孢子虫感染キハダマグロ筋肉のジェリー化程度の判定法, ならびにジェリー化と温度の関係^{*1}

小 長 谷 史 郎^{*2}

(1981 年 9 月 3 日受理)

Evaluation Methods of the Jellification Grade of Sporozoa-Infected Yellowfin Tuna Meat, and the Jellification Rate at Various Temperatures^{*1}

Shiro KONAGAYA^{*2}

Attempts were made to evaluate objectively the jellification grade of sporozoa *Hexacapsula neothunni* infected meat of yellowfin tuna *Thunnus albacares*. Two methods are suitable: a method using the compressive stress of meat as a parameter, and another one determining spectrophotometrically the copper-FOLIN color development of meat extract.

The jellification rate of the yellowfin tuna meat was determined at various temperatures from 0 to 30°C using these methods. Results showed that comparable degrees of jellification were attained when the meat was stored for 8 days at 0°C, for 6 days at 5°C, for 4 days at 10°C, and for one day at 20°C. A similar grade of jellification took place within half a day at 30°C.

粘液孢子虫の 1 種 *Hexacapsula neothunni*¹⁾ の筋肉寄生を伴うキハダマグロ *Thunnus albacares* のジェリーミート、通称“アズキ”は、普通、消費地市場で解体されて初めて発見され、漁獲直後に発見された例はない。したがって、この魚のジェリー化は死後 1~2 日以内に起きるものと考えられている。²⁾ 著者はすでに、ジェリーミート中に比較的高いプロテアーゼ活性が検出されることから、ジェリー化が同活性による筋肉構造タンパク質などの崩壊に起因すると推定した。^{2,3)} その視点に立てば、活性のほか、筋肉の pH や温度もジェリー化に関係する基本的要因と考えられ、したがって漁獲時およびその後の魚体温度や、処理条件、いわゆる手当の良否はジェリーミートの出現やその程度に関連を持つであろう。

本研究は、キハダマグロについてまずジェリー化の程度の客観的測定法を確立し、次いでジェリー化と魚体の貯蔵温度の関連について検討したものである。

実 験 方 法

材料 1978 年 6 月、八丈島付近でまき網で漁獲、直ちに氷蔵後、東京都中央卸売市場築地市場に搬入されたキハダマグロ *Thunnus albacares* のうち、同市場事故処

理委員により“アズキ”と判定されたもの^{*3} (以下、異常肉と呼ぶ)、および正常のキハダマグロ (正常肉) を用いた。また一部は -40°C に凍結保存して実験に供した。供試魚体はすべて 50 kg 前後のものであった。

筋肉抽出液のゲル透過 異常肉^{*4} および正常肉 50 g を 100 ml の冷リン酸塩緩衝液 (3.38 mM KH_2PO_4 -15.5 mM Na_2HPO_4 , pH 7.3) とともに 5°C 以下でホモジナイズし、遠心分離 (9,000×g, 30 分) して得た上澄を水溶性区分とし、その一部 (2 ml) を Bio-Gel P100 カラム (1.5×60 cm) を用いて、5°C 付近で上記緩衝液でゲル透過した。溶出液を 5 ml ずつ集め、次項の銅-FOLIN 法⁴⁾ で主にタンパク質・ペプチドを発色し 660 nm でモニターした。

他方、前記の水溶性区分 75 ml に等量の 10% トリクロル酢酸 (TCA) を混合し、その滲液から TCA をエーテルで抽出除去後減圧濃縮して 10 ml とし、これを非タンパク質区分とした。この 2 ml を Bio-Gel P2 カラム (2.0×85 cm) で水でゲル透過した。溶出液を 2.5 ml ずつ集め前記と同様に発色し、モニターした。水溶性、非タンパク質両区分中の N 量はマイクロケルダール法で測定した。

^{*1} 東海区水産研究所業績 B696 号。マグロ類ジェリーミートに関する研究-IV (Studies on Jellied Meat of Tuna-IV).

^{*2} 東海区水産研究所、東京都中央区勝どき 5-5 (Kachidoki-5, Chuo, Tokyo 104).

