

「イノシン酸の分離」

高木美代子*

緒言

最近、新調味料として5'ヌクレオチド類が注目されているが、なかでもイノシン酸はその代表的なものである。イノシン酸 (Inosinemono phosphate, 略してIMPと呼ばれる)は1847年に、Liebigによって肉エキス中に発見された最も古い歴史を持つヌクレオチドである。1913年小玉新太郎は、そのヒスチジン塩が鰯節の主要呈味成分であることを指摘したが、本格的な研究は昆布の主要呈味成分であるL-グルタミン酸ソーダ(略してMSG)や、酒や貝類の主要呈味成分であるコハク酸の研究に比して著しく立ち遅れていた。L-グルタミン酸の母体である蛋白質や、コハク酸の母体である炭水化物に比して、イノシン酸の母体である核酸の研究が全般的に立ち遅れていた事が長く陽の目を見なかった重要な原因である。

イノシン酸は、ヒポキサンチンとリボースの結合したヌクレオチドのリン酸エステルであって、2'-, 3'-, 5'-, の三種の異性体を持っているが、この化合物はRNAの構成成分であるプリンヌクレオチドの生合成過程で重要な位置を占めている。

従来からの旨味成分として知られていたグルタミン酸や、コハク酸を凌ぐ呈味作用を有すると言われるイノシン酸のうち、2'-, 3'-, の異性体は、単独ではほとんど旨味を呈さないが、5'イノシン酸には独特の顕著な呈味作用が存在する。即ち、呈味力発現には、塩基部が6-水酸基を有するプリン核であり、リボース部の5'がリン酸エステル化されている。この呈味5'イノシン酸とヒスチジン塩との間には、呈味に関してとくに相互作用は見られないが、酸性アミノ酸殊に、MSGとの間には、MSG1g+5'IMP1g=MSG15gという特異的相乗作用が存在する。日本の食品にはMSGを含有するものが相当多く、飲食品の旨味増強に対する効果はとくに強力に発揮される。この意味に於いても、イノシン酸の化学調味料としての前途は、洋々たるものがあると言えよう。

イノシン酸は極めて変動し易い成分で食品中の含量はその食品の鮮度、貯蔵条件、製造法、加工法により

大きく影響を受けるが、一般に背推動物の鮮肉、煮乾品の含量は非常に高い。鮮肉では筋肉中のATPが死後イノシン酸に変化しているからで、又煮乾品ではイノシン酸が蓄積した状態で加熱を行うため、イノシン酸分解酵素が破壊され、以後イノシン酸は比較的安定に保たれるからである。

これに対し、冷蔵品および加熱加工された食品は中程度の含量を示し、無背推動物および植物性食品にはほとんど見られない。これは無背推動物は死後分解する際、脱アミノをほとんどせずに、アデニル酸の形で蓄積されるためであり、植物では、イノシン酸の給源となるATPが少いためである。

この様に、核酸の生化学の開化により、一躍食品学界の脚光を浴びようになった5'イノシン酸は次の様な方法で製造されている。

- (1)生物組織から抽出する方法
- (2)RNA分解による方法
- (3)生合成による方法
- (4)化学合成による方法

私は(1)の方法により、経済的で且つ得易い鰯の生鮮肉からイノシン酸を分離し、その呈味作用について研究しようと試みた。

実験の部

[1] イノシン酸の分離

A イノシン酸バリウム塩の分離

1 試料

市販されている鰯のうち、特に新鮮なものを選んで試料とした。

2 実験操作

ヤマサ醤油の国中明氏による特許(昭和32-1653号「5'イノシン酸製造法」)に基づいて実験を行なった。

鰯の生鮮肉を細粹せずにそのまま水を加えてコッホ蒸気釜で100°Cで1時間蒸煮し、汁液に蛋白分解酵素剤(パパイン)を加えて、60°Cで2時間保つ。酵素分解液を濾過し、予め2N-HCl 1000ccを通じて活性化し、酸性を呈さな

