スケトウダラ肉貯蔵中のトリメチルアミン-*N*-オキシドの 分解機構と酸素ガスによる分解抑制

木村メイコ,¹ 竹内規夫,¹ 埜澤尚範,¹
水口 亨,² 木村郁夫,² 関 伸夫,^{1a}

(2005年11月21日受付, 2006年3月9日受理)

¹北海道大学大学院水産科学研究院食品生化学研究室, ²日本水産物中央研究所

The mechanism and oxygen gas inhibition of the degradation
of trimethylamine-*N*-oxide in walleye pollack muscle during storage

MEIKO KIMURA,¹ NORIO TAKEUCHI,¹ HISANORI NOZAWA,¹
TORU MIZUGUCHI,² IKUO KIMURA² AND NOBUO SEKI^{1*}

¹Laboratory of Food Biochemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate
041-8611, ²Central Research Laboratory, Nippon Suisan Kaisha Ltd., Hachioji, Tokyo 192-0906

The inhibitory effect of oxygen gas on the degradation of trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) to dimethylamine (DMA) and formaldehyde in walleye pollack muscle during storage was investigated. At 5°C storage, the formation of DMA in the muscle was markedly inhibited in oxygen gas than in nitrogen gas, air and vacuum. In the case of frozen storage at -5 and -10°C, oxygen gas effectively inhibited DMA formation. At -20°C, oxygen gas also inhibited DMA formation if improved gas supply to muscle tissue was provided. It was found that optimum pH of DMA formation was neutral in walleye pollack muscle during frozen storage at -20°C which was similar to that of TMAOase-like activity mediated by aspolin, but differed greatly from the optimum pH 5.5 *in vitro* for non-enzymic reaction carried out in a frozen solution containing TMAO, Fe²⁺ and cysteine.

キーワード：アスポリン, 酸素ガス, ジメチルアミン, スケトウダラ, 貯蔵, トリメチルアミン-*N*-オキシド,
ホルムアルデヒド

海産動物組織には浸透圧調節のためにトリメチルアミン-*N*-オキシド (TMAO) が含まれている。特に、タラ科の魚類とエソなど一部の海産魚類および板鰓類の筋肉および内臓には多量に含まれ、¹⁻⁵⁾ スケトウダラ筋肉中には 60-100 μmol/g (筋肉湿重量) の TMAO が存在している。スケトウダラ肉を 0°C 以上で貯蔵した場合、TMAO は貯蔵中に分解され、ジメチルアミン (DMA) とホルムアルデヒドを等モルずつ生成するが、数日後には微生物の TMAO 還元酵素による分解でトリメチルアミン (TMA) の急激な増大が起るために DMA の生成は事実上認められなくなる。^{2,6)} 一方、徳永は⁷⁾ スケトウダラ普通肉を -17 から -19°C に凍結貯蔵した場合も、TMAO から DMA とホルムアルデヒドが多量に生成さ

れてくることを明らかにしている。産業的には生成したホルムアルデヒドが筋原繊維タンパク質を変性させ、肉の品質 (肉タンパク質の溶解性, 乳化性, 加熱ゲル形成能, テクスチャー) を著しく低下させることが問題となっている。⁷⁻¹⁰⁾ エソ類ではマエソよりもトカゲエソでホルムアルデヒド生成が多く、ゲル形成能の低下が速いことが知られている。^{11,12)} この問題は肉を水晒しして TMAO を除去するすり身の開発で解決された面もあるが、全魚体および魚肉として貯蔵する場合には依然として未解決の残された問題である。

TMAO の分解は長年 TMAOase (trimethylamine-*N*-oxide demethylase) による酵素反応であると考えられてきたが、¹³⁾ 著者らは¹⁴⁻¹⁷⁾ スケトウダラ筋肉から酵素

* Tel.: 81-3-3244-7081. Email: n-seki@nissui.co.jp

^a 現所属: 日本水産物食品機能科学研究所 (Food Function Research Center, Nippon Suisan Kaisha Ltd.)

