

## 塩蔵オキアミの利用に関する研究 (第3報)

—オキアミエキスの成分と利用—

河端 信・田口 邦子・大槻 耕三・田中 敬子\*

## Studies on Utilization of Salted Antarctic Krill (*Euphausia superba*) (III)

—Constituents of the Krill Extractives and  
its Utilization as a Natural Flavoring Agent—

MAKOTO KAWABATA, KUNIKO TAGUCHI, KOZO OHTSUKI  
and YOSHIKO TANAKA\*

Nitrogenous components of the extractives from salted antarctic krill (*Euphausia superba*) were characterized.

The nucleic acid derivatives were identified by gel chromatography on Sephadex G-15 or Biogel P-2 column and by UV spectra. The nucleosides, inosine, uridine, guanosine and adenosine were found in the extractives but no nucleotide was detected.

Betaine, trimethylamine-trimethylamineoxide and creatine-creatinine were determined by specific methods of analysis. As previously reported, free amino acids and betaine were predominant constituents of the krill extractives and these substances mainly contribute to the taste of extractives.

The ethanol treatment was effective to reducing the NaCl content to 50% of the original extractives without loss of ninhydrin positive constituents. Ethanol was mixed with equal volume of extractives and precipitates were removed by the centrifugation. The supernatant was concentrated with the rotary evaporator.

Besides NaCl, a part of nucleosides and brown pigment were removed by the ethanol treatment.

We obtained the product of concentrated extractives which contains 45.4% moisture, 14.5% NaCl and 32.3% crude protein and it will be practically used as a natural flavoring agent.

(Received July 13, 1981)

### 緒 言

近年、加工食品の高級化、冷凍食品のマーケット拡大などに伴って、調味ベースとして利用されてきた天然調味料の分野の発展にはめざましいものがあるが、とくに魚介類においては原料の供給能力に限界のくる

ことが心配されている。

著者らはさきに、塩蔵オキアミから、イソプロピルアルコール (IPA) 抽出法により、オキアミたん白濃縮物 (KPC) と同時にエキスを分離し、このエキ스는遊離のアミノ酸に富み、かつ甘味を帯びた旨味を呈し、天然調味料として利用することが期待できる

京都府立大学食物学科食品学講座

Laboratory of Food Chemistry, Department of Food Science, Kyoto Prefectural University

\* 光華女子短期大学

Kōka Women's Junior College

と報告した。

今回、エキス成分を明らかにするために、天然調味料の含窒素成分中で、呈味に補足的作用を果している<sup>2)</sup>と考えられているトリメチルアミノオキサイド (TMAO)、ベタイン、クレアチンの定量およびセファデックス G-15 によるカラムクロマトグラフィーにより分画された各画分の紫外外部吸光比および紫外外部吸収スペクトルの測定を行ない、主として核酸関連物質の同定を行なった。

つづいて、実際に調味料として利用する場合には、色調、塩分、魚介臭、保存安定性、物性などが品質上の問題として考えられ<sup>3)</sup>、現在製造販売されているエビエキスの規格としては、水分40%以下、塩分12%以下、粗たん白40%以上が大体の目標とされている<sup>4)</sup>。そこで、得られたエキスを調味料として利用するためには、塩分に対する粗たん白濃度が低いので、食塩を減らして濃縮する方法を検討したのでその結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 実験材料

オキアミエキスは前報<sup>1)</sup>の方法で調製した。

### 2. エキス成分の分析法

遊離アミノ酸およびペプチドは前報<sup>1)</sup>の方法、ベタインは AOAC の分析法<sup>5)</sup>、トリメチルアミン (TMA) は橋本ら<sup>6)</sup>の方法で、トリメチルアミノオキサイド (TMAO) はデバルダ合金で TMA に還元後、前記の方法で、クレアチン (Cre) およびクレアチニン (Crn) はアルカリ・ピクラート法<sup>7)</sup>で、核酸関連物質は活性炭吸着法<sup>8)</sup>で濃縮と他の成分の除去をした後測定を行なった。

