

# 魚肉イノシン酸分解酵素活性に及ぼす食塩およびグリセリン の影響

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	富岡, 和子 遠藤, 金次
巻/号	54巻11号
掲載ページ	p. 1947-1951
発行年月	1988年11月

## 魚肉イノシン酸分解酵素活性に及ぼす食塩およびグリセリンの影響

富岡 和子, 遠藤 金次

(1988年2月20日受付)

Effect of sodium chloride and glycerine on activities of enzymes decomposing 5'-inosinic acid in fish muscle

Kazuko Tomioka\*<sup>1</sup> and Kinji Endo\*<sup>2</sup>

In order to clarify the mechanism of the inhibitory effect of some additives on the enzymatic decomposition of 5'-inosinic acid (IMP) in fish muscle, the effect of sodium chloride and glycerine was examined on the 5'-nucleotidase and acid phosphatase in various fish muscle extracts.

The pH-activity curves observed for IMP-decomposition in fish muscle extract varied with the different fish species and their pattern could be well explained by the activity ratios of 5'-nucleotidase to acid phosphatase. It was therefore confirmed that IMP is decomposed in fish muscle by the action of a 5'-nucleotidase and an acid phosphatase.

These enzymes were suppressed by addition of sodium chloride, in a competitive inhibitory manner. The apparent  $K_i$  values for 5'-nucleotidase and acid phosphatase of 8 species of fish examined, closely resembled each other, and were calculated to be 0.111-0.161 M and 0.070-0.142 M, respectively. It was also found that both enzymes were suppressed by addition of glycerine in the same manner. The apparent  $K_i$  values for 5'-nucleotidase and acid phosphatase of these fishes, regardless of difference of species of fish, were calculated to be 4.02-6.31 M and 1.09-1.67 M, respectively.

魚肉の貯蔵中における 5'-イノシン酸 (以下 IMP) 濃度の変動について、数多くの研究が行われてきたが、魚介類の塩蔵や乾燥貯蔵中の IMP の変化についての研究は比較的乏しい。われわれは、塩干しや酢漬けなどの加工・調理的処理によって、魚肉中の IMP の分解がどのような影響を受けるかを、若干の魚種について調査し、低水分活性や低 pH が IMP の分解をある程度抑制することを前報<sup>1)</sup>において報告した。一方、魚肉中の IMP の分解には、5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼとが主として関与し、魚肉における pH-IMP 分解活性曲線は魚種ごとに著しく異なることは、両酵素の寄与の程度が、魚種によってさまざまであるためであろうということについても、すでに推論した。<sup>2)</sup> したがって、魚肉中での IMP の分解に及ぼす塩蔵や乾燥の影響についての基礎的知見を得るためには、これら両酵素の活性に対する食塩や低水分活性の抑制作用について検討することが必要であろう。

本研究では、数種の魚類の魚肉水抽出液中の 5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼについて、食塩と糖(便宜上グリセリンを使用)の添加がこれらの酵素活性に

及ぼす影響を比較検討した。

## 試料および実験方法

試料 下記 10 種の背肉を用いた。

ブリ (Yellowtail) *Seriola quinqueradiata*, マイワシ (Sardine) *Sardinops melanostictus*, マアジ (Horse mackerel) *Trachurus japonicus*, マダイ (Red sea bream) *Pagrus major*, イトヨリダイ (Golden thread) *Nemipterus virgatus*, マサバ (Common mackerel) *Scomber japonicus*, ベニザケ (Salmon) *Oncorhynchus nerka*, サンマ (Pacific saury) *Cololabis saira*, アカガレイ (Flathead flounder) *Hippoglossoides dubius*, カワハギ (Monacanthus) *Stephanalepis cirrhifer*。

イノシン酸分解酵素および酸性ホスファターゼ活性の測定 魚肉を 2 倍量の水とともにホモジナイザー (日本精機, AH-11) で最高速度で 3 分間磨砕して得られるホモジネートを 9,000×g で遠心分離し、その上清を 4°C で脱イオン水に対して透析し、透析内液を活性測定用粗酵素液とした。この粗酵素液 1 ml と m/7 ベロナール緩衝液あるいはグリシン-NaOH 緩衝液 2.5 ml を混合し、

\*<sup>1</sup> 奈良教育大学 (Nara University of Education, Nara 630, Japan).

