

## 魚類の腐敗検定法に関する研究(3)

### ヌクレオチドの変化による検定について

宮崎由紀子\* 坂田由紀子\*\*  
太田馨\*\*\*

Studies on the Determinate method for the Grade  
of Putrefaction of Fish. Part 3.

On the Determination by the Decomposition of Nucleotide.

Yukiko Miyazaki, Yukiko Sakata,  
Kaoru Ohta

#### 1. ま え が き

著者等は魚類の腐敗度を検定するに当り、従来から行なわれていない新しい方法、あるいは、より正確な方法を見出そうと種々検討を行なっている。

魚類の腐敗度を判定するには種々の方法があるが、魚肉の腐敗による分解生成物を測定する方法、例えばアンモニア<sup>①</sup>、アミノ酸<sup>②</sup>、トリメチルアミン<sup>③</sup>、硫化水素<sup>④</sup>、インドール等を定量する方法がよく行なわれるが、これらの結果より腐敗初期を判定することは、研究者により、また魚種等により多少異っている。

魚類の腐敗は細菌による分解作用の外、同時に、あるいは細菌の作用に先立って酵素作用による自己消化がおこり、自己消化のため種々の変化が進行する。これらの変化のうちにはヌクレオチドの著しい変化も見られる。齊藤らはヌクレオチドの分解により生ずるヒポキサンチンを定量し、鮮度検定の指標として適していると報告している。著者等はヌクレオチドの変化により、魚肉中に残存する成分、あるいは分解により生ずる成分を定量し、腐敗度検定を行なうことが可能であるかどうかについて実験を試みた。その結果、魚肉中に残存するヌクレオチドの DNA, RNA量、および分解により生成する Guanine 量を定量することにより、腐敗度を判定しうる可能性のあることを認めたので報告する。

#### II. 実 験 の 部

##### II. 1. 供試材料

海産魚類を死直後の最も新鮮な状態で入手することは困難であるため、供試魚類として、フナをえらん

だ。体長約15cm、体重約120gのフナの頭部を強打して死亡させしめ、そのまま30°Cの恒温器中に保存して鮮度を低下せしめ、一定時間後に取り出して背肉の自身の部分をそれぞれの実験に供した。

##### II. 2. 実験方法

II. 2. 1. 揮発性塩基態窒素の定量魚類の腐敗度を検定するため従来から行なわれている方法のうち、揮発性塩基態窒素を定量する法を本実験の比較対照としてえらび、常法によりこれを行なった。

II. 2. 2. 核酸の抽出、分画核酸の抽出、分画には種々の方法があるが著者等はSchmidt, Tannhauser, Schneider法(S. T. S法)により行なった。

##### 酸可溶性燐物質の除去

供試フナ肉5gをとり、水15mlを加え、Potter-Elvehjem ホモゲナイザーにて氷冷しながらホモジネートを作り、このホモジネート5mlに冷10%トリクロール酢酸(TCA)12.5mlを混合してよくかきまぜ遠心する。沈澱はもう一度12.5mlの冷10%TCAに懸濁して遠心し、このTCA抽出液と洗液とを合せて酸可溶性燐物質分画とし、沈澱は次の操作を行なう。

##### 燐脂質の除去

前項の10%TCAでおとした沈澱を5mlの水に懸濁し、冷95%エタノール20mlを加えてよくまぜて遠心する。沈澱はもう一度5mlのエタノールで洗い、沈澱をエタノール:クロロホルム=3:1の混液25mlで2回、エタノール:エーテル=3:1の混液25mlで1回それぞれ室温でしばらくかきまぜた後遠心する。最後にエーテルで洗い、沈澱を室温で乾燥する。これらの抽出液、洗液を合せて燐脂質分画とし、沈澱につき次の操作を行なう。

\*\*\*本学教授    \*\*本学助手    \*昭和40年度卒業生

RNA分画

前項で得た沈澱に0.3N水酸化カリウム液50mlを加え、37°Cで20時間水解する。水解後濃過塩素酸で中和し、更に濃過塩素酸を加えて過塩素酸について5%とすると、蛋白質、DNA、過塩素酸カリウムの沈澱が得られる。遠心して沈澱は25mlの冷5%過塩素酸で2回洗う。この過塩素酸抽出液と洗液とを合せ65mlとしRNA分画とする。

DNA分画

前項で得た沈澱を5%過塩素酸5mlに懸濁させ、90°Cで15分間加熱し冷却後遠心する。沈澱はもう一度5%過塩素酸12.5mlで洗い、抽出液と洗液とを合せてDNA分画とする。

