

[報文]

X-band ESR を用いた殺菌胡椒のラジカルの評価

松浦昌彰¹⁾, 小川聡子¹⁾, 大和田滋²⁾, 鶴飼光子¹⁾

¹⁾ 北海道教育大学 (〒 040-8567 北海道函館市八幡町 1-2)

²⁾ 聖マリアンナ医科大学 (〒 216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1)

X-band ESR study on Evaluation of radicals induced in pasteurized pepper

Masaaki MATSUURA¹⁾, Satoko OGAWA¹⁾, Shigeru OOWADA²⁾ and Mitsuko UKAI¹⁾

¹⁾Hokkaido University of Education, 1-2 Hachiman-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8567, Japan

²⁾St. Marianna University, 2-16-1 Kanagawa 216-8511, Japan

Summary

The radical properties of pasteurized pepper were investigated by means of X-band ESR spectroscopy. Pasteurization process was done by irradiation or steam. There were three radicals in the specimens before and after pasteurization. Upon irradiation a new radical was found. ESR peak intensity of specimen before and after parturition with steam was almost same level. Peak intensity of radiated pepper showed almost 4 times as compare with that of non treated pepper. Radical activity of the specimens after pasteurization showed almost same value. We concluded that radicals were induced by irradiation. But the radical activity was not changed before and after pasteurization.

Key words: cold pasteurization, ESR, radiation, steam, radical

はじめに

原子力委員会は報告書¹⁾の中で照射食品の有用性を明らかにし、食品照射に関する今後の取組みに関する考え方を示している。検知技術については、精度向上や高度化に向けた研究開発を進めることとしている。

われわれはすでに検知技術について電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて検討を行っているが、ESR は照射誘導ラジカルを直接計測できる技術であり、照射履歴の定量も可能であることを報告した^{2),3)}。

胡椒の殺菌は日本では放射線を用いることは許可されていない。蒸気殺菌が行われている。蒸気殺菌は食品の温度上昇を伴うので胡椒の風味を損なうことから、世界的に放射線殺菌が導入されている。ガ

ンマ殺菌処理により食品の温度上昇はほとんどないため、照射処理法は低温殺菌 (Cold Pasteurization) 処理とも称される。将来、日本でもガンマ殺菌胡椒の流通が予想される。

本研究では、照射処理や蒸気処理によって殺菌された胡椒に誘導されるラジカルを ESR により計測し、殺菌処理方法の違いによりラジカル産生に差が生ずるか否かについて検討した。また、殺菌処理した胡椒のラジカル活性について ESR スピントラップ法⁴⁾を用いて評価した。

実験方法

1. 試料

厳密に胡椒中のラジカルを計測するため、インド Kerara 州 Idukki 地方原産の胡椒粒を、常法により

蒸気殺菌したものを試料とした。入手後直ちに冷蔵保存し、実験に供した。照射処理はガンマ線を用い、50kGy とし、独立行政法人日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所にて実施した。

2. ESR 測定³⁾

ESR 測定は、ESR 分光法(JES-FE1XG および JES-TE300, 日本電子製)を用いて行った。測定に用いたマイクロ波の周波数は X バンド (9.3GHz) である。ESR 測定の検出温度は、すべて室温(20)である。

3. ラジカルの活性評価

3.1 試料調製法

試料を 5g 秤取した。乳鉢で砕いた後に超純水(WAKO 製 Ultra pure Water for LC/MS LC/MS 用)および 80%エタノール(WAKO 製, 99.5%, 試薬一級)を 30ml 加えた。その後, 24 時間冷蔵庫静置して抽出した。ろ紙 (No.2, 125mm, Toyo Roshi kaisha, Ltd, japan) を使い, 自然ろ過し, 50ml にメスアップした。

3.2 ラジカル活性評価法

ラジカル活性は、ヒポキサンチン (HPX), キサンチンオキシダーゼ (XOD) によるスーパーオキシサイド発生系と ESR スピントラップ法を用いた。スピントラップ剤として CYPMPO (Fig. 1)⁵⁾を用いた。標準ラジカルとして Supper Oxide Dismutase (SOD) を用い, スピニアダクトの活性は SOD 様活性 (Super Oxide mimicking activity, SODMA) として評価⁵⁾した。

