

可視・近赤外分光法を用いる中晩柑‘せとか’凍害果の 比重計測の可能性

伊藤史朗 菊池孝*

Potential of Non-destructively Determining the Specific Gravity of Cold Injured Fruit in the Field Using Visible / Near-infrared Spectroscopy on Medium-late Maturing Citrus ‘Setoka’ Tangor

ITOU Fumiaki and KIKUCHI Takashi

要 旨

厳寒期の寒波に遭遇することで発生する中晩柑‘せとか’凍害果は果実外観から正常果との識別が困難であるが、正常果に比べて比重が軽い等の特徴がみられる。そこで、可視・近赤外分光法を用いる‘せとか’凍害果の比重の計測の可能性について検討した。人為的に凍結させた果実を用いて可視・近赤外領域波長である500～1010nmを測定した結果から、比重を推定できる最適な説明変数として540, 610, 858および894nmの4波長が選択された。これら波長を説明変数とする検量線(重回帰式)の精度は $R=0.926$, $SEC=0.013$ であった。また、検量線の評価時の精度は $R=0.916$, $SEP=0.014$, $Bias=0.000$ となり、計測の可能性を示唆した。

キーワード：‘せとか’，凍結，比重，近赤外

1. 緒言

栽培期間中の環境変化が柑橘の果実品質に影響を及ぼした事例は多数あり、その一つに寒害が挙げられる。寒害には2つに区分され、低温によって樹体および果実が凍結し、そのことで異常症状が発生する凍害と、寒風にさらされることで主に果皮に障害が発生する寒風害がある(中川ら, 1976; 小中原, 1984)。県下で発生した‘せとか’の凍害事例を挙げると、す上がりや粒化症の発生、じょうのう膜の内外に空洞の発生など正常果とは明らかに異なる症状を肉眼で視認できる(松本ら, 2006; 伊藤ら, 2015)ほか、苦味の発生により食味が悪化する場合もある。しかし、凍害果の外観は正常果との違いが殆どみられず識別が困難であり、凍害果が市場へ流出する危険がある。そのことは産地ブランドの失墜を引き起こす恐れがあるため、産地毎の対策が必要である。

一方、柑橘に対し可視・近赤外分光法を用い

て果実品質を非破壊計測した事例がある(宮本, 2003)。一般的に800～2500nmの近赤外領域はC-H, O-H, N-Hの伸縮振動の高次倍音と電子吸収が観測できるほか、透過性がみられる特徴を有する(尾崎, 1996)。これら光学的特徴の利用事例として選果機による果肉部の糖度計測機能が既に実用化されている。このことは、既存の選果機に新たな検量線を導入することで、糖度以外の果実品質の計測の可能性を示しており、ブラッドオレンジのアントシアニン含量に関する報告例などがある(伊藤ら, 2012; 菊池, 2013)。

そこで、可視・近赤外分光法を用いる非破壊計測技術を応用し比重の計測精度および正常果に混入した凍害果の識別技術の可能性を検討したので報告する。

2. 材料および方法

供試品種については、耐寒性が中位で‘清見

* 現 農業大学校

よりやや弱く、露地栽培では収穫時期が2~3月となる(松本ら, 2003)ことから凍害果の発生が懸念される‘せとか’を選定した。なお、本品種には退色防止のためサンテ被覆の事例があるが、これには保温効果が期待できないとの報告がある(愛媛県農林水産部農業振興局農産園芸課)。

供試果実の来歴を表1に、その品質を表2に記載した。人為凍害果が検量線作成用、凍害果が検量線評価用の果実にそれぞれ相当し、産地や果実の入手月日など経緯が異なるため外部バリデーション方式による試験となる。

表1 供試した‘せとか’果実の来歴(2014年)

月日	人為凍害果 (宇和島市産)	凍害果 (今治市産)
1/27	-	寒波の襲来
2/7	-	寒害調査により 果肉異常を確認し 出荷停止措置
2/13	果実収穫	-
2/14	果実入手	-
2/15	人工的な低温 処理の開始	-
3/2	-	果実収穫
3/4	-	果実入手
3/14	低温処理終了	-
3/17	試験実施	試験実施

