

論文内容要旨

水産食品に含まれる脂質は高度不飽和脂肪酸に富んでいる。これらの脂肪酸は成人病予防等に優れた生理効果が期待され、多くの注目を集めている反面、極めて酸化しやすく植物油の主要構成不飽和脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸の酸化機構が詳細に解明されているのに比較して、その酸化機構の詳細、とくに酸化速度などについては不明のままである。水産食品の加工および貯蔵中の酸化による劣化は魚臭発生などのおいしさの劣化にとどまらず色や味の変化、酸化油脂の毒性やさらにはたんぱく質などの他の栄養成分の損傷など大きな問題となっている。一般に不飽和脂質の酸化は hydroperoxide (HPO) を第一次生成物とするフリーラジカル連鎖反応と考えられており、反応が進むにつれて種々の二次生成物が生ずることが知られている。しかし、水産食品においては高度不飽和酸が多く含まれ、たんぱく質をはじめ他の諸成分が共存するため、HPOの分解が促進されることが予想されるがその詳細な機構は不明である。水産食品の酸化的劣化の指標としては過酸化物質価やチオバルビツール酸 (TBA) 値が広く用いられているが、これらがどれだけ劣化を正確に反映しているかについても疑問がある。

食品中で脂質酸化を促進する物質としては無機遷移金属、ヘム色素蛋白質がよく知られているが、未加熱のものでは lipoxygenase (LOX) が豆類をはじめとする植物特有の酸化促進物質といわれてきた。しかし、最近では動物組織中にも LOX の存在が明らかになり、とくにロイコトリエンなどエイコサノイド代謝において重要な生理機能を持っていることが明らかになってきた。

そこで、本研究では水産食品の脂質変化機構の解明を目的とし、まず水産物脂質に特有の高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA, 正式にはイコサペンタエン酸であるが、本論では慣用名を使用する) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) を脂質のモデルとし、酸化速度および酸化生成物の pattern を明らかにした。ついで魚肉モデル系として EPA を添加した脱脂マイワシの各組織での酸化の様子を観察したところ、とくに皮に酸化促進因子が存在することが明らかになったので、この酸化促進因子の分別精製を行い、酵素が酸化に関与しているか否かを検討した。また、魚粉中での酸化反応に伴う劣化の際に油脂の特数やたんぱく質がどのように変化するかを調べ、従来の評価法の妥当性について検討した。最後に、メイラード反応、あるいは高圧炭酸ガス抽出によって保存中の酸化的劣化を抑制した水産食品の開発を試みた。

第1章 高度不飽和脂肪酸の自動酸化

エイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) のエチルエステルを 5℃ の暗所あるいはケイ光灯照射 (90Lux) の条件下で自動酸化させた時の諸変化についてリノール酸 (Lo) およびリノレン酸 (Ln) エチルエステルと比較検討した。基質とした EPA, DHA は魚油から尿素付加法および減圧蒸溜で調製したもので、純度はそれぞれ 94.5, 94.1% であった。

EPA および DHA は酸素吸収量からその酸化を追跡すると暗所においても 3 - 4 日の誘導期を過ぎると速やかに酸化され、特にケイ光灯照射下では誘導期なしに酸化が進行した (Fig. 1, 2)。一方、植物油に多く含まれている Lo, Ln は 5℃ の暗所では 50 日以上および 20 日の酸化誘導期を

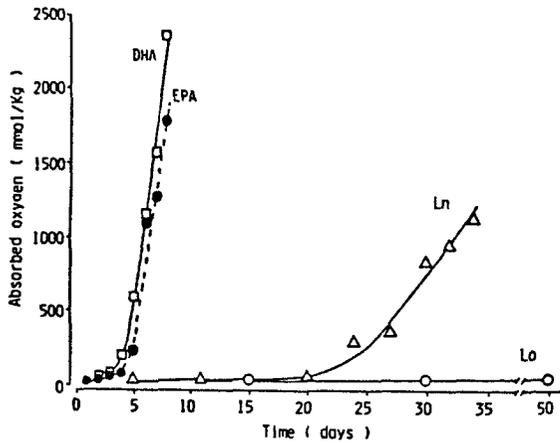


FIG. 1. Time course of oxygen absorption during autoxidation of ethyl esters of Lo, Ln, EPA and DHA at 5 C in the dark.

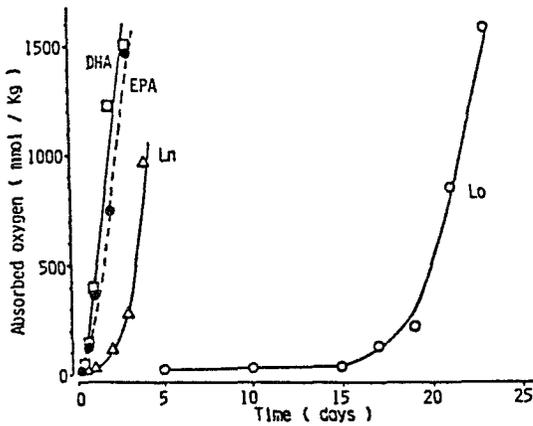


Fig. 2. Time-course of oxygen absorption during autoxidation of Lo, Ln, EPA and DHA at 5°C under a fluorescent lamp irradiation.

