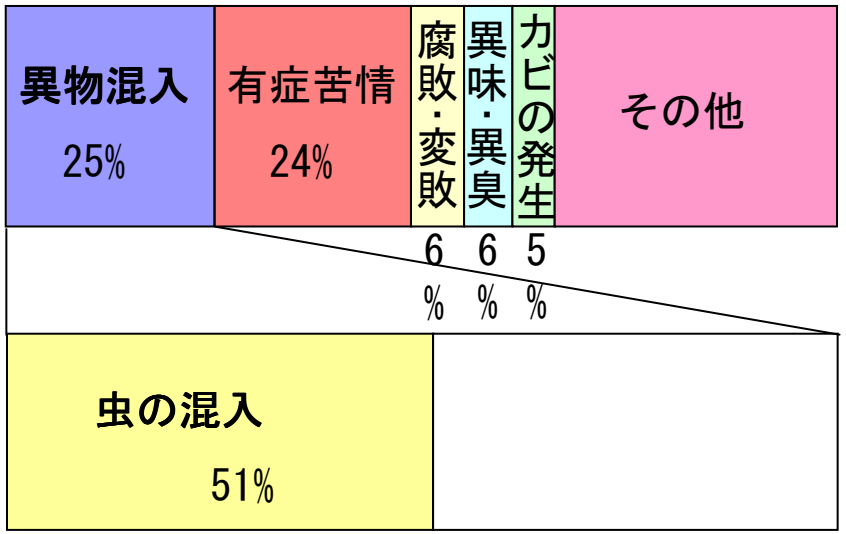
CD(円二色性分散計)を用いた昆虫混入時期推定法

日本分光株式会社

飲料水への虫混入に対する飲料メーカーの対応

食品の苦情の中で、異物混入に対するものが1995年現在全体の25%となっている。その中で、原因物質として虫の混入に対する苦情が約半数を占めている。品質保証管理では、この苦情対応のため、虫の混入時期の特定が重要となっている。

