

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02317

研究課題名（和文）生物時計の同調あるいは攪乱による収穫後青果物の品質制御

研究課題名（英文）Quality control of postharvest fruits and vegetables by entraining or disturbing the biological clock

研究代表者

黒木 信一郎（Kuroki, Shinichiro）

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00420505

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：拡散および浸透水透過係数の計測により、収穫後の時間経過に伴う細胞膜の機能劣化が低酸素濃度環境によって抑制されることを明らかにした。また、タイムラプスハイパースペクトル画像計測、および高速フーリエ変換とオイラー動画像誇張処理法を用いた解析によって、青果物周囲の酸素濃度に依存して周期変動の振幅強度が変化することを明らかにし、概日時計制御理論を、葉菜類の品質保持技術へ組込むための基礎的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パルス磁場勾配NMR法によって、葉を組織のまま用いて拡散水透過係数を測定できることを示し、より侵襲性の低い手法で収穫後の品質劣化の初発的な症状を捉えられることを明らかにした。またタイムラプスハイパースペクトル画像取得とその解析により、収穫後葉菜類の周囲環境の酸素濃度と対応する生体情報の空間的・時間的変動を明らかにした。これらの知見は、概日時計制御理論を利用した品質保持技術の高度化に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Measurements on diffusion and osmotic water permeability have shown that low oxygen levels can slow down the deterioration of cell membranes in harvested produce. Furthermore, time-lapse hyperspectral imaging with fast Fourier transform and Eulerian video magnification have demonstrated that the intensity of periodic fluctuations in the images varies with the oxygen levels surrounding the spinach leaves. These findings lay the groundwork for applying circadian rhythm management to improve the preservation of leafy greens' quality.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：ハイパースペクトル画像 拡散水透過係数 浸透水透過係数 低酸素 周期変動解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒト用食料の3分の1がロスまたは廃棄される一方で¹⁾、世界人口の必要量を上回る食料が生産されている²⁾。これは、現在のフードチェーンに過剰生産と大量廃棄のシステムが存在する証拠である³⁾。易変性のため損失割合が特に顕著な葉菜類においては、現状打破のために品質劣化メカニズムのより完全な理解が必要とされ⁴⁾、収穫後の生理状態の履歴を反映する内在要素を捉えようとした研究が進められてきた。しかしながら、単なるデータ増強ではフードチェーンの中で活用可能な技術にまで精度を高めるのは困難で、収集データと品質要素とを機械学習によって単純に対応付ける手法とは別の観点から、品質劣化に関連する計測値変動の情報を炙り出すような特徴選択・抽出が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ガス環境の変化に迅速に応答し、貯蔵環境を制御した実験系において多様な鮮度状態を実現できると期待される葉菜類を対象に、品質劣化の初発的な症状の一つと期待される細胞膜の機能劣化について、水透過性の観点から明らかにすることを目的とした。さらに近年、栄養・生殖成長⁵⁾、害虫や病原体への抵抗性⁶⁻⁸⁾、一次および二次代謝物の増減⁹⁻¹¹⁾と関係していることなどが報告されてきた、植物体の体内時計への関与を介した代謝制御理論である概日時計制御理論を、葉菜類の品質保持技術へ紐込むための基礎学理の構築に資するべく、タイムラプスハイパースペクトル画像取得とその解析により、収穫後葉菜類の生体情報の空間的・時間的変動の観察可能性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料および貯蔵条件

供試材料には、人工環境下で水耕栽培し、商業サイズ(1株当たり約50g)で収穫したホウレンソウ葉 (*Spinacia oleracea* L., cv. ‘オーライ’)を用いた。栽培条件を表1に示した。

表1 ホウレンソウの栽培条件

	育苗 (2週間)	定植 (6週間)
気温 (明期 / 暗期) [°C]	22.3 ± 1.6 / 18.6 ± 0.5	24.6 ± 0.4 / 23.4 ± 0.7
湿度 (明期 / 暗期) [%RH]	22.4 ± 4.4 / 56.6 ± 11.0	42.7 ± 5.6 / 45.8 ± 7.7
明暗周期 [h/h]		11/13
PPFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	68.6 ± 30.1	189.1 ± 5.3
養液	水道水	大塚ハウス肥料 A 処方 (EC = 1.20 ± 0.05 mS cm^{-1} ; pH = 6.0 ± 0.5)

