

魚肉の脂質過酸化に及ぼすNaClとEDTAの影響

食品や生体組織に多く存在する高度不飽和脂肪酸（以下PUFA）はその構造上、酸化を受けやすい。PUFAの酸化反応によって生成される過酸化脂質は、食品の味、栄養、安全性に悪影響をおよぼす。細胞膜などの生体膜に存在するリン脂質は、生体膜の流動安定性を保つために、リノール酸やアラキドン酸などのPUFAが存在するため、活性酸素やフリーラジカルにより酸化されやすい。そのため、膜構造が変化し細胞や組織に障害を起こす。また、老化をはじめとする生理的変化や癌、動脈硬化などのいろいろな疾病と過酸化脂質が関連していることを示す結果も数多く報告されている。

マロンジアルデヒド（以下MDA）、カルボニル修飾タンパク質（以下CP）、4-ヒドロキシヘキセナール（以下HHE）は、すべて脂質過酸化に関係する物質である。PUFAは過酸化により最終的にMDAになる。このMDA含量は食品および生体組織の酸化の指標として用いられている。CPは、脂肪酸の自動酸化によって生じた活性の高いカルボニル類が、システイン、リジン、ヒスチジンなどのアミノ酸残基と反応してできるタンパク質である。これは、食肉の品質の低下のみならず、アルツハイマー病、動脈硬化、白内障リウマチ関節炎などの疾病などに関与していると報告されている。6) HHEは、 ω 3 脂肪酸の酸化によって生じる α 不飽和アルデヒドである。この不飽和アルデヒドには、たくさんの種類が存在することが確認されているが、中でもこのHHEは、非常に強い細胞毒性を持つことで知られており、最近特に注目されているアルデヒドである。

これらMDA、CP、HHEは我々が日常的に摂取する食品中に含まれており、食品の安全性と重要な関わりをもっている。したがって、食肉の脂質過酸化の進行を抑制することは重要である。脂質過酸化はNaClやFeイオンにより促進されることはよく知られている。特にNaCl添加は食肉の加工上、例えば、すり身等で重要であり、NaCl添加による脂質過酸化の促進は食肉加工上、重要な問題である。しかしながら、食肉の脂質過酸化抑制のメカニズムについては、ほとんど報告されていない。

そこで本研究では、NaClによる脂質過酸化の促進メカニズムとして考えられている、Feイオンの遊離を抑えるために、そのキレート剤として、Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt（以下EDTA）を添加した際の、その進行状況を明らかにするために、本実験を行った。

第1章ブリ貯蔵実験1

目的

Kanner *et al.* は、七面鳥筋肉組織の脂質過酸化におけるNaClの影響を報告している。¹⁾これによると、NaClを加えた筋肉組織において、脂質過酸化が促進されるためMDAが生成され、NaCl濃度を増すことにより、それは促進される。これは、NaClがタンパク質とキレート結合しているFeを遊離させ、Feイオンが生じ、触媒となり、ラジカルが生成されるためだと報告されている。⁷⁾しかし、EDTAやセルロプラスミンが同時に存在すると、NaClの作用は抑制される。また、魚肉組織においても、NaClを加えると、脂質過酸化が促進されるためMDAが生成され、NaCl濃度を増すことにより、それが促進されることは確認されている。さらに、魚肉組織において、Feを加えた場合にも同様の効果が得られることも確認されている。そこで、Kanner *et al.* の研究を基に、魚肉の脂質過酸化におよぼすNaClおよびEDTAの影響を明らかにするために、MDA、CP、HHE量を測定した。

実験方法

1) MDA、CP、HHE測定用試薬

1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid（以下DETBA）は、Aldrich Chemicalsより購入した。抗酸化剤Butyl Hydroxy Toluene（以下BHT）は、東京化成工業より購入した。Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt（以下EDTA）、Sodium dodecyl sulfate（以下SDS）、1,1,3,3-tetraethoxypropane、2,4-Dinitrophenylhydrazine（以下DNPH）、尿素は、和光純薬より購入した。Bio-Rad protein Assay Kid（以下PAK）は、Bio-Rad Laboratoriesより購入した。なお、このPAKは標準として牛血清アルブミンを使用した。高速液体クロマトグラフィー（以下HPLC）用の溶媒は、すべて、HPLC用の試薬を用いた。他の試薬については、できる限り特級を用いた。

2) 試料

試料のブリは、一般の市場で購入した。皮および内臓を取り除き、脂身と血合筋を削除した後、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かくした。その試料を4等分

し、Control, 1mM EDTA, 0.3M NaCl, 1mM EDTA+0.3M NaClとなるように調整した。それぞれをポリエチレンバックに入れ、0°Cで貯蔵後、試料のMDA, CP, HHE含量を0, 3, 7日目に測定した。

3) MDA測定法

試料をテフロンホモジナイザーに1gずつ正確に秤量し、生理的食塩水を20ml加えホモジネートを作成した。それを0.5ml栓付試験管に採取し、0.125M リン酸緩衝液 (pH3, 0.4% SDS, 10mM DETBA, 4mM BHTを含む) を3.5ml加えた。100°Cのヒーターブロックで150分間反応させた。反応後、水中で冷却しながら酢酸エチルを4ml加え、激しく振盪した。2500rpmで15分間遠心分離を行い、その上清0.5mlを共栓付試験管に採取し、エバポレーターで濃縮乾固した。これを200 μ lのメタノールで再溶解し、その20 μ lをHPLCに注入し測定した。分析用のポンプにはBIP-I pump (日本分光工業) を、インジェクターには7725 Injector (島津製作所)、カラムにはInertsil ODS (5 μ m particle size 250 \times 4.6mm i.d.; GL Science) をそれぞれ用いた。検出波長は、Ex515nm-Em555nmの条件で行い、検出器にはRF-10A分光蛍光検出器 (島津製作所) を用いた。展開溶媒は、アセトニトリル: 0.1M NaCl溶液=3:1を用いた。なお溶出量は、1ml/minとした。

4) CP測定法

試料をテフロンホモジナイザーに1gずつ正確に秤量し、50mM Tris-HCl (1mM EDTAを含む) を、20ml加えホモジネートを作成し、4°C、10000rpmで10分間遠心分離を行った。上清を栓付試験管2本に3.5mlずつ採取し、10%トリクロロ酢酸を3.5ml加え、2500rpmで15分間遠心分離を行い、蛋白質を沈殿させ上清を除去した。一方の栓付試験管には、2N-HClのみを、もう一方には、10mM DNPHを含んだ2N-HClを5mlずつ加え、15°Cに調整した恒温槽で5~10分おきに攪拌しながら1時間反応させた。反応後、2500rpmで15分間遠心分離を行い、上清を除去した。その沈殿物に、エタノール: 酢酸エチル=1:1混合液を5ml加え洗浄し、2500rpmで15分間遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を3回繰り返して行った。沈殿した蛋白質に、8M尿素を3.5ml加え、再溶解させた。吸光度は、UV-1200分光光度計 (島津製作所) で測定した。カルボニル残基含量は360nmの吸光度より22000⁻¹のモル吸光度係数を用いて、nmol/mg proteinで算出した。protein量はPAKを使用して測定した。

