ホタテガイ白干し中の ATP 関連物質含量に及ぼす 製造工程の冷凍・解凍処理の影響

山崎雅夫[§], 西岡不二男^{*}

東京農業大学生物産業学部食品科学科

^{*} 富山県食品研究所

The Effects of Freezing and Thawing in the Manufacturing Process on ATP-related Compound Contents of the Boil-dried Adductor Muscle of Scallop (*shiraboshi*)

Masao Yamazaki[§] and Fujio Nishioka^{*}

Dept. Food Sci., Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture,
196 Yasaka, Abashiri, Hokkaido 099-2356

^{*} Toyama Food Research Institute, 360 Yoshioka, Toyama 939-8153

The contents of ATP-related compounds in the boil-dried adductor muscle of scallop (*Shiraboshi*), that had a step of freezing in different stages of the manufacturing processes were compared. The product manufactured with a freezing step after the processes of the 1st boiling (with plain water) to open the shell and the water washing had high HxR and Hx contents. On the other hand, the product manufactured with a freezing step after the processes of the 2nd boiling (with salt water) to season and the torrefaction had a high AMP content and almost no HxR. The main ATP-related compound was AMP in the frozen samples and the rapidly thawed samples. However, Hx increased in the slowly thawed samples. These observations indicated that the AMP in the products were highly dependent on the quality of the scallop adductor used as the material. Furthermore, it was shown that the introduction of the step of freezing after the step of the 2nd boiling was desirable to obtain the dried scallop product with a high level of AMP. During the steps prior to this step of the 2nd boiling, the AMP was not affected by applying the rapid thawing. These knowledge indicate the possibility of year-round operation of the boil-dried adductor muscle of scallop manufacturing by the addition of a freezing step to the processes using superheated steam for the torrefaction. The 1st boiling process decreased the ATP content and increased the AMP content of adductor muscle of scallop. ATP degrading enzyme in the adductor was not inactivated with the 1st boiling process, but inactivated with the 2nd boiling. Even AMP in the adductor muscle treated with the 1st boiling was decomposed during low temperature storage. AMP degrading enzyme is easily inactivated by the heating of 80°C for 5 min.

(Received Sep. 10, 2004 ; Accepted Jun. 11, 2005)

ホタテガイは北海道を代表する水産物であり、水産業における重要な魚介類の一つである。ホタテガイから得られる閉殻筋（貝柱）は生鮮で利用される他、冷凍品として、あるいは一度煮熟された後に冷凍されたボイル冷凍品として利用され、さらには調味および加熱処理を施した後に乾燥させた加工品としても利用され¹⁾ 白干もその一つである。

一般にホタテガイからつくる白干しの原料貝には、一晩の放置で弱らせ開殻作業を容易とさせた貝が用いられる。白干しの製造は次の通りである。貝を洗浄し、一番煮と呼ばれる短時間の水煮により貝をあけ、脱殻する。その後、中腸腺、外套膜、生殖腺、鰓を除去し、貝柱だけにしてお

らさらに表面を覆う薄膜を除去する。二番煮と呼ばれる食塩水を用いた煮沸行程で貝柱に加熱と調味を施し、焙乾後、熱風乾燥と天日乾燥およびあん蒸工程が繰り返される¹⁾。この製造方法は明治時代に開発されて以来、白色化と身割れ防止の工夫を加えながら継承され、原料貝として使用するホタテガイは現在も生貝に限定されている。製品の等級を判断する指標として、肉質（身割れ）、色沢（褐変度）、乾燥度などがあり、呈味成分などは考慮されていないようである。従って、白干しの製造はホタテガイ漁に大きく左右され、年間を通じ一定して製造することができず問題となっている。その打開策の一つには、製造工程中に原料貝の冷凍処理を施すことで、凍結原料貝の使用を可能にすることにあると考えている。

