

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850172

研究課題名(和文) 生体内水の運動性と膜機能との関係解明に基づく青果物品質の評価・診断技術の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation/diagnosis technology for quality in fruits and vegetables based on the dysfunction of cell membrane

研究代表者

黒木 信一郎(Kuroki, Shinichiro)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00420505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：収穫後のホウレンソウ葉を対象として、特に外観的症状等が生じる以前の潜在的な青果物の鮮度低下過程における生体膜の透過性と膜脂質過酸化物の変化について定量的な検討を行うと共に、それらの非破壊計測技術を開発することを目的とした。その結果、膜脂質過酸化物が膜透過性の増大に先行して増加することを明らかとすると共に、膜透過性増大をもたらす脂質過酸化物の蓄積量に閾値が存在することを示した。また、イオン漏出速度定数とマロンジアルデヒド当量について、決定係数0.5以上の予測モデルの構築が可能であることを示し、可視近赤外スペクトルを用いた生体膜の健全性評価とそれに基づく青果物の鮮度評価の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were to examine the changes in permeability and lipid peroxide of biomembrane in postharvest spinach leaves, and to develop nondestructive measurement technology for those properties using visible and near infrared spectroscopy. Results revealed that membrane lipid peroxide was gained prior to the increase in membrane permeability, suggesting that there is a threshold in the accumulation of lipid peroxide to increase membrane permeability. It was possible to construct calibration models having an R-square value above 0.5 for rate constant of ion leakage and malondialdehyde equivalent. This study gave the possibility of freshness evaluation of fruits and vegetables based on health assessment of the biomembrane using visible near-infrared spectroscopy.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：可視近赤外分光法 脂質過酸化物 膜透過性

### 1. 研究開始当初の背景

貯蔵時間の経過に伴うオオムギ子葉鞘の  $T_1$  緩和時間の増大や、低温障害の進行に伴うキュウリ果実の  $T_1$  緩和時間の増大などを示した研究例がある。これらの研究成果で示された青果物内部における水の運動性の増加は、老化や生理障害の進行に伴う生体膜の機能劣化によるものであると予想されている。しかし、生体膜が受けたダメージの程度について明確に検討されたデータは、国内外を問わず未だ報告されておらず、また膜機能の劣化が青果物組織内の水移動に与える影響については未解明であった。

### 2. 研究の目的

植物組織における鮮度低下の初期的かつ基本的な原因は細胞膜の機能低下であると予想されており、これまで細胞膜の膜透過性を表す指標であるイオン漏出割合や水伝導係数が鮮度劣化の進行に伴い変動することや、細胞膜脂質の過酸化の進行程度を表す指標であるマロンジアルデヒド(MDA)当量が、収穫後遭遇した積算温度と高い正の相関があることが報告されている。しかしながら鮮度低下に伴い変化する膜透過性に関する複数の指標の関係を比較した研究例はほとんどない。また、細胞膜の機能低下過程において細胞膜の透過性増大は、膜脂質過酸化物の蓄積が起因となって生じていることが報告されているものの、膜脂質過酸化物量と膜透過性の定量的関係にまで言及された例は見られない。そこで本研究では、収穫後に細胞膜が受けたダメージの程度を、膜透過性の指標と膜脂質過酸化の指標によって評価し、ホウレンソウ葉の細胞膜機能低下過程における膜透過性と膜脂質過酸化物の変化の関係を定量的に検討すると共に、それらの非破壊計測技術を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

供試材料には、温室栽培したホウレンソウ葉(*Spinacia oleracea* L., cv. ‘オーライ’)を用いた。20°C設定のインキュベーター内に設置した計測チャンパー内に、収穫したホウレンソウを静置し、暗黒条件下で最大8日間貯蔵した。チャンパー内のガス濃度は、加湿した所定の濃度( $O_2$ : 5, 10, 20%;  $N_2$ : balance)のガスを毎分10 mLで通気させることにより一定に制御した。所定の貯蔵期間終了後のサンプルについて、維管束を避けた葉肉部から切片を作成し、電気伝導度計を用いたイオン漏出割合(IL)およびイオン漏出速度定数(Ks)の測定に供試した。また、葉肉プロトプラストを単離し、周囲の溶液を0.4 M から0.6 M マンニトール溶液に瞬時に置換した際の、浸透脱水過程におけるプロトプラストの体積収縮を観測することで細胞膜水伝導係数(Lp)を算出した。サンプルの残りは、真空凍結乾燥後、チオバルビツール酸反応物質(TBARS)法によるMDA当量測定に供試した。

