

## 水晒しがエソ肉冷凍すり身の品質に及ぼす影響について

福島英登<sup>†</sup>・黒川清也・石上 翔<sup>1</sup>・桑田智世<sup>1</sup>・山内春菜<sup>1</sup>・福田 裕<sup>1</sup>

### Influence of leaching process on the properties of lizardfish surimi

Hideto FUKUSHIMA<sup>†</sup>, Shinya KUROKAWA, Shou ISHIGAMI<sup>1</sup>, Tomoyo KUWATA<sup>1</sup>,  
Haruna YAMAUCHI<sup>1</sup>, and Yutaka FUKUDA<sup>1</sup>

Lizardfish meat is popular as the material of surimi based products, due to its high gel forming ability, white color, and good flavor. However, lizardfish meat yields formaldehyde (FA), which strongly attaches and denatures the surimi protein, even in the frozen temperature at -20°C. Thus, it is difficult to store the lizardfish surimi for a long time. Trimethylamine oxide (TMAO) is the precursor substance of FA, and soluble in water. If TMAO was removed by washing before change to FA, the surimi probably can be kept for a long time. In this study, the effect of leaching on the quality of lizardfish surimi was investigated. In the case of the fresh meat whose K value was 14 %, almost all TMAO was removed by twice leaching and its gel strength kept high for 40 days. On the other hand, the slightly low fresh meat whose K value was 29 %, remained FA after twice leaching and its gel strength decreased during frozen storage. These results suggested that the lizardfish frozen surimi having high gel forming ability would be prepared from fresh lizardfish meat by processing of fully leaching.

**Key words :** Lizard fish, Frozen surimi, Leaching, Thermal gel formation.

#### 緒 言

水産練り製品は我が国の水産加工品のうち最大の生産量を誇る<sup>1)</sup>。地で採れた魚種を用いるため地方色豊かな食品であり、西日本ではエソを原料にしたものの評価が高い。新鮮なエソ肉は優れた加熱ゲル形成能を有するだけでなく、白色の肉色や味に優れる。エソ肉を練り製品に用いる場合、高鮮度のものを極めて簡単な水晒しにより「生すり身」とする。これを凍らない4°C程度で冷蔵貯蔵し、逐次利用する。こうした「生すり身」の利用期間は製造後の数日に限られることから、長期間の貯蔵が可能な冷凍すり身の製造が求められている。

前報<sup>2)</sup>では、エソ肉の冷凍すり身化に関わる研究として、凍結貯蔵温度とホルムアルデヒド (FA) 生成の関係につい

て報告した。FAは魚体中に含まれるトリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) より生成される<sup>3)</sup>。筋肉タンパク質を変性させることから、エソ肉の加熱ゲル形成能を低下させる主要因であると考えられている<sup>4,8)</sup>。FAは-20°C以上の凍結貯蔵温度では徐々に生成するが、-25°C以下の貯蔵温度では生成を停止することを明らかにした。FAは容易にタンパク質と結合するため、一旦生成すると除去は困難である。一方、FAの前駆物質であるTMAOは水溶性であることから、すり身製造時に行われる水晒し工程で取り除くことが可能である<sup>9)</sup>。現在、産業的に行われている水晒し方法は、エソ類魚肉がもつ独特の美味しさを残すために、スケトウダラなどの通常のすり身の水晒し工程に比べ水量も回数も少ないことから、この工程に着目した。TMAOの段階で水晒しにより除去できればFAの生成を防

<sup>1</sup>水産大学校食品科学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)

<sup>†</sup>別刷り請求先 (Corresponding author): hfukushi@fish-u.ac.jp

止でき、長期に渡り冷凍すり身の貯蔵が可能だと考えられる。そこで本研究では、エソ冷凍すり身の品質に及ぼす水晒しの効果について鮮度の異なるエソを用いて検討した。

## 材料と方法

### 試料

下関近海で底引き網漁にて漁獲後、直ちに氷蔵され市場に水揚げされたワニエソ (*Saurida wanieso*) を原料とした。市場で購入後、冷蔵で研究室まで運送した。約半分の魚体は直ちにすり身とし、残りは3日間氷上保存し、鮮度を落とした状態としてすり身を調製した。

