魚皮結合組織の崩壊による皮脂質の酸化促進

山口 邦子・豊水 正道

(1984 年 3 月 26 日受理)

Acceleration of Lipid Oxidation in the Skin of Fish by the Disintegration of Connective Tissue

Kuniko YAMAGUCHI*¹ and Masamichi TOYOMIZU*¹

As one of the causes for which lipid oxidation proceeded preferentially in the skin during cold storage of fish in the round, it was supposed that lipids in the skin, buried in the connective tissue of skin, move to the surface from the inner layer by the disintegration of connective tissue and that the fact brings about acceleration of lipid oxidation during storage of fish.

The acceleration of lipid oxidation was examined by the degradation of connective tissue in the skin with glycosidase and proteinase. By the incubation of the skin of Pacific mackerel with hyaluronidase at 37°C for 2 h or with Pronase P at 37°C for 2 h after the preincubation at 70°C for 10 min, the value of TBA/kg skin increased with reference to control. After the incubation of the skins of four kinds of fish (Pacific mackerel, sardine, striped pigfish and plaice) with both enzymes, acceleration of lipid oxidation was observed in every skin. Increasing rates of lipid oxidation in all the skins were almost the same with hyaluronidase and Pronase P. Among these fishes; increasing rate was the highest in the skin of plaice, which was the lowest in lipid content.

魚を丸のまま低温貯蔵し、各魚種の各組織における脂質酸化の実態を調べると、多脂魚でも少脂魚でも脂質酸化は皮で選択的に進行することを前報¹⁾で述べ、これに関与する因子として皮での空気接触の容易さと高脂質含量²⁾および皮脂質そのものの不安定性³⁾を指摘した。

豊水および花岡³⁾は、細碎普通肉の -5°C 貯蔵中における脂質酸化が新鮮時の 37°C、2 時間保温後に測定した $TBA_{37^{\circ}C-2h}$ で表示した普通肉の脂質酸化感受性でよく予測されると述べた。しかし、その後 TOYOMIZU ら⁴⁾は、丸のまま -5°C に 1 カ月貯蔵した皮での脂質酸化が新鮮時の皮の $TBA_{37^{\circ}C-2h}$ では予測されないが、1 カ月貯蔵後の皮の $TBA_{37^{\circ}C-2h}$ と比例関係にあると述べ、さらに新鮮時の皮の 60°C、2 時間保温によって顕著に上昇する $TBA_{60^{\circ}C-2h}$ で表示した皮の脂質酸化感受性が -5°C、1 カ月後の皮の脂質酸化をよく予測すると述べた。魚皮は表皮と真皮とから構成されており、その主要部である真皮は硬たんばく質と多糖とを構成成分とする繊維性結合組織である。^{5,6)} 上述の実験結果は、皮組織の脂質は皮表面にのみ分布しているのではなく、繊維性結合組織中に埋没して存在し、長期に亘る凍結貯蔵あるいは 60°C 加熱処理によって皮組織が崩壊して脂質が溶出し、酸化されやすくなることを示すものである。

東ら⁷⁾も、サバ塩干品の貯蔵中における皮の軟化による皮下脂肪層から皮上表皮部への脂肪移行と脂肪酸化促進を報告している。

このような皮組織の崩壊による脂質酸化促進を明らかにする目的で、多脂魚としてマサバ、マイワシの皮、少脂魚としてイサキ、ヒラメの皮を試料とし、酵素処理による組織の崩壊と脂質酸化の上昇とについて調べた。

実験方法

glycosidase による皮組織の崩壊 glycosidase としてウシ臍丸 hyaluronidase (生化学工業 KK 製, 10.1 mg, 3030 units), *Proteus vulgaris* の産生する chondroitinase ABC (生化学工業 KK 製, 1.61 units) および *Flavobacterium keratolyticus* の産生する endo- β -galactosidase*² (九州大学農学部水産化学第二教室製 20 m units) を用いた。これら水溶液 100 μ l の単独あるいは混合物を等量の水と 30 秒ずつ 2 回ホモジナイズした 0.4 g の皮組織ホモジネートに添加し、37°C、2 時間保温後に TBA/kg 皮を測定⁸⁾した。保温に当たっては脱イオン水を添加して全試料の容積が等量になるように配慮した。Iro ら⁹⁾がサバ皮から調製した粗多糖を原料として keratan sulfate を調製するために用いた hyalu-

*¹ 九州大学農学部 (Laboratory of Fisheries Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 46-04, Fukuoka 812, Japan).,

