

機関番号：14301  
 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） Inactivation of blackening enzymes in crustaceans by inert gases and prevention of blackening.  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）による甲殻類の黒変防止機構を調べた。CO<sub>2</sub>は黒変酵素の活性中心近傍の構造を変化させ、黒変反応を抑制した。クルマエビ血漿中から新規黒変酵素をクローニングした。CO<sub>2</sub>下で貯蔵してもホルムアルデヒドの生成は認められなかった。黒変にともない機能性物質の減失が認められた。CO<sub>2</sub>はホッコクアカエビ上の腸炎ビブリオの増殖を抑制した。以上、CO<sub>2</sub>は甲殻類の黒変防止、機能性成分保持、食中毒菌抑制に有効な流通手法である。

## 研究成果の概要（英文）：

Blackening in crustaceans was controlled under carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). The structure in the vicinity of active site of the blackening enzyme may be altered by the action of CO<sub>2</sub>. A novel enzyme was cloned from plasma of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. Formaldehyde was not observed in the prawn during storage under CO<sub>2</sub>. Blackening of the prawn was accompanied by the loss of functional components. The growth of *Vibrio parahaemolyticus* in Alaskan pink shrimp *Pandalus eous* was effectively suppressed under CO<sub>2</sub>. These results showed that CO<sub>2</sub> is a useful tool for prevention of blackening together with suppression of growth of food poisoning *Vibrio*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,500,000	5,250,000	22,750,000
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

## 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：メラニン、二酸化炭素、エビ、黒変、フェノール酸化酵素、ホルムアルデヒド

## 1. 研究開始当初の背景

甲殻類、特にエビ類は我が国の輸入水産物のうちもっとも重要な品目である。輸入量は全水産物中で第2位（24万トン、2005年）、金額ベースでは第1位（2352億円、2005年）である。輸入エビ類の産地はほとんど熱帯、

亜熱帯であり、我が国には冷凍品として輸入されている。これら冷凍エビ類は、添加物による黒変防止処理が施されていない場合、解凍時に急速に黒色のメラニンを生成し、その商品価値が著しく損なわれる。国産エビもその多くが冷凍品として流通しており、同様の

黒変問題が存在する。

メラニン<sup>1)</sup>はエビ体内のチロシンや3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) がフェノールオキシダーゼ (PO) の作用により酵素的に酸化されて DOPA キノン<sup>2)</sup>を生成し、これは非酵素的に DOPA クロム<sup>3)</sup>に変換される。さらに数段の酵素反応を経て、最後は非酵素的な重合反応により生成するというのが定説である。DOPA キノンはチオール類とも反応し、システイン等の機能性成分を減失させる可能性がある。そこで、DOPA クロム生成抑制のために、亜硫酸塩などの添加物が広く使用されている。しかし、添加された亜硫酸塩はエビ中のトリメチルアミノオキサイドと反応して有毒物質ホルムアルデヒドが生成するという大きな問題がある。亜硫酸塩等の添加は代替手段がないため認められているが、このような添加物利用は消費者からの忌避反応が強い。このため、無添加冷凍エビ類を流通する革新的技術の開発が望まれている。そのためには、エビの黒変機構を基礎的に明らかにすることが必須であった。

## 2. 研究の目的

甲殻類の黒変 (メラニン生成) は、主としてフェノール類の酵素的酸化により進行すること、またこの酸化は二酸化炭素下での保存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酵素的酸化の機構、二酸化炭素が甲殻類 (特にエビ類) の黒変および黒変にともなうその他の品質変化を明らかにし、その品質を高度に保持する新技術の可能性を探索することを目的とする。具体的には以下のである。

- (1) 黒変酵素の本体また二酸化炭素による活性阻害の機構を明らかにする。
- (2) 二酸化炭素下でも食品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

## 3. 研究の方法

### (1) 黒変酵素の特性解明

#### ① 二酸化炭素が黒変酵素活性中心に及ぼす影響

円偏光二色性分析により黒変酵素の活性中心に及ぼす影響を解析した。

#### ② 黒変酵素の単離・精製・クローニング

クルマエビ生体 (京都中央卸売市場より購

入) より採取した血液を、血球画分と血漿画分に分離した。活性画分を非変性ポリアクリルアミド電気泳動 (Native-PAGE) 後、活性染色、CBB 染色により検出した。硫酸アンモニウムによる塩析、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行い活性蛋白質を単一に精製した。SDS-PAGE による分離後、この蛋白質のバンドを切り出し、MALDI-TOF-MS による、PMF 解析を行った