食品への苦情原因（1995年）

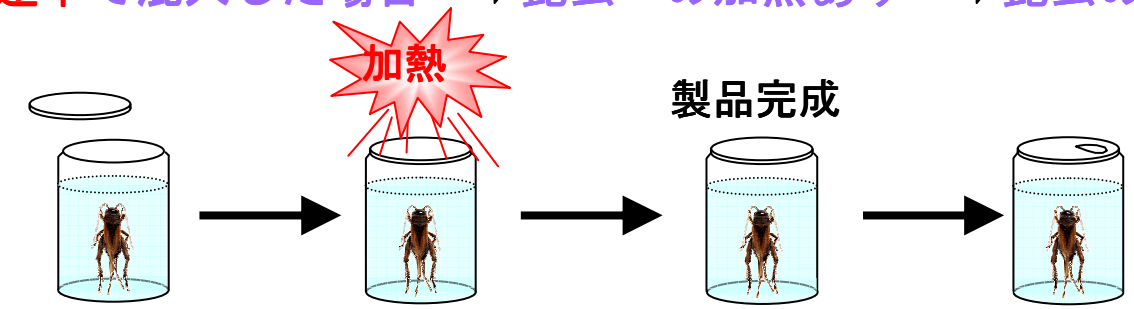


「食品衛生関係苦情処理集計表」より

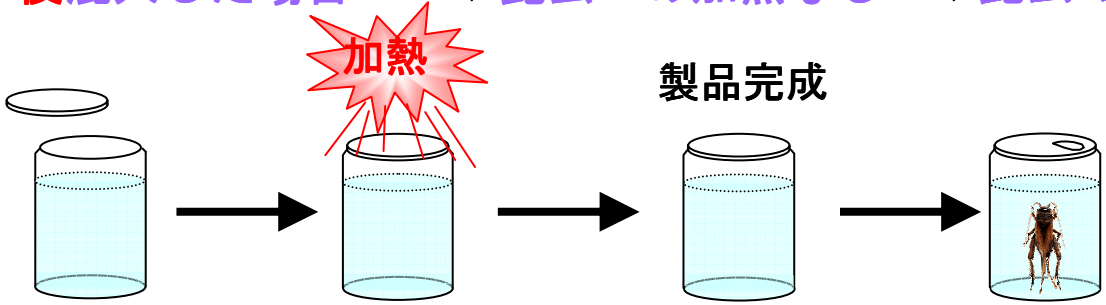
CDを用いる新たな解決法とは？

飲料水は殺菌のため製造過程の最終段階で加熱処理される。その加熱履歴を、CDを用いて昆虫のタンパク質の変性の有無を確認することにより混入時期を鑑定する方法である。

製造過程の途中で混入した場合 ➡ 昆虫への加熱あり ➡ 昆虫のタンパク質；変性



製造過程終了後混入した場合 ➡ 昆虫への加熱なし ➡ 昆虫のタンパク質；未変性



タンパク質の変性について

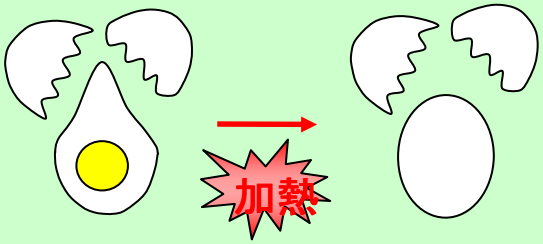
タンパク質の変性とは？

タンパク質は熱、溶液のpH 、変性剤により、一次構造は変化しないが、**二次構造以上の高次構造が変化して**活性を失うこと。

身近で起こるタンパク質変性の例は？

＊生卵を加熱するとゆで卵になる。

卵のタンパク質である卵白アルブミンなどの変性凝固による作用。



CDは、タンパク質の二次構造の情報が得られる。従って、CDスペクトルの違いによって変性の有無が判断できる、すなわち加熱前後のどちらで混入したか判断できる。

昆虫の体のタンパク質

昆虫の体は様々なタンパク質で構成されており、二次構造もそれぞれ異なる。そのため、ある特定のタンパク質をターゲットとして用いる必要がある。そのターゲットとしては豊富に含まれており、広範囲の昆虫に含まれているタンパク質が望ましい。この手法ではMyosinをターゲットタンパク質としている。

