

のり冷蔵保存中の二、三の成分の変動

井上 晃男・中村 英幾*・浅川 末三
(広島大学水畜産学部水産学科)

Changes of a Few Constituents in Purple Laver (Red Alga *Porphyra*) after Some Periods of Storage in Frozen State.

Akio INOUE, Hideki NAKAMURA* and Suezo ASAKAWA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal
Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama
(Figs. 1-8; Tables 1-4)

日本におけるのり養殖の歴史は古く、現在では、海に面する大部分の都府県で実施されるに至っている。その生産は、たとえば、昭和45年には年産約60億枚にも上り、また、このために使用された網ひびの数は約2,000万枚の多きを数えている¹⁾。しかしながら、のりの養殖業は気象条件によって左右され易いため、極めて不安定であり、年による豊凶の差が甚しい。そこで、少しでも生産を安定させるために、冷蔵網の技法が導入され²⁾、また、その理論的な裏付けも次第になされ^{3~5)}、現在ではこの冷蔵網の活用によって大きな経済的効果を挙げ得るに至っている。

一般に、のり網の冷蔵は10~12月の間に行なわれ、急速冷凍後、 $-15\sim-25^{\circ}\text{C}$ で保存する方法で実施されている。このような方法で約11ヶ月冷蔵した場合でも、のりは約80%が生存し得ること⁶⁾から考えれば、実際にはのりを冷蔵して越夏させることも可能であろうと思われる。しかし現実には、約4ヶ月以内に冷蔵網を漁場に出す場合が多く、これ以上の長期保存はごく稀にしか行なわれていない。

冷蔵網が実用化されて以来、その枚数は年ごとに増加の一途をたどり、たとえば昭和45年には、日本全国で使われた総網ひび数の約1/3に当る500万枚の多きを数えるに至っている。冷蔵網は、原則的には、予備的なものとして準備されるものであるから、これらのすべての網が実際に漁場に張り込まれた訳ではないにしても、その数が膨大なものであることに変わりはない。冷蔵網をのり場に設置する場合には、種々の注意が必要とされているが⁶⁾、充分な配慮を払ってもなお冷蔵網から採取、製品化したのりは、商品価値が若干落ちるとされている。

このような事実から、のりを冷蔵保存した場合に、葉体成分がどのように変化するかを明らかにするため、本研究はその一端として、のり葉体中の遊離アミノ酸およびTTC還元能の変化を調べ、二、三の知見を得たのでここに報告する。

試料および実験方法

試験試料および冷蔵法：福山市水呑地先で養殖されたのり（主としてスサビノリ *Porphyra yezoensis*）のうち肉眼的に健全と思われるものを選んで摘採し、できるだけ速やかに研究室に持ち帰り、汙過海水でよく洗った後、表面水を汙紙で軽く拭き取り、室温（ $14\sim17^{\circ}\text{C}$ ）で約7時間風乾した。この乾燥試料を2部に分け、それぞれをビニール袋に入れ、空気または N_2 ガスを充満させた。なお実施に当っては、のり葉体

* 現在富士昆布K.K. (Fuji Konbu K.K.)

約10gずつを小袋に入れ、この20袋ずつを前記のビニール袋に収め、 -25°C のフリーザー中で冷蔵した。また、実際に冷蔵網を製造する場合には急速冷凍法が利用されているので、本研究においても、その一部の試料についてサーモボックス（住友電気工業製）による急速冷凍処理を行なった。その時のサーモボックス内の温度変化は Fig. 1 の通りであり、試料を入れてから約60分後に -25°C に下がることがわかった。

TTC還元量の測定法：TTC還元量の測定は、のりのコンコセリスおよび成葉について尾形^{7,8)}が用いた方法に準じて行なった。

すなわち、湿重量約1gの試料葉体をTTC溶液(2mg/ml)100ml中に浸漬し、 37°C の恒温器中に12時間放置して反応を行なわせた。次いで、乳鉢またはポッターホモゲナイザーで十分に磨碎し、氷酢酸：トルエン：水(2：1：1)50mlで抽出後、遠心

