

研究報 文

蛋白性残留物による食器汚染の臨地 検出法について

森 真理子**, 浅見益吉郎*

Method of on-the-Spot Inspection for the Proteinic Contaminants of Table-wares.

Mariko Mori, Masukichirou Asami

食器を常に清浄に保っておくことが食品衛生上の基本原則であるのはいうまでもない。ことに大量の食器を洗浄処理しなければならない集団給食の場においては、その清浄度を時々チェックして安全を確認する必要があると考えられる。この目的に適する現場試験法¹⁾として、“食品衛生検査指針”には食器等の澱粉性ならびに脂肪性残留物についての簡易検出法が記載されているが、われわれの調査した限りでは、蛋白性の残留物に関する検出法は、いずれの成書にも記されていない。

しかし現実には、蛋白性残留物は食器洗浄に際しての最もやっかいな存在であり、洗浄操作が不十分ないし不適切であれば、本来可溶性の残留物も不溶化して、食器表面に頑固な汚染斑を形成する可能性も起り得る。

このような見地より、われわれは食器の蛋白性残留物についても、簡易、迅速、確実でかつ安全に実施できる臨地検出法を設定したいと考え、まず既知の蛋白、ペプチドないしアミノ酸の各種呈色反応を吟味した結果、

- a. Ninhydrine 反応（以下 N- 反応）
- b. Biuret 反応（以下 B- 反応）
- c. DNP 化反応（以下 D- 反応）
- d. Ehrlich 氏反応（以下 E- 反応）

の4種を選び、種々の蛋白及び蛋白性食品を対象として目的に対する適否の検討を試みた。

* 本学食品衛生学研究室

** 元本学実験助手（現姓：梅谷）

実験の部

1. 予備試験（呈色反応の検討）

上記4種の呈色反応のうち、どの反応が最も目的に適するかを判定するためにこの実験を行った。

実験方法は検体食器として直径16cmの白色陶製平皿（Ⅰ）及び直径17cmの淡黄色合成樹脂（メラミン）製平皿（Ⅱ）を使用し、これらに表1に記した6種の蛋白性食品溶液（又は懸濁液）を筆で塗布したのち60°C以下の温度で乾燥、固定したものについて、表2に記した呈色反応を試みた。その結果は表3のとおりである。

さらに呈色斑の付着した諸検体について、その洗浄状態を検討したところ、表4の結果を得た。

表3ならびに表4の成績より判断して、その発色操作の簡易性、呈色の確実性及び呈色斑洗浄の容易さなどの諸点で、他の呈色反応よりすぐれているN-反応が最も目的にかなうものと考えられたので、以下、本反応を応用して実地に適用し得る蛋白性残留物検出法を設定するために補足的な実験を行った。

2. Ninhydrine 発色法の検討

試料として表5に掲げた7種の蛋白標準品を用い、これらの溶液を検体（Ⅰ）に塗布したのち乾燥、固定したものに1%-Ninhydrine を噴霧してN-反応を試みた。

その結果、塗布、固定した蛋白斑はいずれも十分発色したが、Ninhydrine 溶液に溶けてその像に乱れを

表1. 予備試験に使用した蛋白性試料

No.	試料名	調製法 ^①	実測乾物量 ^②
1	新鮮卵黄	2g/100ml(H ₂ O)	15mg/g
2	新鮮卵白	10ml(ガーゼろ過)/100ml(H ₂ O)	15mg/g
3	牛乳カゼイン	1g/100ml(N/10-NaOH), H ₃ PO ₄ 中和	12mg/g
4	ひらめ(すり身)	4g/100ml(0.9%-NaCl)	75mg/g
5	豚肉(すり身)	2.5g/100ml(0.9%-NaCl)	85mg/g
6	白味噌	2g/100ml(H ₂ O)	20mg/g

