

# 食品中の核酸成分に関する研究\* —XV

## シイタケの冷凍における核酸成分の消長

毛利 威徳・橋田 度・志賀 岩雄・寺本 四郎\*\*

### Studies on Nucleic Acid Related Substances in Foodstuffs - XV

#### Changes of 5'-nucleotides in frozen shii-take (*Lentinus edodes*)

TAKENORI MOURI, WATARU HASHIDA, IWAO SHIGA  
and SHIRO TERAMOTO\*

In the previous paper<sup>4)</sup>, changes of 5'-nucleotides and nucleoside polyphosphate in mushrooms (*Psalliota bisporus*) during their cold storage and defrosting were reported.

It seems interesting to compare the change of nucleotide content in Shii-take (*Lentinus edodes*) with that in mushrooms (*P. bisporus*), because the enzymatic activities of Shii-take decomposing nucleic acid are different from those of mushrooms. The amount of 5'-nucleotides in frozen Shii-take at  $-20^{\circ}\text{C}$  was determined by ion exchange chromatography and 5'-nucleotidase assay.

A remarkable decrease of ATP and a slight increase of 5'-nucleotides were found during the defrosting process of Shii-take at  $5^{\circ}\text{C}$  for 24 hr or at  $35^{\circ}\text{C}$  for 2 hr. Under storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 6 months, the amount of ATP decreased gradually, but no increase of each 5'-nucleotide was observed. Activities of RNase and PDase remained rather stable in frozen samples stored after 6 months' cold storage. Authentic ATP was degraded to 5'-AMP and adenosine at a low temperature in a crude enzyme solution extracted from frozen Shii-take stored for 6 months. These facts may substantiate the possibility of the formation of AMP and adenosine by a decrease of ATP during the prolonged cold storage of Shii-take.

### 緒 言

きのこ類の中でシイタケ<sup>1-4)</sup>は核酸分解酵素系がかなり強く、その作用型式はマッシュルーム

\* 醗酵工学48巻2号109(1969)所載

\*\* Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University,  
大阪大学工学部醗酵工学教室

1-4)とは異なっているので核酸成分が冷凍中にいかなる作用を受けるか興味深いと考えられる。冷凍時における核酸成分の変化について水産物では数多くの報告<sup>5)</sup>があるが、きのこ類についての研究は少い。

本報では5'-GMPなど5'-ヌクレオチドの消長並びにそれらに関連する核酸分解酵素系の変化について検討した。

## 実 験 方 法

1. 供試標準物質は前報<sup>1-4)</sup>に準ずる。
2. 供試シイタケ (*Lentinus edodes*) は兵庫県産の市販品を使用した。冷凍は Super-Wall 製品の冷凍機により $-20^{\circ}\text{C}$ 、6カ月間貯蔵した。シイタケ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。また試料から5'-ヌクレオチドを抽出する際に、あらかじめ解凍することの影響を検討するために冷凍貯蔵したものを $5^{\circ}\text{C}$ で24時間あるいは $35^{\circ}\text{C}$ で2時間放置して解凍したものを常法通り冷時過塩素酸で抽出し試料とした。
3. 分析方法 総5'-あるいは3'-ヌクレオチド量は中島ら<sup>3)</sup>の酵素法によった。個々のヌクレオチドはDowex  $1 \times 8$ を用い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12,000 rpmで冷却遠心しその上澄液を粗酵素液として使用した。測定法は前報<sup>1-4)</sup>に準ずる。

## 実 験 結 果

### 1. 原料シイタケの核酸系物質の組成と含量

Table 1 Amounts of the nucleotides of Shii-take.

Sample		5'-AMP	5'-UMP	5'-GMP	ADP	ATP
Fresh No. 1	UV 260*	2.24	2.16	1.45	39.95	34.78
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$	0.25	0.36	0.22	4.95	4.31
Fresh No. 2	UV 260	6.99	4.81	3.21	31.06	45.59
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$	0.47	0.42	0.25	2.05	3.14
Fresh No. 3	UV 260	4.05	trace	5.15	29.76	20.57
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$	0.44	trace	0.59	3.33	2.35
Fresh No. 4	UV 260	6.50	trace	8.01	101.25	44.60
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$	0.26	trace	0.38	4.08	1.81
Fresh No. 5	UV 260	4.45	trace	4.23	43.11	21.65
	$\mu\text{mol/g dry wt.}$	0.39	trace	0.44	3.94	1.97
Mean value	$\bar{X}$ $\mu\text{mole/g dry wt.}$	0.36		0.37	3.67	2.71
Standard deviation	$\mu\text{mole/g dry wt.}$	$\pm 0.03$		$\pm 0.04$	$\pm 0.35$	$\pm 0.44$

