身近な教材を用いた生物工学実験(1)
－ＨＰＬＣを用いた魚肉中のＡＴＰ代謝生成物分析による鮮度測定－

笹村泰昭*・遠藤俊二**・岩波俊介***・清水祐一****

Bioengineering Experiment using Familiar Samples (1)
- Freshness measurement by analysis of the ATP metabolism generated ingredients by HPLC.

要　旨

４年生の生物工学実験テーマとして、近くを流れる錦多峰川を遡上してくる鮭の鮮度測定を取り上げた。ＨＰＬＣによる分析で、死直後には明かなＡＴＰのピークが認められたが、市販の鮭にはこのＡＴＰのピークが認められなかった。本実験を通じ生物が生きるためのエネルギー通貨ＡＴＰへの学生の興味を引き出すことが出来た。

Abstract

Freshness measurement of the salmon which ascends the Nishitappu river which flows near our college. The analysis was taken up as a theme a bioengineering experiment for the fourth grade students. The peak of clear ATP was accepted immediately after death by HPLC. The peak of this ATP had disappeared with the commercial salmon. The student was able to get interest in the energy currency ATP through this experiment.

１　はじめに

動物の筋肉組織では、ATP（Adenosine TriPhosphate，アデノシン三リン酸）の分解エネルギーが筋肉の収縮エネルギーとして利用される。リン酸が外れ、分解生成物としてADP（Adenosine DiPhosphate アデノシン二リン酸）が生成する。通常、生きている場合には、このADPはエネルギー供給系の反応によって再びATPに戻る。死に至りこのエネルギーの供給が断たれると、ADPはさらに一分子のリン酸を放出してAMP（Adenosine MonoPhosphate，アデノシン一リン酸，アデニル酸）へ、次いでアンモニアを失ってIMP（Inosine MonoPhosphate，イノシン一リン酸，5´-イノシン酸）へと分解する。このIMPは鰹節のうま味成分として良く知られている。さらに時間を経るとIMPからリン酸が外れHxR（RibosylHypoxanthine，イノシン）からHx（Hypoxanthine，ヒポキサンチン）とリボース（Ribose）へと分解が進む。従って死んでから長時間経過するとHxR、Hxの割合が増してくることになる。

以上のような代謝行程に注目して、以下の魚肉鮮度判定恒数Ｋ値が定義されている。

$$\text{K値}(\%) = \frac{(\mathrm{HxR}+\mathrm{Hx})}{(\mathrm{ATP}+\mathrm{ADP}+\mathrm{AMP}+\mathrm{IMP}+\mathrm{HxR}+\mathrm{Hx})} \times 100$$

Ｋ値が小さいほど「活きが良い」、大きいと「活きが悪い」ことになる。一般に20以下が高鮮度、40以下が良鮮度とされている。焼き魚で食べる場合は60までと言われている。

佐伯ら[1)]は市販の冷凍マグロのＡＴＰ関連化合物のＨＰＬＣ分析から魚肉鮮度判定恒数Ｋ値を求める方法を生徒実験として取り上げている。その結果、時間経過に伴うなめらかなＫ値の増加を認めている。そしてＡＴＰは勿論、代謝の前半の生成物ＡＤＰ、ＡＭＰはほとんど無視されＫ値に大きく影響しているにはＩＭＰ、Ｈｘ、ＨｘＲとしてる。試料としたマグロの素性、何時死んだかについては分からないのも当然と言えば当然である。著者らも同様のテーマをエネルギー通貨ＡＴＰ[2)]の役割を学習するための学生実験として取り上げた。魚肉試料調製法は、佐伯らの方法に準じるものとした。ただし裏ごし操作が明らかに鮮度を下

＊　教　授　物質工学科
＊＊　技　官　技術専門職員　物質工学科
＊＊＊　助教授　物質工学科
＊＊＊＊　教　授　物質工学科

げることが認められたので省略することにした。

2　高速液体クロマトグラフイー（ＨＰＬＣ）の分析条件の検討

佐伯らは、カラムにＴＳＫゲルＯＤＳ－80Ｔｓ（東洋ソーダ社製）、溶離液に0.1M-NaH_2PO_4を用いている。本報でも同じカラム用い、溶離液もこれを基本として使用した。すなわち0.1M-NaH_2PO_4水溶液を100倍に希釈したリン酸を用いてＰＨを3.6に調整し、さらに全体の保持時間調整のためにメタノールを添加した。ＡＴＰ代謝化合物６成分の濃度既知の標準溶液の例を図-１に示した。

