

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780229

研究課題名（和文）近赤外分光法を用いた生体内代謝モニタリング

研究課題名（英文）In vivo monitoring of plant metabolism by near infrared spectroscopy

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

研究成果の概要（和文）：キュウリ果実において、低温障害の進行中に可視近赤外領域における吸光度が特異的に変化する波長を明らかにした。低温障害進行の指標である電解質漏出割合をスペクトルから推定する PLS 回帰モデルの構築は困難であったことから、より定量的な他の低温障害の指標について検討する必要があると考えられた。また、ホウレンソウ葉を対象に、可視近赤外スペクトルを用いた、周囲酸素濃度に伴う代謝変化の非破壊検出の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We found specific wavelengths in VIS-NIR range where the absorbance changed with progressing chilling injury in cucumber fruit. It was difficult to construct partial least square regression models for a ratio of electrolyte leakage from the obtained spectra, suggesting that it is necessary to examine other more quantitative index for chilling injury. We also showed that measuring VIS-NIR spectra of spinach leaves probably allowed detecting changes in metabolism with variation of atmospheric oxygen concentration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ポストハーベスト工学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：ケモメトリックス、電気伝導度、CA 環境

## 1. 研究開始当初の背景

組織内の水の物理的性質と組織の生理的状態には密接な関係があるとされているが、水分子の動的状態と体内の生理的状態との関係については、ほとんど知見が得られていない。一方、近赤外分光法を水ストレス、低温障害などの検出へと応用する試みもいくつかなされているが、一部の成分分析への応用と同様に、ケモメトリックスの適用により導かれた最適解である以上の言及が不足しており、その検出原理については、依然としてブラックボックスになっていた。

## 2. 研究の目的

植物試料を対象として、生体内における代謝の代表として広く認知されている呼吸作用や、低温ストレスに伴う低温障害と、近赤外分光法の利用によって得られる生体内水の動的状態との関係について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 可視近赤外スペクトルを用いたキュウリ果実の低温障害の非破壊検出

① 供試材料および貯蔵条件

群馬県福地農園から入手したキュウリ果

実(*Cucumis sativa* L., ‘久輝’)を用いた。キュウリ果実は、収穫後 24 時間以内に研究室まで常温輸送された後、15°C、7°C、2°Cに設定されたインキュベータに静置され、10 日間貯蔵された。

#### ②電気伝導度(EC)・pH の測定

EC と pH を貯蔵 1 日目から 3 日毎に測定し、低温障害の指標とした。コルクボーラを用いてキュウリ果実長手方向中央部の果肉部から採取した直径 4 mm、長さ 10 mm の試料を 0.2 mol L<sup>-1</sup> のマンニトール水溶液中(25°C、20 mL)に浸漬し、3 時間経過後まで経時的に溶液の EC 値を測定した。その後、10 分間煮沸し、25°C のウォータバス内で 1 時間冷却した溶液の EC 値を測定して全 EC 値とした。電解質漏出割合、および電解質漏出速度は、以下の式で算出した。

電解質漏出割合[%]

$$= \frac{\text{実測 EC 値} - 0.2\text{M マンニトール水溶液の EC 値}}{\text{全 EC 値} - 0.2\text{M マンニトール水溶液の EC 値}}$$

$$\text{電解質漏出速度}[\% \text{ min}^{-1}] = \frac{d}{dt} (\text{電解質漏出割合})$$

EC の測定に用いた果実長手方向中央部以外の部分を破碎・ろ過後、遠心分離(3180×g、20min)して得た上澄み液の pH を測定した。

#### ③近赤外拡散反射スペクトルの測定と解析

貯蔵 1 日後から 1 日毎に NIR-GUN (分解能 2 nm、積算時間 30 ms、測定波長領域 650-1060 nm、FANTEC)を用いて、キュウリ果実 1 個体につき長手方向中央部の異なる 3 つの位置における近赤外拡散反射スペクトル測定した。各実験区別に電解質漏出割合、電解質漏出速度、pH、貯蔵後経過日数をそれぞれ目的変数とした PLS 回帰分析を行った。また、主成分分析により、収穫後の時間経過に伴う主成分スコア値の変化を検討した。解析には、The Unscrambler(ver. 10.1、camo)を用いた。

