

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14836

研究課題名（和文）マイクロ・ナノ微細構造情報に基づく青果物の品質評価法の確立

研究課題名（英文）Quality evaluation of fruit and vegetables based on micro- and nano-structure observation and image processing

研究代表者

田中 史彦（Tanaka, Fumihiko）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30284912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：青果物細胞組織の微細構造を μ X線CTやAFM等の最新観察機器によってマイクロからナノレベルで観察し、画像処理を行うことによって構造に関する特徴量を抽出、また、AFMの持つ走査機能を駆使することによって細胞壁を構成する多糖類の構造と青果物の品質の関係を明らかにした。具体的には、 μ X線CTによる観察では、取得画像からカキ果肉の三次元構造を再構築し、空隙率の算出と熱移動を解析、物性値マッピングを行った。AFM観察では、青果物を調理する温度が細胞壁構造変化に与える影響を調査した。

研究成果の概要（英文）：Microstructure of fruit and vegetables was observed using high- and normal-resolution X-ray CT and AFM systems. The three-dimensional microstructure was reconstructed and some physical properties were obtained using image processing and CFD simulation techniques. In the X-ray CT experiments, the porosity, thermal conductivity and moisture distribution were visualized for an intact persimmon fruit based on analysis of microstructure image data. AFM analysis was also employed to clarify influences heat treatments on carrot texture.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：農業工学 生体材料 AFM X線CT 細胞計測 構造解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 欧州委員会が進めてきた第7次研究・技術開発のための枠組み計画 (FP7) 課題のひとつとして Inside Food プロジェクトがある。この Inside Food プロジェクトは、最新の光学技術や画像処理技術を駆使することによって食材等の微細構造を明らかにし、微細構造と食品の品質評価に生かそうというものである。

(2) 申請者らは、2013年4月にベルギーで Inside Food プロジェクトについての国際シンポジウムを開催し (Scientific Committee として参画)、欧米における研究シーズを俯瞰的に調査するとともに、本分野の重要性を強調した。

(3) 今後、この研究は観察技術の飛躍的な発展によって対象がマイクロレベルからナノレベルまで拡がり、ナノ構造と食品の品質との関係が明らかにされることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、青果物細胞組織の微細構造を μ X 線 CT 及び原子間力顕微鏡 (AFM) によってマイクロ (細胞組織構造) からナノレベル (多糖類構造) で観察し、画像処理を行うことで構造に関する形態的特徴量を抽出、また、AFM の持つ種々の走査機能を駆使することによって細胞壁の特性を直接計測し、観察と計測から得たデータと青果物の品質 (硬さや食感など) の関係を明らかにすることを目的とする。最先端の機器による微細構造観察とコンピュータによる高度な画像解析との融合によってマイクロ～ナノ情報に基づく新たな青果物の品質評価法を確立できるものと期待でき、これまで検知できなかった青果物の品質劣化を早期に察知したり、分子レベルの情報に基づくより高度な品質評価を目的とする。

(1) 解像度が異なる X 線 CT 画像マルチスケール解析による青果物の品質評価

青果物の内部構造を非破壊観察し、品質評価に生かす研究は数多く報告されているが、マイクロレベルでの観察結果を品質評価に生かした例は少なく実用の段階には至っていないのが現状である。先行する基礎研究としては、例えば、Herremans *et al.* (2013, 2014) は貯蔵におけるリンゴ果実の細胞組織構造の経時変化を高解像度 X 線 CT 装置を用いて観察し、細胞間隙の減少と褐変障害に密接な関係があることを明らかにしている。また、Barcelon *et al.* (1999) はモモ果実の内部品質測定と CT 画像解析により果実含有水分および密度と CT 値の間に相関があることを明らかにしている。その他にも、青果物の生育段階で細胞の大きさや空隙率が変化することを報告した研究もある (Herremans *et al.*, 2015, Cantre *et al.*, 2014)。しかしながらいずれの研究も微細構造観察から得られた結果を青果物個体レベルの解析に生

