

食品中の核酸成分に関する研究*—Ⅲ

水産食品における 5'-ヌクレオチドの分布

毛利 威徳・橋田 度・志賀 岩雄

STUDIES ON NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN FOODSTUFFS-Ⅲ. DISTRIBUTION OF 5'-NUCLEOTIDES IN SEA FOOD PRODUCTS

Takenori Mouri, Wataru Hashida, and Iwao Shiga

Distributions of 5-nucleotides in sea foods, namely in shellfishes, squids, shrimps and crabs, were investigated in order to learn these role on flavor. Individual distributions of 5'-nucleotide in perchloric acid extracts of three kinds of *Crustacea* and five kinds of *Mollusca* were determined by ion-exchange coulumn chromatography.

Six fractions were obtained by Dowex 1×8 column from the extract of raw shrimp. Among them two fractions were identified as 5'-adenylic acid (5'-AMP) and 5'-inosinic acid (5'-IMP). Also the presence of 5'-AMP and 5'-uridylic acid (5'-UMP) was recognized in boiled Asari (*Venerupis semidecusata*). As the results of column chromatography, 5'-AMP and 5'-UMP were found to be the major components belonging to 5'-nucleotides, of *Crustacea* and *Mollusca*. 5'-cytidylic acid was found in several cases, but only small amounts of 5'-guanylic acid were detected. 5'-IMP was found in very small quantities, except in shrimp (264 μmole/100 g in shrimp extract). Samples of sea foods were mostly found to contain 15-150 μmole/100 g material of a total of 5'-nucleotide. It was supposed that 5'-AMP may contribute to the flavor of sea foods in conjunction with glutamic acid.

緒 言

水産食品は生食用あるいは加工食品として家庭的に利用されるが、一方食品工業では重要な缶詰原料として古くから使用されている。すでに旨味成分の 5'-イノシン酸 (以下 5'-IMP) の含量を中

* 本研究は大阪大学工学部醗酵工学教室教授寺本四郎先生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。

醗酵工学 43巻 1号 P.35 (1965) 所載

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)
- ADP : adenosine diphosphate
- ATP : adenosine triphosphate
- RNA : ribonucleic acid
- DNA : desoxyribonucleic acid

心に水産食品類の核酸成分に関連しては¹⁾齊藤, ²⁾藤田, ³⁾富山, ⁴⁾中島, ⁵⁾Jones, ⁶⁾小俣らの報告がある。その結果水産食品中には一般魚類のように 5'-IMP が存在しているものもあり、また、軟体動物、甲殻類の一部などのように 5'-IMP の見出されないものが報告されている。食品工業の観点からはこのような両者の差違は興味深いもので夫々の 5'-ヌクレオチド分布のパターンを明らかにするとともにその結果に立脚した加工方法が考えられねばならない。

私達は前報^{7)~8)} 蔬菜類、またきのこ類につづいて、かに・いか・貝類・あわびなど軟体動物、甲殻類を対象にして 5'-ヌクレオチド類の分布を検討した結果を報告する。

実 験 の 部

1. 実 験 方 法

1.1 供試標準物質

定性、定量のための標準物質として 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-IMP, 5'-GMP はいず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、ヌクレオシドポリリン酸類は市販品を用いた。

1.2 試料およびその調製法

供試水産物は次のごときものである。学名は文献^{9,10)} によった。

通称くるまえび (*Penaeus Japonicus*)、するめいか (*Ommastrephes seani Pacificus*)、しじみがい (イソンジミ, *Nuttallia olivacea*)、あわび (*Haliotis gigantea*)、あさり (*Venerupis semidecusata*)、かき (*Ostrea giges*) は市販品、ずわいがに (*Acanthodes armatus*) は山陰地方産、しばえび (*Penaeus joyneri*) は冷凍市販品である。

カラムクロマトグラフィーの試料を調製するために次の方法で抽出した。

貝類の生身は貝がらを割ってそのままを過塩素酸抽出、また、煮熱肉は100°C、5分間煮沸したものを過塩素酸抽出した。

あわび、くるまえび、するめいか、あさはりは80°C 3分間煮沸して過塩素酸抽出、しばえびは解凍した後過塩素酸抽出した。

過塩素酸抽出法は氷冷下で10%過塩素酸溶液、次に2回5%過塩素酸溶液とともにホモジナイズし遠沈して抽出液を合併し 5N-KOH で中和し沈澱物を除いて試料とした。

