

## 食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成23年3月6日受理

産技連/食品健康産業分科会  
食品機能成分分析研究会 編

[s-food@m.aist.go.jp](mailto:s-food@m.aist.go.jp)

### 塩水ウニの鮮度（ATP 関連物質）

作成者： 北海道立工業技術センター研究開発部  
食品技術科 木下康宣

[kinoshita@techakodate.or.jp](mailto:kinoshita@techakodate.or.jp)

#### 1. 塩水ウニについて

ウニの生殖腺は、身崩れを防ぐためにミョウバンなどのタンパク質凝固作用のある食品添加物で処理を施した後、折詰めして出荷されることが多い。これは、一般に「生ウニ」や「板ウニ」と呼ばれ、従来より寿司、刺身として全国各地で流通、消費されている<sup>1)</sup>。一方、最近では、生殖腺をミョウバンで処理せずに、殺菌海水や食塩を水に溶かした人工海水とともにカップ容器に包装した塩水パック品の流通量が増加している（図1）。これは、「塩水ウニ」と呼ばれ、自然なウニの風味が味わえると消費者に好評である。



図1 市販されている塩水ウニ

#### 2. 生鮮水産物の鮮度指標値について

##### 2. 1 一般的に利用されている鮮度指標値

一般に、生鮮水産物の価値は鮮度によって決定されることが多い。このため、その維持技術や評価方法が広く研究されている。

生物が活着している間は、呼吸活動による酸素の供給によって、細胞レベルで効率的にATPの生合成がなされており、組織活動により消費されても常にほぼ一定値を保持していることが知られている。一方、死後は、その生合成が停止することによって、保管中にATP含量が減少し、死後硬直に代表されるような諸々の品質変化を招くと考えられている。このことから、水産物の鮮度を客観的に評価することは重要で、古くより様々な方法が提案されている。

魚類の鮮度を理化学的に評価する場合、生化学的にその如何を評価することになるATP関連物質は重要であり、鮮度指標値として、死後の時間経過に伴う筋肉中のアデノシン三リン酸（ATP）の分解から求めたK-値が最も広く用いられている。この指標は、ATPがアデノシン二リン酸（ADP）、アデノシン一リン酸（AMP）、イノシン酸（IMP）、イノシン（HxR）、ヒポキサンチン（Hx）に分解されていく各生成物のうち、リン酸を含まない成分（HxR、Hx）の蓄積量を全体に対する比で表したものである<sup>2)</sup>。イカ<sup>3、4)</sup>の

ような頭足類、ホタテ<sup>5, 6)</sup> やカキ<sup>7)</sup> といった貝類、クルマエビ<sup>8)</sup> のような甲殻類などについても、分解経路やその速度などに違いはあっても、K-値を鮮度指標として利用することの有用性が指摘されている<sup>9)</sup>。

一方、近年は、消費者の高鮮度志向に対応するため、酸素を供給しながら組織を活かしたままで貯蔵するという新しい水産物の貯蔵方法が提案されている。ホタテガイ貝柱を酸素環境下で貯蔵すればATP含量を低下させずに維持することができ、ATP消失に伴う硬化発生を抑制できることが報告されている<sup>10-12)</sup>。また、スルメイカでも、酸素の供給が貯蔵中の外套膜筋のATPの減少を抑制し、透明感の低下を遅延できることが示されている<sup>13)</sup>。このような、まだATPの再生産が継続されていると予想される状態のものでは、K-値よりもむしろ、ATP含量そのものを鮮度指標値として利用の方が科学的にみて合理性が高いと考えられる。

## 2. 2 塩水ウニで適用される鮮度指標値

塩水ウニは、貯蔵に伴い塩水に濁りが生じて外観の劣化を招くことから、商業的には、官能的な塩水の濁り具合が鮮度の指標として用いられている。一方で、ウニのような生殖腺を可食部とする場合のATP関連物質の経日変化を追跡した例は乏しく、K-値やATP含量が鮮度指標値として利用できるかについては、ほとんど検討されていない。特に、「塩水ウニ」のように、脱殻して得た生殖腺を、特別な処理なしで保管した際のATP関連物質の動向に関する知見は、極めて乏しい。そこで、ここでは塩水ウニの保管中における生殖腺のATP関連物質の変化を追跡した。