20 °C 設定のインキュベータ内に設置した計測チャンバー内に収穫したホウレンソウ株を静置し、暗黒条件下で最大4日間貯蔵した。設定した酸素濃度 (O₂: 20%, 5%; N₂: balance) のガスをチャンバー内に一定流量で加湿しながら通気させることで、青果物周囲のガス濃度と湿度を一定に制御した。

(2) 実験方法

ホウレンソウ葉の中肋と側脈を避けた葉肉部から、直径7mmおよび20.5mmのコルクボーラでくり抜いた切片をそれぞれ拡散水透過係数 P_d および浸透水透過係数 P_o の測定に供試した。直径10mmのNMR試験管内に切片を積層し、パルスNMR装置(JNM-MU25A, JOEL)を使用して Stimulated-Echo 法で測定した自己拡散係数 D を以下の式に代入して P_d を算出した。

$$D_{\infty}^{-1} = D_0^{-1} + (aP_d)^{-1}$$

ただし、 D_0 は水分子の自由拡散が仮定される場合の自己拡散係数を、 D_{∞} は細胞膜障壁により拡散が最小に制限される場合の自己拡散係数を示す。また、 a の値には、光学顕微鏡観察によって測定したホウレンソウ葉柔組織の平均細胞サイズを用いた。一方、Goto et al.¹²⁾ を改良した方法でプロトプラストを単離し、二層流法¹³⁾を用いて、浸透脱水過程におけるプロトプラストの体積応答を観察することによって P_o を測定した¹⁴⁾。

図1にタイムラプスハイパースペクトル画像計測システムを示した。Excel VBA マクロによって所定のインターバルで光源のシャッターを開くことで、密閉容器上部に設置した石英窓を隔てて、計測チャンバー内に静置した葉サンプルに約 $19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のハロゲン光を照射し、照射と同期して反射率の分光画像を取得した。サンプルと共に観察視野内に設置したファントム物質(シリコンセプタム)の反射率を用いて、撮影条件による変動を補正した。補正後の葉領域のスペクトルを主成分分析した。前処理には中心化を用いた。第1-3主成分スコアを0-255(8 bit)にスケールし、各スコアをそれぞれRGB色空間の輝度値とみなした擬似カラー画像を作成した。各フレームを時間方向に結合した動画を、高速フーリエ変換(fast Fourier transform, FFT)およびオイラー動画像誇張処理法(Eulerian video magnification, EVM)¹⁵⁾で解析した。

