

# マグロ肉色とメトミオグロビン還元酵素活性との関係についてI

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	山中, 英明 高見沢, 光子 天野, 慶之
巻/号	39巻6号
掲載ページ	p. 667-671
発行年月	1973年6月

## マグロ肉色とメトミオグロビン還元酵素 活性との関係について—I

### マグロ肉抽出液中のメトミオグロビン還元酵素活性測定方法\*

山中 英明・高見沢光子・天野 慶之

(1973年1月17日受理)

#### Relation between the Colour of Tuna Meat and the Activity of Metmyoglobin Reductase—I.

#### A Determination Method of Metmyoglobin Reductase Activity of the Extract from Tuna Meat

Hideaki YAMANAKA\*\*, Mitsuko TAKAMIZAWA\*\*,  
and Keishi AMANO\*\*

In order to elucidate the relation between the colour of tuna meat and the activity of metmyoglobin reductase, a method for measuring its activity was examined using an extract prepared from big-eye tuna meat.

The most convenient method was found to be one in which the reductase activity is calculated from the ratio of the optical density at 406 m $\mu$  (SORET maximum of metmyoglobin) to that at 415 m $\mu$  (SORET maximum of oxymyoglobin). It was demonstrated from absorption spectra that the enzymatic reduction of metmyoglobin is accelerated by the removal of oxygen. As to the intracellular localization of the enzyme, it was suggested that it is not attached to particulates such as mitochondria, but is rather a fraction of myogen.

マグロ肉を同一貯蔵条件に保つた場合、個体によつて色変の速さがかなり異なつている。この個体差の原因の一つとして、肉のメトミオグロビン (metMb) 還元酵素活性の違いによる影響が考えられる。

STEWART<sup>1)</sup>は、牛肉を用い、磨碎肉の酵素的な metMb 還元活性を測定し、metMb 還元活性は個体による差が著しいことを述べている。また、pH、貯蔵温度、塩濃度などの還元活性への影響を検討し、さらに還元機構についても言及している。WATTS<sup>2)</sup>は、牛および豚肉の酵素的還元過程においては、NAD<sup>3)</sup>が肉中の酸素消費と metMb の還元重要な役割を演じており、NADH<sup>4)</sup> 酸化阻害剤により肉の還元活性は完全に抑えられることを観察している。また、清水<sup>3-5)</sup>は、魚類の metMb 還元酵素、metHb 還元酵素の研究を進め、これらの酵素は主として NADPH<sup>6)</sup> とリンクし、metMb あるいは metHb の還元を触媒すると述べている。さらに、スジイルカから単離した metHb 還元酵素、metMb 還元酵素はともに、NADPH または NADH を補酵素として、メチレンブルー存在下で、metMb、metHb、酸化型チトクローム c を還元するが、NADPH を補酵素とする場合の活性が高いことを報告している。

ところで、metMb 還元酵素活性と肉色との関係についての研究はこれまであまりなされていない。そこ

\* 東海区水産研究所業績 B 569 号

\*\* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo)

\*\*\* NAD: nicotinamide-adenine dinucleotide

\*\*\*\* NADH: 還元型 NAD

\*\*\*\*\* NADPH: 還元型 nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate

で、典型的な赤身魚であり、しかも生で食べる割合が多く、肉色が経済上特に重要なマグロを用いて実験を行なった。肉色と還元酵素活性の関係を調べるに先立ちマグロ肉から調製した粗酵素液を用いて、マグロ肉の metMb 還元酵素活性を測定する方法について検討したので以下に報告する。