#### (2) エビの機能性成分の分析

空気、窒素、二酸化炭素雰囲気下でエビを保存後、機能性成分として含硫化合物の変化を解析した。すなわち、オボチオール、システイン、グルタミルシステイン、システイニルグリシン、グルタチオンを経時的に HPLC で定量した。

#### (3) 有害物質、食中毒菌の抑制評価

##### ① ホルムアルデヒドの分析

比色法により分析した。

##### ② 食中毒菌の挙動

エビを経口摂取した際の食中毒の原因となる腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) をクルマエビから分離・同定し、供試菌種とした。

ホッコクアカエビに  $10^2$  CFU/g の腸炎ビブリオを摂取し、大気、100%  $N_2$  または 100%  $CO_2$  とともにアクリルチャンバー内に封入し、20°C で 48 h 貯蔵するとともに、菌数を TCBS 培地による平板寒天培養法で計測した。

次に、実際の流通に有効なデータを得るため、包装袋としてクレハロン ML VS-20 (株クレハ) を用い、 $10^0 \sim 10^2$  CFU/g ホッコクアカエビ (未滅菌及び滅菌) を大気、高  $N_2$  または高  $CO_2$  とともに封入した後、20°C で 48 h 貯蔵した。貯蔵中に菌数を測定するとともに、目視により黒変の状況 (未滅菌試料) を観察した。

別途腸炎ビブリオ未接種のホッコクアカエビを 3 種のガス環境で 6 h 貯蔵した後、表面の pH と食味を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 黒変酵素の特性解明

① 円偏光二色性分析により活性画分を解析した。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、二酸化炭素は酵素の  $\beta$ -シート構造や  $\alpha$ -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。

## ②黒変酵素のクローニング

黒変酵素全活性のうち、約 90%が血漿画分にて検出されることが明らかとなった。黒変酵素はこれまでに配列の報告がない新規のタンパク質であることが明らかとなった。すなわち、この新規黒変酵素は分子量約 80kDa で、ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出位置から、活性タンパク質は 6 量体を形成していると考えられる。アミノ酸配列解析のため、プロテインシーケンサによる N-末端の解析を試みたが、末端の修飾により配列を得られなかった。次に、新規黒変酵素の内部アミノ酸配列の決定を行うため、プロテアーゼ消化断片の配列解析を試みた。得られたペプチド配列を基に、縮重プライマーを設計し、RT-PCR により部分配列を決定し、5' / 3' -RACE 法により新規黒変酵素全長の cDNA 配列を明らかにした。

新規黒変酵素と、黒変活性を有するとされるフェノールオキシダーゼ、ヘモシアニンとのアミノ酸配列を比較したところ、相同性は高くなかった。また、クルマエビ肝臓由来、及び血球由来の RNA を鋳型とした RT-PCR の結果、新規黒変酵素遺伝子は肝臓においてのみ、既知フェノールオキシダーゼ遺伝子は血球においてのみ発現していることが確認された。

更に、新規黒変酵素のフェノールオキシダーゼ様反応に関する酵素反応速度論解析を行った。その結果、ジフェノールである L-DOPA、ドーパミンを基質とした場合の  $K_m$ ,  $V_{max}$  はそれぞれ、 $0.0993 \pm 0.0120$  mM と  $0.804 \pm 0.0192$ , および、 $0.175 \pm 0.0318$  mM と  $2.14 \pm 0.121$   $A_{475}/min$  であり、既知のフェノールオキシダーゼよりも格段に高い基質特異性と反応性を示すことが明らかとなった。

以上のように、本研究では、これまでクルマエビ黒変の原因酵素と考えられてきた諸酵素よりも格段に反応性の高い新規フェノールオキシダーゼを見出した。食用クルマエビの凍結、融解に伴う黒変現象に対する本酵素の寄与を精査する必要がある。

