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 28 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。

平成 26 年度は、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った。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。

今年度は、各種魚肉中の K-値上昇を決定する IMP 分解酵素に関する研究、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、鮮度変化測定法として遊離アミノ酸の成分変化、魚肉の透明感、乳酸生成量、蛍光指紋について検討を行った。また、各種魚類ミオグロビンのメト化率測定法について確立したので報告する。

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
　3-1 各種魚肉中のK値上昇を決定するIMP分解活性の比較　6
　3-2 マダイ、ギンザケの冷蔵保存中のATP関連化合物変化と
　　肉色透明感遊離アミノ酸生成などの品質評価指標の検討　17
　3-3 ０，５，10℃で保管したクエのK値とpHの変化　23
　3-4 蛍光指紋による魚肉鮮度の非破壊測定の試み　28
　3-3 各種魚類ミオグロビンのメト化率測定法確立　32

4. 総　括　46
　4-1　本研究により得られた知見・成果　46
　4-2　今後の方針　47

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、各種魚肉中の K 値上昇を決定する IMP 分解酵素に関する研究、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、鮮度変化測定法として遊離アミノ酸の成分変化、魚肉の透明感、乳酸生成量、蛍光指紋について検討を行った。また、各種魚類ミオグロビンのメト化率測定法について確立したので報告する。

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ている。

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言いがたいとの指摘がある。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

3-1 各種魚肉中のK-値上昇を決定するIMP分解活性の比較

北海道大学大学院水産科学研究院
今野敬子　今野久仁彦

魚肉貯蔵中のK値上昇は魚種により大きく異なることが知られている。ATPから始まる連続した分解経路において、全体の反応の進行、すなわちK値上昇を決定するのはIMPから HxRへのIMP分解活性である。昨年度の研究成果から、ヒラメのIMP分解酵素の一部は水溶性であり，筋肉から抽出できるが，一部は不溶性画分に残存すること、しかし、トリトン X100 を含む溶液では容易に溶解することから、酵素の存在状態に関し、膜構造の関与も示唆された。今年度は、これらの成果を受け、K 値上昇速度の異なる種々魚種を用い、IMP 分解活性に対する様々な因子の影響について明らかにし、何がK値上昇を決定しているのかを知ることを目的にした。

方法

試料として、活魚店で購入したヒラメ（養殖，天然)、アイナメ、ホッケ、マゾイおよび硬直前の高鮮度のマダラ、ニシンを用いた。魚肉の貯蔵は、即殺後、皮膚、骨などを取り除いたフィレから魚肉(5－10ｇ)を切り出し、個々にラップに包み、設定温度で保存した。所定の貯蔵期間後に取り出し、その 1g を用い、一昨年確立した方法で核酸関連成分（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。

魚肉中のIMP分解活性を測定するため、以下の方法で試料を調製した。魚肉2gを10 mlの0.1 M NaCl,、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)中でそのまま15000 rpm、30秒ずつ４回ホモジナイズし、微細化した。それを透析バッグに詰め、同液に十分透析した。IMP分解活性はIMPからの生成する無機リン酸(Pi)を定量して求めるので、魚肉由来の Pi は大きな測定障害となる。そのため、ホモジネートは十分に透析する必要があった。魚肉には10 mM程度のATPが含まれるので、それに含まれるすべてのリン酸がPiに変化すれば､30 mMと計算される｡これがホモジネートに含まれていれば、最終反応組成液0.8 mlに 0.2 mlの粗酵素を加えて測定するので、酵素由来のPiは7.5 mMとなり、用いたIMP濃度 1 mMを大きく上回る

ことになる。測定に影響のない程度（最大で 0.1 mM と仮定すれば）750 倍の希釈が必要である。現実的には、ホモジネートが粘性を示すため、拡散の効率が悪く、内容物の 20 倍量程度の透析外液を用い、外液の 3 回の交換が必要であった。
IMP 分解活性の測定は 0.1 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl2、1 mM IMP の反応組成を用い、25℃で反応させた。IMP 分解により生じた Pi 量は ATPase 活性測定に準じて、比色法で定量した。目的に応じて、反応温度、pH を変えた。さらに、基質を ATP にし、その後の連続した分解経路も解析した。この場合の反応進行は生成成分の HPLC による分析の手法を用いて定量した。
ホモジネートに含まれる酵素活性の水溶性画分への活性の回収は、上記のホモジネートを 20,000 xg で 20 分遠心分離し、上澄みを水溶性酵素画分として用いた。さらに必要に応じ、抽出の際にトリトン X100 を加えた。
さらに、IMP 分解酵素の熱安定性を比較するため、ホモジネートを種々温度で 30 分加熱し、残存活性を求めた。

結果

種々魚肉の貯蔵中の K 値上昇の比較

様々な魚種の魚肉を 0 および 10℃で保存した時の K 値上昇を比較した(図 1 a, b)。

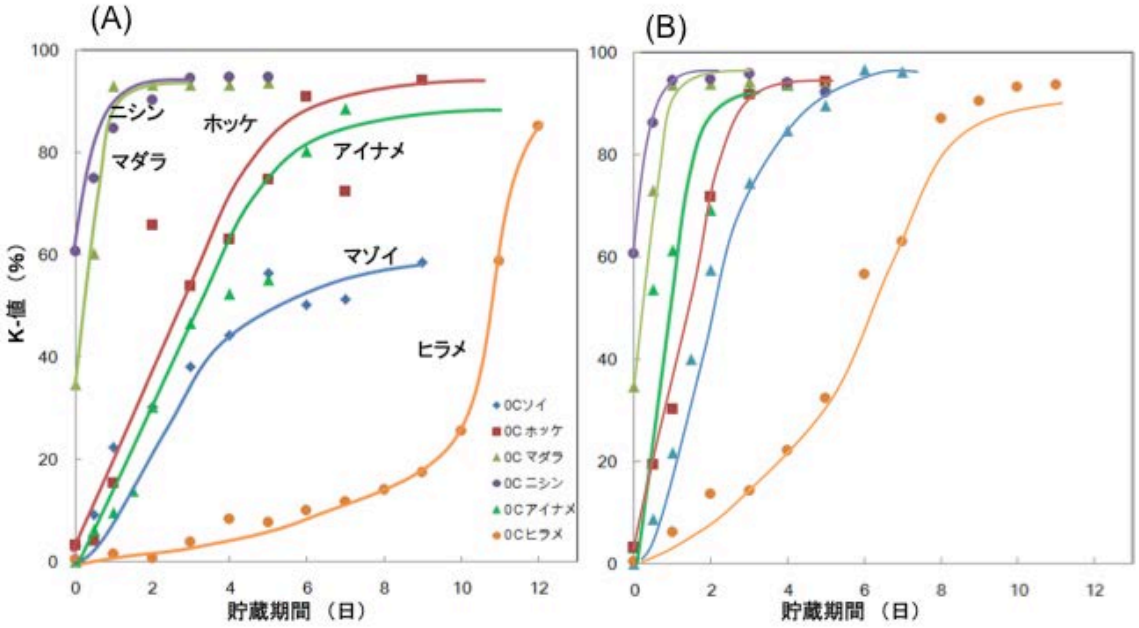


Fig. 1 魚種による貯蔵中の K 値上昇の比較
(図中に示した魚種の魚肉を 0℃(A)および 10℃(B)で保存し、K 値変化を追跡した。)

ニシン、マダラはかなり新鮮な魚体を用いたつもりであったが、すでにかなり K 値が上昇していた。0℃一日貯蔵後にはすでに 100%に達した（図１a)。用いた 6 種のうち、ヒラメはもっとも K 値上昇が緩やかに進行した。中間的な変化を示したのがアイナメ、ホッケ、マゾイであった。いずれも実験開始時の K 値は 0%であった。ヒラメの 0℃での 10 日以降に認められる急激な K 値上昇は昨年の結果から、腐敗微生物が産生した IMP 分解酵素によるものである。これらの傾向は 10℃（図 1b）でも同じであったが、10℃の方が短期間で反応が進行した。これら数種の魚類における K 値上昇の違いは、これまでの研究結果を支持するものであった。

種々魚肉 IMP 分解酵素活性に及ぼす種々因子の影響

魚種間での K 値上昇の違いの原因を知るため、それぞれの魚肉における IMP 分解活性の大きさを比較検討した。昨年の成果から、一部の IMP 分解酵素は低イオン

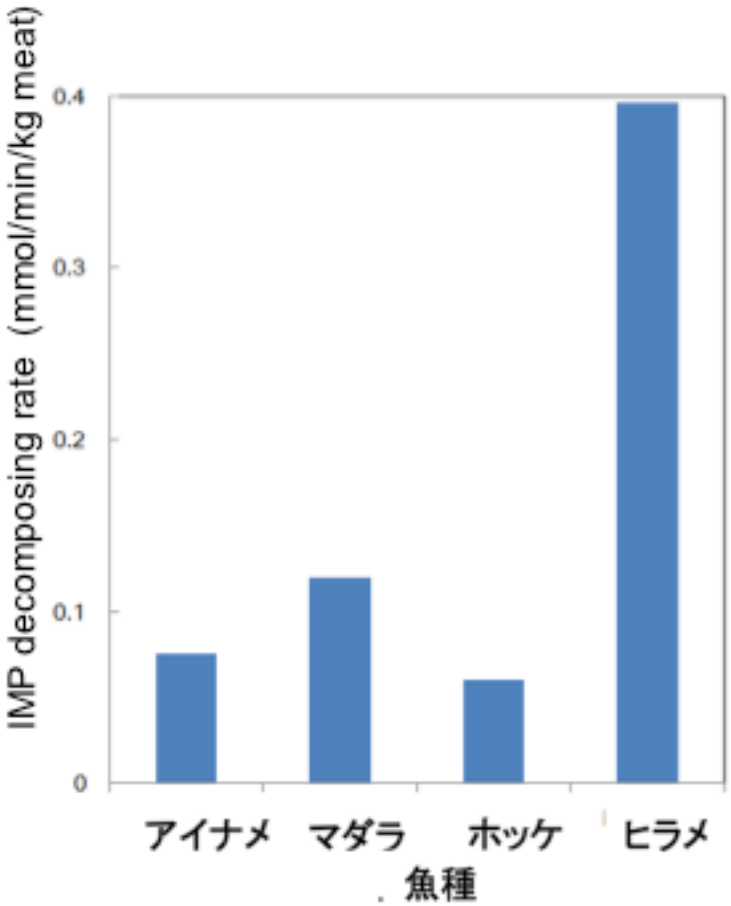


Fig. 2 各種魚類筋肉の IMP 分解酵素活性レベルの比較

(魚肉ホモジネートを用い、IMP 分解活性を比較した。活性は 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl2, 1 mM IMP の条件で 25℃で測定した。さらに、魚肉 1g あたりの活性をして表示した。)

強度の溶液に溶解しないことが知られているので、ここでは粗酵素を抽出する方法を取らず、魚肉をそのままホモジナイズしたもの粗酵素として利用することにした。なお、魚肉由来の Pi を取り除くため、十分透析した試料を用いて検討した。4 種の魚種の IMP 分解活性を測定した結果を図 2 に示す。
ここでは魚肉 1g あたりの活性としてあらわした。得られた活性を比較すると、K 値上昇が最も遅いヒラメの活性が他の K 値上昇が比較的早い魚種より著しく高かった。一番活性の小さいホッケとヒラメの差は 8 倍程度であった。すなわち、K 値上昇の違いは、単純に魚肉の示す IMP 分解活性の大小では説明できなかった。
このホモジネートの示す IMP 分解活性は非常に低く、魚肉を約 6 倍に希釈したことになるホモジネート 0.2 ml を 0.6 ml の反応組成液に加え（総量 0.8 ml）、25℃で 3 時間くらいの反応を行うことでやっと IMP 分解により生成した Pi が定量できる程度であった。すなわち、魚肉中のタンパク質含量を 15%と仮定すると、反応組成中のタンパク質濃度は 6.25mg/ml と計算され、この程度の濃度でないと測定できないのが現実であった。低活性から測定しやすい温度を用いたが、魚肉の貯蔵温度とは異なる。なるべく貯蔵温度に近い温度での活性を比較するため、活性を 10℃から 30℃までの各温度で測定し、得られた活性をアウレニウスプロットした（図 3）。

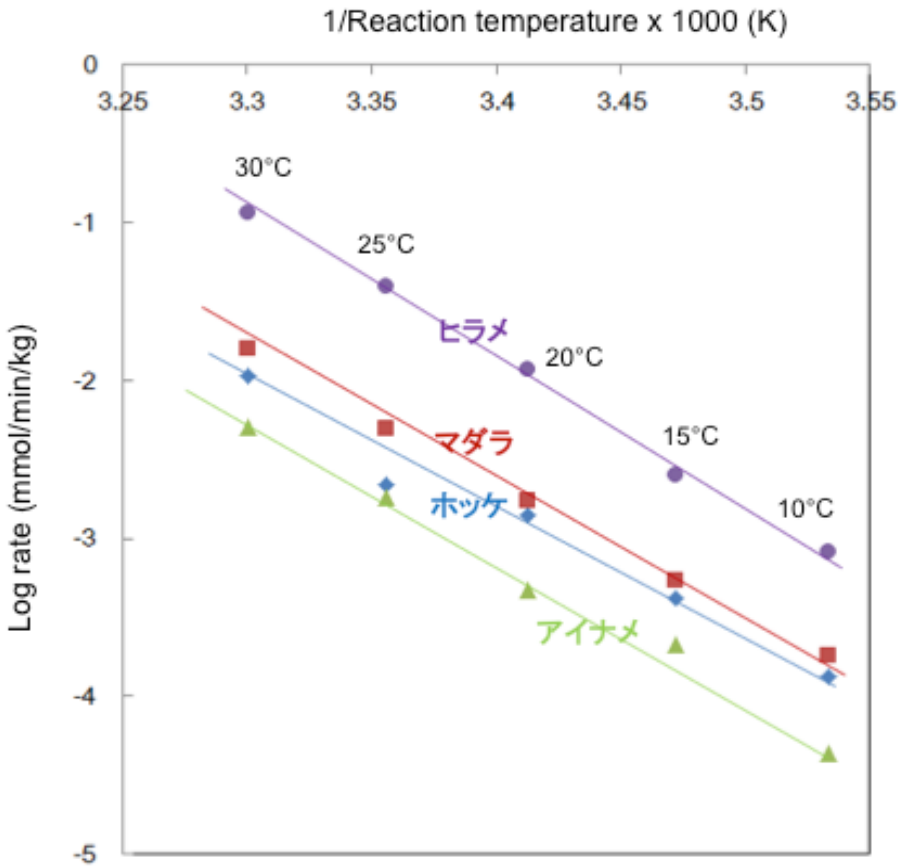


Fig. 3 各種類筋肉の IMP 分解酵素活性に及ぼす反応温度の影響
(図 2 と同じ反応組成液を用い、反応温度を 10 から 30℃まで変えて測定し、活性はアウレニウスプロットした。)

