

魚介類の貯蔵における細菌叢および
品質変化に関する基礎研究

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博士論文

令和 5 年 9 月
(2023 年)

王 潤

目 次

| | |
|--|----|
| 第1章 緒論 | 1 |
| 第2章 異なる温度で貯蔵した活ムール貝 (<i>Mytilus Galloprovincialis</i>) のエキス成分および菌叢の変化 | |
| 第1節 緒言 | 9 |
| 第2節 実験方法 | 12 |
| 第1項 試料調製 | 12 |
| 第2項 致死率の測定 | 12 |
| 第3項 コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性の測定 | 13 |
| 第4項 pHおよび水分含量の測定 | 13 |
| 第5項 核酸関連物質の測定 | 14 |
| 第6項 有機酸の測定 | 14 |
| 第7項 遊離アミノ酸 (FAA) およびアンモニア (NH ₃) の測定 | 15 |
| 第8項 非タンパク態窒素の測定 | 15 |
| 第9項 グリコーゲンの測定 | 16 |
| 第10項 VBCの測定 | 16 |
| 第11項 TAVおよびEUC | 17 |
| 第12項 DNA抽出, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および次世代シーケンシング (NGS) .. | 17 |
| 第13項 シーケンスデータの処理と解析 | 20 |
| 第14項 統計解析 | 20 |
| 第3節 結果 | 21 |
| 第1項 致死率およびSDH活性 | 21 |

| | | |
|-----|--|----|
| 第2項 | 水分, NPN, グリコーゲン含量, pHおよびVBC …… | 21 |
| 第3項 | FAAおよびNH ₃ …… | 22 |
| 第4項 | 核酸関連物質 …… | 23 |
| 第5項 | 有機酸 …… | 23 |
| 第6項 | TAVおよびEUC …… | 24 |
| 第7項 | HCAヒートマップ …… | 25 |
| 第8項 | NGS解析 …… | 26 |
| 第4節 | 考察 …… | 26 |
| 第5節 | 小括 …… | 31 |
| | | |
| 第3章 | 氷蔵におけるマダイ (<i>Pagrus major</i>) 肉の品質および菌叢の 変化 | |
| 第1節 | 緒言 …… | 48 |
| 第2節 | 実験方法 …… | 50 |
| 第1項 | 試料調製 …… | 50 |
| 第2項 | VBCの測定 …… | 51 |
| 第3項 | TVBN, TMAおよびTBARSの測定 …… | 52 |
| 第4項 | 揮発性成分の測定 …… | 53 |
| 第5項 | 官能評価 …… | 55 |
| 第6項 | DNA抽出, PCRおよびNGS …… | 55 |
| 第7項 | シーケンスデータの処理と解析 …… | 56 |
| 第8項 | 統計解析 …… | 56 |
| 第3節 | 結果 …… | 56 |
| 第1項 | VBC …… | 56 |
| 第2項 | TVBN, TMAおよびTBARS …… | 57 |

| | | |
|-----|-------|----|
| 第3項 | 揮発性成分 | 57 |
| 第4項 | 官能評価 | 59 |
| 第5項 | NGS解析 | 59 |
| 第4節 | 考察 | 61 |
| 第5節 | 小括 | 66 |
| 第4章 | 総括 | 89 |
| | 謝辞 | 92 |
| | 参考文献 | 93 |

第 1 章 緒論

新鮮な魚介類は、遊離アミノ酸、核酸関連物質または有機酸（特にコハク酸）など多くの呈味成分が含まれるため、独特の風味とおいしさを有している。一方、タンパク質、ビタミン、ミネラル、オメガ-3 脂肪酸など健康に良いとされる栄養素が魚介類には、豊富に含まれるため、世界中の食卓で人気を集め、国際的な需要が高まっている。

しかしながら、その水揚げ後は不適切な環境や処理による斃死、不飽和脂肪酸の酸化、細菌の繁殖などの品質劣化問題が起こりやすく、貯蔵・流通時の品質保持が解決すべき困難な課題となっている。近年は、コールドチェーン、ガス置換包装またはコーティング処理などの魚介類の消費期限の延長方法が開発されてきた。コールドチェーンは、冷蔵輸送による水産物への劣化を防ぐための最も重要なシステムである（Li and Sun, 2015; Han et al., 2020）、この方法により、食品の品質を保ち、腐敗を抑え、汚染を防ぐことができる（Fu and Zhou, 2019）。しかしながら、魚種や漁獲地域などの違いにより、水産物の脂肪酸含量や初期生菌数もそれぞれ異なっている。したがって、同じ条件で貯蔵を行った場合においても異なる結果が生じる場合がある。そのため、魚介類の賞味期限を延ばし、長期間品質を維持するためには、魚種や産地に合わせて魚介類の品質劣化挙動を詳細に明らかにし、適切な流通条件を確立することが重要である。

貝類は世界の水産物生産の主要な品目の 1 つである。具体的には、ムール貝、マガキ、ホタテ貝、アサリなどがある。一般に貝類には、タンパク質、必須アミノ酸、生理活性ペプチド、長鎖多価不飽和脂

脂肪酸，アスタキサンチンなどのカロテノイド，ビタミン B12 などのビタミン類，銅，亜鉛，無機リン酸塩，ナトリウム，カリウム，セレン，ヨウ素などのミネラル類，その他の栄養素が相当量含まれており，消費者に様々な健康上のメリットをもたらす (Abeynayake et al., 2014; Grienke et al., 2014; Hamedand et al., 2015)。魚介類の核酸関連物質，遊離アミノ酸等 (FAA) のエキス成分は，呈味に重要な役割を果たす。貝類に含まれるいくつかの核酸関連物質はそれらの風味に密接な関係があり，官能的な影響を与える (Liu et al., 2013)。イノシン酸 (IMP) はうま味の主成分であり，うま味を増強し，貝類の嗜好性，おいしさ，新鮮な風味に寄与する可能性がある (Bi et al., 2021)。さらに，アデノシン一リン酸 (AMP) は風味増強の効果があるとも考えられ，甘味だけでなく塩味にも寄与し，苦味を抑制する。さらに，AMP と IMP の間には相乗効果があり，IMP の濃度が低い場合，AMP はうま味を呈するだけでなく，甘味も増強する (Rotzoll et al., 2006)。イノシン (HxR) とヒポキサンチン (Hx) に関しては，上記のヌクレオチドの主要分解産物であり，アサリのオフフレーバーの主要な原因である (Bi et al., 2022)。遊離アミノ酸 (FAA) も水産物における重要な風味成分であり，貝類においても主要な風味成分とされている (Cochet et al., 2015; Wang et al., 2007)。Hayashi et al. (2010) は，FAA が水産物の風味に及ぼす影響を検討し，アラニン (Ala)，アルギニン (Arg)，グルタミン酸 (Glu)，グリシン (Gly) の 4 つの FAA が水産物の特徴的な風味に影響を及ぼすことを示唆している。また，Glu は旨味アミノ酸であり，Ala と Gly は甘味アミノ酸，Arg は苦味アミノ酸が，味の持続性，複雑さ，こくなどを増加させ，嗜好性を向上させる役割を担っている (Liu

et al., 2013; 道川と鴻巣, 1995)。さらに, FAA 含量が貝類の鮮度に影響するという報告もある。(Melis and Barbarossa, 2017)。

上述の核酸関連物質の変化は, 貝類の生理状態にも反映する。これらは代謝に積極的に関与し, 生理学的プロセスにエネルギーを供給する (Caballero, 2009)。ATP 分解の経路は以下の通りである: アデノシン三リン酸 (ATP) → アデノシン二リン酸 (ADP) → AMP → IMP → HxR → Hx。ATP から IMP への分解は主に内因性の自己分解酵素に起因し (Gram and Huss, 1996), IMP から HxR および Hx への分解は酵素と細菌の増殖と関連している (Surette et al., 1988)。しかしながら, 一部の貝類には AMP デアミナーゼの活性が低いまたは存在しないため, IMP の生成が困難と考えられ, ATP → ADP → AMP → アデノシン (AdR) → HxR → Hx の代謝経路により ATP が分解される (横山と坂口, 1998)。これら ATP 分解産物は, 貝類の生理状態により影響されることが示唆されており, アサリの場合, 高温貯蔵により分解が促進される (Anacleto et al., 2013)。また, HxR と Hx の過剰蓄積が貝類の品質低下につながる可能性を報告している (Hong et al., 2017; Lawal and Adeloju, 2012)。一方, FAA の変動も貝類の生理状態を反映する。Hosoi et al. (2003) は, 養殖海水の塩分濃度が急激に低下または上昇した場合の *Crassostrea gigas* の外套膜中のほとんどの FAA が低浸透圧適応の過程で 2-8 時間以内に有意な同期減少を示し, 遊離アミノ酸の非選択的流出が遊離アミノ酸減少の主因であることが明らかにした。また, Bi et al. (2022) は, 環境温度の突然上昇がアサリの FAA 総量の減少を引き起こすことを示した。これらの結果は環境条件の急激な変化に伴い, 貝類中の FAA の種類と含有量は, 貯蔵過程における貝類の品質に影響を与え

る可能性があることを示唆している。しかしながら、エキス成分に対する研究は、主にマガキ、ホタテ貝、アサリなどが中心であり (Potts, 1967; Hosoi et al., 2003; Lawal and Adeloju, 2012; Hong et al., 2017), ムール貝のこれらの成分に関する研究は少ない。

磯や防波堤などの潮間帯に生息するムール貝は、養殖しやすく、栄養価値が高く、安価であるなどの利点があるため、世界的に重要な食料資源となっており、世界各地で広く養殖されている。ヨーロッパでは、マガキよりも大衆二枚貝として広く食用に供されている (坂口ら, 1987; 劉ら, 1983)。しかしながら、日本のムール貝は全沿岸帯に分布しているが、一部の地方を除いてはほとんど食用とはされず、海中構造物の汚損動物または汚染指示生物として見られている (劉ら, 1983)。その理由のひとつとして、ムール貝が 1920 年代に渡来した外来種であり、歴史的にも日本人にとって水産食品としてのなじみの薄い (劉ら, 1983) ことやマガキ (Sakaguchi and Murata 1989; 米田ら, 2012), ホタテ (木村ら, 2002), アワビ (Watanabe et al., 1992), アサリ (鴻巣ら, 1965) など他の貝類に比べて、ムール貝に関する科学的情報が少ないことが挙げられる (Hirabayasi et al., 2021)。Hirabayasi et al. (2022) は、Taste active value (TAV), Equivalent umami concentration (EUC), 階層的クラスター分析 (HCA) を用いて、ムール貝のエキス成分をカキ、アサリ、ハマグリなど、他の貝類と比較し、そのエキス成分組成の特徴を明らかにし、その結果として、4 種類の貝のうま味は有意差がなく、ムール貝とマガキの特徴が類似であることを報告している。一方、Hirabayasi et al (2021, 2022) は、季節変動や氷蔵がムール貝の品質に及ぼす影響についての検討も行っている。この中で、日本においてムール貝を

活魚として氷蔵で流通した場合，その運輸中に致死する可能性があることを明らかにした。また，ムール貝は水をろ過することで栄養を摂取するため，海水汚染の影響を受け，病原性細菌だけでなく環境由来の多様な細菌を宿主とすることがある。Bozcal et al. (2020) は *Arcobacter*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Vibrio* 等の病原性細菌属をムール貝から同定した。それらの微生物の増殖の抑制も課題となっている。そのため，ムール貝の貯蔵温度が，貝類の致死率の他，味覚や嗜好性に関わるエキス成分および細菌叢に及ぼす影響を調べることで貝類の品質変化を理解する上で有効である。

魚介類において，不適切な貯蔵は，特定腐敗生物（SSO）の活動により外観と臭いの変化を伴う腐敗を引き起こし，食中毒のリスクとも関連する。一般的に，水産物に含まれる SSO には，*Pseudomonas* や *Psychrobacter* に属するいくつかの種が含まれ，割合としては少ないが，*Shewanella* や *Lactobacillales* も含まれる（Anagnostopoulos et al., 2022）。貯蔵後にどの微生物が優位となるかは，保存条件，初期の微生物組成，微生物相互作用などの一連の要因によって異なる（Gram et al., 1996; Boziaris et al., 2017）。したがって，魚介類の品質を最大限に高めるためには，魚介類に存在する菌叢，またはこれらの菌叢が特定の貯蔵条件下でどのように変化しているか，そして最終的に官能的拒絶につながるには，どのような代謝産物が生成されるかについての知識が必要である。これまでの研究で SSO である *Shewanella* や *Aeromonas* は，海産魚に特有の臭気成分であるトリメチルアミン（TMA）の生成に関与している（Howgate et al., 2010）ことが報告されている。Vladimir et al (2016) は，*Pseudomonas* が 2-ノナン，2-ヘプタノン，2-ウンデカノンおよびジメチルジスル

フィドを生成することを報告している。アセトインと 2-ブタノンの生成は、*P. phosphoreum* (Olafsdottir et al., 2005) や *Lactobacillales* の生菌数が一定密度に達したとき (Jonsdottir et al., 2008) に起こるとされている。また、脂質酸化の生成物と推察されるアルデヒド類 (プロパナール, ブタナール, ペンタナール), ケトン類 (プロパノン, ヘプタノン, ノナノン), アルコール類 (1-ペンテン-3-オール, 1-ペンタノール) など揮発性成分も、魚肉の生臭さの原因として魚の品質と嗜好性に大きな影響を与える (Moreira et al., 2013; Tanimoto and Shimoda 2016; Tanimoto et al., 2018)。そのため、新鮮な状態から腐敗に至るまでの魚介類の細菌叢や揮発性成分の変化挙動を明らかにすることは、消費者が嗜好性の高い状態で魚介類を安全に喫食するために必要である。

魚類の筋肉は血合肉 (DM) および普通肉 (OM) に分類される。DM は OM に比べて、ヘモグロビン, ミオグロビン, チトクロームに富む。魚はこの DM 含有割合の違いにより赤身魚 (4~30%) と白身魚 (3%未満) に分けられる (鈴木, 1976)。これまでに赤身魚の OM と DM の相違についていくつかの報告がされている。Liu et al (2014) は新鮮なカツオ (*Katsuwonus pelamis*) において、OM が DM と比べてより多くの粗タンパク質を含むが、脂肪酸が少なく、OM の臭い成分は主にアルコール類およびアルデヒド類であるのに対して、DM は炭化水素およびケトン類であり、また DM はより高い K 値, 総揮発塩基性窒素 (TVBN) およびチオバルピツール酸 (TBA) 含量を示すことを報告している。Kannaiyan et al.(2016) も *Euthynnus affinis* の DM が OM と比べてより多くの TVBN と TMA を含むこと報告している。一方、Sohn et al. (2006) は氷蔵ブリの DM の過酸化

脂質含量が OM と比べて高く，官能的にも DM の腐敗臭と酸化臭が OM より大きいことを報告している。また，Tanimoto and Shimoda (2016) は，冷蔵したブリ DM 中の揮発性成分の変動が OM より大きく，1-ペンテン-3-オール，(Z)-2-ペンテン-1-オール，2,3-ペンタンジオンなどの成分が OM と比べて DM で多く含まれ，また，TBA 反応物質 (TBARS) も DM が OM より貯蔵中に多く増加することを報告している。

マダイ *Pagrus major* は，日本国内においては北海道全沿岸から九州南岸の日本海，東シナ海，太平洋沿岸，瀬戸内海，屋久島，奄美大島，喜界島，沖縄と広範囲に分布する (林ら，2013)。他魚種と比較して価格が高いため，日本の魚類の海面養殖業の総生産量の約 4 分の 1 を占め，産業上重要な白身魚の一つとなっている (長野ら，2015)。日本におけるマダイの養殖は 1960 年以降に開始され，1978 年に年間漁獲量は年に 1 万トンを超え，1990 年に 5 万トンを超えた。2000 年以降は一時に 5 万トン以下に減少したが，2014 年以降は 6 万トンに回復している (家戸，2021)。これまでにも，白身魚の代表魚種であるマダイの品質劣化についての研究が行われてきた。これらの研究では，腐敗指標としての TMA，TVBN 含量，生菌数，酸化指標としての TBA，または揮発性成分および菌叢の変化を中心に行なわれてきた。Ahimbisibwe et al. (2010) は，0 °C に貯蔵したマダイ筋肉中の HxR および Hx 含量が上昇し，K 値が 5 日目に 20% 以上になり，VBN 含量は 15 日に 25 mg/100 g に達し，TMA 含量は 10 日目に 0.4mg/ 100g に達したことを示した。Cai et al. (2014) はこれらの指標について類似の結果を報告し，生菌数は 12 日目に腐敗規準であった 7 Log CFU/g となった。Liu et al. (2020) は，冷蔵したマ

ダイ筋肉の K 値が 4 日目に 20% 以上になり, TVBN 含量は 8 日に 30 mg/100 g 以上に達し, TBA 含量は 6 日目に 2 mg/kg に達したことを示した。これらの研究は, マダイの品質劣化挙動は貯蔵条件に大きく影響することを示唆している。一方, Anagnostopoulos et al. (2022) は, 0 °C で 12 日間貯蔵した異なるバッチのマダイ筋肉中で *Psychrobacter* または *Pseudomonas* がそれぞれに優勢になり, 2-メチルブタナール, 3-メチルブタナール, 3-メチル-1-ブタノール, エタノール, 2,4-オクタジエン, 乳酸エチル, アセトアルデヒド, (E)-2-ペンテン-1-オールなどの揮発性物質が, マダイの腐敗マーカーとして利用できる可能性があることを示した。しかしながら, それらの研究は, OM と DM を分別していない試料についてであり, 収穫された海域も本論文と異なる。

貯蔵中の魚介類における細菌の増殖については幅広く研究が行われており, そのほとんどはプレートカウント法で測定されてきた (Parlapani et al., 2015; Anagnostopoulos et al., 2023; Calanche et al., 2020; Jaffrès et al., 2009)。しかしながら, この方法は難培養性細菌や環境中に存在量が少ない細菌についての解析が困難で, 魚介類に存在する腐敗に関連した菌叢の研究において不十分となる場合があった。次世代シーケンシング (NGS) 技術は, 近年に急速に発展してきており, 微生物群集の網羅的把握には, メタ 16S 解析が用いられる。この解析では, 試料から抽出された遺伝子群から原核細菌が固有に持つ 16S rRNA 遺伝子の特異的にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅させ, それをシーケンサーで配列決定する。16S rRNA の保存領域を基にしたプライマーを設計することにより, 一度に数千から数百万の可変領域の遺伝子配列を得ることができ, 得られた

16S rRNA 遺伝子を既存のデータベースと比較することで、培養不可能な微生物や少数で存在する微生物を含む細菌叢の正確な同定を可能にする (Mayo et al., 2014 ; 山田, 2015)。近年、水産物の細菌群集を評価するためにこのメタ 16S 解析が用いられ、貯蔵中の菌叢の変化や、魚介類の官能特性の劣化の原因となるような微生物に関する情報を得るための研究に応用されてきている (Anagnostopoulos et al., 2022; Odeyemi et al., 2018; Parlapani, 2021; Zhuang et al., 2020)。

そこで本研究では、二枚貝としてムール貝、白身魚の代表的な魚種としてマダイを試料とし、魚介類の貯蔵時のエキス成分および揮発性成分の変化について検討するとともに、NGS による菌叢解析を行い、魚介類の菌叢および品質に及ぼす貯蔵の影響に関する以下の検討を行った。

1. 第 2 章では、活ムール貝の適切な流通条件を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的として異なる温度で貯蔵した活ムール貝の致死率、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性、一般成分、生菌数 (VBC) およびエキス成分を測定し、TAV および EUC を算出するとともに、分析値に基づく HCA、さらに、NGS による菌叢解析を行い、ムール貝の最適な流通条件を検討した。
2. 第 3 章では、腐敗に至るまでのマダイ筋肉 (OM と DM) の揮発性成分と菌叢の変化を明らかにするとともに、腐敗に特徴的な揮発性成分を特定することを目的として、マダイ筋肉の VBC、TVBN、TMA、TBARS および揮発性成分の分析、官能評価と NGS による菌叢解析を行い、腐敗に至るまでマダイの品質劣化における SSO および揮発性成分を検討した。

第 2 章 異なる温度で貯蔵した活ムール貝 (*Mytilus Galloprovincialis*) のエキス成分および菌叢の変化

第 1 節 緒言

ムール貝 (*Mytilus galloprovincialis*) は、世界で最も人気のある貝類のひとつである。栄養価が高く、美味なため広く一般に食べられており、しかもホタテなど他の食用二枚貝に比べて安価で、市場での競争力が高く、商業的意義も高い (Grienke et al., 2014)。遊離アミノ酸 (FAA) や核酸関連物質などのエキス成分は、魚介類の味を構成する重要な要素である (Sarower et al., 2012)。ムール貝のこれらエキス成分については、地域や季節による比較 (Fuentes et al., 2009; Hirabayasi et al., 2021; Oliveira et al., 2015) や他の貝類との比較 (Hirabayasi et al., 2022) が報告されている。

活ムール貝は一般に氷蔵で出荷・販売され、夏はその「旬」である (Hirabayasi et al., 2021; Hirabayasi et al., 2022)。氷蔵中の活ムール貝の品質変化を明らかにするため、味覚活性成分に基づいて TAV と EUC を用いた解析をおこなった (Hirabayasi et al., 2022)。この研究では、氷蔵にもかかわらず、品質が徐々に低下することが示唆された。また、10 日間保存後の致死率は 66.7% と高値であった。したがって、流通中のムール貝の歩留まりを増やし、品質を維持するためには、適切な流通条件を提案する必要がある。

ムール貝以外の生きた二枚貝を単一温度で保存した時のエキス成分の変化が報告されている (Enomoto et al., 1996; Kawabe et

al., 2010; Yoneda and Inoue, 2018)。また，二枚貝のエキス成分の死後変化に対する温度の影響についても報告されている（Kawashima et al., 1992; Yoneda et al., 2002）。しかし，活二枚貝のエキス成分に対する貯蔵温度の影響については，ハマグリ（Chiou et al., 1998）以外ほとんど情報がなく。この中でエキス成分の変化挙動は温度に依存することが示されている。

生の魚介類保存中の微生物増殖は，食品衛生上極めて重要な問題である。活ムール貝の VBC が，氷蔵 13 日後には 3 オーダーから 5 オーダーに増加した（Hirabayasi et al., 2022）。しかし，VBC は，培養が不可能な菌や難培養菌の存在により微生物多様性を過小評価し，食品の腐敗に寄与する微生物群集の同定ができないなど，保存中の食品中の微生物群集を完全に解明することは困難である（Emborg et al., 2002; Juste et al., 2008; Reynisson et al., 2009; Rudi et al., 2004）。次世代シーケンシング（NGS）技術は，数千から数百万の DNA 分子をハイスループットにかつ同時にシーケンスができるため，培養困難な微生物や存在割合の小さい微生物を含む微生物群集の正確な同定が可能である（Baltasar et al., 2014）。これまでに，この手法を用いてトルコ沿岸の環境汚染指標として知られるムール貝の病原性細菌を含む微生物の多様性が明らかにされている（Bozcal & Dagdeviren, 2020）。さらに，4°C のガス置換包装中で保存された活ムール貝の腐敗微生物群集が，16S rRNA アンプリコンシークエンシングを用いてプロファイリングされている（Olumide et al., 2019）。しかし，活ムール貝の微生物群集の変化に及ぼす保存温度の影響に関する研究は認められない。

本章は、活ムール貝の適切な流通条件を決定することを目的とした。そこで、異なる温度で保存された活ムール貝の品質を評価するため、致死率とエキス成分の変化を調べ、TAVとEUCを算出した。また、活貝の鮮度指標であるエラのSDH活性を測定した。さらに、腐敗指標として貯蔵中のVBCをモニタリングし、菌叢の変化をNGSで解析した。

第2節 実験方法

第1項 試料調製

広島湾西部で約1年間養殖後、2021年8月に収穫された活ムール貝 ($n = 350$) を広島県の養殖業者から購入した。収穫後、一晚清浄海水で蓄養後、翌朝実験室に搬入した。全試料のうち、150個を致死率の実験に、200個を微生物学および生化学的実験に使用した。この2つのグループを0°C、5°C、10°Cの3つの温度グループに分けて保存、それぞれ0、1、3、7、12日目にサンプリングした。SDH活性を除く分析試料は、活ムール貝3個を1サンプルとして採取後、足糸を除いて、細切、混合し、この処理をサンプリング日に3回繰り返した。SDH活性とVBCは、サンプリング日にそれぞれ測定し、その他の実験では、実験まで-80°Cで保存した。

第2項 致死率の測定

ムール貝の致死率の計算は、斃死したムール貝を分析から除外するために、開口した貝をサンプリング日に1回刺激した。10

分後，開いたままの貝をサンプルから取り出し，斃死個体としてカウントした。ムール貝の致死率は，斃死数個体の数が全サンプル数を除した値のパーセントで表した。

第 3 項 SDH 活性の測定

SDH 活性は比色定量法 (Tsunoda et al., 1985) により測定した。3 個のムール貝からそれぞれエラ (0.2~0.4 g) を切除した後，合計約 1 g のエラを採取し，試料とした。試料を 5°C 以下に冷却した塩化トリフェニルテトラゾリウム (TTC) 試験液 10mL に加えた。この溶液を 37°C で 30 分間インキュベートし，水中で 5 分間冷却して反応を停止させた。濾過後，分光光度計 (HMC-358, ジャスコインタナショナル株式会社) を用い，濾液の吸光度 484 nm をモニターした。サンプル中のトリフェニルホルマザン (TF) 含量は TF 標準溶液による検量線を用いて算出した。SDH 活性は TF/g で表した。

第 4 項 pH および水分含量

試料の pH は，Cao et al (2009) の方法に若干の修正を加えて測定した。すなわち，第 1 項に記載した細切試料 0.5 g を蒸留水 5.0 mL に加え，24,000 rpm で 2 分間ホモジナイズ後，pH メーター (F-71, 株式会社堀場エステック) を用いて測定した。水分含量は，日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂版) マニュアル (https://www.mext.go.jp/content/20220222-mext_kagei-index_100.pdf) に従い，常圧乾燥加熱法で測定した。細切試料約 1.5g を 105°C で 24 時間乾燥後，重量を測定した。

第 5 項 核酸関連物質

核酸関連化合物は，Zhong et al (2015) の方法に若干の修正を加えて測定した。すなわち，第 1 項で述べた細切試料約 1.0 g を氷冷 10% 過塩素酸 (PCA) 5 mL でホモジナイズ後，3000 × g，5 分間遠心分離した。沈殿に 5 mL 氷冷 5% PCA でホモジナイズ後，3000 × g，15 分間遠心分離した。上清を合わせ，10M または 1M KOH で pH を 7.0 に調整後，混合物を 3000 × g，15 分間遠心分離した。沈殿を 5 mL の蒸留水で洗浄し，3000 × g，15 分間遠心分離した。上清を合わせ，蒸留水で 25 mL とした。この PCA 抽出物を蒸留水で 10 倍に希釈後，0.45 μm のフィルターでろ過し，その濾液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システム (LC-6AD，株式会社島津製作所) に注入した。カラムとして，CAPCELLPAK C18 SG (4.5 × 150 mm，株式会社大阪ソーダ)，移動相として 20 mM クエン酸，20 mM 酢酸，40 mM トリエチルアミン (pH 4.6) を用いた。流速は 1.0 mL/分，カラム温度は 40°C に設定し，吸光度 260 nm をモニターした。核酸関連化合物は，サンプルのピークと標準化合物の保持時間の一致に基づいて同定し，それらを用いた検量線により定量した。

第 6 項 有機酸

有機酸含量は，Zhong et al (2015) の方法に若干の修正を加えて測定した。すなわち，第 5 項で述べた PCA 抽出物を 0.45 μm のフィルターでろ過後，Shodex KC-811 (8.0 × 300 mm，昭和電工マテリアルズ株式会社) を 2 本直列に連結したカラムを備えた

HPLC システム (LC-10AD, 株式会社島津製作所) に注入した。移動相として 3.0 mM PCA, ポストカラム用 pH 指示薬 : 0.2 mM ブロモチモールブルーを含む 15mM リン水溶液を用いた。移動相の流速は 1.0mL/分および pH 指示薬の流速は 0.7mL/分, カラム温度を 50°C に設定し, 吸光度は 420nm でモニターした。有機酸は, サンプルのピークと標準化合物との保持時間の一致に基づいて同定し, それらを用いた検量線により定量した。

第 7 項 遊離アミノ酸 (FAA) およびアンモニア (NH₃) の測定

FAA と NH₃ は, Je et al (2005) の方法に若干の修正を加えて測定した。すなわち, 第 1 項で述べた細切試料約 1.0 g を, 冷却した 2% 5-スルホサリチル酸 (SSA) 10 mL でホモジナイズ後, 13,000 ×g で 5 分間遠心分離した。上清の pH を 10 M または 1 M NaOH で 4.0 に調整した後, 蒸留水で 25 mL にした。SSA 抽出物中の FAA と NH₃ をマニュアル (AccQ-Tag Derivatization Kit, Waters Co., MA, U.S.) に従って誘導体化後, 反応混合物をカラム (AccQ-Tag™ ULTRA C18 1.7 μm, 2.1 × 100 mm, Waters Co., MA, U.S.) を備えた超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) システム (Waters UPLC Amino Acid Analysis Solution, Waters Co., MA, U.S.) を用いて分析した。FAA と NH₃ は, サンプルのピークと標準化合物との保持時間の一致に基づいて同定し, それらを用いた検量線により定量した。

第 8 項 非タンパク態窒素 (NPN) の測定

NPN の測定には, 第 7 項で述べた SSA 抽出液 1 mL を用い,

Pregl-Dumas 法 (Patterson, 1973) により, Vario Max CNS 元素分析装置 (Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Germany) を用いて分析した。

第 9 項 グリコーゲンの測定

第 1 項に記載した細切試料約 1.0g を, 10mL の冷 5%トリクロロ酢酸 (TCA) 中でホモジナイズ後, 2000×g で 5 分間遠心分離した。沈殿物から, 同じ手順でグリコーゲンを 2 回抽出し, すべての上清を合わせた後, 蒸留水で最終容量 25 mL にした。グリコーゲン含量は, アントロン-硫酸法 (Carroll et al., 1956) を用いて測定した。50 倍希釈した TCA 抽出物 (1 mL) に氷冷した 75% (v/v) 硫酸 4 mL を加え, 激しく攪拌後, 混合物を 10 分間沸騰させた。冷却後, 分光光度計 (V-570, ジャスコインタナショナル株式会社) を用いて 620nm の吸光度を測定した。標準曲線は, グルコース溶液を用いて作成し, 試料中のグリコーゲン含量は, グルコースの計算値により換算した。

第 10 項 VBC の測定

VBC は, 食品衛生検査指針 (2018) の方法に従って希釈液を調製後, 培地に混釈した。すなわち, 無菌的に細切したムール貝 3 個から約 10.0 g の試料を採取し, 滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl) 90 mL を入れたストマッカーバッグに移した。サンプルをストマッカーで 2 分間混合し, 滅菌ペプトン-生理食塩水 (0.15% ポリペプトン, 0.85% NaCl) で連続希釈した。この希釈液 1.0mL を標準プレートカウント寒天培地 (日水製薬株式会社) と混合した。中

温細菌は，食品衛生検査指針（2018）に従ってプレートを 35°C，48 時間で中温細菌を培養した。通性低温細菌は，Greer（1981）および Hilgarth et al（2018）に記載の方法に若干の修正を加え，25°C，168 時間培養した。VBC は対数コロニー形成単位（Log CFU）/g で表した。

第 11 項 TAV および EUC

TAV は，単純マトリックスにおける味覚活性成分の閾値を用いて算出した（Chen et al., 2007；Zheng et al., 2015）。EUC は，グルタミン酸ナトリウム（MSG）と 5'-ヌクレオチドの混合物のうま味強度に相当する MSG の濃度である（Mau, 2005）。活ムール貝の EUC の評価には，下式を用いた（山口ら，1971）：

$$Y = \sum a_i b_i + 1218 \quad (\sum a_i b_i) \quad (\sum a_j b_j)$$

ここで，Y は EUC（MSG g/100g）， a_i はうま味アミノ酸 [アスパラギン酸（Asp）またはグルタミン酸（Glu）] の濃度， a_j はうま味 5'-ヌクレオチド [イノシンーリン酸（IMP）またはアデニンーリン酸（AMP）] の濃度， b_i は MSG に対するうま味アミノ酸の相対うま味濃度 [Glu（1），Asp（0.077）]， b_j は IMP に対するうま味 5'-ヌクレオチドの相対うま味濃度 [IMP（1），AMP（0.18）]，1218 は相乗定数である。

第 12 項 DNA 抽出，ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および次世代シーケンシング（NGS）

DNA 抽出は，Pan et al (2018) の方法に若干の修正を加えて行った。すなわち，ストマッカーバッグに入れた 10g の細切試料を 90mL の滅菌生理食塩水で 2 分間ホモジナイズし，ホモジネートを 4°C, 800×g で 5 分間遠心分離した後，上清 40mL を 4°C, 12,000×g で 5 分間遠心分離し，ペレットを 1.5mL の滅菌生理食塩水に懸濁した。この懸濁液から，NucleoSpin® Microbial DNA キット（タカラバイオ株式会社）を用いて，マニュアルの指示に従って細菌 DNA を抽出した。DNA サンプルは First PCR までに -80°C で保存した。

微生物群集を評価するために，細菌の 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシングを 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16smetagenomiclibrary-prep-guide-15044223-b.pdf “Accessed 2 Dec 2022”, Illumina, San Diego, CA, USA) のプロトコールに若干の修正を加えて実施した。最初に，以下のプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅した (Herlemann et al., 2011) :

341F (5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') と 805R (5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') .

