

## 酵素活性の測定による食品の加熱程度の確認について

中塚 由加里\*、五十嵐 智大\*、八木 潤\*、片山 貴之\*

### Study on the determination of the extent of heat treatment in foods by use of an Enzymatic Activity Test

Yukari NAKATSUKA\*, Tomohiro IGARASHI\*, Jun YAGI\* and Takayuki KATAYAMA\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In the Customs Tariff Schedule, foods are classified differently based on whether they are heat treated or not. Therefore, whether food was heat treated or not is to be determined by the catalase test in which with the addition of hydrogen peroxide causing foam then it will be judged to be (+). However, there are some samples for which judgment by this method is difficult. Under such circumstances, in this study, we focused on the peroxidase enzyme, which had the same role as catalase and can decompose hydrogen peroxide in vivo, and studied whether values obtained by quantifying the enzyme activity of peroxidase could be used as an indicator of the extent of heat treatment. As a result, it was possible to quantify the enzyme activities of peroxidase even for samples in which it is difficult to judge whether they were heat treated or not by the conventional catalase test.

### 1. 緒 言

食品は加熱処理されているか否かにより税番が異なる。例えば、いかの場合、関税率表上の分類では生鮮のもので第3類、加熱済みのものでは第16類となる。さらに、第03.07項に分類される大部分のいかは輸入割当品目に該当し、輸入貿易管理令によって規制されている。このことから、適切な関税分類及び輸入割当管理の両面において、加熱処理されているか否かを判別することが重要である。

現在、税關では、カタラーゼ活性を確認することで加熱処理されているか否かを判別している。これは3%過酸化水素水を試料に加え、過酸化水素が水と酵素に分解されることで生じる酸素に由来する発泡が認められればカタラーゼ活性が陽性と判断するものである。カタラーゼは動物、植物、微生物の好気的細胞に広く存在する酵素であり、生体内で生じる有毒な過酸化水素を分解し、無毒化する役割があるが、加熱すると失活するため、このような分析法が用いられている。しかしながら、加熱が不十分な試料では発泡しているか否か判別が困難なものがある。

一方、カタラーゼと同様に過酸化水素を分解する役割を担う酵素の一種にペルオキシダーゼがあり、この酵素は動物、植物、微生物界に広く分布し、加熱により失活する。また、カタラーゼは過酸化水素を分解するのに対し、ペルオキシダーゼは過酸化水素で基質を酸化する酵素である<sup>1)~3)</sup>。本研究では、試料からペルオキシダーゼを抽出し、過酸化水素でピロガロールを基質として酸化し、紫外可視分光光度計を用いて測定したサンプル溶液の吸光

度からその酵素量を数値化することで、加熱程度の指標となるか検討を行ったので報告する。

### 2. 実 験

#### 2.1 試 料

・いか5種（市販品）

ソディイカ（沖縄県産・解凍）*Thysanoteuthis rhombus*  
スルメイカ（長崎県産・生）*Todarodes pacificus*  
トラフコウイカ（タイ産・解凍）*Sepia pharaonis*  
ロール状のいか（中国産・冷凍）  
シーフードミックス中のいか（タイ産・冷凍）

・小豆（市販品）

#### 2.2 試薬

100 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）

りん酸二水素ナトリウム・二水和物（和光純薬工業）及び  
りん酸水素二ナトリウム12水（和光純薬工業）を混合し、溶  
液の全量を100.0 mLにメスアップしたもの  
0.50% (w/w) 過酸化水素水  
30%過酸化水素水（和光純薬工業）1 mLに対してイオン交  
換水59 mLを加えたもの  
5% (w/v) ピロガロール水溶液  
ピロガロール（SIGMA-ALDRICH）0.5 gに対してイオン交  
換水10 mLを加えたもの

0.1% (w/v) ウシ血清アルブミン水溶液  
ウシ血清アルブミン溶液 (SIGMA-ALDRICH) 0.05 g に対して 100 mM リン酸緩衝液を 50 mL 加えたもの  
3%過酸化水素水  
30%過酸化水素水 (和光純薬工業) 5 mL に対してイオン交換水 45 mL を加えたもの