### 3. セファデックス G-15 によるゲルろ過<sup>9)</sup>

0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化したセファデックス G-15 をカラム (1.5×85 cm) に詰め、エキス 1.0 ml につき同じ緩衝液を用いて 0.5 ml/min の流速で溶出を行ない、フラクションコレクターで溶出液を 5 ml ずつ分取し、各試験管につき、260 nm の吸光度測定、塩濃度は電導度計 (CD-35M, エムエス機器製) を用い、同時に、アミノ基はニンヒドリン反応<sup>10)</sup>、糖はフェノール硫酸法<sup>11)</sup>、着色物質は 520 nm の吸光度により測定した。

### 4. ヌクレオチド、ヌクレオシドおよび塩基の分離<sup>12)</sup>

アルカリ前処理を行なったバイオゲル P-2 (400

メッシュ) をカラム (0.6×65 cm) に詰め、セファデックス G-15 で分画した各ピーク画分の 50  $\mu$ l を通し、0.02 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.4) を用いて 0.4 ml/min の流速にペリスタポンプで調節して溶出を行ない、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよび塩基の同定を行なった。

### 5. 紫外外部吸光比の測定<sup>13)</sup>

セファデックス G-15 により分画された各画分の 250, 260, 280, 290 nm における吸光度を測定し、260 nm に対する吸光比 ( $E_{250/260}$ ,  $E_{280/260}$ ,  $E_{290/260}$ ) を求め、標準物質の値と比較して同定を行なった。

### 6. 紫外外部吸収スペクトルの測定

標準物質 (ウリジン, イノシン, グアノシン, アデノシン) 1 mg を 5 ml の蒸留水に溶解し、1) 0.1 N HCl (pH 2.0), 2) 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 3) 0.1 N NaOH (pH 12.0) の溶液でさらに 5 倍に希釈した液につき、日立 124 型ダブルビーム分光光度計を用いて波長 230~300 nm 間の吸収スペクトルを測定しておき、同じくセファデックス G-15 で分画された各画分を上記 1), 2), 3) の溶液で 5 倍希釈した液につき吸収スペクトルを求め各物質の同定を行なう。

### 7. エタノール (EtOH) 処理による脱塩

50 ml 容共栓遠沈管にエキス 5 ml をとり、99% (v/v) EtOH をそれぞれ 5, 10, 15, 20 ml 加えてよく振りまぜたのち、遠心分離し、その上清をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して EtOH を除いたのち、定容とし、処理前後のエキス成分 (食塩、総窒素、アミノ窒素、色調) の変化を比較する。

## 結果および考察

### 1. エキス中の含窒素成分について

エキス中の含窒素成分を分析した結果を Table 1 に示した。アミノ酸およびペプチドが73.9%を占めていることから、呈味の中心は遊離のアミノ酸が主体であることがわかる。ついで、そう快な甘味を持っているベタインが11.2%含まれ、呈味に補足的に関与していると考えられる。その他の主な成分としては、核酸関連物質が含まれている。

### 2. セファデックス G-15 によるカラムクロマトグラフィー

セファデックス G-15 によるカラムクロマトグラフィーの結果を Fig. 1 に示した。260 nm の吸光度、

Table 1 Nitrogenous Constituents in the Salted Krill Extractives

	N/total N (%)
Free Amino Acids	60.4
Peptides	13.5
Betaine	11.2
TMA+TMAO	2.1
Cre+Crn	1.1
Nucleic Acid Components	11.0
NH <sub>3</sub>	0.1
Others	0.6