*² endo- β -galactosidase, ケラタン硫酸分解酵素

ronidase 量と chondroitinase ABC 量およびサバ皮粗多糖中の keratan sulfate の酵素的定量のために用いた endo- β -galactosidase 量に準拠して各酵素の添加量を決めた。

Pronase P による皮組織の崩壊 0.4 g の皮組織ホモジネートに 200 μ l の脱イオン水を加え、コラーゲンの三重螺旋構造をほぐすために 70°C、10 分間加熱し、^{8,10)} 流水で冷却後、Pronase P (科研工業 KK 製、0.1~2 mg, 75~1500 units) の水溶液 100 μ l を加え、37°C、2 時間保温後に TBA/kg 皮を測定した。

実験結果

glycosidase によるサバ皮の崩壊が脂質酸化へ与える影響 魚皮ではコラーゲン、エラスチンなどの硬たんぱく質が hyaluronic acid, keratan sulfate, chondroitin sulfate などの多糖と共存して繊維性結合組織を構成している。魚皮中の多糖含量は脱脂、脱水組織 1 g 当り 13.8~2.5 mg⁹⁾ で僅少であるが、繊維性結合組織の構造に重要な役割を演じていると推察されるので、glycosidase によるこれら多糖の分解が脂質酸化の上昇へ与える影響をサバ皮を用いて調べた。

hyaluronic acid, chondroitin sulfate の N-acetylhexosamine の β -1, 4 結合を hyaluronidase で切断すると、サバ皮の脂質酸化は明らかに上昇したが、chondroitinase ABC あるいは endo- β -galactosidase によってはほとんど上昇せず、hyaluronidase にこれら glycosidase を併用しても、併用効果は認められなかった (Fig. 1)。

Pronase P によるサバ皮の崩壊が脂質酸化へ与える影響 コラーゲンは加熱によって三重螺旋構造がほぐさ

Fig. 1. Increase in lipid oxidation by degradation of skin of Pacific mackerel with glycosidases.

Control was incubated at 37°C for 2 h.

Fig. 2. Degradation of skin of Pacific mackerel with Pronase P and increase of lipid oxidation.

Control was incubated at 70°C for 10 min and then at 37°C for 2 h.

Fig. 3. Increase in lipid oxidation by degradation of skin of Pacific mackerel with Pronase P.

Control was incubated at 70°C for 10 min and then at 37°C for 2 h.

れると、Pronase P によって分解されて可溶化する。それゆえ、あらかじめ 70°C で 10 分間加熱したサバ皮ホモジネートに Pronase P を添加して 37°C、2 時間保温した後の TBA/kg 皮を測定して Pronase P によるサバ皮の崩壊と脂質酸化上昇との関係を調べた。Fig. 2 に示すように、1 mg、750 units の Pronase P の添加によって脂質酸化の上昇がほぼ最大に達したので、Pronase P の添加量を 0.2 g のサバ皮に対して 750 units とした。この Pronase P による硬たんぱく質の分解で皮組

Fig. 4. Increase in lipid oxidation by degradation of skins with hyaluronidase and Pronase P.

Table 1. Increasing rate of lipid oxidation by degradation of skins with hyaluronidase and Pronase P

Fish	Pacific mackerel	Sardine	Striped pigfish	Plaice
Lipid content (%)	35.5	30.0	5.14	1.81
Hyaluronidase (c/b × 100)*	148	130	190	272
Pronase P (e/d × 100)*	154	179	159	287

* Refer to Fig. 4.

組織はほぼ完全に崩壊した。750 units の Pronase P 処理によるサバ皮の脂質酸化上昇を Fig. 3 に示す。Pronase P によって脂質酸化は明らかに上昇したが、同時に添加した hyaluronidase との併用効果は全く認められなかった。これは、hyaluronidase が Pronase P によって分解されるためであろう。

Pronase P および hyaluronidase 処理による各種皮組織での脂質酸化上昇 マサバ、マイワシ、イサキおよびヒラメ皮の hyaluronidase と Pronase P 処理による脂質酸化上昇を Fig. 4 に示した。いずれの魚皮でもこれら酵素処理によって脂質酸化は上昇し、処理後の TBA/kg 皮は Pronase P 処理で hyaluronidase 処理

