

カタラーゼ活性試験の検討

徳岡 太誠*, 江頭 海*, 村上 賢太朗*, 石井 さつき*, 中山 清貴*

Study of Catalase activity test using analytical equipment

TOKUOKA Taisei *, EGASHIRA Kai *, MURAKAMI Kentaro *, ISHII Satsuki * and NAKAYAMA Kiyotaka *

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

In this study, methods to determine the presence or absence of well-cooked by analytical equipment were examined. In the experiment, 3% H₂O₂ test solution was added to the sample, the solution was stirred at specified time and H₂O₂ concentration in the test solution was analyzed by Potentiometric titrator. A difference in hydrogen peroxide concentration in the test solutions of each samples, as observed by the presence or absence of bubbles released in the catalase activity test, could be confirmed. However a decrease in hydrogen peroxide concentration in the test solutions was also observed in samples with an absence of bubbles released. Decomposition of hydrogen peroxide due to factors other than catalase may be a possibility.

1. 緒 言

関税率表において、輸入される肉類や魚介類の中には、加熱による調理の有無によって、関税分類が異なり、一部、輸入貿易管理令における輸入割当て品目の対象に該当するものもある。そのため、適正な関税分類及び輸入貿易管理の点から、肉類や魚介類の加熱による調理の有無を判別することは重要である。

関税中央分析所報において、食品の加熱程度の確認に関して、徳島¹⁾は水産加工品、中塚²⁾はいか及び小豆、池原³⁾は小豆についてカタラーゼ活性試験の報告をしているが、当該試験における過酸化水素濃度の変化についての報告はない。

カタラーゼ活性試験は、動植物等の細胞内に存在している酵素であるカタラーゼが、過酸化水素を水と酸素に分解する反応を触媒すること、また、カタラーゼは熱を加えると変性し、前述の分解反応を触媒する機能を失うことを利用した試験である。

本研究では、分析機器を使用し、得られた測定値から、加熱による調理の有無を判別する方法を検討することを目的とした。そこで、税関において汎用的な分析機器である電位差滴定装置を使用し、種々の試料に 3%過酸化水素水を加え反応させたのち、液中の過酸化水素濃度を測定した。得られた過酸化水素濃度について、カタラーゼ活性試験における気泡が認められる試料と認められない試料の結果を比較することで、加熱による調理の有無を判別できるか否か検討した。

また、試料に 3%過酸化水素水を加え、過酸化水素の分解の際に発生する酸素を密閉容器内に捕集し、酸素濃度計により、容器内気相中の酸素濃度を測定したので、その結果についても併せて報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

魚介類

市販品

しらす（生・ボイル）

桜エビ（生・ボイル）

ほたて（生・ボイル）

スルメイカ（生・ボイル※）

輸入品

ちりめん

市販の牛レバー（生）

※スルメイカ（ボイル）は、（生）の試料を湯煎して作成した。

2.1.2 試薬

過酸化水素水（和光純薬工業製）

カタラーゼ（牛レバー由来, 8000Unit/mg）（和光純薬工業製）

1N 過マンガン酸カリウム溶液（和光純薬工業製）

リン酸緩衝剤粉末 1/15 mol/L, pH7.0（和光純薬工業製）

希硫酸(60 w/w %)（キシダ化学工業製）

0.02 mol/L(N/10)過マンガン酸カリウム溶液

（1N 過マンガン酸カリウム溶液を 10 倍に希釈）

リン酸緩衝液（リン酸緩衝剤粉末 1 包と純水 1L を混合）

3% 過酸化水素水（過酸化水素水を純水で 10 倍に希釈）

（以下、「試験液」という）

メンブレンフィルター（セルロースアセテート, 孔径 0.45 μm）

（東洋濾紙社製）

2.2 装置

電位差滴定装置 AT-710（京都電子工業製）

* 神戸税関業務部 〒650-0041 兵庫県神戸市中央区新港町 12-1

複合白金電極（京都電子工業製）
酸素濃度計 OXY-1 SMA trace（PreSens 社製）

2.3 実験

2.3.1 試料の調製

標準品カタラーゼ溶液：

8000 Unit/mL (=8 Unit/ μ L) になるよう、リン酸緩衝液で調製した。標準品カタラーゼ溶液を沸騰浴で1分又は1時間加熱したものについても測定に供した。

魚介類試料：

しらす（ちりめんを含む） 細断等なし。
桜エビ 細断等なし（殻つきのまま）。
ほたて・スルメイカ 5 mm 角程度に細断した。

対照用試料：

しらす、桜エビ、ほたて及びスルメイカのボイル各5.0 gをビーカーに採取し、30秒から2分程度、電子レンジで加熱した。牛レバー：

生の牛レバーを3–5 mm 程度に細断した。また、生の牛レバー一塊を1.5時間程度沸騰浴で加熱したのち、5 mm 角程度に細断し、さらに1.5時間沸騰浴で加熱したものも測定に供した。

