

γ線照射における5'-ヌクレオチド水溶液の安定性

寺田 潤子・秦 圭子・毛利 威徳
橋田 度・志賀 岩雄

Stability of 5'-Ribonucleotides in γ-irradiated Solution

JUNKO TERADA, KEIKO HATA, TAKENORI MOURI,
WATARU HASHIDA and IWAO SHIGA

Some of the nucleotides such as 5'-IMP and 5'-GMP have been found to play an important part in the flavor-enhancement of foodstuffs. In order to investigate the stability of nucleotides to γ-irradiation, solutions containing nucleotides were sealed in glass ampoules and irradiated with a 5,000 curie cobalt-60 source. Remaining nucleotides were assayed from the amount of phosphoric acid liberated by the action of 5'-nucleotidase.

With the increasing dose of irradiation, pH of 5'-IMP solutions reduced accompanied by the decrease of remaining 5'-IMP (Table 1). A linear relation was revealed to exist between the logarithmic amount of remaining 5'-IMP and the irradiation dose (from 1 to 10 Mrad) (Table 2, Fig.1). 5'-IMP was found to be rather stable at pH 9 but less stable at pH 3 or 5 (Fig. 3). Purine nucleotides are more stable than pyrimidine nucleotides (Tables 3 and 4).

Food components, such as glucose, sucrose, casein hydrolyzate or sodium chloride were added to the 5'-IMP solutions and irradiated at 1 Mrad. Glucose, sucrose and casein hydrolyzate exerted an inhibitory effect on the decomposition of 5'-IMP (Figs. 4 and 5). Hypoxanthine is the main decomposition product during irradiation of 5'-IMP at pH 3 and 5, whereas, at pH 9, inosine as much as hypoxanthine are formed.

From these results it is assumed that the decomposition mechanism of 5'-nucleotides with γ-irradiation is quite different from that with heat sterilization.

本報は日本食品照射研究協議会第3回大会(1967.12.6. 東京)において講演発表したものの要旨である。

脚注: 本報ではつぎの略号を使用する。

5'-IMP: 5'-イノシン酸

5'-GMP: 5'-グアニル酸

5'-AMP: 5'-アデニル酸

5'-CMP: 5'-シチジル酸

5'-UMP: 5'-ウリジル酸

緒 言

核酸およびその成分に対する放射線の影響については既に数々の研究が行なわれており、光化学的な安定性および分解生成物については2, 3の総説¹⁻³⁾に要約されている。一方食品の放射線処理に関連して細胞のDNA, RNAに対する生理学的な研究も行なわれている⁴⁾。

核酸成分の中でも5'-ヌクレオチドは食品の呈味成分として重要なものであるが食品の γ 線照射によってその安定性がどんな影響を受けるかについては殆んど研究は見当たらない。近年魚類に γ 線を照射した場合のヌクレオチド関連成分の変化およびその風味に対する影響に2, 3の検討⁵⁻⁶⁾が行なわれているが広く一般の食品についてもこのような食品化学的研究が発展すると考えられる。本報においては先ず5'-ヌクレオチド水溶液を対照として γ 線照射を行なった場合に5'-ヌクレオチドの安定性に対する照射線量, 溶液pH, 共存食品成分の影響についてしるべさらに個々の5'-ヌクレオチド相互の安定性の比較および分解生成物についての検討を行なったので報告する。

実 験 之 部

1. 実 験 方 法

1) γ 線照射設備

住友化学工業株式会社宝塚放射線中央研究所に照射を依頼した。

Co-60線源は約5,000キュリー、線量率は $2.3 \times 10^3 \sim 3.56 \times 10^5$ レントゲン/hr.の範囲であった。

2) 供 試 試 料

5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP および 5'-UMP のそれぞれのナトリウム塩を武田薬品工業株式会社より恵与された。