表2 供試した‘せとか’果実の果実重、品温および比重

調査項目	単位	人為凍害果 (検量線作成用)	凍害果 (検量線評価用)
年月		2014年3月	2014年3月
産地		宇和島市	今治市上浦町
個数	個	106	68
果実重 ^z	g	233.0 ± 3.6	236.7 ± 22.1
品温 ^z	℃	8.5 ± 0.5	8.5 ± 0.5
比重 ^z	w/v	0.95 ± 0.00	0.93 ± 0.01

^z 平均値 ± 標準誤差

検量線の作成・評価を行うには多数の凍害果が必要となるが、これら果実は寒波遭遇によって発生するため、安定的かつ計画的な入手が見込めない。この点について、筆者らは‘せとか’正常果に対し複数の条件で人為的に低温を遭遇させて作製した人為凍害果の品質を調査した結果、果肉部の異常症状やその程度、比重においては現地から入手した凍害果と近似する

ことを報告している(伊藤ら, 2015)。この知見をもとに検量線の作成において人為凍害果を活用することとし、人為凍害果の作製にあたり正常果は寒害果の発生がみられていない愛媛県宇和島市産果実のうち出荷規格が2L相当品(果径は80~88mm, 果実重は250g前後)を選定した。果実入手後は低温処理前に恒温機(TABAI ESPEC製 TBR-2.5WOSX)を用いて5℃で4時間の品温調整を行った。次にインキュベータ(HITACHI製 CR-32, 2機)を用いて表3に示す9種類の処理条件で低温ストレスを付加し、処理後は非破壊計測の準備が整うまで5℃で貯蔵した。供試果実数は1区12果としたが、腐敗果が試験区9では腐敗果が2個発生したため、それらを除外し総数は106個となった。

表3 ‘せとか’人為凍害果作成の低温処理条件

試験 区名	処理条件 ^z	
	温度 (℃)	時間 (hr)
1	5	8
2	0	4
3	0	8
4	-3	4
5	-3	8
6	-6	4
7	-6	8
8	-9	4
9	-9	8

^z 処理にはHITACHI製CR-32(2機)を使用
供試果実数: 12果/区

凍害果については寒波による凍害の発生がみられた愛媛県今治市産果実を選定した。これらの果実は寒波の襲来後に行われた寒害の現地調査において果肉部にす上がりを確認したため出荷停止の措置をとった果実群であるが、このうち出荷規格が2L相当の果実68個を供試した。果実入手は2014年3月4日、試験開始までは5℃で保管した。

供試果実の可視・近赤外スペクトルの取得にあたっては、(株)クボタ製の可視・近赤外分光光度計(K-BA100)を用いた。本機の特性については表4に、スペクトル計測と機器の試料台形状については図1に示した。測定にあたり受光量が2.5~7.0Vの適正電圧外となった果実

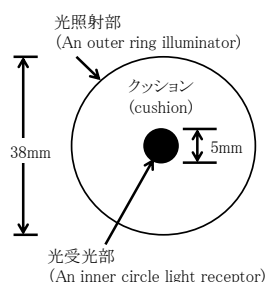
は、適正電圧内に収まるように蓄積時間を 300～800ms の範囲で調整した。また、測定部位は対極する果実赤道部 2 か所とし、平均処理して解析に用いた。試験実施日は 2014 年 3 月 17 日、測定環境は 23℃ に設定した室内で実施し、非破壊計測値後のデータ取り扱いにあたっては本機に付属されたサポートソフト (K-Support) を使用した。

表4 可視・近赤外分光光度計の主要諸元

項目	仕様など
メーカー	(株) クボタ
型式	K-BA100
測定方法	近赤外分光分析 (インタラクタンス方式)
光源	ハロゲンランプ (20W)
測定波長	500～1010nm
波長間隔	2nm
光照射部	直径38mmの円状
光受光部	直径5mmの円状
寸法	高240×幅300×奥行118mm
電源	AC100V
重量	約5kg (バッテリー除く)



(a) 果実の設置方法



(b) 試料台の形状

図1 可視・近赤外スペクトル計測

直径38mmの円状に可視・近赤外光が照射され、その中心部で拡散反射光(放射)が検出される

非破壊計測後の果実は、小宮山ら (2007) の方法を参考としながら次の方法で比重 (w/v) を測定した。まず、果実全体が収まる程度の容器内に満杯となる水道水を入れ、容器および水道水の重量 (g) を計測した。その次に果実を容器内に水没させた後に果実を取り出して再度、重量を測定した。これら重量の差分を水道水の比重を 1.00 とみなすことで果実の体積 (cm³) とした。別途、果実重 (g) を測定することで比重を算出した。

