



Title	酸化魚肉脂質のタンパク質に及ぼす影響：Ⅰ. 自動酸化ドコサヘキサエン酸メチルエステルによるタンパク質の劣化
Author(s)	樋口, 達夫; HIGUCHI, Tatsuo; 羽田野, 六男 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 28(4), 212-219
Issue Date	1977-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23622
Type	departmental bulletin paper
File Information	28(4)_P212-219.pdf



酸化魚肉脂質のタンパク質に及ぼす影響

I. 自動酸化ドコサヘキサエン酸メチルエステルによるタンパク質の劣化*

樋口 達夫**・羽田野 六男・座間 宏一***

The Effect of Oxidized Fish Lipids on Protein

I. Deterioration of protein by autoxidized methyl docosahexaenoate*

Tatsuo HIGUCHI**, Mutsuo HATANO and Kōichi ZAMA***

Abstract

Deterioration of marine foods caused by autoxidized highly unsaturated fatty acids, which exist in processed fish products, includes the production of off-flavors, browning and the decrease of nutritional value.

This study was performed to determine the nutritional changes of egg albumin in model system composed of egg albumin and several different oxidized methyl docosahexaenoate (2:1, w/w, mixtures) during storage at 30°C and RH 80%.

Several autoxidized methyl docosahexaenoate were fractionated on a Bio-Beads SX-3 column and separated into four components: tetramer, trimer, dimer and monomer. In storage, the browning of albumin, the loss of available lysine and the decrease of digestibility in vitro with pepsin was observed. The content of essential amino acids of albumin, particularly methionine, threonine, lysine and phenylalanine decreased considerably.

The degradation of egg albumin was most observable in the model system composed of the egg albumin and oxidized methyl docosahexaenoate corresponding to the propagation period.

緒 言

最近「水産未利用資源の有効利用と漁獲物利用の再検討」ということが課題となり、特にわが国近海産多獲性魚種であるイワシ、サバなどの高度利用が急務とされている。しかしこれらの魚種は一般に脂質含量が高く、その利用にあたって魚肉脂質の酸化はまぬがれず、その酸化生成物が魚肉の色沢の劣化、食味の低下、異臭の発生さらには魚肉タンパク質の栄養価の低下など品質劣化の原因となっている。

脂質酸化にともなうタンパク質の劣化については、Roubalら¹⁾²⁾がタンパク質の一部の構成アミノ酸の損傷とタンパク質間の重合が起ることを認めているほか、堀米ら³⁾⁴⁾、柳田ら⁵⁾⁶⁾も酸化リノール

* 昭和52年4月、日本水産学会春季大会(東京)講演発表

** 原籍: 大塚製薬株式会社, 商品開発研究所
(Commodity Development Div., Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.)

*** 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)

酸エチルエステルがカゼイン、卵アルブミンに作用してその栄養価を低下させることを報告している。また一方 Zirlin ら⁷⁾ はリノール酸メチルエステルとゼラチンの混合物でリノール酸メチルエステルの酸化によりゼラチンの粘性と溶解性などが低下することをみ、湿度もこれらの性状の変化に影響を与えると述べている。このようにジエン酸レベルの酸化生成物とタンパク質の相互作用についての研究は比較的多くみられるのに反し、水産物特有の高度不飽和酸レベルの酸化生成物との相互作用についての研究はあまり行われていない。

本研究では、今日問題となっているイワシ、サバなどの脂質酸化にともなう魚肉タンパク質の劣化機構を明らかにすることを目的とし、魚肉脂質を構成する代表的脂肪酸のドコサヘキサエン酸をとり上げ、そのメチルエステルを自動酸化し過酸化物の増大前期、増大中期および下降期のものについて性状を検討し、さらにこのメチルエステル酸化生成物と今回まず魚肉タンパク質の代りに単純タンパク質である卵アルブミンとの混合モデル系を高湿度の苛酷な条件下にて貯蔵し、卵アルブミンの劣化機構について検討を行なった。