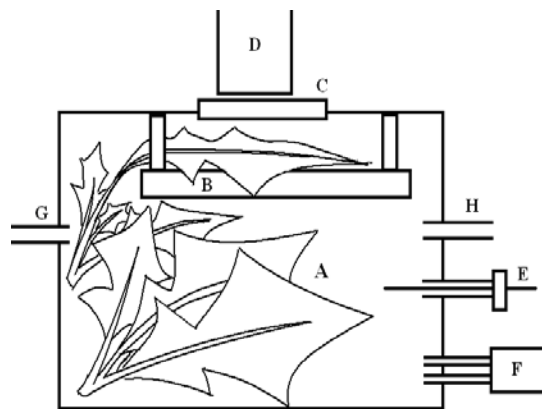


図1 スペクトル計測チャンパー

A: ホウレンソウ葉; B: セラミック反射板; C: 石英窓; D: 分光光度計のプロブ; E: 酸素センサー; F: 二酸化炭素センサー; G: ガス流入口; H: ガス排出口

収穫直後、および所定の貯蔵期間終了直後におけるホウレンソウ葉の可視近赤外拡散反射スペクトル(波長範囲: 588.19-1091.74 nm, 分解能: 2 nm, 露光時間: 12 msec)を計測した。石英ガラス窓とチャンパー内に設置したセラミック製の反射板との間に静置されたホウレンソウ葉1枚の拡散反射スペクトルを、チャンパーの外側から石英窓を通して、非接触で取得した(図1)。測定波長領域は592から1092 nm、波長分解能は2 nmであった。1葉につき異なる5点から取得したスペクトルを説明変量、対応する試料株の葉から計測したIL、Ks、Lp、MDA当量のそれぞれを目的変量とし、部分最小二乗回帰分析(PLSR)を用いて検量モデルを作成した。ノイズ領域を除いた波長範囲620~1070 nmのスペクトルに対して、サビツキ-ゴレイ平滑化(11点の対称カーネル)、およびSNV処理によるデータ変換を行った。最適潜在変数の決定にはLeave one sample out cross validationを使用した。全ての計算に用いたソフトウェアは、多変量解析ソフト The Unscrambler (ver. 10.3, CAMO)であった。

### 4. 研究成果

#### (1) 膜透過性の経時変化

収穫後経過日数の増加に伴うイオン漏出割合(IL)、イオン漏出速度定数(Ks)、水伝導係数(Lp)の推移を図2に示した。貯蔵酸素濃度20%試験区では、いずれの指標も収穫後経過日数の増加に伴い増大した。低酸素貯蔵区である酸素濃度5%および10%試験区のLpは、収穫後2日目に貯蔵酸素濃度20%試験区と比べ有意に増大が抑制された。今回測定した3つの膜透過性に関する指標においては、Lpが最も鮮度劣化に対して鋭敏に応答することが示された。