* 昭和36年度本学卒業生

なるまで洗滌した陽イオン交換樹脂、アンバーライト I R—120N a 型 (200ml) に 1ml/min の流速で通した。この樹脂通過液を苛性ソーダで微アルカリ性となし、更に酢酸バリウムを加え、生じた磷酸バリウムの沈殿を濾別した後、過剰の炭酸バリウムを加えて濃縮した。熱いうちに濾過して過剰の炭酸バリウムを除き、0°C に15時間放置して、5'イノシン酸バリウム塩と推定される粗結晶を析出せしめた。母液は再度濃縮後、アルコールを添加して生じた沈殿物を、熱水に溶解して濃縮し、同様に0°C に15時間保って、これからも粗結晶を析出せしめた。再粗結晶を熱水から2度再結し、5'イノシン酸バリウム塩と推定される結晶(以下結晶A)を得た。

3 結果

鯛の生鮮肉1.5kgより結晶A 0.564gを得ることが出来た。

B 分離した結晶Aからイノシン酸ナトリウム塩の調製

1 試料

上記方法により分離した結晶Aを試料として用いた。

2 実験操作

結晶Aを温水に溶解し、不溶物を除いた上澄液を冷却しながら、Dowex50×80H- type 樹脂を添加して攪拌し、バリウムを樹脂に吸着させて濾過した。この操作は出来るだけ低温で、素早く行なった。得られた濾液をNaOHで中和して、冷所に放置した。

3 結果

結果A 0.3gより、5'イノシン酸ナトリウム塩と推定される結晶(以下結晶B)を0.162gを得た。

C 5'イノシン酸の同定 鯛の生鮮肉より分離した結晶Bを Paper chromatography, 紫外吸収, 燐の定量および糖(Ribose)の定量により同定した。

1 Paper chromatography による同定

a 試料調製

前記調製した結晶Bを用いた。対照物質として標準の5'IMP(タケダ製)「いの一番」(4%の5'IMPと4%のグアニル酸を含有する)。「味の素プラス」(5'IMP 2%含有), アデニル酸(AMP)およびグアニル酸

(GMP)を同時に展開した。

b 操作

1) 方法

Paper chromatography 一次元上昇法

2) 濾紙

Whatman NOI (46.5×1.5)

3) 展開液

硫安系溶媒

80%飽和硫安; tert-Butanol; 1

N-NH₄OH=400ml; 6ml; 2mlのP

H=6.8調製液

アルコール系溶媒

メタノール; エタノール; 濃塩酸; 水=200ml; 100ml; 24ml; 76ml

4) 展開温度および時間

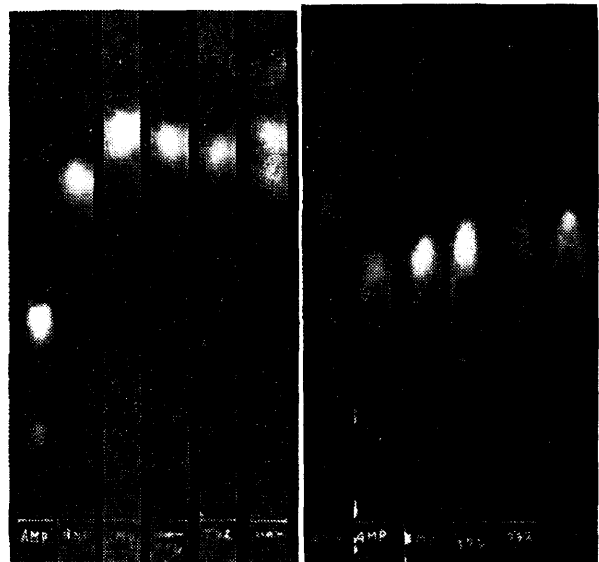
24°C 恒温室中, 硫安系溶媒は18時間, アルコール系溶媒は15時間

5) 発色方法

濾紙を乾燥後, 紫外線検出器にかけて発現スポットを検し, 紫外線照射撮影をして位置を検索した。

c 結果

以上の操作により図の如くスポットを検出し、(第Ⅲ図および第Ⅳ図) Rf 値を得た。



この結果 Sample は標準の5'IMPや「いの一番」「味の素プラス」に含まれる5'IMPとはほとんど等しいRf値を示した。いの一番の含有するGMPを標準物のRf値と一致した。又AMPに2個のスポットが発現している

