

魚類の腐敗検定法に関する研究〔2〕

——酵素活性の変化による検定について——

太田 馨* 坂田由紀子**

原田佳子*** 和田和子***

まえがき

著者らは魚類の腐敗度検定に際して従来よりあまり行なわれていない方法について検討を試み、¹⁾前報においては、腐敗により生成するヒスタミンの定量により魚類の腐敗度を知ることが可能であることを報告したが、本報においては死後魚体内の各種酵素活性が変化するところから、その活性の測定により鮮度および腐敗度が検定できるかどうかを検討した。その結果酵素の種類によっては検定可能であることを知ったので、その結果につき報告する。

実験の部

1 コリンエステラーゼ活性による検定

実験材料および酵素液の調整

市販の新鮮なサバの血合肉をみじん切りしてシャーレに入れ 32°C 恒温器中にて放置し、一定時間後その 3g をとり、pH 7.4 のリン酸塩緩衝液 2cc を加え、Potter—Elvehjem ホモゲナイザーにてよく磨碎し、脱脂綿で濾過した濾液を酵素液とした。

コリンエステラーゼ活性の測定法²⁾

Hestrin 比色法により行なった。すなわち、基質液 0.005 M アセチルコリンブロマイド液 1cc に酵素液 1cc を加え、37°C 恒温槽にて 30 分間反応せしめ、常法により発色後エルマ式分光光度計 N4 型にて波長 540m μ で、[吸光度を測定し、残存するアセチンコリンを定量し、コリンエステラーゼ活性を測定した。

実験結果

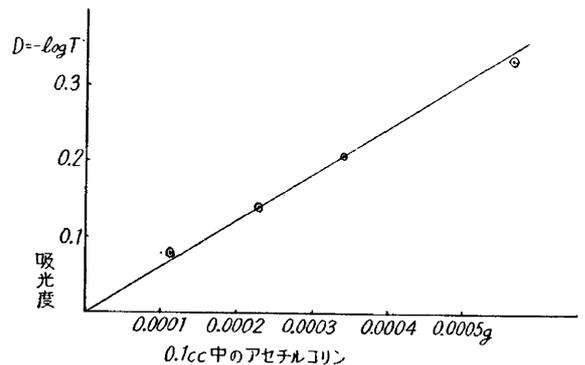
アセチルコリンの標準曲線は第1図のようである。さば血合肉の腐敗によるコリンエステラーゼ活性の

変化を測定した結果は第1表のごとくである。

第1表 コリンエステラーゼ活性の変化 (さば血合肉)

腐敗時間	吸光度	残存アセチルコリン (g)	分解アセチルコリン (g)	分解率 (%)
新鮮時	0.134	0.000220	0.000910	80.53
3時間	0.150	0.000245	0.000885	78.31
6時間	0.166	0.000271	0.000859	76.01
24時間	0.252	0.000411	0.000719	63.62

第1図 アセチルコリン標準曲線

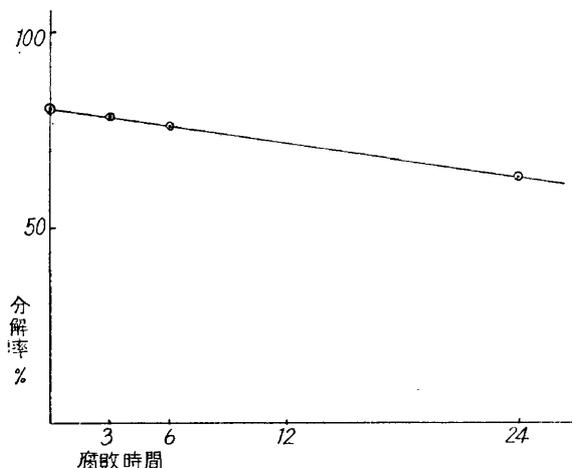


考察

第1表に見られるごとく、さば血合肉は腐敗するに従い、そのコリンエステラーゼ活性は低くなる。その分解率を求めて図示すれば第2図のとおりであり、測定時間以外の時間における分解率も予想出来る。

*本学教授 **本学副手 ***昭和38年度卒業生

第2図 アセチルコリン分解率



磨碎さば肉の 30°C 保存における腐敗度をアンモニア態窒素で検定すると、6時間³⁾で 30mg% に達し、この時期が腐敗初期と認められる。本実験においては6時間後のコリンエステラーゼ活性は分解率 76.01% であり、かかる分解率前後が腐敗初期と考えられる。すなわち、コリンエステラーゼ活性の測定により魚類の腐敗度を検定することが可能である。