\*<sup>2</sup> 奈良女子大学家政学部 (Faculty of Home Economics, Nara Women's University, Nara 630, Japan).

イノシン酸分解酵素活性の場合は 25 mM IMP 0.5 ml を、酸性ホスファターゼ活性の場合は 25 mM *p*-ニトロフェニールりん酸 (以下 *p*-NPP) を加え、所定の条件でインキュベートし、8% トリクロロ酢酸 2 ml を加えて反応を止めた。得られたろ液一定量について、酵素反応によって生成した無機りん酸は Youngburg-Youngburg 法<sup>3)</sup> により、ニトロフェノールは 430 nm での吸光度からそれぞれ定量し、各酵素活性の単位とした。

酵素反応の際の水分活性の調整は、反応液に食塩またはグリセリンを添加して行った。反応液へのこれらの添加量は、モル濃度 (m) と水分活性 (*A<sub>w</sub>*) との関係式

$$\log_e A_w = -\nu m \phi / 55.1$$

に従い、<sup>4)</sup> 所定の水分活性になるように添加した。ただし、食塩の場合は、 $\nu$  (イオン数) を 2,  $\phi$  (浸透係数) を 1, グリセリンの場合は、 $\nu$  と  $\phi$  を 1 とし計算した。

### 実験結果および考察

イノシン酸分解酵素活性と pH 10 魚種の魚肉水抽出液について pH-IMP 分解活性の関係を調べた。その中の代表的な pH-活性曲線の 3 例を Fig. 1 に示した。ブリの場合の特徴としては pH 8 付近にピークを示し、pH 5 前後に肩を伴っている (ブリ型) 点であった。マイワシの場合もほぼ同様の曲線を示した。マアジの場合の特徴は、pH 5 付近に明瞭なピークがあり、pH 5 から中性域にかけてやや低下し、微アルカリ性域では、ほとんど平

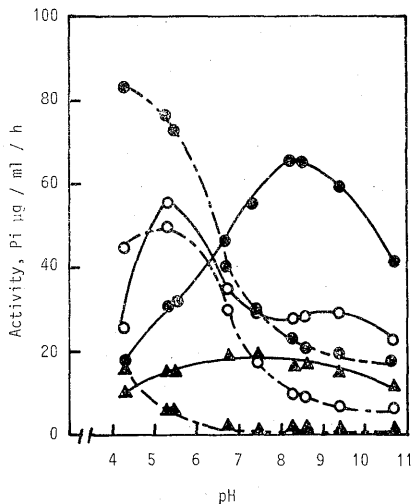


Fig. 1. Effect of pH on IMP and *p*-NPP-decomposing enzymatic activities of fish muscle extract.

- , IMP-decomposing activity
- - -, *p*-NPP-decomposing activity
- (●), yellowtail
- (○), horse mackerel
- (▲), common mackerel

坦となる (アジ型) 点である。マダイやイトヨリダイもこれと類似した曲線を示した。また、これらの魚種の活性曲線では、pH 5 付近における明瞭なピークのほかに、pH 9 付近に極めて小さな肩がみられた。マサバの場合は、pH 6~9 の広範囲にかけて活性が認められる (サバ型) のが特徴的である。

