

食品中の核酸成分に関する研究* —XIII

マッシュルーム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・寺本 四郎*

Studies on Nucleic Acid Related Substances in Foodstuffs - XIII

Changes on 5'-nucleotides during freeze-drying of mushroom (*Psalliota bisporus*)

TAKENORI MOURI, YOSHIO SHIMODA, WATARU HASHIDA
and SHIRO TERAMOTO*

Sliced French mushrooms (*Psalliota bisporus*) were freeze-dried below 20°C and stored in cans in vacuo at 5°C or 30°C for 6 months. Amounts of nucleotides and related compounds were measured using ion exchange chromatography and by phosphatase assay.

The amount of nucleotides of freeze-dried mushrooms was the same as that of the raw sample. When the freeze-dried sample was dipped in water for 10 min at room temperature, both the decrease of ATP and ADP and the increase of 5'-AMP were found in restored mushrooms. Routine samples from freeze-dried mushrooms were extracted with cold perchloric acid without dipping in water.

Under storage at 5°C or 30°C for 6 months, the amounts of ATP and ADP decreased slowly, and 5'-AMP increased correspondingly. About one half of each activity of RNase, PDase or PMase remained in freeze-dried samples stored in vacuum cans. Crude enzyme solution of freeze-dried mushrooms formed adenosine, 5'-AMP and ADP from authentic ATP, and adenosine from authentic 5'-AMP, respectively.

It seems reasonable that some changes of nucleotides occur during dipping in water or long period storage due to the action of enzymes degrading nucleic acid and its components.

* 醱酵工学45巻8号 725 (1967) 所載

** Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University,
大阪大学工学部醱酵工学教室

結 言

前報¹⁾においてクルマエビの冷凍乾燥における 5'-ヌクレオチドの消長について報告したが、きのこ類の 5'-ヌクレオチド分布は水産食品よりも複雑であるからそれらの冷凍乾燥における 5'-ヌクレオチドの変化もまた興味ある問題と思われる。きのこ類の冷凍乾燥における核酸成分の変化についての報告は見当たらない。また前報ではマッシュルームの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。なおこれら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。

実 験 方 法

1. 供試標準物質

前報¹⁾に準ずる。

2. 試料調整法

冷凍乾燥の方法：マッシュルームを 2~3 mm の厚さに切り前報¹⁾と同様に共和真空工業製 RL-1000 HS 型で冷凍乾燥した。経過は Fig. 1 のごとくである。

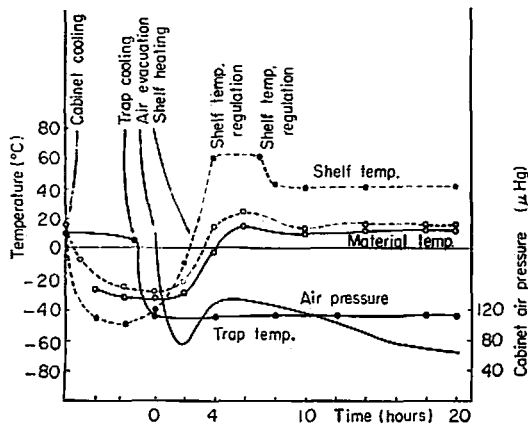


Fig. 1 Time course of freeze-drying of mushrooms.

- trap temperature
- shelf temperature
- material temperature
- cabinet air temperature

rpm で冷却遠心しその上澄液を使用した。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⁾によった。

以後の操作は前報と同様に行なった。

生原料 3,640 g (スライス) 乾燥後重量 264 g 乾燥比 14.0 であった。乾燥品は直ちに無塗装 7 号缶に減圧下に缶詰し 5°C と 30°C で 6 か月間貯蔵した。5'-ヌクレオチド測定用の試料は前報¹⁾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で定量した。

4. 核酸分解酵素活性の測定

粗酵素液は 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 12,000

実 験 結 果

1. 水戻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戻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戻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び室温(30°C)で10分間水戻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。

