

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 29 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。

平成 27 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。

平成 28 年度は、魚肉中の K-値上昇を決定する IMP 分解と腐敗微生物の関与に関する研究、ヒラメ肉低温貯蔵中の二相的な IMP 分解に関する研究、交流電界印加によるホタテの鮮度保持に関する研究および首折り法で即殺したゴマサバ筋肉の死後変化の遅れに関する研究を行ったので結果を報告する。

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                                  | 2  |
| 1. 本事業について                          | 5  |
| 1-1 報告書の適用範囲等                       | 5  |
| 1-2 事業目的                            | 5  |
| 2. 研究背景と目的                          | 6  |
| 2-1 研究背景                            | 6  |
| 2-2 研究目的                            | 6  |
| 3. 鮮度・品質測定方法の検討                     |    |
| 3-1 魚肉中の K-値上昇を決定する IMP 分解と腐敗微生物の関与 | 8  |
| 3-2 ヒラメ肉低温貯蔵中の二相的な IMP 分解           | 16 |
| 3-3 交流電界印加によるホタテの鮮度保持               | 31 |
| 3-4 首折り法で即殺したゴマサバ筋肉の死後変化の遅れについて     | 45 |
| 4. 総 括                              | 53 |
| 4-1 本研究により得られた知見・成果                 | 53 |
| 4-2 今後の課題                           | 54 |

## 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）、岩手大学農学部袁春紅研究室の参画を得ている。

### 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、魚肉中の K-値上昇を決定する IMP 分解と腐敗微生物の関与に関する研究、ヒラメ肉低温貯蔵中の二相的な IMP 分解に関する研究、交流電界印加によるホタテの鮮度保持に関する研究および首折り法で即殺したゴマサバ筋肉の死後変化の遅れに関する研究を行ったので結果を報告する。

## 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、岩手大学、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 魚肉中の K-値上昇を決定する IMP 分解と腐敗微生物の関与

北海道大学大学院水産科学研究院

今野 敬子, 今野久仁彦

生きているときに生命維持のために再生産が続けられる ATP は死後、連続した酵素反応により Hx(ヒポキサンチン)まで分解される。最終化合物までの反応のなかで、IMP から HxR への IMP 分解が遅く、この先まで反応が進行しているかの指標が K 値である。これまでは、核酸関連化合物の抽出操作が煩雑であったため、保管中の変化について大まかな進行しか追跡されなかった。これまでの本プロジェクトの成果として、抽出操作の簡便化がある。これにより、IMP 分解あるいは K 値上昇は単純な変化を示さず、二相性を示すことが知られた。この後期に起こる急激な反応に腐敗微生物がかかわっていることが抗生物質添加の実験から推察してきた。今年度は、これらの成果を受け、IMP 分解に腐敗微生物の生産する酵素がかかわっていることをさらに検証し、ヒラメのように K 値上昇が遅い魚種では微生物の生産する IMP 分解酵素の寄与が含まれていることを明らかにした。

また、鮮度変化は本来鮮魚、未凍結品で議論されるが、凍結品を解凍して解凍魚として販売される場合も見かけられる。このように、一旦凍結した魚肉では、その後の冷蔵貯蔵中に急激な K 値上昇が起こるのかについても検討した。

#### 方法

試料として、活魚店で購入したヒラメ（養殖，天然），を用いた。魚肉の貯蔵は，即殺後のフィレあるいはフードカッターで 15 秒処理し、ミンチ状にした魚肉(5-10 g)をラップに包み，設定温度で保存した。この際、微生物の関与を知るため、150 ppm のクルラムフェニコールを添加したものも作成し、同じ条件で貯蔵した。核酸関連化合物(Nuc)の分析は，1g の魚肉を用い，昨年までに確立した方法で抽出した。最終的な Nuc 構成成分の分析は，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 から生成する無機リン酸(Pi)のを定量して求めた。

IMP 分解活性の測定は 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM IMP の反応組成を用い、25°C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。

魚肉貯蔵中の微生物繁殖と IMP 分解活性の変化は上記のホモジネートを試験管に採取し、一部には抗生物質を添加し、10、5、0°Cの冷蔵庫で保管した。継時的に IMP 分解活性を測定した。もし、微生物が酵素を生産するなら、活性の上昇が見込まれるはずである。

さらに、魚肉由来の IMP 分解酵素と微生物の生産する酵素を区別するため、熱安定性を比較した。そのため、ヒラメミンチを抗生物質添加、無添加の条件で貯蔵し、無添加で活性が上昇した貯蔵 14 日目の両魚肉から、ホモジネートを作成し、種々温度で 30 分加熱し、残存活性を求めた。

微生物が増殖すれば、IMP 分解酵素以外の酵素も生産している可能性が考えられる。

そこで、上記のホモジネート貯蔵中の筋原線維タンパク質の分解を追跡した。タンパク質の変化はホモジネートを SDS で溶解し、SDS-PAGE で解析した。

また、ヒラメ肉を一旦-20°Cで 1、3 日間凍結し、その後 0°Cに戻し、保管を続け、IMP 分解の進行を追跡した。

## 結果

### ヒラメ貯蔵中の IMP 分解に及ぼす抗生物質添加の影響

ヒラメ肉を 0°Cで貯蔵すると、ATP は直ちに IMP に変換されるが、IMP の減少は初期に遅く、後期に速い変化を示すことが知られている (図 1A)。後期の急激な変化は通常の酵素反応の機構では説明できないため、他の因子の関与が考えられた。様々な検討を行った結果、クルラムフェニコールを添加することで、後期の急激な IMP 減少が消失することを見出した (図 1B)。この結果は K-値は高感度の鮮度指標として開発されたものであるが、ヒラメのように K-値上昇が緩やかな場合は、これまであまり議論されてこなかった魚肉の腐敗に関わる微生物が IMP 分解に関与し、奇妙な IMP 分解現象を引き起こすことが明らかになった。しかし、微生物の関与は確認されたが、具体的に IMP 分解を促進させる因子を生成しているのか、あるいは IMP 分解酵素そのものを生産しているのかは結論が出せない。

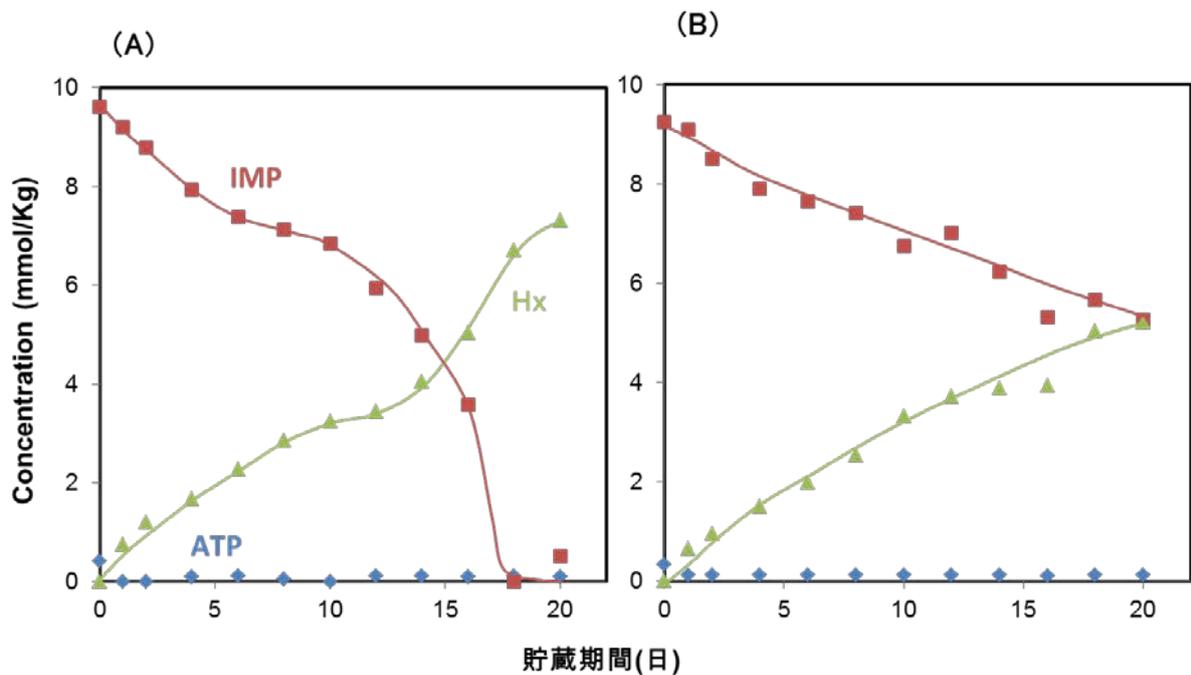


Fig. 1 ヒラメ肉貯蔵中の IMP 分解に及ぼすクロラムフェニコール添加の影響  
 ひき肉にしたヒラメを 150ppm のクロラムフェニコール非存在下(A)および存在下(B)  
 において 0C で保存し、ATP 分解の進行を追跡した。化合物は図中に示した。

そこで、ヒラメ肉を抗生物質なしで貯蔵し、IMP 分解が急激に進む 14 日まで貯蔵した魚肉からホモジネートを作成した。もし、微生物が IMP 分解酵素を生産するならば、このホモジネートには本来の魚肉由来の酵素に加え、微生物の酵素が含まれることになる。一方、魚肉に抗生物質を添加して貯蔵したものでは、急激な IMP 分解が起こらないので、魚肉由来の酵素のみが存在していることが期待される。両者を区別するため様々な試みを行ったが、熱安定性に差があることが判明した。図 2 に示すように、未加熱の酵素と比較すると、IMP 分解が急激になった抗生物質なしのホモジネートは抗生物質ありの魚肉から得られたものに比べ高い活性を示した。抗生物質ありの酵素は 50℃付近までの加熱ではあまり活性の低下が認められず、50-65℃で大きな失活が起こった。一方、抗生物質なしの系で得られたホモジネートの活性は 30℃付近から失活が認められ、大きな減少は 30-45℃で認められ、その後 60℃までに残りの活性が消失し、二相的な変化を示した。この結果は熱安定性の異なる二種の酵素が存在していること、魚肉由来の酵素に比べ、微生物由来の酵素は不安定であることが明らかになった。

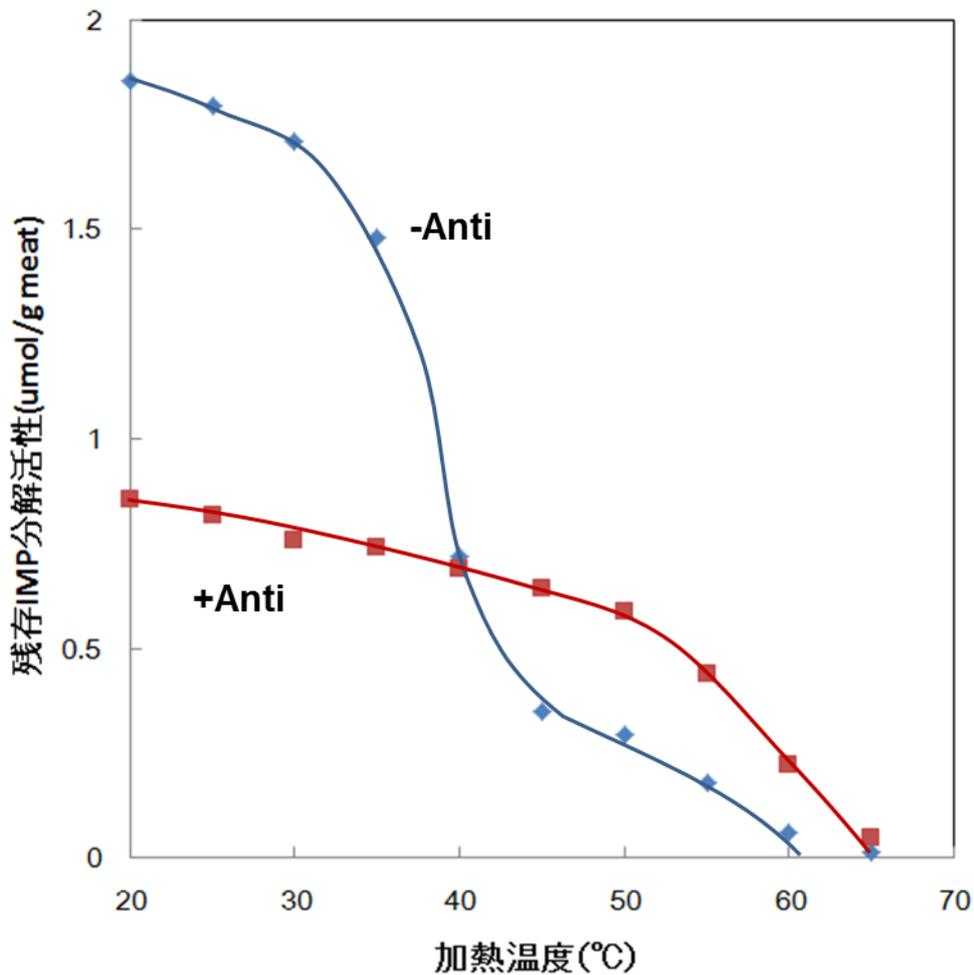


Fig. 2 魚肉、微生物由来の IMP 分解酵素の熱安定性の比較

ヒラメひき肉を図 1 と同じように抗生物質あり (+Anti)、なし (-Anti) の条件で 0°C において 14 日貯蔵し、それらからホモジネートを作成した。0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に十分透析した後、図中の各温度で 30 分加熱し、残存活性を測定した。活性は 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM IMP の条件で 25°C において測定した。さらに、魚肉 1g あたりの活性をして表示した。

#### ヒラメホモジネート貯蔵中の IMP 分解活性の変化

ヒラメ貯蔵中に微生物が繁殖し、その微生物が IMP 分解酵素を作り出していることが示された。そのことを確認するため、活魚のヒラメからホモジネートを作成し、それを試験管に分注し、10, 5, 0°C で貯蔵した (図 3)。この際、微生物の増殖を抑制する

ため10ppmのクルラムフェニコールを添加したものも準備した。0℃で貯蔵した場合、このような低濃度の抗生物質の添加で、活性は非常に緩やかに減少するのみであったが、無添加の場合は7日目から活性が上昇してきた。この結果は、新たな酵素が生成していることを示す。5℃の場合、抗生物質添加で活性の経時的な低下が認められるが、無添加の系では0℃より初期の貯蔵2日から活性上昇が起こった。さらに10℃の場合は、抗生物質添加の系でも5日目までは活性の上昇が抑制され、急激な失活が認められたが、その後、活性上昇に転じ、もはや微生物制御ができないことが示された。

