

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05853

研究課題名（和文）紫外光励起蛍光分光画像計測による農産物の蛍光指紋抽出と品質評価

研究課題名（英文）Extraction of fluorescence fingerprint and quality estimation for agricultural products using a fluorescence spectroscopic imaging method with UV-light excitation

研究代表者

小林 太一（Kobayashi, Taichi）

宮崎大学・研究・産学地域連携推進機構・准教授

研究者番号：40541355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：非破壊の農産物品質評価技術の確立に向けて、紫外光励起蛍光分光画像法を用いたシステムを試作した。本システムは、紫外励起光源（375nm LED）、試料架台、冷却CMOSカメラ、システム制御用PC等から構成される。低温貯蔵ヘベスは経日的に障害が進行し、同時に蛍光強度が増加する傾向が見られたことから、このシステムはヘベスの低温障害のモニタリングに利用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、蛍光分光計測と画像を一体化した蛍光指紋イメージングにある。これまで蛍光分光光度計を用いて局所的に計測し蛍光分光解析及び蛍光指紋測定によって農産物等の品質評価されてきたものを面として広範囲に検知することが可能となる。また、社会的意義は、これまで以上に多様化する食のサプライチェーンにおいて食の安全・安全性、高品質の担保が可能となる。

研究成果の概要（英文）：To develop a system that measures the agricultural products, we selected a technology that utilizes a fluorescence spectroscopic imaging method with UV-light excitation. The system consists of a blue LED(365nm) with a low-pass filter, a cooled CMOS camera with an Varispec liquid crystal tunable filter to capture the fluorescence image on a PC, and image processing software for measuring the fluorescence intensity of the image. Deterioration and/or low temperature injury of stored hebesu advanced as storage period lengthened, and simultaneously the tendency for fluorescence intensity increased, indicating that this system can be used for monitoring low temperature injury of hebesu.

研究分野：農業環境工学および農業情報工学関連

キーワード：紫外励起 蛍光分光画像 蛍光指紋 品質評価 非破壊計測

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。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食品や農産物の非破壊・迅速評価は分光光度計を用いた分光学的手法を中心に展開された。分光原理では紫外～近赤外の吸収・反射はもちろん、蛍光やラマン分光に至る。また、目的とする品質成分が不均一に含まれる農産物の場合、照射された部分(単点)の平均的なスペクトル情報に留まることから、幅広い波長感度をもつカメラと分光素子を組み合わせた方法で、出力にピクセル一つ一つにスペクトル情報を格納させたハイパースペクトルイメージング手法を用いた評価技術も考案されてきた「池羽田, 食品の非破壊・迅速評価, SUNATEC e-Magazine vol.162」。さらに、近年では蛍光分光光度計を用いた蛍光指紋及び紫外励起蛍光カラー画像などから農産物の品質評価などが報告される。しかしながら蛍光画像では自家発光が微弱であることが多いため、ハイパースペクトルイメージングを適用した評価技術、及びピクセルごとの蛍光指紋を導き農産物の品質評価に適応した例は見当たらない。

### 2. 研究の目的

本研究では第一の目的として、自家発光が微弱な蛍光を捉えるための紫外励起蛍光分光画像撮影システムの構築を行う。第2の目的として、構築したシステムを用いて農産物の品質評価として①. 蛍光分光画像を用いた品質成分の疑似可視化、②. 複数の紫外光励起を用いて取得した蛍光画像からの蛍光指紋取得とその解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 紫外励起蛍光分光画像撮影システムの構築

自家発光が微弱な蛍光画像を撮影するため、励起光強度を強くし蛍光強度を稼ぎ、高感度検出器を用いることとした。

#### (2) 農産物の品質評価

##### ①. 蛍光分光画像を用いた品質成分の疑似可視化

宮崎県の特産果実であるへべすを対象としてその鮮度評価及び疑似可視化を行った。鮮度指標とされる果実表面の緑色保持について、異なる低温貯蔵過程における状態変化(クロロフィル(以後 Chl)含有量と重量変化)を紫外光励起蛍光分光画像から観察した。

