



Title	塩辛の細菌學的研究：第4報 熟成現象に就て
Author(s)	長尾, 清; NAGA0, Kiyoshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 3(4), 259-264
Issue Date	1953-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/22765">https://hdl.handle.net/2115/22765</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	3(4)_P259-264.pdf



# 塩辛の細菌學的研究

## 第4報 熟成現象に就て

長尾 清 (水産細菌学教室)

### BACTERIOLOGICAL STUDIES OF SHIOKARA OR "SOUSED SQUID"

#### 4. STUDIES ON THE RIPENING PHENOMENON OF SHIOKARA

Kiyoshi NAGAO

(Laboratory of Bacteriology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The action of autolyzing enzymes and bacterial enzymes as affecting the ripening of Shiokara were studied identically. The phenomenon of ripening of Shiokara under several conditions was observed by determining the amount of amino-nitrogen and free amino acids. Experimental conditions were as follows:

- Sample 1. Filled with  $H_2$  the air-tight vessel, which has been half filled with Shiokara.
- Sample 2. Filled with  $H_2$  the air-tight vessel, which has been half filled with Shiokara, mixed with toluene.
- Sample 3. Blow the air into Shiokara, half filled in an open vessel.
- Sample 4. Mixed the toluene in shiokara, which has been half filled in covered vessel.
- Sample 5. (Control sample) kept in natural condition in an open vessel.

塩辛が熟成する際には、これを構成している種々の物質は自家消化酵素及び細菌の作用を受け分解し<sup>(1)(2)</sup>、漸次低級の化合物となる。一般に魚肉が自家消化を起す場合には、蛋白質はアミノ酸にまで分解するに止まり、それ以上は分解されないとされている。自家消化中に生ずる微量のアンモニアはアミノ酸より遊離するものでなく、プリン塩基たるアデニン、グアニン等から生ずるものであらうと考えられている。アミノ酸は細菌酵素に依つて脱アミノ作用、脱炭酸作用等が行われる。しかしこの分解作用は規則正しく段階的に行われるものでなく、其の時の状態によつて或は酸化作用であり、或は還元作用であり、或は其の両作用であり、若しくは一旦分解によつて生じた物質が再び合成されたり、多種多様の変化が起るが、一般に好氣的条件下に於ては主として酸化作用が行われ、嫌氣的条件下に於ては還元作用が行われる。従つて細菌が嫌氣的状態で發育する場合にはアミノ酸は還元的に分解されて、其のアミノ酸に相当する飽和酸になる。然し好氣的条件下でも一部に於てこの様な分解型式が行われ、又嫌氣的条件下でも酸化作用が行われる場合もあるので、単に酸素の存否のみによつて酸化作用若しくは還元作用が行われるものとは限らないが一般には主として酸素の存在する程度によつて種々の分解作用が行われる。

著者は塩辛の熟成に關与する自家消化酵素及び細菌の作用を、なるべく区々に分け、下記の様に色々な条件下に於て熟成させ、分解産物を測定して総合的に塩辛の熟成現象を考察した。

1. 塩辛を容器中に約半量入れ、容器中の空気を $H_2$ と置換し密封した。
2. 塩辛を容器中に約半量入れ、之に toluene を加え、容器中の空気を $H_2$ と置換密封した。
3. 塩辛を容器中に約半量入れ、一方の口より塩辛中に硝子管を差し込み、この管を通じて通氣し

た。

4. 塩辛を容器中に約半量入れ之に toluene を加えた。

以上 (1) (2) (3) (4) はいずれも一定時の間隔を置いて、一定時間振盪し続けた。

5. 塩辛を容器中に約半量入れ、振盪しないで放置した (対照試験)。

以上の条件下に置いた塩辛に就て熟成過程をアミノ態窒素の量を測定して比較検討した。又遊離アミノ酸の消長について paper chromatography に依り観察した。