1.3 分 析 方 法

個々の 5'-ヌクレオチド量は Dowex1×8 を用うるカラムクロマトグラフィーによった。方法は前報^{7,8)} に準ずる。なお、あさり、しばえびの画分の同定のために径 2 cm、長さ 30 cm の大型カラムを用いた。カラムからの溶出位置が 260m μ の吸収を peak とするフラクションを集めて濃縮し同定した。

なお Schmidt-Thannhauser 法によってあさり、かきの RNA, DNA, 酸可溶性成分を定量した。分析には Volkin E. and W. F. Cohn,¹¹⁾ 三浦, 田中,¹²⁾ Kuroiwa and Horie,¹³⁾ の記載を参照した。

2. 実験結果

2.1 しばえび, あさり各画分の同定

しばえび, あさりの抽出液の紫外外部吸収曲線は260m μ 附近に明瞭な peak が認められ, これから核酸成分の存在が推定される.

しばえび解凍肉 200g を過塩素酸抽出法によって抽出,

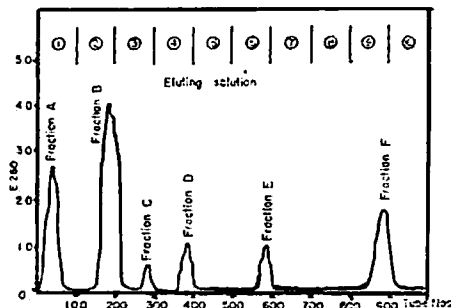


Fig. 1 Chromatogram of perchloric acid extract of raw shrimp (*Penaeus joyneri*), a large scale column

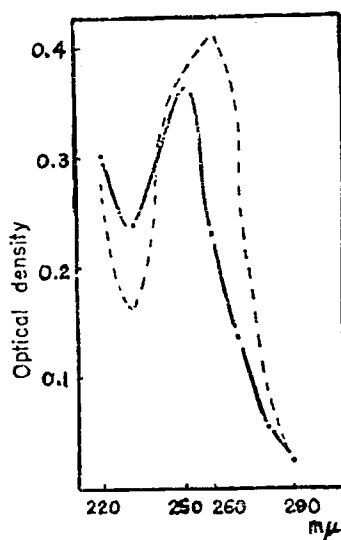


Fig. 2 Absorption curves of shrimp fractions D, and E.

0.2		0.4		0.6		0.8	
R_f							
				Solvent 2			
				○	○		
				○			
				Solvent 5			
				○	○		
				○			
				Solvent 2			
				○			
				○			
				○			
				○			
				Solvent 4			
				○			
				○			
○							
○							
				○			
				○			
				○			
				○			

authentic Hypoxanthine
fraction B
authentic Inosine
authentic Hypoxanthine
fraction B
authentic Inosine
authentic 5'-AMP
fraction D
authentic 5'-IMP
fraction E
fraction E, decomposed with IN-HCl.
authentic Hypoxanthine
authentic 5'-AMP
fraction D
fraction D, 5'-nucleotidase treated.
authentic Adenosine
authentic 5'-IMP
fraction E
fraction E, 5'-nucleotidase treated.
authentic Inosine

Fig. 3 Identification of shrimp fractions D and E by paper chromatography.
Solvent 2: n-propanol, conc ammonia, water.
Solvent 4: saturated $(NH_4)_2 SO_4$ Water. IM sodium acetate.

冷時遠心分離し上澄液を集め 550 ml ($UV_{260}=4125$, UV_{260} とは $260 m\mu$ の吸収量と液量 ml 数との積) を大型カラム ($2 \times 30 cm$) を通過させた. そのクロマトグラムは Fig. 1 のごとくである. A, B, C, D, E, F, の 6 個の画分を得たが, 画分 D, E の紫外外部吸収曲線を描くと D は $260 m\mu$ 附近に, E は $250 m\mu$ 附近に最大吸収を示し, 核酸成分と考えられる. Fig. 2 のごとくである. Fig. 3 はペーパークロマトグラフィの結果の一例であるが画分 D および E は溶媒〔2, 3, 4〕(前報⁷⁻⁸⁾ 参照) で同定した. 画分 D, E に 5-スクレオチダーゼを作用させると分解しアデノシン, イノシンに一致した. また $1N \cdot HCl$ で分解するとそれぞれアデニン, ヒポキサンチンに一致した. これらは夫々 5'-AMP, 5'-IMP に由来するものと考えられる.

