

해산어의 부분동결에 의한 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} -dependent Adenosine Triphosphatase 활성 및 근섬유의 미세구조 변화

Ⅲ. 저온저장 과정에서 방어 근육조직의 미세구조의 변화

최경호¹ · 박찬성*

효성여자대학교 식품영양학과

*경산대학 식품과학과

Changes in the Ca^{2+} and Mg^{2+} - dependent Adenosine Triphosphatase Activity and Ultrastructure of Marine Fishes by Partial Freezing

Ⅲ. Changes in the Ultrastructure of Muscle Tissues of Yellowtail during Low-temperature Preservation

Kyoung-Ho Choi¹ and Chan-Sung Park*

Dept. of Food Science and Nutrition, Hyosung Women's University, Hayang 713-702, Korea

*Dept. of Food Science, Kyungsan University, Kyungsan 712-240, Korea

Abstract

Yellowtail fishes(*Seriola quinqueradiata*) were submitted to the storages using ice-cooling(0°C), partial freezing(-3°C) and freezing(-20°C) method. Changes in the structures of muscle during storage at different temperatures were investigated. The ice-cooling and partial freezing storage caused early decomposition of glycogen granules and mitochondrial inner membrane. Muscle fibers days of the storage. The partial freezing storage also caused decomposition of glycogen granules and mitochondrial inner membrane, but it was accorded to much slower manner comparing with that of ice-cooling storage. The scars of ice crystals were appeared after three days of storage. The number and size of the crystal increased as progressing of the storage. They were circular and mostly located between fibers. When using the freezing storage, glycogen granules were mostly found from the muscle cell even after fourteen days of storage. Mitochondrial inner membrane maintained their integrity. The scars of ice crystals were also found, however, different from those of partial freezing storage. Their existing sites were random and their shapes were irregular. In many cases, they located in the fiber and had keen edges. Fibers were broken mostly at the Z-lines on fourteen days of storage. From these results, it was concluded that partial freezing storage can repress autolytic enzymic action and can reduce the physical damage from ice crystals which is caused by freezing.

Key words : yellowtail fish, ultrastructure of muscle, low-temperature preservation

¹To whom all correspondence should be addressed

서 론

근간 생선의 단백질 변성억제와 선도유지를 위한 방법으로 $-1 \sim -5^{\circ}\text{C}$ 의 범위를 이용하는 부분동결 (partial freezing, 이하 PF라 약함) 저장법이 개발되어 이 저장법이 상시고 등의 이름으로 가정용 냉장고에 채택되어 생선과 야채 등의 저장에 널리 이용되고 있다.

PF저장에 이용되는 온도는 일반식품에 있어서 최대 빙결정 생성대에 해당하는 온도로서¹⁾, 이 온도 범위에서 식품을 저장하면 식품내부에 생성된 빙결정의 성장으로 인하여 조직의 기계적인 파괴를 초래할 뿐만 아니라 단백질 변성을 촉진하는 등, 전반적인 식품의 품질을 저하시키기 때문에 함수율이 높은 식품의 저장법으로는 바람직하지 못한 것으로 인식되어 왔다. 실제로 Saito 등²⁾은 육류의 PF저장에서 느린 동결과정으로 인한 근육중 ATP의 분해 및 유기산류의 축적 등의 품질저하 현상을 보고 하였다.

그러나 이러한 PF저장의 불리점에도 불구하고 海産魚의 경우에는 田中 등³⁾을 위시한 많은 연구자들이⁴⁻⁸⁾ 2~3주의 단기 저장법으로서의 유효성을 보고하고 있다. 이것은 0°C 直下의 온도를 이용하여 세균 증식을 억제하는 한편 빙결정 생성시기를 지연시킴으로 일정기간 동안 어육의 선도를 유지시키는 방법으로서, Nowlan 등⁹⁾과 Kakuda 등¹⁰⁾은 해산어에서, 李 등^{11,12)}과 Kato 등¹³⁾은 담수어에서 각각 PF저장의 선도유지 및 단백질변성 억제효과를 보고하였다. 한편, Aleman 등¹⁴⁾은 PF고등어의 저장에서 해당과정 관련 효소류의 활성이 억제 됨으로서 빙장의 경우보다 현저히 긴 기간동안 해당작용이 지속됨을 보고하였고 Lee 등¹⁵⁾도 PF저장의 경우가 빙장에 비하여 생화학적 변화가 억제되고 동결저장어에 비하여 어육 조직의 물리적 변화가 억제 됨을 보고하였다.

