2) 重曹アルカリ性 KMnO_4 溶液を発色剤として, Phytonein のペーパークロマトグラフィが種類の展開剤で得られた。

4) Phytonein は $285\text{ m}\mu$ に強い極大吸収をもち, その部分では吸光度と濃度 ($5\sim 50\text{ }\gamma/\text{cc}$) との検量線は LAMBERT-BEER の法則に従った。

4) 本菌を RICHARDS 培地で 28° で培養すると, 25 日目前後の濾液が西瓜に対して毒性が最も強く, その後減退していったが, この関係は濾液中における $285\text{ m}\mu$ の吸収能の消長からも肯定され, 濾液の毒性が Phytonein に基くことが更に確証された。

5) 蔓割病罹病組織内からも Phytonein が検出されたので本毒素は vivo-toxin と認め得る。

元素分析は京都大学農学部三井研究室の方方を煩わしたもので発表に当り深甚な謝意を表する。本研究の一部は昭和 30 年 4 月の日本植物病理学会で講演した。

(1) N. CLAUSON-KAAS, P. A. PLATTNER, E. GÄUMANN : <i>B. Schweiz. Bot. Ges.</i> , 54, 523 (1944).	(12) D. W. WOOLLEY, R. B. PRINGLE, A. C. BRAUN <i>J. Biol. Chem.</i> , 197, 409 (1952).
(2) P. A. PLATTNER, N. CLAUSON-KAAS <i>Helv. Chim. Acta</i> , 28, 188 (1944).	(13) F. T. WOLF : <i>Phytopath.</i> , 43, 294 (1953).
(3) D. W. WOOLLEY : <i>J. Biol. Chem.</i> , 176, 1291 (1948).	(14) K. TAMARI, J. KAJI : <i>Bull. Fac. Agr. Niigata Univ.</i> , 4, 41 (1953).
(4) D. W. WOOLLEY : <i>ibid.</i> , 176, 1299 (1948).	(15) I. G. WHITE, F. T. WOLF <i>Phytopath.</i> , 44, 334 (1954).
(5) E. GÄUMANN, S. NAEF-ROTH, H. KOBEL : <i>Phytopath. Z.</i> , 20, 1 (1952).	(16) I. G. WHITE : <i>Amer. J. Bot.</i> , 42, 757 (1955).
(6) E. GÄUMANN, S. NAEF-ROTH, H. KOBEL <i>C. R. Acad. Sci., Paris</i> , 234, 173 (1952).	(17) H. H. LUKE, H. E. WHEELER : <i>Phytopath.</i> , 45, 453 (1955).
(7) E. GÄUMANN, C. STOLL, H. KERN <i>Phytopath. Z.</i> , 20, 345 (1953).	(18) C. A. BRAUN <i>ibid.</i> , 45, 659 (1955).
(8) S. S. GOTHOSKAR, R. P. SCHEFFER : <i>Phytopath.</i> , 43, 472 (1953).	(19) A. E. DIMOND, P. E. WAGGONER : <i>ibid.</i> , 43, 195 (1953).
(9) 広江 勇, 西村正暘 <i>日植病報</i> , 20, 161 (1956).	(20) R. P. SCHEFFER, J. C. WALKER <i>ibid.</i> , 43, 116 (1953).
(10) C. A. THOMAS : <i>Phytopath.</i> , 39, 572 (1949).	(21) A. E. DIMOND, P. E. WAGGONER : <i>ibid.</i> , 43, 229 (1953).
(11) F. KOBEL : <i>Phytopath. Z.</i> , 18, 157 (1951).	(22) 西村正暘 : 未発表.
	(23) 広江 勇, 西村正暘 : <i>日植病関西部会で発表</i> (1955).

魚体組織の腐敗生産物に関する研究 (第 1 報)*

DYER 法によるトリメチルアミンの定量を阻害する濁濁現象について

斎藤 要, 鮫島宗雄 (鹿児島大学水産学部)

昭和 31 年 4 月 21 日 受理

緒 言

海産魚は一般にトリメチルアミンオキシサイド (TMAO と略) 排泄性であるが, 死後魚体より特徴的な臭気を発するのは, 主として組織中の TMAO に腐敗菌が作用しトリメチルアミン (TMA と略) を生ずるためと考えられている⁽¹⁾. かように TMA は魚体の代表的な腐敗生産物である事より魚肉の変敗を判定する方法としてその定量が適当と考えられ, 従来は主として蒸溜法により定量されていた. その後比色定量法として DYER 法⁽²⁾, CROMWELL 法⁽³⁾等が発表され両法について佐々木等⁽⁴⁾が詳細な検討と改良を加えており, 最近では DYER 法によ

* Studies on the Putrefactive Products of Fishes Tissues. Part I. On the Turbid Phenomena in Colorimetric Determination of Trimethylamine by DYER's Method.

By Kaname SAITŌ, Muneo SAMESHIMA (Faculty of Fisheries, University of Kagoshima)

る TMA の定量が一般に行われているようである。著者等も同法による魚組織の腐敗過程における TMA 量の変化を検討した際、或る腐敗条件下では発色操作の段階で比色液に螢光を帯びたかの如き濁濁現象が現れ、測定が不可能となる事をしばしば経験した。この原因は実験法特に脱水操作の不備或は試薬の不純にあるのではないかと思ひ十分検討したが、これらが原因ではなく、主として腐敗菌の作用により試料中に生じた或る種の塩基（カダベリン、第 2 報参照）に起因する現象である事を確め得た。本報では DYER 法による TMA の定量が濁濁現象により著しく制約される場合のある事、並にその発生条件と除去法等につき検討した結果を報告する。

実 験 の 部

実験材料：市販の新鮮なゴマサバ (*Scomber tapeinocephalus*)、ツノザメ (*Squalus mitsukurii*)、キハダマダロ (*Neothunus macropterus*)、バンショウカジキ (*Istiophorus orientalis*)、イトヨリ (*Euthyoteroma virgatum*) 及びカマス (*sphyræna* sp.) 等の各組織を用いた。

試料の調製及び測定法：生鮮組織を肉挽器にかけそのまま或は 5 倍量の水を加えて 25° に所定時間放置し、各組織の 10 倍抽出除蛋白液を供試液として DYER の比色定量法に準じて発色度と濁濁度の測定を行つた。濁濁度は光電光度計（日立製 EPO-A 型）により測定し、液層の厚さ 10 mm、フィルターは主として 670 m μ のものを用いた場合の吸光度 $-\log T$ で表した。従つてその数値は光度計の性能によつて異なる相対値である。なお試料の pH はガラス電極 pH メーター（東洋理化学工業製 G-A 型）で測定した。

1. 比色操作中における濁濁度の時間的変化 濁濁現象は DYER 法における発色操作、即ち試料のトルエン抽出層にピクリン酸溶液を添加した直後に現れ始めるが、更に長時間放置すると肉眼的にも黄色不定形の沈澱析出が認められる。しかし短時間の観察では第 1 図に示すように、試料の種類並びに濁濁度の強弱にかかわらずその時間的変化はほぼ同様の傾向を示し、添加後 5~7 分位で一時的な平衡状態を保つ。そこで被検液の黄色に

影響されない主波長 670 m μ のフィルターを使用し、ピクリン酸溶液を添加してから 5 分後の吸光値を以て濁濁度を表わす事にした。

2. 試料の鮮度と濁濁出現との関係：新鮮な各組織或は防腐剤添加の条件で放置した組織では濁濁現象は殆ど認められない事より、濁濁は腐敗に伴う現象と一応考えられる。次にツノザメの水浸組織を所定条件に放置した場合の揮発性塩基及びアンモニア量の時間的変化と濁濁発現の有無を検討した結果の 1 例は第 1 表の如くである。即ち濁濁は一般に腐敗が進行すれば出現する傾向にある事は、他の魚種の場合にも同様に認められる事実であるが、腐敗度と濁濁生成との間には一定の関係はないようである。例えばサメ肉では他の組織が既に濁濁を生ずる以上に腐敗が進行しても濁濁は殆ど認められないのである。

3. 各組織及び魚種別による濁濁の変化 濁濁度及びその出現期は同一魚体にあつても各組織によつて異なるが、ゴマサバ及びツノザメの水浸組織を所定条件に放置した場合の濁濁度の変化は、各第 2 図及び第 3 図の通りである。ゴマサバ、ツノザメ両者の脾臓、肝臓、腎臓及びゴマサバの幽門垂は、他の組織より早く且つ強く濁濁が現れるが減少に移る傾向も早い。これに対してツノザメの肉、心臓及び脳は殆ど濁濁しない。又ゴマサバの普通肉及び血合肉では前記の臓器に比し濁濁は徐々に出現しその消失

第 1 図 比色操作中における濁濁度の時間的変化

第 1 表 ツノザメ組織の鮮度と濁濁生成の有無

	放置時間	揮発性塩基-N (mg %)	アンモニア-N (mg %)	濁濁生成
腎臓	0	8.52	3.28	—
	6	14.38	6.56	—
	12	45.64	17.38	—
	24	327.49	223.90	+
	48	882.31	680.60	+
脾臓	0	19.00	7.11	—
	6	25.07	9.62	—
	12	51.78	26.10	+
	24	295.50	187.10	+
	48	899.72	738.42	+
筋肉	0	11.36	2.76	—
	6	20.95	6.49	—
	12	29.30	4.09	—
	24	287.71	72.57	—
	48	1079.80	688.80	—

揮発性塩基：通気法(6)

アンモニア-N：NESSLER 試薬による比色法(7)

第 2 図 ゴマサバ各組織の放置時間による濁濁度の変化

第 3 図 ツノザメ各組織の放置時間による濁濁度の変化

第 4 図 ゴマサバ肉の処理条件による濁濁度の変化
(図中の数値は試料の pH) 第 5 図 試料の pH による濁濁度の変化
(ゴマサバ肉, 図中の数値は試料の pH)

期も更に遅れるようである。ツノザメの脳では濁濁は認められなかつたが、DYER はレシチン類が濁濁生成物質となり得る事を指摘⁽²⁾しているが、この脳に含まれるリピッド態は 250 mg % (生鮮物) であつた。従つて組織中のレシチン類もこの程度の含量では、本操作における濁濁の原因とはなり得ないと考えられる。ツノザメとゴマサバの各組織の濁濁度を全体的に見ると後者の方がかなり強い。又濁濁度を魚肉のみについて魚種別に観察した所、キハダマグロ、バショウカジキはゴマサバと同程度に強く現れたが、マアジではやや弱くイトヨリ、カマスでは極く僅かに認められたに過ぎず、一般には所謂赤身の魚に強く白身の魚に弱い傾向があり、しかもその濁濁度はいずれの場合でも腐敗過程において消長のある事が認められた。

4. 試料の処理別による濁濁度の変化 次に同一試料について前処理を変えた場合の濁濁度の変化を検討した。第 4 図はゴマサバのミンチ肉及び圧搾器によるその搾汁と残渣並に水浸ミンチ肉を所定条件に放置し、濁濁度の変化を同一条件で求めた結果である。即ち水分に富む搾汁及び水浸肉は顕著に濁濁が認められるのに対し、ミンチ肉及び圧搾残渣には殆ど認められなかつた。この事は魚肉を未処理の状態に放置した場合には DYER 法による TMA の定量が濁濁現象により阻害される程度の少い事を意味している。ここで興味を感じる事は放置試料の pH 変化と濁濁との関係である。図に各試料の 5 倍浸出液の pH を所定時間毎に測定した結果を併記したが、ミンチ肉のまま放置した試料は水浸試料に比し早く pH が上昇する傾向がある。この事実より濁濁の出現には両者の腐敗条件の相異、特に試料の pH が濁濁の生成に重要な関係を持つものと考え次のような実験を行った。

