

原著論文

ゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジを利用した くさやと魚醤油に含まれる 魚肉アレルギー原因物質パルブアルブミンの定量

伊藤康江^{1,*}・塩見一雄²・三枝静江¹・細井知弘¹・三枝弘育¹

¹東京都農林総合研究センター（東京都立食品技術センター）

²東京海洋大学 海洋科学部

摘 要

食物アレルギーの原因食物は多岐にわたり、成人では、小麦、甲殻類、果物類に次いで、魚類が原因食物の第 4 位となっている。本研究では、東京都の島しょ地域において漁獲・利用されている 3 魚種（ゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジ）に含まれるアレルギータンパク質パルブアルブミンについて、enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）による定量系を新たに確立するために、分取した各魚種のパルブアルブミン異性体と抗体 3 種との結合活性を検討し、定量に適する抗体として抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体を選定した。次に、確立した ELISA 法により、複数のムロアジの生魚およびくさやの背肉に含まれるパルブアルブミンを定量した。その結果、くさやのパルブアルブミン量は、生魚と比べて明らかな減少は認められず、微生物を含むくさや液を用いてムロアジをくさやに加工しても、パルブアルブミンは顕著に分解されないことが判明した。一方、ゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジそれぞれを原料魚とし、*Aspergillus oryzae* を使用した麦麴と醤油製造用酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を用いて、常温で 6 ヶ月間発酵後に压榨および火入れを行い、4°C、1 年間保存した魚醤油においては、パルブアルブミンが 1 µg/g 未満に減少した。また、麦麴より分離した *A. oryzae* および食品や酵素の生産等に利用されている糸状菌株 *A. oryzae*, *A. brasiliensis*, *Penicillium pinophilum*, *P. chrysogenum*, *P. biforme*, *Rhizopus microsporus* は、マサバパルブアルブミンの分解活性を有していたが、魚加工品を分離源とする乳酸菌株 *Pediococcus pentosaceus* および *Lactobacillus plantarum* のマサバパルブアルブミンの分解活性は低かった。以上の結果は、抗体を用いたパルブアルブミンの定量には魚種ごとに適した抗体を用いる必要があること、および特定の微生物を利用した発酵によりパルブアルブミン量を低減させた魚加工品が製造可能なことを示唆している。

キーワード：魚肉アレルギー、パルブアルブミン、くさや、魚醤油、麹菌

東京都農林総合研究センター研究報告 10: 1-13, 2015

2014 年 11 月 5 日受付, 2015 年 1 月 14 日受理

*著者連絡先 E-mail: yasue-ito@food-tokyo.jp

緒言

食物アレルギーの原因食物は多岐にわたり、鶏卵、牛乳、小麦、大豆、そば、落花生、キウイフルーツといった農畜産物のほかに、魚類、魚卵、甲殻類などの水産物も重要な原因食物である。成人では、小麦、甲殻類、果物類に次いで魚類が原因食物の第4位となっている(「食物アレルギーの診療の手引き 2011」検討委員会, 2011)。

魚類の主要アレルゲンは、1960年代から1980年代にかけてノルウェーの研究者グループがタラ類 *Gadus callarias* を対象として精製し、そのアミノ酸配列の分析結果からパルブアルブミンであることを明らかにした(Elsayed and Aas, 1971a; Elsayed and Bennich, 1975; Kuehn et al., 2014)。タラ類に加え、タイセイヨウサケ(Lindström et al., 1996)、マアジ(Shiomi et al., 1998)、ウナギ(Shiomi et al., 1999)、メバチ(Shiomi et al., 1999)、コイ(Swoboda et al., 2002)、マサバ(Hamada et al., 2003a)などの魚においても、主要アレルゲンはパルブアルブミンであることが魚アレルギー患者の血清を用いた試験により、明らかとなっている。パルブアルブミンに次ぐ重要な魚類アレルゲンとして、コラーゲンが挙げられるが(Hamada et al., 2001)、魚アレルギー患者のうち、コラーゲンを認識する患者の割合はパルブアルブミンに比べて少ないとされる(Hamada et al., 2003b)。

パルブアルブミンは、質量約12 kDaの筋形質タンパク質で、熱安定性が高く(Aas and Elsayed, 1975; Arif and Hasnain, 2010)、 Ca^{2+} 結合能をもち、筋肉の弛緩に関与していると考えられている(Gillis et al., 1982)。パルブアルブミンのアミノ酸配列は、魚種によりその一部が異なり(Hamada et al., 2003b)、また、同一魚種であっても、アミノ酸配列の異なる異性体が複数存在する場合があることが知られている(Shiomi et al., 1999)。パルブアルブミンはペプチド鎖の長さにより、109残基以上の α タイプと108残基以下の β タイプに分けられ、魚類パルブアルブミンのほとんどは β タイプとされている(Moncrief et al., 1990)。

各種魚類のパルブアルブミンは、互いに抗原交差性を示すことから共通のIgEエピトープを有すると考えられているものの、その交差性には、アミノ酸配列の相同性のみならず、ときに立体構造が影響することも示唆されている。例えば、タラのパルブアルブミンGad c 1の場合には、立体構造が変化してもIgE反応性の低下は約25%であることから、一次構造エピトープが重要とされる(Elsayed and Aas, 1971b)一方、コイパルブアルブミンおよびマサバパルブアルブミンの場合には、立体構造

が変化するとIgE反応性はそれぞれ30~90%、60~100%低下することから、立体構造エピトープが重要とされている(Swoboda et al., 2002; Tomura et al., 2008)。

さらに、パルブアルブミンは、魚種により、アミノ酸配列のみならず、魚肉1gあたりに含まれる量が異なり、また、魚の加工によっても、その量や構造、抗体結合活性が変化する(Kuehn et al., 2010; de Jongh et al., 2013)。魚類以外の哺乳類や両生類といった脊椎動物にもパルブアルブミンは含まれており、特に魚類と両生類の筋肉においてその含量は高く(Kretsinger and Nockolds, 1973)、魚類とカエルのパルブアルブミン間では抗原交差性も存在する(Hamada et al., 2004)。このようなことから、種々の魚類と、その加工品に含まれるパルブアルブミン量を明らかにすることは、魚アレルギー患者の危険を回避し、また患者や補助者が摂取可能な魚加工品を選択・決定するうえで極めて有用となる。

魚加工品の1つとして、東京都島しょ地域には、ムロアジ、トビウオなどを利用する「くさや」という伝統的な干物が存在する。くさやは、様々な微生物を含むくさや液(元は塩水であるが魚を漬け込むことを長年くり返すことにより発酵した液体)に、ムロアジ、トビウオなどを一晩漬け込んだ後、乾燥させて製造するもので、特有の香りを有することからも、島しょの特産品として重要なものとなっている。

また、魚醤油は、魚を発酵させて製造する調味料で、東南アジアや日本のいくつかの地域で製造されており、東京都立食品技術センターでは、伊豆諸島で漁獲される低利用魚の有効利用を図るため、ゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジを用いた魚醤油の開発を行ってきた。従来の魚醤油は、魚と塩のみを原料とするが、製造中に微生物叢の影響を反映していると思われる酸敗臭が生成する場合があること、また1年以上の醸造期間を必要とすることから、三枝ら(2013)は、糸状菌を含む麹と酵母を添加して比較的短期間で製造する、風味の良いゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジの魚醤油を開発した。

魚肉に含まれるパルブアルブミンの定量方法としてenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)があり、マサバやコイのパルブアルブミンに対する抗体、また、魚類パルブアルブミンと抗原交差性のあるカエルパルブアルブミンに対する抗体を用いて、マアジ、マサバなどに含まれるパルブアルブミンの定量がすでに可能となっている(Kobayashi et al., 2006; 濱田ら, 2000; 嶋倉ら, 2012)。しかしながら、前述のとおり、パルブアルブミンは魚種によってそのアミノ酸配列が一部異なり、また、同じ魚種のパルブアルブミンにも複数の異性体が存在する場合があるため、より正確な定量を行うためには、各パルブ