I. I. III. RNA, DNAの定量法

RNAの定量はオルシノール反応法を用いた。鉄アンモニウム硫酸1.35gとオルシン2.0gを50mlの蒸留水にとかし、冷所に保存する。使用直前に保存液2.5mlを濃塩酸41.5mlにとかし、水で50mlにうすめる。本液3mlをRNA検液1mlに加え、沸騰水浴中で20分間加熱する。冷後エルマ分光光度計で665mμの吸光度を測定し、対照として溶媒を同様に処理したものをを用い、純RNAからの標準曲線よりRNA量を求めた。

DNAの定量はインドール反応法を用いた。DNA検液1mlに、0.04%インドール溶液1mlと濃塩酸1mlを加えてよくまぜる。沸騰水浴中で10分間加熱後流水中で冷却し、クロロホルム4mlを加え1分間よく振りまぜ、軽く遠心して2層に分け、クロロホルム層を駒込ピペットで除く。この操作を3回くり返し、桃色に着色する不純物を完全に抽出除去する。得た検液をエルマ分光光度計にて490mμの吸光度を測定する対照として試料溶液の溶媒を同様に処理したものをを用う。純DNAからの標準曲線よりDNA量を求めた。

I. I. IV. 有機塩基の分離

有機塩基の分離をペーパークロマトグラフィーにより行なった。供試フナ肉5gをとり、水15mlを加えてホモジネートを作り、10%TCA 25mlを混じてよくまぜた後遠心し、沈澱をもう一度10%TCA 25mlで洗い、抽出液と洗液とを合せ、これを2mlに濃縮する。その0.02mlを検液とした。

東洋沓紙No. 50, 展開液メタノール:濃塩酸:水(70:20:10)を用い、一次元上昇法によった。展開後沓紙を風乾し、紫外線照射によりスポットを検出した。有機塩基のうち Adenie, Guanine, Uracil, Cytocine につき同時対照試験を行なった。

スポットの部分の部分を細く刻み、共栓付試験管に入れ、

0.1N塩酸5mlを加えて37°Cで軽く振り抽出する。抽出液を沓過し、沓液の紫外外部吸収曲線を島津自記光電分光計により測定し、検液の塩基の種類を決めた。

I. I. V. 有機塩基の定量

前項と同様にしてスポットからの抽出を行ない、248mμの吸光度を測定した。ブランクとして検液の代わりに検液の溶媒のみをつけて展開し、スポットに相当する位置を切りとり、同様に処理したものについて測定した。

I. III. 実験結果

I. III. I. 揮発性塩基態窒素を定量した結果をフナ肉100g中のmg数で示し、これを図示すると図1のごとくである。

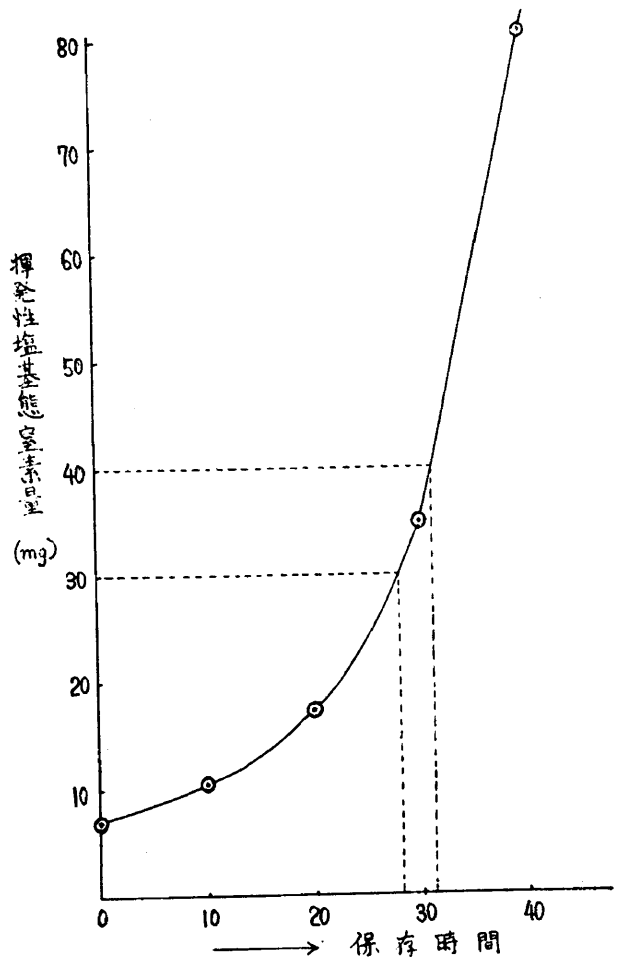


図1. 鮮度低下と揮発性塩基態窒素 (30°C保存, フナ肉100g中)