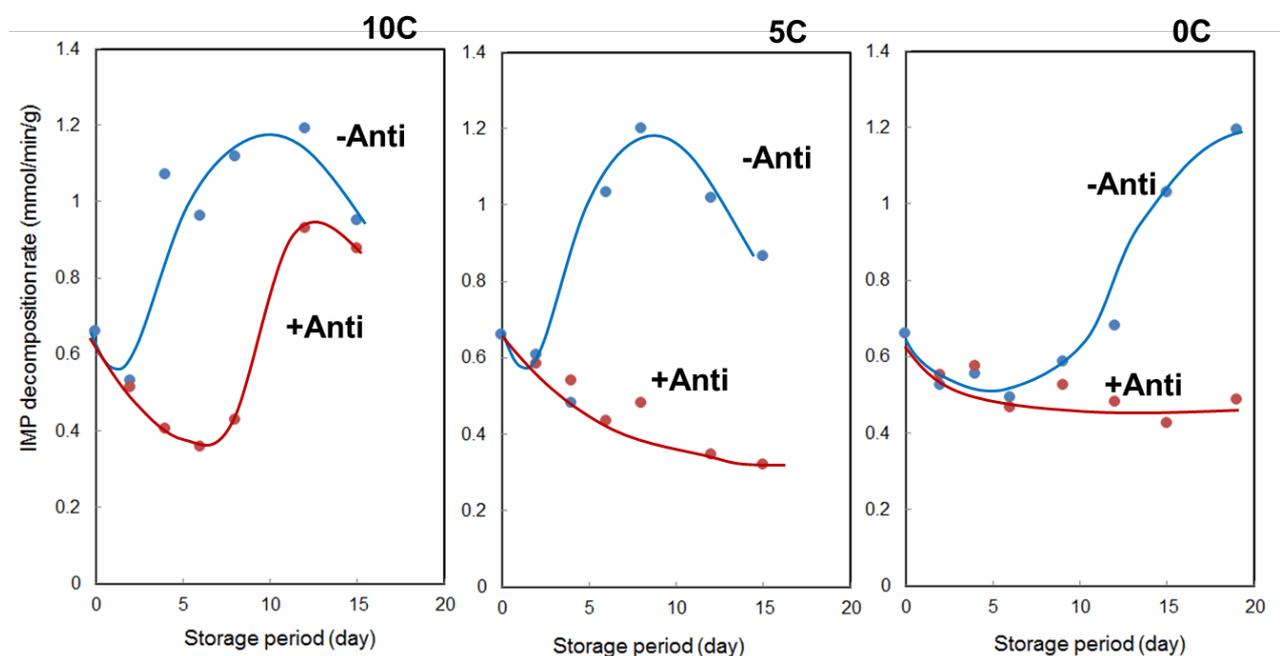


Fig. 3 ヒラメホモジネート貯蔵中の IMP 分解酵素活性に及ぼす抗生物質添加の影響  
新鮮なヒラメ肉からホモジネートを作成し、それを試験管に分注し、10ppm クルラムフェニコールの存在下(+Anti)、非存在下(-Anti)において10, 5, 0℃で保存した。図2と同じ反応組成液を用い測定した。

ホモジネート中に増殖した微生物はIMP分解酵素を生産していることが確かめられたが、増殖のために他の酵素も生産しているはずである。そこで、一つの試みとして、プロテアーゼの生産の有無を筋原線維の分解の解析から検討した。上記と同じように、ヒラメ魚肉のホモジネートを試験管にとり、クルラムフェニコールの有無の条件で

0°Cで保存し、継時的に筋原線維の分解を SDS-PAGE で追跡した。抗生物質が添加されている場合、21 日までの貯蔵中に筋原線維に含まれる主だったタンパク質成分に変化はなく、内在性酵素を含めプロテアーゼ活性はさほど高くないことが示された。一方、抗生物質無添加の場合は 14 日まではほとんどパターンに変化は認められないが、17 日から急激な分解が進行した。17 日ではミオシン重鎖(HC)の分解物と考えられるバンドが重鎖の下方に認められるが、(A)のバンドに大きな変化はない。しかし、21 日ではミオシン重鎖もアクチンもほぼ消失し、かなり強いプロテアーゼが生産されていることがわかる。

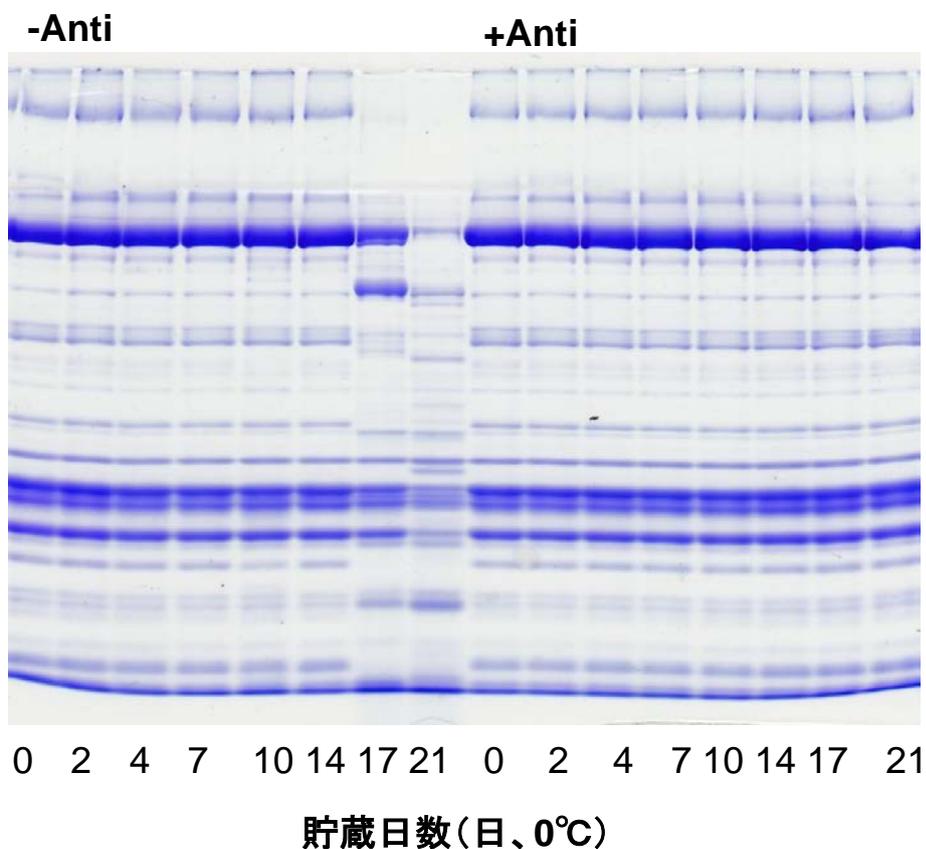


Fig. 4 ヒラメホモジネート貯蔵中の筋原線維タンパク質分解の進行

図3と同じヒラメホモジネートをフェニコールの存在下(+Anti)、非存在下(-Anti)において0°Cで保存した。継時的に取り出し、筋原線維の分解を SDS-PAGE で解析した。

この分解が認められる貯蔵期間は図1でIMP分解が急激に進行する期間と類似したも

のであった。魚肉の貯蔵とホモジネートの貯蔵は条件が異なるので、直接の比較はできないが、同じような日数が必要であることは同じ現象を見ていることを強く支持するものである。

### ヒラメ魚肉の凍結がその後の氷温貯蔵中の鮮度変化に及ぼす影響

通常、刺身の形態で魚肉を消費する場合は鮮魚のままの場合が多い。一方、流通、貯蔵の観点から冷凍した魚肉も刺身商材として広く流通している。そこで、そのような状況を想定し、活ヒラメ肉を一旦 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結したのち、氷温貯蔵し IMP 分解が凍結処理によりどのような影響を受けるかを検討した (図 5)。この実験では、活魚を使用したので、凍結前の 0 日の試料では IMP 含量は低く、まだ ATP が主成分である (図示せず)。そして、すでに示したように、貯蔵 1-2 日で ATP はすべて IMP に変換されている。この IMP は貯蔵 10 日にわたり高度に保たれたままであるのも、すでに報告した通りである。同じ魚肉を $-20^{\circ}\text{C}$ で一晩凍結すると、ATP の分解が 30%ほど進行し、IMP 量が上昇している。凍結魚肉からの核酸成分の抽出は凍結のままの魚肉に過塩素酸を添加し行っているため、解凍時の反応とは考えられない。凍結魚肉中でも ATP の分解が進行することを示している。それは凍結 3 日の試料での IMP 含量がさらに上昇し、50%以上の ATP が IMP に変換されていることからわかる。一旦凍結した魚肉でもその後の一日の氷蔵で IMP 含量は最大値に達し、氷温貯蔵中に未凍結品と同じように高濃度に維持されていた。同じ結果は凍結 3 日の試料でも得られ、高濃度 IMP は 10 日の間維持された。これらの結果は、一旦魚肉を凍結し、魚肉中に氷結晶が生成されても IMP 分解が促進されるような現象は起こらないことが示された。これは、高鮮度の状態で魚肉を凍結すれば、K 値の観点からは未凍結品と遜色のない高鮮度の品質が維持されることを示している。

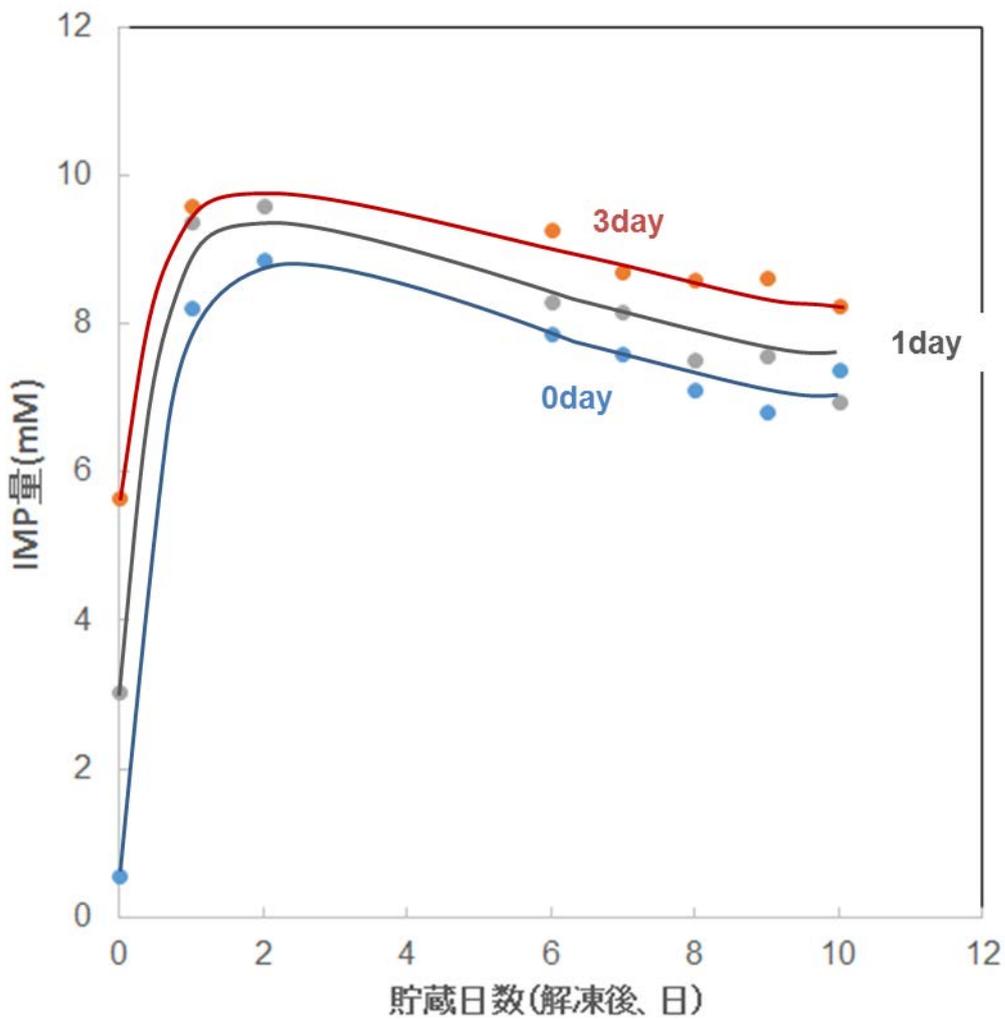


Fig. 5 魚肉の一次凍結処理がその後の IMP 分解に及ぼす影響

ヒラメひき肉を-20Cで1,3日間凍結させ、解凍後0°Cで貯蔵を続けた。この時のIMP含量の変化を追跡した。なお0は凍結処理をしていない試料である。図中の貯蔵期間は0°Cでの貯蔵期間を示し、凍結期間は入っていない。

### 3-2 ヒラメ肉低温貯蔵中の二相的な IMP 分解

呉 依蒙（北大院水，上海海洋大），張 佳琪（北大院水，浙江大），石 奇立（北大院水，上海海洋大），蛭谷幸司（北大院水，道網走水試）今野久仁彦（北大院水）  
はじめに

魚介類筋肉を刺身などの生食で消費することを想定し，K 値は有用な鮮度指標として広く利用されてきた。<sup>1-4)</sup> 生きている魚介類筋肉では生命活動に必要なエネルギーは ATP を ADP に加水分解する過程で生産される。生きている生物では，呼吸で取り入れた酸素を使い，ADP は直ちに ATP に再生され，筋肉内 ATP 濃度は常に高く維持されている。しかし，死後，血流の停止により酸素供給が停止すると筋肉中での ATP の再生は停止し，ATP は ADP に加水分解されたのち，一連の酵素群により，連続的に Hx まで分解される。この連続した反応の中で，IMP から無機リン酸が解離し，HxR に変化する反応が最も緩やかに進行し，総反応の律速段階となっている。この事実に基づき，K 値は総 ATP 関連核酸成分(Nuc)量に対する，IMP から生成した HxR と Hx の和の占めるパーセントとして定義される。オートサンプラー付きの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いることで多数の試料について K 値の計算に必要な ATP から Hx までのすべての成分量を比較的短時間で定量できるようになった。著者らは前報において，イオン交換クロマトグラフィーによる分析を前提に開発された Nuc 抽出法の各ステップを検証し，HPLC による分析では必要でないステップを除き，簡便化させた。<sup>5)</sup> これまでの方法における，特に，Nuc 抽出液の中和の目的はリン酸を含有する成分をイオン交換樹脂に結合させるためであると同時に，Nuc 成分の PCA による酸分解を抑制することである。PCA 溶液中の安定性を再検討したところ，分解されるのは ATP のみであるので，取扱いに気を付ける必要があるのは Nuc に ATP が含まれる場合のみであることも示した。それゆえ，K 値のみが必要な場合，あるいは ATP 消失後の試料では，PCA 中での保管でも結果に悪影響はない。

