

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02304

研究課題名（和文）4D(xy t)画像解析による収穫後青果物の非破壊非接触鮮度評価

研究課題名（英文）Non-destructive and non-contact freshness evaluation of postharvest fruits and vegetables by 4D image analysis

研究代表者

黒木 信一郎（KUROKI, Shinichiro）

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00420505

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：葉肉細胞の浸透圧応答の観察によって、細胞膜の力学および水輸送物性に、プロトプラスト単離条件そのものが与える影響を明らかにすると共に、単離操作がもたらす効果が貯蔵条件によって異なることをも活用した鮮度評価を提案した。また、従来の破壊的測定法で課題となっていたH₂O₂濃度測定の不確実性を克服すると共に、当該手法によって取得可能となったH₂O₂濃度をハイパースペクトル画像から非破壊的に推定する計測手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロトプラスト単離操作の影響を踏まえた上での膜物性評価法が確立された。また、酸化ストレスマーカーの空間分布とその時間変化のモニタリング技術が開発された。当該技術は、フードサプライチェーンの過程において、生産者の栽培管理能力や流通業者の品質管理能力の評価、あるいは日持ち性の高い品種選抜などに応用可能であり、産物の高品質化や収穫後のロスと廃棄の低減にも寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Microscopic observations of the osmotic response of spinach mesophyll cells clarified the effect of the protoplast isolation protocol themselves on the mechanical and water transport properties of the cell membrane, proposing a freshness evaluation method that also utilizes the fact that the effect of the isolation protocol depends on the storage conditions. In addition, we overcome the uncertainty of H₂O₂ concentration measurement that has been a problem with conventional destructive measurement and developed a nondestructive measurement method for estimating H₂O₂ concentration from hyperspectral images.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：過酸化水素 ハイパースペクトル画像 酸化ストレスマーカー 膜破断時張力

1. 研究開始当初の背景

「健康志向」は、食の志向で最も強く要望されており、購買動機でも、価格以上に鮮度が重要視されている。しかしながら、鮮度劣化は、栄養成分の消耗や水分損失の結果の高次の症状として観察・議論されてきたに過ぎず、鮮度には、それがグローバルな概念であるにも関わらず、科学的な定義が確立されていない。鮮度を科学的に理解し、客観的で計測可能な数値指標として取り扱えるようにするには、鮮度劣化が顕在化する前の低次の症状を捉える必要があると考えられる。初発的な症状の一つとして、細胞膜の機能劣化が有力な候補に挙がる。細胞膜の機能が劣化すれば、細胞内コンパートメントの維持や老廃物の除去などが滞り、内容成分や水分の損耗が連鎖的かつ加速度的に進行すると予想されるからである。しかし、鮮度劣化の程度と細胞膜の力学的特性や水輸送特性などの膜物性との関係や、鮮度低下に関わる酸化ストレスマーカーの非破壊計測手法などに未解明の課題が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、収穫後における葉菜類の鮮度低下と細胞膜機能劣化との関係を明らかにする上で、当該計測に必要なプロトプラストの単離操作そのものが細胞膜物性に与える影響に着目し、貯蔵中における細胞膜の力学的特性および水輸送特性の変化要因をプロトプラスト単離条件と貯蔵環境条件との観点から検証することを目的とした。また、収穫後における葉菜類の鮮度低下に関わる酸化ストレスマーカーの一つである過酸化水素(H_2O_2)について、キシレノールオレンジを用いた従来の比色法を改良した新手法を提案すると共に、当該破壊法で得られるデータを教師値とする機械学習により、非破壊的に得られる近赤外ハイパースペクトル画像から葉内における H_2O_2 の濃度や空間分布を推定する技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料および貯蔵条件

供試材料には、人工環境下で水耕栽培し、商業サイズ (1株当たり約 50g) で収穫したホウレンソウ葉 (*Spinacia oleracea* L., cv. 'オーライ') を用いた。2週間の育苗および6週間の定植時における栽培条件を表1に示した。

表1 ホウレンソウの栽培条件

	育苗	定植
気温 (明期 / 暗期) [°C]	22.3 ± 1.6 / 18.6 ± 0.5	19.9 ± 0.9 / 19.2 ± 0.6
湿度 (明期 / 暗期) [%RH]	22.4 ± 4.4 / 30.0 ± 4.6	30.3 ± 7.2 / 27.9 ± 6.1
明暗周期 [h/h]		11/13
PPFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	68.6 ± 30.1	199.1 ± 13.8
養液	蒸留水	大塚ハウス肥料 A 処方 (EC = 1.85 ± 0.05 mS cm^{-1} ; pH = 6.0 ± 0.5)

