

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21380155

研究課題名(和文) 二次元分光吸光イメージ解析による収穫後緑色野菜の黄化速度予測に関する研究

研究課題名(英文) Nondestructive prediction of postharvest yellowing velocity of green vegetables by image analysis of two dimensional spectral absorbance

研究代表者

牧野 義雄 (Makino, Yoshio)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70376565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：ブロッコリーの品質低下の主要な原因は、部分的な花蕾部の黄化である。そこで本研究では、ハイパースペクトルカメラで二次元分光反射/吸収スペクトルを測定し、統計解析を行うことにより、部分的な花蕾部の黄化速度や黄化が早い部分を予測した。ニューラルネットワークにより黄化速度予測モデルを構築した結果、相関係数0.99、予測標準誤差は 5.4×10^{-5} mg/gの水準で予測可能であった。さらに、花蕾部から抽出したミトコンドリアの分光分析を行った結果、シトクロムcオキシダーゼに起因する440 nmにおける光吸収が認められた。このことから、当該波長における光吸収が、黄化速度予測に貢献していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Main cause of deterioration of broccoli is caused by the yellowing of buds. In the present study, nondestructive prediction of yellowing velocity of broccoli buds using hyperspectral camera combined with statistical analysis was attempted. Proposed artificial neural network model was effective for predicting the velocity at the accuracy that correlation coefficient was 0.99 and standard error of prediction was 5.4×10^{-5} mg/g. Mitochondria prepared from broccoli buds absorbed the visible light at 440 nm. This may be caused by the absorption by cytochrome c oxidase. Therefore, the light absorption may contribute to the prediction of yellowing velocity.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業環境工学

キーワード：ポストハーベスト工学 緑色野菜 分光分析 非破壊検査

1. 研究開始当初の背景

緑色野菜の収穫後における深刻な品質低下現象として「黄化」が挙げられる。変色することで外観品質を損なうことにより商品価値を喪失する。呼吸速度 (O_2 吸収速度) が高い保存条件下においてブロッコリー花蕾の黄化が促進されると報告されていることから、緑色野菜の黄化と O_2 吸収速度との関連性が示唆される。

一方、細胞内に取り込んだ O_2 分子の 90% 以上を呼吸鎖の末端に位置する酸化酵素である呼吸酵素 (チトクローム *c* オキシダーゼ (COX, EC 1.9.3.1)) が消費する。研究代表者 (牧野義雄) らは過去の研究において、分光分析によって青果物内の COX 濃度と O_2 吸収速度を測定できる可能性を示唆するとともに、非線形モデリングを併用した可視/近赤外分光分析によって、トマト果実中 COX 由来の光吸収に基づき O_2 吸収速度を測定できることを実証した。このことは、分光分析が緑色野菜の黄化速度予測に有効である可能性を示唆する。

2. 研究の目的

可視/近赤外分光分析で取得した収穫直後における緑色野菜の分光吸収イメージから黄化速度を迅速に予測する手法を開発する。緑色野菜の外観品質および栄養価の低下の原因となる、収穫後における黄化の速度を、二次元分光反射/吸収スペクトル解析によって非破壊かつ迅速に予測する手法を明らかにすることを目的とした。

また、黄化速度と呼吸速度との関連性が示唆されることから、細胞の呼吸活動における重要な酵素である COX の光吸収特性を明らかにするために、ブロッコリー花蕾部から抽出したミトコンドリアの分光吸収スペクトルを測定し、呼吸酵素が緑色野菜の分光吸収スペクトルに及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 分光分析によるブロッコリー花蕾部の黄化速度非破壊予測

