

イカ類筋肉の物性変化に対する
コラーゲンの影響に関する研究

安藤 真美

目 次

【緒言】	1
【第1章】 ヤリイカ外套膜の冷蔵中における物性変化	
緒言	5
材料および方法	6
結果および考察	7
要約	16
引用文献	16
【第2章】 コラゲナーゼによるヤリイカ外套膜の物性変化	
緒言	20
材料および方法	20
結果	22
考察	31
要約	32
引用文献	33
【第3章】 凍結解凍したモンゴウイカ外套膜の加熱調理に伴う物性変化への コラーゲンの関与	
緒言	35
材料および方法	36
結果	38
考察	45
要約	46
引用文献	47
【第4章】 凍結解凍した数種イカ外套膜の加熱調理による物性変化と コラーゲンの可溶化	

緒言	50
材料および方法	50
結果	51
考察	56
要約	57
引用文献	57

【第5章】 凍結解凍した数種イカ外套膜コラーゲンの加熱調理による構造変化

緒言	59
材料および方法	59
結果	61
考察	69
要約	70
引用文献	70

【第6章】 数種イカ外套膜コラーゲンの架橋と加熱による変性

緒言	73
材料および方法	74
結果および考察	76
要約	85
引用文献	86

【総括】 88

【著者論文】 92

【謝辞】 93

緒 言

日本におけるイカ類の近年の漁獲高は60万トンにもおよぶとともに、輸入量に至っては100万トンを超えており、漁獲高が激減しているサバ類やイワシ類などの多獲魚と比較しても、その資源としての重要性はますます高まってきている。将来的に予測される世界的な食糧危機の到来を考えると、豊富なイカ資源の有効利用をめざすことはきわめて重要である。

イカを食糧として利用する場合、その調理法は刺身、煮物、揚げ物、焼き物と多様であり、逆にいえばあらゆる調理法が可能な食材ということになる。しかし、昔からイカが食材の1つとして取り入れられ、あらゆる調理形態が受け入れられている日本とは異なり、諸外国では生イカ肉の独特な弾力性が嫌われる傾向にある。一方、加熱されたイカ肉については世界的に広く調理に取り入れられており、今後も需要が期待できる。よってこれからも調理法あるいは加工法の改良を重ねてゆくことで、加熱イカ肉の利用をさらに推進するとともに、生イカも諸外国に抵抗なく受け入れられるような物性に改変することで、さらに世界的にイカが食糧資源として受け入れられることをめざしてゆくことがきわめて重要である。

食材として実際に食する場合、調理したものの色・味など様々な要因が品質を決定し、ひいてはその消費量に大きく影響する。イカ肉の特徴として、まず白い色があげられる。個性的な色をもたないために様々な料理に適合し、広く受け入れられる食材となったと考えられる。また独特の歯ごたえもイカ肉の大きな特徴としてあげられる。イカ肉が調理に利用される際、様々な調味をされたうえで、その歯ごたえが特にイカの特徴として好まれると考えられる。

食品の物性は、あらゆる調理および加工方法により様々に変化する。イカ類を材料とした研究例の場合、冷蔵・冷凍・塩蔵・乾燥・加熱などにおいて、その工程においてどのような物性変化が起こるのかが調べられている。イカ肉を冷凍保存した場合、Stanley and Hultin (1982) は生のイカと凍結解凍したイカについて加熱後の硬さを比較し、ケンサキイカにおいては凍結解凍した肉のほうが硬いが、スルメイカでは凍結期間が1日を超えると逆に凍結解凍した筋肉のほうが軟らかくなることを報告している。ケンサキイカにおいて凍結操作により加熱後の筋肉が硬くなった点について彼らは、ホルムアルデヒドの生成によりタンパク質に架橋ができたためであろうとしている。また、Ueng and Chow (1998) は凍結解凍後に生のままで3種類のイカについてその物性を測定し、いずれも凍結期間が長いほど硬くなることを示し、その原因として組織学的観察により筋繊維の凝集を挙げている。Kugino *et al.* (1993) は乾燥前に水あるいはアルカリ溶液に

漬けたのち、乾燥させたイカ外套膜の物性を測定し、浸漬処理の延長にともない強度が低下することを示した。そしてこの場合の物性変化には細胞内への水の浸入が大きく関与していることが電子顕微鏡観察によって明らかにされている。

また加熱肉の場合、その調理法が広く受け入れられていることもあり、最も研究例が多い。加熱前後の物性を比較すると、加熱により物性が軟らかくなるとする報告が大半をしめる (Otwell and Hamann 1979, Stanley and Hultin 1982, K olodziejska *et al.* 1987, Kugino *et al.* 1994, 久木野 1994, Kugino *et al.* 1995, 内藤等 1995)。これらの研究例によれば、加熱による軟化現象は主に筋細胞の熱変性が原因と考えられているようである。

ところで、筋肉の中には、その大部分を占める筋細胞の他に、細胞間を結合する結合組織が存在し、筋肉としての物性を支えている。結合組織はその分布状態の特徴から、筋上膜、筋周膜、筋内膜などに分類されている。これらの名称は組織学的観点から名付けられたものであるが、その成分の大部分はコラーゲンが占めている。コラーゲンは非常に難溶性のタンパク質であるとともに、物理的強度が大きく、強い強度が要求される腱や皮膚などをはじめとして体のあらゆる部分に存在する。コラーゲンは動物体中にもっとも多く含まれるたんぱく質であり、生体の全タンパク質の20%から30%を占めている。特に皮膚、骨、軟骨、腱などの主要な構成成分になっており、全コラーゲン量の40%は皮膚に、20%が骨や軟骨に含まれ、その他血管や内臓など全身に広く分布している。

コラーゲンは筋肉の物性にも大きく関与しており、コラーゲン量が多い筋肉ほどその物性が硬くなるとされている。魚介類においてその相関性が明らかにされているのはサザエ、アワビ、および魚類一般である (Ochiai *et al.* 1985, Sat o *et al.* 1986, 畑江等 1986, Olaechea *et al.* 1993)。ところで、コラーゲン量が筋肉の物性と相関性をもつのは生の状態においてであり、これらを加工、特に加熱した場合には大きく状況が異なってくる (畑江等 1986)。コラーゲン分子はらせん構造を有しているとともに、それらが架橋により結合してコラーゲン繊維を形成している。生体内のコラーゲン繊維の場合、強く加熱されると繊維を構成する分子内のらせん構造がほどけて変性し、その一部はゼラチンとなって可溶化する。それにともない、筋細胞間の結合力が失われ、結果的に加熱によって筋肉の物性は軟化する。無脊椎動物のサザエとアワビの筋肉に関する報告では、加熱により徐々に軟化するとともに、コラーゲン繊維の構造が膨化するといった変化が認められている (Ochiai *et al.* 1985, Olaechea *et al.* 1993)。

ところが、これらの研究例にもかかわらず、一般的にはイカは加熱すると逆に硬くなるというイメージがあり、調理書にもそのような記述が見受けられる (野崎と成瀬 1992)。このように一般調理のイメージとは異なる実験結果が報告さ

れているのは、言い換えればそれだけ加熱による物性変化の機構が複雑かつ微妙な現象であるということができ、さらに解明すべき点が多く含まれていると考えられる。特にイカ肉に関してはコラーゲンに関して論じた研究例は少なく、この点における詳細な検討が必要であると考えられる。また、顕微鏡を用いた組織学的手法は組織構造の変化を調べるためには非常に有効な手段ではあるが、コラーゲンを調べるという観点からこの手法を用いた研究例は少なく、特にイカ筋肉についてはほとんど見あたらないというのが現状である。

そこで本研究では、イカ肉の物性変化の機構をコラーゲンに注目しながら組織学的手法を中心としてさらに詳細に解明することを目的とした。本研究によりイカ肉の物性変化の新たな機構が明らかになれば、それは新たな視点からのイカの貯蔵法、加工法あるいは調理法開発のヒントとなり、ひいては新たなイカに対する需要を生み出し、豊富なイカ資源の有効利用へとつながっていくものと思われる。また、近年化粧品や医療品としての応用がさかんなコラーゲンについて新たな製品の開発へとつながることが期待される。

引用文献

畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎 (1986) 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与, 日本水産学会誌, **52**, 2001~2007

Kolodziejska, I., Shikorski, Z. E., and Sadowska, M. (1987) Texture of Cooked Mantle of Squid *Illex argentinus* as Influenced by Specimen Characteristics and Treatments, *J. Food Sci.*, **52**, 932~935

Kugino, M., and Kugino, K. (1994) Microstructural and Rheological Properties of Cooked Squid Mantle, *J. Food Sci.*, **59**, 792~796

久木野睦子 (1994) イカ外套膜の破断特性にみられる異方向性とこの現象に及ぼす加熱温度の影響, 活水論文集, **37**, 21~28

Kugino, M., and Kugino, K. (1995) Changes in the Microstructure and Rheological Properties of Squid Mantle due to Cooking in a NaCl Solution and Soy Sauce, *J. Home Econ. Jpn.*, **46**, 751~757

Kugino, M., Kugino, K., and Wu, Z. (1993) Rheological Properties of Dried Squi

d Mantle Change on Softening, *J. Food Sci.*, **58**, 321~324

内藤文子, 高橋節子, 佐藤之紀, 野口 駿, 内藤 博, 田中直義 (1996) 真空調理法がスルメイカの物性および食味特性におよぼす影響, *家政誌*, **47**, 153~159

野崎洋光, 成瀬宇平 (1992) 『魚調理の「こつ」』柴田書店, 東京, 43~49

Ochiai, Y., Kariya, Y., Watabe, S., and Hashimoto, K. (1985) Heatinduced Tendering of Turban Shell (*Batillus cornutus*) Muscle, *J. Food Sci.*, **50**, 981~984

Olaechea, R. P., Ushio, H., Watabe, S., Takada, K., and Hatae, K. (1993) Toughness and Collagen Content of Abalone Muscles, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 6~11

Otwell, W. S., and Hamann, D. D. (1979) Textural Characterization of Squid (*Loligo pealei* L.) :Instrumental and Panel Evaluations, *J. Food Sci.*, **44**, 1636~1643

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., and Shimizu, Y. (1986) Collagen Content in the Muscle of Fishes in Association with Their Swimming Movement and Meat Texture, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 1595~1600

Stanley, D. W., and Hultin, H. O. (1982) Quality Factors in Cooked North Atlantic Squid, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **15**, 277~282

Ueng, Y. and Chow, C. (1998) Textural and Histological Changes of Different Squid Mantle Muscle during Frozen Storage, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4728~4733

3

ヤリイカ外套膜の冷蔵中における物性変化

1. 緒言

日本においてはイカを生で食する習慣があるため、イカの鮮度に対する関心は高い。Kuginoら (1997) はアオリイカ外套膜の剪断力を測定し、5℃貯蔵において死後急速に軟化が進行することを報告している。ここで、筋組織の構造にどのような変化が冷蔵中に生じるのかが問題となる。イカの外套膜は、4層の組織からなる表皮に覆われている。外側の2層は容易に剥がすことができるが、内側の2層を剥がすことは容易ではなく、特に最も内側の組織は筋肉と強く結合しているといわれている。また、表皮の内側には筋肉が存在するが、それは平行に並んだ筋細胞によって構成される層が交互に直交しながら重なることで形成されている (田中 1958)。このような構造をもつイカ筋肉において、冷蔵中の軟化現象にともない、細胞間が拡大することが電子顕微鏡観察により認められている (Kugino *et al.* 1997)。また同時に、分子量54kの成分が減少して21kおよび19kの成分が増加しており、この変化が細胞間の結合の変化と関係があるとされている。細胞間には一般にコラーゲンが存在し、細胞間を結合している。コラーゲンは生の筋肉においてその物性に大きな影響を与えている。魚類筋肉の場合、死後1日以内というきわめて初期に筋肉が軟らかくなる軟化現象が生ずるが、これは筋細胞間に存在する筋内膜部分のコラーゲン繊維が崩壊することが原因とされている (Ando *et al.* 1992; Sato *et al.* 1997)。

また畑江 (1997) はスルメイカ、ヤリイカ、アオリイカの表皮の剪断力を測定し、スルメイカとヤリイカについては即殺後から冷蔵2日目まで剪断力が低下するのに対し、アオリイカではそのような剪断力の低下は認められなかったことを報告している。この際にはコラーゲンの溶解性が増大することも報告されており、冷蔵中にコラーゲンに何らかの変化が生じていることを示している。これらの研究例はいずれも短期間の冷蔵中にその物性が低下することを示しており、様々な物理学およびその原因となる生化学的变化がイカのコラーゲンに生じている可能性を示している。また、生のイカ肉の物性が大きく変化する以上、加熱したイカ筋肉の物性にも影響を及ぼすとも考えられる。しかしながら、生きたイカの入手が困難なこともあり、イカの死直後からの時間経過に伴う変化が加熱肉へ及ぼす影響については詳細な報告例は少ない。

そこで本章では、生きたヤリイカの外套膜について、死後の時間経過に伴う

構造変化を観察するとともに、加熱肉の構造についても比較し、鮮度が生肉および加熱肉に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2. 材料および方法

(1) 材料

生きたヤリイカ (*Loligo bleekeri*) の外套膜を用いた。即殺直後に薄皮を剥き、5℃で貯蔵した。肉の厚みは約5mmであった。

(2) 剪断力の測定

死後0, 3, 6, 9, 12, 24時間経過した試料をカミソリの刃で、10×40×5mmに切り、レオメーター（（株）不動工業、RT-1002A）により剪断力を測定した。アダプターにはカッターの替え刃を装着し、ステージのスピードは1mm/秒に設定した。剪断はFig. 1に示すように輪走筋を横断する方向で、外套膜の表側より行った。また、それぞれの貯蔵時間において、沸騰した蒸留水約100mlの入ったビーカーに同じサイズの試料を入れ、30分間加熱した後、剪断力を測定した。

測定値の有意差についてはt-検定により評価した。

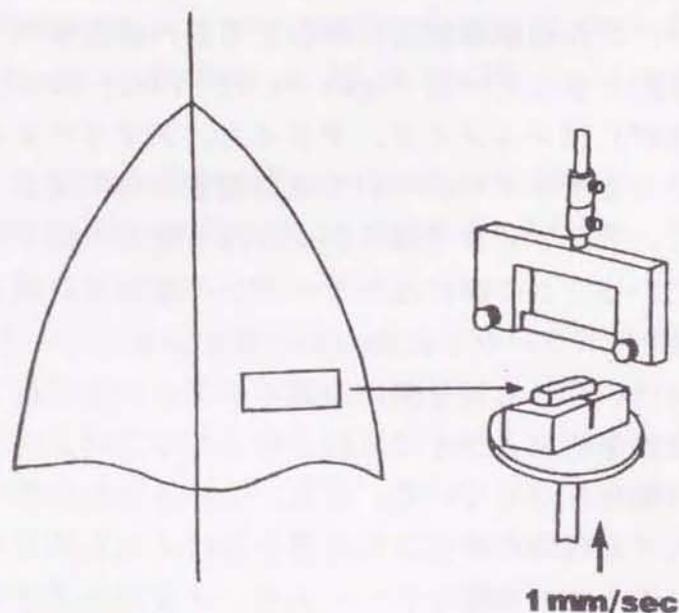


Fig. 1: Sample orientation and equipment for measuring the shear force.

(3) 組織学的観察

剪断力を測定した試料より、表皮を含む部分をカミソリの刃で3×3×3mmの大きさに切り出し、5%グルタルアルデヒド(0.1Mリン酸緩衝液, pH 7.4)に1日以上浸漬して固定し、組織観察用試料とした。次に固定したサンプルから、カミソリの刃で1×1×3mmの小片を切り出し、50-100%エタノールによる脱水を行った後、プロピレンオキサイドで置換して、エポキシ樹脂(Epok812, (株)応研商事)に包埋し、65℃で12時間重合させた。固化した樹脂ブロックからウルトラミクロトーム(デュポン, MT-6000)を用いて厚さ1μmの切片を作成し、トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡(オリンパス(株), BX50)により観察した。また同じ試料ブロックより厚さ0.1μmの超薄切片を作製し、酢酸ウラン、クエン酸鉛各溶液による二重染色後、透過型電子顕微鏡((株)日立製作所, H-800)により加速電圧100kVで観察した。

(4) 細胞間隙面積の測定

冷蔵時間ごとの電子顕微鏡写真について、筋細胞間隙の面積をデジタイザー(ニコン)によって測定し、断面積全体に対する割合(%)を計算した。また、その数値の有意差をt-検定によって評価した。

3. 結果および考察

(1) 剪断力の変化

生肉および加熱肉の剪断力の測定結果をFig. 2に示す。生肉の場合、即殺後3時間ほどから徐々に剪断力が低下し、9時間でほぼ一定となった。一方、加熱肉の場合は、すべての時間にわたって生肉に比べて剪断力が低かった。この結果はイカ肉は加熱により軟化するというこれまでの報告の結果と一致した(Otwell and Hamann 1979; Stanley and Hultin 1982; Kolodziejaska *et al.* 1987; Kugino *et al.* 1994; 久木野 1994; Kugino *et al.* 1995; 内藤等 1995)。また、貯蔵時間の違いにおいて比較した場合、加熱肉は生肉の場合と異なり、貯蔵時間の経過にかかわらず剪断力に有意差はなかった。

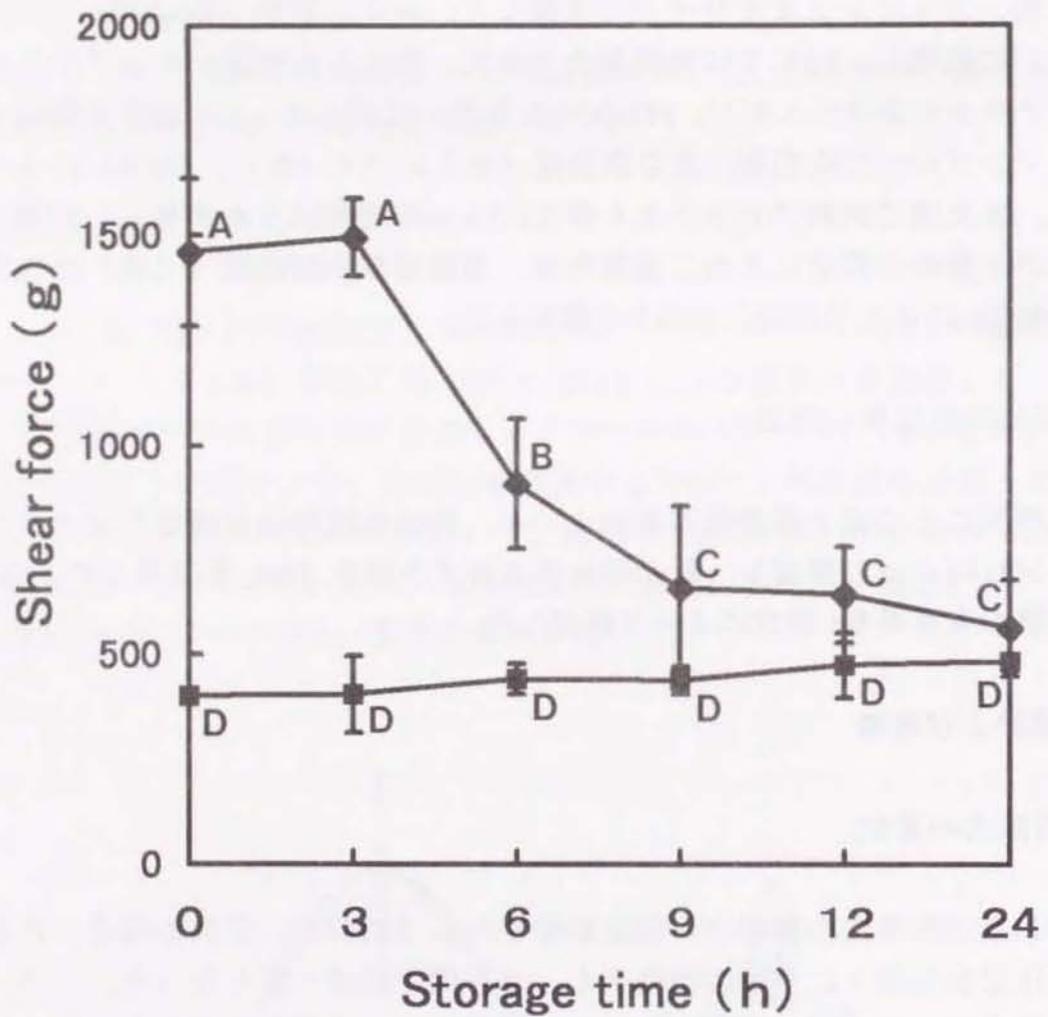


Fig. 2: Changes in shear force of raw and cooked mantle muscles during refrigeration. ◆, raw muscles; ■, cooked muscles. ^{A B C D} Different letters with each set of data indicate significant difference ($p < 0.05$).

(2) 光学顕微鏡観察

生肉をLMで観察した結果をFig. 3に示した。写真の大部分は直径約5ミクロンの筋細胞の横断面であり、その中に走方向が直交している筋細胞の薄い層が認められる (Fig. 3, 矢印)。即殺直後では無傷の細胞間物質により細胞同士が密着している (Fig. 3A)。しかしながら死後9および24時間において細胞間が分離し、その間に多数の隙間が生じてくる様子が認められた (Fig. 3B, C, 矢頭)。この冷蔵中の細胞間の分離によって細胞間の結合力が低下し、その結果イカ筋肉が軟化すると考えられた。

一方、加熱肉においてはいずれの試料においても構造的な差異は認められず、いずれも生肉の初期のように細胞間が密着したままであった (Fig. 4)。つまり、生肉の剪断力が冷蔵時間の経過とともに低下したのは細胞間の結合力が低下したためであり、また、加熱肉の剪断力に違いがないのは加熱後の筋肉の構造に貯蔵時間の違いによる差異がないためであると考えられた。

(3) 透過型電子顕微鏡観察

未加熱筋肉のTEMによる観察結果をFig. 5に示した。筋細胞の断面には特徴的な縞模様が認められ、これらは冷蔵時間の経過につれてより明確になった。この縞模様は、さらに高倍率にて観察したところ、細胞内の収縮フィラメントの粗密を表していることがわかった (data not shown)。各細胞内にあるミトコンドリアは冷蔵中に大きくなる傾向があった (Fig. 5B, C, 矢頭)。また9時間および24時間経過した筋肉には黒い斑点状の粒子が認められた (Fig. 5B, C, 矢印) が、それらは即殺直後の筋肉にはほとんど観察されなかった (Fig. 5A)。よってこの粒子は、その正体はいまだ明らかではないが、筋肉の死後変化による何らかの反応産物であると推測された。筋細胞は即殺直後においては未同定の物質 (Co) によって密着しており、これはMoon and Hulbart (1975) の報告した構造にほぼ一致していた。9および24時間冷蔵後には、結合組織の中に隙間が生じ始めた (Fig. 5B)。これによって細胞間の結合力が低下し、剪断力の低下につながったと思われる。この隙間の占める面積の全体に対する割合を比較したところ、即殺直後と死後9時間の間で有意な差が認められた (Fig. 6)。

生の筋肉においては、冷蔵中における結合組織や筋原繊維の構造変化が生じることが哺乳類や魚類において報告されている (Love *et al.* 1969; Bremner and Hallet 1985, 1986; Hallet and Bremner 1988; Ando *et al.* 1991, 1992,

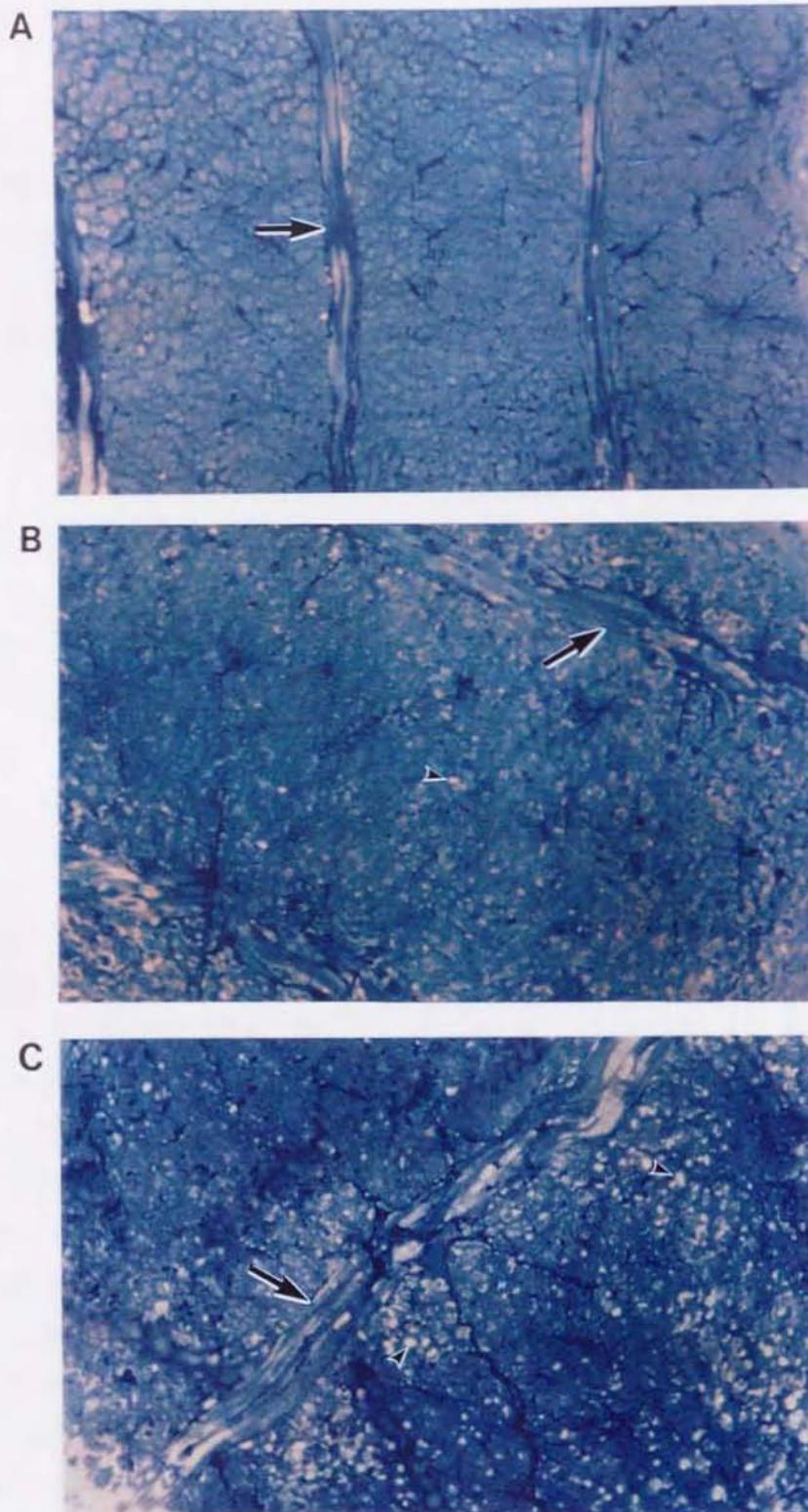


Fig. 3: Light microscopic photographs of raw muscles stored at 5°C. A, just after killing; B, 9 h refrigeration; C, 24 h refrigeration. Arrows, muscle fibers' layer which runs vertically to others. Arrowheads, voids which occurred during chilled storage. Bar represents 50 μ m.

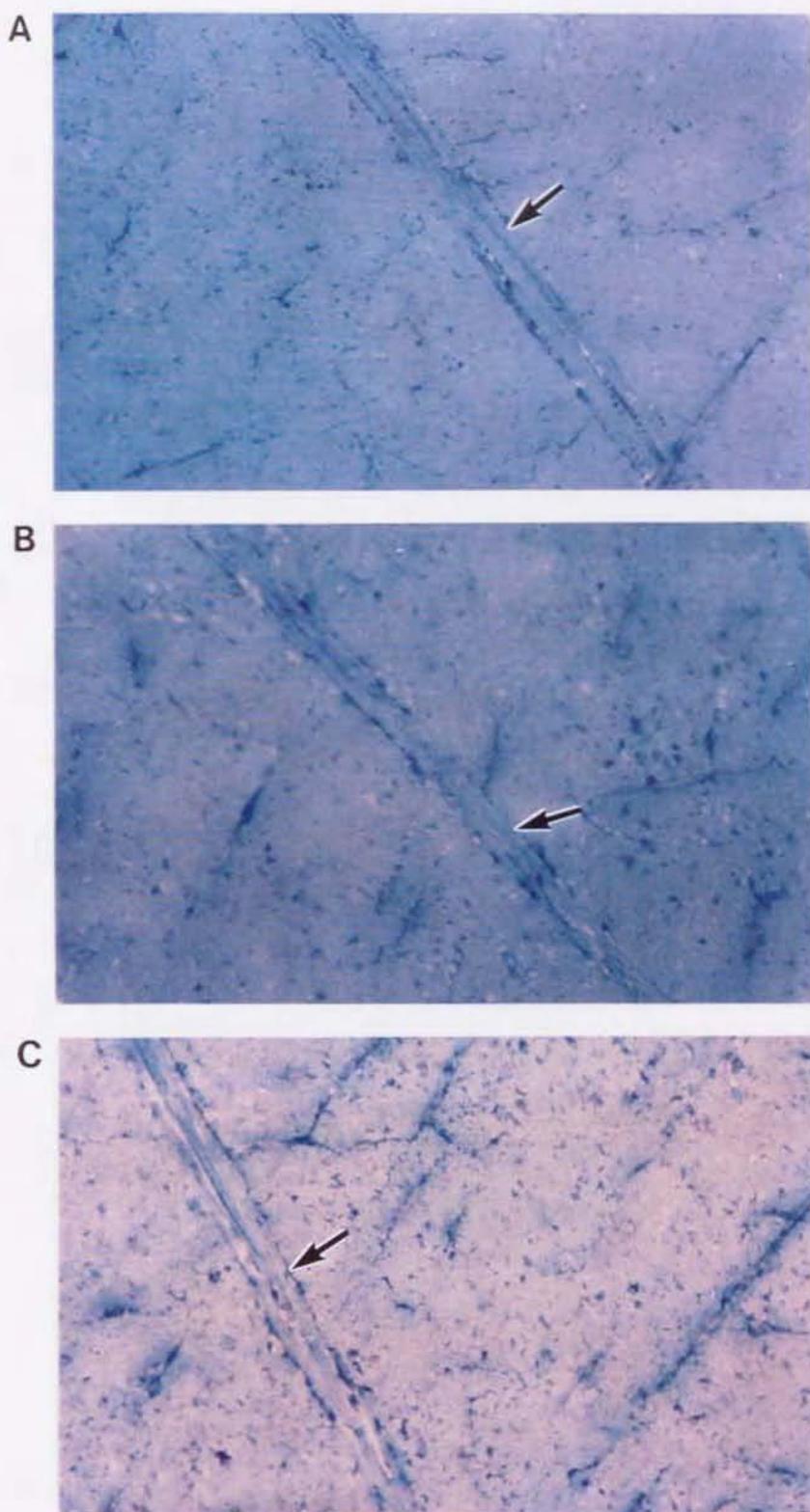


Fig. 4: Light microscopic photographs of cooked muscles. A, just after killing; B, 9 h refrigeration; C, 24 h refrigeration. Arrows, muscle fibers' layer which runs vertically to others. Bar represents 50 μ m.

