

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02309

研究課題名(和文)異種分析融合による青果物の抗酸化能関与成分の解明と非破壊推定

研究課題名(英文) Investigation of radical scavenging ability related compounds by multiple analyses fusion and their non-destructive estimation

研究代表者

蔦 瑞樹 (Tsuta, Mizuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：80425553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：コマツナ、イチゴの個体と、タマネギの溶媒抽出物について、可視-近赤外吸光スペクトル、蛍光指紋、NMRスペクトル、ESRスピントラップ法による活性酸素消去活性を測定した。タマネギ抽出物について得られたデータに相関ネットワーク解析を適用したところ、一重項酸素の消去活性と可視領域の吸光スペクトルおよび蛍光指紋に有意な相関関係があることが分かった。これらの分光データに回帰分析を適用したところ、高い精度で一重項酸素の消去活性を推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青果物の持つ代表的な機能性である抗酸化能は、分析法によって評価結果が異なることが報告されている。また、抗酸化能分析の従来法は試料の破壊を伴うため、ばらつきの多い青果物の機能性を保証できる非破壊計測技術の開発が求められている。本研究では、可視-近赤外分光あるいは蛍光指紋といった非破壊計測により、青果物が持つ個々の活性酸素種の消去活性を推定可能なことを示した。機能性表示食品制度を活用した青果物の付加価値向上などに寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Visible-near infrared absorption spectra, fluorescent fingerprints, NMR spectra, and radical scavenging activity by the ESR spin trap method were measured for Komatsuna, strawberry and solvent extracts of onions. When a correlation network analysis was applied to the data obtained for the onion extract, it was found that there was significant correlations between the scavenging activity of singlet oxygen, the absorbance spectrum in the visible region and the fluorescent fingerprint. When regression analysis was applied to these spectral data, the scavenging activity of singlet oxygen could be estimated with high accuracy.

研究分野：非破壊計測

キーワード：近赤外分光法 蛍光指紋 ESR NMR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 27 年度に始まった機能性表示食品制度は、青果物の付加価値を向上させる機会をもたらした。糖度が保証された果実やトマトが高価格で取引されるのと同様に、機能性が保証された青果物が流通するようになれば、生産者のみならず、選択肢が広がるという点で消費者も機能性表示食品制度の恩恵を受けられると考えられる。

一方で解決すべき課題も多い。青果物の持つ代表的な機能性である抗酸化能は、DPPH ラジカル消去活性法や ORAC 法などを用いて評価されることが多い。しかし、同じ成分であっても分析法によって評価結果が異なることが報告されている¹。また、研究分担者の亀谷は ORAC 法と ESR スピントラップ法を比較し、ORAC 法では消去活性を評価できない活性酸素種が複数存在することを明らかにした²。したがって、抗酸化能の評価には、活性酸素種を直接測定できる ESR を活用することが重要と考えた。

また、糖度測定など非破壊分析に用いられている近赤外分光は、成分含量が推定できるメカニズムがブラックボックスである場合が多い。例えば、近年ウンシュウミカンの機能性成分であるβクリプトキサンチン含量を近赤外分光法で推定する研究³がなされているが、これは糖度とβクリプトキサンチン含量に相関関係があることを利用し、糖度の推定値を用いてβクリプトキサンチン含量を推定する「二重に間接的」な手法である。このような手法は青果物品質の季節変動などの外的要因によって精度が低下することが想定されるため、機能性成分の吸光や発光特性そのものに基づいた非破壊推定法の開発が必要と考えた。また、成分によっては強い蛍光を発することも考えられるため、近赤外分光法のみならず、蛍光指紋も活用すれば幅広い機能性成分を対象にできると期待される。

以上の経緯から、信頼性の高い抗酸化能分析法として、活性酸素種を直接測定できる ESR スピントラップ法を活用する、抗酸化能を担う関与成分を明らかにし、その吸光・蛍光特性を把握する、に基づき、高精度で関与成分を推定可能な技術を開発する、という本申請課題を着想した。また、関与成分の同定については、青果物中の一次代謝物から抗酸化活性関連二次代謝物まで、幅広い構造範囲の成分群を同時に解析できる NMR メタボロミクスが最適と判断した。

