

食品中の核酸成分に関する研究*—Ⅺ

クルマエビの冷凍乾燥における5'-ヌクレオチドの消長

毛利 威 徳 ・ 下 田 吉 夫 ・ 橋 田 度

STUDIES ON NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN FOODSTUFFS-XI CHANGES OF 5'-NUCLEOTIDES DURING FREEZE-DRYING OF KURUMAEBI (PRAWN)

Takenori Mouri, Yoshio Shimoda, and Wataru Hashida

Raw meat of Kurumaebi (*Penaeus japonicus*), was freeze-dried below 40°C, and stored in cans in vacuo at 5°C or 30°C for six months. Changes in amounts of nucleotides, nucleosides, and bases were investigated using ion exchange chromatography and phosphatase assay, as same as in the case of freezing (J. of Fermentation Technology 45, 151 (1967)).

The amount of nucleotides of freeze-dried Kurumaebi was more than that in the raw sample. ATP and ADP decreased comparatively fast during freeze-drying, and 5'-AMP and 5'-IMP were accumulated correspondingly. During storage at 5°C or 30°C for six months, the change in amounts of AMP and IMP was rather slow. The phosphomonoesterase activities of freeze-dried samples were comparatively stable.

We guess that 5'-IMP and 5'-AMP are formed during freeze-drying of Kurumaebi, and they may contribute to the flavor of freeze-dried Kurumabi.

結 言

食品の冷凍乾燥においては、乾燥後の食品は一部の成分を除いて安定に保存されると考えられるが、冷凍乾燥の操作中には冷凍と加熱による乾燥の2工程をとまなうので、その際の変化は興味深い。冷凍乾燥における5'-ヌクレオチドの変化についての報告は少なく、また興味ある問題と思われる。

前報では活クルマエビを対照として、冷凍工程について検討したが、本報では同様に冷凍乾燥工程における5'-ヌクレオチドの消長を検討した。なおこの変化と酵素反応との関連についても若干の考察を行なった。

* 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いたします。

醸酵工学45巻3号 P.254 (1967) 所載

脚注：本報における化合物名の符号は前報と同じ。

実験方法

- 1) 供試標準物質は前報¹⁾に準ずる。
- 2) 試料調製法

冷凍乾燥の方法：活クルマエビを一夜 -20°C で予備凍結し解凍することなく、そのまま共和真空工業製R L-1000H S型で冷凍乾燥した。経済的にはより短時間高温の乾燥が可能であるが、本報では酵素作用の可能性を考えて、最高品温を 40°C に設定したものである。その経過はFig. 1のごとくである。

すなわち、まずキャビネットを冷却して -30°C に達したところに予備凍結したクルマエビを、トレイに乗せて棚上にのせた。つぎにトラップの冷却をはじめて $-50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ に達した頃キャビネットより脱気をはじめ、同時に棚温を徐々に上げはじめた。棚温を最初は 60°C に、3時間後には 40°C に調節することによって、品温を 40°C 以下に保つようにした。そのために乾燥には比較的長時間を要した。生原料1894 g、乾燥後重量514 g、乾燥比3.7であった。乾燥品はただちに無塗装2号缶に減圧下に缶詰し、 5°C と 30°C で6カ月間貯蔵した。5'-ヌクレオチド測定用の試料は、前報に準じて冷時過塩素酸にて抽出した。

3) 分析方法

総5'-あるいは3'-ヌクレオチド量は中島ら²⁾の酵素法によった。個々のヌクレオチドはDowex 1×8を用うるカラムクロマトグラフィーによった。揮発性塩基は富山ら³⁾の方法によった。

4) 酵素活性の測定

5倍量の水を加え水で冷却しながらホモジナイズした後、12000 rpm で冷却遠心し、その上澄液を使用した。酵素活性の測定法は大村、須原⁴⁾らの方法によった。

実験結果

1) 水もどしにおける核酸系物質の組成変化

生原料中のヌクレオチド組成は、前報¹⁾に報告したごとくである。冷凍乾燥品においては、水もどしを行ってから食用にされるのが通常であるので、その水もどし中にどのようにヌクレオチド組成が変わるか否かを調べた。すなわち冷凍乾燥直後に、冷時過塩素酸抽出したもの、およ

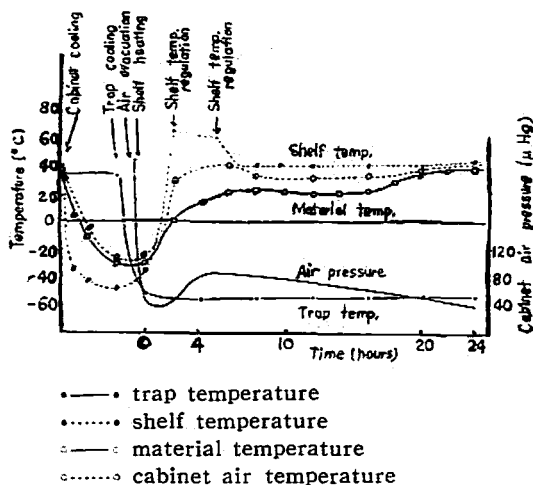


Fig. 1 Time course of freeze-drying of Kurumaebi.