^{*3} 筋肉中に *H. neothunni* の胞子が塗抹法⁵⁾ で検出された。

^{*4} ジェリー化の程度 (後述) が III 度のものを用いた。

ジェリー化程度の判定法 2つの方法を試みた。その一つはタンパク質分解物を銅-FOLIN 法⁴⁾で発色, 660 nm でその呈色値を測定するものである。すなわち, 試料肉 2 g を 40 ml の前記リン酸緩衝液とともにポルトロンホモジナイザー (KINEMATICA 社), 標準型でホモジナイズ後, 遠心分離し, 上澄に等量の 10% TCA を混合して除タンパクした。この上清 0.5 ml にアルカリ性銅液 5 ml, および希釈 FOLIN 試薬 0.5 ml を加えて発色させ $E_{660\text{nm}}$ を測定した。⁴⁾

もう一つの方法は筋肉組織の脆弱化を圧縮応力の変化として捉えるもので, コガネガレイの場合⁵⁾とほぼ同様にして測定した。ただし, 測定すべき試料は予め -40°C で急速凍結し, 凍結状態で径約 15 mm, 高さ約 9 mm (1.50~1.55 g) の円柱状にくり抜き, 4°C で 1 時間解凍後, レオメーター RMT-1300 (飯尾電気) を用いて, 厚さ 3 mm の板状に圧延するときの最大応力 (kg) を測定した。

ジェリー化の追跡 ジェリー化が脊椎骨周辺のみ極めて軽度認められるキハダマグロの第 1 背ビレと第 2 背ビレの間の背部筋肉を試料として用いた。互いに近接する部位から厚さ約 6 cm の肉片 (Fig. 3 参照) を 5 枚切り取り, それぞれラップフィルムで包み, 0, 5, 10, 20, 30°C に所定時間放置し, ジェリー化の進行状況を, その都度新しい面を切り出し, 官能的に観察した。別に, ほぼ同一部位から, 小さな肉片 (約 $3 \times 3 \times 3\text{ cm}$) を多数切り取り, 同様にラップフィルムで包んで種々の温度に放置した。所定時間後 2~3 個ずつ取り出し, 圧縮応力と銅-FOLIN 呈色値を測定した。なお, 腐敗の有無を調べる目的で遊離アンモニアを, 銅-FOLIN 呈色値を測定した残りの試料液を用いて, 微量拡散法と NESSLER

法の組合せ⁶⁾で定量し, 筋肉 100 g 当りの mg 数に換算した。

タンパク質の分画法 肉片 2 g を用いて, 常法⁷⁾によって, 非タンパク質区, 水溶性, 塩溶性, ゲル状および変性タンパク質区に分画し, 各区中の N をマイクロケルダール法で定量した。各区中の N 量をストローマタンパク質 N を除く全 N に対する百分率で表わした。

結 果

ジェリーミート水抽出液中のタンパク質分解物 ジェリー化の過程でタンパク質が酵素的に分解されていれば, その分解物量の多少でジェリー化程度を判定できると考えられる。そこでまずジェリーミートおよび正常肉について, 水溶性区分, 非タンパク質区分のゲル透過を試みた。Fig. 1 に示すように, 水溶性区分の溶出パターンは, 比較的高分子の成分については, ジェリーミートと正常肉とで量的にはほぼ同じであるが, 低分子成分 (ペプチド) は前者の方が明らかに多い。なお, 供試液中の N 量はジェリーミートで 8.26 mg/ml と, 正常肉での 7.87 mg/ml より数%高いに過ぎない。

非タンパク質区分の溶出パターン (Fig. 2) より, ジェリーミート中のペプチド区分には分子量 10^4 程度のものからかなり低分子量のものまで含まれていたと考えられる。溶出液をニンヒドリンで発色したときのパターンは 150 ml 以後ではジェリーミート, 正常肉相互間ではほとんど完全に一致し, アミノ酸量は両者でとくに違わないことが示された。なお供試液中の N 量はジェリーミートで 18.7 mg/ml , 正常肉で 17.9 mg/ml であった。この場合も, N 量としては両者で数%違うにすぎないが, 銅-FOLIN 法で呈色したパターンでは, ペプチド量

Fig. 1. Gel-filtration of the water-extract of jellied (●—●) and normal (○---○) yellowfin tuna meat on Bio-Gel P100 in phosphate buffer (ionic strength: 0.05, pH 7.3), as monitored by copper-FOLIN color ($E_{660\text{nm}}$). Hb: bovine hemoglobin, Mb: sperm whale myoglobin.

