

食品中の核酸成分に関する研究*—XII

マッシュルームの冷凍における5'-ヌクレオチドの消長

毛利 威 徳 ・ 橋 田 度 ・ 志 賀 岩 雄

STUDIES ON NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN FOODSTUFFS-XII CHANGES OF 5'-NUCLEOTIDES DURING FREEZING OF MUSHROOMS (*PSALLIOTA BISPORUS*)

Takenori Mouri, Wataru Hashida, and Iwao Shiga

In a previous paper (Journal of Fermentation Technology 45 151, 254 (1967)), an increase in the amounts of 5'-AMP and 5'-IMP was observed under freezing storage of Kurumaebi (prawn) at -5°C . The amount of 5'-nucleotides in French mushrooms (*Psalliota bisporus*), which had been frozen and stored at -20°C , was measured with ion exchange chromatography and phosphatase assay. Frozen mushrooms was defrosted at 5°C for 24hrs or at 35°C for 2 hrs. ATP in defrosted sample was less than that in fresh mushrooms. Accordingly routine samples were extracted with cold perchloric acid without defrosting.

Under storage at -20°C for 6 months, the amount of ATP decreased gradually, and both 5'-AMP and adenosine increased correspondingly. No 5'-IMP was found.

About one half of each activity of RNase, PDase, or PMase was remained in frozen samples stored for 6 months. Crude enzyme solution extracted from frozen mushrooms degraded authentic ATP and formed both 5'-AMP and adenosine.

結 言

前報¹)においてクルマエビの冷凍工程における5'-ヌクレオチドの消長および核酸分解酵素系の変化について報告した。クルマエビ凍結中のヌクレオチドの変化は極めて遅いがATPが分解し5'-IMPなど5'-ヌクレオチドが蓄積することを認めた。水産物以外に、たとえばきのこ類のように核酸成分が多く、また核酸分解酵素系も比較的強い食品において、それらの変化もまた興味深いと考えられる。

本報では缶詰原料として重要なマッシュルームを対称として冷凍工程における5'-ヌクレオチドの消長ならびに、それに関連する酵素系の変化について検討したので報告する。

* 脚注：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45巻4号P362 (1967) 所載。

実験方法

1) 供試標準物質は前報¹⁾に準ずる。

2) 試料調製方法

供試マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) は当研究所試作品を使用した。冷凍は Super-wall 製品の冷凍機により -20°C 、6カ月間貯蔵した。マッシュルームは途中適宜取り出し、通常は冷時過塩素酸抽出し 5N-KOH で中和後分析試料とした。また解凍および抽出条件の検討をするために冷凍貯蔵したものを 5°C で24時間あるいは 35°C で2時間放置して解凍したものを常法通り、冷時10%過塩素酸で抽出して試料とした。

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で定量した。

4) 核酸分解酵素活性の測定

試料に5倍量の水を加え氷で冷却しながらホモジナイズした後 12000 rpm で冷却遠心し、その上澄液を粗酵素液として使用した。測定法は大村、須原ら³⁾の方法によった。詳細な条件は前報¹⁾に準ずる。

実験結果

1) 原料マッシュルームの核酸系物質の組成と含量

生原料を冷時過塩素酸抽出して核酸系物質の組成を調べた結果は Table 1 のごとくである。試料の No. 1, No. 2 は春季, No. 3 ~ No. 5 は秋季に収穫されたものである。なお種菌は同一系のものである。ATP, ADP, 5'-AMP, 5'-UMP などの含量について収穫時期による差違あるいは個体差は認められなかった。5種の試料について g dry wt 当りの μmol で平均値と標

Table 1 Amounts of the nucleotides of mushrooms.

Sample		Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-UMP	UDPAG	ADP	Frac. H	ATP
Fresh No. 1	UV ₂₆₀ ** $\mu\text{mol/g dry wt.}$	101.2	9.9	4.8 0.3	1.7 0.4	74.7	41.7 3.8	16.1	57.5 6.6
Fresh No. 2	UV ₂₆₀ $\mu\text{mol/g dry wt.}$	93.3	trace	3.9 0.2	1.3 0.2	39.2	15.2 2.1	8.3	29.3 4.3
Fresh No. 3	UV ₂₆₀ $\mu\text{mol/g dry wt.}$	128.2	trace	2.0 0.2	1.9 0.2	64.6	21.2 2.3	19.2	42.1 4.1
Fresh No. 4	UV ₂₆₀ $\mu\text{mol/g dry wt.}$	190.2	trace	1.8 0.2	1.9 0.3	51.2	23.4 2.5	23.4	52.3 4.4
Fresh No. 5	UV ₂₆₀ $\mu\text{mol/g dry wt.}$	139.7	6.6	1.6 0.3	1.4 0.2	47.3	15.0 2.3	9.9	27.5 4.2
Mean value	\bar{x} $\mu\text{mol/g dry wt.}$			0.24	0.26		2.60		4.72
Standard deviation	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			± 0.02	± 0.03		± 0.04		± 0.04

*: Fraction B includes nucleosides and bases.

