研 究 ノ ー ト

食 肉 の レ サ ズ リ ン 還 元 試 験 に つ い て

大 高 文 男*・丸 山 峰 男*・藤 田 稔*

SAFFLE ら¹⁾は、牛肉を用いてレサズリン還元試験を行ない、レサズリン色素の退色に要する時間と官能的な鮮度および生菌数とがよく相関することを報告している。著者らも豚肉について同様な試験を行ない、退色時間と生菌数とが相関することを認めたが、この場合、変色とくにピンク色の程度が見にくいことと、新鮮な試料では退色に時間がかかるので、15分間ごとに色の変化を観察することはかなり面倒であった。SAFFLE らの用いた方法は、滅菌した0.5%酵母および肉エキスパイ液10 ml に、1±0.1 g の肉とレサズリン液1 ml とを加え、しゃ光して30°C に保ち、15分ごとに乳白色板の前で色を観察し、ピンクまたは無色になるまでの時間を測定するのであるが、肉塊の周辺以外の変色は見にくいようであった。そこで肉塊の代りに、生菌数測定用に調製した肉の滅菌生理食塩抽出液を用いてみたが、肉エキ自体も着色しているので、やはり見にくいことは同じであった。

この場合、液自体が牛乳のように白濁していれば、色調の変化がより見やすくなるのではないかと考え、ひとつの方法として脱脂粉乳を用いて検討したので、その結果を報告する。

1. 実験方法

(1) 試料溶液の調製

生菌数の測定に用いるものと同じように調製した。すなわち衛生検査指針²⁾を参照し、豚ひき肉50 g を滅菌広口ビンにとり、滅菌生理食塩水（以後食塩水と略す）を加えて100 ml とし、1分間振とうしたものの上澄液を用いた。

(2) レサズリン還元試験法

滅菌試験管（内径約13 mm、長さ150 mm で共センつき）に10%脱脂粉乳を5 ml いれ、120°C に15分間滅菌しておく。これに試料溶液5 ml とレサズリン液（レサズリン錠1錠を200 ml の滅菌水にとかし、7日以内

に使用する）1 ml を加え、静かに3回転倒して混合する。これを37°C の恒温水槽にしゃ光してつけておく。30分後に色調を観察し、また3回静かに転倒してから恒温水槽にもどす。このようにして60分および120分後まで観察した。なお試験管の上部は酸化により色がもどりやすいので、下部4/5までの色調を観察する。また色調は、牛乳用のレサズリン色調表を用いて比色し、つぎのように0～4の記号で表わした。すなわち、0は青色、1は青-紅紫色、2は紅紫-濃紅色、3は紅-淡紅色、4は無色（白色）の5段階である。

(3) 生菌数の測定

衛生検査指針²⁾を参照した。すなわち、前記の試料溶液を原液として適当な希釈液を作り、37°C に48±3時間平板培養（プレートカウントアガー）し、30～300コの計測を得たものを平均し、肉1 g に対する細菌数で示した。

2. 実験結果および考察

(1) 滅菌脱脂粉乳溶液の色調

色調の変化を見やすくするため、脱脂粉乳を加えて試験液を白濁させたが、加熱によるSH基の生成などのためにレサズリンが還元されるかも知れないので、まず脱脂粉乳溶液を加熱滅菌したときの色調を観察した。すなわち全乳、脱脂乳および10%脱脂粉乳溶液を120°C に15分間滅菌し、おのおの5 ml に滅菌食塩水5 ml およびレサズリン液1 ml を加え、30、60および120分後の色調を観察した。いずれの場合もレサズリン色調表による反応番号が0であった。新鮮な脱脂粉乳を用いれば、滅菌による色調番号の進行はないものと考えられたので、つぎにこれを汚染させてみた。すなわち、食塩水の代りに肉の試料溶液5 ml を加えてレサズリン試験を行ったところ、第1表の結果を得た。

これによると、肉試料を入れたことにより色調番号が進み、またその色調は、牛乳のレサズリン色調表によ

* 茨城大学農学部（茨城県稲敷郡阿見町）

A Resazurin Reduction Test for the Determination of Microbiological Quality of Meat. By FUMIO OHTAKA, MINEO MARUYAMA and MINORU FUJITA.

