

〔醸工 第42巻, 第7号 p. 434~441, 1964〕

食品中の核酸成分に関する研究

(第2報) 食用きのこにおける 5'-ヌクレオチドの分布

橋田 度・毛利 威徳・志賀 岩雄
(東洋食品工業短期大学)

寺本 四郎 (大阪大学工学部醸酵工学教室)

Studies on Nucleic Acid Related Substances in Foodstuffs

(II) Distribution of 5'-Nucleotides in Edible Mushrooms

Wataru Hashida, Takenori Mouri, Iwao Shiga

(Toyo Junior College of Food Technology, Kawanishi City, Hyogo)

Shiro Teramota

(Dept. Ferment. Techn., Facult. Engin., Osaka Univ.)

Fractions of 5'-nucleotides in boiled extracts of 10 kinds of mushrooms, i. e., *Psalliota bisporus*, *Lentinus edodes* (Shii-take), *Tricholoma matsutake* (Matsutake) etc. were separated and analysed by means of ion exchange chromatography on a Dowex 1X8 column (formate form). Four fractions of raw *Lentinus edodes* were identified as 5'-cytidylic acid (5'-CMP), 5'-adenylic acid (5'-AMP), 5'-uridylic acid (5'-UMP) and 5'-guanylic acid (5'-GMP), and two of *P. bisporus* as 5'-AMP and 5'-UMP. 5'-GMP, which is called "a tasty component of dried Shii-take" was also found in boiled extracts of *Lyophyllum aggregatum* (amounted to 0.15% on dry basis), *Lactarius hatsudake*, and *T. matsutake*, etc.

The level of 5'-nucleotides of dried *L. edodes* extracted with boiling water was higher than that of 5'-nucleotides extracted with cold perchloric acid or sulfuric acid. The amount of individual 5'-nucleotide of dried *L. edodes* was about two times as much as that of 5'-nucleotide of the raw sample, on a dry basis. The amount of 5'-nucleotides in some mushrooms was fairly more than found in vegetables. The amount of free 5'-nucleotide in mushrooms was no more than about one tenth of the amount of ribonucleic acid in them.

脚註：本報においては次の略号を使用する。

5'-AMP : adenosine-5'-mono phosphate (5'-adenylic acid)

5'-CMP : cytidine-5'-mono phosphate (5'-cytidylic acid)

5'-UMP : uridine-5'-mono phosphate (5'-uridylic acid)

5'-IMP : inosine-5'-mono phosphate (5'-inosinic acid)

5'-GMP : guanosine-5'-mono phosphate (5'-guanylic acid)

R N A : ribonucleic acid

D N A : desoxyribonucleic acid

緒 言

きのこ類は生食されあるいは乾しいたけのように調味食品として家庭的に利用されるが一方食品工業では通称マッシュルーム、なめこのように重要な罐詰原料になるものもある。既にきのこ類の核酸成分に関連して國中⁽¹⁾ Bergkvist⁽²⁾ 脇田⁽³⁾らの報告があるが、最近中島・藤田ら⁽⁴⁾は乾しいたけに 5'-GMP を見出しこれが「乾しいたけの味」と呼ばれているので、きのこ類の核酸成分は呈味成分として食品工業の観点からも興味深いと考えられる。

私達は前報⁽⁵⁾野菜類につづいて、マッシュルーム・えのきたけ・まつたけなど約10種のきのこ類を対称にして 5'-ヌクレオチド類の分布をしらべると共に、抽出法による 5'-ヌクレオチド量の相違、きのこの生の場合と乾した場合の比較、きのこの核酸組成に対する遊離の 5'-ヌクレオチド類の割合などについて検討した結果を報告する。

実 験 の 部

I. 実験方法

(1) 供試標準物質

定性、定量のための標準物質として 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-IMP, 5'-GMP はいずれもナトリウム塩を武田薬品工業株式会社研究所より提供された。またヌクレオシド類、核酸塩基類は市販品を用いた。

(2) 試料およびその調製法

供試きのこ類は次のごときものである。学名は文献⁽⁶⁾によった。

通称マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) は当短大製品、しいたけ (*Lentinus edodes*)、えのきたけ (*Flammulina velutipes*)、まつたけ (*Tricholoma matsutake*)、しよろ (*Rhizopogon rubescens*)、は市販品、やなぎまつたけ (*Agrocybe cylindracea*)、はつたけ (*Lactarius hatsudake*)、しめじ (*Lyophyllum aggregatum*)、ひらたけ (*Pleurotus ostreatus*) は採集品である。

