

筋漿タンパク質等電点電気泳動ゲルのヘムタンパク質染色 による豚肉中の混入異種肉の検出

誌名	日本養豚学会誌 = The Japanese journal of swine science
ISSN	0913882X
巻/号	303
掲載ページ	p. 215-219
発行年月	1993年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



筋漿タンパク質等電点電気泳動ゲルの ヘムタンパク質染色による豚肉中の 混入異種肉の検出

松岡昭善・高橋 強・山中良忠

東京農業大学農学部畜産物利用学研究室, 世田谷区 156

(1993年2月17日受付)

要約 既報¹⁾のポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法による肉種鑑別において, *o*-toluidine を基質として用いた Peroxidase 反応による Heme protein 染色 (T-Hp 染色) が肉種の識別に有効であることを明らかにしたが, 本実験においては SHAW and PRASAD²⁾ の 3-amino-9-ethylcarbazole を基質とする Peroxidase 反応を用いて Heme protein 染色 (C-Hp 染色) を行い, 牛, 馬, 豚, 山羊および緬羊肉の識別並びに牛豚合挽肉を対象として, 豚肉に混入された牛肉および牛肉の代替肉として想定される, 馬および緬羊肉の識別可能な最低混入率について比較検討した。結果は次のとおりである。

1) C-Hp 染色は染色性が強く, T-Hp 染色¹⁾と比較してバンドの数が若干少ない傾向にあったが, ほぼ類似した分離パターンを示し, 馬, 牛, 緬羊・山羊, 豚の4群に識別することが可能であった。

2) 豚肉に牛肉を混入した場合の検出可能な最低混入率は1%であったが, 牛肉に豚肉を混入した場合は, 混入率が1%になると豚固有のバンドが不明瞭となり, 識別が困難となった。豚肉に馬肉を混入した場合は, 馬肉の混入率が1%で馬肉固有のバンドが認められた。馬肉に豚肉を混入した場合は, 豚肉の混入率が1%になると豚肉固有のバンドが認められるようになった。豚肉に緬羊肉を混入した場合には, 緬羊肉の1%混入で識別可能となった。緬羊肉に豚肉を混入した場合も1~5%の混入率で識別可能であった。以上の結果は既報¹⁾の T-Hp 染色とほぼ同等の結果であった。

緒 言

日本における1991年の一世帯当りの食肉購入量は, 牛肉 11,347 g (36,778 円), 豚肉 16,841 g (24,137 円), 鶏肉 12,857 g (12,575 円) で, 豚肉が最も多く, 次いで鶏肉, 牛肉の順で, 馬肉, 緬羊肉および山羊肉は統計量として表示されていない。支出金額では牛肉が最も多く, 次いで豚肉, 鶏肉の順となっている³⁾が, これは牛肉が高価格であることによる。

食肉はブロック肉, スライス肉, 挽肉など様々な形態で販売されている。従って, 消費者は外観から肉種を識

別することは困難であり, 販売店の表示を信頼する以外にない。このようなことから, 過去には肉種を詐称したり, 異種肉を混入した肉が販売され, 社会問題になったこともあった。著者らは牛, 馬, 豚, 山羊および緬羊肉の筋漿タンパク質をポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法 (PAG-IEF) を用いて分画を行い, 肉種の識別に有効なタンパク質を検索し, 基質に *o*-toluidine (bendizine 誘導体) を用いた Peroxidase (Px) 反応による Heme protein (Hp) 染色 (T-Hp 染色) が短時間で染色可能であり, 染色性が強く, 牛, 馬, 山羊・緬羊, 豚, (同一下線の畜種は識別できないことを示

Analysis of adulterant meat species in raw pork samples by heme protein staining of isoelectric focusing gels

A. MATSUOKA, T. TAKAHASHI and Y. YAMANAKA

Laboratory of Utilization of Animal Products, Department of Zootechnical Science, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156.