かすものではない。これに対し、Mebatsion *et al.* (2008) はマルチスケール解析の重要性を説いており、異なるスケールで観察した画像の解析データを両者間でどのように生かし合うか、その手法を確立することこそが今後に求められる緊急の課題であるとしている。これを受け、ここでは、著者らが提案した解像度の異なるふたつの X 線 CT 観察によって得られた青果物の両画像から果実全体の空隙率、熱伝導率分布を可視化する手法を提案する。

(2) 原子間力顕微鏡 (AFM) による青果物微細構造解析

マイクロレベルよりさらに微細なナノ構造を対象とする AFM 観察では、現在、細胞壁を構成する多糖類 (セルロース、ヘミセルロース、ペクチンなど) に注目して高分子鎖の長さや枝分かれ、網状構造と果実硬度との関係を明らかにする研究が行われている (Kozioł *et al.*, 2017, Zdunek *et al.*, 2014, 2016)。特に果実や野菜の組織では、ペクチンがその構造の維持に重要な役割を担っており、果実の成熟時や加熱加工時における組織の軟化はペクチンの可溶性が大きな要因となっている。ペクチンは植物の細胞壁や中葉に含まれる複合多糖類で、ガラクトuron酸が α -1,4-結合したポリガラクトuron酸が主成分である。ここでは、エンジンの加熱温度がペクチン構造変化に与える影響について AFM 観察により明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 解像度が異なる X 線 CT 画像マルチスケール解析による青果物の品質評価

① 供試材料 供試材料として、福岡県 (JA 筑前あさくら) で収穫された収穫直後のカキ (富有) を使用した。

② X 線 CT 観察 CT 画像の撮影は、普通解像度については実験動物用 X 線 CT 装置 (Latheta LCT-100、日立) を用いて行い、X 線源管電圧 50kV、管電流 1mA、スライス幅を 2mm として CT 画像を取得した。高解像度については、 μ X 線 CT 装置 (Skyscan 1172、Bruker) を用いて行い、X 線源管電圧 60kV、管電流 100mA、スライス幅を $3.24\mu\text{m}$ とした。

③ CT 値の抽出、3D ジオメトリ作成、空隙率計測 高解像度 X 線 CT 装置で取得したカキ細胞組織の連続 CT 画像中の一部を、一辺 0.2 mm の立方体にくり抜いた後、それぞれの画像から CT 値を抽出し、平均値を算出した。CT 値の抽出は画像解析ソフトウェア (CT-Analyzer, Bruker) を用いた。次に、くり抜いた連続 CT 画像から、細胞部分と細胞間隙部分の輪郭をそれぞれ抽出することで、カキ細胞組織の三次元形状の再構築を行った。この際、300 ボクセル以下の微小部位はアーチファクトであり、また計算結果に影響を与えないものと考え除去した。その後、三次元再構築したジオメトリにおいて細胞部分と空隙部分の体積をそれぞれ計測し、細胞組織内

における空隙率を算出した。三次元形状の再構築および空隙率の計測には 3D 可視化解析システム (Amira、マックスネット) を用いた。

④ 三次元微細構造モデルを用いた熱解析による熱伝導率の推算 前項で完成したジオメトリを STL 形式ファイルで保存し、ICEM CFD 17.1 (ANSYS) にエクスポート、各節点、表面、ボディを認識させ、メッシュ・ジェネレータ機能を用いて計算要素に分割した。要素分割後のジオメトリの一例を図 1 に示す。この図は空隙率が 0.04 の密組織立体像の例であるが、ガスなどの通路となる空隙の形状が明瞭に分かる。空隙率が 0.3 以上となる部分は果実全体の 4% 以下でしかないが、空隙に含まれる気体の熱伝導率は細胞が含む水の約 1/25 倍となるため、この存在は無視できない。空隙が細胞組織内の熱移動に与える影響を調べるため、空隙率が 0.04~0.47 とする 0.3mm 角の立方体ジオメトリサンプルを準備し、その一面 (上面) から冷却、他の面は断熱条件を与え、冷却面とは反対面 (下面) の平均温度の経時変化を求めた。同時に、熱伝導率をモデルインプットパラメータとする 0.3mm 角の均質材料を仮定した冷却計算を行い、下面における平均温度の経時変化と細胞組織モデル解析結果とを比較、最も適合性の高くなる熱伝導率の値を細胞組織モデルの有効熱伝導率とした。