貝柱における呈味成分として、グリシン、グルタミン酸

〒099-2493 北海道網走市八坂 196

^{*} 〒939-8153 富山県富山市吉岡 360

[§] 連絡先 (Corresponding author), m-yamaza@bioindustry.nodai.ac.jp

などのアミノ酸類やグリコーゲンのほかに、アデノシン 5'-リン酸 (AMP) などが知られており²⁾、白干しの味に影響を与えると考えられる。これら成分の季節変化³⁾や冷蔵中の変化⁴⁾⁵⁾など様々な報告がみられる。貝柱の呈味成分の一つである AMP は、貝柱冷蔵中に漸減し、その分解物とされる、イノシン (HxR)、ヒポキサンチン (Hx) が増加し、結果として鮮度の指標である K 値の上昇が惹起する⁶⁾⁷⁾。貝柱の多くは冷凍され利用されるものの、冷凍貝柱の加工利用あるいは解凍過程におけるヌクレオチドの変化に関する知見⁷⁾は少ない。

著者らは高品質白干しの安定な製造に取り組んでおり⁸⁾、製造時の品質評価は主に外観で判断されるものの、食材としての白干しの用途を考えると、呈味成分に配慮した製造が今後必要になると考えている。そこで、今回、白干し製造工程に冷凍工程を加え、焙乾工程に過熱水蒸気を用い、製品を調製し、その評価として貝柱の呈味成分の一つである AMP を指標に、解凍方法の違いがヌクレオチドの組成に与える影響について検討した。

実 験 方 法

1. 試料および試薬

北海道常呂町産殻付き生鮮ホタテガイを小売店で購入し試料とした。白干しの製造工程には業界での常法である、一番煮、水晒し、二番煮を試料について行ってから既報⁸⁾に示した過熱蒸気による焙乾と真空乾燥を行う方法を用いた。すなわち、まず、95℃の湯中に3分間浸漬する一番煮でホタテガイの開殻と軟体部の分離を行い、貝柱の薄膜を除き、16℃、15分間の水晒しをしてから100℃の10%食塩水で16分間煮熟する二番煮を行った。次に150℃の過熱蒸気を10分間与えた焙乾と、真空デシケーター (約800 Pa) による乾燥を繰り返し行い、市販白干し製品の水分に達するまで乾燥させた。一番煮と二番煮における品温は、熱電対を貝柱の中心に差し込んで測定し、一番煮においては10秒毎に、二番煮においては30秒毎に、それぞれ江藤電気 (株) 社製サーモダック E にて記録した。

脱殻後に凍結貯蔵されたホタテガイ貝柱を原料貝とする場合を想定し、前述の白干し製造工程のうち、一番煮、水晒し、二番煮、焙乾のそれぞれの工程を経た後に、貝柱は-80℃で急速凍結し、乾燥を防ぐグレーズ処理を行ってから-35℃で27日間貯蔵した。凍結した貝柱は、約5℃の冷蔵庫内に3日間放置して緩慢解凍を行い、その後白干し製造に用いた。

冷凍および解凍処理を施した貝柱の ATP 関連物質を測定した。また、白干し製造工程の一番煮、水晒し、二番煮のそれぞれの工程を経た後に凍結した中間原料貝の貝柱について、5℃、48時間放置により行う緩慢解凍と、40℃の温水を用いた急速解凍を施した貝柱からも、それぞれ ATP 関連物質を次項に示した方法により測定した。

用いた試薬は全て特級または HPLC グレードのものを使用した。

2. ATP 関連物質の分析

貝柱 1g に冷却した 15% 過塩素酸溶液を加え、乳鉢で磨砕後、遠心分離 (110×g, 10 分間, 2℃) して得られた上清に 200 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を加え 0.2 μm のフィルターで濾過し 10 μl を HPLC 分析に供した。

装置には島津製作所製の HPLC システム (CLASS-VP) を利用した。カラムには Shodex Asahipak GS-320 7E (7.6 mm×250 mm)、ガードカラムには Shodex Asahipak GS-2G-7B を用い、カラムオープン温度を 30℃ とした。検出器には紫外可視検出器 (SPD-10AVP) を用い、260 nm の吸収を測定した。移動相として 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) を用い、流速 1 ml/min とし 40 分間の分析を行った。

