

## 凍結・解凍にともなうホタテガイ貝柱の組織変化

西山 一朗

### Histological Change of Scallop Adductor Muscles during Freezing and Thawing

Ichiro NISHIYAMA

#### 緒言

食品貯蔵の有効な方法の一つとして、冷凍貯蔵があげられる。凍結することにより、食品に生ずる生化学的变化やそれに伴う栄養価の低下、腐敗や食中毒の原因となる微生物の増殖などが抑えられ、長期保存が可能となる<sup>1)</sup>。この食品冷凍技術は、近年のワールドチェーンの発達と相まって、生鮮食品の長距離輸送を可能にするとともに、その価格・品質・供給量等の安定化に寄与している。これらの利便性のため、冷凍食品の生産・消費量は、年々増加の一途をたどっている<sup>1,2)</sup>。また家庭用冷凍冷蔵庫の普及およびその性能の向上に伴い、家庭における食品の凍結、いわゆるホームフリージングも広く行われるようになってきた。

このように冷凍貯蔵法は多くの長所を有するが、また一方では、食品に対して凍結と解凍という2つの操作を行うことが不可欠であり、それに伴う組織学的・物性学的変化が避けられないという宿命をも有している。食品を凍結するとき、一般にはその凍結速度が大きいほど食品組織の破壊が小さく、また解凍時のドリップ流出も少ない良質の冷凍が可能であると考えられている<sup>1)</sup>。冷凍に伴う食品組織の変化は、これまで主に魚肉や畜肉を材料として研究されており、特に凍結速度と組織変化については、詳細な報告がある<sup>3-5)</sup>。しかし、その他の食品に関しては、検討の余地が残されている。またこれまでの報告は、主として商業用の冷凍操作を対象として行われており、家庭での冷凍操作に関する検討もまた、十分とはいえない。

そこで本実験では、新鮮材料の入手が容易なホタテガイ貝柱(閉殻筋)を材料として、ホームフリー

ジングを模した条件で凍結保存を行ったときの組織変化を光学顕微鏡にて観察した。また比較のために、急速冷凍を行ったときの組織像の観察を行うとともに、これらを解凍したときの組織像およびタンパク質の変化についても調査を行った。

#### 材料と方法

##### 1. 試料

鮮度の良いホタテガイ貝柱を鮮魚店より購入し、4℃前後に保ち搬送した後、直ちに実験に供した。

##### 2. 凍結・解凍ならびに温度測定

試料をポリエチレンバッグ(セイニチ、ユニパック)に入れ、 $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ の冷凍庫(サンヨー、メディカルフリーザーMDF-U331)中のステンレスバット上で、ステンレス面に触れるようにして凍結した。凍結後はそのまま冷凍保存した。「結果と考察」で記す通り、この方法ではいわゆる緩慢凍結になることが判明したため、以下この方法を緩慢凍結と記す。

**【急速凍結】** ポリエチレンバッグに入れた試料を、ドライアイス-アセトン中に浸漬し凍結した。中心温度が $-20^\circ\text{C}$ 以下に低下した後、上記の冷凍庫に移し冷凍保存した。

**【緩慢解凍】** 上記の方法にて凍結後、5日間冷凍保存した試料を、ポリエチレンバッグに入れたまま冷蔵庫( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )に移し、解凍されるまで放置した。

**【急速解凍】** 上記の方法にて凍結後、5日間冷凍保存した試料を、ポリエチレンバッグに入れたまま流水( $23^\circ\text{C}$ )に浸漬し、急速解凍を行った。

なお、温度変化はK電熱対式温度計(タスコジャ

パン、TNA-120)を用い、中心温度を連続測定することにより調査した。

### 3. 組織観察

試料を8mm×8mm×10mm程度の大きさに切り出し、ドライアイス-アセトンを用い、OCTコンパウンド(マイルス)中に包埋した。この試料よりクリオスタットにて5 $\mu$ m厚の凍結切片を作成し、卵白コートしたスライドグラスに乗せ、室温で30分以上乾燥させた。これを4%パラホルムアルデヒド(タブ)-0.1mol/lリン酸緩衝液(pH 7.4)で、4 $^{\circ}$ C、10分間固定した後、常法によりヘマトキシリン・エオシン染色を施した。観察は、パノックス顕微鏡(オリンパス)により行ない、Tマックス100フィルム(コダック)にて写真撮影を行った。

