

オゾン処理による核酸の変動

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

堤, 将和
九州大学農学部食糧化学教室

有吉, 浩一
株式会社ロッテ : 浦和工場

石北, 隆一
福岡市役所環境衛生課

<https://doi.org/10.15017/23109>

出版情報 : 九州大学農学部学芸雑誌. 26 (1/4), pp.517-523, 1972-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



オゾン処理による核酸の変動¹⁾

大村 浩久・堤 将和
有吉 浩一²⁾・石北 隆一³⁾

Variation of nucleic acids by ozonation

Hirohisa Omura, Masakazu Tsutsumi,
Koichi Ariyoshi and Ryuichi Ishikita

オゾンは強い酸化力を持ち広汎な殺菌ないし静菌作用を示すので、この処理を食品の加工ないし貯蔵に利用する可能性が考えられる。たとえば空瓶の高速洗浄や殺菌においてオゾンは亜硫酸よりも高い効率を示し(石井 1966), また飲料水の浄化や各種生産工場の廃水処理などにも適用される(石井 1965-1)。さらにオゾンは気体であるので、低温多湿の冷蔵庫のような殺菌の困難な場所に用いられる。事実オゾン処理は食品保蔵にも試みられ、卵、チーズ、リンゴ、柑橘類、鶏肉、牛肉などの腐敗を起こす細菌の繁殖防止(石井 1965-1), あるいはチェダーチーズの青カビ抑制(石井 1965-2)などに用いられている。

一方オゾンは近年問題化した光化学スモッグの原因成分ないしオキシダントの1つとして公害問題とも関連して論じられている。さらに近年紫外線殺菌灯の使用が普及し食品工場などにおいても広く利用されるようになったが、この場合 253 mμ 以下の短波長ではオゾンの発生が認められていて、これが紫外線による殺菌の原因とも考えられる(Giese, Lighton, Bailey, 1952)。

こうして食品工業ないし食品衛生面においてオゾンの利用が考えられるようになったが、それとともにその強力な酸化作用により食糧成分の変化がひき起こされることも容易に推定される。従つて食品の加工および貯蔵におけるオゾン処理の可能性とともに、栄養面の変動も予かじめ検討しその実態を把握しておくことが望ましい。そこでまずオゾンの殺菌効果の解明とも関連してその核酸に対する作用を試験検討した。

実験方法

オゾン処理 家庭用オゾン発生装置(横山製作所 YS-1 型)を用いて発生させたオゾンを直接試験に用いた。装置の発生口にゴム管を介してガラス毛细管を付け、試料溶液の底部までひたしたその先端から気泡として通気し処理した。この場合定量的取り扱い極めて困難であつたが流量を適当に調節して試験に用いた。なおその量は自製水銀マノメーターにより第1図から求めた。また装置からの発生量は第1表に示すように 20 分後にはほぼ安定したのでこの予備期間をおいた。

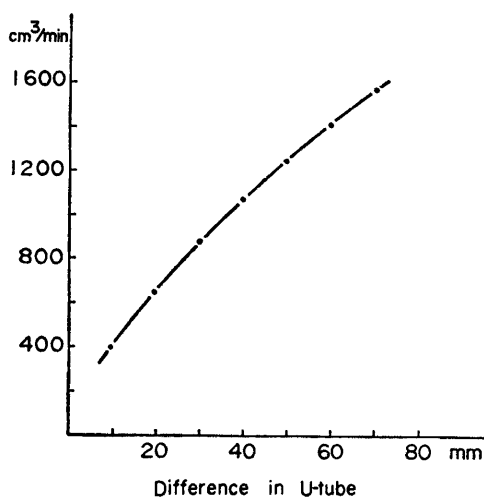


Fig. 1. Estimation curve of ozone.
A domestic ozonizer, YS-1, was employed.

1) 食品の加工および貯蔵におけるオゾンの利用に関する研究 第1報。
2) 株式会社ロッテ, 浦和工場。
3) 福岡市役所環境衛生課。

Table 1. Volumetric velocity of ozone.

Time after switching on an ozonizer (min.)	0	5	10	15	20	25	30	60
Reading in a manometer (mm)	41	44	44	44	45	45	45	45
Volumetric velocity (cm ³ /min.)	1100	1150	1150	1150	1170	1170	1170	1170

A domestic ozonizer, YS-1, was employed.

