

# 水産加工品の品質保持と冷凍貯蔵の温度条件

若生 豊<sup>†</sup>・伊藤 由加里<sup>††</sup>

## Development of Lipid Oxidation and Flesh Quality of Marinade Mackerel during Chilled Storage

Yutaka WAKO<sup>†</sup>, Yukari ITOH<sup>††</sup>

### ABSTRACT

Marinade mackerel “Shimesaba”, traditional Japanese sea food, was stored at -17, -30 and -70 °C for one year. Raw mackerel, control for “Shimesaba”, was also stored at same temperature. The TBARS contents in the marinade mackerel was higher than those in raw mackerel stored at -70 °C. The TBARS contents in raw and marinade mackerel showed a tendency to increase as the stored temperature rises. Disulfides bonds in muscle proteins in raw and marinade mackerel were estimated by labeling with mBBBr and subsequent electrophoresis. There was no difference in fluorescence intensity of any protein to stored temperature change. To keep the quality of marinade mackerel for long term, the freezing storage at -17 °C, or -30 °C was insufficient.

**Key Words:** marinade mackerel, chilled storage, lipid oxidation, TBARS

**キーワード:** シメサバ, 冷凍貯蔵, 脂質酸化, TBARS

### 1. 緒 言

サバ (*Scomber japonicus Houttuyn*) はタンパク質含有量や脂肪含有量も高く、心血管疾患予防に有効な n-3 系脂質の豊富な供給源ともなっている。さらに、ビタミンの含有量や炭水化物含有量も高く栄養成分の充実している食材として理解され食に供されて来た。サバは脂質含有量が高く鮮度劣化が早いことから、酢を用いた調理や加工が古くよりなされ、シメサバは惣菜、嗜好品

として広く親しまれている。八戸のシメサバは全国に知られるようになり各地に出荷されているが、引き続き品質の維持向上が求められている。しかし、シメサバの冷凍貯蔵による保持期間は約 20 日程度と短いことや、さらにアレルギーの表示が求められる 20 品目の食品の一つであることなどは、今後商品の価値を高める上で検討すべきポイントと考えられる。そこで、本研究では以下の 2 点につき検討を行った。

①脂質酸化劣化抑制に対する冷凍温度条件の評価と、商品の抗酸化対策の重要性。

②サバ筋組織タンパク質のアレルゲン性に関する、タンパク質分子中のジスルフィド結合量に着目した検討。

---

平成 23 年 1 月 14 日受理

<sup>†</sup> 工学部バイオ環境工学科・教授

<sup>††</sup> 工学研究科機械・生物化学工学専攻博士前期課程・1 年

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 試料調製

試料は青森県産業技術開発センター食品総合研究所の作製したシメサバを試験に供した。サバ同一個体より得た2枚のフィレーの一方をしめサバに加工し、もう一方は、加工せずに対照試料の生のフィレーとし、この一組をセットとして5点のサンプル (No.1~No.5) を用いた。それぞれ約1年間、 $-17^{\circ}\text{C}$  (No.2, No.4),  $-30^{\circ}\text{C}$  (No.5),  $-70^{\circ}\text{C}$  (No.1, No.3) で冷凍保存を行った。

冷凍貯蔵後、サバ試料の所定部位を1g採取し5倍容の30mM Tris-HCl で、氷冷下にてホモジナイズした後、1万回転で10分間遠心分離を行い、その上清を抽出試料とした。この抽出試料をTBARS測定(脂質酸化)、およびアレルギー検討(電気泳動)の試料として供した。

### 2.2 冷凍貯蔵試験

上記、シメサバ、および各対照となる生サバを冷凍貯蔵した。本研究では、品質保持や冷凍

貯蔵・流通等に対する貯蔵温度の関係を明らかにする基礎的データを得ることを目的とした。従って、貯蔵温度や期間は、あくまでも有効なデータを得る観点から設定を行い、期間は1年間、温度は $-17^{\circ}\text{C}$  ~  $-70^{\circ}\text{C}$ と極端な条件とし、商業的な貯蔵・流通温度とは異なった設定となっている。真空パックされたシメサバおよび対照の生サバを下記の各冷蔵庫で、1年間貯蔵した。

貯蔵温度 冷蔵庫の種類・型式

$-17^{\circ}\text{C}$  冷凍室東芝 (GR22)