カラムクロマトグラフィの試料を調製するためにきのこは次の3種の方法で抽出された。

煮出し法：中島ら⁽⁴⁾の記載に準じ細断したきのこを100°C、3分間煮沸し、煮出し液とした。

過塩素酸抽出法⁽²⁾：氷冷下で10%過塩素酸、次に5%過塩素酸と共にホモジナイズし、遠沈して抽出液を合併し、5N・KOH で中和し、沈澱を遠沈で除いて試料とした。

硫酸抽出法：氷冷下 0.1N・H₂SO₄ と共にホモジナイズを3回繰返し遠沈して抽出液を合併し苛性ソーダで中和した。

(3) 分析方法

個々の 5'-ヌクレオチド量は Dowex 1×8 を用うるカラムクロマトグラフィによった。方法は前報⁽⁵⁾に準ずる。なおマッシュルームの画分の同定のために径2cm、長さ30cmのカラムを用いた。カラムからの溶出位置が260m μ の吸収の peak となるフラクションを集めて濃縮し同定した。

なお Schmidt-Thannhauser 法⁽⁷⁾ によってきのこの RNA, DNA, 酸可溶性区分を定量した。分析には、E. Volkin and W. E. Cohn⁽⁸⁾ 三浦・田中⁽⁹⁾、Kuroiwa and Horie⁽¹⁰⁾ の記載を参照した。

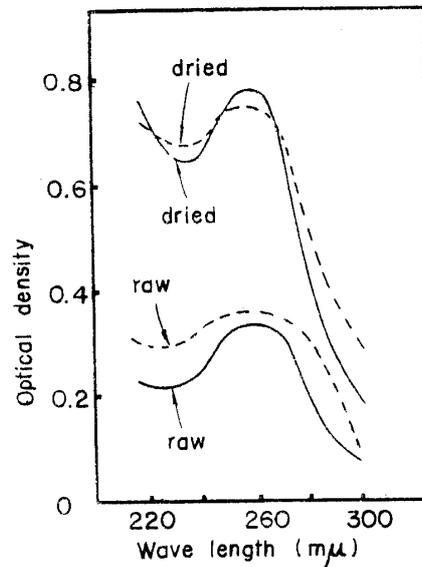
II. 実験結果

(1) マッシュルーム、生しいたけ各画分の同定

マッシュルームおよびしいたけの煮出し液の紫外外部吸収曲線は Fig. 1 のごとくであって、生のもも乾したのもも260m μ 附近に明瞭な peak が認められ、これから核酸成分の存在が推定される。

生マッシュルーム細断物 200 g を水 500ml と共に加熱、100°C で3分間保った後に冷却し綿にて濾過し、冷時遠心分離し、上澄液を集め 450ml (UV₂₆₀=8100, UV₂₆₀ とは 260m μ の吸収量と液量ml 数との積) を大型カラム (2×30cm) を通過させた。そのクロマトグラムは Fig. 2 のごとくで大きい画分が5個 (A, B, D, E, G), および小さい画分が3個得られた。画分DおよびEの紫外外部吸収曲線は 260m μ 附近に最大吸収を示し、核酸成分であると考えられる。ペーパークロマトグラフィの結果、画分DおよびEは溶媒〔2, 3, 4〕(前報⁽⁵⁾参

照), いずれによっても夫々 5'-AMP, 5'-UMP に一致すること, および 5'-スクレオチダーゼを作用させると分解されておのおののアデノシン, ウリジンを生成することから画分 D, E はおのおの 5'-AMP, 5'-UMP であると確認された. 画分 A は活性炭吸着による回収率が低く核酸成分は少ないと考えられる. 画分 B は混合物でありその中にウリジンが存在することが溶媒〔2, 3, 4〕によって認められた. 画分 C₁ は 5'-CMP に相当する位置にあるが微量でペーパークロマトグラフィでは確認できなかった. 画分 G は uridine-diphosphate-糖複合物に相当するがこの同定については後報に譲る. このように生マッシュルームでは 5'-AMP と 5'-UMP が主要なヌクレオチドで 5'-GMP, 5'-IMP に相当する画分はほとんど認められなかった. なお生マッシュルームの過塩素酸抽出液を基本にして, 個々の 5'-ヌクレオチドの回収率を求めた. 生マッシュルーム細断物 20 g に夫々 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-IMP, 5'-GMP 標準品溶液 (夫々 2mg 相当量) 計 25ml を添加し過塩素酸抽出を行った. なお対照として生マッシュルーム細断物 20 g に蒸留水 25 ml を添加し同様に過塩素酸で抽出して対照



— Shii-take Mushroom
Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of boiled extracts of Shii-take (*Lentinus edodes*) and mushroom (*Psalliota bisporus*).

