

学位論文

養殖ブリの品質向上を目的とした血合筋褐変機序の解明

および品質評価に関する研究

Study on elucidation of mechanism of discoloration of dark muscle and quality evaluation for quality improvement of cultured yellowtail

2017年12月

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

久保 久美子

Kumiko Kubo

目次

緒言.....	56
第1章 養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代謝並びに褐変進行に及ぼす脂質酸化の影響.....	59
1 材料と方法.....	59
1.1. 供試魚	
1.2. ブリ切身の色調の経時変化	
1.3. 魚肉ブロックの pH と糖代謝関連成分の測定	
1.4. 境界面モデルの調製と pH および糖代謝関連成分の測定	
1.5. 血合筋と普通筋の解糖系酵素活性の測定	
1.6. ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響	
1.7. 普通筋と接する血合筋の脂質酸化度	
1.8. ミオグロビンのメト化に及ぼす脂質酸化の影響	
1.9. 成分分析	
1.10. 統計処理	
2 結果.....	62
2.1. ブリ切身の色調の経時変化	
2.2. 魚肉ブロックの pH と糖代謝関連成分	
2.3. 境界面モデルの pH および糖代謝関連成分	
2.4. 血合筋および普通筋の解糖系酵素活性	
2.5. ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響	
2.6. 普通筋と接する血合筋の脂質酸化度	
2.7. ミオグロビンのメト化に及ぼす脂質酸化の影響	
3 考察.....	66
第2章 養殖ブリ血合筋の褐変に及ぼす飼料および季節の影響.....	68
1 材料と方法.....	68
1.1. 血合筋の褐変に及ぼす飼料の影響	
1.2. アスコルビン酸誘導体の添加給餌による褐変抑制	
1.3. アスコルビン酸誘導体の添加給餌による血合筋中のアスコルビン酸量および持続性	
1.4. 魚肉 pH に及ぼす餌止めの影響	
1.5. 血合筋の褐変に及ぼす α トコフェロール量, アスコルビン酸量, pH の季節変動	
1.6. 統計処理	
2 結果.....	71
2.1 飼料と血合筋の α トコフェロール量との関係	
2.2 血合筋の α トコフェロール量と褐変との関係	
2.3. アスコルビン酸誘導体の添加給餌による褐変抑制	

2.4.	アスコルビン酸誘導体の添加給餌による血合筋中のアスコルビン酸量および持続性	
2.5.	魚肉 pH に及ぼす餌止めの影響	
2.6.	血合筋の褐変に及ぼす α トコフェロール量, アスコルビン酸量, pH の季節変動の影響	
2.7.	α トコフェロール量, アスコルビン酸量, pH と褐変との関係	
3	考察.....	74
第3章	インピーダンス法を用いたブリの脂肪量の非破壊測定.....	79
1	材料と方法.....	79
1.1.	供試魚および実験方法	
1.2.	インピーダンス測定器	
1.3.	インピーダンスの測定方法	
1.4.	脂肪量の測定	
1.5.	多周波インピーダンスから脂肪量の測定	
2	結果.....	82
2.1.	水揚げ後の経過時間によるインピーダンスへの影響 (実験 1)	
2.2.	魚体温がインピーダンスに及ぼす影響 (実験 1)	
2.3.	インピーダンス法を用いたブリの脂肪量測定 (実験 2 および 3)	
3	考察.....	85
第4章	インピーダンス法を用いたブリのヤケ肉判定.....	89
1	材料と方法.....	89
1.1.	供試魚および実験方法	
1.2.	インピーダンス測定器および測定方法	
1.3.	筋肉性状に関する測定	
2	結果.....	91
2.1.	加熱魚の Cole-Cole プロットの変化 (実験 1)	
2.2.	魚肉ブロックのインピーダンス比の変化および色調 (実験 2)	
2.3.	加熱によるミンチ肉のクレアチンキナーゼ活性および Ca-ATPase 活性の変化 (実験 2)	
2.4.	即殺および窒息死したブリの部位別の色調 (実験 3)	
2.5.	即殺および窒息死したブリの部位別の筋肉性状 (実験 3)	
2.6.	即殺および窒息死したブリの Ca-ATPase 活性とインピーダンス比との関係 (実験 3)	
3	考察.....	97
第5章	総合討論.....	99
謝辞.....		102
参考文献.....		103

緒言

世界の人口は増加し続け2050年には96億人になる見通しがあるうえ、経済発展の続く新興国を中心に水産物の消費量が大きく伸びており、¹⁾ 食料としての水産物および水産業は、飢餓をなくし、健康を促進し、貧困を削減するために重要な役割が強調されている。世界の漁業生産量は1980年代後半から横ばいで9,000万tが続き、養殖生産量は増加し続け2012年で9,043万tと漁業・養殖業生産量に占める養殖業の割合は半分に達した。²⁾ 一方、日本の人口は2008年を境に減少し、海面漁業漁獲量は2008年の437万tから2015年には355万tに減少している一方、海面養殖生産量は2008年の115万tに対し2015年は107万tと比較的維持している。³⁾ 人口減少や魚離れを背景に日本の水産物消費は減少し、養殖業では差別化あるいは輸出への動きが始まっている。特にこうした取組が急速に行われているのがブリ *Seriola quinqueradiata* である。

ブリはスズキ目アジ科に分類される回遊性の大型肉食魚で、西太平洋（日本近海）に生息する。⁴⁾ ブリ養殖は香川県東かがわ市安戸池で1928年に始まった日本で最初の海面魚類養殖である。⁴⁾ かつては連鎖球菌症、類結節症等各種の病気がまん延し、その治療のため抗菌性の水産用医薬品が多く使用され「医薬品等が残留している」イメージが出来上がった。²⁾ 1997年以降、主要な病気に対するワクチンが普及し、病気の発生は大きく減少した。²⁾ また、養殖が始められた当初、餌料には主としてカタクチイワシなど小魚がそのまま餌（生餌）として利用されていた。²⁾ 生餌は魚の種類や季節によって脂肪量等の栄養成分が大きく異なり、生餌を用いたブリは偏った栄養バランスにより「イワシ臭い」「脂っぽい」と評価された。²⁾ この間にマーケットが全国に拡大し、生産量は15万tまで増加したため、養殖魚に悪いイメージがついた。^{2,5)} 1980年代には粉末の配合飼料および飼料添加物等と生餌を混合し、粒状に形成して作るモイストペレット（Moist Pellet：MP）が開発され、²⁾ ブリの成長に必要な栄養成分が研究された。

⁶⁾ 養殖技術は改良されたが、マーケットは飽和し生産量は頭打ちとなった。⁵⁾ 1990年代には飼料に含まれる栄養成分を一定にし、漁場環境への負荷を軽減するため高温高圧処理したエクストルーデッドペレット（Extruded Pellet：EP）が開発された。^{2,7)} このような飼料に関する取組を経て2014年の全国消費者モニターを対象とした調査では、10年前と比べ養殖水産物の品質（「味」「安全性」）がよくなったと感じている消費者は多くなった。⁸⁾

養殖魚の品質向上に伴い、市場評価は向上し、価格面に現れるようになった。天然ブリの脂の乗る時期は冬に限られるため、脂肪量を調整できる養殖ブリは周年にわたり評価され、天然ブリの価格を上回る時期が長くなっている。²⁾ 養殖ブリの品質が評価され、価格に転化される時代となったが、飼料により成分が一定化されると、養殖魚の品質は均一化され、新たな付加価値による差別化（ブランド化）が必要となった。そこで着目されたのが「血合筋の褐変抑制」である。

魚類の褐変は筋肉中に含まれる色素タンパクであるミオグロビンのメト化が主要因と言われている。ミオグロビンは鉄を含むヘム部分とグロビンと呼ばれるタンパク部分からなり、ヘム部分の鉄は、生体では2価の形態（還元型ミオグロビン・酸化型ミオグロビン）で存在するが、死後、時間経過に伴いメトミオグロビンと呼ばれる3価の形態になる。この形態変化はメト化と呼ばれている。この時、暗紫赤から鮮赤紅色を呈していた魚肉は褐色へと変色する褐変が生じる。⁹⁾ ミオグロビンを多く含む魚肉の色調研究はマグロ類の普通筋で進められた。これは1950年代の冷凍技術の発達に伴い冷凍マグロを長期間保管することによる褐変が課題となったためである。マグロ類の褐変をメト化率で表す方法が示されると、¹⁰⁾ メト化は一次反応で進む自動酸化であり、魚類のミオグロビンは哺乳類よりメト化が速く、種類を問わず10°Cの上昇でメト化速度は4倍から5倍になることが報告された。¹¹⁾ このため、現在は長期保管が必要なマグロは漁獲直後から超低温による冷凍流通となっている。¹²⁾ その他にもpHが0.3から0.4低下す

ることでメト化の速度は倍になること、酸素分圧の影響により表面より内部のメト化率が高くなることが知られている。^{11,13,14)}

一方、ブリ血合筋の褐変は2000年以降に注目された。ブリ血合筋の褐変指標にはこれまでマグロ類で報告されたメト化率や色調が用いられ、^{10,15)} 褐変を抑制するために抗酸化物質であるビタミンEおよびCを飼料に添加することでミオグロビンのメト化と脂質酸化が抑制される報告がされると、¹⁶⁾ ポリフェノールなどの抗酸化物質を含むオリーブ葉やユズ（果汁や果皮ペースト）など地域特産品を添加した給餌が行われ、血合筋の褐変抑制とともに産地の特徴づけによる差別化の取組が報告された。^{17,18,19,20)} 給餌以外の方法では、ラジカルスカベンジャーであり低酸素環境への耐性を担うセレノネインを静脈に投与する方法が報告されている。²¹⁾ また、同属種のカンパチ *Seriola dumerili* やヒラマサ *Seriola aureovittata* と比較しブリ血合筋の褐変が速いことが報告されるようになると、^{22,23)} カンパチやカツオ *Katsuwonus pelamis* ではマグロ類で用いられたメト化率の計算方法では誤差が生じることが示唆され、^{24,25)} 2015年にはブリを含む数魚種のメト化率の測定方法が報告され、²⁶⁾ ブリ血合筋に関する基礎的な研究も進められるようになった。

しかしまだブリ血合筋に関する基礎的な知見は十分でないと考えられる。その一つにマグロ類では報告されていない褐変初期の特徴的な状態が挙げられる。ブリの褐変は血合筋の一部から始まり、それが血合筋全体に広がることを確認している。大山らは背骨周辺部から始まり、徐々に体表部に向け進行し、褐変の進行時における血合筋の色調は均一ではないと報告している。¹⁷⁾ また、この現象に関して、森岡らはブリ血合筋の褐変は血合筋と普通筋の境界から始まり、それが血合筋全体に広がることを確認し、さらに血合筋と普通筋のpHの差がこの現象に関係していることを示唆している。²³⁾ しかしながら、この褐変初期の機序はこれ以降報告されていない。そこで、本研究の第1章ではこの褐変初期の機序について検討した。

また、ブリ血合筋の褐変の進行速度はEPやMPなど飼料成分の違いにより異なるようである。さらに、流通関係者からはブリ血合筋の褐変は産卵後と夏期に速いと言われ、夏期のブリは敬遠され取引量が少なくなる。²⁾ このため、夏期の血合筋の褐変を抑制する技術は産業的に重要な意義を持つ。流通関係者の評価を検証することで血合筋の褐変促進あるいは抑制因子を解明し、産卵後および夏期のブリ血合筋の褐変抑制対策について第2章で検討した。

ブリの品質で褐変と並び重要なのが「脂の乗り」である。かつての日本では脂が多すぎ「脂っぼい」と評価を落としたが、海外では脂が多いほうが好まれるなど、好まれる脂肪量は国や地域により異なるようである。ブリはタイ類やヒラメ、トラフグなどとは異なり、余剰エネルギーを筋肉に蓄積する生物学的特性を有する。²⁷⁾ 脂肪が可食部に蓄積し、飼育技術の善し悪しが肉質に反映するため、脂肪量は養殖ブリの品質指標になると考えられる。しかしながら、「脂の乗り」の評価は仲買人による目利き（主観）で行われてきた。また、養殖業者も長年の経験や肥満度（体重/尾叉長³⁾）を基に飼育を管理し、脂肪量は測定していない。脂肪量の測定は専門的な知識と分析機器が必要であり時間もかかるうえ、測定した試料は食用にできない。そのため、養殖場や流通現場では客観的な数値は用いられず、「脂の乗り」を指標に用いた養殖ブリのブランド化は行われていない。

一方、果物では糖度が測定され、サイズや形、糖度により等級化され、ブランド化に繋がっている。糖度は近赤外分光光度計などを用いた非破壊測定法が用いられている。²⁸⁾ なお、この方法は水産業界にも導入の動きがあるものの、^{29,30)} 小規模な漁業関係者が使用するには価格が高く、まだ広く普及には至っていないようである。

そこで、養殖業者が養殖魚の脂肪量を知り、「脂の乗り」をブランド化につなげるため、非破壊で簡便に脂肪量を測定する装置の開発を目指した。装置に用いる原理はヒト用体脂肪計で普及が進んでいる生体電気インピーダンス法とした。³¹⁾ この

原理を用いた装置は比較的安価に製造でき、小規模な養殖業者でも購入ができる価格帯が見込まれるため、広く普及を図ることが可能と考えた。ただ、ヒト用体脂肪計では問題を生じない「温度」や「鮮度」がインピーダンス値に影響することが想定されたため、ブリのインピーダンス値に及ぼす温度および鮮度の影響を調べ、非破壊で簡便に脂肪量を推定できる安価な装置開発の可能性を第3章で検討した。

第3章で用いたインピーダンス法による脂肪量測定技術の結果、時間経過（鮮度低下）に伴い、低周波は高周波のインピーダンス値より低下速度が速いことを見出した。低周波のインピーダンス値の低下は細胞膜の崩壊を示すため、^{32,33)} 多周波のインピーダンス値を測定することにより細胞レベルでの劣化情報を迅速に得られると考えた。この電気的特性はこれまで客観的な指標がないヤケ肉の損傷程度を数値化できると考えられた。そこで第4章では、インピーダンス法を用いてブリのヤケ肉を非破壊で判定することを目的にブリの正常肉およびヤケ肉モデルの筋肉性状とインピーダンス値との関係を検討した。

以上のことより、本研究は5つの章から構成される。第1章では、これまでに明らかにされていなかったブリ血合筋の褐変初期の機序について、血合筋と普通筋の筋肉性状を糖代謝関連から調べ、その性状の違いにより褐変を引き起こすミオグロビンのメト化への影響を検討した。併せて、周辺部へ徐々に褐変が進行する要因についても検討した。第2章では、第1章で判明した要因に着目し、養殖ブリ血合筋の褐変に及ぼす飼料(抗酸化物質)および季節の影響を解明した。第3章では、消費者の好みに応じた脂肪量のブリを生産するために必要となる安価で簡便な脂肪量測定装置開発を目的にブリの脂肪量とインピーダンス値との関係を調べ、脂肪量測定装置の可能性を検討した。さらに、第3章の結果から多周波のインピーダンス値が細胞膜の状態を示すことが示唆されたため、インピーダンス法を用いたヤケ肉判定を検討した。

第5章では、第1章および第2章で得られた結果からブリ血合筋褐変抑制対策について考察し、第3章および第4章の結果からインピーダンスを用いたブリの品質評価に関する測定技術を提唱し、今後の養殖魚の品質向上に関して総括した。

第1章 養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代謝並びに褐変進行に及ぼす脂質酸化の影響

魚類筋肉中にあるミオグロビンのヘム鉄は二価（酸化型ミオグロビン，還元型ミオグロビン）と三価（メトミオグロビン）の状態が存在し，ヘム鉄の電価とこれに結合する分子によって色調は変化する。⁹⁾ 生体では，三価のメトミオグロビンは還元性物質やNADH-チトクロム b_5 還元酵素（EC 1.6.2.2）により直ちにミオグロビンに還元されるが，死後は還元作用を失い，メトミオグロビンが蓄積し筋肉の褐色化（褐変）を引き起こす。³⁴⁾ 死後，ヘム鉄の二価から三価への変化（メト化）は筋肉中の温度，pH，酸素分圧，過酸化物等の影響を受け自動酸化で進行する。^{11,13,14)} このため，マグロ，ブリ，カツオ類等のミオグロビンが多い赤身魚では褐変が発生しやすく商品価値の低下に結びついている。

そのため，養殖クロマグロでは出荷前の絶食によりグリコーゲンを減らし，pH低下を抑制，メト化の自動酸化速度を遅くする試みが行われ，³⁵⁾ 養殖ブリでは直接メト化の防止またはメトミオグロビンの還元を目的とし，抗酸化物や抗酸化物を多く含む食品などを添加する試みが実施されている。¹⁶⁻²¹⁾ しかしながら，これらの手法によっても完全なメト化防止（予防）とはならず，ブリの血合筋の褐変は血合筋の一部分から始まり，徐々に血合筋全体に広がる。^{17,23)} 森岡らはブリ血合筋の褐変が血合筋と普通筋の境界から始まる要因を血合筋と普通筋のpHの差が関与していることを示唆しているが，褐変が徐々に体表部に向け進行する要因は，pHの差だけでは説明できないと考える。そこで，褐変の進行要因として脂質酸化に着目した。ブリを含む魚類ではミオグロビンのメト化が脂質酸化を促進することが報告されている。^{22,36,37,38)} 一方，モデル系では脂質酸化で生じる過酸化物（4-ヒドロキシノネナール）がミオグロビンのメト化を促進する報告がある。³⁹⁾ 魚類では脂質酸化を抑制することで褐変が抑制される報告があり，脂質酸化とメト化の相互作用が示唆されて

いる。^{40,41)} Baron and Andersen は脂質を多く含む筋肉食品の酸化による劣化の理解には主要な脂質成分であるトリグリセリドおよびリン脂質とヘムタンパク質との相互作用について更なる検討が必要と述べている。⁴²⁾

そこで，本章では養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代謝に着目し，褐変が血合筋と普通筋の境界から発生する要因を検討した。また，褐変が周辺部に徐々に進行する要因として脂質酸化に着目し，脂質酸化がメト化に及ぼす影響を検討した。

1. 材料と方法

1.1. 供試魚

長崎県長崎市地先でEP給餌により養殖されたブリを用いた。

1.2. ブリ切身の色調の経時変化

2017年11月20日にブリ3尾（2年魚，体重： 5.8 ± 0.4 kg）を延髄刺殺し，24時間の氷蔵後，魚体中央部を厚さ1 cmの切身状に5枚切り出した。切身は乾燥を防ぐため蓋付きプラスチック製容器（蝶プラ工業社製 タイトボックス）に入れ，上面が空気に曝される状態で10°C保管し，経時的にデジタルカメラ（オリンパス社製 μ 790SW）を用いて撮影した。また，血合筋中央部の色調は切身毎に色彩色差計（コニカミノルタ社製 CR-300）を用いてL*値（+L*＝白色，-L*＝黒色），a*値（+a*＝赤色，-a*＝緑色），b*値（+b*＝黄色，-b*＝青色）を測定し，最大値，最小値を除く3回の測定値から平均値を求めた。

1.3. 魚肉ブロックのpHと糖代謝関連成分の測定

切身の色調測定に用いたブリ3尾の頭部側筋肉ブロック5 cmを取上げ直後に切出し，血合筋（Fig. 1a），普通筋（Fig. 1b）および血合筋と普通筋の境界面（以後，境界面（Fig. 1c））のpHを測定した。pH測定は測定電極が直径3 mmの円錐形のpHメ

ーター (テスト社製 Testo 205) を用いた。境界面の測定は pH メーターの先端が境界面を捉えるように差し込んだ。切出した筋肉ブロックはポリエチレン製の袋に入れ冷蔵し、経時的に測定した。

血合筋と普通筋のグリコーゲン量と乳酸量の測定は背側中央部を用いて 0, 24 時間後に後述の方法により測定した。

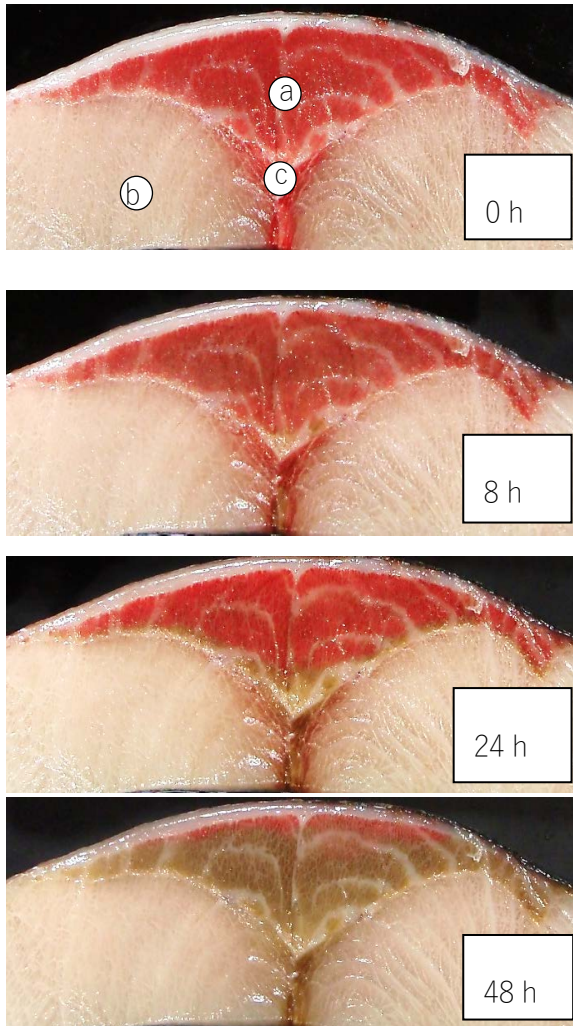


Fig. 1 Changes in storage time of the typical appearance of yellowtail muscle slice. Circles are pH measurement part. (a): Dark muscle, (b): ordinary muscle, (c): boundary part between dark muscle and ordinary muscle. 0 h: 0 hour storage, 8 h: 8 hours storage, 24 h: 24 hours storage, 48 h: 48 hours storage.

1.4. 境界面モデルの調製と pH および糖代謝関連成分の測定

境界面から褐変が生じる状況を再現することを目的として境界面モデルを作製した。

2016 年 6 月 28 日に延髓刺殺し冷蔵で搬入 (所要時間 15 分) したブリ (3 年魚, 体重: 6.4 kg) から直ちに血合筋と普通筋を採取し, それぞれの試料に 5 倍量の蒸留水を加え, ホモジナイズしたものを血合筋懸濁液と普通筋懸濁液とした。それぞれの懸濁液に等量の蒸留水を加えた血合筋ホモジネート, 普通筋ホモジネートおよびそれぞれの懸濁液を等量混合した混合ホモジネートを調製し, 5°C で保管, 経時的に pH, グリコーゲン量, 乳酸量を測定した。なお, pH 測定は卓上型 pH メーター (HORIBA 社製 F-54) を用いた。

1.5. 血合筋と普通筋の解糖系酵素活性の測定

2016 年 11 月 1 日に活魚で搬入したブリ 6 尾 (当歳魚, 体重±標準偏差: 0.9 ± 0.1 kg) を延髓刺殺後直ちに血合筋と普通筋を採取し, それぞれのグリコーゲン・ホスホリラーゼ (EC 2.4.1.11, GPase), ホスホフルクトキナーゼ (EC 2.7.1.11, PFK) ピルビン酸キナーゼ (EC 2.7.1.40, PK), および乳酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.27, LDH) の活性を測定した。試料はマイクロチューブ (nippi 社製 Bio Masher II) に 0.01 g を精秤し, 抽出用緩衝液あるいは蒸留水 200 μ L を加え, 電動攪拌機 (nippi 社製 Power Masher II) を用いてホモジナイズした。その後, 4°C, 15,000 \times g で 20 分間遠心分離し, 上清を粗酵素液とした。GPase の抽出緩衝液は 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 5 mM 2-メルカプトエタノール, 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.8) を用い, 活性測定は Hata らの方法⁴³⁾ に従った。PFK 抽出緩衝液は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) を用い, 活性測定は垂井, 河野の方法⁴⁴⁾ に準じて測定した。すなわち, 終濃度が 91.2 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0), 5 mM フルクトース-6-リン酸 \cdot 2Na, 1.3 mM ATP, 1.12 mM ホスホエノールピルビン酸 \cdot TCA, 0.262 mM NADH, 5 mM KCl, 2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, PK, LDH を含む反応液 300 μ L に粗酵素液 1 μ L を加え, 30°C における 340 nm の吸光度を 5 分間測定した。PK 抽出は蒸留水を用い,

活性測定は Moon and Johnston の方法⁴⁵⁾に従った。LDH 抽出は Johnston の方法⁴⁶⁾、活性測定は Vassall の方法⁴⁷⁾に従った。各酵素活性は組織重量 (g) あたり 1 分間に变化する補酵素の μmol 数で示した。

1.6. ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響

2012 年 3 月 26 日に延髓刺殺し、24 時間氷蔵したブリ 1 尾 (当年魚, 体重: 0.8 kg) の血合筋からミオグロビンを抽出した。ミオグロビンの抽出は尾藤の方法⁴⁸⁾を改変し、血合筋に冷却した蒸留水を 9 倍量加え、石英砂と共に乳鉢で磨り潰し、濾紙 (アドバンテック社製 5A) で濾過したものを粗ミオグロビン抽出液とした。抽出液は 8,500 \times g で 5 分間冷却遠心分離し、この上清に NaOH 水溶液あるいはマレイン酸で pH を 7.0, 6.5, 6.0, 5.5 に調整し、バイオマルチンキューベータ (NK システム社製 LH-30-8CT) 内で 10°C 保存し、経時的にメト化率を測定した。なお、pH は混合ホモジネートの pH を参考にして 5.5 から 7.0 の範囲とした。

1.7. 普通筋と接する血合筋の脂質酸化度

切身の色調測定に用いたブリ 3 尾の中央部より後端部分の血合筋を厚さ 5 mm の刺身状にスライスして用いた。試料は乾燥を防ぐため蓋付きプラスチック製容器 (蝶プラ工業社製 タイトボックス) に入れ、両面が空気に曝されるよう容器の中にはステンレス金網を敷き 10°C で保管し、経時的に脂質酸化度を測定した。脂質酸化度はチオバルビツール酸 (TBARS) 比色法による過酸化脂質とした。普通筋に接する側から 3 mm までの血合筋と体表側から 3 mm までの血合筋をそれぞれ接触側と体表側とした。細い部分は中間線で切り分け接触側と体表側とし、残りの血合筋を中間部として用いた。なお、ソックスレー抽出法を用いて血合筋の脂肪量を測定した。

1.8. ミオグロビンのメト化に及ぼす脂質酸化の影響

2017 年 5 月 24 日に延髓刺殺し、24 時間氷蔵し

たブリ (3 年魚, 体重: 4.9 kg) の血合筋から Bligh and Dyer 法⁴⁹⁾に従い総脂質を抽出し、伊藤らの方法⁵⁰⁾に準じてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりトリグリセリド (TG), リン脂質 (PL) 画分を分画した。分画した脂質は実験に供するまでポリプロピレン製の容器に窒素封入し、-80°C で保管した。また、2017 年 6 月 13 日に延髓刺殺し、24 時間氷蔵したブリ (2 年魚, 体重: 3.8 kg) の血合筋から前述 (1.6.) の方法に従いミオグロビンを抽出した。抽出液のタンパク質濃度は 16.4 mg/mL であった。なお、タンパク質濃度はウマミオグロビン (ナカライテスク社製) を標準物質としてビウレット法⁵¹⁾により定量した。

総脂質 (平均 \pm 標準偏差: 500.0 \pm 0.5 mg) から分画した脂質成分の全量 (TG 平均 \pm 標準偏差: 428.6 \pm 4.6 mg, PL 平均 \pm 標準偏差: 53.4 \pm 1.7 mg) を用いた。ミオグロビン (Mb) と混合する区 (TG+Mb 区, PL+Mb 区) とミオグロビンと混合しない単独区 (TG 区, PL 区) および粗ミオグロビン抽出液 (Mb 区) とした。分画した脂質は粗ミオグロビン抽出液と混合する前に 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL とジメチルスルフォキシド (DMSO) 0.1 mL を加え、超音波分散機 (トミー精工社製 UR-20P) を用いて乳化した。混合区はミオグロビン抽出液と乳化した脂質成分、単独区は蒸留水、粗ミオグロビン抽出液は 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 20 mL 加え混合し、5°C で保管、経時的にメト化率および TBARS 量を測定した。

