

## カツオ筋肉中のプロテアーゼの凍結処理 による活性化について

大 城 善 太 郎\*

### Effect of Freezing on Activation of Protease Contained in Skipjack Muscle

Zentaro OOSHIRO\*

#### Abstract

Rates of activation of crude protease contained in skipjack muscle was measured at  $-10$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ . The results showed that the activation rate of the protease increased at low temperature in early period of storage. If the distinguished increases on activation rate described in the manuscript are due to the freezing of protease, such behavior of the enzyme may give important suggestion on the storage technology of the frozen skipjack.

生鮮物を凍結貯蔵した場合、組織中の酵素作用が著しく低下することは、反応速度論的見地からも異論のないところである。

しかし筆者が凍結貯蔵中のカツオ筋肉中から抽出したプロテアーゼの活性の変化について検討した結果では、特に凍結初期において顕著に活性化することが認められた。この事実は酵素化学的にも極めて重要なことであると考えられ、又凍結カツオの品質にも影響するものであろうと思われるので、活性化の機構につき若干の解明を試みた。

#### 実験材料および方法

##### 1. 実験材料

長崎県五島沖でとれた新鮮なカツオを $-10^{\circ}$ および $-20^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫中で凍結保存し、一定時間後筋肉部10gを秤取し、これに蒸留水 50 ml を加えてホモジナイザーにて抽出し、懸濁液を遠心分離し、その上澄液を粗プロテアーゼ液とした。

##### 2. プロテアーゼ活性の測定法<sup>1)</sup>

基質として1%カゼイン (pH 8.0) を用い、その2ml にカツオ筋肉より抽出した粗酵素液 1 ml を加えて一定時間反応させ、0.4Mトリクロール酢酸溶液 3 ml を加えて反応を停止させ未反応のカゼインの沈澱を完成させた後これを濾過し、濾液中の非蛋白性物質中のチロシン量を280m $\mu$ における吸光度を測定することによってプロテアーゼ活性を求めた。

\* 鹿児島大学水産学部水産加工学教室 (Laboratory of Food Processing Technology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

## 実験結果

## 1. 長期間凍結保管したカツオ肉プロテアーゼ活性の変化について

−10°および−20°Cに新鮮なカツオと少々鮮度の低下したカツオを凍結保管し、その筋肉プロテアーゼの活性を1ヶ月、2ヶ月目に測定し、その結果を Fig. 1 に示した。

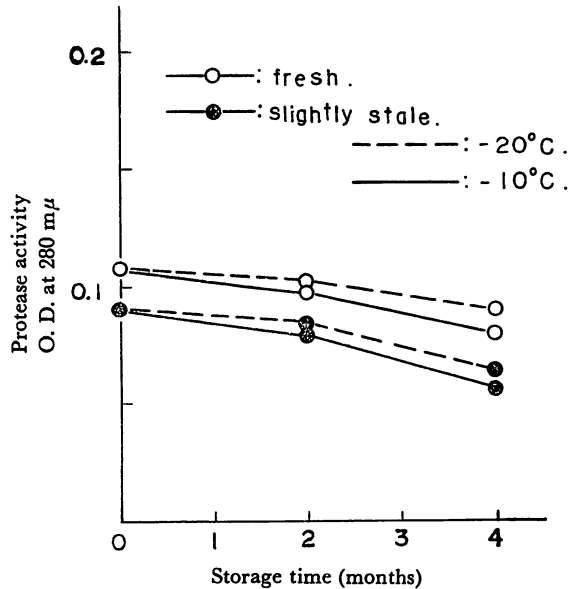


Fig. 1 Changes of protease activity in skipjack muscle during cold storage. Protease activity was determined by the rate of hydrolysis of 1% casein in phosphate buffer after incubation for 10 hours at 37°C. The decreases in optical density of TCA filtrate means the depression of the protease activity.