いずれの魚種のホモジネートも同じ温度依存性を示し、アウレニウスの式に従い活性は温度に依存して変化した。すなわち、いずれの温度で比較しても、ヒラメ筋肉中の IMP 分解活性が常に高いことは変わらなかった。
次に、酵素活性に及ぼす pH の影響を求めた。ここでは K 値上昇が異なるヒラメとアイナメで比較した（図 4)。

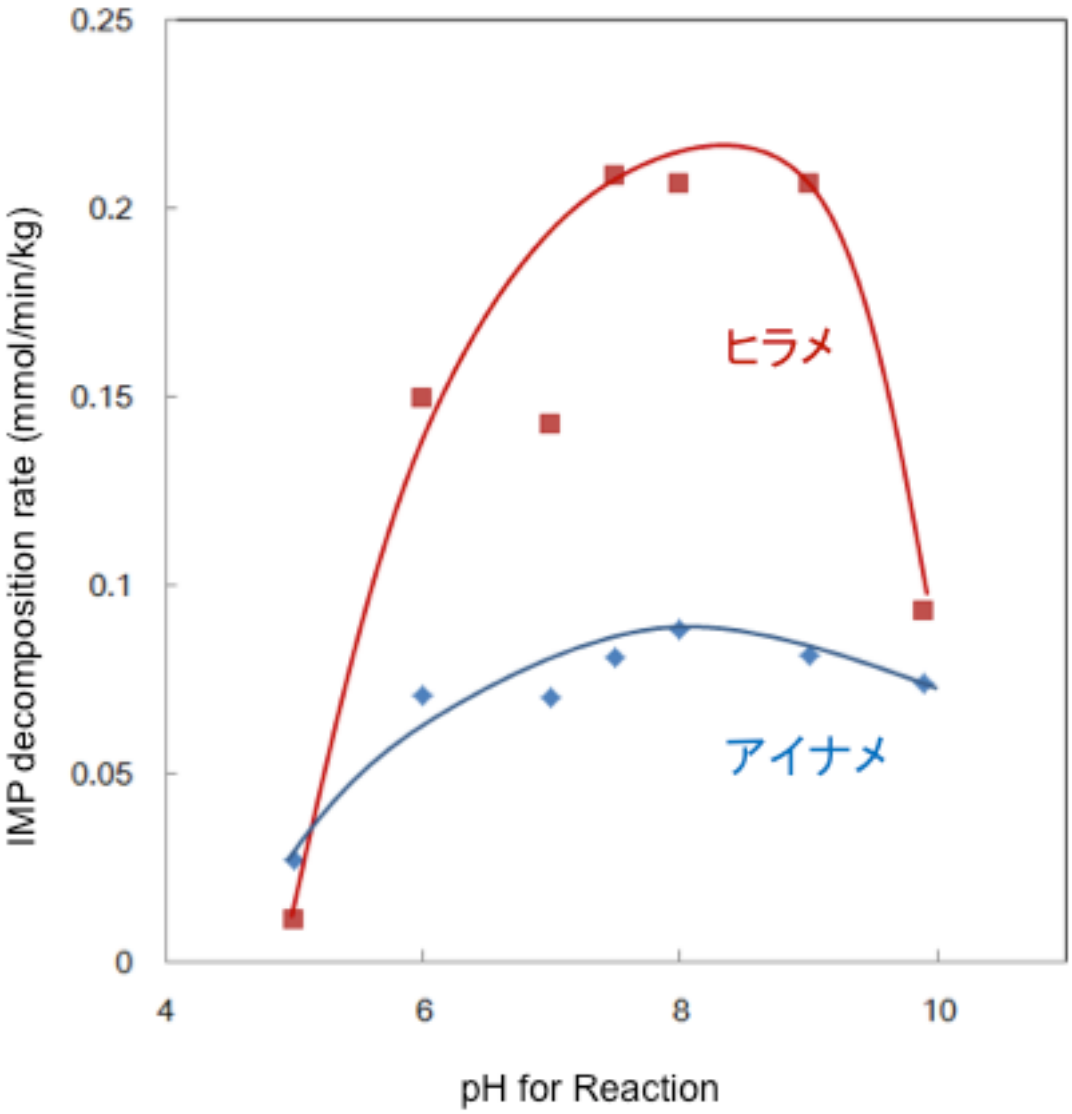


Fig. 4 ヒラメ、アイナメの IMP 分解酵素活性に及ぼす pH の影響
(反応組成液の pH を 5 から 10 まで変化させ、IMP 分解酵素活性を測定した。それ以外の条件は図 2 と同じである。)

pH により活性は大きく変動した。しかし、両魚種のホモジネートで同じような依存性を示し、pH7.5-8.5 付近で最大活性を示した。pH が低くなるにつれ、活性は次第に低下し、pH5 ではほぼ活性は検出されない程度まで低下した。実際のヒラメ、アイナメ魚肉中ではこのような pH 低下は起こらないので、中性付近での活性の値で比較してもよいと考えられるが、図 2 で示した結論であるヒラメの活性が高いという結論がここでも得られた。赤身魚の貯蔵中には死後 pH 低下が起きるので、pH 低下に伴い IMP 分解活性は次第に低下することが予想される。すなわ

ち、死後 pH 低下するにつれ IMP 分解が遅くなり、結果として K 値上昇が遅くなる。すなわち、赤身魚の K 値に関しては，pH 低下したものほど K 値は小さく維持され、見かけ上高鮮度であると間違って判断される可能性が高い。これは K 値測定の原理を理解しないで用いた場合に存在するであろう危険性を示しているものである。

IMP 分解酵素の熱安定性の比較

魚種によりその筋肉タンパク質ミオシンは熱安定性が大きく異なり、低水温に生息する魚類のものほど不安定であることが知られている。これは、温度順化の結果であることから、ミオシン以外の酵素にも成り立つ可能性が高い。

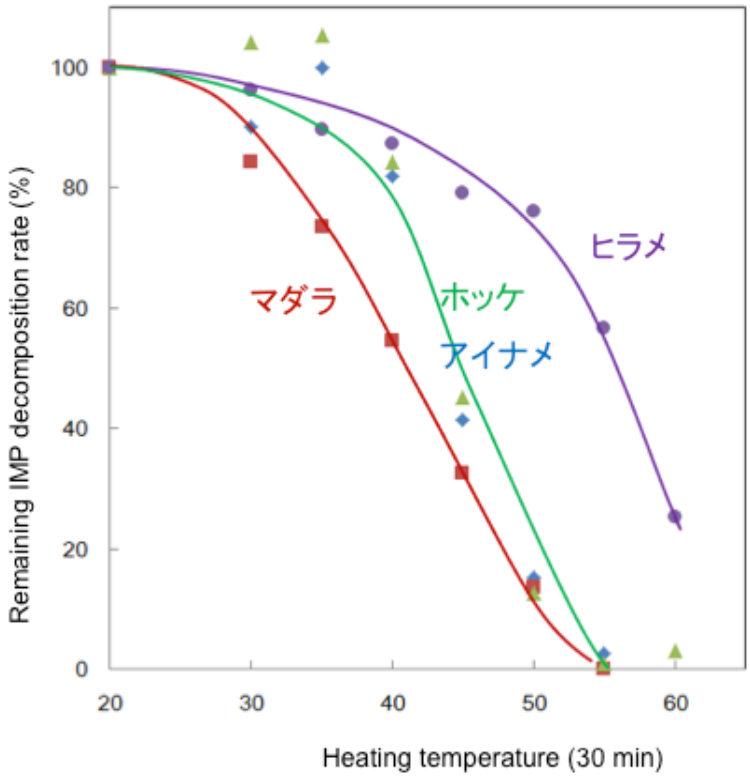


Fig. 5 各種魚類筋肉の IMP 分解酵素の熱安定性の比較

(ヒラメ、アイナメ、ホッケおよびマダラのホモジネートを各温度で 30 分加熱し、残存活性を図 2 と同様な方法で測定した。)

もし、IMP 分解酵素が非常に不安定であれば、魚肉の貯蔵中に失活が起こり、魚肉中でそれ以上の IMP 分解が停止してしまうことになる。ヒラメの持つ酵素がそのように不安定であれば、K 値上昇が遅い理由が説明できる。そこで、魚肉ホモジネートを各温度で 30 分間加熱し、それに伴う失活を調べた（図 5)。

30 分という比較的短時間の加熱であるが、活性を完全に消失されるには 50℃以上の温度での加温が必要であった。また、魚種間の安定性を比較すると、低温に生息するマダラの酵素が最も不安定で、次にアイナメ、ホッケ、そしてヒラメの酵素はこの中で最も安定であった。50%失活を引き起こす温度で比較すると、ヒラメで 57℃、ホッケで 45℃、マダラで 40℃でかなり大きな違いが認められた。すなわち、ヒラメの IMP 分解酵素はこの中では安定で、失活による IMP 分解の低下が原因とは考えにくかった。

種々魚肉ホモジネートにおける ATP からの連続的分解の比較

これまでの IMP 分解活性は、ホモジネートに直接 IMP を添加し、その分解を検討したものである。しかし、魚肉中では ATP からの分解から始まる反応である。そこで、上記で得られた魚種による IMP 分解活性の違いが ATP から始めても再現できるか確認した。すなわち、ホモジネートを用いた反応系に IMP の代わりに ATP を加え、反応を開始し、その後の反応の進行を追跡した。図 6 にマダラ、アイナメ、ホッケ、ヒラメの場合を示した。

いずれの場合も、ATP から IMP までの変換は非常に早く、添加した ATP は 25℃の反応では 5 分以内にすべて IMP に変換された。その後の IMP 分解は前に求めた IMP を基質とした実験と同じく，ヒラメが最も早かった。これは IMP 分解が律速することをホモジネートを用いて再確認したことになる。

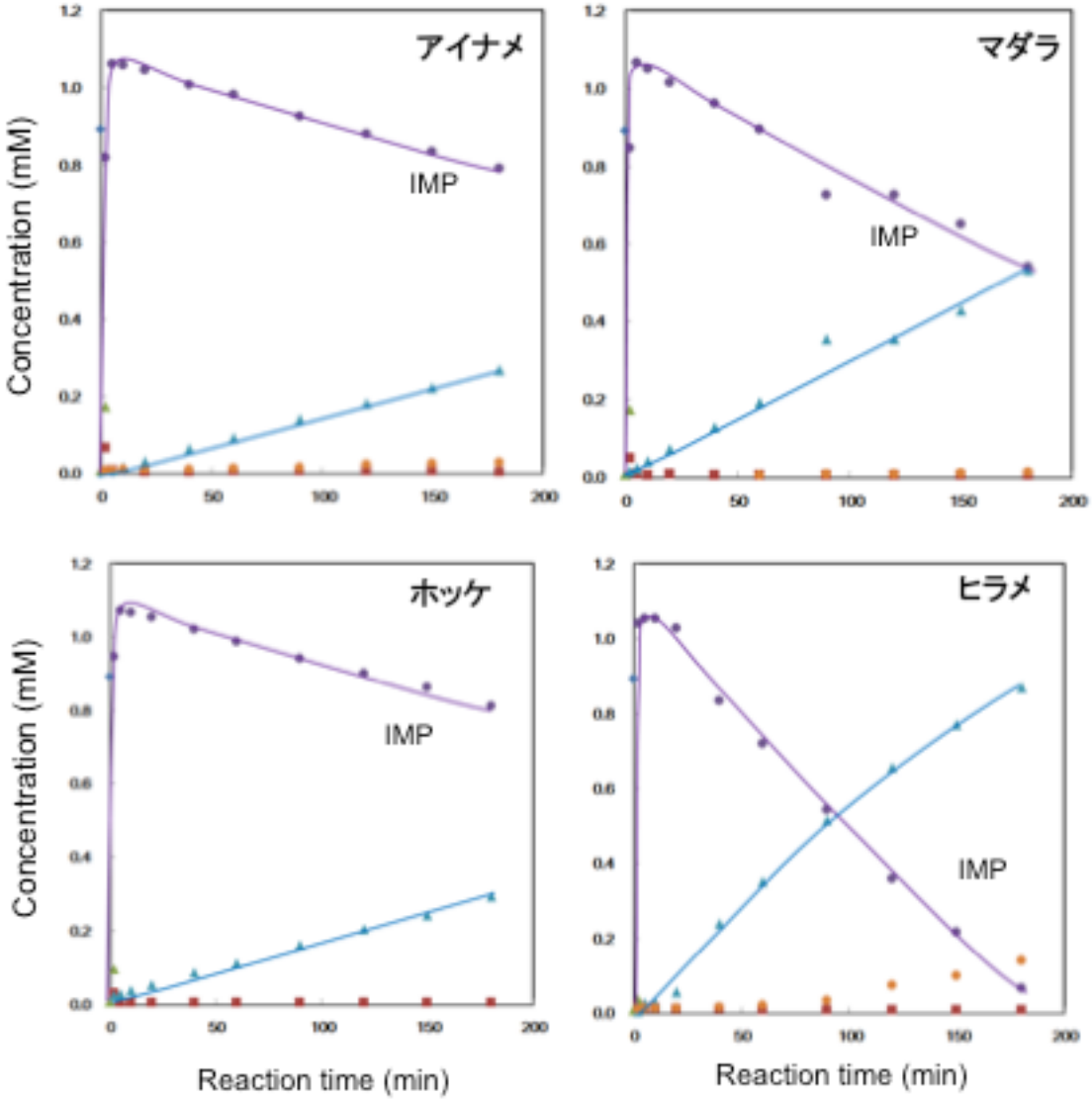


Fig. 6 各種魚類筋肉による ATP からの連続分解の比較
(図 2 と同じ条件で IMP の代わりに ATP を基質にして、反応を開始した。反応の進行は HPLC による成分解析を用いて追跡した。)

種々魚肉ホモジネートにおける IMP 分解酵素の存在状況の比較（トリトン X100 添加効果）

すでに、IMP 分解酵素の一部は膜構造に取り込まれており、水溶性画分に回収されないことを示した。そこで、魚種により、この水溶性画分に回収される割合が異なるか不明である。そこで、魚種により IMP 分解酵素の存在状態が同じかどうかを、ホモジネート中の水溶性画分に回収される活性の割合から比較した。ホモジネートを遠心分離し、遠心前のホモジネートと上澄み中の活性を測定した（図 7a)。さらに、上澄みに得られた回収率を図 7b に示した。