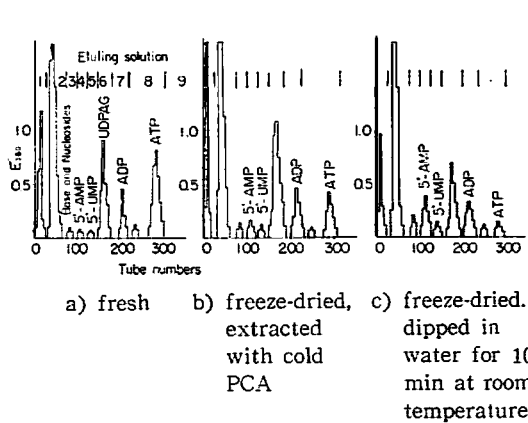


Fig. 2 Effect of dipping in water on the nucleotides of freeze-dried mushrooms.

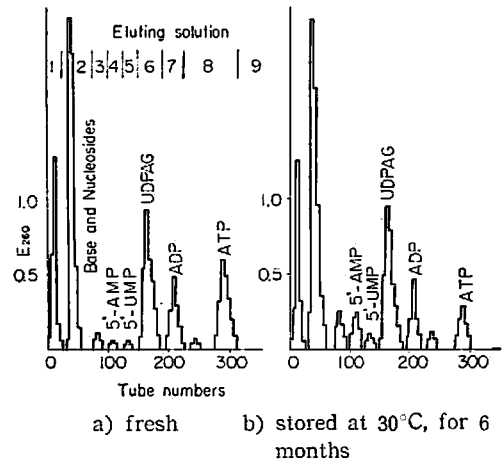


Fig. 3 Changes of the nucleotides of freeze-dried mushrooms.

Table 1 Effect of dipping in water on the nucleotides of freeze-dried 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
	μmol/g dry wt.			0.2	0.2		3.5		4.5
Freeze-dried, immediately extracted	UV ₂₆₀	244.8	17.1	7.4	2.1	82.5	36.9	8.5	44.2
	μmol/g dry wt.			0.6	0.2		3.2		3.8
Freeze-dried, dipped in water for 10 min at room temp.	UV ₂₆₀	110.2	12.2	25.6	7.6	50.7	28.4	trace	trace
	μmol/g dry wt.			2.5	0.7		2.8		

*: Fraction B includes nucleosides and bases.

** : absorbancy at 260mμ of each fraction.

生のマッシュルームと冷凍乾燥後のマッシュルームとでは 5'-ヌクレオチド組成の相違が認められなかった。しかるに乾燥品を10分間水戻した時影響が現われた。すなわち ATP, ADP の減少と 5'-AMP の増加が見出された。前報¹⁾のようにクルマエビでは冷凍乾燥中に変化が起っているがマッシュルームでは水戻し操作中に変化が起った。冷凍乾燥工程中での変化はほとんどみとめら

れず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. 冷凍乾燥品の貯蔵経過における核酸系物質の経時的変化

冷凍乾燥品を缶詰内で 5°C または 30°C でそれぞれ 6 カ月保存して核酸系物質の変化を調べたが、それらのクロマトグラムの一例は Fig. 3 のごとくである。

また個々のヌクレオチドの含量は Table 2, Table 3 のごとくである。

Table 2 Changes of the nucleotides of freeze-dried mushrooms under storage at 30°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
	μmol/g dry wt.			0.2	0.2		3.0		4.5
Freeze-dried, immediately after drying	UV ₂₆₀	244.8	17.1	7.4	2.1	82.5	36.9	8.5	44.2
	μmol/g dry wt.			0.6	0.2		3.2		3.8
Freeze-dried stored at 30°C for 1 month	UV ₂₆₀	165.9	5.1	12.5	6.3	46.2	26.9	22.1	20.3
	μmol/g dry wt.			1.1	0.4		2.7		2.0
Freeze-dried stored at 30°C for 3 months.	UV ₂₆₀	110.6	trace	24.3	0.7	91.4	23.8	20.1	35.2
	μmol/g dry wt.			1.5	0.1		1.5		2.2
Freeze-dried stored at 30°C for 6 months.	UV ₂₆₀	110.7	trace	6.3	trace	42.7	9.1	11.8	13.9
	μmol/g dry wt.			0.8			1.2		1.9

