

低温で貯蔵した鮮魚肉蛋白質の スルフヒドリル基について

金津良一・大橋英敏・田端義明

Protein-bound Sulfhydryls in Fish Meat Stored at 2~5°C

Ryoichi KANAZU, Hidetoshi OHASHI and Yoshiaki TABATA

Mackerels obtained at fish-market and carp obtained alive and killed immediately were stored at 2~5°C, and estimating sulfhydryls (SH) in their meats by SEDLAK's method⁶⁾, the following results were obtained.

1) Of mackerels, all protein-bound SH (PB-SH) showed a decrease throughout the period. However, the decreasing rate was not constant and a rapid decrease was observed at a certain time of the stored period. These tendencies may be thought to differ qualitatively from those of K-values which depend upon ATP break-downs.

2) The facts observed in 1) were nearly the same whether the meat of mackerels was ground or not. But, the decreasing rate in ground meat was the highest at the beginning of the stored period, while the rate in round fish meat was the highest on the 5th day.

3) Of mackerels, free SH (F-SH) that was mainly made up from protein-bound SH reactive to ELLMAN's reagent in water, also decreased similar to PB-SH. But the size of decrease was far less than PB-SH.

4) PB-SH of carp meat showed a considerable increase at 12 th hour of the death and decreased suddenly, but the decreasing became mild after 24 hrs. F-SH of carp meat also showed some increase at 12 th hour of the death but the size of increase was very small.

魚類貯蔵・加工の方面では、肉蛋白質スルフヒドリル基 (SH) の酸化と魚肉の物理的な性質との関係に関心が見られる。かまぼこのテクスチャーとジスルフィド結合 (SS) との関係^{1,2)} については異論もあるようであるが、関心は冷凍冷蔵の分野^{3,4)}でも示されており、いずれにしてもSH酸化の果す役割を明らかにする必要は認められているものと考えられる。しかし、現在までに明らかにされた所は少ないようである。

研究が進まない最大の原因はSHならびにSSの測定法にあるものと考えられる。蛋白質SHの酸化還元を知るにはまずSHやSS含量を定量する必要があるが、現在の定量法にはこのような研究に適したものが少ない。すなわち多くの定量法⁵⁾が示されているが、貯蔵・加工の研究では常用的に行なえるものでなければならない。

数年前 SEDLAKら⁶⁾はエルマン試薬⁷⁾を80%メタノール中に働かせることによって、動物組織中の蛋白質に結合しているすべてのSH (PB-SH) を簡単に測定しうることを発表した。この方法を常温以下で用いれば、PB-SH含量の増減をはかることによって酸化還元のおよそを知ることができる。と考える。

著者らは SEDLAK 法を用いて、低温貯蔵中の魚肉について PB-SH 含量の測定を行ない、2、3 の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

実験材料 サバは長崎魚市場より、コイは活魚として養魚場よりそれぞれ入手した。

試薬 0.01M DTNB 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (半井化学)99mgを精製メタノール 25ml にとかし、低温保管。0.2 M トリス緩衝液 Hydroxymethyl aminomethane (半井化学) 24.2 g を蒸留水にとかし、これに0.2M EDTA 2 ナトリウム塩 (EDTA-Na₂) 100mlを加えてから蒸留水で1 ℓとし、1 N塩酸でpH8.2に調整する。低温で保管し1週間以内に更新する。

0.4M トリス緩衝液 上と同様。

0.02M EDTA-Na₂ 特級試薬を用いて調製。

全 SH (T-SH) の測定 魚肉 1 g に20倍容の0.02M EDTA-Na₂ を加えホモゲナイズして検液とする。検液0.5mlを試験管にとり、これに0.2M トリス緩衝液1.5ml, 0.01M DTNB 0.1 ml および精製メタノール 7.9mlを加えて混合し、5分後にろ過し、ろ液について412nmの吸光度を測定する。検液を加えないものおよび DTNB を加えないものについても吸光度を測定して対照とする。吸光度の測定はおよそ15分以内に行なう。

非蛋白質SH (NP-SH)の測定 T-SH 測定に用いたホモジネート 5 ml に 10% トリクロル酢酸 5 ml を加えて混合し、10分後にろ過し、ろ液 2 ml に0.4M トリス緩衝液 4 ml と0.01M DTNB 0.1ml を加えて混合し、5分以内に412nmの吸光度を測定する。検液を加えないものについても吸光度を測定して対照とする。

