

生ノリ葉体の凍結保存

國本正彦^{1*}・鬼頭 鈞^{2*}

Cryopreservation of *Porphyra* laver

Masahiko Kunimoto^{1*} and Hitoshi Kito^{2*}

Porphyra farming is one of the most important aquaculture in Japan. Ten billion "Nori sheet" have been produced every year. However, almost harvested *Porphyra* have been processed to dried sheet only. It is very difficult to keep a good quality of fresh *Porphyra* for a long time, even if it was frozen. Because cells in *Porphyra* laver dead by freezing and successive cryopreservation. Dead laver lost a unique texture and flavor. Therefore, we search for the freezing and cryopreservation conditions to keep a living laver for several months. Two important facts were known to survive the laver cells under freezing and cryopreservation process. Firstly, laver must be cooled below 1.0°C per minute. Secondly, laver must be cryopreserved with cryoprotective additive such as a 20% D-glucose solution. Both this cooling rate and cryoprotectant were necessary for cryopreservation of living *Porphyra* laver. A life and death of laver was discriminate easily by the observation of the cells using a microscope. Plasmolysis was observed in the dead cells. Plasmolysis caused by freezing or cryopreservation did not recover after thawing and successive incubation.

1 緒言

アマノリ葉体はそのほとんどが養殖により生産される水産物で、年毎の生産量に変動はあるものの、生重として年間約39万トンの生産があり最も安定した水産物の一つである。しかしながら、アマノリは板ノリに加工されて流通するものがほとんどで、食生活の変化に対応できないで価格、消費ともに低迷している。アマノリの生産は12月から翌年の2月の冬季に集中し、ただちに板ノリに乾燥後、冷凍保存されて周年の消費に対応している。未加工の生ノリ葉体は産地で酢の物などに利用されているが、これは冬季の食品としては好まれるものではなく、全国的に流通していない。生ノリを冷凍保存し、夏季に流通することが可能になれば、新しい食材としての商品化が期待できる。生ノリ葉

体の凍結保存を困難にしている問題点は、凍結によるアマノリの細胞の死滅による食感と風味の劣化で、この品質の劣化を防ぐために、解凍後も細胞の生きていることが必要である。アマノリの凍結保存に関しては、多くの研究が行われてきた¹⁾。長期の保存には液体窒素による凍結と保存が理想であるが、コストが高く、食品の保存法として利用することは困難である。そこで、本研究では、凍結・凍結保存の過程を経ても、死細胞の発生が少ない葉体を得る条件を明らかにすることを目的にした。

2 試料および実験方法

2.1 試料

本実験では宇部市岬で養殖されたスサビノリ *Porphyra yezoensis* f. *narawaensis* の2番摘みの葉体を用いた。

2002年5月22日受付. Received May. 22. 2002.

1 *水産大学校食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University).

2 *水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University).

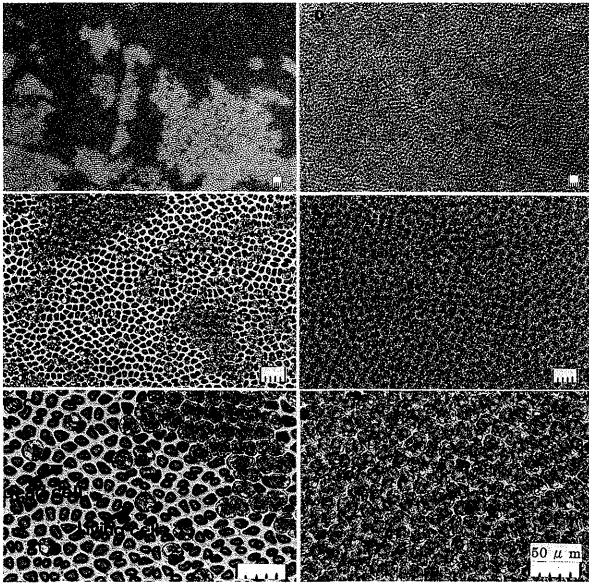


Fig. 1. Freezing injury in *Porphyra* laver. Injured part (A-C) of thawed laver was changed to purplish color. Also, injured cells produced plasmolysis. Cells in survived part (D-E) did not produce plasmolysis.

