

冷凍貯蔵中にイカ外套筋表面に生じた白色析出物の主要成分

谷本 昌太, 岡崎 尚, 守本 京三, 米田 達雄

(1999年9月2日受付, 2000年1月21日受理)

Main Components of White Spots Appearing on Surface of Mantle Muscle of European Common Cuttlefish during Freezing Storage

Shota Tanimoto,*¹ Takashi Okazaki,*¹
Kyozo Morimoto,*¹ and Tatsuo Yoneda*¹

White spots were observed on the surface of the mantle muscle of European common cuttlefish during freezing storage. To investigate the cause of production of the white spots, several constituents of the spots were analyzed. Octopine, whose content was 42.7%, was proved to be the main component. The total amount of protein and peptide was 25.4%, so they were the secondary major component. Water and ash content were 7.0% and 5.4%, respectively. On the other hand, microscopic studies proved that the white spots were crystalline material like needles.

キーワード: オクトピン, イカ, 白色析出物, タンパク質, ペプチド, エキス, 針状結晶

広島県内の企業において冷凍貯蔵中のヨーロッパコウイカ *Sepia officinalis* の外套筋表面に斑点状の白色析出物を生じた。そのため、冷凍イカ製品の外観は損なわれ、商品価値は著しく低下した。

これまでに、イカの乾燥品および塩辛の加工または貯蔵中に白色の析出物（白粉）が生じることが知られている。谷川ら¹⁾は乾燥スルメイカに生じた白粉の成分について調べ、ベタイン、タウリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、フェニルアラニンおよびスレオニンを主成分とする物質であることを報告している。槇、佐藤²⁾も同じく乾燥スルメイカの白粉の成分について調べ、主要成分としてタウリンおよびベタイン、その他の成分としてナトリウム、カリウム、リン酸、マグネシウム、ヨードの無機物および少量のグルコース、フルクトース、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジンが含まれていることを報告している。また、村瀬ら³⁾は小型剣先イカ乾燥品に生じた白粉の成分の遊離アミノ酸組成を調べ、グリシン、タウリン、グルタミン酸、アラニンおよびチロシンの比率が高く、析出原因としてアミノ酸の溶解度を挙げている。さらに、山下ら⁴⁾は、ホタルイカの塩辛中に生じた白色析出物の原因がチロシンであることを示し、その低い溶解度のため析出するとしている。しかしながら、冷凍貯蔵中に生のイカ外套筋の表面に白色析出物が生じたという報告は、これまで見当た

ない。

そこで著者らは、冷凍貯蔵中に生じた白色析出物の生成原因を調べるため、析出物および外套筋の成分分析を行った。その結果、これまでに報告された白色析出物の成分とは異なるオクトピンが主要成分として検出された。また、分析結果から析出物の生成原因についても考察した。

実験方法

試料 表面に白色析出物を生じたアフリカ産ヨーロッパコウイカ (*S. officinalis*) の外套筋および白色析出物を分析用試料とした。なお、外套筋の皮は、輸入前に除かれていた。また、試料は、冷凍状態で輸入された外套筋を企業において解凍し、適当な大きさに切断した後、再凍結し、脱酸素剤とともに包装し、-20℃で冷凍されていた。

光学顕微鏡による析出物の形状観察 ノマルスキー微分干渉顕微鏡（オリンパス製、BH2-NIC）を用いた。

成分分析 水分、灰分、粗タンパク質（全窒素）は、常法に従って分析した。⁵⁾ 非タンパク態窒素の定量は、坂口らの方法⁶⁾に多少の修正を加え行った。遊離アミノ酸は、白色析出物では20倍量また外套筋では2倍量の蒸留水で抽出、スルホサルチル酸により除タンパクした後、プレカラムにおいてニンヒドリン発色法で検出を行

*¹ 広島県立食品工業技術センター (Hiroshima Prefectural Food Technology Research Center, Hijiyamahonmachi, Minami, Hiroshima 732-0816, Japan).