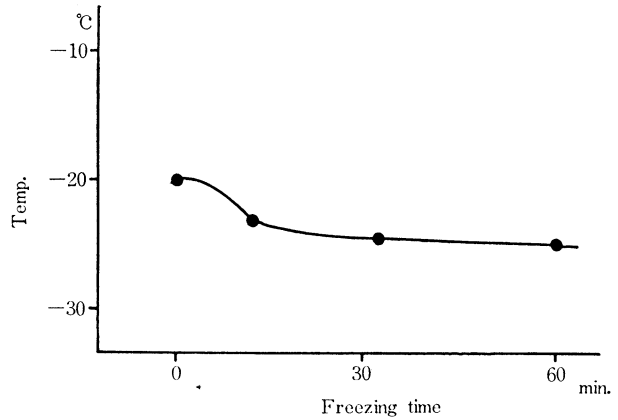


Fig. 1. Changes in internal temperature of quick freezing box.

分離によって紅色のフォルマザンを含む上澄液を集め、定容後、島津光電分光々度計QV-50により $490\text{m}\mu$ における吸光度を測定した。この値を、既知量のTTCと、これを還元するに足る L-アスコルビン酸 とを反応させて作成した検量線に適用し、試料によって還元されたTTC量を求めた。得られた検量線を Fig. 2 に示した。

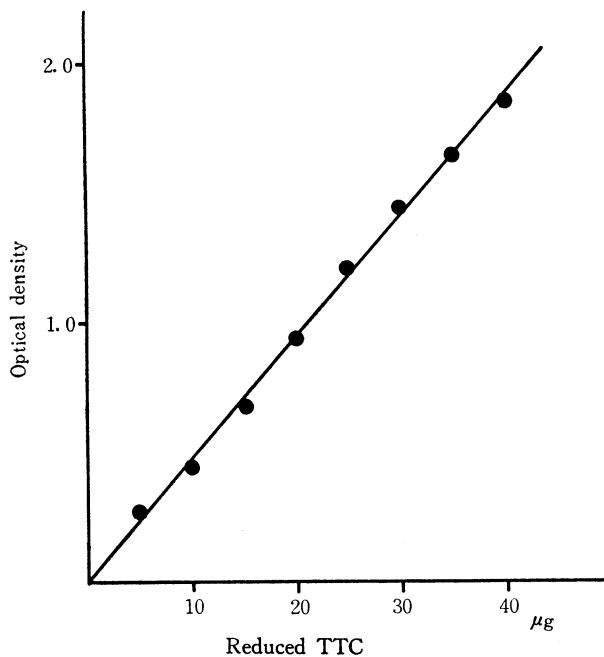


Fig. 2. Linear relation between the quantity of TTC reduced and optical density at $490\text{m}\mu$.

遊離アミノ酸の分析法：試料葉体をできるだけ細切した後、約50倍量の70%アルコールと少量の石英砂を加え、乳鉢中で十分に磨砕し、フラスコに移し、還流冷却器を付して80°Cで15分間温浸した。冷後、遠心分離と残渣の洗滌を3回繰り返す、これらの上澄液を合して減圧下で濃縮した。この液を試料として、遊離アミノ酸、エキス態Nを測定した。なお、遊離アミノ酸は日立034液体クロマト装置により、また、凍結試料をそのまま用いて分析した全Nおよびエキス態Nはマイクロキェルダール法によってそれぞれ分析した。

実験結果

室温で行なった予備乾燥時におけるのり葉体中の水分量の変化を Fig. 3 に示した。

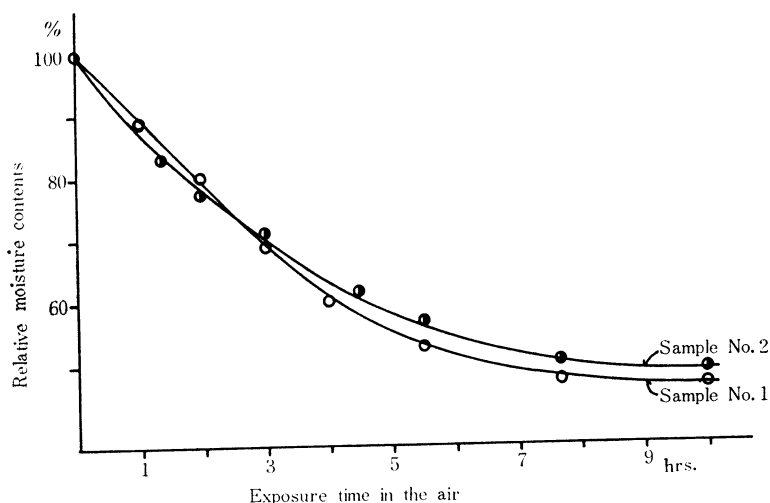


Fig. 3. Changes of moisture contents in purple laver samples exposed in the air at room temperature.

