かつお節および各種だし材料の緩衝能と 寄与化合物

大熊恵美子*・阿部宏喜*

Buffering Capacity of Dried Skipjack (Katsuobushi) and the Other Fish Stock (Dashi) Materials and the Compounds Contributed to Them

Emiko OKUMA* and Hiroki ABE*

* *Department of Food and Nutritional Science, Kyoritsu Women's
University, 1-710, Motohachioji, Hachioji, Tokyo 193*

Measurement of buffering capacity (BC) has been tried to apply for checking the qualities of various foods. The compounds contributing to the BC, however, has been scarcely identified hitherto. We determined the BC of dried skipjack (Katsuobushi) and the other fish stock (Dashi) materials in the neutral pH range of 6.0~8.0, and identified the compounds contributing to the BC. Among eight Dashi materials, Katsuobushi showed the highest BC in the pH range 6.0~7.0, followed by dried frigate mackerel, dried sardine, and dried mackerel. Contribution of histidine-related compounds such as free histidine, carnosine, and anserine was as high as 40% to the BC of hot-water extracts from Katsuobushi, while the contribution was almost 20% in the case of dried mackerel and dried sardine. Inorganic phosphate contributed above 80% to the BC of hot-water extracts from dried mackerel and dried sardine, while below 40% in Katsuobushi. Histidine-related compounds and inorganic phosphate accounted for above 80% in total to the BC of the above dried fishes. In umami stock which contained large amounts of nucleotides and glutamic acid, on the other hand, these compounds were responsible for the greater part of the BC. (Received Sep. 12, 1991)

緩衝能測定装置が辻¹⁾によって開発されて以来、緩衝能測定による味噌、醤油²⁾³⁾あるいは牛乳⁴⁾の品質管理や、フィッシュミールの品質評価⁵⁾などが試みられている。しかしながら、測定されている pH 2~12 までの広範囲の緩衝能は食品の極めてマクロな性格を反映するにすぎず、緩衝能測定が分析的意味を持つためには、分子レベルでの緩衝能への寄与化合物に関する情報が必要と考えられる。

そこで本研究では中性付近の緩衝能を取り上げ、その緩衝能に寄与する化合物を特定することを試みた。これまでカツオ・マグロ類の筋肉は中性付近に強い緩衝能を

示すことが知られ⁶⁾⁷⁾、これらの緩衝能には無機リン酸および遊離ヒスチジンあるいはヒスチジン含有ジペプチドのカルノシン、アンセリンおよびバレニンなどの関与が大きいことが明らかにされている⁷⁾。このような観点から試料としてはかつお節を始めとして、そうだ節、さば節、煮干および近年利用頻度の高いかつお風味調味料などのだし材料を取り上げ、その中性付近の緩衝能に対する寄与化合物を特定することから、緩衝能測定がかつお節を中心とした各種だし材料の判別に利用可能か否かを検討した。

* 共立女子大学家政学部 (〒193 東京都八王子市元八王子町 1-710)

実験方法

1. 試料およびエキス調製法

(1) 試料

かつお節としては、13種の市販の花かつおおよび製造元の明らかな5種の雄節、3種の雌節、2種のかめ節および4種のそだ節を用いた。さば節は市販の5種の削り節を用い、また煮干も5種類の市販品を使用した。これらの試料のうち、節類は削り機により1本すべてを削り、削り節および煮干は最低50gをそのまま、いずれも粉砕機を用いて粉砕し、均一な試料粉末とした。一方、かつお風味調味料は、市販の顆粒状および粉末状の固形調味料5種および液体調味料3種を前処理せずに使用した。

(2) 熱水抽出液の調製

各試料0.5gに脱イオン水80mlを加え、30分間沸騰水中で加熱抽出を行い、冷却後100mlに定容した。その後0.45μmのミリポアフィルターを用いてろ過し、ろ液を緩衝能測定に供した(0.5%抽出液)。