2. 研究の目的

本研究では、抗酸化関与成分に基づく機能性表示の基盤技術として青果物の全数検査を目指し、青果物を電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法、核磁気共鳴 (NMR) メタボロミクス、近赤外分光法及び蛍光指紋という複数の手法で分析し、データ統合及びネットワーク相関解析によって各種活性酸素種の消去を担う関与成分を明らかにすることを目的とした。さらに、関与成分特有の吸光・蛍光波長を探索し、その含有量を非破壊かつ高精度推定する手法の開発を目指した。

3. 研究の方法

対象試料にはコマツナ、イチゴ、タマネギを用いた。このうち、タマネギについては comprehensive extraction (CE)⁴ による溶媒抽出を行い、得られた抽出画分を供試材料とした。CE は溶媒の組成を変化させながら連続的に抽出を行い、1 つのサンプルから成分組成の異なる複数の画分を得る手法である。これにより、サンプル点数が少ない場合でも、効率的に多くのデータを取得することが可能となる。

コマツナ、イチゴ試料は分光データの取得直後に液体窒素で急速凍結し、凍結乾燥したのちブルカーバイオスピン社製 EMX-plus を用いた ESR スピントラップ法によるラジカル消去活性測定と、Bruker Avance-500 による NMR メタボロミクスに供試した。タマネギの抽出画分については、先に ESR スピントラップ法と NMR メタボロミクスを実施した後、5 倍に希釈した溶液を可視-近赤外分光測定に、さらに 5 倍希釈した溶液を蛍光指紋測定に供試した。

試料の可視-近赤外分光測定には FOSS 製 XDS を使い、400-2500 nm の範囲で、0.5 nm おきに吸光度データを得た。コマツナ、イチゴについては XDS の rapid content analyzer の測定窓に試料を置いて反射測定を行い、タマネギの場合は画分を入れた石英シャーレを測定窓に置き、その上に金反射板を置いて透過反射測定を行った。コマツナ、イチゴの蛍光指紋測定には落射測定オプションを装着した日本分光製 FP-8500 を使い、測定窓に試料を置いて蛍光指紋を取得した。タマネギ抽出画分の蛍光指紋測定には日立ハイテクノロジーズ製 F-7100 を使い、25 倍に希釈した試料容器を石英セルに入れ、right-angle 法で蛍光指紋を取得した。いずれの場合も、蛍光指紋は励起波長 200-600 nm、蛍光波長 250-750 nm の範囲で、それぞれ 5 nm 間隔で取得した。

得られたデータに相関ネットワーク解析 (correlation network analysis: CNA) を適用し、分光、NMR データとラジカル消去活性の三者の関係を可視化した。また、分光データを説明変数、ラジカル消去活性を目的変数とする多変量解析を行い、前者から後者を推定するモデルを作成した。データの前処理には数値解析ソフト (マスワークスジャパン製 MATLAB) CNA にはオープンソースのネットワーク解析ソフト (Cytoscape 3.9.1) 多変量解析には研究代表が開発したソフト (N2SA FullAuto) を用いた。

4. 研究成果

ここではタマネギの抽出画分に関する実験結果を示す。サンプルはA~Hの計8品種を用いた。各品種3個体を凍結乾燥、粉碎して均一化した試料にCEを適用した。CEによる溶媒抽出には表1に示すグラジエントを用い、1サンプルから11個の画分を得た。得られた画分を蒸発乾固または凍結乾燥して得られた粉末をDMSOで溶解し、実験に供試した。

表1 CEによるタマネギの抽出条件

| 画分番号 | ヘキサン [%] | アセトン [%] | 水 [%] |
|------|----------|----------|-------|
| 1 | 100 | 0 | 0 |
| 2 | 80 | 20 | 0 |
| 3 | 60 | 40 | 0 |
| 4 | 40 | 60 | 0 |
| 5 | 20 | 80 | 0 |
| 6 | 0 | 100 | 0 |
| 7 | 0 | 80 | 20 |
| 8 | 0 | 60 | 40 |
| 9 | 0 | 40 | 60 |
| 10 | 0 | 20 | 80 |
| 11 | 0 | 0 | 100 |

図1に、サンプルのうち2番目に高い活性酸素除去能を示したGについて、2次微分した可視-近赤外吸光スペクトルを示す。若い画分番号のスペクトル670nm付近のピークが見られるなど、画分にスペクトルが異なることが分かった。また、図2に示す同一サンプルの蛍光指紋についても、画分によって蛍光ピークの位置や強度が異なっていた。これらのことから、吸光スペクトルに見られる670nm付近のピーク、蛍光指紋の蛍光670nm付近のピークはクロロフィルを反映していると考えられ、画分によって含有成分が異なることが示唆された。