3. AMP 分解酵素の耐熱性

生鮮ホタテガイから一番煮により開殻させ、貝柱を摘出した。貝柱重量の 3 倍容の 1 mM MgCl₂, 30 mM Triton X 100 を含む 40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加えホモジナイズした。濾過後濾液を遠心 (11 000×g, 10 分間, 2℃) し、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析後、濃縮し粗酵素液とした。粗酵素液の調製は 4℃ 下で行った。得られた粗酵素を 20, 40, 60, 80, 100℃ の各温度で 5 分間加温した後、基質に 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ を含む 4 mM AMP 溶液を用いて 20℃, 12 時間の反応後に生成する HxR を先述の HPLC システムにて検出し、20℃ 加温処理の活性を 100 とし相対活性を求めた。

実験結果および考察

1. 一番煮、二番煮処理中の品温

一番煮では、10 秒から 30 秒でホタテガイは開殻し、5 回実施した操作での開殻時の品温は、4, 5, 6, 13, 16℃ と貝によってばらつきが見られた。二番煮では煮熟 8 分で品温が 80℃ に達し、終了時には 99℃ にまで達した (Fig. 1)。

2. 冷凍処理を施した白干しの ATP 関連物質

一番煮、水晒し、二番煮、焙乾の各白干し製造工程の直後に冷凍処理を施し、1 ヶ月間冷凍した貝柱を緩慢解凍し、引き続きその後の工程を実施して調製した白干しの ATP 関連物質の含量を Fig. 2 に示した。この結果、一番煮、水晒し後に冷凍したものには、ATP, ADP がほとんど見られず、モル比で約 7 割以上が HxR, Hx であった。一方、二番煮や焙乾後に冷凍処理を施した場合、ATP, ADP, AMP のモル合計は、全体の 9 割以上に達し、その多くが AMP であった。また、一番煮や水晒し後の冷凍処理で見られた Hx がほとんど検出されなかった。二番煮以降に冷凍処理した白干しの ATP 関連物質含量は、その総量でも高い値を示し、白干し製造に際し冷凍処理を導入する場合は、一番煮や水晒しの後、二番煮の前では AMP が消失しやすい

ことが示唆された。

3. 各製造工程後に冷凍処理した貝柱の ATP 関連物質

製造工程中に一旦貝柱を冷凍処理することにより調整すると、白干し製品の ATP 関連物質の組成に差異が見られたことから、過熱焙乾や乾燥工程中に HxR や Hx が増加するのではなく、冷凍原料が解凍中に変化することが考えられた。そこで、一番煮、水晒し、二番煮をそれぞれまで実施した直後に冷凍した貝柱について、一週間冷凍貯蔵後、ATP 関連物質の組成を、生鮮貝柱について直ちに冷凍したときの組成と比較した。ATP 関連物質の抽出は緩慢解凍処理 (5℃, 48 時間) したものと凍結したままの貝柱についてそれぞれ行った (Fig. 3)。

生鮮状態で冷凍した貝柱では、ATP と ADP が主要なヌクレオチドであった。一方、白干しの ATP 関連物質分析では、HxR や Hx がみられた一番煮や水晒しの工程において、緩慢解凍で同様に HxR や Hx が主に検出され、ATP はほとんど見られなかった。また、凍結状態の貝柱に

は、AMP が主要なヌクレオチドとして検出され、HxR や Hx はわずかであった。このことから、HxR や Hx の生成に解凍方法が影響を与えると考えられた。また、生鮮品を冷凍した貝柱に比べ一番煮処理を施したものは ATP、ADP が少なく、AMP が多くなっていたことから、一番煮によって、貝柱中の ATP や ADP が AMP に分解することが示唆された。