試料溶液の調製

水溶液：5'-ヌクレオチドを0.2, 0.5%濃度で蒸留水に溶解したもの。

緩衝溶液：クエン酸ソーダ・HCl緩衝液(pH 3, pH 5), トリス・アミノメタンHCl緩衝液(pH 7, pH 9)に5'-ヌクレオチドを0.2, 0.5%濃度で溶解したものをそれぞれ用いた。

これらの試料溶液を20 ml容量の硬質ガラスアンプルに封入して γ 線を照射した。

対照として γ 線を照射せず冷蔵保存, 室温保存の試料をとった。

3) 分 析 方 法

5'-リボヌクレオチドの分析

a) 5'-ヌクレオチドの定量は5'-リボヌクレオチダーゼ(Bull seminal nucleotidase)を用いる中島らの酵素法, また個々のヌクレオチドの分析にはBergkvist法によるDowex 1×8を用いるカラムクロマトグラフィーによった。

b) 5'-ヌクレオチドの分解生成物の確認には飽和硫酸・1M 酢酸ソーダ・イソプロパノール (80:20:2) および n-ブタノール・酢酸・水 (4:2:1) の溶媒を用いるペーパークロマトグラフィーによった。東洋濾紙 No. 51 を用いた。なおスポットの確認には紫外線ランプ (253 m μ) を使用した。

2. 実験結果

1. 安定性に及ぼす照射線量の影響 (水溶液中)

5'-IMP の水溶液 (濃度は 2.0 mg/ml) をガラスアンプルに 20 ml 宛充填し共存物質なしで 0.29 ~ 27.6 $\times 10^6$ rad の r 線を照射した結果は Table. 1 のようである。

Table 1 Stability of 5'-IMP irradiated in distilled water.

Irradiation dose (10 ⁶ rad)	pH after irradiation	% 5'-IMP remaining
0	(7.32)	(100)
0.29	6.95	90.3
0.96	6.71	64.2
2.88	6.62	29.9
27.6	6.47	1.6

すなわち照射線量が高くなるに伴って pH が低下し色調が黄色に近づくことが認められ、5'-IMP の残存率が低下した。なお 5'-IMP は後述の pH 7 Buffer における挙動と比較すると Buffer 内よりも不安定であることが認められる。

ここで全線量が一定で単位時間の線量率を異にする場合の 5'-IMP の安定性を比較吟味した。すなわち 5'-IMP を蒸留水で溶解して 2.0mg/ml の溶液とし 1.00 $\times 10^6$ rad の全線量で線量率が 1.49 $\times 10^4$, 2.23 $\times 10^4$, 4.46 $\times 10^4$ レントゲン/hr. の時の 5'-IMP の残存率を酵素法で測定すると残存率はそれぞれ 59.2, 61.5, 62.4 % であってほぼ一定となり、この範囲の線量率では残存率に対する影響はないと考えられる。線量率が 10⁵ レントゲン/hr. を越える時にはコバルト線源に接近するために温度の調節や照射の均一化など二次的な考慮が必要となるだろう。

2. 安定性に及ぼす照射線量の影響 (緩衝液中)

5'-IMP \cdot Na₂ 標品を pH 7 のトリス・アミノメタン \cdot HCl Buffer (1/20 M) に 2mg/ml の割合に溶解しガラスアンプルに空気の共存下に 20 ml 宛封入し r 線を照射した。

線量率は 2.3 $\times 10^3$ ~ 1 $\times 10^5$ r の範囲であった。照射線量に対する 5'-IMP 溶液の pH, 色調, 5'-ヌクレオチド量の変化を示すと Table 2 のようである。

すなわち照射線量が増加するに伴い pH は酸性側に移行しかつ色調は黄色を帯びようになる。この色は後述するように 280 m μ より 350 m μ に至る範囲での吸収増加に由来すると考えられる。5'-IMP 残存率は酵素法による 5'-ヌクレオチド量より計算したものである。

同表の 5'-IMP 残存率の対数と照射線量の関係を図示すると Fig. 1 のようになりほぼ 10⁶ rad から 10⁷ rad の範囲では直線関係になると認められた。したがって 5'-IMP の初濃度を a % (ここでは 100%)、照射線量 t (Mrad) のときの 5'-IMP の残存率を x % とし 5'-IMP の分解恒数 k

Table 2 Stability of 5'-IMP irradiated in Tris-buffer (pH 7).