注 ① () 内は溶媒, ② Kett 迅速水分計による

表2. 予備試験で試みた呈色反応

反応	試薬	呈色操作	発色
N	1%-Nimhydrine(H ₂ O)	噴霧→加熱(沸騰水浴上, 2分)	紫～赤紫
B	①10%-NaOH ②1%-CuSO ₄	①噴霧→②噴霧→加熱 (沸騰水浴上, 2分)	青紫～赤紫
D	①2%-Fluoro-2, 4- dinitrobenzene(95%-EtOH) ②1%-NaOH, 又は 5%-NH ₄ OH	①噴霧→②噴霧→室温放置	黄～橙黄
E	①2%-p-Dimethylbenzaldehyde(95%-EtOH) ②20%-HCl ③3%-H ₂ O ₂	①噴霧→②噴霧→③噴霧→加熱 (沸騰水浴上, 2分)	青(下地: 黄)

表3. 予備試験の結果

反応	試料 検体	呈色度及び色調 ^①						備考
		1	2	3	4	5	6	
N	I	+ V	++ V	++ V	++ V	++ V	+ VBr	蛋白塗布部以外に黄斑を生ずることがあるが判定に影響しない。
	II	++ V	++ V	++ V	++ V	++ V	+ VBr	
B	I	+ BV	++ V	++ V	++ V	+ V	± fY	塗布部以外の場所にも褐斑を生じ観察し難い。
	II	± BV	++ V	++ V	++ V	++ V	-	
D	I	++ Y	± Y	± Y	+ Y	+ Y	+ Y	噴霧に際し鼻粘膜刺激。 NH ₄ OHの方が発色良好。
	II	++ Y	+ Y	+ Y	+ Y	± Y	± Y	
E	I	± fY	± fY	+ BV	+ Y	+ Y	± Y	全般に観察し難い。
	II	+ B	++ B	++ B	+ B	+ B	± B	

注 ① 色調 B: 青色, Br: 褐色, V: 紫色, Y: 黄色, fY: 淡黄色。

生ずる (写真1)。この難点を免れるためには、Ninhydrine 溶液に適度の粘稠性を賦与して、噴霧後の溶液の流動を防ぐのが好ましいと考え、N-反応に与える影響の少ない糊剤として Polyvinyl alcohol (PVA) と Carboxymethyl cellulose (CMC) を選び、これらを添加した 1%-Ninhydrine を検体に噴霧して N-反応を試みた。糊液の添加濃度は高きに過ぎると噴霧操作に支障を与えるので、PVA は 5%、CMC は 0.3% となるように添加した。その結果は、写真2のように呈色像に乱れを生ぜず、洗浄に当たっても全く悪影響を及ぼさないことを知った。しかし糊剤の添加により N-反応の呈色感度が若干低下するのではないかとの

疑念を持ったので、1%-Casein 溶液を試料とし、その 1ml に、1%-Ninhydrine と H₂O 又は 5%-PVA 又は 0.3%-CMC の等量混合液 1ml を加え、加熱発色させたのち全量を 100ml とした呈色液について、液相における吸光度を波長 400nm 及び 570nm で比較測定した。

その結果は表6のとおりで、CMC 添加は (少くとも液相においては) 呈色にほとんど影響を及ぼさないことを知ったので、以後の実験には糊剤として CMC を 0.3% の濃度になるよう添加した 1%-Ninhydrine 水溶液を使用することにした。

3. 有色食器表面の蛋白性汚染斑の検出

N-反応を白色ないし淡色 (青~紫色系の色調を除く) の食器表面で行った場合、呈色斑の検出は容易であるが、濃厚に着色された食器、ことに黒色食器の表面では、たとえ呈色斑が存在していても、そのままでは肉眼的検出が極めて困難な場合が多い。

この欠点を免れる一考案として、有色食器表面に生じた呈色斑をろ紙上に転写する方法を試みた。すなわち、

- (1) 適当な大きさの円形ろ紙 (No. 2 が適当) に缺で放射状の切れ目を 7~8 本入れ、これを N-反応の発色操作を行った有色食器の上に置く。
- (2) この上に蒸留水を軽く噴霧してろ紙を均等に湿らせる (写真3)。
- (3) 次に湿ったろ紙の上を、清浄な指サックをはめた指先で軽くおさえてろ紙を食器の内壁に密着させ、約 1 分間放置する (写真4)。

表4. 食器検体の洗浄状態
(流水中スポンジで軽くこする)