その結果、時間経過に伴ってATP関連物質の総量に対するATPの割合が低下することが分かった。なおこの時、商業的な鮮度指標として利用されている塩水の濁りが、ATP割合の低下に伴って増加することを確認している。このことから、塩水ウニの鮮度はATP関連物質総量に対するATPの割合(%)で評価できると結論した。

## 3. ATP関連物質について

本マニュアルの「鮮魚のATP関連物質」参照

<引用・参考文献>

1. 遠藤良徳ら、岩手県水産試験場年報、7、p123-125 (1995)
2. T. Saito et al、Nippon Suisan Gakkaishi、24、p749-750 (1959)
3. Y. Yokoyama et al、Fish. Sci.、60、p583-587 (1994)
4. T. Yoshioka et al、Fish. Sci.、69、p408-413 (2003)
5. K. Kawashima et al、Nippon Suisan Gakkaishi、58、p2175-2180 (1992)
6. 木村稔ら、日水誌、65、p103-107 (1999)
7. Y. Yokoyama et al、Nippon Suisan Gakkaishi、58、p2125-2136 (1992)
8. M. Matsumoto et al、Nippon Suisan Gakkaishi、56、p1145-1149 (1990)
9. 大橋実、New Food Industry、41、p31-39 (1999)
10. 木村稔ら、日水誌、66、p475-480 (2000)
11. N. Seki et al、J. Food Sci.、69、FCTp262-267 (2004)
12. 埜澤尚範ら、ホタテガイ貝柱の生存保蔵技術。「水産物の品質・鮮度とその高度保持技術」(中添純一、山中英明編) 恒星社厚生閣、p113-119 (2004)



5. アセトニトリル (HPLC 用)
6. アデノシン三リン酸 (ATP) の標準物質 (シグマ社製など)
7. アデノシン二リン酸 (ADP) の標準物質 (       "       )
8. アデノシン一リン酸 (AMP) の標準物質 (       "       )
9. イノシン酸               (IMP) の標準物質 (       "       )
10. イノシン               (HxR) の標準物質 (       "       )
11. ヒポキサンチン       (Hx) の標準物質 (       "       )

※ 標準物質は、 $0.1 \mu\text{mol/ml}$  となるよう、上述した移動相の A 液を用いて溶解する。

#### 4. 2 分析用試料の前処理・調製方法

1. 分析しようとする試料は、ATP 関連物質の組成変化を避けるため、予め採取時に液体窒素を用いて即時凍結し、試料保管用冷凍庫で保管しておく。
2. 発泡容器などに氷を敷き詰め、50ml 容遠沈管の筒部を埋めて冷却しておく。
3. 氷中から遠沈管を取り出して外部をキムワイプで拭いてすばやく水気を取り、電子天秤に載せて風袋を切る。
4. 器具類冷却用冷凍庫から、予め冷却しておいたまな板・出刃包丁・ピンセットを取り出して実験台へ移す。
5. 試料保管用冷凍庫から試料を取り出し、凍った状態のまま約 0.4g の試料片を切り出す。
6. 切り出した試料は、50ml 容遠沈管へ投入して重量を記録する。(注：試料が溶解すると ATP 関連物質の組成が変動する可能性があるので素早く行う)。
7. 残った試料・まな板などは温度が上がらない様にすばやく器具類冷却用冷凍庫に戻す。
8. 同遠沈管に冷 10% 過塩素酸水溶液 10ml をエッペンドルフピペットなどですばやく投入し重量を記録する。
9. 同遠沈管を氷中に埋め、すばやく 30 秒程度ホモジナイズする。
10. 刃に残った繊維は、爪楊枝で取り除き遠沈管内へ落とす。遠沈管は氷中で冷却しておく。(注：適切に過塩素酸による抽出処理が終わったら、その後の ATP 関連物質の組成は比較的安定しているので、必要に応じて次の試料を処理)
11. 蒸留水でホモジナイザーのシャフトを 3 回水洗いし、キムワイプなどで十分に水気を取ったら、上述した手順を繰り返して他の試料を処理する。
12. ホモジナイズした試料が揃ったら、天秤で遠沈管のバランスをとり  $4,000 \times g$  で 10 分間遠心分離する。
13. 遠心分離終了後、新たな 50ml 容遠沈管を氷水中にセットして、No. 5C の濾紙を用いて上澄みを濾過する。
14. 15ml 容遠沈管にろ液を約 7ml 採取して重量を記録する。
15. 慎重に 5M KOH 溶液を加え、pH 試験紙を用いて pH を 6.5~7.0 に調整して、氷水中に保存する。
16. pH 調整時に生成される塩を十分に沈殿させるため、冷凍庫で一旦凍結保管するか、あるいは氷水中で 1 時間以上冷却する。その後、上澄みをディスポシリン

