バイオセンサ法による各種水産食品中の 残存亜硫酸の測定法の検討[†]

松本隆志*・深谷正裕*・秋田澄男*
川村吉也*・伊藤誉志男**

Determination of Sulfite in Sea Foods by a Microbial Sensor Method

Takashi MATSUMOTO*, Masahiro FUKAYA*, Sumio AKITA*,
Yoshiya KAWAMURA* and Yoshio ITO**

* Nakano Research Institute, Nakano Vinegar Co., Ltd.,
2-6, Nakamura-cho, Handa, Aichi 475

** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University,
11-68, Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya, Hyogo 663

For determining the total sulfite content in sea foods by a microbial sensor method, the conditions for decomposition of combined form of sulfite into free form by sulfuric acid were examined. The optimum sulfuric acid conc., heating temperature and heating time were determined to be 1 N, 85°C and 15 min, respectively. Under the optimum condition, the recovery of added sulfite from 11 kinds of sea foods was 90 to 98%. The total sulfite values measured by the microbial sensor method were coincided with those obtained by the modified Rankine's method. The sensitivity of the microbial sensor for sulfite determination was enhanced to 0.1 µg/ml or g by changing a gas-permeable membrane and a sample volume. These results indicated that the microbial sensor method was applicable to the determination of the total amount of sulfite in various sea foods.

(Received May 26, 1994)

亜硫酸及びその塩類は、食品の保存、漂白、酸化防止などの目的で広く使用されており、各食品毎に食品衛生法で食品添加物としての使用基準が設けられ、使用量が規制されている¹⁾。

亜硫酸の測定法としては、日本では改良ランキン法²⁾が公定法として採用されている³⁾。改良ランキン法は、蒸留時間が短く、また検出感度も高い優れた方法であり、装置も安価なため、広く普及している。しかし、蒸留操作が必要であるため、熟練を必要とすることや、低濃度の亜硫酸を測定するためには比色法で測定する必要があるが、用時調製の試薬があり、また測定時間が長い

という問題点がある。

著者らは、より簡便かつ迅速で信頼性の高い亜硫酸分析法の開発を目指し、蒸留を必要としない新しい亜硫酸測定法としてバイオセンサ法を開発した⁴⁾⁵⁾。バイオセンサ法は、Fig. 1のような構成の装置を使用する。本法の特徴は、微生物（硫黄酸化細菌）を含有する膜を酸素電極の表面に固定し、さらに微生物膜の表面をガス透過性膜で覆っていることにある。原理的に微生物膜に到達できるのはガス状物質だけであることから試料中の混在物質の影響を受けにくいこと及び微生物が亜硫酸に選択的に反応することから、極めて特異性の高い方法と考え

[†] バイオセンサ法による食品中の亜硫酸測定（第2報）（前報，文献6）

*（株）中埜酢店研究所（〒475 愛知県半田市市中村町2-6）

** 武庫川女子大学薬学部（〒663 兵庫県西宮市甲子園九番町11-68）

られる⁴⁾。しかし、食品中に含まれる亜硫酸の大部分は、食品成分と結合したものであり⁶⁾、上記バイオセンサ法でこれらの結合型を含む総亜硫酸量を測定するには、測定に供する前にあらかじめ結合型亜硫酸を分解し、全て遊離型にしておく必要がある。既にワインや味噌などについて結合型亜硫酸を遊離化する条件の検討を行い、希硫酸存在下で加熱する方法（以下酸分解法と称する）が有効であることが明らかになっている^{5) 7)~9)}。

しかし、測定精度を考慮すると、従来のバイオセンサ法⁵⁾での検出下限は $1\mu\text{g/ml}$ or g であり、希釈率を考えると、食品中では $10\mu\text{g/ml}$ or g に相当し、基準値を越えているかの判別は可能であるが、亜硫酸の添加の有無や $10\mu\text{g/ml}$ or g 以下での正確な定量が必要な場合には問題があった。このため、より広範な用途にバイオセンサ法を適用するためには、 $10\mu\text{g/ml}$ or g 以下の低濃度の亜硫酸も検出できるようにする必要があった。

