防腐剤フリルフラマイドの微生物的定量法の検討—II. 検液調製方法の検討

篠山茂行・鈴木郁子

(1966年3月22日受理)

A STUDY ON THE MICROBIOASSAY OF FURYLFLURAMIDE AS FOOD PRESERVATIVES—II. PREPARATION METHOD OF TEST SOLUTION FOR DETERMINING OF FURYLFLURAMIDE IN FISH PRODUCTS

Shigeyuki SASAYAMA and Ikuko SUZUKI*

As part of the determination method of furylfluramide (FF) in fish products, the preparation of the test solution for a microbioassay of FF which has been added to ground fish meat or fish sausage was studied, and following results were obtained.

The removal of water-soluble components from fish flesh shows no discernible effect of interference on the recovery of FF (Table 1). When the ground meat of whale is stored at $3\pm 1^\circ\text{C}$, the amount of FF decreased to one-tenth of the initial amount after 96 hours (Table 2). The decrease of FF is also recognized in the case of storage test of homogenated meat (Table 3), however, the recovery of FF seems to differ with different proportion of fish meat and water (Tables 4 and 5). In the preparation of supernatant to be tested from homogenate, the speed of centrifugation affects on the amount of FF in supernatant (Table 6).

On the basis of the results presented above, the following method of preparation of test solution was recommended:

To one part of sample such as fish sausage, is added three parts of DMF buffer solution, and the mixture blended for 1 minute by homogenizer. The homogenate obtained is centrifuged at 6000 r.p.m. for 15 minutes, and the supernatant is subjected to the determination of FF.

第1報¹⁾において生魚肉あるいは魚肉ソーセージなどに加えた Furylfluramide (以下 FF と略称) が、はじめの半量あるいはそれ以下に減少することを報告した。最近、小島ら²⁾は魚肉ソーセージ製造の際に、すり身の調製中に添加された FF が減少すること、加熱処理後の製品にはさらに減少していることをみている。一方、松田ら³⁾は、クジラについて、このものを亜硝酸ソーダで漬け込み処理することにより、FF の残存量低下が防止できること、また、魚肉懸濁液中での FF 量の減少はシステイン溶液中でのそれと同一現象を示す⁴⁾ことを報告、これらの結果から魚肉中での FF の減少は、肉中の SH 基など還元性物質によつて還元失活するためであつて、その際ミオグロビンが触媒的に還元反応を促進することを推定している。

このように、FF が魚肉成分によつて分解されるとすれば、微生物的定量法に際して、定量に供される試験液は肉の懸濁液を用いるので、定量中にも FF が変化する可能性がある。

この点について検討を加えた結果、検液中の肉質が FF の回収率に相当大きく影響をおよぼすことを知り得たのでここに報告する。

東海区水産研究所業績 B450 号

* 東海区水産研究所 (Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo)

実験方法および結果

FF の定量方法 第1報¹⁾に報告したシリンダープレートを用いる微生物的定量法により行ない、抽出剤および希釈剤には DMF 緩衝液¹⁾を用いた。

水洗処理を施した魚肉からの FF の回収 魚肉中のミオグロビンが FF 残存量低下の一原因に推定されている³⁾ことから、これらの成分を水洗によりできるだけ除去した肉をつくり、FF の残存に対する影響を検討した。

実験は、キハダマグロ、クジラ赤肉およびメジロザメの冷凍肉を用い、これらの未解凍の肉を切断して小塊とし、さらに肉挽機にかけ細碎する。これを対照の未水洗肉区とする。一方、同様細碎した肉に8倍量の水を添加し、ブレンダーで2分間処理のち、遠心(3000 r.p.m., 10分)する。得られる沈殿肉に8倍量の水を加え、よく攪拌、少時放置したのち上澄液を傾瀉し、残りを再び遠心して肉を集める。これを7回繰り返して水に浮上する物質および水溶性部分をできるだけ除いた肉をつくる。これを水洗肉区とする。

両区に FF を 50 ppm となるように加えてよく混和のち、3倍量の DMF 緩衝溶液を加え、ブレンダーで1分間処理、その肉懸濁液についてただちに FF を定量する。

結果は Table 1 に示すように、FF の回収率は未水洗肉と水洗肉との間に大きな差違がなく、また魚種間にもほとんど差違がない。したがって定量操作中の失活は肉中のミオグロビン、水溶性蛋白あるいは脂肪などによってはそれほど影響を受けないものと思われる。

魚肉に加えた FF の経時変化 FF を微生物的方法によつて定量するときは、DMF 緩衝溶液を加えてブレンドした試料（たとえば魚肉ソーセージ）の懸濁液を培地上におき約 20 時間にわたつて放置する操作が含まれている。肉中での FF の挙動について小畠ら²⁾は、FF を魚肉ソーセージ用すり身に添加して混和中、10分経過後で残存量は約 64% におちるが、でき上つたすり身は 5°C に4時間放置してもその間になんらの減少を示さず安定であると述べているが、4時間以上の変化は不明である。そこで定量方法に関連して肉に添加した FF が長時間安定であるか、どうかを知るため、次の実験を行なつた。

