

長期貯蔵が塩漬魚肉の脂質過酸化に与える影響

目的

以前からNaClは食品中の脂質過酸化を促進すると言われてきた。例えば、Kannerらは七面鳥の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。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にMDAが生成され、またそれは、NaCl濃度を増すことにより促進されるとある。魚肉組織においても同じ結果が確認されている。しかし、短期間における塩漬魚肉の貯蔵研究は行われてきたが、長期間における貯蔵の研究はまだ行われていない。そこでKannerらの研究や過去の研究結果を基に長期にわたる貯蔵が塩漬魚肉の脂質過酸化に与える影響を明らかにするため、MDA, CP, HHEを測定した。

実験方法

1) 試薬

1,3-Diethyl-2-thiobarbituric acid (以下DETBA) は、Aldrich Chemicalsより購入した。Sodium dodecyl sulfate (以下SDS) と1,1,3,3-tetraethoxypropane、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (以下DNPH)、尿素は和光純薬より購入した。Bio-Rad Protein Assay Kit (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。抗酸化剤 Butyl Hydroxy Toluene (以下BHT) は、東京化成工業より購入した。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、できうる限り特級を用いた。

2) 試料

試料(ブリ、カンパチ)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刻んだ。その試料を四等分し、Control、0.3MNaCl、0.6MNaCl、0.9MNaClとなるように調製した。それぞれをポリエチレンバックに入れて-20°Cで貯蔵したものを用いた。以上の条件で貯蔵した試料のMDA, CP, HHE含量を0日目から4週間ごとに32週目まで測定した。

3) MDAの測定法

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の測定法

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、1000rpm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-M10AV $\text{\textcircled{R}}$ 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

図1はMDAの変動を表したグラフである。Control区は、4週目までは変化ないが8週目で著しく増加し、12週目で著しく減少する。その後24週目まで徐々に増加しているが大きな変化はなかった。NaCl0.3M区は、8週目まで増加し、その後はControl区と同様に、12週目で著しく減少し、24週目まで徐々に増加しているものの大きい変化はなかった。NaCl0.6M区、0.9M区も0.3M区と同じ変化であった。増加の幅は、Control区に対して、0.9M区、0.6M区、0.3M区の順に大きかった。図2はCP量の変動を示したグラフである。Control区は、12週目までほとんど変化しなかったが、16週目で少し増加し、28週目で著しく増加し、32週目で著しく減少した。0.3M区は、4週目に少し増加し、8週目には減少したが、16週目まで徐々に増加していき、20週目にはまた減少し、その後Control区同様著しく28週目まで増加し、32週目で減少した。0.6M区は、4週目で増加し、その後徐々に減少するが、16週目でまた増加し、その後Control区同様28週目まで著しく増加し、32週目では著しく減少した。0.9M区は、20週目での一時的な減少は見られなかったが、0.6M区とほぼ同様な変化を示した。増加の幅は、Control区に対してMDAと同様に、Control区に対して、0.9M区、0.6M区、0.3M区の順に大きかった。図3はHHE量の変動を示したグラフである。Control区は8週目まで増加するが、その後16週目まで減少し、また24週目まで徐々に増加し、その後徐々に減少した。0.3M区は、8週目まで著しく増加するが、12週目では著しく減少し、その後は16週目で少し減少するが大きな変化は見られなかった。0.6M区も0.3M区と同様に、8週目まで著しく増加するが、12週目では著しく減少した。20週目まで少しの増加は見られたが、大きな変化は見られなかった。0.9M区も同様に、8週目まで著しく増加したが、12週目で著しく減少し、その後は大きな変化は見られなかった。増加の幅は、Control区に対してMDA、CPと同様に、Control区に対して、0.9M区、0.6M区、0.3M区の順に大きかった。

考察

以上の実験結果から、MDA、HHEが8週目まで著しく増加し、12週目で著しく減少していることから、8週目までかなりの量の脂質過酸化物を生じて、それ以後はほとんどすべて脂質過酸化されてしまったため、12週目以降の数値の変化がなかったのだと考えられる。HHEは非常に強い毒性を持った物質であり、長期貯蔵された魚肉の安全性は、かなり低いことを意味しており、品質低下に深刻な影響を与えている。CPは脂質過酸化進行度の指標とされるものである。グラフを全体的にみると、CPだけが徐々に増えているのは魚肉自体が週を追うにつれて脂質過酸化されやすくなっていると言える。28週目に一時的な高い数値の増加は説明できない。-20度の貯蔵においてさえも、脂質過酸化の影響をかなり受けていることがわかった。またMDA、HHE、CPともにControlに対して、NaCl濃度が高いほど数値が高かったことから、NaCl濃度を増すことにより脂質過酸化が促進されることが言える。NaClが脂質過酸化を生成するメカニズムは、まだ解明されていないが、Kannerらの実験結果によると、NaClが蛋白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、これが触媒となり、ラジカルを生成するとある。

