天然および養殖アユのリポキシゲナーゼ様酵素と 香気成分の生成について

章 超 樺, 白井隆明, 鈴木 健, 平野敏行

(1991 年 11 月 15 日受付)

Lipoxygenase-like Activity and Formation of Characteristic Aroma Compounds from Wild and Cultured Ayu*

Chao-Hua Zhang,^{*2,*3} Takaashi Shirai,^{*2} Takeshi Suzuki,^{*2}
and Toshiyuki Hirano^{*2}

Lipoxygenase-like activity was found in the crude extracts from the skin and gill of wild and cultured ayu. After incubation of arachidonic acid with the crude extract from the wild and cultured ayu skins, the major oxygenated product was estimated to be 12-hydroxyeicosatetraenoic acid under high-performance liquid chromatography using a Waters μ bondapak fatty acid column. On the other hand, eicosapentaenoic acid yielded 12-hydroxyeicosapentaenoic acid. This enzyme activity of wild and cultured ayu was inhibited strongly in the presence of the following reagents: BHA, esculetin, *p*-chloromercuribenzoate, SnCl_2 , CuCl_2 .

The C_9 carbonyl compounds and alcohols specifically formed from the oxidation of polyunsaturated fatty acids in the crude extract of wild ayu skin. In GC-MS chromatogram, a peak height of (E,Z)-2,6-nonadienal formed from the wild ayu skin was higher than that of the cultured ayu skin, while that of 3,6-nonadien-1-ol from the wild ayu skin was lower than that from the cultured fish skin.

養殖アユは天然アユに比べて独特の香気に欠け、外観、食味において天然アユに及ばないと言われている。著者らは養殖アユの品質向上のために、これまで生鮮の天然および養殖アユの香気の本体を解明し、その香気成分の来源を追究した。¹⁻²⁾ 養殖アユの特有のにおい成分は魚体内のリポキシゲナーゼ (以下 LOX と略記) 様酵素による高度不飽和脂肪酸の酸化から生成されることを推測した。本研究では、天然および養殖アユの皮、鰓などから粗酵素液を調製し、LOX 様酵素の特徴を調べた。また、天然アユの皮の粗酵素液を用いて酵素的に由来する揮発性生成物を検索し、天然および養殖アユの香気成分の生成の差異を比較検討した。

実験方法

試料 天然アユは、1991 年 7 月と 8 月の 2 回にわたり、栃木県那珂川と同県思川の上流で友釣りにより採捕したものを直ちに採捕地で液体窒素により急速凍結

し、ドライアイスを入れたアイスボックスに詰め、研究室に持ち帰った。養殖アユは 1991 年 7 月、東京都中央卸売市場 (築地) から愛知県産のものを活魚で購入し、天然アユと同様に処理して用いた。

粗酵素液の調製 前報²⁾と同様な方法で組織別に粗酵素液の調製を行ったが、リン酸塩緩衝液の代わりに、0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液を使用した。

モノヒドロキソンの抽出と分析 飯島ら³⁾の方法に準じ、粗酵素液 15 ml を 20°C で 1 分間インキュベート後、アラキドン酸またはエイコサペンタエン酸 (EPA) のエタノール溶液 (100 μM) を添加した。これを 20°C 10 分間インキュベート後、直ちに 0.2 M クエン酸を加え、pH 3~4 にして反応を停止させた。その後、3 倍量のジエチルエーテルで 3 回抽出し、エーテル層を約 20 ml にまで減圧濃縮させた。これに数滴の水を加え、2,000 rpm で遠心分離した後、エーテル層を無水硫酸ナトリウムカラム (15×50 mm) に通した。脱水後、再び溶媒を除

*1 魚類のにおいに関する食品化学的研究—IV (Studies on the Odor of Fishes—IV).

*2 東京水産大学食品生産学科 (Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

*3 中国湛江水産学院 (Zhanjiang Fisheries College, Jiefan Road, Xiashan Zhanjiang, Guangdong, China).

