

継続事業（研究開発事業）報告書

魚肉中のイノシン酸量簡易測定方法の検討

一般社団法人全国すり身協会

目 的

魚のおいしさは、魚肉中のアミノ酸やヌクレオチド類が大きく関与している。特に煮干しや節類の旨味はヌクレオチド中のイノシン酸（IMP）と云われている。魚の旨味であるイノシン酸（IMP）は、運動ためのエネルギーである魚肉中のアデノシン三リン酸（ATP）が酵素的に分解されて、ATP→アデノシン二リン酸（ADP）→アデニル酸（AMP）→IMP→イノシン（Ino）→ヒポキサンチン（Hx）という順に変化していく過程で生成される。この分解の経路はすべての魚で同じであり、一連の反応はイノシン酸の分解速度で決まる。さらに文献（水産学シリーズ4 魚の品質 p87、恒星社厚生閣）によるとATP、ADP、AMPのアデニンヌクレオチドは、漁獲時の苦悶運動により消失し、トロール船上で漁獲直後の生きた魚の筋肉アデニンヌクレオチドは痕跡に過ぎず、ほとんどがイノシン酸であったと記されている。そこで残存するヌクレオチドは、イノシン酸として仮定して測定する。また、魚の鮮度をヌクレオチドのアデノシン三リン酸の分解によるイノシン（Ino）とヒポキサンチン（Hx）の生成量から求めるK値で表すことができる。一方、魚肉中のヌクレオチド類の分析定量方法は、一般には高速液体クロマトグラフィーで測定するが、装置が高額であるため、中小水産加工企業では、設備を持つことが困難である。そこで簡易で安価な測定方法を検討した。

検討結果

水産生物化学・食品学実験書（p263～p267、恒星社厚生閣）の魚肉鮮度の薄層クロマトグラフィーによる簡易迅速判定（斉藤恒行）を参考にECTEOLA-セルロースを用いる簡易測定方法を検討した。

ATP、ADP、AMP、IMPのヌクレオチドはリン酸基を持っているので、ECTEOLA-セルロースに吸着されるがリン酸基のないイノシンとヒポキサンチンは吸着されないので、この差を利用してイノシン酸とK値を測定する方法を種々検討し、下記の方法を見いだした。

挽肉試料を約2~3gを精秤し、沸騰蒸留水（電子レンジで沸騰させると速い）を加えて約50g（精秤）とし、ラップをして時々かき混ぜて10分間放置する。その後挽肉試料を細々に潰して良く均一化し、室温程度に水冷後、No. 5C濾紙で濾過する。最初の濾液20mLを捨てた濾液を試料液とする。この試料液0.5mLと蒸留水10mLを試験管に取り良く混合し、その250nm吸光度(a)をヌクレオチド（ほぼイノシン酸）+イノシン+ヒポキサンチンとする(A $\mu\text{mol/g}$ 挽肉)。さらに吸光度を測定した試料液を試験管に戻し、ECTEOLA-セルロース片をおおよそ0.03g加えて激しく混合して10分間、ヌクレオチドを吸着させ、No. 5C濾紙で濾過する。最初の濾液を2mL捨てた濾液の250nm吸光度(b)からイノシン+ヒポキサンチンを求め(B $\mu\text{mol/g}$ 挽肉)、これを差し引いてイノシン酸量(A-B $\mu\text{mol/g}$ 挽肉)を求める。またイノシン酸の分子量M=348.21から計算してイノシン酸の重量濃度(mg/g挽肉)も求めることができる。さらに、K値(%)は $B \div A \times 100$ 、あるいは、 $250\text{nm吸光度}b \div a \times 100$ で求める。

同じように操作した蒸留水を対照とする。なお、標準物質としてイノシン酸二ナトリウムを用いて検量線を作成する。

イノシン酸検量線：イノシン酸二ナトリウム（99%、Aifa Aesar）M=392.24を105°C24時間乾燥し、0~60nmol/mLとして試験管に取り、吸光度計（島津UV-100-02）で250nmの吸光度から検量線を求める。

$$\text{イノシン酸} (\mu\text{mol/g挽肉}) = \text{係数} \times \text{吸光度} \div \text{試料液中の挽肉重量 (g)}$$

