冷凍すり身中のタンパク質の分散状態の電子顕微鏡的研究

佐藤 繁雄・土屋 隆英・松本 重一郎

(1984 年 5 月 11 日受理)

Electron Microscopic Study of Dispersion Profiles of Proteins
in Frozen Surimi (Fish Mince)Shigeo SATO,*¹ Takahide TSUCHIYA,*² and Juichiro J. MATSUMOTO*²

Dispersion profiles of proteins in "muen" (non-salt) and "kaen" (salt added) frozen surimi (fish mince) were examined under electron microscope. The cross sections of the muen surimis gave various profiles but no appreciable difference related with the jelly strength of the derived kamabokos was found. The dispersion profiles of the muen surimis were classified roughly into following four types: (1) a profile demonstrating well reserved myofibrillar structures in which the M-lines and the Z-bands remain in nearly intact state, (2) a profile demonstrating myofibrillar structures in which the M-lines are inappreciable and the vague Z-bands are shown, (3) a profile demonstrating parallel streams of fine filaments which are probably assignable as actomyosin filaments, (4) a profile in which no uniform structure is appreciable. The dispersion profiles in the kaen surimis were similar to those found in kamabokos (cooked jellies) and showed dense or loose matrices of cross-linked filaments. Dilute homogenate suspensions of the surimis illustrated two types of filaments which were probably assignable as actomyosin filaments and as naked F-actin filaments beside aggregates of myosin. The grade SA surimis and some grade C surimis demonstrated fine arrowheaded filaments of actomyosin and gave good jellies. Other grade C surimis demonstrated filaments of myosin-poor actomyosin filaments and gave poor jellies.

1958 年、西谷ら^{1,2)}によって“冷凍すり身法”が開発されて以来、スケトウダラ冷凍すり身の需要は大幅に増え、今や水産ねり製品原料の大部分を賄うようになった。冷凍すり身の品質の評価は、足形成能の良否、すなわち、良質のねり製品を生ずるか否かによって決定される。³⁾ かまぼこの足の形成機構は、いまだに解明され尽してはいないが、それがかまぼこの主成分タンパク質であるアクチン及びミオシンの相互作用に依存することは確かであり、冷凍魚肉の足形成能の低下の原因は、アクチンミオシンの変性に帰されている。⁴⁾ 冷凍すり身の意義は、魚肉タンパク質の冷凍変性を抑制するところにある。

しかしながら、ねり製品の足の発現、魚肉保藏中または冷凍貯蔵中のゲル形成能の低下および冷凍すり身法の効果などに関する従来の研究の大部分は、タンパク質の性質や状態の変化に集中してきた。⁵⁻⁷⁾ すなわち、溶解性、水和性、酵素活性、分子の大きさ、形、分散状態などの変化を主な対象としている。しかし、魚肉は多種類のタ

ンパク質が一定の規則に従って相互に関係しつつ作り上げた複雑にして秩序ある微細構造を持っている。ねり製品もまた、肉のタンパク質がつくりだした空間構造を持ち、足と呼ばれる独特の粘弾性を生みだしている。したがって、魚肉からすり身または冷凍すり身を経てかまぼこに至る微細構造の推移を認識することは、かまぼこの足および足形成機構を理解し、必要な制御を行うために極めて重要と考えられる。

著者らは、上記の魚肉タンパク質の空間的分散状態の推移を電子顕微鏡観察によって認識することを企て、まず、魚肉およびかまぼこの微細構造に関する研究を報告し^{8,14)}引きつづいて冷凍すり身における魚肉構成成分の分散状態を明らかにしようとした。

実験材料と方法

実験材料 冷凍すり身の試料としては、市販の無塩および加塩スケトウダラ冷凍すり身を使用した。前者は、SA 級 (大洋漁業・壮洋丸製造) のもの 5 点、C 級 (釧

*¹ 株式会社紀文 (KIBUN, Co. Ltd., &-14-13 Ginza, Chuo, Tokyo 104, Japan).

