

# 冷凍食品の解凍におけるヌクレオチドの消長\*

毛利 威徳, 橋田 度, 志賀 岩雄

## Changes in Nucleotides During Defrosted of Frozen Food

Takenori Mouri, Wataru Hashida and Iwao Shiga

Identification and determination of 5'-nucleotides in perchloric acid extracts of five kinds of foodstuffs were carried out with ion exchange chromatography. Some discussions are made on the change in the amounts of nucleotides during heat processing.

Three peaks of nucleotide fractions on the chromatograms obtained from the extracts of the prawn (*Penaeus japonicus*) were identified as those of 5'-IMP, 5'-AMP and 5'-UMP, respectively. Four fractions from raw shii-take (*Lentinus edodes*) were identified as 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP and 5'-GMP, respectively, and two from mushroom (*Psalliota bisporus*) as 5'-AMP and 5'-UMP.

The increases of 5'-AMP during heat processing of oyster, green beans, and mushroom may be attributed to an enzymatic breakdown of ATP and ADP originally contained. Decomposition of RNA was relatively slow in sea foods during heat treatment. In the case of shii-take, a mixture of four kinds of nucleotides which are known to be the constituents of its own RNA accumulated during defrosted in water. In the case of mushroom the increases of 5'-nucleotides due to the decomposition of RNA were relatively small.

It is reasonable to consider that 5'-AMP and 5'-IMP contained and accumulated in foodstuffs contribute to their flavor.

### 緒 言

5'-イノシン酸 (5'-IMP), 5'-グアニル酸 (5'-GMP) などヌクレオチド類は食品の呈味成分として重要なものであるが, 食品加工に伴うそれらの変化もまた注目すべきものがある<sup>1,2)</sup>, 冷凍食品のヌクレオチド組成については既に若干の報告<sup>3~7)</sup>があるが, 私達は解凍に際してヌクレオチド組成に特徴ある変化のおこることを認めたので, 2, 3の食品を対象にその変化の原因として, 食品原料に元来含まれている核酸分解酵素系が作用するのではないかと, この観点の下に検討を行なつた結果を報告する。

### 方 法

(1) 試料の調製 クルマエビ, 生シイタケは市販品, マッシュルームは当短大栽培品であるが, それぞれ特徴あるヌクレオチド組成を示すので対象として選ばれた。いずれも新鮮なものを Super

\* 凍結及び乾燥研究会会誌15 (1969) 所載

wall 製の冷凍機により  $-20^{\circ}\text{C}$  に冷凍貯蔵した。これらは解凍することなく可食部分を冷時、過塩素酸(濃度5%)とともにホモジナイズして抽出した。冷却遠心沈澱を行なって、上澄液を 5N-KOH で中和し、沈澱を除いてヌクレオチド量測定用の試料とした。

解凍は  $5^{\circ}\text{C}$  で24時間、あるいは  $35^{\circ}\text{C}$  で2時間放置して行ない、ドリップを併せ、冷時、過塩素酸で抽出して試料とした。

(2) 分析方法 個々のヌクレチオドは中島らの記載<sup>9)</sup>による Bergkvist の方法<sup>9)</sup>により Dowex 1  $\times$  8 のカラムと蟻酸、蟻酸ソーダの溶媒系を用いて定量した。その他は常法による。

(3) 核酸分解酵素系の活性測定、新鮮なもの、あるいは冷凍貯蔵した食品の可食部を、冷時5倍量の蒸留水とともにホモジナイズし、12,000rpm で冷却遠沈し、その上澄液を粗酵素液とした。必要に応じて硫酸飽和や、DEAE-cellulose. Sephadex カラムによる分画によって精製した。

須原・大村ら<sup>10)</sup>の報告に準じて粗酵素液の RNase (Ribonuclease), PDase (Phosphodiesterase), および PMase (Phosphomonoesterase) 活性を測定した。蛋白質量は Folin-Ciocalteu<sup>11)</sup> の呈色法または 280m $\mu$  の吸収量によって求めた。