First PCR は，Tks Gflex™ DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて行った。サーマルサイクリングは VeritiPro™ 96 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham,

Massachusetts, U.S.) を用い, 以下の条件で行った: 95°C・3 分の熱変性, 続いて 30 回増幅サイクルを行い: 95°C・30 秒, 55°C・30 秒, 72°C・30 秒。最後に 72°C・5 分の最終伸長を行った。この PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動で正しく増幅されていることを確認し, Second PCR まで -80°C で保存した。

2nd PCR から NGS までは, 生物技研(株)に委託した。First PCR 産物を Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, CA, USA) を用いて精製した後, Synergy H1 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, U.S.) と QuantiFluor dsDNA System (Promega, Madison, WI, U.S) を用いて濃度を測定した。First PCR の精製産物を以下のインデックスプライマーで増幅した:

2ndF (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- Index2
-ACACTCTTTCCCTACACGACGC-3') と

2ndR (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT- Index1
-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3')。

TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ株式会社) を用いたサーマルサイクリングは以下の条件で行った: 94°C・2 分の熱変性, 続いて 10~12 回増幅サイクルを行い: 94°C・30 秒, 60°C・30 秒, 72°C・30 秒。最後に 72°C・5 分の最終伸長を行った。Second PCR の産物を Agencourt AMPure XP で精製した後, Synergy H1 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, U.S.) と QuantiFluor dsDNA System (Promega, Madison, WI, U.S) を用いてライブラリー濃度を測定した。最後に, dsDNA 915 Reagent Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, U.S.) を用いた Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Ankeny, IA,

U.S.) でライブラリーの品質を確認した。その後、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, Inc. San Diego, California, U.S.) を用い、Illumina MiSeq プラットフォーム (Illumina, Inc. San Diego, California, U.S.) で PCR アンプリコンのペアエンドシーケンス (2 × 300 bp) を行った。

第 13 項 シーケンスデータの処理と解析

NGS で生成したショートリードのメタゲノム解析を、以下のステップで行った。QIIME 2 ソフトウェアプログラム (2019.7) を使用して (1) 入力配列の品質管理を行い、品質スコアを 30 以上に設定し、配列の長さを 500bp 以上にフィルターし、feature table を構築した。次に、DADA2 アルゴリズムを用いてデノイズを行い、キメラ配列を同定して除去した；(2) 「Silva 132 99% OTUs from 515F/806R region of sequences」のデータベースを用いて sequences species を取得し (Pruesse et al., 2007)、分子系統樹を構築した；(3) operational taxonomic unit (OTU) 数、 α 多様性 (Good's coverage, ACE, Chaol, Simpson and Shannon index)、 β 多様性 (weighted UniFrac distance) を算出した；(4) weighted UniFrac distance を用いて主座標分析 (PCoA) と 16S rRNA 遺伝子の可視化は QIIME プラットフォーム (<https://view.qiime2.org>) を用いて行った。

第 14 項 統計解析

致死率を除く上記の実験はすべて 3 連で行った。3 つのサンプルから得られたデータは、平均値および標準偏差 (SD) として示

した ($n = 3$)。SPSS Statistics 23 (IBM Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、平均値間の有意差を検定するために Tukey の多重検定を用いた。統計的有意性は、 $P < 0.05$ に設定した。MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) を用いて、代謝物データと VBC に基づく階層的クラスター分析 (HCA) を行った。HCA には Ward's 法を用いた。

第 3 節 結果

第 1 項 致死率および SDH 活性

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の致死率と SDH 活性の変化を Table 2-1 に示す。ムール貝の致死率は、いずれの温度においても 12 日間の貯蔵中に増加した。同じ保管期間において、 5°C は、 0°C と比べて致死率が低く、 10°C は、7 日目と 12 日目の致死率が 5°C より高かった。

0°C で貯蔵した活ムール貝のエラにおける SDH 活性は、1 日目に有意に上昇し ($P < 0.05$)、その後有意に低下した ($P < 0.05$)。他の貯蔵温度では、貯蔵中の SDH 活性の有意な変化は観察されなかった。しかし、 5°C で貯蔵した初日は、個体差は大きいものの、高い活性を示した。貯蔵 7 日目と 12 日目には、 0°C で貯蔵したムール貝の SDH 活性は、 5°C と 10°C で貯蔵したものより有意に低かった ($P < 0.05$)。

第 2 項 水分, NPN, グリコーゲン含量, pH および VBC

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の水分, NPN, グリコー

ゲン含量, pH および VBC の変化を Table 2-2 に示す。貯蔵中の水分含量の有意な変化は, どの貯蔵温度でも観察されなかった。0°で貯蔵した活ムール貝の NPN 含量は, 1 日目に有意に増加し ($P < 0.05$), その後有意に減少した ($P < 0.05$)。5°C および 10°C は貯蔵により有意な変化は見られなかった。0°C で 1 日貯蔵した試料の NPN 含量は, 5°C および 10°C で貯蔵した試料よりも有意に高く ($P < 0.05$), 0°C で 12 日間貯蔵した試料の NPN 含量は, 5°C および 10°C で貯蔵した試料よりも有意に低かった。0°C で貯蔵したムール貝のグリコーゲン含量は, 1 日目に有意に増加し ($P < 0.05$), その後 12 日間の貯蔵により有意に減少した ($P < 0.05$)。1 日目, 0°C で貯蔵した試料のグリコーゲン含量は, 他の温度で貯蔵した試料よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。活ムール貝の pH は, すべての温度条件下で 12 日間の貯蔵後に有意に上昇した ($P < 0.05$)。

0°C で貯蔵した試料では, 12 日間の貯蔵中, 中温細菌数, 通性低温細菌数も有意な変化はなかった。5°C で貯蔵した試料では, 12 日間の貯蔵後, 中温細菌数と低温細菌数の両方が有意に 1 オーダー増加した ($P < 0.05$)。10°C で貯蔵した試料では, 貯蔵 12 日後と 7 日後に, 中温細菌数と低温細菌数がそれぞれ 1 オーダーの有意な増加を示した ($P < 0.05$)。5°C と 10°C で 12 日間貯蔵した試料の中温細菌数は, 0°C のものより有意に高かった ($P < 0.05$)。5°C で 12 日間, 10°C で 7 日間および 12 日間貯蔵した試料の VBC は, 0°C のものと比較して有意に高かった。

第 3 項 FAA および NH₃

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の FAA および NH₃ の変化

を Table 2-3 に示す。0°C と 5°C で貯蔵した試料では、NH₃ が貯蔵中に徐々に増加し、12 日目には貯蔵前よりも有意に高くなった ($P < 0.05$)。10°C で貯蔵した試料では、NH₃ は 7 日目に貯蔵前より有意に高くなった ($P < 0.05$)。0°C で貯蔵した試料では、12 日目の総 FAA、セリン (Ser)、アルギニン (Arg)、Glu、アラニン (Ala) が、1 日目に比べて有意に減少した ($P < 0.05$)。5°C で貯蔵した試料では、12 日目の総 FAA、Glu、スレオニン (Thr)、β-アラニン (β-Ala)、Ala の含量は、0 日目に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。10°C で貯蔵した試料では、12 日目の総 FAA、Ser、グリシン (Gly) および Glu が、0 日目および / または 1 日目と比較して有意に増加した ($P < 0.05$)。5°C および 10°C で 12 日間貯蔵した後の NH₃ は、0°C で貯蔵したものよりも低かった。5°C および 10°C で 12 日間貯蔵した後の総 FAA、タウリン、Ser、Gly、Glu および Ala は、0°C で貯蔵したものよりも有意に高かった ($P < 0.05$)。0°C で 1 日貯蔵した後の総 FAA と多くのアミノ酸は、他の貯蔵温度よりも高かった。

第 4 項 核酸関連物質

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の核酸関連物質の変化を Table 2-4 に示す。IMP、ADP および AMP が、ムール貝の主な核酸関連物質であった。0°C で貯蔵したムール貝の核酸関連物質の総量は、未貯蔵と比べて 1 日目に有意に多かった ($P < 0.05$)。10°C で 12 日間貯蔵した後のイノシン (HxR)、AMP、アデノシン二リン酸 (ADP) 含量は、0°C で貯蔵した場合よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。

第 5 項 有機酸

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の有機酸の変化を Table 2-5 に示す。10°C で貯蔵したムール貝は，12 日目のリンゴ酸含量が 1 日目によりも有意に高かった ($P < 0.05$)。0°C 貯蔵 7 日目のムール貝のコハク酸含量は，0 日目によりも有意に高かった ($P < 0.05$)。5°C および 10°C で貯蔵したムール貝のコハク酸含量は，貯蔵 12 日目および 3 日以上でそれぞれ貯蔵前に比べて有意に増加した ($P < 0.05$)。5°C および 10°C 貯蔵後のコハク酸含量は，7 日目を除き，0°C 貯蔵後よりも有意に高かった。0°C 貯蔵 12 日目のムール貝中の乳酸含量は，貯蔵 0 日目のそれよりも有意に高かった ($P < 0.05$)。0°C および 5°C で貯蔵したムール貝中の酢酸含量は，それぞれ貯蔵 12 日後および 7 日後に，貯蔵前に比べて増加した ($P < 0.05$)。プロピオン酸は 0°C で 7 日以上，5°C と 10°C でそれぞれ 3 日以上貯蔵した後に検出された。

第 6 項 TAV および EUC

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝のエキス成分の TAV および EUC の変化を Table 2-6 に示す。ムール貝中の Glu, Asp, Ala, コハク酸の TAV は，すべての貯蔵条件下で，貯蔵期間を通じて 1 以上を維持した。5°C と 10°C で貯蔵したムール貝の IMP の TAV は，1 日目と比較して貯蔵中に有意に減少し，さらに貯蔵すると 1 以下になった ($P < 0.05$)。5°C および 10°C で 12 日間貯蔵したムール貝のコハク酸の TAV は，貯蔵前に比べて有意に増加した ($P < 0.05$)。5°C および 10°C で 12 日間貯蔵したムール貝の Glu, Ala, AMP および コハク酸は，0°C で貯蔵したものより有意に高かった ($P < 0.05$)。0°C で 7 日以上貯蔵したムール貝の EUC は，貯蔵 1 日目のものに比べて

有意に低下したが ($P < 0.05$), 同じ貯蔵期間において, 貯蔵温度の異なる試料間で有意差は認められなかった。

第 7 項 HCA ヒートマップ

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝のエキス成分と VBC データセットに基づく HCA ヒートマップを Fig. 2-1 に示す。HCA は試料を大きく 2 つのクラスターに分けた。クラスター I (5°C と 10°C の 1 日目), II (0°C の 0, 7, 12 日目, 5°C の 3 日目), III (10°C の 3 日目, 5°C と 10°C の 7 日目) の試料が, 1 つ目の同じクラスターに分類された。その他の試料は 2 つのサブクラスターに分けられた: IV (5°C と 10°C で 12 日目) と V (0°C で 1 日目と 3 日目)。クラスター A にはオルニチン (Orn), リンゴ酸, アデニンニリン酸; クラスター B には NH_3 , Glu, Ala, ほとんどの有機酸, VBC; クラスター C にはほとんどの FAA, AMP, グリコーゲン; クラスター D には Asp, IMP, アデニン三リン酸が含まれた。クラスター A と B の有機酸と VBC の値は, クラスター V で高く, クラスター C のほとんどの FAA とグリコーゲンの値は, クラスター V と VI の試料で高く, クラスター I から IV の試料で低かった。クラスター D の IMP, ヒポキサンチン, アデノシンの値はクラスター I の試料で高かった。これらの結果から, 貯蔵前の試料の代謝物組成および VBC は, 0°C で 1 日および 3 日間貯蔵した試料 (クラスター V), 5 および 10°C で 12 日間貯蔵した試料 (クラスター IV) とは異なり, 0°C で 7 日間以上貯蔵した試料, 5 および 10°C で 1 日および 3 日間貯蔵した試料 (クラスター I~III) と比較的類似していた。 5°C と 10°C で 12 日間および 0°C で 1 日と 3 日間貯蔵した試料は, 他の試料に比べ, 比較的高

いエキス成分を示した。

第 8 項 NGS 解析

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の菌叢の OTU 数および α 多様性の変化を Table 2-7 に示す。Good's coverage の値は 0.99 以上であり、得られたリード数は多様性解析の推定に十分であることが示された。5°C で貯蔵したムール貝の OTU 数, Chao1, ACE は、貯蔵 7 日後に有意に減少した ($P < 0.05$)。10°C で貯蔵したムール貝の 7 日目のすべての α 多様性, 12 日目の OTU 数, Chao1, ACE の値は、0 日目の値よりも有意に低かった ($P < 0.05$)。

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の属レベルでの菌叢組成を Fig. 2-2 に示した。貯蔵前は、未分類の *Vibrionaceae* が優勢な属であった。貯蔵中、この種の存在比はすべての温度条件で減少した。さらに、どの温度条件においても、貯蔵中に総菌叢存在比が 50% を超える優勢菌種はなかった。

異なる温度で 12 日間貯蔵したムール貝の属レベルの菌叢に基づく PCoA の結果を Fig. 2-3 に示す。PCoA スコアの 3 主成分（それぞれ PCo1, PCo2, PCo3）は全分散の 31.96%, 6.87%, 5.94% を占めた。PCoA スコアにより全試料が、貯蔵前；0°C・12 日、5°C・7 日および 10°C・3 日間貯蔵；5°C・12 日間貯蔵；10°C・7 日間貯蔵；10°C・12 日間貯蔵の 5 群に分けられた。

第 4 節 考察

二枚貝は、低温で湿潤な環境であれば、長期間水なしで生きられ

ることが知られているが、このような条件は、二枚貝の代謝を低下させる (Anacleto et al., 2013)。活貝の鮮度評価に K 値が不適切なことから、本論文ではエラの SDH 活性を測定し、ムール貝の活力を評価した (Mochinaga & Taguchi, 1963 ; Tsunoda et al., 1985)。0°C での貯蔵中にエラの SDH 活性が低下することは、ムール貝が生きていても貯蔵中に活力を失しなわれたことを示している。本論文の試料は夏季に収穫されたため、海水温と保管温度の違いによる何らかのストレスが、0°C で保管されたムール貝の SDH 活性 (活力) の低下と致死率の上昇に寄与している可能性がある。Bi et al (2022) は、急性の温度ストレスがアサリ (*Ruditapes philippinarum*) の高い致死率につながったことを報告している。本論文の致死率および SDH 活性の結果は、5°C がムール貝の保管と輸送に適切な温度であることを示唆している。一方、10°C 貯蔵の 7 日以降の試料から、官能的に不快臭が感じられた、これは微生物の増殖の影響と推定された。一方、10°C 貯蔵下致死率が 7 日目からの上昇は細菌の増殖に関係すると推定される。

水分含量の増加は、ムール貝の歩留りと乾燥重量に影響し (澄川ら, 1985), 品質に影響することを示している。水分含量の結果から、本論文における貯蔵条件は、貯蔵後のムール貝の肉収量および乾燥重量に影響を与えないことが示唆された。NPN の減少と総アミノ酸の減少は正の相関関係にあることから (Sakaguchi and Murata, 1989), 0°C における NPN の減少は FAA の減少に起因すると考えられる。グリコーゲン、二枚貝の主要な貯蔵エネルギーであり、不利な環境条件に備えて貯蔵されている (Lucas and Beninger, 1985)。さらに、アサリでは急性低温ストレス後にいくつかの酵素活性が変動する

(Dong et al., 2020)。したがって、0°C 貯蔵 1 日目における SDH 活性、グリコーゲン、NPN の増加は、貯蔵中の低温ストレスに起因すると考えられる。これまでの研究では、本論文と同じ温度での貯蔵中に、ハマグリ（*Tridacna*）のグリコーゲンの減少が起こった（Chiou et al., 1998）。このことは、貯蔵中のグリコーゲンの変化挙動が貝の種によって異なる可能性を示唆している。

水生動物は低温にさらされると一連のストレス関連反応が始まり、様々な生理的パラメーターの乱れにつながる（Dong et al., 2020; Kuo et al., 2006; Panase et al., 2018）。実際、Bi et al (2022) は、アサリ（*Ruditapes philippinarum*）の総 FAA は 4°C での貯蔵中に 1 日目に増加し、その後減少することを報告している。本論文では、FAA 含量は 0°C で貯蔵すると 1 日目に増加し、その後減少したが、5°C および 10°C で貯蔵すると、基本的に変化しないか、わずかに増加した。したがって、0°C での貯蔵 1 日目に FAA が増加したのは、ムール貝の自然生息温度と大きく異なる低温による高いストレスが、アミノ酸代謝に影響を与えたためと考えられる。

カキ、ロブスター、アカエビでは AMP は主にヌクレオチドであり、その蓄積は AMP デアミナーゼ活性が低い結果であることが報告されている（Mendes et al., 2001; Yokoyama et al., 1992）。AMP は、今回の結果で最も豊富な核酸関連化合物であった。貯蔵中の HxR と Hx の蓄積は、貝類のストレス指標として利用できることが報告されている（Mendes et al., 2001）。10°C で貯蔵したムール貝の Hx の増加は、より高い貯蔵温度が、活ムール貝にストレスを与えることを示しているのかもしれない。

有機酸の変動は、ムール貝の代謝状態をモニターするに利用がで

きる。二枚貝では，トリカルボン酸中間体の大量蓄積は，このサイクルの中断の結果である（Jha et al., 2015）。二枚貝は無酸素条件下で，コハク酸，プロピオン酸，Ala など，いくつかの嫌気性最終生成物を蓄積する（Grieshaber et al., 1994；Honda et al., 2010）。コハク酸，プロピオン酸および酢酸もまた，嫌気条件下での貯蔵中にムール貝（*Mytilus Edulis L.*）に蓄積する（Kluytmans et al., 1977）。本論文の試料は，気中放置のため低酸素状態であり，同様の有機酸蓄積傾向を示した。さらに，ハマグリのコハク酸および Ala 濃度は，5°C および 10°C での貯蔵中に 0°C よりも速い速度で増加し（Chiou et al., 1998），前述の知見を裏付けている。このことは，活ムール貝の嫌気性代謝が低温貯蔵中に起こり，代謝レベルが比較的高い高温では代謝産物の蓄積がより進んだことを示唆している。

TAV と EUC の変化は，貯蔵中のムール貝の味の変化パターンを示す。Glu と Ala は貝類の主な味覚活性物質である（Yamaguchi et al., 1971）。カキ（*Crassostrea ariakensis*）の Glu と Ala の TAV は，4°C と 20°C で 15 日間貯蔵すると減少し，EUC も同じ貯蔵条件で減少した（Liu et al., 2022）。ムール貝（*M. galloprovincialis*）の Glu と Asp の TAV は，0°C で 13 日間貯蔵した後に減少し，EUC も同じ貯蔵条件で減少した（Hirabayasi et al., 2022）。本論文については，5°C および 10°C で 12 日間貯蔵した活ムール貝では，0°C で貯蔵した試料に比べて Ala とコハク酸の TAV が高かった。これらの結果から見ると，0°C 貯蔵したムール貝の味の変化パターンは 5°C と 10°C とは異なることが示唆される。一方，EUC については，異なる温度で貯蔵した試料間で有意な差は認められなかった。この結果は，アミノ酸と核酸によるうま味の強度は，貯蔵条件の違いにより影響されない

ことを示している。

HCA ヒートマップから、0°Cでの貯蔵中、1日目に様々な代謝物が増加した後、貯蔵により徐々に減少し、その組成は貯蔵前に近づいた。一方、5°Cと10°Cでの貯蔵では、貯蔵7日目までは一部の代謝物のみが変化した。その後、様々な代謝物やVBCが増加し、VBCを除き、0°Cで1日貯蔵したムール貝と同様の組成となった。このように、HCAは異なる貯蔵条件下での代謝物とVBCの変化挙動を可視化した。前述のように、これらの違いは、生息温度と大きく異なる0°Cでの貯蔵によるストレスが高く、ムール貝の代謝に影響を与えた結果と考えられる。このことは、0°Cでの保管中に観察されたムール貝の致死率の高さからも裏付けられた。

α 多様性の結果は、5°Cおよび10°Cで貯蔵した試料の細菌の種数が貯蔵中に減少したことを示唆している。本論文では、5°Cおよび10°Cでの貯蔵後期にVBCが有意に増加したことから (Table 2-2)、これらの温度における微生物群集の多様性が低下していることが裏付けられた。細菌叢の組成とPCoAの結果から、微生物叢は貯蔵前と貯蔵後期(特に5°Cと10°C)で異なることが示唆されたが、優占菌は観察されなかった。本論文では、貯蔵前のムール貝の優勢細菌の属は、以前に貝類で報告されたものとは異なっていた (Cappello et al., 2015; De Sousa et al., 2004; Eggermont et al., 2017; Fernandez-Delgado et al., 2007)。このことは、新鮮な貝類の細菌叢が海洋環境と温度の影響を受けている可能性を示唆している。4°Cで8日貯蔵したムール貝剥き身のSSOでは、*Psychrobacter alimentarius* (Parlapania et al., 2020)、4°Cで7日間貯蔵した生ガキでは、*Pseudoalteromonas* と *Vibrio* が優勢であった (Madigan et al.,

2014)。本論文では、これらの属は貯蔵後の試料の一部でのみ優勢であったか、すべての貯蔵後の試料では優勢ではなかった。これは、貯蔵後の VBC の増加が約 1 オーダーであったことに起因すると考えられる。10°C 貯蔵の 7 日以降の試料から官能的に不快臭が感じられたが、同様に生菌数の有意な増加が認められた 5°C 貯蔵の試料には、不快臭がほぼ感じられなかった。本論文の結果については、10°C、7 日の試料のみ *Shewanella* の存在比が 20% 以上になった。トリメチルアミン (TMA) は海産魚の特徴的な臭気成分であり、*Shewanella* のような細菌の増殖が臭気に寄与することがわかっている (Howgate et al., 2010)。したがって、このような菌叢の違いが、不快臭の発生に寄与したかもしれない。

しかしながら、本論文では、ムール貝の脂質、揮発性成分の変化および官能検査についての検討は、行われていない。今後、貯蔵中ムール貝の品質変化をさらに明らかにするため、これらについてのさらなる研究が必要である。

第 5 節 小括

本章では、貯蔵中のムール貝の品質変化を明らかにするために、ムール貝の致死率、SDH 活性、エキス成分、VBC、細菌叢について検討した。5°C および 10°C で貯蔵したムール貝の致死率は、0°C で貯蔵したものより低かった。0°C で 7 日以上貯蔵したムール貝は、5°C および 10°C で貯蔵したものよりも SDH 活性が有意に低かった。異なる温度で貯蔵した試料間で EUC に有意差は見られなかったが、5°C と 10°C で 12 日間貯蔵したムール貝では、0°C で貯蔵した試料

よりも Ala とコハク酸の TAV が有意に高いことが観察された。エキス成分, VBC, TAV, EUC に基づく階層的クラスター分析の結果は, 5°C および 10°C で貯蔵した試料は, 0°C で貯蔵した試料の代謝物組成, 細菌, 味の変化パターンが異なることが示唆された。NGS による解析では, 5°C と 10°C で貯蔵した試料は, 微生物の多様性が失われ, 貯蔵前と比較して変化していることが示された。これらの結果を考慮すると, ムール貝の高品質を維持するための最も適した貯蔵条件は, 5°C, 7 日以内であることが示された。

Table 2-1. Changes of mortality and succinate dehydrogenase (SDH) activity in mussels during storage at various temperature for 12 days.

| | 0°C | | | | |
|------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| Mortality (%) | 0 | 40 | 46 | 56 | 66 |
| SDH activity (mg/100g) | 742 ± 60.79 ^b | 1208 ± 357.21 ^a | 685 ± 78.99 ^{bc} | 388 ± 36.41 ^{Bbc} | 302 ± 98.86 ^{Bc} |

Table 2-1 (continued)

| | 5°C | | | | |
|--|-------------|---------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| | 0 | 8 | 14 | 16 | 18 |
| | 742 ± 60.79 | 1567 ± 824.84 | 810 ± 88.68 | 765 ± 76.27 ^A | 752 ± 76.63 ^A |

Table 2-1 (continued)

| | 10°C | | | | |
|--|-------------|------------|------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| | 0 | 4 | 8 | 24 | 38 |
| | 742 ± 60.79 | 807 ± 36.6 | 773 ± 39.4 | 688 ± 55.13 ^A | 789 ± 92.58 ^A |

The values indicate mean ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$).

The different capital letters at the same storage time indicate significantly different values ($P < 0.05$).

The different small letters at the same storage temperature indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Table 2-2. Moisture content, non-protein nitrogen (NPN), glycogen content, pH and viable bacteria count of mussels during storage at 0, 5 and 10°C for 12 days.

| | 0°C | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|--|------------------------------|--|-----------------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|--|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| Moisture content (%) | 77.92 ± 3.42 | | 76.98 ± 1.59 | | 76.22 ± 2.72 | | 79.51 ± 1.44 | | 75.68 ± 3.01 | |
| NPN (mg/100g) | 591.93 ± 91.67 ^b | | 795.37 ± 50.38 ^{Aa} | | 765.88 ± 33.52 ^a | | 671.57 ± 61.56 ^{ab} | | 589.14 ± 25.58 ^{Bb} | |
| Glycogen (g/100g) | 5.06 ± 1.04 ^c | | 10.73 ± 0.68 ^{Aa} | | 8.22 ± 1.46 ^{ab} | | 5.73 ± 1.12 ^{bc} | | 4.64 ± 1.17 ^c | |
| pH | 6.49 ± 0.01 ^b | | 6.50 ± 0.09 ^b | | 6.68 ± 0.09 ^{ab} | | 6.71 ± 0.05 ^{ab} | | 6.86 ± 0.16 ^a | |
| Mesophilic bacteria counts (logCFU/g) | 3.33 ± 0.49 | | 3.51 ± 0.49 | | 3.48 ± 0.64 | | 3.84 ± 0.12 | | 3.49 ± 0.07 ^B | |
| psychrotrophic bacteria counts (logCFU/g) | 3.74 ± 0.44 | | 3.71 ± 0.17 | | 3.72 ± 0.40 | | 3.86 ± 0.16 ^B | | 3.84 ± 0.07 ^B | |

Table 2-2 (continued)

| 5°C | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--|-----------------------------|--|---------------------------|--|-----------------------------|--|-----------------------------|--|--|
| 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | | |
| 77.92 ± 3.42 | | 78.01 ± 4.76 | | 75.62 ± 0.70 | | 77.33 ± 3.64 | | 74.97 ± 0.09 | | |
| 591.93 ± 91.67 | | 642.76 ± 26.60 ^B | | 638.32 ± 49.54 | | 606.80 ± 18.07 | | 747.99 ± 18.24 ^A | | |
| 5.06 ± 1.04 | | 6.14 ± 1.05 ^B | | 5.97 ± 1.93 | | 5.33 ± 0.13 | | 6.40 ± 1.11 | | |
| 6.49 ± 0.01 ^b | | 6.65 ± 0.04 ^{ab} | | 6.65 ± 0.12 ^{ab} | | 6.75 ± 0.06 ^a | | 6.76 ± 0.06 ^a | | |
| 3.33 ± 0.49 ^b | | 3.23 ± 0.13 ^b | | 3.71 ± 0.23 ^{ab} | | 3.54 ± 0.04 ^{ab} | | 4.10 ± 0.11 ^{Aa} | | |
| 3.74 ± 0.44 ^b | | 3.52 ± 0.17 ^b | | 3.77 ± 0.09 ^b | | 4.01 ± 0.12 ^{Abab} | | 4.55 ± 0.21 ^{Aa} | | |

Table 2-2 (continued)

| 10°C | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--|----------------------------|--|---------------------------|--|---------------------------|--|-----------------------------|--|--|
| 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | | |
| 77.92 ± 3.42 | | 77.56 ± 4.58 | | 79.26 ± 5.24 | | 74.97 ± 2.43 | | 76.53 ± 2.62 | | |
| 591.93 ± 91.67 | | 613.75 ± 5.42 ^B | | 676.60 ± 32.83 | | 654.46 ± 30.09 | | 718.68 ± 71.87 ^A | | |
| 5.06 ± 1.04 | | 5.75 ± 1.70 ^B | | 7.63 ± 0.68 | | 4.25 ± 0.64 | | 7.23 ± 1.89 | | |
| 6.49 ± 0.01 ^b | | 6.71 ± 0.10 ^{ab} | | 6.58 ± 0.06 ^{ab} | | 6.79 ± 0.04 ^a | | 6.73 ± 0.02 ^a | | |
| 3.33 ± 0.49 ^{ab} | | 2.76 ± 0.85 ^b | | 3.35 ± 0.37 ^{ab} | | 3.98 ± 0.38 ^{ab} | | 4.22 ± 0.27 ^{Aa} | | |
| 3.74 ± 0.44 ^b | | 3.74 ± 0.16 ^b | | 3.67 ± 0.26 ^b | | 4.38 ± 0.20 ^{Aa} | | 4.22 ± 0.13 ^{Ab} | | |

The values indicate mean ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$).

The different capital letters at the same storage time indicate significantly different values ($P < 0.05$).

