29	6	115.9	173.8	430.2	273.8	1.7	80.95	24.1
30	6	118.9	192.6	514.8	269.7	1.7	96.23	28.5

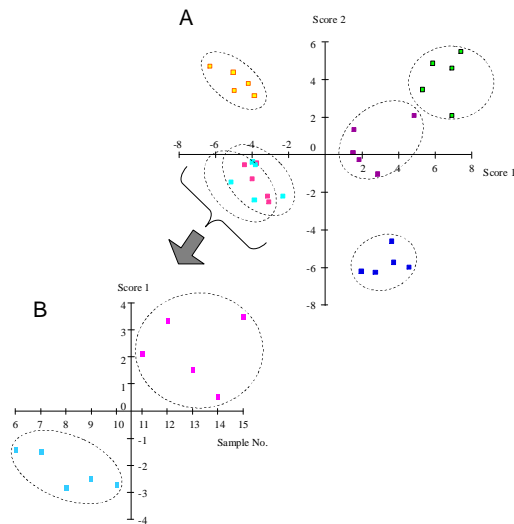


図 - 1 キャベツ 6 品種の多変量解析結果 (図Aのグループ2と3の再解析結果を図Bに示した)

その結果、今回使用したキャベツ 30 個から得られた酵素活性プロファイルを多変量解析することで 6 種類の品種に判別分析することができた。

2) 米 (コシヒカリ) の産地特定

平成 21 年に収穫したコシヒカリを愛知県、岐阜県、福井県、宮城県各農業共同組

合より各 20 検体を直接入手した。合計 80 検体のコシヒカリの酵素活性値プロファイル / 多変量解析した結果を表-2 に示した。

表 - 2 コシヒカリ産地別判別結果

産地	判別結果				合計
	愛知県産	福井県産	岐阜県産	宮城県産	
愛知県産	14	3	3	0	20
福井県産	2	16	2	0	20
岐阜県産	5	2	11	2	20
宮城県産	0	0	1	19	20
判別率 (%)	70.0	15.0	15.0	0.0	100.0
福井県産	10.0	80.0	5.0	0.0	100.0
岐阜県産	25.0	10.0	55.0	10.0	100.0
宮城県産	0.0	0.0	5.0	95.0	100.0

SPSS (V17.0)

今回の結果より、産地間が離れていると判別率が高くなる傾向を示した。また、宮城産と中部北陸産のコシヒカリは判別率可能 (判別率 95%) であることが示唆された。以上の結果から、同法で産地推定が可能であること示唆された。

3) 毒キノコと食用キノコの判別

平成 22 年の秋、大分、広島、福島、長野の各県より採取した食用キノコと、見誤りやすい毒キノコを用いて試験を行った。その結果、毒-食用キノコ間での判別率は全て 100% であった。一例としてクサウラベニタケ (毒) とウラベニホテイシメジ (食) の判別結果を図-2 に示した。

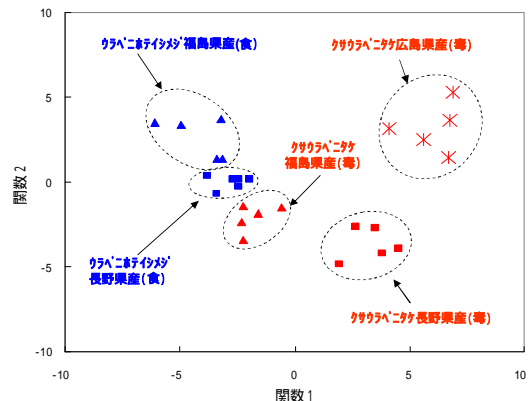


図 - 2 毒キノコと食用キノコの判別結果

今回の結果から、毒キノコ-食用キノコの産地間の判別も可能であることが判明した。

4) 放射線照射ニンニクの検知

試験には平成 23 年に愛知県岡崎市内で生

産されたホワイト六片 1.5kg を愛知県岡崎市額田町栄濃センターより入手。その一部のニンニクに、日本原子力研究機構（栃木）にて Co-60 線 150 Gy を照射し放射線照射処理ニンニク群とした。比較として熱処理（50、6 時間）による芽止めニンニク、及び、未処理ニンニクの 3 群（各群 8 球）で試験した。各試料は 93 日の室温保存期間中、2 で 1 ヶ月間保存することで発芽を促した。結果を図 - 3 に示した。

