

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580273

研究課題名（和文） 温度周期性に応答するカビ成長パターンの幾何学的解析と
ポストハーベストへの応用研究課題名（英文） Geometric and Growth Analysis of Fungi in response to
Cyclic Temperature and its Application to Post-Harvest

研究代表者

小出 章二 (KOIDE SHOJI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70292175

研究成果の概要（和文）：モデルカビを用いて、培地上のコロニー径とコロニー画像情報（色・形状）の経時変化を計測し、積算温度を用いて温度変動に対応できるカビの発芽・コロニー径の簡易予測モデルを導出した。併せてコロニー画像情報に温度依存性があることを見いだした。次に、導出したモデルは、りんごこうじかび病の病斑成長の予測に適用可能であることが示された。更に、本研究より青果物を一時的に低温に晒しただけでも青果物の腐敗を大きく遅らせることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, colony size and the image information of colony medium (color and shapes) of model mould on PDA agar was measured. Results indicated that the germination of mould and colony diameter under moving temperature was predicted by a simple model by using thermal temperature. It was found that there was temperature dependence in image information of colony. Application for postharvest was also performed for *Aspergillus rot* in apple, and the lesion was also predicted by derived model. Furthermore, it was suggested that fruits and vegetable subjected temporary to cold temperature slows its decay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：温度周期、カビコロニー、成長モデル、ポストハーベスト、病斑、積算温度

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、予測微生物学では HACCP などを用いられるゴンペルツモデル、パラニーモデルなどの式が、増殖するバクテリア数の予測に対して代表的予測モデルとされて

いたが、カビ成長に関するモデルは少なく、そのなかでも温度変動に対応できるモデルは皆無であった。

本研究ではカビ成長に着目したが、このカビ発生は収穫後農産物のポストハーベスト

において特に貯蔵・保存・流通の場で起きやすく、その防黴（防カビ）対策は、温度と湿度の管理制御が必要となる。しかし、実際の流通時や貯蔵施設内の温度は1日あるいは1年単位で周期的に変動し、併せて湿度も変動する。収穫後農産物にとってカビ発生は、商品価値を失うことにつながるため、温度等を指標として、カビ成長の予測や、成長速度と温度との関係を調べることは、収穫後農産物の品質ロスを防ぐ観点から強く望まれていた。

本研究では温度周期や温度変動に着目し、それらがカビ成長（コロニー径）に与える影響を調べモデル化することを着想した。併せて、温度変動に伴い、温度、温度周期性、累積積算温度、平均温度のどの因子がカビ成長に影響を与えるのかも考察することとした。

更に、カビは目視でも幾何学的情報、色彩学的情報が得られることをかんがみ、コロニー成長にともなう形状や色情報の画像解析を行い、その温度依存性について知見を得ることとした。

本研究は、得られる知見を基に、ポストハーベストにおける農産物防黴等や、カビ成長からの温度履歴を逆解析（例えばカビセンサー）出来る知見を発信することを目的としており、本例は研究開始当初のみならず現在でもほとんど見当たらない。

2. 研究の目的

(1) ポストハーベストにおいて、収穫後農産物へのカビの発生は、貯蔵・保存・流通の場で起きやすく、その防黴（防カビ）対策は、温度および湿度の管理制御が肝要であるが、農産物の流通時や貯蔵施設内の温度は1日あるいは1年単位で周期的に変動し、あわせて湿度も変動する。収穫後農産物にとってカビ発生は商品価値を失うため、本研究ではポストハーベストにおけるカビの発生やその防止について、特に温度の観点について調べることを目的とした。

(2) 本研究は、温度環境として恒温、温度変動条件や温度周期を与えてモデルカビを培地上で培養させ、これに反応するカビの成長パターンを、直径（一次元情報）と造形性（面積、成長パターンや色情報など）から数値化し、カビが晒された温度の反応を解析することを一つの目的とした。更に、温度変動時には、温度、温度周期性、累積積算温度、平均温度の四つの温度因子があるが、農産物貯蔵、保存流通施設での防カビにはどの温度因子を指標とすることが望ましいかを、ポストハーベストの観点から検討した。