分析に要する時間は40分で、実際のサンプルの

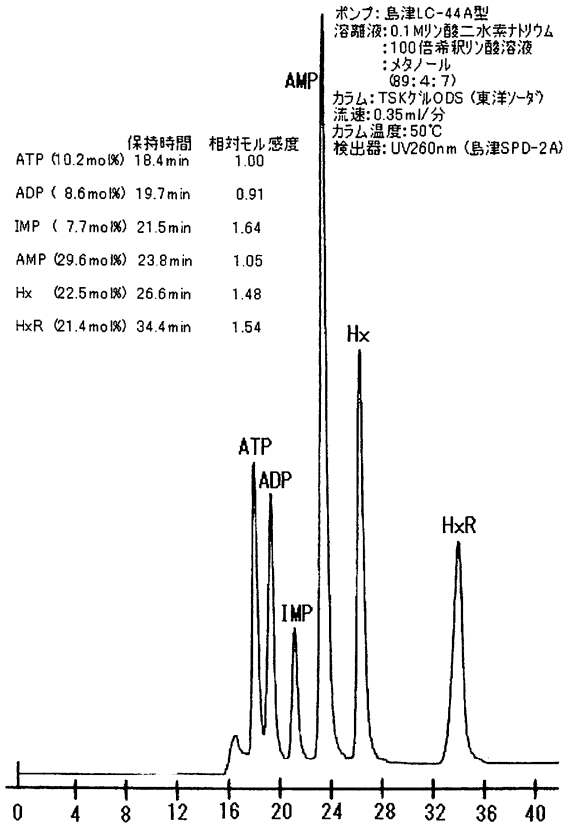

図-１　ＡＴＰ代謝生成物の標準クロマトグラム

データ処理は、この標準物質のクロマトグラムから相対モル感度を予め求めておき、島津クロマトパック-Ｅ１Ａを用い相対モル感度法（Method 42)にて行った。

3　実験と結果

学生実験としての操作方法を検討する目的で３－１から３－３の分析を試みた。

３－１　市販の魚肉の鮮度測定

表-１　市販魚の分析結果

魚名	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	HX	K値(%)
アジ	0.6	6.1	1.0	81.3	8.5	2.5	11.0
イカ			26.3	8.8	18.8	46.1	64.9
エビ		6.2	7.0	23.8	40.6	22.4	63.0
カレイ	1.9	8.0	1.1	52.1	11.6	25.2	36.8
ニシン	3.8	6.7	0.7	61.6	24.5	2.7	27.2
フクラギ		4.7	1.0	65.5	23.8	4.3	28.1
マグロ	1.6	6.0	1.9	76.1	9.4	5.1	14.4
メヌキ	3.0	13.6	2.2	4.3	0.8	76.2	77.0
カツオ	0.3	4.2	2.4	56.9	33.6	2.7	36.3
カジカ	1.6	8.6	0.4	69.9	14.9	3.6	18.5
キュウリ	1.3	6.8	0.4	71.4	15.3	4.7	20.0
チカ	3.1	3.1	4.1	83.7	4.5	1.6	6.1
サケ	0.1	6.0	0.9	51.2	36.9	4.9	41.8
サバ	0.7	0.7	2.4	76.2	18.4	1.5	19.9
サンマ	0.0	4.7	1.0	75.4	14.7	4.2	18.9
ハタハタ	0.0	8.9	3.7	4.3	1.8	81.3	83.1