ジに採取し、0.45 $\mu$ mと0.2 $\mu$ mの試料ろ過用フィルターを用いてろ過する。

17. ろ液はHPLC分析に使用するサンプルカップに入れて、オートサンプラーのラックに並べる。

#### 4.3 高速液体クロマトグラフィーによる分析方法 (TOSOH [LC-8020] を用いた例)

ATP 関連物質を高速液体クロマトグラフ (TOSOH、LC-8020) を用いて測定した。

##### 4.3.1 移動相の調製

(1) A液：0.1Mリン酸ニ水素ナトリウム (pH 4.1)

(2) B液：20%アセトニトリルを含むA液

※ 調製した移動相は、吸引ろ過などの方法により、0.45 $\mu$ m相当のポアサイズを有するろ過フィルターを用いて、予めろ過しておくことが必要。

##### 4.3.2 分析条件

(1) 検出波長：254nm

(2) カラム温度：室温 (カラムオープンで定温管理することが望ましい。)

(3) 流量：1ml/min

(4) グラジエント条件：リニアグラジエント (表4-1参照)

表4-1 グラジエント パターン

	時 間	A 液	B 液
分析	0 分	98%	2%
	5 分	98%	2%
	15 分	90%	10%
	25 分	90%	10%
	25.1 分	98%	2%
	40 分	98%	2%
洗浄	適宜	0%	100%
再生	適宜	98%	2%

##### 4.3.3 定性及び定量

(1) 上述の条件でHPLCにより分離、定量を行う。

(2) 検出は、ATP、ADP、AMP、IMP、HxR、Hxの6成分について行う。

(3) 分離された成分の定性は、標準物質との保持時間の比較により行う。定性が困難な場合には、分析試料液への標準物質の添加試験を行い同定する。

(4) 定量は標準物質を用いた絶対検量線法により、クロマトグラムの面積から計算する。

(5) 鮮度指標値は、これらATP関連物質総量(6成分の定量値の合計値)に対するATPの割合を求め、ATP割合として百分率(%)で表す。

## 5. 分析例

上記手法を用いて、標準物質および塩水中に浸漬保管したウニ生殖腺のATP関連物

質を分析して、ATP 割合（%）を算出した例を以下に示す。

### 5.1 標準物質およびウニ生殖腺のクロマトグラフ

初めに、本法により分析した時の標準物質のクロマトグラフを図5-1に示す。致死後の魚肉などでは、保管中にATPが逐次、ADP、AMP、IMP、HxR、Hxへと分解されることが知られているが、本法により得られるクロマトグラフでは、ATP、ADP、IMP、Hx、AMP、HxRの順で溶出される。示したクロマトグラフは、上述した標準物質6成分の混合試料であるが、これらの溶出位置は、標準物質を単品で分析することにより確認している。