PF저장의 빙장에 비하여 선도유지에 효과가 있음은 이론의 여지가 없으나 동결저장에 비하여 조직변화를 억제하는 원인은 확실치 못하여 본 연구에서는 그 원인을 규명하기 위하여 방어를 공시어로 하여 각각 빙장, PF저장 및 동결저장 하면서 저장 과정중에 일어나는 근육조직의 형태적 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

공시어

공시어로는 방어 (Yellowtail fish, *Seriola quinqueradiata*)를 사용하였으며 길이 $40 \pm 2\text{cm}$, 무게 $650 \pm 10\text{g}$ 의 활어를 구입하여 공시하였다.

저장

공시어를 한 마리씩 film으로 이중포장하여 빙장 (0°C), PF저장 (-3°C) 및 동결저장 (-20°C)하였다. 빙장의 경우에는 얼음에 채워 0°C 의 냉장고에 보관하였고, PF저장의 경우에는 $-3 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 의 대류식 저장고에, 그리고 동결저장의 경우에는 $-20 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 의 동결실에 보관하였다.

현미경 시료제작

광학현미경 시료는 정 등¹⁶⁾의 방법에 따라 제작하였다. 즉, 등부의 근육을 2mm크기로 細切하여 bouin 용액으로 고정하고 50% ethanol로 여분의 혈액과 고정약을 세척하였다. 이후 ethanol과 tert-butyl-alcohol (TBA)로 탈수하였으며, paraffin으로 包埋한후 microtome (Leitz)으로 절편하였다. 절편은 slide glass에 부착시키고 hematoxylin과 eosin으로 이중염색한 다음 광학현미경 (Olympus)으로 검경하였다.

전자현미경 시료는 최 등¹⁷⁾의 방법에 따라 등부의 근육을 약 5mm 크기로 절취한후 0.2% osmic acid로 예비고정하고 예비고정액 중에서 다시 2mm 이하의 크기로 세절하였다. 이후 2% osmic acid로 4°C 에서 18시간 본고정하였으며 여분의 고정액을 인산완충용액으로 세척하고 0.2% uranyl acetate 수용액으로 3시간 염색하였다. 이후 70, 90, 95, 100% ethanol 및 propylene oxide로 각각 30분간 탈수하였으며 100% ethanol 및 propylene oxide는 2회 반복 처리하였다. 이후 Epon mixture와 propylene oxide의 1:1 용액으로 4°C 에서 24시간 전포매한 후 Epon mixture에 40, 55, 60°C 에서 각각 24시간 incubation하였다. 포매후 ultramicrotome (LKB, Ultratome V)으로 초박절편하고 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하였으며 염색한 시료는 전자현미경 (JEOL-100CX)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

생시료의 근육조직

저장전 생선의 근육조직을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. A는 광학현미경 사진으로서 근원섬유가 평행으로 발달되어 있었으며 섬유속 사이에는 mitochondria로 추측되는 구조물이 충전되어 있었다. B, C는 전자현미경 사진으로서 B는 횡단면, C는 종단면을 나타내고 있다. B에서 핵막, mitochondria, basal membrane 등이 완전한 상태로 관찰되었고 많은 glycogen입자가 존재하였다. 사진 C에서는 Z-line, transverse tubule 및 sarcoplasmic reticulum 등의 섬유구성요소들이 명확하였으며 전체적으로 skeletal muscle의 전형적인 모양을 나타내었다.

氷藏중 근육조직의 변화

빙장중 생선의 근육조직 변화는 Fig. 2 및 3과 같다. Fig. 2는 광학현미경 사진으로 저장 3일째 (photo A)에 수개소에서 근원섬유가 절단되었으며 저장 7일째 (photo B)에는 섬유속 배열의 규칙성이 현저히 흐트러졌다. 저장 10일째 (photo C)에서 섬유속 내부에

매우 작은 균열이 무수히 생겼으며 이후 부패가 완전하였다.

Fig. 3은 저장 3일 및 7일째의 전자현미경 사진으로써, 저장 3일째에는 glycogen 입자가 관찰되었으나 그 양은 대조구에 비하여 현저히 감소되었으며 mitochondria가 퇴행되었다 (photo A). 또한 Z-line이 대부분적으로 와해되었으며 (photo C), 저장 7일째에는 mitochondria의 내막구조가 완전히 퇴행되고 glycogen입자는 관찰되지 아니하였으며 (photo D 및 F) Z-line의 분해가 현저하였다 (photo E).

