

水産加工品のたんぱく質に関する研究（第 1 報）

徳島 将光*, 家田 繭子*, 松澤 昌夫*, 中山 清貴*

Study of proteins derived from fishery products (the first report)

TOKUSHIMA Masamitsu *, IEDA Mayuko *, MATSUZAWA Masao * and NAKAYAMA Kiyotaka *

*Kobe Customs Laboratory, 12-1, Shinko-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, 650-0041 Japan

In the customs analysis, a catalase activity test is performed in order to determine whether fishery products were sufficiently cooked or not. Previous studies in Customs Central Laboratory reported that peroxidase activity could be used as an indicator of the extent of heat treatment; however, the method using peroxidase is not appropriate in some cases. In this study, we focused on the quantification of catalase activity and SDS-PAGE based on some literature, and revealed that the heat treatment of scallop adductor muscle caused the change of its catalase activity and SDS-PAGE band pattern.

1. 緒 言

実行関税率表の第 3 類又は第 16 類に分類される魚介類は、施される処理の内容により分類が異なる。例えば、軟体動物の場合、生きているもの、生鮮のもの、冷蔵したもの、冷凍したもの、乾燥したもの、塩蔵したもの、塩水漬けたものと及びくん製したものは第 03.07 項に分類されるが、第 3 類に記載のない方法により調製し又は保存に適する処理をしたものは第 16.05 項に分類される。また、第 03.07 項に分類されるもの（一部を除く）のうち、くん製したもの以外のものは、輸入貿易管理令における輸入割当ての対象品目でもあるため、輸入に際し経済産業大臣から輸入割当てを受けなければならない。それゆえ、これらを識別することは関税分類及び輸入貿易管理のために非常に重要である。

魚介類等が十分に加熱処理されているか否かを調べるため、カタラーゼ活性等の試験を実施している。カタラーゼは、動植物等の細胞に存在し、過酸化水素を水と酸素に分解する反応を触媒する酵素であり、加熱処理により失活する。カタラーゼによる過酸化水素の分解反応は非常に速く、その際に酸素の気泡が生じるため、反応を目視により確認することが可能であるが、試料の状態によっては判別することが困難な場合がある。

中塚ら¹⁾はカタラーゼと同様に動植物等の細胞に存在し、過酸化水素の分解反応を触媒する酵素であるペルオキシダーゼに着目し、その酵素活性を数値化し加熱の程度の指標となるか検討したが、測定することが困難な場合があることを報告している。

一方、加熱に起因する食品たんぱく質の変化を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGE と略記する。）により、泳動パターンの変化という形で確認することが可能であるとの報告がある²⁾。

本研究では、上記のことを踏まえてホタテガイの貝柱を試料として、加熱処理によるカタラーゼの酵素活性の変化を活性測定に

より数値化し、加熱処理によるたんぱく質の変化を SDS-PAGE により分析し、それらの結果を目視によるカタラーゼ活性試験の結果と比較するとともに、カタラーゼの失活とホタテガイの貝柱由来のたんぱく質の変性による泳動パターンの変化に関連性が確認することができないか検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

市販品のホタテガイの貝柱（国産）3 種

- ・生鮮品（sample A）：殻付生鮮のものを実験当日にむき身にして取り出したもの
 - ・冷蔵品（sample B）：刺身用と表示のあるもの。
 - ・冷凍品（sample C）：解凍・生食用と表示のあるもの。
- 以降、上記の 3 試料を各々 sample A, B, C と表記する。

2.1.2 試薬

過酸化水素、海砂、2-メルカプトエタノール

（以上、和光純薬工業社製）

ドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDS と略記する。）

（片山化学工業社製）

グリセロール、Catalase Assay Kit CAT100 – KT

（以上、SIGMA – ALDRICH 社製）

メンブレンフィルター（ポアサイズ：0.45 μm）（東洋濾紙社製）

Hi-QRAS Gel N (10%)（ジェレックスインターナショナル社製）

CLEARLY Protein Ladder (Unstained)（タカラバイオ社製）

ラビッド CBB KANTO 3S（関東化学社製）

0.5M Tris-HCl Buffer (pH 6.8), 10x Tris/ Glycine/ SDS Buffer

（以上、BIO-RAD 社製）

10x Tris/ Glycine/ SDS Buffer は蒸留水で 10 倍希釈して使用した

* 神戸税関業務部 〒650-0041 兵庫県神戸市中央区新港町 12-1

（希釈後溶液組成：25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3）。

SDS-PAGE 用試料溶解液

SDS を 0.2 g, 0.5M Tris-HCl Buffer (pH 6.8) を 1 mL, 2-メルカプトエタノールを 0.469 g 及びグリセロールを 2 g それぞれ量とり、蒸留水で 10 mL に定容したもの。

