

低真空走査型電子顕微鏡を用いた スケトウダラ冷凍すり身ゲルの内部構造観察法の検討

久保田 賢・田村 佳子・森岡 克司・伊藤 慶明
(農学部栽培漁業学科水産利用学研究室)

Observation of Internal Structures in Walleye Pollack Surimi Gel by Variable Pressure-Scanning Electron Microscope

Satoshi KUBOTA, Yoshiko TAMURA, Katsuji MORIOKA, and Yoshiaki ITOH

Laboratory of Aquatic Product Utilization, Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture

Abstract : The internal structure of surimi gel made from walleye pollack were observed using a variable pressure electron microscope (VP-SEM) at various magnifications ($\times 50$, $\times 250$, $\times 1500$, $\times 3000$, and $\times 10000$). At low magnifications ($\times 50$ and $\times 250$), internal porous and network structures were observed under the VP-SEM, whereas extra fine structure were not observed except for small porous structure on the filamentous structure at high magnifications ($> \times 1500$). When the exposed internal structure left at 20°C for 90 minutes, uneven network structure disappeared and entire uneven face became flat. There were fine uneven network structures in the gel containing no salt and gels containing 1 and 2% NaCl, whereas entire structures became flat in the gel containing 3 and 4% NaCl. Ice storage of the gels did not drastically affect on the internal structures. These results suggest that internal structure of surimi gel should be observed at low magnification immediately after exposing the face within 3 weeks ice storage of sample gel. Present study and previous report (Kubota et al., *J. Food Sci.*, 2003) indicate that VP-SEM could be a useful tool for observation of the internal structure of surimi gel.

Keywords : gel, N-SEM, surimi, VP-SEM

緒 言

かまぼこの弾力性に富んだ食感は「あし」と呼ばれ、その品質の良し悪しを決定する極めて重要な因子のひとつである¹⁾。この物性は、魚肉に塩を加えて播潰して得られる肉糊を加熱することにより生じる。これは、魚肉中の筋原繊維タンパク質のミオシンが塩により可溶化し、加熱により三次元的な網状構造を形成することに起因すると考えられてきた。かまぼこの品質は、原料魚の品質、塩濃度、加熱時間や方法の違いにより左右されることから、この差異がどのような構造に起因するかを明らかにすることは極めて重要である。

岡田および右田²⁾は、光学顕微鏡 (LM) を用いて約200倍でかまぼこを観察し、多くの楕円形の

間隙やレース状の網状構造の存在を明らかにした。さらに、この網状構造を形成するフィラメント上にもさらに細かい網状構造を見出している。その後、この細かな網状構造を明らかにする目的で、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた微細構造の観察が行われ、「あし」の強いかまぼこはこの構造が均一に分散していることが示された¹⁻⁶⁾。

一方、TEM による二次元的な観察像と比較して三次元的な観察が可能であることから、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いたかまぼこ内部構造の観察も数多く試みられている⁷⁻¹⁶⁾。しかしながら、SEM を用いた場合、一部の報告を除いて⁷⁻¹⁰⁾、LM や TEM で観察された網状構造とはまったく異なり、細かい突起状構造の集まりが観察されている¹¹⁻¹⁶⁾。著者らは、この構造は SEM 観察用の試料調製時に行う固定・脱水操作によりかまぼこの構成成分が凝集して生じたアーティファクトではないかと考えた。そこで、これらの操作が不要な低真空走査型電子顕微鏡 (VP-SEM または N-SEM とも呼ばれる) を用いてスケトウダラ冷凍すり身ゲルの内部構造を観察し、通常の SEM を用いた場合に観察される凝集した構造が VP-SEM では観察されず、種々の網状構造や孔状構造が観察可能なことを示した¹⁷⁾。さらに、この VP-SEM は固定・脱水操作が不要なこと、低倍率では非常に鮮明な観察像が得られること、試料を繰り返し観察しても像の変化はほとんど見られないことも明らかにした¹⁷⁾。しかしながら、試料の観察面に水滴が付着すると観察時の減圧により網状構造の著しい破壊が生じることも見出されていることから、VP-SEM によるかまぼこの内部構造観察を行うためにはより詳細な観察条件を検討する必要がある。そこで、本研究では VP-SEM を用いたスケトウダラ冷凍すり身ゲルの内部構造観察法について更に検討を重ねた。

方 法

材料 無塩スケトウダラ S S 級冷凍すり身を用いた。冷凍すり身はサイレントカッターで破碎後、 -20°C で貯蔵した。

すり身ゲルの調製 4°C で1晩放置して解凍した冷凍すり身を、あらかじめ冷却しておいた乳鉢を用いて均一になるよう15分間混合した。水分含量を80%に調整した後、終濃度が0-4%になるように NaCl を添加して10分間播潰した。生じた肉糊を円筒形のステンレス製リング ($\phi 30\text{mm} \times 30\text{mm}$) に詰めた。塩化ビニル製ラップで包んだ後ウォーターバスを用いて 80°C で20分間加熱し、直ちに氷冷した。4% NaCl を加えた肉糊の一部はラップで包装し、水中に放置した。

低真空操作型電子顕微鏡観察 すり身ゲル内部構造の低真空走査型電子顕微鏡観察は、Kubota ら¹⁷⁾の方法により行った。市販の両刃かみそりを用いてゲルを $30 \times 5 \times 5\text{mm}$ の拍子木状に切断し、長軸方向に手でちぎって露出した面を観察した。試料をクールステージ (-10°C , HITACHI) に固定し、SEM (S-2380N, HITACHI) を用いて、VP-SEM モード (加速電圧15kV, 気圧7-20Pa) で観察した。VP-SEM を用いて高倍率ですり身ゲルを観察した場合、鮮明な観察像が得られる倍率を知るため、細孔構造が比較的少ない3% NaCl 添加加熱ゲルと細かな網状構造を持つ4% NaCl 添加氷蔵すり身の内部構造を50倍から10000倍で観察した。

試料の乾燥の影響 ゲルの内部構造の露出後に放置した場合の観察像の変化を知るため、NaCl 無添加および3% NaCl 添加加熱ゲルの内部構造を露出して 20°C で90分間放置した後 VP-SEM 観察を行った。