이상의 결과는 빙장시 생선의 근육조직에서 Z-line, mitochondria내막 및 glycogen입자들이 빠르게 소실되며 근원섬유가 절단됨을 나타내고 있다. 특히 섬유의 절단면이 둥근 형태를 나타낸 것은 myofibril까지도 분해됨을 나타내는 것으로서 Tokiwa 등¹⁸⁾과 Stromer 등^{19,20)}은 단백질 분해효소 (trypsin)에 의하여 우선적으로 Z-line이 소실됨을 보고하고 있고 박 등²¹⁾도 빙장시의 빠른 세균증식과 glycogen 입자의 소실 및 근원섬유의 변성을 보고하고 있다. 이로 미루어 빙장시에는 생선 근육조직의 효소 또는 오염세균에 의한 근육조직의 분해가 저장의 제한요소인 것으로 판단된다.

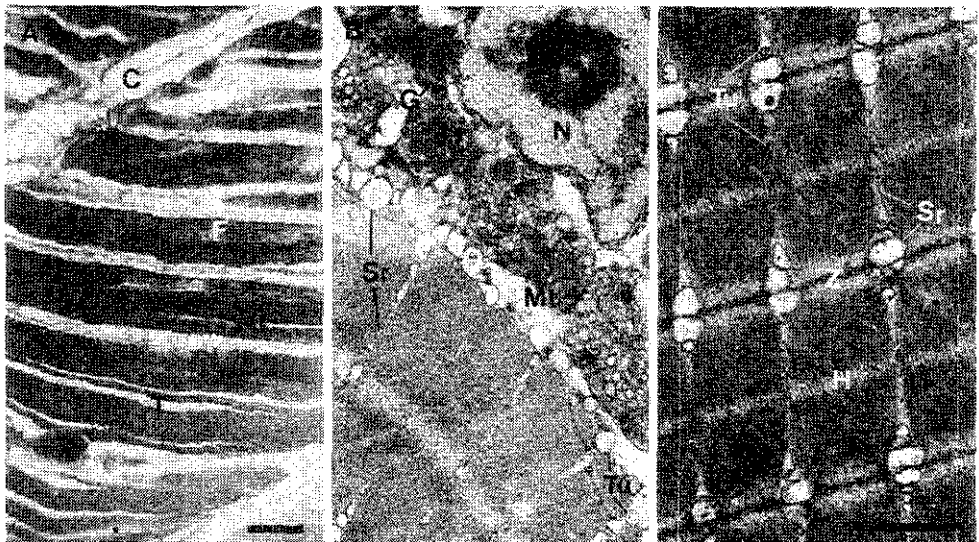


Fig. 1. A morphology of muscle fibers of yellowtail.

Photo A was taken by using a light microscope. Photo B and C were taken by using an electron microscope. Photo B shows the cross-sectioned fiber, while photo C shows that of a longitudinal section. Fibers in the photoes reveal typical morphology of skeletal muscle. Symbols are C : capillary vein, T : tubule, F : fiber, Sr: sarcoplasmic reticulum, N : nucleus, G : glycogen granule, M : mitochondrion, Tr : transverse tubule, Z : Z-line and H : H-zone. Scale line in photo A is 100 μ m and that in photo B and C is 1.0 μ m.