5) HHE測定法

試料を三角フラスコに1gずつ正確に秤量し、試料に対して0.5%のBHTを添加した。この三角フラスコに、DNPH 2.5mMを含んだ1N-HClを20ml加え、低温(4°C)暗所で2時間反応させ、抽出と誘導化を同時に行った。反応後、試料を濾過し、3倍量のジクロロメタンを加えて、分液漏斗を用いて激しく攪拌し、HHE-DNPH誘導体を含む下層を500ml容なす型フラスコに採取した。この操作を2回繰り返した。その後、エバポレーターを用いて、濃縮乾固した。得られた残渣を2mlのクロロホルムで溶解し、あらかじめヘキサン: クロロホルム=2:1混合液3mlで洗浄したSilica Gel Disposable Extraction Columnに注入した。注入後、ヘキサン: クロロホルム=2:1混合液3mlを2回カラムに注入し、試料を展開させ、HHE-DNPH誘導体を含むバンドを分離させた。分離したバンドをクロロホルム6mlで溶解させ、溶出液を10ml容共栓付試験管に採取し、濃縮乾固した。これをメタノール500 μ lで再溶解し、HPLC用プレフィルターで濾過後、20 μ lをHPLCに注入し測定した。分析用のポンプには880-PU pump (日本分光工業) を、インジェクターには7725i Injector (島津製作所)、カラムにはUltrasphere (25cm \times 4.6mm i.d. Beckman) をそれぞれ用いた。検出波長は365nmで、検出器にはSPD-M10AVP紫外可視検出器 (島津製作所) を用いた。展開溶媒は、30mM sodium citrate/27.7mM acetate buffer (pH4.75): メタノール=35:65を用いた。なお溶出量は、1ml/minとした。この測定方法による検出限界は、0.01nmol/g以下である。HHE-DNPH誘導体のピークの同定は、その保持時間およびスパークテストにより行った。

結果

MDA, CP, HHE量の測定結果を表1に示した。図1はMDA量の変動を示したグラフである。Control, EDTA, NaCl, EDTA+NaClのすべてにおいて、MDA量は3日目まで増加し、7日目には減少した。増加の幅は、EDTA+NaCl, NaCl, Control, EDTAの順に大きかった。図2はCP量の変動を示したグラフである。Control, NaClは3日目まで増加し、7日目にはほとんど変化がなかった。EDTAは3日目まで増加し、7日目にはわずかに減少した。EDTA+NaClは3日目まで増加し、7日目には著しく減少した。図3はHHE量の変動を示したグラフである。Control, NaClは3日目まで増加し、7日目には減少した。EDTA, EDTA+NaClは7日目まで増加しつづけた。3日目までの増加の幅は、NaCl, EDTA+NaCl, Control, EDTAの順に大きく、7日目では、EDTA+NaCl, EDTA, Control, NaClの順にHHE含量が多かつ

た。
考察

この実験結果から、魚肉にEDTAを添加すると、脂質過酸化の進行を抑制することが明らかになった。これは、EDTAが魚肉中の遊離したFeイオンと錯体を形成し、Feイオンによる脂質過酸化の促進を抑制したためだと考えられる。しかし、NaClと同時にEDTAを添加しても、脂質過酸化を抑制することはできなかった。むしろ、脂質過酸化を促進させた。CP量が7日目に減少したのは、早い段階で脂質過酸化が進行し、最終産物であるMDAへ移行したためだと考えられる。EDTAの添加によって、NaClによる脂質過酸化の促進が抑制されなかったことについては、魚肉中のFeの存在量が蓄肉と比較して多いことが原因と考えることもできる。しかし、NaClのみを添加したときよりも、同時にEDTAを添加したときのほうが、脂質過酸化が促進されたことについては説明ができない。他の何らかのメカニズムが作用しているものと考えられる。今後、同様の実験を行い、検討する必要がある。

第2章ブリ貯蔵実験2

目的

第1章の実験結果を基に、魚肉の脂質過酸化におよぼすNaClおよびEDTAの影響をより明らかにするために、貯蔵温度条件を0℃よりも脂質過酸化の進行しやすい4℃にして、MDA、CP、HHE量を測定した。

実験方法

1) MDA、CP、HHE測定用試薬

測定用の試薬は、第1章で述べたものを使用した。

2) 試料

試料のブリは、第1章と同様に調整し、4℃で貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料のMDA、CP、HHE含量を0、3、7日目に測定し、それぞれの値の変動を観察、検討した。

3) MDA、CP、HHEの抽出および測定法

MDA、CP、HHEの抽出および測定は、第1章で述べた方法にしたがって測定した。

結果

MDA、CP、HHE量の測定結果を表2に示した。図4はMDA量の変動を示したグラフである。Control、EDTAは7日目までにわずかに増加した。NaCl、EDTA+NaClは3日目までにわずかに増加し、7日目には著しく増加した。図5はCP量の変動を示したグラフである。Controlは3日目までほとんど変化せず、7日目にはわずかに増加した。EDTAは3日目まで減少し、7日目には増加した。NaCl、EDTA+NaClは7日目まで増加しつづけた。図6はHHE量の変動を示したグラフである。Control、EDTA、EDTA+NaClは3日目まで増加し、7日目には減少した。NaClは7日目まで増加しつづけた。3日目までの増加の幅は、Control、EDTA+NaCl、EDTA、NaClの順に大きかった。7日目では、NaCl、EDTA+NaClの順にHHE含量が多く、Control、EDTAでは検出されなかった。

考察

この実験結果から、魚肉にNaClと同時にEDTAを添加しても、NaClによる脂質過酸化の促進は抑制されないことが明らかになった。このことは、EDTAが、遊離したFeイオンとうまく錯体を形成できなかったためだと考えられる。また、魚肉にEDTAを添加すると、CPとHHEの生成が抑制された。MDAについてはControlとの差はほとんどみられなかった。毒性の強いHHEを抑制することは、食品の安全性と重要な関わりがある。

第3章 カンパチ貯蔵実験

目的

第1章と第2章の実験結果を基に、魚肉の脂質過酸化におよぼすNaClおよびEDTAの影響を明らかにするために、試料にカンパチを用いて、貯蔵温度条件を0℃にし、MDA、CP、HHE量を測定した。