活性を指標に本酵素を精製単離し, その酵素学的性状およびタンパク質化学的性状を調べたところ, ポリ-アスパギン酸様の極めて特異なアミノ酸配列を有する新規のタンパク質であることを明らかにし, aspolin と命名した。TMAOase 活性は aspolin と Fe^{2+} による酵素類似作用によって発揮されることが分かった。さらに, 著者らは¹⁸⁾ TMAO は *in vitro* で, 凍結中に Fe^{2+} と還元剤の存在下において無機的に分解されることを報告している。Castell ら,⁸⁾ Spinelli と Koury は^{10,19)} Pacific whiting の凍結肉では TMAO から DMA の生成は Fe^{2+} とシステインの代謝産物である cysteinesulfinic acid や hypotaurine によって非酵素的に起こることを述べている。

TMAO の分解を抑制する方法を開発する上で, Reece⁹⁾ の -10°C 凍結肉中のホルムアルデヒドの生成が肉の表面に近い程阻害されるという報告は注目に値する。岡ら^{11,20)} はエソを酸素ガス置換包装して貯蔵するとかまぼこゲル形成能が延長されることを報告している。著者らは¹⁴⁻¹⁷⁾ TMAO の分解が酵素類似反応あるいは非酵素的に起こるとしても, いずれの場合も Fe^{2+} が重要な作用をしており, Fe^{2+} の酸化が反応の抑制になると考えている。そこで, 本研究ではスケトウダラ肉を酸素ガス中で 5°C および凍結貯蔵 ($-5, -10, -20^{\circ}\text{C}$) することにより, TMAO の分解が抑制される可能性およびスケトウダラ凍結肉中で TMAO の分解が aspolin による酵素類似反応に依存するのか, あるいは無機反応によるのかを推測した。

試料および方法

試料 函館近海産のスケトウダラ *Theragra chalcogramma* (体重約 700 g) を刺し網で漁獲後, 氷冷して 12 時間以内に購入し, その背肉フィレーを採取し, 血合筋を除いて使用した。TMAO は Aldrich 社製のものを, 1,10-フェナントロリンは同仁化学研究所のものをを用いた。DMA, ホルムアルデヒドなどその他全ての試薬は和光純薬社製の特級試薬を使用した。

スケトウダラ肉のガス包装と貯蔵 生鮮スケトウダラの背側普通筋を 10 mm 目の挽肉器で均一にし, その 10 g をプラスチックフィルム製の袋 (キャンズ フィルム B-type, 90 μm (厚さ) $\times 11\text{ cm} \times 20\text{ cm}$; 酸素透過度 49 $\text{ml}/(\text{m}^2 \cdot 24\text{ h} \cdot \text{atm})$; 四国化工) に入れ, 脱気後, 直ちに窒素ガス, 空気, 酸素ガスをフィルター (Millex-FG50; Millipore Co.) を通して, それぞれ約 350 mL 充填した。真空包装は自動真空ガス包装機 (Auto vacuum packer: FVSII-500G-II 古川製作所) を用いて行った。なお, 脱気前までの作業は 4°C の部屋でこなった。包装後, 各温度に設定した恒温槽中に貯蔵した。 -20°C の場合は冷凍庫 (ナショナル NR-174 FC) 中に保存した。

スケトウダラ肉の pH 調整 背肉を 10 mm 目の挽肉器で均一にし, 0.5 M HCl または 0.5 M NaOH を用いて pH を調整し, ガラス電極で測定した。さらに凍結貯蔵後, 未解凍のまま肉の 10 倍量の 1 mM ヨード酢酸 (pH 7.0) を添加してホモジナイズし解凍後, ガラス電極を使用して測定した。調整時との差は小さかったが, 解凍後の pH を肉の pH として用いた。

TMAO の非酵素的分解反応の測定 凍結下の TMAO の非酵素的 (無機) 分解反応は 20 mM TMAO, 0.2 mM FeCl_2 , 2 mM システイン (Cys) からなる反応液 (全量 5 mL) を用いた。pH の調整は pH 4.5~6.0 には 20 mM 酢酸緩衝液, pH 6.0 $\leq$ は 20 mM Tris-acetate 緩衝液を用いた。各試薬溶液を氷冷下で混合した後, -20°C の冷凍庫中に貯蔵した。反応停止は終濃度 2.5% となるようにトリクロロ酢酸を添加した後, 25°C の恒温水槽中に 5 分間入れて解凍しておこなった。

