

食品の鮮度検定法としての硫黄反応について

足立晃太郎*

田中千代子**

緒 論

食品特に魚・獣肉類の鮮度低下は、死後直に開始される。即ち、死後或時間後に死後強直をおこし、組織は軟化していわゆる自家消化をおこして自家消化産物を生成し、次いで細菌により腐敗現象をおこし、ここに腐敗産物を生成する。前者の自家消化をおこす際には、種々の物理的变化と化学的变化とを伴うが、特に化学変化に於ける最も著しい変化は、筋肉の大部分を占める蛋白質の変化である。蛋白質が変性をおこす結果として、SH基が遊離することは、先ずHopkins¹⁾によつて発見せられ、次いで Anson, Masky²⁾ 又が国に於ける荒谷³⁾ 等によれば、蛋白質の変性並に分解作用により蛋白質分子中の硫黄間に変化が生じて、その結果としてSH基・SS基が遊離することが明らかにされている。又森、泰⁴⁾の研究によれば、魚介類が自家消化並に腐敗によつて生成するSH基の量と鮮度との関係が明らかにされている。

筆者は、魚・獣肉類の鮮度低下に於て特に硫黄化合物の生成状態に注目して、遊離のSH基・SS基並に硫化水素の生成量と鮮度との関係を明らかにしようとし、他の二三の鮮度検定方法即ち、水素イオン濃度、アンモニア態窒素、揮発性塩基態窒素等の測定との総合的比較に於て、硫黄反応による妥当なる魚・獣肉類の鮮度検定法を設定しようと試みて本実験を開始したのである。

実 験 の 部

試 料

試料として、市販の牛肉（碎挫肉）と鯖肉を用いた。

実験方法

検体の調製法は、次に示す各検定法の第一段階の調製法として牛肉はそのまま使用するが、鯖肉は皮、骨を除いたものを乳鉢で細く摺りつぶして均一なもの

して各々5grをElrenmeyerフラスコに秤取し、これに20ccの蒸溜水を加え綿栓をする。鮮度低下を促進して実験の能率を増進するために、検体は30°Cの恒温器中に1日間保存し2時間おきに1、2回取り出して、鮮度低下に伴う硫黄反応と化学的变化との結果を次に示す検定法より求めた。尚各検定法を実施する際必要な場合は、第二段階の検体調製を各項で述べる如く行う。

[A] 硫黄反応について

- i) 遊離SH基・SS基の定量
- ii) 硫化水素の定性反応及び定量

[B] 硫黄反応と他の化学的検定法による結果との関係について

- i) 硫黄反応と水素イオン濃度との関係
 - ii) 硫黄反応とアンモニア態窒素との関係
 - iii) 硫黄反応と揮発性塩基態窒素との関係
- 以上に示した項目につき次の如き結果を得た。

実 験 結 果 及 び 考 察

[A] 硫黄反応について

- i) 遊離SH基及びSS基の定量

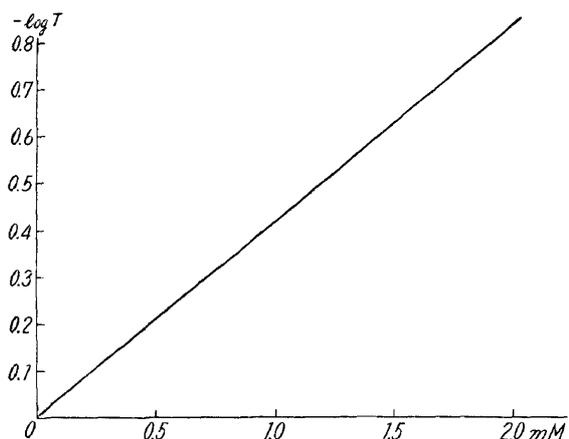
定量法としては、ニトロプルシッド法⁵⁾即ち光電比色定量法を使用した。この場合、遊離SH基はSodium nitroprusside に対し陽性な物質として存在するが、遊離SS基は還元されてはじめて陽性を示す物質である。従つて、 $\text{-SH} \xrightarrow{\text{HCN}} \text{-SH} + \text{N} \equiv \text{C-S}$ なる反応のもとに還元剤として5%シアンソーダ溶液を用い、遊離SS基の定量は還元前後のSH基の定量値の差から求めた。

