

カツオ筋肉脂質に関する研究—II

低温貯蔵中における各脂質区分の変化

西元 諄一・原田 良一・御木 英昌*

Studies on Lipid in the Muscle of Skipjack (*Katsuwonus pelamis*)—II

Deterioration Pattern of major Lipid Classes in the Muscle stored at 0°C

Jun-ichi NISHIMOTO*, Ryoichi HARADA* and Hidemasa MIKI*

Abstract

The deterioration of lipids of minced skipjack muscle stored at 0°C was investigated from the view-point of the decomposition of phospholipid (PL) and neutral lipid (NL).

The pattern of deterioration of muscle lipid expressed as the decrease in $C_{22:6}$ acid of PL or NL, showed that PL underwent more severe hydrolysis and oxidation than NL did, and also oxidation of free fatty acid was more severe in early stage of storage. This pattern, therefore, was assumed to be a characteristic of deterioration of skipjack muscle lipid.

The presence of lipolytic enzymes was determined by histochemical method, and it was noted that in this case the stained colour, due to phospholipase action, of salts of liberated fatty acid was positive in surface and deep muscles, while the stained colour, due to lipase action, of salts of liberated fatty acid was negative in the fresh muscle.

魚肉保蔵の手段として一般に低温貯蔵がなされており、その品質保持は微生物による腐敗防止ばかりでなく品質低下防止が重要であるといわれ、脂質の加水分解・自動酸化およびこれらによる魚肉の品質劣化は強い関心の的となっている。脂質劣化の測定に関しては種々試みられているが¹⁻⁹⁾ とくに遊離脂肪酸の中 $C_{22:6}$ 酸量の変化が注目され^{7), 10)}, $C_{22:6}$ 酸減少率を指標とすることが提案されている。最近これにより低温貯蔵中におけるマアジ普通肉の脂質変化が調べられ、りん脂質 (PL) の加水分解が中性脂質 (NL) に較べて大きいことが認められた¹¹⁾。先にカツオ筋肉脂質組成比が試料により変動することを認めた¹²⁾が本報ではカツオを水揚げした後の低温貯蔵中の脂質の変化について PL を主体にしらべそれと併行して組織化学的に加水分解酵素の存在を顕微鏡下で実証することを試み若干の考察をした。

実験方法

試料

薩南あるいは南方カツオの普通肉のみを均一な細碎混和肉としこれから約 10g の肉塊

* 鹿児島大学水産学部食糧保蔵学研究室 (Laboratory of Food Preservation, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

(28φ×20mm) を作製し、蓋付シャーレに入れて 0°C に貯蔵し、また全魚（丸のまま）をポリエチレン袋に入れて保管し経時ごとに試料を採取した。

方 法

脂質の抽出と分画

試料から脂質を BLIGH and DYER 法¹³⁾ で抽出し、抽出脂質を HANSEN and OLLEY 法¹⁴⁾ で PL と非りん脂質区分に分画、さらに非りん脂質区分を McCARTHY and DUTHIE の方法で遊離脂肪酸 (FFA) を分離し NL 区分を得た。各脂肪酸 (FA) 組成はガスクロマトグラフィ (GLC) (島津 GC-3BF, 2mm×2m glass column, 10% DEGS, 60~80mesh Shimalite W, カラム温度 185°C) で分析した。FA 量は内部標準法¹⁰⁾ (n-octadecan 使用)¹⁶⁾ によって求めた。

酵素の組織化学的証明法

組織の氷結切片について、全脂質は Sudan III 染色¹⁷⁾、PL は SMITH-DIETRICH 法と SCHULZ 法¹⁸⁾ (コレステロール存在確認) を併用することにより観察した。また組織中の酵素の存在を間接にしらべる武内ら¹⁹⁻²⁰⁾ の方法により、Tween 40, 60 および 80 を基質として lipase の存在を、lecithin を基質として phospholipase (PLase) の存在を観察した。