2.2 葉体の生死の判定

凍結あるいは凍結保存後の葉体の生死の判定は解凍後の葉体を検鏡し、細胞質の収縮の有無と培養による成長の確認によった。

2.3 葉体の凍結

培地あるいは凍結保護剤を含む溶液にスサビノリ葉体を浸漬した後、葉体を取り出し、濡れたまま0.25mlの精液管に詰め込み、プログラムフリーザーで冷却速度を制御しながら -35°C まで冷却・凍結し、凍結後は -35°C の冷凍庫に移して保存した。凍結保護剤は培地に溶解した。

2.3 葉体の培養

凍結保存後の精液管は 15°C のエルトシュライバー培地(ES培地)で解凍して葉体を取り出したあと、新しい 15°C のES培地に移して培養した。

3 結果と考察

3.1 葉体の解凍後の生死の判定

スサビノリの葉体をES培地から取り出したそのままの状態 -35°C の冷凍庫に放置して一晩凍結した後、 15°C の培地で解凍して、葉体の細胞を観察した結果をFig. 1に示

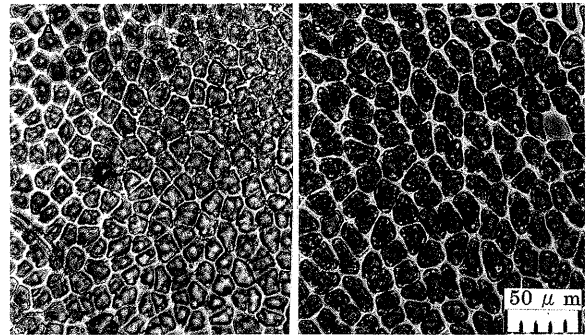


Fig. 2. Cells of dry laver(A) and returned laver in ES medium(B). Laver dried to 9.7% moisture content in refrigerator for 7 hours at 5°C . At this moisture, plasmolysis did not produce.

した。Fig. 1のAからCのように凍結障害を受けた部分では細胞質の収縮が認められる。一方、Fig. 1のDからFの凍結障害が出ていない部分では細胞質の収縮は観察されず、細胞内小器官も明瞭に観察できた。死滅した細胞では原形質分離が認められ、このことから細胞外凍結によって引き起こされる細胞の脱水収縮が凍結障害の原因と考えられる。この現象は赤血球、ウニ卵細胞で認められている現象とよく似ており、最小体積説で説明される凍結障害であると考えられる¹⁾。細胞質の収縮した細胞は解凍後に培養を行っても回復することなく、培養とともに色落ちと細胞の崩壊が進行した。海藻の細胞の生死の判定には、ニュートラルレッドやエリスロシン染色による染色性の違いによる判定方法が報告されているが²⁾、スサビノリの葉体では判別は困難だった。細胞の生死の判定は細胞質の収縮の有無で判定する方法が簡便で信頼性が高かった。

3.2 凍結保護剤による脱水がアマノリ葉体の生死に及ぼす影響

凍結障害により死滅した細胞では細胞質の収縮が認められ、細胞外への水の移動が原因であったが、このことは乾燥したアマノリの葉体を冷凍して種網に用いる冷凍種網の技術と矛盾する¹⁾。この矛盾を解決するため、風乾と凍結保護剤の高張液による脱水後の細胞を比較した。風乾は 5°C の冷蔵庫内で葉体を乾燥し、その一部を検鏡と培養に用い、残りを水分含量の測定に用いた。凍結保護剤はD-グルコース、D-ソルビット、L-プロリン、ポリエチレングリコール4,000を用い、それぞれの0-70%溶液に葉体を浸漬して、細胞質の収縮を観察した。Fig. 2のAに水分含量9.7%まで乾燥した葉体の細胞を示したが、細胞質の収縮

