

## ホウレンソウおよびキャベツの鮮度指標となる

### 揮発性化合物の探索

曾我綾香

## Exploration of Freshness Marker for Spinach and Cabbage by Comprehensive Mass-spectrometric Analysis of Volatile Compounds

Ayaka SOGA

### 要 旨

青果物を購入する際に、消費者が最も重要視する点の一つに「鮮度」が挙げられる。しかしながら、鮮度の定義や評価法は定まっておらず、流通関係者の目利きや消費者自らの判断に基づく主観的な評価によって行われているのが現状である。また、鮮度の指標となる内容成分の減耗度合いを、機器分析により測定して鮮度判定ができて、初発値を把握できない流通の現場などでは適用しがたい。そのため、客観的かつ定量的、さらには単回の計測で判定できる鮮度評価方法が求められている。そこで本研究では、青果物のガス代謝、特に放散される揮発性化合物の挙動に着目した。ホウレンソウおよびキャベツの鮮度低下に伴い放出される揮発性化合物の挙動を明らかにし、鮮度マーカー候補化合物を同定することを目的とした。

第1の研究では、ホウレンソウの鮮度を反映する放散揮発性化合物を特定するために、ガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS) によるメタボロミクス解析を行った。5, 15, 25°C 貯蔵時に生成される揮発性化合物をガス吸着管で捕集し、加熱脱着法により GC-MS へ導入した。揮発性化合物量から貯蔵積算温度を推定する PLS 回帰分析によって、テルペン、アルコール、炭化水素及び未同定を含む 10 種類の化合物が鮮度を説明する重要な物質として選択された。さらに、階層クラスター分析から、これらの化合物の構成比で貯蔵積算温度を 3 段階に推定できることが示された。これらのことから、放散成分プロファイリングはホウレンソウの鮮度評価に有用であることが示唆された。

第2の研究では、ホールおよびカットキャベツの鮮度を反映する放散揮発性化合物を探索するために、ガスクロマトグラフィー・質量分析によるメタボローム解析を行った。ホールキャベツから 40、カットキャベツから 30 個の物質がアノテートされ、そのうち 20 個は共通した。検出された揮発性化合物を用いた PLS 回帰モデルは、貯蔵積算温度をうまく説明できた。変数重要度指標に基づいて選定された物質による階層クラスター解析では、貯蔵積算温度の増加に応じてそれらのプロファイルが異なった。以上のことから、選定された物質はホールあるいはカットキャベツの鮮度マーカー候補であり、それらのプロファイリングによる鮮度評価の可能性が示された。

本研究の結果からホウレンソウおよびキャベツの鮮度指標となりうる物質を揮発性化合物から見出した。これらの化合物単独での消失あるいは出現を検出することによって、あるいは複数の化合物の構成比率によって、鮮度状態を評価できる可能性が示された。

## Abstract

The quality of agricultural produces is an important factor when consumers purchase. Especially in fruits and leaf vegetables, the degree of freshness is highly interested. In the laboratory, the freshness has been usually evaluated by the reduction rate of sugar or ascorbic acid against an initial value. However, it is impossible to apply at an actual distribution because there is no way to know the initial value. Therefore, freshness often judged by the appearance such as color. Given that such a subjective judgement is ambiguous, objective and quantitative freshness evaluation methods are required. In this study, we focused on gas metabolites especially volatile compounds released from fresh products during storage. To identify candidate compounds for freshness markers, we analyzed changes in the volatile compounds released with spinach and cabbage deterioration by comprehensive analysis using a gas chromatograph mass spectrometer (GC-MS) and search for freshness index compounds of fresh produces by the profiling of volatile compounds.

In the first study, a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolomics approach was used to identify specific volatile compounds as an indicator for assessing the freshness degree of harvested spinach leaves during storage. Volatiles produced from the leaves stored at 5 °C, 15 °C, and 25 °C were collected periodically in a gas adsorption tube and subsequently withdrawn into GC-MS by a thermal desorption method. Partial least squares regression for predicting the cumulative storage temperature based on the detected volatiles has selected ten substances as important volatiles that can explain the degrees of freshness, which belong to terpene, alcohol, aldehyde, hydrocarbon, and unknown ones. A hierarchical cluster analysis revealed that the composition ratios of these compounds allowed estimating the cumulative storage temperature of the samples in three levels. These results suggest that the profiling of volatile compounds emitted from stored spinach could probably be a practical method for assessing the degrees of freshness.

In the second study, gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics approach was applied to reveal volatile compounds that reflect the freshness of whole and fresh-cut cabbage. Forty and thirty volatiles were annotated in whole and fresh-cut cabbage, respectively, and twenty of which were in common. A developed partial least squares regression (PLSR) model using the detected volatiles allowed estimating the cumulative storage temperature with sufficient accuracy. A hierarchical cluster analysis with selected volatiles based on variable importance in projection of each PLSR model showed that the profiles of the volatile compounds differed with the cumulative storage temperature. These results suggest the feasibility of the freshness assessment for whole and fresh-cut cabbage by profiling the selected volatile compounds as candidates for freshness markers.

As a result, candidates of freshness for spinach, cabbage and cut cabbage from their volatile compounds were found. It was shown that the freshness can be evaluated by detecting the disappearance or appearance of these compounds alone, or by the composition ratio of these compounds.

## 第1章 緒言

厚生労働省が推進する「健康日本 21」によると、カリウム、食物繊維、抗酸化ビタミンなどの摂取は、循環器疾患などの生活習慣病やがんの予防に効果的に働くと考えられ、これらの摂取量と食品摂取量との関連を分析すると、野菜の摂取が寄与する割合が高い。また、野菜や果実の摂取の重要性は経験的に知られており、近年では疫学調査によっても、健康への寄与が報告されている（厚生労働省 2000）。

このように、健康な食生活に欠かせない野菜の生産と消

費について見てみると、日本の農業産出額のうち、野菜が占める割合はおおよそ 25% である。

また、野菜の国内需給の 80% は国内産であり、20% は輸入である（農林水産省 2020）。消費者は年間を通じて様々な野菜を入手することができるが、近年の食の外部化や簡便化の流れの中で、生鮮野菜の購入金額は減少傾向にあるのに対し、サラダの購入金額は増加が続いている（農林水産省 2019）。このため加工・業務用向けの野菜需要は拡大が続き、

収穫時期に限られた、季節の旬野菜だけではなく、「年間を通じて同じ種類」の野菜の供給が求められており、栽培技術の進歩や品種開発はもとより、収穫後から実需者・消費者に届くまでの品質保持技術を含めた物流システムの発展が大きく寄与している。一方で、各地に開設されている農産物直売所の人気は高く、消費者の地場農産物に対する需要は高い。その理由の一つとして、消費者が農林水産物購入時に重視する要素の一つに、「鮮度」が最も多く選択されていることが挙げられる（図 1, 神奈川県 2020）。生産者が収穫した後、様々な流通段階を経ずに、直接、店頭に並ぶ青果物は、「新鮮」そのものであると考える消費者は少なくないためであろう。一方、購入した青果物に対する不満の 1 つとして「鮮度が悪い」ことがしばしば挙げられる（NPO 法人野菜と文化のフォーラム 2006）。

鮮度、すなわち新鮮さの度合いとはどのように判断されているのだろうか。その定義や評価法は定まっていないが、青果物は収穫された時点が鮮度の開始点かつ最高点であり、それは時間経過とともに低下していくと考えられる（松岡ら 1999, 永田 2018）。

青果物収穫後の時間経過に伴って起こる「鮮度の低下」は、収穫ストレスや流通過程などの外的環境の変化の影響と、収穫後も継続する青果物の呼吸や蒸散などの代謝変化などの複合的な作用の影響を受けて起こる。従って、これらの現象に起因する変化を以て、鮮度状態が評価されることになるが、その指標となる項目は様々である。その理由は、対象となる青果物の種類、利用される部位や成熟度が多岐に亘ることにある。そのため、青果物の鮮度を評価する指標の探索や、開発される手法は共通の技術であったとしても、基準は品目ごとに異なる。また、青果物の鮮度評価技術の開発と対になるように青果物の鮮度を保持する技術開発も進められてきたが、いずれも技術開発の前提となるのは、収穫後の青果物品質が低下するメカニズムの解明であり、様々な研究が進められてきた（樽谷 1963）。

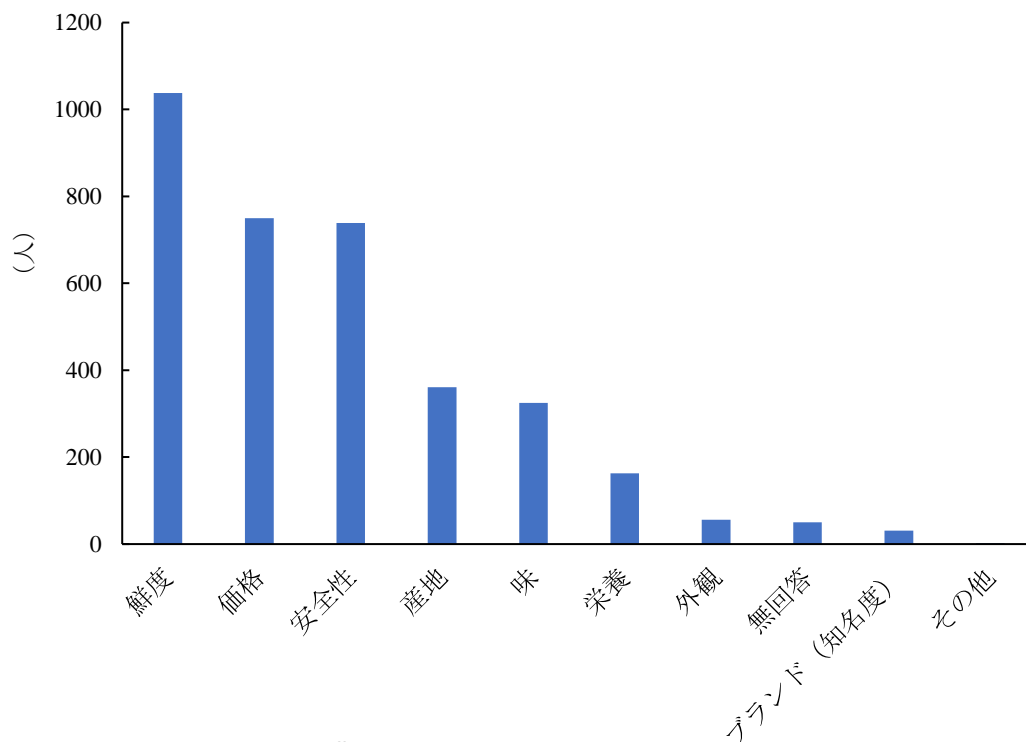


図1 農林水産物購入時に重視する点  
(神奈川県, 2020 より作成) n=1,264, 複数回答

では、実際に青果物の品質低下に基づく青果物の鮮度の判定基準はどのようなものであろうか。広く用いられているのは色、艶、みずみずしさ、張り等の外観の評価による。現在でも流通現場における野菜等の青果物の鮮度評価は、外観の善し悪しを流通関係者の経験や知識、感覚に基づいて判定する、いわゆる目利きによって行われることが多い。また、消費者が青果物を購入する際にも、自ら品物を吟味し、各自の判断で鮮度や品質を評価、選択している(中野 2010)。青果物の鮮度状態が外観に反映されることに疑いはないが、このように統一的な基準がなく、主観的判断による鮮度の判定は曖昧である。そこで、外観変化の定量的な指標を得るために、色や光沢の変化の定量化や(松岡 1995, 石川ら 1996)、力学的性質と重量・体積の減少の関連付け(田原ら, 1968)がなされた。しかしながら、色の変化が捉えられるのは劣化が進んだ段階と考えられ、体積減少ともども鮮度の評価というより貯蔵性、もしくは商品性の限界の判定であった。また、組織的な変質と鮮度状態との関連を、物理的品質特性や電気的特性の測定により定量化する手法が検討されてきた(中馬ら 1980, 加藤 1988, 大森ら 1994)。これらの研究は、主に果菜類や果実での適用が対象で、果肉の軟化状態と鮮度の関連付けが行われており、鮮度とは別の評価軸で考える、いわゆる食べ頃判定や内部損傷の検出により有効であると考えられる。一方、外観が良い状態に保たれていても内容成分の変化・減少が起きていることもある。一般に青果物は、収穫後も水や養分が供給されない環境で呼吸等の代謝活動が続くため、蓄積した糖や有機酸を有機的に分解して、生命活動に必要なエネルギーを作る(永田 2018)。これらの内容成分の減少は外観の変化に先行するため(日坂 1989)、ポストハーベスト工学研究においても、鮮度の評価基準として外観変化の定量的な評価のみならず、内容成分の変化も重視されており、その含有量を分析・測定することにより鮮度状態を定量化してきた(粕川ら 1969)。とりわけ、栄養機能成分として知られているアスコルビン酸の分析法は古くから確立され(小川 1938)、青果物収穫後のアスコルビン酸減少には、時間経過や貯蔵温度が強く関わっていることから(塚本 1942, 緒方ら 1974, 日坂 1991)、長らく様々な品目の鮮度の定量的な指標の一つとして用いられてきた(緒方ら 1976)。また、糖、アミノ酸などの代謝関連物質も鮮度低下に伴って減少することが報告されている(日坂ら 1989, 水野ら 2015)。さらに、機器分析

の技術が一般化してきたことに伴い、様々な青果物の品質評価が行われ、収穫後の外観に加え、内容成分などの客観的な変化に関する知見が蓄積されてきた(表 1, 永田 2018)。多くの知見が蓄積されるにつれ、内容成分含量は品種や部位、栽培時期によってしばしば変動することが明らかとなってきた。例えば、ホウレンソウにおいては、葉柄部より葉身部で、外側よりも内側の葉でアスコルビン酸含有量が高く(日坂 1991)、冬期より夏期に栽培した方が少ないことが報告されている(目黒ら 1991)。先に述べた物理的品質特性の収穫後の変化においても、組織的な特性などに品種間差があることが予想される。そのため、収穫時の含有量、物性値に対する相対値の変動を評価して鮮度の善し悪しを判定する場合、収穫直後の値を得ることが困難である流通の現場でこれらの手法の適用は難しい。さらに、内容成分の分析評価は、対象を破壊して行うのが一般的である。搾汁液などをそのまま測定する簡易な手法や、目的成分を抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの機器による分析定量が実験室レベルでは広く行われるようになった。物理的品質特性の評価においても、破壊測定が多い。それに対して、破壊を伴わずに対象成分等を測定する手法は、産物の表皮色測定を主な目的とした研究に始まり、熟度、硬度、傷などの測定、果実類の呈味成分測定を目的とした近赤外分光法の応用研究や、放出されるガスの測定による評価など研究開発が進められてきた(河野 1998)。特に、近赤外分光法による果物の糖度測定技術は広く普及し、選果場などでの装置導入の他、小型の装置開発も進んだ(吉田 2007)。一方、糖度以外に非破壊で鮮度評価に資する項目を測定する機器の開発も行われたものの、広く普及するには至らなかった。このように、現在でも、流通過程における品質管理の高度化や新たなバリューチェーンを構築するための、客観的かつ定量的判定を与える鮮度評価技術が求められている。