1.9. 成分分析

グリコーゲンの精製およびグリコーゲンからグルコースへの分解は三坂らの方法⁵²⁾を用いた。グリコーゲンを分解した液はムタロターゼ-GOD 法に基づく測定キットであるグルコース CII-テスタワコー (和光純薬工業社製標準物質添付 測定波長 505 nm) を用い、吸光度測定は分光光度計 (島津製作所社製 UV-1650PC) を用いた。求めたグルコース量に 0.9 を乗じてグリコーゲン量とした。

乳酸測定を試料は過塩素酸でタンパク質を除去、1,400 ×g で3分間遠心分離し、上清をポアサイズ 0.22 μm のメンブランフィルター (MILLIPORE 社製 MILLEX-GP) で濾過した。濾液は酵素法⁵³⁾を改変した Igisu *et al.*⁵⁴⁾に従い 25°C で30分間経時的に吸光度 (340 nm) を測定した。乳酸濃度は L-乳酸 (和光純薬工業社製, 特級) を標準物質として算出した。

メト化率は粗ミオグロビン抽出液を 8,500 ×g で5分間冷却遠心分離し、上清をポアサイズ 0.22 μm のメンブランフィルターで濾過,⁵⁵⁾ 分光光度計を用いて可視部吸収スペクトル (波長 500 - 700 nm) を測定した。メト化率の計算は井ノ原らの方法²⁶⁾を用いた。すなわち, $metMb(\%) = -99.70 (A_{548\text{ nm}}/A_{524\text{ nm}}) + 164.96$ 。A は吸光値。

TBARS 量は精秤した血合筋 0.5 g に 1% NaCl 5 mL を加えホモジナイズした溶液または粗ミオグロビン抽出液と分画脂質を混ぜた溶液 0.75 mL に等量の 10% TCA を加えタンパク質を沈殿させた後、5,300 ×g で5分間遠心分離した上清を適宜希釈し、希釈液 1.5 mL に 1% EDTA 0.5 mL および 1% TBA 試薬 0.5 mL を混合し、今井, 荒井の方法⁵⁶⁾に準じて沸騰水中で15分発色させた。発色後、常温まで急冷し、5,300 ×g で5分間遠心分離、上清の吸光度 (532 nm) を測定、分子吸光係数 1.56×10^5 を用いて TBARS 量を算出した。⁵⁷⁾

1.10. 統計処理

統計処理は Statcel ver.3 を用いた。⁵⁸⁾ 2 種間の比較には Student の *t* 検定を行い、3 種間以上の比較は、正規分布に従い、分散が均一とみなせる場合、一元配置分散分析を行い有意差が見られた場合は引き続き Tukey-Kramer 検定を行った。危険率は 5% で有意差を判定した。

2. 結果

2.1. ブリ切身の色調の経時変化

切出し直後の血合筋中央部の色調は L* 値 (平均 ± 標準偏差) 40.6 ± 0.3 , a* 値 21.0 ± 0.4 , b* 値 9.8

± 0.9 であった。その後 L* 値の変化はほとんどなく, a* 値は 4 時間後に 18.5 ± 0.9 となった後 24 時間までは変化が少なく, その後 36 時間後には 13.5 ± 1.4 , 48 時間後には 8.7 ± 0.2 に低下した。b* 値は徐々に増加し 48 時間には 13.8 ± 0.2 となった。なお, 8 時間後の境界面付近の血合筋にはわずかに褐変が認められ, その後, 体表側に向け徐々に褐変が進行し, 48 時間後には全体的に褐変した (Fig. 1, Fig. 2)。

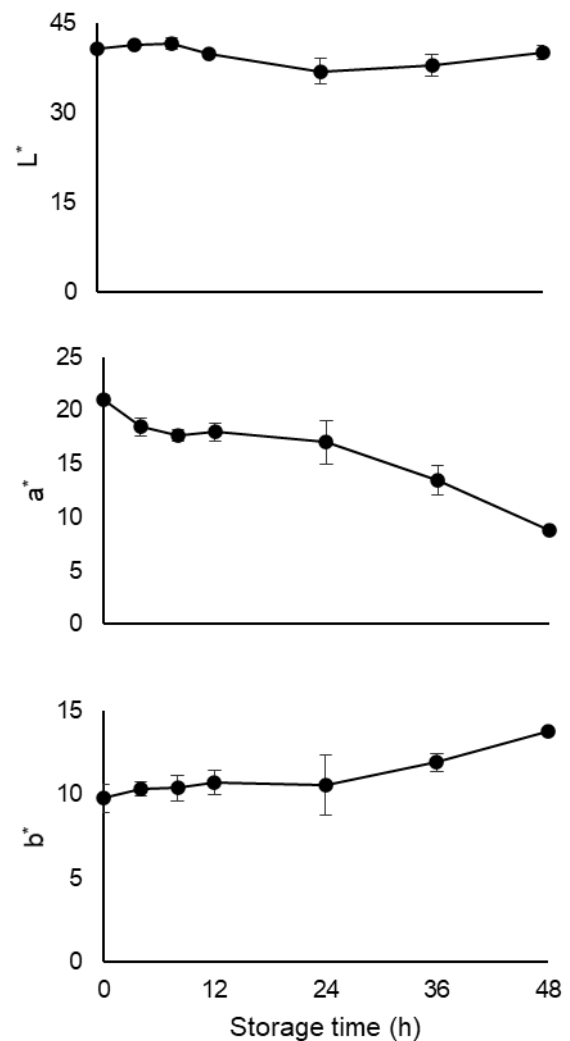


Fig. 2 Changes in L*, a* and b* values in dark muscle of sliced meat prepared from yellowtail during storage at 10°C. Sliced meat was prepared from fish stored in ice for one day after sacrificing. Data are presented as mean ± standard deviation (n=3).

Table 1 Changes in the pH of yellowtail dark muscle, ordinary muscle and boundary part during ice storage

	0 h	1 h	2 h	6 h	24 h
Dark muscle	7.31±0.15	7.26±0.09	6.84±0.22 ^{ab*}	6.39±0.10 ^{ab*}	6.51±0.07 ^{a*}
Boundary part	7.32±0.02	6.87±0.51	6.59±0.25 ^{a*}	6.09±0.08 ^{a*}	6.15±0.08 ^{b*}
Ordinary muscle	7.22±0.12	7.34±0.08	7.11±0.09 ^{b*}	6.81±0.35 ^b	6.24±0.15 ^{b*}

Values are mean ± standard deviation ($n=3$).

Boundary part is between dark muscle and ordinary muscle.

The asterisks show significant difference to 0 h in each part ($p<0.05$).

Sets of letters on each symbol indicate significant difference in each hour ($p<0.05$).

2.2. 魚肉ブロックの pH と糖代謝関連成分

血合筋と普通筋および境界面の pH を Table 1 に示した。取上げ 0 時間の pH (平均±標準偏差) は血合筋 7.31 ± 0.15 , 普通筋 7.22 ± 0.12 , 境界面 7.32 ± 0.02 と有意な差は認められなかったが, 1 時間以降, 境界面の pH は他の部位より低い値を示し, 24 時間後の境界面は血合筋に対し有意に低い値となった ($p<0.05$)。

血合筋と普通筋のグリコーゲンおよび乳酸量を Fig. 3 に示した。0 時間後のグリコーゲン量 (平均±標準偏差) は血合筋 469.0 ± 91.0 mg/100g, 普通筋 266.6 ± 28.1 mg/100g であったが, 24 時間後は血合筋 211.5 ± 35.4 mg/100g, 普通筋 32.4 ± 8.0 mg/100g となり, 血合筋では 257.5 mg/100g, 普通筋では 233.6 mg/100g の減少となった。一方, 0 時間後の乳酸量は血合筋 4.4 ± 1.9 μ mol/g, 普通筋 33.6 ± 11.8 μ mol/g であったが, 24 時間後の血合筋は 31.2 ± 5.7 μ mol/g, 普通筋は 89.7 ± 20.6 μ mol/g となり, 血合筋では 26.8 μ mol/g, 普通筋では 56.1 μ mol/g の増加となった。

2.3. 境界面モデルの pH および糖代謝関連成分

境界面モデルの pH, グリコーゲン量, 乳酸量を Fig. 4 に示した。0 時間の血合筋ホモジネート pH は 6.67 で, 普通筋ホモジネートと混合ホモジネートはそれぞれ 6.30, 6.29 であった。血合筋ホモジネートの pH はあまり低下せず, 普通筋ホモジネートでは 2 時間後まで低下し 5.89 となり, 混合ホモジネートでは 3 時間後まで低下し 5.68 となった。

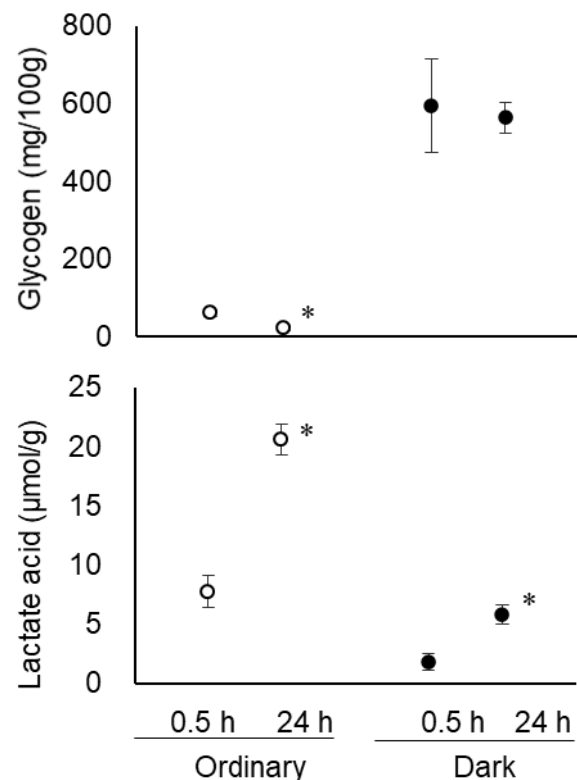


Fig. 3 Changes in glycogen and lactic acid content of ordinary muscle and dark muscle in yellowtail during ice storage. Data are presented as mean ± standard deviation ($n=3$). 0 h, 24 h: 0, 24 hours after sacrificing. Asterisks show significant difference from 0 hour ($p<0.05$).

血合筋ホモジネートのグリコーゲン量は 0.75 mg/mL から 0.62 mg/mL, 普通筋は 0.13 mg/mL から 0.08 mg/mL に減少した。混合ホモジネートのグリコーゲン量は 0 時間で血合筋ホモジネートより低い 0.63 mg/mL を示し, 24 時間後には 0.34

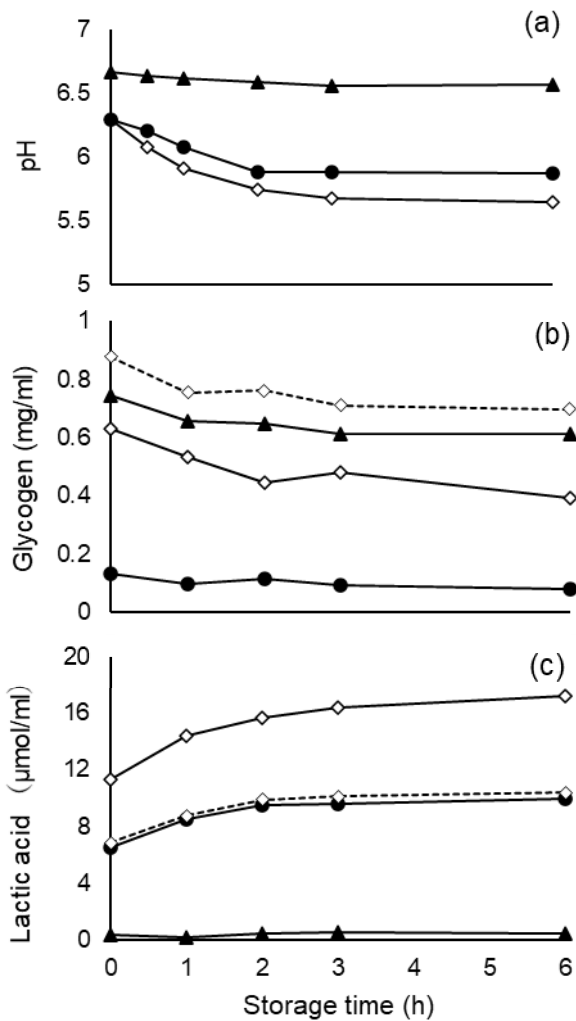


Fig. 4 Changes in pH (a), glycogen (b) and lactic acid (c) of muscle homogenate in yellowtail. Symbols are as follows: triangle: dark muscle homogenate, diamond: mixture of dark muscle homogenate and ordinary muscle homogenate, circle: ordinary muscle homogenate, solid line: measured values, dashed line: calculated values when mixing dark muscle homogenate and ordinary muscle homogenate.

mg/mL となった。血合筋ホモジネートの乳酸量は 0.21 mg/mL から 0.56 mg/mL で推移し、普通筋ホモジネートは 6.48 mg/mL から 9.09 mg/mL に増加した。一方、0 時間の混合ホモジネートの乳酸量は血合筋ホモジネート 0.35 $\mu\text{mol/mL}$ と普通筋ホモジネート 6.48 $\mu\text{mol/mL}$ の合計より高い 11.34

$\mu\text{mol/mL}$ を示し、24 時間後には 16.46 $\mu\text{mol/mL}$ となった。

2.4. 血合筋および普通筋の解糖系酵素活性

血合筋と普通筋の解糖系酵素活性の結果を Table 2 に示した。GPase 活性は血合筋 $4.6 \pm 0.5 \mu\text{mol/min/g}$ 、普通筋 $6.6 \pm 0.5 \mu\text{mol/min/g}$ 、その差は 1.4 倍であった。PFK 活性は血合筋 $5.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/min/g}$ 、普通筋 $21.8 \pm 3.7 \mu\text{mol/min/g}$ 、その差は 4.3 倍であった。PK 活性は血合筋 $19.5 \pm 3.8 \mu\text{mol/min/g}$ 、普通筋 $127.3 \pm 42.7 \mu\text{mol/min/g}$ 、その差は 6.5 倍であった。LDH 活性は血合筋 $362.4 \pm 28.2 \mu\text{mol/min/g}$ 、普通筋 $1,648.2 \pm 149.6 \mu\text{mol/min/g}$ 、その差は 4.5 倍であった。測定した酵素活性は全て血合筋より普通筋が有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

2.5. ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響

異なる pH に調整した粗ミオグロビン抽出液のメト化率の経時変化を Fig. 5 に示した。調整直後のメト化率は 9.5-14.5 % の範囲であったが、24 時間後には pH7.0 では 14.4 %、pH6.5 では 26.1 %、

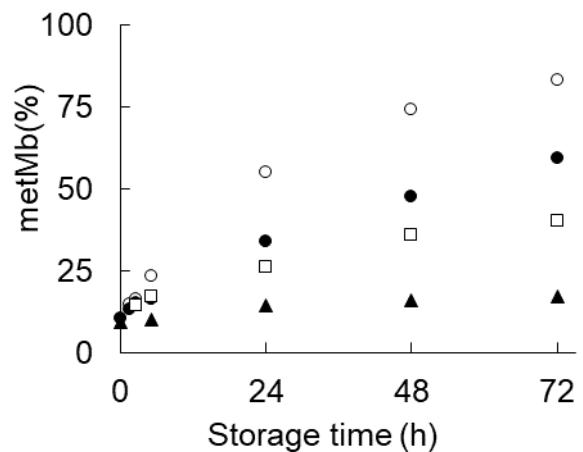


Fig. 5 Effect of pH on the ratio of metmyoglobin (metMb) to total myoglobin in crude myoglobin solution prepared from dark muscle in yellowtail. Crude myoglobin solution was incubated at 10°C. Symbols are as follows: open circle: pH5.5, closed circle: pH6.0, square: pH6.5, triangle: pH7.0.

Table 2 Activities ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{wet g}$) of selected enzymes in yellowtail dark muscle and ordinary muscle

	Dark muscle	Ordinary muscle
Phosphorylase	4.6±0.5	6.6±0.5*
Phosphofructokinase	5.1±0.4	21.8±3.7*
Pyruvate kinase	19.5±3.8	127.3±42.7*
Lactate dehydrogenase	362.4±28.2	1648.2±149.6*

Values are mean \pm standard deviation ($n=6$).

Asterisks show significant difference from the dark muscle at each enzymes ($p<0.05$).

pH6.0 では 34.1 %, pH5.5 では 55.1 % となりその後も pH が低いほどメト化率が増加した。

2.6. 普通筋と接する血合筋の脂質酸化度

血合筋の部位別の TBARS 量を Fig. 6 に示した。境界面で褐変が確認された 8 時間後から接触側の TBARS 量は他より高い $0.24 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\text{g}$ を示し、24 時間後に $0.58 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\text{g}$, 48 時間後には $0.82 \pm 0.08 \mu\text{mol}/\text{g}$ まで増加した。体表側の TBARS 量は 24 時間後までは低く $0.04 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\text{g}$ であったがその後増加し、48 時間では $0.59 \pm 0.16 \mu\text{mol}/\text{g}$

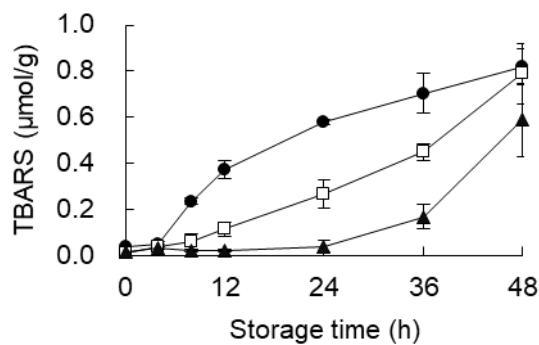


Fig. 6 Changes in thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels by site of dark muscle in yellowtail during storage at 10°C. Sliced dark muscle was prepared from fish stored in ice for one day after sacrificing. Symbols are as follows: circles: contact side, squares: center, triangles: body surface side. Data are presented as mean \pm standard deviation ($n=3$).

となった。中間部は接触側と体表側との値を示した。なお、血合筋の脂肪量 (平均 \pm 標準偏差) は $33.2 \pm 2.7 \%$ (接触側 $29.5 \pm 1.2 \%$, 中央部 $33.6 \pm 1.6 \%$, 体表側 $36.7 \pm 1.4 \%$) であった。

2.7. ミオグロビンのメト化に及ぼす脂質酸化の影響

脂質画分と粗ミオグロビン抽出液の混合区と粗ミオグロビン抽出液, ミオグロビンと混合しない単独区のメト化率および TBARS 量の経時変化を Fig. 7 に示した。血合筋から抽出した脂質成分は TG が 85.7 %, PL が 10.7 %, その他の画分は 1.8 % であった。メト化率は PL+Mb 区が顕著に増加し 48 時間後には 92.5 % であったが, Mb 区および TG+Mb 区はそれぞれ 18.0 % と 19.5 % であった。Mb 区および TG+Mb 区は 96 時間後まで 28.2 %, 28.9 % と緩やかな増加であったが, その後 TG+Mb 区は急増し 168 時間後には 88.9 % となった。

TBARS 量は単独区よりミオグロビンと混合した区が高い値を示し, 48 時間後, PL 区は $29.2 \mu\text{mol}/\text{mL}$ に対し PL+Mb 区は $40.5 \mu\text{mol}/\text{mL}$, TG 区は $0.3 \mu\text{mol}/\text{mL}$ に対し TG+Mb 区は $9.8 \mu\text{mol}/\text{mL}$ となった。PL 区および PL+Mb 区の 0 時間はそれぞれ $8.1 \mu\text{mol}/\text{mL}$, $8.3 \mu\text{mol}/\text{mL}$ で, その後 96 時間までは他の区より高い値で推移した。TG+Mb 区は 48 時間後に PL+Mb 区の 0 時間と同程度の $9.8 \mu\text{mol}/\text{mL}$ となり, 168 時間には最も高い $55.2 \mu\text{mol}/\text{mL}$ となった。

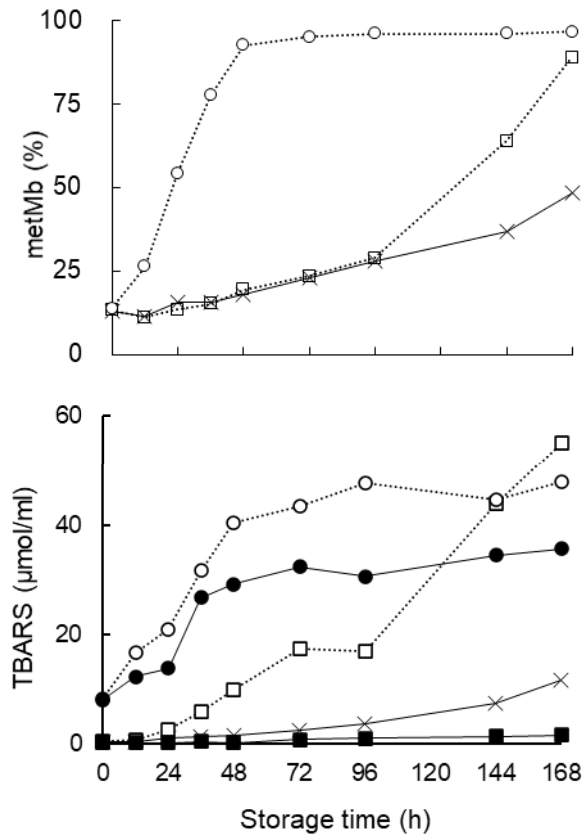


Fig. 7 Changes in metMb and TBARS levels of the mixture of extracted crude myoglobin and lipid fractionation from dark muscle in yellowtail ($n=3$). Symbols are as follows: circles: phosphalipids, squares: triacylglycerols, opened symbols: mixture of crude myoglobin and lipid extracted from dark muscle, closed symbols: lipid, cross marks: crude myoglobin extract.

3. 考察

第1章では、養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代謝に着目し、褐変が血合筋と普通筋の境界から生じる要因を検討した。また、褐変が周辺部に徐々に進行する要因として脂質酸化に着目し、脂質酸化がメト化に及ぼす影響を検討した。

取上げ直後の血合筋、普通筋、境界面の pH に有意差は認められなかったが、1 時間後には境界面が最も低くなり、その後も他の部位より低い傾

向を示し、24 時間後の境界面の pH は血合筋より有意に低い値となった (Table 1)。血合筋と普通筋のグリコーゲンと乳酸量を測定したところ、グリコーゲン量は血合筋に多く普通筋に少なかったが、24 時間後の乳酸量は普通筋に多かった (Fig. 3)。そこで、解糖系酵素活性を測定したところ、活性は血合筋より普通筋が有意に高い値を示した (Table 2)。普通筋は乳酸生成が高い嫌氣的代謝 (解糖)、血合筋では好氣的代謝 (クエン酸回路) が主な代謝となること^{59,60}と一致する。普通筋に乳酸量が多かったことから、乳酸が pH 低下の主要因と推察した。

血合筋はグリコーゲンが多く、普通筋は解糖系酵素活性が高いため、血合筋のグリコーゲンと普通筋の解糖系酵素が接触する境界面で乳酸が生成、pH 低下が起こると考え、血合筋と普通筋の懸濁液を混合したホモジネートを境界面モデルとして解析した (Fig. 4)。調製直後のグリコーゲン量は血合筋ホモジネート 0.75 mg/mL、普通筋ホモジネート 0.13 mg/mL であったが、混合ホモジネートは 0.63 mg/mL で血合筋ホモジネートより少なかった。一方、乳酸量は血合筋ホモジネートが 0.35 μmol/mL、普通筋ホモジネートが 6.48 μmol/mL であったが、混合ホモジネートは 11.34 μmol/mL と血合筋と普通筋ホモジネートの合計以上に生成した。酵素活性はホモジネートと筋肉中などその条件によって異なるが、これまでの結果から血合筋のグリコーゲンが普通筋の解糖系酵素によって分解され、乳酸が生成することにより境界面で pH 低下が起こっていると考えた。

ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響を調べ、低い pH でミオグロビンのメト化が促進される結果が得られた (Fig. 5)。これは森岡らの報告²³と同様であった。このため、初めに境界面においてミオグロビンのメト化が促進されたと推察した。実際、切出し直後の血合筋の色調では部分的な色の違いは見られなかったが、8 時間後には境界面付近で変色が確認された (Fig. 1)。以上のことから、ブリ血合筋の部分的な褐変が発生した要因は境界面の pH 低下によるものと考えた。

pH 低下が起きている境界面からミオグロビンのメト化が発生すると推察したが、境界面以外の血合筋では、境界面から体表側に至る部分で pH の高低差は確認されなかった。境界面から起きた褐変はその後徐々に体表側へと進行し、切出し 48 時間後には血合筋全てが褐変したため、pH だけでメト化が徐々に体表側に向け進行することは説明できない。これまでもミオグロビンのメト化促進因子には pH の他に温度、酸素分圧、過酸化物質などが報告されている。^{11,13,14)} 一般的に脂質含量は普通筋より血合筋に多く、体表に近い筋肉は背骨に近い筋肉より高いとされている。⁶¹⁾ 脂質の酸化はその過程で脂質ペルオキシラジカルを生成することから褐変の進行には過酸化物質が関係すると考え、血合筋を接触側、中央部、体表側に区分し TBARS 量を調べた。脂質が少ない接触側の過酸化物質は 8 時間後には他の部位より高い値となった (Fig. 6)。褐変の進行と同様、接触側から脂質酸化が進んでいた。血合筋の色調の経時変化 (Fig. 1) と血合筋の過酸化物質 (Fig. 6) から脂質の酸化後にメト化が促進されると示唆された。血合筋は高度不飽和脂肪酸が多いことやリン脂質が多いことが知られているため、^{37,62)} 脂質クラス組成別に脂質の酸化とメト化への影響を調べた。PL+Mb 区は混合 12 時間後に過酸化物質の増加と同時にメト化率が増加し、メト化が促進されることを確認した (Fig. 7)。PL の酸化がメト化に及ぼす影響は PL が持つ酸化のしやすさの他に両親媒性が関係すると思われる。PL は主に細胞膜を構成し、ミオグロビンは筋細胞内に存在する。このため、細胞膜を構成するリン脂質は皮下組織に蓄積する TG⁶¹⁾ と比較してミオグロビンとの接触性は高く、PL の酸化で生じた過酸化物質がミオグロビンに影響を与えると考えられる。また、過酸化物質は粗ミオグロビン抽出液と混合した区 (PL+Mb 区, TG+Mb 区) が単独区 (PL 区, TG 区) より高い値を示したことから、ミオグロビンのメト化が脂質酸化を促進すると考えられた。このことはこれまでの報告を裏付ける結果である。^{22,36,37,38)} なお、96 時間以降に TG+Mb 区のメト化が促進された原因は不明だが、

Fig. 1 で示したように褐変は 8 時間後には開始され、48 時間後には全体に広がることから、褐変抑制を考える上で重要なことは PL の酸化抑制と考える。

以上の結果から、普通筋と接する境界面から褐変が発生する要因は、筋肉糖代謝の違いにより血合筋と普通筋の境界面の pH が低下し、低下した pH により境界面のミオグロビンがメト化するためと考えた。ミオグロビンのメト化は脂質酸化を促進し、リン脂質の酸化はミオグロビンのメト化を促進することが明らかとなった。これにより、褐変が体表に向け進行する要因はリン脂質の酸化が影響したと考えた。このため、境界面から発生する褐変を抑えるためには pH 低下の抑制が重要であり、その後の褐変の進行を抑えるにはリン脂質の酸化を抑制する必要がある。褐変の進行は脂質酸化がミオグロビンのメト化を促進させていることから、第 2 章ではリン脂質の酸化を防ぐ抗酸化物質に着目することとした。

第2章 養殖ブリ血合筋の褐変に及ぼす飼料および季節の影響

前章において、pH低下とリン脂質の酸化がブリ血合筋の褐変が部分的に起こり、徐々に進行する要因であることを明らかにした。高度不飽和脂肪酸を多く含むリン脂質は細胞膜を構成し、高度不飽和脂肪酸の二重結合部分に α -トコフェロール (α Toc) を選択的に取り込む。^{63,64)} 脂質酸化を防ぐ α Toc は各組織にほぼ均等に含まれ、⁶⁵⁾ その量は飼料の影響を受けることやマサバでは季節変動が報告されている。^{66,67,68)} そのため、 α Toc 量に応じた抗酸化作用が褐変抑制に働くと考えた。なお、同じく抗酸化物質で α Toc との相乗効果が知られているアスコルビン酸 (AsA) は筋肉中の蓄積量が少ない。^{69,70)}