結果および考察

NL および PL の総 FA 量ならびに FFA 量の変化

Table 1 に示したような脂質組成をもつカツオを 0°C に貯蔵した場合の各カツオの NL, PL および FFA 区分の FA の変化は Fig. 1 のようであった。各カツオ筋肉脂質の NL および FFA 区分の FA 量変化は小さく、PL 区分では A, B 試料で顕著な減少を示し、とくに A では 36 時間後当初量の約 1/2 に達した。このような PL 区分での変化速度の相異は冷蔵中のカツオ筋肉における PLase 活性度によることもあろう²¹⁾ が、恐らく供試カツオが漁獲直後のものでなく、また船中での保管条件も異っていたのでこれらが影響し、貯蔵当初の C_{22:6} 酸量の多寡にもよると考えられる。高間ら²²⁾ はカツオと同系の回游魚であるホンマグロでは

Table 1. Contents of fatty acids constituting neutral lipid, phospholipid and free fatty acid of minced skipjack muscle.

Skipjack	Total lipid content (g/100 g muscle)	Total content of FA (mg/100 g muscle)		
		NL	PL	FFA
A	0.80	242	354	44
B	0.67	—	262	—
C	0.86	296	99	35
D	0.57	228	66	20

FA: Fatty acid, PL: Phospholipid, NL: Neutral lipid, FFA: Free fatty acid.

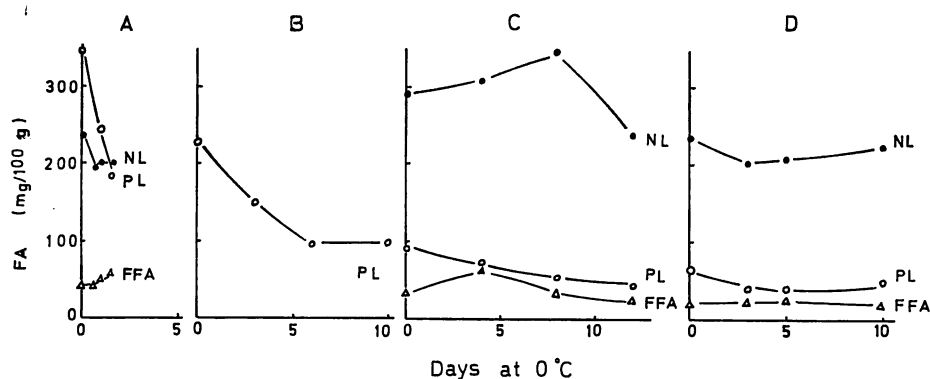


Fig. 1. Changes in total contents of fatty acids constituting neutral lipid (NL), phospholipid (PL) and free fatty acid (FFA) of minced skipjack muscle lipids.

triglyceride がかなり分解されたと報告しているが、カツオの場合は他の魚種（タラ⁵⁾，キハダマグロ，スケトウダラ，スズキ，ブリ⁹⁾ およびマアジ¹¹⁾）でいわれているように脂質分解の主体は PL であることが明らかになった。