** : Absorbancy at 260m μ of each fraction

標準偏差を求めると ATP, ADP, 5'-AMP, 5'-UMP はそれぞれ 4.72 ± 0.04 , 2.60 ± 0.04 , 0.24 ± 0.02 , 0.26 ± 0.03 μmol の範囲で個体差はほとんど無視することができると考えられる。

2) 解凍前後における核酸系物質の変化

冷凍したマッシュルームは加工あるいは消費される前に解凍されるのが通常であるが、解凍の方法によってヌクレオチド組成が変わるか否かを生および解凍即時に過塩素酸抽出したマッシュルームについて比較した。-20°C に一昼夜冷凍したものを 5°C あるいは 35°C で解凍し、ドリップと共に冷時過塩素酸で抽出し、カラムクロマトグラフィーで組成を調べた結果、典型的な一例は Fig 1 のごとくである。個々の含量を計算すると Table 2 のごとくである。

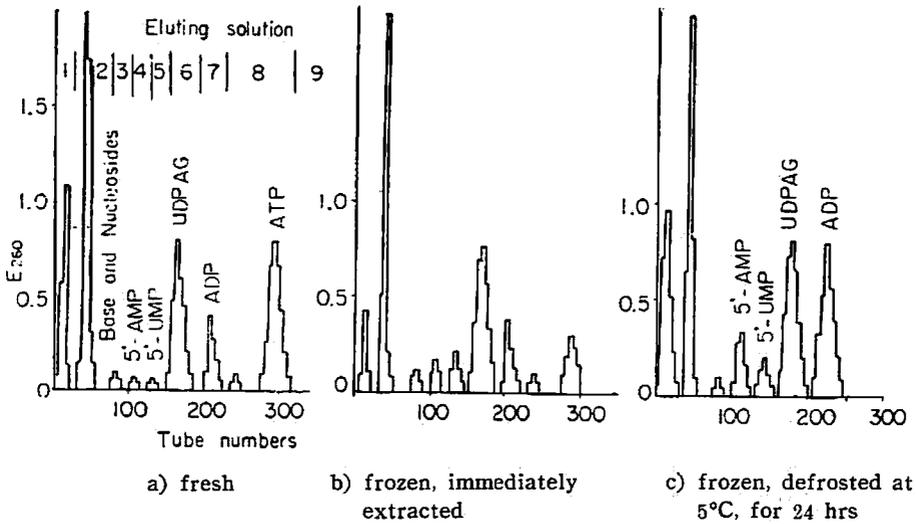


Fig. 1 Effect of defrosting on the nucleotides of frozen mushrooms.

Table 2 Effect of defrosting conditions on the nucleotides of frozen mushrooms.

Sample		Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-UMP	UDPAG	ADP	Frac. H	ATP
Fresh	UV ₂₆₀ **	101.2	9.9	1.6	1.6	74.6	41.6	16.1	57.4
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			0.2	0.2		3.5		4.5
Frozen, immediately extracted	UV ₂₆₀	98.8	6.6	10.1	9.3	50.9	24.4	8.3	20.1
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			1.2	2.0		3.4		3.1
Frozen, defrosted at 5°C, for 24 hr	UV ₂₆₀	83.2	trace	7.6	5.4	36.1	20.0	trace	trace
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			1.1	1.0		3.4		
Frozen, defrosted at 35°C, for 2 hr	UV ₂₆₀	55.0	trace	11.2	5.2	35.4	26.9	trace	trace
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			1.8	1.1		4.4		

*: Fraction B includes nucleosides and bases.