The different small letters at the same storage temperature indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Table 2-3. Free amino acids contained in mussels during storage at 0, 5 and 10°C for 12 days (mg/100g).

| | 0°C | | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| NH ₃ | 2.5 ± 0.3 | ^c | 1.8 ± 0.6 | ^c | 4.1 ± 1.3 | ^{bc} | 5.6 ± 0.7 | ^b | 18.8 ± 1.4 | ^{Aa} |
| Histidine | 21.8 ± 11.1 | | 33.2 ± 4.7 | ^A | 29.4 ± 4.2 | | 18.9 ± 5.7 | | 16.9 ± 3.2 | ^B |
| Asparagine | 40.1 ± 13.4 | ^b | 65.9 ± 8.6 | ^{Aa} | 42.5 ± 5.7 | ^b | 30.6 ± 8.5 | ^b | 31.8 ± 3.9 | ^b |
| Taurine | 557.4 ± 45.9 | | 589.7 ± 111.1 | | 630.2 ± 96.3 | | 512.3 ± 61.4 | | 506.8 ± 19.7 | ^B |
| Serine | 103.1 ± 13.1 | ^{bc} | 143.6 ± 16.9 | ^{Aa} | 139.2 ± 7.2 | ^{ab} | 100.5 ± 23.6 | ^{bc} | 85.5 ± 5.5 | ^{Cc} |
| Glutamine | 63.0 ± 19.7 | | 97.6 ± 13.7 | ^A | 80.5 ± 7.9 | | 58.9 ± 30.1 | | 64.2 ± 12.6 | |
| Arginine | 136.8 ± 23.2 | ^{bc} | 190.6 ± 16.5 | ^{Aa} | 168.8 ± 16.3 | ^{ab} | 129.3 ± 19.8 | ^{bc} | 112.4 ± 17.0 | ^c |
| Glycine | 97.1 ± 17.4 | | 144.2 ± 33.4 | | 127.7 ± 9.2 | | 131.6 ± 27.9 | | 96.7 ± 20.4 | ^B |
| Aspartic acid | 90.9 ± 2.5 | | 92.7 ± 14.9 | | 101.3 ± 11.8 | ^A | 91.5 ± 19.0 | | 88.9 ± 2.6 | |
| Glutamic acid | 77.1 ± 5.3 | ^b | 108.9 ± 11.9 | ^{ab} | 111.2 ± 11.1 | ^a | 91.4 ± 11.0 | ^{ab} | 97.1 ± 3.8 | ^{Bab} |
| β-Alanine | 10.5 ± 1.8 | | 14.8 ± 7.2 | | 17.1 ± 2.1 | ^A | 16.8 ± 6.0 | | 13.8 ± 3.5 | |
| Threonine | 35.4 ± 12.9 | ^c | 73.1 ± 5.7 | ^{Aa} | 64.9 ± 12.6 | ^{ab} | 38.7 ± 13.5 | ^{bc} | 42.6 ± 3.2 | ^{Bbc} |
| Alanine | 117.3 ± 25.0 | ^c | 194.8 ± 5.7 | ^{Aa} | 167.4 ± 16.3 | ^{ab} | 129.4 ± 23.8 | ^{bc} | 129.3 ± 4.6 | ^{Bbc} |
| Proline | 41.6 ± 18.0 | | 73.9 ± 14.7 | ^A | 71.5 ± 20.3 | | 39.9 ± 23.2 | | 42.9 ± 2.7 | |
| Ornithine | 15.2 ± 0.5 | | 15.9 ± 1.7 | | 16.2 ± 3.8 | | 13.7 ± 3.6 | | 17.6 ± 2.3 | |
| Cystaine | 0.2 ± 0.1 | | 0.2 ± 0.0 | | 0.0 ± 0.0 | | 0.1 ± 0.0 | | 0.0 ± 0.0 | |
| Lysine | 58.4 ± 8.0 | | 80.7 ± 10.9 | ^A | 79.5 ± 22.5 | | 49.9 ± 23.4 | | 45.1 ± 9.3 | |
| Tyrosine | 35.8 ± 12.0 | | 55.2 ± 9.2 | ^A | 47.1 ± 7.5 | | 36.3 ± 22.3 | | 27.1 ± 1.0 | ^B |
| Methionine | 5.7 ± 0.9 | ^b | 14.8 ± 3.4 | ^{Aa} | 8.9 ± 1.5 | ^{ab} | 7.1 ± 3.7 | ^b | 6.1 ± 1.0 | ^b |
| Valine | 10.6 ± 2.2 | | 16.4 ± 0.9 | ^A | 16.1 ± 2.5 | | 13.3 ± 7.3 | | 12.0 ± 0.3 | |
| Isoleucine | 8.1 ± 2.0 | | 12.2 ± 0.9 | ^A | 11.3 ± 1.6 | | 10.6 ± 4.3 | | 9.8 ± 0.2 | |
| Leucine | 9.2 ± 1.9 | | 13.6 ± 1.4 | ^A | 11.5 ± 1.9 | | 10.9 ± 5.7 | | 10.7 ± 1.6 | |
| Phenylalanine | 7.4 ± 1.8 | | 12.6 ± 2.1 | ^A | 9.3 ± 1.4 | | 8.5 ± 4.7 | | 7.7 ± 0.3 | ^B |
| Sum | 1545.0 ± 133.7 | ^{ab} | 2046.3 ± 177.5 | ^{Aa} | 1955.8 ± 207.0 | ^{ab} | 1545.6 ± 292.0 | ^{ab} | 1483.6 ± 31.4 | ^{Bb} |

Table 2-3 (continued)

| 5°C | | | | | | | | | |
|----------|--------------------|----------|---------------------|----------|--------------------|----------|--------------------|----------|---------------------|
| 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| 2.5 ± | 0.3 ^b | 4.4 ± | 1.4 ^b | 3.0 ± | 1.0 ^b | 6.9 ± | 2.7 ^{ab} | 11.2 ± | 3.1 ^{Ba} |
| 21.8 ± | 11.1 | 19.8 ± | 4.1 ^B | 23.7 ± | 13.0 | 16.3 ± | 2.4 | 28.7 ± | 2.5 ^A |
| 40.1 ± | 13.4 | 32.7 ± | 9.1 ^B | 37.7 ± | 24.9 | 26.1 ± | 5.1 | 51.4 ± | 10.9 |
| 557.4 ± | 45.9 ^{ab} | 600.5 ± | 60.9 ^{ab} | 553.6 ± | 36.7 ^{ab} | 540.3 ± | 24.0 ^b | 719.5 ± | 107.3 ^{Aa} |
| 103.1 ± | 13.1 ^{ab} | 112.3 ± | 13.3 ^{ABb} | 106.9 ± | 20.4 ^b | 79.7 ± | 6.5 ^b | 146.8 ± | 4.3 ^{Aa} |
| 63.0 ± | 19.7 | 51.7 ± | 10.6 ^B | 68.0 ± | 44.0 | 39.9 ± | 3.0 | 69.5 ± | 8.9 |
| 136.8 ± | 23.2 | 128.1 ± | 2.3 ^B | 133.0 ± | 47.2 | 112.2 ± | 19.3 | 157.8 ± | 28.2 |
| 97.1 ± | 17.4 | 109.3 ± | 23.0 | 116.1 ± | 4.6 | 123.6 ± | 42.4 | 142.9 ± | 18.8 ^A |
| 90.9 ± | 2.5 | 81.5 ± | 16.7 | 76.1 ± | 7.8 ^{AB} | 62.8 ± | 6.4 | 77.8 ± | 14.4 |
| 77.1 ± | 5.3 ^b | 93.1 ± | 6.2 ^b | 97.4 ± | 20.2 ^b | 108.3 ± | 18.6 ^{ab} | 139.4 ± | 17.4 ^{Aa} |
| 10.5 ± | 1.8 ^b | 10.4 ± | 2.3 ^b | 11.6 ± | 1.3 ^{Bab} | 11.1 ± | 2.5 ^{ab} | 16.8 ± | 2.9 ^a |
| 35.4 ± | 12.9 ^b | 38.6 ± | 5.5 ^{Bab} | 41.4 ± | 17.1 ^{ab} | 33.5 ± | 1.2 ^b | 64.8 ± | 7.4 ^{Aa} |
| 117.3 ± | 25.0 ^b | 126.8 ± | 29.9 ^{Bab} | 133.0 ± | 42.6 ^{ab} | 148.1 ± | 21.2 ^{ab} | 197.6 ± | 7.3 ^{Aa} |
| 41.6 ± | 18.0 | 36.6 ± | 16.8 ^B | 50.0 ± | 23.8 | 42.6 ± | 12.3 | 60.6 ± | 6.3 |
| 15.2 ± | 0.5 | 13.8 ± | 0.5 | 15.0 ± | 3.4 | 13.5 ± | 3.8 | 18.7 ± | 1.6 |
| 0.2 ± | 0.1 | 0.3 ± | 0.1 | 0.1 ± | 0.1 | 0.1 ± | 0.0 | 0.1 ± | 0.0 |
| 58.4 ± | 8.0 | 49.4 ± | 10.4 ^B | 54.7 ± | 18.8 | 52.4 ± | 16.4 | 63.6 ± | 8.3 |
| 35.8 ± | 12.0 | 30.8 ± | 6.7 ^B | 34.6 ± | 14.1 | 24.7 ± | 3.2 | 44.4 ± | 1.6 ^A |
| 5.7 ± | 0.9 | 6.3 ± | 2.4 ^B | 9.6 ± | 7.4 | 3.6 ± | 0.7 | 9.3 ± | 2.5 |
| 10.6 ± | 2.2 | 9.7 ± | 2.7 ^B | 12.5 ± | 4.4 | 8.9 ± | 1.2 | 15.7 ± | 2.8 |
| 8.1 ± | 2.0 | 7.4 ± | 2.4 ^B | 9.5 ± | 3.1 | 6.9 ± | 0.6 | 12.0 ± | 3.0 |
| 9.2 ± | 1.9 | 8.1 ± | 2.4 ^B | 10.6 ± | 4.7 | 8.1 ± | 0.8 | 13.0 ± | 3.3 |
| 7.4 ± | 1.8 | 6.8 ± | 1.6 ^B | 7.5 ± | 3.6 | 6.6 ± | 0.8 | 12.0 ± | 1.1 ^A |
| 1545.0 ± | 133.7 ^b | 1578.3 ± | 103.5 ^{Bb} | 1605.7 ± | 291.9 ^b | 1476.4 ± | 88.9 ^b | 2073.5 ± | 141.1 ^{Aa} |

Table 2-3 (continued)

| | | 10°C | | | | | | | | | |
|----------|---------------------|----------|--------------------|----------|--------------------|----------|---------------------|----------|------------------|----------------|--|
| 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | | | |
| 2.5 ± | 0.3 ^b | 3.6 ± | 1.8 ^b | 5.5 ± | 1.9 ^b | 23.3 ± | 12.8 ^a | 11.7 ± | 3.0 | ^{Bab} | |
| 21.8 ± | 11.1 | 17.8 ± | 3.0 ^B | 21.3 ± | 2.2 | 23.1 ± | 3.2 | 23.5 ± | 6.2 | ^{AB} | |
| 40.1 ± | 13.4 | 29.8 ± | 5.1 ^B | 32.5 ± | 5.8 | 30.5 ± | 3.6 | 48.5 ± | 12.9 | | |
| 557.4 ± | 45.9 | 499.4 ± | 67.3 | 513.4 ± | 22.4 | 568.5 ± | 86.4 | 599.5 ± | 38.9 | ^{AB} | |
| 103.1 ± | 13.1 ^{ab} | 89.0 ± | 10.3 ^{Bb} | 114.8 ± | 6.6 ^{ab} | 101.6 ± | 2.4 ^{ab} | 117.4 ± | 13.8 | ^{Ba} | |
| 63.0 ± | 19.7 | 51.1 ± | 9.8 ^B | 57.0 ± | 4.5 | 37.3 ± | 5.4 | 83.5 ± | 35.5 | | |
| 136.8 ± | 23.2 | 118.3 ± | 26.7 ^B | 126.3 ± | 16.5 | 100.3 ± | 15.4 | 145.9 ± | 38.9 | | |
| 97.1 ± | 17.4 ^b | 112.6 ± | 20.4 ^{ab} | 123.6 ± | 11.4 ^{ab} | 106.2 ± | 12.2 ^{ab} | 137.4 ± | 5.0 | ^{Aa} | |
| 90.9 ± | 2.5 | 79.7 ± | 24.3 | 60.0 ± | 21.3 ^B | 70.8 ± | 14.5 | 69.6 ± | 8.3 | | |
| 77.1 ± | 5.3 ^c | 94.5 ± | 12.9 ^{bc} | 114.1 ± | 7.5 ^{ab} | 118.2 ± | 4.8 ^{ab} | 127.8 ± | 7.3 | ^{Aa} | |
| 10.5 ± | 1.8 ^b | 10.1 ± | 1.0 ^b | 20.5 ± | 2.3 ^{Aa} | 12.9 ± | 1.3 ^{ab} | 18.8 ± | 6.5 ^a | | |
| 35.4 ± | 12.9 | 36.2 ± | 7.8 ^B | 49.9 ± | 2.6 | 44.2 ± | 9.1 | 48.9 ± | 9.4 | ^{AB} | |
| 117.3 ± | 25.0 | 137.2 ± | 5.5 ^B | 168.7 ± | 28.8 | 175.2 ± | 32.6 | 173.9 ± | 16.2 | ^A | |
| 41.6 ± | 18.0 | 41.4 ± | 11.5 ^{AB} | 55.2 ± | 9.4 | 40.3 ± | 6.6 | 54.6 ± | 17.0 | | |
| 15.2 ± | 0.5 ^{ab} | 14.5 ± | 0.7 ^{ab} | 14.6 ± | 3.0 ^{ab} | 11.9 ± | 2.7 ^b | 20.4 ± | 2.5 ^a | | |
| 0.2 ± | 0.1 | 0.2 ± | 0.2 | 0.0 ± | 0.0 | 0.3 ± | 0.1 | 0.1 ± | 0.1 | | |
| 58.4 ± | 8.0 | 48.0 ± | 9.5 ^B | 60.8 ± | 9.4 | 46.0 ± | 3.1 | 63.2 ± | 16.9 | | |
| 35.8 ± | 12.0 | 29.0 ± | 8.0 ^B | 32.7 ± | 1.7 | 30.6 ± | 1.3 | 38.5 ± | 5.7 | ^A | |
| 5.7 ± | 0.9 | 6.4 ± | 2.2 ^B | 6.7 ± | 1.3 | 5.1 ± | 1.5 | 9.6 ± | 2.1 | | |
| 10.6 ± | 2.2 | 9.7 ± | 1.9 ^B | 11.1 ± | 2.1 | 9.9 ± | 1.6 | 13.9 ± | 4.1 | | |
| 8.1 ± | 2.0 | 6.9 ± | 1.5 ^B | 8.7 ± | 1.2 | 7.4 ± | 1.1 | 10.6 ± | 3.0 | | |
| 9.2 ± | 1.9 | 8.2 ± | 1.9 ^B | 9.3 ± | 1.2 | 7.2 ± | 1.5 | 11.9 ± | 3.4 | | |
| 7.4 ± | 1.8 | 6.5 ± | 1.3 ^B | 7.8 ± | 0.4 | 7.0 ± | 1.9 | 8.9 ± | 1.4 | ^B | |
| 1545.0 ± | 133.7 ^{ab} | 1450.1 ± | 60.9 ^{Bb} | 1614.9 ± | 41.9 ^{ab} | 1577.7 ± | 100.1 ^{ab} | 1838.1 ± | 192.7 | ^{Aa} | |

The values indicate mean ± standard deviation of triplicate determinations (n = 3).

The different capital letters at the same storage time indicate significantly different values (P < 0.05).

The different small letters at the same storage temperature indicate significantly different values (P < 0.05)

Table 2-4. Nucleotide contained in mussels during storage at 0, 5 and 10°C for 12 days (µmol/g).

| | 0°C | | | | |
|-------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| Hx | 0.18 ± 0.03 | 0.32 ± 0.19 | 0.09 ± 0.01 | 0.13 ± 0.04 | 0.09 ± 0.02 |
| IMP | 0.91 ± 0.15 | 1.44 ± 1.23 | 0.61 ± 0.15 | 0.59 ± 0.18 | 0.67 ± 0.21 |
| Ad | 1.18 ± 0.56 | 1.26 ± 0.63 | 0.46 ± 0.12 | 0.45 ± 0.03 | 0.53 ± 0.05 |
| HxR | 0.19 ± 0.09 | 0.16 ± 0.05 | 0.11 ± 0.02 | 0.18 ± 0.04 | 0.19 ± 0.00 ^B |
| AMP | 2.17 ± 0.60 | 4.68 ± 2.40 | 3.02 ± 0.45 | 2.63 ± 0.59 | 1.79 ± 0.42 ^B |
| ADP | 1.30 ± 0.64 | 1.23 ± 0.71 | 1.47 ± 0.40 | 0.93 ± 0.33 | 0.55 ± 0.17 ^B |
| ATP | 0.32 ± 0.11 | 0.32 ± 0.08 ^A | 0.18 ± 0.13 | 0.23 ± 0.11 | 0.12 ± 0.05 |
| AdR | 0.27 ± 0.12 ^b | 0.66 ± 0.29 ^{ab} | 0.22 ± 0.04 ^{Bb} | 0.84 ± 0.34 ^{Bab} | 1.77 ± 1.03 ^a |
| Total | 6.24 ± 1.01 ^b | 9.41 ± 1.87 ^a | 5.94 ± 0.67 ^b | 5.14 ± 1.02 ^b | 3.95 ± 0.78 ^{Bb} |

Table 2-4 (continued)

| | 5°C | | | | |
|-------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| | 0.18 ± 0.03 | 0.59 ± 0.48 | 0.12 ± 0.03 | 0.13 ± 0.04 | 0.23 ± 0.06 |
| | 0.91 ± 0.15 ^{ab} | 1.69 ± 0.73 ^a | 0.45 ± 0.29 ^b | 0.59 ± 0.18 ^b | 0.38 ± 0.06 ^b |
| | 1.18 ± 0.56 | 1.08 ± 0.68 | 0.67 ± 0.24 | 0.45 ± 0.03 | 0.61 ± 0.12 |
| | 0.19 ± 0.09 | 0.20 ± 0.06 | 0.19 ± 0.08 | 0.18 ± 0.04 | 0.30 ± 0.07 ^{AB} |
| | 2.17 ± 0.60 | 2.06 ± 1.09 | 2.47 ± 1.37 | 2.63 ± 0.59 | 4.45 ± 1.50 ^A |
| | 1.30 ± 0.64 | 0.67 ± 0.15 | 1.58 ± 1.60 | 0.93 ± 0.33 | 1.32 ± 0.62 ^{AB} |
| | 0.32 ± 0.11 | 0.15 ± 0.04 ^B | 0.33 ± 0.42 | 0.23 ± 0.11 | 0.14 ± 0.03 |
| | 0.27 ± 0.12 ^c | 0.41 ± 0.18 ^{bc} | 0.35 ± 0.09 ^{Bbc} | 1.40 ± 0.34 ^{ABa} | 0.99 ± 0.25 ^{ab} |
| Total | 6.24 ± 1.01 | 6.46 ± 1.00 | 5.81 ± 3.02 | 5.14 ± 1.02 | 7.43 ± 1.91 ^A |

Table 2-4 (continued)

| 10°C | | | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| 0.18 ± 0.03 ^b | 0.51 ± 0.06 ^a | 0.21 ± 0.09 ^b | 0.13 ± 0.09 ^b | 0.17 ± 0.10 ^b |
| 0.91 ± 0.15 ^b | 2.29 ± 1.19 ^a | 1.24 ± 0.81 ^b | 0.24 ± 0.10 ^b | 0.52 ± 0.17 ^b |
| 1.18 ± 0.56 | 0.86 ± 0.32 | 0.77 ± 0.37 | 0.36 ± 0.10 | 0.74 ± 0.48 |
| 0.19 ± 0.09 | 0.29 ± 0.05 | 0.31 ± 0.13 | 0.47 ± 0.31 | 0.43 ± 0.15 ^A |
| 2.17 ± 0.60 ^{bc} | 1.45 ± 0.72 ^c | 3.38 ± 0.69 ^{ab} | 1.78 ± 0.68 ^{bc} | 4.68 ± 0.17 ^{Aa} |
| 1.30 ± 0.64 ^{ab} | 0.47 ± 0.22 ^b | 2.13 ± 0.82 ^a | 0.82 ± 0.36 ^{ab} | 2.16 ± 0.37 ^{Aa} |
| 0.32 ± 0.11 | 0.15 ± 0.06 ^{AB} | 0.36 ± 0.21 | 0.28 ± 0.14 | 0.15 ± 0.06 |
| 0.27 ± 0.12 ^b | 0.50 ± 0.14 ^b | 0.79 ± 0.21 ^{Ab} | 1.65 ± 0.13 ^{Aa} | 2.02 ± 0.56 ^a |
| 6.24 ± 1.01 ^{ab} | 6.02 ± 2.47 ^{ab} | 8.39 ± 1.59 ^a | 4.08 ± 0.64 ^b | 8.85 ± 0.70 ^{Aa} |

Hx, hypoxanthine; IMP, inosine mono-phosphate; Ad, adenine; HxR, Inosine;

AMP, adenosine mono-phosphate; ADP, adenosine di-phosphate; ATP, adenosine tri-phosphate;

AdR, adenosine

The values indicate mean ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$).

The different capital letters at the same storage time indicate significantly different values ($P < 0.05$).

The different small letters at the same storage temperature indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Table 2-5. Organic acid contained in mussels during storage at 0, 5 and 10°C for 12 days (mg/100g).

| | 0°C | | | | | | | | | |
|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--|------|--|-------|--|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| Malic acid | 44.93 ± 15.06 | 54.43 ± 21.69 | 49.73 ± 10.61 | 45.28 ± 11.62 | 56.15 ± 8.61 | | | | | |
| Succinic acid | 47.68 ± 10.08 ^b | 33.56 ± 6.92 ^{Bb} | 24.69 ± 6.04 ^{Cb} | 90.14 ± 19.96 ^a | 44.29 ± 1.09 ^{Bb} | | | | | |
| Lactic acid | 54.06 ± 1.64 | 58.73 ± 8.61 | 56.29 ± 11.37 | 58.60 ± 4.61 | 63.81 ± 12.46 | | | | | |
| Acetic acid | 13.57 ± 5.09 ^b | 14.28 ± 3.60 ^b | 17.89 ± 4.01 ^b | 23.28 ± 3.06 ^{ab} | 28.71 ± 3.74 ^a | | | | | |
| Propionic acid | 0.00 ± 0.00 ^c | 0.00 ± 0.00 ^c | 0.00 ± 0.00 ^{Bc} | 42.15 ± 4.77 ^a | 26.36 ± 1.67 ^{Bb} | | | | | |

Table 2-5 (continued)

| | 5°C | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------|--|------|--|-------|--|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| 44.93 ± 15.06 | 32.87 ± 7.36 | 58.69 ± 48.64 | 35.48 ± 10.96 | 59.70 ± 5.17 | | | | | | |
| 47.68 ± 10.08 ^b | 63.52 ± 9.09 ^{Ab} | 95.85 ± 25.34 ^{Bb} | 139.86 ± 72.90 ^{ab} | 203.85 ± 21.40 ^{Aa} | | | | | | |
| 54.06 ± 1.64 ^b | 54.10 ± 4.71 ^b | 51.10 ± 3.80 ^b | 64.08 ± 6.45 ^{ab} | 73.99 ± 9.36 ^a | | | | | | |
| 13.57 ± 5.09 ^c | 12.74 ± 5.59 ^c | 24.35 ± 5.85 ^{bc} | 30.39 ± 0.86 ^{ab} | 40.12 ± 3.43 ^a | | | | | | |
| 0.00 ± 0.00 ^b | 0.00 ± 0.00 ^b | 43.93 ± 15.48 ^{Aa} | 56.59 ± 8.15 ^a | 52.56 ± 7.66 ^{Aa} | | | | | | |

Table 2-5 (continued)

| | 10°C | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------|--|------|--|-------|--|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| 44.93 ± 15.06 ^{ab} | 29.78 ± 2.06 ^b | 57.26 ± 24.60 ^{ab} | 42.96 ± 12.85 ^{ab} | 85.84 ± 26.84 ^a | | | | | | |
| 47.68 ± 10.08 ^c | 65.12 ± 13.95 ^{Ac} | 158.92 ± 7.09 ^{Ab} | 150.32 ± 19.43 ^b | 208.09 ± 17.40 ^{Aa} | | | | | | |
| 54.06 ± 1.64 | 57.85 ± 3.38 | 66.43 ± 20.81 | 62.51 ± 8.75 | 67.14 ± 5.01 | | | | | | |
| 13.57 ± 5.09 | 19.08 ± 4.03 | 61.12 ± 60.59 | 38.20 ± 12.46 | 30.32 ± 10.46 | | | | | | |
| 0.00 ± 0.00 ^b | 0.00 ± 0.00 ^b | 69.46 ± 20.43 ^{Aa} | 41.08 ± 15.69 ^a | 41.11 ± 4.98 ^{Aa} | | | | | | |

The values indicate mean ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$).

The different capital letters at the same storage time indicate significantly different values ($P < 0.05$).

The different small letters at the same storage temperature indicate significantly different values ($P < 0.05$).

Table 2-6. Changes in the taste active values (TAVs) and the equivalent umami concentration (EUC) of mussels during storage at 0, 5 and 10°C for 12 days.

| FAAs/nucleotides /succinic acid | Taste attribute (\pm) ¹⁾ | Threshold ^b (mg/100 g) ²⁾ | 0°C | | | | |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| Histidine | Bitter (-) | 698.2 | 0.03 \pm 0.02 | 0.05 \pm 0.01 ^A | 0.04 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.01 | 0.02 \pm 0.00 ^B |
| Serine | Sweet/bitter/sour (+) | 262.7 | 0.39 \pm 0.05 ^{bc} | 0.55 \pm 0.06 ^{Aa} | 0.53 \pm 0.03 ^{ab} | 0.38 \pm 0.09 ^{bc} | 0.33 \pm 0.02 ^{Cc} |
| Arginine | Bitter (-) | 1306.5 | 0.10 \pm 0.02 ^{bc} | 0.15 \pm 0.01 ^{Aa} | 0.13 \pm 0.01 ^{ab} | 0.10 \pm 0.02 ^{bc} | 0.09 \pm 0.01 ^c |
| Glycine | Sweet (+) | 187.7 | 0.52 \pm 0.09 | 0.77 \pm 0.18 | 0.68 \pm 0.05 | 0.70 \pm 0.15 | 0.52 \pm 0.11 ^B |
| Aspartic acid | Umami (+) | 53.2 | 1.71 \pm 0.05 | 1.74 \pm 0.28 | 1.90 \pm 0.22 ^A | 1.72 \pm 0.36 | 1.67 \pm 0.05 |
| Glutamic acid | Umami (+) | 16.2 | 4.76 \pm 0.33 ^b | 6.73 \pm 0.73 ^a | 6.87 \pm 0.69 ^a | 5.65 \pm 0.68 ^{ab} | 6.00 \pm 0.24 ^{Bab} |
| Threonine | Sweet (+) | 416.9 | 0.08 \pm 0.03 ^b | 0.18 \pm 0.01 ^{Aa} | 0.16 \pm 0.03 ^{ab} | 0.09 \pm 0.03 ^{bc} | 0.10 \pm 0.01 ^{Bbc} |
| Alanine | Sweet (+) | 106.9 | 1.10 \pm 0.23 ^c | 1.82 \pm 0.05 ^{Aa} | 1.57 \pm 0.15 ^{ab} | 1.21 \pm 0.22 ^{bc} | 1.21 \pm 0.04 ^{Bbc} |
| Proline | Sweet/bitter (+) | 287.8 | 0.14 \pm 0.06 | 0.26 \pm 0.05 ^A | 0.25 \pm 0.07 | 0.14 \pm 0.08 | 0.15 \pm 0.01 |
| TAV Lysine | Sweet/bitter (-) | 1169.5 | 0.05 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.01 ^A | 0.07 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.01 |
| Tyrosine | Bitter (-) | 72.5 | 0.49 \pm 0.17 | 0.76 \pm 0.13 ^A | 0.65 \pm 0.10 | 0.50 \pm 0.31 | 0.37 \pm 0.01 ^B |
| Methionine | Bitter/sweet (-) | 74.6 | 0.08 \pm 0.01 ^b | 0.20 \pm 0.05 ^{Aa} | 0.12 \pm 0.02 ^{ab} | 0.10 \pm 0.05 ^b | 0.08 \pm 0.01 ^b |
| Valine | Bitter/sweet (-) | 351.5 | 0.03 \pm 0.01 | 0.05 \pm 0.00 ^A | 0.05 \pm 0.01 | 0.04 \pm 0.02 | 0.03 \pm 0.00 |
| Isoleucine | Bitter (-) | 131.2 | 0.06 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 ^A | 0.09 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.03 | 0.07 \pm 0.00 |
| Leucine | Bitter (-) | 144.3 | 0.06 \pm 0.01 | 0.09 \pm 0.01 ^A | 0.08 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.04 | 0.07 \pm 0.01 |
| Phenylalanine | Bitter (-) | 743.4 | 0.01 \pm 0.00 | 0.02 \pm 0.00 ^A | 0.01 \pm 0.00 | 0.01 \pm 0.01 | 0.01 \pm 0.00 ^B |
| IMP | Umami (+) | 20.9 | 1.51 \pm 0.26 | 2.40 \pm 2.05 | 1.02 \pm 0.25 | 0.98 \pm 0.30 | 1.12 \pm 0.36 |
| AMP | Umami (+) | 86.8 | 0.87 \pm 0.24 | 1.87 \pm 0.96 | 1.21 \pm 0.18 | 1.05 \pm 0.24 | 0.72 \pm 0.17 ^B |
| Succinic acid | Sour/Umami (+) | 10.6 | 4.50 \pm 0.95 ^b | 3.17 \pm 0.65 ^{Bb} | 2.33 \pm 0.57 ^{Cb} | 8.50 \pm 1.88 ^a | 4.18 \pm 0.10 ^{Bb} |
| EUC | | | 8.26 \pm 1.16 ^{ab} | 17.84 \pm 7.44 ^a | 9.40 \pm 1.57 ^{ab} | 7.50 \pm 2.14 ^b | 7.13 \pm 1.78 ^b |

Table 2-6 (continued)

| 5°C | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| 0.03 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 ^B | 0.03 ± 0.02 | 0.02 ± 0.00 | 0.04 ± 0.00 ^A |
| 0.39 ± 0.05 ^b | 0.43 ± 0.05 ^{ABab} | 0.41 ± 0.08 ^b | 0.30 ± 0.02 ^b | 0.56 ± 0.02 ^{Aa} |
| 0.10 ± 0.02 | 0.10 ± 0.00 ^B | 0.10 ± 0.04 | 0.09 ± 0.01 | 0.12 ± 0.02 |
| 0.52 ± 0.09 | 0.58 ± 0.12 | 0.62 ± 0.02 | 0.66 ± 0.23 | 0.76 ± 0.10 ^A |
| 1.71 ± 0.05 | 1.53 ± 0.31 | 1.43 ± 0.15 ^{AB} | 1.18 ± 0.12 | 1.46 ± 0.27 |
| 4.76 ± 0.33 ^b | 5.75 ± 0.38 ^b | 6.02 ± 1.25 ^b | 6.69 ± 1.15 ^{ab} | 8.62 ± 1.07 ^{Aa} |
| 0.08 ± 0.03 ^{ab} | 0.09 ± 0.01 ^{Bb} | 0.10 ± 0.04 ^{ab} | 0.08 ± 0.00 ^b | 0.16 ± 0.02 ^{Aa} |
| 1.10 ± 0.23 ^b | 1.19 ± 0.28 ^{Bab} | 1.24 ± 0.40 ^{ab} | 1.39 ± 0.20 ^{ab} | 1.85 ± 0.07 ^{Aa} |
| 0.14 ± 0.06 | 0.13 ± 0.06 ^B | 0.17 ± 0.08 | 0.15 ± 0.04 | 0.21 ± 0.02 |
| 0.05 ± 0.01 | 0.04 ± 0.01 ^B | 0.05 ± 0.02 | 0.04 ± 0.01 | 0.05 ± 0.01 |
| 0.49 ± 0.17 | 0.43 ± 0.09 ^B | 0.48 ± 0.19 | 0.34 ± 0.04 | 0.61 ± 0.02 ^A |
| 0.08 ± 0.01 | 0.08 ± 0.03 ^B | 0.13 ± 0.10 | 0.05 ± 0.01 | 0.12 ± 0.03 |
| 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 ^B | 0.04 ± 0.01 | 0.03 ± 0.00 | 0.04 ± 0.01 |
| 0.06 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 ^B | 0.07 ± 0.02 | 0.05 ± 0.00 | 0.09 ± 0.02 |
| 0.06 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 ^B | 0.07 ± 0.03 | 0.06 ± 0.01 | 0.09 ± 0.02 |
| 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 ^B | 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 | 0.02 ± 0.00 ^A |
| 1.51 ± 0.26 ^{ab} | 2.82 ± 1.21 ^a | 0.76 ± 0.48 ^b | 0.93 ± 0.63 ^b | 0.64 ± 0.10 ^b |
| 0.87 ± 0.24 | 0.83 ± 0.44 | 0.99 ± 0.55 | 0.81 ± 0.23 | 1.78 ± 0.60 ^A |
| 4.50 ± 0.95 ^b | 5.99 ± 0.86 ^{Ab} | 9.04 ± 2.39 ^{Bb} | 13.19 ± 6.88 ^{ab} | 19.23 ± 2.02 ^{Aa} |
| 8.26 ± 1.16 ^{ab} | 13.93 ± 4.83 ^a | 6.13 ± 2.30 ^b | 6.23 ± 1.68 ^b | 10.24 ± 2.59 ^{ab} |

Table 2-6 (continued)

| 10°C | | | | |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0day | 1day | 3day | 7day | 12day |
| 0.03 ± 0.02 | 0.03 ± 0.00 ^B | 0.03 ± 0.00 | 0.03 ± 0.00 | 0.03 ± 0.01 ^{AB} |
| 0.39 ± 0.05 ^{ab} | 0.34 ± 0.04 ^{Bb} | 0.44 ± 0.03 ^{ab} | 0.39 ± 0.01 ^{ab} | 0.45 ± 0.05 ^{Ba} |
| 0.10 ± 0.02 | 0.09 ± 0.02 ^B | 0.10 ± 0.01 | 0.08 ± 0.01 | 0.11 ± 0.03 |
| 0.52 ± 0.09 ^b | 0.60 ± 0.11 ^{ab} | 0.66 ± 0.06 ^{ab} | 0.57 ± 0.07 ^{ab} | 0.73 ± 0.03 ^{ABa} |
| 1.71 ± 0.05 | 1.50 ± 0.46 | 1.13 ± 0.40 ^B | 1.33 ± 0.27 | 1.31 ± 0.16 |
| 4.76 ± 0.33 ^c | 5.84 ± 0.80 ^{bc} | 7.05 ± 0.46 ^{ab} | 7.30 ± 0.30 ^a | 7.89 ± 0.45 ^{Aa} |
| 0.08 ± 0.03 | 0.09 ± 0.02 ^B | 0.12 ± 0.01 | 0.11 ± 0.02 | 0.12 ± 0.02 ^{AB} |
| 1.10 ± 0.23 | 1.28 ± 0.05 ^B | 1.58 ± 0.27 | 1.64 ± 0.31 | 1.63 ± 0.15 ^A |
| 0.14 ± 0.06 | 0.14 ± 0.04 ^{AB} | 0.19 ± 0.03 | 0.14 ± 0.02 | 0.19 ± 0.06 |
| 0.05 ± 0.01 | 0.04 ± 0.01 ^B | 0.05 ± 0.01 | 0.04 ± 0.00 | 0.05 ± 0.01 |
| 0.49 ± 0.17 | 0.40 ± 0.11 ^B | 0.45 ± 0.02 | 0.42 ± 0.02 | 0.53 ± 0.08 ^A |
| 0.08 ± 0.01 | 0.09 ± 0.03 ^B | 0.09 ± 0.02 | 0.07 ± 0.02 | 0.13 ± 0.03 |
| 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 ^B | 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.00 | 0.04 ± 0.01 |
| 0.06 ± 0.01 | 0.05 ± 0.01 ^B | 0.07 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | 0.08 ± 0.02 |
| 0.06 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 ^B | 0.06 ± 0.01 | 0.05 ± 0.01 | 0.08 ± 0.02 |
| 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 ^B | 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.00 ^B |
| 1.51 ± 0.26 ^{ab} | 3.82 ± 1.98 ^a | 2.06 ± 1.35 ^{ab} | 0.40 ± 0.16 ^b | 0.86 ± 0.28 ^b |
| 0.87 ± 0.24 ^{bc} | 0.58 ± 0.29 ^c | 1.35 ± 0.28 ^{ab} | 0.71 ± 0.27 ^{bc} | 1.87 ± 0.07 ^{Aa} |
| 4.50 ± 0.95 ^c | 6.14 ± 1.32 ^{Ac} | 14.99 ± 0.67 ^{Ab} | 14.18 ± 1.83 ^b | 19.63 ± 1.64 ^{Aa} |
| 8.26 ± 1.16 ^{ab} | 15.95 ± 4.95 ^a | 13.05 ± 6.89 ^{ab} | 4.27 ± 0.46 ^b | 10.58 ± 0.90 ^{ab} |

The values indicate mean ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$).

