

魚肉の脂質過酸化に及ぼす燻液添加の影響

第1章 燻液添加実験1回目

目的

魚肉の脂質過酸化におよぼす燻液の影響を明らかにするため、MDA、HHE、CPを測定する。

実験方法

1) 試薬

(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。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、できる限り特級を用いた。

燻液は日本女子大学、グエン・ヴァン・チュエン先生から研究燻液として頂いた萬有栄養株式会社の燻液を使用した。

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。その試料を三等分し、何も加えないものをControlとし、あとの2つを、試料に対し、燻液濃度が0.1%、0.5%となるように調製した後、それぞれをポリエチレンバックに入れて4°Cで貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料のMDA、CP、HHEを0、3、7日目に測定した。

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、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℃)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1-1は、MDA量の測定を行った結果である。Controlは3日目までゆるやかに増加し、7日目まで増加した。0.1%は、3日目までゆるやかに減少し、7日目まで増加した。3日目の段階では0.5%がControlを上回ったが、7日目には、Control、0.5%、0.1%の順に値が大きかった。図1-2はCP量の測定を行った結果である。Controlは7日目まで、ゆるやかに減少を続け、0.1%は3日目まで減少、7日目までは増加した。0.5%は、3日目までに著しく減少し、7日目までに増加、最終的には、他の2つと同じ位の値になった。図1-3はHHE含量の測定を行った結果である。Control、0.1%、0.5%とも3日目まで増加し、7日目までにControlは減少、0.1%はゆるやかに増加し、0.5%は著しく増加した。

考察

MDA測定実験7日目の結果から、魚肉への燻液添加は、脂質過酸化の抑制に何らかの影響をおよぼすと考えられるが、燻液の濃度差に比例する効果は見られなかった。

HHEの測定結果についても、7日目になると、HHEが大量に検出されているので食品の安全性上、非常に重要な問題と考えられる。

第2章 燻液添加実験2回目

目的

第1章の結果を基に、新たに燻液を1.0%添加する試料を加え、魚肉の脂質過酸化に及ぼす燻液の影響を明かにする。

実験方法

1) 試薬

試薬は、第1章で述べた試薬を使用した。

2) 試料

試料(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、何も加えないものをControlとし、あとの3つを、試料に対し、燻液濃度が0.1%、0.5%、1.0%となるように調製した後、それぞれをポリエチレンバックに入れて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日目に測定した。

3) MDA、CP、HHEの測定法

MDA、CP、HHE含量の測定は、第1章で述べた方法にしたがって行った。

結果

図2-1はMDA量の測定を行った結果である。実験時のミスで、3日目のControlの結果が得られていないが、0.1%、0.5%、1.0%とも、3日目まで減少し、7日目までは増加した。7日目は、Control、1.0%、0.1%、0.5%の順に値が大きかった。

