

魚スープストック中の核酸関連物質 およびタンパク質の加熱変化について

田 島 真理子

(1990年10月15日 受理)

Change of Nucleotides and Proteins in Fish Soup Stock by Heating

Mariko TAJIMA

I. 緒 論

日本料理の献立構成において汁物は欠くべからざるものであるが、その多くはだしとしてかつお節や昆布を使用している。かつお節中のだしとしての主成分はイノシン酸を中心とした核酸関連物質であるが、このイノシン酸には旨味成分としての効果があることが広く認められている。一方、潮汁のように魚肉を汁に用いる場合、魚肉中に含まれるアミノ酸および核酸関連物質が溶出することによりあらたにだしを取る必要はない。また、右田ら¹⁾は、“こいこく”の実験においてコラーゲンからのゼラチンの溶出が、汁の味にこくを与えることを報告しており、汁中のアミノ酸をはじめ、低分子ペプチドやタンパク質も味に影響していることが推測される。しかし、これまで魚肉を用いた汁物あるいは煮物における旨味についてはあまり研究されておらず、特に魚種や加熱時間の影響についての検討はなされていない。そこで、魚肉中の核酸関連物質やタンパク質の水中での加熱に伴う変化を白身魚と赤身魚の魚種について検討した。また、核酸関連物質の測定については、近年その利用が進んでいる高速液体クロマトグラフィーを用いることとし、その測定条件についても検討を行った。

II. 実験方法

1. 試 料

魚種は、核酸関連物質の測定においてはイサキとサバの2種を用い、タンパク質に関する実験にはタイ、サバを用いた。試料魚はすべてごく新鮮なものを市場より購入し、直ちに実験室に運び試料調製を行った。実験に使用されるまでの移動間はすべて氷中に保存した。いずれの魚も実験に

あたっては、背肉、腹肉、血合肉に分けて用いた。魚種により、肉の重量、厚み等が異なるため、核酸関連物質の測定にあたっては一部の実験を除き、いずれも細かく切裁し、部位による差異を生じないように混ぜ、これより一定量を秤量して実験に用いた。

2. 核酸関連物質の測定

各試料魚肉は上述の方法で部位ごとに分けて、重量の2倍量の10%過塩素酸を用いて氷冷下で磨砕し、冷却遠心分離法により上清を分離した後、更に5%過塩素酸により2回抽出を行い、得られた全上清液を水酸化カリウムで中和し、遠心分離により上清区分を集め、更に沈澱を少量の蒸留水で2回洗浄し、この洗浄液も先の上清区分に加えて魚肉抽出試料とした。

魚肉スープについては、スープを日本ミリポア工業製遠心ろ過チューブウルトラフリーC3GCでろ過して分子量10,000以上のタンパク質を除去したのち測定用試料とした。

核酸関連物質の測定には高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) を用いた。HPLC関連機器は東洋曹達工業製のCCPMコンピューターコントロールポンプ、UV-8000紫外可視検出器 (260nm) を用い、データ処理はSIC社のChromatocorder12を使用した。分離カラムは東洋曹達工業製の逆相クロマトグラフィー用タイプの中からODS-120T 4.6×150mmを用い、カラム温度は室温とし、流速は0.8ml/minとした。

核酸関連物質の分離条件設定のための標準物質としては、アデノシン三リン酸 (ATP)、アデノシン二リン酸 (ADP)、アデノシン一リン酸 (AMP)、イノシン酸 (IMP)、イノシン (H_xR)、ヒポキサンチン (H_x) の6種 (いずれも半井薬品) を用いた。

3. タンパク質の定量および電気泳動による分析

魚スープストック中に溶解しているタンパク質量はGornallら²⁾のビュレット法により測定した。また、溶出タンパク質の分析にはWaberら³⁾のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を一部改変して用いた。電気泳動用試料はトラッキング・ダイ溶液 (2-メルカプトエタノール1.33ml, 0.4%ブロムフェノールブルー0.30ml, 13.1%SDS-150mMリン酸緩衝液 (pH7.0)1.64ml, グリセリン0.83mlの混液) 1容量に対して試料溶液2容量の割合で混和した後、沸騰湯浴中で10分間加熱して調製した。アクリルアミドゲルはアクリルアミド7.5%に調製し、泳動用緩衝液は0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.0とした。泳動後、ゲル中のバンドは、明日香工業製デンシトメーターOZ802を用いて移動度を測定し、標準物質により分子量を算出した。

