

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25252045

研究課題名(和文)呼吸酵素活性の可視化診断に基づく青果物の鮮度低下速度予測

研究課題名(英文) Prediction of deterioration rate of fruits and vegetables on the basis of visualized localization of enzymatic activity for respiration

研究代表者

牧野 義雄 (Makino, Yoshio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：70376565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,600,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ科野菜花蕾部の鮮度低下速度分布と呼吸酵素の関係について研究を行った。光センシングによりブロッコリー花蕾部の黄化速度分布の非破壊推定精度には、750 nm付近の光反射率が影響し、これはクロロフィル蛍光に起因する光反射であることが確認できた。カリフラワー花蕾部の褐変速度分布の非破壊推定は、スクリーニングレベルの精度で可能であった。

ブロッコリー花蕾部の黄化速度は呼吸酵素の1種「オルタナティブオキシダーゼ(AOX)」量の増減と関係が深く、AOX量増加が抑制される環境条件で、黄化が抑制された。このことから、呼吸酵素がアブラナ科野菜の鮮度低下速度制御に影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： We studied the distribution of deterioration rate of cruciferous vegetable flower buds and the relationship between respiratory enzymes. By the light sensing, the nondestructive estimation accuracy of the yellowing rate distribution of broccoli flower buds was influenced by light reflectance around 750 nm, which was confirmed to be light reflection due to chlorophyll fluorescence. Nondestructive estimation of the browning rate distribution of cauliflower flower buds was possible with screening level accuracy.

The yellowing rate of the broccoli flower bud was deeply related to the increase / decrease of one type of respiratory enzyme "Alternative Oxidase (AOX)", and the yellowing was suppressed under the environmental condition where the increase in AOX amount was suppressed. From this, it became clear that respiratory enzymes influence the deterioration rate control of cruciferous vegetables.

研究分野：農業環境・情報工学

キーワード：分光分析 農業工学 農林水産物 細胞・組織 酵素

1. 研究開始当初の背景

2012年6月、日本学術会議を含む世界の科学アカデミーは、人口と消費に関する共同声明を発表し、将来の人口爆発が予想される中、持続可能な食料供給に関する懸念が示された(人口と消費に関するインターアカデミーパネル共同声明, 2012)。食料供給量を増やす方策としては、増産が考えられるが、近年の水資源の逼迫などと併せて考えれば、急激な耕地面積の拡大や生産性の向上は容易ではない。一方、国際連合食糧農業機関(FAO)は、世界全体で人の消費向けに生産された食料の約1/3、量にして約13億トンの年が失われ、捨てられていると発表するとともに、当該廃棄量の削減は、限られた天然資源から全ての人々に十分な食料を供給するための、最も重要な優先事項であると提言した(FAO, 世界の食料ロスと食料廃棄, 2011)。その中でも青果物のロス・廃棄率は、全食料の中で最も高い35~55%となっており、その抑制による食料確保が喫緊の課題となっている。

青果物の鮮度低下に大きく影響を及ぼす要因の一つが呼吸であり、保有する栄養成分を消耗する生命活動であることから、収穫後においては外観品質の劣化、栄養分の消耗、目減り等を引き起こす。青果物の呼吸速度が大きい品目ほど鮮度保持期間が短いという報告(Robinson et al., *Annals Appl. Biol.*, 81, 399-408, 1975)があり、呼吸の遅速(呼吸速度)が収穫後における青果物の品質保持期間に大きく影響を及ぼすことを裏付ける。細胞内に取り込まれたO₂分子の多くは、呼吸鎖の末端に位置する酸化酵素「チトクロムcオキシダーゼ(COX)」により消費され、生命活動に必要な高エネルギー化合物ATPを生成する(Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell* 3rd ed., Garland Publishing, Inc., pp.672-684, 1994)。