この簡便な Nuc 抽出法を用い，ヒラメ肉を低温貯蔵したときの，Nuc の組成変化を K 値が上昇するまで丁寧に追跡した。一般的に，K 値は刺身としての鮮度指標などとし

て利用されており、微生物が関与する腐敗を基準とした鮮度とは区別されて利用されてきた。ヒラメ肉を 0℃貯蔵したところ、蓄積された IMP がなかなか減少せず、2 週間にわたる長期貯蔵で二相的に減少した。それゆえ、ヒラメ肉中の IMP の分解は単純な酵素反応では説明されなかった。さらに、IMP が減少するような貯蔵期間ではヒラメ肉から腐敗臭が感知されたので、IMP の分解に、腐敗にかかわる微生物の関与が示唆された。これまで、カキ<sup>6)</sup>、クルマエビ<sup>7)</sup>に抗生物質を添加して貯蔵すると、IMP の分解が抑制され、同時に揮発性窒素成分の抑制も認められることが報告されている。さらに、腐敗マアジ肉から IMP 分解活性を有する微生物が単離、同定されている。<sup>8)</sup> 本研究では、長期間を要して K 値が上昇するような魚種の IMP 分解について、微生物の関与を再検討した。

## 材料と方法

実験試料として、市内の鮮魚店から活魚として購入したヒラメ *Paralichthys olivaceus* を用いた。同一種の魚でも、貯蔵中の変化には個体差が生じる。その影響を除くため、多数の試料を貯蔵し、分析値の平均、標準偏差などから議論することで、個体差を克服する手法が用いられている。個体差の影響を除く別の手法として、同一個体から得た魚肉に対し、条件を変え貯蔵し、その違いから条件の影響を議論することも可能である。この場合は、同種の実験を異なる個体を用いて、独立して複数回行い、同じ結論が得られるかという確認が必要である。本論文では、後者の方法を採用した。すなわち、体重 1kg 程度の一尾のヒラメから得た背肉を 5 g ずつ、プラスチックフィルムで包装し、様々な温度に設定した冷蔵庫 (Twinbird SC-DF25) 中で貯蔵した。なお、魚肉に抗生物質であるクロラムフェニコール (150ppm) を添加する場合は、魚肉をスピードカッター (Panasonic MK-K48P) で 30 秒ずつ 4 回破碎し、微細化した魚肉を用いた。

魚肉からの Nuc の抽出は前報に準じた。<sup>5)</sup> 氷冷下、貯蔵魚肉の中心部から約 1g を 50ml 容量のディスポーザブルプラスチック遠心管に精秤し、直ちに氷冷 5% PCA を 10mL 加え、ガラス棒で魚肉をつぶしながら 15 分間以上 Nuc を抽出した。その後、抽出液の pH が pH2.5-3.5 になるよう前もって決定しておいた一定量の 1 M KOH 溶液を変性タンパク質の沈殿を含んだままの抽出液に添加した。その後、使用 PCA, KOH 量を考慮し、全量が 20 mL になるよう蒸留水を加えた。一連の操作は一本のプラスチック製のディスポーザブル容器中で行った。これを静置、あるいは 1,700 xg で、10 分間遠心分離して得られた上澄みをポアサイズ 0.45  $\mu$  m の前処理膜 (トーソー マイシヨリディスク W-13-2) を透過させ、微小懸濁成分を除き、濾液を分析試料とした。なお、前報で示した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.5) (20 mM) の添加は必須ではない。複数の貯蔵条件で貯蔵中の Nuc 組成変化を追うような場合は、同時点で複数の試料の分析が必要になる。この場合は、約 1 g を精秤し、最終的に魚肉中の含量に換算することで対応することができる。

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<sup>7)</sup>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分離、定量した。

魚肉中の総 IMP 分解活性を求めるため、ヒラメ肉 (2 g) に対して 8 mL の 0.1 M NaCl, 20 mM Tris HCl (pH 7.5) を加え、ポリトロン (Polytron PT 3100, Ninematica AG, Littau, Switzerland) でホモジナイズして (16,000 rpm, 30 秒ずつ 4 回) ホモジネートに変換させた。このホモジネートを同液に氷冷しながら、透析した。外液は 2 回以上交換し、魚肉由来の低分子成分の除去したものを酵素試料として用いた。富岡ら<sup>9)</sup>が用いているように、反応組成に Mg イオンを添加し、0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM IMP の条件下、25°C において測定した。反応の進行は IMP 分解で生じる無機リン酸を比色定量することで追跡した。すなわち、反応を 5% PCA で停止後、生成無機リン酸をリンモリブデン酸法で比色定量した。<sup>10)</sup> また、活性はホモジネートにした時の魚肉の希釈率 (2g / 10 ml), 用いた粗酵素量 (0.2 ml enzyme / 0.8 mL reaction

mixture)から, 1 分間で 1 kg 相当の魚肉が加水分解する IMP のミリモル数(mmol/min/kg muscle)で表した。

## 結果

### ヒラメ肉低温貯蔵中の Nuc 成分の変化

ヒラメ肉を 0°C , 10°C で保存した時の Nuc 成分の変化を Fig.1a,b に示す。本研究では個別に包装した魚肉を経時的に一個ずつ取り出し, それを分析する方法を採用した。同様の実験を試料, 日時を変えて複数回繰り返したが (図示せず), 多少の違いは認められたが, 本質的な Nuc 組成の経時変化は再現されることを確認している。この Fig. 1a の 0°C 貯蔵の場合は 16 日にいたる貯蔵期間に 23 点で分析を行っている。即殺後のヒラメ肉の Nuc の分析から, 構成成分のほとんどを ATP が占めていた (約 8.5 mmol/kg)。ATP の加水分解生成成分である ADP も少なく (図示せず), ヒラメの即殺処理が適切に行われたことが示された。ATP は 0°C では 1.5 日, 10°C では 2.5 日くらいで消失し, 10°C 貯蔵の方がやや緩やかに減少した。この結果は, 既報の通りである。<sup>11)</sup> そして, ATP の消失と対応して IMP の生成が認められた。ADP, AMP の蓄積はほとんど認められなかった (図示せず)。

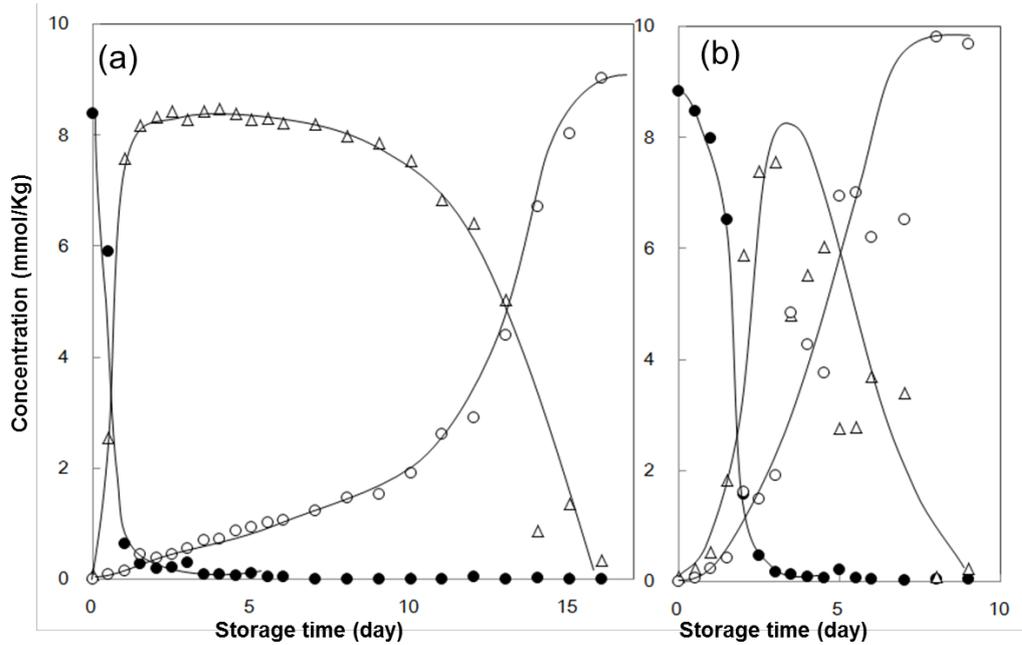


Fig. 1 ヒラメ肉を 0°C , 10°C で保存した時の Nuc 成分の変化

ヒラメ肉を(a) 0°C、(b) 10°C で保存した。● : ATP, △ : IMP, ○ : Hx

また、いずれの温度でも、ATP の最終分解生成物は Hx であり、HxR の蓄積もほとんど観察されなかったので、IMP が HxR に加水分解された後ただちにリボースの解離反応が起きたことを意味する。すなわち、IMP 分解段階が総反応の律速段階であることを確認した。

魚肉を 0°C 保存した場合は、貯蔵 10 日位までの IMP 減少は非常に緩やかで、高濃度のまま維持されていた。その後、16 日までの比較的短期間で急激に消失した(Fig. 1a)。本論文では、IMP の減少が緩やかな期間を初期、急激に減少する期間を後期と呼ぶことにする。一方、魚肉を 10°C 保存した場合、当然のことながら、0°C に比べ短期間で IMP の減少が認められた(Fig. 1b)。貯蔵 4 日で IMP は最大 (約 7.5 mmol/kg) となり、その後貯蔵 8 日程度で消失した。0°C 保存でみられた IMP 量の二相的な変化は認められなかった。

## ヒラメ肉貯蔵中の IMP 分解に対するクロラムフェニコール添加の影響

ヒラメを 0°C で 12 日程度貯蔵すると、腐敗臭が確認され、明らかに腐敗菌が増殖していることが推定された。この時期に IMP 分解が起きているので、増殖が急激な IMP の分解に関与しているのかを知るため、抗生物質のクロラムフェニコールを魚肉に添加し、微生物の増殖を抑制した条件で魚肉を貯蔵し、IMP 分解の様子を追跡した。ここでは、クロラムフェニコールを均一に魚肉に混合するため、ひき肉にしたヒラメ肉を用いた。ひき肉で保存した時の Nuc 組成の変化の様子を Fig. 2a に示した。魚肉をスピードカッターで微細化した後、1 時間以内に PCA 溶液を添加し、Nuc 抽出を行ったが、この短い時間内に ATP はほぼ完全に消失し、貯蔵当初から Nuc の主成分は IMP に変わっていた。貯蔵中の IMP 量はやはり二相的に変化し、緩やかな減少に引き続き急激な減少が認められた(Fig. 2a)。急激な IMP 量低下の時期が Fig. 1 と多少異なるが、大まかな IMP 量の変化は魚肉そのものの貯蔵の場合と同様であった。それゆえ、ひき肉にすることは IMP 分解にさほどの影響を与えないと判断した。Fig. 1 と比較すると、ひき肉で貯蔵した場合の初期の IMP 含量低下速度が多少大きいようである。このひき肉に抗生物質を添加すると(Fig. 2b)、初期の IMP 含量は無添加とほとんど同じであったが、貯蔵 13 日から始まる IMP 量の急激な減少が認められなくなった。その結果、IMP は単純減少するように変化した。抗生物質無添加では貯蔵 18 日で IMP が消失するのに対し、抗生物質を添加した場合はまだ約 5 mmol/kg の IMP が維持されていた。この結果から、この抗生物質に感受性のある腐敗菌により生成された IMP 分解酵素が魚肉の長期保存中の IMP 分解にかかわっていると結論した。なお、抗生物質の添加で魚肉の腐敗臭の発生が抑制されたので、腐敗菌の増殖が抑制されていることを定性的に確認した。

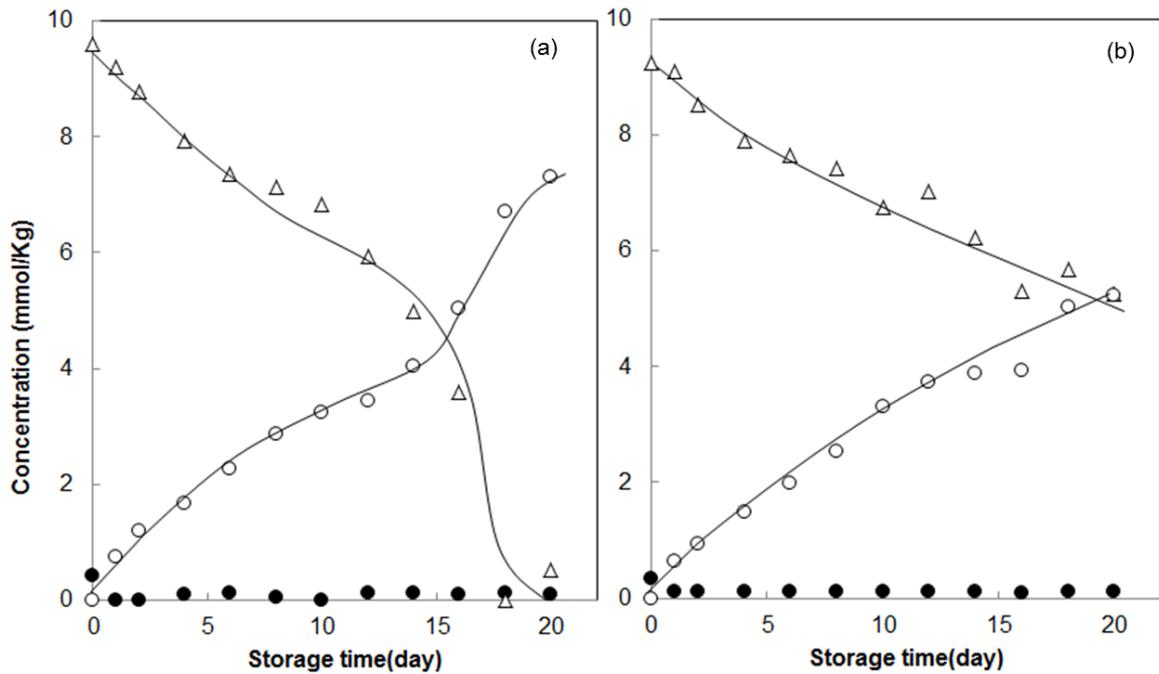


Fig. 2 ヒラメミンチ肉冷蔵保存中の IMP 分解様式におよぼすクロラムフェニコール添加の影響

(a)ヒラメミンチ肉、(b)クロラムフェニコール 150 ppm を含むヒラメミンチ肉を 0°C で保存した。● : ATP, △ : IMP, ○ : Hx

魚肉をそのまま保存した場合、腐敗菌で汚染されるのは魚肉表面であると考えられる。そこで、0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)に 150ppm になるようクロラムフェニコールを溶解し、それにキムワイプ（日本製紙クレシア，東京）を浸漬し、それでヒラメ肉(5 g)を包んだ上、その上から乾燥を防ぐためプラスチックフィルムで包装し、0°C で貯蔵した。この時のヒラメ肉の Nuc 組成の変化を Fig. 3 に示した。この実験に用いたヒラメの場合、Fig. 1 の場合に比べ、IMP 濃度が高く維持される期間が短く、6 日以降に急激な減少に転じ、貯蔵 16 日で IMP は完全に消失した(Fig. 3a)。一方、抗生物質存在下で保存した場合は(Fig. 3b)、貯蔵 3 日で IMP 量は最大値 (6.8mmol/g) に達したのち、貯蔵期間にわたり緩やかに、一方的に減少し、貯蔵 20 日でもまだ、約 2.8

mmol/kg の IMP が残存していた。これらの結果から、貯蔵後期の IMP 分解に腐敗菌が関与していることが確認された。急激な IMP 分解が開始される貯蔵期間が異なるのは腐敗菌の汚染の程度が違っていることが理由かもしれない。