## 結 果 と 考 察

### (1) 凍結貯蔵中のヌクレオチドの変化

新鮮なクルマエビではヌクレオチドとしては ATP が主要なもので、ADP, 5'-AMP が若干認められているが、それを  $-20^{\circ}\text{C}$  で貯蔵した場合、第1表のように、3カ月までは変化が少いが、6カ月後になると ATP が減少し、5'-AMP と 5'-IMP が増加しているのがみとめられた。またマッシュルーム(第2表)では ATP, ADP, 5'-AMP, 5'-UMP が主要なもので、凍結貯蔵中その変化は遅いが、ATP, ADP が徐々に減少し、5'-AMP が増加した。なほシイタケでも ATP が徐々に

Table 1 Changes of the nucleotides of frozen prawn under storage at  $-20^{\circ}\text{C}$

Samples	$\mu\text{mol/g dry wt}$			
	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Immediately after freezing	3.6	1.2	10.8	40.9
Stored for 1 month	3.8	0.9	8.6	40.6
Stored for 3 months	3.2	trace	11.3	43.6
Stored for 6 months	10.1	13.5	12.8	24.9

Table 2 Changes of the nucleotides of frozen mushroom under storage at  $-20^{\circ}\text{C}$

Samples	$\mu\text{mol/g dry wt}$			
	5'-AMP	5'-UMP	ADP	ATP
Immediately after freezing	1.1	2.0	3.4	3.1
Stored for 1 month	1.8	0.1	1.5	3.4
Stored for 3 months	2.7	1.0	1.4	2.5
Stored for 6 months	2.8	0.2	1.2	2.0

減少した。

凍結貯蔵温度を  $-5^{\circ}\text{C}$  にしたときは、クルマエビでのヌクレオチドの変化は、傾向は同様なものであるが、速度は速くなった。

(2) 解凍前後のヌクレオチドの変化

新鮮な原料を短期間凍結貯蔵したものを解凍すると、外観的な鮮度の変化はほとんど認められないが、クルマエビの場合第3表に示すように、解凍せずに直接過塩素酸で抽出した対照に対して、

Table 3 Effect of defrosting on the nucleotides of frozen prawn.

Samples	$\mu\text{mol/g dry wt.}$						
	Adenosine	Inosine	Hypoxanthine	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
No defrosting	9.0	2.2	1.1	3.6	1.2	10.8	40.9
Defrosted at $5^{\circ}\text{C}$ , for 24 hrs	10.1	2.5	1.3	34.6	15.7	7.8	3.7
Defrosted at $35^{\circ}\text{C}$ , for 2 hrs	9.4	2.3	1.2	18.7	10.5	18.0	11.8

解凍したものは ATP の著しい減少と、5'-AMP, 5'-IMP の増加が認められた。ADP は減少する場合や増加する場合があるが、後者の場合は ADP が ATP より分解物として一時的に蓄積するためと考えられる。

マッシュルーム (第4表)、シイタケ (第5表) の場合は、ATP が著しく減少した。5'-ヌクレオチドの変化は区々であるが、 $35^{\circ}\text{C}$  で2時間解凍した場合、5'-AMP と ADP が増加することがみとめられた。

Table 4 Effect of defrosting on the nucleotides of frozen mushrooms.

Samples	$\mu\text{mol/g dry wt.}$			
	5'-AMP	5'-UMP	ADP	ATP
No defrosting	1.2	2.0	3.4	3.1
Defrosted at $5^{\circ}\text{C}$ , for 24 hrs	1.1	1.0	3.4	trace
Defrosted at $35^{\circ}\text{C}$ , for 2 hrs	1.8	1.1	4.4	trace

Table 5 Effect of defrosting on the nucleotides of frozen Shii-take (*Lentinus edodes*).

