

食品の新しい保蔵と利用に関する研究

神野節子, 堀津圭佑, 宇高京子, 土居則子, 木元幸一

Setsuko KANNO, Keisuke HORITSU, Kyouko UTAKA,
Noriko DOI, Koichi KIMOTO

3. 鶏肉と真鱈の貯蔵に於ける鮮度の研究。

木元幸一, 宇高京子, 堀津圭佑,
神野節子, 土居則子

緒 言

新鮮な食べ物の貯蔵は、従来、冷凍か冷蔵に限られていた。それは主に腐らせないためのものであり微生物の繁殖を押さえるのが目的であった。一方、食卓や流通での鮮度保持という観点から見直し、科学的に検討されてきたのはごく最近である。ある食品は冷凍により品質はほとんど劣化しないが、あるものは著しく品質を損なうなど、一概には考えられない場合が多い。それは、個々の食品が持つ生化学的特性がそれぞれ違うためである。その事が一般的に考えられる腐敗を防ぐための保存から、より新鮮で美味な食品の維持へ指向することの難しい点である。特に魚などにおいては、冷凍は劣化が激しく、一方、水中の冷蔵においても、鮮度の損失や腐敗の進行が急速な場合が指摘されていた。そこで第三の保蔵法が望まれるようになったわけである。

氷温とは、零下以下でその食品が凍り始める氷点までの温度帯をいう。従来の食品保蔵では、0℃が起点となりそれ以上では冷蔵、それ以下では冷凍として扱っていた。そこで最初に生鮮魚の保蔵法としてパーシャルフリージングが研究開発された。生鮮魚の場合、氷結点は-0.7

~2.0℃の間にあり、平均して-1.3℃位である。従って、生鮮魚を保蔵する場合の温度はその辺りを考慮しておかなければならない。その結果数種類の魚についてはその極地性といったような問題が克服されつつある。

いわゆる飽食の時代といわれ、また1億総グルメといわれるいるときに、食生活が多様化し、より自然に近い状態、できるだけ新鮮にという欲求は、とみに強くなってきている。近年、消費者の間では、「氷温」、「チルド」という言葉がいわれるようになり、その温度設定をかね備えた家庭用冷蔵庫も普及されてきた。氷温で貯蔵すると生きたままの状態が維持され、生のままに近い風味を持ちながら鮮度維持できるといわれている。

Partial Freezing についてはN. TOMLINSO¹⁾の報告があり、わが国では、内山²⁾と山根³⁾の報告がある。我々は、前報に於いて、鶏肉を保存し、保存中の微生物の繁殖状態を調べた結果を報告した。そこで今回は、そのK値を測定し鮮度を確認すると共に、タンパク質の分解に関与していると思われるプロテアーゼの挙動についても報告する。また氷温に於ける貯蔵性についてさらなる確認を行うために、真鱈の貯蔵と鮮度維持についても報告する。なお、鶏肉につ

いては、沼田⁴⁾らの報告を参考にして実験を行った。

実験方法

1. 魚類鮮度判定恒数K値の測定法

(1) K値について

魚類の死後、筋肉ATPは図1のように分解される。

図1のATPの分解だけに注目すると、そのパターンはATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hxと分解される。分解は筋肉中の諸酵素に支配され、それがいかなる魚でも同一であるので、上記のパターンは、イワシでもマグロでも同様であり淡水魚でも同一であることが認められている。すなわちATPの分解は魚類筋肉細胞の死後における自己分解 (autodegradation) を反映したものとみることができる。これを生鮮魚との関係でみると、ATPから

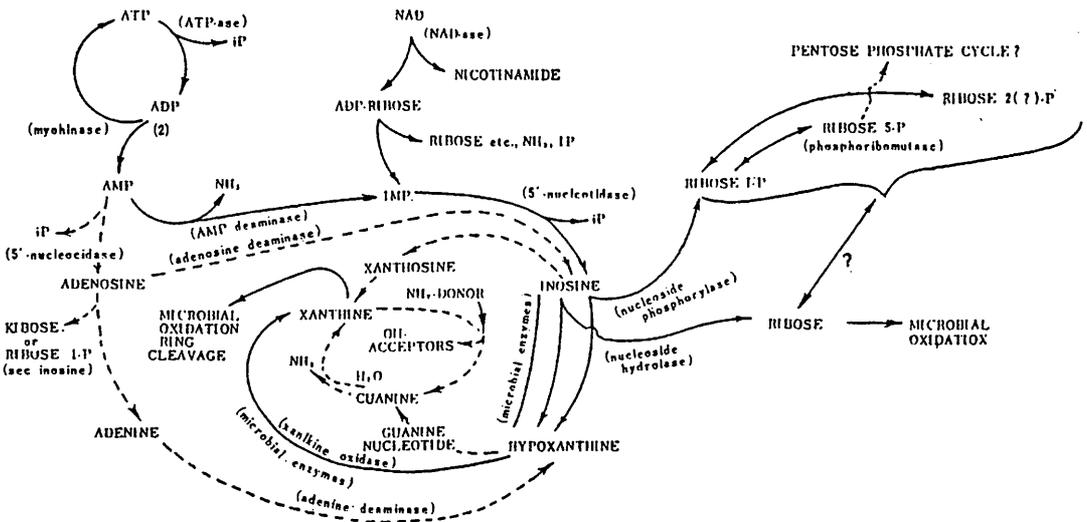


図1 魚肉 ATP の分解経路, 実線は主要経路を示す
(B. O. KASSEMSARN, B. SANZ PEREZ, J. MURRAY,
and N. R. JONES(1963)⁵⁾)

IMPまでのヌクレオチドが魚肉中の主成分である間は、生鮮度が良好であるが、ヌクレオシド (HxR) あるいは塩基 (Hx) の増大とともに生鮮度が低下する。したがって、ATPの分解生産物6化合物中に占めるHxRとHxの百分率は、生鮮度測定の実用的尺度となるこれを魚類鮮度判定恒数、K値と称し次式によって算出する。

$$K \text{ 値 } (\%) = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100$$

この式からわかるごとく、筋肉のATP関連化合物は上記の6成分の分画定量が中心となる。したがってこれら化合物をいかに簡易かつ精度よく測定するかの問題がある。

(2) 分画操作

①連続濃度勾配装置を用いる方法

図2に示す本装置は分画を迅速に行うために用いるものである。二つの円筒からなり、底面積が1:2になっている。左側は120ml容、右側は240ml容、そして両者はコックを有する細管で接続されている。右側の底部にマグネティックスターラーを置く。できれば

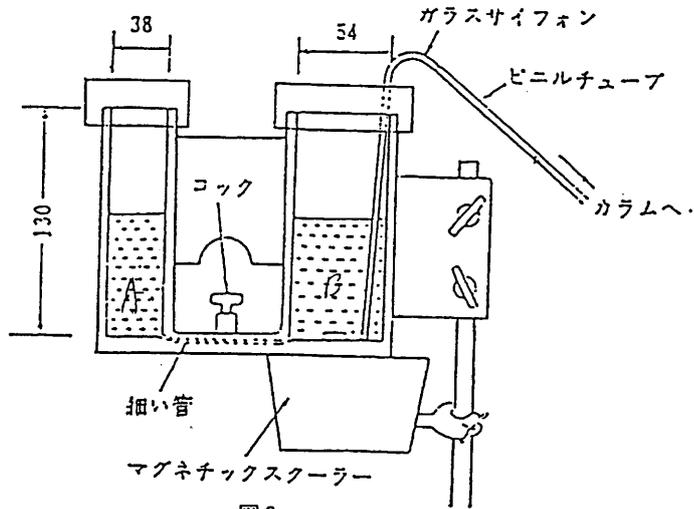


図2

低速用のものがよい。高速では液面が渦巻状に上昇し、二つの円筒の水面が一定しない。

連続濃度勾配装置により緩衝液を流した。また、カラム出口に記録計と接続してある紫外外部測定用の分光光度計を置きフローセルにより255nmの波長を連続的に記録した。展開液流量は2.0ml/min.程度とした。

