

食品中の核酸成分に関する研究

(第1報) 蔬菜類における5'-ヌクレオチドの分布*

橋田 度・毛利威徳・志賀岩雄

Studies on Nucleic-Acid-Related Substances in Foodstuffs

(I) Distribution of 5'-nucleotides in vegetables

Wataru Hashida, Takenori Mouri, Iwao Shiga

Distributions of 5'-nucleotides in vegetables were investigated in order to elucidate the role of them on the flavor of vegetable foods. A total of 5'-nucleotides were determined employing the 5'-nucleotidase procedure in boiled extracts of 17 kinds of herbage, 7 kinds of fruit, 10 kinds of earth vegetables, and 6 kinds of processed foods. Individual distributions of 5'-nucleotide were determined by ion-exchange column chromatography.

5 fractions were obtained by Dowex 1×8 column from boiled extract of tomato. Among them 2 fractions were identified as 5'-adenylic acid (5'-AMP) and 5'-uridylic acid (5'-UMP).

Samples of vegetables were mostly found to contain 1-10 μ moles/100g. material of a total of 5'-nucleotide. More than 7 μ moles/100g. of a total of 5'-nucleotides were found in welsh onions (green), lettuce, immature green peas with pod, tomatoes, cucumber, Japanese radishes and several processed foods.

As the results of column chromatography, 5'-AMP and 5'-UMP were found to be the major components in boiled extracts of vegetables. 5'-CMP was found in several cases, but 5'-IMP and 5'-GMP were found only in small quantities, 5'-AMP amounted to about 0.01% in the extract of tomatoes. We guess that 5'-AMP may contribute to the flavor of vegetables under the coexistence of glutamic acid.

緒 言

近年5'-イノシン酸 (5'-IMPと略), 5'-グアニル酸 (5'-GMP) などの核酸成分が調味料として製造開発されているが, これら5'-ヌクレオチド類が本来の食品においてどの程度分布するのか, また天然核酸成分が食品加工に伴ってどのように変化するのかは食品工業の観点からも興味深いものである。農産食品を対象としてみると, 一般植物中のヌクレオチド類に関する報告は若干あるが食品の呈味成分として取扱った研究は少ない。中島ら¹⁾ はきのこと類及び数種の蔬菜について報告し

*本研究は大阪大学工学部醸酵工学教室寺本四郎教授との協同研究である。ご懇切な御助言、御協力を賜ったことに深謝致します。なお本文は醸酵工学雑誌第41巻第8号P.420 (1963) 所載のものである。

脚註：本報においては次の略号を使用する。

5'-AMP : adenosine-5'-monophosphate (5'-adenylic acid)

5'-CMP : cytidine-5'-monophosphate (5'-cytidylic acid)

5'-UMP : uridine-5'-monophosphate (5'-uridylic acid)

5'-IMP : inosine-5'-monophosphate (5'-inosinic acid)

5'-GMP : guanosine-5'-monophosphate (5'-guanylic acid)

ているが、私達は缶詰製造等食品加工の立場も含めて、本報ではまず一般蔬菜類における5'-ヌクレオチド類の分布をしらべた結果を報告する。

まずトマト煮出液より分離した画分について、個々の5'-ヌクレオチドの同定を行なった。次に約40種の蔬菜類及び加工品の煮出液について酵素法により総5'-ヌクレオチドを定量すると共に、その量の多いものについてはDowex 1×8を用いるイオン交換クロマトグラフィにより個々の5'-ヌクレオチドの分布を定量した結果を報告する。同時にグルタミン酸含量についても分析した。

実 験 之 部

I. 実験方法

(1) 供試標準物質 定性、定量のための標準物質として5'-IMP, 5'-GMP, 5'-アデニル酸(5'-AMP), 5'-シチジル酸(5'-CMP), 5'-ウリジル酸(5'-UMP)は何れもナトリウム塩を武田薬品工業株式会社研究所より提供された。またヌクレオシド類、核酸塩基類は市販品を用いた。

(2) 試料調製法 蔬菜類は葉菜類17品目、果菜類7品目、根菜類10品目、加工品6品目で、市販品の可食部をできるだけ均一にとり細断した後にホモジナイズした。5'-ヌクレオチドの抽出は煮出法によった。すなわちホモジナイズした蔬菜類を等量の水と共に100°Cで3分間煮出し、綿で濾過し、粕は水で洗い洗液は濾液に合併して試料とした。後に報告²⁾するように過塩素酸で冷時抽出する場合には煮出し法よりも一般に5'-ヌクレオチド量が少ない。本報では食品中の呈味成分という観点から煮出し法を採用した。

(3) 分析方法 総5'-ヌクレオチド量は中島ら³⁾の酵素法によった。すなわち武田薬品工業研究

Table 1-a. Composition of eluting solution.

