

# 核酸成分の変化から見た缶詰原料の鮮度—I

## 魚肉中の核酸成分の変化

毛利 威徳・橋田 度・秦 圭子

### Assesment of Freshness of Marine Products Based on the Composition in Nucleic Acid Related Substances in Canned Sea-Food.-I

### Determiration of the Nucleic Acid Related Substances in Fish Muscle.

Takenori Mouri, Wataru Hashida and Keiko Hata

The relation between the composition of compounds induced from ATP and the freshness of raw fish was investigated. For the analyses of Hx, HxR and IMP by using 5'-nucleotidase, nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase were. The assay method is based on the separation of adenine, hypoxanthine, adenosine, inosine and nucleotides with ion exchange resin (Dowex 1×2 chloride type). From the results shown in Fig 2 it is proposed that the analysis of these substances in canned fishes can be adopted as a index of its quality.

## 1. 緒 言

近年水産動物筋肉などの核酸関連物質についてJones<sup>1)</sup>, 齋藤<sup>2)</sup>, 中島<sup>3)</sup>, 藤田<sup>4)</sup>, 藤井<sup>5)</sup>, 著者<sup>6)</sup>らの多くの報告がなされている。これらの核酸関連物質が食品としての呈味性と共に水産動物の死後経過時間、放置温度などに強い相関を示すことからATP分解物質であるヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸が鮮度の指標として適当であるとされている。しかしヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸の定量法については多くの方法があるが、これらのヌクレオチド類とヌクレオシド類、核酸塩基類の分析を連続して行うことが可能でしかも容易に分析できることが必要である。本報では缶詰原料及び缶詰生産物の鮮度を判定する指標とされているヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸を測定するためにカラム（クロマトグラム）法、酵素法による定量法を吟味した結果と併せて従来、鮮度の指標として提唱されているその他の方法について比較検討したので報告する。

脚註：本報において次の略号を使用する。

5'-AMP : adenosine-5'-monophosphate (5'-adenylic acid)

5'-CMP : cytidine-5'-monophosphate (5'-cytidylic acid)

5'-UMP : uridine-5'-monophosphate (5'-uridylic acid)

5'-IMP : inosine-5'-monophosphate (5'-inosinic acid)

5'-GMP : guanosine-5'-monophosphate (5'-guanylic acid)

ADP : adenosine diphosphate

PMase : phosphomonoesterase

ATP : adenosine triphosphate

PNPP : *p*-nitrophenylphosphate

BPNNP : bis-*p*-nitrophenylphosphate

## 2. 実験方法

2・1 標準物質 定量, 定性のための標準物質として ATP, ADP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP, ヌクレオシド類, 核酸塩基類は市販品を用いた。

2・2 試料調製法 水産物の可食部をできるだけ均一に取り細断した後に10~5%過塩素酸で冷時ホモジナイズし抽出した。その後5N-KOHにより中和後試料として用いた。供試水産物は次のときものである。学名は文献<sup>7)</sup>によった。

- サンマ (Cololabis Saira)
- アジ (Trachurus Japonicus)
- カツオ (Kalsuwonus Pelamis)
- サバ (Peneumalopharus Japonicus)
- マグロ (Thunnus Orientalis)
- ハクレン (Hypophthalmichthys Molitrix)

ハクレンは大阪府淡水魚試験場より提供された。

2・3 分析方法 個々のヌクレオシドポリホスフェイト, ヌクレオチド類は Dowex 1×8 を使用し, カラムの調整法は前報<sup>9)</sup>に準ずる。試料の添加法は pH 7.0に調整し Dowex 1×8カラムを通過させ素通り区分を減圧濃縮し, ヌクレオシド, 核酸塩基類の区分にした。Dowex 1×8 カラム吸着区分は前報に準じて, ヌクレオシドポリホスフェイトを分析した。またヌクレオシド, 核酸塩基類の分析は Dowex 1×2 (塩酸型) を使用し, カラム調整法, 試料の添加法等は, Cohn<sup>8)</sup>法による斎藤<sup>2)</sup>らの記載に準じた。展開液組成は Table 1-a のごとくで, アデニン, アデノシン, イノシン, ヒポキサンチン類の回収率は Table 1-b のごとく満足なものであった。

Table 1-a Composition of solution

(1) Distilled water including sample
(2) 0.04N-HCl 0.4N-NH <sub>4</sub> OH
(3) 0.05N-HCl 0.01N-Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>

Table 1-b Recoveries of bases or nucleosides by ion exchange column chromatography.