** : Absorbancy at 260m μ of each fraction

凍結物を直接冷時過塩素酸で抽出したものの組成は生原料の組成と良く似ていることが認められた。5°C、24時間あるいは35°Cで2時間かかって解凍したものではヌクレオチド組成の変化が認められる。すなわち ATP の減少と 35°C、2時間解凍の場合は 5'-AMP、ADP の増加が

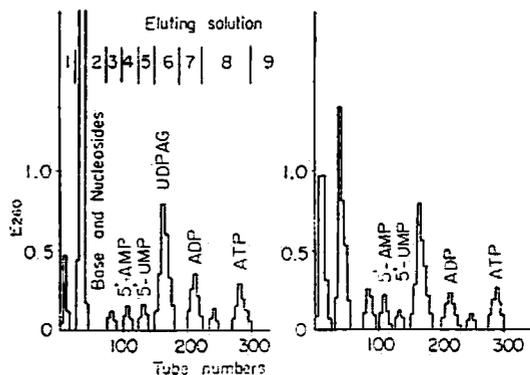
見出された。この原因として解凍処理中の核酸分解酵素系の作用が考えられる。したがって冷凍食品のヌクレオチド組成を求めるには解凍放置した後に測定することは不適當で、凍結品に冷過塩素酸を加え、即時にホモジナイズして抽出する方法が適當であると考えられる。その後の実験では解凍処理を行なわないで、即時過塩素酸抽出して、カラムクロマトグラフィーの試料とした。

3) -20°C での冷凍経過におけるマッシュルーム核酸系物質の経時的变化

-20°C で6カ月間冷凍貯蔵したものの経時变化をカラムクロマトグラフィーで調べると Fig 2のごとくで、その個々のヌクレオチドは Table 3のごとくである。

冷凍直後のヌクレオチド組成は ATP ADP についてはほとんど生原料と変わらないが、1カ月後では ATP が減少し 5'-AMP が少し増加した。

なお -20°C で3カ月後、6カ月後にわたる変化は徐々に認められた。冷凍直後から15日間ほど -5°C で貯蔵した場合は、生原料との差違はほとんど認められなかった。



a) immediately after freezing b) stored at -20°C , for 6 months

Fig. 2 Changes of the nucleotides of frozen mushrooms under storage at -20°C .

Table 3 Changes of the nucleotides of frozen mushrooms under storage at -20°C .

Sample		Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-UMP	UDPAG	ADP	Frac. H	ATP
Fresh	UV ₂₆₀ **	101.2	9.9	1.6	1.6	74.6	41.6	16.1	57.4
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			0.2	0.2		3.5		4.5
Frozen, immediately after freezing	UV ₂₆₀	98.8	6.6	10.1	9.3	50.9	24.7	8.3	20.1
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			1.1	2.0		3.4		3.1
Frozen, stored for 1 months	UV ₂₆₀	148.3	19.6	16.9	4.8	49.3	17.7	24.2	38.2
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			1.8	0.1		1.5		3.4
Frozen, stored for 3 months	UV ₂₆₀	83.0	9.1	20.0	11.3	54.8	10.8	12.8	19.9
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			2.7	1.0		1.4		2.5
Frozen, stored for 6 months	UV ₂₆₀	75.3	13.3	28.2	1.4	50.3	11.9	21.4	21.7
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			2.8	0.2		1.2		2.0

*: Fraction B includes nucleosides and bases.

** : Absorbancy at $260\text{m}\mu$ of each fraction.

4) マッシュルーム冷凍経過における総 5'-ヌクレオチド量の変化

前項までの分析を吟味する意味で総 5'-ヌクレオチド量を酵素法によって調べた。生原料および -20°C における冷凍経過中の試料の総 5'-ヌクレオチド量を示すと Table 4のごとくである。

総 5'-ヌクレオチド量はカラムクロマトグラフィーでのヌクレオチド量の総和と概ね一致した。また 5'-ヌクレオチド変化についてみると -20°C 貯蔵では1カ月後にやや多くなっている。

Table 4 Total 5'-nucleotides of some mushrooms samples.

Sample	Storage period	Total 5'-nucleotide (μmol)	
		/g	/g dry wt.
Fresh		0.045	0.64
		0.040	0.57
		0.042	0.60
Frozen	-20°C, 0	0.055	0.785
	" 1 month	0.182	2.600
	" 3 months	0.162	2.300
	" 6 months	0.170	2.428
Defrosted	5°C, 24hr	0.090	1.280
	35°C, 2hr	0.165	2.350

5) 冷凍マッシュルームにおける核酸分解酵素系の経時的変化

前項までのマッシュルーム冷凍経過や解凍前後におけるヌクレオチドの変化は ATP→ADP→AMP→アデノシンの経路を通り、核酸分解酵素系の作用に由来すると考えられるので、冷凍貯蔵の経時的にマッシュルームより粗酵素液を抽出して核酸分解酵素系の活性をしらべた。前報¹⁾の結果よりマッシュルーム酵素系の最適条件で、すなわち RNase あるいは PDase は pH 8.0 で PMase は pH 4.5 で測定した。その結果は、Table 5, 6, 7 のごとくである。

粗酵素液の RNase 活性, PDase 活性は弱いが PMase 活性は比較的強いことがわかった。6カ月にわたって冷凍経過中の RNase, PDase, PMase 活性の消長を測定した結果、3種の活性ともに3カ月目より $\frac{1}{2}$ 程度活性が失なわれていたが、6カ月後でもなおかなり残存しており、酵素反応の好条件下では比較的酵素系が作用しうると考えられる。このようなことより ATP, 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 3 のごとくである。

Table 5 RNase activity of the crude extracts of frozen mushrooms.