試料および実験方法

ドコサヘキサエン酸メチルエステルの調製

市販イカ油メチルエステル（日本化学飼料 KK. 製）を尿素付加法により高度不飽和酸メチルエステルを含む区分を分別し、さらにこのものを真空蒸留を行ない 181°C (0.75 mmHg) 留出分の性状からこの留出分をドコサヘキサエン酸メチルエステルとして以下の実験に用いた。このものの純度と性状は表 1 に示すとおりである。

Table 1. Properties of methyl docosahexaenoate fraction

Saponification value	167.5	Polyenoic acid composition*	
Acid value	0.3	C _{22:6} acid	78.2%
Iodine value	379.6	C _{22:5} acid	7.1%
Peroxide value	16.0	C _{20:5} acid	8.7%

* Abbreviation: Operation condition of gas-liquid chromatography
Hitachi 063 Gas Chromatograph
Column: 10% DEGS/Chromosorb W,
(3 mm×2 mm)
Column temp.: 205°C
N₂ flow rate: 40 ml/min

ドコサヘキサエン酸メチルエステルの自動酸化

上記ドコサヘキサエン酸メチルエステルを 4°C で通気、自動酸化させ図 1 に示すような酸化程度の異なるメチルエステルすなわち 過酸化物増大前期 (OE₁)、増大中期 (OE₂) および下降期 (OE₃) のものを得た。

自動酸化ドコサヘキサエン酸メチルエステルの性状

過酸化物価 (POV) は Lea 法により、カルボニル価 (COV) は熊沢ら⁸⁾ の方法に従って測定した。また自動酸化生成物の分画は中村ら⁹⁾ のゲルクロマトグラフィーに準じ、Bio-Beads SX-3 カラム (Bio-Rad 社製, 200~400 mesh, 2.5×89.5 cm) に自動酸化ドコサヘキサエン酸メチルエステルを注入しベンゼンで溶出を行なった。さらに各溶出画分の分子量は蒸気圧平衡法 (日立 115 分子量測定装置) により測定した。

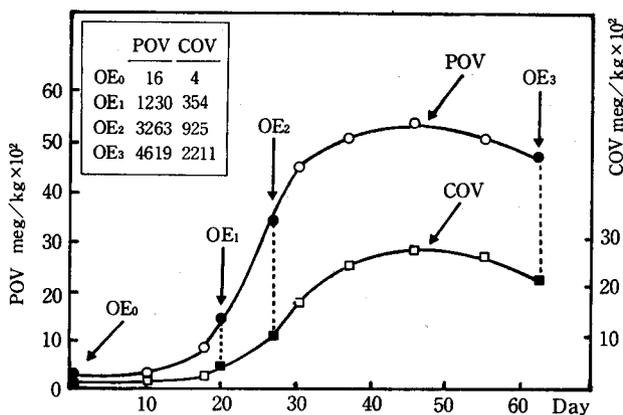


Fig. 1. The autoxidation process of methyl docosahexaenoate.

自動酸化ドコサヘキサエン酸メチルエステル-卵アルブミン混合系の調製

図1に示した酸化程度の異なる3種のメチルエステル(OE₁, OE₂, OE₃)と対照の未酸化メチルエステル(OE₀)をそれぞれ卵アルブミン(Difco社製)と1:2(w/w)の割合で乳鉢中で混和し, M₁, M₂, M₃と対照のM₀の各混合系を調製した。

各混合系の貯蔵試験

上記の各混合系3gをそれぞれシャーレ(直径9cm)にとり, 相対湿度(RH)80%に調整したデシケーター中に30°Cで貯蔵した。貯蔵した各混合系を48, 120, および240時間後にとり出し, 15倍量のアセトンとエチルエーテルでそれぞれ3回脱脂, 脱脂残渣のタンパク質区分の重量変化を測定し, あわせて以下のタンパク質区分の性状の検討に用いた。

