

# アオリイカ外套筋の死後変化に関する研究

**STUDIES ON POSTMORTEM CHANGES IN MANTLE OF THE OVAL SQUID**  
*(Sepioteuthis lessoniana)*

2009 年 3 月

長崎大学大学院生産科学研究科

本 田 榮 子

<b>第1章 緒 言</b> .....	1
1.1 本研究の目的および研究概要 .....	1
参考文献 .....	5
 <b>第2章 アオリイカ外套筋の白濁に及ぼす保存温度の影響</b> .....	8
2.1 方 法 .....	8
2.1.1 試 料 .....	8
2.1.2 試料の保存及び採肉時間 .....	9
2.1.3 ATP関連化合物の測定 .....	9
2.1.3.1 ATP関連化合物の抽出 .....	10
2.1.3.2 ATP関連化合物の定量 .....	11
2.1.4 グリコーゲン量の測定 .....	13
2.1.4.1 グリコーゲンの抽出 .....	13
2.1.4.2 グリコーゲンの定量 .....	14
2.1.5 乳酸量の測定 .....	16
2.1.5.1 乳酸の抽出 .....	16
2.1.5.2 乳酸の定量 .....	16
2.1.6 pHの測定 .....	18
2.1.7 感覚色度L*の測定 .....	18
2.2 結 果 .....	19
2.2.1 保存温度別ATP含量の経時変化 .....	19
2.2.2 ATP + ADP合計値の経時変化 .....	21
2.2.3 AMP含量の経時変化 .....	23
2.2.4 K値の経時変化 .....	25

2.2.5 Hx /AMP比の経時変化.....	27
2.2.6 グリコーゲンの経時変化 .....	29
2.2.7 乳酸量の経時変化 .....	31
2.2.8 pHの経時変化 .....	31
2.2.9 L*値の経時変化.....	33
2.3 考 察 .....	35
参考文献 .....	39
 <b>第3章 死後硬直測定法の検討.....</b>	<b>42</b>
3.1 方 法 .....	42
3.1.1 試料.....	42
3.1.2 試料より外套筋の採取 .....	42
3.1.3 測定時間及び保存温度 .....	43
3.1.4 柱状筋による筋収縮率と張力.....	44
3.1.4.1 筋収縮率の測定 .....	44
3.1.4.2 張力の測定 .....	46
3.1.5. 輪状筋による筋収縮率と柱状筋による張力.....	48
3.2 結 果 .....	49
3.2.1 柱状筋による筋収縮率の経時変化.....	49
3.2.2 柱状筋による張力の経時変化.....	50
3.2.3 輪状筋による筋収縮率の経時変化.....	51
3.2.4 輪状筋による筋収縮実験で用いた固体の柱状筋による張力の経時変化.....	52
3.3 考 察 .....	53
参考文献 .....	59

<b>第4章</b>	<b>アオリイカ外套筋の筋収縮に及ぼす保存温度の影響</b>	<b>60</b>
4.1	方 法	60
4.1.1	筋収縮に及ぼす保存温度の影響	60
4.1.1.1	試 料	60
4.1.1.2	輪状筋を用いた筋収縮率の測定	61
4.1.2	筋原線維(Mf)Mg <sup>2+</sup> -ATPase活性の測定	63
4.1.2.1	試料	63
4.1.2.2	筋原線維の調製	63
4.1.2.3	タンパク質の定量	66
4.1.2.4	Mf Mg <sup>2+</sup> -ATPaseの反応速度の測定	67
4.1.2.5	無機リン酸の比色定量	69
4.1.3	筋小胞体(SR)Ca <sup>2+</sup> -ATPase活性の測定	70
4.1.3.1	試料	70
4.1.3.2	筋小胞体の調製	70
4.1.3.3	筋小胞体(SR)Ca <sup>2+</sup> -ATPase の反応速度の測定	73
4.2	結 果	74
4.2.1	各保存温度における輪状筋の筋収縮率の経時変化	74
4.2.2	各反応温度におけるMf Mg <sup>2+</sup> -ATPase活性	79
4.2.3	各反応温度における(SR)Ca <sup>2+</sup> -ATPase活性	81
4.3	考 察	83
	参考文献	86
<b>第5章</b>	<b>総 括</b>	<b>89</b>
	参考文献	100

## 第 1 章 緒 言

- ・ 本研究の目的
- ・ 研究概要
- ・ 参考文献

## 第1章 緒 言

### 1.1 本研究の目的および研究概要

イカ類は日本人が消費する水産物の中で最も消費数量の多い魚種であり、生鮮から加工品までさまざまな用途に利用され、好まれている水産物のひとつである。

イカ類生産量の約8割はスルメイカであるが、ケンサキイカやアオリイカなど地域の特産種としての貴重なイカ類も存在する。ジンドウイカ科に属するアオリイカ (*Sepioteuthis lessoniana*) は肉質が厚く美味なことからグルメブームの対象となり需要が高く長崎県近海でも重要種のひとつになっている。

流通時の値段を高く安定させるためには高鮮度状態を保つことが不可欠である。イカ類は、生きたまま「活イカ」として輸送することも可能であるが<sup>1,2)</sup>、イカ類の輸送には大量の海水を必要とするのみならず、輸送中における刺激で墨を吐き、水質を著しく悪化させることから、濾過装置等設備面でのコスト高やその取り扱いに細心の注意が必要で<sup>3)</sup>、大量に輸送して流通させることが困難なのが現状である。

イカ類の商品価値を決定する条件として、体色や透明感が大きな要素を占める。また、イカ類の筋肉は生きている間は透明であるが、死後、保存中に白濁が始まり、鮮魚として流通させる場合、どのように筋肉の白濁を遅延させるかが課題となっている。

アオリイカは外套筋の透明感が残っているものが、市場価格が高く評価され、外套筋の透明感を保持することは商品価値の向上にもつながる。

イカを大量に輸送して高価格での取引を可能にするには、致死条件や流通過程における保存温度を調節することによって筋肉の白濁を抑制するとともに、鮮度低下を抑制させる必要がある。

魚類では以前から致死条件や保存温度に関する研究はさかんに行われ<sup>4-8)</sup>、現在では活魚や死後硬直の魚類が刺身用の食材として流通するようになっている。しかしイカの鮮度に関する研究は、現時点では魚類に及んでいない。

魚類の死後硬直を測定する場合によく用いられている尾藤らの硬直指数<sup>9)</sup>は比較的簡単に使用でき、魚類における硬直の進行をとらえる方法として極めて有用であるが、魚体全体を用いるための同一魚体から、その他の科学的情報を得ることが困難である。これまで当研究室では養殖マダイの魚体側面から柱状に採取した筋肉の収縮割合を筋収縮率として硬直の指標に用い<sup>10-11)</sup>、同一魚体の死後硬直と、科学的成分分析を測定可能にする方法を確立している。

しかし、イカ類の生鮮度に関する研究は充分ではなく、中でも死後硬直の検討では外套筋分に甲があるため、尾藤らの方法をそのまま利用することは出来ないのが現状である。

そこで本研究では、アオリイカ外套の死後変化を明らかにする研究の一環と

して、致死後における外套筋の白濁の進行と保存温度の関係、外套筋の死後硬直に及ぼす保存温度の影響について、外套筋より作成した輪状筋を用いた筋収縮率の測定により検討した。

さらに、魚種では、筋細胞内で筋原繊維 (Mf) の  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性が変化すると ATP の消失速度が変わり、それに伴って死後硬直の進行も変化するとされている。同時に Mf  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性は筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の違いに影響され、その  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の制御はカルシウムポンプの役割を果たす筋小胞体 (SR) の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性によってなされるとも報告されている<sup>12)</sup>。

そこで、アオリイカにおいても魚類と同様の現象が生じている可能性が考えられることから、アオリイカ外套筋より筋原繊維 (Mf) と筋小胞体 (SR) を調製し、Mf  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性と SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性について反応温度依存性の点からアオリイカ外套筋の死後硬直進行へ及ぼす影響について検討を行った。

なお、本論文は以下の各章のごとく構成されている。

**第 1 章**では、本研究の目的と意義、本研究に関連した従来の研究および本研究の概要について述べた。

**第 2 章**では、アオリイカ外套筋の白濁現象について保存中の ATP 関連物質の分解と、外套筋の感覚色度からみた透明感の点から検討を行い、ATP 関連化合



物の動態と感覚色度の点から保存条件について考察した。

**第3章**では、アオリイカの外套筋より作製した柱状筋（保存温度 10℃）と輪状筋（氷蔵）の筋収縮率と張力を測定し、保存温度と経時変化との関係について検討し、輪状筋を用いた新しい死後硬直進行の測定法について論じた。

**第4章**では、第3章を基に外套筋の筋収縮に及ぼす保存温度の影響を検討し、死後硬直からみたアオリイカ外套筋の最適な保存温度について考察した。

さらに、即殺したアオリイカ外套筋より、筋原線維(Mf)を調製し、Mf  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性と、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性についても検討を行い、死後硬直進行に係わる Mf  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性と筋小胞体（SR）の働きについて考察を行った。

**第5章**では、これまでの結果を総括するとともに総合的な考察を行った。

## 参考文献

- 1) 水産庁編「平成 16 年度 水産白書」P.100. (2005)
- 2) Yoshioka T., Kinoshita Y.: Recent progress on the quality preservation technology of squid, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **72**, 495-500. (2006)
- 3) Okutani K., Ogura M., ed: *Ika-sono seisankara shyouhimade*, Tokyo, Seizandoshoten, 267-286. (2002)
- 4) Iwamoto M., Ioka H., Saito M. and Yamanaka H.: Relation between rigor mortis of sea bream and storage temperatures, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 443-446. (1985)
- 5) Mochizuki S., Sato A.: Effects of various killing procedures and storage on post-mortem changes in the muscle of horse mackerel, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **60**, 125-130. (1994)
- 6) Okamoto A., Hamada Y., Miura K., Nonaka K., Kuwahara K., Osako K., Mishima T., and Tachibana K.: Influence of killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **72**, 918-923. (2006)
- 7) Yamanaka H.: Relation between post mortem changes and quality in the muscle of

- fish and shellfish, Nippon Suisan Gakkaishi, **68**, 5-14. (2002)
- 8) Iwamoto M., and Yamane R.:「Kensakiika no sigohenka nikannsuru Kenkyuu-Tyozouondo to taishokuhenka」, Shimaneken suisanshikenjyo jigyouhoukoku, p. 83-90. (1991)
  - 9) Bito M., Yamada K., Mikumo Y., and Amano N.: Studies on rigor-mortis of fish-1. Difference in the mode of rigor-mortis among some varieties of fish by modified cutting's method, Bull. Tokai Rab. **109**, 89-96. (1983)
  - 10) Tsuchimoto M., Yamaga T., Lee K., H. Wu Z., Mishima T., and Tachibana K.: The Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration around myofibrillar  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase on the Speed and pattern of rigor mortis in fish species or cultured and wild fish, Fishres Sci, **64**, 148-159. (1998)
  - 11) LeeK H., Tsuchimoto M., Onishi T., Wu Z., Jabaarsyah A., Mishima T., and Tachibana K.: Differences in progress of rigor mortis between cultured red sea bream and cultured Japanese flounder, Fishres Sci. **64**, 309-313. (1998)
  - 12) Watabe S.:「Biochemical changes during the progression of rigor mortis (Rigor Mortis in fish)」, Yamanaka H. ed. Tokyo koseisha Koseikaku, p. 9-20. (1991)

- 13) Kato N., Uchiyama H., Tsukamoto S., and Arai K.: A biochemical study on fish  
Fishres Sci.r, Nippon Suisan Gakkaishi, **43**, 857-867. (1977)

## 第2章アオリイカ外套筋の白濁に及ぼす保存温度の影響

- ・ 試料と測定項目

ATP 関連化合物   グリコーゲン量

乳酸量   pH   感覚色度 L\*の測定

- ・ 結果

保存温度別各測定項目の経時変化

- ・ 考 察

- ・ 参考文献

## 第2章 アオリイカ外套筋の白濁に及ぼす保存温度の影響

アオリイカの価格決定の大きな要因の一つに外套筋の透明感があるが、この透明感はいかの死後急速に白濁する。アオリイカを高価格で流通させるには、この白濁現象を遅延させる必要がある。そこで、アオリイカ外套筋の白濁現象について、保存中の ATP 関連物質の分解と、外套筋の感覚色度からみた透明感の点から検討するために以下のような種々の保存温度実験を行い考察した。

### 2.1 方 法

#### 2.1.1 試 料

試料には、生きたアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* 8 杯を用いた。アオリイカはいずれも長崎近海で捕獲したもので、平均外套背長と平均体重はそれぞれ、 $20.3 \pm 5.4$  cm,  $614.1 \pm 383.0$  g であった。試料は生きたまま研究室に運搬し、実験に供した。

### 2.1.2 試料の保存及び採肉時間

アオリイカの両眼の間を出刃包丁で刺し、その後すぐに胴部と頭足部を切離し、これを即殺とした。即殺後、直ちに胴部は外套筋の表皮を剥ぎ、体軸に沿って二分して含気状態でプラスチックバッグに入れ、氷蔵あるいは恒温水槽中(5, 10, 15℃)に保存した。外套筋からの採肉は、各々0, 1, 2, 4, 8, 12, 24時間目に行った。

### 2.1.3 ATP 関連化合物の測定

ATP 関連化合物の抽出は、乳酸の抽出と同時に行った。抽出は ATP 関連化合物および乳酸それぞれの抽出法である Ehira ら<sup>1)</sup>の方法と Hohorst の<sup>2)</sup>方法を改良した方法で行った。その抽出方法を **Fig. 2-1** に示した。分析および定量は槌本ら<sup>3)</sup>の方法に準じて HPLC 法で分析した。その詳細は以下のごとくであった。

### 2.1.3.1 ATP 関連化合物の抽出

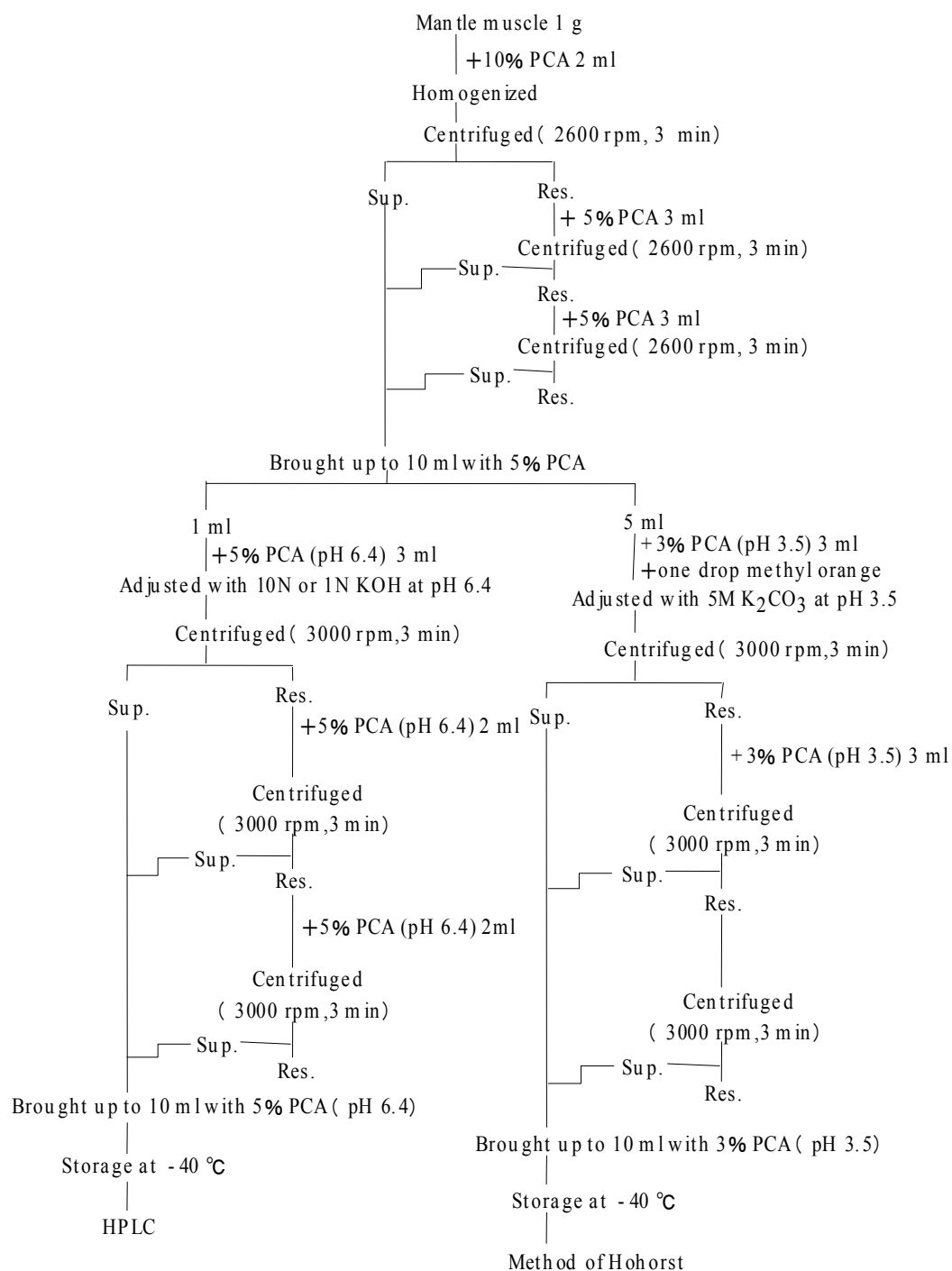
採肉した外套筋約 1 g を精秤して遠心管に取り,ここに冷却 10%  $\text{HClO}_4$ (PCA) 2 ml を加え,ポリトロンホモジナイザー(KINEMATICA 社製)でホモジナイズした。このホモジネイトを 2600 rpm で 3 分間遠心分離し,上澄みを別の遠心管に分取した。刃は別に準備しておいた 2 本の冷却 5%PCA 3 ml で順次洗浄し,これを洗浄液とした。残渣に刃を洗浄した冷却 5%PCA 3 ml を加え,タッチミキサーで攪拌後,同条件で遠心分離して上澄みを分取し,先に合わせた。残渣に刃を洗浄した冷却 5%PCA 3 ml を加えて攪拌し,遠心分離後,上澄みを分取して先に合わせた。合わせた上澄みを純水で 10 ml に定容した。そこから 1 ml を取り,冷却 PCA 中和液を 3 ml 加えた。これを 10 M 及び 1 MKOH で pH 6.4 に調製した。この操作で生じた過塩素酸カリウムは,2600 rpm で 3 分間遠心分離して沈殿させ,上澄みを 10 ml のメスフラスコに取った。その残渣は冷却 5% PCA 中和液(pH 6.4) で 2 回洗浄し,遠心分離後,先の上澄みと合わせ,純水で 10 ml に定容した。直ちに測定に供さない場合はバイアルビンに入れて,  $-40^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。なお以上の操作はすべて,熱による分解を防ぐため碎氷中で冷却しながら行った。



### 2.1.3.2 ATP 関連化合物の定量

抽出液を 0.45 $\mu$ m のメンブランフィルター(ADVANTEC TOYO 社製)でろ過後、その 20 $\mu$ l を槌本ら<sup>3)</sup>の HPLC 法による分析測定に供した。定量に用いた標準物質には、ATP 関連化合物の ATP, ADP, AMP, IMP, HxR, Hx, (シグマ社), のそれぞれを 0.02 mM 含む混合液を用いた。

分析定量には、(島津社製) 逆相分配カラム(Sim-pack CLC-ODS, 0.15 mm $\times$ 6.0mm $\phi$ )を用い、展開溶媒として H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.36 ml, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N 4.2 ml, CH<sub>3</sub>CN 25 ml を超純水で 1 $\ell$  にメスアップし、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> で pH 5.5 に調整したものを用いた。測定条件は、試料注入量 20 $\mu$ l, 流速 1.5 ml/min, 測定波長 254 nm ピーク面積法, カラム保持温度 35 $^{\circ}$ C とした。



**Fig.2-1** Muscle extract preparation for ATP related compounds and lactic acid determination

#### 2.1.4 グリコーゲン量の測定

グリコーゲン量の抽出方法は藤井ら<sup>4)</sup>の方法に従い、定量はアントロン硫酸法<sup>5)</sup>で行った。その詳細は **Fig. 2-2** に示すように行った。

##### 2.1.4.1 グリコーゲンの抽出

外套筋約 0.5 g を遠心管に入れ 30% KOH 1 ml を加え、沸騰水浴中で 40 分間加熱後、96%エタノール 3 ml を加え攪拌し、再び沸騰するまで加熱した。水道水中で放冷後、3000 rpm で 30 分間遠心分離し、上澄みを除去した。

沈殿に純水 1 ml を加え、沸騰水浴中で加温溶解させ、放冷後、飽和 KCl 1 滴とクロロホルム：エタノール（1：4）混液 2 ml を加え、再び加熱沸騰させた。それを水道水中で放冷し 3000 rpm で 30 分遠心分離し上澄みを除去した。