Fig. 2. Gel-filtration of the non-protein fraction of jellied (●—●) and normal (○—○) yellowfin tuna meat on Bio-Gel P2 in water, as monitored by copper-FOLIN color (E_{660nm}). Arrows indicate the elution positions of hexaglycine (MW: 360), cysteine (MW: 121) and glycine (MW: 75). V_0 : Void volume (MW: 10⁴).

Table 1. Jellification grades of yellowfin tuna meat

Jellification grade* ¹	Description of abnormality	Compressive stress (kg)	Copper-Folin color (E_{660nm})
0	Premonitory stage: No abnormality can be seen from outer appearance.	2.2–2.5* ²	0.16–0.18* ²
I	Very early stage: Small pockets of 2–5 mm in diameter with somewhat opaque fluid are seen at the cut surface of meat. Texture is almost the same as that of normal meat.	2.2–2.5	0.16–0.21
II	Early stage: Many relatively big pockets (3–8 mm) are seen. The meat is somewhat mushy.	1.6–2.1	0.3–0.45
III	Advanced stage: The pockets are filled with puslike fluid and blurred, joining neighboring ones. The meat becomes flabby and sticky.	0.6–1.2	0.5–0.7
IV	Farther advanced stage: The meat shows greasy appearance and is partly liquefied.	0.3–0.6	0.8–1.2

*¹ Refer to Plate 1. Jellied meats at Grade I to III are called azuki. The jellied meat at Grade IV is called azuki-nagare.

*² Comparable ranges are also given by the normal meat.

に明らかな差が認められた。これは銅-FOLIN 法によりペプチドを極めて高感度に検出できることを示している。

以上の結果から、銅-FOLIN 呈色値によりジェリー化程度を一応判定できると考えられ、以下のように検討を加えた。

ジェリー化程度の判定法の検討 キハダマグロのジェリーミートを、官能的に Table 1 のように 0～IV の 5 段階に分けた。ジェリー化は通常、脊椎骨の周辺の筋肉で最も進行しており、表皮に近い筋肉、または、頭部や尾部の筋肉では外観上ジェリー化が認められないことが多い。正常肉でもこれらの測定値が部位によって異なることが懸念されたので、異常肉、正常肉両者につき、部

位別に圧縮応力と銅-FOLIN 呈色値を比較した。採取部位を Fig. 3 に、また測定結果を Table 1 および Fig. 4 に示す。異常肉の各部位のジェリー化程度は a と t で 0～I 度、b で II 度、c で III 度であった。正常肉の場合には両測定値は部位を問わずほとんど一定であった。異常肉では c が最低の圧縮応力と最高の銅-FOLIN 呈色値を示し、a および t での両測定値は正常肉のレベルにあった。b はその中間にあった。

以上の検討により、ジェリー化程度が II 度以上のものであれば、圧縮応力、銅-FOLIN 呈色値いずれも官能的にみた程度によく対応するが、0～I 度のものの測定値は正常肉のそれとほぼ同じであった。圧縮応力の測定値は相対誤差 ±5% 程度を伴う。また、後述するよう

に、比較的高温に置かれたジェリーミートでは一部の筋原繊維タンパク質の変性(圧縮応力を大きくする)も考慮すべきであろう。

ジェリー化と貯蔵温度の関連 ジェリー化速度に対する温度の影響をモデル実験的に検討した。ジェリー化が

Fig. 3. Sampled portions of yellowfin tun.

