

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 27 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。

平成 24 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タンパク質の性状測定方法に工夫が必要となることが示された。

平成 25 年度は、各種魚種の ATP 核酸関連化合物と K 値の経時変化についてデータの収集を行った。

今年度は、昨年度に引き続き各種魚種の ATP 核酸関連化合物と K 値の経時変化についてデータの収集と保水性との関係および冷蔵保存後期に見られる IMP の急激な分解に関する原因調査を行い、また、品質の判定法として冷凍保存中のミオグロビタンパク質のメト化の進行に影響する要因について検討を行った。

本調査によって得られた結果や知見は、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	6
3-1 ティラピアおよびシマアジの各種保管温度における K 値と保水性の変化	6
3-2 ニジマス、マイワシの各温度における ATP 核酸関連化合物の変化	16
3-3 ヒラメ肉中の IMP 分解におよぼす微生物増殖、膜構造の関与	18
3-4 凍結保存時の鮮度（ATP 濃度）は冷凍保存性に影響する	24
4. 総 括	41
4-1 本研究により得られた知見・成果	41
4-2 今後の方針	42
5. 文 献	43

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郁夫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久仁彦研究室、東京海洋大学岡崎恵美子研究室、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（村田裕子主任研究員）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、昨年度に引き続き各種魚種の ATP 核酸関連化合物と K 値の経時変化および保水性との関係や冷蔵保存後期に見られる IMP の急激な分解に関する原因調査を行い、また、品質の判定法として冷凍保存中のミオグロビンタンパク質のメト化の進行に影響する要因について検討を行った。

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、今後も国際商品としての流通量が増大すると期待される。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チルド輸出する際には、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。さらに、水産物の国際流通では流通の大部分が冷凍状態で行われる。冷凍保存と解凍は品質に大きな影響を与えるが、凍結前鮮度と冷凍保存性に関する研究例は少ない現状にある。

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

2-1 ティラピアおよびシマアジの各種保管温度における K 値と保水性の変化

(東京海洋大学 岡崎恵美子・中澤奈穂・守谷圭介・宮本裕貴・高元沛)

「要約」

①各種温度 (5℃、0℃、-5℃) で保管したティラピアの K 値と保水性の変化
遠心分離法によりドリップロスを求め、各保管温度による保水性の変化を調べた。誤差が大きいため再検討の余地があるが、同じ K 値で比較すると、保水性は、5℃ > 0℃ > -5℃ との結果になった。すなわち、同じ K 値であっても、肉質は必ずしも同じでない場合があることが示唆された。

②各種温度 (0℃、5℃、10℃) で保管したシマアジの K 値と保水性の変化
遠心分離法によりドリップロスを求め、各保管温度による保水性の変化を調べた。誤差が大きいため再検討の余地があるが、保管時間 12 時間後で比較すると、保水性は、10℃・5℃ > 0℃ との結果になった。

3-1-1 5℃、0℃、-5℃で保管したティラピアの K 値と保水性

【試料】 ティラピア (活魚、東京海洋大学にて飼育)

水槽から取り上げ後、一尾ずつ活け締め処理し、5、0、-5℃にて保管 (いずれの温度帯においても、魚体を密封し一定温度に調整した水中で保管)
魚体サイズが小さいため、1尾につき4回サンプリングした。

1条件につき、n=3 (別個体) で測定し、平均値を算出した。計 50 尾を使用した。

平均尾叉長 (cm)	平均重量 (g)
25.2±1.6	296.9±60.2

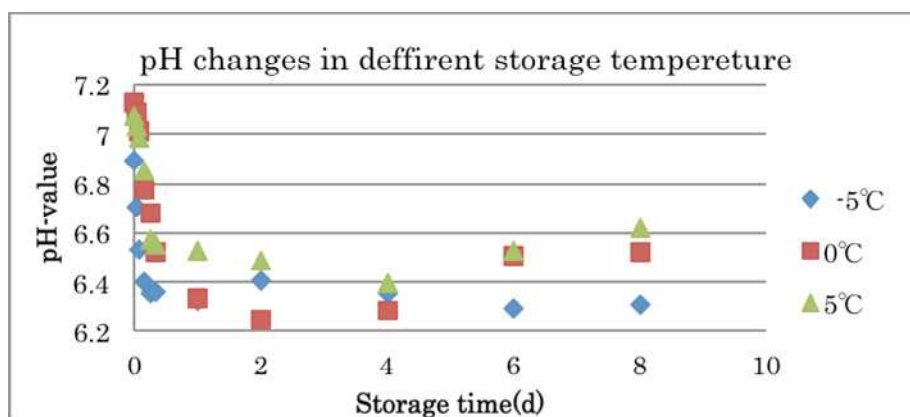
【測定項目】

- ・ **K 値** サンプリングは今野法により抽出し、日本海事検定協会にて HPLC 分析した。
- ・ **pH** 10 倍量の 0.02M モノヨード酢酸を加えてホモジナイズし、測定した。
- ・ **保水性** 遠沈管にサンプルを採取し、①遠心ドリップ量測定、または②遠心後試料に含まれる水分量（遠心前重量当たり）で示した。

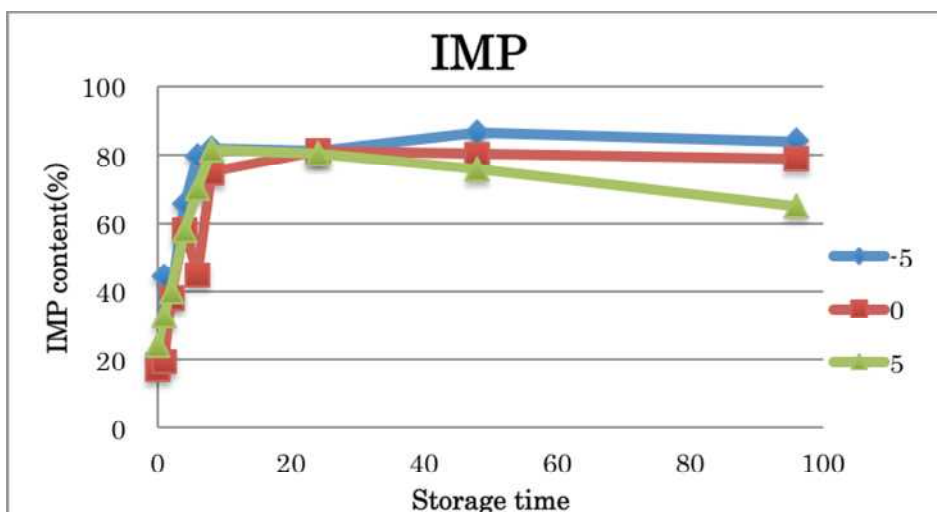
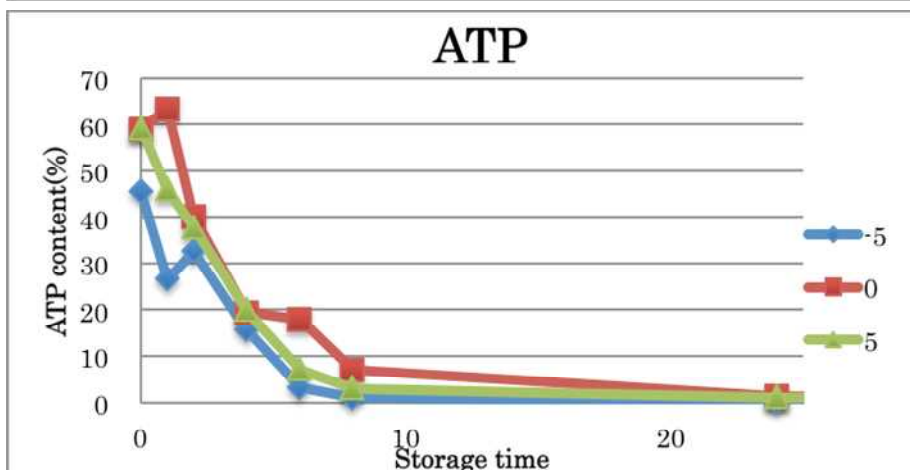
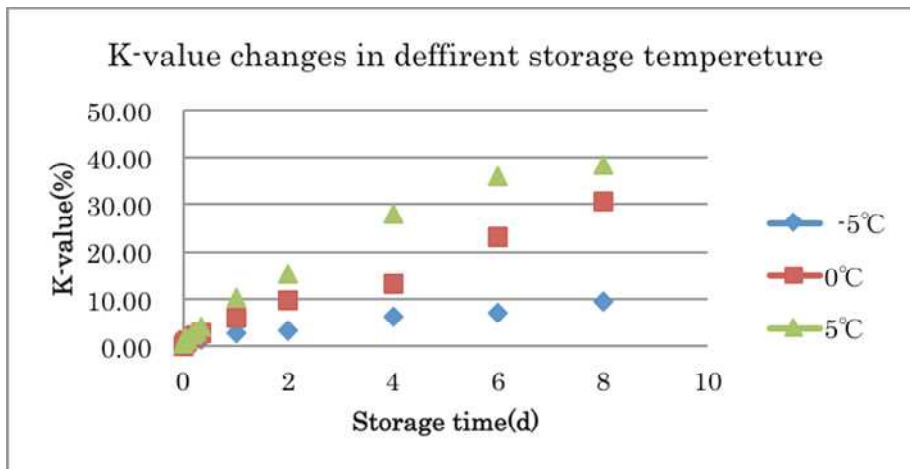
【測定結果】

保管温度は-5、0、5℃にて保存した。魚体 pH は活メ直後で約 7.1 を示し、その後 1 日保存で 6.3~6.5 に低下した。保管温度ごとに最低 pH は異なっていたが、経日とともに、上昇傾向が認められた。ATP 核酸関連化合物濃度の変化については、保管温度別、化合物別データについて、p. 8 に示した。また、各保存温度におけるドリップロスの変化ならびに K 値と保水性の関係について p.10、11 に示した。

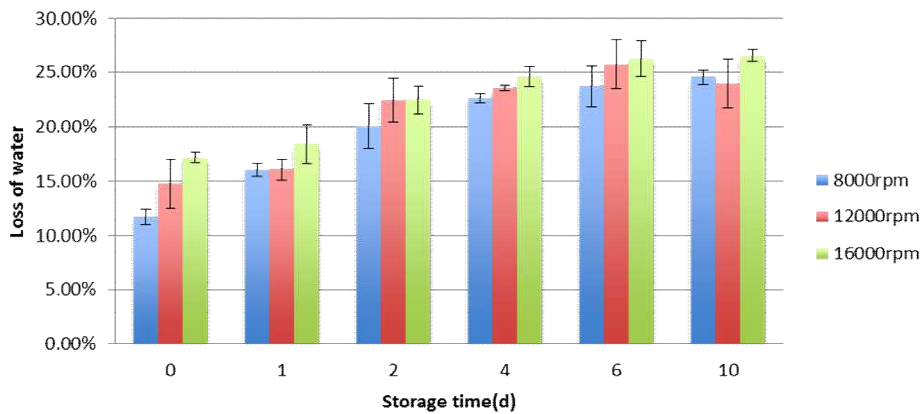
① 各温度帯における pH の変化



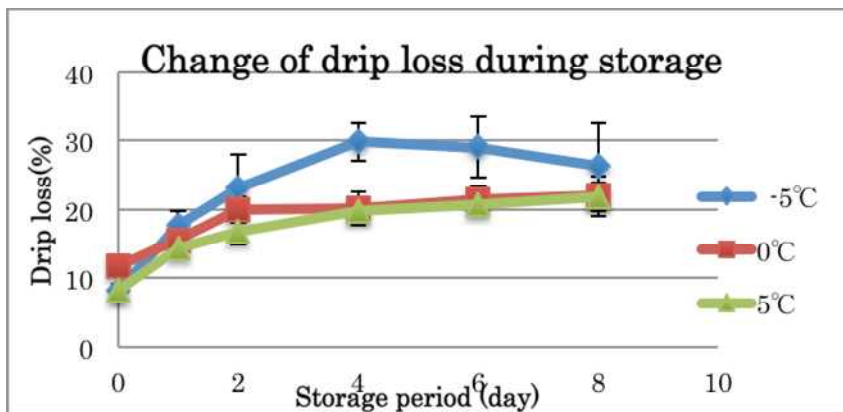
② 各温度帯における K 値ならびに核酸関連化合物の変化



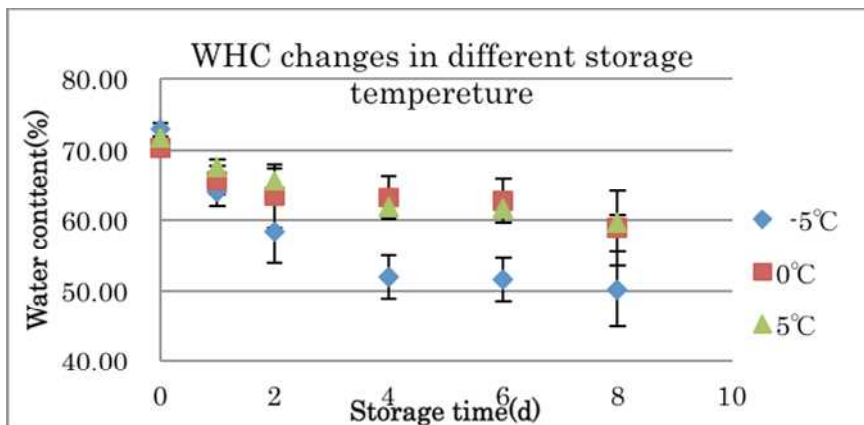
③ 保水性の測定に用いる遠心分離条件の検討 (各 15 分)