PB-SH 含量の算出 SHとの反応により生じたチオニトロフェニレート・アニオンの分子吸光係数を $13,100\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とし、T-SH および NP-SH の含量を魚肉100 g 中に含まれるSH のmMとして計算し、両者の差より PB-SH 含量を算出する。

遊離 SH (F-SH) の測定 魚肉 1 g に20倍容の水を加えてホモゲナイズし検液とする。検液 1 ml に0.2M トリス緩衝液 2 ml, 0.01M DTNB 0.1ml および水6.9mlを加えて混合し、5分後にろ過し、15分以内に412nmの吸光度を測定する。検液を加えないものおよび DTNB を加えないものについても吸光度を測定し対照とする。

K値の測定 内山法⁸⁾による。

実 験 結 果

既知濃度のメルカプト・エタノール、還元型グルタチオン、システインおよびリゾチム (ナトリウム・ボロハイドライド NaBH₄ で還元した) の各溶液についてSH含量を調べた結果、いずれも実測値とほぼ一致した。

サバおよびコイの筋肉ホモジネートについて T-SH および NP-SH を測定した値およびこれらより算出した PB-SH 含量の2、3例を Table 1 に示す。

表にみられるように、測定値の偏差はサンプルによってかなり異なっており、この表に示した値より大きい場合もみられた。偏差の原因は主としてホモゲナイズの精粗によるものと考えられるが、間接的には魚肉の鮮度が関係するよう思われた。

Table 1. Optical densities of total sulfhydryls (T-SH) and non-protein sulfhydryls (NP-SH) in fish meat determined by SEDLAK's method⁶⁾, and calculated total protein-bound sulfhydryls (PB-SH).

Sample	Optical densities of homogenates*		PB-SH calculated mM/100g of muscle
	T-SH	NP-SH	
Mackerel muscle 1	0.566 ± 0.002	0.157 ± 0.001	1.61 ± 0.01
" " 2	0.524 ± 0.009	0.087 ± 0.000	1.53 ± 0.03
Carp muscle 1	0.457 ± 0.003	0.085 ± 0.002	1.33 ± 0.01
" " 2	0.467 ± 0.014	0.045 ± 0.003	1.40 ± 0.05

* Obtained by homogenizing 1g of meat with 20ml of 0.02M DETA-Na₂ solution by a glass tool.

魚肉をホモゲナイズする場合に、0.02M EDTA-Na₂ のほか0.02M EDTA-Na₂ の8M尿素溶液および0.02M EDTA-Na₂ の0.5%ドデシル・硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を用い、各モジネートについて、SEDLAK 法による測定を行なった結果、相互に近い値を得た。

また、魚肉をpH8.2の8M尿素溶液でホモゲナイズしたものを直接 DTNB で発色させSH含量を測定したところ、つねに SEDLAK 法によるものよりも低い値となった。

2~5°Cに貯蔵したサバすり身のSH サバの普通肉を採取して、ひき肉後播潰し、一定量ずつを大型シャーレにとり2~5°Cに貯蔵した。貯蔵後一定時間ごとに肉塊の一定部分より試料をとり、T-SH, NP-SH, F-SH およびK値を測定した。SHに関する測定は同一モジネートについて各3回行ない、その平均値より PB-SH および F-SH 含量を算出した。Fig. 1 に PB-SH, F-SH 含量およびK値の貯蔵日数による変化を示す。

図にみられるように、F-SH に比べて PB-SH の変化は大きく、特に貯蔵後3日間に当初の約1/2の減少をみた。K値はこの間に0%より47%に上昇した。

全魚体のままで2~5°Cに貯蔵したサバ肉のSH ほぼ同大のサバを無処理で2~5°Cに貯

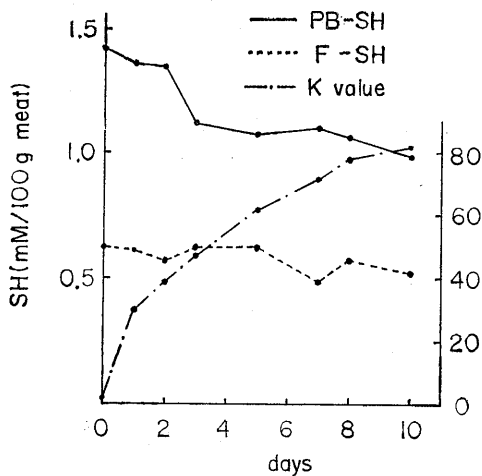


Fig. 1. Changes of total protein-bound SH (PB-SH), free SH (F-SH) and K-values in ground meat of mackerels stored at 2~5°C.

