

腐敗現象に関する基礎的研究

中山大樹

(昭和35年9月1日受理)

Fundamental Studies on the Putrefactive Process of Protides

By Ōki NAKAYAMA

The present author stated a conception "typical putrefaction". It was proved through experiments that the typical putrefaction never takes place under the following conditions :

- 1) Fermentable sugar exist in abundance, as compared with protides.
- 2) Lack of the putrefactive microbes.
- 3) Lack of the putrefiable protides. For example, glutamic acid, urea, yeast cell, certain denatured protides are not putrefiable, on the other hand, most of the raw animal proteins are putrefiable.

It is quite possible to prevent the putrefaction without sterilizing. The present author has been succeeded in devising to prepare the preservable foods, by mixing sugar with the proteinous materials or denaturing the protein itself.

The degree of the putrefied odor is neither parallel to the analytical values of amines nor volatile reducing substances. Mercaptanes are always detected in the typically putrefied matters. The principal fraction of the odor is extractable from acidified materials by means of ether.

微生物による生化学的変化のうち、人生に有用なものが広義の発酵、有害なものは広義の腐敗と呼ばれている。発酵現象に対しては微生物の生理面からも人生への応用面からも広範な研究が行われて来たが、腐敗現象の方は、生理面では生化学的脱アミノ反応、脱炭酸反応等が断片的に研究されて居るに過ぎず、実用面に至っては、腐敗防止の問題が殺菌の問題の中に解消されてしまっている感がある。

筆者は、嘗て多田 ('54)²³⁾ と共に、生の魚を磨り潰し、糖蜜を混ぜて放置すると、何等、殺菌手段を用いずとも、腐敗が起らず、長期に亘って保存できることを明らかにした。この現象を機械的に解釈すれば糖蜜の発酵によって生じた有機酸のため、混合物のpHが低下し、その結果、腐敗菌の生育が抑制されたものと考えることができる。しかし、その後の研究により、pHの低下は一つの結果であって、この種の過程がおきるための必要条件では無く、糖の存在そのものが、混合物の中で起る可能性のある反応群を、非

腐敗の方向へと指向させたものと考えねばならないことがわかった。

このような事から、腐敗現象と基質と菌の間の関係を、現象面から改めて見直すことが必要であると考えて、一連の実験を行った。その結果、典型的な、或は狭義の腐敗という概念を抽象し、この意味の腐敗の起る条件を明らかにして、腐敗現象を或程度系統化することができ、また殺菌によらない防腐法について、いくつかの新しい知見を得たので、ここに報告する。

実験の部

1. 糖の腐敗抑制作用の確認

生魚を磨り潰したものに糖蜜を加えれば腐敗を起さない事から、一般に「プロチドを主成分とする含水物に、易発酵性の糖を加えると腐敗が抑制される」と帰納して差支無いか否かを確かめる実験を行った。

プロチド分として、小アジ全体をチョッパーで潰した泥状物、シロナガス鯨の赤肉をチョッパーで潰した泥状物、キヒトデを切り開き卵巣、肝臓等軟い部分を取り出して混和したもの、ヤリイカの肉を細切し、潰したもの、アンモニア水を加えて pH 6.0 になるように溶解した 5% カゼイン液、ペプトンの 3% 水溶液を用いた。

カゼイン及びペプトンの水溶液の調整に当っては、次の組成の塩類溶液を用いた。以後述べる実験についても、これに準ずる。

塩類溶液: KH_2PO_4 0.05%; K_2HPO_4 0.05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%; NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 各々 0.001%; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 各々 0.0001%。

プロチド原料 250g ずつを広口ボンド瓶に入れたものを 3 本ずつ用意し、その 1 本には、還元糖濃度を 60% に調整した糖蜜 25g, 1 本には 60% ブドウ糖液 25g を加て混合し、残る 1 本は、糖を加えず、対照実験とした。いずれにも、良好な糖味増と、腐敗し

TABLE I
Effects of Glucides on preservation of various Proteinous Materials
(for 3 days at 30°C)

Material	Final color*			Odor			pH		
	M	G	C	M	G	C	M	G	C
Scad, not boiled	br.	p. br.	d. br.	—	—	+++	3.4	3.8	7.2
Whale meat	br.	p. br.	pink	—	—	+++	4.0	4.2	7.6
Star fish	br.	or.	black	—	—	+++	3.6	3.8	6.8
Cuttle fish	p. br.	ye.	d. br.	—	—	+++	4.2	4.4	6.8
Casein solution	p. br.	white	gray	—	—	+++	4.3	4.3	7.0
Peptone solution	br.	or.	ye.	—	—	+	3.6	4.0	8.2

* M, G, C, Molasses, Glucose and None (control) added respectively; br., brown; ye., yellowish; or., orange; p., pale; d., dark; —, signifies, absent; +, signifies, present.

た魚腸の混合物（以後混合菌と仮称する）約 1g を接種し、パラフィン紙で覆って昆虫の侵入を防ぎつつ 30°C に 7 日間保存した後、表面の菌苔及び酸化層を除いて、色、腐敗臭及び pH をしらべた。その結果は TABLE I の通りで、相当広い範囲のプロチド原料に対し、還元糖の添加が腐敗の防止に有効なことがわかった。

2. 細菌の種類と腐敗の関係

以上の実験で、ペプトンを用いた場合は腐敗臭があまり著しくないが、一応、腐敗のモデルとして使えることがわかった。そこで、プロチドとしては、成分が一定しており、完全水溶性で、オートクレーブによる殺菌が可能で取り扱いに便利なペプトンを、糖としては、ブドウ糖を用いて定量的な実験を行った。

ペプトンの 10% 溶液、ブドウ糖の 10% 溶液及び塩類溶液を適当に混合して、ペプトン及びブドウ糖の濃度を調節した液 10ml ずつを試験管に分注してオートクレーブで殺菌し菌を接種して 30°C に 20 日間放置し、pH、悪臭及び VRS 値または揮発酸、揮発塩基を比較した。