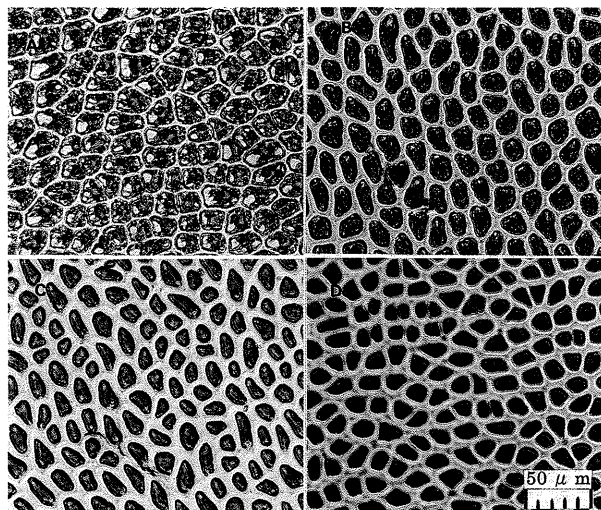


Fig. 3. Cells of dehydrated laver in glucose solution. Cells of dehydrated laver in 0, 20, 40 and 70% glucose solution were showed in photograph A,B,C,D, respectively.

は起きていない。一方、Fig. 3のA(0%), B(20%), C(40%), D(70%)にグルコース溶液中で脱水した葉体の細胞を示したが、20%と40%の溶液で細胞質の収縮が起きている。しかし、細胞内小器官は認められる。一方、70%の溶液で脱水した葉体の細胞では細胞内小器官も認められない。これらの風乾あるいは高張液で脱水した葉体をES培地にもどして、一日培養した葉体の細胞をFig. 2のBとFig. 4のA(0%), B(20%), C(40%), D(70%)に示した。風乾したもの、0-40%のグルコース溶液中で脱水したものは細胞質の収縮が回復して、その後の培養で発育が見られた。一方、強く収縮したグルコース70%溶液中で脱水したものは、死滅していた。凍結保護剤による脱水の影響はソルビット、プロリン、ポリエチレングリコール4,000でもグルコースと同様だった。これらの結果から考察されることは、脱水速度が細胞質の収縮に関与しており、脱水速度が速くて細胞膜の内外で浸透圧の差が増大すると細胞膜は半透過性を失ってしまう、赤血球で見られる現象がアマノリの細胞でも起きていることが考えられる⁴⁾。アマノリ葉体の水分含量が低下すると対凍性が増大することが報告されているが、このことは細胞膜内外の浸透圧の差が少なくなれば細胞膜に障害が起き難いことを示唆している⁴⁻⁵⁾。これらの結果から、スサビノリ葉体の脱水は速度を調整できれば有効であると考えられる。凍結保護剤の溶液中で脱水すると脱水速度が速く約15分で細胞質の収縮が起きるため、50%以上の凍結保護剤の溶液は使えない。また、葉体を乾

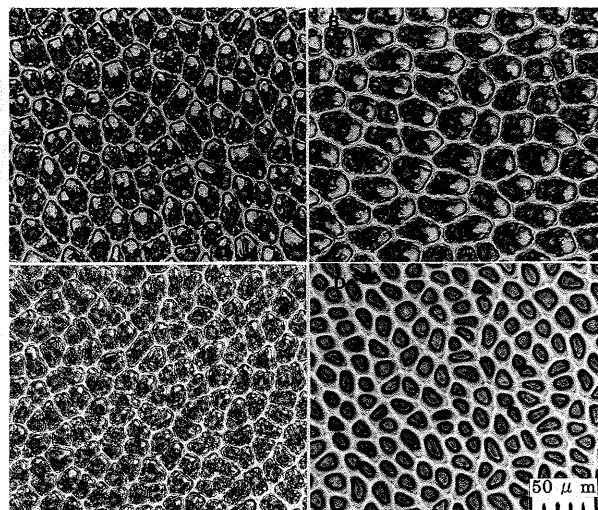


Fig. 4. Cells of returned laver in ES medium. Cells of laver returned in medium after dehydration in 0, 20, 40 and 70% glucose solution were showed in photograph A,B,C,D, respectively.