(3) 過塩素酸抽出液の調製

各試料0.5gを8%過塩素酸溶液9.5mlとともに氷冷しながら1分間ホモジナイズし、0℃、15分間遠心分離(15000×g)し、この上清を分析に用いた。

2. 分析方法

(1) 緩衝能測定

緩衝能は、液体のかつお風味調味料については1%、それ以外は0.5%熱水抽出液について、β-タイトレータ(BETA-1; 東亜電波工業製)を用いて測定した⁸⁾。すなわち、熱水抽出液10mlを、0.1N NaOHあるいは0.1N HClでpHを6に調整した後、0.1N NaOHでpH6から8まで滴定した。緩衝能は、pH6.0~7.0、6.5~7.5、および7.0~8.0の範囲で、試料1g当りのpHを1単位上げるのに要するNaOHのμmol数として表わした。なお、測定はすべて20℃の恒温室内で行った。

(2) 標品の緩衝能の検量線の作成

L-ヒスチジン、アンセリン、カルノシンおよびIMPは20~180μM、L-グルタミン酸は0.2~2.0mMになるように調製した標品の水溶液の緩衝能を上記の測定方法に従って測定し、各化合物の緩衝能の検量線を作成し

Table 1 Moistures and buffering capacities over the pH ranges 6.0~7.0, 6.5~7.5 and 7.0~8.0 in various fish stock (Dashi) materials

Sample name	n	Moisture (%)	Buffering Capacity (μmol NaOH/pH · g dry wt)		
			6.0~7.0	6.5~7.5	7.0~8.0
Hanakatsuo ^{*1}	13	14.2	201±25	193±29	158±29
Katsuobushi ^{*2}					
Obushi ^{*3}	5	14.4	202±9	192±9	154±7
Mebushi ^{*4}	3	14.7	177±8	188±22	139±6
Kamebushi ^{*5}	2	15.5	180±7	169±8	139±7
Others					
Sodabushi ^{*6}	4	13.8	168±23 ^a	156±15 ^a	129±10
Sababushi ^{*7}	5	10.4	116±30 ^c	114±26 ^b	95±19 ^c
Niboshi ^{*8}	5	15.2	133±12 ^b	131±14 ^b	107±12 ^b
Umami stock ^{*9}					
Solid product	5	1.4	65±14 ^c	48±10 ^c	50±8 ^c
Liquid product	3	73.0	111±36 ^c	85±32 ^c	83±30 ^b

Mean ± SD. ^aP<0.05, ^bP<0.01, and ^cP<0.001 to the buffering of hanakatsuo.

^{*1}Shaved products made from the skipjack muscle after the boiling and smoking process,

^{*2}Dried skipjack after boiling, smoking, sun-drying and moulding processes, ^{*3}Katsuobushi made from dorsal muscle of large skipjack tuna, ^{*4}Katsuobushi made from abdominal muscle of large skipjack tuna, ^{*5}Katsuobushi made from both dorsal and abdominal muscles of small skipjack tuna, ^{*6}Dried frigate mackerel, ^{*7}Dried mackerel, ^{*8}Dried whole body of sardine,

^{*9}Products made from the extracts of Katsuobushi and additives.

た。

(3) 水分測定

かつお節、さば節、煮干および固形のかつお風味調味料の水分は2gの試料を用いて105℃乾燥法で測定した。また、液体のかつお風味調味料の水分は70℃、30mmHg以下で5時間減圧乾燥させる方法で測定した。