筆者はこの場合検液を比色によつて定量したのであるが、吸光度よりSH基、SS基を算定する方法は複雑であるので、簡単にSH基、SS基の値を求めることが出来るSH standard curveを第1図の如くニトロプルシッド法により求めた。

遊離SH基の定量の実験方法は、先ず検液調製を行う。先で準備した検体を恒温器より毎測定時刻に取り出して、乳鉢でよく摺りつぶし洗液として水5ccと共に試験管に流し込み1%トリクロール酢酸5ccを加

* 本学教授

** 昭和32年度本学卒業生



第1図 SH Standard curve

えて除蛋白を行う。これを乾燥濾紙で濾過し、水 5cc でよく濾紙を洗滌し濾液は重曹で中和する。中和した液は50ccのメスフラスコに入れ水を加えて50ccとして検液とする。この検液について、ニトロプルシッド法に従い光電比色に供し吸光度の目盛を読み第1図のSH Standard curve によつて、5 gr に対す遊離SH基のmM数を求める。

次にSS基の定量の実験方法としては、SH基の場合と同様に検液の調製を行うが、重曹で中和後5%アンソーダ溶液5ccを加え、10分間放置して完全還元して遊離SS基を陽性のSH基とした後、50ccのメスフラスコに取り水を加えて50ccとする。以下SH基と同様に光電比色計の示す吸光度より、第1図のSH Standard curveによつてSH基のmM数を求める。ここで得た値より還元前即ち上記の如く定量して得たSH基のmM数を減じた値が検体5grに含まれている定量値は、第1表、第2図に示す如きである。

遊離SH基、SS基の測定結果は、肉眼的鑑定により腐敗初期と断定した測定時刻8時には、鯖肉、牛肉共に25~26mM%、5.0~6.0mM%を示した。SH基、

Fig II-a 鯖肉

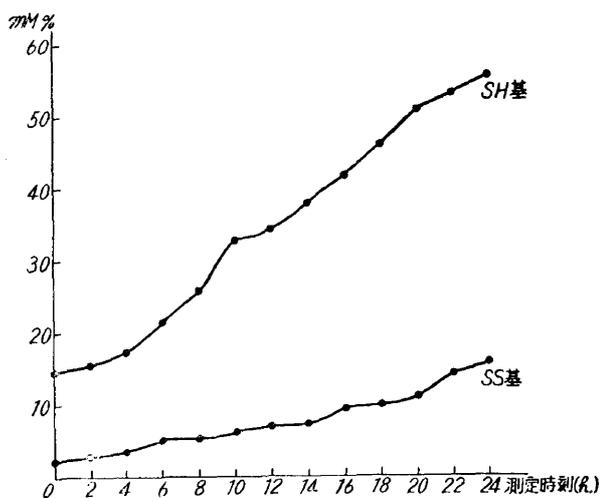
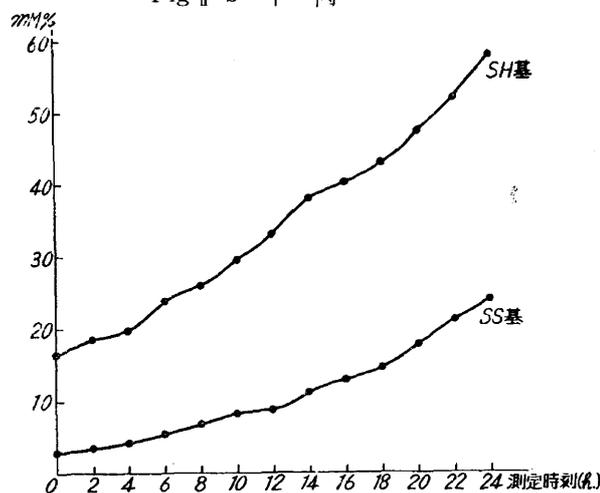