### 2.3 分析装置及び条件

紫外可視分光光度計 : UV-2550 (島津製作所製)  
電子冷熱式恒温セルホルダ : TCC-240A (島津製作所製)  
波長範囲 : 420 nm  
測定セル : 石英セル (光路長 1 cm)

### 2.4 実験方法

#### 2.4.1 カタラーゼ活性試験方法

試料を約 3 mm 角の大きさに細断した後、試験管に移し、3%過酸化水素水を少量加え、よく混和した。

#### 2.4.2 ペルオキシダーゼ抽出法

##### 2.4.2 (1) ホモジナイス法

試料 1 g をサンプル容器に量りとり、5 mL のイオン交換水を加え、ホモジナイスにより均質にした。均一にした試料の一部を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離 (0 °C, 10,000rpm, 5 分間) を行った後、上澄み溶液をサンプル溶液とした。

##### 2.4.2 (2) 細断法 1 (ホモジナイス法との比較)

試料 5 g を約 3 mm 角の大きさに細断した後、三角フラスコに移し、5 mL のイオン交換水を加え、4 °C の冷蔵庫中で抽出を 24 時間行った。この抽出液を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離 (0 °C, 10,000rpm, 10 分間) を行った後、上澄み溶液をサンプル溶液とした。

##### 2.4.2 (3) 細断法 2 (抽出時間の検討)

試料 10 g を約 3 mm 角の大きさに細断した後、三角フラスコに移し、5 mL のイオン交換水を加え、4 °C の冷蔵庫中で抽出を 16 時間、19 時間、22 時間、24 時間、88 時間で行った。この抽出液を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離 (0 °C, 10,000rpm, 10 分間) を行った後、上澄み溶液をサンプル溶液とした。

##### 2.4.2 (4) 細断法 3 (採取量の検討)

試料 1 g, 3 g, 5 g, 10 g を約 3 mm 角の大きさに細断した後、三角フラスコに移し、5 mL のイオン交換水を加え、4 °C の冷蔵庫中で抽出を 24 時間行った。この抽出液を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離 (0 °C, 10,000rpm, 10 分間) を行った後、上澄み溶液をサンプル溶液とした。

##### 2.4.2 (5) 細断法 4 (いかの加熱程度の評価)

試料 1 g を約 3 mm 角の大きさに細断し、約 50 °C の温水で 0 分から 100 分の間ににおける任意の時間で加熱し、氷冷した。その後、各々加熱した試料を 2 mL チューブに移し、0.7 mL のイオン交換水を加え、4 °C の冷蔵庫中で振とう抽出を 24 時間行った。この抽出液を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離 (0 °C, 10,000rpm, 10 分間) を行った後、上澄み溶液をサンプル溶液とした。

#### 2.4.2 (6) 細断法 5 (小豆の加熱程度の評価)

試料 1 g を約 3 mm 角の大きさに細断し、約 97 °C の熱湯で 0 分から 60 分の間ににおける任意の時間で加熱し、氷冷した。その後、各々加熱した試料を 15 mL 遠心管に移し、2 mL のイオン交換水を加え、4 °C の冷蔵庫中で振とう抽出を 24 時間行った。この抽出液を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離 (0 °C, 10,000rpm, 10 分間) を行った後、上澄み溶液をサンプル溶液とした。

#### 2.4.3 吸光度測定方法

吸光度の測定は、石英セルにイオン交換水 2.1 mL, 100 mM リン酸緩衝液を 0.32 mL, 0.5% (w/w) 過酸化水素水を 0.16 mL, 5% (w/v) ピロガロール水溶液を 0.32 mL 注入し、転倒混和させ、20 °C に保った後、プランク測定は 0.1% (w/v) ウシ血清アルブミン水溶液、試料測定はサンプル溶液を 0.1 mL 加え、10 秒間混合し、紫外可視分光光度計により 420 nm における吸光度を 5 分間測定した<sup>4)</sup>。

#### 2.4.4 酵素量算出方法

ペルオキシダーゼ量 (酵素量) は Formula.1 により算出した。

Quantity of enzyme (Units/mg)

$$= \frac{((\Delta A_{420}/20 \text{ s of sample solution}) - (\Delta A_{420}/20 \text{ s of blank})) \times 3}{12 \times 0.1 \times (\text{the amount of sample (mg/mL)})}$$