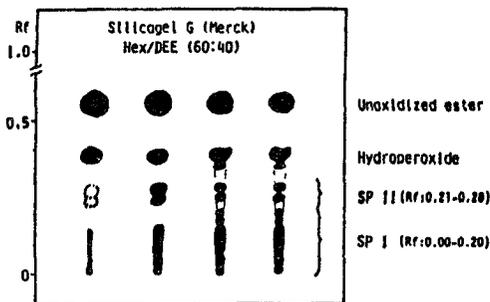


FIG. 3. Typical TLC patterns of oxidized esters.

示し、ケイ光灯照射下でもそれぞれ 1-2, 15日間の誘導期を示した (Fig. 1, 2)。暗所での EPA・DHA の誘導期後の酸素吸収速度は Ln の 5.2, 8.5 倍 (Fig. 1), ケイ光灯照射 2 日目での酸素吸収速度は Ln の場合は Lo の 99 倍であったが, EPA・DHA はそれぞれ 743, 948 倍であった (Fig. 2)。したがって、水産物の冷蔵保存中にも EPA および DHA は速やかに酸化が行なわれると予想される。

酸化に伴う酸化生成物のパターンを薄層クロマトグラフィーで調べると、EPA・DHA の酸化一次産物である hydroperoxide (HPO) は Lo の HPO より極めて不安定で、酸化初期からその HPO の分解が起きて HPO 量を上回るかなりの高極性二次酸化生成物ができ (Fig. 3-5), その大部分 (約 70%) は二量体などの重合体であった (Table 1)。そのため Fig. 6, 7 に示したように全消費酸素の約 1/2 しか過酸化物質として示すことができず、これは植物油の主要ポリエン酸であるリノール酸では 90% 以上が HPO であるのと大きく異っている。したがって、一般に食品の脂質酸化評価法として用いられている過酸化物質は水産食品においては定量的評価法として適当ではないと思われる。

一般に、酸化油脂重合物の結合様式としては C-C, C-O-C, C-O-O-C の 3 種が考えられ、初期酸

化段階の Methyl Lo はもっぱら C-O-O-C の結合をもっていると報告されているが、EPA、DHA の酸化においては C-O-C の結合様式を持つものも20%ぐらい検出された (Table 2)。

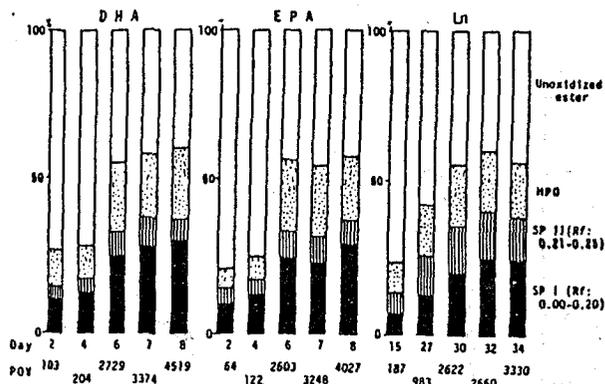


FIG. 4. Quantitative analysis of ethyl Ln, EPA and DHA autoxidized at 5°C in the dark.

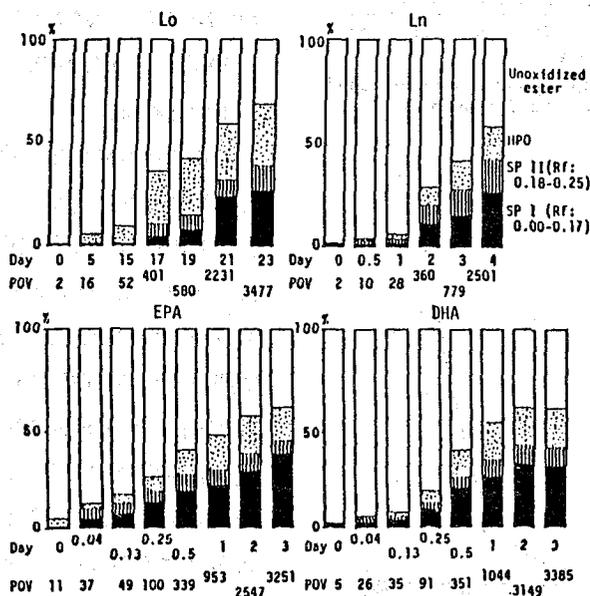


Fig. 5. Quantitative TLC analysis of autoxidized ethyl Lo, Ln, EPA and DHA at 5°C under a fluorescent lamp irradiation.

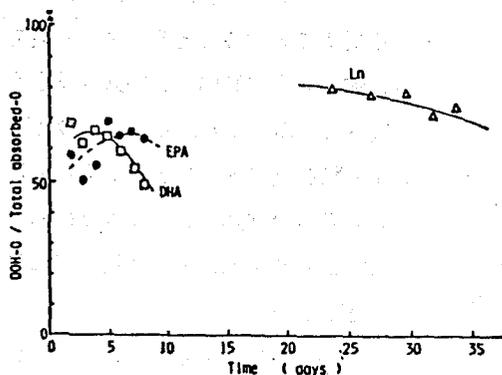


FIG. 6. Ratio of OOH-oxygen to total absorbed oxygen during autoxidation of ethyl esters of Ln, EPA and DHA at 5°C in the dark.

