

魚肉試料の固定に関する化学的研究

第1報 揮発性塩基定量を目的とする固定法

その1 除蛋白剤による固定について*

大城善太郎・永吉秀夫

Chemical Studies on the Fixative Procedure of Fish Meat for the Various Estimation...I

(1) On the Fixative Procedure for the Estimation of Volatile Basic Nitrogen

(a) Fixation by Using Protein Precipitant

Zentaro OOSHIRO and Hideo NAGAYOSHI

序

魚類死後の成分変化若くは鮮魚の保蔵における成績を検討する一手段として揮発性塩基（以下 V-N と略記する）の測定が屢々行われているが、その測定は漁獲現場・保蔵現場において直ちに行わねば正確な数値を期待することは出来ない。

然し乍ら多くの場合之等の測定を行わんとする場所は一般に実験室的設備を有しない漁船・工場内であるところから、試料を一時的に固定して実験室へ搬入する便法が採られている。現今行われている魚肉試料の固定法としては、細挫魚肉に三塩化酢酸・過塩素酸溶液を加えて肉蛋白を完全に凝固させると共に酵素作用を停止せしめて更に凍結する方法¹⁾、又は細挫魚肉に上記の如き酸性除蛋白剤を加えて得た除蛋白液を冷却する方法²⁾等がある。何れの方法も凍結設備を要し或いは濾過操作を伴う故尙不便な点がある。

最近多くの研究者³⁾⁴⁾によれば、遠洋性漁獲物特にマグロ類の V-N が死直後でも 40~50 mg % にも達する故にその測定によつては鮮度判定が出来ないと結論している。

然るに筆者⁵⁾が本学練習船に便乗し、チモール近海において即時測定した V-N 量はマグロ類でも一般魚肉の夫と殆んど同様な結果が得られた。そこで筆者が上述の如き実験結果の不一致の原因を確かめるため種々検討を加えたが、その結果は従来云われているような過大の V-N 量は普通試料を現場で酸性除蛋白剤によつて固定しておいて 10~20 日後に測定した値であることから、固定法の実施時自身にその大半の原因があることを知った。

そこで更に筆者は固定法を簡易化する目的で—— 1) 常温で保存する。2) 繁雑な操作を要しない。—— と云う立場から種々検討を行つた結果、殆んど所期の目的を達し得たので茲にその大要を報告する。

実験並びに考察

* 1953 年 4 月 5 日、日本水産学会大会にて講演。

I. V-N 生成に対する防腐剤の効果

魚肉中の V-N は主として細菌の作用によつて生成増加するものと考えられる。腐敗菌の發育を停止せしめることによりどの程度その生成を防止し得るかを確かめるために先ず防腐剤の効果を試験した。即ち細挫マグロ肉 5 gr. に水 20 cc. を加えて一様に肉を懸濁させ、更にトルオール・クロロホルム (2:1) 5 cc を加えて充分混和し、20°C の恒温器及び -4~0°C の冷蔵庫内に保存しておき、V-N 量を減圧蒸溜法 (公定法)⁹⁾ により測定した。Fig.1 はその結果である。

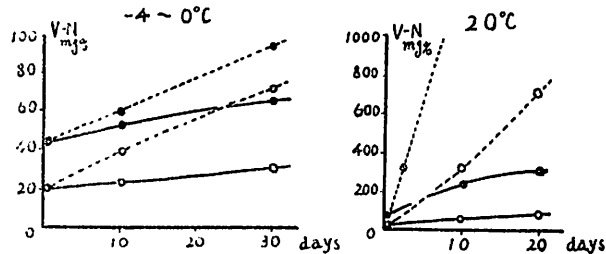


Fig. 1 Effect on development in volatile basic nitrogen of antisepticizer (toluol-chloroform) added in fish meat, which is stored at -4~0°C and 20°C.

○ : fresh, ● : decayed, — : antisepticized, --- : non-antisepticized

即ちトルオール・クロロホルム混液を添加防腐しても 20°C においては勿論、-4~0°C 冷蔵の場合にも魚肉中の自己消化酵素及び漁獲後に附着繁殖したと思われる細菌の生産酵素の作用により V-N は生成増加する。特に鮮度の低下した魚肉の場合にその生成量が多いから細菌酵素の影響が著しく従つて漁獲物の時間的変化を取扱う場合には誤差を生ずる原因とならう。従つてこのような防腐剤のみによる試料の固定は不可能と思うのである。

