

## 凍結・解凍による 食品ダメージ程度のNMRによる評価

### Damage Evaluation on Freeze-Thawing Process of Food by Using NMR

安藤 寛子\*      福岡 美香\*      宮脇 長人\*\*      鈴木 徹\*  
 Hiroko ANDOU\*      Mika FUKUOKA\*      Osato MIYAWAKI\*\*      Toru SUZUKI\*

\*東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科 (108-8477東京都港区港南4-5-7)  
 Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology  
 (4-5-7 Kounan, Minato-ku, Tokyo, 108-847, Japan)

\*\*石川県立大学生物資源環境学部食品科学科 (921-8836石川県石川郡野々市町末松1-308)  
 Department of Food Science, Isikawa Prefectural University  
 (1-308, Suematsu, Nonoichi-Machi, Isikawa, 921-8836, Japan)

#### Summary

Freeze-thawing process gives significant damages for a food structure. Several new techniques have been attempted for quantitative evaluation of the damages. In this study, using NMR (nuclear magnetic resonance) with a stimulated echo method, restricted diffusion phenomena of water molecules was measured for damaged food (onion and tuna) tissues that were subjected to the repeat of freeze-thawing. Through experiments, water permeability of tissue membrane was calculated. The water permeability of fresh tissues for onion showed clearly restricted diffusion, but after freeze-thawing, it disappeared. On the other hand, the water permeability of fresh tuna tissue was small significantly, even though it was a little higher after freeze-thawing. After all, the damage level after freeze-thawing showed a significant difference between onion and tuna. These results support the view that plant tissue is very sensitive to freeze-thawing and that the water permeability of plant is much lower than that of animal.

**Keywords :** Refrigeration, Thawing, Frozen food, NMR, Water permeability

#### 1. 緒言

食品は凍結・解凍プロセスにおいて氷結晶生成による激しいダメージを受ける。特に細胞構造を持つ野菜、魚肉ではそのダメージによって品質を著しく低下させてしまう。これまで食品の凍結・解凍ダメージについては顕微鏡観察、テクスチャー、ドロップ量測定、たんぱく質変性など様々な研究が行われてきた<sup>1-3)</sup>。これら既往の研究においても凍結・解凍後の変化は観測されているが、凍結・解凍後の変化の原因を明確にするには至っていない。そのため、近年、凍結・解凍後の変化の原因解明のため細胞膜の水透過性に着目した測定が行われ、動物と植物で細胞膜の水透過性に大きな差があり、これが凍結・解凍後の組織変化の原因の1つであるとする

説が提唱された<sup>4)</sup>。これまでも細胞膜の水透過性は、誘電率測定<sup>5)-10)</sup>・浸透圧<sup>11)-12)</sup>を利用した測定がなされている。特に、誘電率測定では凍結・解凍後に Cole-Cole 円弧が消失することより、凍結・解凍処理による細胞膜の変化が確認されている。しかし、既往の研究では凍結・解凍処理が多数の細胞から構成される“組織”に与える影響を定量的に比較・評価されていない。また、測定時に組織に何らかの負荷を与えるため、非破壊な状態で測定されてこなかった。凍結・解凍後の組織の復元性を向上させるためにも、これらの問題点を克服した組織の変化程度、つまり、組織へのダメージ程度を定量的に比較・評価できる測定法の確立が重要であると考える。そこで、本研究では組織を非破壊で使用できる NMR を用い、凍結・解凍が食品に与え



るダメージの測定を試みた。

NMR 測定は試料を非破壊で使用でき、生体に近い状態の情報が得られる。特にプロトン NMR は  $T_1$ ,  $T_2$  の測定を通して水分子の分子間相互作用の情報を与える。また、従来から NMR の応用的利用としてパルスシーケンスを工夫することで、水分子の拡散情報から構造を把握する試みが行われてきた<sup>13)</sup>。こういった NMR を用いた水分子拡散の観察を細胞などの閉鎖的系に対して行った場合、水分子の拡散が制限される現象、すなわち制限拡散が観察される。この制限拡散を観測することで、細胞の構造状態変化を数マイクロメートルのスケールで把握できる。これまでこういった手法は植物、動物組織の水分子の透過性評価<sup>14)-15)</sup>に使われてきた。しかし、NMR を使った凍結・解凍ダメージの評価という観点からは詳細に検討されてこなかった<sup>16)</sup>。そこで、本研究では凍結・解凍サイクルが植物組織（野菜）及び動物組織（魚肉）に与えるダメージについて NMR による水分子の拡散挙動の観測を行い、比較検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料の調整