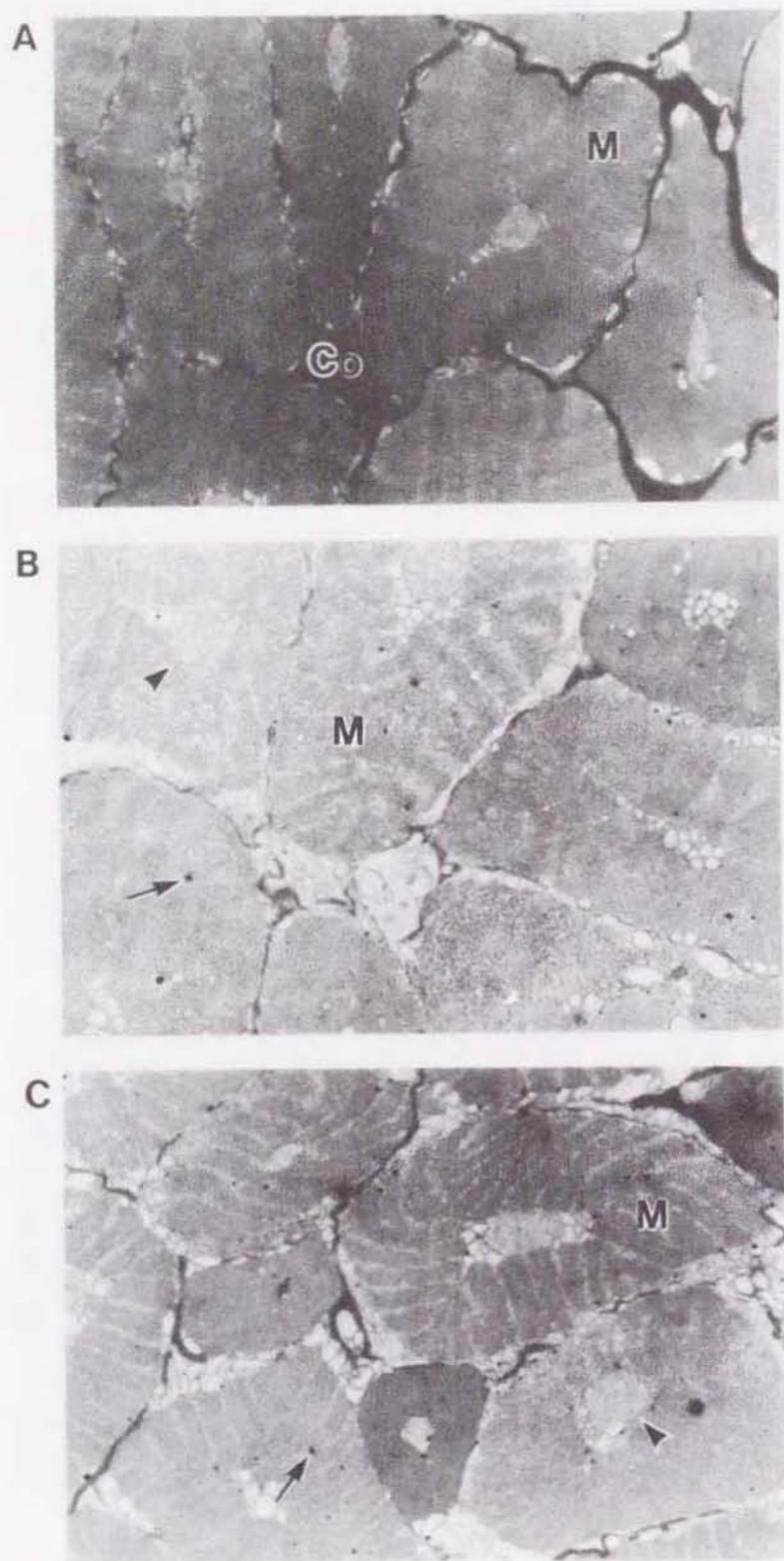


Fig. 5: Transmission electron microscopic photographs of raw muscles. A, just after killing; B, 9h refrigeration; C, 24h refrigeration. M, muscle cell; Co, connective tissue-like structure. Arrows, unknown tiny particles; arrowheads, mitochondria. Bar represents $1\mu\text{m}$.

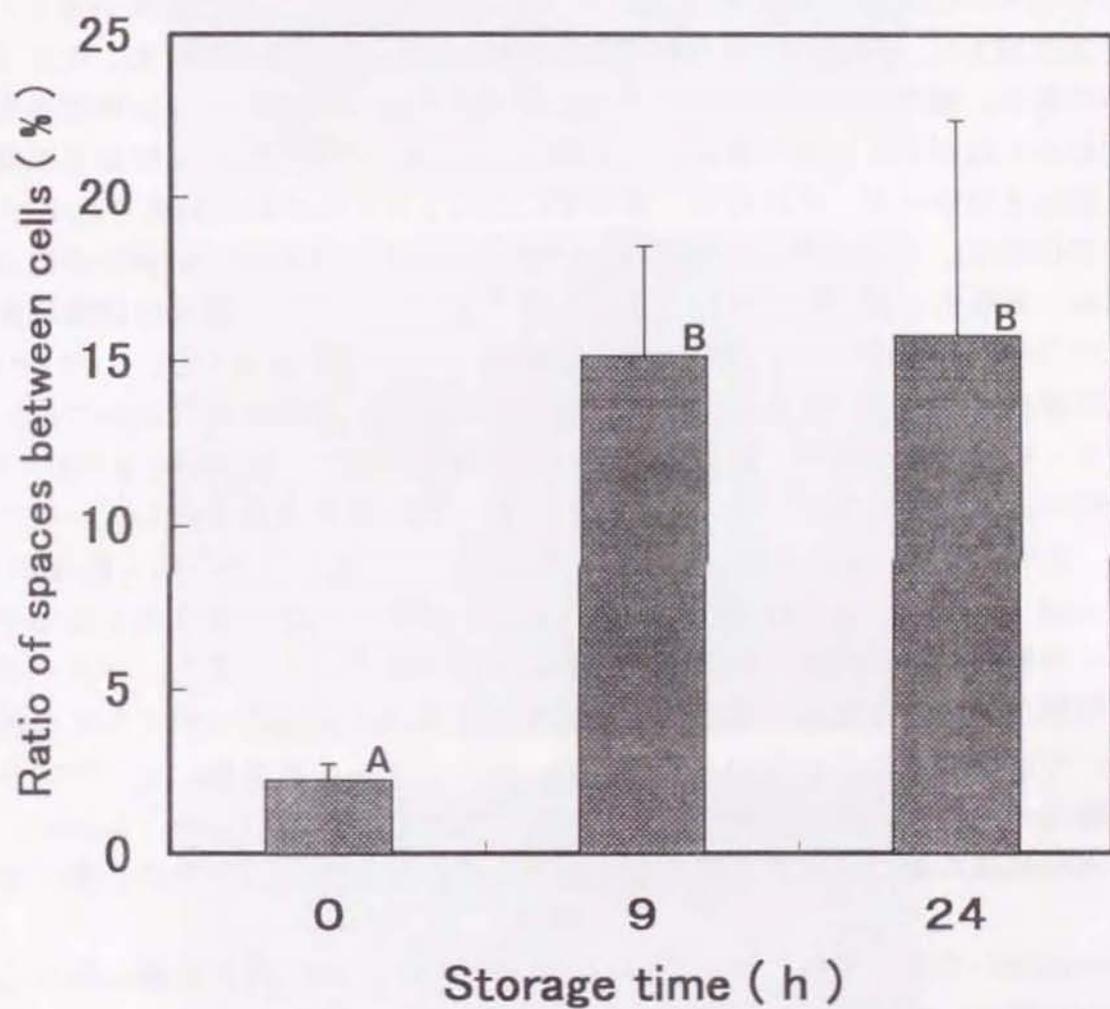


Fig. 6: Estimation of the degree of cell detachment during storage of raw squid muscle. The area of intercellular spaces and whole muscle was measured on electron microphotographs and ratio between them was calculated (means+S.D.). ^{A,B}Different letters with each set of data indicate significant difference ($p < 0.01$).

1993, 1995; Tachibana *et al.* 1993; Nishimura *et al.* 1994; Liu *et al.* 1994; Sato *et al.* 1997)。コラーゲン繊維の崩壊は特に冷蔵1日以内の魚肉の軟化現象の原因とされている(Ando *et al.* 1992, 1995; Sato *et al.* 1997)。今回観察されたイカ筋肉の細胞間の分離は、魚類筋肉と同様の軟化機構がイカ筋肉にも存在することを示している。

軟化したイカ肉における細胞の分離の機構としては次の3つの仮説が考えられる。まず第1に、細胞の収縮が細胞間に間隙を生みだし筋肉が軟化したとするものである。哺乳類と魚類においては、筋肉は死後に収縮し、死後硬直が起こる。しかしながら、今回の実験中の観察によれば、イカ筋肉は筋収縮も死後硬直も起こさなかった。それゆえ、本研究においてはこの仮説は除外される。

第2の仮説は、コラーゲン繊維がほどけたことにより細胞間の結合力が低下した結果、細胞の分離が起こったとするものであり、さらに3番目の仮説は細胞膜とコラーゲンの間の結合力の低下によるものとするものである。この2つの仮説は筋肉コラーゲンの変化に関連するものである。魚類筋肉においては、コラーゲンの分解は冷蔵1日後に生じることが報告されている(Sato *et al.* 1991, 1997)。イカ外套膜には高いカテプシンB, D, L活性が存在していることから、コラーゲンの分解は何らかの酵素作用によって生じるのかもしれない(Sakai and Matsumoto 1981; Makinodan *et al.* 1993)。しかし現在のところ冷蔵中のイカ筋肉のコラーゲンの分解を報告した研究例はない。また、コラーゲンと細胞膜を結合するために重要な基底膜やインテグリンはについてもイカ筋肉については研究されていない。そのため、コラーゲンや基底膜、インテグリンの影響はイカ筋肉の軟化現象においてはいまだ解明されていない。よって、イカ筋肉の死後の軟化現象の機構を解明するためにはさらなる研究が必要である。

加熱肉においては、生肉において認められた筋細胞および結合組織における構造的な特徴がいずれも消失しており、生肉を加熱した場合(Fig. 5)に比べ細胞の区別が不明瞭になっていた(Fig. 7, 矢頭)。生肉において認められた細胞間の間隙もまた観察されなかった。また加熱肉においては冷蔵時間の違いによる構造の違いは認められず、このことが硬さに違いが認められなかった原因と考えられる。加熱肉の硬さが弱く、しかも冷蔵時間に関係なく一定であることは、硬さの違いが認められなくなるほど加熱によって細胞間の結合力が低下するためと考えられた。

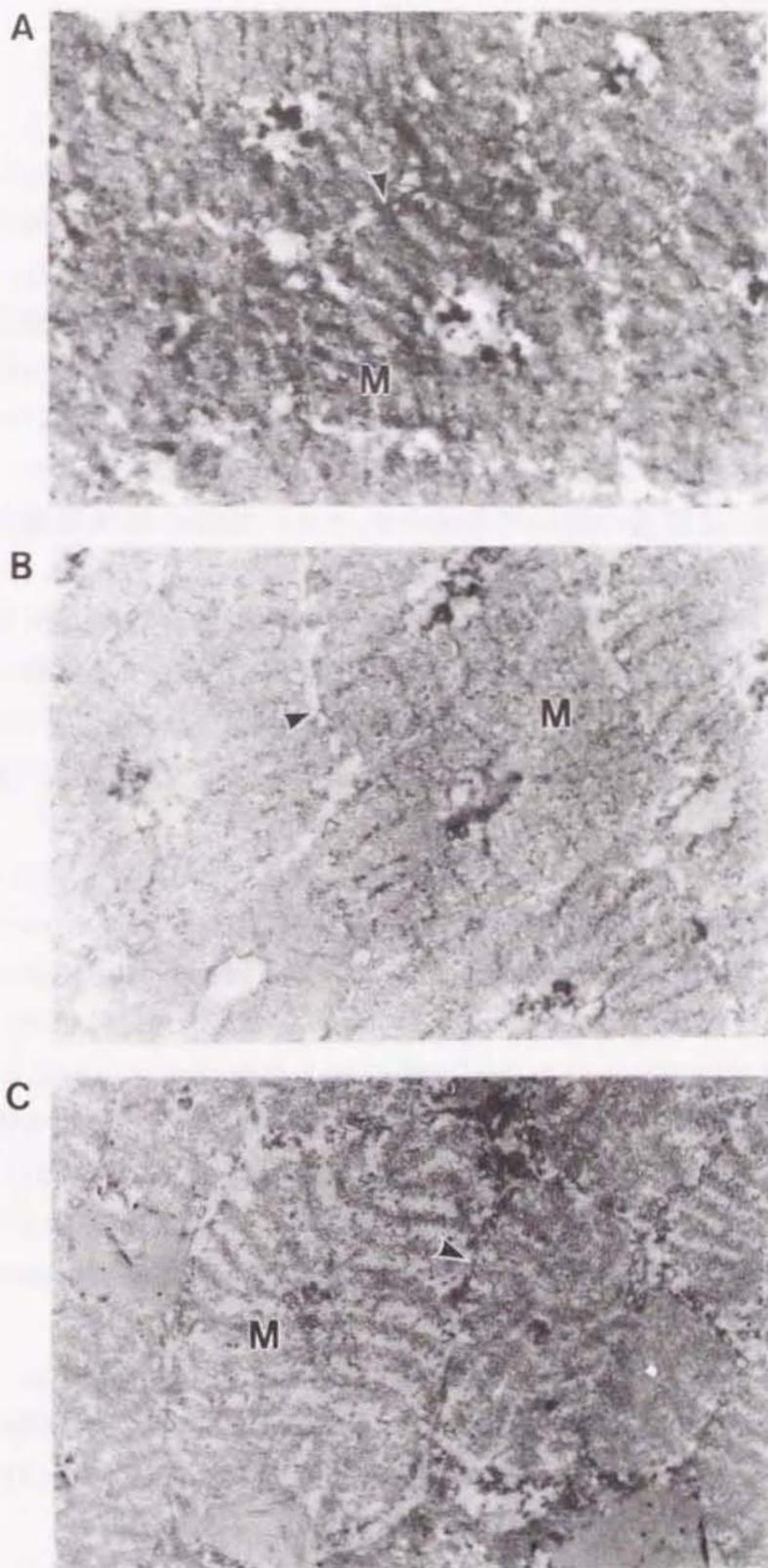


Fig. 7: Transmission electron microscopic photographs of cooked muscles. A, just after killing; B, 9 h refrigeration; C, 24 h refrigeration. M, muscle cell. Arrowheads, the border of the muscle cells. Bar represents 1 μ m.

5. 要約

ヤリイカ外套膜の構造における冷蔵中（5℃）の変化を組織学的に検討した。生きたヤリイカを即殺後、外套膜の剪断力を測定したところ、死後3から9時間間に急激に数値が低下した。また、光学顕微鏡による観察では、軟化した筋肉の筋細胞間に多数の隙間が認められた。透過型電子顕微鏡観察からは、細胞間が結合組織から分離した結果生じた空間が認められた。また、冷蔵後の筋肉を加熱した場合では、剪断力は一定であり、また生の筋肉において認められた細胞間の隙間は認められなかった。透過型電子顕微鏡観察により、生の筋肉との加熱後の筋肉とで構造の違いは認められたが、死後の時間経過の違いによる加熱肉の構造の違いは認められなかった。

以上の結果より、死後の時間経過とともに筋細胞が結合組織から分離するために剪断力が低下するが、この物性の変化は加熱肉の物性には影響しないことが明らかとなった。

6. 引用文献

Ando, M., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (1992) Post-mortem Tenderization of Rainbow Trout Muscle Caused by the Disintegration of Collagen Fibers in the Pericellular Connective Tissue, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 58, 567~570

Ando, M., Toyohara, H., Shimizu, Y., and Sakaguchi, M. (1991) Post-mortem Tenderization of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Muscle Caused by Gradual Disintegration of the Extracellular Matrix Structure, *J. Sci. Food Agric.*, 55, 589~597

Ando, M., Toyohara, H., Shimizu, Y., and Sakaguchi, M. (1993) Post-mortem Tenderization of Fish Muscle due to Weakening of Pericellular Connective Tissue, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 59, 1073~1076

Ando, M., Yoshimoto, Y., Inabu, K., Nakagawa, T., and Makinodan, Y. (1995) Post-mortem Change of Three-dimensional Structure of Collagen Fibrillar Network in Fish Muscle Pericellular Connective Tissue Corresponding to Post-mortem Tenderization, *Fisheries Sci.*, 61, 327~330

Bremner, A. H. and Hallet, C. I. (1985) Muscle Fiber Connective Tissue Junctions in the Fish Blue Grenadier (*Macruronus novaezelandae*). A Scanning Electron Microscope Study, *J. Food Sci.*, 50, 975~980

Bremner, A. H. and Hallet, C. I. (1986) Muscle Fiber Connective Tissue Junctions in the Spotted Trevalla (*Seriola punctata*), *J. Sci. Food Agric.*, 37, 1011~1018

Hallet, C. I. and Bremner, A. H. (1988) Fine Structure of the Myocommata Muscle Fiber Junction in Hoki (*Macruronus novaezelandiae*), *J. Sci. Food Agric.*, 44, 245~261

畑江敬子 (1997) 『調理と細胞外マトリックス』, 魚介類の細胞外マトリックス, 恒星社厚生閣, 東京, 91~101

Kolodziejska, I., Shikorski, Z. E., and Sadowska, M. (1987) Texture of Cooked Mantle of Squid *Illex argentinus* as Influenced by Specimen Characteristics and Treatments, *J. Food Sci.*, 52, 932~935

久木野睦子 (1994) イカ外套膜の破断特性にみられる異方向性とこの現象に及ぼす加熱温度の影響, 活水論文集, 37, 21~28

Kugino, M., and Kugino, K. (1994) Microstructural and Rheological Properties of Cooked Squid Mantle, *J. Food Sci.*, 59, 792~796

Kugino, M., and Kugino, K. (1995) Changes in the Microstructure and Rheological Properties of Squid Mantle due to Cooking in a NaCl Solution and Soy Sauce, *J. Home Econ. Jpn.*, 46, 751~757

Kugino, M., Kugino, K., and Ogawa, T. (1997) Changes in Microstructure and Rheological Properties of Squid Mantle during Storage, *Food Sci. Technol. Int., Tokyo*, 3, 157~162

Liu, A., Nishimura, T., and Takahashi, K. (1994) Structural Weakening

of Intramuscular Connective Tissue during Post Mortem Ageing of Chicken Semitendinosus Muscle, *Meat Sci.*, 39, 135~142

Love, R. M., Lavety, J., and Steel, P. J. (1969) The Connective Tissues of Fish-II. Gaping in Commercial Species of Frozen Fish in Relation to Rigor Mortis, *J. Food Technol.*, 4, 39~44

Makinodan, Y., Nakagawa, T., and Hujita, M. (1993) Effect of Cathepsins on Textural Change during Ripening of Ika-shiokara (Salted Squid Preserves), *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 59, 1625~1629

Moon, T. W., and Hulbart, W. C. (1975) The Ultrastructure of the Mantle Musculature of The Squid *Symplectoteuthis oualaniensis*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B, 145~149

内藤文子, 高橋節子, 佐藤之紀, 野口 駿, 内藤 博, 田中直義 (1996) 真空調理法がスルメイカの物性および食味特性におよぼす影響, *家政誌*, 47, 153~159

Nishimura, T., Hattori, A., and Takahashi, K. (1994) Structural Weakening of Intramuscular Connective Tissue during Conditioning of Beef, *Meat Sci.*, 39, 127~133

Otwell, W. S., and Hamann, D. D. (1979) Textural Characterization of Squid (*Loligo pealei* L.) : Instrumental and Panel Evaluations, *J. Food Sci.*, 44, 1636~1643

Sakai, J. and Matsumoto, J. J. (1981) Proteolytic Enzymes of Squid Mantle Muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 389~395

Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Nakagawa, T., Makinodan, Y., Ohtsuki, K., and Kawabata, M. (1997) Involvement of Type V Collagen in Softening of Fish Muscle during Short-term Chilled Storage, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 343~348

Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K., and Kawabata, M. Type V Collagen in trout (*Salmo gairdneri*) Muscle and Its Solubility Change during Chilled Storage of Muscle, (1991) *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1222~1225

Stanley, D. W., and Hultin, H. O. (1982) Quality Factors in Cooked North Atlantic Squid, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **15**, 277~282

Tachibana, K., Misima, T., and Tsuchimoto, M. (1993) Changes of Ultrastructure of Cytochemical Mg^{2+} -ATPase Activity in Ordinary Muscle of Cultured and Wild Red Sea Bream during Storage in Ice, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **59**, 721~727

田中武夫 (1958) イカ肉の利用・加工に関する組織学的及び組織化学的研究-I. イカ肉の組織学的特性, 東海区水研報, **72**, 77~121

第2章

コラゲナーゼによるヤリイカ外套膜の物性変化

1. 緒言

イカは漁獲直後は半透明であるが、死後速やかに透明感は失われ全体に白くなる。この例に代表されるようにイカの死後変化は非常に早く、なかでも物性の変化が著しいことが経験的に知られている。本研究では第1章において、死後の時間経過とともに筋細胞が分離するために数時間で筋肉が軟らかくなってしまうことを示した。筋細胞間にはコラーゲンが存在し細胞間を結合していることが予想されるため、冷蔵中にコラーゲンが何らかの要因で分解し、その結果細胞間の結合力が低下したとも考えられる。しかしながら、それらの冷蔵時間内にはコラーゲンに相当するタンパク質の分解は生じていないことから (Kugino *et al.* 1997)、この変化はタンパク質以外の要因によるものか、あるいはきわめて微量なタンパク質成分の変化による可能性が考えられる。魚類筋肉の場合、冷蔵中の筋肉の軟化現象にはコラーゲンのなかでもわずかに2~3%しか存在しないV型コラーゲンの分解が原因であるとされている (Sato *et al.* 1991, 1997)。よって、イカ筋肉の軟化現象にも、微量な成分が関与している可能性があるが、それについての報告例は現在のところ見あたらない。

コラーゲンを分解する代表的なプロテイナーゼはコラゲナーゼであるが、イカ筋肉に存在するコラゲナーゼに関する報告例はない。またイカ筋肉のコラーゲンそのものの分解も報告されていないことから、実際にイカコラーゲンが冷蔵中に分解しているのかは現在のところ不明である。ところで、大部分がコラーゲンから形成されているイカの表皮については冷蔵中にその物性が脆弱化することが報告されており (畑江 1997)、コラーゲンになんらかの変化が生じていることを示している。よって、イカの体内でコラーゲンを分解する機構が存在している可能性は十分にある。

そこで本章では、活ヤリイカの外套膜について、人工的にコラゲナーゼを作用させることにより、その物性と構造の変化を検討し、ヤリイカ筋肉の物性変化へのコラーゲンの関与について検討することを目的とした。

2. 材料および方法

(1) 材料

活ヤリイカ (*Loligo bleekert*) の外套膜を用いた。即殺直後に表皮を剥き、実験に用いた。肉の厚みは約5mmであった。

(2) コラーゲンの分画

即殺したヤリイカの外套膜から表皮を剥いだのち、Satoらの方法(1988)によりコラーゲンを抽出した。筋肉をミンチにした後、0.1 M NaOH 中で一晩攪拌し、筋原繊維タンパク質を溶解させた。溶解液を遠心分離(10000g × 30min)して沈殿を回収した。同じ操作を3回繰り返すことにより、筋原繊維タンパク質を除去した。次に沈殿から NaOH を取り除くため、蒸留水でホモジナイズ・遠心分離を行い、遠心上清のpHが8.8付近になるまで繰り返し、得られた沈殿をコラーゲンとした。なお、すべての操作は5°Cで行った。

沈殿2gに対して100mlの蒸留水を加えてホモジナイズし、懸濁液中のコラーゲンの濃度を常圧乾燥法を用いて測定したところ、8mg/mlであった。

(3) コラゲナーゼによる分解

細菌コラゲナーゼ(細胞分散用, 和光純薬工業(株))を反応用緩衝液(0.2M NaCl , 0.1M CaCl_2 , 0.05M Tris-HCl , pH7.4)(堤等 1998)中に1mg/mlになるように分散した(酵素液)。次にコラーゲンの懸濁液500 μl を1.5mlのマイクロチューブに入れ、卓上遠心機で12000 rpmで1分間遠心分離し、上清を捨てたあとの沈殿に、酵素液400 μl と反応用緩衝液600 μl (基質:酵素=10:1)、酵素液40 μl と反応用緩衝液960 μl (基質:酵素=100:1)、酵素液4 μl と反応用緩衝液996 μl (基質:酵素=1000:1)をそれぞれ加え、5°Cで3, 6, 9, 12, 24時間反応させた。所定の時間の経過後、別のマイクロチューブに反応液を500 μl とり、SDSサンプル調製用緩衝液(0.05M Tris-HCl , pH6.8, 2%SDS, 10%グリセロール, 6% β メルカプトエタノール)を500 μl 加えて沸騰水中で5分間加熱した。このようにして作製した試料について、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、ゲル1枚あたり20mAの電流を流し、SDS電気泳動を行った(Laemmli 1970)。泳動終了後、銀染色法により染色した。なお、試料は1レーンあたり2 μl を添加した。

(4) コラゲナーゼ溶液への浸漬と剪断力の測定

3個体の外套膜から体軸方向に10mm、体軸方向直角に40mmの短冊をそれぞれ切り出した。プラスチック容器に濃度の異なるコラゲナーゼ溶液(0mg/ml, 0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml)を入れ、その中に切り出した短冊状の筋肉を個体ごとに5本ずつ浸漬した。なお、コラゲナーゼおよび緩衝液は上記と同じものを用い、反応は5°Cで行った。反応時間は3, 6, 9, 12, 24時間とし、各時間終了後、各個体ごとに1本ずつ取り出した。次にカッターの替え刃を装着したレオメーター((株)不動工業, RT-1002A)によりテーブルスピード1mm/秒にて輪走筋を横断する方向で完全に切断し、その際に記録された最高荷重を剪断力とした(第1章)。剪断力の測定は1本の試料に対し2~3回行った。また、それぞれの測定時刻において、対照区と各試験区との間における有意差検定をt-検定により行った。

(5) 組織学的観察

剪断力を測定した試料について、第1章の方法に従い、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡による構造観察を行った。

3. 結果

(1) コラゲナーゼによるイカコラーゲンの分解

細菌コラゲナーゼの低温下でのイカコラーゲンに対する反応性を検討した(Fig. 1)。反応用緩衝液のみの対照区(A)では、24時間反応後においてもコラーゲンのバンド(α 鎖, 矢頭)パターンに全く変化は認められなかった。つまり、コラゲナーゼが存在しない状況ではコラーゲンは全く分解しなかった。これに対して、酵素重量比1:1000区(B)では α 鎖のバンドは24時間後でも明瞭に認められるものの(矢頭)、 α 鎖より低分子量のタンパク質がはっきりとしたバンドにはならないが反応時間の経過とともに増加しており、ある程度分解が進行しているようであった。これに対し、重量比1:100(C)および1:10の試験区(D)では、反応3時間後ですでに α 鎖の消失が認められた。また分子量40k dalton付近にバンドが2本認められたが、分子量の大きさから考えると、これらはコラゲナーゼのバンドであると思われた(永井と藤本 1982)。(C)では(B)の場合よりもさらに低分子量成分のところまでが染色されており、(D)では(C)よりもさらに低分子量域の、特にフロントラインが濃く染色された。これらの低分子量成分は、コラゲナーゼの分子量40k~50k dalton(永井と藤本 1982)よりもあきらかに小さいことから、コラゲナーゼではないと思われる。また、動物性コラゲナーゼがコ

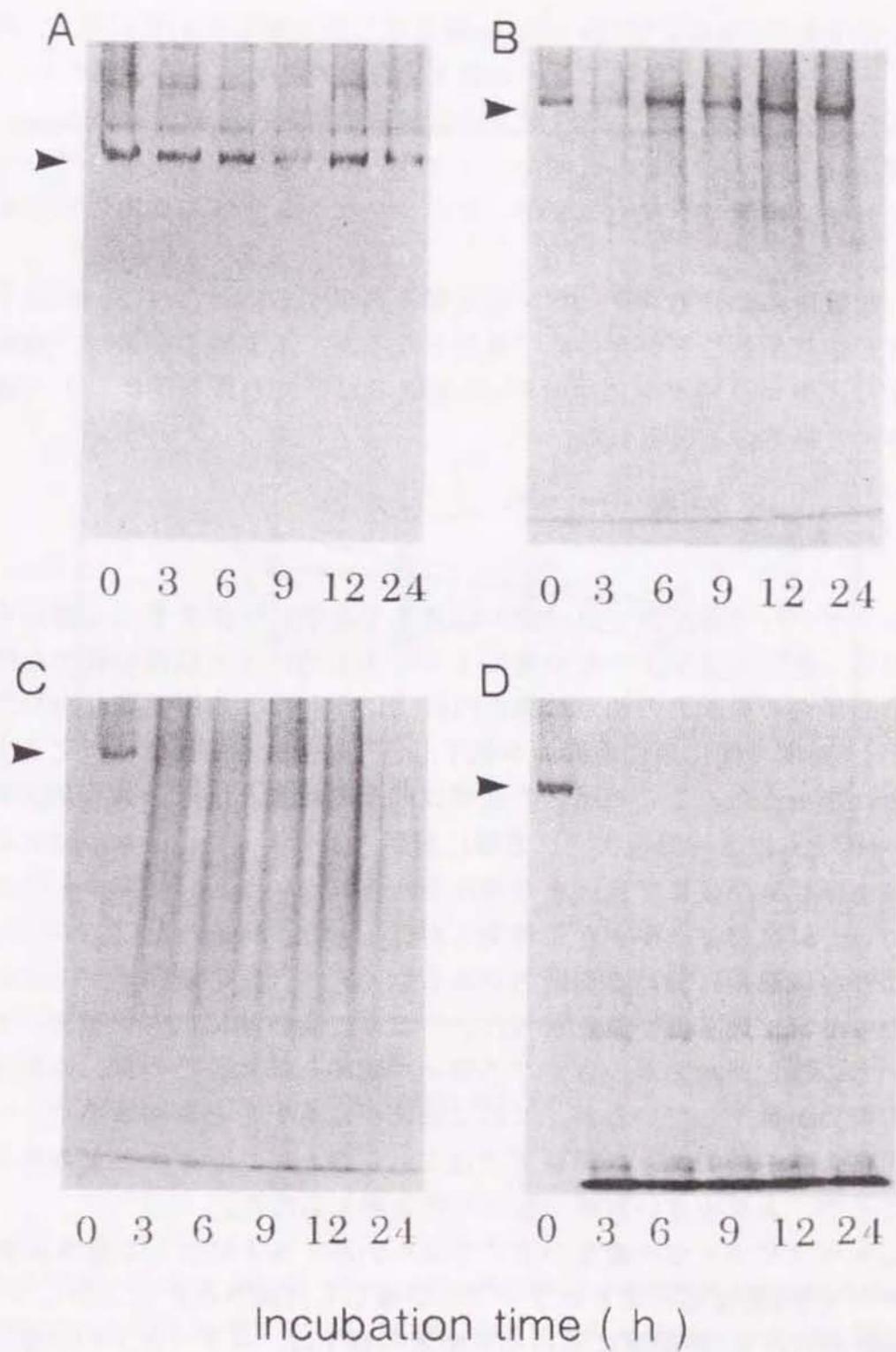


Fig. 1: SDS-PAGE analysis of degradation of arrow squid collagen by bacteria collagenase. A, control (no collagenase). The ratio (w/w) of collagenase : substrate = 1:1000 (B); 1: 100 (C); 1:10 (D). Arrowheads indicate α -chain of collagen. The reaction temperature is 5°C.

