食品の鮮度測定法に関する研究—XI.

水蒸気蒸留法によるサバ肉の揮発性還元物質の定量法

富山哲夫・池浦一也・大山重信

(1959年7月29日受理)

STUDIES ON THE METHOD FOR TESTING THE SPOILAGE OF FOOD—XI.
DETERMINATION OF VOLATILE REDUCING SUBSTANCES
OF MACKEREL FLESH BY STEAM DISTILLATION

Tetsuo TOMIYAMA, Kazuya IKEURA and Shigenobu OYAMA*

In the VRS determination by STROHECKER's method difficulties were experienced due to foaming in the distillation and due to tediousness in removing protein coagulum adhered to distillation flask. Data in Table 3 clearly indicate that volatile reducing substance (VRS) can be determined on an extract as well which is freed from protein by magnesium sulfate. So, the above trouble can be easily removed by employing this extract.

Since it has been found that both neutral and basic volatile reducing substances were increased at incipient spoilage (Fig. 2), the steam distillation of the extract is to be carried out in alkaline reaction (about pH 9.3). This improvement in the method gives rise to a more pronounced increase in VRS at incipient spoilage. Data illustrated in Fig. 3 demonstrate that VRS is, among several chemical indices, the most sensitive one for bacterial spoilage of the mackerel flesh.

The present method in which six-minute distillation followed by 5-minute boiling with potassium permanganate is employed, enables us to run six determinations with a single apparatus within one hour.

食品の化学的鮮度判定法には揮発酸 (VA と略記), 揮発性塩基 (VBN と略記), トリメチルアミン (TM と略記), pH, 昇汞沈澱反応, チロシン, チラミン, ヒスタミン, 酸化還元電位, 揮発性還元物質 (VRS と略記) 等の定量値が利用されている。これらの内で VRS についての研究をみると, 肉の水蒸気蒸留物の KMnO_4 消費量が鮮度の判定に利用できることが初めて 1937 年に STROHECKER 氏等¹⁾によつて報告され, その後 1944~1956 年に FARBER 氏等²⁾は獣肉および魚肉圧搾汁を常温で通気して VRS を定量する方法を発展させ, VRS は VBN, TM および VA の値よりも腐敗初期に急激な変化を示すことを発表した。富安氏等³⁾は 1952 年に STROHECKER 氏等の方法を追試した結果, 供試魚肉の VRS は VBN よりも鋭い変化を示すことを確かめた。

著者等の一人 (富山)⁴⁾はクロルテトラサイクリンによるサバの鮮度保持の研究において, 官能検査では初期腐敗とみられる場合でも VBN が 20 mg% 程度に過ぎなかつたことを観察した。因つてサバの場合の鮮度の官能検査の結果と平行する客観的指標として VRS が役立つかを検討してみた。本研究では硫酸苦土で除蛋白した液を酸性, アルカリ性および中性としてそれぞれ減圧および水蒸気蒸留することによつて揮発成分を酸性, 塩基性および中性区分に分別し, それらのいずれが鮮度低下に関係が深いかを検討した。その結果, VRS 増加の初期には中性および塩基性物質が増加し, 酸性物質の増加は多少遅れることを認めた。これらの検討を基礎として従来の VRS の定量法を改良したのでここに報告する。

* 九州大学水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ.).

研 究 方 法

1. 研究材料

サバは市場より求めたもので、肉のみを採って肉碎器に数回かけて細碎したものを使用した。貯蔵中の変化をみるには、碎肉を数個のポリエチレンの袋に入れ、3~9°C の冷蔵庫に保存し、毎日一つの袋の内容を供試した。

除蛋白剤には富山等⁶⁾ が VA の定量に用いた硫酸々性の硫酸苦土の濃厚溶液を用いた。すなわち 600 g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を蒸溜水で 1 l とし、これに 20 cc の 6N 硫酸を加えたものである。

2. 定量方法

A. pH: 細碎した供試肉を蒸溜水で約 10 倍に稀釈し、ガラス電極(日立製 EHP-1 型 pH 計)を用いて pH を測定した。

B. VBN: CONWAY の微量拡散法⁶⁾ によつた。この場合のビュレットには富山のマイクロビュレット⁷⁾ を用い、また滴定中の攪拌には magnetic stirrer を用いた。

C. Histamine の定量: 津田、富山の方法⁸⁾ により定量した。ただしアンモニヤを除去していないので、多少過大値を示す。

D. VRS の新定量法

(1) 試料の調製: 十分に細碎混和した供試肉の 10.0 g に蒸溜水 20 cc を加えて乳鉢で充分に抽出し、つぎに除蛋白剤 70 cc を加えてミックスナーに移し、短時間(約 10 秒)混和してから汙過する。透明な汙液 25 cc (2.5 g の供試肉に相当)を水蒸気蒸留にかける。

