

氏名	董 師良	
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	連研第 847 号	
学位授与年月日	令和 5 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 生物資源科学専攻	
学位論文題目	Effect of shell shape, post-harvest rearing, and super-chilling storage on the changes in biochemical properties of Pacific oysters (<i>Crassostrea gigas</i>) （太平洋牡蠣（<i>Crassostrea gigas</i>）の生化学的性質の変化に対する貝殻の形状、水揚げ後の蓄養、およびスーパーチリング保存の影響）	
学位審査委員	主査 岩手大学教授	袁 春紅
	副査 岩手大学教授	山下 哲郎
	副査 弘前大学准教授	君塚 道史
	副査 山形大学教授	永井 毅

論文の内容の要旨

Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is a highly significant economic species in the seafood industry and ranks among the world's important aquatic products. According to the report of Food and Agriculture Organization (FAO, 2018), the global production of oyster was 643,500 tons. In recent years, the increasing demand for oysters, particularly in the live and half-shell markets, has been driven by the proliferation of oyster bars. However, like other perishable seafood, oysters have a limited shelf life due to the growth of microorganisms and the enzymatic activity of endogenous proteolytic agents. Therefore, ensuring oyster freshness and achieving optimal quality, especially for raw consumption, becomes crucially important. Many studies reported that superchilling is a highly effective technique for preserving the quality of food. However, few studies focused on the impact of superchilling storage on shelled oysters. Moreover, initial vitality and shell shape of oyster will also affect its shelf life and quality. Therefore, viability recovery and shape selection were also crucial problems to be solved. On the other hand, many studies have confirmed that there are two adenosine monophosphate (AMP) decomposition pathways in oysters and the accumulation of inosine monophosphate (IMP) is different from different conditions of oysters (whole body and separates). Hence, one of the purposes of the study was to clarify the effect of shell shape, post-harvest rearing, and super-chilling storage on the changes in biochemical properties of Pacific oysters. Another objective was to examine the cause of IMP accumulation in the adductor muscle of oysters.

The quality changes of shelled Pacific oysters were examined in relation to the effects of superchilling storage at -1 °C for 28 days by measuring changes in biochemical properties (microbial analysis, ATP-related compounds, pH, free amino acids) and sensory evaluations in Chapter 1. The results indicated that microorganism growth was significantly inhibited during superchilling storage. Adenosine diphosphate (ADP) and AMP accumulated while ATP rapidly decreased in the adductor muscle. Adenosine triphosphate (ATP) and ADP were the primary components in the other 3 tissues including mantle, gill, and body trunk of oysters, and they remained relatively stable over time. The pH and adenylate energy charge (AEC) in the adductor muscle could be utilized as freshness indicators for shelled oysters. However, there were no significant differences ($P > 0.05$) among the free amino acids during whole storage. According to the sensory evaluations, oysters could remain alive and maintain their quality up to 21 days when stored at -1 °C. Therefore, superchilling storage at -1 °C could be more effective in preserving eating quality of shelled oysters, allowing for an extension of the shelf life up to 21 days.

Because the level of vitality significantly influences the shelf life of shelled oysters stored at superchilling temperatures, Chapter 2 investigated the impact of short-term rearing on oyster vitality prior to preservation. Some vitality indexes (pH, AEC value, arginine phosphate and glycogen) in the adductor muscle of oysters were studied after short-term rearing and during storage at -1°C. The results indicated that, after short-term rearing the vitality of oysters recovered in a better condition, as the AEC value, pH and arginine phosphate of short-rearing groups were higher than no rearing group at day 0. The 3-day rearing group showed the highest level vitality among the three groups. During the storage, the pH and AEC values of 3-day rearing group were kept in a high level compared to other two groups. However, there were no significant differences observed in glycogen levels among all the groups. Therefore, it can be concluded that short-term rearing effectively enhances vitality, positively impacting the quality and freshness of Pacific oysters.