Irradiation dose (10 ⁶ rad)	pH after irradiation	% 5'-IMP remaining	Reaction constant k*
0	6.91	(100)	
0.47	6.79	94.7	0.104
0.93	6.61	88.2	0.131
1.86	6.42	76.8	0.141
3.72	6.21	59.6	0.138
5.58	6.11	46.4	0.137
7.44	6.00	35.9	0.138
9.3	5.91	33.0	0.120

$$* k = \frac{2.303}{t} \log \frac{x_0}{x}$$

t ; dose (Mrad)

x₀ ; initial amount of 5'-IMP

x ; remaining amount of 5'-IMP

0.134
±0.008

を次式から計算すると Table. 2 に示すようである。

$$k = \frac{2.303}{t} \log \frac{a}{x}$$

分解定数の平均値は 0.134 ± 0.008 であった。そして一定量を 90% 分解する照射量すなわち残存率 10% の場合の D 値は 17.2 Mrad であった。

照射した 5'-IMP 溶液の 100 倍希釈 (pH 2.0) の紫外外部吸収曲線は Fig. 2 に示すようである。照射線量が増加するに伴って 250 mμ の吸収が減少し 220 mμ および 280 mμ ~ 300 mμ の吸収が増加することが認められた。なお遠紫外部でも 300 ~ 350 mμ の範囲で吸収が増加した。

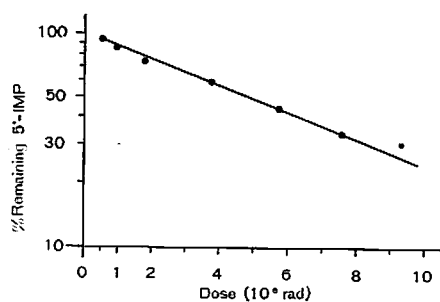


Fig. 1 Relation of remaining 5'-IMP and corresponding irradiation doses in Tris-buffer (pH 7).

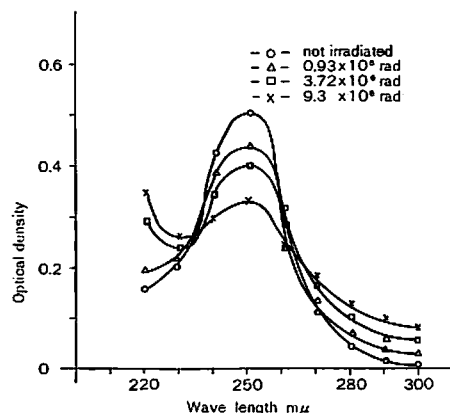


Fig. 2 Change of UV spectra of 5'-IMP irradiated in Tris-buffer (pH 7).

3. 5'-ヌクレオチドの安定性に及ぼす溶液 pH の影響

5'-IMP·Na₂ 標品を pH 3.5 のクエン酸ソーダ・塩酸 Buffer, および pH 7.9 のトリス・ア

ミノメタン・塩酸 Buffer に何れも 2 mg/ml の溶液になるように溶解しガラスサンプル内に空気共存下に $10^6 \sim 10^7$ rad の r 線を照射した結果は Fig. 3 のようである。

すなわち 5'-IMP は pH 9 の場合が実験 pH の範囲で最も安定であり pH 7, pH 5 と中性さらに酸性側になるに伴って不安定となった。pH 3 と pH 5 との間にはあまり相違はなかった。

4. 個々の 5'-ヌクレオチドについて安定性の比較

呈味成分として重要と考えられる 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP の 5 種の 5'-ヌクレオチド標品の安定性を相互に比較した。すなわちこれらは何れも単独に 2mg/ml の濃度になるようにトリス Buffer (1/20 M, pH 7) に溶解しガラスサンプル中に空気の共存下に 20ml 宛封入して r 線を照射した。

線量率は $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ r/hr, 照射線量は 0.93×10^6 rad と 4.65×10^6 rad の 2 種類であった。結果は Table 3 のようである。

Table 3 Comparative stabilities of 5'-nucleotides irradiated in Tris-buffer (pH 7).