Ⅱ アルギナーゼ活性による検定

実験材料および酵素液の調整

前項実験と同様、市販の新鮮なさばの血合肉をみじん切りにして 32°C の恒温器中にて放置し、一定時間後その 4g を採り、pH 9.5 NH₄OH-NH₄Cl 緩衝液 4cc を加え、Potter-Elvehjem ホモゲナイザーにてよく磨碎し、脱脂綿で濾過した濾液を酵素液とした。

アルギナーゼ活性の測定法

Watt 比色法⁴⁾により行なった。すなわち 0.8M アルギニン溶液 0.5cc に酵素液 1cc を加え、25°C 恒温槽にて 10 分間反応せしめ常法により発色後、エルマ式分光光度計 N4 型にて波長 420m μ で吸光度を測定し生成尿素量を定量し、アルギナーゼ活性を測定した。

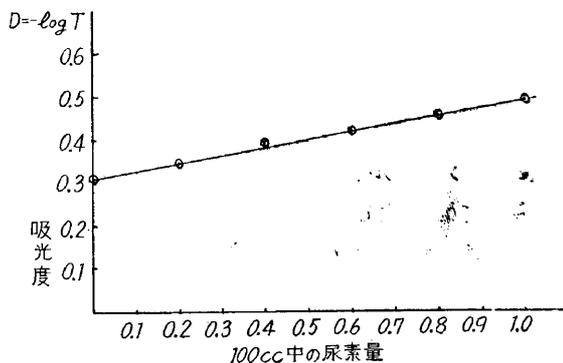
実験結果

尿素的標準曲線は第3図の通りである。さば血合肉の腐敗度におけるアルギナーゼによる尿素生成量は第2表の通りである。

第2表 アルギナーゼ活性の変化

	測定値	Blank test値	生成尿素量	生成尿素率
新鮮時	0.407	0.385	0.120	2.5
24時間後	0.361	0.360	0.015	0.31
48時間後	0.455	0.455	0.000	0

第3図 尿素標準曲線

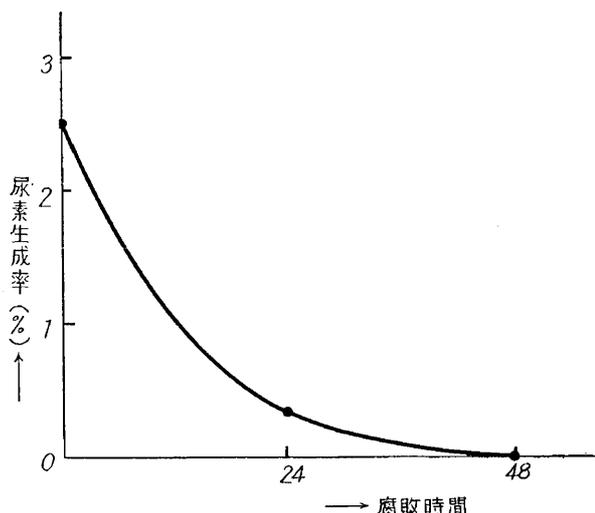


考 察

第2表に見られるごとく、さば血合肉は腐敗するに従いそのアルギナーゼによる尿素生成量は少なくなり、アルギナーゼ活性はかなり急速に低くなる。計算値に対する腐敗時の尿素生成率を図示すれば第4図の通りとなる。

さば血合肉の 32°C 保存における腐敗初期は前項同様6時間後であり、6時間後の尿素生成率は1.6% であり、この生成率前後が腐敗初期と考えられる。この結果アルギナーゼ活性の測定により腐敗度を検定する事は可能である。

第4図 尿素生成率



Ⅲ 脱水素酵素活性による検定

実験材料および酵素液の調整

市販のさば白身、あじの血合肉、鯉の肝臓を各マンジャーレに入れ、33°C の恒温器中に放置し、一定時間後 3g ずつとり、pH 7.4 のリン酸塩緩衝液 2cc を加え、乳鉢でよく磨碎し、脱脂綿で濾過した濾液を酵素液とした。