#### (2)近赤外スペクトルを用いたハウレンソウ葉の呼吸応答の非破壊モニタリング

##### ①異なる溶存 O<sub>2</sub> 濃度の水の近赤外透過スペクトル計測

温度 20°C 一定の条件下で所定の濃度のガス(O<sub>2</sub>: 0.00、4.79、9.35、15.02、20.78 %; N<sub>2</sub>: balance)を純水に通気し、溶存 O<sub>2</sub> 濃度の異なる水を作製した。光路長 1 mm の石英セルにサンプルを入れ、MPA(BRUKER Optics, Japan)を用いて近赤外透過スペクトル(833-2500 nm、波長分解能 0.3-2.3 nm)を測定し、溶存 O<sub>2</sub> 濃度の増加に伴う水素結合水の変化について検討した。また、溶存 O<sub>2</sub> 濃度を目的変数とした PLS 回帰分析を行った。

##### ②異なる CA 貯蔵下におけるハウレンソウ葉の近赤外スペクトル計測

ハウレンソウ葉(*Spinacia oleracea* L., ‘オー

ライ’)7 株を容積 21.075 L の呼吸速度・近赤外スペクトル測定チャンバ(以下、チャンバ)に封入し、20.1±0.4°C の環境に静置した。加湿した所定の濃度のガス(O<sub>2</sub>: 4.79、9.35、15.02、20.78 %; N<sub>2</sub>: balance)を一定流量(10 ml min<sup>-1</sup>)で通気し、O<sub>2</sub> 濃度計(Neofox、Ocean Optics)と CO<sub>2</sub> 濃度計(LX-710、飯島電子)を用いてチャンバ内の O<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> 濃度を測定すると同時に、近赤外分光器(NIR-GUN、FANTEC)を用いて、サンプル葉部の近赤外拡散反射スペクトル(測定波長範囲 592-1092 nm、波長分解能 2 nm)を測定した。貯蔵 O<sub>2</sub> 濃度および貯蔵期間の経過に伴う、水素結合水の存在比変化、およびスペクトル変化について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1)可視近赤外スペクトルを用いたキュウリ果実の低温障害の非破壊検出

異なる貯蔵温度下における、キュウリ果実の pH、電解質漏出割合、電解質漏出速度の揭示変化を図 1(a)に示した。いずれの温度においても、収穫後の時間経過に伴い、pH は増加する傾向にあった。また、低温障害発生の臨界温度以下である 7°C および 2°C 貯蔵区では、15°C 貯蔵区と比較して、pH の上昇が大きく、貯蔵 10 日目において、pH に有意差が認められた。貯蔵期間の経過に伴う、電解質漏出割合、一方、電解質漏出速度の変化を図 1(b)、および(c)に示した。15°C 貯蔵区における電解質漏出割合、および電解質漏出速度が一定の値の範囲を維持するのに対して、7°C および 2°C 貯蔵区では増加する傾向が認められ、貯蔵 7 日目には、15°C 貯蔵区と比較して有意に大きな値を示した。これらの結果より、pH、電解質漏出割合、電解質漏出速度は、低温障害の進行に伴い増加することが認められた。しかしながら、近赤外拡散反射スペクトルを説明変数に、それぞれの低温障害の指標を目的変数とした PLS 回帰分析を行った結果、十分な精度を持つ数学モデルの構築は困難であった(R<sup>2</sup> < 0.3)。本研究で測定した 3 種類の低温障害の指標は、いずれも低温障害の進行程度を定量的に示す指標としては不十分である可能性があると考えられた。今後、低温障害の進行をより定量的に表現可能である他の指標、例えばマロンジアルデヒドの推移など、を目的変数とした解析を行い、近赤外拡散反射スペクトルが低温障害の指標の非破壊測定技術として有用かどうかを評価する必要があると考えられた。

一方、近赤外拡散反射スペクトルを説明変数、収穫後経過日数を目的変数として、PLS 回帰分析を行った結果を、表 1 に示した。各貯蔵温度区毎に構築した予測モデルの推定精度は、いずれの温度区においても良好な値を示した(R<sup>2</sup> > 0.7)。貯蔵期間の経過に伴うスペクトル変化は、15°C 貯蔵区では、主に老化