### ATP 関連化合物の抽出

ワニエソ肉約5gを精秤し10%過塩素酸水溶液15mlを加えポリトロンホモジナイザー(Kinematica社製PT2100型)でホモジナイズ後、ろ紙(Toyo Roshi Kaisha 製 No.2 110 mm)でろ過した。その残渣に5%過塩素酸水溶液10mlを加えよく混ぜ、約30秒間静置後再びろ過した。この操作を2回繰り返した。ろ液は10N KOH 溶液と1N KOH 溶液を用いてpHを6.3-6.4に調整した後、蒸留水を用いて50mlに定量し抽出液とした。

### ATP 関連化合物の測定

上記の抽出液をシリンジフィルター(sartorius社製孔径0.45  $\mu\text{m}$ )でろ過後、カラム(GL Sciences社製 Inertsil ODS-4、カラムサイズ:5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  150 mm)を使用してHPLC(HITACHI社製 L-7100型ポンプ、L-7610型デガッサ、L-7200型オートサンブラ、L-7300型カラムオープン、L-7400型UV検出器、D-7500型クロマトデータ処理装置)を用い、流速1.0 ml/min、カラム温度35 $^{\circ}\text{C}$ 、注入量10  $\mu\text{l}$ 、検出波長260 nmの条件で分析した。また、移動相には0.2 mol トリエチルアミン含有0.07 mol リン酸緩衝液(1%アセトニトリル含有)を使用した。

K値はATP関連化合物、すなわちATP、ADP、AMP、IMP、HxR(イノシン)、Hx(ハイポキサンチン)の合計量に対するHxRとHxの合計量の割合から算出した。

### すり身の調製

ワニエソ魚体より、頭および内臓を除去し、冷却水で腹腔内の血や汚れを洗い流した。洗浄後、ローラー式採肉機(備文機械製作所製 94NF-2DX-74)で採肉し、ミートチョッパー(NIPPON CAREER社製GM-DX)にて小骨、鱗、筋などを除去した。一部は落とし身として貯蔵し、残りの落とし身に約10倍量の冷却水を加え、3分間攪拌する水晒しを行い、その後麻製濾し袋で軽く脱水を行った。この

水晒し工程は2回行った。水晒し後、遠心脱水機で肉が毛羽立つ程度(水分約80%)まで脱水を行った。落とし身および脱水肉に肉重量の4%スクロース、4%ソルビトールおよび0.3%重合リン酸塩を加えサイレントカッター(備文機械製作所製 AP40AW)でよく混合し、すり身を調製した。すり身はチャック付ポリビニレンパックに入れ薄く延ばした後、-20および-50 $^{\circ}\text{C}$ で凍結貯蔵した。

### 揮発性塩基成分分析用試料液の調製

揮発性塩基成分であるTMAOおよびFAの定量は前報に従って行った<sup>2)</sup>。なお、揮発性塩基物質の測定はそれぞれn=3で行い、その平均値を表記した。

### SDS-PAGE

すり身0.2gを精秤し8M尿素、2%SDS、2%メルカプトエタノールを含む20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0) 3.75 mlを加え、2分間煮沸した。煮沸後、20時間以上25~30 $^{\circ}\text{C}$ で振とうさせながら溶解した。溶解後、溶解液を200  $\mu\text{l}$ 取り、5%SDS、5%メルカプトエタノール、50%グリセロールを含む50 mM Tris-HCl 緩衝液を50  $\mu\text{l}$ 加え1分間煮沸してSDS-PAGE標品とした。

SDS-PAGEは常法に従い<sup>10)</sup>、0.1% SDSを含む10%ポリアクリルアミドミニスラップゲルを用いた。電気泳動後、ゲルを30%メタノール、10%酢酸を含む0.1% Coomassie Brilliant Blue(CBB)G-250で染色し、その後、30%メタノール、10%酢酸を含む溶液で脱色した。分子量マーカーはミオシン重鎖(227kDa)、 $\beta$ -galactosidase(116kDa)、phosphorylase b(97.2kDa)、BSA(66.4kDa)、glutamate dehydrogenase(55.6kDa)、ovalbumin(45kDa)、glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase(35.7kDa)、prestained carbonic anhydrase II(35kDa)、carbonic anhydrase(29kDa)、soy bean trypsin inhibitor(20.1kDa)、lysozyme(14.3kDa)、aprotinin(6.5kDa)を含むXL-Ladder Broad(アプロサイエンス社製)を用いた。