*4 飯島憲章, 帖佐 敏, 松本浩幸, 鹿山 光: 平成 2 年日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 175 (1990).

去し, 得られた残さをヘキサン/ジエチルエーテル (9:1, V/V) 1 ml に溶かし, 同溶媒で平衡化しておいたケイ酸 (約 1 g) カラムを通して 20 ml の同溶媒でカラムを洗浄し, 遊離脂肪酸を溶出させた。ついでヘキサン/ジエチルエーテル (4:6, V/V) の溶媒を 20 ml, さらにジエチルエーテル 10 ml を流してヒドロキシ酸画分を溶出させた。この画分を減圧乾固後, メタノールに溶かし, 逆相系のカラムを用いた HPLC (RP-HPLC) によって分析した。なお, ヒドロキシ酸の標品として, Sigma 社製の 12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (12-HETE) と 12-ヒドロキシエイコサペンタエン酸 (12-HEPE) を用いた。RP-HPLC の分析条件として, JASCO BIP-1 HPLC (日本分光製), μ Bondapak 脂肪酸分析用カラム (3.9 mm $\times$ 30 cm, Waters 製), JASCO 875-UV 紫外可視分光検出器 (波長, 235 nm, 日本分光製), C-R6A クロマトパックデータ処理器 (島津製) を用い, 移動相として, アセトニトリル/水/メタノール/酢酸 (45:45:15:0.02, V/V) を使用し, 流量は 1 ml/min とした。

LOX 様酵素活性の測定 German と Creveling³⁾ の方法に準じ, 各試料魚の皮, 鰹, 筋肉の粗酵素液 5 ml を 20°C で 1 分間インキュベート後, アラキドン酸エタノール溶液 (100 μ M) を添加し, 10 分間インキュベート後,

直ちに 3% のギ酸 (1 ml) を加えて反応を停止させた。その後 3 倍量の酢酸エチルを加えて初期酸化生成物を 2 回抽出し, RP-HPLC の分析に供した。酵素活性は基質アラキドン酸から酵素反応液 1 ml 当たり, 10 分間に生成される 0.1 nmol の 12-HETE をもって 1 unit とした。

酵素反応に由来する揮発性成分の捕集と同定 即報²⁾と同様にヘッドスペース法による揮発性生成物の捕集および GC-MS による分析と同定を行った。

結果および考察

初期酸化生成物と酵素活性 アユの粗酵素液にそれぞれアラキドン酸と EPA を添加して反応させた後, それらの生成物であるヒドロペルオキシドをヒドロキシ体として検出した。Fig. 1 に示すように, 養殖アユと天然アユにはいずれもアラキドン酸からはピーク 3, また EPA からはピーク 1 の生成が確認された。両ピークの溶出時間は, それぞれモノヒドロキシ酸標品の 12-HETE (ピーク 3) と 12-HEPE (ピーク 1) のそれと一致した。一方, 5 分間加熱した粗酵素液に基質アラキドン酸を加えて同様に分析したところ, ピーク 3 は検出されなかった。German ら⁴⁾ はニジマス鰹の 12-LOX に

Fig. 1. Chromatograms of RP-HPLC for hydroxy fatty acids formed from the crude extract of wild and cultured ayu skins. Arachidonic or eicosapentaenoic acid was added to a final concentration of 100 μ M to the crude enzyme of wild and cultured ayu skins and incubated for 10 min. Retention times of peaks were identical with those of authentic 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) and 12-hydroxyeicosapentaenoic acid (12-HEPE).