Solution			
① distilled water, including sample solution	200 ml	⑥ { 0.1N-HCOOH	150 ml
		{ 0.1N-HCOONa	150 ml
		⑦ { 0.1N-HCOOH	150 ml
② 0.005N-HCOOH	300 ml	{ 0.3N-HCOONa	150 ml
		⑧ { 0.1N-HCOOH	150 ml
③ 0.02N-HCOOH	300 ml	{ 0.6N-HCOONa	150 ml
		⑨ { 0.2N-HCOOH	150 ml
④ 0.1N-HCOOH	300 ml	{ 0.8N-HCOONa	150 ml
		⑩ { 0.2N-HCOOH	150 ml
⑤ { 0.1N-HCOOH	200 ml	{ 1.0N-HCOONa	150 ml

Table 1-b. Recoveries of 5'-nucleotides by ion exchange column chromatography

	Exp. No. 1		Exp. No. 2	
	Determined μ mol.	Recovery %	Determined μ mol.	Recovery %
5'-CMP	5.29	100.6	4.30	102.2
5'-AMP	11.7	105.2	17.25	101.5
5'-UMP	8.12	102.0	8.21	101.9
5'-IMP	9.60	95.7	4.05	99.4
5' GMP	6.56	96.4	8.15	96.4

所より提供された5'-ヌクレオチダーゼを作用させ遊離する磷酸量を定量した。

個々の5'-ヌクレオチドはイオン交換樹脂クロマトグラフィによった。すなわちDowex 1×8を使用し、カラムの調整・試料の添加法はBergkvist法⁴⁾による中島らの記載⁵⁾に準じた。展開液組成はTable 1-aの如くで、5'-ヌクレオチド類の回収率はTable 1-bの如く満足なものであった。なおトマトについては画分の同定のために大量の試料を扱う大きいカラムを使用した。Bergkvistの記載⁶⁾を参照して内径2cm、長さ30~50cm、蟻酸型で行なった。

それぞれの画分は10ml宛で展開液を対照とし、日立製分光光電比色計(EPU

-2型)で260m μ の吸収量を測定し、なお適宜250m μ , 280m μ における吸収も測定した。中島ら⁵⁾に準じて、試料ml当りの260m μ における吸収量と液量ml数との積をUV₂₆₀で表わすことにする。

なお食品における他の重要な旨味成分としてグルタミン酸を *E. coli* 菌体による酵素法によって定量した。

(4) 5'-ヌクレオチドの同定法 ヌクレオチド類は、カラムからの溶出液の各々260m μ の吸収曲線がピークとなる画分を集め、活性炭吸着後、1.4%アンモニア含有50%エタノール水溶液で溶出した後に濃縮してペーパークロマトグラフィにより同定した。なお画分が5'-ヌクレオチドであることは上述の5'-ヌクレオチダーゼを作用させその分解により確認した。

ペーパークロマトグラフィには溶媒として次の5種を用いた。〔溶媒1〕飽和硫酸・3級ブタノール・0.025Nアンモニア水(160:3:40)⁵⁾〔溶媒2〕n-プロパノール・濃アンモニア水・水(60:30:10)⁷⁾〔溶媒3〕iso-プロパノール・濃塩酸・水(65:16.7:18.3)⁸⁾〔溶媒4〕飽和硫酸・1M醋酸ソーダ・イソプロパノール(80:20:2)⁹⁾〔溶媒5〕n-ブタノール・醋酸・水(4:1:5)。なお緩衝 buffer (pH2.8), 硼酸塩 buffer (pH9.2) を用いる濾紙電気泳動法も同定に用いた。

それぞれの画分の塩基、リボース、5'-燐の組成モル比について、塩基は260m μ における紫外線吸収(分子吸光係数については E. Volkin and Cohn, M. E.¹⁰⁾ 参照), リボースはオルシノール塩酸法, 5'-燐は5'-ヌクレオチダーゼ法により定量した。