NL, PL および FFA 中の構成 FA 量の変化

供試カツオ筋肉脂質の主な構成 FA¹²⁾ の冷蔵中の変化は Fig. 2 のように PL 区の C_{22:6}

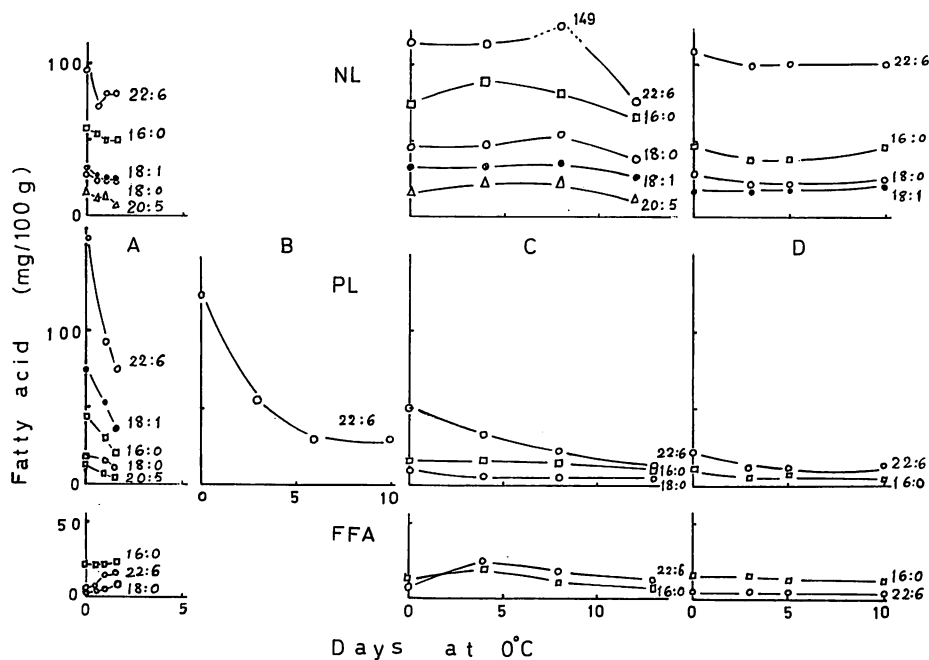


Fig. 2. Changes on contents of main fatty acids constituting NL, PL and FFA of minced skipjack muscle lipids.

酸（以下 PL-22:6 と略す）の減少が顕著であった。これは貯蔵中の脂質分解による $C_{22:6}$ 酸の遊離量と遊離後の酸化された量との差が表示されるので主な変化の総合的結果を示していると考えられ、カツオ筋肉脂質の変化は PL-22:6 量の変化で代表し得るようである。なお、供試カツオ筋肉の PL-22:6 量が当初から異り、貯蔵中のそれぞれは PL-22:6 含量によって減少割合が異り、含量の多いものがその割合が大きかった。ところが、供試魚中最も PL-22:6 量の多い A の含量にすべての試料の当初含量があったと仮定し、B の初値を A の変化カーブ上にプロットし B の変化をみると初期の一部は A のカーブによくのり、B の初値は A での 0.5 日貯蔵に相当した。ゆえに B の貯蔵日数に 0.5 日加算した日数が A を基準とした時の貯蔵日数となる。C、D について同様にとすると、C では約 3.5 日、D では約 11 日加算した日数が貯蔵日数となり、これを一連の曲線で示せば Fig. 3 のようになる。釣獲直後の

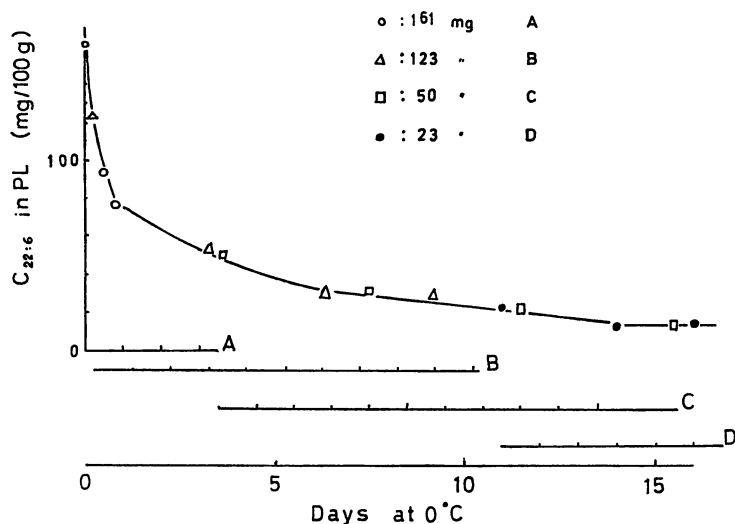


Fig. 3. Changes of contents in $C_{22:6}$ acid of PL.

