

魚肉試料の固定に関する化学的研究 (第2報)

揮発性塩基定量を目的とする固定法

b. 酸性除蛋白剤浸漬保存中における揮発性塩基の生成について*

大城 善太郎・永吉 秀夫

Chemical Studies on the Fixative Procedure of Fish Meat for the Various Estimations. (II)

— On the Fixative Procedure for the Estimation of Volatile Basic Nitrogen —

b. On the Volatile Nitrogen Produced in Fish Meat fixed in Acidic Protein Precipitant.

Zentaro OOSHIRO and Hideo NAGAYOSHI

序

前報¹⁾で揮発性塩基(V-N)定量のための魚肉試料の固定保存は中性除蛋白剤と防腐剤の併用によつて完全になし得ることを報告した。

而して従来から屢々に行われている方法即ち三塩化酢酸、過塩素酸の如き酸性除蛋白剤中に試料を浸漬保存する方法では、仮令細菌の發育並に自己消化酵素の作用を停止し得ても新に著量のV-Nが生成することを認め、而もその生成量が保存の温度、時間並に供用除蛋白剤の濃度に比例して増加することからその際に生成されるV-Nは魚肉中成分の上記除蛋白剤による加水分解の結果によるものであることを確め、この様な方法では少くもV-N測定目的には妥当な結果が得られなかつたことも述べた。

本小論では固定法の確立という立場から、上記酸性除蛋白剤中に浸漬保存中生成されるV-Nについて検討し略々結論し得る結果を見たので、茲にその大要を報告する。

実験並に考察

I. 酸性除蛋白剤浸漬保存中に生成増加するV-Nの内容

魚肉を酸性除蛋白剤溶液に浸漬保存中著量のV-Nが生成されることは既に前報において述べた。そこで更に酸による加水分解に関与する魚肉中成分を明らかにするため、先ず保存中に生成するV-Nの内容を追求した。即ちマグロ肉を細挫し、その5g.を三角フラスコに採り之に各種濃度の過塩素酸・三塩化酢酸各々20cc.宛を加え、凝固する肉塊を出来るだけ液中に分散せしめて密栓し25±1°Cに保存、一定時間後之に水50cc.を加えてよく振盪濾過し濾液50cc.を常法の如く減圧蒸溜して規定硫酸で受け之を一定容となし、その一部を苛性ソーダ溶液で滴定しV-Nを求め、他方その受液についてネスラー法によ

* 1953年11月4日、日本水産学会秋季大会(津)にて講演

つて $\text{NH}_3\text{-N}$ を求め、 V-N と $\text{NH}_3\text{-N}$ の差を以て V-amine-N とした。

(尚ほ $\text{NH}_3\text{-N}$ を比色定量する場合共存する V-amine が比色値に影響するのは $\text{NH}_3\text{-N} \leq \text{V-amine-N}$ において極めて僅かながら認められるのであるが、この様な試料を扱うことは先ず考えなくてよいとした。)

之等の結果は第1表に示す通りである。即ちこの表から保存中に生成される V-N は $\text{NH}_3\text{-N}$ のみであることが確認された。

Table. 1. Change in ammonia and volatile amine nitrogen of fish meat preserved in acidic protein precipitant solution at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Protein precipitant used	Amount of ammonia and volatile amine nitrogen after the following days (mg%)								
	0		7		17		27		
	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*	
HClO_4	5%		58.9	2.4	67.2	2.3	98.3	2.3	
	10%	13.2	2.2	106.3	2.2	138.0	2.2	185.4	2.1
	20%		133.1	2.3	168.0	2.3	208.2	2.2	
CCl_3COOH	5%		28.0	2.1	44.2	2.1	85.3	2.0	
	10%	12.7	2.0	68.3	2.1	95.0	1.7	168.5	2.1
	20%		103.3	2.0	127.9	2.2	185.1	2.2	

* A : ammonia-N
B : volatile amine-N

II. 各種魚肉の保存中に増加するアンモニア量

実験Iの結果から加水分解によつて生成される V-N は $\text{NH}_3\text{-N}$ のみであることを認めたのであるが、尚ほ魚種による差異の有無を確めるため実験Iと同様の方法で試料を固定し $35 \pm 1^\circ\text{C}$ に保存し $\text{NH}_3\text{-N}$ を測定した。第2表はその結果である。