低温貯蔵中の魚介類筋肉での ATP の分解にはカルシウムイオン等で活性化される Mg-ATPase が関与することが知られている^{5)~7)9)~12)}。この ATPase はホタテガイ生鮮貝柱の -3℃ や 0℃ といった低温貯蔵においても ATP の分解に関与する⁴⁾⁵⁾¹³⁾。従って、今回の実験においてもこの ATPase が緩慢解凍や煮熟工程中に働き、一番煮や水晒しの工程中に貝柱の ATP を分解させたことが考えられた。また HxR や Hx へ至る分解反応の中間生成物である AMP が、一般的な開殻操作として利用されている一番煮で増加することから、煮熟貝柱は ATP が多い生鮮貝柱に比べ、HxR や Hx が増加しやすい状態にあると言える。

二番煮直後に冷凍すると、解凍方法にかかわらず、AMP が貝柱の主要なヌクレオチドであり、ATP、ADP、HxR、Hx が少なかった。

4. 貝柱の急速解凍と ATP 関連物質

緩慢な解凍によって ATP 関連物質の組成に影響を受けると推測される一番煮直後の冷凍貝柱について、急速解凍を実施した。白干し製造において一番煮に続く工程は水晒しなので、一番煮貝柱の冷凍品について、40℃ の温水を用いた急速解凍と水晒しを同時に行った。この結果、ATP 関連物質について、急速解凍は、水晒し直後の冷凍品と同等の組成を示し、HxR や Hx の生成を抑制するには急速解凍が有効であることが示唆された (Fig. 4)。また、Fig. 2 の白干しに見られた HxR や Hx の生成は過熱水蒸気焙乾によるものではなく、凍結原料の解凍方法に起因することが推察された。

Fig. 1. Changes in the temperature of adductor muscle of scallop on the 2nd boiling process with salt water ($n=4$)

Fig. 2. Changes in content of ATP-related compounds of Shiraboshi had a step of freezing

First boiling : freezing step was done after the 1st boiling process.

Second boiling : freezing step was done after the 2nd boiling process.

torrefaction : freezing step was done after the 1st torrefaction process.

$n=3$

Fig. 3. Changes in the composition of ATP-related compounds of frozen workpiece material depending on thawing

Refrigerated storage for 7days, -35°C , after each process.

Freezing : extraction from frozen condition.

Thawing : extraction from slowly thawing in 5°C , 48 h.

$n=3$

Fig. 4. The relationship between the ATP-related compound and thawing method of frozen adductor muscle of scallop

Washing : freezing step was done after the water exposure process.

Freezing : extraction from frozen condition.

Slowly thawing : in refrigerator 5°C , 48 h.

Rapid thawing : with warm water (40°C) for 5 and 15 min.

$n=3$

5. 冷凍貝柱の緩慢解凍と ATP 関連物質

一番煮における貝柱の中心温度は、 20°C 未満であった。また、二番煮における貝柱中心温度は、Fig. 1 にあるように 90°C を超えていた。これら加熱処理を経た貝柱の冷凍品について、約 5°C の冷蔵庫を用いた緩慢解凍を実施し ATP 関連物質の消長を検討した。

この結果、一番煮直後に冷凍した貝柱は緩慢解凍中に AMP, ADP が 18 時間で大幅に減少し、特に AMP は 24 時間で 83% 減少する一方、HxR は 3 倍、Hx は 4 倍に増加した (Fig. 5 a)。また 6 時間後であっても貝柱における ATP 関連物質の HxR と Hx の割合はともに 35% を超えていた。これに対し、二番煮直後に冷凍した二番煮貝柱は、緩慢解凍中高い AMP 含量を保つ一方、HxR や Hx をほとんど生じなかった (Fig. 5 b)。このことから、一番煮や水晒し後に冷凍処理を施し調製した白干しにおいて、AMP

