

励起蛍光マトリクスに基づくエダマメの糖組成および水分の迅速推定

新潟大学 農学部
斎藤 嘉人

Rapid Estimation of Sugar Composition and Water Content in Edamame Based on Excitation Emission Matrix

Faculty of Agriculture, Niigata University
Yoshito Saito

The best time to harvest edamame is short, and if the right time is missed, the quality will deteriorate. Therefore, accurate estimation of the optimum harvest time is required for high quality edamame. It has been reported that moisture content and free sugar content change with increasing ripeness, and measuring these ripeness-related qualities may lead to an accurate and objective determination of the best time to harvest. In this study, instead of conventional chemical analysis, we newly focused on fluorescence spectroscopy to estimate the ripeness-related qualities of soybean based on the fluorescence characteristics of the capsular surface. From the excitation emission matrix (EEM) measurements, moisture content and free sugar contents (fructose, glucose, maltose, and sucrose) in the fruit were estimated by a prediction model for by using edamame samples harvested at different harvest dates.

EEM measurements revealed that the fluorescent characteristics of the shell surface of the edamame changed from before to after the optimum harvest period. In addition, moisture content and free sugar content were found to change with ripeness. The partial least square regression (PLSR) model for estimating ripeness-related quality with EEM data as input resulted in $R^2 = 0.73$ for moisture content estimation. On the other hand, the $R^2 = 0.46$ was obtained for the estimation of fructose content, indicating that the estimation of moisture content was more accurate than that of fructose content. In the estimation of water content, the highest values were obtained at fluorescence wavelengths around 685 nm, which was the chlorophyll-derived peak based on the VIP results. In addition, peaks at excitation wavelengths of 350-400 nm and fluorescence wavelengths near 400-500 nm were found to contribute to the estimation.

1. 研究背景および目的

新潟県では、エダマメの作付面積が全国最多であり、特産品でもある。しかし、エダマメはダイズへと熟度が増すにつれて品質は変化し、エダマメの収穫適期は短く、収穫適期を逃すと品質が低下するとされている（水野ら 2008）。よって、エダマメの高品質化には収穫適期の正確な判断が求められる。

エダマメは熟度が増すにつれて水分率や遊離糖含量が変化すると報告されている（水野ら 2008; 高野ら 2012）。これら熟度関連品質を測定することで正確かつ客観的な収穫適期の判断につながる可能性がある。エダマメの収穫適期判断の先行研究には、莢の厚さおよび色を利用した手法があるが（廣田ら 2004）、色の違いは微小であり判断が難しい。近年、非破壊かつ迅速・簡便に品質を測定できる光学的手法として蛍光分光法が着目されている。蛍光は紫外線などの励起光を分子が吸収して励起状態となり、長波長側で発光して基底状態へ戻る現象である。蛍光分光法

は、蛍光物質への高い選択性があり、蛍光強度をゼロレベルに対して測定するため感度が高い。応用事例として、特定の励起波長の光源とフィルター、カラーカメラを用いたイメージング装置が考えられる。

そこで本研究では、莢表面の蛍光特性に基づくエダマメの熟度関連品質の推定を目的とした。収穫日の異なるエダマメについて、励起蛍光マトリクス (EEM) の測定、子実の水分率計測と遊離糖含量（フルクトース、グルコース、マルトース、スクロース）の測定、熟度関連品質の推定モデル構築を行った。

2. 試料および方法

2-1. 試供材料

エダマメ品種‘湯あがり娘’を供試し、新潟大学新通ステーション（新通）と五十嵐キャンパス内（五十嵐）の圃場で収穫日を変え、子実が3粒入りの莢を全132莢取得した。各収穫場所での収穫日について、Table 1に示す。

