低温貯蔵中におけるコイ肉ヌクレオチド の変化と鮮度について*

富山哲夫・小林邦男・北原慶子

白石悦子・大庭信良

(1965 年 11 月 22 日受理)

A STUDY ON THE CHANGE IN NUCLEOTIDES AND FRESHNESS OF CARP MUSCLE DURING THE CHILL-STORAGE

Tetuo TOMIYAMA, Kunio KOBAYASHI, Keiko KITAHARA,
Etsuko SHIRAISHI and Nobuyoshi OHBA**

A number of studies have been reported on the change in the acid-soluble nucleotide of muscle tissue. In fish muscle, however, few works have been done on the relation between the change in the nucleotides and the freshness based on the bacterial spoilage. It is proposed recently from a consumer's standpoint that the flavor quality index of muscle tissue is more desirable as the freshness rather than the bacterial spoilage index. The present paper deals with the relationship between the change in the concentrations of various nucleotides, VBN and the number of bacteria in carp muscle during the chill-storage.

The concentration of IMP is quite important as the index of flavor quality of fish muscle, because IMP is the major nucleotide in fish flesh as the flavor-enhancing constituent. The amount of IMP reached the maximum level (5.5μ mole/g) at $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ one day after slaughter of carp. IMP stays about three days without appreciable change under this chill-condition. Following 4-day storage, however, IMP was decreased rather rapidly. On the other hand, the bacterial spoilage was found to occur after 11-day storage. Therefore, the maintenance time of IMP, namely, the time of keeping passable flavor quality of carp muscle was one third to one half of the time of incipient spoilage.

緒 言

魚肉に含まれる各種のヌクレオチドの同定についてはイオン交換クロマトグラフィーによる研究が斎藤ら (1955), JONES ら (1957) によつて進められてきた。貯蔵中における魚肉のヌクレオチドの変化についてはすでに多くの報告があり、分析技術の進歩とともにその変化の過程もかなり明らかになったが、ヌクレオチドの変化と鮮度とを直接比較した報告は数少ない。

斎藤¹⁾ および JONES ら²⁾ はヌクレオチドがヌクレオシドおよび塩基に変化する割合から鮮度を判定することを提案している。しかしヌクレオチドの変化からみた鮮度と従来の細菌による変敗度を基礎とした鮮度との関係は明らかにされていない。NAZIR ら³⁾ はボラなどの3種類の魚を 2°C に貯蔵した場合の ATP (adenosine triphosphate), TMA (trimethyl amine) などの変化をみているが、ATP 以外のヌクレオチドや TVB (total volatile base) などについては明らかにしていないだけでなく、実験した貯蔵期間は 0~20 時間であつて鮮度との関係は明らかでない。SPINELLI ら⁴⁾ は English sole などの3種類の魚について、貯蔵中における全ヌクレオチド量、Hx (hypoxanthine) 量、TMA および TVB 量の関係をみているが、

* 本研究の要旨は昭和 39 年 10 月下関市における日本水産学会秋季大会で発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ., Fukuoka)

ヌクレオチドは全量を 256 m μ における吸光度で示してヌクレオチドの構成については触れていないし、特に死後短時間における変化については明らかにしていない。

最近欧米では細菌による変敗からみた鮮度では満足せず、一步進んで flavor quality の保持が重要視されてきた。筆者らは魚肉の flavor として重要なヌクレオチドの貯蔵中の変化を時間的に追跡すると同時に、VBN (volatile base nitrogen) および細菌数も合わせて測定し、ヌクレオチドの変化と鮮度との関係を比較検討したので、その結果について報告する。

実験方法

1. 実験材料： 実験は長時間貯蔵した場合のヌクレオチド、VBN および細菌数の変化を明らかにすることを目的としたものと、死後比較的短時間における魚肉中のヌクレオチドと VBN の変化を明らかにすることを目的としたものと、2回に分けて行なった。

長時間の貯蔵実験では体重 180~320 g、体長 20~25 cm のコイを氷水中で 90 分間冷却した後、100 V の交流を 10 秒間通じて即殺し、0~4°C の室温で貯蔵した。即殺直後4尾から、また適当な経過日数後にそれぞれ2尾の背肉を採取し、試料とした。

短時間貯蔵実験ではコイの環境水温を 20°C から 10 時間かかつて 10°C に下げ、ついで 5°C に 30 分間、さらに 0°C に 30 分間浸漬した後、前記と同様 100 V の電流を 10 秒間通じて即殺し、ポリエチレンの袋に入れた後に 0°C の氷水中に貯蔵した。供試魚の体重は 200~300 g、体長は 24~29 cm であった。即殺直後および適当な経過時間後にそれぞれ3尾の背肉 20~25 g を採取し、試料とした。