実験方法

1) MDA, CP, HHE測定用試薬

測定用の試薬は、第1章で述べたものを使用した。

2) 試料

試料にはカンパチを用いて、第1章と同様に調整し、0°Cで貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料のMDA, CP, HHE含量を0, 3, 7日目に測定し、それぞれの値の変動を観察、検討した。

3) MDA, CP, HHEの抽出および測定法

MDA, CP, HHEの抽出および測定は、第1章で述べた方法にしたがって測定した。

結果

MDA, CP, HHE量の測定結果を表3に示した。図7はMDA量を示したグラフである。Control, EDTA, NaCl, EDTA+NaClのすべてにおいて、7日目まで増加しつづけた。3日目までの増加の幅は、EDTA+NaCl, NaCl, Control, EDTAの順に大きく、特にEDTA+NaClで著しく増加した。7日目ではEDTA+NaClが特に多く、ついで、EDTA, NaCl, Controlの順にMDA含量が多かった。図8はCP量の変動を示したグラフである。Control, NaClは3日目までほとんど変化せず、7日目に減少した。EDTAは3日目まで減少し、7日目に増加した。EDTA+NaClは7日目まで著しく増加しつづけた。図9はHHE量の変動を示したグラフである。Controlは3日目まで増加し、7日目にはほとんど変化しなかった。EDTAは3日目まで減少し、7日目には増加した。NaClは3日目まで増加し、7日目にはほとんど変化しなかった。EDTA+NaClは7日目まで著しく増加しつづけた。増加の幅は、EDTA+NaClが特に大きく、ついで、NaCl, Control, EDTAの順に大きかった。

考察

この実験の結果から、NaClとEDTAを同時に添加すると、魚肉の脂質過酸化を促進することが明らかになった。MDA, CP, HHE量のすべてが著しく増加しており、NaClとEDTAの相乗効果によるものと考えられる。このメカニズムについては、今後も、様々な条件下で実験を行い、検討し、解明する必要がある。EDTAのみを添加した場合は、3日目までは脂質過酸化を抑制しているが、7日目には増加している。これは、脂質過酸化を抑制するというよりも、脂質過酸化の進行速度を遅くする効果があると考えられる。

第4章 総合考察

魚肉にEDTAを添加すると、脂質過酸化の進行速度を遅くする傾向があることが明らかになった。これは、魚肉中に自然に遊離したFeイオンとEDTAが錯体を形成し、Feイオンによる脂質過酸化促進を抑制したためだと考えられる。また、魚肉にNaClとEDTAを同時に添加すると、NaClのみを添加した場合よりも、脂質過酸化を促進することが明らかになった。Kanner *et al.*は七面鳥の筋肉組織を用いた実験を行い、その実験結果では、EDTAによって、NaClの脂質過酸化促進作用が抑制されている。脂質過酸化を促進すると考えられるNaClによりタンパク質から遊離させられたFeイオンが、EDTAと錯体を形成することにより、脂質過酸化が抑制されるとKanner *et al.*は考えている。しかし、本実験の結果では、EDTAによって、逆に、NaClによる脂質過酸化が促進されており、このメカニズムでは説明できない。魚肉中において、NaCl, Feのそれぞれに脂質過酸化促進作用があることは確認されており、本実験の結果からは、次のような可能性が考えられる。まずは、魚肉中のFe存在量が畜肉と比較して多く、NaClによって遊離されたFeイオンが、うまくEDTAと錯体を形成できなかったという可能性が考えられる。しかし、NaClのみを添加した場合よりも脂質過酸化が促進されたことについては説明できない。二つ目は、NaClがFeイオンを遊離させずに脂質過酸化を促進しており、EDTAの添加によって、何らかのメカニズムがはたらき、相乗効果が得られるという可能性が考えられる。今後、EDTA添加濃度を変化させたり、EDTAとFeを同時に添加したりするなどして、実際に、魚肉中でEDTAが錯体を形成するのかを確認する必要がある。

参考文献

- 1) J.Kanner, S.Harel, and R.Jaffe, *J.Agric.Food Chem.* 39, 1017-1021 (1991)

