

氏名	魏 華茂
本籍（国籍）	中華人民共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研 779 号
学位授与年月日	令和 2 年 9 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学
学位論文題目	Changes in Biochemical Properties and Microstructure of Scallop(<i>Patinopecten yessoensis</i>) Striated Adductor Muscle During Freeze-thawing, Freeze-drying and Rehydration Process (凍結解凍、凍結乾燥および復水プロセスによるホタテガイ (<i>Patinopecten yessoensis</i>) 閉殻横紋筋の生化学的特性と微細造の変化)
学位審査委員	主査 岩手大学准教授 袁 春紅 副査 山下 哲郎(岩手 教授),前多 隼人(弘前 准教授),永井 毅(山形 教授)

論 文 の 内 容 の 要 旨

Scallop (*Patinopecten yessoensis*), which is a very important economic species as seafood, is one of the important aquatic products in Japan. According to the report of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF), the productions and the export of scallop was 388 kilotons (38% increase than last year) and 84 kilotons (76.6% increase than last year) in 2018. One of the challenges in market distribution is to maintain scallop quality while maximizing its shelf life. Freezing and drying are good ways to maintain the quality of scallops. Many studies reported fish which are frozen in pre-rigor have a better quality than that of in rigor or post-rigor stage. On the other hand, freeze-drying as a good method, which does not cause shrinkage or toughening of the material being dried, and flavors and smells generally remain unchanged, was also widely used. However, few basic information regarding the effect of thawing process on the biochemical changes of pre-rigor scallop adductor muscle after freeze-thawing, freeze-drying and rehydration process is available. Moreover, many studies have confirmed that there are two AMP decomposition pathways in scallops and the accumulation of IMP is less due to the low activity of AMP deaminase. But the studies which focus on AMP decomposition pathway and its influencing factors in scallops are scarce. Therefore, one of the purposes of the project was to clarify the changes in biochemical properties of scallop adductor muscle during freeze-thawing, freeze-drying and rehydration process. Another aim was to investigate the AMP decomposition pathway in scallop adductor muscle and its influencing factors, such as EDTA or EGTA addition, heating, metal ions concentration change, et al.

In Chapter 1, the effects of thawing methods on the biochemical properties and

microstructure of pre-rigor frozen scallop striated adductor muscle was examined. Postmortem biochemical properties (pH, salt solubility, Ca^{2+} -ATPase activity, ATP-related compounds) and microstructural changes in the striated adductor muscle of pre-rigor frozen scallop (*Patinopecten yessoensis*) were studied after thawing and during storage at 4°C. Four thawing methods were used: running water (18°C, R); ice-water (0°C, I); air (4°C, A) and ice-saltwater (-2°C, S). The pH values and salt solubility of R group were lower than the other three thawing groups while I group was highest after thawing. However, no significant difference ($p > 0.05$) in Ca^{2+} -ATPase activity were detected among 4 groups. The microstructure results indicated that the structure of I group was close to that of fresh scallop. Moreover, ATP decomposition rate was the slowest. Therefore, ice-water thawing is the best method because it induced the least changes in the biochemical properties and microstructures of scallop adductor muscle.

Because the ATP decomposition rate in scallops after thawing is much faster than in fresh products, in chapter 2, condition-dependent adenosine monophosphate decomposition pathways by endogenous enzymes in striated adductor muscle from scallop (*Patinopecten yessoensis*) was investigated. The purpose of this study was to confirm inosine monophosphate (IMP) generation and to clarify the decomposition pathway of adenosine monophosphate (AMP) by investigating the properties of AMP, IMP and adenosine (AdR) decomposition enzymes in scallop (*Patinopecten yessoensis*). The results showed that IMP accumulated due to AMP decomposed by endogenous enzymes in scallops when stored at both 4°C and 20°C. The AMP decomposition rate was highest in the supernatant of homogenized scallop adductor muscle, follows are the suspended solution and precipitate, while IMP could not be decomposed in scallop. The results indicated that the activity of adenosine deaminase was very high, and this enzyme was involved in an intracellular process in scallop. Moreover, one minute of heating exerted little influence on the AMP and AdR decomposition rates, while 5 min of heating induced enzyme denaturation. The IMP generation rate increased dramatically in scallop crude enzyme solution containing 5 mM EDTA. This suggests that the major pathway of AMP decomposition might change with variations in metal ion concentrations in Japanese scallop.