Fig. 4. A: Compressive stress of jellied (●) and normal (○) yellowfin tuna meat. B: Copper-FOLIN color (E_{660nm}) of the deproteinized extract of jellied (●) and normal (○) yellowfin tuna meat. Refer to Fig. 3 for signs a, b, c and t.

Fig. 5. Changes in compressive stress of jellied (A) and normal (B) yellowfin tuna meat during storage at different temperatures. Arrows indicate the beginning of spoilage.

極めて軽度 (Fig. 3 の a, b に相当する部位で 0~I 度) の試料肉片を種々の温度に放置して、官能的に、また圧縮応力と銅-FOLIN 呈色値を指標として、ジェリー化の進行状況を追跡した。

0°C に放置した場合、時間の経過とともに液化空胞が数と大きさを増し、8 日後には II 度となった。5°C では 4~6 日後に、10°C では 2~4 日後に同程度になった。20°C では 1 日後に II 度、部分的には III 度まで、また 30°C では 12 時間以内に II~III 度、部分的には IV 度までジェリー化が進行した。代表例を Plate 1 に示す。

異常肉および正常肉について、圧縮応力と銅-FOLIN 呈色値の測定結果を Fig. 5 と Fig. 6 に示す。正常肉の圧縮応力 (Fig. 5B) は、放置温度が 20°C 以上のときは著しく増加したが、10°C 以下ではほとんど一定であった。他方、異常肉 (Fig. 5A) では 30°C でわずかに増加した後減少したが、20°C 以下では時間とともに減少した。銅-FOLIN 呈色値は、正常肉 (Fig. 6B) では

Fig. 6. Changes in copper-FOLIN color of the deproteinized extract of jellied (A) and normal (B) yellowfin tuna meat during storage at different temperatures. Arrows indicate the beginning of spoilage.

Fig. 7. Changes in N distribution in jellied yellowfin tuna meat during storage at different temperatures. ■: Non-protein N, □: water soluble protein N, ▨: salt soluble protein N.

Fig. 8. Changes in N distribution in normal yellowfin tuna meat during storage at different temperatures. ■: Non-protein N, □: water soluble protein N, ▨: salt soluble protein N, ▩: protein N in gel-fraction, ░: denatured protein N.

30°C の場合を除きほとんど一定であったが、異常肉 (Fig. 6A) では、時間とともに増加した。これらの結果はさきの官能的観察結果によく対応している。

放置後の肉片中の非タンパク質 N、水溶性、塩溶性両タンパク質 N の消長を Fig. 7 と Fig. 8 に示す。異常肉では放置中ジェリー化が著しく進行したにもかかわらず、非タンパク質 N、水溶性タンパク質 N の増加や塩溶性タンパク質 N (全筋原繊維タンパク質 N) の減少は意外に僅少であった。

正常肉を 20°C 以上に放置すると圧縮応力が增大する理由として筋原繊維タンパク質が変性することが考えられたので、変性タンパク質 N 量を測定した。Fig. 8 にみられるように、20°C に 1 日、30°C に 12 時間放置し

たものでは筋原繊維タンパク質の塩溶液に対する溶出性が著しく減少し、明らかにかなり変性していた。

異常肉中の遊離アンモニアは、官能的に腐敗の初期と考えられた時期で、肉 100 g 当り 40 mg 前後であった (Fig. 9)。放置温度が 10°C 以下の場合にはこの試験中アンモニア量はほとんど増加せず、ここでみられた筋肉の脆弱化やタンパク質の分解には腐敗の影響は考慮しなくてもよいであろう。なお、放置中のアンモニア量の変化は正常肉でもほとんど同じであった。

以上の諸結果から、ジェリー化速度は温度に依存し、20°C 以上では極めて速く、0°C でも緩慢ながら進行することが明らかにされた。

Fig. 9. Changes in ammonia content in abnormal yellowfin tuna meat during storage at different temperatures. Arrows indicate the beginning of spoilage.