VRS (Volatile Reducing Substances) 値は、LANG ('45)¹⁴⁾、FARBER ('49)⁸⁾ 内藤 ('56)¹⁷⁾ 等によって、食品等の臭気及至腐敗の指標として推奨されているもので、試料の通気によって揮発して来る成分を塩基性過マンガン酸カリ液で捕捉し、残存過マンガン酸カリをヨード滴定法でしらべ計算する。この値が大きい程、揮発性還元物質が多いことになる。

揮発酸は、試料 10ml に、6N 硫酸 1ml を加えて水蒸気蒸溜し、留液を N/10 苛性ソーダで受けてフェノールフタレインを指示薬として逆滴定し、規定度として算出した。揮発酸は、酸性試料の VRS 値に寄与する一成分であり、また、糖の少ない試料の揮発酸量が多いときは、分子量の小さいアミノ酸またはアミノ酸分解物の脱アミノ反応が起っていることを示唆する。

揮発塩基は、揮発酸定量残渣に 6N 炭酸カリ液 2ml を加えて水蒸気蒸溜し、留液を N/10 塩酸で受けて、コンゴレッドを指示薬として逆滴定して算出した。揮発塩基の値は、アミン及びアンモニアの合計量をあらわすが、どの試料も、際だったアンモニア臭を呈していなかったもので、ほぼアミンの量を代表するものではないかと思われる。

測定結果は TABLE II, TABLE III, の通りで、結論として次のような事がいえる。

- 1) ペプトンに対する糖の割合が大きければ、いわゆる腐敗菌が繁殖しても、腐敗にならない。
- 2) ペプトンに対する糖の割合が小さければ、いわゆる腐敗菌は、概ね腐敗またはこれに近い様相を呈せしめる。
- 3) 酵母、乳酸菌、*B. coagulans* 等は、糖が少くとも腐敗を起す作用が無い。
- 4) pH、揮発塩基、揮発酸、特に VRS 値は、必ずしも悪臭と平行しない。

TABLE II
Effects of Inoculum and Amount of Glucose Added to the
Putrefying 2% Peptone Solution

Inoculum		Glucose added (%)					
		0 Glucose/Peptone : 0	0.5 1/4	1.0 1/2	2.0 1/1	3.0 3/2	4.0 2/1
<i>Proteus vulgaris</i> IAM-1025	pH	7.8	5.4	5.2	5.2	5.0	—
	Odor	++	+	±	±	—	—
	VRS*	10	18	24	22	22	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM-1201	pH	8.2	7.6	7.8	7.0	5.2	—
	Obor	—	±	—	—	—	—
	VRS	0	22	6	10	16	—
<i>Escherichia coli</i> LAT-218	pH	7.8	7.2	4.6	4.6	4.4	—
	Odor	++	+	±	—	—	—
	VRS	10	14	46	6	22	—
<i>Bacillus subtilis</i> LAT-132	pH	8.4	8.0	7.6	7.4	6.6	—
	Odor	++	+	—	—	—	—
	VRS	4	6	26	24	6	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasse II	pH	6.4	6.2	6.0	5.8	5.2	—
	Odor	±	—	—	—	—	—
	VRS	12	8	14	30	44	—
Mixed culture	pH	6.4					4.4
	Odor	++					—
	VRS	8					70
Spontaneous putrefaction	pH	8.4	7.6	7.6	6.8	6.6	3.8
	Odor	++	+	+	±	—	—
	VRS	62	26	22	20	18	16
Control (Not inoculated)	pH	7.0					7.0
	Odor	—					—
	VRS	4					4

* VRS, Volatile reducing substances, as $N/50 \text{ KMnO}_4$.

IAM, The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo.

LAT, Laboratory of Agricultural Chemistry, Tamagawa University.

TABLE III

*A Transition from Putrefactive Metabolism into Fermentative one
Caused by Increasing the Ratio of Glucose (G) to Peptone (P)*

Inoculum		Substrate								
		P : (%)	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	0.4	0.2
		G : (%)	0.2	0.2	0.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0
		G/P :	1/20	1/10	1/5	1/2	1/1	2/1	5/1	10/1
<i>S. cerevisiae</i> <i>Rasse XII</i>	pH		7.0	6.4	6.2	5.8	5.4	5.0	5.0	4.4
	Odor		—	—	—	—	—	—	—	—
	V. A. a)		0.8	1.4	0.7	1.1	0.9	1.2	1.8	2.3
	V. B. b)		0.2	0.4	0.4	0.4	0.5	1.3	1.0	2.6
<i>E. coli</i> <i>LAT-224</i>	pH		7.6	7.4	7.4	7.4	7.4	7.0	6.6	5.4
	Odor		++	++	++	++	+	+	±	—
	V. A.		1.4	0.5	0.2	0.8	1.5	1.1	0.8	0.5
	V. B.		0.3	2.6	1.2	2.1	1.9	1.1	0.4	1.3
<i>Sarcina lutea</i> <i>IAM-1009</i>	pH		8.6	7.8	6.5	6.4	5.0	5.0	5.0	4.4
	Odor		+	+	±	—	—	—	—	—
	V. A.		1.1	1.4	1.4	0.9	1.5	0.8	1.0	0.5
	V. B.		1.3	0.2	0.5	0.2	1.6	0.2	3.5	2.9
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>IAM-1058</i>	pH		7.6	7.4	6.8	6.4	6.2	6.0	5.4	5.4
	Odor		++	++	++	+	+	±	—	—
	V. A.		1.3	0.6	2.9	2.0	2.8	2.0	2.0	3.2
	V. B.		0.2	0.1	1.2	1.5	0.2	1.9	5.7	6.5
<i>L. delbrueckii</i> <i>IAM-1085</i>	pH		5.4	5.0	4.4	4.2	4.2	4.0	4.0	3.8
	Odor		—	—	—	—	—	—	—	—
	V. A.		0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	1.2
	V. B.		0.2	0.1	0.6	1.4	1.4	0.5	1.1	1.1
<i>B. coagulans</i> <i>IAM-1115</i>	pH		7.2	7.0	6.0	5.0	4.4	4.4	4.4	4.4
	Odor		±	±	±	—	—	—	—	—
	V. A.		1.9	2.5	1.1	0.5	1.1	1.8	1.3	0.9
	V. B.		0.9	0.4	0.3	0.2	1.4	1.4	1.3	2.7
<i>B. cereus</i> <i>IAM-1029</i>	pH		7.6	7.6	7.0	5.4	5.2	5.2	5.2	4.8
	Odor		+	+	+	+	±	±	—	—
	V. A.		0.7	0.8	1.1	0.9	1.7	1.8	1.8	0.9
	V. B.		0.2	0.2	0.2	0.2	2.2	1.5	2.7	3.2
<i>B. circulans</i> <i>IAM-1112</i>	pH		6.8	6.8	6.8	6.2	5.6	5.6	5.6	4.8
	Odor		+	+	+	+	±	±	±	—
	V. A.		0.2	0.9	0.6	0.7	1.6	2.9	0.8	1.8
	V. B.		0.3	0.2	0.2	0.6	1.2	2.3	2.4	2.5
Mixed culture	pH		8.6	8.4	8.2	7.8	7.0	7.0	6.6	6.0
	Odor		++	++	+	+	±	±	±	—
	V. A.		1.1	0.6	0.2	2.3	2.7	2.8	3.1	1.6
	V. B.		0.4	0.2	2.3	3.9	10.1	6.9	5.3	5.7
Control (Not inoculated)	pH		7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	1.0	7.0	7.0
	Odor		—	—	—	—	—	—	—	—
	V. A.		0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6
	V. B.		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

