魚類組織のリポキシダーゼに関する研究—I.

肝臓抽出液によるビタミンAの酸化

小 野 豊 樹・永 山 文 男

(東京水産大学)

Studies on the Lipoxidase in Fish Tissues—I.

Oxidation of Vitamin A by the Extract of Some Fish Liver

Toyoki ONO and Fumio NAGAYAMA

That the loss of vitamin A content during the storage of fish liver was markedly affected by the temperature and seemed to be caused by a catalytic action of a certain enzyme system was previously reported by the present authors¹⁾.

The authors, now, observed the enzymatic action of the extract of fish liver in the oxidation of vitamin A, and attempted to determine the identity of the soybean lipoxidase and an enzyme in fish liver.

Though our experiment, following facts were found: the vitamin A oxidizing enzyme in fish liver was a lyo-form and was found not only in mackerel liver but in perch liver. The absorption spectra of vitamin A oxidized by the liver enzyme showed the flattening of peak at 328 m μ in our experiments as same as in the usual by air oxidation. The enzyme possessed a special thermal property as having more activity at 60°C. A large quantity of liver oil inhibited the enzyme activity at room temperature, but at higher temperature the activity began to develop by breaking down of inhibitors. The higher fatty acids seemed to be less oxidized in the states of glyceride by the enzyme. The enzyme had many similar properties to the soybean lipoxidase but showed different value from the soybean enzyme in the optimum pH.

著者等は先に¹⁾ 魚類肝臓の貯蔵中におけるビタミンAの減少度は貯蔵温度に著しく影響され、その際のビタミンAの減少は或る種の酸化酵素の作用によるものであらうと推測した。その後、ビタミンAを急速に酸化する肝臓中の酵素はリポキシダーゼ類似と考えられる点を認めた。

1932年 ANDRE等²⁾により大豆中から発見されたリポキシダーゼは COSBY等³⁾により分離され、又 THORELL等⁴⁾により結晶化されたが、更に他の豆類⁵⁾、馬鈴薯⁶⁾等高等植物ばかりでなく、動物組織^{7,8)}にも含まれることが報告された。リポキシダーゼは高級不飽和脂肪酸を酸化するものであるが、FREY⁹⁾、HAUGE等¹⁰⁾および HAUGE¹¹⁾は乾燥ウマゴヤシのビタミンAの酸化はリポキシダーゼの作用によることを発見し、WILBUR¹²⁾は乳牛の飼料に大豆を混ざれば生産されるバターのビタミンA含量が減少することを発見した。

一方、鉄ポルフィリンが酵素系の存在無しに高級不飽和脂肪酸を酸化する¹³⁾ことが知られているので、動物組織中のリポキシダーゼの存在は疑問とされている。HAUROWITZ等¹⁴⁾はヘモグロビンが酸素による脂肪酸の直接酸化を促進させることを観察した。このような作用は、蛋白を含まないヘミンについてもよく知られていることであり、ヘモグロビンを多量に含む動物組織中のリポキシダーゼの存在が疑問とされるのである。しかしながらリノール酸コレステロール・エステルが血液ヘモグロビンにより酸化され難い事実もあり、魚類肝臓中のビタミンAの酸化は、脂肪の酵素的酸化に基因するものと考えられる。

魚類の組織のビタミンAあるいは脂肪酸の酸化酵素に関してはいくつかの報告がある。即ち BROCKLESBY等¹⁵⁾は鮭の肝臓によるビタミンAの酵素的酸化について、BANKS¹⁶⁾、¹⁷⁾はニシンの筋肉、KHAN¹⁸⁾はニシン血合肉のリポキシダーゼについて報告した。

著者等は魚類組織のビタミンA酸化作用を観察し、大豆リポキシダーゼと魚類組織の酸化酵素との異同および不飽和脂肪酸酸化の機構を明らかにしたいと考え研究を続けているので、その結果の一部を報告する。