#### (2) 膜脂質過酸化物量と膜透過性との関係

各試験区における膜脂質過酸化物量の平均値と膜透過性に関する指標の平均値との関係を図3に示した。脂質過酸化物量の増大が膜

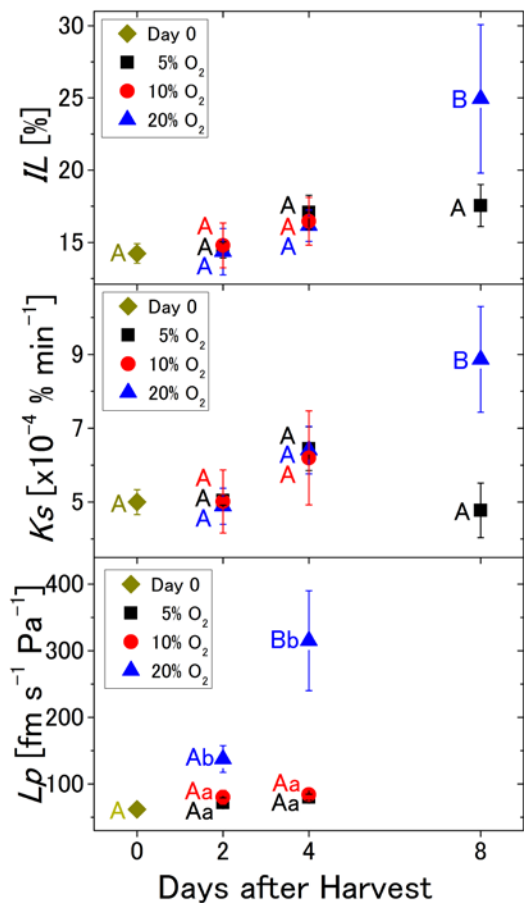


図2 膜透過性指標の変化

図中のバーは標準誤差を、AおよびBは同一酸素濃度区における、aおよびbは同一貯蔵日におけるチューキーのHSD検定( $p < 0.05$ )による有意差を示す。

透過性の増大に先行して生じていることが確認された。 $L_p$ はMDA当量が約 $150 \text{ nmol gDW}^{-1}$ の付近に、ILはMDA当量が約 $200 \sim 450 \text{ nmol gDW}^{-1}$ の付近に達すると有意に増大した。これらにより、膜透過性の増大は、膜脂質過酸化物が一定の閾値以上になったことによって生じることが明らかとなった。生体膜を構成する脂質二重膜には、本来リン脂質により隙間なくパックされた液晶構造をしている。しかし、老化時にはリン脂質が選択的に減少し、リン脂質の分解産物、およびその過酸化物の蓄積が発生して膜の流動性が低下し、局部的にゲル化領域が形成される。脂質二重膜にゲル化領域と液晶領域が混在する状態に陥ると二重膜のパッキングが不完全となり、とくにカチオンの透過性を高めてしまうとされる。本実験での結果は、上記の既往の学説を支持するものであり、さらに、膜透過性増大をもたらす脂質過酸化物の蓄積量に閾値が存在することを示すものであると考えられる。

### (3) 生体膜機能劣化の非破壊計測

可視近赤外拡散反射スペクトルを用いて膜透過性の指標となるIL、 $K_s$ 、 $L_p$ 、膜脂質過酸化

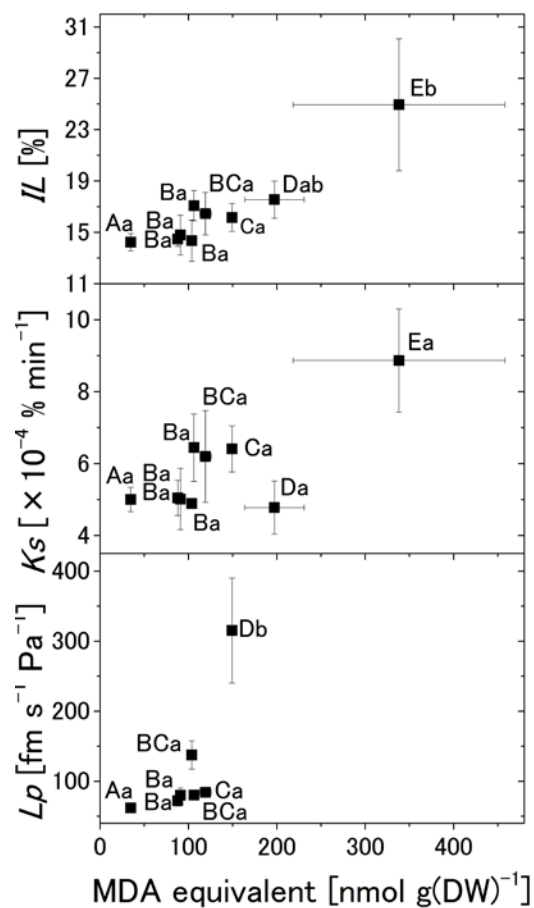


図3 膜透過性と膜脂質過酸化の関係

図中のバーは標準誤差を、A~Eは全試験区におけるMDA当量の平均値に、a~bは全試験区におけるIL、 $K_s$ 、 $L_p$ のそれぞれの平均値におけるチューキーのHSD検定( $p < 0.05$ )による有意差を示す。