市販されているいろいろな種類の魚の鮮度測定を行なった。結果をモル%で表-１に示した。空欄は検出されなかったことを示している。イカ、エビ、メヌキ、ハタハタのＫ値は60以上と非常に悪い。メヌキ、ハタハタについては、Ｈｘの割合が非常に高いので、死後かなりの時間が経っていると推測される。アジ、マグロ、カジカ、キュウリ、チカ、サバ、サンマについては20以下で刺身として食用に適しているとされる鮮度ということになる。ここでイカのＡＴＰ関連化合物の組成率を他の魚と比較すると、ＡＭＰは26.3%と非常に高く、ＩＭＰは8.8%と非常に低くなっている。エビについても同様の傾向にある。魚介類でもイカ、タコ、貝類などの海産無脊椎動物では、ＡＭＰが蓄積しその後もＩＭＰが生成せずにアデノシンを経てイノシンＨｘＲとなるからである[3)]。一般に悪くなりやすいと言われる”ひかりもの”のアジ、サバ、サンマのＫ値が小さい。悪くなりやすいと言われるが、Ｋ値を指しているのではなくそれらの魚に多く含まれる不飽和脂肪酸の酸化を指しているのであろう。しかしながら、市販の魚では、どれも死後経過時間が不明なので、魚の種類による鮮度の違いを比較することは余り意味がない。従って単に市販の魚を試料とした分析はＡＴＰの代謝あるいはエネルギー通貨ＡＴＰの学習には不適切であった。

3-2　錦多峰川の鮭の分析

本校の近くに毎年夏から秋にかけて鮭の遡上する錦多峰川が流れている。生きている、エネルギー通貨ＡＴＰを検出できる魚としてこの鮭に注目した。死後経過時間が明確なので試料として適切と考え鮮度測定をおこなった。クロマトグラムを分析結果のデータと共に次ページの図-２から図-５に示した。

