

# 食品中の核酸成分に関する研究\*—X

クルマエビの冷凍における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-X CHANGES OF 5'-NUCLEOTIDES DURING FREEZING OF KURUMAEBI (PRAWN)

Takenori Mouri, Wataru Hashida, and Iwao Shiga

Change in the amounts of nucleic acid components occurring in Kurumabi (*Penaeus japonicus*), which had been frozen and stored at  $-5^{\circ}\text{C}$  or  $-20^{\circ}\text{C}$ , was investigated by ion exchange chromatography and phosphatase assay. The amount of free nucleotides was measured through the extraction with cold perchloric acid before defrosting. Nucleotides in defrosted Kurumaebi were more than free nucleotides present in the frozen sample.

When frozen muscle was held at  $-5^{\circ}\text{C}$ , a rapid increase of 5'-AMP was occurred accompanying with decreases of ATP, and ADP, within the first 3 days. During the following five days, 5'-AMP decreased slowly and 5'-IMP increased correspondingly. Subsequently, decreases of 5'-IMP and 5'-AMP were observed with the beginning of the increases in inosine and hypoxanthine contents.

Held at  $-20^{\circ}\text{C}$ , for six months, the decreases in amounts of ATP and ADP were comparatively slow and 5'-AMP was mainly accumulated as decomposed compound.

The phosphomonoesterase activities were comparatively stable during the storage at  $-5^{\circ}\text{C}$  or  $-20^{\circ}\text{C}$ .

We guess that 5'-IMP is formed during freezing and may contribute to the flavor of Kurumaebi.

### 緒 言

前報<sup>1)</sup>において種々の食品の缶詰工程などの加熱処理に際し、核酸分解酵素系の作用により nucleoside polyphosphate または高分子核酸の分解にともなって5'-ヌクレオチドが蓄積することを見出した。一方、加熱処理以外に冷凍における5'-ヌクレオチドの変化もまたそれと対比して興

---

\* 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 2号 P 151 (1967所載)

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は、すでに新井<sup>2)</sup>のトヤマエビ、また Jones<sup>3)</sup>のタラ、富山<sup>4)</sup>のコイ、藤井<sup>5)</sup>のヒラメなどについての報告があるが、核酸分解酵素系との関連性もまた今後解明されるべき問題と思われる。

クルマエビは水産食品の内でも硬骨魚類と軟体動物の中間のヌクレオチド分布を示し、場合によっては5'-IMPが見出されるという特徴があり、また活物が入手しやすいという利点がある。本報ではクルマエビの冷凍における5'-ヌクレオチドの消長を調べ、原料鮮度あるいは核酸分解酵素系との関連について検討したので報告する。

## 実験方法

(1) 供試標準物質は前報<sup>1)</sup>に準ずる。

(2) 試料調製方法

供試クルマエビ (*Penaeus japonicus*) は市販品で活クルマエビを使用した。冷凍は Super-wall 製品の冷凍機により $-20^{\circ}\text{C}$ で6カ月間、あるいは $-5^{\circ}\text{C}$ で10日間貯蔵して途中適宜取り出し、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 $5^{\circ}\text{C}$ 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どおり冷時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<sup>6)</sup>の酵素法によった。個々のヌクレオチドは Dowex  $1 \times 8$  を用うるカラムクロマトグラフィーで定量した。

揮発性塩基は富山<sup>4)</sup>らの方法によった。

(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12000rpmで冷却遠心し、その上澄液を使用した。測定法は大村、須原<sup>7)</sup>らの方法によった。詳細な条件は前報<sup>1)</sup>に準ずる。

## 実験結果

### 1. 原料クルマエビ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。

ATP、ADPなどの含量に大きな相違があり、また微量見出される5'-AMPと5'-IMPにも若干の相違がある。このように原料の鮮度や個体差によって、かなり変化があると考えられるので統計的処理を行なった結果、ADPは $10.6 \pm 1.84$ 、ATPは $43.7 \pm 4.64$ の範囲にあり、主要なヌクレオチドである。また、5'-AMPは $1.3 \pm 2.01$ の範囲で微量ながら存在が認められ、いずれもクルマエビの鮮度、購入時期などの差が大きいことが認められたので、以後の実験は一度に多く原料を購入し、個体差をなくすように心がけて実験を行なった。このような食品に

おいては原料の選択に気をつける必要があると思われる。

Table 1 Amounts of the nucleotides of Kurumaebi.