TMA: Trimethylamine

TMAO: Trimethylamineoxide

Cre: Creatine

Crn: Creatinine

フェノール硫酸法による 490 nm, ニンヒドリン反応による 570 nm の吸光度を測定した結果より, 合計 10個のピークに分画された。

F-1 (フラクション-1) は void volume の位置で溶出される着色物質で, フェノール硫酸法による発色

が非常に高い値を示す。F-2, 3 はニンヒドリン反応が陽性で, F-2 はペプチド画分, F-3 は食塩と一緒にアミノ酸が溶出していることを示している。F-4, 5, 7, 8 は  $E_{260} > E_{280}$  を示し, 核酸関連物質であることが予想される。また, 着色物質は F-1 と F-3 の2つの画分に分離溶出された。

### 3. 核酸関連物質の同定

Fig. 1 で分画された F-4~10 の各画分および標準物質の pH 7.0 (0.05 M リン酸緩衝液) における吸収極大値と 260 nm に対する 250, 280, 290 nm の吸光比を Table 2 に示した。標準物質のセファデックス G-15 によるカラムクロマトグラフィーの溶出位置と各吸光比の値から F-4, 5, 6, 7, 8, 10 は, それぞれウリジン, イノシン, キサントシン, グアノシン, アデノシンおよびグアニンであることが確認された。

F-9 は吸収極大値が 280 nm 付近にあり,  $E_{280} > E_{260}$  を示すこととセファデックス G-15 によるカラムクロマトグラフィーの結果と合わせて, 遅れて溶出される芳香族アミノ酸と考えられ, Fig. 2 に示したように吸

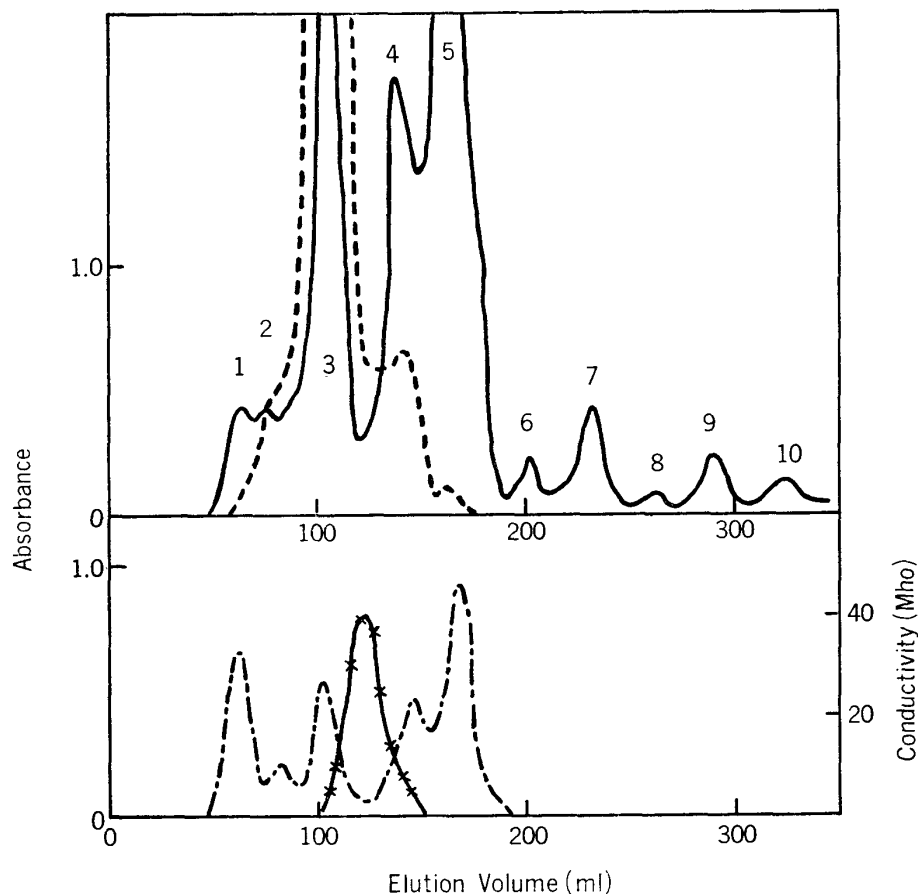


Fig. 1. Gel Filtration Pattern of the Salted Krill Extractives on Sephadex G-15 Column  
A column (1.5×85 cm) was equilibrated with 0.05M phosphate buffer (pH 7.0) and eluted with the same solution  
——, 260 nm; ----, 570 nm; - · - ·, 490 nm; —×—, Mho

