

博士論文

鹿児島県産魚類及び水産加工品の品質向上に関する技術開発研究

鹿児島大学

保 聖子

2017

目次

英文要旨	I
和文要旨	III

緒言	1
----	-------	---

第1章 ゴマサバの短期蓄養によるストレス回復効果と体成分の変化

緒言	5
----	-------	---

材料および方法

蓄養ゴマサバ氷蔵流通品の品質評価用サンプル	6
-----------------------	-------	---

漁獲ストレス負荷方法と短期蓄養によるストレス回復試験	6
----------------------------	-------	---

蓄養モデル試験	8
---------	-------	---

蓄養実用規模試験	8
----------	-------	---

肥満度の測定	8
--------	-------	---

内臓重量及び肝臓重量の測定	9
---------------	-------	---

血漿成分分析	9
--------	-------	---

筋肉の乳酸, 肝臓グリコーゲンおよび ATP とその関連物質濃度の分析	9
-------------------------------------	-------	---

筋肉の圧縮弾性強度	10
-----------	-------	----

筋肉成分試料の調製	10
-----------	-------	----

筋肉成分分析	10
--------	-------	----

統計処理	11
------	-------	----

結果

ゴマサバ氷蔵流通品の品質評価	11
----------------	-------	----

強制運動後の蓄養による血漿コルチゾル濃度の変化	13
-------------------------	-------	----

強制運動後の蓄養による筋肉 ATP 濃度の変化	14
-------------------------	-------	----

強制運動後の蓄養による筋肉乳酸濃度の変化	15
----------------------	-------	----

強制運動後の蓄養による肝臓グリコーゲン濃度の変化	16
--------------------------	-------	----

蓄養期間における肥満度の変化	17
蓄養期間における内臓重量比，肝臓重量比の変化	18
蓄養期間における血漿成分の変化	20
蓄養期間における筋肉物性の変化	21
蓄養期間における筋肉成分の変化	22
考察	25

第2章 イワシ類稚仔魚の冷蔵保存中のタンパク質の溶解

緒言	28
----	----

材料と方法

シラス試料	28
シラス魚体のタンパク質分解の測定	29
遊離アミノ酸分析	29
プロテアーゼ活性の測定	29
プロテアーゼ阻害スペクトルの測定	30
SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法によるシラスタンパク質の測定	31
タンパク質濃度の測定	31
魚体 pH の測定	31
統計処理	31

結果

冷蔵したシラスのタンパク質分解	31
冷蔵保存中の遊離アミノ酸量の変化	33
シラス冷蔵保存中のプロテアーゼ活性の変化	35
粗酵素の保存中におけるプロテアーゼ活性の変化	36
粗酵素の保存中のタンパク質の消長変化	38

粗酵素プロテアーゼ活性の阻害スペクトル	39
考察	42

第3章 うるめいわし丸干への柑橘精油添加による

ヒスタミン蓄積抑制効果

緒言	46
材料および方法	
丸干製造工場でのサンプリング	47
ヒスタミン (Hm) 蓄積量の測定	47
水分量と塩分濃度の測定	48
丸干製造モデル試験	48
供試魚	48
丸干の試作	48
好塩性細菌数, Hm 生成菌数および Hm 蓄積量の測定	48
塩分濃度と水分活性の測定	49
試作丸干からの Hm 生成菌の分離	49
Hm 生成菌の簡易同定	49
Hm 生成菌の増殖温度依存性	50
丸干から分離した Hm 生成菌のウルメイワシ肉への接種試験	50
柑橘精油	50
Hm 生成菌に対する柑橘精油の増殖抑制試験	51
Hm 生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素 (hdc) に対する柑橘精油の阻害作用測定	51
hdc 粗酵素液の調製	51
hdc 活性阻害反応試験	51

柑橘精油による Hm 蓄積抑制実証試験	52
統計処理	52
結果	
加工工程ごとの Hm 蓄積実態調査	52
乾燥工程による好塩性細菌数, Hm 生成菌数, Hm 蓄積量, 塩分濃度 および水分活性の変化	54
試作丸干の Hm 生成菌の簡易同定	56
丸干から分離した Hm 生成菌の増殖温度依存性	56
試作丸干から分離した Hm 生成菌のウルメイワシ肉への接種試験	57
丸干から分離した Hm 生成菌に対する柑橘精油の増殖抑制効果検証	57
丸干から分離した Hm 生成菌の hdc に対する柑橘精油の活性阻害	58
実証化試験	58
考察	59
第4章 総括	
総括	62
文献	68
謝辞	75

略語リスト

ATP : アデノシン 3 リン酸

HPLC : 高速液体クロマトグラフ

HACCP : 危害要因分析管理点

Hm : ヒスタミン

hdc : ヒスチジン脱炭酸酵素

Tris : トリスヒドロキシメチルアミノメタン

List of Figures

- Fig. 1** Changes in plasma cortisol concentration after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. 13
- Fig. 2** Changes in ATP concentration in muscle after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. 14
- Fig. 3** Effect of resting time on ATP concentration in muscle at time of death and after storage at 5°C for 6 h. 14
- Fig. 4** Changes in lactate concentration in muscle after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. 15
- Fig. 5** Changes in glycogen concentration in liver after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. 16
- Fig. 6** Changes in condition factor during short-term rearing. Sampling were done (a) at 2008 in October,(b) at 2015 in September. 17
- Fig. 7** Changes in visceral weight rate during short-term rearing. Sampling were done (a) at 2008 in October,(b) at 2015 in September. 18
- Fig. 8** Changes in liver weight rate during short-term rearing 19

Fig. 9 Changes in triglyceride concentration in plasma during short-term rearing.	20
Fig. 10 Changes in glucose concentration in plasma during short-term rearing.	20
Fig. 11 Changes in elastic strength during short-term rearing.	21
Fig. 12 Changes in moisture and crude fat concentration in muscle during short-term rearing. open circles; moisture. closed circles; fat	22
Fig. 13 Changes in protein concentration in muscle during short-term rearing.	23
Fig. 14 Changes in total free amino acid mass in muscle during short-term rearing.	23
Fig. 15 Changes in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of juvenile sardines during cold storage.	32
Fig. 16 Effect of postmortem temperature on the autolysis of juvenile sardines measured with the total free amino acids concentration.	34

Fig. 17 Effect of press-treatment of juvenile sardines on the autolysis measured with the total free amino acids concentration.	34
Fig. 18 Changes in total proteases activity of whole juvenile sardines during cold storage.	35
Fig. 19 Effect of frozen-treatment of juvenile sardines on the changes in total proteases activity during storage at 0°C.	37
Fig. 20 Effect of heat treatment of crude enzyme solution on the total proteases activity.	37
Fig. 21 Effect of heat treatment on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of crude extracts from juvenile sardines.	38
Fig. 22 Inhibition of total proteases activity of crude enzyme extracted from juvenile sardines by Antipain.	41
Fig. 23 Histamine content in fish on the each process of producing dried whole red-eye round herring.	53
Fig. 24 Effect of drying process time on the growth of halophilic bacteria.	55

Fig. 25 Effect of drying process time on the growth of histamine-producing bacteria. 55

Fig. 26 Effect of drying process time on the histamine accumulation in dried whole red-eye round herring. 55

Fig. 27 Effect of temperature on the growth of histamine-producing bacteria. 56

Fig. 28 Effect of citrus essential oil on the growth of histamine-producing bacteria. 57

Fig. 29 Effect of essential oil from pomelo treatment on histamine accumulation in dried whole red-eye round herring products. 58

List of Tables

Table 1 Contents of ATP and its related compounds in muscle stored at 5 °C for 9 h after death of captured spotted mackerel by a purse seine and fish that had recovered from capture stress by the resting in a fish cage for 72 h. . . 12

Table 2 Elastic strength of muscle stored at 5 °C for 13 h after death of captured spotted mackerel by a purse seine and fish that had recovered from capture stress by the resting in a fish cage for 72 h. 12

Table 3 Changes in concentration of free amino acids in muscle during short-term rearing. 24

Table 4 Inhibition spectrum of proteases activity of crude extract from juvenile sardines. 41

Table 5 Moisture and Salinity of fish on process dried whole red-eye round herring. 53

Table 6 Salinity and Water activity of fish on process dried whole red-eye round herring. 54

ABSTRACT

Activation of fishery industry in Kagoshima prefecture has been ranked as an extremely important issue. I have investigated the following important technical subjects on fishery food processing and distribution.

1) Recovery from stress and changes in body composition of spotted mackerel by briefly testing in a fish cage

Spotted mackerel caught in purse seines in Kagoshima are commonly rested for a few days in fish cages. They are then killed instantaneously and distributed in Kagoshima as high-quality sashimi (raw fish meat). To elucidate the effects of resting in a fish cage on the flesh quality of spotted mackerel caught by a purse seine, the muscle, blood and liver metabolites after exhaustive exercise by hauling with net were monitored. The concentrations of plasma cortisol in blood and lactate in muscle were increased by the exercise, and then decreased. The glycogen content in liver also recovered during resting. Then, I determined the acceptable period of time for which the fish could be rested unfed in fish cages while still maintaining their high quality as sashimi. To do this, I analyzed the condition factor, various body components such as plasma and muscle properties. Research data indicate that spotted mackerel can be rested unfed in fish cages for less than 15 days before their quality as sashimi products declines.

2) Postmortem autolysis of juvenile sardines during cold storage

Postmortem autolysis of juvenile sardines during cold storage is an obstacle to distribute juvenile sardines for consumption as raw fish. I investigated the changes in total protease activity and types of primary proteases in the whole body of juvenile sardines during cold storage and the effect of physical attrition and compression on the

body during fishing on its autolysis. The juvenile sardines pressed with plates by hand as a pressed fish model showed faster autolysis during cold storage. The total protease activity of body of juvenile sardines increased remarkably corresponding to the temperature during cold storage. Results of the protease inhibitory spectrum suggested that the activation of total proteases activity was caused by the autolysis of precursors of trypsin and chymotrypsin. Egg white also showed strong inhibitory activity for proteases of autolysis of juvenile sardines.

3) Suppression effect of essential oil from pomelo *Citrus grandis* on histamine accumulation in dried whole red-eye round herring(RRH), *Etrumeus teres*

Accumulated histamine in dried whole sardines causes an allergic symptoms of food poisoning. I investigated the processing method to depress histamine accumulation in it. A histamine-producing bacterium was isolated from dried whole RRH. The closest phylogenetic neighbor of this bacterial strain was *Photobacterium angustum*, which shares a 99.15% similarity based on 16S rRNA gene sequencing. An essential oil prepared from pomelo rind showed strong inhibition of growth of *P. angustum* isolated from dried whole RRH. Histamine accumulation was also strongly depressed in dried whole RRH by the addition of the essential oil to the brine used in the salting process. Application of this citrus essential oil therefore effectively suppresses histamine formation in whole dried sardines.

I expect that these research results contribute greatly to develop the fishery industry in Kagoshima.

和文要旨

鹿児島県は水産業の活性化を重要な取組みの一つに位置付けている。私は鹿児島県の水産物の加工・流通にかかわる以下の重要技術課題に取り組み、下記の成果を得た。

1) ゴマサバの短期蓄養によるストレス回復効果と体成分の変化

鹿児島県では、まき網で漁獲したゴマサバの一部を数日間絶食蓄養してストレスを回復させた後即殺し、死後硬直前の状態での刺身商品の流通が行われている。本研究ではまき網で漁獲されたゴマサバを短期蓄養した場合の品質に与える影響を検討するため、漁獲ストレスの影響とその回復条件について検証した。生け簀で 20 分間の強制運動をさせた後、72 時間蓄養し、代謝変化を測定した。強制運動により血漿コルチゾル濃度や筋肉乳酸濃度は上昇するが、蓄養により低下し、肝臓グリコーゲン濃度も回復した。一方、筋肉 ATP 濃度は、強制運動直後でも高い値を示し、蓄養による変化は認められなかった。次に、適正な蓄養期間を明らかにするために、肥満度及び血漿と筋肉の各成分や筋肉物性を指標として検討した。蓄養期間中、筋肉脂質量は変化しないが、筋肉タンパク質量は減少した。筋肉圧縮強度は蓄養 21 日まで維持した。蓄養 15 日まで肥満度は変化せず、それ以降で有意に減少した。無給餌でも 15 日程度の蓄養であれば、刺身商材としての価値を維持できることを確認した。

2) イワシ類稚仔魚の冷蔵保存中の自己消化

シラス（イワシ類稚仔魚）の冷蔵保存中に発生する自己消化について、魚体プロテアーゼ活性の経時変化やプロテアーゼの種類および漁獲時の魚体にかかる圧の影響を測定した。モデル試験で魚体に圧力を加えると冷蔵保存中の自己消化が促進した。また、冷蔵保存中には保存温度に依存してプロテアーゼ活性の上昇がみられ、その原因としてセリンプロテアーゼ（主にキモトリプシン）の酵素活性値が高くなることをプロテアーゼ阻害スベ

クトルから明らかにした。

3) うるめいわし丸干への柑橘精油添加によるヒスタミン蓄積抑制効果

イワシ類丸干の製造において蓄積されるヒスタミンはアレルギー食中毒の原因となるため、蓄積抑制方法の確立が必要である。ヒスタミン蓄積が認められたうるめいわし丸干から分離した細菌は、16 S rRNA 配列分析で 99.15% の相同性を示した *Photobacterium angustum* と同定された。柑橘の文旦の精油は丸干由来の *P.angustum* に対して増殖抑制作用を示した。うるめいわし丸干製造時の塩漬工程で柑橘精油を添加した結果、丸干のヒスタミンの蓄積が抑制された。うるめいわし丸干製造におけるヒスタミン蓄積を抑制する方法として柑橘精油の添加が有効であることを明らかにした。

以上に得られた研究成果は、鹿児島の水産業が抱える重要な技術課題を解決することに応用される基礎的な知見である。これらの研究成果は鹿児島の水産業の発展に大いに貢献することが期待される。

緒言

鹿児島県の漁業（養殖業を除く）生産量は平成 23 年の 97,921 トンをピークに年々減少し、平成 26 年は 83,277 トンとなった¹⁾。漁業生産額（養殖業を除く）も平成 23 年の 271 億円から平成 26 年の 256 億円¹⁾と減少傾向にあり鹿児島県の水産業界を取り巻く環境は厳しさを増している。こうしたなか、鹿児島県では平成 20 年に水産基本計画²⁾を策定し、水産業振興のための様々な取組を推進している。具体的には、消費者や実需者の多様なニーズに対応した流通機能の強化を図るために、生産者自らが関与する販売活動の取組への支援や漁業の 6 次産業化を推進し、他産品との差別化に繋がる付加価値の高い製品づくりの取組を促進している。また、水産物の競争力を強化し、海外輸出を視野に入れた HACCP 認定工場の推進など高度な品質衛生管理の導入を支援している。これに関連して、鹿児島県産水産物の品質や付加価値の向上に関する研究開発は主要な施策として位置付けられているところである。このようななか、漁業者においては漁獲物に新たな可能性を見出すための取組を、水産加工業者においては安全な水産物の供給を確立すると同時に海外に視野を向けた取組を始めている。本研究では、このような漁獲物に新たな価値を創出するための取組について、モデル試験を実施して科学的知見を収集し、その取組の内容を客観的に評価することで新たな視点でより収益性の高い事業の展開を図ることを目的とした。魚介類の鮮度・品質は致死前の生理状態、致死条件並びに貯蔵温度により大きく影響を受け、³⁻⁶⁾ その価格が変動する特徴を持つ。例えば、市場では硬直が進んでいない個体ほどセリでの評価が高い。⁷⁾ 本研究では、鹿児島県で漁獲される主要な魚種のうち、特に鮮度低下が速いゴマサバ *Scomber australasicus* 及びイワシ類の生鮮品と加工品の流通に関する技術課題を対象とした。

第 1 章ではゴマサバの付加価値向上を目的とした研究内容について報告する。平成 27 年度の農林水産統計⁸⁾によれば、鹿児島県のサバ類の生産量は 10,700 トンで、生産額はおよそ 12 億円であり平均単価は 115 円 /kg と安価である。利用目的別では、養殖用餌向けが最も比率が高く 77 % を占め、生鮮向けはわずか 6 % である。⁸⁾ このような状況のなか、生きたまま漁獲し水揚げ港近くの海面生け簀で数日間蓄養（短期蓄養）したのち一尾ずつ活けしめ処理を行うことにより、単価の高い鮮魚として流通する動きが見られるようになった。本研究では、品質を重視した取り組みとして全国的にも注目されている「ゴマサバの短期蓄養」について科学的に検証した。すなわち蓄養したゴマサバと通常の方法によってまき網で漁獲したゴマサバの品質の違いを比較し、蓄養したゴマサバを高品質魚として流通させるための漁獲方法、蓄養条件、活けしめ処置方法および流通条件など各工程の有効性を検証した。漁獲行為そのものが魚に様々なストレスを与えること⁹⁾やストレスからの回復は漁獲時の魚の動作強度や漁獲時間および魚種により異なるといった報告がある。¹⁰⁾ 本研究では、蓄養を目的として生かして捕獲する場合にゴマサバが受ける漁獲ストレスの影響とその後のストレス回復に及ぼす蓄養の効果を検証するために、漁獲現場で実際に行われている漁獲作業に模した揚網による強制運動負荷によるモデル試験を行った。ストレス指標の一つである血漿コルチゾル濃度や筋肉中の乳酸濃度および ATP 濃度を指標として測定した。一方、蓄養期間中は無給餌であるため、蓄養期間が長期に亘ると絶食により魚は飢餓状態となり、栄養障害による疾病罹患や「痩せ」による商品としての品質の低下を引き起こすことが懸念される。そのため絶食が魚の食品としての品質に与える影響について明らかにすることが求められている。本研究ではゴマサバについて刺身用生鮮魚として価値の高い状態で出荷ができる蓄養可能期間（以下蓄養可能期間という）の検証を行った。

第 2 章では冷蔵保管した場合に鮮度低下が極めて速いイワシの稚魚（シラス）を生食用素材として流通させる取り組みを支援することを目的として研究を行った。鹿児島県では北薩，西薩，志布志の 3 つの海域が主要な漁場であり，平成 25 年度の漁獲量は約 3,000 トンで 10 億円の生産額⁸⁾（平均単価 333 円 / kg）であり重要な水産物として位置付けられる。シラスは一般的に漁獲直後の早い段階で蒸煮や乾燥などの加工処理を行った後，釜揚げしらすやちりめんじゃこ商品として市場に流通している。¹¹⁾ 生食用の生鮮シラスは 700 円 / kg 以上の高級食材として扱われている。しかし鮮度低下が速いため水揚げ地近郊での消費に限られ，生鮮シラスの流通量はシラス全体の生産量の 1 % にも満たない。生鮮シラスの遠隔地への流通は非常に困難とされており，その流通範囲を拡大するためには冷蔵中の品質変化や冷凍保存性などの情報が必要とされるが，これらに関する研究報告は少ない。そこで本研究ではシラスの冷蔵保存時の魚体溶解現象に焦点をあて，漁獲時の魚体損傷や冷凍処理の影響およびシラス内在性消化酵素の特性について検討を行い，生食用シラス流通拡大のための条件を明らかにしたので，その成果を報告する。

第 3 章では水産加工食品の安全性を高め品質を保証するための加工処理技術について検討した結果を報告する。水産物においては，鮮度低下や不適切な温度管理によってヒスタミン（以下 Hm という）の大量生成による食中毒の発生事例が報告されている。海外では Hm の規制値を設けている国があるが，我が国においては衛生・取扱基準に Hm の規制値は設けられていない。しかし，加工場での HACCP 取得が義務化する動きがあり HACCP 取得においては Hm のリスク管理が重要な項目となっている。2011 年から 2012 年に農林水産省が実施した加工食品の Hm 含有調査において，イワシ類等を原料とした塩干品で Hm 濃度の高い製品が流通している実態が明らかにされた。¹²⁾ 鹿児島県の阿久根地域は，古くから阿久根漁港に大量に水揚げされるイワシ類を原料とし

た加工を行う水産加工業者が多い地域として有名である。鹿児島県における平成 27 年度のイワシ塩干品生産量は約 2,000 トンと千葉県に次ぐ全国第 2 位の生産量を誇る。⁸⁾ このような社会的背景から、いわし丸干製造における Hm 蓄積抑制技術の確立は急務となっている。これまで生鮮魚流通や発酵食品製造において問題となる好塩性 Hm 生成菌や Hm 生成菌の増殖特性に関しては多くの研究が報告されている。¹³⁾⁻¹⁶⁾ 水産発酵食品では発酵スターターを利用した Hm 蓄積抑制技術の開発が進んでいる。¹⁷⁾ 一方、いわし丸干に関しては、Hm 食中毒事例の検証で、海洋細菌の *Photobacterium phosphoreum* が原因菌と推定された報告はあるが、¹⁸⁾ いわし丸干の Hm 蓄積抑制に関しては原料の鮮度管理や製品の低温流通¹⁹⁾ 以外の具体的な抑制技術は確立されていないのが実情である。本研究では、Hm 蓄積を抑制するための実用的な技術を開発することを目的として、まず、Hm 蓄積リスクの高い加工工程を調べ、Hm 生成の原因菌を特定し、その増殖特性について検討を行った。さらに、植物由来の精油には殺菌効果²⁰⁻²²⁾ や Hm 生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素 (以下 *hdc* という) 活性阻害を示すことが報告²³⁾ されているので、本研究では植物精油によるいわし丸干の Hm 生成に及ぼす抑制効果について検討した。精油は鹿児島県の丸干製造が盛んな阿久根地区の柑橘郷土銘菓「文旦漬」の製造時に派生する文旦 *Citrus grandis* 果皮から製造されているものを用いた。