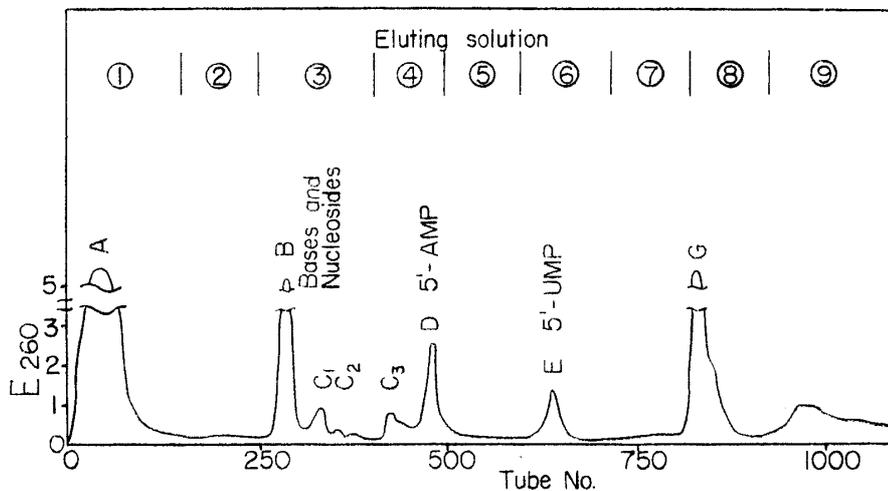


Fig. 2. Chromatogram of boiled extract of raw mushroom (*P. bisporus*).
A large scale column.

とした. 両者を全く同様にしてカラムクロマトグラフィを行い, そのクロマトグラムを比較した. その結果は Fig. 3 のごとくである. 5'-ヌクレオチドの部分を重ねると添加した標準 5'-ヌクレオチドはおのおのの 260m μ の吸収増加 (黒色部分) となって示されている. この場合抽出およびクロマトグラフィを通じてのおのおのの回収率は 5'-CMP 101.8%, 5'-AMP 99.0%, 5'-GMP 97.6%, 5'-IMP 103.2%, 5'-UMP 96.1% であって満足なものと考えられる. 画分 D, E に相当する peak は完全に 5'-AMP, 5'-UMP に一致し, これからも生マッシュルームにおける 5'-AMP, 5'-UMP の存在が認められた. また, 微量ながら 5'-CMP に相当する画分の存在も認められた.

生しいたけ 30 g から 310ml の煮出し液 ($UV_{260} = 12.0/ml$) を得た. UV_{260} が 480 に相当する煮出し液 (40ml) をカラムに添加し常法通り溶出した. 全く同様にした 3 本分のカラムについてその溶出位置の一致する溶出区

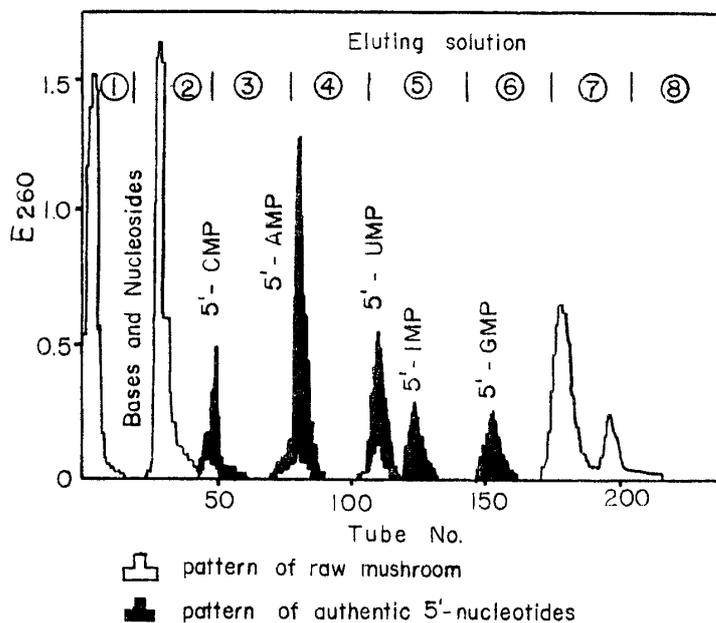


Fig. 3. Chromatogram of perchloric acid-extracted solution of raw mushroom (*P. bisporus*). A pattern of authentic 5'-nucleotides is put upon that of raw mushroom.