客観性や定量性に加え、実用面での課題として、初発値や継続的な測定を必要とせず、単回の測定・評価で鮮度を判断できる指標が求められている。近年では、絶対量を鮮度評価の指標とする手法として、遺伝子発現の解析なども進められている。すなわち、収穫後の日数経過により発現量の異なる遺伝子を鮮度評価のマーカーとして、外観に変化が現れる前に鮮度低下の兆候を捉えようとする手法である(永田 2018)。複数の遺伝子発現の組み合わせの解析により葉が黄化する前の段階のホウレンソウの鮮度低下の進

み具合を検出する方法が報告されている(永田ら 2016).  
しかしながら、遺伝子発現や成分分析に基づく鮮度評価は  
破壊検査を基本とする。実際の流通過程で普及・利用する

ためには、対象の遺伝子や成分を非破壊で定量する技術開  
発が別途必要である。

表1 野菜の鮮度に関連する項目とその評価・分析法(永田, 2018)

分析項目	主な分析方法・装置	サンプリング	
		破壊的	非破壊的
色	官能評価(目視), 色彩色差計, 画像解析		○
つや	官能評価(目視), 光沢計, 画像解析		○
香り	官能評価(嗅覚), GC, GC-MS, 匂いかぎGC, においセンサー	○	○
味	官能評価(味覚), Brix糖度計, pHメータ	○	
物性	官能評価(食感, 触感), 突き刺し応力計, 打音, 固有振動	○	○
クロロフィル	HPLC, 葉色計, 分光光度計	○	○
ビタミンC	HPLC, RQ flex, 比色定量(分光光度計)	○	
カロテノイド	HPLC, LC-MS, 分光光度計	○	
アントシアニン	HPLC, LC-MS, 分光光度計	○	
糖	HPLC, Brix糖度計, 近赤外分光計, HPCE	○	○
有機酸	HPLC, pHメータ, 滴定酸度計, 近赤外分光計, HPCE	○	○
遊離アミノ酸	HPLC, LC-MS, アミノ酸分析装置, HPCE	○	
食物繊維	比色定量(分光光度計)	○	
水分	重量変化測定(水分減少率), 乾燥重量測定(水分含量)	○	○
呼吸量	GC, 酸素センサー, 炭酸ガスセンサー		○
エチレン生成量	GC, Photo-Acoustic Spectroscopy		○
メタボローム解析	GC, GC-MS, LC-MS	○	
タンパク質	比色定量, 酵素活性測定(分光光度計)	○	
遺伝子発現	ノーザン解析, 定量PCR	○	
トランスクリプトーム解析	DNAマイクロアレイ, mRNAseq	○	

一方、呼吸やエチレンの生成・放散、ストレス応答等のガス代謝は植物に普遍で、ガスセンサーを用いた非破壊検出には好適である。呼吸の変化は、基質となる成分の消失や鮮度の低下を引き起こす前駆的な指標となるとして、秋元ら (1997) は、貯蔵温度を変化させながらホウレンソウの呼吸量を測定し、温度を変動させるとそれに追従して呼吸量も変化し、変動周期が短い方が外観上の品質低下が早いことを報告した。このように、青果物のガス組成制御は、品質保持技術の重要な要素の一つであり、呼吸やエチレン生成を測定して、青果物の品質変化を把握することにより、最適な品質保持条件が確立されてきた (椎名 2016)。青果物の香気を形成する揮発性化合物の貯蔵後の変化についても検討が行われている。例として、ミツバを低温で保存した際に、外観の状態は良く保持されていても、官能評価では香りの強度が低下した (南出ら 1981)。また、ルッコラの揮発性物質の生成や保持に品種間差があるが、鮮度低下による変化には共通性がある (Bellら 2016)、といった報告がある。揮発性化合物については、ストレス応答機構として特定の揮発性化合物の放出が害虫への防御反応として起こることが明らかにされるなど、近年研究が進展している (Rutherら 2005, 細川 2007)。特

に、揮発性化合物と脂肪酸代謝との関連については、組織破壊時の青葉アルコールや青葉アルデヒドの生成

(Hatanaka 1993) や、果実の成熟・老化に伴う  $\beta$ -酸化による香気成分の生成が知られている (Song and Bangerth 2003)。これらの脂肪酸代謝の反応の1つとして、植物体の老化やストレス反応による生体膜脂質の過酸化・分解がある。これによって膜構造の変質が生じ、最終的には細胞の機能が喪失するプロセスが知られており (図2, Marangoniら 1996)、特に、収穫後においては、品質低下につながる現象と考えられている (Shewfelt and del Rosario 2000)。さらに、Yamauchiら (1986) は、ホウレンソウ収穫後の葉の黄化の原因となるクロロフィルの分解は、クロロプラストに局在する極性脂質の分解によって生じた脂肪酸の過酸化物が関与していると推察した。

中野 (2013) は、こうした生体膜脂質の過酸化・分解に注目し、青果物の脂質過酸化率と貯蔵時の積算温度の間には正の相関があることを認め、青果物のリン脂質と糖脂質と脂質過酸化物の総量に対する脂質過酸化物の割合から鮮度を評価する方法を考案した。この場合、分母となる脂質総量は常に初発値一定のままであり、収穫時に初期値を把握する必要がないという利点がある。さらに、細胞生体膜脂質の

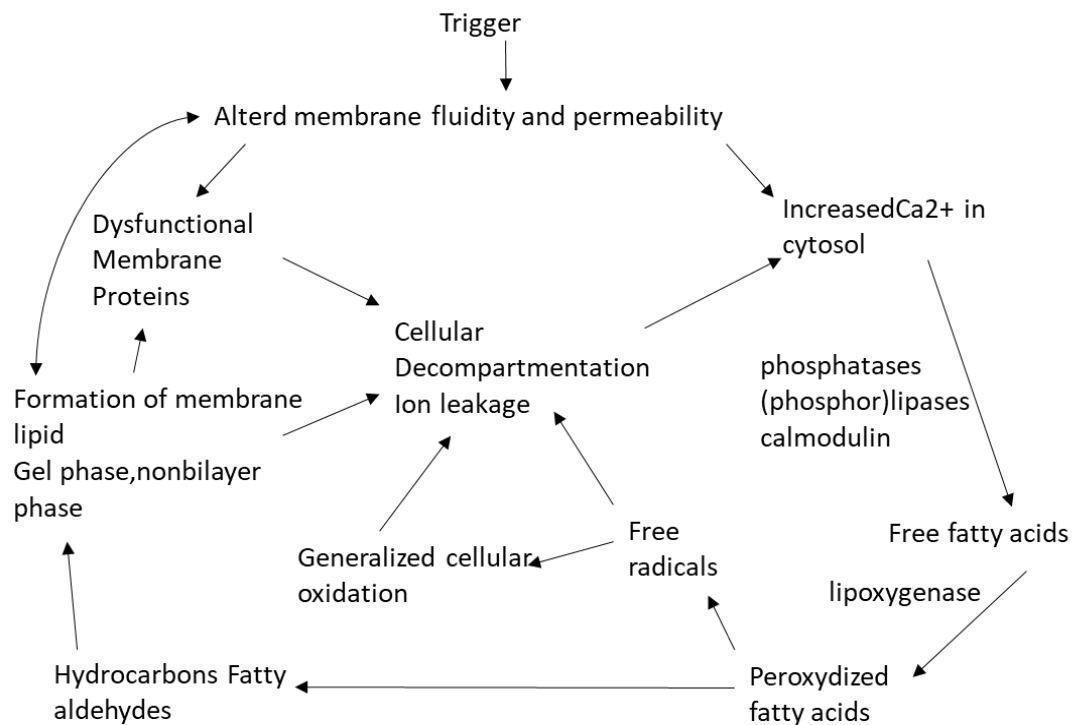


図2 ストレスによる植物組織の膜の変質の概念図

(Marangoni, A.G. ら 1996)

過酸化・分解反応における最終生成物であるカルボニル化合物について、大豆モヤシを対象としたリポドミクスにより、アブシジン酸が鮮度マーカー代謝物となることが明らかとなった (Syukri ら 2018)。このように、生体膜脂質の代謝変化に注目した新たな鮮度評価手法や鮮度マーカー化合物が見出されつつある。

ところで、オミクス (Omics) とは網羅解析を意味する単語であり、前述のリポドミクスは (Lipid ; 脂質 + Omics) で「脂質の網羅解析」を意味する。同様に、Metabolomics (メタボロミクス) とは、Metabolite (代謝物) の語尾に Omics (網羅解析) がついた単語であり、「代謝物の網羅解析」を意味する。すなわち、生物の代謝の状況を明らかにするもので、代謝の過程で生じる様々な低分子化合物が対象となる (及川 2013)。低分子量の代謝物質とは、アミノ酸や糖、脂質などが含まれるが、これらはさらに主要 (一次) 代謝物質と二次代謝物質に分類され、二次代謝物質は生育に必須ではないが、香気成分や色素など植物などに特徴的なものである (阿部ら 2011)。メタボロミクスは、医療分野での応用研究が進んでいるが、農業・食品分野の研究で取り組まれている例もあり、育種の際の選抜基準となるバイオマーカーの検索や設定、栽培技術・加工条件による代謝物の相違、農産物のブランド化に資するための他産地・他品種との比較等が行われており (及川 2013)、収穫した青果物の貯蔵中の代謝変動の解析などにも有用であると期待される。

本研究では、従来の鮮度評価項目とその分析評価手法を鑑み、非破壊計測が可能な、青果物の収穫後に放散される揮発性化合物に着目した。ガスクロマトグラフィー・質量分析計 (以下 GC-MS) を用いた揮発性化合物の挙動と青果物収穫後の鮮度状態の関係を網羅的に解析し、鮮度低下の過程に関連して様々な挙動をする化合物を探索し、新たな鮮度指標となりうる鮮度マーカー候補分子を明らかにすることを目的とした。これらの化合物のプロファイルが、貯蔵中のある時点での鮮度状態を反映することが明らかとなれば、

単回の測定によって鮮度の判定が可能となることが期待される。

第 2 章では、収穫後の品質劣化が極めて速く、高度な鮮度保持技術とともに客観的な鮮度評価技術のニーズの高いホウレンソウを対象に、貯蔵中の揮発性化合物を捕集し、GC-MS による網羅的分析を行った。捕集した揮発性化合物の挙動と鮮度の参照値とした貯蔵積算温度の PLS 回帰分析によって、外観変化が生じる前のホウレンソウの鮮度に関連する揮発性化合物を選定し、これらのプロファイルと鮮度の関係を検討した (曾我ら 2020)。

第 3 章では、キャベツの球 (以下ホール) 及びカットという異なる形態における、揮発性化合物の挙動に着目した。キャベツは、家庭消費はもとより、近年はその生産量の半分以上は業務・加工用途として仕向けられている。カットキャベツは、切断による物理ストレスを受けるため、傷害エチレンの生成等、ホールキャベツとは異なった収穫後代謝が作用する。そのため、ホールとカットで放散される揮発性化合物のプロファイルは異なり、同定される鮮度マーカー物質も異なる可能性がある。そこで、キャベツ収穫後及びカット処理後の貯蔵中の揮発性化合物を捕集し、ガスクロマトグラフィー・質量分析計 (GC-MS) による網羅的分析を行った。ホールとカットという異なる形態のキャベツの貯蔵中に放出される揮発性化合物のプロファイルの差異あるいは共通性を解析するとともに、鮮度低下の指標となりうる化合物を探索した (曾我ら 2021)。

第 4 章では、第 2 章及び第 3 章で得られた成果を総括するとともに、ホウレンソウ、キャベツ、カットキャベツの貯蔵積算温度の増大、すなわち鮮度低下に連動した挙動を示す揮発性化合物の新たな鮮度指標としての可能性や、これらを用いた評価手法と、他作物での適用や課題について展望した。

## 第2章 放散成分プロファイリングによるホウレンソウの鮮度評価

### 2-1 緒言

ホウレンソウはアスコルビン酸やカロテノイドを豊富に含む栄養価の高い緑黄色野菜である。また、「全国的に流通し、特に消費量が多く重要な野菜」という位置づけにあたる指定野菜の一つであり、日本国内での農業産出額は、約1,100億円と野菜全体の5%に当たる(農林水産省 2019)。生鮮流通のほか、冷凍加工品等に幅広く利用されているが、国内の作付面積は減少傾向にあり、加工用冷凍ホウレンソウは輸入もされている(農林水産省 2020)。ホウレンソウは収穫後の品質劣化が極めて速く、高度な鮮度保持技術とともに客観的な鮮度評価技術のニーズは高い。また、他の青果物と同様に、収穫後も水や養分が供給されない環境で呼吸等の代謝活動が続くため、流通・貯蔵期間や環境条件に応じて糖(日坂 1989)やアスコルビン酸(日坂ら 1991)が減少するが、これらの減少は外観の変化に先行する。しかしながら、前章で述べたように内容成分含量は品種や栽培時期によってしばしば変動し、ホウレンソウにおいては、アスコルビン酸含有量が夏期に少なくなることが報告されている(目黒ら 1991)。そのため、収穫時の含有量に対する相対値として評価する必要があるが、収穫直後の値を得ることが困難である流通の現場での適用は難しい。またこれらの分析評価は、破壊検査を基本とし、流通過程での普及・利用には、対象の遺伝子や成分を非破壊で定量する技術開発が別途必要である。そこで本研究では、放散される揮発性化合物に着目し、ガスクロマトグラフィー・質量分析計(GC-MS)を用いたメタボロミクスにより、外観変化が生じない段階でのホウレンソウの潜在的鮮度低下を指し示すマーカー分子を明らかにすることを目的とした。青果物の鮮度の定義について、学術的なコンセンサスは得られていないが、鮮度を生物学的老化の度合いとするならば、それは収穫からの時間経過や温度履歴に強く関連すると考えられる(Brashら 1995)。そこで本研究では、貯蔵温度と収穫からの経過時間の積で表される貯蔵積算温度を鮮度の参照値とし、ホウレンソウを収穫後、異なる温度条件にて貯蔵し、生成される揮発性化合物を、GC-MSによって網羅的に検出した。それらの挙動と貯蔵積算温度の関係について解析し、鮮度マーカーとなる化合物を探索した。