1. 生肉中での変化

FF の濃度を 50 ppm としたクジラ赤肉のすり身を塩化ビニリデンケーシングに充填し、 $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫に保存する。この試料を 24 時間経過ごとに取り出し、その都度3倍量の DMF 緩衝液とともにブレンドし、得られる肉懸濁液を定量にかける。

結果は Table 2 に示すが、肉に FF を添加調製した直後（0時間）の検出率は 46%、24 時間後 26%、それ以降時間の経過とともに直線

Table 1. Effect washing of fish meat on the recovery of FF by microbioassay.

Sample	Recovery rate of FF	
	Not washed	Washed
Yellowfin tuna (Kihadamaguro)	37%	35%
Whale (Kujira)	39	35
Roundhead shark (Mejirozame)	42	39

Note: The water-soluble component in 100 g of fish meat was exhaustively removed by washing with seven 800 ml portions of water, and the residue was used as washed meat. Initial concentration of FF in meat was adjusted to 50 ppm. The determination method of FF was virtually identical with that of previous paper¹⁾.

Table 2. Change of recovery rate of FF in raw ground meat of whale during storage at $3\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Storage time (hours)	Recovery rate of FF
0	46%
24	26
48	14
72	7
96	4

Note: Initial concentration of FF was adjusted to 50 ppm.

的に減少の傾向がみられる。小畠ら²⁾が述べるように肉に FF を添加後早くもその減少がおきているが、その後も減少は停止することなく、72 時間で 7% の残存を示すにすぎない。

2. 懸濁液中での変化

FF の濃度が 25 ppm のクジラ赤肉すり身をつくり、通常の方法によつて肉懸濁液を調製する。次にこれを 2 分し、一部 (A 区) はただちに定量にかけ、他の一部 (B 区) は褐色フラスコに入れて密栓を施し、37°C の定温器中に 20 時間放置のち定置にかける。

Table 3. Change of recovery rate of FF in homogenate during storage.

Test material	Recovery rate of FF
(A) Homogenate immediately after preparation	44%
(B) Homogenate after storage at 37°C for 20 hours	22

Note: FF concentration in whale meat was adjusted to 25 ppm.

結果は Table 3 のように、A 区の FF 検出率は 44% に対し、B 区のそれは 22% を示し、両区の間にかんがりの差違を生じ、懸濁液中でも FF が減少するのがみられる。この実験で B 区の肉懸濁液の 37°C、20 時間放置は、ふつうの方法で定量にかけられる検液のカップ中での状態と同一条件におかれたことになるので、B 区の検出率が A 区より低いことは FF が定量操作の間に変化することを示唆している。

検液中の魚肉量が FF 検出率におよぼす影響 生肉に添加された FF または肉懸濁液に含まれている FF は、放置温度が低温 (前実験の $3 \pm 1^\circ\text{C}$ の場合) または高温 (前実験の 37°C の場合) であるとを問わず約 20~24 時間経過後ではじめの添加量の約半量に減少することが明らかとなつたので、FF の検出率に対する肉量の影響を知るためつぎの実験を行なつた。

1. 肉量と FF 検出率との関係

スケトードラすり身、クジラ赤肉、マグロ類、メジロザメなどの冷凍肉および通常の方法でつくられた FF 無添加の魚肉ソーセージを、それぞれ肉挽機で細碎のち水を加え、肉の量が 75%、50% および 25% の肉懸濁液をつくる。ここでは水を加えない肉だけのものを 100% とする。つぎにそれぞれに FF を 25 ppm となるように加え、さらに 3 倍量の DMF 緩衝液を追加し、ブレンダー処理のち、ただちに FF を定量する。

結果は Table 4 に示すように、肉量が少なくなるにしたがつて検出率の上昇がみられる。したがつて、FF の検出率には検液中に含まれる魚肉量が相当大きく影響をおよぼすことがわかる。またスケトードラすり身および魚肉ソーセージは肉量が少ないと 90% 近い検出率を示し、他の肉と様相を異にするのが注目される。

Table 4. Relation between the amount of fish meat and recovery rate of FF.

Mixing ratio of meat and water	Recovery rate of FF					
	Alaska pollack (frozen ground meat of Sketodara)	Whale (Kujira)	Yellowfin tuna (Kihadamaguro)	Big-eye tuna (Mebachimaguro)	Roundhead shark (Mejirozame)	Fish sausage
Meat : Water						
100 : 0	49%	37%	41%	42%	32%	50%
75 : 25	58	45	48	44	50	54
50 : 50	77	46	54	54	59	77
25 : 75	90	62	64	64	68	93

Note: To diluted meat, FF (25 ppm) was mixed, and the mixture was blended with extractant.

