

魚肉蛋白質に関する物理化学的研究〔Ⅱ〕

魚肉蛋白の死後における電荷分布の変化について*

大竹茂夫・尾藤方通

Physico-chemical Study on Fish Muscle Proteins (II)

On the post-mortem change in the charge distribution of fish muscle proteins.

Shigeo OTAKE and Masamiti BITO

緒 言

前報¹⁾において著者の1人は魚の死後の抽出窒素量の変化が魚肉蛋白質の構造的変化によるものではないかと考えた。蛋白質が変性するとき SH 基又は S-S 基が増加又は変性することが知られているが²⁾、一般に蛋白質が変性すればそれに従つて遊離基の質又は量に変化をおこすものと考え、その結果として電荷の分布に変化をもたらすことも考えられる。そこで魚肉の抽出量変化を蛋白質の構造変化として考え得るかどうかを検討する一つの試みとして電荷分布の変化を観察しようとした。

電荷の測定法としては種々の方法が考えられるが、此の研究の企図する所の自然状態そのままを観察しようとする場合は、単に総括的な考察を下し得る程度の方法で足りる。この立場から寺山³⁾によるコロイド滴定法を利用することとした。

コロイド滴定法は今尙研究途上にあり、僅かに純粹高分子物質についてある程度の見透しがついた程度のものであるから、これを魚肉のような複雑な自然物についての適用は、基礎研究が確立された後でなければならない⁴⁾。それにも拘らず此の方法は極めて簡単であり、部分的に詳細な研究に入る前のいわば“Out look Survey”としては見のがせない Charge の問題を取扱ひ得るものであるといふ理由から、現在方法論的に確立されていないが、極く大体の傾向を見るという目的で此の方法を採用した次第である。

実 験

試料は生きた魚の尾部を切断し10分間流血せしめた後、白味の肉を採りチョツパーにてひき、うらごしして瓶中に貯え、綿栓して恒温器 0°C、20°C 又は 25°C 中におき、使用の都度そのうちから一定量を採取した。採取した肉を乳鉢にてすりつぶし、緩衝液を加えて 100cc. としたものを 1cc. とり滴定した。此の場合溶液は不均一系であるので、1cc. を採取する前の放置時間が問題となる。そこで採取されるべき上澄液が、どの位の時間放置されたならば均一系になるかを見るために実験した結果、乳鉢ですりつぶし緩衝液を加えよく振盪してから25分放置したのも、20分放置後遠心分離5分した

* 昭和25年11月水産学会西日本支部創立大会にて講演したものに実験を追加し修正を加えた。

ものも同一の滴定値を示したので、25分以上放置したものの上澄液を用ひればよいと考えた。

標準正及び負コロイドとしては夫々、キトザン塩酸塩又はマクラミン及びポリヴィニールアルコール硫酸加里を用ひた。これはマクラミンを除き寺山³⁾の方法で自製した。滴定法は魚肉を上記の如く処理した試料 1cc. に一定濃度のキトザン塩酸塩又はマクラミン溶液を加え、これをトルイジンブリーを指示薬としてポリヴィニールアルコール硫酸加里の一定濃度の溶液で滴定し、その滴定数を V_x とし、あらかじめキトザン塩酸塩又はマクラミンとポリヴィニールアルコール硫酸加里との滴定値 (V_0) をとつておき、両者の差より蛋白自身の滴定値 ($V_x - V_0$) を求める所謂間接滴定法を用ひた。此の際終点の決定に困難を来したが、滴定速度その他著色程度を一定にするように注意すれば熟練のうへ一定値を得ることが出来ることを確めた。然し個人的におそらく差を生ずるであろうと考えられる点疑問があるが、此の研究の目的では同一試料について実施するときは相対的な滴定値が得られると仮定してもよいと考え、実験中は条件を同一にして滴定することによつて終点をきめる方式をとつた。又 1g 当りの当量 (蛋白 1g が Colloid ion と結合する当量) は次の如く計算した³⁾。

$$P \times V \times 10^{-3} \times \frac{1}{C_{\%} \times B \times 10^{-2}} = \text{当量/g.}$$

- 但し P……………ポリヴィニールアルコール硫酸加里の規定度
- V……………滴定値 (上述の $V_x - V_0$ に相当)
- $C_{\%}$ ……検体中の窒素の百分率濃度
- B……………検体の使用された容積 (cc.)