## 2-2 材料および方法

### 2-2-1 供試試料

供試材料には、神奈川県農業技術センターほ場にて栽培されたホウレンソウ(*Spinacia oleracea*)‘ミラージュ’と‘クロノス’(サカタのタネ)を用いた。ホウレンソウ品種はその生育特性が、耐暑性、耐寒性、抽苔の早晩性などで分けられ、栽培地や栽培時期に適した品種が選択される(香川 2001)。「ミラージュ」(早春~春まき向き)は2018年4月10日播種、2018年5月29日収穫、「クロノス」(秋~早春まき向き)は、2018年10月10日播種、2018年12月4日に収穫したものである。

### 2-2-2 ホウレンソウの貯蔵条件

ホウレンソウを収穫後、直ちに株元についた土を水洗いして除去し、余分な水分を拭き取った。収穫ストレスによって生成される揮発性化合物の影響を考慮し、3時間程度、室温条件下で静置してから収穫日の分析と貯蔵を開始した。貯蔵は、厚さ0.02mmのポリエチレン袋に、直径5.5mmの穴を片面に10か所ずつ、計20か所開け、ホウレンソウを5株ずつ入れて袋の口を折り、恒温器内に静置して行った。この時の袋内の湿度は $95.5 \pm 0.5\%RH$ であった。「クロノス」は、低温貯蔵と収穫時期の気温を勘案して $5^{\circ}C$ および $15^{\circ}C$ に貯蔵し、収穫・貯蔵開始当日を0日として、0, 3, 7日後に揮発性化合物を捕集した。「ミラージュ」は、「クロノス」よりもやや高温での流通・貯蔵を想定して $15^{\circ}C$ と $25^{\circ}C$ に貯蔵し、 $15^{\circ}C$ では0, 1, 3, 5, 7日後に、 $25^{\circ}C$ では0, 1, 3日後に揮発性化合物を捕集した(表2)。貯蔵積算温度の上限は、 $105^{\circ}C \cdot d$ としたが、これは目視により葉の黄化が認められず、萎れも商品として許容できる条件である。

### 2-2-3 揮発性化合物の捕集

ホウレンソウ1株を入れた2.3Lの密閉容器の上部と下部にチューブを接続し、TENAX TAを充填したガラス管(以下TENAX管、GLサイエンス、T-Dex・ATD 60/80 150 mg)を直接繋いだ。ポンプを介して容器内に空気を循環させ、ホウレンソウより放出される揮発性化合物をTENAX管に捕集した(図3)。捕集は、 $23^{\circ}C$ の室温条件下で行い、ポンプの流量は、 $500 mL \cdot min^{-1}$ 、捕集時間は60分とした。捕集は各区3回ずつ、株を変えて行った。また、空の容器でも捕集



し、これをブランクとした。

表2 ホウレンソウの貯蔵とサンプリング条件

品種	収穫日	貯蔵温度 (°C)	サンプリング日 (収穫後日数)	サンプリング時の貯蔵 積算温度 (°C・day)
ミラージュ	2018/5/29	15	0, 1, 3, 5, 7	0, 15, 25, 45, 75, 105
		25	0, 1, 3	
クロノス	2018/12/4	5	0, 3, 7	0, 15, 35, 45, 105
		15		

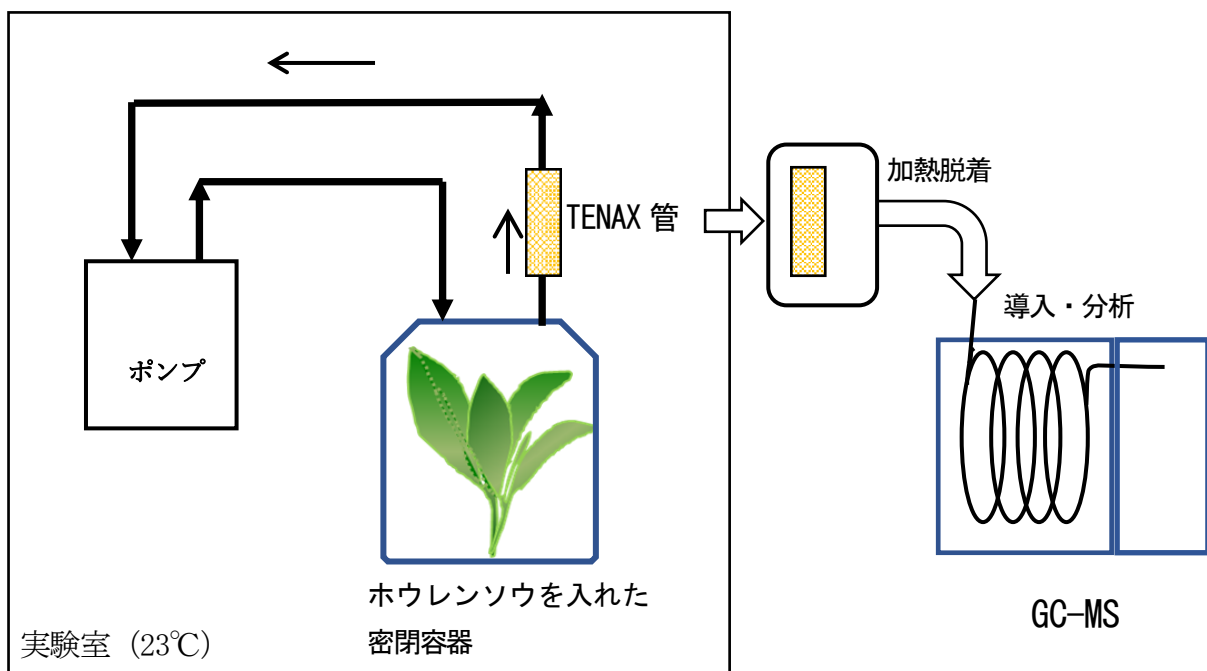


図3 ホウレンソウの揮発性化合物捕集とGCMS分析の概要

## 2-2-4 揮発性化合物の分析

TENAX 管に吸着させた揮発性化合物は、加熱脱着装置 (Shimadzu, TD20) によりガスクロマトグラフィー・質量分析計 (以下 GC-MS, Shimadzu, QP2010) へ導入し、分析した (図 3). 加熱脱着装置の温度条件は、トラップ温度を  $-20^{\circ}\text{C}$  とし、 $250^{\circ}\text{C}$  の加熱条件で 5 分間保持して  $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  の流量で GC-MS へ導入した. GC 分析において、カラムには DB-WAX (Agilent Technology, 長さ  $30\text{ m}\times$  内径  $0.25\text{ mm}\times$  膜厚  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ ) を使用した. カラム温度は、初期温度  $50^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保持後に  $140^{\circ}\text{C}$  まで  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $220^{\circ}\text{C}$  まで  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  で昇温し、 $220^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保持した. キャリアガスは、ヘリウムを用い、流量は線速度一定で  $40\text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$  (カラム流量  $1.22\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), ページ流量は  $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  とした. 注入モードはスプリット (スプリット比 20:1), MS 温度はイオン源  $200^{\circ}\text{C}$ , インターフェース温度  $200^{\circ}\text{C}$  とし,  $m/z$  20–350 を測定範囲としてスキャンした.

## 2-2-5 データ処理および統計解析

GC-MS 分析により検出されたトータルイオンクロマトグラムについて、波形処理して得られたピークを解析に用いた. まず、得られたピークのうち、ブランクで検出されたピークを除外し、同一条件で処理した試料 3 反復の 1 点のみで検出されたピークは 0 とした. 次に、各ピーク面積をサンプル質量で除して正規化した. そして、この値を、オートスケーリングにより各揮発性化合物のピークのサンプル間平均が 0, 標準偏差が 1 となるよう標準化した.

これらの値を説明変数、ホウレンソウの貯蔵積算温度を目的変数にした PLS (Partial Least Squares; 部分的最小二乗) 回帰分析を行い、これにより得られた Variable Importance in the Projection (VIP) 値を用いて、貯蔵積算温度の推定に寄与する成分を探索した. PLS 回帰分析は、SOLO (ver.8.6, Eigenvector Research) により行った. また、回帰モデルの成分数は、Venetian blinds クロスバリデーションによって決定した. VIP 値により選択された化合物と貯蔵積算温度の関係を探るために、ユークリッド距離に基づく最遠隣法による階層クラスター分析を、R (version 3.6.1, The R Foundation for Statistical Computing) により行った. また、各ピークに対する化合物名の推定は、n-アルカンで補正した保持指標 (Retention Index ; RI) と、質量スペクトルデータベース (NIST) によるマススペクトルの比較により行った.

## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 貯蔵ホウレンソウの揮発性化合物の捕集

TENAX 捕集と加熱脱着/GC-MS 分析により得られたトータルイオンクロマトグラムを波形処理したところ、それぞれの貯蔵条件で約 70 個のピークを得た. マススペクトルのデータベース検索により、そのうち 50 個のピークについて成分名がアノテートできた. これらの中には、*d*-Limonene や (*Z*)-Hex-3-en-1-ol, (*E*)-2-Hexenal などのテルペン、アルコール、アルデヒドが含まれ、TENAX 管を用いたアクティブサンプリング法によってホウレンソウから放出される揮発性化合物を捕集することができた. また、6 月収穫より 12 月収穫は、全般にピーク面積が小さい傾向であった. 生育から収穫期までの気温等が代謝系に影響したためか品種間差によるものと考えられた. 放散量については、今後より定量的な評価とともに検討する必要がある.

### 2-3-2 捕集された揮発性化合物と貯蔵積算温度の関係

本研究では、貯蔵温度と収穫からの経過時間の積で表される貯蔵積算温度を鮮度の参照値とし、放出される揮発性化合物との関連性について考察した. 貯蔵積算温度の増大に伴って変動するピークを把握するために、正規化した各ピーク面積と貯蔵積算温度をそれぞれ説明変数、目的変数とした PLS 回帰分析を行った. PLS 回帰分析は説明変数をそのまま用いずに、互いに無相関になるように線形変換した潜在変数を決定することにより変数を減少させることが可能であるため、多重共線性のリスクを減少することができる. そのため、より多くの説明変数を用いた良好な予測モデルを作成することができ、多変量の相関の解析に有用である (Wold ら 2001, 阿部ら 2011). また、本研究では異なる 2 つのホウレンソウ品種よりデータを得たが、品種毎に PLS 回帰分析を行うと、解析対象の品種に対応した回帰モデルが構築され、選定される鮮度マーカーも品種特異的となる可能性がある. そこで分析では、異なる品種においても通用するロバストな鮮度マーカー分子を探索するために、2 つの品種から得られたデータを併合して供した. なお、 $T^2$  及び  $Q$  統計量によって検出された外れ値 4 点は分析から除外した.

貯蔵積算温度の実測値と PLS 回帰分析による予測値の関係を図4に示す. 第3潜在変数までを用いた  $R^2_{cv}$  は0.87であった. 捕集された揮発性化合物変化を説明変数とした貯蔵積算温度の予測値と実測値の相関は高く, 貯蔵積算温度の推定に寄与する揮発性化合物, すなわち鮮度マーカーとなりうる成分が存在する可能性が示された.

### 2-3-3 ホウレンソウの鮮度マーカー候補となる揮発性化合物の探索

貯蔵積算温度の増大, すなわち鮮度の低下に伴う挙動を示すと考えられる成分を見出すために, 貯蔵積算温度の予測に対して寄与度の高いピークを, VIP 値により確認した(図5). VIP 値は大きいほど寄与が認められる(Trapら2013). そこで閾値(1.0以上)を超え, 貯蔵積算温度の予測に有意に寄与していると考えられる上位10点の化合物を選択した.

これらの化合物について, リテンションインデックス(RI)及びスペクトルデータによる定性を行った結果を表3に示す. 回帰係数が負の値を示す化合物, すなわち, 貯蔵積算温度が低い条件で多く検出される化合物として, (*E*)-2-Hexenal や(*Z*)-Hex-3-en-1-olなどが確認された. これらは, 草や野菜特有の青臭い匂いを有し, 青葉アルデヒド, 青葉アルコールとして知られる. 生体膜脂質の構成成分であるリノレン酸が過酸化分解されて生成されるが, 食害などの組織破壊により急激に生成放散される特徴があり(細川2007), 環境ストレス応答のシグナル分子としての機能を有することが明らかとなっている(山内2014). 本実験では, サンプルのホウレンソウを収穫後から3時間程度静置して, 収穫時の切断ストレスによって生成される揮発性化合物の影響を排除してから, 収穫0日後の揮発性化合物の捕集を開始しようとしたものの, 完全であったとは保証できない. よって, (*E*)-2-Hexenal や(*Z*)-Hex-3-en-1-olが高鮮度を示す鮮度マーカー物質であるかを明らかにするには, 更なる検証が必要である.