### 4. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

解凍直後の試料0.1gを計り取り、2mlの電気泳動用緩衝液(2%SDS、20%グリセロール、2%2-メルカプトエタノール、0.001%プロモフェノールブルーを含む50mmol/l トリス-塩酸緩衝液)を加え、超音波破碎機(タイヨー、VP-55)によるホモジナイズを行った。これを同緩衝液にて5倍に希釈し、100 $^{\circ}$ C 3分間の加熱処理の後、SDS-PAGE用試料として供した。試料はレーン当たり5 $\mu$ l乗せ、7.5%ポリアクリルアミドゲルにより、還元条件下でタンパク質の分離を行った<sup>9)</sup>。泳動後、常法によりクーマシーブリアントブルー染色を施した。

### 結果と考察

**凍結速度と組織変化** 試料をドライアイス-アセトン中にて急速凍結したときの中心温度の変化を図1 aに示す。凍結開始から1分間で中心温度は4 $^{\circ}$ Cから-23 $^{\circ}$ Cまで下降した。一方-20 $^{\circ}$ Cの冷凍庫内で凍結を行った場合には、図1 bに示す通り、4 $^{\circ}$ Cから-1.7 $^{\circ}$ Cまでは比較的速やかな温度下降が認められたが、以後30分以上もその温度域に留まった後、再び下降するという多相性の温度低下パターンが観察された。

凍結試料の組織像を第2図に示す。急速凍結した試料では、凍結前の組織構築(図2 a)がよく保たれていることがわかった(図2 b)。所々、小型の水

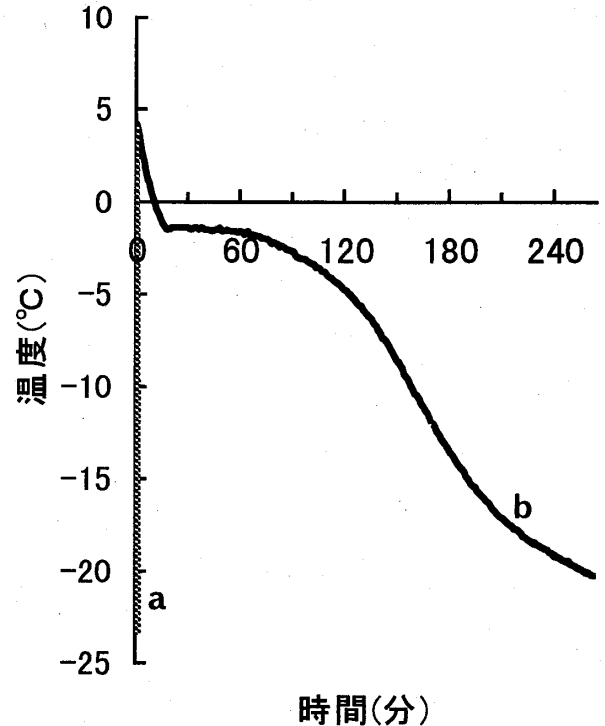


図1 ホタテガイ貝柱凍結時の温度変化  
a ドライアイス-アセトン中での急速凍結  
b 冷凍庫内での凍結

結晶の形成(図2 b、矢印)が見られるものの、筋線維、結合組織ともに凍結前とほぼ同等の形態が保たれていた。また、縦断面の観察からは、整然とした横紋が保持されていることが示された(写真は示していない)。一方緩慢凍結を行った試料では、著しい組織の変化が観察された(図2 c)。大型の水結晶の形成(図2 c、アステリスク)と、それに伴う筋線維の圧縮が認められ、また結合組織の断裂も頻繁に認められた。縦断面の観察からは、水結晶による筋線維の断裂が各所で認められたが、横紋構造は保持されていることが示された(写真は示していない)。