タンパク質区分の性状

褐変度は柳田ら⁶⁾の方法によりタンパク質区分にプロナーゼ(科研化学KK, 製)を含むリン酸塩緩衝液(pH 7.5)を加え, 40°C, 5時間分解後, 430nmの吸光度を測定, 窒素16mgあたりの値として表示した。人工消化率は堀米ら⁷⁾の方法に従いタンパク質区分にペプシン(Difco社製)を加え, pH 1.5, 37°C, 24時間消化後, トリクロル酢酸を加え除タンパクし上澄液中の可溶性窒素をケールダール法で測定した。なお人工消化率の表示はメチルエステルと混合しない卵アルブミンをアセトンとエチルエーテルで処理したものの消化率を基準とした。有効性リジン(Lys)量はCarpenter¹¹⁾の方法, すなわちタンパク質区分に1-フルオロ2,4-ジニトロベンゼンを加えてDNP化後, 8.1N HClで120°C, 20時間加水分解しε-DNP Lysを分別, 435nmで比色, 窒素16gに対するLys g数として示した。構成アミノ酸組成は6N HClで110°C, 24時間加水分解し, 日立アミノ酸自動分析計(KLA-3)により求め, 窒素1gあたりの各アミノ酸のg数として示した。

実験結果および考察

自動酸化ドコサヘキサエン酸メチルエステルの分画と性状

対照としての未酸化ドコサヘキサエン酸メチルエステル(OE₀)とその自動酸化メチルエステル(OE₁, OE₂, OE₃)をそれぞれゲルクロマトグラフィーにより分画を試みた結果, 図2と表2に示すと

樋口外: 酸化魚肉脂質のタンパク質に及ぼす影響. I

おり OE_0 では単一ピークのみ示すのに対し, OE_1 では3成分, OE_2 と OE_3 では各4成分よりなることが認められた。つぎに OE_0 および OE_3 の各溶出画分の平均分子量を求めるとそれぞれで OE_0 :338, OE_3 -I:351, OE_3 -II:679, OE_3 -III:922, OE_3 -IV:1319 あり, いま OE_0 の溶出画分を単量体とすれば OE_3 -I は単量体, OE_3 -II は2量体, OE_3 -III は3量体, OE_3 -IV は4量体となる。一方 OE_1 と OE_2 についても同一条件によって行なったゲルクロマトグラフィーによる各溶出画分の溶出位置が OE_3 のそれらと一致することから, それぞれ単量体, 2量体, 3量体, 4量体に相当するものと考えられる。以上の結果より OE_0 では単量体のみであるが, 過酸化増大期にあたる OE_1 と OE_2 では単量体の含量が減少し2量体以上のものの含量が増加することがみられ, また過酸化下降期の OE_3 では多量体により増加することが認められる。さらに表2の結果は多量体の POV と COV が単量体のそれよりも高い値を示すが, このことは多量体中に過酸化物とカルボニル化合物がより多く存在することを示している。

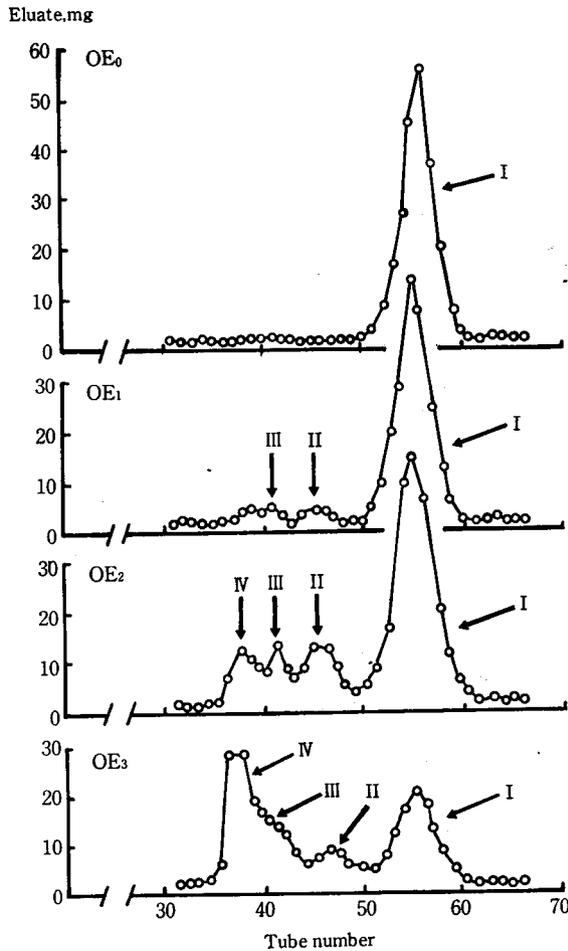


Fig. 2. Gel permeation chromatogram of autoxidized methyl docosahexaenoate

Table 2. Fractionation of autoxidized methyl docosahexaenoate.