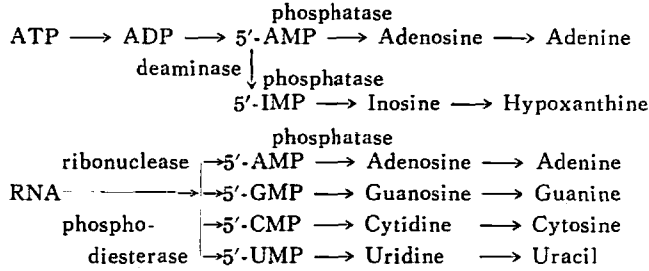
Samples	$\mu\text{mol/g dry wt.}$				
	5'-AMP	5'-UMP	5'-GMP	ADP	ATP
No defrosting	0.44	trace	0.59	3.33	2.35
Defrosted at $5^{\circ}\text{C}$ , for 24 hrs	0.51	1.15	0.76	1.51	trace
Defrosted at $35^{\circ}\text{C}$ , for 2 hrs	1.05	0.94	0.44	4.10	trace

(3) ヌクレオチドの変化と核酸分解酵素系との関係

従来、魚肉貯蔵中のヌクレオチドの変化として、斎藤<sup>12)</sup>、Jones<sup>13)</sup> などによって第1図上段に示すように、筋肉中の ATP に由来し、ADP, 5'-AMP を経て 5'-IMP に至る経路がみとめられている。クルマエビでは 5'-AMP から 5'-IMP に脱アミノする作用が弱く、通常は 5'-AMP からアデノ

シン, アデニンと分解する傾向が強いと考えられる。しかし凍結に際しては 5'-AMP から 5'-IMP への反応も徐々に進行し, 解凍することによって, その反応も遙かに速く進行すると考えられる。

Fig. 1 Schematic pathways of the changes of 5'-nucleotides and related substances in foodstuffs.



マッシュルームをアルカリ性側で自己分解させるときりや、シイタケを 70°C で水とともに加熱するときには第 1 図下段のような反応が進行, RNA の分解に伴う 5'-ヌクレオチドの蓄積がみとめられる。しかし冷凍や解凍においては、この反応はあまりみとめられない。

凍結貯蔵, 解凍に伴う変化は, 前述のように ATP の分解に由来する一連のヌクレオチドの消費であると考えられるので, 食品原料中の PMase 活性区分の作用について検討した。

すなわちクルマエビ (第 6 表), マッシュルーム (第 7 表) の粗酵素液には PMase 活性が含ま

Table 6 PMase activity of the crude extracts of frozen prawn.

Samples	Storage period		Specific activity (unit/mg protein)	
			to PNPP	to 5'-AMP
Fresh			12.0	1.10
Frozen	-20°C,	0	10.3	1.01
		1 month	10.5	1.03
		3 months	13.0	1.28
		6 months	12.5	1.15
Frozen	-5°C,	0	10.3	1.01
		5 hrs	13.0	1.20
		1 day	12.7	1.17
		3 days	10.5	1.01
		5 days	11.5	1.01

Table 7 RNase, PDase, and PMase activities of the crude extracts of frozen mushrooms.

Samples	Storage period		Specific activity (unit/mg protein)		
			RNase	PDase	PMase
Fresh			4.09	23.5	1,830
Frozen	-20°C,	0	4.54	29.0	1,602
		1 month	4.03	24.7	1,622
		3 months	2.74	19.6	1,086
		6 months	2.80	11.5	946

れており、新鮮なものに較べて、凍結貯蔵中のものでもかなり安定であることがみとめられた。  
 クルマエビ、マッシュルーム、シイタケのそれぞれの PMase 画分の性質は第 8 表に示すようである。

Table 8 Properties of PMase fractions of prawn, mushrooms, and Shii-take.

	Sources		
	Prawn	Mushrooms	Shii-take
optimum pH	4.5	4.5—5.0	4.5—5.0
optimum temp. °C	50	45—50	45—50
stable at pH	6.0	6.0—7.0	4.0—5.0
unstable over, °C	70	70	70
inhibitor	NaF, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NaF, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NaF, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Inhibitory metal ions		Zn <sup>++</sup> , Cu <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup>	Zn <sup>++</sup> , Cu <sup>++</sup>

これら PMase 活性区分は、標品の ATP に対し pH 5.0 の Buffer 内で 37°C, 1 時間反応させると、第 2 図のように、いずれも ATP を分解して ADP, 5'-AMP およびその分解物を生成した。

クルマエビの酵素は加えて 5'-IMP も生成した。またこれら PMase 画分の最適温度は 45~50°C であるが、低温においてもなお作用する可能性が第 9 表からみとめられる。