### 加熱ゲルの調製

-20および-50 $^{\circ}\text{C}$ で凍結貯蔵していた冷凍すり身を冷蔵庫で一晩かけて解凍後、包丁で細かく裁断し真空高速攪拌機(Stephan社製 UMC 5 electronic)を用いて1,800 rpmで2分間荒摺りを行った。荒摺り後、すり身の水分が80%になるように加水し、1,500 rpmで1分間、さらに1,800 rpmで1分間攪拌し水延ばしを行った。水延ばし肉に対して2.5%のNaClを加え、1,800 rpmで2分間、3,000 rpmで4分間攪拌し塩摺りを行った。塩摺り肉を幅35 mmのケーシングチューブ(クレハ社製)に充填し、30 $^{\circ}\text{C}$ で60分間の坐り加熱後に85 $^{\circ}\text{C}$ で30分間本加熱を行い、加熱ゲルを

調製した。

破断強度測定

高さ 25 mm に切り分けた加熱ゲルにつき、直径 5 mm の球形プランジャーを取り付けたレオメーター (YAMADEN 社製 RHEONER II CREEP METER RE2-33005S) で押し込み試験 (進入速度 1 mm/s) を行い、破断強度 (N) および破断凹み率 (%) を測定した。

結 果

水晒しによる FA 関連化合物の変化

本研究では、鮮度の異なるワニエソ肉を用いて水晒しの効果を検討した。エソ肉は漁獲後 2 日後のものとその後 3 日間冷蔵保存したものをを用いた。それぞれすり身調製時の K 値は 14% (漁獲 2 日後) と K 値 29% (漁獲約 5 日後) であった。

鮮度の異なるエソ肉を水晒した際の FA 関連化合物の

**Table 1** The amount of TMAO, TMA and FA from the lizardfish minced meat before and after twice leaching

|             |                | TMAO<br>( $\mu\text{mol/g}$ ) | TMA<br>( $\mu\text{mol/g}$ ) | FA<br>( $\mu\text{mol/g}$ ) |
|-------------|----------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| K value 14% | No leaching    | 26                            | 0.54                         | 1.3                         |
|             | Twice leaching | 0.8                           | 0.15                         | 0.12                        |
| K value 29% | No leaching    | 20                            | 1.5                          | 4.4                         |
|             | Twice leaching | 0.8                           | 0.2                          | 0.5                         |

肉の FA 関連化合物は、TMAO 量 26  $\mu\text{mol/g}$ 、トリエチルアミン (TMA) 量 0.54  $\mu\text{mol/g}$ 、FA 量 1.3  $\mu\text{mol/g}$  であり、K 値 29% では TMAO 量 20  $\mu\text{mol/g}$ 、TMA 量 1.2  $\mu\text{mol/g}$ 、FA 量 4.4  $\mu\text{mol/g}$ 、であった。3 日間の氷上保存中に TMAO は減少し、TMA および FA が生成することが確認された。FA 量は、K 値 14% と比較的鮮度の良いエソ肉に比べ、K 値 29% の鮮度が低下した肉では約 4 倍量生成していた。