なお塩基, リボース, 燐酸のモル比は Table 1 のごとくである. これらのことから画分 D, E

Table 1. Molar ratio of ribose and 5'-phosphate to base in shrimp fractions D and E.

Fraction	Base	Ribose	5'-Phosphate
D	1.00	1.11	1.02
E	1.00	1.00	0.99

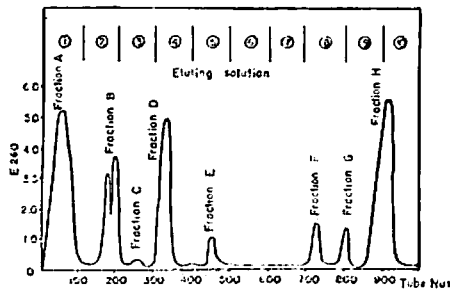


Fig. 4 Chromatogram of perchloric acid extract of raw Asari (*Venerupis semidecussata*), a large scale column.

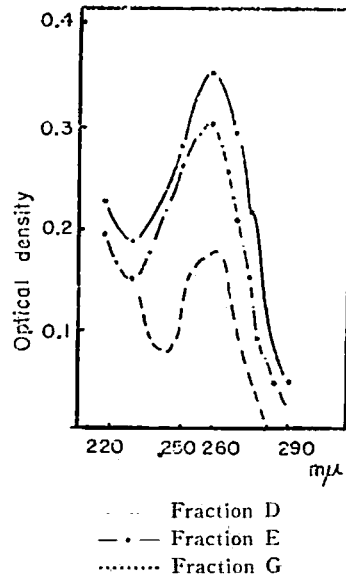


Fig. 5 Absorption curves of Asari fractions D, E and G.

は夫々 5'-AMP と 5'-IMP であることが確認された. 画分 A は活性炭吸着による回収率が低く核酸成分は少ないと考えられる. 画分 B は混合物でありアデニン, ヒポキサンチンが存在することが溶媒〔2, 3, 4〕によって認められた. 画分 C は 5'-CMP に相当する位置であるが微量でペーパークロマトグラフィでは確認できなかった. あさりについては分析法はしばえびと同じであるが, あさりむき身 ($100^{\circ}C$, 7分) 100 g を過塩素酸抽出法によって抽出した. 上澄液 505 ml ($UV_{260}=5050$) を大型カラムを通過させた. そのクロマトグラムは Fig. 4 のごとくである. A, B, C, D, E, F, G, H の 8 個の画分を得たが画分 D, E の紫外外部吸収曲線を描くと D, E とともに $260 m\mu$ 附近に最大吸収を示し核酸成分であると考えられる. Fig. 5 のごとくである.

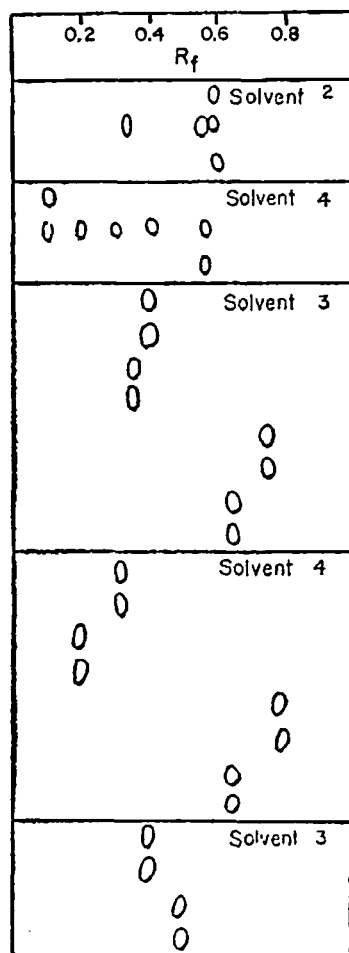
塩基, リボース, 燐酸のモル比は Table 2 のごとくである. Fig. 6 はペーパークロマトグラム

の一部を示した。画分 D および E は夫々 5'-AMP, 5'-UMP と一致した。また画分 D, E に 5'-ヌクレオチダーゼを作用するとアデニンとウリジンに一致し、また 1N・HCl で分解するとアデニンとウラシルに一致した。これらのことから画分 D, E は夫々 5'-AMP と 5'-UMP であることが確認された。画分 A は核酸成分は少ないと考えられ、画分 B は混合物でありアデニン、ウラシルが存在することが溶媒〔2, 3, 4, 5〕で認められた。

緩酸 buffer (pH 2.8) 480 V/cm 0.2 mA 2 時間濾紙電気泳動すると陽極への移動距離は 5'-AMP,

Table 2. Molar ratio of ribose and 5'-phosphate to base in asari fractions D, E, and G.

