γ線照射における 5'-ヌクレオチド水溶液の安定性

東洋食品工業短期大学 寺田潤子・秦 圭子・毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄

Effects of γ-Irradiation on the Stability of 5'-Nucleotides in Solutions

Junko TERADA, Keiko HATA, Takenori MOURI, Wataru HASHIDA
and Iwao SHIGA

Toyo Junior College of Food Technology, Kawanishi,
Hyogo, Japan

Summary

5'-IMP and related 5'-nucleotides are potent flavor substances contained in some foods. Sodium salts of 5'-IMP and other 5'-nucleotides were dissolved in distilled water or buffered solution and sealed in glass ampoules under atmosphere. The samples were irradiated with a 5,000 curie cobalt-60 source at the dose rates of $2.3 \times 10^3 - 3.6 \times 10^5$ r/hr at room temperature.

The residual levels of 5'-IMP irradiated at 1.0 Mrad were 61 and 86% in distilled water and in buffer of pH 7 (Fig. 2), respectively. The decimal reduction dose at pH 7 was 17.2 Mrad. 5'-IMP was found to be more labile at pH 3 and 5 rather than at pH 7 and 9 (Fig. 3). Irradiation of 5'-IMP led to the splitting of the bond between nucleic base and ribose phosphate, resulting in the increase of hypoxanthine (Table 5 and 6).

There is a significant difference between the mode of decomposition affected by heating and by γ-irradiation. Purine nucleotides are more stable than pyrimidine nucleotides against γ-irradiation (Table 3 and 4), but the formers are more labile than the latters against heating. Existence of sugar is protective against the destruction by γ-ray (Fig. 5) but is promotive of that by heat.

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すでに数々の研究が行われており、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は興味深いものである。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。また最近久保田・渡辺氏によって水溶液における核酸成分の変化について報告された。⁷⁾

本報においてはまず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らべ、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。

実験方法

I γ 線照射設備

住友原子力工業株式会社宝塚放射線研究所Co-60照射実験室に照射を依頼した。

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。

II 供試試料

5'-イノシン酸ナトリウム(5'-IMP)、5'-グアニル酸ナトリウム(5'-GMP)、5'-アデニル酸ナトリウム(5'-AMP)、5'-シチジル酸ナトリウム(5'-CMP)および5'-ウリジル酸ナトリウム(5'-UMP)は武田薬品工業株式会社より恵与された。

試料溶液の調整

- 1) 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。
- 2) 緩衝溶液: クエン酸ソーダ・HCl緩衝液(pH3, pH5)トリス・アミノメタンHCl緩衝液(pH7, pH9)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20ml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。

III 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 $\times$ 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。

実験結果と考察

I 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20ml宛充填し共存物質なしで $0.29 \sim 27.6 \times 10^6$ radの γ 線を照射した結果はTable 1.のようである。

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pH7 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2.0 mg/mlの溶液とし 1.00×10^6 radの全線量で線量率が

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

1.49×10^4 , 2.23×10^4 , 4.46×10^4 R/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 10^5 R/hr.を越える時には、コホ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2次的な考慮が必要となるだろう。

II 安定性に及ぼす照射線量の影響（緩衝液中）

5'-IMP・Na₂標品をpH7のトリス・アミノメタン・HCl Buffer (1/20 M)に2 mg/ml

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

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

5; dose (Mrad) x_0 ; initial amount of 5'-IMP

x; remaining amount of 5'-IMP

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γ線を照射した。線量率は $2.3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 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 mμより350 mμ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 10^6 radから 10^7 radの範囲では直線関係になると認められた。従って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。

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

分解恒数の平均値は 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 (pH2.0)の紫外吸収曲線は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).

Ⅲ 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 にいずれも 2 mg/ml の溶液になるように溶解しガラスアンプル内にて空気共存下に $10^6 \sim 10^7$ rad の γ 線を照射した結果は Fig. 3. のようである。

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

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

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

すなわち、5'-IMPはpH9の場合が実験pHの範囲で最も安定でありpH7、pH5と中性さらに酸性側になるに伴って不安定となった。pH3とpH5との間にはあまり相違はなかった。

IV 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。すなわちこれらはいずれも単独に2mg/mlの濃度になるようにトリスBuffer(1/20M, pH7)に溶解し、ガラスアンプル中に空気の下に20ml宛封入してγ線を照射した。