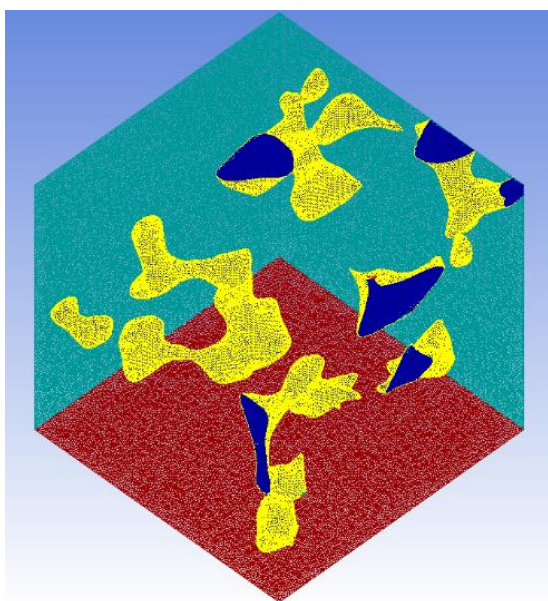


図 1 カキ果肉細胞組織モデル

⑤ 空隙率と熱伝導率の関係 二相から成る材料の熱伝導率と空隙との関係を表す式については直列モデルや並列モデル、多分散系モデル、Maxwell-Eucken モデル、Brailsford モデルなど多くのモデルが提案されている。この中で、カキ果実の熱伝導率と空隙率の関係を最も良く表すのが以下の Brailsford モデルである。

$$\lambda_e = \frac{(3\varepsilon - 1)\lambda_a + (2 - 3\varepsilon)\lambda_w + \sqrt{\{(3\varepsilon - 1)\lambda_a + (2 - 3\varepsilon)\lambda_w\}^2 + 8\lambda_a\lambda_w}}{4} \quad (1)$$

ここで、 λ : 熱伝導率 ($\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$)、添字 e, a, w はそれぞれ有効、空気、水を表す。本式より、CT 値から推算した空隙率から熱伝導率が求められることとなる。

6) マルチスケール解析による果実内空隙率および熱伝導率分布の可視化 高解像度 X 線 CT を用いた微細構造解析より、CT 値から細胞組織の空隙率を、空隙率から熱伝導率を推算できることとなった。細胞組織レベルの解析で得られた関係を個体レベルに適用すれば、カキ果実内部の空隙率と熱伝導率分布の可視化が可能となる。周知のように、X 線 CT 測定で用いられる HU 値は、空気を -1000、水を 0 として定義される値であり、水に対する相対値で物質の粗密を評価する指標となる。理論的にはいずれの装置においても差はなく、物質固有の値が観測されるべきであるが、実際は線源の特性の違いや安定性などによって値にばらつきが生じる。このため、数種類の基準物質を用いたキャリブレーションや装置の特性によらないロバスト制御法の開発などが求められている (Roa *et al.*, 2015)。ここでは、空隙率を基準に両装置間のキャリブレーションを行った。

(2) 原子間力顕微鏡 (AFM) による青果物微細構造解析

① 供試材料 供試材料として、直径 15mm、長さ 10mm 円柱状に成形したニンジンを用いた。

② ブランチング処理 実験では、生の材料と 95°C で 2 分間ブランチング処理 (HTB)、60°C で 60 分ブランチング処理 (LTB)、LTB 処理の後 HTB 処理した試料を準備し、水溶性 (WSP)、キレート可溶性 (CSP)、稀アルカリ可溶性ペクチン (DASP) の構造変化を AFM によって観察した。

③ AFM 観察 ペクチン鎖の特徴量計測実験では、生のニンジンから各種処理によって抽出した各種ペクチン懸濁液を雲母劈開面上に滴下、乾燥し、これを観察用試料とした。AFM 計測はタッピングモードで行い、 $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ 面をスキヤニングすることで 3D 情報を取得、SPIP 6.6.4 ソフトウェア (Image Metrology) を用いてフィルタリング処理し、AFM 立体画像を得た。