a) Volatile acids as *N*/10 NaOH, b) Volatile base as *N*/10 H₂SO₄.

3. 腐敗臭成分の検討

1) **VRS 法の検討** VRS法は、一定の食品の一定の菌による腐敗度の比較には、良い結果を与えられると思われるが、TABLE II によれば基質の組成が違う場合にも、菌の種類が違う場合にも、腐敗臭を正確にあらわさない。これは pH 等の僅かな違いによって、アルコール等の中性溶剤、揮発塩基、揮発酸、メルカプタン、硫化水素等が種々の程度に捕捉され、それらの和が機械的に VRS 値として現われる為であると思われる。

しかし微量の揮発性有機化合物を、もれなく定量するためには別に良い方法がないので、VRS 法の変法により、ある程度種類の違う物質の間の腐敗度を比較することは出来ないかどうかを検討した。この目的のため、各種の腐敗物及び発酵食品をそのまま水にといた状態及び 0.5N の硫酸濃度にしたもの、0.5N の苛性ソーダ濃度にしたものの状態で VRS 値を測定してみた。その結果を TABLE IV に示す。

TABLE IV
VRS Values of various Putrefied or Fermented Products
obtained under Strong Acidic (A) or Basic (B) Conditions

No.	Final		VRS*		
	Odor	Flavor	A	B	C
Putrefied products of					
1. Peptone (2% solution)	++	—	36	24	24
2. Peptone (4% solution)	++	—	92	26	78
3. Scad, not boiled	+++	—	1.6	1.4	1.2
4. HCl added (2%) to No. 3	+	—	1.4	2.1	1.7
5. Yolk	+++	—	6.8	15.0	7.5
Fermented products of					
1. Peptone (2%), Glucose (4%) ^{a)}	—	±	12	16	12
2. Peptone (2%), Glucose (4%) ^{b)}	—	±	10	76	70
3. Cheese (3% emulsion)	—	+	0.08	0.20	0.24
4. Soy sauce	—	+	0.42	0.49	0.48
5. Miso (a salted bean paste)	—	+	0.06	0.26	0.20

* Volatile reducing substance as N/50 KMnO_4 , A, B, C, H_2SO_4 , NaOH, and none added respectively. a) By a lactic acid bacteria, b) By a yeast (*Saccharomyces*).

TABLE IV から次のような結論を引き出すことが出来る。

- (1) 試料そのままの VRS 値は腐敗度を正確にあらわさない。例えば、むしろ芳香のあるペプトン—ブドウ糖液の値が 70、悪臭の著しいアジの値が 1.2、味噌が 0.2 で、その間には何らの規則性も見出されない。
- (2) 硫酸を添加した試料の VRS 値も不可である。これは(1)と同じ例の値が 10, 1.6, 0.06 であることから明らかである。

- (3) 苛性ソーダを添加した試料のVRS値は、アミンの総量と中性揮発成分の和をあらわすものと思われるが、これも、同様の例から腐敗臭に比例しないことがわかる。
- (4) 観点を变えて、硫酸を加えて測定したVRS値をa、そのままの測定値をn、苛性ソーダを加えて測定した値をbとした時、 $a:n:b$ の値の比を見ると、芳香のある味噌も、悪臭の著しい卵黄も共に $a < n < b$ である。一方、臭いペプトン腐敗物が、丸反対の $a > n > b$ となって居り、この比も何等意味を持たない。ただ注意すべき点は発酵食品に $a < b$ のものが多く、腐敗即アミンの生成という通念が正しくない事を示唆している事である。

揮発酸、揮発塩基、VRS法及びVRS変法が、いずれも腐敗度を正確に表わさないからには、定量的方法で莫然と腐敗を追跡することは困難である。

- 2) 重金属塩による悪臭成分の検出 さきに指摘したように、発酵食品に、 $a < b$ のものが多く、腐敗物に $a > b$ のものが多い。この事はアミンが腐敗臭の主成分でない事を暗示する。そこで種々の腐敗物に硫酸及び苛性ソーダを加えて臭をしらべてみると、VRS値が $a < b$ である卵黄腐敗物に到る迄例外なく、硫酸を加えた方が悪臭が烈しくなることがわかった。

そこで小型水蒸気蒸留装置に試料を2ml入れ6N硫酸1mlを加えて水蒸気蒸留して留出物を種々の溶液に通じてみた。その結果、重金属塩、特に硝酸鉛、昇汞及び硝酸銀溶液が、腐敗物の留出液と特異的に反応して黒色沈澱を生ずることがわかった。TABLE IVの悪臭の強いもの(卅及び卅)は、ペプトン腐敗物を除きいずれも黒色沈澱を生じ悪臭のないもの(一)は、黒色沈澱を生じなかった。

腐敗臭は硫化水素臭と違うが悪臭を伴う腐敗は硫化水素の発生を伴うか、或は硫酸と加熱することにより硫化水素を生ずる物質の生成を伴うものと思われる。

- 3) 悪臭成分の抽出 腐敗物の悪臭は、硫酸を加えることにより一層激しくなり、且つ臭の性質がやや変化する。アルカリを加えるとややおとなしいアミン臭になるのが普通である。