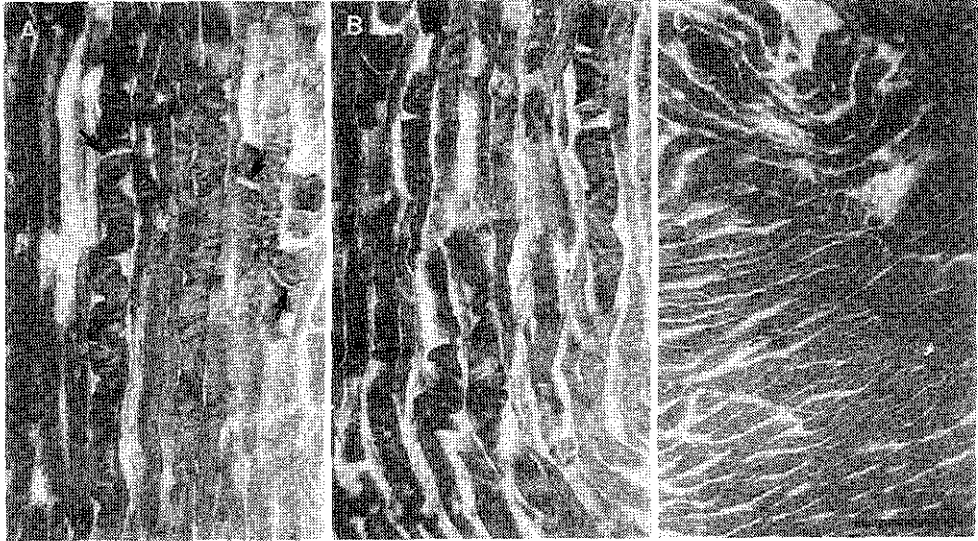


Fig. 2. Changes in the structure of muscle fibers occurring during storage by ice-cooling.

Photographs were taken after 3 days of storage (A), 7 days (B) and 10 days (C) by using a light microscope. The fibers show cleavages at the arrowed sites in photo A. The fibers in photo B show much more cleavages on them. In photo C, the fibers lost their continuity indicating a predominant enzymatic decomposition. Scale line is 100 μ m.

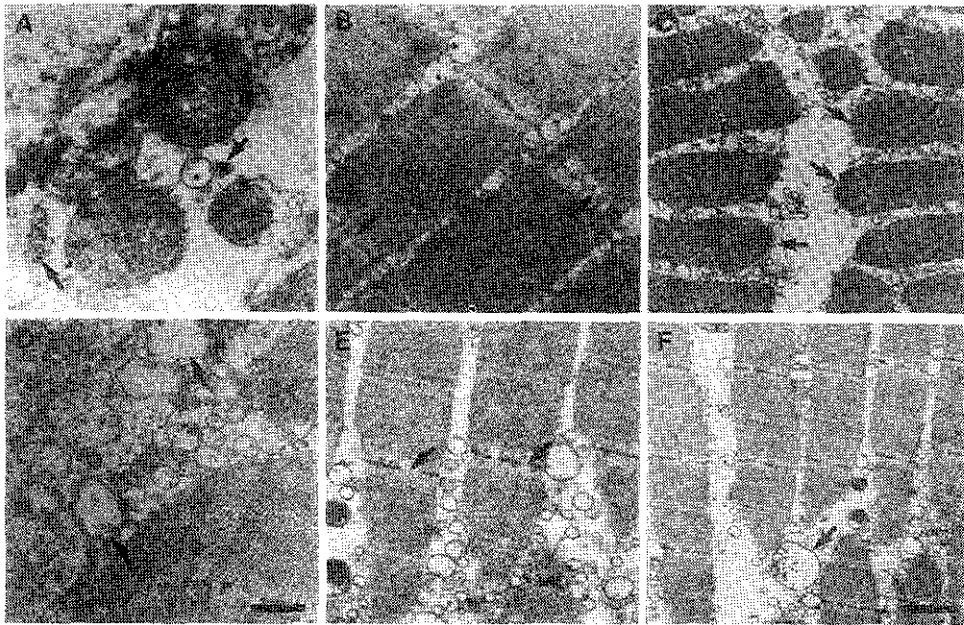


Fig. 3. Structure of muscle fibers after storage by ice-cooling.

Photographs were taken after 3 days (A, B and C) and 7 days (D, E and F) of storage, respectively. Mitochondrial inner membranes are partially decomposed. Glycogen granules are visible at the arrows in photo A. Z-lines are discontinuous at the arrows in photo B. Muscle fibers show round-shaped end in photo C. Mitochondria lost most of their inner membrane and little glycogen granule is visible in photo D and F. Z-lines in photo E show more progressed decomposition than that in photo B. Scale line in photo D is 0.5 μ m and same with photo A, B and E. The line in photo F is 1.0 μ m and same with photo C.

PF저장중 근육조직의 변화

PF저장중 생선의 근육조직 변화는 Fig. 4 및 5와 같다. Fig. 4는 광학현미경 사진으로서 저장 3일째 (photo A)에 섬유속 사이에 비정상적인 공간이 생성되었으며 부분적으로는 섬유속 내부에 까지도 공간이 생성되었다. 저장 7일째 (photo B)에는 이러한 현상이 보다 진행되었으며 10일째 (photo C)에는 공간의 크기가 더욱 커지고 숫자도 증가되었다. 이 공간은 빙결정의 흔적으로 판단되며 특징적인 동근 형태를 나타내었다.