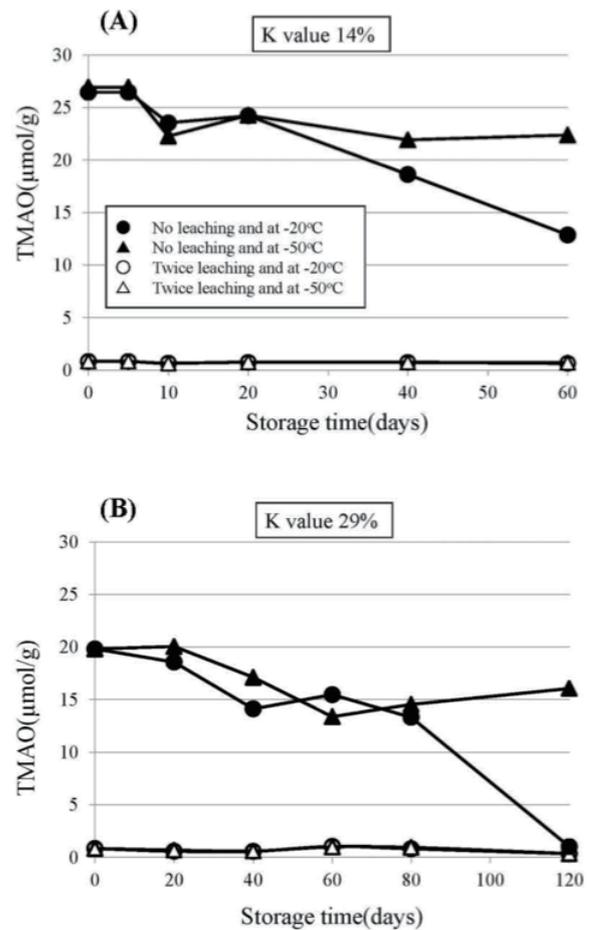
次に、2 回の水晒しによって FA 関連化合物がどのように変化したのかを調べた。TMAO 量は、K 値 14% のエソ肉では 26  $\mu\text{mol/g}$  から 0.8  $\mu\text{mol/g}$  と 3% まで減少し、K 値 29% のワニエソでは 20 から 0.8  $\mu\text{mol/g}$  と 4% までそれぞれ減少した。水晒しにより 96~97% の TMAO は除去されたことから、水晒しによる TMAO の除去効果は明確であった。

FA は TMAO からジメチルアミン (DMA) 量とともに等モル量生成することから<sup>1)</sup>、FA 量は生成した DMA 量から求めた。Table 1 に表記した FA 量はあくまでも DMA 量から推定される数値である。水溶性である DMA は水晒し

で除去された可能性が高いため、無晒し肉で測定された FA が水晒し後にどの程度残存していたかの詳細は不明である。

凍結貯蔵中の TMAO の経時変化

ワニエソの無晒し肉および水晒し肉に糖類を添加し -20°C および -50°C で貯蔵したときの TMAO の経時変化を Fig.1 に示す。それぞれのすり身を以降、無晒しすり身および水晒しすり身と呼ぶ。



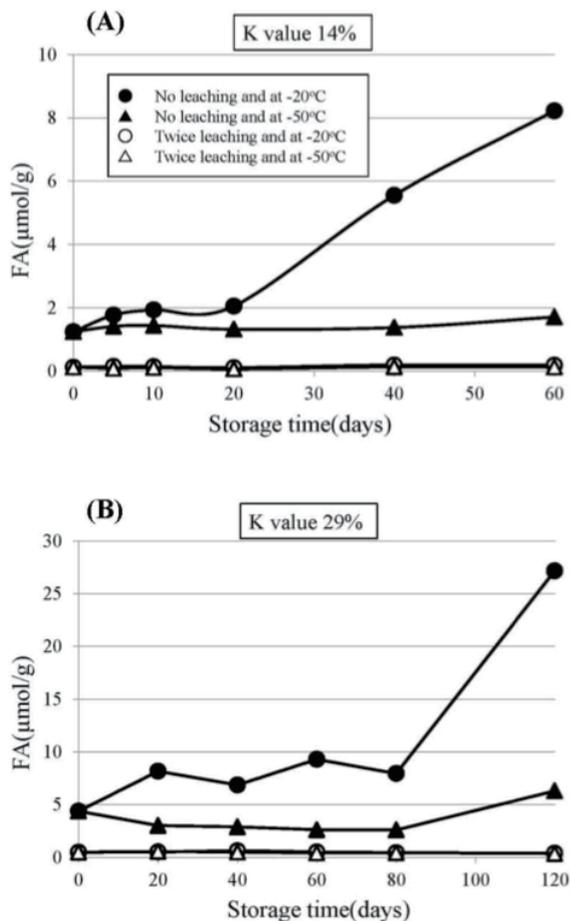
**Fig. 1** Changes in the amount of TMAO for 60 and 120 days in lizardfish surimi showing 14% (A) and 29% (B) of K value, respectively. Symbols show each surimi as follows. Full circle: surimi without leaching in the storage at -20°C, full triangle: surimi without leaching in the storage at -50°C, open circle: surimi with twice leaching was stored at -20°C, open triangle: surimi with twice leaching in the storage at -50°C.