(4) ヒスチジン関連化合物およびヌクレオチド分析

ヒスチジン関連化合物およびヌクレオチドは、それぞれの試料の過塩素酸抽出液についてABEらの方法⁹⁾を用いて高速液体クロマトグラフィにより分離定量した。

(5) グルタミン酸分析

グルタミン酸は、各試料の過塩素酸抽出液についてアミノ酸分析機K-606S(協和精密製)により分離定量した。

(6) 無機リン酸の定量

無機リン酸はモリブデンブルー法¹⁰⁾により定量した。

結果と考察

1. 水 分

かつお節の水分はいずれも11~20%の範囲にあり、一方、さば節では8~12%、煮干では12~18%の範囲でかなりの差が認められた。風味調味料では固形調味料

が1~3%、液体調味料が65~81%であった。これらの平均値をTable 1に示す。なお、水分含量の差を消去するため、以下の結果はすべて無水物当りに換算した。

2. 各種だし材料の緩衝能

各種だし材料のpH 6.0~7.0、6.5~7.5および7.0~8.0の緩衝能の測定結果をTable 1に示す。花かつお、雄節、雌節、かめ節およびそうだ節の緩衝能はいずれもpH 6~7が最も高く、pH範囲が上がるにつれて低下した。これは後述のようにかつお節に多いヒスチジンのpKが6付近にあることによるものと考えられる。また、どのpH範囲においても花かつおと雄節の緩衝能が最も高く、雌節とかめ節が同程度で、そうだ節のそれは最も低かった。このようなかつお節間の緩衝能の差の原因は、脂肪が多い腹肉と背肉の差異あるいは血合肉の混入の程度によるものと考えられる。この結果はかつおのヒスチジン関連化合物含量が普通筋に多く、また背肉に多いことと一致している¹¹⁾。一方、花かつおと比較するとそうだ節は有意に低い緩衝能を示した。これらのことから、かつお節間の差異よりも種による差の方が大と考えられる。

一方、その他のだし材料のさば節、煮干、固形および液体のかつお風味調味料の緩衝能は、どのpH範囲で

Table 2 Concentrations of several components contributing to the buffer capacity of fish stock (Dashi) materials

	Hanakatsu	Obushi	Mebushi	Kamebushi	Sodabushi	Sababushi	Niboshi	Solid Stock	Liquid Stock
	(μmol/g dry wt)								
His	171 ±14.1	147 ±14.6 ^b	131 ±18.8 ^b	140 ±11.5 ^a	124 ±37.9 ^b	66.5 ±23.0 ^c	61.1 ±12.0 ^c	8.91 ±2.55 ^c	50.3 ±17.2 ^c
Car	14.8 ±11.6	12.4 ±14.1	7.41 ±6.44	7.4 ±4.51	2.44 ±0.96 ^a	0.03 ±0.04 ^c	0.01 ±0.02 ^c	0.27 ±0.08 ^c	0.89 ±0.61 ^b
Ans	38.5 ±18.2	42.2 ±21.4	32.6 ±13.0	23.2 ±6.22	11.6 ±4.96 ^b	0.11 ±0.14 ^c	0.07 ±0.07 ^c	1.35 ±0.45 ^c	6.14 ±3.75 ^a
Pi	148 ±15.0	174 ±17.7 ^a	168 ±7.53	159 ±1.30	165 ±6.04	209 ±21.5 ^b	385 ±102 ^c	49.4 ±60.4 ^c	38.0 ±17.9 ^c
IMP	20.8 ±5.41	24.7 ±3.63	18.9 ±0.29	17.2 ±1.87	16.3 ±4.10	19.9 ±4.41	30.0 ±3.26 ^b	33.9 ±28.2 ^c	32.5 ±1.33 ^b
GMP	0.70 ±0.27	0.54 ±0.34	0.51 ±0.11	0.39 ±0.03	0.45 ±0.18	0.84 ±0.35	2.01 ±0.23 ^b	4.24 ±3.69 ^b	5.78 ±4.24 ^b
Glu	2.17 ±0.56	2.27 ±1.36	3.31 ±3.14 ^b	3.45 ±2.15 ^b	3.53 ±0.65 ^b	4.40 ±1.59 ^c	3.95 ±2.17	1117 ±243 ^c	1087 ±427 ^c

Mean±SD. ^aP<0.05, ^bP<0.01, and ^cP<0.001 to the concentrations of each compound in hanakatsu. GMP; guanosine 5'-monophosphate. Refer to the legend of Table 1 and Fig. 1 for sample and compound names.