2. 組織抽出液： 採取した約 10 g の背肉に氷冷した 10 倍量の 6 % 過塩素酸 (PCA) 溶液を加え、2 分間ホモジナイズし、10 分間静置した後濾過した。これらの操作はすべて -5°C の低温室で行なった。

3. カラム・クロマトグラフィーによるヌクレオチドの分離： 前記抽出液 50 ml を活性炭カラム (300 mg, 0.35 cm²×4 cm) に通し、20 ml の蒸留水で洗滌した。次に 30 ml の 1.4 % アンモニア・50 % エタノール溶液で溶出した。溶出液はなす型フラスコにとり、水温 45°C の湯煎中に浸漬し、減圧で残渣がほぼ乾燥状態になるまで濃縮した。濃縮に要した時間は約 30 分であった。蒸発残渣を 20 ml の蒸留水に溶解し、その 10 ml を蒸留水で 100 ml に稀釈し、濃アンモニア水で pH を 9.6 に調整した後、Dowex 1, X2 (200~400 メッシュ、ギ酸型) の 1.2 cm²×7 cm のカラムに吸着させた。

100 ml の蒸留水で洗滌した後、(1) 0.005 M HCOOH, (2) 0.02 M HCOOH, (3) 0.05 M HCOOH, (4) 0.05 M HCOOH・0.025 M HCOONa, (5) 0.05 M HCOOH・0.05 M HCOONa, (6) 0.05 M HCOOH・0.15 M HCOONa, (7) 0.05 M HCOOH・0.3 M HCOONa, (8) 0.1 M HCOOH・0.4 M HCOONa, (9) 0.2 M HCOOH・0.8 M HCOONa, (10) 1 M HCOOH・1 M HCOONa をそれぞれ 250~500 ml ずつ流した。流速は約 1 ml/min とし、流出液は 10 ml ずつ試験管にとり、260 m μ における吸光度を測定した。

4. VBN の定量： CONWAY の微量拡散法⁵⁾ によつて定量した。なお試料中の PCA を中和する必要から、分解液に試料中の PCA と当量の KOH を加えた。すなわち K₂CO₃ 61 g を 100 ml の蒸留水に溶解した液と、KOH 17 g を蒸留水 100 ml に溶解した液を 5:3 の容積比で混合したものを分解液とし、PCA 組織抽出液 2 ml に対して分解液 1 ml を加えた。

5. 細菌数の測定： 前記の採取した背肉から 2.5 g を無菌的にとり、0.9 % 滅菌食塩水 25 ml を加え、2 分間ホモジナイズした。ホモジネイトの 1 ml を 9 ml の培地*に混釈し、滅菌シャーレに流した。この液の稀釈は 10² になる。10² 稀釈液から順次 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, ……稀釈液を調製した。同じ稀釈率の培地を 3 ケのシャーレに流し、その混釈培地が固化した後、その上に 5 ml の新しい無菌培地を流した。つぎに 20°C の恒温器で 48 時間培養し、集落数から試料 1 g 中の菌数を算出した。

* Beef extract 3 g, ペプトン 5 g, NaCl 5 g, 寒天 15 g を 1 L の蒸留水に溶解し、pH を 7.0 に調整したもの。

結果および考察

コイ肉の PCA 抽出液中におけるヌクレオチドのクロマトグラム数例を Fig. 1 に示した。それぞれの peak は紫外吸収スペクトル, リボースおよび 2-デオキシリボース (acid labile 糖および全糖) の定量ならびにペーパークロマトグラフィーの結果から ATP, ADP (adenosine diphosphate), IMP (inosine 5'-monophosphate), HxR (inosine) および Hx のいずれであるかを同定した。AMP (adenosine 5'-monophosphate) は実験期間を通じて微量検出されたに過ぎなかった。

Fig. 1. Separation patterns of nucleotides in PCA extract from chill-stored carp dorsal muscle.

The fish had been stored in a cold room at 0~4°C after instant death by the application of AC of 100 V. Sample solution subjected to the chromatography was a perchloric acid extract from 2.27 g of carp dorsal muscle.

Exchanger: Dowex 1, X2, 200~400 mesh, 1.2 cm²×7 cm, formate form.

Eluents: (1) 0.005 M HCOOH, (2) 0.02 M HCOOH, (3) 0.05 M HCOOH, (4) 0.05 M HCOOH·0.025 M HCOONa, (5) 0.05 M HCOOH·0.05 M HCOONa, (6) 0.05 M HCOOH·0.15 M HCOONa, (7) 0.05 M HCOOH·0.3 M HCOONa, (8) 0.1 M HCOOH·0.4 M HCOONa, (9) 0.2 M HCOOH·0.8 M HCOONa, (10) 1 M HCOOH·1 M HCOONa.

Flow rate: 1 ml/min.

