

水産物貯蔵中のトリメチルアミン・オキシド含量の変化と 水産物鮮度判定法

大塚 滋・富永哲彦・岡田文子・加藤育代

DECREASE OF TRIMETHYLAMINE OXIDE CONTENT DURING CHILL STORAGE OF MARINE PRODUCTS AND A NOVEL METHOD FOR ESTIMATING FRESHNESS.

Shigeru Otsuka, Tetuhiko Tominaga, Fumiko Okada, and Ikuyo Kato

The novel method for the determination of trimethylamine oxide (TMAO) was applied on the studies of the post-mortem change of TMAO content during chill storage of marine organisms.

The Polovinski reaction, a specific intramolecular rearrangement of methyl-N-oxides with acetic anhydride, can be utilized for the specific and direct determination of TMAO. When the resulting N-methylol compound (or its acetate) is hydrolyzed and formaldehyde liberated is determined colorimetrically after its condensation with chromotropic acid, this method is applicable for the micro-determination of TMAO content of water extract from natural substances. Overall procedure is as follows:

1. Add 2.5 ml. acetic anhydride to 0.25 ml. of the practically neutral sample (extract) contained in a glass reaction tube, mix, and heat in a boiling water-bath for 1 hour under a air condenser.
2. After cooling, add 2.5 ml. of water into the tube and mix thoroughly to hydrolyze remaining acetic anhydride.
3. Add 3 volumes of chromotropic acid reagent (0.2 per cent chromotropic acid in approximately 20 N sulfuric acid). Heat in a boiling water-bath for 1 hour.
4. After cooling, read the density of the color developed in a colorimeter at 580 m μ .

The relationship between the color density and the concentrations of TMAO was found to satisfy the Lambert-Beer's law (Fig. 1).

TMAO contents of the muscles of some live marine organisms are shown in Table I, which decrease during chill storage (Fig. 2-14). Variations in amounts of the toluene extractable amines and of total organic bases are shown together with that of pH. It is concluded from these results that:

1. The disappearance of TMAO during storage is common among all the marine organisms tested.
2. The typical pattern of the TMAO content during storage is consisted of two decreasing phases and a "plateau" between these where practically no change in TMAO takes place.
3. At the beginning of the second decreasing phase, signs of the spoilage of the

samples (appearance, smell, etc.) are remarkable.

4. Organic bases starts to increase shortly earlier than the beginning of the second decreasing phase, and continues to increase during spoilage of the sample.

It is believed that the post-mortem disappearance of TMAO is due to its reduction to the corresponding amine, trimethylamine (TMA), caused by the action of bacteria. It is safe, therefore, to say that the second decreasing phase of TMAO content is, at the same time, the beginning stage of the spoilage. From these considerations, some possibilities of the freshness estimation of marine products are discussed (Fig. 15).

The freshness of marine products may be estimated by:

1. *The TMAO content in muscles.*

Initial contents of TMAO in fish organs varies due to the season, spot and depth of waters where the fish is caught. However, possibilities for estimating freshness are still available when statistics are made from examinations and experiences accumulated. If a fish is found to contain no or a very small amount of TMAO, it is judged as spoiled.

2. *The comparison of the contents of TMAO and TMA.*

The extent of the spoilage is conveniently estimated by comparing the amount of TMA and its oxide. When the fish is sufficiently fresh, the content of TMAO stays in a high level, whereas, that of TMA is nil or very low.

If $\{TMAO\} \gg \{TMA\}$, the fish is sufficiently fresh, and, if $\{TMAO\} \cong \{TMA\}$, the fish is spoiled and not edible. ($\{TMAO\}$ and $\{TMA\}$ are the molar concentrations of TMAO and TMA, respectively).

3. *The speed of the disappearance of TMAO.*

As shown in Fig. 15, if the decrease of TMAO content is at the stage of the "plateau", in which the fish is fresh and could be used, the rate of decrease of the TMAO content per hour (or per day) is very small during the chill storage, whereas, if the fish is spoiling and the decrease of TMAO is at the second phase of decrease, where the spoilage is taking place, the rate is remarkable.

The ratios of the decreasing rates were usually found to be more than 1:10. Thus, a possible way of estimating the freshness of fish with this respect is:

If the value, $-\{TMAO\}/3 \text{ hr}$, is less than 1, the fish is practically fresh, and if more than 5, the fish is on its way of spoilage (Table II).