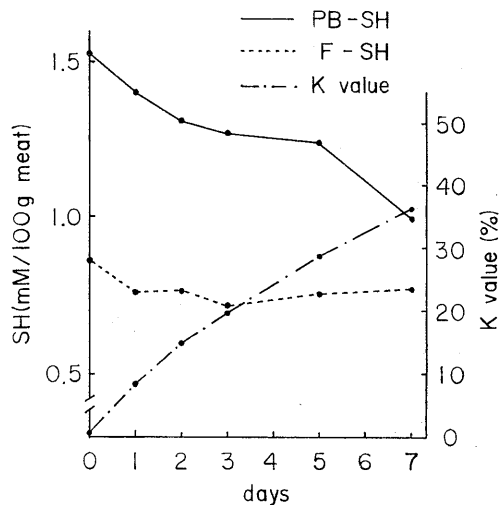


Fig. 2. Changes of PB-SH, F-SH and K-values in round fish meat of mackerels stored at 2~5°C.

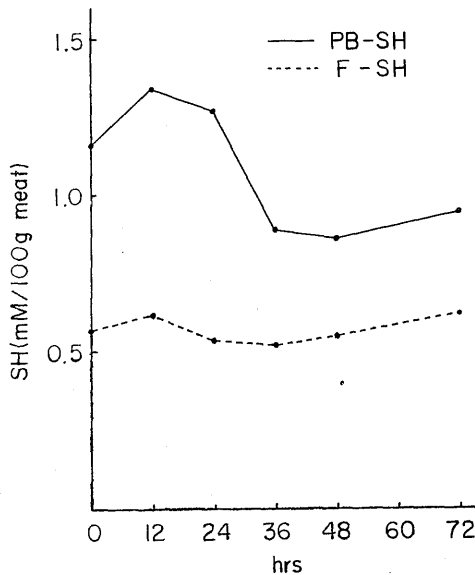


Fig. 3. Changes of PB-SH and F-SH in carp meat stored at 2~5°C immediately after slaughter.

即殺直後の SH 含量は 5 尾の平均値を示した。

図にみられるように、即殺12時間後の PB-SH 含量は当初の $\frac{1}{2}$ ほどの増加を示し、F-SH 含量についても12時間後やや増加の傾向がみられる。同一魚体の各半身についての比較においても、12時間および24時間後の PB-SH の含量は即殺直後の含量よりも大きかった。

考 察

測定法の検討 前文で述べたように、SEDLAK らによる PB-SH の測定は動物組織を対象としたものであるが、他の測定法による実験の裏付けを欠いているので、この方法によって果して PB-SH の含量を測定しうるものかどうか、この点がやはり問題であろう。

原報では種々の純粋蛋白質溶液について PB-SH を測定して既往の文献値と比較し、ほぼ一致することを示しているので可溶性した蛋白質の PB-SH はすべてこの方法によって測定しうるものとする。

Table 1 に示したように、魚肉ホモジネートにおける T-SH および NP-SH 含量の測定にやや再現性を欠く場合もあるが、ホモゲナイズを十分に行なうことによってこの点は改良しうるものとする。

8 M 尿素溶液や SDS 溶液などを加えてホモジネートの可溶性を高めても測定値に変化がなく、また 8 M 尿素溶液によるホモジネートについて直接 SH の測定を行なった場合の SH 含量が、つねに SEDLAK 法で測定したものより低い値であること等より、SEDLAK 法による測定値は最高値を示すものであり、従ってこの方法によって PB-SH 含量の測定が可能であると一応判断した。もちろん十分な検討でないので今後さらに検討する必要がある。

2~5°C に貯蔵したサバ肉の SH 長崎魚市場で入手し得るサバには K 値 0% のものがしばしば見受けられるが、しかし、入手した時点では既に死後硬直期を経過しているものと思われる。

蔵し、一定時間毎に12尾ずつを取り出し、魚体の一定部分より普通肉を採取してホモゲナイズし、SH および K 値を測定した。Fig. 2 に PB-SH, F-SH 含量および K 値の貯蔵日数による変化を示す。