試料ゲルの氷蔵の影響 加熱したすり身ゲルの内部構造が、長期の氷蔵中に変化するかどうかを知るため、0 - 4 % NaCl を添加した加熱ゲルを 3 週間まで氷蔵し、内部構造を VP-SEM で観察した。

結 果

種々の倍率での観察 Fig. 1 に 3 % NaCl を添加した加熱ゲル (Fig. 1A, C, E, G) および 4 % NaCl を添加した氷蔵すり身 (Fig. 1B, D, F, H) の内部構造を示す。50倍および250倍で観察した場合、直径数100 μ mの孔構造 (Fig. 1A - D) や10 μ m前後の網状構造 (Fig. 1D) が、明確に観察された。これらの構造を1500倍で観察した場合、観察像が不鮮明になった (Fig. 1E, F)。細かい網状構造の観察された 4 % NaCl を添加した氷蔵すり身では、250倍で観察された網状構造のフィラメント上に存在するさらに細かな孔状構造 (Fig. 1F 矢印) が拡大されて観察された。これ以上高倍率で観察した場合でも、さらに細かい構造は観察することができなかった (Fig. 1G, H, 10000倍のデータは示していない)。

乾燥の影響 Fig. 2 に、NaCl 無添加加熱ゲル (Fig. 2A - D) および 3 % NaCl 添加加熱ゲル (Fig. 2E - H) の内部構造を露出し、室温に放置した試料の観察像を示した。NaCl 無添加ゲルでは、細かな不定形の網状構造が観察された (Fig. 2A, C)。この網状構造は、1.5時間放置することにより消失した (Fig. 2B, D)。一方、3 % NaCl を添加した加熱ゲルの場合は、大きな起伏のある構造を示したが (Fig. 2E, G)、それと比較して乾燥後は全体的に滑らかな構造を呈した (Fig. 2F, H)。

試料ゲルの氷蔵の影響 Fig. 3 に NaCl 無添加加熱ゲルの内部構造を示した。作製直後のゲル (Fig. 3A, B)、氷蔵 1 週間 (Fig. 3C, D)、氷蔵 2 週間 (Fig. 3E, F) および氷蔵 3 週間 (Fig. 3G, H) のゲルすべてで大きさが10 μ m以下の不定形の網状構造が観察された。また、大きな不定形の孔が随所に観察された (Fig. 3 矢印)。Fig. 4 は NaCl を 1 % 添加した加熱ゲルの内部構造を示している。NaCl 無添加のゲルと同様な大きさの不定形の細孔構造は観察されたが、その密度は低くなった (Fig. 4B, D, F, H)。また、NaCl 無添加ゲルで観察された大きな不定形の孔構造も観察されたが、その数も少なくなっていた。氷蔵 3 週間のゲルの内部構造は起伏がわずかに大きくなっていた (Fig. 4G, H 矢印)。Fig. 5 に NaCl を 2 % 添加した加熱ゲルの内部構造を示す。添加する食塩濃度が 1 % 以下のものと比較して、細孔構造が顕著に減少し、全体的に滑らかな構造を呈するようになった。また、直径が10 - 50 μ mの楕円形の孔構造 (Fig. 5 矢印) や直径数100 μ mのクレーター様構造 (Fig. 5 星印) も観察された。また、NaCl を 1 % 添加した加熱ゲルの場合と同様に、長く氷蔵した場合にわずかに起伏が大きくなっていた (Fig. 5 矢頭)。Fig. 6 は NaCl を 3 % 添加した加熱ゲルの内部構造である。NaCl 濃度が 2 % 以下の場合に観察された網状構造はほとんど観察されなくなった。また、NaCl を 2 % 添加したゲルで観察された10 - 50 μ mの細孔構造も顕著に減少した。それに反して、観察像全体で、数100 μ mのクレーター様構造が観察されるようになった (Fig. 6 矢印)。NaCl を 1 および 2 % 添加したゲルで観察された氷蔵中の起伏の増加は、このゲルでは氷蔵 1 週間ですでに観察されていた (Fig. 6C, D 矢頭)。食塩濃度 2 % までで観察された大きな不定形の孔は、食塩濃度が 3 % 以上になるとほとんど消失し、観察像全体が密になった。Fig. 7 に NaCl を 4 % 添加した加熱ゲルの内部構造を示した。NaCl を 3 % 添加した加熱ゲルと似た構造を示したが、10 - 50 μ mの孔構造 (Fig. 7A, C 矢印) はさらに減少した。また、氷蔵することによりこの孔構造はほとんど観察されなくなった。