考 察

ジェリーミートにおけるジェリー化の程度を客観的に捉える方法は、研究上も是非必要とされる。しかし、キハダマグロのジェリーミートの場合、タンパク質分解物は量的に少ないので、非タンパク質N量や水溶性タンパク質N量などを判定指標にすることは一般的には無理である。^{*1} 今回、筋肉組織の脆弱性を圧縮応力から、タンパク質分解物量を銅-FOLIN 法による呈色値から測定することにより、ジェリー化程度の判定がある程度まで可能となった。ただし、極めて軽度のものはこれらの方法で判定できない。このような肉は筋肉中のプロテアーゼ活性³⁾ または *H. neothunni* の孢子の有無から判別可能と考えられる。³⁾

本報では、ジェリー化の前駆的なものを0度、すでに流動状のものをIV度とし、その間を程度に応じて3段階に分けた。しかし、ジェリー化は連続的なものであるから、この分け方はあくまで便宜的なものにすぎない。松本^{*2} はキハダマグロのジェリーミートを前駆期、初期、進行期、後期の4期に分けた。本研究の分け方との対比は必ずしも明らかでないが、前駆期は当然0度に、後期はIV度に相当するものと考えられる。本研究ではこの間をI~III度に分けた。放置中の肉片の圧縮応力や銅-FOLIN 呈色値の変化が直線的でない (Fig. 5A,

Fig. 6A) ことはジェリー化がある段階で急速に進むことを示唆するものかもしれない。しかし、後期はそれ以上の組織崩壊が目立たなくなる時期と解すべきで、停止を意味するものではないであろう。

前述のように、プロテアーゼ活性の強度は、ジェリー化速度に関して最も基本的な要因と考えられる。今回は活性が種々異なる異常肉試料を入手できなかったため、活性が平均的なレベル (活性単位³⁾: 約 0.12) で、ジェリーの初期 (0~I度) のものを用いて、ジェリー化速度と温度の関係のみに検討を加えた。

ジェリー化は 20°C 以上で急速に進行する。漁獲時のマグロの体温は魚体中心部で通常 20~30°C である。^{8,9)} また、中心部は冷却効果の最も悪い部位でもあることを考え併せれば、漁獲後比較的早期 (1~2日後) に中心部がジェリー化しているという一般的事実がよく説明できる。

漁獲後魚体を急速に冷却すれば、ジェリー化はある程度抑制できると考えられるが、実験結果によれば、0°C でも全く停止することはない。また、かりにある程度防止できたとしても、ジェリー化の要因は筋肉中に依然として残っている理であり、温度条件によってはジェリーミートが顕在化することになる。

文 献

- 1) Y. ARAI and K. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **18**, 293-299 (1953).
- 2) 小長谷史郎: さかな (東海水研業績 C 集), 15号, 32-39 (1975).
- 3) S. KONAGAYA and K. AMANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 1169-1178 (1973).
- 4) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. BANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 5) 小長谷史郎: 日水誌, **46**, 1019-1026 (1980).
- 6) 石坂音治: 化学実験操作法 (緒方 章・長瀬雄三編), 続編 IV, 南江堂, 東京, 1966, pp. 271-309.
- 7) 小長谷史郎・渡辺武彦・神名孝一: 冷凍, **56**, 15-19 (1981).
- 8) F. G. CAREY and J. M. TEAL: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56**, 1464-1469 (1966).
- 9) S. KONAGAYA, K. YAMABE, and K. AMANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 410-416 (1969).

*1 ジェリー化がかなり進行しているコナゲレイやメルルーサの例では非タンパク質N量、塩溶性タンパク質量は、正常肉に比べ明らかに異なる。

*2 松本浩一: 日本輸出冷凍水産物検査協会参考資料, 第7号. 1-32 (1954),

Plate 1. Photos of yellowfin tuna meat at different jellification grades, 0–IV ($\times$ ca. 0.7).
 A. Very early stage (Grade: I, partly 0).
 B. After storage at 0°C for 8 days (Grade: II).
 C. After storage at 20°C for 24 h (Grade: II, partly III).
 D. After storage at 30°C for 12 h (Grade: II, partly III and IV).