II. 酸性除蛋白剤の防腐効果

実験 I. の結果から V-N 測定を目的とする試料の固定は、細菌の發育並びに酵素作用を完全に停止せしめることによつてのみその目的を達し得られるものと考えられる。一般に除蛋白剤によつて酵素は沈澱し不活性化するので、通常用いられる濃度の酸性除蛋白剤が防腐効果を示せば所期の目的を達し得られるものだと思ひその防腐性を検討して見た。即ち細挫マグロ肉 5 gr. を三角フラスコに採り之に夫々 5% (2% の場合には発酵して実験不可能となつた) の三塩化酢酸並びに過塩素酸溶液を 40 cc. 宛加え、凝固した肉塊を打碎き前述の如き防腐剤を加えて密栓し 20°C 及び -4~0°C に保存して V-N の時間的変化を追跡した。それ等の結果は Table. 1 に示す通りである。

即ち防腐区と対照区の V-N 量が殆んど一致することから、少くとも 5% 程度の濃度ならば除蛋白剤のみで充分防腐し得ることが確認された。但し何れの場合にも保存中に V-N の増加が見られるが、この増加現象は腐敗作用並びに自己消化酵素作用以外にその原因があるものと考えられる。

III. V-N 生成に対する酸性除蛋白剤の影響

上記 II の実験結果から酸性除蛋白剤浸漬による試料の保存中新に著量の V-N が生成増加し、その増加量は除蛋白剤の種類によつても異なるが、保存温度並びに貯蔵日数に比例

Table 1. Antiseptic effect of acidic protein precipitants.

| -4~0°C | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|-------|----------------|----------------|
| storing time (days) | | | | 0 | 12 | 20 |
| fixative agent | | | | | | |
| A | { | + | - | 19.30 | 23.07 23.10 | 27.65 27.62 |
| B | { | + | - | 20.01 | 21.10 21.10 | 21.90 21.58 |
| A | { | + | - | 42.80 | 54.30 54.30 | 54.40 55.02 |
| B | { | + | - | 41.53 | 47.93 48.06 | 49.12 48.98 |

| 20°C | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|-------|----------------|------------------|
| storing time (days) | | | | 0 | 5 | 14 |
| fixative agent | | | | | | |
| A | { | + | - | 26.25 | 54.02 53.95 | 60.70 60.68 |
| B | { | + | - | 25.15 | 36.60 36.65 | 45.76 45.79 |
| A | { | + | - | 42.80 | 73.60 73.60 | 103.50 103.55 |
| B | { | + | - | 40.31 | 49.40 49.45 | 60.83 60.80 |

A : 5% HClO_4 , B : 5% CCl_3COOH , + : antisepticized, - : non-antisepticized

していることからその増加の原因は魚肉成分の酸分解の結果によるものであろうと推定してみた。

この推定を確めるため、マグロ肉 5 gr. に各種濃度の酸性除蛋白剤 40 cc. を加えて前述の実験同様 -4~0°C, 20°C, 35°C に保存し V-N 量を測定した。Table. 2 はその結果である。

即ち酸性除蛋白剤による試料の固定保存中、氷蔵処理に相当する 0°C 前後の低温でも V-N が徐々に生成増加し、而もその増加量は除蛋白剤の種類、濃度並びに保存温度、時間に比例することが確認された。

依つて上記の諸実験結果から、酸性除蛋白剤によつては、たとえ細菌並びに自己消化酵素の作用を停止させても魚肉中成分の酸分解により V-N が生成され、その生成量は約 200~250 mg % にも及ぶことが確められた。

このことから従来キハダマグロ等の如き遠洋性のものに V-N 量が多いと云う一般通念は恐らくこの様な酸性除蛋白剤浸漬法によつた固定試料について実験されたため、二次的に（酸分解されて）生成された V-N をも測定した結果による誤判ならずやと考えられる。尚酸性除蛋白剤には本実験に使用したもの以外にも多数あるが、酸性溶液である以上程度の差こそあろうが、大体本実験の場合と同様の結果となることが類推し得られた。

以上のことから筆者等の理想とする魚肉試料の常温保存が従来用いられている酸性除蛋

Table 2. The effect of acidic protein precipitant to the production of volatile basic nitrogen

- 4 ~ 0 °C

| fixative agents | storing time (days) | 0 | 10 | 20 | 30 |
|-----------------------|------------------------|------|------|------|------|
| | concentration (%) | | | | |
| HClO ₄ | 5 | 21,6 | 24,7 | 25,5 | 27,1 |
| | 10 | | 25,6 | 29,0 | 32,0 |
| | 20 | | 28,2 | 36,9 | 46,5 |
| CCl ₃ COOH | 5 | 20,8 | 24,1 | 25,0 | 27,0 |
| | 10 | | 25,5 | 27,0 | 28,5 |
| | 20 | | 26,0 | 29,0 | 31,5 |