牛レバー懸濁液：

粉碎、裏漉しをした生の牛レバーを100 mg 程度採取し、リン酸緩衝液5 mL に懸濁させた。また、牛レバー懸濁液を沸騰浴で1時間加熱したものも測定に供した。

2.3.2 カタラーゼ活性試験

2.3.1 で調製した各魚介類試料を適量ビーカーにとり、試験液を加え、気泡の発生の様子を目視で観察した。

2.3.3 電位差滴定法

2.3.3 (1) 試験液中の過酸化水素濃度

次の手順に従って、過酸化水素濃度を求め、8回連続測定 of 平均値を試験液中の過酸化水素濃度(w/v %)とした。

(過酸化水素濃度測定)^{5), 6)}

50 mL ビーカーに試験液をマイクロピペットで250 μ L 採取し、純水10 mL 及び希硫酸10 mL を加え、スターラーで攪拌しながら、0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液で滴定し、当量点までに要した滴定量 (mL) を求めた。

得られた滴定量 (mL) を次の計算式に代入し、過酸化水素濃度 C (w/v %) を計算した。

$$C = A \times X \times F / V / 10$$

A : 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液の滴定量 (mL)

X : 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液1 mL に相当する過酸化水素の質量 (=1.701 mg/mL)

F : 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム溶液のファクター (=1.000)

(試薬瓶に表示の値を使用した)

V : 検液量 (mL)

1/10 : mg $\rightarrow$ g への単位変換係数 1/1000 及び%への単位変換係数

100 の積

2.3.3 (2) 標準品カタラーゼの測定

(検液調製)

2.3.1 で調製した標準品カタラーゼ溶液10, 25, 40, 50 及び60 μ L をマイクロピペットでそれぞれビーカーに採取し、試験液10 mL をホールピペットで加え、室温で30分間攪拌し、試料と試験液を反応させ、検液とした。1分間加熱した標準品カタラーゼ溶液についても、40 μ L 採取して、同様に検液を調製した。

(過酸化水素濃度測定)

2.3.3 (1) の(過酸化水素濃度測定)に準じて行った。

2.3.3 (3) 各魚介類試料の測定

(検液調製)

2.3.1 で調製した各魚介類試料5.0 g 及び対照用試料5.0 g をそれぞれビーカーに採取し、試験液10 mL をホールピペットで加え、室温で30分間攪拌し、試料と試験液を反応させた。その後、上澄み液を遠心分離(4°C, 9500 g, 5分)及びメンブレンフィルターにより不溶分を除去し、検液とした。

(過酸化水素濃度測定)

2.3.3 (1) の(過酸化水素濃度測定)に準じて行った。

2.3.3 (4) 牛レバーと標準品カタラーゼ溶液の比較

(検液調製)

2.3.1 で調製した牛レバー懸濁液及び標準品カタラーゼ溶液について、加熱したものと加熱していないもの各100 μ L をマイクロピペットでそれぞれビーカーに採取し、試験液10 mL をホールピペットで加え、室温で30分間攪拌し、試料と試験液を反応させた。その後、上澄み液を遠心分離(4°C, 9500 g, 5分)及びメンブレンフィルターにより不溶分を除去し、検液とした。

生の牛レバー0.1 g 及び加熱した牛レバー5.0 g についても同様に検液を調製した。

(過酸化水素濃度測定)

2.3.3 (1) の(過酸化水素濃度測定)に準じて行った。

2.3.4 気体発生量の簡易定量

10 mL メスシリンダーに試料(ほたて(生・ボイル)、標準カタラーゼ溶液)を量り取り、試験液をメスシリンダーから溢れる直前まで加えたのち、ゴム栓をして、30分間静置し、発生した気体を捕集した。気体の捕集量が約1 mL になる試料量を求めた。