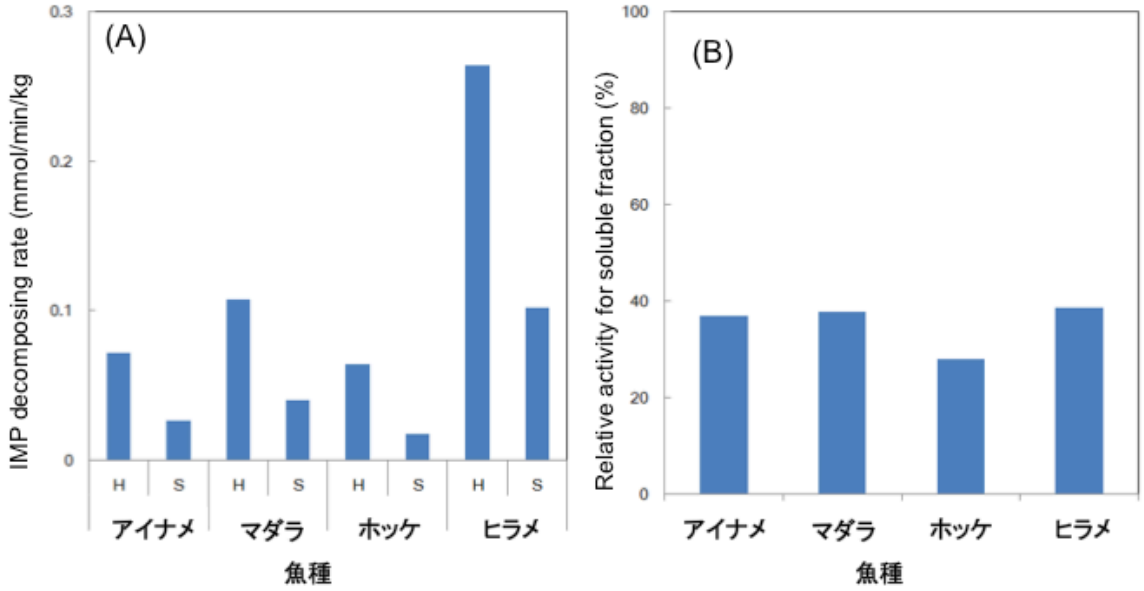


Fig. 7 各種魚類筋肉の IMP 分解酵素の水溶性画分への回収

(図 2 で用いた魚肉ホモジネートを遠心分離し、上澄みに回収された活性を測定した。(A) H はホモジネートの示す活性、S は上澄みの活性。(B)上澄みに回収された活性の回収率、%。(A)の値から計算した。)

すでに図 2 に示したように、ホモジネートの示す活性そのものは魚種によって異なる。しかし、水溶性画分にはその一部だけが抽出されるということは共通していた。回収率を計算すると、4 種でほとんど差がなく、約 40%程度であり、ヒラメ筋肉中で酵素が特殊な存在状態であるということは否定された。さらに、トリトン X100 による水溶性画分への移行の増加について、ヒラメとマダラを用いて比較した。すなわち、0.1 M NaCl、pH 溶液に 1%までのトリトン X100 を加えて水溶性画分に回収される活性を求めた。図 8a に示すように、ヒラメでは約 0.4%の添加でほぼ完全に水溶性画分に回収されるようになった。一方、マダラの場合

はトリトンの添加でホモジネートの活性が上昇するというヒラメとは異なる性質を示すものの、0.2%程度の非常に低濃度のトリトンの添加で活性の回収率は大きく上昇したので（図 8b），基本的な性質は同じであろうと判断した。

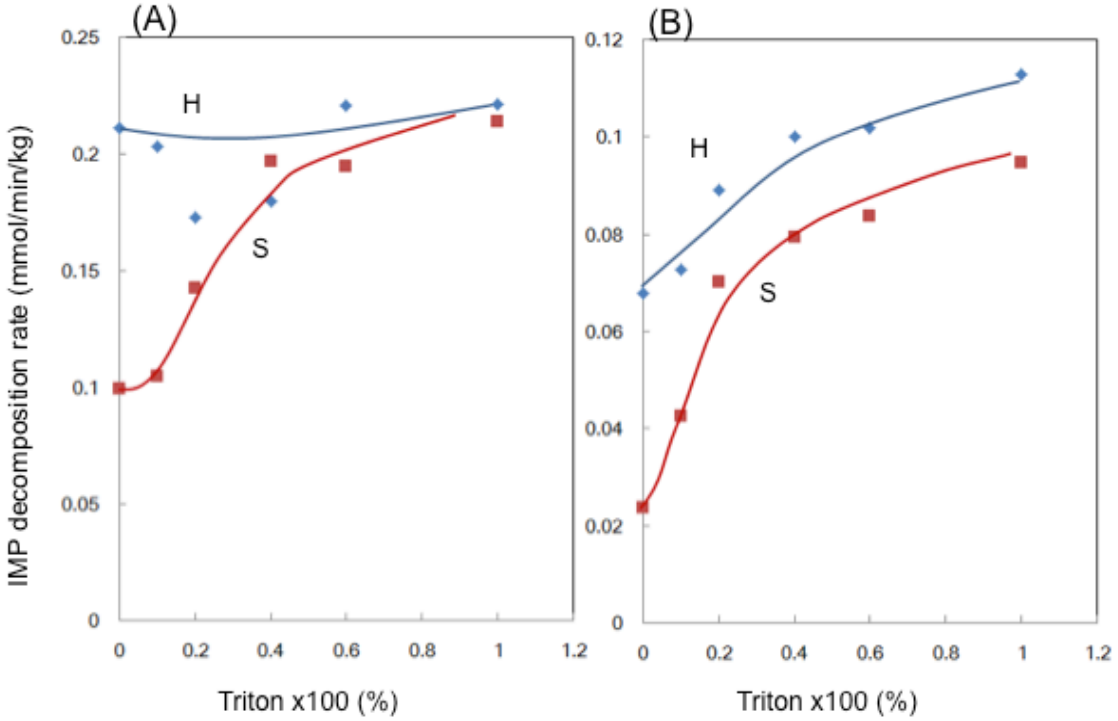


Fig. 8 各種魚類筋肉の IMP 分解酵素の水溶性画分への回収に及ぼすトリトン X100 の効果

(図 7 の水溶性画分への回収率をトリトン X100 濃度を変化させて求めた。(A), (B)はそれぞれヒラメとマダラの結果を示す。(H),(S)は図 7a と同じ)

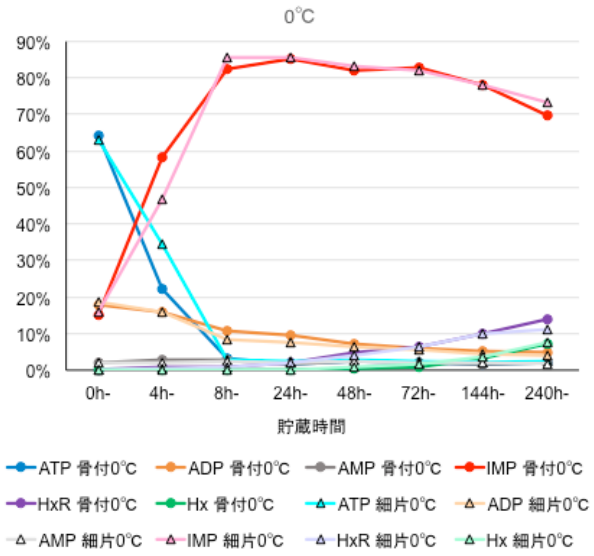
３－２　マダイ、ギンザケの冷蔵保存中の ATP 核酸関連化合物変化と肉色透明感、遊離アミノ酸生成などの品質評価指標の検討

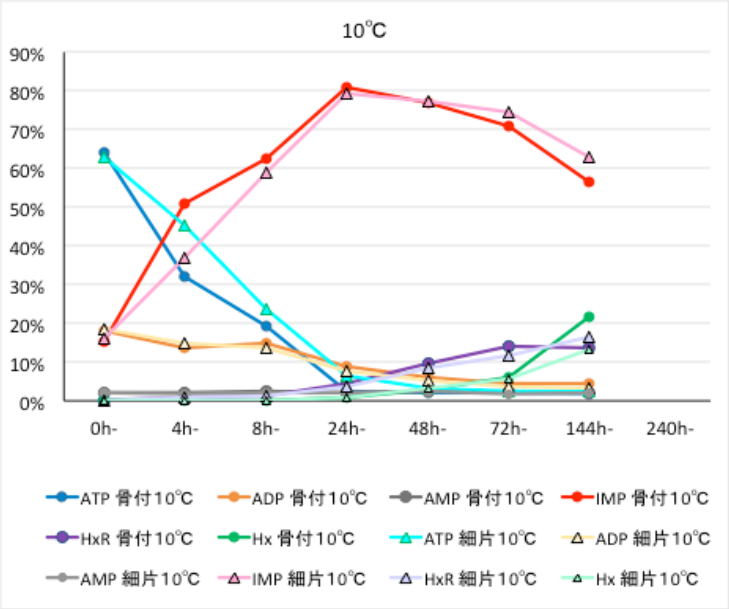
水産総合研究センター中央水産研究所

村田裕子

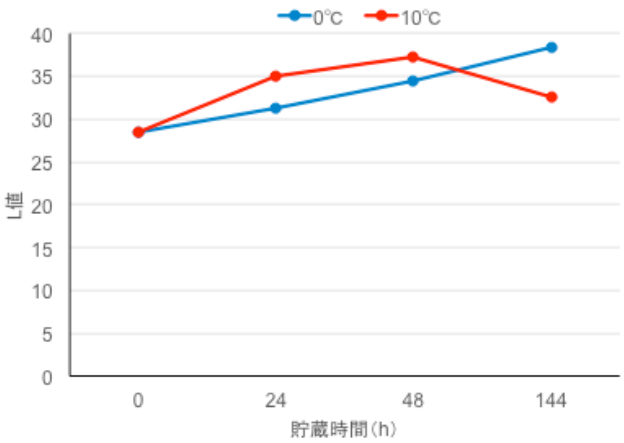
［実験方法］　養殖マダイ（中央水研で飼育、全長 460mm、体重 1793g）を即殺後、骨付きの半身と細片（骨なしの半身の細切れ）に分け、それぞれ 0℃（氷蔵）、10℃で貯蔵した。

［結果概要］　骨付きと細片では、核酸関連化合物の組成の変化に差が見られなかった。従って、魚肉の保管、サンプリング方法による核酸関連化合物組成への影響はほとんどないことが示唆された。





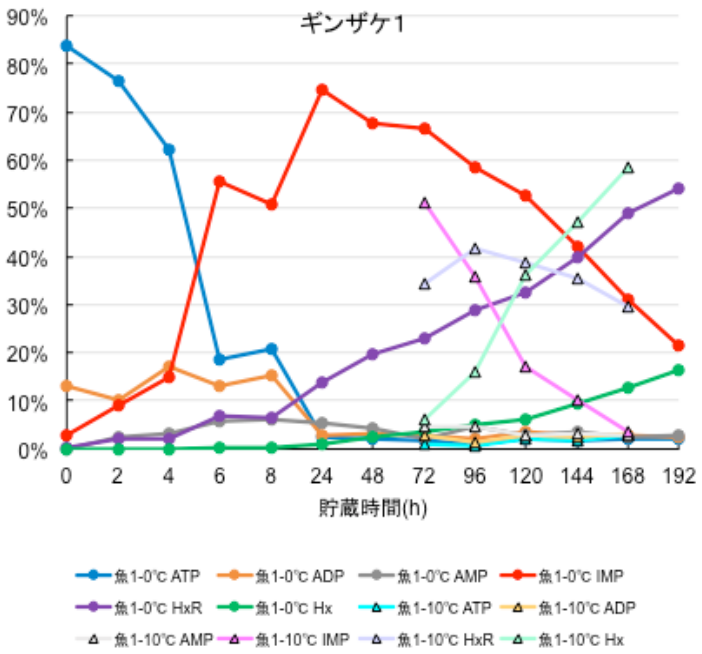
[実験方法]　養殖マダイ（中央水研で飼育、全長 460mm、体重 1793g）を即殺後、骨付きの半身を 0℃（氷蔵）、10℃で貯蔵した。
黒紙の上に薄い肉片を置き、白色度(L 値の上昇＝肉の透明感の低下)を測定した。
[結果]保管時間経過とともに L 値の上昇が見られ、48 時間までは、10℃保管のほうが高い値であった。なお、144 時間は、薄片の切り出しがうまくいかず 10℃の値は低くなったと考えられる。これらの結果から、この方法で透明感の評価が可能でかつ鮮度低下に伴う透明感の低下を評価の可能性が得られた。