- ・供試材料と貯蔵：へべすは、宮崎県日向市(K農園株)で露地栽培された105個を選別した。それら35個ずつ3種類の貯蔵方法において、それぞれ2週あたり5個のへべすを画像撮影及び化学分析を行った。貯蔵は、低温用エアコン(ダイキン工業：LCDMDK02BAS)を用いて試験区1では貯蔵庫内温度が6℃、湿度が80%、試験区2では温度2℃、湿度80%になるように貯蔵庫を制御した。へべすの低温障害を低減することを目的として、試験区3では温度2℃、湿度80%下で、1週間に1回、貯蔵庫内が24時間10℃になるように制御し、中間温度処理を行った。

##### ・紫外励起蛍光分光画像撮影装置と撮影

- 4.(1)で示す画像撮影システムを用いて420-750nm(10nm間隔)の蛍光分光画像を取得した。
- ・化学分析：へべすのChl.a含有量は、果皮のみを採取しミルで粉碎後、ヘキサソール30mLを加え24時間静置した。その後、濾過物にアセトン20mlを加え2時間静置した後、そのろ液をマイクロプレートリーダーにより蛍光測定した。励起波長は325nmとし、635~775nmの間の蛍光ピーク面積を算出、標準試料を用いた検量線法によりChl.aの定量を行った。
- ・解析方法：画像処理及びスペクトル作成：自作の画像処理プログラム(MATLAB R2020A)により、①画像全体から目的とするサンプルを切り出し、②背景除去(背景の輝度平均値を閾値に設定)、③抽出したサンプルのみの各画像の輝度値を算出、④その平均値と階調値分布算出を行った。データ処理は蛍光強度比率(740nm/680nm)からChl.a含有量の推定、及び蛍光分光画像から求めた波長ごとの蛍光強度を説明変数、化学分析値を目的変数として多変量解析(SPSS Statistics21)により検量線の作成を行った。

##### ②. 複数の紫外光励起を用いて取得した蛍光画像からの蛍光指紋取得とその解析

- ・供試材料と貯蔵：へべすは、宮崎県日向市で栽培された露地もの10個を供試した。貯蔵は、-1℃の恒温恒湿チャンバとし、17日間貯蔵し経日的に画像撮影を行った。
- ・蛍光ピーク計測：へべすの蛍光ピークの観察は蛍光分光光度計(HITACHI社製：F-7100)を用いた蛍光指紋計測により行った。励起波長範囲は250-380nm、蛍光波長範囲は390-750nm、測定波長間隔は10nm、スリット幅は10nmとした。また、分光器特有の高次光(2次光, 3次光など)の不要光を除去するため、カラーガラスLPフィルター(SCHOTT：GG400)を挿入した。
- ・紫外励起蛍光分光画像撮影装置と撮影
- 4.(1)で示す画像撮影システムを用いて420-750nm(10nm間隔)の蛍光分光画像を取得した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 紫外励光励起蛍光画像撮影システムの構築

構築した撮影システムの構成は、冷却 CMOS カメラ(BITRAN 社製: CS-66UV)、レンズ(PENTAX 社製、H1212B TV)、液晶フィルター(CRI 社製 VS-V153-10-HC-20)から構成した。照明は、励起用紫外 LED(OPTOSUPPLY 社 OSV1YL5111A(ピーク波長 365nm、出力 4mW、視野角 15°))を 100 個用いた紫外 LED 照明アレーを 8 灯作製し、対象物から約 15cm 上方、約 40 度の角度で 8 方向から均一に照射した。なお、励起光源と対象物の間には LED から発せられる可視光成分を除去するために紫外線透過可視吸収フィルター(シグマ光機社製、UTVAF-50S-34U)を挿入した。撮影は、外乱光の影響がない暗室で行った。