反応	検体	洗 浄 状 態
N	I	良 好
	II	良 好
B	I	褐斑が落ち難い(クレンザー使用が必要)。
	II	良 好
D	I	良 好
	II	良 好
E	I	紫斑が落ち難い(クレンザー使用が必要)。
	II	黄斑が滲透残留(クレンザーでも落ちない)

表5. N-反応の検討に用いた試料蛋白

No.	試 料 名	調 製 法	色 調 ^①	発色程度 の 順 位
1	Albumin (卵白)	0.1g/10ml(H ₂ O)	V	7
2	Globulin	0.1g/10ml(.9%-NaCl)	BrV	2
3	Lysozyme (卵白)	0.1g/10ml(1%-NaOH)	V	1
4	Casein(牛乳)	0.1g/10ml(1%-NaOH), H ₃ PO ₄ 中和	dV	3
5	Catalase	0.1g/10ml(H ₂ O)	VBr	4
6	Gelatine	0.1g/10ml(w. H ₂ O)	fBG	6
7	Peptone	0.1g/10ml(H ₂ O)	fBrBG	5

注 ① 色調dV: 暗紫色, G: 緑色, その他は表3に同じ。

表6. 液相における Casein 溶液のNinhydrine 呈色物の吸光度

波 長 (nm)	吸 光 度 (log I ₀ /I)	
	570	400
1%-Ninhydrine (H ₂ O)	.84	.59
1%-Ninhydrine (0.3%-CMC)	.79	.58
1%-Ninhydrine (5%-PVA)	.65	.50

- (4) 呈色斑が存在すれば、以上の操作によってろ紙上に完全に転写されるので、有色食器表面の蛋白性残留物を検出することができる(写真5)。

4. 本検出法の感度

陶製白色滴板の各、円凹孔(直径23mm)内に希薄Casein溶液(0.01, 0.001及び0.0001%)を0~10滴(0~0.5ml)滴下し、水を加えてそれぞれの液量を等しくして各凹孔内の液の表面積をほぼ1.5cm²(直径14mm)にそろえたのち、徐々に加温して乾固させたものを検体とし、これに1%-Ninhydrine(0.3%-CMC添加)を噴霧して加熱発色させたところ、肉眼的に青紫色の呈色が認められた限界は、0.0001%液6滴(Casein量:0.3μg)滴下したものであった。従って本法による蛋白の検出限界濃度は0.2μg/cm²と算出される。ただし、凹孔内液の加温蒸発に際し、溶質は均等に分布して乾固せず、周縁部へより濃厚に集積する傾向があるので、上記の検出限界濃度値はあまり厳密なものとは言い難いが、一応本検出法の感度の目安とすることはできるとと思われる。

前項のろ紙転写方式による検出感度も、実験の結果、ほぼ同程度であることを知った。

さらに、故意に汚れた手をこすり着けたり、クシャ

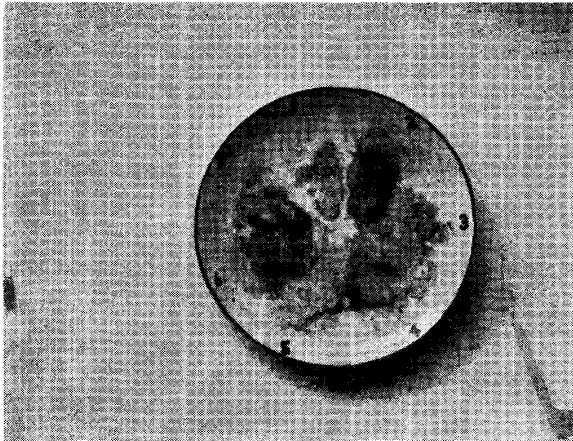
ミの飛沫を付着させて乾固した食器検体について、本法を試みたところ、写真6のように明らかな汚染斑が検出できた。