他方, 回帰係数が正の値を示し, 貯蔵積算温度増大に伴って増加した化合物は, 3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol (Hexahydrofarnesol), 2,6,10-Trimethyldodecane (Farnesane)などのテルペン類で, 前者はセスキテルペノイド, 後者はセスキテルペン的一种である. テルペン類は, 植物体が傷害を受けた時に細胞膜脂質から遊離したリノレン酸などの過酸

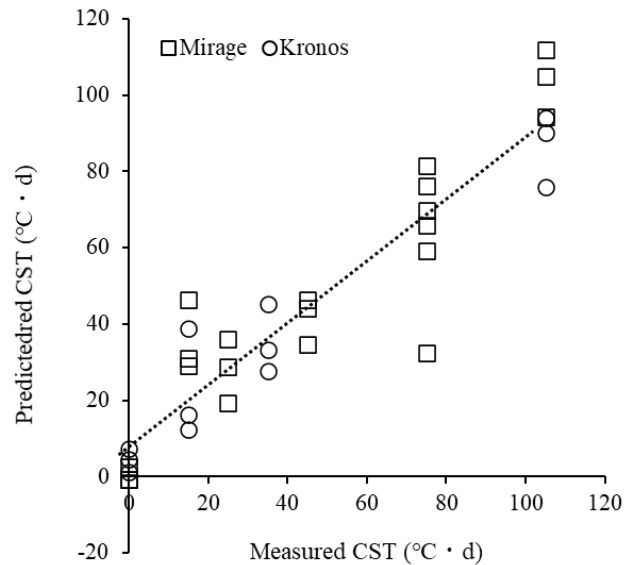


図4 PLS回帰分析による, ホウレンソウ貯蔵積算温度(CST)の実測値と予測値の関係

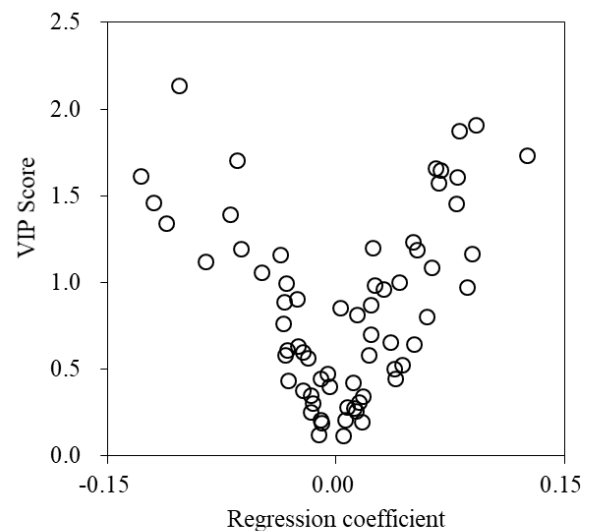


図5 ホウレンソウ貯蔵積算温度予測における各化合物の回帰係数とVIPスコア

化によって生成されるオキシリピン化合物(酸化脂肪酸)によって生成が誘導される物質であるといわれる(松井ら2003, 細川2007). 本実験において, 収穫時や貯蔵初期に検出された(*E*)-2-Hexenal や(*Z*)-Hex-3-en-1-olはオキシリピン化合物の一種であり, これらがメバロン酸経路を活性化してセスキテルペンである2,6,10-Trimethyldodecane (Farnesane)の生成を誘導し, さらに, その酸化修飾などによってセスキテルペノイドである3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol (Hexahydrofarnesol)が生成されたと考えられた. なお, オキシリピン化合物より生成が誘導されるテルペン類の一種で

ある *d*-Limonene も、本研究において試験期間を通じて検出されたものの、貯蔵積算温度との関連が認められなかったためにリストされなかった。また、表 3 にリストされたその他のアルコールや炭化水素についての生成機作は明確ではなかったが、炭化水素鎖を基本骨格に有していることから、老化に伴う脂肪酸の酸化・分解に由来していると考えられる。

表 3 収穫後ホウレンソウの貯蔵積算温度予測への寄与度が高い揮発性化合物

Sign of regression coefficient	RI	VIP score	Candidate compounds
-	1233	2.13	2-Hexenal
	1402	1.71	( <i>Z</i> )-Hex-3-en-1-ol
	1145	1.62	4-Methyl-dodecane
+	1666	1.91	unknown
	1928	1.88	3,7,11-trimethyl-1-dodecanol
	1355	1.73	2,6,10-trimethyldodecane
	1358	1.66	2-Butyl-1-octanol
	1336	1.65	unknown
	1230	1.61	1-Methyl-2-pentylcyclohexane
	1923	1.58	( <i>E</i> )- 5-Octadecene

### 2-3-4 ホウレンソウ鮮度マーカー候補化合物による階層クラスター分析

次に、PLS 回帰分析によって選択された上記 10 点の化合物の各ピーク面積を、平均を 0、標準偏差を 1 とするオートスケール処理して Z-score を算出し、各化合物の変動に関する類似度と貯蔵積算温度に関する類似度について階層クラスター分析を行った (図 6)。その結果、ホウレンソウから放出される揮発性成分は、貯蔵積算温度の増大に伴い減少傾向を示す成分群 (④) と増加傾向を示す成分群 (①~③) の大きく 2 つのグループに分けられ、PLS 回帰分析による回帰係数の符号と階層クラスター分析による類似度は一致した。さらに、回帰係数が正の値を示した化合物については、3 つのグループに分けられた。これらは貯蔵積算温度の増大に伴う挙動が類似しており、①収穫直後から貯蔵積算温度が 45 °C・d までは、ほとんど検出されない群、②収穫後から検出されるが、一度減少後に増加に転じる群、③ 75 °C・d をピークに急増し、105 °C・d では大きく減少する群、のようにグルーピングされた。また、貯蔵積算温度に関しては、①貯蔵積算温度 0 °C・d (収穫当日)、②15、25、35、45 °C・d、③75、105 °C・d の 3 つのグループに分けられた。グループ②については、15、25 °C・d でグルーピングされたが、45 °C・d の方が 35 °C・d よりもこれらと類似度

が高く、貯蔵積算温度との関係が明瞭ではなかった。特に、35 °C・d のデータは ‘クロノス’ を 5 °C で 7 日間貯蔵したときの揮発性化合物プロファイルである。35 °C・d では、老化に伴い放散量が減少する 4-Methyl-dodecane が多く、増加する (E)-5-Octadecene が少なかった。アブラナ科野菜の一種であるルッコラの揮発性化合物プロファイルは、複数の系統間で異なるものの、主成分分析によって貯蔵前後を説明する共通の成分が見出されている (Bell ら 2016)。また、ワイルドロケット (セルバチコ) の貯蔵中における揮発性化合物の量的変化に、貯蔵温度や積算呼吸量の影響が認められた (Luca ら 2017)。他方、シソ科のスイートバジルでは、貯蔵温度に因らず香気成分が低下したことが報告されている (野口 2018)。よって、35 °C・d における揮発性化合物プロファイルの特異性は、‘クロノス’ の品種的特徴、あるいは低温での長期貯蔵 (5 °C-7 日間) の影響によるものかについて、今後詳細な検討が必要である。

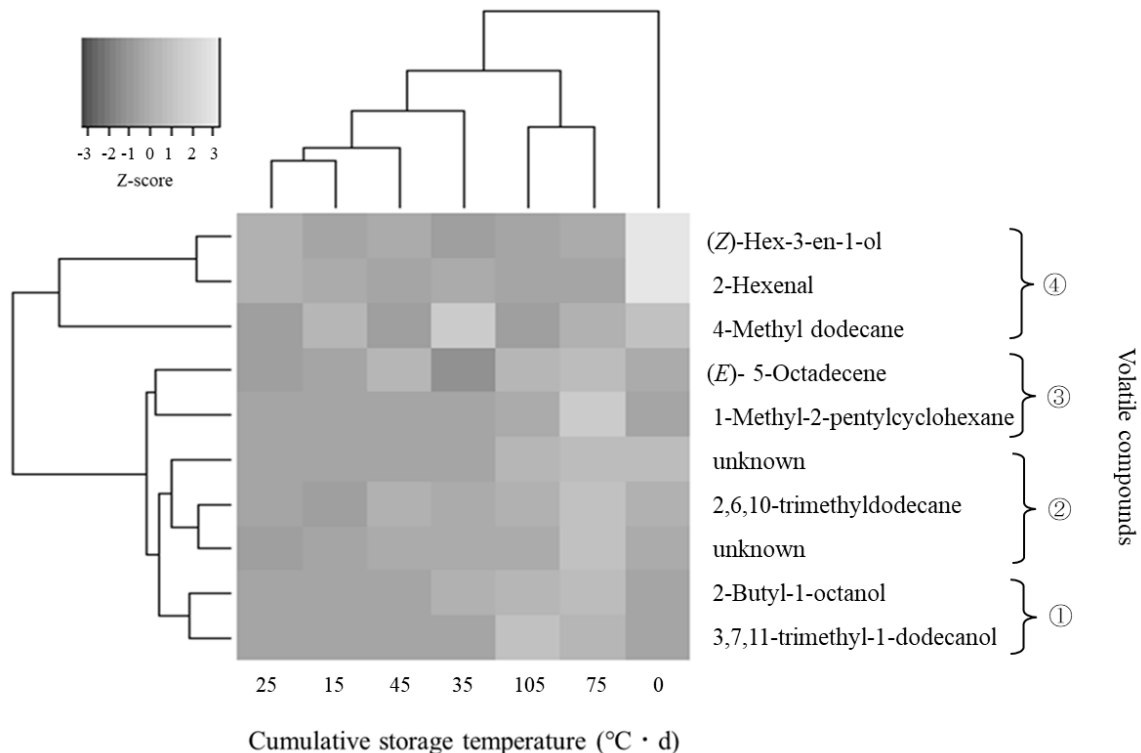


図6 ホウレンソウ貯蔵積算温度予測に寄与度の高い揮発性化合物と貯蔵積算温度の階層クラスター分析

いずれにせよ、放出される揮発性化合物を捕集してプロファイリングすることで、収穫からの貯蔵積算温度を大・中・小の3つのスケールで推定可能であることが示唆された。また、本研究で設定した貯蔵積算温度上限の105°C・dまで貯蔵したホウレンソウは、外観の商品性が損なわれておらず、実際の流通場面で取り扱われている鮮度状態のホウレンソウにおける潜在的な鮮度低下を揮発性化合物分析によって検知できることが示唆された。

## 2-4 小 括

本研究では、収穫後の品質低下が速く、定量的な鮮度評価法の開発が望まれるホウレンソウを対象として、異なる貯蔵温度・期間のホウレンソウから放散される揮発性化合物を加熱脱着/GC-MS法により分析し、鮮度低下との関連を検討した。捕集した揮発性化合物のピーク面積を説明変数、鮮度低下の指標とした貯蔵積算温度を目的変数にしたPLS回帰分析により、ホウレンソウの鮮度に関連する重要な揮発性化合物を選定できた。収穫後のホウレンソウより放出される揮発性化合物のうち、貯蔵積算温度との関連が高いと考えられた10点の化合物は、貯蔵積算温度の増大に伴って、増加するもの、減少するものがそれぞれ確認された。これらはリテンションインデックスとデータベースによる定性で、脂肪酸の過酸化分解に伴う代謝物由来と考えられる物質や、植物体のストレス防御や情報伝達関連の成分により活性化されるテルペン合成系代謝などによる揮発性化合物と確認された。また、放散成分のプロファイルは、貯蔵積算温度に応じて大きく3つにグルーピングされ、スクリーニングレベルでの鮮度評価の可能性が示唆された。特に、(E)-2-Hexenalと(Z)-Hex-3-en-1-olは、収穫直後に多く認められる一方で、2,6,10-Trimethyldodecane (Farnesane)や3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol (Hexahydrofarnesol)は、貯蔵積算温度の増加に伴って増加したことから鮮度低下を示すマーカー候補として有望と考えられた。

## 第3章 放散成分プロファイリングによるホールおよびカットキャベツの鮮度評価

### 3-1 緒言

キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) は、年間を通じて多く消費される野菜の一つである。外食・中食産業の基本的食材として広く使用されていることに加え、近年のカット野菜の需要増加により、その生産量の半分以上は業務・加工用途として仕向けられている (小林 2018)。業務・加工用野菜においては、「定時・定量・定質・定価」および、周年安定供給が強く求められる。生産から流通、加工まで各段階を担う事業者が流通コスト削減のための工夫と共に、特にキャベツにおいては収穫時期・量の予測システム開発など、安定供給体制の構築が進められている (今田 2020)。また、キャベツは結球性葉菜類野菜であり、ホウレンソウのような非結球性葉菜と比較して呼吸速度が小さい。低温に置くことで3~4ヶ月程度の長期貯蔵が可能である。そうしたことから、産地からの収穫後間もない直送品のほか、低温貯蔵品など様々な流通履歴を有する原料キャベツが供給されている。キャベツの品質状態は、流通・貯蔵環境に大きく依存し、さらには製造されるカットキャベツの品質を大きく左右する。したがって、カット野菜製造においては、原料の鮮度状態に応じて加工計画を立てることが重要となる。特に、低温長期貯蔵品では外葉の劣化は避けられないため、食用に適さない部位をトリミング、洗浄してから加工に用いるのが一般的である。しかしながら、どの程度まで外葉をトリミングすべきかは作業者の判断に委ねられているのが現状であり、過剰に廃棄されている可能性も否めない。また、加工歩留まりの見積もりを厳しくするが故に、原料を余分に確保することが結果的に廃棄量を増やすという側面もある。したがって、高品質なカットキャベツの生産のみならず、フードロスを削減する観点からもホールキャベツの鮮度状態を加工現場で簡便かつ客観的に評価できる手法の開発が望まれている。もちろん、一般消費者向けの流通においても、品質管理システムの高度化や在庫管理の適正化のために、外観に変化が生じていない段階で、ホールキャベツの潜在的な鮮度低下を捉えられる評価手段が同様に求められている。

一方、カットキャベツは加工時に切断傷害というストレスが加わるため劣化が著しい。青果物は収穫後に物理的な損傷を受けると、エチレン生成量が増大するなどのストレ

ス応答反応が生じるためである (タンマウオン 2014)。一般に、カット野菜は、生鮮野菜でありながらも加工を伴うため、食品衛生の観点から一般生菌数を根拠として販売期限が設定される。しかしながら、より高度化する消費者ニーズに対応するためには、安全性の確保はもとより、新鮮で、且つ、栄養機能性に富み、食味良好なカット野菜を供給できる体制を構築する必要がある。カット野菜は易変性であるため、貯蔵技術の高度化による長期貯蔵を目指すよりはむしろ、入・出荷管理を適正化することが重要である。First-in First-out (先入れ先出し) を基本にしながらも、鮮度状態に応じて臨機応変に対応する必要がある。従来、流通や中食・外食の現場においては、目視によって色のくすみ等を評価して鮮度を把握してきた。しかしながら、こうした官能検査による評価は基準が曖昧で、評価者によって判定結果が異なることが問題となる。そうした背景から、カットキャベツにおいてもホールキャベツと同様に簡便かつ客観的に鮮度を計測できる技術が望まれる。