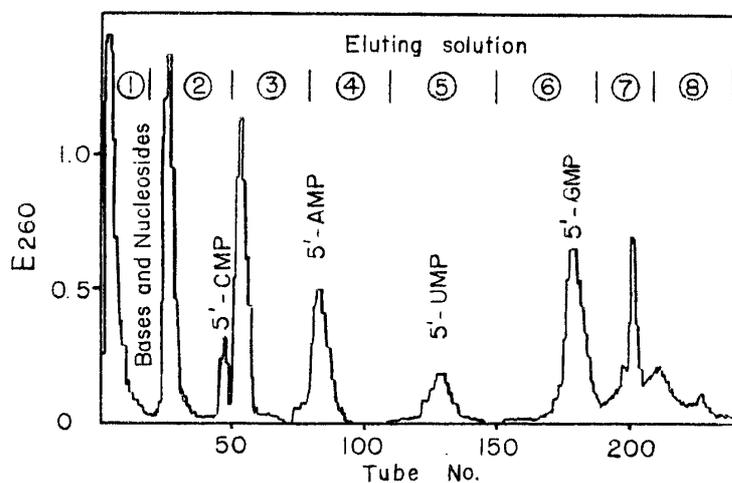


Fig. 4. Chromatogram of boiled extract of raw Shiitake (*Lentinus edodes*).

分を合併した。そのクロマトグラムは Fig.4のごとくである。これから A,B, C₁, C₂, D, E, F, G の 8 個の画分を分離した。これらをおのおの pH 2.0 に調整し活性炭処理して濃縮する。画分 A はあまり回収されないが B から F 迄は略々完全に回収される。ペーパークロマトグラフィの結果、溶媒〔2, 3, 4〕のいずれによっても画分 C₁, D, E, F は夫々 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-UMP, 5'-GMP に一致することが認められた。画分 B は塩基およびヌクレオシドの混合物と考えられるが溶媒〔2, 4〕によってウリジンの存在が確認され、他にウラシル、シチジンの存在が推定された。画分 G は流出順序からはウリジン誘導体と考えられるが同定はしなかった。画分 C₂ も既知のものと同定できなかった。

(2) 抽出法による 5'-スクレオチド量の相違

乾しいたけを対象とし、100°Cで水で煮出す方法と、0°Cで過塩素酸または稀硫酸とホモジナイズしながら抽出する方法を比較した。結果は Table 1 のごとくである。

Table 1. Comparison of extraction methods : Amounts of individual 5'-nucleotide in extracts of dried *L. edodes* by several methods. Concentration in $\mu\text{mole per g dry weight}$.

Extraction	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP
Boiling water	1.58	2.28	3.62	0	3.96
5%-Perchloric acid	trace	0.66	0.64	0	0.67
0.1N-H ₂ SO ₄	trace	1.00	0.99	0	1.79

過塩素酸または稀硫酸で冷時抽出する方法に較べて、煮出し法の方が 5'-GMP, 5'-UMP, 5'-AMP が夫々 2 ~ 3 倍含量が高かった。食品を対象とする観点から本報では煮出し法を主として採用した。

(3) 生のきのここと乾したきのこの相違

きのこを食品として利用するに当っては、たとえばしいたけのように生の場合と乾燥する場合があるので、それらの 5'-スクレオチド組成を比較した。市販の生しいたけ、乾しいたけおよび生しいたけを当研究室で乾燥させたものについて分析した結果の平均値を示すと Table 2 のごとくである。

Table 2. 5'-Nucleotide content of boiled extracts of Shii-take (*Lentinus edodes*).