2.2 装置

2.2.1 キットによるカタラーゼ活性の測定

装置：紫外可視分光光度計 UV-2550（島津製作所製）

測定条件

- ・過酸化水素濃度測定

測定波長：240 nm

測定セル：石英セル（光路長 1cm）

- ・酵素活性測定

測定波長：520 nm

測定セル：ディスポセミマイクロセル（光路長 1cm）

2.2.2 SDS-PAGE によるたんぱく質の泳動像の確認

装置：Electrophoresis Power Supply-EPS 601

（Amersham Biosciences 社製）

条件：

泳動用ゲル	：Hi-QRAS Gel N（10%）
泳動用緩衝液	：1x Tris/ Glycine/ SDS Buffer
アプライ量	：5 μ L
電気条件	：15 mA/ gel（定電流）
泳動時間	：100 min
染色液	：ラピッド CBB KANTO 3S
洗浄液	：蒸留水

2.3 実験

2.3.1 試料の加熱処理

ホタテガイの貝柱を約 95°C の熱湯にて各々 0, 30, 60, 90, 120, 150 sec 間加熱したのち、氷冷した。その後、包丁で貝柱の外側部分を取り除いて中心部から採取した。

2.3.2 目視によるカタラーゼ活性の確認（目視法）

2.3.1 で調製した試料約 100 mg をバイアルに量とり、3%過酸化水素水を少量添加したのち発泡の状態を目視で観察した。

2.3.3 キットによるカタラーゼ活性の測定（キット法）

2.3.3.1 検液の調製

2.3.3.1(1) 検量線用検液の調製

過酸化水素水を 1x Assay Buffer を用いてそれぞれ 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 mM になるように希釈したものを検量線用検液とした。

2.3.3.1(2) 試料検液の調製

2.3.1 で調製した試料約 100 mg を 1.5 mL 容サンプリングチューブに正確に量とり、1x Assay Buffer 500 μ L を添加してペッスルによりホモジナイズした。ホモジナイズ後、1x Assay Buffer 500 μ L を添加して混合したのち、遠心分離（4°C, 9,500 g, 20 min）し、遠心上清を活性測定用試料検液とした。

2.3.3.2 活性測定

2.3.3.2(1) 検量線の作成

2.3.3.1(1)で調製した検量線用検液を Catalase Assay Kit CAT100-KT のプロトコルに従って活性測定を行い、検量線を作成した。

2.3.3.2(2) 試料検液の測定

2.3.3.1(2)で調製した試料検液を Catalase Assay Kit CAT 100-KT のプロトコルに従って活性測定を行い、検量線から過酸化水素量を求め、試料 1 g あたりの活性を Formula 1 により算出した。なお、本研究では過酸化水素の分解反応に使用する検液量を 50 μ L、反応時間を 5 min とした。

$$\text{Activity } (\mu\text{mol/ min/ g}) = (\Delta\text{H}_2\text{O}_2 \times 100 \times 1) / (0.05 \times 5 \times S)$$

$\Delta\text{H}_2\text{O}_2$: 過酸化水素消費量 (μmol)

100 : 希釈倍率

1 : 調製した検液量 (mL)

0.05 : 酵素反応に供した検液量 (mL)

5 : 酵素反応時間 (min)

S : サンプル採取量 (g)

Formula 1 Calculation method of enzyme units

2.3.4 SDS-PAGE によるたんぱく質の泳動像の確認

（電気泳動法）

2.3.4.1 試料検液の調製

2.3.1 で調製した試料約 100 mg を 1.5 mL 容サンプリングチューブに量とり、蒸留水を 500 μ L 添加して少量の海砂とともにペッスルによりホモジナイズした。ホモジナイズ後、蒸留水を 500 μ L 添加して混合したのち、遠心分離（4°C, 9,500 g, 20 min）した。遠心上清をポアサイズ 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、ろ液 100 μ L と SDS-PAGE 用試料溶解液 100 μ L を混合したのち、室温（25°C）で 1 晩反応させたものを SDS-PAGE 用検液とした。