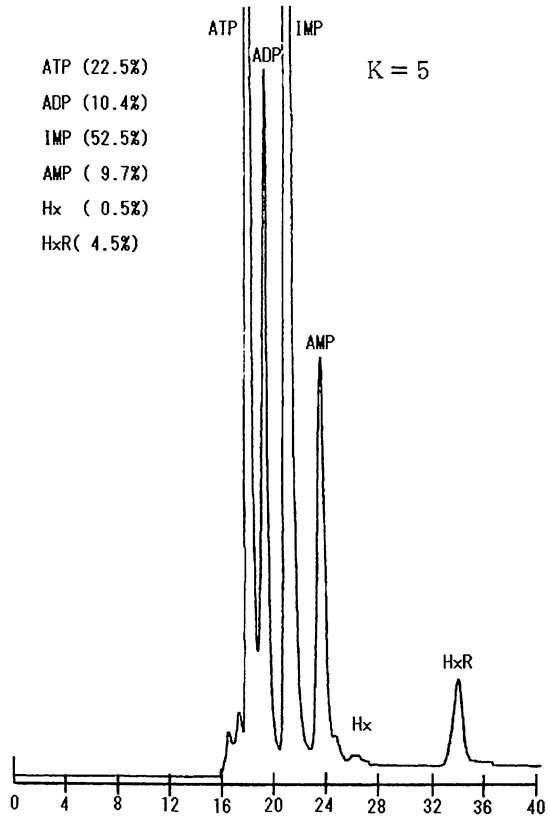

図-2　死直後のクロマトグラム

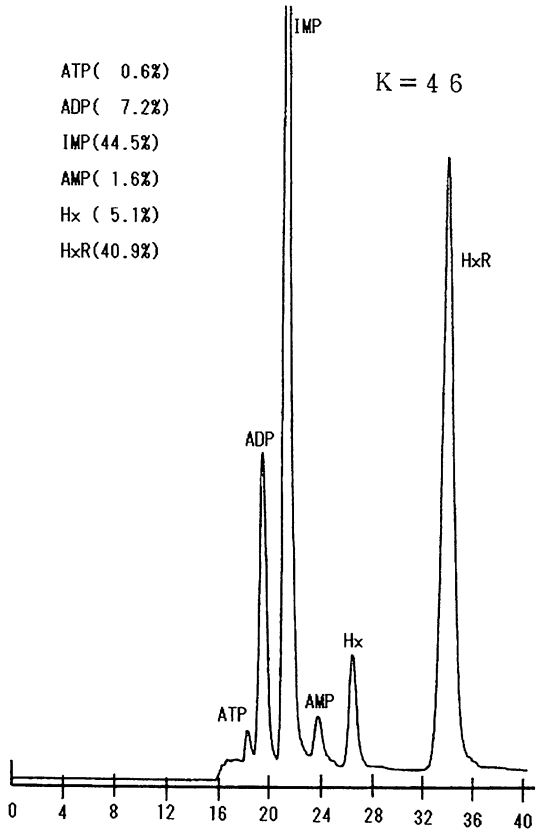

図-4　死後1日後のクロマトグラム

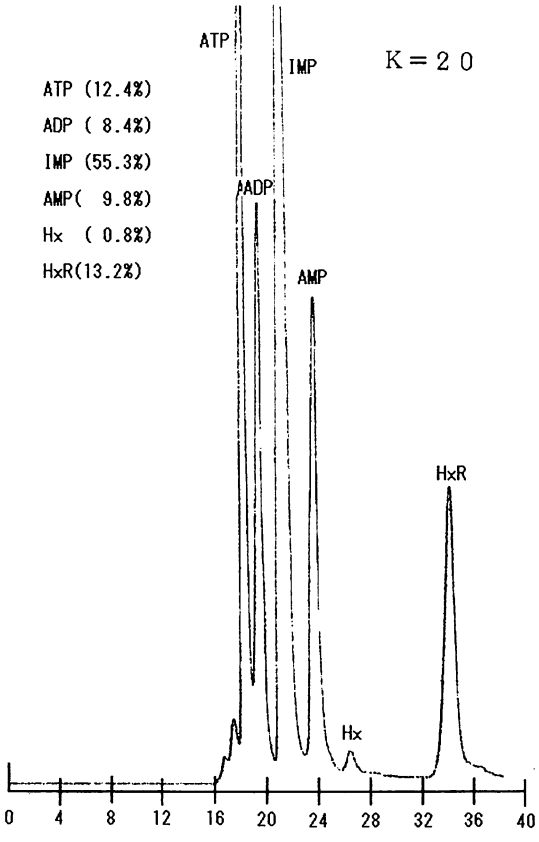

図-3　死後1時間後のクロマトグラム

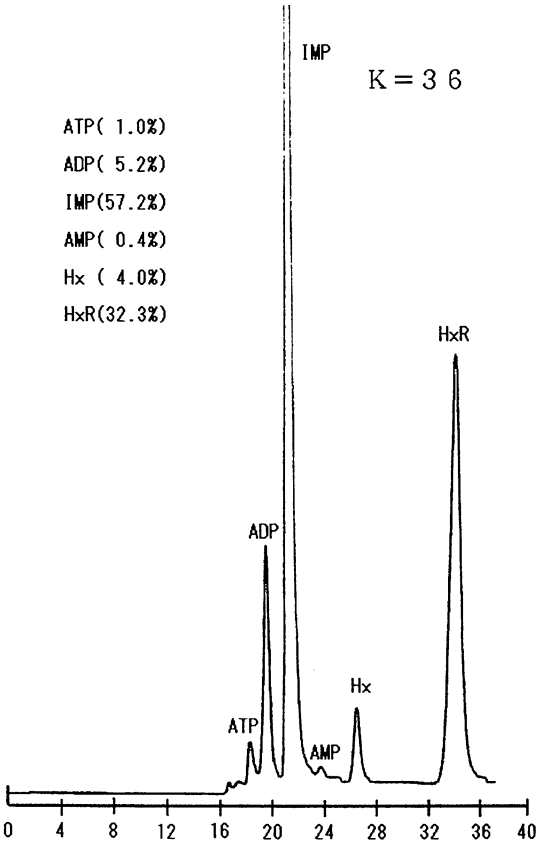

図-5　市販鮭の切り身のクロマトグラム

保存は冷蔵である。その結果、死直後（図-２）、１時間後（図-３）ではＡＴＰの存在が顕著に認められる。この明かなＡＴＰのピークの出現は鮭が直前まで生きていた証拠である。一日たつとＫ値は46で（図-４）、ＡＴＰはほとんど消失していた。市販品の鮭の切り身（図-５）ではＫ値は36で店頭に出たのは死に至って１日以内であることを示している。この実験では死直後の明確なＡＴＰのピークの存在と急速な減少を認めることができるので、当初の目的とした学生の「生物工学実験」のテーマとして適切であると判断した。

3-3　冷蔵・冷凍保存の比較

食品化学へつなげるための参考に、3-2の鮭について、冷蔵庫（５℃）と冷凍庫（－20℃）および食塩を５％添加して冷蔵した場合のＫ値の変化を測定した。結果が図-６である。