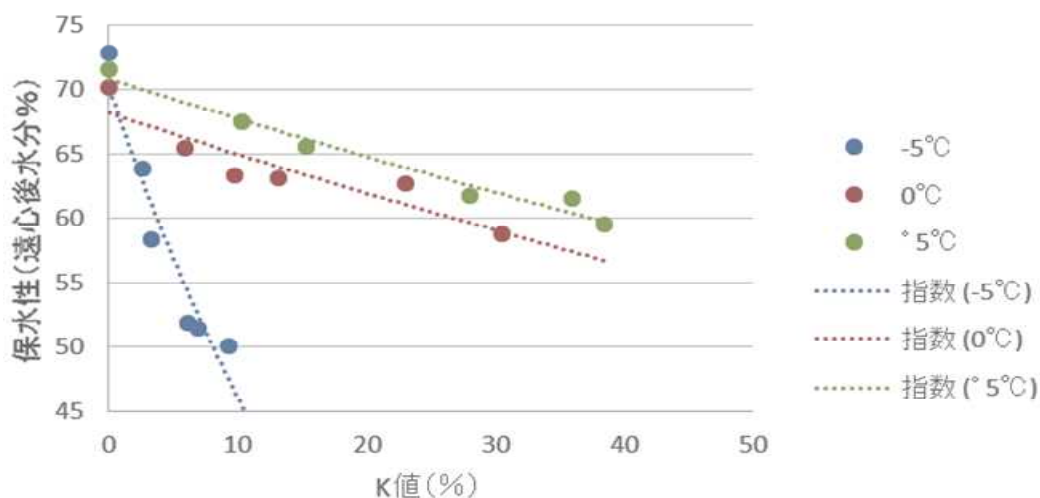
④ 各温度帯における保水性の変化 (ドリップロス)



(遠心後試料中の水分量/遠心前試料重量あたり)



⑤ 異なった温度で保管したティラピアのK値と保水性の関係



3-1-2 0、5、10°Cで保管したシマアジのK値と保水性

【試料】シマアジ (*Pseudocaranx dentex*) (活魚業者より東京海洋大学に搬入した (水温 14.8°C))。水槽から取り上げ後、一尾ずつ活き処理 (延髄刺殺、神経破壊) し、0、5、10°Cにて保管した。(いずれの温度帯においても、魚体を密封し一定温度に調整した水中で保管)

1 個体から経時的にサンプリングした。

1 条件につき、n=2 (別個体) で測定し、平均値を算出した。

平均体長 (cm)	平均重量 (g)
36.8 ± 1.5	597.2 ± 81.3

【測定項目】

・ K 値：サンプリングは今野法により抽出し、日本海事検定協会にて HPLC 分析した。

・ pH：5 倍量の 0.02M モノヨード酢酸を加えてホモジナイズし、測定した。

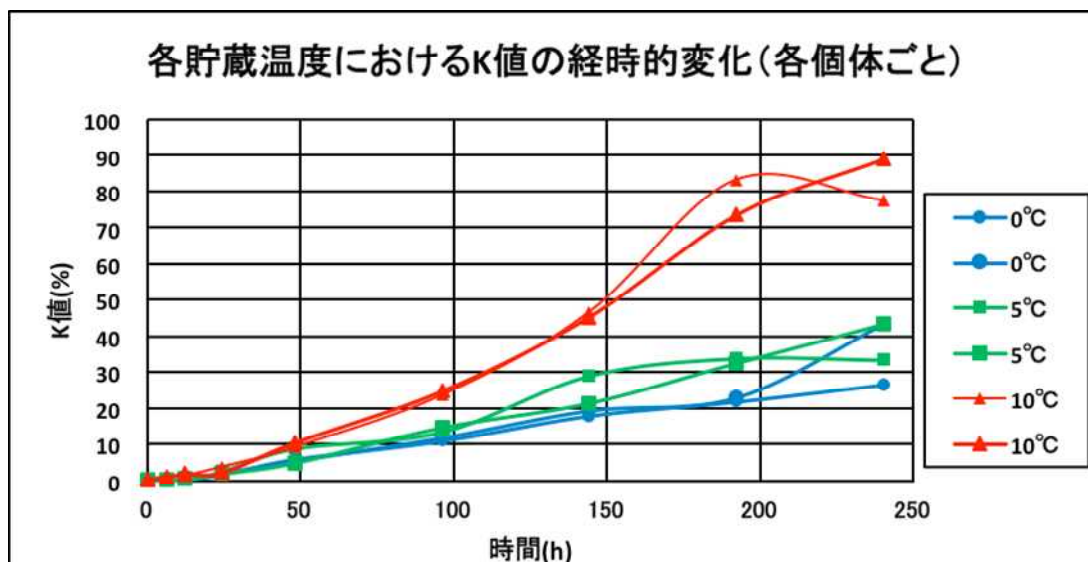
・ 保水性：遠沈管にサンプルを採取し、遠心前後の重量変化より測定した。

(遠心後の試料重量 / 遠心前の試料重量 × 100 (%))

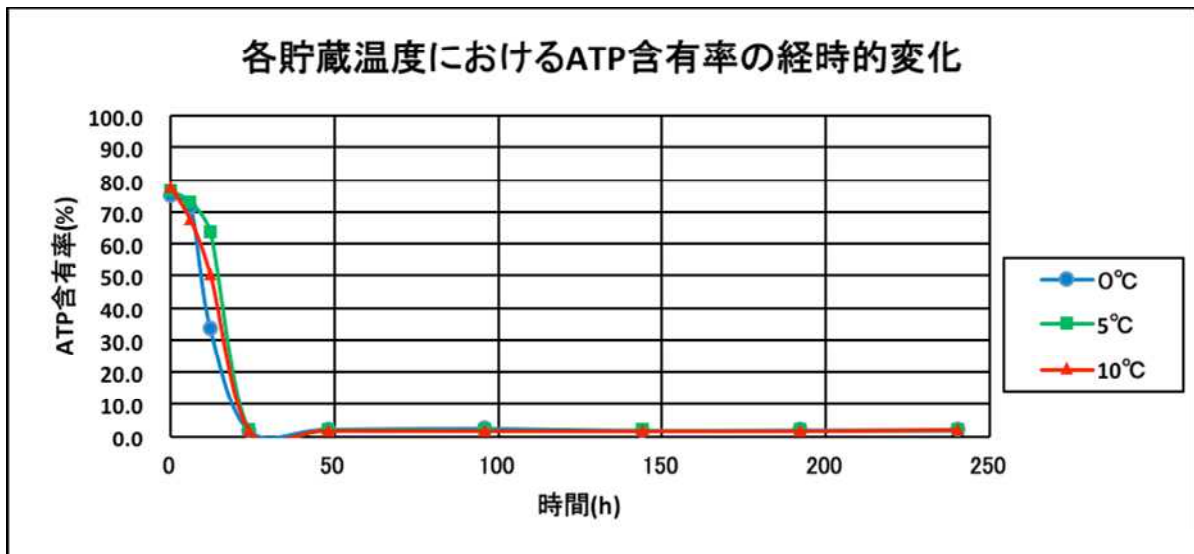
【測定結果】

保管温度は0、5、10℃にて保存した。魚体 pH は活後直後で約 7.1~7.2 を示し、その後1日保存で6.1~6.2に低下した。保管温度ごとに最低 pH はやや異なっていたが、経日とともに、上昇傾向が認められた。K 値ならびに ATP 核酸関連化合物濃度の変化については、保管温度別、化合物別データについて、p.11~13 に、各保存温度におけるドリップロス（保水性）の変化を p.14 に、各保存温度における温度履歴について p.15 に示した。

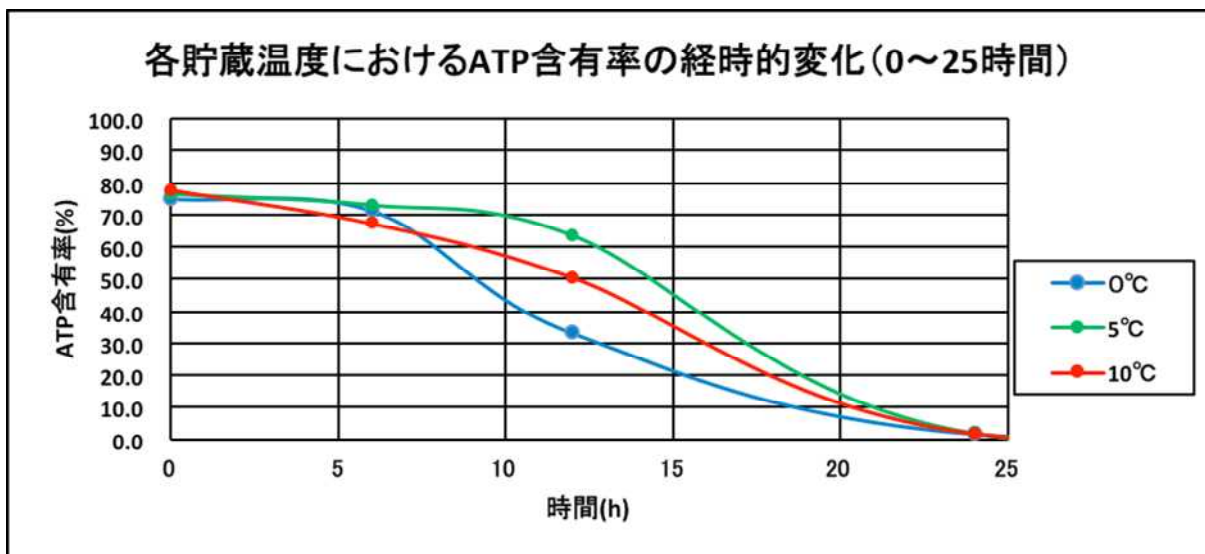
① シマアジの各貯蔵温度における K 値の経時的変化



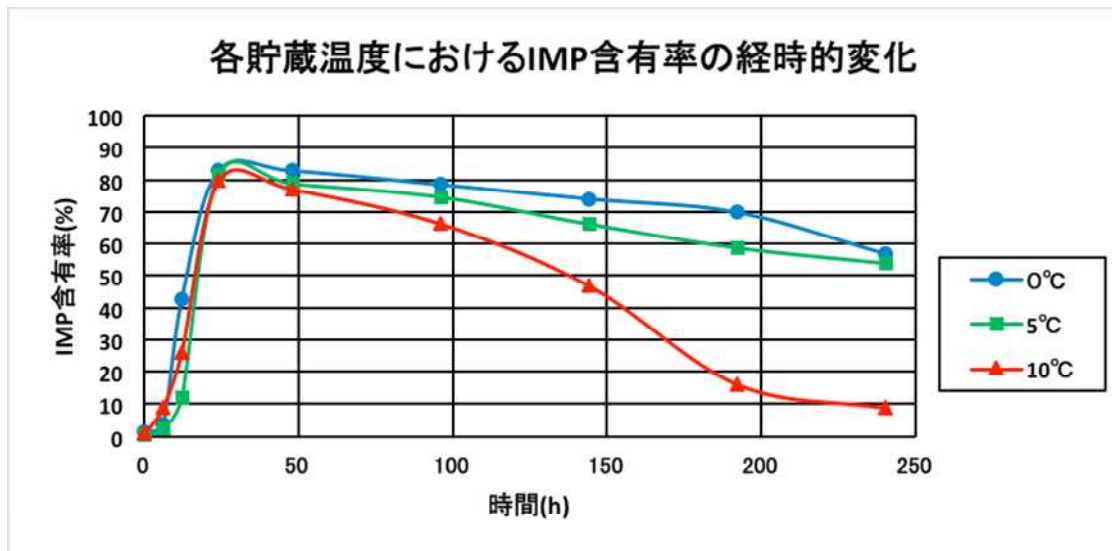
② シマアジの各貯蔵温度におけるATP（平均値）の経時的変化



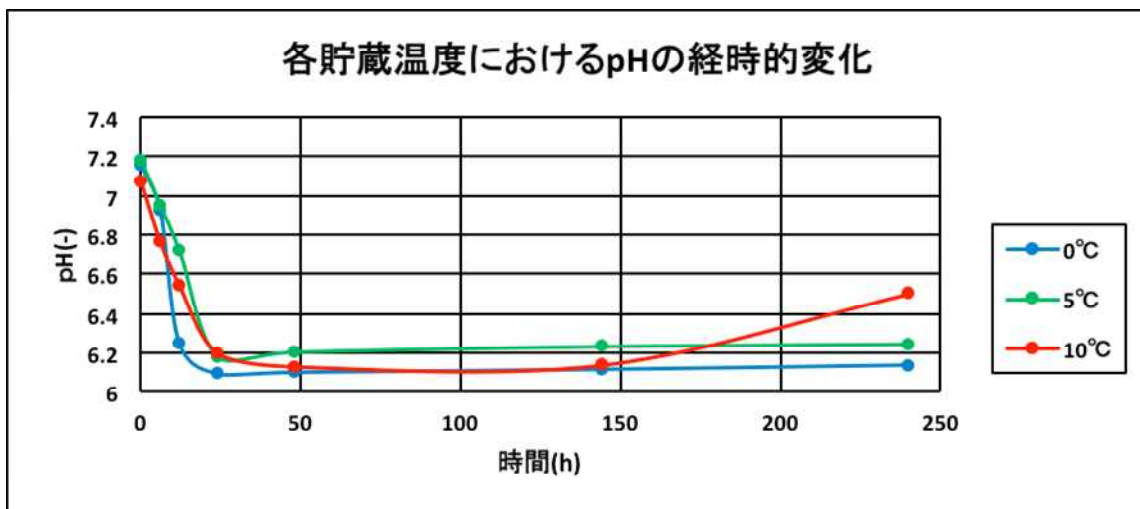
初期変化 (0~25 時間)