畜肉や魚などを凍結するとき、0~-5 $^{\circ}$ Cの温度域において肉中の水分が氷結するため、この温度域は一般に最大氷結晶生成帯と呼ばれる<sup>4)</sup>。田中らがマサバとスケトウダラ筋肉を材料として、凍結速度と組織変化との関係を調べた結果、最大氷結晶生成帯を数秒間で通過すると、食品中における水の移動速度よりも凍結速度が大きいと、微小な氷結晶が細胞内外にまんべんなくできるのに対し、この温度帯の通過に90分間を要した場合には、細胞外に柱状の大型結晶が形成されることが報告されている<sup>4)</sup>。ま

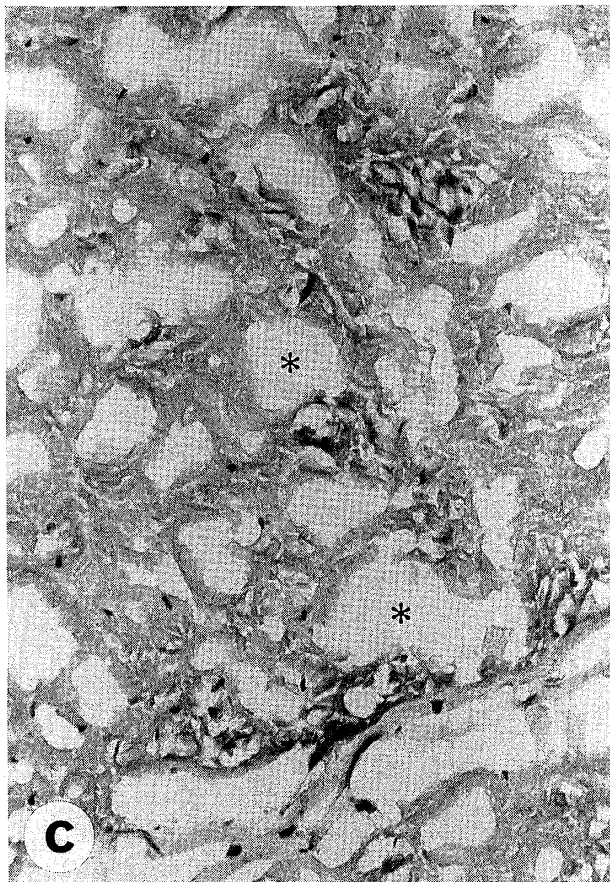
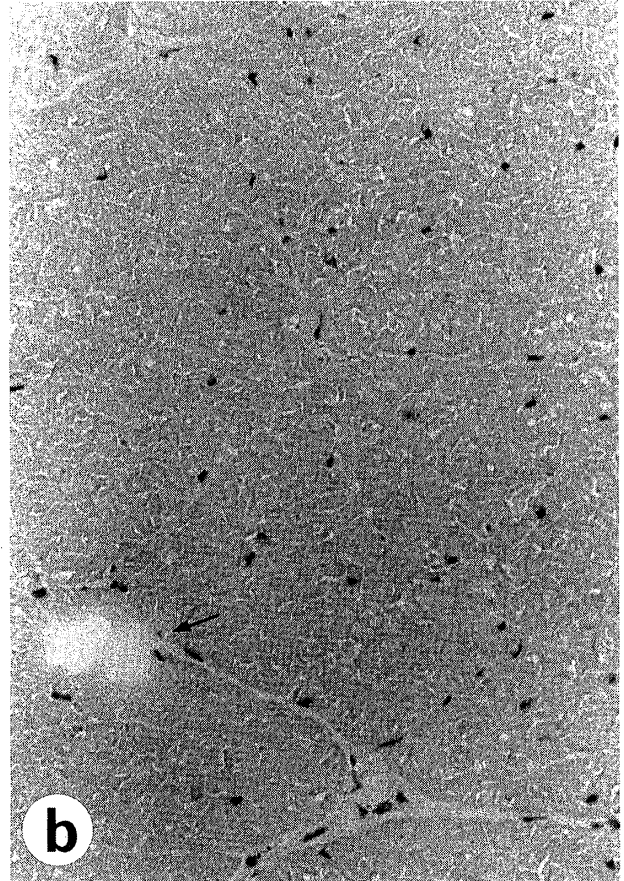
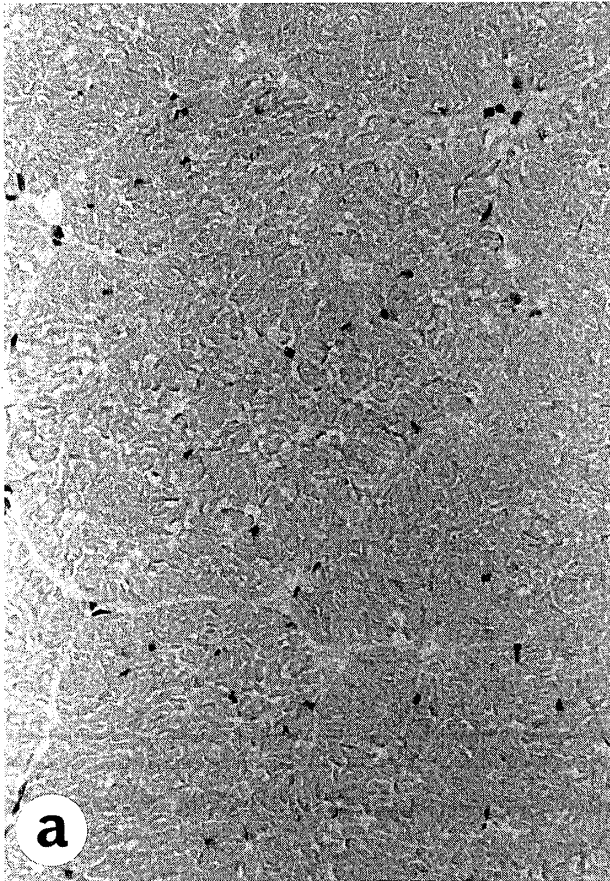