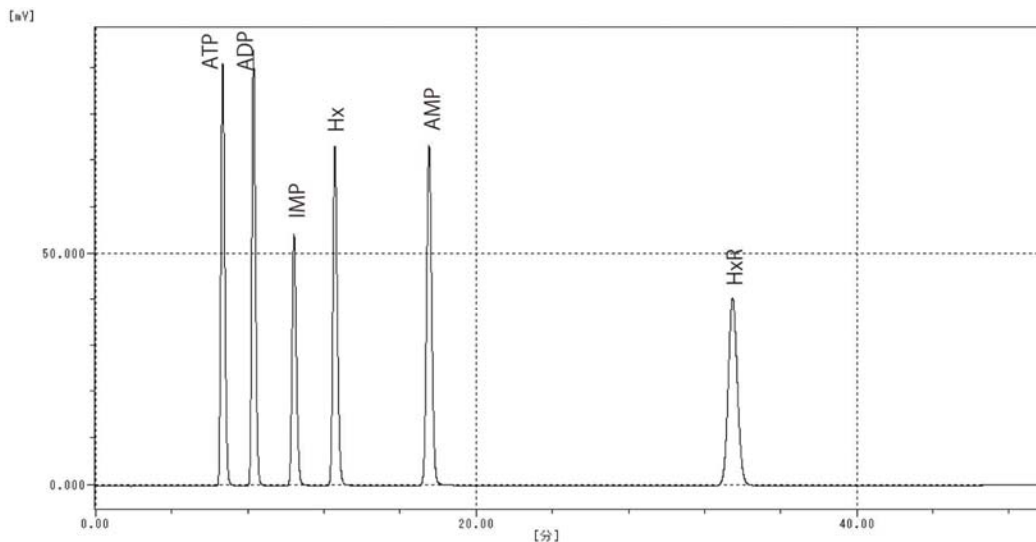


図 5-1 標準物質のクロマトグラフ

次に、ウニ生殖腺のクロマトグラムを図5-2に示す。試料には、保管0日目の生殖腺を用いている。

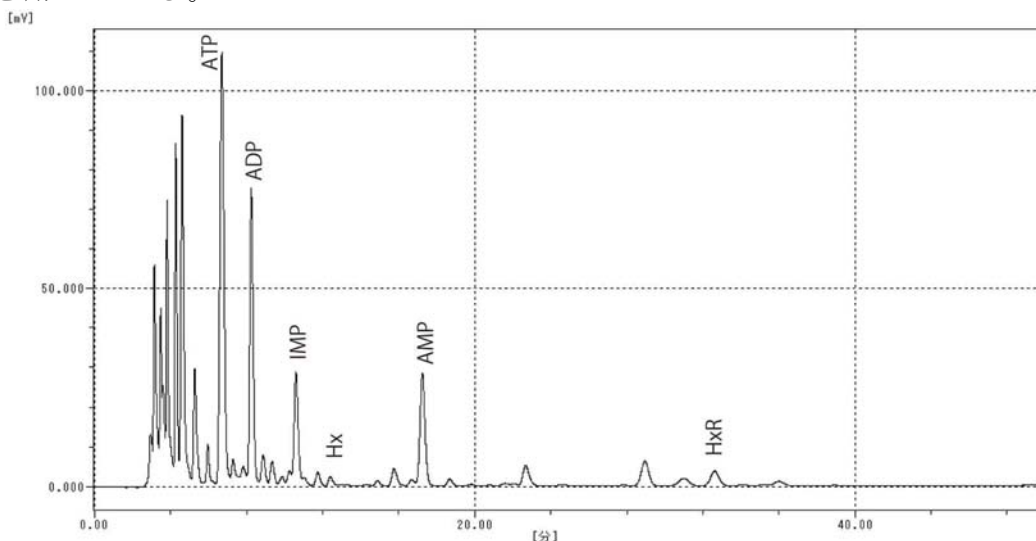


図 5-2 ウニ生殖腺のクロマトグラフ

## 5. 2 保管中の塩水ウニ生殖腺における ATP 関連物質の経日変化

魚肉の鮮度指標値として利用されている ATP 関連物質の組成変化が塩水ウニの鮮度指標としても利用できるかを検討する目的で、保管中の塩水ウニにおける生殖腺の ATP 関連物質の経日変化を追跡した。