す)の識別が可能であることを明らかにした。さらには牛、馬、豚および緬羊の4畜種を用い、これらの2畜種を種々の比率で混入した場合の検出可能な最低混入率が、いずれの組合せの場合にも1~5%であったことから、Hpは肉種鑑別に有効なタンパク質の一つであると考えられた¹⁾。

一方、Px反応の基質は bendizine 誘導体の他に fluorene 誘導体、naphthol 誘導体、carbazol 誘導体等が用いられているが、本実験では carbazol 誘導体の 3-amino-9-ethylcarbazole を基質とする SHAW and PRASAD²⁾の方法(C-Hp染色)を用い、上記5畜種の識別並びにハンバーグなどの材料として多く用いられている牛豚合挽肉を対象として、豚肉に牛肉および牛肉の代替え肉として想定される、馬および緬羊肉をそれぞれ種々の比率で混合し、検出可能な最低混入率について検討を行い、既報¹⁾の T-Hp 染色と比較した。

実験方法

1. 材料

牛および馬は食肉専門業者より、豚および緬羊は本学で飼育されたものをと殺解体し、実験に供した。

2. 方法

1) 電気泳動用肉汁の調製: 前記家畜肉の脂肪組織と結合組織をできるだけ除去し、ナイフで細切した後、肉と同量の冷却した生理食塩水を加え、水中で冷却しながら、ヒスコトロン(日音医科機製)を用いてホモゲナイズした。これを水中に30分放置して筋漿タンパク質を抽出し、次いで12,000 RPMで30分間冷却遠心分離を行い、上澄みを東洋濾紙 No. 5Cで濾過し、泳動用肉汁とした。豚肉に牛、馬並びに緬羊肉を混入した混合肉

の肉汁の調製は、豚肉と他の肉を0/100, 1/99, 5/95, 10/90, 25/75, 75/25, 90/10, 95/5, 99/1, 100/0の各種の比率で混合し、上記と同様にして調製した。

2) PAG-IEF: 230×120×1mm厚のゲル(ゲル濃度:5%, Pharmalyte:3%, pH range:5.0~8.0)を用い、陽極側ゲル端から15mm内側に3×10mmの濾紙(東洋濾紙 No. 514 A)を7mm間隔で張り付け、これに前記肉汁を5μlずつ添加し、Pharmacia製の電気泳動槽(Multiphor II)と電源(MultiDrive XL)を用いて20Wの定電力で1.5時間泳動を行った後、SHAW and PRASADのPx染色法²⁾を用いてHpの染色を行った(C-Hp染色)。すなわち、50mgの3-amino-9-ethylcarbazoleを5mlのdimethylformamideに溶解し、次いで0.05M sodium acetate(pH 5.0)を92.5ml, 0.1M CaCl₂を2ml, 3% H₂O₂を0.5ml加えて十分混合後、この反応液にゲルを浸し、冷室にて赤褐色のバンドが現れるまで反応させた。

結果および考察

牛、馬、豚、山羊および緬羊肉のT-Hp染色およびC-Hp染色によるHpの泳動像は図1および2のとおりである。

C-Hp染色は染色性が強く、各家畜の等電点を比較すると馬肉が最も高く、次いで牛肉で、山羊肉と緬羊肉は差がなく、豚肉が最も低かった。これにより馬肉、牛肉、山羊肉・緬羊肉、豚肉の4群に識別することが可能であり、豚肉と他の4家畜肉では等電点にかなりの差があることから識別は容易であった。T-Hp染色¹⁾と比較すると染色性は若干劣り、染色性の弱いマイナーバンドが少なくなる傾向が認められたが、ほぼ類似した染色パ

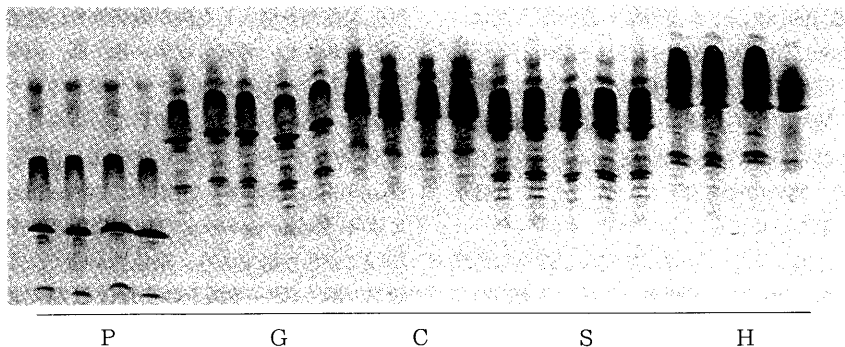


図1. *o*-toluidine を基質とした Heme protein 染色による肉種の識別

Fig. 1. Isoelectric focusing gel pH range 5-8, cathod at top; stained for heme protein in *o*-toluidine solution. Sample identification: P, pig; G, goat; C, cattle; S, sheep; H, horse.