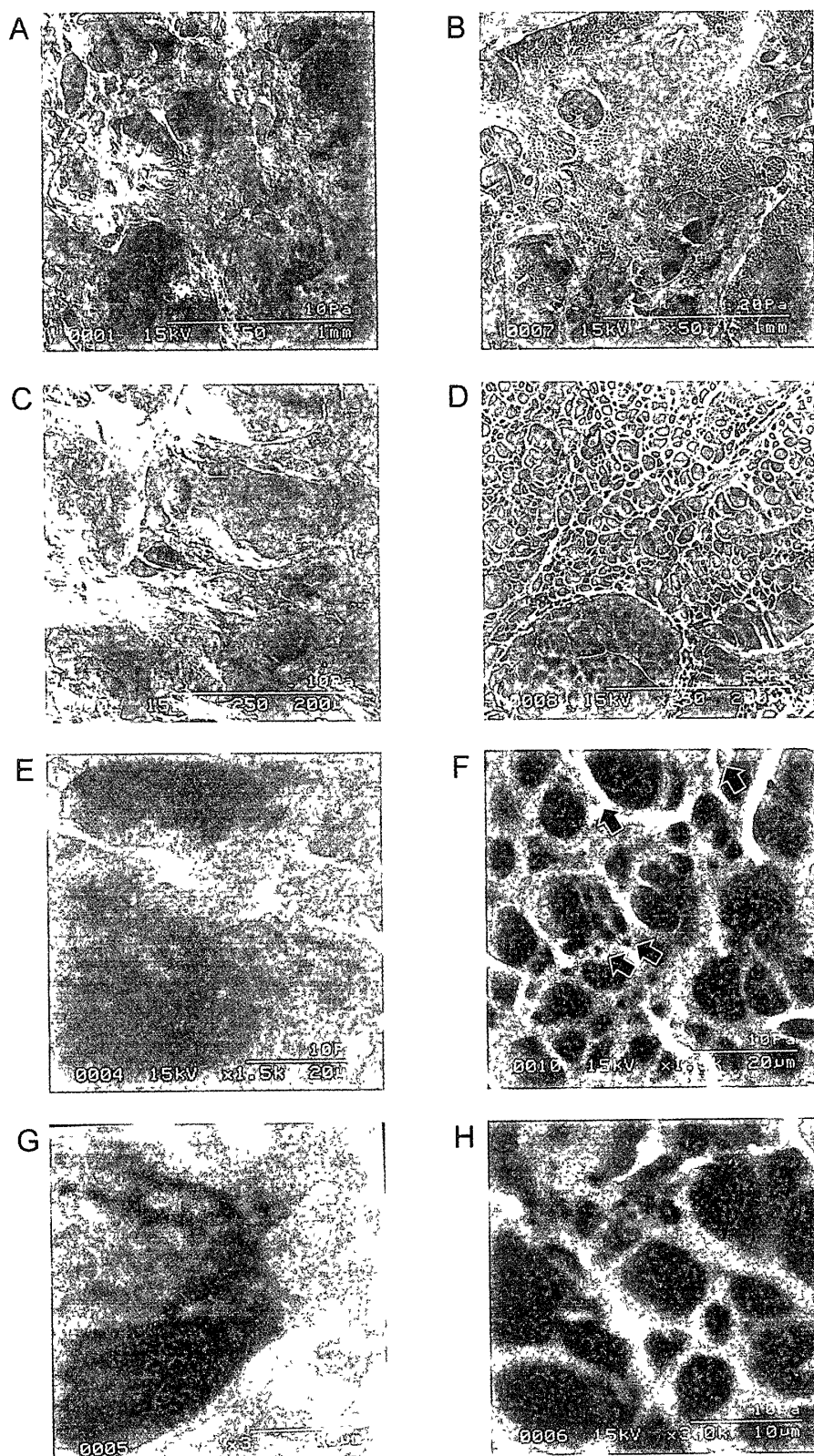


Fig. 1: Images obtained by using a VP-SEM of internal structure of the heated gel (3% NaCl) and ice-stored surimi paste (4% NaCl)
 A, C, E, G: heated gel, B, D, F, H: ice-stored surimi paste. A, B: $\times 50$, C, D: $\times 250$, E, F: $\times 1500$. G, H: $\times 3000$.

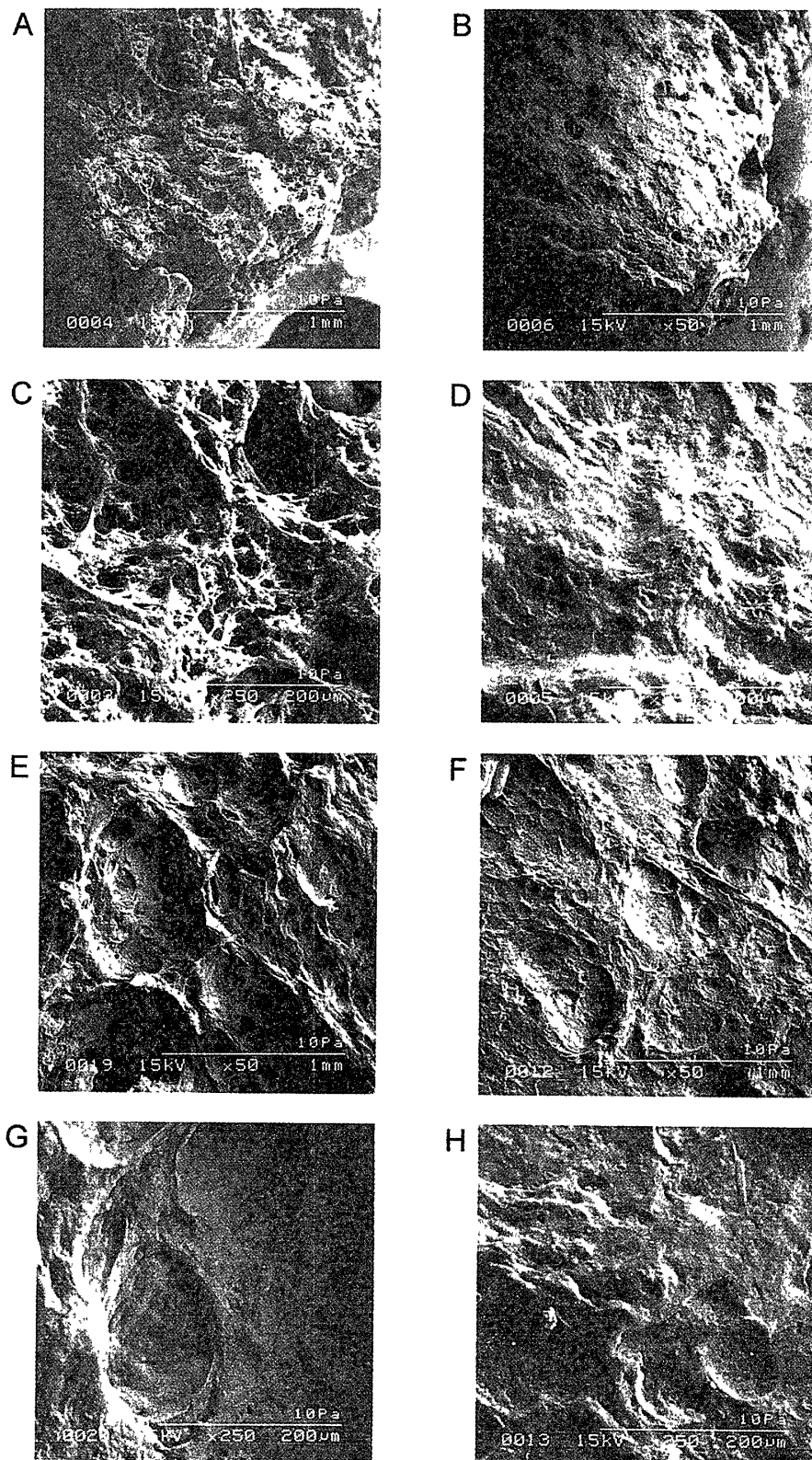


Fig. 2: Images obtained by using a VP-SEM of internal structure of the heated gels (0 and 3% NaCl) and those left at 20°C for 90 min after the exposition.