よるアラキドン酸と EPA の生成物として 12-HETE と 12-HEPE を同定している。アラキドン酸では、酸素 1 分子が付加される位置は C の 5, 8, 9, 11, 12, 15 位の 6 カ所である。非酵素的に酸化 (自動酸化) が起れば、各種類のヒドロペルオキシドエイコサテトラエン酸の混合物が得られるが、LOX による酵素反応では、それらに位置特異性が見られる。⁵⁾ 本研究ではアラキドン酸と EPA の酸化生成物については、C₁₂ の位置特異性や加熱による阻害効果が示され、酵素的に由来するものと思われる。

Table 1 は天然および養殖アユ組織別の LOX 様酵素活性を示したもので、両者を比較してみると、いずれも鰓、皮には強い酵素活性が認められたが、筋肉には認められなかった。この結果はすでに報告された多種魚類のそれと一致している。⁶⁾ また、既報の養殖アユ²⁾ とキューウリウオ⁷⁾ では酵素的に生成した揮発性成分は鰓と皮にのみ見られ、本酵素はアユ特有の香気成分の生成に関与することを明らかにした。LOX 様酵素は香気の強いものほどその活性が強いと思われるが、天然アユと養殖アユの皮の酵素活性にはほとんど差が見られなかった。

LOX 様酵素活性に及ぼす試薬と金属イオンの影響 本研究においては、酵素活性は試薬無添加の活性値を 100% とし、相対活性で示した (Table 2)。天然および養殖アユの酵素活性はいずれもエスクレチン、BHA、*p*-CMB によって著しく阻害され、過酸化水素とヨードアセトアミドによっても活性の低下が見られたが、エスクレチンと BHT による影響はほとんどなかった。エスクレチンは LOX の阻害剤⁸⁾ として知られており、BHA と *p*-CMB もニジマスの鰓の 12-LOX に強い阻害作用を示すと報告されている。⁹⁾ 一方、 α -トコフェロールは天然および養殖アユに対して、いずれも活性化効果を示した。 α -トコフェロールは、BHA と BHT と同じく酸化防止剤として知られているが、¹⁰⁾ 養殖アユの粘液分泌を増進する効果があるといわれている。その活性化効果はアユの香気生成にどのように関係しているのか、さらに検討することが必要と考えられた。

このほか、金属イオンを用いて LOX 様酵素に対する影響を調べたところ、Table 3 に示すごとく、Ca²⁺、K⁺ および Fe²⁺ の影響はほとんどなかったが、Sn²⁺、Cu²⁺ の存在で、活性が完全に阻害された。そのうち、SnCl₂ は LOX の特異的な阻害剤として報告されている。^{4,11)} 以上の結果から本酵素は 12-LOX と推測されるが、さらに阻害剤に対する挙動を詳しく検討する必要があると思われる。

天然アユの酵素的に由来する揮発性生成物 天然アユの皮の粗酵素液にリノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、EPA およびドコサヘキサエン酸 (DHA) をそれぞれ

Table 1. Lipoygenase-like activity in the crude extracts from ayu

Sample	Place of catch	(unit/mg protein)*		
		Gill	Skin	Muscle
Wild ayu				
A	Naka River, Tochigi	32	26	0
B	Omoi River, Tochigi	11	23	0
Cultured ayu	Fish farm, Aichi	17	23	0

* One unit refers to the production of 0.1 nmol 12-hydroxyeicosatetraenoic acid per ml after the 10 min incubation at 20°C with substrate of arachidonic acid.

Table 2. Effects of reagents on the lipoygenase-like activity in the crude extract of ayu skin

Reagents	Concentration (mm)	Relative activity (%)	
		Cultured ayu	Wild ayu
None	—	100	100
Esculetin	0.01	22	26
Esculin	0.01	98	100
H ₂ O ₂	5	43	
	1	36	67
BHA	0.01	0	0
BHT	0.01	96	108
α -Tocopherol	1	193	150
	0.1	100	
	0.01	108	
<i>p</i> -CMB	5	0	16
Iodoacetamide	5	26	53

Table 3. Effects of metal ions on the lipoygenase-like activity in the crude extract of ayu skin

Metal	Concentration (mm)	Relative activity (%)	
		Cultured ayu	Wild ayu
None	—	100	100
CaCl ₂	1.0	80	88
KCl	1.0	94	79
FeCl ₂	1.0	98	74
SnCl ₂	5.0	0	15
CuCl ₂	1.0	0	0