試料には北海道産黄タマネギ *Allium cepa* L 約 300g) 及び、生メバチマグロ *Thunnus obesus* を使用した。これらの試料を Fig.1 に示すように、それぞれ 3mm-3mm-5mm に切り出し生鮮試料とした。生鮮試料を  $-18^{\circ}\text{C}$  の雰囲気内で 3 日間凍結、室温 ( $25^{\circ}\text{C}$ ) で解凍したものを凍結・解凍後試料とした。なお、凍結・解凍は 1 回、2 回、3 回繰り返し行い試料とした。

### 2.2 NMR を用いた拡散係数 $D$ の測定<sup>17)</sup>

NMR 装置はパルス磁場勾配アクセサリーを装着した Bruker AM200WB (4.7 Tesla) を使用した。パルスシーケンスは Fig.2 に示した通り、3 つの  $90^{\circ}$  RF パルスを組み合わせた stimulated echo 法を用いた。一回目の  $90^{\circ}$  パルスの直後と 3 回目の  $90^{\circ}$  パルスの直後にそれぞれ磁場勾配強度  $g$  [Gauss/cm], パルス幅  $\delta$  [ms] の磁場勾配パルスを挿入した。2 つの磁場勾配パルスの間隔  $\Delta$  [ms] が、拡散観測時間である。 $\delta$  と  $\Delta$  を一定に保ちながら磁場勾配強度 ( $g$ ) を変化させエコーシグ

ナルを観察すると、シグナル強度  $E$  は次式に従って減衰する。

$$E = \exp[-D(\gamma\delta g)^2(\Delta - \delta/3)] \quad (1)$$

ここで  $\gamma$  は水素原子  $^1\text{H}$  の磁気回転比で  $4258[\text{Hz/Gauss}]$  である。 $(\gamma\delta g)^2(\Delta - \delta/3)$  に対して  $\ln(E)$  をプロットして得られる直線の傾きから拡散観測時間  $\Delta$  における見かけの拡散係数  $D[\text{cm}^2/\text{s}]$  を求めた。本研究では、拡散観測時間 ( $\Delta$ ) を  $19.5 \sim 1210[\text{ms}]$  の範囲とし、磁場勾配強度 ( $g$ ) を  $3.0 \sim 37.8[\text{Gauss/cm}]$ 、測定温度は約  $20^{\circ}\text{C}$  で測定を行った。

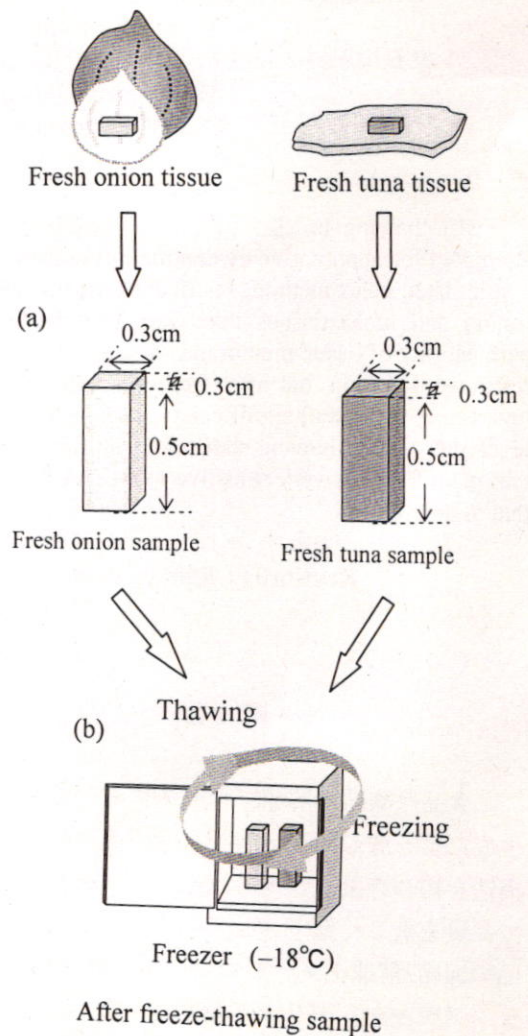


Fig.1 The treatment of samples. The samples (onion and tuna) were treated by freeze-thawing after cutting fresh samples into the size of 3mm-3mm-5mm. (a): fresh (b): after freeze-thawing.