さらに第 4 章では、第 1 ～ 3 章の研究について水産食品科学的視点から包括的な考察を行い、本研究の鹿児島県の水産業発展への貢献度と意義について総括した。

第1章 ゴマサバの短期蓄養によるストレス回復効果と体成分の変化

緒言

数年前から、まき網漁獲時に生きた状態でサバを漁獲して生け簀まで活魚輸送し数日間蓄養したのち、一尾ずつ活けしめ処理を行うことにより、単価の高い鮮魚として流通する動きが見られるようになった。蓄養したゴマサバと通常の方法によってまき網で漁獲したゴマサバの品質の違いを比較し、蓄養したゴマサバを高品質魚として流通するための漁獲方法、蓄養条件、活けしめ処置方法および流通条件など各工程の有効性を検証することは、漁獲物の品質を重視した漁業の新たな取り組みを支援する上で重要である。本研究では蓄養を目的として、生かして捕獲する場合にゴマサバが受ける漁獲ストレスの影響とその後のストレス回復に及ぼす蓄養の効果を検証するために、漁獲現場で実際に行われている漁獲作業に模した揚網による強制運動負荷によるモデル試験を行った。ストレス指標の一つである血漿コルチゾル濃度や筋肉中の乳酸濃度およびATP濃度を指標として蓄養によるストレス回復を測定した。蓄養期間中は無給餌であるため、出荷調整等により長期間の蓄養が行われれば魚は飢餓状態となる。飢餓状態が継続すると、栄養障害による疾病罹患や「痩せ」による商品としての品質の低下を引き起こすことが懸念される。無給餌による絶食が魚体に及ぼす影響については、魚類増養殖分野において成長及び疾病との関連について多くの研究が行われてきた。²⁴⁻³¹⁾ 一方、天然魚を対象とした短期蓄養において、絶食が食品としての品質に与える影響や、無給時でも商品価値が低下しない蓄養可能期間について検証した事例は報告されていない。そこで、本研究ではゴマサバについて刺身用生鮮魚として価値の高い状態で出荷ができる蓄養可能期間の検証を目的とした。試験は2回実施し、1回目の試験は鹿児島県水産技術開発センター内の試験用海面生け簀にて蓄養のモデル試験

を実施した（以下モデル試験という）。2 回目の試験はゴマサバの短期蓄養を実施している業者の海面生け簀を使って実用規模の試験を実施した（以下実用規模試験という）。試験は、各蓄養期間における肥満度、内臓重量比率、肝臓重量比率、血漿中のトリグリセリドとグルコース濃度、筋肉成分としてタンパク質含量、脂質含量、遊離アミノ酸含量および刺身の重要な品質要素³²⁾となる「歯ごたえ」の指標として筋肉の圧縮弾性強度を測定し、ゴマサバの刺身品質に影響を及ぼさない無給餌蓄養可能期間について検討した。

材料および方法

蓄養ゴマサバ氷蔵流通品の品質評価用サンプル 蓄養処理をしたゴマサバ流通品は、2009 年 8 月に鹿児島県西方海域においてまき網で生きたまま漁獲され、活魚運搬船により鹿児島県いちき串木野市地先まで移送され漁港内の生け簀で民間の漁業者によって 3 日間蓄養後、一尾ずつ活けしめ処理して水揚げされたゴマサバ（平均体重 555.0 g, $n = 5$ 。以下、蓄養ゴマサバと称す）を用いた。活けしめ方法は、頭部を折って（以下、首折りと称す）行った。また、比較対照として同年 6 月～7 月にまき網で漁獲され鹿児島県枕崎漁港に水揚げされたゴマサバ（平均体重 662.0 g, $n = 12$ 。以下、まき網ゴマサバと称す）を用いた。蓄養ゴマサバは活けしめ時刻を致死時とし、まき網のゴマサバは、漁獲後魚倉に氷とともに投入された時刻を致死時とした。それぞれ測定まで、氷を敷いたスチロール容器内で供試魚を貯蔵し、致死後 9 h にあたる時間に背肉の ATP 関連物質濃度を測定した。

漁獲ストレス負荷方法と短期蓄養によるストレス回復試験 漁業現場では、蓄養を目的としてゴマサバを漁獲する際には網を絞って網裾を揚げながら魚を一カ所に囲い込む。そのとき魚が水面に出ないようにするために、網はすべて空

中に揚げられず海水中に一部分浸かった状態である（以下、この状態を揚網と称す）。そして、キャンバス生地の袋網で魚の体表を傷つけないように掬い取り、活魚運搬船の魚倉に移す。揚網が行われている時間は約 20 分間である。漁獲ストレスの評価試験は現場で行うのが理想であるが、漁模様や作業状況の影響から現場での試験が困難であったため、本研究では以下に示す漁獲水揚げ時の条件に近いモデル試験を行った。2010 年 7 月に鹿児島県西方海域においてまき網で漁獲され、活魚運搬船で鹿児島県山川漁港内の 4 m 角形生簀にあらかじめ移送収容されたゴマサバ（収容尾数 1,700 尾、平均尾叉長 35 ± 1 cm、平均体重 575 ± 48 g）を用いて、実際の漁獲状況に近い揚網モデル試験を実施し、漁獲時に魚が受けるストレスの程度と蓄養によるストレス回復状況を血漿中のコルチゾルや筋肉中の乳酸と ATP および肝臓中のグリコーゲンの各濃度を指標にして検証した。すなわち、生け簀内の網を一部解いて網底を持ち上げ魚を一カ所に集め、20 分間網で囲い込むことで、強制的に激しい運動をさせて現場の揚網作業と同等レベルの負荷を与えた（以下、強制運動と称す）。その後、網の絞りを解き、生け簀の網を元の状態に戻して蓄養を開始した。蓄養中は無給餌とした。試験実施期間中の蓄養生け簀内の平均水温は 27°C で、斃死率は約 5% であった。20 分間の強制運動負荷直後を試験開始時として、0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h 経過後に生け簀からゴマサバを静かに取り上げ、直ちに高濃度のフェノキシエタノールによる深麻酔で死に至らしめ、筋肉と肝臓および尾部腹面より採血を行い成分分析に供した。なお血液サンプル採取は 30 尾から行い、筋肉および肝臓については、別の 15 尾から採取した。血液サンプル採取時と同様に深麻酔処理を施した後、素早く背部より筋肉を一部採取するとともに、同一個体から肝臓を採取した。採取した筋肉は乳酸および ATP 濃度測定用に個体ごとにサンプルチューブに取り分け液体窒素により凍結を行い、分析に供するまで -80°C で保管した。肝臓はグリコーゲン濃度測定用に個

体ごとにサンプルチューブに取り分け、筋肉と同様に凍結し貯蔵した。また、蓄養時間 0 h, 4 h, 24 h の筋肉及び肝臓を採取した。筋肉については、5 °C で 6 h 貯蔵し、貯蔵中の筋肉 ATP 濃度の変化を測定した。

蓄養モデル試験 2008 年 10 月に鹿児島県西方海域において、まき網漁で漁獲されたゴマサバ（平均尾叉長 $30.8 \pm 1.1 \text{ cm } n = 70$ ）200 尾を用いた。漁獲後直ちに活魚運搬船により鹿児島県水産技術開発センターに移送し、施設内の海面に設置した 3 m 角形生簀に収容し 21 日間にわたり蓄養を行った。漁獲から生け簀収容まで約 5 時間を要した。収容から 2 時間経過した時点で試験開始時のサンプリングを行った。なお、サンプリングは、一定期間ごとに生簀から無作為に 3–5 尾を取り上げ試験に供した。また、試験開始時の海水温は約 25°C、終了時の海水温は約 23°Cであった。

蓄養実用規模試験 2015 年 9 月に鹿児島県西方海域において、まき網漁で漁獲され、漁獲後直ちに活魚運搬船により串木野漁港内に移送し、海面に設置した 8m 角形生け簀に収容した約 5,000 尾のゴマサバ（平均尾叉長 $34.2 \pm 1.5 \text{ cm } n = 60$ ）を用い 22 日間にわたり蓄養を行った。漁獲から生け簀収容までは、モデル試験と同様で約 5 時間を要した。また、試験開始時のサンプリングはモデル試験と同様に収容 2 時間経過後に実施した。なお、サンプリングは、一定期間ごとに生簀から無作為に 7 尾（蓄養開始時のみ 5 尾）を取り上げ試験に供した。また、試験開始時の海水温は約 26 °C、終了時の海水温は約 24 °Cであった。

肥満度の測定 蓄養開始日を蓄養 0 日とし、一定期間ごとにサンプリングした魚体の尾叉長 L (cm) および体重 W (g) を測定し、肥満度を次式によ

り求めた。

肥満度： $(W/L^3) \times 10^3$

内臓重量及び肝臓重量の測定 肥満度測定時に胃を含む消化器系臓器の重量を測定し、魚体重量に占める内臓の重量比を算出した。また、実用規模試験では内臓重量測定後に内臓から肝臓を切り離して、肝臓重量も測定し、魚体重量に占める肝臓の重量比を算出した。

血漿成分分析 供試魚に FA100（田村製薬株式会社，東京）を用いて深麻酔を行い、尾部静脈から血液を採取した。採血は岡本ら³³⁾の方法により行い、ヘパリン処理を施したシリンジ（2.5 mL，注射針 22 G）を用いた。採取した血液から遠心分離（4,000 rpm，5 分間）により血漿を分離し、分析に供するまで -80 °C で貯蔵した。ストレス回復試験で測定した血漿中のコルチゾル濃度は Cortisol Express EIA Kit（Cayman Chemical Company 製，USA）により測定した。蓄養モデル試験で実施した血漿成分の分析は、蓄養 0, 1, 4, 7, 14, 21 日目に実施した。なお血漿中のグルコースおよびトリグリセリド濃度は DRY-CHEM3500V（富士フィルム株式会社，東京）で測定した。

筋肉の乳酸，肝臓グリコーゲンおよび ATP とその関連物質濃度の分析 0.6 M 過塩素酸でホモジネート抽出し、遠心分離（4 °C，15,000 rpm，10 分）して得られる上清を用いて行った。乳酸濃度は上清を試料として F-kit 乳酸（Roche Diagnostics 製，BRD）により測定した。ATP とその関連物質濃度は過塩素酸抽出で得られた上清を 2 M 水酸化カリウムで中和し，Murata *et al.*³⁴⁾の方法に準じて HPLC（ポンプ：LC-10AD，カラム恒温槽：CTO-10A，検出器：SCL-10A 島津製作所製，カラム：GS-320 7E Shodex Asahipak 製）

で測定した。なお移動相には 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 2.9)を用い検出波長は 260 nm を使用した。肝臓のグリコーゲン濃度は、10 % トリクロロ酢酸でホモジネート後、濾液を試料としてアンスロン硫酸法³⁵⁾により測定した。

筋肉の圧縮弾性強度 蓄養モデル試験を実施する際に血液採取後の魚体を用いて筋肉の弾力を測定した。致死後約 1 時間で死後硬直前のサンプルについて胸鰭基部後方の背筋から体側と垂直方向に 1 cm の厚さで 5 ~ 6 片を切り出し皮と中骨を除去した後、筋肉の厚さがほぼ均等な 3 片を選び、1 片あたり 1 カ所の圧縮弾性強度を測定した。圧縮弾性強度の測定にはレオメーター (サン科学製 CR-500DX) を用い、Ando らの方法³⁶⁾に準じて直径 15 mm の円板プランジャーを魚肉に 5 mm 侵入させた時の強度を指標とした。測定は各 3 尾を使用し計 9 個ずつのデータを得た。

筋肉成分試料の調製 筋肉成分の測定は実用規模試験時に実施した。肥満度測定に使用した魚体を用い、蓄養 0, 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15, 22 日目に実施した。魚体の頭部を胸鰭基部後端位置で切り離してフィレにし、片側のフィレのみを分析に供した。フィレの胸鰭基部後端から 2 / 3 の長さの位置で切断した頭部側を用い、腹骨を除き表皮を付けた状態で 1 個体ずつミンチにした。なお、サンプルは分析に供するまで -30 °C で保存した。

筋肉成分分析 粗脂肪含量はソックスレー抽出法により測定し、筋肉重量に対する脂肪量の割合 (%) で示した。水分含量は常圧加熱乾燥法 (105°C) で測定し、筋肉重量に対する水分量の割合 (%) で示した。粗タンパク質含量はケルダール法により測定し、筋肉重量に対するタンパク質量の割合 (%) で示した。また、遊離アミノ酸含量はミンチ肉の 5 倍量の 20 % (w/v) トリクロロ酢酸でホ

モジネートし、遠心分離（4 °C, 5,000 rpm, 10 分間）により得られた上清を pH 2.2 クエン酸緩衝液（和光純薬工業株式会社，大阪）で適宜希釈後，0.45 μm のフィルターでろ過したものをサンプルとし，HPLC（移動相ポンプ：LC-10AD，反応液ポンプ：LC-10AT，カラム恒温槽：CTO-10A，検出器：RF-10A，カラム：Shim-Pack AMINO NA 島津製作所製）を用いた OPA 誘導化法により各アミノ酸量を測定し，筋肉 100 g に含まれる遊離アミノ酸量(mg /100 g)として示した。

統計処理 得られた値は *Bartlett's* 検定にて等分散の検定を行った後，一元配置分散分析による多重比較検定（*Dunnnett* 法又は *Williams* 法）を行った。

結果

ゴマサバ氷蔵流通品の品質評価 まき網で漁獲後 3 日間蓄養し，一尾ずつ首折り活けしめ処理をして水揚げされた蓄養ゴマサバと同時期にまき網で漁獲水揚げされた通常のみき網ゴマサバについて，刺身商材として消費される時間を想定した氷蔵（魚体温約 5 °C）後 9 h における筋肉の ATP とその関連物質濃度と筋肉の圧縮弾性強度を比較した（Table 1, 2）。蓄養ゴマサバの ATP 濃度は， $7.06 \pm 1.77 \mu\text{mol} / \text{g}$ ($n = 5$)と高い値で維持されていたが，まき網ゴマサバの筋肉の ATP 濃度は $0.13 \pm 0.13 \mu\text{mol} / \text{g}$ ($n = 12$)まで消失していた。この結果は Welch の *t* 検定で有意差が認められた ($p < 0.01$)。また，筋肉の圧縮弾性強度は，蓄養ゴマサバで $761 \pm 216 \text{ g}$ であったが，まき網ゴマサバでは $494 \pm 83 \text{ g}$ であった。筋肉の圧縮弾性強度についても，*t* 検定の結果，有意差が認められた ($p < 0.01$)。以上の結果から，蓄養ゴマサバは，まき網ゴマサバと比べ鮮度が高く，筋肉の弾力も強いことが明らかになった。

Table 1 Contents of ATP and its related compounds in muscle stored at 5 °C for 9 h after death of captured spotted mackerel by a purse seine and fish that had recovered from capture stress by the resting in a fish cage for 72 h.

	ATP (μ mol/g)	ADP (μ mol/g)	AMP (μ mol/g)	IMP (μ mol/g)	HxR (μ mol/g)	Hx (μ mol/g)
Captured fish	0.13 \pm 0.13	1.22 \pm 0.29	0.23 \pm 0.07	11.94 \pm 1.52	0.24 \pm 0.10	0.15 \pm 0.15
Recovered fish	7.06 \pm 1.77	2.54 \pm 0.43	0.08 \pm 0.13	2.88 \pm 3.01	0.0	0.0

Values are mean \pm standard deviation ($n=12$ for captured fish, $n=5$ for recovered fish)

Table 2 Elastic strength of muscle stored at 5 °C for 13 h after death of captured spotted mackerel by a purse seine and fish that had recovered from capture stress by the resting in a fish cage for 72 h.

Elastic strength by strain (g)	
Captured fish	494 \pm 83
Recovered fish	761 \pm 216

Values are mean \pm standard deviation ($n=45$ for captured fish, $n=45$ for recovered fish)

強制運動後の蓄養による血漿コルチゾル濃度の変化 揚網モデル試験による強制運動負荷直後およびその後の蓄養中の血漿コルチゾル濃度の変化を Fig. 1 に示す。強制運動負荷直後の血漿コルチゾル濃度は 346 ± 201 ng / mL ($n = 30$)であり、蓄養 4 h 後には 160 ± 78 ng / mL ($n = 30$)、8 h 後には 83 ± 56 ng / mL ($n = 30$)と急速に低下した。24 h 後では 54 ± 40 ng / mL ($n = 30$)、72 h 後は 44 ± 34 ng / mL ($n = 30$)と 24 h ~ 72 h における変化は小さかった。強制運動負荷後の蓄養経過時間ごとの変化について、一元配置分散分析を行ったところ、強制運動負荷直後に対して 4 h 後を除く、8 h、24 h、48 h、72 h 後の結果とともに有意差が認められた ($p < 0.01$)。また、蓄養 24 h 以後の変化については、統計的に有意差は認められなかった。血漿コルチゾル濃度は、強制運動負荷直後に最大値を示し、その後の蓄養経過時間とともに急速に低下したことから、ゴマサバの漁獲ストレスの影響およびその回復の指標となるものと考えられた。

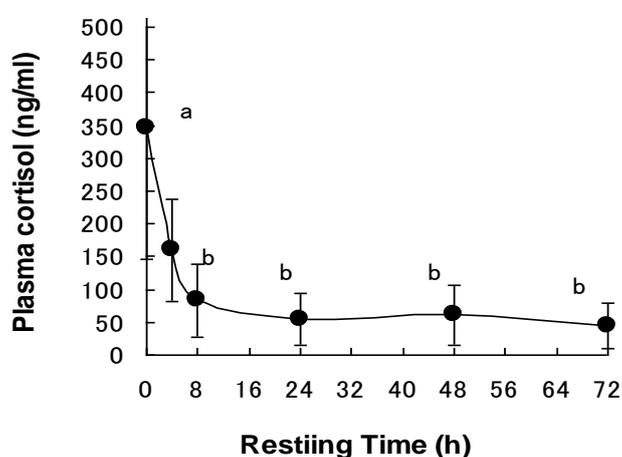


Fig. 1 Changes in plasma cortisol concentration after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. Values are mean \pm standard deviation ($n=30$). Different letters (a,b) indicate significant difference ($p < 0.01$).

強制運動後の蓄養による筋肉 ATP 濃度の変化 筋肉の ATP 濃度の変化を Fig. 2 に示す。強制運動負荷直後で、 $8.94 \pm 0.54 \mu\text{mol/g}$ ($n = 15$) と高い値であった。蓄養 4 h 後には $9.21 \pm 0.62 \mu\text{mol/g}$, 8 h 後には $9.07 \pm 0.64 \mu\text{mol/g}$, 24 h 後には $8.18 \pm 1.04 \mu\text{mol/g}$, 72 h 後で $8.40 \pm 0.67 \mu\text{mol/g}$ と強制運動負荷直後から蓄養 72 h 後まで高い値で推移した。各個体の ATP 濃度について一元配置分散分析を行ったところ、有意差は認められなかった。また、強制運動負荷直後、およびその後 4 h, 72 h 蓄養を行った魚を即殺し、 5°C にて 6 h 貯蔵した場合の筋肉 ATP 濃度の変化を Fig. 3 に示す。いずれも $8 \mu\text{mol/g}$ 以上の高い値を示しており、試験区間に有意差は認められなかった。今回、まき網漁の揚網作業が魚体に及ぼすストレスを評価するために、実際の漁獲現場での作業に準じて実施した強制運動負荷によるストレスの強さは、筋肉の ATP 濃度に影響を及ぼさない程度であることが示唆された。

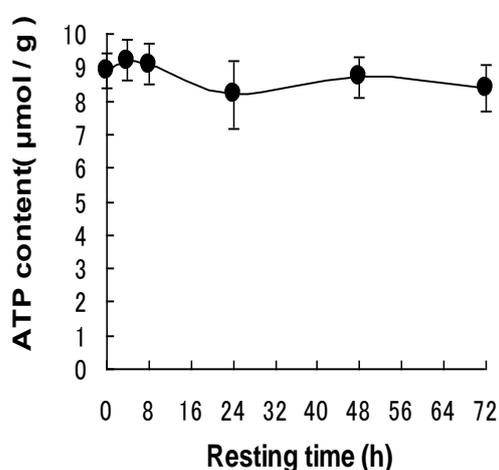


Fig. 2 Changes in ATP concentration in muscle after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. Values are mean \pm standard deviation ($n=15$).

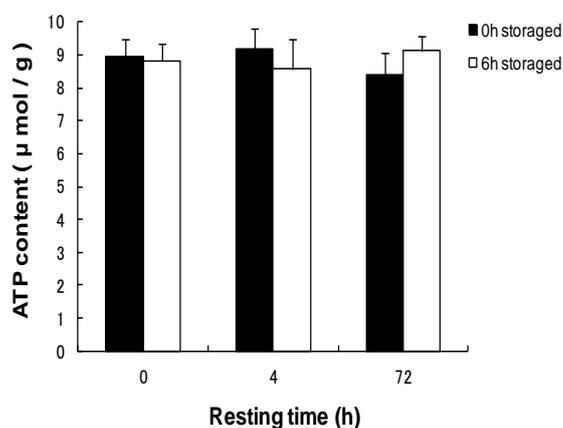


Fig. 3 Effect of resting time on ATP concentration in muscle at time of death and after storage at 5°C for 6 h. Values are mean \pm standard deviation ($n=15$).