4. 研究成果

(1) 解像度が異なる X 線 CT 画像マルチスケール解析による青果物の品質評価

① X 線 CT 観察 図 2 及び図 3 に X 線 CT によって撮影したカキ果実及び果肉細胞組織の CT 画像を示す。部位ごとに細胞密度に大きな差があることが確認された。高解像度 X 線 CT では、細胞と細胞間隙を区別することは可能であった。



図2 X線CTによるカキ果肉組織の縦断面図

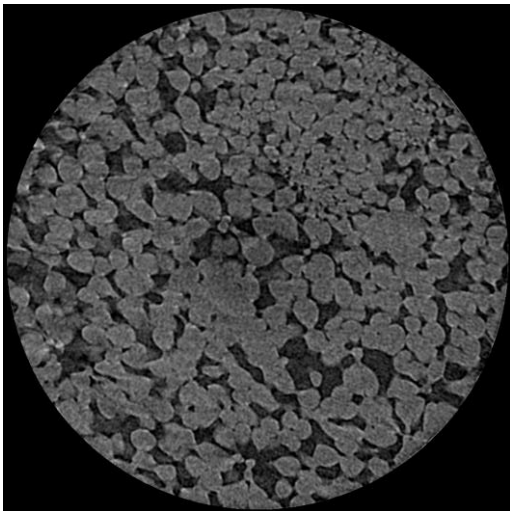
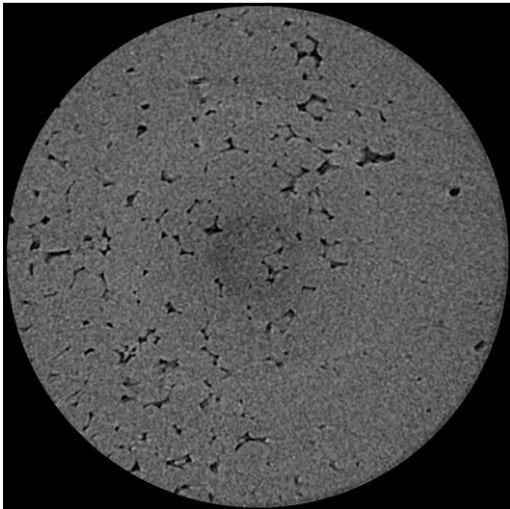


図3 μ X線CTによるカキ果肉組織の断面映像（上：密構造組織；下：疎構造組織）

② CT値の抽出、3Dジオメトリ作成、空隙率計測 図4に3Dサンプルの空隙率と平均CT値の関係を示す。得られた結果に以下のLogistic式を当てはめた結果、両者の間には、高い相関関係があることが示された。

$$\text{空隙率(\%)} = 137.2 - \frac{136.8}{1 + \left(\frac{x}{-590.7}\right)^{1.9}}$$

(2)

これにより、カキ細胞組織において、CT値から空隙率を推定可能であることが示された。

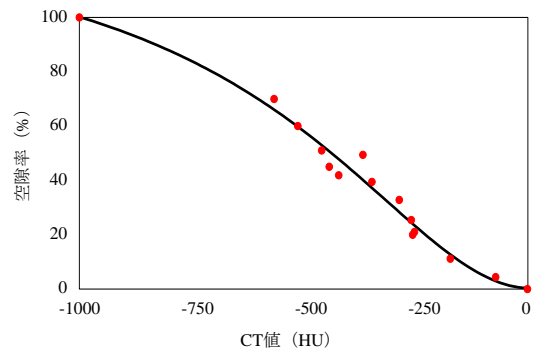


図4 空隙率とCT値の関係（●：測定値；—：近似値）

③ 三次元微細構造モデルを用いた熱解析による熱伝導率の推算 空隙率の異なる各モデルを用いて数値解析により求めた底面の平均温度の経時変化を図5に示す。空隙率の増加に伴い底面の平均温度が一定に達するまでの時間も長くなった。これは、空気の熱伝導率が水と比べてかなり小さいため、空隙率の増加に伴いモデル全体において熱が伝わりにくくなったことが理由である。以上のことから、空隙の有無が熱移動に影響を与えていることが確認され、カキ果肉細胞組織における熱移動解析では、空隙を考慮したモデルの必要性が示された。図6に、熱解析及び