つぎに 0~18 日間貯蔵した魚肉中の ATP, ADP, AMP, IMP および HxR+Hx の量的変化を, それぞれクロマトグラムから求めると, Fig. 2 に示すようであった。なお HxR+Hx の量は吸光値から HxR として計算した。さらに貯蔵期間中の魚肉の VBN 量の変化も Fig. 2 に併記した。また即殺後, 短時間におけるヌクレオチドおよび VBN 量の変化は Fig. 3 に示すようであった。

コイ肉の ATP 含量は死直後 5.8~6.5 μmole/g であり, 16 時間後に 3.9 μmole/g を示したが, 以後

Fig. 2. Change in the concentrations of ATP, ADP, AMP, IMP, HxR+Hx and $\text{NH}_3\text{-N}$ in carp dorsal muscle during the chill-storage.

Fig. 3. Change in the concentrations of ATP, ADP, AMP, IMP, HxR+Hx and $\text{NH}_3\text{-N}$ in carp dorsal muscle during the chill-storage.

急激に減少し、24 時間後には $0.75\sim0.98\ \mu\text{mole/g}$ となり、2~3 日以後はほとんど消滅した。ADP は死直後は $0.82\sim0.99\ \mu\text{mole/g}$ 存在し、24 時間後もほぼ同じ値を示した。2 日後 $0.44\sim0.50\ \mu\text{mole/g}$ に減少し、以後ほとんど変化せず、18 日後も $0.41\ \mu\text{mole/g}$ 残存した。IMP 含量は死直後 $0.29\sim0.70\ \mu\text{mole/g}$ に過ぎなかつたのに、ATP の減少とは逆に 16 時間後ごろから急激に増加し、1~2 日後に最高 $5.4\sim5.7\ \mu\text{mole/g}$ に達した。以後 3~4 日までほぼ安定したが、のち急速に減少し、11 日後に $0.4\ \mu\text{mole/g}$ 残存し、15 日後にはほぼ完全に消滅した。AMP 含量は死直後 $0.04\sim0.05\ \mu\text{mole/g}$ であり、16 時間および 24 時間後にそれぞれ 0.09 および $0.27\ \mu\text{mole/g}$ に増加したが、その他の試料からはいずれも $0.03\sim0.04\ \mu\text{mole/g}$ 程度検出されたに過ぎなかつた。HxR+Hx 含量は死直後 $0.12\sim0.20\ \mu\text{mole/g}$ のものが、貯蔵時間の経過と共に次第に増加し、4 日以後 IMP の急激な減少が起ると同時に急速に増加し、12~14 日後に約 $6.5\ \mu\text{mole/g}$ に達した後、次第に減少した。

斎藤⁶⁾はコイ肉中の ATP の分解過程は $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{IMP} \rightarrow \text{HxR} \rightarrow \text{Hx}$ であると推定している。しかし前述のように、ATP がほぼ完全に消滅した後もかなりの ADP が長期間残存すること、また AMP 含量が 18 日間の貯蔵期間を通じて常に極く微量であつたことから、ADP と AMP を経由する分解過程に疑問が生ずる。しかし斎藤⁷⁾はコイ肉の食塩水ホモジネイトに添加した AMP が速かに IMP に分解することを報告しており、また筆者ら⁸⁾はコイ肉の食塩水ホモジネイトに ADP を添加した場合も ADP の速かな減少と、それに伴う IMP の増加を認めているので、ADP と AMP についての疑問はつぎのように説明できるであろう。すなわち (i) ATP が分解して ADP を生ずるとしても ADP は直ちに分解してしまう。前述の長期間残存する ADP は ATP の分解生成物としての遊離 ADP でなく、PERRY⁹⁾が兎肉について報告しているように、恐らく myofibril と結合した、酵素に対して安定な状態の ADP である。(ii) AMP が極く微量しか検出されなかつたのは、コイ肉の AMP deaminase の活性が ATPase の活性に優つているため、ATP から生じた AMP は直ちに IMP になり、AMP の集積がみられない。

つぎに $\text{NH}_3\text{-N}$ 値は死直後 $1.6\sim2.5\ \mu\text{atom/g}$ ($2.2\sim3.5\ \text{mg}\%$) のものが、IMP の増加と全く平行して増加し、16 時間後には $5\ \mu\text{atom/g}$ ($7\ \text{mg}\%$) に、24~48 時間後には $8.5\sim9.3\ \mu\text{atom/g}$ ($12\sim13\ \text{mg}\%$) に達し、以後 11 日までほとんど変化しなかつた。しかし 11 日以後急激に増加し、18 日後には $19.5\ \mu\text{atom/g}$ ($27\ \text{mg}\%$) を示した。死後 24~48 時間における $\text{NH}_3\text{-N}$ 値の増加は約 $6.8\ \mu\text{atom/g}$ であり、その間における IMP の増加量 $5.1\ \mu\text{mole/g}$ と HxR の増加量 $0.47\ \mu\text{mole/g}$ の和、約 $5.6\ \mu\text{mole/g}$ にほぼ近い。したがって 0~48 時間にかけての $\text{NH}_3\text{-N}$ 値の増加はアデニンヌクレオチドの deamination によつて生じたものと考えられる。11 日以後の急激な増加が細菌によるものであることは Table 1 に示す

