

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19208020

研究課題名（和文）不活性ガスによる甲殻類黒変酵素の選択的不活性化機構の解明と黒変防止技術の開発

研究課題名（英文）The inhibitory mechanism of carbon dioxide in blackening of crustacean induced by melanin-producing enzymes and development of anti-blackening technology

研究代表者

平田 孝（HIRATA TAKASHI）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40273495

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：甲殻類、黒変、メラニン、包装、エビ

1. 研究計画の概要

甲殻類の黒変（メラニン生成）は、主としてヘモシアニン画分に存在するフェノールオキシダーゼ（PO）様活性により進行すること、また PO 様活性は二酸化炭素により阻害できることをすでに明らかにしてきた。そこで、ポストハーベストにおける PO 様活性の発現機構、二酸化炭素が甲殻類（特にエビ類）の黒変、およびそれにとともなうその他の品質変化を抑制する機構を明らかにし、その品質を高度に保持する新技術を開発することを目的とする。具体的には以下のようなものである。

(1) PO 様活性の本体および活性化機構の解明、また二酸化炭素による PO 様活性阻害の機構を明らかにする。

(2) 二酸化炭素下でも栄養価、機能性などが保持されているか否か明らかにする。

(3) 二酸化炭素下では有害な物質の生成がなく、また食中毒菌の増殖が抑制されることを確認する。

(4) 流通条件での試験を行い、品質保持効果を検証する

2. 研究の進捗状況

(1) 円偏光二色性分析によりヘモシアニン画分を解析した。二酸化炭素処理の有無にかかわらず、スペクトルに大きな相違は認められなかった。従って、二酸化炭素はβ-シート構造やα-ヘリックス構造に大幅な変化を惹起しているとは考えにくく、活性部位もしくはその近傍のわずかな構造変化をもたらすことによって、活性を低下させていると示唆された。フェノールオキシダーゼ様活性を示すヘモシアニン画分の本体の単離に成功し

た。アミノ酸配列の部分配列も決定できたが、全配列およびクローニングには至っていない。また、フェノールオキシダーゼ類を活性化する因子の部分クローニングを行うことができた。

(2) 機能性物質として、頭足類などの無脊椎動物に認められる SH 化合物オボチオールは検出できなかった。エビ類のフェオメラニンの生成にはシステイン由来の SH 基が主として関与していることを示した。

(3) ホッコクアカエビの食中毒菌として重要な腸炎ビブリオ菌に及ぼすガス環境の影響を検討した。エビ専用のフィルム袋（クレハロン MLVS-20（株クレハ））を用いてガス置換包装を行い、100%-N₂、100%-CO₂ 環境下で 20℃、48 時間貯蔵した。その結果、最大菌数は 100%-CO₂ が他の試験区に比べて 1/1000 程度となったことから、CO₂ は増殖を抑制する効果を持つと考えられた。亜硫酸処理済み、および未処理のホッコクアカエビ筋肉のホルムアルデヒド濃度を評価した。その結果、亜硫酸処理済みエビからは窒素下、二酸化炭素下、空気下にかかわらず、最高 45ppm という高濃度のホルムアルデヒドが検出されたが、無処理では殆ど検出されなかった。

3. 現在までの達成度

① おおむね順調に進展している。

(1) PO 様活性本体を単離できたので、最終年度にクローニングは完成できると期待している。ヘモシアニン画分中からの PO 様活性本体の単離は、極めて少量であること、またヘモシアニンはヘテロ単量体からなる多量体でありその中から本体を分離することが容易ではない等の理由から、非常に困難であ

った。しかし、単離できたので、今後は順調に研究進行ができると判断している。また、活性化因子も部分配列を明らかにできたので、これも最終年度に全配列を解明できる予定。

(2)オボチオール存在の確認できなかったが、黒変進行下では、他のSH化合物(システイン等)との反応によりフェオメラニンが高比率で生成している可能性、すなわち機能性の低下が示唆された。これは、黒変防止は栄養価あるいは機能性保持のためにも重要であることを初めて示すものである。