Fig. 5는 3일간 저장한 시료의 전자현미경 사진으로서, mitochondria 내막이 약간 퇴행되었으나 연속적인 배열을 유지하였으며 (photo A), Z-line과 H-Zone 및 myofibril도 거의 완전한 상태로 관찰되었다 (photo B). 저장 7일째에도 많은 glycogen 입자가 관찰되었으며 (photo C) 섬유속이 부분적으로 절단된 것 (photo D) 외에는 저장 3일째와 비슷한 모습이었다. 저장 14일째에도 커다란 변화는 관찰되지 아니하였으나 섬유속의 절단부위가 확대되었고 (photo F), basal membrane이 손상되었으며 mitochondria 내막이 보다 퇴행되었다 (photo E). Glycogen 입자는 거의 관찰되지 아니하였다.

이상의 결과는 PF저장시에도 다수의 빙결정이 생성되나 주된 빙결정 생성부위가 섬유속의 외부로서

섬유속에 미치는 손상이 경미함을 나타나고 있으며 저장 14일째 까지 Z-line, H-zone, mitochondria가 거의 손상되지 않은 점으로 미루어 효소의 작용도 억제되는 것으로 사료된다. PF저장시 빙결정의 생성부위에 관하여 안 등²⁸도 세포의 동결을 보고하고 있다.

동결저장중 근육조직의 변화

Fig. 6은 동결저장중 근육조직의 변화를 나타낸 것으로서 저장 3일째 (photo A)에 섬유속의 내외부를 불문하고 빙결정의 흔적이 발견되었으며, 저장 7일째 (photo C)에는 섬유속이 많은 부분에서 절단되었으며 배열의 규칙성을 잃었다. 그리고 빙결정의 흔적은 PF저장시와는 달리 날카로운 형태를 나타내었다. Fig. 7은 전자현미경 사진으로서 3일째에는 섬유속이 많은 부분에서 절단되었으며 (photo A), 절단된 모양이 빙장시와는 달리 불규칙하였으며, Z-line도 전체적으로 손상되었다 (photo B). 저장 14일째에는 basal membrane과 mitochondria가 거의 완전한 상태로 관찰되었으며 glycogen 입자도 다수 관찰되었다 (photo C). 그러나 basal membrane은 부분적으로 절단되었으며 섬유속이 Z-line 부위에서 파열됨으로서 Z-line이 소실되는 모습을 나타내었다 (photo D).

이상의 결과는 동결저장시 효소작용은 극도로 제한되나 빙결정이 섬유속 내부까지 생성됨으로서 myofi-

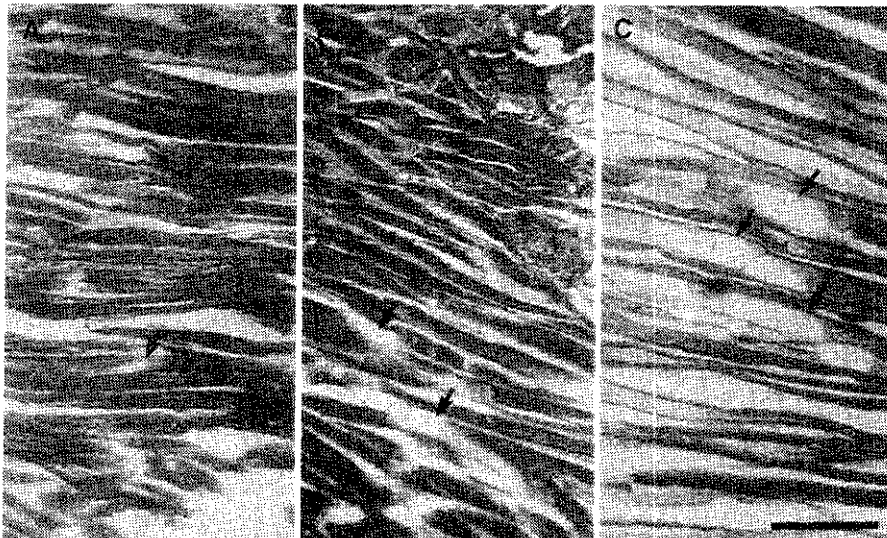


Fig. 4. Changes in the structure of muscle fibers occurring during partial freeze storage.

