イカ及びホタテガイ貯蔵中のポリアミンの消長

(平成元年2月3日受理)

山中英明* 嶋倉邦嘉* 塩見一雄*
菊池武昭* 奥積昌世*

Changes in Polyamine Contents of Common Squid and Scallop during Storage

Hideaki YAMANAKA, Kuniyoshi SHIMAKURA, Kazuo SHIOMI,
Takeaki KIKUCHI and Masayo OKUZUMI

(Tokyo University of Fisheries: 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo, Japan)

Changes in polyamine contents and viable counts of total bacteria were examined in the meats of common squid and scallop with and without the addition of chloramphenicol during storage at 10°C. In the common squid and scallop meats without chloramphenicol, the levels of agmatine, putrescine and cadaverine increased remarkably as decomposition proceeded. These polyamines appear to be useful as potential indicators of the freshness and decomposition of common squid and scallop. In the meats added with chloramphenicol, viable counts increased slowly and polyamines were produced in very small amounts. From these results it was concluded that polyamines were produced from amino acids by bacterial decarboxylases and not by endogenous muscle enzymes. When viable counts of total bacteria reached the level of 10^3 /g in common squid and 10^3 /g to 10^4 /g in scallop, the formation of polyamines was observed. *Alteromonas putrefaciens* produced putrescine, cadaverine, agmatine and tryptamine.

(Received February 3, 1989)

Key words: スルメイカ common squid; ホタテガイ scallop; ポリアミン polyamines; クロラムフェニコール chloramphenicol; プトレシン putrescine; カダベリン cadaverine; アグマチン agmatine; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 腐敗細菌 spoilage bacteria

緒 言

魚介類を貯蔵するとポリアミン類の生成がみられる。これらのポリアミンはアミノ酸が脱炭酸されて生成される。魚介類のポリアミンに関する研究は最近かなり行われるようになり、貯蔵中の消長に関する報告^{1)~5)}や鮮度判定指標としての応用に関する報告^{6)~9)}がある。しかし、これらのポリアミンが細菌の酵素によって生ずるのか、あるいは筋肉の脱炭酸酵素が関与しているのかを明確にした研究はない。そこで、本研究ではスルメイカの外套

筋(胴肉)とホタテガイの閉殻筋(貝柱)を試料として、抗菌剤のクロラムフェニコールを添加した場合と無添加の場合のそれぞれのサンプルを貯蔵し、経時的にポリアミンを定量してその生成機構を明らかにしようとした。

実験方法

1. 試 料

活スルメイカ及び活ホタテガイを試料とし、スルメイカの外套筋及びホタテガイの閉殻筋を用いた。数個体からの外套筋及び閉殻筋を集めてコンポジット試料とし、それぞれを軽くホモジナイズ後、筋肉 100 g 当たりクロラムフェニコールを 100 mg 加えた肉と無添加の肉を

* 東京水産大学: 東京都港区港南 4-5-7

Fig. 1. High performance liquid chromatogram of fluorescent derivatives of five standard polyamines and monoamines (solid line), and gradient elution program (broken line)

1: Tyramine (Tym); 2: Putrescine (Put); 3: Cadaverine (Cad); 4: Agmatine (Agm); 5: Tryptamine (Tpm)

Solution A (0.1 M NaH_2PO_4 + 10 mM sodium octanesulfonate)

Solution B (Solution A : methanol = 1 : 1).