The different capital letters at the same storage time indicate significantly different values ($P < 0.05$).

The different small letters at the same storage temperature indicate significantly different values ($P < 0.05$).

¹⁾ Taste attribute: (+) pleasant; (-) unpleasant (Shallenberger et al. 1993).

²⁾ Taste threshold values (mg/100 g) (Meyer et al. 2016).

Table 2-7. OTU number and alpha diversity index of of mussels during storage at 0, 5 and 10°C for 12 days.

| | 0°C | | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| Good's coverage | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| Shannon | 5.82 ± 0.82 | 5.26 ± 0.70 | 5.13 ± 0.38 | 5.20 ± 1.09 | 5.55 ± 0.79 ^A | | | | | |
| Simpson | 0.94 ± 0.05 | 0.90 ± 0.05 | 0.92 ± 0.04 | 0.88 ± 0.11 | 0.93 ± 0.06 | | | | | |
| OTUs | 220.67 ± 29.84 | 203.67 ± 37.81 | 154.67 ± 18.58 | 191.67 ± 24.70 ^A | 195.00 ± 41.39 ^A | | | | | |
| Chao1 | 220.67 ± 29.84 | 204.33 ± 37.42 | 154.67 ± 18.58 | 192.33 ± 25.77 ^A | 195.33 ± 41.96 ^A | | | | | |
| ACE | 220.67 ± 29.84 | 204.38 ± 37.45 | 154.67 ± 18.58 | 192.39 ± 25.86 ^A | 195.33 ± 41.96 ^A | | | | | |

Table 2-7 (continued)

| | 5°C | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| Good's coverage | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| Shannon | 5.82 ± 0.82 | 4.32 ± 1.17 | 5.68 ± 0.17 | 4.46 ± 0.77 | 4.01 ± 0.19 ^B | | | | | |
| Simpson | 0.94 ± 0.05 | 0.78 ± 0.17 | 0.96 ± 0.01 | 0.88 ± 0.05 | 0.89 ± 0.03 | | | | | |
| OTUs | 220.67 ± 29.84 ^a | 174.67 ± 43.10 ^{ab} | 190.00 ± 33.00 ^{ab} | 113.00 ± 53.03 ^{ABbc} | 73.00 ± 2.65 ^{Bc} | | | | | |
| Chao1 | 220.67 ± 29.84 ^a | 175.33 ± 42.92 ^{ab} | 190.67 ± 33.01 ^{ab} | 113.67 ± 54.01 ^{ABbc} | 73.33 ± 2.08 ^{Bc} | | | | | |
| ACE | 220.67 ± 29.84 ^a | 175.33 ± 42.92 ^{ab} | 190.72 ± 33.08 ^{ab} | 113.67 ± 54.01 ^{ABbc} | 73.33 ± 2.08 ^{Bc} | | | | | |

Table 2-7 (continued)

| | 10°C | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0day | | 1day | | 3day | | 7day | | 12day | |
| Good's coverage | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| Shannon | 5.82 ± 0.82 ^a | 5.44 ± 0.27 ^a | 5.59 ± 0.58 ^a | 3.33 ± 0.30 ^b | 4.68 ± 0.29 ^{ABa} | | | | | |
| Simpson | 0.94 ± 0.05 ^a | 0.92 ± 0.02 ^{ab} | 0.93 ± 0.04 ^a | 0.81 ± 0.07 ^b | 0.89 ± 0.02 ^{ab} | | | | | |
| OTUs | 220.67 ± 29.84 ^a | 183.00 ± 59.81 ^{ab} | 216.67 ± 28.18 ^{ab} | 56.33 ± 7.02 ^{Bc} | 125.67 ± 18.58 ^{Bbc} | | | | | |
| Chao1 | 220.67 ± 29.84 ^a | 183.67 ± 60.43 ^{ab} | 217.00 ± 29.55 ^{ab} | 56.67 ± 7.09 ^{Bc} | 125.67 ± 18.58 ^{Bbc} | | | | | |
| ACE | 220.67 ± 29.84 ^a | 183.72 ± 60.48 ^{ab} | 217.06 ± 29.62 ^{ab} | 56.67 ± 7.09 ^{Bc} | 125.67 ± 18.58 ^{Bbc} | | | | | |

The values indicate mean ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$).

The different capital letters at the same storage time indicate significantly different values ($P < 0.05$).

The different small letters at the same storage temperature indicate significantly different values ($P < 0.05$).

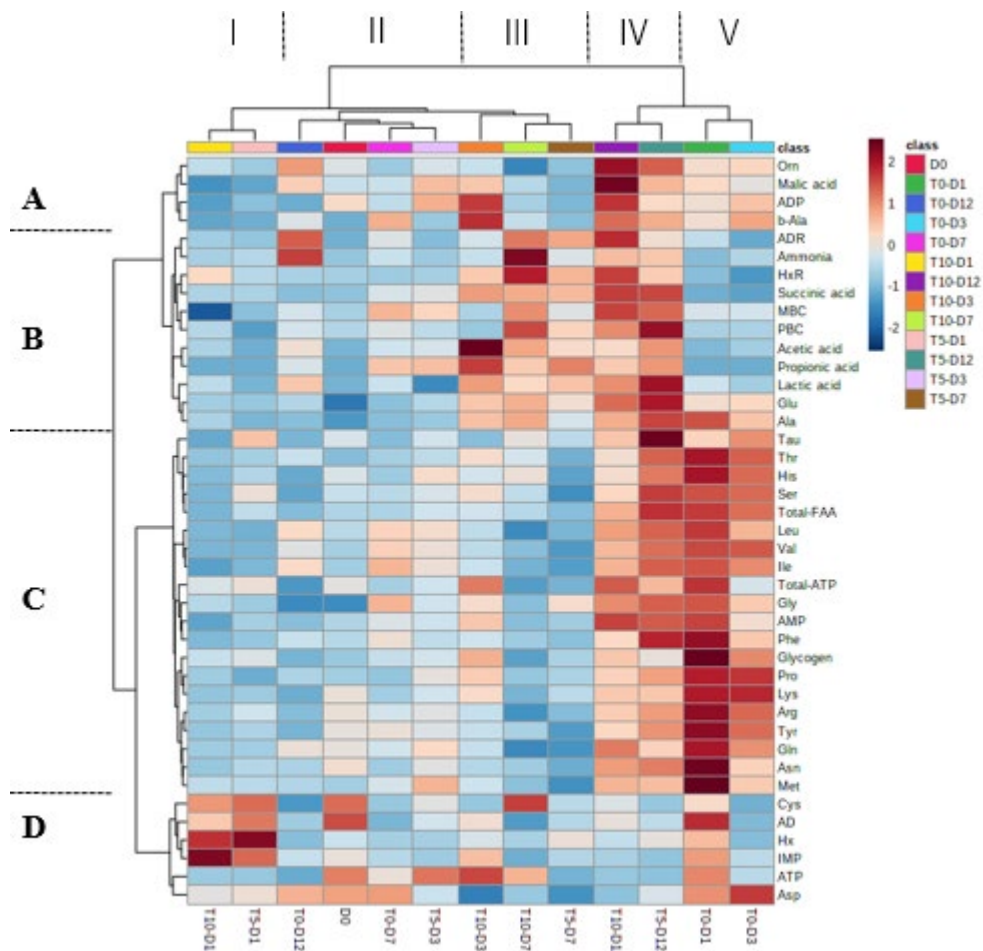


Fig. 2-1 Figure 1. Heatmap visualization and hierarchical clustering on the levels of extractive components and visible bacterial counts of mussel flesh with different storage conditions.

Data were auto-scaled between 0 (mean) and 1 (standard deviation).

The grey scale indicates a relative value (white, low value; black, high value).

The class indicates the storage conditions. Storage time is indicated as ex. D7 (storage for 7 d). The numbers on the left of the storage time indicate storage temperature.

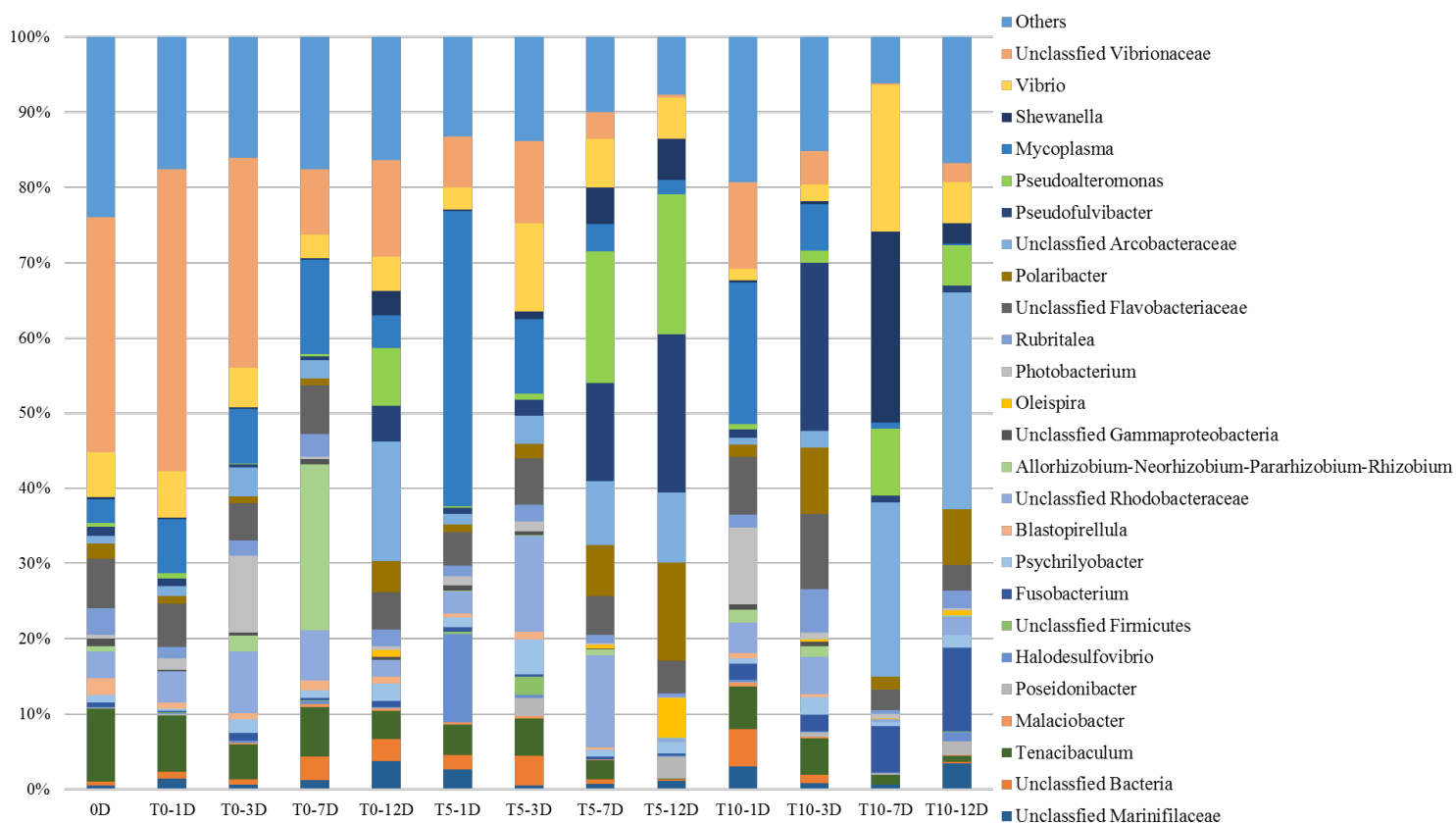


Fig. 2-2. Relative abundance at the genus level based on the classification of partial 16S rDNA sequences of bacteria from mussels during storage at various temperature for 12 days.

The class indicates the storage conditions. Storage time is indicated as ex. D7 (storage for 7 d). The numbers on the left of the storage time indicate storage temperature.

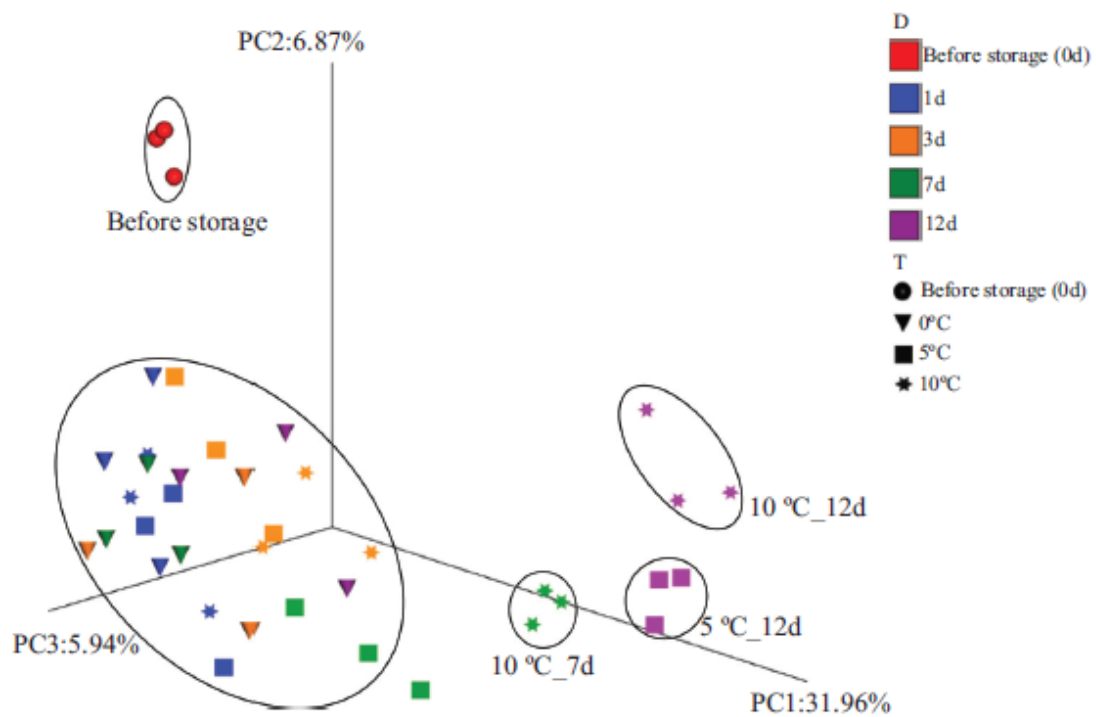


Fig. 2-3 Principal coordinate analysis based on microbial community at genera level in live mussels during 12 days of storage at various temperatures. The analysis was based on the weighted UniFrac method. D is the storage time (days), and T is the storage temperature ($^{\circ}\text{C}$). Storage time is indicated as ex. D7 (storage for 7 days). The temperature on the left side of the storage time indicates the storage temperature.

第 3 章 氷蔵におけるマダイ (*Pagrus major*) 肉の品質および菌叢の変化

第 1 節 緒言

魚は栄養価が高く、美味しい食品である。しかし、魚は貯蔵による品質が劣化しやすく、外観や臭いに変化する。この劣化は、微生物の活動や貯蔵中の脂肪酸の酸化によるものである。一方、魚の腐敗は、SSOとして知られる微生物群によって引き起こされる (Gram and Huss, 1996)。また、魚肉中での食中毒細菌の増加は食中毒のリスクに直接的に関連する。したがって、魚を安全かつおいしく食べるためには、貯蔵中の魚肉の品質と細菌叢の変化挙動を明らかにする必要がある。

貯蔵中の魚肉における細菌増殖については幅広く研究が行われており、そのほとんどはプレートカウント法で測定されてきた (Parlapani et al., 2015; Anagnostopoulos et al., 2023; Calanche et al., 2020)。しかし、環境中に存在する細菌の大半は、培地での培養が困難であることが知られている (Broekaert et al., 2011)。一方、NGS技術では、サンプルに直接得られた DNA から、数千から数百万の 16S rRNA 遺伝子アンプリコンのシーケンシングが可能である (Mayo et al., 2014)。この技術により、これまで困難であった難培養性の細菌や少数しか存在しない細菌を分析することが可能である (Mayo et al., 2014)。これまでに、NGSによって貯蔵中の魚肉の菌叢変化を解析した研究がいくつか報告されている (Parlapani et al., 2018; Parlapani et al., 2021; Li et al., 2021)。これらの研究において、

Pseudomonas と *Shewanella* が腐敗における最も重要な微生物として特徴づけられており，一方，*Psychrobacter* も腐敗後に優勢になることが示されている（Parlapani et al. 2021）。

魚は赤身魚と白身魚に分けられることが知られている。これまでに，赤身魚の代表としてのブリを微生物の影響のない条件で貯蔵し，揮発性成分の変化を調べたところ，DM と OM の揮発性成分の変化挙動が異なることが報告されている（Tanimoto et al., 2018; Kitabayashi et al., 2019），これらの研究では，2,3-ブタンジオンのような DM 中の閾値が小さい臭気成分が貯蔵前後のブリ肉の匂いに寄与しており，貯蔵中に DM 中で増加する揮発性成分は主にアルデヒド，ケトン，アルコール化合物であり，これらの物質は脂質酸化によって生成されると推定されている。白身魚についても，アルコールやカルボニル化合物が魚臭に大きく寄与している（Leduc et al., 2012; Wierda et al., 2006; Alasalvar et al., 2005; Syropoulou et al., 2021）。しかし，白身魚の貯蔵中の揮発性成分の変化について，OM だけでなく DM も行った研究は，コイに関するもの以外に見当たらない（Li et al., 2018）。一方，いくつかの揮発性成分は，微生物の増殖に伴って大きく変化するため，腐敗と密接関係していると考えられている（Faidra et al., 2021; Parlapani et al., 2015）。また，TMA は海産魚の特徴的な臭気成分であるが，*Shewanella* のような細菌の増殖がなければ，臭気への寄与は少ないことが示している（Howgate P., 2010）。

タイ科の魚は世界中に約 100 種存在し，そのうち 13 種が日本近海に生息している（<https://www.maff.go.jp/j/heya/sodan/1110/02.html>）。マダイはそれらの中で商品価値の高い高級魚であり，日本における

主要な養殖海産魚種のひとつである (Anagnostopoulos et al., 2022)。したがって、貯蔵中のマダイの揮発性物質と菌叢の変化を明らかにし、その品質劣化の過程を解明することに重要である。これまでの、ヨーロッパ海域におけるマダイの貯蔵中の揮発性成分や菌叢の変化に関する研究いくつか報告されている (Parlapani et al., 2015; Parlapani et al., 2017; Anagnostopoulos et al., 2022)。これらの研究は、マダイの SSO は *Psychrobacter* および/または *Pseudomonas* であることが示唆し、2-メチルブタナール、3-メチルブタナール、3-メチル-1-ブタノール、(E)-2-ペンテン-1-オールのようないくつかの揮発性成分は、マダイの腐敗マーカーと推定している。しかし、我々の知る限り、白身魚の代表であるマダイの OM および DM それぞれの揮発物質の貯蔵による変化を詳細に検討した研究は認められない。さらに、魚の生息地域の違いが、貯蔵中の揮発性成分や菌叢の変化に影響する可能性もある。

そこで本章では、氷蔵したマダイの腐敗に至るまでの揮発性成分と菌叢の変化を明らかにし、腐敗したマダイの特徴的な揮発性成分と SSO を同定することを目的とした。また、腐敗指標として生菌数、TVBN、TMA の分析、脂質酸化の指標として TBARS の分析、マダイ肉の官能評価を行った。

第 2 節 実験方法

第 1 項 試料調製

試料として養殖マダイ (*Pagrus major*, 体重 1.77 ± 0.07 kg) 9 尾を広島市地元の市場から購入し、無作為に 3 群分け、当日に氷蔵

して 9 時間以内に実験室に搬入した。魚をフィレにし、生理食塩水で軽く洗い、OM と DM が含まれるように 1cm の厚さにスライスした。0 日目の試料を除くすべての試料をラップで包み、ポリエチレン袋に入れ、氷を入れた発泡スチロールの箱に 21 日間貯蔵した。発泡スチロール箱の氷は 1~2 日ごとに取り替えた。サンプリングは貯蔵 0, 3, 7, 14, 21 日目に行った。サンプリングは試料を OM と DM に切り分け、それぞれ無菌的ミンチにし、5.0g はサンプリング日に VBC 測定に使用し、残りは他の分析までに -80°C で貯蔵した。

第 2 項 VBC の測定

試料 5.0 g をストマッカーバッグに移し、滅菌ペプトン-生理食塩水 (0.85% NaCl, 0.1% ペプトン) 45 mL を加え、ストマッカー内で 2 分間攪拌した。懸濁液 1 mL を採取し、9 mL の滅菌ペプトン-生理食塩水を入れた試験管に加え、10 倍希釈液を調製した。段階希釈も同様に行った。培地には、標準寒天培地 (PCA) と 2.5% NaCl-BPG 寒天培地 (藤井ら, 1983) を用い、それぞれ一般生菌数または低温細菌を検出するために用いた。PCA はポリペプトン 5g, 酵母エキス 2.5g, グルコース 1g, NaCl 5g, 寒天 15g を蒸留水 1L に溶解し、pH7.0±0.2 とした。BPG は、ポリペプトン 5g, 魚エキス 5g, グルコース 1g, MgSO₂ · 7H₂O 2.5g, NaCl 5g, KCl 1g, 寒天 15g を pH7.0±0.2 の蒸留水 1L に溶解した。希釈した試料溶液 1mL をシャーレに加え、各培地を注ぎ、混合した後、室温で約 1 時間放置して固化させた。PCA は 35±1°C で 72 時間、BPG は 20±1°C で 7 日間培養した。培養後、コロニー数を測定し、各試料の VBC (Log CFU/g) を算出した。PCA の生菌数が 7 Log CFU/g に達した時点で、初期腐

敗とした (ICMSF 1986)。

第 3 項 TVBN, TMA および TBARS の測定

TVBN は, Conway (1948) の方法に従って測定した。すなわち, 試料 1.0 g を 10 mL の 5%トリクロロ酢酸でホモジナイズし, 10,000 x g で 20 分間遠心分離した。上清を試料溶液とし, 分析まで-30°C で貯蔵した。試料溶液と 1%ホウ酸溶液それぞれ 1.0mL をコンウェイユニットの内室と外室に入れ, 外室をさらに 1.0mL の飽和炭酸カリウム溶液を加えた。蓋をしたまま試料と炭酸カリウム溶液を混合し, 37°C で 80 分以上放置した後, 0.01M 硫酸溶液でホウ酸を滴定した。ブランクとして, 1.0 mL の 5%トリクロロ酢酸を用いた。TVBN 含量は, 滴定値から以下の式で算出した:

$$\text{TVBN (mg/100)} = 0.28 \times (X - b) \times 1.08 \times 100/0.1$$

ここで, X は試料の滴定値 (mL), b はブランクの滴定値 (mL) 示す。

TMA の含有量の測定は Niizeki et al (2003) の方法に若干の修正を加えて測定した。すなわち, 試料は, TVBN と同様にトリクロロ酢酸により抽出した。バイアル管に 65% KOH 1.0 mL を入れ, ベンゼン 0.5 mL, 試料溶液 2.0 mL および内部標準物の 0.20% トリエチルアミン (TEA) 0.1 mL を加えて, 30 秒間振とうした後, 30°C で 10 分間静置し, さらに 2 分間ボルテックスした。10 分間静置後, 上層を試料し, ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) により分析した。分析は, GC - MS - QP2010 Ultra システム (島津製作所

(株)) で、カラムとして、Rtx - Volatile Amine (30 mm × 0.32 mm, RESTEK, Bellefonte, PA, U.S.) を用いた。キャリアガスとしてヘリウムを用い、線速度 50cm/sec で使用した。注入ポートの温度は 250°C、トランスファーラインの温度は 250°C、イオン源の温度は 200°C とした。カラムオーブンは、初期温度 100°C で 10 分間維持し、その後 20°C/分の速度で 250°C まで昇温し、5 分間保持した。試料は、スプリットモード (スプリット比, 40 : 1) で 1.0 μL を注入した。質量分析計は 70eV の electron impact (EI) モードで作動させた。フラグメントイオン (m/z) は : TMA (42, 58, 59) , TEA (58, 86) と設定し、TMA を標準試料として、内部標準法で検量線を作成し、定量した。

TBARS については、まず、試料を 1.15% KCl (w/v) でホモジナイズした。この懸濁液 200 μL に 0.6% チオバルビツール酸-エチレンジアミン四酢酸 (TBA-EDTA) 溶液 (5.2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (w/v) 0.20 ml, 0.8% ブチルヒドロキシトルエン酢酸溶液 (w/v) 50 μl , 0.8% TBA 溶液 (w/v) 1.5 ml および 3.0 mM EDTA 1.70 ml) 650 μL に酢酸緩衝液 (pH3.5) 150 μL を加えて攪拌後、氷中で 60 分間放置し、さらに沸騰水浴中で 60 分間加熱した。急冷後、ブタノール-ピリジン混液 (15 : 1) を加え、700 × g で 10 分間遠心分離し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax 340PC384, molecular devices, California, U.S.) を用いて上清の 532 nm の吸光度を測定した。標準試料として 25 μM の 1,1,3,3-テトラエトキシプロパンを使用し、魚肉 1g あたりの TBARS 含量 (nmol/g) を算出した。

第 4 項 揮発性成分の測定

揮発性成分の捕集は、固相微量抽出（SPME）法により行った。試料 1.2 g に飽和食塩水 6.0 mL を加えて、24,000 rpm でホモジナイズし、4°C、15,000 x g、10 分間遠心分離した。上清 5 mL と内部標準液（0.010% シクロヘキサノール溶液）5.0 µL をバイアル管に取り、バイアルを密閉して、40°C・60 分間保持し、揮発性成分をヘッドスペースに平衡化後、40°C・30 分間 SPME ファイバー 65 µm Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene（Supelco, Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.）吸着した。揮発性成分の捕集後、ファイバーを GC-MS の注入口に挿入して分析した。

分析には GC-MS-QP2010 Ultra システム（島津製作所（株））を用い、カラムは Inert Cap Pure-WAX（60 m×0.25 mm、膜厚 0.25 µm、ジーエルサイエンス（株）、東京、日本）を使用した。キャリアガスにはヘリウムを用い、ヘッド圧を 170.0kPa で一定とした。揮発性成分の分離は以下の条件で行った：揮発性成分は、液体窒素を用いてクライオフォーカシングを行いながら、スプリットレスモードで 1 分間 GC に導入され、その後スプリットモードを 5 分間続けた（スプリット比：10）。カラムオープン温度は最初 35°C で 10 分間保持した後、4°C/分の昇温速度で 230°C まで昇温して 1 分間保持し、その後 10°C/分の昇温速度で 250°C まで昇温して 10 分間保持した。MS は、m/z 35～200 をスキャンし、トータルイオンクロマトグラムとして取得した。インターフェース温度は 230°C、イオン源温度は 200°C とした。

化合物の同定は、マススペクトルライブラリ NIST11（National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, U.S.）の MS、および/または標準物質の Kovats 保持指標（KI）値の比較によって

行った。KIは n-アルカン(C5-25)の同族列を用いて決定した(Kovats, 1965)。各揮発性物質は、その揮発性物質の全イオンピーク面積と内部標準物質のピーク面積の比を用いて半定量し、魚肉 1g あたりの揮発性物質 (ng/g) を算出した。

第 5 項 官能評価

広島県立大学の 23.5±3.3 歳の学生 42 名をパネラーとし、尺度法で各貯蔵期間の試料の臭いを比較した。各試料 5g をアルミホイルで覆ったバイアル管に入れ、室温で 2 時間放置した後、官能評価を行った。官能評価は 0, 3, 7, 14, 21 日間貯蔵した OM の試料について行った。パネルには事前にこれらの評価項目を説明し、官能評価のトレーニングを行った。完全に腐敗したマダイの OM を基準として評価を「5」とし、「腐敗臭」の相対値を 5 段階（1：非常に弱い，2：弱い，3：中間，4：強い，5：非常に強い）で評価した。貯蔵前のまたいの OM を基準として評価を「1」とし、「生魚としての好ましさ」の相対値を 5 段階（1：非常に良い，2：良い，3：許容できる，4：許容できない，5：非常に許容できない）で評価した。生魚としての好ましさについては、4 点以上が不可食として評価した。

第 6 項 DNA 抽出，PCR および NGS

First PCR までの方法は、以下の部分を除き、第 2 章第 12 項に示した。First PCR は、0 日試料は Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA（タカラバイオ（株））を用い、他の試料は Tks Gflex™ DNA Polymerase（タカラバイオ（株））を用いて行った。サーマルサイクリングは、細菌数に依存して、30～40 回増幅サイクルを行った。

Second PCR および NGS の方法は第 2 章第 12 項に示した。

第 7 項 シーケンスデータの処理と解析

シーケンスデータの処理と解析の方法は第 2 章第 13 項に示した。菌叢の階層クラスター分析 (HCA) は、存在比が 0% のデータを最小存在比の値を用いて補正後、存在比を常用対数に変換し、MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) を用い、Ward 法で行った。

第 8 項 統計解析

実験はすべて 3 連で行った。3 つの試料から得られたデータは、平均値および標準偏差 (SD) として示した ($n = 3$)。SPSS Statistics 23 (日本 IBM (株)) を用いて、平均値間の有意差の検定は Duncan の多重比較で行った ($P < 0.05$)。OM と DM 間の有意差検定は、スチューデント t 検定または Welch の t 検定を行った ($P < 0.05$)。揮発性成分の半定量値について SIMCA13 (Sartorius Stedim Biotech, Auvergne, France) を用いて主成分分析を行った。

第 3 節 結果

第 1 項 VBC

氷蔵中におけるマダイ筋肉中の一般生菌数と低温細菌数の変化を Table 3-1 に示す。0 日と比較して、PCA と BPG の菌数は OM と DM とともに 14 日目から有意に増加し ($P < 0.05$)、21 日目に 7 Log CFU/g を超えた。一般生菌数は、21 日目に OM と DM の両者で同じオーダー

一となった。同様に，21日目の低温細菌数も，OMとDMで同じオーダーであった。OMとDMを比較すると，一般生菌数と低温細菌数の両方が，3日目にOMが有意に高値を示した ($P < 0.05$)。

第2項 TVBN, TMA および TBARS

氷蔵中におけるマダイ筋肉中のTVBN, TMA および TBARS の変化を Table 3-2 に示す。OM中のTVBNは，貯蔵前のサンプルと比較して，貯蔵7日後に有意に増加した ($P < 0.05$)。OM中のTMAは，貯蔵0日目に比べて21日目に有意に増加した ($P < 0.05$)。OM中のTBARSは，貯蔵中に有意な変化は認められなかった。一方，DMのTBARSは貯蔵14日目以降に貯蔵前と比較して有意に増加した ($P < 0.05$)。OMとDMを比較すると，DMのTBARSは，3日目を除き，同じ貯蔵日においてOMより有意に高かった ($P < 0.05$)。

