乾海苔の5'イノシン酸とその酵素的生成

荒木 繁*・桜井武麿*・泉野友香*・高橋幸資**

5'-Inosinic Acid Content and its Enzymatic Increase in Dried Nori, *Porphyra yezoensis*, a Red Alga

Shigeru ARAKI*, Takemaro SAKURAI*, Yuka IZUMINO*
and Koji TAKAHASHI**

* Yamamoto Nori Research Laboratory, 5-4-6, Oomori-Higashi, Oota-ku, Tokyo 143

** Tokyo University of Agriculture and Technology, Faculty of
Agriculture, 3-5-8, Saiwaicho, Fuchu-shi, Tokyo 183

The contents of 5'-inosinic acid (5'IMP) in dried and toasted nori, sheet-like products of *Porphyra yezoensis* (a red alga), were measured with HPLC from the standpoint of an enzymatic increase in them, and the following facts were observed. 1) 5'IMP was not determined by HPLC in the case of directly extracting the sample with 80% ethanol, while 5'-adenylic acid (5'AMP) and 5'-guanylic acid were. However, a considerable amount of 5'IMP could be determined when soaking the sample in a small volume of water for a short time prior to the ethanol-extraction, and it was, moreover demonstrated that an increase in the 5'IMP content was followed by a decrease in the 5'AMP content. 2) The maximum production of 5'IMP was attained by soaking for 180 or 120 sec for dried or toasted nori, respectively. 3) In both samples of nori, the 5'IMP content reached the maximum at 30-40°C in the soaking temperature, but could not be determined above 75°C. In commercial toasted nori, considerable amounts (201-304 mg/100 g dry matter) of 5'IMP could be determined with pre-soaking at 30°C for 120 sec. 4) The extract of dried nori with 50 mM tris-acetate buffer at pH 6.5 containing 3 mM 2-mercaptoethanol and 10 mM CaCl₂ showed high activities of 5'AMP deaminase. These results strongly suggest that 5'AMP deaminase in dried nori takes part in the increase of 5'IMP content.

(Received Jan. 24, 1996)

乾海苔は、その独特の旨味と高い栄養価により、古来から日本人に親しまれてきた、いわゆる伝統食品のひとつである。乾海苔には、アミノ酸、とくにグルタミン酸やアラニンなどの呈味性をもったアミノ酸が極めて多く含まれている。これに加えて、5'イノシン酸(5'IMP)の存在が認められており、これらの物質が乾海苔の旨味をひきおこす中心的な成分になっているものと考えられる。5'IMPは、獣肉や魚肉には普通に見出だされるが、植物組織中においてはきわめて希で、乾海苔における5'IMPの存在は、特異的であり、興味深い。

乾海苔の5'IMPの含量については、いままでに2, 3

の報告がみられるが、研究者の間で必ずしも一致した分析値が得られていない。野田ら¹⁾は、わが国のいろいろな産地で生産された乾海苔について5'IMPの含量を調べた結果、乾海苔100g当たり2.2-8.5mgであったと報告している。これに対して、中村ら²⁾は、千葉県産の乾海苔の2つの試料のうち、1つの試料で40mg/100g・乾重の5'IMPが認められたが、他の試料ではまったく検出できなかったとしている。このような差異の是非や理由は不明のまま残されている。すでに述べたように5'IMPは、乾海苔の重要な呈味成分であり、その含量を明らかにすることは意味深いことと考えられる。

* 山本海苔研究所 (〒143 東京都大田区大森東5-4-6)

** 東京農工大学・農学部 (〒183 東京都府中市幸町3-5-8)

著者らは、乾海苔の品質と呈味成分の関係を調べる一連の過程において、乾海苔に含まれる5'アデニル酸(5'AMP)が酵素的に5'IMPに変化する可能性を見出し、それゆえに、いままでに報告された乾海苔中の5'IMPの測定値よりもはるかに高い値がえられたことなどいくつかの知見を得た。この報告は、それらの知見を述べ、乾海苔における5'IMPの生成とその意義について2, 3の考察を試みたものである。

実験材料と方法

1. 試料

主として九州の有明海地区で養殖されたスサビノリ(*Porphyra yezoensis*)の葉体を摘採後、直ちに水洗いし、細切して炒き上げ、機械乾燥によって製造した乾海苔を試料に用いた。試料は、入手後ただちに二次乾燥(約50℃, 2-3時間)により水分含量を3%前後に低下させた後、乾燥剤とともに密封して、分析に供するまで4℃で貯蔵した。焼海苔は、約200℃で5秒間加熱して製造したものをを用いた。