2. 試料の DMF 緩衝液による希釈程度と FF 検出率との関係

試料は冷凍クジラ赤肉から調製した解凍生肉、水洗肉および加熱肉 (120°C, 15 分) をそれぞれ用いた。なお肉の水洗処理は最初の実験の方法に準じた。また肉の加熱処理は、肉の殺菌をも考慮して高温加熱を採用した。それぞれの処理肉に FF の濃度が 100 ppm となるように加えたのち、これを 2 分し、一部は DMF 緩衝液で 4 倍に、他の一部は 8 倍に希釈し、ブレンダー処理、各肉懸濁液を定量にかける。

結果は Table 5 にみられるように、肉の処理方法のいかんを問わず 4 倍希釈区に比して 8 倍希釈区は高い検出率を示し、希釈率を増大することにより回収率も増加している。4 倍希釈および 8 倍希釈の場合の定量にかけられるときの肉量は、前記の実験 1 の肉量と水量との比が 100 : 0 および 50 : 50 の実験区にそれぞれ相当し、これらの結果とほとんど一致することからみて、FF の検出には検液中の肉量の影響を無視できないことが再確認された。

3. 検液の遠心分離処理と FF 検出率との関係

以上の結果から、検液中の肉量をできるだけ減少させることが検出率を高めるうえに有効であることがわかつたので、肉量を減少させる簡易な手段として遠心分離をえらび、さらにその効果を検討することとした。

まず、肉懸濁液を遠心分離する際の遠心機の回転数と FF 検出率との関係をみる目的でつぎの実験を行なった。

FF 濃度 25 ppm のクジラ赤肉のすり身をつくり、通常の方法で肉懸濁液を調製する。つぎにこれを 6 区に分け、そのうちの 1 区はそのまま定量にかけ、他はそれぞれ 1000, 3000, 5000 および 10000 r.p.m. で 15 分間遠心し、得られる上澄液を定量に供する。

結果は Table 6 のように、遠心処理を施さない肉懸濁液そのままでは検出率 35%、1000 r.p.m. の遠心処理では 50%、3000 r.p.m. で 60% に上昇するのがみられ、それ以上の回転数では検出率がほとんど平衡状態となることが知れた。したがって最高の検出率が得られる所要回転数は少なくとも 3000 r.p.m. を必要とされるが、肉質除去の確実性を考慮して以後の研究では遠心処理の条件を 6000 r.p.m., 15 分とし、これを定量操作に加えることにした。

つぎに上記の条件にしたがい、試料にマグロ類およびメジロザメを用いて遠心処理の効果を検討した。この実験では試料肉に加えた FF の濃度を 50 ppm としたが、その他は前記クジラとまったく同様に処理を行なった。

結果は Table 7 に示すが、マグロ類、メジロザメともに遠心処理区 (B) が対照区 (A) より約 20% 高い検出率を示し、遠心処理を追加した方法が FF 検出率を上昇させる効果のあることが確認された。

魚肉ソーセージからの FF 回収試験 前述の結果から、遠心処理を追加した方法を用い、実際の製造条件に準じてつくられた魚肉ソーセージについて FF の定量を行なった。

Table 5. Effect of dilution of sample on the recovery rate of FF.

Sample*	Recovery rate of FF	
	4 times of DMF buffer was used	8 times of DMF buffer was used
Raw meat	46%	62%
Washed meat	45	53
Cooked meat (heated at 120°C for 15 minutes)	43	55

Note: * Whale meat
FF added to raw, washed and cooked meat were 100 ppm respectively.

Table 6. Relation between centrifugal speed and recovery rate of FF.

Centrifugal speed (r. p. m.)	Recovery rate of FF
0 (homogenate)	35%
1000	53
3000	62
5000	64
7000	59
10000	64

Note: Initial concentration in whale meat was adjusted to 25 ppm.

Table 7. Effect of centrifuging of homogenate on the recovery rate of FF.

Test material	Recovery rate of FF		
	Yellowfin tuna	Big-eye tuna	Roundhead shark
(A) Homogenate	42%	31%	34%
(B) Supernatant (homogenate was centrifuged at 6000 r. p. m. for 15 minutes)	61	58	54

Note: FF concentration in raw fish meat was adjusted to 50 ppm.
Homogenate or supernatant obtained from homogenate was tested.