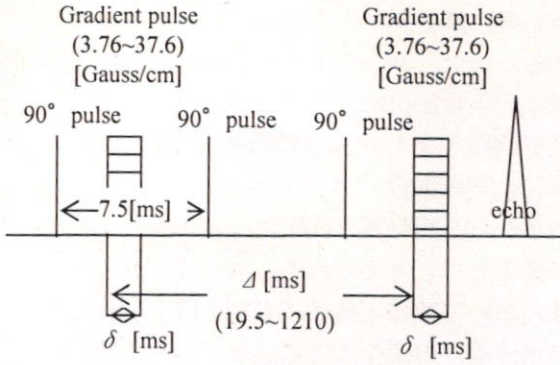


Fig.2 Stimulated echo pulse sequence

### 2.3 水透過係数 $p$ の計算<sup>14, 18)</sup>

水透過係数は NMR 測定データから求めることができる。本研究の様に観測している水、本研究では自由水、が障壁によって細かく区切られた空間に存在している場合、拡散係数と拡散観測時間をプロットすることで制限拡散現象を観測できる(Fig.3)。

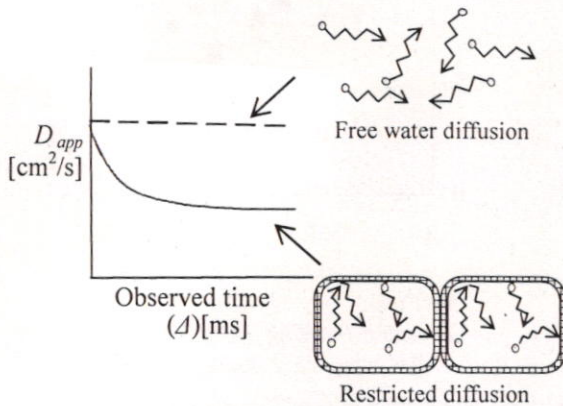


Fig.3 Image of the restricted diffusion. When there were water molecules in free space, the diffusion coefficients of water molecules were constant and there were no relation with the observed time ( $\Delta$ ). On the other hand, when there were water molecules in the limited space, diffusion coefficients was not constant decreasing with the observed time.

このような場合、式(2)を用いて水透過係数を求める事ができる。

今、組織構造がある程度浸透しうる障壁で仕切られた閉鎖的構造であると仮定し、拡散観測時間を無限大とした場合における拡散係数  $D_i$  は式(2)によって表せられる。

$$D_i^{-1} = D_0^{-1} + (p \times a)^{-1} \quad (2)$$

( $D_i$ :十分に拡散させた時の拡散係数,  $D_0$ :移動範囲に制限がない水の細胞質内における水の拡散係数,  $p$ :水透過係数,  $a$ :拡散距離(細胞サイズ))

多くの研究では、水透過係数と細胞サイズの両者を未知数として NMR データから推定している。このため、凍結・解凍後試料のように制限拡散が観測されにくくなると、細胞サイズを正確に測定できなくなる可能性が高い。しかし、光学顕微鏡観察結果から得られる細胞サイズを利用することで、生鮮組織においても凍結・解凍後の組織においても水透過係数を正確に求められると考えられる。そこで、本研究では光学顕微鏡観察と NMR 測定を組み合わせ水透過係数の評価を行った。ただし、本研究において水透過係数の計算には、測定データの精度を考慮して  $\Delta$  のゼロ最近傍( $\Delta=19.5\text{ms}$ )で得られた  $D_0$  を用いた。