び室温 (30°C) で10分間水もどして、同様に過塩素酸抽出したものを比較した。そのクロマトグラムは Fig. 2 のごとくで個々の量的変化は Table 1 のごとくである。

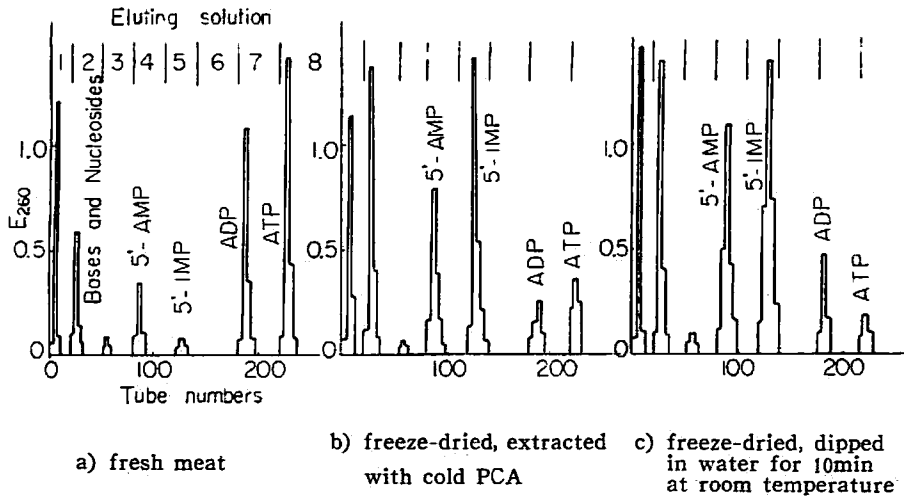


Fig. 2 Effect of dipping in water on the nucleotides of freeze-dried Kurumaebi. (Prawn)

Table 1. Effect of dipping in water on the nucleotides of freeze-dried Kurumaebi.

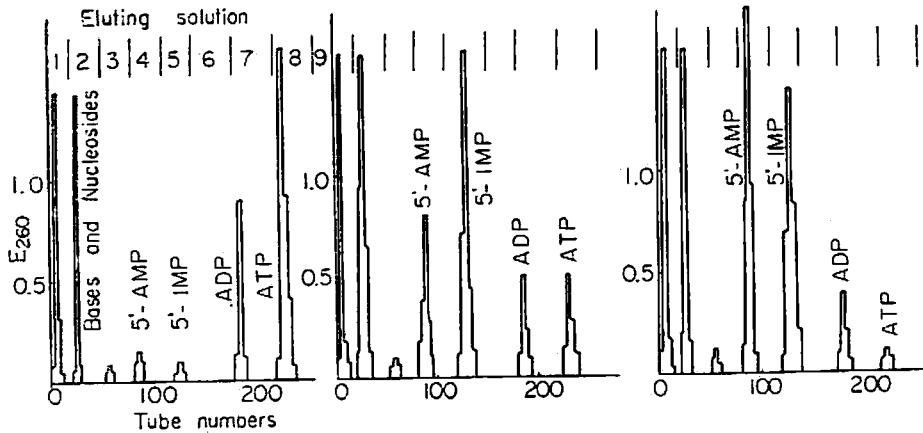
Sample		Adeno- sine	Inosine	Hypo- anthine	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Fresh	UV ₂₆₀ *	57.2	3.6	trace	1.2	trace	69.5	214.1
	μmol/g dry wt.	4.19	0.17		0.3	trace	13.4	42.4
Freeze-dried, extracted with PCA	UV ₂₆₀	81.04	40.52	10.13	75.0	96.7	9.8	46.7
	μmol/g dry wt.	4.88	2.47	0.20	10.9	23.8	1.1	5.4
Freeze-dried, dipped in water for 10min. at room temp.	UV ₂₆₀	106.4	53.20	13.30	118.0	86.1	30.2	5.3
	μmol/g dry wt.	5.17	1.05	0.21	11.3	18.9	2.8	0.5

* Absorbancy at 260mμ of each fraction.