II 実験結果および考察

(1) トマト煮出液画分の同定

トマト煮出液の紫外線吸収曲線は250~260m μ にピークを示し核酸物質の存在が考えられる。原料600g相当量(UV₂₆₀=9625)の煮出液を大型カラムによって展開した。そのクロマトグラムはFig. 1の如くである。画分Aより画分Eまで5個のピークを分離した。画分Aは活性炭吸着による回収も悪く核

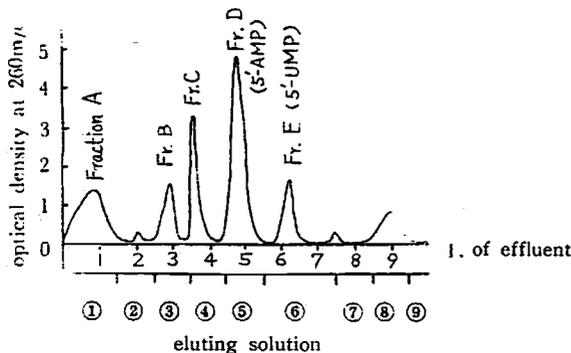


Fig. 1. Chromatogram of boiled extract of tomato

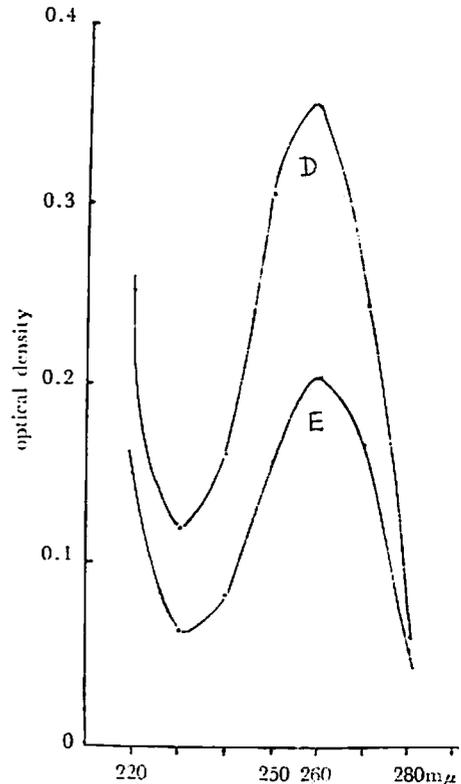


Fig. 2. Absorption curves of tomato fractions D and E.

酸成分ではないと考えられる。画分Bはペーパークロマトグラフィの結果、ウリジン等のヌクレオシドおよび塩基の混合物と認められた。画分Cは流出位置では5'-CMPに近いがペーパークロマトグラフィで5'-CMPとは同定できなかった。

画分D, EはFig. 2の如く核酸成分特有の紫外外部吸収曲線を示し、流出位置からはそれぞれ5'-AMP, 5'-UMPに相当すると考えられる。250m μ :260m μ 及び280m μ :260m μ のそれぞれ吸収比も略々既知標準品に一致した。Table 2の如く塩基部分の吸収1 mol. に対しリボース, 5'-磷酸がほぼ1 mol. 宛含まれていてribonucleoside-5'-monophosphateであることを示している。ペーパークロマトグラフィによって、〔溶媒2, 4, 5〕によって画分D, Eがそれぞれ5'-AMP, 5'-UMPに一致することが認められた。Fig. 3にはクロマトグラムの一部を示したが、画分Dを5'-ヌクレオチダーゼ処理するとアデノシンに一致することが〔溶媒4〕により、また1N-HClで分解すると

Table 2. Molar ratio of ribose and 5'-phosphate to base in tomato fraction D and E.

