

## 異なる低温度下で保存された魚の遊離多価不飽和脂肪酸量の差異

佐二木順子, 高橋 勝弘

## Differences of polyunsaturated fatty acids among fishes stored under low and frozen temperatures.

Junko SAJIKI and Katsuhiko TAKAHASHI

## Summary

To investigate the influence of preservation conditions at low temperatures on the quality of fish, crude lipid contents, peroxide values (POV), concentrations of arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were measured in lipophilic fractions extracted from viscera and flesh of a few fishes (bonito, sea bream and anchovy) stored at various temperatures (5°C, -20°C and -70°C for 30 days.)

Changes of crude lipid contents of samples varied in fish species after the preservation. In both portions, viscera and flesh of sea bream, lipids increased after the preservation at all temperatures. On the other hand, those in viscera of bonito decreased at all temperatures, more remarkably at colder conditions. The more the preservative temperature fell, the lesser POV became (-70°C < -20°C < 5°C). Under all conditions, both POV and PUFA concentrations showed higher in the viscera than in flesh of all fishes. In viscera of bonito and sea bream stored even at -70°C, the liberation of PUFA was observed. In flesh of all fishes, both POV and PUFA concentrations were depressed by storing at -70°C.

A positive and significant correlation ( $r=0.609$ ) was observed between POV and PUFA concentrations. This shows that a depression of the liberation of PUFA from lipid is important for prevention of fish from lipid peroxidation.

In conclusion, it is necessary to select the suitable cold temperature for the preservation depending on the species or portion of fish for the purpose of preventing the debasement.

## はじめに

魚介類中に多く含まれる多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は酸化されやすいため, その酸化物が品質の劣化はもとより, ヒトをはじめ動物に対し種々の障害を引き起こすものと考えられている<sup>1-3)</sup>。

著者らは多量のエイコサペンタエン酸 (EPA) や酸化されたEPAが下痢を引き起こすことをウサギの腸管試験により示した<sup>4)</sup>。経口的に投与したPUFAの下痢原性は低いと思われるが, 多量のPUFAが遊離した魚を食べた場合, 消化管内における中性脂質やリン脂質の加水分解による遊離PUFA量を加算すると下痢原性を示す可能性が考えられる<sup>5)</sup>。

漁獲後, 魚のホスホリパーゼによるリン脂質からの遊離脂肪酸の増加が不飽和脂肪酸の酸化を助長しているという事実<sup>6)</sup>からも, 魚介類中に含まれる遊離PUFA濃度を把握することは食品衛生上重要であると考えられる。

本実験では, 低温保存された魚からどのくらいのPUFAが遊離され, 酸化されるかを (魚の主要PUFAについて) 調べた。特に保存温度, 期間, 魚の種類, 魚の内臓と肉部分の差異に注目して検討した結果, 魚の種類と部位による差を見いだした。

## 実験材料ならびに方法

## 実験材料ならびに機器

魚は市販の新鮮カツオ (*Katsuwonus pelamis*), タイ (*Pagrus major*), カタクチイワシ (*Engraulis japonica*), を用いた。魚は内臓と身 (筋肉部分) に分け, 均一試料を得るためホモジナイズし, それぞれ5°C, -20°C, -70°Cで30日間保存した。標準試料のEPA, アラキドン酸 (AA), ドコサヘキサエン酸 (DHA) はSigma Co. Ltd. より購入した。

高速液体クロマトグラフ (HPLC), UV検出器, ならびに記録計はそれぞれLC-6A, SPD-6A, C-R6A (島津製作所) を使用した。

## 実験方法

## 1. 魚ホモジネート中の過酸化度の測定

ヨード滴定法<sup>7)</sup>により過酸化度 (POV, peroxide value) を測定した。

## 2. 魚からの脂質の抽出

既報の著者らの方法<sup>8)</sup>によってアセトン, エーテルにて抽出し, その一部については重量測定法により粗脂肪量の測定を行った。

## 3. 遊離PUFAの測定

既報<sup>9)</sup>にもとずき5mgの魚ホモジネートに相当するエーテル抽出残渣をメタノールに溶解し, メタノール可溶分画の20 $\mu$ lをHPLCに注入した。標準AA, EPA, DHAとの比較により

異なる低温度下で保存された魚の遊離多価不飽和脂肪酸量の差異

遊離PUFA (AA, EPA, DHA) の濃度を算出した。HPLCの測定条件は次のとおりであった。カラム; ODS (4.6mm i.d. x 250mm, 島津製作所), 溶離液; アセトニトリル/メタノール/水/リン酸 (53:20:17:0.1, v/v/v/v), 流速; 1.2ml/min, 測定波長; 195nm.