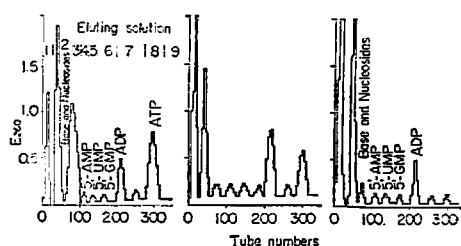
\*: Absorbancy at 260 m $\mu$  of fraction

生原料を冷時過塩素酸抽出して個々のヌクレオチド組成を調べた結果は Table 1 のごとくである。

このように原料によって ATP 含量にかなり変化があると考えられるが平均値を求めると ATP は  $2.71 \pm 0.44 \mu\text{mole/g dry wt.}$ , ADP では  $3.67 \pm 0.35 \mu\text{mole/g dry wt.}$  の範囲にありヌクレオチド類では  $0.36 \pm 0.03 \sim 0.37 \pm 0.04 \mu\text{mole/dry wt.}$  の範囲で微量ながら存在が認められた。その結果平均値と標準偏差から ATP, ADP 量には相当の差異変化のあることが認められた。したがって原料選択に気をつける必要がある。以後の実験は一度に兵庫県の新シイタケを多く購入し、個体差をなくすように心掛けて実験を行なった。

## 2. 解凍前後における核酸系物質の変化

冷凍したシイタケは加工あるいは消費される前に解凍されねばならない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シイタケについて比較した。  $-20^{\circ}\text{C}$  一昼夜冷凍したものを  $5^{\circ}\text{C}$  あるいは  $35^{\circ}\text{C}$  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。



a) Fresh b) Frozen, immediately extracted c) Frozen, defrosted at  $5^{\circ}\text{C}$ , for 24 hrs

Fig. 1 Effect of defrosting on the nucleotides of frozen Shii-take.

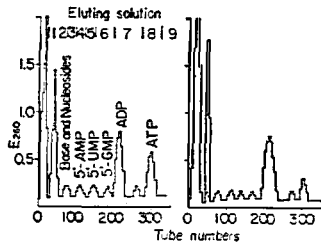
Table 2 Effect of defrosting conditions on the nucleotides of frozen Shii-take.

Sample		Frac. B*	5'-AMP	5'-UMP	5'-GMP	ADP	ATP
Fresh	UV 260**	170.07	6.99	4.81	3.21	31.06	45.59
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.47	0.42	0.25	2.05	3.14
Frozen, immediately extracted	UV 260	89.20	4.05	trace	5.15	29.76	20.57
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.44	trace	0.59	3.33	2.35
Frozen, defrosted at $5^{\circ}\text{C}$ , for 24 hrs.	UV 260	226.73	6.85	11.05	8.42	20.4	trace
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.51	1.15	0.76	1.51	
Frozen, defrosted at $35^{\circ}\text{C}$ for 2 hrs.	UV 260	205.10	9.96	6.24	3.60	39.46	trace
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		1.05	0.94	0.44	4.10	

\*: Fraction B includes nucleosides and bases.

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

冷凍物を直接冷時過塩素酸で抽出したものの組成は生原料組成とよく似ているが、 $5^{\circ}\text{C}$  で24時間あるいは  $35^{\circ}\text{C}$  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 の大きな減少と4種の5'-ヌクレオチドがわずかに増加するのが認められた。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。したがって冷凍シイタケ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冷凍品に冷時過塩素酸を加え即時にホ



a) Immediately after freezing    b) Stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , for 6 months

Fig. 2 Changes of the nucleotides of shiitake under storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

モジナイズして抽出する方法が一般の冷凍シイタケには適当であろう。

以後の実験は解冻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. $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍経過におけるシイタケ核酸系物質の経時的变化

$-20^{\circ}\text{C}$  で6カ月間冷凍したものの経時变化を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量は Table 3のごとくである。

Table 3 Changes of the nucleotides of frozen Shiitake under storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Sample		Frac. B*	5'-AMP	5'-UMP	5'-GMP	ADP	ATP
Fresh	UV 260**	170.07	6.99	4.81	3.21	31.06	45.59
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.47	0.42	0.25	2.05	3.14
Frozen, stored for 1 month	UV 260	150.95	2.90	4.95	3.60	33.66	32.24
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.14	0.38	0.21	1.82	1.75
Frozen, stored for 3 months	UV 260	197.24	4.39	3.60	4.50	33.23	25.23
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.23	0.27	0.28	1.80	1.36
Frozen, stored for 6 months	UV 260	171.92	3.75	2.69	1.42	37.38	22.17
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.22	0.23	0.10	2.18	0.90

\*: Fraction B includes nucleosides and bases

\*\* : Absorbancy at 260 m $\mu$  of fraction

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カ月後から ATP, ADP が減少したが5'-ヌクレオチドにはほとんど変化なかった。この原因はできたヌクレオチドがヌクレオチダーゼによってヌクレオシドになったと思われる。しかし1カ月から6カ月までの間は核酸系物質には余り変化はないものと考えられる。個々のヌクレオチド組成と同時に総5', 3'-ヌクレオチド量を測定したがカラムクロマトグラフィーと同じような結果を得た。