$\Delta A_{420}$  : Absorbance increment at 420 nm

3 : The amount of sample solution (mL)

12 : Absorbance coefficient at 420 nm of purpurogallin 1 mg/mL

Formula.1 Calculation method of enzyme units

なお、Formula.1において  $\Delta A_{420}/20 \text{ s}$  は 420 nm における 20 秒間での吸光度増加分であり、5 分間の測定時間のうち、増加率が最大となる 0 秒から 20 秒の間での吸光度により算出した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 ペルオキシダーゼ抽出法の検討

##### 3.1.1 ホモジナイス法と細断法 1 の比較

ソディカについて、ホモジナイス法及び細断法 1 によってサンプル溶液を抽出し、吸光度測定方法に従って測定した吸光度の経時変化を Fig.1 に示す。ホモジナイス法では吸光度がわずかに確認できる程度であるが、細断法 1 では十分な吸光度を確認できた。ホモジナイス法は均質にする際、試料の粘性により試料量を一定以上採取することは困難であったが、細断法 1 はホモジナイス法よりも試料採取量を増やすことができ、検出に十分な量のペルオキシダーゼが抽出できたためと考えられる。

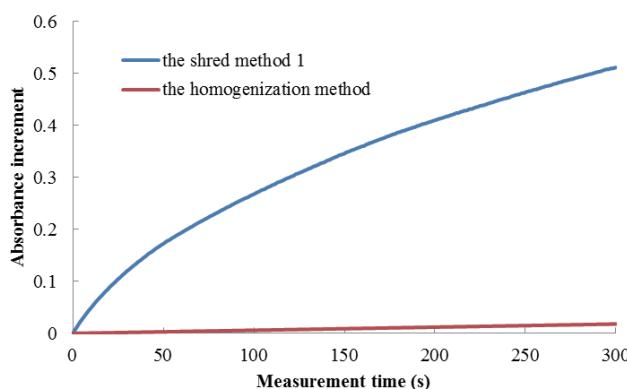


Fig. 1 The time change of absorbance at 420 nm either by the shred method 1 or by the homogenization method

### 3.1.2 抽出時間の検討

ペルオキシダーゼの抽出時間を検討するため、ソディカについて、細断法2によりサンプル溶液を調製した。抽出時間の異なる各サンプル溶液について吸光度の経時変化をFig.2に示す。各抽出時間における吸光度の経時変化を比較したところ、24時間で吸光度増加分が最大となることから、抽出時間を24時間とした。

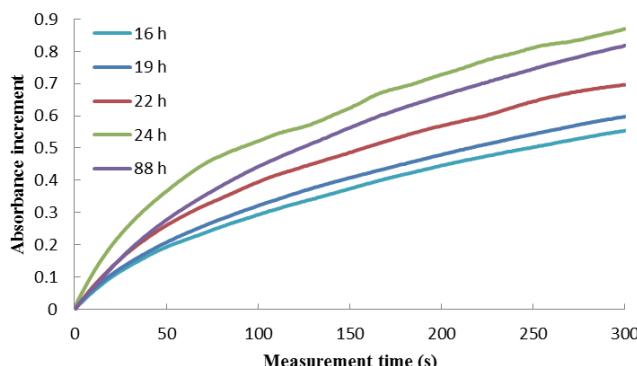


Fig. 2 The time change of absorbance at 420 nm by the shred method 2 (time comparison)

### 3.1.3 採取量の検討

十分なペルオキシダーゼを抽出するのに必要な試料採取量を検討するため、ソディカについて、細断法3によりサンプル溶液を抽出した。サンプル溶液は吸光度測定方法に従って測定し、各採取量における吸光度の経時変化をFig.3に示す。採取量を比較したところ、10gで吸光度増加分が最大となり、採取量が大きいほど吸光度が大きくなる。なお、採取量10gは5mLのイオン交換水に浸すことのできる最大量であり、10g以上とした場合には全試料をイオン交換水で浸すことが不可能であった。

