リソゾーム酵素活性を指標とする解凍魚と 非凍結魚の鑑別法の検討^{*1}

下村 博, 高橋 喬, 森下達雄, 上野隆二

(1987年2月5日受理)

Investigation of the Differentiation of Frozen-Thawed Fish from Unfrozen Fish by Comparison of Lysosomal Enzyme Activity

Hiroshi Shimomura,^{*2,3} Takashi Takahashi,^{*2} Tatsuo Morishita,^{*2}
and Ryuji Ueno^{*2}

Lysosomal enzymes are released when lysosomal particles are ruptured by freezing-thawing. This study is concerned with whether or not frozen-thawed fishes can be differentiated from unfrozen ones by the activity level of lysosomal enzymes in the press juice of the muscle.

The press juice were squeezed from unfrozen fish muscle and frozen-thawed one by centrifugation, and the extracts were prepared by homogenizing the squeezed meat remained after centrifugation with 1% NaCl solution. The press juices and the extracts were used for determination of the activities of lysosomal enzymes: β -N-acetylglucosaminidase, α -glucosidase, and cathepsin D.

For each of the three enzymes, the ratio of the activity in the press juice to total activity (the sum of the enzyme activities in the press juice and the extract) in frozen-thawed muscle was compared with that of the unfrozen one. Seven fish species were tested for the ratio. The activity ratio was increased by freezing-thawing by two to three fold, higher than that of the unfrozen muscle for the five species examined and by more than ten fold higher for the two species examined. It was, however, rather difficult to find out a standard level of the activity ratio adequate for differentiation of the frozen-thawed muscle from unfrozen muscle of various species of fish because the activity ratio varied considerably from species to species.

冷凍魚の品質に関する研究にくらべると、解凍魚と非凍結魚との鑑別を目的とした研究はきわめて少ない。既往の研究では鑑別の指標として酵素活性の変化や活性の出現、¹⁾ 組織や微細構造の形態的变化、²⁾ 血球破壊³⁾などが利用されている。これらのなかでは酵素活性の変化を指標に用いた研究が比較的が多いが、同じ種類の酵素でも、魚種が異なれば凍結解凍による活性の変化が同様とは限らないようであり、⁴⁾ 今後考案される鑑別法は勿論のこと、すでに報告された方法についても、多くの魚種に適用できることが望まれ、その検討が必要であろう。

リソゾーム顆粒中の酵素はリソゾームの包膜が破壊されると活性を示すようになる。Rehbein ら⁵⁾は、タラ類やメバル類を用い、筋肉の圧出液中のリソゾームに由来する酵素の活性が凍結解凍によって高くなることを利用した鑑別法を検討し、解凍魚と非凍結魚との鑑別が可能

であることを報告しているが、著者らは脂質を多く含む魚種には、この方法はそのまま適用することができないことを知った。

本研究では、魚肉のリソゾーム酵素のうちで、酵素活性が比較的高く、しかも潜在活性も大で、包膜破壊後に遊離、可溶化されやすい β -N-acetylglucosaminidase (E. C. 3.2.10.30), α -glucosidase (E. C. 3.2.1.20.) および cathepsin D (E. C. 3.4.23.5) を指標として解凍魚と非凍結魚との鑑別法を検討した。

実験方法

試料 実験にはコイ *Cyprinus carpio* イサキ *Parapristigoma trilineatum*, カツオ *Katsuwonus pelamis*, マイワシ *Sardinops melanosticta*, マダイ *Pagrus major*, セイゴ *Lateolabrax japonicus*, マサバ *Scomber japonicus* を用

^{*1} 本報告の概要は昭和 60 年度日本水産学会秋季大会において発表した。

^{*2} 三重大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Mie University, Edobashi, Tsu 514, Japan).

^{*3} 現所属: ヤマサチくわ株式会社 (Present address: Yamasa Chikuwa Co. Ltd., Shimoji, Toyohashi 440, Japan).

いた。コイ、マダイは養殖魚、コイは即殺したものを、その他の魚は漁獲後、数時間から 24 時間までのものを使用した。

圧出液および抽出液の調製 後述する圧過円筒の底に濾紙をしき、その上にはさみで細切した筋肉約 5 g をはかり取り、この圧過円筒を普通の遠沈管に入れ、9,600×g、30 分間遠心分離した。濾紙を通して得られた遠心分離液を圧出液とし、その重量を測定後 1% 食塩水でメスフラスコに洗い流し、定容したのち酵素活性の測定に供した。圧出液を分離した後の肉に 10 倍量の 1% 食塩水を加え、ワーリングブレンダー (佐久間製作所) 目盛 4 で 5 分間ホモジナイズし、濃度が 0.2% となるようにトリトン X-100 を加え、4°C に 30 分間放置後 22,500×g、10 分間遠心分離し、得られた上澄液を酵素活性測定用抽出液とした。

酵素活性の測定法 β -N-acetylglucosaminidase: Woollen⁸⁾ の方法に準じて測定した。6 mM p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside 基質溶液 1 ml、0.2 M クエン酸緩衝溶液 (pH 4.5) 2 ml に酵素溶液 1 ml を加え、37°C、1 時間反応後 0.4 M ホウ酸緩衝溶液 (pH 10.0) 4 ml を加え、生ずる沈殿を圧別後 405 nm における吸光度を測定した。

α -glucosidase: 20 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 基質溶液 1 ml、0.2 M クエン酸緩衝溶液 (pH 4.5) 2 ml に酵素溶液 1 ml を加え、37°C、2 時間反応後 0.4 M ホウ酸緩衝溶液 (pH 10.0) 4 ml を加え、生ずる沈殿を圧別後 405 nm における吸光度を測定した。

Cathepsin D: 0.6% ヘモグロビン基質溶液 (pH 3.5) 2.5 ml に酵素溶液 0.5 ml を加え 37°C で 3 時間反応させ、0.44 M トリクロル酢酸溶液 2.5 ml を加えて反応停止後圧過し、圧液中のヘモグロビン分解物の濃度を Lowry 法⁷⁾により測定した。

鑑定法 供試魚の左右いずれかの片側の背部中央付近の普通肉を非凍結魚試料として採取し、残りはビニル袋に入れ -30°C のストッカーに凍結貯蔵した。7~10 日後にストッカーより取り出し、袋に入れたまま流水中で解凍後、凍結前に試料を採取した部位と対称的な部位から普通肉を採取し、これを凍結解凍魚試料とした。これらの試料から得られた圧出液および抽出液の各酵素活性を測定し、下記の式から筋肉 1 g 当りの全酵素活性 (圧出液の酵素活性 + 抽出液の酵素活性) に対する圧出液の酵素活性の割合を求め、非凍結魚および凍結解凍魚におけるこの酵素活性の割合 (以下、遊離活性の割合と記す) を比較した。

$$\text{圧出液の酵素活性 } A = \frac{E \times V}{M}$$

$$\text{抽出液の酵素活性 } B = \frac{E' \times V' \times 10(M-P)}{M}$$

$$\text{遊離活性の割合 (\%)} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

E および V: 希釈圧出液の酵素活性 (吸光度) および希釈倍数, E' および V': 希釈抽出液の酵素活性 (吸光度) および希釈倍数. P: 圧出液重量 (g), M: 筋肉採取重量 (g).

結果および考察

圧出液調製法の検討 すでにリゾゾーム顆粒から遊離し可溶化されている筋肉中の酵素を抽出する際には、未破壊のリゾゾーム顆粒をできるだけ損傷することのない抽出法を用いなければならない。Rehbein⁹⁾は細切した筋肉を遠心分離 (28,000×g, 30 分間) して得られる上澄液を圧出液とし、遊離酵素活性の測定に使用している。しかし、ウナギでは圧出液が得られないことも報告している。⁸⁾ この圧出液の調製方法を検討したところ、イサキやメバルなどの筋肉脂質含量が比較的少ない魚種では問題がなかったが、養殖ハマチのように脂質含量が多いものでは、脂質が上部に滲出するだけで圧出液は全く得られなかった。

遠心分離法のほかにワーリングブレンダーを用いて遊離酵素を抽出する方法も種々検討したが、結局、Fig. 1 に示した圧過円筒を用い遠心分離して遊離酵素を抽出する方法が適切と考えられたので、さらに遠心分離の条件などに検討を加えた。

圧過円筒はステンレス製で底には小孔を適当数あけてある。底に濾紙をしきその上に細切した筋肉を採取した

Fig. 1. Filter tube

Preparation of press juice: Fish muscle was cut with scissors into small pieces and 5 g of the muscle pieces were taken into the filter tube illustrated in which a filter paper was placed at the bottom. The filter tube was put in a usual centrifuge tube and centrifuged at 9,600×g for 30 min using RPR-20 angle rotor and a Hitachi refrigerated conentrifuge.

のち、汙過円筒を普通のプラスチック製遠沈管に入れて遠心分離した。低速で遠心分離すると、コイのように肉質が硬いものでは圧出液がほとんど得られなかった。また、回転速度を高くすると、肉質のやわらかいものでは汙紙の目づまりをひきおこし、圧出液は肉の上部に滲出し遠沈管には流下してこなかった。このような問題を解決するため種々検討した結果、図示した寸法の汙過円筒を用い、魚肉の採取量を約 5 g とし、アングルローターを使用して遠心分離することにより、魚肉は汙紙の周辺の一部がわずかに露出する状態で沈着する (Fig. 1) ので、肉質のやわらかいものを比較的高速で遠心分離しても、魚肉の表面に滲出してくる圧出液を遠沈管に集めることができた。また、即殺コイのような肉質の硬いものから圧出液を採取するためには、比較的高速で遠心分離する必要があり、本実験では、汙過円筒 1 本当り 5 g の魚肉を採取し、アングルローターを用いて 9,600 × g (10,000 rpm), 30 分間遠心分離して圧出液を調製することにした。

解凍肉および非凍結肉の活性の割合 イサキ 6 尾を用いて解凍肉および非凍結肉における遊離活性の割合を調べた。凍結貯蔵期間は 5 日間でその他の実験条件は鑑定

法に述べたとおりである。Table 1 にその結果を示す。遊離活性の割合は、3 種類の酵素とも、個体間の差異はやや大きい、平均すると解凍肉における遊離活性の割合は非凍結肉のその 2~2.5 倍であった。

次に活けすから採取したきわめて新鮮なイサキを所定の日数間氷蔵したのち凍結貯蔵して、解凍肉および非凍結肉における遊離活性の割合を調べた。結果を Fig. 2 に示す。非凍結肉の遊離活性の割合は、氷蔵期間が長くなるにしたがって増加する傾向がみられるが、3 種類のいずれの酵素においても、魚を生けすから採取したのち氷蔵 1 日の間に約 2 倍に急増し、その後は徐々に増加した。このような傾向は解凍肉においてもみられ、氷蔵期間の長いもの程活性の割合が大きかった。解凍肉の活性の割合は凍結前のそれに応じて変動することを示しているが、これはまた、鮮度が低下するにしたがって、非凍結肉においても、解凍肉においても、遊離活性の割合が増大することを示しており、氷蔵 0 日から氷蔵 1 日の間に急増するのは、おもに死後硬直の影響があらわれているものと考えられる。また実験した範囲内では、氷蔵期間が長くなっても凍結しないものは、死後数時間後に凍結したものよりも遊離活性の割合が低いという結果を得

Table 1. Activity ratios of lysosomal enzymes in unfrozen muscle and frozen-thawed muscle

State of muscle	Press juice obtained (g/10 g muscle)	Activity ratio		
		β -N-acetyl-glucosaminidase	α -Glucosiadse	Cathepsin D
Unfrozen				
No. 1	1.25	9.1%	12.0%	5.9%
No. 2	1.65	12.2	14.0	7.5
No. 3	1.61	11.5	12.7	6.9
No. 4	1.51	9.8	12.0	6.5
No. 5	1.57	12.2	19.3	10.2
No. 6	1.65	10.9	15.6	6.3
Mean	1.54±0.2	11.0±1.3	14.3±2.8	7.2±1.6
Frozen-thawed				
No. 1	1.36	20.2	19.3	11.3
No. 2	1.96	31.6	31.5	14.7
No. 3	1.75	30.2	22.8	15.8
No. 4	2.04	28.5	28.2	18.6
No. 5	1.96	30.4	29.3	20.8
No. 6	2.19	31.0	38.2	17.2
Mean	1.88±0.3	28.7±4.3	28.2±6.6	16.3±3.6

The anterior parts of dorsal muscle of grunts, *Parapristipoma trilineatum*, was used for as an unfrozen sample and the posterior parts as a frozen (at -30°C for 5 days)-thawed sample.

Activity ratio: The ratio of enzymatic activity in the press juice to total activity which is the sum of the enzymatic activities in the press juice and the extract.

Press juice: A juice squeezed from muscle by centrifugation as described in Table 1.

Extract: 1% NaCl extract (containing 0.2% Triton X-100) prepared from the squeezed muscle by homogenization and centrifugation (22,500 × g, 10 min).

Enzyme assays: β -N-acetylglucosaminidase activity was determined by the method of Woolen *et al.*⁽⁶⁾ modified by the incubation time of 1 hour. α -glucosidase; *p*-nitrophenol released from *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside at pH 4.5, 37°C for 2 hr was measured at 405 nm at alkaline pH. Cathepsin D; hydrolysis product of hemoglobin at pH 3.5, 37°C for 3 hr was determined by the method of Lowry *et al.*⁽⁷⁾

Fig. 2. Increases in activity ratios of lysosomal enzymes along with iced storage time of unfrozen fish.

Grantses *Parapristipoma trilineatum* were stored in an ice box and on every day indicated in the figure three fishes were tested for the activity ratio by the same manner as that described in Table 1 except that the samples were frozen for 9 days.

○ unfrozen, ● frozen-thawed

た。

数種類の魚について解凍肉と非凍結肉における遊離活性の割合を調べた。結果を Table 2 および Fig. 3 に示す。遊離活性の割合はいずれの魚種においても解凍肉の

Fig. 3. Activity ratios of lysosomal enzymes in unfrozen and frozen-thawed muscles of 7 species of fish.

The manner was the same as that described in Table 1 except that the samples were frozen for 9 days. As to the symbols of fish species, refer to the legend of Table 2.

Open bar: unfrozen, Shaded bar: frozen-thawed.

Table 2. Yields of the press juices squeezed from unfrozen and frozen-thawed muscles of 7 species of fish

(g/10 g muscle)

State of muscle	Species						
	A	B	C	D	E	F	G
Unfrozen	1.90	1.39	1.54	0.15	0.51	1.26	0.72
Frozen-thawed	2.20	1.61	1.88	1.75	1.73	1.90	0.91

The press juice was prepared by the same manner as that described in Fig. 1.

Species A: Mackerel, *Scomber japonicus*. B: Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. C: Grunts, *Parapristipoma trilineatum*. D: Carp, *Cyprinus carpio*. E: Sea bass, *Lateolabrax japonicus*. F: Sardine, *Sardinops melanosticta*. G: Red sea bream, *Pagrus major*.

Frozen-storage condition: -30°C , 9 days.

ほうが非凍結肉よりも大きいことが、とくに、コイおよびセイゴではこれらの割合の間に著しい差がみられた。たとえば β -N-acetylglucosaminidase についてみるとコイでは約 40 倍、セイゴでは 16 倍ほど大である。これは、コイおよびセイゴの非凍結肉における遊離活性の割合がきわめて小さいことによるものであるが、これらの魚種では肉質が硬く、Table 2 に示すように非凍結肉から得られた圧出液の量が著しく少ないことに起因する。このように解凍肉と非凍結肉の間で、遊離活性の割合に大きな差異がある場合には、解凍魚と非凍結魚とを区別するための共通の基準値をみいだすことは比較的容易である。コイ、セイゴ以外の魚種では、解凍肉の遊離活性の割合は非凍結肉のその 2~3 倍大きく、それぞれの魚種については解凍魚と非凍結魚とを区別することが可能のように思われる。しかしながら、遊離活性の割合は魚種によって異なり、たとえば非凍結肉の遊離活性の割合は魚種間（コイ、セイゴを除く）で約 2 倍の差があるから、多くの魚種に適用できる鑑別のための基準値を定めることは困難である。この実験では、cathepsin D の遊離活性の割合が 9~10% 以上であれば解凍魚とみなして

もよさそうな結果も得られたが、さらに多くの魚種について調べると同時に、cathepsin D と他の方法の併用についても検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) S. Vincenzo, F. Franceso, and P. Giovanna: *J. Sic. Food Agric.*, **36**, 811-817 (1985).
- 2) K. Yoshioka and M. Kitamikado: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 151 (1983).
- 3) 吉岡慶子: 日水誌, **51**, 1331-1336 (1985).
- 4) 小長谷史郎: 水産学シリーズ 29, 水産食品の鑑定 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1979, pp. 100-101.
- 5) H. Rehbein, G. Kress, and W. Schrieber: *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 1076-1082 (1978).
- 6) J. W. Woolen, R. Heyworth, and P. G. Walker: *Biochem. J.*, **78**, 111-116 (1961).
- 7) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 8) H. Rehbein: *J. Food Biochem.*, **8**, 79-89 (1984).