## 結 果

### 1. 魚ホモジネート中の粗脂肪量ならびにPOVについて

新鮮魚類を身と内臓に分けホモジナイズし均一になるよう調整した直後の検体, ならびにそれを5℃, -20℃, -70℃で30日間保存した検体の粗脂肪量と過酸化度(POV)を表1, 2に示した。

Table 1 Total lipid contents (%)\* in fish stored at different temperatures after 30 days

Fish	Portion	Before storage	Storing temperature		
			5℃	-20℃	-70℃
Bonito	Flesh	3.3	3.6	3.6	3.0
	Viscera	2.9	2.6	2.0	2.0
Sea-bream	Flesh	4.2	6.3	5.7	4.7
	Viscera	31.7	42.2	40.1	33.3
Anchovy	Flesh	3.6	4.9	5.0	3.8
	Viscera	8.6	9.8	8.4	8.6

\* Amounts of total lipids are shown with their percentage to fish wet weight

Table 2 POV of fish stored at different temperatures after 30 days

Fish	Portion	Before storage	Storing temperature		
			5℃	-20℃	-70℃
Bonito	Flesh	4.5	5.3	2.1	0
	Viscera	15.9	57.3	27.1	17.7
Sea-bream	Flesh	1.0	7.3	2.0	0
	Viscera	24.9	42.7	15.5	10.4
Anchovy	Flesh	20.8	21.9	31.2	3.1
	Viscera	57.3	82.3	78.1	48.9

POV are shown by mequiv/kg fish wet weight

3種類とも身の粗脂肪量は低く, 類似した値を示したが, 内臓の値は魚の種類により差が認められた。とくにタイの内臓の粗脂肪量は高値を示し, カツオの内臓の約10倍であった。保存による粗脂肪量の変動について新鮮ホモジネートと比較した場合, -70℃で保存したカツオの身に0.3%の低下, 5℃, -20℃, -70℃で保存したカツオの内臓にそれぞれ0.3, 0.9, 0.9%の低下, -20℃保存のイワシの内臓に0.2%の減少が認められたが, その他の検体には粗脂肪量の増加が認められた。タイの身の増加は5℃で2.1%, -20℃で1.5%, -70℃で0.5%と特に大きかった。

POVについてはすべての検体で保存温度が低いほど低値を示し, 5℃保存のものは新鮮ホモジネートに比べ高値であった。中でもカツオ内臓ではすべての保存温度下で新鮮ホモジネートに比べPOVが増加し, 5℃で3.6倍, -20℃で1.7倍, -70℃で1.1倍であった。

Table 3 Concentrations of AA, EPA and DHA in fish stored at different temperatures after 30 days

Fish	Portion		(mg/g wet weight)				
			AA	EPA	DHA	Total*	
Bonito	Flesh	Cont.**	0	0.19	0.41	0.60	
		-70℃	0	0	0	0	
		-20℃	0	0	0.43	0.43	
	Flesh	5℃	0	0.22	0.90	1.12	
		Viscera	Cont.	0.24	1.30	1.57	3.11
			-70℃	0.52	2.13	2.54	5.19
	-20℃		0.44	1.63	2.28	4.35	
	Viscera	5℃	0.94	2.59	4.79	8.32	
		Sea-bream	Flesh	Cont.	0	0	0
-70℃				0	0	0	0
-20℃	0			0	0	0	
5℃	0			0.21	0.34	0.55	
Viscera	Cont.	0.22	3.90	1.35	5.47		
	-70℃	0.26	8.52	2.89	11.67		
	-20℃	0.64	5.79	2.31	8.74		
	5℃	2.18	19.57	11.01	32.76		
Anchovy	Flesh	Cont.	0	0.1	0.07	0.17	
		-70℃	0	0.05	0	0.05	
		-20℃	0	0.36	0.46	0.82	
		5℃	0	0.65	1.19	1.84	
	Viscera	Cont.	0.39	4.10	3.44	7.93	
		-70℃	0.16	4.49	3.26	7.91	
		-20℃	0.44	5.26	3.24	8.94	
		5℃	1.01	12.11	6.24	19.36	

\* A sum total of AA, EPA and DHA

\*\* Control samples before storage.