Table. 2. Increase of ammonia nitrogen in several fish meats preserved in 20% perchloric acid at $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Fish speies	Amount of ammonia after the following days (mg%)					
	0	2	5	10	20	60
Sardinia melanosticta (MAIWASHI)	18	128	180	253	255	253
Germo macropterus (KIHADA)	23	116	178	255	253	256
Pagrosomus unicolor (MADAI)	15	121	190	248	249	250
Carcharinus albimarginatus (TUMAGIRO ZAME)	24	137	202	240	242	239
Galeus glaucus (YOSHIKIRIZAME)	40	135	196	238	240	240

第2表に見る如く加水分解は約10日間で完了しその後における $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成はない。而も魚種による相異は殆んどなく(サメ類肉とて例外ではない)、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 生成最高量

は大約 200~230 mg % 程度である。

従つて之等の結果から加水分解に関与する成分は限られたそしてより簡単な物質か乃至は肉蛋白構成々分の特定のものであろうことが略々推定し得られるに到つた。

Ⅲ. 酸アミドの保存中に生成されるアンモニア

加水分解によつてアンモニアを(脱離)生成する魚肉中成分としてはアミノ酸アミド(アスパラギン, グルタミン)及炭酸のアミドと考えてよい尿素が挙げられよう。^{2) 3)}

之等のアミド類が本実験の如き比較的低温度の保存処理によつてアンモニアを生成するか否かを明らかにするため, 魚肉の場合と同様酸性除蛋白剤に溶解して保存し $\text{NH}_3\text{-N}$ を測定した。

a) アスパラギンの変化

和光純薬の特級アスパラギン 160.0 mg を 20% 三塩化酢酸及過塩素酸各々 50 cc. に溶解し密栓して $0\sim 2^\circ\text{C}$ 及び $35 \pm 1^\circ\text{C}$ に保存, 一定時間毎に $\text{NH}_3\text{-N}$ を測定した。第3表はその結果である。

Table 3. Liberation of ammonia nitrogen from asparagine in acidic protein precipitant and stored at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ or $0\sim 2^\circ\text{C}$.

35 ± 1°C							
Protein precipitant used	Amount of ammonia nitrogen liberated after the following days (mg/cc)						
	0	1	2	3	5	10	15
20% HClO_4	0	0.16	0.24	0.30	0.33	0.34	0.34
20% CCl_3COOH	0	0.06	0.08	0.10	0.27	0.32	0.34

0~2°C			
Protein precipitant used	Amount of ammonia nitrogen liberated after the following days (mg/cc)		
	0	4	10
20% HClO_4	0	0.012	0.150
20% CCl_3COOH	0	0.005	0.125

Test solution is made by dissolving 160.0 mg of asparagine in 50 cc. of protein precipitant solution.

Each figure is expressed in mg. of ammonia nitrogen per cc test solution.

表示してある数字は試料 1 cc. 中の $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg) である。アスパラギン 3.20 mg/cc. が完全に分解すれば当モルのアンモニアとアスパラギン酸を生成するからそのときの $\text{NH}_3\text{-N}$ 量は 0.34 mg/cc. である。従つて 35°C の場合には 20% 過塩素酸で約 10 日, 三塩化酢酸で約 15 日後には $\text{NH}_3\text{-N}$ 生成が最高値に達し水解脱離は完了する。又 $0\sim 2^\circ\text{C}$ の如き低温度でも約 10 日間で三塩化酢酸処理の場合約 10%, 過塩素酸処理の場合約 20% のアスパラギンが分解されることになる。

b) グルタミンの変化

和光純薬の特級 L-グルタミン 34.5 mg. を 20% 三塩化酢酸 15 cc. に溶解し 35°C に保存後 $\text{NH}_3\text{-N}$ を測定した。結果は第4表に示す通りである。

Table 4. Liberation of ammonia nitrogen from glutamine stored in 20% trichloroacetic acid at $35 \pm 1^\circ$.

Amount of ammonia nitrogen liberate dafter the following time in hours, (mg/cc)									
0	1	2	3	6	8	10	12	24	36
0	0.021	0.050	0.067	0.120	0.150	0.172	0.192	0.221	0.220

Test solution is made by dissolving 34.5 mg. of glutamine in 15 cc of 20% trichloroacetic acid.

Each figure is expressed in mg. of ammonia nitrogen per cc. test solution.