検量線は比重を目的変数、非破壊計測値 (2 次微分値) の中から変数増減法で選定した波長

を説明変数に用いて重回帰式により作成した。また、検量線の作成と評価に際し計測精度に関する 5 項目 (①検量線作成時の重相関係数: R, ②検量線作成時の標準誤差: SEC, ③検量線評価時の重相関係数: R, ④検量線評価時の予測標準誤差: SEP, ⑤残差の平均値: Bias) については Microsoft Excel 2013 を用いて算出し、②, ④及び⑤にかかる算出方法は以下に示した。

②検量線作成時の標準誤差 (Standard Error of Calibration, SEC)

$$= \left[\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n - p - 1)} \right]^{1/2}$$

④検量線評価時の予測標準誤差 (Standard Error of Prediction, SEP)

$$= \left[\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{(n - 1)} \right]^{1/2}$$

⑤残差の平均値 (Bias)

$$= \sum d_i / n = \bar{d}_i$$

各式中の記号の意味は次のとおり。

y_i : 実測値, \hat{y}_i : 推定値, n : サンプル数,

p : 説明変数の数, d_i : 残差, \bar{d}_i : 残差の平均値

なお、作成した検量線の解析のため、Minolta 製色彩色差計 (CR-300) を用いて果実赤道部 2 か所の果皮色調 (a^* 値) を測定した。

3. 結果および考察

‘せとか’人為凍害果の非破壊計測値 (吸光度) を図 2 に示した。540nm と 980nm 付近に強い吸収を観測でき、前者は色素、後者は水分に由来し、負を示す吸光度については分光器の感度が高いことから減光してリファレンスを測定しているためとの報告がある (伊藤ら, 2012)。

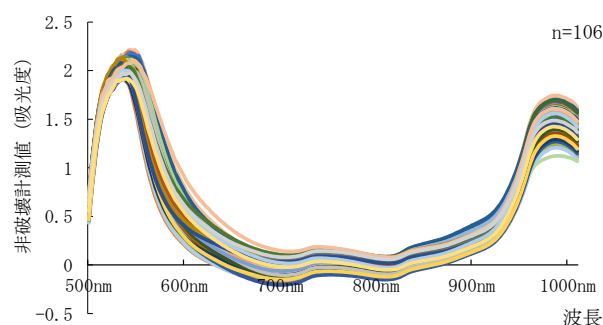


図2 ‘せとか’人為凍害果の非破壊計測値 (吸光度)

さらに詳細に非破壊計測値をみると、ノイズと思われるスペクトルの微動がみられるが、これは検量線作成にあたり影響を及ぼす可能性がある。加えてこの非破壊計測値（吸光度）には色素や水分の他にもピークが埋もれている可能性がある。

そこで、ノイズ除去のために Savitzky-Golay 法による平滑化処理、また、ピーク顕在化のために2次までの微分処理を順次行った（近赤外研究会，2015）。その結果、スペクトルの微動が抑制され、色素や水分のピークと比べると小さいが740, 820, 840nm 付近に新たなピークが出現した（図3）。

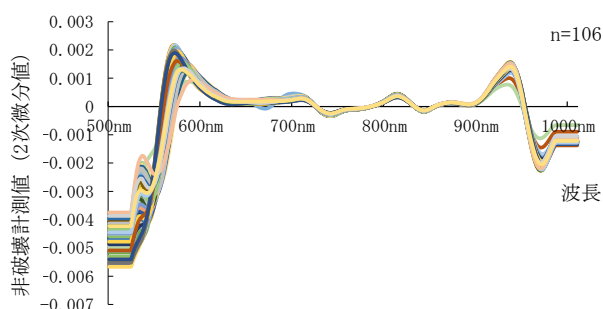


図3 ‘せとか’人為凍害果の非破壊計測値 (2次微分値)