TABLE V

Odor Extracted from some putrefied Materials by Ether

Material (incubated for 10 days at 30°C)	Additions	Odor of Extracts from*				Remarks
		S	A	B	D	
1. Peptone (4% solution)	None	+	+	±	±	Amine like odor
	Glucose 4%	±	±	±	±	"
2. Scad	None	卅	卅	±	±	"
	Glucose 10%	—	—	±	—	"
3. Casein (4% solution)	None	卅	卅	±	±	"
	Glucose 4%	—	—	±	—	"
4. Yolk	None	卅	卅	±	±	"
	Glucose 10%	—	—	±	—	"

* S, Samples before extraction; A, B, D, extracted under strong acidic, basic, and untreated condition respectively. —, Signifies, absent; +, signifies, present; ±, signifies, obscure.

腐敗物に硫酸または苛性ソーダ溶液を加え、もしくは加えずに、エーテル抽出を試みたところ悪臭成分は概ねそのままエーテル層に移りエーテル駆逐後も臭は残り、開放下に放置するときは、次第に臭気が消失することがわかった。ペプトン液の場合、糖を加えずに放置したものと、加えて放置したものとの硫酸酸性下でエーテル抽出したものの匂いが、やや似ているが魚、カゼイン、卵黄等の場合は糖を加えたものと、加えずに放置したものの酸性抽出物の臭気が極めてはっきり異なる。

これに反し、塩基性抽出物は一様に弱いアミン臭を呈し腐敗物と発酵物との間の差が判然としない。この結果を TABLE V に示す。

4) メルカプタン及びアルキルサルファイドの検出 市販削りぶしを、繰返しエーテルで洗って脱脂し、エーテル駆逐後、粉碎し5倍量の塩類液を加えて30分間沸騰湯煎にかけたものに10%の割にブドウ糖を加え、もしくは加えずに混合菌を接種して30°Cに10日間放置し、得られた液及び対照として滅菌保存液についてメルカプタン及びアルキルサルファイドの検出を行った。

方法は、DATEO ら (1957) の方法に準じた。即ち試料に硫酸を加え pH 4.6 に調整して、アミンの揮発を抑制したもの 5ml を大型試験管に入れて沸騰湯煎にかけ吸引によりおだやかに窒素ガスを通じ、このガスを塩基性酢酸鉛層を通過させて、硫化水素を除いた後、4% のシアン化第2水銀溶液をくぐらせてメルカプタンを捕捉し、更に3%の昇汞水をくぐらせてアルキルサルファイドを捕捉する。シアン化水銀液及び昇汞水は、実験後、遠心分離、水洗により白色沈澱を分離、それぞれ3N塩酸で分解し、再び生ずる悪臭によりメルカプタン及びアルキルサルファイドを証明した。その結果はTABLE VI の通りで、有機硫黄化合物の量の差こそ、腐敗と非腐敗の主な区別点であると断じて差支あるまい。

TABLE VI

Detection of the Mercaptanes and Alkylsulfides Formed in a Putrefied Fish Meal Mash (FMM)

Material	Mercaptanes ppt. from $\text{Hg}(\text{CN})_2$		Alkylsulfides ppt. from HgCl_2	
	Amount	Odor*	Amount	Odor*
Putrefied FMM ^{a)}	++	++	±	±
FMM with glucose (10%)	±	±	±	±
FMM refined	—	—	—	—

* Regenerated odor from precipitates.

a) Decoction of a dried fish meal incubated for 10 days at 30°C.

4. プロチドの種類と腐敗の関係

糖を加えるとプロチド一般の腐敗が抑制されること、腐敗度の検定にはVRS法等は不適當で、感能試験またはメルカプタンの検出が望ましいことがわかった。ところがプロチドの中にはペプトンのように腐敗臭の著しくないものがあり、一方魚肉や卵黄のように猛烈な腐臭を生ずるものもある。そこでプロチドの種類と腐敗の基質となり得る能力との関係をしらべて見た。

1) 簡単な窒素化合物と腐敗 微量栄養源として酵母エキスを 0.3% 加えた塩類溶液に、簡単な窒素化合物を 2% ずつとかし、ブドウ糖を 2% 或は 0.1% 添加して、試験管に分注し、オートクレーブで滅菌した後、菌を接種して 30°C に 20 日間放置して、菌の生育、pH 及び悪臭の度合を調べた。その結果は TABLE VII の通りで、たとえ菌が生育し糖濃度が低くても、実験に用いたような窒素化合物はペプトンより一層腐敗現象の基質となり難いことがわかった。

TABLE VII
Comparison of Odor Formed from Three Chemically Defined
Nitrogenous Compounds and Peptone by Various Inocula

Inoculum	Glucose added %	NH ₄ HPO ₄			Urea			Na-glut.*			Peptone		
		G	pH	O	G	pH	O	G	pH	O	G	pH	O
<i>S. cerevisiae</i>	0.1	±	6.0	—	±	8.0	—	+	8.8	—	+	8.6	—
<i>BrH. Rasse II</i>	2.0	+	4.0	—	++	5.5	—	+	5.0	—	++	6.4	—
<i>Stap. aureus</i>	0.1	±	6.0	—	+	8.6	—	+	8.8	—	++	8.6	+
<i>IAM-1058</i>	2.0	++	5.0	—	++	6.8	—	++	6.0	—	++	6.0	—
<i>Sarcina lutea</i>	0.1	+	6.0	—	++	8.2	—	++	8.6	—	++	8.2	±
<i>IAM-1009</i>	2.0	++	4.2	—	++	6.0	—	++	7.4	—	++	4.4	—
<i>E. coli</i>	0.1	++	7.2	—	+	8.0	—	+	8.2	—	++	8.2	+
<i>LAT-224</i>	2.0	+	6.2	—	++	6.8	—	++	8.2	—	+	6.6	±
<i>B. coagulans</i>	0.1	±	6.0	—	+	7.4	—	++	8.6	—	+	7.4	—
<i>IAM-1115</i>	2.0	++	5.5	—	++	6.0	—	++	6.0	—	++	5.5	—
<i>B. circulans</i>	0.1	+	6.2	—	+	6.0	—	+	7.4	—	+	8.0	±
<i>IAM-1112</i>	2.0	+	4.4	—	+	4.6	—	+	6.2	—	+	4.2	—
<i>B. cereus</i>	0.1	±	6.0	—	++	7.6	—	+	8.6	—	++	8.4	+
<i>IAM-1029</i>	2.0	+	5.5	—	+	5.0	—	++	5.0	—	+	6.0	—
<i>B. megaterium</i>	0.1	±	6.0	—	+	8.0	—	++	8.0	—	++	8.2	—
<i>LAT-138</i>	2.0	++	5.0	—	++	6.0	—	++	6.0	—	++	6.0	—
Mixed culture	0.1	+	7.4	—	+	8.4	—	++	8.6	—	++	8.6	+
	2.0	++	4.2	—	++	6.8	—	++	5.5	—	++	6.0	—