試料が得られなかったので試料により測定値は異なったが、新鮮なものを貯蔵すれば Fig. 3 のような変化パターンとなると考えられる。すなわち貯蔵初期（1～2日間）に急激に減少（約60%）、3～5日目やや緩かになり、その後徐々に減少15日目以降はほとんど変化がみられなかった。上の変化を脂質の加水分解と酸化の相互関係として捉えるため庄野・豊水¹⁰⁾の方法を適用し、これらの関係を Fig. 4 に示した。PL は貯蔵初期にかなりの加水分解があり、加水分解前 (ester form) 酸化が貯蔵10日前後にみられ、加水分解後 (liberated FA) の酸化が貯蔵初期に大きかった。FFA 区分の酸化は顕著で加水分解によって遊離した $C_{22:6}$ 酸の大部分が酸化され、脂質の加水分解と酸化の関係が明らかに認められた。また NL での FFA 生成が少ないので加水分解は貯蔵初期わづかであると考えられ、したがってこの酸化もわづかであったが貯蔵後期に加水分解、FFA の酸化も大きかった。これらの変化のうち、分解は主に加水分解酵素によると考えられるが、カツオにおいても脂質含量1.3%のアジ筋肉（0°C 貯蔵）で示された変化パターン¹¹⁾、すなわち NL の加水分解、酸化による

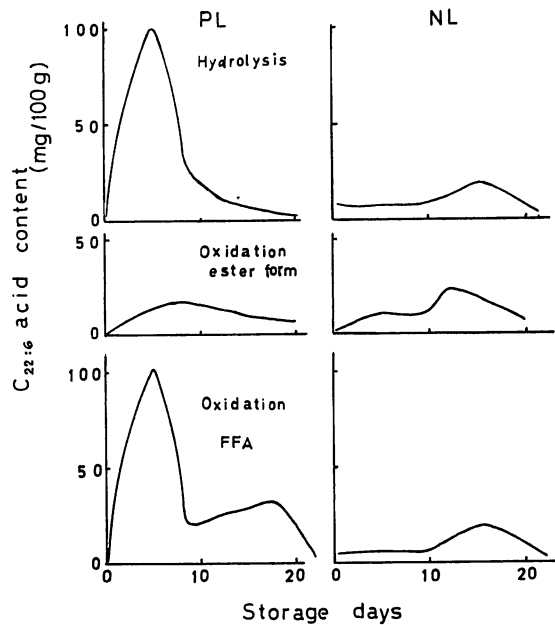


Fig. 4. Pattern of hydrolysis and oxidation expressed as variations of $C_{22:6}$ acid content constituting PL and NL.

$C_{22:6}$ 酸減少が共に少なく、PL の加水分解、酸化の進行による $C_{22:6}$ 酸減少が大きく、NL は加水分解にも酸化にも PL より安定であることと同じ傾向を示し、さらに lipase より PLase 活性が優勢であるといわれていることと一致した。しかし、貯蔵初期に PL の加水分解、FFA の酸化がかなり活潑である変化パターンはアジの場合と必ずしも一致しなかったが、PL の貯蔵初期での加水分解がとくに大きかったことは和田ら²³⁾の破碎タラ肉 0°C 貯蔵での実験結果と同じ傾向であった。

脂質分解酵素分布の組織化学的検出

冷蔵中における加水分解に関与する酵素がカツオ以外の魚種において検出されている²⁴⁻²⁸⁾がカツオでは報告されていない。Plate I-IV は NL および PL の分布ならびに筋肉中の酵素分布を組織化学的に調べた結果である。Plate I は sudan III による染色結果であり貯蔵脂肪として NL が皮下に多く存在することを示す。PL を検出するため、複合脂質およびコレステリンに陽性である SMITH-DIETRICH 法（黒色を呈する）とコレステリンのみを染色する SCHULZ 法（緑色を呈する）を併用してみた結果が Plate II であるが Plate II-(E), (F) のようにコレステリンの存在はわずかで SMITH-DIETRICH 法で染色された部分の大部分が PL と判断され表層部にかなり存在するもののようであった。本実験で用いた方法による NL, PL およびコレステリンの分布観察は細胞間、結合組織に限られており、細胞内に存在する複合脂質の検出は出来なかった。なお、用いた試料の脂質含量は、表層肉（表面から 8~10mm）で 1.34g/100g tissue, 深部肉（中心部）で 0.53g/100g tissue, NL 含量は表層肉