分画は、 $H_x + H_{xR} \cdot AMP \cdot IMP \cdot ADP \cdot ATP$ の順で記録計に表れるので、それぞれのグラフの山の面積を計算して、(1) K値についてで示した式によってK値を求めた。

②簡易測定法⁷⁾

簡易カラムクロマトグラフ法としてさらに改良されたものに、筋肉の($H_x + H_{xR}$)分画のE250nmに対するATP関連化合物総量の同波長における比からK値を求める方法があり、次式により算出する。

$$K \text{ 値 } (\%) = \frac{E_{250nmA}}{E_{250nmA} + E_{250nmB} \times 1/2} \times 100$$

K値は低ければ低いほど生鮮度良好なことを示す値である。

簡易測定法

A液

Sodium Tetraborate 1.9g · NaCl 1.2g
· DW 500~600ml

22.5ml of 1 N HCl

0.7ml of Ethylenediamine

Adjusted at PH7.5 With 0.6N HCl

fill up to 1000ml

A Eluate

B液

NaCl 17.4g · DW 500~600ml

150ml of 1 N HCl

fill up to 1000ml

B Eluate

カラムとペリスタ・ポンプを接続して、2.0ml/min. の流速で始めに、アンモニア水でpH9.4に調整した脱イオン水を実験前に流した。その後簡易法用A液10ml流し、1Mアンモニア水でpH9.4に調整した抽出試料を4~10mlビーカーから流した。実験前に流したpH9.4の脱イオン水でビーカーを洗って流した後、同じ脱イオン水を流してATP関連化合物以外のカラムに非吸着性紫外吸収物質を除いた。次いでA液約50mlを流し、50ml容メスフラスコに溶出液を集め定容した。この操作によってIMP・AMP・ADP・ATPが容出された。

A液、及びB液の分画をよく振りまぜ吸光度250nmで測定し、(1) K値についてで示した式によってK値を求めた。

(3) 樹脂の調製

Dowex 1, ×4, 200~400メッシュと、簡易法ではBio-Red, AG 1-×4, 100~200メッシュ, Cl⁻型を用いた。この調製は樹脂が異なるが全く同様である。

まず初めに、約50gをとり、アセトン200~300mlで洗った。攪はんし20分程放置してから、ブフナーのロート上に流してアセトンを除いた。脱イオン水で洗い、1N NaOH 500~600mlをビーカーにとり、樹脂をこの中に移した。攪はんして約30分放置後、再びブフナーのロートでNaOHを除いた。水洗いして、今度は1N HCl 500~600mlで攪はん、同じく約30分放置してHClを除き、十分に中性になるまで水洗した。調製した樹脂は脱イオン水を加えて冷蔵庫に保管した。(図3参照)

一度使用した樹脂も上記のごとく処理して再使用できる。樹脂はイオン交換能を消失することなく、10回程度は使用できる。

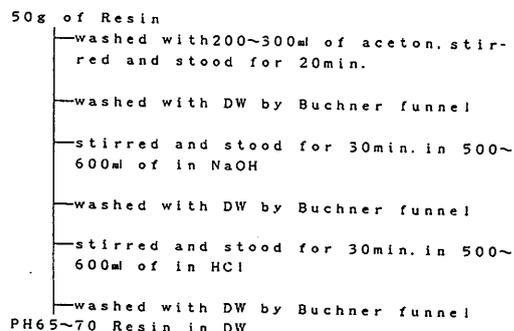


図3 Preparation of Resin

(4) 魚肉抽出試料の調製

<試料>

十条駅前、割烹料理「立山」より、生きたマアジを購入し、実験開始直前におろし、その後冷凍(-18℃)、チルド(-2℃)、冷蔵(5℃)に保蔵した。

<方法>

魚肉を除タンパクしてATPとその分解物を抽出した。紫外線を用いて測定するため、それに吸収をもつ三塩化酢酸は使用できず、過塩素酸(PCA)を用いた。市販のPCAは60%であるので、10%と5%溶液を作り、冷蔵庫に保管した。

冷却10%PCA 2mlを先細の遠心管I(10ml容)にとり、魚肉1gをつぶした。遠心して上澄を別の遠心管IIに移した。遠心管IIは砕氷上におき、遠心残さは5%PCAを加えて再抽出した。上澄を遠心管IIへ、残さはもう一度抽出した。合せた上澄は10N-KOHで中性付近に調節し、次に5N-KOHを用い、pH6.5~7.0に調節した。(KOHの滴下によって過塩素酸カリウ

食品の新しい保蔵と利用に関する研究

ムの白色の結晶が生じた。) 中和した抽出液の入った遠心管Ⅱは、碎水中にて冷却、結晶を十分に沈澱させた後(5~10分)遠心して結晶を分離、上澄は10ml容メスフラスコに移した。初めに作っておいた中和液を遠心管Ⅱに加え、下部に結晶が残っているので、ガラス棒で攪はんして再び遠心し、

上澄を上記のメスフラスコに加えた。この操作を二回繰り返した。10mlに定量した抽出液は小型試験管に移して、パラフィルムで栓をし、-20℃で保存した。

図4は上記の抽出手順をまとめたものである。

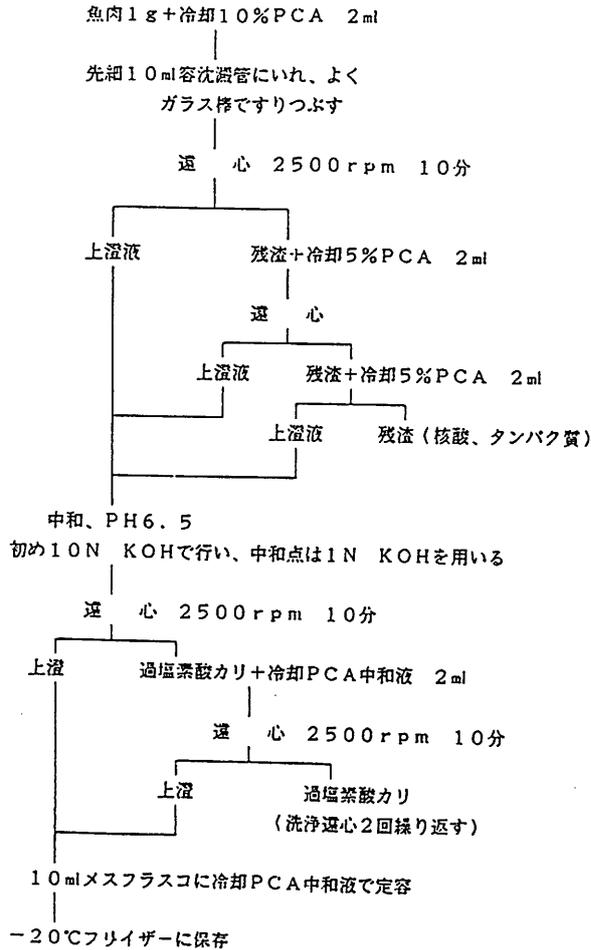
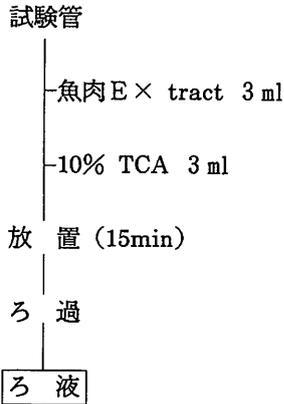