Photographs were taken after 3 days (A), 7 days (B) and 14 days (C) of storage, respectively, by using a light microscope. The arrows indicate scars of ice crystals growing in accordance to the progress of storage. Scale line is $100\mu\text{m}$.

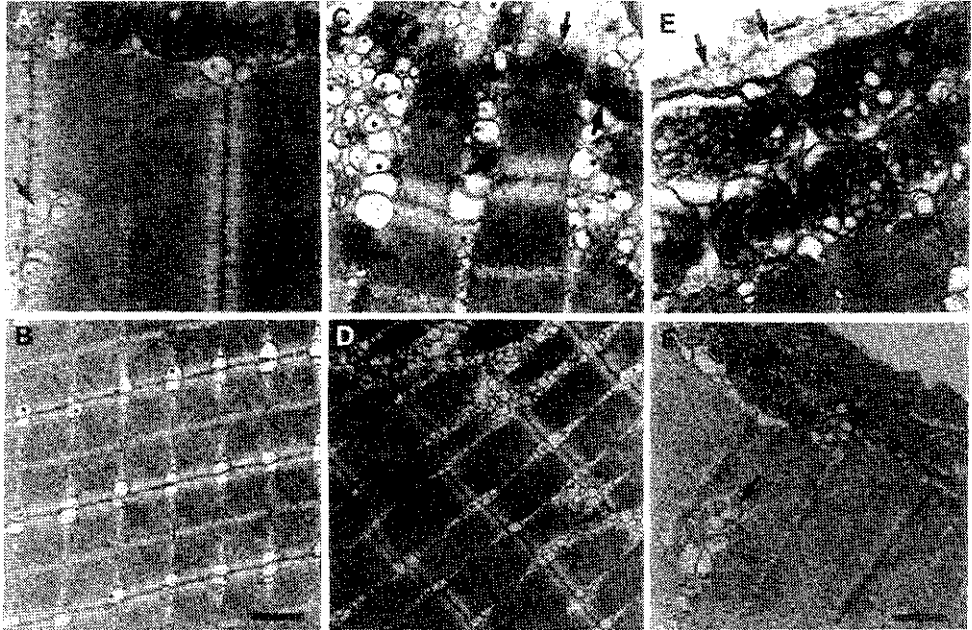


Fig. 5. Changes in structure of muscle fibers occurring during partial freeze storage.

Photographs were taken after 3 days (A and B), 7 days (C and D) and 14 days (E and F) of storage, respectively, by using an electron microscope. Fibers in photo A and B show similar structure with the Fig. 1. Some glycogen granules are visible in photo C. In photo E, basal membrane are decomposed at the arrows and little glycogen granules are visible. Fibers are damaged at the arrows in photo F. Scale line in photo B is $1.0\mu\text{m}$ and same with photo D. The line in photo F is $0.5\mu\text{m}$ and same with photo A, C and E.

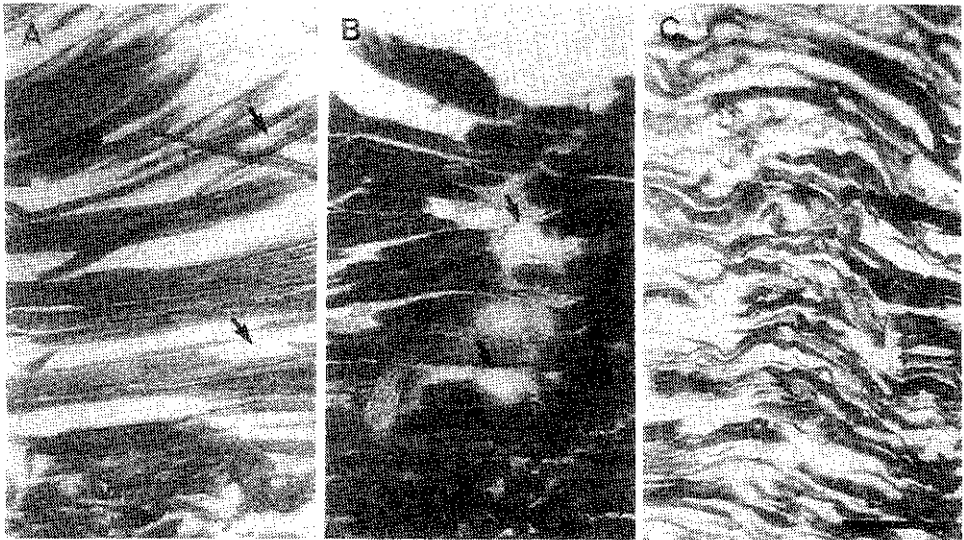


Fig. 6. Changes in structure of muscle fibers occurring during frozen storage.