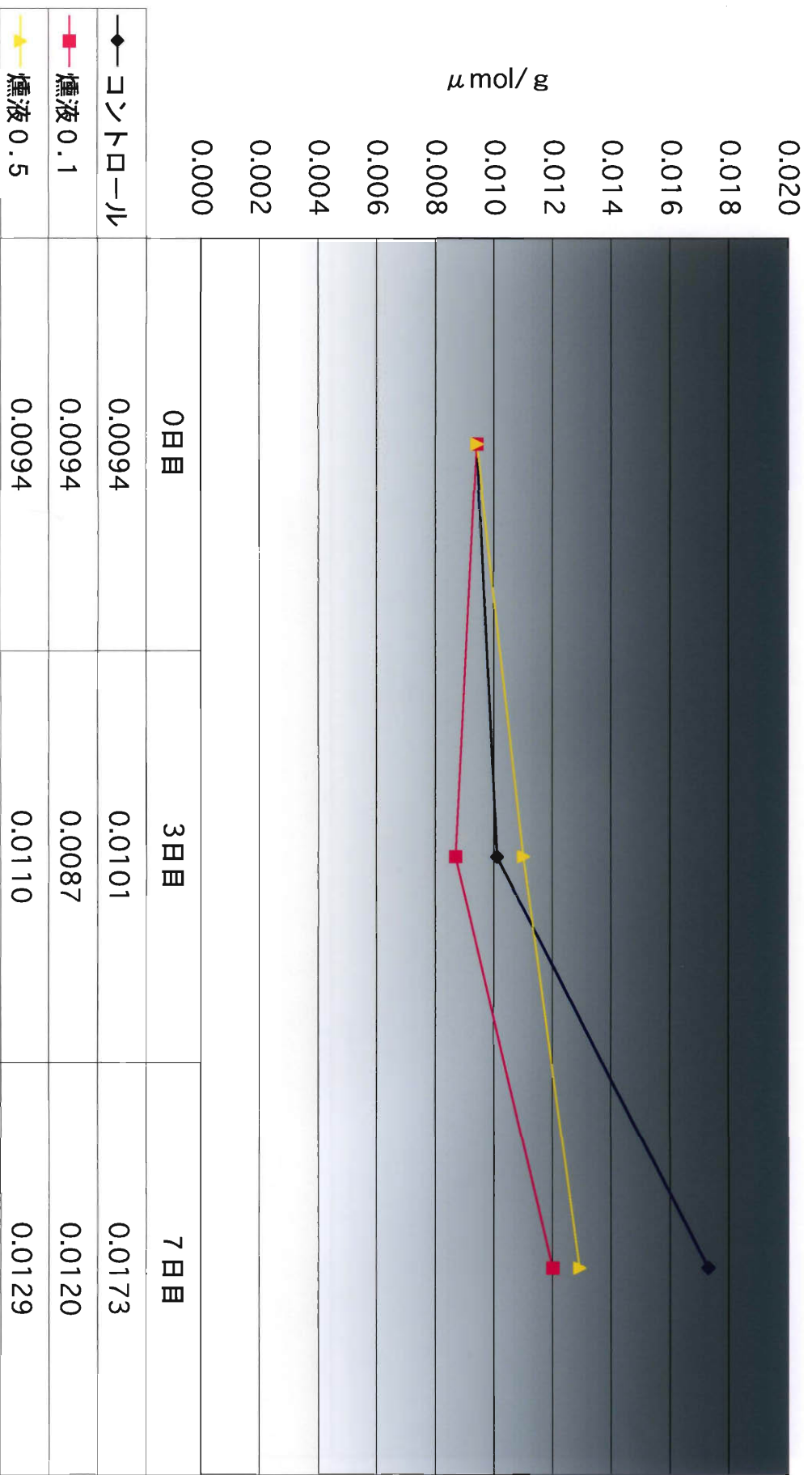


図1-1 燻液1回目 MDA

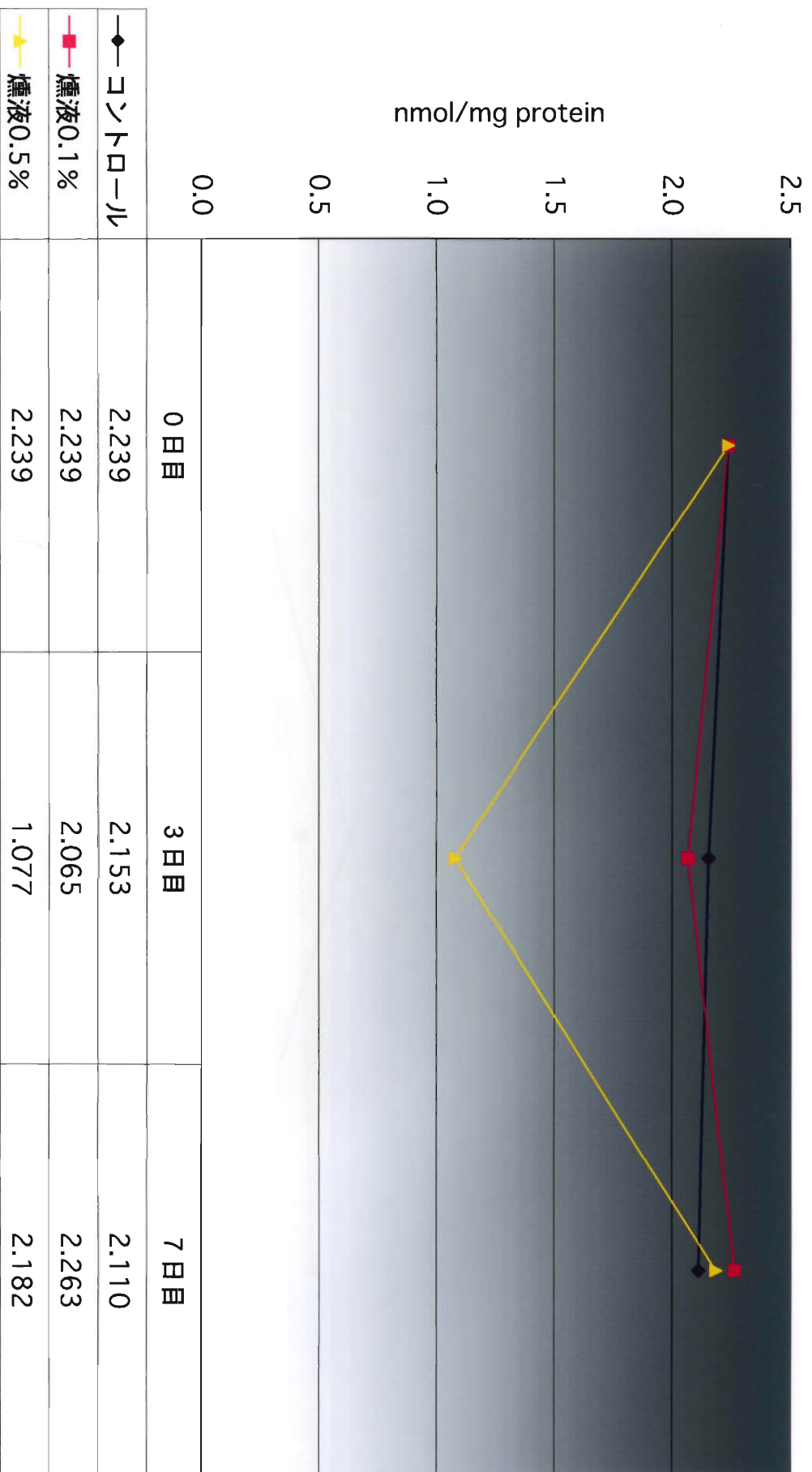