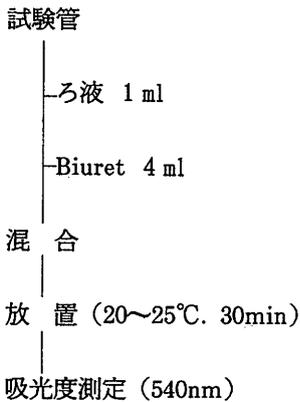
図4 魚肉抽出試料の調製

(5) タンパク質, ペプチド, アミノ酸の定量⁸⁾

魚肉抽出液と抽出液のTCA可溶区分についての定量を行った。

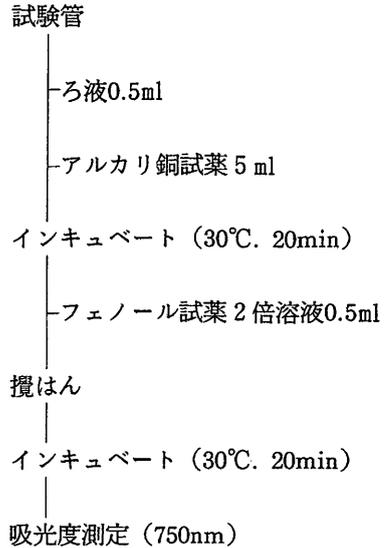


① Biuret法



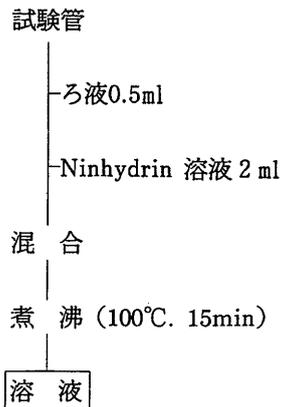
② Lowry 法

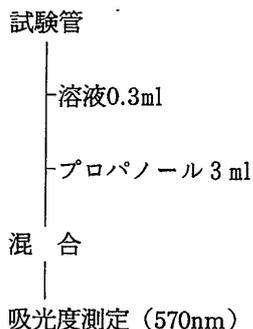
Biuret 法同様TCA処理を行ったろ液1.5 mlにアルカリ銅試薬 5 mlを加え混合し, 30°Cに10分間放置後フェノール試薬の2倍溶液0.5mlを加え, 直ちに攪はんし30°Cに20分間放置し, 750nmで吸光度を測定した。



③ Ninhydrin 法

同様にTCA処理を行ったろ液0.5mlに, Ninhydrin 溶液 2 mlを加え混合し15分間煮沸を行った。この溶液0.3mlにプロパノールを 3 ml加え混合し, 750nmで吸光度を測定した。





結果と考察

1. 鶏肉について

(1) K値の変化について

試料AのK値は、解体後既に約6%である。5℃で貯蔵すると、2日後19%、3日後24%、7日後で41%に達した。-2℃貯蔵では、2

日後12%、3日で17%、7日目でも32%にとどまっていた。K値でみると、5℃よりも-2℃の方が貯蔵において勝れていると思われるが、生菌数ほど顕著な結果ではなかった。沼田らによると、10℃での貯蔵に比べて、5℃以下での貯蔵は大きな効果があると報告している。

また試料Bについては、購入直後既に28%あり、これは、鶏が小売店にくる前に温熱処理され、脱羽されるなどしているためであろう。5℃貯蔵では、1日経過後、31%、2日後44%、3日後で60%に達した。一方、-2℃貯蔵では3日後も40%を越えた。5℃貯蔵での異常な上昇は不明であるが、-2℃ではA試料との差はみられた。この事は、生菌数と内在する酵素によるATP分解との無関係は沼田らに指摘されているので、外来する微生物による結果ではないと考えられる。

SAMPLE A

	5℃	-2℃
2日後	19.5	12.0
3日後	23.8	17.7
7日後	40.0	31.7

SAMPLE A

0日 5.95

SAMPLE B

	5℃	-2℃
1日後	31.0	33.2
2日後	44.5	40.5
3日後	67.3	46.5

SAMPLE B

0日 28.9

(2) プロテアーゼ活性について

試料Aの自己消化活性は、5℃及び-2℃の貯蔵でほとんど消失した。酸性プロテアーゼ活性は徐々に減少していった。しかし中性プロテアーゼ活性は5℃貯蔵の場合、一度減少した活性が7-14日後また高くなっており、これは腐敗菌によるものかもしれない。一方、試料Bは、5℃で保存すると、自己消化活性、酸性プロテアーゼ活性、中性プロテアーゼ活

性いずれも0日よりも高くなっている。この現象は5℃貯蔵の場合ほど顕著ではないが、-2℃でも同様に観察された。試料Bの場合既に最初の生菌数が高く、これが貯蔵日数と共に増え、腐敗に基づく外来的なプロテアーゼ活性の増大であることが予測される。これらの事より、プロテアーゼによる組織蛋白の破壊や、鮮度損失への律速が示唆された。

		0日後	1日後	2日後	3日後	7日後	14日後
自己消化活性	5° C	0.02	0.02		0.02	0.12	0.44
	-2° C	0.03	0.03		0.05	0.18	0.17
酸性プロテアーゼ	5° C	0.13	0.12	0.15	0.10	0.22	0.27
	-2° C	0.14	0.17	0.16	0.17	0.25	0.27
中性プロテアーゼ	5° C	0.09	0.09	0.05	0.04	0.20	0.21
	-2° C	0.08	0.09	0.09	0.02	0.11	0.12

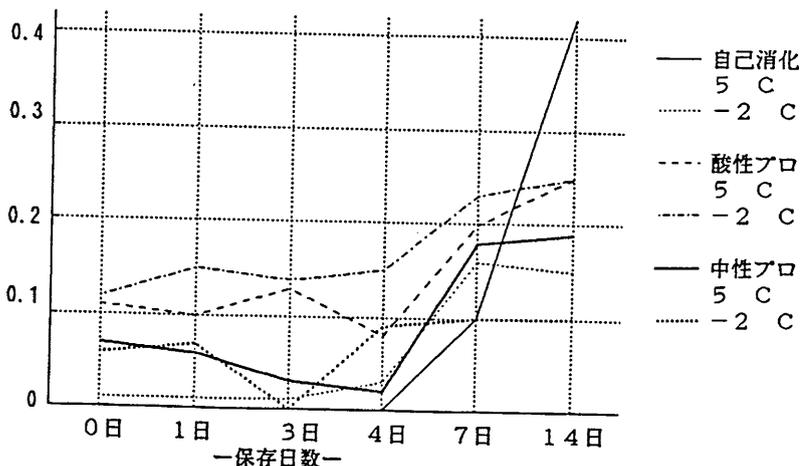


図5 保蔵温度に於けるプロテアーゼ活性の経時変化

2. アジの保蔵温度における鮮度維持

(1) 連続濃度勾配装置によるK値の変動

マアジをおろした直後のK値は、5.8%であった。-2℃、5℃で保蔵した同魚は24時間後から早くも差が明らかであり、-2℃は8.7%、5℃では14.1%という値に達した。