調製し、 10° でインキュベートした。経時的にサンプリングし、肉 10 g に冷却した 5% 過塩素酸 50 ml を加えて除タンパクした。10,000 rpm で 10 分間冷却遠心分離した後、さらに沈殿に 5% 過塩素酸を加えて同様に抽出を行い、遠心分離後上清を合わせて分析試料とした。

2. ポリアミンの定量

5 種類のポリアミン及びモノアミンすなわちプトレシン (Put)、カダベリン (Cad)、アグマチン (Agm)、チラミン (Tym) 並びにトリプタミン (Tpm) は蛍光検出器付高速液体クロマトグラフ (HPLC) によって定量した。HPLC は (株) 島津製作所製のものを用い、送液ポンプ (LC-6A) 3 台 (移動相送液用 2 台、反応試薬送液用 1 台)、カラムオープン (CTO-6A)、システムコントローラー (SCL-6A)、蛍光検出器 (RF-530)、サンプルインジェクター及びクロマトグラフ用データ処理装置 (クロマトパック C-R6A) 各 1 台より構成した。試料注入量は 20 μl で、カラムは Shim-pack CLC-ODS を用い、カラムオープン温度は 50° とした。移動相としては A 液 (0.1 M リン二水素ナトリウム + 10 mM オクタンサルホン酸ナトリウム, pH 4.28) 及び B 液 (A 液に等量のメタノールを加えた溶液, pH 4.20) を用い、溶出は 2 液グラジエ

ントにより行った。グラジエントのプログラムはシステムコントローラーによって制御し、流速は 1.2 ml/min に設定した。Fig. 1 に示すとおり、A 液及び B 液の混合割合は B 液 40% からスタートし、徐々にその割合を高めて 25 分後に 90% とし、5 分間濃度を 90% に維持した後、再びスタート時点の割合に戻すグラジエントプログラムを用いた。また、カラムで分離後、オルトフタルアルデヒド及びメルカプトエタノールの混液を反応試薬として 0.2 ml/min で送液し、ポストラベル法により生成する発蛍光体を蛍光検出器 (島津 RF-530, Ex. 348 nm, Em. 450 nm) で検出した。Fig. 1 には 5 種類の標品ポリミアン及びモノアミン各 1 mg を 100 ml の 0.1 M HCl に溶解し、20 μl を注入した場合のクロマトグラムを示す。この分析条件により 5 種類のポリアミン及びモノアミンは相互によく分離し、感度も高かったので以下この方法で試料の分析を行った。

3. 揮発性塩基窒素 (VBN) の定量

Conway¹⁰⁾ の微量拡散法によって定量した。

4. トリメチルアミン態窒素 (TMA-N) の定量

スルメイカについては TMA-N も定量した。定量は小村ら¹¹⁾の方法に準拠した。

5. pH の測定

試料に 5 倍量の脱イオン水を加え、ホモジナイズ後、pH メーターで測定した。

6. 全生菌数の測定

Okuzumi ら¹²⁾の方法に従い、50% 人工海水入り寒天平板培地 (50% ASW agar, pH 7.0) を調製し、50% 人工海水にて適宜希釈したホモジネートを 0.1 ml 塗抹し、 20° で 7 日間インキュベート後、3 枚のコロニー数の平均を求めて全生菌数とした。

7. 官能判定

研究室の 5 人のパネリストによって行った。臭いを主体とし、触感についても実施した。新鮮な試料を対照とし、腐敗臭を全く感じなく、組織のしっかりした状態のものを (1)、わずかに腐敗臭を感じ、組織のやや軟化したものを (2)、腐敗臭を感じ、組織の軟化したものを (3) とし、パネリストの過半数が (1) と判定した場合 acceptable (可食)、過半数が (2) と判定した場合初期腐敗、過半数のパネリストが (3) と判定した場合腐敗とした。

結果及び考察

Table 1 にクロラムフェニコール無添加のスルメイカ肉を 10° に貯蔵したときの結果を示す。活スルメイカ筋肉には Agm が痕跡程度認められた以外はポリアミンは検出されなかった。また全生菌数は $10^2/\text{g}$ 以下、VBN は 9.2 mg/100 g と低く、TMA-N は検出されなかった。1.5 日後に Cad, Agm, Tpm が少量検出され、Put も痕跡程度認められた。TMA-N も初めて少量検出された。2.5 日後が初期腐敗と判定され、全生菌数は $8.6 \times 10^6/\text{g}$ であった。ポリアミン類の中では Agm の増加が顕著で