Myosinとは？

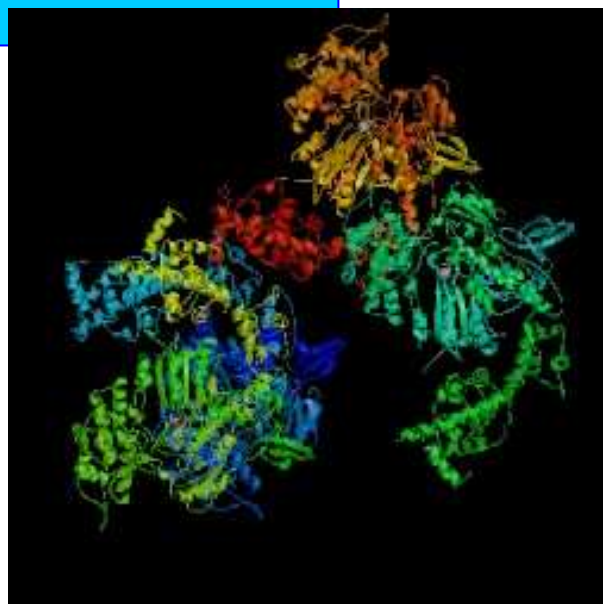
◆筋肉の主な構造タンパク質

◆骨格筋では筋原繊維の全タンパク質の60%を占める

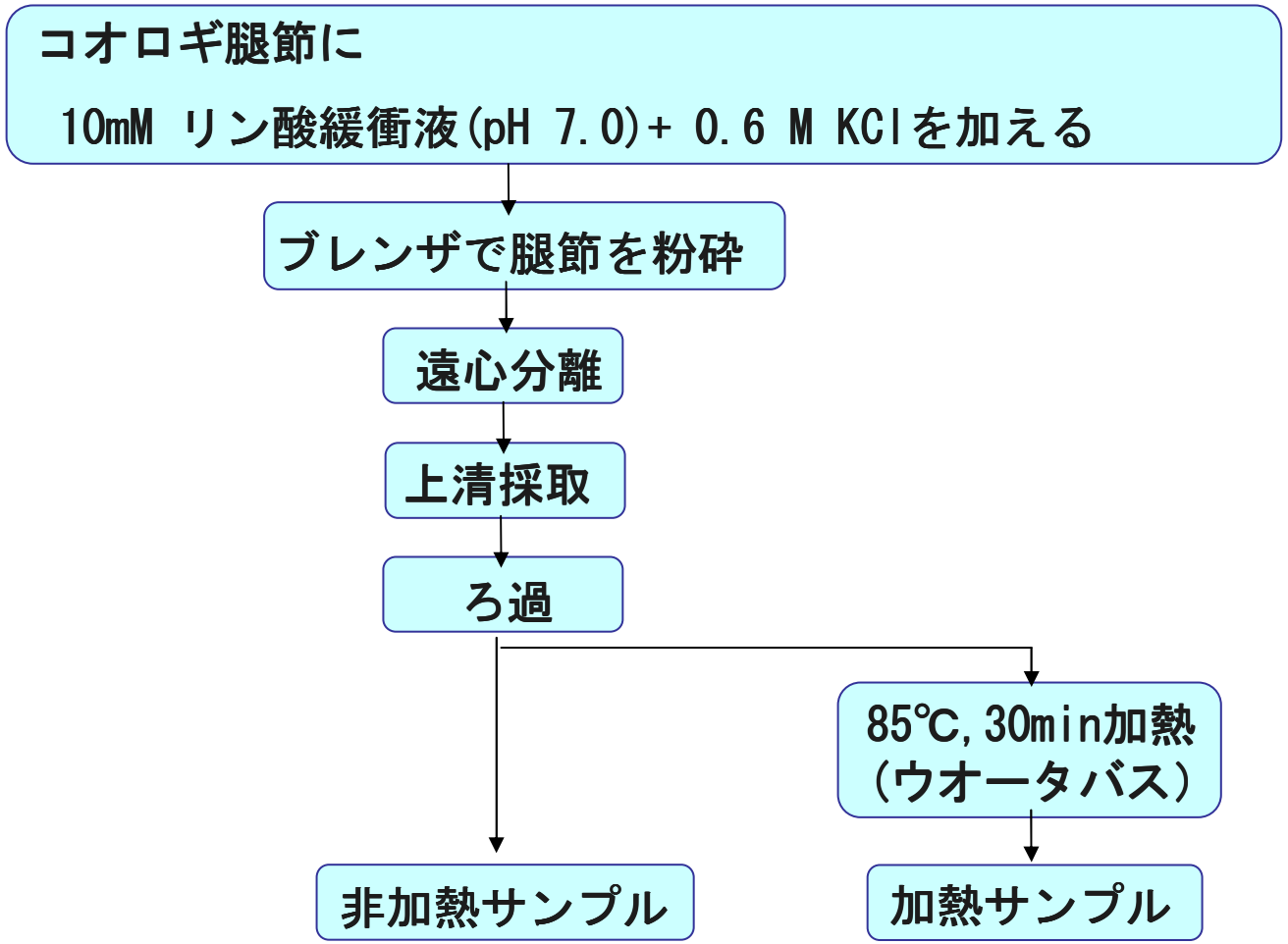
◆ α-Helixリッチなタンパク質

◆高塩濃度で可溶化する数少ないタンパク質である。

Myosinの構造