A, C, E, G: immediately after exposition of internal structure, B, D, F, H: after 90 min. A-D: gel containing no salt, E-H: gel containing 3% NaCl. A, B, E, F: $\times 50$, C, D, G, H: $\times 250$. Fig. 2A and B are reproduced¹⁷⁾.

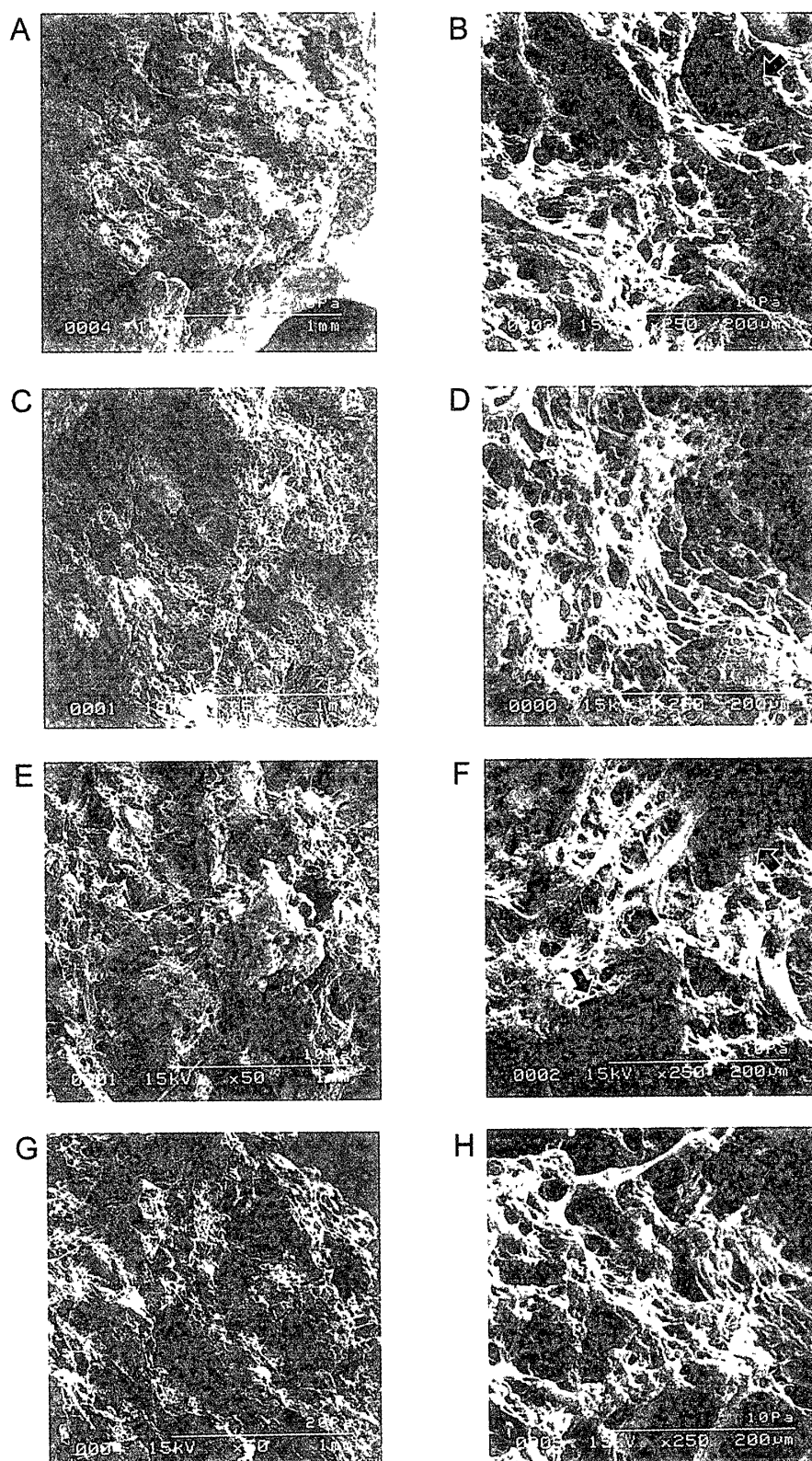


Fig. 3 : Images obtained by using a VP-SEM of internal structure of the gel containing no salt stored in ice.

A, B: not stored. C, D: 1 week stored. E, F: 2 weeks stored. G, H: 3 weeks stored. A, C, E, G: $\times 50$.
B, D, F, H: $\times 250$.