この非破壊計測値（2次微分値）の中から比重（w/v）の推定に有効な波長を選定する条件として、変数増減法により次の3条件を設けて検討した。

- ・ 選択基準は P 値 < 0.05
- ・ 選択数の上限は設けない
- ・ 多重共線性がみられる波長は除外

その結果、選択されたのは 540, 610, 858, 894nm の4波長であり、いずれも回帰係数の有意性を示す P 値は 0.05 以下であった（表5）。

表5 ‘せとか’人為凍害果の非破壊計測値から変数増減法により選択された波長

説明変数	項目1 (選択波長 ²)	項目2	係数	P値
λ 1	540nm	-	-17.165	1.992E-04
λ 2	610nm	-	213.579	5.672E-13
λ 3	858nm	-	-2023.954	5.282E-04
λ 4	894nm	-	-1801.535	4.260E-06
参考)		(切片)	0.960	2.665E-47

² 各波長における2次微分値を示す

これら波長を用いて重回帰式で作成した検量線を改めて示す。

‘せとか’の比重（w/v）の非破壊計測値＝

$$0.96 - 17.165 \times \lambda_{540\text{nm}} + 213.579 \times \lambda_{610\text{nm}} - 2023.954 \times \lambda_{858\text{nm}} - 1801.535 \times \lambda_{894\text{nm}}$$
 （下線部は、可視・近赤外分光法による非破壊計測値のうち各波長における2次微分値）

作成した検量線を手為凍害果（図4）と凍害果（図5）の果実群にそれぞれ当てはめたときの計測精度とグラフを示した。検量線作成時の重相関係数（R）は0.926、標準誤差（SEC）は0.013であり、また、この検量線評価時の重相関係数（R）は0.916、予測標準誤差（SEP）は0.014、残差の平均値（Bias）は0.000となり、総じて良好な精度を示した。

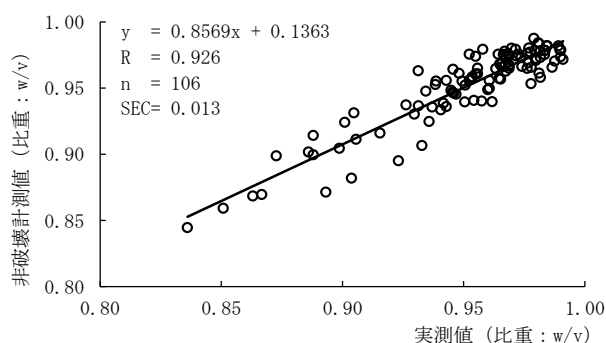


図4 ‘せとか’人為凍結果における比重の実測値と非破壊計測値の相関

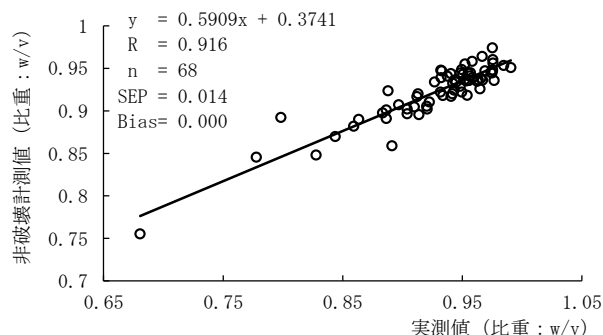


図5 ‘せとか’凍害果における比重の実測値と非破壊計測値の相関

選択した4波長の解析を行うため、比重（実測値）と非破壊計測値（2次微分値）の相関ス

ペクトルを作成した(図6)。これによると858nmおよび894nmにおける相関係数はおよそ-0.8であり、負の相関が高いことが分かる。この波長域は前述したとおり980nm付近にみられる水分由来のピークの立ち上がり部分に相当し、果実比重の推定にあたっては水分挙動の観測が有効であることを示唆している。