沈殿に純水 1 ml を加え加温溶解させ、飽和 KCl 1 滴と 96% エタノール 2 ml を加え攪拌し、加温溶解させた。それを水道水中で放冷し 3000 rpm で 30 分遠心分離し、上澄みを捨てた。得られた沈殿に純水 1 ml を加え沸騰水浴中で加温し完全に溶解させた。その後、純水で 10 ml ～ 25 ml に希釈定容し、これをグリコーゲン抽出液とした。

#### 2.1.4.2 グリコーゲンの定量

氷水中で試料 1 ml にアントロン試薬 ( アントロン : 0.2 g, 硫酸 : 95 ml, 純水 : 25 ml ) 5 ml を振り混ぜながら加え, タッチミキサーで攪拌後, 沸騰水浴中で 10 分間加熱した。これを氷水中で放冷後, 室温になるまで放置し, 波長 620 nm の吸光度を測定した。グルコース標準液についても同様の操作を行い, 作成した検量線より抽出液中のグリコーゲン濃度を算出し, 下式に代入しグリコーゲン量を求めた。

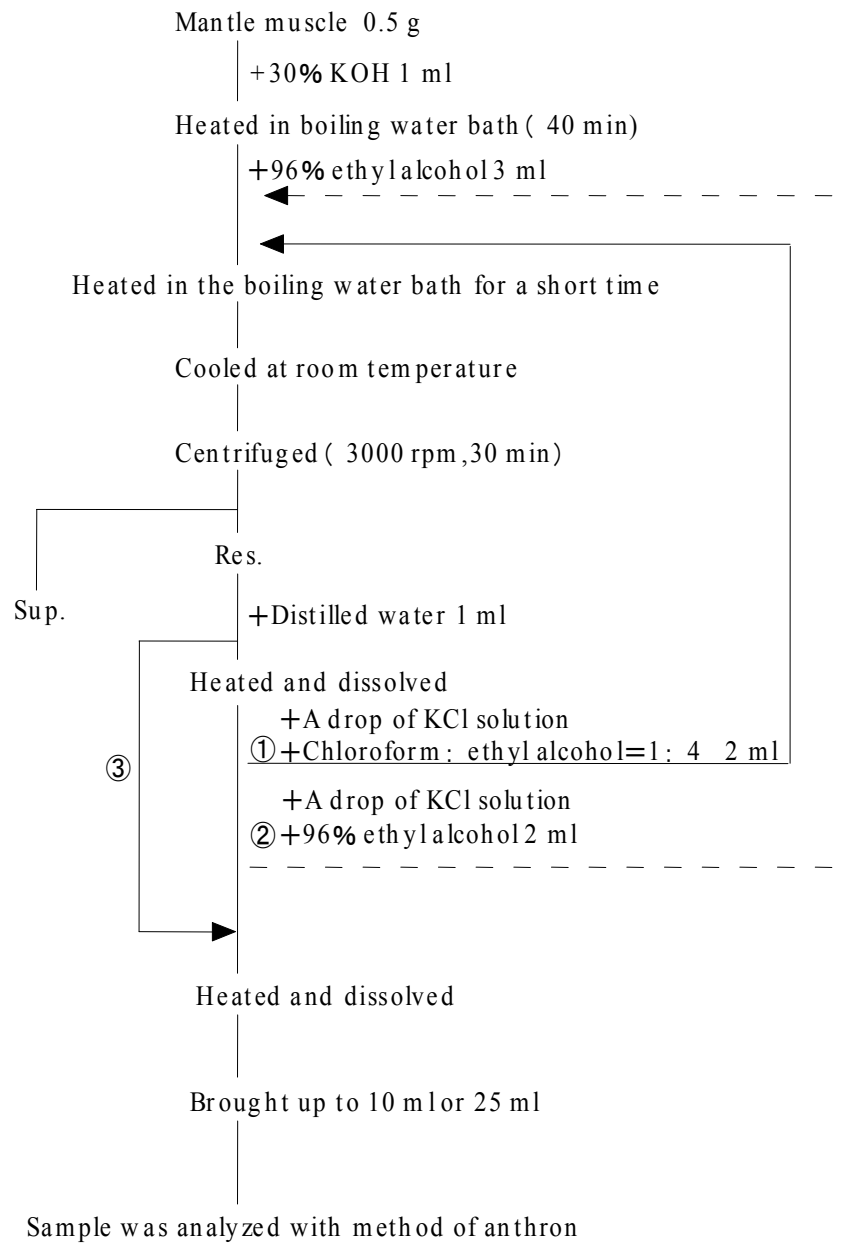
$$\text{グリコーゲン量} \quad (mg / 100 \text{ g}) = \frac{K \cdot a}{W \cdot d}$$

$K$ : 希釈倍率

$a$ : 検量線より求めた濃度 ( mg / ml )

$W$ : 採肉量 ( g )

$d$ : Morris よりグリコーゲンへの換算係数 1.11<sup>6)</sup>



**Fig.2-2** Muscle extract preparation for determination of glycogen

## 2.1.5 乳酸量の測定

### 2.1.5.1 乳酸の抽出

乳酸は、先述の方法より ATP 関連化合物と同時に抽出し、純水で 10 ml に定容した溶液から 5 ml を遠心管に取り、メチルオレンジ指示薬（0.05%水溶液）1 滴を加え、5 M  $K_2CO_3$  で pH 3.5 に調製した。沈殿した過塩素酸カリウムを 3000 rpm で 3 分間遠心分離し、上澄みを 10 ml メスフラスコに分取した。残渣に冷却 3 % PCA（pH 3.5）1 ml 加え攪拌し、3000 rpm で 3 分間遠心分離後上澄みを分取した。さらに、もう一度同様の操作を行い、全上澄みを合わせて、冷却 3 % PCA（pH 3.5）で全量を 10 ml に定容した(Fig. 2-1)。

これを抽出試料とし、測定まで-40 °Cで凍結保存し、測定時に解凍して定量を行った。

### 2.1.5.2 乳酸の定量

乳酸の定量は、石英マイクロセル中に乳酸抽出液 0.1 ml を取り、純水 0.4 ml , ヒドラジングリシン緩衝液 0.45 ml, 40 mg / ml NAD 溶液 0.05 ml を加え、ミク로스パーテルでよく攪拌し、波長 340 nm の吸光度を測定した。3 分後再び測定し、この差が 0.003 以下であることを確認し、この吸光度を  $E_1$  とした。

さらに乳酸脱水素酵素（LDH : 5 mg / protein / ml）0.01 ml を加えて十分に攪

拌し、分光光度計のセルホルダー内（25℃）で15～20分間反応させ、吸光度を測定した。そのままの状態でも3分経過後再び測定し、その吸光度差が0.003以下であることを確認し、これをE<sub>2</sub>とした。

抽出試料の吸光度の増加は $\Delta E = E_2 - E_1$ で表わした。

なお、検量線に用いた標準液の濃度はそれぞれ、0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μMであった。各濃度の吸光度の増加は $\Delta E = E_2 - E_1$ で表わし、各濃度と $\Delta E$ の関係式、すなわち検量線を求めた。この検量線に先の試料で測定した $\Delta E$ を代入し、下式によって乳酸量を算出した。

$$\text{乳酸量 (mg / 100 g)} = \frac{K \cdot a \times 90.1}{W}$$

$K$ ：希釈倍率

$a$ ：検量線より求めた濃度（μM）

$W$ ：採肉重量(g)

#### 2.1.6 pH の測定

外套筋約 1g に 9 倍量の純水を加え，ポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA 社製)でホモジナイズし，pH メーター(HORIBA 社製)で測定した。

#### 2.1.7 感覚色度 L\*の測定

採肉後の外套筋について，表皮の色素胞の影響を避けるため試料の皮組織を除去した外套筋を黒色板の上に乗せて，色彩色差計(MINOLTA 社製)を用いて明度を示す L\*，a\*，b\*値を測定した。あわせて肉眼による観察をおこなった。

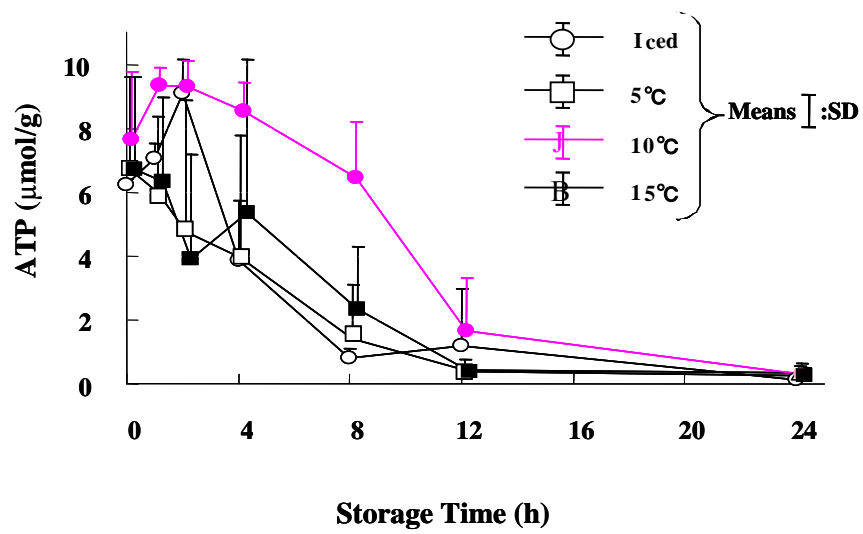


## 2.2 結 果

### 2.2.1 保存温度別 ATP 含量の経時変化

保存温度別の ATP 含量の経時変化について **Fig. 2-3** に示す。

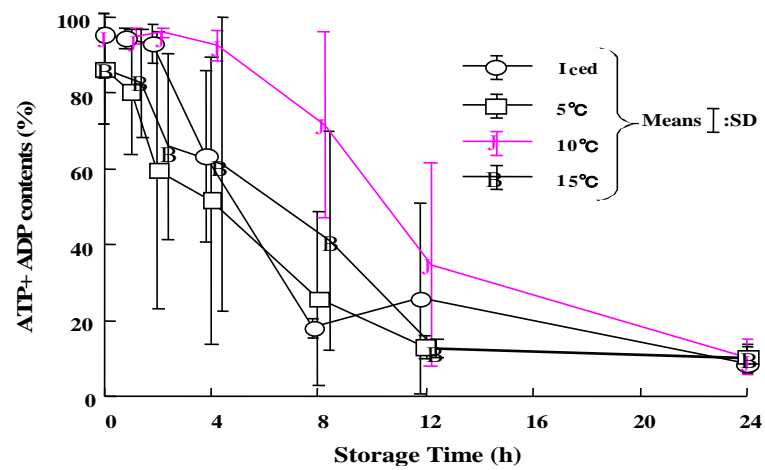
ATP 含量は氷蔵では最も減少が早く、8 時間目に  $1\mu\text{M}$  以下となり、保存 24 時間目にはほぼ消失した。5°C 保存では即殺直後に  $6.5\mu\text{M}$  を示したが、保存 12 時間目にはほぼ消失した。15°C 保存では即殺直後に  $6.5\mu\text{M}$  を示し、8 時間目に  $2.5\mu\text{M}$  以下となり、保存 12 時間目にはほぼ消失した。一方、10°C 保存では保存 8 時間目でも  $6.0\mu\text{M}$  を維持し、保存 24 時間目にはほぼ消失した。氷蔵及び 10°C 保存では致死直後から保存 1 及び 2 時間目に ATP 含量が上昇したのは ATP の減少について個体差が大きかったと考えられるが、ATP 含量の減少傾向は、保存温度によって差異が認められ、マアジ、イサキなどの魚類と同様<sup>7-9)</sup>氷蔵、5°C、15°C 保存よりも 10°C の保存温度で減少が遅延した。



**Fig. 2-3** The effect of storage temperatures on adenosine triphosphate (ATP) concentration of the Oval squid mantle muscle.

### 2.2.2 ATP + ADP 合計値の経時変化

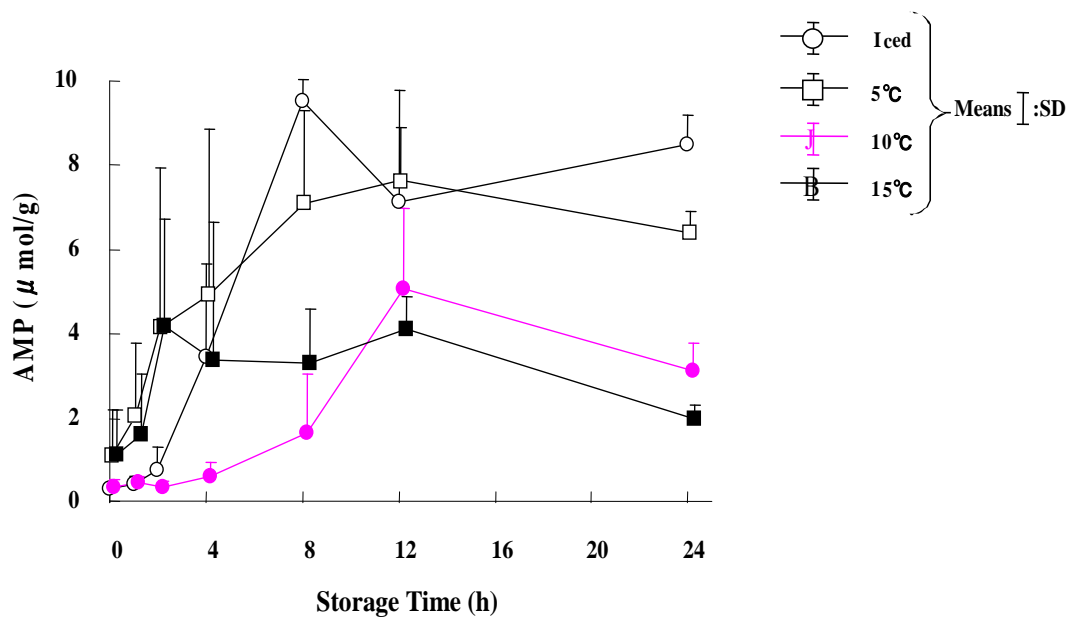
各保存温度（氷蔵，5℃，10℃，15℃）における ATP + ADP 合計値平均の経時変化を **Fig. 2-4** に示した。ATP + ADP 合計値の経時変化を保存温度別にみると，氷蔵では致死直後に 95% 程度で保存 2 時間目までほとんど変化しなかった。しかし保存 8 時間目までに急激に減少し，約 20% となった。5℃ 保存では致死直後に約 85% で，保存 12 時間目にかけて減少して 15% 程度になった。10℃ 保存では，保存 4 時間目まで約 90% とほとんど変化せず，その後は保存 24 時間かけて約 15% に減少した。15℃ 保存での減少は 5℃ 保存より緩やかであったが，ほぼ同様の動きを示した。各保存温度で比較すると，ATP + ADP 合計値が約 20% まで低下したのは氷蔵が最も早く，5℃，15℃，10℃ 保存の順で減少が緩やかだった。



**Fig. 2-4** Changes in ATP+ADP contents of squid mantle muscle during storage in ice, 5°C, 10°C and 15°C.

### 2.2.3 AMP 含量の経時変化

AMP 含量の経時変化を **Fig. 2-5** に示す。氷蔵では保存 2 時間以降、8 時間目までに急激に蓄積し、以降ほぼ一定であった。5℃保存は致死直後より増加し 8 時間目で約 7 $\mu$ M に達し、24 時間目まではほぼ一定であった。10℃保存では保存 4 時間目まではほぼ一定であったが、以降 12 時間後には約 5 $\mu$ M となり、24 時間後には約 3 $\mu$ M まで若干減少した。15℃保存では保存 2 時間目で約 4 $\mu$ M を示し、同レベルを 12 時間後まで維持し、24 時間後には減少した。氷蔵及び 10℃保存では AMP の経時変化は保存 12 時間までは ATP の減少と呼応していた。保存 24 時間では保存温度が高いほど AMP 含量が低かった。



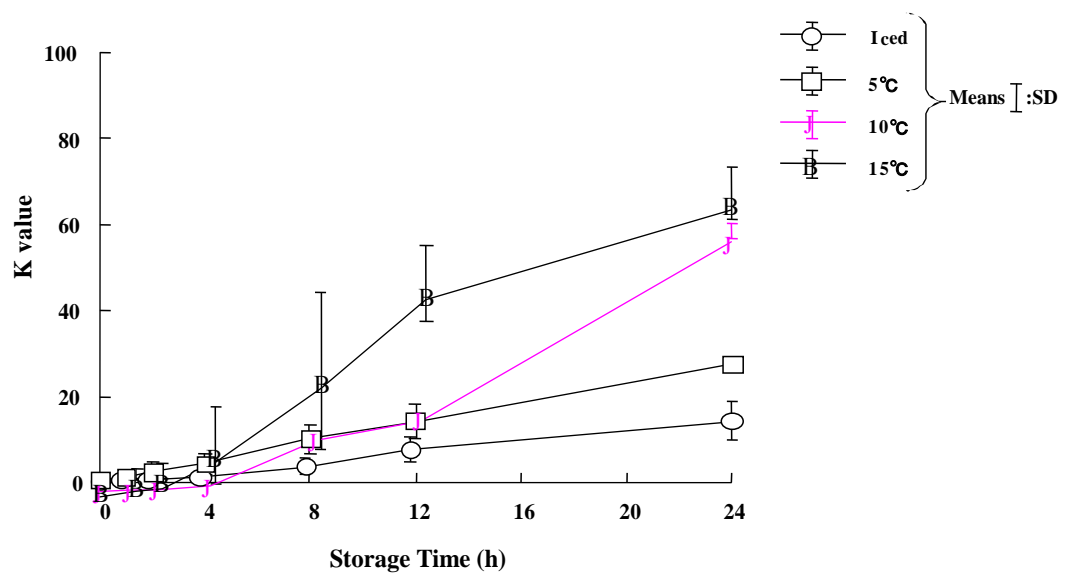
**Fig. 2-5** The effect of storage temperatures on adenosine monophosphate (AMP)

Concentration of the Oval squid mantle muscle

#### 2.2.4 K 値の経時変化

各保存温度(氷蔵, 5℃, 10℃, 15℃)における K 値平均の経時変化を **Fig. 2-6** に示した。

各保存温度別にみると, 氷蔵では保存 24 時間目でも目立った上昇は認められず, 20%以下の K 値を示した。5℃保存も保存期間を通して大きな上昇が認められなかった。10℃保存は保存 12 時間目まであまり大きく上昇しなかったが, その後は大きく上昇して保存 24 時間目で約 60%になった。15℃保存では保存 4 時間目から大きく上昇し, 保存 12 時間目に約 60%に達し, 保存 24 時間目には約 70%となった。各保存温度で比較すると, 15℃が最も早く上昇し, 次いで 10℃, 5℃, 氷蔵の順であった。



**Fig. 2-6** Changes in K value of squid mantle muscle during storage in ice, 5°C, 10°C and 15°C



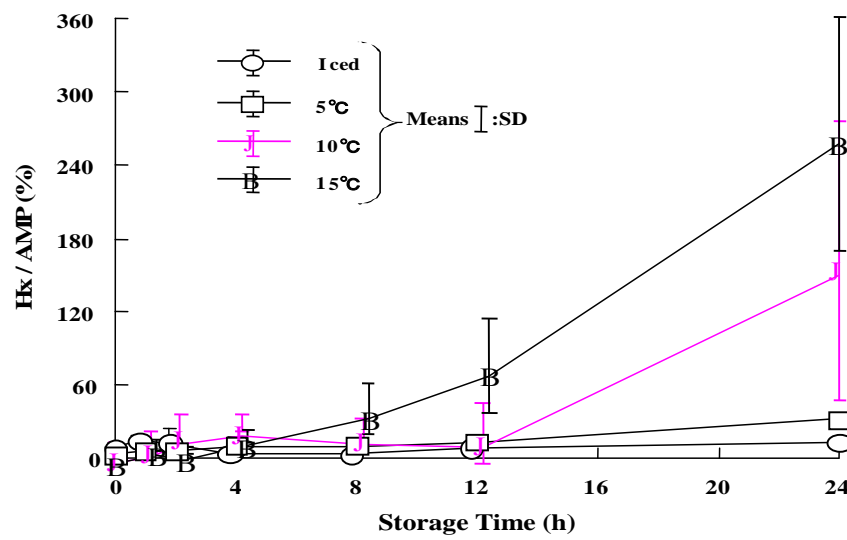
### 2.2.5 Hx /AMP 比の経時変化

各保存温度(氷蔵, 5℃, 10℃, 15℃)における Hx/AMP 比平均の経時変化を

**Fig. 2-7** に示した。

各保存温度別にみると、氷蔵では保存期間中に大きな変化は認められず、保存 24 時間目でも約 15%であった。5℃保存も保存期間中に大きな上昇はなく、保存 24 時間目に約 30%となった。10℃保存では保存 12 時間目まではほとんど上昇しなかったが、その後保存 24 時間目には約 160%まで上昇した。15℃保存では保存 4 時間目まではほとんど変化しなかったが、その後は大きく上昇して保存 24 時間目に約 260%となった。

各保存温度で比較すると、15℃が最も大きく上昇し、次いで 10℃, 5℃, 氷蔵の順であった。



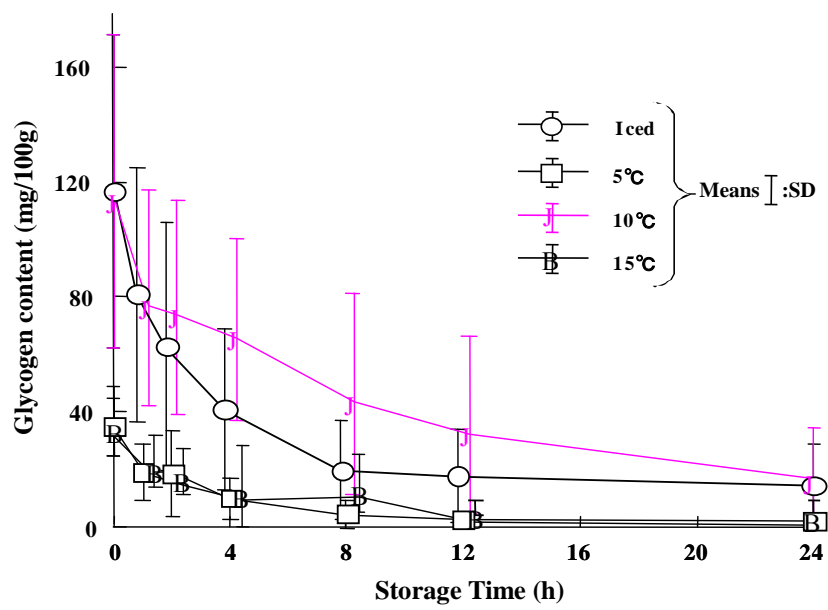
**Fig. 2-7** Changes in Hx/AMP(%) of squid mantle during storage in ice, 5°C, 10°C and 15°C.