グルタミンも水解により当モルのアンモニアを生成するから、試料グルタミン 3.1mg/cc. が完全に水解するときには $\text{NH}_3\text{-N}$ として 0.22mg/cc. となろう。従つて表から見取れる如くグルタミンは極めて水解し易く 1 時間でその約 10% 相当量が遊離され、36 時で完全に分解されアンモニアを脱離生成する。

c) 尿素の変化

尿素を前二者と同様処理しても保存温度が少くも 35°C 以下 (50°C でも変化しなかつた) では分解が起らず勿論アンモニアの生成は全く認められなかつた。

このことは実験 II で多量の尿素を含有するサメ類肉 (尿素含量: ヨシキリ 688 mg%, ツマジロ 655 mg%) を保存した時生成されるアンモニア量が一般魚種と大差ないことも符合する。

従つて a) ~ c) から保存時に生成されるアンモニアは少くも魚肉中のアスパラギン及グルタミン等の遊離アミノ酸アミドの加水分解に依るものであり尿素は全く関与しないことが認められた。

IV. 魚肉中の遊離アミノ酸アミド

魚肉を酸浸漬して保存する際のアンモニア生成源としては前述の如くアスパラギン, グルタミンであると一応考えてよい。

併し乍ら魚肉中に $\text{NH}_3\text{-N}$ 200 mg% を生成すべき多量のアミドが含有されているとは考えられないので念のため常法⁴⁾により遊離 Amide-N を測定した。第 5 表はその結果である。

Table 5. Contents of free amide nitrogen in several fish meats.

Fish species	Free amide - N (mg%)
Sardinia melanosticta (MAIWASHI)	8.5
Scomber tapeinocephalus (GOMASABA)	7.6
Germo macropterus (KIHADA)	9.1
Pagrosomus unicolor (MADAI)	10.2

即ち遊離 amide-N は 5~10 mg% であり前記諸実験で得た $\text{NH}_3\text{-N}$ 200~230 mg% に遙かに及ばずその約 2~4% に相当する僅少量である。

V. 魚肉消化液保存中のアミドとアンモニア生成量の関係

実験 VI の結果から、魚肉を酸浸漬保存中にアンモニアを生成する因子としてアミノ酸アミドのみを取り上げることは該物質の含量があまりにも少な過ぎることを述べたのであるが、このアンモニア生成は魚肉の完全加水分解に達しないうちに終了する事実から比較的容易に脱離して生ずるものであり、換言すれば魚肉蛋白の構成成分としてのアミドも直接分解に参加してアンモニアを生ずるのであらうと考えた。この推定を確かめるためには生成するアンモニア量と共にアミドの減少量を検査することが望ましいのであるが肉蛋白を構成しているアミドを直接定量することは出来ない。そこで筆者等は魚肉を酵素で消化させた試料について実験を行うことにした。

即ちキハダマグロ肉を細挫し、その 5 gr に酵素液（サバ幽門垂消化液）50 cc. を加え更にトルオール約 5 cc. を混和して充分消化させ、この消化液 20 cc. に 40% 過塩素酸 20 cc. を加えて 35°C に保存し amide-N, $\text{NH}_3\text{-N}$ を夫々測定し第 1 図を得た。これで明らかなように amide-N の減少と $\text{NH}_3\text{-N}$ の増加には相関が認められる。而も $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成が約 10 日で完了することは、魚肉を消化させないで直接保存した前諸実験結果と全く同一の傾向を示すものである。之等の事実から魚肉試料を酸性除蛋白剤溶液に浸漬保存した場合に生成されるアンモニアは遊離型、結合型の別なく魚肉中の全アミドの水解によつて生ずるものと考えてよいであらう。

IV. 魚肉にアスパラギンを加えた場合の変化

以上の実験から魚肉を酸性除蛋白剤に浸漬保存すれば、アミドの水解によつて著量のアンモニアを生成することが明らかとなつたのであるが、更に魚肉にアスパラギンを加えた場合の変化を見るための実験を行つた。

即ちアスパラギン水溶液 3.21 mg/cc を用いて次の如く試料を調製する。

A : アスパラギン溶液 5 cc. + 25% 過塩素酸 20 cc.

M : 水 5 cc. + マグロ肉 5 gr. + 25% 過塩素酸 20 cc.

A-M : アスパラギン溶液 5 cc. + マグロ肉 5 gr. + 25% 過塩素酸 20 cc.