$-30^{\circ}\text{C}$  深低温冷凍庫 (SANYO MDF330)

$-70^{\circ}\text{C}$  超低温槽 (SANYO MDF492 A)

表に、試料コード、貯蔵温度(摂氏および絶対温度)、試料重量、および測定データをまとめた。数字は試料の番号で、Mと示したシメサバとRで示した対照の生フィレーが組となりそれぞれ $-17^{\circ}\text{C}$ 、 $-30^{\circ}\text{C}$ 、 $-70^{\circ}\text{C}$ に1年間保存した。 $-17^{\circ}\text{C}$ と $-70^{\circ}\text{C}$ には2組の試料があるが、 $-30^{\circ}\text{C}$ は一組の試料のみである。各試料重量には大きな差はなく脂質含量もほぼ同程度と考えられる。

### 2.3 チオバルビツール酸反応陽性物質の定量

表 冷凍貯蔵試験におけるシメサバ、生サバの試料番号、貯蔵温度、試料重量、およびTBARS測定データと可溶性タンパク質量

No.	chilled temp.		weight <sup>a</sup> (g)	TBARS <sup>b</sup> ( $\mu$ mol/g)	Sol. Protein <sup>c</sup> (mg/ml)
	(°C)	(K)			
marinad makerel (シメサバ)					
2M	-17	256	199	44. 4	1. 23
4M	-17	256	212	45. 1	1. 87
5M	-30	243	248	51. 7	1. 02
1M	-70	203	244	24. 5	1. 29
3M	-70	203	261	14. 3	1. 72
raw mackerel (生サバ <sup>〃</sup> )					
2R	-17	256	208	54. 6	7. 68
4R	-17	256	243	107. 8	5. 86
5R	-30	243	221	37. 9	9. 90
1R	-70	203	303	11. 1	—
3R	-70	203	290	1. 1	10. 90

a: 試験試料重量, b: チオバルビツール酸反応物質レベル:TBARS c:抽出試料の可溶性タンパク質量

市販のキット（TBARS assay kit, Cyman chemical）を利用し測定した。抽出溶液 $50\mu\text{l}$ 、 $\text{SDS}$ 試薬 $50\mu\text{l}$ 、チオバルビツール酸を含む発色試薬 $4\mu\text{l}$ を加え、1時間沸騰水浴中で反応を行う。その後、直ちに10分間氷冷し、 $3000\text{rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$ で、10分間、遠心を行なう。上清を別の試験へ取り波長 $540\text{nm}$ で吸光度を測定した。標準試薬であるマロンジアルデヒドを0から $50\mu\text{M}$ の濃度に調製し、同様の条件で測定し、標準曲線を作成した。この標準曲線より試料のTBARS値を計算した。

## 2.4 タンパク質のmBBR標識によるジスルフィド結合の解析

ジスルフィド結合の解析はMommaの方法<sup>1)</sup>に従った。タンパク質のジスルフィド基の標識には mBBR（蛍光色素モノプロバイメイン）を使用した。試料溶液 $85\mu\text{l}$ へ $0.5\text{mM}$  ジチオスレイトール（DTT）を含む緩衝液（ $30\text{mM}$  Tris-HCl, pH 7.9） $25\mu\text{l}$ を加え、室温で20分間還元反応を行った。次いで、 $20\text{mM}$  mBBR を $5\mu\text{l}$ 加え、室温で15分間反応の後、 $100\text{mM}$ メルカプトエタノールを $10\mu\text{l}$ 、 $20\%$  SDSを $5\mu\text{l}$ 加え反応を停止し、さらに $80\%$  グリセロールと $0.005\%$  ブロモフェノール溶液を加え電気泳動試料とした。還元処理をしていない試料を同様に mBBRで標識し対照とした。電気泳動はSDSを含む $10\sim 20\%$ のグラディエントポリアクリルアミドゲル（市販の既製ゲル）を使用し、行った。MBBR 標識試料をゲルへロードし、 $40\text{mA}$ にて 80分間通電した。泳動後、ゲルを $10\%$  トリクロロ酢酸で1時間固定後、 $40\%$ （v/v）メタノール、 $10\%$ （v/v）酢酸中で2時間振盪し、過剰な mBBR を除いた。ジスルフィド基を蛍光標識されたタンパク質のバンドはトランスイルミネータ（ $365\text{nm}$ ）上で検出し、フィルターを装着したデジタルカメラ（DC290 Zoom）で撮影した。蛍光画像は解析ソフトEDAS290（Kodak1D）で計測し、各バンドの蛍光強度を計算した。次にタンパク質の画像を観察するため、蛍光画像撮影後の電気泳動ゲルを CBB（クーマジーブリリアントブルー）染色した。脱色後、分離パターンをブライトボックス上でフィルターをはずしたデジタルカメラで撮影し、同様に画像を解析ソフト