実 験

試料 (1) サバ肝臓アセトン粉末 新鮮なサバ *Scomber japonicus* の肝臓を搗潰し5倍容冷アセトンを加え暗所で数時間振盪し、綿布で濾し更に3倍容のアセトンと振盪、アセトンを除き低沸点石油エーテル3倍容で振盪、濾過後乾燥する。

(2) 大豆アセトン粉末 大豆を粉碎し上と同様に処理する。

(3) 肝油 0.1%アルカリで精製し、洗滌後乾燥したマグロ肝油(80,000 IU/g)を用いた。

(4) 酵素液 乾燥粉末を pH 5.4 の M/15 磷酸塩緩衝液3倍容で冷所1時間抽出後遠心分離し、上澄液を用いた。

方法 酵素液 30 ml に乳化剤として CMC (carboxymethyl cellulose) 1.5 g を溶かし、肝油 0.2 g を加え低温で乳化し 37°C に incubate する。一定時間後メタノール 5 ml と精製したエチルエーテル 50 ml を加え振盪し肝油をエーテル層に回収し、そのビタミンA含量を比色法又はスペクトル法で測定し、ビタミンAの減少量から酵素活力を推定する。

結果および考察

ビタミンA濃度の影響 反応液のビタミンA濃度がビタミンA酸化の度合におよぼす影響について実験を行った。Table 1 に示すように 37°C におけるビタミンA酸化の度合はビタミンA濃度の高い試験区に小さいが、60°C においてはビタミンAの濃度による差異が認められない。この場合温度の影響が大きかったものと考えられる。

Table 1. Effect of vitamin A in various concentration.

Time, hr.	Vit. A	0		2		24	
		Content I. U.	Loss %	Content I. U.	Loss %	Content I. U.	Loss %
37		500	0	335	33.0	135	73.0
60		500	0	325	35.0	—	—
37		6800	0	5960	12.5	—	—
60		6800	0	4370	35.8	—	—

基質(油脂)濃度の影響 肝油 58.6%を含む反応液(a)と34.7%を含む反応液(b)について実験した結果は Table 2 に示すように、(a)の場合 37°C では反応が抑えられ 60°C では反応が正常に進行するようであり、(b)ではビタミンAの破壊が温度に関係なく顕著である。肝臓粉末 1 g が 24 時間に酸化したビタミンA量は(a)で 1,252 IU、(b)で 1,870 IU で a/b=1.5 であった。

Table 2. Effect of substrate (oil) in various concentration.

		Loss of vitamin A, %					
Oil concentration, %		58.6				34.7	
Temp., °C.		37	60	37	60	37	60
Enzyme		Mackerel liver		Control		Mackerel liver	
Incubation time, hr.	0	0	0	0	0	0	0
	2	6.9	10.0	0.9	1.8	12.7	13.7
	4	8.2	8.6	2.7	—	16.5	17.1
	6	8.8	19.5	3.0	9.5	22.8	25.8
	10	9.0	23.7	4.4	14.0	24.1	30.0
	24	10.4	26.1	5.3	—	38.9	48.1

酵素の型 ビタミンAを酸化する肝臓の酵素は水溶性と考えられるが、それを確認するための実験を行った。乾燥粉末 10 g を M/15 磷酸塩緩液 60 ml で 1 時間抽出し、遠心分離した上澄液と沈澱についてそれぞれの酵素活力を測定した。Table 3 に示したように上澄液の酵素活力が強く酵素は水溶性であることが明らかである。

Table 3. Type of the enzyme.