Fraction	Base	Ribose	5'-Phosphate
D	1.00	0.85	0.86
E	1.00	—	1.07
G	1.00	1.09	2.73



authentic Adenine
 fraction B
 authentic Uracil
 authentic Adenine
 fraction B
 authentic Uracil
 authentic 5'-AMP
 fraction D
 fraction D, decomposed with 1N-HCl.
 authentic Adenine
 authentic 5'-UMP
 fraction E
 fraction E, decomposed with 1N-HCl.
 authentic Uracil
 authentic 5'-AMP
 fraction D
 fraction D, 5'-nucleotidase treated.
 authentic Adenosine
 authentic 5'-UMP
 fraction E
 authentic Uridine
 fraction E, 5'-nucleotidase treated.
 authentic ADP
 fraction G
 fraction G, boiled for 2 hrs.
 authentic 5'-AMP

Fig. 6 Identification of Asari fractions D and E by paperchromatography.

Solvent 2: n-propanol, conc. ammonia water.

Solvent 3: isc-propanol, conc. HCl, water.

Solvent 4: saturated (NH₄)₂ SO₄ water, 1M sodium acetate., isopropanol.

3'-AMP は 1.1 cm と 1.0 cm でしばえび画分 D, あさり画分 D は 1.1 cm であった。 硝酸塩 Buffer (pH 9.2) 20 V/cm 0.1 mA 4 時間, 5'-AMP, 3'-AMP は 6.2 cm と 4.8 cm, 5'-UMP は 6.8 cm であった。 5'-IMP は 6.6 cm であり, しばえび E は 6.7 cm, あさり D は 6.7 cm であった。

以上の結果を総合してしばえびでは画分 D は 5'-AMP, 画分 E は 5'-IMP であり, あさはり画分 D は 5'-AMP, 画分 E は 5'-UMP であることを確認した。

このようにして, しばえびでは 5'-スクレオチドとしては 5'-AMP と 5'-IMP が主体であり, あさはりは 5'-AMP と 5'-UMP が主体であることを認めたが 5'-GMP はいずれも見出せなかった。

2.2 水産食品中の個々の 5'-スクレオチドの分布

数種の水産物抽出液についてその 5'-スクレオチド組成をカラムクロマトグラフィでしらべた。 あわび, しじみがい, ずわいがに, かきのクロマトグラム数例は各々 Fig. 7 および Fig. 8, 9, 10 に示すごとくである。 いずれのクロマトグラムにおいても 5'-AMP, 5'-UMP が見出され, えび類には 5'-IMP が見出されている。 また比較的少量ではあるが 5'-CMP も見出された。 また 5'-モノスクレオチド類の前に核酸塩基, スクレオチドの混合区分が, また 5'-CMP の後に polyphosphate 区分が認められた。 これらの水産物においても 2-, 3'-スクレオチドに相当する画分は見出

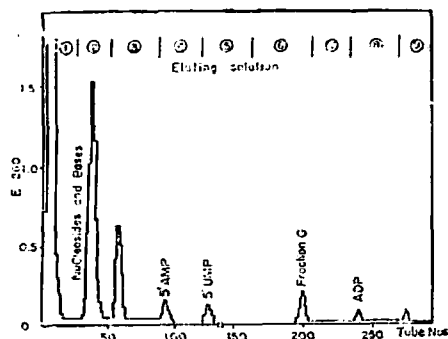


Fig. 7 Chromatogram of perchloric acid extract of Sizimigai (*Nuttallia olivacea*).

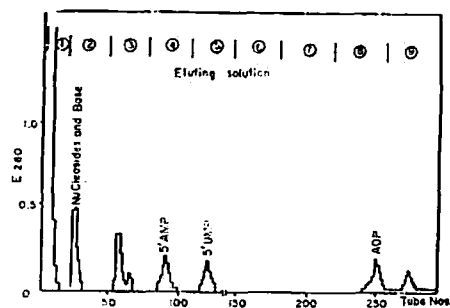


Fig. 8 Chromatogram of perchloric acid extract of Zuwaigani (*Acanthodes armatus*).