## 3. 結果と考察

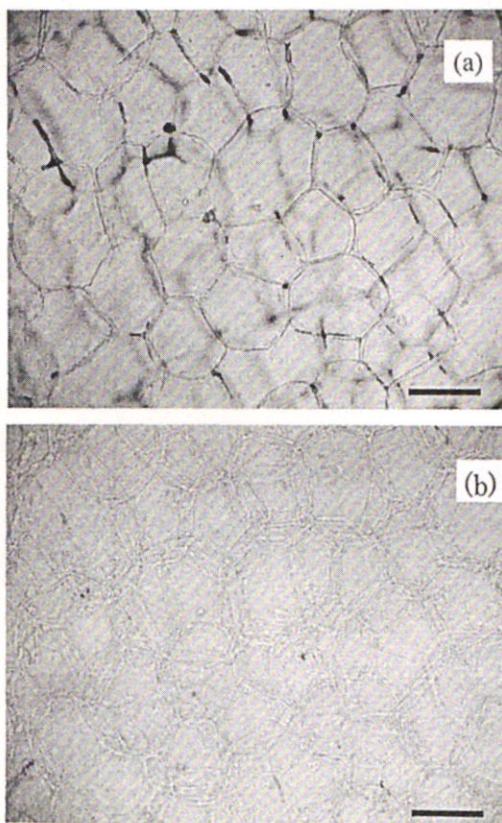
### 3.1 タマネギ組織の凍結・解凍後の変化

Fig.4 にタマネギ組織の顕微鏡写真を示す。凍結・解凍後の組織では若干、細胞壁、細胞膜の辺りが厚くなるという変化が観察された。しかし、凍結・解凍を繰り返し行っても大きく変化することはない、従来言われている様な細胞破壊や細胞膜の変化<sup>12)</sup>は観測されなかった。また、観察された細胞から平均値を計算した結果、サイズにも変化は見られず平均  $1.5 \times 10^{-2} [\text{cm}]$ であった。この様に光学顕微鏡観察では凍結・解凍後の変化はほとんど観測されなかった。

Fig.5 に拡散係数の測定結果を示す。生鮮タマネギ組織には、拡散係数が拡散観測時間と共に著しく減少する制限拡散が見られ細胞内の水の拡散を妨げる障壁が存在していることがわかった。凍結・解凍後組織では、凍結・解凍回数によって明らかな水分子の動きの違いが見られた。すなわち、凍結・解凍1回の組織では制限拡散は見られるものの、生鮮組織に比べて拡散係数が増加し、プロット全体が上方にシフトしている。凍結・解凍2回の組織では、さらに上方にシフトしており、凍結・解凍3回でほぼ制限拡散は見られなくなった。



水透過係数を Fig.6 に示す. 生鮮組織の場合, 光学顕微鏡観察の結果から得られた細胞サイズ  $a=1.5 \times 10^{-2}$  [cm] を NMR 測定結果から得られた拡散係数  $D_1$  及び  $D_0$  を式(2)に代入し, 水透過係数  $p=7.1 \times 10^{-4}$  [cm/s] が得られた. NMR 測定による他の生鮮植物組織の水透過係数 ( $p$ ) は約  $10^{-3}$  [cm/s]<sup>14), 20)</sup> であることから本方法で求められた値は妥当であると考えられた. 凍結・解凍後組織についても同様に計算した結果,  $p=2.8 \times 10^{-3}$  [cm/s] が得られた. つまり, タマネギ組織は凍結・解凍を施すことで1オーダー水透過性が増加することがわかった.



Scale bar = 100µm

Fig.4 Optical microscope image of the onion tissue, (a):the fresh onion tissues (b): the onion tissue after freeze-thawing.

既往の研究によれば一般に植物組織の「細胞壁」は水を自由に透過させる構造<sup>21)</sup>であり, 「細胞膜」は水透過性が非常に低いことが知られており, 凍結・解凍に伴う脱水スピードに細胞膜が耐えられず細胞がダメージを受けると考えられている<sup>9)</sup>. タマネギ組織においても同様に凍結・

解凍処理は細胞膜に大きな影響を与えると考えられる. また, 本研究の顕微鏡観察によって細胞膜に大きな変化が観察されなかった理由は解像度の問題であり, 電子顕微鏡観察では凍結・解凍による膜融合<sup>22)</sup>の変化が報告されている. この事からも細胞膜の変化により組織の水透過性が変化したと考えられる. よって, タマネギ組織において凍結・解凍後の細胞膜の変化と組織の水透過性の変化の間には明らかな関連性があり, この変化が凍結・解凍後の組織に張りが無くなる原因であることが示唆された.