う HPLC (株式会社日立製作所製 L-6200 型) により定量した。⁷⁾ 4 級アンモニウム塩基および核酸関連物質については次のように分析した。ペタイン類および核酸関連物質は過塩素酸 (PCA), トリメチルアミノオキシド (TMAO) およびトリメチルアミン (TMA) はトリクロロ酢酸 (TCA) により抽出した。ペタイン類は Gorham の方法⁸⁾ に準じて行った。TMAO および TMA は, 微量格拡散法とピクラート法を組み合わせた方法⁹⁾ により行った。核酸関連物質は榎本らの方法¹⁰⁾ に準じて行った。なお, 以上の分析は, 外套筋および白色析出物について行った。

外套筋および白色析出物のオクトピンは PCA により抽出後, Kawashima and Yamanaka の方法¹¹⁾ に準じて行った。すなわち, オクトピンをベンゾインで誘導化後, HPLC (日本分光株式会社製 PU-980) で分析した。カラムは Kaseisorb LC-ODS-300-5 (4.6 mm I.D. × 250 mm 東京化成工業株式会社製) を, 検出器には蛍光検出器 (日本分光株式会社製 821-FP) を用いた。

白色析出物のタンパク質およびペプチド含量の総量は, 試料に蒸留水を加え攪拌し, 等量の 15% TCA を加え 30 分放置後, 沈殿を遠心分離で集め, 0.1 N NaOH 溶液で可溶化し, ビュレット法¹²⁾ で定量した。また, ケルダール法による定量は, 全窒素から非タンパク態窒素を差し引き, この値にタンパク質換算係数 6.25 を乗じ算出した。

結果および考察

析出物の形状観察 外套筋表面に生じた白色析出物の外観は, 直径 1~2 mm で盛り上がった斑点状であり, 微生物のコロニーに類似していた。そこで, 析出物が微生物でないことを確かめるため, 形状観察を行った (Fig. 1)。観察の結果, 析出物は針状の結晶であり, 微生物は確認できなかった。さらに析出物から微生物の分離を試みたが, 発育する微生物を確認できなかった。し

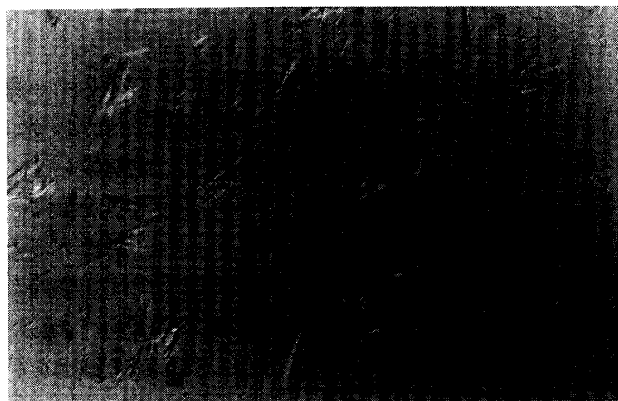


Fig. 1. Micrograph of the white spots.

たがって, 本析出物は微生物または微生物由来のものではないと判断し, 以下の成分分析を行った。

一般成分および非タンパク態窒素 一般成分として分析した水分, 灰分, 粗タンパク質の結果を Table 1 に示した。析出物では, 水分 7.0%, 灰分 5.4%, 粗タンパク質 96.3% であった。外套筋では, 水分 73.5%, 灰分 1.8%, 粗タンパク質 22.8% であった。外套筋の分析結果は, これまでの報告¹³⁾ と比べると, 水分が低く, 粗タンパク質がやや高い傾向にあった。

また, 析出物は外套筋と比べると粗タンパク質の割合が著しく大きく, 析出物の主要成分が窒素含有化合物であることが推定された。さらに析出物中の一般成分の合計値は 100% を超えた。これは, 窒素成分としてタンパク質換算係数の低いエキス成分が多く含まれている可能性を示唆している。そこで, 全窒素中のエキス成分の占める割合を調べるため, 非タンパク態窒素を測定し, Table 1 の右側に示した。析出物の非タンパク態窒素は, 11.3% 含まれており, 全窒素 (15.4%) の 73% を占めていた。したがって, 析出物中には窒素成分が著しく多く含まれ, 特に含窒素エキス成分が析出物の主要成分の 1 つと推定された。