	Amount of sample-( $\mu$ mole)	Measured( $\mu$ mole)	Recovery (%)
Adenosine	5.0	4.8	96.0
Adenine	5.0	—	—
Inosine	7.2	7.1	98.6
Hypoxanthine	3.3	3.0	90.9

5'-IMP, イノシン, ヒポキサンチンは Kalchor<sup>9)</sup>らの酵素法に依った。すなわち5'-ヌクレオチダーゼ(武田薬品工業より恵与されたもの)ヌクレオシドホスホリラーゼ, キサンチンオキシダーゼ(市販品)を作用させ尿酸に分解し290m $\mu$ の吸収により定量した。

2・4 ヌクレオシド, 核酸塩基の同定法 ヌクレオシド, 核酸塩基類はカラムからの溶出液の各々260m $\mu$ の吸収曲線がピークとなる画分を集め活性炭吸着後2.8%アンモニア含有エタノール水溶液で溶出した後濃縮し, ペーパークロマトグラフィにより同定した。なお画分がヌクレオシドであることを, 上述のヌクレオシドホスホリラーゼを作用させ,<sup>9)</sup>また1N-HClで分解し確認した。ペーパークロマトグラフィ, 薄層クロマトグラフィの溶媒は前報参照。尚, 酢酸 Buffer, 硼酸 Buffer

を用うる口紙電気泳動法も同定に用いた。

### 3. 実験結果

3・1 ハクレン過塩素酸抽出画分の同定 ハクレンの過塩素酸抽出液の紫外線吸収曲線は 244~255 $\mu$  にピークを示した。原料約 5g に相当する ( $UV_{260}=450$ ) 過塩素酸抽出液を pH 7.0 にし、Dowex 1 $\times$ 8 (ギ酸型) カラムによって展開した。そのクロマトグラフィは Fig 1 のごとくである。

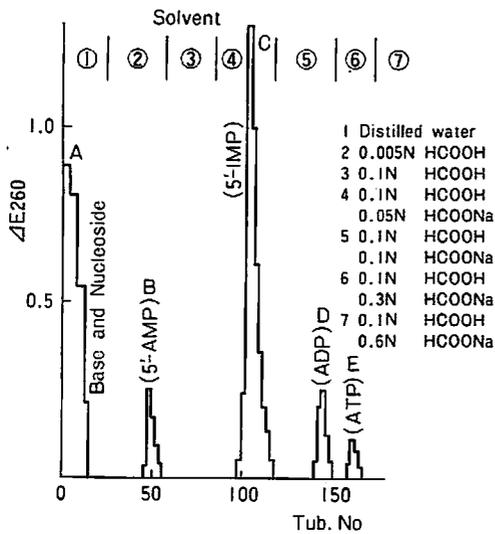


Fig 1 Chromatogram of perchloric acid-extracted of Hakuren (Hypophthalmichthys Molitrix).

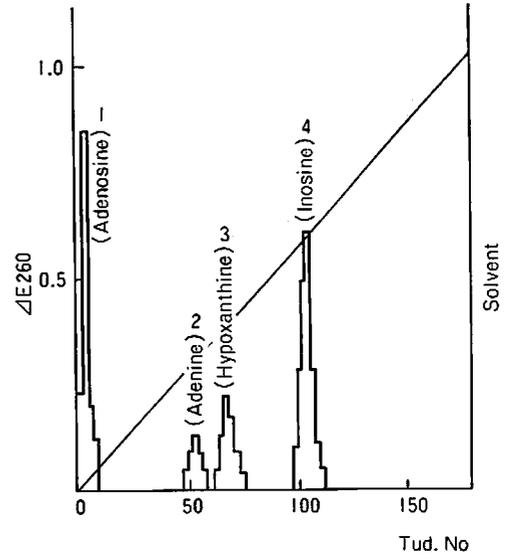


Fig 2 Chromatogram of perchloric acid-extracted of Hakuren (Hypophthalmichthys Molitrix).