反応液の溶存酸素濃度の調整はあらかじめ FeCl_2 と Cys を除いた反応液に酸素ガスまたは窒素ガスを通気させた。その後, FeCl_2 と Cys を加え, DO メーター (YSI model 95, Yellow Springs, OH, USA) で溶存酸素濃度を測定し, 直ちにプラスチック製バイアル (5.75 mL コーニング製クライオバイアル) 中に 5 mL 入れ, 密栓して凍結した。

DMA と TMA の定量 TMA の定量は以下に示す Dyer らの方法^{21,22)} に基づいて行った。スケトウダラ肉の 5% トリクロロ酢酸抽出液を終濃度 1.25% となるように水で希釈し, 試料として用いた。試料 1 mL を共栓試験管にとり, これに 10% ホルムアルデヒド 0.25 mL, 30% KOH 0.75 mL, トルエン 2.5 mL を加え, 30°C で 5 分間加温した。直ちに激しく振とう, 攪拌した後, 再び加温, 振とう, 攪拌を行い, TMA の抽出された上層 (トルエン層) を約 0.5 g 無水硫酸ナトリウムで脱水処理した。この 1 mL に 0.02% ピクリン酸-トルエン溶液を 1 mL 加え, 410 nm で比色定量した。DMA の定量は銅-ジメチルカルバメート法²³⁾ で定量した。上述の方法で調製した試料 4 mL を共栓試験管に移し, 0.4 mL の CuSO_4 -ammonia 溶液および 4 mL のベンゼンを添加した後, 40°C の恒温水槽中で 5 分間加温した。その後よく振とう, 攪拌し, 黄褐色の銅-ジメチルカルバメートをベンゼン層 (上層) に抽出した後, 440 nm で比色定量した。

Fe^{2+} の定量 反応液中の Fe^{2+} の量はフェナントロリン吸光度法 (JIS K0101: <http://www.jisc.go.jp/app/pager?id=13978>) により Fe^{2+} と 1,10-フェナントロリン複合体のオレンジ赤色を 510 nm で比色して求めた。反応液中の Cys は Fe^{2+} の定量に影響しないことを確かめた。

Fig. 1 Formation of DMA in minced walleye pollack muscle during storage at 5°C. Minced walleye pollack muscles were packaged in oxygen gas (triangles), air (diamonds), nitrogen gas (circles) and vacuum (squares), and then stored at 5°C. Bars indicate means $\pm$ SD.

結果と考察

ガス置換包装による貯蔵中の DMA の生成 スケトウダラ肉を窒素ガス、酸素ガス置換包装、空気および真空包装して 5°C で 7 日間まで貯蔵した時の DMA の生成量を Fig. 1 に示す。窒素ガス置換および真空包装では貯蔵 3 日目には 1 $\mu\text{mol/g}$ に達し、その後急激に増加し、5 日目には 3 $\mu\text{mol/g}$ となった。一方、空気中ではこれらに比べて DMA の生成は遅く、5 日目では 1.5 $\mu\text{mol/g}$ であった。さらに酸素包装の場合は DMA の生成は抑制され、1 週間経過後も 1 $\mu\text{mol/g}$ に到達しなかった。以上の結果から、肉を酸素ガス中で貯蔵すると、DMA の生成抑制に顕著な効果があることが明らかになった。スケトウダラ肉中の DMA は多量に存在する TMAO の分解により等モル量のホルムアルデヒドとともに生成することが知られているので、酸素ガスによる貯蔵は TMAO の分解防止とホルムアルデヒドの生成抑制に有効である。本研究に用いたスケトウダラは刺し網で漁獲後、漁箱に密封された状態で入手されたことから、魚は窒息死であると考えられ、肉は無酸素状態に近いと推測される。したがって、魚肉の環境は本研究における窒素ガス置換の状態に近いものと思われる。魚肉を空気に晒したり、酸素ガス中に貯蔵することは少なくとも DMA の生成抑制に効果があることが推測される。王ら²⁰⁾はトカゲエソで貯蔵中の肉は酸素分圧が低いことを推測しており、Reece⁹⁾もタラ肉を積層したとき、深部程酸素濃度が低く、このような条件下でホルムアルデヒドの生成が多いことを報告している。

次に真空およびガス置換包装したスケトウダラ肉を -5°C で 10 日間まで凍結貯蔵した (Fig. 2)。真空貯蔵の

Fig. 2 Formation of DMA in minced walleye pollack muscle during storage at -5°C. Minced walleye pollack muscles were packaged in oxygen gas (triangles), nitrogen gas (circles) and vacuum (squares), and then stored at -5°C. Bars indicate means $\pm$ SD.