20 °C 設定のインキュベータ内に設置した計測チャンバー内に収穫したホウレンソウ株を静置し、暗黒条件下で最大4日間貯蔵した。予め設定した酸素濃度 (O_2 : 20%, 5%; N_2 : balance) のガスをチャンバー内に毎分 32 mL で加湿しながら通気させることで、青果物周囲のガス濃度と湿度を一定に制御した。収穫直後または所定の貯蔵期間終了後の試料を実験に供試した。

(2) 実験方法

プロトプラストの単離には、Shatil-Cohen ら (2014) と Danon (2014) の方法を改変した手法を用いた。第3または4葉の中肋を避けた葉身部から作製した直径 $\phi = 20.5 \text{ mm}$ の切片を、CPW 溶液を溶媒として、 0.5 mol L^{-1} のマンニトール、1.0% (w/v) のセルラーゼオノズカ RS、0.1% (w/v) のペクトリアーゼ Y-23、 5.0 mmol L^{-1} の MES (2-モルホリノエタンスルホン酸) で構成される酵素液に浸漬し、酵素処理時間を1時間および3時間、遠心強度を 50g および 100g とした条件でプロトプラストを単離した。精製後のプロトプラストを $0.1\text{--}0.6 \text{ mol L}^{-1}$ のマンニトール溶液に曝し、0.08% (w/v) エバンスブルー染色下で生細胞数を直径 $10 \mu\text{m}$ ごとに計数した。 0.5 mol L^{-1} のマンニトール溶液内における生存数に対する相対生存率を正規累積分布関数で回帰して、プロトプラストの半数が膨張破裂して死滅する際の浸透圧 (平均破壊浸透圧) を求め、これとプロトプラスト半径の逆数との関係を Young-Laplace の式で直線回帰することにより算出される膜破断時張力 γ の多寡で低浸透圧耐性を評価した。さらに、Kuroki ら (2022) の方法により、浸透脱水過程におけるプロトプラストの体積応答を観察することによって細胞膜水伝導係数 L_p を測定した。

H_2O_2 の測定は、過酸化水素アッセイキット (national diagnostics, CL-204) のプロトコルを改変した手法を用いた。5% (v/v) のトリクロロ酢酸溶液を溶媒として、凍結した葉肉部をバイオマッシャー SP を用いて氷上で磨碎して得た抽出液、および当該抽出液をカタラーゼ処理した溶液に、所定の濃度の H_2O_2 を添加し、反応試薬と任意の割合で混合して 30 分経過後の 560 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで計測した。

近赤外スペクトルカメラ (XIMEA, MQ022HG-IM-SM5X5NIR) を用いて、葉肉切片、および葉身を対象に、649–942 nm 内の 25 波長の反射率を測定した。画像の前処理および解析には MATLAB の HYPER-Tools v.3.0 を使用した。中心化した反射率の中央スペクトルを説明変量、画像取得後に破壊測定により実測した葉内 H_2O_2 濃度を目的変量として、部分最小二乗回帰 (PLSR) による H_2O_2 濃度推定モデルを構築した。当該推定モデルを葉身の画像に適用し、 H_2O_2 濃度の葉内分布を調査した。

4. 研究成果

ホウレンソウ葉肉プロトプラストの低浸透圧耐性を測定した結果、いずれの単離条件においても、収穫後日数の経過に伴い細胞膜の破断時張力が低下すること、および低酸素濃度貯蔵によりそれが抑制されることが示された (図 1)。さらに、遠心強度の増加に伴う細胞膜の破断時張力の低減効果は、貯蔵酸素濃度が高く、収穫後日数が経過しているほど大きかった。これらから、単離時の遠心強度が同一である場合の膜破断時張力、および単離時の遠心強度の差に伴う膜破断時張力の差によって、目視では確認できない段階でのホウレンソウ葉の鮮度低下を客観的に評価できることが示された。一方、酸素濃度 20% で貯蔵された試料では、酵素処理時間が長く、遠心強度が大きいほど、膜破断時張力が小さい傾向が認められた。また、貯蔵期間が短いほど、酵素処理時間の増大による膜破断時張力の低下が著しく、貯蔵後期では下げ止まる傾向があった。したがって、酵素処理時間の差によって生じる膜破断時張力の差もまた鮮度低下の指標となり得るものの、長すぎる酵素処理時間は、膜破断時張力の観測範囲を狭める点に注意が必要なが明らかとなった。他方、細胞膜水伝導係数については、日数の経過や貯蔵酸素濃度、あるいは遠心強度の違いによる有意差は認められなかった。これにより、貯蔵に伴う細胞膜の機能劣化は、細胞膜水伝導係数の増加よりも先に、細胞膜の破断時張力の低下という形で生じることが明らかとなった。

