低温貯蔵中のベラの筋肉における ヌクレオチドの変化について*

富山哲夫・小林邦男・北原慶子・小橋昌裕

(1966 年 2 月 15 日受理)

A STUDY ON CHANGE IN NUCLEOTIDES OF MUSCLE OF WRASSE KEPT IN CHILL-STORAGE

Tetuo TOMIYAMA, Kunio KOBAYASHI, Keiko KITAHARA
and Masahiro KOHASHI**

Data presented here showed that the degradation pattern of varying nucleotides in muscle of wrasse, *Pseudolabrus japonicus*, kept at 0°C somewhat differed from that of carp¹⁾. ATP decreased quite rapidly as compared with that in carp muscle. A complete degradation of ATP occurred approximately a three-hour period after slaughter, which corresponded to 1/20 to 1/30 of the time required for ATP degradation in carp muscle. While nearly no rigor mortis was detected in carp muscle during the chill-storage¹⁾, a quite marked rigor mortis was detected in the wrasse muscle at three-hour period of storage, accompanied with the rapid disappearance of ATP and the accumulation of considerable amount of AMP.

Not much difference was noted between wrasse and carp muscle in the time of maintaining of maximal amount of IMP. The time of keeping passable flavor-quality was found about a half the time of incipient spoilage.

筆者らは低温貯蔵中におけるコイの肉ヌクレオチドの変化についてすでに報告した¹⁾。本報においては海産魚ササノハベラ, *Pseudolabrus japonicus* を実験に供し, 低温貯蔵中における筋肉中のヌクレオチドと VBN の変化を時間的に追究した。その結果, (1) コイ肉に比べて ATP の分解が著しく速いこと, (2) コイ肉では 18 日間 AMP 含量が微量であつたのに対し, ベラ肉ではかなりの AMP が集積したこと, また (3) コイでは実験期間中硬直はほとんど認められなかつたのに, ベラ肉では即殺後 2~3 時間で烈しい硬直が認められたことなど両者の間に著しい相異点を認めたので報告する。

実験方法

実験は死後短時間におけるベラ肉中のヌクレオチドおよび VBN の変化を追跡するものと, 死後比較的長期間貯蔵した場合のヌクレオチドおよび VBN 量の変化を追跡するものと, 2 回に分けて行なつた。トロールなどで漁獲中にはなはだしく疲労した魚では, 筋肉中の ATP は大部分消失するのが知られているので^{2,3)}, この実験では漁獲による疲労を避けるため, 竿釣で漁獲したベラを供試した。

短時間貯蔵実験 竿釣で漁獲したベラを数時間生簀に放置し, ついで 0~2°C の海水に約 70 分間浸漬後, 100V の交流を 10 秒間通じて即殺し, ポリエチレンの袋に入れて 0°C の氷水中に貯蔵した。供試魚の体重

本論文で使用した略号。

ATP: adenosine triphosphate. ADP: adenosine diphosphate. AMP: adenosine monophosphate. IMP: inosine monophosphate. GMP: guanosine monophosphate. HxR: inosine. Hx: hypoxanthine. VBN: volatile bases nitrogen. PCA: perchloric acid.

* 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)

は 44~97g, 体長は 14~16.7 cm であった。即殺直後に 3 尾から, また適当な日数間隔で 2 尾ずつから筋肉 10~16g を採取し試料とした。魚肉からヌクレオチドの抽出, カラムクロマトグラフィーによるヌクレオチドの分離および VBN の定量はすべて既報¹⁾コイの場合と同様に行なつた。

長時間貯蔵実験 竿釣で漁獲したペラを一夜生簀に放置した後, 水温 25°C で前記と同様に電流を通じて即殺し, ポリエチレンの袋に入れて氷水中に貯蔵した。即殺直後に 4 尾から, また適当な日数間隔で 2 尾ずつから, それぞれ筋肉 10~20g を採取し試料とした。各試料に 10 倍量の 6% PCA を加えてヌクレオチドを抽出し, 活性炭(アンモニア・エタノールで処理したもの)で吸着分離した。つぎに得られたヌクレオチドを後記するように低濃度および高濃度 PCA 溶液中で加熱分解し, 遊離してくる磷酸を定量し, それらの値から acid labile P 量 (2'-, 3'-, 6'-, および 7'-P) および 5'-P 量を算出する方法⁴⁾ならびに 5'-ヌクレオチダーゼによつて遊離される磷酸を定量する酵素法⁵⁾によつて, 貯蔵中における魚肉の acid labile P 量および 5'-ヌクレオチドの量的変化を時間的に追跡した。酸分解による方法はつぎのように行なつた。