アルブミン異性体と抗体との結合活性を解析し、異性体間での結合活性の差が小さい抗体を選択することが必要となる。これまでに、ゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジのパルブアルブミンの異性体と種々の抗体との結合活性について検討した報告はなく、ELISAによるパルブアルブミン量の測定系も確立されていない。したがって、ゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジを用いたくさや、魚醤油および魚醤油の製造過程の諸味におけるパルブアルブミン量の測定に際し、従来からのマアジやマサバなどに含まれるパルブアルブミンの定量法を適用することの是非の確認と、必要に応じて方法の改変を図ることが必要となる。

そこで本研究では、初めに、3魚種（ゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジ）のパルブアルブミンの定量に適した抗体を選定するために、3魚種の複数個体からパルブアルブミンの異性体を精製し、抗体3種（抗コイパルブアルブミン抗体、抗カエルパルブアルブミン抗体、抗マサバパルブアルブミン抗体）との結合活性を検討した。その結果から、抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体が3魚種のパルブアルブミンの定量に適していると判断し、本抗体を用いて、ムロアジの生魚およびくさや、また、麴と酵母を用いた魚醤油とその製造過程の諸味に含まれるパルブアルブミンを定量し、魚の加工によるパルブアルブミン量の変化を検討した。さらに、魚醤油の製造に用いた麦麴に使用されている麴菌 *Aspergillus oryzae* のパルブアルブミン分解作用について調べるために、分離した麴菌を NaCl 含有マサバパルブアルブミン含有液体培地に接種し、液体培地中のパルブアルブミン量の変化を検討した。また、パルブアルブミン低減化食品製造への応用を考慮し、食品や酵素の生産等に利用されているその他の糸状菌株6種、および魚加工品を分離源とする乳酸菌株2種についても、マサバパルブアルブミン含有液体培地に接種し、各菌株のパルブアルブミン分解活性を検討した。

材料および方法

1. パルブアルブミン濃度測定試料の調製

(1) パルブアルブミンの精製

ゴマサバ（新島産、2009年および2010年漁獲）、ハマトビウオ（八丈島産、2008年、2009年および2010年漁獲）、ムロアジ（新島産、八丈島産、枕崎産、2009年漁獲）は、水揚げ直後に -20°C で冷凍されたものを用いた。また、対照として、市販のマサバを用いた。

パルブアルブミンの精製は、Shiomi et al. (1998)の方法に準じて、以下の手順で行った。各魚種について、個

体ごとに背肉部分の各20gに3倍量の0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を加えてホモジナイズし、遠心分離(18,000×g, 20分間)した。得られた上清を 100°C 、15分間加熱し、再度、遠心分離(18,000×g, 20分間)後に上清を回収し(粗タンパク質抽出液)、エバポレーターにより約20 mLに濃縮した。この濃縮液をゲルろ過クロマトグラフィ(固定相: Sephadex G75 カラム, 2.5×96 cm, GEヘルスケア・ジャパン; 移動相: 0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0)に供し、各フラクションの吸光度(280 nm)を測定するとともに SDS-PAGE を行い(方法は3に後述)、パルブアルブミンと推定される質量12 kDa付近のバンドを含むフラクションを個体ごとに合一した。次に、パルブアルブミンの異性体を分取する目的で、個体ごとに合一したフラクションを逆相 HPLC (送液ユニット: LC-10ATvp, 島津製作所; UV 検出器: SPD-10Avp, 島津製作所; 固定相: TSKgel ODS-120T カラム, 東ソー; 移動相: 0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル, アセトニトリルの濃度勾配は0~5分: 0%, 5~7分: 0~35%, 7~67分: 35~49%, 67~69分: 49~70%, 69~79分: 0%; 流速: 1 mL/min; 検出波長: 220 nm)に供し、出現したピークごとに溶出液を分取(パルブアルブミン各異性体に相当)、あるいは出現したピークに対応する溶出液すべてを分けずに採取(異性体混合物に相当)した。対照のマサバについては、既報(Hamada et al., 2003a)の通り、1本の主要ピークにて溶出されたパルブアルブミンの溶液を採取した。次に、これらのパルブアルブミン溶液あるいはパルブアルブミンを含有すると予想される溶液に含まれるアセトニトリルを遠心エバポレーターにて揮発させたのち、凍結乾燥した。乾燥物を蒸留水で $150 \sim 300$ $\mu\text{g/mL}$ 程度に溶解後、ウシ血清アルブミンを標準液としてタンパク質濃度を測定し(Quick Start Bradford Protein Assay, Bio-Rad)、コーティング液(0.015 M Na_2CO_3 :0.03 M NaHCO_3 =1:2, pH 9.5)で 1 $\mu\text{g/mL}$ に調製してELISAに供した。

(2) ムロアジの生魚とくさやからのタンパク質の抽出

2009年に漁獲されたムロアジの生魚(新島産、八丈島産、枕崎産、それぞれ3個体ずつ)および同じ漁獲時の生魚を原料魚として製造されたくさや(新島産および枕崎産ムロアジは新島にて、また八丈島産ムロアジは八丈島にて加工、それぞれ3個体ずつ)を購入して用いた。生魚およびくさやについて、個体ごとにそれぞれの背肉部分5gに3倍量の0.15 M NaCl 添加0.01 M リン酸緩衝液(pH 7.0)を加えてホモジナイズし、 25°C にて一晩静置後、 100°C 、10分間加熱した。加熱後、遠心分離(18,000×g, 20分間)して上清(粗タンパク質抽出液)を回収し、コーティング液(0.015 M Na_2CO_3 :0.03 M NaHCO_3 =

1:2, pH 9.5)で200~1000倍に希釈してELISAに供した。また、SDS-PAGEには、生魚およびくさや各1個体の試料について、回収した上清を5% β -メルカプトエタノール添加 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) を用いて2倍に希釈したものを供した。

(3) 魚醤油・諸味からのタンパク質の抽出

魚醤油および諸味は、既報(三枝ら, 2013)にて製造したものを用いた。すなわち、2008年に漁獲されたゴマサバ、ハマトビウオ、ムロアジを各原料魚とし、仕込み割合を各魚53%、麦麴12%(*A. oryzae* 使用の乾燥麦麴を指定の方法により加水、ピオック)、食塩10%、砂糖5%、水20%(いずれも重量%)として仕込み、2週間後に醤油用酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*, 10^6 /mLに調整した懸濁液、ピオック)を諸味重量の0.2%添加し、常温で6ヵ月間静置後、圧搾および火入れ(80°C, 40分間)を行い、魚醤油を製造した。仕込み当日、および仕込み後1ヵ月、2ヵ月経過した諸味サンプル(採取後、ELISA実施時まで-20°Cで保存)については、(2)と同様に調製した粗タンパク質抽出液をコーティング液で10~1000倍希釈してELISAに供した。また魚醤油(火入れ後、4°C, 1年間保存)については、コーティング液で10倍に希釈してELISAに供した。SDS-PAGEには、諸味の粗タンパク質抽出液および魚醤油を5% β -メルカプトエタノール添加 Laemmli Sample Buffer を用いて20倍に希釈して使用した。

(4) 糸状菌または乳酸菌を接種したパルブアルブミン含有液体培地からの測定試料の調製

魚醤油の製造に使用した乾燥麦麴から麴菌 *A. oryzae* を、ポテトデキストロース寒天(PDA)培地を用いて純粋分離し、そのコロニーの1白金耳量を、マサバより精製したパルブアルブミンを50 μ g/mL添加したYM液体培地(Yeast Mold Broth, Difco; NaCl濃度: 0, 5および10%)に接種し、好氣的に25°Cで静置した。麴菌接種2~14日後に採取した各液体培地試料を前述のコーティング液で10~200倍に希釈してELISAに供した。また、採取した各液体培地試料を5% β -メルカプトエタノール添加 Laemmli Sample Buffer を用いて2倍に希釈し、SDS-PAGEに供した。