ビタミンEとCを飼料に1%添加することでブリ血合筋の褐変が抑えられることが報告されている。¹⁶⁾ 餌飼料中の α Toc や AsA 量は季節や配合割合により異なるため、魚肉中に含まれるこれらの量も異なると考えられるが、褐変との関係は詳細には調べられていない。抗酸化物質は多種多様であり、これまで抗酸化物質あるいは抗酸化物質を多く含む天然由来の食品等 (オリーブ葉、¹⁷⁾ セレノネイン、²¹⁾ ユズ、^{18,19)} アスタキサンチン・γ-オリザノール⁷¹⁾) がブリ血合筋の褐変抑制に効果があると報告されてきたが、報告された抗酸化物質等を特別に強化配合した飼料でなくても市販のエクストルーダーペレット (EP) や養殖業者が調製するモイストペレット (MP) など成分の違いにより褐変の進行状況は異なるのが現状のようである。さらに、流通関係者は産卵後と夏期に褐変の進行が早いと話し、大山らは褐変が季節により影響を受けることを示唆している。¹⁷⁾

そこで本章では、ブリ血合筋の褐変に関する基礎的知見を得ることを目的に異なる餌飼料で養殖されたブリ血合筋の褐変状況、月毎の褐変状況と pH や抗酸化物 (α Toc と AsA) 量との関係を検討し、改めて褐変を促進または抑制する因子を解明した。

1. 材料と方法

1.1. 血合筋の褐変に及ぼす飼料の影響

長崎県内の養殖業者よりブリ養殖用餌飼料 32 検体入手し、餌飼料中の α Toc 量を測定した。なお、MP および生餌の水分量を 105°C で 48 時間乾燥して求め乾物換算した。

次に、 α Toc 量が異なる餌飼料を使用している 6 業者を選択、長崎県南松浦郡新上五島町、佐世保市、平戸市地先で養殖されたブリ (2 年魚 : 各 3 尾) について以下の検討を行った。なお、本章で用いたブリのサイズおよび取上げ日は Table 3 に示した。取上げたブリは脱血・延髄締めを施し、直ちに海水氷で 3 時間以上冷却した。冷却後、流通実態に合わせて 2 日間氷蔵してから試料とし、頭部側の血合筋から α Toc、AsA 量を測定、併せて、魚体中央部の血合筋の色調を測定した。

α Toc 量は五十嵐の方法により前処理を行った。⁷²⁾ すなわち、試料 1 g に石英砂と 3 %ピロガロール入りエタノール 10 mL を加え乳鉢磨細し、蓋付き遠沈管に移し、60 %KOH 水溶液 1 mL を加え窒素封入、70°C で 30 分間けん化した。けん化後は水冷し、10 %酢酸エチル/ヘキサン 15 mL と 1 %NaCl 22.5 mL を加え 5 分間振とうし、640×g 5 分で遠心分離し、上澄みをナスフラスコに吸引した。残った遠沈管内の溶液は水冷以降の工程を 2 回繰り返して、上澄みをナスフラスコに集め、濃縮乾固し、ヘキサン 1 mL を加え、メンブランフィルターで濾過し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定用試料とした。HPLC は島津製作所製を用い、カラムは Shim-pack (CLC-NH₂ 6.0×150mm)、移動相にはヘキサン : イソプロピルアルコール : 酢酸 (1000 : 10 : 5) を 1.5 mL/min で流し、検出器はフォトダイオードアレイ (島津製作所製 SPD-20A) を用いて波長 297 nm の吸光度を測定した。標準品はビタミン E 同族体セット (エーザイ製) を用いて吸光面積から求めた。

AsA 量はメタリン酸で抽出した後、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンで誘導体に変え HPLC で測定した。⁷³⁾ HPLC は島津製作所製を用い、カラム

Table 3.1 Data on cultured yellowtail used in the experiment

Sampling date		Place	Fork length (cm)	Body weight (kg)	Bait types*	n =
Survey within the Nagasaki Prefecture						
2012	15th Oct.	Shinkamigotou	54.7±0.4	2.36±0.04	EP	3
	15th Oct.	Shinkamigotou	66.4±1.2	4.67±0.23	MP	3
	15th Oct.	Shinkamigotou	64.3±0.3	4.92±0.23	EP	3
	26th Oct.	Sasebo	58.9±5.5	2.97±0.09	MP	3
	28th Oct.	Hirado	65.4±2.5	5.01±0.68	EP	3
	28th Oct.	Hirado	70.8±1.4	6.04±0.39	EP	3
Feeding test						
2013	26th Jul.	Nagasaki	53.9±4.3	2.02±0.20	EP	3
	26th Jul.		54.3±1.4	2.14±0.05	EP+AP	3
Continuous effect test						
2014	20th Jan.	Nagasaki	31.5±1.6	0.51±0.07	EP	40
	~		32.0±1.7	0.52±0.07	EP±AP	40
	21th Feb.		32.3±1.5	0.55±0.06	EP±AP	40
Fasting test						
2012	17th Aug.	Nagasaki	48.2±0.9	1.76±0.16		4
	24th Aug.		46.5±2.0	1.48±0.18		4
	30th Aug.		47.2±3.9	1.48±0.26		4

Values are mean ± standard deviation.

EP: Extruder pellet

MP: Moist pellet

AP: Ascorbic acid phosphate ester sodium

は Shim-pack (XR-SIL, 3.0×75mm) を 40℃で保持, 移動相に酢酸:ヘキサン:酢酸エチル (1:4:5) を用いて 1.5 mL/min で流し, 検出器はフォトダイオードアレイで波長 495 nm の吸光度を測定した。AsA 量は AsA (特級) を用いて吸光面積から求めた。

色調測定は第 1 章 1.2. と同じ方法で行った。

1.2. アスコルビン酸誘導体の添加給餌による褐変抑制

水産試験場内の海面筏 (3 m×3 m) で飼育した

ブリ (2年魚) を用いた。供試魚は給餌試験開始 1 週間前に対照区と試験区に分養した。飼料は市販のブリ用 EP (日清丸紅飼料社製) を用い, アスコルビン酸誘導体としてアスコルビン酸リン酸エステルナトリウム (DSM ニュートリション社製 ステイ C-35) を使用した。試験区には EP 飼料に対し外割で 1 %のアスコルビン酸誘導体を添加し, グアーガム (1 %) と蒸留水 (5 %) で展着させた。対照区はグアーガム (1 %) と蒸留水 (6 %) とした。給餌は 2 日に 1 度の頻度で 5 回の飽食とし, 取上げ前の 2 日間は絶食させ, 前述 1.1.同様に取

Table 3.2 Data on cultured yellowtail used in the experiment

Sampling date	Place	Fork length (cm)	Body weight (kg)	Bait types*	n =	
Annual Survey						
2012	Nagasaki	23th Mar.	37.5±1.3	0.96±0.12	EP	4
		23th Apr.	38.4±2.4	1.02±0.19	EP	4
		25th May	43.1±1.4	1.30±0.13	EP	4
		23th Jun.	46.3±0.7	1.53±0.08	EP	4
		20th Jul.	47.5±1.4	1.55±0.18	EP	4
		24th Aug.	48.2±0.9	1.76±0.16	EP	4
		28th Sep.	47.8±3.9	1.73±0.23	EP	4
		19th Oct.	50.9±1.5	2.15±0.29	EP	4
		16th Nov.	52.2±2.2	2.22±0.39	EP	4
		14th Dec.	50.0±4.2	2.12±0.56	EP	4
2013	Nagasaki	18th Jan.	53.3±2.2	2.60±0.15	EP	4
		15th Feb.	51.8±2.4	2.35±0.39	EP	4

Values are mean ± standard deviation.

EP: Extruder pellet

上げ α Toc 量, AsA 量, 色調, メト化率および pH を測定した。

メト化率の測定試料は色調測定試料の後端の部位 (肛門付近) を切出し, スライサー (七島屋エンジニアリング社製 NF-252F) を用いて血合筋の厚みが 5 mm になるよう切り揃え, 蓋付き容器にステンレス製金網を敷き, 両面が空気に曝される状態で 10°C 保管した。ミオグロビンは第 1 章 1.6. の方法で抽出し, メト化率は第 1 章 1.9. の方法で測定した。

pH は卓上型 pH メーター (HORIBA 社製 F-54) を用いて, メト化率を測定した上清を測定した。なお, 各種測定は切出し 0, 24 および 48 時間後に行った。

1.3. アスコルビン酸誘導体の添加給餌による血合筋中のアスコルビン酸量および持続性

前述 1.2. 同様の飼料および飼育条件による AsA 量の蓄積性・持続性を確認するため, 血合筋

の AsA 量を調べた。試験は 3 生簀 (1 生簀が対照区, 2 生簀が添加区) 各 40 尾で開始した。2 日に 1 度の頻度で添加給餌を行い, 1, 2, 3, 6 回の給餌の翌日に各生簀から 4 尾または 8 尾取上げた。添加給餌後, 添加区は餌止め区と通常給餌戻し区とし, 餌止め区は添加給餌終了の 2, 5, 8 日後, 通常給餌戻し区は 8, 14, 22 日後に各 8 尾取上げた。取上げ後は直ちに血合筋を切り出し, AsA 量を測定した。

1.4. 魚肉 pH に及ぼす餌止めの影響

餌止め (無給餌) による死後硬直時の魚肉 pH への影響を調べるため, 2012 年 8 月 16 日の給餌を最後とし, 翌日 (体重 ± 標準偏差: 1.8 ± 0.2 kg), 8 日後 (1.5 ± 0.2 kg), 14 日後 (1.5 ± 0.2 kg) に各 4 尾取り上げ, 魚肉ブロックの pH を第 1 章 1.3. 同様に測定した。なお, 供試魚には水産試験場内の海面筏 (3 m × 3 m) で飼育したブリ (2 年魚) を用いた。

1.5. 血合筋の褐変に及ぼす α トコフェロール量、アスコルビン酸量、pHの季節変動

水産試験場内の海面筏（3 m×3 m）で市販EP（日清丸紅飼料社製）を給餌したブリ（4尾/月）を用いた。給餌は週に2-3回の頻度で飽食とし、取上げ前の2日間は絶食とした。飼育期間中の日間給餌率は0.5-1.5%であった。ブリは前述1.2. 同様に取上げ α Toc量、AsA量、色調、メト化率およびpHを測定した。なお、水深2mの海水温は午前9時に多項目水質計（Hydrolab社製Quanta）を用いて測定した。

1.6. 統計処理

統計処理は全てStatcel ver. 3を用いた。⁵⁸⁾ 2種類の比較にはStudentの*t*検定を行い、3種類以上の比較は、正規分布に従い、分散が均一とみなせる場合、一元配置分散分析を行い有意差が見られた場合は引き続きTukey-Kramer検定を行った。危険率5%で有意差を判定した。

切出し24時間後の a^* 値およびメト化率と α Toc量、AsA量およびpHとの関係はピアソンの相関係数により有意差を検定した。また、 α Toc量、AsA量およびpHを説明変数として切出し24時間後の a^* 値およびメト化率を変数増加法による重回帰分析により推定し、重相関係数を求めた。

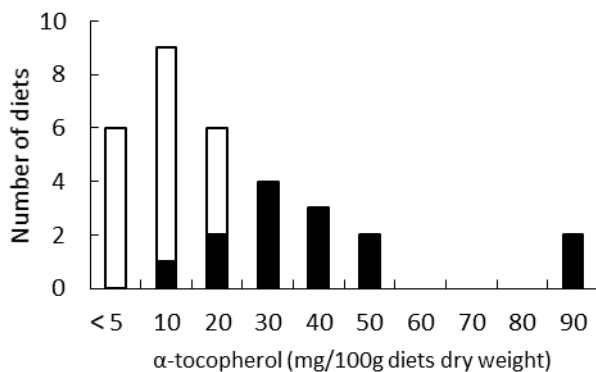


Fig. 8 Histogram of α -tocopherol levels of feed used by aquaculture farmers. Open columns show Moist pellet (MP). Closed columns show extruder pellet (EP).

2. 結果

2.1. 飼料と血合筋の α トコフェロール量との関係

長崎県内養殖業者が使用している餌飼料を α Toc量別に度数で示した（Fig. 8）。生餌を含むMPの α Toc量は1.8-15.2 mg/100g（平均±標準偏差：7.2±3.5 mg/100g）、EPは7.1-84.6 mg/100g（平均±標準偏差：34.8±23.4 mg/100g）であった。

餌飼料中の α Toc量とその飼料を給餌したブリ血合筋の α Toc量との関係をFig. 9に示した。EP給餌ブリでは、飼料中の α Toc量が多いほど、血合筋中の α Toc含量は多い傾向が見られたが、 α Toc量が最も多く含まれたEPを給餌されたブリの血合筋では最小14.2 mg/100g、最大39.8 mg/100gと個体差が大きかった。また、 α Toc量が4.9 mg/100gのMPを給餌したブリの血合筋中には α Tocが13.8 mg/100g含まれていたのに対し、 α Toc量が7.1 mg/100gのEPを給餌したブリの血合筋には5.0 mg/100gしか含まれず、MP給餌ブリ血合筋の α Toc量はEP給餌ブリと比べて高かった。

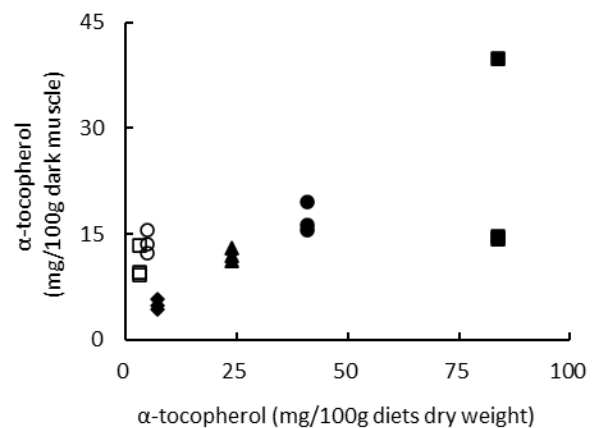


Fig. 9 Relationships between α -tocopherol levels in diets and α -tocopherol levels in dark muscle. Open symbols show moist pellet (MP). Closed symbols show extruder pellet (EP). Different symbols indicate differences in aquaculture farmers.

2.2. 血合筋の α トコフェロール量と褐変との関係

血合筋に含まれる α Toc 量と 10°C で 24 時間空気に曝した後の a^* 値および AsA 量との関係を Fig. 10 に示した。今回の測定では a^* 値の変化が目視による感覚と一致した。すなわち、血合筋中心部の a^* 値が 20 以下となると鮮やかさがなくなり普通筋と接する部分では変色し始め、18 以下では中心部も赤みは失われ褐変の進行が確認された。そのため、変色の指標には a^* 値を用いた。EP 給餌ブリ血合筋は α Toc 量が多いほど、切出し直後の a^* 値 (平均 \pm 標準偏差: 23.1 ± 1.3) を維持し、 α Toc 量が少

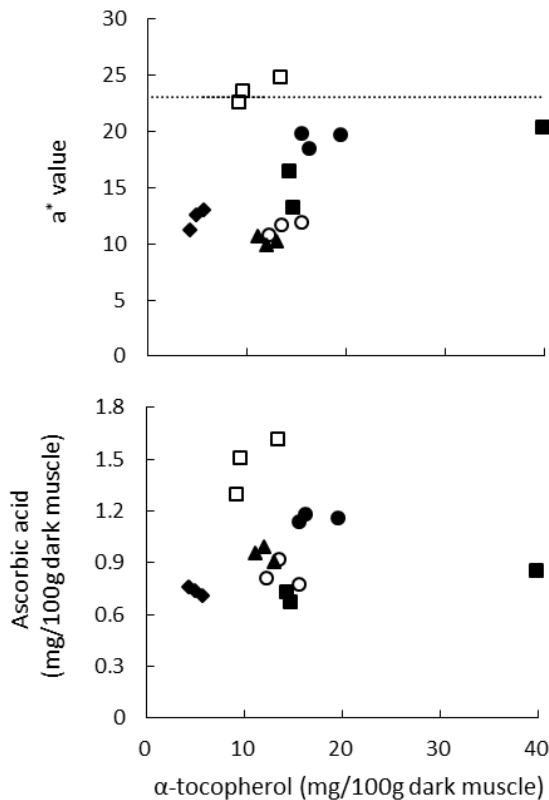


Fig. 10 Relationships between α -tocopherol levels in dark muscle and a^* value (redness), ascorbic acid levels in dark muscle. The a^* value was measured after air exposure for 24 hours at 10 ° C. Open symbols show moist pellet (MP). Closed symbols show extruder pellet (EP). Different symbols indicate differences in aquaculture farmers. The dotted line represents the average of a a^* value at 0 hour.

ない血合筋では 24 時間後の a^* 値は低下した。

一方、MP 給餌ブリは EP 給餌ブリと同じ傾向を示す個体群と異なる傾向を示す個体群が見られた。そのため、血合筋の AsA 量を測定したところ、 α Toc 量が低いにも関わらず a^* 値が高い値を維持した 3 個体の血合筋の AsA 量は 1.3-1.6 mg/100g あり、他は 0.7-1.2 mg/100g であった。メト化率は a^* 値が高いほど低い傾向であった。なお、切出し 24 時間後の血合筋 pH (平均 \pm 標準偏差) は 6.23 ± 0.08 であった。

2.3. アスコルビン酸誘導体の添加給餌による褐変抑制

AsA 量がブリ血合筋の褐変に影響することが示唆されたため、アスコルビン酸誘導体を添加した飼料を給餌する試験を行った。血合筋の AsA 量は対照区が 1.1 ± 0.1 mg/100g、試験区は 2.0 ± 0.1 mg/100g と有意に高くなった ($p < 0.05$)。 α Toc 量は対照区が 3.3 ± 0.4 mg/100g、試験区は 4.3 ± 0.8

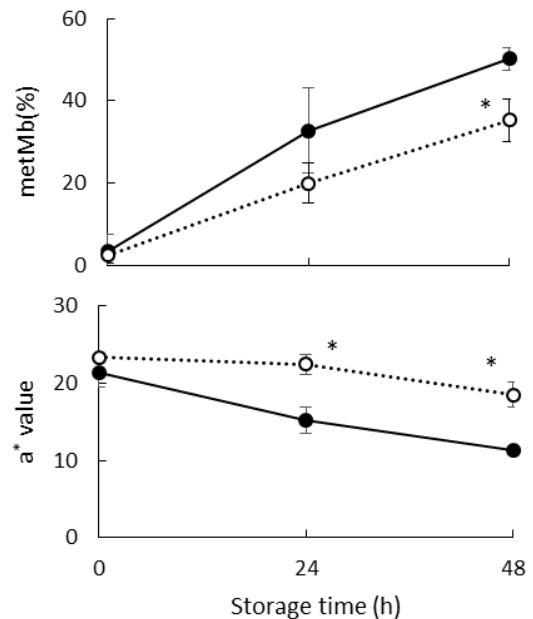


Fig. 11 Changes in the ratio of metmyoglobin to total myoglobin (metMb) and a^* value (redness) of sliced dark muscle of yellowtail during storage at 10°C. Close symbol show control. Open symbol show experimental diets. Asterisks show significant difference from the control ($p < 0.05$).

Table 4 Changes in the amount of ascorbic acid in dark muscle of yellowtail by addition of ascorbic acid precursor substance and starved

Sampling date	Times *	Days **	Ascorbic acid (mg/100g)		
			Control	Addition and starved	Addition and fed
			Mean±S.D. (n)	Mean±S.D. (n)	Mean±S.D. (n)
2014					
20th Jan.	1		1.22±0.09 (8)	1.35±0.14 (4)	1.28±0.07 (4)
22th Jan.	2			1.39±0.14 (4)	1.50±0.12 (4)
24th Jan.	3		1.29±0.11 ^a (8)	1.56±0.09 ^b (4)	1.63±0.19 ^b (4)
30th Jan.	6	1	1.31±0.12 ^a (8)	1.86±0.17 ^b (4)	1.64±0.09 ^b (4)
31th Jan.		2		1.75±0.26 (8)	
3rd Feb.		5		1.58±0.24 (8)	
7th Feb.		8	1.28±0.29 (8)	1.58±0.17 (8)	1.41±0.16 (8)
13th Feb.		14			0.92±0.23 (8)
21th Feb.		22	1.14±0.29 (8)		0.93±0.23 (8)

* Times: The number of feeds of experimental diets

** Days: The number of days after fast

Values not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).

mg/100g と高い傾向であったが有意な差ではなかった。また、切出し 24 時間後の血合筋 pH は対照区 6.15 ± 0.13 、試験区 6.20 ± 0.04 であった。

血合筋の色調およびメト化率の経時変化を Fig. 11 に示した。 a^* 値は 24, 48 時間に有意差が見られ、メト化率では 48 時間で有意な差が見られた ($p < 0.05$)。

2.4. アスコルビン酸誘導体の添加給餌による血合筋中のアスコルビン酸量および持続性

アスコルビン酸誘導体を添加した飼料給餌による血合筋の AsA 量の変化を Table 4 に示した。AsA 量は 3 回目、6 回目の給餌後、対照区と比べ有意に高い値を示した。しかしながら、アスコルビン酸誘導体の添加をやめた通常給餌戻し区および餌止め区では添加給餌終了の 8 日後には対照区より高い値を示したものの有意な差ではなかった。

2.5. 魚肉 pH に及ぼす餌止めの影響

氷蔵 24 時間後の魚肉ブロック（普通筋、血合筋、境界面）の pH を餌止め期間の別に Fig. 12 に示した。給餌翌日取上げでは血合筋 6.49 ± 0.02 に対し境界面 6.35 ± 0.05 、8 日後取上げでは 6.49 ± 0.09 に対し 6.33 ± 0.04 、14 日後取上げでは 6.68 ± 0.09 に対し 6.46 ± 0.14 となった。餌止め期間に関わらず境界面の pH は血合筋より有意に低かった。普通筋の pH は給餌翌日取上げより 8 日後取上げで高い値を示し、血合筋と境界面では給餌翌日と 8 日後では変化がなかったが 14 日後には高い値を示した。

2.6. 血合筋の褐変に及ぼす α トコフェロール量、アスコルビン酸量、pH の季節変動の影響

海水温と月毎の切出し 24 時間後の a^* 値およびメト化率、 α Toc 量、AsA 量、pH を Fig. 13 に示し

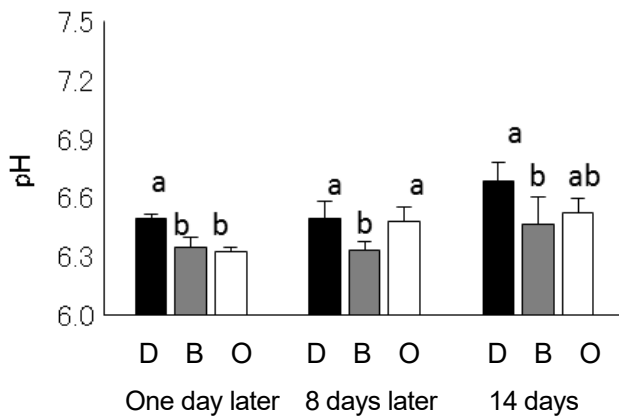


Fig. 12 Differences in three types of muscle pH affected by starvation period. Black columns (D): dark muscle, gray columns (B): boundary part between dark muscle and ordinary muscle, white columns (O): ordinary muscle. Data are presented as mean \pm standard deviation. Values not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).

た。3月の a^* 値は 9.4 ± 0.6 であったが、月を追う毎に高くなり6月から11月の間の a^* 値は中心部では変色を感じられない20以上となった。8月から10月のメト化率は20%以下となり、3月と12月から2月までの間は40%以上となった。 a^* 値が低く、メト化率が高かった3月、12月、1月および2月の取上げ日の海水温はそれぞれ 14.3°C 、 15.5°C 、 13.2°C および 12.9°C であり、それ以外の月は 17°C 以上であった。

AsA量は3月から5月にかけて上昇し、7月を除き4月から11月までは $1.5 \text{ mg}/100\text{g}$ 以上となったが、水温が低い3月および12月から2月までは $1.5 \text{ mg}/100\text{g}$ 未満と低い傾向を示した。 αToc 量は3月、4月はそれぞれ 16.6 、 $17.4 \text{ mg}/100\text{g}$ と高く、その後6月までは減少、8月から11月は 13.7 - $15.5 \text{ mg}/100\text{g}$ で推移し、12月から2月は $14.0 \text{ mg}/100\text{g}$ 以下となった。pHは3月から5月にかけて低く、5月が最も低い 5.98 ± 0.09 となった。その後上昇し、9月が最も高い 6.39 ± 0.05 となり、それ以降は再び低下した。

2.7. α トコフェロール量, アスコルビン酸量, pHと褐変との関係

切出し24時間後の a^* 値またはメト化率とpH、 αToc 量、AsA量との関係をFig. 14に示した。メト化率とpHとの相関係数は -0.544 、AsA量とは -0.661 でそれぞれ有意な相関($p < 0.001$, $n=72$)が認められたが、 αToc 量との相関は認められなかった。 a^* 値との相関係数もpHは 0.588 、AsA量は 0.594 と有意な相関($p < 0.001$, $n=72$)が認められたが、 αToc 量との相関は認められなかった。これらの3因子をもとに変数選択-重回帰分析した結果をFig. 15に示した。メト化率および a^* 値どちらも説明変数に選択されたのは、pHとAsA量であり、 αToc 量は選択されず、メト化率の実測値と推定値の重相関係数は 0.788 ($p < 0.05$, $n=48$)、 a^* 値では 0.768 ($p < 0.05$, $n=48$)となった。

3. 考察

第2章では、ブリ血合筋の褐変に関する基礎的知見を得ることを目的に異なる餌飼料で養殖されたブリ血合筋の褐変状況、月毎の褐変状況とpHや抗酸化物質(αToc とAsA)量との関係を検討した。

養殖業者毎にブリ血合筋の褐変速度が異なるのならば、主な要因は飼料の成分の違いと考えた。第1章よりリン脂質の酸化が褐変の進行を促進すると考えたため、細胞膜の脂質酸化を抑制する抗酸化物質である αToc に着目し、餌飼料中の αToc 量を調べた。EPの αToc 量は 7.1 - $84.6 \text{ mg}/100\text{g}$ であり、これまでの報告⁷⁴⁾と同様の結果であったが、MP中の αToc 量は 1.8 - $15.2 \text{ mg}/100\text{g}$ でEPと比較して少なかった(Fig. 8)。 αToc 量が異なる飼料を給餌したブリ血合筋の Toc 量を調べた結果、EPと血合筋の αToc 量に正の相関傾向が見られたが、 αToc 量が最も多いEPを給餌したブリの血合筋では個体により蓄積量に差があった(Fig. 9)。 αToc を経口投与すると投与量の増加に伴い吸収率が低下することが知られているが、⁷⁵⁾ αToc の代謝機構についてはまだ不明なところも多いため、

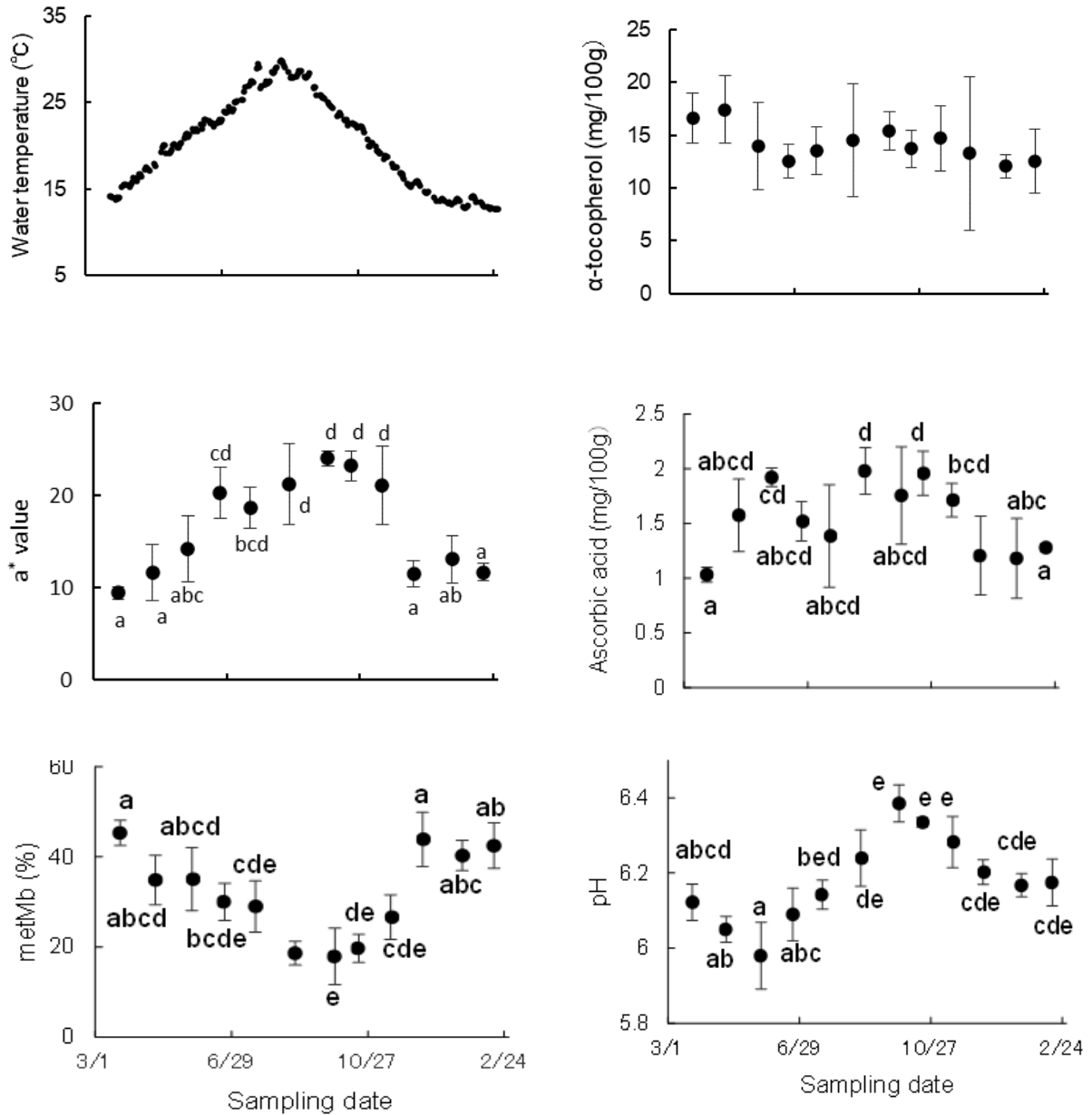


Fig. 13 Changes in seawater temperature, a^* value (redness), the ratio of metmyoglobin to total myoglobin (metMb), ascorbic acid levels, α -tocopherol levels and pH in dark muscle of yellowtail. The seawater temperature was measured at 9 am. The a^* value and metMb was measured 24 hours after air exposure store at 10°C.