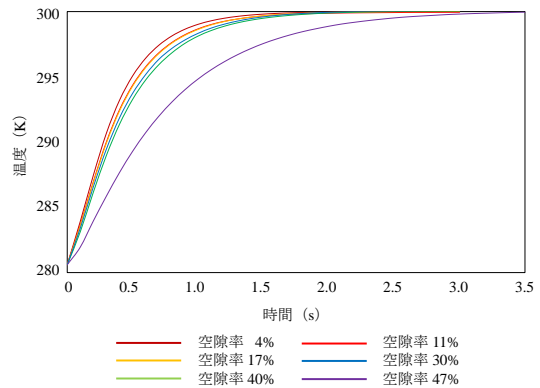


図5 空隙率の違いによるカキ果肉細胞組織モデル底面の平均温度変化への影響

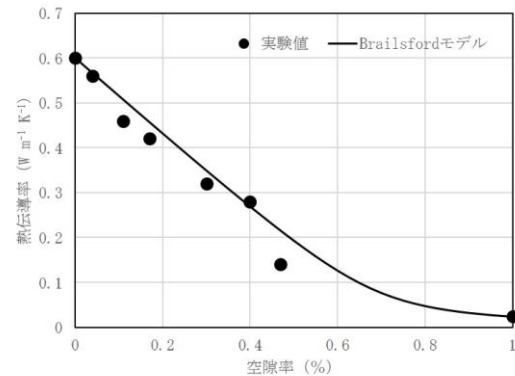


図6 熱伝導率の空隙率依存性

Brailsford モデル計算によって得られた有効熱伝導率の空隙率依存性を示す。両者の比較の結果、平均二乗誤差 RMSE は $0.041 \text{ (W m}^{-1} \text{ K}^{-1})$ となり高い適合性が示された。以上のことから、カキ果実の細胞組織における熱伝導率の推算には、連続相中に球形粒子が不規則に分散すると仮定した Brailsford モデルが適すると結論した。

④ マルチスケール解析による果実内空隙率および熱伝導率分布の可視化 図7にカキ果実の X 線 CT 画像と式(1)と式(2)を基に算出した空隙率と熱伝導率の分布を図示する。両式を介することによりカキ果実の X 線 CT 画像から空隙率と熱伝導率分布の可視化が可能となった。すなわち、両式が両スケール間の橋渡しをする役目となるということである。図から明らかのように、ヘタ下中央付近に CT 値の低い部分が存在し、疎な構造が広がることが分かる。カキでは貯蔵中ヘタ下から水分が抜け、中央部の空隙が広がることが確認されている。その他、キュウリについては胎座部に比べ果肉部に空隙が広がることが観察されている(大島ら、2015)。このように、青果物の貯蔵では内部構造変化に由来する品質変化が X 線 CT で容易に観察できる。マルチスケール観察による品質評価は、個体レベルの X 線 CT 画像から得られる単純な定性的情報を定量化するツールとなることが明らかとなった。