### 4. 冷凍シイタケにおける核酸分解酵素の経時的变化

前項までシイタケ冷凍経過におけるヌクレオチドの変化の原因として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シイタケより粗酵素液を抽出して RNase, PDase, PMase 活性を測定した。結果は Table 4, 5, 6, 7のごとくである。

シイタケ粗酵素液について酵母 RNA, 合成基質 BPNPP, PNPP を基質としてそれぞれ酵素活性を調べた結果 RNase 活性, PDase 活性はいずれも時間経過に伴う変化が少なく PMase 活性は約  $\frac{1}{2}$  に低下した。シイタケにおいて RNA からの分解があるが温度が低いために RNA の分解が起りにくいので ATP からの分解が主体と考えられるので ATP について粗酵素液を標品の

Table 4 RNase activity of the crude extracts of frozen Shii-take.

Sample	Storage period	RNase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		2980	75.6	39.1
		3006	65.5	45.7
Frozen	-20°C 1 month	2800	86.8	31.7
	" 6 month	2570	77.6	33.1

Table 5 PDase activity of the crude extracts of frozen Shii-take.

Sample	Storage period	PDase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		2260	75.6	29.5
		1296	65.5	19.3
Frozen	-20°C 1 month	1660	86.8	19.1
	" 6 month	920	77.6	12.3

Table 6 PMase activity of the crude extracts of frozen Shii-take.

Sample	Storage period	PMase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
Fresh		82100	75.6	1035
		79830	65.5	1220
Frozen	-20°C 1 month	76000	86.8	880
	" 6 month	45500	77.6	585

ATP 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。酢酸緩衝液 (pH 4.5) 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 のごとくである。

Fig. 4 は冷凍したシイタケ粗酵素液に依ったもので ATP が、減少するに対して ADP, 5'-AMP, アデノシンが生成した。核酸成分相互の活性の強弱について今後検討したいと考えている。この酵素実験よりシイタケ冷凍において

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

Fig. 3 Degradation of ATP.

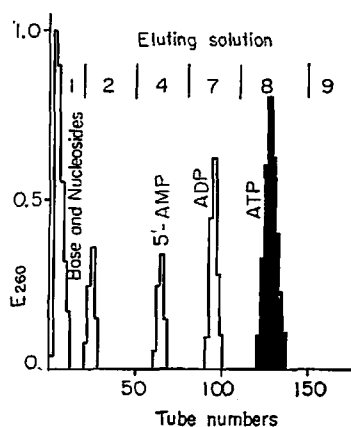


Fig. 4 Degradation of ATP with crude enzyme extract from dried shii-take.

■ before incubation  
 ▨ after incubation

は ATP→ADP→5'-AMP→アデノシンの経路で変化が起こる可能性が裏付けられた。

## 考 察

シイタケ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→ADP→5'-AMP→アデノシンに至る変化を認めた。とくにシイタケの場合の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冷凍 -20°C 貯蔵においては主体は, PMase 活性の作用によるものと考えられる。マッシュルームと異なる点としてわずかながら 5'-GMP が認められる。冷凍貯蔵中において多少 PMase 活性は低下しているが解凍に際しては PMase 活性は酵素作用に好適な条件では一度冷凍されたものでもヌクレオシドポリリン酸からのヌクレオチドの変化が起こると考えられる。一方 RNase 活性はほとんど失われないうちにマッシュルームと異なり解凍時に RNA からのヌクレオチドの変化が起こることが考えられるが温度が低いために RNase 活性の作用が弱いものとする。これらの変化は富山<sup>7)</sup>, 藤井<sup>9)</sup>, 斎藤<sup>5)</sup>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 Spinelli<sup>10)</sup> は冷凍と解凍による変化の原因として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。著者らも本報シイタケにおいて解凍経過中に核酸成分の変化が起こっていると見出したがその理由として Spinelli<sup>10)</sup> 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する。

## 要 約

シイタケ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。シイタケの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 3.14 μmole/g dry wt. まで減少した。4種の 5'-ヌクレオチドすなわち 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-CMP, 5'-GMP の増加は認められなかった。冷凍中のシイタケの RNase 活性, PDase 活性は比較的安定であったが PMase 活性は6か月後約1/2に低下していた。

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、秦圭子嬢に深謝致します。

## 文 献

- 1) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 248 (1966).
- 2) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 925 (1966).
- 3) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 45, 151 (1967).
- 4) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 45, 362 (1967).

- 5) 斎藤, 新井: 日水誌, 25, 573 (1959).
- 6) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 37, 558 (1961).
- 7) 富山, 小林, 北原, 小橋: 日水誌, 32, 600 (1966).
- 8) 富山, 小林, 北原, 白石, 大庭: 日水誌, 32, 262 (1966).
- 9) 藤井, 内山, 江平, 野口: 日水誌, 32, 410 (1952).
- 10) Spinelli, J.: 私信 (1966).