Fig II-b 牛肉



第2図 遊離SH基、SS基

SS基は、共に試料を購入した直後より存在している点から、自家消化による蛋白質の変性と共に遊離しはじめる物質で、その値は測定時刻の経過するにともない、即ち腐敗の進行にともなつて次第に増加し測定時刻24時まで増加の一途をたどつていくことが明らかである。又SH基は量的に多く存在しSS基は鮮肉、牛

第1表 遊離SH基、SS基の定量

遊離SH基

試料	測定時刻	0h	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
		mM%	14.7	15.2	17.1	22.3	25.8	33.2	34.3	37.9	41.8	46.0	51.2	53.0
鯖	肉													
牛	肉	16.7	18.5	19.9	23.8	26.6	29.7	33.1	37.8	40.1	43.2	47.4	52.0	58.1

遊離SS基

試料	測定時刻	0h	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
		mM%	2.3	2.6	3.4	4.8	5.0	5.9	6.7	7.0	9.2	9.9	10.6	14.0
鯖	肉													
牛	肉	3.0	3.5	4.1	5.4	6.7	8.1	8.4	11.2	12.8	14.5	17.6	21.7	23.7

肉共に比較してはるかに少量である。これは肉蛋白質を構成する Cysteine, Cystine の組成の相違に基づくものと考えられ、牛肉の方が鮮肉に比較して多く遊離していることも、Cysteine, Cystine が牛肉、鮮肉の蛋白質に於いて異つた組成をしていることを示していると考えられる。

一般にSH基、SS基の遊離は、食品中の Cysteine Cystine の組成量の大小に起因するものと考えられるが、肉類の自家消化即ち蛋白質の変性によつて遊離ははじめ、腐敗の進行にともなつて、その量を増加し肉類の種類により遊離する状態が異らず大体一定なものであるというこの事実から推して、SH基、SS基の遊離する状態は、食品の鮮度と大きな関係を持つものであることが考察されるに至つた。この考察については、後に述べる水素イオン濃度の測定、アンモニア態窒素の定量、揮発性塩基態窒素の定量等の結果との比較に於いて、より明確なものとする事が出来ると考える。

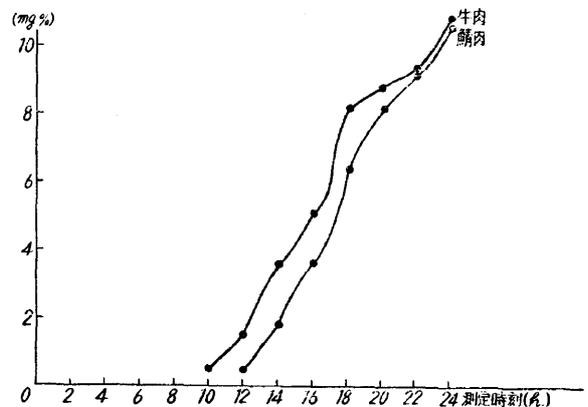
ii) 硫化水素の定性反応及び定量

食品の腐敗現象によつて発生する硫化水素については、従来数多くの研究が行われている。硫化水素は食品の腐敗によつて生成する物質であることは、Veaner, Clough 又我が国に於ける木俣、三雲等によつても究明されているところである。