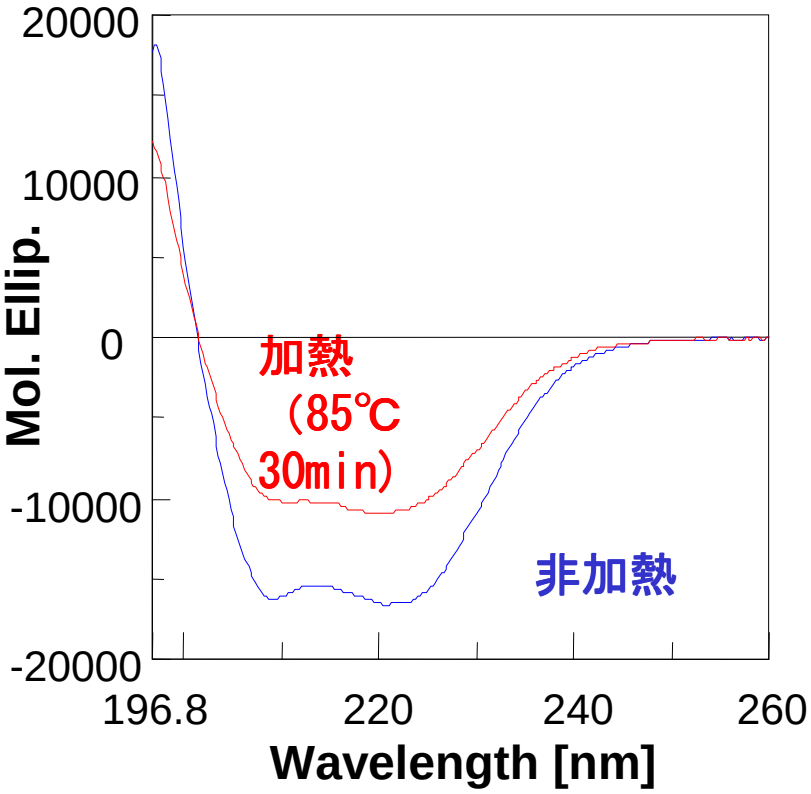


サンプル調整方法

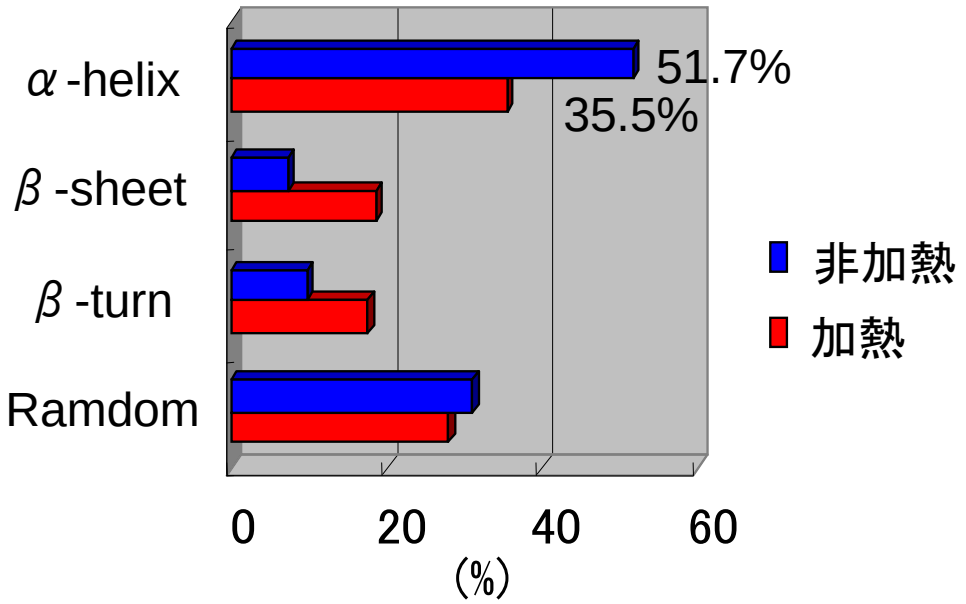

コオロギ腿節に
10mM リン酸緩衝液(pH 7.0)+ 0.6 M KClを加える
ブレンザで腿節を粉砕
遠心分離
上清採取
ろ過
85℃, 30min加熱
（ウオータバス）
非加熱サンプル
加熱サンプル