材料にはクジラ赤肉、メバチマグロ、クロカワカジキおよびスケトウダラすり身などの冷凍品を用い、これらを混合したすり身に FF が 20 ppm となるように添加し、さらに十分に混和ののち、塩化ビニリデンケーシングに詰め、90°C で 60 分間加熱、水冷して製品とする。

でき上った魚肉ソーセージを肉挽機で細碎し、その 10 g に 30 ml の DMF 緩衝液を加えてブレンダー処理し、肉懸濁液をつくる。つぎにこれを 2 分し、一部は対照としてそのまま、他の一部は遠心処理を施し、それぞれについて FF を定量する。

結果は Table 8 のように肉懸濁液では 14%、遠心処理を施した上澄液では 25% の検出率を示し、魚肉ソーセージについても遠心処理が高い検出率を得ている。ただし、今までの実験で得られている生肉の場合より低い検出率を示していることが注目される。この実験では FF の添加量を使用基準の 20 ppm としたが、検出量が上澄液からでも 5 ppm 程度を示し、これは実測値では 1.25 ppm に当たるので、FF の最低検出限界濃度約 1 ppm に近い値となっている。

Table 8. Recovery test of FF in fish sausage prepared commercially.

Test solution	Recovery rate of FF
Homogenate	14%
Supernatant	25

Note: Initial FF concentration was adjusted to 20 ppm.

考 察

松田ら⁶⁾は、微生物的方法による FF の定量に際し、標準液は、試験品（たとえば魚肉ソーセージ）と同一組成の FF 不含のものを用意し、これに各濃度の FF を含む 10% DMF 水溶液を 3 倍量加えて調製した肉懸濁液を用いている。この方法は標準液および試験液はともに同一の肉懸濁液が使用されるので、魚肉成分の影響は相殺されることになり、定量方法としては一応問題なくみえる。しかし、実際には食品検査の立場からみると、多くは組成未知の製品が検定に供されるので、定量の都度試験品と同一組成の対照品をおくことは極めて困難のように思われる。

そこで、われわれは標準液に FF 純末を DMF 緩衝液で数種の濃度に溶解した溶液を用いることにしたが、この場合試験液に肉懸濁液を供すると肉質が介在するのでその影響が懸念される。この点について、本研究の結果から FF は肉中で減少を示し、しかも時間の経過により減少が進むことがわかった。この現象を定量操作条件に当てはめると肉懸濁液をそのまま定量に供することは不適当であると考えられるので、試験液の調製方法について検討したところ、試験液には肉質ができるだけ含まれないように処理する必要があることを認めた。すなわち、試料に十分な希釈剤を加えて肉の濃度を希薄にすることにより、従来の 3 倍希釈法より高い検出率を得ることができる。しかし、魚肉ソーセージについては、FF の使用基準は 0.02 g/kg に規定されていること、製造中に FF が減少すること、製品の貯蔵中に減少が進むこと^{6,7,8)}、一方、微生物的定量法による FF の検出限界は最低 1 ppm 付近であることなどを考慮すると、希釈剤の添加量はおのずから制限される。これに対し、遠心分離処理は十分に効果を認めることができるので、定量法に 6000 r.p.m.,

15 分間の遠心分離処理を採用することは有効であろう。

要 約

シリンダープレートを用いる微生物的方法で FF を定量する場合の検液の調製方法について、スケトウダラすり身、マグロ類、クジラ赤肉およびメジロザメを試料に用いて検討した。

1. 魚肉中の水さらしによつて除去される血液、血色素、水溶性蛋白ならびに脂肪の一部あるいはエキス成分などは FF の定量操作にそれほど大きな影響はおよぼさない。

2. すり身に加えた FF は、 $3 \pm 1^\circ\text{C}$ に放置中時間の経過とともに直線的に減少し、肉懸濁液中での FF も同様な変化をする。

3. 検液に含有される肉の量によつて FF 検出率が変化し、肉の量が希薄になるにしたがつて検出率は上昇する。試料の希釈率をふつうの 4 倍から 8 倍とすることにより、検出率が 10~15% 程度上昇し、肉懸濁液の遠心分離処理 (6000 r.p.m., 15 分) は常法にくらべ 20% 程度の検出率の増加を示す。

4. FF の使用基準にしたがつてつくられた魚肉ソーセージ中の FF 残存量は、常法では 2.8 ppm (14%)、遠心処理法では 5 ppm (25%) であつた。

終わりに FF の入手にご援助いただいた上野製菓株式会社に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 篠山茂行・鈴木郁子・天野慶之：本誌，**32**，267~273 (1966)。
- 2) 小島 渥・松田敏生：本誌，**31**，214~218 (1965)。
- 3) 松田敏生・小島 渥： ” **31**，365~369 (1965)。
- 4) 松田敏生：醗酵工学雑誌，**43**，426~431 (1965)。
- 5) 松田敏生・小島 渥：本誌，**31**，208~213 (1965)。
- 6) 芝崎 勲：日本食品工業学会第 11 回大会 (1964)。
- 7) 篠山茂行・鈴木郁子：未発表。
- 8) 小島 渥：本誌，**31**，365~369 (1965)。