収穫した日ごとに収穫適期およびその前後とラベルを付けた。五十嵐では新通で収穫した試料に比べて、よりダイズに近い状態のものを収穫するため収穫回数を1回多くした。

Table 1 各収穫場所での収穫日

| 収穫期 | 新通における収穫日 | 五十嵐における収穫日 |
|--------|---------------|---------------|
| 収穫適期前 | 2023/7/19 (水) | 2023/7/28 (金) |
| 収穫適期 | 2023/7/24 (月) | 2023/8/1 (火) |
| 収穫適期後1 | 2023/7/26 (水) | 2023/8/4 (金) |
| 収穫適期後2 | | 2023/8/7 (月) |

2-2. EEM 測定

3粒入りの莢のうち、中心子実の莢表面の蛍光特性を、EEMによって網羅的に計測した。EEM測定には分光蛍光光度計 (FP-8350、日本分光) を用いた。測定条件は、励起波長 200-735 nm、蛍光波長 210-750 nm、バンド幅は励起波長、蛍光波長ともに 5 nm とした。

2-3. 熟度関連品質の測定と推定モデルの構築

熟度関連品質である水分率は、凍結乾燥前後の3粒の子実重量から計算した。遊離糖含量は、子実から抽出液を作成し、超高速液体クロマトグラフィー (ACQUITY、Waters) を用いて測定した。さらに、部分最小二乗回帰 (PLSR) により EEM データを入力とした水分率および遊離糖含量の推定モデルを構築した。説明変数とした EEM データは、単波長での入力と全 EEM データの入力を行った。単波長での入力では、EEM 測定結果から観測されたピークに関係のある励起波長 320、340、365、370、400 nm における蛍光波長 375-700 nm までの EEM データを説明変数とした。全 EEM データでの入力では、ノイズ (励起波長 200-235、600-735 nm、蛍光波長 210-230、700-750 nm、散乱がみられる励起波長 + 20 nm の蛍光強度) を除いて推定を行った。

3. 研究結果・考察

3-1. EEM

Fig. 1 に五十嵐における収穫適期前と収穫適期後2の試料の代表的な EEM の結果を示す。縦軸が励起 (ex) 波長 (nm)、横軸が蛍光 (em) 波長 (nm)、色は蛍光強度 (R.U.) である。

Fig. 1 から、EEM では2つのピークが観測され、収穫適期前から収穫適期後にかけてピーク A (励起: 290-410 nm、蛍光: 380-580 nm) は観測範囲が広がり、ピーク B (励起: 345-500 nm、蛍光: 660-700 nm) は蛍光強度が小さくなり観測範囲が狭くなった。ピーク A はフェルラ酸 (Lichtenthaler & Schweiger 1998) などが

由来と考えられるが、ピーク範囲が広く特定することが難しい。ピーク B はクロロフィル由来 (Baker 2008) とされる。また、ピーク A の観測範囲の広がりや蛍光強度の増加は、ピーク B の低下、つまりクロロフィルの分解過程での蛍光物質の生成に由来する可能性がある (Borrmann *et al.* 1998)。

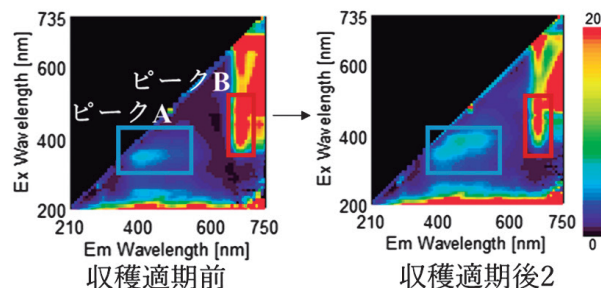
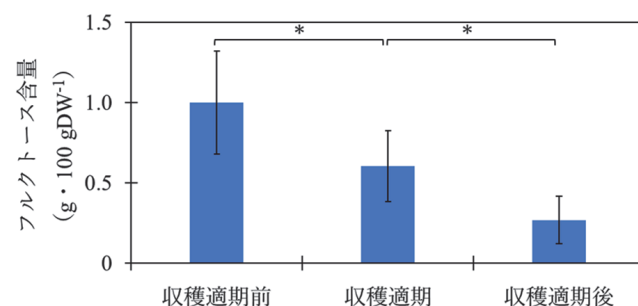