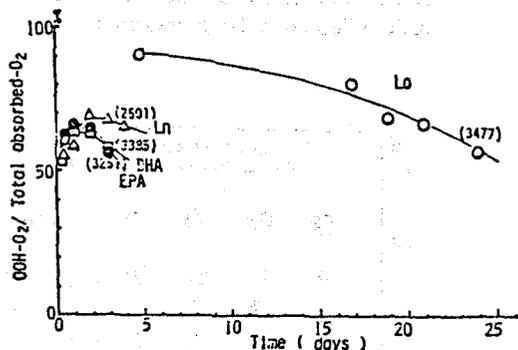


Fig. 7. Ratio of OOH-oxygen to total oxygen uptake during autoxidation of ethyl esters of Lo, Ln, EPA and DHA at 5°C under a fluorescent lamp irradiation. The values in parentheses indicate peroxide value.

TABLE 1

Distribution of Polymers in Polar Materials of Ethyl EPA and DHA Autoxidized at 5°C in the Dark

SiO ₂ column fractions (yield)	Bio-Beads S-X3		Weight (%)	Distribution in polar materials (%)		
	column fraction No.	Mean MW		Tetra, trimer	Dimer	Monomer
EPA (POV:4734 meq/kg)						
DEE/Hex(40:60, 50:50)	35-47	548	10.5			
Rf: 0.05-0.19 (9.8%)	49-52	418	54.0			
	55-80	308	35.5			
DEE/Hex(70:30), DEE(100) and EtOH(100)	30-43	1438	44.1			
Rf: 0.00-0.07 (25.3%)	45-52	593	45.0			
	55-95	380	11.0			
Total polar materials				36.0	38.7	25.3
DHA (POV:5152 meq/kg)						
DEE/Hex(40:60, 50:50)	35-47	624	11.2			
Rf: 0.05-0.19 (11.6%)	49-52	466	50.9			
	55-80	376	37.9			
DEE/Hex(70:30), DEE(100) and EtOH(100)	30-43	1576	46.4			
Rf: 0.00-0.07 (31.9%)	45-52	734	46.7			
	55-95	362	7.1			
Total polar materials				38.1	40.5	21.4

Table 2. Intermolecular linkage distribution of dimers formed during autoxidation of ethyl esters of Lo, Ln, EPA and DHA at 5°C under irradiation with a fluorescent lamp

	POV (meq/Kg)	C-O-O-C (%)	C-O-C (%)
Lo	1170	73.7	26.3
	3285	69.8	30.2
Ln	1475	84.4	15.6
	3249	80.0	20.0
EPA	1130	79.6	20.4
	3185	80.0	20.0
DHA	1150	80.8	19.2
	3199	79.2	20.8

第2章 脱脂凍結乾燥魚肉を用いた食品モデル系における エイコサペンタエン酸の酸化および実際の水産加工品の 貯蔵中の脂質変化

前章では魚肉に含まれる高度不飽和脂肪酸は非常に酸化しやすく、リノール酸と異なってHPOの安定性が低いので、過酸化価で示される酸素は全消費酸素の1/2以下であることを示した。魚肉においてはヘム蛋白などの酸化促進物質も共存するため、さらにHPOの分解が促進されるのが予想されるが、その詳細はまだ不明である。そこで、本章では魚肉モデル系と実際の水産加工品中での酸化反応に伴う劣化の際に油脂の特数やたんぱく質がどのように変化するかを調べた。

2-1 脱脂凍結乾燥魚肉を用いた食品モデル系における エイコサペンタエン酸の酸化

まず、本節では自動酸化に伴う魚肉中での脂質酸化の様子を定量的に調べるために、酸化が速いといわれるヘム蛋白質含量の高い赤身魚としてマイワシを選び、その普通肉、血合肉および皮の脱脂凍結乾燥標品にエイコサペンタエン酸エチルエステル (E・EPA) を混合したモデル系を調製し、酸化の進行を白身魚であるスケトウダラ普通肉および脱脂大豆あるいは casein 共存下での反応と比較検討した。

Fig. 8 に示したように魚肉の普通肉の E・EPA 酸化への影響はマイワシとスケトウダラでほとんど差がなく、ヘモグロビン含量が著しく高いマイワシ血合肉でも本条件下では普通肉よりやや速かったに過ぎなかった。しかし、皮の場合には著しい酸化促進がみられ、この効果は 120℃ で 60 分加熱した場合には約 80% 酸化が抑えられ、熱不安定な酸

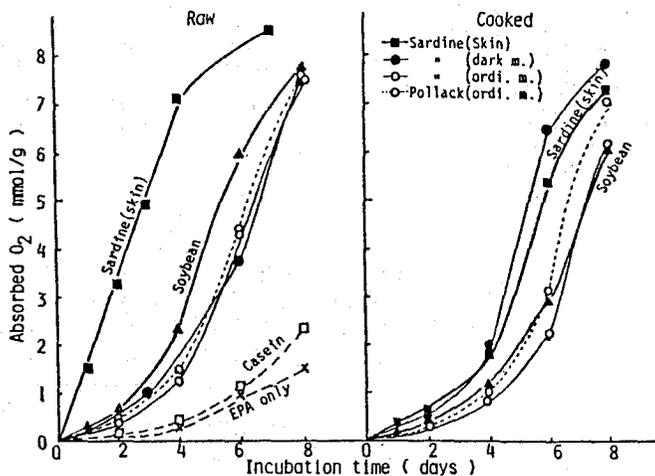


Fig. 8. Time course of oxygen absorption during autoxidation of ethyl EPA with various proteins at 5 C in the dark.

