

食品中の核酸成分に関する研究 — V

食用きのこの加工における核酸成分の消長 (その2)

毛利 威徳・橋田 度・志賀 岩雄

STUDIES ON NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN FOODSTUFFS.-V.

CHANGES OF NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES DURING THE PROCESSING OF EDIBLE MUSHROOMS. II

Takenori Mouri, Wataru Hashida, and Iwao Shiga

Supposing that the increase of 5-nucleotides during boiling process of mushrooms was due to the breakdown of mushroom ribonucleic acid (RNA), we investigated the changes of RNA, perchloric acid (PCA) soluble fraction, and total phosphorus, during boiling in water, and the accumulation of 3'- or 5'-nucleotide in buffered solutions of various pH.

As a result of boiling, RNA fraction in the solid part of Shii-take (*Lentinus edodes*) was considerably decreased and a total of phosphorus compound was increased in boiled extract. The base ratio of Shii-take RNA was almost equal whether Shii-take was boiled or not. 5'-Nucleotides were accumulated at pH6~9 and 3'-nucleotides at pH4. At pH6 (natural condition of boiling), the degradation of RNA and the accumulation of 5'-nucleotides was observed. The latter was a mixture of four kinds of nucleotides which were the members of Shii-take RNA. In the case of *P. bisporus*, the increase of 5'-nucleotides due to RNA decomposition was relatively small. Also it was recognized that the crude extract of Shii-take degraded the yeast RNA and accumulated a mixture of 5'-nucleotides. We assume that the formation of 5'-GMP (it is called the taste of Shii-take) and other 5'-nucleotide during boiling process is due to the activity of the RNA-decomposing enzyme system.

緒 言

前報において、マッシュルーム、シイタケの煮熟や煮出しなどの加工に伴う5'-ヌクレオチド類の増加の原因として、ATP、ADPよりの5'-AMPの生成について検討した。本報においては5'-ヌクレオチド類の増加がきのこ高分子核酸の分解に基づくのではないかとこの観点から、加熱処理に

* 本研究は大阪大学工学部醸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。

醸酵工学 43巻5号 P.344 (1965) 所載

脚註：本報においては次の略号を使用する。

RNA: ribonucleic acid

ADP: adenosine diphosphate

AMP: adenosine monophosphate

UMP: uridine monophosphate

ATP: adenosine triphosphate

DNA: desoxyribonucleic acid

CMP: cytidine monophosphate

GMP: guanosine monophosphate

伴う核酸成分の消長を追及した。RNAの分解が単なる加熱による分解のみとは考えられないので、RNA分解酵素系が活動する可能性についても若干の検討を行なった。シイタケの場合は、そのRNA分解酵素系の作用によって「シイタケの味」と呼ばれる5'-GMPが生成すると考えられるのでここに報告する。

実 験 の 部

1. 実 験 方 法

1.1 供試標準物質 前報¹⁾に準ずる。

1.2 試料調製法

供試きのこはシイタケ (*Lentinus edodes*) と通称マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) で前者は市販品、後者は当研究所試作品である。

いずれも可食部をできるだけ均一に取り細断した後に種々の条件で処理し、冷却してホモジナイズし5~10%の過塩素酸溶液で反応停止と抽出を兼ねて処理し、5 N-KOH で中和し活性炭処理した後アルコール含有アンモニア溶液にて溶出濃縮し試料とした。

1.3 分 析 方 法

総5'-あるいは3'-ヌクレオチド量は中島²⁾らの酵素法によった。個々のヌクレオチドはDowex 1×8を用いるカラムクロマトグラフィで定量した。Schmidt-Thannhauser³⁾法によつてきのこの全磷酸、可溶性磷、RNA 磷、DNA 磷画分を分画定量した。そのうちRNA画分については1N-KOHで37°C、18~20時間分解してモノヌクレオチドとして構成塩基組成を調べた。また自己分解酵素系におけるpHの影響を調べるために酢酸 Buffer とトリシアミノメタン Buffer を使用した。自己消化はpH 4.0あるいはpH 8.0において、50°Cで4時間保温した後、反応液は活性炭処理後カラムクロマトグラフィで定量した。

2. 実 験 結 果

2.1 生シイタケ、生マッシュルームの煮出しに伴う核酸成分の変化

シイタケを煮出す時に5'-GMPなど5'-ヌクレオチド類が増加することは、すでに認められてい

Table I. Content of phosphorus in some fractions of raw mushroom and boiled mushroom (*P. bisporus*.)