以上の結果から、凍結および解凍に際して認められる ATP 関連物質の消長の原因は、凍結中でも安定に保持されている PMase 画分が凍結中にはきわめて徐々に、解凍に際しては急速に作用するためと考えられる。解凍の場合は細胞組織の破壊がおこり、筋肉や植物体が元来保持している核酸分解酵素系が基質と接触し反応しやすくなるのであろう。

Spinelli<sup>14)</sup> はシタバピラメヤニジマスでは解凍によって 5'-IMP が減少すること、オヒョウ

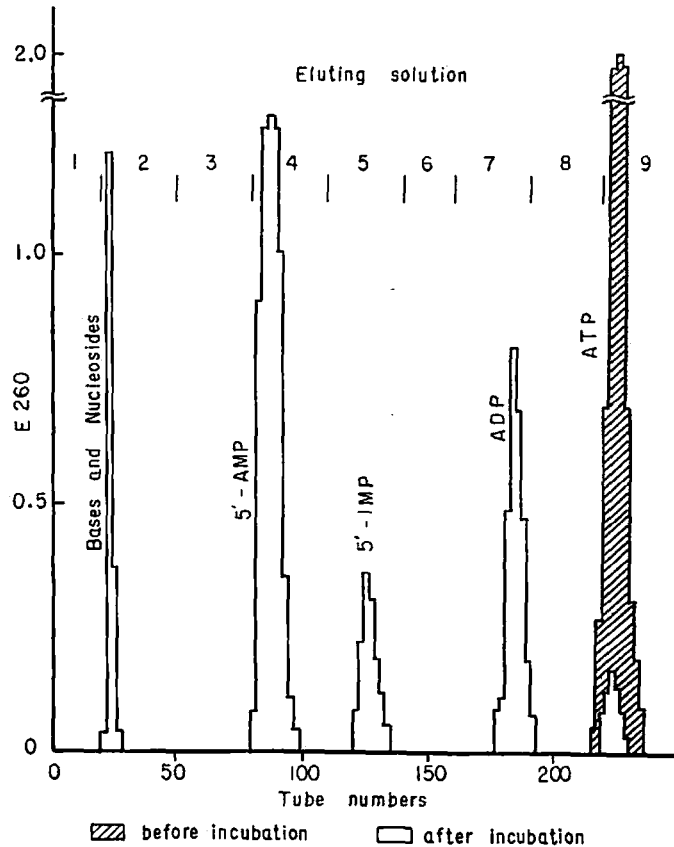


Fig. 2 Degradation of ATP with a crude enzyme extract from defrosted prawn.

Table 9 Activities of PMase fractions at low temperatures.

	Reaction temp. °C	ΔE (400 mμ)	Protein (mgN)	ΔE/mgN
Prawn	37	0.137	0.035	3.91
	15	0.295	0.35	0.84
	5	0.245	0.35	0.70
Mushrooms	37	0.172		90—185
	15	1.430	0.0077	22.4
	5	0.035	0.154	9.3

やサケでは 5'-IMP があまり減少しないことを見出し、これは魚肉酵素系の強弱によるといっている。

解凍に際しての変化と類似の現象が凍結乾燥品の水戻しに際しておこることが、斎藤・新井<sup>15)</sup>によってホタテ、アワビなど貝類で、毛利ら<sup>16)</sup>によってマッシュルームでみとめられた。

また Cronman<sup>17)</sup> は凍結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、Matheson<sup>18)</sup> は乾燥肉を予備加熱処理してないときは酵素によるグリコーゲンの減少が著しいことを述べている。これは凍結物の解凍や乾燥物の吸水によって酵素が作用する可能性を示しているといえよう。

近年冷凍魚の供給が急速に増加しているが、その解凍に際して魚肉の旨味成分である 5'-IMP の消長について、詳細な考慮を払う必要のあることを指摘したいと思う。

## 総 括

冷凍食品の解凍に際して ATP に由来するヌクレオチドの消長がみとめられた。すなわち、クルマエビでは ATP が著しく減少し、5'-AMP, 5'-IMP が増加した。マッシュルームとシイタケでは 35°C で 2 時間解凍すると、ATP が減少し、5'-AMP と ADP が増加した。これらの変化の原因として食品自体から抽出した PMase 画分について吟味した。PMase 活性は凍結中比較的安定に保有され、それを含む画分は標品 ATP を分解して、ADP, 5'-AMP あるいは 5'-IMP を生成した。解凍に際して細胞組織の破壊がおこり、PMase 画分が作用しやすくなってヌクレオチドの変化が急速におこったと考えられる。