低濃度 PCA 分解 ヌクレオチド水溶液 2 ml を試験管にとり, 11% PCA 溶液 2 ml を加え, ポリエチレンの膜でカバーをした後, 沸騰水中で 30 分間加熱した。つぎに氷水で冷却した後, KING 法⁶⁾を改変した方法, すなわち前記試料に 60% PCA 0.5 ml, 5% モリブデン酸アンモン溶液および FISKE-SUBBAROW 試薬をそれぞれ 0.2 ml ずつ加え, 蒸留水で全量を 5 ml に定容し, 沸騰水中で 10 分間加熱, 発色, ついで冷却後分光光度計で 830 mμ における吸光値から燐量を定量した。この操作によつて acid labile P (2'-, 3'-, 6'- および 7'-P) のほぼ全量が定量される外に, 5'-P の一部も分解, 定量される。

高濃度 PCA 分解 ヌクレオチド水溶液 2 ml を試験管にとり, 60% PCA 溶液 8 ml を加え, ポリエチレン膜でカバーをし, 沸騰水中で 30 分間加熱した後, 氷水で冷却した。つぎに蒸留水を加えて全容を 20 ml とし, この 2 ml を試験管にとり, これに PCA を加えることなく前記と同様にして燐を発色, 定量した。この操作によつて筋肉に含まれるヌクレオチドの全燐がほぼ完全に定量される。

前記高濃度および低濃度 PCA 分解による燐の定量値をそれぞれ A および B μmole/g とし, 低濃度 PCA 分解定量中に起こる 5'-ヌクレオチドの分解係数を K とすれば, 試料中の 5'-ヌクレオチドの燐量 (5'-P μmole/g) は次式によつて算出できる。

$$5'-P = \frac{A-B}{1-K}$$

ただしこの 5'-P 量には ATP および ADP 中の 5'-P も含まれる。また 5'-AMP, 5'-IMP および 5'-GMP の K 値はそれぞれ約 0.09 である。

結果および考察

イオン交換クロマトグラフィーによるヌクレオチドの変化の追跡 ペラ肉の PCA 抽出ヌクレオチドのクロマトグラム 4 例を Fig. 1 に示した。それぞれのピークは紫外外部吸収スペクトル, リボースおよび acid labile 燐, 全燐の定量ならびにペーパークロマトグラフィーの結果にもとづいて ATP, ADP, AMP, IMP, HxR および Hx のいずれであるかを同定した。つぎに即殺後 0~7 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, Fig. 2 に示した。なお HxR+Hx 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。

Fig. 2 から明らかなようにペラ肉の ATP 含量は死直後 5.9 μmole/g であったが, 30 分後には半減し, 1 時間後には 0.86 μmole/g になり, 3 時間後には 0.07 μmole/g 残存するに過ぎなかつた。ペラ肉中の ATP の減少は既報¹⁾コイの場合に比べて 1/30~1/20 の短時間に起こつた。コイでは死後 1~2 日経て極く弱い硬直を認めたに過ぎないが, ペラでは死後約 2 時間で極めて強い硬直がみられたことも, ペラ肉における ATP の急速な分解を裏づけている。死直後 0.55 μmole/g であった IMP 含量は, ATP の減少とは逆に死後急激に増加し, 7~10 時間後には最高 6.1 μmole/g に達し, その後次第に減少したが, その減

Fig. 1. Separation patterns of nucleotides in PCA extract of muscle tissue of wrasse kept at 0°C.

The fish were stored in ice in a cold room after being shocked by the application of AC of 100 V. Sample solution for the chromatographic separation was a perchloric acid extract from 3.4 g of wrasse muscle.

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

Eluents: (1) 0.005 M HCOOH, (2) 0.02M 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.

Fig. 2. Change in the concentrations of ATP, ADP, AMP, IMP, HxR+Hx and NH₃-N in wrasse muscle during the chill-storage.