同様にして、50 μ g/mL マサバパルブアルブミン含有YM液体培地(NaCl濃度: 0%)を用いた *A. oryzae* NBRC 5710, *A. brasiliensis* NBRC 9455, *Penicillium pinophilum* NBRC 6345, *P. chrysogenum* NBRC 4626, *P. bifforme* NBRC 7722, および *Rhizopus microsporus* NBRC 8631株の接種試験(PDA培地上コロニーより1白金耳量を接種, 25°C, 4日間, 好気培養), および50 μ g/mL マサバパルブアルブミン含有MRS液体培地(*Lactobacillus* broth acc. to de

MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck; NaCl濃度: 0%)を用いた魚加工品を分離源とする乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* JCM 2023 および *Lactobacillus plantarum* JCM 8343株の接種試験(MRS寒天培地上コロニーより1白金耳量を接種, 30°C, 14日間, 好気培養)を行い、SDS-PAGE解析を実施した。

2. パルブアルブミンのELISAによる検出

前項1(1)の各パルブアルブミン溶液に対しては、抗体3種、抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体(235, Swant), 抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体(P3088, Sigma-Aldrich) および抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体(東京海洋大学より分与)を、前項1(2)~(4)の試料に対しては、抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体を用いてELISAを行った。

ELISAは、Ishikawa et al. (1997)の方法を一部改変し、以下の手順で行った。ELISA用マイクロプレート(MS-8896F, 96-wellプレート, Hタイプ平底, 住友ベークライト)に、コーティング液(0.015 M Na_2CO_3 :0.03 M NaHCO_3 =1:2, pH 9.5)を用いて希釈した各試料液50 μ Lを加えて固相化(37°C, 2時間)後、マイクロプレートウォッシャー(モデル1575, Bio-Rad)を用いて0.05% Tween 20添加リン酸緩衝生理食塩水(Tween 20-PBS)で洗浄した。次に、1%ウシ血清アルブミン溶液350 μ Lを加えてブロッキングしたのち(4°C, 一晩), 同様に洗浄した。続いて、抗体希釈液(0.1%ウシ血清アルブミン添加 Tween 20-PBS)を用いて1:5000に希釈した前述の抗体をそれぞれ50 μ L加えてインキュベート(37°C, 1時間)後、洗浄した。さらに、抗コイパルブアルブミン抗体および抗カエルパルブアルブミン抗体を添加した場合には、二次抗体としてHRP-抗マウスIgG1抗体(610120, Invitrogen; 抗体希釈液で1:10,000に希釈)を、抗マサバパルブアルブミン抗体を添加した場合には、二次抗体としてHRP-抗ウサギIgG抗体(656120, Invitrogen; 抗体希釈液で1:10,000に希釈)をそれぞれ50 μ L加えてインキュベート(37°C, 1時間)後、洗浄した。最後に、発色基質溶液(0.1% *o*-フェニレンジアミン, 0.03% 過酸化水素含有0.05 M クエン酸緩衝液, pH 5.0)50 μ Lを加えて暗所に5分間静置後、1 M 硫酸50 μ Lを加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(モデル680, Bio-Rad)を用いて490 nmにおける吸光度を測定した。パルブアルブミンを定量する際の標準試料として、ムロアジの生魚とくさや、および3魚種から製造した諸味と魚醤油の場合には、前項1(1)で調製したそれぞれの魚種に対応するパルブアルブミン異性体混合物を、麴菌によるパル

ブアルブミン分解試験の場合には、マサバから精製したパルブアルブミンをそれぞれ使用した。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によるタンパク質の検出

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、前項 1 で調製した各試料を 5% β -メルカプトエタノール添加 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) で希釈し、沸騰水中で 5 分間加熱した試料 20 μ L を、ポリアクリルアミド既製ゲル (e・パジェル E-T15L, ゲル濃度 15%, アトー) の各レーンに添加し、電気泳動を行った。マーカーとして、Precision Plus Protein Standards (161-0363, Bio-Rad) を同時に泳動した。泳動後のゲルを、クマシーブリリアントブルー (CBB) R-350 (GEヘルスケア・ジャパン) を用いて染色し、タンパク質の検出を行った。

結果および考察

1. ゴマサバ, ハマトビウオ, ムロアジ由来パルブアルブミンの定量に適した抗体の選定

3 魚種の複数個体 (ゴマサバは漁獲年の異なる 2 個体 A および B, ハマトビウオは漁獲年の異なる 3 個体 A, B および C, ムロアジは同一漁獲年で漁獲場所が異なる 3 個体 A, B および C) より個体ごとに得た粗タンパク質抽出液について、ゲルろ過クロマトグラフィーを実施後、逆相 HPLC を行った。その結果、得られたピーク数は、ゴマサバ 3, ハマトビウオ 4~5, ムロアジ 9~15 であり、ハマトビウオおよびムロアジのピーク数には個体により差が認められた (Fig. 1)。対照としたマサバについては、1 本のピークが検出された。各ピークに対応する溶出液を分取して、タンパク質濃度 1 μ g/mL に調製し、ELISA に供した結果、3 種の抗体 (抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体, 抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体および抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体) がいずれもすべての物質に結合したことから、各物質はすべてパルブアルブミンと考えられた。

3 魚種それぞれにおいて、パルブアルブミン含有量をより正確に定量するためには、ELISA に使用する抗体が各パルブアルブミン異性体と同様の程度で結合すること、すなわち、各異性体と抗体の結合活性の差が異性体間で小さいことが望まれる。供試した抗体 3 種 (抗コイパルブアルブミン抗体, 抗カエルパルブアルブミン抗体, 抗マサバパルブアルブミン抗体) の中では、抗コイパルブアルブミン抗体の各異性体との結合活性の差が最も小さかった (Fig. 2, ムロアジ個体 C に関するデータについては、Fig. 1 にて個体 B と同様のピーク溶出位置を示し、

抗体の結合活性も個体 B における結果と同様であったために未掲載)。また、ELISA を実施するにあたり、異なる個体に由来して異性体の構成比が異なるパルブアルブミン混合物に対しても、パルブアルブミンの総量が等しい場合には、同程度の抗体結合活性を示すことが望まれる。そこで、各魚種において、個体ごとに調製したパルブアルブミン異性体混合物 (濃度 1 μ g/mL に調製, 含有する異性体とその濃度はそれぞれ異なる) と抗体 3 種との結合活性を ELISA により検討した。その結果、抗コイパルブアルブミン抗体の結合活性の差が最も小さかった (Fig. 2)。以上より、3 魚種のパルブアルブミンの定量には、供試した 3 種の抗体のうち、抗コイパルブアルブミン抗体が最も適していると判断した。

Shiomi et al. (1999) は、ウナギとメバチからそれぞれ 2 種のパルブアルブミン異性体を精製し、これら 4 種のパルブアルブミン異性体に、抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体が同様の程度で結合したと報告している。本研究で使用した抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体 (235, Swant) は、Shiomi et al. (1999) の研究で使用された抗体 (P-3171, Sigma-Aldrich) とは異なることから、両抗体が認識するパルブアルブミンのアミノ酸配列の部位は異なる可能性がある。しかしながら、2 種の抗体それぞれが 4 魚種 (ゴマサバ, ハマトビウオ, ムロアジ, マサバ) あるいは 2 魚種 (ウナギ, メバチ) のパルブアルブミン異性体に対して同程度の結合活性を示したことから、2 種の抗体それぞれが認識するパルブアルブミンのアミノ酸配列および/または立体構造は、ゴマサバ - ハマトビウオ - ムロアジ - マサバ間、あるいはウナギ - メバチ間において保存性の高い部位であったと考えられる。より広範な魚種に関してパルブアルブミンの定量方法を確立するためには、種々の魚種由来パルブアルブミン異性体に対して、本研究で用いた抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体を含む種々の抗パルブアルブミン抗体の結合活性に関する検討の実施が望まれる。

