



Title	魚類筋肉脂質の冷凍貯蔵中における変化：V. 魚肉中の脂質酸化促進物質
Author(s)	高間, 浩蔵; TAKAMA, Kōzō
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 25(3), 256-263
Issue Date	1974-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23532
Type	departmental bulletin paper
File Information	25(3)_P256-263.pdf



魚類筋肉脂質の冷凍貯蔵中における変化

V. 魚肉中の脂質酸化促進物質

高 間 浩 蔵*

Changes in the Flesh Lipids of Fish during Frozen Storage

V. Accelerative substances of lipid oxidation in the muscle of the rainbow trout

Kōzō TAKAMA*

Abstract

The accelerative substances of lipid oxidation were extracted with phosphate buffer (I=0.01, pH 7.0) from the dorsal muscle of the rainbow trout.

The positive fraction of the lipoxygenase activity test, obtained from Sephadex G-150 or G-200 gel chromatography, was characterized to be oxyhemoglobin by the absorption spectra and other evidences, but the presence of lipoxygenase-like materials could not be recognized in the fraction.

Oxyhemoglobin prepared from the rainbow trout blood was added to the blended muscle, and stored in a freezer (-20°C) to determine the effects on the oxidation of the muscle lipids as indicated by increased oxygen absorption and malonaldehyde.

The rainbow trout dorsal muscle slides stained with hematoxylin-eosin dyes were observed to have numerous blood cells around true-skin and myocomma by microphotographs.

These results suggest that the minced flesh of fish is susceptible to rancidity induced by the dispersed blood pigments in the flesh caused by the mechanical destruction of the tissue.

緒 言

魚皮、筋肉中に存在する生触媒的な脂質酸化促進物質としては、ヘモグロビン (Hb) やミオグロビンなどのヘム化合物のほか、リポキシダーゼ様物質の存在が知られている。

ヘム化合物の脂質酸化促進性については、すでに多くの研究がなされており、リポキシダーゼとは異なって基質特異性がなく、低温においてもその作用の強いことが知られている。

一方、魚類におけるリポキシダーゼ様物質の存在は、内臓以外では皮部に局在することが示されているが^{2,3)}、魚肉中には見出されていない。

しかし、既報⁴⁾⁵⁾で示したように、魚類細碎肉の冷凍貯蔵中の脂質変化が単なる加水分解にとどまらず、酸化分解にまで進行していきことから、魚肉中にも脂質酸化を促進する物質の存在することを推察した。

本報では、ニジマス筋肉を試料として脂質酸化促進物質の存在を明らかにしようとした。

* 北海道大学水産学部食品化学第一講座 (Laboratory of Food Chemistry I, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

実験方法

試料魚肉からの抽出 本学七飯養魚場で飼育のニジマス (*Salmo gairdnerii irideus*) を即殺し、側線より上部の剥皮背肉部を分取後、3倍容のリン酸塩緩衝液でホモジナイズし、10,000×G、20分間遠心分離して得られる上澄液を抽出液とした。

ゲルクロマト法による脂質酸化促進物質の分離 $I=0.01$, pH7.0 のリン酸塩緩衝液で膨潤させたのち、二重管式ゲルクロマト用カラムに充填した Sephadex G-150 および G-200 に魚肉抽出液を供し、クロマト中の温度を5°Cに保持しながら同緩衝液で溶出を行った。その他の条件は図の説明文中に示してある。

脂質酸化促進活性テスト ゲルクロマト法による溶出液の脂質酸化促進活性テストは、WALLACE のリポキシダーゼ活性テスト法⁹⁾ によって行った。すなわち、溶出液の1滴を白色磁製プレートにとり、リノール酸乳化液の1滴を加え、5分間放置後、KI 飽和溶液1滴を加え、直ちに1% デンプン溶液1滴を加えたのち10分以内に褐色となったものを陽性とした。リノール酸乳化液は和光純薬製リノール酸を用い、原法に従って調製した。