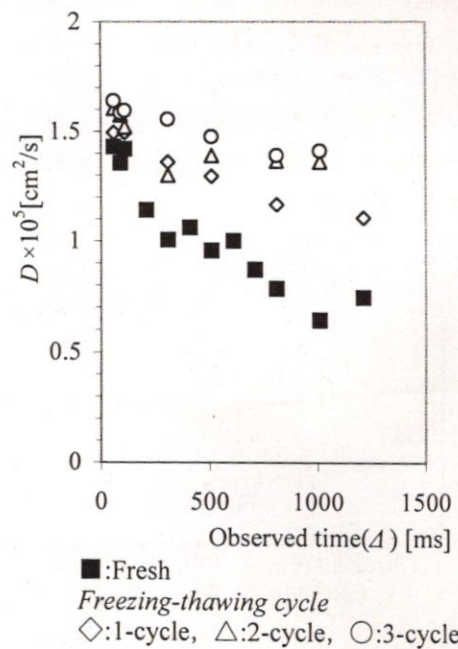


Fig.5 The diffusion coefficient of water molecule in fresh and frozen-thawed onion tissue.

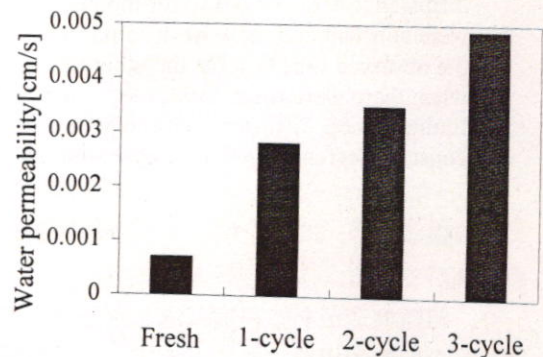


Fig.6 Influence of the freeze-thawing cycle on the water permeability of onion tissues.

また, 水透過係数に関して, 凍結・解凍1回で

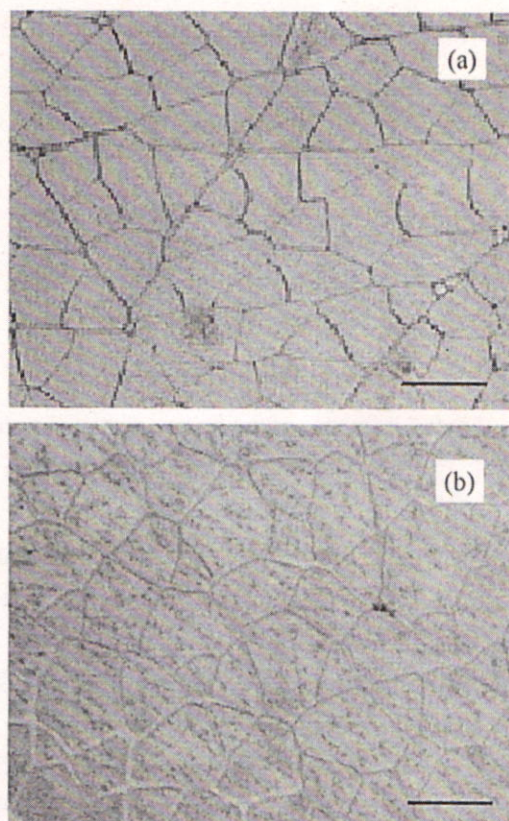


は  $2.8 \times 10^{-3} [\text{cm}^2/\text{s}]$ , 2回では  $3.5 \times 10^{-3} [\text{cm}^2/\text{s}]$ , そして, 3回では  $4.9 \times 10^{-3} [\text{cm}^2/\text{s}]$  と徐々に増大する変化が捉えられた. よって, 繰り返し凍結・解凍を行うことで細胞膜は徐々にダメージを大きく受け, 最終的には確実に全ての細胞の細胞膜に変化が起きると考えられる. これらの結果は凍結・解凍による細胞膜のダメージ程度の違いを表していると考えられ, 凍結・解凍の繰り返しがタマネギ組織に大きなダメージを与える事が定量的に評価されたとと言える. すなわち, 本方法を用いることで凍結・解凍後の組織変化を定量的に比較可能となり, 凍結・解凍後の農作物の品質向上を実現する評価法の1つとして利用可能であると考えられる.