2. ムロアジの生魚とくさやに含まれるパルブアルブミン量

異なる 3 か所で漁獲されたムロアジ (新島, 八丈島, および枕崎産; いずれも 2009 年漁獲) の生魚およびそれらを原料として製造されたくさやの背肉部分に含まれるパルブアルブミンについて、前項 1 において選定した抗コイパルブアルブミン抗体を用いた ELISA により定量するとともに、SDS-PAGE により含まれるタンパク質の変化を検討した。その結果、3 種の生魚 (a-c) と比較して、対応するくさや (a-c) に含まれるパルブアルブミン

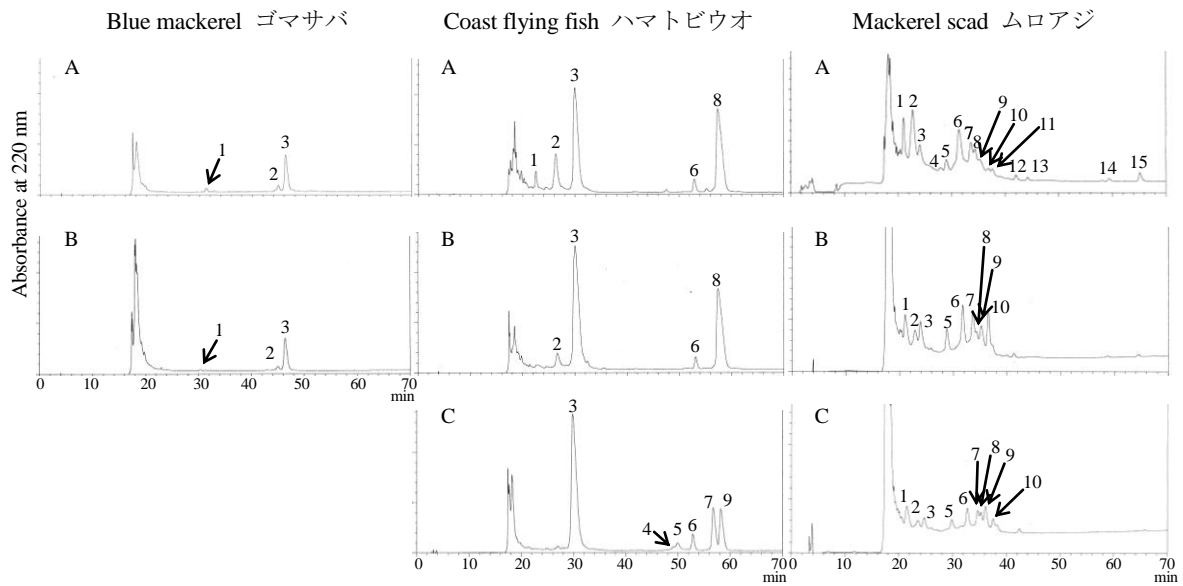


Fig. 1. Parvalbumin isoforms were separated from the heat-stable 12-kDa fractions obtained from multiple individuals (A-C) of blue mackerel, coast flying fish and mackerel scad, using reverse-phase HPLC.

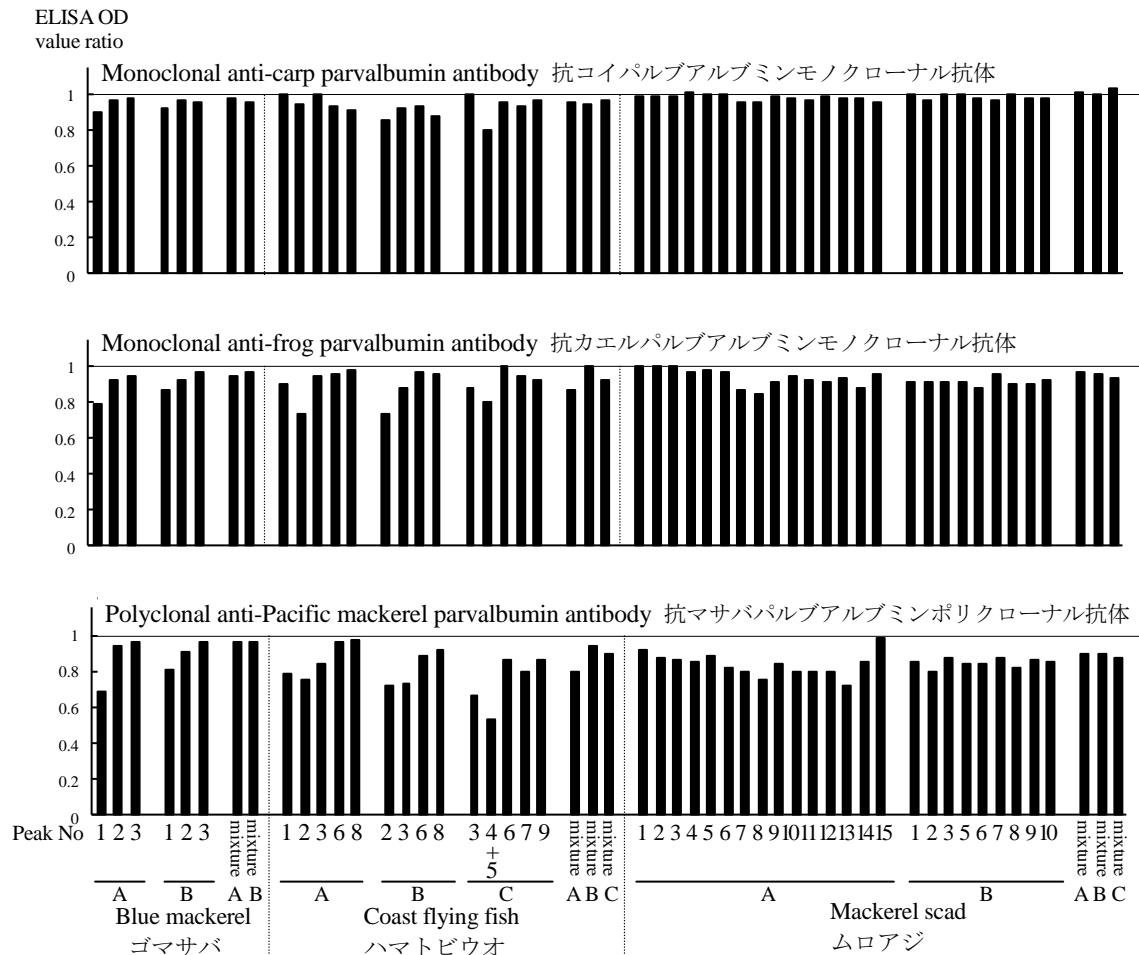


Fig. 2. Binding activities of three different antibodies against the parvalbumin isoforms (see Fig. 1) and their mixtures obtained from multiple individuals (A-C) of blue mackerel, coast flying fish and mackerel scad.

ELISA was performed with a monoclonal antibody against carp muscle parvalbumin (235, Swant), a monoclonal antibody against frog muscle parvalbumin (P-3088, Sigma-Aldrich) and a polyclonal antibody against Pacific mackerel muscle parvalbumin (a gift from the Tokyo University of Marine Science and Technology).

The ELISA OD ratio represents the ratio of the optical density (OD) value obtained from 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of a given parvalbumin isoform versus that obtained from 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pacific mackerel parvalbumin.

The data for mackerel scad individual C were similar to those of individual B, and are not shown.