一方オゾンの量は Throp (1940) に従いヨウ素澱粉反応を利用して次のようにして測定した。2 N KI 溶液 100 ml と緩衝液 5 ml を混合し、その 100 ml に一定流量のオゾン を 15 分間吹き込んだのち遊離したヨウ素を 0.01 N Na₂S₂O₃ 溶液で滴定する。この場合 1% 澱粉溶液を指示薬とし、また緩衝液は AlCl₃・6H₂O 5 g と NH₄Cl 1 g を水に溶かし 1 l としたものをを用いる。こうして得た滴定値から次式によつてオゾンの量が求められる。

$$\text{オゾン量 (ppm)} = 112 \times T/S$$

T: Na₂S₂O₃ 消費量 (ml); S オゾン流量 (l)

こうして求めた本装置による流量とオゾン量との関係の 1 例を第 2 表に示す。

Table 2. Amount of ozone.

Test No.	Volume of ozone (l/15 min.)	0.01 N Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)	Ozone (ppm)
1	17.55	9.74	62.4
2	17.55	9.44	60.4
3	17.55	9.67	61.8

Ozone was estimated as follows according to Throp. Ozone (17.55 l/15 min.) was bubbled through 100ml solution of a mixture (100ml 2N KI+5ml buffer) and titrated with 0.01N Na₂S₂O₃ solution using 1% starch solution as an indicator. (Buffer was prepared by dissolving 5g AlCl₃・6H₂O and 1g NH₄Cl in 1000ml H₂O.) Amount of ozone (ppm) was calculated on the equation: $112 \times T/S$, where T: volume of Na₂S₂O₃ (ml) and S: volume of ozone (l).

オゾンは特有の臭いがあるので食品保蔵などにおいては通常数 ppm 程度の濃度で用いられている。しかし装置の関係もあつて本実験では約 50 ppm 程度で処理した。従つてこの条件は著しく強力なものとなるが、少なくともその作用は類推されるものと思われる。

核酸 DNA はわれわれの研究室で常用している SDS 法 (Kay, Simmons, Dounce, 1952; Hashi-

naga, Murakami, Yamafuji 1966) により仔牛胸腺から調製した。一方 RNA は酵母からの市販標品 (和光純薬) を使用した。

ヒドロキシルアミンの核酸に対する作用は pH により著しく異なるので (Omura, Yamaguchi 1967) オゾン処理も同様に pH 5, 7, 9 で行なつた。そのため核酸は 0.01 M 酢酸緩衝液, リン酸緩衝液 または トリス緩衝液に溶かして供試した。

吸収スペクトルの測定 常用している島津マルチパーパス自記分光光度計 MPS-50 型により自動的に記録して測定した (大村, 内田, 尊田, 1967)。測定は通常 1 分間で行なつた。

塩基組成の分析 オゾン処理を行なつた核酸溶液は 1 昼夜流水透析して低分子物質を除いたのち温浴上でゆつくり蒸発乾固し、以後次のようにして核酸を分解しペーパークロマトグラフィーにより塩基組成を検出した。

DNA (Hershey, Dixon, Chase 1953; Uchida, Shigematsu, Yamafuji 1965) は 6 N 塩酸 0.3 ml に溶かしガラス管に封入する。沸騰水浴中で 3 時間加熱分解したのち開管し、減圧下に水酸化カリウムまたは水酸化ナトリウム上で蒸発乾固後 0.1 N 塩酸 50 μ l に溶かしその適当量をペーパークロマトグラフィーに供した。東洋濾紙 No. 51, イソプロピルアルコール: 濃塩酸: 水 (170: 41: 39) で上昇法により展開し紫外線で検出した。分析は念のため重複して行なつた。一方 RNA (Smith, Markham, 1950) はガラス管中に 1 N 塩酸 50 μ l を加えて封管し、100°C 1 時間分解後メタノール: 塩酸: 水 (7: 2: 1) で上昇法により展開し同様に紫外線で検出した。これによつて DNA からは構成塩基が検出されたが、RNA の場合グアニン, アデニンのほかシチジル酸とウリジル酸が検出された。