2.3.4.2 たんぱく質の泳動像の確認

2.3.4.1 で調製した検液を 2.2.2 に記載する条件で電気泳動し、泳動後ラピッド CBB KANTO 3S のプロトコルに従って、洗浄・染色・脱色を行い、たんぱく質の泳動像を確認した。

3. 結 果

3.1 目視法

目視法では、Fig. 1 左図のように数分間連続した発泡が認められるものを (+)，Fig. 1 中図のように発泡が認められないものを (-) として、各検体の試験結果を Table 1 の上段に示した。なお、sample A-150 は、Fig. 1 右図に示すように 1 分程度後に観察すると微少の気泡が試料表面に付着しており、さらに数分間観察を継続したが気泡の大きさに変化がなく、新たな気泡の発生もなかった。

3.2 キット法

2.3.3.2 で算出した試料 1 g あたりの活性を、Table 1 の中段に示した。

3.3 電気泳動法

2.3.4.2 で確認した、たんぱく質の電気泳動像を Fig. 2 に示す。

目視による比較の結果、加熱時間の変化に伴うバンドの濃淡の変化を確認した 6 本のバンド (150-250 kDa 間のバンド : ①, 80-100 kDa 間のバンド : ②, 40-50 kDa 間のバンド : ③, 30-40 kDa 間の