Table 1. Concentrations of parvalbumin in raw dorsal flesh of mackerel scad caught at three different places (a-c), and processed *kusaya* obtained from these fish

			Parvalbumin concentration (mg/g)	
			Wet	Dry (calculated)
Mackerel scad (ムロアジ)	Raw fish	a	2.00 ± 0.09	6.84 ± 0.32
	<i>Kusaya</i>	a	2.41 ± 0.15	6.93 ± 0.42
	Raw fish	b	2.47 ± 0.87	8.63 ± 3.04
	<i>Kusaya</i>	b	2.71 ± 0.16	9.21 ± 0.55
	Raw fish	c	1.92 ± 0.23	6.51 ± 0.77
	<i>Kusaya</i>	c	2.40 ± 0.28	6.99 ± 0.81

Data are presented as the mean ± SD (n=3).

We tested raw fish obtained from the Japanese fishing ports of Niijima (a), Hachijojima (b) and Makurazaki (c), plus processed *kusaya* derived from these fish.

ELISA was performed using a monoclonal antibody against carp muscle parvalbumin (235, Swant).

量は、いずれも高い値を示し、くさやにも、パルブアルブミンは分解せずに残存していた (Table 1)。くさやは生魚に比べて乾燥していることから、乾物換算して比較したところ、生魚をくさやに加工してもパルブアルブミン量に明らかな減少は認められなかった (Table 1)。また、SDS-PAGE の結果、生魚、くさやのいずれにおいても、パルブアルブミンの質量 (12 kDa) 付近にバンドが観察され、他のタンパク質についても、くさやで顕著な分解は認められなかった (Fig. 3)。以上より、一般に、ムロアジをくさやに加工してもパルブアルブミンは分解されないと予想される。

板垣ら (2009) は、抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体を用いた ELISA により、数種の水産発酵食品中のパルブアルブミン量を測定した結果、熟成期間の短いムロアジのくさや、および糠ニシンでは、タンパク質がほとんど分解されず、パルブアルブミン量もほとんど変化しなかったが、熟成期間の長いふなずし、きそ、へしこ、アンチョビでは、タンパク質が分解され、パルブアルブミンも顕著に低減していたと報告している。くさやの製造に用いられるくさや液には *Pseudomonas* 属, *Marinobacter* 属, *Bacteroides* 属, *Flavobacterium* 属などプロテアーゼ活性を有する様々な微生物が存在しているとされるが (Takahashi et al., 2002), くさやを製造する際の魚の漬け込み期間は一晚と短く、食塩を含むくさや液に存在する微生物とその酵素の作用では、パルブアルブミンは分解されないと推察される。

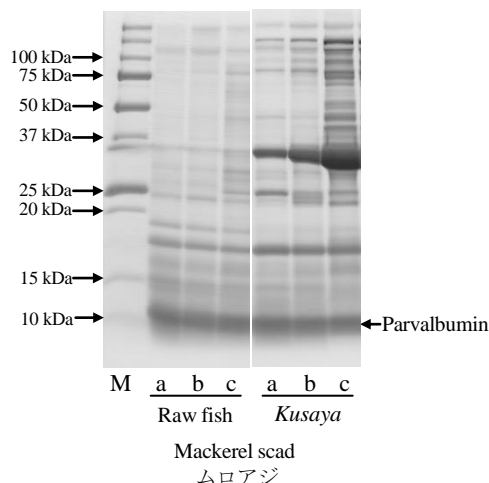


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of heated extracts obtained from raw dorsal flesh of mackerel scad caught at three different places (a-c), and the corresponding processed *kusaya*.

We studied raw fish obtained from the Japanese fishing ports of Niijima (a), Hachijojima (b) and Makurazaki (c), and processed *kusaya* derived from these fish.

Lane M: marker proteins.

3. ムロアジ, ハマトビウオ, ゴマサバを原料魚とする 諸味および魚醤油に含まれるパルブアルブミン量

ムロアジ, ハマトビウオ, ゴマサバそれぞれと *A. oryzae* 含有麦麴および醤油用酵母 *Z. rouxii* を原料として作製した諸味 (初期食塩濃度 10%, 仕込み当日, および仕込み後 1 ヶ月, 2 ヶ月にサンプリング) および魚醤油 (常温で 6 ヶ月間醸造後, 压榨および火入れを行い, 4°C, 1 年間保存) に含まれるパルブアルブミンを ELISA により定量するとともに, SDS-PAGE により含まれるタンパク質の変化を検討した。

ムロアジ、ハマトビウオ、ゴマサバそれぞれの仕込み当日の諸味のパルブアルブミン量は、ELISA の結果、ムロアジ 848 $\mu\text{g/g wet}$ 、ハマトビウオ 1,144 $\mu\text{g/g wet}$ 、ゴマサバ 92 $\mu\text{g/g wet}$ と魚種により濃度に 10 倍以上の差が認められた。3 魚種いずれも、パルブアルブミン量は仕込み当日に最も高く、その後減少し、魚醤油では 3 魚種いずれも 1 $\mu\text{g/g}$ 未満であった (Fig. 4)。SDS-PAGE の泳動像では、3 魚種において、仕込み後 1 ヶ月、2 ヶ月と経過するに従い、パルブアルブミンの質量 12 kDa 付近のバンドは薄くなり、パルブアルブミンの分解が進行した様子が観察された (Fig. 5)。

本研究における魚醤油の製造時には、麦麴と醤油用酵母を併用した。一般に、魚醤油の製造工程においては、麴やタンパク質分解酵素を人為的に添加せず、その場合には魚の自己消化酵素がタンパク質の分解に大きく関与するとされ (藤井, 1992)、麴を使用せずに製造された魚醤油であるしょつつるにおいても、パルブアルブミンが分解・低減したと報告されている (板垣, 2011)。一方、麴・酵母・乳酸菌を作用させる大豆醤油においては、麴を用いても、醸造中に大豆アレルゲンは完全に分解されず、圧搾、火入れ、オリ下げ、ろ過によって除去されることにより消失すると報告されている (橋本ら, 2005)。本研究におけるハマトビウオを用いた諸味については、パルブアルブミン含有量が元来高いためか、仕込み 2 ヶ月後の諸味中には、依然としてパルブアルブミンが 41 $\mu\text{g/g wet}$ 残存した (Fig. 4)。圧搾を行った仕込み 6 ヶ月後までに、諸味中のパルブアルブミン量はより減少したと考えられるものの、仕込み 6 ヶ月後の諸味中には依然としてパルブアルブミンが残存し、圧搾、火入れ工程で除去された可能性も完全には否定できない。また、他のアレルゲンが残存している可能性も存在するとともに、ELISA では、検出・定量に用いる抗体によっても測定値が異なる可能性があり、さらには、魚類アレルギー患者の血清に含まれる抗体も、魚種ごとにわずかに異なるパルブアルブミンに対して異なる反応性を示し、その反応様式も患者ごとに異なることが知られている (Shiomi et al., 1998)。したがって、魚類アレルギー患者が魚醤油や諸味を摂取する際には、細心の注意を払う必要があると思われる。

4. 麴菌を含む糸状菌と乳酸菌のマサバパルブアルブミン分解活性の検討

本研究の前項 3 で供試した魚醤油は、麦麴と醤油用酵母を用いて製造したために、魚の自己消化酵素だけでなく、麴菌および酵母もパルブアルブミンの分解に関与した可能性がある。そこで、本研究では、食塩存在下にお

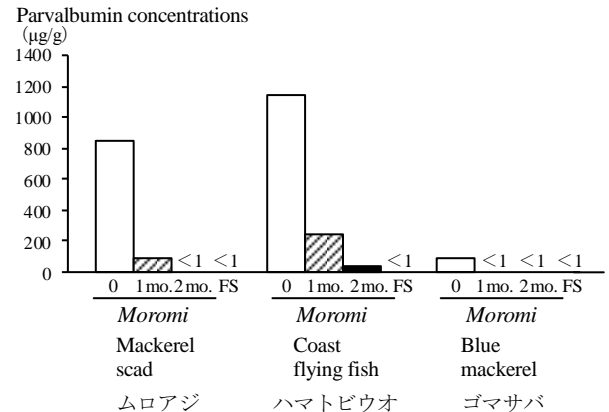


Fig. 4. Concentrations of parvalbumin in fish sauce mash (*moromi*) and fish sauce (FS) made from mackerel scad, coast flying fish and blue mackerel.