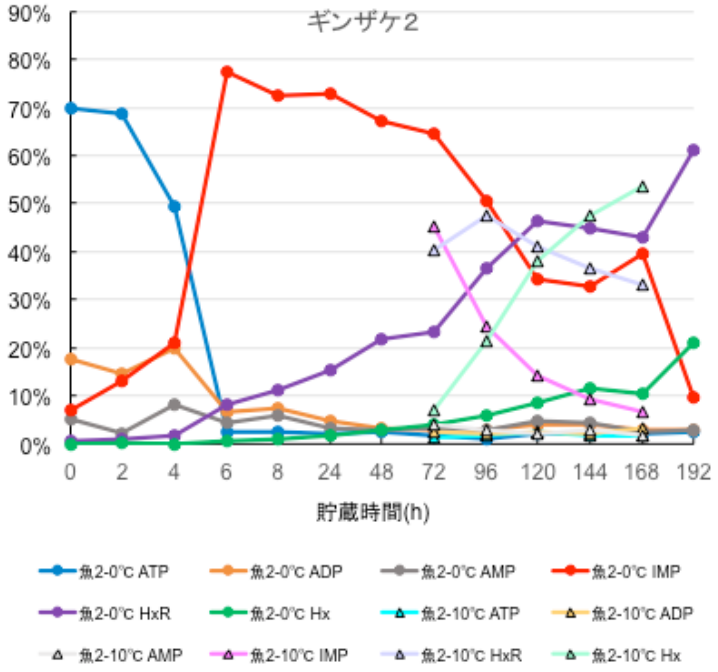


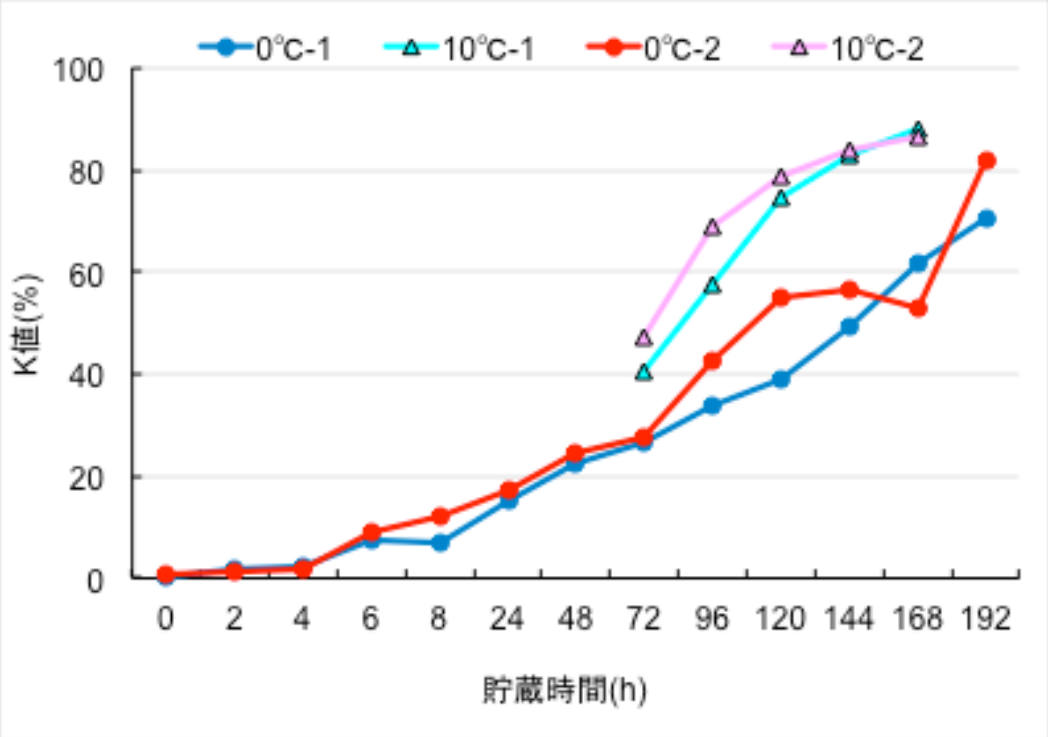
[実験方法]東北水研宮古支所で飼育した 2 尾（1. 体重 1235g、全長 448mm, 2. 体重 1244g、全長 464mm）を即殺、フィレーの状態を氷蔵（0℃）で 24 時間貯蔵、中央水研へ輸送後、2 つに分け氷蔵と 10℃で貯蔵した。核酸関連化合物、遊離アミノ酸、乳酸（有機酸）の変化について調べた。

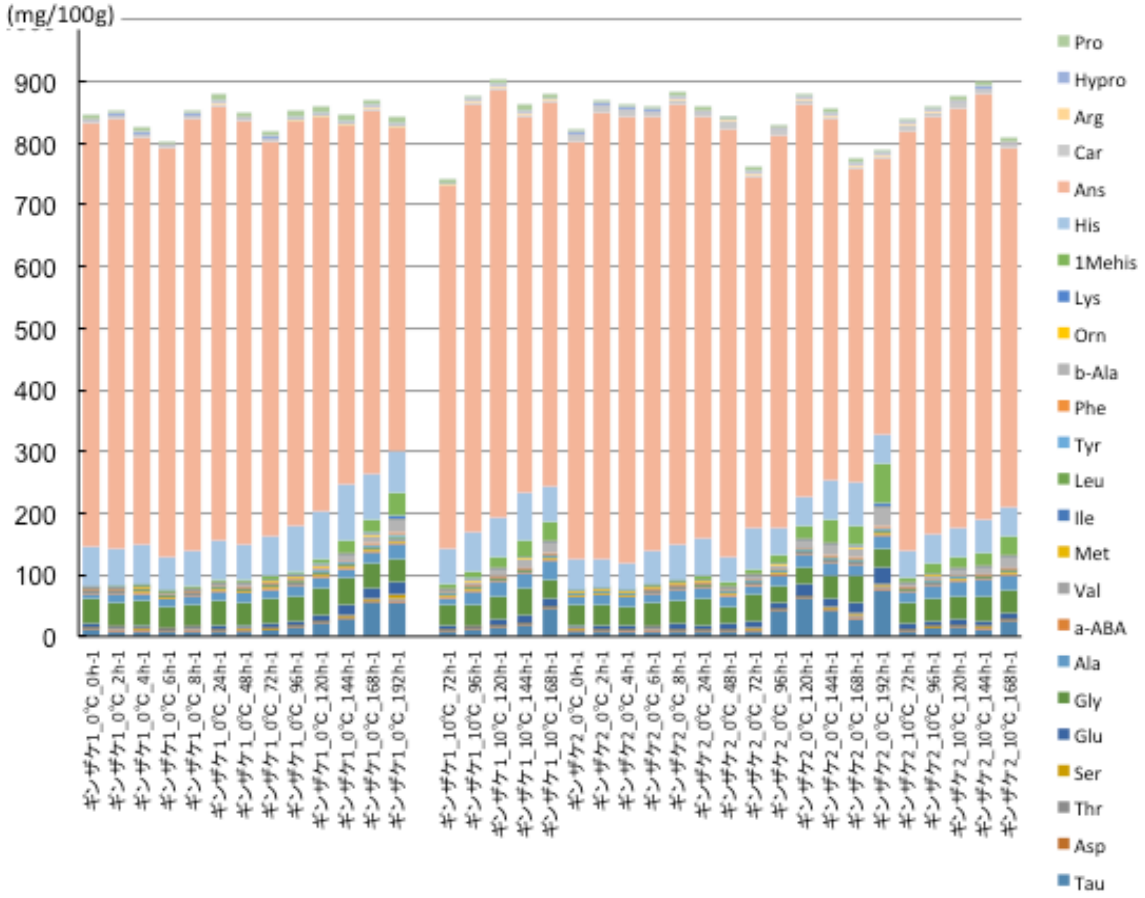
[結果]核酸関連化合物は、貯蔵時間の経過とともに K 値は上昇した。0℃よりも 10℃のほうが K 値の上昇は速かった。

このパターンは、貯蔵温度が高いほど、即殺後の ATP の残存量が低いほどほぼ同じままで速いほうにシフトした。



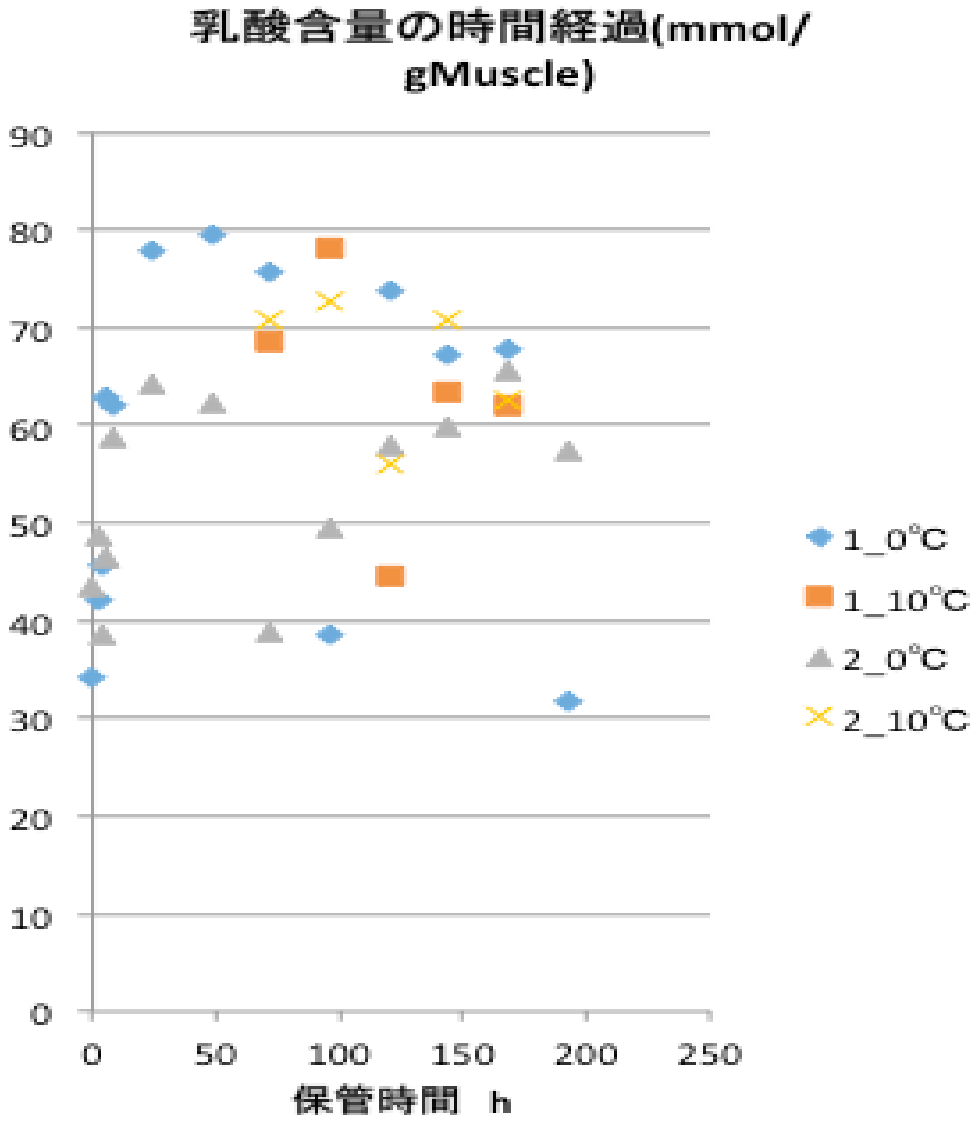

ギンザケ2
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0 2 4 6 8 24 48 72 96 120 144 168 192
貯蔵時間(h)
魚2-0℃ ATP
魚2-0℃ ADP
魚2-0℃ AMP
魚2-0℃ IMP
魚2-0℃ HxR
魚2-0℃ Hx
魚2-10℃ ATP
魚2-10℃ ADP
魚2-10℃ AMP
魚2-10℃ IMP
魚2-10℃ HxR
魚2-10℃ Hx


0℃-1
10℃-1
0℃-2
10℃-2
100
80
60
40
20
0
K値(%)
0 2 4 6 8 24 48 72 96 120 144 168 192
貯蔵時間(h)



［結果］　遊離アミノ酸では、　K 値の上昇に伴い、タウリン、グルタミン酸、1-メチルヒスチジン含量が著しく増加し、アラニンも増加がみられた。

・タウリンとグルタミン酸は 10℃よりも 0℃で高い増加が見られた。



［結果］　ギンザケの有機酸のほとんどは乳酸であった。

３−３　０、５、１０℃で保管したクエのＫ値とpHの変化

東京海洋大学　岡﨑惠美子　守谷圭介　姜晴晴　中澤奈穂

【試料】クエ（*Epinephelus bruneus*）（東京海洋大学の水槽から搬入）

水槽から取り上げ後、氷冷海水中に一時浸漬し、全身を麻痺させた（６個体ともほとんど暴れず)。約３分後に静止状態になったことを確認し、鰓動脈を切断して常温海水中で脱血した。約 10 分後に魚体がほぼ動かなくなったことを確認後、氷に漬けて冷却し、魚体測定し、解体した（魚肉片は背部フィレを５分割し、各々チャック付きポリ袋に空気を抜いて封入)。その後、0, 5, 10℃にて保管した（0℃：4.5℃低温室で氷水中にて保管、5℃：低温室内の発泡スチロール箱で保管、10℃：常温の実験室内で、10℃のディープフリーザー内で保管)。魚肉片にした後に 0 時間の抽出サンプル液を調製した(水槽から取り上げてから約 30 分後)。