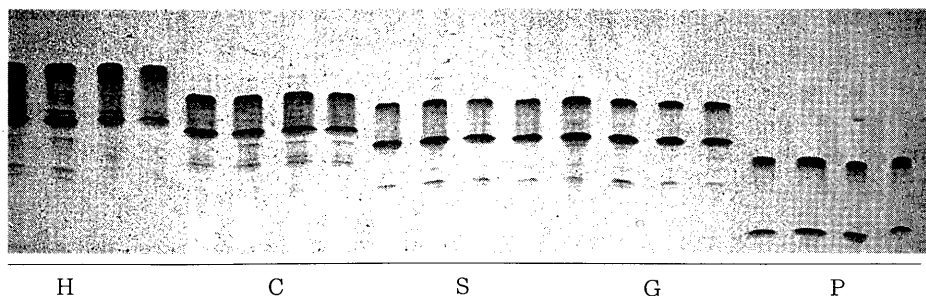
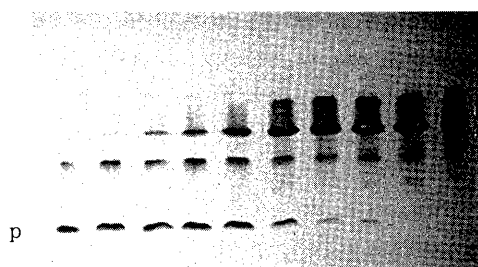


図 2. 3-amino-9-ethylcarbazole を基質とした Heme protein 染色による肉種の識別

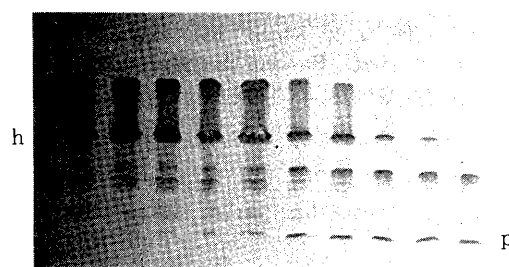
Fig. 2. Isoelectric focusing gel pH range 5-8, cathod at top; stained for heme protein in 3-amino-9-ethylcarbazole solution. Sample identification: P, pig; G, goat; C, cattle; S, sheep; H, horse.



C	0	1	5	10	25	75	90	95	99	100
P	100	99	95	90	75	25	10	5	1	0

図 3. 豚肉に混入した牛肉の検出可能な混入率

Fig. 3. Isoelectric focusing gel pH range 5-8, cathod at top; stained for heme protein in 3-amino-9-ethylcarbazole solution. The proportion of the pig (P) and cattle (C) extracts are shown. Band p is characteristic of pig, band c of cattle.



H	100	99	95	90	75	25	10	5	1	0
P	0	1	5	10	25	75	90	95	99	100

図 4. 豚肉に混入した馬肉の検出可能な混入率

Fig. 4. Isoelectric focusing gel pH range 5-8, cathod at top; stained for heme protein in 3-amino-9-ethylcarbazole solution. The proportion of the pig (P) and horse (H) extracts are shown. Band p is characteristic of pig, band h of horse.

ターンを示し、既報¹⁾の T-Hp 染色と遜色ないものと思われた。

豚肉に混入された異種肉の検出可能な最低混入率については、豚肉に牛肉を混入した場合は、図3に示すとおり、1%の混入で牛肉固有のバンド(c)が認められるようになった。反対に牛肉に豚肉を混入した場合は、豚肉混入率1%で豚肉固有のバンド(p)が不明瞭になった。これらの検出可能な最低混入率は、既報¹⁾の T-Hp 染色とほぼ同等であった。

豚肉に馬肉を混入した場合は、図4に示すとおり、馬肉の混入率が1%で馬肉固有のバンド(h)が認められるようになり、既報¹⁾の T-Hp 染色と検出可能な最低混入率は同等であった。馬肉に豚肉を混入した場合は、