の指標となるMDA当量のPLS回帰分析を行った。その結果、 $K_s$ 、およびMDA当量に対して決定係数 $R_{\text{val}}^2 = 0.5$ 以上の予測モデルの構築が可能であった一方、IL、 $L_p$ を推定するモデル式の構築は困難であった。ハウレンソウ葉内における脂質過酸化物濃度はppmオーダーであることなどから推定すると、可視近赤外拡散反射スペクトルを用いたMDA当量、および $K_s$ の推定モデルの解釈については更なる検討が必要であり、MDA当量や $K_s$ と直接的あるいは間接的に関係する要因を明らかにする必要があると考えられた。

以上、本研究は、異なる酸素濃度環境に貯蔵されたハウレンソウ葉について、細胞膜の物理化学的特性を測定し、膜透過性と膜脂質過酸化物との関係性から生体膜の機能劣化の機序を定量的に明らかにすると共に、可視近赤外スペクトルを用いた生体膜の健全性評価の可能性を示したものであり、生体膜の機能劣化を指標とした青果物の鮮度評価技術の構築に寄与する成果であると考えられる。

## 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)

- ① Makino, Y., Isami, A., Suhara, T., Goto, K., Oshita, S., Kawagoe, Y., Kuroki, S., Purwanto, Y.A., Ahmad, U., Sutrisno, 2015. 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* 21, 59-65.
- ② Ahmad, U., Sutrisno, Purwanto, Y.A., Budiastira, W., Makino, Y., Oshita, S., Kawagoe, Y., Kuroki, S., Novita, D.D., 2014. Prediction of hardness development in mangosteen peel using NIR spectroscopy during low temperature storage. *Engineering in Agriculture, Environment and Food* 7, 86-90.
- ③ Kuroki, S., Mizutani, R., Tachikawa, Y., Nakano, K., 2013. Nondestructive freshness evaluation of spinach leaves under low oxygen storage using visible and near infrared spectroscopy, In: Itoh, H., Kuroki, S. (Eds.), *The 2013 IFAC Bio-Robotics Conference*. International Federation of Automatic Control, Hotel Agora Regency Sakai, Sakai, Japan, pp. 302-306.
- ④ Makino, Y., Isami, A., Suhara, T., Oshita, S., Kawagoe, Y., Tsukada, M., Ishiyama, R., Serizawa, M., Purwanto, Y.A., Ahmad, U., Mardjan, S., Kuroki, S., 2013. Non-destructive analysis of internal and external qualities of mango fruits during storage by hyperspectral imaging, In: Kanlayanarat, S., Purwadaria, H.K., Szrednicki, G. (Eds.), *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science, Yogyakarta, Indonesia, pp. 443-449.
- ⑤ Purwanto, Y.A., Okvitasari, H., Mardjan, S., Ahmad, U., Makino, Y., Oshita, S., Kuroki, S., Kawagoe, Y., 2013. Chilling injury in green mature 'Gedong Gincu' mango fruits based on the changes in ion leakage, In: Kanlayanarat, S., Purwadaria, H.K., Szrednicki, G. (Eds.), *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science, Yogyakarta, Indonesia, pp. 219-226.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kuroki, S., Tachikawa, Y., Koizumi, K., Soga, A., Yoshida, M., Nakamura, N., Shiina, T. & Nakano, K. Measurement and evaluation of dysfunction of cell membranes in fruits and vegetables during low oxygen storage. *International Conference on Sustainable Agriculture, Food and Energy (SAFE2014)*, 2014 年 09 月 19 日, Denpasar (Indonesia)