強制運動後の蓄養による筋肉乳酸濃度の変化 強制運動負荷直後及び蓄養中の筋肉の乳酸濃度の変化を Fig. 4 に示す。強制運動負荷直後の乳酸濃度は $19.9 \pm 4.7 \mu\text{mol} / \text{g}$ ($n = 15$)であり、その後急激に上昇し 8 h 後には最大値の $31.6 \pm 7.3 \mu\text{mol} / \text{g}$ ($n = 15$)となった。最大値に達した後は緩慢に低下し、72 h 後には $19.2 \pm 5.7 \mu\text{mol} / \text{g}$ と強制運動負荷直後の値まで戻った。蓄養経過時間ごとの値について一元配置分散分析を行ったところ、8 h 後では、強制運動負荷直後に対して有意 ($p < 0.01$) に高く、72 h 後の値は 8 h 後の結果に対して有意 ($p < 0.01$) に低いことを示した。

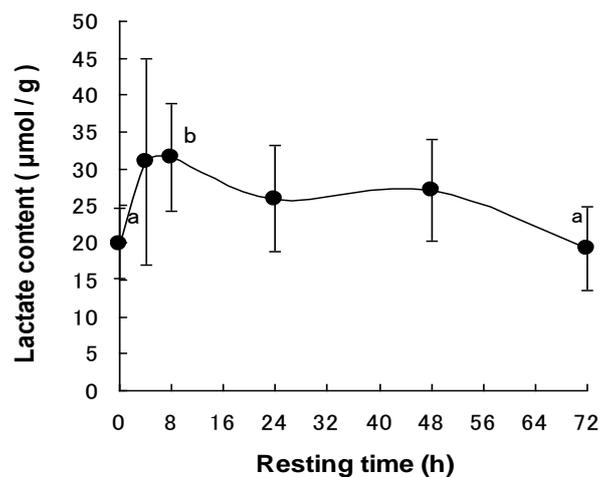


Fig. 4 Changes in lactate concentration in muscle after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. Values are mean \pm standard deviation ($n=15$). Different letters (a,b) indicate significant difference ($p < 0.01$).

強制運動後の蓄養による肝臓グリコーゲン濃度の変化 肝臓のグリコーゲン濃度の変化を Fig. 5 に示す。強制運動直後に $0.75 \pm 0.41 \text{ mg/g}$ ($n = 15$)であったものが、蓄養 4 h 後と 8 h 後にそれぞれ $0.42 \pm 0.16 \text{ mg/g}$ ($n = 15$)と $0.29 \pm 0.17 \text{ mg/g}$ ($n = 15$)となり有意 ($p < 0.01$) に低下した。その後、蓄養によってグリコーゲン濃度は上昇し、24 h 後は $0.95 \pm 1.20 \text{ mg/g}$ ($n = 15$)、48 h 後は $1.73 \pm 1.95 \text{ mg/g}$ ($n = 15$)となった。蓄養 8 h 後に観察された最低値と比較すると、蓄養 48 h 後に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。蓄養 72 h 後には低下し、 $0.56 \pm 0.59 \text{ mg/g}$ ($n = 15$)となった。以上のように、肝臓グリコーゲン濃度は強制運動直後から低下し、蓄養 8 h 後において最低値を示した後、蓄養時間の経過とともに上昇して 48 h 後に最高値となりその後、蓄養開始時の値へと変化した。蓄養 48 h までの肝臓グリコーゲン濃度の変化は、筋肉乳酸濃度の変化 (Fig. 4) に少し遅れてほぼ鏡像的に進行することが認められた。

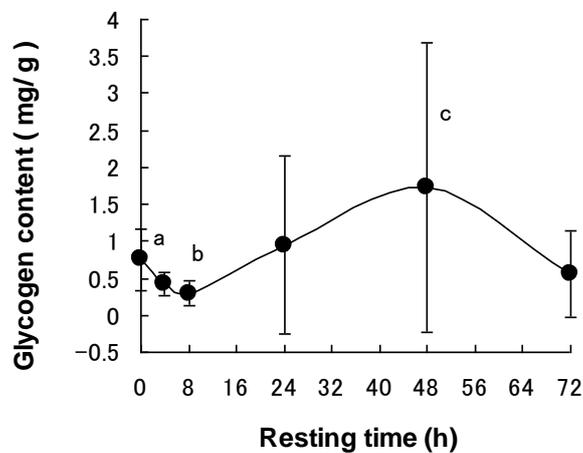


Fig. 5 Changes in glycogen concentration in liver after 20 min of exhaustive exercise and during resting in a fish cage for 72 h. Values are mean \pm standard deviation ($n=15$). Different letters (a,b) indicate significant difference ($p < 0.01$). Different letters (b,c) indicate significant difference ($p < 0.05$).

蓄養期間における肥満度の変化 モデル試験における肥満度の変化を Fig. 6(a)に示す。蓄養開始時の肥満度は 11.50 ± 0.69 であり、8 日目に 11.36 ± 0.40 、14 日目に 11.16 ± 0.74 となったが、14 日目まで有意な変化は認められなかった。その後 21 日目に 10.97 ± 0.22 となり、蓄養開始時と比較して有意 ($p < 0.05$) に減少した。実用規模試験における肥満度の変化を Fig. 6(b)に示す。蓄養開始時の肥満度は 12.32 ± 0.48 でありモデル試験と比較するとやや高い値であった。その後 9 日目で 12.56 ± 0.71 、15 日目に 11.86 ± 0.10 となったが蓄養開始から 15 日目まで有意な変化は認められなかった。その後 22 日目に 10.93 ± 0.56 となり、蓄養開始時と比較して有意 ($p < 0.01$) に減少し、モデル試験と同じ傾向で推移した。

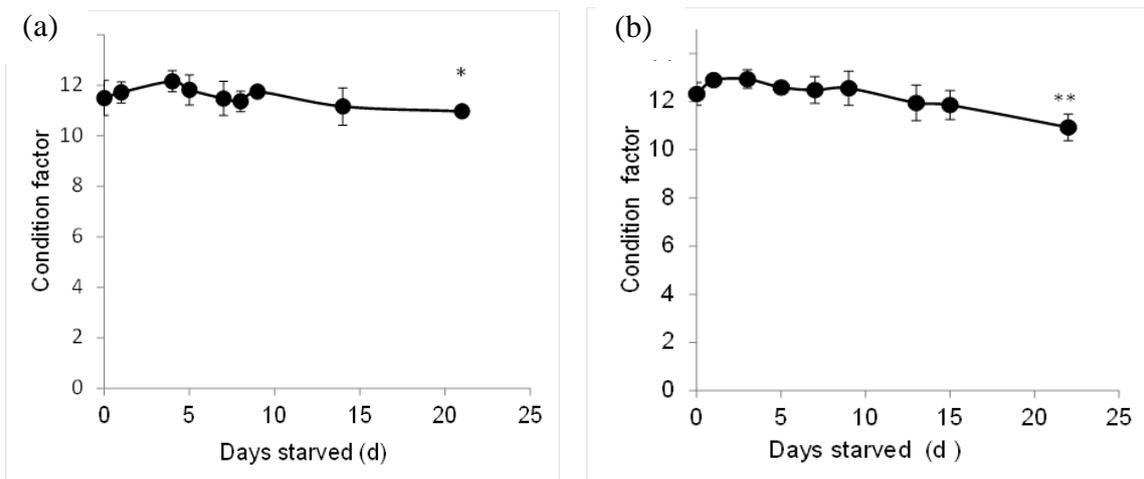


Fig. 6 Changes in condition factor during short-term rearing. Sampling were done (a) at 2008 in October,(b) at 2015 in September. Values are mean \pm standard deviation. (a; $n=3-8$) (b; $n=5-7$) Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$).Significantly different (**) from the corresponding initial value ($p < 0.01$).

蓄養期間における内臓重量比，肝臓重量比の変化 モデル試験における内臓重量比の変化を Fig. 7(a)に示す。蓄養開始時の内臓重量比は $6.32 \pm 0.96\%$ であった。蓄養 4 日目には $5.76 \pm 0.28\%$ と減少する傾向を示し，蓄養 7 日目には $5.12 \pm 0.35\%$ と有意に ($p < 0.05$) 減少し，蓄養 21 日目には $4.66 \pm 0.31\%$ となった ($p < 0.01$)。実用規模試験における内臓重量比の変化を Fig. 7(b)に示す。蓄養開始時の内臓重量比は $6.60 \pm 0.89\%$ であり，モデル試験とほぼ同様の値であったが，蓄養 1 日目以降で有意 ($p < 0.01$) に減少し，蓄養 7 日目には $4.97 \pm 0.59\%$ ($p < 0.01$) となり，蓄養 22 日目には $4.33 \pm 0.51\%$ となった ($p < 0.01$)。

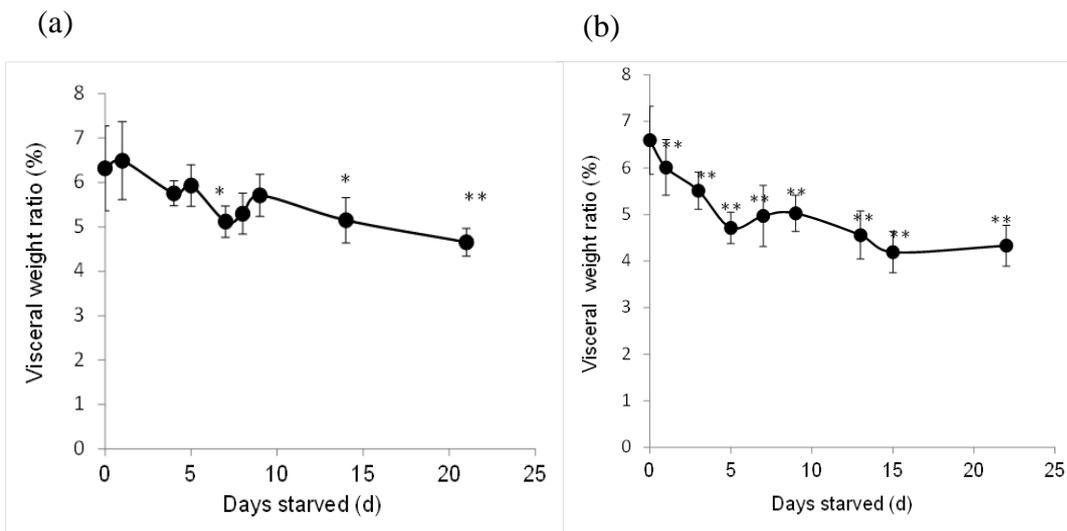


Fig. 7 Changes in visceral weight rate during short-term rearing. Sampling were done (a) at 2008 in October, (b) at 2015 in September. Values are mean \pm standard deviation (a; $n=3-5$) (b; $n=5-7$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$). Significantly different (**) from the corresponding initial value ($p < 0.01$).

また、実用規模試験で測定した肝臓重量比 (Fig.8) は、蓄養開始時に $0.94 \pm 0.17\%$ であり、蓄養3日目までは変化は認められなかった。蓄養5日目以降に減少する傾向を示し、蓄養7日目で $0.78 \pm 0.14\%$ 、15日目で $0.74 \pm 0.12\%$ 、22日目には $0.66 \pm 0.11\%$ となり、蓄養7日目以降で有意 ($p < 0.05$) に減少した。

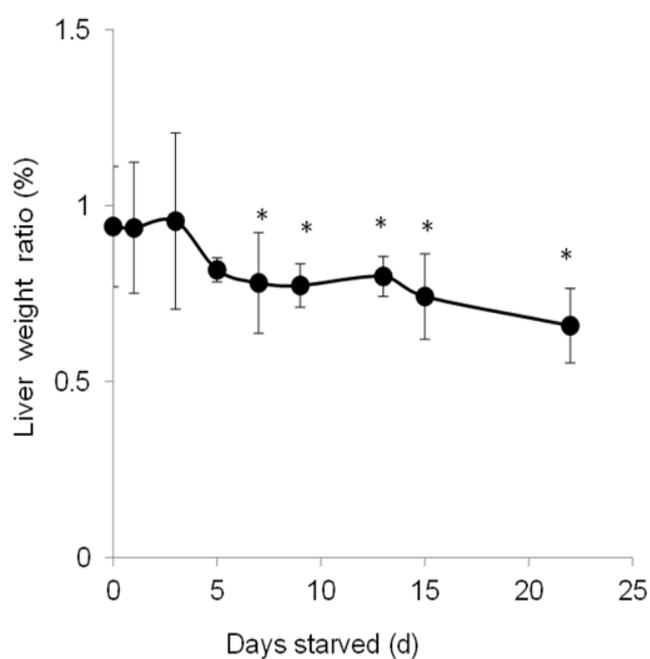


Fig.8 Changes in liver weight rate during short-term rearing. Values are mean±standard deviation ($n=5-7$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$).

蓄養期間における血漿成分の変化 モデル試験における血漿成分の変化を Fig. 9, 10 に示す。トリグリセリド濃度は蓄養開始時に $68.2 \pm 16.3 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ であり、その後 4 日目には $134.4 \pm 36.6 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ と有意に ($p < 0.05$) 上昇し、蓄養 21 日目には開始時の約 2.5 倍の $173.0 \pm 32.5 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ まで上昇した ($p < 0.01$)。一方、グルコース濃度は、蓄養開始時に $147.8 \pm 84.7 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ であったが、蓄養日数と共に徐々に低下し、蓄養 14 日目で $86.8 \pm 8.7 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$ と有意 ($p < 0.05$) に低い値となった。蓄養期間中における血漿中のトリグリセリドとグルコースは、成分ごとに濃度変化の様相は異なっていた。なお、血漿タンパク質濃度についても測定をしたが、蓄養による変動は認められない結果が得られた (結果は示さない)。

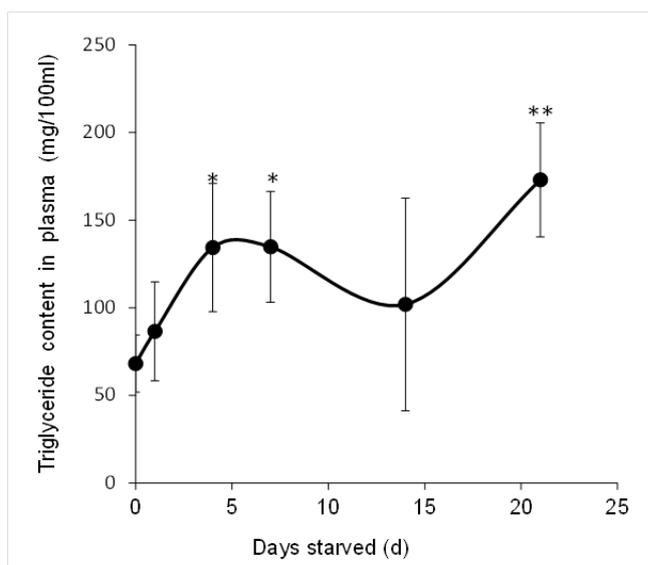


Fig. 9 Changes in triglyceride concentration in plasma during short-term rearing. Values are mean \pm standard deviation ($n=5$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$). Significantly different (**) from the corresponding initial value ($p < 0.01$).

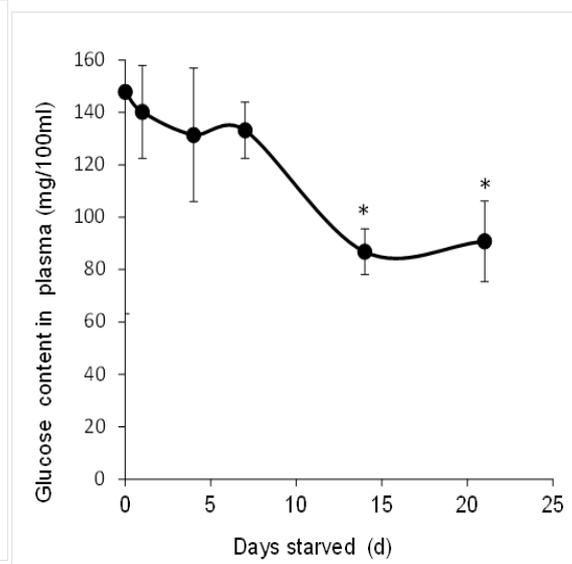


Fig. 10 Changes in glucose concentration in plasma during short-term rearing. Values are mean \pm standard deviation ($n=5$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$). Significantly different (**) from the corresponding initial value ($p < 0.01$).

蓄養期間における筋肉物性の変化 モデル試験における筋肉の圧縮弾性強度の変化を Fig. 11 に示す。蓄養開始時に 327 ± 132 g を示したが、蓄養日数の経過と共に僅かずつ強度が高くなる傾向を示し、蓄養 14 日目では 539 ± 128 g と高い値となり有意差を示した ($p < 0.01$)。その後、蓄養 21 日目では強度は低下したが、蓄養開始時とほぼ同じ強度であった。

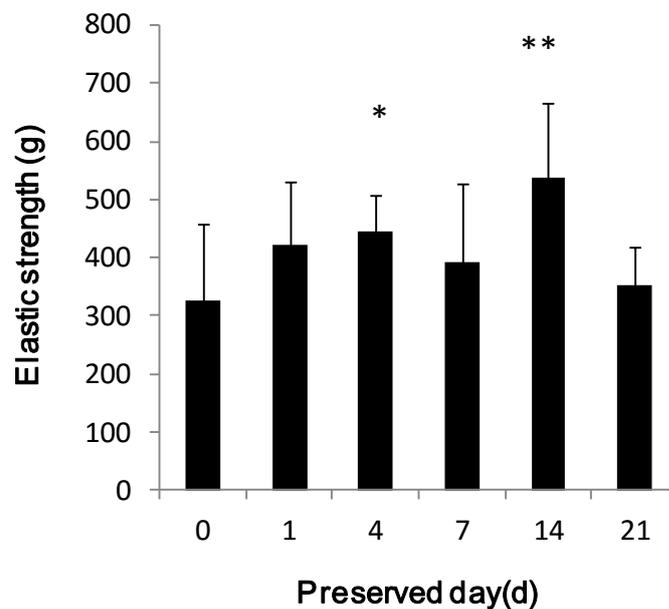


Fig. 11 Changes in elastic strength during short-term rearing. Values are mean \pm standard deviation ($n=9$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (**) from the corresponding initial value ($p < 0.01$).

蓄養期間における筋肉成分の変化 実用規模試験における筋肉の粗脂肪量及び水分量の変化を Fig. 12 に示す。蓄養開始時の粗脂肪量は $4.2 \pm 1.1\%$ であった。蓄養期間中の粗脂肪量は僅かな数値変動を示しながら推移し、蓄養 22 日間を通して有意差は認められなかった。一方、水分含有量については、蓄養開始時に $71.8 \pm 1.1\%$ であり、蓄養 15 日目までは有意な変化は認められなかったものの、15 日目で $72.9 \pm 2.8\%$ と増加の傾向を示し、蓄養 22 日目には $81.5 \pm 2.8\%$ と有意 ($p < 0.05$) に増加した。なお、ゴマサバの蓄養中における筋肉の粗脂肪含量がほぼ一定値を示したことについて、筋肉中の水分量増加の影響を考慮し水分値で補正して検討したが、粗脂肪の変動傾向は水分補正後も変わらないことを認めた (図は示さない)。

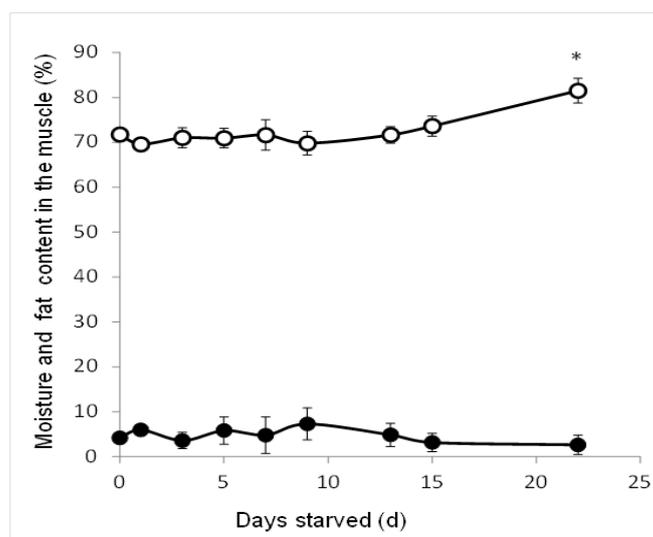


Fig. 12 Changes in moisture and crude fat concentration in muscle during short-term rearing. open circles; moisture. closed circles; fat contents. Values are mean \pm standard deviation ($n=5-7$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$).

また、筋肉の粗タンパク質量の変化を Fig. 13 に示す。蓄養開始時における筋肉の粗タンパク質量は $23.0 \pm 0.3\%$ であったが、蓄養 1 日目から有意 ($p < 0.05$) に減少し、蓄養 22 日目には $21.3 \pm 0.9\%$ となった。蓄養中の筋肉内遊離アミノ酸総量の変化を Fig. 14 に、遊離アミノ酸組成変化を Table 3 に示す。蓄養開始時の遊離アミノ酸総量は $1048.4 \pm 81.7 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ であり、蓄養 1 日目から有意に減少し、蓄養 22 日目には $816.2 \pm 48.3 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ となった ($p < 0.01$)。また、遊離アミノ酸ごとに検証すると、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン及びアルギニンは蓄養 2 日目若しくは3日目から、ヒスチジンは蓄養 5 日目以降に有意な減少を示した。また各遊離アミノ酸のうち、リジンだけが蓄養期間中に減少しなかった。

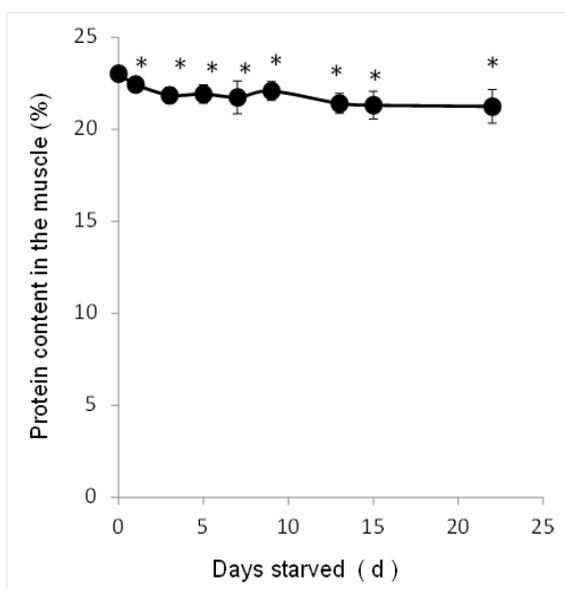


Fig. 13 Changes in protein concentration in muscle during short-term rearing. Values are mean \pm standard deviation ($n=5-7$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$).