Fig. 1 EEM 結果の一例

3-2. 熟度関連品質の測定と推定

子実の水分率計測を行った結果、両収穫場所で収穫適期前から収穫適期後にかけて水分率は減少傾向となった。また、遊離糖含量を測定した結果を Fig. 2 ~ Fig. 5 に示す。Fig. 2 ~ Fig. 5 に示すグラフにおいて、縦軸が内部子実の乾燥重量 100 g あたりに含まれるそれぞれの遊離糖含量 ($\text{g} \cdot 100 \text{gDW}^{-1}$)、横軸が収穫適期前から収穫適期後の収穫日のラベルである。図中の * は有意差検定により有意差があった部分を示し、有意差検定には有意水準 5% による t 検定を用いた。

(a) 新通



(b) 五十嵐

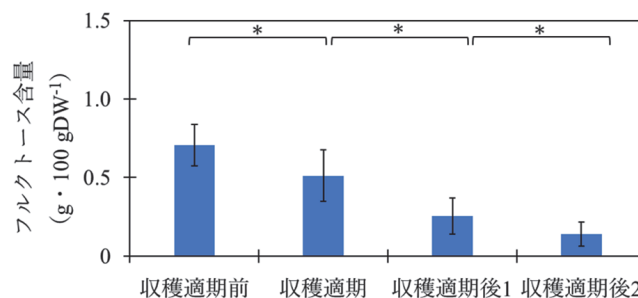


Fig. 2 フルクトース含量の測定結果 (* $p < 0.05$)

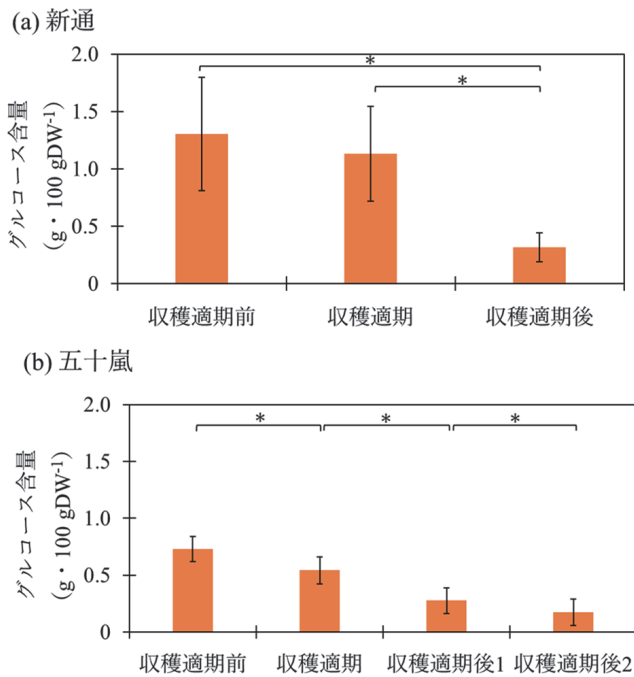


Fig. 3 グルコース含量の測定結果 (* $p < 0.05$)