G, Growth : ±, signifies, scanty ; +, signifies, moderate.

O, Odor : —, signifies, absent ; ±, signifies, faint ; +, signifies, present.

* Monosodium glutamate.

2) 天然の含窒素物質の種類と腐敗能力 簡単な窒素化合物の多くは、腐敗反応の基質となり得ないことがわかったが、生物体を構成している天然の含窒素化合物の複合体は一般に腐敗の基質となるのか、その中でも腐敗するものと、しないものがあるのか、という点を明らかにするため、種々の物質に塩類液を添加しブドウ糖を加え、もしくは加えずに、混合菌を接種して 30°C に 14 日間放置して、pH 及び臭をしらべた。その結果は TABLE IIX の通りで、腐敗の基質となるものは、天然の複合プロテドの中でもむしろ特殊なものに限るとさえいえることが出来る。

TABLE IIX
Inhibition of Putrefaction of Some Natural Protides by Added Glucose

Material	Control		Glucose added (10%)	
	pH	Odor	pH	Odor
1. Baker's yeast, boiled	7.8	—	6.0	—
2. Fish meal, boiled	7.4	卅	4.4	—
3. Filtrate of No. 2	9.0	±	4.0	—
4. Lees of No. 3	6.0	—	4.0	—
5. Defatted, from No. 2	7.4	卅	4.2	—
6. Filtrate of No. 5	7.4	±	4.2	—
7. Ether extract of No. 2	6.0	—	4.0	—
8. White of egg	7.2	—	7.2	—
9. Yolk	8.0	卅	5.0	—

—, signifies, absent; ±, signifies, faint; +, signifies, present.

3) 変性蛋白質の腐敗能 単一物質であると、複合物質であるとを問わず、プロチドの中にはそれ自身、腐敗性のないものが少なくないことがわかったので腐敗性のあるプロチドを、非腐敗性のものに変えることは出来ないか否かをしらべる実験を行った。取り敢えず、次のような変性蛋白質を作りこれらに無機塩類0.3% 酵母エキス及び0.1% ブドウ糖を加え、混合菌を接種して30°Cに20日間放置して腐敗の様相を観察した。

精製鯨肉——シロナガス鯨の赤肉を、苛性ソーダの稀薄溶液に浸漬して、ミオシン等を抽出し、抽出液を塩酸で中和して、蛋白質を沈澱させ、水洗したもの。

ニトロカゼイン——牛乳カゼインを稀薄な苛性ソーダ溶液に溶解したものに濃硝酸を過剰に加え攪拌しつつ5分間湯煎し中和、水洗後乾燥して得た黄色物質。ケルダール窒素は8.16%に低下している。

デスアミノカゼイン——亜硝酸ソーダを過剰に含む稀薄な苛性ソーダ溶液に、牛乳カゼインをとかし、このものを2N塩酸の中に押し出して固めると共に遊離アミノ基を窒素ガスとして除去し、水洗乾燥した淡褐色物質。ケルダール窒素は11.90%。

対照1として、チヨッパーにかけたシロナガス鯨の生肉を用いた。

対照2として、牛乳カゼインを用いた。ケルダール窒素は11.60%。

カゼイン及びその誘導体は稀薄なアンモニア水に溶解して、固形物を1%含むpH6.2の溶液として用いた。

その結果はTABLE IXの通りで、蛋白質としての性質を失わずに、腐敗性蛋白質を非腐敗性のものに变化させることが可能なことがわかった。

TABLE IX
Experiments with the Putrefying Ability of Some Denatured
Protides in Comparison with Natural Protides

Material	pH	Odor	Gas ^{a)}	Xanthop. ^{b)}	Biuret ^{c)}
Denatured Protides :					
1. Wahle meat, reprecipitated ^{d)}	7.2	±	—	+	+
2. Nitrocasein	6.8	—	++	+	—
3. Desaminocasein ^{e)}	6.4	—	—	+	+
Natural Protides :					
1. Whale meat	8.6	+++	—	+	+
2. Casein	6.8	+++	—	+	+

a) Generation of a visible bubble of gas : —, signifies, absent ; b) Reaction of xanthoprotein ; c) Reaction of biuret ; d) Dissolved by dilute solution of NaOH, and precipitated by HCl ; e) Prepared by HNO₃.

5. 防腐法及び脱臭法の検討

以上断片的に判明した腐敗現象に関する知見を応用して、効果的な防腐法及び腐敗物の脱臭法について具体的に検討した。

1) 殺菌による防腐の限界 いわゆる発酵菌に腐敗作用がないこと、腐敗菌に腐敗作用があることがわかったが、腐敗菌の繁殖が腐敗のための必要条件であるか否かについては更に検討を要する。

このためアジの肉及び内臓をそれぞれ磨り潰して試験管に入れブドウ糖を 10% の割に加え、もしくは加えずトルオールが存在下に 30°C に 7 日間放置してみた。その結果は、TABLE X に示す通りである。トルオールによって殺菌された条件の下でも、内臓またはその中に介在する細菌の酵素の作用によって、腐敗に近い状態が、起り得ることがわかった。この事は動物屍体等のオートリゼは必ずしも単純な加水分解とは限らないことを意味し、細菌によらない腐敗という新しい概念を提起する。また具体的な殺菌過程は多くの場合、防腐作用を伴うが殺菌そのものは必ずしも防腐を保証しないということが出来る。

TABLE X
Effect of Added Toluene on the Putrefaction of a Fish

Material	Addition or Treatment			Odor
	Toluene	Glucose	Heat	
Viscera of a scad	+	—	—	+
	+	+ ^{a)}	—	—
	+	—	+ ^{b)}	—
	—	—	—	++
	—	+ ^{a)}	—	—
Muscle of a scad	+	—	—	—
	—	—	—	++

a) 10 per cent of the glucose added.

b) Heated for 10 min. at 100°C.