よりも高い値を示した。これらの結果は肉眼的に観察される皮組織の崩壊とよく一致した。このように、硬たんぱく質あるいは多糖の分解によって脂質酸化が上昇したことは、いずれの魚皮においても繊維性結合組織の崩壊が脂質酸化を促進することを示している。

hyaluronidase 処理では対照の 37°C, 2 時間保温後の TBA/kg を, Pronase P 処理では対照の 70°C, 10 時間保温して急冷後, 37°C, 2 時間保温後の TBA/kg をそれぞれ 100 として TBA/kg の上昇率を算出し, 酵素処理そのものの効果を検討すると, Table 1 に示すように, 各皮組織で hyaluronidase 処理と Pronase P 処理とはほぼ同一の値を示し, 多糖の分解も硬たんぱく質の分解と同じように脂質酸化促進に重要な役割を果たしていることが分かる。これら 4 魚皮での脂質酸化上昇率は脂質含量の低いヒラメ皮で最高であり, ヒラメ皮では繊維性結合組織中に埋没されて保護されている脂質の含有率が高いことを示している。

考 察

皮組織内に脂質が埋没して酸化から保護されているならば, 皮組織を崩壊すれば脂質は溶出して酸化されやすくなるであろうと推定して, 組織を壊した皮と壊さない皮 (対照) の 37°C, 2 時間保温後の TBA/kg 皮の差異を調べた。このために, 魚皮と水のホモジネートを用いたが, 魚皮はホモジナイザーによって部分的にしか切断されず完全には崩壊されていなかったためその目的を達した。

魚皮硬たんぱく質の主成分はコラーゲンであり, この大部分は酸可溶性コラーゲンである。¹¹⁻¹³⁾ それゆえ, 予備実験でマサバ皮コラーゲンを可溶化するために酢酸処理を行ったところ TBA/kg 皮が上昇し, HCl 処理によっても上昇したが, NaOH 処理では対照よりも低下した。ニワトリ磨砕肉を酸性域で貯蔵すると TBA/kg 組織の上昇がアルカリ性域での貯蔵より高かったことから, アルカリ性域での脂質酸化抑制と酸性域での促進を主張した報告もある。¹⁴⁾ しかし, TBA 反応物質であるマロンアルデヒドの安定性が pH によって著しく支配されることから, 異なる pH 下で測定した TBA 値の消長が脂質酸化を正しく反映しているかどうかには疑問がある。

それゆえ, 著者は酵素的手段による皮の繊維性結合組織の崩壊が TBA/kg 組織に与える影響を調べた。供試

各酵素の至適 pH は 5.5~7.5 にあり, 供試魚皮ホモジネートの pH は 6 前後であったことと上述の理由で pH 調整を行わなかった。hyaluronidase と Pronase P はともに各魚皮を崩壊して脂質酸化を上昇させた。このことは少脂魚でも多脂魚でも皮の表面にのみ脂質が分布しているのではなく, 組織内部に埋没されて存在していることを示し, 全脂質に対する埋没されている脂質の割合はヒラメのような少脂魚の皮で大であった。このように, 脂質には皮組織中に埋没して内蔵されている脂質もあるので, 内部脂質が皮表面に溶出することが酸化促進につながるから, 魚の保蔵にあたっては皮を保護して保蔵することが大切である。

本研究費の一部は東和食品研究振興会の学術奨励金によった。

文 献

- 1) 山口邦子・中村 孝・豊水正道: 日水誌, 50, 869-874 (1984).
- 2) 山口邦子・豊水正道・中村 孝: 日水誌, 50, 1245-1249 (1984).
- 3) 豊水正道・花岡研一: 日水誌, 46, 1007-1010 (1980).
- 4) M. TOYOMIZU, K. HANAOKA, and T. NAKAMURA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1011-1017 (1980).
- 5) 松原喜代松・落合 明・岩井 保: 魚類学(上), 恒星社厚生閣, 東京, 1965, pp. 35-41.
- 6) M. ITO, T. MORINAGA, and M. KITAMIKADO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1445-1452 (1982).
- 7) 東 秀雄・村山繁雄・築瀬正明・田部井明子: 日水誌, 20, 741-749 (1954).
- 8) R. O. SINNHUBER and T. C. YU: *Yukagaku*, 26, 259-267 (1977).
- 9) J. E. EASTOE: *Biochem. J.*, 65, 363-368 (1957).
- 10) K. A. PIEZ and J. GROSS: *J. Biol. Chem.*, 235, 995-998 (1960).
- 11) 久保田穠: 魚肉たんぱく質 (鈴木たね子・橋本周久・志水寛編), 恒星社厚生閣, 東京, 1977, pp. 59-74.
- 12) R. YOSHINAKA, M. SATO, and S. IKEDA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 42, 455-463 (1976).
- 13) S. KIMURA: *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, 525-528 (1983).
- 14) T. C. CHEN and C. WAIMALOONGORA-EK: *J. Food. Sci.*, 46, 1946-1947 (1981).