Boiling condition		Phosphorus μ mole/g dry wt. of material			
		Total phosphorus	Acid-soluble fraction	RNA fraction	DNA fraction
100°C, 3 min	Before boiling, in solid	391	188	50	2.2
	After boiling, in solid	299	152	38	1.1
	After boiling, in liquid	82			
70°C, 30 min	Before boiling, in solid	485	223	45	3.8
	After boiling, in solid	263	108	33	3.8
	After boiling, in liquid	168			

Table II. Content of phosphorus in some fractions of raw Shii-take and boiled Shii-take (*Lentinus edodes*.)

Boiling condition		Phosphorus μ mole/g dry wt. of material			
		Total phosphorus	Acid-soluble fraction	RNA fraction	DNA fraction
100°C, 3 min	Before boiling, in solid	113	74	16	2.9
	After boiling, in solid	87	30	9	1.4
	After boiling, in liquid	40			
70°C, 30 min	Before boiling, in solid	167	121	18	3.8
	After boiling, in solid	140	41	8	3.3
	After boiling, in liquid	24			

るが、^{1,4,5} 磷酸画分として全磷、酸可溶性磷、RNA 磷、DNA 磷が、煮出しの前後においていかなる消長を示すかをしらべた。

生シイタケ、生マッシュルームを水から加温し、100°C で3分間煮出す条件と、70°C で30分間煮出す条件で、煮出し前後のきのこの固型物と液汁について分析した。

その結果はマッシュルームについては Table I, シイタケについては Table IIのごとくである。

マッシュルームもシイタケも、いずれも兩種の煮出し条件による相違は少なく、煮出しによって固型物中の全磷、酸可溶性磷、RNA 磷が減少し、液汁中の全磷として回収されている。RNA 画分の減少の程度はマッシュルームでは少ないが、シイタケでは著しかった。このように煮出しにおいては核酸成分の消長が著しく、とくに RNA の分解が考えられる。それで煮出しの前後における RNA 区分についてその構成塩基の組成などをしらべた。

2.2 生シイタケ、生マッシュルームの煮出しに伴う RNA 画分の変化

シイタケ、マッシュルームより過塩素酸可溶成分および脂溶性成分を除き、RNA 画分をアルカリで分解したものを対照とし、水から温めて100°C で3分間煮出した後同様の処理を行なった試料とを比較しながらカラムクロマトグラフィを行なった。そのクロマトグラムは Fig. 1, Fig. 2のごとくである。

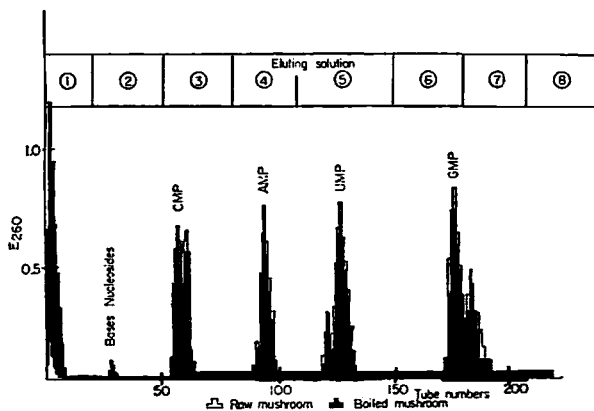


Fig. 1. Chromatogram of alkaline digest of mushroom RNA after perchloric acid extraction.

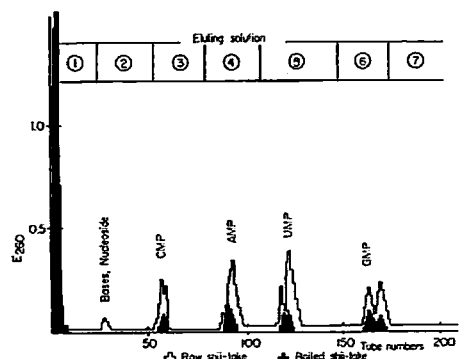


Fig. 2. Chromatogram of alkaline digest of Shii-take RNA after perchloric acid extraction.

きのこの RNA のアルカリ分解によって4種のモノヌクレオチドが生成し、いずれも 3'-または 2'-ヌクレオチドと考えられる。マッシュルームの場合は煮出しによる RNA 分解の総量が少なくしたがってアルカリ分解によってその構成塩基をしらべても煮出し前後の差違が少なく、シイタケの場合は煮出しによる RNA 画分の減少が著しく、かつアルカリ分解によるモノヌクレオチドの生成量も少ない。両者について RNA 画分の構成塩基組成を示すと Table 3, Table 4 のごとくである。

Table 3. Molar ratio of alkaline digest of mushroom.

