ヒラメ氷蔵中におけるリボースの消長について

江平重男・内山 均

(1966年9月19日受理)

Change in Ribose Content of Plaice Muscle during Ice Storage

Shigeo EHIRA and Hitoshi UCHIYAMA*

In the previous papers, it was reported that the fish muscle could be significantly lowered in freshness by autolysis rather than by bacterial action during ice storage, and that post mortem changes of biochemical substances, especially of degradation products of ATP, should be more precisely elucidated in connection with freshness, as had already been shown by several authors. From this point of view, the present communication deals with the changes in the concentration of free ribose and glucose in the plaice muscle during the ice storage.

At first, the recovery tests for added ribose and glucose were performed using the paper chromatographic determination method proposed by JONES. The recoveries were 51~74 per cent for ribose and 70~80 per cent for glucose, even when the aqueous solution of sugar was used as the sample (Table 1). On the other hand, the recovery percentage of 92 for ribose and 94 for glucose was obtained with the extract of muscle by applying FERNELL's method for simultaneous determination of pentose and hexose (Table 2). In this experiment interfering substances such as amino acids and nucleotides were removed according to JONES' description.

The ribose content of plaice muscle increased almost linearly during the ice storage, and did not show any symptom of decrease even after 17 days' storage examined here (Fig. 1). It might be supposed that bacterial activity was not so high as to induce a significant decrease in ribose content, although the muscle was already much lowered in freshness at that time. And there was observed the stoichiometric relation between ribose and hypoxanthine accumulated during the ice storage (Fig. 2). Glucose was significantly increased for the first 9 days of storage and thereafter was gradually decreased.

前報^{1~3)}で著者らはヒラメ、カツオの氷蔵中における筋肉内諸物質の変化の状態を検討し、これらの魚の初期の鮮度低下は細菌の分解作用よりも、むしろ自己消化作用によるものと考えべきこと、したがって鮮度の研究に当つては自己消化との関係を重視すべきことを指摘し、さらに自己消化の尺度としては、SAITO⁴⁾らの提案するヌクレオチド関連化合物、特にイノシンおよびハイポキサンチンの生成量を用いることが適当であることを報告した。

ところで、TARR⁵⁾は魚肉の褐変機構に関する研究に関連して、魚の死後、その筋肉内に遊離リボースが生成されること、そしてこれは主として自己消化によるものであり、死直後の筋肉には遊離リボースが存在しないか、痕跡程度に過ぎないと報告している。JONES⁶⁾も魚の死後における遊離リボースの増加の傾向を認めている。しかもこの遊離リボースの母体は主としてATPであることが明らかにされている^{7~9)}。かくして、ヌクレオチドの最終的分解生成物の一つであるリボースが自己消化の一指標となる可能性がある。そこで魚の鮮度に関する研究に当り、この点を検討しておくことが望ましいと考え本実験に着手した。

さて、魚肉中の遊離リボースの定量法については、TARR⁵⁾およびJONES¹⁰⁾らの方法があり、いずれも

紙クロマトグラフ法でリボースを分別し、前者は発色スポットを沱紙上においてそのまま、後者はこれを溶出した上で比色定量するものである。精度の上から考えれば後者の方が好ましいと思われる。そこで著者らは、後者の方法を追試したところ、展開沱紙上のリボースが定量的に回収されず、定量法としては必ずしも適当でないとの結果を得た。そこで JONES 法に準じてまず試料を調製した上、沱紙クロマトグラフィーを行なう代りに、ヘキソースとペントースの混在する状態でオルシノール反応を用いて両者を同時に定量する FERNELL¹¹⁾ 法を適用してリボースを定量したところ、良好な結果を得た。そこでこの方法を用いて、ヒラメの水蔵中におけるリボースの遊離の状態を追究し、その鮮度低下との関係を考察した。ここに以上の経過を報告したい。

実験方法

試料 ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (全長約 62 cm, 体重約 2.5 kg) は昭和 39 年 10 月東京魚市場で生簀中の活魚を購入した。即殺後、前報と全く同様に、防熱材で覆ったトロ箱に水蔵し、箱ごと約 5°C の冷蔵庫内に保管して魚体温が常に 0.5°C 前後になるように注意をはらった。なお、氷はポリエチレン袋に入れ、融解した氷水が直接魚体にふれないように工夫した。筋肉試料は一定期間ごとに、少量ずつ所要量(約 30 g)を脊肉部から採取した。試料採取時における肉試料および採肉部位の細菌汚染の防止のための処理法は、前報¹⁾と全く同様である。