燥する方法は短期の保存には適しているが、凍結保存が数ヶ月の長期に渡る場合には、さらに氷の昇華による乾燥が進んで死滅する。また、大量の葉体の水分を均一かつ速やかに乾燥することは工業的には困難である。

3.3 冷却速度と凍結保護剤の影響

スサビノリ葉体を冷却すると細胞内の水が細胞外に移動して凍結し、このとき細胞質が収縮して死滅が起きることから、冷却速度が水の移動に影響していることが予想されるため、冷却速度の細胞の生存への影響を検討した。葉体を入れた精液管の冷却にはプログラムフリーザー(東京理科製, MPF-1000)を用い、Fig. 5に示すプログラムによった。冷却速度の調整はセグメント2の設定時間を変えて対応した。このとき精液管に葉体を入れる溶液として、0~60%の凍結保護剤溶液を用いた。Fig. 6のAに0~60%のグルコースの溶液中で0.1°C/分~1.0°C/分の冷却速度で凍結した後、解冻し、ES培地に移して一日培養した葉体を示す。グルコース濃度が50~60%では冷却速度に関係なく紫色に変色した細胞の死滅した部分が認められるが、グルコース濃度が20~40%では冷却速度に関係なく葉体で死滅した部分がほとんど観察されない。Fig. 6のBに0~60%のプロリンの溶液中で0.1°C/分~1.0°C/分の冷却速度で凍結した後、解冻し、ES培地に移して一日培養した葉体を示す。プロリン溶液中で凍結した葉体では、冷却速度の影響が強く現われ、プロリン濃度が40%では0.5°Cと

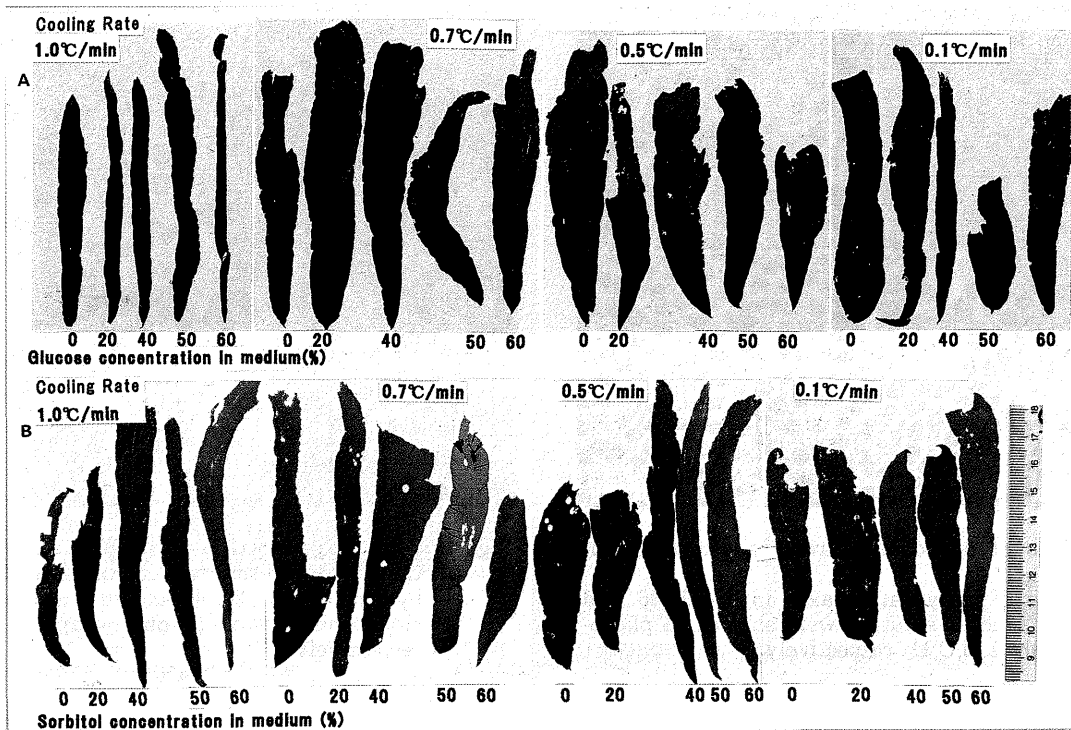
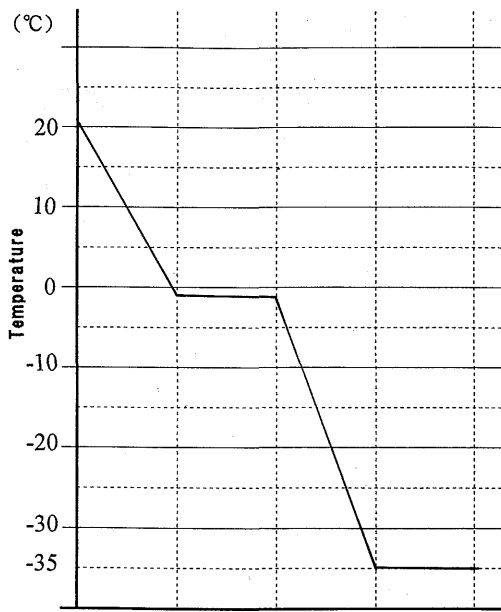


Fig. 6. Effect of cooling rate and cryoprotective additives on survive of laver. Lavers were frozen at 0.5°C/min with 0-60% glucose(A) solution and 0-60% proline solution (B).



Segment	0	1	2	3
Set up temp.	-1	-1	-35	-35
Set up time	0:22	0:05	1:08	1:00

Fig. 5. Program time chart for *Porphyra* laver freezing. Segment 2 was altered to change the cooling rate.

0.7°C/分の冷却速度で凍結した葉体でも死滅した部分が多くなる。また、プロリンとともに凍結した葉体は保存中に死滅した。ソルビットとともに凍結した場合には障害は現われず、細胞膜不透過性の保護剤であるグルコースと同じ程度の保護効果がみられる⁹⁾。これらの結果から保護剤の種類により保護効果が異なることがわかった。また、20~40%グルコース溶液のような適切な保護剤を用いると、本実験で用いた冷却速度0.1~1.0°C/分の範囲内では冷却速度の影響がみられないことがわかった。

3.4 凍結保存中の細胞の死滅

0~50%のグルコース溶液中で0.5°C/分の冷却速度で-35°Cまで冷却して凍結したスサビノリの葉体を-35°Cの冷凍庫で30日間保存した後、15°Cの海水中で解凍した結果をFig. 7に示す。凍結直後では収縮した細胞がみられなかった0%と40%のブドウ糖溶液中凍結した葉体でも、30日の保存後には収縮した多くの細胞が観察され、凍結中にも細胞質の収縮が進行していることがわかった。一方、20%のグルコース中で凍結・保存した葉体では収縮した細胞は認められなかった。6ヶ月後の葉体でも収縮は認められず、20%のグルコース溶液に凍結保護効果があることを示していた。20%のソルビット溶液でも、グルコースと同等の効

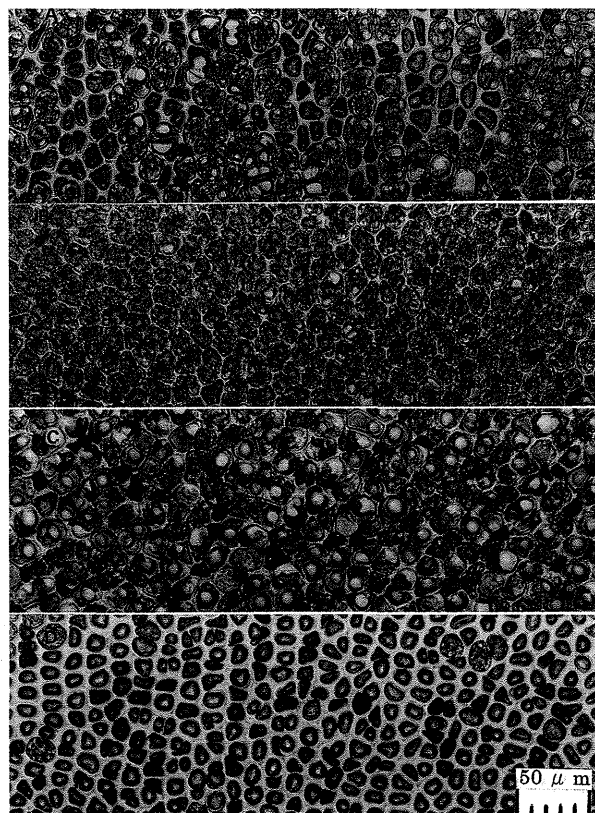


Fig. 7. Cells of thawed laver after cryopreservation for 30 days with glucose. Lavers were frozen at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with 0(A), 20(B), 40(C) and 50%(D) glucose solution. After 30 days cryopreservation, cells of thawed lavers were observed.

果が認められたが、ポリエチレングリコール、プロリンは効果がなかった。これらの結果から、ササビノリの凍結保存には20%のグルコース溶液とともに $1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下の冷却速度で凍結して -35°C で保存すれば、少なくとも半年は生きた状態でササビノリ葉体を保存できることがわかった。しかし、大量の葉体をプログラムフリーザーで冷却速度を制御しながら凍結することは実用性に乏しいため、 -25°C の商業冷蔵庫中での凍結と保存を行った。アマノリの葉体を20%のブドウ糖溶液とともに6.5cmの円筒状のケーシングに詰め、ケーシングの表面と中心に温度計を設置して、 -25°C の冷凍庫内に置いて温度の低下を記録した結果をFig. 8に示した。一部ケーシングは冷却速度を低下させるため発泡スチロールの箱に入れて冷蔵庫内に置いた。ケーシングの表面でも $0.04^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度で、中心部が凍結を始めると約 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却しているが、それ以上は速くならなかった。この結果は冷凍機を使わなくても冷蔵庫で凍結が可能であることを示唆している。また、発泡スチロールの箱に入れて断熱する必要もなかった。これらの結

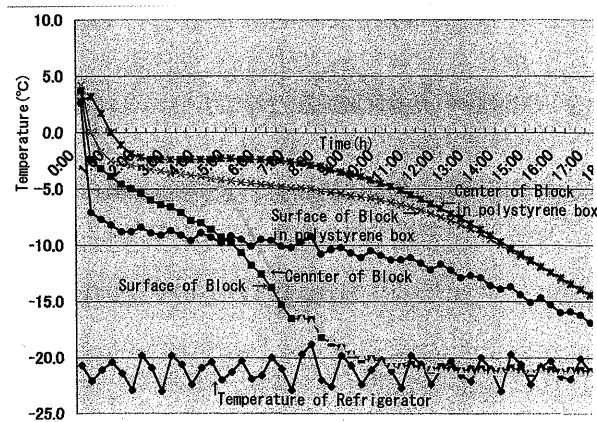


Fig. 8. Cooling of laver blocks in commercial refrigerator. Laver was packed in 6.5 cm dia. cylinder shape films with 20% glucose, and placed in refrigerator.

果から、ササビノリの葉体は生ノリとして商業冷蔵庫で大量に冷凍保存できることがわかった。

4 要約

生ササビノリ葉体を細胞が生きている状態で凍結・凍結保存する方法を明らかにして、周年流通の可能な食材とすることを目的に、凍結・保存の条件を検討し、次の結果を得た。

- (1) アマノリ葉体の生死は細胞質の収縮で判定できる。
- (2) アマノリ葉体は20%のグルコース溶液とともに $1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下の冷却速度で凍結することにより、生きたまま凍結することができた。
- (3) アマノリ葉体は20%のグルコース溶液とともに -35°C で保存すれば少なくとも6ヶ月は生きたまま保存することができた。
- (4) -25°C の商業冷蔵庫での凍結でも $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下の冷却速度でアマノリの凍結に使用できる。

以上の結果から、生ノリの凍結保存を行う条件が明らかになった。

引用文献

- 1) 藤吉栄治：凍結保存，有用海藻のバイオテクノロジー（能登谷正浩編），恒星社厚生閣，1997，pp.105-115.
- 2) N. Saga：Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst., 53, 43-53 (1989).

- 3) H.T. Meryman : *Annu. Rev. Biophys.*, **3**, 341-363 (1974).
- 4) 右田清治 : 長崎大水研報, **21**, 131-138 (1966).
- 5) 倉掛武雄・堀淳 : 冷凍, **41**, 15-29 (1966).
- 6) 僧都博 : 微生物の凍結および乾燥障害と耐性, 凍結保存 (酒井昭編), 朝倉書店, 東京, 1987, pp. 23-29.