### 実験方法

**試料** 東京中央卸売市場で購入した冷凍メバチマグロ肉および日本近海で漁獲した氷蔵メバチマグロ肉を用いた。また、基質の metMb 調製のためには、冷凍メバチマグロの血合肉を使用した。

**metMb の調製** metMb 標品は SCHMID の方法<sup>6)</sup>に従い、メバチマグロ血合肉より調製し、冷蔵庫に保管した。使用時にその一部をとり、セロファンチューブに入れ、塩類を除去するため1日間流水透析を行なった。透析後、14,000×g で15分間遠心分離し、上澄を蒸溜水で稀釈して0.25% metMb 溶液とし、基質に用いた。なお、基質は99%位メト化していた。

**補酵素溶液の調製** 清水ら<sup>3-5)</sup>の報告に従い、metMb 還元酵素とリンクし、metMb を還元する NADPH を用いた。0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.50) に溶解し、濃度は1 mM とした。補酵素溶液は実験の都度毎回調製した。

**粗酵素液の調製** メバチマグロ普通肉 2 g に氷冷 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.00) 18 ml を加え、氷冷しながら日本精機製 HD 2 型ホモジナイザーでホモジナイズし、続いて 6,000×g で15分間遠心分離し、上澄を粗酵素液とした。

**metMb 還元酵素活性測定方法** ツンベルグ管の主室に 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.00) 3 ml, 0.25% metMb 溶液 0.5 ml, 粗酵素液 0.3 ml, 0.1 mM メチレンブルー 0.1 ml をとり、側室には 1 mM NADPH 0.5 ml を採取した。数分間、25°C の恒温水槽中に保つた後、25 mmHg の真空度になるように調節した真空ポンプにツンベルグ管を接続し、2分間吸引した。吸引後、NADPH を主室に流し込み、その時点を反応開始時とした。6分間、25°C の恒温水槽中に静置し、次いで通気し、3分後 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.00) で4倍に稀釈し、分光光度計で 406 m $\mu$  と 415 m $\mu$  の吸光度を測定した。6分間および3分間の静置時間は予備実験に従って決めた。その吸光比より、以下の結果の項で述べる計算図表および計算式に従って metMb 還元酵素活性を求めた。

**蛋白の定量** 粗酵素液の蛋白濃度は、FOLIN-CIOCALTEU 法を少しく改変した方法<sup>7)</sup>で行なった。

### 結果と考察

**metMb 還元酵素活性測定方法の検討** 肉の中で metMb の還元に関与している酵素としては、metMb 還元酵素、フェリ Hb 還元酵素、diaphorase が考えられるが、上記反応条件で測定されるのは、metMb 還元酵素だけと考えてよいと思われる\*。分光光度計を用いて、その吸光度から活性を測定する際に、従来は可視部の波長が使われてきた<sup>1,2,4)</sup>。しかし、可視部の吸収はあまり大きくない上に、水素伝達体として用いるメチレンブルーの吸収が丁度同じ波長帯に存在し、測定を複雑にする。そこで、著者らは、ヘム蛋白の Soret 帯の大きな吸収に着目し、metMb の吸収極大 406 m $\mu$  およびオキシン Mb の吸収極大 415 m $\mu$  の両波長を用いることにした。なお、都合のよいことには、メチレンブルーおよび NADPH の吸収は Soret 帯には存在しない。

まず、肉色の指標としての metMb% と 406 m $\mu$  および 415 m $\mu$  の吸光比  $E_{406 \text{ m}\mu}/E_{415 \text{ m}\mu}$  との関係を求める必要がある。そこで、肉色の異なる多数のメバチマグロ肉を用いて、Fig. 1 に示すような相関曲線を得た。

metMb 還元酵素活性を、次式で求めた metMb 還元能力で表わすことにし、この還元能力は上記の曲線を用いて求めた metMb% の減少量で示した。なお、本式は、粗酵素液無添加の場合にも、メチレンブルー

\* 松居 隆・清水千秋・松浦文雄：昭和46年10月日本水産学会秋季大会(函館)にて講演。

と NADPH によつて、BROWN ら<sup>8)</sup>の報告しているような非酵素的還元が起こり、かなりの量の metMb が還元されることや粗酵素液中にも低濃度ながら Mb が含まれていることをも考慮に入れたものである。

metMb 還元酵素活性 = (反応前の metMb% - 反応後の metMb%) - (基質 metMb 溶液の metMb% - 粗酵素液無添加で反応させた場合の metMb%)、