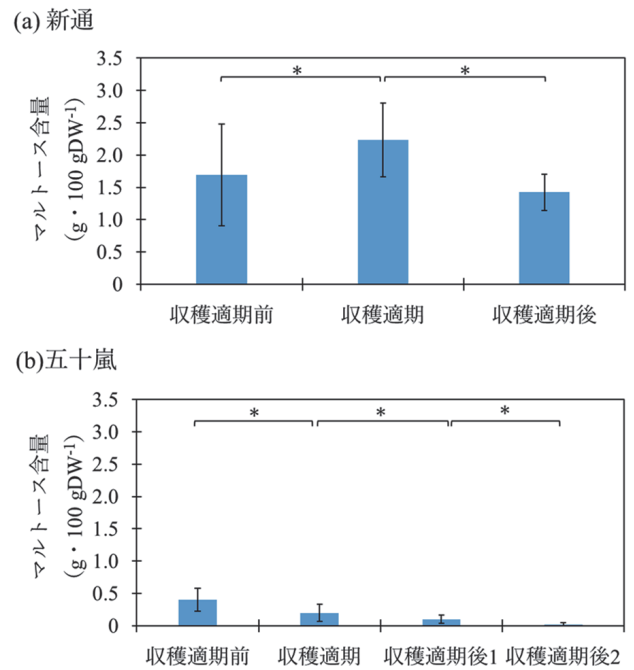


Fig. 5 マルトース含量の測定結果 (* $p < 0.05$)

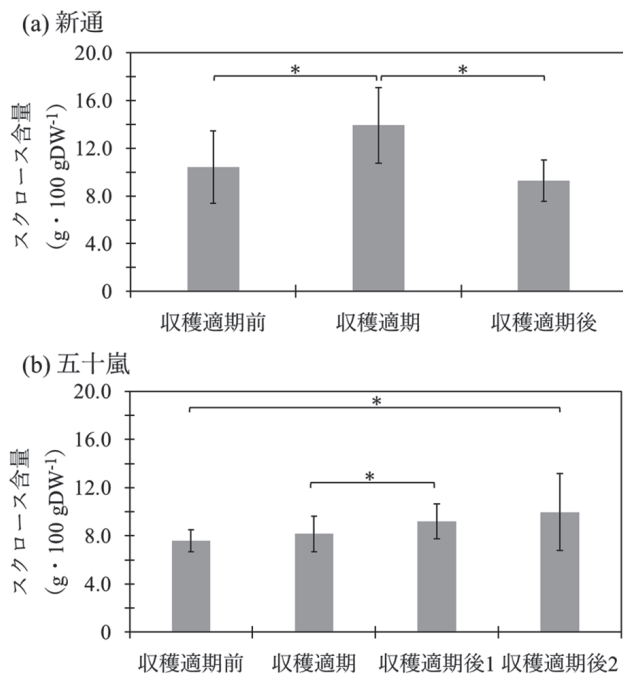


Fig. 4 スクロース含量の測定結果 (* $p < 0.05$)

Fig. 2 ~ Fig. 5 から、両収穫場所で遊離糖含量はそれぞれ熟度に伴って変化がみられた。特に Fig. 2 に示したフルクトース含有量は収穫日が遅くなるほど含有量が単調減少していた。

EEM データを入力とした熟度関連品質推定モデルでは、遊離糖含量の中でも新通と五十嵐で同様の傾向があり、収穫日ごとに有意差があったフルクトースを目的変数とした。EEM データの入力パターンごとの推定結果について、水分率の結果を Table 2、フルクトース含量の結果を Table 3 に示す。潜在変数は、交差検証 (Leave-one-out cross-validation) によって決めた。また、訓練データとテストデータは、4 : 1 に分割した。

Table 2 と Table 3 から、水分率の推定精度は最も高く決定係数 (R^2) が 0.73 であり、フルクトース含量の推定精度は決定係数が 0.46 であった。水分率はフルクトース含量と比較して全体的に推定精度が高かった。フルクトース含量の推定精度が高くなかった要因として、EEM から得られた蛍光特性とフルクトース含量の相関が非線形であったため、推定モデルの構築に利用した PLSR が適していなかった可能性がある。精度が最も高かったノイズを除去した全 EEM データを入力とした時の、テストデータにおける水分率の推定結果のプロットを Fig. 6 に示す。Fig. 6 は、縦軸が予測値、横軸が実測値であり、単位は%である。