添加して反応させた。各々の揮発性生成物を捕集し、GC-MS で同定した。その結果、リノール酸、リノレン酸の C₁₈ ポリエン酸からは、反応生成物は検出されなかったが、Fig. 2 に示すように、*n*-6 系のアラキドン酸 (A) と、*n*-3 系の EPA (B) と DHA (C) の両系列の間に、異なった生成パターンが見られた。すなわち、アラキド

Fig. 2. Total ion chromatograms by GC-MS of volatile compounds formed from the crude extract of wild ayu skin incubated with arachidonic (A: 1, (E)-2-octenal; 2, 1-octen-3-ol; 3, (E)-2-nonenal; 4, (E)-2-octenol; 5, (Z)-3-nonenol), eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids (B and C: 1, 1,5-octadien-3-ol; 2, (E,Z)-2,6-nonadienal; 3, 2,5-octadien-1-ol; 4, 3,6-nonadien-1-ol).

ン酸 (A) では (E)-2-octenal (ピーク 1), 1-octen-3-ol (ピーク 2), (E)-2-nonenal (ピーク 3), (E)-2-octenol (ピーク 4) および (Z)-3-nonenol (ピーク 5) の 5 成分, また, EPA (B) と DHA (C) ではいずれも 1,5-octadien-3-ol (ピーク 1), (E,Z)-2,6-nonadienal (ピーク 2), 2,5-octadien-1-ol (ピーク 3) および 3,6-nonadien-1-ol (ピーク 4) の 4 成分の生成がそれぞれ確認された。この結果は既報の養殖アユ²⁾のそれと同じであるが, 特に (E,Z)-2,6-nonadienal と 3,6-nonadien-1-ol の両成分の生成比の違いが注目された。

Fig. 3 は天然アユと養殖アユの粗酵素に EPA を基質として作用させ, 酵素的に生成した揮発性成分の分析結果を示したものである。天然アユ(B)では, ピーク 2 の (E,Z)-2,6-nonadienal はピーク 4 の 3,6-nonadien-1-ol より多く生成されたが, 養殖アユでは, 逆の傾向を示した。ちなみに, においの特徴としては, 前者はキュウリ様臭で,¹²⁾ 後者はスイカのにおいが連想される。¹³⁾ この両成分の差がそれぞれ天然および養殖アユの香気パターン¹⁾に反映されることから, 両者の香気の違いはこの両

成分の組成比に左右されるものと思われる。

香気成分の生成経路の推定 野菜や果物の持つさわやかな香気は, LOX の作用で生成した脂肪酸のヒドロペルオキシドに由来する揮発性カルボニルやアルコール類より賦与されることが知られており, さらに LOX のほかにヒドロペルオキシドリアーゼやアルコールデヒドロゲナーゼなどの酵素も香気の生成に関与している。¹⁴⁻¹⁶⁾

天然および養殖アユの脂質の初期酸化について, 上述のように 12-LOX の作用が示唆されている。さらに, 酵素反応からアユ特有のカルボニル類とアルコール類が生成されたことから, 植物のものと同様に LOX 以外の酵素の関与が示唆される。

以上のことからアユ香気の主成分である (E,Z)-2,6-nonadienal について, その生成経路を推測してみると, Fig. 4 に示すように EPA は 12-LOX 様酵素の作用で, 12-ヒドロペルオキシドエイコサペンタエン酸 (n-9 ヒドロペルオキシド)⁸⁾ が生成され, さらに酵素 2 のヒドロペルオキシドリアーゼによって短鎖の C₉ の 3,6-nonadienal が生成される。この C₉ 中間生成物から, 酵素 3 の

Fig. 3. GC-MS total ion chromatograms of volatile compounds formed from the crude extract of cultured (A) and wild ayu (B) incubated with eicosapentaenoic acid. 1, 1,5-octadien-3-ol; 2, (E,Z)-2,6-nonadienal; 3, 2,5-octadien-1-ol; 4, 3,6-nonadien-1-ol.