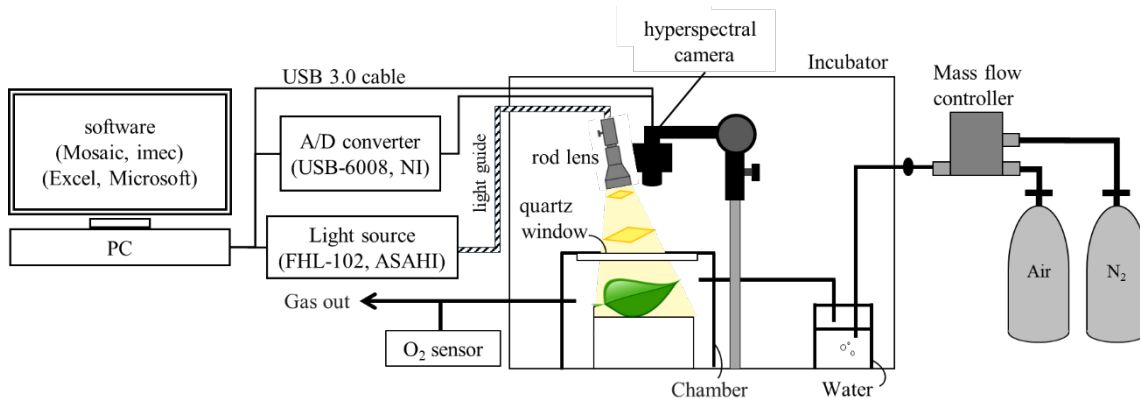


図1 貯蔵環境制御システムおよびタイムラプスハイパースペクトル画像取得システム

4. 研究成果

酸素濃度20%の条件下で貯蔵したホウレンソウ葉では、収穫直後から収穫4日後までの間に、 P_d は $15.7 \pm 1.2 \mu\text{m s}^{-1}$ から $38.7 \pm 2.4 \mu\text{m s}^{-1}$ まで増加した。一方、 P_o は $8.6 \pm 0.4 \mu\text{m s}^{-1}$ から $14.8 \pm 3.1 \mu\text{m s}^{-1}$ に増加した(図2)。収穫後の時間経過に伴う水透過係数の増加傾向は、拡散係数計測および浸透脱水のフラックス計測のどちらにおいても認められたことから、細胞膜の水透過性は品質劣化の初期症状の指標となり得ると考えられた。 P_o に比べて P_d の変化が大きかったこと、および P_o 測定にはプロトプラストが必要であるのに対して、 P_d はコルクボーラでくり抜いただけの切片組織から測定値が得られることから、酵素処理によるプロトプラスト単離操作が水透過性やその貯蔵中における変化を抑制する可能性が示唆された。また、アクアポリンタンパクが発現している系では、 $P_o \geq P_d$ となることが知られている¹⁶⁾。両者の大小関係およびその変化傾向の理解にはさらなる検討が必要である。また、膜の脆弱化と脂質過酸化の進行が低酸素環境によって抑制され、4日間貯蔵後の P_o は5%酸素濃度下で小さくなる傾向があった。

タイムラプスハイパースペクトル画像計測の結果、葉の反射率は全ての波長で単調ではなく変動しながら漸減していくことが明らかとなった(図3)。またその低下量は葉の領域ごとに異なった。時間経過に伴う反射率の低下は既往の研究でも観察されており¹⁷⁾、かつ拡散および浸透水透過係数のいずれもが収穫後の時間経過と共に増加したことから、組織内細胞間隙の自由水の増加に伴う屈折率の不連続性の減少や組織内部散乱の増大による見かけの光路長増大によって反射率が低下すると考えられた。

図4に、酸素濃度20%の環境で3日間貯蔵した際の第1主成分スコア画像の経時変化を示した。第1主成分負荷量は平均反射スペクトルと類似したスペクトル形状を取った。葉内の部位や貯蔵条件の違いによる主成分スコア変化の周期性をFFTおよびEVMで解析した結果、おおよそ24時間の周期における第1主成分スコアの振幅強度の葉内分布が可視化された(図5)。収穫後の時間経過に伴う目減りにより、葉が収縮し