電気泳動法 7.5% ポリアクリルアミド分離用ゲルを調製し、Tris-グリシン緩衝液中 (pH 8.3)、ゲル1本当たり3mA、約2時間通電によるディスク電気泳動を行い、アミドブラック 10B で染色後、明日香製 OZUMOR-82 型自記濃度計によってデンストグラムを作成した。

酸素ヘモグロビン (HbO₂) の調製 ヘパリン処理したガラス容器にニジマス活魚の尾部を切断して採血し、0.9% 食塩水で数回洗浄後、ピスキングチューブに移し入れ、水を加えて溶血し、水あるいはリン酸塩緩衝液 ($I=0.01$, pH7.0) に対して透析を行ったのち、3,000 r. p. m., 10分間遠心分離して HbO₂ を調製した⁷⁾。また、市販めん羊血液 (東芝化学工業) から同様に調製し、吸収スペクトルから HbO₂ であることを確認して用いた。

魚肉ホモジネートの酸素吸収測定法 魚肉ホモジネートの入っている三角フラスコのヘッドスペースガス 50 μ l をモレキュラーシーブ 5A カラムによるガスクロマト分析に供し (日立製 K-23 ガスクロマトグラフ, 2m スチールカラム, カラム温度: 50°C, ヘリウム流速: 50ml/min), N₂ ピーク高に対する O₂ ピーク高の比を求め、空気のそれから差引いた値をフラスコ中の O₂ 減少指標として、仮の魚肉ホモジネートの O₂ 吸収量とした。

魚肉ホモジネートの TBA 値測定法 5g の魚肉ホモジネートを 25 ml の 7.5% トリクロロール酢酸⁸⁾ とともに1分間ホモジナイズして濾過し、濾液 5 ml に 5 ml の 0.02M TBA 試薬を加えたのち、沸騰水浴中で 40 分間加熱後、10 分間流水中で冷却し、538 nm の吸光値を測定した。

その他の実験法 ゲルクロマト法による溶出液の濃縮は、Zeineh 濃縮器によって行い、タンパク質濃度はビューレット法によって測定した。また、ニジマス背肉の組織顕微鏡観察は背びれを基準にして切断した背肉部をテシマート包埋後、厚さ 10 μ の切片を作成し、DELAFIELD のヘマトキシリン-エオシン二重染色法で染色して行った。

結果および考察

本実験に先立ち、ニジマス試料肉のリン酸塩緩衝液 ($I=0.05$, pH6.8) による抽出液を Sephadex G-50 ゲルカラムに供して分別したタンパク質区分がレシチンの酸化を促進することをワールブルグ検圧法によって認め (Fig. 1), さらにこのタンパク質区分をリン酸の反応が陰性になるまで水に対して透析すると、その作用が水溶性タンパク質区分に移行することを認めた (Fig. 2)。また、活性物質の抽出には、 $I=0.01$, pH7.0 のリン酸塩緩衝液を用いることが最も良好な結果を示した (Table 1)。それゆえ本報においてはすべて $I=0.01$, pH7.0 のリン酸塩緩衝液を抽出剤とし、ニジマス背肉を用いて脂質酸化促進物質の検索を行った。

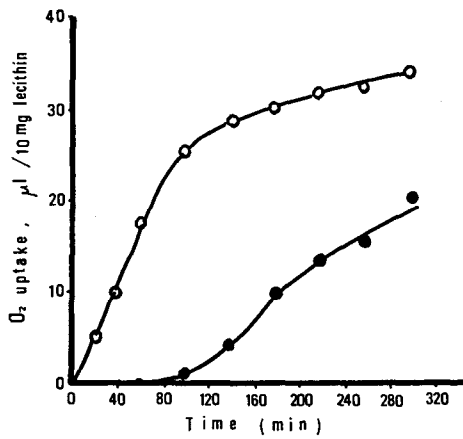


Fig. 1. Oxygen uptake of lecithin (●) and lecithin+muscle extract (○). The oxygen uptake was measured at 30°C using Warburg manometers. Ten mg of lecithin was emulsified with 1.5 ml of I=0.05, pH 6.8 phosphate buffer in the main compartment of a Warburg flask, the centre well of which contained a filter paper fan moistured with 0.2 ml of 20% KOH solution. One ml of centrifugal supernatant of the muscle extracted solution with 3 vols. of the phosphate buffer were added in the flask.