EDAS290（Kodak1D）で解析し、各バンドのタンパク染色強度を計算した。これらの結果から、mBBR 標識したときの主要バンドの蛍光強度とCBB染色におけるバンド濃度を比較した。

## 2.5 その他の分析

タンパク質の定量は市販のキット（プロテインアッセイ, BioRad）を用い、クーマジーブリリアントブルー染色し  $595\text{nm}$  の吸光度を測定し行った。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 抽出試料中の可溶性タンパク質

シメサバの加工によりタンパク質は酸変性し、ホモジネート遠心上清の可溶性タンパク質量は著しく低下した。この遠心上清試料をTBARS値測定へ使用することとしているため、上清試料中のタンパク質の濃度の減少がTBARS値測定へ影響を及ぼさないかについて、はじめに考察した。各貯蔵温度のシメサバ、および生サバの可溶性タンパク質量とTBARS値の比較を行った（図1）。しかし、TBARS値と可溶性タンパク質量に比例関係は無く、酸化生成物の抽出効率は可溶性タンパク質量から独立していることが考えられ、この上清試料を使用してTBARS値の比較検討を行うことは可能と判断した。

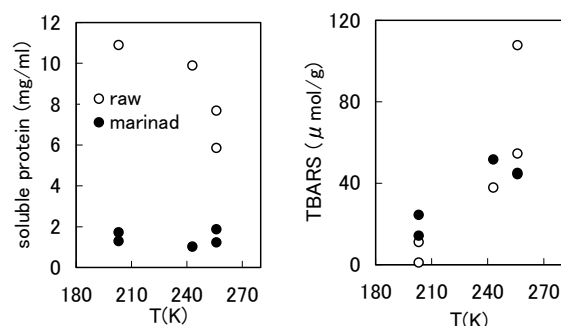


図1 シメサバおよびサバ組織抽出試料の可溶性タンパク質量（左）とTBARS値（右）の比較

### 3.2 冷凍保存シメサバの脂質劣化に対する貯蔵温度の影響

サバは鮮度劣化の著しい魚の代表であり、脂質含有量の高さがその原因とされる。高度不飽和脂肪酸は酸化反応により、ラジカル種を経て、一次的に脂質ヒドロペルオキシド類、二次的にアルデヒド類、低級脂肪酸類、炭化水素類など様々な反応物が生成し、これらは酸敗臭の原因となり、中には有害性を示すものもある。したがって、脂質劣化度の判定には、これらの生成した成分の検出・定量によってなされるが、本研究では油脂酸化劣化の尺度として、脂質過酸化反応において最も多くの成分を総合的に測定する方法としてよく利用されている、チオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS) を測定することとした。

各貯蔵温度におけるシメサバおよび生サバ試料のTBARS値を表に示した。また、TBARS値の絶対温度に対する変化を散布図として図2(左)のグラフに纏めた。シメサバ、生サバいずれの試料も温度が高いほど高くなる傾向を示したが、シメサバ試料では $-30^{\circ}\text{C}$ と $-17^{\circ}\text{C}$ の間に変化は認められなかった。これらの結果をアレニウスプロットに整理し図2(右)に示す。アレニウスプロットは反応が反応温度に規定されていることを検討する関係式であり、絶対温度の逆数に対する速度定数の対数値の相関性を示したものである。個体によりTBARS値がかなり異なるデータがあり、この温度条件とデータ数だけで確かな判断はできないが、TBARS値と貯蔵温度はアレ