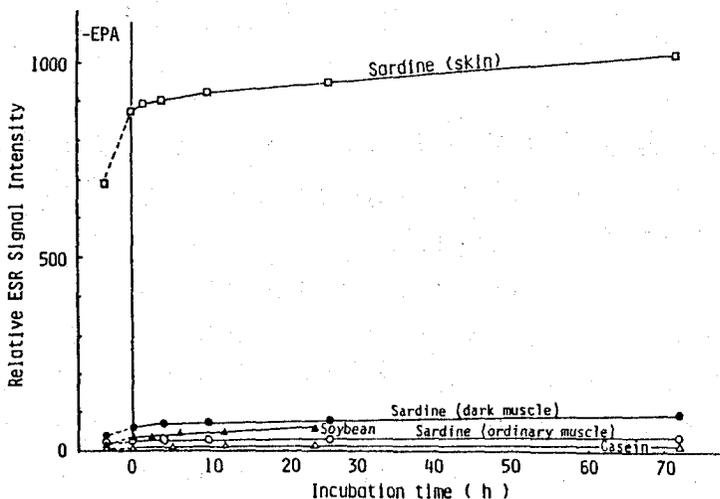


Fig. 9. Time course of ESR signal intensity during autoxidation of ethyl EPA with various proteins at 5 C in the dark.

化促進物質，恐らく酵素による酸化促進が示唆された。特に，ESR (Electron Spin Resonance, 電子スピン共鳴吸収) による radical 量を測定した結果，皮に他の部分より radical が多量に存在し，またEPAを添加した後の radical 増加も最も著しかったので，皮の酸化促進活性が大きいことが radical 量からも示された (Fig. 9)。普通肉の場合にはマイワシ・タラとも貯蔵8日目の間の酸化は加熱処理によって20-50%が抑えられた。一方，マイワシ血合肉の場合は加熱処理によってE・EPAの酸化が逆に促進される傾向がみられ，血合肉の場合にはヘム蛋白による非酵素的促進が重要であることが裏付けられた。

過酸化価によって測定されるヒドロパーオキシド酸素 (Fig. 10) の全消費酸素に対する割合を求めてみると，Fig. 11に示したようにこの比は脂質単独よりも著しく小さく，とくに酸

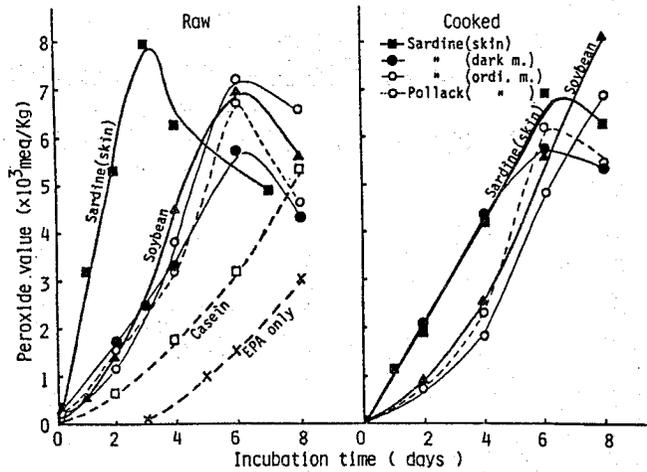


Fig. 10. Time course of peroxide value of ethyl EPA during autoxidation with various proteins at 5 C in the dark.

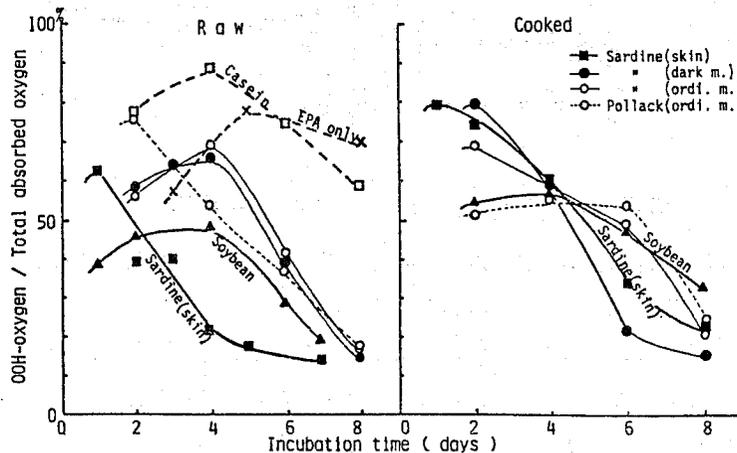


Fig. 11. Ratio of OOH-oxygen to total absorbed oxygen during autoxidation of ethyl EPA with various proteins at 5 C in the dark.