緒 言

従来、水産物鮮度を判定する化学的方法として、数種の判定法あるいは規準が提唱され、実際に使用されており^{1,2)}、効果的常用法として揮発性塩基窒素、トリメチルアミン（以下 TMA と略称）、揮発性有機酸、インドール、ヒポキサンチンなどの含量による方法、pH、昇汞反応³⁾、ホルマリンによる蛋白沈澱量の測定などの方法が用いられている^{2,4)}。ことに TMA（および TMA を含めて有機塩基）含量を規準とする方法は、トリメチルアミンの生成が魚類死後における、きわめ

て著しい変化の一つであるので最も有利な方法の一つとしてよく用いられている⁴⁾。トリメチルアミン・オキシド (TMAO) は TMA の前駆物質 (母体) であることが知られており、魚類腐敗時におけるこの還元反応はもっぱら腐敗細菌によるとされ、TMAO→TMA の還元反応に関与する細菌酵素系に関する研究もおこなわれている。そして、もし TMAO の分解——TMA の生成がもっぱら腐敗細菌の増殖に随伴するものであるならば、TMAO 量の貯蔵中の変化の様子は、食品の腐敗進展のパターンに最も密着したものとなるはずである。

著者らはこの点に着目し、かつ、TMAO がほとんどの海産動物の生存中の常在成分であることから、もしこれが一定の法則に従って、魚類鮮度の劣化に伴なって減少していくものならば、魚類貯蔵中の TMAO 含量を検討することによって、魚類鮮度判定の一つの目安となしうと考へた。

TMAO の定量に当たっては従来これを何らかの方法によって還元し、TMA となしてのちトルエン層に抽出してピクリン酸塩として定量する、いわゆる Dyer の方法^{6,7)} がとられてきたが、この方法は煩雑に過ぎるとともに、その精度についても難点があった。著者らは TMAO の無水酢酸処理によって定量的に生成するホルムアルデヒド量から TMAO 量を測定する新定量法を提唱したので⁴⁾、TMAO 含量の測定にこれを採用するときは、十分簡便な鮮度判定法として提唱されうのではないかと考へ、以下数種海産動物について、その貯蔵期間中の TMAO 量の変化を追跡したので報告する。なお、合わせて TMA 含量、pH、総塩基量の変化の様態とともに、海産物鮮度判定の可能性について 2、3 考案を行なう。

実験および実験材料

1. 無水酢酸：市販無水酢酸中に通常不可避的に存在する光分解物は TMAO 定量の第 2 段反応中、硫酸によって FA に変化して高い盲値を与えるので、市販無水酢酸を精製した。すなわち、無水酢酸 800 ml に濃硫酸数滴を添加して混合し、還流冷却器下に数時間煮沸する。精溜塔を付して蒸溜し、137°C~139°C の溜分を採取する。精溜は 2 回繰り返す。

2. TMAO：市販品を水とアルコールから再結晶し、エーテルで洗浄して乾燥した後、硫酸デシケーター中で恒量になるまで脱水、無水物として使用した。

3. ジメチルアミン塩酸塩：TMAOと同様、処理によって精製した。

4. TMA塩酸塩：同上。

5. クロモトローブ酸：水とエタノールから再結晶した。

6. クロモトローブ酸試薬：1 g のクロモトローブ酸を 100 ml の水に溶かして、24 N 硫酸 400 ml を徐々に混合しつつ加える。

7. FA：市販ホルマリン溶液

8. ホルムアルデヒド重亜硫酸ソーダ：ホルマリンと重亜硫酸ソーダから常法によって合成、アルコールから再結晶し、真空デシケーター中で恒量となるまで保存した。

9. 実験材料：サルエビ、マアナゴ、アワビ、イイダコ、メイタカレイ、ヒイカ、ナマコ、キュウセン（ペラ）、スズキは瀬戸内海で捕獲された活けものを明石市において購入し、ドライアイスによって凍結して研究室に持ち帰った。クルマエビは淡路島付近において捕獲されたものを購入した。アサリは市販のものを用いた。