F-SH に比べて PB-SH の変化が著しいことはすり身同様であるが、貯蔵5日後より7日目までの変化が早く、この間当初の約 $\frac{1}{2}$ の減少をみた。K 値は 0% より 35% に上昇した。

即殺後 2~5°C に貯蔵したコイ肉の SH
ほぼ同大の 5 尾のコイを即殺後 3 枚におろし、各半身の一定部分より採肉したものすべてについて、ただちに SH を測定し、他の半身はすべて 2~5°C に貯蔵し、12 時間ごとに 1 半身ずつを取り出してその一定部分より採肉後 SH を測定した。Fig. 3 に貯蔵時間による PB-SH および F-SH 含量の変化を示す。

このような試料を 0°C 近くで貯蔵した場合には、つねに PB-SH 含量が減少することを Fig. 1, 2 は明示するものとする。また、特に還元的要素のない限り、酸素による酸化で SH が減少することは一応考えられる所でもある。Fig. 2 の全魚体に比べて Fig. 1 のすり身の PB-SH 含量の減少が貯蔵初期に著しい原因は、播漬中に取り入れられた酸素の酸化力が貯蔵初期に働くためと考える。減少速度が変動的で、ある時期に急激な減少を示すことはすり身、全魚体においても同様で、この点は 0°C に貯蔵したマス ミオシンの SH 含量の変化について BUTTKUS^{3,4)} が示した変化曲線に似ている。理由は不明としても、 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ に貯蔵した魚肉の PB-SH 含量の変化の特徴で、K 値の変化とは質的な相違があるように思われる。

上述のような事実から、PB-SH 含量の測定結果が鮮度判定に応用されうることも一応考えられるが、それまでに PB-SH の性質をさらに詳細に検討する必要がある。なお同一魚体では血合肉における PB-SH 含量と普通肉におけるそれとの間には著しい差があり、通常血合肉は普通肉の約 $\frac{1}{2}$ とみられる。これについてはさらに検討したい。

F-SH が検出試薬や測定条件で変化することは周知の事実であり⁹⁾、従って Fig. 1, 2 に示された結果はこの実験条件における F-SH の変化の一例に過ぎない。

Fig. 1, 2 における F-SH 含量の変化の傾向は PB-SH 含量の変化に類似しているが、変化の幅は著しく小さい。F-SH 含量の減少を測定することによって SH の酸化を判定した研究報告¹⁾ も見られるが、やはり特別な条件の場合に限られるものとする。

F-SH の変化が蛋白質の変性によることは勿論であるが、酸化還元による変化が F-SH の変化にどの程度寄与しているかについては、さらに別の実験を必要とする。

ここでは、数回におよぶサバの低温貯蔵試験において、F-SH の変化の傾向が つねに PB-SH の変化に類似していることから、低温貯蔵中のサバ肉においては蛋白質の変性はわずかであった、その間における F-SH の変化には酸化還元の影響が多少ながら反映するものと解釈した。かつて F-SH の変化を魚肉の鮮度判定に応用しようとする試み¹⁰⁾ がなされたが、F-SH の変化には蛋白質の変性の他に酸化還元による変化も考慮する必要があるように思われる。

2~5°C に貯蔵した即殺コイ筋肉の PB-SH この実験は回数が少ないので、今後十分な追試を必要とするが、現在までの実験結果は Fig. 3 に示されたように、即殺後のコイ筋肉の PB-SH 含量は一時的にかなりの増加を示す。

実験結果では、即殺12時間後 PB-SH は最高を示し、24時間後もおお即殺直後より大きい値を示す。野口¹¹⁾によればコイを即殺後 20°C に放置した場合は、約3時間後に死後硬直を開始し20時間後最盛期に達する。従って PB-SH 含量の一時的な増加は死後硬直期に行なわれているものとする。

PB-SH の増加は SS の還元によるものと解釈されるが、種々の報告^{12,13)} にみられるように、死後硬直期の筋肉は還元的状態にあると考えられるので、SS の還元も起こりうるものと思われる。また、SS の還元は蛋白質構造の変化につながるから、魚肉の物理的性質に何らかの変化をもたらすことが考えられる。ただし、製パンにおける SS の増加はパン・テクスチャーの増強につながる¹⁴⁾ から考えれば、SS の還元は死後硬直の物理的性質と逆向きの感じを与える。