ELISA was performed with a monoclonal antibody against carp muscle parvalbumin (235, Swant).

Moromi containing each of the three fish (53%) and 10% table salt was fermented at room temperature for 6 months with wheat-*koji*, using *Aspergillus oryzae* and a starter culture containing *Zygosaccharomyces rouxii*. After fermentation, each *moromi* was pressed, filtered and pasteurized to prepare the mature FS, which was then stored at 4°C for a year before analysis.

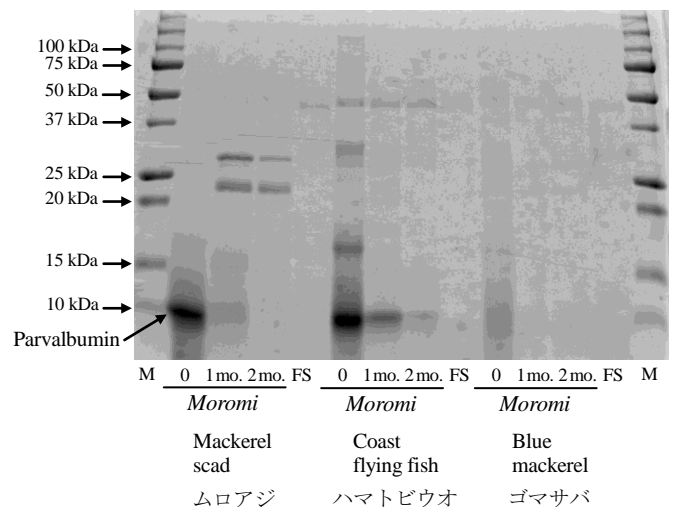


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of heated extracts from *moromi* and FS made from mackerel scad, coast flying fish and blue mackerel.

Mash *moromi* and FS were prepared as described in the legend to Figure 4.

Lane M: marker proteins.

ける麴に含まれる麴菌のパルブアルブミン分解作用について調べるために、NaCl濃度を変化させた 50 $\mu\text{g/mL}$ マサバパルブアルブミン含有 YM 液体培地 (初発 NaCl 濃度: 0, 5, 10%) に対し、使用した乾燥麦麴より分離した麴菌 *A. oryzae* を 1 白金耳量接種後、好氣的に 25°C で静置し、2~14 日後に採取した各液体培地試料について、ELISA によるパルブアルブミンの定量および SDS-PAGE

を行った。

液体培地の NaCl 濃度の違いにより、パルブアルブミン量の減少速度に差が認められ、麹菌接種 4 日後のパルブアルブミン量は、0% NaCl 液体培地では 4 $\mu\text{g/g}$ 、5% NaCl 添加液体培地では 13 $\mu\text{g/g}$ 、10% NaCl 添加液体培地では 24 $\mu\text{g/g}$ であったが、14 日後では、いずれの NaCl 濃度においてもパルブアルブミン量は 1 $\mu\text{g/g}$ 未満となった (Fig. 6)。SDS-PAGE の泳動像では、日数が経過するに従いパルブアルブミンの質量 12 kDa 付近のバンドは薄くなり、いずれの NaCl 濃度においても、14 日後ではパルブアルブミンの質量 12 kDa 付近にバンドは観察されなかった (Fig. 7)。

次に、食品や酵素の生産等に利用されている糸状菌および魚加工品を分離源とする乳酸菌のマサバパルブアルブミン分解活性を NaCl 非含有の YM および MRS 液体培地を用いて同様に検討した。SDS-PAGE 解析により、糸状菌 *A. oryzae* NBRC 5710, *A. brasiliensis* NBRC 9455, *P. pinophilum* NBRC 6345, *P. chrysogenum* NBRC 4626, *P. bifforme* NBRC 7722 および *R. microspores* NBRC 8631 がパルブアルブミン分解能を有すること (Fig. 8)、加えて、乳酸菌 *P. pentosaceus* JCM 2023 および *L. plantarum* JCM 8343 のパルブアルブミン分解活性は低く、培養 14 日後にもパルブアルブミンが残存することを確認した (Fig. 9)。

以上の結果から、糸状菌にはマサバパルブアルブミン分解能を有する菌種が存在することが明らかであるとともに、本研究で供試した魚醤油における原料魚のパルブアルブミンの分解には、魚の自己消化酵素のみではなく、乾燥麦麹に使用されていた麹菌 *A. oryzae* のプロテアーゼも作用していたと推察される。

逢阪ら (2006) は、*A. oryzae* 由来のプロテアーゼ (ス

ミチーム LP50D および FP, 新日本化学工業株式会社) を用いてタンパク質を分解させて作製した魚肉ペーストについて、患者血清を用いた ELISA により解析した結果、もとの魚肉に比べてパルブアルブミンのアレルゲン性が低下したと報告している。その他のアレルゲンの分解については、小麦のグリアジンに関して、パン製造時に *Lactobacillus sanfranciscensis* を添加してサワードウを作製する際に、*A. oryzae* および *A. niger* 由来のプロテアーゼを添加するとグルテン濃度が低下し、グリアジンが分解されること (Rizzello et al., 2007)、また、*A. oryzae* 由来のプロテアーゼにより、小麦のグリアジンおよびグルテニンのエピトープペプチド (Oita, 2012)、および α -アミラーゼインヒター CM16 (老田, 2009) が分解されると報告されている。

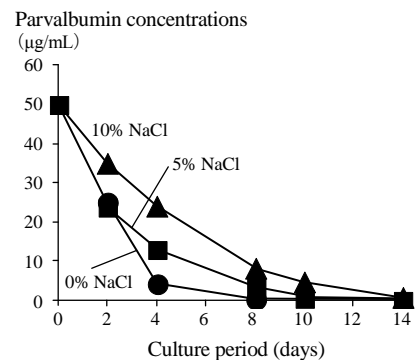


Fig. 6. Degradation of Pacific mackerel parvalbumin by *Aspergillus oryzae* isolated from wheat-koji.

ELISA was performed with a monoclonal antibody against carp muscle parvalbumin (235, Swant).

Aspergillus oryzae was inoculated into Yeast Mold (YM) broth containing 50 $\mu\text{g/mL}$ Pacific mackerel parvalbumin and 0% (●), 5% (■) or 10% (▲) NaCl on day 0, and thereafter incubated at 25°C.

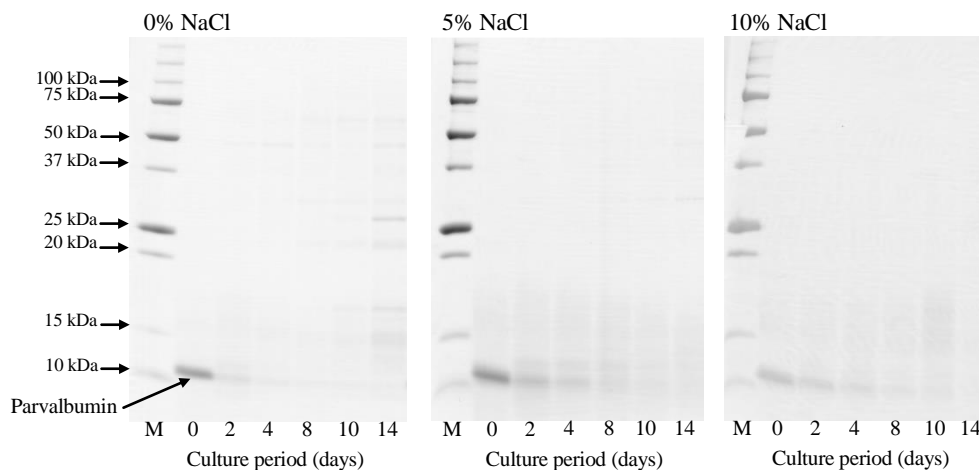


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of YM broth containing 50 $\mu\text{g/mL}$ Pacific mackerel parvalbumin and 0-10% NaCl following fermentation at 25°C with *Aspergillus oryzae* isolated from wheat-koji.