4. 低分子物質の測定

魚スープストックに同量の5%トリクロル酢酸 (TCA) を加えて混和し、タンパク質を変性させた後、3000rpmで15分間遠心分離を行い、上清液を得た。この除タンパク質液をLowry法⁴⁾により定量して、フェノール試薬陽性物質質量を算出した。なお、検量線はチロシンにより求めた。

Ⅲ. 結果及び考案

1. HPLCによる核酸関連物質量の測定条件

先に述べたように魚肉は有力な旨味成分であるIMPを含むが、このIMPは、死後ATPからADP, AMPを経て生産され、さらにHxR, Hxに分解される。ATP, AMPは単独では旨味を示さないが、グルタミン酸との相乗効果を持つ一方、HxRは苦味を持つことが真部ら⁵⁾によって報告されている。富岡ら⁶⁾は魚肉中でのIMPの分解は5'-ヌクレオチダーゼ、フォスファターゼが関与しており、魚種によってその活性が異なることを報告しているが、魚のIMPについて検討するとき、その生成から分解にいたるATPからHxまでの把握が重要である。これまで、これらの分離測定には、分離に長時間を要する液体クロマトグラフィー法、移動相に濃度勾配を必要とするHPLCによる方法⁶⁾などが行われているが、より単純な装置で短時間の分離測定を可能とすることは、IMPを中心とする一連の核酸関連物質に関する研究を迅速にすることができる。そこでHPLCを用いて、ATPからHxまでの6種の核酸関連物質を同時に短時間に測定することを目的に分離測定条件の検討を行った。

HPLCの分離条件の設定にあたっては、先に示したようにカラムはTSKゲルODS-120Tを用い、移動相は、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.4) / アセトニトリル (v/v) を99/1, 98/2, 97/3の3段階に変えて6種の標準物質の分離を試みた。その結果、99/1の溶液で最も良好な分離が得られ、98/2, 97/3ではADPとIMPが十分に分離されなかった。99/1での分離パターンを図1に示す。この結果、6種の核酸関連物質を単一の分離相を用いて25分以内に分離することが可能になった。

次に上記の条件での各核酸関連物質の定量性について検討した。図2にIMPでの定量結果を示す。IMPはカラム添加量0.2 μ gから1.6 μ gの範囲で、ピーク面積との間に直線関係を示した。他の核酸関連物質についても、図は省略したが、IMPと同様に直線関係を示し、本実験条件で定量的測定が可能であることがわかった。

以上の結果から、以後の核酸関連物質の測定には、上述の条件を使用した。

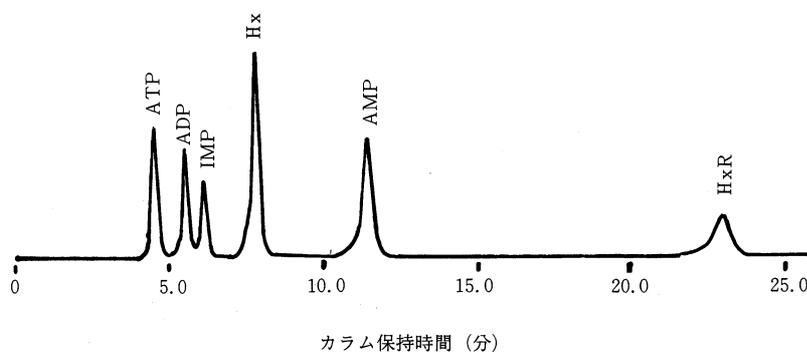


図1. ATP, ADP, AMP, IMP, HxR, HxのHPLCによる分離パターン

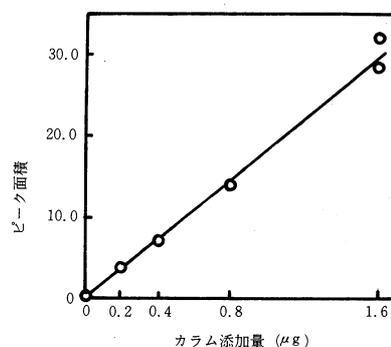


図2. IMP添加量とピーク面積との関係

2. 魚肉およびスープストック中の核酸関連物質について

白身魚としてイサキを、赤身魚としてサバを用いて、魚肉の水中での加熱時間に伴う核酸関連物質の変化について調べた。表1に示すように、未加熱の魚肉中に含まれる核酸関連物質の総量はイサキで7.62 $\mu\text{mole/g}$ 、サバで9.36 $\mu\text{mole/g}$ で、味の中核となるIMPはイサキで約80%、サバで約70%含まれていた。内山ら⁷⁾は魚肉のヌクレオチド含量は5~10 $\mu\text{mole/g}$ に分布していることが多く、サバ、ブリなどの赤身魚では10 $\mu\text{mole/g}$ 以上を示すものがあると述べているが、本実験でもATPからIMPまでのヌクレオチド含量はこの範囲内であった(イサキ6.65 $\mu\text{mole/g}$ 、サバ7.04 $\mu\text{mole/g}$)。また、魚の鮮度判定法としてしばしばK値が用いられるが、K値は以下の式により求められる。

$$K \text{ 値} = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100 (\%)$$

実験に使用したイサキのK値は12.7%で、サバでは24.8%であった。一般にK値は、即殺魚で10%以下、すし種になるような生鮮魚で20%付近に集中しており、小売店で惣菜用に売られている魚では40%以上の値を示すことが報告されている⁷⁾が、本実験に使用した魚は両者とも鮮度のよいものであることがわかる。これらの魚肉を使って汁を作る場合に、魚肉からスープストックへ核酸関連物質がどの程度移行するかを調べるために加熱された魚肉とストック中の核酸関連物質について調べた。魚肉は背肉と腹肉に分け、さらにそれぞれを頭に近い部分から前・中・後の3部分に分けて各部分から同一量ずつを取り部位による違いがないように配慮して、沸騰水中で加熱した。

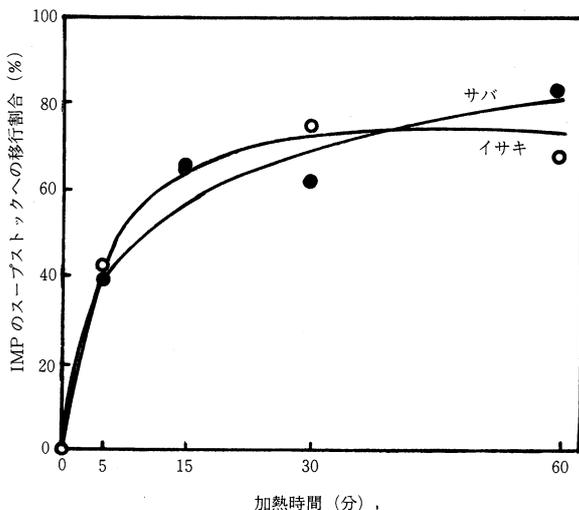


図3. 加熱時間に伴うIMPの魚肉からスープストックへの移行割合の変化

表1. 魚肉1g中の核酸関連物質

	イサキ $\mu\text{mole/g}(\%)$	サバ $\mu\text{mole/g}(\%)$
ATP	0.08 (1.0)	0.07 (0.7)
ADP	0.51 (6.7)	0.42 (4.5)
AMP	0.09 (1.2)	0.07 (0.7)
IMP	5.97 (78.3)	6.48 (69.2)
HxR	0.03 (0.4)	1.36 (14.5)
Hx	0.94 (12.3)	0.96 (10.3)
総量	7.62	9.36

沸騰水中で加熱した。IMPの魚肉から煮汁への移行割合を図3に示す。イサキ、サバともに加熱5分まで煮汁への溶出が急激に増加し、加熱15分までに約60%前後のIMPが移行している。本実験では部位による差を生じないように魚肉を細切して用いたが、この場合通常の魚の汁物などの加熱時間では旨味の主体であるIMPはその約2/3が汁に移行することがわかる。

次に、魚の部位による加熱15分でのIMPの煮汁への溶出割合の違いを表2に示す。この実

験においては部位での差をみるため、魚を背側、腹側に分け、さらにそれぞれを頭の方から前・中・後の3つに分けて6部位の切り身にして加熱した。各切り身は重量を測定し、魚肉1gあたりのIMP量に換算した。切り身で加熱した場合のストックへの溶出は15分加熱で40%前後であり、先の細切の場合の60

表2. 魚肉，煮汁中の部位別IMP量と煮汁への移行割合

魚種	部位	背			腹			平均
		前	中	後	前	中	後	
イサキ	魚肉 (%)	3.57 (51.2)	4.24 (55.7)	2.67 (42.3)	3.16 (48.9)	5.91 (62.5)	3.16 (53.0)	3.79 (53.2)
	煮汁 (%)	3.40 (48.8)	3.37 (44.3)	3.64 (57.7)	3.30 (51.1)	3.55 (37.5)	2.80 (47.0)	3.34 (46.8)
	総量	6.97	7.61	6.31	6.46	9.46	5.96	7.13
サバ	魚肉 (%)	2.49 (60.0)	3.51 (69.2)	0.42 (17.1)	2.95 (69.6)	4.86 (70.9)	2.71 (59.7)	2.82 (63.3)
	煮汁 (%)	1.66 (40.0)	1.56 (30.8)	2.04 (82.9)	1.29 (30.4)	1.42 (29.1)	1.83 (40.3)	1.63 (36.7)
	総量	4.15	5.07	2.46	4.24	6.28	4.54	4.45

%は総量に対する割合を示す

%前後に比べてやはり低い値を示したが、切り身の場合でも40%前後と加熱によるIMPの移行は大きく、汁の味にIMPが貢献していることがわかる。また、部位別のIMP総量を見ると、イサキもサバも、背・腹ともに中部分が多く、この部位が旨味を多くもつことが推測された。

加熱に伴うHxRおよびHx量の変化についてK値で見ると図4に示すように経時的に増加していた。しかし、このIMPを中心とするヌクレオチドの加熱によるHxR、Hxへの変化は通常の汁物の調理時間ではあまり大きくないと推測される。

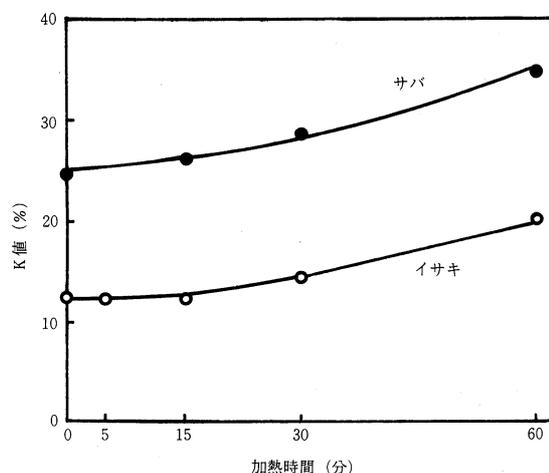


図4. 加熱時間に伴うK値の変化

3. 魚肉からスープへの溶出タンパク質量

魚肉スープの旨味の主体はIMPであるが、その他にうろこ、骨、皮に多く含まれるコラーゲンが加熱によりゼラチン化して汁に溶出し、これが汁の味にこくを与えると右田ら¹⁾は報告している。一方、魚肉中の筋漿タンパク質を主とする水溶性タンパク質は汁に溶出し多くはあくへ移行する^{8) 9)}が、一部変性タンパク質は汁中に分散して汁を濁らせる原因となったり、あるいは溶解したままのタンパク質は汁の旨味を補強する役割を持つと言われる。このように魚肉スープにおける魚肉からのタンパク質の溶出は功罪両面で汁の味・外観に関与する。そこで魚肉、骨、皮からのタンパク質、および、更に味に関与するアミノ酸、ペプチド等の低分子物質の溶出について検討した。魚種は白身魚としてタイを、赤身魚としてサバを用いた。まず、溶出タンパク質量については、図5に見られるようにいずれの使用部位においてもタイの溶出タンパク質量がサバに比べて多かった。また、使用部位による明らかな差異が見られ、魚肉によって調製したスープストックより骨によるものが溶出タンパク質量は多く、更に皮を使用した場合、加熱15分における溶出タンパク質量は、タイで

は魚肉の約10倍、骨の約4倍、サバの場合で、魚肉の約3.5倍、骨の約1.3倍と非常に高い値を示した。魚の汁物、スープを調製する場合、しばしば骨、皮を付けて調製されるが、本実験の結果はその合理性を裏付けている。骨、皮でタンパク質の溶出が多いのはコラーゲンのゼラチン化による溶出によるものと推定される。ストック中に溶出したタンパク質のSDS-PAGEパターンを図6に示す。タイ、サバともに魚肉から調製したストックでは分子量40,000ダルトンのタンパク質が多く存在するが、骨、皮から調製されたストックでは、100,000ダルトンおよび200,000ダルトンのタンパク質が主体である。この分子量はコラーゲンの α および β 成分の分子量100,000ダルトン、200,000ダルトンに一致する。したがって図6の結果は、骨、皮より調製されたスープストック中の主成分はコラーゲンから生じたゼラチンであることが推測されるが、本実験においてはコラーゲンの定量は行っていないので今後更に検討を加える必要がある。