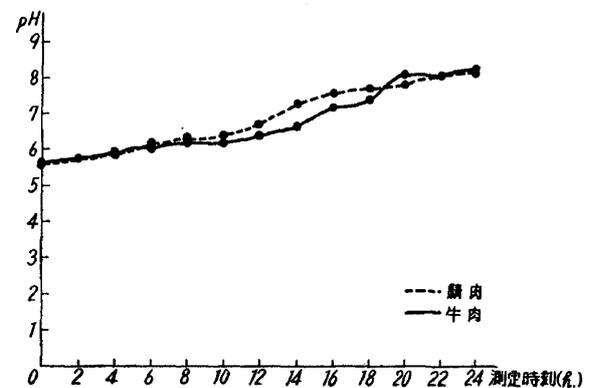
硫化水素の定性反応には、最も一般的な鉛糖紙法⁵⁾を用い定量法としては、ヨウ素滴定法⁶⁾を用いた。筆者は本実験にあつて、遊離のSH基、SS基と共に硫黄反応を示す物質としての硫化水素が自家消化を経て腐敗初期、腐敗後期に至る食品の鮮度低下にともなつて、はたしてどのような型で発生し、腐敗初期に於けるSH基、SS基の遊離状態をより明確なものとするために先づ硫化水素の定性反応を行い、更に定量をもつて精密に証拠だてる目的で取りあげた。しかし第Ⅱ表に示す定性反応、第Ⅲ表に第Ⅲ図肉眼的鑑定により

腐敗初期と断定した測定時刻6~8時には発生せず、鮮度がかなり低下した即ち腐敗が相当程度まで進行した測定時刻10時に至つて発生している。従つて腐敗初期に於けるSH基、SS基との関連は結論することは困難であると考えられ、硫化水素は腐敗初期検定の方法としては適当でない。むしろ肉眼的鑑定を行う場合の補助的な鮮度検定法として、用いられるべきものであることは Clough⁷⁾も提唱しているところである。この事については、他の化学的鮮度検定との比較に於いて後に述べる如く明らかである。

〔B〕硫黄反応と他の化学的検定法による結果との関係について



第Ⅲ図 硫化水素



第Ⅳ図 水素イオン濃度

第Ⅰ表 硫化水素の定性反応

試料	測定時刻	0 ^h	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
鯖	肉	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+++	+++
牛	肉	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+++	+++	+++

第Ⅲ表 硫化水素の定量

試料	測定時刻	0 ^h	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
鯖	肉	mg% 0	0	0	0	0	0	0.489	1.787	3.564	6.374	8.191	9.199	11.576
牛	肉	0	0	0	0	0	0.408	1.495	3.595	5.943	8.719	8.852	9.345	10.879

i) 硫黄反応と水素イオン濃度との関係

水素イオン濃度は、ガラス電極を用いて測定した。検体を毎測定時刻に取り出し乳鉢で磨砕してこれを遠心分離機にかけて上澄液について測定したもので、結果は第IV表、第IV図に示す如くである。

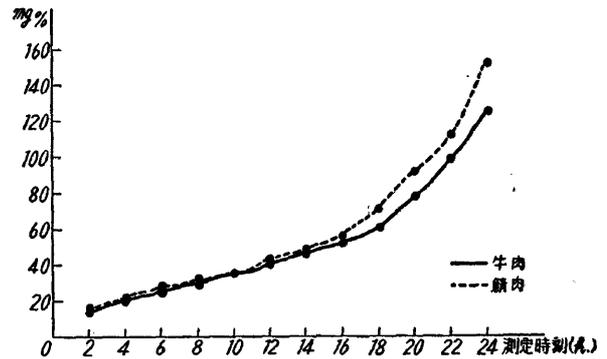
一般に魚・獣肉類の自家消化及び腐敗の速度は、水素イオン濃度によつて異なるものである。水素イオン濃度はごく新鮮な魚・獣肉類では7.0附近であるが自家消化により乳酸を生じ、従つて次第に酸性を呈するが、しかし一方自家消化作用によりアンモニア態窒素、アミノ態窒素等を生成するので次第に又水素イオン濃度の値は中性に傾いて来る。大谷・三雲等によれば、自家消化は水素イオン濃度4.5附近が最も旺盛で、再び中性に傾くにつれて鮮度はより低下し水素イオン濃度の値6.2~6.3をもつて腐敗初期と断定しているが、本実験に於いては、測定時刻8時に至つて腐敗初期を示している。この時期に相当する鯖肉・牛肉の遊離SH基は25~26mM%、遊離SS基の値は5.0~6.0mM%でSH基、SS基の遊離の増加するものは、水素イオン濃度7.2~8.2附近で腐敗後に相当する時期に至つて、一層旺盛となつている。