Based on the above results, the viability of oyster played an important role in shelf life under superchilling storage. The shell shape of oysters was also strongly correlated with vitality. In Chapter 3, we proposed a non-destructive and real-time classification method for assessing the vitality maintenance ability of Pacific oysters solely based on their external shape features using 3D morphometric techniques. Additionally, this chapter explores the differences between flat and round oysters during superchilling storage. The results showed that the classification accuracy of round and flat oysters was 70.0% by using 3D morphometric techniques. During superchilling storage, the round type oysters showed higher vitality than flat type. The AEC value of round type oysters was consistently in the range of 50%-60%. In the flat type, AEC values decreased from 59.19% to 39.98% during the superchilling storage. The results of AEC values also correlated with the interval water content. The pH of two groups also showed a similar trend. However, no significant difference of major free amino acids between two types was observed in our experiments. The results suggested that 3D morphometric measurement techniques can have a significant impact on branding and enhancing the quality of oysters. It enables the non-destructive and real-time classification of oysters based on their vitality throughout the supply chain.

Furthermore, in Chapter 4, the regulatory mechanism of IMP formation in the oyster adductor muscle was investigated. Through this study, we confirmed that IMP generation in the oyster adductor muscle under different conditions, primarily due to, the extracellular fluid in oysters.

In the extracellular fluid of oysters, AMP is rapidly broken down, resulting in the generation of IMP. Similarly, IMP is quickly decomposed during incubation. However, when EDTA is added, the decomposition of AMP into IMP occurs in the absence of bivalent metal ions in both the adductor muscle group and extracellular fluid group. While the activity of AMP deaminase in the extracellular fluid remains unaffected, the decomposition of IMP slows down. Under natural conditions, the adductor muscle of oysters is influenced by the extracellular fluid, preventing the significant accumulation of IMP. Removing bivalent ions not only inhibits the adenosine (AdR) pathway in the adductor muscle but also retards the breakdown of IMP by the extracellular fluid.

To conclude, the shell shape, post-harvest rearing, and super-chilling storage on the changes in biochemical characteristics of Pacific oysters were elucidated. This research was expected to be applied to high quality shelled oyster preservation and transportation in the future. Meanwhile, through the investigation of formation of IMP in oyster adductor muscle, this study will contribute to the control of flavour quality of oysters in the storage process.

太平洋牡蠣 (*Crassostrea gigas*) は、世界的に非常に重要な水産物であり、経済的にも大きな価値を持つ種である。国連食糧農業機関 (FAO、2018 年) の報告によると、世界の牡蠣の生産量は 643,500 トンであった。近年、特に生牡蠣やーフシェルの需要の増加は、オイスターバーの普及によって推進されている。しかし、他の腐敗しやすい水産物と同様に、牡蠣も微生物の成長と内因性プロテアーゼの酵素活性により、保存期間が制限されている。そのため、牡蠣の新鮮さを保ち、特に生食に適した品質を確保することは非常に重要である。多くの研究が、超冷却が食品の品質を保存するために非常に効果的な技術であると報告している。しかし、殻付き牡蠣の超冷却保存の効果に焦点を当てた研究はほとんどなかった。さらに、牡蠣の初期の活力と殻の形状も、保存期間と品質に影響を与える。したがって、牡蠣の等級選別に活力の回復と形状の選択も解決すべき課題であった。

一方、多くの研究は、牡蠣にはアデノシンーリン酸 (AMP) の分解経路が 2 つあり、イノシンーリン酸 (IMP) の蓄積は牡蠣の異なる状態によって異なることを確認している。したがって、このプロジェクトの目的の一つは、殻の形

状や収穫後の蓄養、超冷却保存が太平洋牡蠣の生化学的特性に与える影響を明らかにすることであった。もう一つの目的は、牡蠣の貝柱での IMP の蓄積の原因を調査することであった。

