

# モモ収穫後の追熟指標の開発

## —水溶性ペクチンに着目した非破壊計測法—

### 1. はじめに

モモのように追熟性の果実においては、収穫適期の判断は特に重要である。一方で収穫後においても、食べ頃に熟しているかどうかの評価が難しく、例えば、糖度が同等であっても未熟な硬い果実と、完熟した柔らかい果実では食味が大きく異なる。食べ頃に熟したかどうかの評価は、現状では熟練者が外観（色味）及び触感（硬度）で主観的に判断することが多い。

果実が熟す過程においてはクロロフィルの減少による地色の変化、同時に軟化、香りの増加が観測される<sup>1)</sup>。また、植物ホルモンであるエチレンの放出量が増加する。果実内部ではグルコースの減少とショ糖の増加、マレイン酸等の有機酸の減少が進行する<sup>2) 3)</sup>。貫入式硬度計を用いた果実硬度測定値や剥皮による地色は、生産現場において収穫適期を知るための熟度の判断によく利用される。こうした方法では果実を破壊する必要があるが、非破壊的にこれを実施しようとする試みも多い<sup>4)</sup>。具体的な方法として微小摂動<sup>5-7)</sup>、打撃法<sup>8-10)</sup>、音響測定<sup>11-12)</sup>、光学測定<sup>13-15)</sup>等がある。中でも打撃法では比較的正確な硬度を得ることができるが、少なからず果実にダメージを与える懸念がある。これに対し、可視・近赤外分光法等の光学的手法では正確性は劣るが、完全に非破壊的であり、全数検査も可能であるなど、利用価値は大きい。

果実の選別技術（選果機）においては、大きさ、重量、糖度などを各種センサーや画像処理技術を用いて測定し、選別する技術が実用化されている。これらの確立した選別技術に、食べ頃が評価できる追熟度を指標として付加することができれば、出荷時期をより精密にコントロールでき、果実の商品価値を高めることができる。実際、このようなアイデアのもと、国内外において選果場のコンベヤー上に設置するインラインセンサーが試行されている。これらの分光学的な熟度選別の原理の詳細は明らかでないが、多くはクロロフィルの減少量を観測しているものと思われる。この基礎となるアイデアは Ziosi らによる指標であり、これはクロロフィル a の吸収ピークにあたる 670nm の吸光度と、ベースライン 720nm の吸光度の差 (index of absorbance difference,  $I_{AD}$ ) として以下のように定義される<sup>16)</sup>。

$$I_{AD} = A_{670nm} - A_{720nm} \quad (1)$$

これは分光分析による非破壊計測であるから、計測による品質劣化の懸念はない。しかしながら、クロロフィルは未熟な果実中に多く含有され、収穫適期に近

づくにつれてその含有量が急速に減少し、消費者の手元に届く段階では殆ど含有量に変化がみられないことが多い。このため、クロロフィル含有量は、樹上での未熟・適熟判定を行う評価指標には適するが、収穫後の追熟期間における食べ頃評価には適さない。その他、追熟の際に非破壊的な分析指標として使用できそうなものに、エチレンや香氣成分等がある。しかし、いずれも微量であり分光学的な測定には適さない。残る指標は果実の軟化である。その原因は完全には理解されていないが、細胞壁に含まれる酵素によるペクチンの加水分解により進行すると考えられている<sup>17-19)</sup>。そこで、我々は収穫後の果実の食べ頃評価のため、ペクチンの分解物として生じる水溶性ペクチン量を指標とした分光学的非破壊的熟度指標の開発を試みた。