の割合が小さく HxR や Hx などを高含量に含む結果は、緩慢解凍中に AMP が分解することが主因と示唆された。また HxR と Hx についても、生鮮貝柱における冷蔵中の変化を報告した結果^{5)~7)13)}と比較して、本研究では短時間で増加していることから、開殻を目的とした加熱が AMP を生成させていることが影響していると推察された。一般に市販の『冷凍 (生) ボイルウロとり製品』などは、一番煮による加熱を経て製造される貝柱であるので、AMP が主要なヌクレオチドであると予想される。内在する酵素の活性も残存していると考えられ、同製品の冷蔵貯蔵や冷凍製品の解凍に際して、ATP 関連物質は Fig. 5 a に示されたものと同様の状況にあると思われる。従って HxR や Hx の増加は生鮮貝に比べ早いと推測され、この製品の冷蔵や解凍製品の取り扱いには注意を要すると判断できる。

Fig. 5. The relationship between the ATP-related compound and thawing time of frozen adductor muscle which were treated with a) the 1st boiling (plain water), b) the 2nd boiling (with salt water). ($n=3$)

◆ ATP ■ ADP ▲ AMP × HxR ● Hx

6. AMP 分解酵素の耐熱性

水棲軟体動物の AMP 分解酵素について報告¹⁴⁾があるものの、ホタテガイ貝柱の AMP 分解酵素に関する知見は少ない。また、この貝柱冷蔵中の ATP 関連物質の分解過程における AMP 分解酵素の関与については十分な議論がなされているとはいえない。今回、貝柱粗酵素抽出液を調製し、基質との反応時間を延長することで、AMP 分解活性を確認した。この活性は 40℃、5 分間の加熱処理により相対活性が 77%、60℃ 処理で 16% と漸減し、80℃ ではほとんど失活することが確認された (Fig. 6)。二番煮工程において、貝柱品温は加熱 8 分後で 80℃ 以上となった (Fig. 1)。これらのことは、内在するヌクレオチド分解酵素が二番煮工程中に失活することにより AMP の分解による HxR や Hx の生成が抑制されたと考えられる。また、二番煮直後に冷凍した貝柱を緩慢解凍しても AMP が高含量で残存し (Fig. 3)、二番煮以降の工程に冷凍処理を行い調製した白干し製品の AMP も高い値を示していた (Fig. 2) ことの原因であることを示唆し、二番煮冷凍貝柱の AMP が解凍後も高い値 (Fig. 5b) を示す要因と考えられた。

以上より白干しの製造に際し、工程中に貝柱を冷凍する場合、貝柱中の AMP を損なわないようにするには、一番煮と水晒し工程直後では急速解凍を実施すればよいこと、二番煮、焙乾工程後であれば緩慢解凍を施してもよいことがわかった。今後はこれら冷凍や解凍処理が白干しの身割れ、褐変度、乾燥度などの品質へ与える影響について検討することが必要であると考えられる。

Fig. 6. The heat-resistance of the AMP-degrading enzyme activity

Heat processing time : 5min.

Reaction temp : 20℃.

Reaction time : 12 h.

$n=2$

要 約

年間を通じ一定して製造することができない北海道産ホタテガイ白干し加工への対応は、製造工程中に貝柱を冷凍し、凍結貝柱の使用を可能にすることにあると考えた。そこで、白干しの製造工程に冷凍工程を加え、焙乾工程に過熱水蒸気を用い、製品を調製した。品質評価の指標として貝柱の呈味成分の一つである AMP を用い、解凍方法の違いがヌクレオチドの組成に与える影響について検討した。

冷凍処理を一番煮と水晒し後に実施し、冷凍貯蔵後緩慢解凍した貝柱を用いて作製した白干しのヌクレオチド量は、二番煮や焙乾後に冷凍処理したものに比べ少なく、HxR や Hx が増加していた。冷凍一番煮貝柱の緩慢解凍では HxR や Hx が多かったものの、その急速解凍では両者は少なく、冷凍二番煮貝柱では緩慢解凍であっても HxR や Hx が僅かであった。開殻を目的とした一番煮の加熱工程は ATP を分解し、AMP を産生することがわかった。一番煮貝柱は生鮮冷凍貝柱に比べ ATP が少なく AMP が多く、内在する酵素により HxR や Hx が増加しやすいことが推察された。貝柱中の ATP 関連物質の分解酵素は一番煮程度の加熱では失活せず、低温貯蔵であっても ADP, AMP を分解し、HxR や Hx を産生させた。AMP 分解酵素は、80℃、5 分程度の加熱により容易に失活し、これは品温が 90℃ を超える二番煮処理貝柱において HxR や Hx が少ない要因と考えられた。