Fraction	Base (absorbancy)	Ribose	5'-Phosphate
D	1.00	0.87	0.99
E	1.00	...	0.95

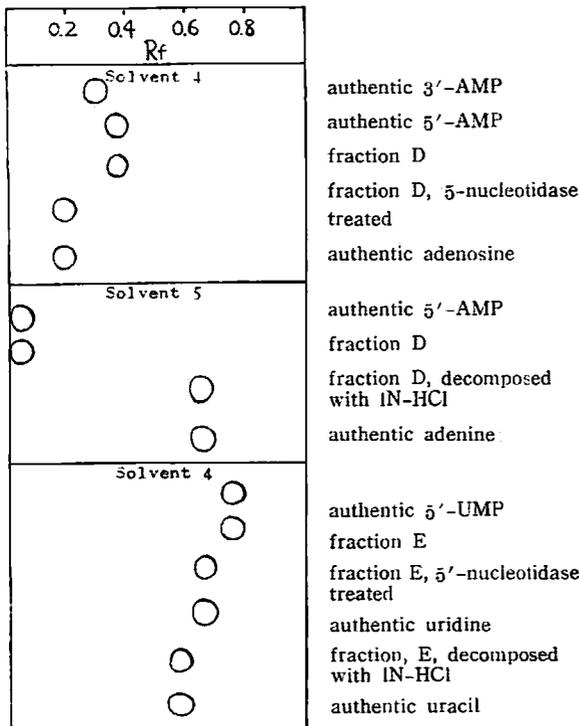


Fig. 3. Identification of tomato fractions D and E by paperchromatography.

Solvent 4: saturated ammonium sulfate : 1M-sodium acetate : isopropanol (80 : 20 : 2)
 Solvent 5: n-butanol : acetic acid : water 4 : 1 : 5)

アデニンに一致することが〔溶媒5〕によりそれぞれ認められた。画分Eは5'-ヌクレオチダーゼ処理するとウリジンに一致することが〔溶媒4〕により、また1N-HClで分解するとウラシルに一致することが〔溶媒4〕により認められた。

蟻酸 buffer (pH2.8) で48V/cm, 0.2 mA, 60分, 濾紙電気泳動すると陽極への移動距離は5'-AMP 1.0cm, 3'-AMP 1.5cm, 画分D 1.1cm, 5'-UMP 9.2cm 画分E 9.3cmであり, また硼酸塩buffer (pH9.2) で20V/cm, 0.1mA, 4時間では, 陽極へ5'-AMP 6.3cm, 3'-AMP 5.7cm 画分D 6.4cm であって, 以下の結果を総合して画分Dは5'-AMP, 画分Eは5'-UMPに一致することが確認された。3'-AMPは流出位置では5'-AMPに近いものであるが, 画分Dでの混在は認められなかった。

(2) 蔬菜類煮出液中の総5'-ヌクレオチド含量

蔬菜類17品目, 果菜類7品目, 根菜類

10品目, 加工品 6品目のそれぞれの煮出液について総5'-ヌクレオチド量を測定した。使用した5'-ヌクレオチダーゼ法の回収率はマッシュルーム缶詰, アスパラガス缶詰を対象にした場合, Table 3に示す如くである。この場合標準試料としては5'-リボヌクレオチドナトリウム(武田薬品製)を使用した。これを固型物または液汁に添加した場合の回収率は91~96%で満足なものであった。実際の測

Table 3. Recoveries of 5'-nucleotides by the method using 5'-nucleotidase.

Agricultural canned foods	Sample	5'-Nucleotide determined $\mu\text{mol.}$	5'-Nucleotide recovered $\mu\text{mol.}$	Recovery %
Mushrooms	Solid 5.0g	1.18		
	Solid 5.0g + Ribotide* 0.625 $\mu\text{mol.}$	1.75	0.57	91
Mushrooms	Liquid 5.0g	1.32		
	Liquid 5.0g + Ribotide 0.625 $\mu\text{mol.}$	1.92	0.60	96
Asparagus	Solid 5.0g	0.60		
	Solid 5.0g + Ribotide 0.850 $\mu\text{mol.}$	1.38	0.78	92

* Ribotide : Na salts of 5'-ribonucleotide

Table 4. Total 5'-nucleotide and glutamic acid in boiled extracts of vegetables (per 100g material)

	Total 5'-nucleotide	Glutamic acid		Total 5'-nucleotide	Glutamic acid
<i>Herbage vegetables</i>			<i>Fruit vegetables(continued)</i>		
spinach	3.1 $\mu\text{mol.}$	27mg	eggplant	1.2 $\mu\text{mol.}$	11mg
brussel sprouts	1.9	29	cucumber	7.5	16
cabbage	1.9	33	pumpkin	3.5	<5
red cabbage	2.1	35	<i>Earth vegetables</i>		
welsh onion, green	7.0	<5	carrot	5.0	5
water dropwort	4.3	13	Japanese radish	7.9	13
Japanese honeywort	4.4	24	red radish	4.0	<5
Garland chrysanthemum	2.9	8	great burdock	3.5	<5
leaf stalk of dasheen	5.0	14	turnip	2.7	29
small onion, green	6.0	27	east Indian lotus	1.2	5
lettuce	8.3	21	white potato	2.3	<5
cauliflower	1.6	51	sweet potato	0.4	<5
celery	2.7	<5	"Wasabi"	1.9	23
"Shakushina"	5.5	31	onion	5.3	25
"Mizuna"	5.0	18	<i>Processed food (Canned food)</i>		
Chinese cabbage	6.0	36	sprout, soybean	12.0	7
"Udo"	2.4	<5	mushrooms, solid	24.7	(22)*
<i>Fruit vegetables</i>			asparagus, solid	17.4	(55)*
immature kidney-beans with pod	4.0	16	green peas, solid	4.9	(4)*
immature green-peas with pod	10.5		green beans, solid	14.8	(18)*
sweet pepper	5.0	10	sweet corn, solid	29.3	(100)*
tomato	10.9	103			