- ② 立川雄樹, 黒木信一郎, 小泉高陽, 曾我綾香, 吉田誠, 中村宣貴, 椎名武夫 & 中野浩平. 低酸素貯蔵がホウレンソウ葉の細胞膜機能劣化に与える影響. 日本生物環境工学会 2014 年東京大会講演要旨, 2014 年 09 月 11 日, 明治大学(東京都)
- ③ 吉野哲史, 黒木信一郎, 曾我綾香, 吉田誠, 中村宣貴, 椎名武夫 & 中野浩平. コマツナの老化過程におけるカルボニル化合物含量の変化. 2014 年度農業施設学会大会, 2014 年 08 月 29 日, 神戸大学(兵庫県)
- ④ 吉田誠, 曾我綾香, 中村宣貴, 椎名武夫, 黒木信一郎 & 中野浩平. 農産物の鮮度指標となる揮発性成分の検索. 第 63 回日本食品保蔵科学会, 2014 年 06 月 28 日, JA 長野県ビル(n 長野県)
- ⑤ 曾我綾香, 吉田誠, 中村宣貴, 椎名武夫, 黒木信一郎 & 中野浩平. 施肥条件が農産物収穫後の品質保持に及ぼす影響. 第 63 回日本食品保蔵科学会, 2014 年 06 月 28 日, JA 長野県ビル(長野県)
- ⑥ 黒木信一郎, 小泉高陽, 立川雄樹, 曾我綾香, 吉田誠, 中村宣貴, 椎名武夫 & 中野浩平. 細胞膜の物理化学的特性を指標とした青果物の品質評価法の開発. 第 73 回農業食料工学会年次大会, 2014 年 05 月 18 日, 琉球大学(沖縄県)
- ⑦ 黒木信一郎, 小湊貴子, 伊藤博通 & 中野浩平. 低温貯蔵中におけるキュウリ果実内潜在ダメージの非破壊計測. 第 73 回農業食料工学会年次大会, 2014 年 05 月 18 日, 琉球大学(沖縄県)
- ⑧ 中野浩平, 黒木信一郎, 曾我綾香, 吉田誠, 中村宣貴 & 椎名武夫. 細胞膜脂質の過酸化分解系の網羅解析に基づく青果物鮮度アセスメントシステムの確立ーわさび菜の貯蔵中における脂肪酸組成の変化ー. 第 73 回農業食料工学会年次大会, 2014 年 05 月 18 日, 琉球大学(沖縄県)
- ⑨ 小泉高陽, 黒木信一郎 & 伊藤博通. 細胞膜の水透過性を指標とした青果物品質評価技術の開発. 農業食料工学会関西支部第 131 回例会, 2014 年 03 月 04 日, 大阪府立大学(大阪府)
- ⑩ Kuroki, S., Kominato, T. & Nakano, K. Nondestructive measurements of biomembrane deterioration in cucumber fruit (*Cucumis Sativa* L.) during cold storage using VIS-NIR spectroscopy. *ASEAN Regional Conference on Food Security*, 2013 年 10 月 10 日, Penang (Malaysia)
- ⑪ 小湊貴子, 黒木信一郎 & 中野浩平. キュウリ果実の低温障害進行過程における生体膜機能劣化の非破壊計測. 第 72 回農業食料工学会年次大会講演要旨, 2013 年 09 月 11 日, 帯広畜産大学(北海道)
- ⑫ 立川雄樹, 黒木信一郎 & 中野浩平. ホウレンソウ葉内脂質過酸化レベルの非破壊モニタリング技術の開発. 第 72 回農業

食料工学会年次大会講演要旨, 2013 年 09 月 11 日, 帯広畜産大学(北海道)

- ⑬ 牧野義雄, 勇垂衣子, 栖原健比呂, 後藤健次郎, 大下誠一, 川越義則, 黒木信一郎, プルワントヨハネスアリス, アフマドウスマン & ストリスノ. ハイパースペクトルカメラによる貯蔵中マンゴの果皮色及び内部品質の非破壊評価. 日本食品工学会第 14 回(2013 年度)年次大会, 2013 年 08 月 10 日, 京都テルサ(京都府)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕 (計 0 件)

〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

黒木 信一郎 (KUROKI SHINICHIRO)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 00420505

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし