

魚肉の鮮度低下に伴う遊離チロシン量の変化について—II

キサントプロテイン反応によるチロシン値の測定

太田冬雄・西元諄一

On the Variation of Free-Tyrosine Content of
Fish Meat in Decrease of its Freshness - II

Estimation of Tyrosine Value under
Application of Xanthoproteic Reaction

Fuyuo OTA and Jun'ichi NISHIMOTO

緒 言

先に筆者らは、魚介肉中の遊離チロシン量を対象としてその鮮度低下に伴う変化をアンモニア量との関係に於て試験し、所謂チロシン値によれば初期腐敗以前の鮮度の差異は却つてアンモニア量によるよりも明瞭で、然もその初期腐敗に対する相当量も魚種を通じて殆ど一定の値をとることから、鮮度判定としてのチロシン値の測定は、肉質の状態特に肉蛋白の分解度を知る意味で、有力な根拠となり得ることを推論した¹⁾。

然し乍ら、上述のチロシン値の測定は、フェノール試薬を用いる比色法に依つたものであつて、方法は簡易であるが、試薬そのものはチロシンに特有ではなく外にトリプトファン、システイン等のアミノ酸、或はフェノール類、スルホヒドリル化合物その他の還元性物質、又僅か乍らトリメチルアミン等によつても呈色することが知られているから²⁾³⁾、実際にはチロシン値といつても、大部分はチロシンではあろうが他の物質の値も含まれているわけで、従つて肉蛋白の分解度を示すという点では、問題がある様に思われる。勿論この値は、これなりに鮮度判定の指標となり得れば充分意義はあるわけであるが、この値のどの程度が蛋白の分解度を示すものであるかは一応明らかにすべきものと思われるし、出来れば肉蛋白の分解度を主体とする鮮度判定という意味でチロシンに対して、より特異的でも簡易な方法が考えられてよいかと思われる。

即ち本実験では、この様な目的の為の一つの試みとして、チロシンに対する呈色反応として知られているキサントプロテイン反応の応用を計つたのである。勿論この反応もチロシンに特有なものではないが、フェノール試薬の場合よりは反応範囲が狭く、且つ試薬、操作等においても簡易に適用できると考えられたからである。以下其の概要とフェノール試薬に依つた定量値との比較結果について述べる。

実 験

I. 測定方法

試薬：三塩化醋酸 10% (W/V). 硝酸 1:1 (V/V). 苛性ソーダ 30% (W/V).

操作： 魚肉浸出液 (1:10) の 10 cc. に三塩化醋酸 2 cc. を加えて濾過し、その濾液の 5 cc. を大型の試験管に採り、之に硝酸 5 cc. を加えて混和、沸騰湯浴中で5分間加熱する。冷却後之に苛性ソーダ 6.5 cc. 加えて呈色せしめ、再び冷却の後比色する。

II. 測定条件の検討

硝酸の濃度： キサントプロテイン反応の主体はいうまでもなく、ベンゾール核のニトロ化で一般にこの為濃硝酸を用いているが、定量法としての濃硝酸の使用はその安定性に難点がある様に考えられたので先ず之について吟味した。即ち濃硝酸、及びこの 1:1, 1:2 稀釈液を用いて、調製使用後の時間的な影響を見たが (Table 1), 予想された様に濃硝酸による場合の定量値は不定で、他は殆ど全く一定であつた。この濃硝酸の場合の値の不定は、主として温度に影響されるのではないかと考え、調製後冷所に貯蔵する方法をとつて見たが、同様一定の値は得られなかつた。従つて硝酸は 1:1, 又はそれ以下の濃度のものが適当と考えられた。尤も余り稀釈が過ぎると、呈色度が稀薄となるので上記の程度を採用した。尚同一稀釈率のものでもメーカーを異にするものでは呈色度を異にするから (Table 2), 新しく調製した硝酸を用いる場合にはその都度標準曲線を作成すべきである。尚又硝酸の安定性を計る目的で、硝酸アルカリと濃硫酸を使用した場合の適否について試験したが、良好な結果が得られた。

Table 1. Effect of concentration of nitric acid on colour value

Tyrosine in test sol. (mg.)	Conc. of nitric acid sol.	Extinction at lapsed time after preparation of nitric acid solution (hr.)						
		0	24	48	72	96	120	144
0.1	conc.	0.146	0.137	0.178	—	0.175	0.155	—
	1:1	0.122	0.119	0.118	—	0.120	0.122	—
	1:2	0.118	0.121	0.119	—	0.119	0.120	—
0.2	conc.	0.234	0.241	—	0.203	—	—	0.235
	1:1	0.220	0.225	—	0.220	—	—	0.222
	1:2	0.217	0.220	—	0.218	—	—	0.222

Table 2. Effect of nitric acid on colour value

Tyrosine in test sol. (mg.)	Extinction in use of nitric acid of a few makers		
	a	b	c
0.1	0.120	0.112	0.132
0.2	0.225	0.203	0.235

加熱時間： 反応に要する加熱時間は Table 3 の結果から、5分が適当と考えられた。尤も之は液量との関係もあるから、最後の比色がより少い液量で可能ならば、それに応じて加熱時間は更に短縮されると思われる。

アルカリの添加量： キサントプロテイン反応の呈色は硝酸との加熱のみでは殆ど現われずアルカリの添加によつてはじめて明瞭となる。この呈色に要するアルカリの添加量は、硝酸の種類が異なる場合は勿論、同一の場合でも多少相異なるから、少しく過剰な一定量を

Table 3. Effect of heating time on colour value

Tyrosine in test sol. (mg.)	Extinction at various heating times (min.)			
	1.5	3.0	5.0	10.0
0.05	0.045	0.050	0.060	0.060
0.1	0.088	0.118	0.122	0.120
0.2	0.156	0.217	0.220	0.222

求めて添加すべきである。この際過剰アルカリの呈色度に対する影響が問題となるが、この点は呈色後の液に水及びアルカリを加えた場合の結果 (Table 4) に見られる様に呈色度が液量に応じて単に稀釈されるというに過ぎないから差支えない。

Table 4. Effect of excess alkali on colour value
(Tyrosine in test solution : 0.15 mg.)

Added solution	Extinction in adding excess volumes (cc.) of sodium-hydroxide or water			
	0	1.0	2.0	3.0
alkali	0.173	0.168	0.162	0.157
water	0.173	0.166	0.160	0.158

除蛋白剤：実際の魚肉試料に適用する為には、先ず除蛋白剤が問題になるが、普通に用いられる、Folin-Wu 試薬、スルフォサリチル酸、三塩化醋酸についての結果では、Folin-Wu 試薬の場合は、硝酸との反応ですでに帯緑黄色の沈澱を生じ、スルフォサリチル酸の場合はそれ自体のニトロ化によるのであろうが濃厚な呈色が見られ、いずれも不適當で結局三塩化醋酸が適當と考えられた。

呈色液：呈色液の色度は極めて安定で、1時間では全く一定、24時間後に僅かに約5%増加した。その吸光値とチロシン濃度との関係は Fig. 1 の様な直線が得られた (フィルター, S-43; セル, 15 mm.)。尙 V'AZQUEZ¹⁾ によればキサントプロテイン反応による呈色は重クロム酸塩溶液の色調に一致するというのであるが重クロム酸塩単独では困難でコバルト塩の混合によつて一致した。之は反応母体物質の種類に基く差異と考えられる。

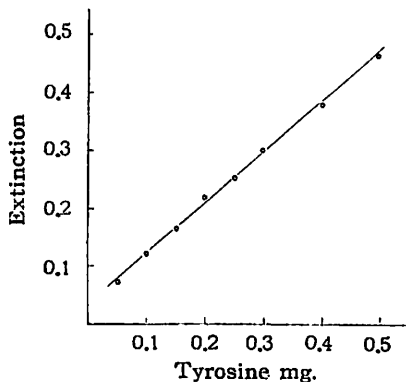


Fig. 1 Calibration curve for tyrosine.

III. 測定方法の相異による測定値の比較

上述の如くキサントプロテイン反応はチロシンに特有ではないから、実際にこの方法を魚肉試料に適用した場合の定量値には当然チロシン以外の物質による影響があるものと考えられるが、ここでも一応その定量値をチロシン値として、前報¹⁾のフェノール試薬によつた場合のそれとの比較を行った。即ち二、三の魚肉の細碎試料を毎日約5時間室温 (26°~32°C) 他は冷所 (0°~2°C) に放置して、その鮮度低下の過程に於けるチロシン値を両者の方法によつて測定し、その結果を Table 5 に示した。

Table 5. Development of tyrosine value in fish meat during storage

Species	Storage time (days)	Tyrosine value (mg. %)			Ammonia content (NH ₃ mg.%)
		Xanthoproteic method	Phenol reag. method	difference (P. - X.)	
<i>Sardinia melanosticta</i> (マイワシ)	0	4.1	12.4	8.3	17
	1	13.7	22.1	8.4	23
	2	37.2	33.1	- 4.1	—
	3	42.8	41.6	- 1.2	46
<i>Katsuwonus vagans</i> (カツオ)	0	18.4	25.1	6.7	15
	1	25.2	39.6	14.4	18
	2	33.6	48.7	15.1	33
	3	39.1	53.9	14.8	52
<i>Paracaesio caeruleus</i> (アオダイ)	0	7.2	7.2	0.0	15
	1	5.2	23.4	18.2	24
	2	4.8	28.0	23.2	28
	3	12.5	33.8	21.3	60

これらの結果から見ると、キサントプロテイン反応による定量値はフェノール試薬による値に殆ど同じか一般には相当に低く、その程度も魚種によつて大部異つている。又その鮮度低下の過程に於ける変化は、一応両者共に増加するが、その増加傾向は、フェノール試薬による定量値では、いずれの魚種に於ても殆ど同様に段階的であるに反し、キサントプロテイン反応によるそれは、アオダイの場合殆ど増加しない過程があり、カツオ、イワシの場合とは異つている。

考 察

キサントプロテイン反応を定量の目的に応用した試みは、概して少い様であるが⁽¹⁵⁾、チロシンを対象とした上の実験から見ると定量法として充分実用性あるものと考えられる。然もその方法における試薬、操作の簡易、呈色液の安定等は大きな特徴である。又その呈色液の色調が重クロム酸、コバルト塩の合液に一致する点も便利な様に思われる。おそらくは一般的なチロシン定量法としての応用も可能でないかと考えられる。問題は魚介肉鮮度の指標としてのチロシン値の測定におけるフェノール試薬の場合との関係であるが、この点は実験例は少いが、前項の Table 5 の結果からある程度の推察ができる。即ち先ず、キサントプロテイン反応による測定値がフェノール試薬による測定値より一般に低いという事は、明らかにフェノール試薬による値がチロシン以外の物質の影響をより多く受けている事を示し、従つてキサントプロテイン反応による値がより実際のチロシン値に近いことを示しているものと推定される。そして又鮮度低下に伴うチロシン値の変化傾向に於て、キサントプロテイン反応による値が殆ど増加しない場合にもフェノール試薬による値が増加しているということは、チロシンを蛋白分解度の目安とする限り、フェノール試薬による値では魚種によつては殆ど蛋白の分解度を示さない場合のあることが推察される。この事は勿論魚種による肉質の性状に関するものと思われるが、ともかくチロシンを対象とする測定にはフェノール試薬によるよりもキサントプロテイン反応によるのが実際に近

いと考えられるのである。尤も鮮度の指標としのてチロシン値の測定という意味では、先ず魚種を通じての適用性が問題となるが、この点については今後の実験が必要である。又フェノール試薬による値が魚種、保蔵条件等によつてどの程度か蛋白分解度として現われるものかも今後の実験に待ちたいと思う。

総 括

1) 魚介肉鮮度判定の有力な指標とされるチロシン値の測定に対し、キサントプロテイン反応の応用を試み、測定法として適用出来ることを認めた。

2) 魚介肉の鮮度低下に伴うチロシン値の変化を、キサントプロテイン反応及びフェノール試薬による方法で測定比較した結果から、魚介肉蛋白の分解度を示すといわれるチロシン値の測定には、前者の方法によるのが適当であることを推論した。

Résumé

Simple method based on xanthoproteic reaction was presented to estimate the free-tyrosine content of fish meat, which was noticed as an index of fish quality in the previous work.

It was inferred from the application of this method in the fish meat during spoilage, that the method was more suitable than that with phenol reagent, for estimating the tyrosine value which is to indicate the degree of decomposition of fish-meat protein.

文 献

- 1) 太田冬雄, 鰺坂比呂志: 鹿大水産紀要, 3, 98~102 (1953).
- 2) REAY, G. A. and J. M. SHEWAN: Advance in Food Research, II (1949).
- 3) DYER, W. J.: J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 351~358 (1945).
- 4) V'AZQUEZ, A.: C. A., 44, 8984 (1950).
- 5) 鈴木友二: 薬学, 4, 42 (1950).