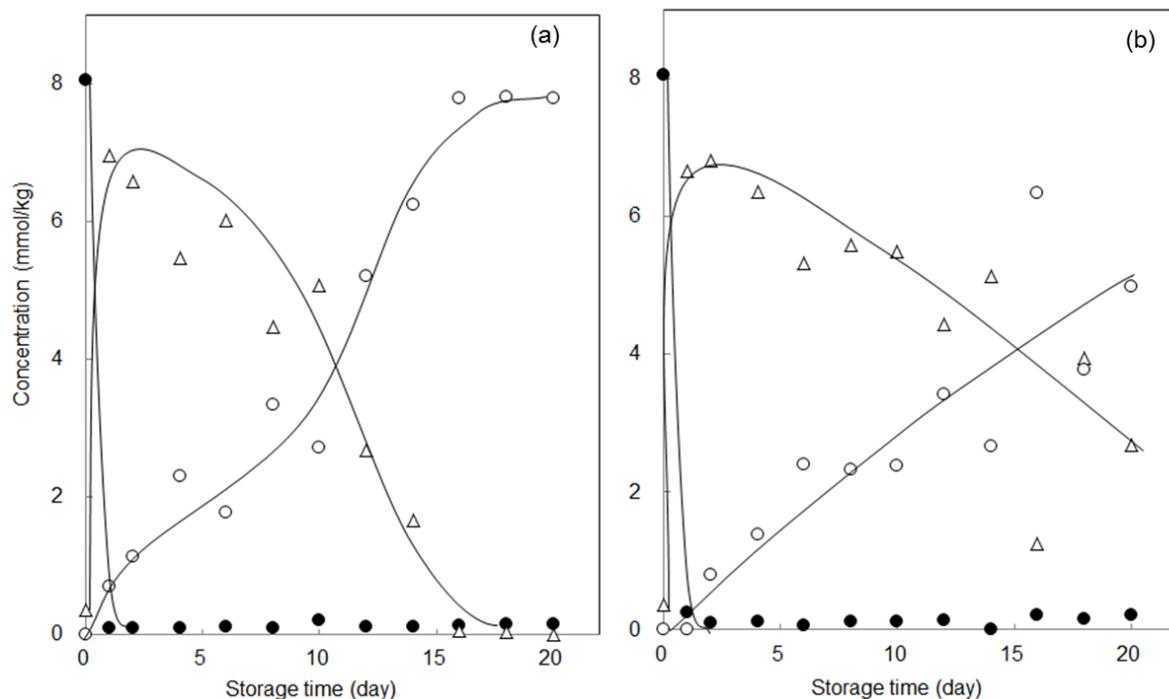


Fig. 3 ヒラメ肉冷蔵保存中の IMP 分解様式におよぼすクロラムフェニコール液含有紙包装の影響

(a) フィルム包装したヒラメ肉、(b) クロラムフェニコール 150 ppm を含む紙で包みフィルム包装したヒラメ肉を 0°C で保存した。

● : ATP, △ : IMP, ○ : Hx

### 種々温度での貯蔵中のヒラメ肉中での IMP 分解に対する抗生物質添加の影響

魚肉中で起きる IMP 分解は内在性の酵素が触媒する反応であるので、0°C に比べ 10°C の方がより IMP 分解は速やかに進行した(Fig. 1)。貯蔵温度を上昇させると、腐敗菌の増殖も促進されるが、内在性酵素の IMP 分解活性上昇の方が大きいなら、微生物由来の酵素の寄与が認められる前に IMP が消失することが予想される。この場合、IMP 分解に対する抗生物質添加の影響は認められないことになる。そこで、ヒラメひき肉

中での IMP 分解に対する抗生物質の添加の影響を 0,10,20°C の温度で比較した (Fig. 4)。

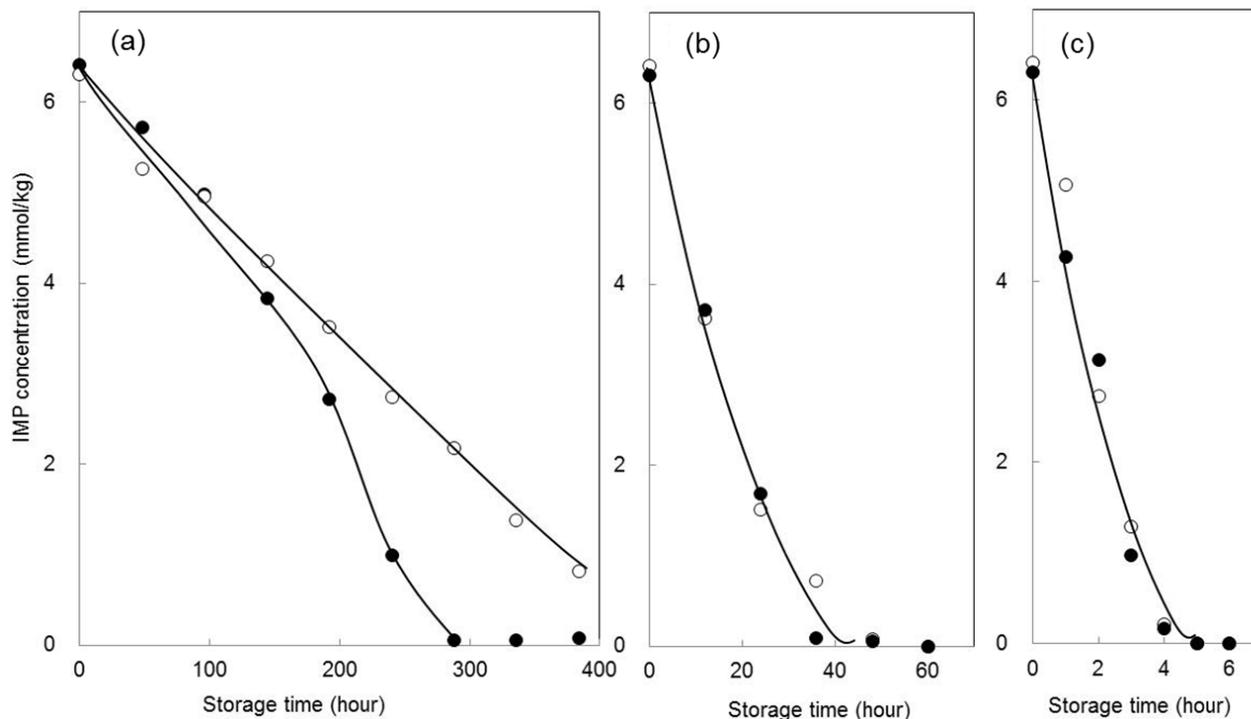


Fig. 4 ヒラメひき肉中での IMP 分解に対するクロラムフェニコールの添加の影響を 0,10,20°C の温度で比較

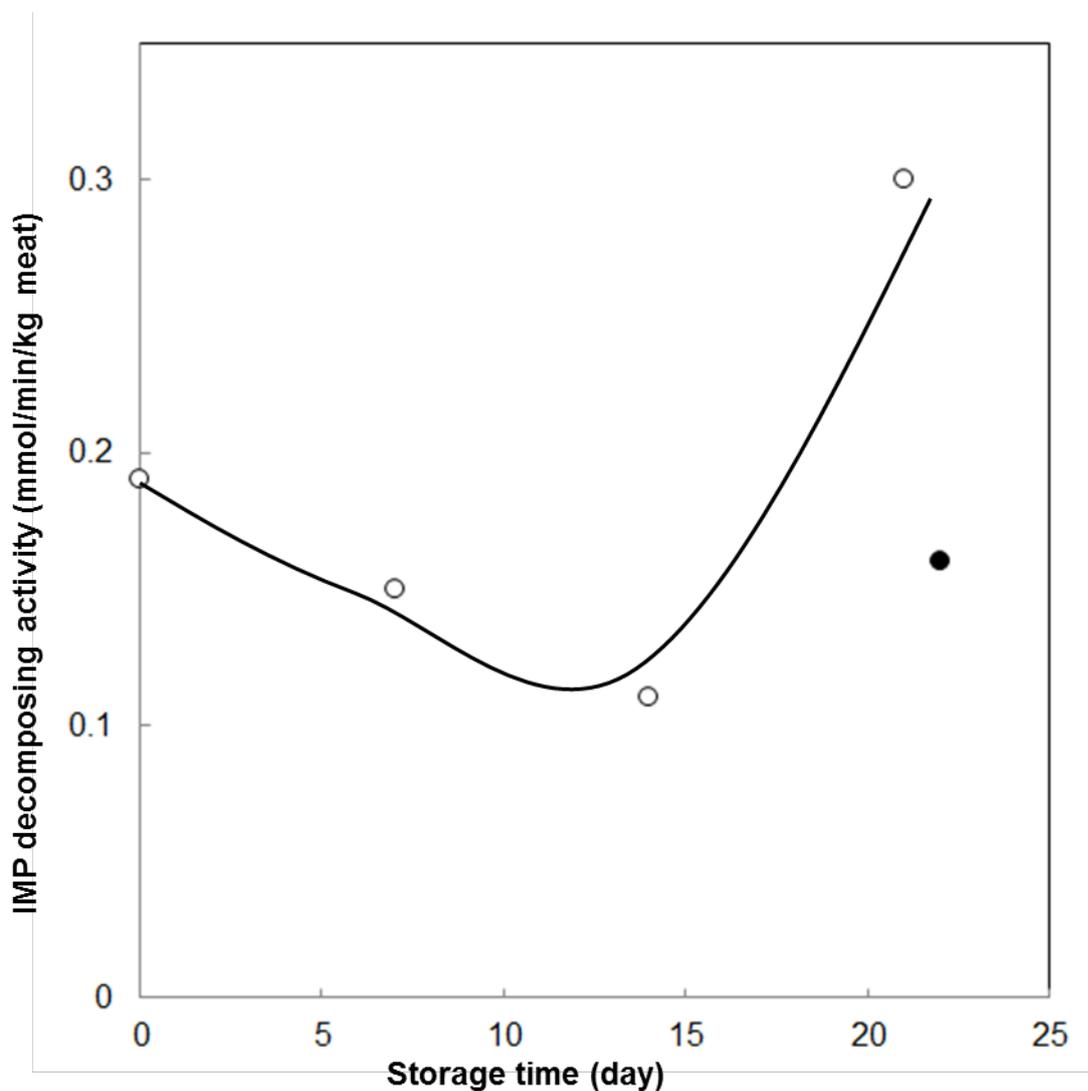
ヒラメひき肉のみ (○)、クロラムフェニコール 150 ppm 添加ひき肉 (●) を (a):0°C, (b):10°C, (c): 20°C で保存した。

ここでは IMP 量の変化のみを示している。0°C では Fig. 3 で示したように 8 日 (192 時間) までは両条件で IMP 量の減少に差がないが、その後、抗生物質無添加区で急激に減少するのに対し、添加区ではそのままの速度で減少した。すなわち、抗生物質添加効果は貯蔵後期にのみ検出された(Fig. 4a)。しかし、10°C 貯蔵の場合、IMP が消失する時間が短縮され、約 1.5 日 (36 時間) で消失したが、抗生物質添加の影響は認められなかった(Fig. 4b)。同じように、20°C で貯蔵した場合、さらに短時間で IMP は消失したが (約 4 時間)、抗生物質の有無はやはり影響しなかった(Fig. 4c)。すなわち、

抗生物質そのものが IMP 分解を抑制しているわけではないことが示された。なお、この試料に関して、10°C や 20°C でのこの貯蔵期間では抗生物質を含まない場合も、官能的に腐敗臭の発生は認められなかった。

### 腐敗菌増殖によるヒラメ肉の総 IMP 分解活性の上昇

腐敗臭が感じられるような貯蔵魚肉中では IMP 分解が顕著になった。もし、微生物が IMP 分解酵素を生産しているとするならば、このような魚肉全体での IMP 分解活性が上昇しているはずである。全活性を測定する手段として、酵素を何らかの緩衝液で抽出する手法があるが、すべてが抽出されるという保証がない。本研究では貯蔵魚肉をそのままホモジナイズし、そのホモジネートを粗酵素とみなし活性を測定する方法を採用した。抗生物質有無の条件でヒラメひき肉を 0°C で貯蔵し、経時的に取り出し、これを定量的にホモジネートに変換させ、さらに、活性に影響を与えるかもしれない低分子成分を透析で除去したホモジネートを用いて活性を測定した。活性の単位は 1kg の魚肉で 1 分間に分解する IMP の mmol と定義した。Fig. 5 に示すように、貯蔵前のホモジネートの活性は約 0.18 mmol/min/kg であったが、貯蔵期間 14 日では 0.11mmol/min/kg に低下した。しかし、貯蔵 21 日目に活性は 0.30 mmol/min/kg まで上昇した。一方、抗生物質を添加して 22 日間保存した場合は、0.16 mmol/min/kg の活性を示し、抗生物質無添加の半分の値であった。この結果から定性的ではあるが、腐敗にかかわる微生物が IMP 分解酵素を生産しており、それが IMP 分解に促進し、結果として二相的な変化を示すようになったと結論した。



**Fig. 5** ヒラメ肉の冷蔵保存中における総 IMP 分解活性変化に及ぼすクロラムフェニコール添加の影響

ヒラメミンチ肉を使用した。(○)：ミンチ肉のみ、(●)：クロラムフェニコール 150 ppm 含有ミンチ肉を 0°C で保存した。総 IMP 分解活性は「材料と方法」の項で示した方法で測定した。