以上のことから、AMP を減少させない白干しの製造として、二番煮以降の工程で冷凍処理できることがわかった。また、それ以前の工程の場合は、急速解凍を実施することで AMP が損なわれない白干しを製造できることがわかった。

本研究に協力していただいた東京農業大学食品科学科、浅岡大介さん、左合友子さん、羽山智子さんに深謝いたします。

文 献

- 1) 茶碗谷洋, III 生産・加工の現状と見通し, 「新版・ホタテ貝生産・加工・流通取扱の手引き」, 初版 (北海水産新聞社, 札幌), pp. 63-107 (1992).
- 2) 鴻巣章二, 渡辺勝子, 郡山 剛, 白井隆明, 山口勝己, ホタテガイの呈味成分 I ホタテガイのエキス成分とオミッショントテストによる呈味有効成分の同定, 日食工誌, **35**, 252-258 (1988).
- 3) 木村 稔, 今村琢磨, 成田正直, 潮 秀樹, 山中英明, ホタテガイ貝柱成分の季節変化, 日水誌 **68**, 72-77 (2002).
- 4) Kawashima, K. and Yamanaka H., Effect of storage temperatures on the post-mortem biochemical changes in scallop adductor muscle, *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 2175-2180 (1992).
- 5) Wongso, S. and Yamanaka, H., Extractive components of the adductor muscle of Japanese baking scallop and changes during refrigerated storage, *J. Food Sci.*, **63**, 5, 772-776 (1998).
- 6) Massa, A.E., Paredi, M.E. and Crupkin, M., Nucleotide catabolism in cold stored adductor muscle of scallop (*Zygochlamys Pataginitica*) *J. Food Biochem.*, **26**, 295-305 (2002).
- 7) Kawashima, K. and Yamanaka, H., Effects of freezing and thawing on post-mortem biochemical changes in scallop adductor muscle. *Fisheries Sci.*, **61**, 694-695 (1995).
- 8) 西岡不二男, 浅岡大介, 山崎雅夫, 過熱水蒸気を用いたホタテ白干し製品の高品質化, 食科工 **51**, 3, 167-171 (2004).
- 9) Watanabe, H., Yamanaka, H. and Yamakawa, H., Post-mortem biochemical changes in the muscle of disk abalone during storage, *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 2081-2088 (1992).
- 10) Iwamoto, M., Yamanaka, H., Watabe, S. and Hashimoto, K., Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys olivaceus* muscle. *J. Food Sci.*, **52**, 1514-1517 (1987).
- 11) Konno, K., Arai, K., Yoshida, M. and Watanabe, S., Calcium regulation in squid mantle and scallop adductor muscles, *J. Biochem.*, **89**, 581-589 (1981).
- 12) Shiraishi, F., Morimoto, S., Nishita, K., Ojima, T. and Ohtsuki, I., Effects of removal and reconstitution of myosin regulatory light chain and troponin C on the Ca^{2+} -sensitive ATPase activity of myofibrils from scallop striated muscle, *J. Biochem.*, **126**, 1020-1024 (1999).
- 13) 木村 稔, 成田正直, 野俣 洋, 金子博実, 山中英明, ホタテガイ貝柱の硬化に与える貯蔵温度の影響, 日水誌 **63**, 4, 621-626 (1997).
- 14) Marseno, D.W., Hori, K. and Miyazawa, K., Distribution of 5'-nucleotidase in muscle of some marine fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 2, 247-53 (1992).

(平成 16 年 9 月 10 日受付, 平成 17 年 6 月 11 日受理)