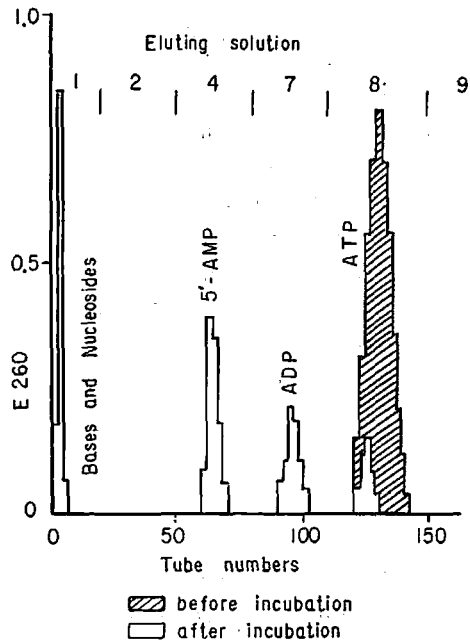


Fig 3 Degradation of ATP with a crude enzyme extract from defrosted mushrooms.

## 文 献

- 1) 毛利・橋田・志賀・寺本：醸工，43，335，344，909 (1965)，44，237 (1966)。
- 2) Teramoto, S., Hashida, W., Mouri, T. and Shiga, I. : Technology Reports of the Osaka University 18, 247 (1968).
- 3) 藤井：New Food Industry, 9 (12), 19, 1967.
- 4) 齋藤・新井：日水誌，23，265，1957.
- 5) Tarr, H.L. : J. Food Science, 31, 846, 1966.
- 6) Murray, J., Jones, N.R. and Burt, J.R. : J. Fish. Res. Bd. Canada., 23, 1795, 1966.
- 7) 竹田・示野：高知大学学術研究報告，14，自然科学，II (11)，115，1965.
- 8) 中島・市川・鎌田・藤田：農化，35，797，1961.
- 9) Bergkvist, R. and Deutch, A. : Acta Chem. Scand., 8, 1877, 1954. Bergkvist, R. : Acta Chem. Scand 12, 1549, 1554, 1958.
- 10) 須原・草葉・大村：酵素化学シンポジウム，第16号，p 115 (1964).
- 11) Folin, O. and Ciocalteu, V. : J. Biochem., 73, 629, 1927.
- 12) 齋藤：化学，15，101，1960，日水誌，27，461，1961，32，196，1966.
- 13) Jones, N.R. : Proc. of the 2nd International Congress of Food Science and Technology, P109 (Aug 22-27) 1966.
- 14) Spinelli, J. : 私信，1966.
- 15) 齋藤・新井：日水誌，25，573，1959. 新井：昭和40年度日本水産学会秋季大会シンポジウム，1965.
- 16) 毛利・下田・橋田・寺本：醸工，45，725，1967.
- 17) Kronman, M.T. : J. Agr. Food. Chem., 8, 67, 1960.
- 18) Matheson, N.A. : Recent Advances in Food Science, 2, 57, 1962.

## 討 論

質問 森地敏樹（農林省畜産試）

私ども微生物屋にも非常に Suggestive な報告です。凍結によって、酵素が基質と接触しやすくなるとお考えだと思いますが、食品原料の細胞内で RNase, PDase などがどの位置に存在するのか教えて下さい。

返答 橋田 度（東洋食品工短大）

食品加工において、凍結品の解凍，凍結乾燥品の水戻し，熱風乾燥品の水戻し，水とともに 60～70°C 位の加熱などに際して酵素作用に依存すると思われる様な核酸成分の変化をみとめています。このような操作によって仰せのように酵素が基質と接触しやすくなるものと考えています。

食品原料の細胞内での酵素の存在部位はまだしらべていません。