Fig. 4. Prospective pathways of formation of ayu volatile compounds from lipoxygenase-catalyzed oxidation of eicosapentaenoic acid in the ayu skin tissue.

イソメラーゼによって (E,Z)-2,6-nonadienal, 酵素 4 のアルコールデヒドロゲナーゼによって 3,6-nonadien-1-ol がそれぞれ生成されるものと思われる。C₈ の 1,5-octadien-3-ol と 2,5-octadien-1-ol はわずかに生成し、これは C₈ 生成物の副産物と思われる。Hsieh と Kinsella⁹⁾ はこれら C₈ 化合物の生成がフリーラジカルによるものと指摘している。DHA も EPA と同様な経路で最初の n-9 ヒドロペルオキシドから、中間体の 3,6-nonadienal を経て、最終的に C₉ 化合物が生成していくものと考えられる。アラキドン酸の場合も、初期酸化産物の n-9 ヒドロペルオキシドから (Z)-3-nonenal の中間体が生成され、さらに酵素 3 によって (E)-2-nonenal が生

成されるものと推測される。

天然および養殖アユの香気生成に及ぼす影響因子 一般に、香りの違いは香りを構成するにおい成分 (寄与している揮発性物質) の種類とその相対濃度 (量比) によって決まると考えられる。¹⁰⁾ 天然および養殖アユの香気に寄与する揮発性物質の種類が同じで、¹⁾ その香りの違いは前述のように (E,Z)-2,6-nonadienal と 3,6-nonadien-1-ol の両成分の生成比によるものと推測されたが、それらの生成は全体の酵素の活性や基質特異性などによって左右されるものと考えられる。LOX 様酵素は天然アユと養殖アユの間に、活性や基質特異性などについて差が認められなかったが、*in vitro* におけるポリエン酸の

最終産物である C_9 カルボニルとアルコールの生成比については、両者の間に明らかな差がみられた。このことから天然および養殖アユの香気の違いは Fig. 4 に示す酵素 3 と酵素 4 による影響が大きいと推測される。

また、天然および養殖アユでは、餌、運動量、生息環境などは明らかに異なる。これらの因子はアユの脂肪酸や酵素系に影響を及ぼすにちがいない。アユ組織の脂肪酸は餌飼料の影響を受けることが知られている。²⁰⁻²³ 部位別と季節による天然および養殖アユの全脂肪酸組成の結果²³から、LOX 様酵素と反応性のある $C_{20:4}$, $C_{20:5}$ および $C_{22:6}$ のポリエン酸のうち、概して天然アユに $C_{20:5}$ (EPA) が養殖アユより多いことが認められた。一方、配合飼料と異なり天然餌料である附着藻類には $C_{18:3}$ が多く、²³ 魚類のリノレン酸代謝経路²⁴を経て、EPA を生合成することが考えられる。そのほか天然アユはなわばりをつくり、つねに激しい水流中に生息しているのに対して、養殖アユはほとんど静水に近い環境で飼育されており、運動量により体内の酵素系の性質が違いを生ずることも考えられる。アユ香気に対するこれらの因子による影響については今後の研究に期待される。

本研究を行うに当たり、LOX による代謝産物モノヒドロキシン酸の測定法について、ご助言をいただいた広島大学生物生産学部の飯島憲章博士、および天然アユの入手について多大にご協力していただいた栃木県水産試験場の方々感謝する。