第3項 揮発性成分

氷蔵中におけるマダイ筋肉中の揮発性化合物の変化を Table 3-3 に示す。OMとDMには計128のピークが検出され。このうち112成分の化合物が同定された。OM中の41の揮発性成分（ケトン7成分，アルデヒド7成分，アルコール4成分，芳香族3成分，カルボン酸3成分，テルペン1成分，アルカン1成分，フラン1成分，Unknown 14成分）および42成分の揮発性成分（ケトン7成分，芳香族5成分，アルカン4成分，アルデヒド4成分，アルコール4成分，カルボン酸2成分，フラン1成分，エステル1成分，Unknown 14成分）；DM中の14成分の揮発性成分（アルデヒド5成分，ケトン4成分，フラン1成分，アルコール1成分，カルボン酸1成分，未知化合物

2成分) および 35成分の揮発性成分(ケトン 9成分, アルコール 7成分, フラン 1成分, エステル 1成分, 芳香族 1成分, アルデヒド 1成分, Unknown 15成分)が, 貯蔵 14日目と 21日目にそれぞれ貯蔵前と比較して有意に増加した($P < 0.05$)。貯蔵前と比較して 14日目と 21日目の両貯蔵日数で有意に増加した成分は, OMにおいては 28成分, DMにおいては 5成分であった($P < 0.05$)。これらの成分の中で, (*E, E*)-3, 5-オクタジエン-2-オン, Unknown (KI:1538), Unknown (KI:1603)の3つの揮発性成分は, OMとDMの両筋肉に共通していた($P < 0.05$)。一方, OM中の揮発性成分の中で, 14日目では 6成分(アルデヒド 3成分, アルコール 2成分, アルカン 1成分), 21日目では 5成分(アルデヒド 2成分, アルコール 2成分, アルカン 1成分)が, 貯蔵前と比較して有意に減少した($P < 0.05$)。これら成分の中で, オクタン, (*E*)-4-ヘプタナール, オクタナール, 1-オクタナールの4つの揮発性成分が, 14日目と 21日目の両貯蔵日数で有意に減少した($P < 0.05$)。

氷蔵中におけるマダイ筋肉中の揮発性成分に基づく主成分分析の結果を Fig.3-1 に示す。Fig.3-1A のスコアプロットの結果は, PC1 は全分散の 40.1%, PC2 は 16.8%を説明した。貯蔵 14日目の DM の 1 バッチを除き, 貯蔵 7日までと貯蔵 14日以上の試料は PC1 で区別され, 貯蔵 14日以上の OM と DM は PC2 で区別された。Fig.3-1B のローディングプロットの結果から, 前者の分類には(*E, E*)-3, 5-オクタジエン-2-オンや 1-ノナノールなどの揮発性成分が, 後者の分類には 2, 3-オクタンジオンやオクタン酸などの揮発性成分が関連する揮発性成分として同定された。

第 4 項 官能評価

氷蔵中におけるマダイ OM の官能評価結果を Table 3-4 に示す。貯蔵前のサンプルに比べ、貯蔵 14 日以上貯蔵したサンプルでは、腐敗臭と好ましさのスコアが両方共に有意に増加した ($P < 0.05$)。さらに貯蔵 21 日目に好ましさが 4 点以上 (許容できない) となった。

第 5 項 NGS 解析

氷蔵中におけるマダイ OM の OTU 数と α 多様性指数の変化を Table 3-5 に示す。Good's coverage 指数はすべての貯蔵期間において 100% であり、これは得られたリード数が多様性解析の推定に十分であることが示す。OTU 数およびすべての α 多様性指数は、貯蔵 14 日以上または 21 日以上 of サンプルで、貯蔵 0 日目のサンプルと比較して有意に減少した ($P < 0.05$)。

氷蔵中におけるマダイ OM の属レベルの微生物群集に基づく PCoA の結果を Fig.3-2 に示す。PCoA スコアの 2 つの主成分 (それぞれ PCo1 と PCo2) において、全分散の 63% と 18% を占めた。PCo1 は 7 日目以前と 14 日目以降のサンプルを区別した。PCo2 は貯蔵前のサンプルと 7 日目以降のサンプルを分離した。

氷蔵した OM の門および属レベルの菌叢組成を Fig.3-3 に示す。門レベル (Fig.3-3A) では、0 日目と 7 日目では、*Firumicutes* (41.8% と 20.1%)、*Proteobacteria* (31.1% と 40.6%) と *Actinobacteriota* (12.7% と 17.8%) の 3 門が優勢であった。*Proteobacteria* は貯蔵中に存在比が増加し、14 日目には 92.5%、21 日目には 84.5% に達し、優勢となった。属レベルでは (Fig.3-3B)、0 日目に *Staphylococcus* (17.8%) の存在比が最も多く、次いで *Sphingobium* (4.6%)、

Tyzzrella (4.3%), *Acinetobacter* (4.1%) の順であった。7 日目に *Pseudomonas* (17.0%) が存在比最も多く、次いで *Flavobacterium* (11.1%), *Acinetobacter* (5.9%) 未分類の *Micrococcaceae* (5.4%) の順であった。14 日目には、*Pseudomonas* (86.2%) の存在比が急増し、未分類の *Micrococcaceae* (4.5%), *Acinetobacter* (2.8%), *Flavobacterium* (2.2%) がそれに続いた。21 日目には、*Pseudomonas* (76.6%) の存在比がわずかに減少し、未分類の *Micrococcaceae* (8.5%), *Brochothrix* (5.6%), *Shewanella* (3.6%) がそれらに続いた。

氷蔵した OM 中の細菌の存在比に基づく門および属レベルの HCA ヒートマップを Fig.3-4 に示す。HCA は、門、属レベルで同様に、14 日目と 21 日目、0 日目と 7 日目の試料をそれぞれにクラスター I、クラスター II に分類した。門レベルでは、HCA は全ての門を 2 つのクラスターに分類した：クラスター A には *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* および *Firumicutes*；クラスター B には *Fusobacteriota*, *Planctomycetota*, *Deinococcota* が含まれた (Fig.3-4A)。クラスター I の試料には、クラスター A に含まれる *Proteobacteria* の存在比が特に大きく、*Actinobacteriota* が続いた。クラスター II の試料では、*Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, および *Firumicutes* は高い存在比を示した。属レベルでは、HCA は全ての属を 3 つのクラスターに分類した：クラスター A は 2 つのサブクラスターに分けられ、1 つ (A1) は *Brochothrix*, *Shewanella* および *Carnobacterium*, もう 1 つ (A2) は *Pseudomonas*, *Acinetobacter* および *Psychrobacter*；クラスター B は *Staphylococcus*；クラスター C は *Bacillus* および *Sphigobium* を含んだ (Fig.3-4B)。クラスター I の試

料は、クラスターAに含まれた細菌（特に *Pseudomonas*）の高い存在比に対して、クラスターIIの試料では、クラスターA2およびクラスターBに含まれた細菌（特に *Staphylococcus*）が高い存在比を示した。

第4節 考察

氷蔵したマダイのVBCは、中温細菌、低温細菌ともに、両筋肉において、貯蔵0日目に3オーダーであり、その後、14日目に6オーダーに増加し、貯蔵21日目には腐敗基準である7オーダーを超え、8オーダーとなった。Anagnostopoulos et al (2022)は、氷蔵したマダイの初期細菌数は4 Log CFU/gで、貯蔵12日目に7 Log CFU/gを超えること、Cai et al (2014)は、氷蔵したマダイの初期細菌数は2 Log CFU/gであり、貯蔵12日目に7 Log CFU/gとなったことを報告している。鮮魚の細菌数のレベルは、通常3~4 Log CFU/gであり (Socaciu et al., 2018)、本論文の結果は、その範囲内にあり、マダイの先行研究の中間的な値であった。生菌数の貯蔵中の変化については、本研究が先行研究と比べて、その増加が遅延しており、初期の生菌数や菌叢の違いによるかもしれない。

TVBN含量は、腐敗指標の1つであり30 mg/100gを超えると、腐敗と判断される (Koseki et al., 2006)。Civera et al (1995)は、3種のタイ科魚類において、冷蔵保存中にTVBNがゆっくりと規則的に増加することを報告している。Ahimbisibwe et al (2010)は、マダイのTVBNは氷蔵15日後に24.75 mg/100gになり、腐敗指標を超えなかったと報告しており、本論文の結果と一致した。TMAは、魚

介類中のさまざまな細菌によってトリメチルアミンオキシド (TMAO) から生成される (Gram and Dalgaard 2002; Rathod et al 2022)。これらの細菌の中に *Shewanella* も含まれる。(Howgate P., 2010)。本論文において貯蔵後に *Shewanella* の存在比の増加していることから、TMA の増加が細菌の作用である可能性が示唆された。本論文における OM 中の TMA は貯蔵 0 日目と比較して 21 日目に有意な増加が認められたが ($P < 0.05$)、その含量は、貯蔵期間を通じて、様々な魚種における TMA の許容限界値 (42~63 $\mu\text{g/g}$) を超えなかった (Endo 1973; Nevigato et al., 2018)。したがって、マダイの腐敗時の指標として、TVBN および TMA は不十分なことが示唆された。本論文において DM 中の TBARS は、貯蔵中に増加し、貯蔵前の 0.11 $\mu\text{mol/g}$ から初期腐敗時 (貯蔵 14 日目) に 0.64 $\mu\text{mol/g}$ になった、この変化パターンは以前のブリの DM 研究と類似な結果であった (Tanimoto et al. 2018)。また、DM 中の TBARS は、VBC (Table 3-1) と同様に貯蔵前と比べて貯蔵 14 日目に有意に増加したことから、マダイ肉の品質変化の指標となる可能性がある。しかし、貯蔵 21 日目には 14 日目に比べて有意な増加は観察されなかったから、DM 中の TBARS はマダイの腐敗の指標としては適切ではないかもしれない。Cai et al (2014) は、16 日間氷蔵したマダイの TBARS が初期値 0.26 mg MDA/kg から 0.63 mg MDA/kg に増加することを報告している。一方、本研究の OM では、TBARS がほとんど変化しなかった。このことは、先行研究の試料に DM が含まれていた可能性が考えられた。

Tanimoto et al (2018) は、腐敗に至る前のブリ肉の貯蔵において、OM ではアルデヒドが減少し、アルコール類が増加したが、DM では、

アルデヒド類などの多くの揮発性生成物が著しく増加したと報告している。Li et al (2018) は、コイの DM は、OM よりも多くの種類の揮発性物質を含み、両筋肉中のケトン類の割合は貯蔵後にかなり増加すると報告している。本論文において、腐敗に至るまで貯蔵した試料は、DM と OM の両筋肉に中の多くのケトン類およびアルコール類の増加が認められたが、OM がより多くの種類の揮発性成分が有意に変化した。したがって、これらの結果の相違は、揮発性成分の変化パターンが、白身魚と赤身魚、あるいは魚種によって異なることを示唆される。カルボニル化合物は、不飽和脂肪酸の酸化による二次酸化生成物である。しかし、本論文では、酸化二次生成物を用いた脂質酸化指標である TBARS の結果が、貯蔵中に DM の酸化が進行するのに対して、OM ではそうではないことを示唆した。この矛盾の理由については、揮発性成分の増加した貯蔵 14 日目以降に、両筋肉部位において生菌数の増加が認められたことから揮発性成分の増加に対して細菌が関与している可能性が考えられるが、今後、詳細な検討を要する。

3-メチル-ブタナールは、Soncin et al (2008) が提案した氷蔵中におけるヨーロッパヘダイの品質指標のひとつである。(E, E)-3, 5-オクタジエン-2-オンは腐敗したブリの揮発成分として報告されており (Lin et al., 1995), n-3 脂肪酸の酸化によって生成される (Marina et al., 2019)。本論文において、3-メチル-ブタナールは DM, (E, E)-3, 5-オクタジエン-2-オンは両筋肉部位の貯蔵により有意な増加が認められたことから、これらが腐敗に特徴的な揮発性成分であることが示唆される。一方、多くの研究が、いくつかの揮発性成分の生成が微生物の活動に関連することを報告している。例えば、アセ

トイン（3-ヒドロキシ-2-ブタノン）の生成は，*P. phosphoreum*（Olafsdottir et al., 2005）や乳酸菌の生菌数が一定の菌密度に達したとき（Jonsdottir et al., 2008）に起こるとされている。本論文においてもアセトインがそれぞれ DM または OM 中に貯蔵 14 日目以降に貯蔵前に比べて有意に増加した（ $P < 0.05$ ）。Vladimir et al（2016）は，*Pseudomonas* が 2-ノナノン，2-ヘプタノン，2-ウンデカノンおよびジメチルジスルフィドを生成することを報告している。香りの閾値が低い揮発性ケトン類は，におい全体への寄与が大きく，多価不飽和脂肪酸の酸化，アミノ酸の分解，または微生物の活動によって生成される（Josephson et al., 1986; Chung et al., 1994; Pan et al., 1994）。本論文では，2-ノナノンが貯蔵 21 日目に OM と DM の両方で貯蔵 0 日目に比べて有意に増加した。2-ヘプタノンは OM で 21 日目に，2-ウンデカノンは OM で 14 日目以降に，DM で 21 日目にそれぞれ貯蔵前と比べて有意に増加した。菌叢解析の結果，腐敗が進むにつれて *Pseudomonas* が優勢になった。また，これらの揮発性成分は，*Pseudomonas* の存在比が急増した 14 日目以降に増加したことから，*Pseudomonas* によって生産された可能性が高いことが示唆された。

α 多様性指数は，ある地域に生息する生物群集が，種や個体においてどれだけ多様であるかを示す値である。本論文において，OM の OTU 数およびすべての α 多様性指標は，貯蔵 14 日以上または 21 日以上の試料で，貯蔵前（0 日）の試料と比較して有意に減少した。したがって，これらの減少は，マダイの身の細菌多様性が氷蔵中に失われたことを示している。主座標分析の結果から，菌叢が，貯蔵前，貯蔵 7 日後，貯蔵 14 日以上の試料間で異なっていることが示さ

れた。また、貯蔵 7 日目のバッチ間の距離は他の試料よりも大きく、このことは、他の貯蔵日数と比較してバッチ間の菌叢の違いが大きいことを示唆している。したがって、貯蔵の初期において、試料により異なる細菌が増殖し、バッチ間で菌叢が異なるが、最終的に類似の菌叢組成に到達することを示唆している。また、各 α 多様性指数および系統解析の結果から、貯蔵により、*Pseudomonas* が増殖し、優勢となり、菌叢の多様性が失われたが、その後、*Shewanella* や *Brochothrix* といった微生物の増殖により、腐敗が更に進行したことを示唆している。

貯蔵 0 日目の OM で *Staphylococcus* が最も高い組成比で検出された。清水ら (1991) は、市販の魚介類から *Staphylococcus* が検出されることを報告しており、本論文の結果を支持する。一部の *Staphylococcus* は魚の潜在的病原菌であり、これらの細菌は魚に細菌性疾患を引き起こす可能性があるため、この属の菌の貯蔵中に増殖した場合、注意が必要である (Haifaa HA. 2014)。Parlapani et al (2016) は、氷蔵ヨーロッパヘタイでは保存時間の増加とともに *Pseudomonas* が優勢になることを報告しており、これは本論文の結果と一致した。Anagnostopoulos et al (2022) はヨーロッパ海域の異なるバッチのマダイに *Psychrobacter* または *Pseudomonas* が貯蔵によりそれぞれに優勢になることを報告した。Parlapani et al (2018) は異なる地域で漁獲したヨーロッパヘダイの腐敗に至るまでは *Pseudomonas* または *Psychrobacter* はそれぞれに優勢になったと報告した。本論文では、氷蔵 14 日に *Pseudomonas* が優勢になり、*Psychrobacter* の存在比の増加が認められなかった。したがって、魚肉中の菌叢の変化パターンは、生息地域や漁獲時の処理により異なる

ることが示唆される。一方、本論文で貯蔵 21 日目に *Shewanella* や *Brochothrix* の存在比が増加した、*Shewanella* のような細菌の増殖が TMA に寄与することがわかっている (Howgate et al., 2010)。Marta et al (2016) は *Brochothrix thermosphacta* は、貯蔵 Atlantic salmon のアセトインの生成に関連すると報告し、Koutsoumanis et al (1999) は腐敗に至るまで貯蔵した *Boops boops* に *Brochothrix thermosphacta* の増加が認められたことを報告している。本論文の官能評価の結果も貯蔵 21 日目が 14 日目 (初期腐敗) に比べて有意に低い評価であった。したがって、*Pseudomonas* 以外の *Shewanella* や *Brochothrix* もマダイの品質変化になんらかの影響を及ぼしているかもしれない。さらに、上述の Anagnostopoulos et al (2022) は、マダイを氷蔵中に増加する腐敗マーカー候補して 9 揮発性成分、貯蔵中に減少する鮮度マーカー候補として、5 成分を提案している。しかし、本論文において、OM または DM において、有意に増加した成分は、3-メチルブタナールおよびアセトアルデヒドの 2 成分のみが共通しており、有意に減少した成分で共通する成分はなく、しかも 1-プロパノールは有意に増加した。したがって、生息地域や漁獲時の処理の違いに伴う腐敗時の菌叢の変化パターンの違いが、揮発性成分の変化パターンに影響し、腐敗や鮮度のマーカーが異なる可能性が示唆された。今後は、魚肉の揮発性成分と菌叢変化に対する異なる貯蔵方法 (温度, 包装方法) や魚種の影響さらには腐敗に伴うにおい成分の変化に寄与する成分について詳細な検討を行う必要がある。

第 5 節 小括

本章では，新鮮な状態から腐敗に至るまでのマダイ背肉の OM および DM の揮発性成分と細菌叢の変化を明らかにし，腐敗魚に特徴的な揮発性成分を特定するために，マダイを氷蔵し，OM および DM の生菌数，TBARS，腐敗指標および揮発性成分の分析，官能検査および NGS アンプリコンシーケンスによる菌叢解析を行った。両筋肉部位の生菌数，OM の TVBN および TMA，DM の TBARS は，14 日間以降に貯蔵 0 日目に比べて有意に増加した。OM の官能検査の結果，貯蔵 14 日目に腐敗し，21 日目には喫食不可レベルになった。(E,E)-3,5-オクタジエン-2-オン，Unknown (KI:1538) と Unknown (KI:1603) が腐敗した OM と DM 共通の特徴的な揮発成分として同定され，マダイの腐敗マーカーとして使用の可能が示唆された。菌叢解析の結果は，貯蔵により細菌の多様性が失われ，腐敗に至るまでに門レベルでは *Proteobacteria*，属レベルでは *Pseudomonas* が優勢となり，*Pseudomonas* がマダイの SSO であることが示唆された。また，*Shewanella* や *Brochothrix* も品質変化の原因菌としての可能性が示唆された。

Table 3-1. Bacterial counts of red sea bream muscles during ice storage (log CFU/g)

| | Muscle type | Storage periods (days) | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| Mesophilic bacteria | OM | 3.22 ± 0.24 ^a | 3.33 ± 0.12 ^{a†} | 3.27 ± 0.37 ^a | 6.27 ± 0.40 ^b | 8.46 ± 0.30 ^c |
| | DM | 3.16 ± 0.01 ^a | 2.98 ± 0.06 ^a | 3.21 ± 0.44 ^a | 6.26 ± 0.65 ^b | 8.44 ± 0.21 ^c |
| Psychrotrophic bacteria | OM | 3.27 ± 0.20 ^a | 3.49 ± 0.09 ^{a†} | 3.28 ± 0.08 ^a | 6.44 ± 0.54 ^b | 7.77 ± 0.65 ^c |
| | DM | 3.14 ± 0.04 ^a | 3.04 ± 0.08 ^a | 3.24 ± 0.37 ^a | 6.37 ± 0.61 ^b | 7.72 ± 0.59 ^c |

The values indicated means ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$). OM, ordinary muscle in dorsal part; DM, dark muscle. † indicates significant difference between OM and DM for the same storage days and the same mediums ($P < 0.05$). Small letters for the same flesh types and the same mediums with a different letter were significantly different ($P < 0.05$).

Table 3-2. Total volatile basic amine (TVBN), trimethyl amine (TMA) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) of red sea bream muscles during ice storage

| Muscle type | Storage periods (day) | | | | |
|-----------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| TVBN (mg/100 g) | 16.09 ± 0.31 ^a | 16.23 ± 0.15 ^a | 17.10 ± 0.15 ^b | 17.68 ± 0.17 ^b | 17.54 ± 0.62 ^b |
| TMA (µg/g) | 0.73 ± 0.91 ^a | 1.02 ± 0.70 ^a | 1.22 ± 0.86 ^a | 1.30 ± 0.84 ^a | 16.02 ± 16.17 ^b |
| TBARS (µmol/g) | 0.004 ± 0.002 ^{at†} | 0.003 ± 0.001 ^a | 0.003 ± 0.0003 ^{at†} | 0.005 ± 0.002 ^{at†} | 0.006 ± 0.001 ^{at†} |
| | 0.11 ± 0.01 ^a | 0.18 ± 0.07 ^a | 0.31 ± 0.11 ^a | 0.64 ± 0.12 ^b | 0.58 ± 0.10 ^b |

The values indicated means ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$). OM, Ordinary muscle in dorsal part; DM, Dark muscle. † indicates significant difference between OM and DM for the same storage days and the same analyzed items ($P < 0.05$). Small letters for the same flesh types and the same analyzed items with a different letter were significantly different ($P < 0.05$).

Table 3-3. Changes in volatile compounds in red sea bream muscles during ice storage (ng/g)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | OM | | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|--------|--|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | | |
| 1 | 690 | Acetaldehyde | 6.56 ± 1.16 ab | 5.70 ± 1.72 a | 7.29 ± 1.03 ab | 11.27 ± 1.61 c | 9.87 ± 1.95 bc | MS, KI | | |
| 2 | 701 | Heptane | 3.70 ± 0.19 † | 2.18 ± 0.23 † | 1.94 ± 0.16 † | 2.80 ± 1.62 | 2.24 ± 0.56 | MS, KI | | |
| 3 | 776 | Propanal | 5.97 ± 0.69 ab | 4.32 ± 0.34 a | 4.53 ± 0.83 a | 7.48 ± 1.39 b | 6.57 ± 1.86 ab | MS, KI | | |
| 4 | 785 | Furan | 0.25 ± 0.03 | 0.26 ± 0.11 | 0.32 ± 0.05 † | 0.41 ± 0.20 | 0.42 ± 0.10 | MS, KI | | |
| 5 | 801 | Octane | 18.19 ± 0.80 c† | 13.47 ± 4.06 bc | 9.73 ± 1.78 b | 4.23 ± 1.50 a | 4.60 ± 1.52 a | MS, KI | | |
| 6 | 805 | 2-Propanone | 1.76 ± 0.32 a | 2.15 ± 1.07 ab | 2.32 ± 0.50 ab | 4.28 ± 1.13 c | 3.83 ± 0.65 bc | MS, KI | | |
| 7 | 823 | 2,3-Dihydrofuran | 4.03 ± 0.44 a | 3.46 ± 0.72 a | 5.23 ± 1.37 ab | 6.98 ± 1.11 b | 6.91 ± 1.75 b | MS, KI | | |
| 8 | 827 | 2-Propenal | 2.04 ± 0.29 a | 1.73 ± 0.23 a | 2.41 ± 0.17 ab | 3.69 ± 0.56 c† | 3.08 ± 0.72 bc | MS, KI | | |
| 9 | 840 | Tetrahydrofuran | 34.72 ± 4.83 ab | 28.02 ± 5.47 a | 47.53 ± 15.61 ab | 61.29 ± 11.25 b | 61.47 ± 16.95 b | MS, KI | | |
| 10 | 852 | 2-Methylfuran | 0.48 ± 0.16 | 0.37 ± 0.07 | 0.30 ± 0.07 | 0.46 ± 0.12 | 0.52 ± 0.24 | MS, KI | | |
| 11 | 856 | Butanal | 3.03 ± 0.40 | 2.39 ± 0.43 | 2.66 ± 0.69 | 4.35 ± 1.06 | 4.03 ± 1.36 | MS, KI | | |
| 12 | 860 | 2-Methyl-2-propanal | 0.50 ± 0.25 | 0.32 ± 0.24 | 0.49 ± 0.06 | 0.65 ± 0.26 | 0.58 ± 0.20 | MS, KI | | |
| 13 | 864 | Ethyl Acetate | 0.13 ± 0.06 a | 0.00 ± 0.00 a | 0.09 ± 0.05 a | 0.19 ± 0.05 a | 2.22 ± 1.37 b | MS, KI | | |
| 14 | 884 | 2-Butanone | 1.07 ± 0.11 ab | 0.89 ± 0.15 a | 0.91 ± 0.32 a | 1.70 ± 0.32 c | 1.53 ± 0.18 bc | MS, KI | | |
| 15 | 895 | 2-Methyl-2-propanol | 0.38 ± 0.10 | 0.39 ± 0.11 | 0.28 ± 0.08 | 0.34 ± 0.12 | 0.42 ± 0.12 | MS, KI | | |
| 16 | 898 | Nonane | 1.78 ± 0.17 b | 1.59 ± 0.10 ab | 1.18 ± 0.11 a | 1.53 ± 0.36 ab | 1.46 ± 0.25 ab | MS, KI | | |
| 17 | 901 | 3-Methylbutanal | 0.20 ± 0.06 | 0.11 ± 0.10 | 0.18 ± 0.09 | 0.44 ± 0.13 | 0.45 ± 0.41 | MS, KI | | |
| 18 | 916 | 2-propanol | 0.06 ± 0.08 a | 0.06 ± 0.05 a | 0.09 ± 0.07 a | 0.15 ± 0.11 a | 0.68 ± 0.16 b† | MS, KI | | |
| 19 | 918 | Ethanol | 1.56 ± 0.95 | 0.63 ± 0.16 | 0.70 ± 0.33 | 1.20 ± 0.20 | 1.24 ± 0.27 | MS, KI | | |
| 20 | 919 | Benzene | 1.83 ± 0.48 a | 1.84 ± 0.37 a | 2.63 ± 0.42 ab | 4.20 ± 0.55 c | 3.72 ± 0.98 bc | MS, KI | | |
| 21 | 925 | 3-buten-2-one | 0.75 ± 0.09 | 0.65 ± 0.19 | 0.51 ± 0.22 | 0.86 ± 0.26 | 0.87 ± 0.08 | MS, KI | | |
| 22 | 934 | 2-Ethyl furan | 7.48 ± 0.89 ab | 5.65 ± 0.57 a | 4.81 ± 0.79 a† | 8.52 ± 2.14 b | 6.82 ± 0.84 ab | MS, KI | | |
| 23 | 944 | 2-Ethyl acrolein | 0.41 ± 0.06 | 0.46 ± 0.25 | 0.59 ± 0.10 | 0.66 ± 0.11 | 0.63 ± 0.18 | MS, KI | | |
| 24 | 955 | 3-Pentanone+2-Pentanone | 7.10 ± 1.13 | 6.06 ± 0.89 † | 4.59 ± 0.92 | 8.00 ± 3.28 | 8.22 ± 1.78 | MS, KI | | |
| 25 | 957 | Pentanal | 28.64 ± 1.81 | 22.02 ± 4.18 | 18.51 ± 5.97 | 30.01 ± 9.94 | 25.06 ± 7.34 | MS, KI | | |
| 26 | 990 | Methyl isobutyl ketone | 0.47 ± 0.24 | 0.28 ± 0.13 | 0.33 ± 0.14 | 0.66 ± 0.44 | 1.01 ± 0.43 | MS, KI | | |
| 27 | 1000 | Decane | 0.95 ± 0.14 | 0.66 ± 0.08 | 0.84 ± 0.24 | 0.75 ± 0.15 | 0.88 ± 0.24 | MS, KI | | |
| 28 | 1004 | 1-Penten-3-one | 8.85 ± 2.12 ab | 6.36 ± 0.13 a | 6.37 ± 0.11 a | 10.38 ± 2.05 b | 5.80 ± 2.30 a | MS, KI | | |
| 29 | 1006 | α-Pinene | 0.03 ± 0.03 | 0.03 ± 0.01 | 0.03 ± 0.03 | 0.07 ± 0.06 | 0.06 ± 0.06 | MS, KI | | |
| 30 | 1020 | (E)-2-Butenal + Toluene | 2.55 ± 0.87 a | 1.90 ± 0.51 a | 1.81 ± 0.34 a | 5.09 ± 1.19 b | 4.87 ± 0.75 b | MS, KI | | |

Table 3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | OM | | | | | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|--|--|--|--|--|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | | | | | |
| 31 | 1027 | 1-Propanol | 0.66 ± 0.47 | 0.96 ± 0.22 | 0.58 ± 0.15 | 1.13 ± 0.15 | 1.18 ± 0.84 | | | | | | MS, KI |
| 32 | 1036 | 2-Methyl 3-buten-2-ol | ND | ND | ND | ND | ND | | | | | | MS, KI |
| 33 | 1045 | Camphene | 1.87 ± 0.30 ab | 1.69 ± 0.41 a | 2.66 ± 0.82 abc | 3.99 ± 0.82 c | 3.60 ± 1.17 bc | | | | | | MS, KI |
| 34 | 1047 | 2,3-Pentanedione | 20.63 ± 2.96 ab | 15.61 ± 1.30 a† | 19.41 ± 1.41 ab | 29.50 ± 3.13 b | 26.54 ± 8.79 b | | | | | | MS, KI |
| 35 | 1065 | Hexanal | 627.65 ± 39.40 b | 487.14 ± 68.10 ab | 364.42 ± 81.58 a | 540.58 ± 174.35 ab | 435.24 ± 91.16 ab | | | | | | MS, KI |
| 36 | 1086 | (Z)-2-Pentenal | 1.92 ± 0.39 ab | 1.76 ± 0.22 ab | 1.42 ± 0.12 a | 2.88 ± 0.86 b | 1.25 ± 0.45 a | | | | | | MS |
| 37 | 1096 | Undecane | 0.74 ± 0.19 a | 1.72 ± 0.41 a | 2.00 ± 0.54 a | 2.70 ± 1.41 a | 5.65 ± 1.16 b | | | | | | MS, KI |
| 38 | 1103 | Ethyl benzene | 1.66 ± 0.45 a | 0.91 ± 0.26 a | 1.23 ± 0.55 a | 3.53 ± 0.13 b† | 5.60 ± 1.05 c | | | | | | MS, KI |
| 39 | 1106 | (E)-2-Pentenal | 15.26 ± 1.87 ab | 12.27 ± 0.65 a | 11.23 ± 0.43 a | 18.79 ± 3.59 b | 14.57 ± 2.39 ab | | | | | | MS, KI |
| 40 | 1117 | 2,3-Hexanedione | 1.18 ± 0.32 | 0.69 ± 0.19 | 1.06 ± 0.18 | 1.47 ± 0.45 | 1.20 ± 0.82 | | | | | | MS, KI |
| 41 | 1117 | 1,3-Dimethyl benzene | 0.68 ± 0.33 | 0.49 ± 0.13 | 0.51 ± 0.26 | 0.68 ± 0.26 | 1.17 ± 0.57 | | | | | | MS, KI |
| 42 | 1130 | (E)-3-Hexenal | 0.78 ± 0.37 | 0.51 ± 0.05 | 0.47 ± 0.25 | 0.53 ± 0.20 | 0.44 ± 0.36 | | | | | | MS, KI |
| 43 | 1133 | (Z)-3-Hexenal | 3.14 ± 0.26 b | 2.32 ± 0.30 a† | 2.48 ± 0.26 a | 3.27 ± 0.43 b | 2.79 ± 0.06 ab | | | | | | MS, KI |
| 44 | 1133 | 1-Butanol | 1.11 ± 0.14 | 1.14 ± 0.26 | 1.63 ± 0.67 | 2.20 ± 0.48 | 2.26 ± 0.73 | | | | | | MS, KI |
| 45 | 1138 | 3-Heptanone | 0.49 ± 0.06 a | 0.58 ± 0.24 a | 0.45 ± 0.15 a | 0.87 ± 0.16 a | 1.50 ± 0.45 b | | | | | | MS, KI |
| 46 | 1149 | 1-Penten-3-ol | 43.72 ± 8.70 | 35.47 ± 4.22 | 37.63 ± 2.40 | 62.10 ± 11.07 | 55.82 ± 19.71 | | | | | | MS, KI |
| 47 | 1159 | 1,2-Dimethyl benzene | 0.19 ± 0.16 a | 0.14 ± 0.12 a | 0.19 ± 0.11 a | 0.71 ± 0.51 ab | 0.82 ± 0.21 b | | | | | | MS, KI |
| 48 | 1166 | 2-Heptanone | 2.03 ± 0.18 a | 2.65 ± 1.06 a | 1.93 ± 0.64 a | 5.48 ± 4.09 ab | 13.31 ± 8.54 b | | | | | | MS, KI |
| 49 | 1169 | Heptanal | 85.14 ± 14.17 † | 90.88 ± 26.59 | 65.02 ± 10.27 † | 86.32 ± 13.99 | 92.72 ± 11.28 † | | | | | | MS, KI |
| 50 | 1179 | D-Limonene | 2.09 ± 1.28 | 4.88 ± 5.08 | 1.83 ± 1.12 | 4.15 ± 2.64 | 6.11 ± 3.84 | | | | | | MS, KI |
| 51 | 1181 | (Z)-2-Hexenal | 0.28 ± 0.10 | 0.06 ± 0.09 † | 0.00 ± 0.00 | 0.13 ± 0.18 | 0.11 ± 0.16 | | | | | | MS |
| 52 | 1195 | (E)-2-Hexenal | 12.58 ± 1.54 bc | 9.30 ± 0.88 a† | 9.00 ± 0.94 a† | 15.34 ± 1.51 c | 11.88 ± 1.38 ab | | | | | | MS, KI |
| 53 | 1198 | Dodecane | 1.51 ± 0.19 a | 4.32 ± 2.15 a | 6.48 ± 3.12 ab | 9.17 ± 7.46 ab | 17.22 ± 6.30 b | | | | | | MS, KI |
| 54 | 1217 | 2-Pentyl furan, | 2.62 ± 0.53 | 2.03 ± 0.11 | 2.00 ± 0.16 † | 2.38 ± 0.62 | 1.97 ± 0.56 | | | | | | MS, KI |
| 55 | 1219 | (E)-4-Heptenal | 0.59 ± 0.15 b† | 0.72 ± 0.12 b | 0.15 ± 0.21 a | 0.14 ± 0.20 a | 0.00 ± 0.00 a | | | | | | MS |
| 56 | 1221 | 1,3,5-Trimethyl benzene | 1.12 ± 0.76 ab | 0.49 ± 0.13 a | 2.12 ± 0.15 ab† | 1.87 ± 0.76 ab | 2.71 ± 1.65 b | | | | | | MS, KI |
| 57 | 1223 | (Z)-4-Heptenal | 3.69 ± 0.69 | 2.96 ± 0.38 | 2.71 ± 0.50 | 4.50 ± 1.37 | 3.74 ± 1.29 | | | | | | MS, KI |
| 58 | 1231 | 3-Methyl 3-buten-1-ol | 0.09 ± 0.10 a | 0.32 ± 0.23 a | 1.04 ± 0.17 b | 1.28 ± 0.37 b | 1.56 ± 0.40 b | | | | | | MS, KI |
| 59 | 1234 | Styrene | 1.46 ± 0.42 a | 1.81 ± 1.19 a | 9.94 ± 5.34 a | 27.89 ± 10.13 a | 64.02 ± 27.99 b | | | | | | MS, KI |
| 60 | 1236 | 1-Pentanol | 16.75 ± 1.67 ab | 14.11 ± 1.49 a† | 13.57 ± 1.14 a | 23.01 ± 4.29 b | 19.01 ± 5.03 ab | | | | | | MS, KI |