化の進行と共に減少するため、5℃、1週間後には約20%に低下した。すなわち、過酸化物価では酸化劣化が評価できないことが明らかになった。従って、魚肉の脂質酸化の判定は過酸化物価は不適で、むしろ抽出油の褐変度 (Fig.12) やケイ光強度 (Fig.13) など安定な生成物を測定した方がいいことが示唆された。

大豆ではやはり過酸化物価の比率が低かったが、これは大豆には lipoxygenase と共に hydroperoxide lyase などヒドロパーオキシドを分解する酵素が共存するためと思われる。

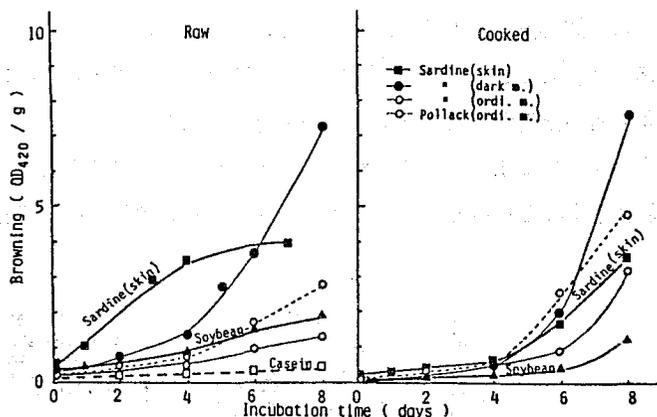


Fig.12. Time course of browning of ethyl EPA during autoxidation with various proteins at 5°C in the dark.

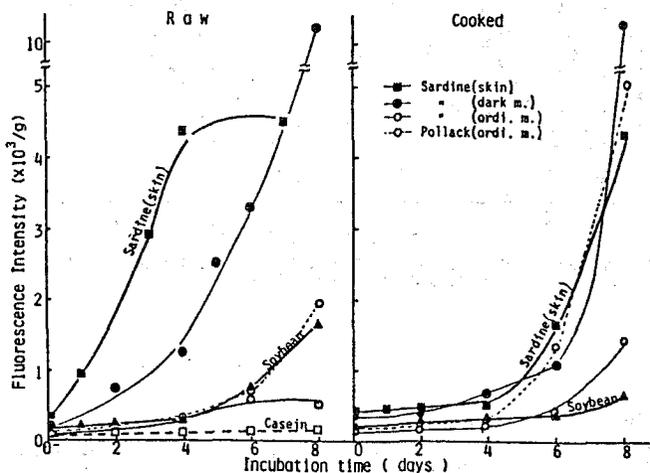


Fig.13. Time course of fluorescence intensity of ethyl EPA during autoxidation with various proteins at 5°C in the dark.

2-2 実際の水産加工品の貯蔵中の脂質変化

実際の水産加工品の製造および貯蔵中の脂質変化を調べることを目的とし、マイワシ塩干品を調製して5℃、暗所保存した際の脂質変化を検討した。

酸素吸収速度を比較すると、通常の製法である未加熱試料の場合は5℃においても誘導期なしに急激に酸素を吸収したが、酵素失活させた cooked 製品と抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA) 処理製品は酸素吸収が抑えられた (Fig.14)。とくに、cooked 製品の場合は5℃貯蔵初期はBHA処理製品と同じにヒドロパーオキシドとカルボニルの生成が非常に抑えられ

た。したがって、加熱処理を行っていない水産物の脂質変化においては単純な自動酸化だけではなく、酵素の関与が示唆された。また、各製品が吸収した酵素の peroxide 生成への転換率 (Fig. 15) は未加熱試料では 0.14~0.44 と低く、速やかな二次生成物への転換が起っているものと思われる。一方、酵素を失活させた cooked 製品では 0.42~0.78 と比較的高かった。このように魚

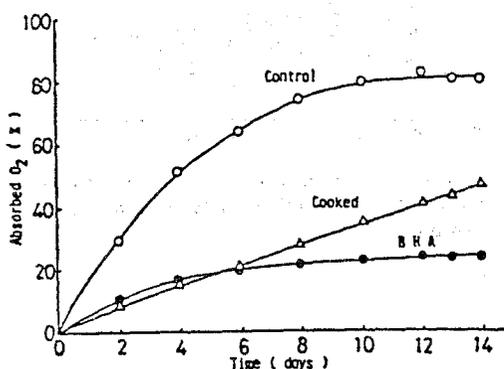


Fig. 14. Oxygen absorption of salted-dried sardine during storage at 5°C.

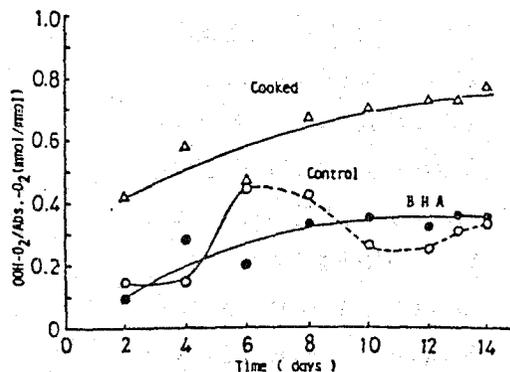


Fig. 15. Ratio of hydroperoxy oxygen to absorbed oxygen of salted-dried sardine during storage at 5°C.