I. III. II. オルシノール反応法によるRNA標準曲線およびRNAを定量した結果をフナ肉100g中の量で示すと図2および図3の通りである。

I. III. III. インドール反応法によるDNA標準曲線およびDNA定量結果を図示すれば図5および図4のごとくである。

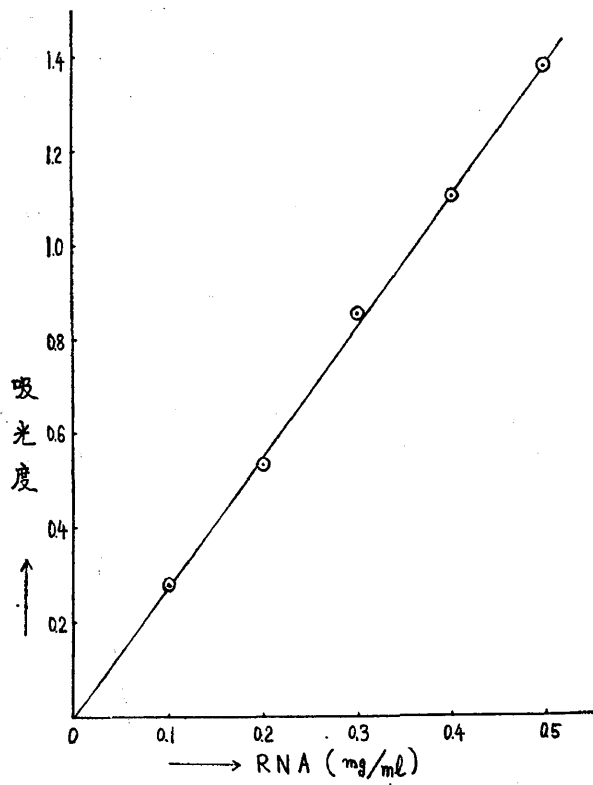


図2. RNA標準曲線(オルシノール反応法)

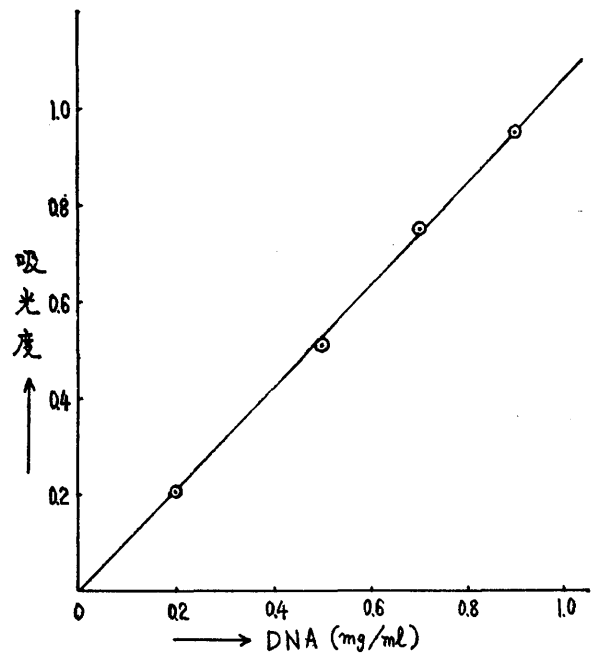


図4. DNA標準曲線(インドール反応法)

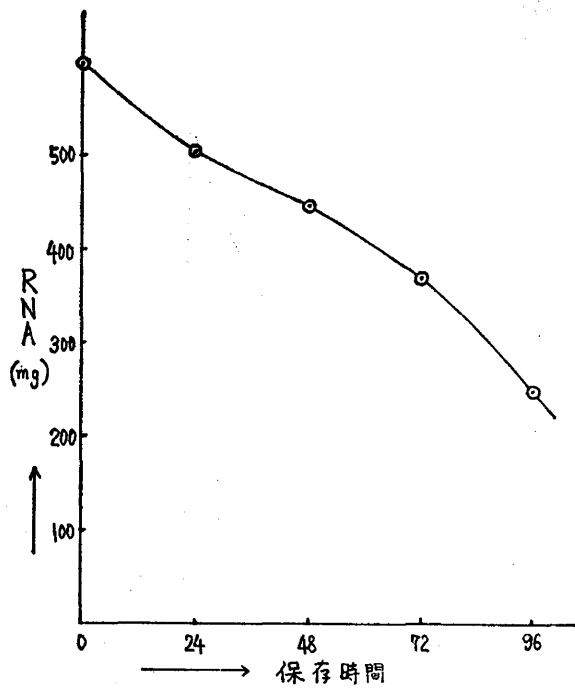


図3. 鮮度低下とRNA量(30°C保存, フナ肉100g中)