本報では、亜硫酸使用頻度の高い各種水産食品中の残存亜硫酸の分析を可能にすることを目的として、先にワインや味噌などで有効であった酸分解法の適用性とバイオセンサにより低濃度の亜硫酸を定量するための測定条件について検討した結果を報告する。

実験方法

1. 試料

本報で用いた11種の水産食品は1993年11月~1994年3月に愛知県平田市内の小売店で購入した。試料は、測定直前に約3mm角の大きさに細切して分析に用いた。液体部分がある水煮あわび缶詰、いわし缶詰及びさば缶詰については、固体部分と液体部分を別々に分析した後、あらかじめ求めておいた両者の重量比により亜硫酸量を算出した。

2. 試薬及び装置

亜硫酸水素ナトリウムは関東化学薬品工業(株)製(特級)、硫酸は片山化学工業(株)製(特級)を用いた。

Fig. 1 Schematic diagram of apparatus

標準溶液は亜硫酸水素ナトリウム 162.5 mg を脱イオン水にて全量を 100 ml とした。本液 1.0 ml 中には、 SO_2 として $1000\mu\text{g}$ を含有する。

ガラス製スクリーキャップ付きバイアル瓶（以下、試料瓶と称する、12 ml 容）は井内盛栄堂社製を用いた。亜硫酸測定用バイオセンサは(株)中埜酢店製を使用した⁴⁾。

アルミブロックヒーターは東京理化器械(株)製を用いた。

濾紙は(株)東洋濾紙製を使用した。

3. 前処理方法（酸分解法）

試料瓶に脱イオン水 4.8 ml 及び 1N 硫酸 6.0 ml を添加した。これに試料 1.2 g を加え、 85°C に保温したアルミブロックヒーターで 15 分間加熱した。その後、水道水で室温まで冷却した。冷却後、濾紙濾過し、得られた濾液をバイオセンサにて測定した。操作の概要を Fig. 2 に示した。

4. 亜硫酸添加回収試験

試料に亜硫酸標準液を試料中の亜硫酸濃度が Table 2 の各亜硫酸添加濃度になるように測定直前に加えたものを添加回収試験に用いた。Fig. 2 に示した方法で前処理を行い、バイオセンサで試料中の亜硫酸濃度を測定し、添加した亜硫酸の回収率を算出した。

5. 試料中の亜硫酸の測定

(1) バイオセンサ装置

硫酸化細菌 *Thiobacillus thiooxidans* NCI11 773 の菌体固定化膜を内蔵した亜硫酸測定用バイオセンサ⁴⁾を使用した。

(2) 改良ランキン滴定法

食品衛生検査指針の方法に準じて測定した¹⁰⁾。

Fig. 2 Analytical procedure for sulfite in sea foods

実験結果及び考察

1. 高感度化の検討

使用するガス透過膜と亜硫酸濃度計への試料注入量を変更することにより、高感度化を検討し、結果を Table 1 に示した。

ガス透過膜を従来の孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ 、膜厚 $125\ \mu\text{m}$ の膜から、孔径 $0.10\ \mu\text{m}$ 、膜厚 $50\ \mu\text{m}$ のものへと変更した。更に、亜硫酸濃度計への試料注入量を従来の $2.1\ \text{ml}$ から $9.6\ \text{ml}$ へと増加させた。

以上の検討により、検出感度が $1.0\ \mu\text{g/ml or g}$ から $0.1\ \mu\text{g/ml or g}$ (希釈率を考慮すると、食品中では 1.0

Table 1 Sensitivity of the microbial sensor method for sulfite determination

	Microbial sensor method	Modified microbial sensor method
Pore size of gas permeable membrane (μm)	0.45	0.10
Thickness of gas permeable membrane (μm)	125	50
Sample volume (ml)	2.1	9.6
Sensitivity ($\mu\text{g/ml or g}$)	1.0	0.1

Fig. 3 Effect of the concentration of sulfuric acid on the recovery of added sulfite

Heating temperature, 85°C ; heating time, 15 min.