72時間後では、-2℃は27.7%、5℃では40.7%となり、チルド保蔵が鮮度維持に優れている事が分かった。-18℃は、おろした直

後のK値とほぼ同様であった。

Hx+HxR量の差の顕著なものについて、その溶出チャートを、図6、図7に示した。K値が高くなると、Hx+HxR・ATP・IMPしか溶出しなかった。

魚肉粉碎時にガラス棒とホモジナイザーの両方を使用したか、結果にほとんど違いが見られなかったため、以後ガラス棒のみで行った。

温度	経過	K 値	状態
	0時間	5.8%	身がしまっている
冷蔵 5℃	24時間	14.1%	肉汁がでていた わずかに腐敗臭がする
	48	29.8%	
	72	42.7%	
	96	69.4%	
チルド -2℃	24時間	8.7%	0時間よりあまり変化なし 肉汁がでていた
	48	21.2%	
	72	27.7%	
	96		
冷凍 -18℃	23日後	4.1%	
	42	4.7%	

図6 真鱈 0日後 K値:5.8%

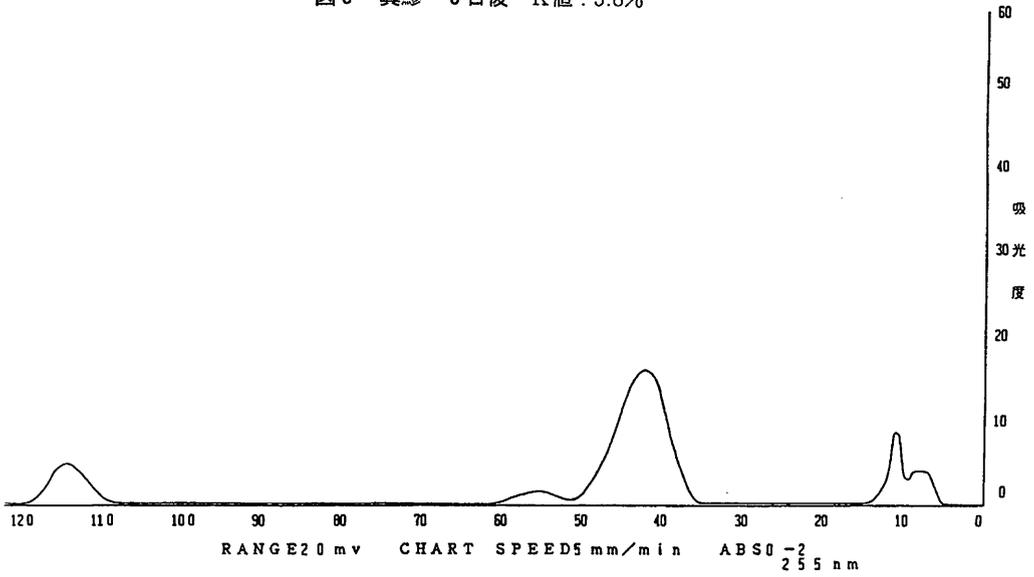
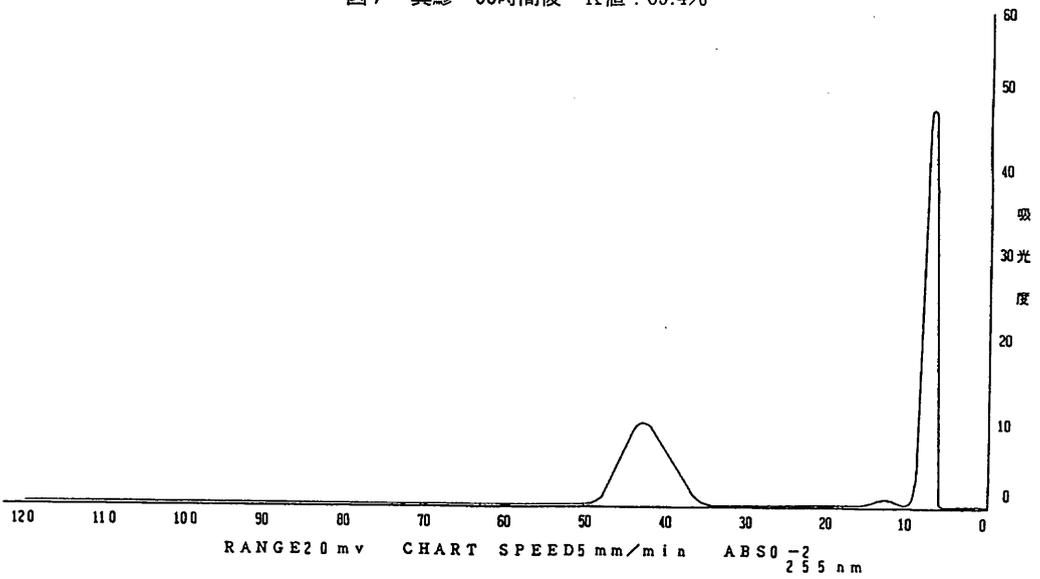


図7 真鱈 96時間後 K値:69.4%



食品の新しい保蔵と利用に関する研究

(2) 簡易測定法によるK値の変動

(1)の結果にも見られた通り、おろした直後3.2%であったマアジは、24時間後、 -2°C では8.1%、 5°C では13.0%であった。9日後では前者24.0%に対し後者は87.7%とすでに腐敗段階に至っていた。(1)の結果

よりもさらに顕著な差が見られ、チルド冷蔵の鮮度維持力は明らかであった。 -18°C で保蔵したものは、(1)同様にK値の変動はほとんど見られなかった。表3、図8はこれをまとめたものである。

表3 簡易測定法によるマアジのK値

	5°C			-2°C		
	E250nmA	E250nmB	K値%	E250nmA	E250nmB	K値%
0日目	0.022	1.350	3.2	0.022	1.350	3.2
1日後	0.213	1.426	13.0	0.135	1.537	8.1
2日後	0.360	1.715	17.4	0.156	1.159	8.9
3日後	0.243	1.100	30.6	0.253	1.293	11.4
4日後	0.431	1.229	41.2	0.370	1.704	17.8
5日後	0.595	1.113	51.7	0.168	1.418	19.2
7日後	0.570	0.678	62.7	0.213	1.257	25.3
9日後	0.585	0.164	87.7	0.208	1.315	24.0
11日後	—	—	—	0.466	0.120	45.4
13日後	—	—	—	0.464	0.957	49.2

% (K値)