ニウスの式に従う可能性が考えられる。すなわち、TBARS値で表わされる脂質酸化による品質劣化は温度上昇に伴い、指数対数的に増大するものと考えられる。長期保存条件のもとでは、 $-70^{\circ}\text{C}$ のみでTBARS値は低く抑えられていて、 $-30^{\circ}\text{C}$ 程度では酸化反応の進行を抑えることは出来ず、TBARS値は上昇し $-17^{\circ}\text{C}$ の値と近いレベルとなっていた。従って、貯蔵温度条件のみに限って、酸化反応の進行を抑える条件を考えると、貯蔵温度としては $-70^{\circ}\text{C}$ 程度の超低温域でないと酸化を抑えられない可能性が考えられた。しかし、一般的に酸化防止を検討する際は酸素除去が大きな鍵となっており、脂質酸化に伴う品質劣化対策への対応としては総合的な考慮が必要である。シメサバ製品の酸化防止対策の現状は良く承知していないが、商業的流通における冷凍温度では酸化の抑制効果は薄く、製品の酸化防止対策<sup>2)</sup>を向上させることにより商品寿命を延ばすことや品質向上を達成できる可能性が考えられる。

図2(右)に示すアレニウスプロットの傾きは脂質酸化の速度 (正しくは活性化エネルギー) を表わすが、今回の結果では以上のように個体間でデータに大きな差が生じて一概に評価することは難しい。すなわち、 $-17^{\circ}\text{C}$ における、シメサバと生サバのTBARS値を比較するとシメサバは2つの試料は共に約 $45\mu\text{mol/g}$ の値を示したのに対し、生サバの試料4では $100\mu\text{mol/g}$ を越す約

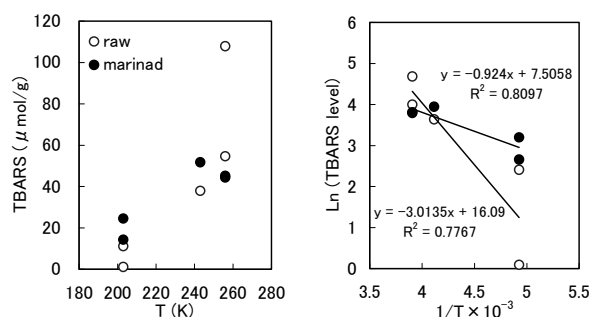


図2 左; 各貯蔵温度 (絶対温度) における TBARS 値 シメサバ (●) および対照の生サバ(○)を 256K( $-17^{\circ}\text{C}$ ), 243K( $-30^{\circ}\text{C}$ ), 203K( $-70^{\circ}\text{C}$ )で約1年間貯蔵する。右; TBARS 生成反応におけるアレニウスプロット。

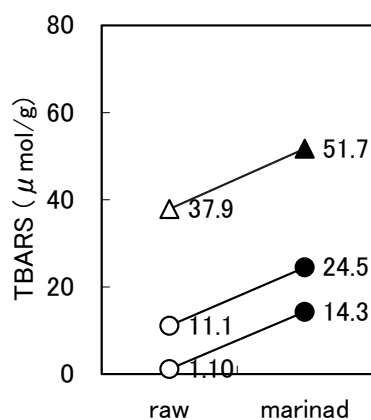


図3 シメサバ加工時の脂質酸化 (TBARS 値) の上昇 ○:  $-70^{\circ}\text{C}$ 保存試料, △:  $-30^{\circ}\text{C}$ 保存試料, 白: 生サバ, 黒: シメサバ

2 倍の値へ上昇していた。サンプル数が 2 つだけであるので、シメサバと生サバで酸化劣化に差があるかどうか判断はできない。また、 $-70^{\circ}\text{C}$ において、生サバの 2 つの試料の間で TBARS 値に 10 倍の大きな違いが認められた。これは貯蔵する以前の脂質酸化の状況を反映したものと考えられる。図 2 より、シメサバと生サバの脂質酸化速度の比較は上記の理由より一概には出来ないが、以上のことを考慮すると、酸化速度には差の無い可能性が考えられる。