A, M, A-M を夫々密栓して 35°C に保存し生成される $\text{NH}_3\text{-N}$ の時間的变化を追跡した結果は第 6 表に示す通りである。

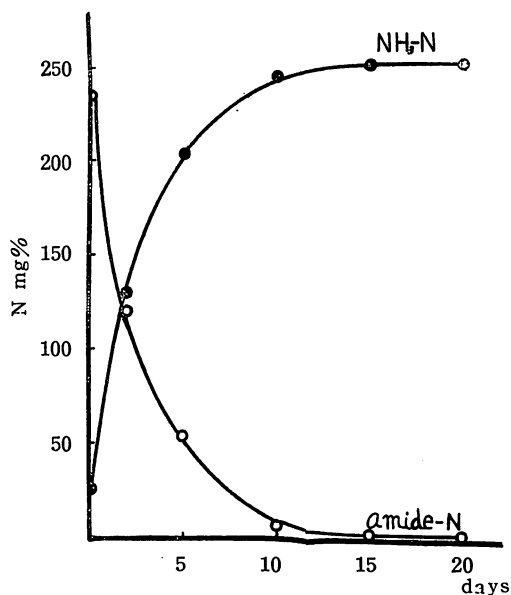


Fig. 1. Relation between increase of ammonia nitrogen and decrease of amide nitrogen in the enzymatic hydrolyzate of fish meat preserved in 20% perchloric acid at 35 ± 1°C.

Table 6 Liberation of ammonia nitrogen in fish meat preserved with asparagine in 20% perchloric acid at $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Sample *	Amount of ammonia liberated after the following days (mg/cc)							
	0	2	4	6	8	10	15	20
A	0	0.036	0.042	0.056	0.060	0.065	0.068	0.068
M	0.036	0.190	0.240	0.281	0.301	0.312	0.311	0.311
A - M	0.036	0.234	0.282	0.336	0.363	0.377	0.381	0.380

* A : 5 cc. of solution containing 3.21 mg asparagine per cc. was added to 20 cc of 25% perchloric acid.

M : 5 cc of water and 5 g of fish meat was added to 20 cc of 25% perchloric acid.

A-M : 5 cc of solution containing 3.21 mg asparagine per cc and 5 g of fish meat was added to 20 cc of 25% perchloric acid.

Each figure is expressed in mg of ammonia nitrogen per cc test solution.

この表から明らかなようにアスパラギン，魚肉共 $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成増加において略々同一の傾向が見られ，而も魚肉にアスパラギンを添加した試料でも夫々の和として定量されることが認められる。

従つてこの実験からも魚肉保存時におけるアンモニアの生成源はアミノ酸アミドであり，而もその型態には殆んど無関係に水解に関与してアンモニアを脱離生成することが明らかとなつた。

摘 要

魚肉に過塩素酸，三塩化酢酸のような酸性除蛋白剤溶液を加へて保存する場合に生成される V-N について検討し，次の諸点を明らかにした。

- 1). 生成される V-N は $\text{NH}_3\text{-N}$ のみである。
- 2). 生成される $\text{NH}_3\text{-N}$ 量は魚種によつて左程の差異は認められず大約 200~230 mg% である。
- 3). アスパラギン，グルタミンのようなアミドを上記溶液に溶解して保存する際，比較的低温度においても容易にアンモニアを脱離する。尿素は本実験の処理条件では全く分解しない。
- 4). 魚肉中の遊離 amide-N 含量は 5~10 mg% 前後である。之は保存時に生成される $\text{NH}_3\text{-N}$ の最高値の約 2~4 % にしか相当しない。
- 5). 魚肉消化液の保存中における amide-N の減少と $\text{NH}_3\text{-N}$ の間には相関が見られる。
- 6). 試料保存中には遊離，結合型アミドの別なく同様に加水分解を受けてアンモニアを脱離生成し，その生成量は 20 % 過塩素酸処理の場合 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で約 10 日，20 % 三塩化酢酸の場合約 15 日後に何れも最高値に達する。
- 7). 従来の実験成績の示す V-N 量の偏差の著しいことの一因は本来酸性除蛋白剤による試料の保存条件に随伴しての変化による結果と思われる。

Résumé

In the preceding paper, these authors presented a fixative procedure of fish meat, using mainly protein precipitant, for the determination of volatile basic nitrogen.

But, in that case a large amount of volatile basic nitrogen was produced when the sample was being fixed in acidic protein precipitant.

In present paper, the authors investigated on the produced volatile basic nitrogen yielded during the storage of fish meat pickled in acidic protein precipitants.

And we confirmed that the production of volatile nitrogen was due to the fact that ammonia was liberated from amide, present in free or combined form in fish meat, by being influenced by the action of protein precipitant as an acid.

文 献

- 1) 大城善太郎, 永吉秀夫 : 本誌; 3, (2), 38~44 (1954)
- 2) M. DAMODARAN : Biochem. J., 26, 235~47, 1704~13 (1932)
- 3) A. SHORE, H. WILSON, G. STUECK : J. Biol. chem., 112, 407~13 (1935)
- 4) 大岡増二郎 : 食品分析一般試験法; 27 (1949)