##### (2) 農産物の品質評価

###### ①. 蛍光分光画像を用いた品質成分の疑似可視化

- ・へべすの状態変化: 試験区 1 は貯蔵 28 日、試験区 2 は 57 日で黄化現象が確認され、この時の Chl.a 含有量は約 18( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )であった。試験区 3 は貯蔵 84 日も緑色が保たれ Chl.a 含有量は約 43( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )であった(図 1)。この時、へべす重量はすべての試験区において貯蔵 28 日で果実の商品価値失われる「田中史彦. 低温高湿度保持コンテナの開発, 農林統計出版, 2016, 163.」とされる 5%減少を上回った。以上より、へべすの鮮度指標は 30( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )あたりが妥当と考えられた。
- ・紫外励光励起蛍光分光画像を用いた Chl.a 含有量の推定: 図 2 に蛍光強度比率 740nm/680nm と Chl.a 含有量の関係を示す。R=0.81 と比較的高い相関を示した。その関係は線形でなく低 Chl.a 含有量を推定する指標としては有効であるが、Chl.a 含有量が増えると誤差が大きくなる「大政謙次. 植物のクロロフィル a 蛍光の画像化とリモートセンシングにおける問題点と展望-細胞から地球観測まで-, 日本リモートセンシング学会誌 38(5), 2018, 386-400.」。そこで、多変量解析により線形の検量線を作成したところ、図 3 に示すように実測値と予測値の関係は R=0.87 と一定の精度が示された。
- ・疑似可視化: ピクセル毎に検量線を適用し、疑似可視化した。次に、鮮度限界値(閾値: Chl.a30( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )以上)のピクセル割合を求め、品質評価の策定を行った。その結果、疑似可視化における鮮度値限界値を超すピクセル割合が 75%の試料において、鮮度保持されることが確認できた。なお、個体選別(n:10)の正解率は 80%であった。
- ・異なる貯蔵環境下におけるへべすの鮮度指標となる Chl.a 及び重量変化の推移と紫外励光励起蛍光分光画像を用いた Chl.a 含量の非破壊計測の可能性が確認できた。