脂質劣化が抑えられ貯蔵開始時の状況が保存されていると考えられた、 $-70^{\circ}\text{C}$ の二組の試料についてシメサバおよび生サバの TBARS 値を比較した（図 3）。二組の試料の値はかなり異なっていたが、同一個体のシメサバおよび生サバ試料間で TBARS 値の比較を行うことにより加工に伴う脂質劣化を検討可能と考えた。それぞれの試料においてシメサバの方が約  $10\mu\text{mol/g}$  上昇していることが分かり、加工時に脂質酸化の進むことが考えられる<sup>3)</sup>。また、 $-30^{\circ}\text{C}$ においても約  $14\mu\text{mol/g}$  上昇している。一般に pH の低下は組織液の流出を引き起こすことが知られており、組織液中にはヘム鉄などの金属が含まれる。従って、シメサバが高い TBARS 値をとる要因には加工処理操作に伴う上昇の他に、組織液中の金属元素が酸化触媒となり亢進した部分も存在することが考えられる。スリミ製造など水産加工時における酸化劣化の亢進が課題となっているが、シメサバにおいても加工時の酸化劣化がどの程度かを把握し、製品の品質に及ぼす影響を検討しておくことは必要であろう。

### 3.4 サバ筋組織タンパク質のアレルゲン性

食物アレルギーに関する関心の高まりに伴い、現在アレルギー例の多い食物成分を含む食品はその旨を表示することが定められている。表示が求められているアレルギー物質を含む特定原材料は、特に発症例数が多く必ず表示しなければならない、卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目と、可能な限り表示することが求められている 20 品目がある。サバは後者の 20 品目の一つであり、サバにアレルギーを示す人も少なくない。

青魚に共通する問題としては、特に鮮度の低下に伴うヒスタミンの増加があり、アレルギー様食中毒を発症させる原因となっている。アレルギーは、ある食品中に含まれる成分に対し、一部の人たち（大人；約 1～2%，子供；約 5～8%）が、かゆみやじんま疹、頭痛、吐き気、嘔吐、下痢を起こし、激しい場合はショック症状を起こし最悪の傷合は死亡することもある。多くの場合、それらを起こす成分は、その食物に含まれる特有のタンパク質であることが多い。サバのアレルギーのもう一つの原因としては、サバに寄生するアニサキスのタンパク質が原因となっていることが知られている。食品アレルギーの原因となるアレルゲンは 170 種ほどが明らかにされているが、原因が明らかでないアレルギーの方がむしろ多い。食品タンパク質のアレルゲン性を調べる方法としては一般に、①消化性が悪いか（消化性が悪い場合  $10\sim 70\text{kDa}$  のペプチドが残る）、②既存アレルゲンのアミノ酸配列に相同性があるか、③そのタンパク質が食品中の主要タンパク質であるか、などを調べ評価される。近年、アレルゲン候補のタンパク質にジスルフィド結合が多いとの知見から、ジスルフィド結合は食品タンパク質のアレルゲン性に関与することが明らかになりつつある。そこで、本研究ではジスルフィド結合に着目し、サバ筋組織タンパク質の検討を行った。補足であるが、ジスルフィド結合は本来、タンパク質の分子内で分子構造保持や活性制御に関与している結合である。

### 3.5 可溶性タンパク質ジスルフィド結合量

$-17^{\circ}\text{C}$ 、 $-30^{\circ}\text{C}$ 、 $-70^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した、シメサバ（M）、生サバ（R）の試料の SDS-PAGE パターンを 図4（左）に示した。シメサバ試料では前述のように可溶性タンパク質が減少し、これに伴い約  $85\text{kDa}$  の重鎖ミオシンと考えられるバンドが減少した。しかし、可溶性タンパク質の分離パターンには、シメサバと生サバの間、および各貯蔵温度の違いによる大きな変化は観察されなかった。観察されたバンドのほとんどはミオシンと考えられる。