Sample	Storage period	RNase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		220	53.9	4.09
Frozen	-20°C 0	180	35.7	4.54
	" 1 month	210	52.1	4.03
	" 3 months	135	49.7	2.74
	" 6 months	105	37.5	2.80

Table 6 PDase activity of the crude extracts of frozen mushrooms.

Sample	Storage period	PDase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		1265	53.9	23.5
Frozen	-20°C 0	1020	35.2	29.0
	" 1 month	928	37.5	24.7
	" 3 months	1025	52.1	19.6
	" 6 months	576	49.7	11.5

Table 7 PMase activity of the crude extracts of frozen mushrooms.

Sample	Storage Period	PMase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		65,000	35.2	1,830
Frozen	-20°C 0	86,250	53.9	1,602
	" 1 month	84,520	52.1	1,622
	" 3 months	40,625	37.4	1,086
	" 6 months	46,980	49.7	946

ATP (20mg/20ml) 5.0ml
 -PMase fraction 2.0ml
 -1M buffer 1.0ml
 incubation, 37°C, 1hr
 HClO₄ treatment
 -active carbon treatment
 Sample for chromatography
 Fig. 3 Degradation of ATP.

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 4, 5, 6, 7のごとくである。

Fig 4, 5は生原料より抽出された粗酵素液によったものでATPが減少するのに対してADP, 5'-AMP アデノシンが生成した。また5'-AMP に作用させた

結果は、アデノシンが生成した。

Fig 6, 7 は -20°C 冷凍 6 カ月目のマッシュルームから抽出した粗酵素液を作用させた場合で、生原料粗酵素液の場合とほぼ同じ作用を示すが、ATP→アデノシンに至る相互の酵素活性の強弱については今後検討したいと考えている。

この酵素実験よりマッシュルームにおいてATP→ADP→5'-AMP→アデノシンの経路で変化が起る可能性が裏付けられた。

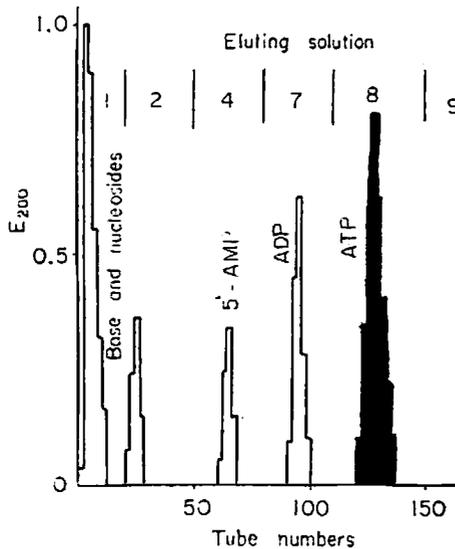


Fig. 4. Degradation of ATP with crude enzyme extract from mushrooms (fresh).

■ before incubation □ after incubation

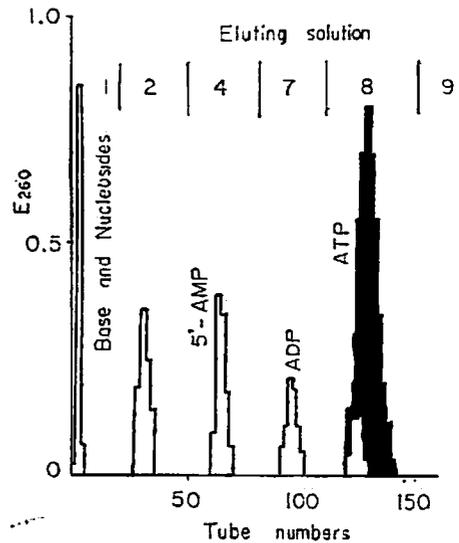


Fig. 5. Degradation of ATP with crude enzyme extract from defrosted mushrooms.