スーパーオキシサイドのシグナル強度は、スピニアダクトの ESR 信号の低磁場から 4 番目の信号の信号強度 (Fig. 2) を用いた。

3.2.1 試薬の調製法

HPX (WAKO 製 MPB, 102030) 4mM の溶液は 20ml 容試験管に 0.005mg をはかりとり, 10.6ml の超純水を入れて調製した。混ざりにくいので, 30 分以上振った。

ジエチレントリアシン五酢酸 (DTPA, WAKO 製 MPB, 102030) の 0.66mM 溶液は 15ml 容試験管に 0.0025mg をはかりとり, 9.6ml の超純水を入れて調製した。

XOD (Roche 製 Xanthine Oxidase 20U/909ml, 110434, From Cow milk) の調製方法は, 15ml 容試

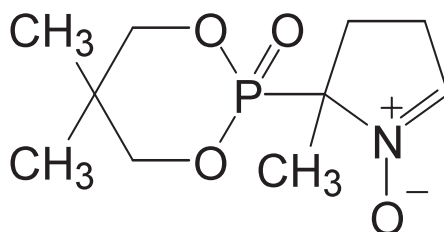


Fig. 1 Structure of spin trap CYPMPO,5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolidine N-oxide.

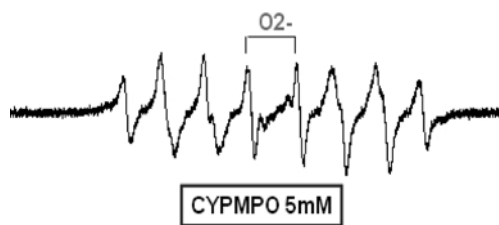


Fig. 2 An ESR spectrum of Spin adduct.

験管に 4.3ml のリン酸バッファーを 1000 μ l 用のピペットマンではかりとり, 試験管に入れ, そこに, XOD100 μ l を 100 μ l 用のピペットマンではかりとり, 試験管に入れて溶かした。これで 0.5U/ml になる。XOD は失活するので, ESR 信号強度が約 3000 になるように XOD の濃度を調整した。

標準ラジカルは SOD (Sigma/Aldrich, S-2515, 3000 unit From Bovine Erythrocytes) 3000U/ml の原液を超純水 3ml に溶かして 1000U/ml のワーキングソリューションを作成した。この 1000 U/ml のワーキングソリューションを各濃度(10 U/ml ~ 0.3 U/ml) に希釈し検量線を作成した。

3.2.2 スピントラップ法⁵⁾

HPX50 μ l, DTPA30 μ l, CYPMPO20 μ l, 超純水 50 μ l を栄研チューブにいれて混ぜ, 最後に XOD50 μ l を入れ, 7 分後に ESR で測定した。自動測定で遅延時間を 7 分にセットし, XOD を混ぜてから 7 分後に測定するように設定した。サンプルの代わりに超純水でブランクを測定した。スピニアダクトの ESR 信号を正確に計測するために, 測定ポイントや線幅の調整をした。

ESR の本測定条件は Frequency 9.2GHz, Power 6.00mW, Center Field 336.2mT, Sweep Width(掃引磁

場) 5mT, Sweep Time (掃引時間) 2min, Modulation Width (変調磁場) 0.1mT, Time Constant (磁場乗数) 0.1sec であった。

ESR 信号解析ソフトは WIN-RAD (ラジカルリサーチ製) の自動測定を使い、遅延時間 7 分後とし、0.2 の範囲だけを測定した。Date Point 400 (初期値は 4096), Start Point 1600 (初期値は 0) である。

3.2.3 検量線の作成

SOD の検量線作成における SOD 濃度は 0.3 U/ml, 0.65 U/ml, 1.25 U/ml, 2.5 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml であった。Fig. 3 に示すように、添加する SOD 濃度が増すに従い、スピアダクトの ESR 信号強度は減少した。スピアダクトの ESR 信号の減少率をとると、この減少率は SOD 濃度との間に Fig. 4 に示すような比例関係があった。本実験条件では、SOD の濃度が 5 U/ml までの間は定量性を有することがわかった。