5'-Nucleotides	% remaining 5'-nucleotides	
	0.93×10^6 rad	4.65×10^6 rad
5'-IMP	86.9	57.4
5'-GMP	88.7	62.9
5'-AMP	88.1	73.0
5'-CMP	83.5	53.6
5'-UMP	75.0	46.9

同表で 5'-ヌクレオチドの残存率は 0.93×10^6 rad 照射の場合、プリン系では 87~89% の範囲にありピリミジン系では UMP が 75%, CMP が 84% で UMP の安定性が低かった。 4.65×10^6 rad を照射した場合は低線量のと看同様にプリン系が比較的安定でピリミジン系が不安定であり 5'-UMP の安定性が 5 種のヌクレオチドの中で最も低かった。

次にこれら 5 種の 5'-ヌクレオチドを混合して r 線を照射した。pH 7.0 のトリス・アミノメタン Buffer に 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP をそれぞれ 0.4 mg/100 ml の濃度になるように混合して溶解し空気とともにガラスサンプルに封入した。 5×10^6 rad を照射したものについて未照射のものを対照として Dowex 1×8 を用いるカラムクロマトグラフィによりそのヌクレオチド組成を比較した。

すなわちヌクレオチド混合物は 260 mμ における吸収が 250 に相当する液量を pH 2.0 で 1 g の活性炭柱に吸着させエタノール・アンモニア水で溶出し溶離液は 40°C 以下で減圧濃縮しアンモニア水で pH 9.4 とし Dowex 1×8 カラムにかけた。

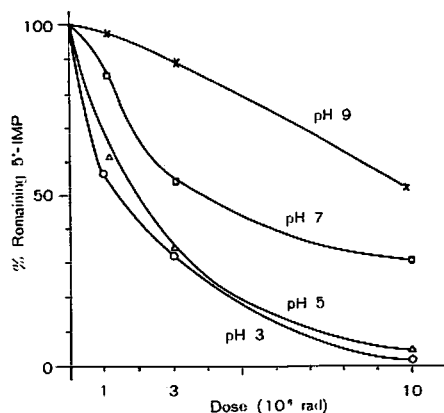


Fig. 3 Stability of 5'-IMP in buffer solutions of various pH.

カラムより溶出した各区分を集めて 260 m μ の吸収量を測定し常法によりそれぞれ核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドとして計算した。結果は Table. 4 のようである。

すなわち 5×10^6 rad 照射によって塩基、ヌクレオシド区分の吸光量増加が認められた。これは 5 種のヌクレオチドの分解により生成したものと考えられる。照射前後の混合液 ml 当りの個々のヌクレオチド量を比較して残存率 (%) を求めると 5'-AMP, 5'-IMP, 5'-GMP が比較的高く、5'-CMP が低く、5'-UMP は著しく低かった。

5'-ヌクレオチド相互間の安定性を比較すると個々に照射した場合同様にプリン系が比較的安定でピリミジン系が不安定であると認められた。

Table 4 Change in the amounts of 5'-nucleotides irradiated in a mixture.