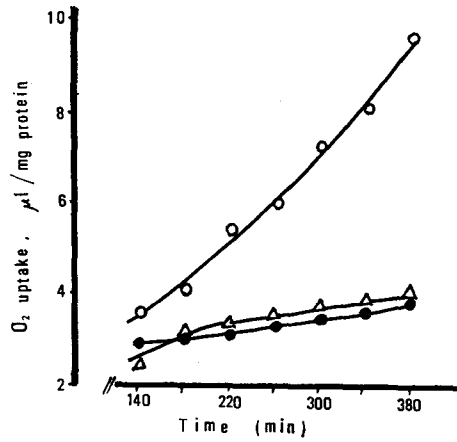


Fig. 2. Comparative study of oxygen uptake by rainbow trout muscle extract (●), water-insoluble protein (Δ) and water-soluble protein (○) obtained from dialysate of the muscle extract against water. All oxidations were conducted under the same conditions as shown in Fig. 1.

Table 1. Influence of buffer solution of extraction on formation of TBA reactive substance during incubation with linoleic acid.

Effect	Buffer	pH		
		5.0	7.0	8.2
pH	0.05 M Phosphate	0.84	0.98	0.94
	0.05 M Tris-maleate	0.60	0.70	0.30
System	0.05 M Phosphate	1.31		
	0.05 M Tris-maleate	0.69		
Ionic strength	Phosphate, I=0.01	1.55		
	I=0.05	1.05		

Muscle extract, 0.5 ml, was added into 0.01 ml of linoleic acid emulsion prepared with 1.5 ml of buffer solution containing 0.1 ml of Tween 20 per 37.5 ml, and then incubated at 30°C for 60 min. (Values as $\times 10^{-5}$ μ mole malonaldehyde/mg protein)

脂質酸化促進物質の分離と同定 魚体側線より背側の肉を3倍容のリン酸塩緩衝液でホモジナイズし、10,000×G、20分間遠心分離して得られた上澄液のうち、タンパク質100.7mg相当量を Sephadex G-150 ゲルカラムに供した際の溶出図を Fig. 3 に示す。WALLACE 法によるリポキシダーゼ活性テストで陽性を示したのは Tube No. 31~34、すなわち 139~153ml の間に溶出される区分であった。

抽出液および Sephadex G-150 グルクロマト法によって得られた活性区分のディスク電気泳動結果は Fig. 4 に示すようであり、活性物質の移動度は 0.27~0.38 であることが推察される。

Sephadex G-150 グルクロマト法で分別された活性区分の吸収スペクトルは Fig. 5 に示すように、

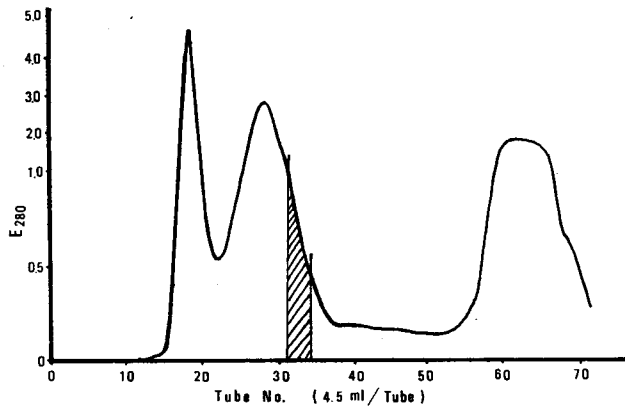


Fig. 3. Elution diagram for separation of accelerative substance of lipid oxidation in extracted solution from dorsal muscle of rainbow trout on Sephadex G-150 column. Column: 1.8×93 cm, Void volume (V_0)=85.5 ml in I=0.01, pH 7.0 phosphate buffer at 5°C, Flow rate: 17 ml/hr
 ■: positive eluate for lipoxygenase activity test according to Wallace's method.