K 値 14% の無晒しすり身は、-20°C 貯蔵の 60 日後に TMAO は 12  $\mu\text{mol/g}$  に減少したが、-50°C 貯蔵では減少は殆ど認められなかった (Fig.1A)。K 値 29% の無晒しすり身も -20°C 貯蔵ではほぼ同様に減少し貯蔵 120 日後にはほぼ消失したが、-50°C 貯蔵では貯蔵 120 日後に 16  $\mu\text{mol/g}$  と僅に減少した (Fig.1B)。

水晒しすり身では、水晒しにより TMAO が除去されていたため、鮮度や凍結貯蔵温度に関わらず貯蔵期間を通じて検出されなかった。

#### 凍結貯蔵中の FA の経時変化

凍結貯蔵中の FA の経時変化を Fig.2 に示す。凍結貯蔵中に無晒しすり身では FA の増加が認められた。特に、鮮度が低下した K 値 29% のエソ肉から製造したものは、凍結前の含有量も高く、 $-20^{\circ}\text{C}$  貯蔵では貯蔵初期段階から生成が始まり、貯蔵 60 日後には  $9\ \mu\text{mol/g}$ 、貯蔵 120 日後には  $27\ \mu\text{mol/g}$  と明確に増加した。 $-50^{\circ}\text{C}$  貯蔵でも貯蔵 80 日後から  $-20^{\circ}\text{C}$  貯蔵と比較すると緩やかだが増加し、貯蔵 120 日後では  $7\ \mu\text{mol/g}$  に増加した。鮮度が良好な K 値 14% のワニエソから製造された無晒しすり身は、 $-20^{\circ}\text{C}$  貯蔵では貯蔵 20 日後から増加し始め、貯蔵 60 日後には  $8\ \mu\text{mol/g}$  と増加したが、 $-50^{\circ}\text{C}$  貯蔵では貯蔵 60 日後でも初期値のま

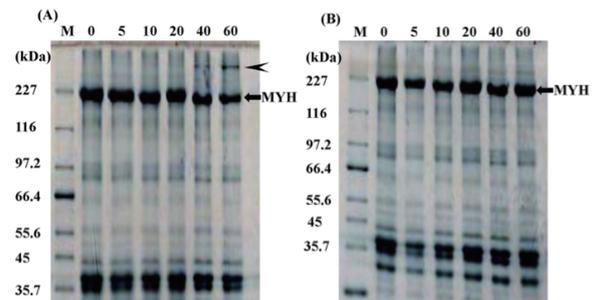


**Fig. 2** Changes in the amount of FA for 60 and 120 days in lizardfish surimi showing 14% (A) and 29% (B) of K value, respectively. Symbols show each surimi as follows. Full circle: surimi without leaching in the storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , full triangle: surimi without leaching in the storage at  $-50^{\circ}\text{C}$ , open circle: surimi with twice leaching was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , open triangle: surimi with twice leaching in the storage at  $-50^{\circ}\text{C}$ .

ま FA は生成しなかった。

一方、水晒しすり身では、鮮度および貯蔵温度・期間に関わらず FA は検出されなかった。この理由として以下の二つの可能性が考えられる。一つ目は、水晒しにより前駆物質の TMAO が除去され、FA そのものが生成しなかった可能性である。二つ目は、先述のように FA は DMA 量から求めており、DMA が水晒しにより除去されてしまえば、タンパク質と結合した FA は測定されず、見かけ上は検出されていない可能性である。結合した FA の影響は加熱ゲル形成能に表れることから、加熱ゲルの物性から検討した。凍結貯蔵中のエソ冷凍すり身の SDS-PAGE 分析

凍結貯蔵中の各すり身を SDS-PAGE に供し、タンパク質の状態を調べた。Fig.3 に K 値 14% の無晒しすり身を  $-20^{\circ}\text{C}$  と  $-50^{\circ}\text{C}$  で 60 日間貯蔵したときの SDS-PAGE の結果を示す。