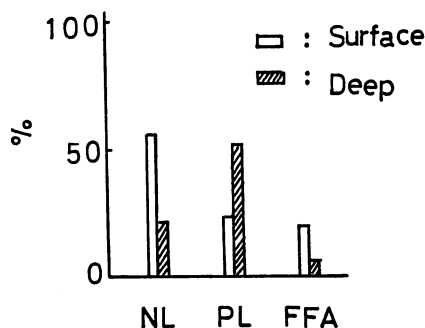


Fig. 5. The proportion of NL, PL and FFA content to total lipid content in skipjack muscle.

で 772mg/100g tissue, 深部肉で 167mg/100g tissue であり, PL 含量は表層肉 334mg/100g tissue, 深部肉 275mg/100g tissue を示し, NL 含量が表層, 深部肉で著しく異なったのに対し, PL ではそれらの差が僅かであった。また, 全脂質量に対する NL, PL の割合は Fig. 5 の様で, NL では表層肉で約 56%, PL では深部肉で約 53% を占めた。これらの結果は組織化学的観察による所見と一致した。

Plate III は lipase の存在を観察した結果である。すなわち, lipase により生成した FA 塩をコロイドニール青で染色し紫色を呈する部で判定したが, 表層, 深部肉とも新鮮肉では検出されず, 0°C 45 時間放置試料で微かに染色され存在が認められた。これらの結果よりカツオ筋肉組織に lipase が存在することは証明されたが, 市川²⁹⁾ がコイ筋肉の lipase 活性が即殺魚でみられず腐敗初期に顕著な活性がみられたとのべていることから, カツオ組織でも同様であろうと考えられたが鮮度低下後に活性化するかあるいは細菌の lipase 作用によるのかは不明である。なお, カツオの lipase は細胞間, 結合組織よりも細胞内に主として存在するのではないかと考えられるが今後の問題であろう。Plate IV は PLase により生成した FA 塩をコロイドアニリン染色 (青色を呈する) した結果であるが表層, 深部肉ともその存在が認められその分布は両者に大差はないと思われた。

試料の状態による変化パターンの相異

組織化学的実験に用いた切身の表層部肉は PL 量 265mg/100g tissue, PL-22:6 量 64mg/100g tissue, 深部肉ではそれぞれ, 226, 34mg/100g tissue で, 貯蔵中の PL-22:6 量の変化は Fig. 6 (A) のようで表層肉での変化が著しく, 深部ではほとんど変化はなかった。これは組織化学的観察結果, 酵素分布が表層, 深部肉で大差なかったことから基質の濃度 (含脂量) と酵素の活性度の差異に影響されたものであろう。一方破碎混和肉では Fig. 6 (B) のように PL-22:6 量減少は表層, 深部肉で同じ傾向を示した。破碎肉を試料とした場合の筋肉脂質の変化は, 和田ら²⁸⁾ がタラでの実験においてフィレーよりも破碎肉の場合に分解され易いことを確かめており, 破碎組織では筋繊維の破壊もあり細胞内物質の流出が考えられるので脂質の酵素的分解による変化パターンの解析には慎重な考慮を払わねばならない。なお, 表層肉中の全脂質に対する PL の比率は深部肉のそれより小さいが, 量的には深部より多い