Fig. 3 Formation of DMA in minced walleye pollack muscle during storage at -10°C. Minced walleye pollack muscles were packaged in oxygen gas (triangles) and nitrogen gas (circles), and then stored at -10°C. Bars indicate means $\pm$ SD.

場合に最も多量の DMA が生成し、10 日後には約 5 $\mu\text{mol/g}$ に達した。一方、窒素ガス下では 4 日目までに 2.7 $\mu\text{mol/g}$ に急増したが、その後はほとんど変化しなかった。一方、酸素ガス包装では貯蔵初期 2 日以内に約 1 $\mu\text{mol/g}$ に達した後はほとんど増大傾向を示さなかった。いずれの場合も他の包装に比べて酸素ガス置換包装で DMA の生成が抑えられていることがわかった。-10°C に凍結貯蔵した場合 (Fig. 3)、窒素ガスと酸素ガス置換包装で比較したが、いずれの場合も -5°C 貯蔵よりも DMA の生成速度が大きかった。さらに窒素ガス下では 16 日後に 10 $\mu\text{mol/g}$ に到達したが、酸素ガス中では 20 日後に 5 $\mu\text{mol/g}$ に到達した。以上の結果より、-5°C および -10°C 凍結貯蔵中においても、酸素ガ

Fig. 4 Formation of DMA in minced walleye pollack muscle during storage at -20°C . Minced walleye pollack muscles were packaged in oxygen gas (triangles), nitrogen gas (circles) and vacuum (squares), and then stored at -20°C . Bars indicate means $\pm$ SD.

スによりスケトウダラ肉中の DMA とホルムアルデヒドの生成を効果的に抑制できることが明らかになった。

次にスケトウダラ肉を真空および窒素ガス、酸素ガス置換包装により -20°C で凍結貯蔵した際の結果を Fig. 4 に示す。いずれの包装でも DMA の生成量は少なく、貯蔵 25 日目で $2\mu\text{mol/g}$ 程度であった。窒素ガスおよび酸素ガス置換貯蔵中の DMA の生成量は $+5$, -5 , -10°C の順に増大し、 -20°C では低下する傾向があった。このような温度依存性は徳永らの報告⁷⁾に一致しており、溶質の凍結濃縮による反応速度の増大と、低温による低下との兼ねあいで決まることが推察された。¹⁸⁾

Fig. 4 において、注目すべきことはいずれのガス置換包装においても DMA の生成速度に殆ど差がなく、酸素ガスの効果が認められなかったことである。酸素ガスは筋肉組織中の未凍結溶液中に溶解し、TMAO の分解を抑制する機能を発揮していると推測されるため、 -5 および -10°C に比較して -20°C では凍結速度が速く、酸素ガスの浸透が不十分である可能性が考えられる。そこでスケトウダラ肉を酸素ガス置換包装し、 $+5^{\circ}\text{C}$ で一定時間放置した後に -20°C で 14 日間凍結貯蔵した (Fig. 5)。酸素ガス置換包装直後の DMA 生成量は微量であったが、これを直ちに -20°C で 14 日間凍結貯蔵後には DMA は $0.5\mu\text{mol/g}$ 生成した。次に $+5^{\circ}\text{C}$ で 6 時間保持した後に凍結貯蔵すると DMA の生成量は $0.05\mu\text{mol/g}$ に低下した。さらに $+5^{\circ}\text{C}$ で 24 時間貯蔵するとその間に DMA は約 $0.2\mu\text{mol/g}$ 生成したが、これを -20°C で 14 日間凍結貯蔵しても DMA の増大は殆どなかった。従って酸素ガス置換包装してから凍結ま

Fig. 5 Effect of holding time of packaged minced muscle in oxygen gas before frozen storage on the formation of DMA. Minced walleye pollack muscles packaged in oxygen gas were held at 5°C (open circles) and then stored at -20°C for 14 days (closed circles). Bars indicate means $\pm$ SD.