## 考察

魚肉の保存中の K 値変化は魚種によって異なる。本研究で用いたヒラメは K 値上昇が遅い魚種として知られている。<sup>3)</sup>事実、0°C で保存すると、魚肉中の IMP はかなり長期間高濃度を維持しており、分解生成物である Hx の生産は非常に遅く、K 値上昇はかなり緩やかに進行した。(Fig. 1) 貯蔵中の IMP 含量の低下は用いた個体により多少異なったが (Figs. 1,3), いずれの場合も緩やかな変化に引き続いて IMP が完全消失するまでの急激な減少に分けることができた。また、本研究では魚体全体の保存ではなく、魚肉を保存する方法を採用したので、このような場合の特殊な変化である可能性も考えられたが、魚体を低温貯蔵した場合にも K 値上昇が二相的な変化をするという事実が他の魚種で報告されているので、用いた魚肉の形態が理由ではないと判断した。<sup>3)</sup> IMP 分解は内在性酵素が触媒していると考えられているが、<sup>9)</sup>反応組成が変わらない限り、途中で速度が大きく変化をすることは考えにくい。すなわち、もし、反応中に速度が変化するなら、反応に影響を与える何らかの因子が反応系に加わったと推定できる。通常の酵素反応系では酵素の量が増大することは想定できないが、魚肉から腐敗臭が感じられるようになり、腐敗菌の増殖が疑われるような場合は、微生物由来の IMP 分解酵素が加わり、酵素総量が増加することは想定可能である。

すでに、クルラムフェニコールの添加はカキ<sup>6)</sup>、クルマエビ<sup>7)</sup>、マアジ<sup>8)</sup>の貯蔵中の IMP 分解を抑制するという報告があるので、同じ抗生物質を用いて、微生物生育を制御し、その影響を見た。魚肉に抗生物質を均一に混合するため、スピードカッターで微細化したヒラメ肉を用いた。魚肉の微細化そのものが IMP 分解に大きな影響を与えるなら、このような試料は使用できない。ヒラメ肉の微細化だけで ATP は短時間で消失し、IMP が貯蔵開始前の Nuc 成分の主成分となった。魚肉をホモジナイズすることで筋小胞体の構造が破壊され、貯蔵されていた Ca<sup>2+</sup>が筋繊維に拡散し、ミオシンのアクチン活性化 Mg-ATPase が著しく活性化され、ATP が短時間で加水分解されたものと考えられる。<sup>12)</sup> 微細化したヒラメ肉でも、魚肉を貯蔵した時と同じように、IMP の減少は二相的に変化したので、微細化は貯蔵中の全体的な IMP の分解にはほとんど

影響を及ぼさなかったと結論した。しかし、微細化したヒラメ肉の貯蔵中の IMP 分解速度はそのまま貯蔵した場合より、多少速く進行することを認めたので、物理的な構造破壊が IMP と酵素の接触を促進するように作用しているのかもしれない。抗生物質を添加すると、長期間貯蔵した魚肉の腐敗臭の発生を抑えることができたので、抗生物質が腐敗微生物の増殖を抑制していることが定性的に確認された。このような場合は、急激な IMP 分解の現象は消失し、緩やかな IMP 量の減少が継続するように変化した。後期の IMP 分解への腐敗菌の関与を再確認するため、微細化した魚肉の代わりに魚肉を抗生物質を含む溶液に浸漬した紙で包装して保存した。この場合も、急激な IMP 分解が起こらなくなった。しかし、抗生物質添加の影響は、比較的高温 (10,20°C) で貯蔵した場合は認められなかった (Fig. 4)。おそらく、これらの温度では内在性酵素による IMP 分解が促進され、腐敗菌増殖が増殖して、それらが IMP 分解酵素を生産する前に魚肉中の IMP が消失してしまったためと推察される。

魚肉由来の IMP 分解酵素は失活し、活性が低下することはあっても上昇することは考えにくい。魚肉由来の酵素活性に腐敗菌由来の酵素活性が加わると仮定すると、腐敗臭を発しているような魚肉では総 IMP 分解活性が上昇しているはずである。魚肉の総 IMP 分解活性を測定するため、魚肉をホモジナイズし、その透析したホモジネートを用いることにした。すなわち、透析チューブ内に微生物由来の酵素も回収した。本研究では IMP 分解活性を IMP の分解に伴う無機リン酸の生成を比色法で定量する方法を採用したので、筋肉に本来含まれる ATP (10 mmol/kg 程度) に由来する 30 mmol/kg の無機リン酸などの低分子成分を除去する必要があった。活性測定は IMP 分解活性の発現に  $Mg^{2+}$  が必要であるという報告に基づき、 $5mM MgCl_2$  を反応液に加えた。また、筋肉内での反応を想定し、 $0.1 M NaCl$ ,  $pH 7.5$  の条件で測定した。IMP 分解活性値は、魚肉の  $0^{\circ}C$  貯蔵中に徐々に低下する傾向だったが、貯蔵 21 日頃には大きく上昇した。このような上昇は抗生物質を添加した貯蔵魚肉 (22 日間貯蔵) の場合は認められないので、増殖した腐敗菌が IMP 分解酵素を生産していることが強く示された。この IMP 分解にかかわる微生物の同定は行わなかった。

魚種により、K 値の上昇速度が異なることは周知の事実であるが、この中で、本研究で用いたヒラメのように非常に緩やかに K 値が上昇する魚種が存在する。このような魚種の K 値が上昇するときに、腐敗菌由来の IMP 分解酵素がかかわっている可能性が高いと推定される。一方、K 値上昇が速やかに起きる魚種では、ヒラメの 10°C 保存の場合のように、IMP 分解は魚肉の内在性酵素のみによって進行すると考えられる。0°C 貯蔵中のヒラメ肉の K 値上昇は非常に遅く、10 日後でも K 値はまだ、20%程度であった。一般の解説書には、刺身として可食限界は K 値 20%以下である、等の記述が散見されるが、K 値 20%のヒラメ肉は官能的に刺身で消費できる鮮度ではない。この事実は K 値上昇が非常に遅い魚種では K 値を盲目的に信じ、それに基づいて鮮度を議論するのは非常に危険であることを警告している。今後、魚種によって異なる K 値上昇を決定する因子についてはさらに研究を進めていく必要がある。

## 文献

- 1) Arai K, Saito T. Changes in adenine nucleotides in the muscles of some marine invertebrate. *Nature* 1961; **192**: 451-457.
- 2) Saito T, Arai K, Matsuyoshi M. A new method for estimating the freshness of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1959; **24**: 749-750.
- 3) 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 *日本水産学会誌*, 1970; **36**: 977-992.
- 4) 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. *日本水産学会誌* 1984; **50**: 263-267.
- 5) 胡亜芹, 張佳琪, 蛭谷幸司, 今野 久仁彦. 魚肉からの ATP 関連化合物抽出法の簡便化. *日本水産学会誌* 2013; **79**: 219-225.
- 6) Yokoyama Y, Sakaguchi M, Azuma Y, Kawai F, Kanamori M. Postmortem changes of ATP and its related compounds in oyster tissues in the presence of antibiotic chloramphenicol. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 312-316.

- 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.
- 8) Seki H, Hamada-Sato N. Identification of bacteria that contribute to Imp degradation in horse mackerel. *J. Food Process. Technol.* 2014; **5**: 363.
- 9) 富岡和子, 遠藤金次. 各種魚類の K 値変化速度とイノシン酸分解酵素活性. *日本水産学会誌*, 1984; **50**: 889-892.
- 10) Fiske CH, Subbarow Y. Colorimetric determination of phosphate. *J. Biol. Chem.* 1925; **60**: 375-400.
- 11) Iwamoto M, Yamanaka H, Abe H, Watabe S, Hashimoto K. Rigor-morits progress and its temperature-dependency in several marine fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 93-99.
- 12) Ebashi S, Kodama A, Ebashi F. Troponin. I. Preparation and physiological function. *J. Biochem.* 1968; **64**: 465-477.

### 3-3 交流電界印加によるホタテの鮮度保持

岩手大学 八重樫太朗、藤原隆寛、袁春紅、日本海事検定協会 鎌田拓也、安部なつみ

近年、ホタテの生鮮貝柱の消費が増加する一方で、流通中のホタテの硬化や黒化が問題となっている<sup>(1,2)</sup>。この硬化は、一般的に死後硬直と呼ばれ、筋肉中のアデノシン三リン酸 (ATP : Adenosine TriPhosphate) の減少によって起きることが知られている<sup>(3,4)</sup>。魚介類は、生きている状態では、酸素が体内に供給されるため、筋肉中で ATP の分解と合成が行われる。しかし、死後は酸素の供給がなくなるため、ATPase によって ATP がアデノシン二リン酸 (ADP : Adenosine DiPhosphate) に分解され、死後硬直が起き、さらに ADP は、アデニル酸 (AMP : Adenosine MonoPhosphate) → イノシン酸 (IMP : Inosin MonoPhosphate) → イノシン (HxR : Hypoxanthine Riboside) → ヒポキサンチン (Hx : Hypoxanthine) の順番に分解されていく<sup>(5)</sup>。ATP の分解は、生鮮食品の鮮度と密接に関係していることから、K 値として鮮度指標に使われており、刺身として食べる場合の K 値は約 20% 以下が適当とされている<sup>(6)</sup>。式 (3-1) に K 値の算出方法を示す。硬化した貝柱は、K 値が上昇するほか、次第に軟化していき、食感や歯ごたえが失われてしまう。また、ヒポキサンチンは苦味となるため<sup>(7)</sup>、味も劣化してしまう。そのため、流通中における、品質保持技術が必要とされている<sup>(8-10)</sup>。

電界印加インキュベータは生鮮食品に交流電界を印加することで、普通の冷蔵庫よりも鮮度を保持できることで知られており、鮮度保持効果の一つとして、マグロの保存中の K 値増加抑制効果が報告されている<sup>(10)</sup>。

本実験では、ホタテの貝柱を交流電界下で保存し、交流電界印加がホタテ貝柱のドリップ漏出量、pH 変化、ATP 関連化合物に及ぼす影響について検討した。

$$K \text{ 値} = \frac{HxR+Hx}{ATP+ADP+AMP+IMP+HxR+Hx} \times 100 \quad [\%]$$

## 1. 実験条件

本実験においても、交流電界印加装置として電界印加インキュベータを用いた。印加電圧は 10 kV、周波数は 50 Hz である。ただし、電界印加インキュベータの下段と中段に台を置くことで電極間距離を 5 cm に狭めることで、電界強度を 2 kV/cm に強めた。

試料には宮古産のホタテ貝の貝柱を使用した。試料は殻つきのものを購入し、実験の直前に殻剥きをすることで、実験開始前の鮮度低下を防いだ。試料数は 5 である。殻剥き後の試料は、キムワイプを下に敷いて、チャック付きの袋の中に入れて、4 °C に設定した電界印加インキュベータに入れて保存した。実験期間は、pH、ATP 関連化合物評価では 6 日間、ドリップ漏出量評価では 9 日間とした。図 1 に保存中の試料の写真を示す。ただし、pH 変化、ATP 関連化合物評価は破壊検査であるため、実験初日に試料を六等分に切り分けたものを、ドリップ漏出量の評価に使用する試料とは別に用意した。



図 1 保存中の試料の写真

## 2. 分析方法

### 2.1 ドリップ漏出量

実験開始前の試料の重量と，9日目の試料の重量の差をドリップ漏出量とした。また，試料の重量によって漏出するドリップ量は大きく異なるため，式（1）より，試料1g当たりのドリップ漏出量を導出した。

$$1 \text{ g 当たりのドリップ漏出量 (Drip ratio)} = \frac{\text{ドリップ漏出量 [g]}}{\text{実験開始前重量 [g]}} \quad (1)$$

### 2.2 pH 変化

はじめに，実験開始前にあらかじめ切り分けておいた試料一片から，試料1gを採取した。次に，試料1gに10倍量の氷冷した20mM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（HORIBA Scientific, D-71）で測定した<sup>[7]</sup>。測定は実験開始日から6日目まで1日ごとに行い，pHの経時変化をみた。ただし，5日目は測定を行っていない。

### 2.3 ATP 関連化合物含有量

本行程は全て冷却化で行う。実験開始前にあらかじめ切り分けておいた試料一片から，試料1gを採取した。次に，10mLの5%過塩素酸（PCA: PerChloric Acid）を添加し，ホモジナイズ後，遠心分離機（久保田商事, N70703-A000）を用いて，遠心分離を行った（6000g, 4°C, 3分）。遠心分離後，上清5mLを50mL遠心管に移し，1Mまたは，10M水酸化カリウム溶液（KOH）を滴下し，pH2~3.5に調整した。pH調整後，蒸留水を加えて10mLにメスアップし，数分間静置した後，4mLの上清を取り出して，1mLの0.1Mリン酸緩衝液と混合した。最後に，0.45μmのフィルターで濾過したものをサンプルとした。サンプリング後，試料を-60°Cで凍結保存し，ATP関連化合物の定量分析を日本海事検定協会食品衛生分析センターが分析した。

## 2.4 筋原線維の調製

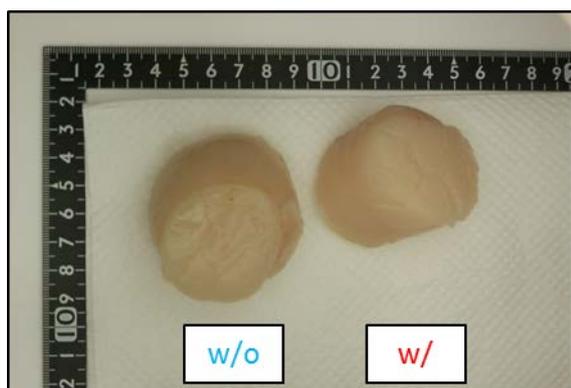
ホタテ閉殻筋横紋筋をミンチし、0.1M KCl 20mM Tris-HCl (pH7.5) 溶液で洗浄後、同バッファー溶液中でホモジナイズした。3000xg で 5 分間遠心分離後、沈殿に得られた筋原線維をさらに同バッファー溶液で 3 回洗浄し、ガーゼ濾過して筋原線維を調製した。

## 2.5 筋原線維の塩溶解性および Ca-ATPase 活性の測定

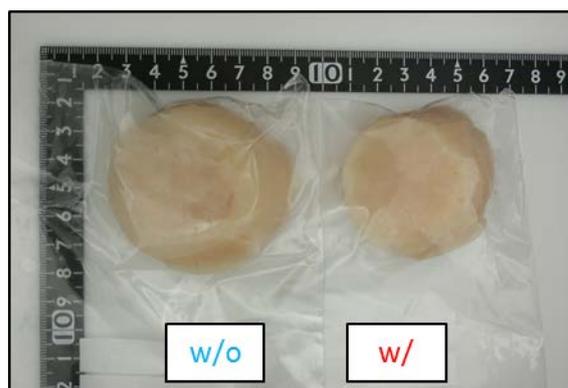
筋原線維懸濁液中の KCl 濃度が 0.5M になるように 3M KCl 20mM Tris-HCl (pH7.5) 溶液を添加した。一晩冷蔵保持後、14000xg で 10 分間遠心分離して上清に塩溶解性タンパク質を得た。筋原線維の溶解性は、筋原線維タンパク質量に対する塩溶解性タンパク質のパーセント濃度として表した。筋原線維 Ca-ATPase 活性は、0.1mg/mL 筋原線維、0.5M KCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、1mM ATP、25mM Tris-maleate (pH7.0) の組成液とし 25°C で反応させ、生成する無機リン酸を比色定量し算出した。なお、タンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準とし、ビウレット法により比色定量した。