生のクルマエビと冷凍乾燥直後のクルマエビで、5'-ヌクレオチド組成の相違が認められた。すなわちATP, ADPの減少と5'-AMP, 5'-IMPの増加が見出され、またイノシンの増加も認められた。乾燥品を10分間水もどした影響はほとんどなかった。このようにクルマエビの冷凍乾燥中にヌクレオチドの変化が著しく、また5'-IMPの生成は興味ある事実と言えるが、この原因として冷凍乾燥中に核酸分解酵素系の作用が考えられる。水もどし後では大きなヌクレオチドの変化は認められないが、これはすでに冷凍乾燥中に起るべき変化が起ってしまったと考えられる。以後冷凍乾燥品をそのまま冷時過塩素酸抽出を行なうことにした。

2) 冷凍乾燥中およびその後の貯蔵経過におけるクルマエビ核酸系物質の経時的変化

冷凍乾燥品を5°Cまたは30°Cで、缶詰内でそれぞれ6カ月保存した結果、クロマトグラムの1例は Fig. 3 のごとくである。また個々の含量は Table 2, Table 3 のごとくであった。



a) fresh meat b) immediately after drying c) stored at 5°C, for 6months
Fig. 3 Changes of the nucleotides of freeze-dried Kurumaebi. (Prawn)

Table 2. Changes of the nucleotides of freeze-dried Kurumaebi under storage at 30°C.

Sample		Frac. A*	Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Fresh	UV ₂₆₀ **	54.1	6.6	trace	1.2	trace	69.5	214.1
	μmol/g dry wt.				0.3	trace	13.4	42.4
Freeze-dried, immediately after drying	UV ₂₆₀	71.7	69.9	3.9	75.0	96.7	9.8	46.7
	μmol/g dry wt.				10.9	23.8	1.1	5.4
Freeze-dried, stored at 30°C for 1 month	UV ₂₆₀	65.6	62.0	2.4	80.0	55.7	23.3	trace
	μmol/g dry wt.				10.3	18.5	2.5	trace
Freeze-dried, stored at 30°C for 3 months	UV ₂₆₀	68.3	86.2	trace	110.4	82.3	45.4	trace
	μmol/g dry wt.				10.0	15.2	4.1	trace
Freeze-dried, stored at 30°C for 6 months	UV ₂₆₀	62.9	95.8	4.6	62.8	56.5	23.1	trace
	μmol/g dry wt.				9.3	17.4	3.4	trace

*: Mixture of nucleosides and bases.

** : Absorbancy at 260mμ of each fraction.

5'-ヌクレオチド組成の変化は生原料と冷凍乾燥直後の間、すなわち冷凍乾燥の操作中に認められた。ATP、ADPが減少し5'-AMP、5'-IMP、イノシンが蓄積した。なお冷凍乾燥品中のヌクレオチド組成は5°C、30°Cの6カ月貯蔵中では安定なもので、ヌクレオチド組成の変化はほとんど認められなかった。ただわずかながらATPと5'-IMPの減少がみられた。

前項までの分析を吟味する意味で、総5'-ヌクレオチド量の検討を行なった。

Table 3. Changes of the nucleotides of freeze-dried Kurumaebi under storage at 5°C.

Sample		Frac. A*	Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Fresh	UV ₂₆₀ **	54.1	6.6	trace	1.2	trace	69.5	214.1
	μmol/g dry wt.				0.3	trace	13.4	42.4
Freeze-dried, immediately after drying	UV ₂₆₀	71.7	69.9	3.9	75.0	96.7	9.8	46.7
	μmol/g dry wt.				10.9	23.8	1.1	5.4
Freeze-dried, stored at 5°C for 1 month	UV ₂₆₀	55.5	72.9	3.3	58.9	49.8	21.6	trace
	μmol/g dry wt.				10.0	19.8	3.5	trace
Freeze-dried, stored at 5°C for 3 months	UV ₂₆₀	72.6	112.2	6.9	84.3	91.0	39.2	trace
	μmol/g dry wt.				9.4	21.0	4.4	trace
Freeze-dried, stored at 5°C for 6 months	UV ₂₆₀	73.5	69.9	4.8	73.3	65.6	24.3	trace
	μmol/g dry wt.				10.9	19.9	3.6	trace

*: Mixture of nucleosides and bases.

** : Absorbancy at 260mμ of each fraction.

3) クルマエビ冷凍乾燥における総 5'-ヌクレオチド量と揮発性塩基の消長

総 5'-ヌクレオチド量を酵素法によって調べた。冷凍乾燥中の試料の総 5'-ヌクレオチド量を示すと Table 4 のごとくである。

Table 4. Total 5'-nucleotides and total volatile base of freeze-dried Kurumaebi.