が相当古い溶液を使用したため、変化を起していたものと思われる。

第一表

試料	硫酸系 R f 値	アルコール系 R f 値
結晶 B	0.61	0.38
標準の IMP	0.62	0.36
いの一	0.62	0.41
	0.56	0.33
味の素プラス	0.60	0.38
GMP	0.56	0.33
AMP	0.32	0.43
	0.14	—

2 紫外部吸収曲線の作成

a 試料

調製した結晶 B と標準物として 5' イノシン酸ナトリウム塩 (タケダ製) を水溶液として

用いた。

b 操作

試料液を夫々 pH=2 と pH=12 に調節し、波長 210m μ ~ 300m μ の間で、紫外線吸収を Hitachi photo-electric spectro photometer

epu-II 型で測定した。

c 結果

測定した結果、その紫外部吸収曲線は第 V 図のように pH=2 では 250m μ に極大を 220~225m μ に極小を持ち、pH=12 では 260m μ と 230m μ に夫々極大と極小を示した。(第 VI 図) これらの紫外部吸収曲線の形は、同時に測定した標準物のそれと一致した。又異なった波長に於ける吸収の比は、第 II 表の如くで、Sample 標準の 5' IMP および文献値に非常に近い値を示した。

第 II 表 紫外部吸収の性質

	pH	吸 収 極 大	吸 収 極 小	吸 収 比			Spectrum type
				250/260	280/260	290/260	
Sample	2	250	220~225	1.652	0.53	0.050	I nosine
	12	255	230	1.072	0.118	0.022	
標準 5' IMP	2	250	220~225	1.513	0.213	0.043	Inosine
	12	255	230	1.064	0.187	0.016	
IMP 文献値	2	250	220	1.68	0.24	0.025	Inosine
	12	255	230	1.05	0.18	0.008	

即ち、Sample は 5' IMP であることが明らかとなった。又 260m μ 吸収から標準 IMP = 15.81mM, Sample = 18.64mM であった。

3 燐の定量

a 試料

前実験で調製した結晶 B の水溶液を用いて行なった。

b 試薬調製

1) 15% 硫酸

2) アミドール亜硫酸塩溶液

アミドール 0.4g と重亜硫酸ナトリウム 8g を加えて水に溶して 100ml とし、活性炭をスーパーテル 1 杯加えて攪拌し、濾過した濾液を用

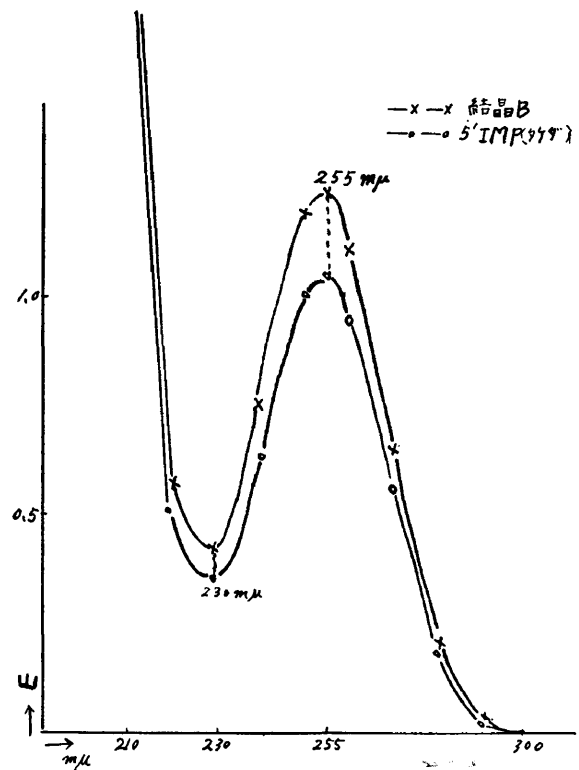
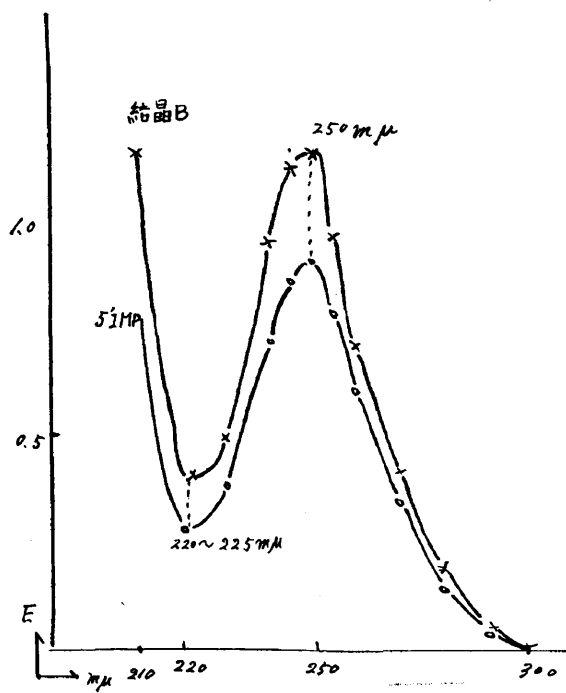
いた。