1 個体から経時的にサンプリング

1 条件につき、n=2（別個体）で測定し、平均値を算出

平均体長(cm)	平均重量（g)
27.1±2.6	474.1±136.3

【測定項目】

・ K 値 ： サンプリングは今野法により抽出し、HPLC にて ATP 核酸関連化合物の濃度を分析した。

・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。

① クエの各温度における ATP 関連化合物および K 値の経時的変化

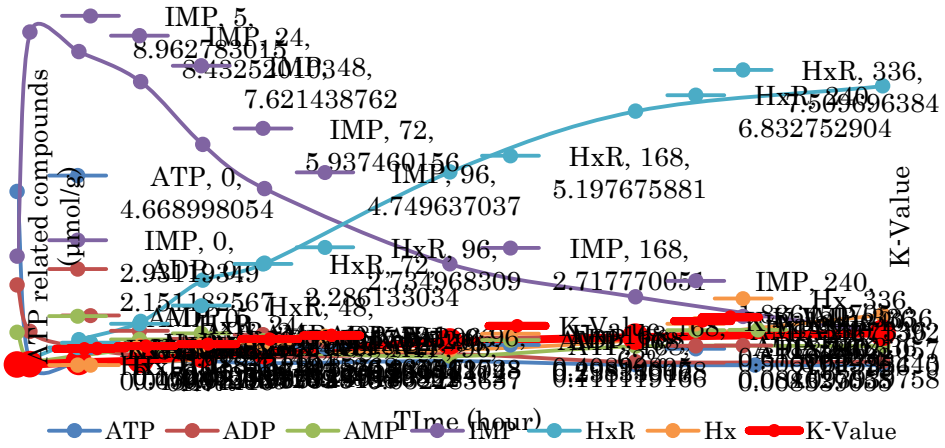


図１　クエ魚肉の 0℃保管中の ATP 関連化合物含量の変化

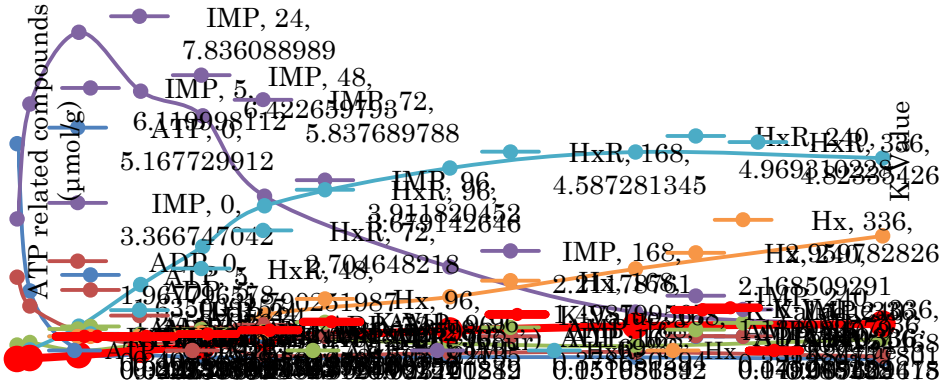


図２　クエ魚肉の 5℃保管中の ATP 関連化合物含量の変化

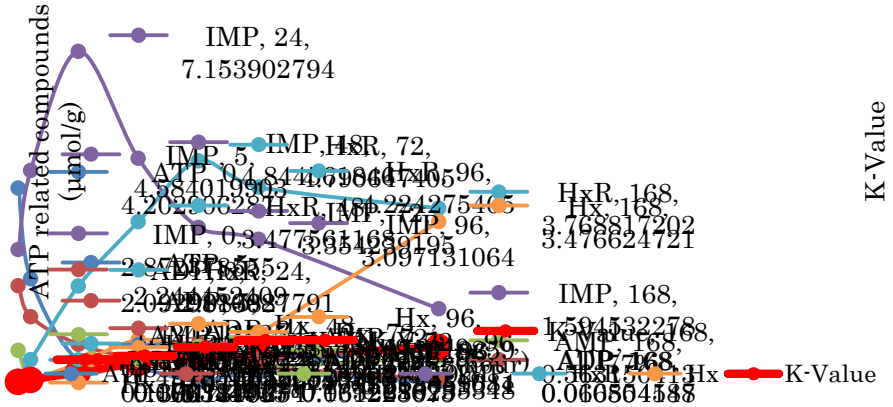


図３　クエ魚肉の 10℃保管中の ATP 関連化合物含量の変化

② 保管温度がクエの K 値の経時的変化に及ぼす影響

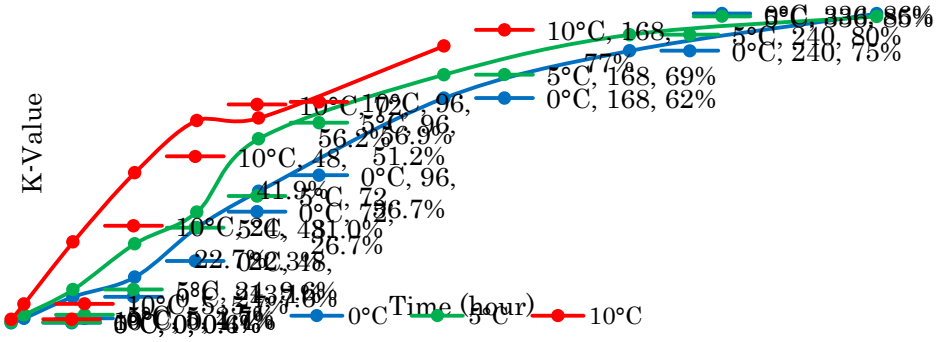


図４　各種温度での保管によるクエ魚肉の K 値の変化

③ 保管温度がクエの ATP 含量の経時的変化に及ぼす影響

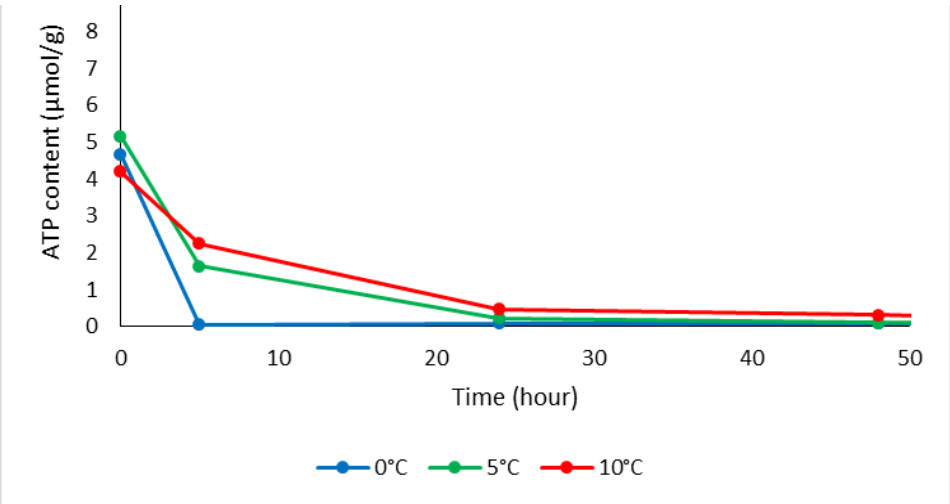


図５　各種温度での保管によるクエ魚肉の ATP 含量の変化

④ 保管温度がクエの IMP 含量の経時的変化に及ぼす影響

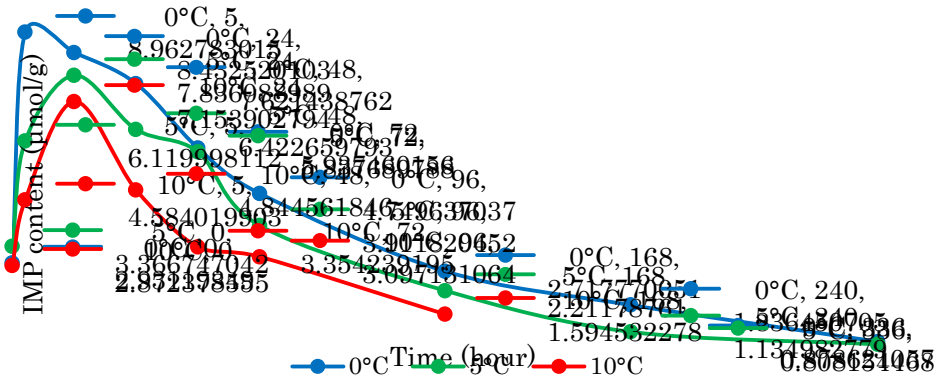


図６　各種温度での保管によるクエ魚肉の IMP 含量の変化

⑤ 保管温度がクエの pH の経時的変化に及ぼす影響

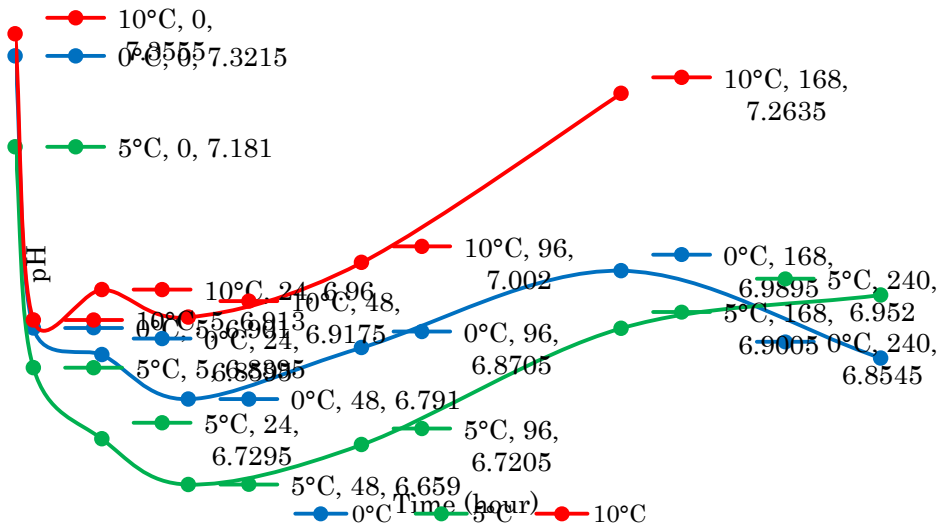


図７　各種温度での保管によるクエ魚肉のｐＨの変化

クエの活きしめ後の ATP 核酸関連化合物の濃度変化の保存温度依存性に関するデータが得られた。また、死後の pH は、6.6 以上でありタンパク質変性が起りにくい pH 低下であることが認められた。

３−４　蛍光指紋による魚肉鮮度の非破壊測定の試み

東京海洋大学　岡﨑惠美子・守谷圭介・中澤奈穂

【蛍光指紋について】

（「冷凍」2015 年 7 月号第 90 巻 525-529 より抜粋、一部改変）

物質に光を照射すると発光現象を示す場合がある。物質に入射する光（励起光）のエネルギーによって電子のエネルギー準位が高い状態に遷移し（電子励起）、エネルギー準位がもとに戻る際に発光現象が観察される。通常、電子は蛍光放出前に熱などの形でエネルギーを失っているため、傾向の波長は励起光よりも長い（エネルギーが低い）。また、蛍光分析の特徴として、ノイズの影響を受けにくいことが挙げられる。

蛍光指紋(Excitation-Emission Matrix)計測においては、励起光の波長条件および観察する傾向の波長条件の両方を変えながら、蛍光の強度を計測する。対象試料において電子励起が起こるかどうか、蛍光が放出されるかどうかを総当たり的に調査する。こうして得られた蛍光指紋は、励起波長、蛍光波長、蛍光強度からなる 3 次元の等高線形状をしており、その等高線パターンが成分に固有であるという特徴を持っている。すなわち、対象に単一の刺激を与え、単一の応答を観察する通常の傾向計測に比べて、多刺激・多応答という特徴をもつ蛍光指紋には、以下のような利点がある。①対象成分について、電子励起や蛍光放出が起こりにくい（蛍光強度が弱い）波長条件も含めた膨大な情報が得られる。②食品のように多数の成分が混在する試料でも、含まれている蛍光物質について網羅的な計測が可能。③極大励起や極大波長が隣接する複数の成分についても、蛍光指紋上では容易に分離・同定が可能。

以上のような特徴を生かして、これまでに食品分野における蛍光指紋の応用例として、ワインの醸造所・醸造年の判別、農薬の同定・検知、小麦カビ毒の定量、チーズの熟成度推定などについての研究例がある。

【蛍光指紋を用いた魚肉鮮度の非破壊測定】

上述のように、蛍光指紋においては、食品中に含まれる微量成分を検出できる可能性があるため、魚肉の鮮度低下に伴う核酸関連化合物等の微量物質の変化についても定量的に検出できる可能性があることが期待された。そこで、東京海洋大学では、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所、

ならびに豊橋技術科学大学と共同で、蛍光指紋による魚肉鮮度の非破壊測定の可能性について検討した。

試料魚は、市場で購入した生鮮マアジを 1、4、7、12 日保管した後、フィレとし、-30℃にて冷凍した。冷凍状態のまま、表皮サイドならびに切断面サイドから蛍光指紋測定を行うとともに、冷凍状態のまま分析用のサンプリングを行って核酸関連化合物を抽出し、HPLC により分析を行った。種々の蛍光指紋測定パラメータを用いた PLS モデルにより、高い精度で冷凍マアジの K 値予測が可能であることが示された。

（以下に示す図表はすべて「Gamal ElMasry, Hiroto Nagai, Keisuke Moriya, Naho Nakazawa, Mizuki Tsuta, Junichi Sugiyama, Emiko Okazaki, Shigeki Nakauchi (2015), Freshness estimation of intact frozen fish using fluorescence spectroscopy and chemometrics of excitation–emission matrix, Talanta, 143, 145-156」より抜粋したものである）