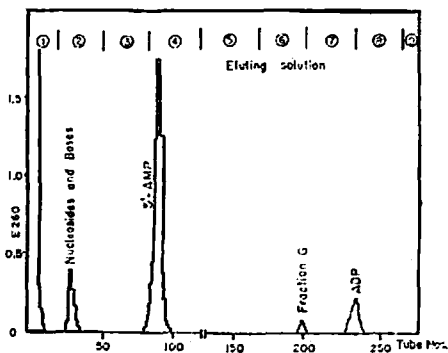


Fig. 9 Chromatogram of perchloric acid extract of boiled Awabi (*Haliotis gigantea*).

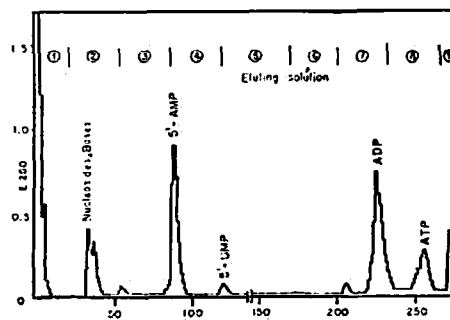


Fig. 10 Chromatogram of perchloric acid extract of Kaki (*Ostrea giges*).

されなかった。

これらのクロマトグラムから 5'-スクレオチド含量を計算すると Table 3 のごとくである。かつお節の旨味と呼ばれる 5'-IMP はくるまえば、しばえびには相当量含有しており旨味として考慮すべきであると考えられる。またその外は 5'-AMP が主体でこれも旨味として幾分か貢献しているのではないかと考えられる。

Table 3. Amounts of individual 5'-nucleotide in perchloric acid extract of several kinds of fisheries. Concentration in μ mole per g.

Fisheries	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP	ADP	ATP
Kurumaebi (<i>Penaeus japonicus</i>), boiled meat	+	2.38	+	2.64	0	0.39	0.04
Surumeika (<i>Ommastrephes seani pacificus</i>), boiled meat	+	0.09	0.11	0	0	0.15	0.08
Sijimigai (<i>Nuttallia olivacea</i>), boiled meat	0	0.03	0.22	0	0	0.02	0.08
Awabi (<i>Haliotis gigantea</i>), boiled meat	0	1.20	0	0	0	0.19	+
Zuwaigani (<i>Acanthodes armatus</i>), raw meat	+	0.14	0.16	0	0	0.28	0.05
Zuwaigani (<i>Acanthodes armatus</i>), boiled meat	+	0.52	0.33	0	0	0.15	0.03
Asari (<i>Venerupis semidecussata</i>), raw meat	+	0.31	0.05	0	0	0.50	0.63
Asari (<i>Venerupis semidecussata</i>), boiled meat	+	1.25	0.13	0	0	0.80	0.22
Shrimp (<i>Penaeus joyneri</i>), raw meat	+	0.08	+	+	0	+	+
Kaki (<i>Ostrea giges</i>), raw meat	+	0.61	0.96	0	0	0.72	0.43
Kaki (<i>Ostrea giges</i>), boiled meat	+	0.37	0.04	0	0	0.41	0.20

2.3 かき、あさり、しばえびの RNA 含量と 5'-スクレオチド組成との比較

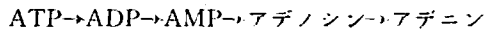
Table 4. Content of phosphorus in fractions of raw asari, shrimp, and kaki.

	Total phosphorus	Acid-soluble fraction	RNA fraction	DNA fraction	
Asari	μ mole/g dry wt.	512.0	220.0	72.2	9.4
	% of each fraction to total phosphorus		42.0	14.0	1.8
Shrimp	μ mole/g dry wt.	225.0	171.0	22.3	7.1
	% of each fraction to total phosphorus		77.2	9.9	3.1
Kaki	μ mole/g dry wt.	276.0	141.0	40.0	7.44
	% of each fraction to total phosphorus		51.0	14.4	2.7

生あさり、解凍しばえび、生、煮沸かきを一定量とり冷時水とともにホモジナイズし均一懸濁液を試料として全燐量、酸可溶性燐画分、RNA 燐画分、DNA 燐画分を分離定量した。Table 4 で RNA 燐（前報参照）に対して遊離状の 5'-スクレオチド（Table 3 参照）は 1/6 量に過ぎないことが認められた。酸可溶性燐は RNA 燐に対しては 1/20~1/30 量に過ぎない。