キャベツの品質を客観的に示す指標として、糖度あるいは遊離糖含量、アスコルビン酸含量が用いられる。品種や作型等によって収穫時における含量は異なるため (Mukasa and Hakoyama 2001)、それらを用いて鮮度を評価しようとする場合には、収穫時の含量に対する相対量として示す必要がある。しかし、流通・加工現場では初発値を把握できないため、同法での鮮度チェックは不可能である。そこで我々は、こうした欠点を解決しつつ、非破壊計測にも対応可能な鮮度評価法を開発することを目的として、老化過程における青果物から放散される揮発性化合物に着目した検討を進めている。特に、ホウレンソウにおいては、脂肪酸の過酸化分解産物により生合成が活性化されるテルペンの 2,6,10-Trimethyldodecane (Farnesane) や 3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol (Hexahydrofarnesol) などが鮮度を指し示すマーカー候補となることをガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS) によるメタボロミクスによって推測した (曾我ら 2020)。しかしながら、ホウレンソウで得られた鮮度マーカー物質のキャベツにおける適用可能性については、別途検討する必要がある。また、カットキャベツは、切断による物理ストレスを受けるため、傷害エチレンの生成等、ホールキャベツとは異なった収穫後代謝が作用する。そのため、ホールとカットで放散される揮発性化合物のプロファイルは異なり、候補となる鮮度マーカー物質も異なる可能性があ

る。

そこで本研究では、収穫後およびカット処理後の貯蔵中におけるキャベツから放散される揮発性化合物を捕集し、GC-MSによる網羅的分析を行った。青果物の鮮度の定義について学術的なコンセンサスは得られていないが、収穫された時点が鮮度の開始点かつ最高点であり（永田 2018）、その低下は生物的老化の度合いとすると、収穫からの時間経過や温度履歴に強く関連すると考えられる（Brash ら 1995）。そこで、貯蔵温度と収穫（加工処理）からの経過時間の積である貯蔵積算温度を鮮度のリファレンスとして、ホールとカットという異なる形態で放散される揮発性化合物のプロファイルの差異あるいは共通性を解析するとともに、鮮度マーカーとなりうる化合物を探索した。

## 3-2 材料および方法

### 3-2-1 供試試料

供試材料のキャベツ‘初恋’（トーホク種苗）は、神奈川県藤沢市の生産者ほ場にて、2020年2月22日播種、同年4月7日定植、同年6月22日に収穫された。収穫当日、結球葉にかぶり（外葉）を2枚程度つけた出荷姿に調製されたキャベツを神奈川県農業技術センターへ運び、試験に供した。供試したキャベツの平均重量は、 $1495.6 \pm 109.5$  gであった。

### 3-2-2 ホールキャベツの貯蔵条件

ホールキャベツは、収穫当日に厚さ0.025 mmのポリエチレン袋（650 mm×800 mm）に3個ずつ入れて袋の口を折り、水分損失防止に留意しながら10℃、および20℃でそれぞれ貯蔵した。収穫当日を0日として、10℃貯蔵は4, 8, 12, 16日後、20℃貯蔵は2, 4, 6, 8日後に色調測定と揮発性化合物の捕集を行った。本研究での貯蔵積算温度の上限は、

160℃・dであるが、これは外葉の色の変化が目視で確認された時点である。

### 3-2-3 カットキャベツの調製および貯蔵条件

キャベツを収穫後、2℃で5日間保管した後、外葉を2枚取り外し、フードプロセッサ（Panasonic, MK-K81-W）により2 mm幅程度のカットキャベツを作製した。これを次亜塩素酸ナトリウム水溶液（有効塩素濃度200 ppm）に1分間浸漬した。その後、水を溜めたボウルに水を流しながら1分間浸漬し、さらに別に水を溜めたボウルに移して同様に1分間流水浸漬した。水切り後に、200 gずつ、厚さ0.03 mmのポリエチレン袋（230 mm×340 mm）に入れて袋の口を折り、5℃、10℃で貯蔵した。揮発性化合物の捕集は、調製当日を0日として、5℃貯蔵は2, 4, 6, 8日後、10℃貯蔵は1, 2, 3, 4日後に色調測定と揮発性化合物の捕集を行った。表4にホール、カットそれぞれの貯蔵とサンプリング日を示す。

表4 キャベツ、カットキャベツの貯蔵温度とサンプリング日

	貯蔵温度 (℃)	サンプリング 収穫/加工処理後日数	サンプリング時の貯蔵 積算温度 (℃・day)
ホールキャベツ	10	0, 4, 8, 12, 16	0, 40, 80, 120, 160
	20	0, 2, 4, 6, 8	
カットキャベツ	5	0, 2, 4, 6, 8	0, 10, 20, 30, 40
	10	0, 1, 2, 3, 4	



### 3-2-4 色調測定

キャベツの色調は、色差計（日本電色，Σ90）により測定した。ホールキャベツは外側から 3 枚目の葉の赤道部、カットキャベツは、細断した試料を直径 30 mm のカップに詰めて測定した。測定した  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  値から色差  $\Delta E$  を以下の式により求めた。

$$\Delta E = \{(L^*0 - L^*)^2 + (a^*0 - a^*)^2 + (b^*0 - b^*)^2\}^{0.5}$$

ここに、 $L^*0$ 、 $a^*0$ 、 $b^*0$  は、貯蔵開始時の値である。

### 3-2-5 揮発性化合物の捕集

ホールおよびカットキャベツの揮発性化合物の分析を行うために、固相マイクロ抽出（以下 SPME）法により、ヘッドスペースガスを捕集した。ホールキャベツ 1 個を入れた 4.5 L の密閉容器に、SPME ファイバー（Supelco, PDMS/DVB, 膜厚 65  $\mu\text{m}$ ）をセットしたホルダーを挿入し、容器内で捕集ファイバーを露出させて揮発性化合物を捕集した。捕集は 23  $^{\circ}\text{C}$  の室温条件下で行い、捕集時間は 45 分とした。捕集は各区 3 個ずつ行った。カットキャベツは、カットキャベツを保存している袋の口から SPME ファイバーをセットしたホルダーを挿入し、袋の口とホルダーと一緒に固定して袋内に捕集ファイバーを露出させ、温度、時間はホールキャベツと同条件にて、各区 3 点ずつ揮発性化合物の捕集を行った。いずれも捕集は貯蔵した恒温器より出庫後直ちに開始した。また、空の容器、袋でも捕集し、これをブランクとした。

### 3-2-6 揮発性化合物の分析

SPME ファイバーに吸着させた揮発性化合物は、GC-MS（Agilent Technology, 7890B GC-System, 5977B MSD）へ導入し、分析した。GC 分析において、分離カラムは DB-WAX（Agilent Technology, 長さ 30 m  $\times$  内径 0.25 mm  $\times$  膜厚 0.5  $\mu\text{m}$ ）を使用した。カラム温度は、初期温度 50  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保持後に 140  $^{\circ}\text{C}$  まで 5  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 、220  $^{\circ}\text{C}$  まで 10  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  で昇温し、220  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保持した。キャリアガスは、ヘリウムを用い、流量は線速度一定で 40  $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ （カラム流量 1.22  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ）、パージ流量は 3  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  とした。注入モードはスプリットレス、注入口温度 220  $^{\circ}\text{C}$ 、MS 温度はイオン源 220  $^{\circ}\text{C}$ 、インターフェース温度 200  $^{\circ}\text{C}$  とした。イオン化法は EI（電子衝撃イオン化法）、四重極型質量分析により、 $m/z$  20–350 を測定範囲としてスキャンした。

### 3-2-7 データ解析

GC-MS 分析により検出されたトータルイオンクロマトグラムについて、波形処理して得られたピークを解析に用いた。まず、得られたピークのうち、同一条件で処理した試料 3 反復の 1 点のみで検出されたピークは不検出と判断した。以降の PLS（Partial Least Squares；部分的最小二乗）回帰分析は、非数字を含む行列に対して実行できないことから、これら不検出ピークに対して 0 を入力して処理した。次に、各ピーク面積をサンプル質量で除して正規化した。そして、この値に 1 を加算して常用対数変換し、オートスケールングにより各揮発性化合物のピークのサンプル間平均が 0、標準偏差が 1 となるよう標準化した。これらの値を PLS 回帰分析および階層クラスター分析に用いた。まず、PLS 回帰分析は、これらの値を説明変数、キャベツおよびカットキャベツの貯蔵温度と収穫からの経過時間の積で表される貯蔵積算温度を目的変数として SOLO（ver.8.6, Eigenvector Research）により行った。回帰モデルの潜在変数の数は、Venetian blinds クロスバリデーションによって決定した。回帰モデルの妥当性は Permutation test を、繰り返し回数 100 回に設定して評価し、クロスバリデーションの決定係数 ( $R^2_{CV}$ ) により回帰式の線形性を確認した。これにより得られた Variable Importance in the Projection（VIP）値を用いて、貯蔵積算温度の推定に寄与する成分を探索した。VIP 値は、1.0 以上が有効とされ、大きいほど寄与が高い（Trap ら 2013）。本研究では、VIP 値が 1.5 以上の化合物を鮮度マーカー候補として選定した。VIP 値により選定された化合物のピーク面積と、貯蔵積算温度の関係について、ピアソンの積率相関係数および、最大情報係数（MIC: Maximal Information Coefficient）（Reshef ら 2011）により線形、非線形の相関を確認した。ピアソンの相関係数の有意差検定は t 検定により行った。また、ユークリッド距離に基づく最遠隣法による階層クラスター分析を、R（ver. 3.6.1, The R Foundation for Statistical Computing）により行った。また、各ピークに対する化合物名の推定は、n-アルカンで補正した保持指標（Retention Index；RI）と、質量スペクトルデータベース（NIST11 および NIST17, 西川計測（株）, Aroma Office ver.7 に収載）によるマススペクトルの比較により行った。

### 3-3 結果および考察

#### 3-3-1 貯蔵中の色調の変化

ホールキャベツは、貯蔵積算温度  $160^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  において、外葉 2 枚の退緑や緑の黄変が目視にて認められた。しかしながら、測定部位とした外から 3 枚目の葉においては、明確な色差の変化は認められなかった（データ省略）。

カットキャベツの貯蔵中の色差の変化を図 7 に示した。色差は、貯蔵積算温度が  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  までは緩やかに増加したが、目視による観察では試験開始時の色と大差はなく、両者を区別するのは困難であった。しかしながら、 $30^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  では急激に増加し、目視でも明瞭な褐変が確認できた。カットキャベツが貯蔵中に褐変するのは、ポリフェノールの酸化による反応が原因の一つ（永田 1994）であり、Watanabe ら（2020）の報告と同様に褐変の進行によるカットキャベツの色差の変化は貯蔵積算温度と相関が認められた。色差値 3.3 以上において、視覚によって色の差異を認知できることが歯学分野の研究（Kolbeck ら 2006）で報告されている。本研究から、色差値が 3.3 を超えるのは積算温度が  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  から  $30^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  の間となる。このことから、 $30^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  以上を経たカットキャベツであることは、視覚によって判定できる。一方、 $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  は、 $5^{\circ}\text{C}$  で 4 日間の貯蔵に相当し、カット野菜の一般的な貯蔵温度と消費期限に一致する。鮮度判定の必要性が高い積算温度領域であるにもかかわらず、視覚での鮮度判定は困難であることが示されている。ちなみに、色彩色差計で色差を求めて定量的な鮮度判定を行うことも考えられるが、色差を求めるには初期値が必要であ

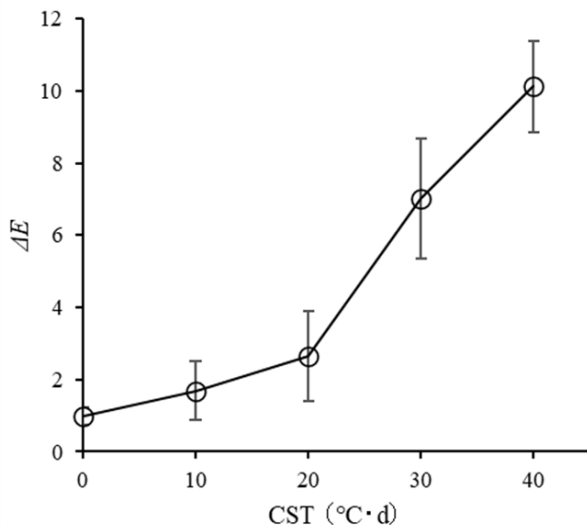


図7 貯蔵積算温度(CST)とカットキャベツの色差( $\Delta E$ )の関係  
(バーは標準偏差;  $n = 3$  [ $0^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ ],  $n = 6$  [ $10, 20, 30, 40^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ ])

るため、流通・小売現場での利用は不適である。

#### 3-3-2 ホール、カットキャベツより捕集された揮発性化合物

ホール、カットキャベツそれぞれのヘッドスペースガスの SPME 捕集と GC-MS 分析により得られたトータルイオンクロマトグラムを波形処理したところ、ホールで約 90 個、カットで約 70 個のピークを得た。環境物質と判断されたものを除き、リテンションインデックス (RI) およびマススペクトルのデータベース検索により、50 個のピークについて成分がアノテートできた (表 5)。これらの中には、Nonane (No. 7), Decane (No. 11), *d*-Limonene (No. 28), (*Z*)-3-Hexenyl acetate (No. 40), (*Z*)-Hex-3-en-1-ol (No. 47), などの炭化水素、テルペン、アルコール 20 個がホールおよびカットキャベツから共通して放散されていた。一方、ホールで放散された化合物は 40 個で、モノテルペン類 (No. 13, 19, 25, 35) が多く、カットキャベツで放散された化合物は 30 個で、Allyl isothiocyanate (以下、AITC, No. 45) の他、アルコール (No. 43, 47), アルデヒド (No. 17, 48, 50) が多く、ホールおよびカットで放散される揮発性化合物のプロファイルは異なった。ホールキャベツがカット加工処理されることによって引き起こされる代謝変化により、新たに生成が誘導あるいは促進される揮発性化合物と、反対に生成が抑制される化合物が存在する一方、このような代謝変化の影響を受けない揮発性化合物もあったと考えられた。

また、ホールキャベツにおいては、 $20^{\circ}\text{C}$  貯蔵の方が  $10^{\circ}\text{C}$  貯蔵よりも、ピーク面積が大きい傾向があった (データ省略)。揮発性化合物の捕集は、恒温器から出庫後短時間で開始したことから、貯蔵温度による品温の差の影響が考えられた。ホールキャベツの品温が室温程度になるまで室温条件下に置いた場合、その間にも品質変化が生じる可能性を考慮したためであるが、今後、結球性野菜であるキャベツの特徴を考慮し、貯蔵温度条件下からサンプリング条件下へ移動後の、品温 (表面温度あるいは中心温度) の変化と揮発性化合物の放散量、品質の関係について、検討が必要である。