Table 3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | OM | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | |
| 61 | 1238 | 1-Hexen-3-ol | 3.89 ± 1.57 | 3.68 ± 1.83 | 3.64 ± 0.45 | 5.73 ± 1.17 | 2.09 ± 2.95 | MS, KI | |
| 62 | 1258 | 1,2,4-Trimethyl benzene, | 0.58 ± 0.32 | 0.56 ± 0.09 | 0.88 ± 0.53 | 1.40 ± 1.11 | 2.59 ± 1.65 | MS, KI | |
| 63 | 1260 | Acetoin | ND | ND | ND | 0.19 ± 0.27 † | 1.80 ± 1.67 | MS, KI | |
| 64 | 1263 | Cyclohexanone | 6.42 ± 1.67 a | 7.93 ± 1.99 a | 8.75 ± 0.85 a | 13.99 ± 1.43 b | 13.89 ± 1.29 b | MS, KI | |
| 65 | 1269 | 2-Octanone | 0.69 ± 0.05 | 1.20 ± 0.24 † | 1.11 ± 0.22 | 0.68 ± 0.52 | 2.26 ± 1.60 | | |
| 66 | 1273 | Octanal | 62.75 ± 11.78 b | 43.81 ± 0.48 a | 39.15 ± 4.76 a | 41.78 ± 7.21 a | 39.07 ± 7.85 a | MS, KI | |
| 67 | 1284 | 1-Octen-3-one | 8.97 ± 0.56 | 5.64 ± 0.75 | 4.97 ± 0.51 | 9.09 ± 2.58 | 4.98 ± 1.70 | MS, KI | |
| 68 | 1294 | (E)-2-Penten-1-ol | 1.71 ± 0.50 | 1.15 ± 0.19 † | 1.16 ± 0.21 | 1.72 ± 0.08 | 1.50 ± 0.55 | MS, KI | |
| 69 | 1298 | Tridecane | 2.13 ± 0.12 a | 6.00 ± 3.46 ab | 11.77 ± 7.57 ab | 18.52 ± 15.26 ab | 25.11 ± 12.00 b | MS, KI | |
| 70 | 1302 | (Z)-2-Penten-1-ol | 23.63 ± 2.74 ab | 18.96 ± 2.36 a† | 17.41 ± 0.88 a | 27.58 ± 3.72 b | 22.34 ± 5.80 ab | MS, KI | |
| 71 | 1309 | 2,3-Octanedione | 53.96 ± 6.42 ab | 48.99 ± 6.29 ab | 41.59 ± 5.65 a† | 68.15 ± 11.84 b | 58.04 ± 11.34 ab | MS | |
| 72 | 1319 | 6-Methyl 5-hepten-2-one | 2.69 ± 1.22 a | 3.41 ± 1.39 a | 3.39 ± 1.52 a | 8.44 ± 2.43 b | 5.41 ± 0.79 ab | MS, KI | |
| 73 | 1337 | 1-Hexanol | 61.59 ± 23.50 b† | 31.17 ± 8.80 a† | 26.90 ± 3.38 a† | 37.68 ± 9.38 ab | 36.81 ± 8.65 ab | MS, KI | |
| 74 | 1345 | (E)-3-Hexen-1-ol | 0.16 ± 0.05 a | ND | ND | ND | 0.06 ± 0.08 b | MS, KI | |
| 75 | 1364 | (Z)-3-Hexen-1-ol | 0.11 ± 0.08 ab | 0.21 ± 0.15 ab | ND | ND | 0.47 ± 0.33 b | MS, KI | |
| 76 | 1372 | 2-Nonanone | 3.27 ± 0.05 a | 4.39 ± 2.14 a | 3.32 ± 1.36 a | 5.60 ± 1.62 ab | 9.88 ± 3.17 b | MS, KI | |
| 77 | 1377 | (E,E)-2,4-Hexadienal | 2.62 ± 0.79 a | 1.37 ± 0.59 a | 3.05 ± 1.11 a | 6.19 ± 2.21 b | 3.60 ± 0.43 ab | MS, KI | |
| 78 | 1377 | Nonanal | 162.60 ± 29.66 b | 147.63 ± 50.74 b | 144.52 ± 19.00 b | 35.08 ± 41.53 a | 92.28 ± 10.09 ab | MS, KI | |
| 79 | 1407 | (E)-2-Octenal | 18.95 ± 2.68 bc | 14.12 ± 0.58 ab | 12.71 ± 0.80 a | 20.23 ± 1.88 c | 14.96 ± 3.24 ab | MS, KI | |
| 80 | 1431 | 1-Octen-3-ol | 102.40 ± 12.42 ab | 89.03 ± 9.92 ab | 68.06 ± 8.52 a† | 119.13 ± 25.77 b | 96.16 ± 21.60 ab | MS, KI | |
| 81 | 1435 | 1-Heptanol | 47.87 ± 5.25 ab | 39.66 ± 6.24 a | 34.77 ± 2.24 a† | 59.63 ± 4.86 b† | 47.62 ± 10.42 ab | MS, KI | |
| 82 | 1439 | (E,Z)-2,4-Heptadienal | 43.26 ± 4.61 ab† | 35.76 ± 3.19 a† | 37.51 ± 3.26 a | 63.34 ± 3.65 c | 51.26 ± 7.75 b | MS, KI | |
| 83 | 1463 | Unknown | 29.22 ± 4.44 ab | 23.20 ± 2.99 a† | 21.52 ± 3.23 a | 42.31 ± 7.99 b | 43.27 ± 11.65 b | | |
| 84 | 1465 | (E,E)-2,4-Heptadienal | 72.37 ± 9.21 ab | 57.72 ± 2.85 a† | 59.03 ± 10.28 a | 106.15 ± 26.69 b | 84.39 ± 21.68 ab | MS, KI | |
| 85 | 1469 | 2-Ethyl 1-hexanol | 24.22 ± 6.68 a | 74.05 ± 28.34 ab | 176.93 ± 78.92 ab | 516.17 ± 229.12 bc | 704.52 ± 365.79 c | MS, KI | |
| 86 | 1479 | Decanal | 4.82 ± 1.62 | 5.54 ± 0.69 | 10.64 ± 4.19 | 14.73 ± 12.65 | 13.89 ± 11.92 | | |
| 87 | 1490 | Benzaldehyde | 15.67 ± 0.53 a | 13.48 ± 3.21 a | 13.51 ± 2.45 a | 23.89 ± 1.38 b | 20.88 ± 0.92 b | MS, KI | |
| 88 | 1492 | (E,Z)-3-Octadien-2-one | 28.10 ± 3.45 ab† | 24.66 ± 3.20 a† | 26.78 ± 3.40 ab | 42.19 ± 3.42 c | 36.36 ± 8.64 bc | MS | |
| 89 | 1493 | Pentadecane | 15.04 ± 6.15 | 14.52 ± 8.73 | 45.99 ± 32.56 | 73.58 ± 45.65 | 68.24 ± 34.10 | MS, KI | |
| 90 | 1513 | (E)-2-Nonenal | 9.86 ± 1.50 ab | 7.28 ± 1.34 a† | 8.69 ± 0.74 ab | 11.68 ± 1.69 b | 9.51 ± 2.80 ab | MS, KI | |

Table 3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | OM | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|--------|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | |
| 91 | 1516 | Unknown | 5.62 ± 0.68 a | 5.20 ± 0.18 a | 5.42 ± 0.80 a | 14.83 ± 2.48 b | 17.44 ± 5.85 b | | |
| 92 | 1517 | Unknown | 5.04 ± 0.62 a | 11.23 ± 2.74 a | 23.13 ± 4.09 a† | 69.11 ± 11.25 b† | 99.64 ± 35.69 b | | |
| 93 | 1525 | Unknown | 4.72 ± 2.43 a | 12.35 ± 4.66 a | 27.77 ± 8.34 a | 77.18 ± 8.95 b† | 107.41 ± 40.41 b | | |
| 94 | 1535 | 1-Octanol | 48.60 ± 3.31 b | 43.49 ± 1.45 ab† | 40.29 ± 0.72 a | 38.87 ± 6.01 a | 38.86 ± 2.94 a | MS, KI | |
| 95 | 1538 | Unknown | 5.54 ± 1.55 a | 27.25 ± 9.60 a | 67.10 ± 10.85 a† | 202.54 ± 30.13 b† | 274.66 ± 108.56 b | | |
| 96 | 1540 | Unknown | 5.54 ± 1.75 a | 28.58 ± 9.43 a | 80.90 ± 18.08 a† | 240.61 ± 55.94 b† | 351.19 ± 121.42 b | | |
| 97 | 1543 | (E,E)-3,5-Octadien-2-one | 18.28 ± 3.06 a | 17.38 ± 2.04 a | 17.96 ± 2.19 a | 38.44 ± 6.20 b | 32.27 ± 4.97 b | MS | |
| 98 | 1550 | Unknown | 0.58 ± 0.38 a | 4.66 ± 1.54 a | 14.28 ± 3.15 ab† | 46.82 ± 7.90 bc† | 69.12 ± 31.95 c | | |
| 99 | 1561 | (E,Z)-2,6-Nonadienal | 7.57 ± 0.63 | 7.76 ± 2.66 | 4.67 ± 0.17 † | 6.46 ± 1.80 | 8.33 ± 4.68 | MS, KI | |
| 100 | 1562 | (E,E)-2,4-Octadienal | 1.73 ± 0.55 | 1.24 ± 0.45 † | 1.70 ± 0.63 † | 2.76 ± 1.24 | 2.16 ± 1.21 | MS, KI | |
| 101 | 1565 | Unknown | 1.81 ± 0.56 a | 7.31 ± 2.79 a | 20.44 ± 4.37 a† | 66.86 ± 11.06 b† | 98.68 ± 42.54 b | | |
| 102 | 1569 | Unknown | 1.24 ± 0.74 a | 10.72 ± 5.20 a | 30.12 ± 5.43 a† | 93.61 ± 12.58 b† | 130.70 ± 44.33 b | | |
| 103 | 1575 | Unknown | 2.89 ± 0.95 a | 13.21 ± 3.79 a | 37.71 ± 8.10 ab† | 114.56 ± 19.85 bc † | 159.62 ± 74.23 c | | |
| 104 | 1579 | 2-Undecanone | 5.22 ± 1.14 a | 7.25 ± 3.43 a | 10.62 ± 3.16 ab | 20.62 ± 5.02 bc | 28.04 ± 8.34 c | | |
| 105 | 1585 | Unknown | 14.50 ± 3.84 a | 56.49 ± 18.08 a | 145.10 ± 25.97 a† | 419.05 ± 49.03 b† | 547.37 ± 198.93 b | | |
| 106 | 1593 | Unknown | 131.30 ± 22.88 a | 188.61 ± 131.23 a | 519.97 ± 74.51 a† | 1303.58 ± 132.81 b† | 1533.95 ± 553.58 b | | |
| 107 | 1601 | Unknown | 15.33 ± 4.20 a | 62.58 ± 21.52 a | 154.44 ± 20.62 a† | 473.50 ± 50.79 b† | 580.68 ± 181.54 b | | |
| 108 | 1603 | Unknown | 16.49 ± 5.05 a | 79.47 ± 24.88 a | 206.20 ± 32.29 a† | 601.01 ± 62.02 b† | 789.64 ± 250.74 b | | |
| 109 | 1606 | Unknown | 25.52 ± 7.35 a | 123.36 ± 33.30 a | 329.08 ± 59.44 a† | 915.96 ± 125.31 b† | 1156.35 ± 481.11 b | | |
| 110 | 1619 | Acetophenone | 0.17 ± 0.16 | 0.27 ± 0.18 | 0.35 ± 0.34 | 1.04 ± 0.67 | 0.78 ± 0.93 | MS, KI | |
| 111 | 1621 | (E)-2-Decenal | 10.92 ± 2.68 | 6.83 ± 1.71 | 8.22 ± 1.84 | 10.28 ± 1.90 | 10.70 ± 4.60 | MS | |
| 112 | 1637 | 1-Nonanol | 14.59 ± 2.55 a | 37.13 ± 6.03 a† | 93.31 ± 17.43 a | 242.40 ± 30.58 b† | 269.33 ± 121.86 b | MS, KI | |
| 113 | 1644 | 2-hydroxy-Benzaldehyde | 3.54 ± 0.55 a | 3.20 ± 0.78 a | 5.88 ± 0.16 ab | 10.48 ± 0.79 c | 7.59 ± 3.20 bc | MS, KI | |
| 114 | 1675 | (E,E)-2,4-Nonadienal | 5.10 ± 0.55 | 4.27 ± 0.61 † | 6.03 ± 2.87 | 6.81 ± 0.48 | 5.52 ± 1.05 | MS, KI | |
| 115 | 1679 | Unknown | 2.60 ± 0.35 † | 2.40 ± 0.50 † | 2.26 ± 1.13 | 4.02 ± 0.23 | 3.95 ± 1.05 | MS, KI | |
| 116 | 1692 | Dodecanal | 5.45 ± 2.09 | 6.24 ± 1.98 | 8.42 ± 3.13 | 6.96 ± 1.03 | 8.64 ± 6.22 | MS, KI | |
| 117 | 1694 | Heptadecane | 4.53 ± 0.95 a | 5.77 ± 2.26 a | 13.26 ± 4.16 ab | 16.96 ± 7.27 ab | 23.85 ± 12.12 b | MS, KI | |
| 118 | 1707 | Pentanoic acid | ND | ND | 0.18 ± 0.15 | 0.38 ± 0.39 | 0.21 ± 0.23 | MS, KI | |
| 119 | 1731 | (E)-2-Undecenal | 6.92 ± 1.79 | 3.84 ± 1.94 | 5.23 ± 1.22 | 4.76 ± 1.27 | 4.84 ± 1.22 | MS, KI | |
| 120 | 1740 | (E,Z)-2,4-Decadienal | 8.93 ± 1.91 ab† | 7.12 ± 0.46 a | 8.92 ± 0.44 ab | 13.27 ± 3.08 b | 10.59 ± 1.83 ab | MS | |

Table 3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | OM | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|--------|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | |
| 121 | 1770 | Tetrahydro 2H-pyran-2-one | 0.04 ± 0.03 | 0.00 ± 0.01 | ND | 0.66 ± 0.94 | 0.02 ± 0.03 | MS, KI | |
| 122 | 1786 | (E,E)-2,4-Decadienal | 11.20 ± 1.70 | 7.74 ± 0.55 | 9.84 ± 2.24 | 13.24 ± 5.45 | 10.05 ± 1.50 † | MS, KI | |
| 123 | 1818 | Hexanoic acid | ND | 4.21 ± 2.56 abc | 2.37 ± 1.86 ab | 8.46 ± 1.06 c | 6.78 ± 3.41 bc | MS, KI | |
| 124 | 1927 | Heptanoic acid | 0.49 ± 0.70 a | 1.83 ± 0.70 ab | 3.43 ± 1.85 b | 0.53 ± 0.75 a | 2.31 ± 1.34 ab | MS, KI | |
| 125 | 1946 | Dodecanol | 3.90 ± 0.64 a | 3.82 ± 1.02 a | 5.50 ± 1.49 a | 9.87 ± 2.48 b | 7.47 ± 1.69 ab | MS, KI | |
| 126 | 2030 | Octanoic acid | 6.43 ± 1.01 a | 15.27 ± 4.45 a | 53.78 ± 17.45 b | 97.47 ± 17.86 c † | 62.96 ± 18.78 b | MS, KI | |
| 127 | 2138 | Nonanoic acid | 15.54 ± 1.09 abc † | 11.07 ± 1.75 a | 19.87 ± 3.01 bc | 20.81 ± 3.73 c † | 13.57 ± 3.99 ab | MS, KI | |
| 128 | 2245 | n-Decanoic acid | 8.83 ± 1.15 a | 8.65 ± 5.74 a | 21.57 ± 4.74 ab | 29.09 ± 9.80 b | 24.16 ± 9.25 ab | MS, KI | |

Table3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | DM | | | | | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|-------------------------|------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|--------|--|--|--|--|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | | | | | |
| 1 | 690 | Acetaldehyde | 7.71 ± 0.91 | 6.50 ± 1.57 | 7.85 ± 2.40 | 8.40 ± 1.59 | 9.04 ± 0.79 | MS, KI | | | | | |
| 2 | 701 | Heptane | 1.90 ± 0.85 | 1.42 ± 0.30 | 1.15 ± 0.20 | 1.29 ± 0.18 | 1.26 ± 0.34 | MS, KI | | | | | |
| 3 | 776 | Propanal | 5.64 ± 1.81 | 5.11 ± 0.96 | 4.99 ± 0.74 | 9.35 ± 2.94 | 7.81 ± 2.32 | MS, KI | | | | | |
| 4 | 785 | Furan | 0.20 ± 0.11 a | 0.19 ± 0.04 a | 0.18 ± 0.05 a | 0.35 ± 0.16 ab | 0.55 ± 0.17 b | MS, KI | | | | | |
| 5 | 801 | Octane | 6.00 ± 2.77 | 6.67 ± 3.74 | 6.93 ± 1.49 | 6.80 ± 1.01 | 2.28 ± 0.42 | MS, KI | | | | | |
| 6 | 805 | 2-Propanone | 2.19 ± 0.43 | 2.52 ± 0.97 | 2.59 ± 0.48 | 3.04 ± 0.81 | 3.49 ± 0.06 | MS, KI | | | | | |
| 7 | 823 | 2,3-Dihydrofuran | 4.66 ± 0.96 | 4.48 ± 1.49 | 4.73 ± 1.03 | 5.23 ± 1.51 | 5.95 ± 0.56 | MS, KI | | | | | |
| 8 | 827 | 2-Propenal | 2.05 ± 0.32 | 1.98 ± 0.61 | 2.18 ± 0.52 | 2.26 ± 0.42 | 2.77 ± 0.26 | MS, KI | | | | | |
| 9 | 840 | Tetrahydrofuran | 40.41 ± 9.46 | 38.66 ± 13.78 | 42.34 ± 11.09 | 44.53 ± 13.86 | 52.65 ± 6.81 | MS, KI | | | | | |
| 10 | 852 | 2-Methylfuran | 0.68 ± 0.26 | 0.48 ± 0.27 | 0.58 ± 0.39 | 0.65 ± 0.12 | 0.59 ± 0.11 | MS, KI | | | | | |
| 11 | 856 | Butanal | 3.05 ± 0.97 | 2.62 ± 0.46 | 2.47 ± 0.52 | 3.67 ± 0.48 | 3.95 ± 0.96 | MS, KI | | | | | |
| 12 | 860 | 2-Methyl-2-propanal | 0.36 ± 0.15 | 0.37 ± 0.05 | 0.33 ± 0.12 | 0.71 ± 0.30 | 0.61 ± 0.27 | MS, KI | | | | | |
| 13 | 864 | Ethyl Acetate | 0.14 ± 0.12 a | 0.24 ± 0.16 a | 0.08 ± 0.06 a | 0.07 ± 0.10 a | 1.11 ± 0.53 b | MS, KI | | | | | |
| 14 | 884 | 2-Butanone | 0.90 ± 0.22 | 1.11 ± 0.24 | 0.95 ± 0.23 | 1.33 ± 0.48 | 1.52 ± 0.36 | MS, KI | | | | | |
| 15 | 895 | 2-Methyl-2-propanol | 0.59 ± 0.32 | 0.42 ± 0.24 | 0.39 ± 0.11 | 0.64 ± 0.12 | 0.54 ± 0.16 | MS, KI | | | | | |
| 16 | 898 | Nonane | 1.62 ± 0.71 | 1.55 ± 0.79 | 1.60 ± 0.50 | 1.50 ± 0.36 | 1.89 ± 0.82 | MS, KI | | | | | |
| 17 | 901 | 3-Methyl-butanal | 0.19 ± 0.15 a | 0.39 ± 0.39 ab | 0.43 ± 0.14 ab | 0.96 ± 0.34 b | 1.10 ± 0.40 b | MS, KI | | | | | |
| 18 | 916 | 2-propanol | 0.08 ± 0.07 a | 0.06 ± 0.09 a | 0.10 ± 0.08 a | 0.08 ± 0.06 a | 1.08 ± 0.09 b | MS, KI | | | | | |
| 19 | 918 | Ethanol | 1.18 ± 0.29 | 0.96 ± 0.35 | 1.15 ± 0.07 | 1.03 ± 0.46 | 1.70 ± 1.36 | MS, KI | | | | | |
| 20 | 919 | Benzene | 3.41 ± 1.04 | 2.53 ± 0.32 | 2.64 ± 0.95 | 4.62 ± 1.20 | 4.89 ± 2.43 | MS, KI | | | | | |
| 21 | 925 | 3-buten2-one | 0.84 ± 0.27 | 0.58 ± 0.19 | 0.69 ± 0.17 | 0.79 ± 0.32 | 0.99 ± 0.22 | MS, KI | | | | | |
| 22 | 934 | 2-Ethyl furan | 10.11 ± 4.03 a | 10.01 ± 2.19 a | 9.71 ± 1.19 a | 35.32 ± 16.19 b | 26.25 ± 9.72 ab | MS, KI | | | | | |
| 23 | 944 | 2-Ethyl acrolein | 0.56 ± 0.15 | 0.41 ± 0.10 | 0.47 ± 0.15 | 0.65 ± 0.12 | 0.54 ± 0.02 | MS, KI | | | | | |
| 24 | 955 | 3-Pentanone+2-Pentanone | 3.75 ± 1.78 a | 2.79 ± 0.94 a | 2.91 ± 0.75 a | 4.98 ± 0.96 a | 9.14 ± 1.33 b | MS, KI | | | | | |
| 25 | 957 | Pentanal | 25.70 ± 12.55 | 19.31 ± 6.41 | 16.42 ± 4.76 | 23.61 ± 2.68 | 25.11 ± 6.60 | MS, KI | | | | | |
| 26 | 990 | Methyl isobutyl ketone | 0.67 ± 0.54 | 0.39 ± 0.20 | 0.45 ± 0.24 | 0.32 ± 0.16 | 0.59 ± 0.22 | MS, KI | | | | | |
| 27 | 1000 | Decane | 0.81 ± 0.30 | 0.68 ± 0.23 | 0.79 ± 0.05 | 0.76 ± 0.19 | 0.86 ± 0.30 | MS, KI | | | | | |
| 28 | 1004 | 1-Penten-3-one | 7.58 ± 3.15 | 7.51 ± 3.50 | 6.87 ± 1.83 | 7.98 ± 1.27 | 8.01 ± 2.28 | MS, KI | | | | | |
| 29 | 1006 | α-Pinene | 0.09 ± 0.07 | 0.20 ± 0.17 | 0.02 ± 0.02 | 0.03 ± 0.02 | 0.19 ± 0.15 | MS, KI | | | | | |
| 30 | 1020 | (E)-2-Butenal +Toluene | 2.96 ± 0.17 | 3.06 ± 0.78 | 2.09 ± 0.27 | 4.23 ± 2.78 | 4.70 ± 0.93 | MS, KI | | | | | |

Table3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | DM | | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------|--|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | | |
| 31 | 1027 | 1-Propanol | 0.71 ± 0.24 a | 0.90 ± 0.30 a | 0.79 ± 0.13 a | 1.57 ± 0.54 ab | 2.90 ± 1.27 b | MS, KI | | |
| 32 | 1036 | 2-Methyl 3-buten-2-ol | 0.03 ± 0.05 | ND | 0.11 ± 0.10 | 0.12 ± 0.10 | 0.15 ± 0.11 | MS, KI | | |
| 33 | 1045 | Camphene | 2.19 ± 0.44 | 2.20 ± 0.79 | 2.44 ± 0.56 | 2.72 ± 0.79 | 3.29 ± 1.06 | MS, KI | | |
| 34 | 1047 | 2,3-Pentanedione | 28.17 ± 2.69 a | 28.28 ± 3.95 a | 36.35 ± 12.25 a | 68.26 ± 20.27 b | 56.57 ± 15.11 ab | MS, KI | | |
| 35 | 1065 | Hexanal | 623.52 ± 302.05 | 461.56 ± 216.66 | 406.89 ± 91.02 | 709.57 ± 232.04 | 531.85 ± 235.25 | MS, KI | | |
| 36 | 1086 | (Z)-2-Pentenal | 2.84 ± 0.52 | 2.92 ± 1.08 | 2.19 ± 0.62 | 3.10 ± 0.69 | 2.07 ± 1.36 | MS | | |
| 37 | 1096 | Undecane | 0.82 ± 0.30 | 3.16 ± 3.48 | 1.07 ± 0.26 | 10.73 ± 12.40 | 4.85 ± 1.37 | MS, KI | | |
| 38 | 1103 | Ethyl benzene | 1.55 ± 0.36 a | 2.21 ± 1.31 a | 1.15 ± 0.24 a | 1.92 ± 0.23 a | 6.64 ± 3.83 b | MS, KI | | |
| 39 | 1106 | (E)-2-Pentenal | 15.77 ± 5.68 | 16.46 ± 2.86 | 14.48 ± 2.18 | 25.39 ± 10.39 | 22.23 ± 4.78 | MS, KI | | |
| 40 | 1117 | 2,3-Hexanedione | 1.27 ± 0.40 | 0.87 ± 0.43 | 0.91 ± 0.27 | 1.80 ± 0.94 | 1.55 ± 0.47 | MS, KI | | |
| 41 | 1117 | 1,3-Dimethyl benzene | 0.89 ± 0.20 ab | 0.57 ± 0.31 a | 0.52 ± 0.13 a | 0.73 ± 0.42 a | 1.77 ± 0.77 b | MS, KI | | |
| 42 | 1130 | (E)-3-Hexenal | 0.64 ± 0.22 | 0.50 ± 0.36 | 0.50 ± 0.12 | 0.94 ± 0.42 | 0.59 ± 0.17 | MS, KI | | |
| 43 | 1133 | (Z)-3-Hexenal | 3.28 ± 0.70 | 4.21 ± 0.55 | 3.07 ± 1.02 | 3.68 ± 1.66 | 2.90 ± 0.57 | MS, KI | | |
| 44 | 1133 | 1-Butanol | 1.34 ± 0.09 | 1.97 ± 0.75 | 1.79 ± 0.59 | 2.42 ± 1.20 | 2.40 ± 0.32 | MS, KI | | |
| 45 | 1138 | 3-Heptanone | 0.65 ± 0.25 | 0.67 ± 0.11 | 0.49 ± 0.11 | 1.07 ± 0.60 | 1.14 ± 0.25 | MS, KI | | |
| 46 | 1149 | 1-Penten-3-ol | 41.42 ± 10.29 a | 44.55 ± 2.11 a | 62.04 ± 24.60 ab | 116.15 ± 33.60 b | 122.66 ± 43.65 b | MS, KI | | |
| 47 | 1159 | 1,2-Dimethyl benzene | 0.34 ± 0.21 ab | 0.18 ± 0.26 a | 0.05 ± 0.04 a | 0.64 ± 0.52 ab | 1.24 ± 0.62 b | MS, KI | | |
| 48 | 1166 | 2-Heptanone | 2.82 ± 0.83 | 2.60 ± 0.91 | 2.97 ± 0.44 | 7.00 ± 3.05 | 14.73 ± 11.49 | MS, KI | | |
| 49 | 1169 | Heptanal | 42.98 ± 11.65 a | 56.22 ± 24.18 ab | 37.98 ± 7.92 a | 88.38 ± 22.16 b | 53.43 ± 8.20 ab | MS, KI | | |
| 50 | 1179 | D-Limonene | 2.38 ± 1.93 | 4.44 ± 2.87 | 2.15 ± 1.70 | 2.60 ± 1.41 | 5.41 ± 3.08 | MS, KI | | |
| 51 | 1181 | (Z)-2-Hexenal | 0.39 ± 0.08 ab | 0.65 ± 0.25 ab | 0.08 ± 0.11 a | 1.04 ± 0.72 b | 0.41 ± 0.12 ab | MS | | |
| 52 | 1195 | (E)-2-Hexenal | 14.59 ± 4.14 | 14.41 ± 1.87 | 15.36 ± 2.18 | 34.47 ± 15.55 | 28.84 ± 11.95 | MS, KI | | |
| 53 | 1198 | Dodecane | 1.38 ± 0.86 | 8.69 ± 10.67 | 1.84 ± 1.67 | 27.03 ± 30.61 | 16.38 ± 6.90 | MS, KI | | |
| 54 | 1217 | 2-Pentyl furan, | 3.56 ± 1.45 | 3.26 ± 0.73 | 3.45 ± 0.62 | 5.02 ± 1.82 | 4.20 ± 1.63 | MS, KI | | |
| 55 | 1219 | (E)-4-Heptenal | 0.21 ± 0.05 | 0.72 ± 0.86 | 0.00 ± 0.00 | 2.66 ± 2.33 | 0.07 ± 0.10 | MS | | |
| 56 | 1221 | 1,3,5-Trimethyl benzene | 1.08 ± 0.36 ab | 0.98 ± 0.69 ab | 0.75 ± 0.16 a | 1.23 ± 0.59 ab | 2.31 ± 0.89 b | MS, KI | | |
| 57 | 1223 | (Z)-4-Heptenal | 3.39 ± 1.36 a | 3.16 ± 1.10 a | 3.56 ± 0.52 a | 14.50 ± 6.94 b | 12.31 ± 7.50 ab | MS, KI | | |
| 58 | 1231 | 3-Methyl 3-buten-1-ol | 0.05 ± 0.07 a | 0.70 ± 0.27 ab | 0.68 ± 0.18 ab | 0.59 ± 0.58 ab | 1.14 ± 0.38 b | MS, KI | | |
| 59 | 1234 | Styrene | 2.13 ± 1.27 | 2.30 ± 0.78 | 3.57 ± 1.08 | 17.27 ± 6.26 | 80.77 ± 77.09 | MS, KI | | |
| 60 | 1236 | 1-Pentanol | 19.34 ± 4.89 | 22.11 ± 2.88 | 23.75 ± 4.79 | 31.30 ± 8.97 | 31.56 ± 11.34 | MS, KI | | |