10. 試料：サルエビ、ヒイカ、イイダコ、ナマコは全体をそのままホモジナイズした。アワビ、アサリは殻をとってホモジナイズした。マアナゴ、メイタカレイ、ペラ、スズキ、マグロは筋肉部をホモジナイズした。クルマエビは筋肉（可食部）全部をホモジナイズした。

11. 貯蔵：以上のようにして得た搗碎物 5g ないし 10g あてを小容器にとり、5°C 内外に調節した冷蔵庫中に保存し、各日数ごとにとり出して観察して後、抽出に付した。

12. 抽出：試料（搗碎物）に2倍量の水を加えて、ただちに沸騰水浴中に10分間保ってのち、室温まで冷却、氷冷下ホモジナイザーを用いて均質になるまでホモジナイズし、これを4°Cに保って遠心分離（10,000rpm, 15分）し、上清を試料溶液とした。

13. 定 量

a) TMAO：試料（搗碎物熱水抽出液）0.25 ml を試験管にとり、これに 2.5 ml の無水酢酸を添加してよく振とうしてのち、空冷管（長さ約 40 cm のガラス管）を付して沸騰水浴中に1時間保つ。とり出して冷却後 2.5ml の水を添加してよく溶け合うまで攪拌して過剰の無水酢酸を分解する。反応混合液に対して3倍量のクロモトローブ酸試薬を添加して、ふたたび沸騰水浴中で1時間加熱して生ずる発色を冷却後 580 m μ で比色する。発色は少なくとも24時間安定であり、TMAO濃度 0 ~ 1.5 μ mole/ml の範囲内で Lambert-Beer の法則に従う。

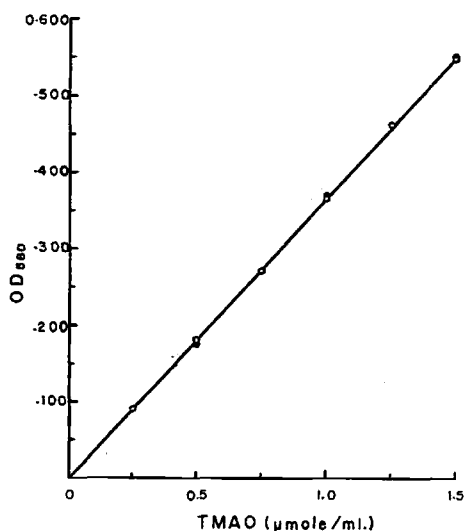


Fig. 1 Standard curve for TMAO determination

b) トルエン可溶性有機塩基 (TEB)：Dyer のトルエン抽出法の変法により定量した。

14. pH の測定は狭域pH試験紙（東洋科学）によった。

15. 初期腐敗の判定は試料および抽出液の臭気、色、濁度などの観察によった。

実 験 結 果

1. 生体試料中のTMAO含量

試験に供した動物生体中の TMAO 含量を調べてみると、Table I のごとくなり、類または目によって TMAO 含量に一種の共通性がみられる。このことはすでに古く見出されて比較生化学的に興味をもたれ、TMAO の生理的意義（塩基の解毒^{9,10}）、滲透圧^{9,10}や緩衝能¹²の調節）を説明あるいは推測する際の基礎となって

いる。

Table I. TMAO Contents in Live Marine Organisms.

Organisms		TMAO
Vertebrates		mg/g
Flatfish	(<i>Pleuronictus cornutus</i>)	2.13
Wrasse	(<i>Halichoeres poecilopterus</i>)	6.30
Sea bream	(<i>Chrysophrys major</i>)	4.29
Bass	(<i>Lateolabrax japonicus</i>)	5.28
Shell-fishes		
Abalone	(<i>Haliotis gigantea</i>)	2.49
Baby clam	(<i>Tapes japonica</i>)	1.90
Crustacea		
Shrimp	(<i>Trachypenaeus curvirostris</i>)	7.65
Prawn	(<i>Penaeus japonicus</i> BATE)	11.52
Cephalopods		
Squid	(<i>Loligo japonica</i>)	12.52
Octopus	(<i>Octopus ocellatus</i>)	3.80
Echinoderm		
Sea cucumber	(<i>Stichopus japonicus</i>)	0.37

2. 魚介類貯蔵中の TMAO 含量の変化

こうして生体中に、あるものではきわめて豊富に存在する TMAO が低温貯蔵中に特有のパターンを描きつつ減少し、代って生体塩基が出現してくる有様を以下の各図に示す。