図2 凍結によるホタテガイ貝柱組織の変化  
凍結前 (a)、急速凍結後 (b) および緩慢凍結後 (c)  
の試料を薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施した。 ×240

た、畜肉を材料とした場合にも、同様の結果が報告されている<sup>3,5)</sup>。この緩慢凍結の場合には、細胞内の水が細胞外へと移動するとともに、大型の水結晶が生じ、これが細胞組織を圧迫し損傷を与える。このようにして生じた組織の損傷は、解凍時にも回復せず、また細胞外に形成された氷は、解凍後も組織には再吸収されにくく、エキス分とともにドリップとして流出し、旨味・栄養価とも減少する。つまり、急速に凍結過程が進行するほど細胞の損傷は少なく、組織の破壊も抑えられ、良質の冷凍保存が可能となる。

本実験では、急速凍結の場合、この最大氷結晶生成帯の通過に10秒間程度を、また緩慢凍結の場合には約110分間を要した(図1)。このことと図2に示す組織像から、ホタテガイ貝柱における凍結速度と組織変化との関係もまた、魚肉や畜肉の場合と同様であることが示唆された。

通常の家用品冷凍冷蔵庫の冷凍庫内温度が $-18\sim-21^{\circ}\text{C}$ であることを考慮すると、貝柱程度の小型の食品であってもホームフリージングでは緩慢凍結となり、かなりの組織変化を伴うことが予測される。また、ホームフリージングの場合には、①必ずしも冷凍庫内スペースに余裕があるとは限らない、②冷凍庫扉の開閉による庫内温度上昇が起こりうる、③スチロール等の包装材に入れたまま凍結する場合があります、④日本製のほとんどの冷凍庫では自動デフロスト機能があり、庫内温度が定期的に $0^{\circ}\text{C}$ 付近まで上昇することなどが考えられる。これらの要因により、凍結速度がさらに低下し、冷凍食品の質の低下が起こることも考えられる。また逆に、冷凍庫中に凍結を速やかに行うための付加機能を有する場合には、より速やかな凍結が可能であると考えられる。この点に関しては、今後の検討を要する。

**解凍速度と組織変化** 図3は凍結試料を流水中で急速解凍した場合(a)ならびに冷蔵庫内にて緩慢解凍した場合(b)の温度上昇過程を表したものである。急速解凍では、試料の中心温度が $-20^{\circ}\text{C}$ から $0^{\circ}\text{C}$ 以上に達するまでに6分間を要した(図3 a)。一方緩慢解凍では、中心温度が $0^{\circ}\text{C}$ 以上になるまでに5時間以上を要し、またその温度上昇曲線は多相性を呈した。特に $-4\sim-2^{\circ}\text{C}$ の温度域では、極めて緩慢な温度上昇が観察された(図3 b)。先に記したと