それぞれの魚肉水抽出液について調べた、pH-*p*-NPP 分解活性曲線も Fig. 1 に示したが、これらの曲線から、*p*-NPP 分解活性はいずれの魚種でも酸性域のみに強い活性が認められた。また、ブリ、マアジ、マダイ、イトヨリダイでは、この *p*-NPP 分解活性の至適 pH と pH-IMP 分解活性曲線の肩の位置がほぼ一致するほか、*p*-NPP 分解活性の強い魚種ほど酸性域での IMP 分解活性が強い傾向が認められた。これらの事実、酸性域での IMP の分解に酸性ホスファターゼ (*p*-NPP 分解活性) が強く関与することを示すものと考えられる。

一方、魚肉中の IMP 分解に関与する酵素の一つとして知られている 5'-ヌクレオチダーゼの至適 pH は、一般に中性から微アルカリ性にあり、<sup>5-7)</sup> ほぼベル型に近い pH-活性曲線を示すのが普通である。したがって、Fig. 1 に示した pH-IMP 分解活性曲線が、魚種によって異なる事実は、生理的 pH における IMP の分解でも 5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼの寄与の割合が魚種間で異なることを示すものと考えられる。すなわち、ブリ型の曲線は、IMP の分解に 5'-ヌクレオチダーゼの方が酸性ホスファターゼより大きく寄与すること、サバ型の曲線は、5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼがほぼ同じ程度に寄与すること、アジ型の曲線は、5'-ヌクレオチダーゼの寄与が酸性ホスファターゼより小さいことをそれぞれ示すものと考えられる。

食塩およびグリセリンの影響 前項において、魚肉中の IMP 分解に、その割合は pH に依存するものの、5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼとが、関与するものと考えられた。そこで、ブリ、マアジ、マイワシの魚肉水抽出液を粗酵素液とし、食塩またはグリセリンの添加により水分活性を調整し、水分活性の異なる条件下で 25°C で酵素反応を行い、水分活性が 5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼにどのような影響を及ぼすかを調べた。なお、5'-ヌクレオチダーゼ活性は IMP を基質として、pH 8.3 において、酸性ホスファターゼ活性は *p*-NPP を基質として、pH 5.3 においてそれぞれ測定した。

5'-ヌクレオチダーゼおよび酸性ホスファターゼ活性に対する食塩濃度の影響は Fig. 2 のとおりである。いずれの魚種の場合も、食塩濃度にほぼ比例して両酵素活性は阻害されたが、その阻害の程度は魚種によって異なり、実験に供した 3 魚種ではブリにおいて阻害程度がも

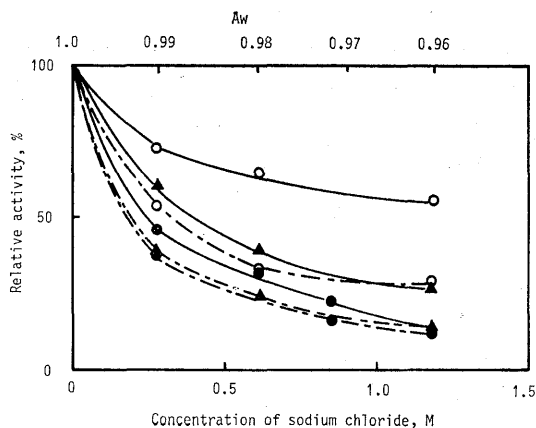


Fig. 2. Effect of  $A_w$  and sodium chloride on 5'-nucleotidase and acid phosphatase.

—, 5'-nucleotidase  
 ---, acid phosphatase  
 (●), yellowtail  
 (○), horse mackerel  
 (▲), sardine

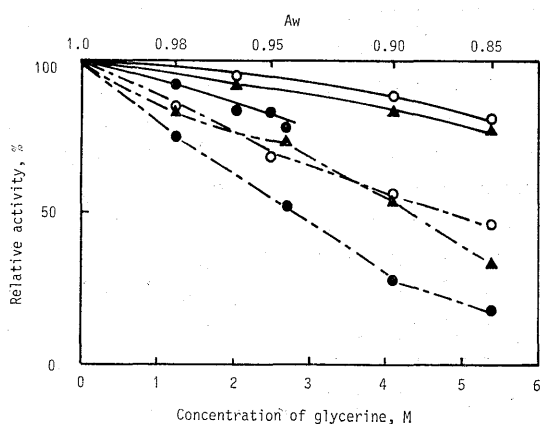


Fig. 3. Effect of  $A_w$  and glycerine on 5'-nucleotidase and acid phosphatase.