木俣⁶⁾は、水素イオン濃度7.5~8.5に於いて、最も旺盛に蛋白質の分解が行われていることを指摘しているが、本実験に於いても大体同じ傾向が見られる。又硫化水素の発生と水素イオン濃度6.2~6.3の腐敗初期に於いては発生が見られず、かなり鮮度が低下した時期即ち、水素イオン濃度6.4附近に於いて発生を見ることが出来る。従つて、硫化水素は遊離SH基、SS基の如く自家消化の時期ないしは、腐敗初期の時期に

発生するものでなく、前述した如く初期の腐敗産物でないことが考察される。

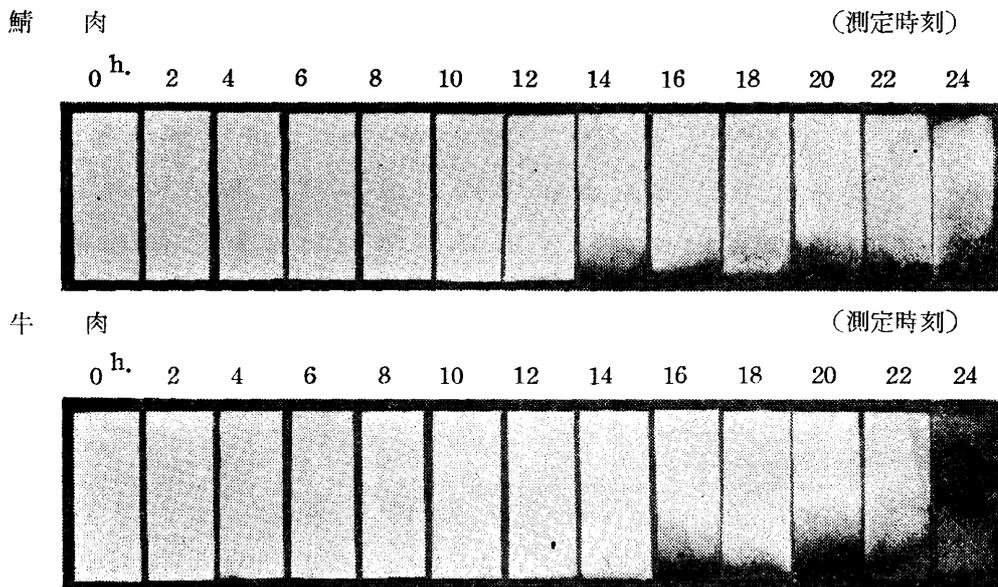
ii) 硫黄反応とアンモニア態窒素との関係、

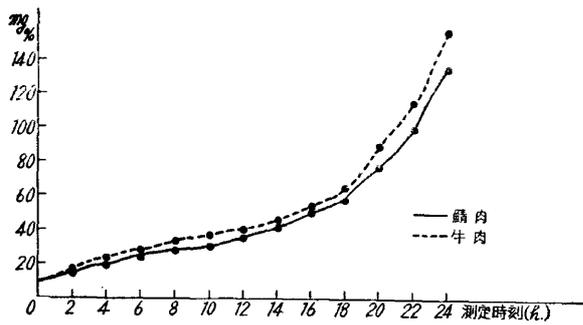
アンモニア態窒素の定量法は、衛生試験法⁹⁾により行つた。その結果は第V表、V図に示す如くであるが、遊離SH基、SS基と同様、自家消化により微量生成される腐敗に至つて急激に増加してゆく物質であることが結論されたが、Tillmans¹⁰⁾ 又我が国の衣笠、服部¹¹⁾ によつても、新鮮肉中にも微量存在し、自家消化によつても生成されることが認められている。又アンモニア態窒素は検体中30mg%以上を超越するのは、すでに腐敗初期に達したものと認められているが、本実験結果に於いては測定時刻8時に至つて、鮮肉、牛肉共に30mg%を超越し、SH基の25~26mM%、SS基の5.0~6.0mM%がアンモニア態窒素の示す腐敗初期に大体一致している。この結果より推してアンモニア態窒素の定量は、食品の腐敗初期の検定法として用うることが出来るが、遊離SH基、SS基の定量も、又腐敗初期の検定法として適當していることが



第V図 アンモニア態窒素

硫化水素の定性反応





第VI図 揮発性塩基態窒素

考えられる。

遊離SH基, SS基の量は, 腐敗以後アンモニア態窒素の増加と同じ curve で増加し, 遊離SH基, SS基の増加に比較して急激な増加を示している。従つて遊離SH基, SS基の定量は食品の鮮度検定法としては一般に広く用いられているアンモニア態窒素の定量と同様に自家消化の時期から腐敗初期への移行をよく判定することの出来る方法であると考えられる。しかし