トリクロロ酢酸溶液を溶媒とした試料抽出液に所定の濃度の H_2O_2 を添加する、いわゆる標準添加法、あるいは試料抽出液を含まない溶液で作成した検量線から算出された H_2O_2 濃度には、試料濃度の増加に伴う比例的な増大が認められなかった。すなわち、従来の手法ではサンプルおよび試料濃度ごとに、検出感度や H_2O_2 濃度が $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ の時の吸光度が変動する欠点があることが明らかとなった。他方、本研究で提案した、カタラーゼ処理による H_2O_2 濃度ブランクの測定と標準添加法とを組み合わせ、サンプルおよび試料濃度ごとに検量線を作成する方法では、反応溶液内 H_2O_2 濃度が $0.454 \mu\text{mol L}^{-1}$ の範囲において、試料濃度の増加に伴う H_2O_2 濃度の比例的な増大が観測され、従来法の課題を克服した H_2O_2 濃度の正確な測定が可能であることが示された。さらに、検出下限以上の濃度帯においても、試料濃度の増大に伴う検出感度低下による H_2O_2 濃度の分解能低下が生じるため、必要とする濃度分解能に応じた試料濃度の設定が望まれることが明らかとなった。

当該新手法による良質な教師データの提供が実現したことを受けて構築した PLSR モデルの精度は、 $3.23\text{--}14.4 \mu\text{mol gDW}^{-1}$ の葉内 H_2O_2 濃度範囲において交差検証 $R^2_{cv} = 0.722$ であった。推定モデルを切片、あるいは葉身に適用して H_2O_2 の葉内濃度分布を可視化したところ、検量線の濃度範囲内のみならず、その範囲外の値が存在することが明らかとなると共に、中肋付近に高濃度の H_2O_2 が蓄積していること、および収穫後の時間経過に伴い、葉肉部の H_2O_2 濃度が減少していくことが明らかとなった (図 2)。

<引用文献>

- Danon, A., 2014. Protoplast preparation and determination of cell death. Bio-protocol 4, e1149.
- Shatil-Cohen, A., Sibony, H., Draye, X., Chaumont, F., Moran, N., Moshelion, M., 2014. Measuring the osmotic water permeability coefficient (Pf) of spherical cells: isolated plant protoplasts as an example. J. Vis. Exp., e51652.
- Kuroki, S., Tanaka, M., Itoh, H., Nakano, K., Sotome, I., 2022. Upgrading the measurement of membrane hydraulic conductivity and osmotically inactive volume of protoplasts for evaluating the freshness of

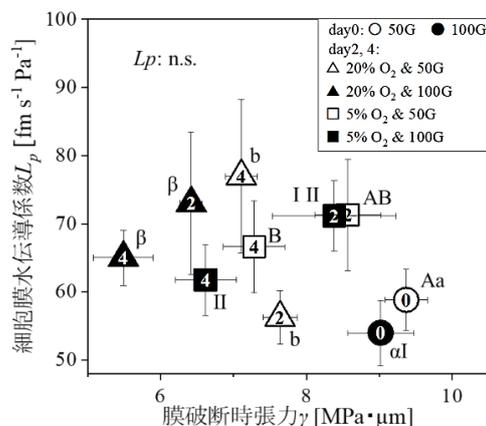


図 1 収穫後における膜破断時張力 γ と細胞膜水伝導係数 L_p の推移 (プロット内の数字は貯蔵日数を、添え字は貯蔵酸素濃度と遠心強度が同一の試験区内で収穫後日数間の γ に有意差があるものを示す)

