吸収がみられる。それらの変化について豚肉の場合は死後 6 時間より波長 248 m μ の吸収が増大し、このことは前報⁽¹⁾で述べたようにアデニル酸の脱アミノ化によるイノシン酸の生成を示すものであり、馬肉においては死直後より 248 m μ の吸収が 260 m μ の吸収より大きく、鶏肉においてはその差が一層著しい。熟成中豚肉においては ATP 或いは ADP よりアデニル酸の生成、アデニル酸よりイノシン酸の生成はともに屠殺後 3 日まで漸増した後減少する。馬肉では死直後一旦急増するが、ともに減少する。鶏肉では著しい変化は認められないが、熟成中漸減の傾向を示した。

以上の結果からこれら 3 種の肉の熟成経過は夫々異なり、特に鶏肉においてはその変化が屠殺後極めて短時間のうちに完了し、以後著しい変化のみられぬことは明らかであり、これらの一端は夫々肉の特異性に基くものと考えられよう。

要

約

屠殺後肉中のグリコーゲン量に著しい差異の認められた豚肉、馬肉、鶏肉の熟成 (貯蔵) 中酸溶性磷酸化合物の変化を実験した。

- (1) 馬肉のグリコーゲン含量は他の肉に比較して死直後はもとより、熟成中も著しく多い。
- (2) 酸溶性全磷は熟成中ほとんど一定しており、豚肉、鶏肉、馬肉の順に少い。
- (3) 無機磷、7 分磷、G 1 P などの変化からみると、鶏肉における熟成変化は死後短時間に進行し、完了するものと考えられる。
- (4) アデニル酸の脱アミノ化の点からもこれら 3 種の肉は異なり、馬肉、鶏肉においては死直後より脱アミノ化が強く、苦悶死と同型の変化を示した。
- (5) 酸溶性磷酸化合物の変化からもこれら 3 種の肉の熟成過程が異なるように考えられる。

- (1) 佐々木林治郎、藤巻正生、古城健三、田中敏夫：本誌，27，725 (1953)。
- (2) 東大農化編：実験農芸化学，624 (朝倉書店)。
- (3) R. A. Lawrie：Biochim. Biophys. Acta，17，282 (1955)。
- (4) J. F. Scaife：J. Sci. Food. Agr.，6，467 (1955)。
- (5) R. Willstätter，M. Rohdewald：Z. Phy-

- siol. Chem.，225，103 (1943)；江上不二夫編：多糖類化学，174 (共立社)。
- (6) V. Solovév，V. Piušskaya：Myasnaya Ind. S. S. S. R.，22，No. 4，74 (1951)；C. A.，45，10423 (1951)。
- (7) B. Lowe：Adv. in Food Res.，1，203 (1948)。

肉の自己分解に関する化学的研究 (第 3 報)*

肉のグリコーゲンの微量比色定量と結合型

グリコーゲンの存在について (1)

藤巻正生，鈴木玲子，荒川信彦 (東京大学農学部農芸化学科
お茶の水女子大学家政学部)

昭和 32 年 12 月 24 日 受理

緒

言

食肉中にグリコーゲンが多いときは、一般にその解糖作用によって生ずる乳酸も増加し、pH は低下する。pH の低下は一般に肉製品の品質及び貯蔵性に良好な影響を与えるといわれている⁽¹⁾。肉中のグリコーゲン量が動物の種類によっても著しく異なること、特に馬肉に多く含まれていることは前報に示してある⁽²⁾。著者はその機構と関連してグリコーゲンが肉中で分解する過程でいわゆる遊離型及び結合型グリコーゲンの存在並びにそれらの変化を解明するために、まずグリコーゲンの簡易定量法を必要とした。

* Chemical Studies on the Autolysis of Meats. Part III. On the Colorimetric Micro-method for the Determination of Glycogen and on the Existence of Bound Glycogen in Meats. (1)
By Masao FUJIMAKI, Reiko SUZUKI and Nobuhiko ARAKAWA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University. Faculty of Home Economics, Ochanomizu Women's University)