50 g の生殖腺を 100 ml の人工海水と共に 5°C で保管した時の ATP 関連物質の経日変化を図 5-3 に示す。保管開始時の ATP 関連物質の主成分は ATP (1.2  $\mu\text{mol/g}$ ) であり、次に ADP (0.8  $\mu\text{mol/g}$ )、AMP (0.3  $\mu\text{mol/g}$ ) の順に量が少なかった。ATP 含量は、保管に伴い減少して 8 日目ではほぼ消失した。ADP も、ATP より緩やかではあるが、時間経過に伴って減少した。AMP は、保管 4 日目まで直線的に増加したが、その後緩やかに減少し、10 日目でも高いレベルを維持していた。図には示していないが、IMP 含量は保管開始時から低く、保管期間を通して大きな変化が見られなかった。HxR および Hx は、保管開始時痕跡程度しか検出されなかったが、時間経過に伴って増加した。しかし、10 日後の値は AMP に比べると非常に低いレベルであった。また、ATP 関連物質の総量は、保管開始時 2.6  $\mu\text{mol/g}$  だったが、時間経過に伴って減少し、8 日目には、およそ半分の 1.2  $\mu\text{mol/g}$  まで低下した。

ウニ生殖巣は保管中、実体顕微鏡による観察像から、生殖巣膜または生殖巣壁が貯蔵に伴って脆弱化し、破損によって膜内の内容物が膜表面に付着すること、また透過型電子顕微鏡による観察像から、卵巣では卵黄球の変形、精巣では精子束配列の乱れなどが起こることが報告されている。このことから、保管中に ATP 関連物質の総量が減少したのは、細胞や組織構造の破壊が生じることによって成分の溶出が起こったためと推定された。

これらの結果から、ATP 含量そのものを鮮度の指標として使用することは不相当と考えられたが、ATP 関連物質総量に占める相対的な ATP の割合 (%) は、塩水ウニの生殖腺において、鮮度指標の一つとして利用できるかと判断した。

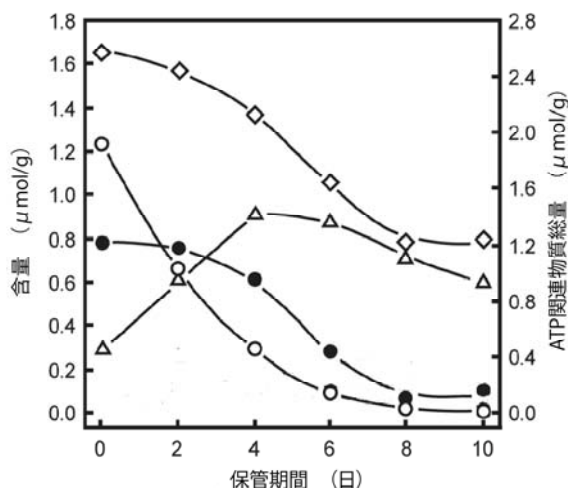


図 5-3 5°C の人工海水中でウニ生殖腺を保管した際の ATP 関連物質の変化 (ATP : ○、ADP : ●、AMP : △、ATP 関連物質の総量 : ◇)

### 5. 3 酸素充填量が異なる場合の ATP 割合の経日変化

塩水ウニに使用される生殖腺は通常非加熱である。このことは、塩水ウニ生殖腺の ATP 再生系が、保管開始時では失活せずに、包装品内に存在する酸素を利用して ATP の再生を継続している可能性があることを示唆している。そこで、ATP 割合が保管中におけるウニ生殖腺の鮮度指標値として利用できることを確認するため、酸素充填量が異なる包装品を調製して保管し、経日的な ATP 関連物質の変化を追跡した。

実験では、100 ml の人工海水に 50 g の生殖腺を入れ、容器の上部にさらに 0~100 ml の酸素ガスを吹き込み、5℃ で保管した。この時の ATP 割合の経日変化を図 5-4 に示す。酸素を充填しない場合、ATP 含量は、保管開始時から減少し続け、8 日でほぼ消失してしまっただ。一方、酸素を充填した場合、保管直後に一旦増加し、その後減少した。減少の速さは充填する酸素量に依存し、酸素充填量が 50 ml の場合、一旦上昇した 2 日から減少に転じた。100 ml の場合、2~4 日は一定のレベルを保ち、その後減少した。