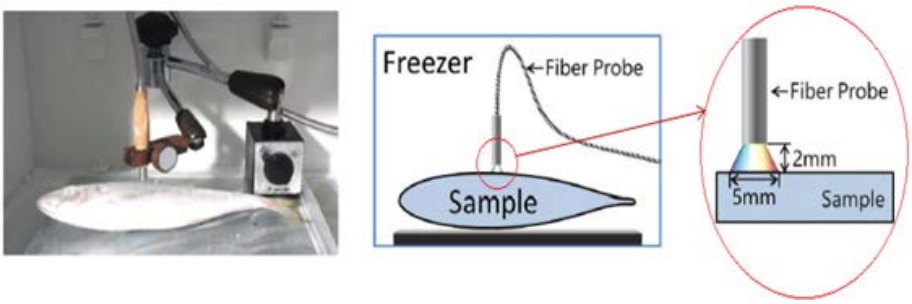


図１　冷蔵庫内部における、光ファイバープローブを用いた冷凍魚試料の蛍光指紋の測定

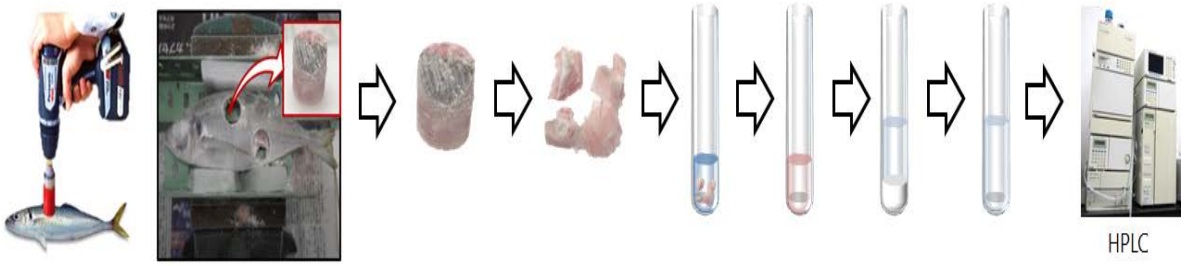


図２　冷凍アジからのサンプリングと核酸関連化合物の抽出・HPLC 分析

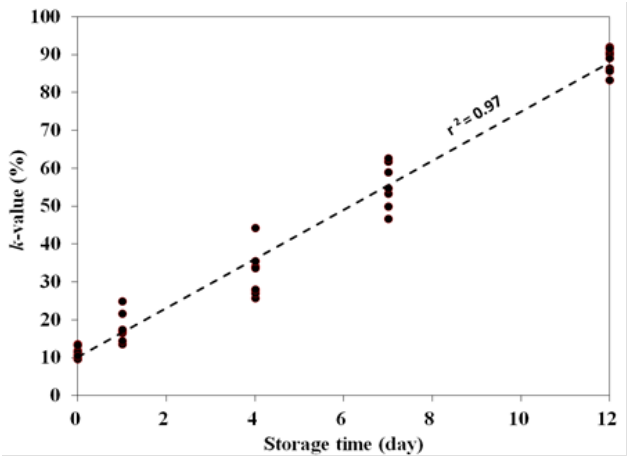


図３　冷凍前の保存期間の異なる冷凍アジのＫ値

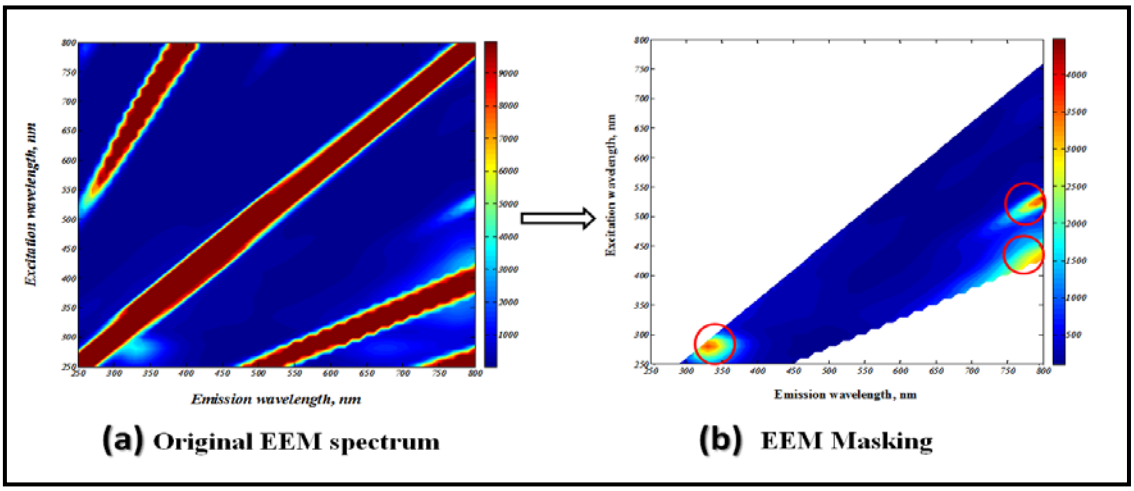


図４　オリジナル蛍光指紋スペクトルのマスキングにより得られる蛍光ピーク

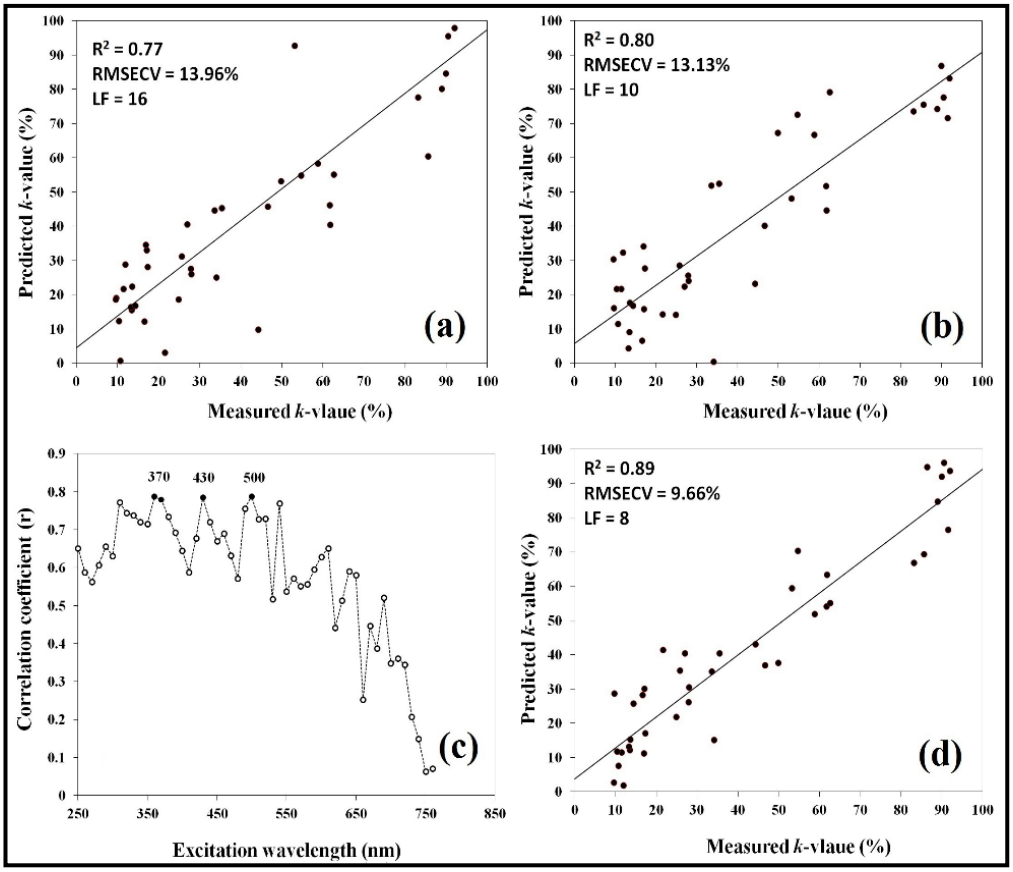


図５　種々の蛍光指紋測定パラメータを用いた PLS モデルによる K 値予測

３−５　各種魚類ミオグロビンのメト化率測定法

鹿児島大学大学院連合農学研究科、鹿児島大学水産学部
井ノ原康太　尾上由季乃　木村郁夫

魚肉の血合肉や赤身魚の普通肉の色調は刺身等の重要な品質要因である。鮮度低下や-20°C のような温度帯で保存した場合、これらの色調が鮮やかな赤色から褐色に変化する。この現象は、魚肉の血合肉や赤身魚の普通肉に多く含まれる色素タンパク質ミオグロビン（Mb）のメト化によるものである。Mb は、ポルフィリン環に含まれる鉄原子の酸化・還元や酸素との結合によりデオキシ Mb（deoxyMb），オキシ Mb（oxyMb）およびメト Mb（metMb）の３状態を呈す。deoxyMb は暗赤色であり酸素が結合した oxyMb は鮮赤色を示すが、酸素の解離とともに生成する metMb は褐色を示す。生体内では、metMb は還元反応によりに deoxyMb となるが、死後の魚肉中では還元反応は停止するため metMb が蓄積し、死後の経過時間とともに魚肉の色調が褐色に変化し商品価値を失う。[1, 2]

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類の流通や冷凍保存に応用されている。[3] 一方, カンパチやブリなどの魚種では-20°C での流通が一般的であり冷凍流通時の褐変が問題となっている。私達のこれまでの研究では、マグロ Mb を用いたメト化抑制に関する研究で生体内エネルギー物質のアデノシン三リン酸（ATP)が Mb のメト化を抑制することを明らかにした。[4] さらに養殖カンパチで活きしめ後に行う海水氷溶液中での冷却時間を調整して作製した ATP 濃度の異なるフィレを-20℃で保存したときのメト化の進行を比較し、ATP 濃度が高いフィレでメト化の進行が抑制されることも明らかにした[5]。この研究において、Mb のメト化率測定法についてマグロ Mb のメト化率測定法である尾藤法[6] をカンパチ Mb に応用したところ、活きしめ直後のサンプルでもメト化率が高い結果となったことから、カンパチ Mb のメト化率測定法について新たに確立した。精製 Mb から deoxyMb, oxyMb および metMb をそれぞれ調製し可視部吸収スペクトルを測定したところ、尾藤法で使用している metMb の検出波長における特性がマグロ Mb とカンパチ Mb で異なることが明らかとなり、尾藤法はカンパチ Mb に応用できないことが示された。以上のことから、魚種により deoxy 型, oxy 型, met 型の３種 Mb の可視部吸収スペクトル特性の関係が異なることが推察されたので、魚種毎に Mb メト化率測定法の検討を行うこととした。現在まで、魚類ミオグロビン（Mb）の自動酸化や構造については多くの研究がなされており[7−11] Mb の自動酸化は魚肉の肉色に大きく関与

することが明らかにされている。しかし、Mb の自動酸化を分析する簡易測定法については、同一測定法で魚種ごとに比較検討した報告は少ない。

本研究ではブリ *Seriola quinqueradiata*, ゴマサバ *Scomber australasicus*, マサバ *Scomber japonicus*, マダイ *Chrysophrys major*, ミナミマグロ *Thunnus maccoyi* を対象とし、血合肉および普通肉（ミナミマグロ）から Mb を精製した後、deoxyMb，oxyMb および metMb をそれぞれ調製し、これら三状態の Mb の可視部吸収スペクトル特性を測定することにより Mb メト化率を導き出す式を求めメト化率測定法を確立した。また、精製 Mb から oxyMb を調製後、加熱処理により経時的に metMb 濃度が異なるサンプルを調製し、これらのスペクトルから Mb のメト化率を求め、本研究により確立した方法で求められるメト化率と尾藤法で算出される値との関係とその差異の要因について検討した。

材料および方法

材料　ブリ、ゴマサバ、マサバ、マダイは、活きしめ処理した死後硬直前のものを養殖場あるいは市場にて購入し実験に供した。これらの魚種では血合肉を材料として Mb を調製した。ミナミマグロは、延縄漁法で生きた状態で漁獲され船上で急速凍結(-60°C)したものを使用し、入手後実験に供するまで-80°C の冷凍庫で保管した。ミナミマグロ Mb は普通肉から調製した。

精製 Mb の調製　魚類 Mb の調製はマグロ Mb の精製法である落合らの方法[4,5,12,13] に準じて行った。すなわち、細切した魚肉に 3 倍量の 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl（pH7.5）を添加しホモジナイズを行い、遠心分離して上清を得た。この上清の 70-90%飽和硫安画分を沈殿として集め、これを抽出液と同じ緩衝液に透析し粗ミオグロビン（cMb）溶液を得た。この 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[12] に準じて 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl（pH7.5）で平衡化した Superdex 200 prep grade（GE Healthcare 製）を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。Mb の検出は溶出液の 280 nm と 540 nm の吸光値を測定して行った。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法(SDS-PAGE)により分析した。SDS-PAGE は Laemmli の方法[14] に従い 17.5%ポリアクリルアミドゲルを使用して行った。Mb の分子量は分子量マーカー（アトー社製　AE1440）を使用し SDS-PAGE における移動距離から求めた。

deoxyMb，oxyMb，metMb の調製　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の測定を前報と

同様に行った。[5] すなわち、deoxyMb は精製 Mb 溶液（0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl（pH 7.5)）にヒドロ亜硫酸ナトリウムを 1%添加して調製した。[15] oxyMb は deoxyMb 溶液をスターラーで撹拌して調製したが、deoxyMb から oxyMb 調製時のオキシ化についてはそれぞれの Mb の可視部吸収スペクトルの特徴から 540 nm における吸光値を指標とし、この吸光値が deoxyMb の 556 nm における吸光値を越えた段階で oxyMb が生成したと判断した。metMb は泉本らの方法 [16] に準じて、精製 Mb 溶液にフェリシアン化カリウムを 3 μM 添加して調製した。可視部吸収スペクトルの測定は Mb のタンパク質濃度 0.1 ~ 1.0 mg/mL (0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)), 測定波長 500 ~ 700 nm，25°C で Shimadzu UV－1800 を用いて行った。

Mb タンパク質濃度の定量は、ウマミオグロビン(ナカライテスク製)を標準タンパク質として使用しビウレット法により比色定量した。[17]

結果

各魚種 Mb の性状　図 1 に各魚種 Mb の SDS-PAGE 像を示した。SDS-PAGE より求めた各 Mb の分子量はブリ（15,000）、ゴマサバ（14,800)、マサバ（14,800)、マダイ（15,200)、ミナミマグロ（15,200)であり、魚種により多少の違いはあるが約 15,000 を示した。

Fig. 1

図 1　各魚種 Mb の SDS-PAGE パターン

A：ブリ，B：ゴマサバ，C：マサバ，D：マダイ，E：ミナミマグロ

M：分子量マーカー

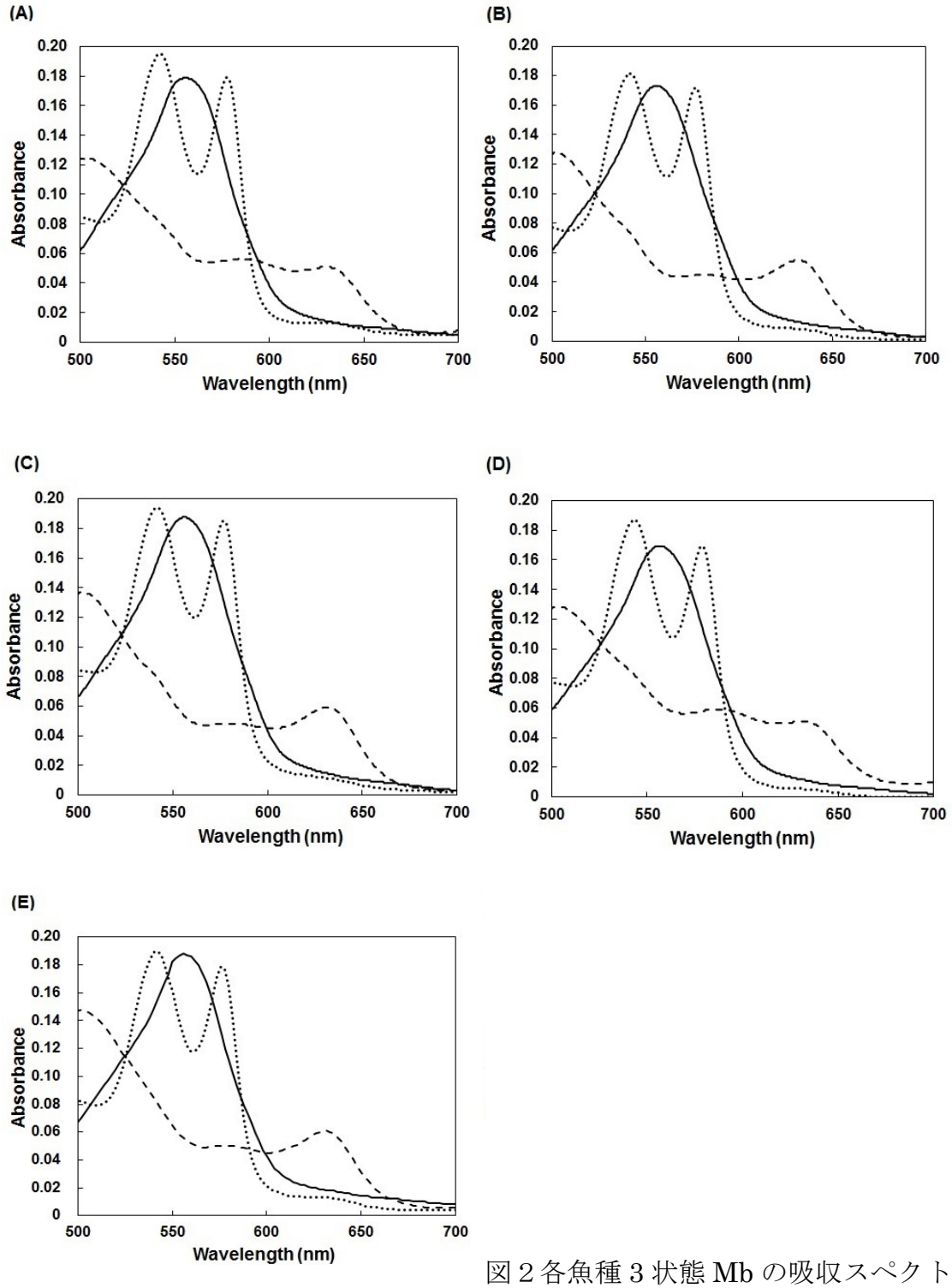


図２各魚種３状態 Mb の吸収スペクトル

A：ブリ，B：ゴマサバ，C：マサバ，D：マダイ，E：ミナミマグロ

各線は deoxyMb (－)，　oxyMb (…) and metMb (---)を表す。

した。各魚種の Mb は典型的な３状態（deoxy-, oxy-, met-型）の可視部吸収スペ

図 ２に各魚種の deoxyMb、oxyMb および metMb の可視部吸収スペクトルを示

クトルを示した。[5] これら３状態の Mb 可視部吸収スペクトルはいずれの魚種でも等吸収点（isosbestic point, IS 点と略）を有した。
IS 点の波長と deoxyMb，oxyMb の吸光値が交差する波長(A_0)を表 1 に示した。各魚種 Mb の IS 点の波長は 523 ~ 525 nm であり，Mb のメト化率 0%の指標として採用した deoxyMb と oxyMb が交差する波長(A_0)は 547 ~ 549 nm を示した。