グリコーゲンの定量法については、従来用いられてきた滴定法⁽³⁾に対し、最近発表されている種々の新定量法^(4,5,6)のうち簡易な微量比色法⁽⁶⁾（肉については検討されていない）が適当と考えられたのでこの方法を追試し、その測定条件を検討して各種食肉への応用を試みたところ、一般にグリコーゲンの少い牛、豚肉と多い馬肉とでは呈色性が異り、前者には原著の比色法をそのまま適用しがたいこと、しかしながら両者の肉から抽出、精製したグリコーゲン⁽¹⁰⁾では呈色性の差異がないことが判ったので、肉中のグリコーゲン定量に適用し得る改訂法を案出した。次にこの定量法を用いて組織グリコーゲンについていわゆる遊離型、結合型の存在⁽⁷⁾を検討し、肉の熟成中これらグリコーゲンの変化を実験し、いわゆる結合型グリコーゲンが減少してゆく過程が認められたのでそれらの結果について報告する。

実験結果及び考察

I. 肉のグリコーゲン定量

A. 滴定法： 滴定法による肉のグリコーゲン定量は肉組織をアルカリで溶解し、アルコールでグリコーゲンを沈澱させる過程、グリコーゲンを糖まで分解する過程及び糖を滴定法⁽⁸⁾によって定量する過程に分けられる。この方法で純グリコーゲンの定量を行った結果は第1表に示してあるように回収率が100%に近かったので牛、豚、馬肉のグリコーゲンの定量を行った。その結果も第1表に示してある。滴定法によるときは精確な結果を期待できるが、加水分解などに長時間を要し、また滴定液の濃度決定など煩雑な操作を要する欠点がある。表に示してあるように、馬肉のグリコーゲンが他の肉に比較して著しく多いことが認められる。

供試グリコーゲン溶液	実測値	牛肉	豚肉	馬肉	肉
グリコーゲン mg%	103.5	98.1*	35.3	27.8	786 862 1759**
* 回収率 95%					
		** 屠殺当日測定、他の肉は市販肉			

B. 比色法： B. Mendel 等によると、グルコースの稀薄溶液（150 γ /cc 以下）と 96%（w/w）硫酸とを混合、加熱するとき生ずるやや青味をおびた桃赤色の強さ（最大吸収、波長 520 $m\mu$ ）はグルコース濃度に比例し⁽⁹⁾、また A. Kemp 等によると、グリコーゲンは高温の硫酸中でグルコースに加水分解されるからこの呈色反応はグリコーゲンの定量にもそのまま応用できる⁽⁶⁾といわれている。

比色法の定量条件の検討 上記定量法⁽⁹⁾にもとづいて、96% 硫酸 3 cc を大型試験管にとり、これにグルコース（メルク製）の水溶液（25～300 γ /cc）1 cc を加え、強く攪拌、混合し、沸騰湯浴中に 6.5 分間加熱後急冷却し、ベックマン型分光光度計を用いて波長 520 $m\mu$ における吸光値と濃度との関係を求めた結果は第1図に示してあるように 200 γ /cc までは直線関係が得られた。しかしこれをこすと赤褐色を呈してこの関係からはなれることが判り、後述の補正曲線（第6図参照）からも定量に適当なグルコースの濃度範囲は文献の 150 γ /cc よりやや狭く、50～100 γ /cc である。

発色後の呈色の安定性は第2図に示してあるように極めて安定である。なおグルコース溶液に添加した除蛋白液（トリクロル醋酸 5 g 及び硫酸銀 0.1 g を水に溶解して 100 cc としたもの）、食塩溶液、硫酸銀溶液の影響は第2表に示してあるように実験に用いる範囲ではほとんどないことが判る。

第1図 グルコース濃度と呈色値

第2図 呈色の安定性

A: 呈色直後測定, B: 24 時間後, C: 48 時間後, D: 72 時間後

第 2 表 グルコース溶液 (100 γ /cc) に添加 (1:1) した除蛋白液, 食塩溶液, 硫酸銀溶液の呈色に及ぼす影響

	対照	除蛋白液	0.1% 食塩溶液	除蛋白液 + 食塩溶液	0.1% 硫酸銀溶液	0.25% 硫酸銀溶液	0.5% 硫酸銀溶液
グルコース (γ /cc)	101	105	100	102	96	92	86