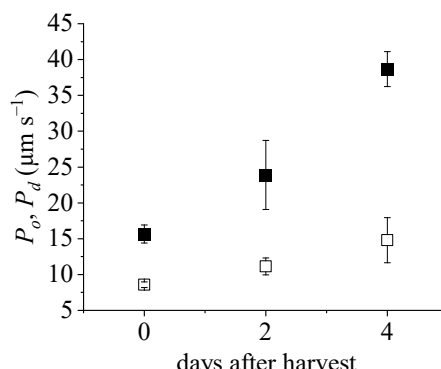


図2 拡散および浸透水透過経時変化

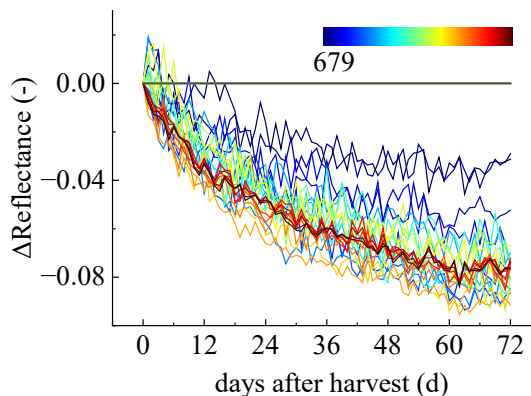


図3 反射率スペクトルの経時変化

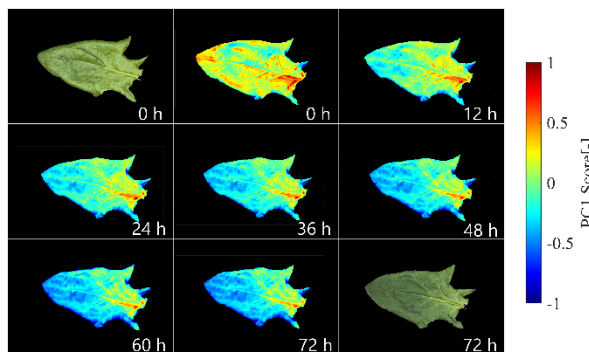


図4 第1主成分スコアの推移(20%O₂貯蔵)
(収穫直後と3日後の写真も併記)

て葉縁部のピクセルでは位置ずれが生じた。葉身部の重心を中心とする 80 pixel 四方(約 $17.6 \times 17.6 \text{ mm}^2$ 、葉縁部を含まない)における振幅強度の平均値を評価した結果、観測できた全ての周波数領域において、低酸素濃度環境下で貯蔵されたサンプルの振幅強度が、通常大気環境下でのそれらと比較して小さい傾向にあった。これらから、周期変動の振幅強度が小さい部位ほど鮮度保持されている可能性が示唆された。今後は部位ごとの鮮度マーカー成分との相関解析が期待される。