2.3.5 酸素濃度測定

上部に酸素濃度測定用のセンサーチップを取り付けた蓋付きのガラス容器に3.1 で調製した試料のうち、しらす(生・ボイル)及びちりめんをそれぞれ5.0 g 採取し、試験液を10 mL 加え、蓋をした。試験液を加えた直後、15分後、30分後のガラス容器内の気相中の酸素濃度を酸素濃度計により室温にて測定した。

3. 結果

3.1 カタラーゼ活性試験

各魚介類試料及び対照用試料について、カタラーゼ活性試験を行った結果を Table 1 に示す。いずれの試料においても、生の試料の方が、ボイルの試料と比較して、多くの気泡が発生していた。

魚介類試料に試験液を加えた際には、数分から十数分間連続して気泡が発生し、徐々に発生量が減少していく様子が確認された。

Table 1 Results of the Catalase Activity Test on fishery products

Sample		Bubble Producing in Catalase activity test
Shirasu	Raw	○
	Boil	○
	Boil + Dry*	○
	Control	×
Sakuraebi	Raw	○
	Boil	○
	Control	×
Hotate	Raw	○
	Boil	○
	Control	×
Surumeika	Raw	○
	Boil	○
	Control	×

*“Tirimen”

3.2 電位差滴定法

3.2.1 試験液中の過酸化水素濃度

8 回連続測定の結果、試験液中の過酸化水素濃度の平均値は 3.963 (w/v %) であり、本研究全ての実験でこの試験液を使用した。

3.2.2 標準品カタラーゼの測定

標準品カタラーゼ溶液の滴定値及び過酸化水素濃度を Table 2 に示す。Table 2 中の酵素量(Unit)は、実際の標準品カタラーゼ溶液の濃度(Unit/ μ L)にその採取量(μ L)を乗じた値である。また、過酸化水素濃度(w/v %)を縦軸、酵素量(Unit)を横軸とした検量線を Fig.1 に示す。

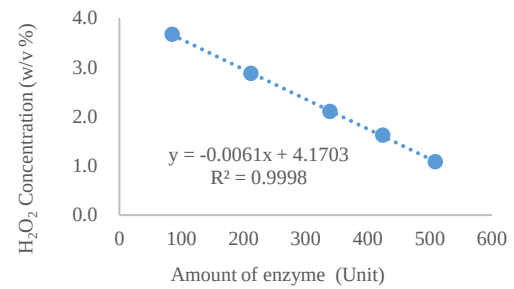


Fig.1 Calibration curve of standard catalase solution.

3.2.3 各魚介類試料の測定

各魚介類試料についての滴定値、過酸化水素濃度及び対照用試料と比較した時の過酸化水素濃度の差を Table 3 に示す。

3.2.4 標準品カタラーゼと牛レバーの比較

牛レバーを調製した各試料及び標準品カタラーゼ溶液の測定結果の比較を Table 4 に示す。

3.3 気体発生量の簡易定量

10 mL メスシリンダーに 1 mL 程度の気体を捕集するために要した試料量は、ほたて（生）が 0.1 g、ほたて（ボイル）が 2.0 g、あった。

3.4 酸素濃度測定

しらす（生・ボイル）及びちりめんについて、酸素濃度計により求めた酸素濃度を Table 5 に示す。

4. 考 察

4.1 カタラーゼ活性試験

3.1 より対照用試料を除き、いずれの試料についても気泡の発生が確認できたため、対照用試料以外は加熱が不十分でありカタラーゼ活性があるものと判断した。以降、気泡の発生が認められた試料は、加熱が不十分な試料（カタラーゼ活性がある試料）、気泡の発生が認められない試料は、加熱十分な試料（カタラーゼ活性がない試料）として考察をした。

Table 2 Titration amount of standard catalase solution and H₂O₂ concentration calculated by potentiometric titration

Sample	Amount of Catalase solution (μ L)	Amount of enzyme (Unit)	Titration amount (mL)	H ₂ O ₂ concentration (w/v %)
Catalase solution without heating	10	85	5.3875	3.666
	25	212	4.2242	2.874
	40	339	3.0895	2.102
	50	424	2.3853	1.623
	60	509	1.5898	1.082
Catalase solution heated in water bath	40	339	5.9333	4.037

4.2 電位差滴定法

4.2.1 標準品カタラーゼの測定

3.2.2 より酵素量(Unit)が増加するに従い、過酸化水素濃度(w/v %)が減少しており、両者の間には相関関係が認められた。Fig. 1の検量線についても決定係数 $R^2 = 0.9998$ であり、良好な直線性を示した。