これで明らかなように−10°および−20°Cに長期間貯蔵した場合には、鮮度の如何によらず貯蔵中幾分失活することが認められた。尚 −10°C に凍結保管した試料のプロテアーゼ活性が −20°C のそれよりも幾分活性の低下が早いことから、いわゆる凍結変性による失活と考えられる。

## 2. 凍結初期におけるカツオ肉中プロテアーゼの活性化現象について

凍結による食品の貯蔵は主として微生物や酵素等の生物活性を抑制して長期間の保存を可能にするものである。しかしながら凍結処理は生鮮食品に大きな物理的变化を与えるから、この変化に伴って微生物および酵素にも影響を与えるものと考えられる。筆者はこれらのことを明らかにする目的から、凍結貯蔵初期におけるプロテアーゼ活性の変化を調べた。その結果は Fig. 2 に示す通りである。

これから明らかなように、凍結初期においてプロテアーゼが著しく活性化されることが認められた。この事実は酵素化学的にも極めて興味あることであるが、又凍結カツオの品質にも影響するものと思われる。

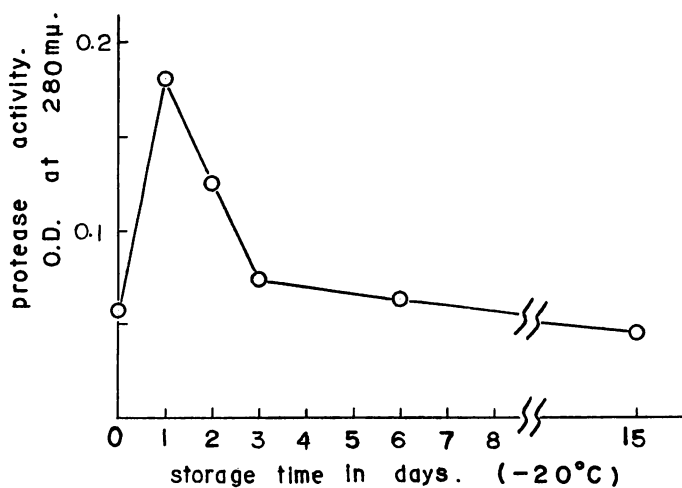
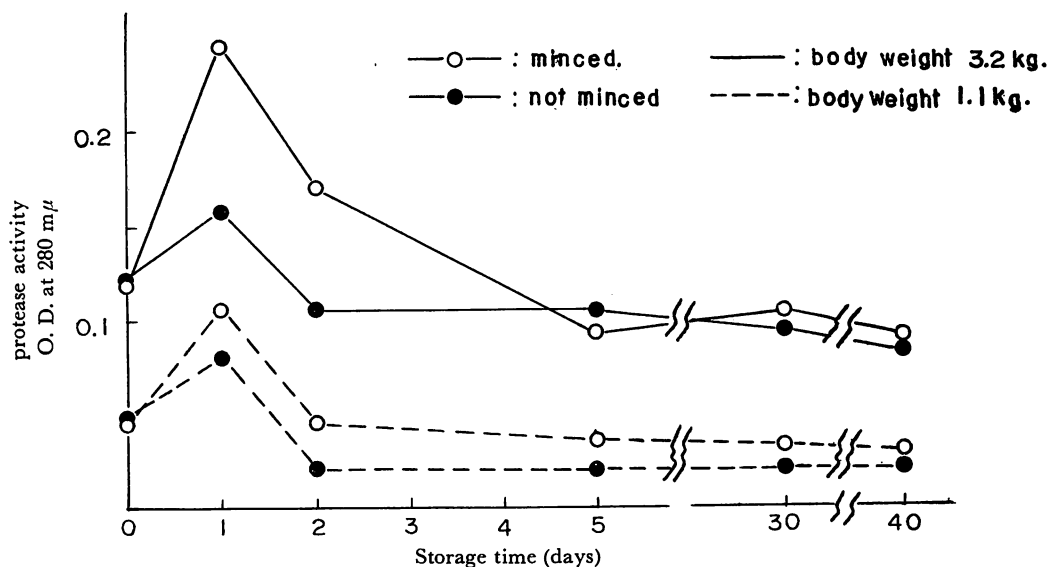


Fig. 2 Effect of freezing on activation of protease in skipjack muscle.

### 3. 凍結初期におけるプロテアーゼの活性化に及ぼす細碎処理の効果

カツオ筋肉中プロテアーゼの凍結処理による活性化の機構を明らかにする目的から細碎効果につき検討した。即ち魚体重量の異なる（大型3.2 Kg, 小型1.1Kg）新鮮なカツオ肉を試料とし、一方はブロックのまま、他方はチョッパーにかけて細碎して直ちに $-20^{\circ}\text{C}$ のストッカーに凍結保管したものにつき特に凍結初期における筋肉中プロテアーゼの活性を測定して、凍結によるプロテアーゼの活性化に及ぼす細碎処理効果を比較検討した。その結果をFig. 3に示す。

Fig. 3 Effect of mincing on activation of protease in skipjack muscle during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