埼玉県産ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*, 品種: サカタのタネ SK048) 17 個体 (検量用 11、検証用 6) を試料とした。5 の恒温庫内で 48 日間貯蔵し、経時的に 380 ~ 1,000 nm の範囲 (波長分解能 5 nm) の二次元分光反射スペクトルを測定した。なお、反射スペクトルは JFE テクノリサーチ (株) 製イメージング分光基本ユニットを使用した。主な仕様は、光源: キセノン-ハロゲン混合光源、分光器: 透過型回折格子 [光学的波長分解能 (半値幅): 9 nm]、入射スリット: 80 μ m、光センサー: CCD (12 ビット)。クロロフィルは 80% アセトン抽出液の吸光度を測定する方法で求め、反射スペクトルから算出した色相角からクロロフィル濃度を求める検量線を作成した。10 カ所/個体 (計: 検量用 110、検証用 60) のデータを SpectrumAnalyzer

ver.1.8.6 (JFE テクノリサーチ) で抽出した。黄化 (クロロフィル減少) 速度定数を目的変数、貯蔵開始時の二次微分分光反射スペクトルを説明変数として、JMP ver.8.02 を使用し、ブロッコリー花蕾の黄化速度定数予測のためのニューラルネットワーク (ANN) モデルを作成した。

(2) ミトコンドリア抽出液の分光分析

埼玉県産ブロッコリー (品種: サマードーム) 3 個を試料とし、花蕾部を 90g 採取した。ミトコンドリア抽出液の調製は、次の手順で行った。10 mM リン酸カリウム緩衝液、0.7 M マンニトール、1.0 mM エチレンジアミン四酢酸および 2 mM ジチオスレイトールを含む抽出液 200 ml を pH7.2 に調整後、花蕾部 90 g に加えて氷冷しながらホモジナイザーで粉碎し、2 層に重ねたナイロンガーゼで固液分離し、ろ液を採取した。500 \times g で 10 min の遠心を 2 回行い、その上澄みを 10000 \times g で 20 min 遠心した。その沈殿を 0.2 M KCl を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) に懸濁した。Modified Lowly Protein Assay Kit を用いて、ミトコンドリア抽出液のタンパク質定量を行った後、タンパク質濃度を 11 μ g \cdot mL⁻¹ に調製した。紫外/可視/近赤外分光光度計で懸濁液の分光吸収スペクトルを測定した。条件は、光路長 10 nm、波長範囲 190 ~ 1000 nm、波長解像度 2 nm、スリット幅 2 nm とした。ミトコンドリア抽出液中の COX の存在は、プロテオーム解析 (化学物質評価研究機構に依頼) で確認した。

4. 研究成果

(1) 分光分析によるブロッコリー花蕾部の黄化速度非破壊予測

ブロッコリー花蕾部の黄化速度は貯蔵時間を変数とする単回帰式によって近似することができた。直線の傾きを黄化速度定数と見なして目的変数とした。また、貯蔵開始時の二次微分分光反射スペクトルから、目的変数との相関が高く多重共線性の無い 15 波長を選択し、説明変数とした。ANN で検量線を作成し、検証用データに適用したところ、相関係数は 0.99 と高く、予測標準誤差は 5.4 \times 10⁻⁵ mg \cdot g⁻¹ と低い水準となった (図 1)。このことから、貯蔵開始時の分光反射スペクトルから、部分ごとに黄化速度を予測することが可能であり、ひいては、黄化が早く進む部分を特定できることが明らかになった。一方、ブロッコリーの場合、質量損失が 10% を超えると商品性を喪失すると報告されている。本研究で用いた試料 17 個体は全て貯蔵開始 14 d 後までに 10% を超える質量損失が認められたことから、本研究で作成した予測モデルは、商品性が保持された範囲内で有効に活用できるものと考えられる。