In chapter 3, based on the above results, the effect of EGTA addition and different ions on the pathways of AMP decomposition in scallop was further studied. Scallop adductor muscle tissue solution was divided into control group (without any treatment) and CP group (containing 0.1% chloramphenicol). These two groups were dialyzed at 4°C and then incubated at 25°C. Changes in ATP-related compounds of scallop adductor muscle tissue solutions with 5 mM EGTA, 10 mM K^+ , 1 mM Ca^{2+} and 6 mM Mg^{2+} additions during incubation were detected by HPLC, and changes in protein composition of both groups were examined by SDS-PAGE during dialysis and incubation period. The results indicated that IMP generated rapidly in scallop crude enzyme solution containing 5 mM EGTA within 2 h. For the control group, the protein in the scallop enzyme solution gradually denatured due to microbial activity during incubation, while CP group did not. Adenosine

deaminase and adenosine kinase were detected in denatured protein fraction (40 kDa) by LC-MS/MS. The results suggested that K^+ promoted the decomposition of AMP to IMP, Mg^{2+} promoted the decomposition of AMP to AdR, and Ca^{2+} slightly inhibit the decomposition of AMP.

Furthermore, in Chapter 4, Changes in biochemical properties and microstructure of Japanese scallop adductor muscle during storage, freeze-drying and rehydration process was investigated. The biochemical properties (ATP-related compounds, salt solubility, Ca^{2+} -ATPase activity) and microstructural changes in freeze-dried scallop adductor muscle of pre-rigor Japanese scallops during room temperature ($18 \pm 2^\circ C$) storage and rehydration process were studied. The results showed that ATP and ADP contents were maintained or kept at $3.63 \pm 0.20 \mu mol/g$ and $2.27 \pm 0.23 \mu mol/g$ in freeze-dried scallop which stored at low humidity (less 10%) and room temperature for 30 days and with no significant difference ($p > 0.05$), and AMP and IMP contents were detected less than $0.42 \mu mol/g$ and $0.1 \mu mol/g$, respectively. ATP was decomposed rapidly within 1.5 min of rehydration, accompanied by the accumulation of AMP. As the rehydration time increased, AMP was gradually decomposed into HxR and Hx. Salt solubility of freeze-dried scallop was lower than that of freeze-thawed scallop. However, no significant difference ($p > 0.05$) in Ca^{2+} -ATPase activity of freeze-dried scallop were detected during storage and rehydration process. Digestion results suggested that the rod of myosin was unstable after freeze-drying process while S-1 part was stable, compared with fresh scallop and freeze-thawed scallop. Moreover, the microstructure results indicated that the Z-line of scallop was broken during freeze-drying process.

要旨和訳：

ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) は、主に北海道や東北地域沿岸で養殖され、日本の主要な水産物の一つで、経済的にも非常に重要な種である。これまでは日本からのホタテの輸出は中国への干し貝柱が主であったが、寿司の海外普及によって冷凍品の需要が増し、生鮮品や活貝の輸出も行われている。遠隔地への市場流通のためには、ホタテの品質を維持しながら、その保存期間を最大化することが課題である。長期保管のため、冷凍と乾燥は一般的に用いられている方法である。凍結乾燥は被乾燥物の収縮や硬化がなく、風味やにおいがほとんど変わらない優れた方法であるとして広く用いられてきた。本研究は、凍結解凍、凍結乾燥および復水プロセス中におけるホタテガイ閉殻横紋筋（以下横紋筋）の生化学的特性の変化を明らかにし、魚介類筋肉の鮮度の指標となる AMP 分解物の生成経路とその影響因子を明らかにすることを目的とした。