Table 2 Identification of the Nucleosides and Bases by Absorption-Ratio of each Fraction of the Salted Krill Extractives separated by Gel Filtration on Sephadex G-15 Column

Fraction No.	$\lambda$ max (nm)	Absorption-Ratio			Identified
		$\frac{E_{250}}{E_{260}}$	$\frac{E_{280}}{E_{260}}$	$\frac{E_{290}}{E_{260}}$	
4	262	0.74	0.37	0.04	Uridine
	(262)*	(0.74)	(0.37)	(0.03)	
5	248	1.67	0.16	0.03	Inosine
	(248)	(1.68)	(0.21)	(0.03)	
6	275	1.33	1.05	0.51	Xantosine
	(278)	(1.30)	(1.13)	(0.61)	
7	253	1.17	0.69	0.21	Guanosine
	(252.5)	(1.16)	(0.67)	(0.25)	
8	258	0.78	0.17	0.02	Adenosine
	(258)	(0.80)	(0.15)	(0.01)	
10	250	1.46	1.07	0.58	Guanine
	(249)	(1.42)	(1.04)	(0.54)	

\* Values in brackets are the data of authentic samples

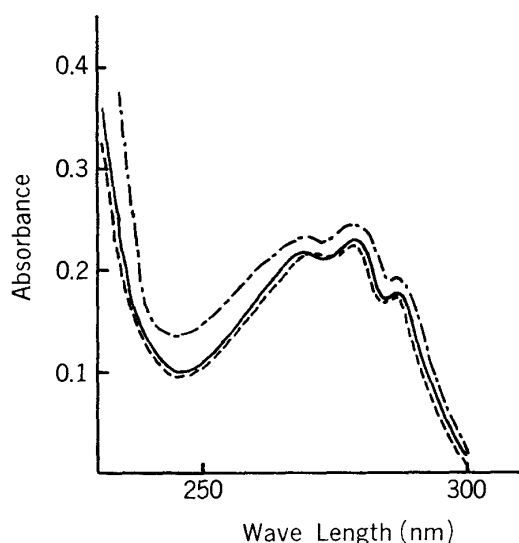


Fig. 2. Absorption Spectra of Fraction-9 of the Salted Krill Extractives separated by Gel Filtration on Sephadex G-15

——, pH 7.0 (0.05M phosphate buffer)  
 ----, pH 2.0 (0.1N HCl)  
 - · - ·, pH 12.0 (0.1N NaOH)

収スペクトルがL-トリプトファンと全く一致した。

バイオゲル P-2 によるカラムクロマトグラフィーにおいては, void volume でヌクレオチドが溶出され, ついでヌクレオシド, 塩基の順に溶出される。セファデックス G-15 のカラムにより分画された各画分の濃縮物をバイオゲル P-2 によりカラムクロマトグラフィーを行なった結果からも, F-4~10 の画分にヌ

クレオチドの存在は認められなかった。

以上, 確認された核酸関連物質は, すべてヌクレオシドおよび塩基であり, ヌクレオチドはほとんど存在していないことから, オキアミに含まれる酵素系は, 他の甲殻類と同様であり, アデニル酸→アデノシン→イノシンという分解経路をとることが確かめられた。また, ヒポキサンチンがほとんど含まれていないことから, その後の反応は進んでいないと思われる。