考 察

水産食品中の酸可溶性核酸成分に関して、¹⁾ 齊藤により主に 5'-IMP の生成について詳細に報告されている。私達は 5'-IMP が認められないと言われている貝類、イカ、カニ類について核酸成分の分布を検討した。イオン交換カラムクロマトグラフィによるパターンはこれらについては略々同様なものであり 5'-AMP、5'-UMP が主体であるが 5'-IMP、5'-GMP はほとんど見出されなかった。鮮度が悪くなるに従ってアデノシン、アデニンが生成された。その経路は次のようなものと考えられる。



齊藤らは¹⁾ 5'-IMP の生成経路について AMP デアミナーゼによって 5'-IMP が生成されるものとしているがカニ、イカ、貝類においては AMP デアミナーゼを欠くために 5'-IMP が見出されないものと推定される。5'-AMP は 5'-IMP には変化せず nucleotidase、nucleosidase の作用をうけてアデノシン、アデニンになるものと考えられる。また一方 5'-UMP の存在とともにその分解産物のウリジン、ウラシルの存在も認められたが、その生成経路についてはウリジンの誘導体からの経路と、また、一方高分子核酸からの分解を考えなくてはならないが今後検討したい。

前報で⁷⁻⁸⁾ きのこ類、農産食品についての結果で煮出すことによって mononucleotide の増加を認めているが、水産食品にもこのような現象が認められ、やはり polyphosphate からの分解が主体をなしていると考えられる。5'-AMP は量的には蔬菜類の約10倍、きのこ類とほぼ同量であった。

要 約

あさり (*Venerupis semidecusata*)、しばえび (*Penaeus joyneri*) など約7種の水産食品を対象にして食品化学的見地から 5'-スクレオチド類の分布を調べた。5'-スクレオチドの定量は Dowex 1×8 を用うるカラムクロマトグラフィによった。また 5'-スクレオチダーゼによる総 5'-スクレオチド量を測定した。あさり、しばえび過塩素酸抽出物について画分の同定を行なった。5'-UMP、5'-AMP、しばえびにおいてはこれらに加えて 5'-IMP の存在を確認した。また、5'-CMP の存在は微量のために確認することはできなかった。一般に貝類、あわび、かに、しばえびには3種の5'-スクレオチドが普遍的に認められたが、2'、3'-スクレオチドはほとんど見出されなかった。えび類においては 5'-IMP の存在を認めた。

貝類、かになどの 5'-スクレオチド類含量はきのこ類と比較すると同じ程度であった。食品自体の RNA の約 1/6 量に過ぎないことが認められた。しばえび、くるまえびにおいては 5'-IMP が見

出され、また、貝類においては 5'-AMP が存在しグルタミン酸との相乗効果によって幾分かは旨味に影響することであろう。

終りに臨み御援助を賜わり懇切な御助言を賜わった武田薬品工業 K K の方々および実験に協力された東洋食品研究所青山延子嬢、寺田潤子嬢に深謝致します。

本報は昭和38年度の日本醸酵工学会大会で発表した。

文 献

- 1) 斎藤：化学，13，101 (1960)
- 2) 藤田，橋本，森高：日本誌，25，177，312 (1959)
藤田，橋本，森高：日本誌，26，907 (1960)
- 3) 富山，北原，大山，阿部：日本水産学会秋期大会報告 (1962)
- 4) 中島，藤田，鎌田，市川：農化，35，797，803 (1961)
中島，藤田，鎌田，市川：農化大会講演会福岡 (1961)
- 5) Jones, N. R., Murray, J.: *Biochem. j.*, 16, 59 (1959)
- 6) 小俣，江口：日本誌，28，630 (1962)
- 7) 橋田，毛利，志賀，西川，寺本：醸酵工学，41，420 (1963)
- 8) 橋田，毛利，志賀，寺本：醸酵工学，41，434 (1964)
- 9) 浅野：分類水産動物図説 (1933)
- 10) 蒲原：原色日本魚類図鑑 (1956)
- 11) Schmidt, G., Thannhauser, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 161, 83 (1945)
- 12) Volkin, E., Cohn, W. E.: *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 287 (1954)
- 13) 三浦，田中：核酸蛋白質酵素 6，486 (1961)
- 14) Kuroiwa Y., Horie. Y.: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, 19, 35 (1955)