高 α Toc 含有飼料で蓄積量に差が見られた要因については今後検討が必要と考える。また、餌飼料中の α Toc 量が同程度の場合、MP 給餌ブリが EP 給餌ブリより血合筋中の α Toc 量が高かった。飼料添加物にはビタミンE粉末と酢酸dl- α -トコフェロールが認められており、⁷⁶⁾ 飼料には合成ビタミンEとその誘導体（酢酸エステル）が主に使われている。⁷⁷⁾ 誘導体は消化管内で加水分解され、d-

およびl- α Toc となりどちらも小腸から吸収されるが、d- α Toc のみが肝臓で超低密度リポタンパク質に組み込まれ、各組織に供給される。⁶⁴⁾ α Toc の吸収率は摂取量や同時に摂取する脂質量などの摂取条件により影響を受けることが知られており、⁷⁸⁾ 飼料添加物の違いや摂取条件が EP 給餌と MP 給餌ブリの血合筋の α Toc 量に関係したと推察した。

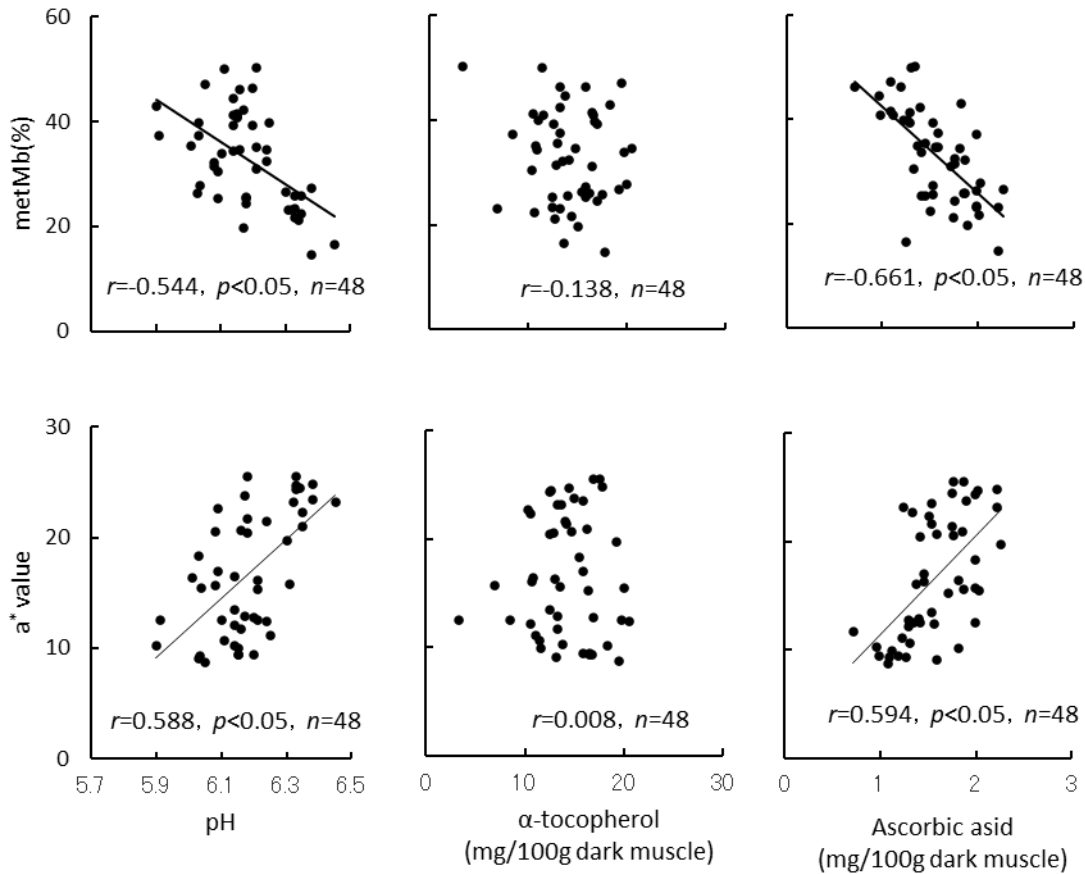


Fig. 14 Relationships between pH, α -tocopherol levels, ascorbic acid levels and the ratio of metmyoglobin to total myoglobin (metMb) or a^* value (redness). The measurement of metMb and a^* value is 24 hours after air exposure store at 10°C. r : correlation coefficient.

血合筋の α Toc 量と褐変との関係では、EP 給餌ブリの α Toc 量が 13.0 mg/100g 以下では 24 時間後の a^* 値は低く、14.7 mg/100g 以上では測定開始時の色調を維持している傾向が見られた (Fig. 10)。しかしながら、MP 給餌ブリでは α Toc 量が少ないにもかかわらず褐変が進行しないブリが存在し、このブリの血合筋には AsA 量が高かったことから、 α Toc 量が低い場合、AsA が褐変抑制に効果を発揮すると推察した。

そこで、アスコルビン酸誘導体を添加した飼料を給餌する試験を行った。アスコルビン酸誘導体単独使用でもビタミン E とビタミン C を併用した Arai *et al.* の報告¹⁶⁾ と同様の傾向が認められた (Fig. 11)。AsA は酸化しやすいため長期保管には向かず、EP にはアスコルビン酸誘導体が添加されている。^{79,80)} このため、血合筋褐変抑制のための

仕上げ飼料には高濃度のアスコルビン酸誘導体が効果を発揮すると考えた。なお、飼料に対し 1% 添加した場合、3 回の給餌で血合筋の AsA 量は対照区と有意な差が確認されたが、その効果は持続性がないことも明らかとなった (Table 4)。一方で餌止めには死後硬直中の魚肉 pH 低下を抑制する可能性が示唆された (Fig. 12)。

流通業界ではブリ血合筋の褐変は産卵後と夏期が問題とされている。そこで、褐変の進行速度が季節により異なる要因を解明するために、毎月の AsA 量、 α Toc 量および pH を測定した。 α Toc 量は 5、6 月に低くなった。長崎近海のブリの産卵期は 4 月下旬から 5 月中旬であり、⁴⁾ 本研究では 5 月から卵巣の発達を確認した。このため、産卵期と関係して α Toc 量が減少したと考えた。また、冬期に低くなる傾向が見られたが、個体差があり頭

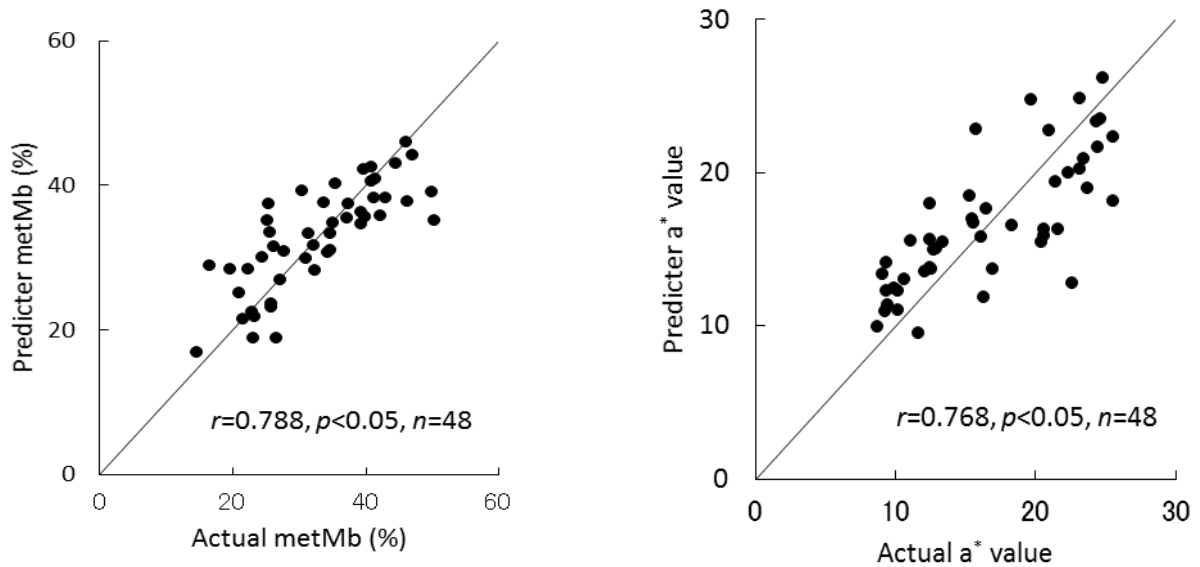


Fig. 15 Relationships between actual values of the ratio of actual metmyoglobin to total myoglobin (metMb) or a* value (redness) and predicted metMb or a* value. *r*: Multiple correlation coefficient.

著な変動ではなかった。AsA量は3月、6月、7月および12月から2月が低くなった。水溶性ビタミンであるAsAは蓄積性が少なく日々の摂餌量が影響するため、水温が低い時期は摂餌量が減りAsA量は低くなったと考えた。pHは5月が最も低く、9月が最も高くなった。この変動は産卵と海水温に影響するものと考えられた。産卵後のマサバでは死後硬直中のpHが5.0以下になることが報告され、原因は過食によるものと推察されている。⁸¹⁾本研究では5月の日間給餌率は前月の2倍に増加しており、摂餌量の増加が関係しているかもしれない。また、ブリの肝臓では低水温時に解糖系酵素活性が低下するため、^{82,83)}水温変動により血合筋の解糖系酵素活性が変動した可能性もある。死後硬直に至るまでのpHは様々な要因により決定されることからpH低下の主要因については今後の検討課題と考える。以上の結果から、生体内の抗酸化力が弱まる時期およびpHが低下する時期に褐変の進行が早いと考えた。そして、実際に産卵期(4, 5月)と冬期(12~3月)はa*値が低く、メト化率が高く、この考えを裏付ける結果であった。

前述した様に流通業界ではブリ血合筋の褐変は産卵後と夏期が問題となっている。産卵期および

産卵後はAsA、 α Tocの減少およびpH低下が見られるため、流通業界の評価と概ね一致する結果となったが、8月の褐変はむしろ抑えられていた。夏期における褐変の進行要因は魚体にあるのではなく、取上げや冷やし込みなどの保管方法にあると考える。血合筋の褐変はミオグロビンのメト化が主要因と言われているが、メト化は温度の影響を大きく受ける。¹¹⁾このため保管温度が高い場合、メト化が促進され褐変が進行する。本章では年間通して同じ条件で取上げ、十分な冷却と保管温度の管理を徹底し、取上げ後の温度による影響を排除している。取上げ方法により魚肉pHが異なることは知られているが、⁸⁴⁾即殺かつ十分な冷却が行われた場合、死後硬直中のブリ血合筋のpHは5月が最も低く、9月が最も高くなる季節変動をすることが明らかとなった。そして、この変動も褐変に影響を与えると推察した。

そこで、褐変に影響を与える因子(α Toc, AsA, pH)と褐変(a*値, メト化率)との関係をそれぞれ調べた。切出し24時間後のa*値とメト化率はpHとAsA量の間に関連が認められたが、 α Toc量とは関連が認められなかった。畜肉では、Tocによる褐変抑制効果が報告されているが、^{85,86)}本研究では、 α Tocによる褐変抑制の効果は他の2要因

と比較して大きなものではなく、これら3つの因子を用いた変数増加法による重回帰分析では、褐変に最も影響を与える因子はAsA量となり、次はpHで、 α Toc量は因子とならなかった。切出し24時間後のメト化率および a^* 値の実測値と推定値の重相関係数はメト化率では0.788、 a^* 値は0.768となった。すなわち、魚体が持つAsA量とpHにより褐変の進行速度が概ね決定することになる。AsAや α Toc以外にも抗酸化作用を持つ物質が存在するため、今後、ミオグロビンのメト化を抑制する抗酸化物質の更なる検討が必要と考える。現在、飼料による肉質改善が盛んに行われているが、流通関係者の評価が夏期に悪いという結果からはpH低下を抑制する取組の必要性が考えられる。さらに、今回の結果はpH低下抑制のための取扱（締め方や温度管理）が伴わないと肉質改善の努力が無駄になることも示している。

第3章 インピーダンス法を用いたブリの脂肪量の非破壊測定

近年、日本の漁獲量は減少しており、漁業関係者は収益を上げるために鮮度保持^{87,88)}やトレーサビリティのシステムにより品質情報を消費者に提供する⁸⁹⁾など、付加価値を向上させるための様々な取り組みを進めている。果物では品質の指標として糖度を取り入れ、消費者は糖度を確認して商品を購入でき、差別化が図られている。魚の品質では脂の乗り、鮮度、美味しさ、歯ごたえなど多くの要素が考えられるが、^{29,87,90)}これらを測定するには専門的な知識と分析機器が必要であり、脂肪量、K値、旨味分量、破断応力などの客観的な数値は流通現場では測定できない。消費者は生鮮食料品の購入にあたって最も重視するポイントは「鮮度」であり、次に「産地」や「味」、精肉を除く野菜、果物、鮮魚では「季節(旬)」が挙げられ、生鮮食料品の購入時に役立った経験では、「産地・生産者名が記載されている」ことに次いで、「味のよさが数値で記されている」ことが挙げられている。⁹¹⁾ブリでは天然物は旬を除くと脂肪量が少ないため、最近では脂肪量の多い養殖物を好む傾向が報告されている。²⁷⁾このため、漁業関係者からは鮮魚のブランド化を図るため、鮮度を保持する技術や現場で簡便にかつ非破壊で脂肪量などの品質を測定できる装置の開発が求められている。

非破壊での脂肪量測定に関しては、アカムツ、カツオ、ビンナガ、マアジについて近赤外分光法を用いた報告がある。^{29,92-94)}また、旧イギリス農水産食糧省トリー研究所がマイクロ波を測定原理としたディステルフィッシュファットメーターを開発し、日本でも販売しているが、小規模な漁業関係者が使用するには価格が高く、あまり普及していないようである。

そこで、比較的安価で購入でき、現場で簡便にかつ非破壊で魚類の脂肪量を測定できる装置開発を最終目標とし、ヒト用体脂肪計で用いられている生体電気インピーダンス法の応用の可能性を検

討した。生体に微弱な交流電流を流すと、電流は水分が少ない脂肪組織にはほとんど流れず、水分が多い除脂肪組織を主に通過する。^{95,96)}電流は脂肪組織が多いと流れ難く、この電気抵抗値(インピーダンス)を元に脂肪量が推定される。さらにヒト用体脂肪計は身長、体重、年齢、性別などから人の体積を算出し、インピーダンスに体積を加味して脂肪量を求めている。⁹⁵⁻⁹⁷⁾一方、魚類ではインピーダンスは鮮度計として利用が検討されてきた⁹⁸⁻¹⁰¹⁾周波数の異なる交流電流を用いて生細胞のインピーダンスを測定すると、高周波と比較して低周波のインピーダンスは高い値を示す。細胞はその内外を隔てる細胞膜で覆われており、細胞膜はリン脂質の二重膜で構成されているため電氣的には絶縁体であるが、水やイオン、その他の物質が通過するチャンネル(protein channel)が貫いている。そのため、時間当たりの周期数を短くする(周波数を上げていく)と、このチャンネルが電気経路となり細胞内を通過する。このことから、細胞膜は電氣的にはコンデンサとして働くと考えられており、時間当たりの周期が長い低周波数では細胞膜に蓄積された電荷は消失され、細胞内には電気が流れず、細胞外の通電性のみが反映されるが、逆に時間当たりの周期が短い高周波数では細胞膜に蓄積された電荷がチャンネルを通じ細胞内部に放出されるため、細胞内の通電性も反映される。⁹⁵⁾低周波のインピーダンスは死後の時間経過に伴い徐々に小さくなることが報告されており、この低周波インピーダンスの変動が鮮度の指標になるとされている。⁹⁸⁻¹⁰¹⁾また、凍結によって生体膜が損傷を受けると細胞の誘電特性が著しく変化するため、冷凍履歴の判定についても報告がある。^{32,33)}

第3章では、このようなインピーダンスの特性を考慮し、ブリの脂肪量測定の可能性を検討することを目的として「鮮度」および「温度」がインピーダンスに及ぼす影響を明らかにした。

1. 材料と方法

1.1. 供試魚および実験方法

長崎県五島灘および橋湾で養殖されたブリを用いた (Table 5)。ブリは即殺 (延髄刺殺)・脱血後、魚体中心部が十分に冷えるまで海水氷中で 4 時間冷却した後、氷蔵で保管し、以下の実験に供した。

実験 1 (Test 1) : 2013 年 5 月に水揚げされた 6 尾を用いて、水揚げ後の経過時間と魚体温 (0, 10, 20°C) がインピーダンスに及ぼす影響を確認した。魚体温を変化させる実験は、水揚げ後の経過時間がインピーダンスに及ぼす影響を確認した後 (144 時間以降) に行った。魚体温の調整には恒温水槽を用いた。すなわち、氷蔵していた魚体を 10°C に調整した水槽に入れ魚体温を変化させ、さらに、水温を 20°C に昇温し、その後、再び 10°C に冷却し、最後は発泡スチロール箱の中で氷蔵状態に戻し、それぞれ目的の温度に達したときのインピーダンスを測定した。なお、魚体中心温度はインピーダンスの測定に影響を及ぼさないように右側尾柄部に切れ目を入れ、魚体中心部に向け温度センサを挿し込みデータロガー (テイアンドデイ製 TR-71Ui) により確認した。また、所定温度に達するまでの時間を記録した。

実験 2 (Test 2) : 2012 年 5 月から 7 月に水揚げされた 21 尾を用いて、インピーダンスと脂肪量との関係を経時的に (4, 24, 48, 72 時間) 調べ、インピーダンスから重回帰分析により脂肪量推定のための検量式を作成した。

実験 3 (Test 3) : 2011 年 12 月から 2012 年 11 月に水揚げされた 18 - 43 尾について、実験 2 で求めた検量式から経過時間別に本検量線が他検体を推定するのに適しているか調べるために脂肪量を求めた。

1.2. インピーダンス測定器

インピーダンスの測定は大和製衡株式会社が試作したインピーダンス測定器 (以下測定器と称す) を用いた (Fig. 16)。一般的に電極の間隔および検体と接触する面積が小さい程、分極 (電極電位が静止電位からずれる現象) が発生し、インピーダ

ンスに影響する。^{96,98)}このため、測定器はインピーダンスが電極構造に左右されないよう電流極と電圧極をそれぞれ独立させた左右四極電極法^{96,98)}を用い、外側の電流極から 500 μ A 以下の交流電流 (定電流) を流し、内側の電圧極で電圧を検出し、インピーダンスを測定した。電圧検出回路は演算部 (CPU) より矩形波信号が出力され、正弦波生成回路にて矩形波信号を正弦波信号に変換し、それぞれの測定周波数を生成する。同時に、CPU より電流値信号が出力され、定電流回路にてそれぞれの測定周波数で一定の交流電流を印加し、電圧を検出する構成とした。電流印加の時に表皮 (鱗) の影響で通電性が悪化し、検出された電圧が所定の範囲を超えてしまう飽和状態に陥った場合は、サチュレーション検出回路がこれを検知し、CPU が段階的に電流値を低減させる信号を出力した。検出した電圧は増幅回路にて増幅させ、整流回路及び平滑回路により直流化し、AD 変換回路にてデジタル信号に変換、CPU にてインピーダンスを演算した。測定周波数は 5, 20, 50, 100 kHz とし、本測定器は一台でこれらの周波数におけるインピーダンスが測定できる多周波数測定方式を採用した。³¹⁾高周波回路はノイズ対策を含む工学技術や安全性の配慮から生産コストが高くなることなどがあり、周波数の上限は 100 kHz とした。その他の周波数には、ヒト用体脂肪計でよく用いられている周波数として 50 kHz、⁹⁶⁾細胞外を見る低周波数に 5 kHz、中間周波数として 20 kHz を用いた。

電極はステンレス (SUS 304) 製を用いた。魚体との接触面は直径 3 mm 以上あれば分極の影響を受けないことを確認したため、接触面の直径は 7 mm とし、丸みを設けて多面で当たる形状とした。電極の間隔は電圧極と電流極の間が 1 cm、電圧極同士の間は 3 cm とした。

1.3. インピーダンスの測定方法

ブリは測定の時以外、体表面の乾燥を防ぐためにパーチを掛け、発泡スチロール箱の中で氷蔵保管した。インピーダンスの測定は試験目的に合わ

Table 5 The analytical data of sample sets of yellowtail

Test	n^{*1}	Fork length	Weight
		(cm) (mean±S.D. ^{*2})	(kg) (mean±S.D. ^{*2})
Test 1	6	51.5±1.7	2.5±0.3
Test 2	21	58.2±6.8	3.3±1.0
Test 3 (4h)	18	52.6±3.3	2.2±0.4
Test 3 (24h)	18	70.8±3.1	5.6±0.8
Test 3 (48h)	43	66.7±6.7	3.9±0.2
Test 3 (72h)	28	64.8±8.8	4.4±0.2

*1 n : The number of samples used.

*2 S.D.: Standard deviation

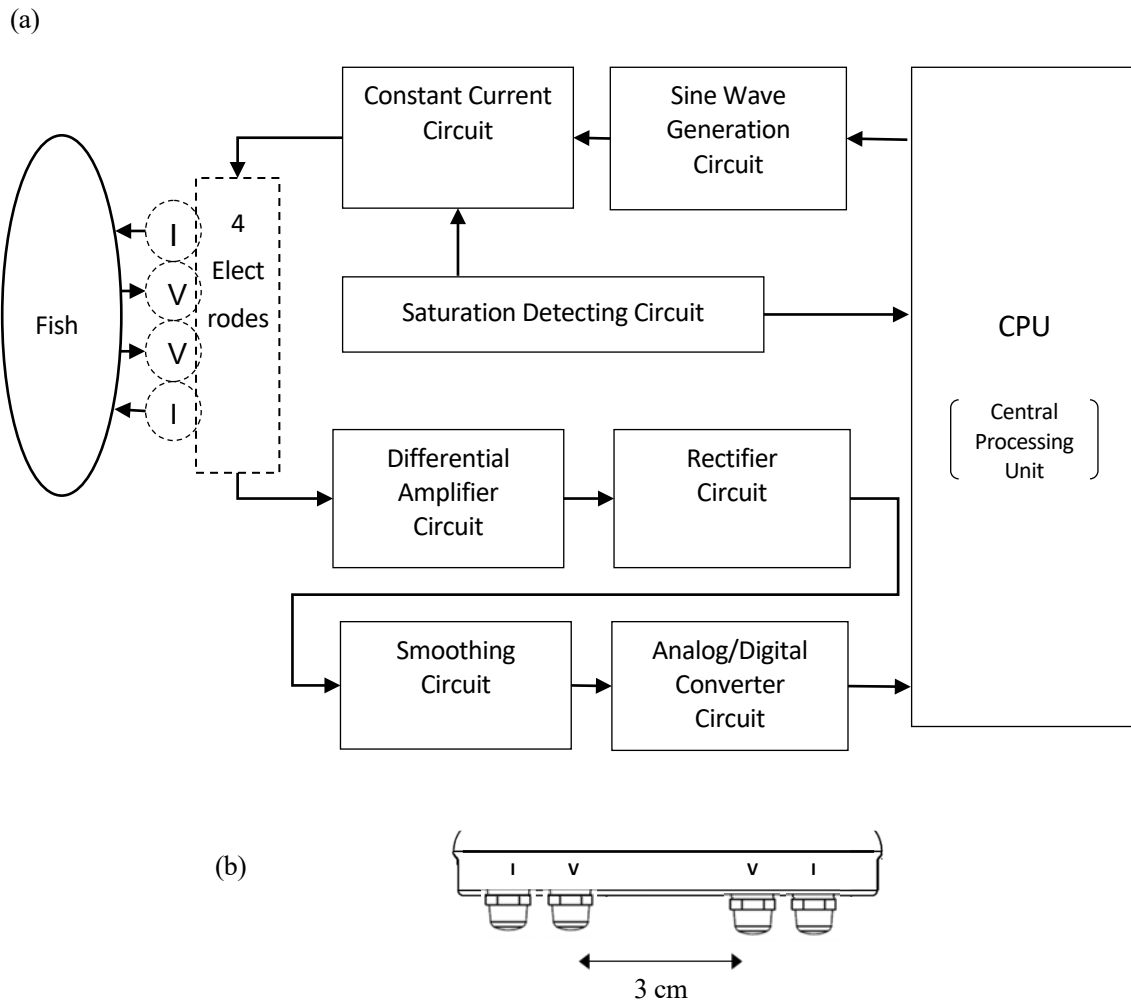


Fig. 16 Block diagram of impedance analyzer (a). 3 cm width electrodes (b); (I) current electrode; (V) voltage electrode.

Table 6 Effect of temperature has on impedance

Fish body temperature (°C)	Impedance (Ω) (mean \pm S.D.*)			
	5 kHz	20 kHz	50 kHz	100 kHz
0	217 \pm 30	164 \pm 19	118 \pm 13	88 \pm 10
10 (heating)	186 \pm 24	130 \pm 16	96 \pm 11	72 \pm 8
20 (heating)	156 \pm 19	105 \pm 13	79 \pm 8	60 \pm 6
10 (cooling)	184 \pm 26	134 \pm 16	96 \pm 10	68 \pm 8
0 (cooling)	211 \pm 26	160 \pm 18	118 \pm 13	89 \pm 10

* S.D.: Standard deviation

せた時間帯ごとに、5°Cに設定した低温実験室で行った。インピーダンスを測定した部位は魚体左側の背側中心部、すなわち魚体中央で最も太い部分である第一背鰭と第二背鰭の下とし、5回測定したインピーダンスから最大値最小値を除いて平均値を算出した (Fig. 17)。インピーダンスの測定は魚体に電極痕が残らないように軽く押し当てた。接触が不十分の場合は電流が流れず、接触不良を示すエラーが表示され測定が開始されない。また、インピーダンスの測定に併せて、胸鰭基部に芯時計 (佐藤計量器製作所製 SK-250WP) を挿し込み、魚体温を測定した。

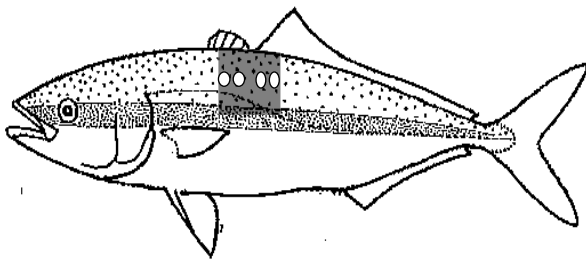


Fig. 17 The sampling positions for measuring the fat content and impedance. Open circles: Impedance measuring point; gray: The fat content measuring point.