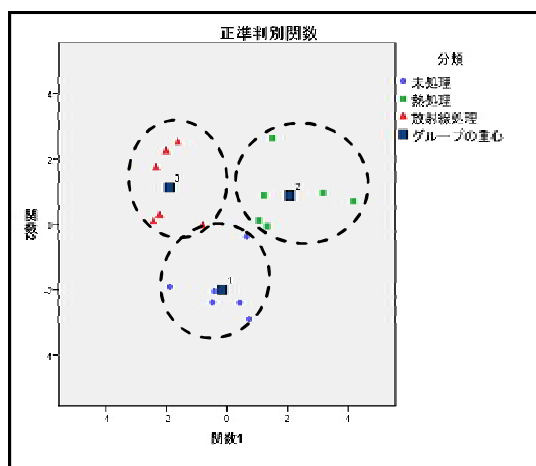


図 - 3 放射線照射ニンニクの検知結果

以上の結果より、今回使用した放射線照射ニンニクにおいて放射線照射食品検知に本法が有効であることが示唆された。

4. 研究成果

今回の研究課題で、以下の成果が得られた。

- 1) キャベツや米、キノコなど多くの食材に共通のグリコシダーゼが含まれていることを確認した。さらに、96 穴プレート内で蛍光酵素基質と試料抽出液を処理し、生成する蛍光強度をリーダーで読み取ることで、8 種類のグリコシダーゼ活性値の一斉分析法を確立した。また、これら値を用いたプロファイリング/多変量解析法を樹立した。
- 2) 同法を用いることでキャベツ 6 品種が一度に鑑別できた。
- 3) 米の産地鑑別試験結果から、産地間の距離が離れると、酵素活性値プロファイルに差が生じることが判明した。
- 4) 食用キノコと誤食しやすい毒キノコの判別ができた。
- 5) 放射線照射ニンニクと非放射線照射ニンニクの判別ができた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shigeyuki Oguri, Ai Nakaoka, Yasuko Amano, Yukari Ito

“Application of glycosidase activity as a marker for characterizing and identifying vegetables”

Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 25 (2012) p39-46. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

小栗重行、天野靖子、中岡愛

「野菜鑑別法を目的とした酵素プロファイリング法の開発」日本分析化学会第 58 年会（2009 年 9 月、北海道大学）

小栗重行、多田真悠子、中岡愛

「酵素プロファイリング法/ケモメトリックスによる米品種鑑別の試み」日本分析化学会第 59 年会（2010 年 9 月、東北大学）

小栗重行、多田真悠子、大澤真由美、大賀祥治

「グリコシダーゼ活性プロファイリング法による毒キノコ鑑別法の開発」日本薬学会第 131 年会（2011 年 3 月、静岡）

小栗重行、多田真悠子、中岡愛

「グリコシダーゼ活性プロファイルに基づくバイオメトリクス技術を利用した毒キノコと米（コシヒカリ）の産地鑑別」日本分析化学会第 60 年会（2011 年 9 月、名古屋大学）

小栗重行、本間美希、安形朋美、溝崎久美子、菊地正博、小林泰彦

「グリコシダーゼ活性プロファイリング法による放射線照射ニンニク検知に関する検討」日本薬学会第 132 年会（2012 年 3 月、北海道大学）

〔その他〕(6 件)

ホームページ等

「野菜鑑別法を目的とした酵素プロファイリング法の開発」が日本分析化学会第 58 年会・展望とトピックスに採択

<http://www.jsac.or.jp/tenbou/TT58/p7.pdf>

「グリコシダーゼ活性プロファイリング法による毒キノコ鑑別法の開発」が日本薬学会第 131 年会はハイライト講演に採択

<http://nenkai.pharm.or.jp/131abst/30P-0794.pdf#search='小栗重行 グリコシダーゼ活性プロファイリング法による毒キノコ鑑別法の開発'>

「酵素の測定による毒キノコの識別とコメの産地判別」が日本分析化学会第 60 年会の「展望とトピックス」に採択

<http://www.jsac.or.jp/tenbou/TTN60/p4.pdf>

新聞掲載等

「酵素活性を利用 野菜の品種鑑別」日本工業日報 2011年9月16日付で掲載
「酵素で毒キノコ識別 コメの産地判別も食品表示に応用期待 愛知学泉大学」日本工業日報 2011年9月14日付で掲載
「食用キノコとよく似た毒キノコを酵素で識別 産地間の判別も可能に 愛知学泉」東京科学新聞 2011年10月7日付で掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小栗重行 (OGURI SHIGEYUKI)
愛知学泉大学家政学部家政学科・教授
研究者番号：20247597

(2) 研究分担者

溝崎久美子 (MIZOZAKI KUMIKO)

研究者番号：50410593

(3) 連携研究者

()