凍結貯蔵カキむき身の加熱時に起こる褐変

中村 孝, 前田 浩幸, 樋口 雅義, 濱 洋 一 郎

(1991 年 11 月 5 日受付)

Browning Occurring by Heating of Shelled Oyster Stored at Frozen Temperature

Takashi Nakamura,* Hiroyuki Maeda,* Masayoshi Higuchi,*
and Yoichiro Hama*

Causes of undersirable browning which occur as a result of heating of shelled oysters stored at -35°C and characteristics of brown pigments produced were investigated. Peroxide values (100–500 meq/kg lipids), which were measured by HPLC, of lipids in potential browning portions were more than ten times larger than those in normal portions, and nearly half of the polyunsaturated fatty acids of the former lipids had been oxidized during storage at -35°C for 6 to 16 months. Discoloration by steaming resulted in a decrease in peroxide value and polymerization of oxidized glycerides. Brown polymers obtained after steaming for 20 min were lipophilic but not hydrophilic. They were fluorescent substances composed of 2–5 molar oxidized glycerides, mainly triglycerides, having intact saturated fatty acids and oxidized polyunsaturated fatty acids, and of nitrogenous compounds (1.0–1.5%N).

凍結貯蔵に伴う魚や魚肉の悪変に関わる諸問題については、数十年来数多くの研究がなされてきた。しかしカキについての報告は少ない。羽田野¹⁾はマガキ凍結貯蔵中の不快味の発生と変色について研究し、不快味の原因が脂溶性画分にあり、貯蔵中に増加する遊離脂肪酸や低級アルデヒド等が関与する事を示唆した。また、水溶性変色物質の生成についても言及した。Jeong²⁾は凍結貯蔵中の脂質劣化とその防止法について研究し、脱酸素剤の有効性を明らかにしている。養殖カキは冬季にむき身にされ、一部は凍結され輸出、加工に供せられる。カキむき身を凍結貯蔵したものを、煮熟あるいは蒸煮すると軟体部が褐変するものがある。貯蔵期間が短いものは褐変部も小さく色も薄い、貯蔵期間が長くなるにつれて、褐変部は広がり濃い赤褐色を呈し商品価値を落とす。

本研究においては、 -35°C に貯蔵されたカキを用い、加熱により軟体部表層に局部的に出現する褐変部と周囲の正常部との違いから変色の原因を探り、さらに生成した褐変物質の性状を検討し、変色防止の指針を得る事を目的とした。

実験方法

試料 養殖マガキ *Crassostrea gigas* (広島県, 1990 年

産) のグレーズしたむき身を -35°C に 6–16 ヶ月間貯蔵したものを用いた。

加熱変色 むき身をそのまま蒸煮した。また、むき身を凍結乾燥後所定の部分をかみそりでかき取って得た粉状物については、同重量の脱イオン水を添加後蒸煮した。

脂質の抽出 かみそりでかき取った凍結乾燥粉状物あるいはそれらの加熱物 (0.2–1.0 g) を 50 ml 容の遠心管に秤り取り、30 ml の CHCl_3 : CH_3OH (2/1, v/v) を加え、氷冷しながらウルトラディスペンサー (ヤマト科学, LK-21 型) で 3 分間抽出した。遠心分離後ろ別して得た抽出液に 7.5 ml の脱イオン水を加えかくはん後、遠心分離により二層に分け、下層部より脂質を得た。

過酸化脂質の定量 過酸化脂質による triphenylphosphine の酸化によって定量的に生成する triphenylphosphine oxide を高速液体クロマト法 (Nova-pak Silica カラム, 3.9 i.d. $\times$ 150 mm, Waters Assoc. Inc.; 溶出液, *n*-hexane/2-propanol 混合液; 流速, 1.5 ml/min) で分析した。³⁾

脂肪酸の分析 5% $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$ でエステル交換⁴⁾後、ガスクロマト法 (Ulbon HR-SS-10 カラム, 0.25 mm $\times$ 25 m, 信和化工; 150–220 $^{\circ}\text{C}$, 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温) で分析した。また、脂肪酸量の算出に内部標準物質として methyl tridecanoate (Serdary Research Lab.) を用いた。

* 九州大学農学部水産化学第二教室 (Laboratory of Fisheries Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi, Fukuoka 812, Japan).