1.4. 脂肪量の測定

ブリの脂肪量はインピーダンスを測定した部位

(背側ロインの魚体中央部, Fig. 17) 100 g 程度を切り出し、皮を剥いだ魚肉をフードカッターで破碎後、無水硫酸ナトリウムにより脱水、ジエチルエーテルを溶媒とするソックスレー法で抽出し、重量法で測定した。

1.5. 多周波インピーダンスから脂肪量の測定

4種類の周波数で測定したインピーダンスまたはインピーダンスに体格 (体重, 尾叉長) を加えたデータと脂肪量の化学分析値をもとにして、統計ソフト (日本アイ・ビー・エム製, IBM SPSS Statistics 19) によりステップワイズ法を用いた重回帰分析により検量式を作成し、脂肪量を算出した。¹⁰²⁾

2. 結果

2.1. 水揚げ後の経過時間によるインピーダンスへの影響 (実験 1)

ブリの水揚げからの経過時間における4種類の周波数で測定したインピーダンス変化を Fig. 18 に示した。各周波数のインピーダンスは水揚げから24時間後に最も高い値を示し、24から72時間後までの2日間では100 kHzで49 Ω , 50 kHzで55 Ω , 20 kHzで83 Ω , 5 kHzで144 Ω 低下した。高周波と比較し、低周波のインピーダンスは大きく変化した。また、72から168時間までのインピ

ーダンスは 100 kHz ではほぼ一定であったが、他の周波数では 50 kHz で 19 Ω, 20 kHz で 45 Ω, 5 kHz で 104 Ω 低下した。この時の低下速度は 50 kHz で 0.20 Ω/h, 20 kHz で 0.47 Ω/h, 5 kHz で 1.08 Ω/h とほぼ一定であった。

2.2. 魚体温がインピーダンスに及ぼす影響 (実験 1)

1 時間あたりのインピーダンスの変動が一定である 144 時間後から魚体温を変化させインピーダンスを測定した結果を Table 6 に示した。100 kHz 以外の周波数のインピーダンスは時間の経過とともに徐々に低下するため、72 時間以降のインピーダンスの低下速度、すなわち、50 kHz は 0.20, 20 kHz は 0.47, 5 kHz は 1.08 を実験に要した時間に乗じ、測定したインピーダンスに加え補正した。すべての周波数で魚体温を上げるとインピーダンスは低下し、再び魚体温を下げると、元と同じインピーダンスを示すことが確認された。ブリでは魚体温が 1 °C 上昇するごとにインピーダンスは、100 kHz で 1.45 Ω, 50 kHz で 1.98 Ω, 20 kHz で 2.76 Ω, 5 kHz で 3.85 Ω 低下した。

2.3. インピーダンス法を用いたブリの脂肪量測定 (実験 2 および 3)

実験 1 により、魚体温の変動はインピーダンスに影響を及ぼしたことから、インピーダンスにより脂肪量を測定する際の魚体温を一定とするために氷蔵下とした。しかしながら、正確には温度の幅が 0.3 - 3.9 °C (平均 2.0 ± 1.1 °C) あったことから、インピーダンス測定時の魚体温に 100 kHz は 1.45, 50 kHz は 1.98, 20 kHz は 2.76, 5 kHz は 3.85 を乗じた値を測定したインピーダンスに加え、魚体温の影響を補正した。また、水揚げからの経過時間はインピーダンスに影響するため、水揚げから 4, 24, 48, 72 時間後と定めて測定した。4 種類の周波数のインピーダンスと脂肪量との相関を Fig. 19 に示した。すべての時間帯で、相関係数 (r) が最も高かった周波数は 100 kHz であり、逆に相

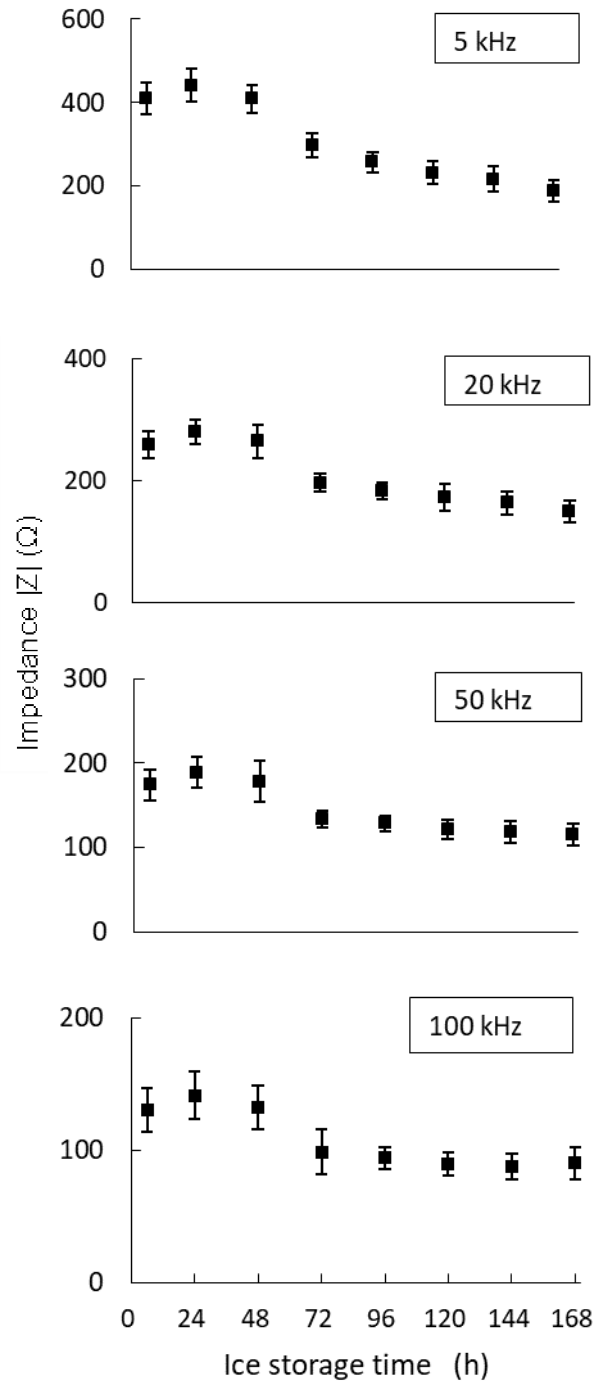


Fig. 18 Variation with ice storage time of impedance of yellowtail measured by the 3 cm width electrodes. Vertical bars present the standard deviation of the mean ($n=6$). (5 kHz) Impedance with 5 kHz; (20 kHz) Impedance with 20 kHz; (50 kHz) Impedance with 50 kHz; (100 kHz) Impedance with 100 kHz.

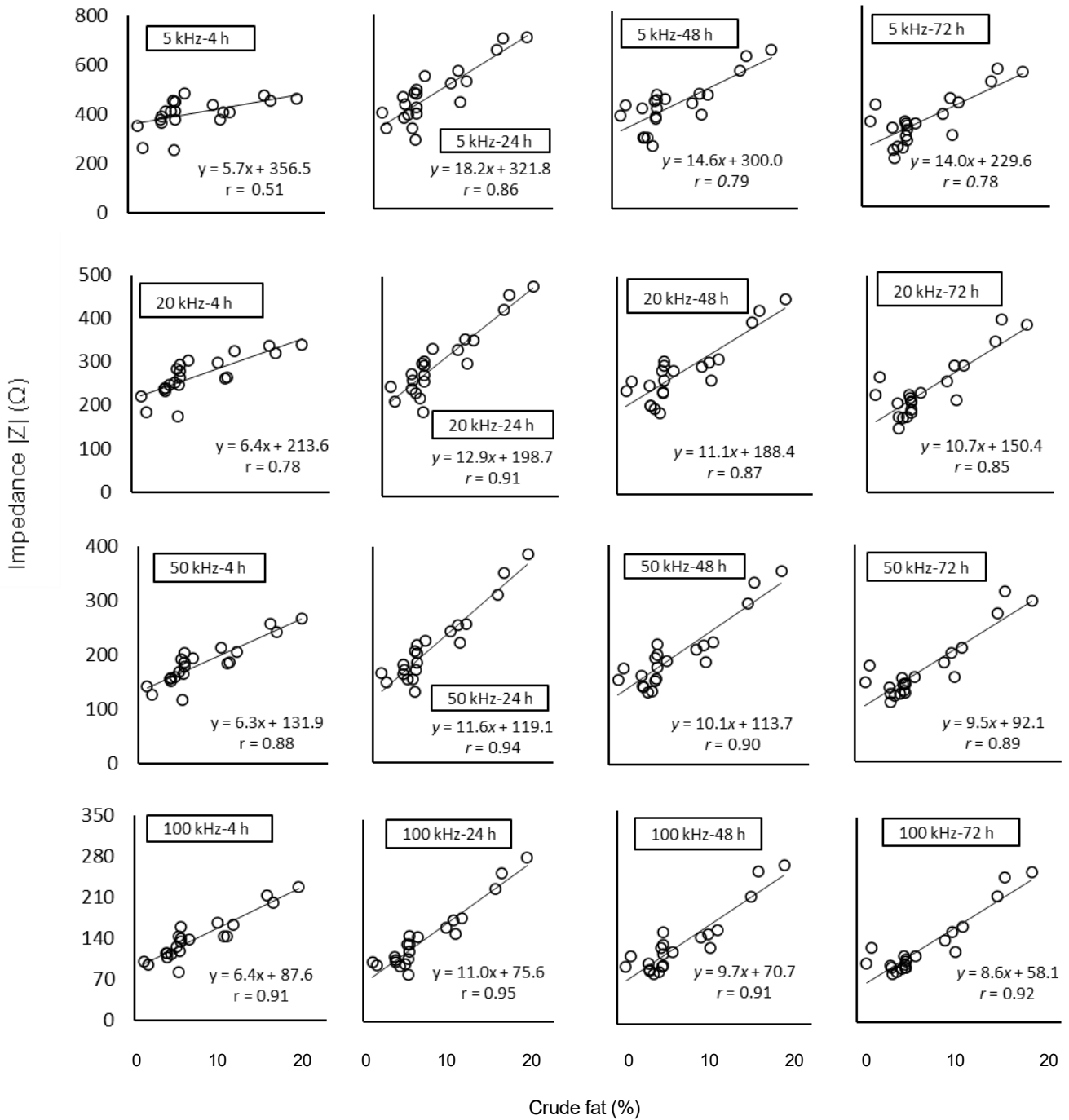


Fig. 19 Relationship between actual values of the crude fat contents and impedance of yellowtail of each storage time. (4 h) Storage time 4 hours; (24 h) Storage time 24 hours; (48 h) Storage time 48 hours; (72 h) Storage time 72 hours. The data used the value that revised temperature. *r*: correlation coefficient.

関係数が低かった周波数は 5 kHz であった。特に、水揚げ 4 時間後における 5 kHz の相関係数 (*r*) は 0.51 と低かった。4 種類の周波数のインピーダンスと脂肪量との回帰直線の傾きは、4 時間後では 5.72 - 6.43 であったが、24 時間後は 10.17 - 18.20

となり、48 時間では 9.73 - 14.61、72 時間後では 8.60 - 14.02 となった。いずれの周波数においても 24 時間後に傾きは大きくなり、その後は小さくなった。脂肪量の多い個体ほど時間経過によりインピーダンスが大きく変動した。

Table 7 Results of calibration for determining fat in each measurement time

Time	Calibration equation ^{*1}	r^{*2}	SEC ^{*3}	SEP ^{*4}	Bias ^{*5}
4h	$y = 0.169 \times (100\text{kHz}) - 0.032 \times (5\text{kHz}) - 2.291$	0.94	1.9	1.7	1.5
24h	$y = 0.117 \times (100\text{kHz}) - 0.020 \times (5\text{kHz}) - 1.838$	0.96	1.6	1.4	-0.8
48h	$y = 0.127 \times (100\text{kHz}) - 0.026 \times (5\text{kHz}) - 0.050$	0.93	2.2	2.2	-1.0
72h	$y = 0.203 \times (100\text{kHz}) - 0.080 \times (20\text{kHz}) + 1.142$	0.94	1.9	1.9	-1.1

*1 100 kHz: Impedance with 100 kHz; 5 kHz: Impedance with 5 kHz;

20 kHz: Impedance with 20 kHz.

*2 r : Multiple correlation coefficient.

*3 SEC: Standard error of calibration.

*4 SEP: Bias-corrected standard error of the prediction.

*5 Bias: Meandifference between actual value and impedance predicted value.

重回帰分析により時間別に脂肪量を推定するために作成した検量式を Table 7 に、推定した脂肪量を Fig. 20 (○) に示した。水揚げ 4, 24, 48 時間後では、脂肪量と相関性が高くなる因子として選択された周波数は 100 kHz と 5 kHz であった。一方、72 時間では 100 kHz と 20 kHz であった。重回帰分析を用いてヒト用体脂肪計で行われているように体格に関するデータ (体重, 尾叉長) を加えて分析したが、ステップワイズ法では除外されたため、脂肪量推定に影響を与える因子とはならなかった。次に実験 3 では、実験 2 で作成した検量式が別の検体を推定できるのかの適性を調べるために、2011 年 12 月から 2012 年 11 月の間に水揚げされたブリ 18 - 43 尾について脂肪量を推定した。推定した脂肪量および相関性を Fig. 20 (●) および Table 7 に示した。検量式より求めた脂肪量と化学分析値の重相関係数 (r) は 48 時間では 0.78 となったものの、その他の時間帯では 0.92 以上となった。

3. 考察

第 3 章では、比較的安価で製造でき、現場で簡便にかつ非破壊でブリの脂肪量を測定する装置開発のために、脂肪量推定に影響を及ぼすインピーダンスの特性を明らかにすることを目的とした。これまで魚類の脂肪量測定にインピーダンスを用

いた報告がされていない理由は、ヒトでは問題にされない「体温」と「死後変化 (鮮度)」が影響していると考えた。ヒトの体温は 36 °C 程度とほぼ一定であるが、魚類の体温は生息環境の温度から水揚げ後の氷蔵まで大きな温度差がある。そこで「体温」についての影響を調べるため、実験 1 では、氷蔵状態から魚体温を 20 °C まで上げ、その後、再び氷蔵まで冷却したところ、4 種類の周波数のインピーダンスは魚体温が上昇すると低下し、魚体が冷却されると元のインピーダンスになる温度依存性が確認された。すなわち、インピーダンスは魚体温が 1 °C 異なると 100 kHz で 1.45 Ω, 50 kHz で 1.98 Ω, 20 kHz で 2.76 Ω, 5 kHz で 3.85 Ω 変動した (Table 6)。仮に脂肪量が 10 % のブリでは、Fig. 19 の 4 時間後、0 °C の場合、100 kHz および 5 kHz のインピーダンスは 152 Ω, 414 Ω となるが、10 °C では 138 Ω, 376 Ω となる。この場合、100 kHz のインピーダンスの単回帰では脂肪量は 7.7 % と推定されるが、Table 8 の検量式から脂肪量を求めると 8.9 % となる。本研究の氷蔵条件では魚体温は 0.3 - 3.9 °C であったため、魚体温の補正をしなかった場合でも本検量式を用いて脂肪量を測定する場合、ブリの体幹部の脂肪量が 0.5 - 30.9 %¹⁰³⁾ と幅広いことを考慮すると、魚体温による推定脂肪量の誤差は小さく、品質を評価する上で大きな問題ではないと考える。魚体温にかかわらずインピーダンスから脂肪量を推定する、ある

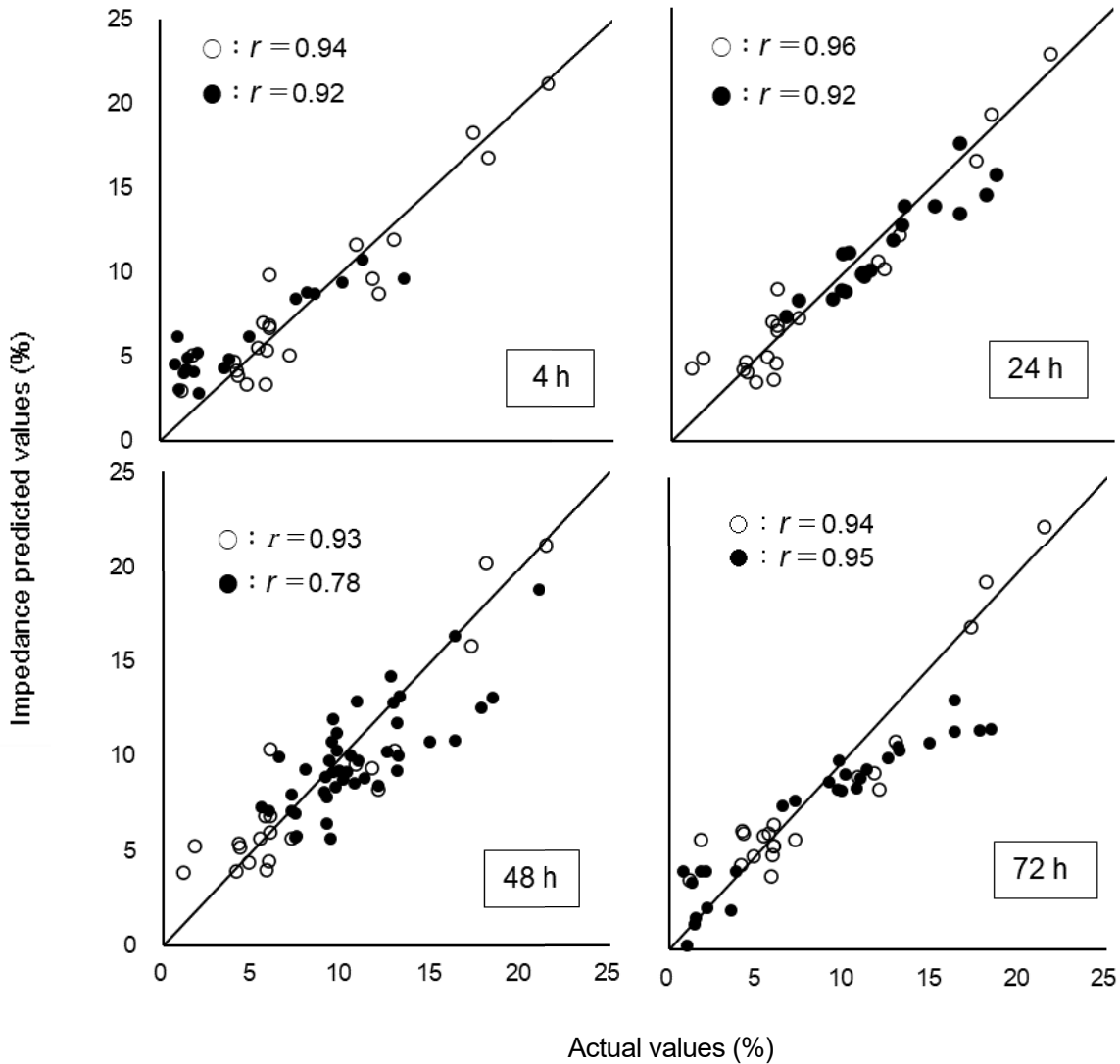


Fig. 20 Relationship between actual values of the crude fat contents and impedance predicted values of yellowtail. Open circle: calibration set; black circle: prediction set. r : Multiple correlation

いは、高精度に脂肪量を測定するためには魚体温の影響を補正する必要があるが、多周波インピーダンスを用いて簡易に脂肪量を測定する場合、特に Table 7 の検量式のように第一因子が正の値に対し、第二因子が負の関係にある場合は、魚体温の影響が小さくなる効果が認められたため、氷蔵し、魚体温を極力一定にすればよいと考える。

「死後変化」については、これまで杉山^{98,99)}や加藤ら^{100,101)}がインピーダンスの特性を明らかにし、インピーダンスを魚類の鮮度判定に用いる可能性を報告している。特に、加藤らは生化学的な成分指標であるK値とは全く別の特性を持った電気的鮮度指標であると報告している。¹⁰⁰⁾実際に、

Distell 社がインピーダンスの特性を応用した鮮度計をトリーメーター⁹⁹⁾として発売している。本研究でも、実験1にて「死後変化」の影響を確認したところ、インピーダンスはこれまでに報告があったように変動することを認めた (Fig. 18)。試験に用いた6尾すべてが同じように変動したため、経過時間が同じであれば、インピーダンスを用いて脂肪量測定が可能になると考えた。なお、この6尾の脂肪量は 5.6 ± 0.8 %であった。実験3では、脂肪量の異なるブリ21尾を用いて、時間経過別に脂肪量と4種類の周波数のインピーダンスとの相関を示した (Fig. 19)。4時間後の5 kHzを除き、相関係数 (r) は0.78以上と高い値を示し、脂肪

量推定の可能性が示された。特に 100 kHz のインピーダンスと脂肪量との相関は高く、測定したすべての時間において相関係数 (r) は 0.91 以上であった。また、回帰直線の傾きは経過時間で異なり、24 時間後の傾きは他の時間に比較して高いことが示された。これは硬直の影響によるものと推察している。田中ら⁹⁶⁾は生体電気インピーダンスを用いてヒトの水分量や体脂肪量を求める有用性と利用限界について述べている。この中で、姿勢や体位の変化により誤差が生じるとし、「手一手」の測定では、腕を曲げるかどうか、筋肉を収縮させるかどうかで結果が異なると述べている。致死条件（神経締めと苦悶死など）を変えると硬直の開始時間が変わり、インピーダンスが上昇する時間が変わることを確認しているため、時間とともに致死条件（硬直状態）も脂肪量測定に影響を与えると推察する。本実験では、養殖ブリを用いて延髄刺殺としたため条件を揃えることができたが、刺殺条件が異なる場合は硬直状態を考慮して時間経過を検討しなければならないと考える。

水揚げ後の経過時間もインピーダンスに影響を与えたことから、実験 3 では、時間別に脂肪量推定の検量式を作成した。ブリでは水揚げ 4, 24, 48 時間後に 100 kHz と 5 kHz のインピーダンス、72 時間後では、100 kHz と 20 kHz のインピーダンスが脂肪量推定の因子となった (Table 7)。このように複数の周波数で測定し、重回帰分析を行うことにより、より正確な脂肪量を推定することが可能と考える。インピーダンスを用いたヒト用体脂肪計が始めて市販された頃は骨格筋の周波数特性に着目し、その周波数帯のほぼ中心周波数である 50 kHz の単周波が用いられたが、⁹⁶⁾その後、多周波のインピーダンスによる脂肪量推定の有効性が報告され、現在では、多周波による研究が主流となり、ヒト用体脂肪計でも多周波のインピーダンスが用いられている。³¹⁾多周波インピーダンスを用いる利点は、異なる周波数のインピーダンスが細胞内外の状況を反映し、細胞内外の水分量の違いを測定できるためとされている。ブリでは 100 kHz のインピーダンスと脂肪量との相関が高く

(Fig. 19)、100 kHz のインピーダンスが脂肪量推定の第一因子と考える。低周波のインピーダンスは鮮度の指標^{100,101)}になるとされていることから 4, 24, 48 時間後の脂肪量推定では、鮮度に関する因子として 5 kHz のインピーダンスが選択され、時間的要素を補正する役割があったと考える。加藤ら^{100,101)}は 10 kHz 以上が鮮度の指標になるとしているが、この報告では二電極法が用いられており分極の影響を考慮している。分極は四電極法を用いることで改善されるため、⁹⁸⁾前述のトリメーターでは四電極法が採用され、周波数には 2 kHz が用いられている。¹⁰⁴⁾このため、今回用いた 5 kHz のインピーダンスは鮮度の因子になると考える。0°C 保存のブリでは 2 時間後から硬直が始まり、9 時間後には完全硬直（硬直指数 100 %）に達し、48 時間後には硬直が解け始め（硬直指数 94 %）、72 時間後には硬直指数は 70 % 以下になったと報告がされている。¹⁰⁵⁾硬直の影響が少なくなる 72 時間後で 5 kHz のインピーダンスが因子から外れたことから、5 kHz のインピーダンスは脂肪量推定における鮮度、特に硬直の影響を考慮するものであったと推察する。脂肪量推定の第一因子となる高周波域（例えば 100 kHz 以上）の検討や脂肪量推定に影響を及ぼす時間的要素について低周波域を用いてどのように補正するか、さらに異なる周波数の組み合わせや多周波インピーダンスの比や差など、高精度かつ汎用性のある機器にするためにはさらなる検討・解析が必要と考える。

本実験では、電圧極の間を 3 cm にした電極を用いて魚体中央部の背部の局所的なインピーダンスを測定した。4 種類の周波数のインピーダンスと体格（体重、尾叉長）に関するデータを重回帰分析したが、体格に関するデータは脂肪量推定の因子として不要であった。ブリでは電圧極 3 cm 幅の電極が脂肪量を測定するのに適した幅であった。この条件でブリの脂肪量を推定した場合の重回帰係数 (r) は 0.78 - 0.95 の値であった (Fig. 20)。これは近赤外分光法で報告のあったビンナガ ($r=0.79 - 0.93$)⁹³⁾やカツオ ($r=0.87 - 0.91$)⁹²⁾と同程度であった。今回、ブリの背側中央部の脂肪

量を求めたが、ブリの背部と腹部の脂肪量には非常に高い相関 ($r=0.97$, $n=35$, 詳細データ省略) が確認されたので、ブリの背部を測定することでブリの腹部を推定、さらにはブリ全体の脂の乗りを評価することも可能と考えている。

以上のことにより、鮮魚におけるブリではインピーダンスを用いて脂肪量を推定するための条件が明らかとなった。インピーダンス測定装置は小型かつ軽量であり、水産現場で使用可能な測定装置として幅広く展開できると考える。なお、魚種毎に時間に対応した検量式を作成することにより様々な場面で簡便かつ非破壊で脂肪量の測定が可能と考える。

第4章 インピーダンス法を用いたブリのヤケ肉判定

マグロ類で発生するヤケ肉は白茶け透明感がなく、肉質が水っぽく、年稠性がなく繊維性（パサパサした感じ）のある異常肉の一種と報告され、その発生要因は高体温と低 pH の影響と考えられている。^{106,107)} 現在では、ヤケ肉発生を防止するために暴れさせない取り上げ（電気ショックによる沈静化）や延髄や脊髄を破壊する神経処理（神経締め）、取上げ後の冷やし込み（シャーベット氷の活用）などの有効性が報告されるが、¹⁰⁸⁾ ヤケ肉は未だに関連産業にかなりの損害を与えている。近年では、ブリにおいてもヤケ肉の発生が報告され、¹⁰⁹⁾ ミオシンやアクチン、 α -アクチニンなどへの影響が報告されている。^{110,111)}

産業的に重要な課題であるマグロ類のヤケ肉研究の進捗を妨げていることに「個体差が大きいこと」と「ヤケ肉の程度を表す客観的指標がないこと」が挙げられている。¹¹²⁾ 一般に著しいヤケ肉であれば解体後は色調から判別できるが、軽微なヤケ肉では加工して空気と接触しやすい状態で時間が経過すると判別しにくくなり、このような場合には、身割れ、筋肉の粘性の低下、保水性の低下など目視だけでなく触感による評価を加えた判断が必要になるとされている。¹¹²⁾ 解体した後でさえ、ヤケ肉の判別は熟練した専門家でなければ非常に難しい状況にある。

一方、第3章で用いたインピーダンス法は生物組織の損傷など、細胞レベルの劣化情報を迅速に得られる方法として注目されている。¹⁰⁰⁾ インピーダンス法を用いて脂肪量を測定する場合、温度や取上げからの経過時間、致死条件（締め方）などを統一する必要がある。これらの条件が異なる場合、正確な脂肪量が測定できない。これらの条件により細胞に損傷が起き、インピーダンス値に影響を及ぼすならば、多周波のインピーダンスを用いてヤケ肉判定の可能性があると考えた。

第4章では、インピーダンス法を用いてブリのヤケ肉を非破壊で判定することを目的にブリの正

常肉とヤケ肉モデルの性状、すなわち pH、色調、圧出ドリップ、クレアチンキナーゼ活性、塩溶解性、Ca-ATPase 活性を調べ、最終的に Ca-ATPase 活性と 100 kHz と 20 kHz のインピーダンス比との関係を検討した。

1. 材料と方法

1.1. 供試魚および実験方法

供試魚はすべて長崎県総合水産試験場の海面筏で飼育したブリを用いた。

実験 1：加熱によるブリ筋肉の電気的特性（Cole-Cole プロット）の変化をインピーダンスアナライザ（日置電機社製 IM3570）を用いて測定した。供試魚は 2017 年 9 月 25 日にフェノキシエタノールを用いた麻酔により安楽死させたブリ 2 尾（3 年魚、平均体重：3.04 kg）を 1 日氷蔵した後に用いた。ブリ 1 尾はポリエチレン製の袋に入れ、恒温槽（アドバンテック社製 LT-480）で 30°C 加熱、もう 1 尾は氷蔵のまま経時的にレジスタンスおよびリアクタンスを測定した。なお、魚体中心温を芯温計（佐藤計量器製作所製 SK-250WP）で測定し、加熱魚の魚体中心温が 30°C に達してから測定を開始した。