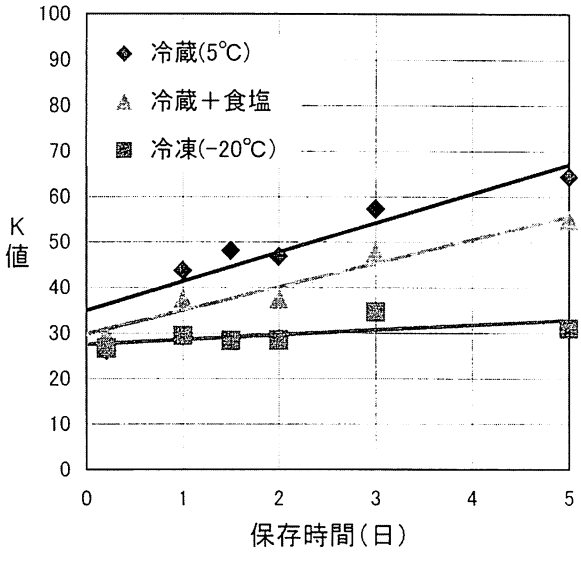

図-６　冷蔵・冷凍庫保存と鮭のＫ値の変化

Ｋ値のみから見れば冷凍保存が良い方法ではあるが、解凍すると味が下がると言われている。鮮度恒数Ｋから見た魚肉の冷蔵庫での保存は数日間が目安であった。それ以上の保存の目的には、食塩などの保存料の使用が考えられ、図から新巻鮭が伝統的な保存方法であることが納得できる。しかし学生実験では連続に数日の実験時間をとることは難しく適切なテーマではない。

Ｋ値を求めるための関連化合物の組成比（モル％）の分析結果を表-２に示した。

表-２　死直後の組成分析結果とＫ値

時間	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	HX	値(%)
0(分)	29.1	15.1	5.0	46.2	2.2	2.4	4.6
5	28.4	15.5	6.1	43.3	3.4	3.3	6.7
10	28.5	14.9	6.2	44.0	3.6	2.9	6.5
20	27.7	15.0	6.8	43.8	3.7	2.9	6.6
30	29.2	15.2	7.1	40.6	4.7	3.1	7.8
40	30.1	14.4	6.3	42.2	4.5	2.5	7.0
50	24.1	15.9	7.2	39.5	7.7	5.6	13.3
60	24.7	16.3	7.2	38.5	8.2	5.1	13.3
90	22.3	15.4	7.1	40.3	10.5	4.4	14.9
120	15.1	13.3	6.9	46.1	14.5	4.1	18.6

ＡＴＰは死後２時間までに著しく減少し、ＨｘＲ、Ｈｘはゆるやかに増加している。ＩＭＰは一時増加するが、数時間後にはゆるやかに減少した。これはＡＴＰからＩＭＰまでの分解反応は速やかであるが、ＩＭＰの分解速度はこれよりもはるかに緩やかであるためでり、ＩＭＰと、Ｈｘ、ＨｘＲの変化がＫ値に大きく影響していることを示している。死後直後にはＡＴＰの割合は、ＩＭＰの次に多くなっている。ＡＴＰは一見、緩やかに減少しているようにみえるが、他の成分と比較するとその差は明かであり、死後２時間で濃度が約半分に減少している。ＡＤＰ、ＡＭＰは、約１時間後から緩やかな減少がみられ、ＩＭＰは、それと同時間に増加し始めている。HxR、Hxも死後１時間前後から増加し始めている。この結果よりＡＴＰはどの成分よりもいち早く減少し、その存在を明確に測定するには死後１～２時間が限界であることがわかった。HxRからHxへの分解反応が、ＩＭＰからHxRへの分解反応よりも、はるかに緩やかでる。このことから、Ｋ値を増加させる最も大きな要因がHxの増加ではなく、ＩＭＰの減少によるHxRの増加であることがわかる。

この様にＡＴＰ代謝生成物の個々の成分に注目した分析も非常に興味深い。この実験は「生物化学コース」16名の学生に供するテーマである。死んでからの経過時間を適当に分担すると、試料の処理は慌ただしいが可能ではある。しかし、ＨＰＬＣでの所要時間が一サンプル40分を要することから一台では到底無理であった。今後の検討課題としたい。