## 3 結果

図 2 に実験開始前後の試料の写真を示す。図より、本実験では黒化が見られなかった。また、交流電界印加による違いも見られなかった。図 3 に殻むき直後と実験開始 6 日目の試料の写真を示す。殻むき直後の試料と 6 日目の試料を比較すると、貝柱の厚みの減少が見られた。これは、死後硬直後の軟化によるものだと考えられる。しかし、貝柱の厚みの変化に関しても、交流電界印加による違いは見られなかった。



(a) 実験開始直後 (0 日目)



(b) 実験終了後 (6 日目)

図 2 実験開始前後の試料

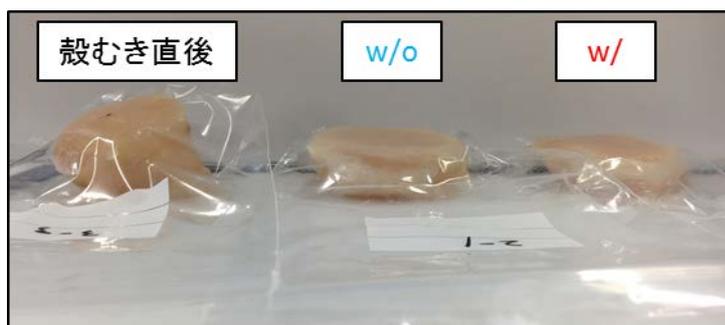


図 3 殻むき直後と実験 6 日目の試料

図 4 に 9 日目のドリップ漏出量を示す。図より、交流電界を印加することでドリップ漏出量が約 38%抑制されたが、有意差は見られなかった。本実験では個体差を考慮せずに別個体で比較したため、誤差が大きくなったと考えられる。個体差を除くために、一つの試料を半分に切り分けて比較する手法もあるが、切り分ける際に細胞が損傷し、ドリップ漏出量が増えることが考えられるため、個体差を考慮した正確な評価は困難である。

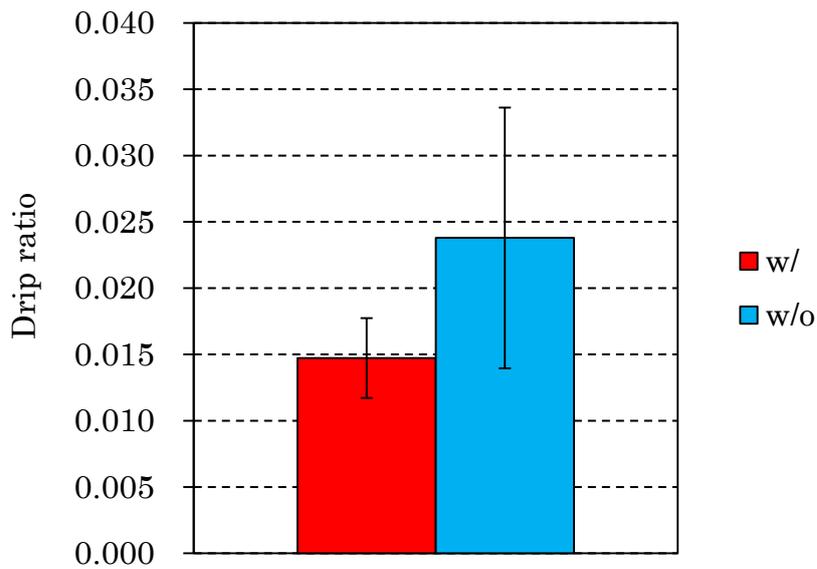


図4 9日目のドリップ漏出量

図5にpHの経時変化を示す。図より3日目まで交流電界印加による差は見られないが、6日目において差が見られた。生鮮食品におけるpH低下はATPが分解されたときに生じる水素イオンに起因していると考えられるため、交流電界印加によりATPの分解が抑制されたことが示唆された。

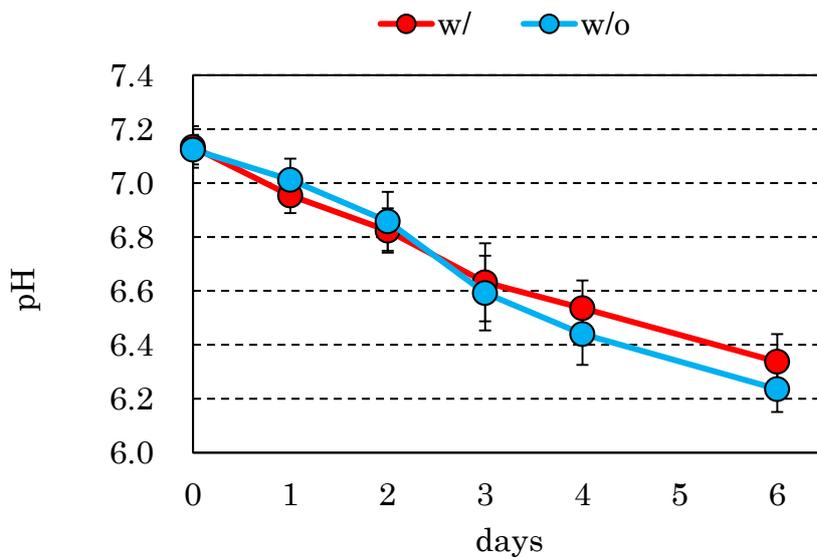


図5 pHの経時変化

図 6 に K 値の経時変化を示す。図 6 より、4 日目まで差がほとんど見られなかったが、6 日目において、交流電界を印加した試料は 34%、control は 48% となり、有意な K 値の上昇抑制効果 ( $P=0.036$ ) が見られた。

図 7 に ATP 関連化合物の経時変化を示す。図より、ATP、ADP において 6 日目に分解抑制効果がみられた。また、HxR、Hx は 6 日目に生成抑制差効果が見られ、特に、HxR においては有意な差 ( $P=0.019$ ) が見られた。しかし、AMP、IMP は日によって差は見られたが、特定の傾向は見られなかった。

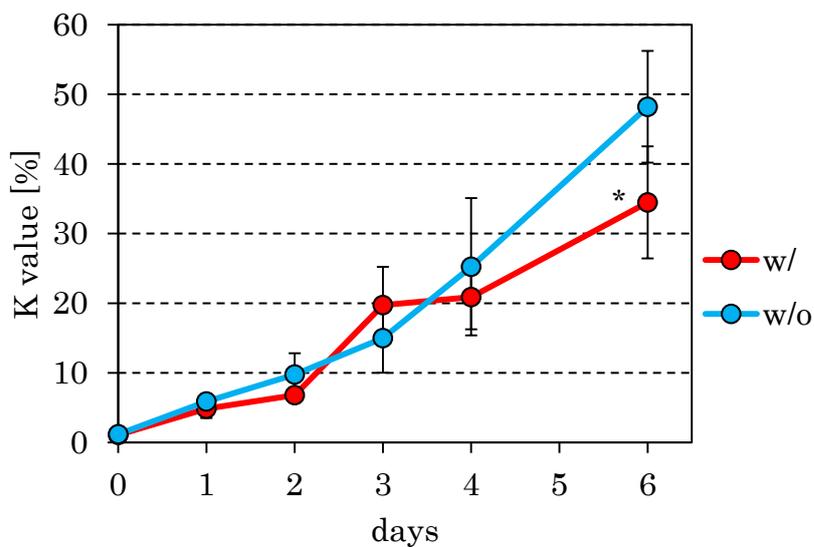
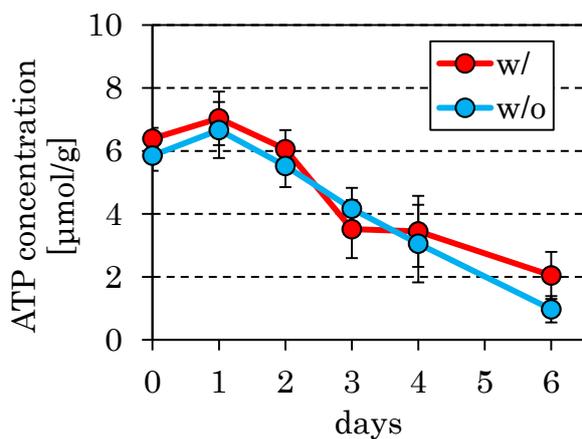


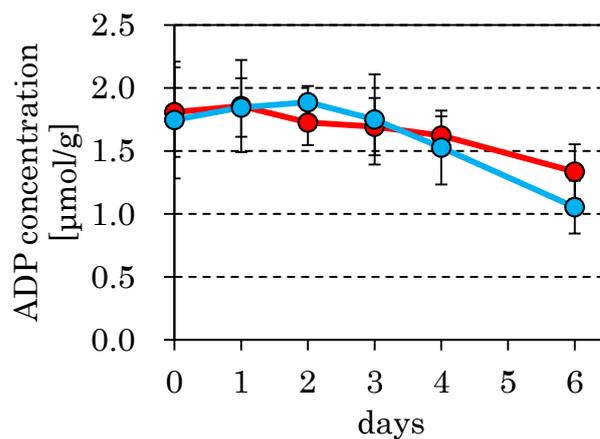
図 6 K 値の経時変化

また、ホタテ貝柱における ATP の分解経路は魚類筋肉とは異なり、AMP はアデノシン (AdR : Adenosine Riboside) に分解されることが報告されている<sup>(3)</sup>。図 3-7 に本実験試料における AdR の経時変化を示す。本実験において IMP は最大で  $0.6 \mu\text{mol/g}$  程度であったのに対して、AdR は最大で  $0.06 \mu\text{mol/g}$  であったことから、AMP の分解に

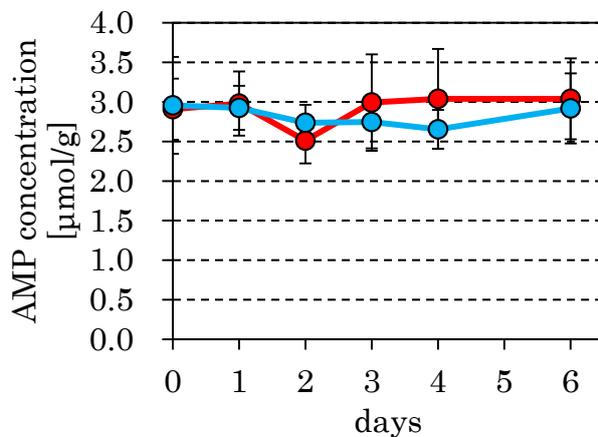
よって IMP が生成されたと考えられる。そのため、K 値の導出には IMP の数値を用いた。



