

水産物等の国際標準となる品質・鮮度指標に関する
調査研究報告書

平成 25 年 3 月 31 日
一般社団法人 日本海事検定協会
（食品衛生分析センター）
国立大学法人 鹿児島大学水産学部

要 旨

世界における水産物の需要は、人口の増加や水産物の健康への優れた効果などから増大し続けているが、今後益々高くなることが予想されている。さらに、日本の食文化である刺身や寿司などの水産物の生食が、欧米や中国など世界中に急速に普及してきている。日本の水産物も含め、刺身など生食用の高鮮度水産物のグローバル流通が活発化してきている。一方、魚の鮮度を評価する国際的な品質・鮮度指標は構築されていないのが現状である。

本調査では、水産物の国際標準となる品質・鮮度指標の開発・実用化のために必要となる基礎的な調査研究を進めた。今年度は、水産物の鮮度指標として日本で開発研究され本調査でも基本的な指標として使用する K 値の分析方法について、より簡便で精度が良いサンプル調製法を構築した。これにより、水産物の各現場で容易に多数のサンプル調製を行うことが可能となった。また、水産物の初期鮮度変化を測定する方法について、ゴマサバを試験対象魚として調査を行い、魚肉タンパク質の変性が速い魚種でのミオグロビンタンパク質の性状測定方法に工夫が必要となることが明らかとなった。

本調査によって得られた結果・知見は、日本国内の水産物の鮮度研究のみならず、国際的な水産物の品質・鮮度指標の策定の基礎的なデータおよび方法として応用できるものと期待する。

目次	
要旨	1
1. 本事業について	3
1-1 報告書の適用範囲等	3
1-2 事業目的	3
2. 研究背景と目的	4
2-1 研究背景	4
2-2 研究目的	4
3. 鮮度・品質測定方法の検討	5
3-1 鮮度測定のための魚肉からの ATP 関連化合物抽出法の簡便化	
3-1-1 研究方法	6
3-1-2 結果および考察	6
4. 魚の初期鮮度変化の測定	18
4-1 ゴマサバの初期鮮度変化	
4-1-1 サンプルング	18
4-1-2 研究方法・結果および考察	19
5. 総括	24
5-1 本研究により得られた知見・成果	24
5-2 今後の方針	25
6. 文献	26

1. 本事業について

1-1 報告書の適用範囲等

本報告書は，一般社団法人日本海事検定協会（以下，日本海事検定協会）と国立大学法人鹿児島大学（以下，鹿児島大学）の共同研究である「水産物等の国際標準となる品質・鮮度指標に関する調査研究」（以下，本事業）の適用範囲に基づく研究成果を取りまとめたものである。本事業の実施場所は鹿児島大学水産学部食品・資源利用学分野木村研究室および日本海事検定協会食品衛生分析センターである。また，鹿児島大学水産学部の研究協力機関として，北海道大学水産学部今野研究室，東京海洋大学岡崎研究室，独立行政法人水産総合研究センター中央研究所水産物応用開発センター（村田主任研究員）の参画を得ている。

1-2 事業目的

本事業は，水産物の国際標準となる品質・鮮度指標の開発・実用化のために必要な基礎的な調査研究を鹿児島大学と日本海事検定協会が共同で実施し，その成果を報告書としてまとめ公表するものである。

本事業の調査研究の成果については，国内外で広く活用されることにより，水産物の適正なグローバル流通に貢献するという波及効果が期待される。

本年は，水産物の鮮度測定方法の一つである K 値の迅速測定方法の検討を行い，鮮度測定方法の効率化を可能とした。また，魚の初期鮮度変化について，ゴマサバを例として調査した。

2. 研究背景と目的

2-1 研究背景

水産物は、世界的な人口増加に対応する貴重な食糧資源であるとともに健康に良い食材としての評価から世界的に需要が増加しているが、米国、欧州、中国をはじめとして、その消費量の増加に伴い、今後も国際商品としての流通量が増大することが考えられる。このため、国際商材として流通・消費される水産物の品質・鮮度評価を、どのように科学的に行うかが大きな課題となってきた。

日本においては水産物を食する文化・伝統が発達しており、魚の購入や調理における水産物の品質・鮮度判定は「刺身などの生食」と「加熱商材」あるいは「腐敗」について経験則等で行われ、国内的には特段不都合が起きてこなかったことから、水産物の鮮度・品質の科学的な評価指標の構築と流通や消費段階における研究成果の応用は必ずしも進んでいないのが現状である。

一方、水産物の鮮度・品質評価は、国や地域により方法や評価基準が異なっているが、水産物の国際取引においては、水産物の安全性を保証するために「腐敗や食中毒のリスク」に対する指標として温度履歴が使われている。例えば、日本から米国にブリなどの刺身商材を輸出する際には、輸送中の温度履歴が測定できるセンサーの使用が義務づけられ、それはUSA-HACCPやEU-HACCPに対応する水産物の流通においては必須になっている。しかし、温度履歴による食中毒リスク対応指標は、水産物の鮮度・品質評価の基準としては十分とはいえないとの指摘がある。

2-2 研究目的

本事業は、水産物等の国際取引の活発化に対応して国際基準として通用しうる水産物等の鮮度・品質の科学的な評価指標の開発・実用化が要請されている状況にあって、それを推進するために必要となる基礎的な調査研究の実施を通じて水産物等の国際取引の円滑化に資するとともに、わが国の国民生活に不可欠な物資の安定供給の確保に貢献するものである。

以上のことから、本業務を円滑に進めさらに公益事業として知見を広く広めることを目的として、鹿児島大学水産学部、北海道大学水産学部、東京海洋大学、独立行政法人水産総合研究センター中央研究所水産物応用開発センター、日本海事検定協会の担当者から構成される委員会を設置した。

3. 鮮度・品質測定法の検討

3・1 鮮度測定のための魚肉からの ATP 関連化合物抽出法の簡便化

(北海道大学大学院水産科学研究院 張佳琪, 今野久仁彦)

魚介類の鮮度は水産資源の利用加工の上で最も重要な課題の一つであり、魚介類の鮮度は死後どのような環境によって置かれたかにより決定される。決定の主要因子は温度である。魚介類を生食することを想定した死後比較的短い期間の鮮度変化の指標として、ATP 関連化合物(Nuc と略す)総量に占めるリン酸を分子内に持たない成分(RH_x, H_x)の割合(%)がK値と定義された。¹⁾ K値の有用性については内山、江平による総説があり丁寧に説明されている。²⁾当初は、陰イオン交換体を用い、Nuc成分を分離する方法が用いられた。^{1,3,4)}その後、Nuc成分の分離に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が導入され、容易にすべてのNuc構成成分を短時間に定量できるようになった。^{5,6,7)}

HPLCによるNuc成分分析ではオートサンプラーを導入し、自動運転することで多くの試料が分析できるようになった。しかし、魚肉からNucを定量的に抽出するという操作はK値が提案された当時からあまり大きな改良がなされていないように思われる。従来法では、まず、過塩素酸(PCA)溶液を魚肉に加え、ホモジナイズし、ATP関連化合物の分解に関わる酵素を瞬時に失活させると同時に、酸に可溶性Nucを抽出する。定量的な測定が必要な場合は、数回抽出した抽出液をまとめて抽出液とする。その後、酸性下でのATP分解を防ぐため、抽出上澄みをKOHで中和させる。KOHが用いられる理由は、イオン交換樹脂へのNucの吸着を妨害する過塩素酸イオンをカリウム塩(KClO₄)の沈殿として除くことができるからである。これら煩雑な試料調製が、HPLCによる自動分析が進んでいる現在のK値測定の律速段階になっているように思われる。本研究では、これまで広く用いられている抽出法の基本原理を変更することなしに、魚肉からのNucを定量的に抽出する簡便な方法を開発した。

方法

試料としてさまざまな魚種に応用ができるかどうかを知るため、ホッケ *Pleurogrammus azonus*、シロサケ *Oncorhynchus keta*、マダイ *Pagrus major*、ブリ *Seriola quinqueradiata* を用いた。Nuc成分の分析は、日本分光社製 HPLC システムを用い、Matsumoto and Yamanaka の方法⁷⁾に従い、分析カラムとして Shodex Asahipak GS-320HQ を用い、リン酸緩衝液(pH2.8)のアイソクラティック法で行った。

3-1-2 結果および考察

抽出条件 従来の Nuc 抽出方法では最初に 10%の PCA 溶液を用い、遠心分離で上澄みを分離回収した後、沈殿に対してさらに 5%PCA を加えて抽出を行う二回抽出方法が用いられている。最初に 10% PCA を用いているのは、使用する PCA 溶液の容量が魚肉に対して少ない場合は(2-3 倍量)魚肉と混合することで PCA 濃度が低下するためである。それが理由なら、多量(肉の 10 倍量)の PCA 溶液を用いれば、魚肉の混合による PCA 濃度低下は無視できると考えた。そこで、PCA 溶液の容量を肉の 10 倍量に固定した上で、Nuc 抽出に必要な PCA 濃度について材料としてホッケ背筋を用いて検討した。また、抽出時にホモジナイザーは使用せず、氷冷下、魚肉をガラス棒でつぶしながら 10 分間抽出する方法を採用した。自然静置で得た上澄みを 0.45 μ m 膜を通した得たる液をさらに蒸留水で 10 倍に希釈し、その 260nm での吸収を Nuc の収量の指標として測定した。結果を Fig.1 に示す。

PCA 濃度が 2.5-7.5%の間では得られた抽出液の 260nm の吸収に差はなかったので、2.5% PCA 以上で十分抽出できると判断した。すなわち、10 倍量の PCA 溶液を使用すれば、Nuc 抽出には 5%PCA 一種の抽出液で十分であると判断した。なお、PCA 濃度が 1.25%では抽出液が濁っており、0.45 μ m 膜ではろ過が難しく、吸収を測定できなかった。また、図示はしないが、抽出時間を 5 分から 30 分まで変えてもほとんど収量は変わらなかったため、抽出時間は 10-15 分で十分であると判断した。

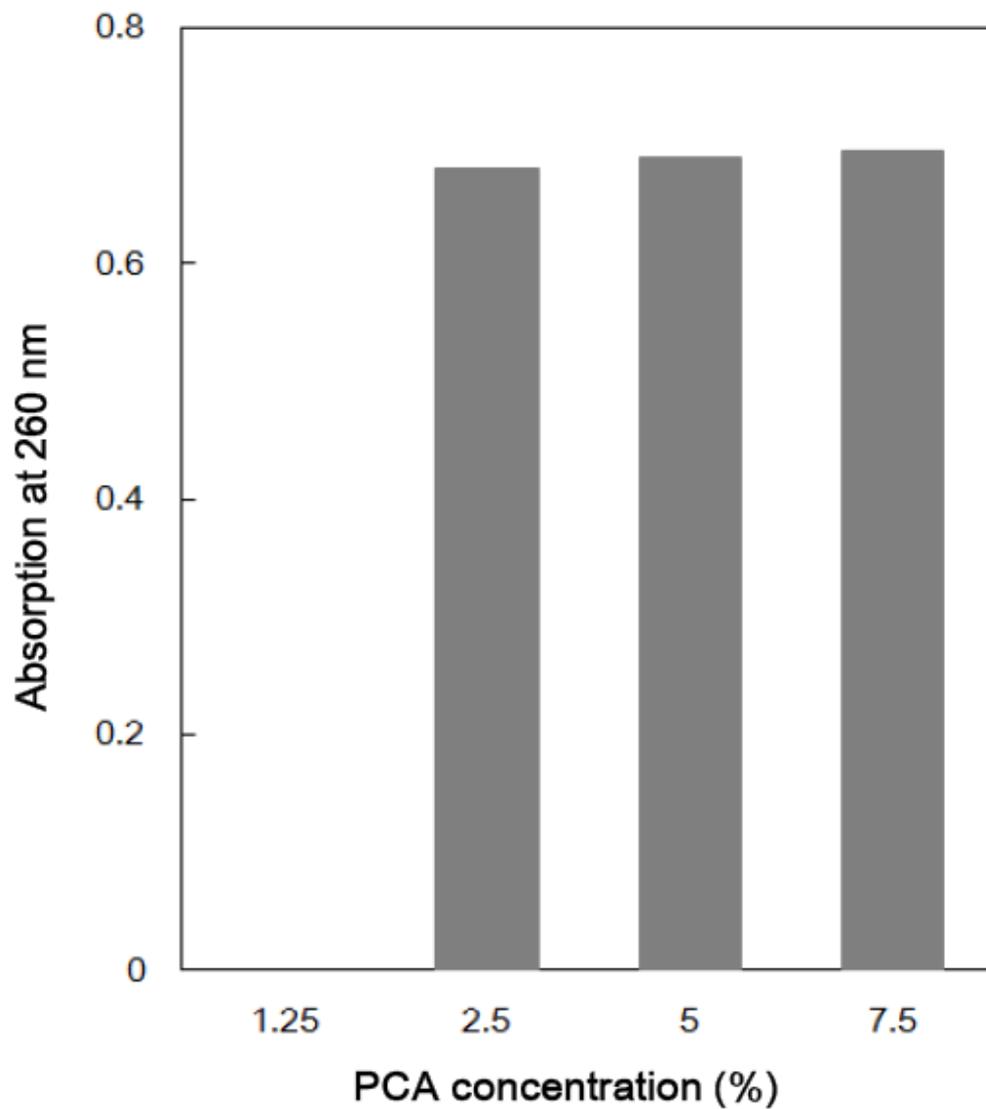


Fig. 1 種々PCA 溶液による魚肉からの ATP および 関連化合物の抽出

「Nuc はホッケ背肉 (1 g) から 10 ml の冷却 PCA 溶液で 15 分抽出した。静置上澄みを 0.45mm 膜を通し, 10 倍に希釈後, 収量の指標として 260 nm での吸収を測定した。」

これまでの Nuc 抽出法では魚肉に含まれている Nuc の総量を求めるため、最低でも二回抽出操作がなされている。そこで、この 10 倍量で抽出する場合でも二回以上の抽出操作が必要かどうか検討した。この実験では、抽出回数ごとに、3000 g x 20 分の遠心分離で上澄みを分離回収し、Fig.1 と同じように膜ろ過し、上澄みの吸収を求めた。Fig.2 に示すように、一回目の抽出液の 260nm の吸収は非常に大きく、二回目、三回目の抽出液の示す吸収はかなり小さかった。この二回目の抽出液に含まれる Nuc は新たに魚肉から抽出されたというより、一回目に抽出された Nuc を含む溶液がタンパク質沈殿や容器の内壁に付着しており、それが二度目に加えた抽出液により希釈されたものであると判断した。

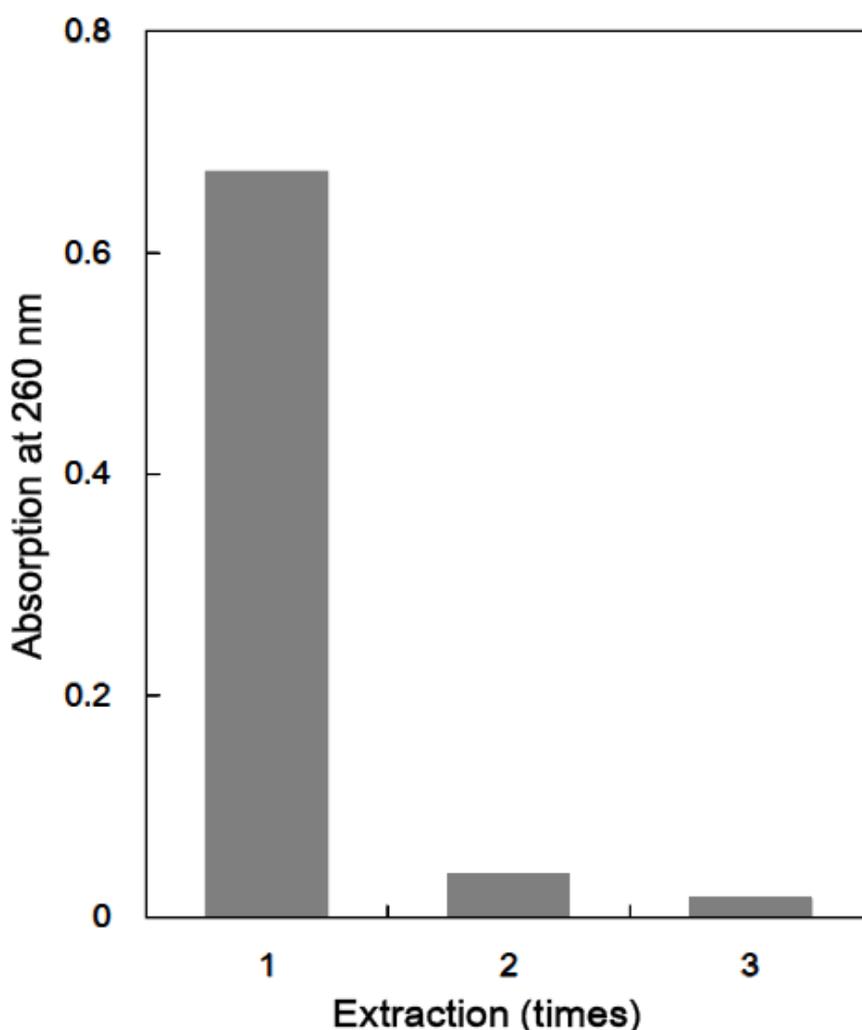


Fig. 2 魚肉からの複数抽出法

「図 1 と同じ方法を用いたが、毎回遠心分離で上澄みを回収した。収量の測定は図 1 と同じである。」

すなわち，一回目の抽出液の吸収，沈殿として回収された変性タンパク質の容量を残存 Nuc 抽出液量と仮定し，さらに二度目の抽出に用いた PCA 容量から計算して求めた吸収と見かけ上二回目の抽出液の吸収は近似した。それゆえ，実際には魚肉からの抽出は一回で十分であると結論した。

従来法では瞬時に酵素群を失活させるため，さらに抽出効率を上げるためにホモジナイザーを用いて PCA 溶液中で魚肉を微細化している。しかし，試料数が多い場合は，試料ごとに，ホモジナイザーの歯や容器の洗浄が必要となる。この操作も煩雑である。そこで，魚肉を微細化しなくても十分な収量が得られるかを検討した。それを確かめるため，魚肉 1g をそのまま用いた場合，大まかに細切した場合，さらになるべく丁寧に細切した場合の三条件で抽出性を比較した。さらに，三種（シロサケ，マダイ，ブリ）の魚肉を用い，魚種による違いがあるかについても同時に検討した。結果を Fig.3 に示す。試料として生鮮魚肉 1g を用いる限り，魚肉そのままを用いたものと丁寧に細切したものと間に収量の差はなかった。これは用いた三魚種で同じであった。この結果は，抽出性を高めようと室温で魚肉を細切するより，PCA を加え，ただちに抽出操作に入る方がよいことを意味する。この三魚種で Nuc 溶液の 260nm の吸収に差が認められたが，三魚種で Nuc 含量に差があるためか，Nuc の組成が異なるために 260nm の吸光値が変わったのか，それともこれら両者が影響しているかはこれだけでは不明である。

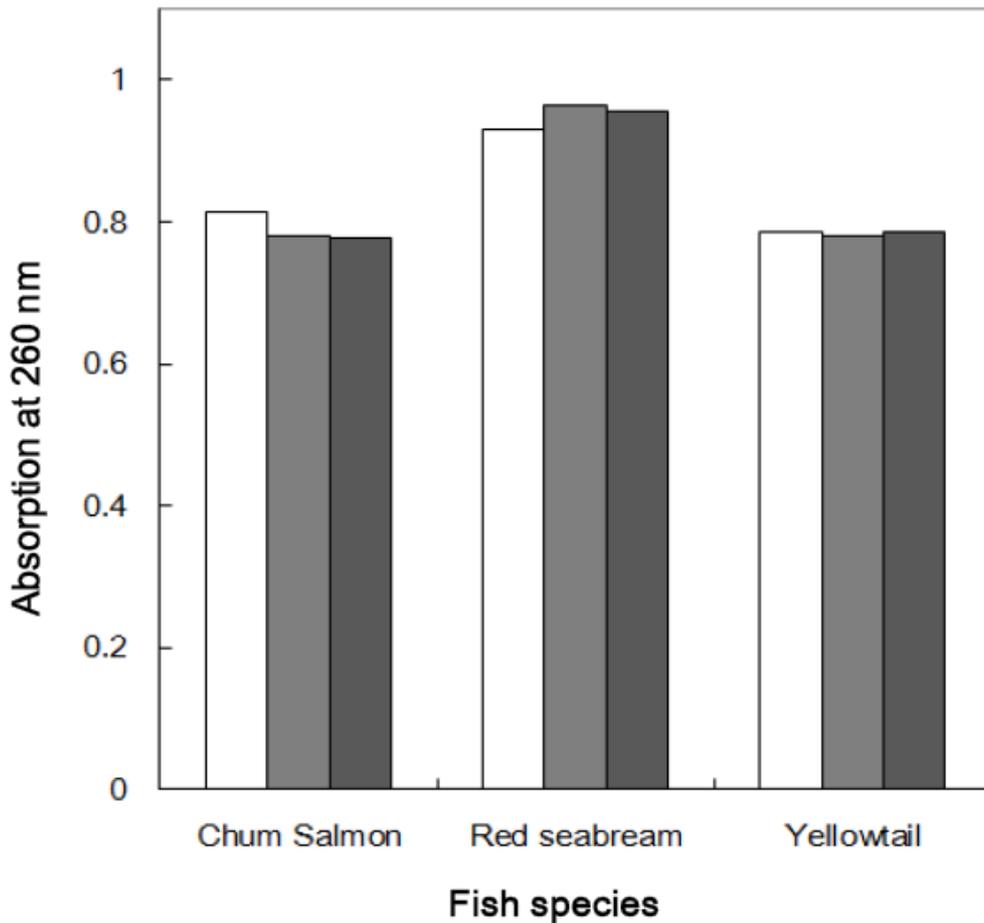


Fig. 3 試料の大きさによる収量への影響

「図1と同じ実験を試料の大きさを変えて測定した。白は固まりのまま、灰色は雑に細切したもの、黒は細かく砕いたもの。他の方法は図1と同じである。」

抽出液の中和条件 従来法では、抽出した Nuc に含まれる ATP の分解を阻止するため、変性タンパク質を分離して得られた Nuc 溶液はただちに KOH で中和される。しかし、この中和反応は強酸の強アルカリによる中和反応であるため、中和点付近の pH 変化が急激であり、pH7 に合わせるのには容易ではない。少しでも容易にするため、通常微調整は低濃度の KOH 溶液が用いられている。いずれにしても、試料ごとに pH メータあるいは pH 試験紙を用いて中和を確認する必要があった。一定量の KOH の添加で中和できないのは、タンパク質沈殿や遠心分離の遠心管の内壁に PCA が付着し、完全回収ができず、不確定な PCA 量を中和することになるからである。また、魚肉に対する PCA 溶液の量が少ないので、残渣に残存する PCA 量も無視できるものではないのであろう。もし、Nuc 抽出

液を残渣から分離しないで中和を行えば，加えた PCA をすべて中和することになるので，一定量の KOH 溶液で中和ができることになる。この方法を採用した場合の問題点として，変性タンパク質の沈殿を分離していないので，PCA で一旦沈殿したタンパク質の一部が中和により再溶解化し，「除タンパク」が達成されないことである。そこで，中和によりどれくらいのタンパク質が再溶解するのかを中和液のタンパク質組成を SDS-PAGE で調べた (Fig. 4a)。