Fig. 6 Effect of muscle pH on the formation of DMA at -20°C . The pH of minced walleye pollack muscle was adjusted to 5.8–7.7 with 1 M HCl or 1 M NaOH. The mince was packaged in oxygen gas (closed symbols) and nitrogen gas (open symbols) and then stored at -20°C for 0 (squares), 7 (triangles) and 21 (circles) days. The muscle pH and DMA content were measured just after storage. Bars indicate means $\pm$ SD.

でに時間をおくことが重要であると思われる。後述するように (Fig. 6, pH 7), $+5^{\circ}\text{C}$ で予備貯蔵した後、 -20°C で 21 日間凍結した場合、窒素ガス置換包装では約 $1.5\mu\text{mol/g}$ の DMA が生成したが、酸素ガス下では $0.7\mu\text{mol/g}$ に抑制された。しかし、酸素ガス中での DMA 生成量は Fig. 5 に比較して多くなっているが、その原因は分からない。酸素の浸透性以外の要因もあるように考えられる。

スケトウダラ肉中の TMAO 脱メチル化反応は TMAOase による酵素反応であると考えられてきた

が,¹³⁾ 著者らは aspolin による酵素類似反応であることを報告した。¹⁶⁾ 一方, 凍結下においては aspolin による脱メチル化反応よりは無機反応によって脱メチル化が起ることを報告しているが,¹⁸⁾ これは *in vitro* の反応であり, スケトウダラ肉を凍結した場合の TMAO の脱メチル化反応については無機反応であるのか, aspolin が関与する反応であるのかは未解決である。aspolin による脱メチル化反応の至適 pH は 7.0 にある。¹⁵⁾ 一方, 無機反応の pH 依存性は明らかになっていない。そこで, 凍結貯蔵におけるスケトウダラ肉中の TMAO 分解の至適 pH と無機脱メチル化反応の pH 依存性を調べ比較した。

TMAO の分解におよぼす pH の影響 本研究で用いたスケトウダラ肉の pH は漁獲直後は pH 7.5 であったが, 5°C で貯蔵すると, 3 日後には約 7.1 に低下した。貯蔵中の pH 低下は遅いことが明らかであるが, 肉中の TMAO 分解におよぼす pH の影響を知るために, スケトウダラ挽肉の pH を HCl または NaOH で種々の pH に調整して -20°C で酸素ガスおよび窒素ガス中に貯蔵した (Fig. 6)。この結果によると, いずれのガス中においても, 肉の DMA 生成量は pH 7 付近で最大値を示した。したがって, 凍結肉中の TMAO の分解は中性 pH がみかけの至適であり, アルカリ性と酸性側では低下することが明らかになった。この図には示していないが, 凍結肉中の TMA 生成は窒素および酸素ガス中, いずれの pH においても 21 日後までほとんど増大しなかった。

次に, -20°C における無機反応による TMAO の分解と DMA および TMA の生成におよぼす pH の影響を調べ, 結果を Fig. 7 に示す。中性 pH 下では DMA の生成は微量であったが, pH 低下に伴って増大し, pH 5.4 で最大値を示した。この -20°C, 至適 pH における無機反応は非常に速く, 24 時間後に 7.5 $\mu\text{mol/g}$ の DMA が生成した。これに較べると, pH 7 における DMA の生成量は微量であった。しかし, 前報¹⁸⁾ で述べたように, 貯蔵 7 日後には約 0.7 $\mu\text{mol/g}$ に達する。この量は凍結肉中における DMA の生成量よりもわずかながら多いことが分かった。無機反応による TMAO からの DMA 生成におよぼす pH の影響は aspolin による DMA 生成およびスケトウダラ肉の凍結貯蔵中の DMA 生成とは非常に異なっていた。一方, 無機反応による TMA 生成量は少なく, pH の影響も小さかったが, pH 7 以上では DMA よりも TMA の生成量が多くなることがわかった。