	Bases, Nucleosides	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP
Control. not irradiated						
Absorbancy at 260m μ (O. D./ml)	0.17	4.17	9.20	7.09	4.87	7.81
μ mol/ml		0.672	0.647	0.717	0.705	0.665
Irradiated at 5×10^6 rad						
Absorbancy at 260m μ (O. D./ml)	3.34	2.13	6.06	1.18	3.04	4.85
μ mol/ml		0.344	0.429	0.119	0.438	0.401
% of remaining 5'-nucleotides		51.2	66.3	16.7	62.1	60.3

5. 安定性に及ぼす共存食品成分の影響

5'-ヌクレオチド標品水溶液の γ 線照射における安定性は前項のようであるが食品中では多種多様の成分が共存するのでその影響を受けることが考えられる。本項では 5'-IMP を蒸留水に約 2 mg/ml の濃度に溶解したものを基本とし、グルコースでは 1~5%, サッカロース, では 0.5~2.5%, Casamino acid (Difco 製ビタミンフリーカゼイン水解物) では 0.4~2.0%, 食塩では 0.4~2.0%, の共存の下にそれぞれ 10^6 rad を照射した場合の 5'-IMP の残存率をしらべると Fig. 4, 5 のようであった。5'-IMP に γ 線を照射すると 310~370 m μ の吸光が増加するが、グルコースが共存するとその増加が著しかった。pH はサッカロース共存のとき 6.0 以下に下った。5'-IMP の残存率はグルコース 1~5%, サッカロース 0.5~2.5% の共存によって 80% 以上となり、これら糖分の共存によって安定性を増すこと、すなわち糖分の保護作用がみとめられた。

Casamino acid, 食塩の場合は pH の変化は 6~7 の範囲であった。Casamino acid 0.4~2.0% の添加によって 5'-IMP の残存率は 80% 以上となり安定性に対する保護効果がみとめられた。

食塩 0.4~2.0% の添加によっては 5'-IMP の残存率には変化はなく保護効果はみとめられなかった。

以上のように 5'-IMP の安定性は純水溶液よりもトリス buffer 内の方が、また糖分、アミノ酸

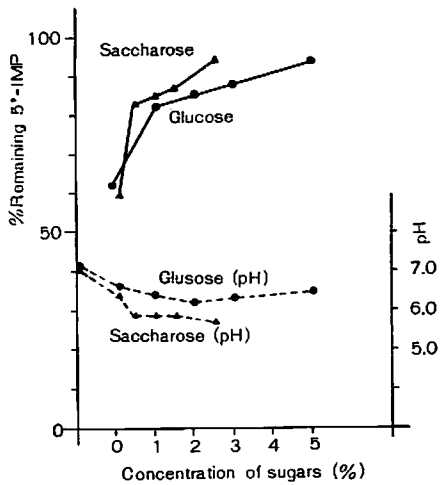


Fig. 4 Stability of 5'-IMP irradiated at 10^6 rad in the mixture with sugars.

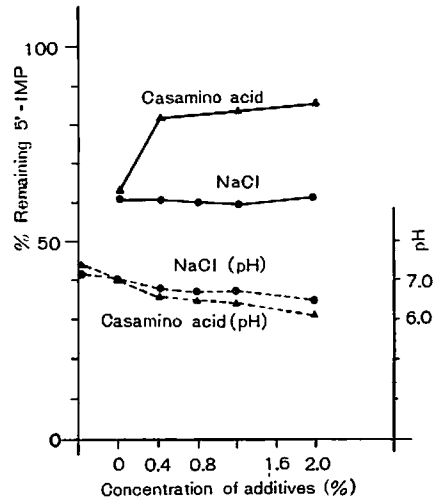


Fig. 5 Stability of 5'-IMP irradiated at 10^6 rad in the mixture with some additives.