## 2. 収穫後の熟度測定

### 2-1 実験

今回の試料には農研機構果樹研（茨城県つくば市）で栽培した白桃：“あかつき”を用いた。ほぼ同時刻に同一栽培区画から、熟練者が外観の色味および触感により収穫適期と判定した40果を収穫した。収穫後は果実硬度の各群の平均値が一定になるよう5果ずつ8群に分け、21℃に制御した室内で貯蔵し、収穫日から計8日間、1日に1群ずつ実験に供した。各実験日には、エチレン産生量、可視・近赤外吸光度スペクトル、果実硬度（FF）、糖度含量（SSC）の測定と、水溶性ペクチン量（WSP）測定のための果肉のサンプリングを実施した。エチレン産生量は果実を密閉容器内において26℃で5～10分間程度静置した後、容器内の空気をシリンジで1 mL 採取し、ガスクロマトグラフィー（GC-14B、島津製作所）で分析した。



**図1** 接触型非破壊糖・酸度計（フルーツセレクター K-BA100R, クボタ）によるモモ果実測定の様子。

装置は可視・近赤外分光装置であり、光ファイバーで接続されたプローブヘッドにて果実内部の拡散反射スペクトル（500-1000nm）を計測する。

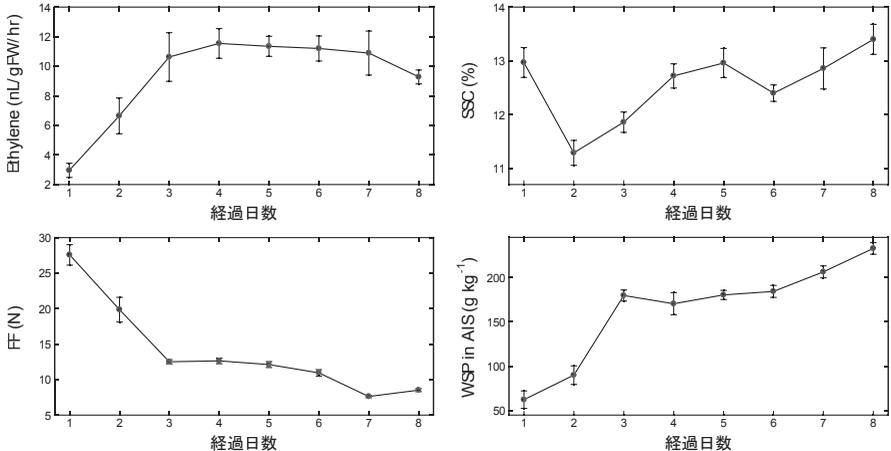


図2 エチレン産生量、果実硬度 (FF)、糖度含量 (SSC) の測定と、水溶性ペクチン量 (WSP) の経日変化。エラーバーは標準誤差を表す。

可視・近赤外吸光度スペクトル計測にはポータブル糖度選果機（フルーツセレクター K-BA100R, クボタ, 図1）を、FF計測には貫入式硬度計 (KM-5, 藤原製作所), SSC測定には屈折率測定方式のBrix糖度計 (Pocket PAL-BX/RI, アタゴ) を用いた。エチレン生成量, 可視・近赤外スペクトル, FF, SSCの測定, およびWSP定量用の果肉サンプリングは, 赤道沿いの3箇所（縫合線から左右90度および縫合線の裏側）において記述した順番に実施した。水溶性ペクチン (WSP) の定量は吉岡らの方法<sup>19) 20)</sup>に基づき, モモ果肉からアルコール不溶性固形物 (AIS: alcohol-insoluble solids) を抽出し, AISを蒸留水40 mLに室温で12時間浸漬, 遠心分離後, 上清液をWSP溶液として抽出した。最終的にm-phenylphenol法<sup>21)</sup>により可視スペクトル強度を用いてWSPを定量した。各実験日に供された5果のエチレン生成量, SSC, FF, WSPの平均を, それぞれ日数の経過に対してプロットした (図2)。