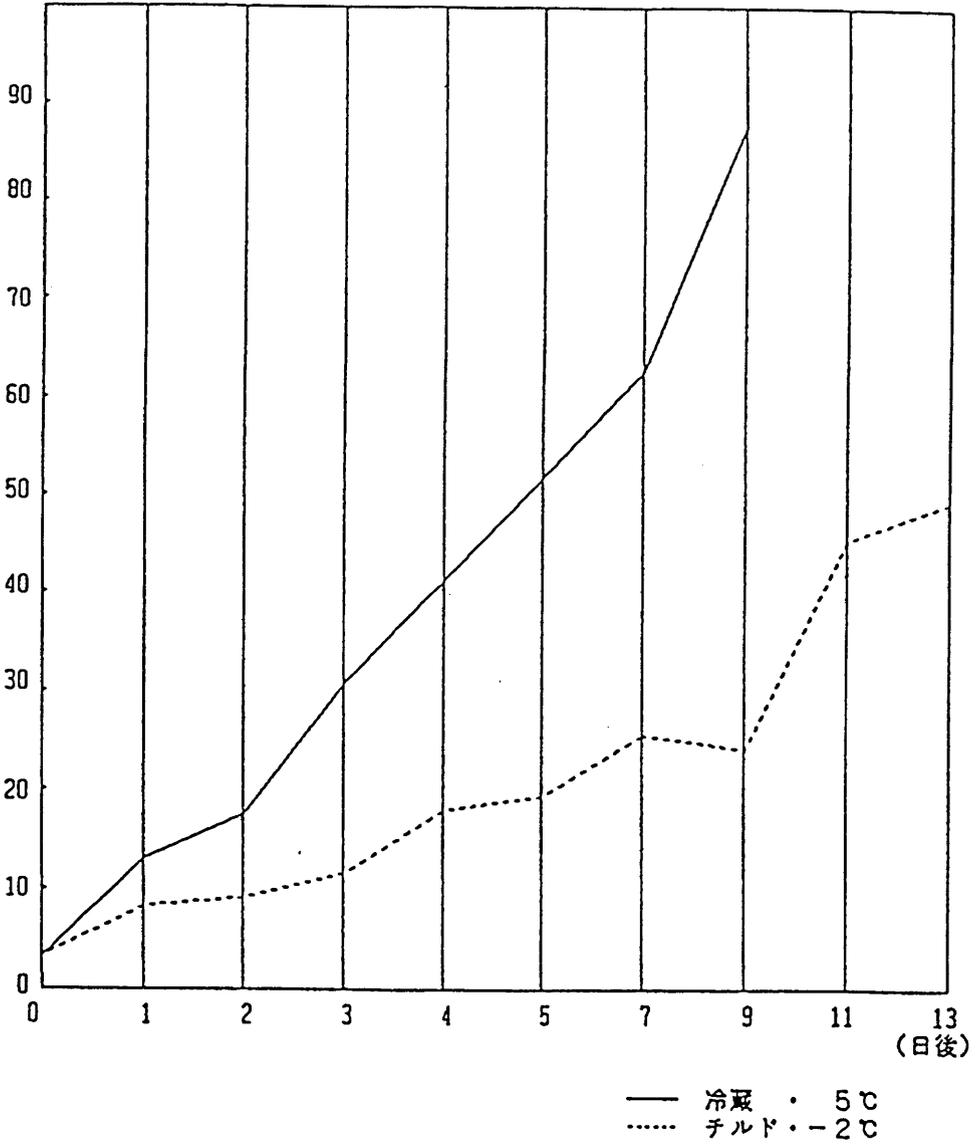


図8 簡易測定法による温度と時間によるK値の変化

食品の新しい保蔵と利用に関する研究

(3) タンパク質の定量結果

保存温度と経日によるタンパク質の変動を Biuret 法により、ペプチド・アミノ酸の変動を Lowry 法により、そしてアミノ酸の

変動を Ninhydrin 法により追跡した。しかし、表1、表2に見られるように0日後と8日後では、K値の変化に見られる顕著な差は見られなかった。

資料 \ 保存状態	温度	経日	定 量 値		
			Biuret 法	Lowry 法	Ninhydrin 法
保存魚A	冷凍(-18℃)	0日後	0.617	—	—
	チルド(-2℃)	8日後	0.586	—	—
	冷蔵(5℃)	8日後	0.490	—	—

資料 \ 保存状態	温度	経日	定 量 値		
			Biuret 法	Lowry 法	Ninhydrin 法
保存魚A	冷凍(-18℃)	0日後	0.069	0.080	0.173
	チルド(-2℃)	8日後	0.069	0.111	0.207
	冷蔵(5℃)	8日後	0.065	0.117	0.151
Blank	—	—	0.045	0.036	0.000
保存魚B	冷凍(-18℃)	0日後	0.063	0.250	0.154
	チルド(-2℃)	8日後	0.071	0.123	0.160
	冷蔵(5℃)	8日後	0.069	0.200	0.235
Blank	—	—	0.045	0.036	0.000

(4) 市販生鮮魚のK値測定結果

姿のままのマアジはどの店もあまり差は見られなかったが、たたきで売られていたもの

は、すでに腐敗段階に入っていると思われるほどK値の高いものもあった。(表5)

表5 店舗別市販生鮮魚のK値

	魚鈴鮮魚店	スーパーよしや	東武デパート
生食用マアジ	17.2%	9.7%	15.2%
たたきマアジ	11.0%	65.6%	22.2%
たたきの販売状況	つまの上にむきだし	ラップでパッケージ	ランチパック入り

魚屋は刺身やたたきは作り置きはせず、売れ行きを見ながら追加して作っているようであった。デパートでも作り置きはほとんどしていなかった。これに対してスーパーは、ラップしているためかショーケースに多くの刺身を並べており、おろしてからかなりの時間が経過しているようであった。生食用マアジはスーパーのものが一番K値が低かったこと

より、仕入れた魚の鮮度は良かったようだが、その後の保蔵状況や、販売方法により低下したようであった。

参考実験では保蔵温度 -2°C の方は、24時間後も12.4%と、おろした時の鮮度をほぼ保っており、 5°C の方でさえ20.6%と鮮度の大きな低下は見られなかった。(表6参照)

表6 マアジたたきの24時間のK値の変化

	0時間	3時間後	6時間後	24時間後
チルド -2°C	9.9%	10.2%	11.2%	12.4%
冷蔵 5°C		12.9%	19.8%	20.6%

この結果より、スーパー・デパートのショーケース内の温度は 5°C 以上であると考えられる。特にスーパーのショーケースは上蓋がなく外気に触れていたため、かなり温かくなってはいたはずで、この様な保蔵状態が明らかにK値を高くしたと考えられる。

三店舗のたたきの外観はどれも同じような色、艶であったが、味はK値の低さと比例しており、スーパーのたたきは肉が軟らかくなっていて歯応えが無く、魚屋のたたきは身がしまっていて、歯応えがあり一番味が良かった。

謝辞

終わりに挑み本実験を行うにあたり多大なご助力を戴いた日本軽金属株式会社萩原俊男氏、ご協力戴いた同、原田祝行氏、土師みさこ嬢に深謝致します。また、予備実験やデータ整理に協力していただいた本学実験助手林あつみさんに感謝します。そして、多大なる実験の労をして下さった昭和62年度栄養学科卒業、江塚和可子、重松純子嬢にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) TOMLINSON., GEICER,S.E., KAY,W. W., UTHE,J., and ROACH,S.W., J.Fish. Res. Bd. 22, 955 (1965)
- 2) UTUYAMA.H., Bull.Jpan soc. Fish.,40, 1145 (1974)
- 3) 山根昭美;食品工業学会誌, 17, 2 (1974)
- 4) 沼田邦雄, 鈴木真, 東京都農業試験場研究報告 17, 20 (1984)
- 5) 内山均;食品と低温 10, 76 (1984)
- 6) 水産生物化学・食品化学実験法 p20
- 7) 内山均, 角田聖済;Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50, 263 (1984)
- 8) 蛋白質の定量法 p75, p109

Studies on Keeping of Freshness and Change of Taste Components (Part 2)

Keisuke HORITSU

(Received on January 28th, 1988)

Introduction

This storage (preservation) experiment was carried on to obtain the best condition of storage in connected with the published reports^{1~5)} adding various discussions and improvements.