### 2.2.6 グリコーゲンの経時変化

各保存温度(氷蔵, 5℃, 10℃, 15℃)におけるグリコーゲン量平均の経時変化を **Fig. 2-8** に示した。

グリコーゲン量平均の経時変化は保存時間の延長に呼応して減少した。各保存温度別にみると、氷蔵では致死直後のグリコーゲン量は約 120mg/100 g であったが、保存 8 時間目には約 20mg/100g まで減少した。5℃保存では致死直後のグリコーゲン量は約 40mg /100 g で、保存 8 時間目にはほぼ消失した。10℃保存では致死直後のグリコーゲン量は約 120mg/100 g で、保存 24 時間目にかけて緩やかに減少して約 40mg/100g となった。15℃保存では致死直後のグリコーゲン量は約 40mg/100 g で、保存 12 時間目でほぼ消失した。

各保存温度を比較すると、採取した時期が異なっていたため致死直後の個体差はあったものの、10℃ 保存が他の温度と比較して、特に減少が緩やかであった。また完全に筋肉中グリコーゲンが消失するのは、5℃および 15℃保存が早かった。



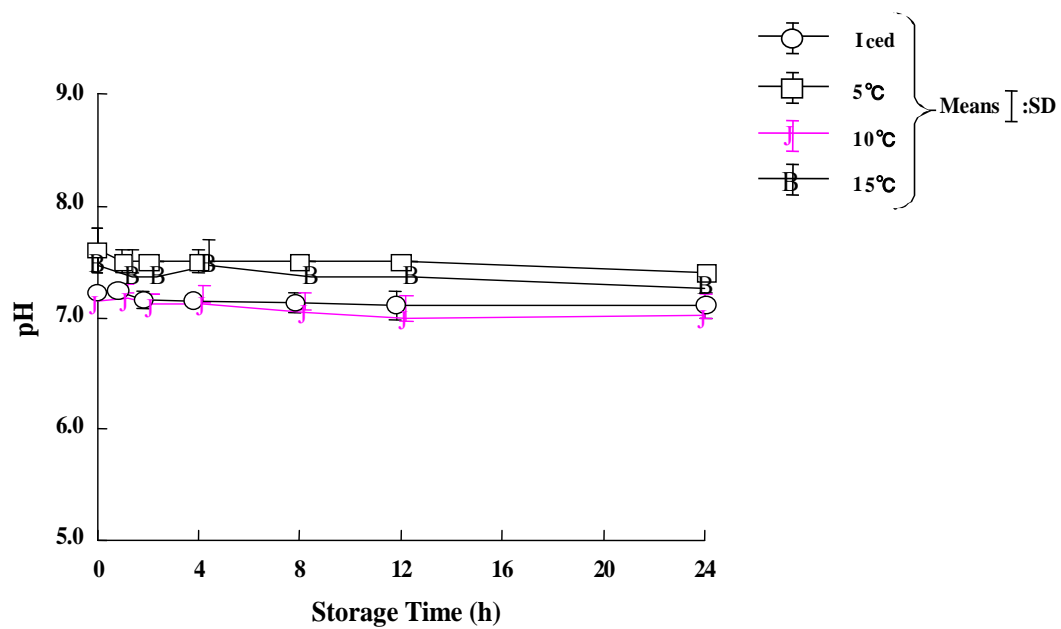
**Fig. 2-8** Changes in glycogen content of squid mantle muscle during storage in Ice, 5°C, 0°C and 15°C.

### 2.2.7 乳酸量の経時変化

乳酸は氷蔵と 10℃保存で用いた致死直後の外套筋からは検出限界以下で検出されなかった。そのため、5℃保存、15℃保存における乳酸量は測定しなかった。

### 2.2.8 pH の経時変化

各保存温度(氷蔵, 5℃, 10℃, 15℃)における pH 平均の経時変化を **Fig. 2-9** に示した。致死直後の pH は、氷蔵, 10℃では 7.2, 5℃, 10℃保存では 7.8 であった。どの保存温度においても、保存期間中の pH はほとんど変化しなかった。



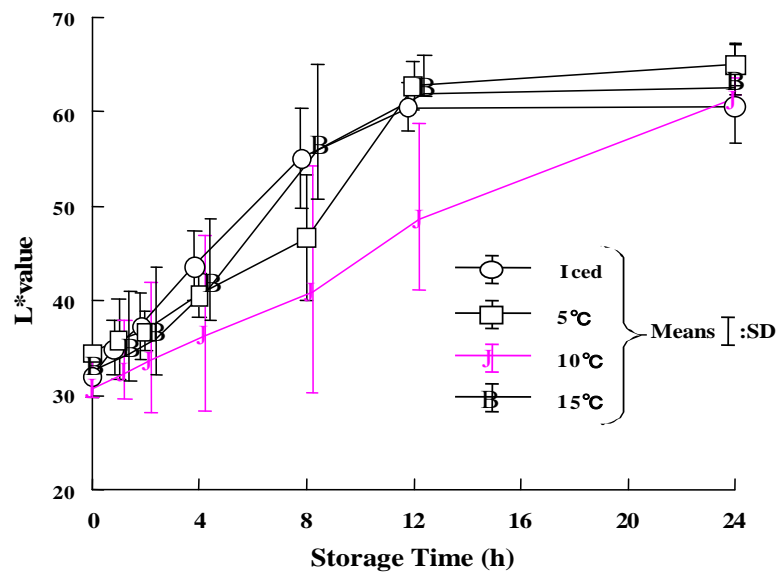
**Fig. 2-9** Changes in pH of squid mantle muscle during storage in iced, 5°C, 10°C and 15°C.

### 2.2.9 L\*値の経時変化

各保存温度(氷蔵, 5℃, 10℃, 15℃)における感覚色度 L\*値(以下 L\*と記す)の経時変化を **Fig. 2-10** に示した。

本実験で用いたアオリイカの外套筋の厚さは 4.0 ~ 12.2mm であった。予備実験を行った結果,この厚さの範囲で L\*への明瞭な影響は見られなかったので感覚色度について補正は行わなかった。保存温度においても,致死直後は 32 前後と大きな差はなかった。その後の変化を各保存温度別にみると, 氷蔵では致死直後より大きく上昇して保存 4 時間目から保存 8 時間目かけて 50 を超え, 保存 12 時間目に約 60 を超えた。5℃保存では保存 8 時間目で 45 程度まで上昇し保存 12 時間目に約 60 を超えた。一方, 10℃保存は経過時間とともに L\*は上昇し, 保存 8 時間目では 40, 12 時間目で 50 を示し 24 時間後には 60 を超えたが各保存温度の中ではもっとも緩慢に上昇した。15℃保存は氷蔵とほぼ同様の上昇を示した。各保存温度を比較すると, L\*値は氷蔵, 15℃保存で最も早く減少し, 次いで 5℃保存, 10℃保存の順であった。

L\*は色の明るさを示す指標であり, 今回の実験においてアオリイカ外套白濁の指標として用いた。肉眼による観察では L\*が約 30 を示した致死直後は背後の黒色版が透き通って確認できる状態であったが, L\*の増加とともに白濁の程度は強くなり, L\*が 50 を超えたときに透明感はほぼ喪失し完全に白濁した。



**Fig. 2-10** Changes in L\* value of squid mantle muscle during storage in iced, 5°C, 10°C and 15°C



## 2.3 考 察

イカは鮮度状態だけでなく皮膚の色や筋肉の透明感など外観も重要視される水産物である<sup>10-12)</sup>。今回用いたアオリイカ外套筋の L\*値は、肉眼で観察した場合 50 を超えると筋肉全体が白濁したように見えた。L\*値が 50 を超えた保存時間は氷蔵、15℃保存で保存 4～8 時間目、5℃保存で保存 8～12 時間目の間に、10℃保存で保存 12 時間目であった。このことから、筋肉の白濁が最も遅いのは 10℃保存であった。

各保存温度における ATP+ADP 合計値の減少は 10℃保存が最も遅く、グリコーゲン含量の減少は、即殺時の個体差があったため一概にはいえないが、氷蔵と 10℃保存を比較すると 10℃保存の方が緩やかに減少した。

10℃保存における K 値および Hx/AMP 比の平均は高い値を示したが、K 値 60%でも生食に支障はなかったため、高鮮度状態が保たれていると考えられた。

以上のことから、アオリイカを保存する際の最適保存温度は 10℃付近であると考えられた。次に、白濁と ATP 関連化合物の変化との関連性について、ATP 減少速度から算出した各保存時間の ATP(%)と L\*値の上昇について検討を行った。

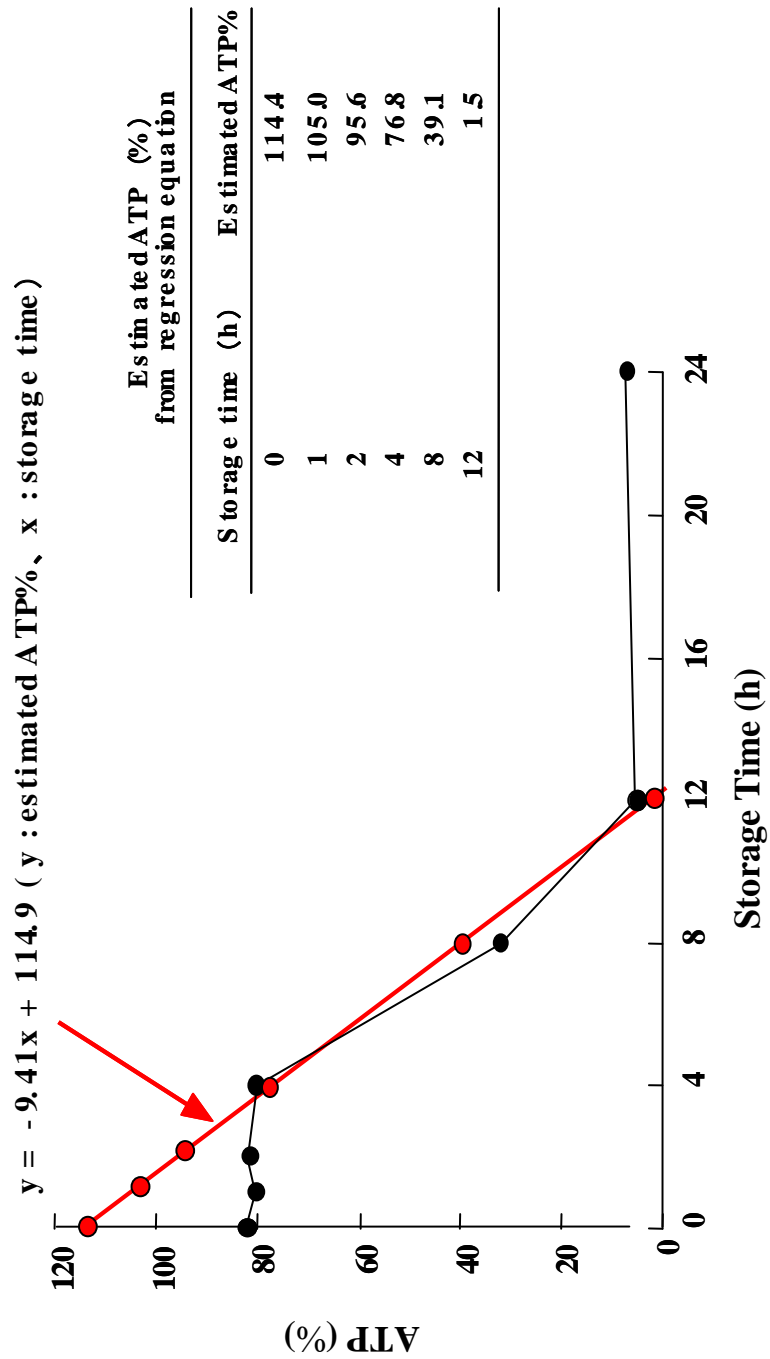
即殺後の保存初期には ATP の減少とともに、ATP 再生系(Creatine kinase, 解

糖など)がはたらいっているため、実際の ATP 減少量は不明である。

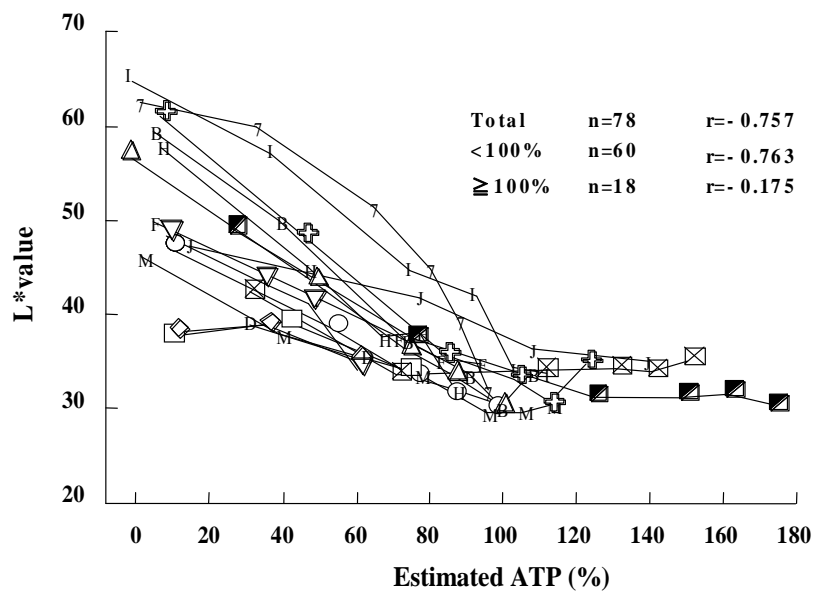
そこで **Fig. 2-11** に示すように全ての保存温度(氷蔵, 5, 10, 15°C) における個体ごとに ATP が直線的に減少している部分で保存時間と ATP%との回帰直線を求めた。求めた回帰直線に各保存時間を代入し、保存初期における各時間の ATP%を推定した。

次いで、推定 ATP%と L\*値との関係について検討を行った(**Fig. 2-12**)。全ての保存温度において、両値の間には推定 ATP が 100%以上、すなわち ATP 再生系がはたらいっている間では L\*値は上昇せず ( $r = -0.175$ ,  $n = 18$ )、推定 ATP が 100% 以下で ATP%の減少に呼応して L\*値が上昇する負の相関関係が認められた ( $r = -0.763$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 60$ )。このことからアオリイカ外套筋の白濁には、ATP 再生系停止以後の筋組織中の変化が影響すると推察された。

吉岡ら<sup>13)</sup>は、薄切りにしたスルメイカを海水入りの酸素充填したパックに詰めて 5°Cで保存すると、長時間透明感を保持できるとしている。これは ATP 再生系が機能する状態、すなわち細胞が生きた状態を保つことが白濁を抑制するという今回の検討を裏付けるものであると考えられた。よって、アオリイカの白濁を抑制して透明感を維持するためには、保存温度だけではなく ATP 再生系が機能する状態、すなわち細胞が生きた状態を可能な限り保つような保存方法を考える必要があると判断した。



**Fig. 2-11** Estimation of ATP (%) of squid mantle muscle for the first 4 h storage Sample (No.3)



**Fig. 2-12** Relations hip between  $L^*$  value and estimated ATP (%) in squid mantle muscle.

## 参考文献

- 1) Ehira S., Uchiyama H., Uda F., and Matsumiya H.: A Rapid Method for  
Determination of the Acid-soluble Nucleotides in Fish Muscle by Gradient Elution,  
Nipponn Suisan Gakkaishi, **36**, 491-496. (1970)
- 2) Hohorst HJ.: In 「Method of Enzymatic Analysis」 (ed by HU Bergmeyer),  
Academic Press, New York, 266-270. (1963)
- 3) 槌本六良, 三嶋敏雄, 宇津木照洋, 北島俊一, 矢田殖朗, 保田正人.:「動揺の  
激しい船内での ATP 関連化合物の分離定量法—逆相分配カラムによる高速  
液体カラムクロマトグラフィー法」, 日本水産学会誌, **51**, 1363-1369. (1985)
- 4) 藤井暢三:「生化学実験法」, 南江堂, 東京, p. 216. (1949)
- 5) 関根隆光.:「生化学領域における光電比色法. 生化学の領域」(増刊 **34**), 南  
江堂, 東京, 36-39. (1958)
- 6) Morris DL.: Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone  
reagent」. Science; **107**, 254-255. (1948)
- 7) Mishima T., Nonaka T., Okamoto A., Tsuchimoto M., Ishiya T., Tachibana K., and  
Tsuchimoto M.: Influence of storage temperatures and killing procedures on

- Post-mortem changes in the muscle of horse mackerel caught near, Nagasaki Prefecture, Japan, *Fish. Sci.*, **71**, 187-194. (2005)
- 8) Okamoto A., Hamada Y., Miura K., Nonaka K., Kuwahara K., Osako K., Misima T., and Tachibana K.: Influenc of killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **72**, 918-923. (2006)
- 9) Okamoto A., Daisy A. M., Hamada Y., Miura K., Nonaka K., Kuwahara K., Osako K., Misima T., Arai H., and Tachibana K.: Influence of storage temperatures on post-mortem changes in the ordinary muscle of wild three-line grunt (*Parapristipoma trilineatum* ), *Nippon Syokuhin Gakkaishi*, **14**, 1-6. (2007)
- 10) 中村邦典, 石川宣次, 木本清暉, 水野雄:「貯蔵中のスルメイカの鮮度変化」, *東海水研報*, **118**, 45-49. (1985)
- 11) 岩本宗昭, 山根玲子:「ケンサキイカの死後変化に関する研究 貯蔵条件と体色変化」, *島根県水産試験場報告*, 83-90. (1991)
- 12) Toda T., Ushio H., and Ohshima T.: Skin Color Changes of Squids *Todarodes pacificus* and *Loligo bleekeri* during Chilled Storage, *Journal of Food Science*, **69**,

414-417. (2004)

- 13) 吉岡武也, 木下康宣, 北海道立技術センター, 「イカの鮮度保持技術の進展」, 日本水産学会誌, **72**, 495-500. (2006)

### 第 3 章アオリイカ外套筋の死後硬直測定法の検討

- ・ 試料と測定項目
- ・ 柱状筋による筋収縮率と張力
- ・ 輪状筋による筋収縮率と柱状筋による張力
- ・ 柱状筋、輪状筋による筋収縮率の経時変化
- ・ 柱状筋による張力の経時変化
- ・ 個体の柱状筋による張力の経時変化
- ・ 考 察
- ・ 参考文献



### 第3章 死後硬直測定法の検討

魚類筋肉の死後硬直測定には、魚体全体を用いる硬直指数法<sup>1)</sup>や体測筋を柱状切り出してその収縮を測定する方法<sup>2)</sup>が知られている。しかし、アオリイカでは、甲が存在するためイカ全体を用いての測定は極めて難しく、また、実験中の筋肉中成分の測定を採肉によって行うことが出来ない。そこで、アオリイカ外套筋の死後硬直測定方法を検討するために、アオリイカ外套筋より作製した柱状筋(保存温度 10℃)あるいは輪状筋(氷蔵)を用いてそれらの筋収縮率と張力を経時的に測定し、両値の関係について検討した。

#### 3.1 方 法

##### 3.1.1 試料

試料には第1章と同様に生きたアオリイカ(*Sepioteuthis lessoniana*)を用いた。捕獲場所はいずれも長崎近海で、平均外套背長と平均体重はそれぞれ、 $19.1 \pm 1.6$  cm,  $476.7 \pm 143.0$  g であった。実験に用いた個体数は合計7杯であった。