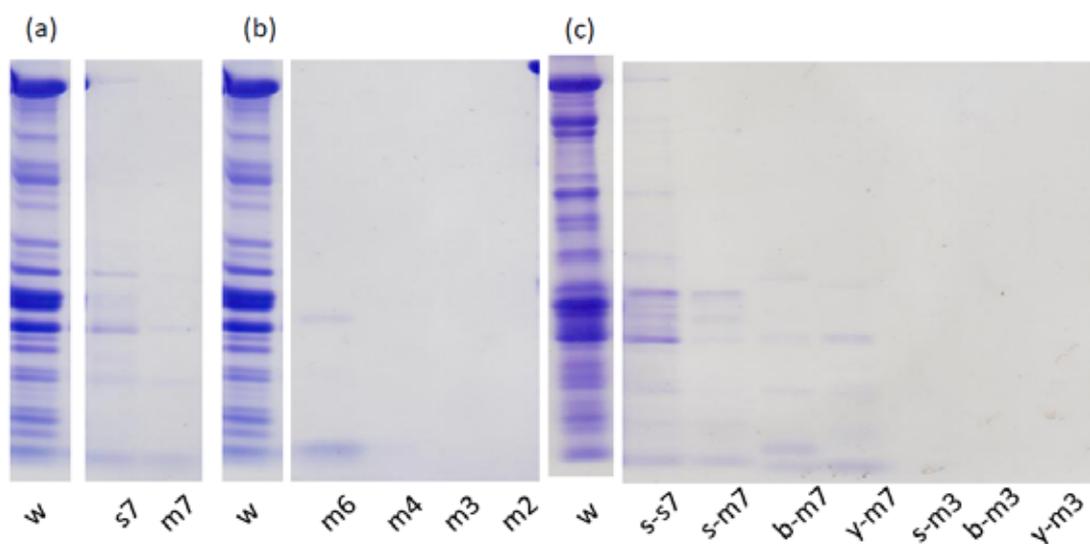


Fig. 4 Nuc 抽出液からのタンパク質の除去

「(a) Nuc 抽出液に検出されるタンパク質成分。ホッケ Nuc 抽出液を pH 7 で中和した静置上澄み (s) ，それを 0.45mm 膜を通したもの(m)。 (s) と (m)の次の数字 (7) は pH を示す。(b) 様々な pH に調整した Nuc 溶液中のタンパク質成分。(m) は (a)と同じである。(m) の隣の数字は (2-6) 調節した pH である。(c) pH 3 調整による種々魚種 Nuc 溶液からのタンパク質の除去。(m) と数字(3 or 7) は(a と b)と同じである。S, B, と Y はシロザケ，マダイ，ブリを示す。(w) はさらに 2.5 倍希釈した筋肉全体のタンパク質成分を示す。」

同一希釈に相当する魚肉構成成分のパターンと比較した。両者の泳動図を比較したところ、Nuc の中和溶液の上澄みには Coomassie brilliant Blue R 250 染色でかすかにタンパク質バンドが認められた。タンパク質バンドを明確に示すため、Fig. 4 では中和試料は 2.5 倍濃縮したものを使用した。ここでは遠心分離操作を用いず、静置して得られた上澄みをそのまま使用することにした。膜を通さずに静置上澄みをそのまま分析すると、ミオシン重鎖と思われるバンドを含め数本のタンパク質成分が認められた。これらの多くは膜を通すことで除くことができたので小さなタンパク質凝集体が浮遊していることがわかる。しかし、膜を通して、トロポミオシンと思われる成分とゲル先端付近に泳動される成分は除くことができなかった (Fig. 4a)。そこで、これらのタンパク質の再溶解を最終 pH を変えることで防ぐことができるか検討した。Fig. 4b は KOH で pH2-6 に調整後、膜を通した試料に含まれるタンパク質成分分析の結果である。pH6 への調整では明らかに先端付近にタンパク質が検出されたが、pH4, 3, 2 ではいずれもタンパク質成分が全く検出されなかった。それゆえ、中和 (pH7 調整) ではなく pH3 付近へ調整すれば、Nuc 試料へのタンパク質の混入は起こらないと結論した。さらに、シロサケ、マダイ、ブリの Nuc 抽出液でも、pH7 調整ではホッケで認められたのと同様の成分が認められたが、この pH3 調整法を用いることで、タンパク質の除去が可能であった (Fig. 4c)。

酸性条件下での ATP の安定性 ATP は酸に不安定で、酸分解を防ぐためにはただちに中性する必要があると言われている。pH3 という酸性条件下に調整することで ATP の酸分解が進行すれば、この方法は使用できないことになる。そこで、ATP 分解に及ぼす PCA 濃度および pH の影響を再検討した。まず、1 mM ATP 溶液に 1-5% になるよう PCA を加え、室温 (28) に 13 時間放置した場合の ATP の分解程度を ATP が分解して生成する無機リン酸量の増加から検討した (Fig. 5a)。ATP の分解程度は共存する PCA 濃度が高くなるにつれて大きくなり、5% PCA では 60%、1% PCA でも 20% 程度の ATP 分解が起きた。この結果は従来の認識と一致している。さらに pH の影響を詳細に知るため、中性に調整した ATP 溶液に希釈した HCl を加え、溶液の pH を 7 から 1 まで変化させ、同じ室温放置実験を行った (Fig. 5b)。pH1 で放置した場合、15% 程度の ATP 分解に相当する無機リン酸の生成が起きたが、pH3 と pH7 ではほとんど無機リン酸の生成が起きなかった (2% 程度)。この結果では ATP 分解の有無は調べることはできるが、それ以外のリン酸化合物に対する影響はわからない。そこで、試薬として

購入した Nuc 構成成分を混合し、pH1, 3, 7 で一晩室温に保存した場合の各成分の分解を HPLC で分析した。pH1 での保存では 15% 程度の ATP が ADP に変化し、ADP 量が増加したが、それが AMP, IMP 量は全く変化することはなかった。また、pH3, pH7 で保存した場合は、無期リン酸の検出から得た結論と同じく、ATP の分解も認められなかった（図示せず）。

ATP が PCA の中で分解を受けることを確認したが、この貯蔵条件はかなり極端な場合である。もし、Nuc 抽出液を氷冷下の PCA 中で貯蔵した場合に上記の室温に比べ、どの程度小さくなるのか、あるいは、分解を無視できる許容時間はどの程度かについて、再確認した。1 mM ATP 溶液に Nuc 抽出液を想定した 5% PCA 中を加えて保存した場合の ATP 分解の様子を貯蔵温度の影響も一緒に検討した。その結果、氷冷中の ATP 分解は非常に遅く、4 時間で 1.6% 程度であった。この分解は測定誤差に入ると判断した

すなわち、PCA で抽出後の以下の中和処理は比較的ゆっくりやっても問題はないと結論した。もちろん、貯蔵温度が高ければ、それに応じて分解は進行した。また、IMP の酸分解は全く認められなかったので、K-値測定に関しては、ATP の分解が多少起きても、全く影響がないことがわかる。