* naturally existed plus artificially added

定でも同時に回収率の試験を併行して測定値の補正を行なった。

Table 4 には蔬菜原料 100g 当りの総5'-ヌクレオチド量とグルタミン酸量を示している。総5'-ヌクレオチドは葉菜類ではレタス、ねぎ、果菜類ではさやえんどう、トマト、きゅうり、根菜類ではだいこんに多く何れも $7\mu\text{mol}$ 。以上であった。加工食品では豆もやしの他に缶詰食品のアスパラガス、マッシュルーム、グリーン・ビーンズ、スイートコーンに多かった。加工食品を除いて総5'-ヌクレオチドは $1\sim 10\mu\text{mol}/100\text{g}$ の範囲であり、トマトの $10.9\mu\text{mol}$ がこの中で最高であった。なお葉・果・根菜の分類によって量的に大小があるかをしらべたが、系統的な差違は認められなかった。グルタミン酸は 30mg 以上はキャベツ、赤キャベツ、はくさい、はなやさい、しゃくしな、トマトで、トマトの $103\text{mg}/100\text{g}$ が最高であった。その絶対量で比較すると例えばトマト 100g 当りの場合、グルタミン酸 103mg に対し5'-ヌクレオチド (5'-AMPの分子量364として) は約 4mg であり、量的には5'-ヌクレオチドはグルタミン酸より遙かに少ないといえる。缶詰食品として試験した蔬菜類には一般に5'-ヌクレオチド類が多かった。このことについては後に考察したい。

(3) 蔬菜類煮出液中の個々の5'-ヌクレオチドの分布

前項の結果で比較的総5'-ヌクレオチド量の多かったものについては、個々の組成をしらべるためにカラムクロマトグラフィを行なった。Fig. 4 は白アスパラガス煮出液のクロマトグラムである。