		Fraction B**	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP
Raw Shii-take (4 samples)	distribution of UV ₂₆₀ *	5.3~ 11.0	1.5~ 2.2	7.5~ 10.0	3.4~ 6.2	0	5.1~ 10.9
	$\mu\text{mole/g material}$		0.28~ 0.45	0.62~ 0.87	0.41~ 0.78	0	0.51~ 1.25
	$\mu\text{mole/g dry wt. (mean)}$		0.91	1.58	1.16	0	1.93
Dried Shii-take (2 samples)	distribution of UV ₂₆₀ *	14.0~ 16.3	1.5~ 2.3	4.3~ 7.8	6.9~ 8.4	0	10.5~ 10.9
	$\mu\text{mole/g material}$		1.4~ 1.6	2.0~ 3.4	2.8~ 3.2	0	3.4~ 3.6
	$\mu\text{mole/g dry wt. (mean)}$		1.72	3.08	3.43	0	4.04

* % of absorbancy at 260m μ of each fraction to a total absorbancy of the sample which was applied on column

** mixture of uridine, cytidine, uracil and guanosine etc.

その結果乾物量 g 当りで比較して、4種の 5'-ヌクレオチドいずれも乾しいたけの場合が生の場合の約 2 倍量になっていると認められた。さらに画分 B はヌクレオチドおよび核酸塩基の混合物であるがその 260m μ 吸収について、全試料に対する画分 B の割合を比較すると乾した場合が生の場合よりも多かった。すなわち低分子成分が多いことを示している。

(4) きのこの RNA 含量と 5'-ヌクレオチド組成との比較

生マッシュルームを一定量とり冷時水と共にホモジナイズし、均一懸濁液を試料として全燐量、酸可溶性燐画分、RNA-燐画分、DNA-燐画分を分離定量した。

Table 3. Content of phosphorus in fractions of raw mushrooms (*P. bisporus*).

	Total phosphorus	Acid- soluble fraction	RNA fraction	DNA fraction
$\mu\text{mole/g dry wt.}$	374	225	51	9
% of each fraction to the total phosphorus	(100)	60.2	13.6	2.3

Table 3で RNA-燐は RNA 区分を IN-KOH と37°C, 20時間保温して分解溶出されたヌクレオチドの燐酸を定量したものである。乾物量 g 当り 51 μmole のヌクレオチドより構成されていると考えられる。それに対してきのこ中から煮出し法で遊離、溶出する 5'-ヌクレオチド (Table 4 参照) は 5'-AMP が 3.4 μmole , 5'-UMP 2.0 μmole で 5'-GMP, 5'-CMP は痕跡量であるから前 2 者を合しても約 1/10 量に過ぎないことが認められる。また、酸可溶性燐に対する割合では 1/40 であった。

(5) 数種のきのこの 5'-ヌクレオチド含量

数種のきのこの煮出し液についてその 5'-ヌクレオチド組成をカラムクロマトグラフィでしらべた。はつたけおよびまつたけのクロマトグラムはおのおの Fig. 5 および Fig. 6 に示すごとくである。いずれのクロマトグラムにおいても、5'-AMP, 5'-UMP, 5'-GMP の画分が見出され、比較的少量であるが 5'-CMP も見出された。また、5'-モノヌクレオチド類の前に核酸塩基・ヌクレオシドの混合区分が、5'-GMP の次に可成りの量の pply

Table 4. Content of 5'-nucleotide extracted with boiling water from raw mushroom (*P. bisporus*).

	Fraction B**	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP
distribution of UV ₂₆₀ *	18.3	0.9	4.3	2.1	0	1.2
$\mu\text{mole/g material}$		trace	0.325	0.196	0	trace
$\mu\text{mole/g dry wt.}$		trace	3.35	2.02	0	trace

* % of absorbancy at 260 m μ of each fraction to a total absorbancy of the sample which was applied on column

** mixture of uridine, cytidine, uracil and guanosine etc.

phosphate 区分が認められた。これらのきのこでは 2', 3' はヌクレオチドに相当する画分は見出されなかった。

これらのクロマトグラムから 5'-ヌクレオチド含量を計算すると Table 5 のごとくである。乾しいたけの旨味と呼ばれる 5'-GMP はしめじ、はつたけ、まつたけにも可成り含有されて居り、量的には生しいたけに匹敵していた。しめじの場合、乾物量中略々 0.15% に達した。なお 5'-AMP, 5'-UMP の含量が高く、これらが主要な 5'-ヌクレオチドであった。5'-CMP は若干見出されたが 5'-IMP はいずれも見出されなかった。