Sample		Adenosine	Inosine	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Fresh No. 1	UV <sub>260</sub> *	57.2	3.6	1.2	trace	69.5	214.1
	μmol/g dry wt.	4.2	0.2	0.3	trace	13.4	42.4
Fresh No. 2	UV <sub>260</sub>	84.3	3.5	25.2	8.4	59.2	238.2
	μmol/g dry wt.	5.9	0.5	3.8	1.4	10.0	35.8
Fresh No. 3	UV <sub>260</sub>	84.6	3.6	6.5	3.7	35.8	224.3
	μmol/g dry wt.	5.9	0.5	1.4	1.7	7.8	48.0
Fresh No. 4	UV <sub>260</sub>	46.9	3.3	2.3	trace	54.4	253.3
	μmol/g dry wt.	8.6	1.2	0.4	trace	10.05	47.7
Fresh No. 5	UV <sub>260</sub>	69.2	4.6	3.4	trace	55.7	212.5
	μmol/g dry wt.	14.3	1.9	0.6	trace	11.5	44.0
Mean value	$\bar{X}$ μmol/g dry wt.			1.3		10.6	43.7
Standard deviation	$\sigma$ μmol/g dry wt.			±2.01		±1.84	±4.64

\* Absorbance at 260 mμ of each fraction

## 2. 解凍における核酸系物質の組成変化

冷凍したクルマエビは、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クルマエビと比較した。-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、ドリップとともに冷時過塩素酸で抽出し、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。

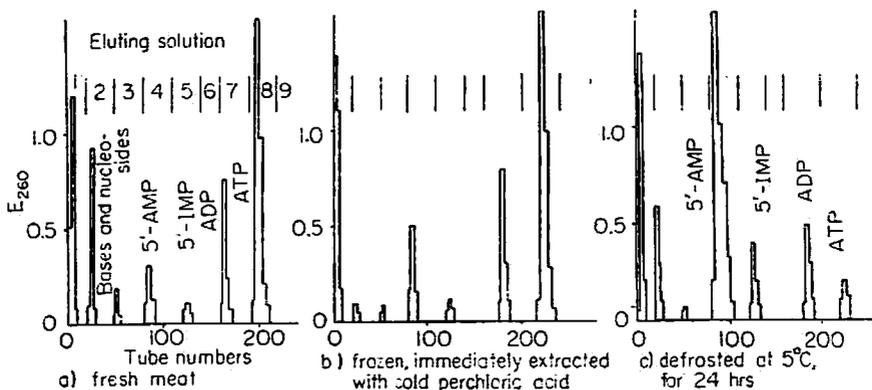


Fig. 1 Effect of defrosting on the nucleotides of frozen Kurumaebi (Prawn).

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の組成とよく似ているが、5°Cで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の大きな減少と5'-AMP、5'-IMPおよびイノシン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、冷凍魚肉のヌク

Table 2 Effect of defrosting condition on the nucleotides of frozen Kurumaebi.

Sample		Adeno- sine	Inosine	Hypo- xanthine	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Fresh	UV <sub>260</sub>	57.2	3.6	trace	1.2	trace	69.5	214.1
	μmol/g dry wt.	4.19	0.17		0.3	trace	13.4	42.4
Frozen, immediately extracted with cold perchloric acid	UV <sub>260</sub>	62.08	30.84	7.76	30.0	5.0	66.5	338.2
	μmol/g dry wt.	8.99	2.18	1.12	3.6	1.2	10.8	40.9
Defrosted at 5°C, for 24 hrs	UV <sub>260</sub>	69.6	34.8	8.70	199.7	39.4	44.8	21.5
	μmol/g dry wt.	10.08	2.45	1.27	34.6	15.7	7.8	3.7
Defrosted at 35°C, for 2 hrs	UV <sub>260</sub>	64.48	32.44	8.11	120.8	29.6	116.4	76.6
	μmol/g dry wt.	9.40	2.28	1.18	18.7	10.5	18.0	11.8

レオチド組成を求めるには、解凍放置して後に測定することは不適當で、冷凍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一般の冷凍魚肉には適當であろう。以後の実験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. 冷凍-20°C経過におけるクルマエビ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。

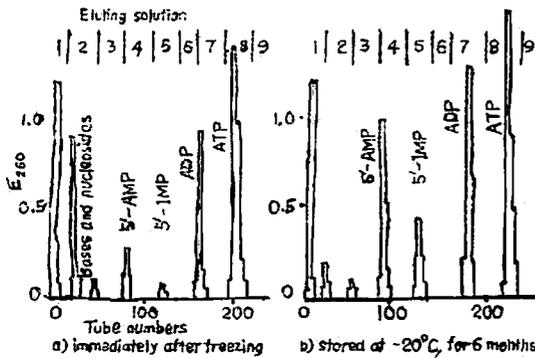


Fig. 2 Changes of the nucleotides of frozen Kurumaebi under strage at -20°C.