(3) カビの成長について、温度周期（温度変動）条件下でのカビの成長を予測できる簡易予測モデルを導出することを試みた。本例

はこれまで見当たらないものである。

(4) 以上より得られたカビ成長予測や防黴に関する知見を、ポストハーベストに応用することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 初年度（2008年度）

供試菌として、*Aspergillus oryzae* NBRC 4079を用いた。*A. oryzae*の分生子を0.05% Tween 80を加えたリン酸生理食塩水（PBS）で分散させ、トーマ型血球計算盤を用いて検鏡し、およそ 2×10^6 spores/mLとなるように分生子懸濁液を調整した。

測定は、はじめに培養温度がコロニー成長に与える影響について行なった。測定は、無菌的に分生子懸濁液をPDA培地の入ったシャーレの中心部に5 μ L接種した。分生子懸濁液が接種されたシャーレはデシケーター内に入れ、デシケーターを各温度（20, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5 $^{\circ}$ C）に設定したインキュベーター内に暗黒下で静置した。ここに、相対湿度は95%以上とした。測定は、デシケーターをインキュベーターに入れた時点から開始し、シャーレ内のコロニー径を24時間毎に計測し、その後16日をもって測定終了とした。

併せて、コロニーの外観測定を行った。コロニー外観は、デジタルカメラで撮影し、USBを介してコロニーイメージ（4272 \times 2848 pixels）をJPEGで転送し、画像解析ソフト内蔵のパソコンで評価した。撮影は暗黒下で予め白色板を用いてホワイトキャリブレーションを行い、シャッタースピード、露出、ISOを決定した。得られた画像はImageJを用いて画像解析した。以上の測定は、周期的温度条件下や温度変動条件でも行った。

(2) (2009年度) 温度変動に伴い、温度、温度周期性、累積積算温度、平均温度のどの因子がカビ成長に主に影響を与えるのかを考察した。この結果をもとに、積算温度の概念を用いて温度変動条件に対応できるカビの発芽・コロニー径の簡易予測モデルの導出・検討を行った。ここでは係数となる最大増殖速度と発芽完了時間の温度依存性を調べ、温度変動条件下でのカビ発芽・コロニー径の簡易予測の精度を検討した。

$$L = L_0 \quad (t \leq \tau) \quad (1)$$

$$L = L_0 + \mu \cdot (t - \tau) \quad (\tau < t) \quad (2)$$

ここに t は培養時間(day)、 L は測定開始から時間 t 経過したときのコロニー径(mm)、 L_0 は初期コロニー径(mm)であり0mmとした。また、 μ は増殖速度(mm/day)であり τ は発芽完了時間(day)である。各温度の増殖速度は以下の

平方根Ratkowsky モデルに当てはめた。

$$\sqrt{\mu} = a \cdot (T - T_{\min}) \cdot \{1 - \exp[-b \cdot (T - T_{\max})]\} \quad (3)$$

ここに、 a 、 b 、 T_{\max} 、 T_{\min} は係数で、 T は温度(°C)である。 T_{\max} はコロニー最大増殖温度で、 T_{\min} はコロニー最低増殖温度を示す。更に、発芽完了時間予測モデルとして次式を提案した。次式は発芽完了時間である係数 τ を、時間とそのときの(培養温度 T -分生子発芽の最低増殖温度 T_{\min})を掛けた積算温度 θ (°C・h)で表したもので、各条件下で得られる θ の標準偏差が最小となる値を θ とおく。