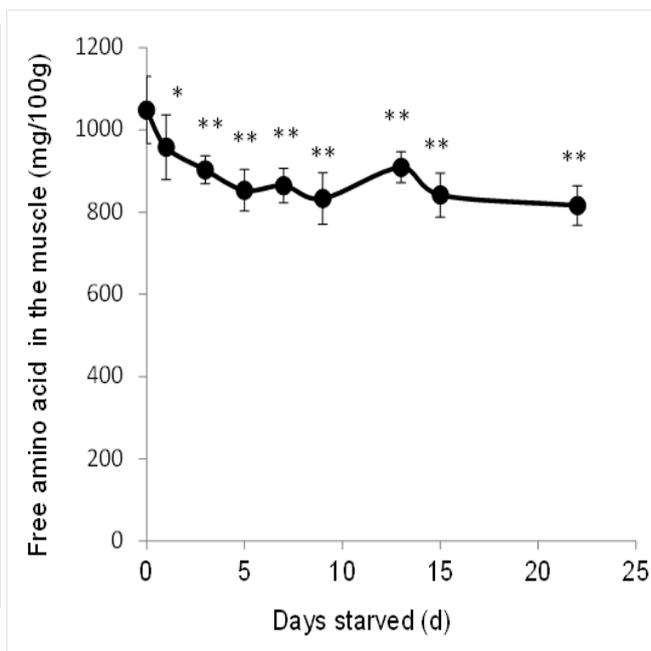


Fig. 14 Changes in total free amino acid mass in muscle during short-term rearing. Values are mean \pm standard deviation ($n=5-7$). Vertical bars show the standard deviations. Significantly different (**) from the corresponding initial value ($p < 0.01$). Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p < 0.05$).

Table 3 Changes in concentration of free amino acids in muscle during short-term rearing. Values are mean±standard deviation (n=5-7). Significantly different (**) from the

Free amino acid (mg/100g)	Days starved (d)									
	0	1	3	5	7	9	13	15	22	
Aspartic acid	5.5±4.5	3.3±2.1	1.7±1.1**	0.8±0.8**	2.4±0.8*	tr**	2.4±0.7*	2.2±1.7*	1.2±0.7**	
Threonine	23.1±5.0	17.4±7.0*	18.1±1.5*	17.9±3.2*	17.9±4.5*	13.2±1.4*	17.9±2.0*	20.2±4.5*	19.2±2.2*	
Serine	19.4±5.2	12.8±6.8*	11.2±1.3**	8.5±1.4**	11.1±3.2**	5.8±0.4**	10.3±1.1**	11.4±3.5**	10.6±1.2**	
Gultamic acid	35.8±5.5	25.2±4.0**	22.7±1.5**	26.1±4.2**	25.2±4.9**	19.6±2.4**	25.2±2.9**	26.4±4.1**	23.3±3.0**	
Prolene	4.8±5.9	tr**	tr**	tr**	1.3±2.8	tr**	tr**	tr**	tr**	
Glycine	17.2±2.6	10.5±3.1**	9.7±1.5**	9.1±1.5**	10.9±3.2**	7.8±0.6**	11.7±1.1**	12.8±1.9**	11.0±1.1**	
Alanine	57.7±10.3	44.7±11.1*	41.4±2.2**	38.5±4.9**	40.1±6.6**	28.6±1.9**	35.9±3.7**	42.7±9.6**	41.3±3.4**	
Valine	24.4±6.4	18.8±6.3*	16.4±1.2**	13.1±1.9**	16.2±3.2**	9.5±0.7**	15.2±2.1**	15.8±3.2**	13.9±1.2**	
Methionine	10.3±3.9	7.4±3.8	6.4±0.6*	5.2±0.9**	6.3±1.8**	3.6±0.4**	6.6±0.5**	6.6±1.3*	5.8±0.6**	
Isoleucine	13.6±3.5	9.1±3.7**	8.6±1.0**	6.7±1.1**	8.5±2.4**	4.5±0.4**	7.5±1.2**	8.6±2.6**	8.0±0.9**	
Leucine	29.0±9.3	21.3±8.5*	18.5±1.5**	14.1±2.4**	17.2±4.9**	9.6±1.0**	16.0±2.3**	17.4±4.4**	15.5±1.7**	
Tyrosine	14.8±3.4	11.2±5.1*	9.6±0.9**	7.9±0.7**	9.8±2.5**	6.0±0.6**	9.1±0.8**	9.6±1.9**	8.6±0.9**	
Phenylalanine	18.1±2.3	12.6±4.4**	10.3±1.1**	8.4±1.4**	10.8±2.3**	5.6±0.5**	9.8±1.2**	10.6±2.4**	9.6±0.8**	
Histidine	731.3±29.8	721.4±14.8	689.7±33.9	660.7±33.1*	642.9±44.9**	671.2±36.4	587.3±20.5**	608.3±81.9**	597.3±36.2**	
Lysine	28.7±6.1	31.5±5.5	29.7±4.0	28.8±3.9	30.6±6.8	25.4±2.3	29.9±3.0	38.1±9.2	38.3±4.9	
Arginine	16.5±6.6	10.3±5.7	9.3±1.2*	7.2±1.6**	13.4±7.7	5.6±0.3**	9.3±0.6*	10.9±3.8	9.2±1.0*	

corresponding initial value ($p<0.01$). Significantly different (*) from the corresponding initial value ($p<0.05$). tr; trace degree

考察

蓄養ゴマサバ流通品の品質を調べた結果、致死後 9 h の氷蔵でも筋肉の ATP 濃度は極めて高かったが、対照として測定したまき網ゴマサバでは、ほとんど消失していることが認められた。流通している蓄養ゴマサバの品質は、まき網で漁獲された通常のみき網ゴマサバと比べ高い品質を有していることが明らかとなった。20 分間の強制運動による揚網モデル試験の結果、強制運動負荷直後に血漿コルチゾル濃度は最大となり、その後、蓄養時間に伴って濃度が低下した。この結果は、揚網行為により魚にストレスが加えられたことを示唆している。また血漿コルチゾル濃度は蓄養 24 h 後で最大値の 16% まで低下し、その後 72 h まで統計的に有意な変化を示さない結果となったことから、強制運動負荷直後に最大値にまで達した血漿コルチゾル濃度を蓄養 24 h で十分に低下させることができるものと考えられた。また、強制運動負荷直後のゴマサバの死後 6 h 後の ATP 濃度及び蓄養 72 h 行ったゴマサバの死後 6 h 後の筋肉の ATP 濃度については、双方とも $8 \mu\text{mol/g}$ 程度の高い濃度で残存していた。Sugita *et al.*³⁷⁾によれば、自らの力で遊泳することができないほどの激しい運動負荷を 15 分間与えたコイでは、運動負荷直後に筋肉の ATP 濃度は低下し、その後回復時間を与えると再び元の値まで戻ることが報告されている。一方、運動負荷が弱い場合においては、筋肉の ATP はクレアチンリン酸回路と解糖系により補給され、見かけ上、低下しないことも報告されている。³⁸⁾これらのことから、揚網モデル試験として実施した 20 分間の強制運動負荷においては、筋肉の ATP 濃度の低下を引き起こすような強い負荷ではなかったと推察している。蓄養を目的として生きた状態で漁獲する場合におけるまき網の揚網は 20 分程度であり、その後の活魚輸送や蓄養で死亡する個体は少ないことから、今回行った強制運動負荷と同程度の漁獲ストレスではないかと推察した。一方で、筋肉中に生成した乳酸は肝臓に運ばれて濃度は

低下しているものの、蓄養開始から 48 h を経過しても依然として高い値であったことから、乳酸の筋肉における濃度をストレス指標にすると、蓄養 48 h 後においても揚網による強制運動負荷の影響が残っていることが示唆された。蓄養 72 h 後には、強制運動負荷直後と統計的に差がないほどに濃度が低下したことから、強制運動負荷の影響がほぼ消失したものと推察した。本研究において、漁獲時の揚網作業により受けたストレスは、3日間蓄養することで軽減されることが明らかとなった。

次に、蓄養期間における体成分等の変化について考察する。本研究で実施したゴマサバの絶食蓄養では、これまでの絶食試験で得られた知見²⁷⁾²⁸⁾と同様に肥満度の変化よりも内臓重量比や肝臓重量比の減少が先行することを認めた。一方、肥満度は蓄養約 2 週間後も有意に減少せず、外見上の「痩せ」が認められない結果となった。体成分においては筋肉中の粗脂肪量は蓄養期間中に有意な変化を示さなかったが、血漿トリグリセリド濃度は有意に上昇した(Fig. 9)。一方、筋肉タンパク質量については、蓄養開始直後からわずかではあるが有意に減少した。また、筋肉中の遊離アミノ酸量も同様に有意に減少した(Fig. 14, Table 3)。ゴマサバの無給餌蓄養期間中における各体成分の変化を測定した結果から、絶食蓄養中の生命維持と運動のためのエネルギー生産について、以下のように考察した。すなわち、蓄養初期においては、肝臓及び内臓の脂質、タンパク質および肝臓グリコーゲンの消費があり、また筋肉タンパクの遊離アミノ酸への分解とこれを利用した糖新生によるグリコーゲン生成が進行する。一方、筋肉脂質濃度は数%と低いことから生命維持に必要な濃度として蓄養中も維持された。また、ホメオスタシスにより一定の濃度を維持する血漿グルコース³⁹⁾が有意に低下する蓄養 14 日以降は、飢餓の進行によりホメオスタシスを維持できない重篤な影響が出始めた時期であると示唆された。また、刺身として重要

な品質評価要素³²⁾である筋肉の弾力は蓄養 14 日目で有意に高くなり、その後、蓄養 21 日目で低下したが蓄養開始日の弾力より低くなることはなかった。本研究の結果から、ゴマサバの蓄養により変化する体成分と刺身商品としての品質との関係について以下のことが明らかになった。すなわち筋肉の粗脂肪量については、蓄養 22 日の期間中変化はなく影響は認められなかった。一方、筋肉タンパク質量は低下したが、筋肉の圧縮弾性強度は蓄養 14 日まで高くなり、蓄養 21 日目でも蓄養開始直後の強度を維持していた。また蓄養 14 日目には血漿中のグルコース濃度が低下し、ホメオスタシスに乱れが生じ重篤な影響が出始める頃であるが、蓄養 15 日目までは内臓の重量比が低下しても、肥満度を指標とする「痩せ」の状態を示さないことが確認された。以上のことから、ゴマサバの無給餌蓄養では約 15 日間までが刺身商材としての価値を維持可能とする蓄養期間であることが示唆された。

第2章 イワシ類稚仔魚の冷蔵保存中のタンパク質の溶解

緒言

マイワシ *Sardinops melanostictus*, カタクチイワシ *Engraulis japonicus*, ウルメイワシ *Etrumeus sadina* などのイワシ類の稚仔魚はシラスと呼ばれている。兵庫県、鹿児島県、愛知県、静岡県が主要な生産地であり、鹿児島県では北薩、西薩、志布志の3つの海域が主要な漁場である。季節や産地によりシラス中のイワシ種の組成は異なることが知られている。2014年漁業・養殖業生産統計⁴⁰⁾における漁獲量と生産額は 62,300 t, 246 億円であり我が国における重要水産物の一つである。漁獲直後のシラスの魚体は透明で物性もしっかりしているが、品質の劣化は速く進み、冷蔵保存時間が長くなると溶解して泥状となる。そのため、一般的には漁獲直後の早い段階で蒸煮や乾燥などの加工処理を行った後、釜揚げしらすやちりめんじゃこ商品として市場に流通している。¹⁾ 食の多様化により生食用の生鮮シラスは高級食材として扱われているが、鮮度低下が速いため水揚げ地近郊での消費に限られており、遠隔地への流通は非常に困難とされている。流通範囲を広げるためには冷蔵時における品質変化や冷凍保存性などの情報が必要とされるが、これらに関する研究報告は少ない状況である。本研究ではシラスの冷蔵保存時の魚体溶解について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による筋肉タンパク質の組成分析を行いタンパク質の分解を確認し、漁獲時の魚体損傷や冷凍処理の影響およびシラス内在性プロテアーゼの活性変化を測定したので得られた結果を報告する。

材料と方法

シラス試料 鹿児島県西薩沿岸域で2013年と2016年の6月に漁獲された生鮮シラスを用いた。このシラスに含まれる魚種組成はカタクチイワシが大部分を占

め、1392尾中カタクチイワシが97% でウルメイワシが 3% であった。試験には漁獲後5 h程度の生鮮シラスと漁獲後に液体窒素で急速冷凍したシラスの2通りのサンプルを用いた。冷凍シラスは -60°C で保存し、解凍は氷中で緩慢解凍して試験に供した。試験では魚体サイズを確認して試験を行った。生鮮シラスで小型サイズのは平均体重0.140 g/尾、大型サイズは0.395 g/尾、冷凍シラスは0.070 g/尾であった。シラスの冷蔵保存試験は、シラスをポリ袋に入れ、0, 4, 10°C の3温度に設定したそれぞれの冷蔵庫にて最大4日まで保存を行った。また、氷蔵した生鮮シラスの一部はポリエチレン製の袋に約3gを入れ、袋を上下からアルミトレー（重量176g）で挟み込み、さらに1052gの重しを載せて魚体を1min圧迫し、水揚げ時における魚体の損傷モデルとして試験に供した。

シラス魚体のタンパク質分解の測定 冷蔵保存中のシラス魚体のタンパク質分解は、以下に示す遊離アミノ酸量、プロテアーゼ活性および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンを指標に測定した。

遊離アミノ酸分析 遊離アミノ酸含量は、魚体全体をミンチしたものに5倍量の20% (w/v)トリクロロ酢酸 (TCA)を加えてホモジネートし、遠心分離 (4°C , 5,000 rpm, 10 分間)により得られた上清を pH 2.2 クエン酸緩衝液（和光純薬工業株式会社）で適宜希釈後、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過したものを分析用サンプルとした。HPLC（移動相ポンプ：LC-10AD, 反応液ポンプ：LC-10AT, カラム恒温槽：CTO-10A, 検出器：RF-10A , カラム：Shim-Pack AMINO NA 島津製作所製）を用いた OPA 誘導化法により各アミノ酸量を測定し、魚体 100 g に含まれる遊離アミノ酸量 (mg / 100 g)として示した。

プロテアーゼ活性の測定 シラス魚体より粗酵素を調製しプロテアーゼ活性

を測定した。1回の測定につき、3あるいは4回サンプリングした。1回のサンプリングは、シラス約3gを使用し、それぞれ粗酵素を調製して酵素活性を分析した。シラス重量の3倍量の0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)溶液を加え、ホモジナイザー（日本精機製）にて温度が上昇しないように氷冷下で30秒攪拌、30秒静置を3度繰り返すホモジナイズを行った。このホモジナイズ液を0°Cで8,000 rpm, 15分間遠心分離し、得られた上清を粗酵素液として使用した。プロテアーゼ活性は、0.48% カゼイン, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 粗酵素液0.1 mL/mL 反応液, 30°Cにて反応を行った。経時的に終濃度5% TCAで反応を停止しろ過を行った後、ろ液についてFolin法にて発色し、660 nmにて比色定量した。⁴¹⁾ 30°C 1 h で1 µg のL-チロシンに相当する非タンパク性フェノール試薬呈色物質の増加をもたらす活性を1単位とした。本研究ではシラス1g当たりの活性として表すこととし、単位をUnit /gとして表記した。

プロテアーゼ阻害スペクトルの測定 シラス魚体の溶解に関わるプロテアーゼの種類を特定するために、各種プロテアーゼインヒビターによる活性阻害率(%)の測定を行った。使用したプロテアーゼインヒビターはLeupeptin（ペプチド研究所）、Antipain（ペプチド研究所）、Chymostatin（ペプチド研究所）、E-64（ナカライテスク）、Pepstatin A（ナカライテスク）、エチレンジアミン四酢酸（EDTA, ナカライテスク）および鶏卵卵白である。なお、卵白については鶏卵から卵白を分離し、卵白の重量の3倍量の0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)溶液を加えてホモジナイズ後、ろ紙で濾過を行った液を使用した。先に記載したシラスから抽出した粗酵素のプロテアーゼ活性を測定する反応溶液にインヒビターを各濃度で添加して同条件下でプロテアーゼ活性を測定し、活性の阻害が飽和するまでインヒビターを添加した場合の阻害率を求めた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法によるシラスタンパク質の分析 SDS-PAGEはLaemmliの方法⁴²⁾に従い、10% または15%ポリアクリルアミドゲルを使用して行った。タンパク質の染色はCoomassie Brilliant Blue R250で行った。なお、シラス全魚体を試料としたSDS-PAGE分析用サンプルは、以下の方法で調製した。液体窒素で急速凍結した冷凍シラス約1gに10倍量の冷5% TCAを添加しホモジナイズした。これを4 °Cで1200 rpm, 5 min遠心分離を行い、沈殿を得た。この沈殿に8 M Urea, 2% SDS, 0.1 M Tris-Glycine (pH9.3) 溶液3 mL, 2-mercaptoethanol 5 μ Lを添加しスターラにて溶解後、BPB-Glycerin 10 μ Lを加え、100 °Cで1 min加熱して溶解しSDS-PAGEサンプルとした。電気泳動にはサンプル4 μ Lを供した。

タンパク質濃度の測定 タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準試料として使用し、ビウレット法⁴³⁾で測定した。

魚体 pH の測定 魚体 pH は、魚体 1 g に冷蒸留水 10 mL を加えホモジナイズ後、速やかに pH メータ (Horiba D-51) にて測定した。

統計処理 得られたデータは、等分散であることを確認したうえで一元配置分散分析による多重比較検定または *t* 検定を行い評価した。

結果

冷蔵したシラスのタンパク質分解 生鮮シラスを長時間冷蔵すると魚体の溶解が進みドロドロとした状態となる。Fig. 15に漁獲後氷蔵5 h の高鮮度品と10 °Cで72 h 保存したシラス全魚体のSDS-PAGEパターンを示した。漁獲後5 h 氷蔵したシラスでは筋原線維の主要タンパク質であるミオシン重鎖、アクチ

ン、トロポミオシン等が認められるが、10 °Cで72 h 保存したシラスではミオシン重鎖やトロポミオシン等のタンパク質バンドがほぼ消失し、タンパク質の分解が進行していることが認められた。この結果は、生鮮シラスが冷蔵中にドロドロとした溶解状態となる原因は、魚肉タンパク質のプロテアーゼ分解によるものであることを示している。本研究ではシラスの冷蔵中に作用するプロテアーゼについて検討を行った。

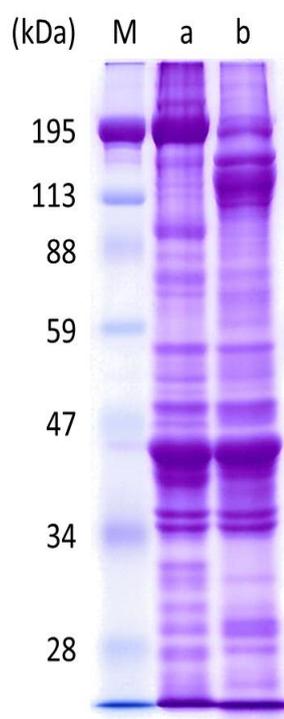


Fig. 15 Changes in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of juvenile sardines during cold storage. Juvenile sardines which were stored (a) for 5 h in ice after catch and (b) for 72 h at 10 °C were frozen with liquid nitrogen. Frozen samples (1 g) were homogenized with 10 volumes of 5% TCA, then centrifuged. Precipitate were dissolved with 3 mL of 8 M Urea, 2% SDS, 0.1 M Tris-glycine (pH 9.3) and 5 μ L of 2-mercaptpetanol. Then 10 μ L of BPB-Glycerin was added. SDS-PAGE was performed by using 10 % polyacrylamide gel. a: Juvenile sardines stored 5 h in ice after catch, b: Juvenile sardines stored at 10 °C for 72 h, M: Molecular weight marker.