(2) ミトコンドリア抽出液の分光分析

ミトコンドリア抽出液の吸光度二次微分

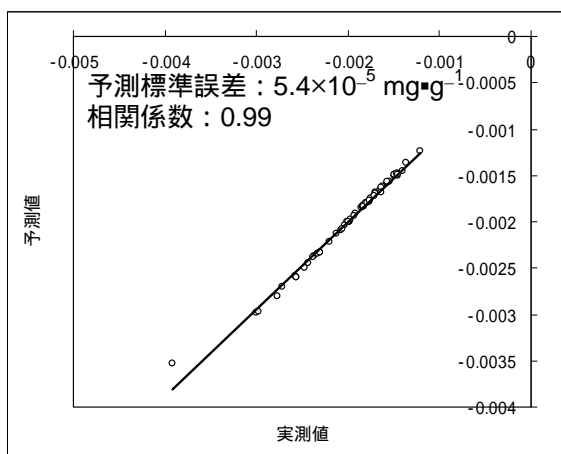


図 1 ブロッコリー花蕾黄化速度定数予測モデルの検証結果

スペクトル(図 2)では、266 nm 付近、440 nm 付近、682 nm 付近に吸光度のピークがみられた。まず、既往の文献によれば COX は 423 nm 付近の光を吸収することと、プロテオーム解析の結果、ブロッコリー花蕾部のミトコンドリア抽出液中において COX のサブユニットの存在が確認されたことから、440 nm におけるピークは、COX の光吸収に由来するピークであると考えられた。すなわち、当該波長における光吸収が、ブロッコリー花蕾部の黄化速度予測に寄与していると考えられた。芳香族アミノ酸(チロシン, トリプトファン)の側鎖に由来するピークが 280 nm に存在することから、266 nm 付近のピークはタンパク質に由来すると考えられた。682 nm 付近にピークが観測され、これはクロロフィルに由来するものと考えられた。

以上の結果から、440 nm における COX 由来の光吸収が、ブロッコリー花蕾部の黄化速度予測に貢献していると考えられた。

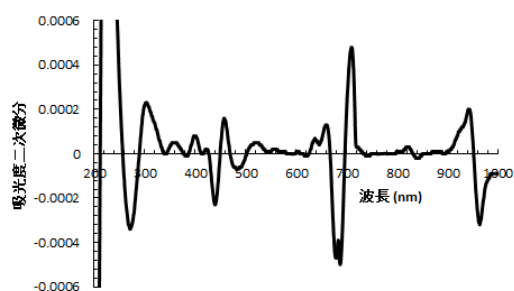


図 2 ブロッコリー花蕾部から抽出したミトコンドリアの分光吸収二次微分スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Makino Y., Oxygen consumption by fruits and vegetables, Food Science and Technology Research, 査読有, Vol. 19, No. 4, 2013, pp. 523-529
DOI: 10.3136/fstr.19.523

Mae N., Makino Y., Oshita S., Kawagoe Y., Tanaka A., Aoki K., Kurabayashi A., Akihiro T., Akama K., Koike S., Takayama M., Matsukura C., Ezura H., Accumulation mechanism of γ -aminobutyric acid in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) under low O₂ with and without CO₂, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 査読有, Vol. 60, No. 4, 2012, pp. 1013-1019

DOI: 10.1021/jf2046812

Siripatrawan U., Makino Y., Kawagoe Y., Oshita S., Rapid detection of *Escherichia coli* contamination in packaged fresh spinach using hyperspectral imaging, Talanta, 査読有, Vol. 85, No. 1, 2011, pp. 276-281

DOI: 10.1016/j.talanta.2011.03.061

Mae N., Makino Y., Oshita S., Kawagoe Y., Tanaka A., Akihiro T., Akama K., Koike S., Matsukura C., Ezura H., Stimulation of γ -aminobutyric acid production in vine-ripened tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits under an adjusted aerobic atmosphere, Journal of Packaging Science and Technology, Japan, 査読有, Vol. 19, No. 5, 2010, pp. 375-381

〔学会発表〕(計 18 件)

Makino Y., Non-destructive prediction of degreening rate of broccoli buds using hyperspectral camera system, 8th CIGR International Technical Symposium Section VI, 2013 年 11 月 5 日, 広州市(中国)

牧野義雄, 二次元分光反射/吸収スペクトル解析によるブロッコリー花蕾部の非破壊品質評価, 第 72 回農業食料工学会年次大会, 2013 年 9 月 12 日, 帯広畜産大学(北海道)