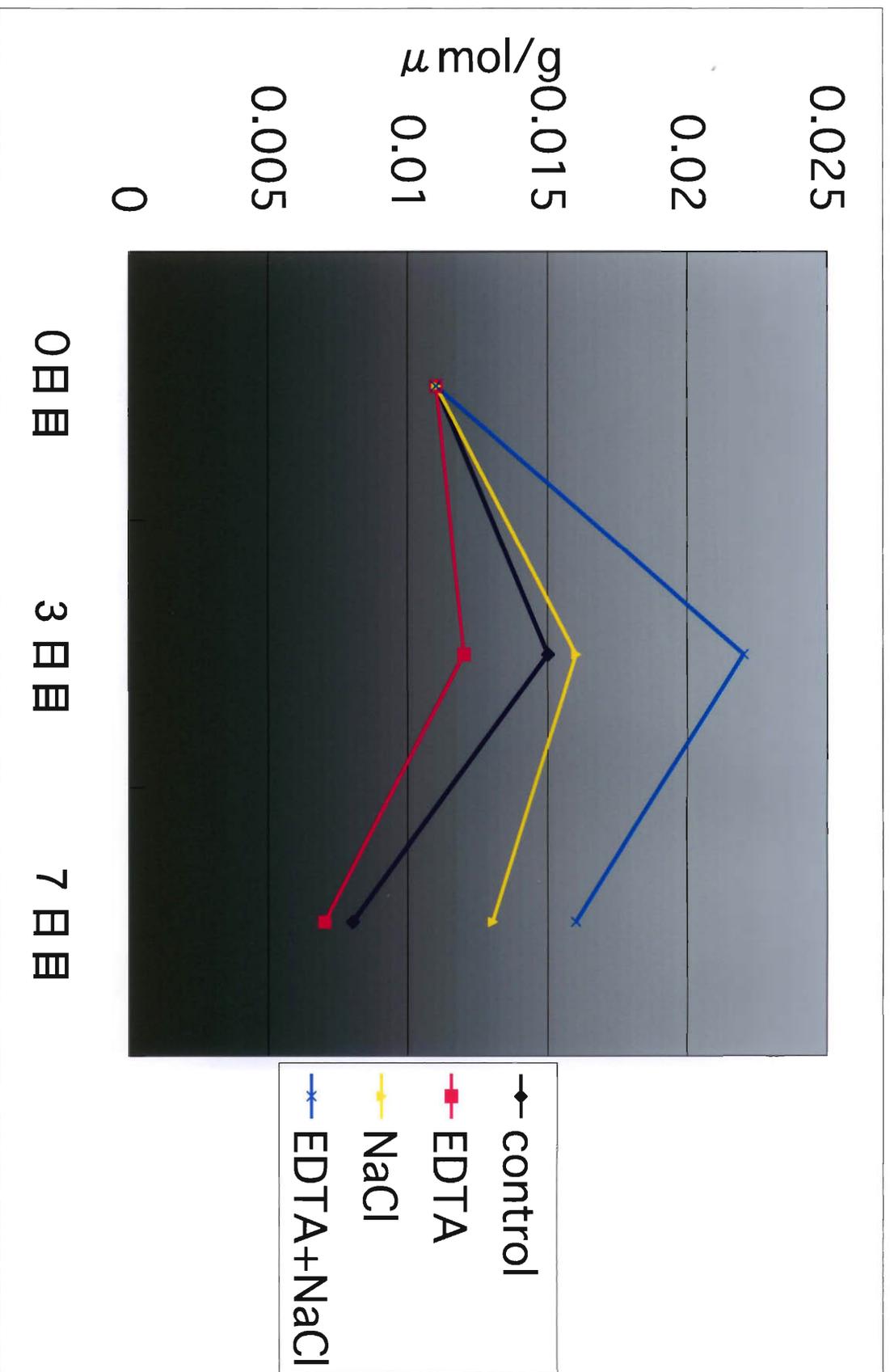
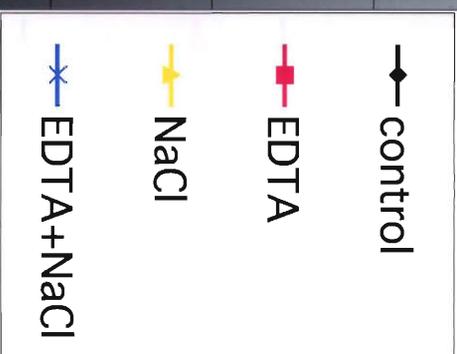
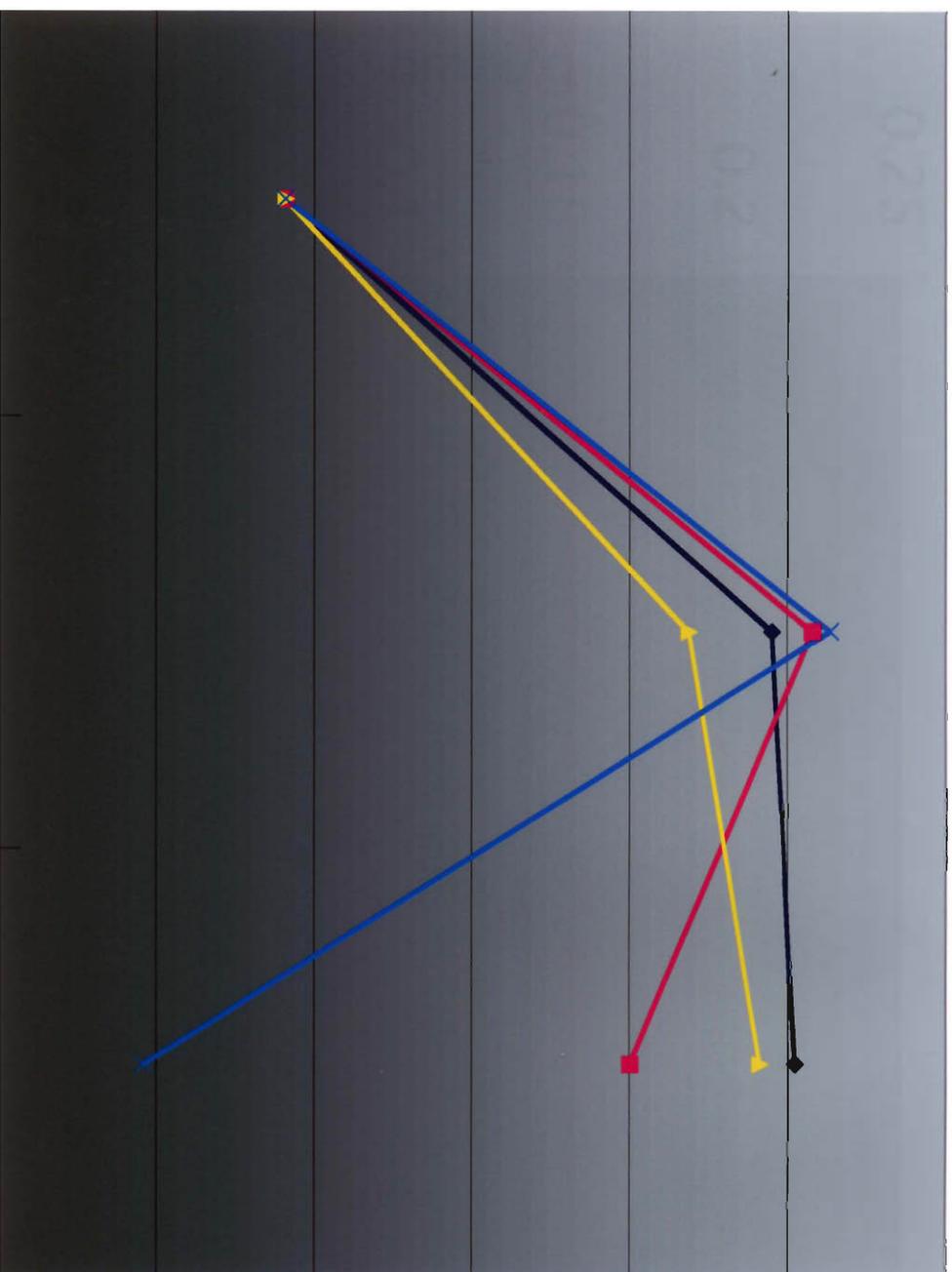