また、クルマエビ以外の重要な食用エビ類においても本酵素の類縁酵素が存在し、黒変現象に寄与している可能性もあるため、クルマエビに留まらず広範な食用甲殻類を用いた検討が必要であると考えられた。そこで、紅ズワイガニについて、同様の活性因子があるかどうか調べた。ベニズワイガニの血漿よりゲルろ過クロマトグラフィーを用いて調製した画分は SDS を添加することでフェノール酸化酵素様の活性を示し、その至適温度は  $55^\circ\text{C}$ 、至適 pH は 9.0 付近であり、30 分間の

熱処理に  $35^\circ\text{C}$ まで耐性が見られた。基質特異性の解析においては、ジフェノール類(DOPA、ドーパミン)の酸化は触媒するものの、モノフェノール類(チロシン、チラミン)の酸化能はほぼ見られなかった。阻害剤においては、実験に供した 6 種類の阻害剤(システイン、ジエチルジチオカルバメート、アスコルビン酸、4-ヘキシルレゾルシノール、ヒノキチオール、フェニルチオウレア)のうち、システインが最も高い阻害能を示した。

ロブスター、クロザコエビ、ホッコクアカエビ等についても同様な活性化画分が存在した。

## (2)機能性の保全

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。エビ類のメラニンフェオメラニンの比率が極めて高いが、こ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。すなわち、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)流通条件下での化学的・微生物的品質保持

### ①ホルムアルデヒドの分析

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、亜硫酸無処理のエビからは雰囲気条件にかかわらず殆ど検出されなかった。

すなわち、黒変防止可能な二酸化炭素、窒素雰囲気等の嫌気条件においてもホルムアルデヒドは生成されないことが明らかになった。このことは、ガス置換包装等により添加物を適用せずにエビ類の黒変を防止することが可能であることを初めて示す結果である。

### ②食中毒菌の分析

以上のように二酸化炭素雰囲気下においてエビの黒変が抑制されることが明らかにされたが、エビは容易に腐敗することが知られており、衛生状態を保つことが重要である。二酸化炭素が微生物増殖を抑制することが知られていることから、エビを二酸化炭素雰囲気下にさらすことで、黒変を抑制すると同

時に、腐敗を抑制できる可能性が考えられた。

そこで、環境ガス組成ごとに微生物の増殖速度を数学モデルで表すことにより、二酸化炭素の増殖抑制効果を検討するとともに、適切な衛生管理を行うためのエビの流通方法を明らかにすることを試みた。

CHROM agar 培地、TSI 斜面培地、0~10% 食塩水でエビから分離した菌株の 16S rDNA は、基準株 NBRC-12711 との相同性が 99.3% であり、GC 含量が 45.7% であったことから、*Vibrio* 属であることが確定した。さらに、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果、基準株との相同性が 81% であったことから、当該株は *V. parahaemolyticus* と同定された。

3 種のガス環境のそれぞれの生菌数の経時変化を Gompertz 式によって近似した結果、二酸化炭素環境では、最大菌数が、大気及び N<sub>2</sub> 環境と比較し 1/1000~1/10000 程度に低く抑制することができた。また、大気と 100% N<sub>2</sub> の間の菌数に有意差がなかったことから、菌数の抑制は無酸素によるものではなく、二酸化炭素の効果によるものと確認された。

包装袋を用いた実験では、袋内二酸化炭素濃度は 90% 程度で貯蔵期間中保持された。菌数は、二酸化炭素貯蔵によって 1/10~1/100 程度に低く抑制された。アクリルチャンパー内での貯蔵に比べて二酸化炭素濃度が低下したために、抑制効果も低下したと考えられた。菌数が増加し始めるまでの時間（誘導期間）は二酸化炭素貯蔵によって 3~7 h 延長した。この結果からも、二酸化炭素による増殖抑制効果が認められた。

黒変（未滅菌試料）については、大気貯蔵が 4 h、高 N<sub>2</sub> 貯蔵が 16 h 後に認められたのに対し、高二酸化炭素貯蔵では、貯蔵中を通じて黒変は観察されなかった。このことから、O<sub>2</sub> 除去によってある程度の黒変抑制は可能になるものの、二酸化炭素封入によってさらに黒変を抑制できることが示された。