$$\tau = \frac{\theta}{24 \cdot (T - T_{\min})} \quad (4)$$

併せて当該年度では、ポストハーベストにおける防黴の観点から、*Aspergillus niger*の殺カビ試験を、次亜塩素酸ナトリウムや水道水、微酸性電解水を用いて検討した。測定は、微酸性電解水(残留塩素濃度 26 ± 4 ppm, pH 5.5 ± 0.1)、次亜塩素酸ナトリウム水(残留塩素濃度 148 ± 10 ppm, pH 9.8 ± 0.3)およびコントロール液(Tween80)の3条件で行った。これら3種類の溶液をそれぞれ2mLずつ滅菌試験管にとり、ウォーターバスで所定温度となるように加温した。ここに予め調製した*A. niger*の分生子懸濁液を $10 \mu\text{L}$ 加え、所定時間まで加温した。その後、直ちに冷却し、その0.1mLを取り出して、Tween80(0.9mL)で10倍段階の希釈列を調整した。そして0.1mLをPDA培地に塗布し、25°Cの恒温槽で3~7日間培養して、コロニー数を計測した。

(3) (2010年度) 実際の収穫後農産物を用いてカビ産生に伴う病斑成長を検討した。ここでは、ポストハーベスト病害の一つである貯蔵中のリンゴに発生するこうじかび病に着目し、人工的に傷をつけ損傷させた市販リンゴを供試材料とし、これに*A. niger*を接種した後、種々の温度条件(35~15°C)や温度変動条件(デパート内の温度環境を再現)下で貯蔵し、こうじかび病の病斑部(写真1)の直径と形状を測定した。併せて、貯蔵中のガス条件を低酸素濃度(CA貯蔵を想定)とし、リンゴこうじかび病の成長に与える影響を考察した。



写真1 収穫後リンゴこうじかび病の病斑部

4. 研究成果

(1) *A. oryzae*のコロニーは、分生子懸濁液の接種点を中心として幾何学的にほぼ円形に形成された。各培養温度で生育したコロニー径の経時変化を計測した結果、コロニー径はWeibullモデルで精度良く近似できた。なお該当年度では温度変動に対応できるWeibullモデルを開発したが、より詳細な解析モデルを2009年度に開発したので後述する。

次にコロニーは、20°Cで分生子着色部は茶色を呈し、培養温度が高くなるにつれ、全体的に灰色から白色へと分生子着色部の色は変化した(図1)。画像からコロニーのRGB各値について抽出した結果を図2に示す。これより、B値は直線的な温度依存性を有することが示された。次に、温度変動条件でのコロニー情報の一例を図3に示す。これを見ると、分生子着色部は、温度変動前まで図2で得られたB値に近く、また温度変動に伴い生じた輪紋様の中心部からの距離は、開発したモデルで得られた計算値とほぼ一致した。このことからカビコロニーの色と輪径を指標として、カビに晒された温度履歴をある程度逆解析することが可能であることを見出した。このことは、カビを用いた温度記録の生物学的センサーの創出にも寄与出来る。