Sample	Storage period	Total 5'-nucleotide(μmol)		Total volatile base (mg/100g)
		/g wet	/g dry wt.	
Fresh		0.54	3.17	5.7—6.2
		0.65	3.83	
		3.26	19.23	
Freeze-dried	immediately after drying	7.58	44.60	11.2—13.5
	5°C, 1 month	5.03	29.60	
	" 3 months	5.45	32.09	
	" 6 months	5.13	30.21	
	" 30°C, 1 month	5.18	30.48	
	" 3 months	4.15	24.47	
	" 6 months	4.84	28.50	
Freeze-dried dipped in water for 10min		7.24	42.60	

総 5'-ヌクレオチド量はカラムクロマトグラムでのヌクレオチド量の総和とほぼ一致した。また変化についても、冷凍乾燥時に変化が認められるのみで貯蔵中はあまり変化はなかった。揮発性塩基は一般に魚肉などの鮮度を示す指標とされているが、生原料と冷凍乾燥品を比較すると 2 倍程度増加していた。揮発性塩基に若干の変化はあるが、鮮度としては良い方であり、その前に冷凍乾燥においても冷凍と同じように ATP から 5'-AMP, 5'-IMP にいたる変化は進行して

いることが認められた。

4) 冷凍乾燥クルマエビにおける核酸分解酵素系の経時的変化

前項までのクルマエビ冷凍乾燥経過における ATP→ADP→AMP→IMP→イノシンの変化の原因が、核酸分解酵素系が主体をなすと考えられるので、経時的にクルマエビ肉より粗酵素液を抽出して、Phosphomonoesterase 活性と phosphatase 活性を測定した。

粗酵素液によって PMase 活性を前報¹⁾と同じように経時的に比活性を測定した結果 Table 5 のごとくである。

Table 5. PMase activity of the crude extracts of freeze-dried Kurumaebi.

Sample	Storage period	PMase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Activity to 5'-AMP (unit/mg protein)
Fresh		870	58	14.9	1.39
Freeze-dried	5°C, 0	4400	282	15.7	1.31
	" 1 month	4704	332	14.2	1.21
	" 3 months	4800	366	13.1	1.21
	" 6 months	1740	154	11.2	1.02
Freeze-dried	30°C, 0	4400	282	15.7	1.31
	" 1 month	4810	385	12.4	1.11
	" 3 months	3150	256	12.3	1.12
	" 6 months	1995	215	9.3	0.90

合成基質 PNPP に対する PMase および 5'-AMP に対する nucleotidase 活性のいずれも時間の経過による変化は認められないが、6 カ月目にわずかながら低くなっているように思われるが、酵素系は比較的安定に保存されていることが考えられる。上述のことより ATP や 5'-AMP が酵素により分解されることが推察されるが、これを裏付けるために、つぎのよう

に authentic な ATP と 5'-AMP に対して作用させてみた。その反応条件は Fig 4 のごとくである。

acetate buffer (pH5.0) で 37°C 1 時間反応させてクロマトグラフィーを行なうと Fig 5, 6 のごとくである。Fig. 5, 6 は冷凍乾燥品より抽出された粗酵素液によったクロマトグラムで ATP が減少するに対して、ADP, 5'-AMP, 5'-IMP, イノシンが生成した。また 5'-AMP に作用させた結果は 5'-IMP が少量生成し、さらにイノシンおよびアデノシンが生成されている。生原料粗酵素液とはほぼ同じ変化を示すが、その強弱については今後検討したいと考えている。

この酵素実験よりクルマエビ冷凍乾燥肉においても、冷凍中の肉と同じように核酸分解酵素系による変化があることが明らかになった。

ATP (20mg/20ml) 5.0ml
 —PMase fraction (18.5units) 5.0ml
 —1M buffer (pH 5.0) 1.0ml
 —incubation, 37°C, 1hr
 —HClO₄ treatment
 —active carbon treatment
 Sample for chromatography

Fig. 4 Degradation of ATP.

