

# 水産加工品のたんぱく質に関する研究（第 2 報）

徳島 将光\*, 徳岡 太誠\*, 西田 泰之\*, 中山 清貴\*

## Study of proteins derived from fishery products (second report)

TOKUSHIMA Masamitsu \*, TOKUOKA Taisei \*, NISHIDA Yasuyuki \* and NAKAYAMA Kiyotaka \*

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

In order to determine whether fishery products were well-cooked or not, the catalase activity test, which is the method adding hydrogen peroxide to the samples and observing the presence or absence of released bubbles, is used in Customs analysis. However, it is difficult to determine visually the presence or absence of the bubbles, if the quantity of generated bubbles is small. In the first report, we focused on the catalase activity measurement and SDS-PAGE, revealing that the results of catalase activity measurement and the electrophoretic patterns were changed by the heat treatment of Japanese scallop adductor muscle, and some of their results were linked to the results of catalase activity testing. In this study, the catalase activity test and measurement were performed on other fishery products (18 species, 34 samples), and it was found that the same result as for Japanese scallop adductor muscle was obtained from many products (15 species, 28 samples).

## 1. 緒 言

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、生体にとって有毒な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、例えば、加熱不十分で発泡はするものの、その量が微量である場合がある。

そこで我々は、文献<sup>1)2)</sup>をもとにホタテガイの貝柱の磨砕抽出物を試料として、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するとともに、加熱処理による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法（以下、「SDS-PAGE 法」という）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した。その結果、カタラーゼ活性測定法ではカタラーゼの酵素活性  $10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  がカタラーゼ活性試験における陽性と陰性の境界である可能性があること、また、SDS-PAGE 法では加熱によりたんぱく質の泳動パターンに変化が生じることを報告した<sup>3)</sup>。

本研究では、第 1 報の結果を踏まえ、結果がより明確であったカタラーゼ活性測定法について他の魚介類についても実施し、第 1 報で報告したホタテガイの貝柱と同様にカタラーゼの酵素活性  $10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  がカタラーゼ活性試験における陽性と陰性の境界となるか検証した。

## 2. 実 験

### 2.1 試料及び試薬

#### 2.1.1 試料

市販の各種冷凍水産加工品（魚、軟体動物、甲殻類）

詳細については Table 1 に示す。

試料については輸入割当て対象品目であるいわし、いか、ほたて貝等を中心に近隣のスーパーマーケット及びインターネット通販にて購入可能なものを収集した。

#### 2.1.2 試薬

過酸化水素（和光純薬工業製）

Catalase Assay Kit CAT100-KT（以下、「キット」という。）

（SIGMA-ALDRICH 製）

### 2.2 装置及び測定条件

装置：紫外可視分光光度計 UV-2550（島津製作所製）

\* 神戸税関業務部 〒650-0041 兵庫県神戸市中央区新港町 12-1

&lt;測定条件&gt;

測定セル：石英セル (光路長 1cm)

測定波長：240 nm (過酸化水素濃度測定)

520 nm (酵素活性測定)

Table 1 Test samples

Sample No.	Japanese name	Scientific name	Import quota (as a species)	Condition	Presence of cooking*
1	イワシ (種名不明)	-	-	Frozen	Uncooked
2					Uncooked
3					Uncooked
4					Cooked
5					Cooked
6					Cooked
7	ヨーロッパスプラット	<i>Sprattus sprattus</i>	×		Unknown
8	カラスガレイ	<i>Reinhardtus hippoglossoides</i>	×		Uncooked
9	カラフトシシャモ	<i>Mallotus villosus</i>	×		Unknown
10	キュウリウオ	<i>Osmerus mordax dentex</i>	×		Unknown
11	ギンダラ	<i>Anoplopoma fimbria</i>	×		Uncooked
12	シロイトダラ	<i>Pollachius virens</i>	×		Uncooked
13	スケトウダラ	<i>Theragra chalcogramma</i>	○		Uncooked
14	サバ (種名不明)	-	-		Unknown
15	サワラ	<i>Scomberomorus niphonius</i>	×		Uncooked
16	ニジマス (サーモントラウト)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	×		Uncooked
17					Cooked (grilled)
18					Unknown
19					Unknown
20	スルメイカ	<i>Todarodes pacificus</i>	○		Uncooked
21					Uncooked
22					Unknown
23					Cooked
24	アメリカオオアカイカ	<i>Dosidicus gigas</i>	○		Uncooked
25					Uncooked
26					Cooked
27					Cooked
28	マゼランツキヒガイ	<i>Placopecten magellanicus</i>	○		Uncooked
29	アサリ	<i>Ruditapes philippinarum</i>	×		Uncooked
30					Cooked
31				Cooked	
32	バナメイエビ	<i>Litopenaeus vannamei</i>	×	Uncooked	
33				Uncooked	
34				Cooked	

\* Uncooked: Described the effect of no heating on the label, Cooked: Described the effect of heating on the label, Unknown: No information about heating