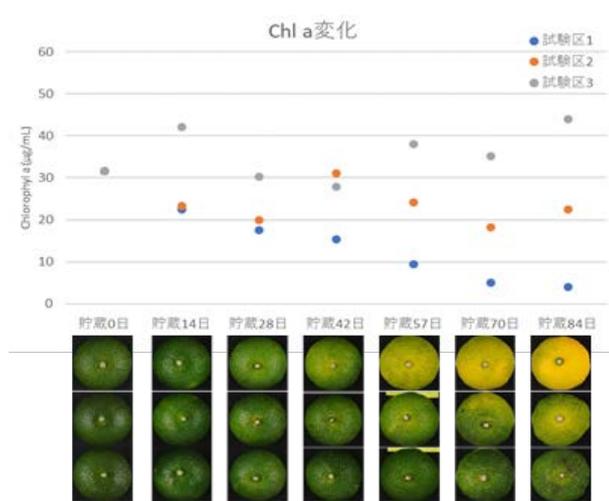


図 1. 異なる貯蔵方法によるへべすの Chl. a の変化

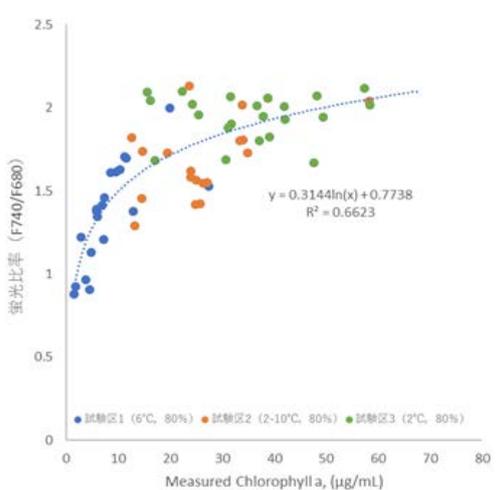


図 2. Chl. a 含有量と蛍光比率の関係

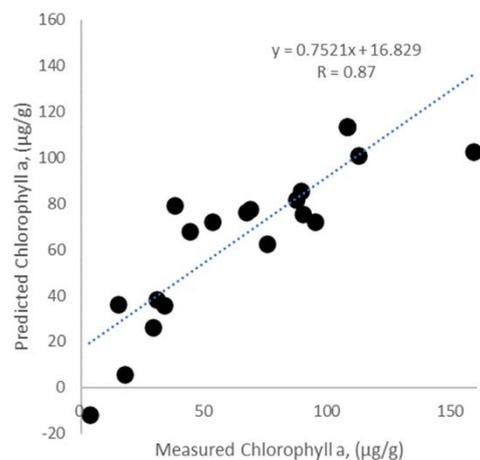


図 3. 多変量解析に求めた Chl. a 含有量推定値と実測値の関係

②. 複数の紫外光励起を用いて取得した蛍光画像からの蛍光指紋取得とその解析

- ・ 蛍光ピーク計測：図 4a)に貯蔵前、図 4b)に貯蔵 7 日目の蛍光指紋の一例を示した。貯蔵前のへべすは励起/蛍光波長が①345/420、②290/450、③315/540、④320/680 および⑤375/740nm、貯蔵 7 日目で⑥375/740nm の位置に蛍光ピークが確認された。①はシネセチンもしくはノビレチン、②はヘプタネトキシフラボン、③はカロテン、④⑤及び⑥はクロロフィルに由来するピークと推察する 3)。図 4c)は貯蔵前後において蛍光ピークが確認された励起波長 375nm における蛍光スペクトルを示す。目視では同緑色に見えるへべすにおいてクロロフィル由来の 740nm の蛍光強度の差は顕著に示された。
- ・ 蛍光分光画像：前述結果に基づき、紫外励起光 365nm で撮影した蛍光分光画像(740nm)及びRGB画像からみたへべすの経日的状態変化の一例を図 5 に示した。図 6 は図 5 で撮影した a) 正常果実、b) 障害果実の蛍光強度を経日的にプロットしたものである。a)正常果実における RGB 画像を目視で確認すると外観色の経日変化が軽微であり、蛍光強度も同様に推移した。一方、b) 障害果実では 8 日目あたりから褐変を示し、蛍光分光画像では経日的に変化の程度(白みがかっている領域の面積)も大きくなるのが観察され、これに伴い蛍光強度も増加することが判った。次に、障害が生じる初期の段階、すなわち、品質低下の予兆がある段階について図 2 b)から観察すると、目視段階では 8 日目から褐変するのに対し、蛍光分光画像では緑色を示す 6 日目より蛍光を発する白みがかっている領域を捉えることが観察された。
- ・ 紫外励起蛍光分光画像の蛍光強度を用いて緑色を保つへべすの貯蔵初期状態の変化を捉えることが確認できたことから、低温障害等の予兆の可能性が伺える。今後、鮮度との関係等を明らかにし貯蔵環境制御への適応を試みる。
- ・ 一方、生菌や微生物固有等の蛍光指紋の導きについては、撮影・照明条件の設定及び迷光やノイズ除去等の画像処理に時間を要し、多変量解析、AI 解析及びデータマイニングにより品質評価指標には至らなかった。