1) 解凍方法による横紋筋の生化学的特性と微細構造に及ぼす影響

凍結した硬直前のホタテガイを解凍中またはその後 $4^\circ C$ での保存中に、異なる解凍方法による横紋筋における生化学的性質 (pH、塩溶解度、 Ca^{2+} -ATPase 活性、ATP 関連化合物) と微細構造変化を調べた。解凍方法は下記の 4 つの方法を使用した。流水 ($18^\circ C$ 、R)、氷水 ($0^\circ C$ 、I)、空気 ($4^\circ C$ 、A) と氷塩水 ($-2^\circ C$ 、S) とした。解凍後 R グループの pH と塩溶解度は他 3 つの解凍グループよりも低く、また I グループの pH と塩溶解度は一番高い値を示した。ただし、4 つのグループ間で Ca^{2+} -ATPase 活性の有意差 ($p > 0.05$) は見られなかった。

微細構造の電顕観察結果は、I グループの構造が新鮮なホタテ貝の構造に近いことを示し、さらに ATP 分解速度も最も低かった。従って、氷水解凍は硬直前に凍結した横紋筋の生化学的特性と微細構造の変化を最小限に抑えるための最も優れた方法であることが示唆された。

2) 横紋筋における内在性酵素によるアデノシンーリン酸分解経路の分析

横紋筋をホモジナイズし、混合した懸濁溶液と遠心分離で得た上清と沈殿物に分け、それぞれ含まれるホタテガイ内在性酵素による AMP の分解速度を測定した。AMP の分解速度は上清部が最も高く、次に混合した懸濁溶液と遠心分離の沈殿物の順であった。生成した IMP は分解されず、Hx または HxR が多く生じており、AdR デアミナーゼが横紋筋細胞内でのヌクレオチド代謝反応に関与していることが示された。また、IMP 生成速度は、5 mM EDTA を含むホタテ粗酵素液で著しく増加し、EDTA の添加による金属イオン (Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} など) のキレートによって AMP 分解の主要な経路が変化することが示唆された。

EGTA 添加と様々なイオン (5 mM EGTA、10 mM K^{+} 、1 mM Ca^{2+} および 6 mM Mg^{2+}) が AMP 分解の経路に及ぼす影響を調べた結果、IMP が 5 mM EGTA を含む横紋筋由来粗酵素溶液中に 2 時間以内で急速に生成されることが明らかになった。また、 K^{+} は AMP から IMP への分解を促進し、 Mg^{2+} は AMP から AdR への分解を促進し、 Ca^{2+} は AMP の分解をわずかに阻害することが示された。

3) 凍結乾燥、常温貯蔵、および復水プロセス中の横紋筋の生化学的特性および微細構造の変化の解析

凍結乾燥またその後の常温 ($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 貯蔵、および復水プロセスによる硬直前凍結したホタテガイの横紋筋の生化学的特性 (ATP 関連化合物、塩溶解度、 Ca^{2+} -ATPase 活性) および微細構造変化について調べた。その結果、低湿度 (10%未満) で室温 30 日間保管した凍結乾燥ホタテにおいて、ATP と ADP の含有量がそれぞれ $3.63 \pm 0.20 \mu\text{mol/g}$ と $2.27 \pm 0.23 \mu\text{mol/g}$ に維持された。1 ヶ月保管しても凍結前と比較して ATP と ADP の含有量に有意差がなかった。復水開始から 1.5 分以内に AMP の蓄積を伴い、ATP が急速に分解されることがわかった。復水するにつれ、AMP は徐々に HxR と Hx に分解された。凍結乾燥した横紋筋の塩溶解度は、凍結解凍したホタテよりも低かった。またキモトリプシンを用いた消化処理を行った結果、凍結乾燥処理により、ミオシンの S-1 部分は安定であるがミオシンの尾部は不安定になることが示唆された。さらに、微細構造の観察結果より、横紋筋の Z 線が凍結乾燥中に壊れていたことがわかった。以上の結果より、金属イオン濃度や温度による酵素活性変化が横紋筋 AMP の分解経路を決定することが明らかになった。

本研究で得られた凍結解凍、凍結乾燥および復水プロセス中におけるホタテガイ閉殻横紋筋の生化学的特性に関する知見は、貝類の高鮮度維持、加工利用など付加価値の高い商品開発の応用に期待できる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、凍結ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) の品質維持と加工利用に着目し、凍結解凍、凍結乾燥および復水プロセス中におけるホタテガイ閉殻横紋筋の生化学的特性の変化を明らかにし、魚介類筋肉の鮮度の指標となる AMP 分解物の生成経路とその影響因子を明らかにすることを目的とした。