3) 3.3% モリブデン酸アンモニウム

水にモリブデン酸アンモンを加熱溶解して作った。

c 実験操作

Allen の方法、中村変法に準じて次のとおり行なった。試料を micro-kjeldahl flask にとり 0.9ml の 60% 過塩素酸を加えて micro-kjeldahl のバーナーで 60 分加熱分解した。分解冷却して H₂O 4 ml を加えて、沸騰湯浴中に 15 分間つけて灰化中に生じたポリ燐酸を加水分解して正燐酸にかえる。流水で冷却後、15% 硫酸 1 ml, アミドール試薬 1 ml およびモリブデン酸試薬を加えて水で 10ml に満し、20°C で 20 分間保



った後、Hitachi photoelectric spectro photometer E P U - II 型で波長 720 で供試料を加えない試薬のみの液を用いた定量は K_2HPO_4 (メルク製) で作成した標準曲線を基準とした。

d 結果

Sample 液あたりの磷酸量……612γ/ml = 19.75 μmole/ml

4 Orcinol 反応による糖(ribose)の定量

a 試料

前実験と同様に前記調製した結晶 B の水溶液を用い、'対照液として標準の 5'IMP 水溶液を用いた。

b 試薬調製

- 1) 0.1% $FeCl_3$ in con. HCl
- 2) orcinol 試薬 95% アルコール 1 ml に 100mg の orcinol を溶したもので、この液は毎日調製

第 III 表

	塩基 μmole/ml	全リン酸 μmole/ml	Ribose / 塩基	全リン酸 / 塩基	Ribose / 塩基
Sample	18.64	19.75	21.85	1.06	1.17
標準 5'IMP	15.81	—	18.45	┌	1.17

即ち、塩基と磷酸と糖が 1 : 1 : 1 の割合に結合しており、又なめてみると、強烈な呈味作用

して用いた。

c 実験操作

10~30% の Pentose を含む 3 ml の試料液を試験管にとり、試薬 1) を 3 ml、試薬 2) を 0.3 ml 加えて 100°C で 40 分加熱し、冷却後 Hitachi photo-electric spectro photometer E P U - II 型を用いて 670 mμ における吸光度を測定した。対照には試料液の溶媒に試薬を加えて、同様に処理したものをを用い、比色定量した。

d 結果

稀釈前液の Ribose の含量は

標準の IMP …… 18.45 μM

Sample …… 21.85 μM

先の磷の定量結果、260 mμ における紫外部吸収および糖の定量結果を総合すると第 III 表の如くである。

を有するところから、この物質は 5'イノジン酸であることを確認した。

〔I〕 5'イノシン酸の呈味性

A 5'IMPとMSGの相乗作用

1 目的

5'IMPとMSGとの間に、極めて顕著な特異的相乗作用が存在することは既述の如くであるが、その相乗効果を実際に確かめるために次の様な実験を行なった。

2 試液調製

5'IMPは標準の5'IMP(タケダ製)をMSGとしては味の素を使用し、濃度は全て重量

%の水溶液を調製した。

3 パネル

京都女子大学家政学部食物学科平研究室の副手及び研究生、計16名より編成した。

4 方法

0.04% 5'IMP(Na²塩)と0.04%MSGおよび両者の等量混合液を比較して、各人旨味を強く感じるものから1, 2, 3, の順位をつける順位テスト法により、各液ごとに順位合計を求めて、総合順位を判定した。