## 2-2 可視・近赤外スペクトルによるPLS回帰モデル

図3に同一の桃果実における8日間の可視・近赤外スペクトル変化を示す。収穫後, 時間が経つにつれ, 670nmにピークを持つクロロフィルaの減少が観測できる。また, 近赤外スペクトル領域 (700nm以上) においては経時的なベースラインの上昇が見られた。次に全40果の可視・近赤外スペクトルに前処理としてSavitzky-Golay平滑化<sup>22)</sup> (窓サイズ11点二次関数) およびベースライン補正<sup>23)</sup>を行った後, これを説明変数としてPLS回帰法<sup>24) 25)</sup>によりFF, WSP, さらに収穫後経過日数 (ED) の検量モデルを作成した。結果は表1に示すとおり,

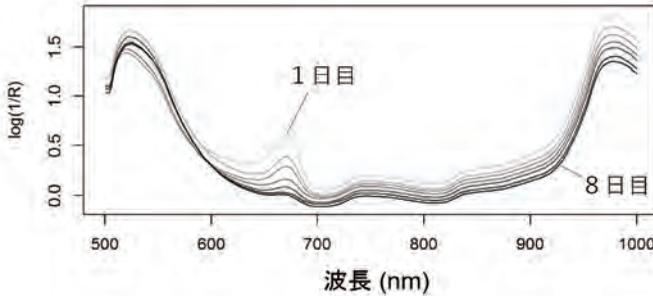


図3 測定されたモノの可視・近赤外拡散反射スペクトル。

縦軸は反射率  $R$  の逆数の対数とすることで吸光度と同一のスケールに対応させた。

表1 果実硬度 (FF), 水溶性ペクチン (WSP), 収穫後経過日数 (ED) の PLS 回帰による検量モデルの成立条件およびパフォーマンス

	N	LVs	$R^2$	RMSEC	RMSECV	Bias
FF (N)	80	9	0.80	3.60	4.41	0.07
WSP in AIS ( $\text{g kg}^{-1}$ )	40	9	0.82	27.08	41.16	-2.50
ED	40	10	0.90	0.70	1.05	-0.05

N: 試料数, LVs: 潜在変数の数,  $R^2$ : Calibration における決定係数, RMSEC: calibration における平均二乗誤差, RMSECV: cross-validation における最小二乗誤差, Bias: calibration における平均誤差, FF: 果実硬度, WSP in AIS: アルコール不溶性固形物中の水溶性ペクチン量, ED: 経過日数

いずれの項目も決定係数 0.8 以上のモデルが成立した。

次の問題は、収穫後熟度の教師データ (目的変数) としてどれを使用すればよいかである。近赤外スペクトルは水や有機物の分子振動を反映するため、水溶性ペクチン量以外は間接的な相関から検量モデルが成立したと推測できる。このことを調べるため、図3に各モデルの回帰係数 (上段) と有効波長指標 VIP (variable importance in projection, 下段)<sup>26)</sup> をプロットした。回帰係数は、測定されたスペクトルの各波長の吸光度に乘算し、足し合わせることで目的変数の推定値を提示する、いわば検量モデルの実体である。図4を見ると、一見、FF, WSP, ED で全く異なるように見えるが、符号の正負や強弱の様子が異なるだけで、有効波長は共通していると解釈できる。さらに明確に有効波長帯域を示す指標である VIP を見ると、FF, WSP, ED の全てがほぼ同じパターンを示すことがわかる。VIP は値が 1 以上の変数が検量モデルの成立に強く寄与するとされる。したがっ