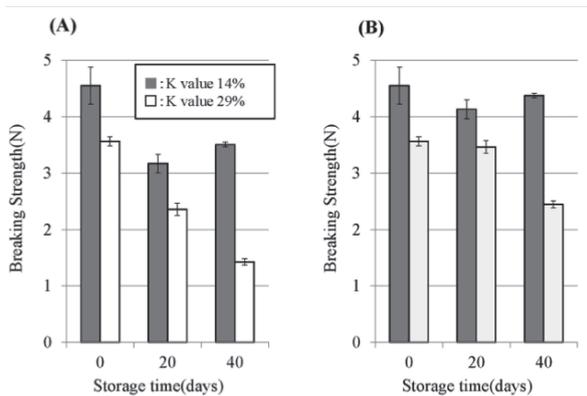
**Fig. 3** SDS-PAGE patterns of surimi showing 14% of K value without leaching in the storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  (A) and  $-50^{\circ}\text{C}$  (B) using 10% polyacrylamide slab gels. Lane M shows molecular weight markers and the numbers above lane show the stored days. Abbreviations: M, molecular weight marker; MYH, myosin heavy chain. Arrowhead indicates dimer or polymer of MYH.

$-20^{\circ}\text{C}$  凍結貯蔵の 20~40 日後で顕著にミオシン重鎖単量体が減少し、高分子側にミオシン重鎖多量体と推定される新しいバンドの生成が認められた。一方、 $-50^{\circ}\text{C}$  で貯蔵の場合はミオシン重鎖単量体のバンドの減少も、ミオシン重鎖多量体のバンドの生成も認められなかった。

FA 量の生成が明らかであった無晒しすり身の  $-20^{\circ}\text{C}$  貯蔵でミオシン重鎖の形成が見られたのに対し、FA 量の生成が明確でない場合には、ミオシン重鎖の多量体形成は認められなかった。このことから、FA がミオシン重鎖の多量体形成に影響したものと推定された。

エソ水晒しすり身の原料鮮度および凍結貯蔵温度によるゲル強度の経時変化

次に水晒しすり身から加熱ゲルを調製し、凍結貯蔵中における破断強度の経時変化を調べた (Fig.4)。



**Fig. 4** Change in breaking strength of thermal gel prepared from lizerdfish surimi with twice leaching after preparation, stored for 20, 40 days at -20(A) and -50°C (B).

破断強度の変化には、原料の鮮度と凍結貯蔵温度の影響が表れた。すなわち、K 値 29% のエソ肉から製造した水晒しすり身の貯蔵開始日（凍結前）の破断強度は 3.6 N であったが、-20°C 貯蔵では貯蔵 40 日後には 1.4 N と著しく低下し、-50°C 貯蔵でも貯蔵 40 日後には 2.4 N と低下した。この様に低鮮度原料から製造した水晒しすり身の品質低下は顕著であり、FA の生成により、すり身中のタンパク質が変性したと推察された。

一方、K 値 14% のエソ肉から製造した水晒しすり身の貯蔵開始日（凍結前）の破断強度は 4.5 N であり、-20°C 貯蔵では貯蔵 40 日後でも 3.5 N と、鮮度が低下したものと比べると高い加熱ゲル形成能が維持された。-50°C 貯蔵では貯蔵 40 日後では 4.3 N と凍結前と変わらない加熱ゲル形成能が維持された。以上の傾向は、同時に測定した破断歪み率でも同様の傾向が見られた（データ未掲載）。

## 考 察

エソ肉は凍結貯蔵中においても FA が生成し、加熱ゲル形成能が低下することが知られている。エソ肉のゲル物性をトランスグルタミナーゼで改善することは可能であるが<sup>12)</sup>、エソ肉本来のしなやかなゲルとは異なる物性となる。また、クエン酸ナトリウム等の添加物により TMAO の分解を抑制する報告もあるが<sup>13)</sup>、エソ肉の味が変化してしまうことも考えられる。現在、高品質なエソのすり身は生すり身に限られており、長期間ゲル形成能を保持する冷凍すり身の開発が求められている。本研究ではエソ肉の鮮度と水晒しが、冷凍すり身の品質に与える影響について検討した。すなわち、鮮度の異なるワニエソから調製した無晒し肉（落とし身）と水晒し肉に冷凍変性防止剤を添加し、凍