3カ月目までのヌクレオチド組成はほとんど生原料と変わらないが、6カ月後ではATPが少し減り、5'-AMPと5'-IMPが若干増加した。このように-20°Cで3カ月間保存しても核酸系物質については生原料と同じ組成で貯蔵されると思われる。温度を上げて-5°Cで冷凍貯蔵した場合の変化は次項のごとくである。

Table 3 Changes of the nucleotides of frozen Kurumaebi under storge at -20°C.

Sample		Frac. A*	Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Fresh	UV <sub>260</sub> **	54.1	6.6	trace	1.2	trace	69.5	214.1
	μmol/g dry wt.				0.3	trace	13.4	42.4
Frozen, immediately after freezing	UV <sub>260</sub>	82.6	13.3	11.7	30.0	5.0	66.5	338.2
	μmol/g dry wt.				3.6	1.2	10.8	40.9
Frozen, stored for 1 month	UV <sub>260</sub>	58.9	12.9	7.6	19.6	2.28	43.1	227.5
	μmol/g dry wt.				3.8	0.9	8.6	40.6
Frozen, stored for 3 months	UV <sub>260</sub>	107.8	13.5	11.7	23.9	trace	85.0	320.7
	μmol/g dry wt.				3.2	trace	11.3	43.6
Frozen, stored for 6 months	UV <sub>260</sub>	54.6	8.8	trace	44.5	28.9	55.9	109.3
	μmol/g dry wt.				10.1	13.5	12.8	24.9

\*: Fraction A and B include nucleosides and bases.

\*\* : Absorbancy at 260mμ of each fraction.

#### 4. 冷凍-5°Cにおけるクルマエビ核酸系物質の経時的変化

-5°Cで10日冷凍したものの変化をクロマトグラフィーで調べたが、典型的な一例は Fig. 3のごとくである。個々のヌクレオチド含量は Table 4のごとくである。

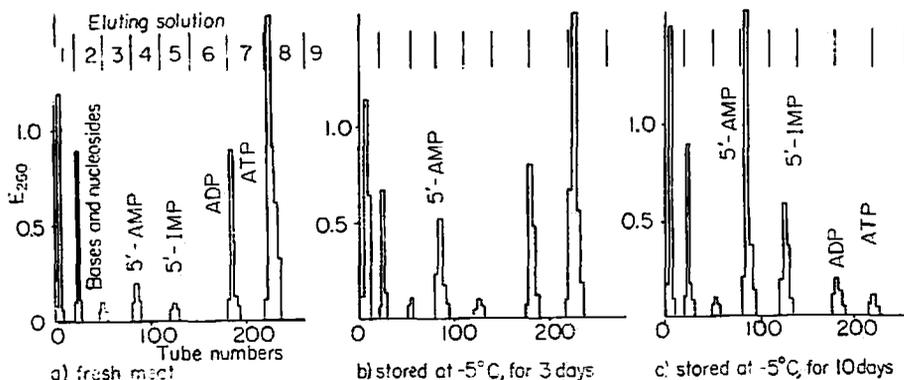


Fig. 3 Changes of the nucleotides of frozen Kurumaebi (Prawn) under storage at -5°C.

Table 4 Changes of the nucleotides of frozen Kurumaebi under storage at -5°C.

Sample		Frac. A*	Frac. B*	Frac. C	5'-AMP	5'-IMP	ADP	ATP
Fresh	UV <sub>260</sub> **	54.1	6.6	trace	1.2	trace	69.5	214.1
	μmol/g dry wt.				0.3	trace	13.4	42.4
Frozen, stored for 5 hours	UV <sub>260</sub>	81.4	6.8	2.3	6.5	3.7	35.8	224.3
	μmol/g dry wt.				1.4	1.7	7.8	48.9
Frozen, stored for 1 day	UV <sub>260</sub>	72.3	4.9	trace	3.9	4.5	47.1	282.2
	μmol/g dry wt.				0.6	1.5	7.5	44.9
Frozen, stored for 3 days	UV <sub>260</sub>	77.4	7.8	trace	34.6	4.6	65.8	199.8
	μmol/g dry wt.				5.9	1.6	11.3	34.5
Frozen, stored for 5 days	UV <sub>260</sub>	62.8	8.7	trace	244.5	9.4	24.4	10.9
	μmol/g dry wt.				50.6	4.0	5.0	2.2
Frozen, stored for 8 days	UV <sub>260</sub>	68.1	17.6	trace	144.2	36.2	18.0	trace
	μmol/g dry wt.				29.1	15.0	3.6	trace
Frozen, stored for 10 days	UV <sub>260</sub>	58.4	14.9	trace	114.7	39.3	15.5	trace
	μmol/g dry wt.				26.3	18.5	3.5	

\*: Mixture of nucleosides and bases.

\*\* : Absorbancy at 260mμ of each fraction.

5時間までの冷凍では生原料と比較して、ヌクレオチド組成の変化は認められないが、3日目よりATPが減少しはじめ5'-AMPの増加が認められた。8日目からはATPはほとんど見出されず、5'-AMP、5'-IMPは増加した。このようなことより-5°Cにおける冷凍経過ではATP→ADP→5'-AMP→5'-IMPの経路での変化が認められた。

#### 5. クルマエビ冷凍経過における総5'-ヌクレオチド量と揮発性塩基量の消長

前項までの分析を吟味する意味で5'-ヌクレオチド総量を酵素法によって調べた。生原料-20°Cあるいは-5°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 5のごとくである。

Table 5 Total 5'-nucleotides and total volatile base of some Kurumaebi samples.

Sample	Storage period		Total 5'-nucleotide ( $\mu$ mol)		Total volatile base (mg/100g)
			/g wet	/g dry wt.	
Fresh			0.54	3.17	5.7-6.2
			0.65	3.83	
			3.26	19.23	
Frozen	-20°C,	0	0.98	5.77	6.8-7.1
	"	1 month	0.88	5.20	
	"	3 months	0.69	4.10	
	"	6 months	5.13	30.21	
Frozen	-5°C,	5 hours	0.71	4.20	
	"	1 day	0.55	3.24	
	"	3 days	1.28	7.54	
	"	5 days	9.79	57.64	
	"	8 days	5.18	30.50	
	"	10 days	7.41	43.60	
Defrosted	5°C,	24 hr	5.29	31.16	
	35°C,	2 hr	6.35	37.33	

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ほぼ一致した。また、5'-ヌクレオチドの変化についても -20°C では6カ月後に多くなり、-5°C では3日目より増加していることがわかった。これは5'-ヌクレオチドの生成を示している。また、揮発性塩基量は一般に魚肉などの鮮度を示す指標とされているが、生原料と-20°C 冷凍の6カ月目と比較して、ほとんど差が見出せなかった。これから鮮度の点ではほとんど変化はないが、その前にATPから5'-AMP、5'-IMPに至る変化は進行していることが認められた。

#### 6. 冷凍クルマエビにおける核酸分解酵素系の経時的変化

前項までのクルマエビ冷凍経過におけるATP→ADP→AMP→IMP→イノシン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、経時的にクルマエビ肉より粗酵素液を抽出して phosphomonoesterase 活性と phosphatase 活性を測定した。粗酵素液について RNase 活性、PDase 活性、PMase 活性を測定した結果、RNase、PDase 活性は弱く、PMase活

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

Sample	Storage period		PMase (unit)	Protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Activity to 5'-AMP (unit/mg protein)
Fresh			720	60	12.0	1.10
Frozen	-20°C,	0	1020	98	10.3	1.01
	"	1 month	2620	256	10.5	1.03
	"	3 months	1998	155	13.0	1.28
	"	6 months	3500	280	12.5	1.15
Frozen	-5°C,	0	1020	98	10.3	1.01
	"	5 hours	720	60	13.0	1.20
	"	1 day	4368	343	12.7	1.17
	"	3 days	5208	493	10.5	1.01
	"	5 days	1232	107	11.5	1.01
	"	8 days	1638	98	16.7	1.23
	"	10 days	2232	128	17.3	1.41

性はかなり強いことが見出された。経時的に PMase の活性を測定した結果は Table 6 のごとくである。

合成基質 PNPP に対する PMase および 5'-AMP に対する nucleotidase 活性のいずれも時間経過にともなう変化が少なく、 $-20^{\circ}\text{C}$ あるいは $-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍において酵素系は比較的安定に保持されていることが考えられる。このようなことより 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次のように 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. 4 のごとくである。

ATP (20mg/20ml)	5.0ml
—PMase fraction (18.5 units)	5.0ml
—1M buffer (pH 5.0)	1.0ml
—incubation, $37^{\circ}\text{C}$ , 1hr	
— $\text{HClO}_4$ treatment	
—active carbon treatment	
Sample for chromatography	

Fig. 4 Degradation of ATP.

acetate buffer (pH5.0) で  $37^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させてクロマトグラフィーを行なうと Fig. 5, 6, 7, 8 のごとくである。

Fig 5, 6 は生原料より抽出された粗酵素液によったもので ATP が減少するに対して、ADP、5'-AMP、5'-IMP、イノシンが生成した。また 5'-AMP に作用させた結果は 5'-IMP が若干生成し、さらにイノシンおよびアデノシンが生成している。

Fig. 7, 8 は  $-20^{\circ}\text{C}$ 、冷凍 6 カ月目

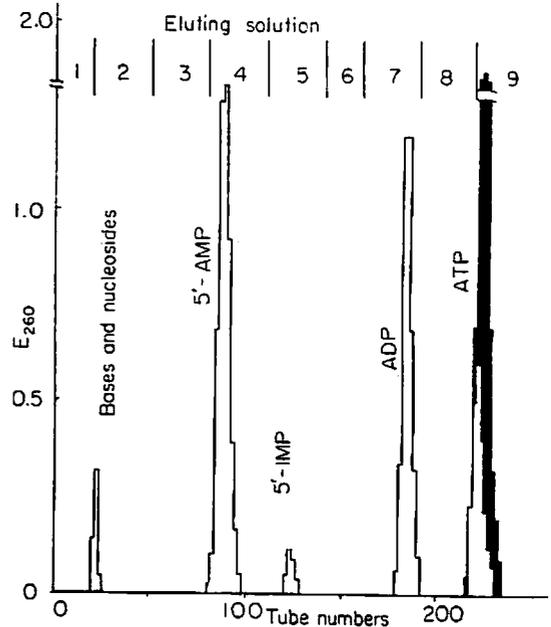


Fig. 5. Chromatogram of ATP reacted by crude enzyme extract from Kurumaebi (fresh meat).  
 ■ before incubation ▨ after incubation

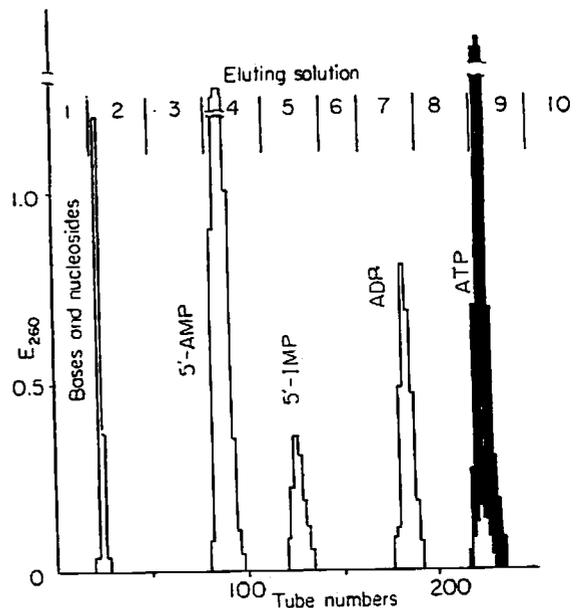


Fig. 6. Chromatogram of ATP reacted by crude enzyme extract from defrosted Kurumaebi.  
 ■ before incubation ▨ after incubation

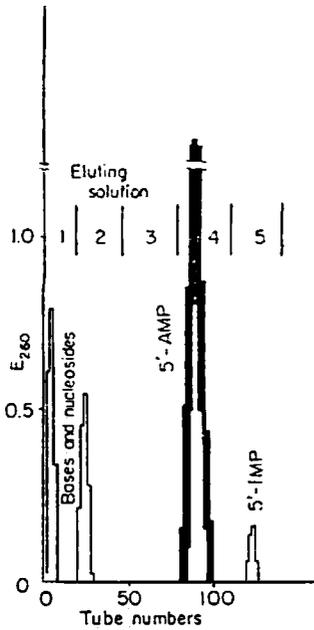


Fig. 7. Degradation of 5'-AMP with crude enzyme extract from fresh Kurumaebi.