少は ATP の場合に比べるとかなり緩慢であつた。

AMP 含量はコイの場合と著しく相異した。死直後には僅か 0.057 μmole/g に過ぎなかつたが、3 時間後には 1.9 μmole/g に達し、その後徐々に減少し、6 日後にはほとんど消滅した。同じ条件で貯蔵したコイ肉には AMP がほとんど見出されず、ベラ肉に多量集積したのは AMP 関連ヌクレオチド間の分解速度の相異によると推測される。すなわちコイ肉では ATP ase の活性がベラ肉ほど強くなく、むしろ AMP deaminase の活性が優つているため、ATP の分解によつて生じた AMP は直ちに IMP に分解し、AMP の集積がみられないのであろう。他方ベラ肉では ATP ase と myokinase との活性

は均衡を保っているのに対して、AMP deaminase の活性がそれに劣っているために AMP の集積が起こり、つぎに ATP が消滅し AMP の供給が停止すると共に AMP の減少がはじまると考えられる。

ADP 含量は即殺直後 $1.59 \mu\text{mole/g}$ であり、2 時間後に $0.64 \mu\text{mole/g}$ に減少したが、その後 7 日間ほとんど変化しなかった。他のヌクレオチドに比べて ADP が安定なことはコイ肉でも全く同様であつて、べら肉の安定な ADP も恐らく PERRY⁷⁾ の説のように myofibril 結合型であつて酵素に安定な状態の ADP であろう。

HxR+Hx の含量は即殺直後 $0.1 \mu\text{mole/g}$ であつたが、5 時間後まで徐々に増加して $0.5 \mu\text{mole/g}$ となり、それから 24 時間後までほとんど変化しなかった。しかし 24 時間以後、IMP の減少が始まると共に急増し、7 日後には $2.3 \sim 2.4 \mu\text{mole/g}$ に達した。

つぎに $\text{NH}_3\text{-N}$ 値は死直後 $2.9 \mu\text{atom/g}$ ($4.0 \text{mg}\%$) のものが、IMP の増加と全く平行して増加し、30 分後には $6.3 \mu\text{atom/g}$ ($8.8 \text{mg}\%$) に、7 時間後には $9.4 \mu\text{atom/g}$ ($13.1 \text{mg}\%$) に達し、その後 7 日間ほとんど変化しなかった。死後 7 時間における $\text{NH}_3\text{-N}$ 値の増加は $6.5 \mu\text{atom/g}$ であり、その間における IMP の増加量 $5.55 \mu\text{mole/g}$ と HxR+Hx の増加量 $0.45 \mu\text{mole/g}$ との和、 $6.0 \mu\text{mole/g}$ とほとんど一致する。したがつて 0~7 時間にかけて急増した $\text{NH}_3\text{-N}$ 値はアデニンヌクレオチドの脱アミノによつて生じたものといえる。

燐の形態からヌクレオチドの変化の追跡 氷水中に 0~19 日間貯蔵したべら肉中のヌクレオチドに含まれる燐のうちで、低濃度 PCA で遊離する燐量、高濃度 PCA で遊離する燐量と低濃度 PCA で遊離する燐量との差、5'-ヌクレオチダーゼで遊離する燐量および VBN 値の変化は Fig. 3 に示すようであつた。

Fig. 3. Change in the concentrations of PO_4 liberated by dil. PCA, that by 5'-nucleotidase, $\text{NH}_3\text{-N}$ and the difference between PO_4 liberated by dil. PCA and that by conc. PCA.

す ADP 値から推測すると、1 日以後 18 日間における acid labile PO_4 のほぼ一定した値は大部分 ADP によるものである。

高濃度 PCA 分解および低濃度 PCA 分解によつて定量された燐量から前記の式によつて算出された 5'-ヌクレオチドの燐量と 5'-ヌクレオチダーゼによる定量値との間には、死後 2 日までは幾分の差が認められたが、その後はほとんど同じ値を示した。それ故に魚肉中のヌクレオチドの定量法として、酸分解による方法は 5'-ヌクレオチダーゼ法に代り得る方法とみなされる。5'-ヌクレオチド量は 1~3 日にかけて全量の約 1/3 が急激に減少したが、その後 6 日まで減少は緩慢になり、6 日以後再び急速に減少した。Fig. 2 から明らかに AMP は 24 時間以後急激に減少する。したがつて 1 日以後の 5'-ヌクレオチドの値は IMP 含量にほぼ等しいといえる。

つぎに $\text{NH}_3\text{-N}$ 値は即殺直後 $4.4 \mu\text{atom/g}$ ($6.2 \text{mg}\%$) であつたのが、1 日後には $9.0 \mu\text{atom/g}$ (12.6