研究代表者(牧野義雄)らは、染色による野菜組織内COX活性分布の解明(Makino et al., *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 132, 239-245, 2007)、近赤外分光分析によるトマト果実のO₂消費速度の非破壊推定(Makino et al., *Food Chem.*, 121, 533-539, 2010)など、青果物のO₂消費に関する基礎研究に取り組んできた。しかし、植物細胞内におけるO₂消費にはATPを生成しない酸化酵素「オルタナティブオキシダーゼ(AOX)」が関与し、その寄与率は50%に及ぶ場合もある。研究分担者(野口航)らは、当該酵素の作用について研究を進めてきた(Yoshida, Noguchi et al., *Plant Cell Physiol.*, 51, 836-841, 2010)。

収穫直後に2種類の酵素活性分布と活性比率を迅速に判定すれば、鮮度低下速度に応じて出荷順序や流通・加工方法を選択、ひいてはロス削減に有効な手段となり得るが、酵素活性を非破壊で評価する方法や、両酵素の活性比率が鮮度低下速度に及ぼす影響については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、収穫直後に青果物組織内の呼吸酵素活性分布を可視化し、鮮度低下速度を予測する方法を明らかにするために、次の研究課題に取り組む。

顕微分光法によるCOX活性組織内分布の非破壊推定について研究を行う。COXには特有の光吸収が認められるものの、生体組織内において微量にしか存在しないため、通常の分光分析等非破壊法で検出・定量することは極めて困難である。そこで、アブラナ科野菜であるブロッコリーとカリフラワーを試料とし、顕微分光法を利用して、組織内における当該酵素活性分布の非破壊推定法を解明する。

ハイパースペクトルカメラによるCOX活性組織内分布の可視化に関する研究では、顕微分光法で明らかにした組織切片のCOX活性の非破壊推定法を、選果選別に適用可能で、マクロ的な分光分析法であるハイパースペクトルカメラで計測したデータと関連付け、青果物個体の酵素活性非破壊推定(可視化)に適用する。

次にCOXとAOXの活性比率評価について研究を行う。AOXは電子伝達に伴いATPを生成しないため、生命活動促進作用は低いと考えられるが、栄養素代謝物由来の電子を受け取る役割があることから、鮮度低下とは無関係ではない。本検討課題ではブロッコリーを試料とし、O₂消費速度と両酵素の活性比率の関係、さらには活性比率が鮮度低下速度に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ブロッコリー花蕾部の呼吸酵素の光センシングによる黄化速度分布の非破壊予測

部分的に呼吸速度と品質変化の程度が異なり、呼吸酵素濃度分布と鮮度低下速度の関係に関する研究を行う上で、実験試料として適しているブロッコリー(*Brassica oleracea* var. *italica*)を選択した。花蕾部の切片をクリオスタットで調製し、顕微紫外可視分光光度計で測定した酵素活性染色前の分光吸収スペクトルと、染色後の活性程度とを部分最小二乗回帰分析で関連付けることにより、非破壊でブロッコリーの呼吸酵素濃度の非破壊推定を試みた。

さらに、試料を25℃、相対湿度90%の恒温恒湿器内で14dの間貯蔵し、経時的に呼吸酵素濃度分布、ハイパースペクトル分光画像、クロロフィル蛍光画像を撮影し、相互の関係を数学モデル(ニューラルネットワーク)で関連付けることにより、黄化速度分布の非破壊推定を試みた。

(2)カリフラワー花蕾部の酸化褐変酵素の光センシングによる褐変速度分布の非破壊予測

部分的に呼吸速度と品質変化の程度が異なり、呼吸酵素濃度分布と鮮度低下速度の関

係に関する研究を行う上で、実験試料として適しているカリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) を選択した。試料を 25℃、相対湿度 90% の恒温恒湿器内で 12 d の間貯蔵し、花蕾部におけるポリフェノールオキシダーゼ (酸化褐変触媒酵素, PPO) 活性の分布を測定するとともに、ハイパースペクトル分光画像を撮影することにより相互の関係を数学モデル (ニューラルネットワーク) で関連付け、褐変速度分布の非破壊推定を試みた。