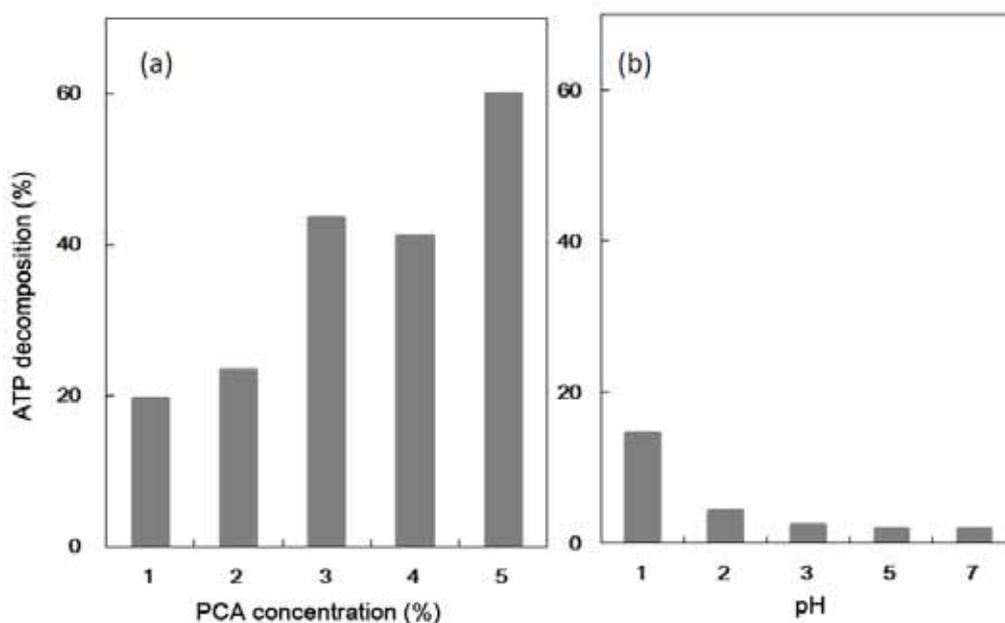


Fig. 5 酸性条件での ATP 分解

「ATP 溶液 (1 mM) を種々 PCA 濃度溶液(a)あるいはさまざまな pH (b)で室温保存し、ATP 分解を無期リン酸量から測定した。」

抽出液の中和処理 Nuc 抽出液を氷冷しておけば pH3 では確実に ATP 分解を無視できることが確認された。さらに長期間の貯蔵を想定し、pH3 調整後に膜ろ過したタンパク質を含まない Nuc のろ液を中和して保存する方法を検討した。魚肉に PCA を加えた抽出液に一定量の 1 M KOH を加え、pH3 および pH2 に調整した溶液をまず調製した。そのろ液に対して、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.5) を種々濃度に加え、その時の pH を測定した。Fig. 6 に示すように、pH3 に調整した場合、2 mM の添加で pH6 以上まで上昇した。さらに 20 mM の添加では、リン酸緩衝液の pH である約 pH7.5 まで上昇した。もし、pH3 への調整がうまくいかず、pH2 程度にとどまった場合でも、20 mM の添加で pH7 付近まで戻すことができた。それゆえ、1 M KOH による pH 調整が多少ずれても、20 mM リン酸緩衝液の添加で Nuc 試料を中性で維持できると判断した。

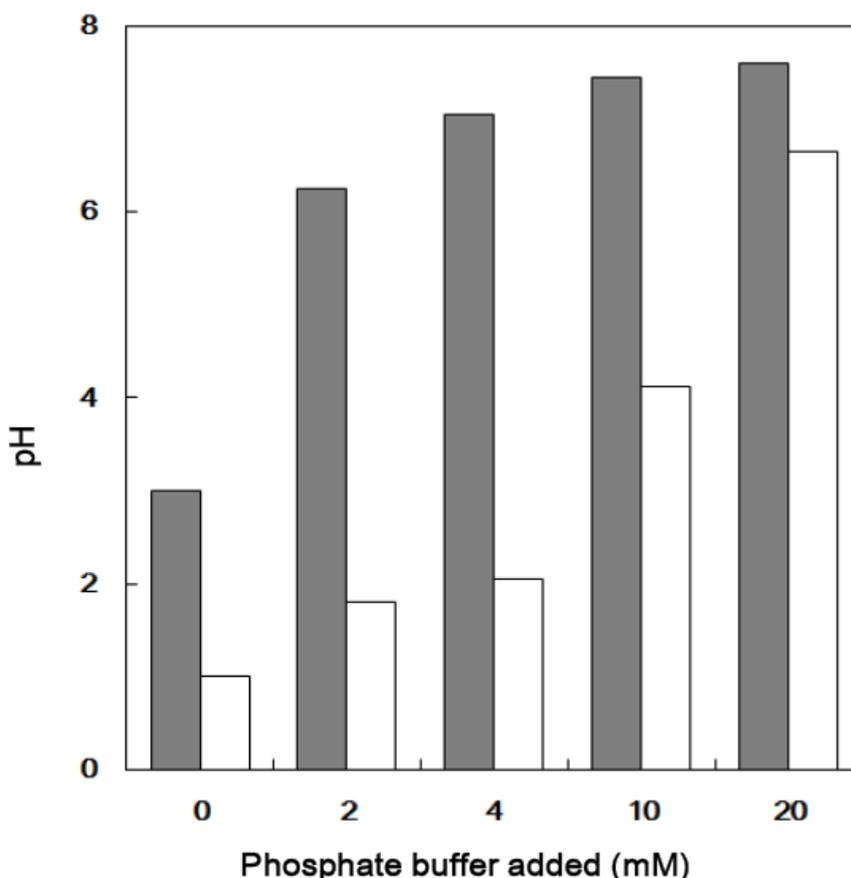


Fig. 6 KOH 溶液，リン酸緩衝液添加による pH 調整

「Nuc 溶液の pH を最初 pH 1 (白) あるいは pH 3 (黒) に合わせた。その後、様々な濃度の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を加え、得られた pH を測定した。」

本研究で確立した方法の再現性を確認するため、10 倍量の 5% PCA 溶液で抽出

した魚肉混在溶液に対して前もって求めておいた一定量の KOH 溶液を加えた時の pH, さらにその膜ろ過後に一定量のリン酸緩衝液を加えた場合の pH を別々の試料を用いて四回実験した。Fig. 7 に示すように, 一定量の 1 M KOH 添加でいずれも pH3 付近に合わせることができた。もちろん, この必要 1 M KOH 量は用いる PCA, KOH 溶液を新しく作り変えるたびに求めておく必要がある。さらに, 20 mM リン酸緩衝液の添加で再現性よく中性化されていることが確認された。

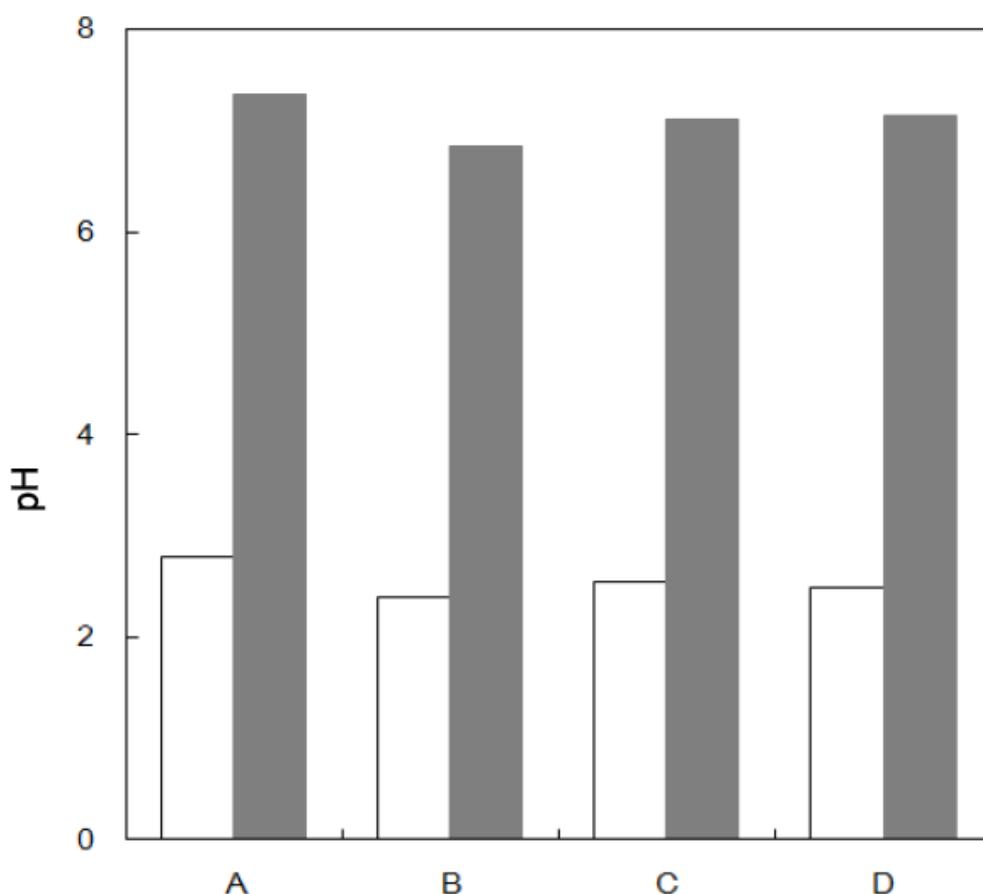


Fig. 7 中和操作の再現性

「抽出 Nuc 溶液 (10 ml) に 1 M KOH (5.5 ml) を加えた(白)。さらに 20 mM になるようリン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えた(黒)。同じ操作を 4 回繰り返した(A-D)。」