##### 3.1.2 試料より外套筋の採取

試料を第1章と同様の方法で即殺して外套とその他に分け、外套筋の表皮を剥いだ。測定は同一個体の筋収縮率と張力について行った。

筋収縮率の測定に採取した試料の形状は以下の 2 種類であった。なお、張力の測定には全て柱状筋を用いた。

柱状筋：外套筋を体軸に沿って 2 つに分け、外套筋の中央部分を体軸と直角

方向に幅約 1cm、長さ約 10cm の柱状に採取した。

輪状筋：外套筋の中ほどを幅約 1cm のリング状に採取した。

### 3.1.3 測定時間及び保存温度

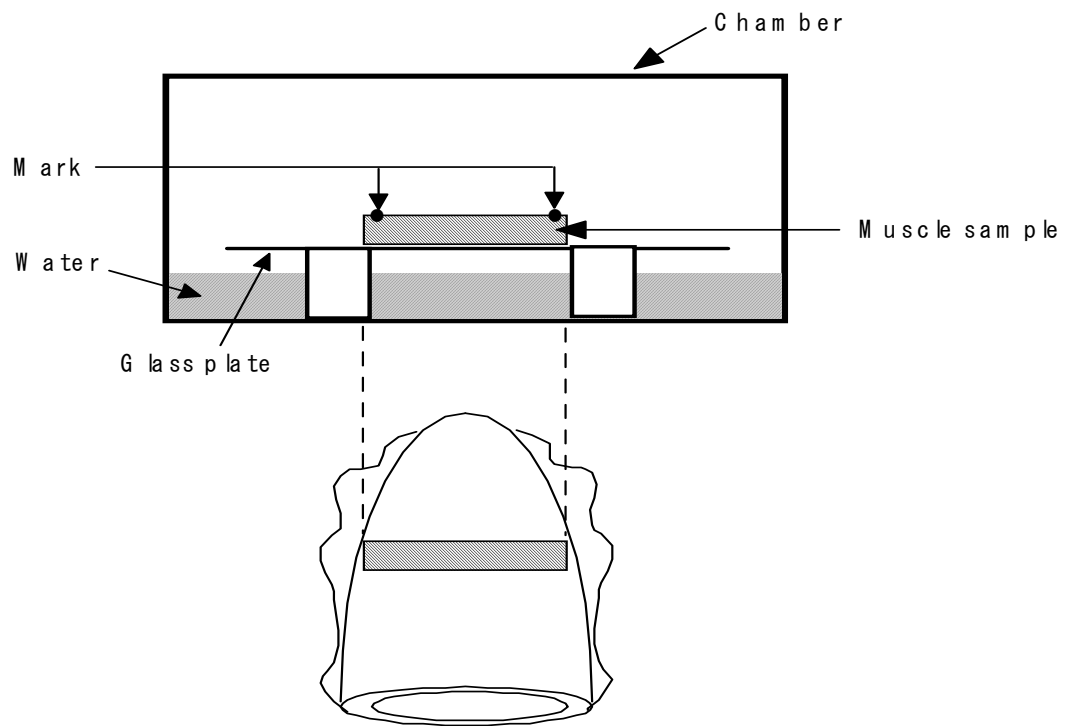
各形状に切り出した外套筋を 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 時間目に測定した。また筋収縮や張力の状況に応じて随時測定回数を増した。保存温度は筋収縮率を測定する際の筋肉の形状によって異なっていた。すなわち柱状筋による筋収縮の測定及び張力の測定に用いた試料は 10℃保存し、輪状筋による筋収縮の測定及び柱状筋による張力の測定に用いた試料は氷蔵した。

### 3.1.4 柱状筋による筋収縮率と張力

#### 3.1.4.1 筋収縮率の測定

測定の詳細を **Fig. 3-1** に示した。採取した柱状筋の両端に木綿糸を通して目印とし、表皮側を下にして湿潤させたガラス平板上に乗せ、一定温度下の水蒸気飽和の容器内に保存した。

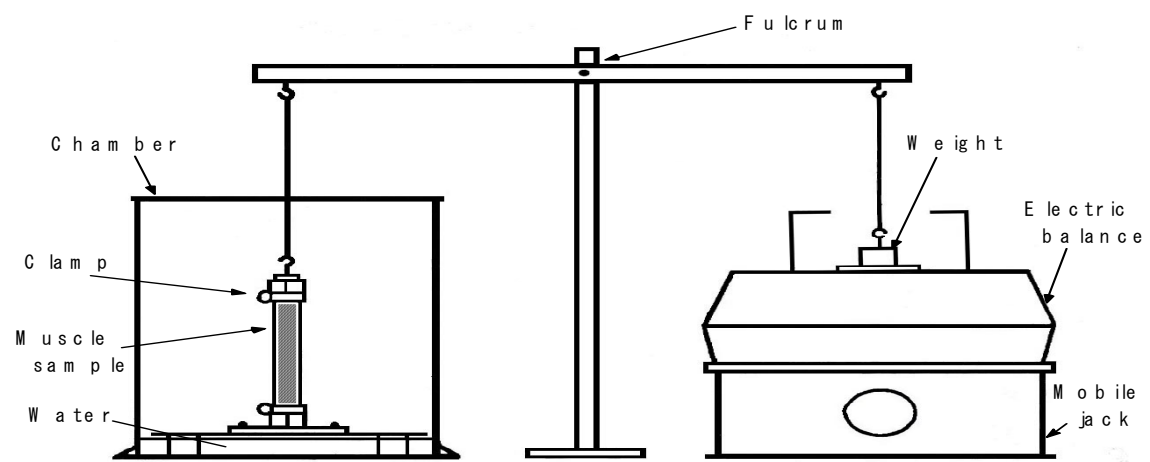
筋収縮率の測定は内蔵側について行い、木綿糸の間の長さをノギスで経時的に計測した。なお、筋収縮率は採肉直後を 0% として、即殺直後の長さに対する収縮割合(%)で表した。



**Fig. 3-1** Illustration of excision portion of squid mantle muscle and the measurement apparatus used for the muscle contraction experiment

#### 3.1.4.2 張力の測定

採取した柱状筋の測定は、Korhonen ら<sup>3)</sup>の装置を一部改良した装置を自製し行った。この装置の概略を **Fig. 3-2** に示した。柱状筋をクリップで止め、一端を容器の底に固定し、他端を天秤の一端よりつるしたナイロン糸に付け、保存容器内に装着した。保存容器内の底には 1 cm 程度の深さに水を張り、側面には水で湿らせたろ紙を貼りつけて容器内が水蒸気飽和になるようにした。柱状の筋肉に力をかけないように、天秤の支点や電子天秤の高さを調整してバランスを取り、分銅の重量を若干電子天秤にかけた状態で電子天秤の値を 0 とした。筋肉が張力を発生することにより減少していく電子天秤のめもりを経時的に読み取り、重量の変化を張力とした。



**Fig. 3-2** Measurement apparatus used for the muscle tension experiment

### 3.1.5. 輪状筋による筋収縮率と柱状筋による張力

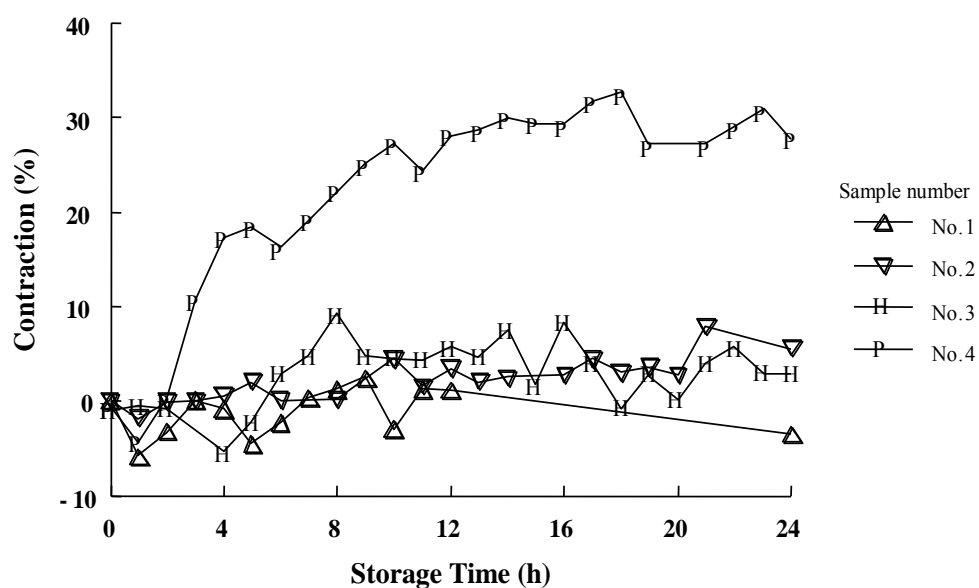
採取した輪状筋の頭部側を下にして、ラミネート加工して表面を湿潤させた方眼紙上に乗せ、これを厚さ 5 cm ほど砕氷を敷き詰めた保存箱に入れて蓋を閉め、保存箱ごと氷蔵した。保存箱は砕氷を入れる前にあらかじめ低温室で 1 日程度冷やした。筋収縮の測定は、輪状筋を保存箱から取り出して写真撮影で室温にて経時的に行った。筋収縮率は撮影した画像データを解析して算出した。算出は以下の通りであった。外套筋の外直径と内直径を各 7 ヶ所測定し、それぞれの平均を求めた。求めた平均外直径と平均内直径から、さらに平均の長さ(平均直径)を求め、これをもとにした円周の変化から筋収縮率を算出した。

## 3.2 結 果

### 3.2.1 柱状筋による筋収縮率の経時変化

柱状筋による筋収縮率の経時変化を **Fig. 3-3** に示した。

筋収縮率は個体によって差があり、1 個体(Sample No. 4)のみ大きな増加が認められ、その最大値は 30%程度であった。しかし他の 3 個体(Sample No. 1, 2, 3)は保存期間を通して±10%程度増減し、明瞭な収縮を検出できなかった。



**Fig. 3-3** Changes in contraction percentage of squid mantle muscle during storage

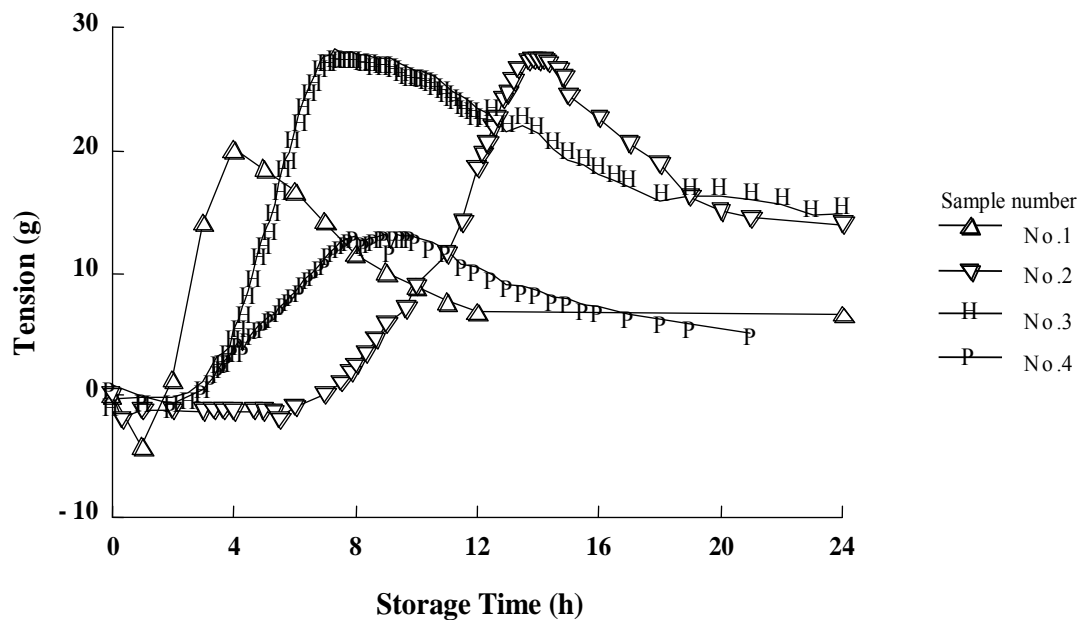
at 10°C muscle were cut as rectangular



### 3.2.2 柱状筋による張力の経時変化

柱状筋による張力の経時変化を **Fig. 3-4** に示した。

張力は個体によって差が大きく、最小値を示した個体(Sample No.4)の最大張力は約 10 g であった。最大値を示した個体(Sample No.2, 3)の最大張力は約 30 g であった。張力が最大を示した保存時間も個体によって大きな差が認められ、最も早い個体(Sample No.1)で保存 4 時間目、最も遅い個体(Sample No.2)は保存 14 時間目であった。



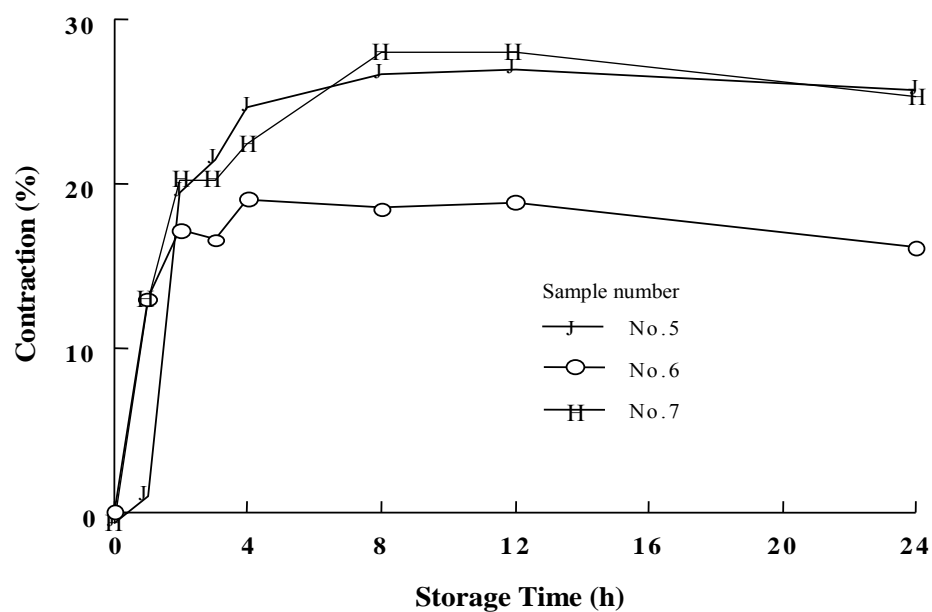
**Fig. 3-4** Changes in tension of squid mantle muscle samples during storage at 10°C

### 3.2.3 輪状筋による筋収縮率の経時変化

輪状筋による筋収縮率の経時変化を **Fig. 3-5** に示した。

筋収縮率は保存初期に急激に上昇し，Sample No.6 で保存 4 時間目，他の 2 個体(Sample No.5, 7)は保存 4 ～8 時間目程度で最大となった。

筋収縮率の最大値は 1 個体(Sample No.6)が約 20%であったが，他の 2 個体 (Sample No.5, 7)は約 30%であった。

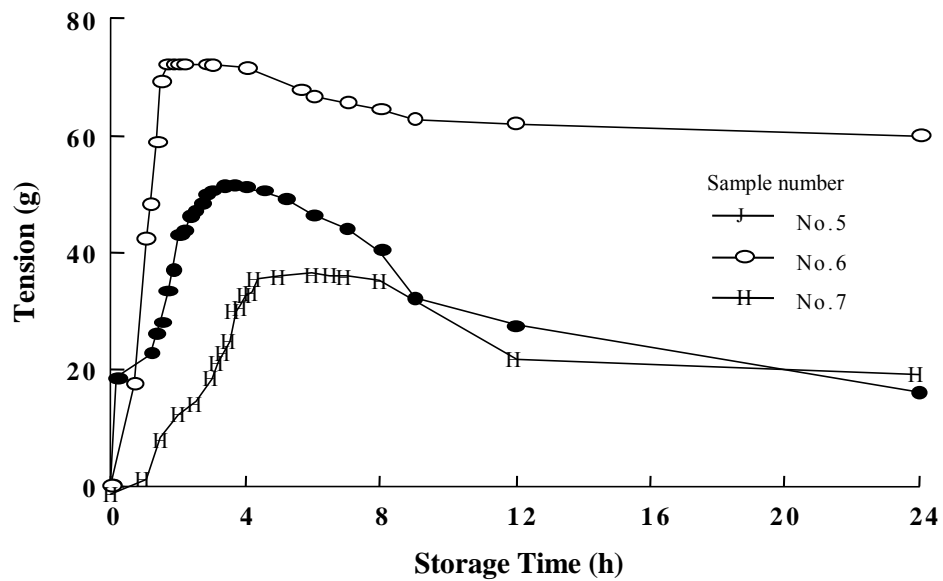


**Fig. 3-5** Changes in contraction percentage of squid mantle muscle during storage in ice. muscle were cut as ring form

### 3.2.4 輪状筋による筋収縮実験で用いた固体の柱状筋による張力の経時変化

柱状筋による張力の経時変化を **Fig. 3-6** に示した。

張力は保存初期である 2～4 時間目に急激に上昇して最大となった。最大値は個体差があり，Sample No.5 は約 75 g と最も大きく，Sample No.7 は 45 g 程度と最も小さかった。



**Fig. 3-6** Changes in tension of squid mantle muscle during storage in ice

### 3.3 考 察

当研究室の山家<sup>4)</sup>は、養殖マダイを用いて 5℃保存における筋収縮率と張力の関係を検討している。このとき筋収縮率と張力の測定に用いた養殖マダイ試料は、背部普通筋を頭部側から尾部側にかけて柱状に切り出したものであった。

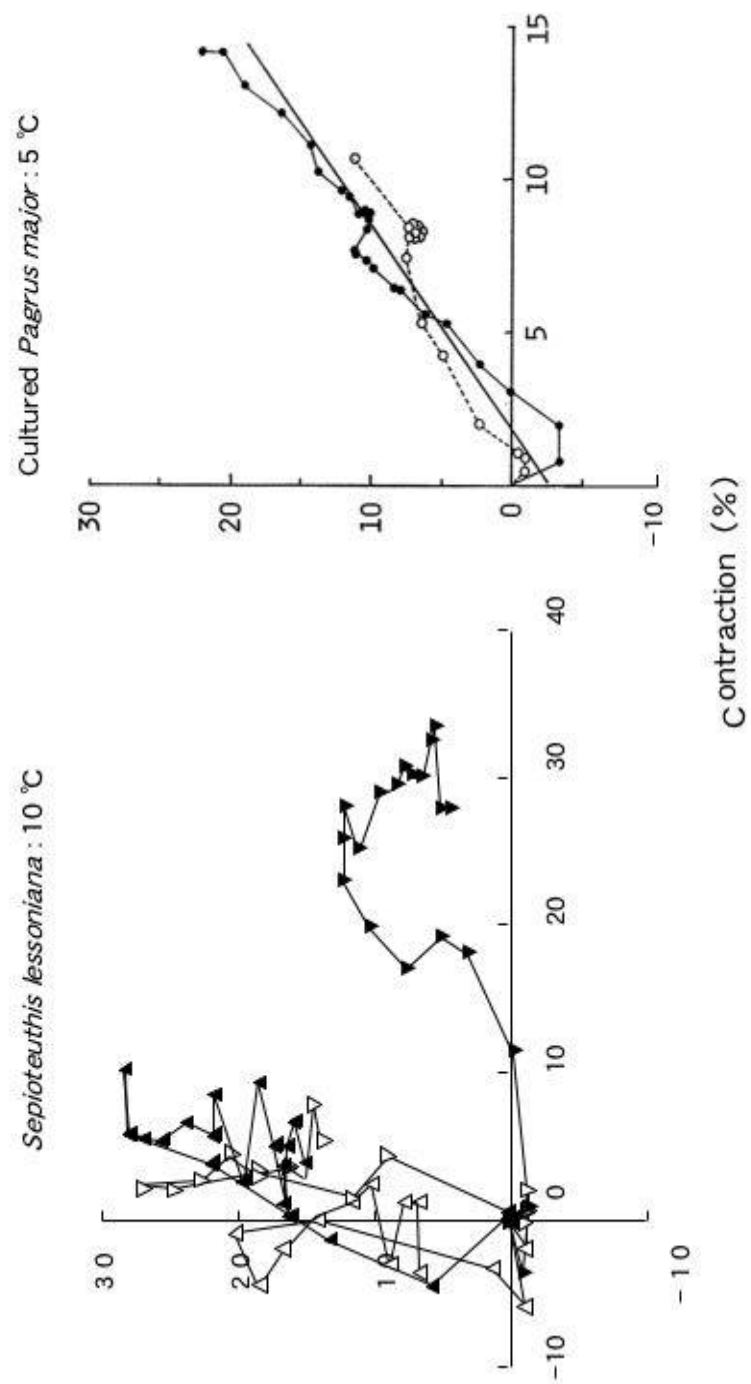
その試料から得られた筋収縮率と張力の間には明確な正呼応の関係が認められた。一方、アオリイカの 10℃保存した柱状筋による筋収縮率と張力の関係では **Fig. 3-7**、張力が増加しても筋収縮率が増加しなかった個体もあり、両者の間に明瞭な正呼応の関係は認められなかった。