緩衝液を用ひて魚肉を抽出しても抽出後の pH 値は、魚肉の緩衝能のために抽出前の pH を示さないと考えられるので、溶解後の pH 値を真空管電位差計法による硝子電極を用いてコイ肉について測定した。その結果は第 1 表に見られるが、等電点より酸性側では約 pH 0.3 アルカリ側に移動し pH 5 位ではあまり差はなく、それより上では pH 0.5 値位低くなつている。此の実験では操作の都合上全試料について pH 値を測定することが出来なかつたので、一応緩衝液の pH 値を以て示した。

Table 1. The pH values of the meat solution extracted by buffer solution

pH of buff. sol.	Time after death (hrs.)		
	7	21	35
1.0	1.30		
1.6	1.91	2.12	1.85
3.0	3.32		
5.6	5.60		
7.0	6.58		
9.0	8.35		
water	6.30	6.16	6.33

電荷分布の状況を知るために必要な要因として全窒素、抽出全窒素、及び蛋白沈澱剤による沈澱窒素量の三者を考えて、コロイド滴定を行つた同一試料についてこれ等を測定した。沈澱剤は三塩素醋酸の 10% 水溶液を用ひた。時間の原点は尾部切断のときを以て零時とした。

また結合当量を測定するには、魚肉が最大解離をする pH 又は最大溶出量を示す pH で行つた方

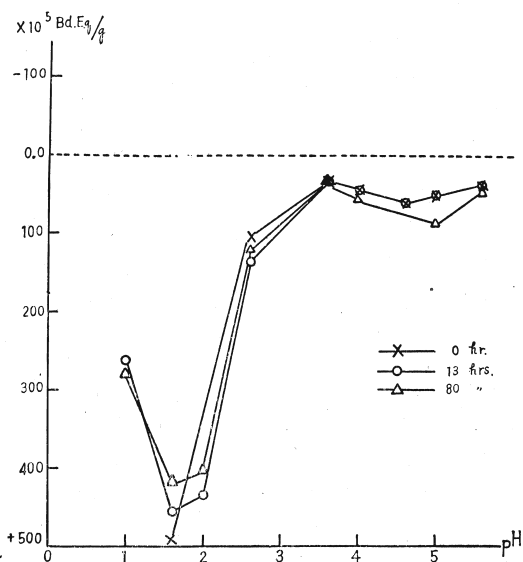


Fig. 1 Relation between pH of extracting solution and Bd. Eq. for total nitrogen (g.)

がよいと考え、pH 値を種々かえた夫々の緩衝液で抽出した溶液について滴定値を求め、全窒素に対する結合等量を求めた結果第1図のようになつた。即ち緩衝液の pH 値で 1.6~2.0 がもつとも大きいので、酸性側の抽出には pH 1.6 の Clark-Lubs の緩衝液を用ひた。図から知られるように pH 1.6 Buff 抽出では最大解離をするので、此の pH 値を用ひ此の際抽出による変性を考慮より除外した。但し Fig. 1 の試料は 0°C に保存されたコイ肉についての実験結果である。

第2表はコイ肉についての諸測定値を示すものである。第2表 a は無防腐肉を各種 pH の緩衝液及び水を以て抽出したものであり、b はトルオール・クロロフォルムで防腐した同試料の実験結果を示すものである。(いづれも 20°C 保

Table 2. Bind. eq./g. of total, soluble, and precipitated nitrogen for carp meat
a. Meat without Antiseptic

pH	1.6				Extracted by water			
	3	14	31	74	3	14	31	74
Time (hrs.)								
Total N.	24.9	25.0	24.9	25.6	24.9	25.0	24.9	25.6
Sol. N.	21.6	18.9	17.8	24.7	8.3	8.0	3.7	23.0
Ppt. N.	4.1	7.1	3.5	—	3.7	6.6	2.8	6.0
Vol. N.	—	8.9	18.6	59.2	—	—	—	—
Titer	3.28	2.76	2.45	3.05	-0.14	-0.05	-0.14	-0.88
Eq./T. N	133×10 ⁻⁵	112×10 ⁻⁵	100×10 ⁻⁵	121×10 ⁻⁵	-6×10 ⁻⁵	-2×10 ⁻⁵	-6×10 ⁻⁵	-35×10 ⁻⁵
Eq./sol. N	154×10 ⁻⁵	148×10 ⁻⁵	140×10 ⁻⁵	125×10 ⁻⁵	-17×10 ⁻⁵	-6×10 ⁻⁵	-38×10 ⁻⁵	-39×10 ⁻⁵
Eq./ppt. N	813×10 ⁻⁵	395×10 ⁻⁵	711×10 ⁻⁵	—	-38×10 ⁻⁵	-8×10 ⁻⁵	-51×10 ⁻⁵	-149×10 ⁻⁵