なお、測定に際しては、漁場で採取したのり葉体を汙過海水で洗滌し、葉体表面の水分を汙紙で軽く拭き取り、それぞれの葉体が重なり合わぬようにして室内（相対湿度40—50%）に放置した。水分量の変化は2試料について測定したが、この図からわかるように、いずれもほぼ7時間後に、最初に含まれていた水分の約50%が失われ、それ以後10時間を経過しても殆んど変らなかった。そこで本実験においては、原則として、室温で7時間乾燥することとし、この乾燥試料を冷蔵保存することにした。

TTC還元能の変化：試料のりの還元能を測定するに先立ち、生成したフォルマザンの保存方法、TTC還元反応に要する時間など二、三の点について予備的に検討した。

一般に、TTCの還元反応は、30°C以下の温度で行なわせた場合、24時間以上を要するとされている⁹⁾。この時間を少しでも短縮することは、酵素本来の性質から云っても、あるいは、多量の試料を処理する際の手間から云ってもかなり効果的であると思われる。そこで、反応温度を37°Cにし、その場合に要する反応時間を調べた。結果を Fig. 4 に示した。

この図から明らかなように、約10時間で反応が終了することがわかったので、実際ののり試料の測定に際しては、37°Cで12時間インキュベートすることにした。

次いで、抽出したフォルマザンの安定性について調べた。TTCの還元反応は、紫外線によって著しく促進されると云われている¹⁰⁾。一方、予備実験の結果、分離されたトルエン層中のフォルマザンは、光に対して特に不安定であり、分離直後から徐々に分解を始めることがわかった(Fig. 5)。

この図からわかるように、遮光した状態で-5°Cで保存すれば、少なくとも抽出後4~8時間は比較的安定であることがわかったので、分離・抽出の処理はできるだけ暗状態で行ない、また490 mμにおける吸

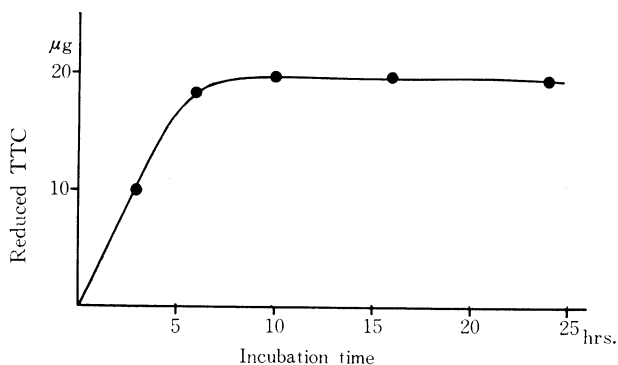


Fig. 4. Relation between the reaction time and the quantities of reduced TTC.