**酵素反応時の脱気効果** 酵素的還元力を測定する際には、脱気が必要なことは WATTS ら<sup>2)</sup>、清水ら<sup>4)</sup>によつて報告されているが、本実験においても、この脱気効果について検討してみた。実験方法の項で述べた測定方法に従つて、脱気後酵素反応を行なつた溶液と脱気せずに酵素反応を行なつた溶液の吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。これらの吸収スペクトルから明らかなように、脱気した場合の方が無脱気に比して速やかに還元が起こつていくことがわかつた。さらに、その反応溶液を 30 分間室温に放置後、吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 3 に示した。これによると、脱気および無脱気の吸収スペクトルは全く同じであり、無脱気の場合でも metMb の還元は緩慢に行なわれることがわかつた。

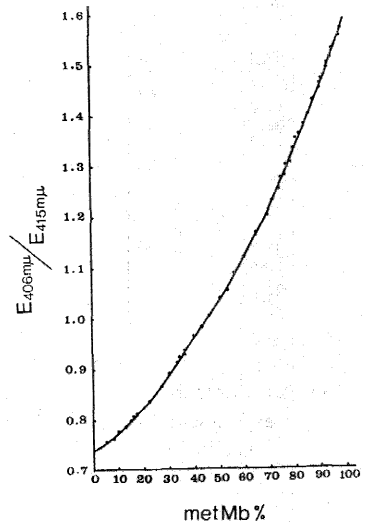


Fig. 1. Relation between the relative concentration of metMb to total Mb and the ratio of the optical density at 406 m $\mu$  to that at 415 m $\mu$ .

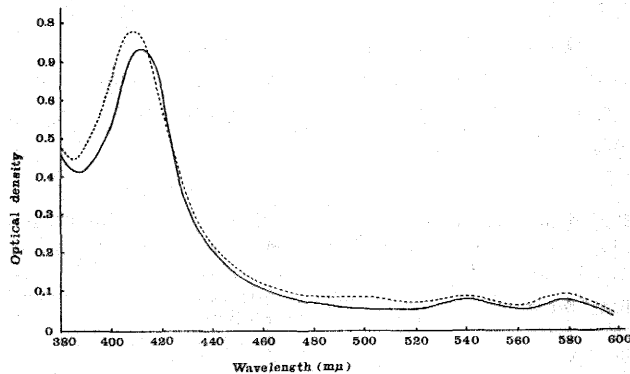


Fig. 2. Comparison of enzymatic reduction of metmyoglobin under aerobic and anaerobic experimental conditions.  
— anaerobic, ---- aerobic

Table 1. Relation between metMb reductase activity of the crude enzyme solution from iced big-eye tuna meat and cutter shaft speed of homogenizer (Time of homogenization, 20 sec).

Cutter shaft speed of homogenizer (rpm)	Protein concentration of crude enzyme solution (%)	metMb reductase activity (%)*
5,000	0.68	5.0
12,500	0.69	5.0
20,000	0.66	5.5

\* Activity is expressed as the decrease of metMb%.

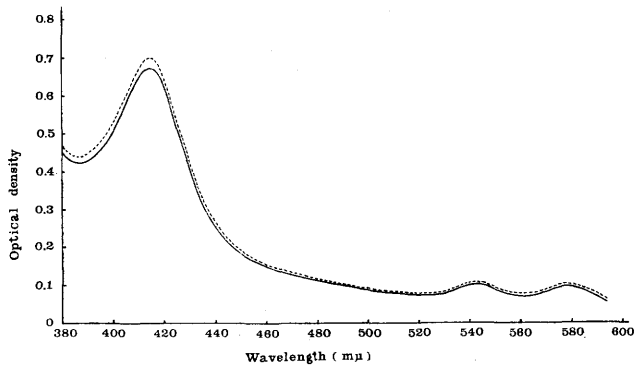


Fig. 3. Comparison of enzymatic reduction of metmyoglobin under aerobic and anaerobic experimental conditions. The same condition as Fig. 2 was employed but the solution was allowed to stand at room temperature for 30 min.  
— anaerobic, ----- aerobic