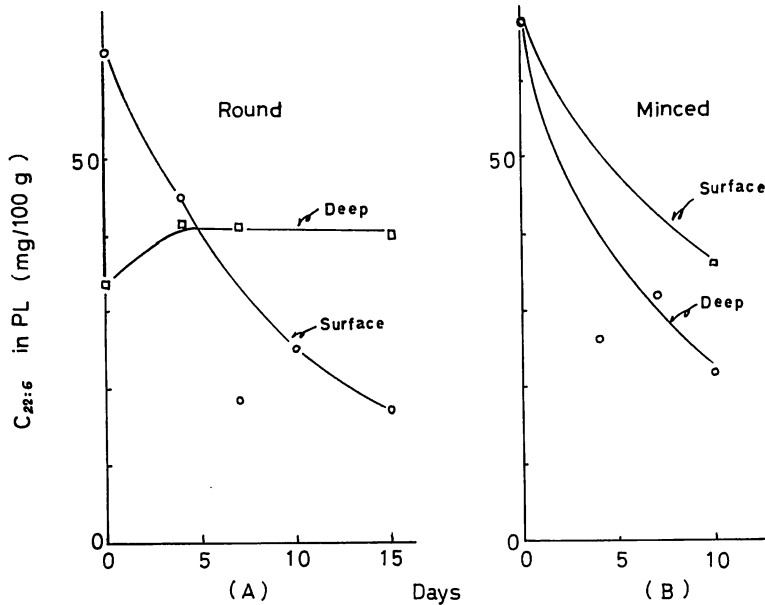


Fig. 6. Changes of $C_{22:6}$ acid content in PL of skipjack muscle stored at 0°C .

のでその分解生成物が多いことは推察されるが酵素分布の面からみて深部で全く変化がなかったことは説明できなかった。

魚肉脂質の加水分解酵素の分布，その単離などについての報告は少ないので実証的実験として組織化学的手法でその分布の検出を試みたが充分解明したとはいえず，さらに観察例を増やすべきであろう。しかし，魚肉脂質ならびにその加水分解酵素の分布についてまとめると Table 2 のように単純に結論すると PLase が lipase 活性より優勢であろうと思われた。したがって，カツオ筋肉脂質の変化パターンから貯蔵初期にかなり加水分解し，それは主として PLase 群による PL の分解であり，後期では lipase による NL の分解であろうと推察

Table 2. Intensity of stained colour of lipid in the muscle tissue of skipjack.

	Surface dorsal muscle	Deep dorsal muscle
Total lipid	+++	+
Phospholipid	++	+
Lipase	— (+)*	— (±)*
Phospholipase	+	+

+++ : positive (strong)

++ : " (slightly strong)

++ : " (common)

— : negative

*() : after storage for 10 days at 0°C

された。PL-22:6の貯蔵中の減少は加水分解、酸化の総合的關係を示し脂質劣化の程度を示すものと考えられた。これらと関連して筋肉中の脂質分解酵素の分布は、PLase群が表層、深部肉に存在し貯蔵初期にかなり活潑に作用するらしいことを観察した。

要 約

カツオ筋肉脂質の0°C貯蔵中の変化を各脂質区分ならびにその構成脂肪酸量の変化から検討し次の結果を得た。

1. 魚肉脂質の劣化の主体はカツオでも他の魚種と同様りん脂質であった。
2. 脂質劣化パターンから貯蔵初期にりん脂質がかなり加水分解し、後期に中性脂質が分解するものと判断された。
3. 筋肉中の脂質分解酵素の存在を組織化学的にしらべ、phospholipase群が表層および深部肉組織に存在し新鮮組織で明らかであった。一方、lipaseは新鮮組織では反応検知し難かったが古い組織で検出された。