## 実 験

I. 試料の調製：スルメイカの胴肉及び頭肉をチョツパーにかけ完全に磨潰したものを 5kg に食塩 1 kg (日本薬局法) 及び肝臓 250g を混合し、良く攪拌した。

II. 実施法：2 立容硝子容器 (Fig. 1. に示す) を 5 ヶ用意し、上記試料 1 kg づゝ均等に入れる。之を次の条件に置いた。

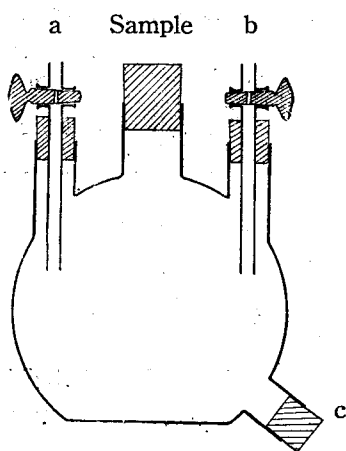


Fig. 1

(1) キツ装置にて発生させた水素を過マンガン酸カリの酸性飽和溶液、濃硫酸、濃苛性カリ溶液、及び塩化カルシウムを入れたガス洗滌塔を順次通して精製し、ガス貯槽中に充填する。

上記容器 (Fig. 1) の活栓 a を閉じ活栓 b を開き、真空ポンプにて真空にした後、活栓 b を閉じ、ガス貯槽と活栓 b 部を連結し、活栓 b を開いて容器中の空気を  $H_2$  と置換した。ガス貯槽は試料を入れた容器よりも高位置に置き、試料を入れた容器中は常に水素ガス圧が加わる様に保つた。この容器を振盪機上に置く、電源と振盪機のモーターとの間にタイムリレーを置き、55分おきに 5 分間振盪する様にする (以下試料 I と称す)。

(2) 試料に toluene 200cc 加える、試料 I と同様に  $H_2$  と置換し又振盪機上に置く (以下試料 II と称す)。

(3) Fig. 1 の活栓 b 部の硝子管を長くして、試料中に差し込む様にし、活栓 b をギヤポンプと連結し、活栓 a 及び b を開いたまゝとし、ギヤポンプの廻転に依り、活栓 b を通り通気する。試料 I と同様に振盪機上に置く。電源とギヤポンプのモーターとの間にタイムリレーを置いて、55分おきに 5 分間通気及び振盪する様にする (以下試料 III と称す)。

(4) 試料に toluene 200cc を加える、振盪機の上に置く (以下試料 IV と称す)。

(5) 対照試料とし、振盪しないで放置した (以下試料 V と称す)。

以上の試料を室温 (平均室温  $25 \sim 27^\circ C$ ) に放置した。試料を取る時は Fig. 1 の c 部のゴム栓をとり、この部分より取る。試料 I 及び II の場合は試料をとつた都度真空ポンプにて真空にし、新たに  $H_2$  と置換した。又試料 II 及び IV は toluene が蒸発するので度々 toluene を追加した。

アミノ態窒素測定法：試料約 10g を正確に秤量し、水を加えて 30 分間抽出後、10% 三塩化リン酸溶液 10cc を加え、沈澱を濾過し、水にて洗滌、濾液と洗液を合せて 50cc とする。Van Slyke 法に依りアミノ態窒素を測定した。

pH の測定：比色法に依る。

Paper chromatograph 法：アミノ態窒素を測定した残液を蒸発皿に入れ、湯浴上にて蒸発乾涸、少量の水に溶解して試料とする。常法<sup>(3)</sup>に依り二次元 chromatograph を行う。溶媒は 90% phenol

及び lutidine と aniline の混合液を使用した。発色には ninhydrin-butanol 溶液を使用した。ninhydrin に依る検出のほか、diazo 試薬を用い (Pauliの反応) tyrosine, histidine を検出<sup>(4)</sup>、二価の硫黄を含む cystine 及び methionine の検出には KPtI<sub>6</sub> を用いた<sup>(5)</sup>。又過渡度で酸化後、Nessler 試薬を用い  $\alpha$ -amino- $\beta$ -oxy 酸である threonine 及び serine を検出した<sup>(6)</sup>。

Table 1. Changes in the amount of amino-nitrogen during the ripening process of Shiokara  
amino-N mg/g dry matter

Sample Days of ripening	Sample I	Sample II	Sample III	Sample IV	Sample V
0	9.81	9.81	9.81	9.81	9.81
1	—	12.91	—	12.64	13.21
2	16.80	16.43	17.39	16.12	16.87
6	19.50	19.02	20.69	19.43	19.51
8	19.60	19.08	21.59	19.62	20.68
10	20.03	19.58	24.74	20.31	22.73
13	20.66	19.63	24.73	20.69	22.74
15	21.02	20.06	24.72	20.71	22.75
17	22.31	20.02	24.74	20.95	23.11
20	22.96	20.54	28.91	21.41	23.62
22	23.05	20.52	29.82	21.80	24.35
25	25.31	20.88	31.30	23.13	26.39
28	25.56	21.06	31.31	23.66	26.78

### 実験結果

各試料のアミノ態窒素量の変化を測定した結果を Table 1 に示した。これを図表に表わすと Fig. 2 の様になる。

各試料の pH の変化を測定した結果を Table 2 に示した。

Table 3 は paper chromatography に依り各試料のアミノ酸の消長を検出した結果を表示したものである。

Sample I. Filled with H<sub>2</sub> the air tight vessel which has been half filled with Shiokara.  
Sample II. Filled with H<sub>2</sub> the air tight vessel which has been half filled with Shiokara, mixed with toluene.  
Sample III. Blow the air into Shiokara, half filled in an open vessel.  
Sample IV. Mixed the toluene in Shiokara, which has been half filled in covered vessel.  
Sample V. (control sample) kept in natural condition in an open vessel.

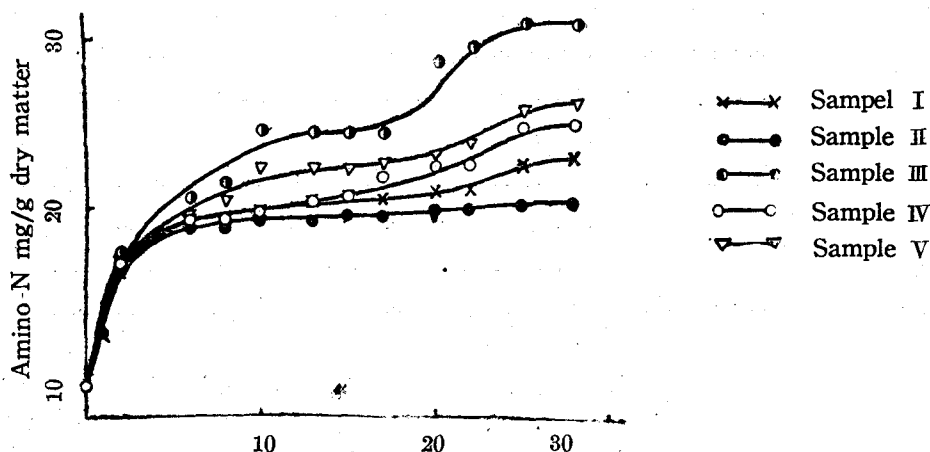


Fig. 2 The change of the amount of amino-nitrogen during the ripening process of Shiokara

Table 2. Changes in pH value during the ripening process of Shiokara

Sample Days of ripening	Sample I	Sample II	Sample III	Sample IV	Sample V
	2	5.9	6.0	6.1	6.0
8	6.0	6.0	6.1	6.0	6.0
15	6.1	6.1	6.2	6.1	6.2
20	6.1	6.1	6.3	6.2	6.3
28	6.2	6.2	6.3	6.2	6.3

考 察

著者は第3報<sup>(7)</sup>に於て、蛋白質の分解に依るアミノ態窒素の増加は塩辛調製後9~12日位迄急速であるが、この期間中の塩辛中の細菌数の増加は緩慢で、従つて細菌の生化学的作用は微弱であると考えられる、故にこの期間に於ける熟成は主として自

Table 3. Changes in free amino acid liberated during the ripening process of Shiokara

Sample Amino acid Days of ripening	Sample I	Sample II	Sample III	Sample IV	Sample V
	1 4 11 18 25 28	3 10 17 21 28	3 10 18 25 28	3 10 18 25 28	3 10 17 21 28
aspartic acid	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
glutamic acid	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
glycine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
alanine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
valine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
leucine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
phenylalanine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
tyrosine	+++---	-----	+++++	+++++	+++++
arginine	++++++	+---+	+++++	+++++	+++++
lysine	++++++	+---+	+++++	+++++	+++++
histidine	++++++	+++++	-++--	+++++	+++++
proline	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
oxyproline	-----+	---+	--++	---+	---+
serine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
threonine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++
ornithine	++++++	+++++	---++	+++++	+++++
taurine	++++++	+++++	+++++	+++++	+++++

家消化酵素に依り起り、それ以後20日位迄はアミノ態窒素量の増加はなく殆ど一定であるが、20日以後に於てアミノ態窒素量は再び増加し、これは塩辛中の細菌数が調製後20日位より急激に増加して居るので20日以後に於ける変化は主として細菌の作用に依るものであらうと推論した。