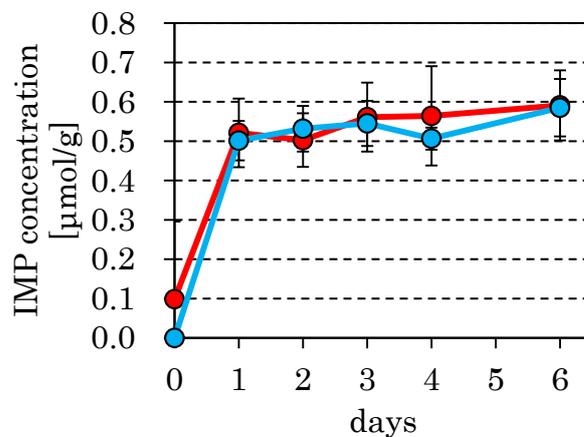
(a) ATP の経時変化



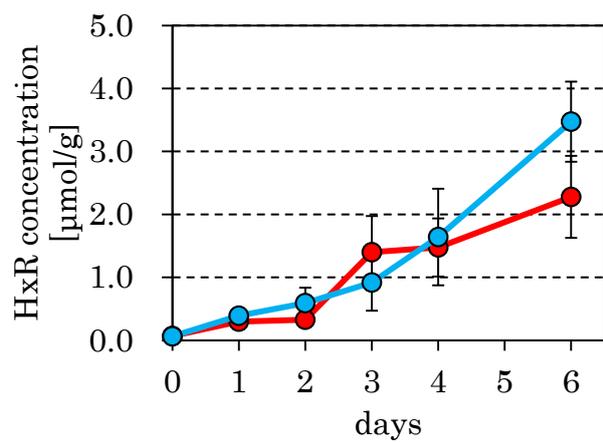
(b) ADP の経時変化



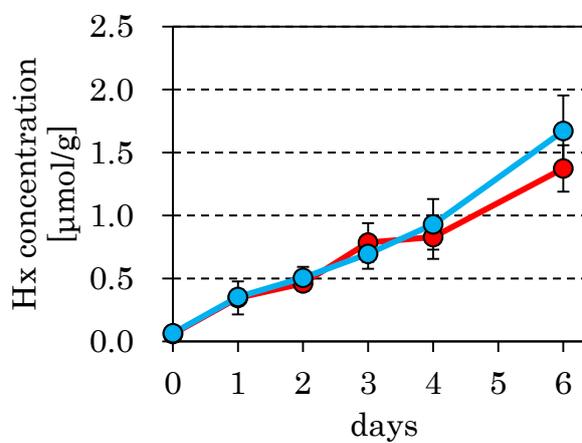
(c) AMP の経時変化



(d) IMP の経時変化



(e) HxR の経時変化



(f) Hx の経時変化

図7 ATP 関連化合物の経時変化

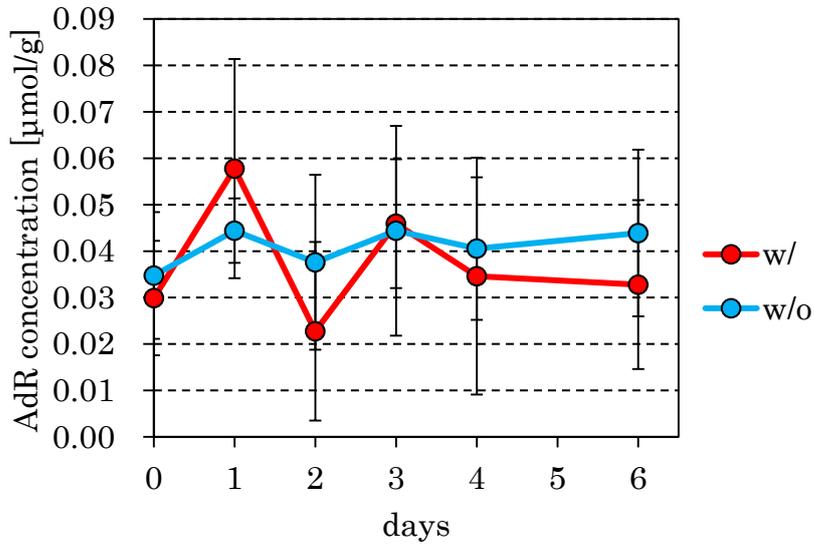


図 8 AdR の経時変化

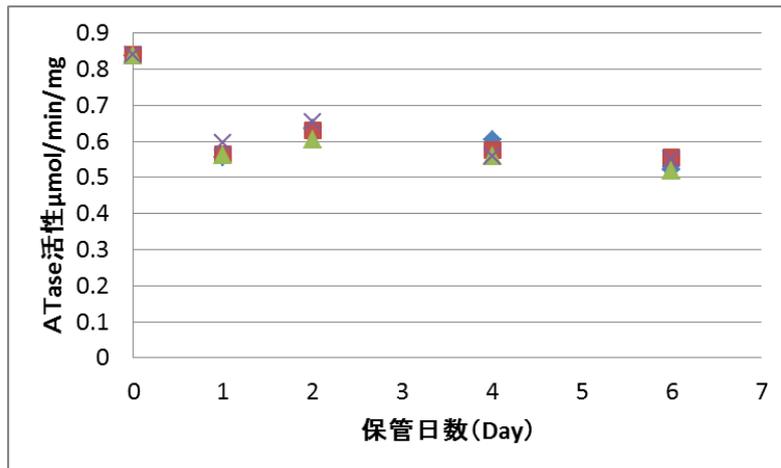


図 9 ホタテMf Ca-ATPase 活性変化

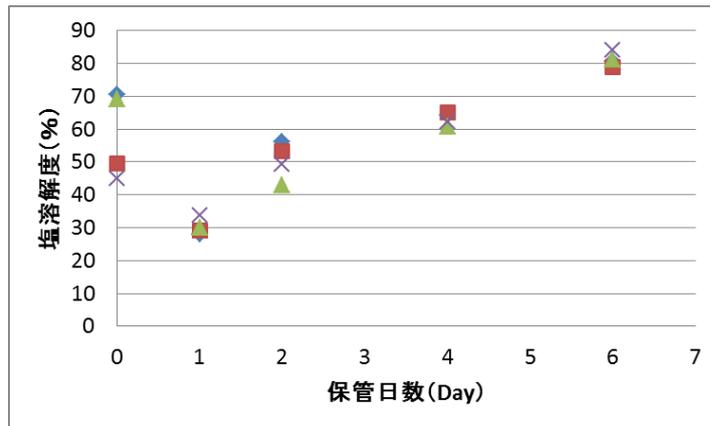


図 10 ホタテMf 塩溶解度変化

冷蔵中ホタテ筋原線維の Ca-ATPase 活性の変化を測定した結果を図 9 に示した。初日ホタテの Ca-ATPase 活性は  $0.815 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  で魚類と比べると非常に高い。冷蔵 4 日目約 25%の活性は低下したが、電場処理の影響を受けなかった。また塩溶解性を測定した結果を図 10 に示した。初日ホタテの筋原線維の塩溶解度は 70%と高い値を示したが、 $5^{\circ}\text{C}$ で 1 日冷蔵すると 31%まで低下した。その後冷蔵中塩溶解度の増加が見られた。増加した理由はわかりませんが、筋原線維の調製方法も今後検討する必要がある。また交流電場の印可は塩溶解度に影響を見られなかった。

#### 4 考察

本実験では、交流電界下で保存したホタテ貝柱の、ドリップ量、pH、ATP 関連化合物、K 値に与える影響を評価した。その結果、ドリップ漏出量抑制効果、pH 低下抑制効果、ATP 分解抑制効果、4 日目までの K 値上昇抑制効果に有意な差は見られなかった。また、交流電場の印可によりホタテ筋原線維の Ca-ATPase 活性と塩溶解度に影響を見られなかった。一方、有意差はないがドリップ漏出量に抑制する傾向が見られ、また、保存 6 日目の K 値は抑制が見られた。

ドリップ漏出が抑制傾向にあるメカニズムについては明らかではないが、交流電界印加が細胞膜に何らかの影響を与えたことを推察している。ドリップとは、脂

質二重層と膜たんぱく質によって構成されている細胞膜が破壊されることで、細胞内に含まれる細胞質などの水分が漏出したものである<sup>(13)</sup>。これまでに、ウシ血清アルブミン（BSA）に対する交流電界印加実験を行ってきた結果、交流電界印加がタンパク質の構造変化を引き起こすことが示唆された<sup>(14)</sup>。以上の情報から、交流電界印加により、ホタテ細胞膜の膜たんぱく質が構造変化し、ドリップの漏出が抑制される傾向にあったと推察している。

ATPの分解抑制効果は、交流電界印加がATPもしくは、ATPの分解に寄与するATPaseに影響を及ぼしていることが考えられる。しかし、本実験において、ATPとATPaseに関する詳細な実験は行っていないため、メカニズムの解明には更なる研究が必要である。また、K値については保存4日までは差が見られず、有意な差が見られた6日目の交流電界を印加した試料のK値は38%であった。しかし、外観から刺身として4日目の限界であり、またK値の値は20%以下が適当であることから、実用化にはあまり向かない。そのため、K値が20%を超える前に、交流電界印加による抑制効果が見られる電界印加条件を探る必要がある。

#### 参考文献

- (1) 山中英明：“魚介類の死後変化と品質”，日本水産学会誌 Vol.68, No.1(2002), pp.5-14.
- (2) 木村稔：“ホタテガイ貝柱の品質保持に関する研究”，北水試研報 Vol.68(2003), pp.1-47
- (3) 小関聡美，北上誠一，加藤登，新井健：“魚介類の死後硬直と鮮度（K値）の変化”，「海-自然と文化」東海大学紀要海洋学部 第4巻 第2号(2006), pp.31-46
- (4) 岡弘康，大野一仁，二宮順一郎：“養殖ハマチの致死条件と冷蔵中における魚肉の硬さとの関係”，日本水産学会誌 Vol.56, No.10(1990), pp.1673-1678
- (5) Rajeev Ranjan, B.S.Priyanka, M.S.Thakur：“ATPase inhibitor based luciferase assay for prolonged and enhanced ATP pool measurement as an efficient fish freshness indicator”，Anal Bioanal Chem, Vol.406(2014), pp.4541-4549
- (6) ニッスイ 企業情報サイト：「<http://www.nissui.co.jp/academy/taste/12/>」

- (7) Meelis Tikk, Kaja Tikk, Mari Ann Torngren, Lene Meinert, Margit D.Aaslyng, Anders H.Karlsson, Henrik J.Andersen : “ Development of Inosine Monophosphate and Its Degradation Products during Aging of Pork of Different Qualities in Relation to Basic Taste and Retronasal Flavor Perception of the Meat” J. Agric. Food Chem., Vol.54(2006), pp.7769–7777
- (8) Woo Ram Kim, Myo Min Aung, Yoon Seok Chang, Charalampos Makatsoris : “Freshness Gauge based cold storage management: A method for adjusting temperature and humidity levels for food quality”, Food Control, Vol.47(2015), pp.510-519
- (9) Myo Min Aung, Yoon Seok Chang : “Temperature management for the quality assurance of a perishable food supply chain”, Food Control, Vol.40(2014), pp.198-207
- (10) Ju-Chia Kuo, Mu-Chen Chen : “Developing an advanced Multi-Temperature Joint Distribution System for the food cold chain”, Food Control, Vol.21(2010), pp.559–566
- (11) 株式会社以輪富 HP : 「<http://www.iwatomi.com/hyokan/effect.html>」
- (12) 村田裕子, 荻原光仁, 舟橋均, 上野久美子, 岡崎恵美子, 木村郁夫. 福田裕 : “高鮮度冷凍クジラ肉の解凍方法の開発”, 水産技術 Vol.1, No.1(2008), pp.37-41
- (13) 斉藤芳枝 : “冷凍魚のドリップのタンパク質”, 東京家政大学研究紀要, Vol.24, No.2(1984), pp.83-90
- (14) Takamasa Okumura, Taro Yaegashi, Kazuki Yamada, Takanori Ito, Katsuyuki Takahashi, Sumio Aisawa, Koichi Takaki, Shigeyoshi Yamazaki, and Bunei Syuto : “Long period preservation of marine products using electrostatic field”, Japanese Journal of Applied Physics 55, 07LG07

### 3-4 首折り法で即殺したゴマサバ筋肉の死後変化の遅れについて

緒方由美、小池博希、木村郁夫（鹿児島大学）、袁春紅（岩手大学）

鹿児島近海で漁獲されるゴマサバは、一本釣りあるいはまき網漁法で漁獲されている。漁獲後、一部の魚については数日間蓄養し、漁獲時のストレスを下げた後に首折り法による即殺処理を行い、魚体の温度管理処理を行って刺身用商材として流通がなされている。本研究ではこのような即殺処理が、致死後の死後硬直の進行、ATP濃度、pH、乳酸濃度の変化および筋肉タンパク質の性状として測定した筋原線維 ATPase 活性や筋原線維タンパク質の塩溶解性に及ぼす影響を測定した。

#### 材料と方法

鹿児島県沖でまき網漁法により漁獲後、活魚状態で港の生け簀に移送し1週間蓄養したゴマサバ（平均体重 450 g）80尾を用いた。海水温は 17°Cであった。活魚車で鹿児島大学に運び、2グループ（各 40尾）に分けて致死処理を行った。グループ1は首折り処理による即殺と放血、グループ2は空中に7~10分間放置した苦悶死群とした。各処理後海水氷溶液中で30分間維持し冷却後、5°C冷蔵庫に保持した。30分から1時間間隔でそれぞれ5尾をサンプリングし試験に供した。死後硬直指数、筋原線維 ATPase 活性と筋原線維塩溶解性の測定は、5°C保存開始後2時間目と8時間目に測定した。

硬直指数の測定は、尾藤らの方法<sup>1)</sup>に従い測定した。ATP濃度は、胡らの方法<sup>2)</sup>に従い魚肉から5% PCA（過塩素酸）溶液で抽出後 pH を 6.5-6.8 調整し HPLC 法により測定した。乳酸濃度は ATP 濃度分析用に調製した PCA 抽出液（pH 6.5-6.8 に調整）を用いて、乳酸測定キット（R-biopharm inc. Germany）にて測定した。魚肉 pH は魚肉 1g に 10 mL の冷 20 mm モノヨード酢酸 Na 溶液を加えホモジナイズ後、pH メータ（堀場製）にて測定した。筋原線維 Ca-ATPase 活性と筋原線維塩溶解性の測定は、Azuma と Konno の方法<sup>3)</sup>に従った。タンパク質濃度はビウレット法（Gonall らの方法）<sup>4)</sup>で測定した。

## 統計処理

すべての試験は3回以上行い、統計解析は Student-Newman-Keuls 法により行った。

## 結果

### 死後硬直の進行

Fig.1 に死後硬直の進行を示す。5°C保存2時間で苦悶死群の死後硬直指数は75-94%となったが、首折り即殺群では45%を示した。4時間後で苦悶死群はすべて死後硬直指数100%を示した。(データは示さない) 一方、首折り即殺群では死後硬直の進行は非常に遅く8時間後でも80%程度であった。苦悶死群と首折り即殺群の5°C保存における死後硬直の進行は有意 ( $p < 0.05$ ) な差を示した。

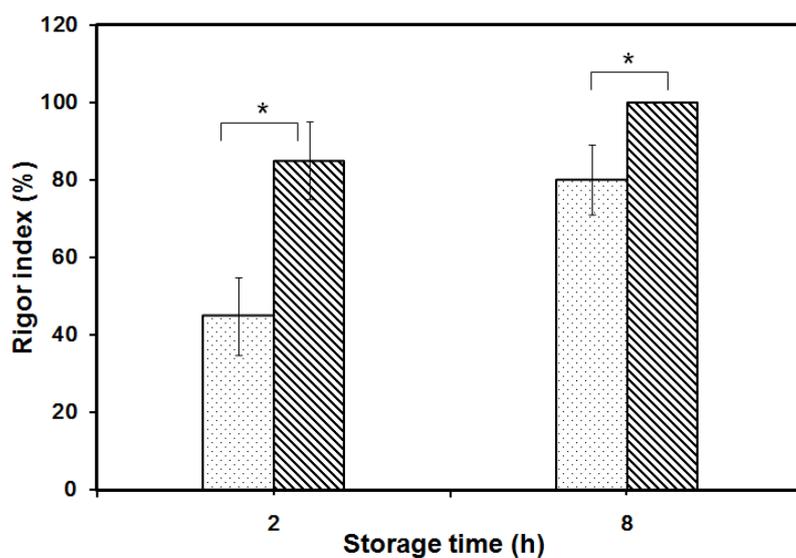


Fig. 1 ゴマサバの苦悶死群と首折り即殺処理群の5°Cにおける死後硬直の進行

□ : 首折り即殺群、■ : 苦悶死群、 \* :  $p < 0.05$

## ATP 分解

苦悶死群と首折り即殺群の筋肉を 5°C で保存した場合の ATP 濃度変化を Fig.2 に示す。首折り即殺群では致死直後の ATP 濃度は 7.8  $\mu\text{mol/g}$  と高い値を示した。5°C 保存中の ATP 濃度は致死後 2 時間では大きな低下はみられず、4 時間目でやや低下したが、8 時間後でも 3.2  $\mu\text{mol/g}$  程度の値を示した。一方、苦悶死群では致死直後は約 5.5  $\mu\text{mol/g}$  の ATP 濃度であったが、5°C 保存中に急速に低下し、保存 4 時間目で ATP はほぼ消失する結果を示した。この結果は死後硬直の進行と良く対応している。

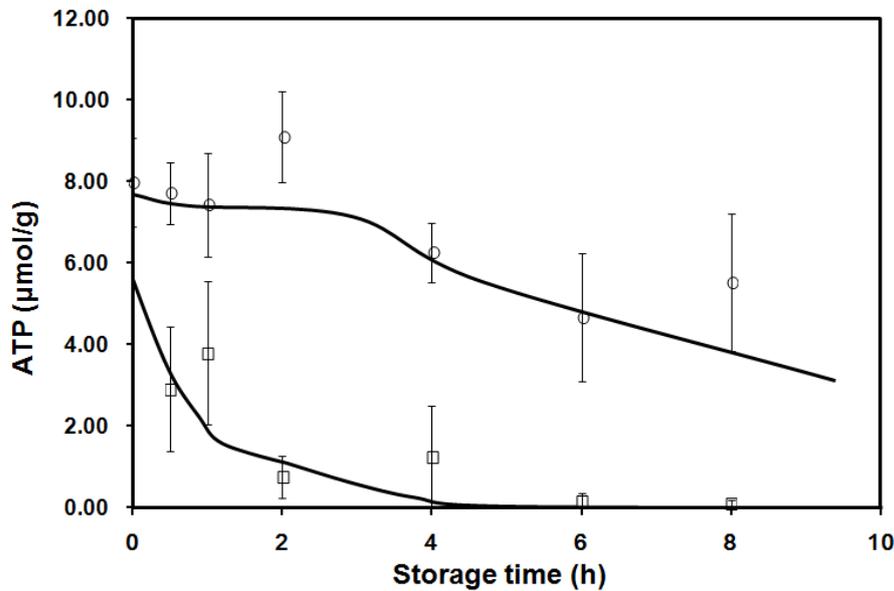


Fig. 2 ゴマサバの苦悶死群と首折り即殺処理群の 5°C における ATP 濃度変化の進行

○：首折り即殺処理群、□：苦悶死群

## 乳酸濃度変化

苦悶死群と首折り即殺群の筋肉を 5°C で保存した場合の乳酸濃度の変化を Fig.3 に示す。致死直後の乳酸濃度は 24.5  $\mu\text{mol/g}$  であった。首折り即殺群での乳酸生成は苦悶死群に比べて遅く 2 時間で 40  $\mu\text{mol/g}$  であり、苦悶死群の 67.6  $\mu\text{mol/g}$  より