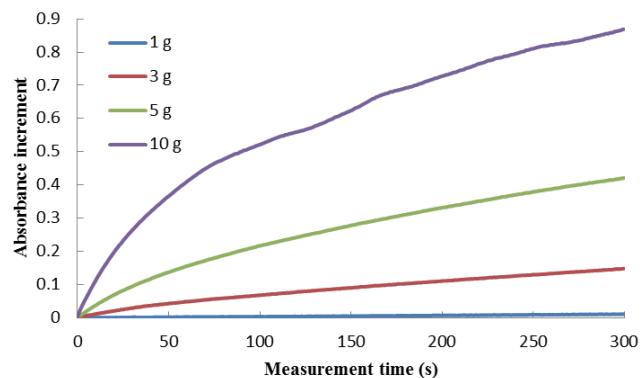


Fig. 3 The time change of absorbance at 420 nm by the shred method 3 (comparison of samples' amounts)

### 3.2 各試料のペルオキシダーゼ量とカタラーゼ活性試験との比較

いかについては細断法4、小豆については細断法5により加熱し、サンプル溶液を抽出した。サンプル溶液は吸光度測定方法に従って測定し、各試料の加熱時間における吸光度の経時変化をFig.4に示す。スルメイカの胴体（非加熱）部分を除き、各試料はいずれもペルオキシダーゼが測定でき、加熱程度により吸光度の違いが確認できた。また、得られた吸光度からペルオキシダーゼ量（酵素量）を算出し、カタラーゼ活性試験と比較した結果をTable 1に示す。この結果から、カタラーゼ活性試験では判別が困難な試料において、ペルオキシダーゼ量が確認できる。また、各試料において加熱しない場合にペルオキシダーゼ量が最大となり、加熱することでペルオキシダーゼ量は減少する。これは、試料中のペルオキシダーゼが加熱により失活するためだと考えられる。なお、スルメイカの胴体（非加熱）部分は粘性が高く、ペルオキシダーゼが十分に抽出できないため、吸光度を測定することが困難であった。

## 4. 要 約

本研究では、いかを中心に、各種の試料中のペルオキシダーゼを水抽出し、吸光度の経時変化から同酵素量を測定することで、加熱処理の程度を把握することを検討した。最適な酵素抽出条件を模索したところ、細断した試料に、可能な限り試料割合が多くなるようイオン交換水を注入し、24時間振とう抽出することで十分な量のペルオキシダーゼを抽出できた。また、生鮮のもので最大の酵素量となり、加熱により酵素量は減少した。従来の過酸化水素水によるカタラーゼ活性試験と比較した結果、同試験で判別が困難な試料について、ペルオキシダーゼの酵素量が確認できた。以上のことから、ペルオキシダーゼを抽出し、酵素量を測定することは加熱程度を判別する上で有効な分析方法であると考えられる。

Table 1 Results of the peroxidase quantification and the catalase test

Samples	heating time	the peroxidase quantification (units/g)	the catalase test
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	0 min	0.0882	+
	20 s	0.0234	±
	100 min	0.0016	-
<i>Todarodes pacificus</i> (body)	0 min	— (†)	+
	20 s	0.0147	±
	5 min	0.0080	±
	100 min	0.0002	-
<i>Todarodes pacificus</i> (legs)	0 min	0.0173	+
	100 min	0.0009	-
<i>Sepia pharaonis</i>	0 min	0.0268	+
	20 s	0.0042	±
	100 min	0.0007	-
frozen squids (roll form)	0 min	0.0051	±
	100 min	0.0002	-
frozen squids (seafood mix)	0 min	0.0039	+
	20 s	0.0056	±
	100 min	0.0000	-
red beans	0 min	0.1127	+
	15 min	0.0126	±
	60 min	0.0000	-

## 文 献

- 1) 今堀和友, 山川民夫 監修：“生化学辞典”, 第2版, P.272 (1990), (東京化学同人)
- 2) 今堀和友, 山川民夫 監修：“生化学辞典”, 第2版, P.1218 (1990), (東京化学同人)
- 3) 丸尾文治, 田宮信雄 監修：“酵素ハンドブック”, P.158 (1982), (朝倉書店)
- 4) Enzymatic Assay of PEROXIDASE (EC 1.11.1.7) from Soybean, (SIGMA-ALDRICH)