Incubation time, hr.		0		2	
Temp., °C.	Vit. A Fraction	Content I. U.	Loss %	Content I. U.	Loss %
37	Filtrate	2000	0	292	85.4
	Residue	3080	0	2728	11.4
	Control	1984	0	1956	1.5
60	Filtrate	2000	0	684	65.8
	Residue	3080	0	2688	12.7
	Control	1984	0	1936	2.3

温度および pH の影響 温度および pH による酵素活力の変化は酵素の純度によっても左右されるので、粗酵素標品では満足すべき結果を得られないが、本実験では粗標品について大略の傾向を観察した。

(1) 温度の影響 0°, 17°, 37°, 60°C での実験の結果は Fig. 1 に示すように、0°C 以外は最初の 3~5 時間に反応が急速に進み、その後は極めて緩慢である。低温では酵素作用が極めて小さいと考えられる。

Fig. 1. Effect of temperature on the enzyme activity at pH 5.4.

Fig. 2. Effect of pH on the enzyme activity. The reaction mixtures were incubated for 20 hours at 37°C.

(2) pH の影響 Fig. 2 に見られるように、サバ肝臓酵素の至適 pH は 6.5 附近、大豆のそれは pH 8.0 附近に見られた。

ビタミンA含量の少ない魚類肝臓の酵素活力 ビタミンA含量が皆無に近いスズキ *Lateorabrax japonicus* の肝臓の酵素活力を、漁獲直後、乾燥粉末とせず測定した結果は Fig. 3 に示すように極めて強い活力を認めた。

反応後の油脂の性質 (1) 肝油のビタミンA吸収スペクトル Fig. 4 に明らかなように、酸化度の小さいものは 328 mμ に吸収のピークを示すが、大豆および肝臓酵素によって酸化されたものは一般吸収を示し、300 mμ 以下の吸光が増大するように思われた。このような吸収曲線の変化は、ビタミンAの酸化生成物によるかあるいは他の原因によるかは本実験では明らかでない。

Fig. 3. Enzyme activity of perch liver. 1, emulsion of 27 ml. of mackerel liver extract (corresponding to 5 g. of liver powder) with 0.4 g. of CMC and 7 g. of tuna liver oil; 2, 14 ml. of mackerel liver extract and 13 ml. of perch liver extract with substrate; 3, 23 ml. of perch liver extract with substrate; C, control.

Fig. 4. Absorption spectra of vitamin A in oxidized liver oil. O, original oil; L₁ and L₂, oils oxidized by liver extract; S, oil oxidized by soybean enzyme.

(2) 肝油の性状 肝臓の酵素がビタミンAと同時に脂肪酸を酸化するか否かを知ることは興味あることである。先¹⁾に述べたように自己消化したサバ肝臓から得た肝油はビタミンAの減少とは逆に、その油脂の性状に何らの変化も示さなかったが、本実験においても Table 4 および 5 に示すように、特別の変化は認められなかった。

Table 4. Properties of oxidized liver oil.
(Incubation with liver extract at 37°C.)

Incubation time, hr.	0	2	4	6	10	24
Vitamin A Content, C.L.O.U.	257	230	230	210	210	185
Loss, %	0	10.5	10.5	18.3	18.3	28.0
Iodine value	123.0	122.5	123.0	...	...	...
Schiffs test	+	+	+	+	+	+
Kreis test	-	-	-	-	-	-

Table 5. Properties of oxidized oils. * ml. of N/200 Na₂S₂O₃.

Enzyme	Incubation time, hr.	Tuna liver oil			Linseed oil		
		Peroxide value*	Iodine value	Acid value	Peroxide value*	Iodine value	Acid value
Mackerel liver	24	6.5	156.8	1.7	1.1	226.1	4.5
	48	6.9	150.5	1.5	0.4	212.8	8.1
Control (pH 6.5)	24	9.2	155.1	0.5	5.3	226.5	0.4
	48	11.8	150.0	0.7	6.6	216.5	0.4
Soybean	24	9.9	156.1	0.8	6.0	211.7	1.9
	48	5.0	155.7	0.9	7.0	209.2	1.5
Control (pH 9.0)	24	7.2	155.1	0.7	10.5	209.8	0.6
	47	8.2	156.3	1.2	9.3	211.1	0.5
Original oil		2.7	156.8	0.4	2.7	226.5	0.5