実験方法の項で述べたように、低濃度 PCA 分解の燐量、すなわち acid labile P 量には ATP の 2 ケ、ADP の 1 ケの PO_4 の外に 5'-ヌクレオチドの PO_4 の約 9% が含まれる。Acid labile PO_4 量は最初 $7 \mu\text{mole/g}$ を示したが、3 時間後には $1.2 \mu\text{mole/g}$ に、1 日後には $1.0 \mu\text{mole/g}$ に減少した。しかしその後安定し、19 日後も $0.7 \mu\text{mole/g}$ を示した。死後 3 時間に起こつた急激な減少は ATP の減少によるものである。即殺直後の値、 $7 \mu\text{mole/g}$ は Fig. 2 の場合に比べて半減している。この原因としてはこの実験での即殺を 25°C で行ない、即殺直後におけるヌクレオチドの抽出および活性炭による吸着分離操作を約 10°C で行なつたために、操作中に ATP の分解が起こつたものと推察される。Fig. 2 に示

mg%) に達し、その後 8 日までほとんど変化しなかつた。しかし 10 日以後急激に増加し、19 日後には $48 \mu\text{atom/g}$ ($67.2 \text{ mg\%}$) に達した。0~1 日にかけての $\text{NH}_3\text{-N}$ 値の増加はアデニンヌクレオチドの脱アミノによつて生じたものであり、これに対し 10 日以後の急激な増加は細菌によつて生じたものとみなしてよいであろう。

したがつてササノハベラを即殺後氷水中に貯蔵した場合、魚肉の flavor quality を IMP 量から判断してみると、急速な減少が開始するまでの 6 日間をその保持期間とすれば、flavor quality の保持期間は初期腐敗 (12~14 日) までの保鮮期間に対し約 1/2 に相当する。

要 約

ササノハベラを電撃で即殺した後 0°C に貯蔵した場合に魚肉中に起こるヌクレオチドの変化と鮮度について研究し、その結果を既報コイの場合と比較検討した。

1. ATP 含量は 30 分後には即殺直後の値の半量となり、3 時間後にはほとんど消失した。すなわち消失までの時間はコイ肉の場合の約 $1/30 \sim 1/20$ の短時間であつた。

2. コイでは死後硬直がほとんど認められなかつたが、ベラ肉では即殺後 2~3 時間で烈しい硬直が起つた。

3. AMP は死直後には僅少であり、3 時間後には $1.9 \mu\text{mole/g}$ に増加し、その後徐々に減少し、6 日後にはほとんど消滅した。コイ肉で AMP が 18 日の貯蔵中微量検出されたのと著しい相異である。

4. コイ肉の場合と同様に ADP は 2 時間後に即殺直後の $1/2.5$ に減少したが、その後 7 日間ほとんど変化しなかつた。

5. IMP 量は死後 ATP の減少とは逆に急激に増加し、7~10 時間後には最高に達した。1~3 日にかけて約 $1/3$ が分解するが、その後 6~7 日まで減少はやや緩慢になり、それから再び急速に減少する。

6. $\text{NH}_3\text{-N}$ 値は 30 分後に死直後の約 2 倍、7 時間後には約 3 倍に増加し、その後 8 日までほとんど変化しなかつたが、10 日以後急激に増加した。初期の増加はアデニンヌクレオチドの脱アミノによるものであり、後期の急激な増加は細菌によつて生じたものと考察した。

7. 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 1/2 に相当する。

文 献

- 1) 富山哲夫・小林邦男・北原慶子・白石悦子・大庭信良：本誌，**32**，262~266 (1966).
- 2) N. R. JONES and J. MURRAY: *Biochem. J.*, **66**, 5 p~6 p (1957).
- 3) N. R. JONES and J. MURRAY: *Z. vergl. Physiol.*, **44**, 174~183 (1961).
- 4) 富山哲夫・小林邦男・北原慶子・松倉秋彦：昭和 39 年度日本水産学会年会発表 (1964, 4 月).
- 5) 中島宣郎・市川恒平・吉村育子・栗山千枝子・鎌田政喜・藤田栄一郎：農化，**37**，558~561 (1963).
- 6) E. J. KING: *Biochem. J.*, **26**, 292~297 (1932).
- 7) S. V. PERRY: *Biochem. J.*, **51**, 495~499 (1952).