第 3 図 グリコーゲンの吸収曲線

第 4 図 牛, 馬肉精製グリコーゲンの呈色による吸収曲線

第 3 表 各種方法による馬肉グリコーゲンの定量

	グリコーゲン mg%	
	屠殺直後肉	市販肉
比色原法	2,100	840
比色変法(1)	1,750	570
比色変法(2)	1,750	—
滴定法	1,758	595

比色変法(1)とは肉より前記のようにアルコール沈澱を得, これを水に溶解させ, 水で定容となし, その1部をとり比色する方法であり, 比色変法(2)とは前法(1)のグリコーゲンを加水分解後水で定容となし, その1部をとり比色する方法である。

表に示してあるように, 馬肉グリコーゲンを4方法で定量, 比較すると, 滴定法の値は第1表に示してあるように信頼し得るものと考えられ, 比色変法(1)及び(2)には差異がなく, 滴定法の値と一致している。従って比色変法によって定量するときは精確な値が得られるし, その(1)と(2)については簡便の点から当然比色変法(1)が適当である。

比色法による組織グリコーゲンの定量 牛, 豚, 馬肉及び牛肝臓 50~200 mg をとり, 除蛋白液 5~10 cc を加えて磨砕, 抽出し, その1cc をとり, 前記の如く加熱発色させた結果は第3図に示してあるように馬肉及び牛肝臓は純グルコース, グリコーゲンの場合と同様その呈色は波長 520 m μ に最大吸収を有し, 桃赤色を呈したが, 牛, 豚肉の呈色は必ずしも波長 520 m μ に最大吸収を有せず, 黄色をおびた赤色を呈した。これらの関係は屠殺直後の肉試料でも市販肉試料でも認められたので牛, 豚肉のグリコーゲンと馬肉のそれとの構造上の差異が呈色に影響するものか, または前者の肉に桃赤色の呈色を阻害する物質が含まれることによるかが考えられた。

牛, 馬肉のグリコーゲン精製とその呈色 屠殺直後の牛肉 500 g, 馬肉 100 g より W. J. Polglase の方法⁽¹⁰⁾により精製グリコーゲン夫々 3.6 g, 1.12 g (馬肉グリコーゲンの方が精製困難であった)を得, これより 160 γ /cc の溶液を調製して前記方法により発色させた結果は第4図に示してあるように両者グリコーゲンではほとんど差異が認められず, 波長 520 m μ に最大吸収を有し, 桃赤色に呈色したので牛肉グリコーゲンと馬肉グリコーゲンとではこの呈色に影響を及ぼすほどの構造上の差異は認められなかったことになる。

従って前記の牛, 豚肉のグリコーゲンの比色定量の場合に, 馬肉の場合のような呈色を示さないのは前者にのみ阻害物質が存在するか, 或いはそれが後者におけるより多く存在することによる影響かと考えられ, これを除去すれば比色可能と考え, 次の実験を行った。

比色法の変法 呈色を阻害する物質の影響を除去するために滴定法の1部(肉組織をアルカリで分解し, アルコールでグリコーゲンの沈澱を得る過程又はさらにグルコースまで加水分解する過程)と比色法の1部(グリコーゲン又はグルコースの形で呈色させ比色する過程)とを組み合わせ, まず屠殺直後及び市販の馬肉について定量法の比較検討を行った。その結果は第3表に示してある。ここに比色原法とは肉に除蛋白液を加えてよく磨砕, 抽出し, そのまま 100° の湯浴中 15 分間加温し, この抽出液を定容となし, その1部に硫酸を加えて発色させ比色する方法であり,

比色原法の値が他 3 法の値より過大である主な原因は遊離の糖の存在によるものと考えられる。即ち A. Kemp によると、正常な組織グリコーゲンの定量には遊離グルコースは無視される⁽⁶⁾が、この場合相当量の存在が考えられるので文献の方法⁽⁶⁾に従って糖の除去操作を行って比色原法を行えば変法と同様正確な値が得られるであろうことが考えられる。なお牛肉について比色変法(1)を行ったところその呈色は波長 520 mμ に最大吸収を有し、