2. 5'イノシン酸の抽出

試料(0.5g)に50mlの80%エチルアルコールを加え、冷却管を付して、沸騰水浴中で15分間抽出した。同様な操作を3回繰り返し、すべての抽出液を合わせて減圧下で濃縮した。濃縮液を分液漏斗に移し、エチルエーテルを加えて振とうしたのち、静置して、エーテル層と水層の二層に分け、水層を回収した。水層はさらに2回エチルエーテルで脱脂した後、減圧下で少量に濃縮した。この液を活性炭カラム(5cm×1cm)に負荷し、含まれるヌクレオチド類を吸着させた後、1.4%アンモニア50%エタノール溶液で溶出した。溶出液は定容したのち、その一部をとり、乾固するまで減圧下で溶媒を完全に除去した。乾固物は、1mlの0.05Mリン酸緩衝液(pH 3.35)に溶かし、これをHPLC分析の試料液とした。

3. 5'ヌクレオチドの分析と同定

抽出液に含まれる5'ヌクレオチドは、島津製作所製LC-10A型HPLCで分離、定量した。使用したカラムは、Shim-pack WAX-1(島津製)で、カラム温度は40℃に設定した。移動相として0.05Mリン酸緩衝液(pH 3.35)を流速1.0ml/分でカラムに流した。分離した5'ヌクレオチドは、260nmの吸光度で検出した。5'ヌクレオチドの同定および定量は、一定濃度の5'ヌクレオチド純品(シグマ社)を標準液とし、それぞれの保持時間とピーク面積の比較によって行った。

結果と考察

1. 5'ヌクレオチドのHPLCクロマトグラム

Fig. 1は乾海苔の抽出液と5'ヌクレオチド標準液のHPLCクロマトグラムを示したものである。Fig. 1(A)は、試料を直ちに80%熱エタノールで抽出したときの抽出液のクロマトグラムを、Fig. 1(B)は少量の30℃の温水に3分間浸漬し、その後、終濃度80%になるようにエタノールを加えて(A)と同様にして抽出したときの抽出液のクロマトグラムを示したものである。また、Fig. 1(C)は、5'ヌクレオチド標準物質のクロマトグラムである。

Fig. 1(A), (B)にみられるピーク1, 2および3の保持時間は、それぞれ標準物質として用いた5'アデニル酸(5'AMP), 5'イノシン酸(5'IMP)および、5'グアニル酸(5'GMP)のそれと一致した。また、試料からの抽出液(A)および(B)と標準物質(C)とのco-chromatographyを行ったとき、それぞれのピークの保持時間は完全に一致した。このことから、Fig. 1(A), (B)におけるピーク1, ピーク2およびピーク3はそれぞれ5'AMP, 5'IMPおよび5'GMPと同定した。しかし、試料の抽出液における5'シチジル酸(5'CMP)の存在は明らかではなかった。

Fig. 1にみられるように、(B)では5'AMPと5'IMP, 5'GMPがそれぞれ検出されたが、(A)では5'IMPは検出されなかった。加えて、(B)においては5'IMPが検出されたこと、および5'AMPが(A)において検出された5'AMP量に比べて著しく減少していることが注目された。このような事実は、5'IMPが乾海苔中にはじめから生成、存在するものではなく、80%エタノール抽出に先立って温水に浸漬された際に、5'AMPの一部が5'IMPに変化した可能性を示唆している。なお、(A)において5'IMPが検出されなかったことは、5'GMPが(B)におけるそれと同等なレベルで検出されていることから、抽出が不十分であったことに原因するものとは考えられない。

2. 浸漬時間と浸漬時の水温の影響

Fig. 1の実験結果から、乾海苔における5'IMPの生成には、乾海苔を水に浸漬することが必要な条件であることが示唆された。そこで、5'IMPの生成と浸漬時間および浸漬時の水温との関係を調べた。Fig. 2は、焙焼前(乾海苔)と焙焼後(焼海苔)の試料を30秒-300秒の範囲で30℃の温水の浸漬し、その後、80%のエタノールで抽出して得られた抽出液中の5'ヌクレオチドの変化

Fig. 1 HPLC-chromatograms of 5'nucleotides extracted from dried nori

(A), the extract with 80% ethanol; (B), the extract with 80% ethanol after soaking in water at 30°C for 3 min; (C), authentic 5'nucleotides.