変色脂質の分画と分析 抽出脂質を液体クロマト法 [Toyopearl HW-40 (東ソー) カラム, $1 \times 30 \text{ cm} \times 2$ 本; 溶出液, CHCl_3 : CH_3OH (2/1, v/v); 流速, 1 ml/min] で分画後, 分子量の最も大きい重合物画分を分取した。溶出脂質の確認は薄層クロマト法 [(Silicagel 60, Merck; 展開剤, diethyl ether/*n*-hexane/acetic acid (50/50/1, v/v/v), CHCl_3 / CH_3OH / H_2O (65/25/4, v/v/v)] と各種の噴霧呈色剤⁵⁾ によった。分子量既知の標準ポリスチレン (GL サイエンス) および trilinolein, cholesteryl palmitate, cholesterol, methyl linoleate (東京化成工業) を上述の液体クロマト法で分析し, 褐変重合物の分子量を推定した。リンの定量は Harris 等の方法⁶⁾ によった。炭素, 水素, 窒素量の分析は元素分析によった。赤外線吸収スペクトルを CHCl_3 溶液で測定した。

結 果

変色部脂質の分析 蒸煮により褐変した組織部分のみをビンセットで集めてかくはん抽出し, (1) 有機溶媒可溶部, (2) 水可溶部, (3) 不溶部 (残さ) に分け変色度

Table 1. Lipid peroxide contents of potential browning portions (yellowish portions) and normal portions of ice-glazed oysters stored at -35°C

Sample	Lipid content* ¹ (% dry wt.)	PV* ² of normal portion (meq/kg lipid)	PV* ² of yellowish portion (meq/kg lipid)
1	13.2	6.7	380
2	14.2	9.2	100
3	15.5	13.4	476
4	15.0	13.7	172
5	13.2	26.8	305

*¹ Lipid content of normal portions.

*² Peroxide value.

Table 2. Changes in peroxide value and discoloration rate of oyster lipid preparations by steaming

Sampling portion	PV		Discoloration	
	Before heating	After heating	Before heating	After heating
	meq/kg lipid		$A_{480\text{nm}}$ (10 mg/ml)* ⁴	
Yellowish portion				
1* ¹	476	295	0.292	0.491
2* ²	380	26.3	0.256	0.824
3* ³	305	23.5	0.698	1.647
Normal portion				
1* ¹	13.3	12.9	0.050	0.106
2* ²	6.7	6.7	0.062	0.075
3* ³	26.8	16.0	0.088	0.120

*¹⁻³ Samples in test tubes were heated for 3, 10, and 20 min respectively in boiling water.

*⁴ Absorbance at 430 nm in CHCl_3 / CH_3OH (2/1, v/v).

Fig. 1. Gel chromatography of oyster lipid preparations. Lipids from (1) normal portion (PV 26.8), (2) potential browning portion (PV 305), and (3) brown portion (PV 23.5) obtained after steaming of (2) were separated on a column of Toyopearl HW-40 ($1 \times 30 \text{ cm} \times 2$, Toso, Tokyo, Japan) with CHCl_3 / CH_3OH (2/1, v/v) at a flow rate of 1 ml/min, and monitored by UV absorption at 250 nm. Brown polymers eluted were also detected fluorometrically (excitation 363 nm, emission 407 nm).

BP, brown polymers; TG, triglycerides; PC, phosphatidylcholine; FA, fatty acids; Ch, cholesterol; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine.

を比較すると、(1)は濃い褐色、(2)はごく淡い黄色、(3)は褐色を呈した。また、変色は組織のごく表層部のみに観察された。これらの事実は加熱による褐変が主に油焼けによることを推測させた。凍結貯蔵カキを取出し、黄変を起こしている物を選別し凍結乾燥した。乾燥物表面に偏在する黄色部（加熱により褐変する部分）と周縁の正常部を別々に、複数個のカキからかみそりを用いてかき取り、脂質を抽出した。脂質含量は13-16% 乾重量でリン脂質は全脂質の約15%（リン含量×25）を占め

た。Table 1 に示しているように、黄色部と正常部の差異は明白で黄色部脂質はいずれも過酸化を起こしていた。凍結乾燥後に得た黄色部と正常部の粉状物を加水蒸煮後抽出した脂質区分について、過酸化価 (PV) と変色度 (A_{480}) を測定した (Table 2)。加熱による PV の減少と変色の高進がみられた。すなわち、加熱による正常部脂質の変色は小さく、過酸化が進行している黄色部脂質が変色に大きく寄与していた。構成脂肪酸の定量分析を行い Table 3 の結果を得た。黄色部と正常部との違い

Table 3. Fatty acid contents of oyster lipid preparations

(% in lipids)

Fatty acid	Normal portion		Yellowish portion		Brown polymer	
	Before heating (PV 26.8)	After heating (PV 16.0)	Before heating (PV 305)	After heating (PV 23.5)	(1) (PV 34.5)	(2)*2
14:0	2.9	3.1	3.0	3.1	2.5	1.7
15:0	0.4	0.4	0.5	0.5	0.4	0.2
16:0	15.5	15.2	14.7	15.1	13.1	9.2
17:0	2.5	2.4	2.2	2.2	2.1	1.4
18:0	2.8	2.8	2.7	2.7	2.3	1.7
Σ Satd.	24.1	23.9	23.1	23.6	20.4	14.2
15:1 (n-8)	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
16:1 (n-7)	2.5	2.6	2.3	2.4	1.7	1.2
18:1 (n-11)	1.1	1.1	1.0	1.0	0.8	0.6
18:1 (n-9)	2.5	2.6	2.1	2.2	1.6	1.1
18:1 (n-7)	5.5	4.9	4.5	4.5	3.3	2.5
20:1 (n-9)	1.1	1.1	1.0	1.1	0.5	0.4
20:1 (n-7)	2.0	2.0	1.9	1.9	1.4	1.1
Σ Monoene	15.0	14.6	14.1	13.3	9.5	7.1
16:2 (n-6)	1.1	1.1	1.2	1.2	1.0	0.7
16:2 (n-4)	0.4	0.4	0.3	0.4	nil	nil
18:2 (n-6)	1.1	1.2	0.7	0.7	0.3	0.2
18:2 (n-4)	0.6	0.6	0.4	0.4	0.1	0.1
20:2 NMI*1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4
22:2 NMI*1	1.5	1.9	1.5	1.8	0.7	0.5
Σ Diene	6.7	6.2	5.0	5.4	2.7	1.9
18:3 (n-3)	1.4	1.4	0.8	0.8	0.1	0.1
22:3 (n-6)	1.1	1.1	0.5	0.5	0.1	0.1
Σ Triene	2.5	2.5	1.3	1.3	0.2	0.2
18:4 (n-3)	4.4	4.3	2.4	2.4	0.4	0.3
20:4 (n-6)	1.1	1.1	0.7	0.6	0.1	0.1
20:4 (n-3)	0.5	0.6	0.3	0.3	0.1	0.1
Σ Tetraene	6.0	6.0	3.4	3.3	0.6	0.5
20:5 (n-3)	19.3	18.7	9.3	9.1	1.4	1.1
21:5 (n-3)	0.4	0.4	0.2	0.3	0.1	0.1
22:5 (n-3)	0.7	0.8	0.4	0.4	0.1	0.1
Σ Pentaene	20.4	19.9	9.9	9.8	1.6	1.3
22:6 (n-3)	12.1	12.0	5.2	5.1	0.9	0.7
Total	85.3	85.1	61.0	61.8	35.6	25.6

The fatty acid contents (% in lipids) were calculated by using an internal standard, methyl tridecanoate.