以下に、測定における諸条件を検討した結果を述べる。

1. ECTEOLA-セルロースの調製

実験書に記述されているようにECTEOLA-セルロース市販品は、紫外線を吸収する不純物を含んでいるために、よく洗浄してそれらを除去しなければならない。

実験書によればまず、ECTEOLA-セルロース50~60gをビーカーにとり、2M-NaCl、200mLで

数10分間、マグネットスターラーで攪拌洗浄後、ブッフナー漏斗を使って吸引濾過し、紫外線吸収物質がなくなるまで繰り返し水洗（4～5L）する。次に1M-水酸化ナトリウム、200mLで同様に洗浄し紫外線吸収物質がなくなるまで水洗する。さらに、1M-酢酸、200mLで15分間攪拌後ブッフナー漏斗を使って濾過し水洗して酢酸型とする。なお、測定に使用したセルロースも、同様な処理を行えば繰り返し使用できると指示されている。そこで本方法では、セルロース10gを2M-NaCl、200mLで1時間攪拌し、濾過後、蒸留水200mLで、1～5回洗浄濾過した。その濾液の250nmの吸光度を測定したところ表1に示すように、2回目の水洗浄以降で吸収が見られなかった。

表1 2M-NaCl攪拌洗浄後の水洗回数の影響

| 水洗回数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 蒸留水 |
|----------|-------|---|---|---|---|-----|
| 250nm吸光度 | 0.210 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

次に、1M-水酸化ナトリウム、200mLで1時間攪拌し、濾過後、蒸留水200mLで、1～4回洗浄濾過した。その濾液の250nmの吸光度を測定したところ表2に示すように、2回目の水洗浄以降で吸収が見られなかった。

表2 1M-水酸化ナトリウム攪拌洗浄後の水洗回数の影響

| 水洗回数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 蒸留水 |
|----------|-------|---|---|---|-----|
| 250nm吸光度 | 0.050 | 0 | 0 | 0 | 0 |

さらに、1M-酢酸、200mLで1時間攪拌し、濾過後、蒸留水200mLで、1～4回洗浄濾過した。その濾液の250nmの吸光度を測定したところ表3に示すように、2回目の水洗浄以降で吸収が見られなかった。

表3 1M-酢酸攪拌洗浄後の水洗回数の影響

| 水洗回数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 蒸留水 |
|----------|-------|---|---|---|-----|
| 250nm吸光度 | 0.050 | 0 | 0 | 0 | 0 |

以上の結果から、水洗浄は確実性を取って4回とする。

水洗浄の終了したECTEOLA-セルロースは、厚さ2~3mmの平板状になるように105℃で24時間乾燥し、ハサミで切って使用した。

2. ECTEOLA-セルロースの必要量

続いてECTEOLA-セルロースの必要量を検討した。

0.05mM-IMP、6mLを試験管に取り0~0.023gのECTEOLA-セルロースを加えて試験管ミキサーで時々攪拌し、10分間吸着後、No. 5C濾紙で濾過後、濾液を250nm吸光度を測定した。

表4のとおりECTEOLA-セルロース0.008g~0.023gでは、全て吸着された。

表4 IMPを吸着するECTEOLA-セルロース必要量

| ECTEOLA-セルロース | 蒸留水 | 蒸留水 | 0 | 0.008g | 0.016g | 0.023g |
|---------------|----------|-------|-------|---------|--------|---------|
| | No. 5C濾過 | | | 小葉さじ0.5 | 小葉さじ1 | 小葉さじ1.5 |
| 250nm吸光度 | 0 | 0.020 | 0.540 | 0.020 | 0.020 | 0.020 |

(0.05mM-IMP, 6mL)

次に、InoとHxがECTEOLA-セルロースに吸着しないかを検討した。

0.05mM-Ino、6mLと0.05mM-Hx、6mLについて ECTEOLA-セルロース0.03gで検討した。

表5のように、Inoで1.4%、Hxで1.7%、と僅かの吸着であった。

表5 IMPを吸着するECTEOLA-セルロース必要量

| ECTEOLA-セルロース | 蒸留水 | 蒸留水 | Ino | | Hx | |
|---------------|-----|----------|-------|-------|-------|-------|
| | | No. 5C濾過 | 0g | 0.02g | 0g | 0.02g |
| 250nm吸光度 | 0 | 0.020 | 0.710 | 0.700 | 0.600 | 0.590 |
| | | | 98.6% | | 98.3% | |

(0.05mM-Ino or Hx, 6mL)