Sample		CMP	AMP	UMP	GMP
Raw mushroom	μ mole/g dry wt.	8.2	8.8	8.9	6.2
	Molar ratio	0.93	1.00	1.00	0.70
Boiled mushroom	μ mole/g dry wt.	8.0	8.3	8.7	6.0
	Molar ratio	0.95	1.00	1.00	0.73

molar ratio: AMP=1.00

Table 4. Molar ratio of alkaline digest of Shii-take.

Sample		CMP	AMP	UMP	GMP
Raw Shii-take	μ mole/g dry wt.	6.27	7.58	8.58	6.07
	Molar ratio	0.83	1.00	1.16	0.80
Boiled Shii-take	μ mole/g dry wt.	1.82	1.82	1.77	1.87
	Molar ratio	1.00	1.00	0.97	1.03

molar ratio: AMP=1.00

AMP のモル数を 1 として CMP, UMP, GMP のモル比率を示している。これらの RNA の構成比率は一般生物におけるものと比較して特異なものではない。煮出しの前後における塩基比率がほぼ同一のことから、煮出しにおいては一様均一な組成をもった RNA がほぼ同様な塩基比率で分解されるものと考えられる。

このように煮出し操作によってきのこの固型物中の RNA の分解が認められ、シイタケの場合は RNA が 1/3 に減少するほど著しいが、マッシュルームはその程度が少ない。この RNA の分解は単なる熱分解のほか、核酸分解酵素系の活動も考慮せねばならない。そこでまず自己核酸の分解における pH の影響についてしらべた。

2.3 核酸の自己分解における pH の影響

生シイタケ、生マッシュルームを細かく切り 50°C または 25°C で pH 3.0~10.0 の範囲の Buffer に浸漬保温し、抽出液の紫外吸収および蓄積された 5'-あるいは 3'-ヌクレオチド量を測定した結果は次のごとくである。(Table 5, Table 6)

マッシュルームの場合 pH 8.0 付近で 260 m μ 吸収物質が最大であるが、pH 3.0 でも約 50% の吸収があり、あまり差違は認められなかった。しかし 5'-ヌクレオチド量では pH 9.0 付近に大きな

Table 5. Autolysation of shii-take and formation of 5'- and 3'-nucleotide at various pH.

Buffer solution	pH		UV ₂₃₀ /100mg dry wt.	5'-Nucleotide μ mole/g dry wt.	3'-Nucleotide μ mole/g dry wt.
	Initial	Final			
Acetate	3.0	3.6	65.5	0.96	1.01
	4.0	4.1	64.7	0.47	1.74
	5.0	5.0	60.8		1.89
	6.0	6.0	58.0	1.74	trace
	7.0	6.6	55.3	1.71	"
Tris-aminomethane	7.0	6.6	61.4	0.75	0
	8.0	7.7	64.4	5.82	0
	9.0	8.7	72.5	5.29	trace
	10.0	9.3	64.1	1.93	0

Table 6. Autolysation of mushrooms and formation of 5'- and 3'-nucleotide at various pH.

Buffer solution	pH		UV ₂₃₀ /100mg dry wt.	5'-Nucleotide μ mole/g dry wt.	3'-Nucleotide μ mole/g dry wt.
	Initial	Final			
Acetate	3.0	3.7	90	5.36	2.23
	4.0	4.1	102	3.07	4.52
	5.0	5.1	135	3.58	4.01
	6.0	6.0	148	5.42	1.93
	7.0	6.8	154	8.52	0.81
Tris-aminomethane	7.0	6.7	149	7.31	1.69
	8.0	7.7	180	18.3	0
	9.0	8.8	172	21.1	0
	10.0	9.3	157	15.4	0