ラーゲン分子を約25kおよび75k dalton成分にしか分解しないのに対し、細菌性コラゲナーゼはトリペプチドのレベルにまで分解可能であることから、(D)で認められた低分子量成分はコラーゲンの分解産物であると考えられる。

この結果は、コラーゲンの分解がコラゲナーゼの量依存的に生じていることを示しており、細菌コラゲナーゼがイカコラーゲンを分解しうることが明らかとなった。

また、冷蔵中におけるコラーゲンの分解を再現するにあたって、低温下でも酵素反応が進行することがきわめて重要となるが、本実験の結果は、細菌コラゲナーゼはイカコラーゲンに対し5℃の低温においてもある程度以上の濃度があれば作用し得ることを示した。

(2) 剪断力の変化

細菌コラゲナーゼがイカコラーゲンに対して有効に作用することが明らかとなったので、次にコラゲナーゼ処理によって人工的にイカ筋肉の軟化を促進させた。その場合の剪断力の測定結果をFig. 2に示した。対照区(0mg/ml)では実験開始から6時間の間に急に剪断力が低下し、その後24時間後までほとんど変化が認められなかった。この対照区の結果は前章の結果とほぼ一致した。試験区の場合、3区ともに3時間後までに急激に剪断力が低下した。0.1mg/ml区および1mg/ml区では12時間後までは大きな差は認められないが、12時間から24時間後にかけて1mg/ml区のほうが大きく剪断力が低下した。10mg/ml区においては、3時間および24時間後における剪断力が最も低く、また反応時間すべてにわたって全体の中で常に最も低い値となった。つまり、全体的にはコラゲナーゼの濃度が高いものほど剪断力が小さくなる傾向が認められた。この際、対照区の筋肉でも剪断力が低下しているが、これは筋肉中にもともと存在するコラーゲン分解作用によるものであり、試験区ではこれにさらにコラゲナーゼの作用が加わったことで、より小さい剪断力を示したと考えられた。

必ずしもコラゲナーゼの濃度が同じではないが、さきに示した電気泳動の結果においても3時間反応によりコラーゲンが著しく分解されたことから(Fig. 1)、今回認められた3時間後における剪断力の低下は、コラーゲンの分解によって生じたとも考えられる。また、コラゲナーゼ濃度の高い試験区ほど剪断力の値が小さいことから、コラゲナーゼの作用によって軟化が促進されたものと思われた。

(3) 光学顕微鏡観察

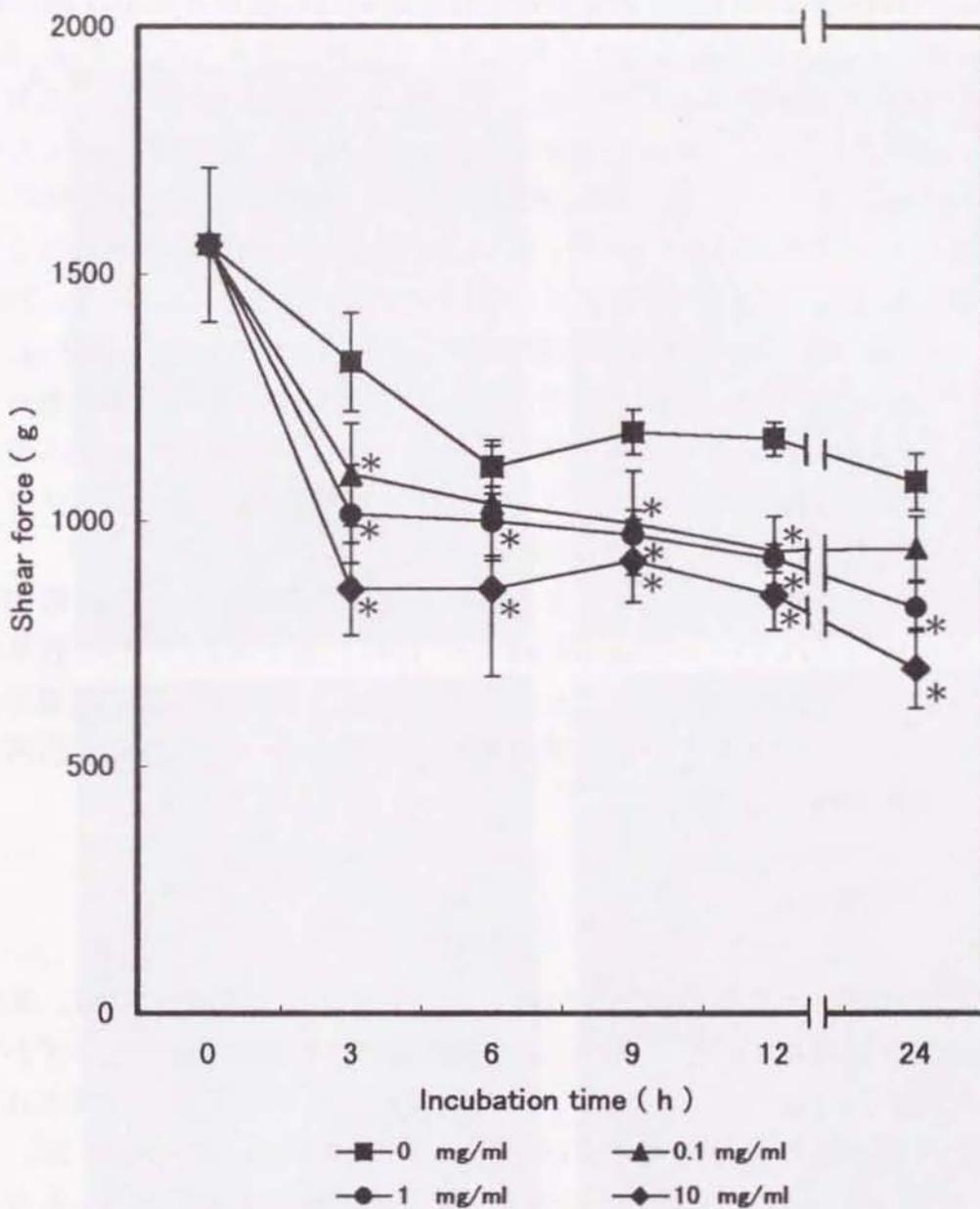


Fig. 2: Shear force of squid muscles which were prepared in collagenase solutions. Collagenase concentrations are 0 (■), 0.1 (▲), 1 (●), and 10 (◆) mg/ml, respectively. The values are expressed as average of 4-6 determinations \pm S.D. Significant difference ($p < 0.05$) was determined by t-test. Asterisks mean the values which are lower significantly than that of control at each time.

光学顕微鏡による観察結果をFigs. 3, 4に示した。即殺直後の筋肉では筋細胞がすきまなくびっしりと並んでいる(Fig. 3A)。対照区では剪断力が低下した死後3時間および6時間においては構造的な変化は認められなかったが(Fig. 3B, C)、死後24時間になると筋肉中の所々に白く見える間隙が認められた(Fig. 3D, 矢印)。今回は緩衝液に浸漬する保存方法によったが、この結果は冷蔵した前章報の結果に一致した。一方、試験区の場合、10mg/ml区では3時間後で早くも間隙が生じ始めた(Fig. 4C, 矢印)。他の試験区では、3時間後においては特に構造の違いは認められないが(Fig. 4A, B)、剪断力の数値には差が認められたことから、光学顕微鏡レベルでは観察できない変化が生じていると思われた。24時間後になると0.1mg/ml, 1mg/ml区ともに間隙がはっきりと認められるが(Fig. 4D, E, 矢印)、10mg/ml区の24時間後における筋細胞間の間隙が最も顕著であった(Fig. 4F, 矢印)。この部分には一般的にコラーゲンが存在すると考えられることから、今回の結果は細胞間に存在するコラーゲンが筋肉内に浸透したコラゲナーゼにより分解された結果とも考えられる。

一方、コラゲナーゼ処理をしなくとも、冷蔵のみで細胞間が広がり、筋肉が軟化することが報告されている(Kugino *et al.* 1997; 第1章)。今回の結果においては、コラゲナーゼ処理を行うことで冷蔵した場合と同様の構造的変化がより早く生じており、コラゲナーゼ処理が冷蔵した場合と同様の作用を筋肉に対してもたらしたと考えられる。

(4) 透過型電子顕微鏡観察

透過型電子顕微鏡による観察結果をFigs. 5, 6に示した。対照区では、即殺直後では細胞間が密着していたが(Fig. 5A)、3時間および6時間後にはわずかに細胞間に隙間が生じ(Fig. 5B, C, 矢頭)、24時間後には光学顕微鏡で観察されたように、細胞間に多数の間隙が生じていることが明らかとなった(Fig. 5D, 矢頭)。一方、0.1mg/ml区および1mg/ml区では、光学顕微鏡で変化が認められなかった3時間後においてすでに細胞間隙が生じていることが明らかとなった(Fig. 6A, B, 矢頭)。10mg/ml区では光学顕微鏡でも認められたように細胞間隙が生じていた(Fig. 6C, 矢頭)。24時間後においては、0.1mg/ml区、および1mg/ml区では3時間後に比べ若干細胞間隙が増加していた(Fig. 6D, E, 矢頭)。10mg/ml区においては細胞間が最も大きく広がっており、光学顕微鏡観察の結果と一致した(Fig. 6F, 矢頭)。

以上の結果は、筋肉に浸透したコラゲナーゼにより細胞間に存在するコラーゲンが分解され、それによって細胞間の結合力が低下し徐々に細胞間が広がっ

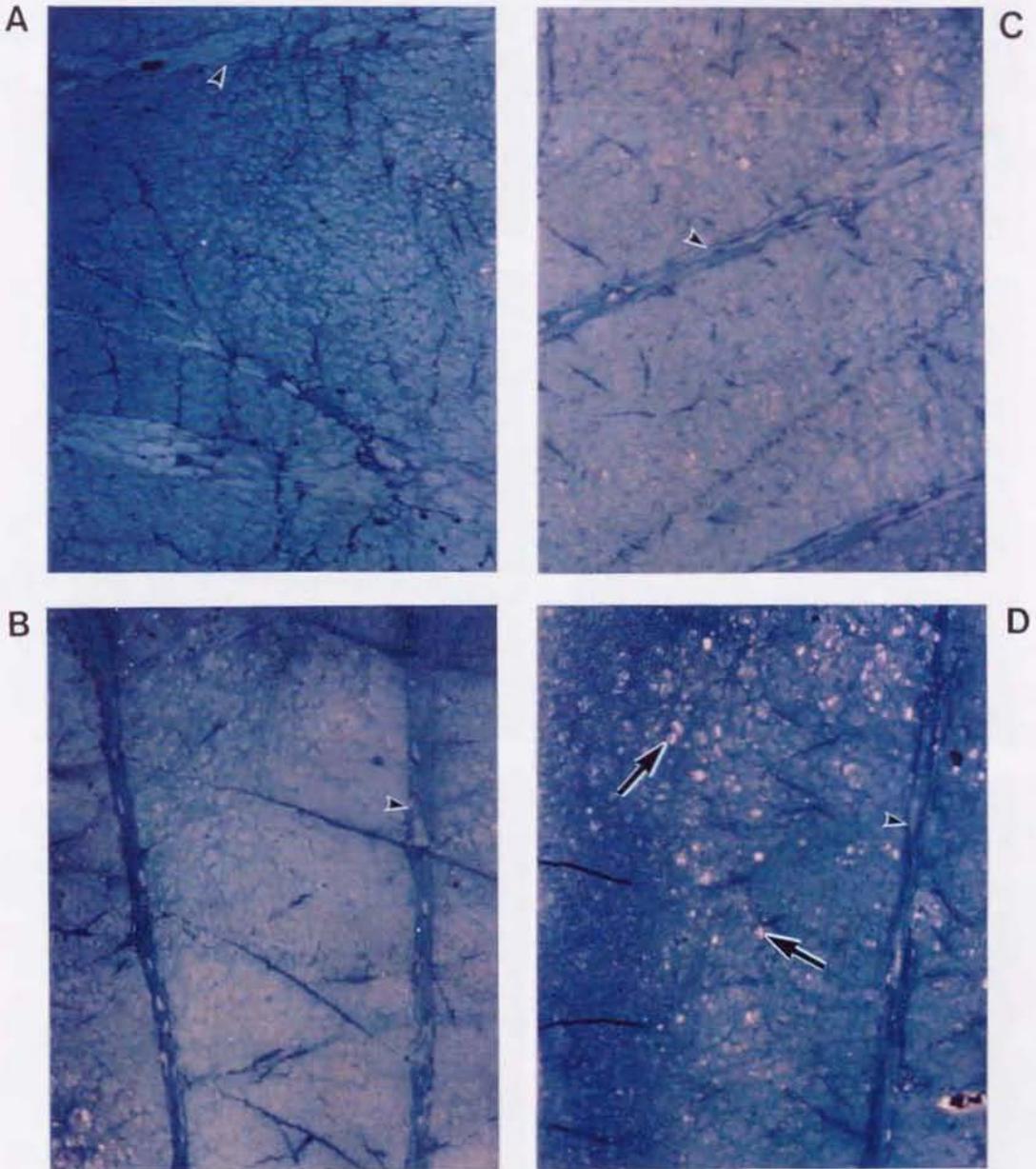


Fig. 3: Light microscopic photographs of the control samples which were immersed in the reaction buffer which contained no collagenase. A, immediately after death; B, prepared for 3 h; C, prepared for 6 h; D, prepared for 24 h. Arrows indicate the spaces which were occurred in muscle. Arrowheads, muscle fibers' layer which runs vertically to others. Bar represents 100 μ m.

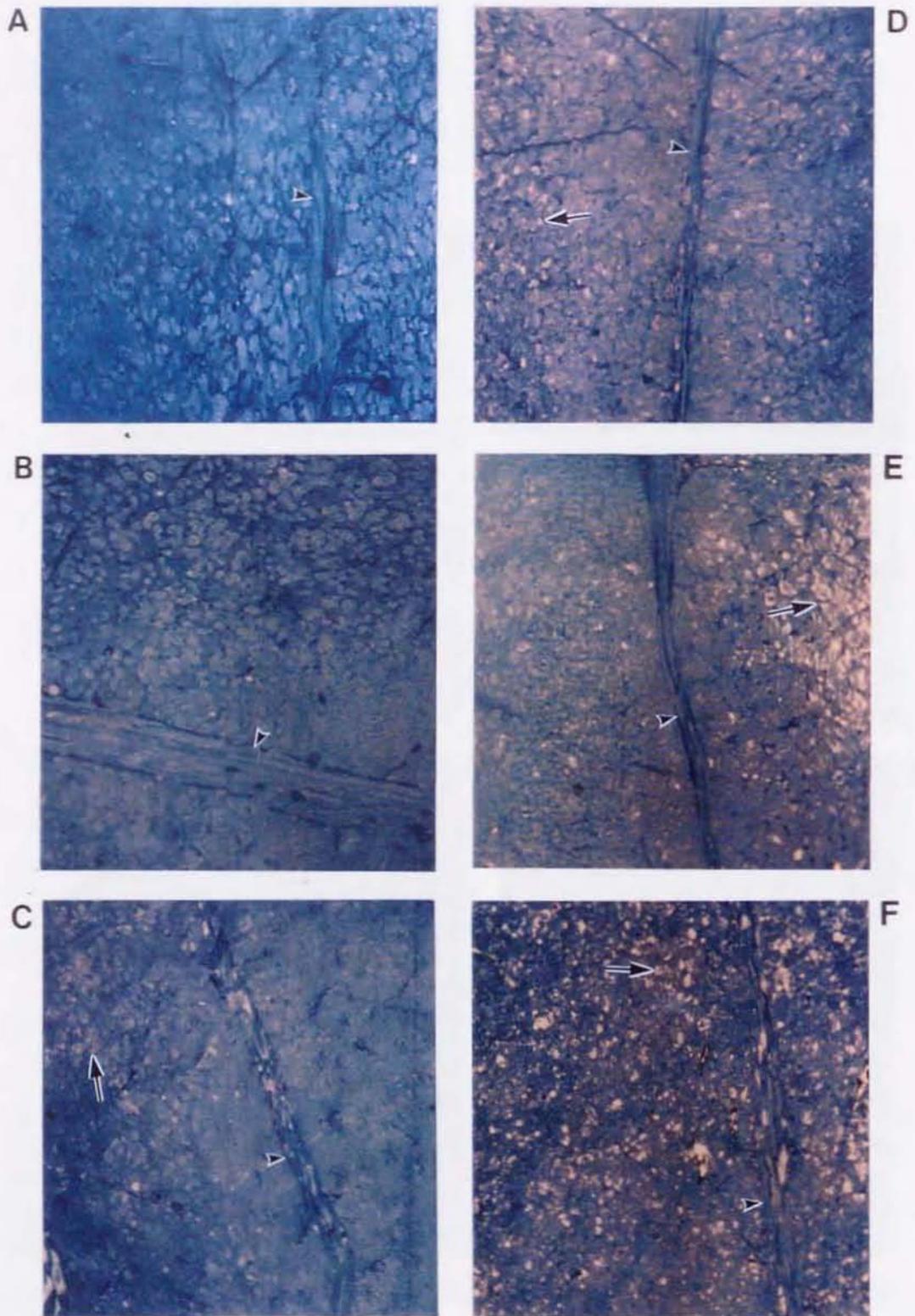


Fig. 4: Light microscopic photographs of the tested samples which were immersed in the collagenase solution. A and D, 0.1mg/ml; B and E, 1mg/ml; C and F, 10mg/ml. A, B, C, after 3 h preparation; D, E, F, after 24 h preparation. Arrows indicate the spaces which were occurred in muscle. Arrowheads, muscle fibers' layer which runs vertically to others. Bar represents 100 μ m.

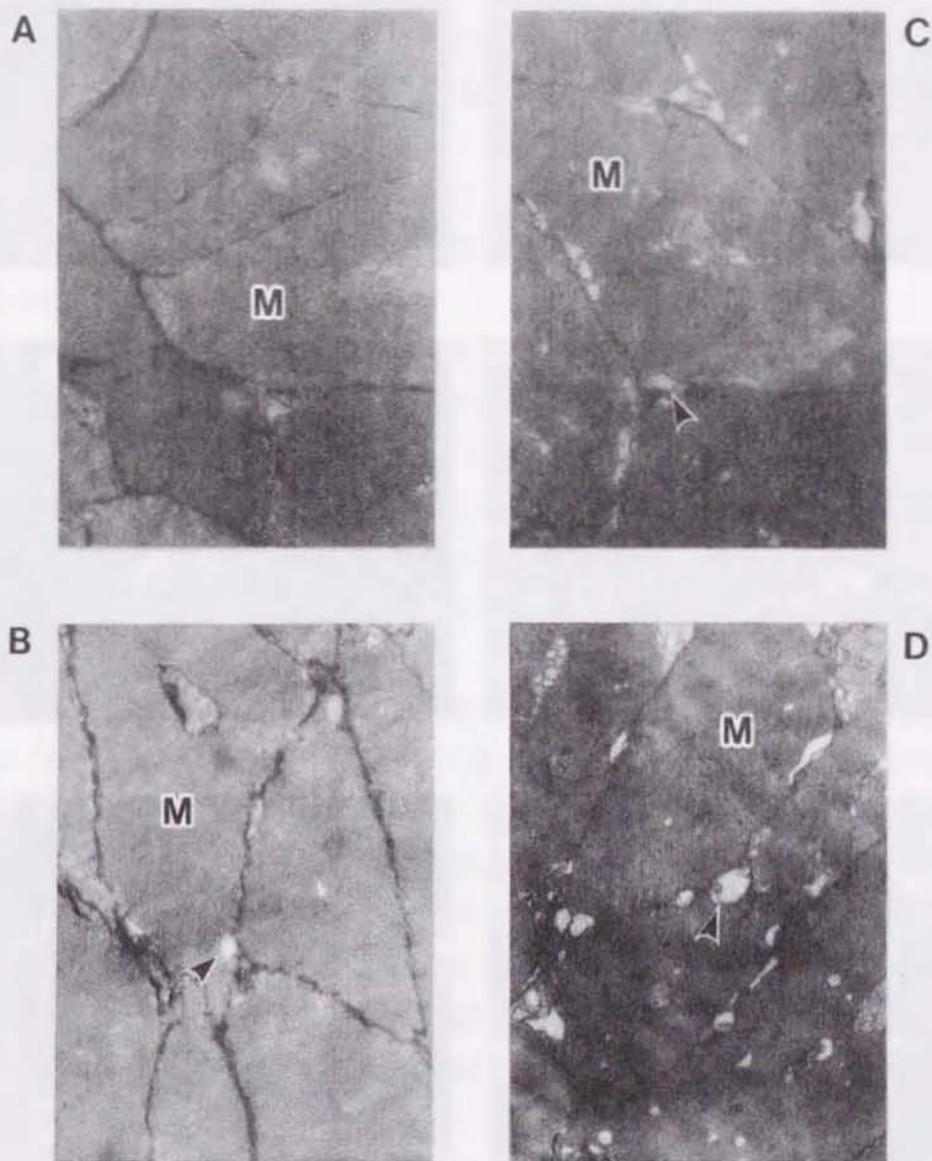


Fig. 5: Transmission electron microscopic photographs of the control samples which were immersed in the reaction buffer which contained no collagenase. A, immediately after death; B, prepared for 3 h; C, prepared for 6 h; D, prepared for 24 h. M, muscle cell. Arrowheads, space between muscle cells. Bar represents $0.1 \mu\text{m}$.

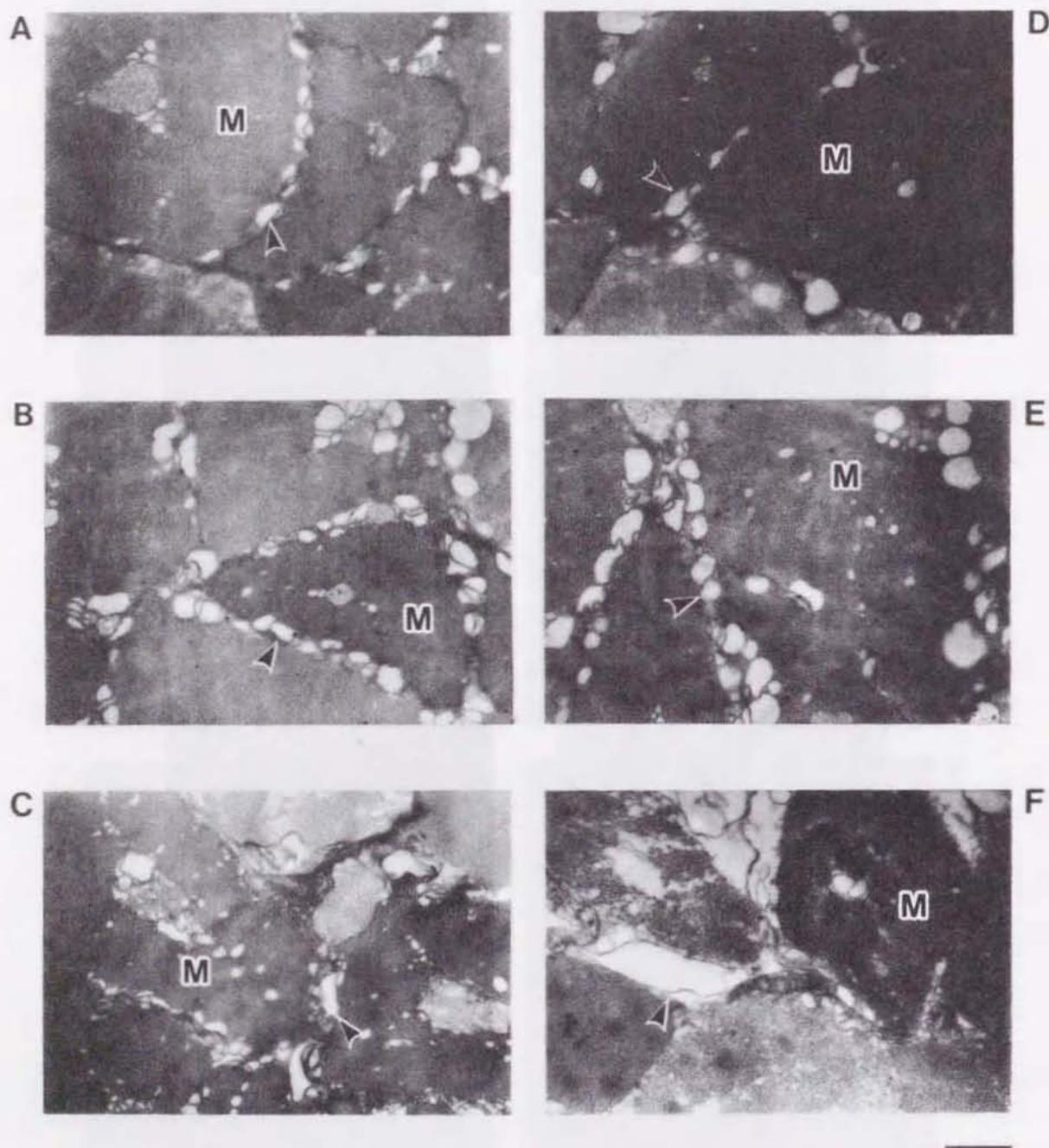


Fig. 6: Transmission electron microscopic photographs of the tested samples which were immersed in the collagenase solution. A and D, 0.1mg/ml; B and E, 1mg/ml; C and F, 10mg/ml. A, B, C, after 3h preparation; D, E, F, after 24 h preparation. M, muscle cell, Arrowheads, space between muscle cells. Bar represents $0.1\ \mu\text{m}$.