図1. 0°C貯蔵ブリー肉中のMDA量の変動



0日目

3日目

7日目

図2. 0°C貯蔵ブリス肉中のCP量の変動

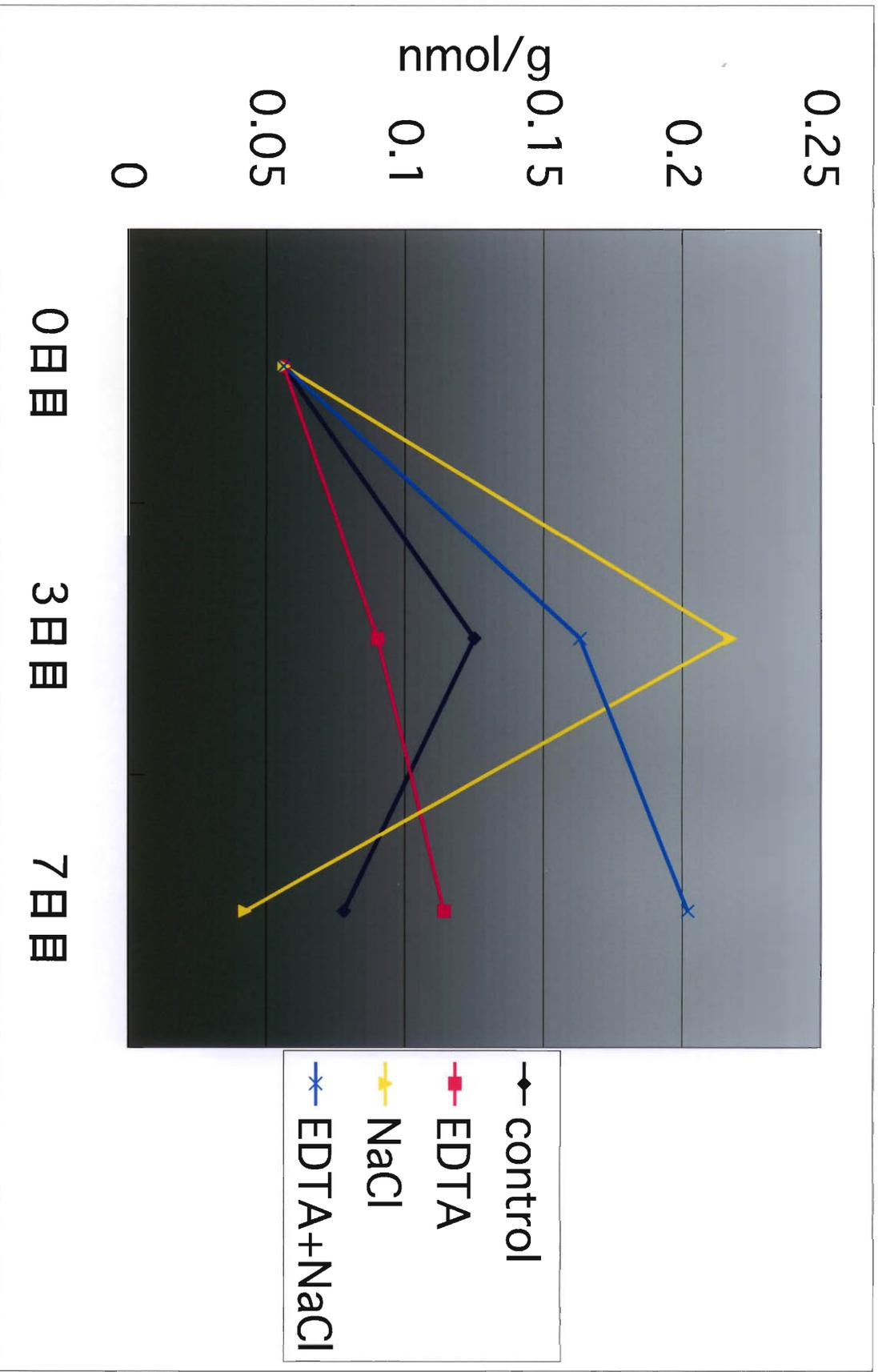


図3. 0°C貯蔵ブリス肉中のHHE量の変動