以上の結果から、保存温度が低いほどPOVは低く（ $-70^{\circ}\text{C} < -20^{\circ}\text{C} < 5^{\circ}\text{C}$ ）、脂質の酸化は保存温度に影響されるが、粗脂肪量は保存温度よりむしろ魚の種類に左右されることが判明した。

## 2. 遊離型PUFA含量について

各保存温度下における各種魚の脂溶性画分中の遊離型AA, EPA, DHAの濃度を表3に示した。遊離PUFA濃度はすべての魚で内臓のほうが身より高かった。3種のPUFAのうちAA濃度はすべての魚で低かったが、カツオではDHAの濃度がEPAより高く、イワシ、タイではEPAのほうがDHAより高かった。保存温度が上昇するほどそれらは高くなる傾向にあり $5^{\circ}\text{C}$ 保存下におけるカツオ、タイ、イワシの内臓中AA, EPA, DHA総濃度（PUFA総濃度）はそれぞれ新鮮ホモジネートの総量の2.7, 6.0, 2.4倍であった。とくに保存中タイの内臓でのPUFAの遊離量は多く、 $-70^{\circ}\text{C}$ 下においてさえ新鮮ホモジネートの2倍以上の増加が認められた。

本実験で用いたすべての検体についてPUFA総濃度と各項目測定値間の相関係数を求めた。粗脂肪量, POV, AA, EPA, DHAとの相関係数はそれぞれ, 0.666, 0.609, 0.938, 0.989, 0.974であり、すべて0.5%水準で有意と判定された。

以上、すべての魚で新鮮ホモジネートの遊離PUFA濃度は内臓のほうが身より高く、保存によりさらにその濃度は高まり保存温度が上昇するほどPUFAの遊離が亢進する傾向であった。タイ、カツオの内臓では $-70^{\circ}\text{C}$ 下保存においてさえPUFAの遊離が亢進した。

## 考 察

一般に魚の脂質が酸化すると重量が増加するため、魚の重量の変化は脂質の酸化の指標になるものと考えられている<sup>9)</sup>。本実験ではカツオの内臓を保存した場合、POVが増加したにもかかわらず粗脂肪量が減少した。佃<sup>9)</sup>はカツオの身の $-20^{\circ}\text{C}$ 保存による脂質含量ならびに中性脂質の低下について観察しており、その原因について中性脂質やリン脂質からの脂肪酸の遊離が亢進し、さらに遊離脂肪酸の分解が生じた可能性を述べている。

遊離脂肪酸のなかでも魚に多く含まれているPUFAは生体内の鉄やヘム化合物により容易に酸化され、また二重結合が多いものほど一次酸化物からの分解速度が速いことが明らかである<sup>10)</sup>。

カツオはヘム化合物であるミオグロビンを多く含む赤身の魚であるため、タイなどの白身の魚に比べPUFAの酸化分解が速いものと考えられる。著しい粗脂肪量の低下が生じた $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存におけるカツオ内臓のPOV, PUFA濃度が新鮮ホモジネートに比べ増加していたことは赤身の魚でPUFAの遊離、酸化分解が亢進していることを示すものであった。このように魚の種類によりPUFAの酸化分解速度は異なりそれがPOV, 粗脂肪量に影響を与えるものと考えられた。

魚肉の脂質の加水分解は凍結凍解により進むことが報告されており<sup>11)</sup>、今回カツオの内臓の粗脂肪量の低下が凍結保存のもので著しかった理由としては赤身の魚での凍結凍解の操作が脂質からの脂肪酸の遊離、分解をさらに亢進させたためと考えられる。なお、カツオやタイの内臓で $-70^{\circ}\text{C}$ 保存時の遊離PUFA量が $-20^{\circ}\text{C}$ に比べ高値を示した事実は、小泉<sup>11)</sup>が指摘した凍結融解によ

る細胞への物理的障害がPUFAの遊離に差をもたらすという可能性によるものかもしれない。

本実験に用いたすべての魚で、内臓の遊離PUFA量が身に比べ高値を示した事実は、魚の部位によりリパーゼ等の脂質水解酵素の活性値に差異があることを示唆するものであった。魚の部位による脂質水解酵素活性に関する報告は少ない。白サケの産卵期に肝臓中のリパーゼ活性が著しく高まり、脂肪酸の遊離が亢進するがこの時期における遊離脂肪酸量は肝臓の方が筋肉中より多く、肝臓が魚の脂質代謝に重要な役割を果たしているものと考えられており<sup>12)</sup>、このような部位による脂質代謝能の差が今回の結果を生みだしたものと推測される。

本実験で、遊離型のPUFA量とPOV値に正の相関が認められたことは魚からのPUFAの遊離を抑えることで酸化が防げることを示すものであった。熱処理により酵素を失活させると脂質の酸化が抑えられることが報告されている<sup>13)</sup>。また遊離PUFAはエステル型のものに比べ酸化されやすいことが明らかにされており<sup>14)</sup>、粗脂肪量の多い魚やミオグロビンを多く含む魚の内臓を保存する場合、酸化されやすいPUFAの遊離を抑えることが食品衛生上不可欠と考えられた。