線量率は $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ 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。

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きと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γ線を照射した。pH7.0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0.4mg/100mlの濃

度になるように混合して溶解し空気に共にガラスアンブルに封入した。5 × 10⁶ 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ー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℃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。カラムより溶出した各区分を集めて260 mμ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。

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 260 mμ (O.D./ml)	0.17	4.17	9.20	7.09	4.87	7.81
μmol/ml		0.672	0.647	0.717	0.705	0.665
Irradiated at 5×10 ⁶ rad						
Absorbancy at 260 mμ (O.D./ml)	3.34	2.13	6.06	1.18	3.04	4.85
μmol/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

すなわち、5 × 10⁶ 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は著るしく低かった。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。

V 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るしかった。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認められた。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認められた。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認められなかった。

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

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。

V 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アンプルに封入し $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 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

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

タノール・酢酸・水 (4 : 1 : 2) あるいは飽和硫酸液・1 M 酢酸ソーダ液・イソブロパノール (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 mμ の吸収量を光電比色計で測定した。5'-IMP の蒸留水溶液に照射した結果は Table 5 のようである。

すなわち、照射線量の増加に伴い 5'-IMP の残存率が低下し僅かであるが 250 mμ 吸収値も減少しまた無機磷酸が漸時増加した。250 mμ 吸収物質の内での 5'-IMP、イノシン、ヒポキサンチンの分布

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

Dose (10^6 rad)	% 5'-IMP remaining	% Absor- bancy at 250 mμ	% 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 mμ.

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

の割合から、5'-IMPが減少するに伴いまずヒポキサンチンが増加するのでイノシン酸の主たる分解経路としては、塩基部分のヒポキサンチンとリボースとの結合がまず切れて、ヒポキサンチンとリボース-5-リン酸が生成するが、ほとんど同時に無機リン酸があらわれてくることから、リボース-5-リン酸のリボースとリン酸の結合もまた容易に切断される考えられる。なお高線量の場合はイノシンも僅かながら生成された。

次に pH 3, 5 のクエン酸ソーダ・HCl Buffer, pH 7, 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ーで分離したがその一例を示すと Fig. 6 のようである。

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

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 mμ吸収物質の分布の割合と無機磷酸の生成、250 mμ吸収の変化を示すとTable 6.のようである。

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

pH of buffers	Dose (10 ⁶ rad)	% Absorbancy at 250 mμ	% 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
7	5	95	13	94	1-2	5
	5	95	8	96	1-2	2
9	10	95	14	85	8	7
	30	70	40	69	13	18

*: The ratios are expressed as the percentage of individual absorbancy to a total absorbancy at 250 mμ.

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

VII 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すでに藤田・中谷⁸⁾，村田⁹⁾，私達¹⁰⁾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。

Table 7. 5'-ヌクレオチドの安定性に対する加熱処理と γ 線照射との影響の比較

加 熱 の 影 響	γ 線 照 射 の 影 響
(1) 100℃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) ビリミジン系ヌクレオチド即ち5'-CMP, 5'-UMPが比較的安定で、プリン系は不安定	(3) 加熱の場合と反対にプリン系即ち5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMPが安定で、ビリミジン系は不安定。
(4) ヌクレオチドのリボースと磷酸との結合が先づ切れてヌクレオシドを生成する。但しpH2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づ切れて核酸塩基を生成する。但しpH9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。糖質の保護作用がみとめられる。 カゼイン酸分解物でも保護作用あり。 食塩は影響はない。

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。

終りに臨み、終始ご懇切なご指導を賜わっている大阪大学工学部寺本教授並びに多大のご援助を賜わっている住友原子力工業株式会社、武田薬品工業株式会社の皆様方にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Weiss, J. J.: Chemical effects of ionizing radiations on nucleic acid and related compounds.
Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 3, 103 (1964)
- 2) 石原宏: 核酸および関連物質に対する紫外線照射の影響: 生化学 35, 753 (1936)
- 3) Shugar, D.: The Nucleic acids III, (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) 久保田・渡辺: 日本水産学会誌 33, 769 (1967)
- 8) 藤田・中谷・木村・石井・佐谷: 栄養と食糧 18, 98 (1965)
- 9) 栗山・伏崎・村田: 栄養と食糧 17, 337 (1965)
- 10) 橋田・毛利・青山: 缶詰時報 43, (1), 65 (1964)