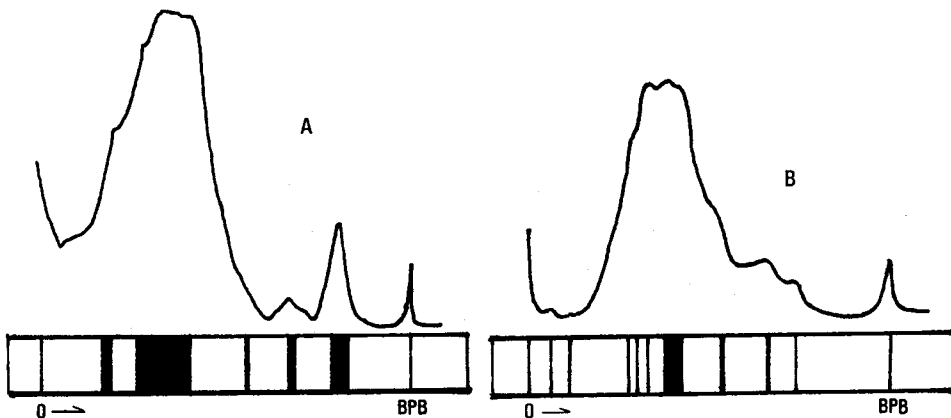


Fig. 4. Disc-gel electrophoregrams and densitograms of (A): muscle extract and (B): eluate (Tube No. 33) from Sephadex G-150 column. 7.5% polyacrylamide-gel in Tris-glycine buffer, 3mA per tube for ca. 2 hr, stained by amidoblack-10B

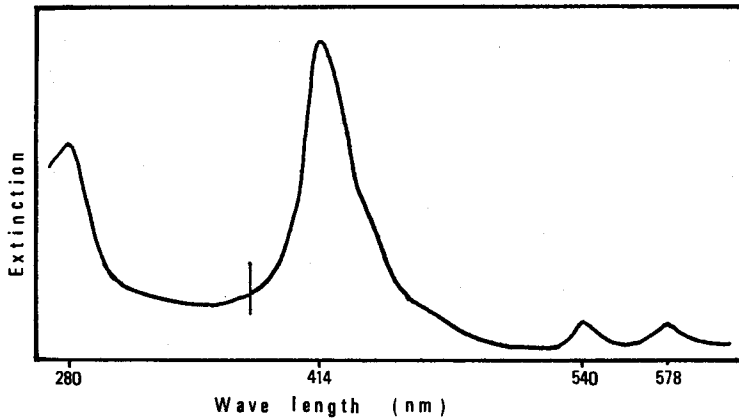


Fig. 5. Absorption spectrum of eluate (Tube No. 33) from Sephadex G-150 column.

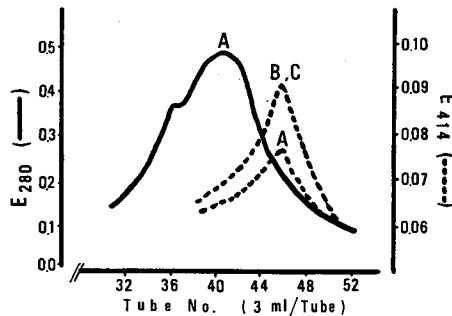


Fig. 6. Elution diagram of extracted solution from dorsal muscle of rainbow trout and oxyhemoglobins prepared from sheep and rainbow trout bloods on Sephadex G-200 column.