本実験に於ては、容器中の空気をH<sub>2</sub>で置換した試料、試料中に通気を行つたもの或は tolueneを加えたもの等いずれの試料に於ても塩辛調製後8~10日位迄アミノ態窒素量は急速に増加している。これは主として自家消化酵素に依り蛋白質が分解してアミノ酸が増加した為であらう。然したとえ

toluene に依る防腐条件下において試料に於てさえ、最初に存在していた細菌に依つて生産された酵素が影響し、その作用が眞の自家消化作用と同時に表われる。勿論これは蛋白質の分解に依るアミノ態窒素の増加率に対しては大なる影響を与えないが、アミノ酸は更に細菌の deaminase 或は decarboxylase の作用に依りそれぞれケト酸とアンモニア或はアミン類と  $\text{CO}_2$  を生成するであろう。著者はアミン及びアンモニア量を測定してこの点を明らかにし様と計画し、ヒスタミン量を木俣、河合氏法<sup>(8)</sup> (Eggerth法<sup>(9)</sup>を改良した方法)に依り測定しようとしたが、測定条件が厳密なので、ヒスタミン及びアンモニアの測定を今回は行わなかつた。追試して追つて報告する予定である。

Fig. 1 に於て塩辛調製後10日位よりアミノ態窒素は殆んど増加していない。これまでの段階を以下第一段階と称すると、この第一段階に於ける試料 I と II 及び試料 IV と V との間アミノ態窒素量の差は toluene に依る自家消化酵素に対する阻害及び微生物の発育阻害或は死滅に依るものであろう。18~20日以後のアミノ態窒素の増加する過程を以下第二段階と称すと、この第二段階に於ける試料 I, III, 及び V のアミノ態窒素の増加は明らかに細菌酵素の作用に依るものであろう。toluene にて処理した試料 II 及び IV は 8~10日以後は殆んど増加していないが、やゝ増加の傾向のあるのは、最初に存在していた細菌によつて生産された酵素に依るものであろう。通気を行つた試料 III と対照試料 V と比較すると、第一段階に於てアミノ態窒素は約 2mg, 第二段階に於て約 5mg の差がある。之は通気に依り好気性菌の侵入及び発育が促進された為で、第二段階に於て細菌酵素の作用が顕著に表われている。試料 III の第一段階の主反応は自家消化酵素に依るものと考えられるが、bacteria free の空気を通氣した試料について実験して見ると更にこの点が明確になると思う。これは追試する予定である。paper chromatography に依るアミノ酸の検出の結果から考察すると、イカ肉は新鮮時既に遊離アミノ酸が多く塩辛調製直後既に aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, arginine, lysine, histidine, proline, serine, threonine, ornithine, taurine が遊離アミノ酸として検出された。試料 I 及び II に於て tyrosine, arginine 及び lysine が消失している。これは恐らく之等のアミノ酸が細菌酵素に依り脱炭酸され、相当するアミン類と炭酸ガスを生成した為であろう。この脱炭酸作用に關与する酵素はその作用の最適 pH が 5.0 附近の酸性側にあるし最適温度は 25~28°C, 且つ適応酵素であつて基質としては何れのアミノ酸もすべて作用をうけるのではなく、OH 基, COOH 基,  $\text{NH}_2$  基等の極性基が  $\alpha$ -アミノ基から遠く隔つた位置にあるものに限られている。即ち lysine, arginine, ornithine, histidine, tyrosine, glutamic acid 等のアミノ酸が基質となる性質をもつている<sup>(10)</sup>。試料は pH も温度も丁度最適に近い条件にある為之等のアミノ酸が脱炭酸作用に依り消失したものと考察する。試料 III, IV 及び V に於ては histidine の消失が見られる。微生物は好気的狀態で  $\alpha$ -アミノ酸の  $\alpha$ - $\text{NH}_2$  基を離脱し相当するケト酸とアンモニアを生ずる所謂酸化的脱アミノ作用が広く認められている。酸化的脱アミノ酵素(フラビン酵素)はその作用の最適 pH が 8.0 附近にあつて、pH 5 以下の酸性側では著しく阻害される。併し 1-histidine 等の塩基性アミノ酸に対する細菌の脱アミノ酵素は pH 6.0 附近に最適 pH を有し、pH 5.0 でも pH 8.0 以上の作用能を呈する性質をもつている<sup>(10)</sup>。試料の pH は 6.0~6.3 にある為に、試料中に於ては中性又は酸性のアミノ酸に対する酸化的脱アミノ作用は弱い、histidine 等の塩基性アミノ酸に対し強力に働いた為に試料中の histidine が消失したと考察する。各試料中 ornithine が検出されたが、之は arginine から arginase に依つて尿素と ornithine を生じたものであろう。又試料 III に於ては初め ornithine が検出されなかつたがこの様な状態に於ては arginase の作用が弱い為であろう。