本報告では基本的な Nuc 調製の原理は維持したままで 短時間で多量の処理が

できる簡便な方法の開発を目指した。Fig. 8 に最終的に得られた簡便法を示す。

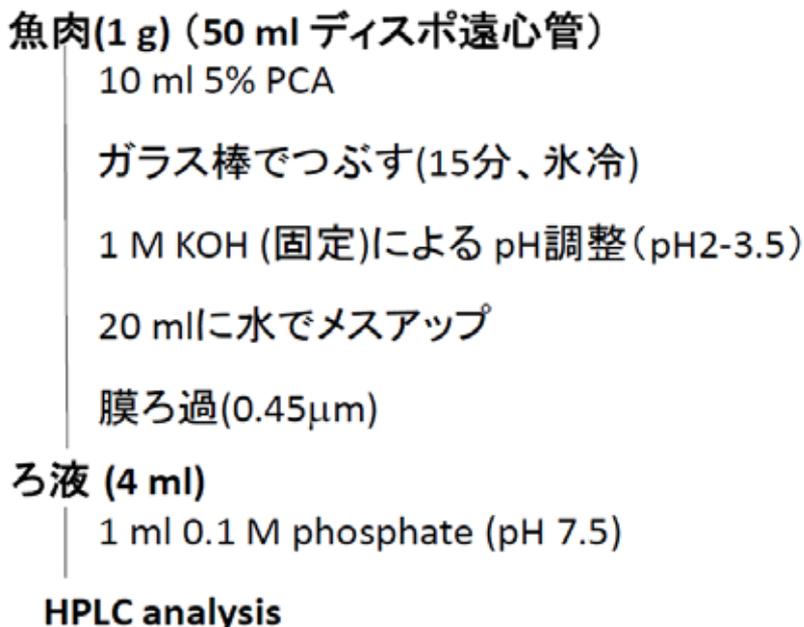


Fig.8 簡便化した Nuc 調製法

主に検討したのは、魚肉からの抽出の部分と PCA を含む抽出液の中和反応の部分の二点である。まず、二種濃度の PCA 溶液の使用、複数回の抽出とそれぞれの遠心分離、ホモジナイズによる微細化の操作を省くことができた。また、使い捨てのプラスチック容器を用いることで、調製後の器具の洗浄の操作も省いた。抽出は 10 倍量の 5% PCA 溶液とガラス棒を用いた方法とした。本報告では検討した限り、鮮魚であればホモジナイザーによる微細化は必要がないと判断した。たとえば、即殺のヒラメ肉から、この方法で Nuc を調製して組成を調べたところ、ほとんどが ATP であり、処理中に ADP に分解しているような様子は認められなかった。それゆえ、比較的肉質が硬い場合もこの方法が十分適応できることを確認している。しかし、肉質が明らかに異なるイカやアワビなどの筋肉の場合はそのまま適応できるか検討する必要がある。また、ATP を多く含む高鮮度の冷凍魚肉等を用いる場合は解凍時に大きな組成変化が起きることが知られているので、凍結肉を PCA に浸漬させ、ガラス棒による破壊のみで瞬時に変化を阻止できるかについても別に検討しておく必要がある。酸可溶性の Nuc 画分を上澄みに回収するため、通常は遠心分離で変性タンパク質が除かれる。氷冷下で自然沈降を待って上澄みを回収したが、画分にタンパク質が認め

られ、完全に変性タンパク質の微小浮遊物を除くのは難しかった。これら浮遊懸濁物は 0.45 μ m の膜でろ過する方法で除くことができた。ディスパーザルシリンジと組み合わせて用いれば、多数の処理が可能であった。なお、低速の遠心分離(3,000 rpm)や、No5C ろ紙によるろ過ではこれら懸濁物を完全に除くことは難しかった。

次に問題にした煩雑な操作は Nuc 抽出液の中和反応である。今回用いた HPLC システムでは pH2.8 のリン酸緩衝液を移動相として用いているので、中和して溶解したタンパク質がカラム中で再沈殿を起こし、カラムの寿命を短くする可能性がある。この再溶解を阻止する方法は、pH7 への中和の代わりに、pH2-3.5 に調整することであった。この pH 調整も、用いた PCA と KOH 両溶液を使っていくらか加えれば目的の pH に調整できるかを前もって求めておけば、この必要量の KOH 溶液を一度に添加することで行うことが可能となり、pH 調整の煩雑さが解消された。かなりの再現性があった。

Nuc を pH3 で保存することによる ATP 分解が心配されたが、高温では明らかに問題となるが、氷冷下ではさほどの問題とならないことを確認した。それでも、pH3 で保存するのは心配となる。そこで、さらに中和する方法を開発した。まず、Nuc 抽出液を pH3 に合わせたのち、20ml になるよう蒸留水を加えて一定量に合わせる。その後、膜ろ過し、得られたろ液に対し、100 mM のリン酸緩衝液 (pH7.5) を 20mM になるよう添加することで、中和することができた。ろ過した後には中和することが重要である。これ以降の ATP の安定性、保存性はこれまでの方法のものと同じであると考えられる。この時点で魚肉中の Nuc は 25 倍に希釈されていることになる。なお、最初に採取する魚肉の重量は 1.00g である必要はなく、その周辺の重量を 0.01g 単位で正確に記録しておけば、得られた分析値から魚肉中のそれぞれ成分の含量に換算できる。

4. 魚の初期鮮度変化の測定

4-1 ゴマサバの初期鮮度変化

4-1-1 サンプルング

本研究で使用したゴマサバは、鹿児島近海の海域でまき網にて漁獲し、港まで活魚輸送され、数日間蓄養されたものである。水揚げは、蓄養している生簀の網を絞り、タモで1尾ずつとりあげ、首折れ処理（写真のように首を折り、脊髄を切断）の活き〆操作を行い、それを海水氷溶液に浸漬した。海水氷溶液への浸漬は、約1時間である。水揚げ直後の漁体温は、約24℃である。冷却後、ラウンド魚体を5尾程度に保存し、大学の研究室に運搬した。活き〆後、約2～3時間後にフィレ処理を行い、乾燥を防止するためにポリ袋に入れ、0℃にて保存を行った。保蔵時の温度変動は、自記温度計にてモニターした。



学名 : *Scomber australasicus*
英名 : Blue mackerel



活き〆



冷却(海水氷)約1時間



フィレ処理

4-1-2 研究方法・結果および考察

ゴマサバの魚肉を0℃で保存した状態を写真で示した。活き処理した当日の刺身は、死後硬直が進行していない（写真処理2時間後）ものを刺身処理したものである。肉は透明感があり、血合肉の色調は鮮赤色を示していた。また、物性はコリコリした食感を示した。一方、0℃で3、5日間保存したものでは、魚肉の透明感が低下して白濁し、身割れが認められた。さらに、血合肉の色調も変化した。