優位に低い値であった。8 時間後においても苦悶死群の 96.2 $\mu\text{mol/g}$  に対して首折り即殺群では 60.6 $\mu\text{mol/g}$  と優位に低い値を示した。

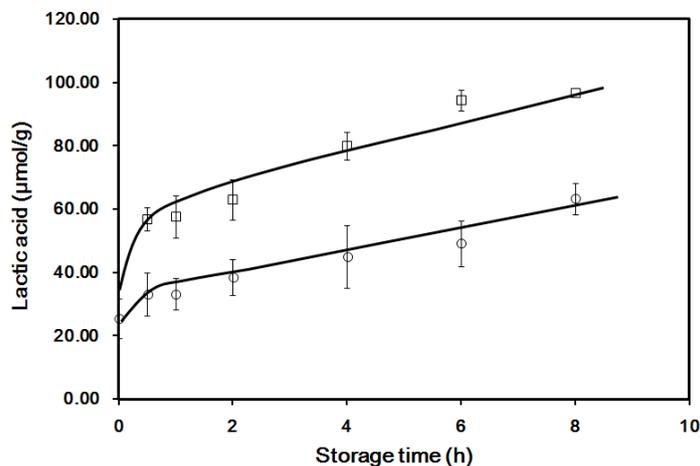


Fig. 3 ゴマサバの苦悶死群と首折り即殺処理群の 5°Cにおける乳酸濃度変化の進行

○：首折り即殺処理群、□：苦悶死群

### pH 変化

苦悶死群と首折り即殺群の筋肉を 5°C で保存した場合の pH の変化を Fig. 4 に示す。致死直後の筋肉の pH は約 7 であるが、苦悶死群では急速に pH の低下が進行する。苦悶死群では 5°C 保存 2 時間で pH 6 付近となり、その後 8 時間で 5.8 となった。一方、首折り即殺群では pH の低下は緩やかで、致死後 8 時間においても pH 6.3 より高い値を示した。

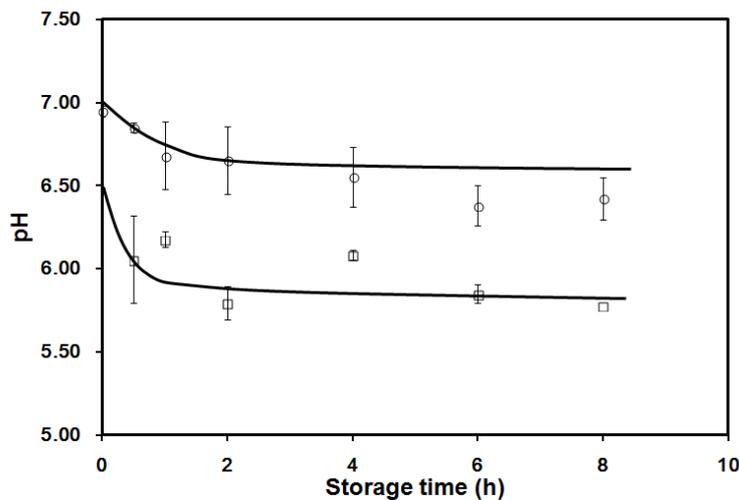


Fig. 4 ゴマサバの苦悶死群と首折り即殺処理群の 5°Cにおける pH 変化の進行

○：首折り即殺処理群、□：苦悶死群

#### 筋原線維 Ca-ATPase 活性の変化

苦悶死群と首折り即殺群の筋肉を 5°C で保存した場合の筋原線維 Ca-ATPase 活性の変化を Fig. 5 に示す。両群の筋原線維 Ca-ATPase 活性の差は小さいものの活性の低下には有意差が認められた。すなわち致死後 2 時間での筋原線維 Ca-ATPase 活性は首折り即殺群で  $0.162 \pm 0.006 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Mf}$ 、苦悶死群で  $0.138 \pm 0.006 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Mf}$  であり、致死後 8 時間では首折り即殺群で  $0.145 \pm 0.008 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Mf}$ 、苦悶死群で  $0.116 \pm 0.008 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Mf}$  であった。いずれの場合も有意差 ( $p < 0.05$ ) を示した。

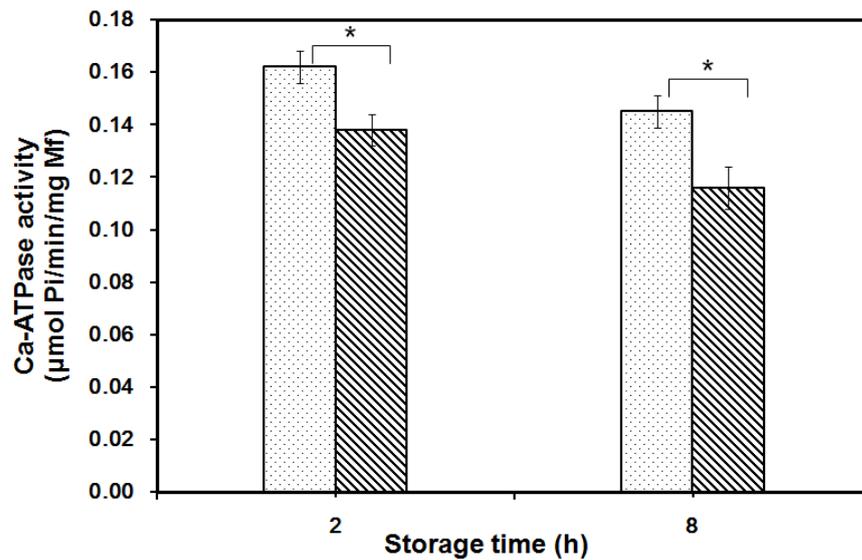


Fig. 5 ゴマサバの苦悶死群と首折り即殺処理群の 5°Cにおける筋原線維 Ca-ATPase 活性の低下

□ : 首折り即殺群、■ : 苦悶死群、 \* :  $p < 0.05$

#### 筋原線維塩溶解性の変化

苦悶死群と首折り即殺群の筋肉を 5°Cで保存した場合の筋原線維塩溶解性の変化を Fig. 6 に示す。首折り即殺群では致死 2 時間後の筋原線維塩溶解性は  $86.2 \pm 4.6\%$  であったが、苦悶死群では  $73.0 \pm 5.0\%$  とやや低い値を示し有意差が認められた。致死 8 時間後では両試験区で抽出性の低下が認められるが、首折り即殺群で  $70.3 \pm 8.4\%$ 、苦悶死群で  $52.6 \pm 5.6\%$  となり有意差が認められた。

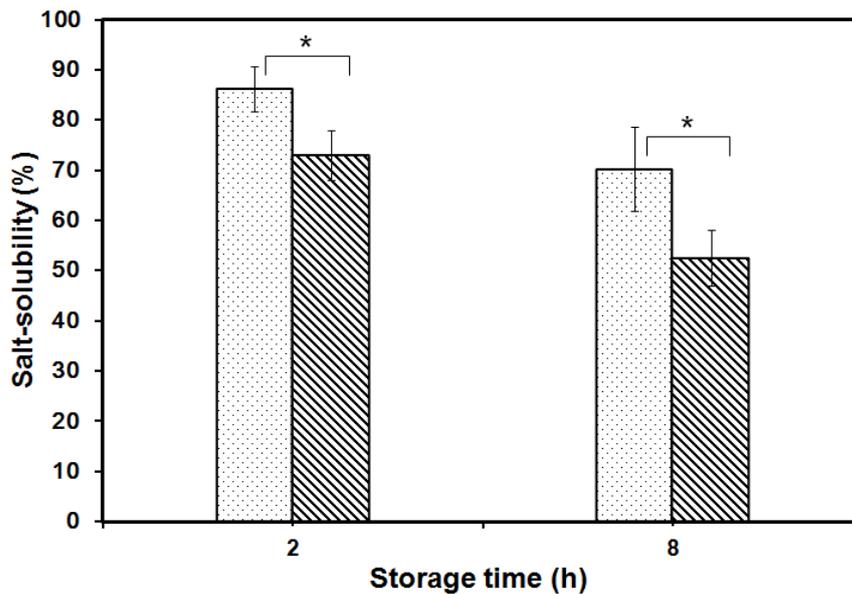


Fig. 6 ゴマサバの苦悶死群と首折り即殺処理群の 5℃における筋原線維塩溶解性の低下

□ : 首折り即殺群、 ■ : 苦悶死群、 \* :  $p < 0.05$

#### 考察

鹿児島県で漁獲されるゴマサバでは、首折り即殺処理により致死後の ATP 濃度低下の抑制、乳酸生成量の抑制が認められ、その結果、pH の低下の抑制と筋原線維タンパク質の変性が抑制されることが確認できた。サバ類では致死後の品質低下が急速に進むことはよく知られているが、漁獲後の蓄養によるストレス低減と首折れなどの即殺処理により致死後の品質低下を抑制することができることが示された。致死後の性状変化を、変性抑制作用のある ATP 濃度や変性促進作用のある乳酸および魚肉 pH を指標とし、筋原線維タンパク質の生化学的な性状も含めた検討をすることは重要である。今後もこのような視点で研究を進め、各魚種について致死後の鮮度変化と品質に関する情報の蓄積を進める予定である。

#### 参考文献

- 1) Bito M., Yamada K., Mikumo Y., Amano K., (1983) Studies on rigor mortis of fish-I. Difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified cutting`s method. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 109, 89-96. (in Japanese)
- 2) Hu Y., Zhang J., Ebitani K., Konno K., (2013) Development of simplified method for extracting ATP-related compounds from fish meat. Nippon Suisan Gakkaishi, 79(2), 219-225, (in Japanese)
- 3) Azuma, Y., and Konno, K. Freeze denaturation of carp myofibrils compared with thermal denaturation. Fisheries Sci. 1998, 64(2), 287-290.
- 4) Gornall AG, Bardwill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J Biol Chem 177:751-766

## 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) ヒラメのような K 値上昇が遅い魚種の IMP 分解あるいは K 値上昇は単純な変化を示さず、二相性を示すことが知られた。この後期に起こる急激な反応に腐敗微生物がかかわっていることが抗生物質添加の実験から推察してきたが、今年度は、これらの成果を受け、IMP 分解に腐敗微生物の生産する酵素がかかわっていることをさらに検証し、ヒラメのように K 値上昇が遅い魚種では微生物の生産する IMP 分解酵素の寄与が含まれていることを明らかにした。

また、鮮度変化は本来鮮魚、未凍結品で議論されるが、凍結品を解凍して解凍魚として販売される場合も見かけられる。このように、一旦凍結した魚肉では、その後の冷蔵貯蔵中に急激な K 値上昇が起こるのかについても検討し、同様な変化が起こることを明らかにした。

0°C 貯蔵中のヒラメ肉の K 値上昇は非常に遅く、10 日後でも K 値はまだ、20% 程度であった。一般の解説書には、「刺身として可食限界は K 値 20% 以下である」等の記述が散見されるが、K 値 20% のヒラメ肉は官能的に刺身で消費できる鮮度ではない。この事実は K 値上昇が非常に遅い魚種では K 値を盲目的に信じ、それに基づいて鮮度を議論するのは非常に危険であることを警告している。今後、魚種によって異なる K 値上昇を決定する因子についてはさらに研究を進めていく必要がある。

2) 交流電界下で保存したホタテ貝柱のドリップ量、pH、ATP 関連化合物、K 値に与える影響を評価した。その結果、ドリップ漏出量、pH 低下および 4 日目までの ATP 関連化合物の分解、および K 値上昇抑制効果に有意な差は見られなかった。また、交流電場の印可によりホタテ筋原線維の Ca-ATPase 活性と塩溶解度に影響を見られなかった。一方、有意差はないがドリップ漏出量に抑制する傾向が見られ、また、保存 6 日目の K 値には抑制が見られた。ホタテ貝柱に関するこのような視点での研究例は少なく、今後もデータを蓄積することが重要である。

3) 鹿児島県で漁獲されるゴマサバでは、刺身商材として流通させるために、首折り即殺処理を行っている。首折り即殺処理により、致死後の ATP 濃度低下の抑制、乳酸生成量の抑制が認められ、その結果、pH の低下の抑制と筋原線維タン

パク質の変性が抑制されることが確認できた。サバ類では致死後の品質低下が急速に進むことはよく知られているが、漁獲後の蓄養によるストレス低減と首折れなどの即殺処理により致死後の品質低下を抑制することができることが示された。致死後の性状変化を、変性抑制作用のある ATP 濃度や変性促進作用のある乳酸および魚肉 pH を指標とし、筋原線維タンパク質の生化学的な性状も含めた検討をすることは重要である。今後もこのような視点で研究を進め、各魚種について致死後の鮮度変化と品質に関する情報の蓄積を進める予定である。

#### 4-2 今後の課題

本調査研究は、5 ヶ年計画の最終年度を迎えた。本調査研究では、水産物の鮮度測定で基礎的な測定方法である K 値の有効性が示された。利用方法を正確に理解し、間違わなければ科学的に優れた鮮度指標であり、世界に広く広めるべき鮮度指標であることが再認識された。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、本事業で測定して得られた結果について整理し、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がわかるようにすることが求められる。同時に魚種特性についても明らかにすることが課題として挙げられる。

実用的な鮮度変化や品質の指標の策定のために、各種の魚を 0~10℃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基礎データを集積したので、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も必要であろう。

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 29 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   | 国立大学法人岩手大学農学部 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  | 国立研究開発法人水産教育・研究機構中央水産研究所主任研究員 |
|     | 山本均   | 一般社団法人日本海事検定協会 理事 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 課長   |
|     | 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  |
|     | 鎌田拓也  | 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 28 年 7 月 13 日（東京海洋大学）

第 2 回 平成 28 年 11 月 26 日（鹿児島県霧島いわさきホテル）