The sample (0.5 g) was extracted with 80% ethanol at 100°C for 15 min, evaporated and washed with ether. The crude 5'nucleotides were purified on an active charcoal column with 1.4% aqueous ammonium-50% ethanol as a solvent.

HPLC conditions: apparatus, Shimadzu LC-10 A; column, Shim-pack WAX-1 (Shimadzu); mobile phase, 0.05 M phosphate buffer pH 3.35; flow rate, 1.0 ml/min; detection, absorbance at 260 nm.

を示したものである。この図で見られるように、乾海苔 (Fig. 2 A) では、浸漬時間が長くなるにしたがって生成する 5'IMP は増加するが、180 秒以上の浸漬時間では生成量は飽和状態になった。これに対して、5'AMP は 5'IMP の生成量の増加に反して減少し、5'IMP の生成が飽和に達する 180 秒以降では、それ以上の減少は見られなかった。5'GMP は浸漬時間に関係なく、ほとんど増減は見られなかった。焼海苔においても同様な関係がみられた (Fig. 2 B) が、5'IMP の生成は焙焼前の乾海苔とは異なり、はじめ急激に増加した後、緩やかに増加して 120 秒前後で飽和に達した。

Fig. 3 は、乾海苔を試料として、種々の温度の水に浸漬したときの各 5'ヌクレオチド含量の変化を定量した結果である。10-40°C までは水温の上昇とともに 5'IMP の生成量は増加した。しかし、40°C を越えると急激にそ

の生成量は減少し、75°C では 5'IMP の生成は完全に抑制された。この場合も 5'AMP は 5'IMP の変動とは逆の変動を示した。これに対して、5'GMP は水温に関係なくほとんど同じレベルを維持していた。

以上の結果は、乾海苔における 5'IMP の生成が、5'AMP の非酵素的な化学変化によるものではなく、試料を温水に浸漬している間に、酵素的に、すなわち 5'AMP デアミナーゼの作用によって生成したものであることを強く示唆している。海苔における 5'AMP デアミナーゼの存在は、いままでに、*P. perforata*³⁾、*P. crispata*⁴⁾、*P. tenera*²⁾ および *P. yezoensis*⁵⁾ の生薬体において報告されているが、乾海苔での報告はない。

3. 乾海苔中の 5'AMP デアミナーゼ

NISIZAWA *et al.*⁵⁾ の方法を一部改変して、5'AMP デアミナーゼの抽出を試みた。すなわち、試料 1 g に 3 mM

Fig. 2 Effect of soaking time on 5'nucleotide contents

(A, upper), dried nori; (B, lower), toasted nori. The samples were soaked in water at 30°C prior to the ethanol extraction and analyzed by HPLC.

の2-メルカプトエタノールと10 mMのCaCl₂を含む30 mlの50 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 6.5) を加え、少量の海砂とともに乳鉢中で磨砕・抽出した。抽出液はサラン布で濾過した後、0°Cで10 000 rpm×30 minで遠心分離した。上清液から5'AMPおよび金属や塩類を除去するため抽出に用いたと同じ組成のトリス-酢酸緩衝液に対して5°Cで2 h透析し、ここに得られた透析液を活性確認のための酵素液として用いた。

30°Cに保持した酵素液1 ml当たり10 µgの5'AMPを添加して反応を開始し、5, 10, 15分後に反応液を分取し、直ちに3倍容の冷エタノールを加えて激しく振とうして反応を停止させ、2 000 rpm×10分で遠心分離した。

Fig. 3 Effect of soaking temperature on 5' nucleotide contents

The samples were soaked in water for 5 min prior to the ethanol extraction and analyzed by HPLC.