(3)呼吸酵素量および活性比率とブロッコリーの鮮度の関係

COX による O₂ 消費は、多量の高エネルギー化合物(ATP)を生成するため、生命活動を活性化させ、鮮度低下の原因となる。一方、AOX による O₂ 消費は、ATP を生成しないため、生命活動促進作用は弱い。従って、呼吸速度と鮮度低下の関係を評価するためには、両酵素の活性比率を調べる必要がある。

既往の研究では、O₂ 消費速度が低い条件では、COX の活性が優勢であり、O₂ 消費速度の上昇とともに AOX の活性比率が上がることで、AOX は COX よりも ³²O₂ を優勢に消費することが明らかにされている。このことは、AOX の活性比率の上昇とともに、同位体である ¹⁸O の残存率が高まることを意味する。

そこで試料を鮮度保持用気体透過性袋あるいは気体組成を制御可能なアクリルチャンパー内にて、25℃ で 2 d の間貯蔵した後、気体遮断袋に入れ、継続的に袋内ガスを採取した。これを質量分析計で分析した結果をレイリーの蒸留式に代入して、同位体比を算出する。併せて貯蔵環境温度が活性比率に及ぼす影響についても検討した。同時に電気泳動にてタンパク質量も測定し、質量分析の結果と比較検討し、測定データの普遍性を確認した。さらに、1℃ で 21 d 貯蔵した場合にも同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1)ブロッコリー花蕾部の呼吸酵素の光センシングによる黄化速度分布の非破壊予測

ブロッコリー花蕾部から調製した切片を試料として顕微分光分析を行ったところ、COX に特有の 400 ~ 450 nm および 830 nm 付近における光吸収が認められた。しかし、個体の花蕾をハイパースペクトルカメラで撮影したところ、クロロフィルによる光吸収が鋭敏であることが理由で、呼吸酵素濃度の光による推定は困難であった。

ただし、750 nm 付近の光反射が大きくなる傾向が見られ、クロロフィル蛍光に由来する現象と考えられた。検討の結果、クロロフィル蛍光と花蕾の黄化速度との間に相関係数 0.83 の精度で正の相関関係が認められた。黄化速度が呼吸速度と関連していることと、本研究の結果から、クロロフィル蛍光は、黄化速度を媒介変数として間接的に呼吸速度を予測する方法として有効であることが明らか

かになった。

(2)カリフラワー花蕾部の呼吸酵素に関する研究

花蕾部における PPO 活性は経時的に上昇し、さらに部分的な違いも経時的に顕著になった。分光分析画像と PPO 活性をニューラルネットワークで関連付けた結果、相関係数 0.76 の精度で正の相関関係が認められた。このことから、カリフラワーの褐変速度を光センシングによりスクリーニングレベルで推定可能であることが明らかになった。