*1 Non-methylene interrupted type.

*2 Highly polymerized specimen left in air for several days after preparation.

Table 4. Ultimate analysis of brown polymers

Brown polymer	PV* ¹	A ₄₃₀ * ²	Element composition				MW (N=1)	Ash (%)	P (%)
	(meq/kg)	(10 mg/ml)	H	C	N	O			
1	37.4	3.29	114	72	1	15	1232	1.87	0.55
2	34.5	5.07	84	52	1	12	914	2.18	0.40
3	16.7	3.10	89	57	1	12	979	2.22	0.49

*¹ Peroxide value (meq/kg lipid).*² Absorbance at 430 nm in CHCl₃/CH₃OH (2/1, v/v).

はトリエン以上の高度不飽和脂肪酸量において明白で、PV 305 程度の酸化度で約 50% の高度不飽和酸が変質したことを示している。また、加熱操作は脂肪酸量にほとんど影響を与えていなかった。以上の結果は、加熱褐変をおこす局部では構成脂質の高度不飽和脂肪酸が酸化され一部はすでに黄変し、加熱により一挙に褐色物質を生成するものと推測される。この事をさらに検討するために Toyopearl HW-40 カラムを用いるゲルクロマト法で分析した。Fig. 1-(1) の正常部脂質 (PV 26.8) の例に示すように、吸着による溶出の遅れが見られたニンヒドリン陽性のリン脂質 (PE, PS, 50-52 分) を除き、28.6 分のトリグリセリド (TG) 以下分子量の大きい順に溶出した。Fig. 1-(2) の黄色部脂質 (PV 305) においては、50-52 分のリン脂質ピーク (PE, PS) もほとんど消失し 21.6, 24.9 分に新たにピークが観察された。黄色部を煮沸後に得た脂質部 (PV 23.5) のクロマトグラム (Fig. 1-(3)) では 28.6 分の過酸化トリグリセリド、過酸化リン脂質を含むピークが減少し、21.6 分の褐色物質ピーク (BP) が著しく増大した。これらの結果は加熱に伴う過酸化物の分解と褐色重合物の生成の事実を裏付けた。

褐色物質の性質 変色度を異にする試料からゲルクロマト法で分取した褐色重合物は、いずれも蛍光 (Ex 363 nm, Em 407 nm) を有し、ポリスチレン標準分子量標品の溶出位置から推定される分子量は約 5,000、脂質標品 trilinolein, cholesteryl palmitate 等で推定される分子量は 2,000 程度であった。赤外スペクトル分析の結果はエステル結合による吸収 (ν C=O, 1730 cm⁻¹; ν C-O-C, 1160 cm⁻¹) の他 3300 cm⁻¹ 域に ν OH, 1600-1700 cm⁻¹ 域に ν NH の吸収を示した。褐色物質を構成する未酸化の脂肪酸総量は正常部位 (85%) の 1/2~1/3 で飽和酸、モノエン酸が主成分で高度不飽和脂肪酸量はわずかであった (Table 3)。また、これらの元素分析等の結果を Table 4 に示した。すなわち、褐色物質は 2~5 モルト程度のトリグリセリドやリン脂質の重合物で、構成脂肪酸のうち飽和脂肪酸はほとんど元のままであるが、不飽和脂肪酸が酸化され、1 脂肪酸当たり新たに 1~2 モル程度の酸素が付加し、1 トリグリセリド当り 1 モル程度の窒素化合物と結合し (Table 3, 4)、着色と蛍光性の官能基