Table 3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | DM | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | |
| 61 | 1238 | 1-Hexen-3-ol | 4.43 ± 0.87 | 11.41 ± 8.88 | 3.22 ± 2.67 | 4.14 ± 2.69 | 9.67 ± 4.37 | MS, KI | |
| 62 | 1258 | 1,2,4-Trimethyl benzene, | 0.91 ± 0.76 ab | 0.94 ± 0.63 ab | 0.34 ± 0.12 a | 0.26 ± 0.21 a | 1.97 ± 0.11 b | MS, KI | |
| 63 | 1260 | Acetoin | 0.31 ± 0.20 a | ND | 0.53 ± 0.57 a | 2.25 ± 0.79 b | 3.05 ± 0.70 b | MS, KI | |
| 64 | 1263 | Cyclohexanone | 9.58 ± 1.79 a | 8.11 ± 1.13 a | 7.44 ± 2.21 a | 11.95 ± 3.01 ab | 14.85 ± 0.52 b | MS, KI | |
| 65 | 1269 | 2-Octanone | 0.74 ± 0.26 a | 0.29 ± 0.21 a | 0.83 ± 0.13 a | 1.34 ± 0.55 a | 3.38 ± 1.50 b | | |
| 66 | 1273 | Octanal | 41.45 ± 5.35 | 36.06 ± 8.20 | 33.59 ± 7.11 | 39.55 ± 6.18 | 32.73 ± 4.40 | MS, KI | |
| 67 | 1284 | 1-Octen-3-one | 10.79 ± 2.47 | 10.79 ± 5.46 | 8.66 ± 2.21 | 18.01 ± 11.43 | 11.38 ± 5.58 | MS, KI | |
| 68 | 1294 | (E)-2-Penten-1-ol | 1.85 ± 0.59 | 2.12 ± 0.17 | 2.19 ± 0.98 | 6.83 ± 4.67 | 5.06 ± 2.58 | MS, KI | |
| 69 | 1298 | Tridecane | 2.50 ± 2.04 | 9.92 ± 10.48 | 2.77 ± 2.61 | 32.59 ± 34.49 | 25.22 ± 12.15 | MS, KI | |
| 70 | 1302 | (Z)-2-Penten-1-ol | 31.58 ± 6.38 | 33.76 ± 0.77 | 33.20 ± 9.54 | 58.40 ± 21.25 | 54.90 ± 20.46 | MS, KI | |
| 71 | 1309 | 2,3-Octanedione | 94.09 ± 34.67 a | 96.10 ± 37.34 a | 117.75 ± 30.63 ab | 242.99 ± 93.25 b | 177.53 ± 66.20 ab | MS | |
| 72 | 1319 | 6-Methyl 5-hepten-2-one | 2.84 ± 1.39 | 2.39 ± 0.87 | 2.99 ± 2.18 | 6.49 ± 4.97 | 6.02 ± 2.35 | MS, KI | |
| 73 | 1337 | 1-Hexanol | 141.52 ± 18.93 | 120.79 ± 14.81 | 66.22 ± 9.55 | 78.69 ± 19.05 | 137.25 ± 63.58 | MS, KI | |
| 74 | 1345 | (E)-3-Hexen-1-ol | 0.06 ± 0.08 a | 0.01 ± 0.02 a | 0.40 ± 0.30 ab | 0.95 ± 0.54 ab | 1.56 ± 1.13 b | MS, KI | |
| 75 | 1364 | (Z)-3-Hexen-1-ol | 0.54 ± 0.39 a | 0.25 ± 0.36 a | 6.94 ± 0.85 b | 1.78 ± 0.85 a | 1.29 ± 1.08 a | MS, KI | |
| 76 | 1372 | 2-Nonanone | 3.95 ± 0.37 a | 3.46 ± 0.58 a | 4.93 ± 2.66 a | 5.33 ± 1.70 ab | 9.87 ± 3.47 b | MS, KI | |
| 77 | 1377 | (E,E)-2,4-Hexadienal | 3.73 ± 1.66 a | 4.70 ± 2.74 a | 5.61 ± 1.96 ab | 15.77 ± 8.62 b | 8.18 ± 3.71 ab | MS, KI | |
| 78 | 1377 | Nonanal | 103.05 ± 49.04 | 117.56 ± 27.23 | 128.59 ± 41.37 | 118.45 ± 35.44 | 73.10 ± 32.26 | MS, KI | |
| 79 | 1407 | (E)-2-Octenal | 22.94 ± 4.98 | 25.58 ± 6.32 | 17.91 ± 2.70 | 36.88 ± 20.56 | 37.30 ± 22.05 | MS, KI | |
| 80 | 1431 | 1-Octen-3-ol | 118.14 ± 41.33 | 117.09 ± 36.18 | 113.66 ± 19.69 | 188.86 ± 66.99 | 246.70 ± 123.91 | MS, KI | |
| 81 | 1435 | 1-Heptanol | 37.37 ± 7.41 | 42.59 ± 2.53 | 25.90 ± 3.84 | 31.86 ± 4.33 | 41.51 ± 12.41 | MS, KI | |
| 82 | 1439 | (E,Z)-2,4-Heptadienal | 62.69 ± 5.05 | 67.29 ± 3.44 | 50.18 ± 6.11 | 117.80 ± 50.81 | 106.56 ± 40.75 | MS, KI | |
| 83 | 1463 | Unknown | 37.07 ± 12.92 a | 40.70 ± 7.01 a | 59.23 ± 17.18 ab | 94.95 ± 26.95 ab | 120.63 ± 54.49 b | | |
| 84 | 1465 | (E,E)-2,4-Heptadienal | 95.23 ± 13.44 a | 103.20 ± 11.22 ab | 105.12 ± 28.58 ab | 219.30 ± 89.54 b | 179.41 ± 60.66 ab | MS, KI | |
| 85 | 1469 | 2-Ethyl 1-hexanol | 21.34 ± 6.18 a | 86.13 ± 22.52 a | 119.15 ± 56.27 a | 292.10 ± 41.30 a | 649.34 ± 325.94 b | MS, KI | |
| 86 | 1479 | Decanal | 5.73 ± 1.70 | 5.48 ± 1.51 | 5.55 ± 1.37 | 5.15 ± 0.90 | 6.13 ± 4.28 | | |
| 87 | 1490 | Benzaldehyde | 15.20 ± 3.08 | 14.16 ± 1.36 | 14.46 ± 2.23 | 35.22 ± 14.28 | 42.37 ± 24.71 | MS, KI | |
| 88 | 1492 | (E,Z)-3,5-Octadien-2-one | 19.51 ± 1.48 | 16.76 ± 1.34 | 16.67 ± 4.91 | 44.16 ± 24.13 | 61.13 ± 40.69 | MS | |
| 89 | 1493 | Pentadecane | 19.67 ± 19.45 | 34.19 ± 15.99 | 21.06 ± 21.82 | 73.27 ± 58.39 | 96.64 ± 47.61 | MS, KI | |
| 90 | 1513 | (E)-2-Nonenal | 10.40 ± 1.33 | 10.86 ± 1.06 | 10.11 ± 2.52 | 18.89 ± 8.92 | 17.57 ± 8.90 | MS, KI | |

Table 3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | DM | | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|--|--------|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | | |
| 91 | 1516 | Unknown | 6.08 ± 1.73 a | 5.35 ± 1.17 a | 6.43 ± 1.40 a | 14.56 ± 5.86 ab | 33.01 ± 21.50 b | | | |
| 92 | 1517 | Unknown | 5.39 ± 1.37 a | 9.50 ± 1.33 a | 11.95 ± 0.84 a | 32.39 ± 8.49 ab | 60.46 ± 34.32 b | | | |
| 93 | 1525 | Unknown | 4.74 ± 3.29 a | 8.17 ± 2.33 a | 18.49 ± 10.65 a | 29.40 ± 6.29 a | 74.24 ± 31.59 b | | | |
| 94 | 1535 | 1-Octanol | 48.40 ± 22.45 | 54.71 ± 4.00 | 45.41 ± 10.10 | 37.52 ± 6.34 | 35.30 ± 9.96 | | MS, KI | |
| 95 | 1538 | Unknown | 5.54 ± 1.38 a | 25.83 ± 9.13 ab | 29.34 ± 9.35 ab | 98.77 ± 29.44 b | 198.27 ± 78.61 c | | | |
| 96 | 1540 | Unknown | 4.56 ± 1.62 a | 25.34 ± 4.99 a | 32.23 ± 10.12 a | 96.34 ± 20.06 a | 259.60 ± 137.99 b | | | |
| 97 | 1543 | (E,E)-3,5-Octadien-2-one | 12.25 ± 0.84 a | 17.05 ± 2.25 a | 21.13 ± 4.98 a | 71.45 ± 27.27 b | 108.99 ± 36.45 b | | MS | |
| 98 | 1550 | Unknown | 0.21 ± 0.17 a | 3.55 ± 1.55 a | 4.05 ± 1.86 a | 18.49 ± 5.15 a | 46.97 ± 23.34 b | | | |
| 99 | 1561 | (E,Z)-2,6-Nonadienal | 9.51 ± 1.29 | 13.72 ± 1.98 | 13.50 ± 0.32 | 35.95 ± 24.40 | 19.67 ± 8.50 | | MS, KI | |
| 100 | 1562 | (E,E)-2,4-Octadienal | 2.55 ± 1.11 | 3.97 ± 1.23 | 3.85 ± 0.59 | 7.38 ± 3.55 | 6.72 ± 4.03 | | MS, KI | |
| 101 | 1565 | Unknown | 2.30 ± 0.51 a | 5.48 ± 1.94 a | 7.22 ± 1.85 a | 26.18 ± 6.80 a | 63.94 ± 30.37 b | | | |
| 102 | 1569 | Unknown | 0.75 ± 0.47 a | 6.67 ± 2.11 a | 9.31 ± 3.42 a | 36.13 ± 10.54 a | 83.25 ± 34.12 b | | | |
| 103 | 1575 | Unknown | 2.92 ± 0.96 a | 14.55 ± 4.14 a | 16.35 ± 4.45 a | 50.77 ± 14.68 a | 117.48 ± 57.54 b | | | |
| 104 | 1579 | 2-Undecanone | 4.09 ± 0.64 a | 5.70 ± 1.70 a | 6.00 ± 1.19 a | 10.48 ± 3.11 a | 19.70 ± 7.98 b | | MS | |
| 105 | 1585 | Unknown | 11.47 ± 1.23 a | 44.61 ± 7.27 a | 57.17 ± 15.98 a | 175.01 ± 43.24 a | 378.88 ± 155.45 b | | | |
| 106 | 1593 | Unknown | 148.96 ± 16.01 a | 261.88 ± 40.72 a | 306.44 ± 57.04 a | 645.91 ± 168.28 a | 1220.17 ± 441.64 b | | | |
| 107 | 1601 | Unknown | 11.15 ± 5.02 a | 52.35 ± 9.99 a | 71.12 ± 21.67 a | 198.15 ± 50.93 a | 431.85 ± 167.35 b | | | |
| 108 | 1603 | Unknown | 11.94 ± 5.07 a | 67.15 ± 13.03 ab | 89.15 ± 23.84 ab | 256.61 ± 58.46 b | 542.05 ± 206.05 c | | | |
| 109 | 1606 | Unknown | 25.77 ± 6.32 a | 128.53 ± 27.43 a | 153.44 ± 43.24 a | 411.56 ± 98.46 a | 850.89 ± 352.12 b | | | |
| 110 | 1619 | Acetophenone | 0.18 ± 0.13 a | 0.04 ± 0.02 a | 0.78 ± 0.58 a | 1.10 ± 1.21 ab | 3.21 ± 1.91 b | | MS, KI | |
| 111 | 1621 | (E)-2-Decenal | 10.83 ± 0.76 | 10.01 ± 3.07 | 12.43 ± 3.36 | 11.15 ± 1.84 | 12.65 ± 11.63 | | MS | |
| 112 | 1637 | 1-Nonanol | 21.19 ± 10.14 a | 57.12 ± 7.18 a | 62.79 ± 9.88 a | 126.68 ± 27.96 a | 247.60 ± 97.97 b | | MS, KI | |
| 113 | 1644 | 2-hydroxy-Benzaldehyde | 4.66 ± 1.24 | 2.44 ± 1.01 | 4.13 ± 1.07 | 6.17 ± 2.75 | 7.17 ± 3.47 | | MS, KI | |
| 114 | 1675 | (E,E)-2,4-Nonadienal | 8.15 ± 1.66 | 8.00 ± 0.77 | 6.91 ± 2.07 | 14.18 ± 6.38 | 11.93 ± 5.61 | | MS, KI | |
| 115 | 1679 | Unknown | 3.39 ± 0.15 | 3.66 ± 0.39 | 4.00 ± 1.65 | 4.39 ± 1.58 | 6.21 ± 3.04 | | MS, KI | |
| 116 | 1692 | Dodecanal | 9.79 ± 7.96 | 6.70 ± 2.77 | 12.44 ± 5.49 | 4.25 ± 1.45 | 4.91 ± 0.25 | | MS, KI | |
| 117 | 1694 | Heptadecane | 13.61 ± 8.56 | 12.76 ± 8.25 | 9.72 ± 2.69 | 7.64 ± 3.76 | 18.53 ± 9.80 | | MS, KI | |
| 118 | 1707 | Pentanoic acid | 0.00 ± 0.00 | 0.39 ± 0.55 | 0.23 ± 0.16 | 0.14 ± 0.20 | 0.60 ± 0.78 | | MS, KI | |
| 119 | 1731 | (E)-2-Undecenal | 5.28 ± 1.02 | 5.28 ± 2.77 | 5.82 ± 1.70 | 3.84 ± 1.70 | 4.15 ± 1.29 | | MS, KI | |
| 120 | 1740 | (E,Z)-2,4-Decadienal | 17.43 ± 1.79 | 17.87 ± 4.52 | 15.62 ± 4.19 | 31.90 ± 15.68 | 33.80 ± 12.89 | | MS | |

Table 3-3. (Continued)

| Peak No | Kovats retention index | Compounds | DM | | | | | | | Identification |
|---------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|--|--|----------------|
| | | | Storage periods (days) | | | | | | | |
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 | | | |
| 121 | 1770 | Tetrahydro 2H-pyran-2-one | 0.00 ± 0.00 | 0.02 ± 0.03 | 0.18 ± 0.20 | 0.16 ± 0.22 | 0.32 ± 0.26 | | | MS, KI |
| 122 | 1786 | (E,E)-2,4-Decadienal | 18.15 ± 3.78 | 18.49 ± 6.70 | 19.11 ± 5.89 | 31.44 ± 11.77 | 27.05 ± 7.64 | | | MS, KI |
| 123 | 1818 | Hexanoic acid | 1.79 ± 0.29 a | 1.48 ± 1.52 a | 1.88 ± 0.41 a | 11.60 ± 6.18 b | 6.33 ± 1.50 ab | | | MS, KI |
| 124 | 1927 | Heptanoic acid | 0.96 ± 0.46 | 2.91 ± 1.76 | 1.07 ± 0.10 | 3.12 ± 4.42 | 1.52 ± 1.08 | | | MS, KI |
| 125 | 1946 | Dodecanol | 5.04 ± 2.09 | 5.71 ± 2.36 | 7.44 ± 3.82 | 6.87 ± 0.42 | 11.10 ± 5.17 | | | MS, KI |
| 126 | 2030 | Octanoic acid | 8.18 ± 3.03 | 12.40 ± 5.05 | 21.33 ± 16.98 | 35.09 ± 21.69 | 31.64 ± 20.19 | | | MS, KI |
| 127 | 2138 | Nonanoic acid | 11.25 ± 1.70 | 9.92 ± 8.65 | 14.43 ± 7.31 | 5.45 ± 5.87 | 9.03 ± 5.27 | | | MS, KI |
| 128 | 2245 | n-Decanoic acid | 8.24 ± 0.98 | 10.29 ± 5.70 | 17.16 ± 9.73 | 11.53 ± 8.15 | 16.24 ± 0.40 | | | MS, KI |

The values indicated means ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$).

OD, Ordinary muscle in dorsal part; DM, Dark muscle. ND, not detected. Identification was based on Kovats retention index (KI) and comparison of mass spectra (MS). † indicates significant difference between OM and DM for the same storage days and the same volatiles ($P < 0.05$). Small letters for the same flesh types and the same volatiles with a different letter were significantly different among samples during storage ($P < 0.05$).

Table 3-4. Sensory test of ordinary muscles from red sea bream subjected to ice storage

| | Storage periods (days) | | | | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| Putrid odor | 2.24 ± 1.05 ^a | 2.42 ± 1.13 ^a | 2.55 ± 1.11 ^a | 3.07 ± 1.12 ^b | 4.43 ± 0.89 ^c |
| Fresh raw fish odor | 2.19 ± 1.13 ^a | 2.36 ± 1.06 ^a | 2.52 ± 1.04 ^a | 3.14 ± 1.22 ^b | 4.26 ± 1.11 ^c |

The values indicated means ± standard deviation ($n = 42$). Small letters for the same analyzed items with a different letter were significantly different ($P < 0.05$).

Table 3-5. OTU and α diversity index of red sea bream ordinary muscles during ice storage

| | Storage periods (day) | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------|----------|--------------------|----------|--------------------|----------|-------------------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | | | | |
| OTU | 132.00 ± | 27.30 ^a | 134.00 ± | 14.00 ^a | 34.00 ± | 12.22 ^b | 29.00 ± | 5.29 ^b |
| Chao1 | 132.33 ± | 27.30 ^a | 134.00 ± | 14.00 ^a | 34.67 ± | 12.22 ^b | 29.00 ± | 5.29 ^b |
| ACE | 132.33 ± | 27.30 ^a | 134.00 ± | 14.00 ^a | 34.67 ± | 12.22 ^b | 29.00 ± | 5.29 ^b |
| Shannon | 5.60 ± | 0.23 ^a | 5.92 ± | 0.22 ^a | 3.46 ± | 0.54 ^b | 3.50 ± | 0.52 ^b |
| Simpson | 0.95 ± | 0.02 ^{ab} | 0.96 ± | 0.02 ^a | 0.87 ± | 0.04 ^{bc} | 0.85 ± | 0.08 ^c |
| Goods Coverage(%) | 100.00 ± | 0.00 | 100.00 ± | 0.00 | 100.00 ± | 0.00 | 100.00 ± | 0.00 |

The values indicated means ± standard deviation of triplicate determinations ($n = 3$). Small letters for the same index with a different letter were significantly different ($P < 0.05$).

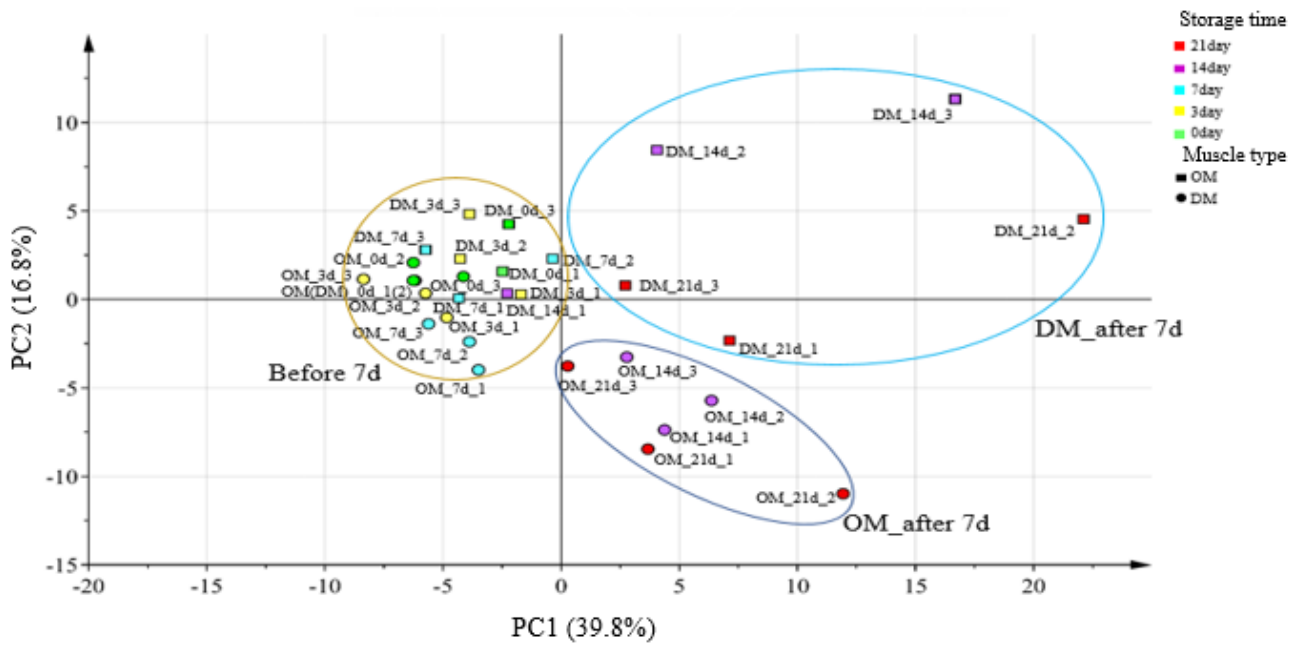


Fig.3-1A. Score plot of principal components analysis (PC1 and PC2) for red sea bream muscles during ice storage by using the peak areas of 128 volatile compounds. OM, Ordinary muscle; DM, Dark muscle. Storage time indicates as follows; ex. 21d, Storage for 21 day. The numbers after storage time indicate sample number.

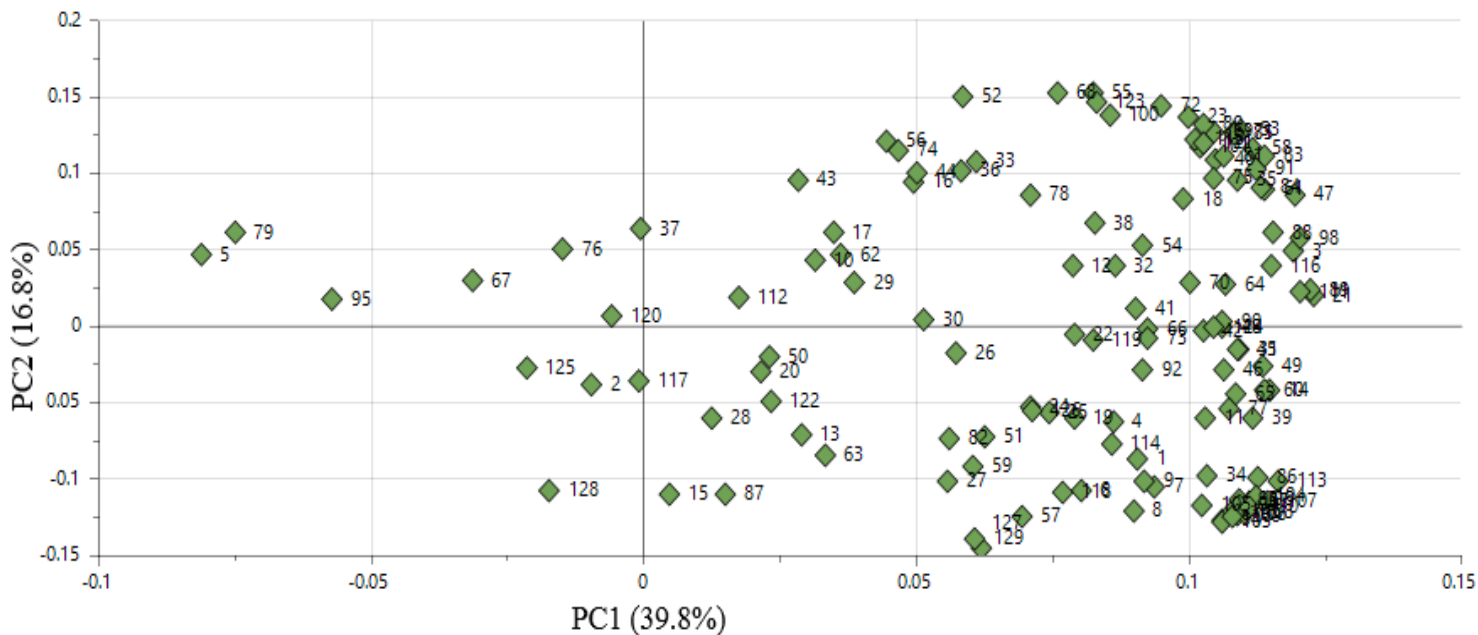


Fig.3-1B. Loading plot of principal components (PC1 and PC2) for red sea bream muscles during ice storage by using the peak areas of 128 volatile compounds. Number indicates peak No. in Table 3-3.

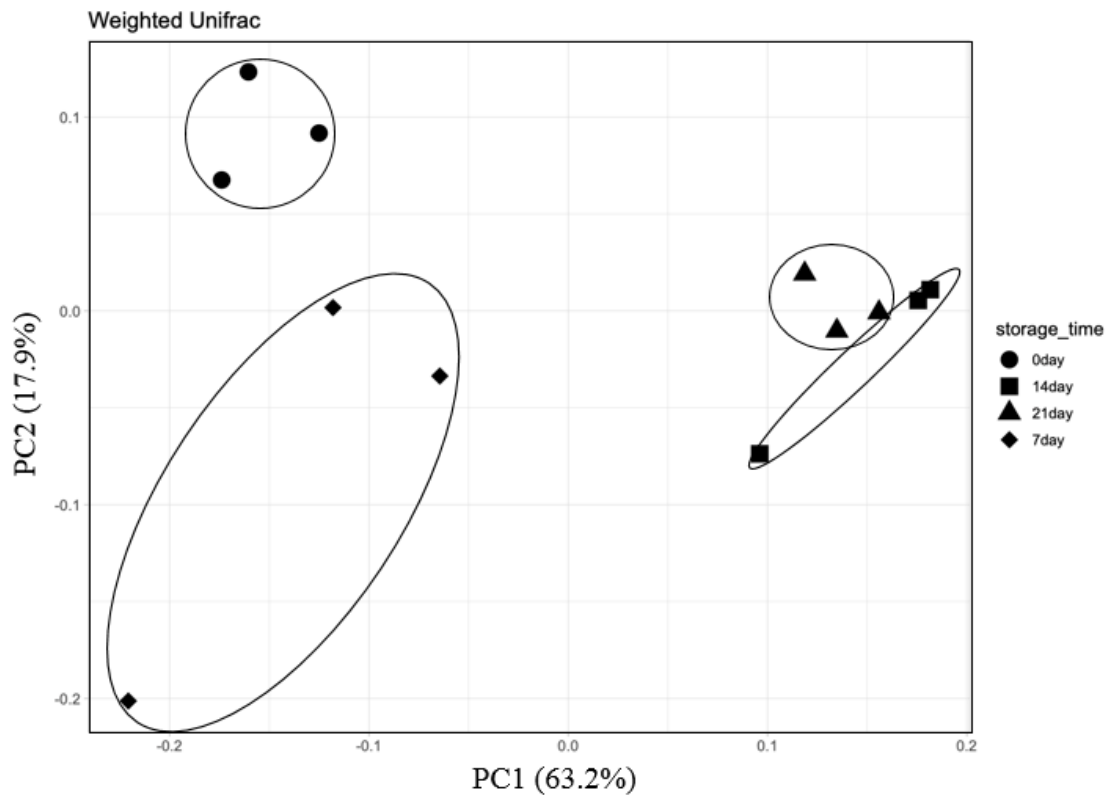


Fig.3-2. Principal Coordinate Analysis for ordinary muscle from red sea bream muscles during ice storage.

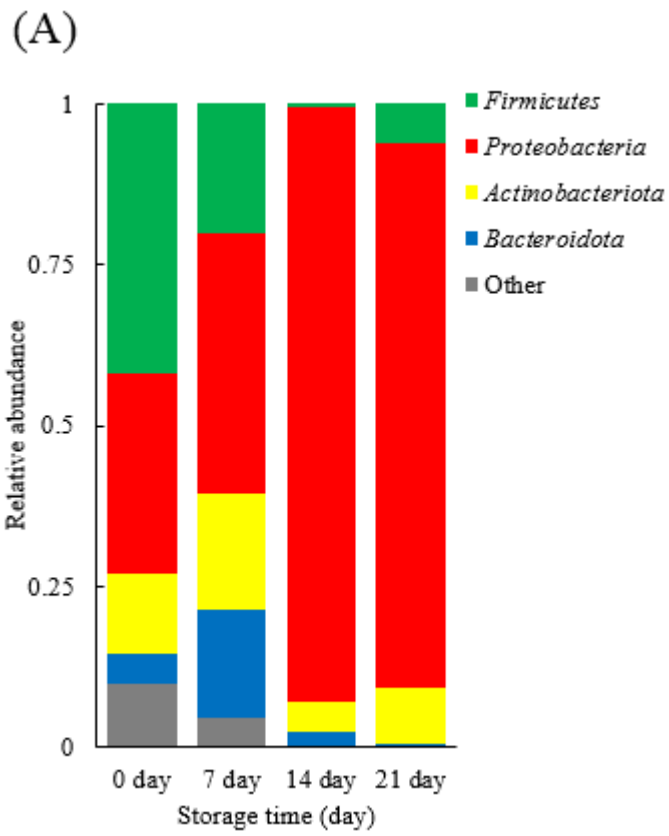


Fig.3-3A.Relative abundance of the microbiota in ordinary muscle from red sea bream during ice storage (phylum level)

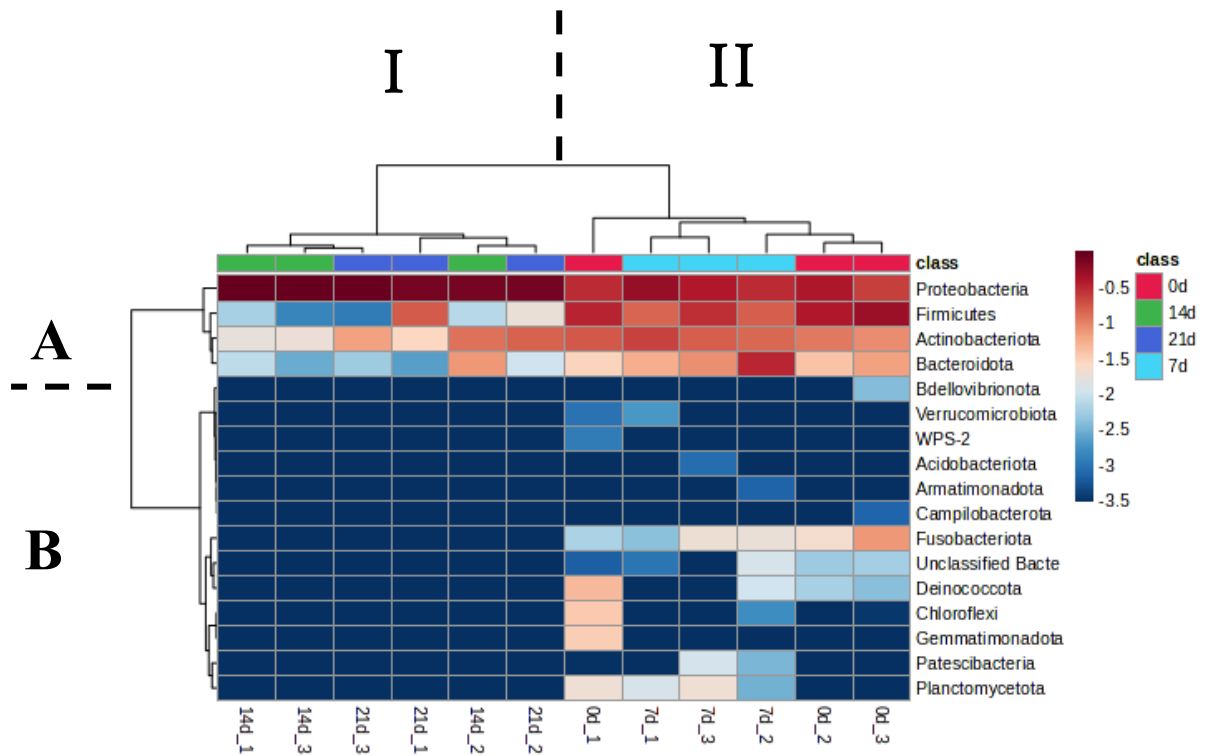


Fig.3-4A. Heatmap visualization and hierarchical clustering based on microbiota in ordinary muscle from red sea bream during ice storage (genus level). The color indicates a relative value (blue, low value; red, high value). Storage time indicates as follows; ex. 21d, storage for 21days. The numbers after storage time indicate sample number.