今回柱状筋の筋収縮率測定において筋収縮率が増加しなかった原因は不明であった。また、柱状筋を氷蔵して測定を行ったが、氷蔵中に柱状筋の両端が内臓側に曲がって収縮し、筋収縮の測定は不可能であった。

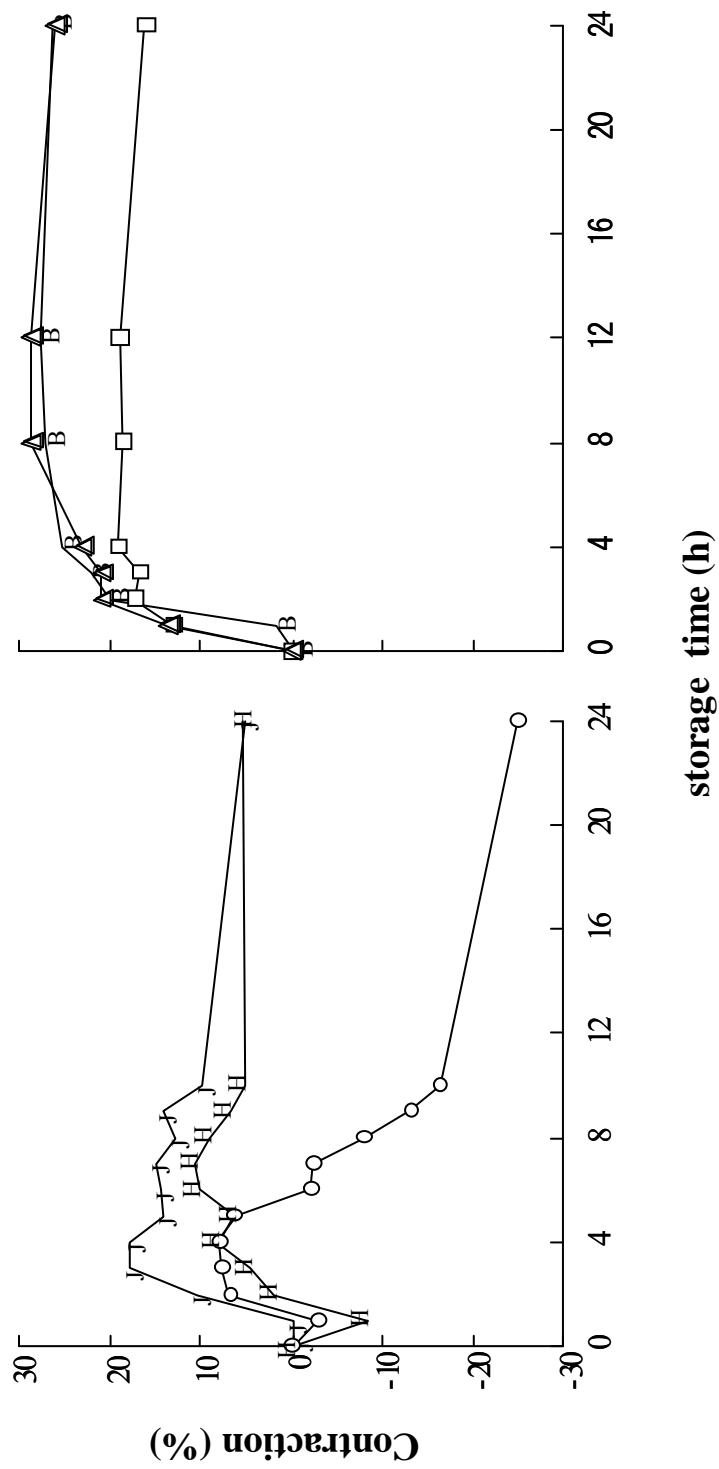
このような収縮が起こったのは、イカの外套筋が体軸と直角方向に走る熱い環状筋と、環状筋と直角に表皮と内臓側に走る放射状筋の積み重ねによって構成されている<sup>5)</sup> ことに起因しているのではないかと考えられた。

輪状筋による筋収縮率の様相は柱状筋の場合よりも魚類と類似しており、**Fig.3-8** に示すように明らかに保存時間の延長に呼応した上昇を示した。

これは柱状筋の筋収縮率を測定する際に認められた筋肉が曲がるという現象が、輪状筋では解消されているためと考えられた。



**Fig. 3-7** Relationship between contraction and tension



**Fig. 3-8** Comparison between rectangular sample and ring form sample of squid mantle muscle in iced storage

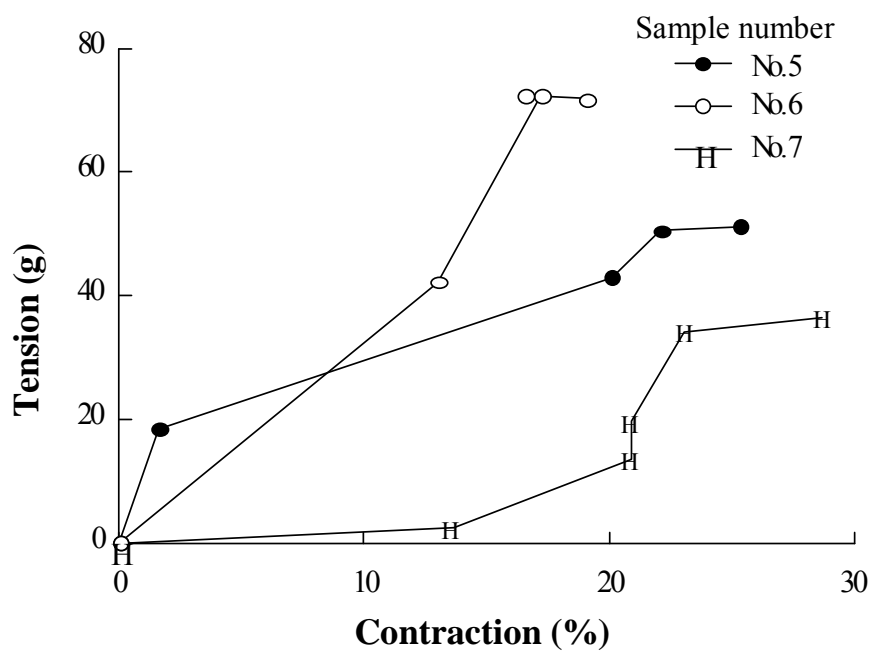
氷蔵した輪状筋による筋収縮率と柱状筋による張力の関係を検討したところ (Fig.3-9), 先の養殖マダイの場合と同様に筋収縮率と張力の間に正呼応の関係が認められた。

ところで、今回の実験では、筋収縮率の測定を行う際に保存箱から室温に筋肉を取り出して撮影した。この撮影に要した時間は比較的短かったが、筋肉温度の上昇や再び所定の保存温度になるまでに時間がかかることが考えられた。

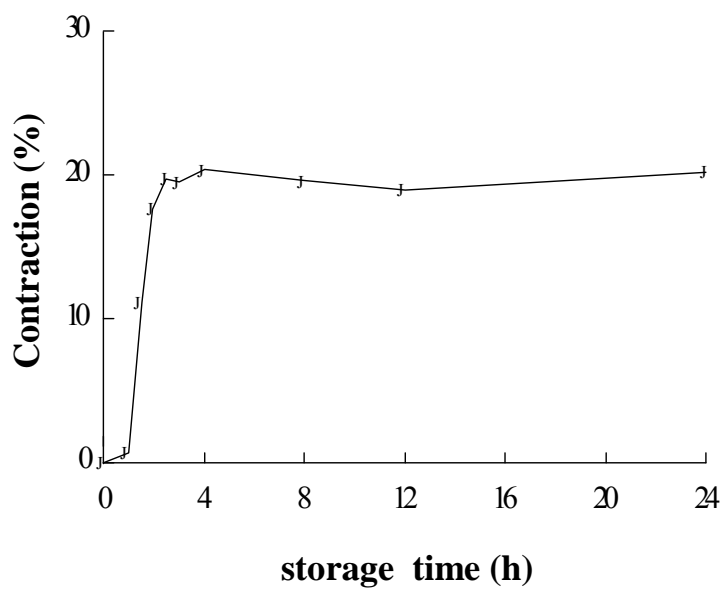
このため筋収縮が大きく上昇する時点で時間あたりの撮影回数を増やすことが困難であった。この点をふまえて、保存箱を室温に出した際に温度差によって蓋の両面に付く水滴を、蓋を開けずに拭き取ることができるように改良した。

この改良によって保存箱に筋肉を入れたままで写真撮影が可能となり、本法を用いて筋収縮を測定した結果 (Fig. 3-10, 3-11, 3-12), 正呼応の関係がより明瞭に認められた。

本実験において、輪状筋による筋収縮率の測定は氷蔵のみで行っているが、今後他の保存温度においても検討が必要であると考えられた。以上のことから、アオイリカ外套筋の筋収縮率を測定する際は輪状筋による測定が有効であると考えられた。

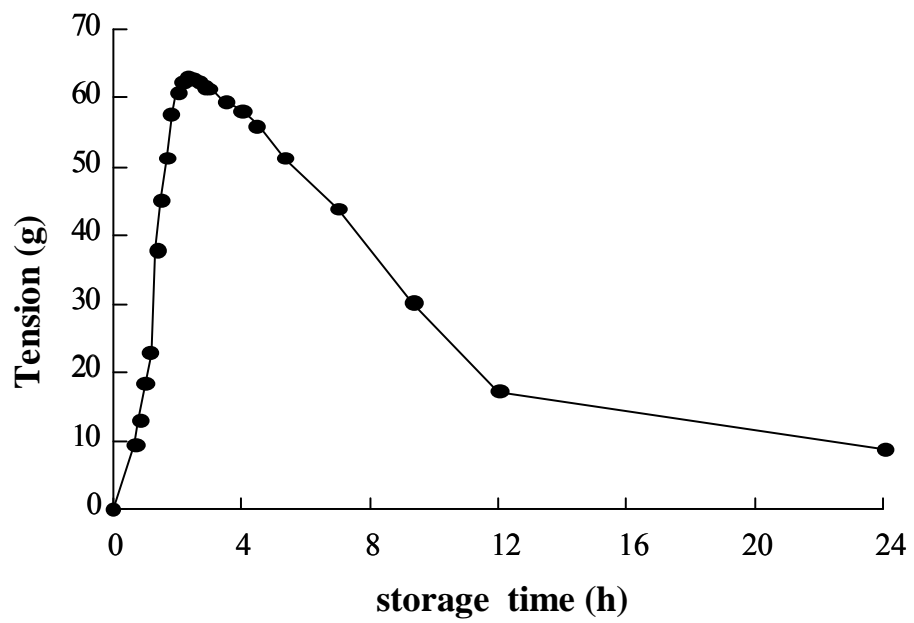


**Fig. 3-9** Relationship between contraction and tension of squid mantle muscle in ice

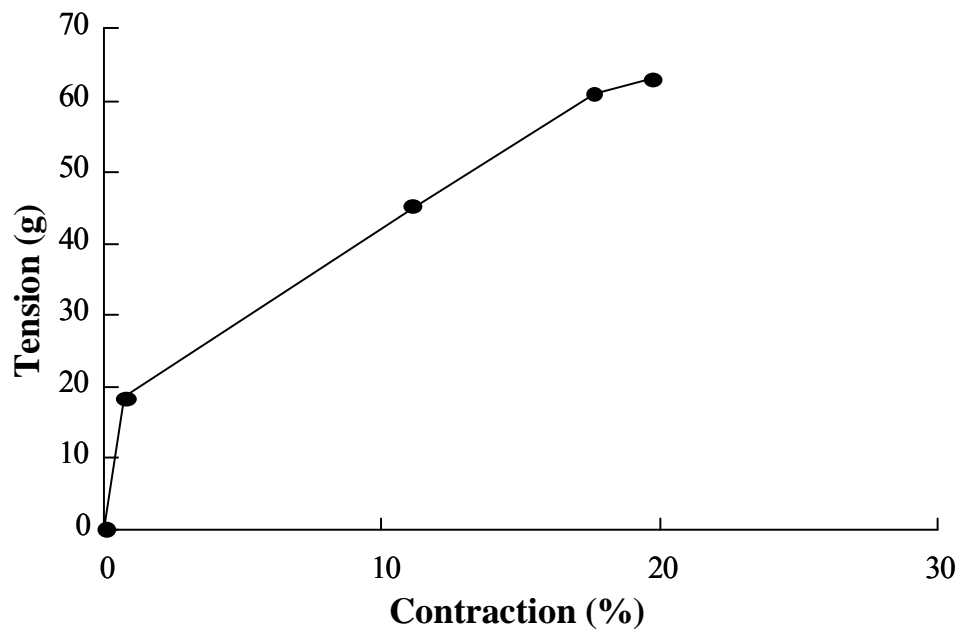


**Fig. 3-10** Changes in contraction of squid mantle muscle after photo analysis during Iced storage





**Fig. 3-11** Changes in tension of squid mantle muscle during storage at ice storage



**Fig. 3-12** Relationship between contraction and tension of squid mantle muscle at ice storage

## 参考文献

- 1) 尾藤方通, 山田金次郎, 三雲泰子, 天野慶之: 魚の死後硬直に関する研究-1, 改良 CUTTING 法による魚対の死後硬直の観察, 東北海区水産研究所研究報告, **109**, 89-96. (1983)
- 2) Buttkus H.: Red and White Muscle in Relation to rigor mortis, Journal of the Fisheries Research Board of Canada, **20**, 45-57. (1963)
- 3) Korhonen RW., Lanier TC. and Giesbrecht F.: An Evaluation of Simple Methods for Following Rigor Development in Fish, Journal of Food science, **55**, 346-348. (1990)
- 4) 山家隆治: 魚種・養殖と天然における死後硬直進行速度やパターンの違いに及ぼす筋原線維  $Mg^{2+}$ -ATPase の  $Ca^{2+}$ 濃度の影響, 修士論文, 長崎大学, 長崎. (1992)
- 5) 須山三千三, 鴻巣章二編: 「水産食品学」, 恒星社厚生閣, 東京, 10-12. (1991)

## 第 4 章アオリイカ外套筋の筋収縮に及ぼす保存温度の影響

- ・ 試料と測定項目
- ・ 筋収縮に及ぼす保存温度の影響
- ・ 筋原線維  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性の測定
- ・ 筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の測定
- ・ 考 察
- ・ 参考文献

## 第4章 アオリイカ外套筋の筋収縮に及ぼす保存温度の影響

本章では、第3章を基にアオリイカ外套筋より作製した輪状筋を用いた筋収縮率の測定及び保存温度の影響と死後硬直進行からみたアオリイカ外套筋の最適保存温度について検討した。さらに、魚種では、筋細胞内で筋原線維(Mf)の  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性が変化すると ATP の消失速度が変わり、それに伴って死後硬直の進行も変化するとされている<sup>1,2)</sup>。同時に Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性は筋細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の違いに影響され、その  $Ca^{2+}$ 濃度の制御はカルシウムポンプの役割を果たす筋小胞体(SR) $Ca^{2+}$ -ATPase 活性によってなされとも報告されている<sup>1,2)</sup>ことから、即殺したアオリイカ外套筋より、筋原線維(Mf)を調製し、Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性と、筋小胞体の  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性についても検討を行った。

### 4.1 方 法

#### 4.1.1 筋収縮に及ぼす保存温度の影響

##### 4.1.1.1 試 料

試料には夏期(水温約 25℃)の長崎近海で漁獲された生きた状態のアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* を用いた。実験に用いた固体総数は 15 杯でこのうち 10

杯を筋収縮実験に用いた。試料の平均外套背長  $25.8 \pm 3.2$  cm, 平均体重  $812.0 \pm 263.0$  g であった。

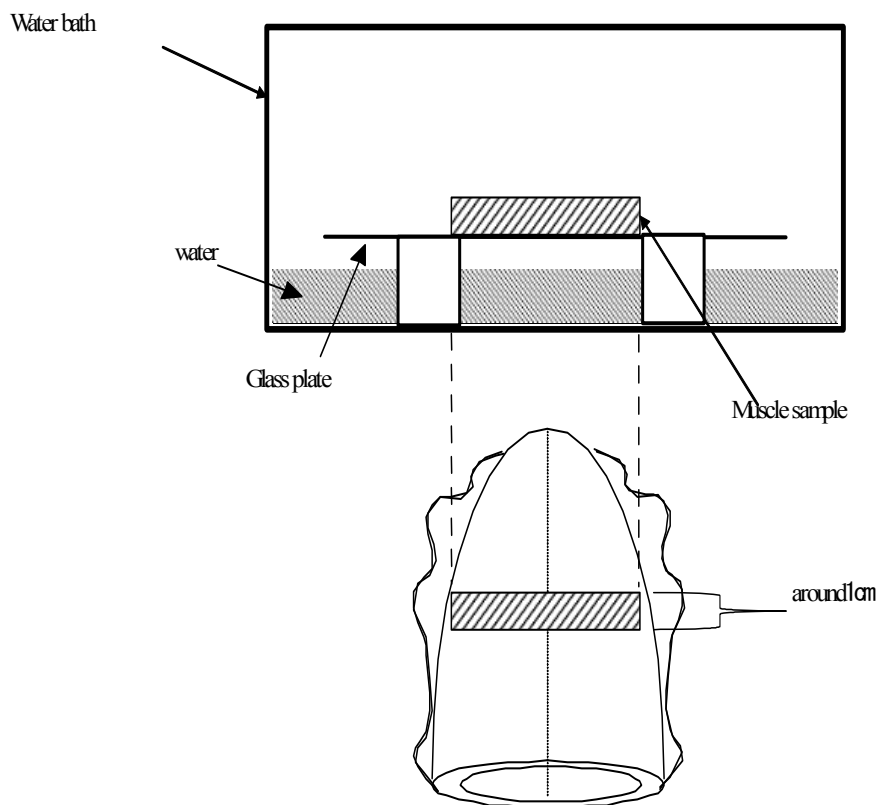
#### 4.1.1.2 輪状筋を用いた筋収縮率の測定

測定の詳細を **Fig. 4-1** に示した。

アオリイカの両眼の間を出刃包丁で刺し,その後すぐに胴と足を切り離して,これを即殺とし,外套筋の中ほどを幅約 1cm のリング状に採取したものを輪状筋とし,筋収縮の実験に用いた。

採取した輪状筋の頭部側を下にして,ラミネート加工して表面を湿潤させた方眼紙をガラス板に載せ,これを氷蔵あるいは 5, 10, 15, 20℃で保存した。

保存は **Fig. 4-1** に示してあるとおりに,各保存温度でウォーターバス内に保存し,エアレーションを入れアクリル板の蓋で密閉した。各保存は魚筋肉の筋収縮測定に用いた方法と同様<sup>3,4)</sup>水蒸気飽和させた各容器に保存し,輪状筋を経時的に写真撮影した。筋収縮率は撮影した画像データから外套筋の外直径と内直径を各 7 カ所測定し,それぞれの平均から輪状筋の円周を算出し,保存 0 時間目と各保存温度における変化から筋収縮率を算出した。



**Fig. 4-1** Illustration of excision portion of squid mantle muscle and the measurement

Ent apparatus used for the muscle contraction experiment

#### 4.1.2 筋原線維(Mf) $Mg^{2+}$ -ATPase 活性の測定

##### 4.1.2.1 試料

試料には長崎近海で漁獲され,実験開始まで生きた状態のアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* (平均外套背長  $25.8 \pm 3.2$  cm, 平均体重  $812.0 \pm 263.0$  g) を5杯用いた。