(3) アマニ油の性状 肝油の脂肪酸が酵素により酸化されないことは、その中に溶存するビタミンAによつて酸化が防止されるためではないかと考え、ビタミンAを含まないアマニ油について同様の実験を行った。Table 5 に明らかなように、沃素価には全く変化が見られず、酸価が増加しているが、これは粗酵素液中に共存するリパーゼの作用によるものと考えられる。又過酸化価は Lea¹⁹⁾ の方法によつたが、対照区の方が大きな値を示した。これは反応時間が長かつたためであろう。アマニ油も肝油と同様に肝臓酵素によつて認められる程の酸化を受けないものと思われる。

要 約

1. 肝油中のビタミンAは魚類肝臓に含まれる或る種の酸化酵素により甚しく酸化される。
2. 大豆リポキシダーゼおよび魚類肝臓酵素により酸化されたビタミンAの吸収スペクトル曲線は、共に 328 m μ のピークが低下する。
3. ビタミンAを酸化する酵素はサバ肝臓のみでなく、ビタミンAを含まない魚類の肝臓にも多く含まれる。
4. 魚類肝臓のビタミンAを酸化する酵素は水溶性であり、60°C で高い活性を示す。
5. 肝油およびアマニ油の高級脂肪酸はグリセライドの形では、この酵素により殆んど酸化されない。
6. 室温では肝油濃度が高ければ酵素活力が抑えられるが、高温では酵素阻害物質の破壊により酵素活力が大きくなると思われる。
7. 魚類肝臓の酵素は大豆リポキシダーゼに類似の性質を有するが、至適 pH がやや異なるように思われる。

文 献

- 1) 小野豊樹・永山文男：本誌 **18**, 509 (1953).
- 2) E. ANDRE and K. HOU: *Compt. rend.*, **194**, 645: 195, 172 (1932).
- 3) E. GOSBY and J. B. SUMNER: *Arch Biochem.* **8**, 259 (1945).
- 4) H. THEOKELL, R. T. HOLMAN and Å. ÅKESON: *Arch. Biochem.*, **14**, 250 (1947).
- 5) H. H. STRAIN: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 3542 (1941).
- 6) H. SULLMANN: *Helv. Chim. Acta*, **24**, 1360 (1941).
- 7) C. H. LEA: *J. Soc. Chem. Ind.*, **56**, 376T (1937).
- 8) A. W. BOSWORTH and I. B. BROWN: *J. Biol. Chem.*, **103**, 115 (1933).
- 9) C. N. FREY, A. S. SCHULTZ and R. F. LIGHT: *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 1254 (1936).
- 10) S. M. HAUGE, W. AITKENHEAD: *J. Biol. Chem.*, **93**, 657 (1931).
- 11) S. M. HAUGE: *J. Biol. Chem.*, **108**, 331 (1935).
- 12) J. W. WILBUR, J. H. WILTON and S. M. HAUGE: *J. Dairy Sci.*, **18**, 661 (1935).
- 13) R. KUHN and K. MEYER: *Z. Physiol. Chem.*, **185**, 193 (1929).
- 14) F. HAUROWITZ, P. SWERN and M. YENSON: *J. Biol. Chem.*, **140**, 353 (1941).
- 15) H. N. BROOKLESBY and N. I. ROGER: *Fish. Res. Bd. Canada, Progress Rep. Pac.*, No. 50, 4 (1941); *Ind. Memo.* No. 6 (1941).
- 16) A. BANKS: *J. Soc. Chem. Ind.*, **56**, 13T (1937).
- 17) A. BANKS: *J. Soc. Chem. Ind.*, **63**, 8 (1944).
- 18) M. M. R. KHAN: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **9**, 8 (1952).
- 19) C. H. LEA: *J. Soc. Chem. Ind.*, **65**, 286 (1946).