III. 考 察

きのこより核酸成分を抽出する方法として、Bergkvist⁽²⁾ は冷時過塩素酸抽出法を用い、中島らは食品化学的見

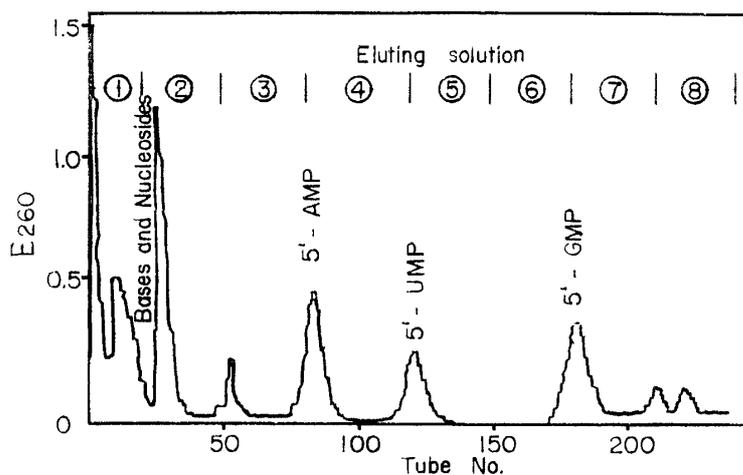


Fig. 5. Chromatogram of boiled extract of Hatsutake (*Lactarius hatsudake*).

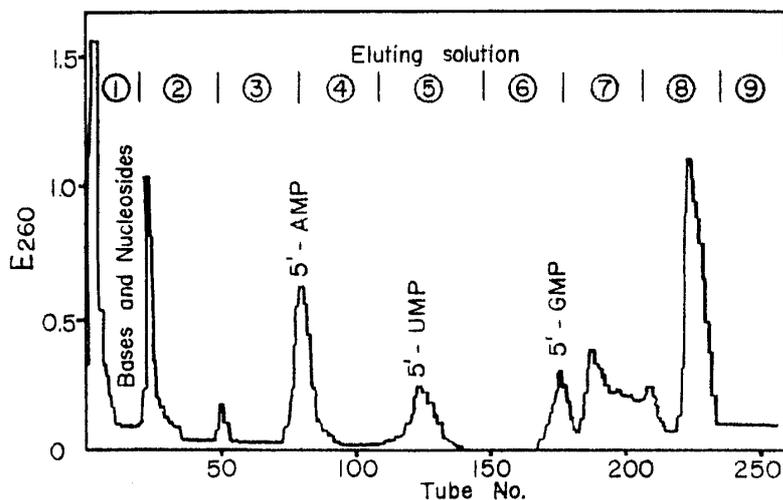


Fig. 6. Chromatogram of boiled extract of Matsu-take (*Tricholoma matsutake*).

Table 5. Amounts of individual 5'-nucleotide in boiled extracts of several kinds of mushrooms. Concentration in μ mole per g dry weight.

Mushrooms	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'GMP
Enoki-take (<i>Flammulina velutipes</i>)	0.28	1.95	0.65	0	1.60
Matsu-take (<i>Tricholoma matsutake</i>)	1.10	2.86	2.01	0	1.78
Yanagimatsu-take (<i>Agrocybe cylindracea</i>)	1.13	2.60	0.73	0	0.96
Shooro* (<i>Rhizoglyphus rufescens</i>)	0.13	0.46	0.21	0	0.16
Hatsu-take (<i>Lactarius hatsudake</i>)	0.23	1.48	1.28	0	1.60
Shimezi (<i>Lyophyllum aggregatum</i>)	0.68	3.38	3.28	0	4.35
Hira-take** (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	0.07	0.61	0.42	0	0.36

* Shooro was extracted with perchloric acid

** Concentration in μ mole/g raw Hira-take

地より煮出し法によっている。私達は乾しいたけを対象としてこの両法を比較したが、煮出し法による方が 5'-スクレオチド量が多かった。なお調理や罐詰加工に際してマッシュルームの加熱処理中に 5'-スクレオチド量が増加することを見出し検討中である。本報では食品という観点より主として煮出し法によった。