—, 5'-nucleotidase  
 ---, acid phosphatase  
 (●), yellowtail  
 (○), horse mackerel  
 (▲), sardine

とも大きかった。後述の速度論的パラメータ (Table 1 参照) と比較すると、食塩の阻害程度の大きいブリ、マイワシ、マアジの順に、見掛けの  $K_m$  値は 5'-ヌクレオチダーゼで 3.45 mM, 1.05 mM, 0.71 mM, 酸性ホスファターゼで 3.23 mM, 1.11 mM, 0.77 mM と小さかった。このように魚種によって食塩の阻害程度が異なる現象には、 $K_i$  値ではなく  $K_m$  値が主として反映するものと考えられる。

5'-ヌクレオチダーゼおよび酸性ホスファターゼに対

するグリセリン濃度の影響は、Fig. 3 のとおりである。阻害の程度がグリセリンの濃度にはほぼ比例すること、魚種間、酵素間で阻害の程度が異なることなどグリセリンの影響は、Fig. 2 に示した食塩の影響と共通する点が多いが、同一モル濃度で比較しても同一水分活性で比較しても、グリセリンの両酵素活性阻害の程度は、食塩の場合より著しく小さかった。このことは、グリセリンの両酵素に対する見掛けの  $K_i$  値が、食塩のその 10 倍以上であることを反映するものであろう。

**食塩およびグリセリンの阻害メカニズム** 前項において、5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼは、食塩やグリセリンの濃度に依存して阻害されることが明らかになったが、この阻害のメカニズムを知るために、常法にしたがって、食塩およびグリセリンの両酵素活性の阻害作用に及ぼす基質濃度の影響を調べた。Fig. 4 はブリ肉水抽出液の 5'-ヌクレオチダーゼに対する基質濃度の影響を示したものである。また、酸性ホスファターゼに対する影響を調べた結果は Fig. 5 に示した。

両酵素とも、最大反応速度は、食塩やグリセリンの添加によって影響を受けず、見掛けの  $K_m$  値は食塩やグリセリンの添加濃度が大きいほど、増大した。このような現象は、拮抗的阻害の際にみられる特徴と一致している。そこで、食塩やグリセリンが基質と競合してこれらの酵素の活性中心に可逆的に結合するという証拠があるわけではないが、食塩やグリセリンがこれらの酵素を拮抗的に阻害すると見做して、見掛けの阻害定数を算出した。5'-ヌクレオチダーゼにおいては、食塩の添加濃度

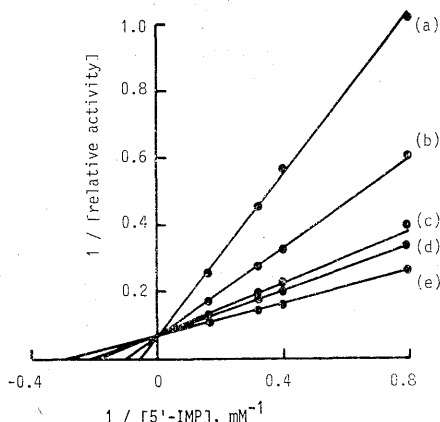


Fig. 4. Inhibitory effect of sodium chloride and glycerine on 5'-nucleotidase in yellowtail muscle.