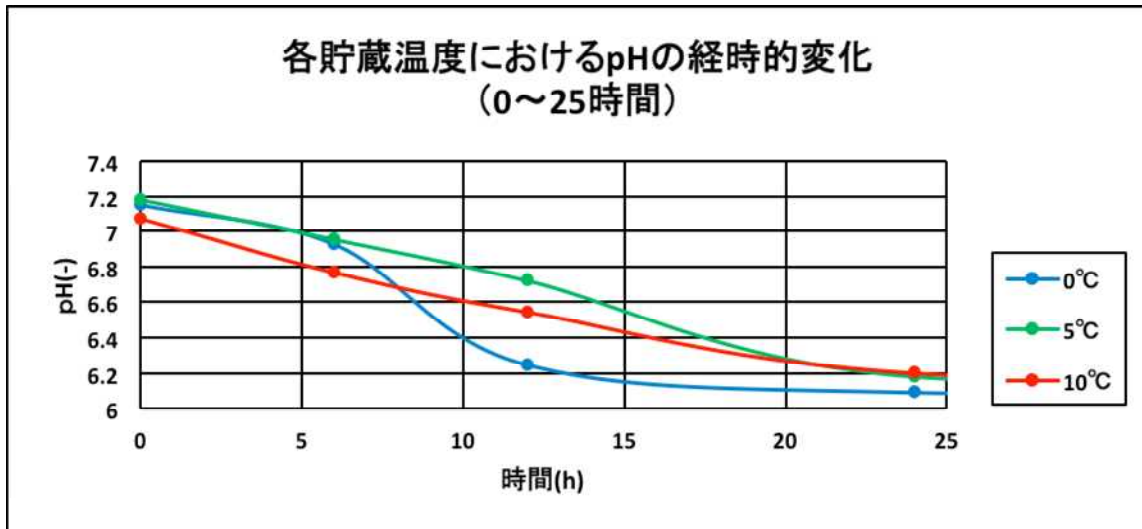
③ シマアジの各貯蔵温度における IMP（平均値）の経時的変化



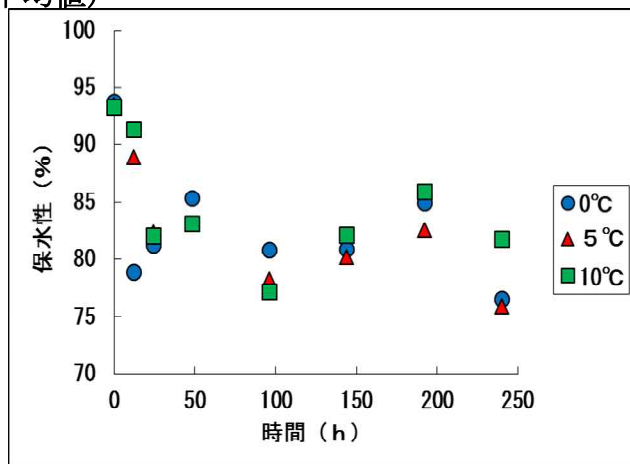
④ シマアジの各貯蔵温度における pH（平均値）の経時的変化



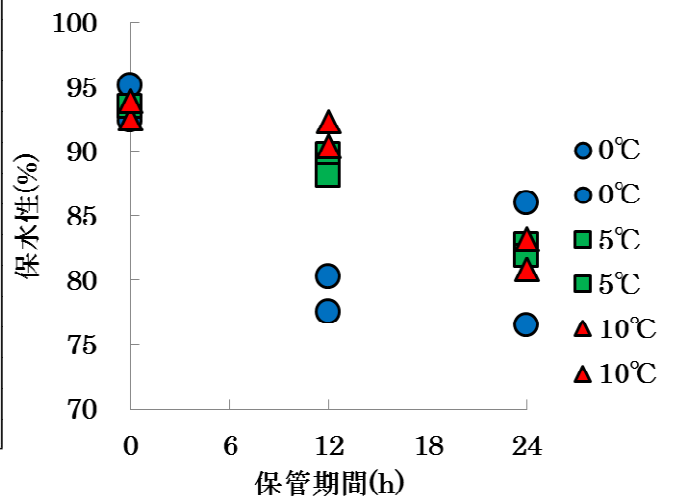
初期変化



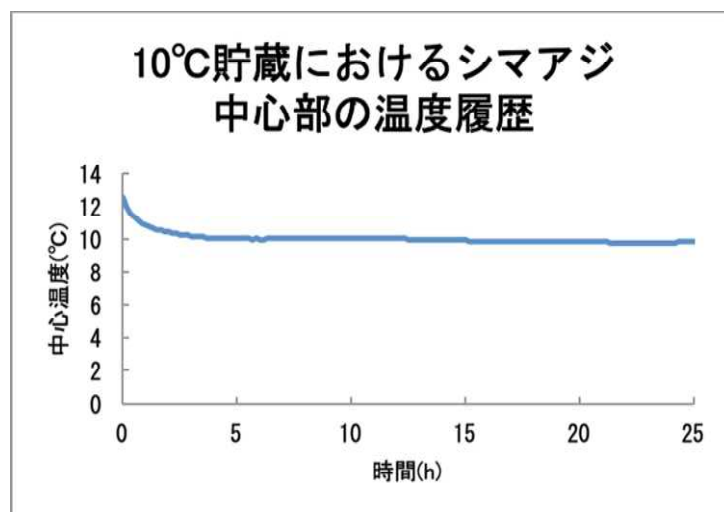
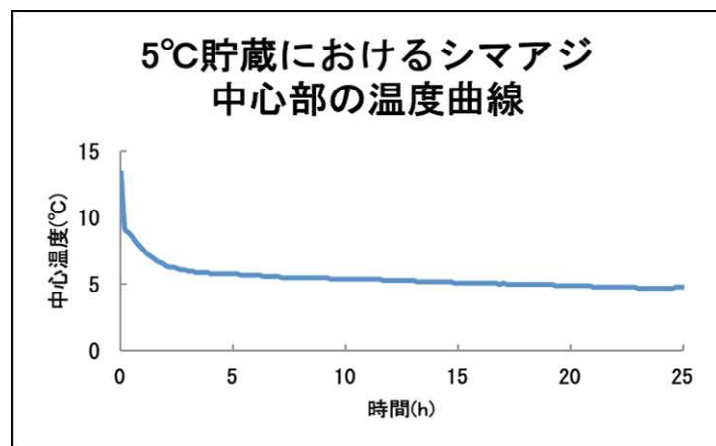
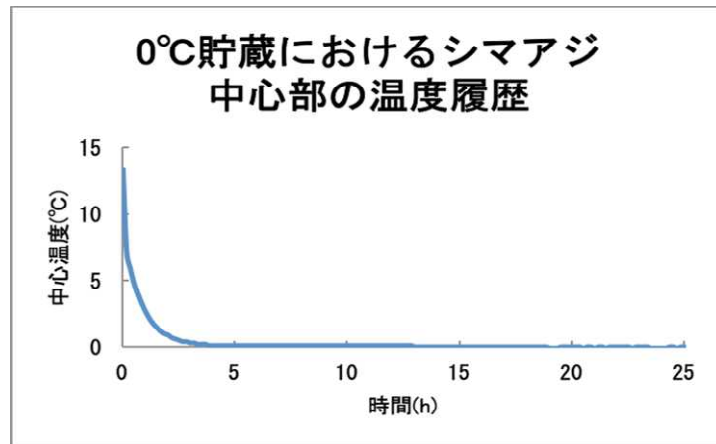
⑤ シマアジの各貯蔵温度における保水性 (遠心後重量/遠心前重量、2個体の
平均値)



初期変化の経時的変化 (0-24h)



⑥ シマアジの各貯蔵温度における温度履歴



3-2 ニジマス、マイワシの各温度における ATP 核酸関連化合物の変化

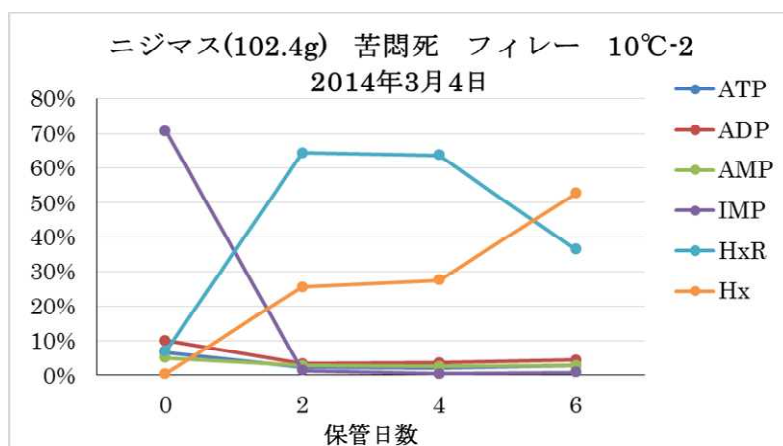
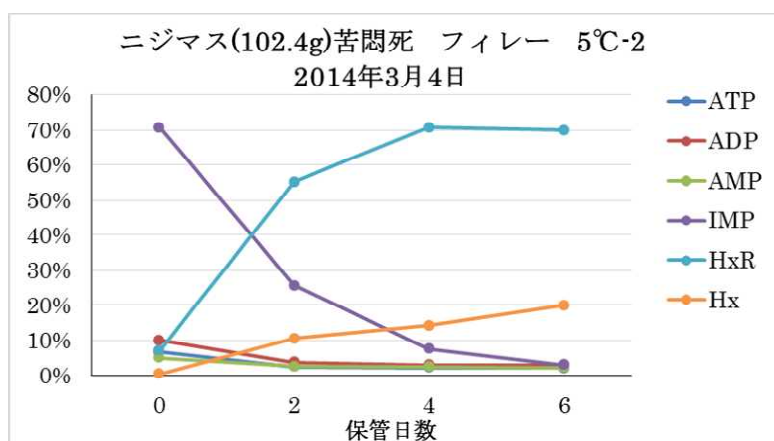
(データ提供 水産総合研究センター 村田裕子、文書作成 木村郁夫)

3-2-1 苦悶死ニジマスの ATP 核酸関連化合物の経時変化

「サンプル調製と試験結果」

ニジマスを1尾ずつ網ですくい、空中で15分放置して苦悶死させた。それを3枚に卸し、一部の肉(1g)を致死直後のサンプルとした。残りのフィレ(皮付き)はラップで包み、5℃、10℃で保存した。一定時間ごとに1gをサンプリングし、ATP 核酸関連化合物の濃度を測定した。ATP 核酸関連化合物濃度の測定は、定法のPCAによる抽出とHPLC分析により行った。

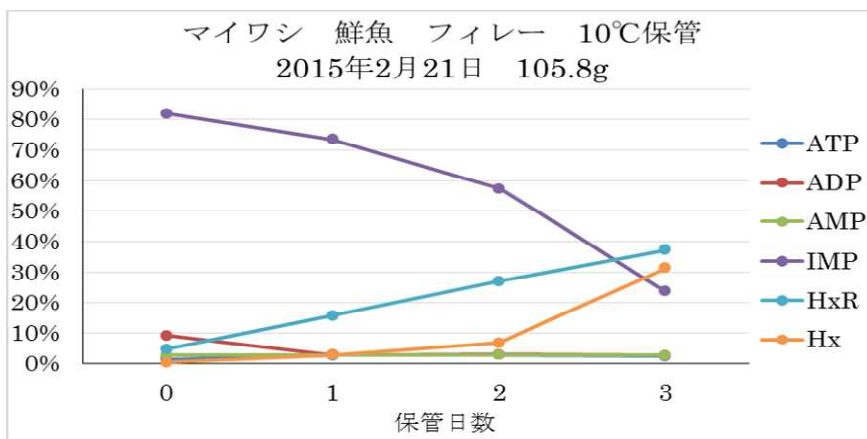
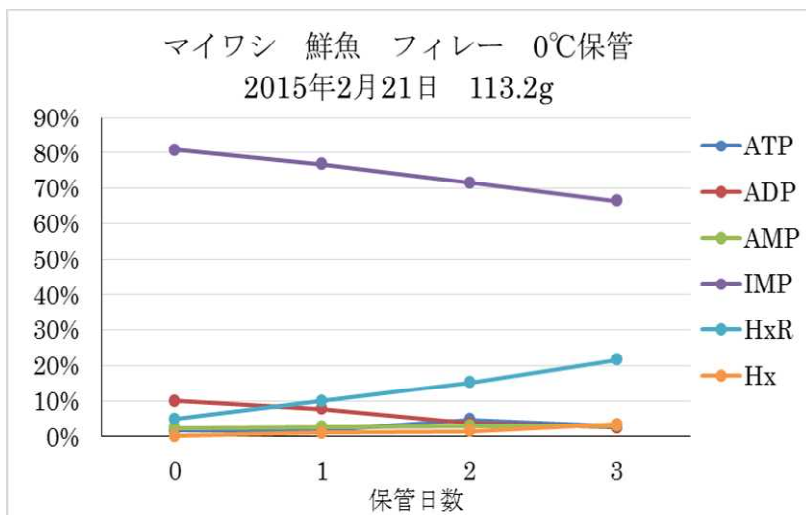
結果を以下の図に示した。ニジマスの場合は、IMPの分解速度が非常に速く進行し、保存温度が高くなるとイノシンからヒポキサンチンの生成が顕著に認められた。



3-2-2 マイワシ鮮魚の ATP 核酸関連化合物の経時変化

「サンプル調製と試験結果」

マイワシについては活魚での入手が困難なため、本試験では高鮮度な鮮魚を市場で購入して ATP 核酸関連化合物の経時変化を測定した。マイワシ鮮魚をフィレ処理し、0℃、10℃で保存し、一定時間ごとに 1g をサンプリングし ATP 核酸関連化合物の濃度を測定した。マイワシを入手した時点を保管日数 0 とした。入手段階で ATP はほとんど検出されず、IMP が 8 割を超えていた。保存経過では、ニジマスに比べて IMP の分解速度は非常に遅いことが示された。10℃保存では、イノシンの生成に遅れてヒポキサンチンの生成が認められた。



3-3 ヒラメ肉中の IMP 分解におよぼす微生物増殖、膜構造の関与

(北海道大学大学院水産科学研究院 吳 依蒙、石 奇立、今野久仁彦)

魚肉貯蔵中の ATP 関連化合物(Nuc と略す)の変化から求められる K 値は一連の反応の律速段階である IMP から HxR への変換速度により決定される。昨年度の研究成果²⁾ から、ヒラメ肉を 0°C のような低温で保存した場合、IMP 分解が初期には非常に緩やかに、後期に急激に進行するという二相性を示すことを見出した。この反応は酵素により触媒される反応であるが、溶液系でみられる法則に従った酵素反応とは考えられず、何らかの因子が関与していることが予想された。本研究では、IMP 分解が急激に認められる貯蔵後期には魚肉の腐敗臭から微生物の生育が推定された。この微生物の IMP 分解への関与について検討した。また、IMP が高濃度に蓄積されても、貯蔵初期に酵素反応が進まない理由として、本酵素の特殊な局在の可能性を検討した。すなわち、本酵素が膜構造に取り込まれているのではないかという観点から検討した。第一の目的のためには、抗生物質であるクロラムフェニコールを添加し、微生物の繁殖を抑制し、その影響を見た。第二の目的のためには膜の溶解に用いられる界面活性剤であるトリトン X100 を添加し、IMP 分解がどのように影響を受けるかから検討した。