Photographs were taken after 3 days (A), 7 days (B) and 14 days (C) of storage. The scars of ice crystals are visible at the arrows in photo A and B. Differently from those in Fig. 4, they reveal keen edges (A) and grown at the middle portion of the fiber (B). Fibers in photo C have many cleavage on them and show irregular shape. Scale line is $100\mu\text{m}$.

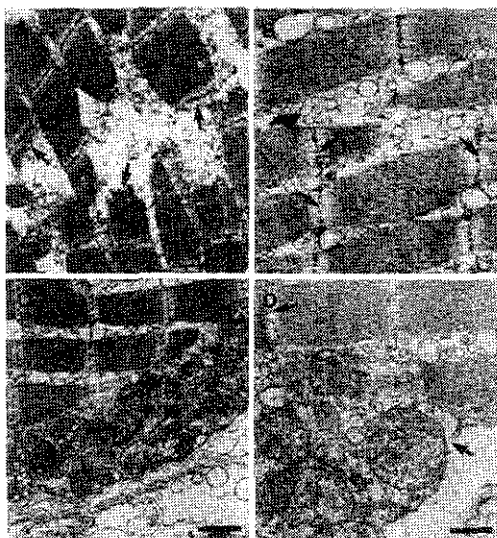


Fig. 7. Changes in the structure of muscle fibers occurring during frozen storage.

Photo A and B were taken after 3 days of storage, while photo C and D were taken after for 14 days of storage. Fibers are broken at many sites in photo A and they show unnatural elongation in photo B. Glycogen granules (dark dot) are visible in photo C. Fibers are cut at the Z-line (upper arrow) and basal membrane is discontinuous at the arrow in photo D. Scale line in photo C is $1.0\mu\text{m}$ and same with photo A. That in photo D is $0.5\mu\text{m}$ and same with photo B.

bril이 손상됨을 나타내는 것으로서, Lee 등⁽³⁾도 동결 저장한 경우가 PF저장한 경우 보다 빙결정에 의한 myofibril의 손상이 심하여 PF저장시보다 해동후 섬유의 복원성이 떨어지는 것으로 보고하였으며 안 등⁽⁴⁾도 동결저장시에는 빙결정이 주로 근육 세포내에서 생성되는 것으로 보고하였다.

요 약

방어를 공시어로 하여 빙장(0°C), PF저장(-3°C) 및 동결저장(-20°C)하면서 저장과정중 일어나는 근육 조직의 변화를 현미경적으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 빙장의 경우에는 저장 3일째에 glycogen이 소실되고 mitochondria 내막이 퇴행되었으며 근원섬유도 절단되었다. 근원섬유의 절단면은 둥근 형태를 나타내었다. PF저장시에도 glycogen이 소실되고 mitochondria가 퇴행되었으나 그 정도는 빙장

에 비하여 경미하였다. 저장 3일째에 빙결정이 생성되어 저장기간이 길어질수록 크기와 숫자가 증가되었으나 빙결정의 모양이 둥근 모습이었으며 주된 생장부위가 섬유축 사이로서 myofibril의 손상은 경미하였다. 동결저장시에는 저장 14일까지 glycogen입자가 관찰되었고 mitochondria도 내막구조를 유지하였으나 저장 3일째부터 섬유축 내부에까지 빙결정이 생성되었으며 이로 인하여 myofibril이 손상되었다. 절단된 섬유의 선단은 빙장의 경우와는 달리 불규칙한 모습이었다. 이상의 결과로부터 PF저장법이 단기간(약 2주)의 생선저장에는 빙장에 비하여 효소활성이 억제되고 동결저장에 비하여 빙결정에 의한 myofibril의 손상이 적은 효과적인 방법으로 판정되었다.