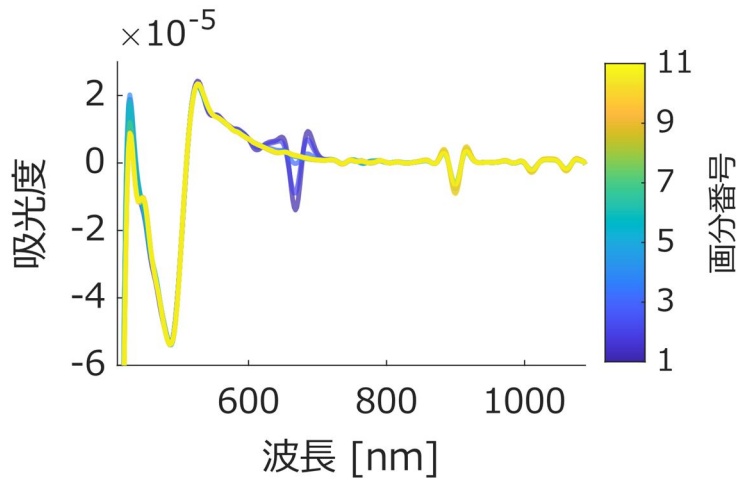


図1 タマネギサンプルG抽出物の可視領域における2次微分吸光スペクトル

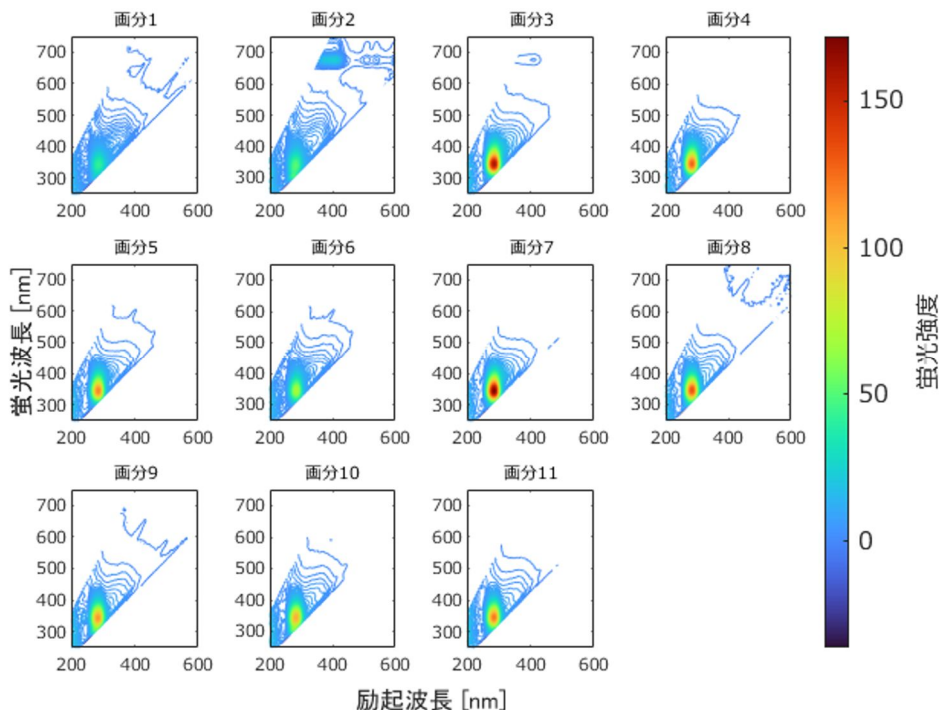


図2 タマネギサンプルG抽出物の蛍光指紋

得られた可視-近赤外吸光スペクトル、蛍光指紋、NMR スペクトルは、いずれも数百～数千の変数からなる行列データである。これに直接 CNA を適用すると、描画されるノード、エッジが膨大となり、異なる分析間の関係を把握できなくなると考えられた。そこで、各データに主成分分析を適用してデータを圧縮し、さらに相関関係が有意と判定されたノードの組み合わせのみを表示した。その結果得られた相関ネットワーク図を図 3 に示す。各サンプルの一重項酸素消去活性（図中の $1O_2$ ）は可視領域の吸光スペクトル、蛍光指紋、NMR データと相関する一方、ヒドロキシラジカル消去活性（図中の OH）は蛍光指紋とのみ相関が見られた。したがって、一重項酸素消去活性は可視領域の吸光スペクトル、蛍光指紋双方で推定できる一方、ヒドロキシラジカル消去活性は蛍光指紋のみでしか推定できないと予想された。