も花かつおと比べて有意に低く、pH 6~7 では煮干、さば節および液体調味料は花かつおの約 1/2、固形調味料では著しく低く、1/4 程度の緩衝能であった。

3. 寄与化合物の濃度

上記のだし材料の緩衝能に寄与する化合物としては、中性付近に pK 値を有する化合物すなわちヒスチジン関連化合物、無機リン酸、ヌクレオチドあるいはある種の有機酸などが考えられる⁶⁾⁷⁾。Table 2 に上記だし材料に含まれるこれら化合物の含量を乾物 g 当りの μmol 数で示す。どの試料においてもヒスチジンの濃度はヒスチジン関連化合物の中で最も高く、中でも花かつおでは他のすべての試料に対して有意に高かった。このことは花かつおに用いられる荒節から本枯節へのかび付け工程で、これらの化合物の多少の分解が起こることを示唆している。しかしながら、かつお筋肉中の多量のヒスチジン¹¹⁾は、製造工程中もかなり安定に保たれるものと考えられる。この含量はこれまでの報告と概略一致していた^{12)~14)}。一方、花かつおを除けば雄節でこの含量は最も高く、次いでかめ節、雌節、そうだ節の順で、さば節および煮干ではかつお節の 40% 程度に過ぎなかった。このことは、ヒスチジン含量の種特異性¹¹⁾をよく反映している。かつお風味調味料では固形製品でかつお節の 4~9%、液体製品では 30% 程度であった。

カルノシンおよびアンセリンの濃度は花かつおと雄節で最も高く、次いでかめ節、雌節、そうだ節の順で、上記ヒスチジンの場合と同様にほぼ緩衝能の傾向と一致していた。また、煮干およびさば節にはこれらのジペプチドはほとんど認められず、かつお風味調味料でも著しく低い値であった。これらジペプチドは加熱等の処理によっても極めて安定であることが知られており¹⁵⁾¹⁶⁾、また動物種によりかなり一定した値を示すことから¹⁷⁾、風味調味料のこれらジペプチドの合計量から原料のかつお節使用量がある程度推定することが可能である。かつお節におけるこれら化合物の平均含量から計算すると、固形調味料ではかつお節使用量は、製品により 1~6%、液体調味料では 11~33% と算出される。

一方、無機リン酸含量はかつお節間では大差はなかった。しかしながら、煮干ではかつお節の 2 倍以上、さば節では 1.2 倍以上と著しく高かった。これは少なくとも煮干では骨の混入のためと考えられる。かつお風味調味料ではいずれもかつお節よりもかなり低い値であった。これら無機リン酸のかかなりの部分は、加工過程でクレアチンリン酸あるいは ATP の分解により生成するものと考えられる。

次に、ヌクレオチドではかつお節の特徴的呈味成分として知られる IMP が最も多く、GMP も含まれていたが、その他のヌクレオチドは僅かであった。煮干やさば節でもほぼ同じ傾向であったが、IMP 量は煮干で最も高かった。また、GMP もかつお節に比べて煮干で約 4 倍、さば節では約 1.5 倍であった。一方、かつお風味調味料では IMP と GMP の比率およびこれらの合計量は製品によって大きく異なり、IMP がかつお節の 3 倍、GMP がかつお節の 22 倍も含まれているものもあれば、かつお節よりも含量の低いものもあった。これらは各調味料におけるヌクレオチドの添加量の差異と考えられる。

グルタミン酸はかつお節では含量は低いものの、さば節および煮干でやや高い値を示した。かつお風味調味料ではかつお節に比べて 250~700 倍程度含まれており、調味料には多量のグルタミン酸が添加されていることが明らかである。ただし、ここではいずれのだし材料も乾物 1g 当りの含量で示してあり、実際のだしの使用濃度は考慮していない。グルタミン酸は pK を 4.3 および 9.7 付近にもつため、中性付近にはほとんど緩衝能を

Fig. 1 Calibration curves for buffering capacities of several buffering constituents

Car; carnosine, P_i ; inorganic orthophosphate, Ans; anserine, His; L-histidine, IMP; inosine 5'-monophosphate, Glu; L-glutamic acid.