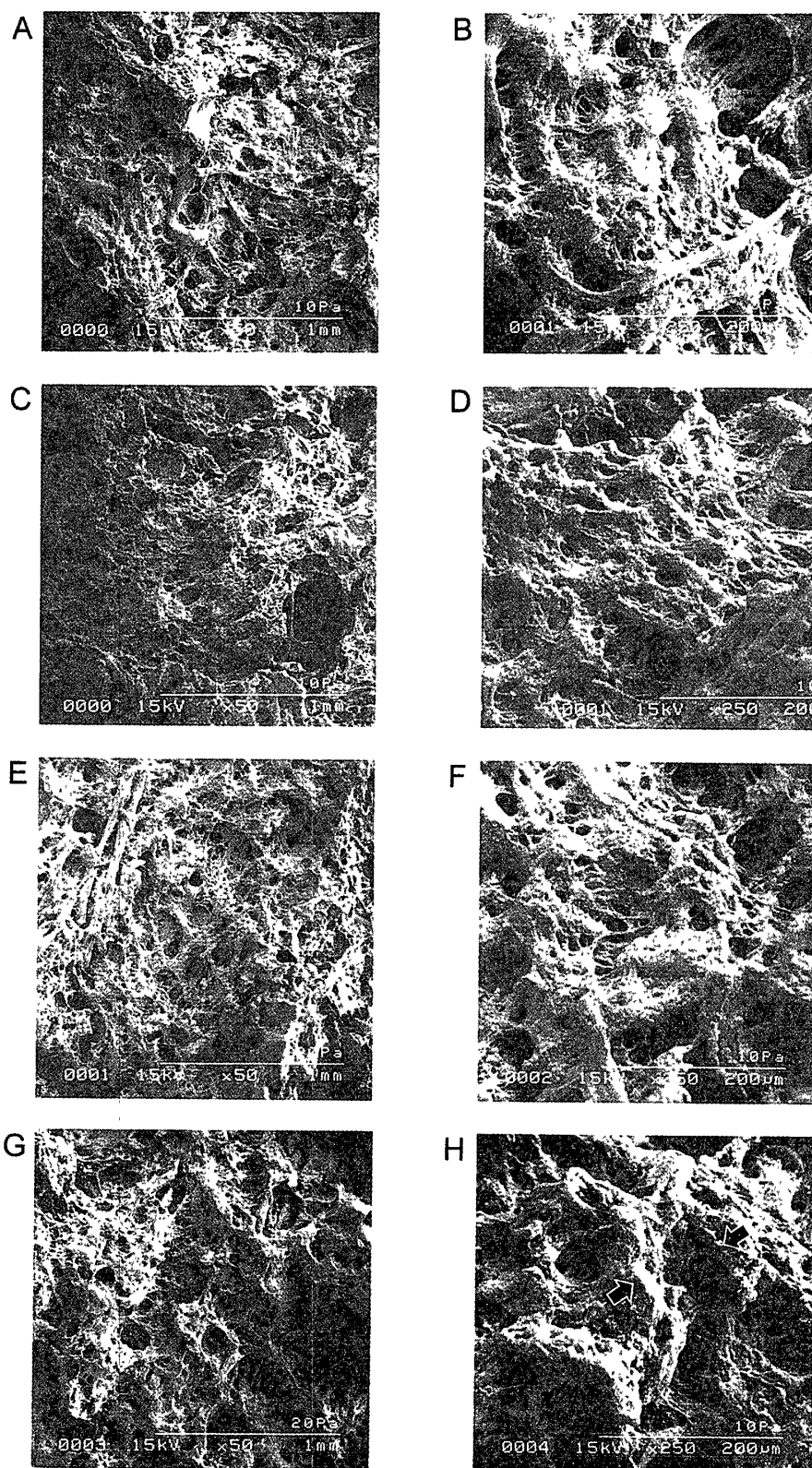


Fig. 4: Images obtained by using a VP-SEM of internal structure of the gel containing 1% NaCl stored in ice.

A, B: not stored, C, D: 1 week stored, E, F: 2 weeks stored, G, H: 3 weeks stored. A, C, E, G: $\times 50$, B, D, F, H: $\times 250$.

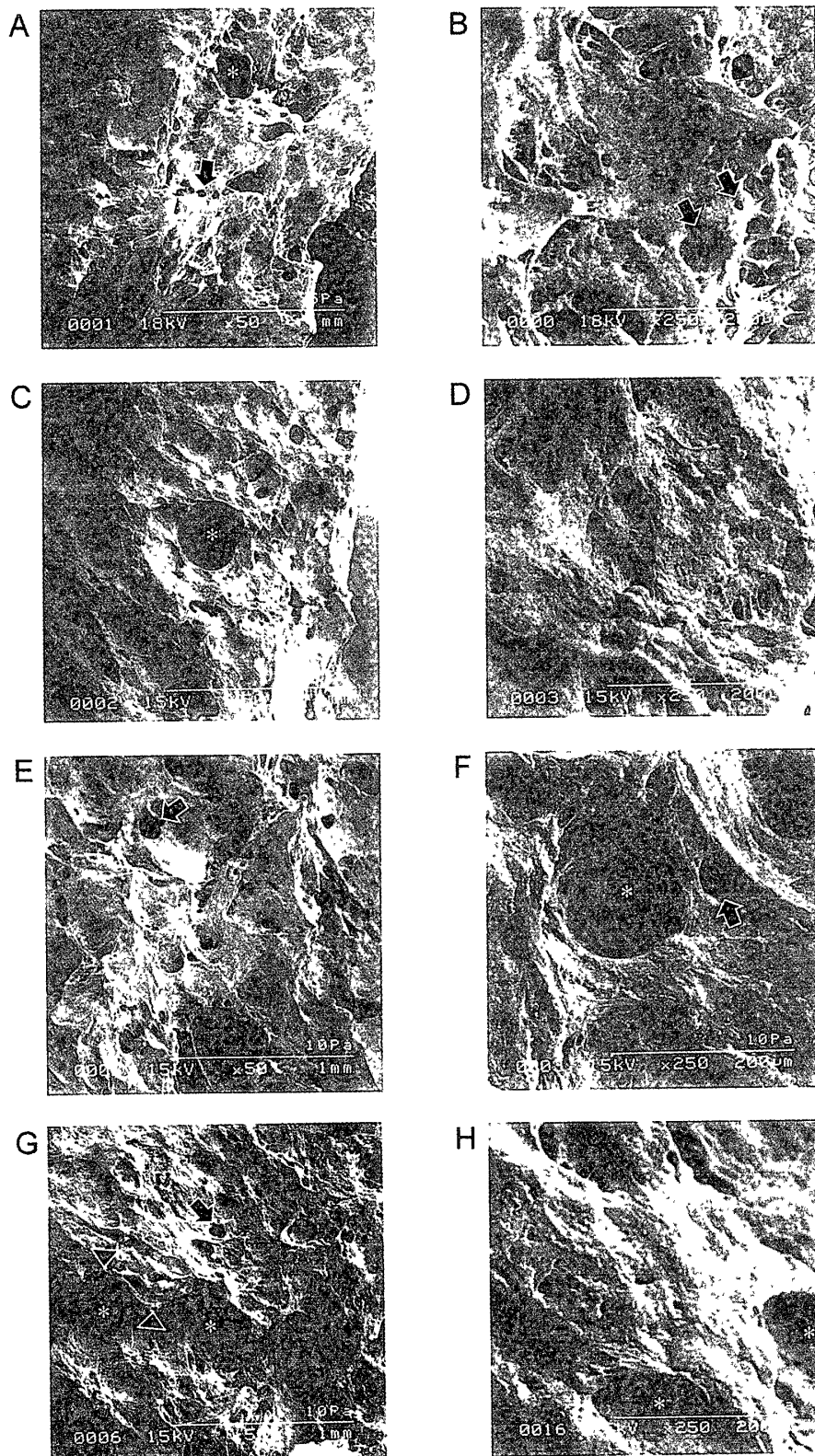


Fig. 5 : Images obtained by using a VP-SEM of internal structure of the gel containing 2% NaCl stored in ice.