終りに本実験に有益な御助言を賜った本学部太田冬雄教授に感謝する。

文 献

- 1) W. J. DYER and D. I. FRASER: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **16**, 43-52 (1952).
- 2) J. A. LOVERN, J. OLLEY and H. WATSON: *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 327-337 (1959).
- 3) J. OLLEY and J. A. LOVERN: *ibid.*, **11**, 644-652 (1960).
- 4) E. G. BLIGH: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **18**, 143-145 (1961).
- 5) J. A. LOVERN and J. OLLEY: *J. Food Sci.*, **27**, 551-559 (1962).
- 6) J. OLLEY, R. PIRIE and H. WATSON: *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 501-516 (1962).
- 7) J. OLLEY and W. R. H. DANCAN: *ibid.*, **16**, 99-104 (1965).
- 8) E. G. BLIGH and M. A. SCOTT: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **23**, 1025-1036 (1966).
- 9) 衣巻豊輔・飯田 遙・新間脩子: 東海水研報告, **61**, 27-41 (1970)
- 10) 庄野壽彦・豊水正道: 日水誌, **37**, 912-918 (1971).
- 11) 庄野壽彦・豊水正道: 日水誌, **39**, 417-421 (1973).
- 12) J. NISHIMOTO and M. TAKEBE: *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **26**, 111-118 (1977).
- 13) E. G. BLIGH and W. J. DYER: *Can. J. Biochem. physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
- 14) S. W. F. HANSON and J. OLLEY: *Biochem. J.*, **89**, 101p-102p (1963).
- 15) R. D. MCCARTHY and A. H. DUTHIE: *J. Lipid Res.*, **3**, 117-119 (1962).
- 16) 高木茂明・和氣三男・有本邦太郎: 油化学, **18**, 67-72 (1969).
- 17) 緒方知三郎: “病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき”, 南山堂, 東京, 1957, pp. 177-181.
- 18) 田中克己: “顕微鏡標本の作り方”, 裳華房, 東京, 1957, pp. 238-239.
- 19) 武内忠男・古田睦広・吉村 清: 東京医事新誌, **70**, 319-321 (1953).
- 20) 武内忠男・古田睦広・吉村 清: 東京医事新誌, **70**, 483-485 (1953).
- 21) 豊水正道・庄野壽彦: 冷凍, **47**, 366-375 (1972).
- 22) 高間浩蔵・座間宏一・五十嵐久尚: 北大水産彙, **18**, 240-247 (1967).
- 23) 和田 俊・小泉千秋・野中順三九: 日水誌, **43**, 1595-1599 (1977).

-
- 24) J. D. WOOD: *Can. J. Biochem. physiol.*, **37**, 937-943 (1959).
25) M. YURKOWSKI and H. BROCKERHOFF: *J. Fish. Res. Bd. Canada.*, **22**, 643-652 (1965).
26) E. BILINSKI and R. E. E. JONAS: *ibid.*, **23**, 207-220 (1966).
27) E. BILINSKI and R. E. E. JONAS: *ibid.*, **23**, 1811-1813 (1966).
28) R. E. E. JONAS and E. BILINSKI: *ibid.*, **24**, 2555-2561 (1967).
29) 市川 収：“食品組織学―組織化学的食品構造論”，光生館，東京，1971，pp. 320.

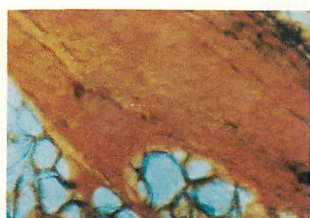
Explanation of plates

Plate I. Location of lipid in the dorsal muscle.

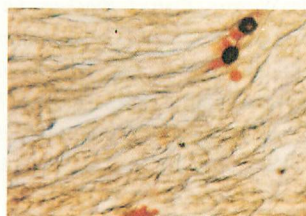
Plate II. Location of phospholipid and cholesterine in the dorsal muscle. (C) and (D) are coloured by Smith-Dietrich's method, and (E) and (F) are coloured by Schulz's method.

Plate III. Location of lipase in the dorsal muscle.

Plate IV. Location of phospholipase in the dorsal muscle.



←(A)
Surface
× 500



(B) →
Deep
× 100

Plate I



←(C)
Surface
× 500



(D) →
Deep
× 500

Plate II

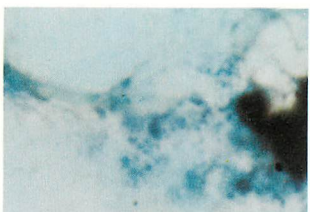


←(E)
Surface
× 100

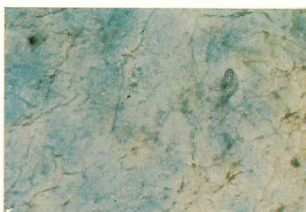


(F) →
Deep
× 500

Plate III



←(G)
Surface
× 500



(H) →
Deep
× 100

Plate IV



←(I)
Surface
× 100



(J) →
Deep
× 100