上清を減圧下で上清中の溶媒を完全に除去した後、少量の水に溶解した。その後のHPLCのための試料液の調製は、“実験材料と方法”に述べた手法にしたがった。

抽出液中の5'IMPの生成に関与する5'AMPデアミナーゼの活性は、抽出直後から次第に減少し、氷冷下においても2 h後には完全に失活したが、抽出液に10 mMのCaCl₂を添加することにより、冷蔵庫中に一夜放置しても活性は、抽出時と同程度に維持されていた。このことは、カルシウムが活性の安定化に必須であることを示している。NISIZAWA *et al.*⁵⁾は、生藻体から抽出した5'AMPデアミナーゼ活性が、添加したカルシウムの増加により活性が著しく促進することを報じている。しかし、乾海苔においてはカルシウムの添加が5'IMPの生成を促進するかどうかは明らかではなかった。以上のことは、乾海苔中にも5'AMPデアミナーゼが存在することを強く示唆している。そこで、本抽出液をここでは5'AMPデアミナーゼ粗抽出液と呼ぶことにした。

Table 1は、乾海苔の5'AMPデアミナーゼ粗抽出液に10 µgの5'AMPを添加したときの5'IMPの生成量の

変化を示したものである。30℃・5 min の反応で 5'IMP が反応液中に検出され、さらに反応時間を延長することにより、5'IMP の生成量は増加した。一方、75℃・15 分の反応では 5'IMP の生成は見られなかった。このような結果は、原藻の摘採から乾燥過程を経て、乾海苔として製品化された後にも、5'AMP デアミナーゼの活性が残存していることを示している。

Table 1 The amount of 5'IMP formed in the crude enzyme solution incubated with 5' AMP for different times

Incubation time	5'IMP formed (μ g)
30℃ 0 min	0.1
5	1.1
10	2.0
15	2.2
75℃ 15 min	0.0

The crude enzyme solution of 5' AMP deaminase was prepared from dried nori by extracting with 50 mM tris-acetate buffer (pH 6.5) containing 3 mM 2-mercaptoethanol and 10 mM CaCl_2 and dialyzing for 2 hrs against the extraction buffer. The crude enzyme solution (1 ml) was incubated with 10 μ g of 5'AMP at 30℃ and 75℃ for 0-15 min. After adding three volume of ethanol, the supernatant was evaporated and dissolved into 1 ml of 50 mM citrate buffer (pH 2.2) to analyze by HPLC. HPLC conditions, see to Fig. 1.

4. 各産地の焼海苔の 5'IMP 量

一般に、乾海苔は一度焼海苔に製して賞味しているの、各産地の乾海苔を焙焼したのち、それぞれ 5'IMP 量を比較した。焼海苔の 5'IMP 量は、試料を水に浸漬する際の条件によって異なるが、Fig. 2 および 3 の結果から 30℃・120 秒間の浸漬で生成量が最大になることから、この条件により比較を試みた。

Table 2 は、各産地の乾海苔を焼海苔とし、上述の条件にしたがって温水中に浸漬して得られた抽出液の 5'IMP 量を調べた結果である。5'IMP 量は試料間で異なるものの非常に高含量を示し、201-304 mg/100 g (乾量) の範囲にあった。また、それらの値と焼海苔の品質との間には多少の関連性が認められた。すなわち、品質の良好な海苔の方が、5'IMP 含量が高い傾向にあった。一方、同時に測定された 5'AMP と 5'GMP は、それぞれ 100 g 乾重当たり 44-118 mg と 40-67 mg で品質との関連性は明らかではなかった。

乾海苔は、摘採した原藻をシート状に乾燥するための一次乾燥とそれをさらに保存性を良くするために行う二次乾燥という 2 つの乾燥過程を経て市場に供給される。焼海苔ではこれに焙焼工程が加わる。このようないくつかの加熱工程が加えられたのちにおいても、乾海苔や焼海苔に 5'AMP デアミナーゼが残存していることは注目し値する。すなわち、この酵素が残存することにより、水に短時間浸漬しただけで 5'IMP が相当量生成し、後述のように海苔を食したときの呈味性に関与する。

乾海苔を抄製するには、原藻を真水で洗浄し、細断してシート状に抄きあげ、それを 50℃ 前後で 2-3 時間乾燥する。したがって、この乾燥過程で、原藻が、十分な

Table 2 The amounts of 5'nucleotides in toasted nori produced at different cultivation fields

Cultivation field	Grade	5'AMP	5'IMP	5'GMP
Minami-Kawazoe (Saga Pref.)	high	62	286	62
Minami-Kawazoe (Saga Pref.)	middle	44	230	50
Minami-Kawazoe (Saga Pref.)	low	60	225	45
Kashima (Saga Pref.)	high	81	304	55
Kashima (Saga Pref.)	low	51	201	40
Yamato (Fukuoka Pref.)	high	85	235	57
Yamato (Fukuoka Pref.)	middle	118	237	66
Koromozaki (Aichi Pref.)	high	72	260	67

All figures were presented as mg/100 g dry matter.