(a), sodium chloride 0.86 M  
 (b), sodium chloride 0.27 M  
 (c), glycerine 2.71 M  
 (d), glycerine 1.26 M  
 (e), no addition

Table 1. Kinetic parameters of 5'-nucleotidase and acid phosphatase in fish muscle

Species	5'-Nucleotidase			Acid phosphatase		
	K <sub>m</sub> *1 (10 <sup>-3</sup> M)	K <sub>i</sub> (M)		K <sub>m</sub> *2 (10 <sup>-3</sup> M)	K <sub>i</sub> (M)	
		NaCl	Glycerine		NaCl	Glycerine
Yellowtail	3.45	0.160	4.99	3.23	0.130	1.42
Horse mackerel	0.71	0.161	4.02	0.77	0.139	1.29
Sardine	1.05	0.126	6.02	1.11	0.070	1.18
Common mackerel	0.67	0.157	5.03	0.91	0.127	1.37
Salmon	0.83	0.142	4.86	1.25	0.130	1.42
Pacific saury	0.91	0.133	5.18	0.69	0.102	1.49
Flat fishes	0.73	0.130	4.92	0.67	0.142	1.67
Monacanthus	1.37	0.111	6.31	1.00	0.088	1.09

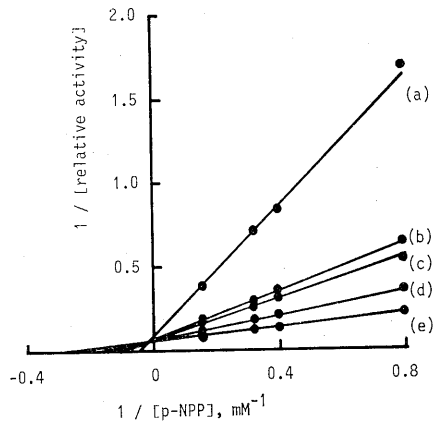
\*1 K<sub>m</sub> value of 5'-IMP for 5'-nucleotidase.\*2 K<sub>m</sub> value of p-NPP for acid phosphatase.

Fig. 5. Inhibitory effect of sodium chloride and glycerine on acid phosphatase in yellowtail muscle.

- (a), sodium chloride 1.22 M  
 (b), sodium chloride 0.27 M  
 (c), glycerine 2.71 M  
 (d), glycerine 1.26 M  
 (e), no addition

0.27 M および 0.86 M の場合に、拮抗阻害と仮定して算出された阻害定数は 0.142 M および 0.178 M とほぼ近似した値であり、グリセリンの添加濃度 2.71 M および 1.26 M の場合も、阻害定数は 5.17 M および 4.82 M とほぼ近似していた。酸性ホスファターゼにおいても、食塩の添加濃度 0.27 M および 1.22 M の場合に、阻害定数は 0.129 M および 0.130 M であり、グリセリンの添加濃度 2.71 M および 1.26 M の場合も、阻害定数は 1.49 M および 1.34 M であった。

他の魚種の 5'-スクレオチダーゼおよび酸性ホスファターゼについても、食塩およびグリセリンの阻害は見掛け上拮抗的であり、両物質の両酵素に対する見掛けの K<sub>i</sub> 値は Table 1 のとおりであった。この K<sub>i</sub> 値は添加