3 本のバンド : 分子量が大きい順に④-⑥) について、バンドが目視により確認された場合は○, 確認されない場合は×として table 1 の下段に示した。

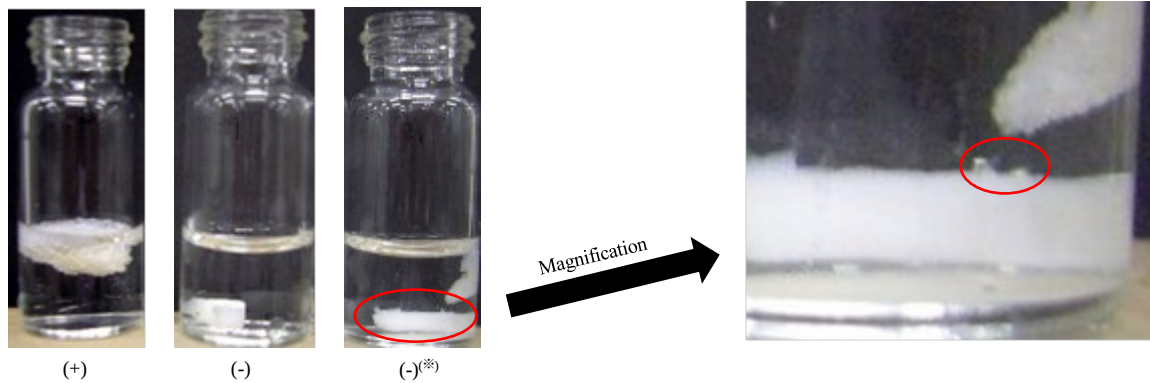


Fig.1 Example of catalase test (+) : positive, (-) : negative

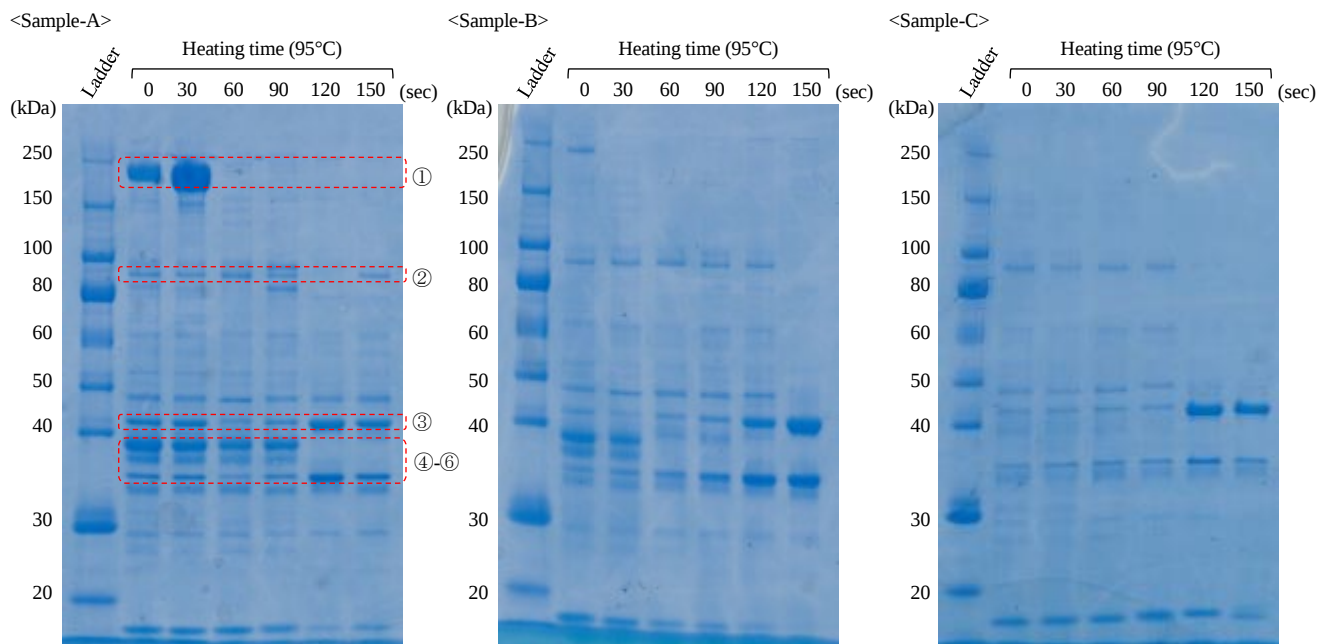


Fig. 2 SDS-PAGE electropherograms of three samples

Table 1 Test results of three samples

<Sample A: Fresh sample>

Sample name	A-0 (Standard)	A-30	A-60	A-90	A-120	A-150
Heating time (sec)	0	30	60	90	120	150
Activity test	+	+	+	+	-	-(※)
Activity measurement ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$)	43.9	33.9	57.8	43.4	4.8	5.4
SDS-PAGE	①	○	○	×	×	×
	②	○	○	○	×	○
	③	○	○	○	○ (stronger than standard)	○ (stronger than standard)
	④	○	○	○	×	×
	⑤	○	○	○	×	×
	⑥	○	○	○	○ (stronger than standard)	○ (stronger than standard)

(※)…A few bubbles exist on the sample surface

<Sample B: Chilled sample>

Sample name	B-0	B-30	B-60	B-90	B-120	B-150
Heating time (sec)	0	30	60	90	120	150
Activity test	+	+	+	+	-	-
Activity measurement ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$)	20.4	54.8	21.7	12.9	-5.0	0.9
SDS-PAGE	①	○	×	×	×	×
	②	○	○	○	○	×
	③	○	○	○	○ (stronger than standard)	○ (stronger than standard)
	④	○	○	×	×	×
	⑤	○	○	×	×	×
	⑥	○	○	○	○ (stronger than standard)	○ (stronger than standard)

<Sample C: Frozen sample>

Sample name	C-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150
Heating time (sec)	0	30	60	90	120	150
Activity test	+	+	+	+	-	-
Activity measurement ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$)	64.2	65.8	77.3	59.5	-15.7	6.2
SDS-PAGE	①	×	×	×	×	×
	②	○	○	○	×	×
	③	○	○	○	○ (stronger than standard)	○ (stronger than standard)
	④	×	×	×	×	×
	⑤	×	×	×	×	×
	⑥	○	○	○	○ (stronger than standard)	○

4. 考 察

4.1 キット法

4.1.1 試料の加熱による活性の変化

3.2 の結果から、試料の加熱処理時間の増加と活性の変化に相関性は見られない。これは、(i) 試料中心部付近から検体を採取しているため、熱が十分に伝導せず、カタラーゼがあまり失活していないこと、(ii) もとからの活性に個体差があることの2つの原因が推測される。

なお、目視法において (-) であった検体の中に、活性が負の値で

あるものが存在している。プロトコルには、クエン酸ナトリウムやヘパリンのような抗凝固剤及びアルブミンやヘモグロビンのような内因性化合物は、本活性測定における妨害物質である旨が記載されており、その影響ではないかと推測される。

4.1.2 目視法とキット法の比較

3.1 及び 3.2 の結果を比較したところ、目視法において (+) であった検体での活性の最小値は $12.9 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ であり、(-) であった活性の最大値は $6.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ であった。今回検討した試料では概ね $10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ 以上であれば、目視法において (+) と判断することができると推測される。

4.2 電気泳動法

4.2.1 試料の状態によるパターンの変化

生鮮、冷蔵及び冷凍の試料購入時における状態の違いによる泳動パターンを確認するため、それぞれの未加熱の試料である sample A-0、sample B-0 及び sample C-0 のバンドパターンを比較した。その結果 sample A-0 及び sample B-0 で検出されたバンド①、④、⑤は sample C-0 ではいずれも検出されなかった。