示さないが、風味調味料のように多量に含有する場合には特に pK 4.3 の β -カルボキシル基の影響で中性付近にも緩衝能を示すものと考えられる。

4. 各種だし材料の緩衝能に対する寄与化合物の寄与率

緩衝能は加成性であるため、予め既知濃度の化合物を用いて濃度からその緩衝能を求めるための検量線を作成しておけば、各試料中の寄与化合物の濃度とこの検量線からそれぞれの化合物の緩衝能と全緩衝能に対する寄与率を算出することが可能である。Fig. 1 に寄与化合物の緩衝能の検量線を pH 6.0~7.0 の範囲について示す。この検量線と Table 2 に示した各試料中の化合物濃度から、各化合物のだし材料の緩衝能に対する寄与率を求めた。pH 6.0~7.0 の結果のみを平均値で Table 3 に示す。かつお節では熱水抽出液に対するヒスチジン関連化合物と無機リン酸の寄与率は同程度で、それぞれ約 40% であった。そうだ節ではヒスチジン関連化合物の

寄与がやや低かった。ヒスチジン関連化合物の中では、ヒスチジンの pK が 6.21 にあり、かつお節における含量が高いことからヒスチジンの寄与が顕著であった。一方、ヌクレオチドの寄与率は低く、グルタミン酸の寄与はほとんど認められなかった。また、これらの熱水抽出液に対する回収率はいずれも 80% 以上で、かつお節類の緩衝能はほぼこれらの化合物によることが明らかであった。また、煮干およびさば節ではヒスチジン関連化合物の寄与率は、その含量の差を反映してかつお節の約 1/2 であり、無機リン酸の寄与が相対的に高かった。煮干では回収率が 120% 以上であったが、これは無機リン酸の緩衝能によるものと考えられる。したがって、このことは熱水抽出液に存在するすべてのリン酸が緩衝能に寄与する訳ではないことを示唆している。

一方、かつお風味調味料ではヒスチジン関連化合物と無機リン酸の含量が低いいためこれらの寄与は小さく、添加物と考えられるヌクレオチドやグルタミン酸の寄与が

Table 3 Buffering capacities of several buffer constituents in the hot water extracts from fish stock materials

($\mu\text{mol NaOH/pH} \cdot \text{g dry wt}$)

Sample name	His	Car	Ans	Pi	IMP+GMP	Glu
Hanakatsuo	66.9 (33.5)	7.23(3.47)	16.7 (8.38)	70.1 (35.0)	7.22(3.68)	0.033(0.016)
Katsuobushi						
Obushi	57.5 (28.5)	6.03(2.99)	18.3 (8.99)	82.3 (40.7)	8.60(4.24)	0.026(0.013)
Mebushi	51.0 (28.7)	3.61(2.02)	14.2 (8.14)	79.5 (44.9)	6.58(3.72)	0.018(0.010)
Kamebushi	54.8 (30.6)	3.62(2.07)	10.1 (5.56)	74.8 (41.7)	5.98(3.32)	0.055(0.030)
Others						
Sodabushi	48.4 (28.2)	1.19(0.68)	5.04(3.26)	77.8 (47.2)	5.67(3.36)	0.056(0.035)
Niboshi	23.9 (17.8)	0.01(0.01)	0.03(0.02)	181 (140)	10.5 (7.84)	0.063(0.049)
Sababushi	26.0 (21.9)	0.01(0.01)	0.05(0.04)	98.8 (89.7)	6.91(6.04)	0.070(0.064)
Umami stock						
Solid 1	4.41(5.55)	0.11(0.14)	0.54(0.68)	9.48(11.9)	25.9 (32.5)	23.7 (29.8)
2	2.55(3.23)	0.14(0.18)	0.83(1.04)	80.3 (101)	5.53(6.99)	20.4 (25.9)
3	4.91 (9.97)	0.07(0.15)	0.27(0.55)	8.48(17.2)	4.18(8.49)	16.5 (33.5)
4	3.09(6.56)	0.14(0.30)	0.75(1.60)	10.2 (21.7)	2.07(4.41)	16.5 (35.0)
5	2.46(3.48)	0.19(0.26)	0.53(0.76)	8.01(11.3)	21.4 (30.2)	12.3 (17.4)
Liquid 1	10.9 (15.4)	0.07(0.10)	0.41(0.58)	8.89(12.6)	10.9 (15.5)	7.74 (11.0)
2	20.9 (19.9)	0.44(0.41)	3.40(3.23)	15.8 (15.0)	12.0 (11.4)	22.3 (21.2)
3	27.2 (17.2)	0.79(0.50)	4.18(2.65)	29.2 (18.5)	11.0 (6.96)	22.1 (14.0)