arginase は脊椎動物<sup>(11)(12)</sup>, 無脊椎動物<sup>(13)</sup>等に広く分布している。イカ肝臓中に arginase が存在しているか否か、存在しているなら ornithine cycle が成立するか否か、細菌の arginase は動物中

に存在する arginase とその分解方式を異にし、arginine を尿素と ornithine に分解しない、多分 guanidinodesimidase であろう<sup>(14)</sup>と云はれているがはたして guanidinodesimidase であるか否か目下研究中であるので追つて報告する予定である。

いずれの試料に於ても proline が遊離状に検出された。天野氏<sup>(15)</sup>に依れば遊離アミノ酸としての proline はイカ特有のものであり、他の魚類では加水分解を行わない限り出現しない。この proline がイカの腐敗過程中（2日程度）に消失する。之は細菌の代謝過程に利用された為であろうと報告している。著者の実験に依れば塩辛に於ては（いずれの試料に於ても）proline が消失した事はなかつた。然し熟成の後期に oxyproline が検出された。paper chromatogram 上に於て proline は ninhydrin と反応して黄色を呈するが、oxyproline は特有の橙色を有し明らかに区別出来る。試料Ⅱに於て28日後に sampling したものが chromatogram 上 oxyproline の附近に紫赤色の spot が検出されたが、この spot は未知のもので恐らく proline か oxyproline の分解産物ではなからうか。

## 要 約

塩辛の熟成に關与する自家消化酵素及び細菌の作用を、なるべく区々別々に分け、下記の様に色々な条件下に於て熟成させ、熟成中の amino-N の量を測定し、又 paper chromatography に依り遊離アミノ酸の消長を観測し、総合的に塩辛の熟成現象を考察した。

- (1) 塩辛を容器中に約半量入れ、容器中の空気を  $H_2$  と置換し密封した。
  - (2) 塩辛を容器中に約半量入れ、之に toluene を加え、容器中の空気を  $H_2$  と置換し密封した。
  - (3) 塩辛を容器中に約半量入れ、一方の口より塩辛中に硝子管を差し込み、この管を通じて通気した。
  - (4) 塩辛を容器中に約半量入れ、之に toluene を加えた。
- 以上 (1) (2) (3) (4) はいずれも一定時の間隔を置いて、一定時間振盪し続けた。
- (5) 塩辛を容器中に約半量入れ、振盪しないで放置した（対照試料）。

## 文 献

- (1) 長尾、木村：水産学雑誌 54, (1949), 21.
- (2) 長尾、木村：北海道大学水産学部研究彙報 1, 2, (1951), 81.
- (3) 長尾：北海道大学水産学部研究彙報 2, 2, (1951), 128.
- (4) 宮木、佐竹、林：薬学雑誌 71, 4, (1951), 249.
- (5) Winegard, Joennies : Science, 108, (1948), 505.
- (6) Consden : Nature, 162, (1948), 359.
- (7) 長尾：北海道大学水産学部研究彙報 2, 2, (1951), 145.
- (8) 木俣、河合：食糧科学研究所報告 5, (1951), 21.
- (9) Eggerth, Littwin & Deutsch : J. Bact., 37, (1939), 187.
- (10) 植村：酵素（坂口、朝井編）p. 135.
- (11) B.Fuchs : Z. physiol. Chem., 114, (1931) 101.
- (12) A. Hunter : J. Biol. Chem., 81, (1929), 505.
- (13) E. Baldwin : Biochem. J., 29, (1934), 252.
- (14) David M. Greenberg : The Enzymes (Edited by Sumner & Myrback) 1, 2, (1951), 893.
- (15) 天野、富谷：日本水産学会誌 16, 12, (1951), 10.

（水産科学研究所業績 第137号）