冷蔵保存中の遊離アミノ酸量の変化 シラスを4 °C と10 °C で保存した場合の魚体中の遊離アミノ酸量の変化をFig. 16 に示す。分析を最初に行ったのは水揚げから約5 h 後であるが、遊離アミノ酸量は $145 \pm 18 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ であった。水揚げから10 h 後には4 °C で $195 \pm 18 \text{ mg} / 100 \text{ g}$, 10 °C では $231 \pm 26 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ とそれぞれ有意 ($p < 0.01$) に増加した。24 h 後には、4 °Cでは漁獲5 h 後の値の約1.5 倍に、10 °C では約2 倍となり保存温度に依存して遊離アミノ酸量は増加した。さらに保存を行った72 h 後でも遊離アミノ酸量は増加し、その増加量は温度依存性を示した。増加する遊離アミノ酸の種類は、分析をした遊離アミノ酸17 種のうちタウリンを除いた16 アミノ酸 (Arg, Lys, His, Phe, Tyr, Leu, Ileu, Met, Val, Ala, Gly, Pro, Glu, Ser, Thr, Asp) で5 ~ 30倍に濃度は増加した。タウリンについては濃度変化をほとんど示さなかった。(結果は示さない) 魚体損傷の影響については、モデル試験で調製した圧着処理サンプルを4 °C で保存した結果をFig. 17 に示す。魚体を圧着損傷させた場合、遊離アミノ酸量は4 °C10 h 後で $216 \pm 8 \text{ mg} / 100 \text{ g}$, 24 h 後で $374 \pm 18 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ となり、生成する遊離アミノ酸量は圧着していないもの(4 °C10 h 後で $194 \pm 7 \text{ mg} / 100 \text{ g}$, 24 h 後で $302 \pm 10 \text{ mg} / 100 \text{ g}$)に比べて24 h 後で有意 ($p < 0.01$) に増加したことを示した。その後48 h ~ 72 h の保存では差が見られなくなったが、圧着損傷により遊離アミノ酸量が急激に増加する24 h で溶解に差が見られることを示唆している。

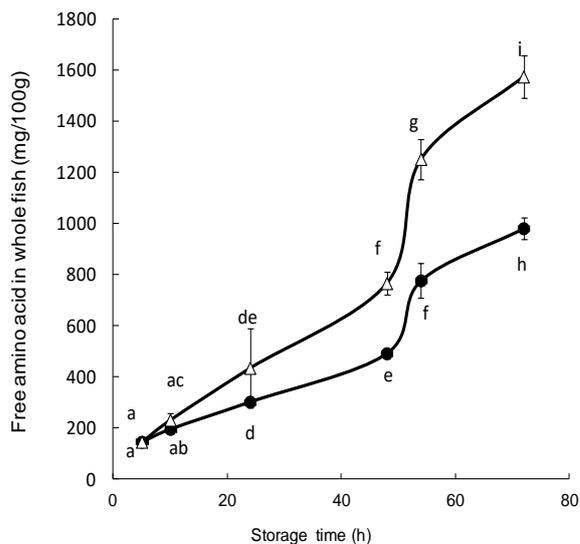


Fig. 16 Effect of postmortem temperature on the autodigestion of juvenile sardines measured with the total free amino acids concentration. Juvenile sardines were stored at 4°C (●) or 10°C (△) for 72 h. The total concentration of free amino acids in whole juvenile sardines was measured. ($n = 5$) Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$).

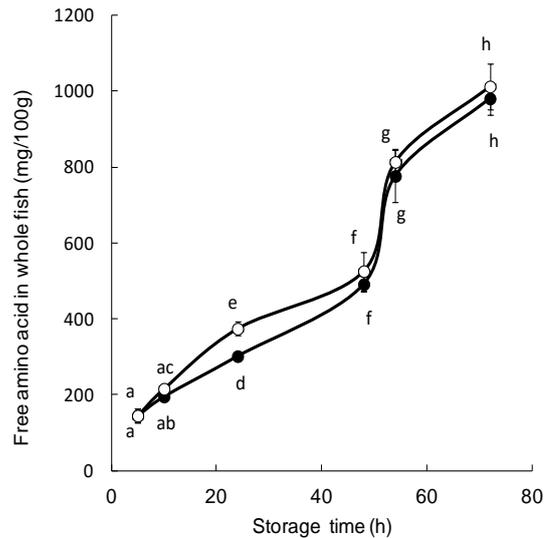


Fig. 17 Effect of press-treatment of juvenile sardines on the autodigestion measured with the total free amino acids concentration. Juvenile sardines were pressed by the putting them between panels and then stored at 4°C for 10 h, 24 h and 72 h. The total concentration of free amino acids in whole juvenile sardines was measured. ($n = 5$) Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$).
 ●: without press-treatment,
 ○: with press-treatment

シラス冷蔵保存中のプロテアーゼ活性の変化 0 °C, 4 °C, 10 °Cで0~4日間保存したシラスからそれぞれ調製した粗酵素液のプロテアーゼ活性を測定した結果をFig. 18に示す。漁獲日に入手したシラスサンプルのプロテアーゼ活性は 1399 ± 55 Unit / g であった。0 °C保存では、保存2日のシラスのプロテアーゼ活性は 1425 ± 25 Unit / g でほとんど変化は見られなかった。一方、4 °Cと10 °Cで保存した場合はシラスのプロテアーゼ活性の上昇が認められた。4 °C保存では保存3日でプロテアーゼ活性は 3262 ± 32 Unit / g, 4日目で 3381 ± 88 Unit / g となり、保存3日でプロテアーゼ活性はほぼ最大となった。10 °C保存では保存2日でプロテアーゼ活性は 3412 ± 262 Unit / g, 3日目で 3336 ± 349 Unit / g, 4日目で 3389 ± 229 Unit / g を示し、保存2日でプロテアーゼ活性は最大となり、その後変化しなかった。Fig.18の結果より、シラスの冷蔵保存中のプロテアーゼ活性の上昇速度は0 °Cで 13 Unit / g / d, 4 °Cで 621 Unit / g / d, 10 °Cで 1006 Unit / g / dと算出され、温度依存性を示すことが認められた。

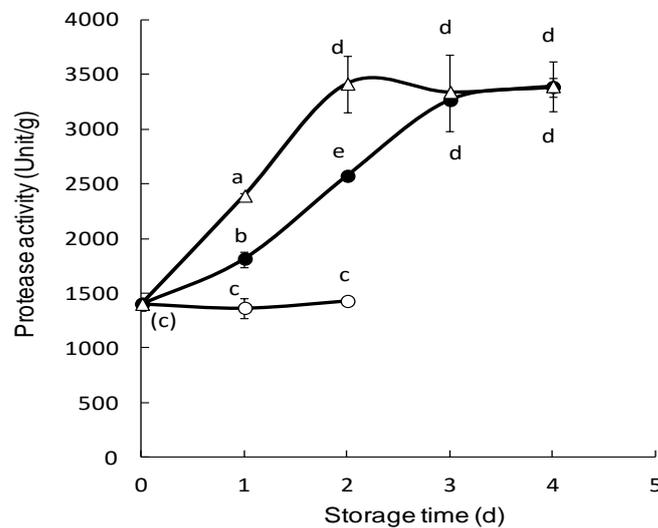


Fig. 18 Changes in total proteases activity of whole juvenile sardines during cold storage. Fresh juvenile sardines were stored at 0°C, 4°C and 10°C for 4 d. The total proteases activity of crude enzymes extracted from stored whole juvenile sardines was measured. ($n = 3$) The protease activity was carried out at 30 °C in a reaction medium containing 0.48% casein, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), crude enzymes extracted 0.1 mL/mL of reaction medium. Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$). 0°C:(○), 4°C:(●), 10°C:(△)

粗酵素の保存中におけるプロテアーゼ活性の変化 シラス魚体を冷蔵保存すると保存期間に対応してプロテアーゼ活性は高くなることが確認された。冷蔵保存中にプロテアーゼ活性が上昇する原因を検討するために、抽出した粗酵素液を冷蔵保存した場合のプロテアーゼ活性の経時変化を測定した。本試験では、シラスを冷凍解凍処理した場合のプロテアーゼ活性に及ぼす影響についても検討を行った。粗酵素液は漁獲日に入手した生鮮シラスと液体窒素で急速凍結したシラスを解凍した解凍シラスを試料として調製した。生鮮および解凍シラスより調製した粗酵素液を 0 °C で保存した場合のプロテアーゼ活性の経時変化を Fig. 19 に示す。生鮮シラスより調製した粗酵素液のプロテアーゼ活性は、調製直後で 1421 ± 55 Unit / g であり、保存日数とともに活性は有意に増大し、保存 2 日では 1830 ± 107 Unit / g (コントロール比 128%) となった。解凍シラスの粗酵素液のプロテアーゼ活性も同様に、調製直後で 1044 ± 107 Unit / g , 保存 1 日で 2131 ± 132 Unit / g , 保存 2 日で 2917 ± 146 Unit / g と保存日数とともに活性は有意 ($p < 0.01$) に 2 倍から 3 倍に上昇した。粗酵素液の調製直後のプロテアーゼ活性は魚の成長などの影響を受けるが、粗酵素液の冷蔵保存中のプロテアーゼ活性の上昇は冷凍解凍処理をしたシラスから調製したもので速いことが認められた。粗酵素液を冷蔵保存するとプロテアーゼ活性は上昇するが、プロテアーゼ活性が最大に到達するのに数日を要する結果である。そこで粗酵素溶液を 40 °C で処理をした場合のプロテアーゼ活性の経時変化を測定した (Fig. 20) 。生鮮シラスから調製した粗酵素液のプロテアーゼ活性は、抽出直後で 1421 ± 55 Unit / g であり、40 °C 30 min 処理で 2207 ± 149 Unit / g に上昇した。冷凍解凍処理をしたシラスから調製した酵素液のプロテアーゼ活性は、抽出直後で 1397 ± 99 Unit / g , 40 °C 30 min 処理で 3015 ± 95 Unit / g , 60 min 処理で 3591 ± 139 Unit / g , 2 h 処理で 3872 ± 12 Unit / g となり、約 60 min 処理で活性値が 3 倍程度まで上昇することが認められた。

40 °C 処理でも冷凍解凍原料から抽出した粗酵素液の方がプロテアーゼ活性の上昇が速いことが示唆された。

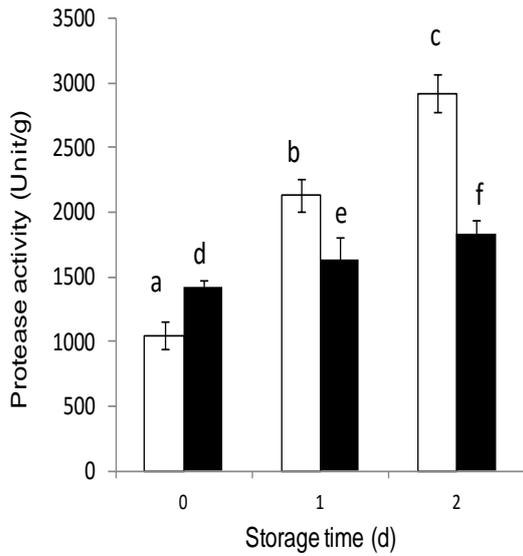


Fig. 19 Effect of frozen-treatment of juvenile sardines on the changes in total protease activity during storage at 0 °C. Juvenile sardines were frozen with liquid nitrogen, stored at -60 °C and then thawed in ice. The thawed and non-frozen juvenile sardines were stored at 0°C for 2 d. The total protease activity of extracted crude enzymes from stored whole juvenile sardines was measured ($n = 3$). The method for protease activity assay was same as in Fig. 4. Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$). □ : non-frozen sardines , ■ : frozen sardines

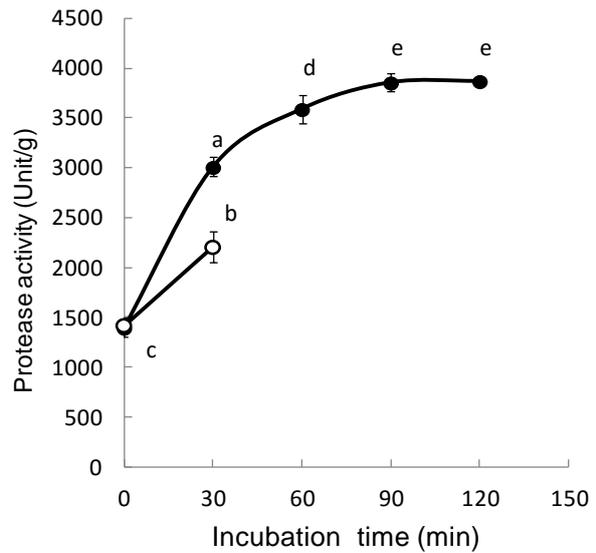


Fig. 20 Effect of heat treatment of crude enzyme solution on the total protease activity. The extracted crude enzyme solution was treated at 40 °C for 120 min. The total protease activity of extracted crude enzymes was measured ($n = 3$). The method for protease activity assay was same as in Fig. 4. Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$).

粗酵素の保存中のタンパク質の消長変化 0 °C で保存したシラスから調製した粗酵素とそれを冷蔵した場合, あるいは 40 °C 処理した粗酵素の SDS-PAGEパターンをFig. 21に示す。0 °Cで保存したシラスから抽出した粗酵素液のSDS-PAGEパターン (A:0日, E:1日保存, G:2日保存) には差が認められなかった。粗酵素液を冷蔵保存すると約90 kDaと20kDaの分子量を示すタンパク質の分解が認められた。(B : 1日保存, C : 2日保存) また, 粗酵素液を40 °C 処理すると, 冷蔵保存で分解が認められた約90 kDa, 20 kDaのタンパク質を含め多数のタンパク質が自己消化されることが示された(40 °C 処理粗酵素:D, F, H)。

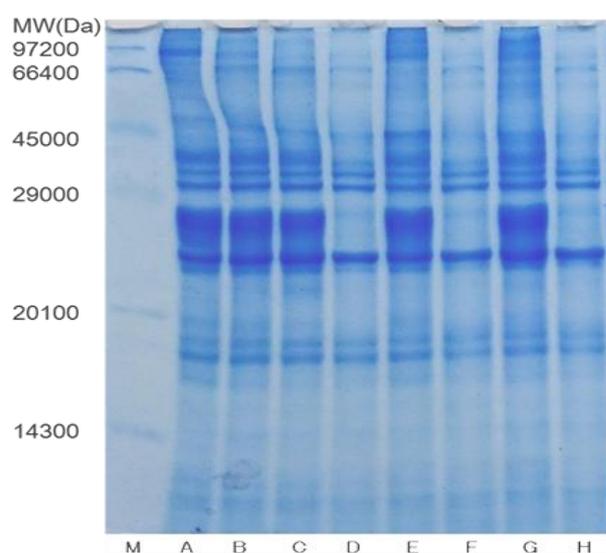


Fig. 21 Effect of heat treatment on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of crude extracts from juvenile sardines. A: fresh crude extract from 0 d stored sardines. B: stored A sample at 0°C for 1 d. C: stored A sample at 0°C for 2 d. D: heat-treated A sample at 40°C for 30 min. E: crude extract from 2 d stored sardines. F: heat-treated E sample at 40°C for 30 min. G: crude extract from 2 d stored sardines. H: heat-treated G sample at 40°C for 30 min. M: Molecular weight marker. SDS-PAGE was performed by using 15% polyacrylamide gel. The protein concentration was 12 µg / lane.

粗酵素プロテアーゼ活性の阻害スペクトル シラス魚体およびシラスから抽出した粗酵素のプロテアーゼ活性は、冷蔵保存や加熱処理により活性値が増大することが認められた。シラス魚体の冷蔵保存中の溶解に関わるプロテアーゼの種類を明らかにするために、各種プロテアーゼインヒビターを用いて粗酵素プロテアーゼ活性の阻害スペクトルを測定した。冷凍シラスから調製した粗酵素溶液（抽出粗酵素と呼ぶ）およびこの粗酵素溶液を40 °Cで30 min処理したもの（熱処理酵素と呼ぶ）を用いた。各種インヒビターのプロテアーゼ阻害効果は、反応組成液中のインヒビター濃度を変えて測定し阻害率が一定になったことを確認することにより、粗酵素に含まれるプロテアーゼの種類を特定し活性割合を明らかにした。Fig. 22に抽出粗酵素に対してトリプシンやパパインなどセリン系あるいはシステイン系プロテアーゼのインヒビターであるAntipainを用いた場合のプロテアーゼ阻害活性を測定した結果を示す。終濃度 2.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ より高い濃度でプロテアーゼ活性の阻害はほぼ一定の値となり、終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で活性値はインヒビター無添加の47 \pm 3.7 % となった。すなわち粗酵素中のプロテアーゼ活性の約53 %がAntipainで阻害される活性値であることを示している。同様に、Leupeptin (セリン・システインプロテアーゼインヒビター), E-64 (システインプロテアーゼインヒビター), Pepstatin A (アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター), Chymostatin (セリン・システインプロテアーゼインヒビター), EDTA (メタロプロテアーゼインヒビター)および卵白を用いたプロテアーゼ活性阻害について測定を行った。Fig. 22に示したAntipainの場合と同様に阻害率が最大となった濃度は、Leupeptin で5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Pepstatin A 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E-64 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Chymostatin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EDTA 0.5 mMであった。卵白については、粗酵素のプロテアーゼ活性測定系に卵白原液の1/8量（酵素反応液中の卵白タンパク質濃度 14 mg/mL ）を最大添加量として測定を行った。また、試験には抽出粗酵素と熱処理酵素を用いた。各プロテアーゼ

インヒビターを用いた場合の阻害される活性絶対値と全活性値に対する相対値をTable 4に示す。抽出粗酵素および熱処理酵素のプロテアーゼ活性は、それぞれ1277 Unit/gと3234 Unit/gであった。抽出粗酵素のプロテアーゼ活性は、Leupeptinで689 Unit/g阻害され全活性値の54%に相当する。Antipainでは651 Unit/g (全活性の51%), Chymostatinで460 Unit/g (全活性の36%), E-64で26 Unit/g (全活性の2%), EDTAで255 Unit/g (全活性の20%)が阻害された。一方、熱処理酵素では、プロテアーゼ活性は3234 Unit/gに上昇したが、Leupeptinにより1358 Unit/g (全活性値の42%)が阻害され、抽出粗酵素の場合に比べて阻害される活性量は約2倍となった。Antipainでは1164 Unit/g (全活性の36%)が阻害され、抽出粗酵素の場合に比べて1.22倍となった。Chymostatinでは1746 Unit/g (全活性の54%)が阻害され、抽出粗酵素の阻害活性量の3.80倍と大幅に上昇した。E-64では65 Unit/g (全活性の2%)であった。一方、Pepstatin Aで阻害される活性値は0 Unit/gと熱処理酵素では認められない結果を示した。卵白では、2684 Unit/g (全活性の83%)が阻害された。以上の結果は、抽出粗酵素と熱処理酵素では活性に関与するプロテアーゼの構成が大きく変化していることを示唆している。

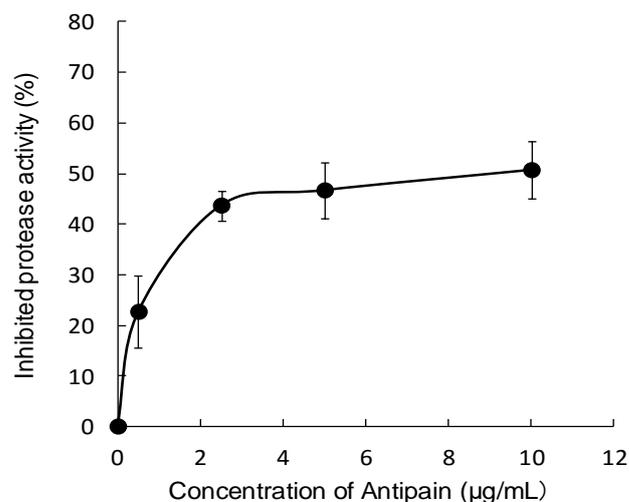


Fig. 22 Inhibition of total proteases activity of crude enzyme extracted from juvenile sardines by Antipain.

The protease activity was carried out at 30 °C in a reaction medium containing 0.48% casein, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), crude enzymes extracted 0.1 mL/mL of reaction medium and various concentration of Antipain ($n = 3$).

Table 4 Inhibition spectrum of proteases activity of crude extract from juvenile sardines.

Inhibitor	Protease activity without heat treatment	Protease activity with heat treatment at 40°C
	1277 Unit/g	3234 Unit/g
	Inhibited proteases activity (Unit/g)	
Antipain	651 (51%)	1164 (36%)
Leupeptin	689 (54%)	1358 (42%)
Chymostatin	460 (36%)	1746 (54%)
E-64	26 (2%)	65 (2%)
Pepstatin A	77 (6%)	0 (0%)
EDTA	255 (20%)	291 (9%)
Egg white	830 (65%)	2684 (83%)

Crude extract and heat-treated crude extract at 40 °C for 30 min were used.

The inhibited protease activity was measured same as Fig. 22 with various inhibitors.

The concentration of inhibitor which saturated inhibition activity in the reaction medium were 10 µg/mL (Antipain), 5 µg/mL (Leupeptin), 10 µg/mL (Pepstatin A), 8 µg/mL (E-64), 10 µg/mL (Chymostatin), 0.5 mM EDTA and 14 mg/ mL (egg white) , respectively. The number in parentheses means relative inhibited protease activity.