次に, -20°C 貯蔵における無機反応による TMAO 分解におよぼす溶存酸素濃度の影響を Fig. 8(a) に示す。pH 7.2 では DMA 生成量は少なく, 溶存酸素濃度の影響をあまり受けていないように見える。酸素濃度が低い

Fig. 7 Effect of pH on the inorganic formation of DMA and TMA from TMAO at -20°C. TMAO (20 mM) solutions containing 0.2 mM FeCl_2 and 2 mM cysteine at different pHs were frozen and stored at -20°C for 24 h. Buffers used: 20 mM acetate buffer at pH 4.5–6.0; 20 mM Tris-acetate buffer at pH 6.0–7.8. Closed circles, DMA; closed triangles, TMA.

ところでは TMA の方が多く生成した。Fig. 8(b)によると, この pH では Fe^{2+} は溶存酸素濃度に関係なく多量に残存していることから, 反応は Fe^{2+} 濃度に律速されていないと考えられる。

次に pH 6.5 においては DMA の生成は溶存酸素濃度が 0.4 $\mu\text{mol/g}$ で最大になり, それ以上では抑制された。しかし, 溶存酸素濃度が低い場合でも DMA の生成が抑制された。この時, 溶存酸素濃度が 0.25 $\mu\text{mol/g}$ 以下では Fe^{2+} は 100% 残存していたが, 溶存酸素濃度が増大するにつれて低下した。したがって, 溶存酸素濃度の増大による Fe^{2+} の酸化が DMA の生成低下要因のように推定される。溶存酸素濃度が低い場合の DMA 生成低下は TMA の生成量が嫌気的条件下では増大することから, TMAO は DMA よりも TMA へ分解されやすくなることが原因と推測された。一方, pH 6.0 では溶存酸素濃度が高い場合でも DMA が多量に生成された。この時の反応後の残存 Fe^{2+} 量は 50% 以上であった。

これらの結果に基づくと, スケトウダラ肉の凍結貯蔵中の TMAO の DMA への分解はその至適 pH の類似性およびスケトウダラ肉の pH が中性付近にあることから無機反応によると考えるよりは, aspolin による TMAOase 類似反応による可能性が高いことが推測された。DMA の生成量については中性 pH 下の無機反応においても説明できるが, この場合 DMA よりも TMA が多く生成される。しかし, 凍結肉中においては TMA がほとんど生成されないことから, 凍結肉中での無機反応の関与は aspolin による TMAOase 類似反応よりも可能性が小さいことが推測される。無機反応の反応液は TMAO, Cys および Fe^{2+} を含んでおり, これらは溶液

Fig. 8 Effect of dissolved oxygen on the formation of DMA and TMA from TMAO, and the concentration of remaining Fe²⁺ at -20°C. TMAO (20 mM) solutions containing 0.2 mM FeCl₂, 2 mM cysteine at different pHs and different dissolved oxygen gas concentrations were frozen and stored at -20°C for 24 h. Buffers used were 40 mM acetate at pH 6.0 (circles) and 40 mM Tris-acetate at pH 6.5 (triangles) and 7.2 (squares). (a) After storage, DMA (closed symbols) and TMA (open symbols) produced were measured. (b) The remaining Fe²⁺ concentrations at pHs 6.0, 6.5 and 7.2 were also determined.

中で複合体を形成している。^{24,25)} TMAO は Cys と直接反応して Cys を酸化して TMA を生成するが,²⁴⁾ 上述したように、凍結肉中での TMA の生成は検出されないため、この反応が凍結肉中で起る可能性は低いと考えられる。Fe²⁺ は aspolin による酵素類似反応および無機反応のいずれの場合も DMA 生成に必要な因子であるが、溶存酸素によって容易に酸化され、酸化速度は pH が高い程速いことが知られている。²⁶⁾ Cys 存在下においては Cys と複合体を形成し、Fe²⁺ の酸化は防止されているが、Cys 自体も溶存酸素で酸化される。したがって、溶存酸素で Cys が酸化されてしまうと、Fe²⁺ が