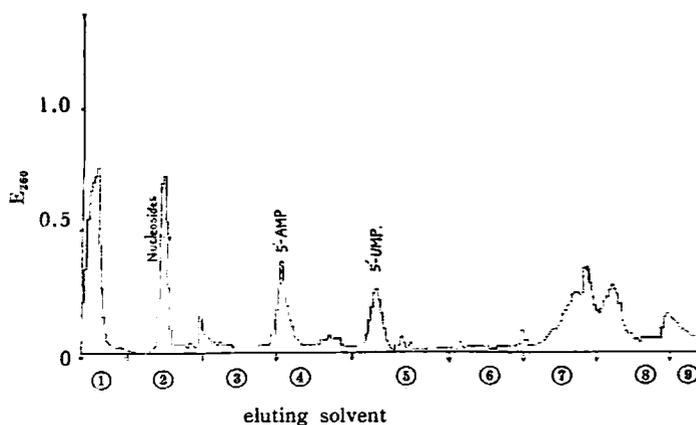


Fig. 4. Chromatogram of boiled extract of white asparagus

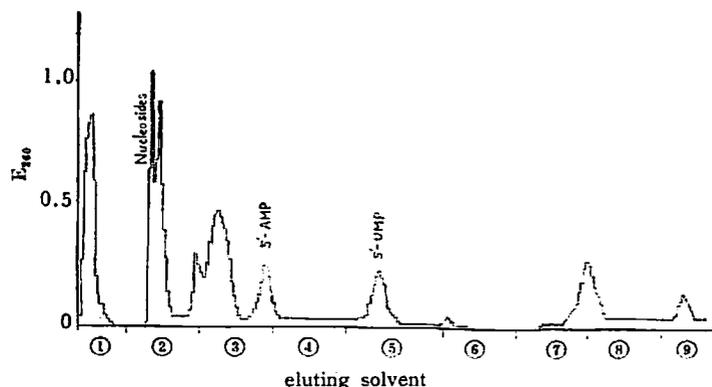


Fig. 5. Chromatogram of boiled extract of Japanese radish

る。展開液②液であられるのは塩基・ヌクレオシドの混合物、④液、⑤液で溶出するのはそれぞれ5'-AMP、5'-UMPであった。⑦液以後のピークはuridine-diphosphate 誘導体を含むものと考えられる。Fig. 5 はだいこん煮出液の場合でヌクレオシド・塩基混合物5'-AMP、5'-UMPの画分の他に③液で溶出し始める画分と小さいが⑥液で溶出する画分があった。後者は5'-IMPの位置に相当していた。Fig. 6 は豆もやし煮出液のクロマトグラムである。ヌクレオシド・塩基混合物、5'-AMP、5'-UMPのそれぞれの画分の他に③

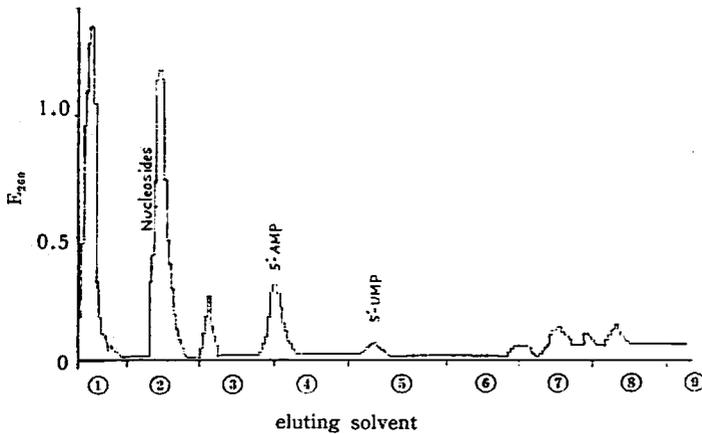


Fig. 6. Chromatogram of boiled extract of sprout, soybean

Table 5. Amounts of individual 5'-nucleotide in boiled extracts of vegetables.

	μmol./100g material				
	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP
asraragus, green	6	11	6	—	±
asparagus, white	4	7	8	—	±
welsh onion, green	—	2.7	1.2	—	—
lettuce	—	2.7	1.6	±	±
tomato	1.4	30	6.8	—	—
green beans	2.6	5.3	8.1	—	—
immature green-peas with pod	±	5.5	4.0	—	—
cucumber	±	1.3	2.0	—	—
Japanese radish	±	3.8	4.4	±	—
onion	±	2.4	1.5	±	—
bamboo shoot	1.5	3.3	4.0	—	—
sprout, soybean	—	6.6	2.1	—	—
fresh "Shiitake"	28—45	62—87	41—78	—	51—125
common mushrooms	±	32.5	19.6	—	±

± : trace

(4) 考 察

Bergkvist 法⁴⁾ はヌクレオシド類の monophosphate のみでなく di- または tri-phosphate の分析も可能であるが、本報では食品の呈味成分に限ったので monophosphate についてのみ行なった。5'-ヌクレオチド以外に 2' または 3'-ヌクレオチドの存在は殆んど認めなかったが、今後更に検討したい。

一般植物中の遊離または酸可溶性ヌクレオチド類の存在については小麦、大麦の地上部分¹¹⁾、発芽期の豆¹²⁾¹³⁾、じゃがいも¹⁴⁾、タリア¹⁵⁾についての報告がある。これらの報告では 5'-AMP と 5'-UMP の存在がしばしば認められている。本報の野菜類の結果でも 5'-AMP, 5'-UMP が主要なものと同認められ、また中島らの示唆¹⁾ にも一致している。動物性食品における分析値⁵⁾¹⁷⁾ と異なっ

液で溶出する画分があり、位置では 5'-CMP に相当していた。

このようなクロマトグラムから個々の 5'-ヌクレオチドを定量した結果は Table 5 の如くである。5'-ヌクレオチドとしては 5'-AMP, 5'-UMP が主要なもので普遍的に分布しており、就中アスパラガスとトマトには多かった。但しトマトは採集時期および品種によってその含量には相当な差違が認められた。他に 5'-CMP も数品目に見出され、5'-IMP, 5'-GMP は殆んど認められなかった。後報²⁾ 予定の生しいたけ、マッシュルームについての値も参考に掲げたが、これらきのこ類は多量の 5'-AMP, 5'-UMP, 及びしいたけは 5'-GMP を含有している。これらに較べると供試の野菜類中の含量は少ないといえよう。