2) 糖の添加による卵黄の防腐 一般に糖の添加によってプロチドが防腐されることは本報の前の方に述べてあり、また糖蜜の添加による魚の防腐は別報²³⁾に詳しく報告されているので、ここでは卵黄の防腐について述べる。卵黄が腐敗すると墨のように黒くなり、他に例をみない程の悪臭を放つ。従って腐敗と非腐敗のインジケーターとして特別な意義をもつ。

鶏卵の卵黄にブドウ糖等を加え加熱せずに溶解し、腐敗した卵黄を少量接種して 30°C に 30 日間放置して腐敗度を調べた。その結果は TABLE XI の通りで、卵黄にブドウ糖を添加することによりいわゆる発酵食品の範疇に入らない、しかも殺菌過程を伴わない貯蔵食品を得ることがわかる。

TABLE XI
Effect of Added Glucose on the Preservation of Yolk in
Comparison with the Salting

No.	Glucose added(%)	NaCl	Odor	Germ*	Color and Taste
1.	10	0	—	—	Bright yellow, sweet
2.	5	0	—	—	Bright yellow, moderate
3.	2.5	0	—	—	Bright yellow, moderate
4.	1	0	+	+	Brown
5.	0	0	++	+	Black
6.	0	10	—	—	Bright yellow, salty
7.	0	5	±	+	Dull yellow
8.	0	2	++	+	Black
9.	5	2	—	—	Bright yellow, moderate

* —, signifies, almost germ-free; +, signifies, presence of cocci and motile rods.

3) 腐敗臭の除去 さきの実験に用いたと同じ腐敗液 2ml を試験管に取り、脱臭剤 1ml 約を加えてよく振り、管内に送風してたまっていた悪臭あるいはガスを駆逐した後、常温に 10 分間放置して残存臭を調べた。その結果は TABLE XII の通りでシアン化水銀溶液、過酸化水素、活性炭素等がやや有効であるがクロロフィリン、カゼイン誘導体等はいずれも無効であった。デアミノカゼインはアミノ基に対する親和力が強く、尿素やジアミノ酸と瞬間的に反応して不溶性物質を作る程であるが、腐敗物に対しては脱臭効果をあらわさない。これは腐敗臭の主成分がアミン類でないことの傍証と考えることが出来よう。

TABLE XII
Experiments with the Various Deodorants for the Treatment
of a Putrefied Fish Meal Mash (FMM)*

No.	Deodorant	Dosage %	Odor ⁺	No.	Deodorant	Dosage %	Odor ⁺
1.	Cu-Chlorophylline ^{a)}	1	++	9.	Lime paste	10	±
2.	Mg-Chlorophylline ^{a)}	1	++	10.	Active carbon	10	±
3.	Casein	3	++	11.	Bentonite ^{d)}	10	+
4.	Desaminocasein ^{b)}	3	++	12.	Formaline	5	++
5.	Desaminocasein ^{c)}	3	+	13.	H ₂ O ₂ (30%)	5	±
6.	Nitrocasein	3	++	14.	HgCl ₂	3	+
7.	NaOH (2N)	5	+	15.	Hg (CN) ₂	3	±
8.	HCl (2N)	5	++	16.	Pb (NO ₃) ₂	3	++

a) Na-Salt, b), c), Prepared by HNO₂ and NaOH respectively, d) Paste.
+ After treatment. * For Preparation of Putrefied FMM see TABLE VI.

考 察

1. 典型的な腐敗について

牛乳の乳酸発酵や酒の酢酸発酵或はジュース類のアルコール発酵さえも、見る人の立場によっては腐敗として扱われ、また推肥等の熟成過程も腐敗と呼ばれることがある。そこで腐敗という言葉は臭気だけの点に限って考えると或る種のチーズの匂いは多くの日本人にとって悪臭であり、味噌や鰹節の匂いを腐敗臭と感ずる欧米人が少なくない。それでは腐敗とは全く主観的な概念であって研究の対象にはなり得ないものかということそうではない。

大多数の人があらゆる果実、全ての醸造酒の匂いを芳香と感ずるように、大多数の人にとって腐敗臭と感ぜられる臭が客観的に存在する。それは第一には脊椎動物の屍臭につながる臭、第二には厨芥の分解臭につながる臭ではなかろうか。これは人類の感ずる腐敗臭の最大公約臭であって、他種の動物にとってはまた別であろうと思われる。

厨芥の臭は含水炭素等の分解によって生ずる揮発性脂肪酸の匂いを主体とするものと思われ、これは、ここで論じない事とする。屍臭につながる臭をここでは典型的な腐敗臭と考え、そのような臭を生ずる過程を典型的な腐敗と定義する。典型的な腐敗はグルシドやリピドの分解によっては起らずプロチドの分解に伴うものであることは経験上明らかである。

2. プロチドの分解に関する諸説の検討

蛋白質分解の第一歩は加水分解であって *Proteus*¹²⁾ や *Pseudomonas*⁹⁾ などのいわゆる腐敗菌の他、乳酸菌¹⁰⁾ や酵母もそれぞれ特有の蛋白分解酵素を生産することが早くから知られている。しかし、加水分解反応そのものはここに言う腐敗とは関係がない。

アミノ酸の分解反応のうち、加水分解的脱アミノ反応は糖の存在によつて抑制され^{18) 25)}、それは糖があれば力源に不自由しない為と説明されている¹¹⁾。糖の存在によって腐敗が抑制されること、この種の反応は *Proteus*¹⁾、*Clostridium*²¹⁾、*E. coli*²⁷⁾、*B. subtilis*³⁾、*Oidium*²⁾ 等に広く見出されていること等は この過程と腐敗現象との関連性を暗示しているようであるが、この過程によって生ずる物質群はアンモニアとオキシ酸であり、しかも後者は、殆んどそのまま力源として代謝されると思われ、この過程そのものが腐敗現象の主役であるとは考えにくい。