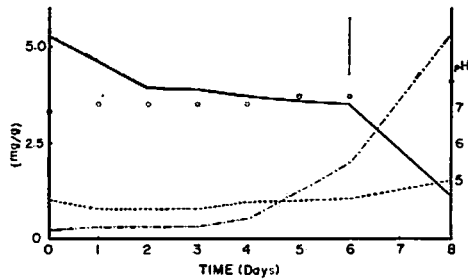


Fig. 2 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of bass (*Lateolabrax japonicus*)

— TMAO - - - TEA
 Total N ○ ○ ○ ○ pH
 TEA: Toluene-extractable amines as TMA

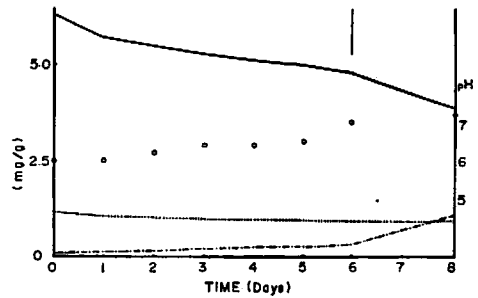


Fig. 3 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of wrasse (*Halichoeres poecilopterus*)

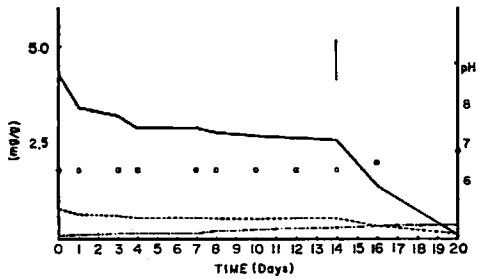


Fig. 4 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of sea bream (*Chrysophrys major*)

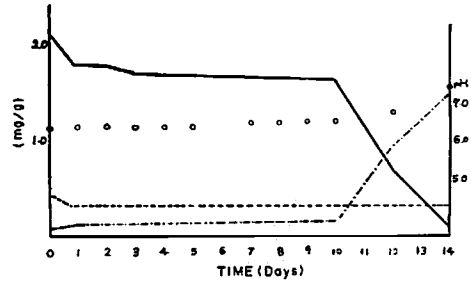


Fig. 5 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of flatfish (*Pleuronichthys cornutus*)

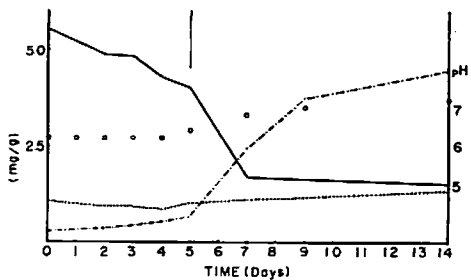


Fig. 6 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of sea eel (*Astroconger nyriaster*)

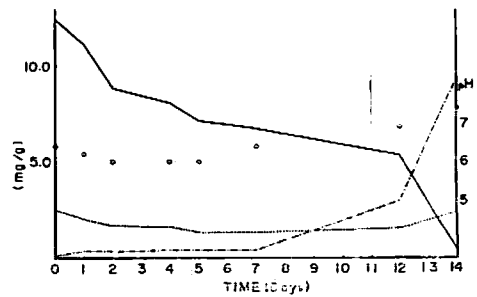


Fig. 7 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of Squid (*Loligo japonica*)

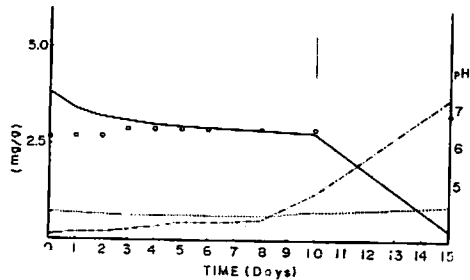


Fig. 8 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of octopus (*Octopus japonicus*)

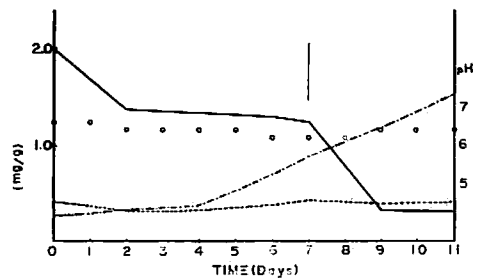


Fig. 9 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of abalone (*Haliotis gigantea*)