表5 HS-SPME捕集により得られたキャベツ及びカットキャベツの揮発性化合物

No.	RI	Annotated compounds	Detected in whole / cut
1	-	Carbon dioxide	w,c
2	747	2-Methyl heptane	w
3	797	Octane	w,c
4	803	2,4-Dimethyl heptane	w
5	840	4-Methyl octane	w
6	850	3-Methyl octane	w
7	884	Nonane	w,c
8	899	3,5-Dimethyl octane	w
9	907	3,6-Dimethyl octane	w
10	953	3-Methyl-nonane	w
11	996	Decane	w,c
12	1025	$\alpha$ -Pinene	w,c
13	1030	$\alpha$ -Thujene	w
14	1046	Toluene	w,c
15	1051	2-Methyl-decane	w
16	1078	3,7-Dimethyl decane	c
17	1089	Hexanal	c
18	1095	Undecane	w,c
19	1127	Sabinene	w
20	1134	Ethyl benzene	w
21	1142	<i>p</i> -Xylene	w
22	1148	<i>o</i> -Xylene	w,c
23	1162	5-Methyl-3-hexanone	w,c
24	1170	$\beta$ -Myrcene	w
25	1186	$\alpha$ -Terpinene	w
26	1191	1,3-Dimethyl benzene	w,c
27	1198	Dodecane	w,c
28	1205	<i>d</i> -Limonene	w,c
29	1217	Propylbenzene	w
30	1223	Butyl butanoate	w
31	1231	1-Ethyl-2-methyl benzene	w
32	1233	1-Ethyl-3-methyl benzene	w,c
33	1244	1-Decene	c
34	1252	Mesitylene	w,c
35	1254	$\gamma$ -Terpinene	w
36	1266	Styrene	w,c
37	1282	Hexyl acetate	w,c
38	1290	1,2,4-Trimethyl benzene	w,c
39	1298	Tridecane	c
40	1328	( <i>Z</i> )-3-Hexenyl acetate	w,c
41	1349	6-Methyl- 5-Hepten-2-one	w
42	1366	3,5-Dimethyl dodecane	c
43	1368	1-Hexanol	c
44	1371	<i>o</i> -Cymene	c
45	1372	Allyl isothiocyanate	c
46	1394	2-Ethylhexyl acetate	w
47	1399	( <i>Z</i> )-Hex-3-en-1-ol	w,c
48	1404	Nonanal	c
49	1465	Acetic acid	w,c
50	1477	Furfural	c

### 3-3-3 ホールキャベツの鮮度マーカー候補となる揮発性化合物の探索

既報 (曾我ら 2020) に従い, 本研究では貯蔵温度と収穫からの経過時間の積で表される貯蔵積算温度を鮮度の参照値とし, 放出される揮発性化合物との関連性について考察した. 貯蔵積算温度の増大に伴って変動するピークを把握するために, 正規化した各ピーク面積と貯蔵積算温度をそれぞれ説明変数, 目的変数とした PLS (Partial Least Squares: 部分的最小二乗) 回帰分析を行った. なお,  $T^2$  及び  $Q$  統計量によって検出された外れ値 1 点は分析から除外した. 貯蔵積算温度の実測値と PLS 回帰分析による予測値の関係を図 8 に示す. 第 4 潜在変数を用いたクロスバリデーションの決定係数 ( $R^2_{cv}$ ) は 0.82 であり, 捕集された揮発性化合物変化を説明変数とした貯蔵積算温度の予測値と実測値に線形性が認められた. さらに, Permutation test によっても, 構築された PLS 回帰モデルは有意 ( $p < 0.05$ ) であることが確認され, 貯蔵積算温度の推定に寄与する揮発性化合物, すなわち鮮度マーカーとなりうる成分が存在する可能性が示された. 貯蔵積算温度の増大に伴い, 放出量が増大あるいは減少する揮発性化合物成分を見出すために, 貯蔵積算温度の予測に対して寄与度の高いピークを選択した. 表 6 に, ホールキャベツの貯蔵積算温度を説明する重要な揮発性化合物として, PLS 回帰分析による VIP 値が 1.5 以上を示した 7 個の化合物をリストした. これらの化合物のピーク面積と貯蔵積算温度の間におけるピアソンの積率相関係数の絶対値および最大情報係数は, それぞれ 0.386–0.617 および 0.414–0.836 を示した. 回帰係数が負の値を示す, すなわち, 貯蔵積算温度が低い条件で多く検出される化合物は 6 個あった. これらは Sabinene,  $\alpha$ -Terpinene,  $\alpha$ -Thujene,  $\beta$ -Myrcene

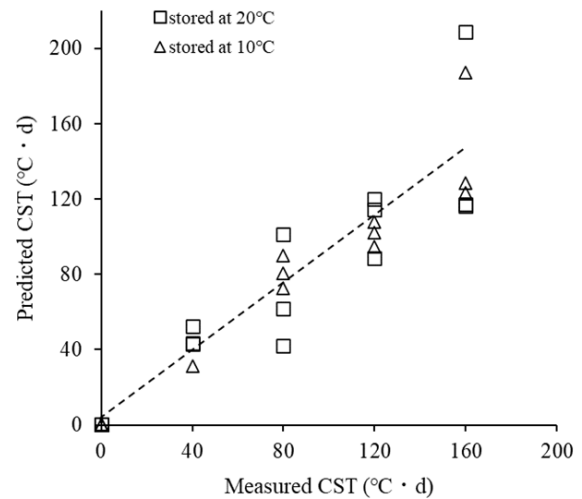


図8 PLS回帰分析による, ホールキャベツ貯蔵積算温度 (CST)の実測値と予測値の関係

などのモノテルペンが主であった. これらは葉緑体で合成され (松井ら 2003), 栽培期間中に生成される生体防御物質や, 収穫の切断ストレス由来の脂質の過酸化・分解物である (Z)-3-Hexenyl acetate などのオキシリピン化合物によって生成が誘導されるものと考えられた. また, Hexyl acetate, Butyl butanoate は, 脂肪酸の  $\beta$  酸化由来と考えられた. 一方, 回帰係数が正の値を示す, すなわち貯蔵積算温度増大に関係する化合物は, 5-Methyl-3-hexanone であった. 5-Methyl-3-hexanone は, カルボニル化合物であり, 脂肪族炭化水素が酸化された構造を有することから, 脂肪酸の酸化分解による代謝産物 (高村 2006, Dajanta ら 2011) と考えられた.

表6 ホールキャベツの貯蔵積算温度予測への寄与度が高い揮発性化合物

No.	Candidate compounds	regression coefficient	VIP score	Pearson's correlation coefficient	MIC
13	$\alpha$ -Thujene	-0.14	2.62	-0.588 **	0.516
19	Sabinene	-0.14	2.62	-0.565 **	0.516
25	$\alpha$ -Terpinene	-0.14	2.62	-0.571 **	0.516
37	Hexyl acetate	-0.14	2.62	-0.617 **	0.516
24	$\beta$ -Myrcene	-0.08	2.02	-0.494 **	0.516
30	Butyl butanoate	-0.09	1.56	-0.411 **	0.414
23	5-Methyl-3-Hexanone	0.08	1.57	0.386	0.836

\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

これらの鮮度マーカー候補化合物の各ピーク面積の変動に関する類似度と貯蔵積算温度に関する類似度について階層クラスター分析を行った(図9)。

揮発性化合物のプロファイルの類似性は、収穫後(0°C・d)に多く放出される化合物と貯蔵後に放出される化合物の2つに大きく分けられた。これは、PLS回帰分析による回帰係数の符号と一致した。回帰係数が負の値を示した化合物の多くは、0°C・dで最も多く放散され、貯蔵後の放散量は大きく減少した。これらは、高鮮度を示すマーカー物質候補と考えられたが、収穫ストレスによる放散の可能性も排除できない。収穫ストレスによる放散物を鮮度指標とみなすことができるかも含め、さらに検証が必要である。また、Butyl butanoateは、40°C・dで増加し、80°C・d以降減少に転じる傾向だった。対して、回帰係数が正の値を示した5-Methyl-3-hexanoneは、貯蔵積算温度との関係において有意な線形相関は認められなかったものの、40°C・dより増加する傾向であった。以上より、選択された7個の化合物は、その構成割合により0°C・dと40°C・d以上を判別でき、また、Butyl butanoateと5-Methyl-3-hexanoneの検出により、40°C・dと80°C・d以上を判別するマーカー候補になりうると考えられた。

揮発性化合物構成割合による貯蔵積算温度の類似度では、120°C・dと160°C・dがグルーピングされ、次いで80°C・d、40°C・d、0°C・dの順に類似し、貯蔵積算温度に応じて、特徴的な揮発性化合物プロファイルを有することが示された。ただし、80°C・dと、120°C・d、160°C・dのプロファイルは酷似しており、揮発性成分の組成比から区別することは難しい。鮮度低下に伴い増加する5-Methyl-3-hexanoneなどの選択されたマーカー候補化合物の放散量を定量し、それらの量的差異やバランスから判断する必要がある。本研究での計測におけるピーク面積のばらつきは、農産物一頭体ずつから揮発性化合物を捕集したことによる個体差や、SPME法の繰り返し誤差が要因として考えられた。同一圃場で栽培された農産物においてもこのような差異が生じ、揮発性化合物の安定的な捕集が難しいことを踏まえ、今後は揮発性化合物のより安定的な捕集方法の検討や、今回得られた候補化合物の定量的な把握を進める必要がある。一方、貯蔵積算温度が80°C・dより低いホールキャベツの鮮度判定においては、揮発性化合物のプロファイリングが有効な手段となる可能性が示唆された。

なお、ホールキャベツにおいては業務・加工用における長期低温貯蔵時の品質保持・評価が重要な課題であり、今後は貯蔵条件や品種間による差異を評価し、マーカー候補のロバスト性の検証が必要である。

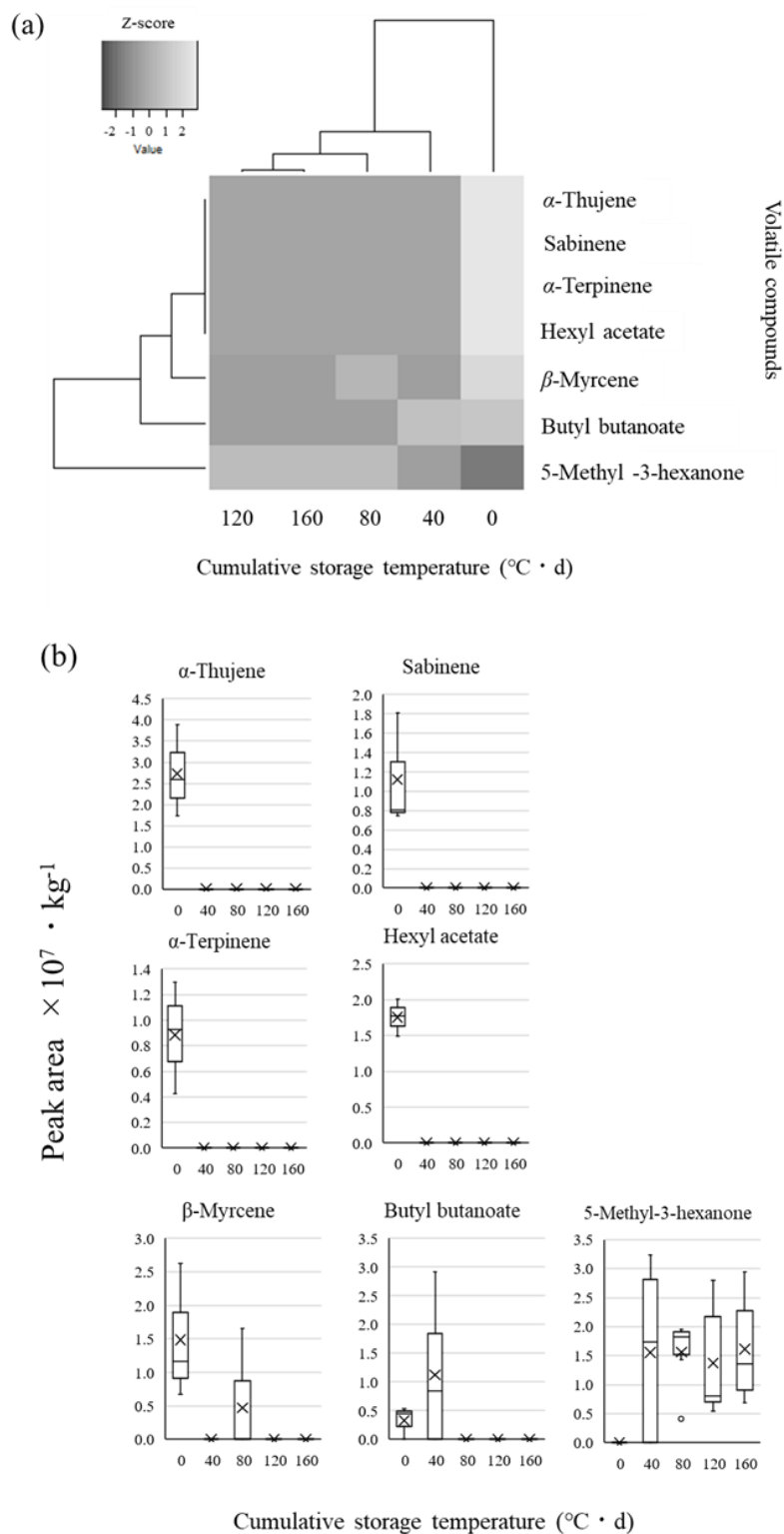


図9 PLS回帰分析によって選択されたホウレンソウ揮発性化合物の階層クラスター分析(a)と単位重量あたりのピーク面積の変化(b) (b)における×は平均値

### 3-3-4 カットキャベツの鮮度マーカー候補となる揮発性化合物の探索

カットキャベツについても、ホールと同様に正規化した各ピーク面積と貯蔵積算温度をそれぞれ説明変数、目的変数とした PLS 回帰分析を行った。貯蔵積算温度の実測値と PLS 回帰分析による予測値の関係を図 10 に示す。第 5 潜在変数を用いた  $R^2_{CV}$  は 0.73 であり、捕集された揮発性化合物変化を説明変数とした貯蔵積算温度の予測値と実測値に線形性が認められた。さらに、Permutation test によっても、構築された PLS 回帰モデルは有意 ( $p < 0.05$ ) であった。表 7 に、カットキャベツの貯蔵積算温度を説明する重要な揮発性化合物として、PLS 回帰分析による VIP 値 1.5 以上を示した 9 個の化合物をリストした。これらの化合物のピーク面積と貯蔵積算温度は、ピアソンの積率相関係数の絶対値および最大情報係数は、それぞれ 0.248–0.754 および 0.367–0.991 を示した。これらの鮮度マーカー候補化合物の各ピーク面積の変動に関する類似度と貯蔵積算温度に関する類似度について階層クラスター分析を行った (図 11)。