実験 2：加熱によるブリのブロック肉のインピーダンス値と色調およびミンチ肉の性状変化を調べた。インピーダンスの測定は魚用品質状態判別装置（大和製衡株式会社製、DFA100）を用いた。供試魚は 2015 年 10 月 21 日に陸上で窒息死をさせたブリ 1 尾（3 年魚、体重：4.62 kg）を脱血および冷やし込みせずに用いた。取上げ後直ちに背側ロインを 6 cm 間隔でブロック状に切出し、腹側ロインは血合筋を除き、冷却機能付き高速カッター（Stephan 製、UM5）を用いてミンチ肉とした。魚肉ブロックおよびミンチ肉はポリエチレン製の袋に入れ真空包装した。ミンチ肉は重量を統一し、外側と中心部に加熱むらが起きないように薄い形状に引き伸ばした。魚肉ブロックとミンチ肉は氷蔵または恒温槽（Neslab 製 RTE-220）により 10°C、20°C、30°C で加熱し、30 分毎に開封し魚肉ブロッ

クのインピーダンスを測定し、90分後には魚肉ブロックを2等分し切断面の色調を測定した。また、30分および60分の加熱後のミンチ肉のクレアチンキナーゼ活性およびCa-ATPase活性を測定した。

実験3：2015年8月4日、8月11日、9月8日に即殺または窒息死させたブリそれぞれ4尾（3年魚、体重 4.69 ± 0.20 kg）5尾（3年魚、体重 4.82 ± 0.38 kg）4尾（3年魚、体重 4.44 ± 0.65 kg）について、魚用品質状態判別装置を用いて100 kHzと20 kHzのインピーダンス値および筋肉性状を測定した。取上げ毎に1尾は即殺し直ちに海水氷で冷却、残りは陸上で窒息死させ、常温で10-40分保管した後に冷却し氷蔵した。8月11日および9月8日の取上げでは窒息死させる個体には5分間の強制運動を行い、遊泳が困難な状況で取り上げた。取上げから3時間後にインピーダンスを測定した。インピーダンス測定後に筋肉の性状を測定した。筋肉の性状は背側から厚さ5 mmの切身を13枚切出し、1枚の切身から内臓側、体表側および内臓側と体表側との3箇所または内臓側の1箇所を測定した。

1.2. インピーダンス測定器および測定方法

インピーダンスアナライザには四端子プローブ（日置電機社製 L2000）を取り付け、測定電極には魚用品質状態判別装置の付属品である小型魚測定用のアタッチメントを土台にステンレス（SUS 304）製で長さ15 cm、土台部の直径7 mm、先端部の直径2 mmで、先端5 mm以外の側面にはフッ素により絶縁加工した針状電極を用いた（以下、挿入型電極 Fig. 21a）。挿入型電極は魚体中央部の表皮をメスで3 cm切り、脊椎骨に当たるまで挿入した。試料に印加される測定用交流電流電圧は1 Vで、測定周波数は4 Hzから1 MHzの範囲の300点で掃引測定を行った。測定結果は付属の等価回路解析ソフト（日置電機社製 IM9000）によりレジスタンスおよびリアクタンスが算出され、同時にCole-Coleプロットが表示される。Cole-Coleプロットとは、横軸にレジスタンス、縦軸に $-$ リアクタンスをとり、測定周波数に応

じてプロットしたものである。なお、インピーダンスはレジスタンスとリアクタンスの二乗の和の平方根と定義されているため、¹¹⁶⁾ 測定したレジスタンス およびリアクタンス から20 kHz および100 kHzのインピーダンス値を求めた。すなわち、インピーダンス値 = $(\text{レジスタンス}^2 + \text{リアクタンス}^2)^{1/2}$

魚用品質状態判別装置（大和製衡社製 DFA100）は第3章1.2.と同じ構造である。電極には市販の電極（接触型電極 Fig. 21b）と前述した挿入型電極を用いた。実験2では魚肉ブロックの中心部を挿入型電極で測定した。実験3では接触型および挿入型電極を用いた。接触型電極は第3章1.3.と同じ部位を測定し、挿入型電極の測定は前述同様、魚体中央部から表皮を3 cm切り、脊椎骨に当たるまで電極を差し込んだ。測定は5回を行い、最大値最小値を除いた3回の平均値を用いた。挿入型電極は電圧極と電流極を誘電性粘着テープにより繋いだ（二電極法）。二電極法では電流極と電圧極が同じになるため、測定部位は電極表面となる。⁹⁸⁾ なお、二電極法では低周波は接触面で分極が発生するため、分極の影響を受けないとされる10 kHz以上の周波数を用いることにした。¹⁰⁰⁾

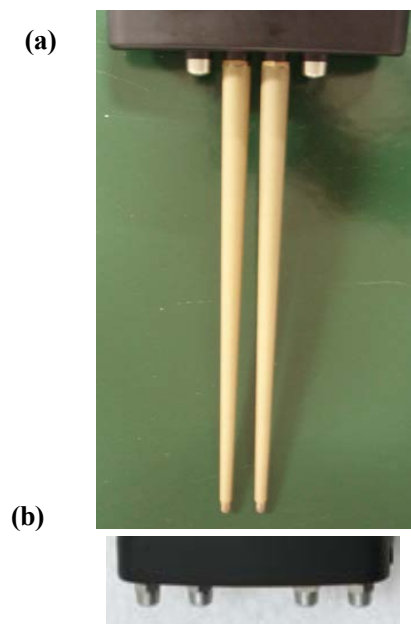


Fig. 21 Insertion type electrode (a) and contact type electrode (b).

すなわち、測定周波数は低周波側を 20 kHz とし、高周波側には 100 kHz を用いた。

1.3. 筋肉性状に関する測定

pH 測定は普通筋 1 g を採取後、10 倍量の蒸留水で希釈し、ホモジナイズの後、卓上型 pH メータ（堀場製作所製、F-22）を用いて測定した。

色調は色彩色差計（コニカミノルタ製 CR-400）を用いて、色彩値（L*値、a*値、b*値）を測定した。実験 2 で用いた魚肉ブロックは 2 等分した切断面（両側）を各 5 箇所した。実験 3 では切身（5 枚）の各 3 箇所（内臓側、中間部、体表側）を測定し、最大値最小値を除いた 3 回からの平均値を求めた。

圧出ドリップの測定は尾藤の方法に準じた。¹¹⁷⁾ 試料は切身（5 枚）から縦横 1.5 cm の魚肉片各 3 箇所（内臓側、中間部、体表側）を切り出した。魚肉片を挟む濾紙には ADVANTEC 社製（No. 2）を用いた。なお、魚肉に触れる内側には濾紙（No. 4）を使用した。加圧は 2 分間 10 kg/cm² とし、加圧前後の重量から求めた。すなわち、圧出ドリップ量（%）＝（試料重量(g)－圧出後試料重量(g)）／試料重量（g）×100

クレアチンキナーゼ（EC 2.7.3.2）活性はミンチ肉 1 g に 0.1 MKCl, 20 mM Tris-Maleic acid (pH7.5) を 10 mL 加えてホモジナイズ（Kinematica 社製、PT10-35）し、遠心分離（3,000 rpm, 5 分, 4°C）後、上清を濾紙（ADVANTEC 社製、5A）および 0.22 μm のメンブランフィルター（MILLOPORE 社製、MILLEX-GP）で濾過した。濾液のタンパク質濃度はウシ血清アルブミンを標準としたビウレット法⁵¹⁾により求めた。測定にはクレアチンキナーゼアッセイキット（BioAssay Systems 社製、ECPK-100）を用いて、タンパク質重量（g）当たり pH6.0 で 1 分間にクレアチンリン酸から ADP に変化するリン酸の μmol 数で表した。

塩溶解性の測定は切身の 3 箇所（内臓側、中間部、体表側）から各 1 g を採取し、10 倍量の 0.33 M NaCl, 22 mM Tris-HCl (pH7.0) を加えてホモジナイズ（Kinematica 社製、PT10-35）、ナイロンメ

ッシュ（#32）で濾過した濾液を筋肉ホモジネートとした。筋肉ホモジネートは 20 mM Tris-HCl (pH7.0) になるように 2.5 倍希釈し、終濃度が 1 M および 2 mM となるようにそれぞれ NaCl と ATP-Mg を加え懸濁液とした。懸濁液は 5°C で 30 分保持した後、遠心分離（20,000 ×g, 30 分, 5°C）した。遠心分離前後のタンパク質濃度を測定し、遠心分離前の懸濁液タンパク質濃度に対する遠心分離後の上清に回収されたタンパク質濃度を百分率で表した。タンパク質濃度の測定は、ウシ血清アルブミンを標準としたビウレット法⁵¹⁾により測定した。

Ca-ATPase 活性の測定は加藤らの方法¹¹⁵⁾により筋原繊維を調製した。すなわち、氷水で冷却しながら 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液中で 20 秒間の冷却時間を間に入れながら 20 秒ずつ 4 回ホモジナイズした。その後、同緩衝液での懸濁と遠心分離（3,000 rpm, 5 分）を繰り返して、最終的には懸濁液をナイロンメッシュ（#32）で濾過し、得られた濾液を筋原繊維懸濁液（Mf）とした。筋原繊維懸濁液の Ca-ATPase 活性は 0.5 M NaCl, 15 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 25 mM Tris-HCl (pH7.0) からなる反応組成液を用いて、25°C で反応させた。反応は過塩素酸を終濃度 5 % になるように加え停止させ、ATP から加水分解の結果により生じた無機リン酸を比色定量¹¹⁶⁾した。

2. 結果

2.1. 加熱魚の Cole-Cole プロットの変化(実験 1)

30°C 加熱に伴う Cole-Cole プロットの変化を Fig. 22 に示した。加熱したブリでは時間経過に伴い Cole-Cole プロットの円弧が収縮した。健全な細胞では、高周波電流は細胞内を直線的に流れ、低周波電流は細胞膜が大きな抵抗として働き細胞膜の間の細胞外液を通るようにして流れる。このような細胞膜の持つ電気的な抵抗によって、Cole-Cole プロットは周波数に応じて円弧を描くという周波数特性を有する。¹¹⁷⁾ 一方で、細胞膜に損傷や劣化が生じた場合には、低周波電流も細胞内を流れ

るようになる。したがって、Cole-Cole プロットで描かれる円弧は、細胞膜の健全性を示す指標として用いられており、円弧の収縮は細胞膜の損傷を意味する。¹¹⁷⁾ すなわち、30°C加熱により細胞膜の損傷が示唆された。

次に、20 kHz および 100 kHz のレジスタンスおよびリアクタンスからインピーダンス値を算出し、

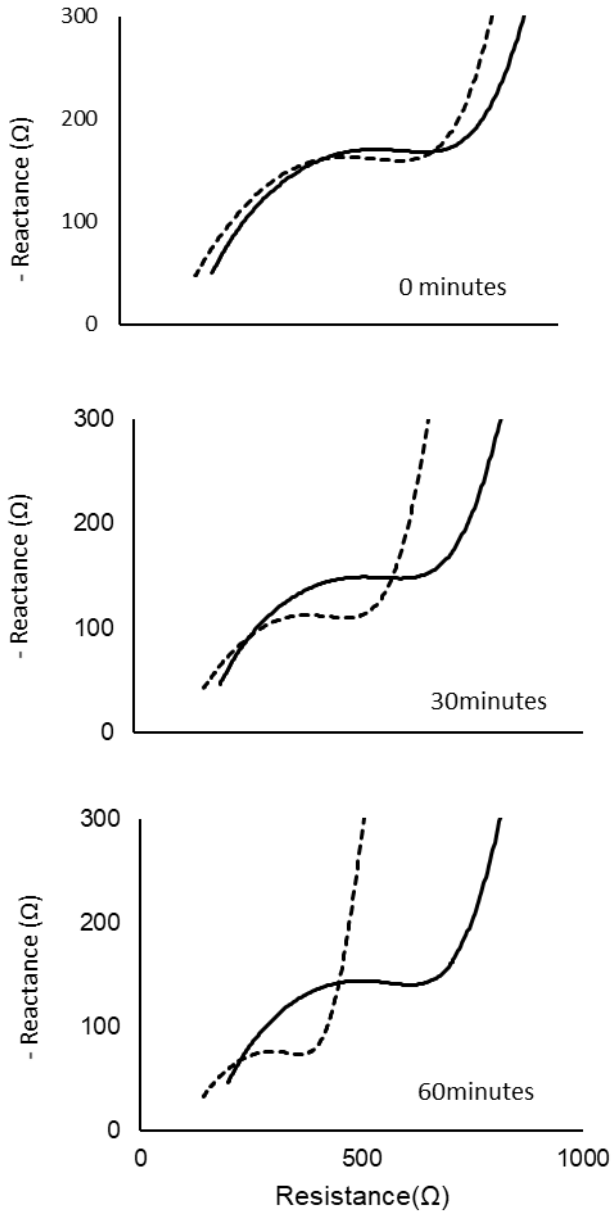


Fig. 22 Variation with ice or heating storage time of complex impedance trajectories of yellowtail measured by the insertion electrodes. Solid line: ice storage, Dashed line: 30 °C heating.

それぞれのインピーダンス値と 100 kHz に対する 20 kHz のインピーダンス比の経時変化を Fig. 23 に示した。氷蔵ではインピーダンス値の低下は見られず、30°C加熱では 20 kHz と 100 kHz のインピーダンス値は共に低下した。特に 20 kHz のインピーダンス値の低下は大きく、100 kHz に対する 20 kHz のインピーダンス比は、氷蔵が 1.41 から 1.36 に低下したのに対し、30°C加熱では 1.52 から 1.28 に低下した。

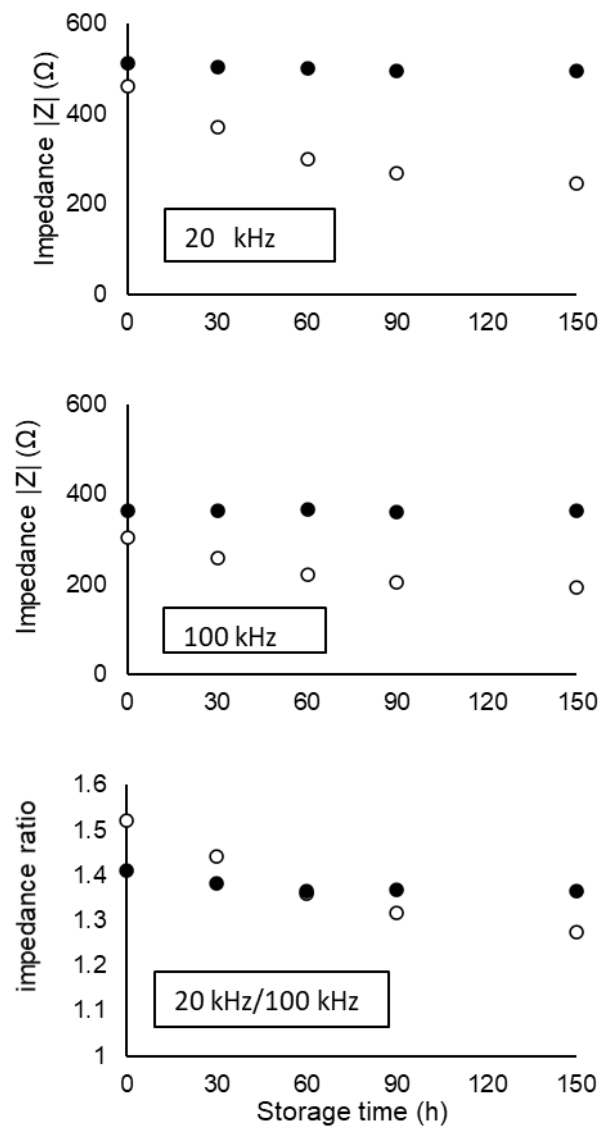


Fig. 23 Changes in impedance and impedance ratio at 100 kHz and 20 kHz of yellowtail stored heating or ice. Closed circles: ice storage, open circles: 30 °C heating.

2.2. 魚肉ブロックのインピーダンス比の変化および色調 (実験 2)

30°C加熱により細胞膜の損傷が示唆されたことから、魚用品質状態判別装置を用いて冷却および加熱した魚肉ブロックの 100 kHz に対する 20 kHz のインピーダンス比を求め、求めたインピーダンス比の変化を Fig. 24 に示した。0°C から 20°C においては、60 分間経過してもインピーダンス比はあまり変化しなかったが、30°C 加熱した魚肉ブロックのインピーダンス比は大きく低下した。

90 分後に魚肉ブロックを 2 等分した切断面の L*値は 0°C から 20°C までは 39.6 から 42.2 であったが、30°C 加熱肉では、45.0 を示し、a*値は 0°C から 20°C までは 3.2 から 5.2 と増加し、30°C は 20°C と同等の 5.1 であった (Fig. 25)。b*値は 0°C から 20°C までは 1.4 から 1.9 であり、30°C 加熱はやや高い 3.0 を示した。インピーダンス比が大きく変化した 30°C 加熱肉は他の温度と比較し、L*値および b*値が高かった。

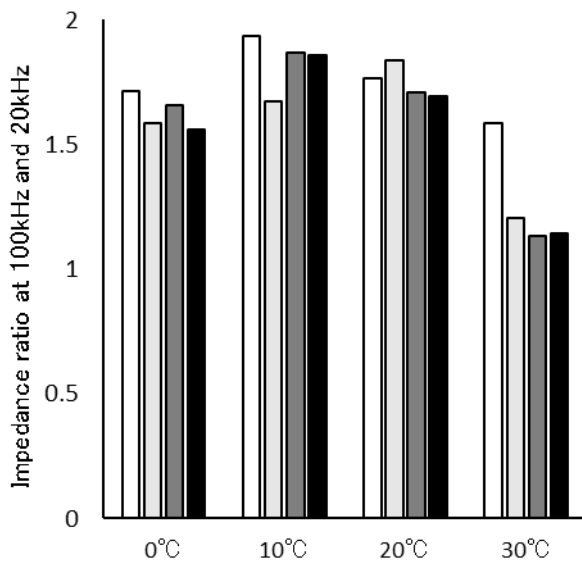


Fig. 24 Change in impedance ratio of heated block meat. White, 0 minute heated; light gray, heated for 30 minutes; dark gray, heated for 60 minutes; black, heated for 90 minutes.

2.3. 加熱によるミンチ肉のクレアチンキナーゼ活性および Ca-ATPase 活性の変化 (実験 2)

加熱したミンチ肉のクレアチンキナーゼ活性と

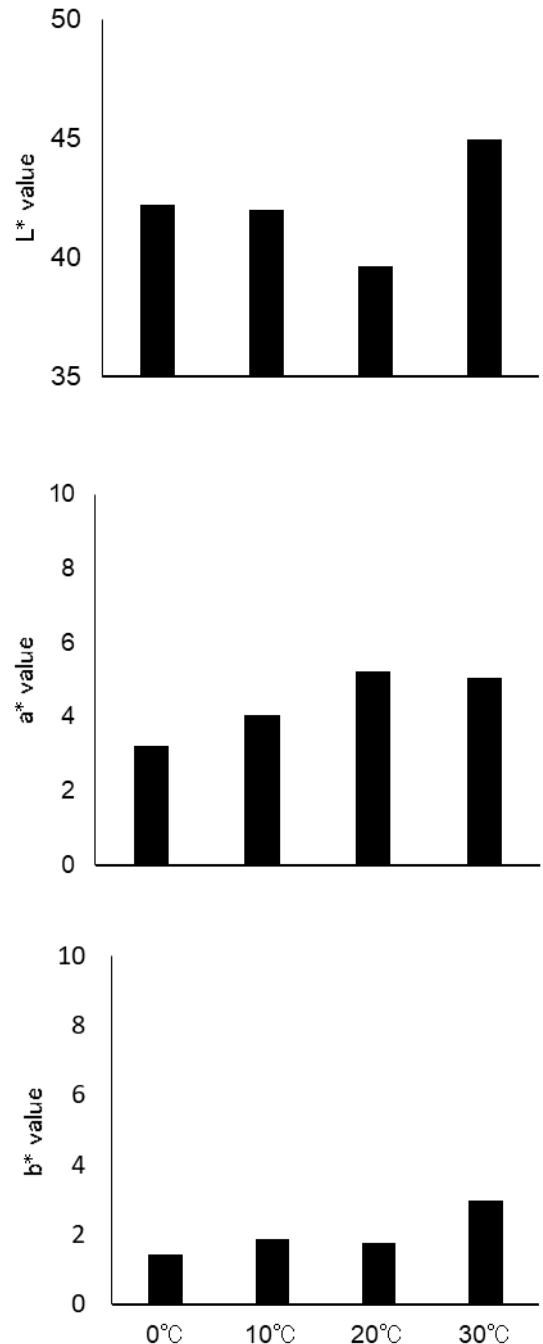


Fig. 25 Color tone of ordinary muscle of yellowtail heated at different temperature for 90 minutes.

Ca-ATPase 活性の変化を Fig. 26 および Fig. 27 に示した。クレアチンキナーゼ活性は加熱による影響は見られず、60.3 から 81.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ であった。氷蔵したミンチ肉の Ca-ATPase 活性は 0.138 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ あり、10°C で 30 分保存したミンチ肉も同程度であったが、60 分となると 0.092 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ に低下した。20°C または 30°C で 30 分

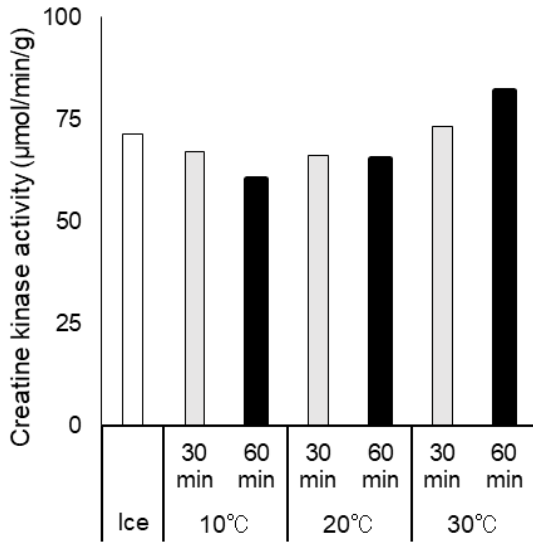


Fig. 26 Change in creatine kinase activity by heated time of minced meat of yellowtail.

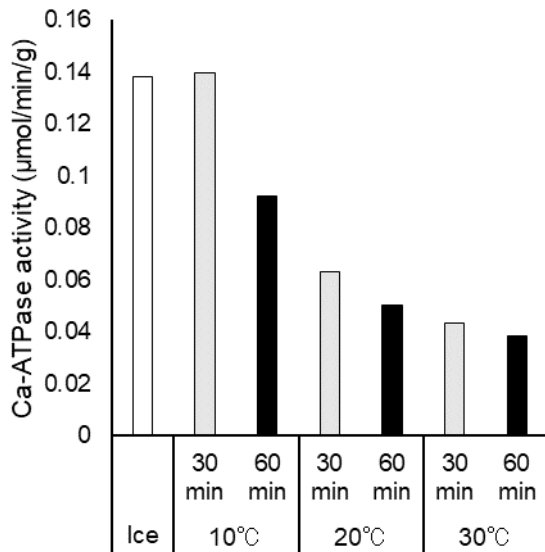


Fig. 27 Change in Ca-ATPase activity by heated time of minced meat of yellowtail.

保存した後の Ca-ATPase 活性値は 0.06 μmol/min/g と 0.04 μmol/min/g に低下した。

2.4. 即殺および窒息死したブリの部位別の色調 (実験3)

8月4日に取上げたブリ4尾の色調を個体別、部位別にFig. 28示した。窒息死した3尾は取上げ後5分程度で動かなくなり、取上げから常温でそれぞれ10、20、40分保管した後に冷却した。この

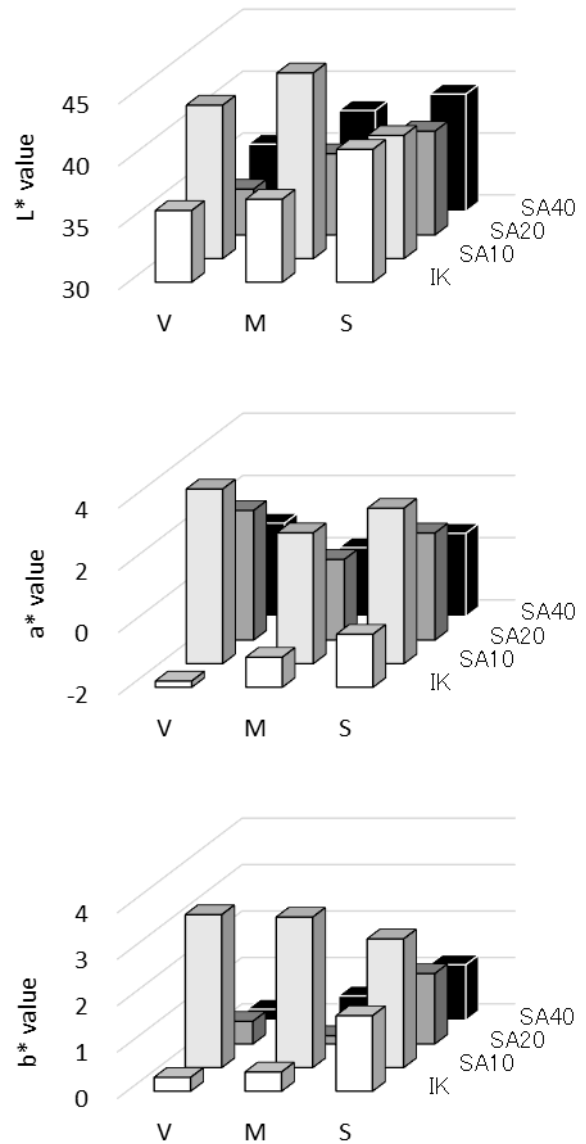


Fig. 28 Color tone by site of ordinary muscle by individual. V, visceral side; M, in the middle; S, surface side; IK, instant killing; SA, suffocation in air; SA10, 20 and 40, after sampling, stored at ordinary temperature for 10, 20 and 40 minutes, respectively.