Table 1. Changes in Polyamines, VBN and TMA-N Contents (mg/100 g), pH Values and Viable Counts of Total Bacteria (/g) of Common Squid Meat during Storage at 10°C

Storage time (days)	Tym	Put	Cad	Agm	Tpm	VBN	TMA-N	pH	Viable counts	Sensory rating*
0	0	0	0	trace**	0	9.2	0	6.20	$<10^2$	1
1	0	0	0	trace**	0	13.4	0	6.40	1.0×10^2	1
1.5	0	trace**	0.15	0.31	0.24	16.2	0.14	6.50	4.8×10^3	1
2	0	trace**	0.42	2.96	0.36	19.0	0.22	6.55	3.0×10^4	1
2.5	0	0.26	2.64	30.5	0.41	25.1	1.11	6.60	8.6×10^6	2
3	0.24	0.74	7.46	40.4	0.39	56.4	1.50	6.80	2.0×10^7	3
3.5	0.39	18.6	9.35	41.8	0.37	120.5	2.12	7.00	5.4×10^7	3
4	0.43	21.1	11.4	41.3	0.38	154.8	2.75	7.80	1.8×10^8	3

* 1: Acceptable; 2: Initial decomposition; 3: Advanced decomposition

** trace<0.10 mg/100 g

Table 2. Changes in Polyamines, VBN and TMA-N Contents (mg/100 g), pH Values and Viable Counts of Total Bacteria (/g) of Common Squid Meat Added with Chloramphenicol during Storage at 10°C

Storage time (day)	Tym	Put	Cad	Agm	Tpm	VBN	TMA-N	pH	Viable counts	Sensory rating*
0	0	0	0	trace**	0	9.2	0	6.20	$<10^2$	1
1	0	0	0	trace**	0	11.9	0	6.20	$<10^2$	1
2	0	trace**	trace**	0.30	0.19	16.8	0	6.25	2.5×10^3	1
3	0	trace**	trace**	0.38	0.25	16.9	0.13	6.25	5.8×10^3	1
4	0	trace**	trace**	0.37	0.24	17.3	0.17	6.30	7.4×10^3	1
5	0	trace**	trace**	0.45	0.26	18.7	0.16	6.30	8.0×10^3	1
6	0	trace**	trace**	0.44	0.32	18.6	0.16	6.30	1.6×10^4	1
7	0	trace**	trace**	0.45	0.34	19.8	0.18	6.30	2.8×10^4	1

* 1: Acceptable

** trace<0.10 mg/100 g

30.5 mg/100 g 検出された。Cad も約 6 倍に増加し、Put も少量測定された。TMA-N も 5 倍に増加し、VBN は 25.1 mg/100 g であった。3 日後腐敗状態となり、Agm は 40 mg/100 g を越え、Tym が新たに検出された。さらに腐敗が進行すると Put, TMA-N, VBN が著しく増加し、これらの物質が腐敗臭に関与していることは明らかである。pH は鮮度低下に伴って増加の一途をたどった。また、いくつかのポリアミンは全生菌数が 10^3 /g のオーダーで産生されることが分かった (Table 1)。初期腐敗時の全生菌数は $10^6 \sim 10^7$ /g であるので、それ以下の食用可能な状態においてもポリアミンは相当量産生されることになる。従って、適当なポリアミンを選べば、測定に時間を要する全生菌数の代わりに鮮度及び腐敗の判定指標としてポリアミンが有効であることを示している。イカの場合、Agm, Cad, Put が適当であると思われる。Agm は活イカ筋肉でも痕跡程度存在し、貯蔵日数と共に増加し、初期腐敗時に 30 mg/100 g を越え、完全腐敗で約 40 mg/100 g に達した。Cad, Put は活イカ筋肉には検出されないが、鮮度低下すなわち貯蔵日数と