表１　各魚種３状態 Mb の I.S.点波長および deoxyMb と oxyMb が交差する波長(A_0)

	yellowtail	spotted mackerel	chub mackerel	red seabream	southern bluefin tuna
Wavelength of A_0 (nm)	548	547	547	549	549
Wavelength of I.S. (nm)	524	524	523	525	524

Mb メト化率測定法の検討　各魚種 Mb メト化率算出式の検討は、前報[5]に準じて行った。即ち、deoxyMb，oxyMb，metMb の可視部吸収スペクトルを測定し、３状態の Mb が混在しても同一の吸光値を示す IS 点を基準値としてメト化率算出式を導出した。各魚種の deoxyMb, oxyMb が交差する波長は３点を示したが、３波長のうち Mb メト化率 0%の指標となる吸光値は 540 nm 付近の値を選択した。（図 2）これらのスペクトル特性を応用し、Mb メト化率算出式を導出した。以下に本研究で検討を行ったブリ Mb を例として説明する。ブリの deoxyMb, oxyMb，metMb の可視部吸収スペクトルを測定した結果を図 2 - (A)に示した。IS 点の波長は 524 nm であった。deoxyMb と oxyMb のスペクトルは 548, 572, 588 nm の 3 波長で交差し、赤色の強さは 540 nm 付近の吸光値が反映されるので 548 nm の吸光値を採用した。この 548 nm における吸光値を A_0とした。吸光値 A_0は deoxyMb と oxyMb が同じ値を示す波長での吸光値なので、deoxyMb と oxyMb が混在しているメト化率 0%の状態を示す値である。IS 点の吸光値（B）と A_0の吸光値比（A_0/B）をメト化率 0%の値とした。 一方、メト化率 100%の吸光値比は、metMb の 548 nm における吸光値（C）と IS 点である 524 nm の吸光値（B）を用いて求めた（C/B）値とした。ブリ Mb のメト化率 0%の A_0/B 値は 1.65 ± 0.05（平均値 ± 標準偏差，$n = 39$）を、メト化率 100%の C/B 値は 0.65 ± 0.02（$n = 39$）を示した。以上の結果よりブリ Mb のメト化率算出式 (1) を得た。

$metMb$ (%) = -99.70（A / B）+ 164.96 (1)

なお，A 及び B は Mb 溶液の A(548 nm)，B(524 nm)における吸光値である。

ゴマサバ、マサバ、マダイ、ミナミマグロについても図 2 の結果より各魚種 Mb の deoxyMb と oxyMb のスペクトルが交差する波長（A_0）および IS 点の波長（表 1)における吸光値を求め、A_0 / B 値，C / B 値を算出した結果を，表 2 に示した。

表２　各魚種３状態 Mb の A_0 / B 値（100% oxyMb），C / B 値（100% metMb）

	yellowtail (n = 39)	spotted mackerel (n = 19)	chub mackerel (n = 17)	red seabream (n = 23)	southern bluefin tuna (n = 11)
A_0 / B (100 % oxyMb)	1.65 ± 0.05	1.65 ± 0.03	1.66 ± 0.03	1.66 ± 0.03	1.69 ± 0.01
C / B (100 % metMb)	0.65 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.66 ± 0.05	0.65 ± 0.02

表 1 および 2 の結果より各魚種 Mb のメト化率算出式を求め以下に示した。

ゴマサバ

$metMb$ (%) = -98.53（A / B）+ 162.83 (2)

なお、A 及び B は Mb 溶液の A(547 nm)，B(524 nm)における吸光値である。

マサバ

$metMb$ (%) = -98.79（A / B）+ 164.87 (3)

なお、A 及び B は Mb 溶液の A(547 nm)，B(523 nm)における吸光値である。

マダイ

$metMb$ (%) = -100.09（A / B）+ 166.85 (4)

なお、A 及び B は Mb 溶液の A(549 nm)，B(525 nm)における吸光値である。

ミナミマグロ

$metMb$ (%) = -96.23（A / B）+ 162.79 (5)

なお、A 及び B は Mb 溶液の A(549 nm)，B(524 nm)における吸光値である。

研究で確立した Mb メト化率測定法と尾藤法との関係　前報 [5] では新たに確立したカンパチ Mb メト化率測定法で得られる Mb メト化率の値と尾藤法を応用して算出した値との関係について検討を行い、両方法により得られる値は異なるものの直線関係が認められることから尾藤法により算出した値から正しいメト化率に換算が可能であることを明らかにした。本研究においても、新たに確立した各魚種 Mb メト化率測定法で求められるメト化率と尾藤法を応用して得られる値

との関係について検討を行った。各魚種血合肉より調製した Mb の濃度を 0.5 mg/mL に調整し、これにヒドロ亜硫酸ナトリウムを添加して deoxyMb とした後、スターラー撹拌により oxyMb を調製した。この 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図 3 に示した。

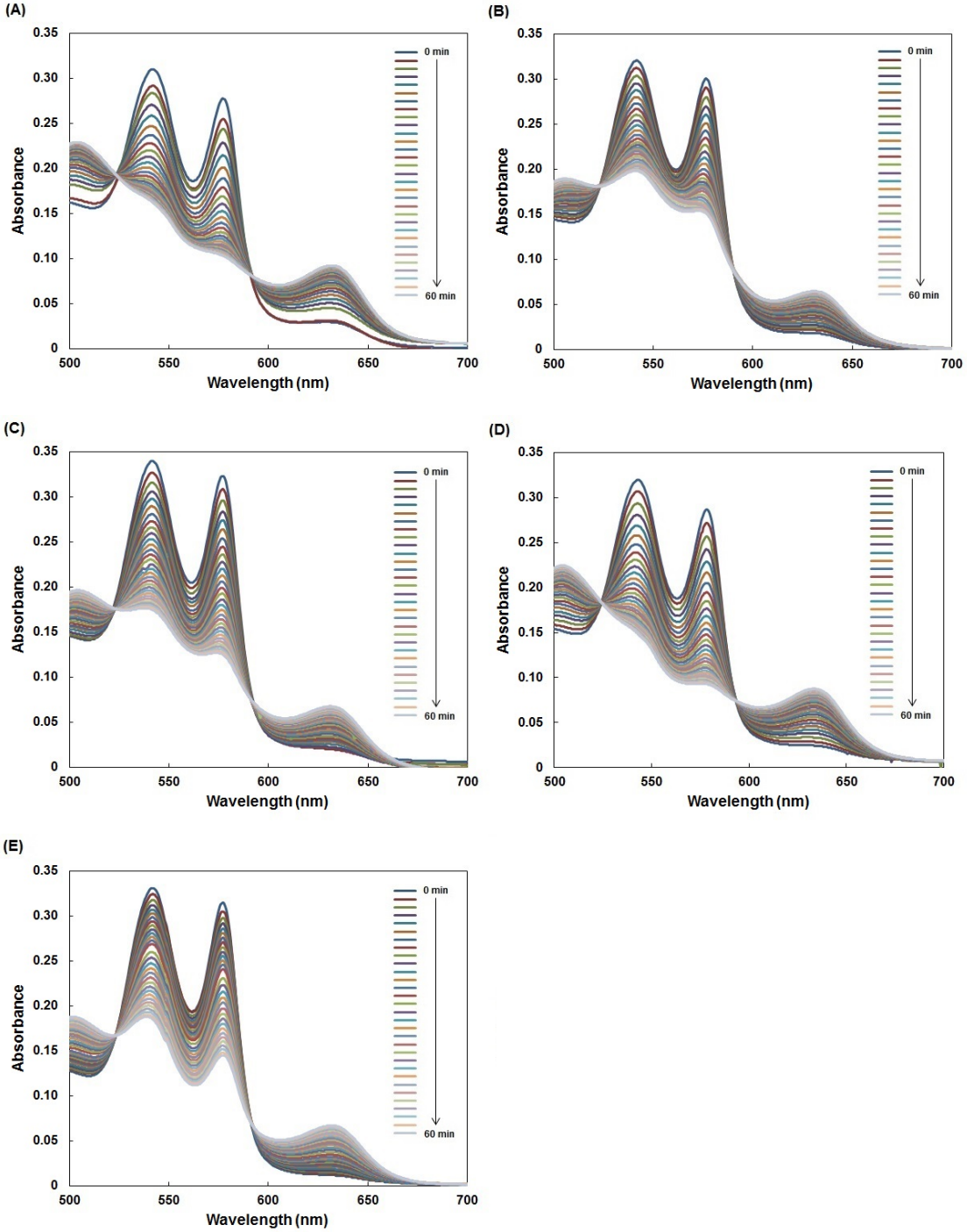
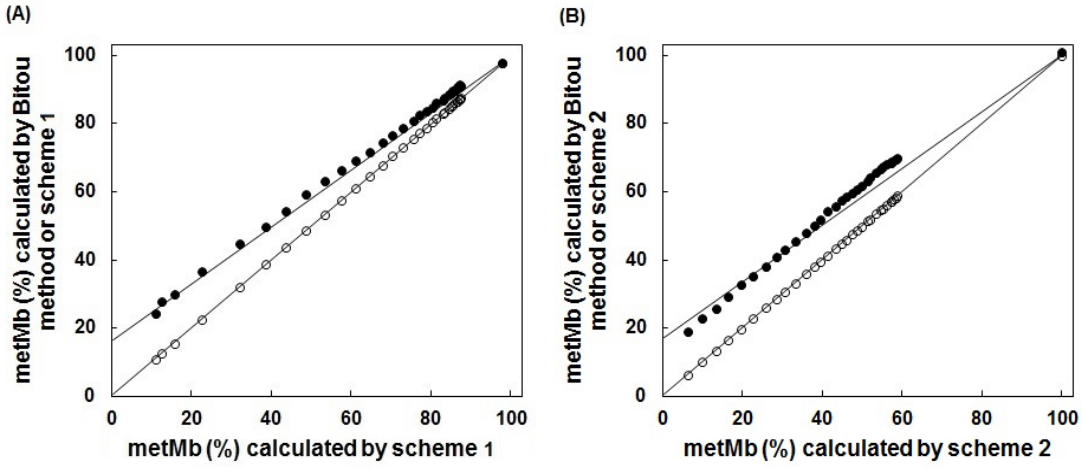


図 3　各魚種 oxyMb の 25℃処理における吸光スペクトル変化
A：ブリ，B：ゴマサバ，C：マサバ，D：マダイ，E：ミナミマグロ

oxyMb は native Mb を還元剤処理して調製したものを使用した。

加熱時間に対応して oxyMb の β ピークと α ピークが減少し metMb の生成が進行した。精製 Mb を還元剤や酸化剤で処理して調製した deoxyMb, oxyMb および metMb の可視部吸収スペクトルから求められた IS 点の波長は，oxyMb の加熱処理で生成した metMb と oxyMb の混合液においても同様に IS 点の波長として確認できた。図 3 のデータを用いて、本研究で確立した各魚種 Mb のメト化率算出式で求めたメト化率の値と尾藤法を応用して得られた値との関係を図 4 に示した。ミナミマグロ以外の魚種では，尾藤法を応用して求めた値はメト化率が低い範囲で 15 ~ 19 %ほど高い値を示す結果となった。一方、ミナミマグロ Mb の場合は、(5) 式で求めたメト化率と尾藤法で得られるメト化率の値は、尾藤法で 3 ~ 7 %ほど高いもののほぼ同じ値を示す結果となった。前報 [5] では、カンパチ Mb のメト化率について、尾藤法を応用して求めた値と前報で確立したカンパチ Mb メト化率算出式で得られるメト化率がほぼ直線関係を示すことから、尾藤法を応用して求めた値から正確なメト化率に換算することが可能であることを示した。