A, B: not stored, C, D: 1 week stored, E, F: 2 weeks stored, G, H: 3 weeks stored. A, C, E, G: $\times 50$.
B, D, F, H: $\times 250$.

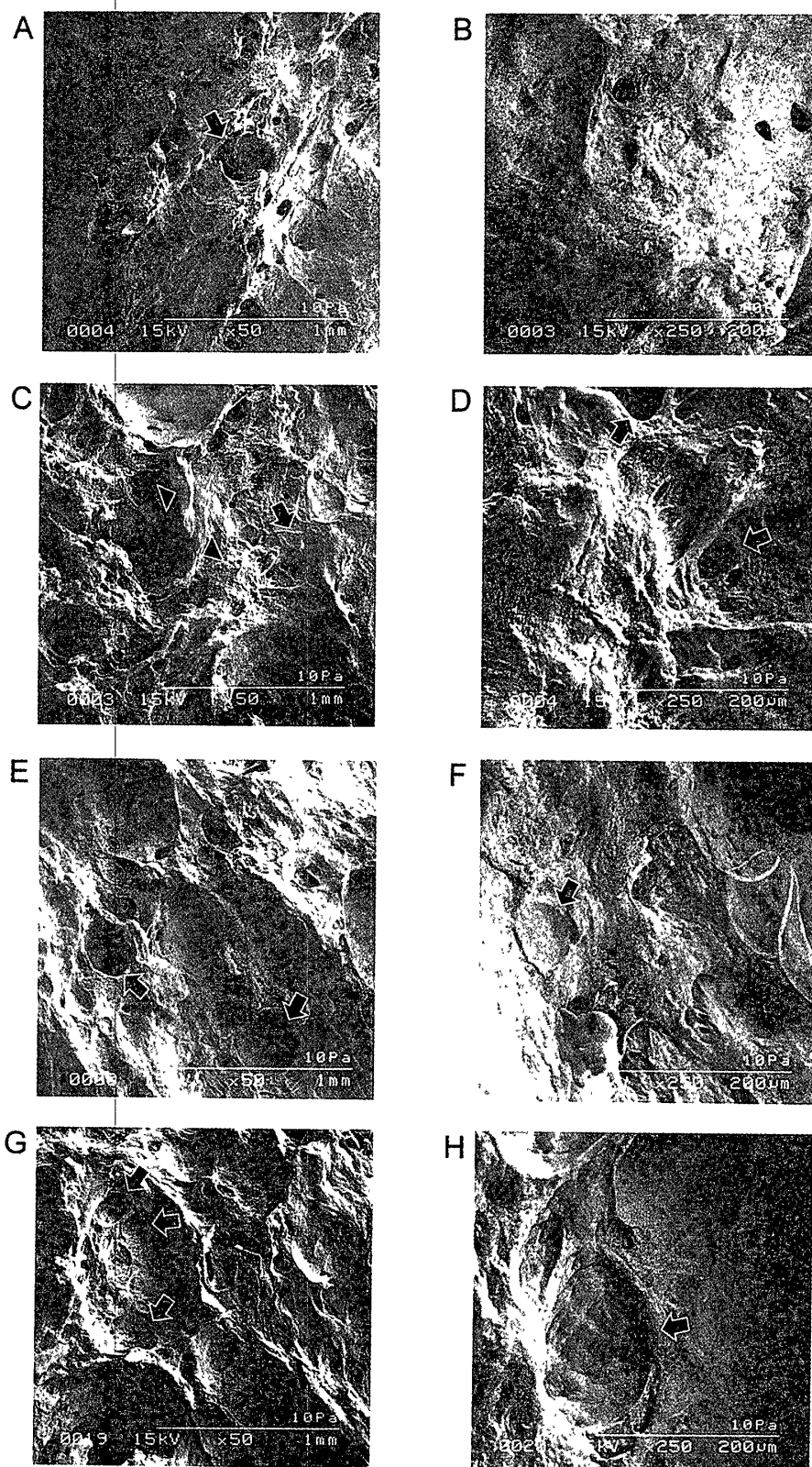


Fig. 6 : Images obtained by using a VP-SEM of internal structure of the gel containing 3% NaCl stored in ice.

A, B: not stored, C, D: 1 week stored, E, F: 2 weeks stored, G, H: 3 weeks stored. A, C, E, G: $\times 50$, B, D, F, H: $\times 250$. Fig. 6A is reproduced¹⁷⁾.