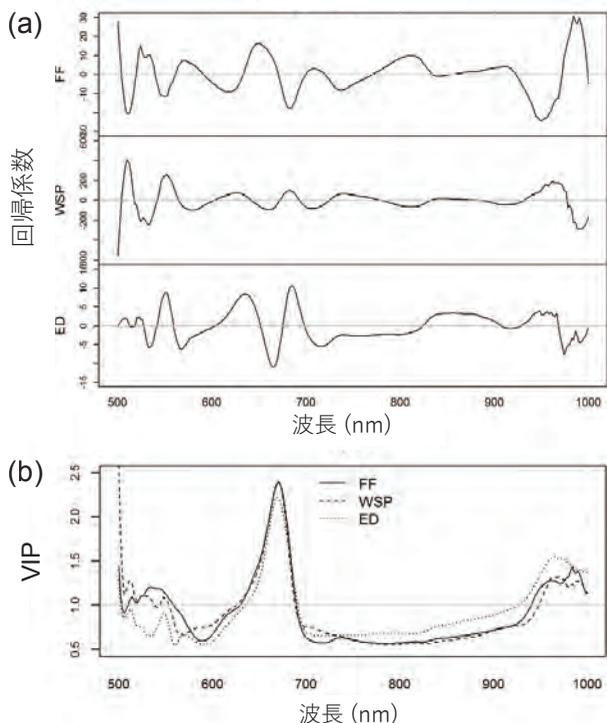


図4 (a) 果実硬度 (FF), 水溶性ペクチン (WSP), 収穫後経過日数 (ED) 検量モデルの回帰係数プロット。(b) 同モデルの有効波長指標 VIP (variable importance in projection)。

て、クロロフィルの吸収帯 (680nm 付近) や 940-980nm の OH 伸縮振動帯などが桃果実の追熟の推定に重要であることが明らかになった。以上のことから、近赤外スペクトルを用いて追熟性の果実硬度の非破壊推定が可能となる背景には、水溶性ペクチン量の変動が寄与していることが強く示唆された。

### 3. 水溶性ペクチンに基づく簡易な光学的指標の開発

#### 3-1 ペクチンの加水分解過程 (in vitro) の観測

桃の追熟、即ち軟化はペクチンの加水分解によって進行すると考えられる。ペクチン分解酵素によって加水分解が進み、ガラクトシュロン酸などの水溶性ペクチンが増加する。これまでに桃の硬度、あるいは経過日数と水溶性ペクチン量は近赤外スペクトルの同帯域に有効波長を持つことが分かった。したがってさらに詳細に水溶性ペクチン特有の吸収波長を特定できれば、これを追熟度指標として利

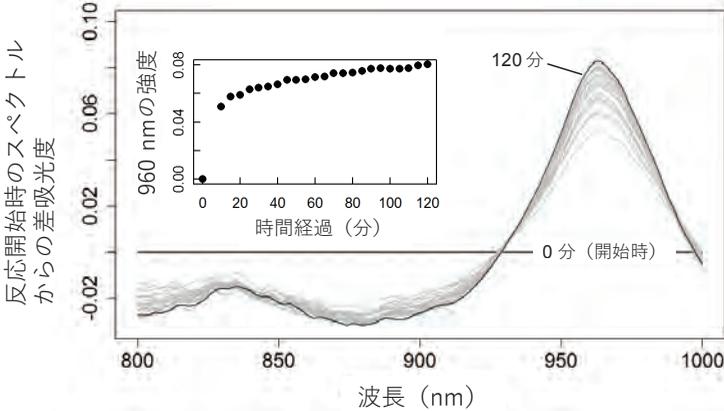


図5 ペクチンの加水分解過程 (in vitro) で観察される近赤外スペクトルの変化, および 960nm におけるピーク強度の時間変化プロット (挿図)

用できる可能性がある。

そこで、市販のペクチン（柑橘由来，和光純薬）の1%水溶液に対し、予め準備したポリガラクトソナーゼ（シグマアルドリッチ）4.5%を加えて反応を開始し、2時間にわたって近赤外スペクトルを測定した。測定には光路長0.2mmの透過反射セル（FOSS社製）を使用した。測定開始時点のスペクトル（0min）を差し引いたスペクトルを図5に示す。800-930nmにはランダムなベースライン変動が見られるが、960nmを中心とした明確なピークが観測された。図5の挿入に示すとおり、960nmにおけるピーク強度はペクチンの分解過程で明らかな増加傾向を持つ。この吸収の帰属は明確ではないが、水溶性ペクチンの生成による末端OH基の増加を反映するものと推察される。次に、この知見を元に、実際の果実の非破壊拡散反射強度から追熟度の指標化を試みた。