5. 試料液の pH と濁濁度との関係 ゴマサバのミンチ肉に pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 の磷酸緩衝液を各加えて所定条件に放置し濁濁度の変化を検討した。試料の pH は魚肉の緩衝作用により一定に保つ事は出来なかつたが、その関係は第 5 図の如くである。即ち一般に試料液の pH が 6.0~7.5 の範囲では pH 値の高い程濁濁度は小さく、更に pH が 8 以上では濁濁が認められなかつた。又別に試料液にグルコース

第 6 図 ゴマサバ肉に尿素を添加した場合の濁濁度の変化
(図中の数値は試料の pH)

く又同時に測定した pH 値は添加量の大きな程高い値を示した。次に第 5 図と第 6 図の結果を比較すれば、同程度の pH 条件で腐敗した試料では尿素添加の有無にかかわらずほぼ同程度の濁濁を示す傾向が認められた。GALE⁽⁵⁾ は一般にアミノ酸を脱炭酸してアミンを生成する酵素は微生物が酸性環境に適応した時に形成され、この酵素の作用 pH 域も相当酸性側にあると発表しているが、このアミン生成の pH 条件は本実験の濁濁生成条件と類似している事より、この濁濁は腐敗により生成する或る種のアミンに由来するのではないかと推察される。

6. 濁濁物質の除去法に関する検討 DYER 法による TMA 定量は前述の結果より考え著しく制約される場合のある事は明らかである。従つて原液の TMA に影響を及ぼさぬ簡単な濁濁物質の除去法の確立が望ましい事になるが、次にこの問題について検討した。先ず濁濁を示す原液を揮発性塩基定量法⁽⁶⁾の条件で通気した場合、濁濁物質は溜出せず残留区分に残る事がわかつた。しかし通気処理後溜出区分を DYER 法で測定する事は蒸溜法より操作が繁雑になる点に問題がある。

次に試料液の吸着剤処理による除去を試みた結果、濁濁物質はアルミナ（和光クロマトグラフ用）及び酸性白土（林製）には殆ど吸着されないが活性炭（和光特撰）には吸着される。しかし完全に吸着させる量を用いる時は TMA 自体も少量ではあるが吸着される欠点がある。更に有機塩基沈澱剤による除去を試みた結果、濁濁物質は硝酸銀及び磷タングステン酸等でも或る程度除去し得たが酢酸第二水銀によれば原液中の TMA に殆ど影響を及ぼす事なく完全に除去する事が出来た。即ち原液を 10% 炭酸ソーダにてほぼ中性に保ちつつ 25% 酢酸第二水銀を滴下後濾過し、その濾液を供試液とすれば濁濁現象に妨害される事なくいずれの試料でも DYER 法による TMA 定量が出来る事を認めた。

要 約

- 1) 魚体の各組織を試料とし DYER 法による TMA 定量を行つた所、比色液に濁濁現象が現れ測定が不可能となる事をしばしば経験した。この濁濁は一般に組織の腐敗過程に現れ、しかもその間に消長のある事を認めた。
- 2) 濁濁の生成と強度は試料の種類と処理別によつて異り一般に水浸試料では顕著に起り、又迴游性魚類の幽門垂、腎臓、脾臓等に強く認められるがサメ肉には認められなかつた。
- 3) 濁濁生成物質の出現には試料の pH 条件が重要な関係を有し、一般に好適生成 pH は 6~6.5 前後にあり 8 以上及び 5 以下では殆ど生成しない。
- 4) 濁濁生成物質は酢酸第二水銀処理により原液中の TMA 量に影響を及ぼす事なく完全に除去される故、この処理によりいずれの試料でも DYER 法による定量が出来る事を確めた。

- (1) E. BALDWIN Dynamic Aspects of Biochemistry, 272, 276 (1949) Cambridge Univ.
- (2) W. J. DYER: J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 351 (1945).
- (3) B. T. CROMWELL: Biochem. J., 46, 578 (1950).

- (4) 佐々木林治郎, 藤巻正生: 本誌, 27, 420 (1953).
- (5) E. E. GALE Bact. Rev., 4, 135 (1940).
- (6) 厚生省: 衛生検査指針 (III) 食品衛生検査指針, 39 (1951).
- (7) 斎藤正行: 光電比色計による臨床化学検査, 94 (1952) 南江堂.