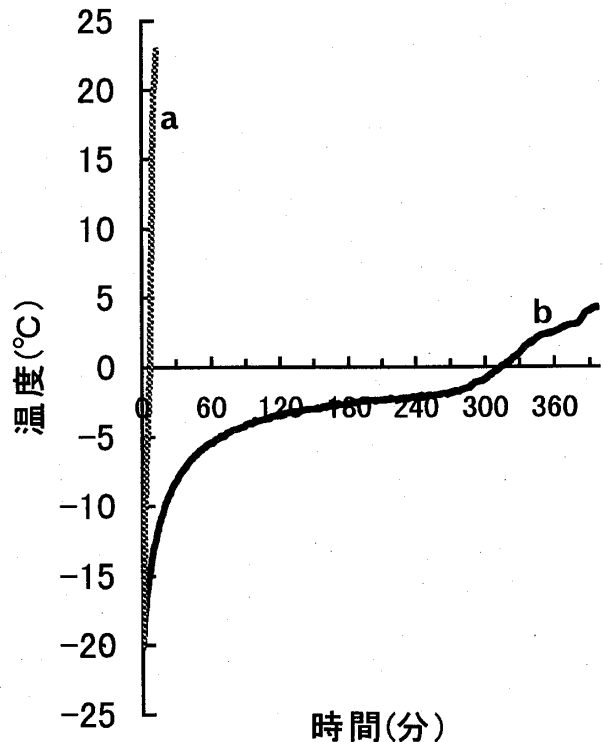


図3 ホタテガイ貝柱解凍時の温度変化  
a 流水下での急速解凍  
b 冷蔵庫内での緩慢解凍

おり、凍結曲線の場合には $-5\sim 0^{\circ}\text{C}$ の温度域を最大氷結晶生成帯と呼ぶのに対し、解凍曲線の場合にはこれを最大氷結晶融解帯と呼ぶ<sup>7)</sup>。本実験では、この温度域を急速解凍の場合で約3分間、緩慢解凍の場合で約4時間で通過している(図3)。

解凍直後の各試料の組織像を図4に示す。急速凍結試料では、凍結時には未凍結試料とほぼ同様の組織像を保っていた(図2 b)のに対し、解凍することによって、筋線維間隙の増加などの組織変化を来した(図4 a、b)。解凍速度による組織像の差は認められなかった。一方緩慢解凍試料では、凍結時には著しい組織構築の破壊が生じた(図2 c)のに対し、解凍後の組織では、かなりの復元が認められ、その組織像は急速凍結試料を解凍したもの、ほとんど遜色のないものであった(図4 c、dをa、bと比較)。

魚貝類の場合、一般には急速解凍よりも緩慢解凍の方が優れた解凍方法であるとされている<sup>7)</sup>。その理由は、緩慢解凍では、凍結時に筋線維外に形成された氷結晶が解けて、細胞や組織に再吸収される時間的余裕が与えられるのに対し、急速解凍ではその多くがドリップとして流失してしまうためである。