コオロギ腿節の磨砕抽出物の CDスペクトルおよび二次構造解析結果

CDスペクトル

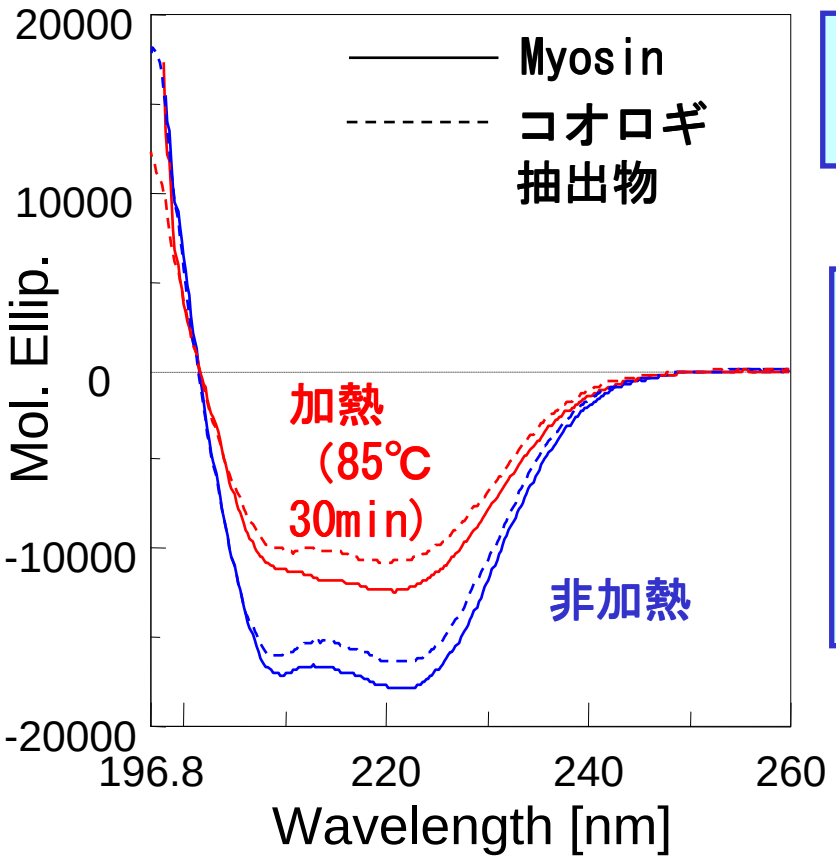


タンパク質二次構造解析結果



加熱前後でCDスペクトルが変化し、
二次構造の割合も変化する。

コオロギ腿節の磨砕抽出物および MyosinのCDスペクトル



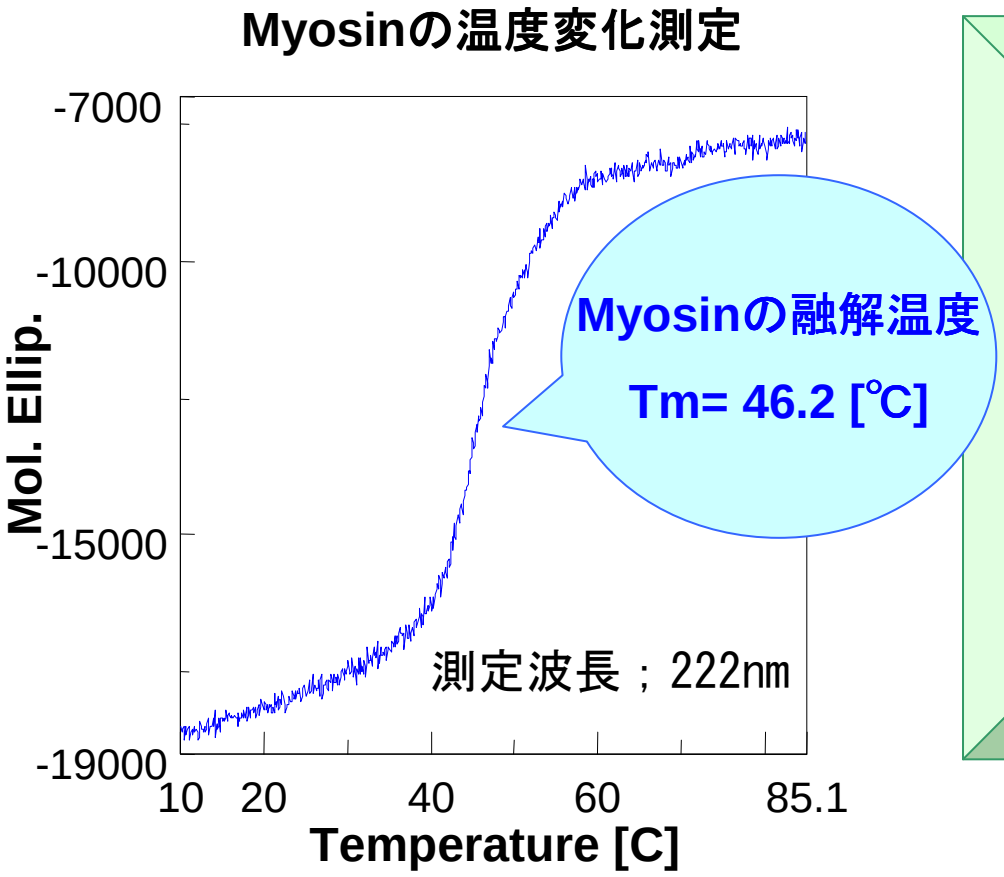
コオロギ腿節の摩砕抽出物と市販のMyosinのCDスペクトルはよく一致する

＊コオロギ腿節の摩砕抽出物中にはMyosinが多く存在する。

＊Myosinの構造は、広範囲の生物種でほとんど変わらない。

広範囲な昆虫に適応できる。

Myosinの温度変化測定



46.2℃以上の温度で
加熱されていれば推定可能。

適応温度範囲が広い。

まとめ

1, CDを測定することで、飲料水への昆虫混入時期を推定できる。

2, タンパク質二次構造解析プログラムと組み合わせることで
より定量的に扱うことが出来る。

3, コオロギの摩砕抽出物にはミオシンが多く含まれている。