これまで解凍方法によるホタテガイ貝柱の鮮度や食感の違いについて生化学的観点から行わ

れた研究事例は極めて少ない。本研究では 4 種類の異なる解凍方法（流水、氷水、空気、氷塩水）によるホタテガイ閉殻横紋筋（以下横紋筋）の生化学性質と微細構造の変化により、氷水解凍後の pH と塩溶解度は最も高く、電子顕微鏡観察した微細構造結果より、新鮮な横紋筋の構造に近いことを示し、さらに ATP 分解も最も遅かった。従って、氷水解凍は硬直前に凍結した横紋筋の生化学的特性と微細構造変化を最小限に抑えるための最も優れた方法であることが示唆された。

次に、凍結解凍後、冷蔵保存中における ATP 関連化合物の分解が速いことから、横紋筋の内在性酵素による AMP 分解経路についてさらに詳しく分析した。横紋筋より調製した 5 mM EDTA を含む粗酵素液で IMP 量が著しく増加したことから、EDTA の添加は AMP 分解経路に変化を及ぼすことを示唆した。また、EGTA と種々のイオン（5 mM EGTA、10 mM K⁺、1 mM Ca²⁺ および 6 mM Mg²⁺）添加が AMP 分解経路に及ぼす影響を調べた結果、IMP が 5 mM EGTA を含む横紋筋由来粗酵素溶液中に 2 時間以内に急速に生成されることを明らかとした。また、K⁺ は AMP から IMP への分解を、Mg²⁺ は AMP から AdR への分解を促進し、Ca²⁺ は AMP の分解をわずかに阻害することが示された。

最後に凍結乾燥またその後の常温（18±2℃）貯蔵、および復水プロセスによる横紋筋の生化学的特性（ATP 関連化合物、塩溶解度、Ca²⁺-ATPase 活性）および微細構造変化について検討した。その結果、低湿度（10%未満）下常温 30 日間保存しても、ATP と ADP 含有量が維持された。復水開始から 1.5 分以内に ATP の急速な分解に伴い AMP が蓄積され、その後復水の進行に従い AMP は徐々に HxR と Hx に分解された。以上の結果より、金属イオン濃度や温度による酵素活性変化が横紋筋に存在する AMP の分解経路を決定することが明らかとなった。

本研究で得られた凍結解凍、凍結乾燥および復水プロセス中におけるホタテガイ閉殻横紋筋の生化学的特性に関する知見は、貝類の高鮮度維持、加工利用および付加価値の高い商品開発の応用に期待できる。

以上、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Wei, H., Tian, Y., Yamashita, T., Ishimura, G., Sasaki, K., Niu, Y., & Yuan, C. (2020). Effects of Thawing Methods on the Biochemical Properties and Microstructure of Pre-rigor Frozen Scallop Striated Adductor Muscle. *Food Chemistry*, Advance online publication. Doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126559.
2. Wei, H., Tian, Y., Lin, Y., Maeda, H., Yamashita, T., Yu, K., Takaki, K., & Yuan, C. (2020). Condition-dependent Adenosine Monophosphate Decomposition Pathways in Striated Adductor Muscle from Japanese Scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Journal of Food Science*, 85(5), 1462-1469.

参考論文

1. Wei H., Zhang M., Hu X., et al. (2015) Recovery and recycle of protein from surimi wash

water. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 29(11), 2172-2177; (in Chinese with English abstract)

2. Zhang Y., Wei H., Zhang Q., et al. (2015) Application of response surface methodology to optimize extraction of protein from *Trichiurus lepturus* surimi wash-water by sodium alginate. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 29(7), 1344-1350; (in Chinese with English abstract)

3. Wei H., Yang W., Zhang M., et al. (2016) Characteristic analysis of the protein from hairtail surimi wastewater and its cyclic utilization in surimi process. *Modern Food Science and Technology*, 32(6), 321-327; (in Chinese with English abstract)

4. Wei H., Yang X., Lou Q., et al. (2016) Refining and fatty acid composition of squid liver oil. *China Oils and Fats*, 41(3), 8-11; (in Chinese with English abstract)