結果および考察

I. DNA

1) 吸収スペクトル

核酸は周知のように紫外部に強い吸収を持ち、その構造変化に伴つて吸収スペクトルないし吸光度の変動を来たすので、まずこれを試験しオゾン処理による核酸の化学的変動の手掛りを求めた。

各 pH の DNA 溶液 (20 μ g/ml) に 30 分間オゾンを通気したが、その前後において紫外線吸収スペクトルを測定するとともにこの間における吸光度の変動を求めた。その結果第 2 図および第 3 図に示すように

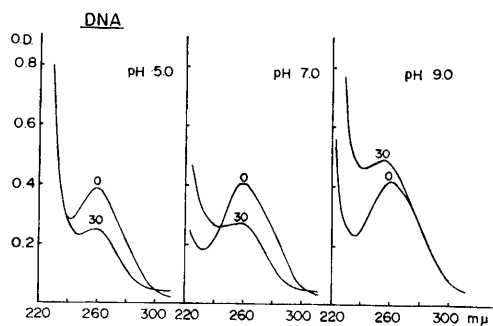


Fig. 2. Absorption spectrum of DNA solution.

DNA solution (20μg/ml) was treated with ozone (about 50 ppm) for 30 minutes at pH 5, 7 or 9. The spectrum was estimated before and after ozonation.

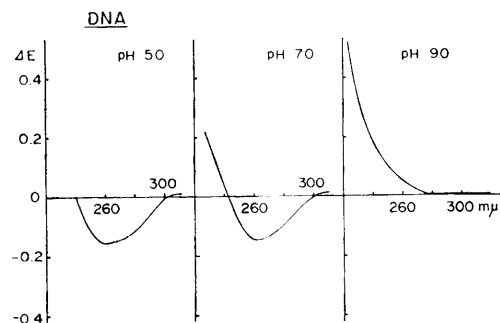


Fig. 3. Variation of the optical density of DNA solution after ozonation.

The same as in Fig. 2.

吸収スペクトルの変化が認められ、しかもそれは pH によって異なった。

pH 5 においては 260 mμ での核酸の代表的吸収は低下したが 30 分後も依然保持された。また極小の位置はやや長波長側に移行したが、240 mμ 以下の短波長域では吸光度にほとんど変化はなかった。従って吸光度は 240 mμ より 300 mμ の範囲にわたって低下し 260 mμ において最も顕著であった。

pH 7 においても同様に 260 mμ を中心として吸光度は低下したが酸性の場合とは異なつて 240 mμ 以下の吸光度はかえつて上昇した。なおこの場合にもスペクトルの極小の波長は多少長波長側に移つた。

これに対して pH 9 では 275 mμ 付近よりも短波長側においてその吸光度は上昇し、しかもその程度は波長が短いほど著るしかつた。従つてこれにともなつて吸収極大の位置は 260 mμ から 256 mμ に移行し、

また極小は 242 mμ と僅かに長波長側に移行した。

こうしていずれにしてもオゾンの処理によって吸収スペクトルに著るしい変動が見られることは核酸分子に変化が起つてゐることを示唆するものであり、またこのオゾンの作用が pH によつてかなり異なることも明らかである。

2) 粘度

過酸化水素、ヒドロキシルアミンその他のウイルス誘発物質がいずれも DNA を解重合することは山藤ら (1957) によりその粘度低下の観察から指摘されている。他方多糖類 (Euler, Hasselquist 1955)、糖蛋白質、核酸 (Conway, Eutler, 1952) などの高分子物質が自動酸化過程にあるデヒドロアスコルビン酸ないしデヒドロアスコルビン酸一過酸化水素系によつて酸化的に解重合されて粘度低下をひき起こすことが観察されている。これらはフリーラジカル関与によるものと考えられているが (八木, 1963) いずれにしても酸化剤に属するものの作用である。オゾン処理によつて核酸の変化が示唆されたので次に DNA 溶液の特徴でもある粘度におよぼす影響を試験した。

DNA 溶液 (0.5 mg/ml) 10 ml にオゾンを 37°C において 3 時間作用させたのち、その 8 ml についてオストワルド粘度計によりその比粘度を測定した。長時間通気する場合発泡するので消泡剤を加えなければならない。オクチールアルコールによつて一応この目的は達成されるがほぼ 30 分で効果を失なう。しかしシリコンオイルの場合市販品 1 ml を水で 100 倍稀释し、DNA 5 mg あたり 1 滴宛添加すれば試験中有効であつたのでこれを適用した。

Table 3. Decrease of viscosity of DNA solution by ozonation.

pH	Control	Test	Rate of decrease (%)
5	2.36	1.07	54.7
7	2.37	1.04	56.1
9	2.37	1.23	48.1

Ozone (about 50ppm) was bubbled through 10ml DNA solution (0.5 mg/ml) at 37°C for 3 hours and relative viscosity was estimated with an Ostwald's viscometer using 8 ml solution.