実験結果および考察

1. 胡椒の ESR 信号

Fig. 5 に示すように、胡椒の ESR 信号は 3 種のラジカル信号を有した。すなわち $g=2$ の 1 本線と Mn^{2+} 由来の 6 本線、および $g=4$ の Fe^{3+} 由来の 1 本線である。

$g=2$ の 1 本線は有機フリーラジカル由来の信号である。蒸気殺菌処理の試料は、殺菌前の ESR 信号と本質的に全く同じであった。放射線殺菌処理の試料は Fig. 6 に示したように、 SiS_2 で示した新規のサイドピークを新たに観測した。

ESR 信号強度を Table 1 に示した。殺菌前の胡椒の有機フリーラジカルの ESR 信号強度は 26.0 であった。

有機フリーラジカルは、胡椒中の対電子を有する成分に由来すると考えられる。例えば、トコフェロールやアスコルビン酸、さらに香気成分などの生理活性の高い成分から産出するラジカルである。

蒸気殺菌処理試料の ESR 信号強度は 28.0 であった。これを粉末化した試料は 26.0 であった。蒸気殺菌処理によりラジカルの増加はないと考えられた。蒸気殺菌では、トコフェロールやアスコルビン酸などの生理活性成分の損傷は非常に少ない。

粉末化により酸素との接触面積が増えると、ラジカル成分が増し ESR 信号強度が高まる^{2),3)}が、本測

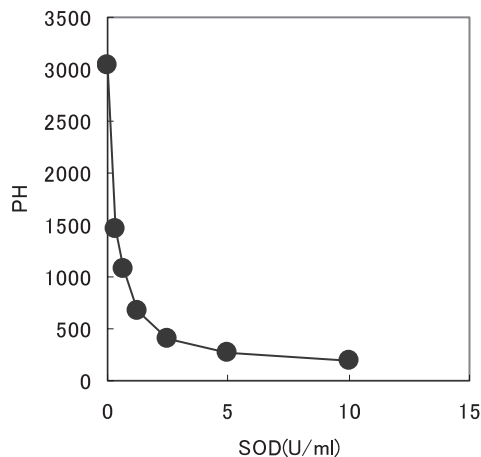


Fig. 3 ESR peak intensity of spin adduct versus Super Oxide Dismutase (SOD) Activity.

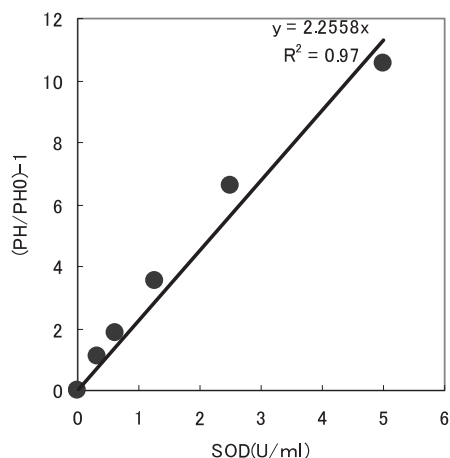


Fig. 4 Standard curve for evaluate the SODMA value of spin adduct.

定結果からみると、市販胡椒のような粉末化処理ではラジカル成分の顕著な増加はないと考えられる。

放射線殺菌試料では ESR 信号強度は 126.0 であった。殺菌前試料に比較して約 4 倍に増大した。これは著者らがすでに照射胡椒の ESR 計測で報告している結果^{2),3)}と同じであった。照射により誘導される有機フリーラジカルはカーボンセンタードラジカルと推定できる。X-band ESR 計測では有機フリーラジカルは一本線で観測されるので、ラジカル種を

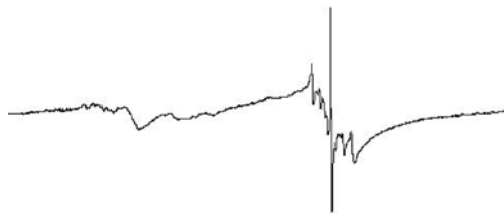


Fig. 5 An ESR spectrum of Pepper before pasteurization.