また、商業的な鮮度指標として利用されている塩水の濁りを、実験担当者をパネルとして 6 段階評価法（ほぼ濁りがない状態を 6 点、やや濁りがある状態を 5 点、かなり濁りがある状態を 4 点、ひどく濁りがある状態を 3 点、著しく濁りがある状態を 2 点、完全に濁っていて商品的価値がないと判断されるものを 1 点として採点）により官能的に評価したところ、酸素を充填しなかった試料（酸素充填量 0 ml）では、保管開始時 6 点であったものが 2 日目で 5 点、4 日目で 3 点と低下し、6 日目には 1 点と採点されたが、酸素を 100 ml 充填したものでは、6 日目でも 3 点を維持しており、1 点に至ったのは 8 日目であった。評価点は、いずれも時間経過に伴って低下したが、その速度は、酸素 100 ml 充填区の方が緩慢であることが示された。

これらの結果から、ATP 割合は、塩水ウニにおける生殖腺の保管初期の鮮度変化を鋭敏に評価できる指標となることが確認された。

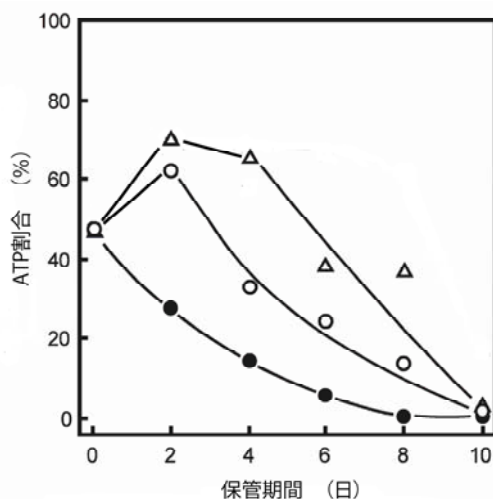


図 5-4 酸素充填量の異なる人工海水中で保管した際のウニ生殖腺の ATP 割合の変化（酸素充填量 0 ml : ●、50 ml : ○、100 ml : △）



#### 5. 4 酸素充填量が異なる場合の K-値の経日変化

この時の K-値の変化を図 5-5 に示す。酸素を充填しなかった場合は、保管開始時から K-値が増加し、8 日後に 30%を超えた。酸素を 50 ml 充填した場合、K-値の上昇は 4 日目まで起こらず、その後緩やかに上昇したが、8 日でも 10%程度であった。酸素を 100 ml 充填した場合はさらに、K-値が上昇するまでの期間が長くなり、6 日目から始まった。このように、保管中の K-値では、図 5-4 に示した ATP 割合の変化よりも保管初期の変動が少ないことが示された。このことは、K-値では極めて新鮮な塩水ウニの鮮度を十分に評価できないことを示している。

以上の結果より、K-値よりも ATP 割合の方が、塩水ウニの生殖腺の鮮度指標値として適切であることが分かった。

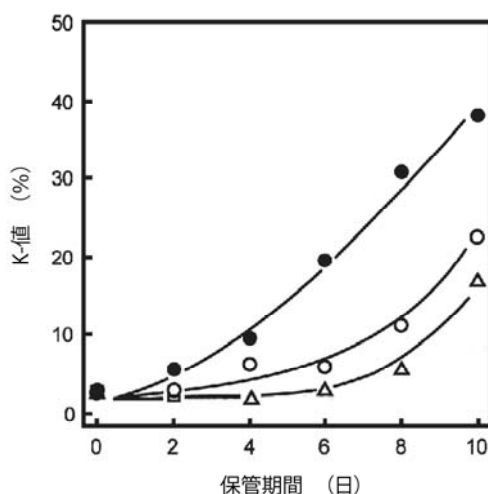


図 5-5 酸素充填量の異なる人工海水中で保管した際のウニ生殖腺の K-値の変化 (図中のシンボルは図 5-4 と同様)

#### 6. 分析上の留意、注意点

図 5-4 では、酸素を充填した試料の ATP 割合が保管 0 日から 2 日目にかけて一時的に増加している。これは、ATP 再生系が働いているような鮮度の良い生殖腺では、酸素との接触によって値が変動することを示している。試料の採取や凍結処理は、迅速に行う必要がある。

#### 7. その他

特になし。

#### 8. 定量法に関する引用・参考文献

1. 木下康宣他：日本水産学会誌、75 (2)、p237-243 (2009)

-以上-