たと考えられる。また、これらの結果は剪断力の結果と対応しており、コラーゲナーゼの添加により軟化が促進されることを示したといえる。

4. 考察

イカの鮮度低下は速く、特にその物性の変化は顕著である(Kugino *et al.* 1997; 第1章)。この際に細胞間の分離が認められること、および細胞間にはコラーゲンが存在することから、コラーゲンの分解による細胞間の結合力の低下が物性の変化につながると考えられた。本研究の結果は、細胞間に存在するコラーゲンをコラーゲナーゼによって分解することで、本来の鮮度低下の様子を人工的に促進させたものと思われる。

筋肉の結合組織が冷蔵中に構造変化を起こすことは、畜肉(高橋 1997)および魚肉(安藤 1997)において報告されている。特に鮮度低下が速いとされる魚肉の軟化現象については、近年、コラーゲン繊維の崩壊による細胞間の結合力の低下にその原因があるとする報告がなされている(Ando *et al.* 1992; Sato *et al.* 1997)。しかし、コラーゲン繊維が冷蔵中に崩壊する原因についてはいまだに不明であることから、本研究の結果はイカ以外の動物の結合組織の変化の機構解明に役立つ可能性がある。

江原ら(1992)はイカ筋肉のホモジネートを4℃および30℃に置くことでミオシンヘビーチェーンが分解されるとともに、分子量が130kおよび90kの成分が出現することを報告している。またSakai and Matsumoto (1981)は、特に酸性領域において強いプロテイナーゼ活性を検出している。牧之段ら(1993)はイカ塩辛の製造工程に関連してイカ肝臓中のカテプシンDやLが筋原繊維を分解し、製品の熟成に大きく関与していることを報告している。最近ではTajimaら(1998)がやはりミオシン分解活性の存在を報告している。これらの報告例より、イカは強いプロテイナーゼ活性を有しており、これらがイカの早い死後変化に関わっていると考えられる。

イカのコラーゲンは難溶性であるため、酵素反応の基質として利用しにくい面がある。ペプシン処理によりある程度可溶化できるが、ペプシン処理の段階ですでにコラーゲン分子の一部が分解されてしまうため、基質として用いる場合には注意が必要である。Mizutaら(1997)は塩酸グアニジンを利用した抽出方法により、ペプシン消化を行わずにコラーゲンを溶解させる方法を用いており、コラーゲンのなかでもごく少量しか存在しない成分でも分離することに成功している。この方法で分離したコラーゲン分子は分解作用を受けていないため分子は完全な形で保存されており、これをコラーゲン分解活性を検出する際の基

質として用いれば有意義な結果が期待できる。

従来、酵素反応の研究においては、25℃あるいは37℃といった比較的高い温度が用いられてきた。これは、消化吸收のモデルを考える場合、反応時間と分解産物の生成量とが直線関係にある限り温度を高くしても良いとされるためである。しかしながら、今回のように冷蔵中の変化のモデルとする場合には、反応温度は同じ低温でなければならない。低温における実験では反応速度が遅いため一般にはあまり行われぬが、本章の結果からわかるように、低温であっても数時間という長時間の反応を行えばコラーゲンは分解可能であることがわかった。温度を上げると本来活性のない酵素まで活性化させたり、あるいは基質側の立体構造が変化し冷蔵中には起こらない分解反応が生じてしまう可能性があるため、より実際の条件に近い条件で実験を行うことが重要であろう。

コラーゲンを分解する酵素は他の構造タンパク質に比べて少ないがいくつか報告されている。また、魚をしめる際には血抜きが行われるが、血抜きを行わないとコラーゲン繊維の分解が促進されることが報告されており、血液にもコラーゲンを分解する酵素が存在する可能性がある(Ando *et al.* 1999)。さらに、キウイフルーツにコラゲナーゼ活性があることが報告されており(堤等 1998)、現在は畜肉の軟化剤としての利用が期待されている。天然の食品中の成分なので添加物として安全性などには問題なく、しかもコラーゲンを分解することが可能であることから、食品の物性の改変剤として期待される。

以上のような可能性についての研究を進めていくことで、イカ筋肉の物性の変化を自在に操作できるような鮮度保持剤の開発などが期待される。

5. 要約

人工的なコラゲナーゼ処理を行うことにより、イカ筋肉の冷蔵中における軟化現象に対するコラーゲンの関与を調べた。

ヤリイカ外套膜より分画したコラーゲンを濃度の異なる細菌コラゲナーゼ溶液(酵素:基質=1:10, 1:100, 1:1000, 5℃)に浸漬し、その変化をSDS電気泳動法により調べたところ、コラゲナーゼの濃度が高い場合ほどコラーゲンの分解が促進された。この結果は、5℃という低温下であっても長時間反応により細菌コラゲナーゼがコラーゲンを分解し得ることを示した。

次にヤリイカの外套膜を濃度の異なるコラゲナーゼ溶液(0.1, 1, 10mg/ml)に浸漬し、その影響を対照試料(0mg/ml)と比較して検討した。その結果、コラゲナーゼを含む溶液に浸した肉片の剪断力は対照試料に比べ低い値を示し、特に10mg/ml区において最も低かった。光学顕微鏡で構造を比較すると、コラゲナ

一ゼ処理3時間後で早くも10mg/ml区の筋肉において細胞間隙が認められた。他の試験区でも24時間後には間隙が認められたが、10mg/ml区において最も多数の間隙が生じていた。透過型電子顕微鏡で観察すると、3時間および24時間後における細胞間隙の数・大きさの違いがより明確に認められた。

以上の結果は、コラゲナーゼの筋肉内部への浸透によりコラーゲンが分解され、結果的に軟化現象が促進されたことを示しており、言い換えれば、コラーゲンが冷蔵中の軟化現象に深く関与していることを示すものである。

6. 引用文献

安藤正史 (1997) 『魚肉の軟化機構』, 魚介類の細胞外マトリックス, 恒星社厚生閣, 東京, 73~82

Ando, M., Nishiyabu, A., Tsukamasa, Y., and Makinodan, Y. (1999) Post-mortem Softening of Fish Muscle during Chilled Storage as Affected by Bleeding, *J. Food Sci.*, 64, 423~428

Ando, M., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (1992) Post-mortem Tenderization of Rainbow Trout Muscle Caused by the Disintegration of Collagen Fibers in the Pericellular Connective Tissue. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 58, 567~570

江原 司, 田宮 徹, 土屋隆英 (1992) イカ類筋肉ミオシンヘビーチェーン分解酵素の検索, 日本水産学会誌, 58, 2379~2382

畑江敬子 (1997) 『調理と細胞外マトリックス』, 魚介類の細胞外マトリックス, 恒星社厚生閣, 東京, 91~101

Kugino, M., Kugino, K., and Ogawa, T. (1997) Changes in Microstructure and Rheological Properties of Squid Mantle during Storage, *Food Sci. Technol. Int., Tokyo*, 3, 157~162

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680~685

牧之段保夫, 中川孝之, 藤田眞夫 (1993) いか塩辛熟成過程中的組織の軟化に及ぼすカテプシンの影響, 日本水産学会誌, 59, 1625~1629

Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., and Sakaguchi, M. (1997) Biochemical and Immunochemical Characterization of Guanidine Hydrochloride-Soluble Collagen in the Mantle Muscle of Squid *Todarodes Pacificus*, *Fisheries Sci.*, 62, 291~296

永井 裕, 藤本大三郎 (1982) 『コラーゲン代謝と疾患』, 講談社, 86~109

Sakai, J. and Matsumoto, J. J. (1981) Proteolytic enzymes of squid mantle muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 389~395

Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Nakagawa, T., Makinodan, Y., Ohtsuki, K., and Kawabata, M. (1997) Involvement of Type V Collagen in Softening of Fish Muscle during Short-term Chilled Storage. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 343~348

Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K., and Kawabata, M. (1991) Type V Collagen in Trout (*Salmo gairdneri*) Muscle and Its Solubility Change during Chilled Storage of Muscle, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1222~1225

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Itoh, Y., and Shimizu, Y. (1988) Isolation of Types I and V Collagens from Carp Muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 155~158

Tajima, T., Tamori, J., Kanzawa, N., Tamiya, T., and Tsuchiya, T. (1998) Distribution of Myosinase II in Tissues of Coleoidea, *Fisheries Sci.*, 64, 808~811

高橋興威 (1997) 熟成に伴う食肉軟化の分子機構, 日本食品科学工学会誌, 44, 543~551

堤ちはる, 永弘悦子, 田中初美, 中島史絵, 吉中哲子 (1998) キウイフルーツのコラゲナーゼの精製と性質, 家政誌, 49, 5~14

第3章

凍結解凍したモンゴウイカ外套膜の加熱調理に伴う物性変化への コラーゲンの関与

1. 緒言

第1章および第2章において、生肉の物性変化に対しコラーゲンが大きく関与していることが明らかとなった。コラーゲン量が多く含まれる筋肉ほどその物性が硬くなるとされているが (Ochiai *et al.* 1985, Sato *et al.* 1986, 畑江等 1986, Olaechea *et al.* 1993), いったん加熱されると生体内のコラーゲン繊維を構成する分子内のらせん構造がほどけ, その一部はゼラチンへと変化するため, 筋細胞間の結合力が失われ, 結果的に加熱肉の軟化の原因となる。第1章において, 加熱した筋肉が冷蔵時間に関係なく生の筋肉よりも軟らかい結果となったのはこのためと思われる。

魚肉を加熱調理した場合, 自身の魚では筋肉の物性は低下するが, 赤身の魚では逆に硬くなる (畑江等 1986, Kanoh *et al.* 1988, Nakayama *et al.* 1990)。赤身の魚の筋肉が加熱により硬くなるのは筋形質タンパク質が筋細胞間において凝固するためとされている (Hatae *et al.* 1990)。無脊椎動物のサザエとアワビの筋肉に関する報告では, 加熱により徐々に軟化するとともに, コラーゲン繊維の構造に変化が認められる (Ochiai *et al.* 1985, Olaechea *et al.* 1993)。ところで, イカ筋肉は加熱調理により, その菌ごたえが逆に硬くなると言われている (野崎と成瀬 1992)。しかしながら, 実際に加熱肉の物性を測定した研究例によれば, 加熱によりイカ肉の物性は柔らかくなることとされており (Otwell and Hamann 1979, Stanley and Hultin 1982, Kolodziejaska *et al.* 1987, Kugino *et al.* 1994, 久木野 1994, Kugino *et al.* 1995, 内藤等 1995), 一般的なイメージとは違いがある。また加熱により柔らかくなるのは, 加熱による筋細胞の構造破壊が主因とされており, コラーゲン繊維のゼラチン化は比較的影響が小さいと考えられている (Kugino *et al.* 1994)。このように考えられる原因として, イカ筋肉の構造上の特徴があげられる。一般に筋細胞間にはコラーゲンが存在し, 筋細胞同士を結合する働きをもっている。ところがイカの筋細胞の場合, 筋細胞が密着しており, 筋細胞間にコラーゲンの存在が確認できない (Moon and Hulbart 1975, Kugino *et al.* 1994, Kugino *et al.* 1995)。そのため, 加熱により筋細胞間に間隙が生じて, それは熱変性による筋

細胞の収縮によるとされており、その部位におけるコラーゲンの関与には言及されていない (Kugino *et al.* 1994)。しかしながら、コラーゲンには基底膜コラーゲンのように明瞭な繊維構造が認められない種類のものも存在しており、筋細胞間におけるコラーゲンの存在を否定できない。

本章では、生肉の物性にコラーゲンが大きく関与するという第1章および第2章の結果をふまえ、より大きく物性が変化する加熱操作におけるコラーゲンの影響を明らかにするため、加熱イカ筋肉の物性を測定するとともに、その際のコラーゲンの組織学および生化学的変化を調べ、物性変化への関与について考察した。

2. 材料および方法

(1) 材料

試料には市販のモンゴウイカ (*Sepia officinalis*, モーリタニア産) 外套膜の凍結解凍品を用いた。凍結期間は約2カ月、厚さは10mmであった。なお、本試料は薄皮剥き品であるため、表側の表面に、表皮の3-4層にあたる部分が残存すると思われる。本章では、この残存する部分をさして表皮とよぶこととする。

(2) 剪断力の測定

表皮を含む試料を10×10×30mmに切り、沸騰した蒸留水(100℃)約50mlの入ったビーカー3個に、1個ずつ入れ、それぞれ10分、30分および60分間ガスバーナーで加熱し、水温を100℃に保った。加熱時間が終了した際、即座にレオメーター(株)不動工業、RT-1002A)により剪断力を測定した。アダプターにはカッターの替え刃を装着し、ステージのスピードは1mm/秒に設定した。剪断は第1章のFig. 1に示したように輪走筋を横断する方向で、外套膜の表側より行った。

(2) 光学顕微鏡による観察

剪断力を測定した試料より、表皮を含む部分をカミソリの刃で3×3×3mmの大きさに切り出し、5%グルタルアルデヒド(0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.4)に1日以上浸漬して固定し、組織観察用試料とした。次に固定した筋肉からカミソリの刃でさらに3×3×2mmに細切し、続いて50-100%エタノールによる脱水を行い、

キシレンで置換した後、パラフィンに包埋した。作製したパラフィンプロックからミクロトームで厚さ5ミクロンの切片を作製し、スライドガラスに貼り付け、ワンギーソン法により染色し、光学顕微鏡（オリンパス（株），BX50）を用いて観察した。なお、前章と異なり光学顕微鏡観察をパラフィン切片を用いて行うのは、ワンギーソン染色法によりコラーゲンを染め分けることを目的とするためである。

(3) 透過型電子顕微鏡による微細構造の観察

光学顕微鏡観察に使用したのと同じ固定したサンプルから、カミソリの刃で1×1×3mmの小片を切り出し、第1章と同様の方法で超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡（（株）日立製作所，H-800）により加速電圧100kVで観察した。

(4) コラーゲンのゼラチン化率の測定

剪断力を測定するサンプルとは別に、表皮を含む生の外套膜を、沸騰した蒸留水（100℃）約50mlの入ったビーカー3個に、それぞれ約10gずつ精秤して入れ、それぞれ10分、30分および60分間ガスバーナーで加熱し、水温を100℃に保った。それぞれ加熱終了後、筋肉を煮汁とともにホモジナイズした。10,000gで20分間遠心分離した後、その上清を蒸留水で100mlにメスアップした。この操作は、筋肉内にとどまり煮汁に溶出していないゼラチンをも抽出することを目的として行った。メスアップした上清のうち500 μ lを6N塩酸で150℃-60分間加水分解した後、アミノ酸分析計（（株）日立製作所，L-8500）によりヒドロキシプロリン（Hyp）量を測定した。また、生の筋肉についても蒸留水中でホモジナイズし、同様の操作を行った。次に、生の筋肉0.5gをそのまま6N塩酸で加水分解してHyp量を測定し、全筋肉中のHyp量を求めた。これらの結果から全Hyp量に対する煮汁中のHyp量の比率を計算し、コラーゲンのゼラチン化率とした。この際、生肉においてもHypを含むペプチド、あるいは遊離型のHypが存在する可能性があるため、下記の計算式にしたがい、すべての測定値より生肉の水抽出物中のHyp量を差し引いたものを、コラーゲンおよびゼラチン由来のHyp量としてゼラチン化率を計算した。

$$\text{ゼラチン化率 (\%)} = \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

- A: 加熱肉の水溶性画分中の総Hyp量
- B: 生肉の水溶性画分中の総Hyp量
- C: 生肉全体のHyp含量

3. 結果

(1) 加熱による剪断力の変化

加熱による剪断力の経時的な変化をFig. 1に示した。加熱時間の経過とともに剪断力は減少し、筋肉の物性が加熱中に軟化していることが明らかとなった。

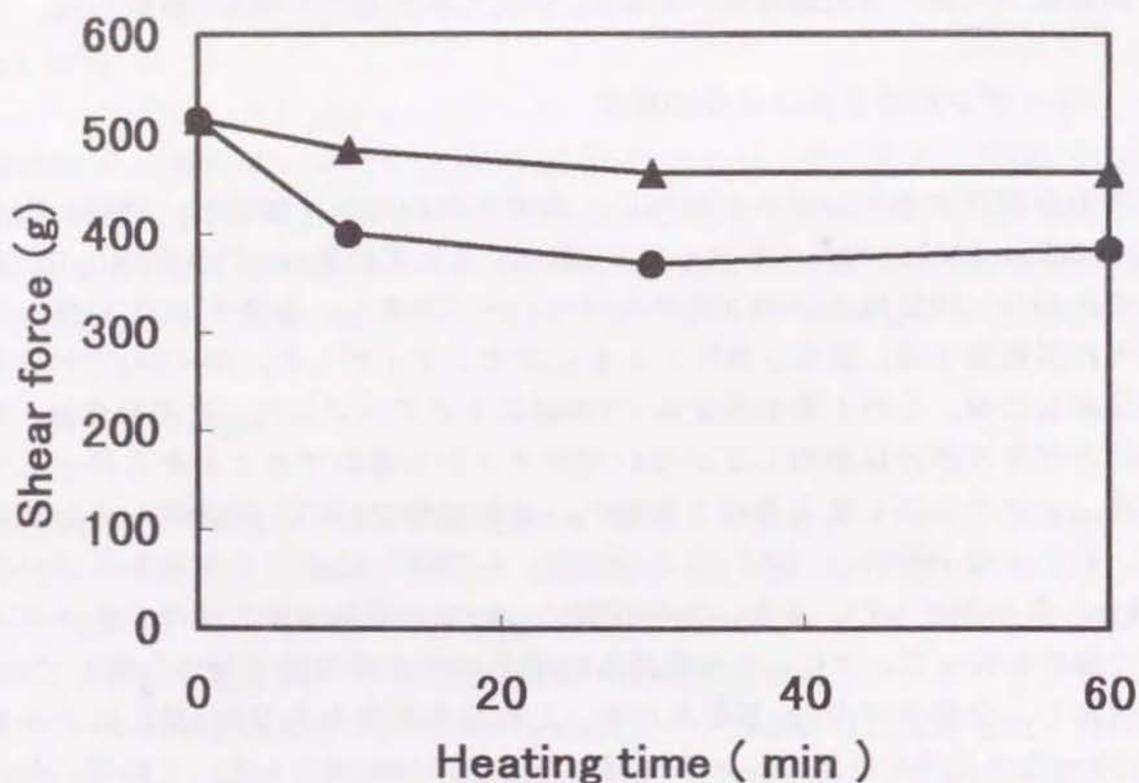


Fig. 1: Shear force values for raw and cooked cuttlefish mantle before and after heating in boiling water. Each value is the average of three determinations. ●, measured just after heating; ▲, measured after cooling to room temperature.

剪断力の測定の際、加熱直後ではなく、室温まで冷却してから測定する研究例があるが (Kugino *et al.* 1994) , そのように測定した場合の測定値はFig. 1 (▲) のような結果となり、加熱直後に測定した場合 (●) に比べてやや大きくなった。加熱調理を考える場合、実際には暖かい料理を食べるため、物性の測定は試料が暖かい状態で行うのが適当と思われた。

加熱の間に筋肉の長さは約21%収縮し、外観は硬くなったように見えた。従来、イカ筋肉は加熱するほど硬くなると一般に考えられてきたが、それはこのような外見から判断された結果と思われる。加熱により皮が収縮し、硬くなるという考え方もあるが (野崎と成瀬 1992) , 今回の剪断力は、薄皮を剥いたあとの表皮の上より筋肉を剪断して測定しているため、皮の収縮によってもイカ肉の硬化は起こらないことを示したといえる。

(2) 加熱による筋組織構造の変化

光学顕微鏡による観察結果をFig. 2に示した。加熱時間の経過とともに、筋肉中に間隙が生じてくる様子が認められた (Fig. 2B, 矢印)。特に筋細胞間に生じている間隙が顕著であった。筋細胞間にはコラーゲンが存在すると考えられるため、コラーゲンがゼラチン化して機械的強度が低下し、筋細胞間に間隙が生じたものと思われた。矢印 (Fig. 2A) は濃く赤に染まったコラーゲン部分であるが、この部分の構造は60分間の加熱の後も筋細胞間に存在し、大きな変化は認められなかった。また同様に、コラーゲンにより構成されている表皮も60分加熱後においても残存しており、その構造が変化することはなかった (Fig. 2C)。

次に透過型電子顕微鏡による観察結果を示す (Figs. 3, 4) 。生肉では筋細胞の横断面に特徴的な縞模様が認められた (Fig. 3A) 。また筋細胞間にコラーゲン繊維が存在すると考えられるが、その幅は非常に狭く (Fig. 3A, 矢印) , コラーゲン繊維の存在は確認できなかった。しかしながらさらに高倍率で観察した場合、場所により筋細胞間に何らかの構造物が認められたため (Fig. 4, 矢印) , コラーゲンの存在を否定はできないと思われる。一方、濃い赤に染まった筋細胞間のコラーゲン部分 (Fig. 2A, 矢印) では、明瞭な構造のコラーゲン繊維が集合して存在しており、それぞれのコラーゲン繊維の太さは約40nmであった (Fig. 3B) 。次に加熱後の筋肉の微細構造を見てみると、加熱前に認められた縞模様が不明瞭になっており、加熱変性による凝集などが起こっているとも考えられる (Fig. 3C) 。しかしながら、光学顕微鏡により認められた筋細胞間の間隙は認められず、筋細胞間は結合したままであった。これは試料作製法の違いに起因すると思われた。つまり光学顕微鏡の場合、パラフィン切片を

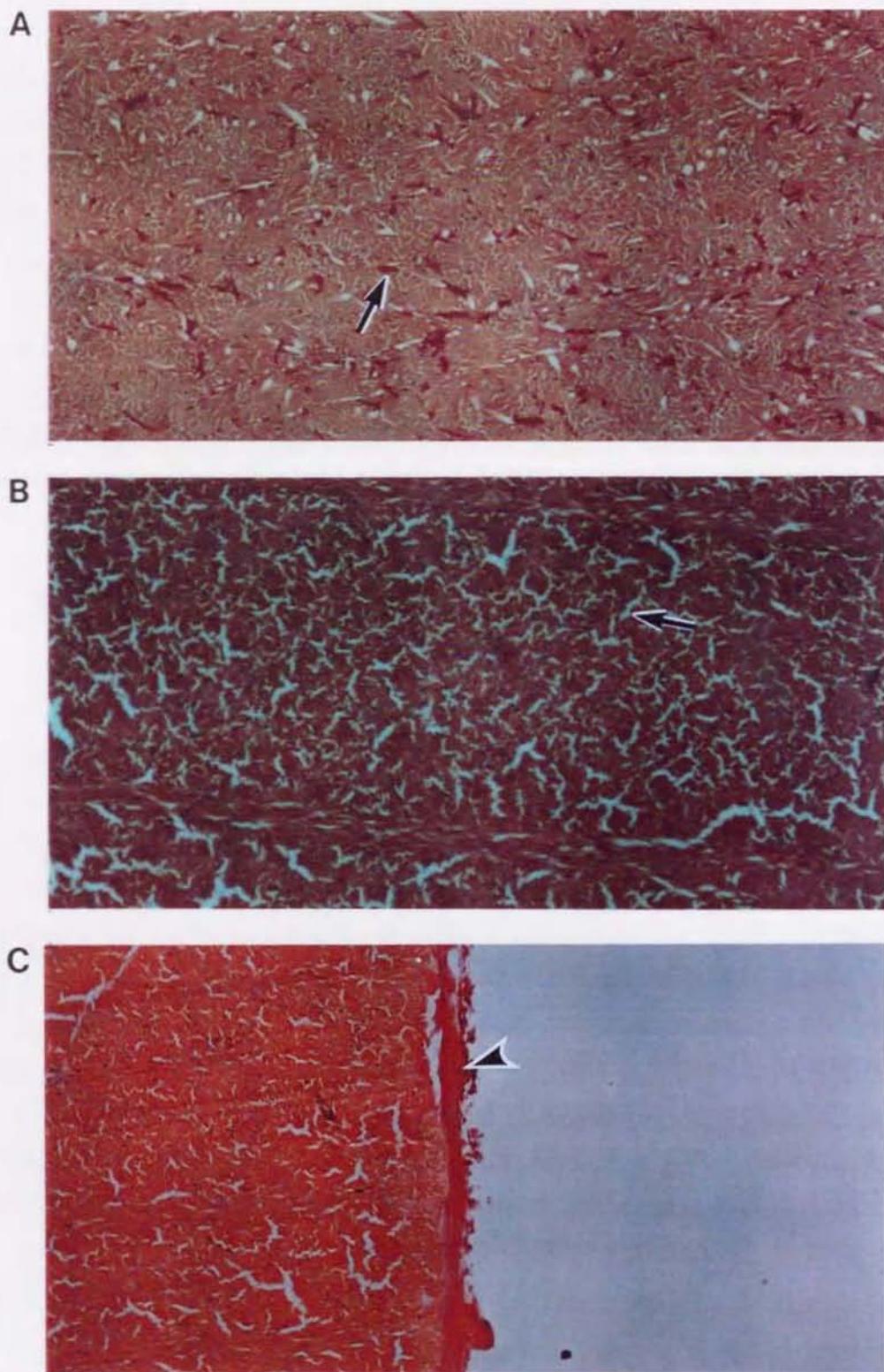


Fig. 2: Optical microscopic photographs of raw and heated cuttlefish mantle. A, raw muscle (the arrow indicates collagen). B, muscle after heating for 60 min (the arrow indicates space among muscle cell). C, surface of muscle after heating for 60 min (the arrowhead indicates the skin which remained even after 60 min of heating). The bar represents 100 μ m.

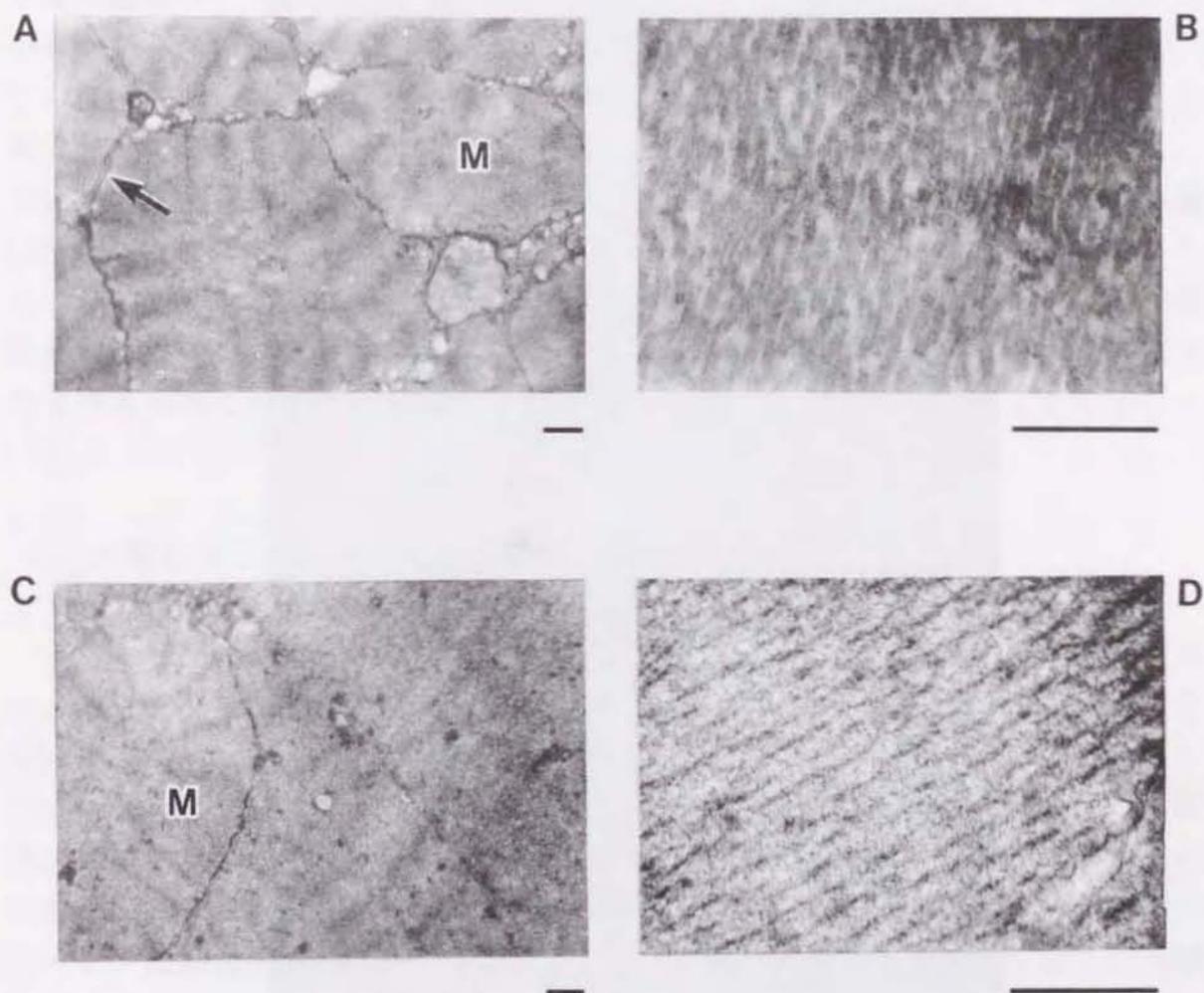


Fig. 3: Transmission electron microscopic photographs of raw and heated cuttlefish mantle. A, cross-section of raw muscle cells; B, collagen fibrils assembled in the raw muscle (Fig. 2A, arrow); C, cross-section of 60 min-heated muscle cells. D, collagen fibrils assembled in the 60 min-heated muscle. Arrow indicates the narrow part between muscle cells. M, muscle cell. Bars represent 500 nm.

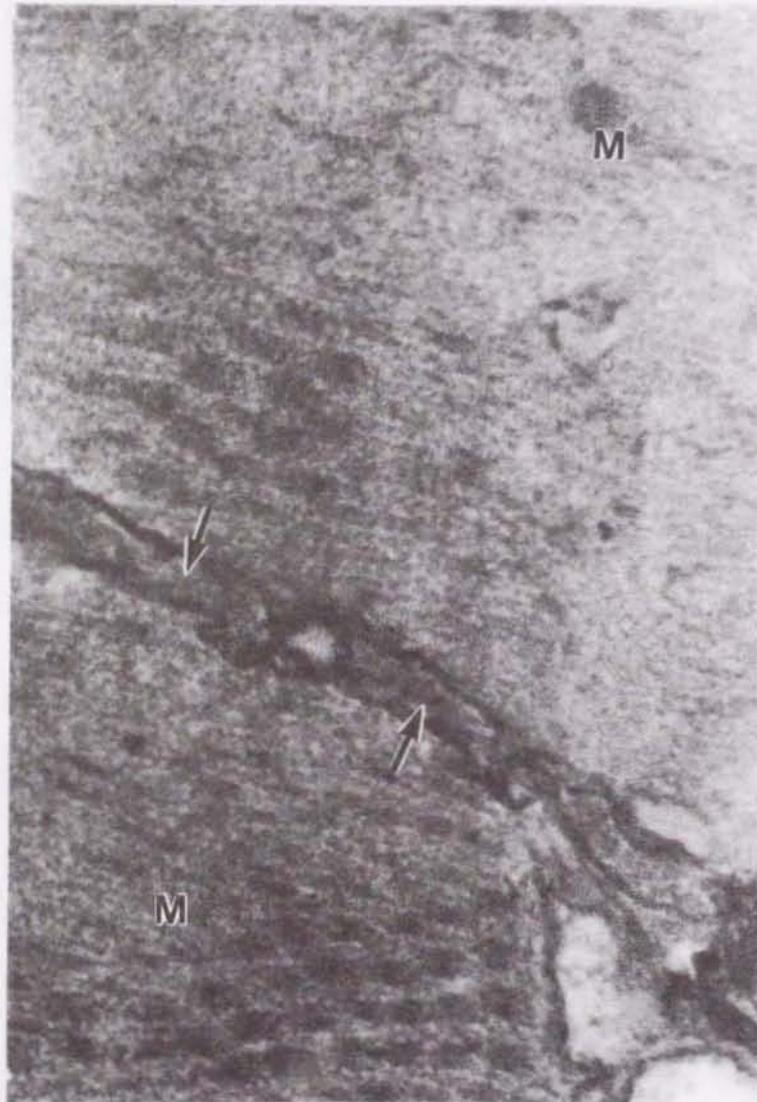


Fig. 4: Microstructure of the intercellular portion. Unidentified material exists between the muscle cells (arrows). M, muscle cell. The bar represents 100 nm.