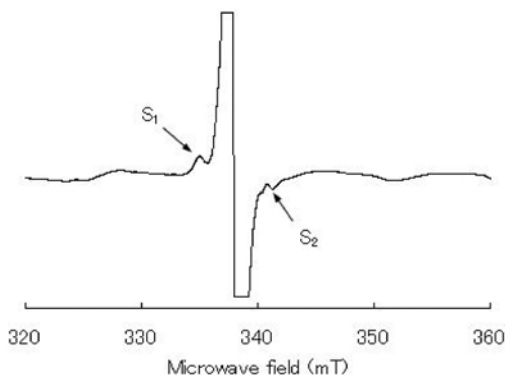


Fig. 6 An ESR spectrum of Pepper after the pasteurization with irradiation.

明らかにすることができない。W-band ESRのような高磁場での計測では一本線を分離させて観測できるので高磁場計測を要する。

2. 殺菌胡椒のラジカル活性

スピントラップ剤 CYPMPO を用い、安定なアダクトが得られた。これにより、再現性のある ESR 信号を観測することができた。SOD の定量範囲は 0.3 ~ 5U/ml であった。ラジカル活性を SODMA (U/g) として評価し、Table 2 に示した。胡椒のラジカル活性は 8.7U/mg、殺菌胡椒は 11 ~ 21U/mg であった。殺菌処理によってラジカル活性の顕著な増大はみられなかった。殺菌胡椒のラジカルは、照射処理により Fig. 3 で示したように ESR 信号強度が増加した。しかし、抽出物はスピントラップ法により評価すると、照射処理によりラジカル活性が増すことはなかった。

まとめ

X-band ESR を用いて殺菌胡椒のラジカルを評価

Table 1 ESR peak intensity of pepper radicals before and after pasteurization.

	Peak intensity of Radical (PH/Amp Gain)
Pepper (non-treated)	26.0
Pasteurized Pepper	
Streamed grain	28.0
Streamed powder	26.0
Irradiated powder	126.0

Table 2 Radical activity estimated as Super Oxide mimicking Activity (SODMA)

	SODMA (U/mg)
Pepper (non-treated)	8.7
Pasteurized Pepper	
Streamed grain	18.0
Streamed powder	21.0
Irradiated powder	11.0

した。殺菌方法は放射線照射処理と蒸気処理である。

殺菌前後での試料中のラジカル産出に差異はなく、いずれの試料にも 3 種類のラジカルが検出された。蒸気殺菌では、殺菌前と比較しラジカル由来の ESR 信号の強度はほぼ同じ値を示した。放射線殺菌では殺菌前に比較し、ラジカル由来の ESR 信号強度は約 4 倍に増加した。抽出物のラジカル活性は SODMA として評価すると、蒸気殺菌でも放射線殺菌でもほぼ同じ値を示した。

以上の結果から、殺菌処理によるラジカル産出は蒸気殺菌処理ではほとんどみられないことが明らかになった。照射殺菌処理によりラジカルは増加するものの、ラジカルの活性は殺菌処理前とほぼ同じであることがわかった。

謝 辞

本研究の一部は平成 18 年度(財)浦上食品・食文化振興財団研究助成金の支援を受けて行われたものである。

文 献

1) 原子力委員会食品照射専門部会：食品への放射

- 線照射について , 28-31 (2007)
- 2) Ukai M. et al.: Free Radicals in Irradiated Pepper; An Electron Spin Resonance Study, *Appl. Magn. Reson*, **24**, 1-11 (2003)
- 3) Ukai M. et al.: An ESR Protocol based on relaxation phenomena in irradiated foods, *Spectrochimica Acta.*, **63(4)**, 879-882 (2006)
- 4) Martin P. et al.: Antioxidant properties of tea

- investigated by ESR spectroscopy, *Biophysical Chemistry*, **106**, 39-56 (2003)
- 5) Kamibayashi M. et al.: Synthesis and characterization of a practically better DEPMPO-type spin trap, 5-(2, 2-dimethyl-1, 3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolime N-oxide (CYPMPO), *Free Radical Research*, **40(11)**, 1166-1172 (2006)
- (2007年6月4日受理)