### 3-2 追熟度の指標化

ペクチンの加水分解が960nmを中心とした吸収として観測されたことから、これを実際の果実の熟度指標として用いる。果実の拡散反射スペクトルには、個体ごとに異なる光の散乱がベースライン変動として加算される。これを補正するため、比較的吸収のない810nmの強度を基準とし、以下の式で桃の熟度指標 (Index of maturity for peaches: IMP) を定義する。

$$\text{IMP} = A_{960\text{nm}} - A_{810\text{nm}} \quad (2)$$

$A_{960\text{nm}}$ ,  $A_{810\text{nm}}$  は、それぞれ960nm, 810nmにおける拡散反射強度である。単

純な2波長強度の差であり、学習による検量モデルの構築は不要である。

さくら、マロンなピーチ、清水白桃、浅間白桃、白鳳、嶺鳳の6種のモモ（白桃）について、購入日を0日目とし、以後5日間、10個体を室温（25℃）に放置し、一日おきに同一箇所のスペクトルを非破壊的に測定した。測定には図1と同じ、フルーツセレクターを使用した。測定した拡散反射スペクトル強度から、(1)式の $I_{AD}$ および(2)式のIMPを計算し、経過日数に対してプロットした(図6)。

従来技術である $I_{AD}$ は、モモの地色に含まれるクロロフィル量に基づいた指標である。市販の桃であるため、多くの品種では収穫時期において既にクロロフィルが消失しており、結果的に白鳳を除いて $I_{AD}$ には大きな変化は見られなかった。一方で水溶性ペクチンの量に基づくIMPでは、すべての品種で購入後に1.5～

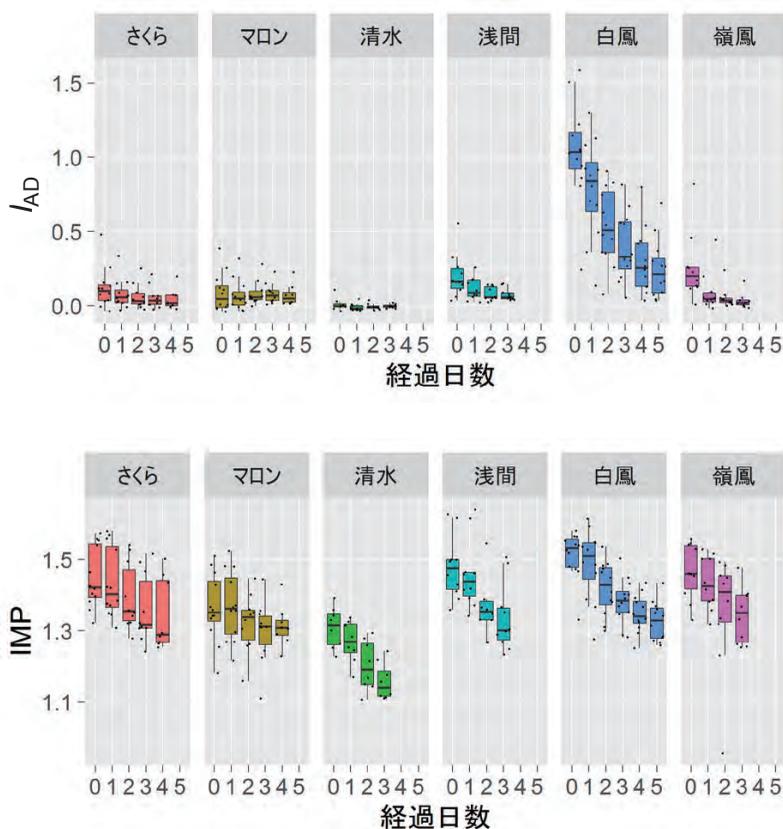


図6 従来の果実熟度指標 ( $I_{AD}$ , 上段) および筆者らが開発した熟度指標 (IMP, 下段)