	Fraction	Tube no.	Yield (%)	POV	COV	Mean Mol. wt.
OE ₀	I	49~60	100.0	16	4	338
OE ₁	I	49~60	87.6	621	216	—
	II	42~48	5.8	4256	1591	—
	III	35~41	6.6	4215	1623	—
OE ₂	I	49~60	68.1	2806	674	—
	II	43~48	12.4	6374	1827	—
	III	40~42	7.8	6234	1938	—
	IV	35~39	11.3	5192	2019	—
OE ₃	I	49~60	39.4	2765	1358	351
	II	43~48	13.5	5628	2286	679
	III	39~42	14.1	5347	2471	922
	IV	35~38	33.0	4935	2454	1319

Abbreviation: I: monomer, II: dimer, III: trimer, IV: tetramer

各混合系の重量変化

M₀, M₁, M₂, M₃ の各混合系の全重量増加率は図3に示すように各混合系間で若干の相異はみられるが、いずれも貯蔵120時間ではほぼ一定となる。このことは混合系の吸収酸素量に由来するのみならず RH 80% 条件下における貯蔵中で吸着水分量が平衡に達したためと考えられる。

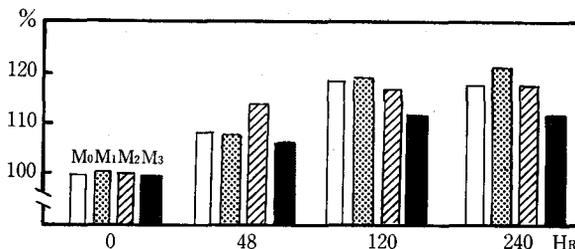


Fig. 3. Changes in weight of oxidized methyl docosahexaenoate-egg albumin mixed system, during storage at 30°C and RH 80%.

タンパク質区分の回収率の変化

各混合系中のタンパク質区分の回収率は図4に示すように、すべての系で貯蔵時間の経過とともに増加し、特に24時間では酸化程度の低い OE₀, OE₁ と混合した M₀, M₁ 混合系が著しい。このことは酸化程度の高いメチルエステルの生成物である多量体の過酸化物とカルボニル化合物よりは、酸化程度の低いものの生成物である単量体中の過酸化物とカルボニル化合物の方がよりタンパク質と結合し複合体を形成しやすいことを示唆している。

褐変度の変化

タンパク質区分の褐変度の変化は図5に示すように、いずれの混合系においても経時的に増加し、特に貯蔵120時間以降で M₀, M₁ および M₂ の各混合系に著しい褐変がみられる。これに反し M₃

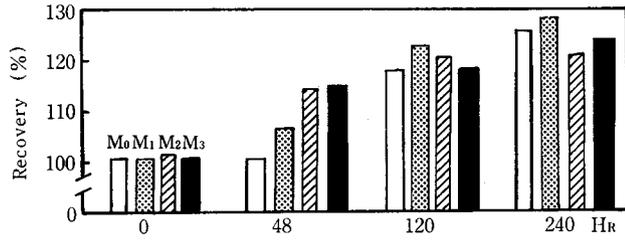


Fig. 4. Recovery of protein moiety.

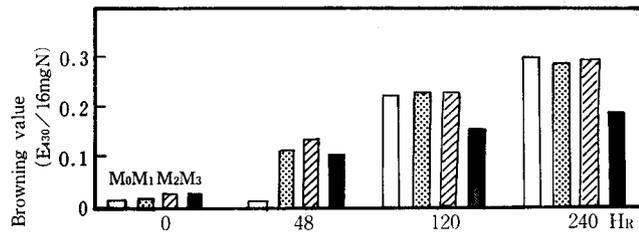


Fig. 5. Changes in browning value of protein moiety.