3-3-1 方法

試料として、活魚店で購入したヒラメ(養殖、天然、約 1 kg)を用いた。即剥後、皮膚、骨などを取り除いたフィレから魚肉(5-10 g)を切り出し、個々にラップに包み、0、10°C に設定した冷蔵庫に保管した。魚肉に均一に抗生物質やトリトン X100 を混合するため、魚肉をスピードカッターで微細にしたミンチ肉も使用した。また、微生物の増殖は魚肉表面で起きることを想定し、抗生物質を染み込ませたキムワイプで上記の魚肉ブロック(フィレ)を包装して保存した。用いた抗生物質はクロラムフェニコール(150ppm)、界面活性剤はトリトン X100 (5%)である。

所定の貯蔵期間後に取り出し、その 1g を用い、初年度に確立した方法¹⁾で Nuc を抽出した。最終的な Nuc 成分の分析は、日本分光社製 HPLC システムと 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。

3-3-2 結果

魚肉の微細化による ATP 関連化合物の経時変化への影響

ヒラメ肉をスピードカッターで微細化した直後(30分以内)に試料を採取して、ATP 関連化合物の分析を行ったところ、すでに ATP はほぼ完全に IMP にまで変換されていた。筋肉中での ATP 分解は主に筋収縮のためのミオシンの Mg-ATPase が担っている。生きている魚肉では筋小胞体に Ca^{2+} が取り込まれており、筋肉中の Ca^{2+} 濃度は低く保たれ、ATP の分解は抑制されている。ミンチにすることで、筋小胞体の膜が破壊され、内部に貯蔵されていた Ca^{2+} が筋細胞に広がり、Mg-ATPase 活性が著しく活性化され、ATP の分解が促進されたと考えられる。また、ADP から IMP までの分解にかかわる酵素群の活性もかなり高いことが示唆された。その後、このミンチ肉を貯蔵したが、基本的な IMP 分解の様子はブロック肉の場合とさほど差が認められなかった。それゆえ、この形態のヒラメ肉の貯蔵実験が可能であると判断した。

ヒラメを 0°C で貯蔵した場合(図 1A)、IMP 含量は非常に緩やかに減少したが、10 日以降に急激に減少した。しかし、クロラムフェニコールを 150ppm 添加した魚肉では(図 1B)、この時期に認められる急激な減少が消失し、初期からの減少が延長されるように単調に減少した。抗生物質添加区では官能的に腐敗に由来する臭気は認められなかった。このミンチで得られた抗生物質の影響を確かめるため、0.1 M NaCl, pH7.5 に 150ppm になるようにクロラムフェニコールを添加した溶液に浸漬したキムワイプでブロック肉を包み、それをラップで包んで貯蔵した。この場合の IMP 分解もミンチを用いた場合と同じように微生物の生育が抑制され、さらに急激な IMP 分解の現象も消失した。この二つの結果から、微生物の生育を抑制すると IMP 分解が抑制されると結論した。多分、腐敗菌の中に IMP を分解する酵素を生成するものが含まれており、その分泌された酵素により IMP 分解が促進されると結論した。K-値の上昇にかなりの期間を要する場合はこの微生物の影響も考慮しなければならない。

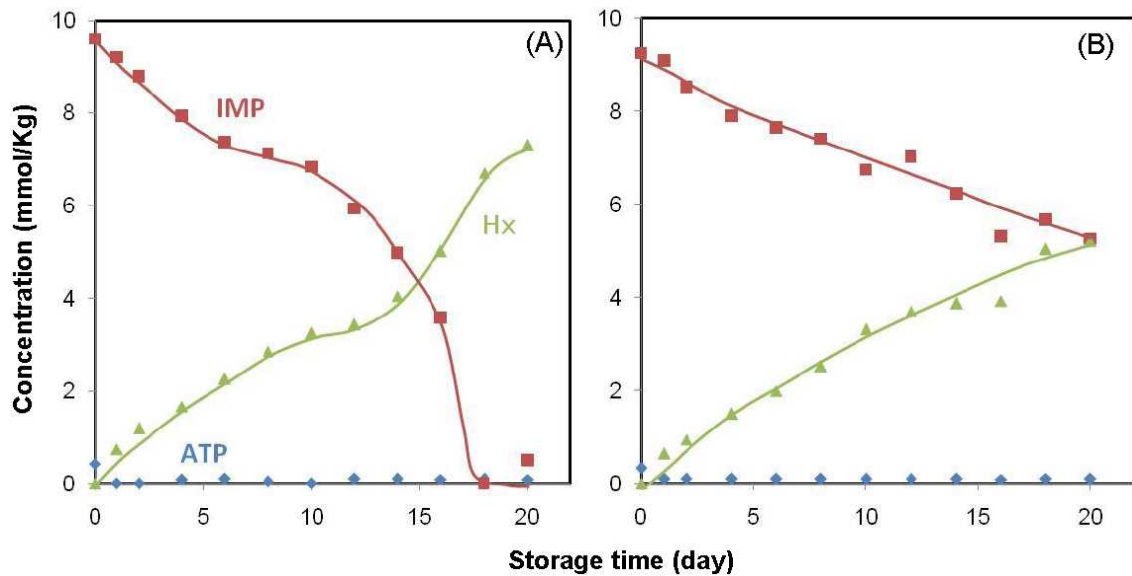


Fig. 1 ヒラメのミンチ肉の0°C保存時のATP関連化合物量の経時変化に対する抗生物質添加の影響 ヒラメのミンチ肉(A)、150ppmのクルラムフェニコールを添加したミンチ肉(B)を0°Cで保存し、貯蔵中のATP関連化合物量の経時変化を追跡した。Nucはヒラメ肉(1g)から10mlの冷却5%PCAで15分抽出し、各含量は肉中の量に変換して表示した。各成分は図中に示した。

さらに、微生物の関与の有無を調べるため、貯蔵温度を0,10,20°Cと変化させて検討した(図2A,B)。すなわち、温度を上げると本来魚肉に含まれているIMP分解酵素の活性が高くなり、微生物の関与が危惧される前にIMP分解が終了してしまうであろうと推定した。抗生物質の有無のミンチ肉でのIMP分解を比較したところ、IMP分解が促進されるのは0°C貯蔵の場合のみで、しかも貯蔵期間が一週間を過ぎた期間からであり、0°Cでも貯蔵初期には添加の影響は認められなかった。さらに、魚肉のIMP分解酵素により急激なIMP分解が起きる10°C(約2.5日でほぼ完全分解)や20°C(5時間で分解)では、抗生物質添加の影響は全く認められなかった。すなわち、用いた抗生物質そのものにIMP分解阻害作用があるわけではなく、微生物の生育を抑制し、結果として、その微生物が産生しているIMP分解酵素によるIMP分解を抑制していることが示された。

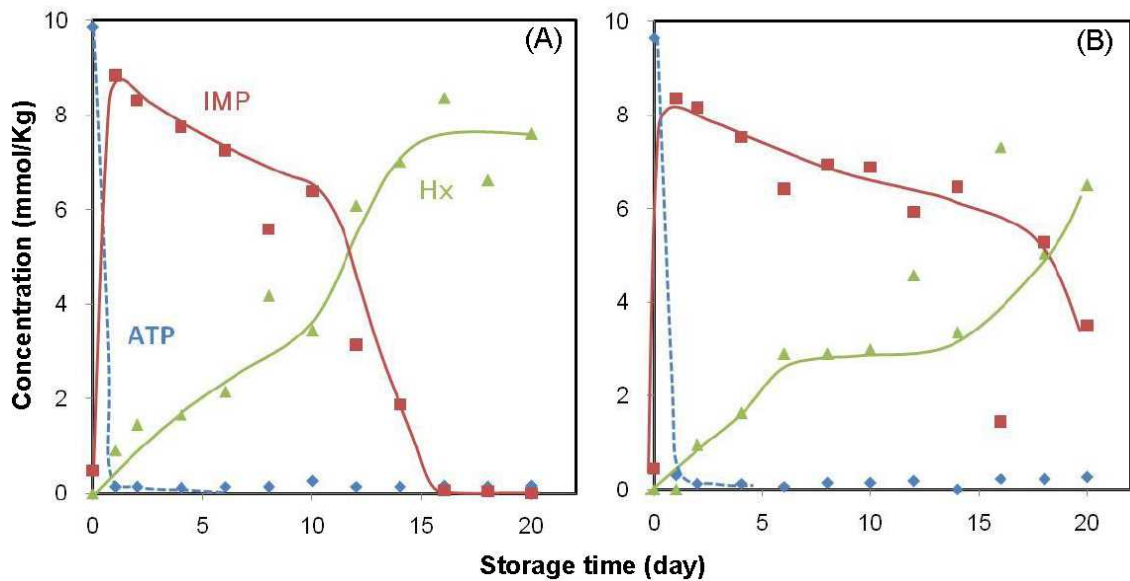


Fig. 2 ヒラメブロック肉の 0°C保存中の ATP 関連化合物量の変化に対する抗生物質添加の影響 ヒラメブロック肉(A)、150ppm のクロラムフェニコールを添加した 0.1 M NaCl, pH 7.5 に浸漬したキムワイプで包んだブロック肉(B)を 0°Cで保存した。ほかの条件、シンボルは図 1 と同じである。

トリトン X100 添加の影響

ヒラメ肉から 0.1M NaCl, pH7.5 で IMP 分解酵素を抽出したところ、この水溶性画分に明らかに IMP 分解活性が認められた。しかし、この得られた活性はヒラメ肉に含まれているすべての IMP 分解活性を反映しているのかは不明である。もし、酵素が膜構造と関係するとすれば、0.1M NaCl, pH7.5 での抽出は難しいと考えられる。そこで、膜を溶解する作用のあるトリトン添加をヒラメのミンチ肉に添加し、IMP 分解が影響を受けるか検討した。ミンチ肉にトリトンを 5% になるよう添加し、0°Cで貯蔵し、IMP 分解を追跡した。この実験では微生物の関与を取り除くため、すべての系にクロラムフェニコールと一緒に添加した。図 4B に示すように、トリトンを添加すると、初期から IMP の分解が促進された。さらに、貯蔵後期に急激に分解が起き、15 日で完全に消失した。この期間ではトリトン無添加の場合は約 50%の IMP が残存していた(図 4A)。後期に急に効果が大きくなる理由は不明であるが、微生物の関与ではないことを腐敗臭が生成しなかったことから確認している。

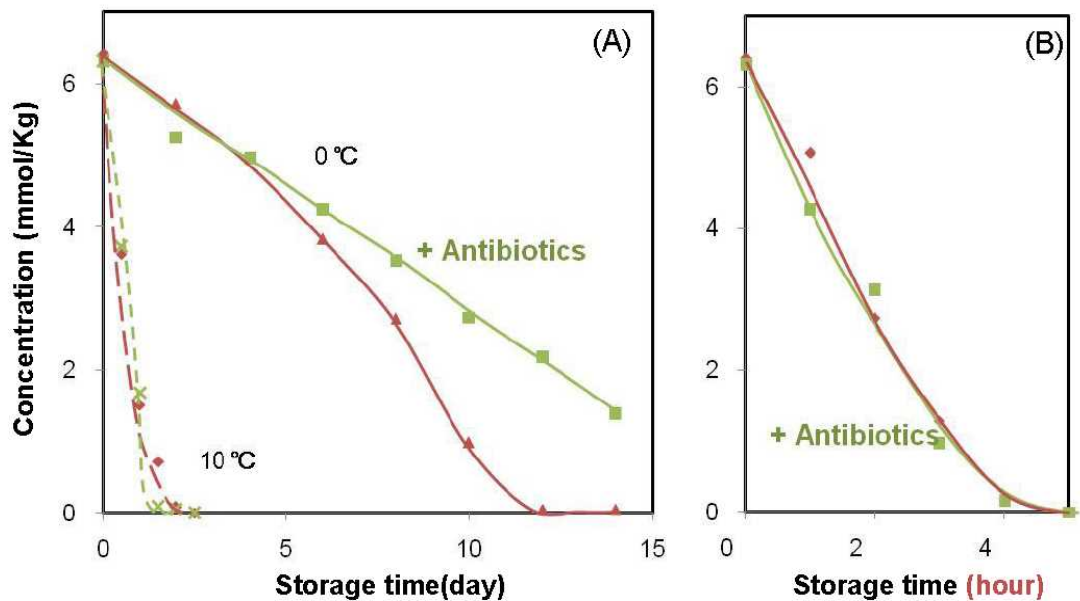


Fig. 3 種々温度での IMP 分解に及ぼす抗生物質添加の影響

図 1 と同じ抗生物質添加の IMP 分解に及ぼす影響を 0、10°C(A)、20°C(B)で比較検討した。得られた分析結果から IMP のみを抜き出し表示している。温度、抗生物質の有無は図中に示した。

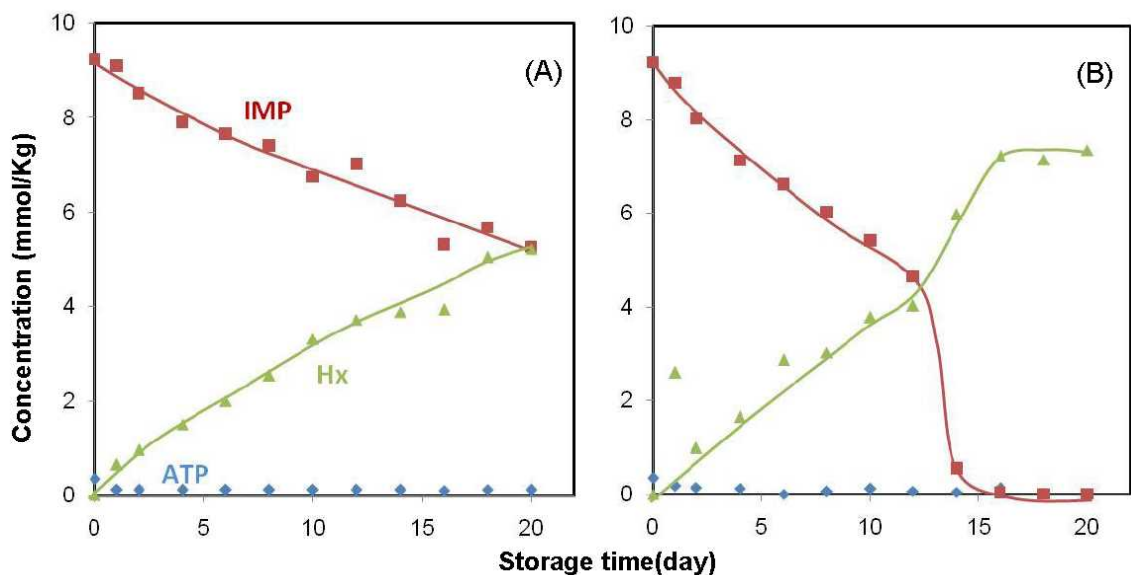


Fig. 4 ヒラメのミンチの貯蔵時の ATP 関連化合物量の変化に対するトリトン

X100 添加の影響

微生物の関与を除くため、150ppm のクロラムフェニコール共存下、トリトン X100 無添加(A)、5%トリトン X100 添加(B)して 0°Cで貯蔵した。それ以外は図 1 と同じである。