*² 上智大学理工学部 (Department of Chemistry, Sophia University, Kioicho-7, Chiyoda, Tokyo 104, Japan).

*³ 佐藤繁雄・高野清允・伊藤慶子・土屋隆英・松本重一郎: 昭和 58 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 180

路および稚内の陸上すり身)のもの6点, 後者は, SA級(大洋漁業製)のもの1点で, 製造・輸送後, 東京都内の商業冷凍庫(-23~-25°C)に貯蔵されていたものである。それらの各々から電子顕微鏡試料を採取すると共に, かまぼこを調製し, ゲル強度を測定した。

かまぼこの調製法 冷凍すり身を4°Cの低温室で自然解凍し, 攪拌擂潰機(石川式 18 型白内径 20 cm)で5分間空すりした後, 2.5%の食塩を加えて15分間擂潰した。これに10%の水を加えて2分間擂潰して水のばしを行い, 塩化ビニリデン(折径 45 mm)のケーシングに詰め, 25°Cで2時間放置した後, 85°Cの湯浴中で25分間加熱し, 直ちに氷水中で冷却した。ゲル強度の測定は, かまぼこの調製後24時間以内に行った。また, ケーシング詰めまでの操作は, 4°Cの低温室で行った。

ゲル強度測定 ゲル強度の測定は, 30 mm径のかまぼこを25 mm幅に輪切りにした試料について, レオメーター(不動工業製 NRN-2010 V-CW)を用い, 直径5 mmの球状プランジャーで破断時の凹み(ΔL_0)および破断強度(τ_0)を測定し, 結果を両者の積(g·cm)で示した。⁸⁾ プランジャー進入速度は6 cm/min, チャートスピードは30 cm/minとした。

電子顕微鏡試料作製法⁹⁾ 1. 切片法 試料を凍結状態のまま, およそ10×1×1(mm)の大きさに細断し, 3%グルタルアルデヒド-0.1 Mリン酸塩緩衝液(pH 7.3)で1夜固定した後, 1%オスミウム酸-0.1 Mリン酸塩緩衝液(pH 7.3)で50分間後固定を行い, その後次の順序でエタノール脱水を行った。すなわち, 70%-15分間, 80%-15分間, 90%-15分間, 95%-15分間,

100%-15分間の処理を行った。次いで, 酸化プロピレンに10分間, 酸化プロピレン-エポキシ樹脂混合液に3時間浸漬した後, エポキシ樹脂に包埋した。これを35°C, 45°C, 60°Cの恒温槽中で各々, 6時間, 12時間, 24時間重合させた後マイクローム(LKB, TYPE 4802A)で超薄切片をつくり, 酢酸ウラン, クエン酸鉛で二重染色を行い, 日立 HS-9 型電子顕微鏡(TEM)で観察した。

2. ネガティブ染色法 すり身の成分¹⁾に合わせてスクロース(4.7%), ソルビトール(4.7%)および多リン酸塩(0.3%)を含む分散液30 mlを半解凍状態のすり身2 gに加え, ガラスホモジナイザーで泡がたたないように注意してホモジナイズした後, 上記分散液を加えて, タンパク濃度が0.1~0.2 mg/ml程度となるように希釈した。なお, ここまでの操作は冷却下で行った。その後, 50%飽和酢酸ウランでネガティブ染色し, 上記と同様に電子顕微鏡で観察した。

光学顕微鏡試料作製法 半解凍状態の試料2 gに10倍量のスクロース, ソルビトール, 多リン酸塩を含む分散液を加え, ガラスホモジナイザーで泡がたたないようにホモジナイズして, 位相差光学顕微鏡(オリンパス社製 BH-2 型)で観察した。

実験結果および考察

Table 1に示した試料を使って, そのゲル強度の測定と電子顕微鏡および光学顕微鏡による観察を行った。Fig. 1~Fig. 12のSample NumberはTable 1に示したものと同じものである。ゲル強度の測定結果をみると, 用いた冷凍すり身は, Sample 5, 10, 11を除いて,