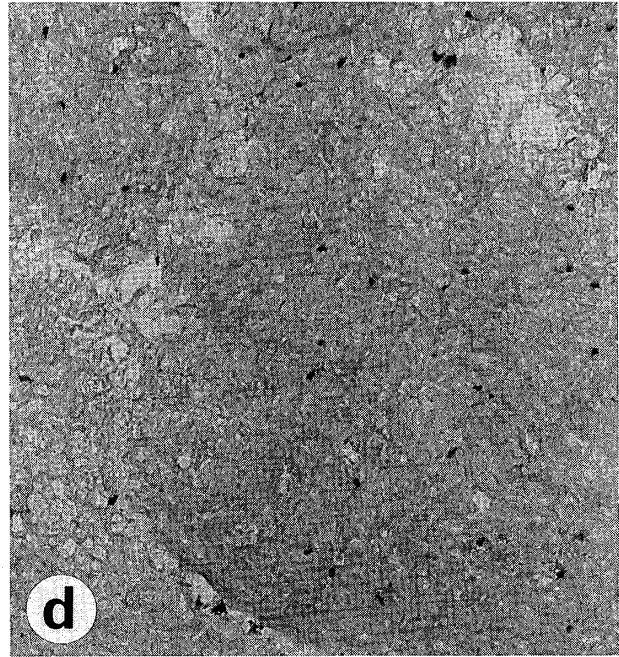
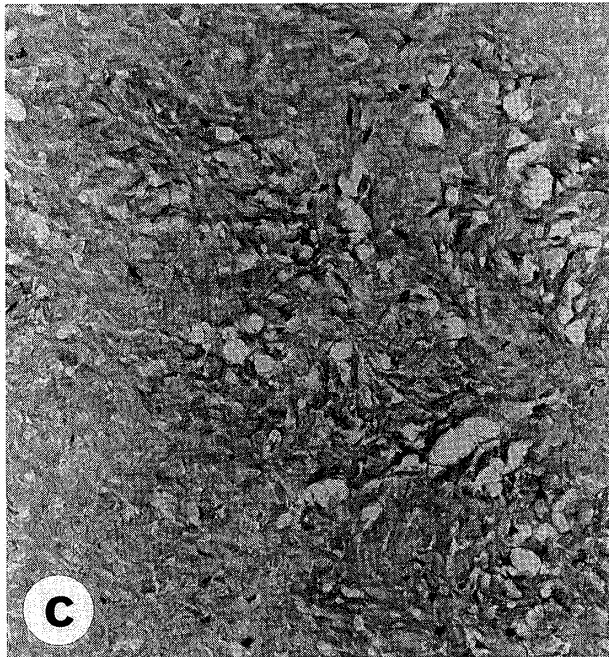
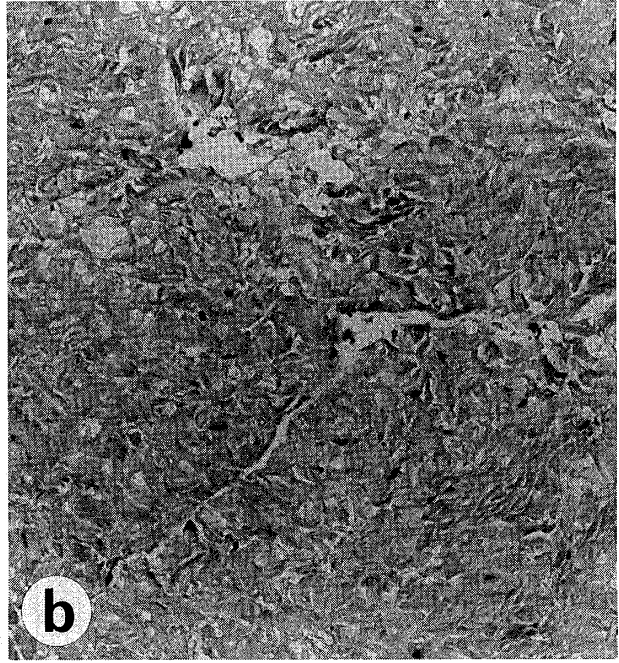
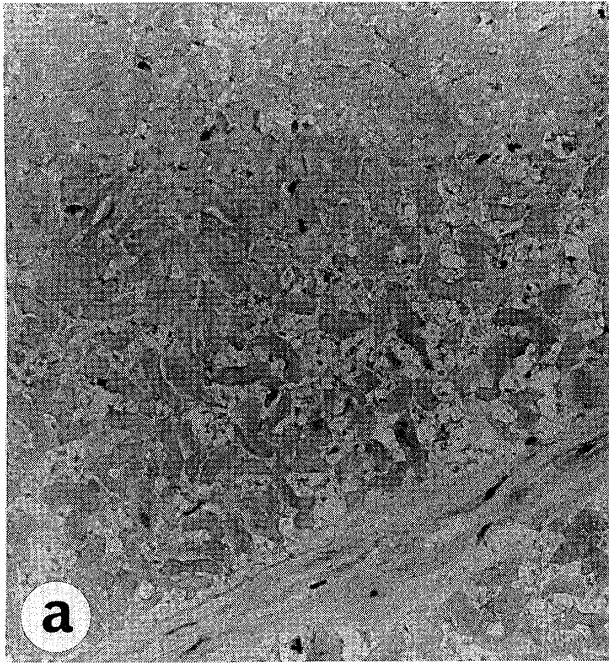