#### 4. EtOH 処理によるエキス成分の変化

EtOH 濃度により食塩の溶解性が異なる<sup>14)</sup>ことから, エキスに 1, 2, 3, 4 倍容の EtOH を加えて沈殿物を除いた後のエキス中の食塩, 窒素含量, アミノ窒素 ( $E_{570}$ ) および色調 ( $E_{520}$ ) の変化を, 処理前と比較した結果を Table 3 に示した。EtOH 濃度を 50~67% とすることにより, 食塩を元の 53~47% まで減らすことができ, しかもアミノ窒素は 6% しか失われていないことがわかった。さらに, EtOH 濃度を上げると, 析出除去される食塩は増加するが, 失われる有効成分も多い。EtOH 処理後は減圧濃縮により EtOH を除く操作が必要であるが, 少量の EtOH の溶存は, 調味料としての呈味の点からはむしろ好ましいと考えられる。

Table 3 Desalting Effect of Ethanol

EtOH Conc. % (V/V)	NaCl %	Total N %	$E_{570}$ %	$E_{520}$ %
0	100	100	100	100
50	53.3	90.3	95.2	76.6
67	46.7	84.1	94.1	57.3
75	36.7	76.9	87.0	34.7
80	30.0	70.8	81.1	23.4

EtOH 処理後のエキス成分の変化をさらに詳しく検討するために, エキスに同容の EtOH を加えたのち, 上清を元の量まで濃縮を行ない, 処理前のものとゲル透過パターンを比較した結果を Fig. 3 に示した。ニンヒドリン反応陽性物質で呈味の主成分であるアミノ酸にはほとんど減少が見られず, 窒素成分の減少は, おもにヌクレオシド画分によるものであることがわかった。

この呈味に関与しない成分の減少は, 調味料として利用する上ではむしろ好ましい結果と考えられる。

以上の結果より, EtOH 濃度 50~67% で処理を行ない沈殿物を除去することにより, 効果的に脱塩, 脱色を行ない, その後, 元の約 2/3 容まで濃縮を行なっ