## ま と め

カツオ、タイ、カタクチイワシを異なる温度下（ $5^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-70^{\circ}\text{C}$ ）で30日間保存した時の粗脂肪量, POVおよび遊離型のPUFA（AA, EPA, DHA）の変動を内臓と筋肉について調べた。保存温度の違いによる粗脂肪量の変動は魚の種類により異なり、タイではすべての温度下で保存により値の増加がみられたが、カツオでは内臓、筋肉ともに保存温度が低いほど値の減少が観察された。とくに、カツオの内臓の粗脂肪量の低下は冷蔵保存（ $5^{\circ}\text{C}$ ）に比べ凍結保存（ $-70^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ ）で著しかった。すべての魚で保存温度が低いほどPOV値は低かった（ $-70^{\circ}\text{C} < -20^{\circ}\text{C} < 5^{\circ}\text{C}$ ）。すべての魚で身に比べ内臓の方がPOV値, PUFA量ともに高く、カツオ、タイの内臓では $-70^{\circ}\text{C}$ の保存においてさえPUFAの遊離が亢進していた。一方、身については $-70^{\circ}\text{C}$ 保存ですべての魚のPOV値, PUFA量の増加が抑えられた。遊離PUFA量とPOV値との間に正の相関関係が認められた（ $r = 0.609$ ）ことは魚の酸化を防止する上で、PUFAの遊離を抑えることが不可欠であることを示すものであった。

以上の結果から魚の品質低下ならびに魚介類摂食による消化器障害を防ぐためには魚の種類、部位にあった適切な保存温度の選択が必要と考えられた。

## 参考文献

- 1) 金田尚志 (1977) : 脂質の食品化学的研究, 栄養と食糧, 30 : 71-78.
- 2) Oarada, M., Majima, T., Miyazawa, T., Fujimoto, K. & Kaneda, T. (1989) : The Effect of Dietary Autoxidized Oils on Immunocompetent Cells in Mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 1012 : 156-160.
- 3) Kanazawa, K. & Ashida, H. (1991) : Target Enzymes

- on Hepatic Dysfunction Caused by Dietary Products of Lipid Peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., 288 : 71-78.
- 4) Sajiki, J., Yamanaka, T., Takahashi, H., Tsuruoka, Y., Mori, K., Takahashi, K., & Hayashi, A. (1993) : Possibility of Diarrheal Effect by Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Autoxidized EPA. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 39 : 100-105.
- 5) 豊水正道, 花岡研一, 山口邦子, 水産動物の筋肉脂質 (鹿山光編) pp107-116, 水産学シリーズ, 恒星社厚生閣 (1985).
- 6) 金田尚志, 植田伸夫, 過酸化脂質実験法, pp59, 医歯薬出版, (1983).
- 7) Sajiki, J. & Takahashi, K. (1991) : *In Vitro* Formation of Methemoglobin by Lipophilic Fractions in Fishes and The Causative Substance. Eisei Kagaku, 37 : 467-472.
- 8) 山口邦子, 豊水正道, 中村 孝 (1984) : 魚の皮脂質と普通肉脂質の安定性, 日本水産学会誌, 50 : 1245-1249.
- 9) 佃伸夫 (1976) : 冷凍魚類の脂質変化, 東海水研報, 84 : 31-41.
- 10) Cho, S-Y., Miyashita, K., Miyazawa, T., Fujimoto, K. & Kaneda, T. (1987) : Autoxidation of Ethyl Eicosapentaenoate and Docosahexaenoate under Light Irradiation, Nippon Suisan Gakkaishi, 53 : 813-817.
- 11) 小泉千秋, 張 俊明, 大島敏明, 和田 俊 (1988) : マイワシおよびマアジの冷蔵中における鮮度低下ならびに脂質劣化に及ぼす凍結・解凍処理の影響, 日本水産学会誌, 54 : 2203-2210.
- 12) Hatano, M., Mizogami, M., Sugawara, A. & Ando, S. (1989) : Lipid Metabolism in the Liver of Chum Salmon during Spawning Migration. Nippon Suisan Gakkaishi, 55 : 1623-1627.
- 13) Cho, S-Y., Endo, Y., Fujimoto, K. & Kaneda, T. (1989) : Autoxidation of Ethyl Eicosapentaenoate in a Defatted Fish Dry Model System. Nippon Suisan Gakkaishi, 55 : 545-552.
- 14) Miyashita, K. & Takagi, T. (1986) : Study on the Oxidative Rate and Prooxidant Activity on Free Fatty Acids. JAOCS, 63 : 1380-1384.