### 3.2 マグロ組織の凍結・解凍後の変化

Fig.7 にマグロ組織の光学顕微鏡写真を示す. 凍結・解凍後には細胞内に小さな傷 (Fig.7-b) ができるといふ明らかな変化が観測された. この様な変化は筋原繊維タンパク質の変性が原因とされ, 魚肉の品質に関わる重大な変化と考えられている.<sup>23)</sup>しかし, この変化が組織にどの様な影響があるのかは明らかでない. また, 細胞の形状には変化がなく, 細胞のサイズは約  $1.0 \times 10^{-2} [\text{cm}]$  であった.

Fig.8 には拡散係数の測定結果を示す. マグロ組織においても生鮮組織で制限拡散が見られた. しかし, 生鮮組織と凍結・解凍後組織で制限拡散状態にほとんど差が観測されなかった. しかし, 凍結・解凍を3回繰り返し行った試料では若干上方へのシフトが見られたが, 非常にわずかな変化であった. また, 水透過係数 (Fig.9) においては, 生鮮組織と凍結・解凍後組織で差は見られなかった. これらの結果より, マグロ組織では凍結・解凍による水透過性の変化が観測されないと考えられた.



Scale bar = 100 $\mu\text{m}$

Fig.7 Optical microscope image of the tuna tissue, (a): the fresh tuna tissue (b): after freeze-thawing of tuna tissue.

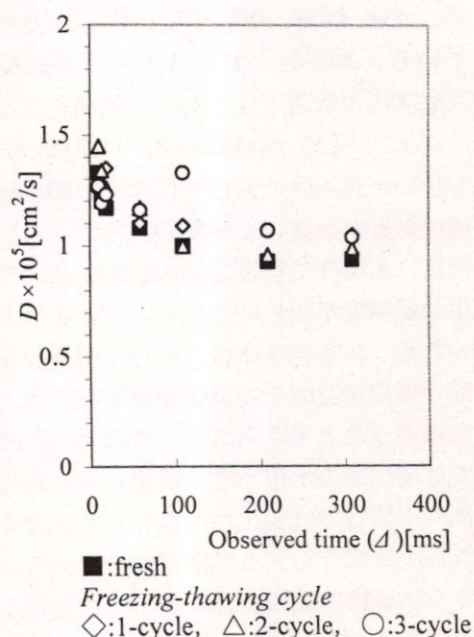


Fig.8 The diffusion coefficient of water molecule in fresh and freeze-thawed tuna tissue.



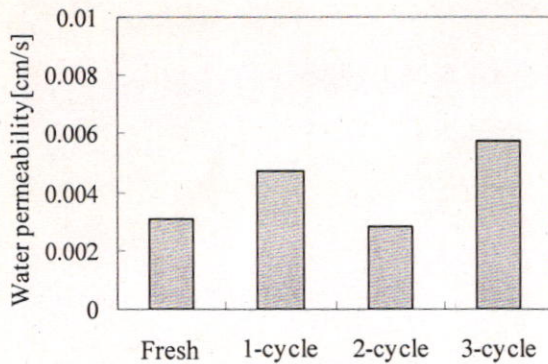


Fig.9 Influence of the freeze-thawing cycle to the water permeability of tuna tissue.