5 結果(第IV表)

	人 別 順 位															順位 合計	総合 順位	
	3	3	3	2	3	3	2	2	2	3	3	3	2	3	3			3
MSG	3	3	3	2	3	3	2	2	2	3	3	3	2	3	3	3	43	3
5'IMP	2	2	2	3	2	2	3	3	3	2	2	2	3	2	2	2	37	2
5'IMP+MSG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16	1

6 検討および結論

この結果、5'IMPとMSGの等量混合液が第一位を独占し、検査後のパネル全員の批評をまとめると、MSGと5'IMPとは味の性質は良く似ているが、その混合物はこの2つに比べてきわだって旨味の強さと質が秀れており、5'IMPはMSGより口当りは柔らかいが、後味ははるかに長く残ると言うことであった。16名中11名が5'IMPの旨味をMSGより高く評価しているが、この両者には嗜好の個人差があることを示している。しかしこの混合液は顕著な相乗作用が発揮されて、嗜好の個人差など全く見られない強烈な旨味が現出している。検定の結果、5'IMPとMSGとの間には有意差は認められなかった。

B 5'イノシン酸の閾値決定

1 目的

5'イノシン酸の閾値決定実験は、最近各方面で相当広く行われているが、京都女子大パネルによる閾値決定と、分離した5'イノシン酸の閾値を調べて、標準物質のそれと比較するために、次の5種類の閾値決定官能検査を行なった。

- a) 5'IMPの絶対閾値の決定
- b) 食塩を添加した場合の5'IMPの閾値
- c) グルタミン酸ソーダを添加した場合の閾値

d) 1%淡口醤油と0.6%食塩を添加した場合の閾値

e) 分離した5'イノシン酸の絶対閾値

2 試液調製

5'IMP・Na²(水分15.7%)と分離した5'IMPを実験a), e)では純水に、b)では0.8%MSGに、又d)では1%淡口醤油+0.6%食塩液に溶解して、試液とした。

3 パネル

京都女子家政学部食物学科専攻者(副手, 研究生, 学部学生)計14%21名をもって構成した。

4 方法

各溶媒ごとに夫々5'IMP(タケダ製)又は5'IMP(Sample)を0.03%以下3倍ずつ希釈したZからFの5~7段階液を調製し、Controlと5'IMP添加液をランダムに組み合わせ、両者を比較して味のある方、もしくはは旨味のより大きい方に印をつけさせるペアテスト法により行なった。試液組成は第V表の如くである。

第V表 試液組成

No 溶媒	a	b	c	d	e
	純水	食塩水	MSG液	醬油+食塩	純水
5'IMP					
0.03 (%)	Z	Z	Z	Z	—
0.01	A	A	A	A	A
0.0033	B	B	B	B	B
0.0011	C	C	C	C	C
0.00037	D	D	D	D	D
0.00012	E	E	E	E	E
0.00004	—	—	F	F	—
0	control	control	control	control	control

5 結果および検討

a) 5'IMPの絶対閾値の決定

1) 結果(第VI表)

N 濃度%	Z	A	B	C	D	E
	0.03	0.01	0.0033	0.0011	0.00037	0.00012
味があるとした	16	15	14	8	5	5
総数	17	17	17	17	17	17
正解率(%)	94.1	88.2	82.4	47.1	29.4	29.4
検定	***	***	**			

*** 1%有意(著しく有意と認めて良い)

** 5%有意(有意と認めて良い)

2) 検討および結論 J. E. Sinsheimer の方法

により, 閾値および95%信頼区間を求める

閾値 $ED_{50} = 0.000600$

点推定 $ED_{50} = 0.000600$

$ED_{84} = 0.005495$

区間推定 $S = \frac{0.005495}{0.000600} = 9.1585$

$N' = 17 \times 4 = 68$

$fED_{50} = 9.1583^{2.77/\sqrt{68}}$

$$\log fED_{50} = \frac{2.77}{8.246} \log 9.158$$

$$= 0.3371 \times 0.96144$$

$$= 0.3241$$

$$fED_{50} = 2.1042$$

$$\text{upper limit} = 0.000600 \times 2.1042 = 0.001263$$

$$\text{lower limit} = 0.000600 \div 2.1042 = 0.000285$$

95%信頼区間 0.001263 ~ 0.000285

b) 食塩を添加した場合の閾値

1) 結果(第VII表)