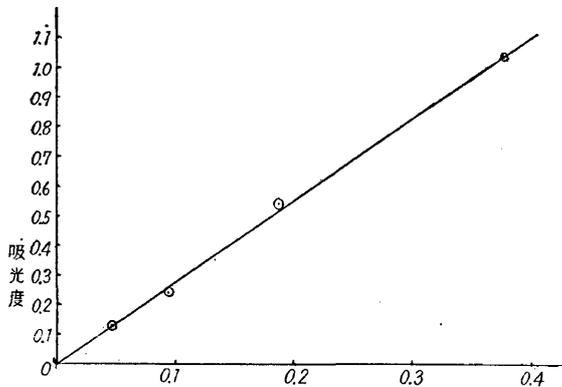
5) 脱水素酵素活性の測定法

脱水素酵素活性の測定法には種々のものがあるが、本実験では、基質からの水素により還元されて発色した色素を抽出し、比色定量する方法を用いた。すなわち pH 7.4 の 1/10M リン酸塩緩衝液 1cc, 酵素液 1cc, 水 1cc をツンベルク管の主室に採り、1/10M コハク酸ソーダ 1cc および 1/1000M TTC (2,3,5-Tri-phenyltetrazolium chloride) 1cc を側室にとり、25°C の恒温槽にて 10 分間温度平衡させてのち、側室液を主室に加えて全量を 5cc として 30 分間反応せしめた。しかる後 20% トリクロル酢酸 0.5cc を加えて反応を止め、酢酸エチル 7.5cc にて抽出し、抽出液をエルマ式分光光度計 N4 型にて波長 480m μ で吸光度を測定し、生成された T.P.F (Tri-phenyl-formazon) を定量し、脱水素酵素活性を測定した。

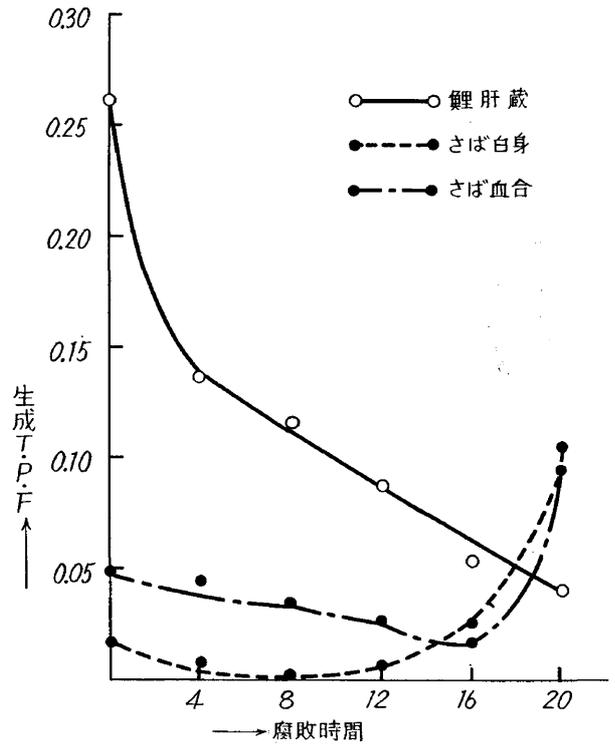
実験結果

T.P.F の標準曲線は第 5 図の通りである。さば白身、あじ血合肉、鯉肝臓の腐敗による脱水素酵素活性の変化は第 6 図に示すごとくである。

第 5 図 T.P.F 標準曲線



第 6 図 脱水素酵素活性の腐敗時間に伴う変化



考 察

さば白身、あじ血合肉、鯉肝臓の腐敗による脱水素酵素活性の変化は、時間の経過により次第に弱くなるが、材料によりその度合はことなり、また一定時間後強くなるが、この時間も材料によりことなる。よって前項の考察のように腐敗の初期を決めることはできない。

IV 蛋白質分解酵素活性による検定

実験材料および酵素液の調整

市販の新鮮なさばの白身、血合肉 4g に水 3cc を加え、鯉の肝臓はそのまま磨碎して 4g をそれぞれ 30°C ~33°C の恒温器中に放置し、一定時間後とりだし、pH 7.8 1/10M リン酸塩緩衝液 2cc を加えよく乳鉢で磨碎して脱脂綿で濾過し、濾液を酵素液とした。

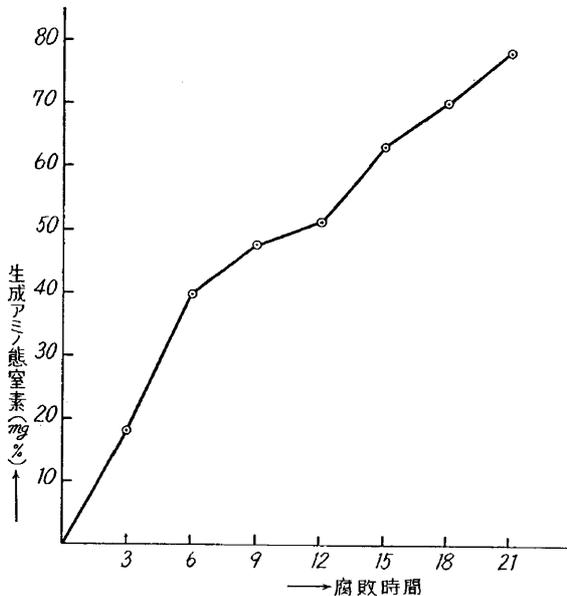
6) 蛋白質分解酵素活性の測定法

牛乳 20cc を蛋白質基質とし、酵素液 2cc を加え、35°C にて 60 分間 反応せしめ、生じたアミノ態窒素の生成量をホルモール法によって定量し、酵素活性とした。