従来、莫然と腐敗の主反応とされてきたのは、アミノ酸の脱炭酸によるアミンの生成であった。*Pseudomonas*⁷⁾、*Streptococcus*⁶⁾、大腸菌¹⁹⁾、*Clostridium*²²⁾ 等による脱炭酸反応が詳しく研究されているが、結論として言えることはアミンの生成が腐敗の主反応であるならば、腐敗臭の強いもの程アミンの定量値が大きく、また腐敗臭は pH の大きさにほぼ比例し、アルカリの添加によって増大し、酸の添加によって減少しなければならない。ところが、今回の実験結果はこれらの予想と矛盾する。従って腐敗臭の主成分はアミンではなくて腐敗の主反応は脱炭酸とは考えられない。

細菌の作用によってシスチン等の含硫化合物から硫化水素¹⁹⁾ やメルカプタンを生ずる

反応が知られて居り、この種の反応が腐敗の重要な部分をなしていることは、今回の実験の結果明らかである。しかしシアン化第二水銀によってメルカプタンを除いた残渣にも明らかな異臭があり、また食用に供されるキャベツ²⁴⁾や新式醤油²⁴⁾の中にも微量のメルカプタンが含まれており、腐敗即メルカプタンの生成と決めてかかるわけにはいかない。

その他、*Clostridium* 等が糖を含まない基質から水素等のガスと共に、未知物質を生ずる反応²⁶⁾、核蛋白質の分解によるプリン系悪臭物質の生産¹⁵⁾ ¹⁶⁾等も知られて居り、これら諸反応についても検討の余地がある。

3. 腐敗の起る条件について

腐敗が起るために絶対不可欠な条件は基質の種類である。今回の実験によりアンモニウム塩や尿素は勿論グルタミン酸、卵白等も腐敗のための唯一の基質となり得ないことが判明した。典型的な腐敗の基質となるものは動物性の蛋白質に限られるようであり、しかもアルカリ、硝酸、亜硝酸等で処理して、動物性蛋白質の腐敗性を破壊することができる。

このような点から、腐敗に必要な基質的条件の一つとして、いわば“APF” (Animal Putrefaction Factor) のようなものの存在を仮定することができる。これは無論 Animal Protein Factor とは一致しないであろうが Animal Protein に特有の成分である公算が大きい。酵母菌体が単独では典型的な腐敗を起さない点から考えるとビタミン、アミノ酸、核酸等が豊富にそろっていても腐敗にとっては充分条件とならない。また TABLE IIX の実験の例から APF の Co-factor のようなものが存在する可能性もある。APF が特殊な硫黄化合物、あるいは硫黄化合物の一定の結合体のようなものであるか、それとも強力な腐敗菌に対する必須栄養素に過ぎないか、このような点は未だ不詳である。削りぶしの煮たものが腐敗することから、APF は殺菌操作を伴う実験に差支えない程度の耐熱性を持っているらしいので、更らに実験的に追求することができよう。

APF が存在しても、糖が多量に共存すると腐敗が進行しない。卵黄の場合などは、加えた糖が殆んど変化して居らず、乳酸菌も、どんな菌も生育していない状態で、糖が防腐効果を現している。この一例からも、糖の防腐作用は糖から生じた酸の殺菌作用のためだというような皮相な解釈、或は糖があれば力源に不自由しないので、脱アミノ過程が不要になるというような¹¹⁾ 目的論的な説明は首肯し難い。糖の防腐作用については今回の研究の結果、その一般性が確認された段階であって、生化学的機作は、APF の実体及びその動態が解明された後に、はじめて明らかにされるであろう。

最後に菌であるが、ペプトンを用いた予備実験によって乳酸菌やアルコール酵母は腐敗をおこさないことがわかった。しかし如何なる菌、或は酵素群がどんな条件の下で典型的な腐敗の agent としての面をあらわすかという点は APF に富む滅菌可能な基質を用いた詳しい実験を経なければ解決できない。

4. 防腐について

防腐と殺菌は昔から殆んど同義のように使われて来たし、殺菌手段の発達、普及に伴い益々その傾向がはっきりして来た。ところが今回の実験の結果、真の典型的な腐敗は極め

て限られた条件の下で起る特殊な現象に格下げされたので、熱や放射線や薬品による“Genocide”的な殺菌に頼らず、在来の発酵食品のマネリズムからも脱却した、新しい生化学的防腐法への道が大きく拓かれた。

直に実用に供し得るものとしては、既報²⁵⁾の糖蜜添加による動物蛋白飼料、本報に挙げた卵黄製品等があるが、糖を加えないでも腐敗しない変性蛋白質の製造も、実験段階としては成功して居り、腐敗現象の本体がはっきりすれば、更らにいろいろな可能性が生まれよう。

5. 腐敗度測定手段について

VRS 法、アミン定量法、鏡検法等、既知の腐敗度測定手段は、元来、生鮮食品の腐敗の極く初期の段階を対象として考え出されたものである。今回の実験の結果、腐敗が進んだ段階や発酵食品などを扱う場合、既知の手段は感能試験と著しく矛盾することがわかった。このような微生物が激しく作用した対象は既知の手段にもとずく腐敗度の目盛を振り切ってしまった所を出発点として、それから先、腐敗の方向へ、どれだけ進んでいるかという事を明確に指し示すような尺度で扱わなければならない。この条件を充たすような尺度は、未だ確立して居らず、今後、開発せねばならない問題である。魚介獣肉等の生鮮食品を対象とする限り、このように、腐敗の進んだ状態をしらべる必要は無かったといえるが、腐敗の本質を究明し、更らに新しい防腐法を開拓して行くためには、どうしても広い範囲に亘って感能試験の結果と矛盾しない腐敗度測定手段の確立が必要になる。