図4 凍結・解凍後のホタテガイ貝柱の組織像

急速凍結 (a、b) および緩慢凍結 (c、d) した試料を、 $-20^{\circ}\text{C}$  にて5日間保存した後、急速解凍 (a、c) または緩慢解凍 (b、d) した。各々の試料を薄切した後、ヘマトキシリン・エオシン染色を施した。  $\times 240$

解凍時に十分な時間が与えられると、氷が解けて生じた水は、細胞や組織に再吸収されて、組織学的復元が起こる<sup>9)</sup>。しかし、緩慢解凍にもいくつかの問題点がある。解凍時間が長くかかり、特に最大氷結晶融解帯に長時間留まるため、これがタンパク質の変性や、酵素的・生化学的变化の原因となりうる。そのため、解凍終温が上がり過ぎないように注意する限り、急速解凍の方が優れた解凍法であるとする説もある<sup>7)</sup>。この点に関しては、冷凍食品の種類、大きさや品質によっても評価が異なるものと考えられ、一概に断ずることは困難であろう。

冷凍食品の質を考える場合、物理的な味としてのテクスチャーも重要な要素となる。今回の実験を行う過程で、凍結・解凍を行った試料では、新鮮試料に比して明らかな軟化が認められた。これら試料の組織構造とテクスチャーとの関連については、今後の検討課題である。

**SDS-PAGE** 凍結・解凍に伴うタンパク質成分の変化を調査するために、解凍試料をSDS-PAGE法により分析した。凍結前および各々の方法にて凍結・解凍を行った試料のSDS-PAGEパターンを図5に示す。いずれの試料においても、分子量205,000前後のミオシン重鎖と、見かけの分子量46,000のアクチンが、主要なタンパク質として認められた。それ以外のタンパク質についても、基本的には同様なバンドパターンが得られたが、分子量約90,000 (図5、矢尻) ならびに約42,000 (図5、矢印) のタンパク質においては、試料間の差異が認められた。このうち分子量90,000のタンパク質は、その泳動パターンから $\alpha$ -アクチニンであると考えられる<sup>9)</sup>が、これは急速解凍した場合 (レーン2と4) には、非凍結試料 (レーン1) と同程度に認められたが、緩慢解凍を行った場合 (レーン3と5) では、明らかに薄いバンドとして認められた。一方の分子量42,000のタンパク質の本体は不明であるが、非凍結試料ではこのバンドがはっきりとは認められないため、何らかのタンパク質の分解産物である可能性が考えられる。このタンパク質も、急速解凍の方が緩慢解凍よりも濃いバンドとして検出された。