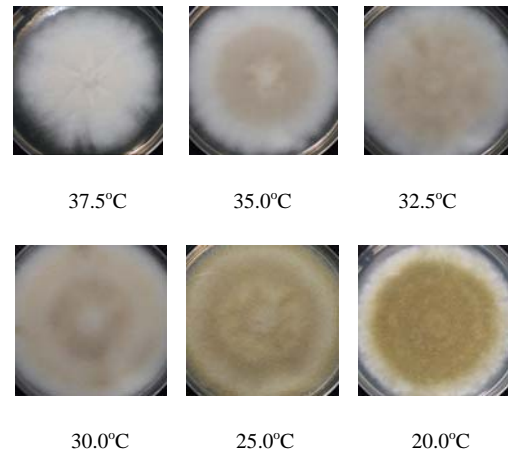


図1 *A. oryzae*の分生子形成部の外観

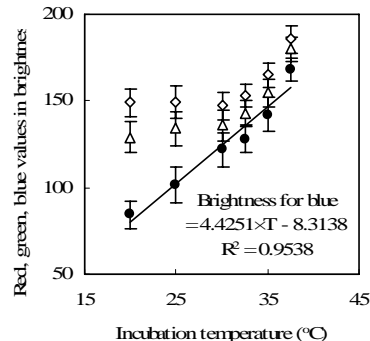


図2 種々の温度で培養した*A. oryzae*の分生子形成部のRGB各値。R値(◇)、G値(△)、B値(●)。

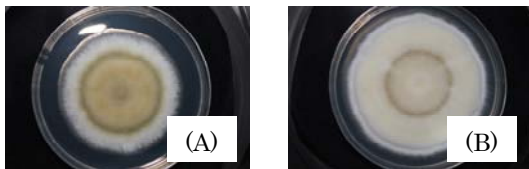


図3 温度変動条件下で培養した *A. oryzae* の分生子形成部の外観。(A) 25°C培養(点種後4~5日目に35°Cに温度を変動)。(B) 30°C培養(点種後3~4日目に20°Cに温度を変動)。

(2) 種々の温度条件におけるコロニー径の経時変化を示す(図4)。コロニーの成長速度は温度の増加とともに増加し、その増殖速度は温度27.5、30、32.5°Cで最大となり、35°C以上の温度領域では増殖速度が温度の上昇とともに遅くなった。次に、各温度での増殖速度 μ を式(3)で近似した結果、高い精度で一致した(RMSE=0.40)。また各温度での発芽完了時間 τ を式(4)にベストフィッティング法で係数を求めた結果、高い精度で一致した(RMSE=0.09)。

なお、温度変動時には、温度、温度周期性、累積積算温度、平均温度の温度因子があるが、増殖速度と発芽に要する時間との関係から、温度や平均温度の概念を用いるよりも、後述する分生子発芽率と積算温度との関係から、積算温度で表現するのが、適切であることが提案された。また温度周期であるが、コロニー表面情報としては、上述したように輪紋様を呈するが、周期が多くなると輪紋様が色情報として確認しづらくなることを考えると、コロニー径の予測は、やはり積算温度で表現するのが望ましいと考えられる。

よって、温度変化に伴うコロニー径の簡易予測モデルとして、次式を提案した。ここでは、分生子の発芽に必要な積算温度を θ (°C·h)と表現し、積算温度が θ となったときの培養時間(発芽完了時間)を設定した。発芽完了時間($t \leq t_1$)まではコロニー径 L は0(mm)と表せ、増殖期($t > t_1$)のコロニー径の成長速度は式(5)で表せる。

$$\frac{dL}{dt} = \mu(T(t)) \quad (5)$$

$$= \{a \cdot (T(t) - T_{\min}) \cdot [1 - \exp(b \cdot (T(t) - T_{\max}))]\}^2$$

ここに、 $L(t_1)=0$ である。これより *A. oryzae* のコロニーを、温度周期条件下で培養し、コロニー径の測定値を数値計算により求めた予測値と比較した(図5)。これより、計算値は測定値を良好に予測出来ることが示された。

図6には、温度変動条件下での分生子発芽率と積算温度との関係を示す。今回は分生子発芽の最低増殖温度は計算より8.4°Cとおいた。図6より、発芽率は積算温度とともにシグモイド曲線を描くことが分かる。カビの発芽のモデル式として用いられる修正ゴンペ

ルツ式にあてはめるところ精度良く一致した。この知見は初めて得られたものであり、温度変動条件下においてもカビの発芽は積算温度で表せる可能性を見いだした。今後は、カビの分生子発芽に関して積算温度を指標とし予測・制御する手法が期待出来る。

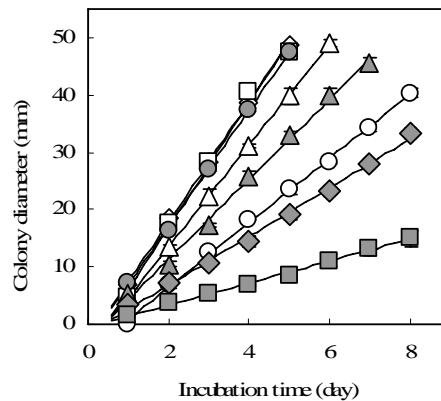


図4 種々の温度条件におけるコロニー径の経時変化。20(○), 25(△), 27.5(◇), 30(□), 32.5(●), 35(▲), 37.5(●), 40(■)。