マグロ組織においてタマネギ組織の様な凍結・解凍後の水透過性の差が観測されなかった原因として2つのことが考えられる。それは、植物と動物の細胞膜の性質の差と磁場勾配強度の問題である。

マグロ組織には凍結・解凍後の顕微鏡による細胞内部の変化が観測されていることより、凍結・解凍による組織変化がないとは考えられない。しかし、動物組織を構成する細胞の形は、植物組織とは異なり細胞膜のみで構成され<sup>21)</sup>、動物の細胞膜は水透過性が高く、凍結・解凍に伴う脱水が起こっても細胞膜が破壊されにくく、組織は凍結・解凍の影響を受けにくいと考えられている。本研究においてもマグロ組織に凍結・解凍後の水透過性の変化は観測されなかった。よって、凍結・解凍後のマグロ組織の変化は細胞膜の水透過性の変化ではなく、細胞膜内の損傷の影響が大きいと示唆された。

次に、本研究で拡散挙動の観測に用いている磁場勾配強度が比較的小さいことがあげられる。そのため、筋肉部の細胞<sup>24)</sup>の様に特異な細胞の内部の極微細空間での拡散挙動を捉えることができなかつたと考えられる。すなわち、組織単位では細胞膜の水透過性に変化は見られないが、内部の小器官では変化が起きていると考えられ、これら小器官でおきる拡散現象を捉えるためにはさらに磁場勾配強度を大きくした測定をする必要がある。また、凍結・解凍を3回繰り返した試料で、わずかにではあるが拡散係数に変化が観測されたことは、細胞単位でも観測できるほどのダメージが小器官に与えられたためである

と考えられ、本研究で用いた NMR においても変化が観測されたとも考えられる。つまり、NMR を用いてマグロ組織のダメージを測定するには磁場勾配強度を大きくする必要がある、さらに小さなスケールでの観測が必要であろう。そのため、磁場勾配強度を大きくした NMR 測定を行うことで、マグロ組織のダメージも定量的に比較可能であると思われる。

### 3.3 タマネギ組織とマグロ組織の水透過性の差

Fig.10 に生鮮タマネギ組織とマグロ組織の拡散係数の差を示す。この結果より、2つの組織の制限拡散挙動に差があること、すなわち、組織の水透過性の差異が確認された。タマネギ組織では  $D_0$  を基準にした時、 $D_t$  は 60% の減少となるのに対し、マグロ組織では 30% の減少にとどまっており、制限拡散現象に約 2 倍の差がある。既往の植物、動物組織の水透過性の研究においてもこの様な差が観測されており、植物、動物組織の性質に差があることは明確であると考えられる。この結果を踏まえ、凍結・解凍後の食品品質の向上を実現するためには動物、植物組織の性質を明らかにし、この差を理解することが重要であると思われる。

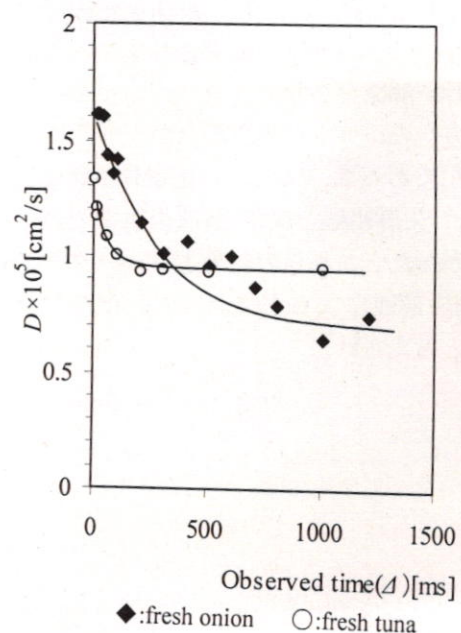


Fig.10 Comparison of restricted diffusion behavior between fresh onion and fresh tuna tissue.



## 4. 結 論

凍結・解凍を繰り返し行うことで食品が受けるダメージの程度を NMR による拡散係数の測定によって観測できることがわかった。

タマネギ組織の凍結・解凍後の水透過係数は、約 1 オーダー増加し、この変化は細胞膜のダメージによるものであることが示唆された。一方、マグロ組織は凍結・解凍による水透過性の変化はなかった。マグロ組織で凍結・解凍による変化が観測されない理由には、細胞膜の水透過性が生鮮状態においても高いといった性質によると考えられる。しかし、魚肉組織においても高磁場 NMR を用いることで組織内の微小部位のダメージも観測可能であると考えられる。