の共存によっても増加するのであり実際の食品においては種々の糖分、蛋白成分など緩衝成分を含有するので 5'-IMP の安定性は純水溶液におけるものよりもかなり高いものであることが推定される。

6. 5'-ヌクレオチドの分解生成物について

5'-IMP 溶液に γ 線を照射したときに生成する分解物について検討を行なった。5'-IMP を 2.0 または 5.0 mg/ml の濃度で蒸留水あるいは pH 3, 5, 7, 9 の Buffer に溶解し空気共存の下にガラスサンプルに封入 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ rad の γ 線を照射した。水溶液のときはそのまま、緩衝液の場合は活性炭吸着により精製した。反応溶液を東洋濾紙 No. 51 に線状に spot し n-ブタノール・酢酸・水 (4:1:2) あるいは飽和硫安液・1 M 酢酸ソーダ液・イソ-プロパノール (80:20:2) を溶媒として展開し乾燥後、紫外吸収部分を切り取って 5 ml の 0.01 N-HCl で室温で 2 時間振盪抽出し抽出液について 250 m μ の吸収量を光電比色計で測定した。5'-IMP 蒸留水溶液に照射した結果は Table 5 のようである。

Table 5 Decomposition products of 5'-IMP irradiated with γ -ray in distilled water.

Dose (10^6 rad)	% 5'-IMP remaining	% Absorbancy at 250m μ	% Inorganic phosphate formed	5'-IMP and related compounds (%)*			
				5'-IMP	HxR	Hx	Undeter= mined
0	(100)	(100)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)
0.2	88	96	11	93	0	7	0
2	46	86	44	54	6	26	14

*: The ratios are expressed as per centage of individual absorbancy to a total absorbancy at 250 m μ .

Abbreviations are used: Hx, hypoxanthine. HxR, inosine.

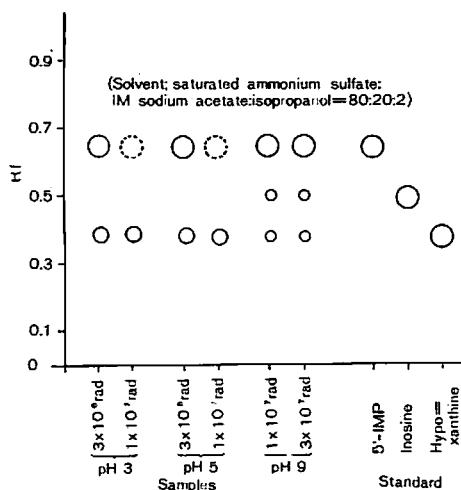


Fig. 6 Chromatogram of the decomposition products of 5'-IMP with γ -irradiation.

次に pH3, 5 のクエン酸ソーダ・HCl Buffer pH7, 9 のトリスアミノメタン・HCl Buffer 内で 5'-IMP に照射して溶液 pH の影響を吟味した。

前項と同様にして分解生成物をペーパークロマトグラフィで分離したがその一例を示すと Fig. 6 のようである。

すなわち pH3, 5 では 5'-IMP の分解によって生成するのは大部分がヒポキサンチンであること、また pH9 ではイノシンとヒポキサンチンが生成することが認められた。緩衝液内の 5'-IMP に照射した結果分解により生成した 250 m μ 吸収物質の分布の割合と無機リン酸の生成、250 m μ 吸収の変化の関係を示すと Table 6 のようである。

Table 6 Decomposition products of 5'-IMP irradiated with γ -ray in buffers at various pH.

pH of buffers	Dose (10 ⁴ rad)	% Absorbancy at 250m μ	% Inorganic phosphate formed	5'-IMP and related compounds (%)*		
				5'-IMP	HxR	Hx
	0	(100)	(0)	(100)	(0)	(0)
3	1	93	7	92	1-2	6
	5	95	13	94	1-2	5
7	5	95	8	96	1-2	2
	10	95	14	85	8	7
9	30	70	40	69	13	18

*: The ratios are expressed as the per centage of individual absorbancy to a total absorbancy at 250 m μ .

Abbreviations are used: Hx, hypoxanthine. HxR, inosine.