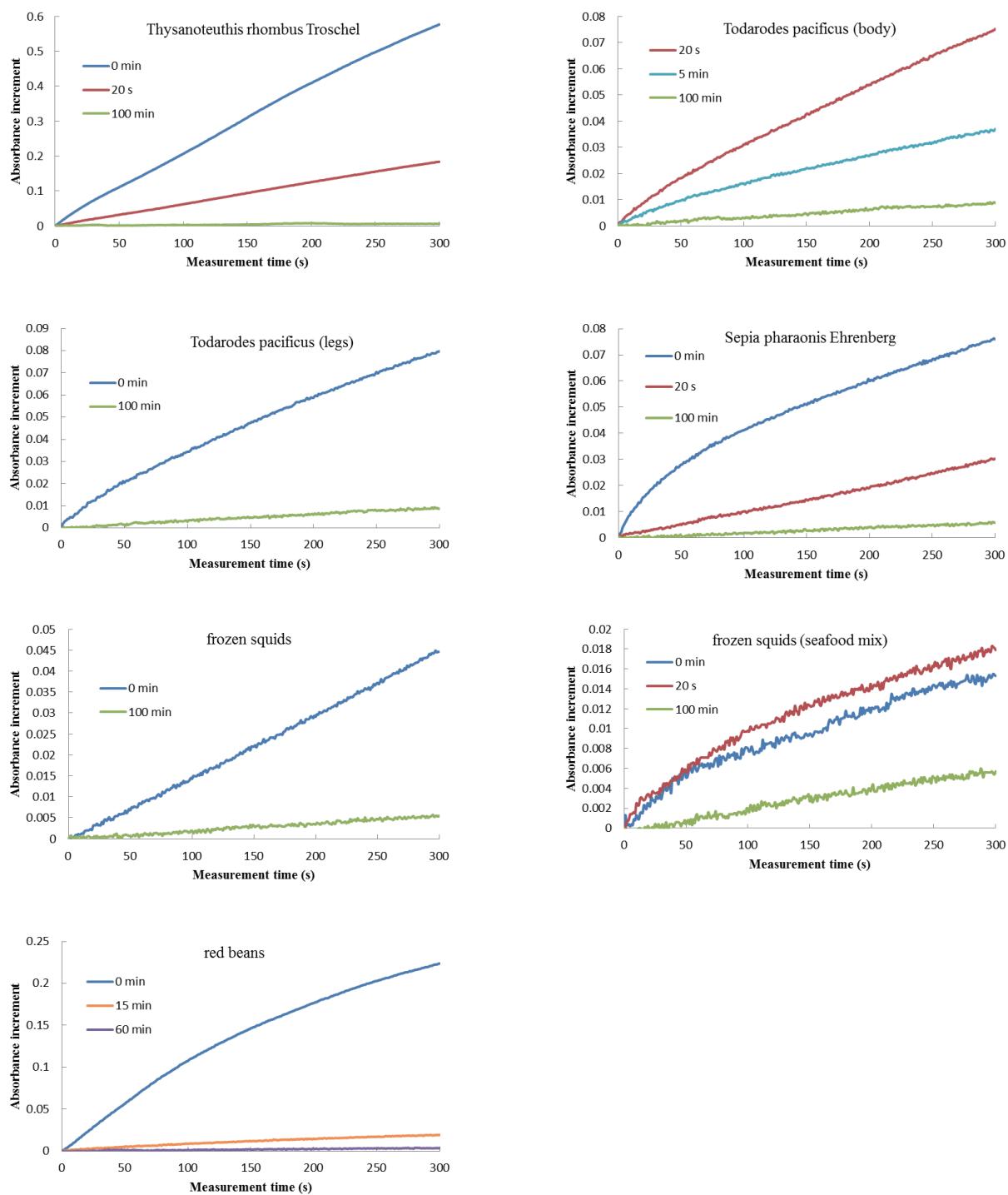


Fig. 4 The time change of absorbance at 420 nm by the shred method 4 (squid samples and red beans)