pH	9.0				12			
	3	14	31	74	3	14	31	74
Time (hrs.)								
Total N.	24.9	25.0		25.6	24.9	25.0	24.9	25.6
Sol. N.	11.40	10.58		20.85	22.5	—	21.4	22.6
Ppt. N.	—	—		—	—	—	—	—
Vol. N.	—	—		—	—	—	—	—
Titer	-0.32	-0.64		-1.21	-1.88	-2.13	-3.65	-3.74
Eq./T. N	-13×10 ⁻⁵	-26×10 ⁻⁵		-48×10 ⁻⁵	-77×10 ⁻⁵	-87×10 ⁻⁵	-149×10 ⁻⁵	-148×10 ⁻⁵
Eq./sol. N	-28×10 ⁻⁵	-61×10 ⁻⁵		-60×10 ⁻⁵	-85×10 ⁻⁵	—	-173×10 ⁻⁵	-169×10 ⁻⁵
Eq./ppt. N	—	—		—	—	—	—	—

b. Meat treated with antiseptic

pH	1.6					
	Time (hrs.)	3	8	21	35	79
Total N.		24.9	23.4	23.4	23.6	24.3
Sol. N.		21.6	16.4	12.4	—	11.9
Ppt. N.		4.1	3.9	2.3	—	3.9
Vol. N.		—	11.7	8.9	6.4	9.1
Titer		3.28	2.50	1.91	1.32	3.91
Eq./T. N		133×10^{-5}	109×10^{-5}	83×10^{-5}	57×10^{-4}	39×10^{-5}
Eq./sol. N		154×10^{-5}	154×10^{-5}	157×10^{-5}	—	80×10^{-5}
Eq./ppt. N		813×10^{-5}	653×10^{-5}	829×10^{-5}	—	270×10^{-5}

pH	12				
	Time (hrs.)	8	21	35	79
Total N.		23.4	23.4	23.6	24.3
Sol. N.		13.8	10.9	—	—
Ppt. N.		2.99	1.57	—	—
Vol. N.		—	—	—	—
Titer		-1.87	-2.11	-2.02	-1.96
Eq./T. N		-81×10^{-5}	-92×10^{-5}	-87×10^{-5}	-82×10^{-5}
Eq./sol. N		-138×10^{-5}	-192×10^{-5}	—	—
Eq./ppt. N		-635×10^{-5}	-1365×10^{-5}	—	—

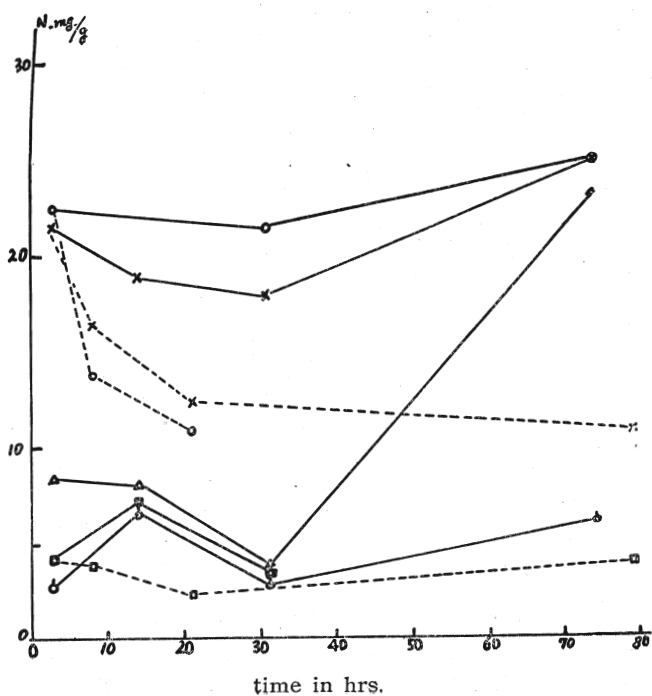


Fig. 2. Change in extracted total nitrogen and precipitated nitrogen.