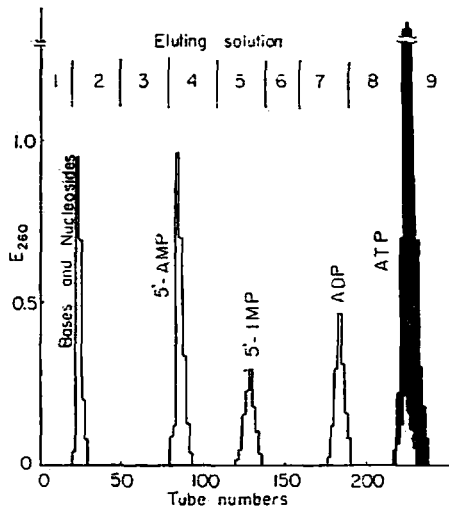


Fig. 5 Degradation of ATP with crude enzyme extract from freeze-dried Kurumaebi.
 ■ before incubation □ after incubation

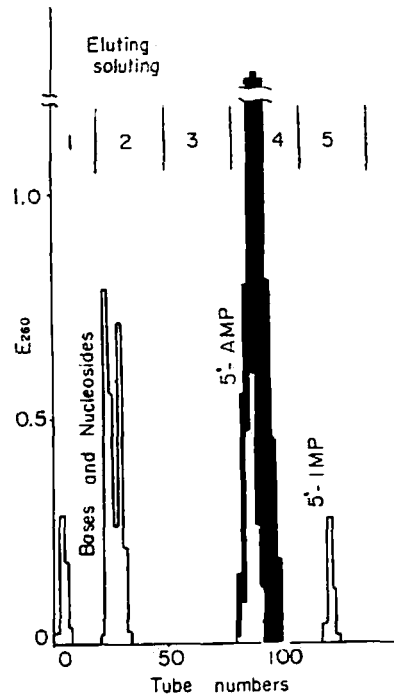


Fig. 6 Degradation of 5'-AMP with crude enzyme extract from freeze-dried Kurumaebi.
 ■ before incubation □ after incubation

考 察

前報¹⁾において冷凍中のクルマエビの変化については報告した。冷凍乾燥の操作中に ATP が減少し、5'-AMP、5'-IMPが増加したが、乾燥後のクルマエビを減圧缶詰中 5°C または 30°C で 6 カ月間貯蔵する間には、それ以上の 5'-ヌクレオチドの変化は余り認められなかった。冷凍乾燥の操作および 6 カ月の貯蔵期間を通じて PMase 活性の衰えはほとんど認められず ATP より ADP、5'-AMP、5'-IMP を経てイノシンとヒポキサンチンにいたる変化が適当な条件下で行なわれることが考えられる。この傾向は前報¹⁾の冷凍品を解凍した時に起る変化に類似している。

本報では冷凍乾燥を品温 40°C 以下という酵素作用に好適の状態で行なったが、その操作中で ATP の分解と 5'-AMP、5'-IMP の蓄積が認められたことは興味深いと思われる。斎藤、新井²⁾はホタテ、アワビなど貝類では、冷凍乾燥品では冷凍乾燥工程中には ATP の分解は起らず、水もどしの状態で変化すると述べ、またイカ、コイは乾燥工程中ですでに分解してしまっていることを述べている。Kronman³⁾は冷凍または冷凍乾燥品においても、蛋白分解酵素系が作用する可能性について述べている。これらのことより食品の品目によって特徴ある傾向を示すことと、酵素作用によるヌクレオチド組成の変化が十分に起りうる事が考えられる。クルマエビにおける変化はコイなどと同じような分解経路をとるものと考えられる。その機構の詳細については今

後検討したい。

要 約

クルマエビの冷凍乾燥試料は水もどしによってヌクレオチド組成の変化は認められず、冷凍乾燥操作中での変化が主体をなしていた。操作中の変化は冷凍と同じようにATP、ADP、AMP、IMPと変化し、さらにイノシン、アデノシンが認められた。5°C、30°Cでの保存試験は、6カ月後までほとんど変化がなかった。冷凍乾燥中はPMase活性が安定に保持されることが認められた。

クルマエビ冷凍乾燥中イカ、タコ、貝類ではみられない5'-IMPが生成することが認められた。この変化は呈味成分としては好ましいものである。

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寺田潤子嬢に深謝致します。

本報は昭和41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, 335 (1965)
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 43, 394 (1965)
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 237 (1966)
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 248 (1966)
- 2) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 37, 558 (1961)
- 3) 富山, 原田: 日水誌, 18, 112 (1952)
- 4) 須原, 草葉, 大村: 酵素化学シンポジウム, 115 (1964)
- 5) 斎藤, 新井: 日水誌, 25, 573 (1959)
斎藤: 日水誌, 27, 461 (1961)
斎藤, 新井: 日本農学大会水産部会発表 (1964)
新井: 昭和40年度日本水産学会秋季大会シンポジウム
- 6) Kronman, M. T.: J. Agr. Food, Chem., 8, 67 (1960)