考察

水産物の食品品質に対してプロテアーゼが影響することは多数報告されている。⁴⁴⁾ 特に、筋肉中内在酵素としてのプロテアーゼはすり身の戻り現象に強く影響することから研究が進められてきている。さらに、粘液胞子虫などが寄生した魚肉での軟化現象やこれら魚肉を原料とした場合のプロテアーゼとプロテアーゼインヒビターに関する研究はすり身生産技術開発に重要な情報を提供してきた。^{45), 46)} 一方、イワシ稚仔魚などのシラスでは漁獲後の時間経過とともに魚体が軟化し溶解するため、漁獲後速やかに蒸煮加工を施し、釜揚げしらすやしらす干しなどの製造が行われてきている。近年、生鮮のシラスを食することが盛になり、消費までの時間を延ばすための流通方法や管理条件に関する情報の提供が求められている。シラスを冷蔵保存すると溶解しドロドロとした状態となるが、このようなシラスのSDS-PAGEパターンは筋原線維の主要タンパク質であるミオシン等の分解が進行していることを示した (Fig.15)。しかしながら漁獲後のシラス魚体の溶解に関与するプロテアーゼの研究は少ない。このような観点から行われた研究としては南極オキアミの消化酵素に関するものがあり、内臓消化酵素の特定と生化学的な性質が明らかにされた。⁴⁷⁾ また、魚類の消化酵素に関する詳細な研究もなされているが、⁴⁸⁾ 致死後の消化酵素の活性変化に関する報告は少ない。本研究ではシラスの漁獲致死後のチルド保存中に作用するプロテアーゼの種類と活性値について検討を行った。その結果、魚体溶解に関わるプロテアーゼ活性は致死後の冷蔵時間の経過とともに上昇することを示唆する結果が得られた (Fig. 18, 19, 20)。すなわち、シラス魚体から調製した粗酵素のプロテアーゼ活性は、魚体の冷蔵期間が長くなるのに従い活性値が高くなり、活性の増大速度は温度依存性を示すことが明らかとなった (Fig. 18)。さらに冷凍解凍処理をした魚体から調製した粗酵素のプロテアーゼ活性の上昇は生鮮シラスに比べて速く

進行することも確認された(Fig. 19)。また、魚体から抽出した粗酵素溶液を熱(40 °C) 処理することによりプロテアーゼ活性は短時間に3倍程度まで上昇することも認められた(Fig. 20)。これらの結果はシラスを漁獲後冷蔵している間に、魚体溶解に関わるプロテアーゼ活性が上昇していくことを示唆するデータであり、熱処理酵素の活性値は魚体そのものの冷蔵処理を数日間行った場合のプロテアーゼ活性の状態と同様であると推察した。魚体全体のpHは冷蔵保存中も約6.8であり、本研究では中性pH域で作用するプロテアーゼについて検討を進めた。プロテアーゼの種類と各プロテアーゼの全活性に対する比率を明らかにするために、抽出粗酵素と熱処理酵素のプロテアーゼに対する各種プロテアーゼインヒビターの作用を測定した(Fig. 22, Table 4)。プロテアーゼインヒビターのなかにはAntipainやLeupeptinのように複数のプロテアーゼに対して阻害作用を示すものもある。本試験ではシステインプロテアーゼインヒビターのE-64による活性阻害率は2%程度と低いことから、AntipainとLeupeptinで阻害されたプロテアーゼは主にトリプシンなどのセリンプロテアーゼと推察することができる。抽出粗酵素のセリンプロテアーゼ活性は約690 Unit/gで全活性の54%を占めていたが、熱処理酵素の活性値は約1360 Unit/gと抽出粗酵素の約2倍となったものの、全活性の42%となり比率は低下した。活性が上昇するセリンプロテアーゼがトリプシンかどうかについて今後検討を予定するが、Ahsanら⁴⁹⁾はカタクチイワシのトリプシノーゲンについて2種のアイソフォームが存在することを報告している。シラスの冷蔵保存中にトリプシノーゲンからトリプシンが生成し、セリンプロテアーゼ活性が上昇した可能性が考えられる。一方、プロテアーゼインヒビターのChymostatinはキモトリプシンを主に阻害する。Chymostatinで阻害される活性値は抽出粗酵素で460 Unit/gと全活性の36%であったが、熱処理酵素では1746 Unit/gと約3.8倍まで上昇し全活性に占める比率も54%となった(Table 4)。シラスの冷蔵保存中に上昇するプロテアーゼ活性は、キモトリプシ

ン活性の上昇によることを示唆する結果である。キモトリプシン活性の上昇については、キモトリプシノーゲンの活性化が考えられる。Wrightらはキモトリプシノーゲンの活性化反応についてトリプシンとキモトリプシンによる限定分解によって活性化が進行することを明らかに種々報告がなされている。⁵⁰⁾⁻⁵²⁾

シラスのキモトリプシノーゲンに関するさらなる研究が必要であるが、冷蔵保存中にキモトリプシノーゲンがトリプシンなどのセリンプロテアーゼにより限定分解され活性型キモトリプシンの生成が進行したことが推察される。

Pepstatin Aはアスパラギン酸プロテアーゼを阻害する。Pepstatin Aで阻害されたプロテアーゼ活性は抽出粗酵素の全プロテアーゼ活性の6%を占めていたが、熱処理酵素では活性が消失した。プロテアーゼ活性を測定しているpHが中性域のためにアスパラギン酸プロテアーゼ活性は低いと思われるが、魚体全体のpHは中性に近い値 (pH 6.8) であるので、このような活性値と考えられる。また、熱処理中にアスパラギン酸プロテアーゼが分解された可能性がある。EDTAはメタロプロテアーゼの阻害剤であり、阻害効果から抽出粗酵素のメタロプロテアーゼ活性の活性値は255 Unit/gで全活性の20%であり、この値は熱処理をした熱処理酵素でもほぼ同じ290 Unit/gであり全活性に対する比率は9%に低下した。以上の結果からシラスの冷蔵保存中においては、漁獲直後の高鮮度状態の魚体ではセリンプロテアーゼ活性が主要酵素であるが、その後トリプシノーゲンの自己分解によるトリプシンの生成やキモトリプシノーゲンのセリンプロテアーゼによる限定分解による活性型キモトリプシンの生成が進行し、プロテアーゼ活性が飛躍的に上昇し魚体の溶解が急速に進むことが推察された。熱処理酵素中のプロテアーゼの大部分 (83%) は、卵白によって阻害される結果が得られた (Table 4)。卵白には主にトリプシンやキモトリプシン酵素を阻害する複数のプロテアーゼインヒビターが含まれており総合的なプロテアーゼインヒビター食品素材であるので、今後シラスの魚体溶解を抑制するプロテアーゼインヒ

ビターとして活用が期待される食品素材であることが示された。⁵³⁾ シラスの冷蔵保存中に魚体が溶解する現象は、セリンプロテアーゼの経時的な活性化によりプロテアーゼ活性が上昇することによることが示された。また、これらの反応は漁獲時に魚体に加わる圧力 (Fig. 17) や保存温度および凍結解凍処理が大きく影響することが明らかとなった。圧力損傷を受けたシラスでは冷蔵保存の初期から24 h程度まで自己消化は速く進むが、それ以降は差が見られなくなった。これは冷蔵保存によりシラス中のプロテアーゼ活性が高くなって分解が進むため、圧処理の影響が見えにくくなったためと推察される。

シラスの生鮮流通時間を延長するためには、漁獲時の魚体に加わる圧力の低減対策やより低い温度におけるチルド冷却保持および凍結解凍後の消費可能時間が短縮することへの対応、さらには卵白等の食品素材プロテアーゼインヒビターの応用を検討することが必要である。

第3章 うるめいわし丸干への柑橘精油添加による ヒスタミン蓄積抑制効果

緒言

ヒスタミン（以下 Hm という）の蓄積は、Hm 生成菌の産生するヒスチジン脱炭酸酵素により遊離アミノ酸のヒスチジンが脱炭酸されヒスタミンを生成するためであり、⁵⁴⁾ Hm 食中毒の原因食材のほとんどは、遊離アミノ酸のヒスチジンを多く含む赤身魚やその加工品であるとされている。⁵⁵⁾ また、2011 年から 2012 年に農林水産省が実施した調査において、発酵食品やイワシ等を原料とした塩干品で Hm 濃度の高い製品が流通している実態が明らかにされた。¹²⁾ このうちイワシの塩干品は丸干のことを示し、原料魚には、マイワシ *Sardinops melanostictus*、ウルメイワシ *Etrumeus teres*、カタクチイワシ *Engraulis japonicas* が使用されるが、中でも脂質含量が低いウルメイワシの丸干は高級品とされている。鹿児島県の北西部に位置する地域では、古くから地元で漁獲されるウルメイワシやカタクチイワシを原料とした丸干の製造が盛んであるが、食の安全を求める食品流通業界から、納品時に製品の Hm 濃度測定結果を求められるなど、製造業者はその対応に苦慮している。現在、我が国においては衛生・取扱基準に Hm の規制値は設けられていないが、Hm の規制値を設けている国もあり輸出のための水産物 HACCP 工場認可取得には、Hm のリスク管理が重要な項目となっており、丸干の海外展開への大きな障壁となっている。このような社会的背景から、いわし丸干製造における Hm 蓄積抑制技術の確立は急務となっている。これまで生鮮魚流通や発酵食品製造における好塩性 Hm 生成菌や Hm 生成菌の増殖特性に関しては多くの研究が報告されていて¹³⁾⁻¹⁶⁾ 水産発酵食品では発酵スターターを利用した Hm 蓄積抑制技術の開発が進んでいる。¹⁷⁾ 一方、いわし丸干に関しては、Hm 食中毒事例の検証で、

海洋細菌である *Photobacterium phosphoreum* が原因菌と推定された報告はあるものの、¹⁸⁾ 丸干の Hm 蓄積抑制に関しては原料の鮮度管理や製品の低温流通¹⁹⁾ 以外の具体的な抑制技術は確立されていないのが実情である。本研究ではいわし丸干の中でも取扱量も多いウルメイワシを対象として、いわし丸干製造時における Hm 蓄積リスクの高い加工工程と生成原因や条件を明らかにし、Hm 蓄積を軽減するための実用的な技術を開発することを目的とした。近年、植物由来の精油には大腸菌やブドウ球菌などに対する殺菌効果や²⁰⁻²²⁾、Hm 生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素 (*hdc*) 活性阻害に関する報告²³⁾があることから、本研究では植物由来の精油の応用試験を行った。精油は鹿児島県の丸干製造が盛んな地区の柑橘郷土銘菓「文旦漬」の製造時に派生する文旦 *Citrus grandis* 果皮から製造されているものを用い、うるめいわし丸干から分離した Hm 生成菌に柑橘精油を添加し、増殖抑制効果と *hdc* 活性阻害作用の検証を行った。また、うるめいわし丸干製造工場での精油添加効果について実証試験を行った。

材料および方法

丸干製造工場でのサンプリング 鹿児島県内のうるめいわし丸干製造工場において、原料魚及び塩水浸漬、水洗による塩抜きならびに乾燥の各工程終了時にウルメイワシを 5 尾ずつ採取した。サンプルはポリエチレン製の保存袋に入れ氷蔵で鹿児島県水産技術開発センターに持ち帰り試験に供した。なお、サンプルは分析に供するまで -40 °C で冷凍保存した。

ヒスタミン (Hm) 蓄積量の測定 半解凍状態で 1 尾ずつミンチにし、ミンチ肉 2 g に 8 倍量のイオン交換水を加え、ポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA 製 PT2500E) でホモジネートし、遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 5 分間) により上清を得た。得られた上清を Histamarine kit (Beckman Coulter)

を用いた ELESAs 法により反応させマイクロプレートリーダー（東ソー MPR-A4i）にて 400 nm における吸光度を測定し、Hm 標準液の濃度と吸光度から作成した検量線により Hm 濃度を求めた。

水分量と塩分濃度の測定 使用したミンチ肉の水分は常圧加熱乾燥法（105℃）で測定した。塩分濃度はミンチ肉を 8 倍量のイオン交換水でホモジネートし塩分計（アタゴ製 PAL-ES1）で測定した。

丸干製造モデル試験 乾燥工程における好塩性細菌数、Hm 生成菌数、Hm 蓄積量、塩分濃度及び水分活性の変化を把握するために製造モデル試験を実施した。

供試魚 鹿児島県西方海域で漁獲され鹿児島県水産技術開発センターに氷蔵で搬送したウルメイワシ（被鱗長 16.0 ± 2.4 cm，体重 57.4 ± 12.1 g）44 尾を使用した。なお、24 尾は製造モデル試験に、残りの 20 尾は Hm 生成菌の接種試験に用いた。

丸干の試作 冷水で原料ウルメイワシを洗浄した後、冷 10% 食塩水に 3 時間浸漬した。その後、冷水で洗浄し水切りを行い、冷風乾燥機（ユニマック製 SD - 50）を使用して 20℃で 24 h 及び 72 h 乾燥して丸干を試作し分析に供した。

好塩性細菌数、Hm 生成菌数および Hm 蓄積量の測定 細菌数の測定は、サンプルの頭と尾鰭を外し、5 尾を個別に分析に供した。ミンチ肉 4 g を Satomi et al.⁵⁶⁾および木村ら¹⁵⁾の方法に準じ、0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び

1.5% 食塩を添加したトリプトチン・イブロス（以下 TSB という）36 mL を添加し、30 °C で 48 h 培養後の濁度から最確数（MPN）法⁵⁷⁾により好塩性細菌数を求めた。また、Hm 生成菌数については、好塩性細菌数の測定に用いた培地の中からチェックカラーヒスタミン（キッコーマン）により黄色く呈色したものを最確数（MPN）法⁵⁷⁾を用いて求めた。また Hm 蓄積量の測定はサンプルの頭と尾鰭を外し、各工程で 5 尾ずつミンチにし、1 個体ごとの Hm 蓄積量を測定し 5 尾の平均値で表記した。

塩分濃度と水分活性の測定 サンプルは胸鰭までの頭部と腹鰭から以降の尾鰭を切り外した胴体部分の脊椎骨より腹肉側をミンチにした。塩分濃度は、ミンチに 8 倍量のイオン交換水を加えホモジネートし塩分計で測定した。また、水分活性は簡易コンウェイ・ユニット法⁵⁸⁾により測定した。

試作丸干からの Hm 生成菌の分離 Hm 生成菌数測定に用いた MPN 試験液のうち Hm の生成が認められた培地を選抜し、限界希釈法⁵⁶⁾により Hm 生成菌を分離し、簡易同定用のサンプルとした。また、分離した菌は Satomi et al.⁵⁶⁾の手法に準じ、0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加した TSB 培地で 30 °C にて 22 h 培養し、分離菌の Hm 生成量を測定した。

Hm 生成菌の簡易同定 Hm 生成菌株の簡易同定は 16S rRNA 遺伝子塩基配列による分子解析により行った。0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加したトリプトチン・イブロス（TSA）平板培地上で発育させた Hm 生成菌の 1 コロニーを 1 白金耳かきとり、1% TritonX-100 を加えた TE 緩衝液（10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0）に懸濁し、100 °C で 5 分間加熱した。加熱後直ちに氷冷し、クロロホルム-イソアミルアルコール（24:1）を等量

加え混合し、遠心分離にて上清を回収し、PCR の鋳型 DNA とした。細菌 DNA の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅は、真正細菌ユニバーサルプライマーである 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-TTACCTGTTACGACTT-3') を用いて行った。⁵⁹⁾得られた増幅産物の確認は 1.5%アガロースゲル電気泳動後、ゲルを臭化エチジウムにて染色して行った。PCR により増幅された 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の配列を DNA シーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA) により決定し、Genbank, EMBL および DDBJ のデータベースの BLAST アルゴリズム⁶⁰⁾ により既知の配列との相同性を検索し、近縁種を推定した。

Hm 生成菌の増殖温度依存性 0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5%食塩を添加した TSB 培地 25 mL に試作丸干から分離した Hm 生成菌液 0.075 mL(10^7 cfu/mL)を添加し、15 °C、20 °C、25 °C、30 °Cで培養し、経時的に培地の濁度 (O.D. 600 nm) をマイクロプレートリーダー (東ソー 製 MPR-A4i) にて測定した。

丸干から分離した Hm 生成菌のウルメイワシ肉への接種試験 ウルメイワシの背肉を滅菌リン酸緩衝液で洗浄し、3 % 食塩水に 1 h 浸漬後 -35 °Cで冷凍保管した。2 日後に半解凍状態でフードプロセッサー (Panasonic MK-K60P) を用いてミンチ肉を調製した。ミンチ肉 30 g を 2 等分し、一方は試作丸干から分離し予め 10^7 cfu/mL に調整した Hm 生成菌を 2 L 接種し 20°C で 24 h 保存し Hm 濃度を測定した。残りのミンチ肉は対照試験に供した。

柑橘精油 鹿児島県内で菓子製造時に派生する文旦果皮を圧搾、遠心分離し

て製造される文旦精油を購入し使用した。

Hm 生成菌に対する柑橘精油の増殖抑制試験 0.5 % L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加した TSB 培地 5 mL に試作丸干から分離した Hm 生成菌液 0.015 mL (10^7 cfu / mL) を接種した。接種後の培地を十分に攪拌し、直ちに柑橘精油を培地に対して 0.5%, 1.0%, 2.0% 4.0% 量添加し攪拌した。それぞれ 30 °C に温度設定した光学検出器付き小型振盪培養器 (ADVANTEC 製 TN-1506) を用いて培養を開始し、経時的に培地の濁度を (O.D.660nm) 計測した。

Hm 生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素(hdc)に対する柑橘精油の阻害作用測定
hdc 粗酵素液の調製 0.5% L-ヒスチジン塩酸塩及び 1.5% 食塩を添加した TSB 培地 5 L に丸干から分離した Hm 生成菌液 6.5 mL (10^7 cfu / mL) を加え、30 °C で 8 時間培養した。この培地を遠心分離 (8,000 rpm, 10 分, 4 °C) して菌体を得た。得られた菌体は滅菌リン酸緩衝液で 2 回洗浄した。その後 200 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.3) を加え氷中で超音波ホモジナイザー (トミー精工 製 UD-21P) を用いて粉碎した後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 分, 4 °C) により得られた上清をタンパク質濃度が 1.5 mg / mL になるように調整し粗酵素液とした。

hdc 活性阻害反応試験 25 mM L-ヒスチジン塩酸塩と 200 mM 酢酸アンモニウム混合液 (pH 5.0) を酵素基質とした。基質 0.8 mL に粗酵素液 0.2 mL と柑橘精油 0.2 mL を加え、35 °C で反応を開始し、15 分後に 16% (w/w) トリクロロ酢酸を加え反応を停止させた。その後生成した Hm を Histamarine kit (Beckman Coulter) による ELISA 法で測定した。柑橘精油を加えずに同様の酵素

反応を行ったものを対照として上井ら²¹⁾の方法に準じて残存活性として表した。

柑橘精油によるヒスタミン蓄積抑制実証試験 うるめいわし丸干製造工場において、通常の丸干製造とともに柑橘精油を添加した丸干を製造した。すなわち、塩水浸漬工程において漬け込み塩水の0.5%量の柑橘精油を添加し適時攪拌を行いながら3h浸漬をした。その後20℃で20hの乾燥を行った。製造後直ちに凍結処理を行い分析に供するまで-25℃で冷凍保管した。

統計処理 得られたデータは、等分散であることを確認したうえで一元配置分散分析による多重比較検定または t 検定を行い評価した。

結果

加工工程ごとの Hm 蓄積実態調査 丸干製造工場でサンプリングした原料魚及び各工程終了後のサンプルの水分量(%)及び塩分濃度(%)を Table. 5 に Hm 蓄積量を Fig. 23 にそれぞれ示す。水分量(%)は原料魚から塩抜き工程までは $70.5 \pm 1.0\%$ から $74.5 \pm 4.0\%$ の範囲内であり、乾燥工程を経て $59.6 \pm 2.2\%$ に減少した。塩分濃度(%)は塩水浸漬後で $2.9 \pm 0.2\%$ となった。塩抜き後に $1.7 \pm 0.3\%$ と低くなり、乾燥工程後は水分量の低下に伴い $4.0 \pm 0.6\%$ まで高くなった。Hm 蓄積量は原料魚、塩水浸漬後、塩抜き後でそれぞれ 0.8 ± 0.1 ppm (乾物換算 2.9 ± 0.5 ppm) , 0.9 ± 0.1 ppm (乾物換算 2.9 ± 0.3 ppm) , 0.7 ± 0.1 ppm (乾物換算 2.8 ± 0.3 ppm) と低かったが、乾燥工程を経ると 83.9 ± 75.2 ppm (乾物換算 206.0 ± 185.9 ppm) と有意に高くなった ($P < 0.01$) 。

Table. 5 Moisture and Salinity of fish on process dried whole red-eye round herring

	Raw fish	Salted fish	Desalinized fish	Dried whole fish
Moisture (%)	72.7±2.0	70.5±1.0	74.5±4.1	59.6±2.2
Salinity (%)	0.88	2.9±0.2	1.7±0.3	4.0±0.6

Values are mean±standard deviation ($n=5$).

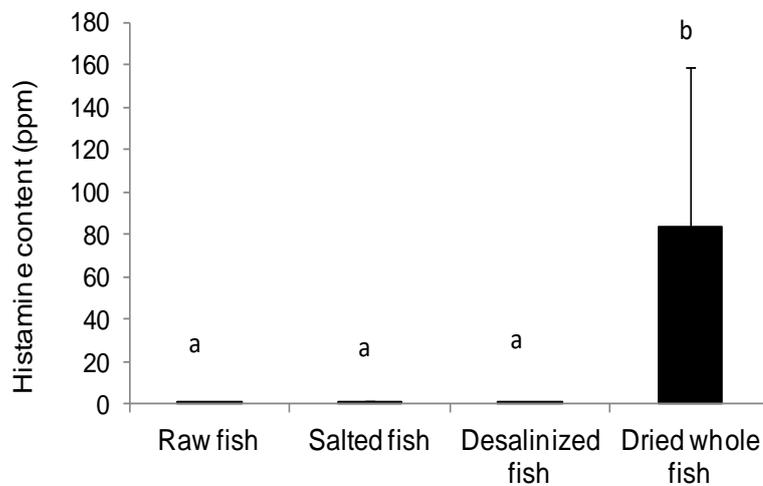


Fig. 23 Histamine content in fish on the each process of producing dried whole red-eye round herring. Values are mean±standard deviation. ($n=5$) Difference letters (a,b) indicate significant difference ($p<0.01$).