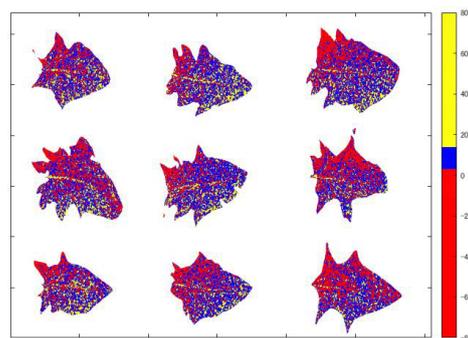


図 2 葉全体の H_2O_2 推定値分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inagaki Yohsuke, Akune Rina, Matsuda Ayano, Kuroki Shinichiro, Takisawa Kenji, Fukushima Takashi	4. 巻 64
2. 論文標題 Effect of Chloroplast Movement on Laser Speckle Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transactions of the ASABE	6. 最初と最後の頁 1747 ~ 1754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.13031/trans.14397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuroki Shinichiro, Tanaka Mai, Itoh Hiromichi, Nakano Kohei, Sotome Itaru	4. 巻 65
2. 論文標題 Upgrading the Measurement of Membrane Hydraulic Conductivity and the Osmotically Inactive Volume of Protoplasts for Evaluating the Freshness of Postharvest Leafy Vegetables	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the ASABE	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.13031/ja.14755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 5件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒木信一郎
2. 発表標題 食料安全保障のための青果物品質の非破壊計測
3. 学会等名 情報処理学会コンピュータビジョンとイメージメディア研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木信一郎, 古財彩音, 伊藤博通, 福島崇志, 中野浩平
2. 発表標題 プロトプラスト膨張破裂時の膜張力計測による葉菜類の鮮度評価
3. 学会等名 2019年農業食料工学会・農業施設学会・国際農業工学会第6部会合同国際大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichiro Kuroki
2. 発表標題 Freshness evaluation of leafy vegetables with based on the cell membrane properties
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Security in Food, Renewable Resources, and Natural Medicine 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木信一郎
2. 発表標題 水分損失の観点から見た青果物の鮮度保持メカニズム
3. 学会等名 技術情報協会セミナーNo.911223 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木信一郎
2. 発表標題 農産物・食品の非破壊計測
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会 第40回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 足立知美, 黒木信一郎, 伊藤博通, 小林英望
2. 発表標題 葉菜類内における活性酸素種と抗酸化能との相互関係解明
3. 学会等名 農業食料工学会関西支部第141回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島優子, 黒木信一郎, 伊藤博通
2. 発表標題 収穫後ホウレンソウ葉内における活性酸素種の濃度変化
3. 学会等名 農業食料工学会関西支部第141回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古財彩音, 黒木信一郎, 吉海江卓, 柳圭佑, 伊藤博通
2. 発表標題 収穫後におけるホウレンソウ葉肉プロトプラストの膜物性評価
3. 学会等名 農業食料工学会関西支部第141回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉海江卓, 黒木信一郎, 伊藤博通, 中野浩平
2. 発表標題 プロトプラスト単離法がホウレンソウ葉の細胞膜物性に与える影響
3. 学会等名 農業環境工学関連5学会2018年合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒木信一郎, 田中麻衣, 伊藤博通, 中野浩平
2. 発表標題 収穫後におけるホウレンソウ葉肉細胞の膜物性変化
3. 学会等名 農業環境工学関連5学会2018年合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒木信一郎
2. 発表標題 SDGs達成に貢献するポストハーベスト工学
3. 学会等名 国際食品工業展 農業食料工学会シンポジウム フードテクノロジー（フーテック）フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井理人, 黒木信一郎, 杉田彩子, 伊藤博通, 中島周作
2. 発表標題 収穫後葉菜類におけるプロトプラスト単離条件と細胞膜物性の関係
3. 学会等名 第79回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田梨乃, 黒木信一郎, 伊藤博通, 中島周作, 中野浩平
2. 発表標題 植物由来物質による測定妨害を考慮した葉菜類のH2O2濃度評価法
3. 学会等名 第79回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 農業食料工学会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 440
3. 書名 ポストハーベスト工学事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.lab.kobe-u.ac.jp/ans-lieb>

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
研究分担者	伊藤 博通 (ITOH Hiromichi) (00258063)	神戸大学・農学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	中野 浩平 (NAKANO Kohei) (20303513)	岐阜大学・大学院連合農学研究科・教授 (13701)	
研究分担者	福島 崇志 (FUKUSHIMA Takashi) (00452227)	三重大学・生物資源学研究科・准教授 (14101)	

	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
研究協力者	津田 梨乃 (TSUDA Rino)		
研究協力者	中井 理人 (NAKAI Masato)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	柳 圭佑 (YANAGI Keisuke)		

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