(2) 水蒸気蒸留および滴定: 除蛋白液の 25 cc を富山等^{9,10)} が硫化水素および揮発性塩基の蒸留に用いた装置の蒸留部にとり、5% NaOH の 5 cc を加えた後、水蒸気を通ずる。他方、冷却管の先端は 200 cc 容の三角フラスコにいれた 0.1N KMnO_4 の 10 cc と 20% NaOH の 10 cc との混液に浸し、留出液が 50 cc になるまで蒸留を続ける。約 6 分間を要する。つぎに三角フラスコを電熱器上で沸騰後 5 分間保ち、5 cc の 10% KI を加える。これを流水中で充分に冷却した後、5 cc の硫酸 (1: 2) を緩やかに振盪しながら加え、直ちに 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の 10 cc を加えて沃度を除き、つぎに約 0.2 cc の 1% 可溶性澱粉液を加え、0.05N KHI_2O_8 で青紫色の沃度澱粉反応が生ずるまで滴定する。なお供試肉抽出液の代りに硫酸苦土溶液と蒸溜水との混合液 (7: 3) の 25 cc を試料として、肉抽出液と全く同様に操作して盲検値を毎日求める。

(3) VRS の計算: VRS 値の計算は次式¹⁾ による。

$$\frac{(T-B) \times 0.05 \times 1,000}{2.5} = \text{VRS, } \mu\text{e/g tissue} \dots\dots\dots (1)$$

T = Titer of 0.05N KHI_2O_8 (cc)

B = Blank value (cc)

E. 蒸留物中に存在する酸性、中性および塩基性還元物質の定量法

D (1) 項に記載した方法で調製した除蛋白抽出液を酸性のまま pH 2 で蒸留した時の還元性物質の値 (A+N) を求め、つぎに蒸留残液に 5% NaOH の 5 cc を加え、新しい KMnO_4 液をもつ受器に換えてから蒸留した時の還元性物質の値 (B) を求める。また、蒸留順序を逆にし、まずアルカリ性で蒸留した時の還元性物質の値 (B+N) および蒸留残液を酸性とした時の還元性物質 (A) を求める。また別に除蛋白抽出液を予め中和してから蒸留した時の還元性物質の値 (N) を求める。これらの結果から VRS を構成する酸性物質 (A)、塩基性物質 (B) および中性物質 (N) をそれぞれ算出できるし、また (N) の値を (A+N) - A および (B+N) - B の値から求めて直接に定量した (N) の値と対比することもできる。

研 究 結 果

1. VRS の蒸留速度

定量法の項に示した条件において VRS がどの程度の速度で蒸留されるかをみた結果は、Table 1 に示す

Table 1. Rate of distillation of VRS¹⁾.

Time of distil. (min.)	Titer of 0.05 N KHI ₂ O ₈ (cc.)	Per cent distilled	Volume of distillate (cc.)
2	3.56	92	13
4	0.32	8	31
6	0		51
8	0		70
10	0		90

1) Sample used was a deproteinized macerel flesh extract.

Table 2. Rate of reaction between KMnO₄ and VRS.

Time of boiling (min.)	Titer of 0.05 N KHI ₂ O ₈ minus blank value (cc.)	Per cent oxidation of VRS
2	1.65	91.7
4	1.73	96.1
6	1.78	98.9
8	1.79	99.4
10	1.80	100

ように、蒸留液 30cc に全部留出し、蒸留開始後 4 分間で完了した。

2. VRS の量と KMnO₄ 消費量との関係

蒸留液中の VRS と KMnO₄ との反応速度について実験した結果は Table 2 にみられるように、煮沸開始後 6 分で完了したことを示す。

VRS の量と KMnO₄ 消費量との量的関係は Fig. 1 に示すように、0.1 N KMnO₄ の 10cc を用いた場合に両者が直線関係を示す範囲は KMnO₄ の量が約 15% 還元されるまで、すなわち盲検値を控除した 0.05 N KHI₂O₈ の滴定値として 3cc までであつて、それ以上の VRS が存在すると直線関係からそれる。しかし VRS の対数値と 3cc 以上の KMnO₄ 消費量との間には直線関係が保たれる。したがつて蒸留液の KMnO₄ 消費量が 3cc、すなわち 150 μ e 以上であつた場合には、除蛋白剤と水 7: 3 の混合液で抽出液を適当に稀釈してから蒸留をやりなおすか、あるいは富山¹¹⁾ が水の KMnO₄ 消費量の定量の場合に用いたような方法で補正せねばならない。すなわち Fig. 1 に示す曲線の直線部の傾斜を図から求めると、