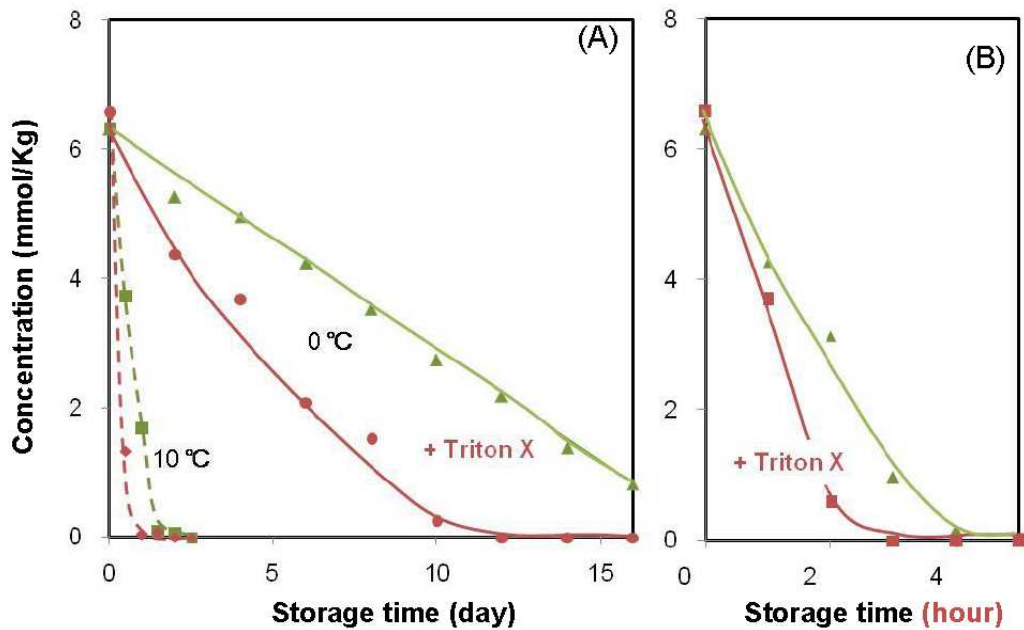


Fig. 5 種々温度での貯蔵時のIMP分解に及ぼすトリトン添加の影響

ヒラメのミンチ肉を5%トリトン X100の有無の条件で0、10°C(A)、20°C(B)の各温度で貯蔵し、IMPの分解の様子を比較した。それ以外は図3と同じである。

トリトン添加のIMP分解への影響を温度を変えて検討した(図5AB)。すると、トリトン添加によるIMP分解促進は抗生物質の場合と異なり、いずれの貯蔵温度でも確認された。この結果は、トリトンは温度に依存せず、普遍的にIMP分解を促進することが示された。この結果からだけでは酵素の局在に膜構造が関与していることを証明できないが、何らかの形に膜構造がかかわっていることが推察された。水溶性抽出画分にもIMP分解活性が認められたことから、完全に膜に埋もれて存在しているわけではないようである。本酵素はトリトンで解離するような膜と緩やかに結合して存在しているのかもしれない。

すでに、魚種によりK値の上昇、すなわちIMP分解の様子が大きく異なることが知られている。この違いが何によって生じるのかは明らかにされていない。本年度の結果から、少なくとも二つの因子を考慮しなければならないことが明らかになった。今後は、本年度に見いだされた知見が普遍的にほかの魚種でも認められるのかを明らかにする必要がある。

3-4 凍結保存時の鮮度（ATP 濃度）は冷凍保存性に影響する

養殖カンパチの凍結時 ATP 濃度と凍結保存中のミオグロビンメト化進行の関係

（鹿児島大学大学院連合農学研究科 井ノ原康太・木村郁夫）

魚肉の色は食品として重要な品質要因である。特に、血合肉や赤身魚の普通肉は色素タンパク質のミオグロビン (Mb) を多量に含むため、鮮度低下や -20°C のような冷凍食品流通温度での貯蔵流通中にメトミオグロビン (metMb) が生成蓄積し、肉色が褐色に変化するため刺身としての商品価値を失う。冷凍貯蔵中の Mb のメト化抑制法としては、 -35°C 以下の超低温保蔵が有効でありマグロの冷凍貯蔵流通に応用されているが、³⁾ 他の魚種では超低温流通はコストが高く利用されていない。本研究で対象とした養殖カンパチやブリを海外へ冷凍品として輸出する際には -20°C で流通しているため、血合肉の褐変が問題となる。 -20°C における魚類血合肉の褐変は Mb のメト化を原因としているが、これを抑制する技術の開発は水産業界から強く要望されているものの有効な方法は開発されていない。なお、血合肉の褐変を抑制するために一酸化炭素処理をしたブリ類の冷凍品が米国など限られた国へ輸出されているが、一酸化炭素処理で生成するカルボキシミオグロビンは独特なピンク色を呈し、さらに鮮度が低下しても色の変化が起きにくいことから消費者が鮮度誤認を起こすことが指摘され、日本や EU などでは許可されていない方法である。⁴⁾ 水産物を高品質な状態でグローバルに流通させるためには、 -20°C 流通で一酸化炭素処理によらない褐変抑制方法の開発が必要である。

我々は、生体内エネルギー物質の ATP (アデノシン三リン酸) がマグロ Mb の熱処理におけるメト化を抑制することを報告した。⁵⁾ 本研究では ATP の機能に着目し、魚肉中に含まれる ATP が -20°C 貯蔵における血合肉のメト化進行に及ぼす影響について明らかにすることを目的に養殖カンパチを用いて試験を行った。すなわち、カンパチを活けしめ後、海水氷溶液中で冷却と放血処理を行うが、この時間を調整することにより ATP 濃度が異なる魚肉フィレを調製した。得られたフィレを -50°C で急速凍結し、その後 -20°C で4ヶ月間貯蔵を行い、筋肉内 ATP

濃度と Mb のメト化進行との関係について分析を行った。血合肉の褐変の程度は Mb のメト化率を指標にして測定したが、研究の初期にマグロ Mb のメト化率測定法である尾藤法⁶⁾をカンパチ血合肉の Mb に応用したところ、活けしめ直後の高鮮度状態の魚肉で色調も鮮やかな赤色を示すものでもメト化率が高い値として算出されることを確認した。ブリ類の血合肉のメト化率測定において尾藤法を応用した場合、活けしめ直後から高い値を示すことが報告されている。⁷⁻⁹⁾そこで本研究では、新たにカンパチ血合肉 Mb のメト化率測定法の開発を行った。方法はカンパチ血合肉から Mb を精製し、精製 Mb からデオキシミオグロビン (deoxyMb)、オキシミオグロビン (oxyMb)、metMb をそれぞれ調製し、各 Mb スペクトルの特性からメト化率を導き出す測定波長と式を求めた。さらに、メト化率測定は血合肉から抽出した粗ミオグロビン (cMb) 溶液を用いるが、cMb 溶液の濁度はスペクトル測定に影響を及ぼすので、溶液の清澄化法についても検討し、カンパチ Mb メト化率測定法を確立した。

3-4-1 材料と方法

材料 鹿児島県桜島沖で養殖されたカンパチ 15 尾 (平均体重 3.14 kg) を活けしめして試料とした。延髄刺殺により活けしめ後、脱血と冷却処理のために海水氷溶液中で 1、2、3、5、7 時間保持した後、各時間に 3 尾からフィレを調製し、それを幅約 5 cm に切断したものをエアーブラスト (-50°C) にて凍結した。これらを真空包装後、-20°C で 0、1、2、3、4 ヶ月貯蔵したものを試験サンプルとした。-20°C 貯蔵期間の影響は同一個体毎に識別して、個々の変化を追跡した。また、対照としたマグロ Mb は、活状態で漁獲され船上で -60°C で急速凍結されたミナミマグロ普通肉 (使用時まで -80°C で保存) から調製した。

カンパチ精製 Mb の調製 カンパチ Mb の調製はマグロ Mb の精製法^{5,11,12)}に従った。すなわち、カンパチ血合肉に 3 倍量の 0.1M KCl 20mM Tris-maleate (pH7.0) 溶液を添加しホモジナイズを行い、遠心分離し上清を得た。この上清の 70-90%飽和硫酸画分を沈殿として集め、これを 0.1M KCl 20mM Tris-HCl (pH7.5) に透析し cMb 溶液を得た。cMb 溶液をフィルター (Minisart RC 15)

で処理したろ液を落合らの方法⁹⁾に準じて 0.1M KCl 20mM Tris-HCl (pH7.5) で平衡化した Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。溶出液の 280 nm と 540 nm の吸光値を測定し Mb を検出した。Mb の純度と分子量は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)により分析した。SDS-PAGE は Laemmli の方法¹³⁾に従い、15%アクリルアミドゲルを使用して行った。

deoxyMb, oxyMb, metMb の調製 カンパチ Mb のメト化率測定法を確立するために、deoxyMb、oxyMb、metMb を調製し可視部吸収スペクトル特性を測定した。deoxyMb は精製 Mb 溶液にヒドロ亜硫酸ナトリウムを 1%添加して調製した。¹⁴⁾ oxyMb は deoxyMb 溶液をスターラーで攪拌して調製した。metMb は泉本らの方法¹³⁾に準じて、精製 Mb 溶液に 3 μ M フェリシアン化カリウムを添加して調製した。deoxyMb, oxyMb, metMb の可視部吸収スペクトル (500-700 nm) の測定は、0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、25°C、Mb (0.1-1.0 mg/mL) の条件で Shimadzu UV-1800 で行った。

Mb メト化率測定法 マグロ Mb メト化率測定法の尾藤法⁶⁾をカンパチ精製 Mb のメト化率測定に応用したところ、高鮮度品から精製した Mb の清澄溶液でメト化率は高い値を示す結果となった。尾藤法では Mb 抽出液の 503 nm と 540 nm における吸光値から 540 nm/503 nm の吸光値比を求め、メト化率と吸光値比に関する関係式よりメト化率を求める。本研究で尾藤法を応用する場合には、これに準じて行った。本研究ではカンパチ Mb のメト化率測定法を新たに確立する必要があったため、カンパチ精製 Mb から調製した deoxyMb、oxyMb および metMb の可視部吸収スペクトルの特性を分析し、メト化率を算出するための測定波長を決定して算出式を求めた。カンパチ Mb メト化率測定法および cMb でメト化率を測定する際に必要となる溶液の清澄化処理方法については実験結果の項で示した。

魚肉 pH の測定 pH の測定は、冷凍状態で細切した魚肉に 5 倍量の氷冷した 20 mM モノヨード酢酸ナトリウム溶液を添加しホモジナイズ後、pH メーターで測定した。

ATP 濃度の測定 魚肉に含まれる ATP 濃度の分析は榎本らの方法¹⁶⁾に準じて行った。ATP 濃度の測定は高速液体カラムクロマトグラフィー自動分析システム(島津製作所製)を用い、GS-320 7E Shodex-Asahipac カラムを使用して行った。測定条件は、分析溶離液として 200 mM リン酸バッファー (pH 2.9) を使用し、検出波長 260 nm で測定した。

統計処理 各試験の測定は 3 検体以上で行い、データの有意差は Student's *t*-test で解析した。

3-4-2 結果

カンパチ Mb の性状 Fig. 1 にカンパチ精製 Mb の SDS-PAGE 図を示した。対照としたミナミマグロ Mb も示したが、いずれも単一バンドとして検出され分子量は約 15000 であった。

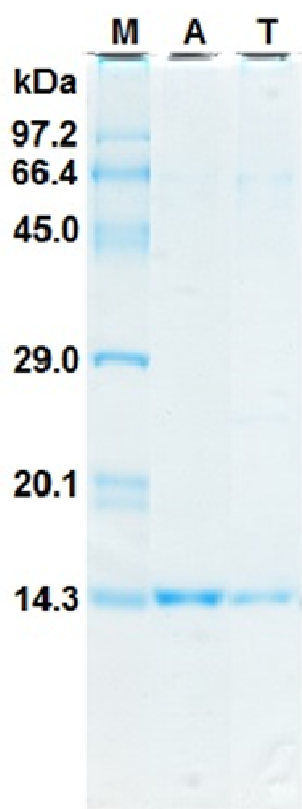


Fig. 1 カンパチ血合筋 Mb とミナミマグロ普通筋 Mb の SDS-PAGE パターン. A: カンパチ精製 Mb, T: ミナミマグロ精製 Mb, M : molecular weight markers

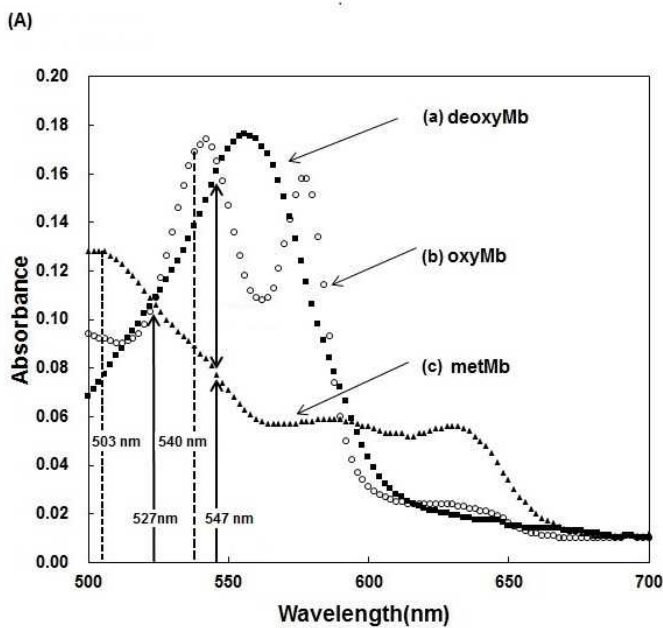
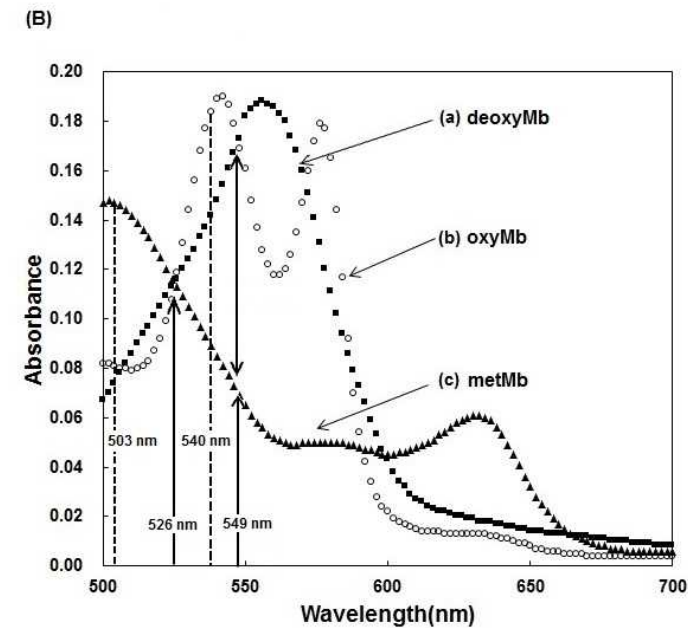


Fig. 2 カンパチとミナミマグロの deoxyMb、oxyMb、metMb の可視部吸収スペクトル. (A) カンパチ Mb, (B) ミナミマグロ Mb, (a) : deoxyMb, (b) : oxyMb, (c) : metMb, Mb : 0.25 mg/mL in 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).