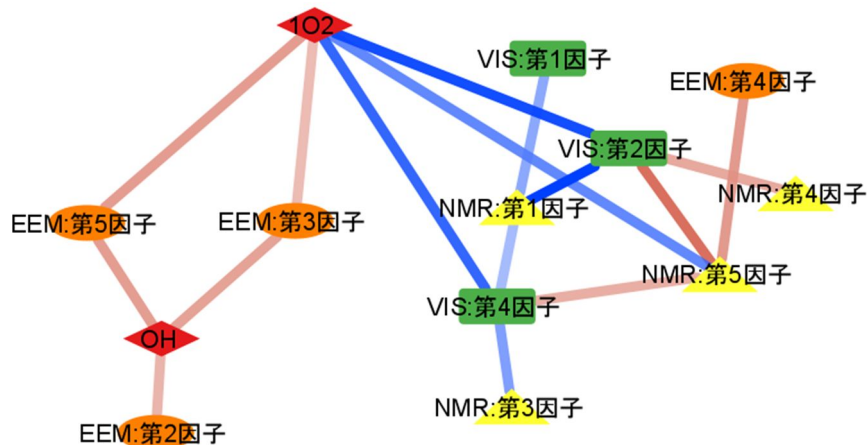


図 3 タマネギサンプル各分析データの主成分得点に基づく相関ネットワーク

そこで、可視領域の吸光スペクトル、蛍光指紋に stepwise selectivity ratio 法⁵による変数選択を伴う partial least square 回帰分析を適用し、各活性酸素種の消去活性を推定するモデルを構築した。この際、データをモデル構築用の training data と、構築したモデルの精度を確認するための test data に分割した。表 2 に得られた各モデルの test data に対する推定精度を示す。表中の数値は実測値と予測値の決定係数である。可視領域の吸光スペクトル、蛍光指紋ともに、一重項酸素の消去活性を比較的高い精度で推定可能なモデルが構築できた。一方で、ヒドロキシラジカルについては、蛍光指紋を用いても精度良く推定することはできなかった。これは、蛍光指紋とヒドロキシラジカルの消去活性に有意な相関関係はあるものの、相関係数は 0.4 程度とあまり高くなかったためと考えられる。

表 2 活性酸素消去能推定モデルの精度

| 分光手法 | 活性酸素種 | |
|----------|-------|-----------|
| | 一重項酸素 | ヒドロキシラジカル |
| 可視-近赤外吸光 | 0.769 | 0.396 |
| 蛍光指紋 | 0.63 | 0.357 |

図 4 左に、可視領域の吸光スペクトルを用いた一重項酸素消去活性の推定結果を示す。消去活性が低い領域では実測値と予測値に乖離が見られたが、消去活性の高いサンプルの選定には十分な精度だと考えられた。また、図 4 右に推定モデルの回帰係数と、各波長の回帰への寄与度である selectivity ratio (SR) を示す。500 nm 付近の SR が最も大きくなっていることから、何らかの色素成分が一重項酸素の消去活性に寄与しており、その色素による光吸収の情報によって一重項酸素の消去活性を推定可能になったと考えられた。