20 °C

| fixative agents | storing time (days) | 0 | 10 | 20 | 30 |
|-----------------------|------------------------|------|-------|-------|-------|
| | concentration (%) | | | | |
| HClO ₄ | 5 | 15,3 | 61,3 | 69,5 | 100,6 |
| | 10 | | 103,5 | 140,2 | 183,3 |
| | 20 | | 135,4 | 170,3 | 223,2 |
| CCl ₃ COOH | 5 | 14,7 | 30,1 | 46,3 | 87,5 |
| | 10 | | 70,4 | 96,0 | 170,3 |
| | 20 | | 105,4 | 130,2 | 185,1 |

35 °C

| fixative agents | storing time (days) | 0 | 10 | 20 | 30 |
|-----------------------|------------------------|------|-------|-------|-------|
| | concentration (%) | | | | |
| HClO ₄ | 5 | 13,4 | 98,1 | 142,3 | 163,5 |
| | 10 | | 141,8 | 185,6 | 226,0 |
| | 20 | | 216,2 | 250,4 | 251,3 |
| CCl ₃ COOH | 5 | 14,0 | 80,8 | 117,4 | 178,5 |
| | 10 | | 121,6 | 163,5 | 230,1 |
| | 20 | | 207,5 | 251,0 | 250,8 |

白剤による方法では全く妥当の結果が得られないことを確認した。

尙お試料の酸分解による V-N の生成機構については後報する。

IV. V-N 生成に対する中性除蛋白剤の影響

酸性除蛋白剤による固定は魚肉中成分の酸分解により二次的に V-N を生成する故、試料の保存目的には不適当であることを知つたのであるが、之等の現象より推理して中性の除蛋白剤を使用すれば、酵素作用をも停止せしめ得るから之を防腐すれば理想的に固定し得るものと考えた。而して固定剤としての適否を吟味するに先立ち、中性除蛋白剤の如き膠状粒子の通性として挙げ得る吸着性を考慮する必要がある。

i) 膠状水酸化亜鉛のアンモニウムイオン吸着に対する PH の影響

Zn(OH)₂ 水様体は普通 ZnSO₄ に NaOH を加えて調製するが、それ等の混合割合如

何によつてその膠状液の PH は微酸性より アルカリ性の広い範囲に亘つて来る から当然 NH_4^+ 等の吸着に対して影響することが考えられる。

筆者等は Somogyi⁷⁾ の方法に準拠して 10% ZnSO_4 と N/2 NaOH の混合割合 (容量) を種々変えて得た $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 溶液 10 cc. に対し NH_4Cl 溶液 (0.02 mg $\text{NH}_3/\text{cc.}$, 0.10 mg $\text{NH}_3/\text{cc.}$) 各々 10 cc. を加えてよく攪拌濾過し、濾液について NH_3 を測定しその吸着の有無を検討した。Table.3 はその結果である。

Table 3. The influence of pH on the adsorption of ammonia which is adsorbed by the colloidal zinc hydroxide precipitant prepared with zinc sulfate and sodium hydroxide solution.

| reagents | A | B | A | B | A | B |
|--|----------|---|----------|---|------------|---|
| mixing ratio | 6 | 4 | 5 | 5 | 4 | 6 |
| pH | 6.5 | | 6.9~7.0 | | 9.7 | |
| ammonia adsorbed { 0.02 mg NH_3/cc 1.0 mg NH_3/cc | 0 % 0 | | 0 % 0 | | 25 % 35 | |

A : 10% ZnSO_4 , B : N/2 NaOH

即ち反応液が微酸性若くは中性のときには NH_4^+ 吸着は全く起きないが、アルカリ性のときには明らかに吸着されることが認められる。依つて今後の実験には両者の混合割合を 1:1 にすることとした。

ii) 中性除蛋白剤の固定力並びに防腐剤添加の効果

前述の諸実験結果から魚肉に 中性除蛋白剤を加えて酵素を不活性化させ更に防腐すれば 酸性除蛋白剤浸漬時におけるような V-N の二次的生成も起らないから試料の常温保存が可能であろうと考えられた。この推定を確認するため次の如き実験を行つた。

Table 4. Preventative effect of volatile nitrogen producing by use of the neutral protein precipitant.