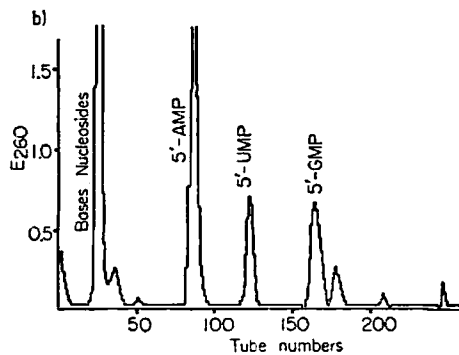
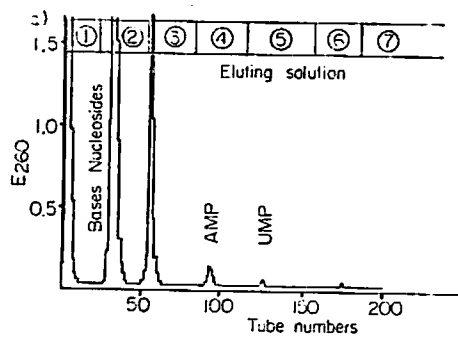
Peak がありまた pH 3.0 でもやや高かった。また 3'-ヌクレオチド量では pH 4.0 にかなり見出された。

シイタケでは pH 8.0~9.0 に 5'-ヌクレオチド、pH 4.0~5.0 に 3'-ヌクレオチドの Peak があったが、シイタケにおいては pH 5.0~6.0 附近よりすでに 5'-ヌクレオチドが存在することがわかった。つぎにそれらの pH における塩基、ヌクレオチド、ヌクレオチド組成をカラムクロマトグラフィーで調べた。結果は Fig. 3, Fig. 4 のごとくでありその含量は Table 7 のごとくである。

pH 4.0 ではマッシュルーム、シイタケでは塩基、ヌクレオチドが主体でモノヌクレオチドはほとんど認められず pH 8.0 ではマッシュルームで 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-UMP が相当量認められた。またシイタケでは pH 8.0 では 4 種の 5'-ヌクレオチドがシイタケ RNA の構成塩基組成に大略似かよった比率で蓄積されていた。

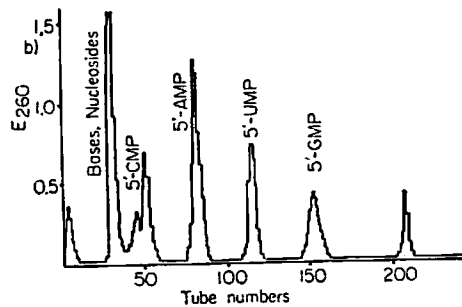
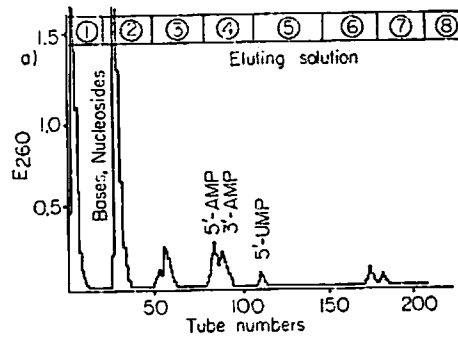
2.4 粗酵素液による酵母 RNA の分解

生シイタケ、生マッシュルームをホモジナイズした上澄液を粗酵素液として、酵母 RNA に作用させその分解反応における pH の影響をしらべた。すなわちきのこ 30g と水 30g をホモジナイズし



a) pH 4.0 b) pH 8.0

Fig. 3. Chromatogram of autolysates of mushroom homogenate.



a) pH 4.0 b) pH 8.0

Fig. 4. Chromatogram of autolysates of Shii-take homogenate.

Table 7. Contents of nucleotide and related substances in the autolysates of Shii-take and mushroom homogenate at pH 8.0.

Sample		A	B	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-GMP	ATP
Mushroom	Distribution of UV ₂₆₀ (%)	33.88	3.89	0.68	22.94	8.04	9.49	2.42
	μ mole/g dry wt.			0.73	11.20	4.10	5.23	
Shii-take	Distribution of UV ₂₆₀ (%)	41.40	5.10	8.10	14.90	9.30	10.6	5.25
	μ mole/g dry wt.			7.00	5.55	5.02	4.30	

遠心沈澱して上澄液をとり粗酵素液とする。粗酵素液 1ml に酵母 RNA (キリンビール製) 2% 溶液 1ml および種々の pH の 0.2 M Buffer 2ml を添加し 60°C で 1 時間保温した。反応終了後 0.75% 酢酸ウラニウム、0.25% 過塩素酸溶液 1ml を加え 0°C に 1 時間放置後冷却時遠心沈澱して上澄液をとり適当に稀釈して 260 mμ の吸収量を測定した。その結果は Table 8 に示した。

同表において 260 mμ の吸収量は酵母 RNA の分解程度に対応するが、シイタケでは pH 4 附近に、マッシュルームでは pH 6 附近に RNA 分解の最適条件があることを認めた。これらの酵素化学的な検討は後報に譲りたい。

Table 8. Degradation of yeast RNA with Shii-take or mushroom extract.