作製したあと、それを加熱しながら伸展操作を行う。この際、伸展のために切片に外力がかかり、機械的強度が弱い部分で構造の破壊が生ずることがある。これを防ぐために固定操作を行うのであるが、加熱により筋細胞間がゼラチン化して強度が低下しているため、固定によっても構造の破壊が防げなかったものと思われる。一方、透過型電子顕微鏡の場合、エポキシ樹脂で試料全体を固定しており、切片作製の段階で試料が壊れることはほとんどない。そのため、電子顕微鏡観察においては、筋細胞間に隙間が生じなかったものと思われる。しかしながら、隙間が生じないかわり、筋細胞間の区別が不明瞭になっており、この部位において加熱により構造破壊が起こっていると考えられる。一方、生肉において認められた、コラーゲン繊維が集合している部分 (Fig. 3B) では、60分間の加熱後において、やや繊維の太さが細くなっているものの、繊維構造は維持されたままであり、この部分のコラーゲンはゼラチン化をあまり起こしていないものと思われる (Fig. 3D)。これらの結果は、集合して存在している部分のコラーゲンは比較的ゼラチン化しにくいのに対し、筋細胞の間に存在すると考えられるコラーゲンはそれよりも熱に対して不安定であることを示している。

(3) 加熱によるコラーゲンのゼラチン化

コラーゲンのゼラチン化率をFig. 5に示した。実際のHyp量の測定値は、生肉の水溶性画分中の総Hyp量: $1.616 \mu\text{mol/g}$ 、加熱肉の水溶性画分中の総Hyp量: 2.409, 3.038, $3.500 \mu\text{mol/g}$ (各10, 30, 60分間加熱)、生肉全体のHyp含量: $7.525 \mu\text{mol/g}$ 、であった。この結果より、60分間の加熱の間、コラーゲンのゼラチン化率は上昇を続けたが、60分加熱後においてもゼラチン化率は31.9%にとどまり、約70%のコラーゲンはゼラチン化を起こさなかった。この約70%のコラーゲンは顕微鏡観察において認められた、コラーゲン繊維が集合している部分のコラーゲンか、あるいは、加熱後も残存していた表皮のコラーゲンであると思われる。一方、ゼラチン化した約32%のコラーゲンは、筋細胞の間を結合しているコラーゲンと思われる。同じ筋肉内のコラーゲンでありながらこのように加熱による影響が異なる原因として、存在部位によるコラーゲンの性質の違いが考えられる。コラーゲンには異なる分子種の存在が報告されており (永井と藤本 1985)、イカ筋肉の場合も2種類のコラーゲンの存在が報告されている (Mizuta *et al.* 1995)。分子種が異なると、その存在部位も異なることが畜肉とクルマエビにおいて報告されており (Duance *et al.* 1977, Mizuta *et al.* 1992)、今回の結果からイカにおいても同様のことが考えられる。

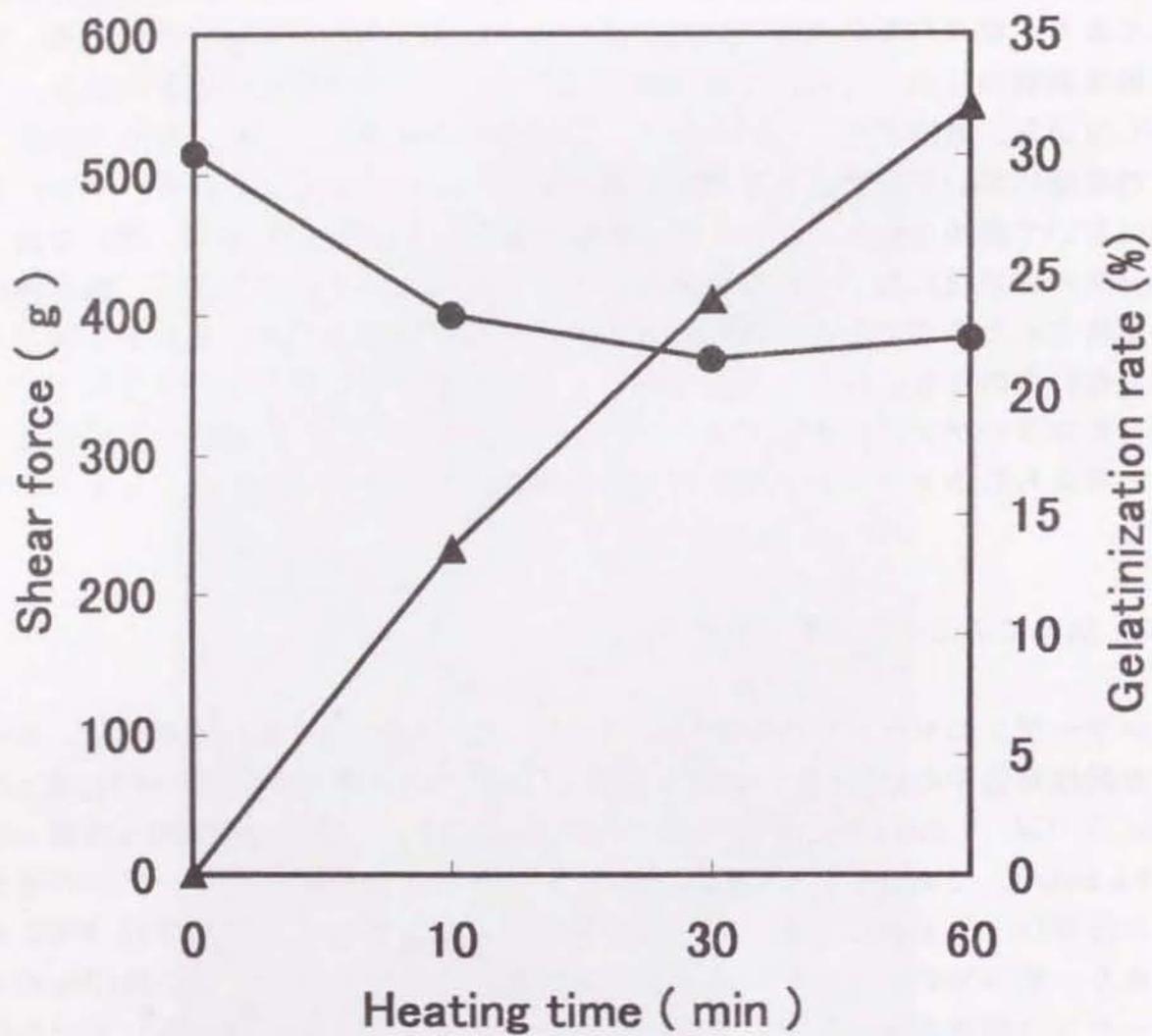


Fig. 5: Change in the gelatinization rate of collagen during heating for 60 min. ▲, gelatinization rate calculated by the determination of hydroxyproline; ●, shear force values for raw and heated cuttlefish mantle as shown in Fig. 2.

4. 考察

イカ肉は特殊な構造を有するとともに、調理学的にも同じ水産生物である魚類の筋肉とは大きく異なる。魚肉の場合、加熱により構造的にかなり破壊される (Kano *et al.* 1988, Hatae *et al.* 1990)。これは魚類の生息温度が哺乳類等に比べて低く、そのためタンパク質の耐熱性が小さいことが原因と考えられる。しかしながら、イカの場合も生息温度には魚類と大きな隔たりがないにもかかわらず、加熱後の筋肉の微細な構造はかなり保存されており、魚類の場合とは大きく異なる。今回の実験結果では、イカの筋細胞間の境界が加熱により不明瞭になった。この部位には、一般的には細胞膜と結合組織が存在するが、本章では、部分的に細胞同士が融合した様子が認められた (Fig. 3C)。また筋細胞の縞模様はやや不明瞭になり、これらは熱変性によるタンパク質の凝集が原因と思われた。一方、アオリイカを30分加熱した場合、筋細胞の縞模様が消失するとともに、細胞間が分離することが報告されており (Kugino *et al.* 1994)、本章の結果とはやや異なる。このような違いが生じた理由として、材料として用いたイカの種類の違い以外に、生と凍結品との違いが考えられる。すなわち、Kugino *et al.* (1994) が用いたイカは生の活けイカであるのに対し、今回用いたのは冷凍イカの解凍品であった。生のイカの場合、筋肉中の様々なプロテアーゼがその活性を維持していると考えられるため、加熱時にこれらが働き、構造破壊を引き起こした可能性がある。冷凍イカの場合、凍結変性により酵素が失活している可能性があり、そのために筋肉の構造が維持されたのかもしれない。また、Stanley and Hultin (1982) は生のイカと凍結解凍したイカについて加熱後の硬さを比較し、ケンサキイカにおいては凍結解凍したほうが硬いことを報告している。この点について彼らは、ホルムアルデヒドの生成によりタンパク質に架橋ができたためであろうとしている。一般に調理に用いられるイカは凍結解凍品が多く、その際には本研究で認められた程度の構造変化が起こるにとどまっていると思われる。つまり、筋細胞の構造変化が小さいにもかかわらず加熱により柔らかくなることから、凍結解凍したイカ肉が加熱により柔らかくなることについては、筋細胞の構造変化の関与は小さいと思われた。

筋細胞の間は非常にせまいが、そこに細胞膜以外の構造物がところどころに認められる (Fig. 4)。今回、コラーゲンのゼラチン化率は60分加熱後において約32%であり、かなり部分的なゼラチン化が起こっていると思われる。表皮 (Fig. 2C) や Fig. 3B に認められたコラーゲンが集合している部分では、コラーゲン繊維の構造変化は小さかったことから、ゼラチン化した32%のコラーゲンは

主に筋細胞の間に存在するものと思われた。イカ筋肉のコラーゲンの変性温度についての報告は見あたらないが、今回、100℃-60分間加熱においても約70%のコラーゲンがゼラチン化しなかったことから、かなり耐熱性の大きなコラーゲンであると思われるが、イカの皮膚と軟骨のコラーゲンについての報告 (Kimura and Karasawa 1985) によれば、それらの変性温度は25℃前後にすぎない。この違いの原因はコラーゲン分子の非らせん部分にあると考えられる。Kimura and Karasawa (1985)の報告においては、コラーゲン分子はペプシン消化を受けており非らせん部分を失っている。分子状に分散したコラーゲンの場合ならば、非らせん部分の有無に関係なく、変性温度は同じである (西原と宮田 1962)。しかしながら、本研究のようにコラーゲン繊維を形成している場合、コラーゲン分子は非らせん部分において分子間架橋を形成しており (永井と藤本 1982)、加熱によっても容易には分子はゼラチンとなって遊離することはできない。それゆえ、結果的にゼラチン化率が約32%にとどまったと考えられる。また、イカ筋肉のコラーゲンが魚類筋肉のコラーゲンに比べゼラチン化しにくいことや、同じイカの筋肉内でも、ゼラチン化のしやすさがコラーゲン繊維の存在部位により異なるのは、それぞれのコラーゲン分子において、分子間架橋量の違いがあるためと考えられる。

本章の結果より、イカ筋肉は加熱により柔らかくなるが、それは筋細胞の構造破壊によることと共に、一部のコラーゲンがゼラチン化するためであると考えられた。

5. 要約

凍結解凍したモンゴウイカ外套膜の加熱による物性および構造の変化を調べた。その結果、レオメーターを用いた剪断力の測定結果から、加熱により柔らかくなることが確認された。また光学顕微鏡による観察によれば、加熱の進行にともない筋細胞間に間隙が生じたが、透過型電子顕微鏡観察によればこの間隙は認められなかった。この結果、光学顕微鏡観察において認められた間隙は人工産物である可能性が高いが、このことは筋細胞間の結合力の低下を示すものと思われた。また、コラーゲンのゼラチン化率は加熱60分後に約32%まで上昇した。

以上の結果より、モンゴウイカ凍結解凍筋肉は加熱により柔らかくなるが、これは筋細胞の構造破壊以外に、筋細胞の間に存在する比較的少量のコラーゲンのゼラチン化によるものと考えられた。

6. 引用文献

Duance, V. C., Restall, D. J., Beard, H., Bourne, F. J., and Bailey, A. J. (1977) The Location of Three Collagen Types in Skeletal Muscle, *FEBS Lett.*, 79, 248~252

畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎 (1986) 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与, 日本水産学会誌, 52, 2001~2007

Hatae, K., Yoshimatsu, F., and Matsumoto, J. J. (1990) Role of Muscle Fibers in Contributing Firmness of Cooked Fish, *J. Food Sci.*, 55, 693~696

Kanoh, S., Polo, A. M. J., Kariya, Y., Watabe, S., and Hashimoto, K. (1988) Heat-induced Textural and Histological Changes of Ordinary and Dark Muscles of Yellowfin Tuna. *J. Food Sci.*, 53, 673~678

Kimura, S., and Karasawa, K. (1985) Squid Cartilage Collagen: Isolation of Type I Collagen Rich in Carbohydrate, *Comp. Biochem. Physiol.*, 81 B, 361~366

Kolodziejska, I., Shikorski, Z. E., and Sadowska, M. (1987) Texture of Cooked Mantle of Squid *Illex argentinus* as Influenced by Specimen Characteristics and Treatments, *J. Food Sci.*, 52, 932~935

Kugino, M., and Kugino, K. (1994) Microstructural and Rheological Properties of Cooked Squid Mantle, *J. Food Sci.*, 59, 792~796

久木野睦子 (1994) イカ外套膜の破断特性にみられる異方向性とその現象に及ぼす加熱温度の影響, 活水論文集, 37, 21~28

Kugino, M., and Kugino, K. (1995) Changes in the Microstructure and Rheological Properties of Squid Mantle due to Cooking in a NaCl Solution and Soy Sauce, *J. Home Econ. Jpn.*, 46, 751~757

Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., Suzuki, T., and Sakaguchi, M. (1992) Immunohistochemical Localization of Genetically Distinct Types of Collagen in Muscle of Kuruma Prawn *Penaeus Japonicus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 103B, 917~922

Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., and Sakaguchi, M. (1995) Immunohistochemical Identification of Distinct Molecular Species of Collagen in Squid Muscle and Skin, *Fisheries Sci.*, 61, 993~997

Moon, T. W., and Hulbart, W. C. (1975) The Ultrastructure of the Mantle Musculature of The Squid *Symplectoteuthis oualaniensis*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B, 145~149

永井 裕, 藤本大三郎 (1982) 『コラーゲン代謝と疾患』講談社, 東京, 69~85

永井 裕, 藤本大三郎 (1985) 『コラーゲン実験法』講談社, 東京, 31~50

内藤文子, 高橋節子, 佐藤之紀, 野口 駿, 内藤 博, 田中直義 (1996) 真空調理法がスルメイカの物性および食味特性におよぼす影響, *家政誌*, 47, 153~159

Nakayama, T., Kimata, T., and Ooi, A. (1990) Texture of Raw and Cooked Fish Muscle Investigated by Sensory and Instrumental Evaluations, *Nippon Syokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 988~996

西原富雄, 宮田暉夫 (1962) コラーゲンに対する酵素の作用と不溶性コラーゲン繊維の構造, *Collagen Symposium*, 3, 66~93

野崎洋光, 成瀬宇平 (1992) 『魚調理の「こつ」』柴田書店, 東京, 43~49

Ochiai, Y., Kariya, Y., Watabe, S., and Hashimoto, K. (1985) Heatinduced Tendering of Turban Shell (*Batillus cornutus*) Muscle, *J. Food Sci.*, 50, 981~984

Olaechea, R. P., Ushio, H., Watabe, S., Takada, K., and Hatae, K. (199

3) Toughness and Collagen Content of Abalone Muscles, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 6~11

Otwell, W. S., and Hamann, D. D. (1979) Textural Characterization of Squid (*Loligo pealei* L.) : Instrumental and Panel Evaluations, *J. Food Sci.*, 44, 1636~1643

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., and Shimizu, Y. (1986) Collagen Content in the Muscle of Fishes in Association with Their Swimming Movement and Meat Texture, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 1595~1600

Stanley, D. W., and Hultin, H. O. (1982) Quality Factors in Cooked North Atlantic Squid, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 15, 277~282

第4章

凍結解凍した数種イカ外套膜の加熱調理による物性変化とコラーゲンの可溶化

1. 緒言

第3章において、モンゴウイカの外套膜を沸騰水中で加熱した場合、コラーゲンのゼラチン化率の増大にともない、筋細胞間の結合力が低下し、その結果加熱肉の物性が軟化するという機構の存在が推定された。ところで、イカの種類は非常に豊富であり、モンゴウイカにおいて認められた結果がそのまま他のイカ類にもあてはまるとは言い切れない。例えば魚類の場合では、加熱によって軟化する魚種と逆に硬化する魚種が存在しており注意が必要である。魚肉を加熱調理した場合、白身の魚では筋肉の物性は低下するが、赤身の魚では逆に硬くなる(畑江等 1986, Kanoh *et al.* 1988, Nakayama *et al.* 1990)。赤身の魚の筋肉が加熱により硬くなるのは筋形質タンパク質が筋細胞間において凝固するためとされている(Hatae *et al.* 1990)。イカ類においても筋形質タンパク質は存在しており、これらが加熱肉の物性に影響する可能性は十分にある。また、コラーゲンにしても変性温度は動物種により大きく異なるため、ゼラチン化率および物性の変化の過程をイカの種間で比較するのはきわめて重要である。

そこで本章では、イカ筋肉を加熱した場合の物性の変化をモンゴウイカ以外の4種類のイカについて調べるとともに、軟化の要因のひとつと考えられるコラーゲンについて、その加熱時における生化学的变化を調べ、物性変化への関与における、イカの種類による影響について検討した。

2. 材料および方法

(1) 材料

市販のケンサキイカ(*Loligo edulis*)、スルメイカ(*Todarodes pacificus*)、ムラサキイカ(*Onmastrephes bartrami*)、ヤリイカ(*Loligo bleekert*)の、凍結解凍品(凍結期間:10~30日間)を用いた。いずれも薄皮を剥いてから実験に供した。肉の厚みはそれぞれ5, 5, 7, 9mmであった。本試料は薄皮を剥いてあるので、表面には表皮の3-4層にあたる部分が残存すると思われる。本章では、この

残存する部分をさして表皮とよぶこととする。

(2) 剪断力の測定

表皮を含む(5-9)×10×30mmに切った試料(約10g)を精秤してから、沸騰した蒸留水約50mlの入ったビーカー2個に1個ずつ試料を入れ、それぞれ10分および30分間加熱した。加熱時間が終了した際、即座にレオメーター(株)不動工業、RT-1002A)により剪断力を測定した。また、未加熱の試料についても同様に剪断力を測定した。なお、アダプターにはカッターの替え刃を装着し、ステージのスピードは1mm/秒に設定した。剪断する方向は第1章の場合と同様に輪走筋を横断する方向とし、剪断は外套膜の表側から行った。

(3) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による水溶性タンパク質組成の分析

剪断力を測定後、試料を煮汁とともにホモジナイズし、10,000g、20分間遠心分離した後、上清を蒸留水で200mlにメスアップし、これを水溶性画分とした。また、未加熱の試料についても同様の操作を行い、水溶性画分を得た。各水溶性画分500 μ lをLaemmli(1970)の方法に従ってSDS処理した後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、コマシーブリリアントブルー R-250による染色、および7%酢酸水溶液による脱色を行い、水溶性タンパク質組成の加熱による変化を分析した。

(4) コラーゲンのゼラチン化率の測定

コラーゲンのゼラチン化率は第3章と同様の方法で測定した。

3. 結果

(1) 加熱による剪断力の変化

加熱による剪断力の経時的な変化をFig. 1に示した。いずれの種においても、10分加熱により大きく剪断力が低下し、その後30分までは、ケンサキイカを除いて徐々に低下した。ケンサキイカは10分から30分にかけて剪断力が若干上昇した(Fig. 1A)。しかしながら、生肉に比べると加熱肉の剪断力はいずれの種

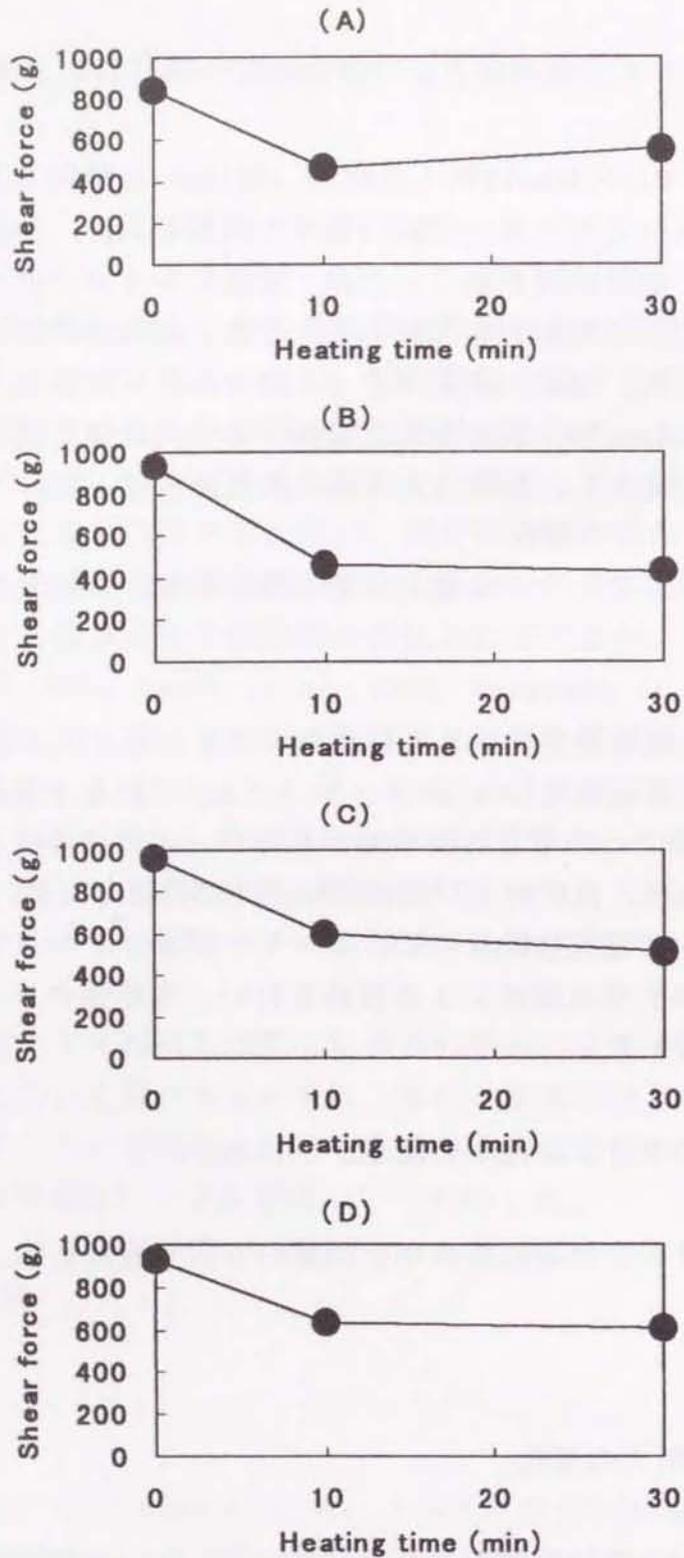


Fig. 1: Shear force values of raw and cooked squid mantles before and after heating in a boiling water. (A), long-finned squid; (B), Japanese common squid; (C), flying squid; (D), arrow squid.

においても低下しており、筋肉が加熱により軟化することが明らかとなった。加熱の間に筋肉は20%前後収縮し、外観は硬くなったように見えた。従来、イカ筋肉は加熱するほど硬くなると一般に考えられてきたが、それはこのような外見から判断された結果と思われる。

加熱により皮が収縮し、硬くなるという考え方もあるが(野崎と成瀬 1992)、今回は、薄皮を剥いた後の、表皮の上より筋肉を剪断しているため、皮の収縮によってもイカ肉の硬化は起こらないことを示したといえる。ただし、今回、ケンサキイカのみ認められた10分から30分にかけての硬化現象(Fig. 1A)については、筋肉の収縮がその原因とも考えられるが、他のイカにおいても収縮は認められたため、硬化にはその他の要因も関与していると思われる。

(2) 水溶性タンパク質組成の変化

水溶性タンパク質画分の電気泳動結果をFig. 2に示した。4種類のイカにおいていずれも、10分及び30分間加熱後において、異染性を示すタンパク質のバンドが認められた(矢印)。一方、同じバンドは未加熱試料の水溶性画分(c)には認められなかった。これらのバンドは、対照のブタ皮膚のI型コラーゲン(b)に認められる α 鎖のバンドとほぼ同じ分子量であること、さらに水溶性のタンパク質であることから、コラーゲンの熱変性によって生じたゼラチンと考えられる。また、それらのバンドの色の濃さは、10分よりも30分加熱の試料において濃くなっていた。これらの結果から、加熱時間の経過に伴い、筋肉の軟化と相関してコラーゲンのゼラチン化が進行していることがタンパク質のレベルで確認された。

(3) コラーゲンのゼラチン化率の変化

コラーゲンのゼラチン化率をFig. 3に示した。この結果から、30分の加熱の間、ゼラチン化率は上昇を続けたことが明らかとなった。この時、30分加熱後において、ゼラチン化率はケンサキイカ29.3%(Fig. 3A)、スルメイカ29.5%(Fig. 3B)、ムラサキイカ17.1%(Fig. 3C)、ヤリイカ16.3%(Fig. 3D)であり、イカの種類によって若干異なった。また、これらの数値から考えると、約70-80%のコラーゲンはゼラチン化を起こさなかったことになる。第1章においてはモンゴウイカを用いた実験で、約70%のコラーゲンが100°C-60分加熱によってもゼラチン化しないことを示した。この場合、ゼラチン化しなかったのは表皮、および筋肉の内部に存在する太い結合組織のコラーゲンであり、ゼラチン化した

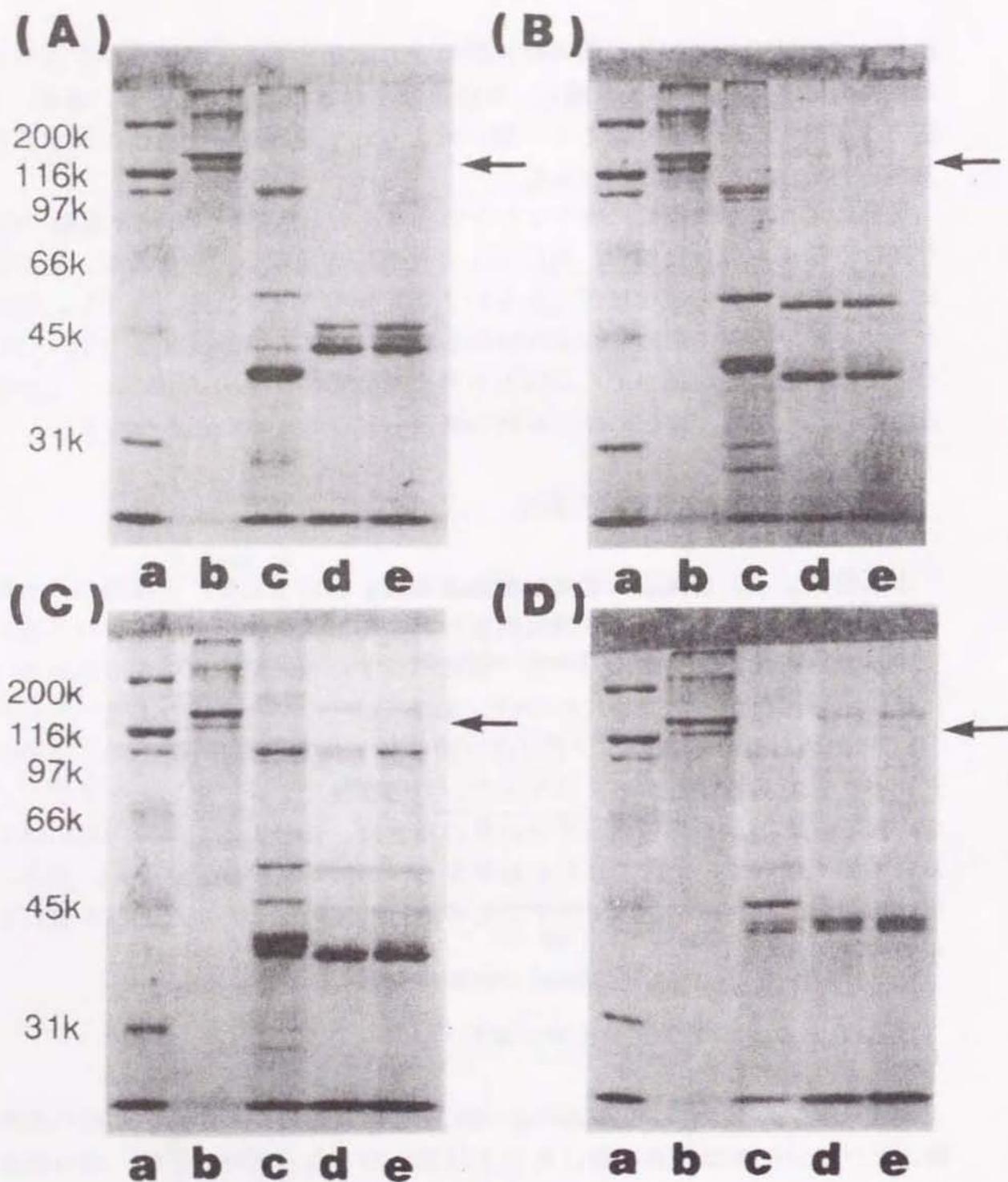


Fig. 2: SDS-PAGE analysis of water-soluble fraction of squid mantles. (A) , long-finned squid; (B); Japanese common squid, (C) ; flying squid, (D) ; arrow squid. Lane a; molecular weight marker, lane b; type I collagen of porcine skin. Lanes c, d, e are the water-soluble fractions of raw, 10 min-heated, and 30 min-heated samples respectively. Arrows show the metachromatic proteins.

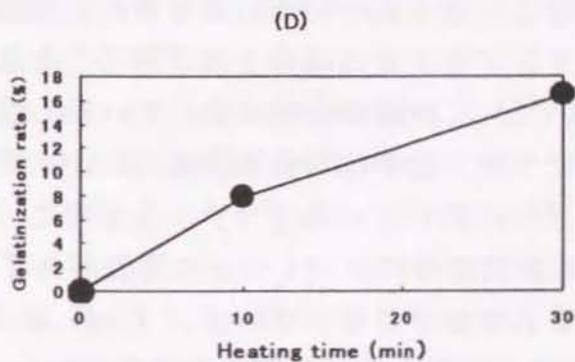
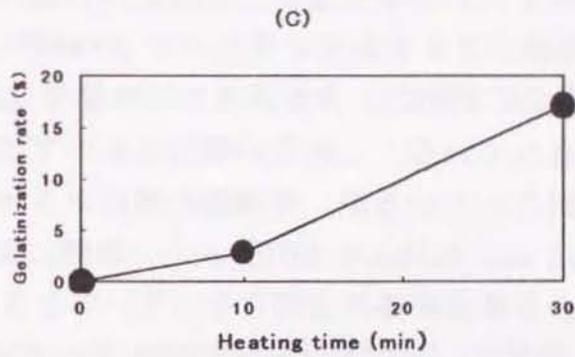
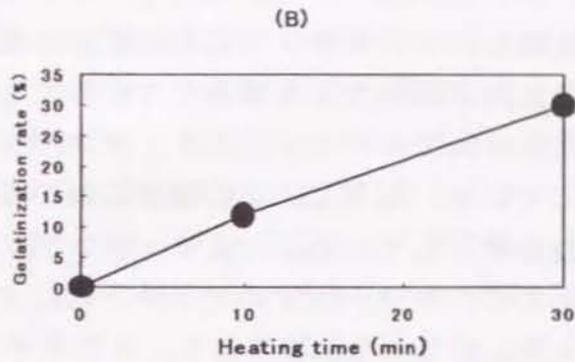
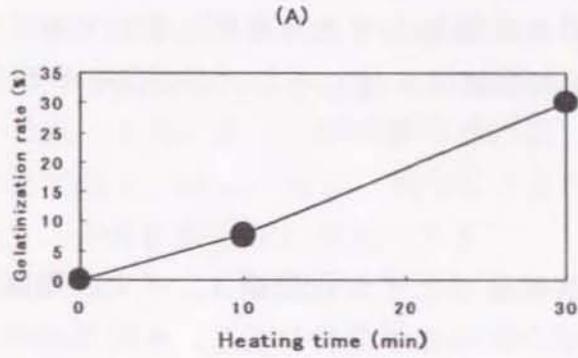


Fig. 3: Change of gelatinization rate of collagen during heating for 30 min. (A), long-finned squid; (B), Japanese common squid; (C), flying squid; (D), arrow squid.