Fe³⁺ に酸化されて、結果的に TMAO の DMA とホルムアルデヒドへの分解が抑制されると考えられる。

一方、前報¹⁸⁾においても考察したが、肉中の DMA 生成においては肉中の Fe²⁺ 量は微量であり、さらに中性 pH では溶存酸素で酸化され易いので、Fe³⁺ 還元システムが必要である。²⁶⁻²⁸⁾ 細胞内の Fe³⁺ 還元は一般にアスコルビン酸、グルタチオン、Cys、NAD(P)H などと還元酵素の作用によることが知られている。²⁹⁻³³⁾ しかし、凍結スケトウダラ肉中の Fe³⁺ 還元系は不明であり、酸素ガスは肉の未凍結液中に溶存することによって、Fe³⁺ 還元系を阻害し、結果的に TMAO の分解を抑制すると考えられる。Aspolin は Fe²⁺ と複合体を形成して TMAOase 作用をおこなうので、^{15,16)} Fe²⁺ の酸化が反応の抑制となる。この酵素類似反応は至適 pH が中性にあるので、pH を弱アルカリあるいは酸性側にシフトさせることも TMAO 分解を抑制することになる。しかし、酸性側へのシフトは TMAO の無機分解を促進する可能性が高いこと、また、筋肉タンパク質の酸変性防止の立場からも避けるほうが良いと推測される。

スケトウダラの死後、血液の循環停止の結果、魚肉は嫌気状態となり TMAO は分解されやすい環境になる。したがって、死後の早い段階で酸素ガス処理をおこない、数時間置いて肉組織への浸透を図った後に凍結貯蔵する方法が、凍結貯蔵中の TMAO の分解抑制と DMA とホルムアルデヒドの生成防止に望ましい方法であると考えられる。本研究では酸素ガスが DMA とホルムアルデヒドの生成抑制に有効であるとの結論に達したが、酸素ガスは魚肉のタンパク質、脂質、色素などの酸化を起こす要因として知られている。酸素ガス処理は DMA とホルムアルデヒドを多量に生成するタラ類、エソ類などにおいてホルムアルデヒドの生成抑制による品質低下防止効果と、タンパク質、脂質、色素などの酸化による品質低下とを比較することが今後必要であろう。

文 献

- 1) Dyer W. Amines in fish muscle. VI. Trimethylamine oxide content of fish and marine invertebrates. *J. Fish. Res. Board Can.* 1952; **8**: 314-324.
- 2) 天野慶之, 山田金次郎. タラ類筋肉中のホルムアルデヒド形成について. *日水誌* 1964; **30**: 430-435.
- 3) 徳永俊夫. 魚類血中肉中のトリメチルアミンオキシドならびにその分解-I. *日水誌* 1970; **36**: 502-509.
- 4) 原田勝彦. 魚介類におけるホルムアルデヒドとジメチルアミンを生成する酵素に関する研究. *水産大学校研究報告* 1975; **23**: 163-241.
- 5) Kimura M, Takeuchi K, Kimura I, Seki N. The existence of aspolin and its trimethylamine-*N*-oxide demethylating activity in the muscle of freshwater fish. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 904-913.
- 6) Castell CH, Neal WE, and Dale J. Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine, and extractable protein in iced and frozen gadoid fillets. *J. Fish. Res. Board*