$$\tan \theta = \frac{p-3.00}{\log 100 - \log x} \div 5.9$$

p = apparent KMnO₄-consumption of a sample extract.

x = per cent VRS corresponding to a level of 3cc of 0.05 N KMnO₄, which is obtained to be 27% from data presented in Fig. 1.

Since P is equal to $\frac{3 \times 100}{x}$, where P , corrected value,

$$\log 100 - \log \frac{3 \times 100}{P} = \frac{p-3.00}{5.9}$$

$$\log P = 0.17p - 0.032 \dots\dots\dots (2)$$

(2) 式を用いると、消費量 3cc 以上の場合の定量値 p から VRS に正比例した消費量 P を算出することができる。

3. 生肉の VRS と抽出液の VRS との比較

STROHECKER 法のように生肉を直接に水蒸気蒸留した時の VRS と肉の除蛋白抽出液について求めた

Fig. 1. Relationship between VRS and titer of 0.05 N KHI₂O₈.

Table 3. Comparison between values for VRS which were distilled from ground flesh and deproteinized flesh extract.

Sample	Days of storage at 3~9°C.					
	0 ^a	1 ^b	2 ^c	3 ^d	4 ^e	5 ^f
pH of ground mackerel flesh	5.84	5.95	6.04	5.94	6.04	6.04
Ground mackerel flesh	6.00	12.0	37.6	106	133	144
Extract of the flesh adjusted to pH 6.0	9.00	2.80	21.4	108	108	124
Ground flesh + MgSO ₄ (pH 1.98)	7.00	11.6	29.8	98	105	101
Extract of the flesh (pH 1.98)	11.4	4.00	12.6	86	86	100
Ground flesh + MgSO ₄ + NaOH*	27.2	27.2	95.6	163	182	195
Extract of the flesh + NaOH*	11.0	11.6	67.0	161	174	198

0^a: fresh. 1^b: no change. 2^c: slight fishy odor, slight rancid odor. 3^d: strong fishy odor, stale. 4^e: slight putrid odor. 5^f: putrid odor. * pH 9.3.

VRS との間にどの程度の差があるかについて検討した。肉の抽出液を調製するには、三塩化酢酸はアルカリ性で加熱すると分解するために使用できないので、富山等⁵⁾がVAの定量に用いた除蛋白剤、即ち微酸性とした硫酸苦土の濃厚溶液を用いた。生肉と除蛋白抽出液を供試した時の比較結果は Table 3 に示す通りである。抽出液を中性、酸性およびアルカリ性で蒸留した場合の VRS 値は、肉そのもの、肉に硫酸苦土を加え酸性としたもの、およびアルカリ性としたものからの VRS 値よりそれぞれ僅かに低かった。しかし硫酸苦土による除蛋白抽出液をアルカリ性 (pH 9.3) で蒸留した時の VRS は生肉そのままを蒸留した時の VRS と同様に初期腐敗の様相をよく示した。また前者の値の方が後者よりも大きいので、実験誤差の影響が小さい。なお、生肉を直接に水蒸気蒸留する場合の発泡、容器を清浄に保つことの困難等を考慮に入れると、抽出液を用いた方がよいといえる。

4. 酸性、アルカリ性および中性で留出した VRS の鮮度低下に伴う変化

VRS を構成している成分を粗分画し、それらの変化をみた上で蒸留の条件を決定しようと考え、定量法の項で示したように、鮮度の異なる肉の抽出液を種々の酸度あるいは塩基度に調整して蒸留してみた。サバ肉の貯蔵中におけるこれらの値の変化は Fig. 2 に示す通りである。すなわち酸性物質の増加はきわめて少ないのに反し、塩基性物質は1日後から、また pH 6 で留出する中性物質は2日後から著るしく増加し、両者の割合は大略 1:1 であった。