を形成していると推測される。また、褐色重合物に占めるリン脂質の割合は 10% 程度 (リン含量×25) と推測される。

考 察

凍結貯蔵カキの煮熟時に起こる褐変は、前述の結果から脂質の酸化によることが明白になった。酸化脂質は加熱により窒素化合物と反応しながら重合し、褐色物質を生成した。凍結貯蔵した魚⁷⁻¹⁰⁾はもちろん、カキ^{1,2)}においても、ホスホリパーゼAやリパーゼ等の作用により遊離脂肪酸が蓄積することは良く知られている。この時生成した脂肪酸がその後の脂質酸化に促進的であるか、あるいは抑制的であるかについては議論が別れる^{11,12)}が、本実験で得た褐色物質は、酵素的に生成した遊離脂肪酸の酸化と相互の重合によって生成したのではなく、大部分はグリセリドの形で重合したと考えられる。褐変は内蔵を含む軟体部、外套膜、鰓等いずれの組織においてもごく表層にのみ出現することから、脂質酸化の原因は内因性ではなく不完全なグレース被覆等による外気酸素との接触に因ると推測される。生成した褐色物質は親油性であり、親水性色素の生成はわずかでメイラード反応 (糖-アミノ反応) の寄与は小さいと考えられる。また、ゲルクロマト法で調製した褐色物質は空気中に放置するとさらに重合が進行し、最終的には溶媒に不溶性の樹脂状物質になった。本研究に用いた脂質過酸化物測定法は今回新しく開発したもので、mg 以下の脂質を用いてピコモルレベルの過酸化物の定量が可能で、本実験の様に試料量に制約がある場合は特に有効であった。

謝 辞

本研究は文部省平成 2 年度科学研究費 (試験研究) によったもので、試験研究全体の企画、取りまとめに尽力された東京水産大学小泉千秋教授に深く感謝する。

文 献

- 1) 羽田野六男, 飯田 遙, 堀 圭介, 高橋是太郎: マガキ凍結貯蔵中の不快味の発生と変色. 日水誌, 56, 1481-1484 (1990).
- 2) B.-Y. Jeong, T. Ohshima, C. Koizumi, and Y. Kanou: Lipid deterioration and its inhibition of Japanese oyster

- Crassostrea gigas* during frozen storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 2081-2091 (1990).
- 3) T. Nakamura and H. Maeda: A simple assay for lipid hydroperoxides based on triphenylphosphine oxidation and high-performance liquid chromatography. *Lipids*, **26**, 765-768 (1991).
 - 4) W. W. Christie: *Lipid Analysis*. Pergmann Press Ltd., Oxford, 1973, pp. 88-89.
 - 5) 鈴木郁生: 薄層クロマトグラフィーの実際. 広川書店, 東京, 1963, pp. 176-185.
 - 6) W. D. Harris and P. Popat: Determination of the phosphorous content of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127 (1954).
 - 7) W. J. Dyer and D. I. Fraser: Protein in fish muscle. 13. Lipid hydrolysis. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **16**, 43-52 (1959).
 - 8) J. Olley, R. Pirie, and H. Watson: Lipase and phospholipase activity in fish skeletal muscle and its relationship to protein denaturation. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 501-516 (1962).
 - 9) I. Bosund and B. Ganrot: Lipid hydrolysis in frozen Baltic herring. *J. Food Sci.*, **34**, 13-18 (1969).
 - 10) M. Toyomizu, K. Hanaoka, K. Satake, and H. Nakagawa: Effect of storage temperature on accumulation of glycerylphosphorylcholine and decomposition of phosphatidylcholine in fish muscle during cold storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **43**, 1181-1187 (1977).
 - 11) F. Mazeaud and E. Bilinski: Free fatty acids and onset of rancidity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) flesh. Effect of phospholipase A: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **33**, 1297-1302 (1976).
 - 12) R. L. Shewfelt, R. E. MacDonald, and H. O. Hultin: Effect of phospholipid hydrolysis on lipid oxidation in flounder muscle microsomes. *J. Food Sci.*, **46**, 1297-1301 (1981).