- Can. 1973; **30**: 1246-1248.
- 7) 徳永俊夫. 冷凍スケトウダラの品質におよぼすトリメチルアミンオキシド分解物の影響. 日水誌 1974; **40**: 167-174.
 - 8) Castell CH, Smith B, Neal W. Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle. *J. Fish. Res. Board Can.* 1971; **28**: 1-5.
 - 9) Reece P. The role of oxygen in the production of formaldehyde in frozen minced cod muscle. *J. Sci. Food Agric.* 1983; **34**: 1108-1112.
 - 10) Spinelli J, Koury B. Nonenzymic formation of dimethylamine in dried fishery products. *J. Agric. Food Chem.* 1979; **27**: 1104-1108.
 - 11) 岡 弘康, 王 錫昌. エソのゲル形成能に及ぼすガス置換包装の影響. 冷凍空調論文集 2003; **20**: 49-56.
 - 12) 平岡芳信, 菅 忠明, 黒野美夏, 平野和恵, 松原 洋, 橋本 照, 岡 弘康, 関 伸夫. トカゲエソの貯蔵中に生成するホルムアルデヒドがかまぼこの品質に及ぼす影響. 日水誌 2003; **69**: 796-804.
 - 13) Sotelo C, Rehbein H. TMAO-degrading enzymes. In: Haard NF, Simpson BK, eds. *Seafood Enzymes* New York: Marcel Dekker; 2000: 167-190.
 - 14) Kimura M, Seki N, Kimura I. Occurrence and some properties of trimethylamine-*N*-oxide demethylase in myofibrillar fraction from walleye pollack muscle. *Fish. Sci.* 2000; **66**: 725-729.
 - 15) Kimura M, Seki N, Kimura I. Purification and characterization of trimethylamine-*N*-oxide demethylase from walleye pollack muscle. *Fish. Sci.* 2000; **66**: 967-973.
 - 16) Takeuchi K, Hatanaka A, Kimura M, Seki N, Kimura I, Yamada S, Yamashita S. Aspolin, a novel extremely aspartic acid-rich protein in fish muscle, promotes iron-mediated demethylation of trimethylamine-*N*-oxide. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 47416-47422.
 - 17) 木村メイコ, 竹内孝明, 木村郁夫, 関 伸夫. タラ肉のトリメチルアミン-*N*-オキシドの分解. 化学と生物 2004; **42**: 4-5.
 - 18) 木村メイコ, 関 伸夫, 木村郁夫. 0℃以下の温度におけるトリメチルアミン-*N*-オキシドの酵素的および非酵素的分解. 日水誌 2002; **68**: 85-91.
 - 19) Spinelli J, Koury B. Some new observations on the pathways of formation of dimethylamine in fish muscle and liver. *J. Agric. Food Chem.* 1981; **29**: 327-331.
 - 20) 王 錫昌, 成田公義, 平岡芳信, 逢阪江理, 岡 弘康. エソ類の低温貯蔵中に起るホルムアルデヒドの生成とゲル形成能の低下に及ぼす酸素の影響. 日水誌 2003; **69**: 82-84.
 - 21) Dyer WJ, Dyer FE, Snow JM. Amines in fish muscle. V. Trimethylamine oxide estimation. *J. Fish. Res. Board Can.* 1952; **8**: 309-313.
 - 22) Dyer WJ. Amines in fish muscle. I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *J. Fish. Res. Board Can.* 1945; **6**: 351-358.
 - 23) Dyer WJ, Mounsey YA. Amines in fish muscle. II. Development of trimethylamine and other amines. *J. Fish. Res. Board Can.* 1945; **6**: 359-367.
 - 24) Brzezinski B, Zundel G. Formation of disulphide bonds in the reaction of SH group-containing amino acids with trimethylamine-*N*-oxide. *FEBS Letters* 1993; **333**: 331-333.
 - 25) Vattem DA, Seth A, Mahoney RR. Chelation and reduction of iron by chicken muscle protein digests: the role of sulphhydryl groups. *J. Sci. Food Agric.* 2001; **81**: 1476-1480.
 - 26) Welch KD, Davis TZ, Aust SD. Iron autoxidation and free radical generation: Effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; **397**: 360-369.
 - 27) Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; **1331**: 1-40.
 - 28) Breuer W, Epsztein S, Cabantchik ZI. Iron acquired from transferrin by k562 cells is derived into a cytoplasmic pool of chelatable iron (II). *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 24209-24215.
 - 29) Comporti M. Iron and cellular redox status. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; **32**: 565-567.
 - 30) Petrat F, Groot H, Sustmann R, Rauen U. The chelatable iron pool in living cells: A methodically defined quantity. *Biol. Chem.* 2002; **383**: 489-502.
 - 31) Welch KD, Davis TZ, Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; **32**: 577-583.
 - 32) Woodmansee AN, Imlay JA. Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escheichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 34055-34066.
 - 33) Petrat F, Paluch S, Dogruoz E, Dorfler P, Kirsch M, Korth HG, Sustmann R, Groot H. Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes in vitro. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 46403-46413.