Column: 1.8×76 cm, $V_0=66$ ml in $I=0.01$, pH 7.0 phosphate buffer at 5°C , Flow rate: 18 ml/hr

A: extracted solution from dorsal muscle of rainbow trout, B and C: oxyhemoglobins prepared from sheep and rainbow trout bloods.

280, 414, 540 および 578 nm に吸収極大を示した。これは HbO_2 の示す典型的な吸収スペクトルと一致している。そこで、めん羊血液およびニジマス血液から調製した HbO_2 のゲルクロマト溶出位置と比較するために、新たに調製した Sephadex G-200 ゲルカラムによって検討した結果、Fig. 6 に示すように、溶出液の 414 nm における吸光値測定で得られたピークの V_e/V_0 (V_e : 溶出液量, V_0 : グル外部容積) がいずれも 2.09 を示したことから、ニジマス肉から得られた脂質酸化促進物質は HbO_2 であることが認められた。すなわち、魚肉中にもリポキシダーゼ様物質の存在が推察されたが、本実験結果では WALLACE 法によるスポットテスト陽性区分からは HbO_2 が主成分として分別、確認され、リポキシダーゼ様物質の存在は確認出来なかった。

さらに Fig. 7 に示すように、標準タンパク質を同 Sephadex G-200 ゲルカラムに供した⁹⁾ 結果、bovine albumin の溶出位置がニジマス HbO_2 のそれと一致したことから、ニジマス HbO_2 の分子量は約 68,000 であると推定され、哺乳動物一般のそれと同様の値を示した。

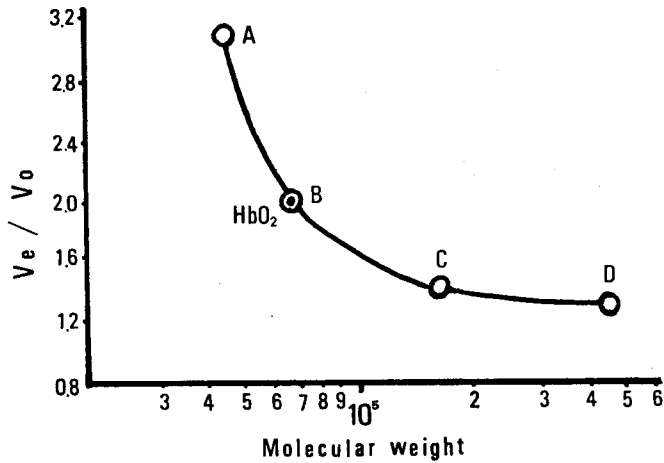


Fig. 7. Plot of elution volume, V_e , against log (mol. wt.) for proteins and oxyhemoglobin prepared from rainbow trout blood on Sephadex G-200 column. Column: 1.8×76 cm in $I=0.01$, pH 7.0 phosphate buffer at 5°C , A: ovalbumin, B: albumin (bovine), C: γ -globulin (human), D: apoferritin (horse)

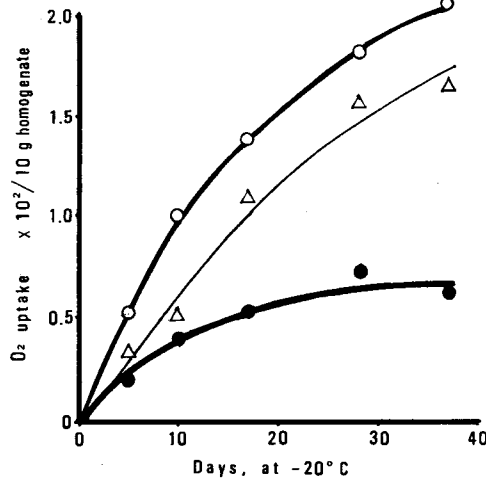


Fig. 8. Effect of oxyhemoglobin on the development of oxygen uptake in muscle homogenate of rainbow trout using a preparation of one part of tissue to three parts of water.