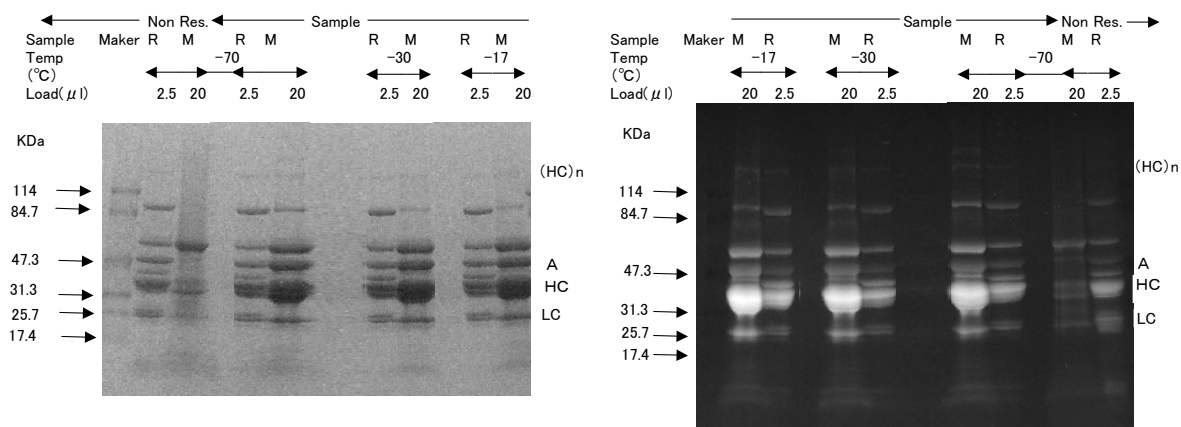


図4 シメサバおよび生サバタンパク質のSDS電気泳動。左：CBB染色，右：mBBR標識タンパク質の蛍光画像。R：生サバ，M：シメサバ，Non Res：還元処理をしないコントロール，他は5mM DTTとともに煮沸処理しジスルフィド結合を完全に還元処理した。

アレルゲンとされるタンパク質の多くがジスルフィドタンパク質であり，タンパク質分子内架橋結合による構造安定化によるアレルゲン性への関与が報告されている。そこで，各温度で貯蔵した，シメサバ，生サバの試料について，タンパク質のジスルフィド結合を解析した。ジスルフィド結合に対する還元処理をしないコントロール，5mM DTTとともに煮沸処理しジスルフィド結合を完全に還元処理した試料を，チオール基に特異的な蛍光色素mBBR（モノプロモバイメイン）で標識し電気泳動した（図4，右）。泳動に供した試料は可溶性タンパク質量がシメサバ試料で少なかったため，生サバ試料の8倍量とした。還元処理したいずれの試料でもCBB染色で観察された各バンドに蛍光が検出された。各バンドごとにCBBの染色強度（タンパク質量に対応）とmBBRの蛍光強度（ジスルフィド結合量に対応）を整理し，両者の比を求め含有比率を計算した。しかし，いずれのバンドにも特別にジスルフィド結合の含有比率の高いタンパク質を見つけることは出来ず，今回の観察からアレルギーに関する考察は行えなかった。しかし，アレルゲンタンパク質は一般に塩可溶性画分に含まれるとされている。今回は30mM Tris-HClで抽出されたタンパク質を対象として分析したが，

アレルゲンの懸念される塩可溶性画分の成分や難消化性のタンパク質を対象として，ジスルフィド結合の評価を行うことが必要と考えられた。

#### 4. 結論

- 1) サバ，およびシメサバの脂質酸化劣化は， $-70^{\circ}\text{C}$ 程度の超低温域でないと抑えられず，商業的な流通の冷凍温度では酸化は避けられない。従って，製品の酸化防止対策を向上させることは，商品寿命を延ばすことや品質の向上にとって効果的な取り組みと考えられる。
- 2) シメサバ加工時に脂質酸化の進むことが考えられ，シメサバのTBARS値は原料のサバに比べ約 $10\mu\text{mol/g}$ 上昇していた。加工時の酸化劣化がどの程度かを把握し，製品の品質に及ぼす影響を検討しておくことは必要であると考えられる。
- 3) アレルゲン候補のタンパク質にジスルフィド結合が多いとの知見から，ジスルフィド結合に着目し，サバ筋組織タンパク質の検討を行った。しかし，今回の検討では特別にジスルフィド結合の含有比率の高いタンパク質を観察することはできなかった。

この研究の一部は青森県産業技術開発センタ

一の研究委託費の助成により行われた。また、研究に対して試料の加工および準備にご協力頂きました同センターの白板孝朗研究員に感謝致します。また、TBARS 測定、タンパク質のジスルヒド結合評価に協力頂いた本研究室卒業生の高松一省氏に感謝致します。

## 5. 参考文献

- 1) Momma, M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 3058 (2006)
- 2) Akhtar, P., Gray, J.: *J. Food Lipids.*, 5, 43 (1998)
- 3) Sylvie, E., Elodie, C. *et al* : *J. Sci. Food Agric.*, 85, 1750 (2005)