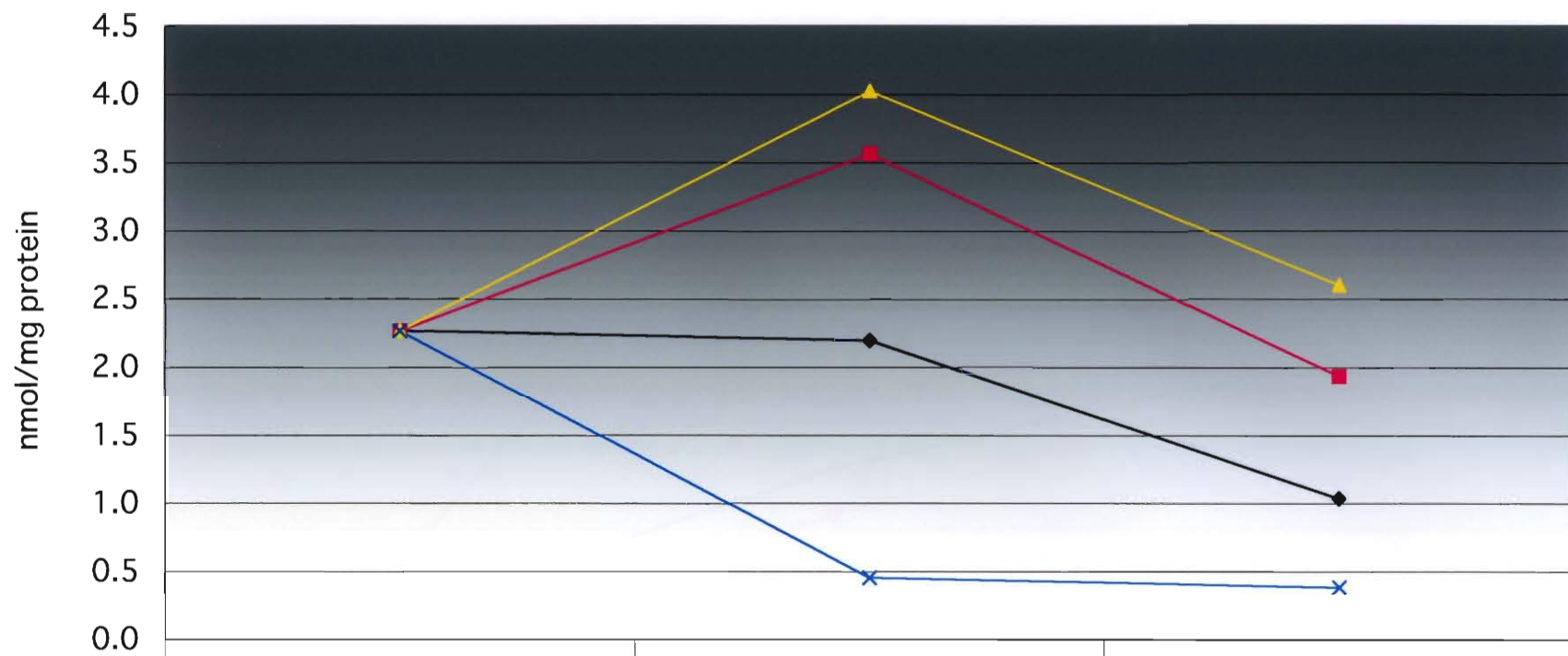
図1-2 燻液1回目 CP



図1-3 燻液1回目 HHE



図2-1 燻液2回目 MDA



	0日目	3日目	7日目
—◆— コントロール	2.27	2.196	1.035
—■— 燻液0.1%	2.27	3.561	1.934
—▲— 燻液0.5%	2.27	4.023	2.601
—×— 燻液1.0%	2.27	0.457	0.387