**metMb 還元酵素の局在性について** 酸化還元酵素のうちのいくつかはミトコンドリア内区画, 内膜, あるいは外膜に存在していることはよく知られている<sup>9)</sup>。そこで, この metMb 還元酵素が顆粒性の酵素かどうかを知る手がかりの一つとして, ホモジナイザーの回転数および遠心分離の際の遠心力を変化させて, それぞれの粗酵素液の還元酵素活性を比較してみた。まず, 氷蔵メバチマグロ肉で, 活性のかなり高いものを用い, ホモジナイザーの回転数の酵素活性への影響を調べた。結果を Table 1 に示した。なお, この時の遠心分離は  $6,000 \times g$  で 15 分間行なった。

ホモジナイザーの回転数を変えても, 酵素活性に差異は認められなかったので, 次に,  $20,000 \text{ rpm}$  で回転させて得たホモジネイトを  $6,000 \times g$ ,  $10,000 \times g$ ,  $20,000 \times g$  で 15 分間遠心分離し, 上澄を粗酵素液として還元酵素活性を測定した。その結果を Table 2 に示した。この表から明らかなように, 遠心力を変化させても還元酵素活性に影響しないことがわかった。

Table 2. Relation between metMb reductase activity of the crude enzyme solution from iced big-eye tuna meat and the centrifugal force (Time of centrifugation, 15 min).

Centrifugal force	Protein concentration of crude enzyme solution (%)	metMb reductase activity (%)*
$6,000 \times g$	0.69	5.0
$10,000 \times g$	0.67	6.0
$20,000 \times g$	0.68	5.0

\* Activity is expressed as the decrease of MetMb%.

また, 凍結および解凍によつてミトコンドリアなどの顆粒性物質が破壊され, 酵素活性が高まるという TAPPEL<sup>10)</sup>の報告があるので, 同じ氷蔵メバチマグロを凍結, 解凍して酵素活性を測定してみたが, 活性は高くならなかった。

以上の三つの実験結果を考え合わせると, metMb 還元酵素はミトコンドリアなどの顆粒性の酵素ではないように思われる。おそらくはミオゲン区の酵素であろう。

#### 文 献

- 1) M. R. STEWART, B. K. HUTCHINS, M. W. ZIPSER and B. M. WATTS: *J. Food Sci.*, **30**, 487-491 (1965).

- 2) B. M. WATTS, J. KENDRICK, M. W. ZIPSER, B. K. HUTCHINS and B. SALEH: *ibid.*, **31**, 855-862 (1966).
- 3) 清水千秋・阿部憲治・松浦文雄: 本誌, **35**, 1034-1040 (1969).
- 4) C. SHIMIZU and F. MATSUURA: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 587-592 (1968).
- 5) C. SHIMIZU and F. MATSUURA: *ibid.*, **35**, 468-475 (1971).
- 6) K. SCHMID: *Helv. Chim. Acta*, **32**, 105-114 (1949).
- 7) Y. I. OYAMA and H. EAGLE: *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, **91**, 305-307 (1956).
- 8) W. D. BROWN and H. E. SNYDER: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6702-6706 (1969).
- 9) 萩原文二: 生体酵素シリーズ ミトコンドリア, p. 5, 朝倉書店, 東京 (1971).
- 10) A. L. TAPPEL: in "Cryobiology" (H. T. MERYMAN, ed.), 173-177, Academic Press, London and New York (1966).