水蒸気蒸留と減圧蒸留とを比較した結果は Table 4 に示すように、いずれの蒸留法によっても酸性物質の増加が著明になるのは初期腐敗の徴候を過ぎてからであつたのに対し、塩基性物質および中性物質の増加は初期腐敗の時期に著明であつた。したがって定量の誤差を少なくする目的から塩基性および中性物質を併わせ定量できるように、抽出液をアルカリ性 (pH 9.3) として蒸留するように定量法を定めた。

Fig. 2. Increase with storage of ground mackerel flesh in amount of neutral, basic and acidic substances in a steam distillate of the flesh. N: neutral substances which are steam-distilled from the extract of pH 6.0. B: basic substances steam distilled from the extract of pH 9.3. N_{B-calc.}: (B+N) - B. See foot-note of Table 4. N_{A-calc.}: (A+N) - A. See foot-note of Table 4.

Table 4. Change in VRS when deproteinized extract was distilled at acid, alkaline and neutral reaction.

Kinds of distillate		Days of storage at 4~8°C.					
		0	1	2	3	6	10
Distil. by steam	A+N*	3.0	4.7	5.2	16.8	82	83.5
	B§	3.1	9.9	21.2	102	123	133.5
	N†	4.1	9.9	7.1	—	83.5	88.0
	B+N††	4.1	10.4	22.9	114	197	245
	A**	2.1	1.3	1.2	5.4	15.0	19.5
Distil. under reduced press.	A+N	11.0	11.0	13.0	19.3		
	B	4.50	7.7	16.3	23.5		
	N	2.90	3.3	7.5	23.8		
	B+N	4.30	9.1	12.1	51.2		
	A	2.10	2.5	7.7	6.3		

* A+N: acidic and neutral substances which are distilled off from acidic reaction. §B: basic substances which are distilled off from alkaline reaction following the distillation of A+N. †N: neutral substances distilled off from neutral reaction (pH 6.0). ††B+N: basic and neutral substances distilled off from alkaline reaction. **A: acidic substances distilled off from acidic reaction following the distillation of B+N.

Fig. 3. Increase in VRS, VBN, histamine and bacterial count in ground mackerel flesh with storage at 4~8°C.

Table 3 をみると、生肉をアルカリ性として蒸留した時の VRS は除蛋白抽出液を同様にアルカリ性とした時の値に比べて高いことが注目される。これは富山^{10,12)}が生肉の水蒸気蒸留あるいは通気により VBN を測定した場合に、同一肉の三塩化酢酸抽出液よりも常に高い値をえた事実と類似している。これらの事実から生肉はアルカリ性で加熱すると還元性塩基物質を遊離することが窺える。

また興味が多いことは中性で留出する還元物質が腐敗開始時に増加することである。また腐敗がさらに進行しても中性物質の増加率は初期腐敗時のそれに比べると著しく小さくなることも注目に値する。この中性物質の種類およびそれらの母体については今後の研究にまたねばならない。STROHECKER 法および FARBER 法では中性付近で蒸留あるいは通気しているの、主として中性物質の増加量を鮮度判定の指標としていることは明らかである。本法では試料抽出液をアルカリ性として蒸留し、塩基性および中性の還元性

5. 鮮度低下に伴う VRS 値の変化と VBN, ヒスタミン量および細菌数の変化との相関

細碎したサバ肉をポリエチレンの袋に入れて 4~8°C に放置中における鮮度の変化を本法による VRS, CONWAY 法による VBN, 津田・富山法によるヒスタミン量, 細菌数および官能検査により追跡した。その結果は Fig. 3 に示す通りである。この結果からみると、少なくともサバの場合には約 30 μg の VRS 値によつて腐敗の初期が鋭敏に捕捉できるようである。しかし VBN の 30 mg % によつては腐敗の初期は検知できない。

考 察

STROHECKER 氏等による VRS の定量に当つての難点は生肉を試料とすることであり、FARBER 氏等による VRS の定

量の難点は肉の圧搾汁を調製することの困難さにある。これらの場合にはいずれも発泡が甚しく、生肉の場合には蒸留器に附着した蛋白質を毎回除去洗滌することが面倒である。本研究の結果では生肉の VRS はその肉を微酸性の濃厚硫酸苦土溶液で除蛋白した汙液に大部分集まることがわかつたので、この抽出液を定量に用いることによつて操作が簡単となつた。