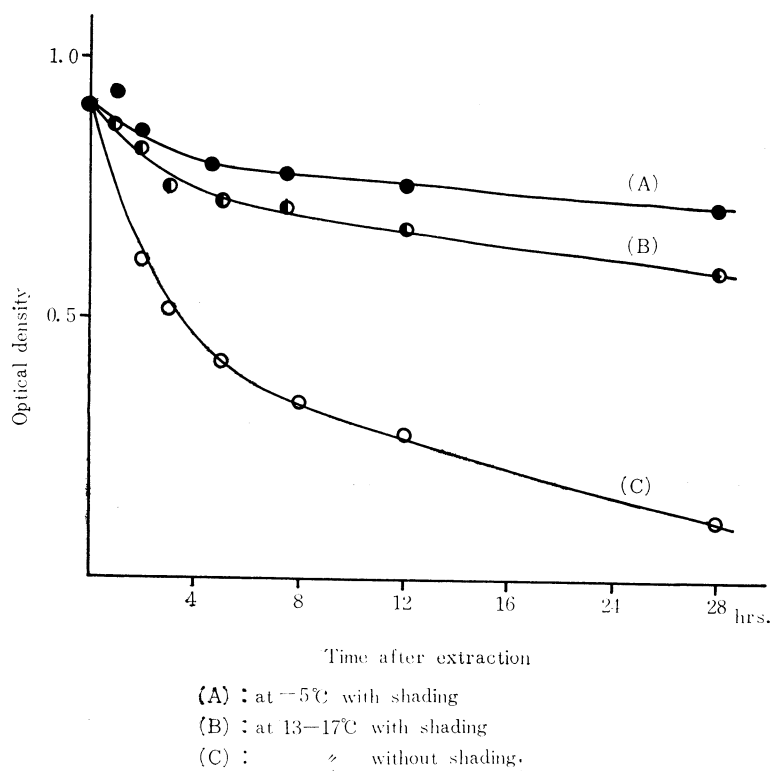


Fig. 5. Changes of extracted formazan in toluene solution.

光度の測定はこの時間帯内に行なうことにした。しかしながら、厳密にはこの時間帯内でもフォルマザンは徐々に分解すること、また遠心分離の操作ではフォルマザンの分離が完全に行ない得ず、全体の2~3%が水層中に残存してトルエン層に転溶しないことがわかった。以上のことを考え併わせると、TTC還元能として表示した値に10%程度の誤差はあったものと考えられる。

実際の測定に際しては、原則として3検体以上の試料についての還元量を調べ、これら複数の試料についての平均値で表わした。

N_2 ガスもしくは空気を充満させたビニール袋中で、6ヶ月間にわたって -25°C のフリーザー中に冷蔵

した場合の、のりのTTC還元能の変化を Fig. 6 に示した。

この図からわかるように、のり葉体単位乾重量当りのTTC還元量は、冷蔵期間が長くなるとともに直線的に変化するのではなく、冷蔵開始後2ヶ月までは急激に、それ以後はゆるやかに低下し、6ヶ月後には当初の約1/5~1/10にまで減少した。空気中で冷蔵保存した場合には、低下の程度がN₂ガス下の場合に比し

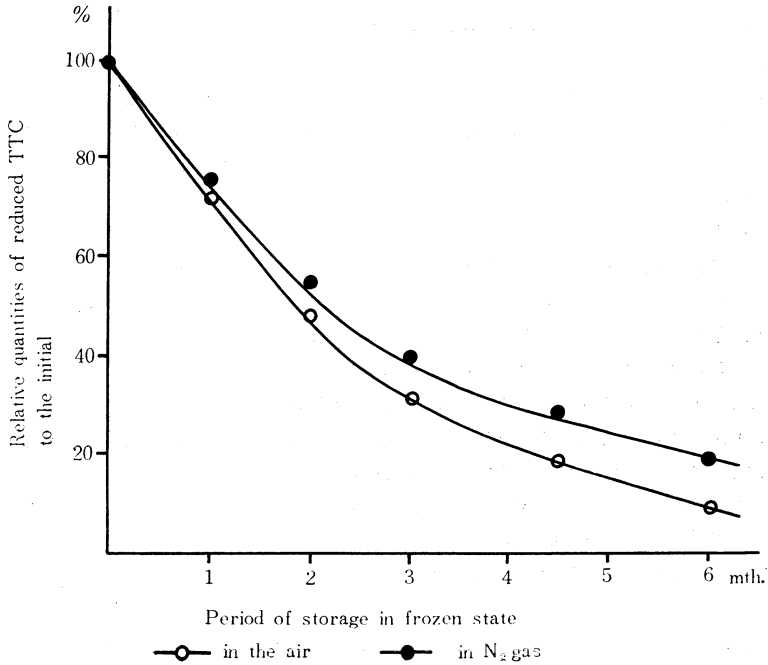


Fig. 6. Changes of quantities of reduced TTC after some period of storage in frozen state.