魚類の中, 鮫等の場合, ごく新鮮なものでも数百 mg% もアンモニアを含んでいるものもあるから, すべての場合に適用すると誤り恐れもあるが, 普通は若干の差が見られる程度で大体一致した結果を得ることが予想される。いずれにしても自家消化の時期のアンモニア態窒素の含有量より腐敗初期の含有量は推定出来る

iii) 硫黄反応と揮発性塩基態窒素との関係

本実験に於ける揮発性塩基態窒素の定量法は, 東京大学実験農芸化学¹²⁾により毎測定時刻に30°C恒温に保存中の検体を取り出して行つたものにつき測定した。

実験結果は, 第VI表, 第VI図に示す如くであるが揮発性塩基態窒素も先の遊離SH基, SS基, アンモニア態窒素の定量結果と同様, 購入直後の試料にも存在していることから, 自家消化によつて生成される物質で新鮮時にもごく微量含まれている。腐敗に至つて急激に増加して行く傾向をもつている。このことは, Tlillmans 及び Otto¹³⁾, 山村¹⁴⁾, 谷川¹⁵⁾, 木俣⁸⁾

第IV表 水素イオン濃度

測定項目	試料	測定時刻													
		0 h	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	
濃イオ	鯖 肉	5.62	5.75	5.82	6.18	6.25	6.41	6.62	7.31	7.64	7.71	7.90	8.12	8.23	
	牛 肉	5.65	5.71	5.92	6.10	6.31	6.40	6.50	6.73	7.20	7.46	8.12	8.21	8.30	
SH	鯖 肉	mM% 14.7	15.2	17.1	22.3	25.8	33.2	34.2	37.9	41.8	41.0	51.2	53.0	56.9	
	牛 肉	16.7	18.5	19.9	23.8	26.0	29.7	33.1	37.8	40.1	43.2	47.4	52.0	58.1	
SS	鯖 肉	mM% 2.3	2.6	3.4	4.8	5.0	5.9	6.7	7.0	9.2	9.9	10.6	14.0	15.2	
	牛 肉	3.0	3.5	4.1	5.4	6.7	8.1	8.4	11.2	12.8	14.5	17.6	21.7	23.7	
硫化水素	鯖 肉	mg% 0	0	0	0	0	0	0.449	1.787	3.564	6.374	8.191	9.199	11.576	
	牛 肉	0	0	0	0	0	0.408	1.495	3.595	5.943	8.179	8.852	9.345	10.879	