## 2.3 実験

### 2.3.1 カタラーゼ活性試験法

解凍した試料の中心部から適量をビーカーにとり、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。

### 2.3.2 カタラーゼ活性測定法

#### 2.3.2.1 検液の調製

##### 2.3.2.1(1) 過酸化水素標準液の調製

過酸化水素に 1x Assay Buffer を加えてそれぞれ 0, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 mM に希釈したものを過酸化水素標準液とした。

##### 2.3.2.1(2) 試料検液の調製

試料約 100 mg を 1.5 mL 容サンプリングチューブに量りとり、1x Assay Buffer 500  $\mu$ L を添加して、水中でペッセルによりホモジナイズした。ホモジナイズ後、1x Assay Buffer 500  $\mu$ L を添加して混合したのち、遠心分離 (4°C, 9,500 g, 20 min) し、上清を活性測定用試料検液とした。

#### 2.3.2.2 活性測定

##### 2.3.2.2(1) 検量線の作成

2.3.2.1(1)で調製した過酸化水素標準液をキットのプロトコルに従って測定を行い、検量線を作成した。

##### 2.3.2.2(2) 試料検液の測定

2.3.2.1(2)で調製した試料検液をキットのプロトコルに従って測定を行い、検量線から過酸化水素量を求め、試料 1 g あたりの活性を次式により算出した。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  $\mu$ L, 反応時間を 5 min とした。

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

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

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)

### 3. 結 果

カタラーゼ活性試験及び活性測定の結果を魚 (Sample No. 1-19) については Table 2 に, 軟体動物 (Sample No. 20-31) については Table 3 に, 甲殻類 (Sample No. 32-34) については Table 4 に示す.

一部の生物種 (Sample No. 17, 18, 20, 21, 32, 33) を除いた全てのサンプルにおいて第1報で報告した結果, つまりカタラーゼ活性試験が陽性であった試料のカタラーゼ活性測定の結果は 10  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  以上であり, 対照的に活性試験が陰性であった試料のカタラーゼ活性測定の結果は 10  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  未満であるという結果と一致した.

Table 2 Results of catalase activity test and activity determination (fish)

Sample No.	Japanese name	Condition	Presence of cooking	Catalase activity test +:positive -:negative	Catalase activity determination ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )
1	イワシ (種名不明)	Frozen	Uncooked	+	79.6
				+	54.7
				+	49.0
2			Uncooked	+	17.8
				+	49.2
				+	71.1
3			Uncooked	+	60.0
				+	52.9
				+	78.3
4			Cooked	-	0.8
				-	-2.2
				-	-0.6
5			Cooked	-	-3.2
				-	-3.1
				-	1.1
6			Cooked	-	3.3
				-	3.6
				-	4.4
7			ヨーロピアンズプラット	Unknown	+
	+	46.2			
	+	18.5			
8	カラスガレイ	Uncooked	+	49.1	
			+	53.2	
			+	23.1	
9	カラフトシシャモ	Unknown	+	34.5	
			+	37.8	
			+	131.2	
10	キュウリウオ	Unknown	+	59.1	
			+	15.5	
			+	30.3	
11	ギンダラ	Uncooked	+	70.8	
			+	85.8	
			+	64.6	
12	シロイトダラ	Uncooked	+	22.0	
			+	68.5	
			+	76.4	
13	スケトウダラ	Uncooked	+	36.7	
			+	17.3	
			+	14.7	
14	サバ (種名不明)	Unknown	+	134.8	
			+	174.2	
			+	184.4	
15	サワラ	Uncooked	+	119.7	
			+	49.2	
			+	78.1	
16		Uncooked	+	20.0	
			+	37.0	
			+	39.1	
17	ニジマス	Unknown	+	-9.9	
			+	23.5	
			+	-3.8	
18		Cooked (grilled)	+	54.5	
			+	49.2	
			+	-2.1	
19	ベニザケ	Unknown	+	150.0	
			+	142.1	
			+	81.7	

Table 3 Results of catalase activity test and activity determination (mollusks)

Sample No.	Japanese name	Condition	Presence of cooking	Catalase activity test +:positive -:negative	Catalase activity determination ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	
20	スルメイカ	Frozen	Uncooked	+	-2.3	
				+	-6.1	
				+	-5.9	
21			Uncooked	+	-1.7	
				+	-14.6	
				+	-0.2	
22			Unknown	-	-6.7	
				-	-5.6	
				-	-4.5	
23			アメリカオオアカイカ	Cooked	-	-7.8
					-	-4.7
	-	2.6				
24	ホタテガイ	Frozen	Uncooked	+	20.1	
				+	25.8	
				+	36.1	
25			Uncooked	+	46.8	
				+	48.4	
				+	51.8	
26			Cooked	-	-18.3	
				-	-16.8	
				-	-15.5	
27			Cooked	-	-7.5	
				-	-3.1	
	-	-3.3				
28	マゼランツキヒガイ	Uncooked	+	122.6		
			+	149.7		
			+	113.9		
29	アサリ	Frozen	Uncooked	+	148.5	
				+	161.7	
				+	118.3	
30			Cooked	-	-2.9	
				-	-13.0	
				-	-7.8	
31			Cooked	-	1.0	
				-	-2.0	
				-	-3.5	