図2-2 燻液2回目 CP

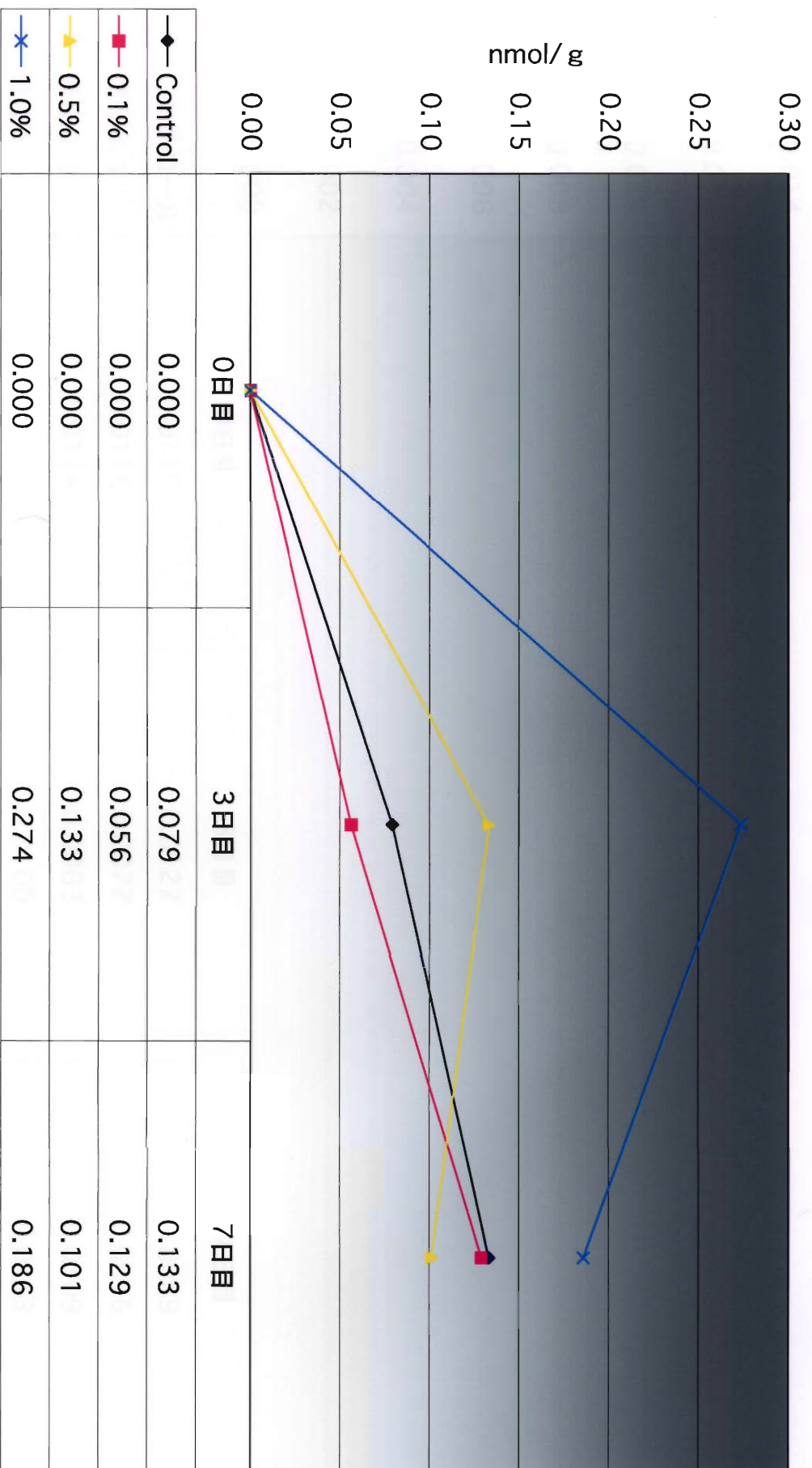


図2-3 燻液2回目 HHE