Like the above described reports, the author is thinking that an organism (living body), cell which composes the organism, is made to be at living state as long as possible under one artificial condition.

Some factors related to keeping of physiological condition of these living cells are studied as one part of this experiment that an establishment of appropriate storage (preservation) is one object.

First of all, the temperature factor was considered as one of some important factors for this object. Namely, these cells of organism are kept at a possible lower temperature that they are not frozen.

Second of all, the water factor was considered as one of important factor among many factors. Namely, the existence condition of water molecules in living cells is kept as unchangeable as possible.

In this manner the experimental aim at the first step was decided to the two achievements related to temperature and water factors.

Also, it is considered practically that the Laboratory of Biology, Studies on New Preservation and Utilization of Food

metabolism rate of organism is depressed with other methods else the above described method. So the experiments related to other methods that are carrying on by the author may be published at the other time.

Now, the two species of apple, Fuji and \bar{O} rin, were selected as the typical samples of agricultural primary product in this case. Also, their some properties were determined with physical and chemical methods. And the properties of other species are determined, so those obtained results may be reported in near future.

Experimental method

A) Temperature (temperature factor): in the experimental cold room, the temperature, $-0.5^{\circ}\text{C} \sim -1.5^{\circ}\text{C} (\pm 0.5^{\circ}\text{C})$, in the functional (many objects type) glove box (plastic improved aseptic box-like apparatus) was kept as main temperature condition with the controller of expansion detector type. Temporally the experiments at $4.0^{\circ}\text{C} (\pm 0.5^{\circ}\text{C})$ and $-2.5^{\circ}\text{C} (\pm 0.5^{\circ}\text{C})$ were tried and kept as other temperature conditions.

B) Humidity (water factor, relative humidity): the glove box that the samples were taken in was set in the experimental cold room. And the glove box was improved by the author partially. As one control apparatus of gas phase component, the absorption apparatus were connected outside of the box to try several kinds of absorbent. The setting model of this glove box was called "outside apparatus model". Namely the relative humidity control was possible to do at the outside of the box. (The setting model on the previous paper⁵⁾ was called "inside apparatus model".)

C) Gas phase component: water component was primary objective in gas phase component. And it was controlled with the apparatus of term B). Of course, the sequence of absorption tower was important.

At the first step, CO_2 or $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$ released from the sample was absorbed in NaOH solution (KOH is better than NaOH, the price of KOH is higher than NaOH.) or H_2O respectively. Other released gases were absorbed in granular active carbon. According to necessity, SiO_2 , zeolite, synthetic material, or $\text{Ca}(\text{OH})_2$ was used as absorbent or molecular sieve.

D) Reagent for water factor: inorganic salts, organic acids, aliphatic small molecular weight compounds, aromatic small molecular weight compounds, sugars, alcohols, and others were used to determine the possibility of usage as the vapor pressure regulator respectively under one important restriction.

E) Nuclear magnetic resonance: HITACHI NMR R-90H (permanent magnet type), the determination temperature was room temperature. Standard reagent used was TMS to correct and check the determination condition. ^{13}C NMR of sample fluid was determined to analyse chemical shift and others. The number of acquisition was 20000.

F) Infrared absorption: HITACHI IR 270-50, really the infrared absorption characteristic was determined in the infrared region, $4000\text{ cm}^{-1} \sim 700\text{ cm}^{-1}$. As this sample was acidic aqueous solution, a multiple refraction cell with Ge window material was used for the first time.

H) Sample: two species of apple (red epidermis, Fuji, and green epidermis, Ōrin) were selected as typical sample. Also, other species are examined to detect various properties. They were stored in the ordinary experimental room at the initial term.

I) Sample fluid: the fluid, supernatant part, cell assembly fluid, was prepared with the creative new preparation method that all metal contained stainless 18-8 was not used completely. This fluid was an assembly of living cell itself as raw as possible. And, during quick preparation, a very small amount of air contacted

with the sample only. The author paid his attention to protect the contact of air as possible.

Under the protection of air contact, the receptacle, cell assembly, that was at four symmetrical sites of a piece was cut with the plastic author's made knife. The cut material was crushed in a seal type small polyethylene bag exchanging inactive gas. After the crushed material was pressed and squeezed with the plastic author's made squeeze apparatus at airtight state, the crushed, pressed, and squeezed material was centrifuged (3000 RPM, 5 min) protecting from air. Then the supernatant fluid was used to determine various properties.

J) Relative density: after the two species samples attained equilibrium at $2.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, the relative density was determined respectively.

K) pH; in this case, the pH at four symmetrical sites of a piece that was completely came to equilibrium at $2.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ was determined respectively with a needle type glass combination electrode pH meter.

Experimental results

A) The typical two results regards to the temperature maintenance in the glove box that was set in the experimental cold room were shown at the upper parts of Fig. 1 and Fig. 2 respectively. Of course, the samples, several pieces to 20 pieces and more, were taken in the glove box. The temperature inside of the glove box was kept at $-1.5^\circ\text{C} (\pm 0.5^\circ\text{C})$. The initial part of the temperature record showed the temperature inside of the opened glove box. The residual part of the record showed the temperature inside of the closed glove box.

B) The two typical results regards to the relative humidity maintenance in the glove box that was set in the experimental cold room were shown at the lower parts of Fig. 1 and Fig.

2 respectively.

The relative humidity inside of the glove box was kept at 97% ~ 99% ($\pm 1\%$). The initial part of the relative humidity record showed the relative humidity inside of the opened glove box. The residual part of the record showed the relative humidity inside of the closed glove box. The pointer showed somewhat low percentage. So it was corrected.

C) Gas phase component control apparatus was made effectively and was fulfilled its function. On the other hand, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is practically very useful to a large scale and the produced CaCO_3 is useful to improvement of soil.

D) The results from usage of the outside apparatus model were agreed to the results from usage of the inside apparatus model that was published on the previous paper.⁵⁾ Namely, there was no different between the inside apparatus model and the outside apparatus model that various treatments like exchange of absorbent and others became easy very much.

And these illustrations with usage of new reagents were similar to this showed illustration on the whole. So, other illustrations else the two typical illustrations were reserved.

The states of typical gas phase component control with the outside apparatus model were shown in Fig. 1 and Fig. 2 respectively. Of course. These examined reagents were different from the reagents that were published on the previous paper.⁵⁾

E) These signal patterns of red epidermis species (Fuji) and green epidermis species ($\bar{\text{O}}\text{rin}$) in the range of 0 ppm ~ 250 ppm (Fig. 3-1) and expanded 55 ppm ~ 150 ppm (Fig. 3-2) were shown on upper part and lower part of Fig. 3 respectively.

F) The infrared absorption patterns of red epidermis species and green epidermis species in the range of 4000 Cm^{-1} ~ 700 Cm^{-1} were presented to Fig. 4 and Fig. 5 correspondently. The -1 signs of Fig. 4 and Fig. 5 were at standard condition: 4000 Cm^{-1} to 700 Cm^{-1} .