Table 3 Changes of the nucleotides of freeze-dried mushrooms under storage at 5°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	16.3	57.4
	μmol/g dry wt.			0.2	0.2		3.5		4.5
Freeze-dried, immediately after drying	UV ₂₆₀	244.8	17.1	7.4	2.1	82.5	36.9	8.5	44.2
	μmol/g dry wt.			0.6	0.2		3.2		3.8
Freeze-dried, stored at 5°C for 1 month	UV ₂₆₀	124.2	5.2	6.8	8.1	50.1	24.7	19.9	26.1
	μmol/g dry wt.			0.6	1.0		2.4		2.5
Freeze-dried, stored at 5°C for 3 months	UV ₂₆₀	96.2	trace	17.7	10.1	91.9	22.4	23.2	43.4
	μmol/g dry wt.			1.1	0.8		1.4		2.8
Freeze-dried, stored at 5°C for 6 months	UV ₂₆₀	109.2	12.6	6.6	7.8	37.1	12.7	22.9	17.8
	μmol/g dry wt.			0.8	1.0		1.5		2.7

冷凍乾燥工程前後の 5'-ヌクレオチド組成の変化は余り認められなかった。なお冷凍乾燥品中のヌクレオチド組成は冷凍乾燥直後では大きな変化はないが 1 カ月後より ATP が減少し 5'-AMP がわずかながら増加の傾向を示している。前項までの分析を吟味する意味で総 5'-ヌクレオチド量を測定した。

3. マッシュルーム冷凍乾燥における総 5'-ヌクレオチド量の消長

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 of some mushrooms samples.

Sample	Storage period	Total 5'-nucleotide (μmol)	
		/g	/g dry wt.
Fresh		0.045	0.64
Freeze-dried	immediately after drying	0.060	0.85
	5°C, 1 month	0.09	1.28
	" 3 months	0.130	1.85
	" 6 months	0.060	1.89
Freeze-dried	30°C, 1 month	0.090	1.28
	" 3 months	0.120	1.71
	" 6 months	0.110	1.75
Freeze-dried	dipped in water for 10 min at room temp.	0.160	2.28

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。また貯蔵1カ月後から総 5'-ヌクレオチド量の変化が認められ、これは個々の 5'-ヌクレオチドの変化と一致している。このような変化には核酸分解酵素系が関与するのではないかと考え核酸分解酵素系の経時的変化を調べた。

4. 冷凍乾燥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乾燥経過における ATP→ADP→AMP→アデノシンの変化の原因は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マッシュルームより粗酵素液を抽出して RNase, PDase, PMase 活性を測定した。前報と同じように RNase, PDase 活性は pH8.0

Table 5 RNase activity of the crude extracts of freeze-dried mushrooms.

Sample	Storage period	RNase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		220	53.9	4.09
Freeze-dried	30°C 0	160	37.8	4.23
	" 1 month	220	55.2	3.98
	" 3 months	132	53.5	2.46
	" 6 months	90	49.2	1.82
Freeze-dried	5°C 0	160	37.8	4.23
	" 1 month	220	53.7	4.09
	" 3 months	208	63.6	3.30
	" 6 months	96	45.6	2.10

で PMase 活性は pH 4.5 で測定した。結果は Table 5, 6, 7 のごとくである。

Table 6 PDase activity of the crude extracts of freeze-dried mushrooms.