乾燥工程による好塩性細菌数, Hm 生成菌数, Hm 蓄積量, 塩分濃度および水分活性の変化 丸干モデル試験の各工程における好塩性細菌数及び Hm 生成菌数の結果を Fig. 24, 25 に Hm 蓄積量を Fig. 26 に示す。原料魚の好塩性細菌数は $3.6 \pm 0.4 \log \text{MPN/g}$ であったが, 24 h 及び 72 h 乾燥後にはそれぞれ $8.0 \pm 0.4 \log \text{MPN/g}$, $8.6 \pm 0.5 \log \text{MPN/g}$ と有意に増加した ($P < 0.01$)。なお, 24 h 乾燥と 72 h 乾燥について比較したが乾燥時間が増えても菌数に有意な変化は認められなかった。一方, Hm 生成菌数については原料魚で $2.1 \pm 1.1 \log \text{MPN/g}$ であったが, 24 h 及び 72 h の乾燥工程後の Hm 生成菌数はそれぞれ $7.8 \pm 0.5 \log \text{MPN/g}$, $8.1 \pm 0.7 \log \text{MPN/g}$ と有意に増加した ($P < 0.01$)。なお, 原料魚の Hm 蓄積量は $0.4 \pm 0.1 \text{ ppm}$ (乾物換算 $1.4 \pm 0.5 \text{ ppm}$) で低い値を示した。一方 24 h 乾燥後には $290.3 \pm 153.5 \text{ ppm}$ (乾物換算 $907.7 \pm 497.9 \text{ ppm}$) となり 72 h 乾燥後では $3934.0 \pm 645.5 \text{ ppm}$ (乾物換算 $10306.2 \pm 2034.4 \text{ ppm}$) と乾燥時間が長くなるにつれ有意に増加した ($P < 0.01$)。また, 原料魚, 24 h 乾燥後及び 72 h 乾燥後の試作丸干の塩分濃度と水分活性を Table. 6 下段に示す。塩分濃度は, 原料魚で $0.4 \pm 0.1\%$, 24 h 乾燥後で $3.3 \pm 0.2\%$, 72 h 乾燥後で $4.2 \pm 1.2\%$ であった。水分活性は原料魚で 0.96 ± 0.01 であり 24 h 乾燥後で 0.95 ± 0.00 , 72 h 乾燥後で 0.93 ± 0.01 となり, 乾燥工程を経て塩分濃度が高く水分活性は低くなったが, 24 h 乾燥では微生物の増殖が可能な値であった。

Table 6 Salinity and Water activity of fish on process dried whole red-eye round herring

	Raw fish	Dried whole fish(24h)	Dried whole fish(72h)
Salinity (%)	0.40 ± 0.11	3.33 ± 0.15	4.22 ± 1.23
water activity	0.96 ± 0.01	0.95 ± 0.00	0.93 ± 0.01

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

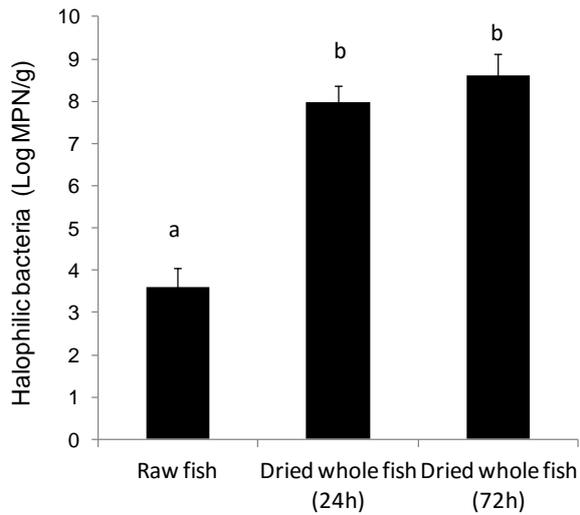


Fig. 24 Effect of drying process time on the growth of halophilic bacteria. The viable cell count as halophilic bacteria in raw fish of red-eye round herring, dried whole red-eye round herring dried for 24 h and 72 h at 20 °C was measured. Values are mean±standard deviation. ($n=5$) Difference letters (a,b) indicate significant difference ($p<0.01$).

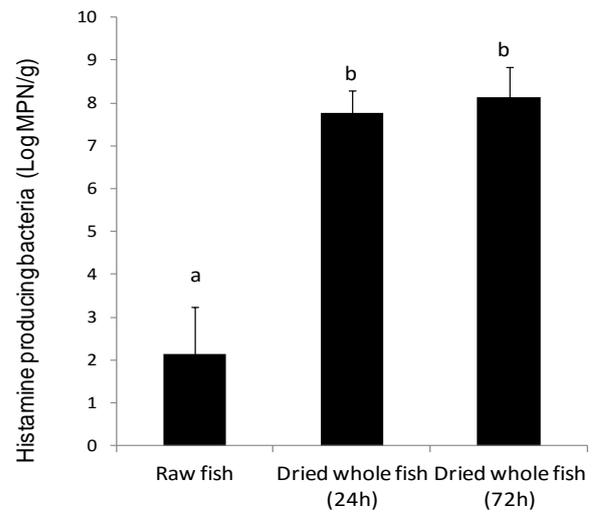


Fig. 25 Effect of drying process time on the growth of histamine -producing bacteria. The viable cell count as histamine producing bacteria in the same materials used in Fig. 2 was measured. Values are mean±standard deviation. ($n=5$) Difference letters (a,b,c) indicate significant difference ($p<0.01$).

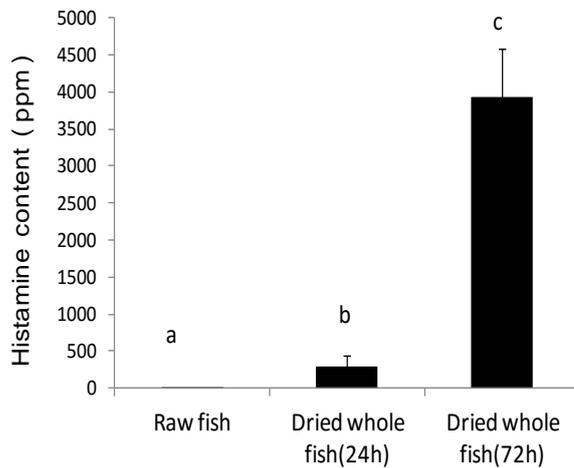


Fig. 26 Effect of drying process time on the histamine accumulation in dried whole red-eye round herring. The histamine content in the same materials in Fig. 2 was measured.

試作丸干の Hm 生成菌の簡易同定 簡易同定の結果, 試作丸干から Hm 生成能を持つ菌が検出され, 分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は *Photobacterium angustum* (以下 *P. angustum* という) と最も近く 99.15% の相同性を示し, 本菌種であると推定された。

丸干から分離した Hm 生成菌の増殖温度依存性 培養温度と *P. angustum* の増殖の関係を Fig. 26 に示す。15 °C から 30 °C の培養では温度が高いほど増殖速度が速かった。一方で, 15 °C でも速度は遅いものの増殖することが確認された。

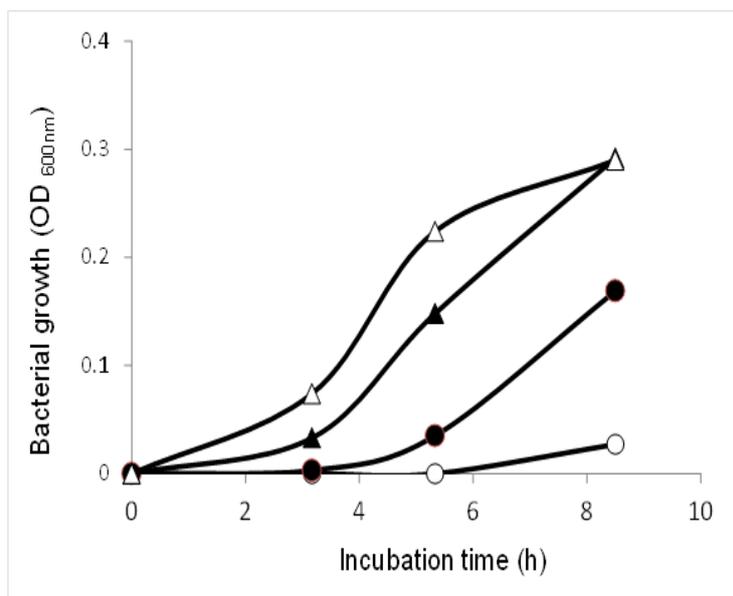


Fig. 27 Effect of temperature on the growth of histamine-producing bacteria. Bacteria growth in TSB broth added 0.5% L-histidine hydrochloride and 1.5% sodium chloride was measured by optical density at 600 nm during cultivation at 15 (○), 20 (●), 25 (▲) and 30 °C (△).

試作丸干から分離した Hm 生成菌のウルメイワシ肉への接種試験 Hm 生成菌を接種したミンチ肉（肉玉）を 20 °C で 24 h 保持した際の Hm 濃度は 105.01 ppm であり，Hm 生成菌を接種しなかった場合の Hm 濃度は検出限界以下であった。このことから，試作丸干から分離された Hm 生成菌（*P. angustum*）はウルメイワシの肉中で Hm を生成することが確認された。

丸干から分離した Hm 生成菌に対する柑橘精油の増殖抑制効果検証

P. angustum の増殖に対する柑橘精油添加の効果を Fig. 27 に示す。*P. angustum* を接種した柑橘精油無添加の培地では培養時間の経過とともに吸光度が上昇し増殖が確認された。一方，柑橘精油を 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 % 添加したものは添加量に関わらず全ての培地で培養時間が経過しても吸光度は上昇せず *P. angustum* の増殖は抑制された。（図には 0.5% の添加結果を示す）また，30 °C で 23 h 培養した時の培地の Hm 蓄積量は柑橘精油無添加で 197.91 ppm, 0.5% 添加で 0.79 ppm となり，柑橘精油添加により Hm 生成が抑制された。

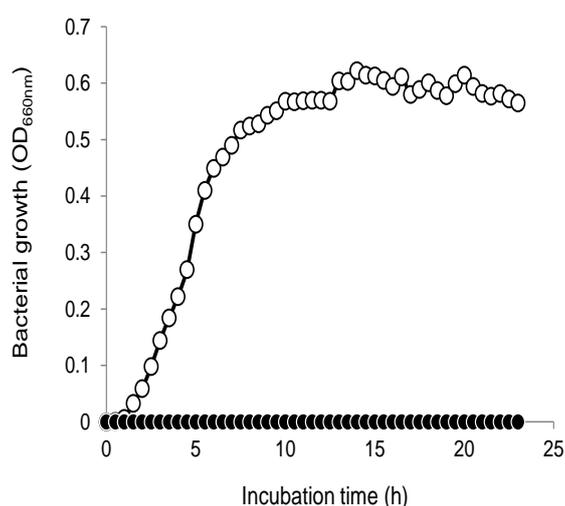


Fig. 28 Effect of citrus essential oil on the growth of histamine-producing bacteria. Bacteria growth in TSB broth added 0.5% L-histidine hydrochloride and 1.5% sodium chloride was measured by optical density at 660 nm during cultivation at 30 °C. Open circles; without essential oil from pomelo. Closed circles; with 0.5% essential oil from pomelo treatment.

丸干から分離した Hm 生成菌の *hdc* に対する柑橘精油の活性阻害 前述のとおり柑橘精油添加により *P. angustum* の増殖と Hm 生成の抑制効果が認められた。次に *P. angustum* の *hdc* を柑橘精油が阻害するかについて *P. angustum* の *hdc* 粗酵素液を使って測定を行った。その結果、*hdc* 粗酵素反応系に文旦精油を添加しても Hm の生成はわずかしか抑制されず、*hdc* の残存活性は 89%であった

実証化試験 丸干工場で行った実証化試験で得られた丸干の Hm 蓄積量の分析結果を Fig. 28 に示す。通常製品では最大で Hm 濃度 27.59 ppm で平均 17.0 ± 8.44 ppm であったのに対し柑橘精油を添加したものは、最大で 2.93 ppm, 平均で 1.57 ± 0.40 ppm と柑橘精油を塩水浸漬工程で Hm 蓄積量は有意に低かった ($P < 0.01$)。

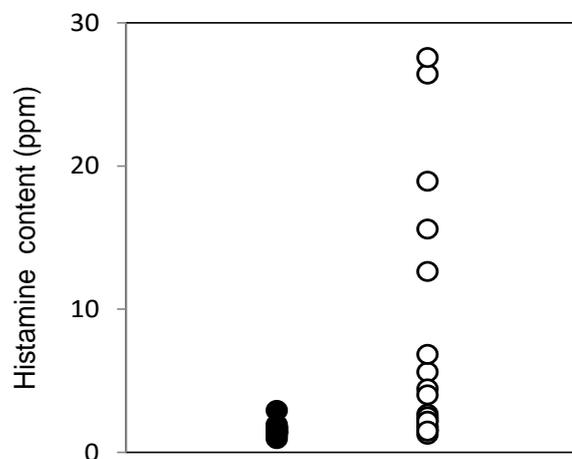


Fig. 29 Effect of essential oil from pomelo treatment on histamine accumulation in dried whole red-eye round herring products. The dried whole products of red-eye round herring were produced in a fishery factory. The essential oil from pomelo treatment was done at salting process with 0.5% essential oil for 3 h. Then, the fish was dried for 20 h at 20°C. Open circles; without essential oil from pomelo treatment, Closed circles; with essential oil from pomelo treatment.

考察

うるめいわし丸干製造の加工工程での Hm 蓄積の実態調査により、乾燥工程を経ると Hm 濃度が急激に上昇することが確認された。また、丸干製造モデル試験の結果では、原料魚に存在する好塩性細菌のうち約 10 % が Hm 生成菌であった。原料魚の Hm 生成菌数は $2.14 \pm 1.09 \log \text{MPN} / \text{g}$ であったが、乾燥工程を経ると Hm 生成菌の占有率は高まった。Hm 生成菌数は 24h 乾燥で $7.76 \pm 0.54 \log \text{MPN} / \text{g}$ 、72 h 乾燥で $8.13 \pm 0.72 \log \text{MPN} / \text{g}$ と有意に増加し、これに対応するように Hm 蓄積量も原料魚では 1 ppm 未満であったが、24 h 乾燥後で約 290 ppm、72 h 乾燥後には約 3900 ppm と有意に高くなったことから、20 °Cにおける乾燥工程が Hm 蓄積に影響を与えることが明らかとなった。Hm 生成には Hm 生成菌の関与が知られているが、⁶¹⁾本研究におけるうるめいわし丸干からは海洋性細菌の一種でグラム陰性菌の *P. angustum* が検出された。また、本研究で使用した丸干の腹側における水分活性は 24 h 乾燥後で 0.95 ± 0.00 と高く、72 h 乾燥でも 0.93 ± 0.01 とサンプルによっては、0.94 以上となるサンプルも確認された。本研究で水分活性が高かった理由は、近年の消費者嗜好に伴う魚肉加工品の低塩分化による脱水効果の低下と内臓を含んだまま製造されるため腹部の水分が蒸発しにくいことが影響していると考えている。モデル試験の結果から乾燥後のウルメイワシには、好塩性細菌及び Hm 生成菌が $10^5 \text{MPN} / \text{g}$ から $10^6 \text{MPN} / \text{g}$ 程度存在し、さらに乾燥後の塩分濃度が 3.3 % から 4.2 % であったことから乾燥中の魚体内は海洋性細菌や Hm 生成菌が増殖し易い環境になっていることが示された。これらのことから、20 °C 乾燥中でもウルメイワシ魚体中は、Hm 生成菌にとって高い水分活性と適度な塩分濃度および温度の環境にあり、*P. angustum* が増殖し Hm が蓄積するのに十分な条件が揃っていることが推察される。Hm 生成菌として本研究で確認された *P. angustum* および、すでに報告されている *P. phosphreumu*、*P. damsela* と

もに海洋性細菌であることから餌の補食時にウルメイワシ体内に取り込まれる可能性があり、また丸干製造における魚肉の塩分濃度や乾燥温度条件は、いずれの細菌も丸干製造中に増殖可能な条件である。したがって、うるめいわし丸干における Hm 蓄積の原因菌はこれら *Photobacterium* 属の海洋細菌の関与が大きいと推察した。うるめいわし丸干製造中においては、魚体内に Hm 生成菌が存在し増殖環境を整えば Hm が高濃度に蓄積するリスクが高いことが本研究で明らかにされたことから、乾燥工程における Hm 生成菌の増殖を阻止するか、もしくは、Hm 生成菌の *hdc* 酵素活性を阻害することにより Hm の蓄積を抑制する必要がある。植物精油には、植物自体を微生物から守るための抗菌作用を持つことが知られている。⁶²⁾丸干から分離した *P. angustum* の培養試験において、柑橘精油は強い増殖抑制作用を示した。丸田ら²²⁾は、テルピネンを主成分とするティートリー (Tea-tree) 精油がグラム陰性菌であるネズミチフス菌に対して強い抗菌作用を有し、精油の主成分だけでなく複数の成分の相互作用を受けている可能性を報告し、また岡村ら²⁰⁾は間伐材精油を用いた試験でグラム陽性菌及びグラム陰性菌の両方に抗菌力を示し、その主要な成分はモノテルペン炭化水素であることを報告している。これらのことから、本研究でグラム陰性菌の *P. angustum* に対して強い増殖抑制作用を示したことは精油中の単一成分での作用ではなく各種成分を含んだ柑橘精油を用いたためと推察している。すなわち、柑橘精油にはリモネン、 γ -テルピネン、 α -ピネンといったモノテルペン炭化水素が約 90%含まれており、これらの相互作用により強い増殖抑制作用を示したものと推察している。一方、*P. angustum* の *hdc* 酵素に対する柑橘精油の阻害作用については、残存活性が 89%であり、わずかな阻害であった。精油成分は、細胞膜の脂質 2 重層構造に入り込みやすく、モノテルペン炭化水素の分子量が小さいために皮膚への浸透性に優れているとされている。⁶³⁾本研究で行った製造現場での実証試験において、塩水浸漬工程で食塩水に柑橘精油を

添加し魚体に柑橘精油を接触させた。その結果、柑橘精油を添加したものは、柑橘精油を添加しないものに比べて有意に Hm の蓄積が少なく、1 ppm 程度であった。このことは、約 3 時間の塩水浸漬時間で柑橘精油が魚体中に浸透し、乾燥工程での Hm 生成菌の増殖が抑制されたために Hm がほとんど蓄積しなかったものと推察した。本研究からうるめいわし丸干の Hm 蓄積抑制にとって柑橘精油の応用は有効な手段と成り得ることを明らかにした。

第4章 総括

本研究は、鹿児島県産魚介類及び水産加工品の鮮度・品質の向上に関する取り組みを科学的に検証し、漁業者および水産加工業者に広く普及することを目的とした。

第1章ではゴマサバの短期蓄養におけるストレス回復効果および体成分の変化について研究成果を報告した。漁獲したゴマサバを短期間蓄養し、出荷時に1尾ずつ丁寧に活けしめ処理を行うことで、価値の高い刺身用生鮮魚として流通させる新たな取り組みについて科学的に検証した。ゴマサバに対する強制運動付与試験の結果は、現場で実施している揚網作業は血漿コルチゾル濃度の変化をきたすがATP濃度の変化に影響しないことが示された。漁獲時の揚網作業は魚にストレスを与えるものの生体内エネルギーの一つであるATPを消耗させ死を招くほどの運動負荷ではないことが明らかになった。また、漁獲ストレスは数日間短期蓄養することで確実に回復することが明らかとなった。短期蓄養は漁獲ストレスの回復以外にも、注文に応じて1尾ずつ活けしめ処理を施す高鮮度出荷を可能にする方法である。また、市場への供給量を考慮しながら計画的に出荷することも可能となるので価格の安定化も期待できることになる一方、市場の流通状況によっては、漁獲時に受けたストレスが回復した後でも出荷を見合わせ、数週間蓄養を行うこともある。一般に、蓄養期間中は無給餌であることから、長期の蓄養は魚を飢餓にし「痩せ」により商品としての品質の低下を引き起こす懸念がある。そこで、本研究ではゴマサバについて刺身用生鮮魚として価値の高い状態での出荷が可能な蓄養期間の検証を行った。本研究で実施したゴマサバの蓄養試験においては、蓄養開始から数日の間に、内臓重量比や肝臓重量比が減少した。この結果はコイやブリで得られた知見²⁷⁾²⁸⁾と同様であり、無給餌蓄養による絶食に伴い、消化物の排出に