Table 1. Origin of Alaska pollack frozen surimis studied and jelly strength of kamabokos therefrom

Sample	Grade of material	Jelly strength* ³ (g·cm)	Date of preparation	
			Surimi	Kamaboko
1	SA* ¹	1074	1982. 10. 21	1983. 8. 1
2	SA* ¹	1101	1982. 10. 24	1983. 7. 20
3	SA* ¹	1067	1982. 10. 25	1983. 8. 1
4	SA* ¹	1131	1982. 10. 26	1983. 7. 20
5	SA* ¹	332	?	1983. 9. 5
6	C* ¹	286	1982. 12. 29	1983. 8. 1
7	C* ¹	290	1983. 1. 12	1983. 7. 20
8	C* ¹	204	1983. 1. 15	1983. 8. 1
9	C* ¹	144	1983. 1. 17	1983. 9. 6
10	C* ¹	108	?	1983. 7. 20
11	C* ¹	61	?	1983. 9. 5
12	SA* ²	896	1983. 1. —	1983. 8. 9

SA: Super A

*¹ Muen surimi (non-salt surimi).

*² Kaen surimi (salt added surimi).

*³ Jelly strength was estimated by a spherical plunger (d: 5 mm). Each figure is product of the breaking stress (g) and the breaking strain (cm) according to YAMADA's method.⁸⁾

Sample 1. JS=1074 (g·cm)

Sample 4. JS=1131 (g·cm)

Fig. 1. Electron micrographs of grade SA muen (non-salt) frozen surimi from Alaska pollack. The samples were ultrathin-sectioned. Fine myofibrillar structures are shown. The Z-bands and the M-lines remain intact. Bars represent 1 μ m.

Sample 7. JS=290 (g·cm)

Sample 9. JS=144 (g·cm)

Fig. 2. Electron micrographs of grade C muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were ultrathin-sectioned. Fine myofibrillar structures as Fig. 1 are shown, but the Z-bands are more loosely shaped than in Fig. 1. Bars represent 1 μ m.

それぞれの等級に応じた形成能が保持されていると考えられた。

電子顕微鏡による観察一切片法 1. 無塩すり身
無塩すり身ではいろいろな構造が認められたが、それらを整理すると次のようにまとめられた。写真は代表的な

ものを示した。なお、写真の中には、タンパク質よりなる実体が周囲よりも淡色となっているものがあったが、そのような場合も包含して考察した。

(1) 筋原線維構造が認められ、しかも M-line や Z-band が生筋に近い状態で残っているもの (Fig. 1,

Sample 2. JS=1101 (g·cm)

Sample 4. JS=1131 (g·cm)

Fig. 3. Electron micrographs of grade SA muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were ultrathin-sectioned. Structures of the Z-bands and the M-lines are indistinct and filaments presumed as actomyosin are shown. Bars represent 1 μ m.

Sample 7. JS=290 (g·cm)

Sample 9. JS=144 (g·cm)

Fig. 4. Electron micrographs of grade C muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were ultrathin-sectioned. Structures as Fig. 3 but less orderly arranged are shown. Bars represent 1 μ m.

Fig. 2, Fig. 5a); 太いフィラメント (ミオシンフィラメント) と細いフィラメント (アクチンフィラメント) の規則的配列も認められる。また、両フィラメント間に架橋も認められる。

(2) 筋原線維構造が認められるが、M-line が消失

していたり、Z-band が不鮮明になっているもの (Fig. 3B, Fig. 4B); 太いフィラメントと細いフィラメントが認められるが、生筋筋原線維に比べ配列が乱れ、規則性が失われている。両フィラメントの間に架橋も認められる。

Sample 5. JS=332 (g·cm)

Sample 10. JS=108 (g·cm)

Fig. 5. Electron micrographs of grade SA muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were ultrathin-sectioned. In (A), fine myofibrillar structures are shown. In (B), structures of the Z-bands and the M-lines are indistinct. Bars represent 1 μ m.