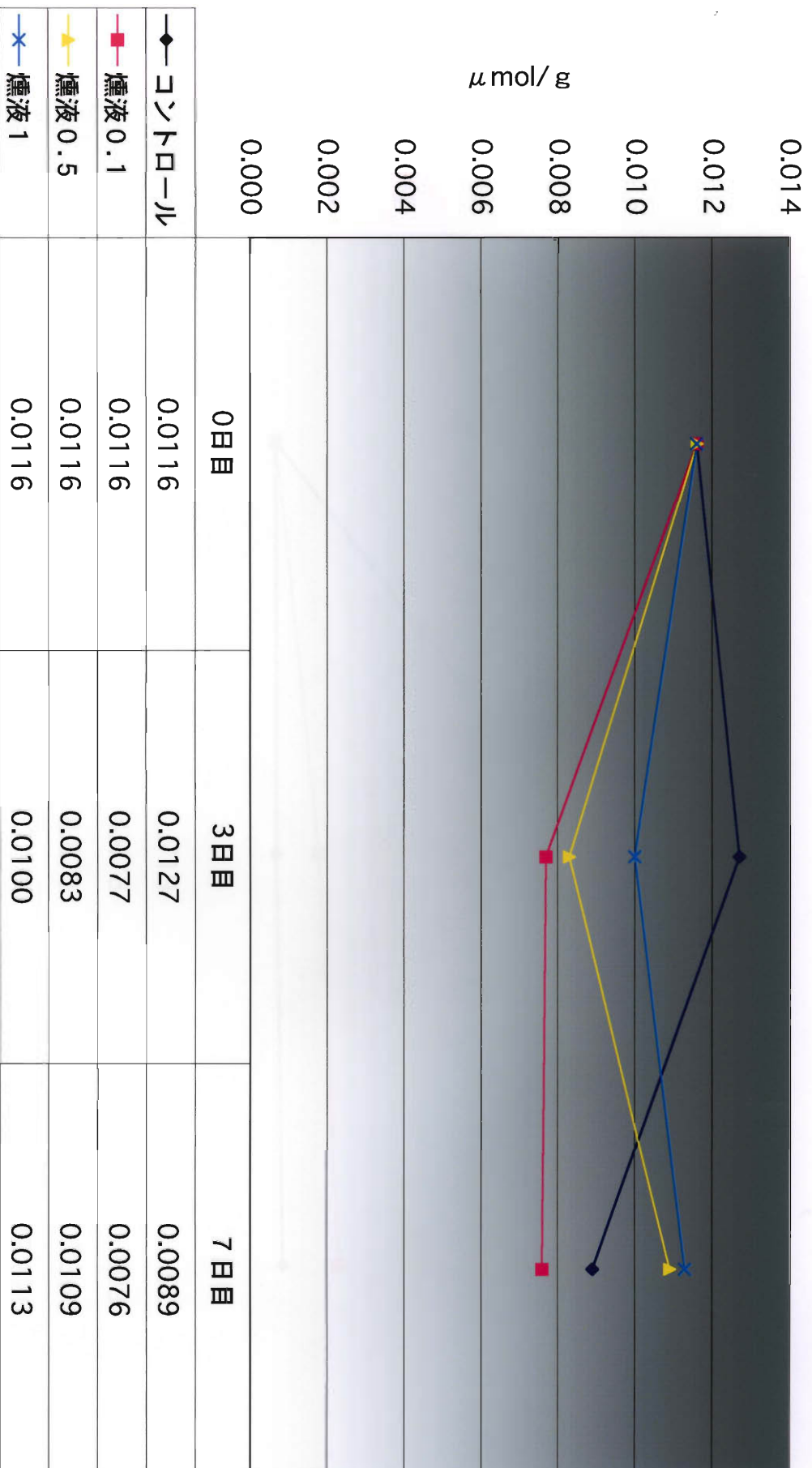


図3-1 燻液 3回目 MDA

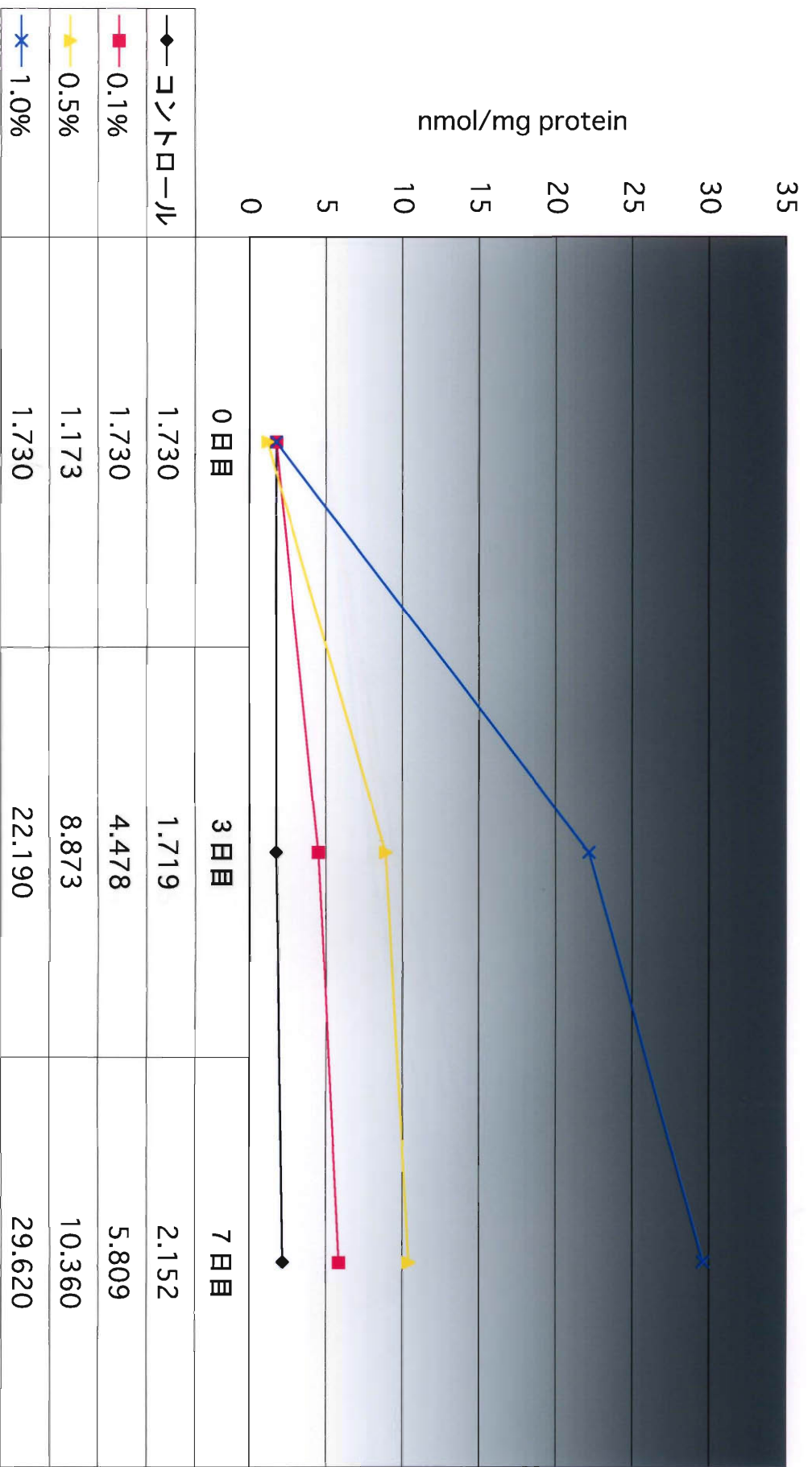