第V表 アンモニア態窒素

測定項目	試料	測定時刻													
		0 h	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	
アンモニア	鯖 肉	mg% 8.35	16.21	22.51	28.03	32.16	34.25	38.29	46.21	53.60	59.82	92.16	110.16	152.47	
	牛 肉	7.50	13.92	20.21	27.30	31.21	34.19	36.40	46.56	49.91	55.50	80.40	98.23	125.30	
SH	鯖 肉	mM% 14.7	15.2	19.9	22.3	25.8	33.2	34.2	37.9	41.8	46.0	51.2	53.0	56.9	
	牛 肉	16.7	18.5	17.1	23.8	26.0	29.7	33.1	37.8	40.1	43.2	47.4	52.0	58.1	
SS	鯖 肉	mM% 2.3	2.6	3.4	4.8	5.0	5.9	6.7	7.0	9.2	9.9	10.6	14.0	15.2	
	牛 肉	3.0	3.5	4.1	5.4	6.7	8.1	8.4	11.2	12.8	14.5	17.6	21.7	23.7	
硫化水素	鯖 肉	mg% 0	0	0	0	0	0	0.489	1.787	3.564	6.374	8.191	9.199	11.579	
	牛 肉	0	0	0	0	0	0.408	1.495	3.595	5.943	8.179	8.852	9.345	10.879	

等の認めているところで30mg%が腐敗初期の限度であると云っている。

実験結果から考察すれば、30mg%を超越しているのは、測定時刻8時に至つて後であり、腐敗初期と断定出来る。又揮発性塩基態窒素は、僅かの増加でも定量出来るので僅かの鮮度低下も知ることが出来る点については、腐敗初期の検定法としては有効であり、これと同様の結果を持つに至る遊離SH基、SS基の定量を、腐敗初期検定法と用いることは特に有効であることが考えられる。又揮発性塩基態窒素の定量結果はアンモニア態窒素の場合と全く同じ型の curve をとつて増加していることは容易に考えられることである。

しかしここで注意したいことは、魚類の場合は種類によつて、新鮮時又は自癒消化を起している時期の揮発性塩基態窒素の含有量に差のあるものもあるが、普通の場合は若干の差が認められる程度で腐敗初期の検定法としては、遊離SH基、SS基、アンモニア態窒素が妥当していると同様に有効なる結果を持つことが結論されるわけである。尚遊離SH基、SS基の定量が、従来の鮮度検定方法として行なわれて来たアンモニア態窒素、揮発性塩基態窒素の定量と並んで、一般的な方法として使用されるには、より一層深い研究が必要であろう。

総 括

以上の実験結果より、食品特に魚獣肉類検定方法の一つとして取りあげた硫黄反応については、次の如き結論がなされるに至つた。

まず遊離SH基、SS基は魚獣肉類の死後直ちに開始される自家消化作用により、その自家消化産物として遊離しはじめ少量つつ存在して来るが、腐敗初期まで

は比較的緩やかに遊離する。しかし、腐敗初期より時間の経過と共に急激に遊離SH基、SS基の量は増加して行き、その速度は腐敗初期以前即ち自家消化時の2倍以上となり、腐敗産物としての硫化水素の増加と併行してその量を増加する。又遊離SH基、SS基、硫化水素等の硫黄反応を示す物質は、水素イオン濃度が腐敗の進行に伴つてアルカリ性に傾くのと併行して増加する。そので自家消化の時期には、比較的少量しか存報しないアンモニア態窒素、揮発性塩基態窒素が、腐敗初期以後急激に増加して行くのと比較して、同様の経過をたどつて増加してゆく。

遊離SH基は25.0mM%~26.0mM%遊離SS基は5.0~6.0mM%をもつて腐敗初期と断定したのであるが、これは肉眼的鑑定によつて断定すると共に、腐敗初期を示す水素イオン濃度6.2~6.3、アンモニア態窒素30~40mg%揮発性塩基態窒素30mg%以上、硫化水素の発生開始等の結果より、その関係を比較して断定したもので、若干の差は認められるが、大体30°C恒温に保存後6~7時間経過したものに一致した結果を見る事が出来る。