よる重量減少と内臓や肝臓に貯蔵された脂質やグリコーゲンおよびタンパク質がエネルギー源として消費されたためと推察した。一方、肥満度は蓄養約 2 週間後も有意に減少せず、外見上の「痩せ」が認められない結果となった。また、蓄養期間中の筋肉脂質含有量は変化が認められなかった。これは本研究で使用したゴマサバの筋肉中の脂質含有量が約 4%と低いため生命活動に必要な一定量の脂肪量を維持したためと推察した。一方、筋肉タンパク質量については、蓄養開始直後からわずかではあるが有意に減少した。これは筋肉タンパク質が絶食時におけるエネルギー生産のためにアミノ酸へ分解され、生成した遊離アミノ酸による糖新生が行われたためと推察した。ゴマサバの無給餌蓄養では蓄養 15 日目までは内臓の重量比が低下したが魚体重の数%と減少率は少ないため、肥満度を指標とした場合「痩せ」の状態を示さない結果となった。また刺身として重要な品質評価要素³²⁾である筋肉の弾力は蓄養 14 日目で有意に高くなり、また、蓄養期間 21 日を通して蓄養開始日の弾力より低くなることはなかった。これらのことからゴマサバの短期蓄養においては、約 15 日目程度までが刺身商材としての価値を維持可能とする蓄養期間であると結論した。ゴマサバの短期蓄養は素材の有用性を最大限に引き出し価値を高めるための取り組みである。蓄養施設整備を必要とするが、給餌は不要であり、計画出荷が可能となるので、まき網漁業のみならず定置網漁業など、一度に大量に漁獲する漁業で活用できる有用な方法と考える。なお、短期蓄養を他魚種に応用する場合、絶食時の体成分の変化は魚種により異なることが予想されるため、魚種別に蓄養可能期間を検討する必要がある。

第 2 章ではシラスの生鮮流通の取り組みを支援するための研究成果を報告した。生鮮のシラスは冷蔵保存中でも魚体溶解が著しく速いため、その流通は限定的である。近年食の多様化が進み、希少価値を求める消費者の

声に対応するために、一部の生産者が生鮮シラスの流通を試み始めた。シラスはこれまで加工原料として扱われていたために、シラスの冷蔵保存中の品質変化について研究した事例はない。そこで本研究では、冷蔵保存時の魚体溶解について、漁獲時の圧力による魚体損傷や冷凍処理の影響およびシラス内性消化酵素の活性変化を測定し生食用流通のための適切な水揚げ条件や流通温度および冷凍処理の影響について検証した。先ずシラスのチルド保存中に作用するプロテアーゼの種類と活性値について検討を行った。その結果、シラス魚体から調製した粗酵素のプロテアーゼ活性は、魚体の冷蔵期間が長くなるのに従い活性値が高くなり、活性の増大速度は温度依存性を示すことが明らかとなった。さらに冷凍解凍処理をした魚体を冷蔵すると、魚体のプロテアーゼ活性の上昇は生鮮シラスに比べて速く進行することも確認された。また、魚体から抽出した粗酵素溶液を熱（40℃）処理するとプロテアーゼ活性は短時間に3倍程度まで上昇することも認められた。これらの結果はシラスを冷蔵している間に、魚体溶解に関わるプロテアーゼ活性が上昇していくことを示唆するデータである。熱処理酵素の活性値は魚体そのものの冷蔵処理を数日間行った場合のプロテアーゼ活性の状態と同様であった。シラスの冷蔵保存中にトリプシノーゲンからトリプシンの生成あるいは肝膵臓分泌性トリプシンインヒビターの分解などが進行しトリプシン様プロテアーゼ活性が上昇したことが推察された。抽出粗酵素と熱処理酵素のプロテアーゼ活性に対する各種プロテアーゼインヒビターの作用を測定した結果から、漁獲直後の高鮮度状態の魚体ではトリプシン様プロテアーゼ活性が主要酵素であると推察した。さらに冷蔵保存によりトリプシノーゲンの自家加水分解によるトリプシンの生成とキモトリプシノーゲンのトリプシンによる加水分解により活性型キモトリプシンの生成が進行し、プロテアーゼ活性が飛躍的に上昇し魚体の溶解が急速に進むものと推察した。また、これらの反応には漁獲時に魚体に加わる圧力や保存

温度および凍結解凍処理が大きく影響することを明らかにした。以上のことからシラスの生鮮流通時間を延長するためには、漁獲時の魚体に加わる圧力の低減対策、より低い温度におけるチルド冷却保持および凍結解凍後の消費までの時間を短縮するなどの対応が必要と結論した。これまでに生鮮シラスの自己溶解に関する研究報告はなかったことから、本研究で得られた結果は貴重な知見となった。生鮮シラスの流通に取り組もうとする漁業者、漁業協同組合ならびに流通業者に対しては、漁獲から水揚げまでの時間が短い漁獲物に限定し、また、漁獲時に圧力が加わり魚体が損傷した可能性のあるものを取り扱わない、さらに魚体温をできるだけ急速に低下させ流通温度も極力低いチルド温度で管理する等の具体的な情報を提供していくこととしている。

第3章では、食の安全を担保するための水産加工業者の取り組みである丸干品の Hm 含量低減に関する研究成果を報告した。うるめいわし丸干の製造各工程でサンプリングを行い Hm が生成する工程を調査した結果、乾燥時に Hm 蓄積量が増大することを明らかにした。丸干の製造モデル実験を行い、乾燥前後の丸干の Hm 生成菌数および Hm 濃度を測定した結果、20 °C での乾燥中に Hm 生成菌は増殖し、乾燥時間が長くなるほど菌数が増加した。また、Hm 生成菌の増殖に伴い Hm も蓄積した。うるめいわし丸干から検出した Hm 生成菌の 1 種である *P. angustum* は、丸干製造で行われている乾燥温度の 15°C から 30°C の温度帯で増殖可能であることが確認された。丸干の水分活性は 0.93 から 0.95 の範囲内であり、しかも塩分濃度も 3.3% から 4.2% と Hm 生成菌が増殖しやすい環境となっていることも明らかにした。一方、柑橘の文旦精油は *P. angustum* の増殖を強く抑制する働きがあることを明らかにした。そこで、丸干製造工場における実用化試験を行った。その結果、塩漬用の食塩水に文旦精油を添加した溶液にウルメイワシを浸漬することにより、乾燥工程における Hm の蓄積を抑制できることを明らかにした。現行の製造工程では原料の鮮度管理を行うだ

けでは Hm 生成菌の増殖を防ぐことができないと考えており、それ故、文旦精油浸漬技術は Hm 蓄積の低減方法として有効な手段と成り得ると結論した。

以上に示した研究報告は、いずれも鹿児島県で多獲されるサバやイワシまたはそれらを原料とした加工品の品質向上や価値の創出に関する内容であり、漁業者や水産加工業者の新しい取り組みを後押しするための技術研究成果として位置付けられる。

第 1 章で取り上げたゴマサバの短期蓄養については、これまで漁業者の経験の上に築いてきた取り組みに対して、科学的なデータを収集することにより、その技術を科学的に検証することができた。さらに業者が求めていた魚の品質を維持可能とする最適蓄養期間について示唆するデータを提供することができた。また、短期蓄養技術は、今後、各種の漁業や魚介類での応用が期待でき、さらに、短期蓄養が漁獲ストレスを低減するという知見は活魚輸送にも応用できるものと推察する。また、第 2 章は生鮮原料として扱われてこなかったシラス（イワシ稚魚）を生鮮原料として利用することを目的としており、これまで研究対象とされていない技術課題に取り組んだ。本研究内容に関する報告は少なく、冷蔵保存中のシラスの魚体溶解を解明した点は貴重な知見であり、生鮮シラスの流通に利用されることが大いに期待される。このように第 1 章および第 2 章は、漁獲時の取り扱い方法や活けしめ処理、低温管理など魚の価値を最大限に引き出すことで、同じ魚でも価値を変えられることを科学データにより実証した貴重な研究成果となった。また第 3 章では、従来の製造工程管理では Hm の蓄積を抑制できなかつたうるめいわし丸干について、実用レベルで Hm 蓄積を抑制する技術開発に成功したことを報告した。この研究結果は、近い将来義務化が予定される加工場への HACCP 導入の際し、鹿児島県内の丸干製造業者に対し貴重な知見を提示することができるものである。

鹿児島県産水産物の流通を活発にし、価値を高めるための方策の一つに、他

産品との差別化が挙げられる。物品が豊富な現代において、他より鮮度や品質の高い水産物を提供するという事は、競争が激化している水産物の流通にとって大きな優位点となり同時にPR情報として他産品との差別化に繋げることができる。水産物の取り扱いや食品加工においては経験値に基づいた取り組みが多い。第1章から第3章で報告した水産物やその加工品の鮮度や品質の向上に関する研究データを水産業界に還元することの意義はとても大きい。これらの研究で得られた新たな発見やデータを水産業界へ発信することは、新しい視点での取り組みに科学的な根拠を加え、技術を広く普及させる重要な役割を果たすと考える。今後も水産物の品質向上に関する技術課題の解決に向けて研究を続け、産業界への技術提供に努めて参りたい。

文献

- 1) 平成 28 年度鹿児島県水産施策の概要
<https://www.pref.kagoshima.jp/af01/sangyo-rodo/syoko/sesakunogaiyou/h28sesaku.html>.鹿児島県, 鹿児島.
- 2) 鹿児島県水産業振興基本計画
<https://www.pref.kagoshima.jp/af05/sangyo-rodo/rinsui/shisaku/suisankihonkeikaku.html>.鹿児島県, 鹿児島.
- 3) 天野慶之, 尾藤方通, 河端俊治. 漁獲直後の処理方法が肉質に及ぼす影響— I . ソーダカツヲ筋肉の解糖作用の相違に就て. 日水誌 1953; 19: 487-498.
- 4) 藤巻正生, 古城健三. 漁獲直後の処理方法が肉質に及ぼす影響— II . ソーダカツヲ筋肉の酸可溶性磷酸化合物の變化について. 日水誌 1953; 19: 499-504.
- 5) Watabe S, Ushio H, Iwamoto M, Md.Kamal, Ioka H, Hashimoto K. Rigor-mortis progress of sardine and mackerel in association with ATP degradation and lactate accumulation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; 55: 1833-1839.
- 6) 岩本宗昭, 山中英明, 阿部宏喜, 渡部終五, 橋本周久. 二, 三海産魚における死後硬直の進行と貯蔵温度の影響. 日水誌 1990; 56: 93-99.
- 7) 田中武夫. 流通条件と市場化学—10℃流通と 0℃流通の比較テスト. 「魚類の死後硬直」 (山中英明編) 恒星社厚生閣, 東京. 1991; 103-116.
- 8) 農林水産統計 <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kensaku/bunya6.html>. 農林水産省, 東京.
- 9) 岡本信明, 劉志紅, 舞田正志. ストレスとその解釈. 「魚の行動生理学と漁法」 (有元貴文, 難波憲二編) 恒星社厚生閣, 東京. 1996; 107-115.

- 10) 安崎友季子, 滝口明秀, 小林正三. 底曳網漁獲ヒラメの鮮度と蓄養による高品質保持. 「水産物の品質・鮮度とその高度保持技術」(中添純一, 山中英明編) 恒星社厚生閣, 東京. 2004; 133-139.
- 11) 門前茂光, 辻野耕實. 釜揚げしらす. 「全国水産加工品総覧」(福田裕, 山澤正勝, 岡崎恵美子監修) 光琳, 東京. 2005 ; 79-81.
- 12) 有害化学物質含有実態調査結果データ集, 農林水産省, 東京. 2011~2012
- 13) Okuzumi M, Awano M, Ohki Y. Effects of Temperature, pH Value and NaCl Concentration on Histamine Formation of N-group Bacteria (Psychrophilic and Halophilic Histamine-Forming Bacteria). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1984; doi:10.2331/suisan.50.1757. (in Japanese with English abstract)
- 14) Kurihara K, Wagatsuma Y, Fujii T, Okuzumi M. Effect of Culture Conditions on L-Histidine Decarboxylation Activity of Halophilic Histamine-Forming Bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993 ;doi:10.2331/suisan.59.1401 (in Japanese with English abstract)
- 15) Morii H, Cann D, Taylor L. Histamine Formation by Luminous Bacteria in Mackerel Stored at Low Temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988; doi:10.2331/suisan.54.299
- 16) Yoguchi R, Okuzumi M, Fujii T. Seasonal Variation in Number of Halophilic Histamine-Forming Bacteria on Marine Fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990 ;doi:10.2331/suisan.56.1473. (in Japanese with English abstract)
- 17) Kimura M, Furutani A, Fukui Y, Shibata Y, Nei D, Yano Y, Satomi M. Isolation and identification of the causative bacterium of histamine accumulation during fish sauce fermentation and the suppression effect of inoculation with starter culture of lactic acid bacterium on the histamine accumulation in fish sauce processing. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2015;

- doi:10.2331/suisan.81.97. (in Japanese with English abstract)
- 18) 神吉政史. ヒスタミン食中毒原因菌の特定および赤身魚でのヒスチジン脱炭酸酵素の役割. 博士論文, 大阪府立大学, 大阪.2007.
 - 19) 「ヒスタミン食中毒防止マニュアル」社団法人大日本水産会.東京.2009
 - 20) 岡村健司, 村上結城, 岡田芳治, 野村正人. 間伐材精油の化学成分とその生理活性について. 近畿大学工学部研究報告 2014;48:1-11.
 - 21) 芋川浩, 今浪愛里. 精油 (ティートリーとラベンダー) の抗菌効果の検討その1. 福岡県立大学看護学研究紀要 2014;11:63-70.
 - 22) 丸田直子, 里村洋明, 前田詠里子, 西田雅博, 世良暢之. 精油の腸管系病原性微生物に対する抗菌活性について. 福岡県保健環境研究所年報第43号 2016;70-75.
 - 23) 上井恵理, 寺田岳, 秋山純基, 一色賢司. 精油成分, 食品添加物, 過酢酸および界面活性剤がヒスチジン脱炭酸酵素活性の阻害に及ぼす影響. 食品衛生学会誌. 2011;52:271-275.
 - 24) 藤谷超, 塚原宏子. 養魚餌料の研究—第Ⅷ報 飢餓魚に現われた症状. 南西海区水産研究所業績 第4号 1969; 63-69.
 - 25) 竹内昌昭, 石井清之介. 冬季における養殖コイの生化学的研究—Ⅱ. 筋肉および肝臓の脂肪酸組成とグリコーゲン含量の変化. 東海区水産研究所研究報告書 1969; 59:19-27.
 - 26) Shimma Y, Ichimura H, Shinata N. Effects of Starvation on Body Weight, Lipid Contents, and Plasma Constituents of Maturing Rainbow Trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1976 ; doi:10.2331/suisan.42.83 (in Japanese with English abstract)
 - 27) 山崎耿二郎. 絶食時の代謝の研究 (1) コイの体成分変化と物質代謝について. 水産増殖 1972 ; doi:10.11233/aquaculturesci.1953.20.127

- 28) Sakaguchi H. Changes of Biochemical Components in Serum, Hepatopancreas and Muscle of Yellowtail Starvation. *Nippon Suisan Gakkaishi*,1976; doi:10.2331/suisan.42.1267 (in Japanese with English abstract)
- 29) Sakaguchi H , Hamaguchi A. Effect of Temperature on the Chemical Constituents in Serum, Hepatopancreas and Other Viscera of Cultured Red Sea Bream during Starva. *Nippon Suisan Gakkaishi*,1981; doi:10.2331/suisan.42.27 (in Japanese with English abstract)
- 30) Shineno S, Kheyyali D,Takeda M. Metabolic Adaptation to Prolonged Starvation in Carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*,1990 ; doi:10.2331/suisan.56.35
- 31) 伴真俊, 長谷川裕康, 江連睦子.絶食と再給餌がサケ幼魚に与える生理学的影響. 北海道さけ・ますふ化場研究報告第 50 号 1996 ; 117-123.
- 32) 安藤正史. 魚肉の軟化機構. 「魚介類の細胞外マトリックス」 (木村茂編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 73-82.
- 33) 岡本信明, 劉志紅, 舞田正志. ストレスとその解釈. 「魚の行動生理学と漁法」 (有元貴文, 難波憲二編) 恒星社厚生閣, 東京. 1996; 107-115.
- 34) Murata Y, Henmi H, Nishioka F.Extractive components in the skeletal muscle from ten different species of scombroid fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1994; 60: 473-478.
- 35) 吉中禮二, 佐藤守. 水産化学実験法 恒星社厚生閣, 東京. 1989; 86-87.
- 36) Ando M, Toyohara H, Shimizu Y, Sakaguchi M. Post-mortem tenderization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle caused by gradual disintegration of the extracellular matrix structure. *J. Sci . Food Agric.*1991; doi:10.1002/jsfa2740550410
- 37) Sugita T, Shimeno S, Nakano N, Hosokawa H, Masumoto T. Response of enzyme activities and metabolic intermediate concentrations to a long burst of

- exercise and following resting in muscle and the hepatopancreas of carp.
Nippon Suisan Gakkaishi 2001; 67: 904-911.
- 38) Sugita T, Shimeno S, Nakano N, Hosokawa H, Masumoto T. Response of enzyme activities and metabolic intermediate concentrations to a short-time exercise and following resting in muscle and hepatopancreas of carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2000; 66: 594-598.
- 39) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎. 血液性状による診断法. 「魚類血液学図鑑」緑書房刊, 東京. 1986; 286-326.
- 40) 2014年漁業・養殖業生産統計
http://www.maff.go.jp/j/tokei/seiryu/kaimen_gaisuu.html.農林水産省, 東京.
- 41) 赤堀四郎編 酵素研究法 第2巻. 朝倉書店, 東京. 1956; 238
- 42) Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 955-960
- 43) Gornall A.G, Bardwill C.J, David M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; 177: 751-766
- 44) 長富 潔, 吉田朝美, 原 研治編, 魚介肉内在性プロテアーゼ 最新の生化学と食品加工への応用. 恒星社厚生閣, 東京. 2016
- 45) 小長谷史郎, 青木徹雄, パシフィック・ヘイクのジェリーミートにおける粘液胞子虫とプロテアーゼ活性との関連. 東海区水研報, 1981; 105, 1-16
- 46) 木村郁夫, 伊東玄二, 那須雅之, 寄生虫感染魚からのすりみ製造法およびそのすりみの利用法. 特許第 3646920 号, 2005.
- 47) Seki N, Sakaya H, Onozawa T. Studies on proteases from Antarctic Krill. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1977; 43, 955 – 962. (in Japanese with English abstract)

- 48) 谷口 (山田) 亜樹子, 魚類消化管中の各種消化酵素の精製と作用機作に関する研究 日本食品保蔵科学会誌, 2005; 31, 189-197.
- 49) Ahsan M.N, Funabara D, Watabe S. Molecular cloning and characterization of two isoforms of trypsinogen from anchovy pyloric cera. *Marine Biotechnology*, 2001; **3**, 80-90.
- 50) Wright H.T, Kraut J, Wilcox P. E. Comparison of the π -, δ - and γ -chymotrypsin family with α -chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* 1968; **37**, 363-366.
- 51) 一島英治. 序. プロテアーゼ小史 3. プロテアーゼの限定分解反応と生体制御. 「プロテアーゼ」学会出版センター, 東京. 1983; 14-15.
- 52) Zhou L, Budge S. M, Ghaly A. E, Brooks M. S, Dave D. Extraction, purification and characterization of fish chymotrypsin: A review. *American journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2011; **7**, 104-123
- 53) 長田俊哉, 荒川秀雄, 西貝正明, 猪飼 篤, α 2-マクログロブリン-プロテアーゼを「生け捕り」にする分子からくりとその細胞工学的利用. 生物物理, 1987 ; 27, 1-7.
- 54) 藤井建夫. アレルギー様食中毒の現状と対策. 「月刊フードケミカル」株式会社食品化学新聞社, 東京. 2009;71-78)
- 55) 厚生統計要覧(2015), 厚生労働省, 東京.
- 56) Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yoshikawa-Takahashi M, Yano Y. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine carboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. *Int.J.Food Microbiol.*2008;**126**:202-209
- 57) 衛生試験法・注解 (2000) . (日本薬学会編) .金原出版株式会社. 東京. 2000;53-56.
- 58) 衛生試験法・注解 (2000) . (日本薬学会編) .金原出版株式会社. 東京.

2000;159

- 59) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* 1991; 173: 697-703.
- 60) Altschul SA, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403-410.
- 61) 山中英明, 藤井建夫, 塩見一雄. 化学性食中毒. 「食品衛生学」恒星社厚生閣, 東京. 2012;99-128.
- 62) 中坪文明. 「木の顔」(日本木材学会抽出成分と木材利用研究会編). 海青社, 滋賀.2002;3-4
- 63) 丸山奈保, 安部茂. 植物精油の抗真菌・抗炎症効果～真菌感染症への可能性～. *Japan Association on Odor Environment* 2012;43:199-210.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご指導とご支援を賜りました木村郁夫教授に厚く御礼申し上げます。鹿児島大学大学院連合農学研究科に社会人として入学し、また社会人早期終了プログラムに申請することを決意してから、本研究を遂行するまでいくつかの困難が立ちはだかりましたが、いつも前向きに進むよう激励下さいました。要所での的確な助言を頂いたお陰で何とか乗り越えてきました。また、学位論文の執筆では、非常に時間が限られている中で、丁寧にかつ熱意を持って論文の添削をして下さり、重ねて御礼申し上げます。

副査である鹿児島大学農学部安部淳一教授、鹿児島大学水産学部上西由翁教授、鹿児島大学水産学部加藤早苗助教には、的確なご助言・ご指示を賜りまして深く感謝申し上げます。

また、本研究の共同研究者である故東京海洋大学特任教授福田裕氏、(国研)水産研究・教育機構増養殖研究所杉田毅氏、(国研)水産研究・教育機構中央水産研究所里見正隆氏、同 奮谷亜由美氏、鹿児島県水産技術開発センター鶴田和弘氏、同 稲盛重弘氏、同 折田和三氏、同 仁部玄通氏、鹿児島大学水産学部藤田聡氏、同 緒方由美氏に感謝申し上げます。最後に社会人として大学院で研究を続ける環境に理解と協力を賜りました鹿児島県水産技術開発センター及び鹿児島県商工労働水産部職員諸氏に、この場を借りて感謝申し上げます。