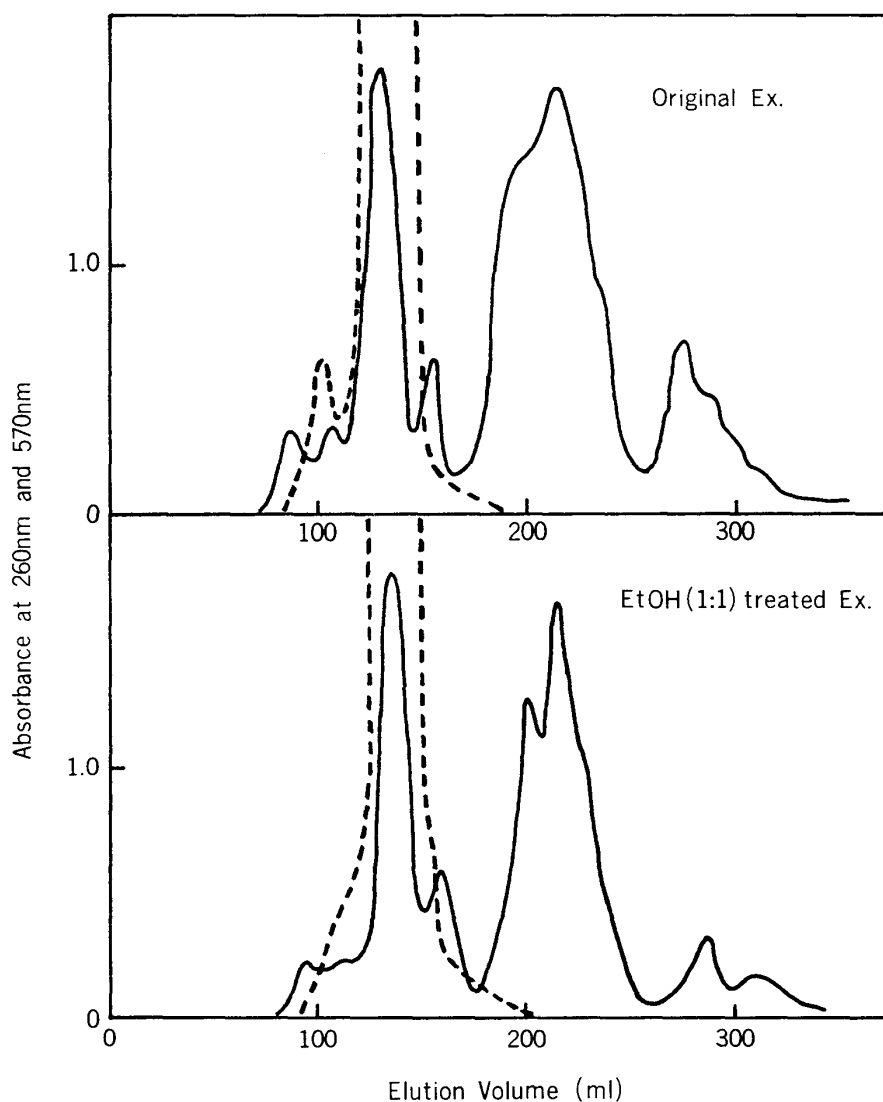


Fig. 3. Gel Filtration Patterns of the Salted Krill Extracts before and after Ethanol Treatment on Sephadex G-15 Column  
A column (3.0×35 cm) was equilibrated with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) and eluted with the same solution  
——, 260 nm; - - - - - , 570 nm

て、水分45.4%、塩分14.5%、粗たん白32.3%の成分組成を持つ濃縮エキスを得ることができた。さらに粉末化などにより、調味料としての利用範囲は大きいと考えられる。

#### 要 約

1. 塩蔵オキアミエキスの呈味の主体は遊離アミノ酸であり、窒素成分の約2/3を占めている。
2. ついで、ベタインが多く含まれ、呈味に補足的に関与している。
3. セファデックス G-15 によるカラムクロマトグラフィーを行なった結果、10個の成分に分画できた。
4. 紫外部吸光比および紫外部吸収スペクトルの測定により、ヌクレオシドとしてウリジン、イノシン、

キサントシン、グアノシンおよびアデノシン、塩基としてグアニンの存在を確認した。

5. エキス中の窒素成分の損失なしに食塩を除く方法として EtOH 50～67%処理が有効であった。
6. エタノール処理により、水分45.4%、塩分14.5%粗たん白32.3%の組成を持つ濃縮エキスを得た。

(1981年7月13日受理)

#### 文 献

- 1) 河端 信・田口邦子・大槻耕三・田中敬子：京都府大学報（理学・生活科学），No. 29，27（1978）
- 2) 石田賢吾：食工誌，25，167（1978）
- 3) 村田昂三：ジャパンプードサイエンス，18（10），29（1979）

- 4) 梶原尚志：ジャパンフードサイエンス, 15 (2), (1976)
- 5) H. William: *Methods of Analysis of the AOAC* 11 ed, p. 376 (1970)
- 6) 橋本芳郎・岡市友利：日水誌, 23, 269 (1957)
- 7) 関根隆光・笹川泰治・森田茂広・木村徳次・倉富一興：光電比色法, 各論 2, 95 (1958), 南江堂 (東京)
- 8) S. P. Colowick and N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, Vol. 3, p 792 (1957), Academic Press
- 9) L. Sweetman and W. L. Nyhan: *J. Chromatogr.*, 32, 662 (1968)
- 10) S. Moore and W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, 176, 367 (1948)
- 11) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rober and F. Smith: *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
- 12) J. X. Khyn: *Anal. Biochemistry*, 71, 231 (1976)
- 13) 浮田忠之雄：核酸, 89 (1965), 朝倉書店 (東京)
- 14) 日本化学会：化学便覧, 498 (1952), 丸善 (東京)