画分Aより画分Eまで5個のピークを分離した。画分BからEはヌクレオシドモノホスフェイト以上の高分子の物質で前報<sup>9)</sup>のごとく、同定を行った結果、画分Bは5'-AMP、画分Cは5'-IMP、画分DはADP、画分EはATPであった。画分Aは核塩酸基、ヌクレオシド類か、その他の物質が素通りした部分であり、これらを減圧濃縮し、Dowex 1 $\times$ 2 (塩酸型) カラムによって展開したそのクロマトグラフィは Fig 2 のごとくである。

画分Aについてクロマトグラフィを行うと画分1から4まで4個のピークを分離した。画分1から4は、核酸特有の紫外線吸収曲線を示し流出位置からは、それぞれアデノシン、アデニン、ヒポキサンチン、イノシンに相当すると考えられる。

250 $\mu$ :260 $\mu$  及び 280 $\mu$ :260 $\mu$  のそれぞれの吸光比も略既知標準品に一致した。ペーパークロマトグラフィによって画分1から4がそれぞれアデニン、アデノシン、ヒポキサンチン、イノシンに一致することが認められた。カラム法によってハクレン即殺後の筋肉と煮熟肉について、カラムクロマトグラムを行った結果は Table 2 のごとくである。

淡水産の草食魚といわれるハクレンにおいても核酸成分は、5'-IMP, 5'-AMP, イノシンが主体をなしている。

3・2 酵素法による ヒポキサンチン, イノシン, 5'-IMPの測定 酵素法(キサンチンオキシダーゼ法, ヌクレオチダーゼ法)の吟味を行った。先づ基本となるキサンチンオキシダーゼが, キサンチン, ヒポキサンチン以外の塩基, ヌクレオシドに対して作用することも考えられるので, 数種の塩基類, ヌクレオシドに作用させた結果, Table 3のごとくである。

キサンチン, ヒポキサンチン以外の塩基ヌクレオシドには, ほとんど作用しない事が明らかになった。Table 4は, キサンチンオキシダーゼ法の回収試験をマグロ, カツオ, アジ, サ

Table 2 Change of individual nucleotides in canning processes of Hakuren.

		Fr. C	5-AMP	5-IMP	ADP	ATP
Raw material	UV <sub>260</sub>	18.8	29.0	153.9	28.4	25.4
	μmole/g		0.2~0.3	2.8~3.5	0.2~0.3	0.2~0.4
Solid after (boiling and washing)	UV <sub>260</sub>	1.2	28.1	53.4	4.0	trace
	μmole/g		0.2~0.3	1.0~1.3	0.02~0.04	trace

		Fr. A	Hypoxanthine	Inosine	Fr. D
Raw material	UV <sub>260</sub>	22.4	7.3	36.6	1.65
	μmole/g		0.03~0.01	0.4~0.5	
Solid after (boiling and washing) SA	UV <sub>260</sub>	15.2	22.1	110.2	34.5
	μmole/g		0.3~0.4	1.2~1.6	

Table 3 Recoveries of hypoxanthine in measurement with enzymatic method.

Sample	Measured (UV <sub>290</sub> )	Amount of Hypoxanthine (μmole)
Adenine	0.100	0.005
Uracil	0.098	—
Guanine	0.152	0.023
Guanosine	0.097	—
Cytidine	0.088	—
Hypoxanthine	0.497	0.224
Distilled water	0.099	—
Thyamine	0.112	0.0058

Table 4 Recoveries of hypoxanthine in measurement with enzymatic method.