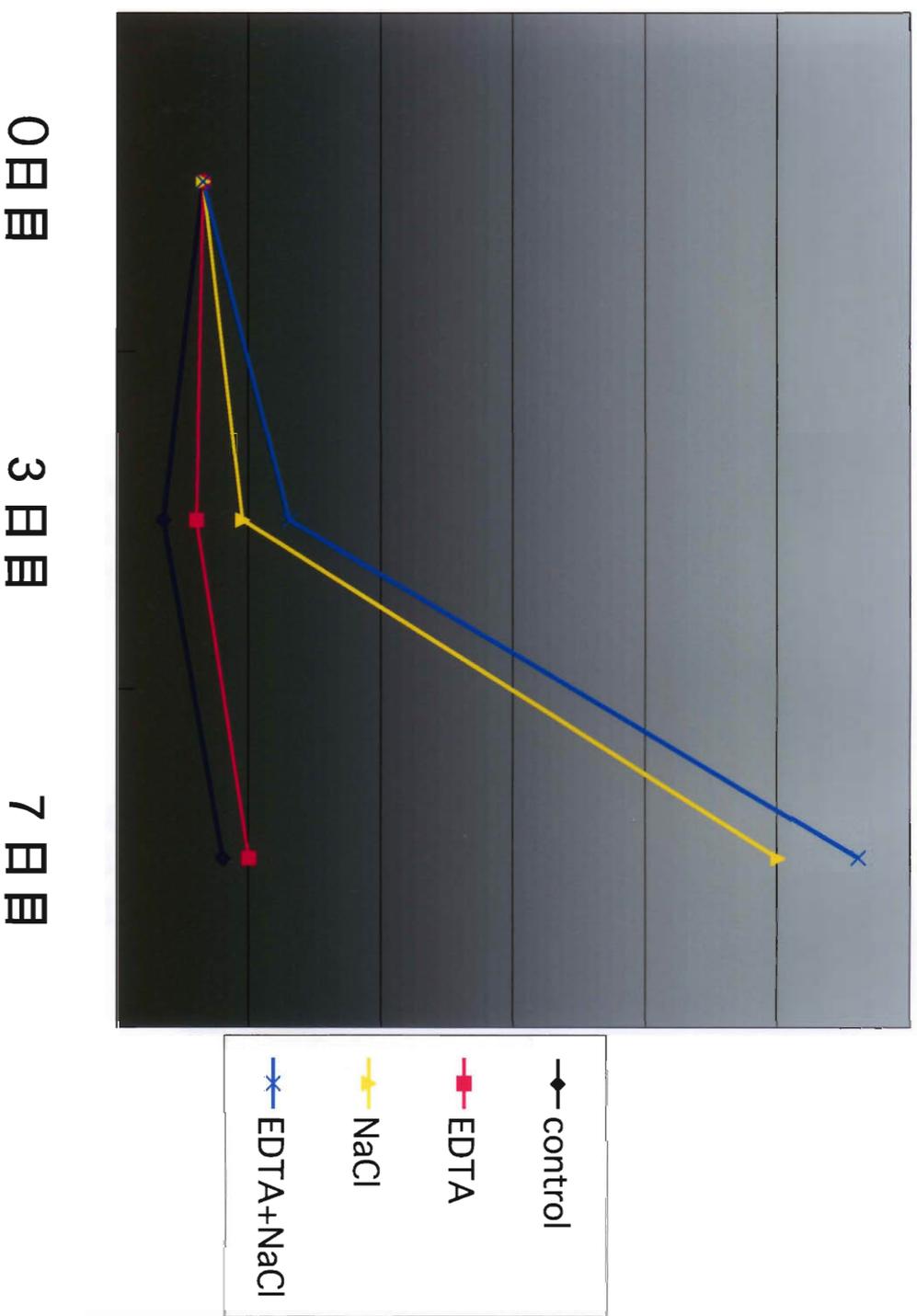


図4. 4°C貯蔵ブリー肉中のMDA量の変動

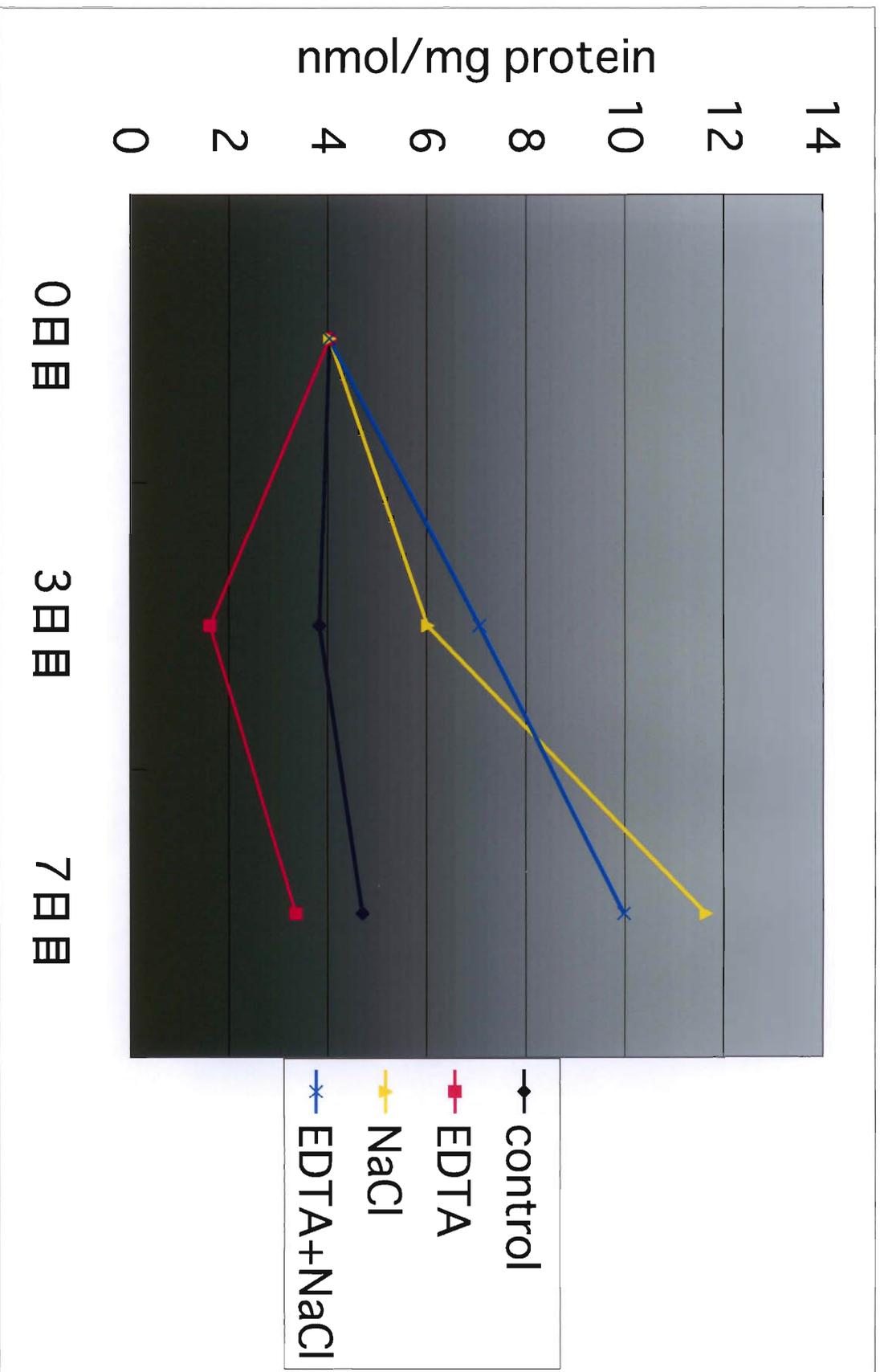


図5. 4°C貯蔵ブリー肉中のCP量の変動