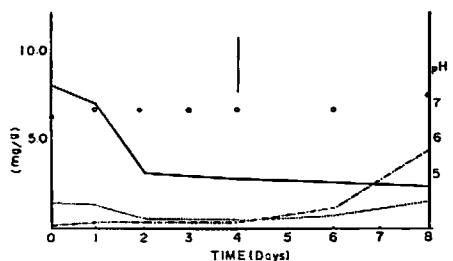


Fig. 10 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of shrimp (*Trachypenaeus curvirostris*)

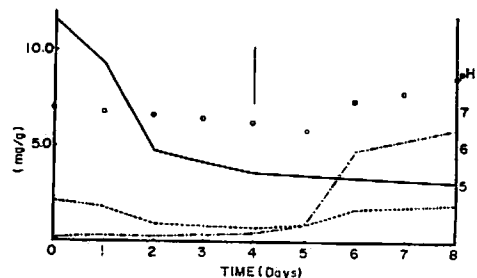


Fig. 11 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of prawn (*Penaeus japonicus* BATE)

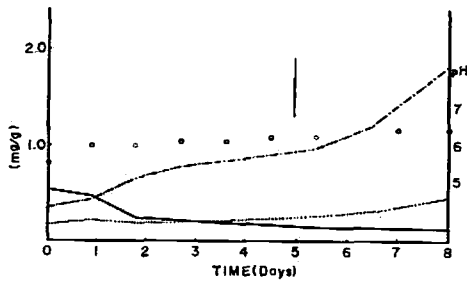


Fig. 12 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of baby clam (*Tapes japonica*)

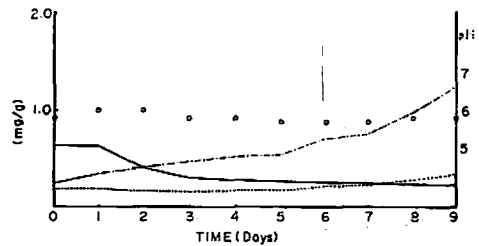


Fig. 13 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of striped baby clam (*Tapes japonica*)

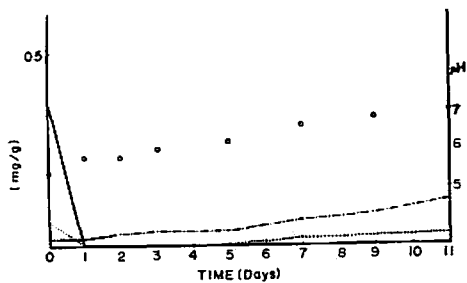


Fig. 14 Variation in trimethylamine oxide content during chill storage of sea cucumber (*Stichopus japonicus*)

考 察

以上の各図から次の諸点が結論される。

1. すべての海産動物はその斃死後、体内 TMAO 含量の低下がみられる。
2. TMAO 減少の様子は動物によってそれぞれ特有であるが、共通している点が 2, 3 見られる。一つは斃死後 10 時間に見られる減少（第 1 減少期）であり、いま一つは初期腐敗開始期に見られる急激な減少である。

そして、この 2 つの減少期にはさまれて数日間にわたる平坦部（“プラトー”）がみられる。

3. TMAO 量の第 2 減少期前後に初期腐敗が認められる。

4. 有機塩基量は TMAO の第 2 減少期より少し以前に増加をはじめ、のちには当初の TMAO の含有量（生体中）に無関係に増加を続ける。

2 の 2 回の減少期中、第 1 次減少期は生体酵素系によるもの、第 2 次減少期は細菌の作用によるものと考えられる。すなわち、第 1 次減少期にあつては生体細胞内にあつて、互いに局在して作用して TMAO \rightleftharpoons TMA の酸化還元的平衡を左側にかたよらせていた酵素群が、ホモジナイズされることによって、その局在性を失って互いに接触する結果、上の平衡を一部右側にずらせたものであろう。

第 1 次減少期で TMAO \rightleftharpoons TMA がある平衡に達し、そのまま数日間を経てのち、細菌の活動による TMAO の分解が始まる（第 2 次減少期）。したがって、言葉の定義からして、TMAO の第 2 次減少期はすなわち“腐敗”そのものの開始と、その進行を示すものといふことができる。そして生存中に存在した TMAO のすべてが消費されたのちも、他のアミン類の生成をとまなうごとき他の化学的变化は続き、これがトルエン可溶性有機塩基（TEB）の増加の継続となって示されているものと考えられる。このことは総塩基窒素量（TMAOを含む）の増加からも知られる（各

図における点線)。

以上の観察から TMAO の定量による水産物鮮度判定の方針について、典型的な TMAO 減少パターン (模型図, Fig. 15) によって 2, 3 考察を行ないたい。

1. TMAO 含量

生体中の TMAO 量は魚介の種類によって異なるし、特定の種類をとり上げてみても、収穫の場所、季節、深度などによって異なる。したがって、貯蔵海産食品に共通な鮮度判定の方法として、ある TMAO 量の規準を示して、これ

を目安とする方法を挙げることはできないが、上述の季節、収穫場所の 1 つ 1 つについて検討し、経験が得られれば、たとえば TMAO 何 mg % 以下の場合には危険といった判定法がもちろん可能であろう。

2. TMAO 量と TMA (TEB) 量の等しくなる時期

上述の TMAO → TMA なる反応のみが TMAO 分解の (そして TMA 生成の) 唯一の反応と仮定するならば、この両者のモル比が 1 となる点は、すなわち TMAO の半量が分解された点となる。この点は生体内 TMAO 量がある程度以上であれば必ず第 2 次減少期に現われるはずであり、実際、アサリ、ナマコなど著しく生体 TMAO 量の低いものを除き、第 2 次減少期に現われている。したがって、貯蔵中の魚介類をとって TMAO および TMA の定量を行ない、TMAO 量が TMA 量に等しいか、あるいはより低い (すなわち $[TMAO] \equiv [TMA]$) ときは食品は腐敗途上にある。実際には TMAO の分解はかなり複雑なようであるが、この法則による判定法は実際的であり、本報に報告した海産食品中、アサリ、ナマコを除くすべてに当てはまる。

3. TMAO 減少曲線の勾配

Fig. 14 (模型) に典型的なパターンを示したごとく、貯蔵中 TMAO の量はゆるやかな減少度を保つプラトーの後、細菌による急激な分解を受けて減少していく。したがって、適当な単位時間内の TMAO の減少量

$$-d [TMAO] / hr$$

を見れば、その絶対値はプラトーと第 2 次減少期において著しい相違を示すはずである。

$$d [TMAO]_p \ll d [TMAO]_s$$

(p: プラトー (平坦部), s: 第 2 次減少期)

じっさい、たとえばスズキではプラトー上、TMAO 減少量の平均は毎日 6.5mg% (毎時間 0.27 mg%) であるのに反し、第 2 次減少期にあっては毎日 112.5mg% (毎時間 4.7mg%) とほぼ 20 倍の減分を示す。

この法則に当てはまるものにはスズキの外にカレイ、ペラ、アナゴなどの魚類、アワビ、タコ、

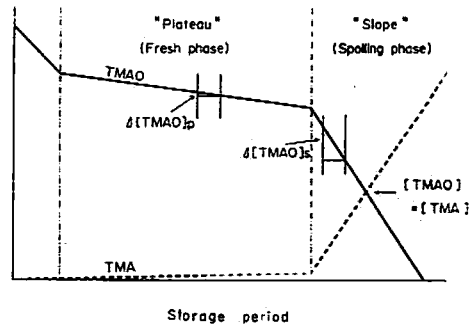


Fig. 15 A model pattern of variation in TMAO content during storage of marine products

イカなど多く、かなり一般的な有力な鮮度判定法が導き出されると考えられる。すなわち試料を採取して2分し、5°C内外に貯蔵し、数時間をはさんでそれぞれTMAO量を測定し、両者の差から経験によって（たとえば前例のスズキの場合には、危険率を考慮に入れて、毎時間0.5mg%以下、4mg%以上というふうにレベルを規定して）試料がプレート上にあるか否か、つまり細菌による“腐敗”以前にあるか否かを適確に知ることができよう。この定量法の精度から考えて2試料の定量の間隔は2ないし3時間が適当と考えられる。Table II に数種魚介類新鮮期および腐敗期において試料が5°Cに保たれた場合のTMAO含量の低下率（毎日および毎3時間）を示した。

Table II. Rate of Decrease of TMAO Contents during Storage of Fresh and Spoiling Marine Products.