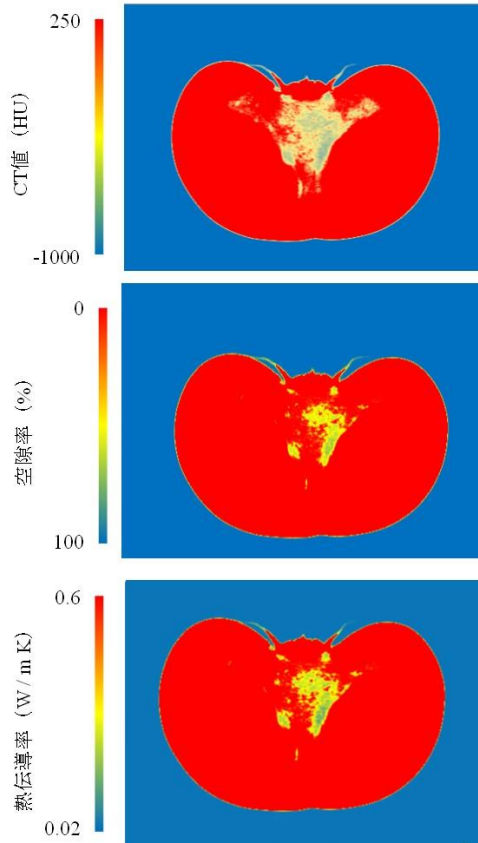


図7 カキ果実断面における各物性値分布の可視化
(上: CT 値、中: 空隙率、下: 熱伝導率)

(2) 原子間力顕微鏡 (AFM) による青果物微細構造解析

① AFM 観察 図8に MultiMode 8 AFM システム (Bruker) によって観察された生ニンジンの WSP、CSP および DASP の構造を示す。WSP は粒状、CSP と DASP は網目状構造を持つことが示され、この発達は DASP において顕著であった。

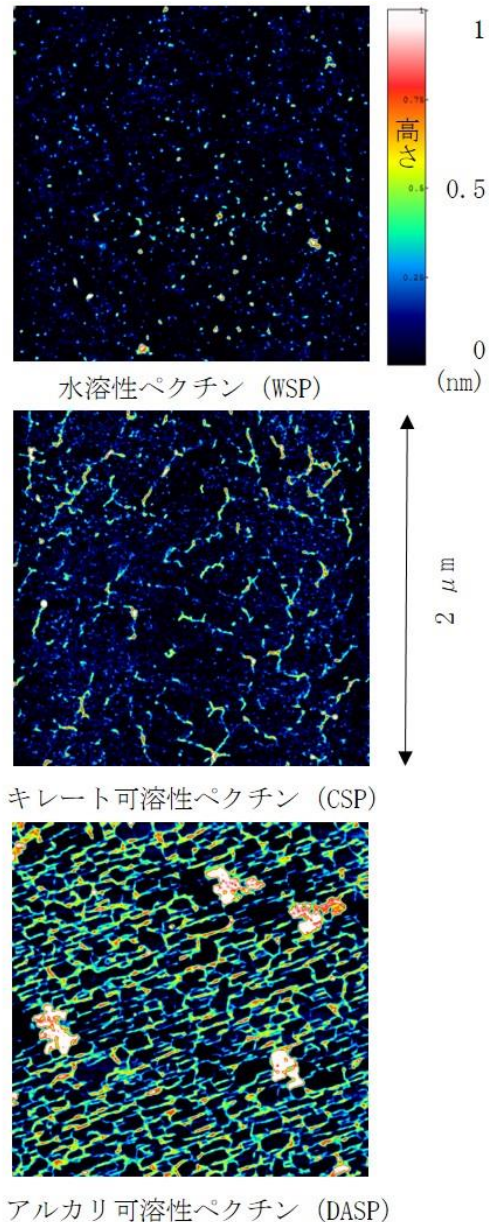


図8 各種ペクチンの AFM 観察結果

② ブランチングがペクチン鎖構造に与える影響 LBT 処理では、WSP 構造についての差は他とは認められなかったものの、CSP と DASP の鎖状構造をより複雑化することが分かった。つまり、LBT 処理はニンジン加熱処理した際にも硬さの維持に役に立つということである。AFM 観察データを基にペクチン鎖の長さ、厚さ(高さ)分布を調べ、ブランチング処理条件の違いによるペクチン鎖構造への影響を定量的に明らかにした。ペクチン鎖の網目構造の複雑さが失われるとニ