第 3 表に比粘度および粘度の低下率を示したが、それによるとこの程度のオゾン処理でかなりの粘度低下が観察された。しかしその低下率は pH によつてそれほど差は認められず、アルカリ性において僅かに低下率は低いように思われる。

3) 塩基組成

オゾン処理によつて DNA 溶液の粘度低下とともに、とくにその吸収スペクトルが著しく変動することは DNA を構成する塩基にも何等かの変化が起ることを示唆する。そこでオゾン処理の前後における DNA の構成塩基を分析しその消長を追跡した。

DNA 溶液 (0.5 mg/ml) 2 ml を室温で 90 分間オゾンで処理したのち透析し DNA の塩基組成を検索した。そのペーパークロマトグラムを第 4 図に模式的に示すが、pH 5 および 7 ではアデニンだけが残り、グアニン、シトシンおよびチミンは消失して検出されなかつた。これに対して pH 9 では 4 種の塩基

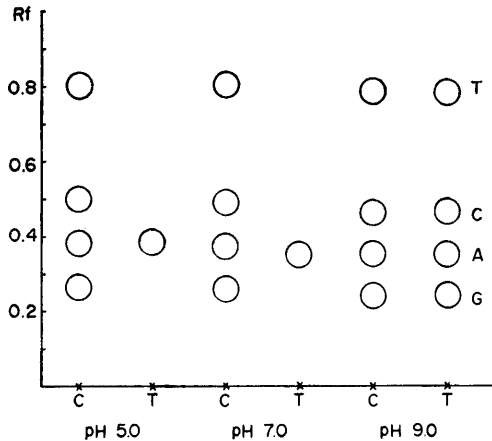


Fig. 4. Base composition of DNA after ozonation at pH 5, 7 or 9 for 90 minutes.

DNA (0.5 mg/ml) solution, 2 ml, was treated with ozone at pH 5, 7 or 9 for 90 min. and base composition of DNA was estimated by paper chromatography after dialysis.

C: control (without ozonation); T: test.

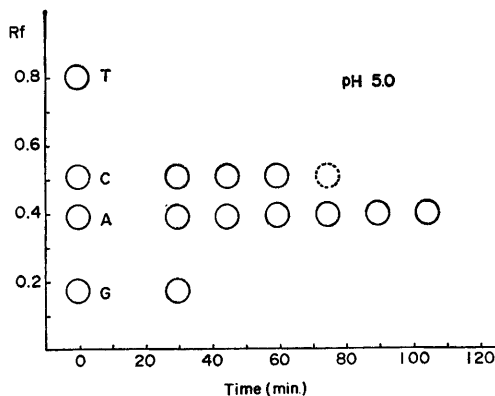


Fig. 5. Base composition of DNA after ozonation at pH 5 for different time.

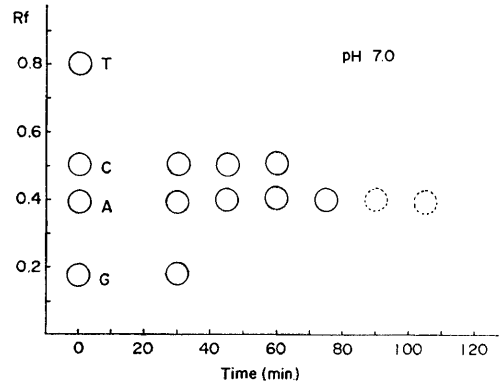


Fig. 6. Base composition of DNA after ozonation at pH 7 for different time.