共に増加がみられた。Agm は活スルメイカ筋肉中に痕跡程度検出され、生体ポリアミンとしても存在するものと判断された。これに関連して Kobayashi ら¹³⁾は軟体動物の組織中の Agm を測定している。その中で、サザエ筋肉に 0.71~2.65 mg/100 g の Agm を生体ポリアミンとして検出し、それが餌すなわち海藻由来と推定している。

Table 2 にはスルメイカ筋肉にクロラムフェニコールを添加した場合の結果を示す。全生菌数は極めて緩慢に増加するが、 10^6 貯蔵 7 日後においても官能検査の結果は腐敗臭が全く感じられず、肉組織の軟化はみられなかった。全生菌数も 10^4 /g のオーダーであった。貯蔵 2 日後全生菌数が 10^3 /g のオーダーで Agm, Tpm が少量、Put, Cad が痕跡程度検出された。3 日後 TMA-N が 0.13 mg/100 g 測定された。

Table 1 及び Table 2 の結果を比較して明らかなように、抗菌剤クロラムフェニコールの添加によってポリアミンの生成は抑えられており、スルメイカの貯蔵中におけるポリアミンの生成は細菌のアミノ酸脱炭酸酵素によ

Table 3. Changes in Polyamines and VBN Contents (mg/100 g), pH Values and Viable Counts of Total Bacteria (/g) of Scallop Adductor Muscle during Storage at 10°C

Storage time (days)	Tym	Put	Cad	Agm	Tpm	VBN	pH	Viable counts	Sensory rating*
0	0	0	0	0	0	12.0	5.93	2.6×10^3	1
1	0	trace**	0.49	0.50	0	26.2	6.02	2.0×10^4	1
2	0.93	1.29	9.10	20.5	0.20	35.4	6.03	9.6×10^5	1
3	2.25	5.06	15.5	23.2	0.24	39.8	6.03	2.5×10^7	2
4	2.85	10.9	18.3	23.0	0.50	42.0	6.04	2.2×10^8	3
5	5.24	24.5	24.9	16.1	1.20	47.0	6.06	4.6×10^8	3

* 1: Acceptable; 2: Initial decomposition; 3: Advanced decomposition

** trace<0.10 mg/100 g

Table 4. Changes in Polyamines and VBN Contents (mg/100 g), pH Values and Viable Counts of Total Bacteria (/g) of Scallop Adductor Muscle Added with Chloramphenicol during Storage at 10°C

Storage time (days)	Tym	Put	Cad	Agm	Tpm	VBN	pH	Viable counts	Sensory rating*
0	0	0	0	0	0	12.0	5.93	2.6×10^3	1
1	0	0	0	0	0	12.8	5.96	2.5×10^3	1
2	0	0	0	0	0	13.0	5.97	2.7×10^3	1
3	0	0	0	0	0	13.3	6.00	2.8×10^3	1
4	0	0	0	0	0	13.6	5.99	3.2×10^3	1
5	0	trace**	0	0	0	15.2	6.04	6.3×10^3	1
6	0	trace**	0	trace**	0	18.2	6.07	1.6×10^4	1
7	0	trace**	trace**	trace**	0	20.4	6.13	3.8×10^4	1

* 1: Acceptable

** trace<0.10 mg/100 g

るものと考えられた。

次に、Table 3 はホタテガイ閉殻筋を 10° に貯蔵したときのポリアミン、全生菌数などの変化を一括して表示したものである。活ホタテガイではポリアミンは全く検出されず、VBN は 12.0 mg/100 g、全生菌数は 1 g 当たり 10^3 のオーダーであった。10° 貯蔵 1 日後に Cad と Agm が少量検出された。VBN は約 2 倍に上昇し、全生菌数は 10^4 /g のオーダーとなった。pH も 0.1 程度上昇した。貯蔵 2 日後には Tym, Put, Tpm が新たに検出され、Agm と Cad の急激な増加が特徴的であった。貯蔵 3 日後の肉は初期腐敗と判定され、VBN は約 40 mg/100 g、全生菌数は 2.5×10^7 /g となった。またポリアミンの増加が観察され、特に Put が急増した。Put はイカの場合と同様に腐敗臭に関与しているものと推定される。4 日後の肉は腐敗状態で、全生菌数は 2.2×10^8 /g となり、やはり Put の増加が顕著であった。5 日後には Agm の分解がみられ、Put への変化が推察される。Table 3 の結果から Cad と Agm は全生菌数が 10^4 /g のオーダーで少量産生された。また鮮度低下とポリアミン含量との関係を見るとスルメイカの場合とほぼ同様に Put, Cad, Agm などとの相関が高かった。