Sample	Measured (UV <sub>290</sub> )	Amount of Hypoxanthine	Hypoxanthine recovered	Recovery (%)
Thunnus Orientalis 0.5ml	0.297	0.127		
Thunnus Orientalis+Hypoxanthine (0.160 μmole)	0.681	0.291	0.164	102.5
Peneumalophorus Japonicus 0.5ml	0.225	0.096		
Peneumalophorus Japonicus+Hypoxanthine (0.160 μmole)	0.587	0.250	0.154	96.5
Saba blood meat 0.5ml	0.332	0.141		
Saba blood meat+Hypoxanthine (0.160 μmole)	0.695	0.297	0.156	97.5
Trachurus Japonicus 0.5ml	0.106	0.045		
Trachurus Japonicus+Hypoxanthine (0.160 μmole)	0.470	0.201	0.156	97.0
Hypophthalmichthys Molitrix 0.5ml	0.176	0.075		
Hypophthalmichthys Molitrix+Hypoxanthine (0.160 μmole)	0.553	0.236	0.161	100.5

バ, サバ血合肉 ハクレンを対象に行った結果である。

その場合の回収率は96.5~102.5%と満足なものであった。しかし5'-IMP, イノシンを測定するために3種か2種の異なる酵素を併用し, かつヌクレオシドポリホスフェイトである ATP, ADP の共存化においても酵素が正常に作用するかについて検討を行った。すなわち ATP, ADP 存

Table 5 Recoveries of hypoxanthine in measurement with enzymatic method.

Sample	Measured (UV <sub>290</sub> )	Amount of Hypoxanthine (μmole)	Recovered (μmole)	Recovery (%)
Kalsuwonus Pelamis	0.102	0.041	—	—
Kalsuwonus Pelamis + Hypoxanthine	0.503	0.240	0.199	99.5
Kalsuwonus Pelamis + ADP	0.110	0.044	0.003	100.0
Kalsuwonus Pelamis + ATP	0.110	0.044	0.003	100.0
Hypoxanthine + ADP	0.440	0.198	0.002	100.0
Hypoxanthine + ATP	0.454	0.205	0.005	100.0
ADP	0.017	0.001	—	—
ATP	0.014	—	—	—
Hypoxanthine	0.444	0.200	—	—
Distilled Water	0.015	—	—	—

Table 6 Recoveries of inosine in measurement with enzymatic method.

Sample	Measured (UV <sub>290</sub> )	Amount of Inosine (μmole)	Recovered (μmole)	Recovery (%)
Kalsuwonus Pelamis	0.487	0.219	—	—
Kalsuwonus Pelamis + Inosine	0.949	0.432	0.213	107
Kalsuwonus Pelamis + ADP	0.485	0.218	-0.001	99.5
Kalsuwonus Pelamis + ATP	0.479	0.215	-0.003	98.1
Inosine + ADP	0.435	0.194	0.006	97.0
Inosine + ATP	0.451	0.202	-0.002	100.0
ADP	0.019	0.002	—	—
ATP	0.011	—	—	—
Inosine	0.447	0.200	—	—
Distilled Water	0.015	—	—	—

Table 7 Recoveries of 5-inosinic acid in measurement with enzymatic method.

Sample	Measured (UV <sub>290</sub> )	Amount of Inosine (μmole)	Recovered (μmole)	Recovery (%)
Kalsuwonus Pelamis	0.810	0.360	—	—
Kalsuwonus Pelamis + Inosine	0.995	0.465	0.105	95.0
Kalsuwonus Pelamis + ADP	0.498	0.221	-0.139	61.3
Kalsuwonus Pelamis + ATP	0.708	0.328	-0.032	91.6
5'-IMP + ADP	0.102	0.041	-0.069	20.0
5'-IMP + ATP	0.235	0.105	-0.005	95.4
ADP	0.033	0.009	—	—
ATP	0.030	0.007	—	—
5'-IMP	0.247	0.110	—	—
Distilled Water	0.015	—	—	—

在下において酵素法の回収試験を行った結果、Table 5, 6, 7のごとくである。

5'ヌクレオチダーゼで5'-IMPをイノシンに分解する時ヌクレオチダーゼがADPのために阻害され回収率が悪くなっているがキサンチンオキシダーゼ、ヌクレオシドホスホリラーゼについてはADPの影響は殆どみられなかった。

3・3 水産物中のヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸含有量 前項までにカラム法、酵素法について測定の吟味を行った。その結果ほぼ満足な測定ができることが明らかになったので水産物の過塩素酸抽出物についてカラム法、酵素法にてヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸を測定した結果はTable 8のごとくである。

Table 8 Amounts of individual nucleotide in perchloric acid extracts of some kinds of sea foods.