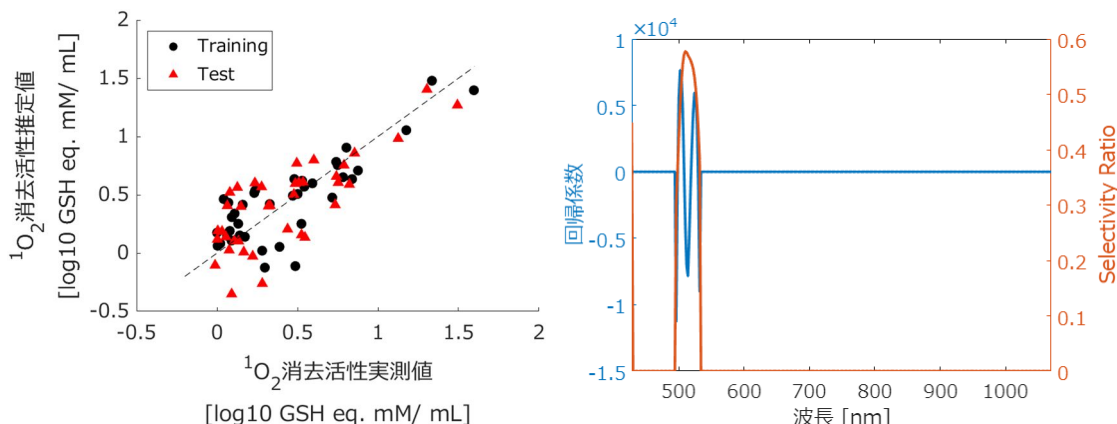


図 4 可視領域の吸光スペクトルによる一重項酸素消去活性の推定結果（左）と推定モデルの回帰係数および selectivity ratio（右）

<引用文献>

1. 近藤他, 食科工誌, 64 (9), 457-463 (2017).
2. Kameya et al., Food Chem., 145, 866-873 (2013).
3. 濱崎他, 園芸学研究別冊 2, 14, 291 (2015).
4. Yuliana et al., Anal. Chem., 83, 6902-6 (2011).
5. Trivittayasil et al., Chemom. Intell. Lab. Syst., 175, 30-36 (2018).

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 Li Xinyue, Tsuta Mizuki, Hayakawa Fumiyo, Nakano Yuko, Kazami Yukari, Ikehata Akifumi | 4. 巻 343 |
| 2. 論文標題 Estimating the sensory qualities of tomatoes using visible and near-infrared spectroscopy and interpretation based on gas chromatography-mass spectrometry metabolomics | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Food Chemistry | 6. 最初と最後の頁 128470 ~ 128470 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2020.128470 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Li Xinyue, Sekiyama Yasuyo, Nakamura Nobutaka, Suzuki Yoko, Tsuta Mizuki | 4. 巻 364 |
| 2. 論文標題 Estimation of komatsuna freshness using visible and near-infrared spectroscopy based on the interpretation of NMR metabolomics analysis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Food Chemistry | 6. 最初と最後の頁 130381 ~ 130381 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2021.130381 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 鳶 瑞樹, 李心悦, 鈴木洋子, 前田育子, 藤原由美恵, 関山 恭代 |
| 2. 発表標題 切らずに測る野菜の鮮度 - コマツナの可視-近赤外・核磁気共鳴融合分光とその解釈 - |
| 3. 学会等名 2020年度人工知能学会全国大会 (第34回) 講演要旨集 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Xinyue Li, Mizuki Tsuta, Yoko Suzuki, Yasuyo Sekiyama |
| 2. 発表標題 The evaluation of komatsuna freshness using visible-near infrared spectroscopy |
| 3. 学会等名 第36回近赤外フォーラム講演要旨集 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 蔦 瑞樹, 李 心悦, 鈴木 洋子, 前田 育子, 藤原 由美恵, 関山 恭代 |
| 2. 発表標題 分光法融合によるコマツナの非破壊鮮度評価 |
| 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 Mizuki TSUTA, Xinyue LI, Yoko SUZUKI, Ikuko MAEDA, Yumie FUJIHARA and Yasuyo SEKIYAMA |
| 2. 発表標題 Spectroscopy fusion of VIS-NIR and 1H NMR for non-destructive freshness evaluation of komatsuna (<i>Brassica rapa</i> var. <i>perviridis</i>) leaf |
| 3. 学会等名 The 19th biennial meeting of the International Council for NIR Spectroscopy (NIR2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Xinyue Li, Yasuyo Sekiyama, Nobutaka Nakamura, Yoko Suzuki, Mizuki Tsuta |
| 2. 発表標題 NIR-NMR spectroscopy fusion, an approach to open the black-box of NIR spectroscopy used to monitor the freshness of vegetables |
| 3. 学会等名 The 20th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy (NIR2021) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 蔦瑞樹、李心悦、関山恭代、中村宣貴 |
| 2. 発表標題 NMRメタボロミクスによるコマツナの鮮度マーカー成分探索 |
| 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0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|-----------|--|---|----|
| 研究 分担者 | 亀谷 宏美 (Kameya Hiromi) (20585955) | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主任研究員 (82111) | |
| 研究 分担者 | 関山 恭代 (Sekiyama Yasuyo) (60342804) | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・上級研究員 (82111) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|