第1表 全乳、脱脂乳および脱脂粉乳培地によるレサズリン試験

試 料	色 調		
	30分	60分	120分
全 乳*5ml/ + 肉試料液5ml/	3	3	3
脱 脂 乳*5 + " 5	3	3	3
脱脂粉乳*5 + " 5	2	3	3

注: * 120°C, 15 分滅菌

第2表 酵母および肉エキス添加の影響

試 料	色 調		
	30分	60分	120分
酵母および肉エキス入り脱脂粉乳液* 5ml/ + 肉試料液5ml/	2	2	3
脱脂粉乳液* 5 + " 5	2	2	3
酵母および肉エキス液* 5 + " 5	2	2	2

注: * 120°C, 15 分滅菌

て比較できることが認められた。

(2) 酵母および肉エキス添加の影響

市川⁹⁾は牛乳のレサズリン試験について、1時間法の程度では細菌の増殖は少なく、還元性の増加は問題視されないで、色調の変化は最初から存在している細菌数に関係するらしいと述べている。しかし SAFFLE^ら¹⁾の用いた方法で肉塊について実施した場合には、肉エキスの代りに食塩水のみにしたもののほうが、変色の進み方が遅いようであったので、一応肉エキスの添加による影響を比較したところ、その結果は第2表のとおりであった。

これによると、脱脂粉乳のみの場合と、これに酵母および肉エキスがはいった場合とでは、いずれも変色の程度に差のないことが認められた。なお後者の場合は、液自体がいくらか着色しているので、むしろ脱脂粉乳ののほうが色調は観察しやすかった。参考までに酵母および肉エキス液のみの場合にも実施したが、これは白濁していないので、厳密にはこの色調表から判断できないが、乳白色板の前で観察したときの相当すると思われる反応番号を示した。

この結果からすると、前記のような肉試料液を用いて脱脂粉乳培地で実施する場合には、酵母および肉エキスを添加しなくてもよいものと考えられた。

(3) 肉中の還元性物質の影響

赤血塩還元法で肉の還元性の程度を経時的にみると⁴⁾、と殺直後の新鮮肉では高いが、これは急速に減少し、その後、いわゆる初期腐敗と思われるような時期からふたたび増加する。市川⁹⁾は、非細菌性還元物質のレサズリン色素に対する影響として新鮮肝臓片による退色を観察し、細胞内のミトコンドリアに存在する脱水素酵素により遊離した水素によって退色することを述べている。還元性物質の量的変化とレサズリン色素の変色の程度とを比較するため、前記のように食塩水で抽出して調製した肉試料液を滅菌し、これを用いて色調の変化を比較した。その結果は第3表のとおりである。

試料とした肉の鮮度にもよるが、この場合は、滅菌した肉試料液が 5 ml/ でも、その半量の 2.5 ml/ でも、色調は大体同じで、さらに半量とした 1.25 ml/ のときに反応番号がいくらか少ない程度であった。

つぎに還元性物質の多い状態と少ない状態、すなわち滅菌した肉試料液が 4 ml/ 存在する場合と食塩水のみの場合について、滅菌しない肉試料液を加えてレサズリン

第3表 滅菌肉抽出液によるレサズリンの色調 (その1)

試 料	色 調		
	30分	60分	120分
滅菌肉抽出液5ml/ + 滅菌食塩水0ml/	1	1	2
	1	2	2
	2	2	2
" 2.5 + " 2.5	1	2	2
	1	2	2
	2	2	2
" 1.25 + " 3.75	1	1	2
	1	2	2
	0	1	2

第4表 滅菌肉抽出液によるレサズリンの色調 (その2)

試 料	色 調		
	30分	60分	120分
滅菌肉抽出液 4ml/ + 肉試料液 1ml/	2	3	3
	2	3	4
	3	3	3
滅菌食塩水 4 + " 1	2	2	3
	2	3	4
	2	2	3