豚肉の混入率が1%になっても豚肉固有のバンド(p)が認められた。

豚肉に緬羊肉を混入した場合は、図5に示すとおり、緬羊肉の混入率が1%で緬羊肉固有のバンド(s)が認められるようになり、既報の T-Hp 染色と同等の検出可能な最低混入率であった。しかし、緬羊肉と山羊肉は本実験の方法では識別困難であることから、山羊肉の混入も想定しなければならない。一方、緬羊肉に豚肉を混入した場合は、1%の混入率でも豚肉固有のバンド(p)が希薄であるものの認められ、1~5%の混入率で検出可能と考えられた。

以上の結果から、本実験の C-Hp 染色は既報¹⁾の T-Hp 染色と同様に、近縁種である山羊と緬羊の識別は困

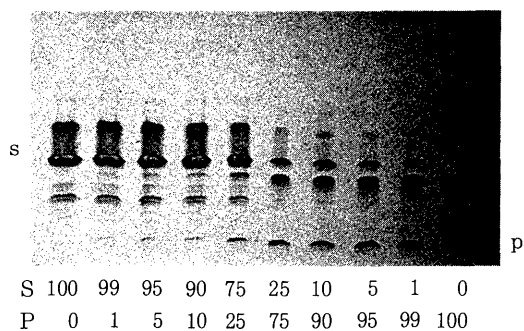


図 5. 豚肉に混入した緬羊肉の検出可能な混入率
 Fig. 5. Isoelectric focusing gel pH range 5-8, cathod at top; stained for heme protein in 3-amino-9-ethylcarbazole solution. The proportion of the pig (P) and sheep (S) extracts are shown. Band p is characteristic of pig, band s of sheep.

難であったが、馬、牛、山羊・緬羊、豚の5群に識別することが可能であること、混入された異種肉の識別可能な最低混入率においても、既報¹⁾の T-Hp 染色と遜色なく、しかも、識別の妨害となる染色性の弱いマイナーバンドが少なく、識別しやすいことを認めた。

文 献

- 1) 松岡昭善・天野 卓・高橋 強・山中良忠：日畜会報, **63**, 82-91, 1992.
- 2) SHAW, C.R. and R. PRASAD: Biochem. Genet., **4**, 297-320, 1970.
- 3) ミート・ジャーナル, **30**, 63, 1993.
- 4) 松岡美代子・宮地隆興：電気泳動法のすべて, 221, 医歯薬出版, 東京, 1987.

Analysis of Adultrant Meat Species in Raw Pork Samples by Heme Protein Staining of Isoelectric Focusing Gels

Akiyoshi MATSUOKA, Tsuyoshi TAKAHASHI
and Yoshitada YAMANAKA

Laboratory of Utilization of Animal Products, Department
of Zootechnical Science, Tokyo University of
Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156

In the previous paper, authors made clear by polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAG-IEF) that the specific staining for heme protein by peroxidase reaction, in which *o*-tolidine—one of the benzidine derivatives—was used as substrate, was available for meat species identification (T-Hp method)¹⁾. Fluorene, naphthol and carbazole derivatives are used for peroxidase reaction as the substrates besides benzidine derivatives. In this paper, the peroxidase reaction by SHAW and PRASAD²⁾, in which 3-amino-9-ethylcarbazole was used as substrate, was applied to stain for heme protein on isoelectric focusing gels (C-Hp method) and the availability for identification of raw cattle, horse, pig, goat and sheep meats and the minimum level of detection in mixtures of pig meat with cattle, horse and sheep meat were compared with T-Hp method in previous paper.

The supernatants from fresh meats and binary mixture meats were separated by PAG-IEF using 1.0 mm thick PAG plates (120 × 230 mm) containing 3.0% ampholytes in the pH range 5.0 ~ 8.0. Gels were stained for heme protein by C-Hp method.

The results obtained in this experiments showed that C-Hp method was able to distinguish between fresh meat from cattle, horse and pig, however, goat and sheep meat could not be differentiated by this method. In detecting different meat species in binary mixture meats of pig with cattle, horse and sheep, approximately 1 to 5% of the contaminating species could be detected by C-Hp method, respectively.

From above results, it was appeared that the heme protein staining of isoelectric focusing gels by C-Hp method for identification of meat species was not at all inferior to T-Hp method.

Jpn. J. Swine Science, **30**, 3 : 215-219

Key words : heme protein, peroxidase reaction, binary mixture meat, PAG-IEF, meat species