4, コオロギのミオシンと市販のミオシンの構造はほとんど変わらない。

↓

広範囲の昆虫種属に対して適応できる。

5, ミオシンの融解温度は46℃前後である。これ以上の温度で
加熱処理した製品に適応できる。

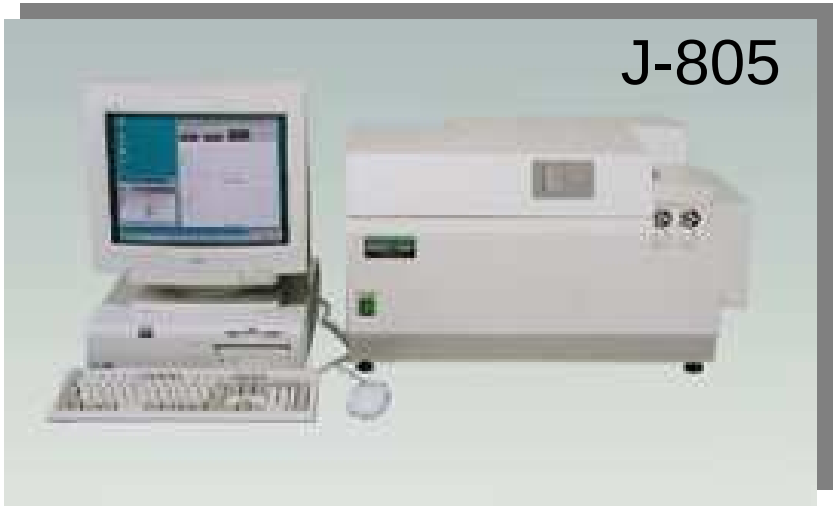
昆虫混入時期推定システムの概略

昆虫混入時期推定推奨システム

J-805型　円二色性分散計　　1式

角型石英セル標準級（1mm）　　1ヶ

専用ソフト（必要に応じて）



■ その他必要なもの

◆ブレンザーもしくはホモジナイザー

◆遠心分離機（必要回転数10000rpm）

◆シリンジフィルタ（2 *u*m）

■ その他必要な操作

◆タンパク質の定量（UV法が簡便）

既存の方法との比較

現在、カタラーゼ活性テスト、アセチルコリンエステラーゼ活性テストという酵素活性測定法が広く使われている。

	✧CDスペクトル法	✧酵素活性測定法
原理	加熱による タンパク質の変性	加熱による 酵素の失活
測定の容易さ	○	○
広範囲の昆虫 種属への適応	○	△
死後混入 ケースへの適応	○	×
適応できる製品の多さ （長時間浸漬した場合）	○	△