##### 4.1.2.2 筋原線維の調製

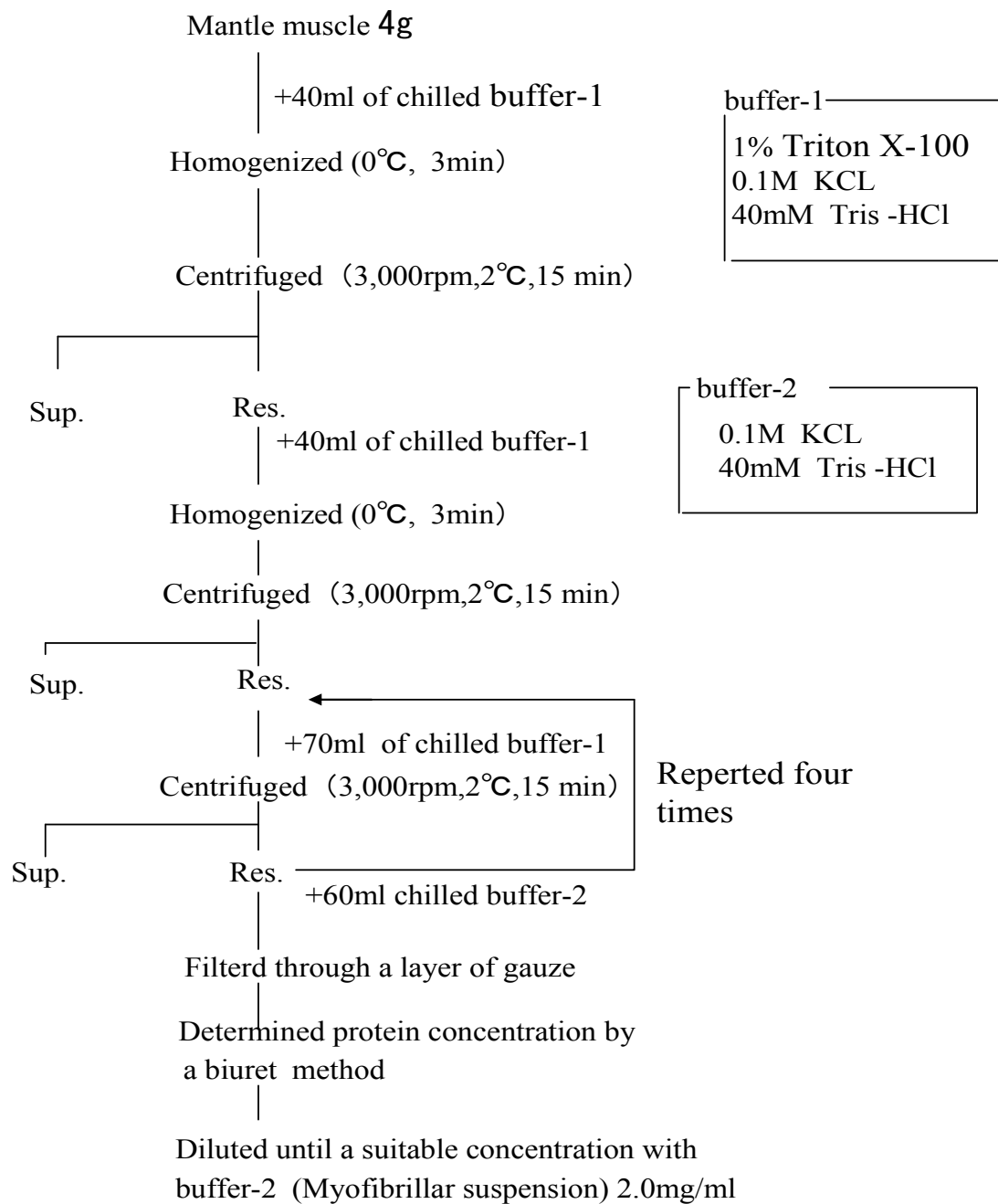
筋原線維(Mf)の調製は,即殺直後のアオリイカ外套筋から採肉し三嶋ら<sup>5)</sup>の方法に準じて行った。(Fig.4-2)アオリイカ外套筋から4g採肉し,冷却したbuffer-1〔0.1M KCl, 0.04M Tris-HCl buffer(pH7.0), 1% Triton-X〕を40ml加え,冷却しながら10,000rpmで3分間ホモジナイズした。これに冷却遠心器を用いて,0°C, 3,000rpmで15分間遠心後,沈殿を得た。この操作を再度繰り返した。次に,冷却buffer-2〔0.1M KCl, 0.04M Tris-HCl buffer(pH7.0)〕70mlを沈殿に加え攪拌後,0°C, 3000rpmで15分間遠心し沈殿を得た。この操作を上澄みが透明になるまで繰り返した。

こうして得られた沈殿にbuffer-2 60mlを加え攪拌後,一層のガーゼでろ過し,筋原線維(Mf)懸濁液とした。Mf懸濁液中のタンパク質濃度が1.5mg/mlになるように希釈し,終濃度で0.1M KCl, 1mM  $MgCl_2$ , 0.25M  $CaCl_2$ , 25mM Tris-maleate

(pH7.0)と 2mM ATP の条件で行った。

反応停止は 30%PCA で行い，生成した無機リン酸量を新井ら<sup>6)</sup>の方法に準じて比色定量した。反応温度は 0，5，10，15，20℃の各温度で，反応速度は定法に従って算出し，タンパク質 mg が 1 分間に分解する ATP 量で表した。





**Fig.4-2** Preparation of myofibrillar suspension

#### 4.1.2.3 タンパク質の定量

タンパク質の定量は SNOW ら<sup>7)</sup>の方法に準じてビウレット法を行った。Mf 懸濁液 2.5ml を試薬 R1 (0.4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.8% NaOH, 0.2% グリセリン溶液) 2.5ml および試薬 R2 (0.8% NaOH, 0.2% グリセリン溶液) 2.5ml にそれぞれ加え、よく攪拌し、暗所で 90 分間放置した。その後、波長 545nm で R1, R2 の吸光度  $D_a$ ,  $D_b$  をそれぞれ測定し、ビウレット呈色度  $\text{OD}_D = D_a - D_b$  を求めた。 $\text{OD}_D$  とタンパク質濃度との間には直線関係が成立するので、 $\text{OD}_D$  と検量線から Mf 懸濁液のタンパク質濃度を求めた。

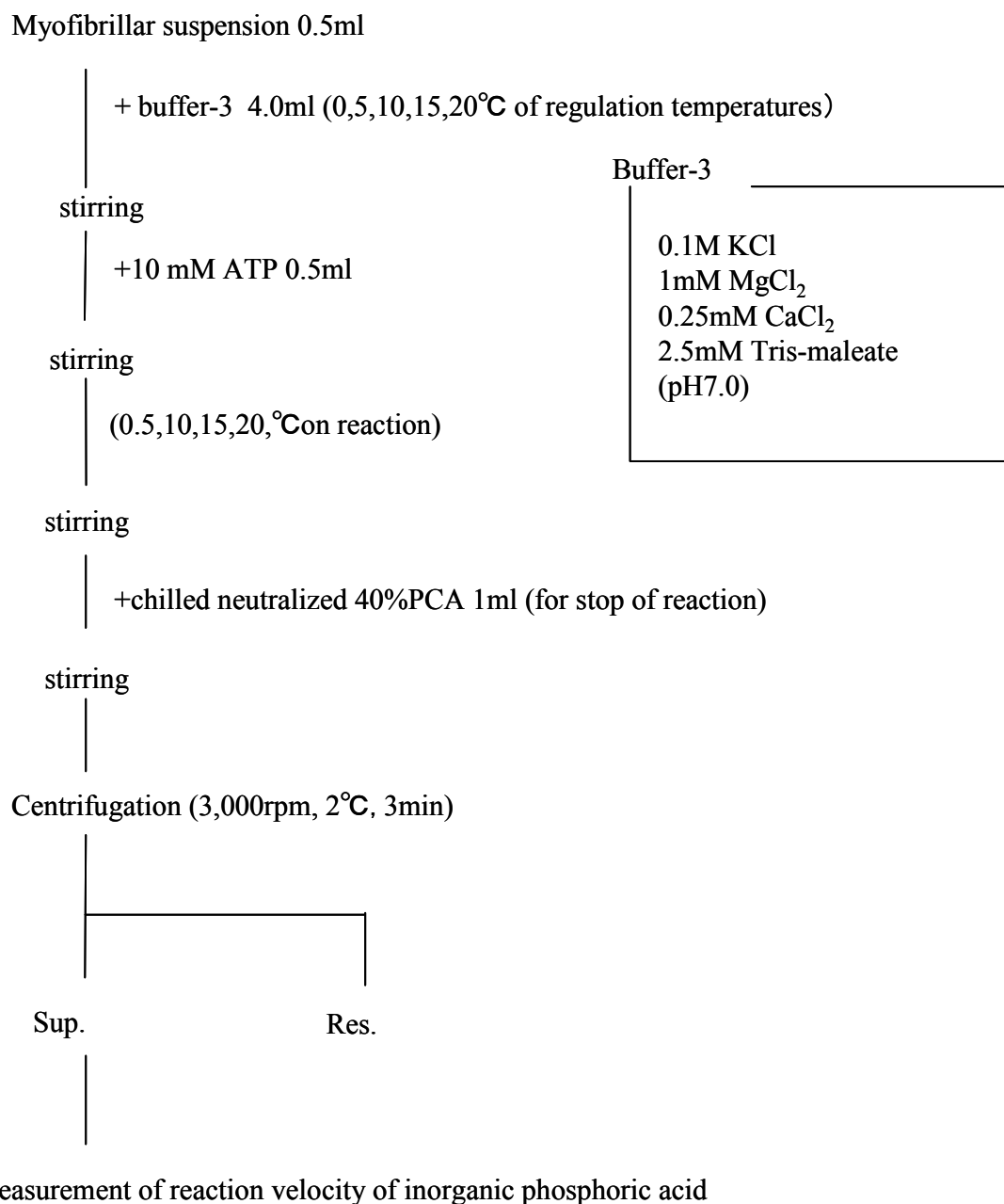
検量線は次のような操作で作製した。

10 mg/ml の牛血清アルブミン溶液を作製し、これを先の Mf 懸濁液の代わりにそれぞれ 0, 2, 4, 6, 8, 10ml を試験管に取り、純水をそれぞれ 10, 8, 6, 4, 2, 0ml 加えてこれを標準液とし、先と同様な方法で操作をおこないビウレット呈色度  $\text{OD}_D$  を測定した。なお、検量線に用いた標準液の濃度はそれぞれ 0, 2, 4, 6, 8, 10mg/ml であった。

#### 4.1.2.4 Mf $Mg^{2+}$ -ATPase の反応速度の測定

Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase の反応速度の測定は加藤ら<sup>2)</sup>の方法に準じ、**Fig. 4-3** のように行った。反応は、Mf 懸濁液 0.5ml, buffer-3 [0.1M KCl, 1mM  $MgCl_2$ , 0.25mM  $CaCl_2$ , 2.5mM Tris-maleate(pH7.0)] 4ml に 10mM ATP 0.5ml を加えて行った。

各反応温度(0, 5, 10, 15, 20°C)で一定時間反応後(0°C, 5°Cでは 0, 4, 8, 16, 32min, 10°C, 15°C, 20°Cでは 0, 2, 4, 6, 8min), 40% PCA 1ml で反応を停止させ、反応停止濾液とした。



**Fig. 4-3** Measurement of reaction velocity of myofibrillar  $\text{Mg}^{2+}$  - ATPase activity.

#### 4.1.2.5 無機リン酸の比色定量

無機リン酸の比色定量は、新井ら<sup>6)</sup>の方法に準じて行った。反応停止濾液 1ml に対し、硫酸モリブデン酸溶液 1ml, Elon 試薬 0.5ml, 純水 2.5ml を加えて攪拌後、室温で 45 分間発色させた。反応液の 640 nm における吸光度を測定し、無機リン酸量から ATP 量を算出した。また、1 分間にタンパク質 1mg における ATP の分解量を ATPase 活性( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )とした。

#### 試薬の組成

- ・ 硫酸モリブデン酸溶液 : 2.5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  500ml に対して 12.5g の  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  を溶解
- ・ Elon 試薬 : 純水 97ml に対して  $\text{NaHSO}_3$  3g を溶解し、さらに Elon(硫酸 p-メチルアミノフェノール)1g を溶解

### 4.1.3.筋小胞体(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性の測定

#### 4.1.3.1 試料

試料には夏期(水温約 25℃)の長崎近海で漁獲されたアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* を用いた。アオリイカを生きたまま実験室に搬入し、安静にさせた後、即殺し実験に供した。実験に用いた個体総数は5杯で、試料の平均外套背長  $25.8 \pm 3.2$ cm, 平均体重  $812.0 \pm 263.0$ g であった。

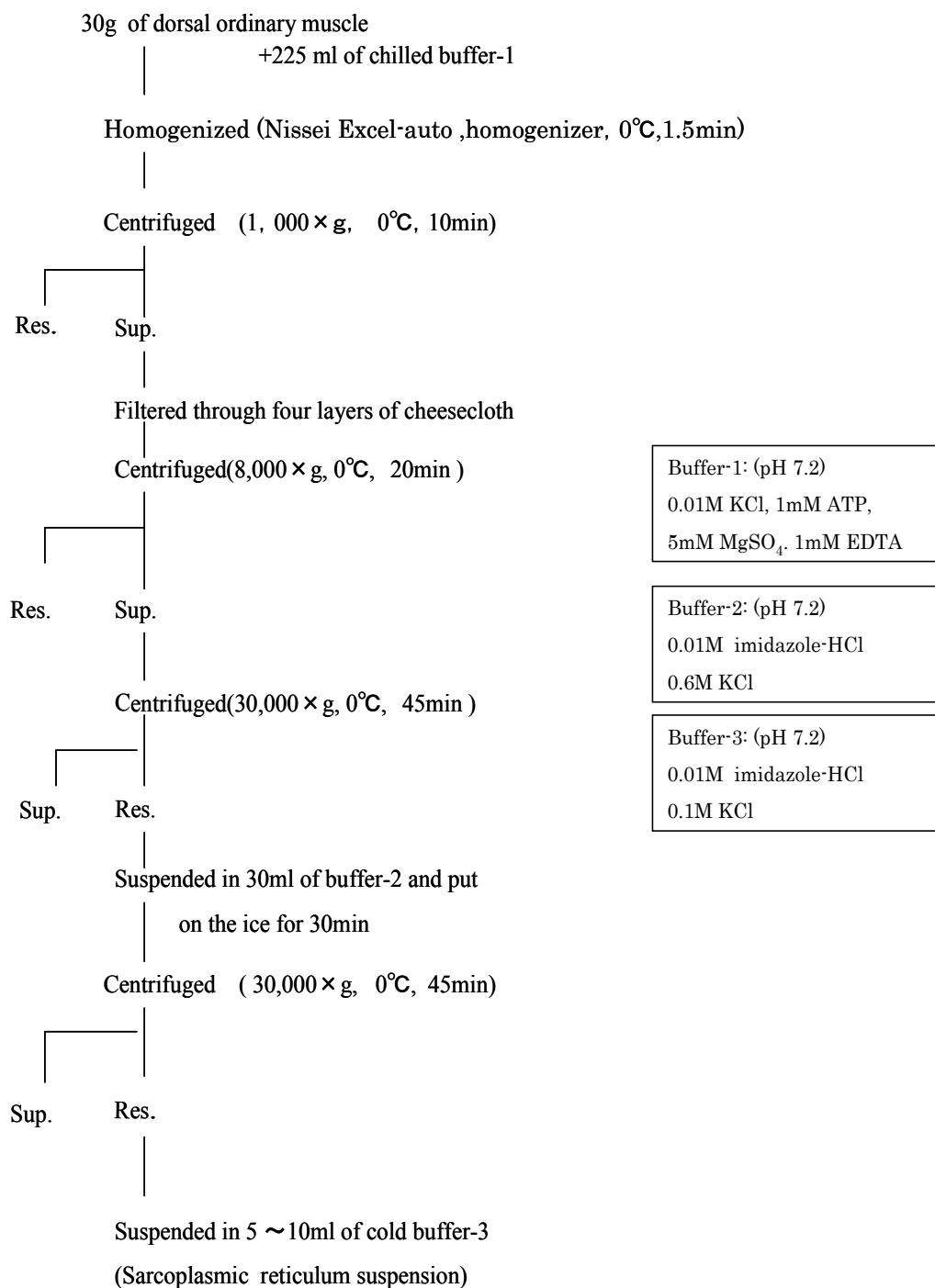
#### 4.1.3.2 筋小胞体の調製

筋小胞体(SR)の調製は Whiting の方法に<sup>8)</sup>に準じて **Fig. 4-4** に示すように行った。即ち、試料アオリイカを即殺後、直ちに外套筋 30g を採肉し、冷却した 0.01M KCL, 5mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 1mM ATP を含む 0.01M imidazole-HCL buffer(pH7.2)を 225ml 加え、よく冷却しながら Nissei ブレンダーで 1.5 分間ホモゲナイズした。これを 0℃で  $1.000 \times g$ , 10 分間遠心分離し、上澄みを四層のガーゼで濾過し、混在する筋原線維、核、細胞膜、結合組織等を除去した。濾液はさらに 0℃で  $8.000 \times g$ , 20 分間遠心分離し、ミトコンドリアを沈澱させて除いた。この上澄みを、0℃で  $30.000 \times g$ , 45 分間遠心分離してミクロソームを沈澱させ、沈澱を冷却した 0.6M KCl を含む 0.01M imidazole-HCl buffer (pH7.2) 30ml に氷冷しながら懸濁させた。これを 0℃下で約 30 分間静置した後、再び

0℃で  $30.000 \times g$ , 45 分間遠心分離し, 残存する筋原線維等を溶解させて除去した。

この沈澱を冷却した 0.1M KCl を含む 0.01M Imidazole-HCl buffer(pH7.4) 5 ~ 10ml に懸濁させ, 筋小胞体調製液とした。

筋小胞体調製液中のタンパク質濃度はマイクロビュレット法により測定し, 0.6mg/ml と 1.2mg/ml の濃度になるように希釈し, これらを筋小胞体懸濁液として, 直ちに筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性および筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み能の実験に用いた。



**Fig.4-4** Preparation of sarcoplasmic reticulum suspension



#### 4.1.3.3 筋小胞体(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase の反応速度の測定

(SR) Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性の測定は、懸濁液のタンパク濃度が、0.1mg/ml になるように希釈し、終濃度で 0.1M KCl, 5.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 25mM Tris-HCl buffer (pH7.4) と 1mM ATP の条件で行った。

反応停止は 20%PCA で行い、生成した無機リン酸を先の筋原線維(MF) Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性と同様に新井ら<sup>6)</sup>の方法に準じて比色定量した。

反応温度は 0, 5, 10, 20℃の各温度で、反応速度は一次反応に従って算出し、さらに CaCl<sub>2</sub> にかえて 1mM

EGTA を加えた反応液での ATP の分解量を差引いた値を筋小胞体タンパク質 1mg が 1 分間に分解する ATP 量 (μmol ATP/min · mg) として表した。

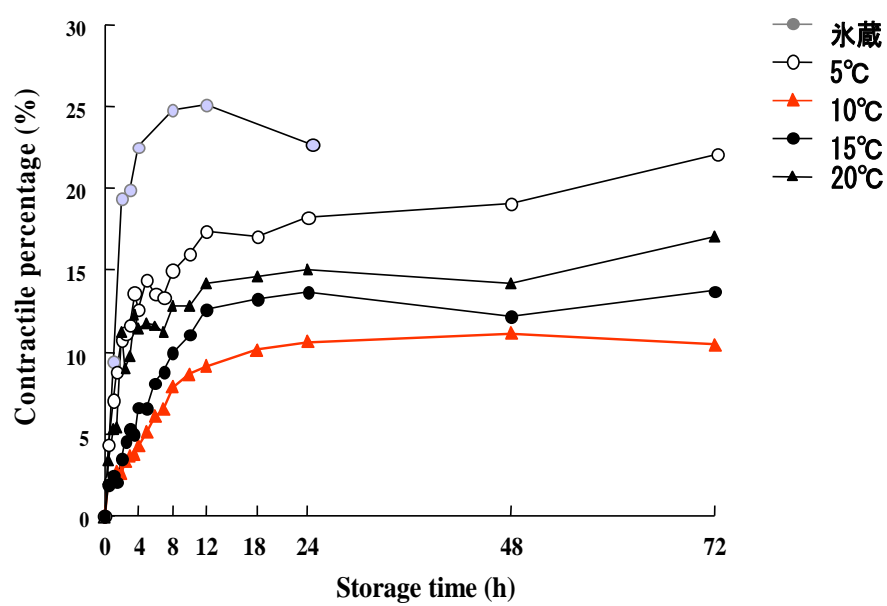
## 4.2 結 果

### 4.2.1 各保存温度における輪状筋の筋収縮率の経時変化

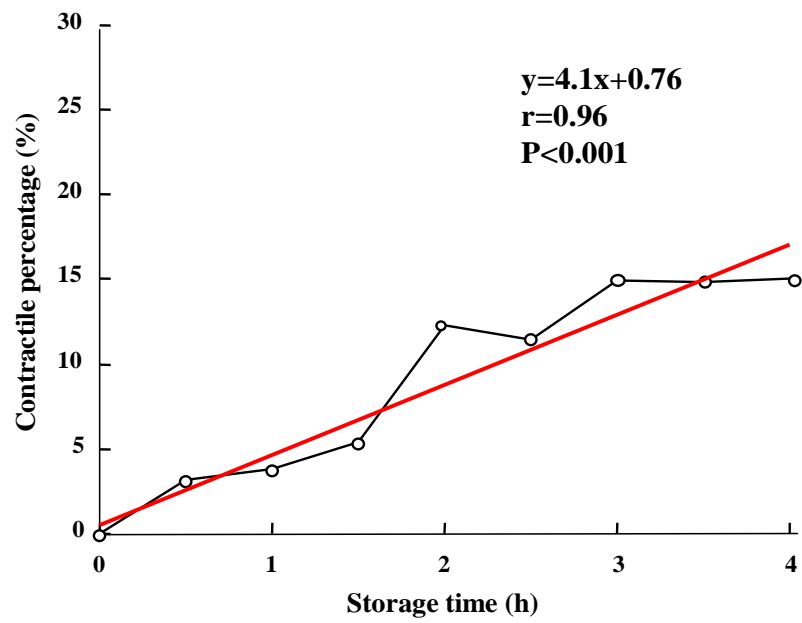
各保存温度における輪状筋の筋収縮率平均値の経時変化を **Fig. 4-5**, **Fig. 4-6** に示した。各保存温度における筋収縮率の変化を比較すると、どの保存温度においても保存初期に直線的に上昇し、その後ゆるやかに漸増する様相がみられた。しかし、保存温度によって筋収縮率が初期の直線的進行からその後ゆるやかに漸増する時相に違いが見られ、氷蔵が最も速く漸増に移行し、10℃が最も遅かった。また筋収縮率の最大到達レベルは、測定した 72 時間の範囲では氷蔵  $> 5^{\circ}\text{C} > 20^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 10^{\circ}\text{C}$  の順で高かった。