■ before incubation □ after incubation

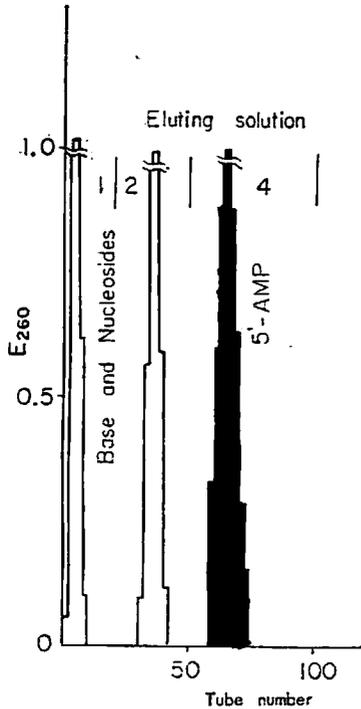


Fig. 6. Degradation of 5'-AMP with crude enzyme extract from fresh mushrooms.
 ■ before incubation
 □ after incubation

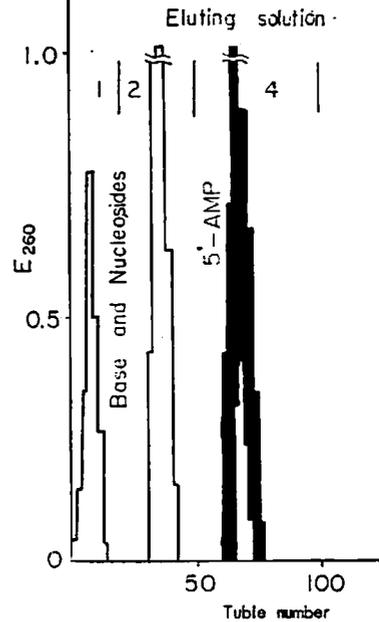


Fig. 7. Degradation of 5'-AMP with crude enzyme extract from frozen mushrooms.
 ■ before incubation
 □ after incubation

考 察

水産食品の冷凍中の核酸成分(ヌクレオチド)変化について多くの報告があるが、きのこ類のように核酸成分が多く、また核酸分解酵素系も比較的強い食品において冷凍中のヌクレオチド変化は興味深いと考え、マッシュルームを対称として検討した。

マッシュルーム冷凍中の変化はクルマエビの場合のように5'-IMPが生成する経路はないが、 $ATP \rightarrow ADP \rightarrow 5'-AMP \rightarrow$ アデノシンに至る変化を認めた。ヌクレオチドの変化はRNase, PDaseの酵素作用によるヌクレオチド組成の変化もあるが、主体はPMaseの作用によるものと考えられる。クルマエビと異なる点は5'-AMPを5'-IMPにするAMPデアミナーゼの存在は認められないことである。冷凍貯蔵中において多少PMase活性は低下しているが、酵素作用に好適な条件では、いったん冷凍されたものでもヌクレオチドの変化が起ることが考えられるが、これらの変化は富山⁴⁾、藤井⁵⁾、斎藤⁶⁾らによって水産物で見出されている変化とよく似ている。また一方解凍中の変化についてSpinelli⁷⁾はEnglish soleで0.5°Cで解凍中に5'-IMPの変化が起ることを見出し、この原因は冷凍と解凍により細胞組織が破壊されて、酵素と基質が接触するからであろうと考えている。著者らも本報マッシュルームにおいて解凍経過中に核酸成分の

変化が起ったと考えられる現象を見出したのであるが、これは Spinelli の見解を採用して冷凍、解凍による組織の破壊によって酵素作用がすみやかに行なわれたものと考えている。

要 約

マッシュルームの冷凍工程におけるヌクレオチドなど核酸成分の変化をしらべた。マッシュルームの冷凍試料は解凍条件によってヌクレオチド組成が異なるので冷時過塩素酸と共にホモジナイズし抽出して試料にすることが望ましい。-20°Cの冷凍保存では ATP が生原料の時に 4.5 $\mu\text{mol/g dry wt.}$ あったものが1カ月後には 3.4 μmol と減少し 5'-AMP は生原料の時 0.2 μmol が 1.8 μmol と増加し、アデノシンの生成が認められた。なお 5'-IMP の生成は認められなかった。冷凍中マッシュルームの RNase 活性、PDase 活性、PMase 活性は3カ月以降はやや失なわれて大体半になった。

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㈱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年度日本醗酵工学大会で発表した。

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, 45, 151 (1967)
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 45, 254 (1967)
- 2) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 37, 558 (1961)
- 3) 須原, 草葉, 大村: 酵素化学シンポジウム, 115 (1964)
- 4) 富山, 小林, 北原, 白石, 大庭: 日水誌, 32, 262 (1966)
- 5) 藤井, 内山, 江平, 野口: 日水誌, 32, 410 (1966)
- 6) 斎藤, 新井: 日水誌, 23, 265 (1957)
- 7) Spinelli, J.: 私信 (1966)