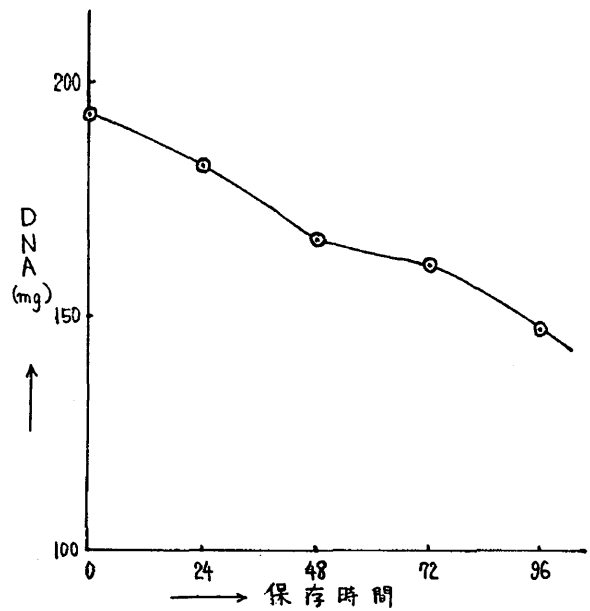


図5. 鮮度低下とDNA量(30°C保存, フナ肉100g中)

Ⅱ.Ⅲ.Ⅳ ペーパークロマトグラフィーにより分離した塩基の紫外外部吸収曲線は図6のようであり、検出された塩基はGuanineと一致する。Guanineの標準曲線は図7のごとくであり、Guanineを定量した結果は図8の通りである。

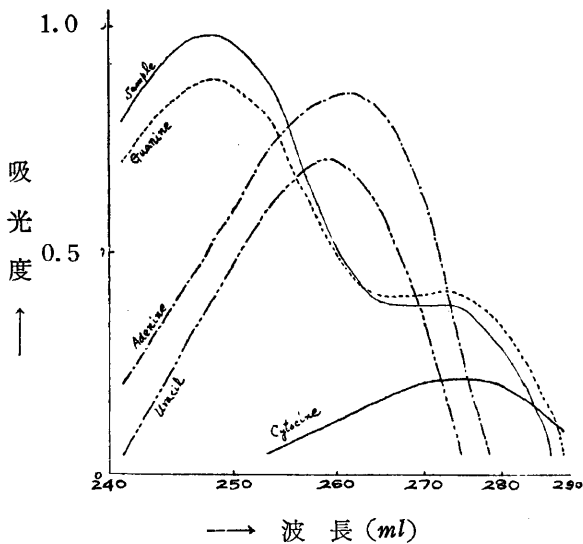


図6 有機塩基の紫外外部吸収曲線

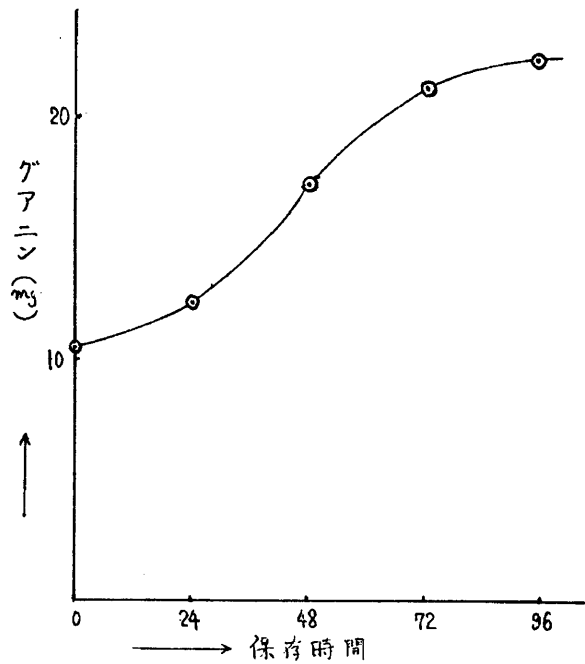


図8 鮮度低下とGuanine量 (30°C保存, フナ肉100g中)