(3)呼吸酵素量および活性比率とブロッコリーの鮮度の関係

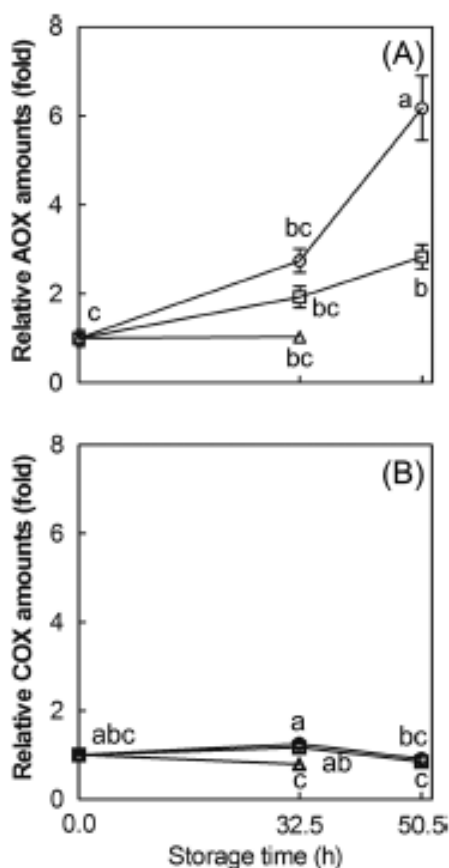


図1 ブロッコリー花蕾部における(A)オルタナティブオキシダーゼ(AOX)および(B)チトクロム c オキシダーゼ(COX)相対量の 25℃ における経時変化

○: 大気; □: 気相調整チャンパー; △: 気相調整袋、値は 6 回の測定の平均値 ± 標準誤差と示す。異なるアルファベットは有意差を示す ($p < 0.05$)。

試料 (ブロッコリー) を大気環境と低 O₂ (5.9%)、高 CO₂ (10.2%) 環境で貯蔵した場合と比較すると、低 O₂、高 CO₂ 環境では黄化、目減りとも抑制され、鮮度が有意に保持された。その際、AOX 量は大気環境で経時的に増加し、

低 O₂、高 CO₂ 環境に比べて有意に多くなった一方、COX 量は安定していた (図 1)。すなわち、ブロッコリーは環境 O₂ の変動に伴い AOX 量を調節し、細胞内における水素イオン除去を制御していると考えられた。また、両酵素の活性比率は貯蔵期間中安定していた。COX 量は減少していたが、活性は安定的に維持し、ATP を継続的に合成することにより、収穫後においても生命活動を維持していることが示唆された。

1 で 21 d 貯蔵した実験では、環境 O₂ は 2.5%、CO₂ は 6.0% で保持された。その結果、鮮度、酵素量、酵素活性比率とも 25 と同様の傾向であった。

すなわち、COX は生命活動維持に必要な ATP を産生する酵素であり、環境 O₂ 水準に関わらず、安定して ATP を産生し続ける必要があることから、含有量を安定させる生理学的特徴があるものと考えられた。

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 5 件)

Wang H. W., Makino Y., Inoue J., Maejima K., Funayama-Noguchi S., Yamada T., Noguchi K., Influence of modified atmosphere on induction and activity of respiratory enzymes in broccoli florets during the early stage of postharvest storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 65, No. 39, 2017, pp. 8538–8543, DOI:10.1021/acs.jafc.7b02318

Makino Y., Goto K., Oshita S., Sato A., Tsukada M., A grading method for mangoes on the basis of peel color measurement using a computer vision system, *Agricultural Sciences*, Vol. 7, No. 6, 2016, pp. 327-334, DOI: 10.4236/as.2016.76033

Makino Y., Wakatsuki A., Amino G., Oshita S., Sato A., Tsukada M., Objective evaluation of external quality of broccoli heads using a computer vision system, *Japan Journal of Food Engineering*, Vol. 17, No. 4, 2016, pp. 107-113, DOI: 10.11301/jsfe.17.107

Makino Y., Isami A., Suhara T., Goto K., Oshita S., Kawagoe Y., Kuroki S., Purwanto Y.A., Ahmad U., Sutrisno, Nondestructive evaluation of anthocyanin concentration and soluble solid content at the vine and blossom ends of green mature mangoes during storage by hyperspectral spectroscopy, *Food Science and Technology Research*, 査読有, Vol. 21, No. 1, 2015, pp. 59-65, DOI: 10.3136/fstr.21.59

牧野義雄, 光センシングによる農畜産物の非破壊品質評価, 調理食品と技術, Vol. 21, 2015, 55-65

[学会発表](計 25 件)

Wang H. W., Makino Y., Inoue J., Oshita S., Maejima K., Funayama-Noguchi S., Noguchi K., Dynamic changes in activity and amount of respiratory enzymes in a broccoli floret stored under modified atmosphere, XII International Controlled and Modified Atmosphere Research Conference, 2017 年 6 月 19 日, ワルシャワ (ポーランド)