メト化率測定法の検討には、これら清澄化した精製 Mb を使用した。Fig. 2 (A, B) に、カンパチとミナミマグロの deoxyMb、oxyMb および metMb の可視部吸収スペクトルを示した。両魚種共に deoxy 型、oxy 型および met 型 Mb の典型的な吸収スペクトルを示し、さらにこれら 3 状態の Mb スペクトルが一点で交わる等吸収点 (isosbestic point, IS 点と略) が認められた。IS 点の波長は、カンパチでは 527 nm, ミナミマグロで 524 nm であった。

カンパチ Mb メト化率測定法 Mb のメト化率測定は、筋肉から抽出した cMb 状態で測定するので Mb 濃度を調整した測定は困難である。従い、尾藤法においては 503 nm と 540 nm における吸光値比を応用しマグロ Mb のメト化率を算出する。カンパチ Mb のメト化率測定法を確立するために、カンパチ精製 Mb から調製した deoxyMb, oxyMb, metMb の可視部吸収スペクトル (Fig. 2 A) 特性を応用した。すなわち 3 状態の Mb の可視部吸収スペクトル曲線は、527 nm で交わる IS 点を有し、さらに deoxyMb と oxyMb のスペクトルは 547、572、588 nm の 3 波長で交差した。これらスペクトルの特性を応用し、メト化率計算式を以下に導出した。IS 点は 3 状態の Mb が混在しても同一の吸光値を示すので、この波長における吸光値をメト化率算出の基準値とした。さらに 547 nm において deoxyMb と oxyMb の可視部吸収スペクトル曲線が交差するので、547 nm における吸光値 (A) を IS 点である 527 nm の吸光値 (B) で除した値 (A/B 値) をメト化率算出の指標として使用した。メト化率 0% は deoxyMb と oxyMb が混在している状態である。deoxyMb と oxyMb のスペクトルが交差した 547 nm の吸光値 (A₀) は deoxyMb と oxyMb が同じ値を示すことを意味しており、この波長における吸光値を採用した。一方、メト化率 100% の吸光値比は、metMb の 547 nm に於ける吸光値 (C) を IS 点である 527 nm の吸光値 B を用いて求めた C/B 値とした。カンパチ Mb のメト化率 0% の A₀/B 値は 1.45 ± 0.01 (平均値 ± 標準偏差, n=15) を、メト化率 100% の C/B 値は 0.60 ± 0.02 (n=15) を示した。以上の結果からカンパチ Mb のメト化率算出式 (1) が得られた。

$$\text{metMb}(\%) = -134.84 (A/B) + 195.03 \quad \dots \dots (1)$$

なお、A および B は、Mb 溶液の A (547 nm)、B (527 nm) における吸光値である。

カンパチ Mb メト化率測定法と尾藤法との関係 カンパチ Mb のメト化率について、本研究で確立した算出式 (1) と尾藤法との関係について検討した。Fig. 3 には、カンパチ精製 Mb から調製した oxyMb を 25°C で加熱処理した時の可視部吸収スペクトルの経時変化を測定した結果を示した。

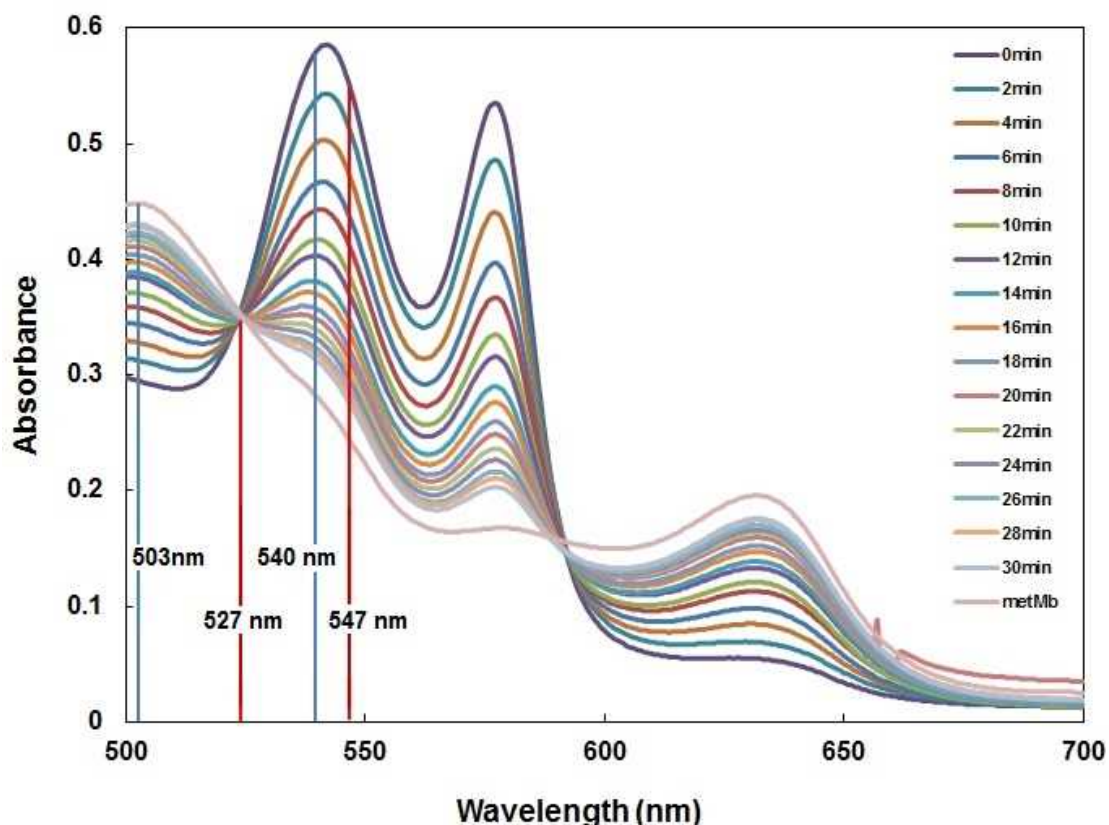


Fig. 3 カンパチ oxyMb を 25°C で加熱処理したときの可視部吸収スペクトルの経時変化. 精製 oxyMb (1.0 mg/mL, 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 25°C で加熱処理. 図中の数字は 25°C における加熱時間を表す.

加熱処理時間に対応して oxyMb の β ピークと α ピークが減少し metMb が生成されることが確認された。算出式 (1) で基準波長とした IS 点の 527 nm は、加熱処理で生成した metMb と oxyMb の混合液においても IS 点の波長として確認できた。Fig. 3 のデータより、カンパチ Mb メト化率算出式 (1) および尾藤法にて

メト化率を求めた結果を Fig. 4 に示した。deoxyMb から調製した直後の oxyMb のメト化率は、今回確立した算出式 (1) では 3%と求められたのに対して、尾藤法で算出すると 23%と oxyMb が主要成分の溶液では大きな誤差が生じることを示した。一方、metMb の濃度が高くなると、尾藤法で得られるメト化率との差が少なくなる結果となった。清澄な精製 Mb を用いても、尾藤法で解析したカンパチ Mb のメト化率は高い値として算出されることが確認された。一方、両方法のメト化率は直線関係を示したので尾藤法で求めたメト化率から今回確立した算出式 (1) で得られるメト化率への換算が可能である。尾藤法で求めた値から、今回確立した算出式 (1) で求められるメト化率に換算する式は以下の通りである。

$$\text{metMb}(\%) = (A - 22.06) / 0.7946 \quad \dots (2)$$

なお、A は尾藤法で求めたメト化率である。

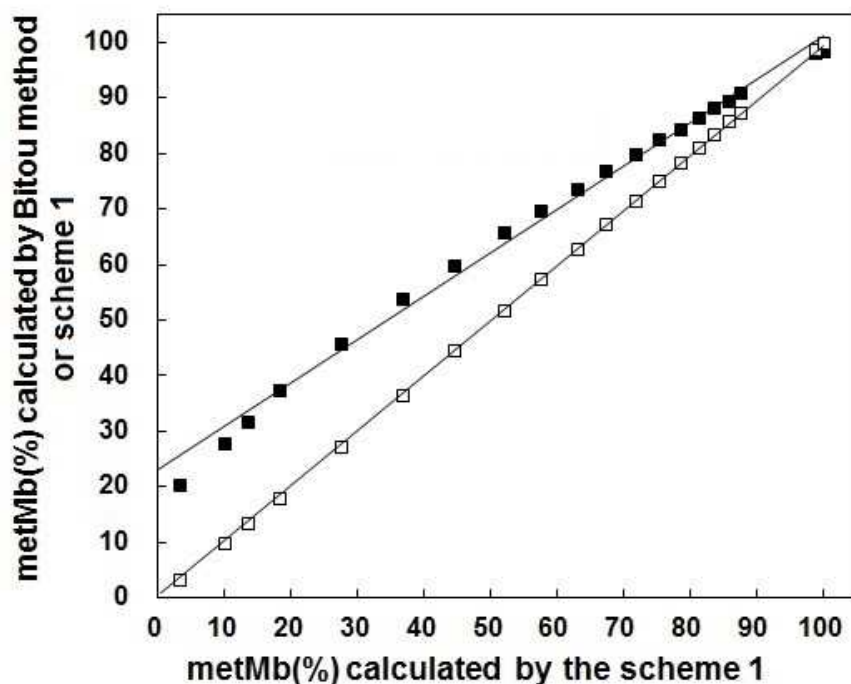


Fig. 4 尾藤法とメト化率算出式 (1) で求められるメト化率の関係 (Fig.3 のデータから算出). (□): メト化率算出式 (1) で求めたメト化率、(■): 尾藤法を応用して求めたメト化率

筋肉粗抽出液での Mb メト化率測定 筋肉 Mb のメト化率測定では、一般的に筋肉から抽出された溶液をフィルター処理して分析に供されている。魚肉のホモジナイズを遠心分離処理して得られる上清には濁りがあり、分光分析に供することができない。濁りを除去するために、ろ紙 (No3) 処理、硫酸分画処理およびゲルろ過処理を行ない、濁りの低減効果と可視部吸収スペクトル分析で得られるメト化率について比較した結果を Fig. 5 および Table 1 に示した。

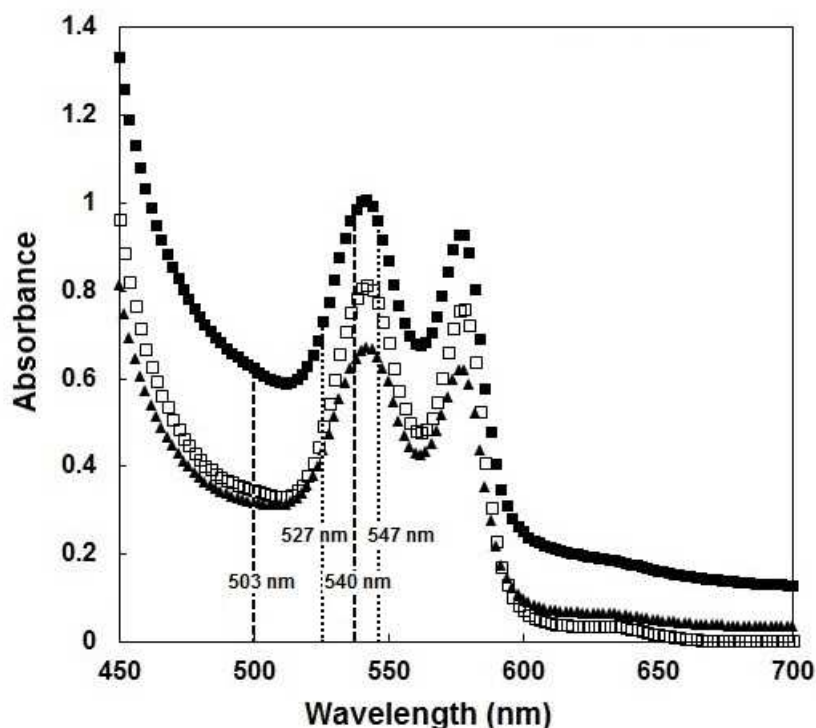


Fig. 5 血合筋粗抽出液, その 55%飽和硫酸処理上清および精製 Mb の 可視部吸収スペクトル. (■): No. 3 ろ紙で処理した粗抽出液, (▲): その 55%飽和硫酸処理上清, (□): 精製 Mb

ろ紙によるろ過処理では濁りは低減せず、濁度があると見かけの吸光値が高くなりメト化率は 26.3%と高い値として計算された。55%飽和硫酸処理の遠心分離上清溶液は清澄化し、可視部吸収スペクトルは濁度の影響が低減したことを示した。このメト化率は 1.9%であり、さらにゲルろ過処理をして精製 Mb として求めたメト化率と同値を示した。以上の結果から筋肉抽出液の 55%飽和硫酸処理遠心分

離上清をメト化率測定溶液として使用した。

Table 1 メト化率算出に及ぼす濁度および硫酸分画処理の影響

	crude Mb filtered by paper filter (No. 3)	Supernatant of crude Mb fractionated with 55% A.S.	Purified Mb
metMb (%)	26.3	1.9	1.9

図5のスペクトルデータからメト化率を算出。

また、Mb 濃度とメト化率との関係について、精製 Mb を用いて測定した結果を Table 2 に示した。本研究で確立したカンパチ Mb メト化率測定法では、Mb 濃度 0.05 から 1.0 mg/mL (547 nm の吸光値では 0.034 から 0.753) において、ほぼ同じメト化率を示した。従い、筋肉抽出液の 55%飽和硫酸処理上清の 547 nm の吸光値が 0.035 以上 0.75 以下の範囲でメト化率を算出することとした。

Table 2 メト化率測定時の Mb 濃度の影響

	0.01mg/ml	0.05mg/ml	0.1mg/ml	0.25mg/ml	0.5mg/ml	1.0mg/ml
metMb(%)	0.74	1.95	1.97	1.97	1.93	1.92
absorbance at 547 nm	0.008	0.034	0.067	0.103	0.253	0.753

各濃度の精製 oxyMb のメト化率と 547nm における吸光値との関係。

カンパチ血合肉の-20°C貯蔵におけるMbのメト化とATP濃度との関係 カンパチを-20°Cで貯蔵した際に血合肉のメト化の進行に及ぼすATPの影響を測定するために、養殖カンパチ15尾を使用し、活けしめ後、海水氷溶液中で各時間浸漬したサンプルを作製した。各サンプル魚肉のATP濃度とpHをFig. 6に示した。

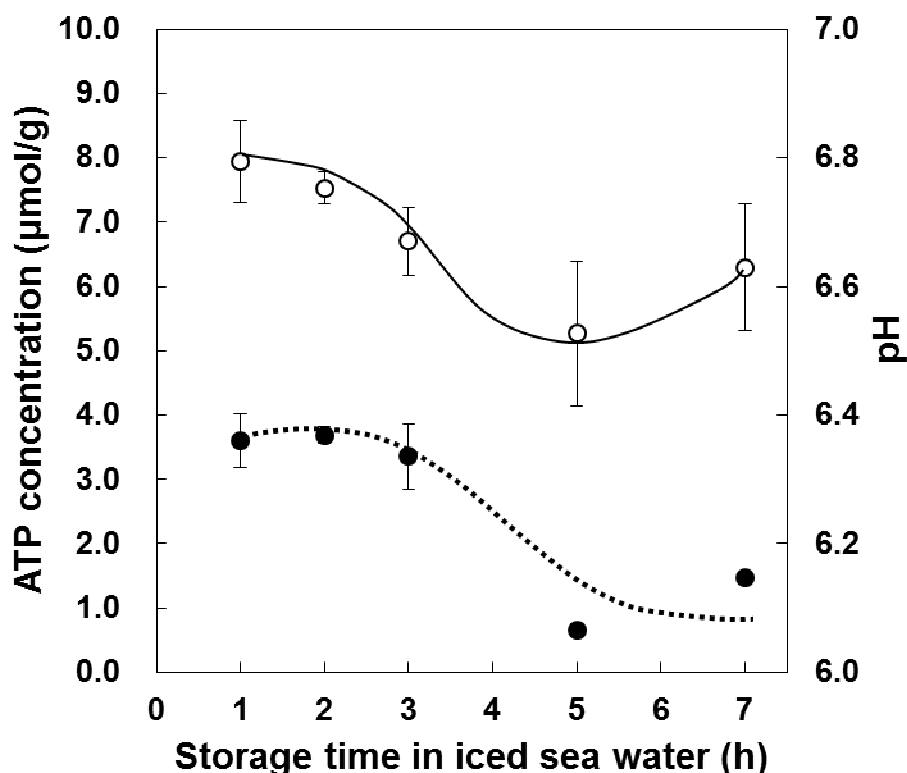


Fig. 6 即殺カンパチ致死後の筋肉内ATP濃度とpHの変化。(氷水保存中)

(●): ATP濃度, (○): pH

活けしめ後1、2時間のサンプルのATP濃度は3 μmole/gと高濃度で残存しているが、3時間頃から減少が始まり、5、7時間のサンプルでは1 μmole/g前後となった。活けしめ後の経過時間毎の魚肉pHは6.8-6.6を示し、海水氷溶液中での放血冷却の経過時間とともに低下傾向を示したが0.2程度の範囲内であった。各サンプルフィレを-50°Cのエア-ブラストで急速凍結後、真空包装し-20°Cで4ヶ月間貯蔵したときの血合肉Mbのメト化率の経時変化をFig. 7に示した。

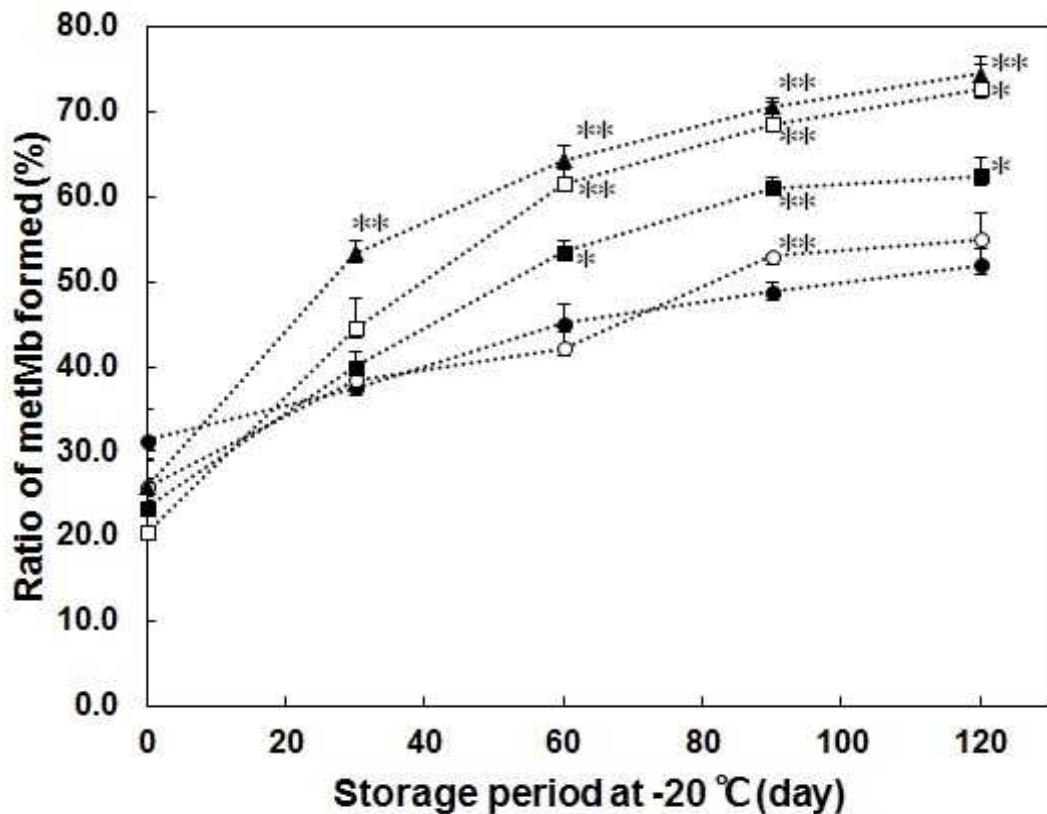


Fig. 7 カンパチ致死後の氷水溶液保持時間が冷凍フィレの-20°Cにおける貯蔵時のメト化進行に及ぼす影響。致死後氷水溶液保存時間: (●) 1h, (○) 2h, (■) 3h, (□) 5h, (▲) 7h. それぞれの時間でフィレ処理をし、それを-50°Cで急速凍結した。冷凍フィレを真空包装し -20°Cで4ヶ月間保存した。 **: ($p < 0.01$) : 1h サンプルに対する有意差. *: ($p < 0.05$) : 1h サンプルに対する有意差..

-20°C 貯蔵期間毎に、活けしめ後の海水氷溶液保持時間が1時間の血合肉 Mb メト化率を基準として、海水氷溶液保持時間が異なる各サンプルのメト化率との有意差を検定した。-20°C 貯蔵開始時（温度調整をするために-20°C 貯蔵1日目に測定）では、平均メト化率に22%から33%とややばらつきはあるが各サンプル間で有意差は認められなかった。-20°C 貯蔵期間と共に各サンプルともメト化率は上昇するが、活けしめ後の海水氷溶液中での保持時間が短く ATP 濃度が高いサンプルでメト化の進行は遅いことを示した。-20°C 貯蔵30日のメト化率では、

活けしめ後海水氷溶液浸漬 1 時間のサンプル (メト化率 37.6%) に対して 7 時間のサンプルのみがメト化率 57.3% で有意差 ($p < 0.01$) を示した。貯蔵 60 日では活けしめ後 1 時間のサンプル (メト化率 45.1%) に対して 3、5、7 時間のサンプルのメト化率は、それぞれ 53.5%、61.6%、64.3% で有意差 ($p < 0.05$) を示した。貯蔵 90 日では活けしめ後 1 時間のサンプル (メト化率 48.8%) に対して 2、3、5、7 時間のサンプルにおいて有意差 ($p < 0.01$) を示した。貯蔵 120 日では、活けしめ後 1 時間のサンプル (メト化率 51.9%) に対して有意差 ($p < 0.01$) を示したのは、3、5、7 時間のサンプルであり、活けしめ後 7 時間ではメト化率が 70% に達した。以上の結果は、凍結前の魚肉の鮮度状態 (ATP 濃度の高低) が凍結保蔵中の血合肉のメト化進行に影響することを示唆している。

3-4-3 考察

本研究では、ブリ類の冷凍流通で技術課題となっている -20°C など通常の冷凍食品や冷凍水産物の流通貯蔵温度における血合肉の褐変に対する筋肉内 ATP の抑制作用を明らかにすることを目的とした。研究には養殖カンパチを用いたが、カンパチ Mb のメト化率測定法の検討が必要であることを確認したので、カンパチ Mb メト化率測定法の確立を行った。対照とした魚類 Mb のメト化率測定法は尾藤法⁶⁾である。マグロ Mb のメト化率測定法である尾藤法はマグロ以外の魚類 Mb のメト化率測定法としても応用されてきているが、魚種によっては血合肉 Mb のメト化率と色調が合わないことも報告されている。^{7-10, 15)} 本研究においても高鮮度で色調も鮮やかなカンパチ血合肉の Mb メト化率を尾藤法で測定すると、活けしめ直後でもメト化率が 20-30% を示すことを確認した。尾藤法でメト化率が高くなる原因としては、Mb 抽出液の濁度の影響が指摘されている。¹⁵⁾ しかしながら、本研究では精製した Mb 溶液を用いてメト化率を測定しているため溶液は清澄であり濁りの影響は無いと判断されるが、例えば Table 1 に示したカンパチ精製 Mb のメト化率 (1.9%) を尾藤法で計算すると 14.9% となった。Mb 溶液が清澄であるにもかかわらず尾藤法ではカンパチ Mb のメト化率は高い値を示すが、我々はこの原因として尾藤法で採用した 503 nm における oxyMb と metMb の吸光値の魚種特性が影響したと推察した。尾藤法では、oxyMb の β ピークの最

大吸収波長に近い 540 nm の吸光値と metMb の最大吸収波長で oxyMb との吸光値差が大きい 503nm の吸光値の比を利用してメト化率を算出する。Fig. 2 には (A)カンパチ Mb と (B)ミナミマグロ Mb の 3 状態の Mb の可視部吸収スペクトルを示したが、503 nm におけるミナミマグロとカンパチそれぞれの oxyMb と metMb の吸光値との関係を吸光値比 (oxyMb/metMb) で比較すると、ミナミマグロで 0.59 ± 0.06 ($n = 11$)、カンパチで 0.66 ± 0.05 ($n = 11$)と大きく異なる結果となった。すなわち、カンパチ Mb は 503 nm における oxyMb の吸光値がマグロ Mb に比べて metMb の吸光値に近い値を示しているため、尾藤法でカンパチ Mb のメト化率を算出すると metMb がほとんど生成していない場合でもメト化率が高く算出される結果となることが確かめられた。そこで本研究ではカンパチ Mb のメト化率算出法を新たに検討した。方法は deoxyMb, oxyMb, metMb の吸収スペクトルの特徴を利用したものであり、3 状態の Mb のスペクトルが 1 点で交わる IS 点の波長 (527 nm) の吸光値 (IS 値と略) を基準として、deoxyMb と oxyMb のスペクトルが交わる波長 (547 nm) の吸光値と同波長における metMb 吸光値のそれぞれの IS 値との比を求め、メト化率算出式 (1)を導出した。本メト化率算出法のカンパチ Mb への有用性は、Fig. 3, 4 の試験において検証した後、カンパチ血合肉の冷凍保蔵における Mb メト化率の測定に応用した。

Mb のメト化率測定では筋肉から抽出した cMb 溶液について吸光値を測定するが、カンパチ血合肉から抽出した cMb 抽出液は油脂を含み濁りがあるため 0.45 μ フィルターでの処理ができなかった。我々は溶液の清澄法として硫安分画法の応用を検討した。(Fig. 5, Table 1) 精製 Mb の調製では Mb 粗抽出液から夾雑タンパク質を除き、さらに次工程でゲルろ過法による精製を行うために Mb 濃縮を飽和硫安濃度 70-90%で行うが、1 回目の硫安分画処理後の遠心分離上清は清澄化することを経験していた。そこで硫安分画 1 回処理において遠心分離上清が清澄化する飽和硫安濃度を検討したところ、45 から 55%で清澄な溶液が得られメト化率が一定の値を示すことを確認した。(Table 3) また、精製した Mb および精製 Mb から調製した metMb の可視部吸収スペクトルは 55%飽和硫安溶液中と硫安を含まない溶液中で差がなく、精製 Mb のメト化率は硫安無しで 10.4%、硫

安存在で 11.5%を示したので、55%飽和硫酸存在は Mb の可視部吸収スペクトルの測定とメト化率の算出に影響は無いと判断した。(Fig. 8) 以上の結果からカンパチ血合肉 Mb のメト化率測定は、ろ紙 (No.3) でろ過した cMb 抽出液を 55% 飽和硫酸で分画し、遠心分離して得られる清澄上清液の 527 nm と 547 nm における吸光値を測定する方法として確立した。

Table 3 粗 Mb 溶液を各濃度の飽和硫酸で分画処理をして得られる溶液の吸光値とメト化率

	Supernatant of saturated A.S. fractionation			
	40% A.S.	45% A.S.	50%A.S.	55%A.S.
547 nm	0.209	0.195	0.186	0.178
527 nm	0.148	0.134	0.127	0.121
metMb(%)	4.61	1.92	1.93	1.94

粗 Mb 溶液を 40, 45, 50, 55%飽和硫酸処理をして遠心分離上清得た. そのスペクトル吸光値を測定し、メト化算出式 (1) でメト化率を求めた.

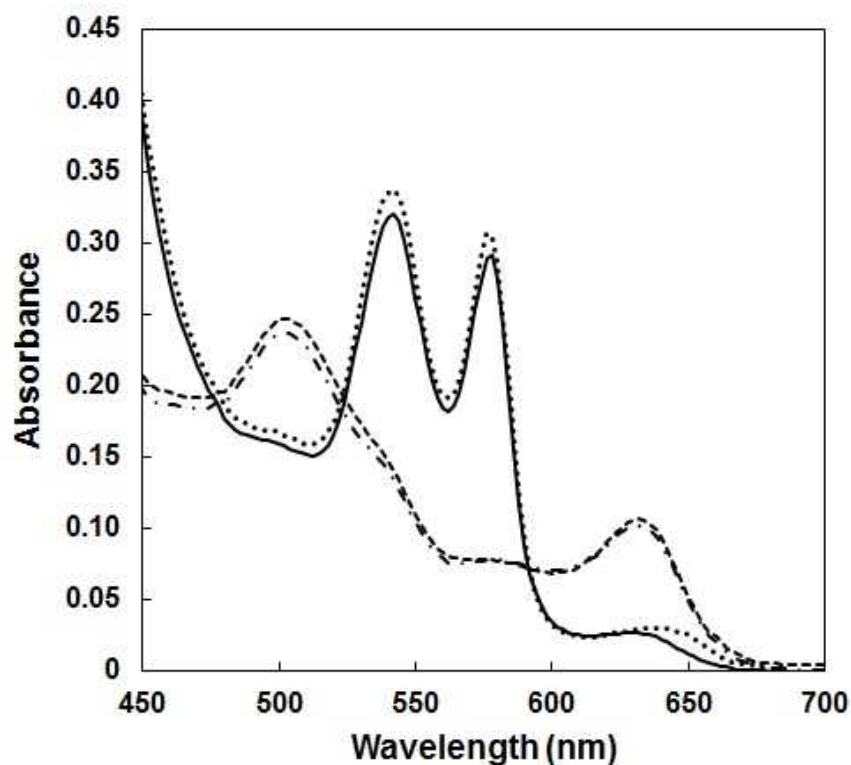


Fig. 8 55%飽和硫安の oxyMb と metMb の可視部吸収スペクトルに対する影響.
oxyMb: 硫安無し(—), 硫安あり.(…), metMb: 硫安無し.(-·-),
硫安あり(---)

本研究で対象としたカンパチ冷凍品の輸出流通では、冷凍コンテナの温度は -20°C であることを検証している。この温度での流通貯蔵では1から2ヶ月程度で血合肉の褐変が進行することを我々は経験している。これは、Fig. 7の筋肉内ATP濃度が低い状態でのカンパチを冷凍貯蔵した場合に1から2ヶ月でMbのメト化率が50%を超えた結果に対応している。一方、Fig. 7の結果から、筋肉内ATP濃度が高い状態で冷凍貯蔵するとMbのメト化率の上昇速度は遅くなることが示された。図には示さないが -20°C 貯蔵におけるメト化率上昇速度と筋肉内ATP濃度との関係を解析したところ、強い相関($r = -0.715$)を示すことを認めた。筋肉内ATPに着目した水産物の冷凍変性抑制に関する研究報告は限られているが、緒方らは生体内濃度のATPが存在すると筋原線維タンパク質の冷凍変性は抑制され、数ミリモルのATP存在下での -20°C における筋原線維タンパク質の変性速度はATP非存在下の -30°C 貯蔵に匹敵することを報告している。¹⁸⁾ また、前報においてマグロMbの 30°C 熱処理におけるメト化は生理的な濃度のATPにより抑制されることを報告した。⁵⁾ Fig. 7の結果は、 -20°C のような温度帯での貯蔵中に進行するMbのメト化は、筋肉内ATPにより抑制されることを示唆している。魚肉鮮度と冷凍貯蔵温度およびメト化の進行に関しては、橋本らにより興味深い報告¹⁹⁾がなされている。すなわち、K値0.8以下の高鮮度状態で冷凍したマグロ肉は -20°C 冷凍貯蔵でもメト化の進行は遅く、 -40°C 貯蔵と同等の保蔵効果が期待されることを報告している。報告された鮮度の指標がK値でありATP濃度に関する記載はないものの、我々が本研究で得た結果に対応する内容であると推察している。Mbのメト化がATPにより抑制されるメカニズムについては、Mbの可視部吸収スペクトル、Mb蛍光、CDスペクトル、Mb分子径および表面電荷等に関する分析からATPによりMb分子の形状が変化することを示唆する結果を得ているが、⁵⁾さらに詳細な研究を進めている。

本研究で得られた成果は、水産業界で解決されていない技術課題である -20°C のような比較的温度の高い冷凍貯蔵時に発生する Mb のメト化を抑制する技術開発に資するものと考えている。筋肉内に元々含まれている ATP を活用する技術であり特別な添加物を必要としないが、魚肉の凍結時に高濃度の ATP が残る活けしめ法や致死後の ATP 分解を抑制する温度管理等、水揚げ時から一貫した高度な鮮度管理技術の確立が必要である。本研究成果は、冷凍カンパチを香港などに輸出している企業で応用されている段階にある。

4. 総括

4-1 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しての品質・鮮度指標の開発・実用化のために必要とされる基礎的な調査研究を進めた。

1) 今年度は、昨年度に引き続き鮮度指標候補の ATP 核酸関連化合物の消長と K 値変化および保水性との関係等について、ティラピア、シマアジ、ニジマス・マイワシを対象に致死条件（即殺あるいは苦悶死）、保管温度（ $-5, 0, 5, 10^{\circ}\text{C}$ ）の影響を調査した。ティラピアでは K 値が同じでも保存温度が異なると保水性に差が認められた。シマアジでは保存 12 時間における保水性を、保存温度 $0, 5, 10^{\circ}\text{C}$ で比較したところ保水性は $10 \cdot 5^{\circ}\text{C} > 0^{\circ}\text{C}$ を示した。ATP の分解に差が見られている。ニジマスの IMP 分解速度は速いのに対して、マイワシでは K 値上昇速度が遅い傾向を示した。各魚種に特有な経時的変化が確認できた。

2) ATP 核酸関連化合物の消長について、ヒラメ肉を 0°C で 20 日間という長期に保存した際に、2 週間経過頃から急激な IMP の分解と Hx の生成の 2 相性を示すが、これは IMP 分解微生物の影響であることが明らかとなった。長期のチルド保存における品質を K 値で評価する場合に、微生物の影響を考慮する必要があることが示された。また、IMP 分解酵素は K 値の魚種特性に関与する酵素であるが、その性状はきちっと調べられていない。IMP が大量に生成しても分解が進まない原因について、膜結合型酵素であることが推察されることから、膜タンパク質溶解剤の界面活性剤（トリトン X）の作用を検討し、本酵素はトリトンで

解離するような膜と緩やかに結合していることを示唆する結果を得た。今後、IMP 分解酵素の魚種差を解明するための検討を進める予定である。

3) 水産物のグローバル流通では、大部分が冷凍状態での輸送で行われている。マグロ等では冷凍保存中の魚肉色調の褐変化(メト化)を防止するために、 -40°C 以下の超低温凍結・貯蔵が行われるが、他の魚種では一般的な冷凍食品の流通温度である -20°C で貯蔵が行われている。その場合、Mb のメト化が進行し、商品価値を失うことが問題とされてきている。本研究で ATP が Mb のメト化の進行を遅延させ、2~3ヶ月の流通・貯蔵が可能となることが明らかにされた。すなわち、魚肉中の ATP 濃度は鮮度の指標となるだけでなく、凍結貯蔵中の品質変化を抑制する重要な作用があることが明らかとなった。今後、水産物冷凍品の品質を評価する指標として、ATP 濃度が活用されることになるであろう。

さらに、Mb のメト化率を測定する簡易法として、従来、マグロ Mb 用に確立された尾藤法が使われてきたが、他の魚種 Mb のメト化率測定に応用できないことが明らかとなった。そのため本研究ではカンパチ Mb のメト化率測定法を確立した。

以上の様な K 値変化や K 値変化の魚種特性および他の指標との関係、さらに冷凍品質に影響する ATP 作用に関する基礎データの収集を詳細に行いデータベース化すれば、各魚種の鮮度・品質について科学的な評価を行うことが可能となる。

4-2 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 値分析の有効性が示されている。世界の流通市場で科学的な裏付けが明らかな魚の鮮度と品質を評価する方法として K 値および本事業で研究している他の評価方法(保水性、ATP 濃度と冷凍中のメト化進行、魚種ごとの Mb メト化率簡易測定法など)の応用が可能となるように、現在グローバル流通されている魚種に調査研究を集中し、各魚種の死後における ATP 関連化合物の消長と各品質指標との関係を測定し、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°C 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など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に取り組む。

文献

- 1) 平成 24 年度 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、一般社団法人 日本海事検定協会ホームページ
- 2) 平成 25 年度 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、一般社団法人 日本海事検定協会ホームページ
- 3) 岡崎恵美子. ミオグロビンのメト化. 「新版 食品冷凍技術」(新版 食品冷凍技術編集委員会編) 社団法人日本冷凍空調学会, 東京. 2009; 87-89
- 4) ブリへの一酸化炭素の使用について. (平成 9 年 9 月 19 日) 衛乳第 263 号衛化第 124 号. 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長, 食品化学課長, 東京. 1997.
- 5) Inohara K, Kimura I, Yuan C. Suppressive effect of ATP on autoxidation of tuna oxymyoglobin to metmyoglobin. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 503-511
- 6) 尾藤方通. 冷凍マグロ肉の肉色保持に関する研究-1. 冷凍貯蔵中の変色と水抽出液の吸光曲線との関係. 日本水産学会誌 1964; **30**: 847-857
- 7) Tsukamasa Y, Kato K, Bimol CR, Ishibashi Y, Kobayashi T, Itoh T, Ando M. Novel method for improving the antioxidative properties of fish meat by direct injection of sodium L-ascorbate into the blood vessels of live fish. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 349-355
- 8) 石原則幸, 荒木利芳, 井上美佐, 西村昭史, 朱 政治, レカ・ラジュ・ジュネジャ, 森下達雄. 緑茶ポリフェノール給与飼育によるブリ筋肉氷蔵中の酸化防止効果. 日本食品科学工学会誌 2000; **47**: 767-772

- 9) Arai H, Tani W, Okamoto A, Fukunaga K, Hamada Y, Tachibana K. Suppression of color degradation of yellowtail dark muscle during storage by simultaneous dietary supplementation of vitamins C and E. *Fish. Sci.* 2009; **75**: 499-505
- 10) 大山憲一, 栩野元秀, 植田 豊, 竹森弘征, 多田武夫. 養殖ブリの血合筋の褐変抑制に及ぼすオリーブ葉粉末添加飼料の投与効果. *水産増殖* 2010; **58**: 279-287
- 11) 落合芳博, 渡辺良明, 内田直行, 小澤秀夫, 渡辺終五. イワシクジラ骨格筋ミオグロビンの生化学的および熱力学的性状. *日本水産学会誌* 2010; **76**: 686-694
- 12) 落合芳博. クロマグロで発生したヤケ肉における肉質の変化および水溶性タンパク質の変性. *日本水産学会誌* 2010; **76**: 695-704
- 13) Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **27**: 955-960
- 14) 三浦弘之, 泉本勝利, 塩見雅志. ミオグロビンの自動酸化速度の測定法について. *帯広畜産大学学術研究報告* 1979; **11**: 389-401
- 15) 泉本勝利, 山口恭史, 三浦弘之. 食肉のメトミオグロビン形成とメトミオグロビン還元活性に及ぼす脱酸素と炭酸ガスの影響. *帯広畜産大学学術研究報告* 1985; **14**: 219-225
- 16) 槌本六良, 三島敏雄, 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. *日本水産学会誌* 1985; **51**: 1363-1369
- 17) 江平重男, 内山均, 角田聖斉. マグロの品質判定における簡易メト化率測定法の吟味. *日本水産学会誌* 1984; **50**: 269-274
- 18) 緒方由美, 進藤譲, 木村郁夫. ATPによる魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制. *日本水産学会誌* 2012; **78**: 461-467
- 19) 橋本周久, 渡部終五. マグロ肉の凍結貯蔵中における肉色および保水性の変化. *日本水産学会誌* 1983; **49**: 203-206

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 27 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
委員	袁 春紅	国立大学法人鹿児島大学水産学部 准教授
委員	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
委員	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
委員	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
委員	山本 均	一般社団法人日本海事検定協会 食品衛生分析センター長
事務局	山口範章	一般社団法人日本海事検定協会 食品衛生分析センター 課長
	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
	蔭山 聖	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 26 年 6 月 12 日（鹿児島大学水産学部）
第 2 回 平成 26 年 12 月 14 日（北海道大学水産学部）
第 3 回 平成 27 年 3 月 9 日（東京海洋大学）