3. 魚肉中に含まれる塩の影響

ECTEOLA-セルロースはイオン交換樹脂であり、樹脂の調製にNaClを使うことと、魚肉にも、無機塩が含まれており、特にNaClの影響を調べた。

ヌクレオチドのリン酸基が、ECTEOLA-セルロースに吸着することで樹脂に捕捉されて濾液中に出てこないことがこの方法の原理であるから、陰イオンの影響は大きい。

魚肉中には0.3% (50mM)程度、NaClが含まれている。検討の結果、250倍以上に希釈し、0.2mM以下にすると影響はなくなった。また、ヌクレオチド類 (ATP関連物質) を測定する場合は、一般に過塩素酸溶液 (PCA) を抽出液に使用するが、本方法では、PCAが存在するとECTEOA-セルロースに全く吸着せず、ヌクレオチド類の抽出方法を検討しなければならなかった。

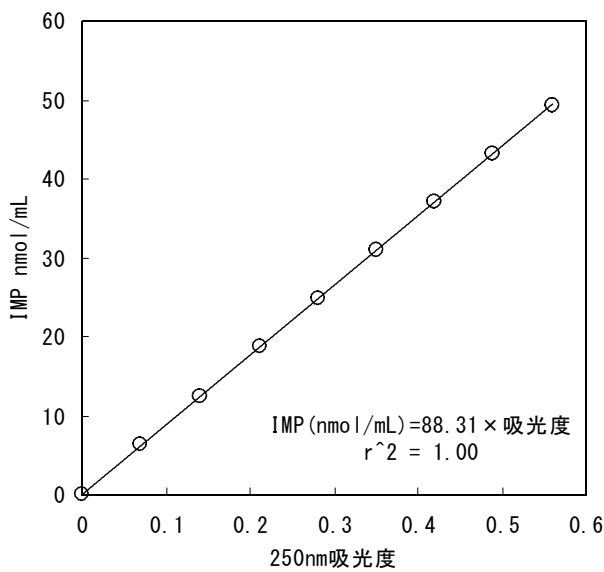
3. 魚肉中からヌクレオチド類の抽出

水産学シリーズ4 魚の品質 (日本水産学会編 1974.4 恒星社厚生閣) の110ページに、加熱してタンパク質を変性させると、アデニンヌクレオチドも抽出されるようになる」と記述されている。そこで魚肉からヌクレオチド類を抽出するため、熱水抽出法を検討した。

熱水を使用することで、ATP等を分解する酵素を失活させ、ATP関連物質を抽出する。挽肉試料を約2~3gを精秤し、沸騰蒸留水 (電子レンジで沸騰させると速い) を加えて約50g (精秤) とし、ラップをして時々かき混ぜて10分間放置する。その後挽肉試料を細々に潰して良く均一化し、室温程度に水冷後、No. 5C濾紙 (直径185mm) で濾過する。最初の濾液20mLを捨てた濾液を試料液とする。この試料液0.5mLと蒸留水10mLを試験管に取り良く混合し、その250nm吸光度 (a) からヌクレオチド (ほぼイノシン酸) + イノシン + ヒポキサンチンを求める ($A \mu\text{mol/g}$ 挽肉)。さらに吸光度を測定した試料液を試験管に戻し、ECTEOA-セルロース片をおおよそ0.03g加えて試験管ミキサーで激しく攪拌し、その後時々攪拌して10分間、ヌクレオチドを吸着させ、No. 5C濾紙 (直径90mm) で濾過する。最初の濾液を2mL捨てた濾液の250nm吸光度 (b) からイノシン + ヒポキサンチンを求め ($B \mu\text{mol/g}$ 挽肉)、これを差し引いて (A-B)、イノシン酸量 ($\mu\text{mol/g}$ 挽肉) とした。これにイノシン酸の分子量 $M=348.21$ を乗してイノシン酸量 (mg/g 挽肉) とする。また、鮮度指標のK値 (%) は $B \div A \times 100$ 、あるいは $b \div a \times 100$ で求めた。

同じように操作した蒸留水を対照とする。なお、標準物質としてイノシン酸二ナトリウムを 105°C 20時間乾燥して検量線を作成した。

検量線の例を図1に示した。



| IMP (nmol/mL) | 250nm吸光度 |
|---------------|----------|
| 0 | 0 |
| 6.25 | 0.070 |
| 12.48 | 0.140 |
| 18.69 | 0.212 |
| 24.87 | 0.282 |
| 31.02 | 0.350 |
| 37.15 | 0.420 |
| 43.26 | 0.490 |
| 49.34 | 0.560 |
| 61.43 | 0.590 |