然るに蛋白質の変性による遊離SH基、SS基の定量より出発して、魚獣肉類の鮮度検定法とする本実験は、他の化学的鮮度検定法との比較に於いてその目的を更により確実なものとする事が出来たと考えられ、遊離SH基、SS基の定量は特に、魚獣肉類の腐敗初期の鮮度検定法として設定することが出来ると考えられ、硫化水素の定量は初期腐敗の検定法としては、妥当でないことも結論される。

1). Hopkins, F. G. ; Nature 126, 328, 368, (1930)
Biochem. J. 19, 787(1925)

第VI表 揮 発 性 塩 基 態 窒 素

測定項目	測定時刻		揮 発 性 塩 基 態 窒 素											
	試料	0 h	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
揮発性塩基態窒素	鯖 肉	mg% 9.02	17.90	23.51	26.31	32.37	36.45	40.21	48.30	55.31	60.31	96.31	113.90	159.31
	牛 肉	8.23	15.92	21.22	24.50	28.95	32.19	35.40	47.58	50.19	59.54	83.40	100.23	135.42
SH	鯖 肉	mM% 14.7	15.2	17.1	22.3	25.8	33.2	34.2	37.9	41.8	43.0	51.2	53.0	56.9
	牛 肉	16.7	18.5	19.9	23.8	26.0	29.7	33.1	37.8	40.1	43.2	47.4	52.0	53.1
SS	鯖 肉	mM% 2.3	2.6	3.4	4.8	5.0	5.9	6.7	7.0	9.2	9.9	10.6	14.0	15.2
	牛 肉	3.0	3.5	4.1	5.4	6.7	8.1	8.4	11.2	12.8	14.5	17.6	21.7	23.7
硫化水素	鯖 肉	mg% 0	0	0	0	0	0	0.489	1.787	3.564	6.374	8.191	9.199	11.576
	牛 肉	0	0	0	0	0	0.408	1.495	3.595	5.943	8.179	8.852	9.345	10.879

- 2). Anson, M. L. and Mirsky, A. E. : J. Gen. physiol. 19. 439 (1935)
J. Gen. physiol. 18. 307 (1935)
- 3). 荒谷真平, 蛋白質化学 ② 545
- 4). 森高次郎, 泰満夫, 日本水産学会誌, 第15卷, 第8号 (昭和24年)
- 5). 日本薬学会編, 衛生試験法註解, 634,
- 6). 日本薬学会編, 衛生試験法註解, 634,
- 7). Clough : Pub. puget Sd. Biol. Sta., 3, 195 (1922), (cit; 木俣正夫・食品腐敗学)
- 8). 木俣正夫, 食品腐敗学, 44. 115.
- 9). 日本薬学会編, 衛生試験法註解, 17
- 10). Tillmans u. Mildner; Zeitschrift f. Nahrungs-u. Genussmittel. 32, 65, (1916), 三雲隆三郎, 衛生化学及検査法, 上卷, 69,
- 11). 衣笠豊, 服部安蔵其他, 日本衛生化学会誌, Vol. 4. No. 3, (Cit; 三雲隆三郎, 衛生化学及検査法 上卷, 69.)
- 12). 東京大学実験農芸化学; 下卷, 627
- 13). Tillmans und Otto; Z. Untersuch. Nahrungsmitt.; 47, (1924) (cit; 木俣正夫, 食品腐敗学)
- 14). 山村, 日本水産学会誌, 第2卷, 昭和8年. 11. 8
- 15). 谷川, 水産製造学会誌, 第3卷, 267. 319(1933)
- 16). Sidey P. Colowick and Nathano Kaplan Methods in Enzymology. (1955)