混合系の褐変度は比較的 low, メチルエステルの過酸化物下降期に生成する高分子カルボニル化合物より増大期に生成する低分子のものの方が, より容易にタンパク質の遊離アミノ基と反応して褐変を起こすためと推察される。

有効性 Lys 量の変化

有効性 Lys 量の変化は図 6 に示すように, いずれの混合系においても貯蔵時間の経過とともに減少するが, M₀, M₁ および M₂ 混合系ではその損失が著しく, 逆に M₃ 混合系では減少が少ない。このことは前述の褐変度の増加にともなって有効性 Lys 量が比例して減少することを示し, 褐変度の場合と同様メチルエステルの酸化生成物である低分子カルボニル化合物は Lys の ε-アミノ基と反応し, その結果として有効性 Lys 量の減少につながるものと思われる。

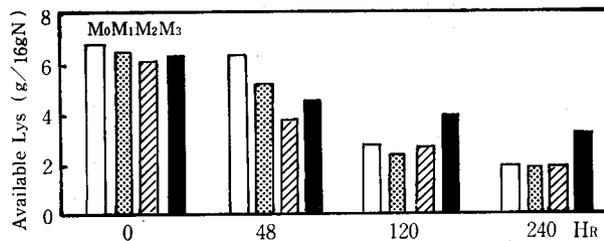


Fig. 6. Changes in the content of available lysine of protein moiety.

人工消化率の変化

ペプシンによる人工消化率の変化は図7に示すように、各混合系とも貯蔵時間が経過するにつれ消化率の低下がみられる。その低下の度合は M_0 , M_1 , M_2 の各混合系で大きく、 M_3 混合系では小さい。この消化率の低下の原因は特に前者の M_0 , M_1 , M_2 系で吸収酸素に由来するタンパク質区分の回収率が増加していることから、Roubal ら²⁾の知見と同様酸化生成物によってタンパク質の重合が起こり、さらに Desai ら¹²⁾の提唱する酸素を介在とする複合体 (POOL-OOP) の形成が行なわれ、このことがペプシンの酵素作用に抵抗性を示すためと考えられる。

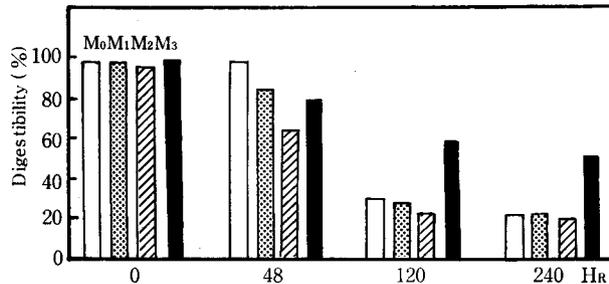


Fig. 7. Changes in relative digestibility by pepsin of protein moiety.

構成アミノ酸組成の変化

貯蔵 48 時間のタンパク質区分の構成アミノ酸組成は表3に示すが、対照とした卵アルブミンのみの組成と比較すると各混合系とも一般的に必須アミノ酸が著しく損傷され、そのうち特に Met, Lys

Table 3. Changes in amino acid composition of protein moiety after storage for 48 hours.

	Untreated albumin	Mixed system			
	Control	M_0	M_1	M_2	M_3
Asp	0.71	0.68	0.69	0.65	0.72
Thr	0.29	0.29(0)	0.27(7)	0.27(7)	0.16(45)
Ser	0.46	0.43	0.42	0.42	0.37
Glu	0.82	0.80	0.74	0.75	0.78
Pro	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19
Gly	0.24	0.21	0.22	0.22	0.23
Ala	0.47	0.42	0.41	0.41	0.42
Cys	0.12	0.12	0.11	0.10	0.11
Val	0.40	0.36(10)	0.36(10)	0.33(18)	0.36(10)
Met	0.22	0.17(23)	0.09(59)	0.06(73)	0.15(32)
Ile	0.32	0.27(16)	0.27(16)	0.26(19)	0.27(16)
Leu	0.60	0.50(17)	0.46(23)	0.46(23)	0.51(15)
Tyr	0.26	0.23	0.22	0.21	0.23
Phe	0.51	0.40(22)	0.34(33)	0.34(33)	0.36(29)
Lys	0.42	0.38(10)	0.31(26)	0.27(36)	0.26(38)
His	0.13	0.13	0.11	0.11	0.09
Arg	0.34	0.32	0.30	0.30	0.29