The -2 signs of the two Figures were at expanded condition: 4000 Cm^{-1} to 700 Cm^{-1} , intensity 30.0% ~ 95.0%. The -3 signs of those were at expanded condition: 1800 Cm^{-1} ~ 700 Cm^{-1} , intensity 30.0% ~ 95.0%. The record in the range of 700 Cm^{-1} to 250 Cm^{-1} was stopped with comparative strong absorption.

I) This preparation procedure was a new one that was improved by the author. A and it could not see in any publication. During centrifugation, cooling state might be better than this state that cooling centrifuge was not established. Then, the centrifugation time was limited in minimum.

J) The mean value of relative densities at four sites of a red epidermis species (Fuji) or green epidermis species ($\bar{\text{O}}\text{rin}$) was 0.816 or 0.826 respectively.

K) The mean value of pH at four sites of a red epidermis species (Fuji) or green epidermis species ($\bar{\text{O}}\text{rin}$) was 4.10 or 4.27 respectively.

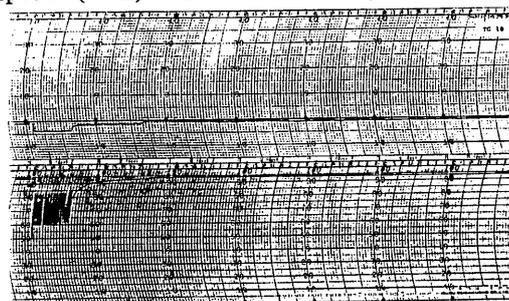


Fig. 1 The state of temperature and relative humidity in outside apparatus model functional glove box, Example 1 (TG-10)

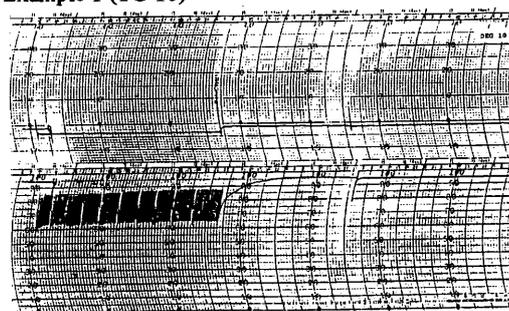


Fig. 2 The state of temperature and relative humidity in outside apparatus model functional glove box, Example 2 (DEG-10)

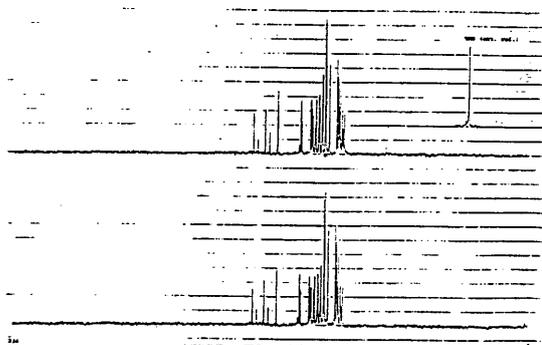


Fig. 3-1 ¹³C NMR of red epidermis species and green epidermis species at standard condition (0 ppm ~ 250 ppm)

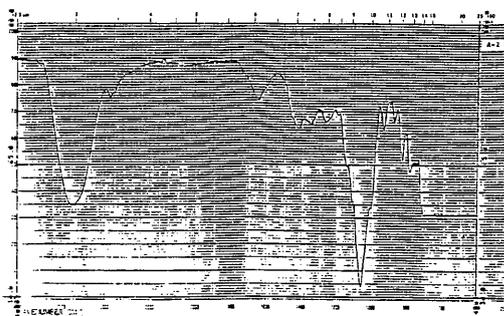


Fig. 4-2 Infrared absorption of red epidermis species at expanded condition: 4000 Cm⁻¹ ~ 700 Cm⁻¹, Intensity 30% ~ 95%

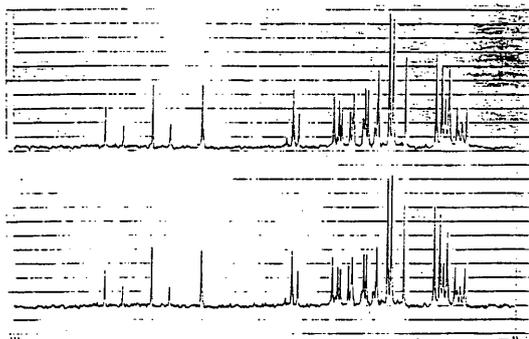


Fig. 3-2 ¹³C NMR of red epidermis species and green epidermis species at expanded condition (55 ppm ~ 115 ppm)

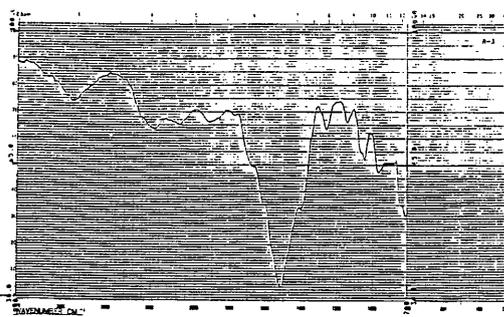


Fig. 4-3 Infrared absorption of red epidermis species at expanded condition: 1800 Cm⁻¹ ~ 700 Cm⁻¹, Intensity 30% ~ 95%

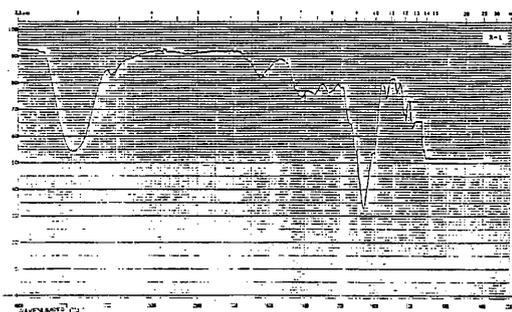


Fig. 4-1 Infrared absorption of red epidermis species at standard condition: 4000 Cm⁻¹ ~ 700 Cm⁻¹, Intensity 0% ~ 100%

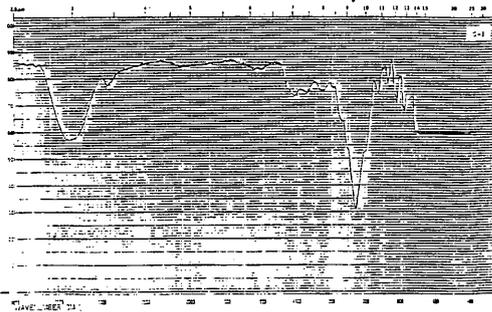


Fig. 5-1 Infrared absorption of green epidermis species at standard condition: 4000 Cm⁻¹ ~ 700 Cm⁻¹, Intensity 0% ~ 100%

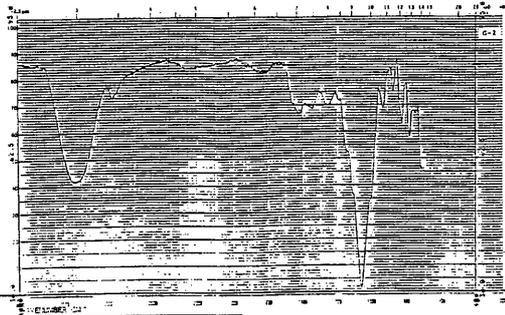


Fig. 5-2 Infrared absorption of green epidermis species at expanded condition: $4000\text{ Cm}^{-1} \sim 700\text{ Cm}^{-1}$, Intensity 30% ~ 95%