Without antiseptic

- ×— Sol. N. for pH 1.6
- △— // // water
- // // pH 12
- ppt. N. for pH 1.6
- ◇— // // water

with antiseptic

-×..... Sol. N. for pH 1.6
-○..... // // pH 12
-□..... ppt. N. for pH 1.6

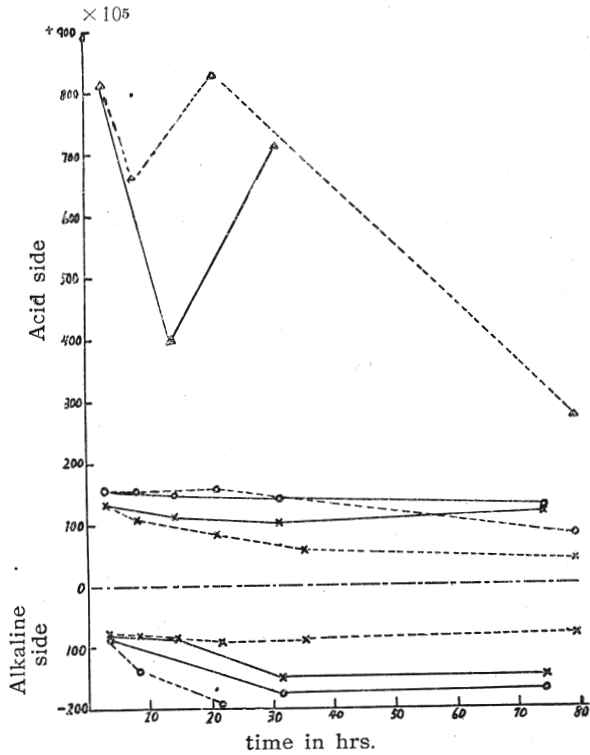


Fig. 3. Change in binding equivalent for total nitrogen, soluble total nitrogen and precipitated nitrogen.

Meat treated with antiseptic

- × Bd. eq./total N.
- ○ Bd. eq./sol. N.
- △ Bd. eq./ppt. N.

meat without antiseptic

- × — Bd. eq./total N.
- ○ — Bd. eq./sol. N.
- △ — Bd. eq./ppt. N.

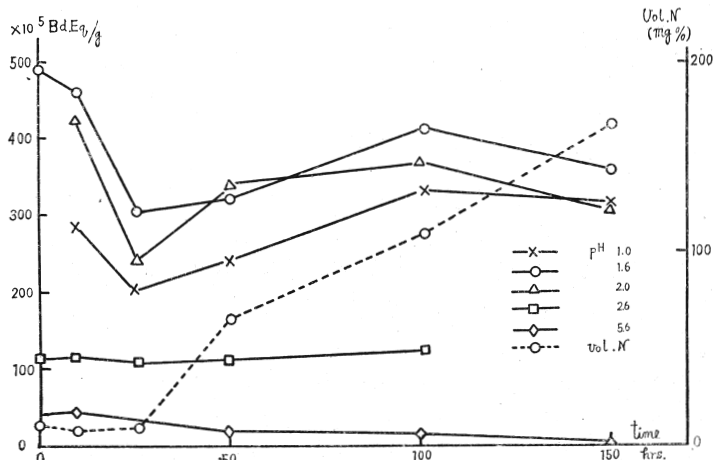


Fig. 4 The change in Bd. Eq. for total nitrogen (g.) after death of fish.

存) 第2表中抽出全窒素及び沈澱窒素量の時間的变化を图示したものが第2図であり、全窒素、可溶性全窒素及び沈澱窒素に対する結合当量の変化を图示したものは第3図である。但し第2表の試料として用ひたコイは12月上旬より翌年3月下旬まで全く飼料を与えず冬眠状態のものであつて、第4図の正常のものの変化に比して変化は小さい。又全窒素量も大きな差を示した。従つて厳密には此の第2表の結果を以て考察を下し得ないのであるが、正常のものとはその傾向において類似している。

尙参考のためにコイ、フナ、イカ、サバ、カレイ、ヒラメ等を用ひて実験したが、全窒素に対する結合当量変化は第4図(コイ 20°C 貯蔵)で代表されるものと類似であり、その他の窒素に対する結合当量は断片的測定のみであるが、大凡第3図と類似するので省略する。但し魚種によつて結合当量は異り、又変化の時間も若干の差があつた。

結果及び考察

I 第2表及び第2図から知られるように、無防腐肉の場合は抽出全窒素は30時間前後において溶解量は極少を示している。沈澱窒素量も大凡可溶性全窒素の変化と類似の傾向を示す。此の結果は前報の場合の結果と一致している。防腐して細菌の作用を阻止した場合は、20時間位で溶解量の減少は停止しその後の時間的経過中そのままつづくものと見られる。即ちこの二つの場合の差は、無防腐区は再び溶解量を増加し、防腐区は増加せず停止してしまふといふことに帰せられる。即ち分解ではなく蛋白の構造的変化に原因を求められるように見える。但し20時間以後の測定値が少いので此の点問題を残す。細菌の作用は可成早期にその効果を表はし、そのために溶解度極少となる時間が延長されるように見える。即ち溶解量の極少となる時間は無防腐肉では30時間前後であり、防腐肉では20時間前後である。且つ溶解量の減少する割合は防腐肉の場合に著しく大きい。