図1 検量線図

4. 実施例

表5および図2、3に沖合底引き網船で漁獲されたホッケを0℃で貯蔵した場合の結果を示した。一般に各種魚肉中に含まれるアデニンヌクレオチド総量は4~12 $\mu\text{mol/g}$ の範囲にあると多くの文献に記されており、今回の実施例でも、総量として7.3~9.0 $\mu\text{mol/g}$ の範囲にあった。文献によると底引き網で漁獲された魚は、漁獲後速やかにATPはほとんどIMPに分解する。魚肉中の総量は、IMP+Ino+Hxと想定した。0℃貯蔵中にK値は上昇し、すなわちIMPは減少し、Ino+Hxは増加し、総量はほとんど一定であった。本方法で、充分分析に使用できることが判った。

表5 ホッケ漁獲後0°C貯蔵による変化

| 0°C貯蔵 | | 魚肉量 mg/mL | 250nm吸光度 | | K値 % | IMP+Ino+Hx μmol/g | Ino+Hx μmol/g | IMP μmol/g |
|-------|-----|--------------|----------|--------|---------|----------------------|------------------|---------------|
| day | | | セルロース無 | セルロース有 | | | | |
| 0.3 | 硬直中 | 2.038 | 0.188 | 0.035 | 18.6 | 8.15 | 1.52 | 6.63 |
| 0.9 | 解硬中 | 2.072 | 0.210 | 0.049 | 23.3 | 8.95 | 2.09 | 6.86 |
| 1.1 | 解硬中 | 2.560 | 0.252 | 0.060 | 23.8 | 8.69 | 2.07 | 6.62 |
| 1.3 | 解硬中 | 2.773 | 0.270 | 0.068 | 25.2 | 8.60 | 2.17 | 6.43 |
| 2.0 | 解硬後 | 2.743 | 0.265 | 0.090 | 34.0 | 8.53 | 2.90 | 5.63 |
| 2.1 | 解硬後 | 2.094 | 0.208 | 0.065 | 31.3 | 8.77 | 2.74 | 6.03 |
| 2.2 | 解硬後 | 2.484 | 0.217 | 0.070 | 32.3 | 7.71 | 2.49 | 5.23 |
| 3.1 | 軟化 | 3.068 | 0.254 | 0.140 | 55.1 | 7.31 | 4.03 | 3.28 |
| 4.1 | 軟化 | 3.452 | 0.302 | 0.160 | 53.0 | 7.73 | 4.09 | 3.63 |
| 5.2 | 軟化 | 3.347 | 0.297 | 0.202 | 68.0 | 7.84 | 5.33 | 2.51 |
| 6.0 | 軟化 | 2.916 | 0.252 | 0.190 | 75.4 | 7.63 | 5.75 | 1.88 |

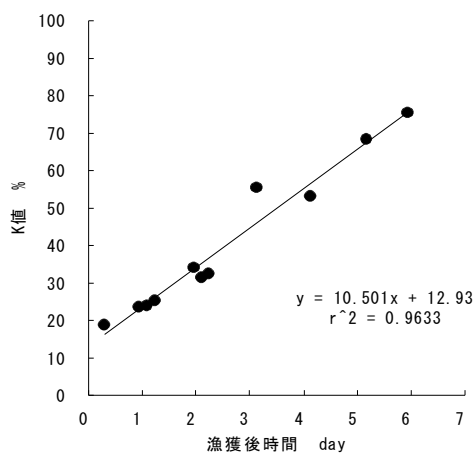


図2 K値の変化

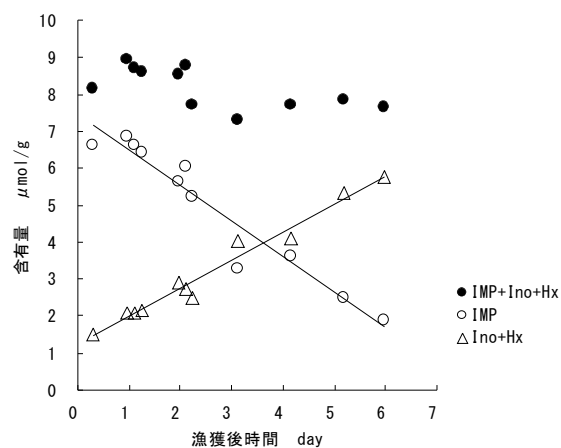


図3 イノシン酸 (IMP) の変化