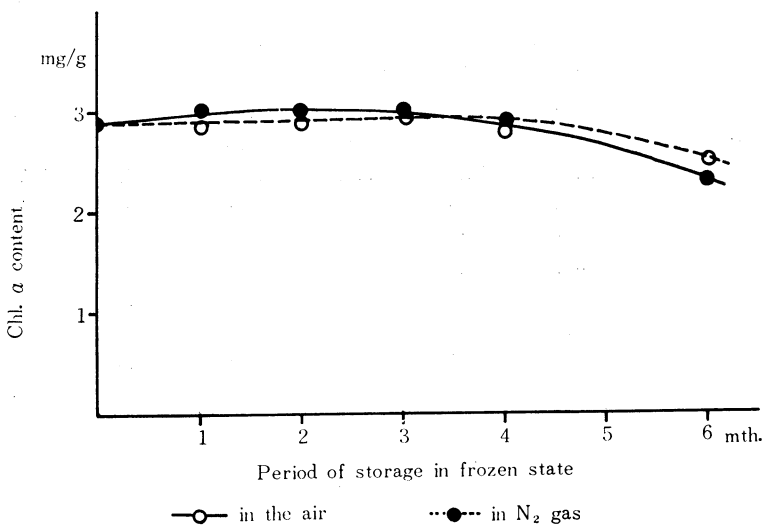


Fig. 7. Changes of Chlorophyll a contents after some period of storage in frozen state.

て著しく、また両者の差は冷蔵期間とともに益々増大し、6ヶ月後には前者のTTC還元能は、後者のその約半になった。なお、6ヶ月の冷蔵保存後、エリスロシン染色および顕微鏡観察によって、保存したのりの大部分が生きていることを確認した。しかし、コハク酸脱水素酵素を主とするTTC還元能は、6ヶ月後にその活性が冷蔵前の少なくとも半に低下することからすれば、冷蔵葉が健全葉と同じような正常な生理機能を回復するまでには、かなりの日時を要するものと思われる。

このTTC還元能と併行して、保存期間中の葉体のクロロフィルa量の変化をA.O.A.C.法によって調べた。結果をFig. 7に示した。

この図が示すように、葉体中のクロロフィルaは、4ヶ月後までは著しい変化は認められず、6ヶ月後にやや減少した。なお、クロロフィルaの測定は、冷蔵網を漁場にもどし採取、製品化したのりに若干色落ちが認められる、といわれるところから行なったものであるが、本実験の結果からは、6ヶ月の冷蔵保存後もそれほど差は認められず、むしろ、カロチノイド、またはフィコエリスリンその他の水溶性色素によるのではないかと推察された。

遊離アミノ酸量の変化：試料葉体中の遊離アミノ酸の測定結果をTable 1および2に示した。

実験開始時におけるそれぞれの遊離アミノ酸の含量は、これまでに発表された報告¹¹⁻¹³⁾と比較的によく一致した。冷蔵保存中に漸減したアミノ酸は、アスパラギン酸、スレオニン(またはセリン)、グリシン、アラニン、イソロイシンなどであり、中でもアスパラギン酸およびイソロイシンの減少がもっとも顕著であった。上に記した以外のアミノ酸およびアンモニアは、冷蔵期間を通じてほとんど増減しなかった。また、N₂ガス下で冷蔵したのり葉体中の遊離アミノ酸の減少の程度は、空気中で保存したもののほど著しくはなく、両試料の間には、冷蔵保存後6ヶ月で、藻体乾重量100g当りアスパラギン酸およびスレオニンで約20mg、アラニンで約160mgの差が認められ、グリシンおよびイソロイシンではほとんど差がなかった。

次に、エキス態Nならびに全N量の変化をFig. 8に示した。

この図からわかるように、全NはN₂下あるいは空気中のいずれの場合も、6ヶ月の冷蔵期間を通じてほとんど変化しなかった。また、エキス態Nは、二、三のアミノ酸と同様に漸減し、空気中で冷蔵保存した時の減少の程度は、N₂下におけるよりも常に顕著であった。さらに、冷蔵期間が長びくにつれて、この差

Table 1. Changes of extractive amino acid contents of purple laver after certain period of storage time in the air in frozen state (amino acids mg per 100 g of dried matter).