Lane M: marker proteins.

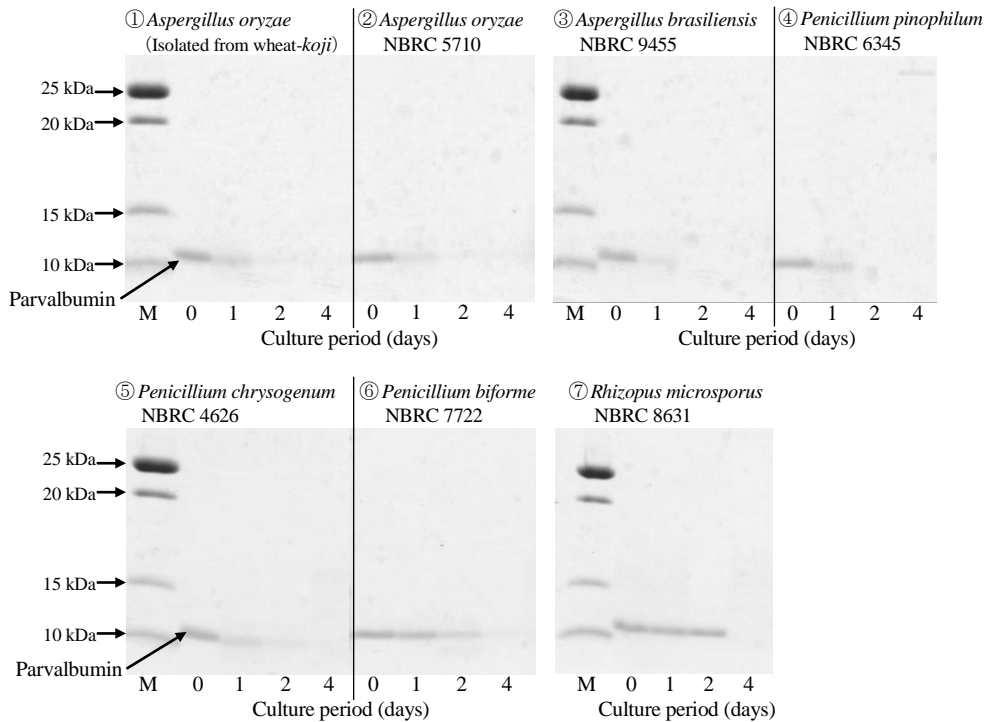


Fig. 8. SDS-PAGE analysis of NaCl-free YM broth containing 50 µg/mL Pacific mackerel parvalbumin following fermentation at 25°C with seven different mold strains. Lane M: marker proteins.

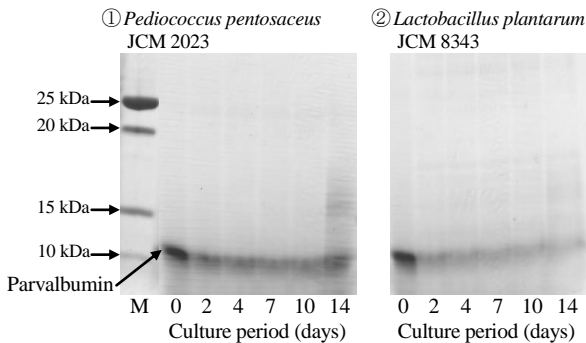


Fig. 9. SDS-PAGE analysis of NaCl-free MRS broth containing 50 µg/mL Pacific mackerel parvalbumin following fermentation at 30°C with *Pediococcus pentosaceus* or *Lactobacillus plantarum*. Lane M: marker proteins.

液体培地の NaCl 濃度の違いにより、パルブアルブミン量の減少速度に差が認められた理由として、NaCl 濃度が 5%、10% と高くなるに従って麹菌 *A. oryzae* の生育が遅くなり、麹菌が産生する酵素の作用が減少して、パルブアルブミンの分解に時間を要したと考えられる。楠本ら (2007) は、NaCl 含有グルコース・酵母エキス寒天培地 (NaCl 濃度: 0, 3, 6, 9%) に 7 株の *A. oryzae* をそれぞれ接種し、30°C、5 日間培養したところ、0% NaCl に比べ、6% および 9% NaCl ではコロニー径が小さくなると報告している。また、NaCl 濃度 10% および 18% 存在下で高い活性を維持する特定の耐塩性 *A. oryzae* 株由来のプロ

テアーゼ生産に関する検討も報告されている (Su and Lee, 2001; Fukushima et al., 1989)。

以上より、食塩を含む魚加工品において糸状菌の作用によりパルブアルブミンを分解させるためには、使用する糸状菌の菌株の選抜、および当該菌株の十分な生育と発酵時間の確保が重要と考えられる。

本研究では、新たにゴマサバ、ハマトビウオおよびムロアジに含まれるアレルギー原因物質パルブアルブミンについて検討し、複数存在した異性体の ELISA による定量に適する抗体の選抜を行った結果、供試した抗体 3 種 (市販抗コイパルブアルブミン抗体、市販抗カエルパルブアルブミン抗体、抗マサバパルブアルブミン抗体) のうち、抗コイパルブアルブミン抗体が最も適すると判断した。また、ムロアジをくさやに加工してもパルブアルブミンは残存するが、麹菌と酵母を用いた魚醤油の製造過程においてはパルブアルブミンが減少すること、加えて、麹菌 *A. oryzae* を含む 7 種の *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属および *Rhizopus* 属糸状菌がパルブアルブミン分解作用を有することを SDS-PAGE により明らかにした。今後、さらに多くの魚種のパルブアルブミンに関する定量方法の検討と、パルブアルブミン低減化食品の開発による魚肉アレルギーへの対応の進展が望まれる。