保存温度における筋収縮率の初期の直線の上昇を示した保存時間において、保存時間と筋収縮率の関係を検討し、**Table. 4-1** に示した。また、各保存温度における筋収縮速度の変化を **Fig. 4-7** に示した。

各保存温度ともに、保存時間と筋収縮率の間には極めて高い有意な正の相関関係が認められ、保存初期には筋収縮率は保存時間の延長に呼応して直線的に上昇した。各保存温度における筋収縮速度を最も遅かった 10℃保存の 0.80%/h と比較すると、氷蔵、5℃、20℃、15℃、10℃保存の順に速かった。各保存温度別の筋収縮速度の遅速は保存温度の違いに必ずしも呼応していなかった。



**Fig. 4-5** The changes of muscular contractile percentage with the lapse of storage time at various temperatures in oval squid

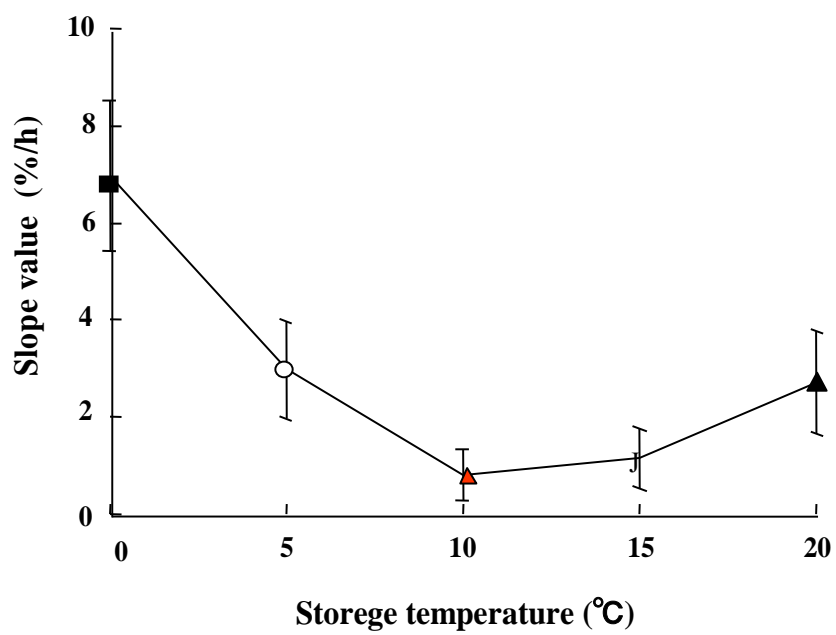


**Fig. 4-6** Changes in contraction percentage muscle during storage in 5°C

Table 1 Relationship between storage time and muscular contractile percentage at several storage temperatures

Storage temp. (°C)	Range of storage time (h)	n	Parameters of correlation between storage time and contractile percentage		
			Slope $\pm$ SD (%/h)	Intercept (%)	r
20	0-4	4	2.7 $\pm$ 1.05	2.1	0.932 ***
15	0-8	6	1.15 $\pm$ 0.62	1.1	0.981 ***
10	0-10	6	0.80 $\pm$ 0.54	1.2	0.982 ***
5	0-4	6	2.98 $\pm$ 1.01	2.9	0.929 ***
Ice	0-3	3	6.97 $\pm$ 1.55	1.7	0.952 *

Each slope and intercept was calculated by using storage time and muscular contractile percentage at several storage temperatures. One and three asterisks show  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  of the significant level, respectively.



**Fig. 4-7** Influence of storage temperature on muscular contractile speed in oval squid

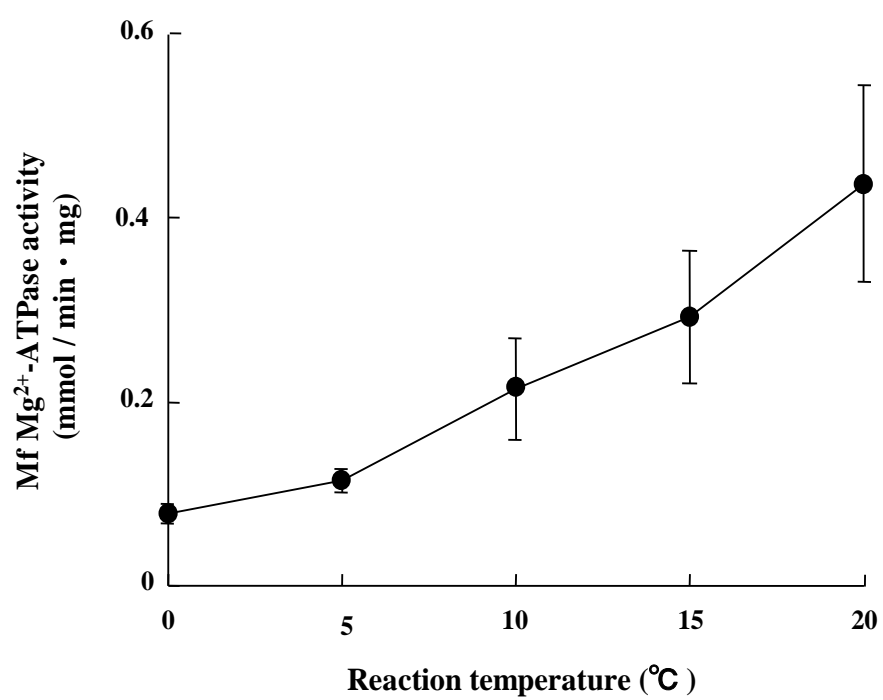
#### 4.2.2 各反応温度における Mf $Mg^{2+}$ -ATPase 活性

各反応温度における Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性を反応温度に対しての経時変化を

**Fig. 4-8** に示した。

各個体ともに反応時間に呼応して無機リン酸量はほぼ直線的に増加していく様相を呈した。そこで ATPase 活性すなわち反応速度を求めるために反応時間と遊離無機リン酸量との関係を検討した。

各反応温度における Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性を平均値レベルでみると 0°Cでは 0.079 $\mu$ mol/min  $\cdot$  mg と最も活性が低く, 5°Cでは 0.115, 10°Cでは 0.215, 15°Cでは 0.292, 20°Cでは 0.437 と Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性は 20°C > 15°C > 10°C > 5°C > 0°Cの順に高くなり, 反応温度の上昇に呼応してその活性も高くなる反応温度依存性が認められた。この結果は先の筋収縮率の結果とは異なった。



**Fig. 4-8** Influence of reaction temperature on myofibrillar  $Mg^{2+}$ -ATPase activity in oval squid Results are mean  $\pm$  SD of five fish.

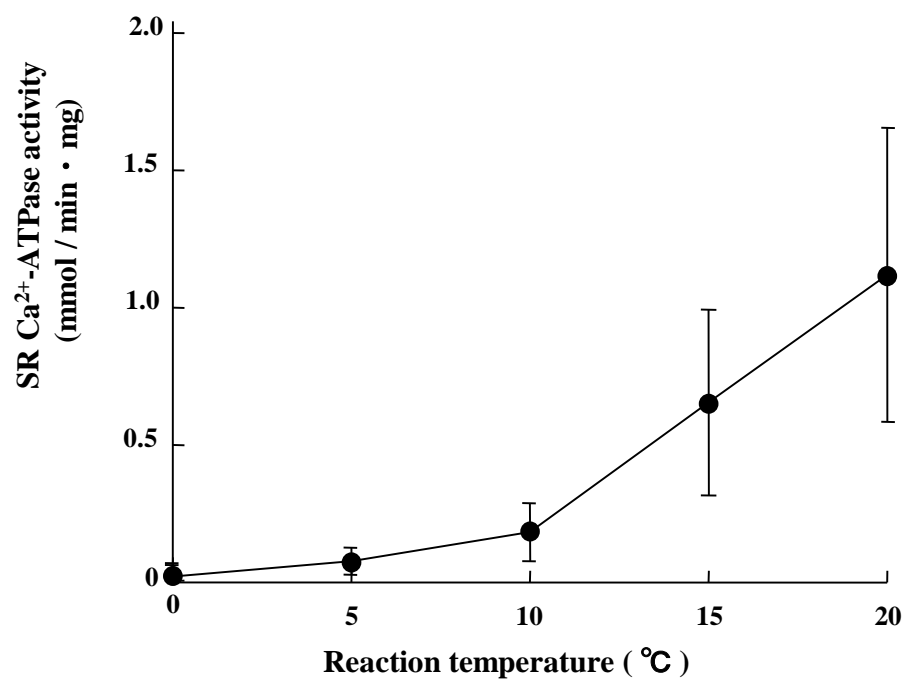


#### 4.2.3 各反応温度における(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

各反応温度における(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性を反応温度に対してプロットし

**Fig. 4-9** に示した。

各反応温度における(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性を平均値レベルでみると 0°Cで 0.016  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  と最も活性が低く, 5°Cでは 0.074, 10°Cでは 0.182, 15°Cでは 0.654, 20°Cでは 1.123 と(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性は反応温度の上昇に呼応してその活性も高くなる反応温度依存性が認められた。この結果は先の(Mf)Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性の反応温度依存性とよく似かよった結果であったが,先の筋収縮率の結果とは異なった



**Fig. 4-9** Influence of reaction temperature on sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity

in oval squid Results are mean  $\pm$  SD of five fish.

### 4.3 考 察

アオリイカ外套筋の筋収縮に及ぼす保存温度の影響を検討したところ、外套筋の筋収縮率は氷蔵から 20℃保存の全ての保存温度において保存初期に急激に上昇し、その後ゆるやかに上昇する傾向が認められた。

そこで、保存初期における筋収縮率の進行速度を算出し、保存温度との関係を検討したところ、氷蔵が最も筋収縮進行が速く 10℃が最も遅かった。

また筋収縮率の到達の最大レベルを比較すると氷蔵 > 5℃ > 20℃ > 15℃ > 10℃の順となり、筋収縮速度、筋収縮最大レベルともに保存温度の変化に対する依存性は認められなかった。著者ら<sup>9)</sup>は魚筋肉の柱状筋を用いた筋収縮実験の結果が死後硬直を良く反映すると報告しており、本実験で用いた輪状筋による筋収縮実験がアオリイカの死後硬直を反映していると考察された。

このことより、アオリイカ外套筋は保存温度が低いからといって死後硬直を遅延できず、むしろ氷蔵では硬直の進行が速かった。岩本ら<sup>10,11)</sup>は魚筋肉を氷蔵に近い低温で保存すると、畜肉<sup>12,13)</sup>で一般に認められるような、急速に筋収縮が進行する低温硬直現象が認められることを報告している。

本実験でもアオリイカ外套筋を氷蔵すると魚類や畜肉で認められる低温硬直現象によって、筋収縮速度の上昇と最大収縮レベルが上昇した可能性が考えられた。

潮ら<sup>14)</sup>は、魚類で筋原線維の  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性が変化すると、ATP の消失速度が変わり、死後硬直の進行も変化すると述べている。そこで即殺したアオリイカ外套筋より Mf を調製し、Mf  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性について検討した。さらに筋細胞では Mf  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性は筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の違いによって大きく影響され、その  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の制御はカルシumpンプの役割を果たす筋小胞体が行い、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性や、 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能によってなされていると述べられている<sup>15)</sup>。

そこで、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性についても検討を行った。

アオリイカ外套筋は  $20^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 10^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} > 0^{\circ}\text{C}$  の順となり、反応温度の上昇に呼応してその活性も高くなる反応温度依存性が認められた。また、同時に行った筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性についてもその活性は  $20^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 10^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} > 0^{\circ}\text{C}$  の順となり、Mf と同様に反応温度の上昇に呼応してその活性も高くなる反応温度依存性が認められ、輪状筋における収縮率の結果とは異なった。

これらのことから、アオリイカ外套筋でも魚類で認められるような氷蔵に近い低温保存では、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能の低下に伴う、筋原線維上の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって、Mf  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性が賦活化され、筋収縮が加速されるという低温硬直現象がおこっていると考察された。著者ら<sup>9)</sup>は既報に於いてア

オリイカ外套筋を種々の温度で保存し、ATP 関連化合物の分解挙動を測定し、本研究における、筋収縮と同様 ATP の減少は 10℃が最も遅く、それよりも低温の保存でも高温の保存でも速くなる結果を報告している。これらのことより、アオリイカ外套筋においても魚類筋肉と同様、低温硬直現象が発現したと考察された。

以上のことから本実験における、アオリイカの筋収縮すなわち死後硬直を抑制する最適保存温度は 10℃付近であることが示唆された。阿部ら<sup>16)</sup>はこの点についてコイなどにおいては棲息水温と保存温度の温度差が小さい場合は死後硬直の進行に大きな差はないが、温度差が大きくなると死後硬直の進行が速くかつ大きくなると報告している。

本実験では用いたアオリイカの棲息水温は約 25℃であった。これらのことから春季や秋季の海域水温が低い時期にあつては筋収縮を遅延させる最適保存温度は 10℃以下になる可能性が考えられた。今後は、棲息水温の違いの点も考慮して最適保存温度を検討する必要があると考察された。

## 参考文献

- 1) Watabe S., Yamanaka H., ed.:「Biochemical changes during the progression of rigor mortis (Rigor mortis in fish)」, Tokyo Koseisha Koseikaku, 9-20. (1991)
- 2) Kato N., Uchiyama H., Tsukamoto S. and Arai K.: A biochemical study on fish myofibrillar ATPase, Nipponn Suisan Gakkaishi, **43**, 857-867. (1977)
- 3) Korhonen RW., Lanier TC. and Giesbrecht F.:「An Evaluation of Simple Methods for Following Rigor Development in Fish, Journal of Food Science, **55**, 346-348. (1990)
- 4) Okamoto A., Honda E., Inoue R., Yokota K., Kuwahara K., Murata S., Hamada Y., Arai H. and Tachibana K.: Influence of storage temperatures on losing postmortem transparency in the mantle muscle of Oval squid *Sepioteuthis lessoniana*, Nipponn Suisan Gakkaishi, **74**, 856-860. (2008).
- 5) Tsuchimoto M., Yamaga T., Lee K., Wo Z., Mishima T. and Tachibana K.: The influence of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration around myofibrillar  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase on the speed and pattern of rigor mortis in fish species or culured and wild fish, Fishres Sci., **64**, 148-159. (1998)

- 6) Arai K.:「Gyokin-niku tanpakshitsu no tokusei no sokutei (Suisanseibutukagaku syokuhingaku jikkensyo)」, Saito T., Uchiyama H., Tsukamoto S., Arai K., ed., Tokyo Koseisha Koseikaku, 189-202. (1974)
- 7) Saito T., Uchiyama H., Umemoto S., Kwabata T., ed.: Suisanseibutukagaku syokuhingaku jikkensyo, Tokyo Koseisha Koseikaku, 203-217. (1974)
- 8) Whiting R. C.: Calcium uptake by bovine muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum, J. Food Sci, **45**, 288-292. (1980)
- 9) Okamoto A., Honda E., Inoue R., Yokota K., Murata S., Hamada Y., Arai H. and Tachibana K.: Influence of killing procedures and storage temperatures on postmortem in the muscle of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*, Nipponn Suisan Gakkaishi, **72**, 918-923. (2006)
- 10) Iwamoto M.:「Effects of death and storage temperature (Rigor mortis in fish)」, Yamanaka H., ed., Tokyo Koseikaku, 74-82. (1991)
- 11) Lee K. H., Tsuchimoto M., Onishi T., Wu Z., Jabarsyah A., Mishima T. and Tachibana K.: Differences in progress of rigor mortis between cultured red sea bream and cultured Japanese flounder, Fisheries Sci., **64**, 309-313. (1998)

- 12) Locker R. H. and Halyards C. J.: A cold shortening effect in beef muscle, J. Sci. Food Agr., **14**, 787-793. (1963)
- 13) Cassens R. G. and Newbold R. P.: Effect of temperature on the time course of rigor mortis in ox muscle, J. Food Sci., **32**, 269-272. (1967)
- 14) Ushio H., Watabe S. and Hashimoto K.: Purification and characterization of carp sarcoplasmic reticulum, Nippon Suisan Gakkaishi, **55**, 1461-1648. (1989)
- 15) Watabe S., Ushio H., Iwamoto M., Yamanaka H. and Hashimoto K.: Temperature-dependency of rigor-mortis of fish muscle: Myofibrillar  $Mg^{2+}$ -ATPase activity and  $Ca^{2+}$  uptake by sarcoplasmic reticulum, J. Food Sci., **54**, 1641-1648. (1989)
- 16) Abe H.: 「Rearing temperature (Rigor mortis in fish)」, Yamanaka H. ed., Tokyo Koseisha Koseikaku, 62-73. (1991)



## 第5章 総 括

- ・ 本研究の結果
- ・ 考察まとめ
- ・ 結論
- ・ 課題
- ・ 参考文献

## 第5章 総括

本章においては、前章までの研究結果を概括し、その他の知見も加えて総合的に考察する。

第1章では、本研究に関連した従来の研究および本研究の概要について述べた。ジンドウイカ科に属するアオリイカ(*Sepioteuthis lessoniana*)は肉質が厚く美味なことからグルメブームの対象となり、需要が高く長崎県近海でも重要種のひとつになっている。

イカ類の商品価値を決定する条件として、体色や透明感が大きな要素を占める<sup>1)</sup>。また、イカ類の筋肉は生きている間は透明であるが、死後、保存中に白濁が始まり、鮮魚として流通させる場合、どのように筋肉の白濁を遅延させるかが課題となっている。アオリイカは外套筋の透明感が残っているものが、市場価格が高く評価され、外套筋の透明感を保持することは商品価値の向上にもつながる<sup>2)</sup>。イカを大量に輸送して高価格での取引を可能にするには、致死条件や流通過程における保存温度を調節することによって筋肉の白濁を抑制するとともに、鮮度低下を抑制させる必要がある。

魚類では以前から致死条件や保存温度に関する研究はさかんに行われ<sup>3-7)</sup>、現在では活魚や死後硬直の魚類が刺身用の食材として流通するようになっている。

しかしイカの鮮度に関する研究は、現時点では魚類に及んでいない。

魚類の死後硬直を測定する場合によく用いられている、尾藤らの硬直指数<sup>8)</sup>は比較的簡単に使用でき、魚類における硬直の進行をとらえる方法として極めて有用であるが、魚体全体を用いるための同一魚体から、その他の科学的情報を得ることが困難である。これまで当研究室では養殖マダイの魚体側面から柱状に採取した筋肉の収縮割合を筋収縮率として硬直の指標に用い<sup>9,10)</sup>、同一魚体の死後硬直と、科学的成分分析を測定可能にする方法を確立している。

しかし、イカ類の生鮮度に関する研究は充分ではなく、中でも死後硬直の検討では外套筋分に甲があるため、尾藤らの方法をそのまま利用することは出来ないのが現状である。そこで本研究では、アオリイカ(*Sepioteuthis lessoniana*)外套筋の死後変化を明らかにする研究の一環として、致死後における外套筋の白濁の進行と保存温度の関係、外套筋の死後硬直に及ぼす保存温度の影響について、外套筋より作製した輪状筋を用いた筋収縮率の測定により検討した。

さらに、魚種では、筋細胞内で筋原線維(Mf)の  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性が変化すると ATP の消失速度が変わり、それに伴って死後硬直の進行も変化するとされている<sup>11,12)</sup>。同時に Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性は筋細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の違いに影響され、その  $Ca^{2+}$ 濃度の制御はカルシウムポンプの役割を果たす筋小胞体(SR)の  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性によってなされとも報告されている<sup>11,12)</sup>。

そこで、アオリイカにおいても魚類と同様の現象が生じている可能性が考えられることから、アオリイカ外套筋より筋原線維(Mf)と筋小胞体(SR)を調製し、(Mf)Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性と(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性について反応温度依存性の点からアオリイカ外套筋の死後硬直進行へ及ぼす影響について検討を行った。

**第2章**では、アオリイカの価格決定の大きな要因の一つに外套筋の透明感があるが、この透明感はいかの死後急速に白濁する。アオリイカを高価格で流通させるには、この白濁現象を遅延させる必要がある。そこで、アオリイカ外套筋の白濁現象について、保存中の ATP 関連物質の分解と、外套筋の感覚色度からみた透明感の点から検討するために、各保存温度(氷蔵, 5℃, 10℃, 15℃)における ATP+ADP 合計値の経時変化, K 値の経時変化, Hx/AMP 比の経時変化, グリコーゲンの経時変化, 乳酸量の経時変化, L\*値の経時変化, について考察した。

イカは鮮度状態だけでなく皮膚の色や筋肉の透明感など外観も重要視される水産物である<sup>7)</sup>。今回用いたアオリイカ外套筋の L\*値は、肉眼で観察した場合 50 を超えると筋肉全体が白濁したように観察された。L\*値が 50 を超えた保存時間は氷蔵, 15℃保存で保存 4~8 時間目, 5℃保存で保存 8~12 時間目の間に, 10℃保存で保存 12 時間目であった。このことから、筋肉の白濁が最も遅いのは 10℃保存であった。