結貯蔵中の揮発性塩基物質および加熱ゲル形成性で比較した。

エソ肉は通常の凍結貯蔵温度である -20°C であっても FA を生成する<sup>2)</sup>。FA はタンパク質と強固に結合するため、生成した FA を除去するのは困難である。一方、FA の前駆物質である TMAO は水溶性であるため、TMAO の段階で水晒しを行えば除去することが可能と考えた。比較的鮮度の良い K 値 14% のエソ魚肉では FA が 1 μmol/g 生成していたが、水晒し後の肉では TMAO の 97% は除去された。そのすり身の凍結貯蔵中では FA の生成は認められず、すり身の加熱ゲルの破断強度も凍結前と比較して低下は小さかった。しかし、K 値 29% の魚肉では既に 4 μmol/g もの FA が生成されており、水晒しで TMAO は除去できるものの、凍結前のすり身の加熱ゲルの破断強度に比べて凍結後のそれは著しく低下した。

すなわち、鮮度が良く FA がほとんど生成していないエソ肉では、水晒しにより FA の前駆物質である TMAO をほぼ除去でき破断強度も飛躍的に上昇した。一方、鮮度が低下し、すり身の調製時に FA が多量に生成している原料では、水晒しを行っても FA が残存しているため、凍結貯蔵中に加熱ゲル形成能が著しく低下した。したがって、加熱ゲル形成能を保持するエソ冷凍すり身の原料には、鮮度が高く、FA の生成量が少ない魚体を使用すること、水晒しを充分に行い、TMAO を除去することが必要であると考えられた。なお、現在のエソすり身の水晒し工程では、エソ類の呈味成分を残すために充分な水晒しが行われていない。こうした点を改善することで、加熱ゲル形成能を保持した冷凍すり身の製造が可能であると思われた。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、試料魚の入手にご尽力を頂いた山九水産株式会社の坂水正志様、末永水産株式会社様、寄付金を寄付して頂きました西京銀行(株)山口県応援ファンド・はつらつ長州寄付金選考委員会様に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 平成 23 年水産加工品生産量年報。農林水産省。
- 2) 福島英登, 黒川清也, 石上翔, 桑田智世, 山内春菜, 福田裕: エソ肉のホルムアルデヒド生成に及ぼす貯蔵温度に関する研究。水大校研報, 60(4), 197-202(2012)

- 3) 木村メイコ, 関伸夫, 木村郁夫: 0°C以下の温度におけるトリメチルアミン-N-オキシドの酵素的および非酵素的分解. 日本水産学会誌, 68, 85-91(2002)
- 4) 平岡芳信, 管忠明, 黒野美夏, 平野千恵, 松原洋, 橋本照, 岡弘康, 関伸夫: トカゲエソの貯蔵中に生成するホルムアルデヒドがかまぼこの品質に及ぼす影響. 日本水産学会誌, 69, 796-804(2003)
- 5) 原田勝彦: 魚介類におけるホルムアルデヒドとジメチルアミンを生成する酵素に関する研究. 水大校研報, 23, 136-241(1975)
- 6) 関伸夫, 原研治: ホルムアルデヒドの生成 TMAOase. 山澤正勝, 関伸夫, 福田裕 (編), かまぼこ: その科学と技術. 恒星社厚生閣, 東京, 87 (2003)
- 7) 山田金次郎: 魚介類におけるトリメチルアミンオキシドの分解. 日本水産学会誌, 34, 541-551(1968)
- 8) 池田静徳, 川合真一郎, 坂口守彦, 佐藤 守, 牧之段保夫, 吉中禮二, 山本義和: トリメチルアミンとその関連化合物. 魚介類の微量成分: その生化学と食品化学. 恒星社厚生閣, 東京, 13-17(1981)
- 9) Mizuguchi T, Kumazawa K, Tamashita S, Stuart G: Effect of surimi processing on dimethylamine formation in fish meat during frozen storage. *Fish. Sci.*, 77, 271-277 (2011)
- 10) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- 11) 木村メイコ, 関伸夫, 木村郁夫: 0°C以下の温度におけるトリメチルアミン-N-オキシドの酵素的および非酵素的分解. 日本水産学会誌, 68, 85-91(2002)
- 12) Benjakul S, Phatcharat S, Tammatinna A, Visessanguan W, Kishimura H: Improvement of gelling properties of lizardfish mince as influenced microbial transglutaminase and fish freshness. *J. Food Sci.*, 73, S239-246 (2008)
- 13) Leelapongwattana K, Benjakul S, Visessanguan W, Howell K N: Effect of some additives on the inhibition of lizardfish trimethylamine-N-oxide demethylase and frozen storage stability of minced flesh. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 43, 448-455 (2008)