1.2の範囲で経日変化を観測することができた。なお、2波長の強度差として定義される $I_{AD}$ とIMPは、両者とも同一装置から求めたため、図6の値はそのまま絶対比較ができる。ここで示したIMPの明確な変化は、同一個体の追跡調査によるところが大きい。しかし数百個の不特定多数の桃果実の実験の過程からも、IMPは果実硬度と一定の相関(相関係数0.6程度)を持つことを確認済みである。

本実験では市販の接触式非破壊糖度センサーの拡散反射強度を利用したが、今後は大規模な選果システムで使用される透過型選果機にも転用可能か、あるいは熟度の変化を最大限効率的に捉えられる光学配置は最適であるかなど、いくつかの検討の余地がある。とは言えIMPの最大の利点はセンシングに2波長しか使用しない点である。したがって2個のLEDを使用すれば、小型かつ安価な追熟度センサーが実現でき、追熟性の果実の収穫後の商品管理や精密出荷に利用可能である。一方、 $I_{AD}$ もまた760nmという特定の波長のみで定義できるため、IMPと合わせることで、さらに生産現場から消費者のもとに至るまで、追熟性果実の適切な熟度を可視化する技術として普及する可能性があると言える。

#### 4. おわりに

農産物の多くは外観や糖度など、少ない基準で格付けされることが多いが、消費者のニーズに応えるためには、食品の二次機能、三次機能を含む様々な訴求点が付加されることが期待される。本稿で紹介した水溶性ペクチンに着目した熟度指標は、多品種の国産モモを海外展開するにあたり、嗜好性調査を行う過程で考案されたが、果実の食べ頃は個人の好みによって異なるため、究極の消費者ニーズかもしれない。なお、本方法は既存の糖度選果機のハードウェアを変更することなく搭載できる可能性があるため、より細かな出荷条件の設定も可能である。また、洋ナシなど、他の品目へ応用できる可能性もある。今後、本技術が生産性向上と国産農産物の普及に役立つことを期待する。

#### 謝辞

本研究は農林水産省委託プロジェクト「国産農産物の多様な品質の非破壊評価技術の開発」内の課題「国産農産物の輸出先における嗜好性の予測技術の開発(H26～29)」の研究補助により行われたものである。

(食品分析研究領域 非破壊計測ユニット 池羽田 晶文)