| 0~2°C | | | | | |
|---------------------|------|------|-------|-------|-------|
| storing time (days) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 |
| antisepticizer* | | | | | |
| + | 19.1 | 19.1 | 19.2 | 19.1 | 19.1 |
| - | | 19.9 | 21.0 | 25.1 | 27.3 |
| + | 43.9 | 44.0 | 43.8 | 44.0 | 43.9 |
| - | | 51.2 | 55.5 | 59.0 | 60.8 |
| 35°C | | | | | |
| storing time (days) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 |
| antisepticizer* | | | | | |
| + | 26.2 | 26.3 | 26.2 | 25.1 | 26.2 |
| - | | 35.8 | 58.5 | 59.1 | 60.0 |
| + | 42.8 | 42.7 | 42.8 | 42.9 | 42.8 |
| - | | 53.5 | 141.0 | 185.4 | 198.2 |

* toluol - chloroform (2:1)

即ち 100 cc. 容の三角フラスコにマグロ細挫肉 5 gr. を採り、之に 10% ZnSO_4 20 cc. $\text{N}/2$ NaOH 20 cc. を加えてよく攪拌し更にガラス棒で肉塊を打挫き一様に肉を懸濁せしめ(対照区)、その固定効果を確めるため更にトルオール・クロロホルム (2:1) 5 cc. を加えて攪拌(防腐区)後各々を密栓し、 $-4\sim 6^\circ\text{C}$ 、 36°C に夫々保存し V-N の時間的変化を見て固定(保存)成績を検討した。結果は Table. 4 の通りである。

上記の表から中性除蛋白剤のみでは、固定が充分ではないが(之の理由としては $\text{Zn}(\text{OH})_2$ が沈降しその上澄液に細菌が発育するためであろう)防腐剤を添加したものは、 0°C では勿論、夏季の気温に相等する 36°C 程度でも殆んど完全に固定保存が可能であることを認め得た。

要 約

V-N 測定を目的とする魚肉試料の固定法を見出すために種々吟味し次の諸点を明らかにした。

1) トルオール・クロロホルム混液のみではたとえ防腐し得ても魚肉中の酵素の作用により徐々に V-N が生成される。特に鮮度の低下した魚肉の場合にこの傾向が著しく、従つて細菌酵素が大きく影響することを認めた。

2) 少くも 5% 以上の濃度であれば、三塩化酢酸、過塩素酸は充分防腐効果がある。

3) 酸性除蛋白剤に浸漬保存する方法では、細菌並びに自己消化酵素の作用を停止せしめ得るが、魚肉中成分の酸分解により二次的に著量の V-N を生成する。

4) 水酸化亜鉛膠状液の如き中性除蛋白剤と防腐剤を使用すれば、常温に於いても殆んど完全に固定保存の出来ることを認めた。

終りに臨み終始御指導を賜つた本学高田教授に謹んで感謝の意を表する。なお本実験について有益なる助言を戴いた太田助教授にも深謝する。

Résumé

In order to find out the fixative procedure of fish meat which is useful to measure the volatile basic nitrogen, some possible examinations were tried with the following results obtained.

(1) When only the toluol and chloroform mixture for antiseptic agent were used, volatile basic nitrogen increased gradually in autolysing fish meat, but the amounts of volatile nitrogen were in inverse proportion to freshness, and so authors supposed this reason was due to bacterial enzymic action.

(2) At 5% or more concentration acidic protein precipitant such as perchloric or trichloroacetic acid showed a remarkable antiseptic effect to bacteria in fish meat.

(3) When the fish meat was pickled in the acidic protein precipitant, the volatile basic nitrogen in meat was not increased by enzymic reaction, but at the same time secondary decomposing volatile nitrogen was increased for the use of this reagent.

(4) When the neutral protein precipitant such as zinc hydroxide and anti-

septics (toluol-chloroform) were added to the fish meat, No changes of volatile basic nitrogen occurred and the fish meat was completely fixed by these precipitant even at normal temperature.

文 献

- 1) 山田紀作, 高尾亀次, 雨宮和子: 南氷洋産冷凍鯨肉に関する研究報告; 9 (1948~1949) 冷凍魚介類価格査定委員会.
- 2) 高瀬 明: 日水誌; 19, 71~74 (1953).
- 3) 浅川末三: 日水誌; 19, 118~123 (1953).
- 4) 天野慶之: 水検月報; 46, 16~19 (1952).
- 5) 田ノ上豊隆, 大城善太郎: 本誌; 3, (1), 21~24 (1953).
- 6) 厚生省編: 衛生検査指針; 39~45 (1951) 協同医書出版社.
- 7) Somogyi: J. Biol. chem. 85, 655 (1930).