7. 加熱殺菌法との比較

食品の殺菌方法として従来から加熱法（缶詰殺菌）が広く行なわれている。加熱処理に際してのヌクレオチドの安定性については既に藤田、中谷⁷⁾、村田ら⁸⁾、私達⁹⁾の報告があるが、 γ 線処理におけるヌクレオチドの安定性と比較することもまた興味深いと考えられる。すなわち Table 7 に示すようである。

5'-IMP の水溶液中における安定性については上述のようであるが、一般食品中では共存成分の保護作用があるので完全殺菌線量（4.5 Mrad）においてもかなり安定なものと考えられる。

Table 7 5'-ヌクレオチドの安定性に対する加熱と γ 線照射とのそれぞれの影響の比較

加 熱 の 影 響	γ 線 照 射 の 影 響
(1) 100°C 以上になると温度上昇に伴い不安定となる。	(1) 線量が高くなるに伴い不安定となる。
(2) 中性より酸性になるに伴い不安定となる。	(2) 中性より酸性になるに伴い不安定となる。
(3) ピリミジン系ヌクレオチドすなわち 5'-CMP, 5'-UMP が比較的安定でありプリン系は不安定	(3) 加熱の場合と反対にプリン系すなわち 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMP が安定でピリミジン系が不安定。
(4) ヌクレオチドのリボースと燐酸との結合が先ず切れてヌクレオシドを生成する。ただし pH 2 以下では核酸塩基とリボースの結合が切れる。	(4) ヌクレオチドの核酸塩基とリボースとの結合が先ず切れて核酸塩基を生成する。ただし pH 9 ではヌクレオシドも生成する。
(5) 共存物質の影響 可溶性澱粉, グルコース, サッカロースの共存により, 分解が促進された。 食塩, グルタミン酸ソーダ, カゼイン酸分解物はほとんど安定性に影響はない。	(5) 共存物質の影響 グルコース, サッカロースは安定性を増加した糖質の保護作用がみとめられた。 またカゼイン酸分解物でも保護作用を認めたが食塩では影響はない。

要 約

5'-ヌクレオチド水溶液に γ 線を照射した場合のヌクレオチド相互の安定性及びイノシン酸水溶液を対象として照射線量の影響、溶液 pH、共存食品成分の影響などをしらべた。

照射線量が高くなるに伴い 5'-IMP の残存率が低下し、とくに pH が酸性側に移行するに伴い安定性が悪くなった。

5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP の 5 種のヌクレオチド標品の安定性を比較するとプリン系が不安定であった。

グルコース、蔗糖、カザミノ酸の共存で 5'-IMP の安定性に対する保護作用を認めた。 γ 線を照射した 5'-IMP の分解生成物は殆んどがヒポキサンチンで pH 9 でわずかにイノシンも生成された。これよりイノシン酸の主な分解経路は塩基部分のヒポキサンチンとリボースの結合が先ず切れ殆んど同時に無機燐が現われることよりリボースと燐酸の結合も容易に切断されると考えられる。

終りに臨み終始ご懇切なご指導を賜っている大阪大学寺本名誉教授並びに多大のご援助を賜っている住友化学工業株式会社、武田薬品工業株式会社の皆様方に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Weiss, J.J : Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 3, 103 (1964).
- 2) 石原宏 : 生化学 35, 753 (1936).
- 3) Shugar, D. : The Nucleic acids 3, (ed. by Chargaff, E. Davidson, J.N) (1960).
- 4) Korableva, N.P. and Metlitskij, L.V. : 日本食品照射研究協議会刊行物第10集 (1967).
- 5) Guardia, E.J. and Dollar, A.M. : J. Food Sci, 30, 223 (1965).
- 6) Spinelli, J. : J. Food Sci, 30, 1063 (1965).
- 7) 藤田・中谷・木村・石井・佐谷 : 栄養と食糧 18, 98 (1965).
- 8) 栗山・伏崎・村田 : 栄養と食糧 17, 337 (1965).
- 9) 橋田・毛利・青山 : 缶詰時報 43, (1) 65 (1964).