Values were calculated from the concentration of each compound in the extracts and the calibration curves for buffering capacity. Contribution rates of the compounds to the total buffer capacity of hot water extract were shown in parentheses.

See the legend of Table 1 and Fig. 1 for sample and compound names. In the case of umami stocks individual data were shown for the large difference of buffering capacities.

極めて高かった。ヒスチジン関連化合物の寄与は、液体調味料でやや高く、固形調味料ではかなり低かった。また、回収率が 50% 程度とかなり低いものが認められた。これらの場合にはここでは検討しなかったが、有機酸などの他の化合物の寄与も予測される。

以上の検討の結果、緩衝能に関して各だし材料にはそれぞれ特徴があることが明らかである。これらの差はいずれも上記各化合物含量の差に由来するものと考えられ、だし材料の中性付近の緩衝能はほぼこれら化合物含量により説明が可能であった。しかしながら、単にだし材料の熱水抽出液の緩衝能を測定しただけではそれぞれのだし材料を判別することは不可能であった。一方、かつお風味調味料中のかつおエキス使用量の推定は、水分とヒスチジン関連化合物の定量によりある程度可能と考えられた。しかしながら、かつお風味調味料など一定の製品の工場における日常管理などにおいては、その熱水抽出液を pH 6~8 までアルカリで滴定するだけで結果が出るため、緩衝能測定を利用することは可能と考えられる。

試料の収集にご協力頂いた播磨史子、桑川喜江、坂本薫、佐藤昭子の各氏および実験に協力頂いた岩城やしほ氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) TSUJI, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 677 (1982).
- 2) 辻 啓一: 農化, **56**, 769 (1982).
- 3) 辻 啓一: 化学と生物, **21**, 757 (1983).
- 4) 宮川金二郎・難波敦子: 日食工誌, **35**, 417 (1988).
- 5) 渡辺悦生・最上和江・林 哲仁・外山健三: 日水誌, **57**, 951 (1991).
- 6) CASTELLINI, M.A. and SOMERO, G.N.: *J. Comp. Physiol.*, **143**, 191 (1981).
- 7) ABE, H., DOBSON, G.P., HOEGER, U. and PARKHOUSE, W.S.: *Am. J. Physiol.*, **249**, R 449 (1985).
- 8) ABE, H. and OKUMA, E.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2101 (1991).
- 9) ABE, H. and OKUMA, E.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2095 (1991).
- 10) TAUSSKY, H.H. and SHORR, R.: *J. Biol. Chem.*, **202**, 675 (1953).
- 11) ABE, H.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1683 (1983).
- 12) 鴻巣章二・橋本芳郎: 日水誌, **25**, 307 (1959).
- 13) 福家真也・渡辺勝子・酒井久視・鴻巣章二: 日食工誌, **36**, 67 (1989).
- 14) 細川 誠・榊原英公・矢島 泉・林 和夫: 日食工誌, **37**, 856 (1990).
- 15) CARNEGIE, P.R., COLLINS, M.G. and ILIC, M.Z.: *Meat Sci.*, **10**, 145 (1984).
- 16) CARNEGIE, P.R., ILIC, M.Z., ETHERIDGE, M.O. and STUART, S.: *Aust. Vet. J.*, **62**, 272 (1985).
- 17) 阿部宏喜: 化学と生物, **23**, 809 (1985).

(平成 3 年 9 月 12 日受理)