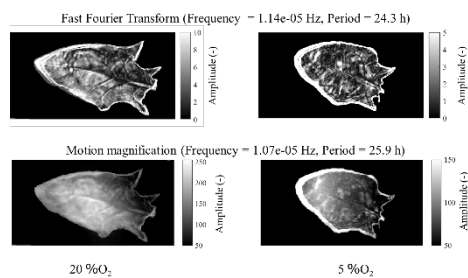


図 5 高速フーリエ変換(FFT, 上段)およびオイラー動画像誇張処理法(EVM, 下段)による約 24 時間周期の振幅強度マップ。

<引用文献>

1) Gustavsson et al., 2011. *Save Food!*, 1–29.; 2) Hiç et al., 2016. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4269–4277.; 3) Editorial, 2019. *Nature* 574, 296.; 4) Foegeding, 2020. *J. Food Sci.* 85, 2632–2632.; 5) Harmer, 2009. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 357–377.; 6) Goodspeed et al., 2013. *Curr. Biol.* 23, 1235–1241.; 7) Wang et al., 2011. *Nature* 470, 110–114.; 8) Bhardwaj et al., 2011. *PLoS One* 6, e26968.; 9) Sicher et al., 1984. *Plant Physiol.* 76, 165–169.; 10) Kiyota et al., 2006. *J. Photochem. Photobiol. B* 84, 197–203.; 11) Hasperué et al., 2011. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 64–70.; 12) Goto et al., 2000. *Rep. Toyo Jr. Col. Food Technol. & Toyo Inst. Food Technol.* 23, 1–7.; 13) Sotome et al., 2004. *Trans. ASAE* 47, 1207–1213.; 14) Kuroki et al., 2022. *J. ASABE* 65, 189–196.; 15) Wu et al., 2012. *ACM Trans. Graph.* 31, 1–8.; 16) Verkman, 1992. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 97–108.; 17) Diezma et al., 2013. *Postharvest Biol. Technol.* 85, 8–17.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroki Shinichiro, Tanaka Mai, Itoh Hiromichi, Nakano Kohei, Sotome Itaru	4. 巻 65
2. 論文標題 Upgrading the Measurement of Membrane Hydraulic Conductivity and the Osmotically Inactive Volume of Protoplasts for Evaluating the Freshness of Postharvest Leafy Vegetables	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the ASABE	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.13031/ja.14755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki Yohsuke, Akune Rina, Matsuda Ayano, Kuroki Shinichiro, Takisawa Kenji, Fukushima Takashi	4. 巻 64
2. 論文標題 Effect of Chloroplast Movement on Laser Speckle Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transactions of the ASABE	6. 最初と最後の頁 1747 ~ 1754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.13031/trans.14397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuroki Shinichiro, Koizumi Koyo, Tanaka Mai, Uno Yuichi, Itoh Hiromichi, Nakano Kohei, Sotome Itaru	4. 巻 207
2. 論文標題 Cell membrane dysfunction in postharvest spinach leaves increases water permeability through parallel pathways involving the lipid bilayer and aquaporins	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Postharvest Biology and Technology	6. 最初と最後の頁 112630 ~ 112630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.postharvbio.2023.112630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shinichiro Kuroki
2. 発表標題 Machine learning-based nondestructive quality evaluation of postharvest agricultural produces for the sustainable world
3. 学会等名 3rd Undergraduate Research Symposium on Agricultural Engineering and Environmental Technology (URSAE)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Tsuru, S. Kuroki, R. Tsuda, S. Nakajima, H. Itoh
2. 発表標題 Estimation of oxidative stress markers in postharvest spinach leaves using hyperspectral imaging
3. 学会等名 The XX CIGR World Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木信一郎
2. 発表標題 機械学習と分光分析を用いた農畜産物の非破壊品質評価
3. 学会等名 関西6大学発農業系シーズ/共同研究/ベンチャーの現状と未来(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴かのん, 黒木信一郎, 津田梨乃, 伊藤博通, 中島周作
2. 発表標題 収穫後におけるハウレンソウ葉内酸化ストレスマーカーの推定
3. 学会等名 第80回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千田理紗, 黒木信一郎, 中島周作, 伊藤博通
2. 発表標題 収穫後青果物における拡散透水係数と鮮度の関係調査
3. 学会等名 関西農業食料工学会第149回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴かのん, 黒木信一郎, 中島周作, 伊藤博通
2. 発表標題 タイムラプス分光画像解析によるハウレンソウ葉の鮮度評価
3. 学会等名 関西農業食料工学会第149回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木信一郎
2. 発表標題 SDGs達成に貢献するポストハーベスト工学
3. 学会等名 国際食品工業展 農業食料工学会シンポジウム フードテクノロジー（フーテック）フォーラム 愛知スカイエキスポ 20210604 2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichiro Kuroki
2. 発表標題 Freshness evaluation of leafy vegetables for the sustainable world
3. 学会等名 International Symposium on Agriculture and Environment Virtual Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井理人, 黒木信一郎, 杉田彩子, 伊藤博通, 中島周作
2. 発表標題 収穫後葉菜類におけるプロトプラスト単離条件と細胞膜物性の関係
3. 学会等名 第79回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田梨乃, 黒木信一郎, 伊藤博通, 中島周作, 中野浩平
2. 発表標題 植物由来物質による測定妨害を考慮した葉菜類のH2O2濃度評価法
3. 学会等名 第79回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田彩子, 黒木信一郎, 伊藤博通, 中島周作, 中井理人
2. 発表標題 葉菜類の細胞膜水透過性の変動に関する因子の調査
3. 学会等名 関西農業食料工学会第147回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴かのん, 黒木信一郎, 伊藤博通
2. 発表標題 タイムラプス分光画像によるハウレンソウ葉鮮度の変動解析
3. 学会等名 農業環境工学関連学会2023年合同大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 博通 (Itoh Hiromichi) (00258063)	神戸大学・農学研究科・教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中野 浩平 (Nakano Kohei) (20303513)	岐阜大学・大学院連合農学研究科・教授 (13701)	
研究分担者	福田 弘和 (Fukuda Hirokazu) (90405358)	大阪公立大学・大学院工学研究科 ・教授 (24405)	
研究分担者	五月女 格 (Sotome Itaru) (90469833)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授 (12601)	
研究分担者	タンマウォン マナスィカン (Thammawong Manasikan) (90763673)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関