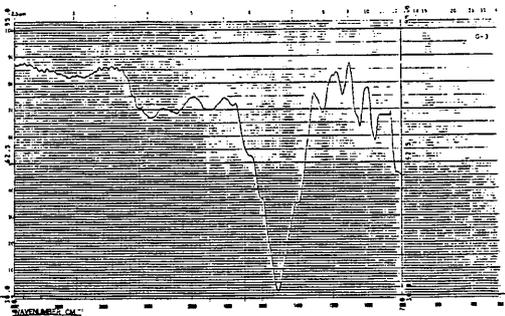


Fig. 5-3 Infrared absorption of green epidermis species at expanded condition: $1800\text{ Cm}^{-1} \sim 700\text{ Cm}^{-1}$, intensity 30% ~ 95%

Discussion

A) Like the previous paper, the storage (preservation) temperature was set at $4^{\circ}\text{C}(\pm 0.5^{\circ}\text{C})$, $0^{\circ}\text{C}(\pm 0.5^{\circ}\text{C})$, and $-2.5^{\circ}\text{C}(\pm 0.5^{\circ}\text{C})$ in the range of present possible precise control with the present institution (experimental cold room) and apparatus. And the temperature, $-1.0^{\circ}\text{C} \sim -1.5^{\circ}\text{C}$, in the glove box was one objective temperature and could be kept constantly. Also the temperature, -2.5°C , in the experimental cold room was the lowest temperature that the intracellular water of the present objective organism was not frozen. Because the released heat from the organism or the equipments must be considered as a very important practical problem. Of course, if the intracellular water of the objective organism is frozen, the experi-

ment is beside the object. And the precision of control should be depended upon the experimental object and the objective organism.

Next, the temperature control is possible to perform with ordinary physical electric detector method that is not so high or high cost. However, the keeping of a constant humidity (relative humidity, water factor) is difficult with ordinary physical electric detector method even a small scale. Of course, it is possible to keep the condition expensively. Moreover, in the case of practical large scale, perhaps the keeping method must be exchanged into other low cost method. While a chemical or physicochemical method is practical economical method that is useful to both small and large scales. So the author is trying to examine the possibility of maintenance of humidity in the range of 97% ~ 99% as a first problem or over 95% as a second problem at least while taking practical problem, large scale, or manufacture into consideration.

B) The problem that the state of intracellular water (water factor) in living cell is made to be similar to the state on tree during a long storage (preservation) term is thought at first. But such a maintenance is almost impossible to do actually. It is possible actually that the state of water factor approaches to the state on tree as similar as possible. And when the approach is performed it is thought that it attains its object practically. In other words, the approach is one necessary condition of storage (preservation). Namely, when the vapor pressure of water in the living cell system during a storage term is equal to the vapor pressure in the living cell before the storage, it is said that this experiment attains its object. Then it was to be desired that the humidity was kept at 97% ~ 99% range as one possible actual condition. However, the maintenance of this range was not so easy. Of course, the author succeeded on the keeping of its humidity at con-

stant. As one practical problem, the lowest limitation of humidity may be over 95%. The decrease of several percentage (%) of humidity produces the drop of the quality in some degree generally. As one countermeasure, a shortening of storage (preservation) term may protect the drop of the quality. The keeping of the quality is most important in a storage. Especially in the case of preservation it is most important. Thus, an appropriate storage (preservation) term may be decided.

D) During such a storage (perservation) of food (contained agricultural primary product), even a very small amount of poisonous component that is itself or is released with the contact or the reaction in the absorption process should be avoided absolutely in the usage of the reagent. This important restriction regards to the usage of the reagent was considered sufficiently to protect a food pollution. Of course, these used reagents were free of the restriction. It is very important consideration. And the humidity was kept at 97% ~ 99% constantly with these used reagents.

The one reagent published on the previous paper⁵⁾ showed the different property from other reagents. So the result that the experiment was carried out again was agreed with the previous result. Then, it was considered that the vapor pressure of the aqueous solution caused the relative humidity to less percentage. Namely, it was characteristic of the reagent.

E, F) The signals of ^{13}C NMR and IR of the fundamental (important) components between red epidermis species and green epidermis species were apperared and detected. Also, the existence ratio of component among these fundamental components was different in the both species. It was important and significant result. It was considered that the detectable results were obtained with this new author's method for the first time. And, the sample fluid was prepared with the creative apparatus

and preparation method. Moreover, it was determined with high aquisition (20000) and 15 multiple refraction Ge cell that was safe to acidic aqueous solution. For long term an aqueous solution afflicted an determination. And an acidic solution afflicted it moreover. These points were some cause of success. And, if a cooling system is established at NMR and if 400 MHz and 600 MHz are can be used, the obtained results may become better. So, the author is trying with those high precise instrument. Partially he determined some samples with 400 MHz at cooling system that was published on the previous time.³⁾

Summary

This experiment was carried on to establish the appropriate long storage (preservation) of agricultural primary product.

The temperature control that was lower temperature, $-1.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (before the living cells freeze), was succeeded by the author in the new outside apparatus model functional improved glove box. Also, the relative humidity could control on 97% ~ 99% ($\pm 1\%$) that was almost similar to the living state in the glove box.

Moreover, as this new glove box was outside apparatus model, gas phase component control was possible to be performed easily.

The new informations of the living cell assembly that was prepared from the the two typical species of apple, red epdermis (Fuji) and green epidermis (Ōrin), with this creative all plastic squeeze apparatus under airtight condition were obtained from the determinations related to ^{13}C NMR and IR ($4000\text{Cm}^{-1} \sim 700\text{Cm}^{-1}$) for the first time. Of course, the important relative density determination that the author has persisted and pH were determined at the same time.

References

- 1) K. Horitsu: *Bull. Re. In. Do. Sci. Tokyo Kasei Daigaku* 7, 48 (1984)
- 2) K. Horitsu: *ibid.* 8, 29 (1985).
- 3) K. Horitsu: *Japan Agr. Chem. Soc.* 342th Con. Kansai 1 (1985).
- 4) K. Horitsu: *Bull. Re. In. Do. Sci. Tokyo Kasei Daigaku* 9, 36 (1986).
- 5) K. Horitsu: *ibid.* 10, 75 (1987).

鮮度保持, 旨味成分の変動に関する研究 (第2報)

堀津圭佑

(1988年1月28日, 受理)

この実験は農業第1次生産物のその適切な長期貯蔵(保蔵)を確立せんとし行ってきた。

生細胞の氷結前の低温 $-1.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ である温度制御が新外部装置型機能的改良グローブボックスのなかで著者により成り遂げられた。また, 相対湿度はグローブボックス内で生きている状態に殆んど等しい97%~99%($\pm 1\%$)に制御できた。

さらに, この新グローブボックスは外部装置型のため気相成分制御が容易になし得る。

リンゴの2代表種, 赤色皮層(富士)と緑色皮層(王林)から気密状態のもとで独創的全プラスチック製圧搾装置で準備されたその生細胞群の新情報が初めて ^{13}C NMRおよび赤外吸収(4000cm^{-1} ~ 700cm^{-1})に関する測定から得られた。勿論, 著者がながく主張してきた重要な相対密度とpHも同時に測定した。