II 次に第3図についてコロイドイオンとの結合当量の変化を見るに、無防腐肉の場合は可溶性全窒素に対する結合当量は、酸性側で抽出されたものにおいては殆んど不変であるから、溶出される窒素化合物は全く荷電を変化することのない、即ち常に一定の蛋白が溶出されるか、又は変化するが全体の荷電は変えないような変化であるかのいずれかである。所でアルカリ性側で抽出されたものについて見ると、可溶性全窒素に対する結合当量は時間と共に増加してゆく。若し酸性側抽出においてもアルカリ性側抽出においても同一の蛋白質が抽出されるとすれば、酸性側で可溶性全窒素について結合当量が無変化なのは溶出窒素化合物が変化しないのでなく、正荷電に変化なく負荷電を増加する変化と考えられる。但し此の場合酸性側とアルカリ性側と同一物であり、且つ抽出時変性しないと云ふ証明はないので結論出来ない。

防腐したものについては死後早期の変化は無防腐の場合と大差はないが、腐敗開始に相当する時間以後若干の相異を示すものようである。

III 沈澱窒素に対する結合当量は、第3図で見られるように測定結果がすくないので明瞭なことは云えないが、少くとも初期においては甚しく異状があるものようである。若し沈澱性窒素の正荷電が第3図から大凡推定されるように、酸性域においては時間と共に減少するとすれば、沈澱性窒素の溶解度はたいした時間的変化がないから(第2図)、可溶性部分中沈澱しないものは沈澱性窒素の正荷電減少に対応する位の正荷電を増加すること、即ちペプチド連鎖の切断か又は蛋白分子のミセルの Unbinding をおこさねばならない。しかしこれは此の程度の酸性又はアルカリ性抽出では、抽出による蛋白の変化も十分考慮せねばならないので、直ちに魚肉蛋白の死後変性に結びつけることは出来ない。

摘 要

1 魚肉の死直後よりその可溶性全窒素量、沈澱窒素量及びコロイド滴定による全窒素量に対する結合当量、可溶性全窒素に対する結合当量及び沈澱窒素量に対する結合当量を、防腐肉及び無防腐肉について測定した。

2 防腐肉の溶解度は 20°C 20時間位で最小となりその後変化しないのに反し、無防腐肉では30時間で極少を示し再び増加する。且つ溶解度の減少量は防腐肉が大である。

3 可溶性全窒素量及び沈澱剤による沈澱窒素量に対する結合等量から魚肉の電荷の変化を論じたが、緩衝液の pH 値で 1.6 及び 12.0 の抽出が抽出時における変性等の有無が確定しないため決定的に

論じられなかつた。但し、若し抽出時における変性がないとすれば魚肉蛋白の死後変化は電荷の分布変化を伴ふものとも考えられる点がある。

本実験遂行にあたり御指導と適切な御批判を賜つた日本海区水産研究所利用部長野口栄三郎技官、実験結果の検討並に御批判訂正を賜つた東海区水産研究所理学博士右田正男技官並に松本重一郎技官の諸氏に対し謝意を表す。実験の一部は香住支所高橋信江嬢の助力を得た。併せて謝意を表す。

文 献

- 1) 大竹・山本：本誌
- 2) M. L. ANSON: *Advances in Protein Chemistry* Vol. II 361 ('45)
- 3) 寺山 宏：化学の研究 第一集 75 ('48)
同 第二集 31 ('49)
- 4) 石本外3氏：生物科学 3 112 ('51) 及び右田正男博士よりの私信

Synopsis

In the previous report¹⁾, the post-mortem change in the extractable total nitrogen of fish muscle has been attributed to the structural change of precipitable proteins. If the result is acceptable, the change of charge distribution on the surface of precipitable proteins might be expected. Thus, the binding equivalents of precipitable proteins to positive and negative colloidal substance per 1g. of proteins were measured using the colloid titration method²⁾.

The results are shown in table 2, a, b, fig. 2, fig. 3 and fig. 4. The binding equivalents of the extractable proteins decreased with time and attained a minimum value and were analogous to the change of the extractability of fish muscle. When bacteria were prevented from growing by addition of toluol-chloroform mixture, the decrease of charge was followed continuously and no minimum was obtained. Thus the charge decreased with time and attained constant value in presence of antiseptic.