牧野義雄, ハイパースペクトルカメラによるブロッコリーの非破壊品質評価, 日本生物環境工学会 2013 年高松大会, 2013 年 9 月 3 日, 香川大学(香川県)

Makino Y., Non-destructive prediction of degreening rate of broccoli by hyperspectral imaging, The 1st International Conference on Sensing Technologies for Biomaterial, Food and Agriculture, 2013 年 4 月 24 日, パシフィコ横浜(横浜市)

保阪亜祐実, ハイパースペクトルカメラを用いたブロッコリーの黄化速度予測に関する研究, 農業環境工学関連学会 2012 年合同大会, 2012 年 9 月 13 日, 宇都宮大学(栃木県)

保阪亜祐実, ハイパースペクトルカメラを用いたブロッコリーの黄化速度予測に関する研究, 日本食品工学会第 13 回年次大会, 2012 年 8 月 10 日, 北海道大学(札幌市)

Hosaka A., Prediction of degradation rate of broccoli during storage by hyperspectral imaging, International Conference of

Agricultural Engineering CIGR-AgEng2012, 2012年7月9日, バレンシア(スペイン)
Siripatrawan U., Hyperspectral imaging as a rapid and non-destructive technique for detection of fungal contamination in rice grains, 5th Shelf Life International Meeting, 2012年6月1日, 昌原市(韓国)
牧野義雄, ハイパースペクトルカメラによるブロッコリーの品質評価に関する研究, 第70回農業機械学会年次大会, 2011年9月28日, 弘前大学(青森県)
牧野義雄, ハイパースペクトルカメラを利用したブロッコリー花蕾部水分の非破壊推定, 日本生物環境工学会2011年札幌大会, 2011年9月8日, 北海道大学(札幌市)
牧野義雄, ブロッコリーの変色を予測する, 2011国際食品工業展アカデミックプラザ研究発表会, 2011年6月7日, 東京ビッグサイト(東京都)
Makino Y., Nondestructive analysis of foods and horticultural products by measuring UV, visible and near-infrared reflectances, 6th Special lecture at Zhejiang University, 2011年5月17日, 杭州市(中国)
Makino Y., Studies on accumulation mechanism of γ -aminobutylic acid in tomato fruits under modified atmospheres, 6th International CIGR Technical Symposium, 2011年4月18日, ナント(フランス)
牧野義雄, ハイパースペクトルカメラを利用したブロッコリー花蕾部の退色速度予測, 平成22年度日本分光学会年次講演会, 2010年11月20日, 京都大学(京都府)
前信和, 貯蔵環境ガス組成が完熟トマト果実中 γ -アミノ酪酸経路関連物質の動的変化に及ぼす影響, 第69回農業機械学会年次大会, 2010年9月15日, 愛媛大学(愛媛県)
Mae N., Effects of atmosphere on dynamic changes in compounds associated with gamma aminobutylic acid shunt, International Conference on Agricultural Engineering AgEng, 2010年9月8日, クレルモンフェラン(フランス)
牧野義雄, 収穫後におけるブロッコリーの品質変化が二次元分光反射スペクトルの経時変化に及ぼす影響, 農業機械学会関東支部第46回年次大会, 2010年8月5日, 上越市春日謙信交流館(新潟県)
前信和, 貯蔵環境ガス組成がトマト果実中 γ -アミノ酪酸経路関連物質の変動に及ぼす影響, 日本包装学会第19回年次大会研究発表会, 2010年7月8日, 東京大学(東京都)

〔その他〕

ホームページ等

[http://proposal.ducr.u-tokyo.ac.jp/cgi-](http://proposal.ducr.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/ccr_user/detail.cgi?num=5918&query=&max=)

[bin/ccr_user/detail.cgi?num=5918&query=&max=](http://proposal.ducr.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/ccr_user/detail.cgi?num=5918&query=&max=)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 義雄 (MAKINO Yoshio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70376565

(2) 研究分担者

川越 義則 (KAWAGOE Yoshinori)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80234053