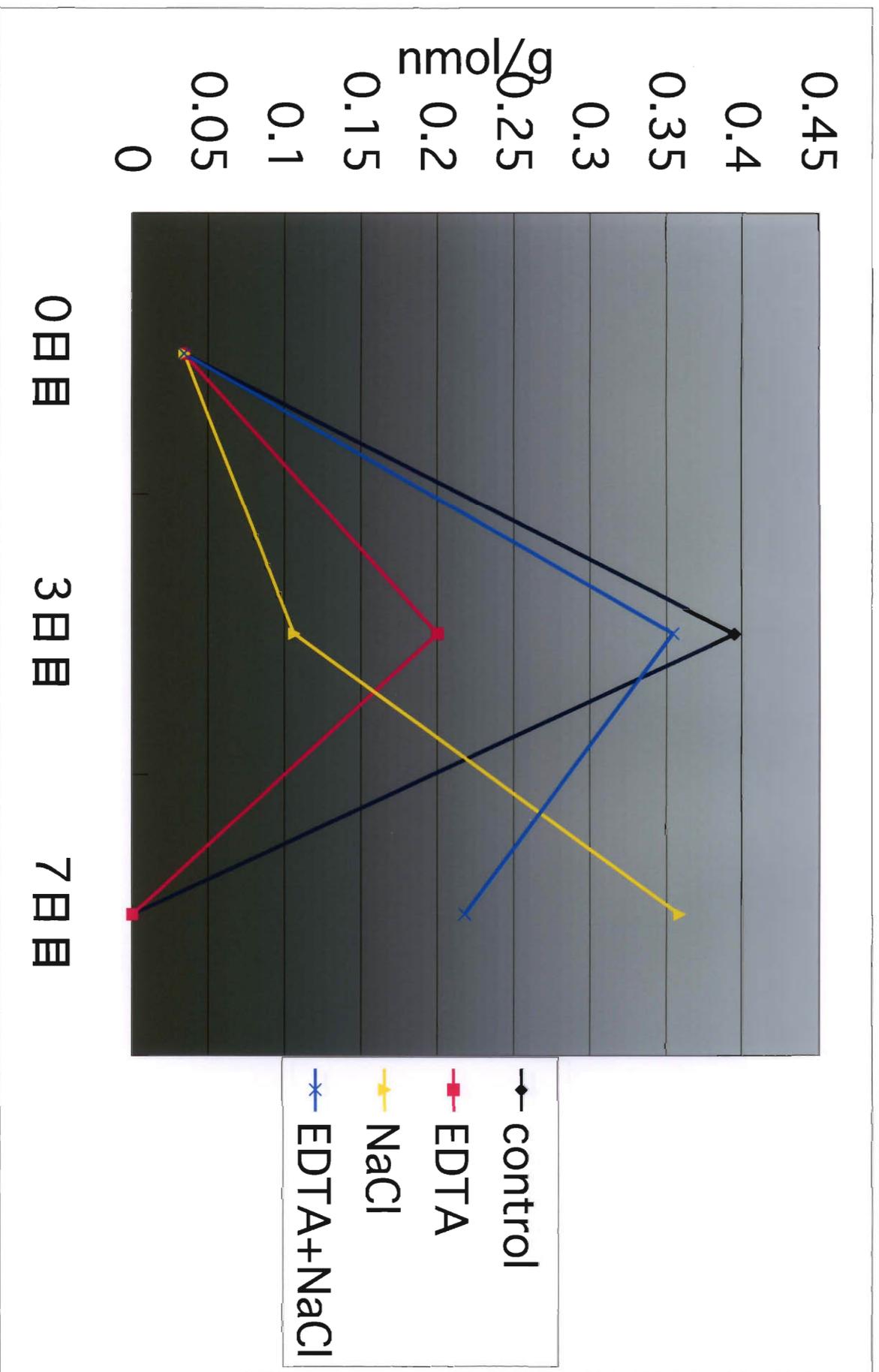


図6. 4°C貯蔵ブリー肉中のHHE量の変動

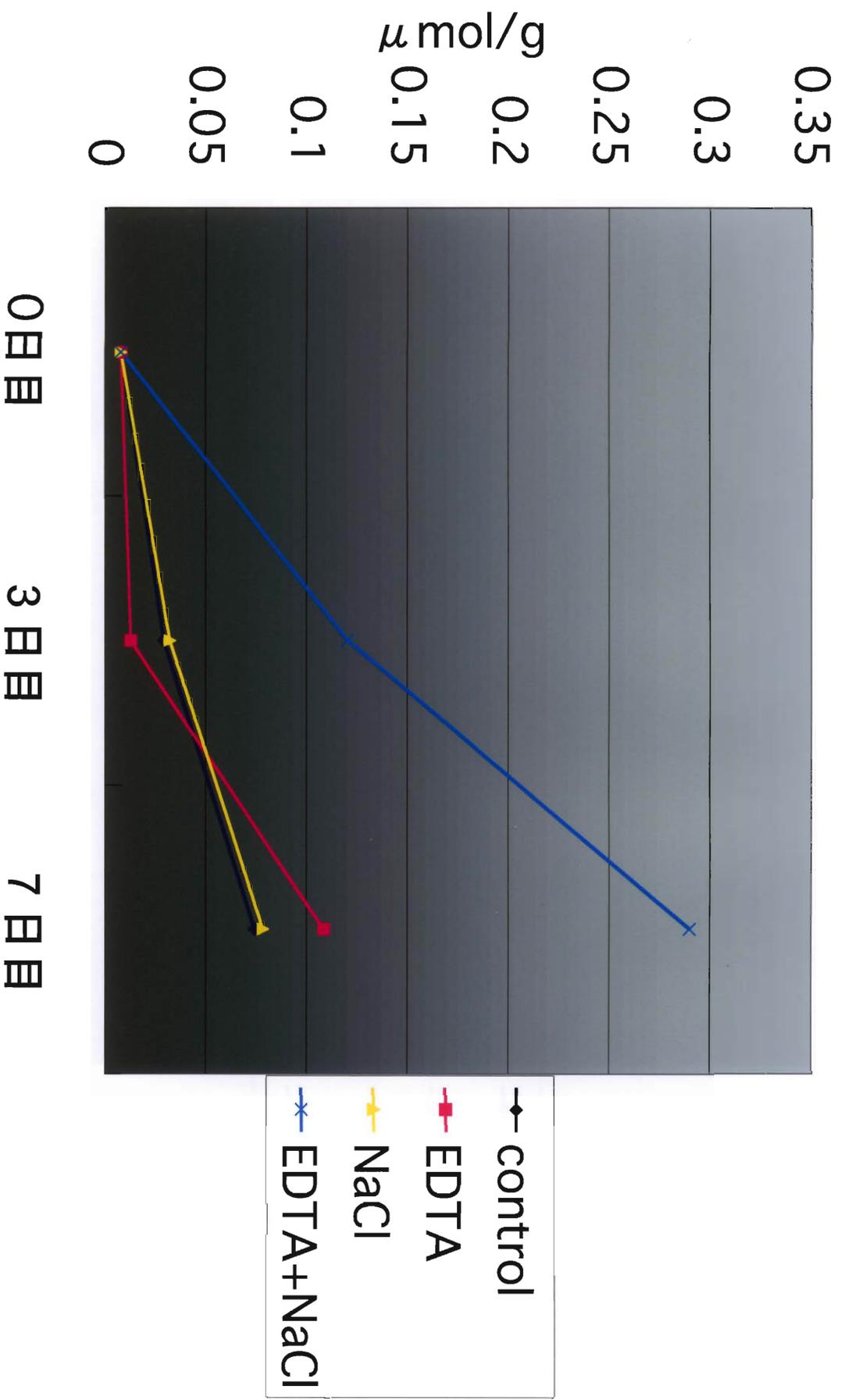


図7. 0°C貯蔵カンパチ肉中のMDA量の変動