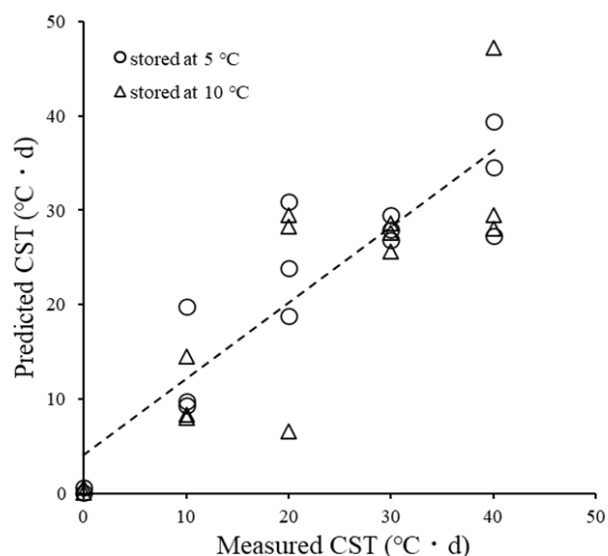


図 10 PLS回帰分析による、カットキャベツ貯蔵積算温度 (CST)の実測値と予測値の関係

表7 カットキャベツの貯蔵積算温度予測への寄与度が高い揮発性化合物

No.	Candidate compounds	regression coefficient	VIP score	Pearson's correlation coefficient	MIC
16	3,7-Dimethyl decane	-0.12	2.29	-0.481 *	0.503
37	Hexyl acetate	-0.12	2.29	-0.521 **	0.503
40	(Z)-3-Hexenyl acetate	-0.11	2.21	-0.481 **	0.503
33	1-Decene	-0.09	1.72	-0.533 **	0.503
45	Allyl isothiocyanate	-0.08	1.62	-0.612 **	0.503
39	Tridecane	0.1	1.95	0.754 **	0.991
7	Nonane	0.09	1.9	0.270	0.843
18	Undecane	0.09	1.75	0.248	0.871
48	Nonanal	0.08	1.72	0.644 **	0.856

\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$

階層クラスター分析では、貯蔵前 ( $0^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ ) に最も多く放出される成分群と貯蔵後に放出される成分群の大きく 2 つに分けられ、PLS 回帰分析による回帰係数の符号と一致した。回帰係数が負の値を示す 5 個の化合物はいずれも貯蔵開始以降大きく減少した。(Z)-3-Hexenyl acetate は、細胞膜脂質から遊離したリノレン酸などの過酸化によって生成されるオキシリピン化合物の一種である(松井ら 2003)。そのため、カット処理の組織破壊によるストレス反応由来と考えられた。また、キャベツ特有の風味をもたらす AITC は、グルコシノレート的一种であるシニグリンが、細胞組織を切断したり破壊したりすることにより、細胞内に局在するミロシナーゼによって分解され、グルコースおよび硫酸とともに生成される(永田 1994)。よって AITC の生成・放出は、(Z)-3-Hexenyl acetate と同様にカット処理による組織破壊由来であり、その後は減少したことから、貯蔵積算温度の増大に伴う組織の老化損傷による放散はほとんど起きなかったと考えられた。従って、これらの化合物は、カットキャベツにおけるカット処理直後の状態を示す鮮度マーカー物質候補と考えられるが、AITC の生成量には品種間差がある(矢野ら 1986) ことから、定量的な共通指標となりうるかなど、更なる検証が必要である。他方、回帰係数が正の値を示した化合物は、アルデヒドである Nonanal や、Tridecane, Nonane, Undecane などの脂肪族炭化水素であった。いずれも貯蔵前には検出されなかったが貯蔵後に放散が確認された。Nonane, Undecane については、貯蔵積算温度との有意な線形相関は認められなかったが、 $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  以降より検出され、放散が継続した。さらに、Tridecane, Nonanal は、 $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  以降より検出された。従って、カットキャベツの貯蔵積算温度  $0^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  と  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  を判別するには、Hexyl acetate や 3,7-Dimethyl decane の減少あるいは不検出や、Nonane, Undecane の放散を確認することが有効であると考えられた。さらに  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  と  $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  以上を判別するには、これらに加え Tridecane や Nonanal の放散が判断基準となりうる。また、 $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  と  $30^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$  以上については、前述のように色調が著しく変化するため、揮発性化合物のプロファイリングを併用することでより確実な判別が可能となると思われる。

このように、鮮度低下に伴って、単調に増加あるいは減少するマーカー候補化合物は見出されなかったものの、複数の化合物の挙動を把握し、組み合わせやその構成割合によ

って鮮度を評価できる可能性が示された。我々はこれまでに、ホウレンソウにおける放散揮発性化合物のプロファイリングによる鮮度マーカー探索を行い、高鮮度を示す鮮度マーカー化合物として数種オキシリピン化合物を候補として挙げた(曾我ら 2020)。キャベツの高鮮度を示す化合物にも同様にオキシリピン経路で生産される (Z)-3-Hexenyl acetate が含まれていた。一方、鮮度低下を示すマーカー候補化合物については、ホウレンソウで見出されたセスキテルペン類などの化合物は選択されず、ホウレンソウとキャベツでは鮮度低下に伴って放散される揮発性化合物の質的変動はかなり異なった。さらに、同じキャベツでもホールとカットにおいて揮発性化合物のプロファイルは大きく異なった。ホウレンソウとキャベツにおいて、さらにはホールとカットで異なるマーカー候補化合物が挙げられたことは、植物種やストレス因子によって、異なる代謝プロセスのもとで、異なる代謝物が生成されながら老化が進行することを示唆している。Luca ら (2017) は、ワイルドロケット収穫後の揮発性化合物の変動は細胞の崩壊とともに、好気性微生物の影響を受けることを指摘した。本研究においては、網羅的解析によって選択された化合物の主たる由来を、組織崩壊や膜脂質の過酸化分解と推定したが、微生物繁殖などの影響も否定できない。従って、揮発性化合物のプロファイリングによる青果物鮮度の評価技術の開発には、より広範な品目を対象とした検討に加え、温度のみならず湿度やガス環境、振動・衝撃、微生物の付着等の多様なストレス因子下における揮発性化合物プロファイルの変動について、今後検討する必要がある。



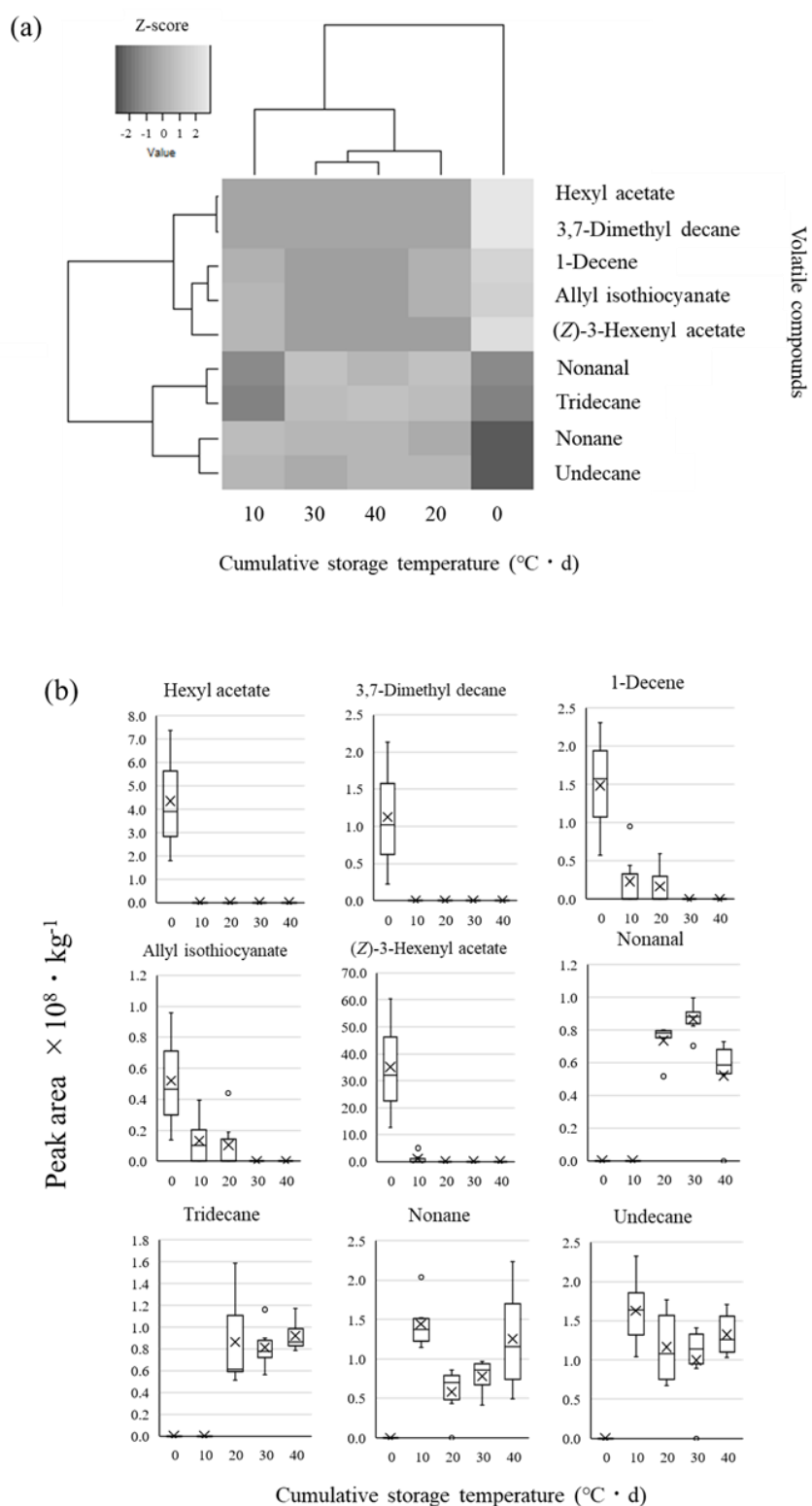


図11 PLS回帰分析によって選択されたカットキャベツ揮発性化合物の階層クラスター分析(a)と単位重量あたりのピーク面積の変化(b)  
(b)における×は平均値

### 3-4 小括

異なる温度に貯蔵したホールおよびカットキャベツから放散される揮発性化合物を固相マイクロ抽出/GC-MS 法により分析し、鮮度低下との関連を検討した。捕集した揮発性化合物のピーク面積を説明変数、貯蔵積算温度を目的変数にした PLS 回帰分析により、貯蔵積算温度を説明する重要な化合物をホールで 7 個、カットで 9 個選択できた。リテンションインデックスとマススペクトルデータベースによるアノテーションで、植物体のストレス防御応答物質やストレス応答の情報伝達により活性化あるいは合成が誘導されると考えられる物質が確認された。特に、ホールではモノテルペン類、カットでは Allyl isothiocyanate や(Z)-3-Hexenyl acetate が、収穫・カット直後に多く認められ、Hexyl acetate はホールおよびカットで共通して高鮮度時に認められた。また、貯蔵積算温度の増加に伴ってアルデヒドやケトン、脂肪酸炭化水素が増加し、ホールおよびカットキャベツで選定された物質は異なった。階層クラスター解析からも、揮発性化合物のプロファイリングとその組み合わせや構成割合によって貯蔵積算温度を区別でき、鮮度を指し示すマーカー候補物質が見出された。

## 第4章 総括

青果物の新鮮さの度合い、すなわち鮮度は、広く用いられている用語であり、且つ青果物にとって重要な品質要素であるにも関わらず、その評価基準は曖昧であり、品目ごとに基準が異なるという問題がある。基準の曖昧さを解決する方法の一つとして、内容成分の変化を定量的に分析評価する手法も普及してきたが、流通の現場での適用が課題となっている。流通技術の向上、高品質高鮮度な青果物の流通のためには、出荷後の各段階において鮮度状態を把握し、適切な品質管理が行えるような技術開発が必要である。そのため、鮮度の評価においては、各現場での単回の測定によって結果が得られるものが望ましい。そこで本研究では、青果物の鮮度低下を評価するための新たな客観的指標の開発に繋がる、鮮度マーカー化合物の探索を目的として、青果物に普遍的に起こるガス代謝に着目した。特に、青果物の老化現象や外敵ストレスへの反応の1つである膜脂質の過酸化分解に伴い放出される揮発性化合物について、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) による網羅的分析を行った。

第2章では、収穫後の品質低下が速く、定量的な鮮度評価法の開発が望まれるハウレンソウを対象として、放出される揮発性化合物についてメタボロミクス解析を行った。5, 15, 25°C貯蔵時に生成される揮発性化合物をガス吸着管で捕集し、加熱脱着法により GC-MS へ導入した。揮発性化合物量から貯蔵積算温度を推定する PLS 回帰分析によって、テルペン、アルコール、炭化水素及び未同定を含む10種類の化合物が貯蔵積算温度に強く関連するものとして選択された。特に、(E)-2-Hexenal と (Z)-Hex-3-en-1-ol は、収穫直後に多く認められる一方で、2,6,10-Trimethyldodecane (Farnesane) や 3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol (Hexahydrofarnesol) は、貯蔵積算温度の増加に伴って増加したことから鮮度低下を示すマーカー候補として有望と考えられた。さらに、階層クラスター分析から、これらの化合物の構成比で貯蔵積算温度を3段階に推定できることが示された。これらのことから、放散成分プロファイリングはハウレンソウの鮮度評価に有用であることが示唆された。

第3章では、ホールおよびカットキャベツの鮮度を反映する放散揮発性化合物を特定するために、ガスクロマトグラフィー・質量分析によるメタボローム解析を行った。ホールキャベツから40、カットキャベツから30種類の物質が同定され、そのうち20物質は共通した。検出された揮発性化

合物を用いた PLS 回帰モデルは、貯蔵積算温度をうまく説明できた。変数重要度指標に基づいて選定された物質による階層クラスター解析では、貯蔵積算温度の増加に応じてそれらのプロファイルが異なった。以上のことから、同定された物質はホールあるいはカットキャベツの鮮度マーカー候補であり、それらのプロファイリングによる鮮度評価の可能性が示された。