Buffer	pH	Shii-take UV ₂₃₀ /100mg dry wt.	Mushroom UV ₂₃₀ /100mg dry wt.
Acetate	3.0	530	100
	4.0	805	95
	5.0	505	145
	6.0	165	145
	7.0	160	140
Tris-aminomethane	7.0	145	140
	8.0	105	140
	9.0	95	110
	10.0	57	130

考 察

島蘭⁷⁾は食品中の5'-ヌクレオチドパターンを大別しそれらの生成機序について考察しており、シイタケ煮出し液中の5'-GMPなど4種の5'-ヌクレオチドは、シイタケに含まれている比較的耐熱性の核酸分解酵素によってリボ核酸の分解により生成するのであろうと説明している。その根拠として中島⁸⁾は、私達と時を同じくして日本農芸化学会大会(1964)において、シイタケ中の核酸分解酵素系による自己RNAの消化によって5'-ヌクレオチドが生成することを認め、粗酵素液について phosphomonoesterase, phosphodiesterase, RNA ase, DNA ase などの活動について報告している。私達の実験結果もこれらの論説を裏書きするものである。

核酸分解酵素系は緒方⁹⁾の説明にもよるよう多様な方向の酵素系を含んでいる。シイタケなどの場合5'-ヌクレオチドが遊離状態で蓄積されるのは、リボ核酸より5'-ヌクレオチドに至る生成速度が、5'-ヌクレオチドから核酸塩基に至る分解速度を上回っておらねばならないと考えられる。今後おのおの方向の酵素系についてさらに詳細な検討を行ないたい。

本報においてはシイタケ、マッシュルームについてRNA分解酵素系の活性および蓄積されるモノヌクレオチド量に対する反応液pHの影響についてしらべたが、両種のきのこにおいて最適条件に若干の相違のあること、およびpH4という条件では5'-ヌクレオチド以外に3'-ヌクレオチドも生成蓄積される可能性が認められた。細菌および酵母において3'-ヌクレオチドを生成する例は中尾^{10,11)}、緒方によって報告されている。

要 約

きのこ熱水抽出(煮出し)において、自己消化が行なわれ、RNAが分解するとともに、5'-または3'-ヌクレオチドが生成蓄積されることが認められた。すなわちシイタケではpH6~9で5'-ヌクレオチド、pH4では3'-ヌクレオチドが蓄積された。これが煮出しにおける5'-GMPなど5'-ヌクレオチド生成の原因と考えられる。マッシュルームでもRNAの分解に伴ってpH4附近では3'-

ヌクレオチド、pH8では5'-ヌクレオチドの蓄積は認められるが、水による煮出し条件（pH6附近）ではRNAの分解とヌクレオチドの生成はいずれも少なかった。このようにきのこの種類によって、pHの相違によるヌクレオチド量の相違が認められた。一般にきのこの煮出しにおいては、前報も含めて、きのこの種類に応じて、ATPからの分解とRNAの分解が認められ、酵素系の特性に応じて生成蓄積するヌクレオチドにも特徴があるものと考えられる。

終りに臨み、貴重な薬品、酵素類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、および実験に協力された当短大青山延子・寺田潤子嬢に深謝致します。

本報は昭和39年度日本農芸化学会大会で発表した。

文 献

- 1) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 43, (1965)
- 2) 中島ら: 農化, 37, 558 (1963)
- 3) Schmidt, G., Thannhauser, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 161, 83 (1945)
Volkin, E., Cohn, W. E.: *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 287 (1954)
- 4) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 35, 797 (1961)
- 5) 橋田, 毛利, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 42, 434 (1964)
- 6) 大沢ら: 核酸, その生物学, 化学, 物理学 p. 84 (1963)
- 7) 島崗: *Amino acid and Nucleic acid* (醗酵と代謝) No. 10, 179 (1964)
- 8) 中島: 日農化昭和39年度大会要旨集 p. 106 (1964, 7月札幌)
- 9) 緒方: 化学と生物 No. 1, 11 (1962)
Amino acid and Nucleic acid (醗酵と代謝) No. 8, 1 (1963)
- 10) Nakao, Y., Ogata, K: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 116 (1963)
- 11) Nakao, Y., Ogata, K: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 499 (1963)