一方、Table 4 にはホタテガイ閉殻筋にクロラムフェニコールを添加後 10° に貯蔵した場合のポリアミン、全生菌数などの変化についての結果を示す。Table 2 に示したスルメイカの場合とほぼ同様に全生菌数及び VBN は極めて緩慢に増加した。ポリアミンは 4 日後まで全く検出されず、5 日後に Put, 6 日後に Agm, 7 日後に Cad が痕跡程度検出されたにとどまった。

Table 3 及び 4 の結果を比較すると、イカの場合と同様ポリアミンが細菌の脱炭酸酵素によって産生されることが明らかである。また、ホタテガイ閉殻筋の場合、ポリアミンが痕跡ないしは少量検出されるには筋肉 1 g 当たり全生菌数が 10^3 ないしは 10^4 のオーダー必要と思われる。

以上のように、スルメイカ及びホタテガイの結果から、貯蔵中のポリアミンの生成は筋肉の脱炭酸酵素は関与せず、細菌の脱炭酸酵素活性によることが明らかとなった。このような軟体動物より分類学上高等な魚類筋肉におけるポリアミンの生成も生体ポリアミン¹⁴⁾を除き細菌の作用によることは確実であろう。従って、魚類の鮮度判定指標として適当なポリアミンを選定し、その含量の増加から鮮度を推定することは可能と思われるの

Table 5. Production of Polyamines and Monoamine from Amino Acids by Decarboxylases of *Alteromonas putrefaciens* during Incubation at 5°C (μmol/ml)

Incubation time (days)	pH			
	4.0	5.0	6.0	7.0
1	0*	0*	Put 0.10	0*
2	0*	0*	Put 0.25	Put 0.20
4	0*	0*	Put 0.60 Cad 0.30 Agm 0.55 Tpm 0.35	Put 0.35

* Production of polyamines and monoamines were not observed.

で、今後更に検討を行う予定である。

最後に、ポリアミンの産生が細菌の脱炭酸酵素作用によることが明らかとなったので、3種類の代表的な腐敗細菌すなわち *Alteromonas putrefaciens* IAM12089, *Alteromonas haloplanktis* IAM12915, *Pseudomonas fluorescens* IAM12022 それぞれの濃厚菌液 (10⁹/ml) 1 ml を McIlvaine の緩衝液で pH を 4.0, 5.0, 6.0 及び 7.0 に調節したアミノ酸混液 (チロシン, オルニチン, リジン, アルギニン, トリプトファン) 1.2 ml に加えた。5°で 1, 2, 4 日並びに 30°で 3, 6, 9 時間インキュベート後、5%トリクロロ酢酸 5 ml を加えて反応を停止させ、HPLC で産生したポリアミン及びモノアミンを測定した。*Alteromonas putrefaciens* の結果を Table 5 及び Table 6 に示す。アミノ酸混液に 5%トリクロロ酢酸を加えた後に、濃厚菌液を添加した場合の HPLC も行い対照とした。この値を差し引いた値を *Alteromonas putrefaciens* の脱炭酸酵素による産生量と考え、検液 1 ml 中の μmol として表示してある。これらの結果から、*Alteromonas putrefaciens* では Put, Cad, Agm, Tpm の産生が観察された。特に Put がかなり広範な条件下で生成がみられた。5°, 30°とも pH 6.0 及び pH 7.0 で最もよくアミンを生成し、インキュベート時間の長い場合ほど生成量は大きかった。