## 参考文献

- 1) Cascales AI, Costell E, Romojaro F. Effects of the degree of maturity on the chemical composition, physical characteristics and sensory attributes of peach (*Prunus persica*) cv. Caterin. *Food Sci Tech Int.* 2005 ; 11(5): 345-352.
- 2) 小宮山美弘, 原川守, 辻政雄果, 実類の熟度と貯蔵条件に基づく糖組成の特徴, 日本食品工業学会誌 1985 ; 32(7): 522-529.
- 3) Crisosto CH. Stone fruit maturity indices : a descriptive review. *Postharvest News Inf.* 1994 ; 5(6): 65N-68N.
- 4) García-Ramos FJ, Valero C, Homer I, Ortiz-Cañavate J, Ruiz-Altisent M. Non-destructive fruit firmness sensors : a review. *Spanish J Agric Res.* 2005 ; 3(1): 61-73.
- 5) Steinmetz V, Crochon M, Bellon Maurel V, Garcia Fernandez JL, Barreiro Elorza P, Verstreken L. Sensors for Fruit Firmness Assessment : Comparison and Fusion. *J Agric Eng Res.* 1996 ; 64(1): 15-27.
- 6) Clayton M, Biasi B, Mitcham B. New devices for measuring firmness of cherries. *Perishables Handling Q.* 1998 ; (95): 2-4.
- 7) McGlone VA, Jordan RB. Kiwifruit and apricot firmness measurement by the non-contact laser air-puff method. *Postharvest Biol Technol.* 2000;19(1): 47-54.
- 8) Jarén C, García-Pardo E. Using non-destructive impact testing for sorting fruits. *J Food Eng.* 2002 ; 53(1): 89-95.
- 9) Slaughter DC, Ruiz-Altisent M, Thompson JF, Chen P, Sarig Y, Anderson M. A handheld, low-mass, impact instrument to measure nondestructive firmness of fruit. *Trans ASABE.* 2009 ; 52(1): 193-199.
- 10) Ian H, Francisco Javier G-R, Jaime O-C, Margarita R-A. Evaluation of a non-destructive impact sensor to determine on-line fruit firmness. *Chil J Agric Res.* 2010 ; 70(March): 67-74.
- 11) Muramatsu N, Sakurai N, Yamamoto R, Nevins DJ, Takahara T, Ogata T. Comparison of a non-destructive acoustic method with an intrusive method for firmness measurement of kiwifruit. *Postharvest Biol Technol.* 1997 ; 12(3): 221-228.
- 12) De Belie N, Schotte S, Lammertyn J, Nicolai B, De Baerdemaeker J. Firmness changes of pear fruit before and after harvest with the acoustic impulse response technique. *J Agric Engng Res.* 2000 ; 77(2): 183-191.
- 13) McGlone V, Abe H, Kawano S. Kiwifruit firmness by near infrared light scattering. *J Near Infrared Spectrosc.* 1997 ; 5(1): 83.

- 14) Lu R, Peng Y. Assessing peach firmness by multi-spectral scattering. *J Near Infrared Spectrosc.* 2005 ; 13 : 27-35.
- 15) Fu X-P, Ying Y-B, Zhou Y, Xie L-J, Xu H-R. Application of NIR spectroscopy for firmness evaluation of peaches. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2008 ; 9(7): 552-557.
- 16) Ziosi V, Noferini M, Fiori G, et al. A new index based on vis spectroscopy to characterize the progression of ripening in peach fruit. *Postharvest Biol Technol.* 2008 ; 49(3): 319-329.
- 17) Brummell DA, Harpster MH. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. In : Carpita NC, Campbell M, Tierney M, eds. *Plant Cell Walls.* Dordrecht : Springer Netherlands ; 2001 : 311-340.
- 18) Chapman GW, Horvat RJ. Changes in nonvolatile acids, sugars, pectin and sugar composition of pectin during peach (Cv. Monroe) maturation. *J Agric Food Chem.* 1990 ; 38(2): 383-387.
- 19) 吉岡博人, 果実・野菜組織の軟化とペクチン及びペクチン分解酵素, 日本食品工業学会誌 1992 ; 39(8): 733-737.
- 20) Yoshioka H, Hayama H, Tatsuki M, Nakamura Y. Cell wall modifications during softening in melting type peach “Akatsuki” and non-melting type peach “Mochizuki.” *Postharvest Biol Technol.* 2011 ; 60(2): 100-110.
- 21) Huber DJ, O'Donoghue EM. Polyuronides in Avocado (*Persea americana*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruits Exhibit Markedly Different Patterns of Molecular Weight Downshifts during Ripening. *Plant Physiol.* 1993 ; 102(2): 473-480.
- 22) Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem.* 1973 ; 54(2): 484-489.
- 23) Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal Chem.* 1964 ; 36(8): 1627-1639.
- 24) Peng J, Peng S, Jiang A, Wei J, Li C, Tan J. Asymmetric least squares for multiple spectra baseline correction. *Anal Chim Acta.* 2010 ; 683(1): 63-68.
- 25) Mevik B-H, Wehrens R. The pls Package : Principle Component and Partial Least Squares Regression in R. *J Stat Softw.* 2007 ; 18(2): 1-24.
- 26) Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S. *Multi- and Megavariate Data Analysis.* 2nd ed. Umeå : Umetrics ; 2006.