遊離アミノ酸 含窒素エキス成分の 1 つである遊離アミノ酸¹⁻⁴⁾ は, これまでイカ加工品の析出物の成分の 1 つであることが示されている。そこで本析出物についても, 遊離アミノ酸を測定した (Table 2)。析出物および外套筋に比較的多く含まれるアミノ酸は, タウリン, プロリンおよびアルギニンであった。これらの遊離アミノ酸を両者間で比べると, プロリンを除き, 白色析出物にかなり多く含まれているが, 乾燥重量当りに換算すると両者はほとんど等しかった。一方, β -アラニンは外套筋に多く含まれていたが, 白色析出物では少なかった。ホタルイカの塩辛における析出物の原因成分であるチロシン⁴⁾ は, 本分析において析出物および外套筋ともにわずかししか含まれなかった。析出物および外套筋の遊離アミノ酸の総量は, それぞれ 3.82%, 1.76% で, 析出物は外套筋に比べ, 約 2.2 倍多く含まれていた。しかしながら, 乾物重量当りに換算すると, 逆に析出物は

Table 1. Proximate composition and non-protein nitrogen in white spots and mantle muscle (%)

	Moisture	Crude protein (Total nitrogen)	Ash	Non-protein nitrogen
White spots*	7.0	96.3 (15.4)	5.4	11.3
Mantle muscle	73.5	22.8 (3.65)	1.8	0.9

* White spots indicate crystalline material appearing on the surface of the mantle muscle of European common cuttlefish during freezing storage.

Table 2. Free amino acids in white spots and mantle muscle (%)

	White spots	Mantle muscle
Taurine	2.15 (2.31)*	0.70 (2.26)
Aspartic acid	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)
Threonine	0.05 (0.05)	0.02 (0.08)
Serine	0.06 (0.06)	0.04 (0.15)
Glutamic acid	0.07 (0.07)	0.03 (0.10)
Proline	0.34 (0.36)	0.33 (1.26)
Glycine	0.05 (0.05)	0.03 (0.09)
Alanine	0.06 (0.07)	0.04 (0.17)
Valine	0.08 (0.08)	0.02 (0.09)
Cystine	0.06 (0.06)	0.01 (0.02)
Methionine	0.03 (0.04)	0.02 (0.09)
Isoleucine	0.04 (0.05)	0.02 (0.06)
Leucine	0.06 (0.07)	0.03 (0.13)
Tyrosine	0.02 (0.03)	0.01 (0.05)
Phenylalanine	0.02 (0.02)	0.01 (0.05)
β -Alanine	0.06 (0.06)	0.21 (0.79)
Lysine	0.04 (0.05)	0.03 (0.10)
Histidine	0.02 (0.02)	0.02 (0.06)
Arginine	0.62 (0.66)	0.19 (0.72)
Total	3.82 (4.11)	1.76 (6.65)

* Values in parentheses indicate percentage to dry weight.

4.11% であるのに対して、外套筋は 6.65% 含まれており、遊離アミノ酸が析出物に特に多く含まれているわけではなかった。また、本析出物の遊離アミノ酸の窒素量は、グリシン換算で 0.71% であり、非タンパク態窒素 (11.3%) と比べるとかなり少なかった。これらの結果からいずれの遊離アミノ酸も本析出物の主要成分ではなかった。

4 級アンモニウム塩基および核酸関連物質 次に、遊離アミノ酸以外の含窒素エキス成分として 4 級アンモニウム塩基および核酸関連物質を測定し、Table 3 に示した。まず、析出物中の TMAO, TMA, ベタイン, ホマリンは 1.38%, 0.04%, 1.50%, 0.22% であり、わずかしが含まれていなかった。一方、外套筋の同成分は、それぞれ 0.67%, 0.01%, 0.93%, 0.07% で析出物同様わずかしが含まれていなかった。ベタインおよび TMAO は析出物に多く含まれていたが、乾物重量当りに換算すると、逆に外套筋に多く含まれる結果となった。これらのことから、両成分は析出物に特に多く含まれる成分ではないと判断した。

核酸関連物質については、析出物および外套筋のいずれもわずかしが含まれておらず、ATP, ADP, AMP, IMP, イノシンおよびヒポキサンチンの合計値でそれぞれ 0.4%, 0.2% であった。したがって、核酸関連物質

Table 3. Quaternary ammonium bases and ATP related compounds in white spots and mantle muscle (%)

	White spots	Mantle muscle
Trimethylamine oxide	1.38 (1.48)*	0.67 (2.52)
Trimethylamine	0.04 (0.04)	0.01 (0.02)
Glycinebetaine	1.50 (1.61)	0.93 (3.51)
Homarine	0.22 (0.24)	0.07 (0.26)
ATP	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
ADP	0.02 (0.02)	0.02 (0.08)
AMP	0.11 (0.12)	0.05 (0.19)
IMP	0.04 (0.04)	0.01 (0.04)
Inosine	0.04 (0.04)	0.01 (0.04)
Hypoxanthine	0.18 (0.19)	0.08 (0.30)

* Values in parentheses are the same as in Table 2.