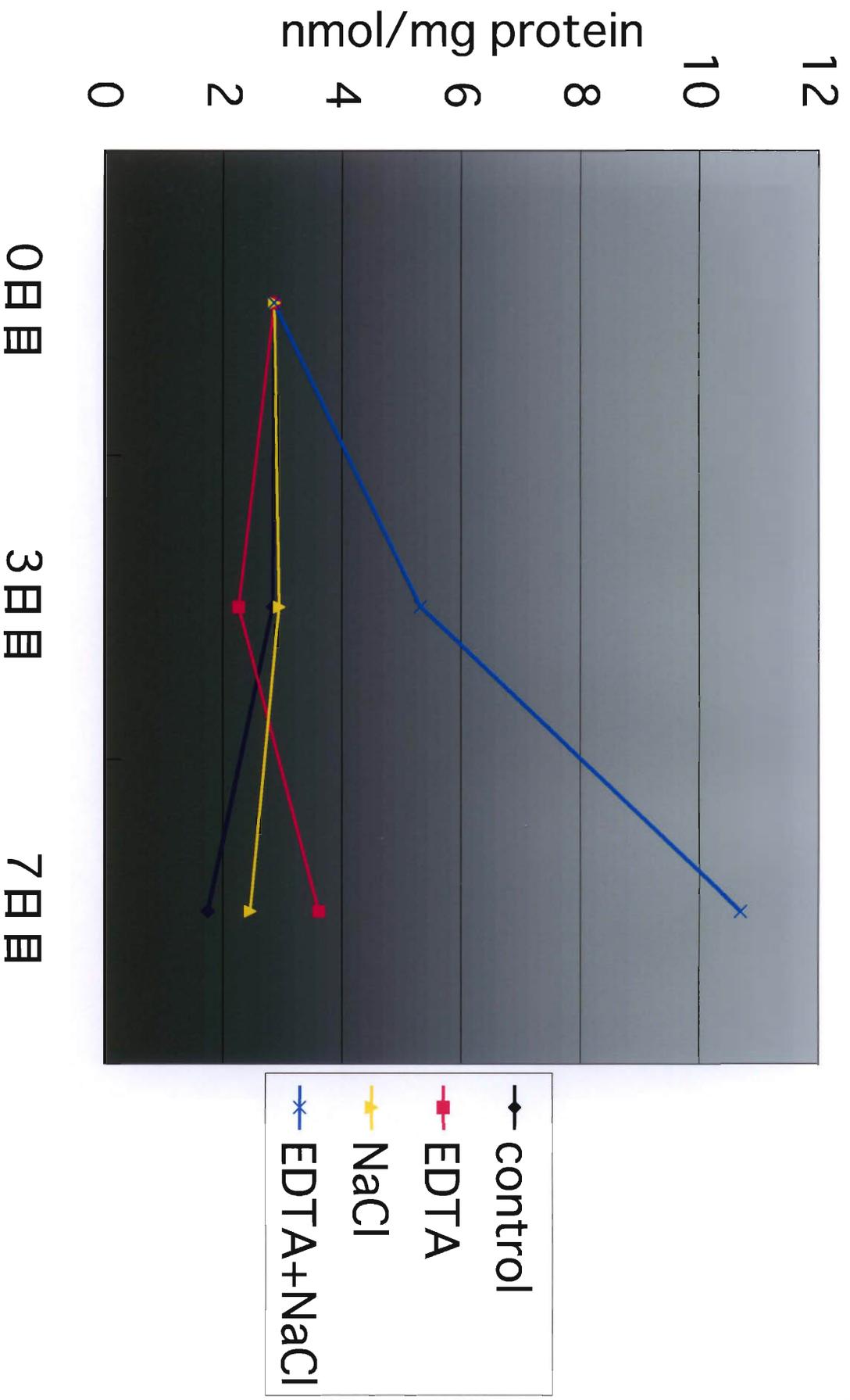


図8. 0°C貯蔵カンパチ肉中のCP量の変動

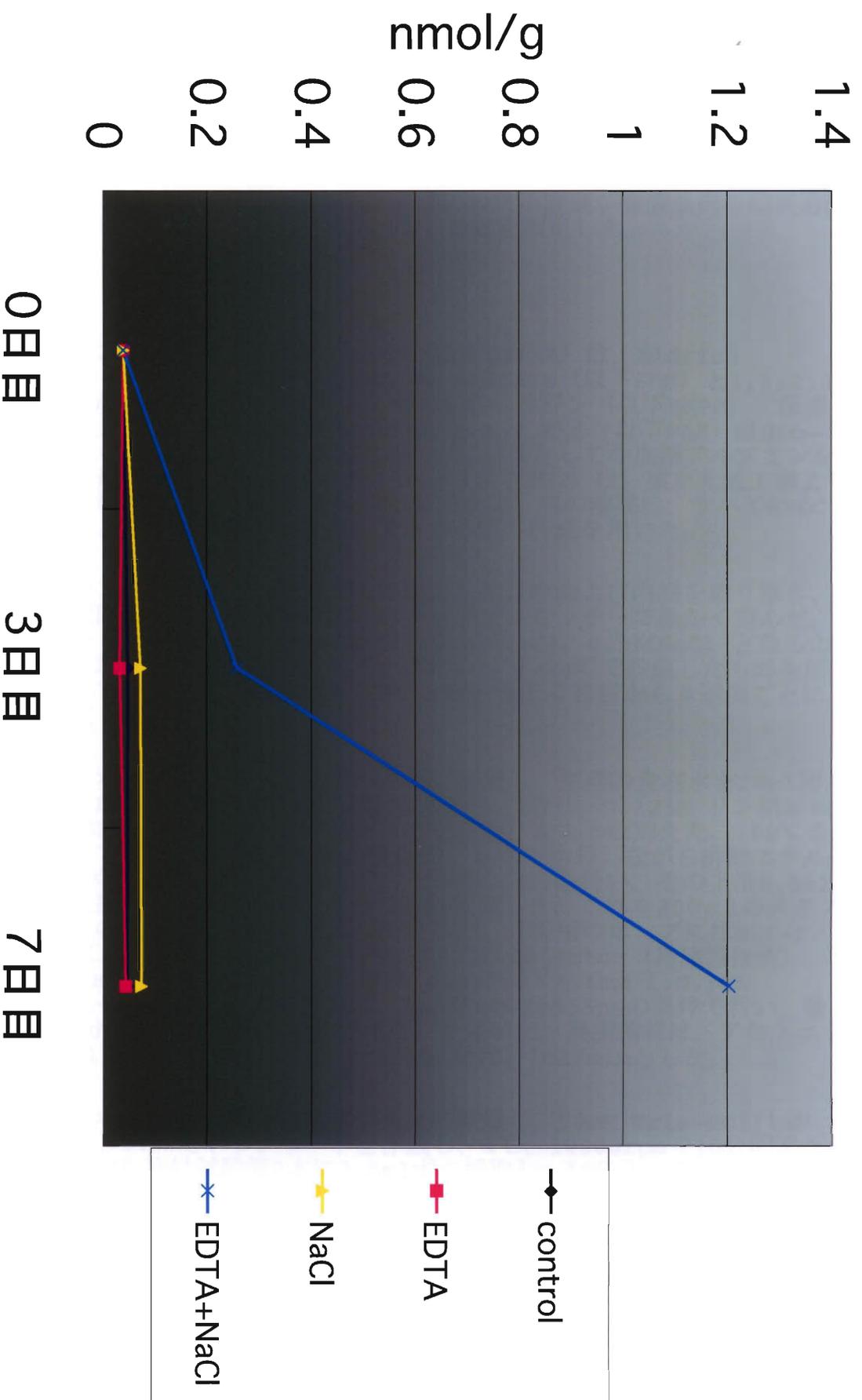


図9. 0°C貯蔵カンパチ肉中のHHE量の変動