試験を行ない、色調を比較したところ、その結果は第4表のとおりであった。

これによると、3回実施したが、4 ml 存在する場合のほうが色調の反応番号がいくらか多くなるようである。

肉は、試料採取の時期や部位により還元性の程度に差異があり、非細菌性の還元性物質が多い状態のものと、少ない状態のものとは、菌数が同じでも色調の変化に差ができるかも知れない。しかし、菌数測定もレサズリン試験の色調も、ある程度幅のあるものであるから、この方法により肉の鮮度を5段階にわけて表現できるのではないかと考え、そのときの生菌数と色調番号との関係について検討を行なった。

(4) レサズリン試験と生菌数との関係

66例の肉についてレサズリン試験および生菌数の測定を並行して行なった。生菌数の対数値とレサズリン反応30および60分値との関係は、それぞれ第5および6表のとおりであった。

両者の相関は第5表では $r=0.662$ 、および第6表では $r=0.652$ であって、いずれの場合もきわめて有意(0.1%)であった。

官能的にみたとき、ここで用いた生菌数測定法で 10^8 までは、大体において腐敗していないようであった。 10^9 になると疑わしいものが多くなり、 10^{10} では明らかに腐敗が認められた。

よってこの場合、レサズリン試験30分値で4のものは、腐敗のおそれがあるものと判定されよう。なお、 $10^4 \sim 10^5$ のものは主として反応1を示し、 10^6 台のものは1~2、 10^7 台では大体が2、 10^8 以上では4であった。

第5表 レサズリン反応と生菌数との関係
(30分値)

		レサズリン反応					計
		0	1	2	3	4	
生菌数	10^4	1	4	2			7
	10^5		6	1			7
	10^6		4	9			13
	10^7		1	5	1		7
	10^8		6	4	6		16
	10^9		3	3	3	1	10
	10^{10}					2	2
計	10^{11}					4	4
		1	24	24	10	7	66

第6表 レサズリン反応と生菌数との関係
(60分値)

		レサズリン反応					計
		0	1	2	3	4	
生菌数	10^4		2	4	1		7
	10^5		3	4			7
	10^6			12	1		13
	10^7			4	2	1	7
	10^8			8	4	4	16
	10^9			5	3	2	10
	10^{10}					2	2
計	10^{11}					4	4
		0	5	37	11	13	66

60分値の場合、反応1のものは 10^5 以下で、また4のものは 10^7 以上であった。

120分値も観察したが、退色したものはすべて4で、それ以上にはわけられないためか、全体的に反応値が3~4のほうへよっていたので、ここで述べた試料液および方法を用いてレサズリン試験を行なう場合は、60分値まで観察して判定すればよいものと認めた。

例数も少なく、試料および白濁液の調製法、また pH および菌種の影響などさらに検討を要するが、ひとつの方法として提示した。

3. 要 約

食肉の鮮度判定に用いられるレサズリン還元時間法を改良した。すなわち、試験用培地を白濁させ(ここでは10%脱脂粉乳を用いた)、これに試料肉の生理食塩水抽出液とレサズリン液とを加え、一定時間後の色調を牛乳のレサズリン色調表を利用して判定し、鮮度を5段階にわけて表現した。この反応値と生菌数との間にはきわめて高い相関を認めた。

この実験に際し、生菌数の測定そのほかに忠告頂いた茨城大学農学部家畜衛生学教室の白坂昭治助教授に感謝する。

文 献

- 1) SAFFLE, R.L., MAY, K.N., HAMID, H.A. and IRBY, J.D.: *Food Technol.*, **15**, (11), 465 (1961).
- 2) 厚生省編: 衛生検査指針Ⅲ. 食品衛生検査指針(I), (協同医書出版), p. 129, 193 (1950).
- 3) 農林省畜産局衛生課・酪農課編: 牛乳品質改善講習会テキスト, p. 1~9 (1958).
- 4) 大高文男: 日畜産, **33**, (4), 226 (1962).

(1964年6月8日受理)