時の気温は 28.7℃、海水温は 27.8℃であった。即殺個体の L*値は体表側より内臓側と中間部が低く、窒息死した3尾のうち2尾 (SA20, SA40) は即殺個体と同様の傾向を示したが、10分常温保管した個体 (SA10) は体表側より内臓側と中間部が高い値を示した。a*値は即殺個体が低く、窒息死した3尾すべてが高い値を示した。即殺個体の b*

値は体表側より内臓側と中間部が低く，SA20，SA40も同様の傾向を示したが，SA10は体表側より内臓側と中間部が高い値を示した。

2.5. 即殺および窒息死したブリの部位別の筋肉性状（実験3）

8月4日に取上げたブリ4尾のpH，圧出ドロップ，塩溶解性，Ca-ATPase活性を部位別，個体別にFig. 29に示した。即殺した個体のpHは5.79-5.86であった。SA20，SA40は即殺した個体よりやや低めの5.68-5.81であったが，SA10は5.58-5.64と低い値を示した。即殺した個体の圧出ドロップは20.9-22.9%であり，窒息死した個体は18.4-30.7%であった。即殺した個体の塩溶解性は63.2-78.4%であり，SA20，SA40は即殺した個体と同様の値を示したが，SA10は34.5-46.5%と低い値を示した。即殺した個体のCa-ATPase活性は内臓側と体表側が0.10，0.09 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ で，中間部が0.06 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ であった。SA20，SA40は0.07-0.10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ と同程度であったが，SA10の体表側は0.09 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ と即殺個体と同程度を示したが，内臓側と中間部が0.04，0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ と低かった。

ブリ流通関係者は氷蔵中にもかかわらず保存初期に筋肉が白濁する現象を“ヤケ肉”と表現しているので，¹¹⁰⁾ 白濁を表すL*値とpH，圧出ドロップ，塩溶解性，Ca-ATPase活性との関係をFig. 30に示した。L*値が高いほどpH ($r=-0.69, p<0.05$)，塩溶解性 ($r=-0.70, p<0.05$)，Ca-ATPase活性 ($r=-0.78, p<0.01$)は低くなる有意な相関が確認された。

2.6. 即殺および窒息死したブリのCa-ATPase活性とインピーダンス比との関係（実験3）

L*値と最も相関が高かったのがCa-ATPase活性であったことから，8月4日，11日および9月8日に取上げたブリの脊椎骨に近い背部普通筋のCa-ATPase活性をヤケ肉の指標とし，100 kHzに対する20 kHzのインピーダンス比との関係をFig. 31に示した。接触型電極を用いて体表から測定し

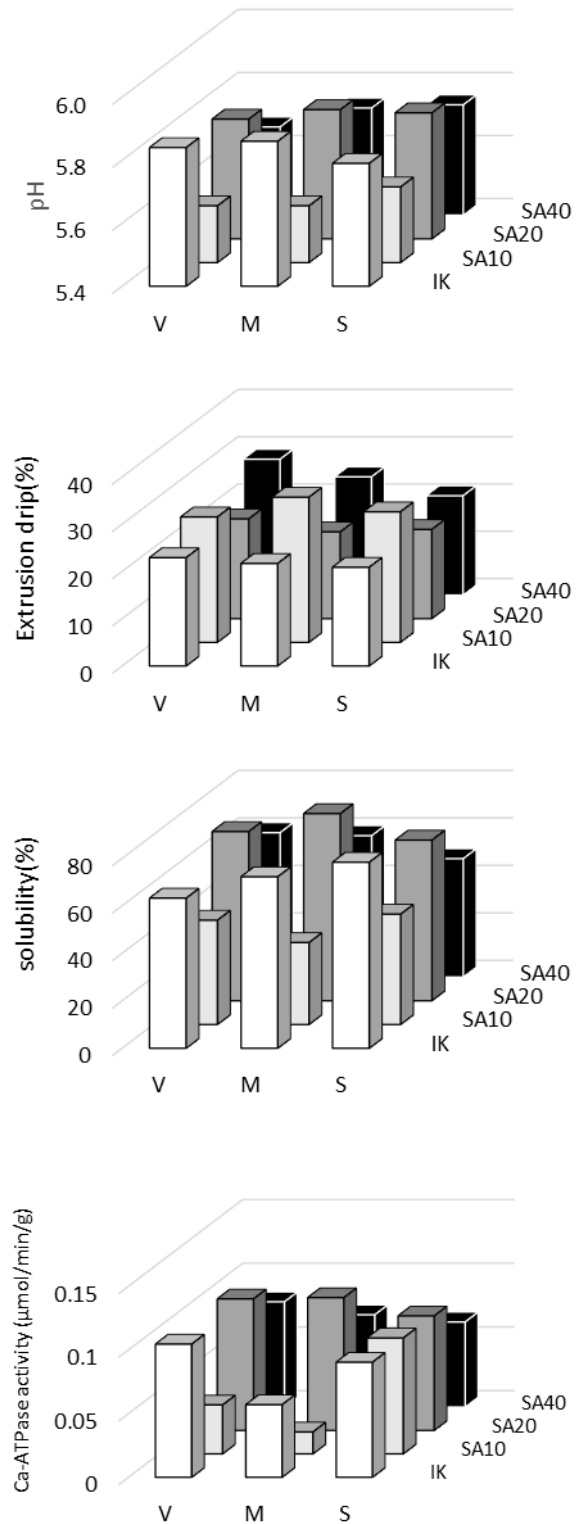


Fig. 29 Characteristics by site of ordinary muscle by individual. V, visceral side; M, in the middle; S, surface side; IK, instant killing; SA, suffocation in air; SA10, 20 and 40, after sampling, stored at ordinary temperature for 10, 20 and 40 minutes, respectively.

た場合、インピーダンス比は 1.58-1.98 の範囲であり有意な相関は見られなかったが、挿入型電極の

インピーダンス比は 1.10-1.97 の範囲となり、有意な相関が見られた ($r=0.85$, $p<0.001$)。

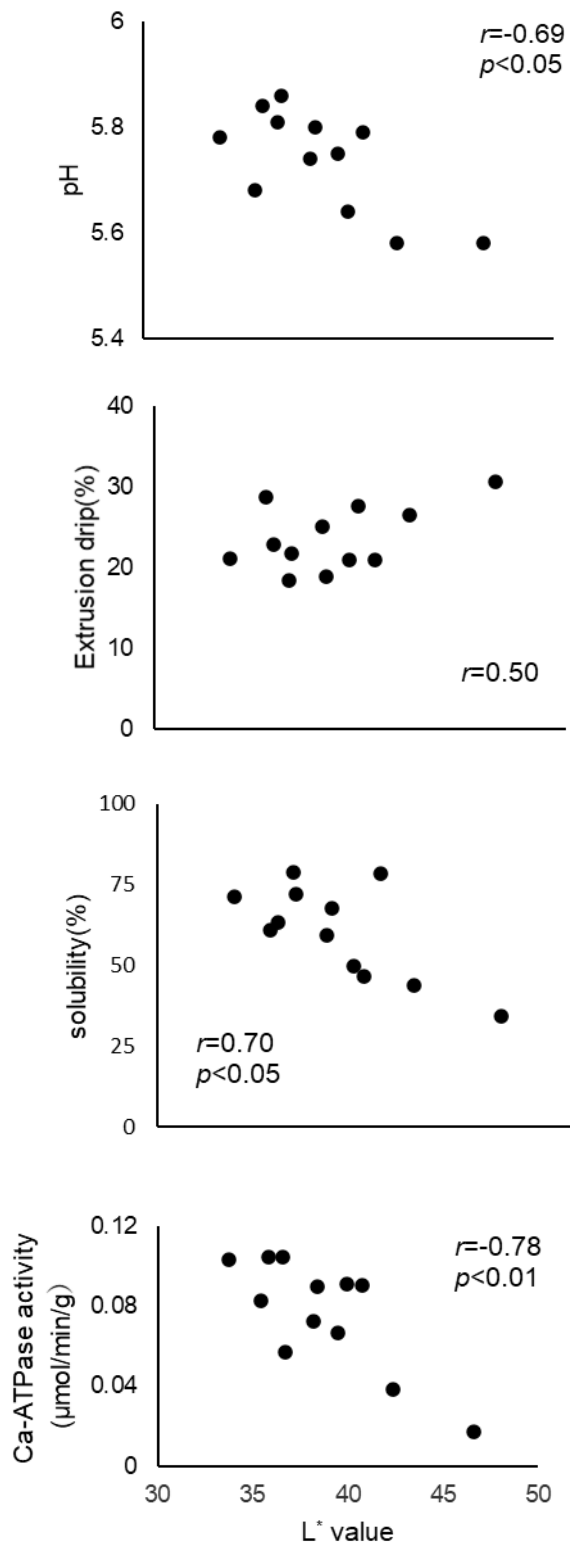


Fig. 30 Relationships between L^* value (whiteness) and the meat quality characteristics.

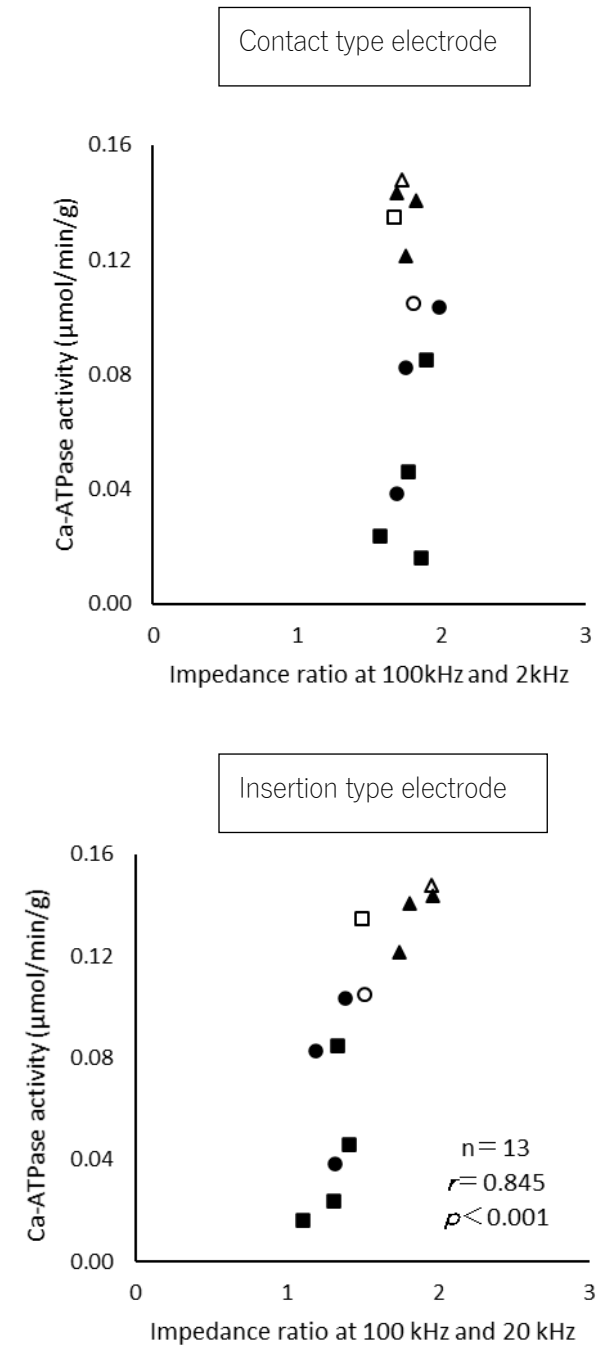


Fig. 31 Relationships between impedance ratio at 100 kHz and 20 kHz and Ca-ATPase of muscle of yellowtail. Open symbols show yellowtail killed immediately. Closed symbols show yellowtail suffocated in the air. Circle: August 4. Square: August 11. Triangle: September 8.

3. 考察

第4章では、インピーダンス法を用いてこれまでで外観から判別ができないヤケ肉の非破壊判別を検討した。

初めに氷蔵および 30°C加熱のブリを用いて経時的に Cole-Cole プロットを作成したところ、加熱ブリでは Cole-Cole プロットの円弧の収縮が確認されたため、ブリが 30°Cで保管された場合、細胞膜が損傷することが示唆された (Fig. 22)。また、この時の 100 kHz に対する 20 kHz のインピーダンス比は時間経過に伴い減少していったことから、高周波と低周波のインピーダンス値を測定することで、細胞膜の健全性を客観的に表すことが可能であると考えた。そこで、第3章と同じ測定原理が用いられている魚用品質状態判別装置で加熱ブロック肉の 100 kHz と 20 kHz のインピーダンス値を測定したところ、30°Cでは 100 kHz に対する 20 kHz のインピーダンス比が低下することを確認した (Fig. 24)。

インピーダンス法は筋ジストロフィーを判定する可能性が示唆されているが、臨床検査ではクレアチンキナーゼ活性等が用いられている。¹²²⁾ マグロのヤケ肉ではクレアチンキナーゼやミオシンおよびアクチンの変性が報告されているため、^{123,124)} 加熱ミンチ肉のクレアチンキナーゼ活性および Ca-ATPase 活性を測定した。クレアチンキナーゼ活性は温度による変化は見られず、Ca-ATPase 活性は温度の上昇および保存時間の増加により低下した。Ca-ATPase 活性は 10°Cや 20°Cの保管でも時間経過に伴い低下し、魚肉ブロックのインピーダンス比の変化と一致しなかったが、これは魚肉ブロックとミンチ肉という形状が影響したと考えた。魚肉をミンチ肉にするとインピーダンス値は 20 kHz も 100 kHz もほぼ同じ値となるため、多周波のインピーダンス測定にミンチ肉を用いることはできない。

次に、陸上で窒息させ常温に曝すことで人為的にヤケ肉を発生させるヤケ肉モデル魚を作製し、部位別の色調および筋肉性状を調べた。窒息死し

た3尾のうち2尾は即殺した個体と同様の傾向を示し、内臓側の L*値が低く、体表側が高かったが、1尾 (SA10) は体表側より内臓側と中間部が高い値を示した。圧出ドリップは特徴的な傾向は見られなかった。pH は部位別の差は小さいが、個体差が見られ SA10 が低かった。SA10 の塩溶解性と Ca-ATPase 活性は他の個体より全体的に低い値を示した。特に SA10 の Ca-ATPase 活性では、体表側より内臓側と中間部で低い値を示した。L*値と Ca-ATPase 活性で見られた傾向は脊椎骨周辺で起こるヤケ肉と一致するものと考えられたことから、SA10 ではヤケ肉が発生したと考えた。なお、SA10 は他の窒息個体より常温保管の時間は短かった。水揚げ直後のヒラメ筋肉の乳酸量は個体差が大きいことが報告されており、¹²²⁾ 取上げたブリの乳酸量が異なっていたと考えられた。ブリのヤケ肉発生では乳酸と pH の影響が報告されていることから、¹¹⁰⁾ 常温保管時間より苦悶することにより起こる疲労がヤケ肉発生に大きく影響するものと考えた。そのため、その後の取上げからは強制運動を行うことにより pH の低下を促し、ヤケ肉を発生させることとした。8月11日の取上げ (気温 29.2°C, 海水温 29.3°C) では Ca-ATPase 活性が低い個体が多かったが、同じ方法で9月8日に取上げたブリでは Ca-ATPase 活性の低下はあまり見られなかった。9月8日の気温は 25.5°C, 海水温は 26.5°Cであったため、ヤケ肉発生にはこれまでに報告であったように取上げ時の気温または海水温が影響するものと考えられた。^{111,123)}

SA10 の L*値と Ca-ATPase 活性は脊椎骨周辺で起こるヤケ肉の性状と一致したが、L*値は脂肪量が多いほど高い値を示すことが知られているため、¹²⁴⁾ L*値のみでヤケ肉を表すことができないと考える。一方、Ca-ATPase 活性は L*値との有意な相関を示したうえ、小谷らはマグロの切断尾部の Ca-ATPase 活性を測定することでヤケ肉を推定できる可能性を示唆しているため、¹¹⁸⁾ 今回はヤケ肉を表す指標として Ca-ATPase 活性を用い 100 kHz に対する 20 kHz のインピーダンス比との関係を調べた。ヤケ肉を非破壊で判定するために接触

型電極による測定を試みたが相関は認められなかった (Fig. 31)。接触型電極は内部で発生するヤケ肉の状態を反映できず、正常な状態であった体表側を反映したと考えた。一方、挿入型電極の測定では、Ca-ATPase 活性とインピーダンス比に有意な相関が認められた ($p<0.001$)。このため、挿入型電極を用いたインピーダンス法はヤケ肉を客観的に判定できる可能性があると考ええる。細胞膜の損傷と Ca-ATPase 活性の関係は不明であるが、宮崎はヤケ肉発生に伴う筋内膜の崩壊を報告しており、¹²⁵⁾ ヤケ肉が発生しているときは筋原繊維タンパク質の分解と筋細胞間結合組織の構造崩壊が同時に起きていると考えられる。このため、細胞膜の崩壊を表すとされるインピーダンス法はブリのヤケ肉の状態を表すと考える。今後は、インピーダンス比とヤケ肉を示す化学的性状をさらに突き詰めると共に流通関係者が行うヤケ肉評価との照合が必要になると考える。なお、ブリのヤケ肉は死後 1-2 時間以降に発生するため、^{109,110,111,116)} ヤケ肉を判定するためのインピーダンス測定はその時間帯以降に行う必要がある。また、取上げ後の時間経過によりインピーダンス値は低下するため、鮮度劣化によるインピーダンス値の低下をヤケ肉と判断してしまう可能性もあり、ヤケ肉判定が可能な時間についても今後検討する必要がある。

第5章 総合討論

本研究では、養殖ブリの品質向上を目的に課題となっている「血合筋の褐変抑制」と「品質の数値化」について検討した。ブリ血合筋の褐変はミオグロビンのメト化が主原因といわれている。ミオグロビンは赤身魚に多く含まれ、長期保管するマグロは褐変防止のため-60°C以下の超低温流通が行われている。一方、血合筋にミオグロビンを多く含むブリの国内流通は生鮮（氷蔵）で行われており、褐変問題は未だ解決していない。ブリの褐変は血合筋と普通筋の境界面から始まるが、その要因については明らかにされていない。そのため、褐変が境界面から生じる要因を解明することが褐変抑制技術開発の第一歩と考えた。また、ブリは日本沿岸を回遊する大型の肉食魚種で、天然ブリは冬期に旬を迎え筋肉に脂を蓄えるものの、旬を除くと脂肪量は少なく、旬以外ではあまり評価されていない。一方、飼料により脂肪量を調整できる養殖ブリは、冬期以外の天然ブリより高い評価を受けている。さらに、ブリは海外でも人気の魚種である。日本では脂が多すぎると「脂っばい」と敬遠されるため適度な脂肪量に仕上げる必要があるが、海外では脂肪量は多いほど高い評価となる。このため、養殖ブリでは消費者の好みに合わせた脂肪量に調整することが差別（ブランド）化に繋がると考えられる。しかしながら、現場で簡便かつ迅速に脂肪量を測定することはできない。そこで、ヒト用体脂肪計で用いられている生体電気インピーダンス法を応用してブリの脂肪量を測定する装置開発を目的に基礎的知見を収集し、装置開発の可能性を検討した。

第1章で普通筋と血合筋の糖代謝関連成分と解糖系酵素活性を調べたところ、グリコーゲンは血合筋に多いが普通筋には少なく、解糖系酵素活性は血合筋で低く、普通筋は高かった (Fig. 3, Table 2)。そこで、血合筋と普通筋ホモジネートを混合したところ、それぞれの単独ホモジネートより混合ホモジネートでは混合直後からグリコーゲンの減少と乳酸の生成が確認され pH が低下した (Fig.

4)。また、pH が低下するほどミオグロビンはメト化したため (Fig. 5)、普通筋と血合筋の境界面で pH の低下が起こり、メト化が発生したと考えられた。境界面で発生した褐変が徐々に周辺部に進行する要因については脂質酸化に着目した。脂質の酸化はその過程で脂質ペルオキシラジカルを生成し、自己触媒的な連鎖反応を引き起こす。反応が開始されると反応速度は急激に増大するため、徐々に進行する褐変現象には脂質酸化が関係すると考えた。魚類の脂質はトリグリセリドとリン脂質が大半を占めること、リン脂質は高度不飽和脂肪酸を多く含み酸化が早いことが知られている。^{37,62)} そこで、リン脂質画分とトリグリセリド画分それぞれを粗ミオグロビン抽出液と混合したところ、リン脂質画分と混合したミオグロビンではメト化が促進された (Fig. 7)。また、トリグリセリド画分と混合したミオグロビンも保存時間が長くなるとメト化を促進したが、切出し 48 時間までに生じる褐変の主要因はリン脂質の酸化であると考えられた。これらの結果から、普通筋と接する境界面から褐変が発生する要因は、筋肉性状の違いにより血合筋と普通筋の境界面の pH が低下し、低下した pH により境界面のミオグロビンがメト化するためと考えた。ミオグロビンのメト化は脂質酸化を促進し、リン脂質の酸化はミオグロビンのメト化を促進することが明らかとなった。これにより、褐変が体表に向け進行すると考えた。

第1章でメト化の進行要因がリン脂質の酸化であったため、第2章では長崎県内でブリを養殖している業者が使用している餌飼料および血合筋の α Toc 量を検討した。両親媒性であるリン脂質は細胞膜を構成しており、 α Toc は細胞膜に取り込まれ不飽和脂肪酸が酸化するのを防ぐ。^{63, 64)} EP 給餌ブリでは飼料と血合筋の α Toc 量との間に相関する傾向が見られ、血合筋中の α Toc が多いほど、メト化が抑制され、色調が維持された (Fig. 10)。しかしながら、MP 給餌ブリでは、逆の現象が確認されたため別の抗酸化物質である AsA を調べたところ、血合筋中の AsA 量もまた褐変を抑制する可能性が示唆された。AsA は筋肉中の量が少な

いにもかかわらず、褐変抑制に大きな影響を与えると推察された。そこで、アスコルビン酸誘導体を飼料に添加する試験を行ったところ、メト化を抑制し、褐変を抑制した (Fig. 11)。アスコルビン酸誘導体は熱に強く、EP 製造時からの添加も可能である。今後、褐変抑制に必要な添加量について季節別に検討が必要になると考える。ただし、アスコルビン酸誘導体の添加による効果は持続性が短く、1 週間程度で元に戻るため、アスコルビン酸誘導体を褐変抑制に添加する際には、出荷計画を基に適切な給餌をしなければならない。

褐変の進行 (切出し 24 時間後の a^* 値およびメト化率) と pH, α Toc 量, AsA 量との関係を月別に調べた。流通関係者は夏期に褐変が早いと認識していたが、8 月の褐変は遅いことが判明した (Fig. 13)。8 月に褐変が抑制される要因は α Toc および AsA 量が多いこと、冬期と比べ pH 低下が起きていないためと考えられた。給餌量が多い夏期に α Toc や AsA が多いことは想定されたが、pH は冬期より夏期に低下しなかった。取上げ保管後の pH は致死条件の他に冷やし込み温度や時間、その後の保管温度の影響を受けるため、海水温が高い夏期は pH が低下しやすいと考えていた。しかしながら、即殺と十分な冷やし込みがされた場合、別の要因により硬直中の pH は決定されるようである。取上げ後の温度以外の要因としては解糖系酵素の影響が考えられた。ブリの肝臓では低水温時期に解糖系酵素活性が低下する報告があるため、⁸¹⁾ 血合筋でも水温の影響を受けると推察した。解糖系酵素活性は水温以外にも給餌制限により影響を受けることが示唆されているため、⁸²⁾ 出荷前の餌止め (無給餌) により解糖系酵素活性を制御し、pH 低下を抑制することができれば血合筋の褐変抑制技術になると考える。コストをかけずに品質の向上が図られれば、養殖業にとって価値がある。深田らは餌止め (無給餌) により脂質酸化が抑制されたことを報告している。¹⁹⁾ 本研究では、2 週間の餌止めにより死後硬直中の魚肉 pH の低下が抑制されたため (Fig. 12)、餌止めにより pH 低下が抑制され、メト化が進行せず、脂質酸化が抑制

されたと考える。これまでブリ血合筋の褐変抑制の主な取り組みは抗酸化物質の投与であったが、褐変抑制のもう一つの重要な要因は pH であり、pH 低下を抑制する必要がある。pH 低下抑制がミオグロビンのメト化およびリン脂質の酸化抑制に繋がり血合筋褐変抑制技術が向上し、今後、さらなる品質向上に繋がるものと期待される。

第 3 章からは消費者の好みに応じた脂肪量のブリを生産するために必要となる非破壊で簡便かつ迅速に脂肪量を測定する方法を検討した。検討した方法はヒト用体脂肪計で普及が進んでいる生体電気インピーダンス法である。魚類におけるインピーダンス法は鮮度計として活用が示唆されている。⁹⁸⁻¹⁰¹⁾ 鮮度計として用いる周波数は 5 kHz または 10 kHz などの低周波である。低周波電流は細胞膜を通過できないため、細胞膜の劣化により低周波のインピーダンス値が低下する原理を活用している。そのため、初めに死後のインピーダンス値の変化を確認した (Fig. 18)。また、電気は温度に影響を受けるため、温度の影響も確認した (Table 6)。そして、死後の経過時間と温度を統一し、インピーダンス値と脂肪量との関係を確認したところ、時間毎に有意な相関が認められたため (Fig. 19)、「鮮度」「温度」を統一することでインピーダンス法を用いた脂肪量測定が可能になると結論づけた。単周波で最も脂肪量との相関が高かったのは高周波の 100 kHz で低周波では相関が低かったが、重回帰解析の結果、第 1 因子には 100 kHz、第 2 因子には死後の経過時間が短い場合 (4 時間から 48 時間) は 5 kHz、経過時間が長い場合 (72 時間後) では 20 kHz となった。低周波は鮮度の影響を反映するため、この低周波に時間の補正的役割があると推察した。そのため、低周波と高周波のインピーダンスを組み合わせる多周波方式により脂肪量推定精度を向上させることができたと考える。高精度あるいは時間的制約を解除する検量線のためには、周波数の組み合わせや多周波インピーダンスの比や差などさらなる検討・解析が必要と考える。

なお、本研究の結果により、インピーダンス法

を用いた脂質の簡易測定装置は魚用品質状態判別装置（大和製衡社製，DFA100）として市販されることになった。今後、脂肪量を客観的な数値として管理することで、脂肪量を売りにしたブランド魚の開発が期待される。

第4章では、第3章と同じインピーダンス法を用いてブリのヤケ肉を非破壊で判定する技術を検討した。初めに30℃加熱したブリでは細胞膜の損傷を表す Cole-Cole プロットの円弧の収縮を確認した (Fig. 22)。この加熱魚では100 kHz に対する20 kHz のインピーダンス比の低下が確認された (Fig. 23)。そこで、魚用品質状態判別装置（大和製衡社製，DFA100）を用いて30℃加熱肉を測定したところ、同じく100 kHz に対する20 kHz のインピーダンス比の低下を確認した (Fig. 24)。そのため、実際のヤケ肉に近い状態、すなわち脊椎骨付近のみにヤケ肉を発生させ、インピーダンス法による判定を試みた。脊椎骨付近のみにヤケ肉を発生させたブリを作製するために取上げ後の常温保管時間を変えたところ、ヤケ肉は常温保管時間に関係なく、10分間の短い時間でも発生した。取上げ時の乳酸量は個体差が大きいことが考えられたため、次の取上げからは強制運動を課した。2度目(8月11日)の取上げ時の気温は29.2℃あり、脊椎骨周辺にヤケ肉が発生している状態となったが、3度目(9月8日)の取上げでは気温が25.5℃となり、ヤケ肉が発生している状態とはならなかった。このことは、これまで報告のあったヤケ肉が発生する温度と一致するものであった。^{111,123)} Ca-ATPase 活性が異なるブリについて接触型電極と挿入型電極を用いてインピーダンスを測定したところ、接触型電極のインピーダンス比は1.58-1.98、挿入型電極では1.10-1.97となった。接触型電極のインピーダンス比はCa-ATPase 活性と関係なく高かったことから、細胞膜が健全な部位（体表側）が反映されたと推察されたが、挿入型電極によるインピーダンス比はヤケ肉が発生している部位を直接測定し、ヤケ肉の状態を反映したためと考える。ヤケ肉は軽度なものから重度なものまで連続的であり、今後、インピーダンス比と

熟練した専門家による評価とをつき合わせる必要があると考えるが、魚体に傷をつけ電極を差し込むことは現在のブリの流通体制では実用的でない。

しかしながら、この技術は養殖クロマグロで応用可能と考える。マグロ類は動脈と静脈が近接して存在する奇網構造があり、養殖現場では胸鰭下を浅く(2~3 cm)切り、動・静脈血管を傷つける血抜き処理が行われている。¹⁰⁸⁾ このため、今回用いた挿入型電極を差し込める切口が存在する。実際、養殖場では魚体中心温度を確認するために血抜きの切口から芯温計が入れられ、温度が測定されている。魚体の中心温度測定は品質管理の一環と考えられ、商品の傷としての認識はされない。なお、マグロでは魚体に芯温計が差し込まれても支障がないのは、血合筋の入り方と商品としての血合筋の扱いが異なるためである。ブリの血合筋は体表付近にあり商品として消費者に提供されるが、マグロの血合筋は深部にも存在し、⁶¹⁾ 芯温計が差し込まれる部位は血合筋で、血合筋は流通の段階で除去され消費者に提供されることはない。クロマグロのヤケ肉は血合筋でも起こることが確認されており、¹²⁰⁾ インピーダンス法を用いたヤケ肉判定は養殖クロマグロで応用されることが期待される。

以上により、養殖ブリの血合筋褐変の発生および進行の機序が明らかとなり、褐変を促進あるいは抑制する要因が判明した。褐変の発生はpHの低下が引き金となっていた。pHの低下は乳酸の生成により引き起こされるため、乳酸の生成を抑制するためには解糖系酵素活性の制御が重要である。解糖系酵素活性は水温や給餌が関係しているが、現状の流通では夏期の温度管理が不十分でpH低下が起きていると考えられた。現在、長崎県内では、ブリ養殖と併せてクロマグロを養殖する業者が増えている。クロマグロ養殖では、ヤケ肉発生を防止するために、取上げ時には電気ショックにより鎮静化させ、延髄および脊椎神経を破壊する即殺が行われ、さらにシャーベット氷を用いて魚体温を急速に下げる取組が行われている。¹⁰⁸⁾ 即