Table 2 水分率の推定結果

| 説明変数 | 潜在変数 | 訓練データ | | テストデータ | |
|-------------|------|-------|------|--------|------|
| | | R^2 | RMSE | R^2 | RMSE |
| 励起波長 320 nm | 9 | 0.60 | 2.05 | 0.34 | 2.94 |
| 励起波長 340 nm | 10 | 0.71 | 1.74 | 0.40 | 2.80 |
| 励起波長 365 nm | 7 | 0.60 | 2.04 | 0.58 | 2.34 |
| 励起波長 370 nm | 7 | 0.59 | 2.08 | 0.60 | 2.29 |
| 励起波長 400 nm | 7 | 0.58 | 2.11 | 0.53 | 2.49 |
| EEM 全データ | 9 | 0.81 | 1.40 | 0.73 | 1.89 |

Table 3 フルクトース含量の推定結果

| 説明変数 | 潜在変数 | 訓練データ | | テストデータ | |
|-------------|------|-------|------|--------|------|
| | | R^2 | RMSE | R^2 | RMSE |
| 励起波長 320 nm | 8 | 0.63 | 0.20 | 0.22 | 0.29 |
| 励起波長 340 nm | 7 | 0.53 | 0.23 | 0.36 | 0.26 |
| 励起波長 365 nm | 9 | 0.68 | 0.19 | 0.46 | 0.24 |
| 励起波長 370 nm | 9 | 0.66 | 0.37 | 0.37 | 0.26 |
| 励起波長 400 nm | 5 | 0.51 | 0.23 | 0.35 | 0.26 |
| EEM 全データ | 9 | 0.81 | 0.14 | 0.40 | 0.25 |

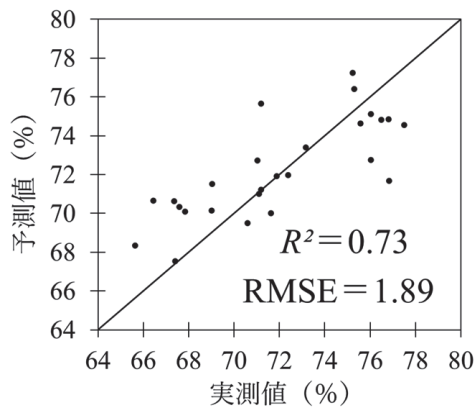


Fig. 6 EEM の全波長を入力とした水分率の推定結果

Fig. 6 に示すように、水分率の推定精度は決定係数が 0.73、二乗平均平方根誤差 (RMSE) は 1.89 であった。また、この推定における第一潜在変数のローディングを Fig. 7 に示す。

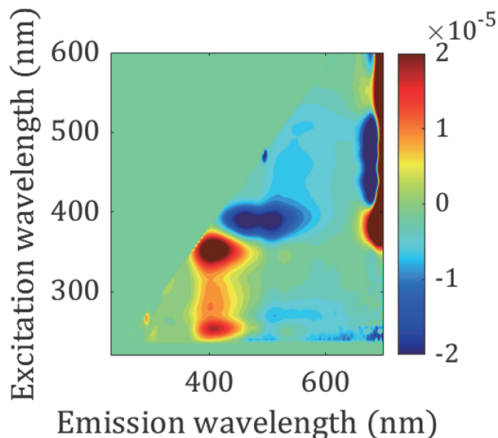


Fig. 7 第一潜在変数のローディング結果

Fig. 7 から、蛍光波長 400、685 nm 付近では強い正の値、蛍光波長 500 nm 付近では強い負の値を示した。さらに Fig. 8 に、この推定における変数重要度 (VIP) の結果を示す。