各保存温度における ATP+ADP 合計値の減少は 10℃保存が最も遅く、グリコーゲン含量の減少は、即殺時の個体差があったため一概にはいえないが、氷蔵と 10℃保存を比較すると 10℃保存の方が緩やかに減少した。10℃保存における K 値および Hx /AMP 比の平均は高い値を示したが、K 値 60%でも生食に支障はなかったため、高鮮度状態が保たれていると考えられた。以上のことから、アオリイカを保存する際の最適保存温度は 10℃付近であると考えられた。

次に、白濁と ATP 関連化合物の変化との関連性について、ATP 減少速度から算出した各保存時間の ATP(%)と L\*値の上昇について検討を行った。即殺後の保存初期には ATP の減少とともに、ATP 再生系(Cremating kinase, 解糖など)がはたらいっているため、実際の ATP 減少量は不明である。

そこで **Fig. 2-9** に示すように全ての保存温度(氷蔵, 5, 10, 15℃)における個体ごとに ATP が直線的に減少している部分で保存時間と ATP%との回帰直線を求めた。求めた回帰直線に各保存時間を代入し、保存初期における各時間の ATP%を推定した。次いで、推定 ATP%と L\*値との関係について検討を行った (**Fig. 2-10**)。

全ての保存温度において、両値の間には推定 ATP が 100%以上、すなわち ATP 再生系がはたらいっている間では L\*値は上昇せず( $r = -0.175$ ,  $n = 18$ )、推定 ATP が 100% 以下で ATP%の減少に呼応して L\*値が上昇する有意な負の相関関係

が認められた( $r = -0.763$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 60$ )。また、このことからアオリイカ外套筋の白濁には、ATP 再生系停止以後の筋組織中の変化が影響すると推察された。

また、ATP 量が 20%以下のレベルで白濁が生じることについて、筋収縮を反映するとされるアクトミオシンの超沈澱反応は ATP の消費によりその濁度が上昇されるとされている<sup>13,14)</sup>。ATP の減少とアオリイカ外套筋の濁度にはこのような筋収縮等の因子の関連性も考えられるが、その詳細については明確ではなく、さらに検討が必要であろう。

吉岡ら<sup>1)</sup>は、薄切りにしたスルメイカを海水入りの酸素充填したパックに詰めて 5℃で保存すると、長時間透明感を保持できるとしている。これは ATP 再生系が機能する状態、すなわち細胞が生きた状態を保つことが白濁を抑制するという今回の検討を裏付けるものであると考えられた。よって、アオリイカの白濁を抑制して透明感を維持するためには、保存温度だけではなく ATP 再生系が機能する状態、すなわち細胞が生きた状態を可能な限り保つような保存方法を考える必要があると判断した。また、イカ類はその商品価値を決定する条件として体色や透明感が大きな要素を占めるもののこれらを基準として鮮度保持を述べた報告は少ない。吉岡ら<sup>1)</sup>は、スルメイカ表皮の発色率、透明感、硬さを用いて品質評価を行っているが、同様にアオリイカにおいても致死後 12 時間以

内であれば体色での新鮮度判定ができることが考えられる。

**第3章**では、魚類筋肉の死後硬直測定には、魚体全体を用いる硬直指数法<sup>8)</sup>や体測筋を柱状切り出してその収縮を測定する方法<sup>15)</sup>が知られている。

しかし、アオリイカでは、甲が存在するためイカ全体を用いての測定は極めて難しく、また、実験中の筋肉中成分の測定を採肉によって行うことが出来ない。

そこで、アオリイカ外套筋の死後硬直測定方法を検討するために、アオリイカ外套筋より作製した柱状筋(保存温度 10℃)あるいは輪状筋(氷蔵)を用いてそれらの筋収縮率と張力を経時的に測定し、両値の関係について検討し、考察した。

山家<sup>16)</sup>は、養殖マダイを用いて 5℃保存における筋収縮率と張力の間関係を検討している。このとき筋収縮率と張力の測定に用いた養殖マダイ試料は、背部普通筋を頭部側から尾部側にかけて柱状に切り出したものであった。

その試料から得られた筋収縮率と張力の間には明確な正呼応の関係が認められた。

一方、アオリイカの 10℃保存した柱状筋による筋収縮率と張力の間関係では (**Fig.3-9**)、張力が増加しても筋収縮率が増加しなかった個体もあり、両者の間に明瞭な正呼応の関係は認められなかった。

今回、柱状筋の筋収縮率測定において筋収縮率が増加しなかった原因は不明であった。また、柱状筋を氷蔵して測定を行ったが、氷蔵中に柱状筋の両端が

内臓側に曲がって収縮し、筋収縮の測定は不可能であった。このような収縮が起こったのは、イカの外套筋が体軸と直角方向に走る熱い環状筋と、環状筋と直角に表皮と内臓側に走る放射状筋の積み重ねによって構成されていることに起因しているのではないかと考えられた。輪状筋による筋収縮率の様相は柱状筋の場合よりも魚類と類似しており、明らかに保存時間の延長に呼応した上昇を示した。これは柱状筋の筋収縮率を測定する際に認められた筋肉が曲がるという現象が、輪状筋では解消されているためと考えられた。

氷蔵した輪状筋による筋収縮率と柱状筋による張力の関係を検討したところ、先の養殖マダイの場合と同様に筋収縮率と張力の間に正呼応の関係が認められた。

ところで、今回の実験では、筋収縮率の測定を行う際に保存箱から室温に筋肉を取り出して撮影した。この撮影に要した時間は比較的短かったが、筋肉温度の上昇や再び所定の保存温度になるまでに時間がかかることが考えられた。このため筋収縮が大きく上昇する時点で時間あたりの撮影回数を増やすことが困難であった。この点をふまえて、保存箱を室温に出した際に温度差によって蓋の両面に付く水滴を、蓋を開けずに拭い取ることができるように改良した。この改良によって保存箱に筋肉を入れたままで写真撮影が可能となり、本法を用いて筋収縮を測定した結果、正呼応の関係がより明瞭に認められた。



本実験において、輪状筋による筋収縮率の測定は氷蔵のみで行っているが、今後他の保存温度においても検討が必要であると考えられた。以上のことから、アオリイカ外套筋の筋収縮率を測定する際は輪状筋による測定が有効であると考えられた。

**第4章**では、第3章をもとに外套筋の筋収縮に及ぼす保存温度の影響を検討した。外套筋の筋収縮率は氷蔵から 20℃保存の全ての保存温度において保存初期に急激に上昇し、その後ゆるやかに上昇する傾向が認められた。保存初期における筋収縮率の進行速度を算出し、保存温度との関係を検討したところ、氷蔵が最も筋収縮進行が速く 10℃が最も遅かった。筋収縮率の到達の最大レベルを比較すると氷蔵 > 5℃ > 20℃ > 15℃ > 10℃の順となり、筋収縮速度、筋収縮最大レベルとともに保存温度の変化に対する依存性は認められなかった。

アオリイカ外套筋は保存温度が低いからといって死後硬直を遅延できず、氷蔵では硬直の進行が早かった。さらに、即殺したアオリイカ外套筋より Mf を調製し、Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性と、筋小胞体の  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性についても検討を行った。アオリイカ外套筋の筋収縮に及ぼす保存温度の影響を検討したところ、外套筋の筋収縮率は氷蔵から 20℃保存の全ての保存温度において保存初期に急激に上昇し、その後ゆるやかに上昇する傾向が認められた。そこで、保存初期における筋収縮率の進行速度を算出し、

保存温度との関係を検討したところ、氷蔵が最も筋収縮進行が速く 10℃が最も遅かった。また、筋収縮率の到達の最大レベルを比較すると氷蔵 > 5℃ > 20℃ > 15℃ > 10℃の順となり、筋収縮速度、筋収縮最大レベルともに保存温度の変化に対する依存性は認められなかった。著者ら<sup>17)</sup>は魚筋肉の柱状筋を用いた筋収縮実験の結果が死後硬直を良く反映すると報告しており、本実験で用いた輪状筋による筋収縮実験がアオリイカの死後硬直を反映していると考察された。このことより、アオリイカ外套筋は保存温度が低いからといって死後硬直を遅延できず、むしろ氷蔵では硬直の進行が速かった。岩本<sup>18)</sup>や著者<sup>12)</sup>らは魚筋肉を氷蔵に近い低温で保存すると、畜肉<sup>19,20)</sup>で一般に認められるような、急速に筋収縮が進行する低温硬直現象が認められることを報告している。

本実験でもアオリイカ外套筋を氷蔵すると魚類や畜肉で認められる低温硬直がみられた。潮ら<sup>21,22)</sup>は魚類で筋原線維の  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性が変化すると、ATP の消失速度が変わり、死後硬直の進行も変化すると述べている。そこで即殺したアオリイカ外套筋より Mf を調製し、Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性について検討した。さらに筋細胞では Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性は筋細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の違いによって大きく影響され、その  $Ca^{2+}$  濃度の制御はカルシumpンプの役割を果たす筋小胞体が行い、筋小胞体の  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性や、 $Ca^{2+}$ 取り込み能によってなされていると述べられている<sup>23)</sup>。そこで、Mf  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性お

よび、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の反応温度依存性についても検討を行った。

アオリイカ外套筋の  $\text{Mf Mg}^{2+}$ -ATPase 活性は、 $20^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 10^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} > 0^{\circ}\text{C}$  の順となり、反応温度の上昇に呼応してその活性も高くなる反応温度依存性が認められた。また、同時に行った筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性についても、その活性は  $20^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 10^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} > 0^{\circ}\text{C}$  の順となり、反応温度の上昇に呼応してその活性も高くなる反応温度依存性が認められ、輪状筋における収縮率の結果とは異なった。

これらのことから、アオリイカ外套筋でも魚類で認められるような氷蔵に近い低温保存では、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み能の低下に伴う、筋原線維上の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって、 $\text{Mf Mg}^{2+}$ -ATPase 活性が賦活化され、筋収縮が加速されるという低温硬直現象がおこっていると考察された。著者は、本論文の第 2 章に於いて、アオリイカ外套筋を種々の温度で保存し、ATP 関連化合物の分解挙動を測定し、本研究における、筋収縮と同様 ATP の減少は  $10^{\circ}\text{C}$  が最も遅く、それよりも低温の保存でも高温の保存でも速くなる結果を述べている。これらのことより、アオリイカ外套筋においても魚類筋肉と同様、低温硬直現象が発現したと考察された。以上のことから本実験における、アオリイカの筋収縮すなわち死後硬直を抑制する最適保存温度は  $10^{\circ}\text{C}$  付近であることが示唆された。

阿部ら<sup>24)</sup>はこの点についてコイなどにおいては棲息水温と保存温度の温度

差が小さい場合は死後硬直の進行に大きな差はないが、温度差が大きくなると死後硬直の進行が速くかつ大きくなると報告している。本実験で用いたアオリイカの棲息水温は約 25℃であった。これらのことから春季や秋季の海域水温が低い時期にあつては筋収縮を遅延させる最適保存温度は 10℃以下になる可能性が考えられた。今後は、棲息水温の違いの点も考慮して最適保存温度を検討する必要があると考察された。本研究対象としたアオリイカ外套筋においても、おもに魚類、陸上脊椎動物で認められている低温硬直現象が無脊椎動物のアオリイカでも観察されたことは新しい知見であった。

## 参考文献

- 1) Yoshioka T. and Kinoshita Y.: Recent progress on the quality preservation technology of squid, Nippon Suisan Gakkaishi. **72**, 495-500. (2006)
- 2) Okutani K., Ogura M., ed.: 「Ika-Sono Seisankara Shyohimade」, Tokyo, Seizandoshoten, , 267-286. (2002)
- 3) Iwamoto M., Ioka H., Saito M. and Yamanaka H.: Relatoin between rigor mortis of sea bream and storage temperatures, Nippon Suisan Gakkaishi, **51**, 443-446. (1985)
- 4) Mochizuki S. and Sato A.: Effects of various killing procedures and storage temperature on postmortem changes in the muscle of horse mackerel, Nipponn Suisan Gakkaishi, **60**,125-130. (1994)
- 5) Okamoto A., Hamada Y., Miura K., Nonaka K., Kuwahara K., Osako K., Mishima T. and Tachibana K.: Influence of killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*, Nipponn Suisan Gakkaishi, **72**, 918-923. (2006)
- 6) Yamanaka H.: Relation between post mortem changes and quality in the muscle of fish and shellfish, Nipponn Suisan Gakkaishi, **68**, 5-14. (2002)

- 7) Iwamoto M. and Yamane R.: 「Kensakiika no sigohenka nikansuru kenkyuutyozouondo to taishokuhenka」, Shimaneken suisanshikenjyo jigohoukoku, 83-90. (1991)
- 8) Bito M., Yamada K., Mikumo Y. and Amano N.: Studies on rigor-mortis of fish—1. Difference in the mode of rigor-mortis among some varieties of fish by modified cutting's method, Bull. Tokai Reg. Rab., **109**, 89-96. (1983)
- 9) Tsuchimoto M., Yamaga T., Lee K. H., Wo Z., Mishima T. and Tachibana K.: The influence of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration around myofibrillar  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase on the speed and pattern of rigor mortis in fish species or culured and wild fish, Fishres Sci., **64**, 148-159. (1998)
- 10) Lee K. H., Tsuchimoto M., Onishi T., Wu Z., Jabarsyah A., Mishima T. and Tachibana K.: Differences in progress of rigor mortis between cultured red sea bream and cultured japanese flounder, Fisheries Sci., **64**, 309-313. (1998)
- 11) Watabe S., Yamanaka H., ed.: 「Biochemical changes during the progression of rigor mortis (Rigor mortis in fish)」, Tokyo Koseisha Koseikaku, 9-20. (1991)
- 12) Kato N., Uchiyama H., Tsukamoto S. and Arai K.: A biochemical study on fish

- myofibrillar ATPase, Nipponn Suisan Gakkaishi, **43**, 857-867. (1977)
- 13) 山田典彦, 新井健一: 「コイ・ミオシン B 超沈澱の濁度変化による測定」  
日水誌, **53**, 77-83. (1987)
- 14) Wang Q., Tsuchimoto M., Yoda O., Lee K H., Jabarasyah A. and Gomez Apablaza  
P A.: Misima T, Tachibana K, Comparison of characteristics of actomyosin from  
white, pink, and red muscle fiber types in cultured carp, Fish. Sci., **67**, 682-689.  
(2001)
- 15) Buttkus H.: Red and White Muscle in Relation to rigor mortis, Journal of the  
Fisheries Research Board of Canada, **20**, 45-57. (1963)
- 16) 山家隆治: 「魚種・養殖と天然における死後硬直進行速度やパターンの違い  
に及ぼす筋原線維  $Mg^{2+}$ -ATPase の  $Ca^{2+}$  濃度の影響」 修士論文, 長崎大学, 長  
崎. (1992)
- 17) Okamoto A., Honda E., Inoue R., Yokota K., Kuwahara K., Murata S., Hamada Y.,  
Arai H. and Tachibana K.: Influence of storage temperatures on losing a  
transparency of postmortem in the mantle muscle of oval squid, *Sepioteuthis*  
*lessonniana*, Nipponn Suisan Gakkaishi, **74**, 856-860. (2008).

- 18) Iwamoto M., Yamanaka H. ed.:「Effects of death and storage temperature ( Rigor mortis in fish)」, Tokyo Koseisha Koseikaku, 74-82. (1991)
- 19) Locker R. H. and Hagyard C. J.: A cold shortening effect in beef muscle, J. Sci. Food agr., **14**, 787-793. (1963)
- 20) Cassens R. G. and Newbold R. P.: Effect of temperature on the time course of rigor mortis in ox muscle, J. Food Sci., **32**, 269-272. (1967)
- 21) Ushio H., Yamanaka H. ed.:「Fish sarcoplasmic reticulum ( Rigor mortis in fish)」, Tokyo Koseisha Koseikaku, 21-27. (1991)
- 22) Ushio H., Watabe S. and Hashimoto K.: Purification and characterization of carp sarcoplasmic reticulum, Nippon Suisan Gakkaishi, **55**, 1641-1648. (1989)
- 23) Watade S., Ushio H., Iwamoto M., Yamanaka H. and Hashimoto K.: Temperature-dependency of rigor-mortis of fish muscle: Myofibrillar  $Mg^{2+}$ -ATPase activity and  $Ca^{2+}$  uptake by sarcoplasmic reticulum, J. Food Sci., **54**, 1107-1115. (1989)
- 24) Abe H., Yamanaka H. ed.:「Rearing temperature (Rigor mortis in fish)」, Tokyo Koseisha Koseikaku, 62-73. (1991)



Fig. 2-1 Muscle extract preparation for ATP related compounds and lactic acid determination.....	12
Fig. 2-2 Muscle extract preparation for determination of glycogen.....	15
Fig. 2-3 The effect of storage temperatures on adenosine triphosphate (ATP) concentration of the Oval squid mantle muscle.....	20
Fig. 2-4 Changes in ATP+ADP contents of squid mantle muscle during storage in ice, 5°C, 10°C and 15°C .....	22
Fig. 2-5 The effect of storage temperatures on adenosine monophosphate (AMP) Concentration of the Oval squid mantle muscle.....	24
Fig. 2-6 Changes in K value of squid mantle muscle during storage in ice, 5°C, 10°C and 15°C .....	26
Fig. 2-7 Changes in Hx/AMP(%) of squid mantle during storage in ice, 5°C, 10°C and 15°C. ....	28
Fig. 2-9 Changes in pH of squid mantle muscle during storage in iced, 5°C, 10°C and 15°C.....	32
Fig. 2-10 Changes in L* value of squid mantle muscle during storage in iced, 5°C, 10°C and 15°C .....	34
Fig. 2-11 Estimation of ATP (%) of squid mantle muscle for the first 4 h storage Sample (No.3) .....	37
Fig. 2-12 Relations hip between L* value and estimated ATP (%) in squid mantle muscle.....	38
Fig. 3-1 Illu stration of excision portion of squid mantle muscle and the measurem entapparatu sused for the muscle contraction experiment.....	45
Fig. 3-2 Measurem entapparatusused for the muscle tention experiment .....	47
Fig. 3-3 Changes in contraction percentage of squid mantle muscle during storage at 10°C muscle were cut as rectangular .....	49
Fig. 3-4 Changes in tension of squid mantle muscle samples during storage at 10°C .	50
Fig. 3-5 Changes in contraction percentage of squid mantle muscle during storage in ice. muscle were cut as ring form .....	51

Fig. 3-6 Changes in tension of squid mantle muscle during storage in ice .....	52
Fig. 3-7 Relationship between contraction and tension.....	54
Fig. 3-8 Comparison between rectangular sample and ring form sample of squid mantle muscle in iced storage.....	55
Fig. 3-9 Relationship between contraction and tension of squid mantle muscle in ice	57
Fig. 3-10 Changes in contraction of squid mantle muscle after photo analysis during Iced storage .....	57
Fig. 3-11 Changes in tension of squid mantle muscle during storage at ice storage ....	58
Fig. 3-12 Relationship between contraction and tension of squid mantle muscle at ice storage .....	58
Fig. 4-1 Illustration of excision portion of squid mantle muscle and the measurement apparatus used for the muscle contraction experiment .....	62
Fig. 4-2 Preparation of myofibrillar suspension.....	65
Fig. 4-3 Measurement of reaction velocity of myofibrillar $Mg^{2+}$ -ATPase activity. ...	68
Fig. 4-4 Preparation of sarcoplasmic reticulum suspension .....	72
Fig. 4-5 The changes of muscular contractile percentage with the lapse of storage time at various temperatures in oval squid .....	75
Fig. 4-6 Changes in contraction percentage muscle during storage in $5^{\circ}C$ .....	76
Fig. 4-7 Influence of storage temperature on muscular contractile speed in oval squid .....	78
Fig. 4-8 Influence of reaction temperature on myofibrillar $Mg^{2+}$ -ATPase activity in oval squid Results are mean $\pm$ SD of five fish. ....	80
Fig. 4-9 Influence of reaction temperature on sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ -ATPase activity in oval squid Results are mean $\pm$ SD of five fish .....	82
Table 1 Relationship between storage time and muscular contractile percentage at several storage temperatures .....	77

## 謝 辞

本研究は、長崎大学水産学部 海洋物質科学講座 栄養学研究室 橘 勝康教授の、終始御懇切な御指導並びに多大なるお力添えと御鞭撻の下に行われましたもので、ここに心から深謝いたします。

本論文を作成するに当たり、数々の有益なご助言、ご校閲並びに良い研究環境を与えて下さった長崎大学水産学部 原 研治教授、荒川 修教授に深く感謝いたします。筆者の論文作成を支えて下さった熊本県立大学環境共生学部 有菌幸司教授、長崎大学水産学部 濱田友貴準教授に深く感謝いたします。

本研究の試料提供、ならびに多大なるご助言をいただきました長崎県総合水産試験場 岡本昭氏、長崎大学水産学部 谷山茂人氏、長崎県食品衛生協会 井上理香子氏に深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うに当たり、種々のご協力と御激励を賜りました長崎大学水産学部 水産栄養学研究室の院生ならびに4年生の皆様、その他数え切れない皆様のご協力、ご支援により本研究が遂行いたしましたことを改めて、深く御礼申し上げます。

2009年3月 著者