冷凍保存が技術が発達している現在において、食肉などを冷凍で長期保存する機会は多い。今回は魚肉を用いた実験だったが、畜肉などについても同じことが言えると思う。実験結果から明らかになったように、魚肉の長期的な貯蔵は酸化を受けやすい状態であり、常に酸化の影響を受けて、HHEなどの毒性の強い物質が生成される危険を伴っている。しかも、冷凍食品には、NaClが多く含まれているものが多い。NaClは脂質過酸化にかなりの影響を与えており、これは冷凍食品の安全性を考える

上で非常に重要な問題である。

今回は3 2週間で4週おきに測定を行ったが、貯蔵する期間を短くし、測定する期間も2週間ごとなどにし実験を行い、塩漬魚肉の脂質過酸化に与える影響を明らかにする必要があるし、その脂質過酸化を抑制する貯蔵の方法などを解明する必要があると思う。

参考文献

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

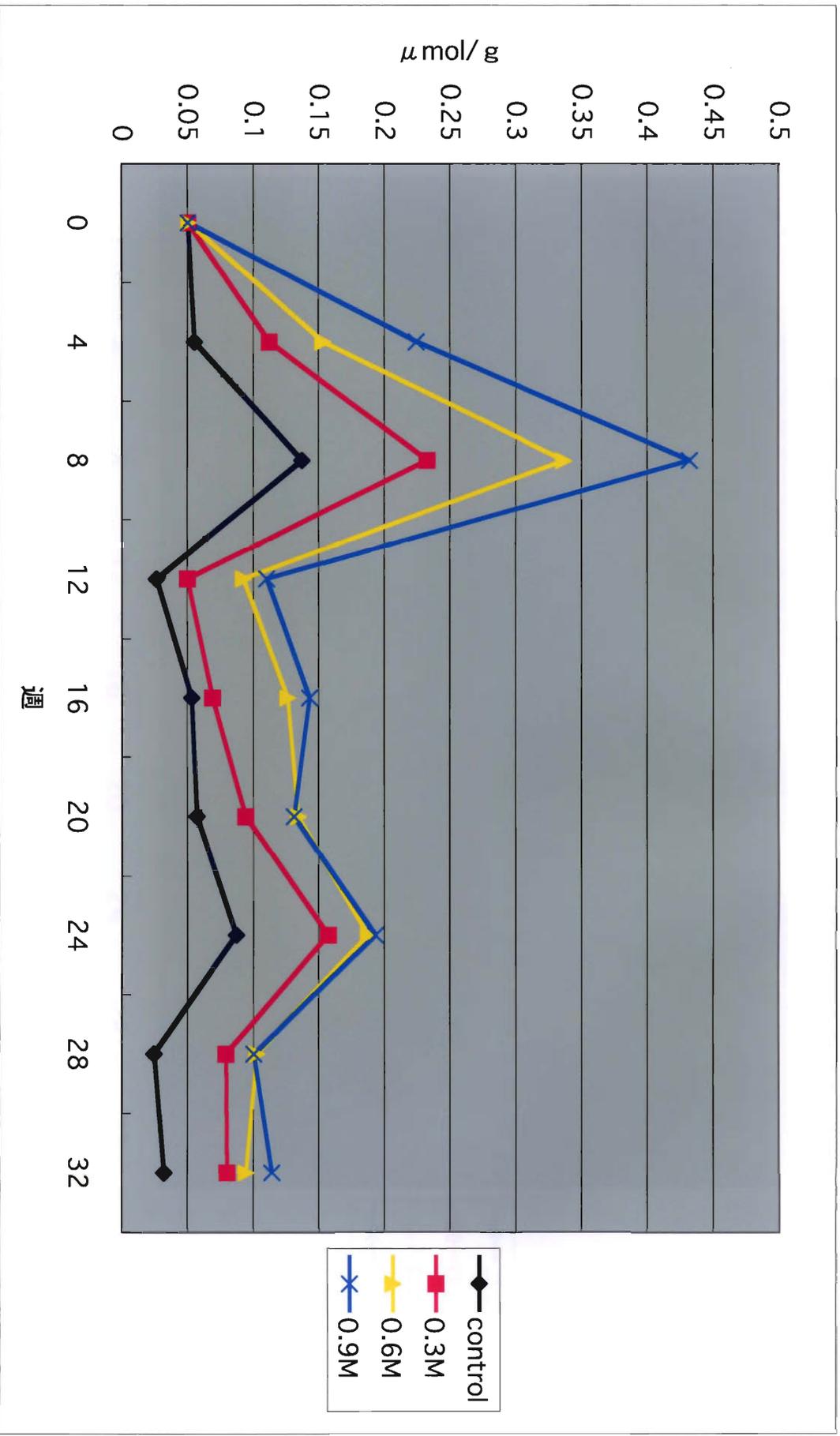


図 1. 3 2 週間 塩漬魚肉中のMDAの変動

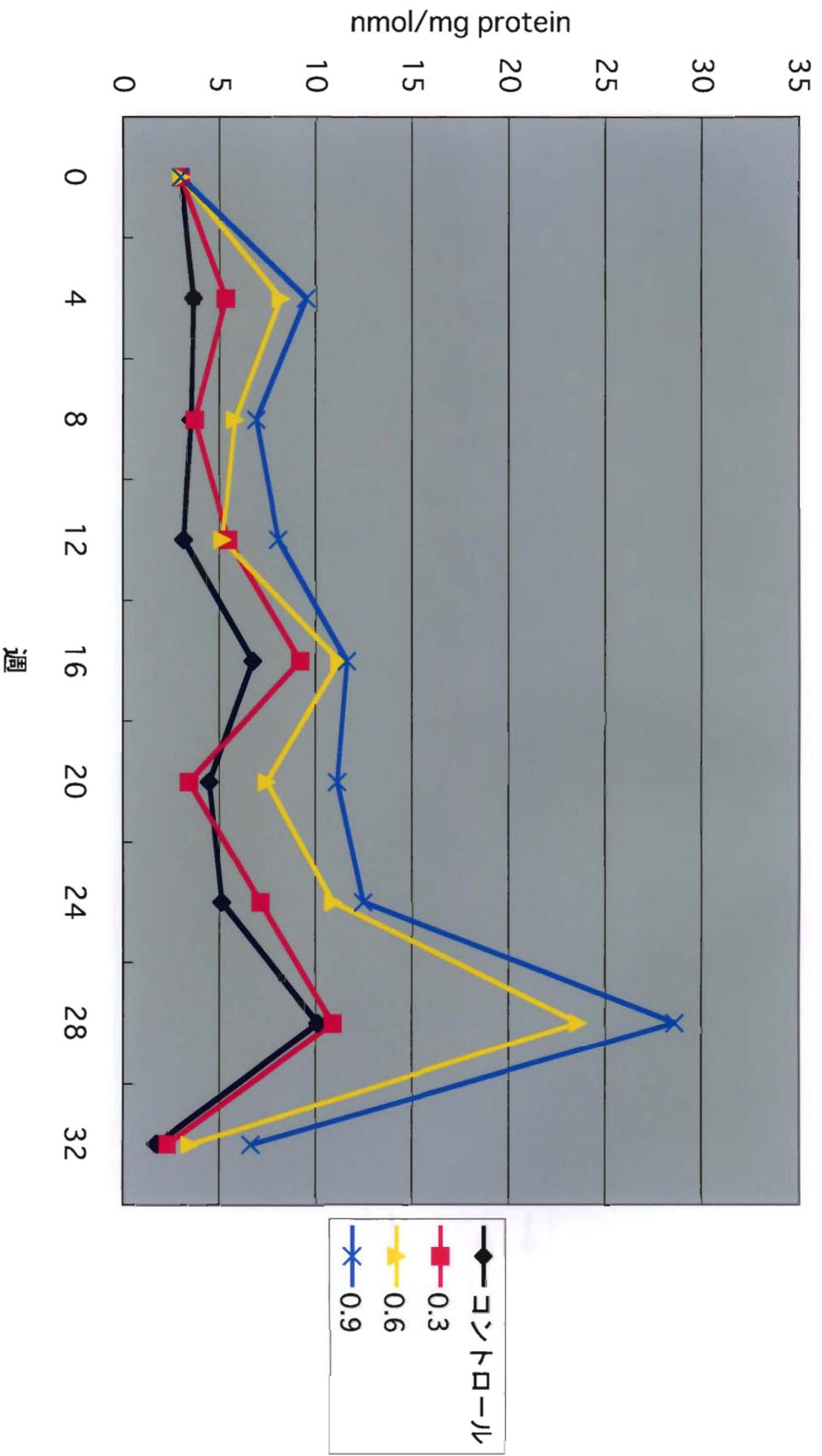


図 2. 3 2 週間 塩漬魚肉中の CP の変動

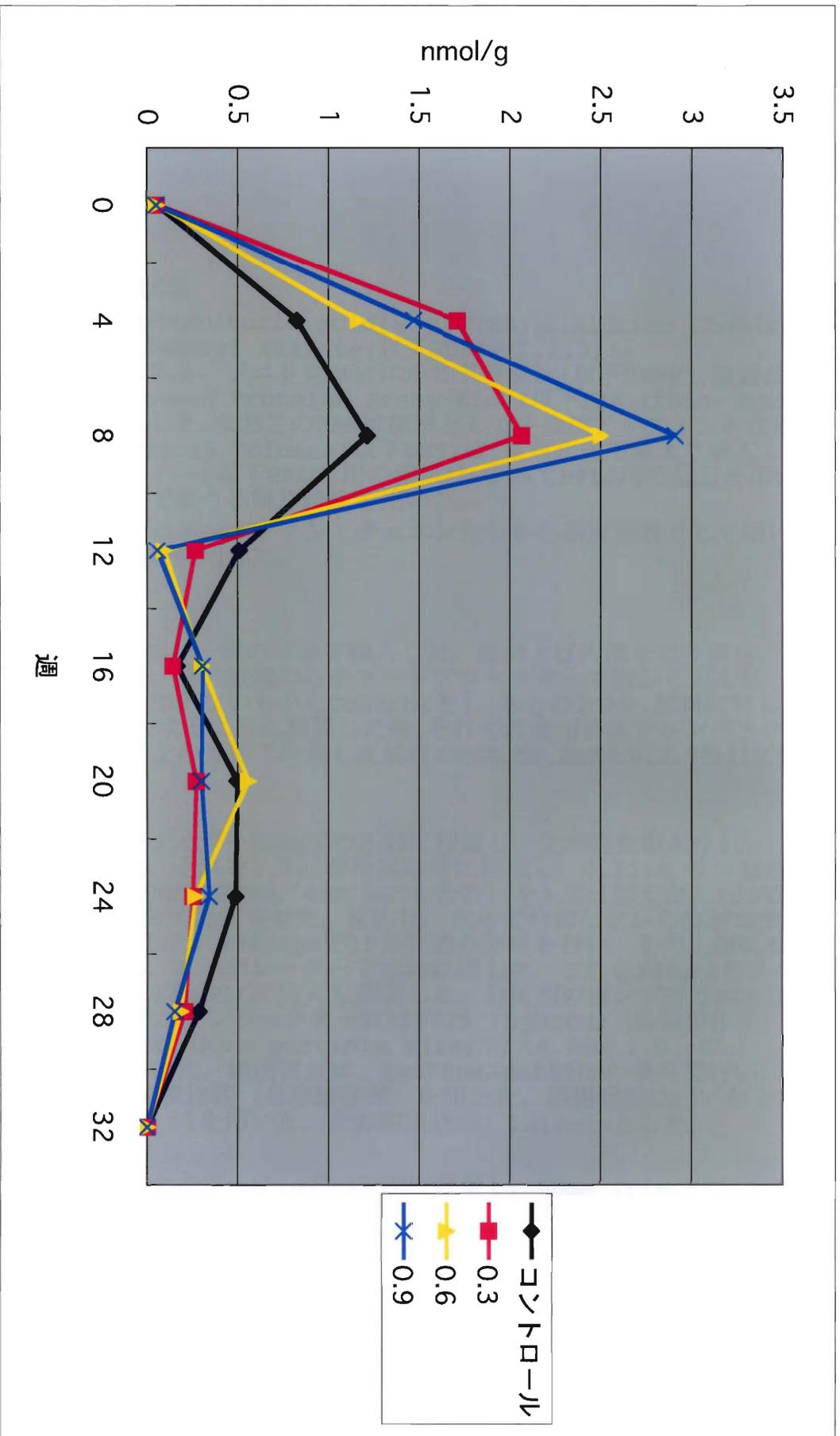


図 3. 3 2 週間 塩漬魚肉中のHHEの変動