Amino acids	Period of storage time						
	Initial	1 mth.	2 mth.	3 mth.	4 mth.	5 mth.	6 mth.
Asp	328	254	231	190	131	100	71
Thr+Ser	139	98	85	84	102	74	59
Glu	1160	1130	1150	1020	920	1210	1050
Cit	62	59	53	59	53	70	58
Gly	79	58	60	49	45	40	40
Ala	1460	1250	1100	920	1000	880	800
Val	29	18	17	18	15	9	14
Ileu	13	5	4	5	3	2	2
Leu	6	11	9	8	14	3	7
Lys	*	*	*	—	*	—	*
His	*	*	*	—	*	*	*
Arg	*	—	—	1	—	*	—
Tau	892	743	853	801	835	861	859
Amm.	67	73	62	69	93	78	69

* Trace

— Not detected

Table 2. Changes of extractive amino acid contents of purple laver after certain period of storage time in N₂ gas in frozen state (amino acids mg per 100 g of dried matter).

Amino acids	Period of storage time						
	Initial	1 mth.	2 mth.	3 mth.	4 mth.	5 mth.	6 mth.
Asp	328	272	198	162	103	103	95
Thr+Ser	139	122	104	139	92	90	83
Glu	1160	1090	980	1210	1000	1160	1210
Cit	62	104	76	72	79	69	64
Gly	79	64	67	53	54	44	39
Ala	1460	1370	1390	1030	1100	1030	960
Val	29	28	28	28	20	19	24
Ileu	13	3	2	2	1	1	1
Leu	6	11	9	8	14	3	7
Lys	*	*	*	*	—	*	—
His	*	*	*	*	*	*	—
Arg	*	*	*	*	*	2	*
Tau	892	826	796	918	885	900	874
Amm.	67	73	84	74	54	77	68

* Trace — Not detected

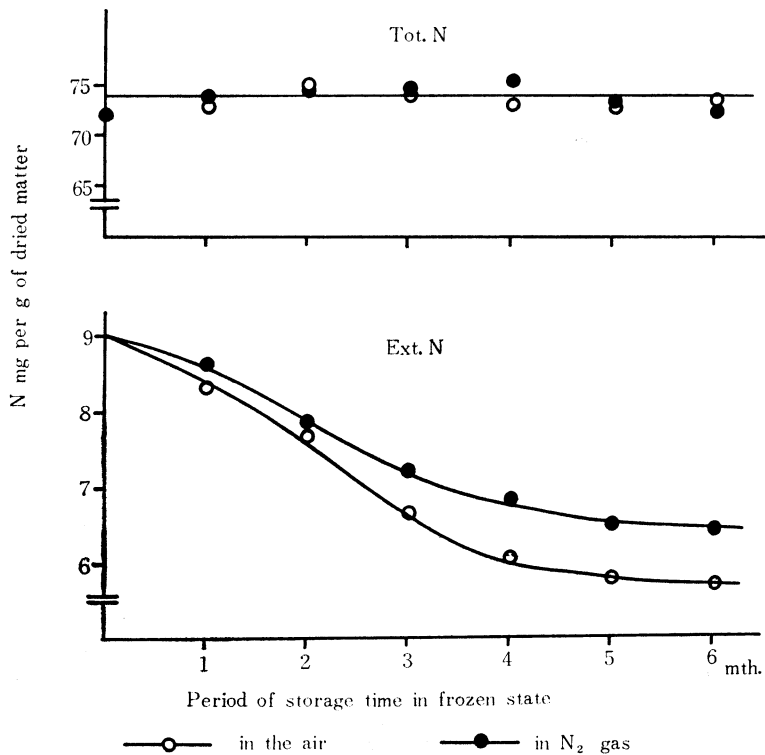


Fig. 8. Changes of total and extractive nitrogen contents after some period of storage in frozen state.

は次第に大きくなり、6ヶ月の冷蔵後には、開始時の約70% (N₂ガス下の冷蔵)、約60% (空气中) にそれぞれ減少した。

考 察

TTCによる生物の viability の測定は、PARKER^{14~17)} が針葉樹の種子の発芽能力の有無を判定する上に始めて使用して以来、尾形^{7,8,18)} は、アサクサノリヤコンコセリスの生死の判定に応用して好結果を得ており、また貝の鮮度判定にも極めて効果的だと云われている¹⁹⁾。この方法は、動、植物の生死、あるいは著しい傷害の判定にはすぶる有効のようであるが、軽微な程度の傷害を見きわめることは比較的困難であり、実際の測定に当っては、二、三の考慮すべき点があることがわかった。すなわち、本研究で用いたように、冷蔵保存したのり葉体について、生成したフォルマザン量の多少によってその傷害程度を判定しようとする場合、たとえフォルマザンが傷害の程度に反比例して生成されるとしても、TTCの還元条件、フォルマザンの抽出、およびその保存方法などに充分注意しないと正確な値は得られない。実験結果の項で明らかにしたように、トルエン中のフォルマザンはとくに光によって分解され易く、また遠心分離によってフォルマザンを安全に分離、回収することは極めて困難である。従って、微妙な活性の差を測定しようとする場合には、更に詳細な検討を加える必要がある。