引用文献

- Aas, K. and S. Elsayed (1975) Physico-chemical properties and specific activity of a purified allergen (codfish). *Dev. Biol. Stand.*, 29: 90-98.
- Arif, S.H. and A-u Hasnain (2010) A major cross-reactive fish allergen with exceptional stability: parvalbumin. *Afr. J. Food Sci.*, 4: 109-114.
- de Jongh, H.H.J., C.L. Robles, E. Timmerman, J.A. Nordlee, P.-W. Lee, J.L. Baumert, R.G. Hamilton, S.L. Taylor and S.J. Koppelman (2013) Digestibility and IgE-binding of glycosylated codfish parvalbumin. *Biomed Res. Int.*, 756789.
- Elsayed, S. and K. Aas (1971a) Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 40: 428-438.
- Elsayed, S. and K. Aas (1971b) Characterization of a major allergen (cod): Observation on effect of denaturation on the allergenic activity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 47: 283-291.
- Elsayed, S. and H. Bennich (1975) The primary structure of allergen M from cod. *Scand. J. Immunol.*, 4: 203-208.
- 藤井建夫 (1992) 塩辛・くさや・かつお節—水産発酵食品の製法と旨味. 恒星社厚生閣, 東京, pp.61-63.
- Fukushima, Y., H. Itoh, T. Fukase and H. Motai (1989) Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 604-608.
- Gillis, J., D. Thomason, J. Lefevr and R.H. Kretsinger (1982) Parvalbumins and muscle relaxation: a computer simulation study. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 3: 377-398.
- 濱田友貴・源河えりな・大平倫敬・長島裕二・塩見一雄 (2000) 魚肉ねり製品及びスケトウダラすり身のアレルギー性. *食衛誌*, 41: 38-43.
- Hamada, Y., Y. Nagashima and K. Shiomi (2001) Identification of collagen as a new fish allergen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 285-291.
- Hamada, Y., H. Tanaka, S. Ishizaki, M. Ishida, Y. Nagashima and K. Shiomi (2003a) Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 1149-1156.
- Hamada, Y., Y. Nagashima, K. Shiomi, N. Shimojo, Y. Kohno, R. Shibata, S. Nishima, H. Ohsuna and Z. Ikezawa (2003b) Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. *Allergol. Int.*, 52: 139-147.
- Hamada, Y., Y. Nagashima and K. Shiomi (2004) Reactivity of serum immunoglobulin E to bullfrog *Rana catesbeiana* parvalbumins in fish-allergic patients. *Fisheries Sci.*, 70: 1137-1143.
- 橋本裕一郎・古林万木夫・宮澤いづみ・高畑能久・田辺創一・谷内昇一郎 (2005) 特異的抗体を用いた醤油原料(大豆, 小麦)の分解機構の検討. *醤油の研究と技術*, 31: 217-222.
- Ishikawa, M., K. Shimakura, Y. Nagashima and K. Shiomi (1997) Isolation and properties of allergenic proteins in the oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries Sci.*, 63: 610-614.
- 板垣康治・中村丁次・土橋朗・鈴木志保子・杉山久仁子 (2009) アレルゲン性を指標とした食情報のデータベース化と食教育への活用に関する基盤研究. 科学研究費補助金研究成果報告書, pp.2-3.
- 板垣康治 (2011) 食物アレルギーと魚. *日本調理科学会誌*, 44: 306-309.
- Kobayashi, A., H. Tanaka, Y. Hamada, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi (2006) Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy*, 61: 357-363.
- Kretsinger, R.H. and C.E. Nockolds (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.*, 248: 3313-3326.
- Kuehn, A., T. Scheuermann, C. Hilger and F. Hentges (2010) Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 153: 359-366.
- Kuehn, A., I. Swoboda, K. Arumugam, C. Hilger and F. Hentges (2014) Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Front. Immunol.*, 22: 179.
- 楠本憲一・古川育代・鈴木聡・柏木豊 (2007) 麹菌の簡便かつ効率的な孢子形成能の強化. *食総研報*, 71: 39-43.
- Lindstrøm, C.D.-V., T. van Dô, I. Hordvik, C. Endresen and S. Elsayed (1996) Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand. J. Immunol.*, 44: 335-344.
- Moncrief, N.D., M. Goodman and R.H. Kretsinger (1990) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evol.*, 30: 522-562.
- 老田茂 (2009) 微生物プロテアーゼによる小麦アレルゲンタンパク質の分解. *東北農業研究*, 62: 225-226.
- Oita, S. (2012) Degradation of wheat epitope peptides for

- atopic dermatitis and exercise-induced anaphylaxis by microbial proteases. *JARQ*, 46: 89-93.
- 逢阪江理・新谷智吉・黒野美夏・平岡芳信 (2006) 魚類アレルギー原因物質除去技術研究. 愛媛県工業系試験研究機関研究報告, 44: 25-30.
- Rizzello, C.G., M. De Angelis, R. Di Cango, A. Camarca, M. Silano, I. Losito, M. De Vincenzi, M.D. De Bari, F. Palmisano, F. Maurano, C. Gianfrani and M. Gobbetti (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 4499-4507.
- 三枝弘育・伊藤康江・宮崎則幸 (2013) 伊豆諸島で漁獲されるムロアジ, ゴマサバ, トビウオと麴および酵母を用いた魚醤油の開発. 東京農総研研報, 8: 49-59.
- 嶋倉邦嘉・綿谷ゆきな・塩見一雄 (2012) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型 (ヤマメ) と遼河型 (サクラマス) のアレルギーの比較解析. 食衛誌, 53: 8-13.
- Shiomi, K., S. Hayashi, M. Ishikawa, K. Shimakura and Y. Nagashima (1998) Identification of parvalbumin as an allergen in horse mackerel muscle. *Fisheries Sci.*, 64: 300-304.
- Shiomi, K., Y. Hamada, K. Sekiguchi, K. Shimakura and Y. Nagashima (1999) Two classes of allergens, parvalbumins and higher molecular weight substances, in Japanese eel and bigeye tuna. *Fisheries Sci.*, 65: 943-948.
- 「食物アレルギーの診療の手引き 2011」検討委員会 (2011) 食物アレルギーの診療の手引き 2011. p.3.
- Su, N.-W. and M.-H. Lee (2001) Screening and characterization of koji molds producing saline-tolerant protease. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 230-234.
- Swoboda, I., A. Bugajska-Schretter, P. Verdino, W. Keller, W.R. Sperr, P. Valent, R. Valenta and S. Spitzauer (2002) Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: A tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J. Immunol.*, 168: 4576-4584.
- Takahashi, H., B. Kimura, M. Mori and T. Fujii (2002) Analysis of bacterial communities in *kusaya* gravy by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Jpn. J. Food Microbiol.*, 19: 179-185.
- Tomura, S., S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi (2008) Reduction in the IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by mutations at Ca²⁺-binding sites. *Fisheries Sci.*, 74: 411-417.

Quantitation of parvalbumin in *kusaya* and fish sauce made from blue mackerel, coast flying fish, and mackerel scad

Yasue Ito^{1,*}, Kazuo Shiomi², Shizue Saegusa¹, Tomohiro Hosoi¹ and Hiroyasu Saegusa¹

¹Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center
(Tokyo Metropolitan Food Technology Research Center)

²Tokyo University of Marine Science and Technology

Abstract

Blue mackerel (*Scomber australasicus*), coast flying fish (*Cypselurus pinnatibarbatu*s), and mackerel scad (*Decapterus muroadsi*) are caught around the Izu Islands of Tokyo Prefecture, and are used to produce fish products, such as *kusaya* and fish sauces. To make *kusaya*, fish are soaked overnight in salt water containing various microorganisms, and then dried. Here, we sought to establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based method for determining the concentration of parvalbumin, a major fish allergen, in these three fish species. We first isolated parvalbumin isoforms from the three species and compared their bindings to different antibodies against parvalbumin (monoclonal anti-frog parvalbumin antibody, monoclonal anti-carp parvalbumin antibody, and polyclonal anti-Pacific mackerel parvalbumin antibody). The monoclonal anti-carp parvalbumin antibody was found to be superior in its ability to bind the tested parvalbumin isoforms, and was therefore used for the subsequent analyses. We next examined parvalbumin concentrations in raw mackerel scad, its processed *kusaya*, and fish sauces made from all three species of fish, using an ELISA-based method that employed the monoclonal anti-carp parvalbumin antibody and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). No marked difference in parvalbumin concentration was observed between raw mackerel scad and its processed *kusaya*, suggesting that parvalbumin is not degraded during the manufacturing of *kusaya* from raw fish. In fish sauce mash (*moromi*), which was made from each of the three fish species plus wheat-*koji* (containing *Aspergillus oryzae*) and yeast (*Zygosaccharomyces rouxii*), the parvalbumin concentrations gradually decreased during fermentation until those in the final fish sauce products fell below the detection limit of 1 µg/g. SDS-PAGE analysis also supported the gradual decrease of parvalbumin in fish sauce mash during fermentation. *Aspergillus oryzae* isolated from wheat-*koji*, along with other tested mold strains (*A. oryzae*, *A. brasiliensis*, *Penicillium pinophilum*, *P. chrysogenum*, *P. biforme* and *Rhizopus microsporus*), were found to degrade parvalbumin in YM broth, whereas two fish-product-derived strains of lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum*) showed little such activity. These results suggest that it is preferable to use a species-optimized antibody for the quantitation of parvalbumin in fish, and that fermentation using specific microbes may enable producers to manufacture hypoallergenic fish products containing little parvalbumin.

Keywords: parvalbumin, *kusaya*, fish sauce, *Aspergillus oryzae*, ELISA

Received 5 November 2014, Accepted 14 January 2015

Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center, 10: 1-13, 2015

*Corresponding author: yasue-ito@food-tokyo.jp