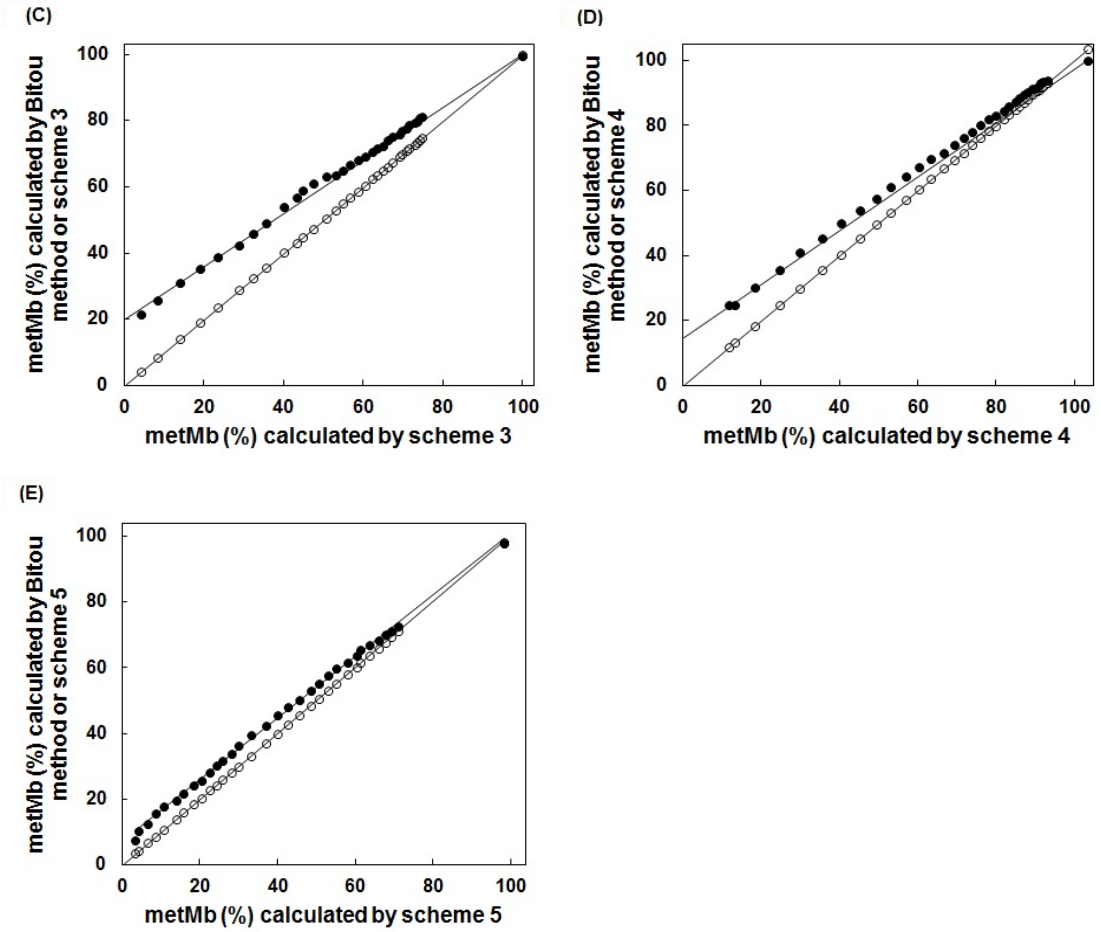


Fig.4

図４　新たに確立した各魚種 Mb メト化率測定法と尾藤法で得られる値との関係
A：ブリ，B：ゴマサバ，C：マサバ，D：マダイ，E：ミナミマグロ
(○)：確立した各魚類 Mb メト化率測定法で求めたメト化率, (●)：尾藤法で求めた値。

本研究でも各魚種 Mb のメト化率を算出するために尾藤法を応用して求めた値について、本研究で確立した方法で求められる正確なメト化率に換算するための式を魚種ごとに求めることが可能なので以下に示した。

ブリ

$$metMb(\%) = (A - 17.10) / 0.85 \qquad (6)$$

ゴマサバ

$$metMb(\%) = (A - 14.73) / 0.96 \qquad (7)$$

マサバ

$$metMb(\%) = (A - 18.78) / 0.83 \qquad (8)$$

マダイ

$metMb(\%) = (A - 14.86) / 0.86$ (9)

ミナミマグロ

$metMb(\%) = (A - 7.00) / 0.94$ (10)

なお、A は尾藤法で求めた値である。換算式は Mb メト化率算出式と同様に各魚種間で異なる式を示す結果となった。ミナミマグロの換算式（10）は、他の魚種の場合に比べて尾藤法で求められる値との差が小さいことを示した。

考察

血合肉や赤身魚の普通肉の赤い色調は刺身等において重要な商品指標である。これらの色調は、Mb の酸素結合状態や鉄原子の酸化・還元により影響を受けるため、[2] Mb が酸化した状態である metMb の存在比は色調の重要な指標となる。魚類 Mb のメト化率測定方法としては、マグロ Mb を対象とした尾藤法、[6] カルボニル Mb と metMb を調製して求める佐野らの方法 [18,19]、および畜肉 Mb のメト化率測定法 [20] を利用した方法などが報告されている。尾藤法に比べて他の方法は煩雑であり一般的な品質分析への応用例は少ない。そのため、尾藤法はマグロ Mb を対象としたメト化率の簡易測定法であるが、マグロ以外の魚種の Mb のメト化率測定に応用されてきた。[21−24] 前報 [5] において、カンパチ Mb のメト化率の測定で尾藤法を応用して得られる値は、活きしめ直後の高鮮度状態でも 20 % 以上の高い値を示すことを認めた。その原因を濁りのない精製 Mb で検討したところ、尾藤法で採用されている波長の 503 nm （metMb の吸収極大波長として定義されている）における metMb と oxyMb の吸光値比がマグロ Mb と大きく異なるためであることを明らかにした。魚種により Mb のメト化率測定方法を検討する必要があることが示唆されたため、本研究ではゴマサバ、マサバ、マダイ、ブリ、ミナミマグロを対象としてメト化率測定法の検討を行った。各魚種の Mb から調製した oxyMb, deoxyMb, metMb の可視部吸収スペクトルはいずれも IS 点を有し、この IS 点における吸収値を基準値としてメト化率測定式（式１−５）を導くことができた。各魚種 oxyMb の加熱処理を行い尾藤法と本報告の方法で Mb メト化率を測定した結果、oxyMb 調製直後において尾藤法で得られる値が約 15 ~ 19%高いことをミナミマグロ以外の各魚種 Mb で確認された。（図 4） Mb 溶液が清澄であるにもかかわらず尾藤法で解析するとミナミマグロ以外の魚種で高い値を示すが、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することが推察された。[5] 各魚種 Mb の可

視部吸収スペクトル測定結果（図 2）より、503 nm における oxyMb と metMb の吸光値比（oxyMb/metMb）を求め表 3 に示した。ミナミマグロ Mb の吸光値比は 0.59 と他魚種の吸光値比と大きく異なる結果となった。すなわち、マグロ以外の各魚種 Mb の 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ので、尾藤法を応用すると 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明らかとなった。

表 3　各魚種 Mb の 503 nm における oxyMb と metMb の吸光値比

yellowtail (n = 39)	spotted mackerel (n = 19)	chub mackerel (n = 17)	red seabream (n = 23)	southern bluefin tuna (n = 11)
0.64 ± 0.08	0.62 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.04	0.59 ± 0.06

また、本研究では近縁種であるゴマサバとマサバのメト化率算出式の関係について検討を行った。両魚種 Mb の IS 点は 524 nm と 523 nm とわずかな差を示したが、両魚種の Mb メト化率算出式の(2)と(3)は非常に近い算出式である。ゴマサバ Mb メト化率算出式 (2)でマサバ Mb メト化率を算出した場合の両値の関係を図 5 に示した。ゴマサバ Mb のメト化算出式を応用して得られた値はマサバ Mb メト化率算出式で得られる値とほぼ同じ値を示したので、マサバ Mb メト化率算出式とゴマサバ Mb メト化率算出式は同じ式として扱えることが明らかとなった。

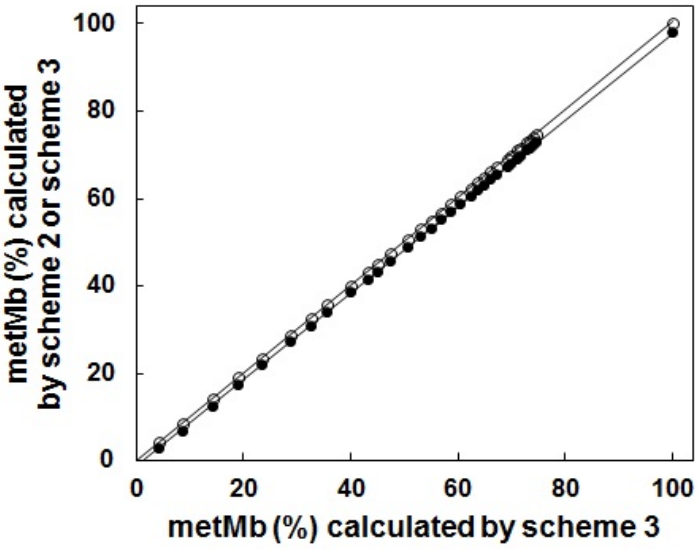


図５　ゴマサバとマサバの Mb メト化率測定式の関係

(○)：図３−C のマサバのデータからマサバ Mb メト化率測定式（式３）で計算した値.

(●)：図３−C のマサバのデータからゴマサバ Mb メト化率測定式（式２）で計算した値.

尾藤法と本報告で確立した Mb メト化率算出法の関係では、算出される Mb メト化率の両値はすべての魚種でほぼ直線関係を示したことから、尾藤法を応用して算出した値から正確なメト化率を求める換算式も得られた。マグロ Mb のメト化率測定法である尾藤法を本研究で検討した各魚種の Mb に応用し算出したメト化率は、測定時の Mb 溶液に濁りが無ければ正確な値に換算することが可能である。なお魚の普通肉や血合肉から抽出した粗 Mb 溶液の清澄化法については、前報で示した硫安分画法が簡便で効果的な方法である。[5)]

本研究で、魚種ごとに Mb メト化率測定法の構築が必要であることが明らかとなった。水産物加工や鮮度保持技術の開発検討を行う際に、鮮度状態や色調を数値として示すことは非常に重要である。現在、赤身魚の重要魚種であるサンマ *Cololabis saira*, マイワシ *Sardinops melanostictus*, マアジ *Trachurus japonicus* の Mb のメト化率測定法について、本研究と同様の方法で測定法を構築したので次に報告を予定している。

参考文献

1)　木村郁夫．水産食品の鮮度と品質．マテリアルライフ　1993; **5**: 45-51.

2)　杉本昌明．冷凍冷蔵中における水産物の色調変化．日本コールドチェーン研究会誌「食品と低温」　1986; **12**: 137-142.
3)　岡﨑恵美子．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)　Inohara K, Kimura I, Yuan C. Suppressive effect of ATP on autoxidation of tuna oxymyoglobin to metmyoglobin. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 503-511.
5)　井ノ原康太，黒木信介，尾上由季乃，濱田三喜夫，保　聖子，木村郁夫．筋肉内 ATP による冷凍カンパチ血合肉の褐変抑制．日本水産学会誌 印刷中（11 月号掲載予定）
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抽出液の吸光曲線との関係．日本水産学会誌 1964; **30**: 847-857.
7)　Shikama K. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: A venerable puzzle. *Chem. Rev.* 1998; **98**: 1357-1373.
8)　松浦文雄，橋本周久，黄川田槇，山口勝巳．魚類ミオグロビンの自動酸化速度について．日本水産学会誌　1962; 28: 210-216.
9)　Chow CJ. Relationship between the stability and autoxidation of myogobin. *J.Agric.Food Chem.* 1991; **39**: 22-26.
10)　Chow CJ, Ochiai Y, Watabe S, Hashimoto K. Autoxidation of bluefin tuna myoglobin at around freezing point. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 473-478.
11)　Chow CJ, Ochiai Y, Watabe S, Hashimoto K. Effects of freezing and thawing on the autoxidation of bluefin tuna myoglobin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 2073-2078.
12)　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.
13)　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.
14)　Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **27**: 955-960.
15)　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.

16)　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.

17)　Gornall A.G, Bardwill C.J, David M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; **177**: 751-766.

18)　佐野吉彦，橋本周久．冷凍貯蔵中に於ける魚肉の変色に関する研究-Ⅰ.混合溶液中の Fe^{II}型及び Fe^{III}型ミオグロビンの同時定量法について．日本水産学会誌 1958; **24**: 519-523.

19)　佐野吉彦，橋本周久，松浦文雄．冷凍貯蔵中における魚肉の変色に関する研究-Ⅱ．魚肉中の Fe^{II}型及び Fe^{III}型ミオグロビンの同時定量法．日本水産学会誌 1959; **25**: 285-289.

20)　Krzywicki K. The determination of hem pigments in meat. *Meat Sci.* 1982; **7**: 29-36.

21)　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.

22)　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.

23)　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.

24)　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.

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。以下に得られた結果の総括を示す。

１）今年度は、鮮度指標候補の ATP 核酸関連化合物の消長と K 値変化および肉色の透明感、遊離アミノ酸成分変化との関係について、マダイ、ギンザケについて検討を行った。肉色の透明感は、マダイについて検討し時間経過とともに白濁していく様子を数値として表すことができた。また、ギンザケの筋肉中の遊離アミノ酸については、遊離アミノ酸の総量で大きな増加は見られないが、タウリンと１−メチルヒスチジンとアラニン、グルタミン酸等の増加が認められた。このような遊離アミノ酸組成変化は鮮度評価指標の一つとなることが期待される結果である。

クエを対象に保管温度（ 0, 5, 10 ℃）の影響を調査した。クエの魚種に特有な ATP 核酸関連化合物の経時的変化が確認できた。クエの pH は 6.6 以上と高い値であり白身魚の性状を示した。

２）鮮度の簡易測定法として、蛍光指紋と K 値に関する研究の紹介があった。魚体表面の蛍光指紋を測定し、K 値との高い相関が認められる結果が示された。今後、各魚種での K 値と蛍光指紋との関係などについて基礎データを集積し、蛍光指紋の魚鮮度を対象とした装置の開発がなされれば、K 値の簡易測定法として応用されることが期待される。

３）ATP 核酸関連化合物の消長について影響を及ぼす 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、IMP 分解酵素が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確認している。今年度は IMP 分解酵素の魚種差を解明するために検討を行った。ヒラメ、ホッケ、アイナメ、マダラの致死後の K 値変化を確認し、ヒラメの K 値変化が最もゆっくりと進行することを確認した。

一方、IMP 分解酵素活性を比較するために、筋肉ホモジネートを透析して得られる粗酵素を用いた試験ではヒラメの粗酵素の活性が低い結果となった。酵素の安定性が原因ではなく、IMP 分解酵素に影響する何らかの因子が存在することを示唆する結果となった。魚肉中の IMP 分解の魚種特性を説明するための研究をさらに進める予定である。

４）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。冷凍輸送・保存における品質上の課題点は血合肉や赤身肉の褐変現象である。褐変は、酸素結合タンパク質のミオグロビンのヘム鉄が酸化して形成するメトミオグロビン（Mb）が蓄積するためである。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昨年度カンパチ Mb のメト化率測定法を確立した。今年度はブリ、マサバ、ゴマサバ、ミナミマグロ、マダイの Mb メト化率測定法を新たに確立した。

以上の様な K 値変化や K 値変化の魚種特性および Mb メト化率等の指標との関係、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ブック化すれば、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，蛍光指紋、ATP 濃度と冷凍中のメト化進行、遊離アミノ酸組成変化、魚肉の透明度、各魚種 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 核酸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℃に保蔵したときの、pH、乳酸量、K 値、ミオグロビン性状の変化などについて明らかにする。最終年度は、これらのデータを総合的に利用し、各魚

種の鮮度・品質を評価するために参考となる科学的データブックの作成を行う。

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 28 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
	岡﨑惠美子	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	国立研究開発法人水産総合研究センター中央研究所主任研究員
	山本　均	一般社団法人日本海事検定協会 理化学分析センター長兼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 理化学分析センター チームリーダー
	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
	安部なつみ	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 27 年 6 月 29 日（東京海洋大学）

第 2 回 平成 28 年 1 月 30 日（東京海洋大学）