図3-2 燻液 3回目 CP



図4-1 燻液4回目 MDA

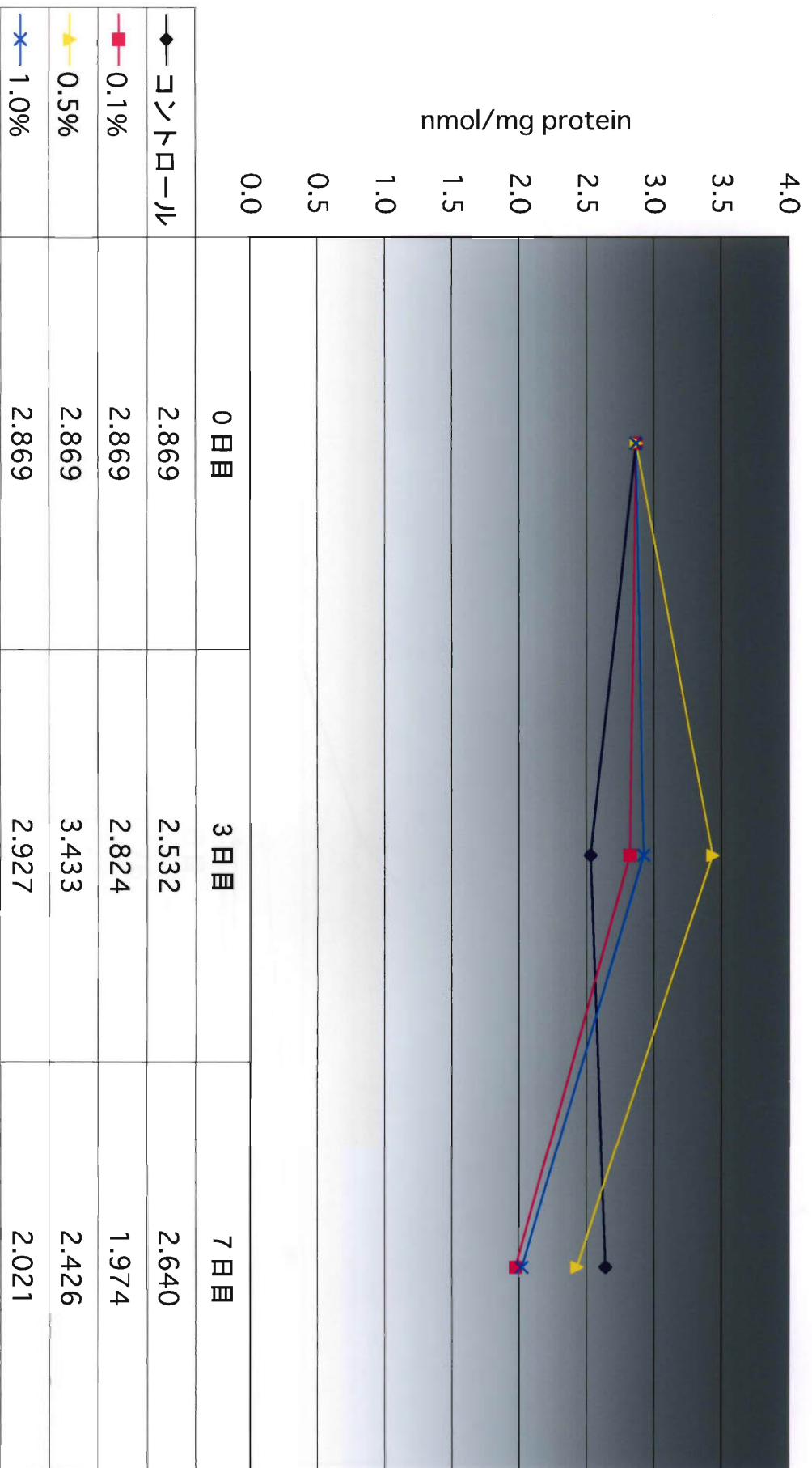