문 헌

1. 内山均, 鈴木なわ子, 江平重男, 野口榮三郎: ヒラメ, カツオの氷藏中における鮮度低下に關する生化學的研究. 東海水研報, 32, 280(1966)
2. Saito, T. and Arai, K.: Slow freezing of carp muscle and inosinic acid formation. *Nature*, 179, 820(1957)
3. 田中和夫: チルド食品の溫度帶とその貯藏特性. 冷凍, 53, 975(1978)
4. 内山均, 江平重男, 内山つね子, 増澤一: Partial freezingによるニジマスの鮮度保持. 東海水研究, 95, 105(1978)
5. 内山均, 江平重男, 内山つね子: Partial freezingによる養殖コイの鮮度保持—活魚輸送に代る方法として. 東海水研究, 94, 105(1978)
6. Uchiyama, H. and Koato, N.: Partial freezing as a means of preserving fish freshness—I. Changes in free amino acids, TMA-N, ATP and its related compounds and nucleic acids during storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 40, 1145(1974)
7. Miguel, A. P., Kakuda, K. and Uchiyama, H.: Partial freezing as a means of keeping freshness of fish. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 106, 11(1982)
8. Tomilson, N., Geiger, S. E. Kay, W. W., Uthe, J. and Roach, S. W.: Partial freezing as a means of preserving Pacific salmon intended for canning. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 22, 955(1965)
9. Nowlan, S. S., Dyer, W. J. and Keith, R. A.: Temperature and deteriorative changes in postrigor cod muscle stored up to 14 days in the superchill range, -1 to -4°C . *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32, 1595(1975)
10. Kakuda, K., Ehira, S. and Uchiyama, H.: Partial freezing as a means of keeping freshness

- of fish. Changes in several substances in muscle of mackerel, stone flounder and horse mackerel during storage. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 113, 43 (1984)
11. 李龍雨, 朴榮浩 : Partial freezing에 의한 魚肉의 鮮度維持 效果에 대하여. 1. Partial freezing에 의한 송어의 鮮度 및 어묵 形成能의 變化. *韓水誌*, 18, 529 (1985)
 12. 李龍雨, 朴榮浩, 安哲佑 : Partial freezing에 의한 魚肉의 鮮度維持 效果에 대하여. 2. Partial freezing에 의한 붕장어 및 방어 鮮度 및 어묵 形成能의 變化. *韓水誌*, 19, 27 (1986)
 13. Kato, N., Uemoto, S. and Uchiyama, H. : Partial freezing as a means of preserving the freshness of fish- II. Changes in the protein during the storage of partially frozen sea bass muscle. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 40, 1263 (1974)
 14. Aleman, P. M., Kakuda, K. and Uchiyama, H. : Partial freezing as a means of keeping freshness of fish. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 106, 11 (1982)
 15. Lee, C. M. and Toledo, R. T. : Comparison of shelf life and quality of mullet stored at zero and subzero temperature. *J. Food Sci.*, 49, 317 (1984)
 16. 정경희, 조성희, 신응남, 최경호, 최영선 : 알콜과 식이지방량이 흰쥐의 간지질 조성파 간조직형태에 미치는 영향. *한국영양학회지*, 21, 154 (1988)
 17. 최경호, 김미림 : *Clostridium sporogenes*의 protoplast화에 따른 미세구조의 변화. *효성여자대학교 연구논문집*, 37, 385 (1988)
 18. Tokiwa, T. and Matsumiya, H. : Fragmentation of fish myofibril. Effect of storage condition and muscle cathepsin. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 35, 1099 (1969)
 19. Stromer, M. H., Goll, D. E. and Roth, L. E. : Morphology of rigor shortened bovine muscle and the effect trypsin on pre- and post rigor myofibrils. *J. Cell Biol.*, 34, 431 (1967)
 20. Strömer, M. H., Hartshorne, D. J. and Rice, R. V. : Removal and reconstitution of Z-line material in striated muscle. *J. Cell Biol.*, 35(C), 23 (1967)
 21. 박찬성, 최경호 : 해산어의 부분동결에 의한 microflora의 변화. *한국영양식량학회지*, 15, 56 (1986)
 22. 박찬성, 최경호 : 해산어의 부분동결에 의한 Ca^{2+} Mg^{2+} dependent adenosine triphosphatase 활성 및 근원섬유의 미세구조 변화. 1. 저온저장에 의한 방어 근원섬유 단백질의 변성. *한국영양식량학회지*, 18, 123 (1989)
 23. 安大鎭 : 육류의 凍結에 관한 研究. 2. 凍結에 의한 육류 組織의 變化. *韓水誌*, 12, 131 (1979)
 24. 安大鎭 : 水産食品의 加工 및 組織學的 變化에 관한 研究. 2. 鰻장어 凍結貯藏中の 組織變化. *韓水誌*, 15, 199 (1982)

(1991년 10월 9일 접수)