The toasted nori was prepared from dried nori by toasting at 200℃ for 5 sec.

The preparation and analytical conditions of HPLC sample solution, see to Fig. 1.

水分を含んだ状態で、30-40℃の温度帯を経過し、5'IMPを生成するのであろうと考えられる。しかし、本実験では乾海苔には、5'IMPが存在しないか、存在してもごく僅かであることが確認された。この原因については明らかではないが、魚肉や獣肉のように死後の自己消化により5'IMPが生成する⁹⁾のとは異なり、海苔では比較的生きた状態の組織構造を維持したまま、言い換えれば自己消化をおこすことなく乾燥、脱水されるため、5'AMPデアミナーゼの作用がないまま乾海苔に製せられるものと考えられる。しかし、乾海苔を水に浸漬すると、組織が破壊されて5'AMPデアミナーゼが働きやすくなるものと推察される。焼海苔では焙焼することにより組織が破壊されるので、水に浸漬することにより酵素がさらに作用しやすくなり、かつ生成した5'IMPも外部に溶出しやすくなるものと考えられる。焼海苔では、乾海苔よりも短時間(30秒間)の浸漬で、5'IMP生成の最高値に近い量の5'IMPが生成したという事実は、上述の推察を裏付けるものといえよう。乾海苔は焼海苔として食されるのが普通で、それが口に含まれて食味を感じ嚥下されるまでの時間は極く僅かで、長くても30秒でそれ以下の短い時間である。しかし、そのような短時間においても、相当量の5'IMPが生成され、それが唾液中に溶出して、海苔の呈味性に関与するものと推察される。

乾海苔の5'IMP量は、水への浸漬時間と水温に左右されるが、そればかりでなく、残存する5'AMPデアミナーゼの活性と5'AMP量も重要な因子である。乾海苔の製造過程で、これらの因子がどの程度残存するかを明らかにすることは、今後のより良い製造工程を考えるうえで重要であるといえる。

要 約

乾海苔の5'イノシン酸(5'IMP)の含量を調べるため、試料を80%エタノールで抽出した場合と、それに先

立って数分間温水に浸漬して水戻しを行ったのちエタノール抽出をした場合とを比較した。その結果、前者では5'アデニル酸(5'AMP)と5'グアニル酸(5'GMP)は検出されたが、5'IMPは認められなかった。これに対して、後者では5'AMPと5'GMPとともに5'IMPが検出された。このことから、5'IMPの生成には試料を水に浸漬することが必須であることが示唆された。そこで5'IMPの生成と試料の浸漬時間および水温との関係を調べた結果、5'IMPの生成量は、乾海苔では180秒、焼海苔では120秒の浸漬時間で飽和に達し、30-40℃の水温で最高値を示した。これらの実験において、5'IMPの生成にともなって5'AMPの低下がみられた。しかも、75℃では5'IMPの生成はみられなかった。

これらの事実は、乾海苔に5'AMPデアミナーゼが存在し、水に浸漬したとき、この酵素が5'AMPに作用して急激に5'IMPが生成されることを示唆している。このことは、さらに乾海苔の5'IMPは、それを口に含んで咀嚼している間に生成することを示唆している。

参 考 文 献

- 1) NODA, H., HORIGUCHI, Y. and ARAKI, S.: *Bull. Jap. Soc. Fish.*, **41**, 1299 (1975).
- 2) NAKAMURA, S., AKAGAWA, H., IKAWA, T. and KAWANABE, H.: *Bot. Mag. Tokyo*, **81**, 550 (1968).
- 3) SU, J.C. and HASSID, W.Z.: *Biochem.*, **1**, 474 (1962).
- 4) SU, J.C., LI, C.C. and TING, C.C.: *Biochem.*, **5**, 536 (1966).
- 5) NISIZAWA, K., OKADA, Y., KUBO, K. and ANZAI, H.: *Jap. J. Phycol.*, **28**, 205 (1980).
- 6) 小原正美：食品の味 光琳全書9(光琳書院、東京), p. 97 (1971).

(平成8年1月24日受理)