また、生鮮タマネギ組織にははっきりとした制限拡散現象が確認されたが、生鮮マグロ組織では制限拡散は弱く、明らかに細胞膜の性質に差がある事が示唆された。

以上のように、本研究によってタマネギ組織とマグロ組織では水透過性に関して細胞膜の性質に明らかな差があり、NMR を用いることで凍結・解凍によるダメージを定量的に評価可能であることがわかった。一方で、本研究による凍結・解凍後の食品組織の評価は、凍結・解凍処理後の組織の水透過性という変化の 1 側面の評価法であり、実際の細胞の膨圧や食感との関係性を合わせて検討していく必要がある。しかしながら、本評価法のように組織の性質の差の理解を助け、凍結・解凍のダメージを定量的に評価可能にすることは凍結食品の品質向上に非常に役立つと考えられる。

## 文 献

- 1) T. Yamada, K. Kuroda, Y. Jituyama, D. Takezawa, K. Arakawa and S. Fujikawa : *Planta*, **215**, 770 (2002).
- 2) C. Fuster, G. Prestamo and M. P. Cano : *J. Sci. Food Agric.*, **64**, 23 (1994).
- 3) Y. C. Tseng, Y. L. Xiong, J. Feng, J. C. Ramirez-Suarez, C. D. Webster, K. R. Thompson and L. A. Muzinic : *Journal of Food Quality*, **26**, 285 (2003).
- 4) 宮脇長人 : 低温生物工学会, **44**(1), 43 (1998).
- 5) E. Ishikawa, Seoung-Kown Bae, O. Mikawaki, K. Nakamura, Y. Shiinoki and K. Ito : *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **83** (3), 222 (1997).
- 6) 杉山純一 : 日本食品工業学会誌, **35**, 647 (1988).
- 7) 杉山純一 : 日本食品工業学会誌, **35**, 717(1988).
- 8) K. Toyoda, H. Kojima, S. Miyamoto and R. Takeuchi : *Drying Technol.*, **15**, 2025 (1997).
- 9) K. Cole : *J. Gen. Physiol.*, **15**, 641 (1932).
- 10) S. Ohnishi, T. Fujii and O. Miyawaki : *J. Food Prop.*, **5**, 317 (2002).
- 11) 五月女格, 大下誠一, 瀬尾康久, 川越義則, 鳥居徹 : 農業機械学会誌, **65**, 86 (2003).
- 12) I. Sotome, S. Oshita, Y. Kawagoe, Y. Torii, Y. Seo : *Trans. ASAE*, **47**, 1207 (2004).
- 13) ファラーベッカー(赤坂一久, 元敏明 訳) : 「パルスおよびフーリエ交換 NMR」, 吉岡書店, 京都(1976).
- 14) A.V. Anisimov, N.Y. Sorokina, and N.R. Dautova : *Magn. Res. Imaging*, **16**(5), 565 (1998).
- 15) C. A. Clark and D. L. Bihan : *Magnetic Resonance in Medicine*, **44**, 852 (2000).
- 16) 上田直康, 田尻明日香, 椎木靖彦 : 日本食品科学工学会大会講演集, **46**, 153(1999).
- 17) 大塚章宏 : 「NMR による多糖類ゲルの構造及び内部の水の運動性に関する研究」, 東京水産大学大学院水産学研究科修士論文 (1994).
- 18) J. E. Tanner : *J. Chem. Phys.* **69**(4), 1748 (1978).
- 19) 上村松生, 富永陽子, 鎌田崇, 中川原千早, 河村幸男, 小島研一 : 低温生物工学会, **50**, 15-20 (2004). 安藤寛子, 福岡美香, 宮脇長人, 鈴木徹 : 第 51 回低温生物工学会講演要旨, 34 (2005).
- 21) B. Alberts, D. Bray, J. Lulian, M. Raff, K. Robaets and J.D. Watson (中村桂子, 松原謙一 訳) : 「THE CELL 細胞の分子生物学」 pp.255, 1099-1110, 教育社, 東京 (1987).



- 22) T. Yamada, K. Kuroda, Y. Jituyama, D. Takezawa, K. Arakawa and S. Fujikawa : *Planta*, **215**, 770 (2002).
- 23) 大泉徹, 村山寛仁, 新井健一 : 日本水産学会, **48**(2), 219 (1982).
- 24) 加藤舜朗 : 「食品冷凍の理論と応用」 pp.424-427, 光琳, 東京(1972).