先にも記したとおり、凍結試料を解凍する過程で、各種の内因性酵素の作用により、試料に生化学的变化、すなわち自己消化が生ずることが知られている。

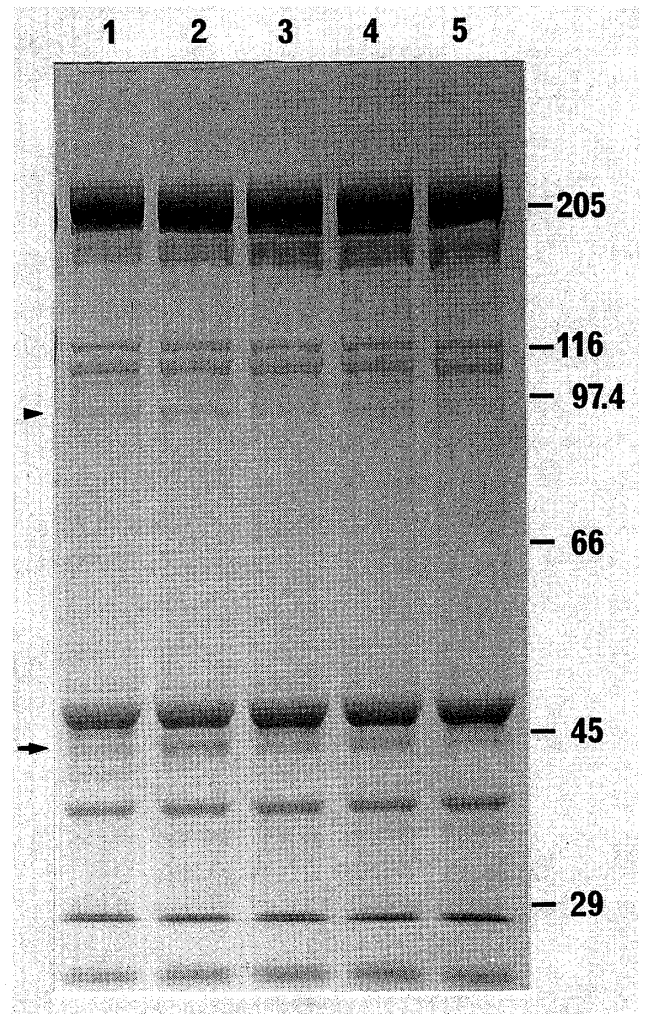


図5 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるホタテガイ貝柱のタンパク質の分析  
1. 凍結前の試料、2. 急速凍結—急速解凍、3. 急速凍結—緩慢解凍、4. 緩慢凍結—急速解凍、5. 緩慢凍結—緩慢解凍  
なお、いずれの場合にも、凍結保存期間は5日間とした。矢尻および矢印は、それぞれ分子量90,000および42,000のタンパク質を示す。右端の数字は、分子量マーカー(×1,000)の位置を示す。

魚介類を材料とした実験では、カテプシン類やカルパインなどの内因性プロテアーゼによって、 $\alpha$ -アクチニンその他の筋原線維タンパク質の分解が起きることが報告されている<sup>10)</sup>。本実験においても、緩慢解凍時に試料がプロテアーゼに長時間暴露された結果、 $\alpha$ -アクチニンの分解が促進されたものと推察される。一方の急速解凍の場合には、解凍に要する時間が格段に短いため、これらプロテアーゼによる分解は最小限に抑えられたものと考えられる。なお、 $\alpha$ -アクチニンは横紋筋のZ線構成タンパク質であるため、その分解はZ線の脆弱化を来し、筋原線維の小片化を引き起こすことが知られている。そのためこ

の分解は、魚肉の軟化機構の1つであると目されている<sup>11)</sup>。

#### 要約

ホタテガイ貝柱を材料として、凍結・解凍条件の違いによる組織ならびにタンパク質の電気泳動パターンの変化を調べた。試料を家庭用冷凍庫と同程度の-20℃で凍結したところ緩慢凍結となり、筋線維間に大型の氷結晶を生じ、組織像に著しい変化が起こった。この凍結試料に対し、緩慢あるいは急速解凍を行ったところ、いずれの方法においても同程度に、組織構造の復元が認められた。また、緩慢解凍を行った試料では、未凍結試料および急速解凍試料と比べ、 $\alpha$ -アクチニンに相当するタンパク質バンドの減弱が認められた。

#### 文献

- 1) 天野慶之他編：冷凍食品事典（1984）朝倉書店
- 2) 大仲均：冷凍食品市場の現状 食品工業，40，42（1997）
- 3) 中江利孝：乳・肉・卵の科学 —特性と機能—（1986）弘学出版
- 4) 田中和夫、小島秩夫：食品冷凍工業（1986）恒星社厚生閣
- 5) TAYLOR, A.A.: Developments in Meat Science 3 (LAWRIE, R.A. ed.), 89 (1985) Applied Science Publishers
- 6) LAEMMLI, U.K.: *Nature*, 227, 680 (1970)
- 7) 田中武夫：コールドチェーン研究, 2, 110 (1976)
- 8) KHAN, A.W. and LENTZ, C.P.: *J. Food Sci.*, 30, 787 (1965)
- 9) SCELUD'KO, N.S. *et al.*: *Biofizika*, 25, 164 (1980)
- 10) 渡邊悦生編：魚貝類の鮮度と加工・貯蔵（1995）成山堂
- 11) 山中英明編：魚類の死後硬直（1991）恒星社厚生閣