殺、神経締めによりグリコーゲンの消費を抑え、取上げ時の冷やし込みにより解糖系酵素の活性を低下させることが、夏期のブリ血合筋の褐変抑制に繋がると考える。

次に、褐変の進行はリン脂質の酸化が影響したことから、褐変抑制のためにはミオグロビンのメト化とリン脂質の酸化を抑える必要がある。褐変の進行が速い冬期や産卵後の血合筋では抗酸化力が低下したため、この時期はさらなる飼料の改良が望まれる。これまでの飼料は養殖魚の成長や健全性、経済性が主な課題とされてきたが、本研究では短期間の仕上げ給餌が褐変抑制に効果を挙げることが明らかとなった。さらに、季節により褐変の進行性や血合筋の抗酸化物量が異なることが明らかとなった。これらのことから、今後は、季節毎に褐変を抑制するために必要な抗酸化物の添加量や褐変抑制に効果的な抗酸化物の検討が必要になると考える。この2つの取組により養殖ブリの品質が向上し、夏期の需要が増し、周年出荷が見込まれるようになると思う。

周年出荷により新たな課題となるのが脂肪量の調整である。ブリは旬である冬期に脂肪量が増加しやすく、産卵後の夏期は脂肪量が低下しやすい。そのため、本研究の成果による魚用品質状態判別装置（大和製衡社製、DFA100）が品質管理に役立つと考える。長崎県では適度な脂肪量を売りにした「びわ茶ブリ」などのブランド化が進められ、脂肪量を測定する取組が始まっている。「びわ茶ブリ」は大手量販店との契約が整い、今後さらなる増産が求められている。脂肪量を測定することで求められている品質がより明確になる。つまり、品質を評価することにより、養殖ブリの品質は今以上に向上すると考えられる。

なお、夏期のブリ出荷ではヤケ肉の発生が懸念されることから、相対取引では出荷先との信頼関係を保つために、予定本数より数本多く出荷されることがある。ヤケ肉を発生したブリを出荷しないために、ヤケ肉を判定する技術が望まれている。本研究では、ブリのヤケ肉を判定する可能性が示唆されたものの、その方法は非破壊式ではなく、

すぐに実用化できる技術には至らなかった。しかしながら、この方法はマグロのヤケ肉判定技術として期待される。単価の高いクロマグロのヤケ肉は経済的損失が大きいため、ブリ以上にヤケ肉判定技術が望まれており、本研究を養殖クロマグロの現場に転用するさらなる研究が期待される。

謝 辞

本研究は、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 村田昌一 教授のご指導、ご鞭撻の下に行われたもので、ここに深甚なる謝意を表す。また、本論文のご高閲を賜った同研究科 橘勝康教授、長富潔 教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に際して、細部にわたり直接ご指導を賜った長崎県総合水産試験場水産加工開発指導センター科長 桑原浩一博士 に深謝する。また、多大なるご教示を賜った長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科准教授 谷山茂人博士ならびに大和製衡株式会社 岡部修一係長に心より謝意を表す。

本研究にご理解頂き、良い研究機会および環境を与えてくださった元長崎県総合水産試験場長 藤井明彦博士、前長崎県総合水産試験場長 柳村智彦氏、長崎県総合水産試験場 長嶋寛治氏、長崎県総合水産試験場水産加工開発指導センター元所長 川口和宏氏、前所長 居村憲昭氏、所長 山下隆広氏に心からお礼申し上げます。

供試魚の飼育ならびに試料の採取に快くご協力くださった長崎県内のブリ養殖業者、長崎県総合水産試験場養殖技術科、長崎県各水産業普及指導センター各施設の職員の皆様に厚くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、種々のご協力、ご配慮を頂いた水産加工開発指導センター各位、特に大島育子氏に感謝する。

文 献

- 1) 平成 24 年度水産白書. 水産庁. 東京. 2012.
- 2) 平成 25 年度水産白書. 水産庁. 東京. 2013.
- 3) 農林水産省大臣官房統計部. 平成 28 年漁業・養殖業生産統計年報. 農林水産省大臣官房統計部, 東京, 2016.
- 4) 宮下盛. ブリ・ハマチ, 「海産魚の養殖」(熊井英水編), 湊文社, 東京. 2000; 52-77.
- 5) 濱田英嗣. 流通. 「養殖魚の価格と品質」(平山和次編) 恒星社厚生閣, 東京. 1990; 14-23.
- 6) 萩原珍吉, 能勢健嗣, 竹田正彦, 池田静徳, 渡辺武, 示野貞夫, 青江弘, 北村佐三郎. 「魚類の栄養と飼料」(萩原珍吉編), 恒星社厚生閣, 東京. 1980.
- 7) 佐藤公一, 舞田正志, 若月彰, 松田晋一. エクストルーダー飼料および生餌飼料を給与したブリ成魚の成長および飼料効率. 水産増殖 2003; **51**: 343-348.
- 8) 食料・農業・農村および水産業に関する意識・意向調査. 農林水産省. 東京. 2014
- 9) 永田致治. 食肉および食肉製品の色と変色「食品の変色の化学」(木村進, 中林敏郎, 加藤博通編), 光琳, 東京. 1995; 385-407.
- 10) Sano Y, Hashimoto K. Studies on the discoloration in fish meat during freezing storage-I. A spectrophotometric method for the simultaneous determination of ferrous and ferric forms of myoglobin in their mixed solution. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1958; doi:10.2331/suisan.24.519 (in Japanese with English abstract)
- 11) Matsuura F, Hashimoto K, Kikawada S, Yamaguchi K. Studies on the autoxidation velocity of fish myoglobin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1962; doi:10.2331/suisan.28.210 (in Japanese with English abstract)
- 12) 木村郁夫. 生体内エネルギー物質 ATP はタンパク質を変性するー水産物高品質化への応用ー. 冷凍 2017; **92**: 10-14.
- 13) Bito M, Honma S. Studies on the retention of meat color of frozen tuna-IV. Acceleration of discoloration of tuna meat by freezing and its relation to storage temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1967; doi:10.2331/suisan.33.33 (in Japanese with English abstract)
- 14) 遊佐敬介. 過酸化物によるミオグロビンの酸化反応の解析. 博士論文. 東北大学. 宮城. 1987.
- 15) Ochiai Y, Chow CJ, Watabe S, Hashimoto K. Evaluation of tuna meat discoloration by hunter color difference scale. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; doi:10.2331/suisan.54.649
- 16) 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.
- 17) 大山憲一, 棚野元秀, 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.
- 18) Fukada H, Hashiguchi T, Kashiwagi T, Seno A, Takakuwa F, Morioka K, Sawamura M, Masumoto T. Effects of yuzu juice-supplemented diets on prevention of dark muscle discoloration during storage in yellowtail *Seriola quinqueradiata* and detection of yuzu flavor components in fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2010; doi:10.2331/suisan.76.678 (in Japanese with English abstract)
- 19) Fukada H, Matsuura T, Takahashi N, Masumoto T. Validating the effects of dietary yuzu-paste supplementation on growth and prevention of discoloration and lipid oxidation in dark muscle in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2014; doi:10.2331/suisan.80.769 (in Japanese with English abstract)
- 20) 深田陽久. 柑橘類(ユズ)を用いた!“香る”養殖ブリの開発. 化学と生物 2016; **54**: 294-297.
- 21) Yamashita Y, Suzuki T, Hara T, Imamura S,

- Hossain AH, Yabu T, Touhata K, Yamahita M. Prevention of metmyoglobin formation in the red muscles of the yellowtail by intravenous injection of the selenium-containing antioxidant selenoneine. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2013; doi:10.2331/suisan.79.863 (in Japanese with English abstract)
- 22) Liang J, Xiao N, Tani W, Yoshida A, Arai H, Takeshita S, Hamada Y, Murata M, Taniyama S, Tachibana K. A comparison of the color change of dark muscle in cultured *Seriola Cuvier* (yellowtail, greater amberjack and goldstriped amberjack) during storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2013; doi:10.2331/suisan.79.416 (in Japanese with English abstract)
- 23) Morioka K, Ohnishi K, Itoh Y. Comparison of discoloration of dark muscle between cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* and amberjack *Seriola dumerili* during chilled storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2013; doi:10.2331/suisan.79.1009 (in Japanese with English abstract)
- 24) Terayama M, Yamanaka H. Effects of bleeding on the quality of skipjack. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2000; doi:10.2331/suisan.66.852 (in Japanese with English abstract)
- 25) Inohara K, Kurogi S, Onoue Y, Hamada M, Tamotsu S, Kimura I. Suppressive effect of ATP contained in muscle on the browning of amberjack *Seriola dumerili* dark muscle during frozen storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2014; doi:10.2331/suisan.80.965 (in Japanese with English abstract)
- 26) Inohara K, Onoue Y, Kimura I. Method of measuring the ratio of metmyoglobin formation in fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2015; doi:10.2331/suisan.81.456 (in Japanese with English abstract)
- 27) 中川平介. ブリ. 「養殖魚の価格と品質」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1990; 38-47.
- 28) 杉山 純一, 小川 幸春. メロンの糖度分布の3次元可視化. 日本食品科学工学会誌 2001; 48: 263-267.
- 29) 清川智之, 井岡久. ポータブル型近赤外分光分析装置によるマアジ, アカムツ脂質含有量の非破壊測定とその活用事例. 島根県水産技術センター研究報告 2007; 11-17.
- 30) Hirose A, Yoshitake M, Onodera J, Ooba K, Sakakibara T, Ito A, Ashida S, Shiina Y. Measurement of fat content of cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* by near-infrared spectroscopy. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2016; doi:10.2331/suisan.82.753 (in Japanese with English abstract)
- 31) 岡部修一. 肥満の管理と生体電気インピーダンス法. 設計工学 2003; 38: 465-470.
- 32) 坂口守彦, 高橋繁, 加藤宏郎. 電氣的のセンサ. 「魚介類の鮮度判定と品質保持」(渡邊悦生編) 恒星社厚生閣, 東京. 1995; 44-51.
- 33) 小長谷史郎. 鮮魚と冷凍品の鑑別. 「水産食品の鑑別」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1979; 93-112.
- 34) Arihara K, Itoh M, Kondo Y. Quantification of NADH-cytochrome *b*₅ reductase (metmyoglobin-reducing enzyme) in bovine skeletal muscle by an immunoblotting assay. *Anim. Sci. Technol.* 1997; 68: 29-33.
- 35) Nakamura Y, Ando M, Seoka M, Kawasaki K, Sawada Y, Miyashita S, Okada T, Kumai H, Tsukamasa Y. Effect of fasting on physical/chemical properties of ordinary muscles in full-cycle cultured pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* during chilled storage. *Fish. Sci.* 2006; 72: 1079-1085.
- 36) Oshima T, Wada S, Koizumi C. Influences of Heme pigment, Non-Heme iron, and nitrite on lipid oxidation in cooked mackerel meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1988; doi:10.2331/suisan.54.2165 (in Japanese with

- English abstract)
- 37) Sohn JH, Taki Y, Ushio H, Kohata T, Shioya I, Ohshima T. Lipid oxidations in ordinary and dark muscles of fish: influences on rancid off-odor development and color darkening of yellowtail flesh during ice storage. *J. Food Sci.* 2005, **70**, 490-496.
- 38) Thiansilakul Y, Benjakul S, Richards MP. Effect of myoglobin from eastern little tuna muscle on lipid oxidation of washed asian seabass mince at different pH conditions. *J. Food Sci.* 2011, **76**, 242-249.
- 39) Faustman C, Sun Q, Mancini R, Suman SP. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* 2010, **86**, 86-94
- 40) Bao HND, Shinomiya Y, Ikeda H, Ohshima T. Preventing discoloration and lipid oxidation in dark muscle of yellowtail by feeding an extract prepared from mushroom (*Flammulina velutipes*) cultured medium. *Aquaculture* 2009, **295**, 243-249
- 41) Seno-o A, Takakuwa F, Hashiguchi T, Morioka K, Masumoto T, Fukada H. Replacement of dietary fish oil with olive oil in young yellowtail *Seriola quinqueradiata*: effects on growth, muscular fatty acid composition and prevention of dark muscle discoloration during refrigerated storage. *Fish Sci.* 2008; **74**: 1297-1306.
- 42) Baron CP, Andersen HJ. Myoglobin-Induced Lipid Oxidation. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**, 3887-3897.
- 43) Hata K, Yokoyama I, Sudo M, Hata M, Matsuda K. Purification and properties of glycogen phosphorylase from the adductor muscle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1987; **87B**: 747-753.
- 44) 垂井清一郎, 河野典夫. 高等動物のホスホフルクトキナーゼ, 「エネルギー代謝と生体酸化(上)」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京. 1976; 132-138.
- 45) Moon TW, Johnston IA. Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic Enzymes in Skeletal Muscles and Liver of the Plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp. Physiol.* 1980; **136**: 31-38.
- 46) Johnston IA, Goldspink G. Quantitative studies of muscle glycogen utilization during sustained swimming in crucian carp (*Carassius carassius* L.). *J. Exp. Biol.* 1973; **59**: 607-615.
- 47) Vassalt A. *Methods of enzymatic analysis Vol. III.* Bergmeyer H.U. (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 1987; 118-126.
- 48) 尾藤方通. メトミオグロビンの測定, 主としてマグロ肉について. 「水産生物化学・食品学実験書」(斉藤恒行, 内山均, 梅本滋, 河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, 1974; 275-280.
- 49) Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; **37**: 911-917.
- 50) Ito D, Takahashi K, Okazaki E, Asada J, Saito H, Osako K. Changes in lipid characteristics of mullet *Mugil cephalus* roe during processing to *Karasumi* product. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2015; doi:10.2331/suisan.81.115 (in Japanese with English abstract)
- 51) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol Chem.* 1949; **177**: 751-766.
- 52) Misaka N, Mizuno S, Miyakoshi Y, Takeuchi K, Takami T, Kasahara N. Changes of triglyceride and glycogen levels in the liver of underyearling masu salmon *Oncorhynchus masou* during starvation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2004; doi:10.2331/suisan.70.168 (in Japanese with English abstract)
- 53) Hohorst HJ. L-(+)-Lactate. Determination with lactic dehydrogenase and DPN. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. 1965; 266-270.

- 54) Igisu H, Dohnao T, Takeya Y. Enzymatic determination of lactate in capillary blood. *J. Health Sci.* 1981; **3**: 127-131.
- 55) 角田聖齊, 内山均. メト化率によるマグロの肉色判定法の改良, 「魚の低温貯蔵と品質評価法」(小泉千秋編), 恒星社厚生閣, 東京. 1986; 60-65.
- 56) Imai H, Arai Z. Hydrolysis of 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane and spectrophotometric determination of its product, malondialdehyde. *Bunseki Kagaku* 1991; doi:10.2116/bunsekikagaku.40.3_143 (in Japanese with English abstract)
- 57) 桜井民子, 島崎弘幸. 生体内過酸化脂質の測定 (1). *化学と生物* 1992; **30**: 604-607.
- 58) 柳井久江. 「4Steps エクセル統計 (第3版)」オーエムエス出版, 埼玉. 2011.
- 59) 塚本勝巳. 魚類の遊泳運動: 水中への適応. *比較生理生化学* 1993; **10**: 249-262.
- 60) 池田静徳. 炭水化物・有機酸, 「魚介類の微量成分」(池田静徳編), 恒星社厚生閣, 東京. 1981; 52-80.
- 61) 魚介類筋肉の主要成分「水産食品学」(須山三千三, 鴻巣章二編), 恒星社厚生閣, 東京. 1987; 14-70.
- 62) 佃信夫. 多獲性赤身魚の脂質. *日本食品工業学会誌* 1980; **27**: 210-219.
- 63) 石永正隆. 生体膜リン脂質に対する環境因子の影響に関する研究. *日本農芸化学誌* 1987; **61**: 1255-1266.
- 64) 河野望, 新井洋由. ビタミンE特異的輸送タンパク質 α -TTPによる体内ビタミンEレベルの制御. *生化学* 2014; **86**: 232-241.
- 65) Sugii K, Kinumaki T. Distribution of Vitamin E in a Few Species of Fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1968; doi:10.2331/suisan.34.420 (in Japanese with English abstract)
- 66) Sekiya T, Murata H, Sakai T, Yamauchi K, Endo M, Shimomura T, Ugawa M. Effects of Dietary Fish Meal Qualities on 2-Thiobarbituric Acid Values and α -Tocopherol Contents of Yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1994; doi:10.2331/suisan.60.505 (in Japanese with English abstract)
- 67) Arakawa T, Ishizaki Y, Chuda H, Shimizu K, Arimoto M, Takeuchi T. Comparison of lipid classes and fatty acid compositions between hatchery reared and wild caught yellowtail *Seriola quinqueradiata* juvenile. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2002; doi:10.2331/suisan.68.374 (in Japanese with English abstract)
- 68) 船山恵一, 牛尾芳雄, 友松俊夫. マサバの脂肪酸組成およびトコフェロール含量の季節的変動. *東京都立衛生研究所研究年報* 1989; **40**: 209-213.
- 69) Ikeda S, Sato M, Kimura R. Biochemical studies on L-ascorbic acid in aquatic animals-II. Distribution in various parts of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1963; doi:10.2331/suisan.29.765 (in Japanese with English abstract)
- 70) 村田晃. ビタミンCの多様な作用と作用機作. *日本農芸化学誌* 1990; **64**: 1843-1845.
- 71) Nagasaka R, Kazama T, Ushio H, Sakamoto H, Sakamoto K. Effects of γ -oryzanol supplementation to diet including astaxanthin on discoloration of yellowtail flesh. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2011; doi:10.2331/suisan.77.1101 (in Japanese with English abstract)
- 72) 五十嵐修. ビタミンE, 「ビタミン分析法」(日本ビタミン学会編), 化学同人, 東京 1989; 27-36.
- 73) 小高要. ビタミン, 「五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル」(安本教傳, 竹内昌昭, 安井明美, 渡邊智子編), 建帛社, 東京 2006; 79-135.
- 74) 魚類養殖対策調査事業報告書〔高品質配合飼料開発試験〕, 社団法人日本養魚飼料協会他, 東京. 2015; 191-248.
- 75) 新井洋由, 井上圭三. ビタミンE特異的輸送タンパク質. *ファルマシア* 1993; **29**: 1009-1013.

- 76) 飼料および飼料添加物の成分規格等に関する省令（平成 29 年 1 月 26 日）農林水産省令第 7 号。農林水産大臣，東京。2017。
- 77) 特集・大豆関連商品の市場動向-ビタミン E 大豆搾油の減少で国内原料はひっ迫。油脂 2011; 64: 20-23.
- 78) Sakaguchi H, Hamaguchi A. Influence of oxidized oil and vitamin E on the culture of yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1969; doi:10.2331/suisan.35.1207 (in Japanese with English abstract)
- 79) 渡辺剛幸，細川秀毅，本木喜隆，示野貞夫。アスコルビン酸-2-グルコシドおよびアスコルビン酸-2-リン酸の安定性。水産増殖 1996; 44: 369-373.
- 80) Sakai T, Maetsu S, Murata H, Ugawa M. Hydrolyzing enzyme activity of L-Ascorbyl-2-monophosphate magnesium salt in yellowtail tissues. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1999; doi:10.2331/suisan.65.1102 (in Japanese with English abstract)
- 81) Matsumiya M, Otake S. The relation between seasonal variation of diamine oxidase activity and chemical composition of common mackerel *Scomber japonicas*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1999; doi:10.2331/suisan.65.1102 (in Japanese with English abstract)
- 82) 示野貞夫，四方崇文，細川秀毅。ハマチ肝臓の糖代謝酵素活性および脂質含有量の季節変化。水産増殖 1992; 40: 201-206.
- 83) 示野貞夫，四方崇文，細川秀毅。ブリ肝臓における解糖中間体およびヌクレオチド含量の動態ならびに phosphofructokinase 活性への関与。水産増殖 1993; 41: 535-539.
- 84) Okamoto M, Saito H. Examination of handling procedures of japanese spanish mackerel *Scomberomorus niphonius* caught by shipboard angling. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2011; doi:10.2331/suisan.77.1083 (in Japanese with English abstract)
- 85) 三津本充，小沢忍，三橋忠由，河野幸雄，原田武典，藤田浩三，小出和之。黒毛和種去勢牛への屠殺前 4 週間のビタミン E 投与による展示中の牛肉色と脂質安定化。日本畜産学会報 1995; 66: 962-968.
- 86) 栗木隆吉，泉本勝利，宮本拓。ジャージー種雌牛へのビタミン E の給与が肉食安定性に及ぼす影響。日本畜産学会報 2000; 71: 264-269.
- 87) Okamoto A, Hamada Y, Miura K, Nonaka T, Kuwahara K, Ohsako K, Mishima T, Tachibana K. Influence of killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2006; doi:10.2331/suisan.72.918 (in Japanese with English abstract)
- 88) Harada K. Analysis of quick refrigeration methods to maintain the freshness of fish caught by offshore trawl fisheries in the western part of the Sea of Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2006; doi:10.2331/suisan.72.440 (in Japanese with English abstract)
- 89) 井岡久。トレーサビリティシステムを活用した地域水産物のブランド化について。日本水産学会誌 2006; 72: 972-973.
- 90) 久保久美子，古賀恵実，松本欣弘，桑原浩一。簡易測定器による非破壊での養殖クロマグロ肉の脂肪量推定の可能性。長崎県水産試験場研究報告 2014; 40: 21-27.
- 91) 平成 27 年度スーパーマーケット白書。一般社団法人新日本スーパーマーケット協会，東京。2015; 40-54.
- 92) Yamauchi S, Sawada T, Kawano S. Nondestructive determination of fat content in frozen skipjack by near infrared (NIR) spectroscopy with fiber optics in intercalance mode. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1999; doi:10.2331/suisan.65.747 (in Japanese with English abstract)
- 93) Shimamoto J, Hasegawa K, Fujii H, Kawano S.

- Fat distribution in albacore and nondestructive determination of the fat content by near infrared (NIR) spectroscopy. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2000; doi:10.2331/suisan.66.1059 (in Japanese with English abstract)
- 94) Shimamoto J, Hasegawa K, Ide K, Kawano S. Nondestructive determination of the fat content in raw and frozen horse mackerel by near infrared spectroscopy. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2001; doi:10.2331/suisan.67.717 (in Japanese with English abstract)
- 95) 水田祥代, 山内健. BIA の原理と臨床応用. 医学のあゆみ 2001; **198**: 981-985.
- 96) 田中喜代次, 中塘二三生, 大河原一憲, 増尾善久. 生体電気インピーダンス (BI) 法の有用性と利用限界. バイオメカニクス研究 2001; **5**: 91-101.
- 97) 酒本勝之, 金子和真, 江崎光裕, 藤井麻美子, 金井寛, 浅野次義. 電気インピーダンス法による新しい体脂肪量測定法. 医用電子と生体工学 1995; **33**: 2-9.
- 98) 杉山純一. 食品の電気的特性と品質評価 (その1). 日本食品工業学会誌 1988; **35**: 647-653.
- 99) 杉山純一. 食品の電気的特性と品質評価 (その2). 日本食品工業学会 1988; **35**: 717-722.
- 100) 加藤宏郎, 坂口守彦, 大井康之, 丸尾信, 豊田薫. インピーダンス特性による魚肉の鮮度判定(第1報). 農業機械学会誌 2000; **62**: 76-83.
- 101) 加藤宏郎, 坂口守彦, 大井康之, 丸尾信, 豊田薫. インピーダンス特性による魚肉の鮮度判定(第2報). 農業機械学会誌 2000; **62**: 59-69.
- 102) 石村貞夫, 石村友二郎. 重回帰分析. 「SPSS による多変量データ解析の手順 (第4版)」東京図書, 東京. 2011; 2-25.
- 103) Ochiai A, Nabeshima H, Umeda S, Hasegawa I. Gonad maturation and dynamics of crude lipid content in the body of yellowtail during the spawning season. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1980; doi:10.2331/suisan.46.407 (in Japanese with English abstract)
- 104) Jason AC, Richards JCS. The development of an electronic fish freshness meter. *J. Phys., E.* 1975; **8**: 621-708.
- 105) 岩本宗昭. 魚類の“生き”の保持に関する研究. 博士論文, 東京大学, 東京 1989.
- 106) Konagaya S, Konagaya T. Acid denaturation of myofibrillar protein as the main cause of formation of “yake-niku”, a spontaneously done meat, in red meat fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1979; doi:10.2331/suisan.45.245
- 107) 小長谷 史郎. 異常性状の魚肉:ジェリーミートとヤケ肉. 日本食品工業学会誌 1982; **29**: 379-388.
- 108) 前田俊道, 福島英登, 福田裕. 神経処理・脱血処理によるマグロ類ヤケ肉防止. 「生鮮マグロ類の高品質管理」(今野久仁彦, 落合芳博, 福田裕編) 恒星社厚生閣, 東京. 2010; 128-140.
- 109) Mora DA, Hamada Y, Okamoto A, Tateishi A, Tachibana K. Characteristics of burnt meat in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish Sci.* 2007; **73**: 651-659.
- 110) デイシー・アロヨ・モラ, 奥村史, 岡本昭, 濱田友貴, 三嶋敏雄, 新井博文, 橘勝康. 養殖ブリのヤケ肉発生に伴う ATPase 活性から見た筋原繊維タンパク質の変性について. 日本食品化学学会誌 2007; **14**: 7-11.
- 111) 肖寧, 谷山茂人, 石原光, 竹下哲史, 榎本六秀, 濱田友貴, 橘勝康. 養殖ブリのヤケ肉発生に伴う背部普通筋における α -アクチニンの変化. 日本食品化学学会誌 2010; **17**: 207-212.
- 112) 木宮隆, 岡崎恵美子, 平岡芳信. ヤケ肉の非破壊検出に向けた取り組み. 「生鮮マグロ類の高品質管理」(今野久仁彦, 落合芳博, 福田裕編) 恒星社厚生閣, 東京. 2010; 95-105.
- 113) 電気インピーダンス法と全身電気伝導率法.

- リチャード N. バウムガートナー.「身体組成研究の基礎と応用」(アレックス F. ロッシュ, スティーブン B. ハイムズフィールド, ティモシー G. ローマン編) 大修館書店, 東京. 2001; 91-118.
- 114) Bito M. Effect of pH on water-holding properties of frozen skipjack meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; doi:10.2331/suisan.44.163 (in Japanese with English abstract)
- 115) Katoh N, Nozaki H, Komatsu K, Arai K. A new method for evaluation of the quality of frozen surimi from alsaka pollack relationship between myofibrillar ATPase activity and kamaboko forming ability of frozen surimi. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1979; doi:10.2331/suisan.45.1027 (in Japanese with English abstract)
- 116) Yoshitomi B, Konno K. Enzymatic properties of myosin ATPase from squid *Todarodes pacificus* mantle muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; doi:10.2331/suisan.48.581 (in Japanese with English abstract)
- 117) 今泉鉄平, 村松良樹, 折笠貴寛, 濱中大介, 田中史彦, 内野敏剛, 田川彰男. イモ類およびダイコンの熱物性および電気的特性に及ぼす熱湯浸漬処理の影響. 日本食品科学工学会誌. 2014; **61**: 244-250.
- 118) 小谷幸敏, 石原幸雄, 石川哲. クロマグロ漁業の操業形態と肉質. 「生鮮マグロ類の高品質管理」(今野久仁彦, 落合芳博, 福田裕編) 恒星社厚生閣, 東京. 2010; 24-42.
- 119) 中山貴博, 大倉正嗣, 塩川隆, 佐藤等, 久留聡, 本吉慶史, 川井充. 筋ジストロフィー患者の骨格筋肉量測定. 筋ジストロフィー治療のエビデンス構築に関する臨床研究論文集. 新生社. 2008; 146-150.
- 120) Ochiaim Y. Changes in quality and denaturation of sarcoplasmic protein components in the burnt meat of bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2010; doi:10.2331/suisan.76.695 (in Japanese with English abstract)
- 121) Konno Y, Konno K. Myosin denaturation in “Burnt” bluefin tuna meat. *Fish Sci.* 2014; **80**: 381-388.
- 122) 安崎友季子, 瀧口明秀, 小林正三. 蓄養によるヒラメの疲労回復が死後硬直までの時間に及ぼす影響. 千葉水研研報 2004; 87-90.
- 123) Liang X, Yoshida A, Osatomi K, Wang Y, Cao MJ, Hara K. Degradation of myofibrils in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* burnt meat: effects of a myofibril-bound EDTA-sensitive protease. *Fish Sci.* 2012; **78**: 147-153.
- 124) 宮崎里帆, 石原光, 宮崎貴美子, 濱田友貴, 平坂勝也, 橘勝康, 谷山茂人. 長崎県産養殖クロマグロの普通筋の肉質に及ぼす体格組成の影響. 水産増殖 2015; **63**: 373-379.
- 125) 宮崎里帆. 魚類のヤケ肉発生に伴う筋内膜の変化と強制運動を用いたヤケ肉発生防止に関する研究. 博士論文. 長崎大学. 長崎. 2016.