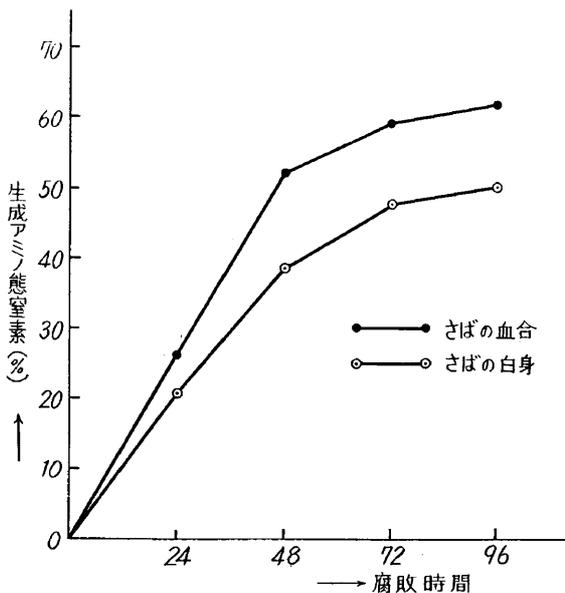
実験結果

さば白身、さば血合肉、鯉肝臓の蛋白質分解酵素の腐敗による活性変化は第 7 図、第 8 図の如くとなる。

第7図 鯉肝臓の蛋白質分解酵素活性の変化



第8図 肉の蛋白質分解酵素活性の変化



考 察

第7図、第8図に見られるごとく、さばの血合肉、さばの白身、鯉の肝臓は腐敗するに従い蛋白質分解酵素活性は強くなる。

前述のように磨砕さば肉の 30°C 保存の腐敗度をアミノ態窒素により検定すると、6時間で 80~100mg%に達し、腐敗初期と認められる³⁾。

本実験において、6時間後における各部の蛋白質分解酵素活性は、牛乳を基質として蛋白質分解酵素によって生成された遊離アミノ態窒素量の測定より検討すると、さば血合肉 65mg%、さば白身 50mg%、鯉肝

臓410mg%となり、それぞれの試料中の蛋白質分解酵素活性が上記のアミノ態窒素生成量の時期が腐敗初期と考えられる。すなわち蛋白質分解酵素活性の測定により腐敗度を検定する事が可能と思われる。

要 約

魚類の腐敗度検定に関して、従来から行なわれている方法以外の方法として各種酵素の活性変化による検定を試み、コリンエステラーゼ、アルギナーゼ、脱水素酵素、蛋白質分解酵素について検定した結果、次の諸点を明らかにした。

1) コリンエステラーゼ

さば血合肉は腐敗するに従い、そのコリンエステラーゼ活性は低くなり、32°C、6時間後におけるアセチルコリンの分解率76.01%附近の活性時期が、腐敗初期と思われる。

2) アルギナーゼ

さば血合肉は腐敗するに従い、アルギナーゼ活性は低くなり、32°C、6時間後の尿素生成率は1.6%前後であり、この時期が腐敗初期と思われる。

3) 脱水素酵素

腐敗による脱水素酵素活性の変化は魚類の組織の差により異なり、腐敗の初期を決定する同一要素がないため、脱水素酵素活性から腐敗を検定することは困難である。

4) 蛋白質分解酵素

さばの血合肉、さば白身、鯉肝臓は腐敗するに従い蛋白質分解酵素によるアミノ態窒素は増加し、牛乳からの生成アミノ態窒素量がさば血合肉65mg%、さば白身 50mg%、鯉肝臓 410mg%の活性時期が腐敗初期と考えられる。

5) 魚類のコリンエステラーゼ、アルギナーゼ、蛋白質分解酵素の活性測定により、魚類の腐敗を検定することが可能である。

文 献

1) 太田馨, 中村佳子, 八木由紀子 : 本誌 15, 6 (1964)
 2) 関根隆光 : 光電比色法, 2, 113 (1960)
 3) 足立晃太郎, 田中千代子 : 本誌 5, 41 (1958)
 4) 関根隆光 : 光電比色法, 2, 58 (1960)
 5) 佐藤 了 : 標準生化学実験, 304 (1954)
 6) 東京農工大食糧化学教室 : 食品学実験法, 19, (1960)