しかし、*Alteromonas haloplanktis* 及び *Pseudomonas fluorescens* ではこれらのアミンの生成はみられなかった。

要 約

スルメイカとホタテガイを試料とし、クロラムフェニコールを添加した肉と無添加の肉を調製し、10°貯蔵中のポリアミン、全生菌数などの変化を調べた。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. クロラムフェニコール無添加肉ではポリアミンの生成が顕著で、特に Agm, Put, Cad の増加が著しかっ

Table 6. Production of Polyamines and Monoamine from Amino Acids by Decarboxylases of *Alteromonas putrefaciens* during Incubation at 30°C (μmol/ml)

Incubation time (hours)	pH			
	4.0	5.0	6.0	7.0
3	0*	0*	Put 0.50	Put 0.55
6	0*	Put 0.35	Put 0.65 Agm 0.15	Put 0.75 Agm 0.20 Tpm 0.05
9	0*	Put 0.45	Put 0.75 Cad 0.20 Agm 0.70 Tpm 0.15	Put 0.80 Cad 0.20 Agm 0.60 Tpm 0.10

* Production of polyamines and monoamines were not observed.

た。鮮度低下とこれらのポリアミン量との相関も高く、鮮度指標として適していると思われる。

2. クロラムフェニコール添加肉では全生菌数の増加が極めて緩慢であり、ポリアミンの生成はわずかであった。

3. ポリアミンの生成は筋肉の脱炭酸酵素は関与せず、細菌の脱炭酸酵素活性によることが証明された。

4. スルメイカでは全生菌数が 10³/g のオーダーで、またホタテガイでは 10³/g ないしは 10⁴/g のオーダーで痕跡あるいは少量のポリアミンが検出された。

5. アミノ酸混液に *Alteromonas putrefaciens* の濃厚菌液を添加後インキュベートすると、Put, Cad, Agm, Tpm の産生が認められた。

文 献

- 1) 高木光造, 飯田 優, 村山花子, 相馬すが: 北大水産彙報. **21**, 133~143 (1970).
- 2) 高木光造, 飯田 優, 岡 重美: 日水誌. **37**, 1,079~1,083 (1971).
- 3) Ritchie, A. H., Mackie, I. M.: "Advances in Fish Science and Technology" p. 489~494 (1980) Fishing News Books Ltd., Farnham (England).
- 4) 外海泰秀, 伊藤智志男, 原田基夫: 食衛誌. **25**, 41~46 (1984).
- 5) 永山敏廣, 田村行弘, 真木俊夫, 観 公子, 直井家壽太, 二島太一郎: 衛生化学 **31**, 362~370 (1985).
- 6) Karmas, E., Mietz, J. L.: Lebensm. Wiss. Technol. **11**, 333~343 (1978).
- 7) Mietz, J. L., Karmas, E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **61**, 139~145 (1978).
- 8) Yamanaka, H., Shimakura, K., Shiomi, K., Kikuchi, T.: Nippon Suisan Gakkaishi **52**, 127~130 (1986).
- 9) Yamanaka, H., Shiomi, K., Kikuchi, T.: J. Food Sci. **52**,

- 936~938 (1987).
- 10) Conway, E. J.: "Microdiffusion Analysis and Volumetric Error" p. 87~107 (1950) Crosby Lockwood and Son Ltd., London.
- 11) 中村邦典, 寺野重造: 東海区水研報. **103**, 93~98 (1980).
- 12) Okuzumi, M., Okuda, S., Awano, M.: Nippon Suisan Gakkaishi **48**, 799~804 (1982).
- 13) Kobayashi, Y., Nakagawa, T., Nagayama, F.: *ibid.* **52**, 1,995~1,999 (1986).
- 14) Yamanaka, H., Shimakura, K., Shiomi, K., Kikuchi, T., Iida, H., Nakamura, K.: *ibid.* **53**, 2,041~2,044 (1987).