■ before incubation  
 □ after incubation

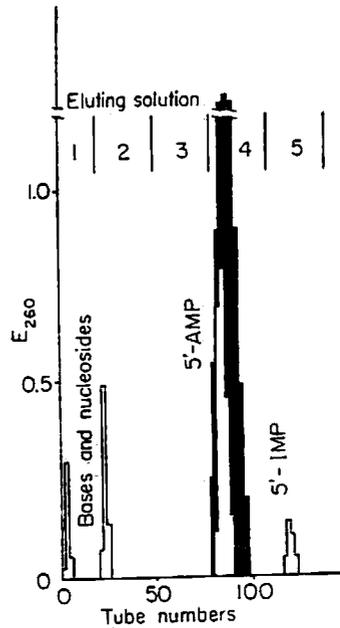
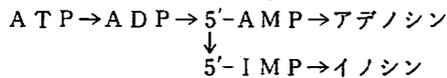


Fig. 8. Degradation of 5'-AMP with crude enzyme extract from frozen Kurumaebi.

■ before incubation  
 □ after incubation

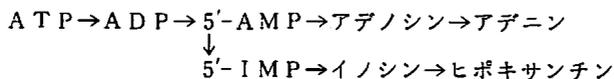
のクルマエビから抽出した粗酵素液で、生原料粗酵素液の場合とほぼ同じ作用を示すが、相互の活性の強弱については今後検討したいと考えている。この酵素実験よりクルマエビ肉において



この経路で変化が起こることが裏付けられた。

## 考 察

無脊椎動物に属する水産食品において 5'-IMP はあまり認められないと一般的に言われているが、著者らは前報においてクルマエビに 5'-IMP の存在することを認めた。また、新井、斎藤<sup>2)</sup>らはトヤマエビにおいて



の経路で 5'-IMP が生成することを述べ、ほかの貝類、イカ、タコ類に見出されない特徴であるとしているが、著者のクルマエビでの結果もこの見解に一致している。

富山<sup>4)</sup>、Jones<sup>3)</sup>、藤井ら<sup>5)</sup>はコイ肉、タラ肉、ヒラメなどにおいて、冷凍の経時的変化について検討しているが、クルマエビと同じような性質を持った PMase の作用によってヌクレオチド組

成の変化が認められている。冷凍貯蔵中において PMase 活性は低下しないで、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この変化が起こると考えられる。解凍条件によっては 5'-AMP と 5'-IMP の生成が認められる。このように旨味については、やはり 5'-IMP が増加することが、旨味成分として好ましいことが官能的に認められた。鮮度との関係は現在一般的に言われている揮発性塩基と比較すると、早く変化が認められることがわかった。このことより鮮度との関係については今後検討したい。

## 要 約

クルマエビ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、冷時過塩素酸で抽出して試料にすることが望ましい。-5°C の冷凍保存では 5~8 日後には ATP の分解と 5'-AMP、5'-IMP、イノシンの生成が認められた。-20°C の冷凍では 6 カ月後にこの変化が見られた。冷凍中は PMase 活性が比較的安定に保持されることが認められた。クルマエビ冷凍中、イカ、タコ、貝類では見られない 5'-IMP が生成することが認められた。この変化は旨味成分としては好ましいものである。

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いたします。

本報は昭和41年度日本農芸化学会大会で発表した。

## 文 献

- |   |  |
|---|--|
| <p>1) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 43, 335 (1965)<br/>毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 43, 394 (1965)<br/>毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 237 (1966)<br/>毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 44, 248 (1966)</p> <p>2) 斎藤, 新井: 日水誌, 25, 573 (1959)<br/>斎藤: 日水誌, 27, 461 (1961)<br/>新井: 昭和40年日本水産学会秋季大会シンポジウム</p> <p>3) Jones, N. R., Murray, J.: Biochem. J., 66, 5 (1957)<br/>Jones, N. R., Murray, J.: J. Sci. Food Agric., 13, 475 (1962)<br/>Jones, N. R.: Recent Advances in Food Science (J. Hawthorn) vol 1, 151 (1962)</p> | <p>4) 富山, 原田: 日水誌, 18, 112 (1952)<br/>富山, 小林, 北原, 白石, 大庭: 日水誌, 32, 262 (1966) 小林: 昭和40年度日本水産学会秋季大会シンポジウム (1965)</p> <p>5) 藤井, 内山, 江平, 野口: 日水誌, 32, 410 (1966) 発表</p> <p>6) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 35, 797 (1961)<br/>中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 35, 803 (1961)<br/>中島, 市川, 鎌田, 藤田, 吉村, 栗山: 農化, 37, 558 (1961)</p> <p>7) 須原, 草葉, 大村: 醗酵化学シンポジウム, 115 (1964)</p> |
|---|--|