図4-2 燻液4回目 CP

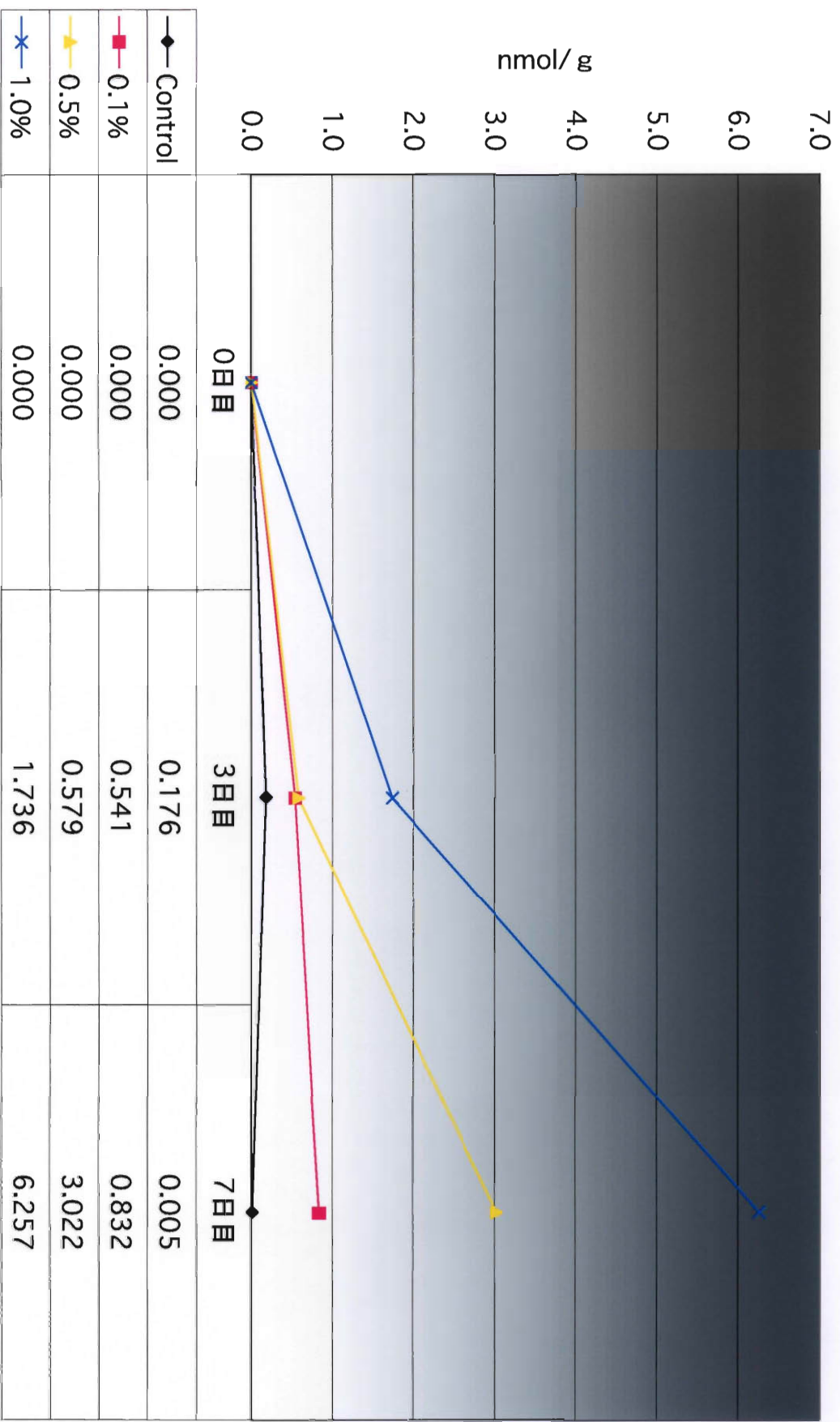


図4-3 燻液4回目 HHE