4　学生実験操作方法

3の検討結果にもとづいて学生実験テーマとしての鮮度測定を以下1)～6)の操作手順で行うものとした。

操作手順

1)試料の魚肉2.0gを素早く切り分けすり鉢に計り取り10%－過塩素酸溶液＊6mℓを加えすりつぶす。
　＊強い腐食性
2)すり終わったらを円心分離器用の容器に移し変え、水4mℓを用いすり鉢の残さも洗いとる。
3)遠心分離後、上澄み液をろ過し共栓付き三角フラスコに入れる。
4)過塩素酸を中和するために5M－水酸化カリウム溶液を加えて、冷蔵庫中に30分程度静置する。
5)上澄みをろ紙を用いて小型の遠心分離器用試験管管に移しとる。
6)遠心分離後上澄みの一部をフィルター（日本ミリポアリミテッド）を通して＊ＨＰＬＣ用のサンプルとする。
　＊注射器に圧力がかかるので液漏れに注意

操作の流れを図-7に示した。

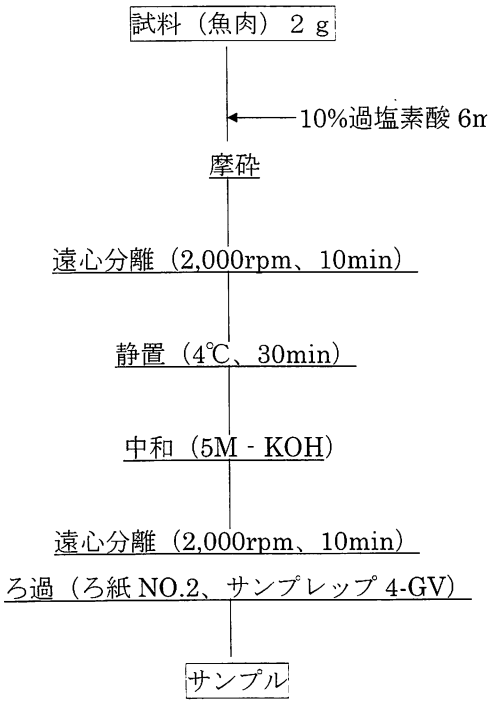

図-7　ＨＰＬＣ用サンプルの調整方法

5　まとめ

生物化学コース4年生がエネルギー通貨ＡＴＰを学習するための「生物工学実験」のテーマを検討した。

市販の色々の魚を試料として試験分析したが、何時死に至ったか知ることが出来ない。そこで近くを流れる錦多峰川を遡上してくる鮭を生きたまま学校に運び実験の時間にあわせて屠殺し鮮度測定に供した。分析はＨＰＬＣによるＡＴＰ代謝生成物の相対モル比の測定である。魚の処理にも工夫をし、魚肉の処理において”裏ごし”操作を省略、直ちに過塩素酸溶液を加える方法をとった。この省略は特に死直後の分析には重要であった。鮭肉中にＡＴＰは、死直後に明らかに認められ、市販の鮭の切り身では消失していた。

食塩による鮭の保存による鮮度のを調べた。食塩の濃度によって保存効果は変化するが、有効な保存方法であることを改めて認識した。

本実験を通じ学生のエネルギー通貨ＡＴＰへの興味を引き出すことが出来た。生きていることとＡＴＰの役割、エネルギー通貨ＡＴＰの存在を授業する良いきっかけであった。

またこの鮮度測定は魚肉の保存への足がかりとして有効な分析であると同時に日常の生活に直結した身近なテーマとして学生の興味を引き出すことが出来た。

さらに近くを流れる川から得た教材を扱うので、高専での15から20歳の多感な期間を過ごした5年間のなかでの一つの思い出としても貴重な体験となったとの感想が見受けられた。

ただＨＰＬＣ分析に時間がかかることが難点であり今後の課題である。

謝辞：生きた鮭を提供して頂いた苫小牧漁業協同組合錦多峰さけ・ますふ化場長 迎 欣司氏に感謝する。

参考文献

1)佐伯幸治・越智やよい・三原三悟,化学と教育,42(11)762(1994)
2)堀池喜八郎,化学と教育,46(6)334(1998)
3)中谷延二・飯渕貞明ら,「食品化学」P165(1995),朝倉書店

（平成13年11月27日受理）