文 献

- 1) T. Hirano, C.-H. Zhang, A. Morishita, T. Suzuki, and T. Shirai: Identification of volatile compounds in ayu fish and its feeds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 547-557 (1992).
- 2) C.-H. Zhang, T. Hirano, T. Suzuki, and T. Shirai: Enzymatically generated specific volatile compounds in ayu tissues. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 559-565 (1992).
- 3) J. B. German and R. K. Creveling: Identification and characterization of a 15-lipoxygenase from fish gills. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 2144-2147 (1990).
- 4) J. B. German, G. G. Bruchner, and J. E. Kinsella: Lipoxygenase in trout gill tissue affecting on arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **875**, 12-20 (1986).
- 5) 上田夏生, 山本尚三: 動物組織のリボキシゲナーゼとその反応性. *農化誌*, **62**, 50-54 (1988).
- 6) R. J. Hsieh, J. B. German, and J. E. Kinsella: Lipoxygenase in fish tissues: Some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 680-685 (1988).
- 7) 章 超輝, 平野敏行, 鈴木 健, 白井隆明, 森下昭寿: キュウリウオのにおい成分とその生成について. *日水誌*, **58**, 773-779 (1992).
- 8) 石崎泰樹, 室田誠逸: シクロオキシゲナーゼ, リボキシゲナーゼ-アラキドン酸カスケードの代謝, 総合脂質科学 (鹿山 光編), 恒星社厚生閣, 東京, 1989, p. 309.
- 9) R. J. Hsieh and J. E. Kinsella: Lipoxygenase generation of specific flavor carbonyl compounds in fish tissues. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 279-286 (1989).
- 10) 藤谷 健: 抗酸化性物質, 総合脂質科学 (鹿山 光編), 恒星社厚生閣, 東京, 1989, pp. 616-628.
- 11) D. B. Josephson, R. C. Lindsay, and D. A. Stuibert: Enzymic hydroperoxide initiated effects in fresh fish. *J. Food Sci.*, **52**, 596-600 (1987).
- 12) D. A. Forss, E. A. Dunstone, E. H. Ramshaw, and W. Stark: Flavor of cucumbers. *J. Food Sci.*, **27**, 90-93 (1962).
- 13) T. R. Kemp, D. E. Knavel, L. P. Stoltz, and R. E. Lundin: 3,6-Nonadien-1-ol from *Citrullus vulgaris* and *Cucumis melo*. *Phytochemistry*, **13**, 1167-1170 (1974).
- 14) 五十嵐 脩, 金田尚志, 福場博保, 美濃 真: 食品と過酸化脂質, 過酸化脂質と栄養, 光生館, 東京, 1986, pp. 125-238.
- 15) 南出隆久: 果実, 野菜の脂質とリボキシゲナーゼの生理作用, *日食工誌*, **24**, 186-199 (1977).
- 16) 畑中顯和: 緑葉の香, 総合脂質科学 (鹿山 光編), 恒星社厚生閣, 東京, 1989, pp. 845-858.
- 17) A. Hatanaka, J. Sekiya, and T. Kajiura: Enzyme system catalyzing formation of *cis*-3-hexenal and *n*-hexenal from linolenic acid and linoleic acid in Japanese Silver (*Farfugium japonicum* Kitamura) leaves. *Plant Cell Physiol.*, **18**, 107-116 (1977).
- 18) A. J. Macleod and H. E. Pikk: Formation of (E)-hex-2-enal and (Z)-hex-3-en-1-ol by fresh leaves of brassica. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 469-475 (1979).
- 19) 蔵島 豊: 食品分析—今後の展開, *日食工誌*, **36**, 609-614 (1989).
- 20) 新聞弥一郎, 田口脩子: 天然および養殖アユの脂肪酸組成について, *日水誌*, **30**, 918-925 (1964).
- 21) 竹内昌昭, 吉川誠次: 投与脂質がアユの体質, 香りと味に及ぼす影響について, *栄養と食糧*, **22**, 341 (1969).
- 22) 岡 彬, 鈴木規夫, 渡辺 武: アユ仔稚魚体脂質脂肪酸組成に及ぼすタマシジコ脂肪酸の影響, *日水誌*, **48**, 1159-1162 (1982).
- 23) 平野敏行, 須山三千三: 天然および養殖アユの脂質の脂肪酸組成とその季節変化, *日水誌*, **49**, 1459-1464 (1983).
- 24) 鹿山 光: 多不飽和脂肪酸の代謝経路, 総合脂質科学 (鹿山 光編), 恒星社厚生閣, 東京, 1989, pp. 270-275.