### Ⅲ. 考 察

一般に魚類の鮮度と揮発性塩基態窒素との間には表1のような関係がある。

表1. 魚肉の鮮度と揮発性塩基態窒素

魚肉の鮮度	魚肉 100g中の揮発性塩基態窒素
極めて新鮮な魚肉	5~10mg
普通の新鮮な魚肉	15~25mg
腐敗初期の魚肉	30~40mg
腐敗した魚肉	50mg以上

表1により、腐敗初期の魚肉100g中には30~40mgの揮発性塩基態窒素を含むが、本実験条件において、図1から30~40mgの揮発性塩基態窒素の生成する時期は約28~31時間後であり、28~31時間をもって本実験における腐敗初期の時期とした。

図3により、フナ肉中のRNA量は鮮度の低下と共に次第に減少し、本実験における腐敗初期である28~31時間後には、RNA量はフナ肉100g中493mg~486mgとなり、本量をもって腐敗初期と判定する一指標とすることができる。

図5により、フナ肉中のDNA量も鮮度の低下と共に次第に減少し、28~31時間後には、フナ肉100g中にDNA量179.8~177.6mgに達し、この量をもって腐敗初期と見なすことができる。

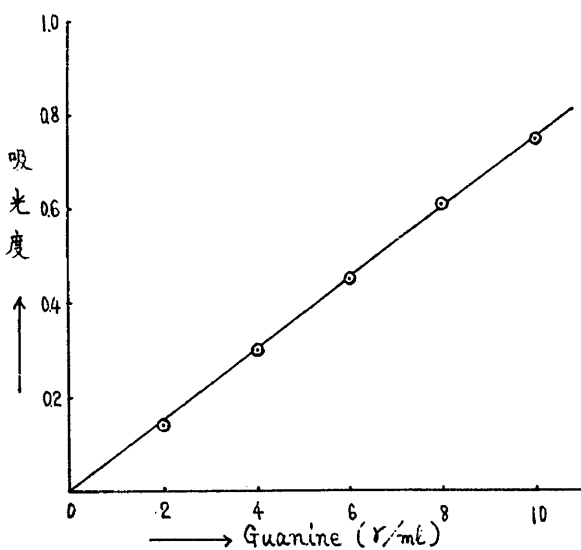


図7. Guanine 標準曲線

フナ肉のトリクロール酢酸抽出液中に、有機塩基としてポリン塩基のうちGuanineを検出し、その量は図8のごとく、鮮度が低下するにしたがい増加する。本実験における腐敗初期である28~31時間後には、フナ肉100gから13.0~13.5mgに達し、本量をもって腐敗初期判定の一指標とすることができる。

本結果はいずれも数回測定した平均値であるが、他の魚種については目下検討中である。

以上要するに魚肉中の核酸構成成分のRNA, DNA量および核酸構成成分の分解により遊離するGuanine量を定量して、魚肉の鮮度を判定することが可能であると思われる。

#### IV. 要 約

ヌクレオチドの変化により、フナ肉の腐敗度を判定する実験を行なった結果、肉中に残存するヌクレオチドを構成するRNA, DNA量および遊離し抽出されるGuanine量を測定することにより、腐敗度を知ることが可能であると思われる。

以上の結果を表一にすれば表2のごとくである。

表2 フナ肉の鮮度とヌクレオチド成分

成 分	腐敗初期における量 mg/100g
揮発性塩基態窒素	30 ~ 40
RNA	493 ~ 486
DNA	179.8~177.6
Guanine	13.0~ 13.7

#### 文 献

- 1) 野中順三九, 他:水産食品学, 75 (昭40)
- 2) Lücke U. Gedel : Z. Unters. Lebens., **70**, 441 (1935)
- 3) B. T. Cromwell: Biochem. J., **46**, 578 (1950)
- 4) 足立晃太郎, 田中千代子:本誌, **5**, 38 (1958)
- 5) Official methods of analysis of A. O. A. C. **7th**. Ed. 302 (1950)
- 6) Saito, T. et al:日水誌, **24**, 749 (1959)
- 7) 京大農化:農芸化学実験書, **3**, 1117 (昭32)
- 8) Schneider, W. C.; T. Biol. Chem., **164**, 747 (1946)
- 9) Brown, A. H.: Arch, Biochem., **11**, 269 (1946)
- 10) Mejbaur, W.; Z. Physiol, Chemy, **258**, 117 (1939)
- 11) Ceriotti, G. : J. Biol. Chem., **198**, 297 (1952) : **214**, 59 (1955)
- 12) 日本化学会:実験化学講座, **23**, 306 (昭32)