	Hypoxanthine		Inosine		5-IMP		K Value
	Enzymatic method	Column method	Enzymatic method	Column method	Enzymatic method	Column method	
Hypophthalmichthys Molitrix	0.27	0.23	0.46	0.48	3.4	3.5	19.1
Cololabis Saira	0.63	0.61	0.88	1.02	5.1	5.2	33.3
Peneumalophours Japonicus	0.48	0.41	2.04	2.13	3.63	3.5	40.4
Trachurus Japonicus	0.43	0.38	1.20	1.21	4.14	4.01	31.1

サバ、サンマ、アジはヒポキサンチン量が多く、それから計算したK値から見ても鮮度が劣っていることが明らかに認められた。ハクレンは即殺したために、イノシン酸、ATP、ADPが多く、鮮度としては非常に良いと考えられる。カラム法と酵素法では、誤差範囲にあまり差はなかった。

3・4 塩基性窒素とヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸との比較 前項で報告した様にヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸含量より鮮度の判定を行ったが、従来の鮮度の指標とされている揮発性塩基窒素 (V

Table 9 Hypoxanthine, Inosine, 5-IMP and VB-N formation in sea foods.

	Hypoxanthine	Inosine	5-IMP	VB-N
Hypophthalmichthys-Molitrix	0.24	0.46	3.5	9.81
Trachurus Japonicus	0.41	2.04	3.5	21.63
Cololabis Saira	0.61	0.88	5.2	13.94

B-N)と比較を行った結果Table 9の如くである。

この結果からもハクレンについては鮮度が非常に良いことがわかるがサンマ、サバについて大分鮮度が悪いことが明らかになった。揮発性塩基窒素とヒポキサンチン等の関係については、今後検討したい。

三種の酵素の混合の場合、他の核酸系物質の阻害が考えられるが、ヌクレオチダーゼがADPにより阻害を受けることが認められた。他の酵素については、ほとんどADPによる阻害は受けなかった。

#### 4. 考 察

淡水魚のハクレンについて核酸系成分を分析した結果、サンマ、マグロ<sup>9)</sup>等とヌクレオチドパターンはあまり変わらないことが明らかになった。即殺のために ATP, ADP, 5'-AMP が多くヒポキサンチン、イノシン等は、少なかった。ヌクレオシド塩基類の分析法について Dowex 1×2 を用うるカラムクロマトグラム法では齋藤<sup>8)</sup>, Cohn<sup>9)</sup> らの報告とほぼ一致した結果を得た。またイノシン酸、イノシン、ヒポキサンチンの個々の分析のためにキサンチンオキシダーゼ、ヌクレオシドホスホリラーゼ、ヌクレオチダーゼを用うる酵素法について吟味検討した結果 Kalkor<sup>9)</sup>らの標品での報告と良く一致した。又カラム法と酵素法との比較についてもあまり差はなかった。

## 5. 要 約

ヒポキサンチン、イノシン、イノシン酸等の核酸成分はカラム法、酵素法によって測定した。淡水魚のハクレンのヌクレオチドパターンは、ATP, ADP, 5'-IMP が主体であった。酵素法での3種の酵素に対する核酸系成分の阻害性については、ADPがヌクレオチダーゼの作用を阻害することが明らかになった。他の核酸塩基へのキサンチンオキシダーゼの作用についてはグアニンにわずかに反応した。

## 文 献

- 1) JONES, N. R : J. Biochem. 66, 5 (1957).
- 2) 齊藤 : 化学 15, 101 (1961). 日水会誌 32, 569 (1957), 29, 168 (1963).
- 3) 中島 : 日農化会誌 35, 803 (1961).
- 4) 藤田 : 日水会誌 25, 147 (1959).
- 5) 藤井 : 日水会誌 32, 410 (1966).
- 6) 毛利 : 醸酵工誌 43, 35, 909 (1965).
- 7) 溝原 : 原色日本魚類図鑑 (1965).
- 8) COHN, W. E : J. Biol. chem. 285, 1488 (1960).
- 9) KALCHOR, H. M : J. Biol. chem, 167, 429, 445 (1947).