本研究では魚 1 尾しか用いていないが、これは個体差による影響を避けたいと考えたためである。なお以下の諸成分含量について筋肉部位別の検討は行なっていない。

リボース試料液の調製 JONES 法¹⁰⁾に準拠した。その骨子は、筋肉のアルコール水抽出液をクロロホルム処理して分離する水溶液をさらにイオン交換樹脂処理して試料溶液とするものである。沱紙クロマトグラフ法の分析用にはここに得た溶液をそのまま用いた。

FERNELL¹¹⁾ 法を用いる場合は、上記の溶液中になお微量ながら残存するヌクレオチド関連化合物によって測定が妨げられるので、これを除去する目的で、JONES¹²⁾に従って上記溶液の pH を 10 N KOH で 6.5 に調節し、Dowex 1×8 (ギ酸型)の小型カラム (1 cm×8 cm) を通したものを試料溶液として用いた。この処理により 260 m μ に吸収極大をもつ物質は全く除去された。

沱紙クロマトグラフ法による定量法 JONES¹⁰⁾の方法に従った。

FERNELL 法 原報¹¹⁾に従った。本法は前記のごとくヘキソースとペントースとの混合溶液について、それぞれの糖含量を測定する方法である。方法の詳細は省くが、その測定原理は次のごとくである。オルシノール硫酸試薬ならびに塩化第二鉄を含むオルシノール塩酸試薬で発色 (それぞれ A 反応, B 反応と呼ぶ) させるときは、A 反応においてはヘキソース、ペントース共に 425 m μ に吸収極大を示す色を生じ、B 反応においては 425 m μ にヘキソースに基づく吸収極大を、また 660 m μ にペントースに基づく吸収極大を示す色を生ずる。したがって A 反応における 425 m μ の吸光値ならびに B 反応における 660 m μ の吸光値を測定すれば、ヘキソースおよびペントースそれぞれのこれらの波長における吸光係数を基にして両者の糖の含量を算出することができる。実際には一定の実験条件の下における calibration curve を用意して置き、吸光度の測定値から直ちに各糖量を求めている。

ハイポキサンチンの定量 前報と同じく中島ら¹³⁾の方法によつて得られるハイポキサンチンとイノシンとの含量をもつて便宜上ハイポキサンチン量と見做した。

結果および考察

まず、JONES¹⁰⁾の沱紙クロマトグラフ法の測定精度を検討すべく、濃度既知のリボースおよびグルコースをそれぞれの水溶液を試料としたときの、両者の測定結果を Table 1 に示した。すなわち、グルコースおよびリボースをおのおの 50 μ g あるいは 100 μ g ずつ沱紙上にチャージし、展開後、風乾し直ちにアニリンフタル酸ブタノール試薬を噴霧した。この発色部分の醋酸抽出液の 480 m μ における吸光値を求め、一方

沱紙にチャージし展開せしめず直ちに発色させたものにつき以下上記と全く同様にし、吸光値を求め、これに対する前者の吸光値の百分比を算出して回収率とした。

Table 1 より明らかなごとく、回収率はグルコースで約 70~80 %, リボースで約 50~70 % の値を示すに過ぎなかつた。JONES¹⁰⁾ は魚肉 (herring) そのままのものと、これに一定量の糖を加えたものとの両者について糖を定量し、糖を添加した魚肉についての定量値から魚肉自身の糖量を差引き、添加量に対するこの値の比をもつて回収率を求め、両種の糖ともに 97~99 % 前後の値を得たとしている。しかし、著者の結果では上記のように沱紙クロマトグラフィーの段階のみでも回収率は決して良好ではない。のみならず同時に平行して行なつた二つの実験において、グルコース、リボースともにその回収率に約 10~20 % のふれがあつた。回収率が良好でない原因については十分検討していないが、沱紙上の発色スポットが完全に醋酸に移行しないで残存することが観察された。この点は抽出時間を延長しても解決されなかつた。ともかく上記のことは、沱紙クロマトグラフ法による定量法の精度の低いことを如実に示している。

Table 1. Recovery test of ribose and glucose by paper chromatographic method.*

Kind of sugar	Charged amount (μg)	Rf	Detected amount (μg)	Recovery %
Ribose	50	0.32	37 33	74 66
	100	"	71 51	71 51
Glucose	50	0.20	41 40	82 80
	100	"	70 75	70 75

* The aqueous solution of sugar was chromatographed on Whatman No. 1 filter paper with a solvent system of butanol-acetic acid-water (4 : 1 : 5).