この違いは、捕獲されてから試料調製までの間にたんぱく質が変性又は分解したためではないかと推測される。文献等を調査したところ、(i) 魚介類のたんぱく質のうち筋原線維たんぱく質は、冷凍変性が生じやすいこと⁴⁾、(ii) 自動貝むき機を使用してホタテガイから貝柱を分離する際、貝の片面を蒸気で加熱して開殻し、反対側を刃物で切断する仕組みになっており、その際に貝柱の表面温度が瞬間的に約 40℃ に上昇するため⁵⁾、加熱面のたんぱく質に熱変性が生じている可能性があること⁶⁾、(iii) 冷凍したホタテガイの貝柱の解凍に際し、-5- 0℃ の温度帯を長時間かけて通過する解凍法では、内因性のプロテアーゼ等による自己消化を長時間受け続けることとなりたんぱく質が分解されること⁷⁾についての報告があった。

4.2.2 試料の加熱によるパターンの変化

3.3 の各泳動パターンを比較すると、最初にバンド①、次に④、⑤、その次に③、最後に②、⑥の順に変化していると推測される。また、バンド②は sample A において加熱時間 120 秒では確認できなかったものの 150 秒で検出されていること、また、バンド⑥は sample C において変化していないことから、この 2 つのバンドは、熱による変性を受けにくいたんぱく質であると推測される。以上から、ホタテガイの貝柱のたんぱく質には熱による変性を受けやすいたんぱく質と受けにくいたんぱく質が存在し、各たんぱく質の熱による変性の受けやすさの順について、おおまかな傾向があることが推測される。

4.2.3 目視法と電気泳動法の比較

3.1 及び 3.3 の結果を比較したところ、バンド①、④、⑤のたんぱ

く質は、目視法においてカタラーゼが失活したと判断した加熱時間よりも短い時間で、バンド③のたんぱく質はそれと同等の加熱時間で、バンド②、⑥のたんぱく質はそれよりも長い加熱時間で変性したと推測される。今回検討した試料においては、バンド②、③、⑥の変化が、目視法におけるカタラーゼ活性の有無の変化に対応しているのではないかと推測される。

4.2.1-4.2.3 に記載した考察に関して、加熱によるバンドの変化は確認されたものの、データ数が不足しているため加熱の有無を判断することが可能な基準を見出すことができなかった。したがって、判断基準を設けるにはより多数の試料の分析を行い、データを収集することが必要である。

5. 要 約

本研究では、ホタテガイの貝柱を試料として、内部までの十分な加熱の有無の判別について現在行っている目視によるカタラーゼ活性試験（目視法）と、キットによるカタラーゼ活性測定（キット法）、SDS-PAGE によるたんぱく質の泳動像の確認（電気泳動法）の各結果の比較を行った。

目視法及びキット法の結果並びに目視法及び電気泳動法の結果をそれぞれ比較したところ、本研究で用いた試料においては、酵素活性の数値が 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ 以上であれば、目視法において (+) と判断することができると推定される。また、泳動パターンの変化に加熱時間による変化が確認されるが、データ不足のため加熱の有無を判断することができないため、明確な判断を行うためには追加検討が必要である。これらの方法は、目視法で判別困難な場合に補完する分析法になりえるとともに、個別にさらなる検討が必要であるが、現在、目視法で判別している品目に対しても適用可能であると推測される。

文 献

- 1) 中塚由加里, 五十嵐智大, 八木潤, 片山貴之: 関税中央分析所報, 57, 41 (2017)
- 2) M. Uddin, S. Ishizaki, M. Ishida, M. Tanaka: *Fishers Science*, 68, 768 (2002)
- 3) 落合芳博, 石崎松一郎, 神保充: “水産・食品化学実験ノート”, P. 66 (2019), (恒星社厚生閣)
- 4) 須山三千三, 三輪勝利: “最新食品加工講座 水産加工”, P. 58 (1981), (建帛社)
- 5) 株式会社ニッコー, “ホタテ貝自動殻剥き機オートシェラー” <https://www.k-nikko.com/product/オートシェラー/> (参照 2021 -3 -4)
- 6) 成田正直ら: *Journal of Fishers Technology*, 10 (1), 9 (2018)
- 7) 西山一朗: 駒沢女子短期大学研究紀要, 31, 49 (1998)