Ten g of the muscle homogenate is packed into 100 ml Erlenmyer flask fitted with a cautchouc stopper tubed a glass sealed the open end with a silicone rubber. Oxygen uptake is measured by analysis of $50 \mu\text{l}$ portions of the headspace gas by gas-chromatography.

Hitachi K-23 gas chromatograph, Detector (TCD) and column (2 m steel column packed with 60-80 mesh of molecular sieve 5A) temp.: 50°C , Carrier gas helium flow rate: 50 ml/min

●: ontrol, Δ : 2.7 ppm $\text{HbO}_2\text{-Fe}$, \circ : 6.2 ppm $\text{HbO}_2\text{-Fe}$

HbO₂ の -20°C における脂質酸化促進性 ニジマス背肉を3倍容の水でホモジナイズし、そのホモジネート 1g 中に HbO₂-Fe が 2.7 ppm および 6.2 ppm になるようにニジマス血液 HbO₂ を添加混合した。ただし、HbO₂ 量はその分子量 (68,000) と分子吸光係数 ($\epsilon_{414}=132,000$)⁷⁾ から算出した。

このようにして調製したホモジネート 10g を 100ml 容三角フラスコに入れ、-20°C に貯蔵してヘッドスペースガスのガスクロマト分析による O₂ 吸収測定を行い、また残りのホモジネートをポリエチレン袋に入れ、同様に貯蔵し、TBA 値の測定を行った。

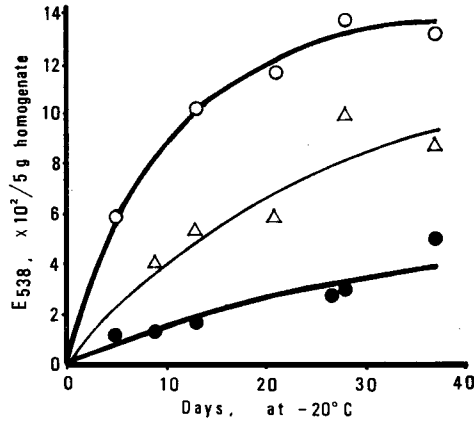


Fig. 9. Effect of oxyhemoglobin on the development of TBA value in muscle homogenate of rainbow trout using a preparation of one part of tissue to three parts of water.
●: Control, Δ: 2.7 ppm HbO₂-Fe, O: 6.2 ppm HbO₂-Fe

ヘム化合物の脂質酸化促進作用の機構は TAPPEL ら¹⁰⁾ によって提示されており、低温においてもその作用の強いことが知られている¹⁾。CASTELL ら¹¹⁾ は、0°C における魚介類筋肉の酸敗に 関与するヘム化合物の影響について検討し、Hb がカタラーゼと同様、高い触媒性を示すことを明らかにしている。本実験の -20°C における結果でも、Fig. 8,9 に示すように、魚肉酸敗の進行が HbO₂ によって促進されることを示した。清水ら¹²⁾ は、サバ血液ならびに血液色素の脂質酸化促進性について検討し、-CH₂-CH=CH-CH₂-CH=CH-CH₂-なる構造をもった脂肪酸の存在が他の不飽和脂肪酸の酸化をも進行させる必須条件であると述べている。このことはヘム化合物がリポキシダーゼと異なり、基質特異性を示さないとするに反するが、魚肉脂質に多量に含有される高度不飽和脂肪酸はこのようなジビニルメタン二重結合配置であることから、いずれにしても魚肉脂質はヘム化合物の酸化促進作用の影響を受けやすいものと考えられる。

ニジマス背肉の組織検鏡写真は Fig. 10 に示してある。これらから明らかなように、血管は真皮付近と筋隔に沿って分布しており、細碎肉調製時には組織の機械的破壊のために色素類が肉中に分散することになり、とくに細碎魚肉貯蔵中の脂質酸化に対し、これらの物質が促進的な影響因子になるものと推察された。