Sample	Storage period	PDase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		1265	53.9	23.5
Freeze-dried	30°C 0	1020	37.8	26.9
	" 1 month	640	52.2	12.6
	" 3 months	414	53.5	7.7
	" 6 months	381	49.2	7.7
Freeze-dried	5°C 0	1020	37.8	26.9
	" 1 month	660	53.7	12.2
	" 3 months	671	63.6	10.5
	" 6 months	376	45.6	8.3

Table 7 PMase activity of the crude extracts of freeze-dried mushrooms.

Sample	Storage period	PMase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		65,500	35.2	1,860
		86,250	53.9	1,602
Freeze-dried	5°C, 0	69,000	37.8	1,830
	" 1 month	83,700	53.7	1,558
	" 3 months	65,620	63.6	1,031
	" 6 months	54,960	45.6	1,205
Freeze-dried	30°C, 0	69,000	37.8	1,830
	" 1 month	80,700	55.2	1,451
	" 3 months	64,080	49.2	1,302
	" 6 months	51,030	53.5	953

冷凍乾燥の前後では核酸分解酵素系の活性には相違は認められなかった。冷凍乾燥品の保存中には RNase, PDase, PMase 活性のいずれも時間の経過により弱化が認められたが6カ月目に元の1/2の活性が残っていた。このように活性が残っていることから 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 に対して作用させた。この反応条件は Fig. 4 のごとくである。

ATP (20mg/20ml)	5.0 ml
—PMase fraction	2.0 ml
—IM buffer (pH 5.0)	1.0 ml
—incubation, 37°C, 1 hr	
—HClO ₄ treatment	
—active carbon treatment	
Sample for chromatography	

Fig. 4 Degradation of ATP.

Acetate buffer (pH 5.0) 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,

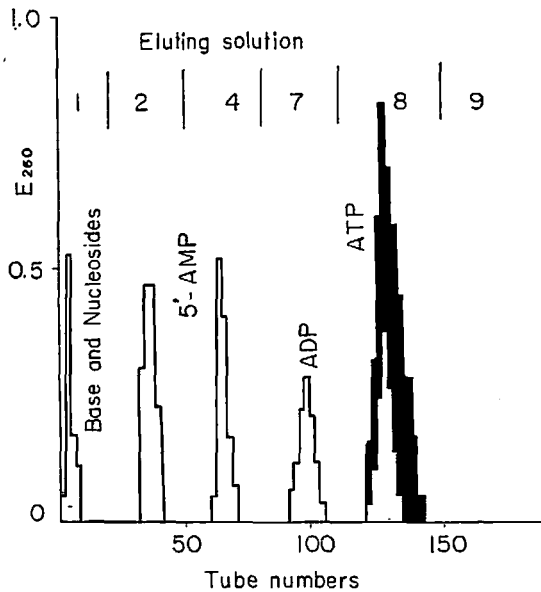


Fig. 5 Degradation of ATP with crude enzyme extract from freeze-dried mushrooms.

▲ before incubation
 ▤ after incubation

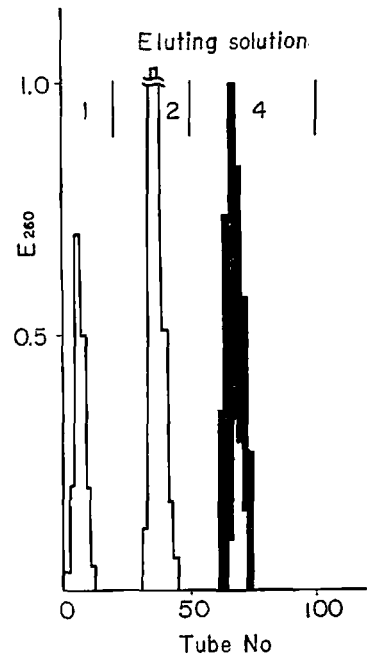


Fig. 6 Degradation of 5'-AMP with crude enzyme extract from freeze-dried mushrooms.