要 約

実験の結果、次のような条件の下では典型的な腐敗が起きないことがわかった。

- 1) プロチドの量にくらべて、ある程度以上の量の易発酵性糖類が共存するとき。
- 2) 腐敗能力ある微生物、更らに正確には酵素群が存在しないとき。
- 3) プロチドの種類が適当な条件を充たしていないとき。例えばグルタミン酸、尿素、酵母菌体、特別なカゼイン誘導体等がプロチドの主要な給源をなしているとき。

以上と逆の場合、即ち強い変性を受けない動物蛋白質と腐敗菌が存在し、多量の糖が共存しなければ典型的な腐敗がおこり得る。

典型的な腐敗の度合はアミンの生成量や、いわゆる VRS (Volatile Reducing Substances) 値とは全く平行せず、酸性でエーテルに転溶するフラクションに腐敗臭の主要部分があり、その一部はメルカプタンらしい。

以上の実験結果にもとづいて腐敗現象の本質、殺菌によらない新しい防腐法等について論じた。

終に臨み、実験に当り有益な示唆を賜った多田靖次教授、いろいろと便宜を賜った小原教授はじめ、本学発酵生産学科の諸賢、菌株を分譲して下さいた東大応微研の飯塚広助教授、実験の一部を担当した小池弘子嬢、協力を賜った栗田馨、牧野毅阿氏に深謝します。

文 献

- 1) ARAI, M. : Über den bakteriellen Abbau des *l*-Leucins. *Biochem. Z.*, **122**, 251 (1921)
- 2) BARKER, H.A. : The fermentation of glutamic acid. *Enzymologia*, **2**, 175 (1937)
- 3) BERTHELOT, A. et D.M. BERTRAND : Sur quelques du "Bacillus aminophilus intestinalis". *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **154**, 182 (1912)
- 4) DATEO, G.P. et al. : Identification of the volatile sulfur components of cooked cabbage and the nature of the precursors in the fresh vegetable. *Food Research*, **22**, 440, (1957)
- 5) EHRLICH, F. und K.A. JACOBSON : Über die Umwandlung von Aminosäuren in Oxysäuren durch Schimmelpilze. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, **44**, 888 (1911)
- 6) EMMERLING, O. : Die Zersetzung von Fibrin durch Streptokokken. *Ibid.* **30**, 1863 (1897)
- 7) EMMERLING, O. und O. REISER : Zur Kenntnis Eiweiss-Spaltender Bakterien. *Ibid.*, **35**, 700 (1902)
- 8) FARBER, F. : *Food Tech.*, **3**, 9 (1949)
- 9) GORBACH, G. : Zur Kenntnis der Bakterienproteasen. *Arch. Mikrobiol.* **1**, 537 (1930)
- 10) GORINI, C., W. GRASSMANN und H. SCHLEICH : Über die Proteasen der "Acidoproteolyten". *Z. physiol. Chem.*, **205**, 133 (1932)
- 11) KENDALL, A. : The significance of the quantitative measurement of the nitrogenous metabolism of bacteria. *J. Inf. Dis.*, **30**, 211 (1922)
- 12) KENDALL, A. and H.R. KEITH : Nature of the soluble proteolytic enzyme of *Bacillus proteus*. *Ibid.*, **28**, 193 (1926)
- 13) KONDO, M. : Über die Bildung des Mercaptans aus *l*-Cystin durch Bakterien. *Biochem. Z.* **136**, 198 (1923)
- 14) LANG, O.W., L. FARBER and F. YERMAN : The "Stickometer"-new tool for measuring volatile odors. *Food Ind.*, **17**, 116 (1945)
- 15) LUTWAK-MANN, C. : The decomposition of compounds by bacteria. *Biochem. J.*, **30**, 1405 (1936)
- 16) MESROBEANU, L. : Contribution à l'étude des corps puriques de la cellule bacterienne. *Arch. Roumaines Path., Exp. et Microbiol.* **9**, 121 (1936)
- 17) 内藤正一 : 揮発性還元物質による匂いの判定法について, 農産加工技術研究会誌 **3**, 92 (1956)
- 18) RAISTRICH, H. and A.B. CLARK : Studies on the cycloclastic powers of bac-

- teria. Part II. A quantitative study on the anaerobic decomposition of tryptophan and tyrosine by bacteria. *Biochem. J.*, **15**, 76 (1921)
- 19) SASAKI, T. und J. OTSUKA : Experimentelle Untersuchungen Über die Schwefelwasserstoff-entwicklung der Bakterien aus Cystin und sonstigen Schwefelverbindungen. *Biochem. Z.*, **39**, 208 (1912)
- 20) SASAKI, T. : Über die biochemische Umwandlung primärer Eiweiss-spaltprodukte durch Bakterien. I. Das Verhalten von Tyrosin gegen *Bact. coli* commune-Eine einfache biochemische Darstellungsmethode von p-oxy-phenylethylamin. *Ibid.*, **59**, 429 (1914)
- 21) SCHMIDT, E. G., W. PETERSON and E. B. FRED : The fermentation of *L*-leucic acid in the acetone-butylalcohol fermentation. *J. Biol. Chem.*, **61**, 163 (1924)
- 22) STICKLAND, L. H. : Studies on the metabolism of the strict anaerobes (Genus *Clostridium*). *Biochem. J.*, **29**, 288 (1935)
- 23) 多田靖次, 中山大樹 : 発酵法による魚介類廃棄物の飼料化, 農産加工技術研究会誌 **1**, 3 ; 132 (1954)
- 24) 上野喬宏, 延原昭男 : 新式醤油に関する研究 (第4報) 揮発性硫黄化合物の分離確認, 日農化 **34**, 7 ; 566 (1960)
- 25) WOHLGEMUTH, J. : Über die Herkunft der Schwefelhaltigen stoffwechselprodukte in tierischen Organisms. *Z. Physiol. Chem.*, **43**, 469 (1904)
- 26) WOODS, D. D. and C. E. CLIFTON : Studies on the metabolism of strict anaerobes (Genus *Clostridium*). VI. Hydrogen production and amino acid utilization by *Clostridium tetanomorphum*. *Biochem. J.*, **31**, 1774 (1937)
- 27) WOOLF, B. : Some enzymes in *B. coli communis* which act on fumaric acid. *Ibid.*, **23**, 472 (1929)