魚肉中の細菌数からも明らかである。すなわち細菌数は7日目では $2 \times 10^2/\text{g}$ 程度であつたが、9日後には $2.2 \times 10^4/\text{g}$ に、11日後には $7.1 \times 10^4/\text{g}$ 、14日以後18日までには $10^5 \sim 10^6$ に増加している。

国中¹⁰⁾によれば 5'-ヌクレオチドの呈味性についてはプリンの6位が OH であつて、糖の5'位が磷酸であることが必要条件であり、それらの条件を具備するヌクレオチドは MSG (monosodium glutamate) と特異な相乗作用を示すとしている。鴻巣¹¹⁾が報告しているように IMP の呈味性が MSG はじめ多くのアミノ酸群と相乗効果を示すことも知られており、魚肉の呈味は IMP 量だけで表わされるものではない。また HASHIMOTO¹²⁾ は AMP および ATP も MSG と共存すると "meaty taste" を表わすと報告している。しかしながらコイ肉においては、0°C の低温でも ATP は死後1~2日間に大部分分解するし、また AMP は極めて微量にしか存在しないので、実際に呈味ヌクレオチドとしては IMP が呈味成分として代表的な役割を果していることは確かである。したがつてコイを即殺後 0~4°C に貯蔵した場合、魚肉の flavor quality を IMP 量から判断すると、その保持期間は初期腐敗までの期間に対し約 1/3 ~ 1/2 に相当する。

摘 要

コイを電戟即殺後 0~4°C に貯蔵した場合、魚肉中のヌクレオチドの変化と鮮度について研究を行なつた。

1. 即殺直後 $5.8 \sim 6.5 \mu\text{mole/g}$ あつた ATP は1日で大部分分解し、2~3日後にはほとんど消滅し。
2. ADP は死直後から24時間までは $0.8 \sim 1.0 \mu\text{mole/g}$ 存在し、2日後に $0.44 \sim 0.5 \mu\text{mole/g}$ に減少したが、以後18日後までほとんど変化しなかつた。
3. AMP は0~18日間の貯蔵期間中極めて微量検出されたに過ぎなかつた。
4. IMP 量は ATP の減少とともに急激に増加し、1~2日後には $5.4 \sim 5.7 \mu\text{mole/g}$ に達し、以後3~4日までほぼ安定したが、その後急速に減少した。
5. $\text{NH}_3\text{-N}$ 値は死直後 $1.6 \sim 2.5 \mu\text{atom/g}$ ($2.2 \sim 3.5 \text{ mg\%}$) であつたが、24時間後には $8.5 \sim 9.3 \mu\text{atom/g}$ ($12 \sim 13 \text{ mg\%}$) に増加した。その後11日までほとんど変化しなかつたが、11日以後急激に増加し、18日後には $19.5 \mu\text{atom/g}$ ($27 \text{ mg\%}$) に達した。初期の増加はアデニンヌクレオチドの deamination によるものであり、後期の急激な増加は魚肉中の細菌数から判断すると、細菌によるものといえる。
6. 魚肉の flavor quality を IMP 量から判断すると、その保持期間は初期腐敗までの保鮮期間に対し、約 1/3 ~ 1/2 に相当した。

文 献

- 1) T. SAITO, K. ARAI and M. MATSUYOSHI: This Bull., 24, 749 (1959).
- 2) N. R. JONES and J. MURRAY: J. Sci. Food Agric., 15, 684 (1964).
- 3) D. J. NAZIR and N. G. MAGAR: J. Food Sci., 28, 1 (1963).
- 4) J. SPINELLI, M. EKLUND and D. MIYAUCHI: J. Food Sci., 29, 710 (1964).
- 5) E. J. CONWAY: Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, London, Crosby Lockwood and Son Ltd. (1950).
- 6) 斎藤恒行・新井健一: 本誌, 23, 265 (1957).
- 7) T. SAITO and K. ARAI: This Bull., 23, 579 (1958).
- 8) 小林邦男・北原慶子・富山哲夫: 昭和40年度日本水産学会秋期大会, シンポジウム発表 (1965).
- 9) S. V. PERRY: Biochem. J., 51, 495 (1952).
- 10) 国中 明: 農化, 34, 489 (1960).
- 11) 鴻巣章二・前田安彦・藤田孝夫: 本誌, 26, 45 (1960).
- 12) Y. HASHIMOTO: FAO Symposium on the Significance of Fundamental Research in the Utilization of Fish, Paper No. WP/II/6 (1964).