▲ before incubation
 ▤ after incubation

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を作用させた場合のクロマトグラムで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。このように生原料の粗酵素液とはほぼ同様な作用を示した。この酵素実験よりマッシュルーム冷凍乾燥においても冷凍中と同じように核酸分解酵素系による変化であることが明らかになった。

考 察

前報¹⁾においてクルマエビの冷凍乾燥の操作中にヌクレオチドが変化することを報告したがマッシュルームの場合は冷凍乾燥操作中にはほとんど変化はなかった。マッシュルームでは水戻しの場合に大きな変化を生じた。ATPは4.5 μ mol/g dry wt. から痕跡量となり5'-AMPは0.2から2.5 μ mol/g dry wt. まで増加した。乾燥後のマッシュルームを減圧缶詰中5°Cまたは30°Cで6カ月間貯蔵する間にもかなりの5'-ヌクレオチドの減少が認められた。また冷凍乾燥の操作中にはRNase, PDase, PMase活性はほとんど衰えなかったが、5°Cまたは30°Cの貯蔵中に活性の衰えが認められた。RNase, PDase, PMase共に6カ月目では活性が $\frac{1}{2}$ 程度残っており、ATP

より ADP, 5'-AMP, アデノシンに至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⁾のマッシュルーム冷凍品を解凍した時に起こる変化に類似している。

斎藤, 新井⁴⁾らは水産食品の冷凍乾燥におけるヌクレオチドの変化について述べている。すなわちホタテ, アワビなど貝類では冷凍乾燥工程中には ATP の分解は起らないが, 水戻しの操作で変化する。またイカ, コイにおいては冷凍乾燥工程中で ATP が既に分解する。このように食品の品目によって相違のあることを指摘している。本報では農産食品のマッシュルームで冷凍乾燥工程中では ATP の変化はないが水戻しに際して ATP が分解され 5'-AMP が増加することを認めた。これは水産食品で見出された現象によく類似していると考えられる。Kronman⁵⁾は冷凍乾燥品においても蛋白分解酵素が作用する可能性について述べ, Matheson⁶⁾は乾燥した肉で予備加熱処理をしない時はグリコーゲンの減少が著しいことを述べている。著者らも前報のクルマエビ¹⁾本報のマッシュルームについても酵素作用によるヌクレオチド組成の変化が起り得ると考えている。

要 約

冷凍乾燥したマッシュルームは水戻しによったヌクレオチド組成の変化が認められるが冷凍乾燥前後の変化はほとんど認められなかった。水戻し操作中に ATP が減少し, 5'-AMP は増加した。またアデノシンの変化も認められた。ADP は差引きほとんど変化がなかった。冷凍乾燥品を 5°C, 30°C で減圧缶詰中に貯蔵すると 1 カ月後より変化が認められ 6 カ月後には ATP は 4.5 から 2.0 $\mu\text{mol/g dry wt.}$ まで減少し 5'-AMP は 0.2 から 1.5 $\mu\text{mol/g dry wt.}$ まで増加した。

冷凍乾燥中は RNase, PDase, PMase 活性は安定に保持されたが 6 カ月間の貯蔵中にそれぞれの活性は約 $\frac{1}{2}$ に低下した。マッシュルーム冷凍乾燥の水戻しで生成される 5'-AMP は若干呈味成分として貢献することであろう。

終りに臨み貴重な薬品, 酵素類など多大のご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。

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, 下田, 橋田, 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, 大村, 草葉: 酵素化学シンポジウム, 115 (1964).
- 4) 斎藤, 新井: 日水誌, 25, 573 (1959).
新井: 昭和40年度日本水産学会秋期大会シンポジウム (1965).
- 5) Kronman, M.T.: *J. Agr. Food Chem.*, 8, 67 (1960).
- 6) Matheson, N.A.: *Recent Advances in Food Science*, 2, 57 (1962).