のは筋細胞の間にわずかに存在するコラーゲンであると考えられた。本研究の結果は、モンゴウイカ以外の種類のイカ外套膜においても、加熱によってほぼ同様の変化が起こり、筋肉の軟化が起きていることを示していると思われる。

4. 考察

本章の結果より、凍結解凍したイカ外套膜は、イカの種類に関係なく、加熱により筋肉中のコラーゲンが一部ゼラチン化し、そのため硬さが低下することが確認された。Stanley and Hultin (1982) は生のイカと凍結解凍したイカについて加熱後の硬さを比較し、ケンサキイカにおいては、凍結解凍した試料の方が生に比べ、加熱後の筋肉が硬いことを報告している。この原因について彼らは、凍結中に発生したホルムアルデヒドにより、タンパク質分子の間に架橋ができたためであるとしている。ただし、この報告においても、やはり加熱の後では加熱前よりも物性は軟化している。つまり、タンパク質の分子間に何らかの架橋は形成されるものの、コラーゲンのゼラチン化による影響が大きく、結果的に軟化したものと思われる。これ以外にも、カナダマツイカ (Stanley and Hultin 1982)、アルゼンチンマツイカ (Kolodziejaska *et al.* 1987)、モンゴウイカ (久木野 1994)、アメリカケンサキイカ (Otwell and Hamann 1979)、アオリイカ (Kugino *et al.* 1994)、スルメイカ (内藤等 1995) などにおいて加熱による軟化が報告されている。これらの研究においては、コラーゲンのゼラチン化についても検討されているが、筋細胞の間にコラーゲン繊維の存在が認められないこと (Moon and Hulbert 1975) から、加熱によるイカ筋肉の軟化には筋細胞の熱変性による構造破壊が主因となっているとされている (Kugino *et al.* 1994)。しかし本研究においては部分的なコラーゲンのゼラチン化も軟化に大きく関与していることを示している (第3章)。今回、剪断力の変化、およびゼラチン化率がモンゴウイカの場合とほぼ同じことから、今回用いた4種類のイカ外套膜においても、同様の変化が生じていると思われる。

今回のコラーゲンのゼラチン化率は30分加熱後において約20-30%であり、ほぼ同様に一部のコラーゲンにおいてのみゼラチン化が起きていると思われる。ところで、コラーゲンの熱安定性にはいくつかの要因があげられる。ひとつは、コラーゲン分子中に含まれるヒドロキシプロリン (Hyp) およびヒドロキシリジン (Hyl) によるコラーゲン分子のらせん構造の形成である。このらせん構造が熱によりほどけたものがゼラチンであるが、HypおよびHylが多いほど水素結合による熱安定性が増加する。また、熱安定性に関係するもうひとつの要因として、コラーゲン分子の分子間架橋の存在があげられる。コラーゲン分子はそれ

それぞれが分子間架橋でつながり、コラーゲン繊維を形成するが、分子間架橋の量が多いほど、熱安定性が大きいとされている。以上のことから、30分間の加熱によってもなおゼラチン化しなかったコラーゲンは、ゼラチン化したコラーゲンに比較してHyp, Hyl, あるいは分子間架橋の量が多いことが推察される。これは、同じ筋肉であっても、著しく性質の異なるコラーゲンが存在することを示唆するものであり、非常に興味深い知見である。

5. 要約

加熱調理による、凍結解凍したイカ外套膜の硬さの変化を、ケンサキイカ、スルメイカ、ムラサキイカ、ヤリイカの4種類のイカについて調べた。レオメーターを用いた剪断力の測定結果から、イカ筋肉は種類にかかわらず、加熱により物性が軟化することが確認された。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析からは、加熱によりコラーゲンが変性してゼラチン量が増加することが明らかとなった。コラーゲンのゼラチン化率を、煮汁および加熱肉の水溶性画分中に含まれるヒドロキシプロリンの測定値から計算したところ、30分加熱後のゼラチン化率は16.3-29.5%であった。以上の結果より、凍結解凍したイカ外套膜は、イカの種類に関係なく加熱により軟化することが明らかになるとともに、この軟化には一部のコラーゲンのゼラチン化が関与している可能性が示唆された。

6. 引用文献

畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎 (1986) 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与, 日本水産学会誌, 52, 2001~2007

Hatae, K., Yoshimatsu, F., and Matsumoto, J. J. (1990) Role of Muscle Fibers in Contributing Firmness of Cooked Fish, *J. Food Sci.*, 55, 693~696

Kanoh, S., Polo, A. M. J., Kariya, Y., Watabe, S., and Hashimoto, K. (1988) Heat-induced Textural and Histological Changes of Ordinary and Dark Muscles of Yellowfin Tuna. *J. Food Sci.*, 53, 673~678

Kolodziejaska, I., Shikorski, Z. E., and Sadowska, M. (1987) Texture of

Cooked Mantle of Squid *Illex argentinus* as Influenced by Specimen Characteristics and Treatments, *J. Food Sci.*, 52, 932~935

Kugino, M., and Kugino, K. (1994) Microstructural and Rheological Properties of Cooked Squid Mantle, *J. Food Sci.*, 59, 792~796

久木野睦子 (1994) イカ外套膜の破断特性にみられる異方向性とその現象に及ぼす加熱温度の影響, 活水論文集, 37, 21~28

Laemmli K. U. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680~685

Moon, T. W., and Hulbart, W. C. (1975) The Ultrastructure of the Mantle Musculature of the Squid *Symplectoteuthis oualaniensis*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B, 145~149

内藤文子, 高橋節子, 佐藤之紀, 野口 駿, 内藤 博, 田中直義 (1996) 真空調理法がスルメイカの物性および食味特性におよぼす影響, 家政誌, 47, 153~159

Nakayama, T., Kimata, T., and Ooi, A. (1990) Texture of Raw and Cooked Fish Muscle Investigated by Sensory and Instrumental Evaluations, *Nippon Syokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 988~996

Otwell, W. S., and Hamann, D. D. (1979) Textural Characterization of Squid (*Loligo pealei* L.): Instrumental and Panel Evaluations, *J. Food Sci.*, 44, 1636~1643

Stanley, D. W., and Hultin, H. O. (1982) Quality Factors in Cooked North Atlantic Squid, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 15, 277~282

第5章

凍結解凍した数種イカ外套膜コラーゲンの加熱調理による構造変化

1. 緒言

第3章および第4章において、5種類の凍結解凍イカ外套膜について、加熱による筋肉の軟化にともなって全コラーゲンの約30%がゼラチン化することを示した。ところで第3章においてモンゴウイカを材料として用いた際、細胞間の狭い部分にも細胞以外の成分が存在すること、およびコラーゲンのゼラチン化に対応して細胞間の結合力が低下することを示し、ゼラチン化の軟化現象への関与が推察された。つまり、細胞間に存在するコラーゲンのゼラチン化が軟化に大きく影響していると考えられる。しかし、細胞間におけるコラーゲンの存在は予想されるものの、イカの筋細胞間の領域は非常に狭く、明瞭なコラーゲン繊維は観察されていない (Moon and Hulbart 1975)。この構造的な特徴もあって加熱による軟化の主因は筋細胞の構造破壊によると考えられている (Kugino and Kugino 1994)。コラーゲンの存在を組織学的に確認する場合、繊維構造やそこにある縞模様が大きな特徴となるが、基底膜のように必ずしも繊維構造をとらないコラーゲンの例もあり、イカ肉の筋細胞間の物質も繊維構造をもたないコラーゲンである可能性は否定できない。

この問題点を解決するために、本章ではOhtani (1987) のアルカリ浸軟/SEM法の応用を試みた。通常のSEM観察法では筋細胞が障害となり、その間に存在するコラーゲンを観察するのは困難である。しかしながら、本法は筋細胞を溶出することで残りのコラーゲンの観察を可能にするものであり、イカ筋肉のコラーゲンの構造を観察できる可能性がある。

本章では、5種類の凍結解凍イカ外套膜について、細胞間におけるコラーゲンの存在の確認、および細胞間に存在する組織の加熱による構造変化の観察を目的とした。

2. 材料と方法

(1) 材料

材料にはケンサキイカ (*Loligo edulis*)、スルメイカ (*Todarodes pacificu*

s), ムラサキイカ (*Ommastrephes bartrami*), モンゴウイカ (*Sepia officinalis*), ヤリイカ (*Loligo bleekert*) の外套膜を用いた。本実験では, 一般家庭における調理を想定し, 材料はいずれも量販店において販売されていたものを用いた。なお凍結解凍の有無による影響を避けるため, いずれの試料も凍結品 (凍結期間 1~3 ヶ月) の表示のあるものを用いた。いずれも薄皮を剥いてから実験に供した。肉の厚みはそれぞれ 5, 5, 7, 10, 9mm であった。

(2) 試料の加熱と固定

試料をカミソリの刃で, (肉の厚さ) × 10 × 10mm に切り, 沸騰した蒸留水 (100℃) 約 100ml の入ったビーカーに入れ, 30 分間ガスバーナーで加熱し, 水温を 100℃ に保った。沸騰水中で 30 分間加熱した後, 5% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) に 1 日以上浸漬して固定し, 組織観察用試料とした。また, 未加熱の試料についても同様に固定した。

(3) 透過型電子顕微鏡による微細構造の観察

固定したサンプルから, カミソリの刃で 1 × 1 × 3mm の小片を切り出し, 1% オスミウム酸による後固定を行ったのち, 50-100% エタノールによる脱水を行い, プロピレンオキシドで置換して, エポン樹脂 (Epok812, 応研商事) に包埋した。次に樹脂ブロックからウルトラミクロトーム (デュポン, MT-6000) を用いて超薄切片を作製した。切片は酢酸ウラン, クエン酸鉛各溶液による二重染色を行い, 透過型電子顕微鏡 (TEM, 日立, H-800) により加速電圧 100kV で観察した。

(4) アルカリ浸軟法による結合組織構造の観察

大谷の方法 (Ohtani 1987) を一部改変して, 結合組織の観察を行った。まず, 固定したサンプルからカミソリの刃で 2mm 角の小片を切り出し, 10% NaOH に 20℃ で 3 日間および 14 日間浸漬し, 細胞成分を溶出した。次に 1% 食塩水で洗浄したのち, 1% オスミウム酸で後固定した。1% 食塩水で洗浄後, 1% タンニン酸に室温で 30 分間浸漬して組織を強化した。1% 食塩水で洗浄後, 50-100% エタノールで脱水し, t-ブタノールに置換し, 冷蔵庫中で凍結させた。続いて凍結乾燥を行い, 乾燥後, 試料台にカーボンペーストではりつけ, イオンスパッタリングにより金蒸着し, 加速電圧 10kV にて走査型電子顕微鏡 (SEM, 日本電子, LV-54

00) により観察した。

また、SEM観察を終了したサンプルについて、試料台よりはがし、プロピレンオキシドに置換後、上記と同様にTEMによる観察を行った。これとは別に、10%NaOHにより細胞成分を溶出し、1%食塩水で洗浄したサンプルについても、樹脂に包埋しTEMにより観察した。

(5) 10%NaOH処理試料のアミノ酸組成の分析

未加熱のモンゴウイカ筋肉を14日間アルカリ処理した後、その残存物を1%食塩水により洗浄後、6M HClで加水分解(150℃, 1時間)したのち、アミノ酸分析機(日立, L-8500)により構成アミノ酸の組成を調べた。また未加熱のモンゴウイカ筋肉より、0.1M NaOHを用いて抽出したコラーゲン(Sato *et al.* 1988)と、ヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジンの標品についても、5%グルタルアルデヒドおよび10%NaOHで処理した後、同様にアミノ酸分析機による分析を行った。

3. 結果

(1) 加熱による微細構造の変化

TEMによる観察結果をFig. 1に示した。ヤリイカ(Fig. 1E)を除く生肉(Fig. 1A-D)では筋細胞の横断面に特徴的な縞模様が認められた。また筋細胞の間には筋細胞以外の構造物が明らかに存在していた。細胞間には一般的に結合組織が存在するため、これらの構造物はコラーゲンにより形成される結合組織と考えられるが、この観察法においてはコラーゲンの繊維構造は認められなかった。次に加熱後の筋肉の微細構造を見てみると、筋細胞の縞模様が未加熱の試料よりもやや不明瞭となっており、加熱変性による凝集などが起こっていると考えられた(Fig. 1F-J)。また、筋細胞間の境界が不明瞭になったり、あるいは不定形の凝集物が認められており、この部位においても加熱による構造破壊が起こっていると考えられた。なお、モンゴウイカについては第3章において同様の結果を報告している(Fig. 1I)。また、細胞間に点在する、コラーゲン繊維の集合体(第3章, Fig. 2A, 矢印)はいずれのイカにおいても認められたが、顕著な構造変化は生じなかった(data not shown)。これらの結果は、第3章において示したモンゴウイカの場合とほぼ同様の変化が他のイカにおいても生じていることを示している。なお、構造変化が認められなかったコラー

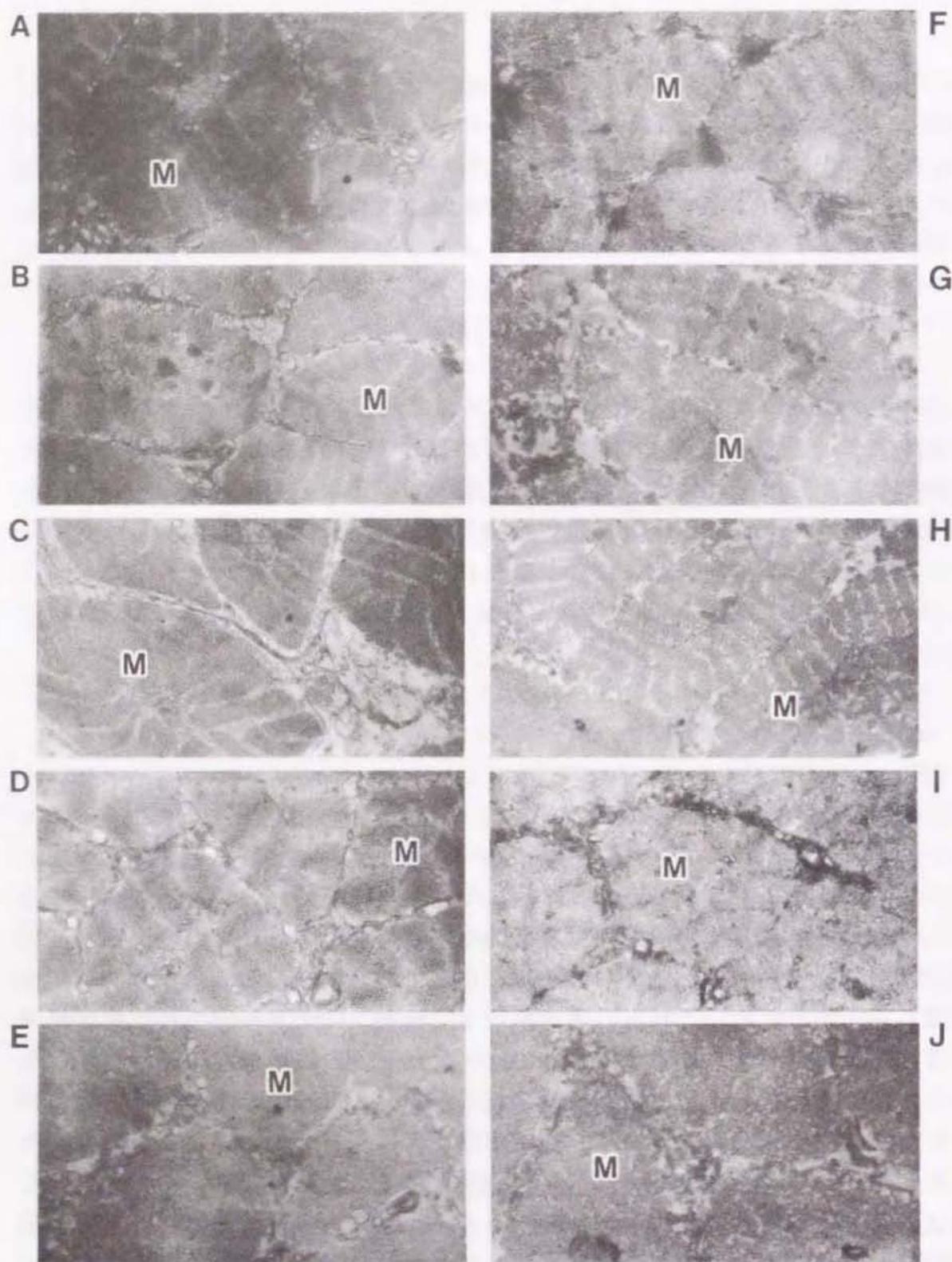


Fig. 1: Transmission electron microscopic photographs of the cross-section of raw muscle (A-E) and 30min-heated (F-J) squid mantles. A and F, long-finned squid; B and G, Japanese common squid; C and H, flying squid; D and I, cuttlefish; E and J, arrow squid. M, muscle cell. The bar represents $1\ \mu\text{m}$.

ゲンの集合体は、加熱によってゼラチン化しない約70%のコラーゲンと考えられるが、ゼラチン化しない原因については後に考察する。

(2) 3日間のアルカリ処理による結合組織の立体構造の観察

モンゴウイカの未加熱試料の細胞間物質の構造についてSEMで観察した結果をFig. 2Aに示した。3日間のアルカリ処理によって細胞成分が溶出され、残った物質の立体構造が明瞭に認められた。筋細胞が消失したあとに形成される穴の直径は $20\mu\text{m}$ 以下であった。また、哺乳類 (Ohtani 1987) や魚類 (Ando *et al.* 1992; Itoh *et al.* 1992; Ando *et al.* 1995) のような明確な蜂の巣状の構造はとらず、アワビの例に見られるように複雑に入り組んでおり (Hatae *et al.* 1995)、筋細胞の方向性が一定ではないことがうかがわれた。

一方、加熱試料の場合、加熱変性により筋細胞の溶解性が未加熱の場合とは異なったため、3日間のアルカリ処理では細胞成分が溶出されなかった (Fig. 2B)。

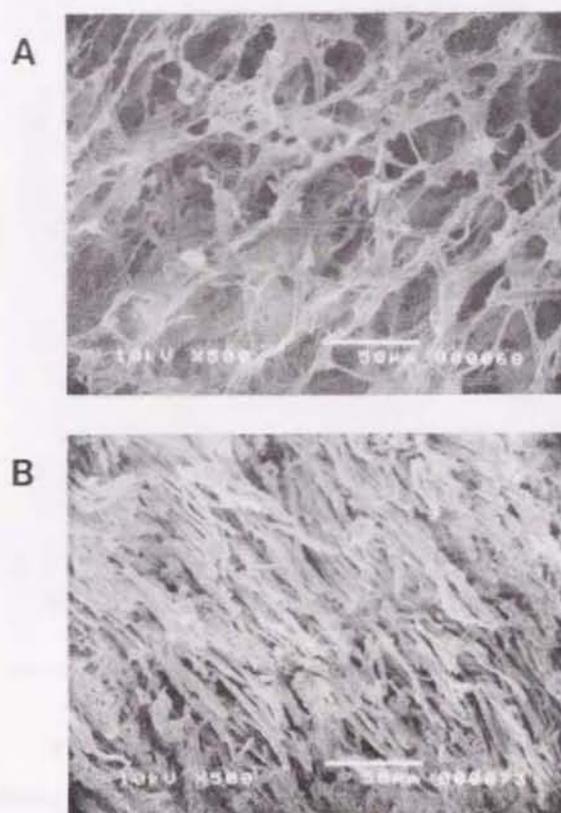


Fig. 2: Scanning electron microscopic photographs of raw (A) and 30min-heated (B) cuttlefish mantles after 10% NaOH maceration for 3 days at 20°C . The bars represent $50\mu\text{m}$.

次に、SEMで観察したNaOH処理後の未加熱試料を樹脂に包埋し、超薄切片を作製してTEMにより観察した (Fig. 3)。筋細胞が溶出された跡が空洞 (M) になっており、空洞の間にはSEMで観察した構造物の断面が認められた (C)。これは細胞間に存在する物質であるため、コラーゲンを主成分とする結合組織であると思われたが、明瞭なコラーゲンの繊維構造が認められないため、これだけではコラーゲンを主とする結合組織であると断定することはできなかった。

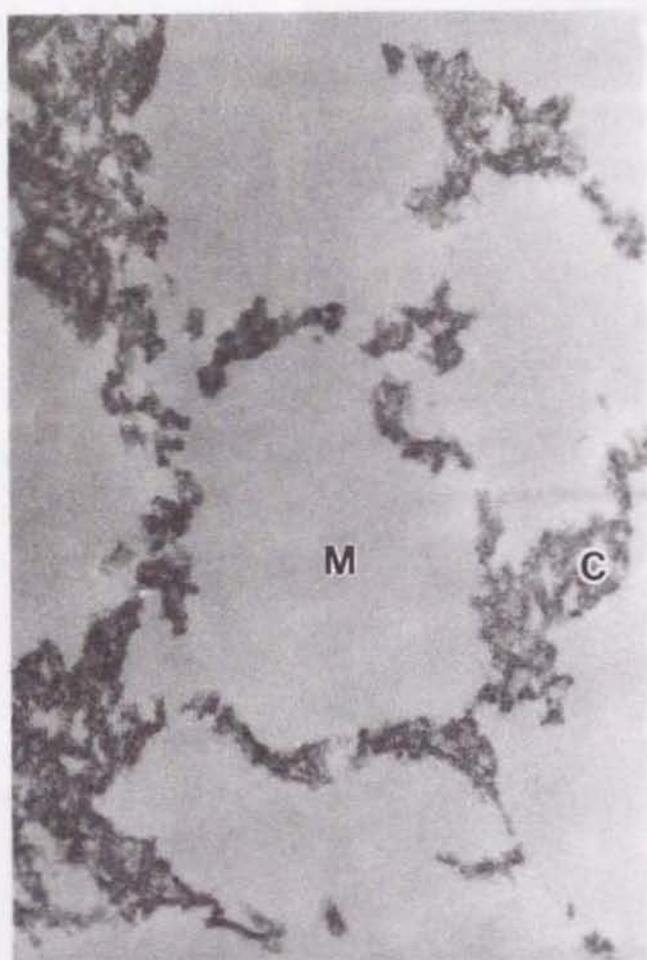


Fig. 3: Transmission electron microscopic photograph of the sample which shown in Fig. 2A. M shows the void after elution of the muscle cell; C is unidentified material which was not eluted by 10% NaOH maceration. The bar represents 1 μ m.

そこで未加熱のモンゴウイカ筋肉をアルカリ処理した後の試料について、アミノ酸組成を分析した (Fig. 4A)。その中で、コラーゲンの特徴であるヒドロキシリジン (Hyl) が検出され (Fig. 4A)，その全アミノ酸組成は実際に抽出したコラーゲンを同様に処理した場合と、ほぼ同じであった (Fig. 4B)。なお、Fig. 4Cはヒドロキシリジンの標品について同様の処理を行った場合であるが、この時の保持時間はグルタルアルデヒドおよびアルカリ処理を行わない場合と一致していた。また、ヒドロキシプロリンについては保持時間が大きく変化したためと思われるが、標品のピークが認められず、ヒドロキシプロリンの存在は確認できなかった。これらの結果から、アルカリ処理中に溶解せず、最後まで残存した物質は大部分がコラーゲンによって構成されていることが明らかとなった。

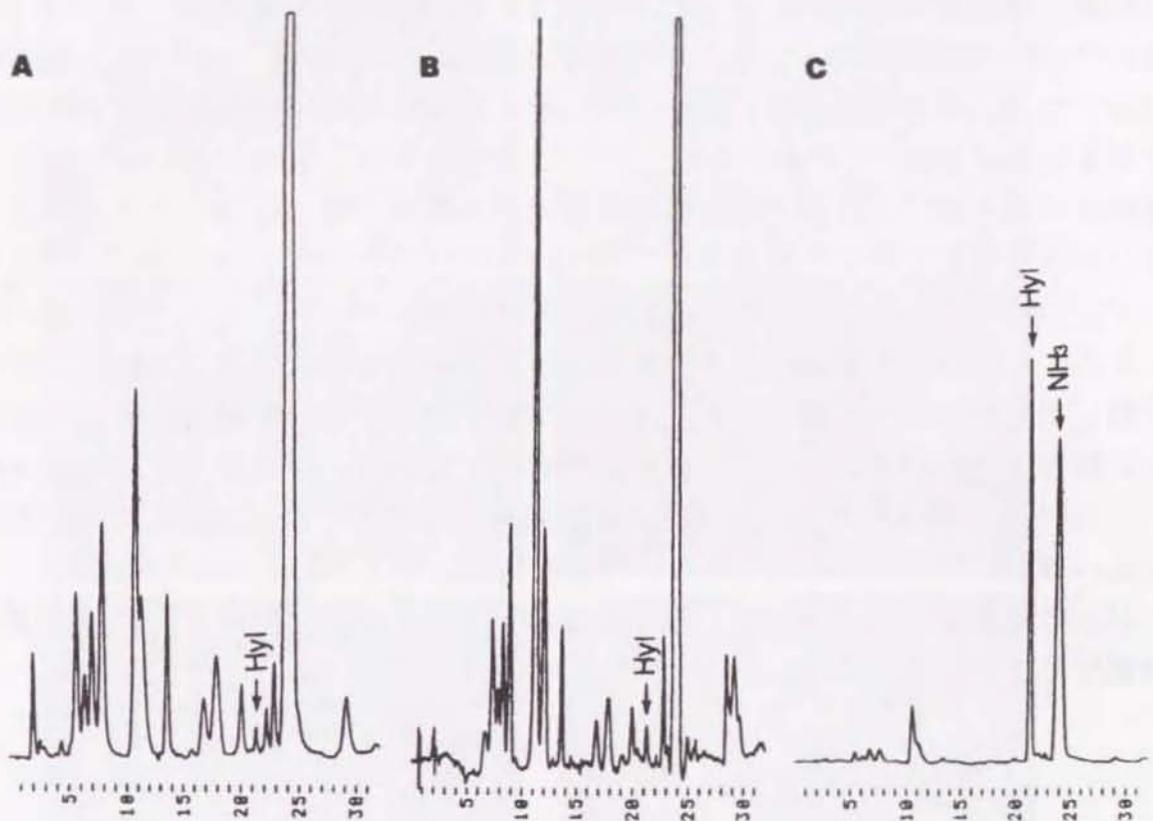


Fig. 4: Chromatogram from the amino acid analysis after hydrolysis by 6M HCl. A, cuttlefish mantle residue after 10% NaOH maceration; B, extracted collagen from cuttlefish mantle following 5% glutaraldehyde and 10% NaOH preparation; C, hydroxylysine standard which was hydrolyzed by 6M HCl after 5% glutaraldehyde and 10% NaOH preparation.

この結果は、SEMで観察された細胞間の構造物がコラーゲンにより形成されていることを示すものである。これまでイカの細胞間の構造物については、細胞間がほぼ密着していたこともあり、コラーゲンの存在は明確にされておらず (Moon and Hulbart 1975)、わずかに結合組織様の構造物についての記述があるにすぎなかった (田中 1958)。今回の実験結果は、イカ筋肉の細胞間にもコラーゲンが存在することを明確に示すものである。

(3) 加熱による結合組織の構造変化

加熱試料の場合、3日間のアルカリ処理では細胞成分が溶出されなかったため (Fig. 2B)、外観的に試料の色が半透明になるまでアルカリ処理を続けたところ、20℃の状態ですら約2週間を要したが、これにより細胞成分が溶出され、結合組織の構造観察が可能となった。そこで、未加熱試料・加熱試料ともに2週間のアルカリ処理を行った後、SEMにより観察した (Fig. 5)。未加熱試料においては、結合組織の特に細かいコラーゲン繊維が複雑に入り組んでいる構造が明瞭に認められた (Fig. 5A-E)。一方、加熱試料においては細かいコラーゲン繊維はあまり認められず、全体に凝集が生じ、繊維が幅広くなったり、構造が部分的に崩壊した様子が観察された (Fig. 5F-J)。この変化は加熱によるコラーゲンのゼラチン化により生じたものと思われた。

また、細胞成分を溶出した後、そのままエポキシ樹脂に包埋して超薄切片を作製しTEMにより観察すると、未加熱試料においては、筋細胞が溶出したあとの結合組織が細胞の形をはっきりと残している様子が観察された (Fig. 6A-E)。一方、加熱後の試料では多くの結合組織の構造が破壊され、未加熱の試料に比べ細胞の形がわかりにくくなっていた (Fig. 6F-J)。

以上の結果は、イカ外套膜の結合組織が、イカの種類に関係なく加熱により崩壊することを示している。

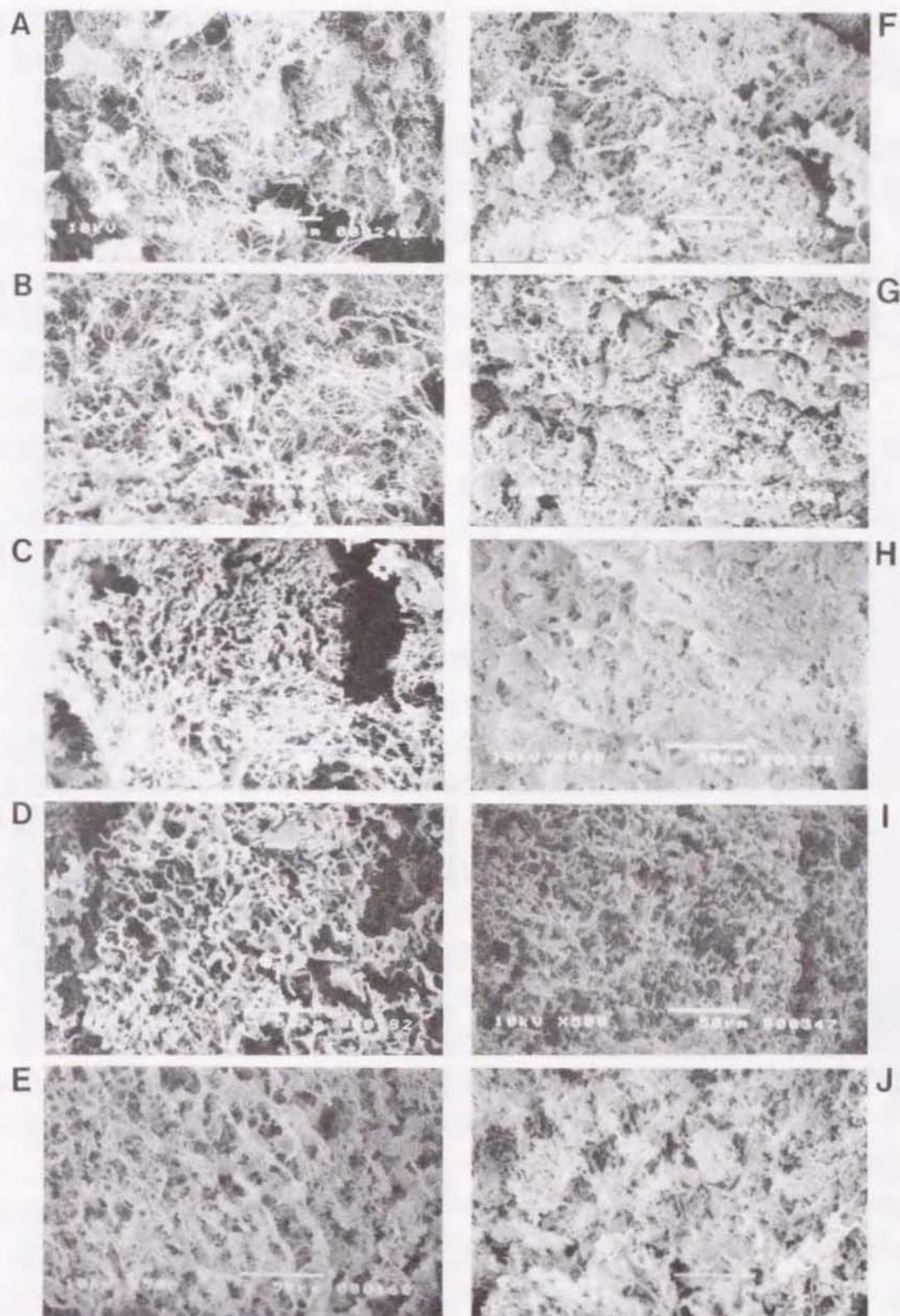


Fig. 5: Scanning electron microscopic photographs of raw (A-E) and 30min-heated (F-J) squid mantles after 10% NaOH maceration at 20°C for 14 days. Samples A-J are the same as those defined in Fig. 1. The bars represent 50 μ m.