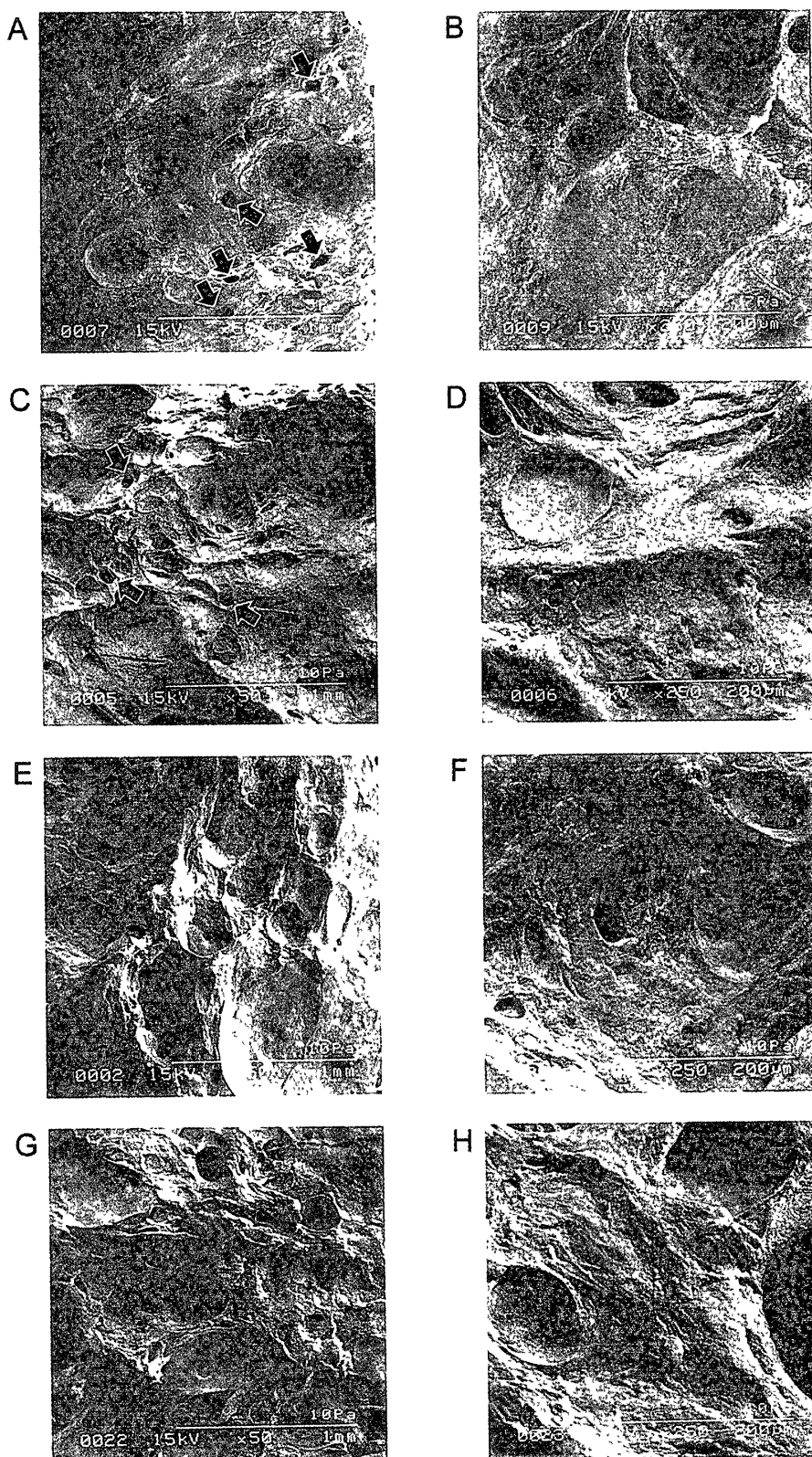


Fig. 7 : Images obtained by using a VP-SEM of internal structure of the gel containing 4% NaCl stored in ice.

A, B : not stored, C, D : 1 week stored, E, F : 2 weeks stored, G, H : 3 weeks stored. A, C, E, G : $\times 50$, B, D, F, H : $\times 250$.

考 察

本研究では、VP-SEM を用いたすり身ゲルの内部構造観察を行う場合に問題となる、観察倍率、試料の乾燥の影響および試料の氷蔵による影響に注目して検討を行った。VP-SEM は、通常の SEM と異なって観察前に試料の脱水、固定や染色操作が不要なため簡便に生物試料を観察できることがその特徴であるが、試料中の水分をある程度保持したまま観察することから試料室の減圧度は比較的高く、高倍率での解像度は比較的低いと言われている¹⁸⁾。50倍および250倍ですり身ゲル試料を観察した場合でのみ極めて鮮明な観察像が得られたことから、VP-SEM は μm レベルでのすり身ゲルの観察に適していることが明らかとなった (Fig. 2A - D)。すり身ゲルを構成する主要タンパク質であるミオシン分子の長軸が約160nm であることから、VP-SEM で観察されるのは分子レベルではなく、ミオシン分子が凝集して束になり形成する構造であると考えられる。この方法を様々な条件で調製したすり身ゲルに応用することにより、このミオシンの凝集様式と物性との関係が徐々に明らかにできることが期待される。

すり身ゲルは水分を多く含む食品のひとつである。この VP-SEM は含水試料の構造をそのまま観察できるという利点を持つ反面、試料面の乾燥がその観察像に悪影響を与える可能性が考えられた。20℃ で90分間放置した観察面では網状構造が消失したことから、内部構造は観察する直前に露出するほうが望ましいことが明らかとなった。2 - 4% NaCl を添加した魚肉すり身加熱ゲルは保水力が高いことが知られている¹⁹⁾。本研究では、NaCl 無添加ゲルおよび3% NaCl 添加ゲルのいずれもが放置により著しい構造変化を生じたことから、ゲルの持つ保水性に関係なく露出直後の観察が好ましいと考えられた。著者らは、内部構造の露出直後のすり身ゲルを一度観察し、常圧に戻したのち観察した場合にはほとんど構造変化は認められないが、過剰の水分を観察面に滴下したのち観察すると、網状構造が顕著に崩壊することを明らかにした¹⁷⁾。これらの事実から、VP-SEM によりすり身ゲルの内部構造を観察する場合には、すり身ゲルが本来保持している水分状態に保つことが不可欠であると考えられた。

一般に、冷蔵している限りかまぼこの賞味期間は数週間である。そこで、0 - 4% の NaCl を添加した直接加熱ゲルを3週間まで氷蔵してその内部構造を VP-SEM で観察した。その結果、食塩濃度の高いゲルでわずかに観察されていた小孔構造 (Fig. 7A, C) が消失することと観察像全体の起伏が多少大きくなること (Fig. 4G, H 矢印, Fig. 5 矢頭, Fig. 6C, D 矢頭) を除いて氷蔵による著しい構造変化は観察されなかった。これは、一度形成されたすり身ゲル構造の大部分は氷蔵中に本質的に変化しないためと考えられる。このことは、種々の条件で調製した多数のすり身ゲルを観察して比較しようとする場合に、必ずしもこれらのゲルを同時に調製する必要はないことを示していた。ただし、NaCl を添加していないゲルを3週間氷蔵した場合にはゲル表面にネトが生じていたことから、それ以上氷蔵すると内部も腐敗して構造が変化すると考えられた。