きのこ類では 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-UMP の 4 種の 5'-スクレオチドが普遍的に見出されたが、5'-IMP および 2', 3'-スクレオチドはほとんど見い出されなかった。また、マッシュルームには 5'-CMP と 5'-GMP はほとんど認められなかった。蔬菜類の場合⁽⁶⁾ 5'-AMP, 5'-UMP が主要スクレオチドであったことと比較して、きのこ類ではスクレオチド・パターンに相当の相違が認められた。また、生原料 g 当りで比較すると、5'-AMP 量は生しいたけで 0.62~0.87 μ mole、蔬菜類では大略 0.05 μ mole であった。きのこでは蔬菜類の約 10 倍量の 5'-スクレオチドが煮出し抽出されるものと考えられる。

きのこ中の遊離の 5'-スクレオチド類の成因として、中島ら⁽⁴⁾ は乾しいたけの場合高分子核酸成分が分解したものであろうと推論している。私達はマッシュルームを対象として酸可溶性磷画分、RNA 磷画分、遊離 5'-スクレオチド類の量的関係を吟味したが、煮出し法によるスクレオチド量は RNA の約 1/10、酸可溶性画分（生化学的には鈴木⁽¹¹⁾、きのこでの含量については Bergkvist⁽²⁾ 参照）の約 1/40 に過ぎなかった。RNA が一部分分解したとしても、遊離 5'-スクレオチド量に充分対応するわけで、量的な面からも、高分子核酸成分の分解の可能性が考えられる。

要 約

マッシュルーム (*P. bisporus*)、しいたけ (*Lentinus edodes*)、まつたけ (*Tricholoma matsutake*) など約 10 種の食用きのこ類を対象にして食品化学的見地から 5'-スクレオチド類の分布をしらべた。5'-スクレオチドの定量は Dowex 1 \times 8 を用うるカラムクロマトグラフィによった。

マッシュルームおよび生しいたけ煮出し液の夫々の画分の同定を行い、5'-AMP, 5'-UMP およびしいたけではこれらに加えて 5'-CMP, 5'-GMP の存在を確認した。一般にきのこ類ではこれら 4 種の 5'-スクレオチドが普遍的に認められたが、5'-IMP および 2', 3'-スクレオチドはほとんど見い出されなかった。

乾しいたけで抽出法を比較したところ 100°C で煮出す方法が冷時過塩素酸または硫酸で抽出する方法よりも 2~3 倍量が高かった。また、しいたけの乾したものと生のものを一定乾物量当りで比較すると乾した場合は生の場合の約 2 倍量であった。きのこの遊離 5'-スクレオチド類は蔬菜類と較べると相当に多いが、それでもきのこの RNA の約 1/10 量に過ぎないことが認められた。

“乾しいたけの味”といわれる 5'-GMP はしめじ (*Lyophyllum aggregatum*)、まつたけ、はつたけ (*Lactarius hatsudake*) にも見い出され、食用きのこに共通の旨味成分と考えられる。しめじの場合は乾物量当り 0.15% に達した。

終りに臨み、懇切な御助言を賜った京都大学浜田稔博士、薬品を寄贈されるなど御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東洋食品研究所青山延子嬢に深謝致します。

本報は昭和 37 年度日本醸酵工学会大会で発表した。

文 献

- | | |
|--|---|
| 1) 国中：農化, 30 , 787 (1956). | 河村：日本菌類図説 (1929). |
| 2) Bergkvist, R.: <i>Acta Chem. Scand.</i> , 12 , 364, 1549, 1554 (1958). | 7) Schmidt, G., Thannhauser, S. J.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 161 , 83 (1945). |
| 3) 脇田：農化, 35 , 583, 686 (1961). | 8) Volkin, E., Cohn, W. E.: <i>Methods of Biochemical Analysis</i> 1 , 287 (1954). |
| 4) 中島・市川・鎌田・藤田：農化, 35 , 797, 803 (1961). | 9) 三浦・田中：核酸・蛋白質・酵素, 6 , 486 (1961). |
| 藤田・鎌田・中島・市川：農化大会講演会, 福岡 (1961). | 10) Kuroiwa Y., Horie, Y.: <i>Bull. Agr. Chem. Soc.</i> , 19 , 35 (1955). |
| 5) 橋田・毛利・志賀・西川・寺本：本誌, 41 , 420 (1963). | 11) 鈴木：生化学, 35 , 737 (1963). |
| 6) 今関・本郷：原色日本菌類図鑑 (1957). | (昭 39. 3. 21 受付) |