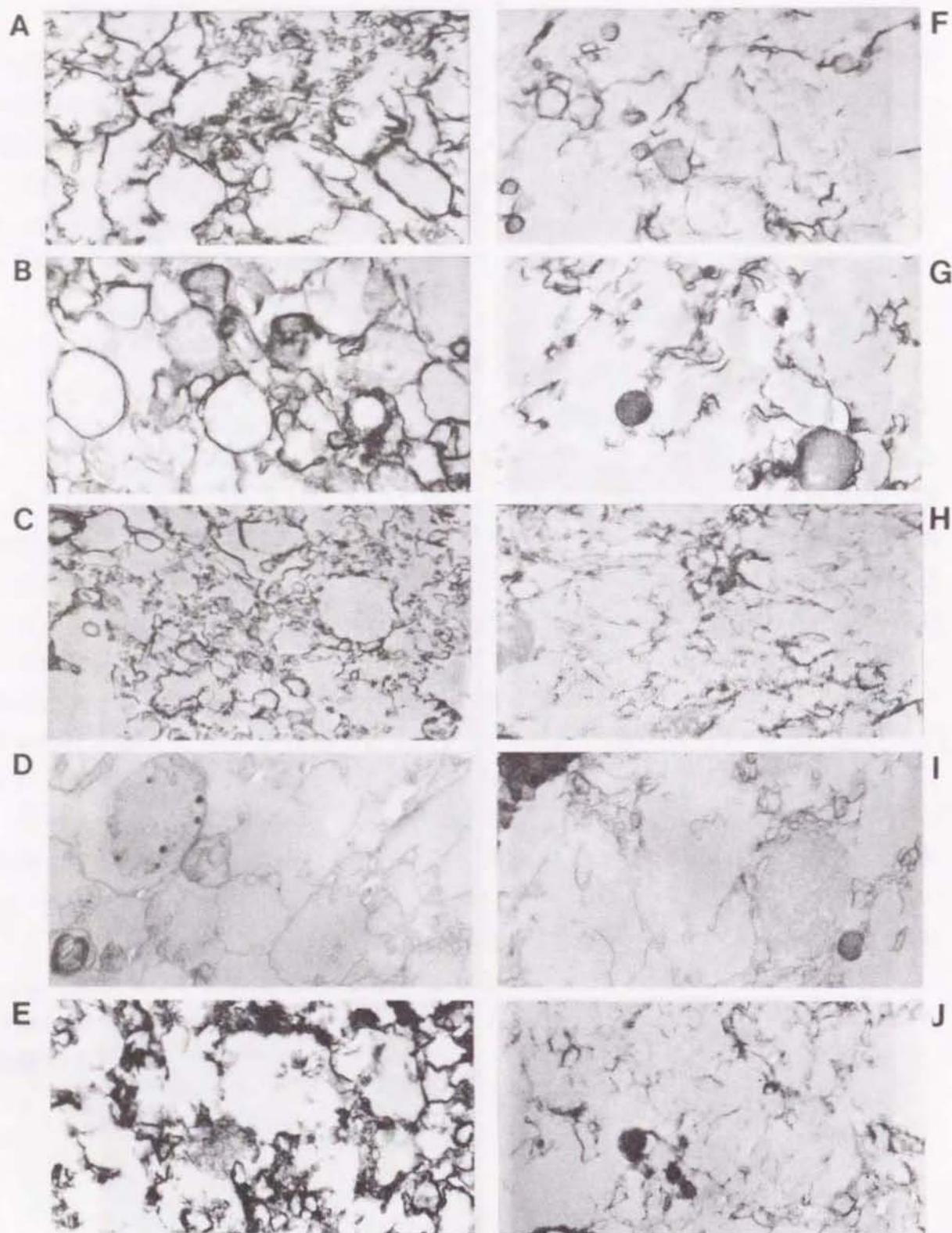


Fig. 6: Transmission electron microscopic photographs of raw (A-E) and 30min-heated (F-J) squid mantles after 10% NaOH maceration at 20°C for 14 days. Samples A-J are the same as those defined in Fig. 1. The bar represents 1 μ m.

4. 考察

アルカリ浸軟/SEM法は特に哺乳類において様々な組織の結合組織の観察に利用されてきたが、最近では、魚類や貝類における結合組織の構造の観察にも用いられており、筋肉の物性との関係が報告されている (Ando *et al.* 1992; Itoh *et al.* 1992; Ando *et al.* 1995; Hatae *et al.* 1995)。今回のアルカリ処理においては、特に温度が重要であった。原報 (Ohtani 1987) においては処理温度を室温としているが、試料を実験室内に放置した場合、夏と冬とでは室温が大きく異なり、結果的に溶出効率に差が生じた。特に溶出しにくい加熱試料の場合、室温でアルカリ処理すると、溶出速度の違いが原因となり観察される構造に高い再現性が得られなかった。そのため、温度はインキュベーターなどで正確に管理し、それぞれの試料にあった溶出条件を設定することが重要である。

本章において、イカ筋肉の結合組織の立体構造がはじめて観察された。骨格筋は通常、筋細胞が並行して規則的に配列しており、その間に存在する結合組織は明瞭な蜂の巣状の構造をもつ。しかし、今回のイカ類においては筋細胞の方向性は多様であり、規則性があまりないため、結合組織も明瞭な蜂の巣状の構造をもっていなかった。逆に、このような規則性のなさが筋肉の柔軟性を生み出しているとも考えられる。

第3章および第4章において、加熱したモンゴウイカ外套膜では筋細胞間の結合力が低下すること、およびこれと相関してコラーゲンのゼラチン化が進行することを報告した。この場合、細胞間に存在すると思われるコラーゲンのゼラチン化により筋肉の軟化が生じると考えられたが、細胞間の狭い部分はコラーゲン繊維が明確に観察されなかったため、断定はできなかった。たとえば、Moon and Hulbart (1975) はイカ筋肉の構造をTEMで詳細に観察しているが、その際、筋細胞は密着しており、細胞間のコラーゲンの存在は認めていなかった。このような構造的特徴もあって、加熱によるイカ肉の物性変化に対しては筋細胞の熱変性による影響が主に注目されてきた。しかしながら今回の研究結果において、細胞間の狭い部分にもコラーゲンが存在すること、またこれらの構造が加熱により変化することがわかり、その影響が示唆された。

今回用いた5種類のイカ外套膜の場合、30分加熱により約30%のコラーゲンは溶解するが、70%前後のコラーゲンは不溶性のままである (第3章; 第4章)。この不溶性コラーゲンの由来は明らかではないが、細胞間に点在するコラーゲン繊維の集合体に由来しているとも考えられる。このようなコラーゲンの溶解性の違いの原因としては、コラーゲンの分子間架橋の影響が考えられる。コラ

ーゲン分子は分子間架橋を形成することで安定化し、コラーゲン繊維を形成する。代表的な分子間架橋としてはピリジノリンの存在が報告されており (Fujimoto 1977), ピリジノリンの量が多いほどコラーゲンの熱安定性は大きいとされている (Horgan *et al.* 1990)。よって今回の場合も、溶けにくいコラーゲンにはピリジノリンをはじめとした分子間架橋がより多く含まれていると考えられる。ピリジノリンはヒドロキシリジンから形成されることから、可溶化コラーゲンと不溶性コラーゲンとでは、ピリジノリン含量以外にヒドロキシリジン含量も異なる可能性がある。コラーゲンには遺伝的に異なる分子種が存在するが、イカ筋肉においても主要なコラーゲン分子以外にマイナーな成分の存在が報告されている (Mizuta *et al.* 1995)。今回認められた溶解性の違いはこのようなタイプの違いに基づくアミノ酸組成の違いなども原因として考えられる。

5. 要約

凍結解凍品のケンサキイカ、スルメイカ、ムラサキイカ、モンゴウイカ、ヤリイカについて、加熱調理にともなう外套膜の結合組織の構造変化を透過型 (TEM) および走査型 (SEM) 電子顕微鏡により観察した。TEM観察によれば、加熱により筋細胞の構造が不明瞭になるとともに、細胞間に不定形の物質が認められた。また10%NaOHにより細胞成分を溶出し、残りの部分をSEMにより観察したところ、細胞間に存在する未知の物質の立体構造が明瞭に観察された。アミノ酸組成の分析より、この構造物は主にコラーゲンにより形成されていることが明らかとなった。加熱後の筋肉をアルカリ処理後にSEMにより観察したところ、生肉で認められた細かい繊維構造の大部分が、凝集物へと変化していた。またアルカリ処理後にTEMで観察した場合においても結合組織の崩壊が認められた。

以上の結果より、加熱によるイカ外套膜の軟化現象に結合組織の構造の崩壊が関与していることが示唆された。

6. 引用文献

- Ando, M., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (1992) Three-dimensional Structure of Collagen Fibrillar Network of Pericellular Connective Tissue in Association with Firmness of Fish Muscle, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1361~1364

Ando, M., Yoshimoto, Y., Inabu, K., Nakagawa, T., and Makinodan, Y. (1995) Post-mortem Change of Three-dimensional Structure of Collagen Fibrillar Network in Fish Muscle Pericellular Connective Tissue Corresponding to Post-mortem Tenderization, *Fisheries Sci.*, 61, 327~330

Fujimoto, D. (1977) Isolation and Characterization of a Fluorescent Material in Bovine Achilles Tendon Collagen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 1124~1129

畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎 (1986) 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与, *日本水産学会誌*, 52, 2001~2007

Hatae, K., Nakai, H., Shimada, A., Murakami, T., Takada, K., Shirojo, Y., and Watabe, S. (1995) Abalone (*Hariltis discus*): Seasonal Variations in Chemical Composition and Textural Properties, *J. Food Sci.*, 60, 32~35

Horgan, D. J., King, N. L., Kurth, L. B., and Kuypers, L. (1990) Collagen Crosslinks and Their Relationship to the Thermal Properties of Calf Tendons, *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 21~26

Ito, I., Toyohara, H., Ando, M., and Sakaguchi, M. (1992) Disintegration of the Pericellular Connective Tissue of Ayu Muscle in the Spawning Season Relevant to Softening, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1553

Kugino, M., and Kugino, K. (1994) Microstructural and Rheological Properties of Cooked Squid Mantle, *J. Food Sci.*, 59, 792~796

Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., and Sakaguchi, M. (1995) Immunochemical Identification of Distinct Molecular Species of Collagen in Squid Muscle and Skin, *Fisheries Sci.*, 61, 993~997

Moon, T. W., and Hulbart, W. C. (1975) The Ultrastructure of the Mantle Musculature of The Squid *Symplectoteuthis oualaniensis*, *Comp. Bioche*

m. Physiol., 52B, 145~149

Ohtani, O. (1987) Three-dimensional Organization of the Connective Tissue Fibers of Human Pancreas: A Scanning Electron Microscopic Study of NaOH Treated-tissues, *Arch. Histol. Jpn.*, 50, 557~566

田中武夫 (1958) イカ肉の利用・加工に関する組織学的及び組織化学的研究-I. イカ肉の組織学的特性, 東海水研報, 72, 77~121

数種イカ外套膜コラーゲンの架橋と加熱による変性

1. 緒言

前章までにおいて、筋肉を沸騰水中で加熱した場合、コラーゲンの溶解度が加熱時間の経過とともに上昇することを示した。しかし、溶解するコラーゲンは全コラーゲンの30%にすぎず、30分間の加熱後でもなお約70%のコラーゲンは溶解しないままである（第3章；第4章）。また、顕微鏡観察により、加熱後も加熱前の構造を保持しているコラーゲン繊維の存在も認められている（第3章）。イカ筋肉の場合、加熱しても魚肉などの場合よりも身がしっかりしており煮崩れするようなことはないことから、加熱調理品の物性の安定性にはこのような加熱に対して安定なコラーゲンが影響している可能性がある。

コラーゲンの耐熱性を決定する要因のひとつとして、ヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジンによる水素結合があげられる。これらはコラーゲン独特のアミノ酸であり、両者合わせてアミノ酸1000残基中に約120~130残基存在する。これらがつもつ水酸基が分子内で水素結合を形成し分子構造の安定化に寄与している。これらは元々はプロリンとリシンであり、タンパク質を形成後、水酸化されて形成する。よって水酸基の量は環境水温に影響され、冷水域に生息する魚類のコラーゲンには比較的耐熱性が必要とされないため、温水域の魚種のコラーゲンに比べ水酸化率が低い（Bornstein and Traub 1979）。イカ類は世界各地の広い海域に生息しており、これら魚類のようにコラーゲンのプロリンおよびリシンの水酸化率が異なる可能性がある。

これとは別に、コラーゲンに耐熱性を与える要因として分子間架橋の存在があげられる。コラーゲン繊維は集合したコラーゲン分子によって形成されているが、この際、コラーゲン分子は共有結合性の架橋により互いに結合している。成熟型のコラーゲンには様々な分子間架橋が存在するが、その中でも代表的なものとしてピリジノリンの存在が報告されている（Fujimoto *et al.* 1977）。ピリジノリンはコラーゲンの物理的な性質に大きく関与しており、その量が多いほど耐熱性が大きくなるとする報告がある（Horgan *et al.* 1990, Smith and Judge 1991, Young *et al.* 1994）。イカ筋肉の場合のように、加熱によって溶解するコラーゲンと溶解しないコラーゲンとが存在する場合、それぞれにおけるピリジノリン架橋に量的な違いが存在すると思われる。しかし、これらに

関する研究は現在までに報告されていない。

そこで本章では、イカ筋肉のコラーゲンについて、電子顕微鏡によりその繊維構造を観察するとともに、加熱により溶解するコラーゲンと溶解しないコラーゲンとについて比較を行い、溶解性の違いの原因について考察した。

2. 材料と方法

(1) 材料

市販のケンサキイカ (*Loligo edulis*)、スルメイカ (*Todarodes pacificus*)、ムラサキイカ (*Ommastrephes bartrami*)、モンゴウイカ (*Sepia officinalis*)、ヤリイカ (*Loligo bleekert*) の凍結品 (凍結期間: 1ヶ月) を用いた。いずれも表面の薄皮を剥いでから実験に供した。

(2) 組織学的観察観察

第1章と同様の方法により、未加熱および加熱後の筋肉の固定試料を作成後、エポン樹脂に包埋した。次に厚さ $1\mu\text{m}$ の準超薄切片を作成し、0.1% トルイジンブルーにより染色後、光学顕微鏡 (BX-50, オリンパス) により観察した。また、同じ試料より厚さ $0.1\mu\text{m}$ の超薄切片を作成し、ウラン-鉛二重染色後、透過型電子顕微鏡 (H-800, 日立) により観察した。

(3) コラーゲンの抽出

それぞれの筋肉より Sato らの方法 (1988) によりコラーゲンを抽出した。筋肉をミンチにした後、0.1 M NaOH 中で一晩攪拌し、筋原繊維タンパク質を溶解させた。溶解液を遠心分離 ($10000\text{g} \times 30\text{min}$) して沈殿を回収した。同じ操作を3回繰り返すことにより、筋原繊維タンパク質を除去した。次に沈殿から NaOH を取り除くため、冷蒸留水で数回洗浄した。こうして得られた沈殿をコラーゲンとした。なお、すべての操作は 5°C で行った。

(4) コラーゲンの溶解率とアミノ酸組成の測定

抽出したコラーゲンを約 10mg ずつ、沸騰した蒸留水約 50ml の入ったビーカーに入れ、ガスバーナーで10分および30分間加熱した。加熱後、ただちに流水中

で冷却し、遠心分離 (10000g × 30min) した。上清はロータリーエバポレーターで濃縮後、6M塩酸中で150℃ 1時間加水分解した。また沈殿にはそのまま6M塩酸を加えて加水分解した。それぞれ加水分解が終了した後、ロータリーエバポレーターで乾固し、0.02M 塩酸に溶解した後、アミノ酸分析機 (L-8500, 日立) によりアミノ酸量を測定した。それぞれの数値より、全ヒドロキシプロリン (Hyp) 量に対する上清中のHyp量の割合を計算し、溶解率とした。

(5) プロリンおよびリシンの水酸化率

プロリン (Pro) およびリシン (Lys) の水酸化率を、アミノ酸分析の結果に基づき、下記の式に従って計算した。

$$\text{水酸化率 (\%)} = \frac{\text{Hyp (Hyl)}}{\text{Pro (Lys)} + \text{Hyp (Hyl)}} \times 100$$

(6) ピリジノリンの定量

Yoshiharaらの方法 (1994) に従い、以下のようにピリジノリンを定量した。約10mgのコラーゲンを約50mlの沸騰水中で加熱後、遠心分離によって得た上清 (熱可溶化コラーゲン) と沈殿 (不溶性コラーゲン) をそれぞれ塩酸加水分解後、ロータリーエバポレーターで塩酸を除去した。次に、n-ブタノール、酢酸、蒸留水が4:1:1(v/v)の溶媒約5mlに溶解し、同じ溶媒で平衡化したセルロースパウダー (CF-11, Whatman, U.K.) をつめたカラム (内径10mm×80mm) に試料を添加し、同溶媒を50ml流すことにより未吸着画分を除去した。続いて50mlの蒸留水で吸着画分を溶出し、溶出液を再度エバポレーターで乾固した。最後に10mMヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) -5%アセトニトリル1mlを加えて乾固物を溶解し、高速液体クロマトグラフ (H-7000, 日立) にODSカラム (Microsorb-MV, 5C-18, 内径4.6 mm × 250 mm, Rainin, U.S.A.) を装着し、2液グラジエント (A: 10mM HFBA 5%アセトニトリル溶液, B: 10mM HFBA アセトニトリル溶液, 0-20分; 15-25% A), 流速1ml/分, カラム温度40℃にてピリジノリンを分離し、蛍光検出器 (F-1000, 日立) により励起波長295nm, 吸収波長395nmでピリジノリンを検出・定量した。なお、ピリジノリン標品は和光純薬製を用い、単位はコラー

ゲン1モルあたりのピリジノリンのモル数であらわした。コラーゲンのモル数はコラーゲンを塩酸加水分解し、ヒドロキシプロリン量をアミノ酸分析機により定量し、ヒドロキシプロリンの重量を7.14倍してコラーゲンの重量とし、分子量を30万として計算した (Stanton and Light 1987)。

(7) 統計分析

各実験の有意差検定はt-検定により行った。

3. 結果および考察

(1) 加熱に安定なコラーゲン繊維の構造

未加熱のモンゴウイカ筋肉の光学顕微鏡写真をFig. 1に示す。筋肉内のいたるところにコラーゲンの存在が認められる (Fig. 1, 矢頭)。なお、この分布様式は他のイカにおいても同様であった。

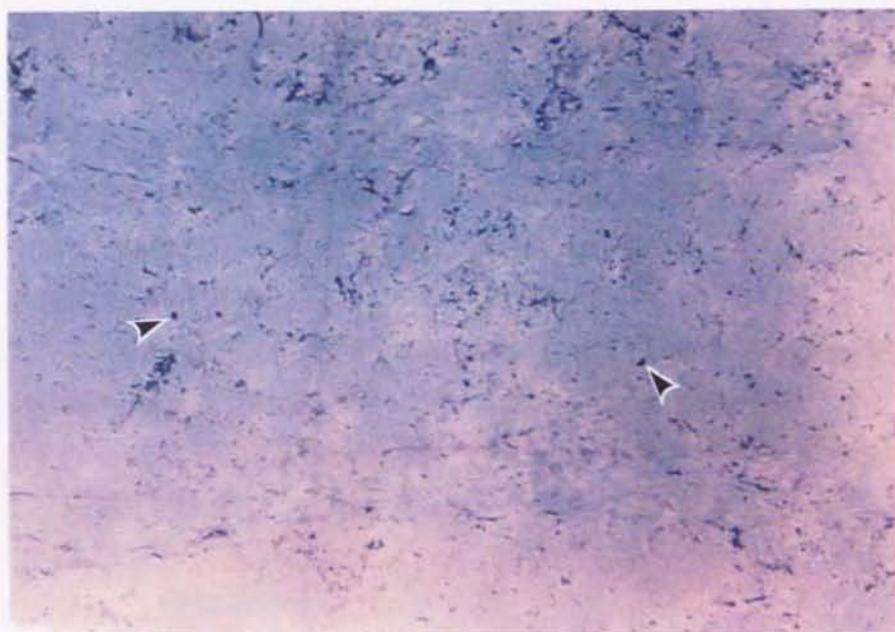


Fig. 1: Light microscopic photograph of the cross-section of raw cuttlefish muscle. Arrowheads indicate collagen. The bar represents 100 μ m.

各種イカにおいて同様に認められたコラーゲン部分 (Fig. 1, 矢頭) を透過型電子顕微鏡により観察した結果をFig. 2に示した。コラーゲン繊維の太さは10-30nmであり, モンゴウイカにおいて認められた約40nmの繊維よりは細かった(第3章)。コラーゲンは筋細胞間が狭い部分にもわずかに存在するが, それらは明瞭な繊維構造をもっていない(第3章)。つまり, Fig. 2に示されたコラーゲン繊維は細胞間の狭い部分に存在するものとは形態的に著しく異なるコラーゲンであることが明らかとなった。

コラーゲンには現在までに19種類もの分子種の存在が報告されている。この中で, 繊維を形成するI, III, V型コラーゲン以外に, 繊維を作らないIV型コラーゲンが存在する。この例から考えると, 今回観察されたコラーゲン繊維と, 細胞間にわずかに存在するコラーゲンとは, 繊維形成性が異なることから, 別の型のコラーゲンによって形成されているとも考えられる。

また, 加熱に対する抵抗性についても, 細胞間のコラーゲンは加熱によりその構造が崩壊するが(第3章), 本章において認められたコラーゲン繊維は加熱後においても繊維構造は残存しており, 細胞間のコラーゲンとは熱安定性に大きな違いがあることが明らかとなった (Fig. 2F-J)。このようにイカ外套膜には形態的あるいは耐熱性に著しい違いをもつコラーゲンが存在することが明らかとなった。

(2) 加熱によるコラーゲンの溶解率の変化

イカコラーゲンの溶解率の変化をFig. 3に示した。この結果から, 5種類のイカは大きく分けて2つのグループに分かれた。ケンサキイカとスルメイカは30分間の加熱により, 溶解率は約55%まで上昇したのに対し, ムラサキイカ, モンゴウイカ, ヤリイカでは溶解率は約30%にとどまった。言い換えれば, この結果よりムラサキイカ, モンゴウイカ, ヤリイカでは約45%, ケンサキイカとムラサキイカでは約70%のコラーゲンが溶解せず, イカのコラーゲンは非常に耐熱性の大きいコラーゲンであることが明らかとなった。

これらの溶解率は以前に報告した筋肉そのものを加熱した場合の溶解率よりも全体的に高めの数値であった(第3章; 第4章)。この原因としては, 第3, 4章の実験においては筋肉そのものを加熱したため, コラーゲンは他の多数のタンパク質と共に存在しており, それらの保護作用が働いたと思われるのに対し, 今回用いたコラーゲンは抽出されたものであり, 直接沸騰水にさらされたためにより強い加熱作用を受けたことが考えられた。

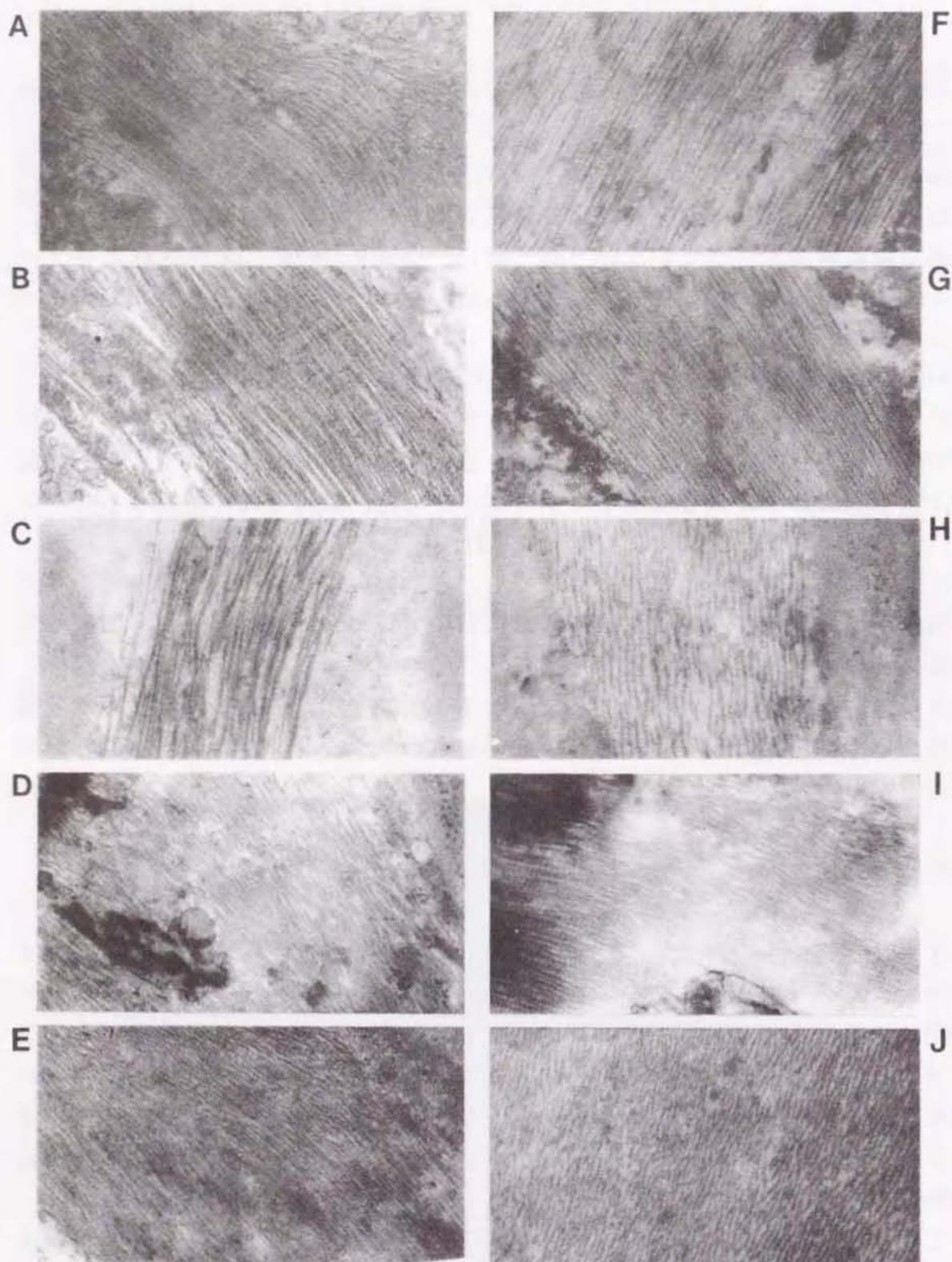


Fig. 2: Transmission electron microscopic photographs of the raw muscle (A-E) and 30min-heated (F-J) squid mantles. These are fine structure of the collagen which was observed by light microscope (Fig. 1). A and F, long-finned squid; B and G, Japanese common squid; C and H, flying squid; D and I, cuttlefish; E and J, arrow squid. The bar represents $1 \mu\text{m}$.

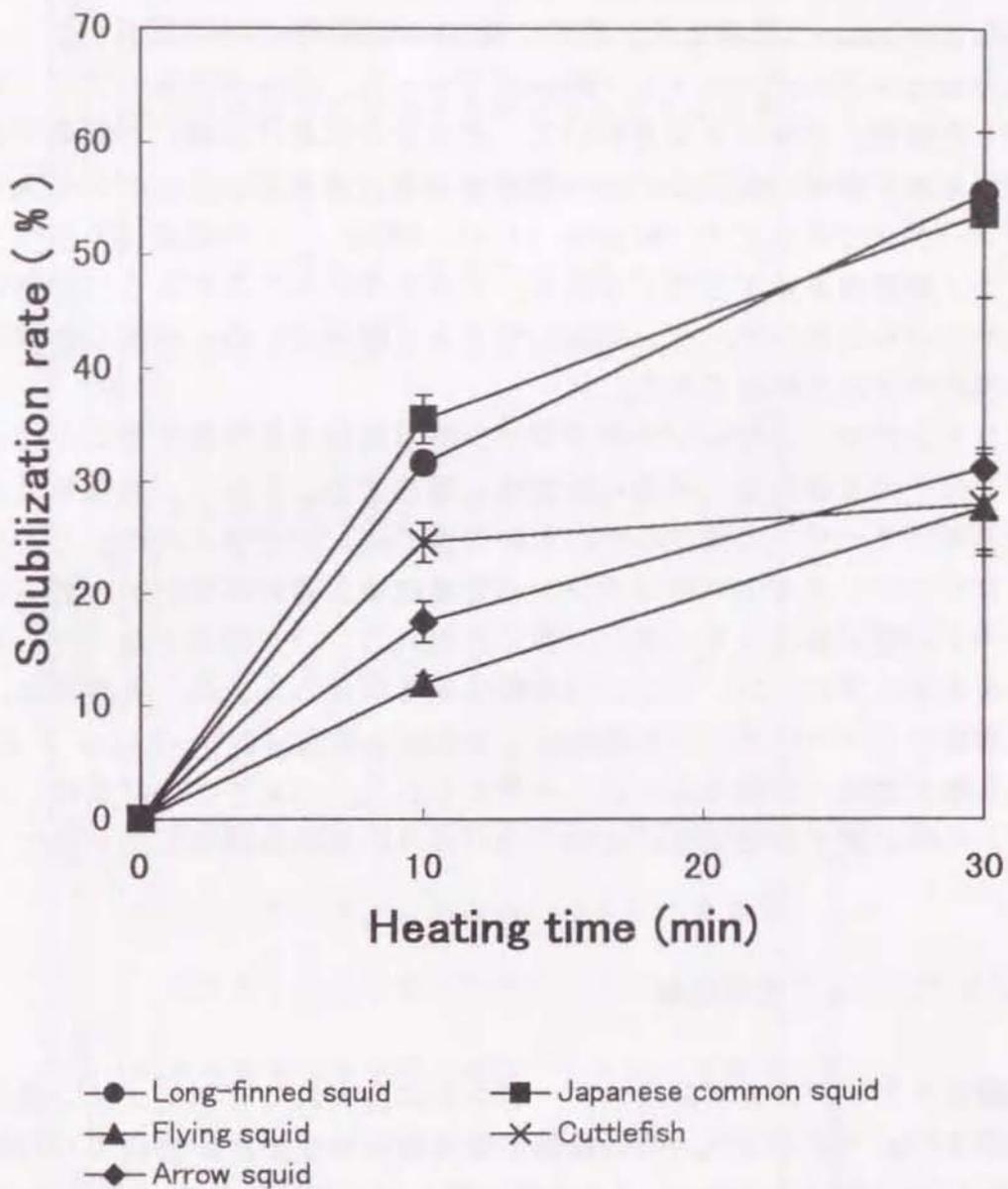


Fig. 3: Change of solubilization rate of squid mantle collagens by heating in boiling water for 30min.