次に、スープストック中の低分子物質質量についての結果を図7に示す。低分子物質質量はストック中のタンパク質をTCAにより除去した上清液中のフェノール試薬陽

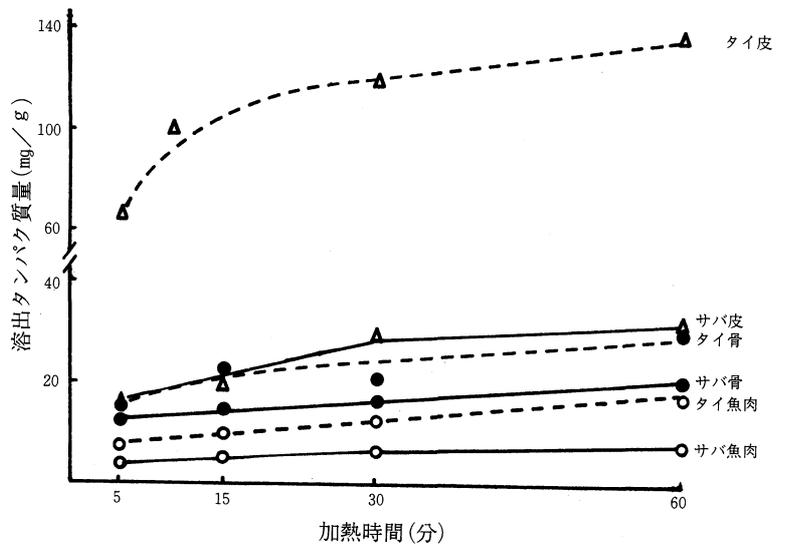


図5. 魚種および使用部位による溶出タンパク質量の経時変化

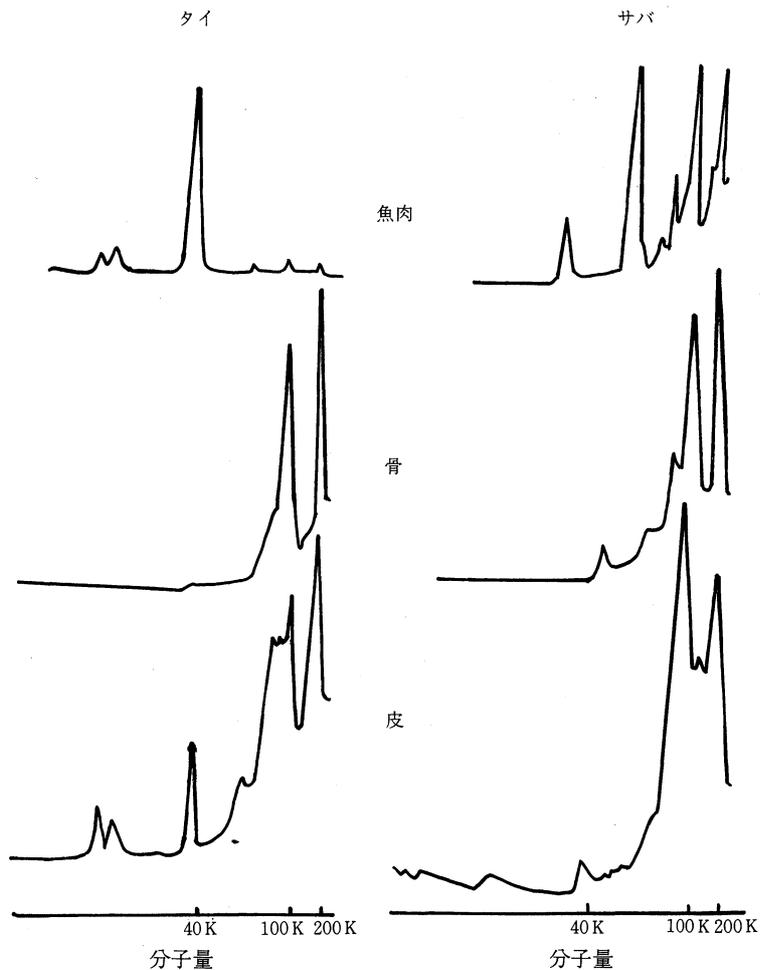


図6. タイ、サバの各部位より調製されたスープストック中の溶出タンパク質のSDS-PAGEパターン
加熱：15分

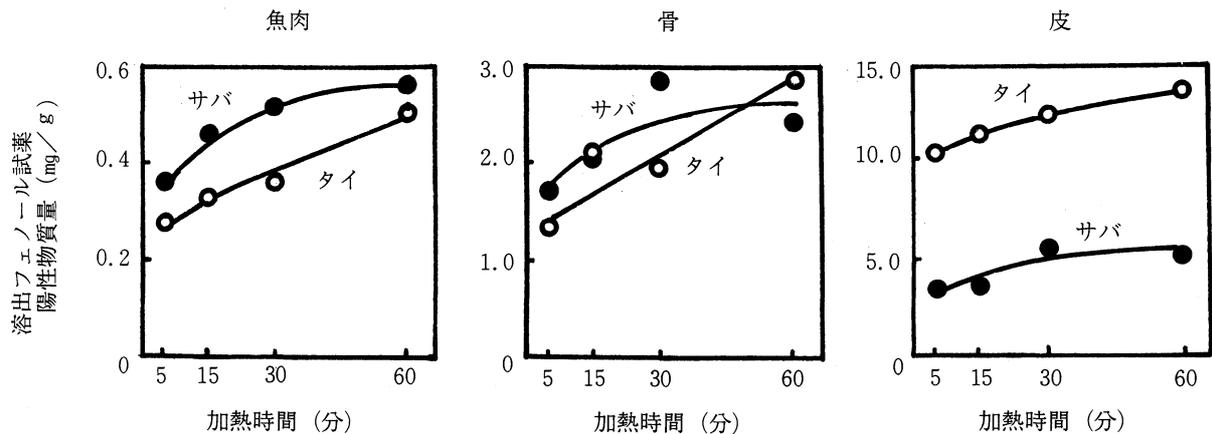


図7. 魚種および使用部位による低分子物質量の経時変化

性物質で示した。これも先のタンパク質量と同様に、魚肉、骨、皮の順に低分子物質量が増加した。また、タイの皮では、サバの約2倍量の溶出が見られ、皮を含めてストックを調製することは、汁に低分子のペプチドやアミノ酸を多く溶出させることが確かめられた。これらの低分子物質は、IMPを中心とする旨味の補強効果をもつため、それらの増加は汁物、スープストックの味に貢献するものと思われる。

VI. 要 約

魚を用いてスープストックを調製する場合のIMPを中心とする核酸関連物質、タンパク質、およびアミノ酸などの低分子物質の魚種、加熱時間による変化について検討し、次のような結果を得た。

1. ATPからHxまでの核酸関連物質に占めるIMPの割合は白身魚のイサキが赤身魚のサバに比べて高かった。
2. IMPのストックへの溶出割合は、加熱15分まで速やかに増加し、その後はゆるやかであった。
3. IMPからHxR, Hxへの変化は、加熱15分まではほとんど見られなかった。
4. 魚の各部分からストックへのタンパク質の溶出は、皮からの溶出が最も多く、次いで骨、魚肉であった。特にタイ皮からのタンパク質の溶出量が多かった。