第 1 章では、 -1°C での超冷却保存（28 日間）の影響に関連して、殻付き牡蠣の品質変化が検証された。この検証では、生化学的特性（微生物解析、ATP 関連化合物、pH、遊離アミノ酸）と官能評価の変化を測定することによって行われた。結果は、超冷却保存中に微生物の成長が有意に抑制されたことを示した。貝柱では、アデノシン二リン酸（ADP）と AMP が蓄積し、一方で ATP は急速に減少した。他の 3 つの組織（外套膜、鰓、内臓部）では、アデノシン三リン酸（ATP）と ADP が主要な成分であり、時間の経過に対して比較的安定していた。貝柱の pH とアデニル酸エネルギーチャージ（AEC）は、殻付き牡蠣の新鮮さの指標として利用できる。ただし、全体の保存中においては、遊離アミノ酸の間には有意な差（ $P > 0.05$ ）はなかった。官能評価によれば、牡蠣は -1°C での保存で最大 21 日間生存し、受け入れる可能性があることが示唆された。したがって、 -1°C での超冷却保存は、殻付き牡蠣の品質をより良く維持し、保存期間を 21 日間延長することが明らかになった。

第 2 章では、保存前の牡蠣の活力に対する短期蓄養の影響を調べた。短期蓄養および -1°C での保存中に、牡蠣の貝柱のいくつかの活力指標（pH、AEC 値、アルギニンリン酸塩、グリコーゲン）が研究された。結果は、短期蓄養後に牡蠣の活力がより良い状態に回復したことを示唆された。短期蓄養グループの AEC 値、pH、およびアルギニンリン酸塩は、蓄養を行わなかったのグループよりも高かった。3 日間の蓄養グループが 3 つのグループの中で最も高い活力を示した。保存中、pH 値と AEC 値は、3 日間の蓄養グループが他の 2 つのグループと比較して高い水準を維持した。ただし、グリコーゲンについては、すべてのグループ間で有意な差はなかった。したがって、短期蓄養は活力を効果的に改善し、太平洋牡蠣の品質と新鮮さに良い影響を与えることができることが示唆された。

上記の結果に基づいて、牡蠣の活力は超冷却保存中の保存期間において重要な役割を果たす。また、牡蠣の殻の形状も活力と密接に関連している。第 3 章では、3D 形態計測技術を使用して、牡蠣の外部形態特徴のみから活力維持能力の非破壊的かつリアルタイムな分類方法を提案し、平型と丸型の牡蠣の超冷却保存中の違いを探究した。結果は、3D 形態計測技術を使用して、平型と丸型の牡蠣の分類精度が 70.0%であることを示唆された。超冷却保存中、丸型の牡蠣は平型よりも良好な活力状態を示唆された。丸型牡蠣の AEC 値は一貫して 50%~60%の範囲内であった。一方、平型では、AEC 値は保存中に 59.19%から 39.98%まで低下した。AEC 値の結果は、間隔水分含量とも関連していった。両グループの pH 値も似た傾向を示唆された。ただし、私たちの実験では、2 つのタイプの間で主要な遊離アミノ酸には有意な差が見られなかった。結果は、3D 形態計測技術が牡蠣のブランド化と品質向上に重要な影響を与える可能性があることを示唆している。これにより、サプライチェーンで牡蠣の活力に基づいた非破壊的かつリアルタイムな分類が可能となる。

さらに、第 4 章では、牡蠣の貝柱における IMP 生成の原理について調査した。この研究では、異なる条件下での牡蠣の貝柱における IMP 生成の違いが確認できた。その理由は、牡蠣の細胞外液にある。牡蠣の細胞外液では、AMP が急速に分解され、IMP が生成される。同様に、インキュベート中には IMP が迅速に分解される。ただし、EDTA が添加されると、二価金属イオンが存在しない状態で AMP が IMP に分解される。細胞外液中の AMP デアミナーゼの活性は影響を受けませんが、IMP の分解は遅くなる。

以上の結果より、むき身の保存条件下では、牡蠣の貝柱は細胞外液の影響を受けており、大量の IMP の蓄積を防いでいる。二価イオンを除去することによって、貝柱におけるアデノシン（AdR）経路の抑制だけでなく、細胞外液による IMP の分解も遅くなる。また殻の形状や収穫後の蓄養、超冷却保存が太平洋牡蠣の生化学的特性を解明することで、今後牡蠣の高鮮度保持、流通輸送などの応用に期待できる。

論文審査の結果の要旨

本研究は太平洋牡蠣（*Crassostrea gigas*）の水揚げ後の等級選別において、活力の回復と

品質保持のために殻形状の選択、水揚げ後の蓄養、およびスーパーチリング（-1℃）保存における牡蠣の各組織（貝柱、外套膜、鰓、内臓部）の変化について研究を行った。また牡蠣の貝柱における IMP の蓄積要因についても検討した。

第 1 章では、-1℃で 28 日間の保存中の殻付き太平洋牡蠣の生化学的特性（微生物解析、ATP 関連化合物、pH、遊離アミノ酸）を測定し、官能評価も行った。その結果、-1℃で微生物の増殖が有意に抑制されたことを示した。貝柱では、ATP は急速に減少したとともに、ADP と AMP が蓄積し、貝柱の pH も低下した。他の 3 つの組織（外套膜、鰓、内臓部）では、ATP と ADP が主要な成分であり、保存日数の経過に対して比較的安定していた。またカキ全体の遊離アミノ酸の変化は見られなかった。貝柱の pH とアデニル酸エネルギーチャージ（AEC）は、殻付き太平洋牡蠣の新鮮さの指標として利用できることが示唆された。官能評価によれば、生食用殻付き太平洋牡蠣は-1℃保存における消費期限は通常 4-5 日から最大 21 日間に伸びる可能性が示唆された。

第 2 章では、短期蓄養および-1℃における保存中に、太平洋牡蠣の貝柱の活力指標である pH、AEC 値、アルギニンリン酸、グリコーゲン含量を測定した。その結果、短期蓄養後に太平洋牡蠣の活力が回復することが示唆された。短期蓄養グループ（1 日と 3 日）の AEC 値、pH、およびアルギニンリン酸は、蓄養を行わなかったグループと比較して高かった。また、3 日間の蓄養グループが最も高い活力を示した。さらに、保存期間における pH 値と AEC 値は、3 日間の蓄養グループが他の 2 つのグループと比較して高い水準を維持した。ただし、グリコーゲン含量は、すべてのグループ間で有意な差は認められなかった。したがって、短期蓄養は太平洋牡蠣の活力を効果的に改善し、その品質を有意に向上させることを明らかとした。

第 1 章および第 2 章の実験結果から、太平洋牡蠣の殻の形状も活力と密接に関連していることが示唆された。第 3 章では、3D 形態計測技術を用いて、太平洋牡蠣の外部形態特徴から活力維持能力の非破壊的かつリアルタイムな分類方法を提案し、平型および丸型太平洋牡蠣の-1℃保存中における活力維持能力の違いを検討した。その結果、平型と丸型太平洋牡蠣の活力維持能力の違いを 76.0%の精度で区別することができた。これにより、サプライチェーンにおける太平洋牡蠣の活力に基づいた非破壊的かつリアルタイムな分類が可能であることを提案した。

さらに、第 4 章では、保存中の太平洋牡蠣の貝柱における IMP 生成の原理について検討し、組織間液の有無や EDTA 添加により二価金属イオンが存在しない異なる条件下での貝柱における IMP 生成の違いを確認した。

以上より、本研究は殻の形状による選別や水揚げ後の蓄養、スーパーチリング保存が、太平洋牡蠣の高鮮度保持や流通輸送などに応用できることを明らかとした。

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. Dong, S., Niu, Y., Wei, H., Lin, Y., Lu, X., Yamashita, T., Yu, K., Takaki, K., & Yuan, C.(2023).

Effect of super-chilling storage on maintenance of quality and freshness of

the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Food Quality and Safety*, 7,
fyad008.