ンジンの硬度も軟化する傾向にありことから、ナノレベル構造はマクロレベルの力学的特性に密接に関連することが確認された。

参考文献

- Barcelon, E. G., Tojo, S. and Watanabe, K., 1999. X-ray Computed Tomography for Internal Quality Evaluation of Peaches. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 73, 323-330.
- Cantre, D., Herremans, E., Verboven, P., Ampofo-Asiama, J. and Nicolaï, B., 2014. Characterization of the 3-D microstructure of mango (*Mangifera indica* L. cv. *Carabao*) during ripening using X-ray computed microtomography. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 24, 28-39.
- Herremans, E., Melado-Herreos, A., Defraeye, T., Verlinden, B., Hertog, M., Verboven, P., Val, J., Fernández-Valle, M. E., Bongaers, E., Estrade, P., Wevers, M., Barreiro, P. and Nicolaï, B. M., 2014. Comparison of X-ray CT and MRI of watercore disorder of different apple cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 42-50.
- Herremans, E., Verboven, P., Bongaers, E., Estrade, P., Verlinden, B. E., Wevers, M., Hertog, M. L. A. T. M., Nicolaï, B. M., 2013. Characterisation of 'Braeburn' browning disorder by means of X-ray micro-CT. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 114-124.
- Herremans, E., Verboven, P., Hertog, M. L. A. T. M., Cantre, D., van Dael, M., De Schryver, T., Van Hoorebeke, L., Nicolaï, B. M., 2015. Spatial development of transport structures in apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit. *Frontiers in Plant Science*, 6, Article 679, 1-14.
- Kozioł, A., Cybulska, J., Pieczywek, P.M., Zdunek, A., 2017. Changes of pectin nanostructure and cell wall stiffness induced in vitro by pectinase. *Carbohydrate Polymers*, 161, 197-207.
- Mebatsion, H. K., Verboven, P., Ho, Q. T., Verlinden, B. E. and Nicolaï, B. M., 2008. Modelling fruit (micro) structures, why and how? *Trends in Food Science and Technology*, 19, 59-66.
- 大島和子、名城昂平、田中史彦、内野敏剛、2015、X線CT画像による青果物の内部構造の可視化、第75回農業食料工学会年次大会、京都大学（京都市）。
- Roa, A. M. A., Andersen, H. K. and Martinsen, A. C. T., 2015. CT image quality over time: comparison of image quality for six different CT scanners over a six-year period. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, 16(2),

350-365.

Zdunek, A., Kozioł, A., Cybulska, J., Lekka, M., Pieczywek, P.M., 2016. The stiffening of the cell walls observed during physiological softening of pears. *Planta* 243, 519-529.

Zdunek, A., Kozioł, A., Pieczywek, P.M., Cybulska, J., 2014. Evaluation of the nanostructure of pectin, hemicellulose and cellulose in the cell walls of pears of different texture and firmness. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3525-3535.

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2件）

① F. Tanaka et al., 2018, Determination of thermal diffusivity of persimmon flesh tissue using three-dimensional structure model based on X-ray computed tomography, *J. Food Eng.*, 査読有 221, 151-157.

② T. Imaizumi, F. Tanaka, D. Hamanaka, Y. Sato, T. Uchino, 2015, Effects of hot water treatment on electrical properties, cell membrane structure and texture of potato tubers, *J. Food Eng.*, 査読有 162, 56-62.

〔学会発表〕（計4件）

① 大島和子、名城昂平、田中史彦、内野敏剛、X線CTによる青果物の内部構造の可視化、農業食料工学会第75回年次大会、2016、京都大学（京都市）

② 内野敏剛、田中史彦、CFD/CAEアプローチによるポストハーベストシステムの最適化、FOOMA Japan 2016、アカデミックプラザ、2016、東京ビッグサイト（東京都江東区）

③ T. Imaizumi, F. Tanaka, Y. Sato, Y. Yoshida, T. Uchino, Relationships of texture, porosity, electrical properties and CT value of heated sweet potato, CIGR-AgEng2016, 2016, Aarhus, Denmark

④ 今村桂太郎、田中史彦、内野敏剛、青果物の三次元微細構造解析と熱移動シミュレーション、第70回農業食料工学会九州支部例会、2016、九州大学（福岡市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 史彦 (TANAKA, Fumihiko)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30284912

(2) 研究分担者

内野 敏剛 (UCHINO, Toshitaka)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：70134393