STROHECKER 氏等は肉の水蒸気蒸留中にアルデヒド反応を示す物質はほとんどなく、ケトンが時々検出されたと報告している。しかし揮発性物質の性質について検討した報告はない。本研究から分かることは酸性で 6 分間水蒸気蒸留した物のなかには還元性物質は少なく、むしろアルカリ性で蒸留したものの中に還元物質が多い。アンモニアはアルカリ性 KMnO_4 と反応しないから、塩基性の VRS は TM のような炭素をもつ物質に

物質と一緒に定量して成るべく高い VRS 値を求め、鮮度判定の誤差を少なくするように方法を決定した。

本定量法の条件における VRS の蒸留速度は STROHECKER 氏が蒸溜液 30 cc について定量していることの正しさを裏書きしている。VRS 量と KMnO_4 消費量との関係についての代表的例では、用いた KMnO_4 の 15% 以上消費した場合には補正すべきことを知ったが、この関係は VRS を構成する化合物により異なるであろうから、種々の試料肉および腐敗度のものでさらにこの関係を確かめる必要がある。STROHECKER 法の操作は本定量法によつて簡易化されたので、少なくとも 6 つの定量を一人で一つの装置を用い 1 時間以内に実施できることは特記に値する。

サバ肉の鮮度低下に伴う VRS の変化を細菌数、VBN およびヒスタミン量の変化と対比すると、腐敗の初期は VRS の $30\mu\text{e}$ で示されるようにみえる。しかし 6 カ月冷凍貯蔵したメバチマグロの筋肉について VRS を最近測定したところ、背部、腹部いずれの肉においても VRS は平均 4~8 であつたが、血合肉だけが 53~120 (平均 88) を示した。この高い値は血合肉の正常な代謝物なのか、死後酵素分解によつて生じたものか、あるいは死後血管を経て侵入した細菌によるものかについては今後の研究にまたねばならないが腐敗の初期を知るための VRS 値を設定するに当つては魚種や組織の種類による VRS の差異をも考慮に入れる必要がある。

総 括

STROHECKER 氏等の VRS 定量法における操作上の難点を検討してつぎのような結果をえたので、それらに基づいて改良法を提出した。

1. 腐敗の開始を示す VRS は中性物質と塩基性物質とからなる。STROHECKER 氏等の方法では中性物質のみを定量しているが、本法では塩基性物質もともに定量できるようにした。
2. 水蒸気蒸留には肉を直接に用いないで、硫酸苦土による除蛋白抽出液を用いるよう改良した。
3. 水蒸気蒸留時間は 6 分、 KMnO_4 液との反応時間は 5 分で充分であつた。
4. VRS の値は酸化に用いた KMnO_4 の 15% 相当の範囲だけが消費量と比例した。
5. サバ肉を低温に貯蔵中の鮮度低下の模様を VRS, VBN, ヒスタミンおよび細菌数によつて追跡した結果、VRS が腐敗の開始期を知るのに適していることを知った。

本研究を行なうに当り、津田 厚、滝 武および衣斐 剛の諸氏の助力を得たので、ここに謝意を表したい。

文 献

- 1) STROHECKER, R., VAUBEL, R., and KIRCHBERG, H.: *Z. Anal. Chem.*, **110**, 1 (1937).
- 2) LANG, O. W., FARBER, L., BECK, C., and YERMAN, F.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **16**, 490 (1944). FARBER, L.: *Food Technol.*, **3**, 300 (1949). ———: *ibid.*, **6**, 319 (1952). FARBER, L., and FERRO, M.: *ibid.*, **10**, 303 (1956).
- 3) 富安行雄・豊水正道・高橋喜久雄: 九州大学農学部学芸雑誌, **12**, 391 (1952).
- 4) 富山哲夫・米 康夫: 本誌, **25**, 290 (1959).
- 5) TOMIYAMA, T., ANTONIO, A. DA COSTA, and STERN, J. A.: *Food Technol.*, **10**, 614 (1956).
- 6) CONWAY, E. J.: *Micro-diffusion analysis and volumetric error*, Rev. ed., 1947, D. Van Nostrand Co., Inc., New York.
- 7) 富山哲夫: 日農化, **13**, 1007 (1937).
- 8) 津田 厚・富山哲夫: 本誌, **25**, 451 (1959).
- 9) 富山哲夫・神崎嘉瑞夫: 本誌, **17**, 115 (1952).
- 10) 富山哲夫・井出克己・秋山 勉: 本誌, **17**, 191 (1952).
- 11) 富山哲夫: 陸水雑, **8**, 314 (1938).
- 12) 富山哲夫: 本誌, **17**, 405 (1952).