死後硬直については、ATP 消失との相関が一般に認められているところであるが^{11,15~19)}、その関係はそれほど単純なものではなく、生体における筋肉収縮のメカニズムをそのまま死後硬直に適用することも無理なようである。このように死後硬直については、なお不明な点が多いので、即殺魚の PB-SH の増加が死後硬直と関係するものであるか否かも一応検討に値するものとする。

常温以下では高温加熱によるSHの分解²⁰⁾は無視しうるので、以上のすべての実験結果に関してPB-SHの変化はほぼ酸化還元によるものとして解釈した。しかし、重金属や脂質分解物²¹⁾等によってマスクされることも考えられるので、SHの酸化還元による変化を十分に理解するにはSS含量を測定することが必要である。著者らも魚肉について、NaBH₄還元にもとづくSS測定法^{20,22)}を検討中である。

要 約

魚市場より入手したサバおよび即殺後のコイを2～5℃に貯蔵し、その間における魚肉のSH含量の変化について調べ、次の結果を得た。

- 1) サバの肉蛋白質に結合するすべてのSH (PB-SH) 含量は貯蔵期間中減少し続けたが、減少速度はある時期に急激で、全体としては変動的であってK値の変化とは質的な相違が見られた。
- 2) 1)に述べた点はサバをすり身とした場合も全魚体のままでもほとんど同様であった。しかし、すり身のPB-SH含量は貯蔵初期に急激な減少を示したが、全魚体のままでは5日後に急激な減少を示した。
- 3) サバ肉についてDTNBによる遊離SH含量の測定を行なった結果は、PB-SH含量と同様な変化の傾向がみられたが、変化の幅がPB-SH含量に比べて著しく小さかった。
- 4) 即殺したコイのPB-SH含量は貯蔵後12時間までかなりの増加を示し、その後急激に減少したのち、緩やかな変化に移行した。遊離SH含量も12時間までやや増加する傾向がみられた。

おわりに、SHに関する文献を御贈与頂いた上野製菓株式会社研究所の松田敏生博士ならびにSHに関してたびたび御意見を頂いた本学部の村松毅助教授に深謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 岡田 稔・中山 正夫：日水誌，27，203～208 (1961)
- 2) 丹羽 栄二・三宅 正人：日水誌，37，884～890 (1971)
- 3) H. BUTTKUS：J. Food Sci., 35, 558～565 (1970)
- 4) H. BUTTKUS：Can. J. Biochem., 49, 97～107 (1970)
- 5) P. C. JOCELYN：Biochemistry of the SH groups, Academic Press, London, 1972, pp. 137～162
- 6) J. SEDLAK and R. H. LINDSAY：Anal. Biochem., 25, 192～205 (1968)
- 7) G. L. ELLMAN：Archiv. Biochem. Biophys., 82, 70～77 (1959)
- 8) 小林 宏・内山 均：東水研報告，61，21～26 (1970)
- 9) K. HOFFMAN and R. HAMM：Fleischwirtschaft, 10, 1125～1129 (1966)
- 10) 森高 次郎・秦 満夫：日水誌，15，407～411 (1949)
- 11) 野口栄三郎：日水研報告，5，1～61 (1949)
- 12) E. M. BARNES and M. INGRAM：J. Sci. Food Agr., 6, 448～455 (1955)
- 13) J. R. BURT and G. D. STROUD：日水誌，32，204～211 (1966)
- 14) L. H. MEYER：Food Chemistry, Reinhold Pub. Co., Philadelphia, Londn (1962) pp. 336～337
- 15) 藤巻 正生・古城 健三：日水誌，19，499～504 (1953)
- 16) 右田 正男：日水誌，27，934～945 (1961)

- 17) A. CANTAROW and B. SCHEPARTZ : *Biochemistry*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, London (1962) pp. 443
- 18) J. R. BURT, N. R. JONES, A. S. MCGILL and G. D. STROUD : *J. Fd. Technol.*, 5, 339~351 (1970)
- 19) 野中順三九・橋本 芳郎・高橋 豊雄・須山三千三 : 水産食品学, 3 訂, 恒星社, 1971 pp. 59~65
- 20) R. HAMM and K. HOFFMAN : *Nature*, 207, 1269~1271 (1965)
- 21) H. BUTTKUS and R. J. BOSE : *J. Am. Oil Chemists Soc.*, 49, 440~443 (1972)
- 22) W. D. BROWN : *Biochem. Biophys. Acta*, 44, 365~367 (1960)