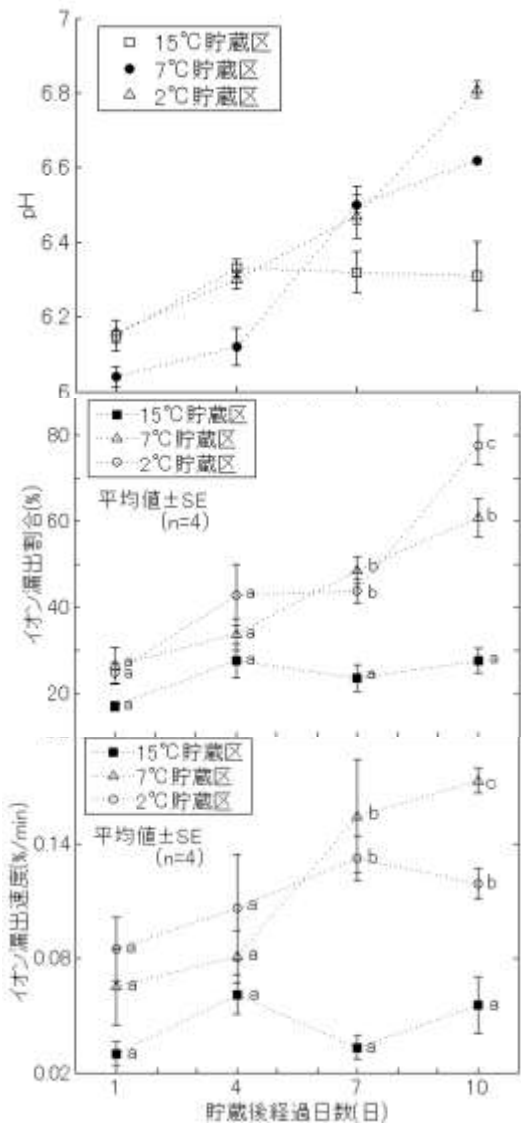


図1(a) 貯蔵後経過日数と pH; (b)イオン漏出割合; (c)イオン漏出速度の関係  
a, b, c: Tukey の多重比較同一日内における平均値に有意差が認められたもの (危険率  $\alpha=0.05$ )

の進行に影響されていると考えられるのに対して、7°Cおよび2°C貯蔵区では、老化に加えて低温障害の進行に伴うダメージの影響も受けていると考えられる。ゆえに、それぞれの温度区毎に構築した数学モデルの回帰ベクトルを比較し、低温障害の進行に関わる情報を持った波長について検討した。その結果、752-756、776-808、816-820、1014-1020 nmの波長が抽出された。これらの波長は、低温障害を受けない温度における老化の進行と独立に、低温障害の進行に伴って特異的に変化する波長であると考えられた。

また、教師値なしの分析である主成分分析により、収穫後の時間経過に伴う主成分スコア値の変化を検討した結果を図2に示した。

表1 貯蔵後経過日数の予測モデル精度 (n = 100)

貯蔵温度	潜在変数	RMSEV(日)	R <sup>2</sup> <sub>val</sub>
15°C	16	1.55	0.71
7°C	15	1.07	0.86
2°C	18	1.57	0.71

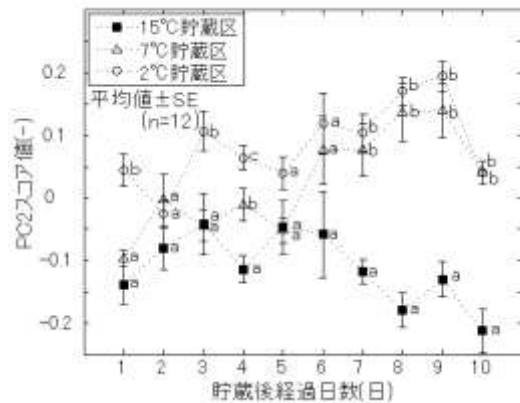


図2 第2主成分スコア値の変化; a, b, c: Tukey の多重比較同一日内における平均値に有意差が認められたもの (危険率  $\alpha=0.05$ )

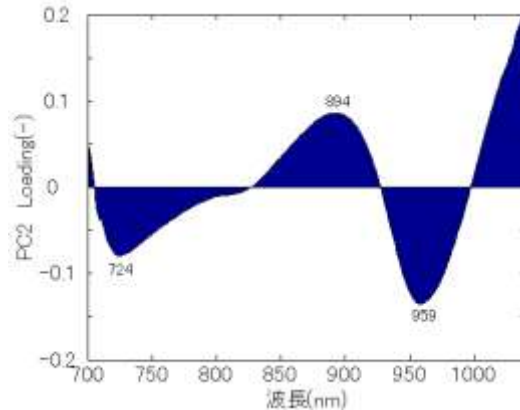


図3 第2主成分ローディング

7°Cおよび2°C貯蔵区における貯蔵7日目以降の第2主成分スコア値は、15°C貯蔵区のそれに比較して有意に大きな値を示した。また、第2主成分のローディングベクトルの観察により、724、894、959、1040 nmにピークが認められた(図3)。これらの結果より、近赤外拡散反射スペクトルを用いた、低温障害進行の非破壊検出の可能性が示された。

(2)近赤外スペクトルを用いたハウレンソウ葉の呼吸応答の非破壊モニタリング

図4に異なる溶存O<sub>2</sub>濃度の水における水素結合水の存在比を示した。短波長領域は956 nmにおける吸光度に対する942 nmのその比を、中波長領域は1440 nmにおける吸光度に対する1390 nmのその比を示してい