本実験で得られた結果にも、恐らく前記の事象に由来する測定誤差がかなり大きいものと考えられるが、6ヶ月の冷蔵保存後にTTC還元能が、冷蔵前の試料のその20%以下に減少したことは、葉体の傷害が冷蔵中にかなり進んだものと推測できるように思われる。もちろん、TTC還元能だけから傷害度の判定をすることは若干の無理があり、また、個々の葉体によっても傷害の程度に差があるものと思われるが、このような著しい還元能の減少は、のり葉体にかなりの負担がかかったことを示すものと考えられ、今後の冷蔵網の作成方法、ならびに、冷蔵期間に改良の余地が充分にあることを示唆するものであろう。

エキス態Nおよび二、三の遊離アミノ酸量は、N₂ガスまたは空気いずれを充満した場合も、冷蔵後まもなく減少し始めたのに対し、全Nは6ヶ月の冷蔵期間を通じてほとんど変化しなかった。従って、のり葉体中のエキス態Nが全N中に占める割合は、冷蔵期間が長くなるにつれて次第に小さくなった (Table 3)。

Table 3. The ratio of extractive nitrogen to total nitrogen.

Period of storage	in N ₂ gas	in the air
Initial	12.4%	12.4%
1 mth.	11.7	11.5
2	10.6	10.3
3	9.7	9.0
4	9.2	8.3
5	8.9	8.0
6	8.8	7.8

これは主として、実験開始時あるいは冷蔵期間の比較的短い時には、70%アルコールに容易に溶解し得た物質が、冷蔵期間が長くなるにつれて溶解し難い物質に変化したためではないかと思われる。この物質がどのようなものか、またその機構はどのようなものか、あるいは、このような性質の変化は、たとえばミトコンドリアのATP aseが低温にさらすと解離し、再度常温でインキュベートするとその活性を回復する²⁰⁾ ような可逆的な性質のものなのかは、本研究では明らかにすることはできなかった。今後に残された興味ある事実であると思われる。

また、個々の遊離アミノ酸およびアンモニアに由来するN量の合計のエキス態N量に対する比率は、ごく僅かではあるが、冷蔵期間とともに減少した (Table 4)。

これは遊離アミノ酸やアンモニア以外の70%アルコール可溶物質、たとえばペプチドなどが増加したこと

Table 4. The ratio of extracted nitrogen* to extractive nitrogen.**

Period of storage	in N ₂ gas	in the air
Initial	59.0%	59.0%
1 mth.	57.5	54.0
2	60.0	57.3
3	60.1	58.3
4	60.3	64.1
5	64.7	64.7
6	64.8	63.1

* Extracted nitrogen was calculated from extractive amino acids including ammonia.

** Extractive nitrogen was determined by micro-kjeldahl method.

を暗示するものと思われるが、詳細は不明である。

一般に、越冬植物は、成長が止まって始めて 0°C 以下の凍結に耐えられるようになり、冬にかけて耐凍度が高まるとされ、概して、植物中の糖量と耐凍度は平行して変動すると云われている。また越冬植物は、0°C 以下の低温にあらかじめさらしておく耐凍度が著しく高まるが、成長中のものにはこの効果が少なく、さらに、このようにして人工的な低温処理によって耐凍度を高めようとする場合、同一温度だけで処理するよりも、0°C から -20°C 付近まで漸進的に温度を低下させた方が、より効果的であるとされている。また、低温処理効果は、耐凍度が高まるとともに高くなる事実も知られている²¹⁾。