Wang H. W., Makino Y., Inoue J., Oshita S., Maejima K., Funayama-Noguchi S., Noguchi K., Effect of gas composition on respiratory enzyme activity in broccoli after harvest, 日本包装学会第 26 回年次大会研究発表会, 2017 年 7 月 11 日, 東京大学 (東京)

井上潤, 王孝雯, 牧野義雄, 吉村正俊, 前島健作, 舟山幸子, 野口航, 低 O₂ 高 CO₂ 環境が収穫後ブロッコリーの呼吸酵素活性の経時変化に及ぼす影響, 第 76 回農業食料工学会年次大会, 2017 年 9 月 9 日, 東京農業大学 (東京)

牧野義雄, 吉村正俊, 外 13 名, デジタルカメラによる青果物外観品質の客観的判定に関する研究, 2017 国際食品工業展アカデミックプラザ研究発表会, 2017 年 6 月 13 日, 東京ビッグサイト (東京)

Wang H.W., Makino Y., Oshita S., Maejima K., Funayama S. N., Noguchi K., The effect of storage environment on the respiratory enzyme activity in broccoli, 8th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems Engineering, 2016 年 5 月 24 日, 朱鷺メッセ (新潟市)

Wang H. W., Makino Y., Oshita S., Maejima K., Funayama S., Noguchi K., Respiratory enzyme activities and protein amounts of broccoli florets under modified atmospheres at different temperatures, 第 75 回農業食料工学会年次大会, 2016 年 5 月 29 日, 京都大学 (京都市)

大下誠一, 牧野義雄, 外 13 名, USB カメラによる収穫後ブロッコリーの迅速外観品質評価, 2016 国際食品工業展アカデミックプラザ研究発表会, 2016 年 6 月 7 日, 東京ビッグサイト (東京)

王孝雯, 牧野義雄, 大下誠一, 前島健作, 舟山 (野口) 幸子, 野口航, 貯蔵温度及びガス組成が収穫後ブロッコリーの呼吸酵素に及ぼす影響, 日本包装学会第 25 回年次大会研究発表会, 2016 年 7 月 7 日, 神戸大学 (神戸市)

Wang H. W., Makino Y., Oshita S., Maejima K., Funayama S., Noguchi K., The effect of micro-perforated pouch on respiratory enzyme of broccoli, 農業食料工学会関東支部第 52 回年次大会, 2016 年 8 月 1 日, 筑波大学 (茨城県つくば市)

井上潤, 王孝雯, 牧野義雄, 大下誠一, 前島健作, 舟山幸子, 野口航, 低 O₂ 高 CO₂ 環境がブロッコリー細胞内呼吸酵素に及ぼす影響, 農業食料工学会関東支部第 52 回年次大会 2016 年 8 月 1 日, 筑波大学(茨城県つくば市)

牧野義雄, 西本成潤, 大下誠一, 分光分析を用いたカリフラワーの貯蔵中における酵素的褐変の出現予測, 日本生物環境工学会 2016 年金沢大会, 2016 年 9 月 13 日, 金沢工業大学(石川県野々市市)

牧野義雄, 光センシングによる農畜産物の非破壊品質評価, 日本調理食品研究会年次大会(平成 27 年度)セミナー「調理食品分野における今最新の話題を探る!」, 2015 年 5 月 22 日大阪国際会議場(大阪市)

牧野義雄, 若月碧衣, 網野元貴, 大下誠二, 天然色素濃度に基づくブロッコリー花蕾部外観品質の客観的評価, 日本食品工学会第 16 回年次大会, 2015 年 8 月 11 日, 広島市立大学(広島市)

牧野義雄, 後藤健次郎, 大下誠二, 佐藤朱里, 塚田正人, USB カメラを利用した収穫後マンゴーの外観品質評価, 日本生物環境工学会 2015 年宮崎大会, 2015 年 9 月 8 日, シーガイアコンベンションセンター(宮崎市)