貯蔵開始 6 h 後のエビ表面の pH は二酸化炭素封入によって 0.5 低下したが、これは、増殖抑制効果を示すほどの値ではないと考えられた。このことから、増殖抑制は pH 低下によるものではなく、二酸化炭素そのものの抑制効果であることが示唆された。食味については、ガス環境による影響はみられなかった。

以上の結果から、二酸化炭素置換包装は、ホッコクアカエビの黒変を防止するとともに、食中毒菌の増殖も併せて抑制できる流通手法であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

- ① Makino Y., Ito Y., Oshita S., Kawagoe Y., Kawabuchi Y., Sugawara T., Hirata T., Mathematical analysis for growth depression of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp under a high carbon dioxide atmosphere, Food Science and Technology Research, 17(1), 2011, 63-67
- ② Wakamatsu, K., Ohtara, K., Ito, S. Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. Pigment Cell & Melanoma Res., 22, 474-486, 2009.
- ③ 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, 2009, 563-579 (Review)

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 殿本将司, 大友良祐, 増田太郎, 菅原達也, 平田 孝, クルマエビの黒変現象に関わる新規因子の単離とその性質、平成 22 年度日本水産学会秋季大会、2010 年 9 月 23 日 京都大学 100 周年時計台記念館（京都市）
- ② 伊藤友樹, 牧野義雄, 大下誠一, 川越義則, 川淵幸映, 綾木毅, 田中幹雄, 広瀬和彦, 菅原達也, 平田孝, エビに付着した腸炎ビブリオ菌の増殖抑制を目的とする CO<sub>2</sub> 置換包装に関する研究、第 69 回農業機械学会年次大会、2010 年 9 月 15 日、愛媛大学農学部（松山市）
- ③ Ito Y., Makino Y., Oshita S., Kawagoe Y., Kawabuchi Y., Sugawara T., Hirata T., Predictive food microbiology on growth depression of *Vibrio parahaemolyticus* in pink shrimp under CO<sub>2</sub>, International Conference on Agricultural Engineering AgEng 2010, 2010 年 9 月 8 日, ポリドーム (クレルモンフェラン市, フランス)
- ④ 伊藤友樹, 牧野義雄, 大下誠一, 川越義則, 川淵幸映, 綾木毅, 田中幹雄, 広瀬和彦, 菅原達也, 平田孝, CO<sub>2</sub> 置換包装によるエビに付着した腸炎ビブリオ菌の増殖抑制に関する研究、日本包装学会第 19 回年次大会研究発表会、2010 年 7 月 8 日、

東京大学弥生講堂（東京）

- ⑤ 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
- ⑥ 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 CO<sub>2</sub> 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（東京）
- ⑦ 牧野義雄, 伊藤友樹, 大下誠一, 川越義則, 川渕幸映, 平田孝, 調整気相下におけるエビ汚染腸炎ビブリオ増殖の予測微生物学モデリング, 日本食品工学会第 10 回年次大会, 2009 年 8 月 2 日, 石川県立大学（石川県野々市町）
- ⑧ 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 CO<sub>2</sub> を利用した増殖抑制に関する予測微生物学的研究, 農業機械学会関東支部年次大会, 2009 年 7 月 11 日, 千葉大学園芸学部（松戸市）
- ⑨ 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 7 件）

- ① 足立亨介, 水産物の黒色変化に関する生化学的解析, 日本水産学会誌（印刷中）
- ② Kohsuke Adachi and Takashi Hirata, Handbook of Seafood Safety, Quality and Health Applications (Ed Shahidi, Cerarettin, Miyashita) Blackspot development on crustaceans during storage. 109-118, 2011, Wiley-Blackwell Publisher.
- ③ 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（985）, 41-44, 2009.
- ④ 平田孝・菅原達也 編, 恒星社厚生閣, 水産物の色素, 127 頁, 2008
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

菅原 達也 (SUGAWARA TATSUYA)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70378818

牧野 義雄 (MAKINO YOSHIO)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70376565

伊藤 祥輔 (ITO SHOSUKE)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号：70121431

若松 一雅 (WAKAMATSU KAZUMASA)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号：80131259

増田 太郎 (SUGAWARA TATSUYA)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40395653

足立 亨介 (ADACHI KOSUKE)

高知大学・教育研究部自然科学系・准教授

研究者番号：40553152

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：