5. また、溶出タンパク質についてのSDS-PAGEパターンから、魚肉からの溶出タンパク質は分子量40,000ダルトンのタンパク質が主であるのに対して、骨、皮からの場合100,000, 200,000ダルトンのタンパク質が主であった。
6. ストック中への低分子物質の溶出も皮で最も多く、次いで骨、魚肉の順であった。

終わりに、本研究に御協力いただいた有馬由美、永野美和子、北村希美、中間美紀子の諸氏に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 右田正男；調理科学 **2**, 42 (1969)
- 2) Gornall, A. G., et al. ; J. Biol. Chem. **177**, 751 (1949)
- 3) Weber, K. and Osborn, M. ; J. Biol. Sci. **244**, 4406 (1969)
- 4) Lowry, O. H., et al. ; J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)
- 5) 真部真里子, 的場輝佳, 長谷川喜代三；日本家政学会第42回大会発表要旨 pp94 (1990)
- 6) 富岡和子, 遠藤金次；調理科学 **19**, 289 (1986)
- 7) 内山 均, 江平重男, 小林 宏, 清水 亘；日本水産学会誌 **36**, 177 (1970)
- 8) 田島真理子, 三橋富子, 妻鹿絢子, 矢野淳子, 荒川信彦；家政学雑誌 **35**, 161 (1984)
- 9) 田島真理子, 三橋富子, 妻鹿絢子, 荒川信彦；日本家政学会誌 **40**, 121 (1989)