Individual amino acid was expressed as g/g N Amino acid loss (%) was calculated using untreated protein as control

および Phe の損傷が大きいことが認められる。また貯蔵中に受ける必須アミノ酸の損傷は過酸化増大期にあたるメチルエステルと混合した M_1 , M_2 混合系で大きく、過酸化増大期のものと M_3 混合系で小さいことから、前者のメチルエステルの酸化生成物である単量体中の過酸化物とカルボニル化合物の反応性がより高く、卵アルブミンの一次構造の必須アミノ酸の部位に損傷を与えるものと考えられる。しかし Thr は例外であり、過酸化増大期のメチルエステルと混合した M_3 系で大きく損傷されるが、それは Thr の化学構造の OH 基と多量体中の過酸化物あるいはカルボニル化合物と特異的に反応するためではないかと考えられる。

要 約

高度不飽和脂肪酸の自動酸化生成物のタンパク質に及ぼす食品学的影響を知るために、まずドコサヘキサエン酸メチルエステルをとり上げ、自動酸化し、過酸化増大期と下降期の酸化程度の異なるメチルエステルを調製した。これらのメチルエステルの自動酸化生成物は単量体から4量体よりなり、いずれも過酸化物とカルボニル化合物を含んでいることが認められた。

つぎにこれらの酸化生成物を含むメチルエステルと卵アルブミンの混合モデル系を調製し、苛酷な条件下で貯蔵試験を行ない、その結果過酸化増大期のメチルエステルが卵アルブミンを食品学的にも栄養学的にも著しく劣化させ、また卵アルブミンの構成アミノ酸のうち特に必須アミノ酸を著しく損傷させることを認めた。

謝 辞

本研究にあたり種々有益な御助言をいただいた本学部秋場稔教授ならびにアミノ酸分析に多大な御便宜をはかって下さった高木光造教授、飯田優博士に、またイカ油メチルエステルを提供して下さいました日本化学飼料株式会社中央研究所長片谷健一博士に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Roubal, W.T. and Tappel, A.L. (1966). Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 5-8.
- 2) Roubal, W.T. and Tappel, A.L. (1966). Polymerization of proteins induced by free-radical lipid peroxidation. *Ibid.* 113, 150-155.
- 3) 堀米隆男・柳田晃良・三浦道雄 (1974). 水系において酸化リノール酸エチルと反応させた蛋白質の栄養化. *農化* 48, 195-199.
- 4) 堀米隆男・三浦道雄 (1974). 粉末状蛋白質と酸化リノール酸エチルとの反応ならびに反応蛋白質の栄養価について. *同誌* 48, 437-444.
- 5) Zirlin, A. and Karel, K. (1969). Oxidation effects in freeze-dried gelatinmethyl linoleate system. *J. Food Sci.* 34, 160-164.
- 6) 柳田晃良・菅野道広・長修司・和田正太 (1973). リノール酸エチルの酸化に伴うカゼインの有効性リジン量および消化率の変化. *農化* 47, 73-78.
- 7) 柳田晃良・菅野道広 (1974). 脂質の酸化にともなう卵アルブミンの生物価および有効性リジンの変化. *栄養と食糧* 27, 275-280.
- 8) 熊沢 恒・大山 保 (1965). 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをを用いる酸化油の総カルボニル測定法. *油化学* 14, 167-171.
- 9) 中村 孝・豊水正道 (1975). リノレン酸メチル自動酸化生成物のゲルクロマト法による分画とその変色力. *日水誌* 41, 59-64.
- 10) 堀米隆男・神立 誠 (1966). 草類蛋白質の栄養価 (第14報) 茎葉のフェノール化合物およびオルソジフェノールオキシゲナーゼの蛋白質の消化率におよぼす影響. *農化* 40, 449-455.
- 11) Carpenter, K.J. (1960). The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochem. J.* 77, 604-610.
- 12) Desai, I.D. and Tappel, A.L. (1963). Damage to proteins by peroxidized lipids. *J. Lipid Res.* 4, 204-207.