Table 2. Recovery test of ribose and glucose added to plaice muscle using FERNELL's method.*

Kind of sugar		Amount added to muscle (μg/g)	Content in original muscle (μg/g)	Detected amount (μg/g)	Recovery %
Ribose		1000	438	1361	92
Glucose		1000	635	1575	94
Mixture of ribose and glucose	Ribose	500	215	693	93
	Glucose	500	336	799	96

* Refer to the text for the method.

そこで次には FERNELL 法¹¹⁾の検討を行なうことにした。まず、既知量のリボースあるいはグルコースを単独に魚肉に添加した場合と、この両者を混合添加した場合のそれぞれの添加糖量の回収率を求めた。結果は Table 2 に示すように、両者を単独に添加した場合の回収率はそれぞれ 92 %, 94 % であつた。また混合添加した場合の回収率もそれぞれ 93 %, 96 % という結果がえられた。ここでは回収率の一例を示したに過ぎないが、多数の実験結果はこの回収率にかなりの再現性のあることを示し、JONES 法の沱紙クロマトグラフ法に比して精度は遙かに良好と考えられる。

ここに、FERNELL 法¹¹⁾の欠点は定量の対象がヘキソースとペントースであつて、糖異性体に分別定量できないことである。しかし、JONES⁶⁾ は cod につき、筋肉中の遊離糖類はグルコースとリボースの 2 種のみを確認し、永山¹⁴⁾ も一般に魚肉中の遊離糖類は以上の 2 種以外はみられないとしている。本研究のヒラメの場合も、沱紙クロマトグラフィーで検討した限りでは、Rf 値からみてグルコースおよびリボース

Fig. 1. Change in concentration of ribose and glucose in plaice muscle during ice storage.

Fig. 2. Stoichiometric relationship between ribose and hypoxanthine accumulated in plaice muscle during ice storage.

に相当するものしか認められなかつた。ここに FERNELL 法¹¹⁾ によつて測定されるヘキソースおよびペントースも、グルコースとリボースであると断定して差支えないであらう。

さて、魚の筋肉の自己消化中に生成する遊離リボースは、既述のごとく ATP 分解生産物、イノシンに由来すると考えるのが妥当のようである。ところが、魚種により代謝の状態が異なり、ある種のものではイノシンのハイポキサンチンおよびリボースへの分解が顕著でないと指摘¹⁵⁾されている。このことは、遊離リボースの生成の状態も魚種によりかなりの相違があることを思わせる。そこで、ヒラメの筋肉ではどのような傾向がみられるかを検討する意味で、FERNELL 法¹¹⁾を用いて氷蔵中の遊離リボースの消長を、参考までにグルコースのそれと併せて測定した結果を Fig. 1 に示した。

遊離リボースは氷蔵日数の経過とともにほぼ直線的な増加を示し、17 日後には 700 $\mu\text{g/g}$ に達した。この増加傾向は JONES⁶⁾ が報告した cod における氷蔵初期のリボースの増加傾向によく似ている。ただ cod については氷蔵 14 日目以降急激な減少傾向を示したといい、JONES はこれを細菌の繁殖によるものと推論している。ヒラメの場合、氷蔵 17 日目まではこのような減少の徴候が全く認められなかつたが、これは魚種、氷蔵条件の違いによるものであらう。あるいは本実験における条件下では細菌の繁殖がかなり抑えられていることを示すものかも知れない。

グルコースは氷蔵中一時増加し 7~9 日目以降やや急速に減少することが観察された。BURT¹⁶⁾ および TARR⁸⁾ もこれに類似の現象を認めている。恐らく彼らのいうごとく amylolysis および glycolysis の反応が関与しているのであらう。