処理2時間後

（死後硬直前の状態）



冷蔵5℃10時間後

（死後硬直状態）

魚肉変化



漁獲初日



3日経過

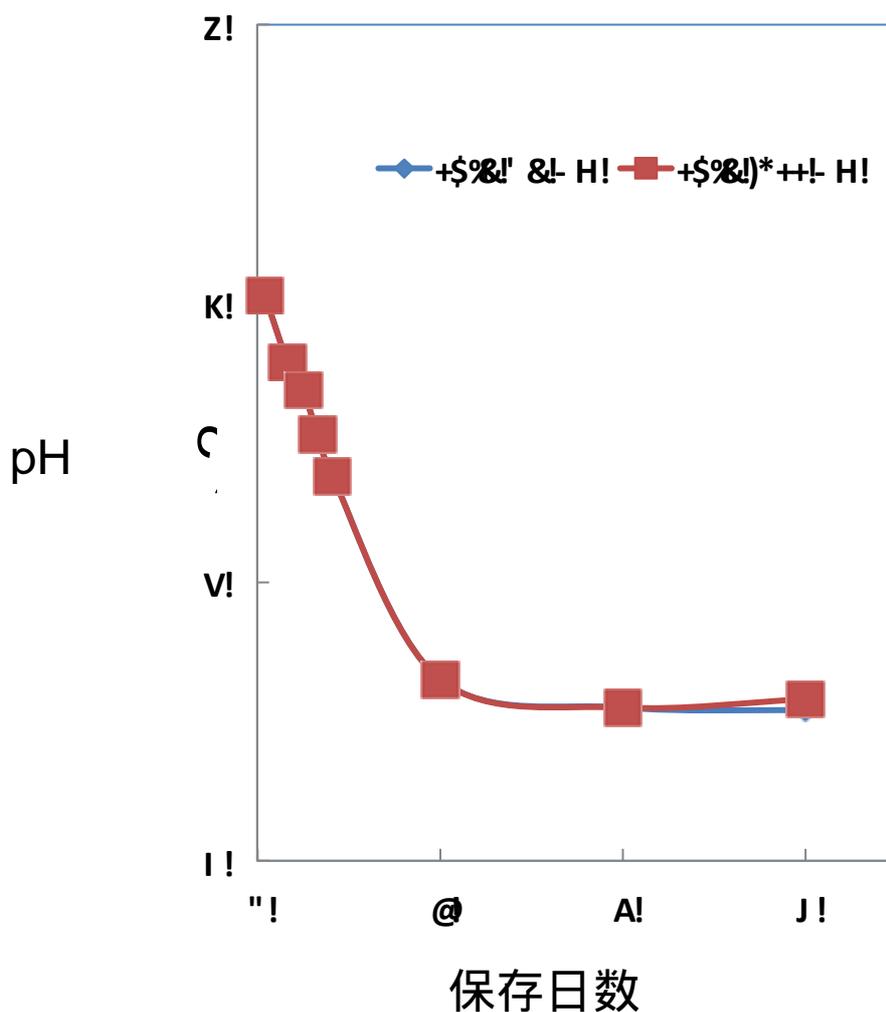


5日経過

上記の魚肉性状の変化を捉える測定方法として、pH、筋原線維(Mf) Ca-ATPase 活性、ミオグロビン性状について、測定方法の検討を行った。

「筋肉 pH 変化」

- ・ pH は、魚肉に対して 5 倍量の 20 mM モノヨード酢酸 Na 溶液を添加ホモジナイズし測定した。

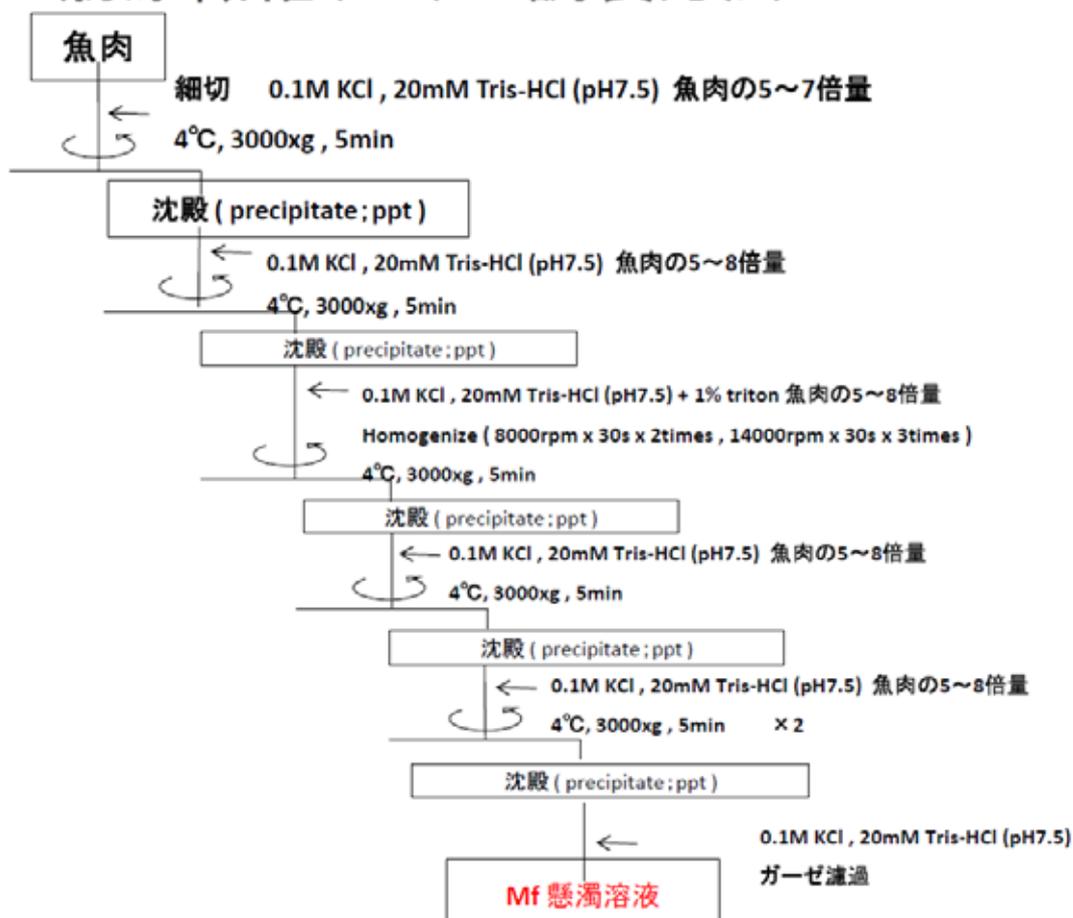


ゴマサバでは、0 保存 1 日で pH 5.5 付近まで pH が低下した。なお、この変化は、筋肉中の乳酸量の増加と対応していた。

「筋原線維 ATPase 活性の変化」

- 筋原線維 (Mf) の調製方法を以下に示した。

筋原繊維 (Mf) の調製方法



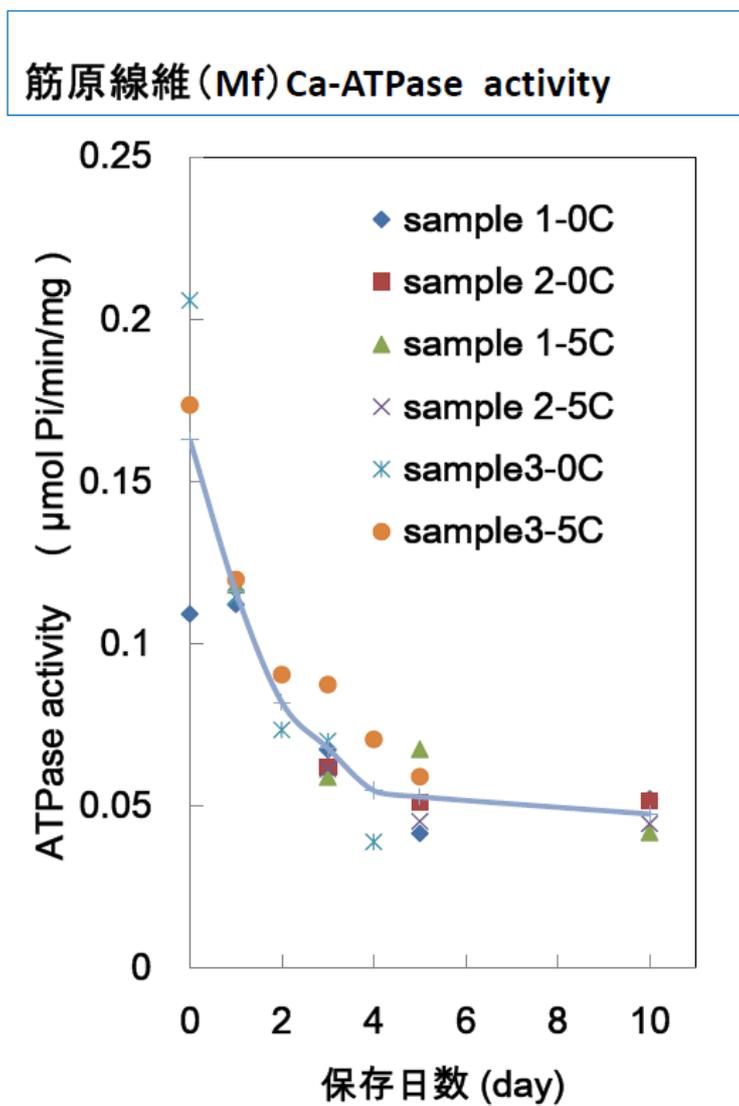
Mf Ca-ATPase 活性は、以下の反応条件で測定した。

反応組成： 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH7.0), 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP,
0.2 mg/ml Mf 25