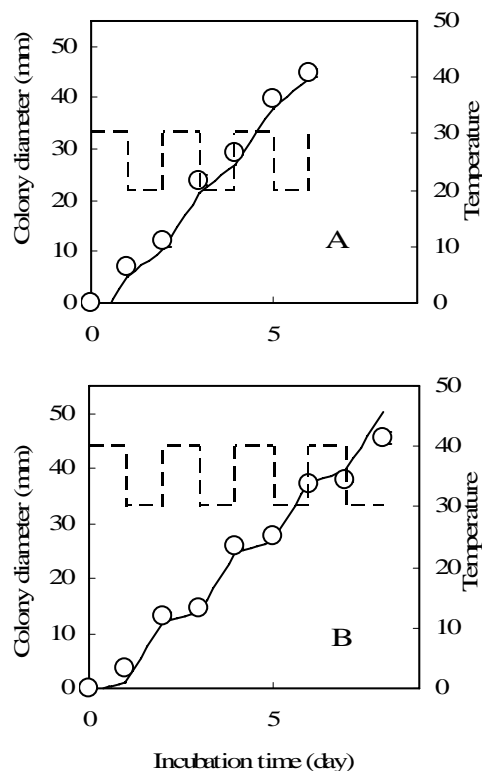


図5 温度変動条件下でのコロニー径の経時変化とその予測。○はコロニー径(測定値)、実線は予測値、点線は温度。

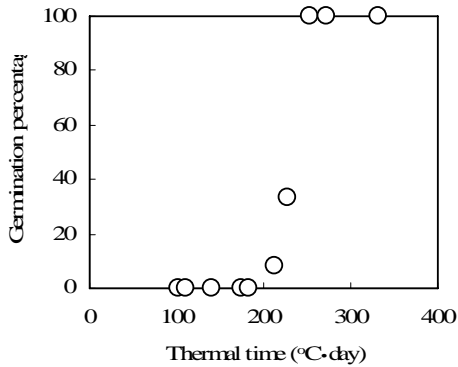


図6 温度変動条件下での分生子発芽率と積算温度との関係。ここでは、分生子発芽の最低増殖温度は8.44℃と設定。

以上、図5をみると予測値と測定値はよく一致した。これは温度変動時の予測モデルに、温度ではなく積算温度でも表現することが出来ることを意味する。

次に、ポストハーベストにおける防黴試験の結果であるが、微酸性電解水は、有効塩素濃度20ppm程度の微酸性電解水温度を45℃付近とすることにより、10分の浸漬でおよそ90%の分生子が殺カビ可能であった。本研究では、これより*in vivo (on Food)*での測定として、パプリカにカビ分生子を点種し表面を乾燥させた後、温度45℃付近の微酸性電解水を用いた表面の洗浄・保存試験を行ったところ、コントロール区と比較して目視であるが顕著な防黴効果が得られた。

(3) 収穫後のリンゴこうじかび病の病斑径の経時変化を図7に示す。測定値を前述した簡易予測モデルに対して適用した結果、モデルは高い適合性を示し、また温度変動下の病斑部成長もよく予測出来た。また病斑成長速度や病斑形成時間の温度依存性は、式(3)と式(4)で用いた予測微生物学モデルにより精度良く近似出来ることが示された(図8、図9)。

一方、病斑部は高二酸化炭素濃度と低酸素濃度の条件下で成長が阻害されることが示された。また病斑部は褐色となり、果皮に損傷部位を中心に円状に近く広がり(写真1)、複数の病斑を成長させると、病徴が重なり合うが、その面積は中心間距離で求められることが示され、温度条件が分かれば病斑面積の予測も可能であることが示された。

以上より、ポストハーベストにおける損傷果実の病斑部径の成長は、貯蔵温度の影響を受けやすいが、図8と図9で明らかなように貯蔵中に温度変動の条件(例えば、室温と低温

の繰り返し)を付すだけでも、病斑の成長をある程度効果的に遅延出来ることがグラフからも測定からも示された。

即ち、青果物の低温貯蔵の有用性が、腐敗防止の観点から示された。

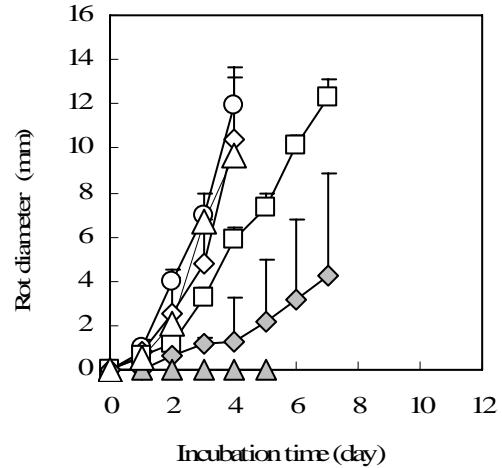


図7 収穫後のリンゴこうじかび病の病斑径の経時変化。○は30℃、◇は27.5℃、△は35℃、□は25℃、◆は20℃、▲は15℃。

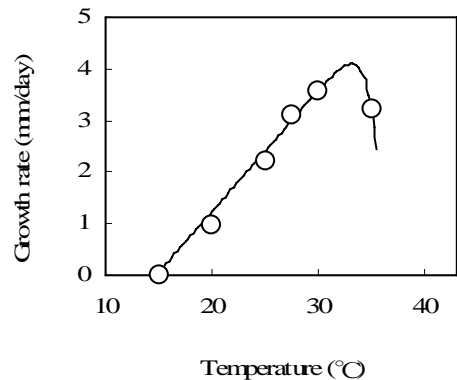


図8 リンゴこうじかび病の病斑成長速度の温度依存性

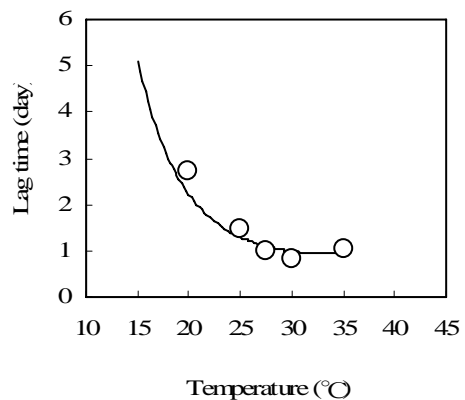


図9 リンゴこうじかび病の斑形成時間の温度依存性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 小出章二、福士祥代、曹 薇、八十川大輔、*Aspergillus oryzae* のコロニー径の簡易予測に関する基礎的研究、農業生産技術管理学会、査読有、16(4)、2010、131-136

[学会発表] (計2件)

- ① 小出章二、加藤 愛、坂本宏平、野手みずほ、固形培地上に培養した *Aspergillus oryzae* の温度依存性を考慮したコロニー成長評価モデルと外観評価、農業環境工学関連学会 2009 年合同大会 (東京大学駒場キャンパス)、2009. 9. 13、東京大学 (東京都)
- ② 小出章二、八十川大輔、立石貴浩、庄野浩資、カビの表面集落の物理的形状から見る培養温度の検討、日本食品科学工学会、2008. 9. 7、京都大学 (京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 章二 (KOIDE SHOJI)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：70292175

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

庄野 浩資 (SHONO HIROSHI)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：90235721

八十川 大輔 (YASOKAWA DAISUKE)
北海道食品加工研究センター・科長
研究者番号：なし