また、標準品カタラーゼ溶液を沸騰浴で、1分間加熱したものについて、試験液を加えた際に気泡の発生が無く、同溶液を40 μ L採取して、測定を行った場合には、過酸化水素濃度の減少は認められなかった。そのため、十分に加熱処理が施され、カタラーゼ活性がない試料と加熱が不十分な試料の過酸化水素濃度を比較した場合に、両者には明確な差が生ずるものと考えられる。

4.2.2 対照用試料と魚介類試料の過酸化水素濃度の比較

3.2.3 から、同じ試料内で気泡の発生が認められない対照用試料と魚介類試料の過酸化水素濃度を比較したところ、いずれも魚介類試料の方が、過酸化水素濃度が小さな値を示し、過酸化水素濃度の差が最小となったほたて(対照用)と(ボイル)においても、0.247 (w/v %)の差が認められた。

4.2.3 気泡が発生しない試料における過酸化水素濃度の減少

しらす、桜エビ、ほたて、スルメイカ全ての対照用試料において、試験液中の過酸化水素濃度が0.4–0.8 (w/v %)程度減少した。対照用試料については、3.1から、カタラーゼは失活しているものと考えられるため、カタラーゼ以外の要因により過酸化水素が分解されている可能性が示唆された。

試験液中の過酸化水素濃度：3.963 (w/v %)と各ほたて試料の過酸化水素濃度を比較した場合、その減少量は、(対照用)：0.816 (w/v %), (生)：1.680 (w/v %), (ボイル)：1.063 (w/v %)である。さらに、(生)と(ボイル)の値から、気泡が生じない過酸化水素の分解要因にあたる(対照用)の値を減じた過酸化水素濃度は、(生)：0.864 (w/v %), (ボイル)：0.247 (w/v %)となり、カタラーゼの分解による過酸化水素濃度の減少と考えられ、これらの値か

ら過酸化水素濃度比(生/ボイル)を求めると、約3.5となり、ほたて(生)は、(ボイル)と比較して、3.5倍の過酸化水素の分解があると考えられる。

一方、3.3において同じ体積の気体を捕集するために要した試料量の比(生/ボイル)は20となり、ほたて(生)は(ボイル)の20倍程度の過酸化水素の分解があると考えられるが、過酸化水素濃度より求めた場合と大きく相違がある。

電位差滴定において求めた過酸化水素濃度の減少は、実際には、気体が発生しない過酸化水素の分解が非常に大きく、気体が発生するカタラーゼによる分解は小さいため、(生)と(ボイル)の差が小さくなっている可能性が考えられる。

カタラーゼ以外に過酸化水素を消費する要因としては、食品に含まれるアスコルビン酸などの抗酸化物質⁷⁾、無機物等が考えられるが、過酸化水素は多くの物質と反応し、食品によって過酸化水素と反応する成分が異なるため、個々の要因を特定し、過酸化水素濃度変化への影響の大きさを明らかにすることは困難である。

したがって、これらの要因をできる限り排除するため、対照用試料と比較し、過酸化水素濃度の明確な差をもって判別を行うことが妥当と考えられる。この差によって加熱による調理の有無を判断するためには、カタラーゼ活性試験での判別が難しい多種の試料を本法で検証し、数値化することが必要である。

4.2.4 牛レバーと標準品カタラーゼの比較

標準品カタラーゼは牛レバーを由来としているため、市販の牛レバーを試料として測定結果を比較した。

3.2.4において、牛レバー懸濁液については、加熱処理前は、試験液を加えた時に気泡が発生し、過酸化水素濃度の減少が認められたが、沸騰浴で1時間加熱した場合においては、気泡は発生せず、過酸化水素濃度の減少は認められなかった。同じ時間沸騰浴で加熱した標準品カタラーゼ溶液についても同様の結果が得られていることから、加熱して気泡が発生しない牛レバーと標準品カ

Table 3 Titration amount of fishery products and H₂O₂ concentration calculated by potentiometric titration