これまでに、かまぼこの物性と内部構造の関連について興味を持たれ、種々の顕微鏡観察が行われてきた。LM では、楕円形の隙間やレース状の網状構造が観察されている^{1, 2)}。また、TEM を用いて分子の均一な分散がその弾力ある物性に重要であることが報告されている^{1, 3, 4)}。しかしながら、このレベルの構造がどのように物性に影響しているかは今のところ不明である。その一因として、従来の顕微鏡観察用の試料調製時に、かまぼこで最も多く含まれている水分を除去しなければならないということが挙げられる。本研究で用いた VP-SEM は水分を除去することなく簡便にかまぼこ試料を観察できる。また、前報¹⁷⁾ および本研究により、VP-SEM を用いたすり身ゲルの内部構造観察法が確立された。今後この VP-SEM によるすり身ゲルの観察結果と、TEM による微

細レベルな構造の知見を融合させることにより、かまぼこの物性に寄与する内部構造がさらに明らかにできることが期待される。

謝 辞

本研究の一部を助成していただいたソルトサイエンス研究財団に感謝する。また、低真空走査型電子顕微鏡観察は農学部暖地農学科共同機器を利用して行った。

要 約

スケトウダラ冷凍すり身ゲルの内部構造のVP-SEMを用いた観察条件について検討した。VP-SEMで鮮明な像が得られる倍率は250倍以下であった。観察面の乾燥は網状構造の消失や、全体的な起伏の減少を引き起こした。また、加熱したすり身ゲルの内部構造は氷蔵後も顕著な変化を示さなかった。本研究の結果から、調製後氷蔵3週間以内のすり身ゲルの内部構造を観察直前に露出させた場合、その構造を低倍率で観察するのにVP-SEMは極めて有用であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 岡田稔：かまぼこの科学, 264pp., 成山堂書店, 東京 (1999)
- 2) 岡田稔・右田正男：カマボコの顕微鏡観察, 日本水産学会誌, 22, 265-271 (1956).
- 3) 三宅正人・林孝市郎・田中明子・丹羽栄二：ねり製品に関する研究-X. かまぼこにおける筋原繊維の分散状態に関する電子顕微鏡観察. 日本水産学会誌, 37, 534-539 (1971).
- 4) 佐藤繁雄・土屋隆英・松本重一郎：かまぼこの微細構造の電子顕微鏡による観察, 日本水産学会誌, 50, 1869-1876 (1984).
- 5) 佐藤繁雄・中川則和・土屋隆英・松本重一郎：かまぼこの調製過程の電子顕微鏡による解析, 日本水産学会誌, 53, 649-658 (1987).
- 6) Auh, J. H., Lee, H. G., Kim, J. W., Kim, J. C., Yoon, H. S. and Park K. H.: Highly concentrated branched oligosaccharides as cryoprotectant for surimi. *J. Food Sci.*, 64, 418-422 (1999).
- 7) 上西由翁・御木英昌・儀端徹・西元諄一：ホシザメ筋肉の加熱ゲル化反応に及ぼす温度の影響. 日本水産学会誌, 56: 1285-1292 (1990).
- 8) Montero, P., Marti, de Castro M. A., Solas, M. T. and Gómez-Guillén M. C.: Textural and microstructural changes in frozen stored sardine mince gels. *J. Food Sci.*, 64, 838-842 (1997).
- 9) 山田愛・吉岡慶子：高圧処理および食塩添加が魚肉すり身ゲルの物理的特性と食味評価に及ぼす影響, 中村学園研究紀要, 31, 223-228 (1999).
- 10) 山口敦子・阿部洋一・石下真人・鮫島邦彦：かまぼこの物性と微細構造-重合リン酸塩の効果. ニューフードインダストリー, 42, 25-32 (2000).
- 11) Montejano, J. G., Hamann, D. D. and Lanier, T. C.: Thermally induced gelation of selected comminuted muscle systems - Rheological changes during processing, final strengths and microstructure. *J. Food Sci.*, 49, 1496-1505 (1984).
- 12) 牧之段保夫・中川孝之・安藤正史・松野智：坐りによる減塩かまぼこの足の補強とかまぼこ組織の電子顕微鏡観察. 日本水産学会誌, 62, 654-658 (1996).

- 13) Pérez-Mateos, M. and Montero, P. : High-pressure-induced gel of sardine (*sardina pilchardus*) washed mince as affected by pressure-time-temperature. *J. Food Sci.*, **62**, 1183 – 1188 (1997).
- 14) Gao, J. C., Pigott, G. M. and Reine, B. : Gel forming additive effects on properties of thermally induced minced fish gel. *J. Food Sci.*, **64**, 414 – 417 (1999).
- 15) Alvarez, C., Couso, I. and Tejada, M. : Microstructure of *suwari* and *kamaboko* sardine surimi gels. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 839 – 844 (1999).
- 16) Alvarez, C., Couso, I., Tejada, M. : Thermal gel degradation (*modori*) in sardine surimi gels. *J. Food Sci.*, **64**, 633 – 637 (1999).
- 17) Kubota, S., Tamura, Y., Morioka, K. and Itoh Y. : Variable pressure-scanning electron microscopic observation of Walleye pollack surimi gel. *J. Food Sci.*, **68**, 307 – 311 (2003).
- 18) Kuboki, K., and Wada, M. : Scanning electron microscopy of food items using a variable-pressure SEM. *Hitachi Rev.*, **45**, 31 – 34 (1996).
- 19) 赤羽義章・志水寛 : すり身とその加熱ゲルの保水性に及ぼす pH と食塩濃度の影響. 日本水産学会誌, **55**, 1827 – 1832 (1989).

平成14年(2002)10月3日受理

平成14年(2002)12月25日発行