Sample 11. JS=61 (g·cm)

Sample 12. JS=869 (g·cm)

Fig. 6. Electron micrographs of grade C muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were ultrathin-sectioned. In (A), vague remains of the Z-bands are appreciable but in (B), no object reflecting the original musculature is observable. The dark objects in (B) is probably assignable as collagen. Bars represent 1 μ m.

(3) フィラメントはほぼ平行に並んでいるが、太いフィラメントと細いフィラメントの区別が不明瞭なフィラメントが認められるもの (Fig. 3A, Fig. 4A); 屈曲したフィラメントの間に分子間架橋が多く認められ、網目構造に近い。アクチンとミオシンがアクトミオシンフィ

ラメントを形成したものと思われる。

(4) 筋原線維構造が不鮮明で、それを構成するフィラメントさえも不鮮明になっており、無構造というべき状態となっているもの (Fig. 5B, Fig. 6)。

SA 級およびC級のすり身のいずれでも (1), (2) の状

Fig. 7. Electron micrographs of grade SA kaen (salt added) frozen surimi from Alaska pollack. The samples were ultrathin-sectioned. Network structures of entwined filaments are shown. This profile resembles microstructure type of kamaboko. Bars represent 1 μ m.

Fig. 8. Same as Fig. 7. The samples were ultrathin-sectioned. The remains of the Z-bands are observed. Such profiles are similar to those found in kamaboko. Bars represent 1 μ m.

態が認められたが、(1)の状態は比較的少なく、大部分は(2)の状態になっていた。

このように、SA級とC級の間では構造上の大きな差は認められなかったが、C級ではZ-bandがより不鮮明で崩れた状態になっていた (Fig. 2A)。

(4) のような状態が認められたものでは、(1)および

(2) の構造はみられず、フィラメントはほとんど分解していたが、そのゲル形成能がだいぶ低下していた。(SA: Sample 5, C: Sample 10, 11) これらでは、筋原線維を構成しているタンパク質が変性しているものと考えられる。

SA級試料のうち、ゲル形成能が低下し、C級程度と

Sample 4. JS=1131 (g·cm)

Sample 7. JS=290 (g·cm)

Fig. 9. Phase contrast micrographs of homogenate of grade SA muen frozen surimi from Alaska pollack. Fragments of myofibrillar structures were found in the amorphous background. Bars represent 0.1 μm .

Sample 2. JS=1101 (g·cm)

Sample 4. JS=1131 (g·cm)

Fig. 10. Electron micrographs of homogenate of grade SA muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were negatively stained. In (A), fine actomyosin filaments with arrowhead structure are shown. In (B), half naked, myosin poor actomyosin filaments are shown. Bars represent 5 μm .

なっていたものでは、(4)の状態の他、(1)や(2)の状態もみられた。(Fig. 5)しかし、C級でみられた崩れたZ-bandは認められず、明瞭なZ帯が観察されており、筋原線維の秩序はまだかなりよく維持されていたと考えられる。

以上、切片法による観察結果から、無塩すり身では大抵の場合、筋原線維の微細構造が残っていることが確

認された。なかには、アクトミオシンフィラメントになっていると思われる所(上記(3)の構造)もみられた。ただし、筋原線維構造といってもM-lineやZ-bandが不鮮明になった例が多い。しかし、品質の低下したC級すり身ではきれいな筋原線維構造はみられず、また、フィラメントがほとんど認められない例もみられた。(Fig. 6)。切片法では、C級でZ-bandがより崩れた状態にな

Fig. 11. Electron micrographs of homogenate of grade C muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were negatively stained. In (A), actomyosin filaments with arrow-head structure are shown. In (B) entangled thin filaments, presumably F-actin filaments with little myosin attached, are observed. Part of the thin filaments are aggregated. Particles spread over the background might be attributable to aggregated myosin. Bars represent 5 μ m.