Table 4. Octopine content in white spots and mantle muscle (%)

White spots	mantle muscle
42.70 (45.91)*	1.07 (4.03)

* Values in parentheses are the same as in Table 2.

についても本析出物の主要成分でなかった。

オクトピン 次に、含窒素エキス成分の 1 つでイカ中に多く含まれるオクトピン^{13,14)}を測定し、結果を Table 4 に示した。本析出物中にオクトピンは 42.7% (乾物当たり 45.9%) 存在し、これまで分析した含窒素エキス成分 (遊離アミノ酸, 4 級アンモニウム塩基および核酸関連物質) の中で最も多く含まれていた。また、外套筋についても 1.1% (乾物当たり 4.0%) 含まれ、含窒素エキス成分の中で最も多く存在していた。これらの結果から、オクトピンは、本析出物の主要成分と推定される。

また、本析出物を生じた外套筋のオクトピン含量 (1.1%) を、須山, 小林の報告¹³⁾と比べるとスルメイカ (1.1%) やアカイカ (1.0%) の値に近く、またコウイカ科のイカの値 (0.77~0.48%) と比べてかなり高かった。これらのことは、外套筋中のオクトピン含量と析出物生成に何らかの関係があることを推察させる。

タンパク質およびペプチド 以上の分析結果から、白色析出物の 62.4% (水分, 灰分, 遊離アミノ酸, 4 級アンモニウム塩基, 核酸関連物質およびオクトピン) が明らかになったが、37.6% が未確認成分として残る。一般分析および非タンパク態窒素の結果からタンパク態窒素が 4.1% 存在し、粗タンパク質として換算すると 25.6% に達する (Table 5)。この結果からタンパク質

Table 5. Protein and peptide in white spots (%)

Kjeldahl method	Biuret method
25.6	25.4

とペプチドの両者またはどちらかが析出物の残りの成分であると予想された。そこで、それを確認するため析出物に含まれるタンパク質およびペプチドの総量をビュレット法により定量した (Table 5)。結果は、25.4%であり、タンパク態窒素からの計算による値とはほぼ一致した。これらの結果から、タンパク質とペプチドの両者またはどちらかが主要成分の1つであることが示唆される。

白色析出物の生成機構 オクトピンは軟体動物において解糖系の最終生産物である。¹⁵⁾ また、遠藤、清水¹⁴⁾はイカの外套筋を5~7°Cで貯蔵したとき、貯蔵初期にアルギニンが減少し、それに相当する分のオクトピンが増加することを報告している。さらに、Kawashima and Yamanaka¹⁶⁾は、ホタテの閉殻筋において死後、冷蔵中にオクトピンが増加し、凍結解凍によりその増加が促進されることを報告している。本分析では、外套筋中のオクトピンはこれまでに示されているコウイカ科の値¹³⁾に比べ、かなり多く含まれていた (Table 4)。また、本析出物を生じた外套筋は、輸入した冷凍イカを解凍後、適当な大きさに加工して再凍結したものである。これらのことを考慮すると、この冷凍イカを加工する前、加工中、または加工後に何らかの理由で外套筋中の解糖系が進行し、オクトピンが蓄積した可能性を考えることができる。

一方、外套筋の水分 (73.5%) は、これまでに報告¹³⁾されている値 (74.8-81.5%) に比べると低い値であった (Table 1)。本析出物を生じた製品容器の包材の内側に、多くの氷結晶が付着している傾向が見られたことから、冷凍貯蔵中に製品 (外套筋) の乾燥が進み、その水分が包材に露結して氷の結晶ができたと考えられる。その結果、外套筋表面が乾燥し、オクトピンが濃縮されたと推察される。また、第二の主要成分であるタンパク質およびペプチドについても、外套筋中の水溶性タンパク質がオクトピンと同じように凍結中に濃縮され析出物の一部になった可能性が考えられる。