% 濃度	Z	A	B	C	D	E
	0.03	0.01	0.0033	0.0011	0.00037	0.00012
味があるとした数	14	10	10	6	4	4

検査総数	16	16	16	16	16	16
正解率(%)	37.1	62.5	62.05	87.1	25	25
検 定	***					

2) 検討および結論

前記方法と同様に点推定，区間推定を行ない，閾値および95%信頼区間を求めた。
閾値 0.00141

95%信頼区間 0.003478~0.0005601

相乗効果 0.43倍

c) グルタミン酸ソーダを添加した場合の閾値

1) 結果 (第 IX 表)

No 濃度%	Z	A	B	C	D	E	F
		0.03	0.01	0.0033	0.0011	0.00037	0.00012
旨味がより大きいとした数	19	19	19	18	16	12	6
検査総数	19	19	19	19	19	19	19
正解率	100	100	100	94.7	84.2	63.2	31.6
検 定	***	***	***	***	***	***	

2) 検討および結論

閾値 0.0000742

95%信頼区間0.0001353~0.0000407

相乗効果 8.3倍

e) 分離した5'イノシン酸の絶対閾値

1) 結果 (第 X 表)

No %	A	B	C	D	E
		0.01	0.0033	0.0011	0.00037
旨味があるとした数	12	10	5	5	5
検査総数	14	14	14	14	14
正解率	85.7	71.4	50.0	35.7	35.7
検 定	***				

2) 結論および検討

値 閾 0.0011

95%信頼区間0.0022913~0.0005281

c) 澄し汁に添加したイノシン酸調味料の効果

1) 目的

市販されている三種のイノシン酸調味料を澄し汁に添加して，天然のだし汁による澄し汁と比較し，イノシン酸調味料が澄し汁に於てどの程度の旨味効果を発揮するか，又個人の嗜好差の有無を知るために，次の様な実験を行なった。

a) かつをと昆布のだしと，「いの一番」およ

び「フレーブ」の比較

b) (かつをと昆布のだしと「味の素プラス」

および「いの一番」の比較

2) 試液調製

a) 土佐本節2% '昆布1.5%から天然のだし汁をとり「淡口ひがしまる」1%と塩0.8%で調味し，「いの一番」と「フレーブ」は0.05%溶液を同様に調味した。

b) 天然のだしはa)と同様に調味し，「味の素プラス」と「いの一番」は0.06%溶液を調味して試液した。

3) パネル

京都女子大学家政学部食物学科専攻者からなる
a) ……20名, b) (……27名より構成した。

4 方法

天然のだし汁による澄し汁と, イノシン酸調味料添加の澄し汁2種に, 比較的旨味の出にくい麩, 豆腐を入れて, 旨いと思う方を記入させる

三点比較法で三試液を順位づけた。

5) 結果および検討

鰹と昆布のだしと, 「いの一歩」および「フレーブ」の比較

1) 結果

試 液	上 別 順 位																		順位合計	総合順位		
	1	1	3	3	1	1	3	1	3	3	3	1	3	2	3	3	2	2			1	2
かつを昆布	1	1	3	3	1	1	3	1	3	3	3	1	3	2	3	3	2	2	1	2	42	2
いの一歩	3	2	2	1	3	3	2	3	2	2	2	3	1	3	2	1	3	3	3	3	47	3
フ レ ー ブ	2	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	31	1

2) 検定および結論

Kramer の表より順位合計による有意差を検定すると, フレーブは5%有意で, 最も好まれるすまし汁であった。天然のだし汁による澄し汁と, イノシン酸調味料による澄し汁とは明らかに判別出来るが, 天然のだしの方を好む人と化学調味料の味を好む人とがあり, 嗜好の個人差がかなりはっきり見られた。イノシン酸12%を含む「フレーブ」が天然のだしに勝る結果を示し, これに対してイノシ