牧野義雄, 若月碧衣, 網野元貴, 大下誠二, 佐藤朱里, 塚田正人, USB カメラを利用した収穫後ブロッコリーの外観品質評価, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015 年 9 月 15 日, 岩手大学(岩手県, 盛岡市)

Makino Y., Amino G., Nishimoto S., Oshita S., Nondestructive estimation of respiratory enzymatic activity associated with food loss during transportation and storage in brassicaceous vegetables, Second International Conference on Global Food Security, 2015 年 10 月 11 日, イサカ市(アメリカ合衆国)

Amino G., Makino Y., Oshita S., Nondestructive prediction of degreening rate of broccoli buds by photosensing, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 16 日, ホノルル市(アメリカ合衆国)

牧野義雄, 青果物包装用高機能フィルムの特徴と使用効果について, 新技術セミナー in 高松(高機能フィルムセミナー), 2014 年 2 月 12 日, サンポートホール高松(香川県高松市)

西本成潤, 大下誠一, 牧野義雄, ブロッコリー花蕾部におけるチトクロム c オキシダーゼ活性の分光分析による非破壊推定, 第 73 回農業食料工学会年次大会, 2014 年 5 月 18 日, 琉球大学(沖縄県中頭郡西原町)

Nishimoto S., Makino Y., Oshita S.,

Detection of cytochrome c oxidase in broccoli buds by spectroscopy and staining, 7th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems Engineering, 2014 年 5 月 21 日, 宜蘭(台湾)

21 Makino Y., Honda S., Oshita S., Noguchi K., Nakao S., Effects of in-package atmosphere on temporal changes in the fractionation of oxygen isotopes during respiration in tomatoes, 19th IAPRI World Conference on Packaging, 2014 年 6 月 17 日, メルボルン(オーストラリア)

22 牧野義雄, 青果物の鮮度低下における呼吸酵素の作用機作, 日本食品保蔵科学会第 63 回大会(長野大会)シンポジウム「青果物の品質保持とその予測技術の最前線」, 2014 年 6 月 29 日, JA 長野県ビル(長野市)

23 西本成潤, 大下誠二, 牧野義雄, 有村慎一, 高梨秀樹, ブロッコリー花蕾部から抽出・精製したミトコンドリアの光吸収特性, 農業機械学会関東支部第 50 回年次大会, 2014 年 8 月 6 日, 静岡県小笠山総合運動公園(静岡県袋井市)

24 Nishimoto S., Makino Y., Oshita S., Nondestructive prediction of cytochrome c oxidase activity in broccoli buds by spectroscopy, The International Conference on Plant Factory 2014, 2014 年 11 月 11 日, 京都大学(京都市)

25 Makino Y., Kosaka Y., Hosaka A., Nishimoto S., Oshita S., Oxygen consumption by horticultural products as a crucial factor in their deterioration during transportation and storage in the market, First International Conference on Global Food Security, 2013 年 9 月 30 日, ノールトウイーケルハウト(オランダ)

〔図書〕(計 2 件)

牧野義雄 他, 情報機構, 機能性植物が秘めるビジネスチャンス~各社事例から学ぶ成分向上手法/事業活用例~, 2016, 332

牧野義雄 他, 文永堂出版, 農産食品プロセス工学, 2015, 315

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 義雄 (MAKINO Yoshio)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 70376565

(2) 研究分担者

野口 航 (NOGUCHI Ko)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号: 80304004

(3)連携研究者

大下誠一 (OSHITA Seichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特
任教授

研究者番号：00115693

(4)研究協力者

塚田正人 (TSUKADA Masato)

日本電気株式会社・データサイエンス研究
所・主任研究員

(5)研究協力者

ボースン・パーク (PARK Bosoon)

米国農務省・Richard B. Russell Research
Center・Lead scientist