はいずれも検出され少なくとも残存することが示された。

そこで次に構成塩基の分解順序を検討するために、pH 5 および 7 の DNA 溶液を一定の時間間隔でオゾン処理を行ない上述のように塩基の検出を行なった。

同様に模式的に示した第 5 図および第 6 図のペーパークロマトグラムからまず 30 分でチミンは消失し、ついで 45 分後にグアニンも検出されなかつた。さらに 75 分処理ではシトシンも分解されたがアデニンだけは 105 分間処理した後も残存して検出された。しかし 75 分間オゾン処理をした場合 pH 5 ではシトシンはかすかに認められた。最終的に残存するアデニンのスポットも pH 5 においては強く検出され、一方 pH 7 のものはかなり淡くなつていた。従つてこのオゾン処理によつて DNA 分子中の塩基はチミン、グアニン、シトシン、アデニンの順に分解されることが認められた。しかもこれらは中性において酸性におけるよりも分解されやすく、またアルカリ性において最も安定であつた。これに対して同じ酸化剤でも過酸化水素で処理した場合はアデニンは核酸から脱離するにしても同じように安定であつて、グアニン、シトシン、チミン、アデニンの順に破壊されることはわれわれの研究室で確認されている (Uchida, Shigematsu, Yamafuji 1965)。いずれにしてもアデニンが最も安定であつた。

II. RNA

1) 吸収スペクトル

次に RNA に対するオゾンの作用を試験した。

RNA 溶液 (2 mg/ml) 4 ml と等容の緩衝液とを混合し、100 倍稀釈シリコン油 2~3 滴を加え 30 分間オ

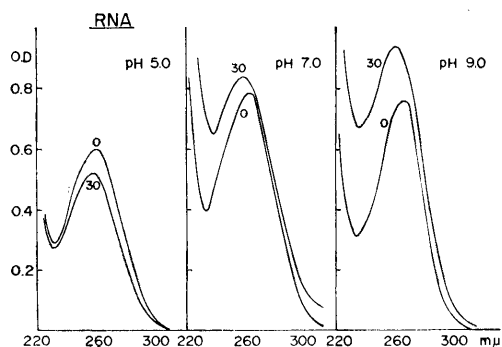


Fig. 7. Absorption spectrum of RNA solution.

RNA solution (1mg/ml) was treated with ozone as for DNA and the spectrum was estimated after 10 times dilution.

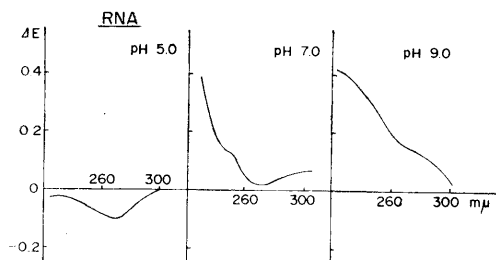


Fig. 8. Variation of the optical density of RNA solution after ozonation.

The same as in Fig. 7.

ゾン処理を行なった。これらの処理液を同一 pH の緩衝液で 10 倍稀釈して吸収スペクトルならびに吸光度の変動を求め第 7 図および第 8 図に示した。

酸性においては紫外部全般にわたって吸光度の低下が見られたがスペクトルの形そのものには変化はなかった。しかし低下度は DNA の場合と多少異なり吸収極大の位置より若干長波長側において最高であつた。なお吸光度は時間とともにさらに多少低下し 90 分でピークに達したが、その後とくに 250 mμ 付近以下ではかえって上昇を始めることが観察された。

それに対して中性では逆に吸光度は上昇した。30 分処理によつて吸収極大はやや短波長側、極小は長波長側に移行したスペクトルが認められた。吸光度の上昇度は 270 mμ 付近において最低であつて、とくに短波長側で顕著であつた。またこの場合には吸光度の上昇は極大値付近では 30 分で最高に達し以後時間とともに低下を始めたが、短波長域では時間とともに上昇を続けることが認められた。

アルカリ側においてもほぼ類似の傾向が観察されたが上昇度は長波長側ほど低かつた。

2) 塩基組成

各 pH の RNA 溶液 (1 mg/ml) 4 ml をそれぞれ種々の時間オゾン処理を行ない、透析後その塩基組成を分析し第 9 図、第 10 図および第 11 図に示した。DNA の場合と異なり各塩基成分はかなり抵抗性を示し 120 分迄は完全に除くことは出来なかつた。しかし酸性では 240 分処理するとグアニンが消失、CMP および UMP はかなり減少した。ついで 360 分処理によつて両ピリミジンもほぼ分解し終りアデニンだけが残つた。中性ではオゾンに対する抵抗性は酸性におけるよりも若干強かつた。グアニンは 240 分ではほぼ消失