桃赤色を呈した。

第 5 図 牛肉の比色原法(A)及び比色変法⁽¹⁾(B)による呈色の吸収曲線

第 6 図 グルコースの吸収曲線とその補正曲線
Ap: 比色変法による吸光度 Ar: 比色原法による吸光度
A: 補正点

次に牛肉試料を用い、80% (v/v) メタノールで抽出を 2 回行って遊離の糖を除去したものについて比色原法及び比色変法(1)を行ったところ第 5 図に示してあるように、前者では波長 520 mμ に最大吸収を有せず、黄赤色を呈し、後者では最大吸収を有し、桃赤色を呈した。なおメタノール抽出液より糖を定量するとき木炭末処理を行う⁽⁶⁾が比色原法ではグリコーゲン抽出液が濁ることがあったのでこの木炭末処理を用いて二重濾過すると透明な濾液の得られることが判った。この場合木炭末処理がグリコーゲン定量にほとんど影響しないことは第 4 表に示してある。

第 5 図に示してあるように、遊離の糖を除去した肉試料について比色変法を行うとグリコーゲンの定量は可能であるが、比色原法によると波長 520 mμ における吸収が少いので定量値は過小となる。元来両法で同一定量値を示すべきであるからこういう試料を作って吸光値から濃度の補正点を求めると、第 6 図に示してあるように補正点 A, B……が得られ、これを結ぶと吸光値と濃度との間に補正の直線関係が得られるからこれを利用して改良原法によ

第 4 表 グリコーゲンの比色定量に及ぼす添加木炭末の影響

呈色度 E_{520}	グリコーゲン溶液		肉のグリコーゲン抽出液	
	無添加	添加	無添加	添加
	0.127	0.130	0.283	0.275

る定量も亦可能であろう(第 5 表参照)。なお第 6 図からも判るように定量は全グルコースとして 100 g/cc 以下の範囲がのぞましい。

II. 遊離型及び結合型グリコーゲンについて

グリコーゲンは天然にはアルブミンなどの蛋白質と弱い結合を形成しているので熱湯又はトリクロル醋酸稀薄液により抽出されるものとされぬものがあるという説や、グリコーゲンの重合度や分枝の多少により

このような性質の差異が現れるという説もある⁽¹¹⁾。最近 Adrienne により、組織グリコーゲンには酸にそのまま抽出される遊離型と酸とともに加熱して始めて抽出される蛋白結合型との 2 型があるといわれ、ねずみ内臓筋について実験されている⁽⁷⁾ので牛肉について糖及び各型のグリコーゲンの定量を行った。その結果は第 5 表に示してある。

第 5 表 牛肉* 中の糖及びグリコーゲンの定量

	グルコース mg%		グリコーゲン mg%	グリコーゲン mg%
	実 測 値	補 正 値	実測補正値	計 算 値
全炭水化物 (糖+グリコーゲン) ¹⁾	272	304		
糖 ²⁾	132	168		
全グリコーゲン (糖除去後比色原法)	115	126		
全グリコーゲン (糖除去後比色変法)	126	—	113	122 ¹⁾⁻²⁾ 120 ³⁾⁺⁴⁾
遊離型グリコーゲン ³⁾ (2 回抽出の和)**	39	41	37	
結合型グリコーゲン ⁴⁾	84	92	83	

* 屠殺、冷蔵後 2 日経過 ** 1 回目 34 mg%, 2 回目 5 mg%
全グリコーゲンに対する結合型グリコーゲンの比 73%

第 6 表 抽出に用いる冷トリクロル醋酸
溶液の濃度とグリコーゲン抽出量
との関係

トリクロル醋酸溶液 (%)	抽出グリコーゲン量 (mg%)
10.0	4,088
7.5	3,975
5.0	3,638
2.5	3,486

第 7 表 市販馬肉中の結合型グリコーゲン
(mg%)

	全炭水化物	結合型グリコーゲン
馬肉 A	1,825	450
馬肉 B	1,525	375

第 8 表 馬肉の熟成中結合型グリコーゲンの変化 (1)
(0°貯蔵)

熟成日数	0	2	4	8
グルコース mg%				
A) 全炭水化物	520	534	490	390
B) 結合型グリコーゲン	280	148	72	16
B/A×100%	54	28	15	4