ところで、魚肉中の遊離リボースが主としてイノシンから生成すると考えると、遊離リボース量はハイポキサンチンの生成量と当量関係にあるように推察される。ハイポキサンチン量の測定結果は Fig. 2 に示したごとくで、Fig. 1 の値から筋肉 1 g 中の μmole に換算したリボース量と対比すると、両者はほぼ当量関係にあると認められる。

ただし、先にも述べたように中島らの方法によつて得られるハイポキサンチン量はイノシンとの含量として得られるのであるが、ヒラメの場合この分画の 250 $\mu\mu$ に対する 260 $\mu\mu$ の吸光比は 1.35~1.42 の範囲に

あり、この比はハイポキサンチンにおける吸光比 1.38 とほぼ一致する。一方イノシンの吸光比は 1.68 でかなり相違する。このことから本分画の内容はほぼハイポキサンチンと考えたものである。この見方が正しいとすれば、上記の当量関係の現われる現象は、一面諸種の魚肉についていわれているごときイノシンの速やかな分解を表わすものといえよう。この点は今後なお精査したいと考えている。

ところで、魚肉中には遊離リボースのみならずリボース-1-リン酸、リボース-5-リン酸¹⁷⁾の存在が明らかにされている。ここに用いたリボース定量法では、これらの全量が測定され各々を分別定量することは不可能である。これについては別に考慮すべきであるが、本法によつて得られる遊離リボース量は、少なくとも自己消化の度をあらわす一つの指標として役立つ可能性があるように思われる。

終りに、東京大学松浦文雄教授には実験結果につき懇篤な御討議をいただいた。厚く御礼申し上げる。

要 約

魚肉の遊離リボースの定量法を吟味し、併せて氷蔵ヒラメ筋肉のリボースの消長についてしらべ、次のとき結果を得た。

1. 沔紙クロマトグラフ法はアニリンフタル酸発色後の沔紙からの糖類の回収が悪く、定量法としては適当でないと認められた。
2. FERNELL 法によるオルシノール反応を利用するヘキソースとペントースの同時定量法を魚肉に応用したところ、かなり精度よくこれら両者の糖を定量することができた。
3. ヒラメ氷蔵 17 日の間筋肉内遊離リボースは直線的な増加を示した。その量はハイポキサンチンの生成量とほぼ当量関係にあつた。

文 献

- 1) 内山 均・鈴木たね子・江平重男・野口栄三郎：本誌，**32**，280～285 (1966)。
- 2) 藤井 豊・内山 均・江平重男・野口栄三郎：本誌，**32**，410～416 (1966)。
- 3) 江平重男・姉川昌彦・本誌，**32**，716～722 (1966)。
- 4) T. SAITO and K. ARAI: This Bull., **24**，749～750 (1959)。
- 5) H.L.A. TARR: *Food Technol.*, **8**，15～19 (1954)。
- 6) N.R. JONES: *J. Sci. Food Agric.*, **9**，672～677 (1958)。
- 7) J.M. SHEWAN and N.R. JONES: *J. Sci. Food Agric.*, **8**，491～498 (1957)。
- 8) H.L.A. TARR and M. LEROUX: *J. Fish. Res. Bd Canada*, **19**，519～520 (1962)。
- 9) N. TOMLINSON and V.M. GREELMAN: *J. Fish. Res. Bd Canada*, **17**，603～606 (1960)。
- 10) N.R. JONES: *Biochem. J.*, **68**，704～708 (1958)。
- 11) W.R. FERNELL: *Analyst*, **78**，80～83 (1953)。
- 12) N.R. JONES: *Analyst*, **85**，111～115 (1960)。
- 13) 中島宣郎・市川恒平・鎌田政善・藤田栄一郎：日農化，**35**，797～803 (1961)。
- 14) F. NAGAYAMA, F. SAKAI, T. KINOSHITA, and T. ONO: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **45**，136～171 (1959)。
- 15) V.M. GREELMAN and N. TOMLINSON: *J. Fish. Res. Bd Canada*, **17**，449～451 (1960)。
- 16) J.R. BURT: *J. Fd Sci.*, **26**，462～468 (1961)。
- 17) N.R. JONES: *Recent Advances in Food Science* (T. MAWTHORN and J.M. LEITCH, ed.), 151～166, Butterworths, London (1962)。