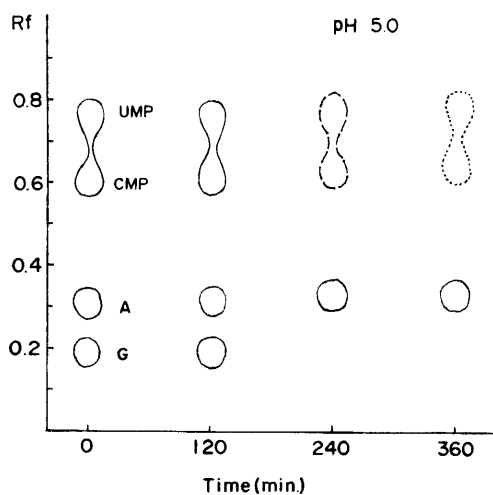


Fig. 9. Base composition of DNA after ozonation at pH 5 for different time.

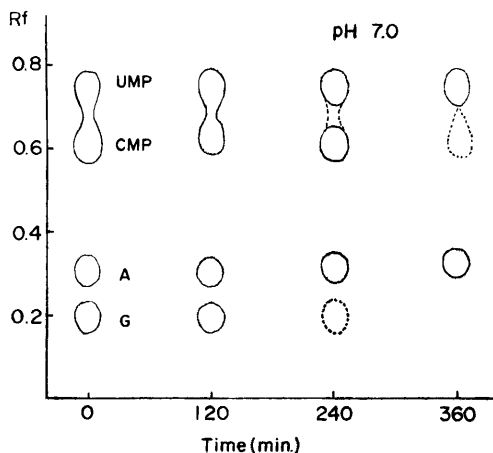


Fig. 10. Base composition of DNA after ozonation at pH 7 for different time.

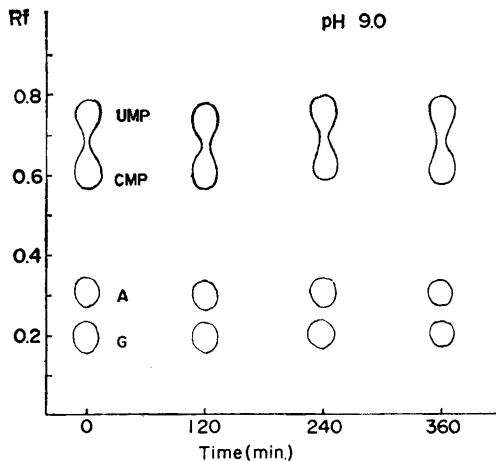


Fig. 11. Base composition of DNA after ozonation at pH 9 for different time.

したが僅かに認められ、また CMP および UMP は明瞭に検出された。また 360 分では CMP も大部分破壊されたが UMP および アデニンは明らかに残存した。これに対してアルカリ性においては 6 時間処理してもいずれも残存した。従つてオゾン処理に対する RNA 構成塩基は一応グアニン、シトシンないしウラシル、最後にアデニンの順に分解され易いことが推定されるがシトシンとウラシルとの相異は明確ではない。この傾向は DNA の場合とも一致し、核酸を構成する塩基の中でとくにアデニンが過酸化水素やオゾンのような酸化剤の作用に対し最も安定であるといえることができる。

総 括

食品加工ないし貯蔵にオゾン処理を利用する場合、その強い酸化力に鑑み食糧成分の変動も予かじめ検討し実態を把握しておくことが望ましい。そのためまずオゾンの殺菌効果の解明とも関連して核酸に対する作用を試験した。

DNA 溶液の吸収スペクトルはオゾン処理によつて著しく変動したが、その変化は pH によつてかなり異なつた。すなわち pH 5 では 240 m μ ないし 300 m μ にかけて吸光度は低下し 260 m μ で最も著しかった。これに対して pH 7 でも同様に低下したが 240 m μ 以下の吸光度はかえつて上昇した。しかし pH 9 では 275 m μ 付近より短波長域において上昇し波長が短い程著しかった。