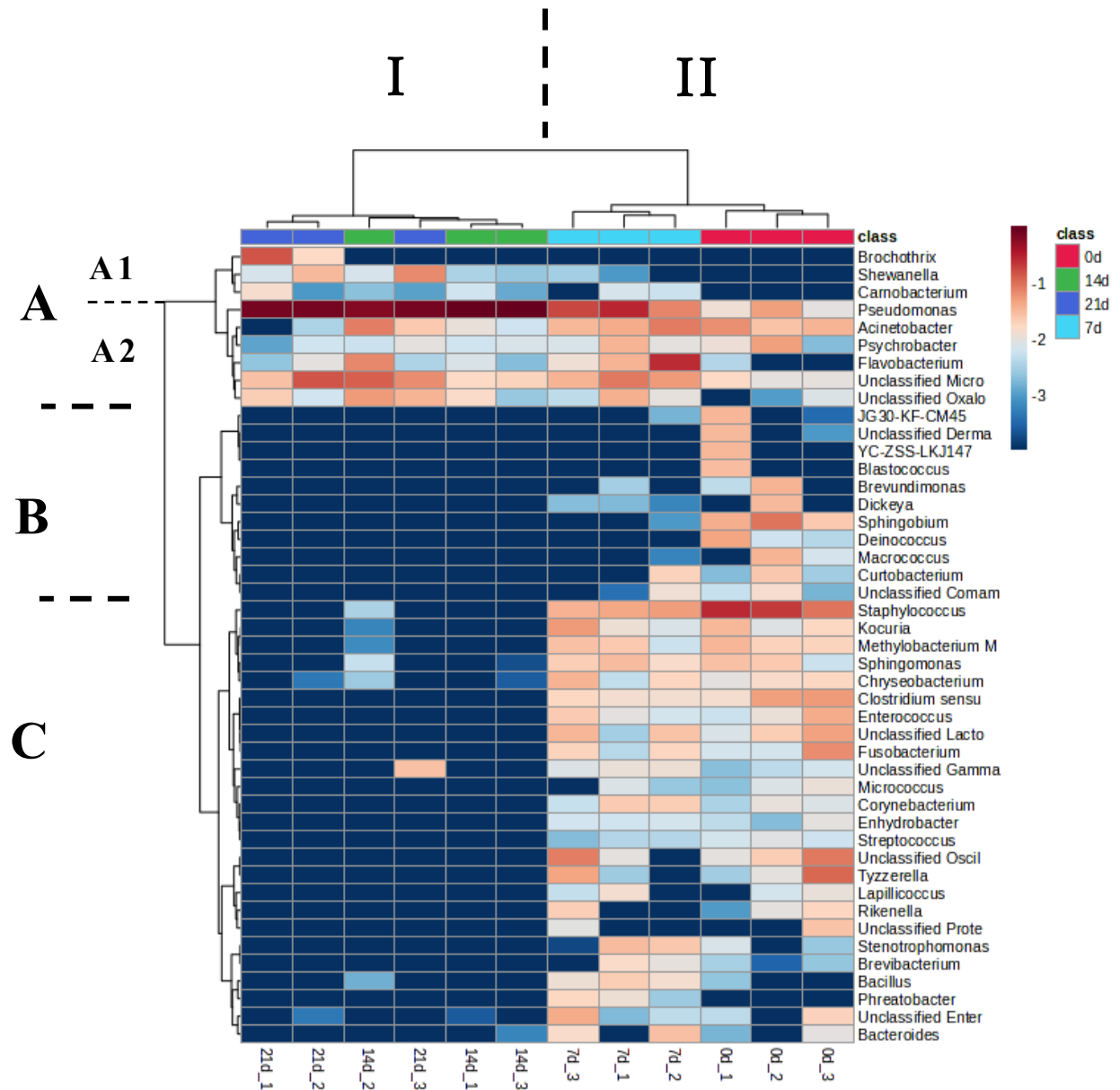


Fig.3-4A. Heatmap visualization and hierarchical clustering based on microbiota in ordinary muscle from red sea bream during ice storage (genus level). Storage time indicates as follows; ex. 21d, Storage for 21 day. The numbers after storage time indicate sample number.

第 4 章 総括

新鮮な魚介類は美味で栄養価も非常に高いため、国際的に需要が高まっている。しかしながら、その水揚げ後の品質劣化が著しく、貯蔵・流通時の品質保持が困難は課題となっている。魚介類の賞味期限を延ばし、品質を維持するためには、その変化挙動を明らかにし、適切な流通条件を確立することが重要である。

そこで、本研究では、活ムール貝およびマダイ肉について、貯蔵が、エキス成分または揮発性成分および菌叢の変化に対してどのような影響を及ぼすか検討を行った。

第 2 章では、活ムール貝の適切な流通条件を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的として異なる温度で貯蔵した活ムール貝の致死率、SDH 活性、一般成分、VBC およびエキス成分を測定し、TAV および EUC を算出するとともに、分析値に基づく HCA、さらに、NGS による菌叢解析を行った。致死率および SDH 活性の結果から、0°C は、活ムール貝の貯蔵に不適切なことが示唆された。EUC および TAV の結果から、異なる貯蔵温度は活ムール貝の旨味強度に影響しないが、5°C および 10°C で 12 日間保存した活ムール貝では、0°C で貯蔵した試料に比べて呈味成分の変化パターンが異なる。エキス成分や VBC に基づく HCA の結果、5°C と 10°C で保存した試料は 0°C で保存した試料とのエキス成分の組成、生菌数、味覚変化のパターンが異なることが示唆された。NGS の解析結果は、5°C と 10°C で貯蔵した両試料が貯蔵前と比較して変化しているが、10°C で貯蔵した試料に腐敗や食中毒に関与する細菌の増殖が 5°C より大きく進行したことを示した。これらの結果から、ムール貝の最適な流通条

件は、5°C、7日以内と判断された。

第3章では、腐敗に至るまでのマダイのOMとDMの揮発性成分と菌叢の変化を明らかにするとともに、腐敗に特徴的な揮発性成分およびSSOを特定することを目的として、マダイ筋肉のVBC、TVBN、TMA、TBARSおよび揮発性成分の分析、官能評価とNGSによる菌叢解析を行った。生菌数と官能評価の結果から、両筋肉部位において、14日目に腐敗が始まり、21日目に完全腐敗し、喫食不可となった。普通肉のTVBNおよびTMAの結果は、この二つの指標は腐敗指標としては不十分なことが示唆された。脂質酸化指標のTBARSの結果は、マダイの氷蔵において、脂質酸化は血合肉で進行するが、普通肉では進行しないことが示された。揮発性成分の結果から、(E,E)-3,5-オクタジエン-2-オン, Unknown(KI:1538), Unknown(KI:1603)の3つの揮発性成分に品質劣化のマーカーとしての可能性があること明らかとなった。NGS解析の結果から、*Pseudomonas*がマダイのSSOとして特定され、同時に*Shewanera*や*Brochothrix*などの腐敗も増殖することが明らかとなった。これらの知見は、マダイの腐敗過程の評価に使用することが可能である。

以上述べたとおり、まず、致死率、エキス成分および菌叢変化に基づき高品質な活ムール貝を消費者に届けることを実現できる流通方法を提案した。また、氷蔵マダイの腐敗に至るまでの揮発性成分および菌叢変化を解明した。したがって、本論文は、流通・貯蔵時の魚介類の品質劣化の挙動の一端を明らかにした研究といえる。しかし本論文では、貯蔵された活ムール貝の脂質や揮発性成分の分析、官能評価は行っていない。貯蔵中のムール貝の品質変化をよりよく理解し、より最適な貯蔵条件を決定するためには、さ

らなる研究が必要である。また，マダイ以外の白身魚について検討を行うとともに，異なる貯蔵条件（貯蔵温度やガス置換包装）の影響を検討することも必要である。このように，魚介類の品質劣化挙動についてさらに理解を深めるためには，今後，さらに多くの知見を得る必要がある。

最後に，本論文の成果は，収穫後の活ムール貝およびマダイの貯蔵管理のための基礎的知見だけでなく，広く水産物の貯蔵・流通に応用されることが期待される。

謝 辞

本研究の実施と論文の執筆にあたり，終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました県立広島大学 地域創生学部 谷本昌太教授に心から感謝申し上げます。

本学位論文の審査にあたり，有益なご助言とご指導を賜りました県立広島大学 地域創生学部 北台靖彦教授 並びに生物資源科学部 馬淵良太准教授，山本幸弘准教授に心より感謝申し上げます。

実験遂行にあたり，ご指導を賜りました山陽女子短期大学 岡崎尚教授，平林眞弓元教授，県立広島大学 地域創生学部 岡田玄也助教，古田歩助教に心より御礼申し上げます。

また，実験遂行にあたり，ご協力いただきました県立広島大学食品学研究室の皆様，同研究室卒業生の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 木村稔，今村琢磨，成田正直，潮秀樹，山中英明（2002）ホタテガイ
貝柱成分の季節変化 日本水産学会誌 68: 72-77
- 鴻巣章二，藤本健四郎，高島良子，松下輝子，橋本芳郎（1965）アサ
リのエキス成分ならびに蛋白のアミノ酸組成 日本水産学会誌
31: 680-686
- 坂口勇（1987）海産付着生物と水産増養殖． 恒星社厚生閣 p. 100.
- 清水晃，尾崎潤一郎，河野潤一，木村重（1991）魚介類および食肉
からの黄色ブドウ球菌の分離と性状 食品と微生物 8: 135-141
- 鈴木たね子（1976）赤身の魚と白身の魚 調理科学 9: 182-187
- 澄川精吾，坂本薫，白石淳（1985）ムラサキイガイにおける身入り
の季節的变化 家政学雑誌 36: 229-233
- 林公義，萩原清司（2013）タイ科．「日本産魚類検索—全種の同定
—第三版」（中坊徹次編）東海大学出版会 p. 955-958
- 藤井建夫，酒井久夫（1983）しょっつるの化学成分と微生物相 日
本水産學會誌 50: 1061-1066
- 道川恭子，鴻巣章二（1995）ホタテガイ合成エキス中のアルギニン
の苦味抑制成分の同定 日本食品科学工学会誌 42: 982-988
- 山田拓司（2015）腸内細菌群集構造のメタゲノム解析 腸内細菌学
雑誌 29: 19-22
- 横山芳博，坂口守彦（1998）魚介類筋肉の死後における ATP の代謝
とその周辺 比較生理生化学 15: 193-200
- 米田千恵，笠松千夏，村上知子，香西みどり，畑江敬子（2012）北
海道厚岸産シングルシード方式による養殖マガキ成分の季節変化

- 日本調理科学会誌 45: 339-345
- 米田千恵, 井上あゆみ (2018) アサリ冷蔵貯蔵中の鮮度変化 日本食生活学会誌 29: 35-43
- 劉明淑, 梶原武 (1983) ムラサキイガイの繁殖生態. 付着生物研究 4: 11-21,
- Abeynayake Ranithri, Mendis Eresha (2014) Anti-aging and immuno-enhancing properties of marine bioactive compounds. In: Kim SK, editor. *Seafood science: advances in chemistry technology and applications. Boca Raton, Fla.: CRC Press.* p 262–75.
- Abhishek K. Jha, Stanley Ching-Cheng Huang, Alexey Sergushichev, Vicky Lampropoulou, Yulia Ivanova, Ekaterina Loginicheva, Karina Chmielewski, Kelly M. Stewart, Juliet Ashall, Bart Everts, Edward J. Pearce, Edward M. Driggers & Maxim N. Artyomov. (2015). Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. *Immunity*, 42: 393-394
- Anagnostopoulos, D.A.; Parlapani, F.F.; Boziaris, I.S. (2022) The evolution of knowledge on seafood spoilage microbiota from the 20th to the 21st century: Have we finished or just begun? *Trends Food Sci. Technol.* 120: 236–247.
- Ahimbisibwe JB. (2010) Effect of bleeding on the quality of amberjack (*Seriola dumerili*) and red sea bream (*Pagrus major*) muscle tissues during iced storage and detection of cathepsin1 in red cell membranes of fish blood. PhD Thesis, Mie University, Mie.
- Baltasar Mayo, Caio T. C. C. Rachid, Ángel Alegría, Analy M. O. Leite,

- Raquel S. Peixoto & Susana Delgado. (2014). Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. *Curr. Genomics*, 15: 293-309.
- Bi, S., Chen, L., Sun, Z., Wen, Y., Xue, Q., Xue, C., Li, Z., Wei, Z., Liu, H., (2021) Investigating influence of aquaculture seawater with different salinities on nonvolatile taste-active compounds in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Food Meas. Charact.* 15: 2078–2087.
- Bi S.J., Xue C., Sun C., Chen L., Sun Z., Wen Y., Li Z., Chen G., Wei Z., & Liu H. (2022). Impact of transportation and rehydration strategies on the physiological responses of clams (*Ruditapes philippinarum*). *Aquac. Rep.*, 22: 100976
- Bolyen E., Rideout J. R., Dillon M. R., Bokulich N. A., Abnet C. C., Al-Ghalith G. A., Alexander H., Alm E. J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J. E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C. J., Brown C. T., Callahan B. J., Caraballo-Rodríguez A. M., Chase J., Caporaso J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37: 852–857.
- Broekaert K, Heyndrickx M, Herman L, Devlieghere F, Vlaemynck G. (2011) Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiol.* 28: 1162-1169.
- Cao R., Xue C. H. C., Liu Q. (2009). Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. *Int. J. Food Microbiol.*, 131:

- Cai Luyun, W Xiaosa, D Zhijian, L Xuepeng, Y Shumin, L Jianrong. (2014) Physicochemical responses and quality changes of red sea bream (*Pagrosomus major*) to gum arabic coating enriched with ergothioneine treatment during refrigerated storage. *Food Chem.* 160: 82-89.
- Cappello, S., Volta, A., Santisi, S., Genovese, L., Maricchiolo, G. & Bonsignore, M. (2015). Study of bacterial communities in mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) by a combination of 16s crDNA and 16s rDNA sequencing. *JSM Microbiology*, 3: 1016.
- Carroll, N. V., Longley, R. W., & Roe, J. H. (1956). The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 220: 583-593.
- Chiou TK, Lin JF, Shiau CY. (1998). Changes in extractive components and glycogen in the edible meat of hard clam *Meretrix lusoria* during storage at different temperatures. *Fish Sci.*, 64: 115-120.
- Chunsheng Liu, Zhifeng Gua, Xianxin Lin, Yuanyuan Wang & Yaohua Shi. (2022). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) and storage temperature on bacterial counts, color change, fatty acids and non-volatile taste active compounds of oysters (*Crassostrea ariakensis*). *Food Chem.*, 372: 131247.
- Clark, M.E., (1985) The osmotic role of amino acids: discovery and function [M]. *Transport Processes, Iono-and Osmoregulation*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 412–423
- Cochet, M., Brown, M., Kube, P., Elliott, N., Delahunty, C., (2015)

- Understanding the impact of growing conditions on oysters: a study of their sensory and biochemical characteristics. *Aquac. Res.* 46: 637–646.
- Conway E.J. (1948) Microdiffusion analysis and volumetric error. *Nature.* 161: 583.
- De Sousa, O. V., Vieira, R. H., De Menezes, F. G., Dos Reis, C. M. & Hofer, E. (2004). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the coco river estuary, Fortaleza, Ceara, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 46: 59–62.
- Eggermont, M., Bossier, P., Sasmita, G., Pande, J., Delahaut, V. & Gupta, N. (2017). Isolation of Vibrionaceae from wild blue mussel (*Mytilus edulis*) adults and their impact on blue mussel larviculture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 93: 39.
- Elif Bozcal & Melih Dagdeviren. (2020). Bacterial metagenome analysis of *Mytilus galloprovincialis* collected from Istanbul and Izmir coastal stations of Turkey. *Environ. Monit. Assess.*, 192: 186.
- Emborg, J., Laursen, B.G., Rathjen, T. & Dalgaard, P. (2002). Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere packed salmon (*Salmo salar*) at 2 °C. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 790-799.
- Enomoto T, Takizawa H & Ohya H. (1996). Changes in umami-related metabolites during acclimation of aerobic scallop (*Patinopecten yessoensis* Jay) to anaerobiosis. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 49: 349-353

- Fernandez-Delgado, M., Contreras, M., Garcia-Amado, M. A., Gueneau, P., & Suarez, P. (2007). Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters. *Revista do Instituto de Medicina. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 49: 355–359.
- Fien Calliauw, Thijs De Mulder, Katrien Broekaert, Geertrui Vlaemynck, Chris Michiels, Marc Heyndrickx (2016) Assessment throughout a whole fishing year of the dominant microbiota of peeled brown shrimp (*Crangon crangon*) stored for 7 days under modified atmosphere packaging at 4 °C without preservatives. *Food Microbiol.*, 54: 60-71
- Fu, F., Zhou and W., (2019) Research on real-time monitoring and optimization of cold chain logistics big data. *Journal of Think Tank Era*, 34: 18-19.
- Fuentes, A., Fernandez-Segovia, I., Escriche, I. & Serra, J. A. (2009). Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. *Food Chem.*, 112: 295–302.
- Gram, L. and Huss, H.H. (1996) Microbiological Spoilage of Fish and Fish Products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 121-137.
- Gounot A.-M. (1986). Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia Birkh/iuser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland*, 42: 1192-1197
- Greer, G. G. (1981). Rapid Detection of Psychrotrophic Bacteria in Relation to Retail Beef Quality. *J. Food Sci.* 46: 1669-1672

- Grieshaber, M. K., Hardewig, I., Kreutzer, U. & Pörtner, H. O. (1994).
Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 125: 43-147
- Grienke U, Silke J, Tasdemir D. (2014) Bioactive compounds from
marine mussels and their effects on human health. *Food Chem* 142:
48–60.
- Hamed I, Ozogul F, Ozogul Y, Regenstein JM. (2015) Marine bioactive
compounds and their health benefits: a review. *Compr Rev Food Sci
Food Saf* 14: 446–65.
- Haifaa HA. (2014) Isolation and identification of *Staphylococcus*
bacteria from fish of fresh water and its antibiotics sensitivity in
Mosul city. *Bas.J.Vet.Res.* 13: 33-42.
- Han, Z., Fang, Y., Hua, L., Ma, Q., Wang, J., Gao, J. and Yuan, P.,
(2020) Research on the development of cold chain logistics of
aquatic products in Zhoushan of China, IOP Conference Series.
Materials Science and Engineering, 787: 012025.
- Hayashi, T., Yamaguchi, K., Konosu, S., (2010) Sensory analysis of
taste-active components in the extract of boiled snow crab meat. *J.
Food Sci.* 46: 479–483.
- Herlemann D. P., Labrenz M., Jürgens K., Bertilsson S., Waniek J. J.,
Andersson A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along
the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5: 1571-
1579
- Hilgarth M., Behr J., Vogel R. F. (2018). Monitoring of
spoilage-associated microbiota on modified atmosphere packaged

- beef and differentiation of psychrophilic and psychrotrophic strains. *J. Appl. Microbiol.* 124: 740—753.
- Hong, H., Regenstein, J.M., Luo, Y., (2017) The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57: 1787–1798.
- Hosoi, M., Kubota, S., Toyohara, M., Toyohara, H., Hayashi, I., (2003) Effect of salinity change on free amino acid content in pacific oyster. *Fish. Sci.* 69: 395–400.
- Houcke, J., Medina, I., Maehre, H.K., Cornet, J., Cardinal, M., Linssen, J., Lutén, J., (2017). The effect of algae diets (*Skeletonema costatum* and *Rhodomonas baltica*) on the biochemical composition and sensory characteristics of Pacific cupped oysters (*Crassostrea gigas*) during land-based refinement. *Food Res. Int.* 100: 151–160.
- Howgate P. (2010) A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chem.* 9: 58-88.
- Jaffrès E, Sohier D, Leroi F, Pilet M F, Prévost H, Joffraud J J, Dousset X (2009) Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* 131: 20-29
- Je J. Y., Park P. J., Jung W. K., Kim S. K. (2005). Amino acid changes in fermented oyster (*Crassostrea gigas*) sauce with different fermentation periods. *Food Chem* 91: 15–18

- Jonsdottir, R., Olafsdottir, G., Chanie, E., & Haugen, J.E. (2008). Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). *Food Chem* 109: 184–195.
- Juste, A., Thomma, B. & Lievens, B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.*, 25: 745-761.
- Kawabe S, Takada M, Shibuya R, & Yokoyama Y. (2010). Biochemical changes in oyster tissues and hemolymph during long-term air exposure. *Fish Sci.*, 76: 841–855
- Kawashima K., Yamanaka H. (1992). Effects of storage temperatures on the post-mortem biochemical changes in scallop adductor muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2175–2180.
- Kitabayashi K, Tanimoto S, Kikutani H, Ohkita T, Mabuchi R, Shimoda M. (2019) Effect of nitrogen gas packaging on odor development in yellowtail *Seriola quinqueradiata* muscle during ice storage. *Fish Sci.* 85: 247–257.
- Kluytmans J. H., De Bont AMT., Janus J. & Wijsman T. C. M. (1977). Time dependent changes and tissue specificities in the accumulation of anaerobic fermentation products in the se mussel *Mytillus Edulis L.* *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem.*, 58: 81-87
- Kovats ES. (1965) Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* 1: 229-247.
- Kuo C. M., & Hsieh S. L. (2006). Comparisons of physiological and

- biochemical responses between milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) to cold shock. *Aquaculture*, 251: 525– 536
- Lawal, A.T., Adeloju, S.B., (2012) Mediated xanthine oxidase potentiometric biosensors for hypoxanthine based on ferrocene carboxylic acid modified electrode. *Food Chem.* 135: 2982–2987
- Li Q, Zhang L, Luo Y. (2018) Changes in microbial communities and quality attributes of white muscle and dark muscle from common carp (*Cyprinus carpio*) during chilled and freeze-chilled storage. *Food Microbiol.* 73: 237-244.
- Lin Hong, Xue Changhu, Li Zhaojie, Lou Weifeng, Chen Xiubai. (1995) Studies on the volatile compounds of spoiled yellowtail *Seriola aureovittata* during storage. *Periodical of Ocean University of China.* 25: 474-480.
- Li, Z. and Sun, X., (2015) Research on the application of cold chain logistics of aquatic products in Suzhou. *Jornal of Co-Operative Economy and Science*, 14: 20-21.
- Liu, Y., Zhang, C., & Chen, S. (2013). Comparison of active non-volatile taste components in the Viscera and Adductor Muscles of Oyster (*Ostrea rivularis Gould*). *Food Sci. Technol. Res.*, 19: 417–424.
- Liu Shulai, Li Xiangyang, Zhou Xuxia, Zhang Xilin & Ding Yuting (2014) Comparative study of basic characteristics of ordinary and dark muscle in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Sci. Biotechnol.* 23: 1397–1404

- Lucas, A., & Beninger, P. G. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44: 187-200
- Madigan, T.L., Bott, N.J., Torok, V.A., Percy, N.J., Carragher, J.F., de Barros Lopes, M.A. & Kiermeier, A. (2014). A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Food Microbiol.*, 38: 219-227.
- Masato Honda, Hiroaki Gunjikake, Shigeaki Matsui, Junya Moroishi, Ik Joon Kang, Yohei Shimasaki & Yuji Oshima. (2010). The effect of hypoxia on respiratory metabolism of ark shell (*Scapharca kagoshimensis*). *Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 65: 31-37.
- Mayumi Hirabayasi, Takashi Okazaki & Shota Tanimoto. (2021). Seasonal variation of extractive components in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Fish Sci.*, 87: 599–607.
- Mayumi Hirabayasi, Takashi Okazaki & Shota Tanimoto. (2022). Changes in extractive components in live *Mytilus galloprovincialis* mussels during ice storage. *Fish Sci.*, 88: 181–189.
- Maria-Ioana Socaciu, Cristina Anamaria Semeniuc, and Dan Cristian Vodnar (2018) Edible Films and Coatings for Fresh Fish Packaging: Focus on Quality Changes and Shelf-life Extension. *Coatings*. 8: 366
- Marina S. N, Bianca S, Ginger L. M, Inar A. (2019) Oxidation products from omega-3 and omega-6 fatty acids during a simulated shelf life of edible oils. *LWT*. 101: 113-122.
- Melis, M., Tomassini Barbarossa, I., (2017) Taste perception of sweet, sour, salty, bitter, and umami and changes due to L-arginine supplementation, as a function of genetic ability to taste

- 6-n-propylthiouracil. *Nutrients* 9: 541.
- Mendes, R., Quinta, R., & Nunes, M. L. (2001). Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 141–146.
- Meyer S, Dunkel A, Hofmann T (2016). Sensomics-assisted elucidation of the tastant code of cooked crustaceans and taste reconstruction experiments. *J Agric Food Chem* 64: 1164–1175
- Mochinaga T., Taguchi A. (1963). A Simple Test for the Freshness of Shellfish (Oyster) Using 2, 3, 5,-Triphenyltetrazolium Chloride. *Food Hyg. Saf. Sci.*, 4: 217-222
- Mohammed Golam Sarower, Abul Farah Md. Hasanuzzaman, Bhabananda Biswas & Hiroki Abe. (2012). Taste producing components in fish and fisheries products: A review. *Intl. J. Food. Ferment. Technol.*, 2: 113-121
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39: 144-167
- Niizeki N, Daikoku T, Hirata T (2003) Mechanism of biosynthesis of trimethylamine oxide in tilapia reared under seawater conditions. *Fish Sci.* 69:74-87.
- Oliveira, A. R., Sykes, A. V., Hachero-Cruzado, I., Azeiteiro, U. M. & Esteves, E. (2015) A sensory and nutritional comparison of mussels (*Mytilus sp.*) produced in NW Iberia and in the Armona offshore production area (Algarve, Portugal), *Food Chem.*, 168: 520–528.
- Olumide A. Odeyemi, Christopher M. Burke, Christopher C. J. Bolch & Roger Stanley. (2019) Spoilage microbial community profiling by

- 16S rRNA amplicon sequencing of modified atmosphere packaged live mussels stored at 4°C. *Food Res Int.*, 121: 568-576.
- Pan Z-Q, Li L., Shen Z-H., Chen Y., and Li M., (2018) Characterization of the Microbiota in Air- or Vacuum-Packed Crisp Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella* C. et V.) Fillets by 16S rRNA PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and High-Throughput Sequencing. *J. Food Prot.*, 81: 1022–1029
- Panase P., Saenphet S., & Saenphet K. (2018) Biochemical and physiological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature. *Aquaculture Reports*, 11: 17–23
- Parlapani F. F, Boziaris I.S. (2016) Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT--Food Sci. Technol.* 66: 553-559.
- Parlapani F.F, Michailidou S, Pasentsis K, ArgiriouA, Krey G, Boziaris I.S. (2018a) A meta-barcoding approach to assess and compare the storage temperature dependent bacterial diversity of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) originating from fish farms from two geographically distinct areas of Greece. *Int. J. Food Microbiol.* 278: 36-43.
- Parlapani, F.F.; Michailidou, S.; Anagnostopoulos, D.A.; Sakellariou, A.K.; Pasentsis, K.; Psomopoulos, F.; Argiriou, A.; Haroutounian, S.A.; Boziaris, I.S. (2018b) Microbial spoilage investigation of thawed common cuttlefish (*Sepia officinalis*) stored at 2 °C using

- next generation sequencing and volatilome analysis. *Food Microbiol.*, 76: 518–525.
- Parlapani F.F. (2021) Microbial diversity of seafood. *Curr. Opin. Food Sci.* 37: 45-51.
- Parlapani F.F., Syropoulou F., Tsiartsafis A., Ekonomou S., Madesis P., Exadactylos A. & Boziaris I.S. (2020) HRM analysis as a tool to facilitate identification of bacteria from mussels during storage at 4 °C. *Food Microbiol.*, 85: 103304.
- Patrícia Anacleto, Ana Luísa Maulvault, Sara Barrento, Rogério Mendes, Maria Leonor Nunes, Rui Rosa, António Marques. (2013) Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures. *Aquaculture*, 408-409: 136-146
- Patterson R. K. (1973) Automated Pregl-Dumas technique for determining total carbon, hydrogen, and nitrogen in atmospheric aerosols. *Anal Chem.*, 45: 605-609.
- Potts, W.T.W., (1967) Excretion in the molluscs. *Biol. Rev.* 42: 1–41.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B. M., Ludwig W., Peplies J., & Glöckner F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.*, 35: 7188-7196.
- Reynisson, E., Lauzon, H., Magnusson, H., Jonsdottir, R., Olafsdottir, G., Marteinson, V. & Hreggvidsson, G. (2009). Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod (*Gadus morhua*) at superchilled temperatures. *BMC Microbiol.*, 9:

250.

- Rotzoll, N., Dunkel, A., Hofmann, T., (2006) Quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments on the key taste compounds in the morel mushrooms (*Morchella eliciosa Fr.*). *J. Agric. Food Chem.* 54: 2705–2711.
- Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S.E. & Nissen, H. (2004). Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified atmosphere-packed salmon and coalfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5010-5018.
- Satomi KOSEKI, Seiichi KITAKAMI, Noboru KATO, and Ken-ichi ARAI. (2006) Rigor mortis of fish and shellfish and evaluation of freshness of their muscles as K value. *Journal of The School of Marine Science and Technology* 4: 31-46.
- Sakaguchi M., & Murata M. (1989). Seasonal variations of free amino acids in oyster whole body and adductor muscle. *Fish Sci* 55: 2037–2041
- Sallam K.I. (2007) Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chem.* 101: 592-600.
- Shasha Dong, Hongtao Nie, Jiahao Ye, Dongdong Li, Zhongming Huo & Xiwu Yan. (2020). Physiological and gene expression analysis of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in response to cold acclimation. *Sci. Total Environ.*, 742: 140427
- Shallenberger, R.S. (1993). Taste chemistry (1st ed.). *Taste of amino acids*. pp. 226-233.
- Silvia Soncin, Luca M Chiesa, Sara Panseri, Pierantonio Biondi, Carlo

- Cantoni (2008) Determination of volatile compounds of precooked prawn (*Penaeus vannamei*) and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice as possible spoilage markers using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 89: 436-442
- Sohn Jeong-Ho, Yusuke Taki, Hideki Ushio, Tomoko Kohata, Itaru Shioya, Toshiaki Ohshima (2006) Lipid Oxidations in Ordinary and Dark Muscles of Fish: Influences on Rancid Off-odor Development and Color Darkening of Yellowtail Flesh During Ice Storage. *J. Food Sci.* 70: s490-s496
- Sumikawa S., Sakamoto K., & Shiraish A. (1985). Seasonal changes of the edible conditions of blue mussel, *Mytilus edulis*. *J Home Econ Jpn* 37: 229–233
- Tanimoto S, Kikutani H, Kitabayashi K, Ohkita T, Arita R, Nishimura S, Takemoto R, Mabuchi R, Shimoda M. (2018) Qualitative changes in each part of yellowtail *Seriola quinqueradiata* flesh during cold storage. *Fish Sci.* 84: 135–148.
- Thomas L Madigan, Nathan J Bott, Valeria A Torok, Nigel J Percy, John F Carragher, Miguel A de Barros Lopes, Andreas Kiermeier (2014) A microbial spoilage profile of half shell Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Food Microbiol* 38: 219-227
- Tsunoda K., Inoue N., Aoyama M. & Hasebe A. (1985). Studies on the Freshness of fish and shellfish, simple colorimetry of dehydrogenase activity in oyster using tetrazolium chloride. *Shokuhin Eiseigaku*

Zasshi, 28: 229-233

Tze-Kuei Chiou, Jen-Fuei Lin & Chyuan-Yuan Shiau. (1998). Changes in Extractive Components and Glycogen in the Edible Meat of Hard Clam *Meretrix lusoria* During Storage at Different Temperatures. *Fish Sci.*, 64: 115-120

Ulrike Grienke, Joe Silke & Deniz Tasdemir. (2014). Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chem.*, 142: 48–60.

Vladimir P, Valentina L, Alexandra P, Olga K, Alexander K, Erno S, Leonid C, Inessa K. (2016) Influence of volatile organic compounds emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains on *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. *APMIS*. 124: 586-594.

Wang, Q., Xue, C., Li, Z., Fu, X., Xu, J., Xue, Y., (2007) Changes in the contents of ATP and its related breakdown compounds in various tissues of oyster during frozen storage. *J. Ocean Univ. China* 6: 407–412.

Watanabe H, Yamanaka H, Yamakawa H (1992) Seasonal variations of extractive components in the muscle of disk abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 921–925

Yamaguchi S, Yoshikawa T, Ikeda S & Ninomiya T. (1971). Measurement of the relative test intensity of some L- α -amino acid and 5-nucleotides. *J. Food Sci*, 36: 846–849

Yoneda C, Inoue A. (2018) Changes of freshness of short-neck clam during cold storage. *J. Integr. Stud. Diet. Habits.*, 29: 35–43

Yoneda C, Kasamatsu C, Hatae K & Watabe S. (2002). Changes in taste

and textural properties of the foot of the Japanese cockle (*Fulviamutica*) by cooking and during storage. *Fish Sci.*, 68: 1138–1144.

Zhong, C., Nakanishi, M., Geng, J. T., Okazaki, E., Cao, M. J., Weng, W. Y., & Osako, K. (2015). Comparison of non-volatile taste-active components in fish sauce produced from lizardfish *Saurida wanieso* viscera under different conditions. *Fish Sci.*, 81: 581–590.

Zhou, Z., Zhang, Y., Gao, J., Ma, L., Huang, X., Zheng, J., Dong, X., Qin, L., (2021) Metabolomic approaches to analyze the seasonal variations of amino acid, 5'-Nucleotide, and lipid profile of clam (*Ruditapes philippinarum*). *LWT Food Sci. Technol.* 148: 11709.