る。いずれの波長領域においても、溶存 O<sub>2</sub> 濃度の増加に伴う、水素結合水の増加は認められなかった。また、833-2500 nm における吸光度を説明変数とし、溶存 O<sub>2</sub> 濃度を目的変数とした PLS 回帰分析の結果、十分な精度を持つモデルの構築は困難であった ( $R^2 < 0.5$ )。これらより、本実験の条件および解析方法では O<sub>2</sub> の溶解に伴う水の構造化を近赤外分光法によって評価することは困難であると考えられた。

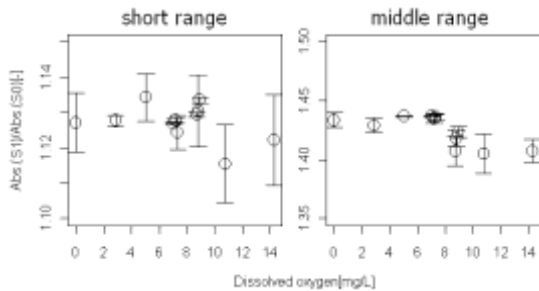


図4 水中の溶存 O<sub>2</sub> 濃度と水素結合水の存在比との関係

一方、ハウレンソウ葉を対象に、異なる O<sub>2</sub> 濃度環境下における収穫後の水素結合水の存在比変化を図5に、有意差検定の結果を表2に示した。貯蔵初期には、環境の O<sub>2</sub> 濃度による水素結合水の存在比に有意差は無いものの、貯蔵4日目には低 O<sub>2</sub> 濃度貯蔵によって水素結合水の存在比が有意に減少することが示された。以上の結果から、環境の O<sub>2</sub> 濃度変化は、ハウレンソウ葉の近赤外拡散反射スペクトルに影響を与えるものの、組織液中の溶存 O<sub>2</sub> 濃度変化に直接対応したものではなく、間接的な影響を捉えたものであると考えられた。周囲 O<sub>2</sub> 濃度と近赤外スペクトルとの関係については、代謝抑制効果を呼吸速度や酸化ストレスマーカーの推移と対比させるなどの更なる検討が必要である。

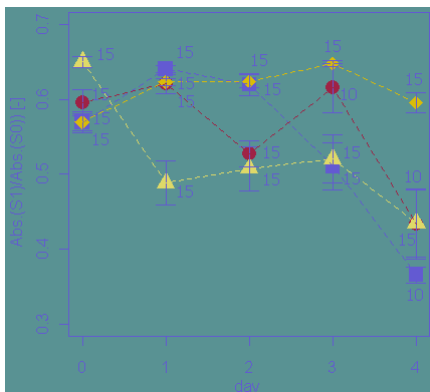


図4 貯蔵期間の経過に伴う水素結合水の存在比の変化(図中の数字は、サンプル数を示す)

表2 貯蔵期間の経過に伴う水素結合水の存在比の変化

oxygen% / day	0	1	2	3	4
■ 5	Aa	Aa	Aa	Aab	Ba
● 10	Aa	Aa	ABab	Aab	Ba
▲ 15	Aa	Bb	Bb	Ba	Ba
◆ 20	Aa	Aa	Aa	Ab	Ab

大文字は同一酸素条件での日数を、小文字は同一日数での酸素濃度を水準とし、Tukeyの多重比較検定により平均値に有意差が認められたもの( $\alpha = 0.05$ )。

## 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0件)

[学会発表] (計4件)

1. 古島七海, 黒木信一郎, 水谷良, ツェンコヴァルミアナ, 2010. キュウリ果実の近赤外拡散反射スペクトルと低温障害との関係, 第69回農業機械学会年次大会講演要旨, 松山, pp. 320-321, 2010年9月13日~16日.
2. 水谷良, 黒木信一郎, 古島七海, ツェンコヴァルミアナ, 2010. 異なるCA環境下におけるハウレンソウ葉の近赤外スペクトルの挙動, 第69回農業機械学会年次大会講演要旨, 松山, pp. 322-323. 2010年9月13日~16日.
3. 黒木信一郎, ツェンコヴァルミアナ, 古島七海, 2010. 近赤外拡散反射スペクトルによるキュウリ果実の低温障害検出, 農業機械学会関西支部第123回例会, 神戸, p. 58, 2010年3月10日.
4. 黒木信一郎, ツェンコヴァルミアナ, 水谷良, 2010. 近赤外分光法によるハウレンソウ葉のガス環境応答の解析, 農業機械学会関西支部第123回例会, 神戸, p. 59, 2010年3月10日.

## 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