本研究で対象としたハウレンソウ、キャベツ及びカットキャベツにおいて、放散される揮発性化合物のプロファイルによって、鮮度のインデックスとした貯蔵積算温度を説明することができた。また、それぞれの揮発性化合物の中から鮮度マーカー候補物質を選択し、アノテーションした。候補物質の中には、植物のストレス防御物質やストレス応答に由来すると考えられる化合物が見出されたものの、ハウレンソウとキャベツにおいて、さらにはホールとカットで異なる鮮度マーカー候補化合物が挙げられたことは、ハウレンソウとキャベツという植物種の違いや、カット処理という大きなストレス因子によって、異なる代謝プロセスが生じており、そこで異なる代謝物が生成されながら老化が進行することを示唆している。

今後、本研究で明らかとなった鮮度マーカー候補物質について、定量性を高めた分析を実施し、これらの変動をより正確に把握し、鮮度マーカーとしてのロバスト性を検証する。また、揮発性化合物のプロファイリングによる青果物鮮度評価技術の開発には、より広範な品目や品種、異なる栽培時期などを対象とした検討に加え、多様なストレス因子下での貯蔵における実験を実施し、揮発性化合物プロファイルの変動について検討する必要がある。

## 謝 辞

本研究の遂行ならびに本学位論文の作成にあたり、終始ご懇意なご指導ご鞭撻を賜った岐阜大学大学院連合農学研究科教授 中野浩平博士に謹んで感謝申し上げます。

また、本論文の作成に当たり貴重なご指導、ご助言ならびにご校閲を賜った岐阜大学応用生物科学部准教授 タンマウオン マナスィカン博士、岐阜大学大学院連合農学研究科客員教授・農研機構食品研究部門 蔦瑞樹博士、岐阜大学応用生物科学部助教 今泉鉄平博士に深く感謝申し上げます。

岐阜大学大学院連合農学研究科客員教授・農研機構食品研究部門食品流通システムユニット長 永田雅靖博士、同ユニット上級研究員 中村宜貴博士にはホウレンソウ試料分析の分析装置使用に際し、ご理解ご支援をいただくとともに本論文執筆に際し多大なるご助言を賜り厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり終始貴重なご指導、ご助言を賜った神戸大学大学院農学研究科准教授 黒木信一郎博士に深く感謝申し上げます。

神奈川県農業技術センターの皆様には多大なるご理解ご支援を賜った。

本論文を構成する研究は、以上の多くの方々のご支援、ご協力のもとに実施されたものです。改めて関係者の皆様に深甚なる謝意を表します。

最後に、常に支えとなり応援してくれた夫と母に感謝します。

## 引用文献

- 阿部淳二・大賀拓史・大橋由明・佐川斉・佐々木一謹・佐藤基・中村征良・藤森玉輝・山本博之. 2011. The Proceedings of Metabolomics. 第2版. 29-32. ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社. 山形.
- 秋元浩一・前澤重禮. 1997. 温度変動がホウレンソウの呼吸と品質におよぼす影響. 農業施設. 27: 195-198.
- Bell, L.・Spadafora, N.D.・Müller, C.T.・Wagstaff, C.・Rogers, H.J. 2016. Use of TD-GC-TOF-MS to assess volatile composition during post-harvest storage in seven accessions of rocket salad (*Eruca sativa*). Food Chemistry, 194, 626-636.
- Brash, D.W.・Charles, C.M.・Wright, S.・Bycroft, B.L. 1995. Shelf-life of stored asparagus is strongly related to postharvest respiratory activity. Postharvest Biology and Technology, 5, 77-81.
- 中馬 豊・中司 敬・大浦正伸. 1980. DLEによるウメ果実の熟度・鮮度の判定. 農業機械学会誌, 42 (2), 293-299.
- Dajanta, K.・Apichartsrangkoon, A.・Chukeatirote, E. 2011. Volatile profiles of thua nao, a Thai fermented soy product. Food Chemistry, 125, 464-470.
- Hatanaka, A. 1993. The biogenesis of green odour by green leaves. Phytochemistry, 34 (5), 1201-1218.
- 日坂弘行. 1989. ホウレンソウ貯蔵中における呼吸量, 糖含量の変化と外観の劣化との関係. 日本食品工業学会誌, 36 (12), 956-963.
- 日坂弘行・小倉長雄. 1991. 貯蔵中のホウレンソウ部位別のアスコルビン酸含量の変化. 日本食品工学会誌, 38 (1), 41-43.
- 細川聡子. 2007. においを介した植物間コミュニケーション. におい香り環境学会誌, 36 (3), 153-155.
- 今田伸二. 2020. 食品流通の合理化と労働力不足への対応. 農産物流通技術 2020, 53-57.
- 石川 豊・牧野義雄・佐藤博実・平田 孝. 1996. 画像解析による包装ブロッコリーの果色変化の評価. 日本食品工学会誌, 43 (11), 1170-1175.
- 香川 彰. 2001. 作型と品種の選択. 農業技術体系, 野菜編, 第7巻, ホウレンソウ, 基礎編, 65-68, 農山漁村文化協会, 東京.
- 神奈川県. 2020. 令和元年度県民ニーズ調査第1回報告書, 第3部, 第7章, 神奈川県の農林水産業, 265-266. <https://www.pref.kanagawa.jp/documents/54386/r1ka0109.pdf>. Accessed June 10, 2020.
- 粕川照男・黒木柁吉・小畑正行. 1969. 収穫後におけるカンランの酵素活性, タンパク質, クロロフィル及びポリフェノール物質の変化. 日本食品工業会誌. 16 (5), 187-191.
- 加藤宏郎. 1988. 高周波インピーダンスによる農産物の非破壊鮮度判定(第1報). 農業機械学会誌, 50 (6), 99-107.
- 河野澄夫. 1998. 青果物の非破壊品質評価技術の現状. 日本食品保蔵科学会誌, 24 (3), 193-200.
- 小林茂典. 2018. 加工・業務用野菜の動向と国内の対応方向. 農林水産政策研究レビュー, 81, 2-3.
- Kolbeck, C.・Rosentritt, M.・Lang, R.・Handel, G. 2006. Discoloration of facing and restorative composites by UV-irradiation and staining food. Dental Materials, 22, 63-68.
- 厚生労働省. 2000. 健康日本21, 栄養・食生活. [https://www.mhlw.go.jp/www1/topics/kenko21\\_11/b1.html#A12](https://www.mhlw.go.jp/www1/topics/kenko21_11/b1.html#A12) Accessed December 23, 2020.
- Luca, A.・Kjær, A.・Edelenbos, M. 2017. Volatile organic compounds as markers of quality changes during the storage of wild rocket. Food Chemistry, 232, 579-586.
- Marangoni, A.G., Palma, T., Stanley, D.W. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. Postharvest Biology and Technology, 7, 193-217.
- 松井健二・有村源一郎. 2003. 情報化学物質として機能する植物揮発性成分の制御. 蛋白質核酸酵素, 48 (13), 1793-1800.
- 松岡英明・渡邊悦生. 1999. 鮮度を測る. 化学と教育, 47 (10), 674-677.
- 松岡孝尚・宮内樹代史・孫徳明. 1995. 農産物の品質判定に関する基礎的研究. 農業機械学会誌, 57 (1), 33-40.
- 目黒孝司・吉田企世子・山田次良・下野勝昭. 1991. 夏どりホウレンソウの内部品質指標. 日本土壌肥料科学雑誌, 62 (4), 435-438.
- 南出隆久・岩田隆. 1981. コールド・チェーンにおける青果物の品質保持と温度許容度に関する研究(第6報). 食品と低温, 7, 10-16.
- 水野寛士・田中仁奈・橋本早紀・山本達也・中野龍平・牛島幸一郎・久保康隆. 2015. 収穫後の貯蔵温度, 形態がエダマメ‘ふくら’と‘湯あがり娘’の品質に及ぼす影響.

- 園芸学研究, 14 (3), 297–304.
- Mukasa, Y. · Hakoyama, S. 2001. Effects of cropping season and storage temperature on quality changes of cabbage during short term storage. Research bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station, 173, 63–72.
- 永田雅靖. 1994. カットキャベツの生理・生化学. 日本食品工業学会誌, 41 (10), 741–746.
- 永田雅靖・平賀智子・竹田尚子. 2016. 遺伝子発現に基づくハウレンソウの鮮度評価法の開発. 日本食品保蔵科学会誌, 42 (6), 247–253.
- 永田雅靖. 2018. 青果物の鮮度に関する収穫後生理学. 食糧, 56, 43–66.
- 中野浩平. 2010. 脂質過酸化レベルに基づく青果物の鮮度評価. 農流技研会報, 282, 19–21.
- 中野浩平. 2013. 岐阜大学. 青果物の鮮度評価方法. 特許第5326166号. 2013–08–02.
- 野口亜里沙. 2018. 香気及び機能性成分に着目したスイートバジルの収穫後の品質に関する研究. 日本食品保蔵科学会誌, 44, 93–97.
- 農林水産省. 2019. 加工・業務野菜をめぐる現状.  
[https://www.maff.go.jp/j/seisan/kakou/yasai\\_kazitu/attach/pdf/kakouyasai-all-R1.12.pdf](https://www.maff.go.jp/j/seisan/kakou/yasai_kazitu/attach/pdf/kakouyasai-all-R1.12.pdf). Accessed December 23, 2020.
- 農林水産省. 2020. 令和元年度食糧需給表.  
<https://www.maff.go.jp/j/zyukyuu/fbs/attach/pdf/index-9.pdf>. Accessed December 23, 2020.
- NPO 法人野菜と文化のフォーラム. 2006. 野菜のおいしさ検討委員会平成18年度野菜ブランド化推進調査事業報告書, 第2章4, 1–2.
- 緒方邦安・伊東卓爾・岩田隆. 1974. コールド・チェーンにおける青果物の品質保持と温度許容度に関する研究, 第3報. 日本食品工業会誌, 21 (8), 394–399.
- 緒方邦安・南出隆久・田尻尚士. 1976. 数種そ菜のCA貯蔵に伴うアスコルビン酸含量の挙動に関する研究. コールドチェーン研究, 2 (1), 11–15.
- 小川政禧. 1938. アスコルビン酸の定量法に就て. 日本農芸科学会誌, 14, 52–64.
- 及川 章. 2013. メタボロミクスの農業・食品分野への応用. 化学と生物, 51, 615–621.
- 大森定夫・鷹尾宏之進. 1994. 青果物の軟らかさ非破壊評価装置の開発 (第1報). 農業機械学会誌, 56 (2), 49–57.
- Reshef, D. N. · Reshef, Y. A. · Finucane, H. K. · Grossman, S. R. · McVean, G. · Turnbaugh, P. J. · Lander, E. S. Mitzenmacher, M. · Sabeti, P. C. 2011. Detecting novel associations in large data sets. Science, 334 (6062), 1518–1524.
- Ruther, J. · Kleier, S. 2005. Plant-plant signaling: Ethylene synergizes volatile emission in *Zea mays* induced by exposure to (z)-3-hexen-1-ol. Journal of Chemical Ecology, 31 (9), 2217–2222.
- Shewfelt, R.L. · del Rosario, B.A. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. Hortscience, 35 (4), 575–579.
- 椎名武夫. 2016. 野菜の品質保持技術について. 野菜情報, 9, 44–56.
- 曾我綾香・吉田 誠・黒木信一郎・蔦 瑞樹・中村宣貴・今泉鉄平・タンマウオン マナスイカン・中野浩平. 2020. 放散成分プロファイリングによるハウレンソウの鮮度マーカーの探索. 農業食料工学会誌, 82 (6), 636–641.
- 曾我綾香・吉田 誠・黒木信一郎・蔦 瑞樹・中村宣貴・今泉鉄平・タンマウオン マナスイカン・中野浩平. 2021. 放散成分プロファイリングによるホールおよびカットキャベツの鮮度評価. 農業食料工学会誌, 83(3), 182–191.
- Song, S. · Bangerth, F. 2003. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. Postharvest Biology and Technology, 30, 113–121.
- Syukri, D. · Thammawong, M. · Naznin, H.A. · Kuroki, S. · Tsuta, M. · Yoshida, M. · Nakano, K. 2018. Identification of freshness marker metabolite in stored soybean sprouts by comprehensive mass-spectrometric analysis of carbonyl compounds. Food Chemistry, 269, 588–594.
- 田原虎次・藍房和・須藤允・石川文武, 1968. 果菜類の物理的手法による鮮度判定法に関する研究 (第1報). 農業機械学会誌, 30, 169–174.
- 高村仁知. 2006. 食品の脂質劣化および風味変化に関する研究, 日本食品科学工学会誌, 53 (8), 401–407.
- タンマウオン マナスイカン. 2014. 青果物の輸送時における衝撃ストレス応答解析に関する生理学的研究. 日本食品保蔵科学会誌, 40 (2), 79–85.
- 樽谷隆之. 1963. 果実・そ菜の貯蔵. 日本食品工業会誌, 10 (5), 186–202.
- Trap, J. · Bureau, F. · Perez, G. · Aubert, M. 2013. PLS-regressions

- highlight litter quality as the major predictor of humus form shift along forest maturation. *Soil Biology & Biochemistry*, 57, 969–971
- 塚本洋太郎. 1942. 柿果のビタミン C に関する研究. 園芸学会雑誌, 13 (2), 166–176.
- Verkerk, R · Dekker, M. · Jongen, W. M. F. 2001. Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of vegetables. *Journal of the science of food and agriculture*. 953–958.
- Watanabe, T. · Nakamura, N. · Shiina, T. · Nagata, M., 2020. Relationships among expression of six representative genes, bacterial multiplication, color changes of fresh cut cabbages during storage with focus on accumulated storage temperature. *Food control*, 113, 107190.
- Wold, S. · Sjöströma, M. · Eriksson, L. 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, 109–130.
- Yamauchi, N. · Iida, S. · Minamide, T. · Iwata, T. 1986. Polar lipids content and their fatty acid composition with reference to yellowing of stored spinach leaves. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 55 (3), 355–362.
- 山内靖雄. 2014. 酸化ストレス応答に関わる新たなプレイヤー. 植物科学調節学会. 49 (2), 143–148.
- 矢野昌充 · 西條了康 · 太田保夫. 1986. イソチオシアネート類によるカットキャベツの褐変防止とエチレン生成阻害. 園芸学会雑誌, 55 (2), 194–198.
- 吉田 誠. 2007. 食品の品質評価技術 第6回 農産物 野菜・果物の品質評価技術. 冷凍, 82, 776–779.