直接に呈味性の強い5'-IMPは殆ど見出せなかったが、グルタミン酸存在時における5'-AMPの相乗的呈味効果も知られているので¹⁶⁾、5'-AMPの存在は呈味成分としても注目すべきものと考えられる。トマト中で5'-AMPは最高0.01%に達した。更に5'-AMPはデアミナーゼによって容易に5'-IMPに変換されるので、加工工程においてデアミナーゼ処理によって5'-IMPとしての旨味を附加することが期待できる。

缶詰にした野菜固型物中での5'-ヌクレオチド量は原料に比較して多いが、これは缶詰殺菌によって増加するためと考えられる。食品加工に伴う5'-ヌクレオチド量の消長については別に検討する予定である。

要 約

葉菜類17品目、果菜類7品目、根菜類10品目、加工食品6品目の野菜類について、呈味成分としての5'-ヌクレオチド類の分布をしらべるために、5'-ヌクレオチダーゼおよびイオン交換樹脂カラムクロマトグラフィによって野菜類煮出し液中の5'-ヌクレオチドを定量した。

トマト煮出し液については原料600g相当分を処理して数個の画分をとり、同定の結果、その中で5'-AMPと5'-UMPの存在を確認した。

野菜類全般について総5'-ヌクレオチド量は大部分が原料100g当り1~10 μ mol.の範囲で、葉菜・果菜・根菜の区別によって量的に大小があるか否かをしらべたが、系統的な差は認められなかった。同時に測定したグルタミン酸量に較べるとその絶対量は相当に少ない。個々の5'-ヌクレオチドとしては5'-AMPと5'-UMPが普遍的に、5'-CMPは若干の品目に見出されたが、5'-IMP、5'-GMPは殆んど認められなかった。トマトでは5'-AMPが最高0.01%に達した。5'-AMPはグルタミン酸共存の下に野菜類の風味に大きな影響を持つと考えられる。

終りに臨み、貴重な酵素、試薬を提供されるなど多大の御援助を賜った武田薬品工業株式会社の方々に深謝致します。なお実験の一部を分担された東洋食品研究所青山嬢、寺本研究室松尾・大山両氏に深謝致します。本報は昭和38年度の日本農芸化学会大会で発表した。

文 献

- (1) 中島、藤田など：農化昭和36年度大会（1961、福岡）、食品衛生学会第4回講演会（1962、大阪）。
- (2) 橋田など：本誌投稿予定。
- (3) 中島など：農化昭和37年度大会（1962、仙台）。
- (4) R. Bergkvist and A. Deutsch : Acta Chem. Scand. 8, 1877 (1954).
- (5) 中島、藤田など：農化, 35, 797, 803(1961)。
- (6) R. Bergkvist : Acta Chem. Scand., 12, 1549(1958)。
- (7) C. S. Hans and F. A. Isherwood : Nature, 164, 1107 (1949)。
- (8) W. E. Cohn and E. Volkin : Nature 167, 483 (1951)。
- (9) R. Markham and J. D. Smith : Biochem. J., 49, 401 (1951)。
- (10) E. Volkin and W. E. Cohn : Methods of Biochemical Analysis, vol. 1, p. 287 (1954)。
- (11) R. Bergkvist : Acta Chem. Scand., 10, 1303 (1956) ; ibid 11, 1457 (1957)。
- (12) V. V. Luu and J. Gregoire : Compt. rend. Soc. biol., 152, 1260, 1262 (1958)。
- (13) K. Sebesta and F. Sorm : Collection Czechoslov. Chem. Commun., 24, 2781 (1957)。
- (14) K. Mori, M. Nakamura and S. Funahashi : Agr. Biol. Chem. (Japan), 24, 344 (1960)。
- (15) N. S. Gonzalez and H. G. Pontis : Biochim. Biophys. Acta, 69, 179 (1963)。
- (16) 池田など：農化大会シンポジウム（1961、4月、福岡）。
- (17) 斎藤：化学, 15, 101 (1960)；日水産誌, 27, 461 (1961)；食品工業, 4, No. 11, 20(1961)。