(3)二酸化炭素により、包装エビの腸炎ビブリオ菌増殖を抑制できることを示した。この効果は単なる嫌気条件によるものではなく、二酸化炭素の特異的な作用によるものであることを示すことができた。これらのことから、二酸化炭素の有効性を確認することができたと判断でき、最終年度に予定している実用的な流通条件に基づく試験に臨むことができる状況である。また、二酸化炭素置換包装を実用化するにあたって、最も懸念されることは、包装容器内が嫌气的条件となることから、ホルムアルデヒドの生成が促進されるのではないかということであった。これまでの結果から、二酸化炭素下でもホルムアルデヒド生成促進は認められないことを明らかにできた。この点からも二酸化炭素置換包装の可能性に一步近づくことができ、最終年度における試験に期待できる状況である。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 活性本体のクローニング、活性化因子のクローニングを行うが、すでに部分配列は明らかになっており、研究推進に問題はないと考えている。

(2) 二酸化炭素による包装エビの腸炎ビブリオ菌増殖抑制、ホルムアルデヒド抑制、黒変抑制について、実際の流通温度で検討する。低温では二酸化炭素の効果は高いと予想され、これまでの結果から、二酸化炭素置換包装の有用性を示すことが期待され、最終確認の意味合いで行うものである。

(3) クルマエビ、ホッコクアカエビについてデータを蓄積してきたが、その他のエビについても二酸化炭素置換包装の効果の比較、あるいは活性本体の比較を行う予定である。

5. 代表的な研究成果

(下線は研究代表者、研究分担者)

[雑誌論文] (計3件)

① Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S., Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function, Pigment Cell Melanoma Res 22,

563-579, 2009 査読有

② 足立亨介、凍結解凍後のエビ類における黒色化の防除策、冷凍(冷凍空調学会誌)、84、41-44、2009 査読無

[学会発表] (計4件)

① T. Hirata, T. Sugawara, T. Ayaki, M. Tanaka, K. Hirose, Effects of carbon dioxide on postharvest blackening of Alaskan Pink Shrimp *Pandalus eous*, 5th World Fisheries Congress, 2009.10.23, パシフィコ横浜

② 伊藤友樹、牧野義雄、大下誠一、川越義則、川渕幸映、平田 孝、エビに付着した腸炎ビブリオ菌のCO₂を利用した増殖抑制に関する予測微生物学的研究、農業環境工学関連学会2009年合同大会、2009年9月18日、東京大学教養学部

③ 大友良祐、若木良大、菅原達也、平田 孝、綾木毅、田中幹雄、広瀬和彦、ホッコクアカエビの黒変におよぼす二酸化炭素の影響、日本包装学会第18回年次大会、2009年7月9日、東京大学弥生講堂

[図書] (計4件)

① Kohsuke Adachi and Takashi Hirata Blackwell Publisher Blackspot development on crustaceans during storage (in Seafood Safety and Quality) 2010 in press

② 平田 孝、京都大学学術出版会、水産物の色(食品の創造 安達修二編 第3章)、2008、62-79

③ 伊藤祥輔、若松一雅、恒星社厚生閣、メラニン色素の化学(平田孝・菅原達也編 水産物の色素) 2008、41-57

④ 平田 孝、足立亨介、恒星社厚生閣、メラニン生成による甲殻類の黒変と品質(平田孝・菅原達也編 水産物の色素) 2008、58-69

[その他]

ホームページ

① <http://www.bioproducts.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

② http://www.jimu.kais.kyoto-u.ac.jp/wiki-gakugai/index.php?plugin=attach&referrer=%B9%AD%CA%F3%B0%D1%B0%F7%B2%F1%A1%A6%B8%A6%B5%E6%B0%66%66%2F4%B1%FE%CD%D1%60%B8%CA%AA%B2%CA%B3%D8%0%EC%B9%B6&openfile=%B3%A4%CD%CE%0%B8%CA%AA%0%B8%BB%BA%CD%F8%CD%D1%B3%D8_new.pdf