一方 DNA 溶液の粘度もオゾン処理により多少低下したが pH の影響はそれ程大きくなくアルカリ側

において僅かに低下度は低いように思われた。

ついで DNA の構成塩基の変動を求めた。その結果 pH 5 および 7 ではチミン、グアニン、シトシン、アデニンの順に分解されることが認められたが、アルカリ性では各塩基成分はいずれもかなり安定であつた。

RNA においても同様にオゾン処理によつて吸収スペクトルは変化した。DNA の場合と多少異なつた。すなわち酸性においては DNA と同様紫外部全域にかけて吸光度は低下したが、中性では逆に増加し、その場合増加度は 270 m μ において最低であつた。またアルカリ域では DNA と同様の増加が認められた。

他方 RNA の構成塩基は一応グアニン、シトシンないしウラシル、アデニンの順に分解されたが、これらの抵抗性は DNA 中のものよりも高かつた。

研究に使用したオゾン発生装置について種々の便宜を計っていただいた帝産業株式会社(北九州市八幡区白川町9-12) 税田文三、武上信雄の両氏に感謝申し上げる。

文 献

- Conway, B., Eutler, J. A. V.: J. Chem. Soc., **1952**, 835.
 Euler, H. v., Hasselquist, H.: Ark. Kemi, **8**, 375 (1955).
 Giese, A. C., Lighton, H. L., Bailey, R.: Arch. Biochem. Biophys. **40**, 71 (1952).
 Hashinaga, F., Murakami, H., Yamafuji, K.: Enzymologia, **30**, 179 (1966).
 Hershey, A. D., Dixon, J., Chase, M.: J. Gen. Physiol., **36**, 777 (1953).
 石井富雄: 食品工業 **8** (14) 75 (1965-1).
 石井富雄: 食品工業, **8** (24), 64 (1965-2).
 石井富雄: 食品工業, **9** (6) 67 (1966).
 Kay, E. R. M., Simmons, N. S., Dounce, A. L.: J. Am. Chem. Soc., **74**, 1724 (1952).
 大村浩久, 内田泰, 尊田民喜: 九大農学芸誌, **23**, 33 (1967).
 Omura, H., Yamagucki, K.: Enzymologia, **33**, 1 (1967).
 Smith, J. D., Markham, R.: Biochem. J., **46**, 509 (1950).
 Throp, C. E.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **12**, 209 (1940).
 Uchida, Y., Shigematsu, H., Yamafuji, K.: Enzymologia, **29**, 369 (1955).
 八木一文: 食品化学の基礎, p. 18. 共立出版 (1963).
 Yamafuji, K., Hirayama, K., Miyata, A.: Enzymologia, **17**, 352 (1956).

Summary

Since some possibility of application of ozonation in processing or storage of foods has been developed, change of food constituents should be preliminary discussed, owing to high oxidizing ability of ozone. At first, variation of nucleic acids after ozonation was examined, in connection with its bacteriostatic action.

An absorption spectrum of DNA solution was changed by ozonation depending on pH of DNA solution. At pH 5, the optical density between 240 m μ and 300 m μ was decreased, the highest one being at 260 m μ . On the other hand, while the optical density was similarly decreased, it was increased at a range of shorter wave length below 240 m μ . On the contrary, the optical density was increased at shorter range below about 275 m μ at pH 9. In this case, high increase was observed at shorter wave length.

However, relative viscosity of DNA solution was decreased by ozonation with about the same rate at pH 5 and 7, but a little lower one at pH 9.

Then, base composition of DNA was also examined after ozonation. At pH 5 and 7, bases were decomposed in the following order, thymine, guanine and cytosine, and only adenine was maintained, whereas, at pH 9, 4 bases were detected under the same condition of the treatment.

An absorption spectrum of RNA solution was also changed and some difference was observed in variation of the spectra of both DNA and RNA. The optical density was decreased at pH 5, but increased at pH 7 with minimum rate at 270 m μ . However, it was increased at pH 9 similar to DNA. On the other hand, bases in RNA were degraded in the following rate of guanine, cytosine or uracil, and adenine. The result indicates that adenine in nucleic acids is the most stable against ozone.