Table 4 Results of catalase activity test and activity determination (crustaceans)

Sample No.	Japanese name	Condition	Presence of cooking	Catalase activity test +:positive -:negative	Catalase activity determination ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )
32	バナメイエビ	Frozen	Uncooked	+	-3.9
				+	-0.5
				+	-7.3
33			Uncooked	+	-9.0
				+	-9.3
				+	-10.2
34			Cooked	-	-3.8
				-	-4.8
				-	-7.3

## 4. 考 察

### 4.1 妨害物質

カタラーゼ活性測定法で使用したキットのプロトコルには、測定に影響を与える物質としてアスコルビン酸、アルブミン、クエン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸三カリウム、ヘモグロビン、ヘパリン、グルコース及び界面活性剤 TRITON X-100 が例

示されており、それぞれある一定の濃度以上において測定に影響を及ぼすと記載されている。

また、脂肪の含有量の多い試料では非酵素的な脂肪酸酸化により生じる過酸化脂質が呈色反応の際に過酸化水素と同様の働きをする<sup>4)</sup>との報告がある。ニジマスの No. 17, 18 については、検液調製における遠心分離の際に、表面に脂質膜が見られたことから、他の試料よりも過酸化脂質による影響を受けたと考えられる。

また、活性試験法の結果が陰性の試料について、活性測定法の

結果が 4.4 から -18.3 と値が 0 ではなくマイナス寄りであることから、妨害物質の総合的な影響は負の誤差を与えるものと考えられる。

#### 4.2 カタラーゼ抽出

スルメイカの No. 20, 21 及びバナメイエビの No. 32, 33 については、活性試験法の結果が陽性であるにも関わらず、活性測定法の結果が全てマイナスであることから、カタラーゼを抽出することができていない可能性が考えられる。特にスルメイカについては他の試料と比較して弾力性があったことから、検液調製においてペッセルを用いた人力でのホモジナイズの際に固形物が残り十分に摩砕抽出することができなかつたことも、カタラーゼの抽出に影響していると考えられる。

#### 4.3 今後の課題

##### 4.3.1 カタラーゼの酵素活性のしきい値

今回使用した試料のうち、第 1 報で報告したとおりの結果にならなかった試料についてカタラーゼ活性があるか無いかを判断するための閾値を設定するためには、試料検液中のカタラーゼ濃度及び妨害物質の影響が第 1 報と同程度であることを確認したうえでの判断が必要であるが、それらを確認可能な評価方法がなく、4.1 及び 4.2 に挙げた原因が改善されたか否かを評価することもできないため、これ以上の本法に対する研究継続は妥当ではない。したがって、別手法の検討が必要である。

##### 4.3.2 他の手法の検討

現行のカタラーゼ活性試験法においては、試料に 3% 過酸化水素水を加えて発泡の有無を確認している。この反応液中の過酸化水素量を本法の定量技術を用いて数値化することが可能であれば、

①目視法による発泡の程度を過酸化水素量の減少量で数値化することができ、②この検液は抽出液ではないため、カタラーゼの抽出方法を検討する必要がなく、③検液調製の際にホモジナイズしないため、検体内部からの妨害物質の溶出も軽減される、と考えられる。

過酸化水素の定量法については、今回使用したキットで用いられている 4-アミノアンチピリン法による比色定量のほかに、酸素電極法や屈折率法が挙げられる。酸素電極法は、感度及び再現性の観点で 4-アミノアンチピリン法より優れているとの報告があり<sup>5)</sup>、ポータブル型の酸素電極を持ち運ぶことで、現場においても判断可能な方法となり得るものとする。

## 5. 要 約

第 1 報においてホタテガイの貝柱を実験材料として目視によるカタラーゼ活性試験とキットによるカタラーゼ活性測定の関係性を調べたところ、活性測定での酵素活性が活性試験における陽性と陰性の境界判断できる可能性を報告したので、本報ではその推測が他の魚介類についてもあてはまるかどうか検証した。

18 種の魚介類から計 34 品の試料に対して分析を行ったところ、15 種 28 品の試料において酵素活性の数値が 10  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  以上であれば、カタラーゼ活性試験において (+) と判断することができる。第 1 報で見出した推測を支持する結果が得られた。

したがって、本法によるしきい値判断は、第 1 報で見出した推測を支持する結果となった生物種においては判断可能であるが、全ての生物種に対して網羅的に判断することは不可能である。

## 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) 徳島将光, 家田繭子, 松澤昌夫, 中山清貴: 関税中央分析所報, **61**, 61 (2021)
- 4) 山東英幸, 橋爪崇, 横山剛: 食品衛生学雑誌, **23**, 325 (1982)
- 5) 社団法人日本食品衛生協会, 食品衛生検査指針 食品添加物編 2003, P.86 (2003) (壮光舎)