ン酸4%+グアニル酸4%を含む「いの一歩」は, 味が少し薄いとの批評であったが, 統計的には両者には有意の差は認められなかった。又パネル人員が比較的濃厚な味を好む若い人達によって構成されている点も考慮する必要がある。

b) 鰹と昆布のだしと, 「味の素プラス」および「いの一歩」との比較

1) 結果

第 XII 表

試 液	人 別 順 位																		順 合 計	位 計	総 順 位	合 位							
	3	3	3	2	1	2	1	1	3	1	2	2	1	1	1	3	3	2					3	3	1	3	1	1	2
か っ を 昆 布	3	3	3	2	1	2	1	1	3	1	2	2	1	1	1	3	3	2	3	3	1	3	1	1	2	2	1	52	2
い の 一 歩	1	1	2	3	3	1	3	2	1	2	1	1	2	2	3	2	2	1	1	1	2	1	2	2	3	1	2	48	1
味の素プラス	2	2	1	1	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	2	1	1	3	2	2	3	2	3	3	1	3	3	62	3

2) 検討および結論

前実験の濃度より0.01%濃くしたい。「いの一歩」は, 本実験では第一位を占め, 上品ないい味として好評であった。「味の素プラス」はイノシン酸4%を含む強力を使用した, 味が薄くこれのみでは物足りないとの事であった。しかし, Kramer の表による検定では, この三試液間には有意の差は認められなかった。

総括と考察

1 国中明氏の特許5'イノシン酸製造法」に基き, 鰹の生鮮肉1.5kgより5'イノシン酸バリウム塩を0.

564g分離した。

2 分離した5'イノシン酸バリウム塩0.3gから5'イノシン酸ナトリウム塩0.162gを調製した。

3 5'IMPの同定

a (Paper chromatography 一次元上昇法により, 5'IMPのスポットを確認した。

b) 紫外部吸収曲線は波長250~255mμで極大を, 220~230mμで極小を示し Inosine の spectrum typeを描いた。

c) 燐, 糖の定量は標準値に近く, 塩基と燐酸および糖が1:1:1に結合しているイノシン酸であることが明らかとなった。

- 4 5'IMPの味はMSGに比べて‘口当りは柔かであるが、後味は遙かに長く残る強烈な旨味を持っている。
- 5 5'IMPとMSGは味の性質は良く似ているが、相当ははっきりと嗜好の個人差が認められる。しかしこの両者を混合することにより、嗜好の或を越えた強烈な旨味を発揮した。
- 6 京都女子大のパネルによる5'IMPの閾値は、標準の5'IMP……0.0006
分離した5'IMP……0.0011
と両者の位置の値に相当ひらきが見られるが‘これは官能検査が気候的条件やパネルの選定、その諸条件により大きく影響を受ける性質のものであることと、分離した5'IMPを分析して水分を出す事が出来なかったので、無水物とみなして閾値実験を行った事が原因と考えられる。
- 7 この5'IMPの閾値は食塩を添加することにより0.43倍と低下し、これに対しMSGを添加すると12.8倍、醤油+食塩を添加することにより8.3倍と著しく高まる。醤油成分の微量のグルタミン酸が相乗作用を起したものと思われる。
- 8 かつを節と昆布による澄し汁と、イノシン酸調味料を用いた澄し汁とを比較すると、両者の間には、はっきり味の相違は感じられたが、嗜好の点では化学調味料の方を好む人が半数ほどあり、調味料として洋々たる将来性を物語っていた。

参 考 文 献

- 1)発酵協会誌 1961, 1および3
- 2)蛋白質, 核酸, 酵素 1961, vol 6, 7号
- 3)日本水産学雑誌 1959, 25(2)および25
1960, 26.
- 4)栄養と食糧 vol 14, No. 2, 1961
- 5)特許公報第16類E—F(2)昭34—9725
- 6)日本農芸化学会誌35巻9号(1961)
- 7)実験化学講座23, 生物化学1
- 8)Amino acid 1960, 2
- 9)36年, 農芸化学大会シンポジウム講演要旨
- 10)調理学実験法
- 11)食品工学シリーズ15, 食品の品質測定66
- 12)Food Research vol, 24, No. 4, 445(1959)
- 13)核酸の生化学