$\mu\text{g/ml or g}$) に高まった。

2. 前処理条件検討

先の実験⁵⁾で、冷凍エビについては酸分解法で結合型亜硫酸が遊離することを示唆する結果が得られていたもので、市販冷凍かにのむき身を用いた添加回収試験で処理条件について詳細に検討した。処理条件の検討は、Fig. 2 の方法の中の処理する硫酸の濃度、加熱温度および加熱時間について実施した。

(1) 硫酸濃度

Fig. 4 Effect of heating temperature on the recovery of added sulfite

Sulfuric acid conc., 1 N; heating time, 15 min.

Fig. 5 Effect of heating time on the recovery of added sulfite

Sulfuric acid conc., 1 N; heating temperature, 85°C

Table 2 Determination and recovery of sulfite in various sea foods by the biosensor method

Sample		Added sulfite ($\mu\text{g/g}$)	Determined sulfite ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
Taisyo prawn, frozen	A	0	71.4	—
		100	169.8	98.4
	B	0	43.3	—
		100	133.3	90.0
Blacktiger, frozen	A	0	10.5	—
		100	102.4	91.9
	B	0	34.8	—
		100	127.4	92.6
Shrimp, frozen	A	0	86.4	—
		100	184.6	98.2
	B	0	50.5	—
		100	145.2	94.7
Crab, frozen	A	0	N.D.	—
		100	93.3	93.3
	B	0	39.1	—
		100	133.6	94.5
Octopus	A	0	N.D.	—
		30	27.5	91.7
	B	0	N.D.	—
		30	28.0	93.3
Squid	A	0	N.D.	—
		30	27.5	91.7
	B	0	N.D.	—
		30	27.9	93.0
Shrimp, dried	A	0	N.D.	—
		30	29.1	97.0
	B	0	N.D.	—
		30	29.5	98.3
Canned ear shell	A	0	N.D.	—
		30	27.6	92.0
	B	0	N.D.	—
		30	28.3	94.3
Canned mackerel	A	0	N.D.	—
		30	27.9	93.0
	B	0	N.D.	—
		30	27.1	90.3
Canned sardine	A	0	N.D.	—
		30	27.2	90.7
	B	0	N.D.	—
		30	28.0	93.3
Seaweed	A	0	N.D.	—
		30	27.4	91.3
	B	0	N.D.	—
		30	27.7	92.3

* N.D., Not detected.

添加する硫酸濃度の影響について検討した。結果を Fig. 3 に示した。0.5~8 N の範囲で、最も高い回収率が得られたのは 1N (試料中の濃度で 0.5 N) で、回収率は 97.4% であった。それ以上の濃度ではかえって低下した。硫酸濃度が 1N~8 N まで、硫酸濃度の増加とともに回収率が低下する傾向があったが、前処理中に亜硫酸が熱分解或いは重合などの反応を起こしたことが原因であると推測した。これらの結果から、最適硫酸濃度は 1N とした。

(2) 加熱温度及び加熱時間

(1) で最適であった 1N 硫酸を添加した場合の加熱温度及び加熱時間の影響について検討した。

Fig. 4 は加熱温度の影響を調べた結果である。55, 70, 80, 85, 90, 95, 100℃ の各温度で検討したが、85~95℃の間では 95% 以上の回収率であり、特に 85℃ で最も高いほぼ 100% の回収率が得られた。70℃ では結合型亜硫酸の分解が不十分であるために 80% 程度の低い回収率しか得られなかったと推定された。100℃ では分解は十分であったが、温度が高すぎるため、試料中の他の成分との反応も同時に起こり、回収率が低くなったと推定された。

次に、85℃ における加熱時間の影響を検討した。Fig. 5 に示すように、10 分まではほぼ直線的に回収率は増加し、10 分以上では一定でほぼ 100% であった。この結果から、最適加熱時間を 15 分とした。

Fig. 6 Determination of the total sulfite in sea foods by the biosensor method and modified Rankine's method

■, Taisyo prawn, frozen; ●, Blacktiger, frozen; □, Shrimp, frozen; ○, Crab, frozen.