一方、のりの冷蔵網は、10月下旬～12月初旬の間に、2～3 cm に伸びた芽を用いて行なわれている。この時期の水温は、普通 10～15°C であるため、のりが生育していた温度と冷蔵温度との差が非常に大きいこと、また、のりの成長はこの時期がもっとも盛んであること、などを考えると、必ずしも適当な方法によってのり網の冷蔵が行なわれているとは考えられない。漁場面積が限られ、投入可能な労働力に限界があり、しかも海況の悪化はしばしば起り得るため、冷蔵網が極めて有効な手段であることは言うまでもないが、冷蔵したのりの生存率を高め、かつその品質を落とさないようにするには、現在行なわれている方法に、若干の改良を加えた方が好ましいように思われる。それにはたとえば、一時的に寒冷地に予め移植することによって低温処理効果を挙げる、できるだけ大きく伸びた芽を冷蔵すること、あるいは、比較的長期間の冷蔵をして、のりが生育していた温度と冷蔵後海にもどす際の温度差を少なくすること、などが考えられよう。

本報告を終るに当たり、終始適切な御助言を賜った本学食品工業化学科伊藤啓二助教授に心から感謝する次第である。また試料としたのりを快よく分与下さった福山市水呑漁業協同組合の方々および試料採取に御協力頂いた福山市農政課近藤泰晶氏にお礼を申し上げる。

文 献

- 1) 農林省：昭和45年漁業養殖業統計年報 (1971)。
- 2) 倉掛武雄：海苔網冷蔵の手引き，全国海苔貝類漁業協同組合連合会，東京 (1968)。
- 3) 右田清治：長崎大学水産学部研究報告，17，44 (1964)。
- 4) 右田清治・山口正一・田中修一：長崎大学水産学部研究報告，31，69 (1971)。
- 5) 照本 勲：低温科学 (生物編) 23，11 (1965)。
- 6) 愛知県水産試験場：のり葉状体の低温保蔵について (第一報) (1965)。
- 7) 尾形英二：日水誌，22，404 (1956)。
- 8) 尾形英二：日水誌，22，94 (1956)。
- 9) 佐藤七郎：植物学雑誌，66，277 (1953)。
- 10) NICKERSON, W. J. and MERKEL, J. R.: *Biochem.*, 39, 901 (1953)。

- 11) 土屋靖彦・佐々木効：日水誌, **23**, 230 (1957).
- 12) 伊藤啓二・佐藤孜郎・佐藤美和・松本文夫：日水誌, **26**, 938 (1960).
- 13) 渡辺 競・加藤 盛：日水誌, **36**, 921 (1970).
- 14) PARKER, J.: *Bot. Gaz.*, **113**, 210 (1951).
- 15) PARKER, J.: *Bot. Gaz.*, **114**, 189 (1952).
- 16) PARKER, J.: *Am. Sci.*, **41**, 614 (1953).
- 17) PARKER, J.: *Nature*, **176**, 647 (1955).
- 18) 尾形英二：日水誌, **22**, 99 (1956).
- 19) 持永泰輔・田口 昭：食衛誌, **4**, 217 (1963).
- 20) 根井外喜男編：凍結・乾燥と細胞障害, p. 2, 東京大学出版会, 東京 (1970).
- 21) 根井外喜男編：低温生物学概説, p. 50-80, 東京大学出版会, 東京 (1971).

SUMMARY

Changes in the TTC reducing ability and in the contents of a few chemical constituents were studied periodically on the fronds of *Porphyra* sp. during a six months storage in frozen state (-25°C). The results obtained can be summarized as follows:

- 1) The TTC reducing ability declined in the frozen fronds either stored in the air or in nitrogen gas; it dropped to one tenth and one fifth of the initial level, respectively, after six months storage. In both cases, rapid decrease occurred during the first two months of freezing storage.
- 2) Chlorophyll *a* contents were almost constant in the fronds during the storage.
- 3) Little changes were observed in the total nitrogen contents of the fronds regardless to the storage period.
- 4) Extractive amino acids such as aspartic acid, glycine, alanine, isoleucine and threonine and/or serine showed tendencies to decrease during the storage. Among these amino acids, aspartic acid and isoleucine had the most conspicuous rates of diminution.
- 5) Extractive nitrogen contents in the frozen thalli decreased gradually to about 60% in the air and to about 70% in nitrogen gas within the six months.