物質により酵素の種類により異なったが、各 K<sub>i</sub> 値の魚種間の差異がほとんどないことがきわめて特徴的であった。

水分活性の低下が、酵素活性を抑制することについては多くの報告があるが、<sup>8-10)</sup> この抑制の機構については知見が比較的乏しい。低水分活性下での酵素反応速度の測定値には実験誤差が多いこともあって、酵素反応の速度論的パラメーターに及ぼす水分活性の影響については、とくに報告が少ないが、Drapron<sup>®</sup> はコムギふすまりパーゼについて検討し、V<sub>max</sub> は水分活性が低いほど小さくなること、および K<sub>m</sub> 値と水分活性との関係には、一定の傾向がないが、Aw 0.4 以上の領域では、Aw の低下につれて K<sub>m</sub> 値が増大するが、Aw 0.6~0.8 の領域では、Aw にかかわらず K<sub>m</sub> 値がほぼ一定の値を示すことなどを示している。本実験結果においては、これらの報告と全く異なり V<sub>max</sub> は水分活性にかかわらず一定であり、Fig. 4 および 5 を各種水分活性における Line-weaver-Burk プロットとみると、Aw 0.85~1.0 の領域では K<sub>m</sub> 値は水分活性の低下につれて増大することになる。Drapron<sup>®</sup> が Aw 0.8 以下の領域で検討しているのに対して、本実験では Aw 0.85~1.0 の領域でしか検討していないこと、検討対象の酵素の性質が大きく異なることなどを考えると、既往の実験結果との違いを論じるには、現状では、酵素反応の速度論的パラメータと水分活性との関係についての知見が、余りにも乏しいといわざるを得ない。また、前報<sup>1)</sup> では様々な程度に乾燥したり、食塩などを様々な濃度で添加した際の魚肉中での IMP の分解は、添加物質の種類にかかわらず、水分活性に依存して抑制されることを報告したが、この事実は、添加物質の種類によって阻害程度が著しく異なるという抽出酵素を用いた本実験結果と明らかに矛盾する。

Drapron<sup>®</sup> が示唆しているように、液体の水の多少が酵素反応に関与する成分の拡散や回転に影響を与えるの

で、同一水分活性であっても、水の量が少ない魚肉の場合と、本実験のような水溶液の場合とで異なる結果になったものと考えられるが、この点についても今後の研究に待ちたい。

### 要 約

魚肉中の IMP 分解に關与する 5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼ活性に及ぼす食塩およびグリセリンの影響を検討し、次の結果を得た。

1. 魚肉水抽出液における pH-5'-イノシン酸分解速度曲線は魚種によって異なるが、その形状は両酵素活性の比率によってほぼ説明可能であった。

2. 両酵素活性とも食塩によって阻害され、少なくとも約 1 M までは、その阻害様式は拮抗的であり、食塩の見掛けの阻害定数は、8 種の供試魚の間でほとんど差がなく、5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼに対してそれぞれ 0.111~0.161 M および 0.070~0.142 M の範囲であった。

3. 両酵素活性はグリセリンによって、少なくとも約 3 M までは、ほぼ拮抗的に阻害され、グリセリンの見掛けの阻害定数は、8 種の供試魚の間でほとんど差がなく、5'-ヌクレオチダーゼと酸性ホスファターゼに対して、それぞれ 4.02~6.31 M および 1.09~1.67 M の範囲であった。

### 文 献

- 1) 富岡和子, 遠藤金次: 調理科学, **19**, 289-294 (1986).
- 2) 富岡和子, 遠藤金次: 日水誌, **50**, 889-892 (1984).
- 3) 赤松 茂: 酵素研究法 (赤堀四郎編), **2**, 朝倉書店, 東京, 1971, p. 44.
- 4) J. A. Troller and J. H. B. Christian: Water Activity and Food, Academic Press, New York, 1978, pp. 1-12.
- 5) H. L. A. Tarr, L. J. Gardner, and P. Ingram: *J. Food Sci.*, **34**, 637-640 (1969).
- 6) Y. Naito and J. M. Lowenstein: *Biochem.*, **20**, 5188-5194 (1981).
- 7) J. M. J. Lamers, C. E. Heyliger, V. Panagia, and N. S. Dhalla: *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 568-575 (1983).
- 8) R. Drapron: in "Properties of Water in Foods" (ed. by D. Simato and J. L. Multon), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1985, pp. 171-190.
- 9) L. W. Acker: *Food Technol.*, **23**, 1257-1270 (1969).
- 10) H. K. Leung: in "Water Activity" (ed. by L. B. Rockland and L. R. Beuchat), Marcel Dekker, New York, 1987, pp. 27-54.