顕微鏡観察の結果、本析出物は針状結晶であった (Fig. 1)。これは、村瀬らの剣先イカ乾燥品の析出物における結果³⁾と一致する。タンパク質には貝殻中の炭酸カルシウムや氷結晶のような無機物の結晶生成を促進するものが存在する。¹⁷⁾ そのため、本析出物の結晶は有機物を主体としており、無機物ではないが、イカ外套筋中のタンパク質およびペプチドが析出物の結晶形成を促進

した可能性も考えられる。

これまでイカ加工品の析出物についていくつかの報告¹⁻⁴⁾があるが、オクトピンについては報告されていない。本報告の中で、オクトピンを主要成分とする析出物がイカ加工品に存在することを初めて明らかにした。このことから、今後イカ加工品の析出物についてはオクトピンについても注意する必要があると思われる。

文 献

- 1) 谷川英一, 工藤駿一, 元広輝重: イカ完全利用に関する研究 第9報 スルメ製造に関する研究 (其の二) スルメ貯蔵中に生成する白色粉末様物質について. 北大水産集報, 4, 234-238 (1953).
- 2) 槇光 章, 佐藤幸夫: 食品に生じる白粉に関する研究 (第4報) スルメの白粉成分について. 家政誌, 20, 15-18 (1969).
- 3) 村瀬 誠, 戸谷精一, 平山幸一, 水谷清司, 山澤正勝: 小型剣先イカ乾製品の白粉について. 愛知食工試年報, 28, 98-104 (1987).
- 4) 山下市二, 川崎賢一, 片山 脩: ホタルイカ (*Watasenia scintillans*, Berry) の塩辛におけるチロシンの析出. 日食工誌, 32, 301-303 (1985).
- 5) 堤 忠一, 安井明美, 氏家 隆: 一般成分および関連成分「新・食品分析法」(日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編), 光琳, 東京, 1996, pp. 1-114.
- 6) M. Sakaguchi, M. Murata, and A. Kawai: Changes in free amino acids and creatine contents in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) muscle during ice storage. *J. Food Sci.*, 47, 1662-1666 (1982).
- 7) 鈴木忠直: アミノ酸組成の定量法「新・食品分析法」(日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編), 光琳, 東京, 1996, pp. 493-508.
- 8) J. Gorham: Separation of plant betaines and their sulphur analogues by cation-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 287, 345-351 (1984).
- 9) 中村邦典, 寺野重造: トリメチルアミンオキシドの簡易測定法による魚肉添加畜肉ハム・ソーセージの鑑別について. 東海水研報, 103, 93-98 (1980).
- 10) 槇本六良, 三嶋敏雄, 宇津木照洋, 北島俊一, 矢田植朗, 保田正人: 動揺の激しい船内でのATP関連化合物の分離定量法-逆相分配カラムによる高速液体カラムクロマトグラフィー法. 日水誌, 51, 1363-1369 (1985).
- 11) K. Kawashima and H. Yamanaka: Effects of storage temperatures on the post-mortem biochemical changes in scallop adductor muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 2175-2180 (1992).
- 12) 菅原 深, 副島雅美: 蛋白質定量法 (第2版). 「生化学実験法7」(瓜谷郁三, 志村憲助, 中村道徳, 船津勝編), 学会出版センター, 東京, 1977, pp. 74-94.
- 13) 須山三千三, 小林博文: イカ類外套筋の遊離アミノ酸と4級アンモニウム塩基の組成. 日水誌, 46, 1261-1264 (1980).
- 14) 遠藤金次, 清水 亘: 水産動物肉に関する研究-XXXVII. イカ肉中のオクトピンについて. 日水誌, 29, 362-365 (1963).
- 15) 坂口守彦: 軟体動物筋肉におけるオクトピンの生成とその生理的意義. 京大食研報告, 41, 1-7 (1978).
- 16) K. Kawashima and H. Yamanaka: Effects of freezing and thawing on post-mortem biochemical changes in scallop adductor muscle. *Fisheries Sci.*, 61, 691-695 (1995).
- 17) 川端康治郎: バイオミネラルゼーション (生鉱物化作用) とそのモデル化. 化学技研報, 85, 31-43 (1990).