本研究の遂行に当り、終始御指導を賜った本学部五十嵐久尚教授、座間宏一助教授ならびに九州大学農学部豊水正道教授に厚く感謝の意を表するとともに、組織観察をしていたごいた本学部山崎文雄助教授に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究の一部は昭和 48 年度、文部省科学研究費 (試験研究: 水産食品脂質悪変の Accelerator, Inhibitor. 代表者五十嵐久尚教授) による。

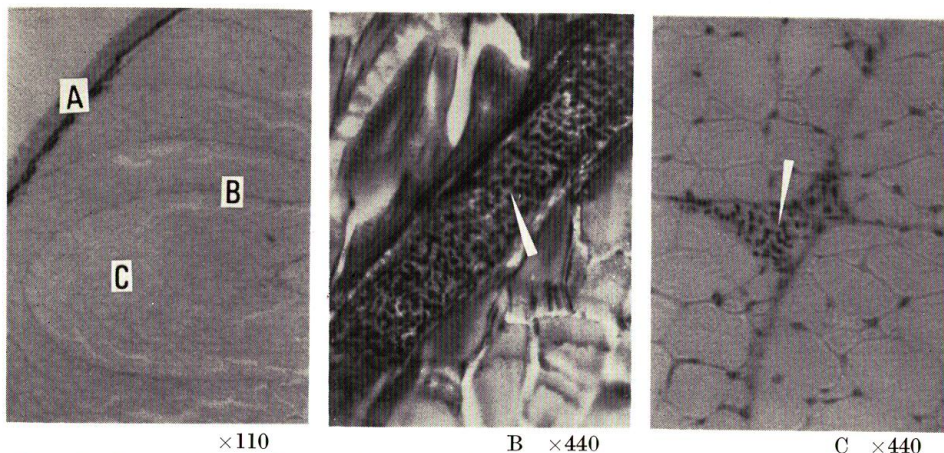


Fig. 10. Microphotographs of rainbow trout dorsal muscle slides stained with hematoxylin-eosin dyes.

A: true-skin, B: myocomma, C: muscle

The arrows indicate the locations of the red blood corpuscles.

文 献

- 1) 八木一文・秋谷年見 (1967). 食品の酸化とその防止. 178 p. 光琳書院, 東京.
- 2) Tsukuda, N. and Amano, K. (1968). Studies on the discoloration of red fishes. V. Enzyme involved in the discoloration of carotenoid pigments in fish skin tissues. *Bull. Jap. Soc. Fish.* **34**, 633-639.
- 3) Tsukuda, N. (1970). Ditto VI. Partial purification and specificity of the lipoxidase-like enzyme responsible for carotenoid discoloration in fish skin. *Ibid.* **36**, 725-733.
- 4) 高間浩藏・座間宏一・五十嵐久尚 (1967). 魚類筋肉脂質の冷凍貯蔵中における変化 I. ホンマグロ筋肉脂質, 北大水産彙報 **18**, 240-247.
- 5) 高間浩藏・座間宏一・五十嵐久尚 (1972). 同上 II. 数種魚類筋肉脂質, 同誌 **22**, 290-300.
- 6) Wallace, J.M. (1972). Spot test for lipoxygenase activity. *J. Lipid Res.* **13**, 282-284.
- 7) 江上不二夫他 (1953). 標準生化学実験. 625 p. 文光堂, 東京.
- 8) Vyncke, W. (1972). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel.* **12**, 1084-1087.
- 9) Andrews, P. (1965). The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**, 595-606.
- 10) 松下雪郎 (1968). 食品生化学. 388 p. 共立出版, 東京.
- 11) Castell, C.H. and Bishop, D.M. (1969). Effect of hematin compounds on the development of rancidity in muscle of cod, flounder, scallops and lobster. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* **26**, 2299-2309.
- 12) 清水千秋・福原忠信 (1959). 不飽和脂肪酸の酸化に対する血液ならびに血液色素の触媒作用, 日水誌 **24**, 760-764.