経時的に反応液を取り出し、PCA 溶液にて反応を停止し、生成した遊離リン酸量を測定した。

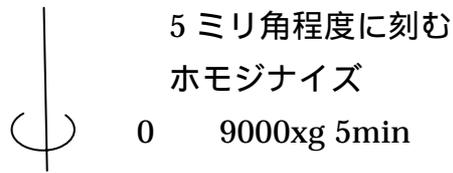
ゴマサバの筋肉 Mf Ca-ATPase 活性は、保存 1 日目で急激な低下を示し、その後 2 日目~5 日目で緩やかに低下する傾向を示した。この変化は、魚肉 pH の

変化と対応する傾向を示した。

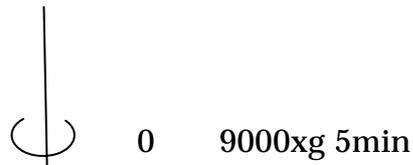


「ゴマサバミオグロビンメト化測定用サンプル調製方法」

血合肉 2~3g 程度

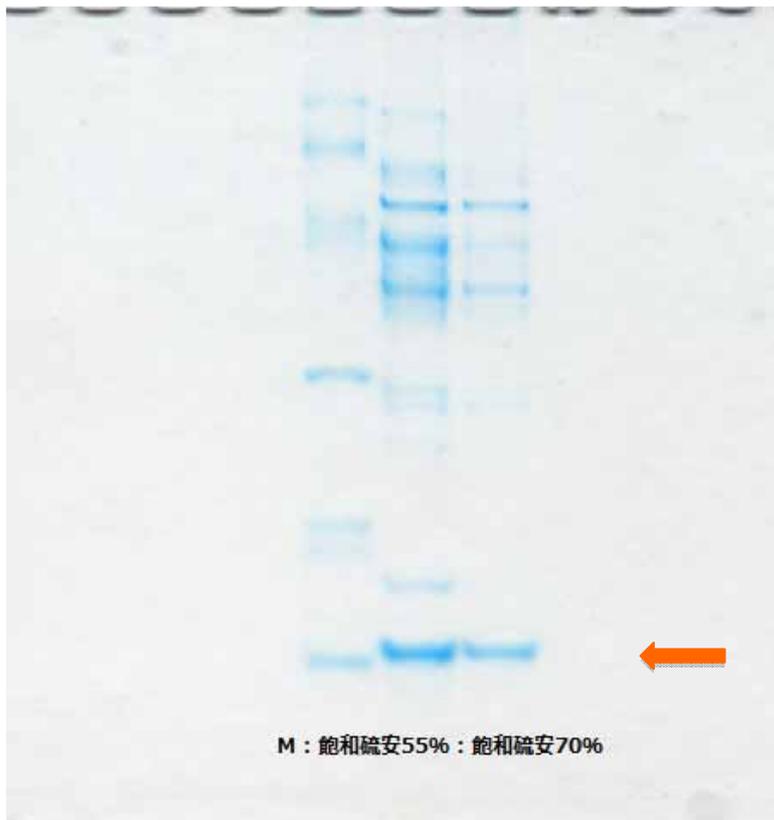


硫安分画 70%飽和



得られた上清を4つ折りにした濾紙でろ過

る液：ミオグロビン抽出液として、可視部スペクトルの測定。



ミオグロビン

血合肉からのミオグロビン抽出液を硫安分画し、70%飽和硫安分画上清について、可視部吸収スペクトルを測定することにより、メト化率を迅速に測定することが可能となった。SDS-PAGEパターンは、70%飽和硫安分画上清にミオグロビンが濃縮されることを示した。ゴマサバのミオグロビン溶液は、硫安分画

後，硫酸の脱塩のために透析をすると，透析中にメト化が進行することを確認している。

5. 総括

5-1 本研究により得られた知見・成果

本調査では，水産物の国際標準となる品質・鮮度指標の開発・実用化のために必要となる基礎的な調査研究を進めた。今年度は，水産物の鮮度指標として日本で開発研究され本調査でも基本的な指標として使用する K 値の分析方法について，より簡便で精度が良いサンプル調製法を構築した。これにより，水産物の各現場で容易に多数のサンプル調製を行うことが可能となった。また，水産物の初期鮮度変化を測定する方法について，ゴマサバを試験対象魚として調査を行い，0 保存において pH が 5.5 付近まで低下する現象がみられ，魚肉タンパク質の変性が速く進行する事，また，この様な魚種のみオグロビンタンパク質の性状測定方法には工夫が必要となることが明らかとなった。

5-2 今後の方針

水産物の鮮度測定で基礎的な測定方法である K 値分析の簡易サンプル調製方法を確立できたので，測定する魚種を拡大し，各魚種の死後における ATP 関連化合物の消長を測定し，魚種特性を明らかにする。また，実用的な鮮度変化や品質の指標の策定に応用する基礎データを集積するために，各種の魚を 0 から 10 に保蔵したときの，pH，乳酸量，K 値，魚肉 Mf ATPase，Mf の塩溶解性，ミオグロビン性状の変化について明らかにする。これらのデータを総合的に利用し，鮮度・品質指標を明らかにする科学的データブック等の作成を行う。

文献

- 1) Saito T, Arai K, Matsuyoshi M. A new method for estimating the freshness of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1959; **24**: 749-750.
- 2) 内山均 ,江平重男 .核酸関連化合物からみた魚類鮮度化学研究の現状. *日水誌* 1970; **36**: 977-992.
- 3) 内山均 ,角田聖斉 .魚類鮮度判定恒数, K値の簡易測定法の改良. *日水誌* 1984; **50**: 263-267.
- 4) 加藤登 ,内山均 ,宇田文昭 . 連続濃度勾配カラムクロマトグラフィーによるイノシン, ヒポキサンチン, 尿酸およびヌクレオチドの迅速定量法. *日水誌* 1973; **39**: 1039-1044.
- 5) Lee EH, Oshima T, Koizumi C. High performance liquid chromatographic determination of K value as an index of freshness of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; **48**: 255.
- 6) 槌本六良 ,三嶋敏雄 ,宇津木照洋 ,北島俊一 ,矢田殖朗 ,保田正人 . 動揺の激しい船内でのATP関連化合物の分離定量法-逆相分配カラムによる高速液体カラムクロマトグラフィー法 . *日水誌* 1985; **51**: 1363-1369.
- 7) Matsumoto M, Yamanaka H. Post-mortem biochemical changes in the muscle of kuruma prawn during storage and evaluation of the freshness. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1145-1149.

水産物等の国際標準となる品質・鮮度指標に関する調査研究委員会
委員一覧 (敬称略)

(職名は平成25年3月現在)

	氏名	所属
委員長	木村郁夫	国立大学法人鹿児島大学水産学部 教授
	袁 春紅	国立大学法人鹿児島大学水産学部 准教授
	岡崎恵美子	国立大学法人東京海洋大学食品生産化学部門 教授
	今野久仁彦	国立大学法人北海道大学大学院水産学研究院 教授
	村田裕子	独立行政法人水産総合研究センター中央研究所 主任研究員
	新堀清正	一般社団法人日本海事検定協会 理事 食品衛生分析センター長
事務局	杉浦恭子	一般社団法人日本海事検定協会 食品衛生分析センター 課員
	岡文香	一般社団法人日本海事検定協会 食品衛生分析センター 課員

委員会開催日： 第1回 平成24年6月1日(鹿児島大学水産学部)
 第2回 平成24年11月5日(北海道大学水産学部)
 第3回 平成25年3月6日(東京海洋大学)