要 約

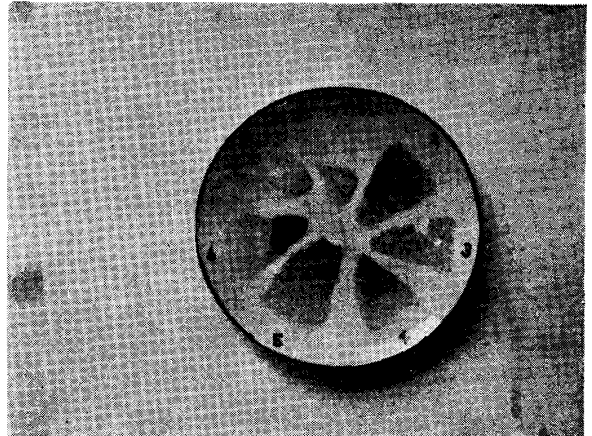
- (1) 食器表面の蛋白性残留物による汚染を臨地検出する手段として、0.3%のCMCを添加した1%-Ninhydrine水溶液を噴霧し、加熱発色させる方法を考案した。
- (2) 有色食器表面の汚染斑検出には、同様の方法でNinhydrine呈色させたのち、水で湿らせた円形ろ紙上に転写させる方式で目的を達することができた。
- (3) 本検出法の感度を、Caseinを試料として実験的に求めた結果、(1),(2)いずれの方式によっても、検出限界濃度としてほぼ0.2μg/cm²の値を得た。

文 献

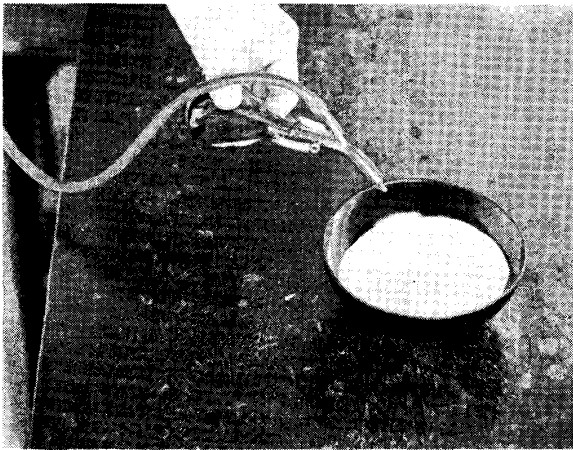
- 1) 厚生省環境衛生局(監修):“食品衛生検査指針・I”, 日本食品衛生協会, p.601(1973)
- 2) 河端俊治:“新食品衛生学”, 同文書院, p.190(1975)



1



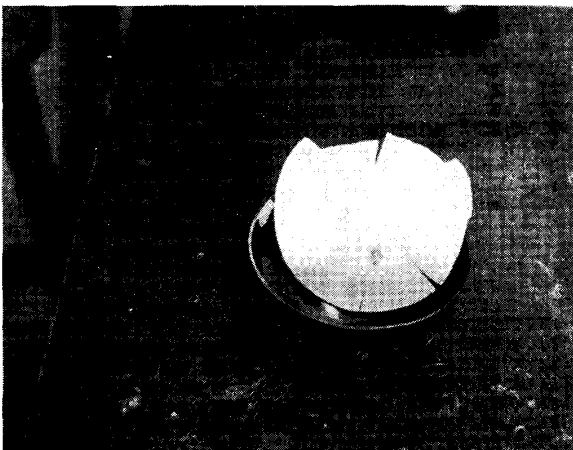
2



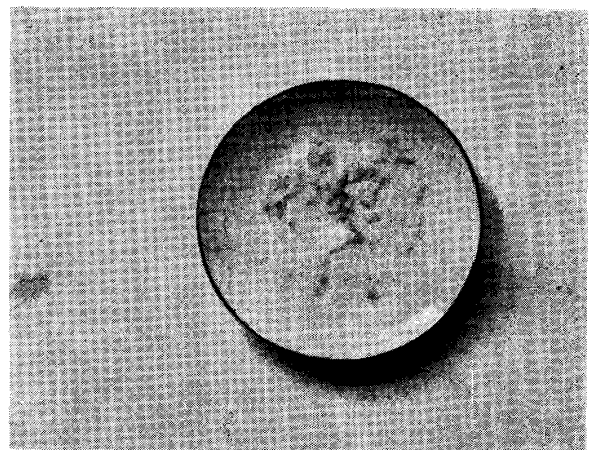
3



4



5



6