(3) 熱可溶化コラーゲンと不溶性コラーゲンにおけるアミノ酸組成の比較

10分間および30分間加熱後の熱可溶化コラーゲンと、不溶性コラーゲンのアミノ酸組成をTable 1に示した。アミノ酸1000残基中約300残基がグリシンであり、典型的なコラーゲンのアミノ酸組成であった。30分加熱後のアミノ酸組成で比較した場合、スルメイカを除いて、グリシンにおける違いが顕著であり、その他にも若干組成の異なるアミノ酸があった。外套膜コラーゲンの大部分はI型コラーゲンであるため (Mizuta *et al.* 1994), この結果はI型コラーゲンのアミノ酸組成を示すと考えられる。しかしながら、このように溶解性の違いにより分けられたコラーゲンにおいてアミノ酸組成に違いが生じた原因については現在のところ不明である。

ヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンは水素結合を形成することによりコラーゲン分子の3重らせん構造の安定性に関与する。よって、熱溶解性が著しく異なる両コラーゲンの間でのそれらの含量の違いが予想された。しかし、ヒドロキシプロリンとヒドロキシリジンの含量は特に違いが無いか、あるいは逆に溶けやすい熱可溶化コラーゲンに多く含まれるという結果となった。アミノ酸組成をもとにプロリン、リシンの水酸化率を計算した結果、両者共に、加熱により溶解するコラーゲンに比較的多く含まれる傾向にあり (Figs. 4 and 5), いずれも熱安定性への関与は小さいと考えられた。つまりこの結果は、イカコラーゲンの熱に対する抵抗性にはHyp・Hyl以外の要因が関与していることを示唆した。

(4) ピリジノリン含量の比較

熱可溶化コラーゲンと不溶性コラーゲンとに含まれるピリジノリン量を測定した結果をFig. 6に示した。その結果、熱可溶化コラーゲンでは10分間加熱では0.6-1.3mol/molcollagen, 30分間加熱において0.9-2.6mol/molcollagenであった。一方、不溶性コラーゲンでは10分間加熱では3.8-7.6mol/molcollagen, 30分間加熱において4.3-8.1mol/molcollagenであり、いずれのイカにおいても不溶性コラーゲンにおいて顕著に多かった。ピリジノリン架橋は加熱に対して安定であるため、架橋されているコラーゲン分子は、たとえ熱により変性してもコラーゲン繊維から遊離して水中へ遊離することは困難である。加熱により溶解しないコラーゲンが比較的多量のピリジノリンを含んでいる今回の結果は、イカも哺乳動物と同様に、ピリジノリンの存在がコラーゲンの難溶性に関与していることを示すと考えられた。

Table 1. Amino acid composition of solubilized and insoluble collagens (residues/1000residues).

Species	Long-finned squid				Japanese common squid				Flying squid				Cuttlefish				Arrow squid			
	10		30		10		30		10		30		10		30		10		30	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
Asp	59	60	58	59	58	62	57	63	59	62	57	65	67	63	62	63	60	57	59	65
Thr	27	26	26	27	23	25	24	27	25	27	24	31	23	25	25	26	24	27	24	28
Ser	32	31	33	39	36	39	36	41	36	42	39	44	41	42	40	41	34	32	32	35
Glu	90	89	89	82	91	93	92	94	88	91	83	91	83	84	87	89	85	82	87	96
Gly	333	333	331	327	325	319	330	313	346	329	329	336	324	314	343	313	310	316	325	301
Ala	85	96	90	95	91	97	97	98	83	88	89	93	84	90	87	93	79	103	89	101
Cys	1	2	1	2	ND	1	2	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Val	27	25	25	21	25	24	23	25	22	22	21	23	19	21	19	20	24	22	24	25
Met	4	16	12	15	11	11	10	7	10	11	12	10	14	13	12	16	9	11	13	14
Ile	26	31	21	16	24	21	20	22	14	13	15	16	15	23	22	23	25	19	23	21
Leu	33	11	30	29	33	33	31	34	27	27	27	31	28	32	28	32	32	34	34	39
Tyr	5	4	6	7	7	8	7	8	5	4	3	8	6	8	3	9	8	4	7	9
Phe	12	11	12	14	11	13	11	14	9	9	9	10	6	13	9	13	12	14	11	15
Hyl	19	16	17	15	17	13	16	13	17	11	15	13	10	11	16	12	19	20	17	14
Lys	15	14	14	15	13	17	13	18	12	11	12	13	10	17	9	16	16	11	16	19
His	11	4	6	6	7	9	7	9	7	7	6	8	6	8	6	7	15	5	6	7
Arg	55	60	55	55	64	58	59	58	57	58	57	60	56	57	59	61	52	52	56	61
Hyp	72	73	76	79	78	66	69	65	81	75	80	60	71	74	71	62	72	74	71	56
Pro	94	98	98	97	86	91	96	90	102	113	122	88	137	105	102	104	124	117	106	94

S: solubilized collagen, I: insoluble collagen. ND = not detected.

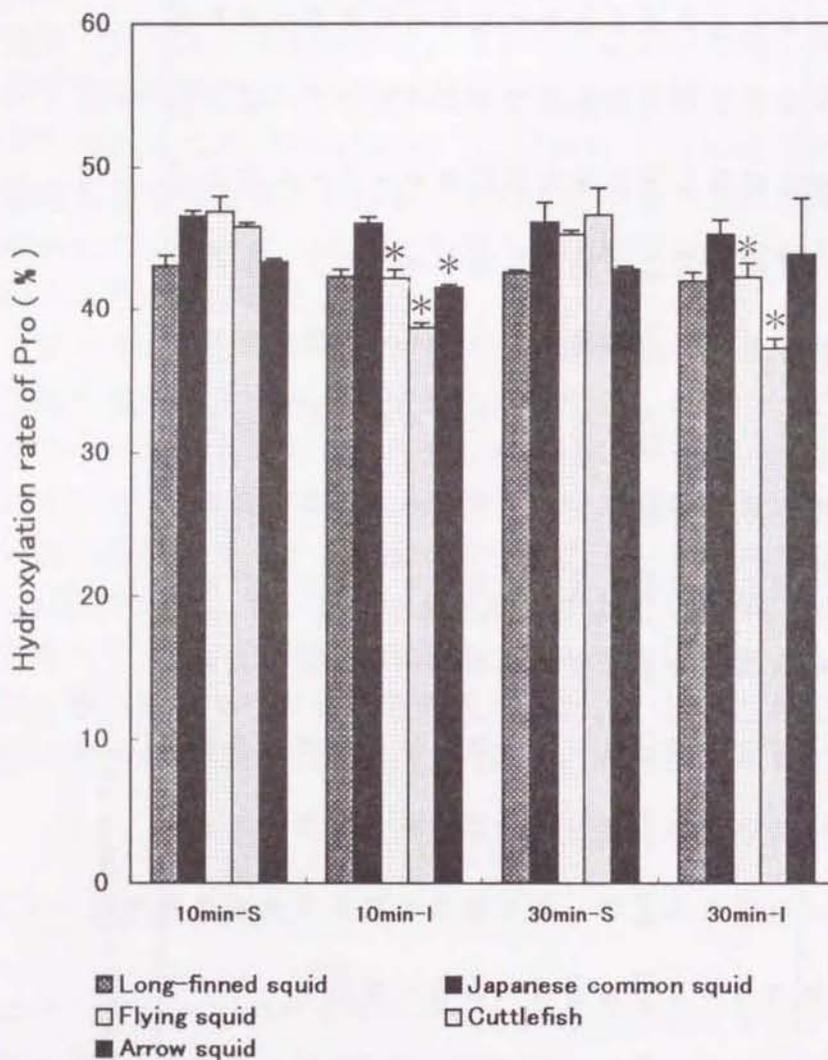


Fig. 4: Hydroxylation rate of proline in solubilized- and insoluble collagens (means+S.D.). 10min-S, solubilized collagen after 10min-heating; 10min-I, insoluble collagen after 10min-heating; 30min-S, solubilized collagen after 30min-heating; 10min-I, insoluble collagen after 30min-heating. The asterisk shows a significant difference ($p < 0.05$) between the soluble and insoluble collagens at each heating time for each species.

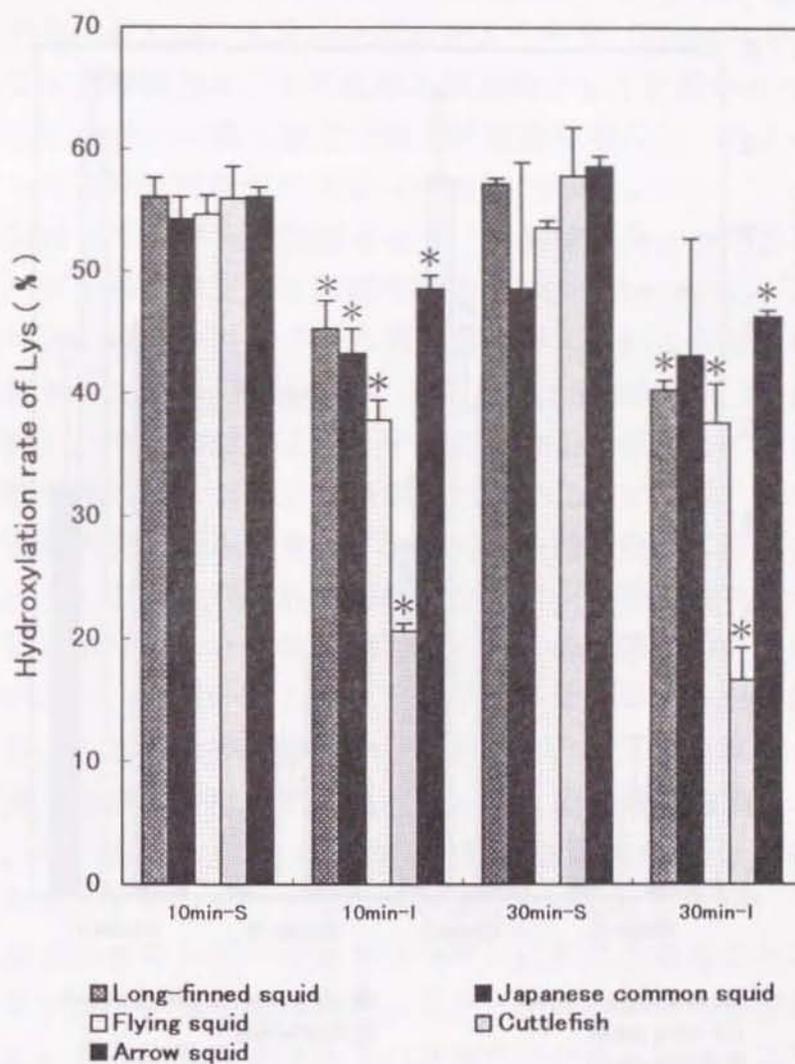


Fig. 5: Hydroxylation rate of lysine in solubilized- and insoluble collagens (means+S.D.). 10min-S, solubilized collagen after 10min-heating; 10min-I, insoluble collagen after 10min-heating; 30min-S, solubilized collagen after 30min-heating; 10min-I, insoluble collagen after 30min-heating. The asterisk shows a significant difference ($p < 0.05$) between the soluble and insoluble collagens at each heating time for each species.

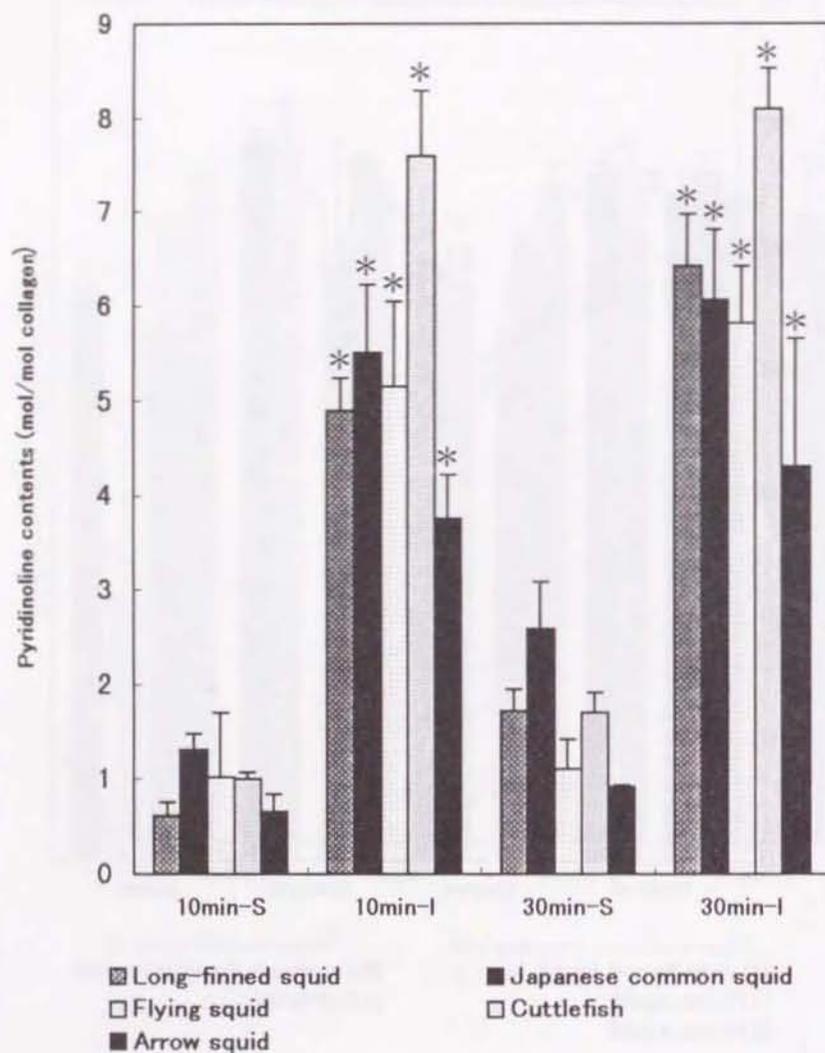


Fig. 6: Pyridinoline contents in solubilized- and insoluble collagens (means+S.D.). 10min-S: solubilized collagen after 10min-heating; 10min-I: insoluble collagen after 10min-heating; 30min-S: solubilized collagen after 30min-heating; 10min-I: insoluble collagen after 30 min-heating. The asterisk shows a significant difference ($p < 0.05$) between the soluble and insoluble collagens at each heating time for each species.

Stanley and Hultin (1982) は生と凍結解凍したケンサキイカについて加熱後の硬さを比較し、凍結解凍した試料の方が生の試料よりも加熱後の筋肉が硬いことを報告している。この原因について彼らは、凍結中に発生したホルムアルデヒドにより、タンパク質分子の間に架橋ができたためであるとしている。分子間架橋の形成はタンパク質の重合を引き起こし、ひいては物理的な強度の強化にもつながる。例えば、トランスグルタミナーゼ (TGase) が食品の物性改善効果をもつことが報告され、すでに食品添加物として市販されている。TGase はリシンとグルタミンとの間に安定な分子間架橋を形成し、さまざまなタンパク質食品をゲル化させ物性を強化する (本木等 1995)。

ピリジノリンはコラーゲンの代表的な分子間架橋のひとつであり、分子間を結合してコラーゲン繊維の安定化に関与する (Fujimoto *et al.* 1977)。ピリジノリンの量が多いほどコラーゲンの熱安定性が大きいことがほ乳類コラーゲンにおいて報告されている (Horgan *et al.* 1990, Smith and Judge 1991, Young *et al.* 1994)。今回の結果より、イカの場合も熱に対して溶けにくいコラーゲンに比較的多量のピリジノリンが含まれていた。ピリジノリンはヒドロキシリジンがヒドロキシリジルオキシダーゼによる酸化を経て形成される。同じ筋肉内のコラーゲンでありながら可溶性コラーゲンと不溶性コラーゲンとでピリジノリン含量が異なることは大変興味深い。この原因については、ヒドロキシリジン含量の違い、あるいはヒドロキシリジルオキシダーゼの活性の違いなどが考えられる。しかし今回の結果からわかるように、ヒドロキシリジンの含量には両者の間で有意な差は認められなかった。電子顕微鏡観察の結果から明らかのように、熱に安定なコラーゲン繊維は局在していることから、場所によりヒドロキシリジルオキシダーゼの活性が異なる可能性もある。

ヒドロキシリジルオキシダーゼをコラーゲンに作用させることにより、コラーゲン中のピリジノリン量を増加させ、コラーゲンの物理的な安定性を向上させることにより、食品の熱安定性あるいは物性の改質といった応用面も期待できる。

4. 要約

5種類のイカ外套膜コラーゲンの熱安定性とピリジノリン含量との相関性について検討した。筋組織全体に結合組織が点在しており、それらは太いコラーゲン繊維が集合してできているものであることが電子顕微鏡観察より認められた。また、それらは30分間の沸騰水加熱によっても繊維構造を失わなかった。

イカ外套膜コラーゲンの溶解率は沸騰水中での30分間加熱により30-55%ま

で上昇した。この溶解率は、さきに報告したイカ肉そのものを加熱した際に測定された数値よりもやや高めであった。

熱可溶化および不溶性コラーゲンの比較において、それらのアミノ酸組成はヒドロキシプロリンを含めてほとんど同じであった。しかしながら、成熟コラーゲンの主要な分子間架橋であるピリジノリンは不溶性コラーゲンにおいてより多く含まれていた。

これらの結果から、筋肉内に点在するコラーゲン繊維の集合体を構成するコラーゲンは耐熱性が大きく、その耐熱性にはヒドロキシプロリン含量よりもむしろピリジノリン含量が大きく影響している可能性が示唆された。

5. 引用文献

Bornstein, P. and Traub, W. (1979) *The Proteins IV* (edited by Neurath, H. and Hiln, R. L.), Academic Press., 411~632

Fujimoto D., Akiba K., and Nakamura N. (1977) Isolation and Characterization of a Fluorescent Material in Bovine Achilles Tendon Collagen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 1124~1129

Horgan, D. J., King, N. L., Kurth, L. B., and Kuypers, L. (1990) Collagen Crosslinks and Their Relationship to the Thermal Properties of Calf Tendons, *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 21~26

Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., and Sakaguchi, M. (1994) Isolation and Partial Characterization of Two Distinct Types of Collagen in the Muscle and Skin of the Squid *Todarodes Pacificus*, *Fisheries Sci.*, 60, 467~471

本木正雄, 添田孝彦, 安藤裕康, 松浦 明 (1995) トランスグルタミナーゼの有用性研究とその実用化, 日本農芸化学会誌, 69, 1301~1308

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Itoh, Y., and Shimizu, Y. (1988) Isolation of Types I and V Collagens from Carp Muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 155~158

Smith, S. H. and Judge, M. D. (1991) Relationship between Pyridinoline Concentration and Thermal Stability of Bovine Intramuscular Collagen, *J. Anim. Sci.*, 69, 1989~1993.

Stanley, D. W., and Hultin, H. O. (1982) Quality Factors in Cooked North Atlantic Squid, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 15, 277~282

Stanton, C., and Light, N. (1987) The Effect of Conditioning on Meat Collagen: Part 1-Evidence for Gross in situ Proteolysis, *Meat Sci.*, 21, 249~265

Yoshihara K., Nemoto S., and Nagata M. (1994) Urinary Excretion Level of Hydroxylysyl Pyridinoline as an Index of Bone Resorption, *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 840~842

Young, A. O., Braggins, J. T., and Barker, J. G. (1994) Pyridinoline on Ovine Intramuscular Collagen, *Meat Sci.*, 37, 297~303

イカは重要な食糧資源と考えられているが、鮮度低下が速いことなど、その利用にあたっての問題点も多い。また、イカ筋肉は独特の物性をもっているため、それが消費者の嗜好性に大きな影響を与えており、イカの消費をすすめるにあたって重要な要素となっている。これらの現状を考えるにあたり、イカ筋肉の物性に関する基礎的な知見の収集は、将来のイカ資源の有効利用に大きく貢献していくと思われる。

そこで本研究では、組織学的手法を中心として、冷蔵および加熱調理におけるイカ筋肉の物性変化の原因を探り、その機構の解明を試みた。

日本においてはイカを生で食する習慣があるため、イカの鮮度に対する関心は強い。イカ筋肉には強いプロテイナーゼ活性が存在するため自己消化が進みやすい。よってイカの鮮度低下は早く、様々な物理学的・生化学的変化が生じると考えられる。しかし、鮮度がイカ肉の物性にどのように影響しているかはほとんど報告例がない。そこでまず、生きた個体の入手が唯一可能であったヤリイカについて、死後の時間経過に伴う外套膜の構造変化を組織学的に観察するとともに、加熱肉の構造についても比較し、生肉の軟化機構および鮮度が加熱肉に及ぼす影響を明らかにしようとした。

その結果、生肉の剪断力は冷蔵9時間後まで急激に低下し、同時に筋細胞間の隙間が拡大する様子が認められた。この隙間の大きさは死後9時間まで有意に増加すること、またこの隙間は筋細胞間の結合組織において生ずることが電顕観察からわかった。一方、加熱した場合、加熱によって軟化が生じたが、物性および筋肉の構造に鮮度の影響は認められなかった。

以上の結果より、鮮度の低下によるイカ肉の物性への影響は生肉において大きく、それは冷蔵中のコラーゲンの脆弱化によるものと思われた。

また、生イカにおいて冷蔵中にコラーゲンの崩壊が原因と思われる結合組織の脆弱化が認められたため、筋細胞間のコラーゲンに何らかの変化が生じている可能性が考えられた。そこで次に、活ヤリイカの外套膜について、人工的にコラゲナーゼを作用させた際の物性と構造の変化を調べ、軟化現象へのコラーゲンの関与について検討した。

その結果、分画したコラーゲンの分解は、コラゲナーゼの濃度依存的に促進された。この結果は、低温でも長時間のコラゲナーゼ処理によりコラーゲンが分解され得ることを示した。また筋肉の場合、試験区試料の剪断力は対照区よりも有意に低かった。光学顕微鏡観察によれば10mg/ml区において最も早く筋肉中に空隙

が認められた。透過型電子顕微鏡観察では細胞間の空隙がコラーゲナーゼ処理3時間後ですでに観察された。これらの結果は、5℃という低温下でも長時間のコラーゲナーゼ処理によってコラーゲンの分解が促進されたことを示しており、冷蔵中のイカ筋肉の軟化現象にコラーゲンが関与している可能性を示唆した。

ここまでに、生肉の物性変化に対しコラーゲンが大きく関与していることが明らかとなった。また、加熱した場合は生肉に比べ明確な軟化が生じることも明らかとなったが、この現象とコラーゲンとの関係については明らかではない。そこで、イカ筋肉を加熱した場合の物性を測定するとともに、生の筋肉の物性に関連が深いコラーゲンについて、その加熱時における組織学および生化学的变化を調べたところ、剪断力の測定結果から、加熱により硬くなるのではなく柔らかくなることが確認された。また、加熱により筋細胞の構造が不明瞭になるとともに筋細胞の間に空隙が生じた。コラーゲンのゼラチン化率は加熱60分後に約32%まで上昇した。

以上の結果より、イカ筋肉は加熱により柔らかくなるが、これは筋細胞の構造破壊以外に、筋細胞の間に存在する比較的少量のコラーゲンのゼラチン化による影響も大きいと考えられた。

モンゴイカ筋肉の加熱による軟化現象には、コラーゲンのゼラチン化が要因のひとつであることが確認されたので、軟化現象の普遍性を調べるため、一般に入手が容易なケンサキイカ、スルメイカ、ムラサキイカ、ヤリイカ（いずれも凍結解凍品）についても実験を行なった。

その結果、生肉に比べると加熱後ではいずれの種においても剪断力は低下しており、筋肉が加熱により軟化することが明らかとなった。水溶性タンパク質画分の電気泳動結果から、4種類のイカにおいていずれも、加熱時間の経過に伴い、筋肉の軟化と相関してコラーゲンのゼラチン化が進行していることがタンパク質のレベルで確認された。コラーゲンのゼラチン化率を測定したところ、30分加熱後のゼラチン化率は16.3-29.5%であり、いずれの種においても加熱により経時的にゼラチン化が進行していることが確認された。

以上の結果より、凍結解凍したイカ外套膜は、イカの種類に関係なく加熱により軟化することが明らかになるとともに、この軟化には一部のコラーゲンのゼラチン化が関与している可能性が示唆された。

イカ筋肉は、加熱にともないコラーゲンのゼラチン化が進行することが確認されたが、イカ筋肉の細胞間は非常に狭いため、細胞間に形態的な特徴をもつコラーゲン繊維を観察しにくいという問題があり、コラーゲンの形態的な変化を確認できていない。そこで5種類の凍結解凍イカ外套膜について、細胞間におけるコラーゲンの存在の確認、および細胞間に存在する組織の加熱による構造変化の観

察を行った。

透過型電子顕微鏡観察によれば、加熱により筋細胞の構造が不明瞭になるとともに、細胞間に不定形の物質が認められた。また 10%NaOH により細胞成分を溶出し、残りの部分を走査型電子顕微鏡により観察したところ、細胞間に存在する未知の物質の立体構造が明瞭に観察された。この構造物は、アミノ酸分析の結果より、ヒドロキシリジンが検出されたことから主にコラーゲンにより形成されていることが明らかとなった。加熱後の筋肉をアルカリ処理後に走査型電子顕微鏡により観察したところ、細かいコラーゲン繊維の多くが凝集していた。またアルカリ処理後に透過型電子顕微鏡観察で観察した場合にも結合組織の崩壊が認められた。

以上の結果より、イカ外套膜の筋細胞間にはコラーゲンが存在すること、また、加熱により結合組織が崩壊しイカ外套膜の軟化現象の一因となっている可能性が示唆された。

これまでの結果より、イカ筋肉は加熱により柔らかくなること、またその原因には細胞間に存在するコラーゲンがゼラチン化するためであることを明らかにした。しかし、ゼラチン化率を測定した場合、加熱によりゼラチン化は進行するが、それでもなお可溶化しないコラーゲンは 50%以上にも及ぶ。

そこで、イカ筋肉のコラーゲンについて電子顕微鏡によりその繊維構造を観察するとともに、加熱により溶解するコラーゲンと溶解しないコラーゲンについて比較を行い、溶解性の違いの原因について考察した。

組織観察によれば、筋肉中のいたるところにコラーゲン繊維の集合体が存在しており、それらは 30 分間の沸騰水加熱によっても繊維構造を失わなかった。熱可溶性および不溶性コラーゲンの比較において、それらのアミノ酸組成はヒドロキシプロリンを含めてほとんど同じであった。しかしながら、成熟コラーゲンの主要な分子間架橋であるピリジノリンは不溶性コラーゲンにおいて有意に多く含まれていた。

これらの結果から、太いコラーゲン繊維を構成するコラーゲンは耐熱性が大きく、その耐熱性にはヒドロキシプロリン含量よりもむしろピリジノリン含量が大きく影響している可能性が示唆された。

本研究の結果より、イカ筋肉の細胞間に存在するコラーゲンは、冷蔵中および加熱中に生ずる軟化現象の原因のひとつと考えられ、その強度が物性に大きく影響していることが明らかとなった。これまで、物性変化の要因は主に筋細胞の損傷とされてきたが、本研究の結果より、コラーゲンという新たな要因も加わり、今後物性の変化に関してはさらに新たな機構の解明が期待される。将来的なイカ資源の世界的需要の増大を目指すにあたっては、未加熱状態での独

特の弾力性が諸外国では嫌われていることを克服していく必要があるが、今回行ったコラゲナーゼを用いた実験のように、効果的にコラーゲンを変質させる方法を開発し、より好まれやすい物性を実現していくことで、未加熱のものでも受け入れられてゆくことが期待される。また、外部からの操作ではなく、カテプシン類をはじめとする内因性の酵素の作用を利用して物性を操作する方法も有効と思われる。

畜肉では長期間冷蔵後に出荷する、いわゆる熟成が肉の物性をやわらげるうえで必須の操作となる。熟成は内因性のプロテアーゼによるタンパク分解により行われるが、これはその結果生ずるペプチドなどによる呈味性の向上の点からも重要である。また、魚類の場合は軟化現象が鮮度低下のひとつの指標となるので、これを食い止めることは非常に重要な課題である。このように、畜産・水産のいずれにおいても内因性の酵素の作用を操作することはきわめて重要であり、本研究の結果はこれらの課題に対しひとつの指針となるかもしれない。

また、本研究では壊れやすいコラーゲンとは逆に、加熱にも安定なコラーゲンの存在も確認された。この耐熱性の大きさは分子間架橋の量により制御できそうであるが、これを意図的に調整できるようになれば、嗜好性に応じた加工食品の製造、あるいは新しい調理法の開発につながる。また、将来的にはコラーゲンを利用した食品以外の分野における新素材の開発なども可能になると思われる。

今後の課題としては、コラーゲンを分解している内因性酵素の探索、あるいはコラーゲンへの耐熱性の付与といったものがあげられるが、これらを通じてさらにイカ資源の有効利用法の開発へとつながってゆくことが期待される。

著者論文

安藤真美 (1996) 凍結解凍した数種イカ外套膜の加熱調理による物性変化, 奈良文化女子短期大学紀要, 27, 121~127

安藤真美 (1997) 凍結解凍したモンゴウイカ外套膜の加熱調理に伴う物性変化へのコラーゲンの関与, 家政誌, 48, 315~321

安藤真美, 安藤正史, 塚正泰之, 牧之段保夫, 三好正満 (1998) 凍結解凍した数種イカ外套膜結合組織の加熱調理による構造変化, 家政誌, 49, 1089~1097

Ando, M., Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., and Miyoshi, M. (1999) Muscle Firmness and Structure of Raw and Cooked Arrow Squid Mantle as Affected by Freshness, *J. Food Sci.*, 64, 659~662

安藤真美, 安藤正史, 塚正泰之, 牧之段保夫, 三好正満 (2000) コラゲナーゼ溶液への浸漬によるヤリイカ外套膜結合組織の崩壊, 家政誌, 51, 395~404

Ando, M., Ando, M., Makino, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., and Miyoshi, M. (2001) Interdependence between Heat Stability and Pyridinoline Contents of Squid Mantle Collagen, *J. Food Sci.*, **66(2)**, in press

謝 辞

本研究を行うにあたりましては、奈良女子大学生活環境学部教授 三好 正満先生より終始有益なるご助言、ご指導を賜りました。また、実験機器の使用につきましては近畿大学農学部教授 牧之段 保夫先生をはじめとしてスタッフの先生方の多大なるご協力をいただきました。

ここに深く感謝し、心より御礼申し上げます。