第 9 表 馬肉の熟成中結合型グリコーゲンの変化 (2)
(0°貯蔵)

熟成日数	0	2	4	6	9
グルコース mg%					
A) 全炭水化物	115	81	51	48	53
B) 結合型グリコーゲン	46	22	10	10	12
B/A×100%	40	27	20	21	23

表に示してあるように、いわゆる結合型グリコーゲンの存在は明らかと思われる。なお糖除去後遊離型グリコーゲン抽出に用いる冷トリクロル醋酸溶液の濃度とグリコーゲンの抽出量との関係を求めた結果は第 6 表に示してあるが、G. A. Le Page によると肝臓以外の組織では 10% 冷トリクロル醋酸はグリコーゲンを抽出しないとされている⁽¹²⁾。この見解が正しいとするならばこの組織は遊離型グリコーゲンの存在を否定せねばならないであろう。

このように考えると肉の新鮮度即ち熟成経過によって（肉の種類によって差異はあるが）遊離型及び結合型グリコーゲンの変化が現れるであろうことが考えられる。

第 7 表は市販馬肉中の結合型グリコーゲンを測定したものであり、第 8、9 表は馬肉（頸肉）を 0° に貯蔵して熟成中の結合型グリコーゲンの変化を測定した結果である。

表に示してあるように、熟成の過程が進むとともに結合型グリコーゲンが減少してゆくのが判る（ただ第 8 表—2 の実験に用いた馬肉試料はグリコーゲン含量が異常に少なかったがこのような例は従来存在しなかった）。このようなグリコーゲンの結合型から遊離型への変化、遊離型グリコーゲンの分解の過程は肉の種類によっても異なるであろうし、また結合型グリコーゲンというものがグリコーゲンの重合度や分枝の多少によるものかどうか或いは蛋白質との結合に関する問題などはこれからの研究にまつべきであろう。

要 約

(1) 煩雑な操作と長時間とを要した従来滴定法による肉のグリコーゲン定量法に対し、簡易且つ微量定量の可能な新比色法を食肉中のグリコーゲン定量に応用すべく、検討を行った。

(2) グリコーゲン含量の多い馬肉や牛肝臓などについては上記比色法をそのまま適用、定量することができたが、牛肉、豚肉においては呈色に干渉すると思われる物質に阻害されて比色原法をそのまま適用できなかった。

(3) 滴定法の 1 部（肉のグリコーゲンをアルコールで沈澱せしめる過程）と比色法の 1 部（グリコーゲンの形で発色、比色する過程）とを組み合わせた比色変法により肉のグリコーゲンを簡易且つ迅速に定量することが可能となった。

(4) 上記比色変法を用いて肉中遊離型及び結合型グリコーゲンを定量し、また肉の熟成中結合型グリコーゲンが次第に減少することが判った。

終りに本実験に御懇篤な御指導を賜った東大教授佐々木林治郎先生、また御校閲ならびに御助言を戴きました東大教授神立 誠先生に厚く御礼申し上げます。また実験に種々御厚配を戴いたお茶の水女子大学稲垣長典教授、福岡博助教授に謝意を表する。

- (1) E. C. Bate-Smith : *Adv. in Food Res.*, 1, 1 (1948).
- (2) 佐々木林治郎、藤巻正生 : 本誌, 32, 628 (1958).
- (3) 東大農化編 : 実験農芸化学, 下巻, 624 (朝倉書店).
- (4) J. Van der Vies : *Biochem. J.*, 57, 416 (1954).
- (5) J. Kahan : *Arch. Biochem. Biophysics*, 47, 408 (1953).
- (6) A. Kemp et al. : *Biochem. J.*, 57, 646

- (1954).
- (7) J. M. Adrienne et al. : *ibid.*, 59, 487 (1955).
- (8) C. S. Hanes : *ibid.*, 23, 99 (1929).
- (9) B. Mendel et al. : *ibid.*, 56, 639 (1954).
- (10) W. J. Polglase et al. : *J. Biol. Chem.*, 199, 97 (1952).
- (11) 江上不二夫編 : 多糖類化学, 174 (共立社).
- (12) W. W. Umbreit : *Manometric techniques and tissue metabolism*, 195 (1951).