上記の結果から、Fig. 2 に示す酸分解法の処理条件を決定した。

3. 各種水産食品のバイオセンサ法による亜硫酸添加回収試験

Fig. 2 の最適酸処理条件の適用性を検討するため、Table 2 に示した通常の分析対象となっている各種水産食品 11 種類 (22 試料) について、亜硫酸添加回収試験を行った。亜硫酸の添加量は使用基準量と同じにし、測定値は測定 3 回の平均値を示した。

結果を Table 2 に示した。いずれの食品においても 90% 以上の高い回収率が得られた。固体と液体が共存する水煮あわび缶詰、いわし缶詰及びさば缶詰の 3 種類いずれの場合についても、固体部分と液体部分いずれも 90% 以上の回収率が得られ、重量比によって算出した全体の回収率も 90% 以上の値であった。

以上の結果から、Fig. 2 の方法は水産食品一般に適用できることが明らかになった。

4. 各種水産食品中の残存亜硫酸測定値の比較

バイオセンサ法と改良ランキン滴定法との相関性を確認するため、残存亜硫酸が検出された各種水産食品 9 試料について、両方法での測定値を比較した。Fig. 6 に示すように、いずれの試料についてもバイオセンサ法と改良ランキン滴定法の分析値は相対誤差 1.5% 以内で一致した。また、再現性は変動係数でみると 4% 程度であった。

以上の結果から、バイオセンサ法が各種水産食品の簡易分析法として有効であることが明らかになった。

要 約

バイオセンサ法による各種水産食品の分析条件について検討した。

薄いガス透過性膜を使用し、試料注入量を増加させることにより、検出下限は 1.0 μg/g から 0.1 μg/g (希釈率を考慮すると実サンプルでは 1.0 μg/g) に高まった。

試料中の結合型亜硫酸の遊離は、試料を硫酸酸性下で加熱する酸分解法により可能であった。酸分解法の処理条件を検討し、添加硫酸濃度 1N、加熱温度及び時間は 85℃、15 分が最適であった。

最適条件での酸分解法による各種水産食品の添加回収試験を行った結果、冷凍エビなどを含む 22 試料いずれにおいても 90% 以上の回収率を得られた。また、改良ランキン滴定法の分析値とも相対誤差 1.5% 以内で一致した。

以上の結果より、バイオセンサ法は各種水産食品中の

残存亜硫酸の測定に有効であることが分かった。

文 献

- 1) 食品，添加物などの基準：厚生省告示第370号 (1959).
- 2) OGAWA, S., SUZUKI, H., TOYODA, M., ITO, Y., IWAIDA, M., NONOGI, H., FUKU, T., OBARA, K., ADACHI, T., FUJITA, K., IKUZAWA, M., IZUMI, T., HAMANO, T., MITSUHASHI, Y. and MATSUKI, Y.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **168**, 206 (1979).
- 3) 日本薬学会：衛生試験法・注解（金原出版，東京），p. 474 (1990).
- 4) 前田和宏・深谷正裕・川村吉也：食品機械装置 **28**, 105 (1991).
- 5) 川村吉也・佐藤 猛・久保伸子・赤野裕文・黒澤 尋・中村和夫・天野義文・伊藤崇志男・藤巻正生：日食工誌. **39**, 233 (1992).
- 6) MITSUHASHI, Y.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **168**, 299 (1979).
- 7) 黒澤 尋・樋口直美・中村和夫・天野義文：醸協. **87**, 155 (1992).
- 8) 本藤 智・桜井令子・安平仁美：味噌の科学と技術, **40**, 351 (1992).
- 9) 荒田治彦・川村吉也：醸協. **88**, 671 (1993).
- 10) 日本食品衛生協会：食品衛生検査指針，厚生省生活衛生局監修（東京），p. 82 (1989).

(平成6年5月26日受理)