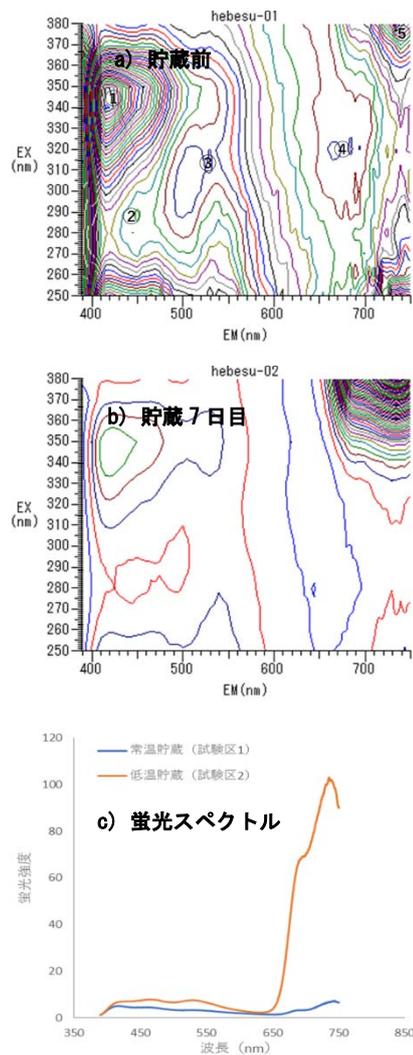


図 4. 貯蔵 7 日目におけるへべすの蛍光指紋及び励起波長 375nm 蛍光スペクトル

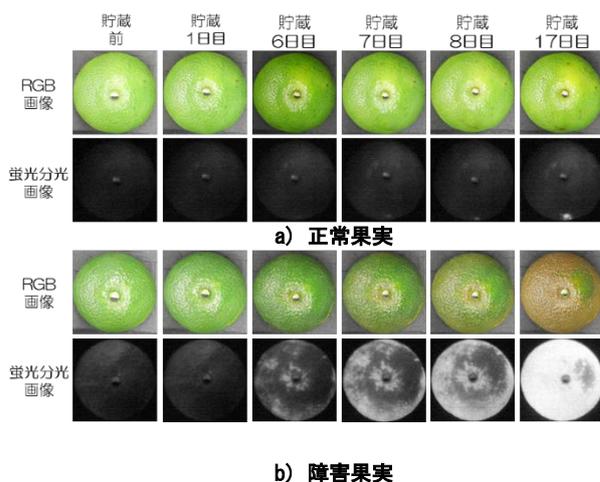


図 5 紫外励起蛍光分光画像及び RGB 画像からみた低温貯蔵へべすの経日的状態変化の一例

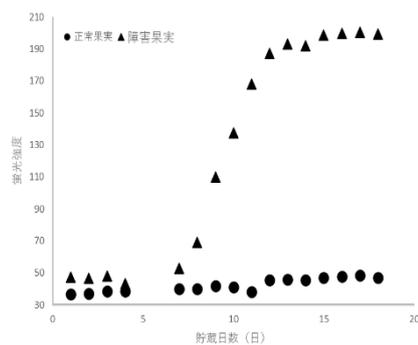


図 6. 図 5 における a) 正常果実、b) 障害果実の蛍光強度経日的推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林太一 日吉健二 槐島芳徳 松本朋子 西本素三 辻本 祐加子 境健太郎
2. 発表標題 紫外光励起蛍光分光画像によるへべすの鮮度評価について～貯蔵過程におけるクロロフィルの推移～
3. 学会等名 日本生物環境工学会2022年福岡大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 境健太郎 日吉健二 槐島芳徳 松本朋子 西本素三 辻本 祐加子 小林太一
2. 発表標題 紫外線励起蛍光スペクトル法による農産物の品質評価
3. 学会等名 日本生物環境工学会2022年福岡大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日吉健二 小林太一 槐島芳徳 松本朋子 境健太郎 西本素三 辻本祐加子
2. 発表標題 へべすの鮮度評価技術に関する研究 - 機械学習を用いたカラー画像によるクロロフィル a 含有量の推定 -
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 小林太一 日吉健二 槐島芳徳 松本朋子 西本素三 境健太郎 辻本 祐加子
2. 発表標題 紫外光励起蛍光分光画像による農産物の品質評価～へべすの貯蔵過程における状態変化～
3. 学会等名 日本生物環境工学会2023年豊橋大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 境健太郎 日吉健二 槐島芳徳 松本朋子 小林太一 西本素三 辻本 祐加子
2. 発表標題 紫外線励起蛍光カラー画像による農産物の品質評価～宮崎特産露地へべすの貯蔵過程による状態変化～
3. 学会等名 日本生物環境工学会2023年豊橋大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 判定装置	発明者 小林太一 他11名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-068891	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 判定装置	発明者 小林太一 他11名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT2022018225	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 判定装置	発明者 小林太一 他11名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7317324号	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------