	Rate of decrease of TMAO content per				Ratio of rate of decrease (b/a)
	Fresh phase (plateau)		Spoiling phase (slope)		
	Per day	Per every 3 hrs.	Per day	Per every 3 hrs.	
Bass	6.50 mg*	0.38 mg*	112.5 mg*	14.06 mg*	17.3
Flatfish	1.30	0.16	38.3	4.67	29.5
Sea bream	2.90	0.36	41.0	5.11	14.2
Abalone	1.20	0.15	45.8	5.73	38.2
Octopus	4.30	0.54	50.0	6.25	11.5

* Milligrams per 100 g wet sample.

緒言に述べたごとく、TMAOの第2次減少期が細菌にもとづくものであり、“有機物が微生物の作用によって悪変して不快臭、有毒物質を生ずる現象”を腐敗と定義する¹³⁾以上、TMAO量変化のパターンは腐敗そのものの進行をもっとも端的に示しているものといえることができ、“魚の鮮度低下の問題は死後の細菌学的変化よりも、生化学的变化に重点があろう¹⁴⁾”とする説を肯定するならば、TMAO量低下の様相はまた正確に鮮度低下そのものの様相を示しているものといえることができると考えられる。したがって、このパターンの適当な解析によって、さらに適確な“腐敗”の判定法や“鮮度”の検定法が導き出されうるものと期待される。

要 旨

数種海産食品貯蔵中のTMAO量の変化の様相を調べ、これらに基づいて海産食品鮮度判定法の可能性について考察した。検討した動物食品中、魚類、貝類（斧足類を除く）、頭足類では、TMAOは日数とともにほぼ共通したパターン描きつつ減少する。すなわち、死直後の急速な減少期のあと数日間著しい減少はなく、初期腐敗の開始とともに、ふたたび急激な減少期があり、TMAOは速やかに消滅し、代って生体塩基の増加がみられる。

このパターンから考察して、可能と考えられる鮮度判定法は次のとおりである。

1. TMAO 含有量による判定
2. TMAO 量と TMA 量を比べて等しいか、あるいはより少ない場合、食用不適とする判定法
3. 単位時間当たりの TMAO 減少量による判定法

謝 辞 本研究を行なうに当たって終始有益なご教示を賜った東洋食品工業短期大学学長志賀岩雄博士および同学講師長田博光氏に深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 天野慶之, 内山均: 日水誌, 14, 48, 165 (昭23) etc.
- 2) Tomiyasu, Y. and Zenitani B.: Adv. Food Res., 7, 14 (1957)
- 3) 天野慶之: 東海区水産研究所報告, 1, 1 (1951)
- 4) Reay, G. A. and Shewan, J. M.: Adv. Food Res., 2, 343-398 (1949)
- 5) Umemoto, T., Hayashi, M., Miyaki, K. and Hayashi, M.: Biochem. Biophys. Acta, 110, 319 (1965) etc.
- 6) Dyer, W. J.: Fish. Res. Bd. Canada, 8, 351 (1945)
- 7) Dyer, W. J., Dyer, F. E. and Snow, J. M.: *ibid.*, 8, 309 (1952)
- 8) 佐々木林治郎, 藤卷正生: 農化誌, 27, 420 (1953)
- 9) Baldwin, E.: Comparative Biochemistry, Cambridge University Press, p.46(1949)
- 10) Baldwin, E.: Dynamic Aspects of Biochemistry, 3rd Ed., Cambridge University Press, p.325. (1959)
- 11) 須山三千三, 徳広真: 日水誌, 24, 267 (1958)
 須山三千三: *ibid.*, 24, 271, 276 (1958)
 須山三千三, 小池淳三, 鈴木和遠: *ibid.*, 24, 281 (1958)
- 12) 化学大辞典, 共立出版社: 7, 915 (昭36)
- 13) 内山均, 鈴木たね子, 江平重男, 野口栄三郎: 日水誌, 32, 280 (1966)
- 14) This report, p. 390