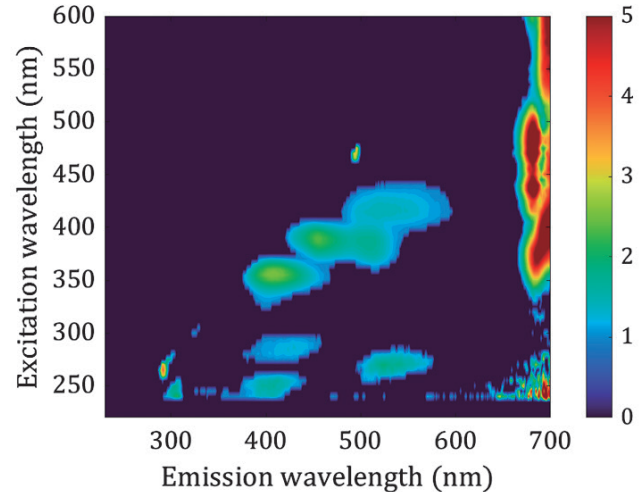


Fig. 8 水分率の推定における VIP の結果

Fig. 8 から、クロロフィル由来のピークとされる蛍光波長 685 nm 付近で VIP が最も高い値を示した。また、励起波長 350-400 nm、蛍光波長 400-500 nm 付近にもピークがみられ、水分率の推定に寄与することが示された。

4. 結論

EEM の測定結果から、エダマメの莢表面の蛍光特性が収穫適期前から収穫適期後にかけて変化することが分かった。また、水分率および遊離糖含量は熟度に伴って変化することが分かった。そして、PLSR によって EEM データを入力とした熟度関連品質の推定モデルを構築すると、水分率の推定では $R^2 = 0.73$ となった。一方で、フルクトース含量の推定では最も高く $R^2 = 0.46$ となり、水分率の推定はフルクトース含量と比較して精度が高かった。水分率の推定において、VIP の結果からクロロフィル由来のピークとされる蛍光波長 685 nm 付近で最も高い値を示した。加えて、励起波長 350-400 nm、蛍光波長 400-500 nm 付近にピークがあり、推定に寄与することが分かった。このことから、励起波長 350、400 nm の 2 つの波長が蛍光特性を計測する波長に適していると考えられる。イメージング装置への応用を行う場合には、これら 2 波長の紫外 LED を利用することが最適であると考えられる。

5. 今後の課題

フルクトース含量の推定精度が高くなかった要因には、EEM から得られた蛍光特性とフルクトース含量の相関が

非線形的であったためであると考えられる。よって、サポートベクターマシン (SVM) やニューラルネットワークなど非線形に対応した手法による推定を行い、推定精度の向上を検討する必要がある。

6. 謝辞

本研究は、公益財団法人東洋食品研究所による助成を受けたものである。試料提供には新潟大学農学部附属農場新通ステーションに協力いただいた。

7. 参考文献

Baker, Neil R., 2008, Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, p.89-113. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759.

Borrmann, Daniela *et al.*, 1998, Chlorophyll Degradation and Formation of Colorless Chlorophyll Derivatives

during Soybean (*Glycine max* L. Merrill) Seed Maturation. *J. Agric. Food Chem.*, **57**(5), p.2030-2034. DOI: 10.1021/jf803191k.

廣田 智子ら, 2004, 丹波黒大豆エダマメの収穫適期判定スケールの開発とその利用方法. *兵庫農技総セ研報 (農業)*, (52), p.23-28.

Lichtenthaler, Hartmut K.; Schweiger, Joachim, 1998, Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plant. *J. Plant Physiol.*, **152**(2-3), p.272-282. DOI:10.1016/S0176-1617(98)80142-9.

水野 寛士ら, 2008, エダマメ ‘ふくら’ と ‘湯あがり娘’ における生育中の品質関連因子解析に基づく収穫適期の評価. *園学研.*, **14**(1), p.61-67. DOI: 10.2503/hrj.14.61.

高野 和夫ら, 2012, 黒大豆 ‘岡山系統1号’ エダマメの成熟に伴う食味成分の変化と収穫適期. *岡山県農業研報.*, (3), p.17-22.