これから明らかなように大型カツオ肉中のプロテアーゼの活性は、小型カツオのそれより幾分大きい、何れの試料でも凍結後一日で生鮮時の約2倍相当の活性が認められた。しかしながら2日目には再び生鮮時の活性のレベルに低下し、それ以後は極めて徐々に失活することが認められた。この際のプロテアーゼの活性化は細碎試料において著しかった。

#### 4. 凍結処理によるプロテアーゼの活性化に及ぼす酸化剤の影響

実験3で認められたように、凍結処理によるカツオ肉プロテアーゼの活性化が細碎試料において著しいことから活性化は凍結時に酵素蛋白質が空気酸化を受けて、その三次元構造に変化をきたし、酵素活性発現に好適な形となるためであろうと考えられた。この想定を確かめるため、プロテアーゼの活性化に及ぼす酸化剤の影響につき検討した。即ちカツオ筋肉の抽出液6 mlに0.001M, 0.01M, 0.1Mのブロム酸カリ溶液をそれぞれ1 mlと緩衝液1 mlを加え、各試料を $-20^{\circ}\text{C}$ のストッカー中で凍結し、1日目および2日目の酵素活性を測定し、活性に及ぼすブロム酸カリの影響を調べた。その結果はFig. 4に示す通りで、特にブロム酸カリの添加による活性化はみられず、むしろブロム酸カリの添加量に比例して酵素活性の阻

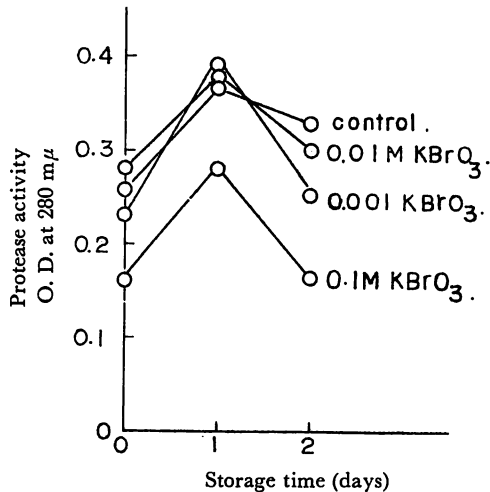


Fig. 4 Influence of an oxidant  $\text{KBrO}_3$  on activity of protease prepared from frozen skipjack muscle.

The protease activity was estimated on the enzyme adding different concentration of  $\text{KBrO}_3$  and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

害が認められた。しかしブロム酸カリによる阻害の様相は一般の塩類による酵素作用の阻害と同様の傾向を示した。これらのことから、凍結初期におけるカツオ筋肉プロテアーゼの一時的な活性化現象は空気酸化等による酵素蛋白質の構造変化によるものとする積極的なうらづけは得られなかった。

#### 考 察

凍結貯蔵初期にみられるカツオ筋肉プロテアーゼの活性化は凍結処理によって酵素蛋白質が、いわゆる ES-Complex を形成するのに、より理想的な形に立体構造が変化するためと

考えられる。Koshland<sup>2)</sup>は酵素の活性中心の構造的可変性 (Flexibility) を考え、酵素蛋白質が外圍の条件に応じてその構造が変り、酵素活性にも変化が起こることを認めている。それ故に酵素を活性の面から見るといわゆる Native なものが必ずしも最良の状態ではないともいわれている。加熱処理による卵白 Muramidase の活性化<sup>3)</sup>等はその良い例であり、これは加熱により蛋白質の folding に変化をきたし、ペプチッド鎖が自由度を獲得したためであると考えられている。しかし一般には酵素蛋白質は冷却されることにより Rigid な構造となり、活性も低下するものと考えられるからカツオ筋肉プロテアーゼが凍結処理によって活性化することは、酵素化学的にも極めて特殊な興味ある事実であり、又凍結カツオの品質にも影響するものと考えられるので今後さらに充分検討する必要がある。

本研究の実施に当り所要経費の一部を本学部太田冬雄教授の昭和37、38年度文部省科学試験研究費より支出し、かつ本学部学生山野延偉、岩崎知之の両君の協力を得た。附記して謝意を表する。

#### 文 献

- 1) KUNITZ, M. (1947): *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291.
- 2) KOSHLAND, D.E. (1959): Symposium on Enzyme Reaction Mechanisms, Oak Ridge National Laboratory, Gatlinburg, Tennessee. P. 245.
- 3) HAYASHI, K., K. HAMAGUCHI and M. FUNATSU (1963): *J. Biochem.*, **53** 374.