Fig. 12. Electron micrographs of homogenate of grade C muen frozen surimi from Alaska pollack. The samples were negatively stained. Thin filaments like those in Fig. 11 are shown but with more extended degree of aggregation. In (B), the spread particles are more abundant. Bars represent 5 μ m.

っていた以外には、SA 級とC級とで明らかな違いは認められなかった。しかし、SA 級とC級とではゲル強度に大きな差がある。それが何に原因するのか、という点についてはあとで検討する。

2. 加塩すり身 加塩すり身では、無塩すり身にみら

れたような筋原線維構造は認められず、かまぼこにみられるようなフィラメントの絡まり合いや網目構造が観察された (Fig. 7)。このフィラメントはおそらく、アクチンフィラメントであると思われる。このことより、かまぼこは加塩すり身をそのまま加熱した状態のものに

近いと推定される。

加塩すり身ではこの他に、残存した Z-band の断片やそれを中心としたフィラメント（アクトミオシンフィラメント）の絡まり合いと考えられる像を示す例も認められた (Fig. 8)。

光学顕微鏡による観察 無塩すり身試料 2 g に 10 倍量の分散液（スクロース 4.7%, ソルビトール 4.7%, および多リン酸塩 0.3%）を加え、ホモジナイズした。分散液の組成は、冷凍すり身中の環境に一致するように選んだ。これを光学顕微鏡で観察すると、筋原線維構造を持つ筋線維の断片が無構造部分のなかに分散している像が観察された (Fig. 9)。ホモジナイズの際の希釈倍率をさらに大きくすると、筋線維構造はほとんど認められなくなった。このことから、切片法で観察された筋線維構造はホモジナイズの際に壊れやすい状態にあると考えられる。

電子顕微鏡による観察—分散質のネガティブ染色法— 試料 2 g に 30 倍量の上記分散液を加えてホモジナイズし、さらに分散液を加えてタンパク濃度が 0.1~0.2 mg/ml となるように希釈した後ネガティブ染色して観察すると、Figs. 10~12 のような像が認められた。負染色により白い像として示されるフィラメントは、明らかに矢尻構造を持つのでアクトミオシンのフィラメントであると判断された (Figs. 10, 11A)。この分散質が光学顕微鏡で観察されたときには、上記の無構造状態として認められたものと考えられる。他方に、Fig. 11B および Fig. 12 では、矢尻構造を持たず屈曲したフィラメントが観察された。これは F-アクトンフィラメントと考えられ、冷凍変性したコイ筋アクトミオシンで認められる像¹⁰⁾と酷似している。これをすり身の等級に関連させて考えると、次の通りとなる。Fig. 10 は SA 級すり身 (Sample 2 および 4) のもの、Fig. 11 および Fig. 12 は C 級のすり身 (Sample 7, 9, 10 および 11) のものである。SA 級ではともに明瞭な矢尻構造を生じ、C 級でも Fig. 11A で矢尻構造が認められたが、後者は C 級のなかでも、ゲル形成能が高いものであった。

魚肉の冷凍貯蔵中にミオシンがまず変性して相互に凝集して不溶化するといわれる¹¹⁾が、このとき同時にアクトンとの結合力を失い、矢尻構造をもつアクトミオシンフィラメントを形成できなくなる。¹²⁾ その際には、ミオシンは相互に凝集して小粒子をつくり、写真の背景に分散しているか (Fig. 11B, Fig. 12B) 或いはフィラメント上の各処に粒状に結合している (Fig. 11B, Fig. 12A, B) ものと考えられる。

ゲル強度との相関関係をみると、Fig. 11B および Fig. 12 の像を示した冷凍すり身はいずれも低いゲル形成能しか示さないものであった。すり身のままの切片法

による観察では、微細構造の状態とゲル形成能との間に密接な対応関係がみられず、筋原線維の構造が比較的に残っている試料でもゲル形成能の貧しい例が認められた。一方、ホモジネートのネガティブ染色法による観察では、フィラメントの状態とゲル形成能の間はかなり高い対応関係がみられた。すなわち、ゲル形成能の高い SA 級試料 (Fig. 10) および C 級試料 (Fig. 11A) では、明瞭な矢尻構造をもつアクトミオシンフィラメントを与えたのに対し、ゲル形成能の低い他の C 級試料 (Fig. 11B, Fig. 12) では、ミオシンが不規則に結合したアクトミオシンフィラメントまたはミオシンの結合していない裸のアクトンフィラメントが認められた。したがって、SA 級と C 級との間の差、すなわち、すり身のゲル形成能の差は、ミオシンが未変性のまま保持されているか、或いは変性しているかの差に関係しているものと考えられる。フィラメント状の物体としては裸のアクトンフィラメントのみが認められるような試料ではゲル形成能が低かったことを考えると、多量のミオシンが未変性のままに残っていて、アクトミオシンフィラメントがよく発達することが、高いゲル形成能を表わすために必要と考えられる。

加藤・新井ら¹³⁾は、ミオシンの変性度とゲル形成能との間に相関関係が認められたことに基いて、冷凍すり身の品質の判定法としてミオシンの Ca^{2+} -ATPase 全活性を測定することを提唱している。本実験のホモジネートのネガティブ染色法による観察結果は、新井らの報告と対応する。

ホモジネートのネガティブ染色法では、アクトミオシンフィラメント、F-アクトンフィラメントおよびミオシンの凝集体が観察された。しかし、切片法の観察結果と考え合わせると、これらは、無塩すり身中では筋原線維の中に存在していたものがホモジナイズされた際に、もとの構造から解放されて二次的に形成されたものと考えられる。ホモジナイズ処理の分散液に含まれていた多リン酸塩が影響したものと推定される。これらの点については、現在検討中である。

終わりに、本研究を行うに当たり、加塩すり身を提供して頂いた大洋漁業株式会社研究所に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 西谷喬助・武田二美雄・田元 馨・田中 修・福見 徹・北林 透・相沢 悟: 北水試月報, **18**, 122-135 (1961).
- 2) 西谷喬助・武田二美雄・田元 馨・田中 修・北林 透: 北水誌月報, **18**, 391-397 (1961).
- 3) 志水 寛: 新版魚肉ねり製品 (岡田 稔・衣巻 豊輔・横関源延編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981,

- pp. 66-80.
- 4) 上田侃男・志水 寛・清水 亘: 日水誌, **28**, 1010-1014 (1962).
 - 5) 三宅正人・林孝市郎: 日水誌, **22**, 48-50 (1956).
 - 6) 岩田和士・岡田 稔: 日水誌, **37**, 1191-1198 (1971).
 - 7) 田元 馨・田中 修・武田二美雄・福見 徹・西谷喬助: 北水試月報, **23**, 50-60 (1961).
 - 8) 山田充阿弥: *New Food Industry*, **11**, 1-8 (1969).
 - 9) 近藤 勇: 電子顕微鏡生物試料作製法 (日本電子顕微鏡学会関東支部編), 丸善, 東京, 1975, pp. 17-32.
 - 10) 小国盛稔・久保俊之・松本重一郎: 日水誌, **41**, 1113-1123 (1975).
 - 11) L. JARENBÄCK and A. LILJEMARK: *J. Food Technol.*, **10**, 309-325 (1975).
 - 12) 大西 守・土屋隆英・松本重一郎: 日水誌, **44**, 27-37 (1978).
 - 13) 加藤 登・野崎 恒・小松一宮・新井健一: 日水誌, **45**, 1027-1032 (1979).
 - 14) 佐藤繁雄・土屋隆英・松本重一郎: 日水誌, **50**, 1869-1867 (1984).