肉ではHPOが蓄積しにくいいため、酸化的劣化を評価するためには前節で述べたように安定な酸化二次生成物あるいは蛋白質などの最終反応生成物を褐変度などで測定した方がいいと思われる。

第3章 マイワシ皮に含まれる脂質酸化促進物質の検索

前章の乾燥系でEPAの酸化の進行を調べた結果、魚皮中で最も酸化が著しく、加熱処理により酸化速度が低下したので酵素が関与している可能性が示唆された。そこで、本章ではマイワシ魚皮の脂質酸化促進物質の本態を明らかにするため、emulsion系での酸化促進効果を指標として種々の抽出法を検討し、引き続き各種 chromatography で精製を試みた。

マイワシの普通肉、血合肉および皮のアセトンパウダーの脂質 (EPA) 酸化促進活性を emulsion 系で調べてみた結果 (Table 3), 前章の乾燥系と同様に皮の区分が血合肉より約3倍活性が高かった。その皮の 0.05Mりん酸 buffer 抽出区分は高イオン強度抽出区分と比べて脂質酸化促進活性が高く (Fig. 16), その酸化活性は KCN (2 mM) 添加でほとんど完全に阻害され、加熱処理によって活性は半減した。そして、この区分は Sephadex G-200 ゲル透過で2つの高活性画分 G-II, G-III が得られ (Fig. 17), その活性は Soret 吸収帯の吸収で測定したヘム量と相関していることがわ

Table 3.
Prooxidant activity of skin, dark and white muscles of sardine at 25°C, pH 6
($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{dry matter g}^{-1}$)

White muscle	0.01
Dark muscle	0.22
Skin	0.66

* Oxygen absorption rate of the mixture with 1 μH of EPA.

かった。これらの画分を加熱処理すると G-II 画分は66-72%, G-III 画分は10-24%それぞれ活性が阻害され, G-III 画分はヘム量が多いことから, 主としてヘム蛋白質により非酵素的に酸化が促進されていることが示唆されたが, G-II 画分は熱不安定な酵素様の物質が脂質酸化を促進すると推定された。この G-II 画分はさらに DEAE-Sephadex A-50および CM-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィーによって少なくとも2つ以上の高活性画分に分けられ, ともに加熱失活によって約80%阻害された。本画分に含まれる酸化促進物質は中性付近に至適 pH をもっており (Fig.18), リノール酸, EPAなどを酸化して共役系を有するヒドロパーオキシドを生ずるところからリポキシゲナーゼ様酵素と推定されるが, ヘムを含有していることが一般のリポキシゲナーゼと異なっている。また従来報告されている動物由来のリポキシゲナーゼが遊離脂肪酸を基質としているのに対し, 本画分はエステル型脂肪酸にも活性を持っている点が特異である。本画分の分子量は電気泳動から約24万以上と大豆リポキシゲナーゼやヘモグロビンよりかなり大きいことが推定された。

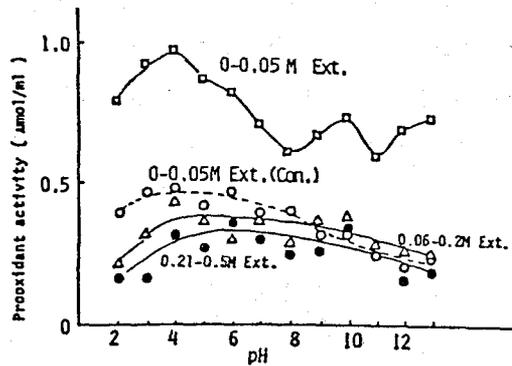


Fig. 16. The pH dependence of prooxidant activity (oxygen absorption rate of the mixture with 0.3M Of EPA) of sardine skin extracts at 25 C for 30 min.

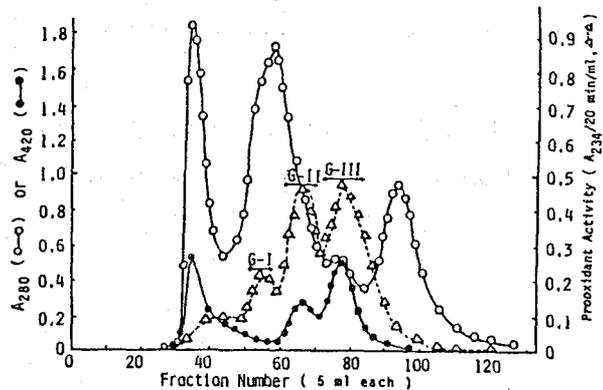


Fig. 17. Elution profile of Sephadex G-200 gel filtration (2.5x95cm) of crude sardine skin extract.

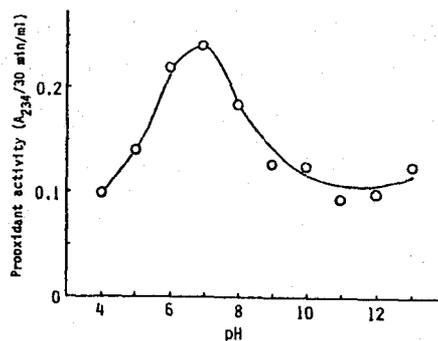


Fig. 18. Effect of pH on prooxidant activity of G-200 intermediate molecular weight fraction (G-II) from the crude sardine skin extract.

第4章 メイラード反応あるいは高圧炭酸ガス抽出法による 脂質酸化抑制水産加工品の開発の試み

水産物の酸化安定性を高めるには抗酸化剤の使用が有効であるが、合成抗酸化剤は発がんなどの恐れから現在ではほとんど使用されなくなっているが、一方代替として適当な天然抗酸化剤がないところから脂質変化による悪影響の方がかえって憂慮される状態となっている。そこで、本章では合成抗酸化剤を用いないで酸化安定性の向上をはかることを目的とし、メイラード反応による酸化安定性の向上と、魚肉たんぱく質からの新しい脱脂法について検討した。

4-1 メイラード反応を応用したフィッシュミールの酸化防止

フィッシュミール、とくに沿岸の多獲性赤身魚を原料として多産されているブラウンミールは脂質含量が高いため、製造ならびに貯蔵中の脂質酸化が大きな問題である。またブラウンミールには遊離ヒスチジンの含量が高く、これはヒスタミンの生成、さらに高温下ではリジンと反応し、ニワトリ砂のうのびらんの原因物質であるジゼロシンの生成を引き起こす。そこで、Fig.19 に示したようにマイワシミールの製造時の中間産物である stick water (エキス分) にグルコースを添加後、100℃で加熱褐変させてから press cake に加えて乾燥し、ホールミールを調製した。本ミールを貯蔵した場合、酸素吸収度から判定した酸化安定性は著しく向上し、エトキシキン添加区(0.01%)に匹敵した(Fig.20)。また、メイラード反応によって、stick water に多量に含まれ、砂のうのびらんの原因となるジゼロシンの前駆物質であるヒスチジンおよびヒスタミンの量が著しく減少した。本法により、たん白質の栄養価を損うことなく酸化安定性を向上できた。

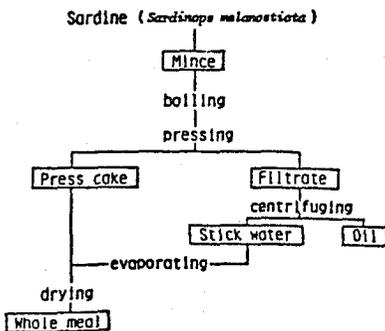


Fig. 19. Processing of fish meal.

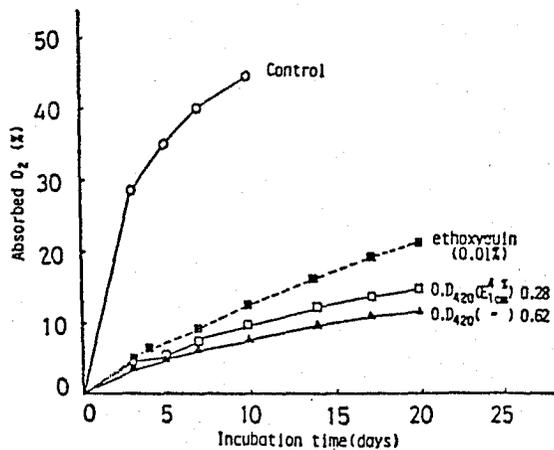


Fig.20.Oxidation stability of sardine meal mixed with browned sardine stick water.

4-2 高浸透圧脱水および高圧炭酸ガス抽出法による すり身用イワシ脱脂魚粉の開発

日本の水産物製品の原料としては、スケトウダラの冷凍すり身が主体となっているが、漁獲の減少が懸念されており原料魚種の多様化が課題となっている。一方漁獲量の大部分が飼料として消費されているマイワシをねり製品原料として利用する試みも行なわれ、その技術は一応確立されている。しかし、赤身魚は筋肉の脂質含量が高いため、水晒しによってその大半は除去されるが、尚残存している脂質は魚臭の原因となり問題となっている。そこで、たん白質変性を伴わない温和な脱脂法として高圧炭酸ガス抽出を試みた (Fig. 21)。

高圧炭酸ガス抽出中、塩可溶性窒素はやや減少したがかまぼこ形成能は保持され、かまぼこの臭いは前処理の高浸透圧脱水操作によって向上し、液化炭酸ガス抽出によってさらに改善された。さらに、液化炭酸ガスによる脂質の抽出は保存中の魚臭の発出の防止および酸化抑制に有効であった。

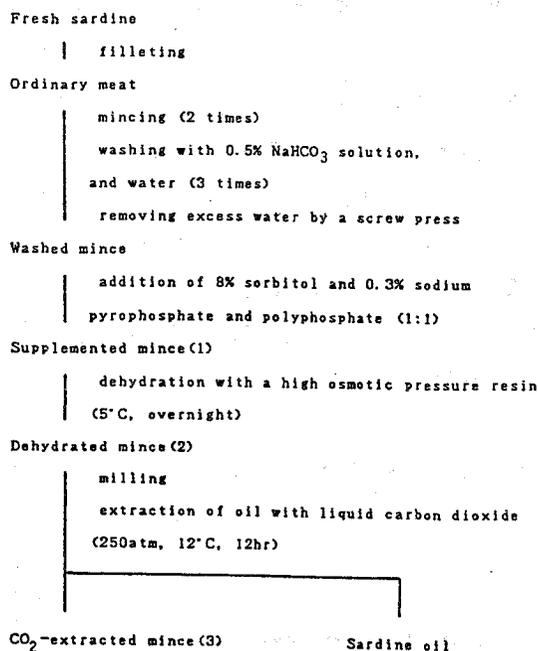


Fig. 21. Preparation of defatted sardine meat powder.

総 括 (Fig. 22 参照)

1. 水産食品に多量に含まれているエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸のような高度不飽和脂肪酸は冷蔵保存の条件でも速やかに酸化され、その第一次酸化生成物であるヒドロパーオキシドは極めて不安定で酸化初期から重合物を主成分とする高極性二次酸化生成物が大量に生成した。
2. 脱脂凍結乾燥魚肉を用いた食品モデル系でもエイコサペンタエン酸は速やかに酸化したが、ヒドロパーオキシドの蓄積は一段と少く水産食品の脂質酸化の判定は過酸化価は不適で、より安定な生成物すなわち褐変度やケイ光強度測定が有効である。

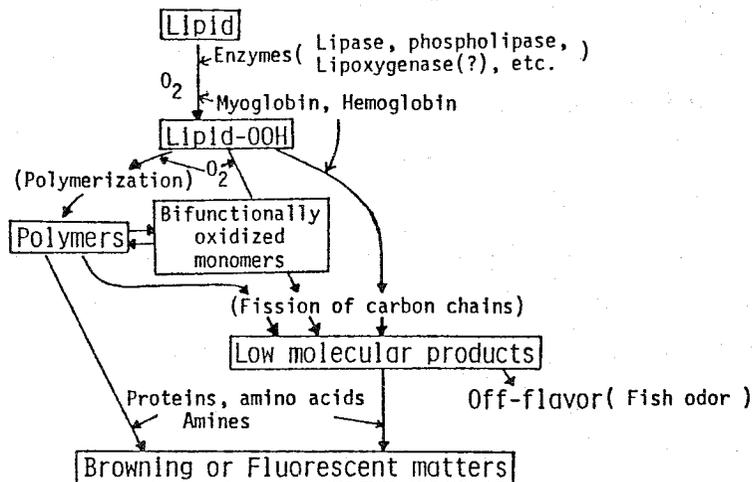


Fig. 22. Proposed mechanism for oxidative deterioration of lipid in marine foods.

3. 赤身魚では脂質酸化は皮の部分で著しく、その促進物質の本態は heme を含む lipoxygenase 様酵素と推定された。
4. メイラード反応を応用したフィッシュミールの調製でたん白質の栄養価を損うことなく酸化安定性を向上できた。
5. 高浸透圧脱水および液体炭酸ガス抽出によって魚臭発生の防止および酸化抑制可能のすり身用脱脂魚粉が製造できた。

審査結果の要旨

水産食品に含まれる脂質は特異的にエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸に富んでいる。これらの脂肪酸は成人病予防などの生理効果から注目を集め、食品への強化が試みられている。しかし、一方これら高度不飽和酸は酸化安定性が悪く、魚臭発生あるいは色や味の劣化の原因となる。植物油の主要構成脂肪酸であるリノール酸、リノレン酸の酸化機構の研究は多いが、高度不飽和酸の酸化速度や詳細な酸化機構は不明である。本研究は水産食品の酸化劣化機構の解明を目的とし、高度不飽和脂肪酸をその脂質モデルとして、種々の条件下で酸化させ、劣化機構を検討したものである。

本研究により、高度不飽和酸の酸化速度はリノレン酸の5～8倍とはやく、冷蔵庫保存の条件でもすみやかに酸化し、第一次生成物のヒドロペルオキシドが不安定でただちに重合物をはじめとする二次生成物に移行することが明らかになった。また魚肉蛋白質が存在すると、その酸化はさらに促進され、ヒドロペルオキシドの分解もはやくなるので従来、水産物の酸化の指標とされてきた過酸化物の定量（過酸化物価）では脂質劣化が評価できないことが明らかになった。魚の組織の中でとくに皮部の酸化促進活性が高く、本活性は熱に不安定なところから酵素と推定され、クロマトグラフィーによってヘムを含む活性画分を得、これは従来知られているリポキゲンナーゼとは異なるユニークなものである。

さらに合成抗酸化剤を使用しない水産食品の酸化劣化防止を試み、メイラード反応や高圧炭酸ガス抽出を用いる新しいプロセスの可能性を見出した。

以上の成果は、脂質酸化機構に関する基礎的な知見をもたらしただけでなく、水産食品の加工、保蔵技術の発展に寄与するところが大きく、農学博士の学位を授与するに値するものと認定した。