Sample		Titration volume (mL)	H ₂ O ₂ Concentration (w/v %)	H ₂ O ₂ Concentration difference from control (w/v %)
Shirasu	Raw	3.6438	2.479	0.644
	Boil	4.0758	2.773	0.350
	Boil + Dry	4.1055	2.793	0.330
	Control	4.5900	3.123	-
Sakuraebi	Raw	4.0219	2.736	0.833
	Boil	4.1311	2.811	0.758
	Control	5.2450	3.569	-
Hotate	Raw	3.3560	2.283	0.864
	Boil	4.2627	2.900	0.247
	Control	4.6260	3.147	-
Surumeika	Raw	3.4489	2.347	0.797
	Boil	3.9545	2.691	0.453
	Control	4.6206	3.144	-

タラーゼについては、ほたての試料とは異なり過酸化水素の分解反応が起こらないと推測できる。

また、参考として、牛レバーを塊状態で 1.5 時間加熱したのち 5 mm 角に細断してさらに 1.5 時間加熱したものについて確認したところ、試験液を加えた際に明らかな気泡の発生があり、過酸化水素濃度の減少も認められた。同加熱試料をさらに電子レンジで 3 分程度追加加熱を行ったが気泡は消失しなかったことから、通常は十分に加熱したと考えられるものも気泡の発生が認められることがある。

4.3 酸素濃度計による測定

3.4 において、試験液を試料に加えた直後は、いずれの試料でも酸素濃度は 20 % 程度であったが、30 分後にはしらす（生）とちりめんそれぞれ 42.78 %、22.29 % と増加が認められ、しらす（ボイル）では 20.45 % と変化がなかったことから、生の試料とボイルされた試料には 30 分後の酸素濃度変化に明確な数値差がある。

3.1 において、生の試料の方が、ボイルされた試料と比較して多くの気泡が発生しており、この客観的な差を本法により数値化することができたといえる。しかし、気泡の発生量が少ない試料に

おいて酸素濃度の増加を反映されない場合があるため、測定条件の改良が必要である。

5. 要 約

魚介類試料等について、加熱による調理の有無を機器分析により得られた測定値により判別できないか検討した。試料に 3 % 過酸化水素水を加え、一定時間経過後の液中の過酸化水素濃度を電位差滴定装置により測定したところ、カタラーゼ活性試験において気泡の発生が認められる試料と認められない試料の間には過酸化水素濃度に明確な差があった。

しかし、気泡の発生が認められない試料でも、過酸化水素濃度の減少が認められたため、試料によってはカタラーゼ以外の要因による過酸化水素の分解が過酸化水素濃度に影響を及ぼす可能性も考えられる。

Table 4 Titration volume of standard catalase solution and bovine lever and H₂O₂ concentration calculated by potentiometric titration

Sample	Processing	Bubble Producing in H ₂ O ₂ solution	Titration volume (mL)	H ₂ O ₂ Concentration (w/v %)
Catalase solution	-	○	0.3111	0.212
	Heating	×	5.7287	3.898
Liver paste suspension	-	○	3.8959	2.651
	Heating	×	5.7455	3.909
Liver	Raw	○	> 0.0200	> 0.0014
	Heating	○	4.2984	2.925

Table 5 Oxygen concentration measured by an oxygen meter

Sample		Oxygen concentration at each elapsed time (%)			Oxygen increment (%)
		0 min	15 min	30 min	
Shirasu	Raw	20.52	32.64	42.78	22.26
	Boil	20.45	20.44	20.45	0.00
	Boil + Dry	20.82	22.13	22.29	1.47

文 献

- 1) 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
- 2) 徳島 将光, 徳岡 太誠, 西田 泰之, 中山 清貴: 関税中央分析所報, **62**, 51
- 3) 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
- 4) 池原 裕可里, 氏原 覚, 渡部 紀太: 関税中央分析所報, **31**, 67
- 5) 京都電子工業株式会社ホームページ: “ヘアカラー液中の過酸化水素の定量” (<https://appsearch.kyoto-kem.com/pdfdl?mode=edit&id=525>), (参照 2022-12-13)
- 6) 日東精工アナリテック株式会社ホームページ: “オキシドール中の過酸化水素分析 (日本薬局方)”

(https://www.n-analytech.co.jp/archives/001/202005/012_GT200-ME020_.pdf), (参照 2022-12-7)

- 7) 中村 成夫: “活性酸素と抗酸化物質の化学”, 日医大医会誌, **9** (3) (2013) 164-169,
(https://www.jstage.jst.go.jp/article/manms/9/3/9_164/_pdf/-char/ja), (参照 2023-03-17)