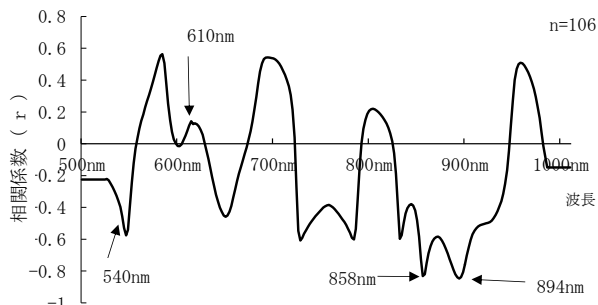


図6 ‘せとか’人為凍害果における比重(実測値)と非破壊計測値(2次微分値)の相関スペクトル

一方、540と610nmの波長は可視領域であることから果皮色の影響を受けやすい特性がある(伊藤ら, 2012)。そこで、人為凍害果の比重と果皮色調を試験区別に検討するため、低温処理前と処理後28日時点の比重と果皮色調(a*値)のデータの差を算出し、これを変化量として図7に示した。低温処理条件が5℃～-3℃および-6℃4hrの試験区(1～6)の果実は、いずれも比重が-0.05～0.05、a*値が0～2の範囲でプロットされ処理前後の差が小さかった。一方、低温処理条件が-6℃8hrおよび-9℃の試験区(7～9)における果実は、比重が-0.16～0.01、a*値が-3～2の範囲でプロットされ、これは試験区(1～6)のレンジと比べると比重では約1.7倍、a*値では約2.5倍であった。また、人為凍害果の全体としては比重とa*値の変化量の間には $r=0.759$ の相関がみられた。これら結果から試験区7～9の条件で作製した人為凍害果のように比重が0.05以上の低下がみられる果実においては果皮色調のうちa*値が低下する場合があるため、果皮色調の情報を有する可視領域波長の計測値も含めて比重を推定することで計測精度が高まる。そのことを検証するため540と610nmの可視領域波長を含めずに近赤外領域から選定した2波長(858と894nm)を説

明変数として作成した検量線の計測精度は $R=0.854$, $SEC=0.017$ となり、いずれも劣ることが確認された。

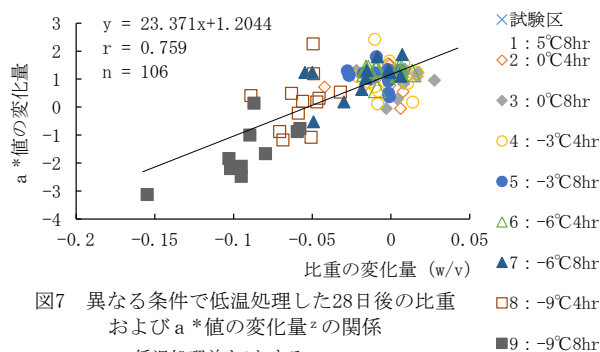


図7 異なる条件で低温処理した28日後の比重およびa*値の変化量^zの関係
^z 低温処理前を0とする

これまでの結果から‘せとか’の比重に着目した正常果と果肉部異常果の選別基準について検討した。非破壊計測値および比重の測定後の凍害果の赤道部を切開し、果肉部を肉眼により観察し図8に示す正常果と果肉部異常果の2区に分別した。分別後は各果実の比重データとともに再度グラフ化した(図9)。その結果、0.92以下となる果実群は全て果肉部異常果であり、反対に0.96以上は全て正常果であった。今回の凍害果(n=68)は全て出荷停止措置となった果実であったが、比重0.96を基準に選別できれば全正常果(n=21)のうち0.96以上であった果実(n=6、全正常果に対する割合は28%)の出荷の可能性が考えられた。この選別基準に対する考察は関係者との詳細な協議が必要と考える。

最後に技術の実用化にあたっての課題を述べる。まず、人為凍害果の作成についてである。一般的に検量線の作成にあたっては予期される計測値の範囲を網羅することが望ましいが、今回の供試果実の品質をみると、人為凍害果の比重の出現範囲は0.84～0.99であるのに対し、凍害果が0.68～0.99となり、なかでも比重が0.84以下となる果実が凍害果において3個多く発生していた。そこで、人為凍害果の作成条件にあたっては、温度帯あるいは温度の処理回数に関する条件を変更しつつ試験区9よりも強い低温ストレスを付加する区を設けて対応することが望ましい。また、今回供試したLLの出荷規格以外の果実の検証や、異なる果実温度でも計測を可能とする温度補償型検量線(Kawano *et al.*, 1995)に向けての調整など、現時点で考

え得る検討事項は複数存在する。

しかしながら、試験に必要な果実は正常果に対する人工的低温処理によって得られることから、自然状況下で発生する凍害果のみを対象とした場合よりも検量線の改良作業は短期間かつ計画的に検討が進み効率的であると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご協力頂いた愛媛県今治支局産業経済部産地育成室、愛媛県南予地方局産業経済部産業振興課産地育成室、JAおちいまばり、JAえひめ南の関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

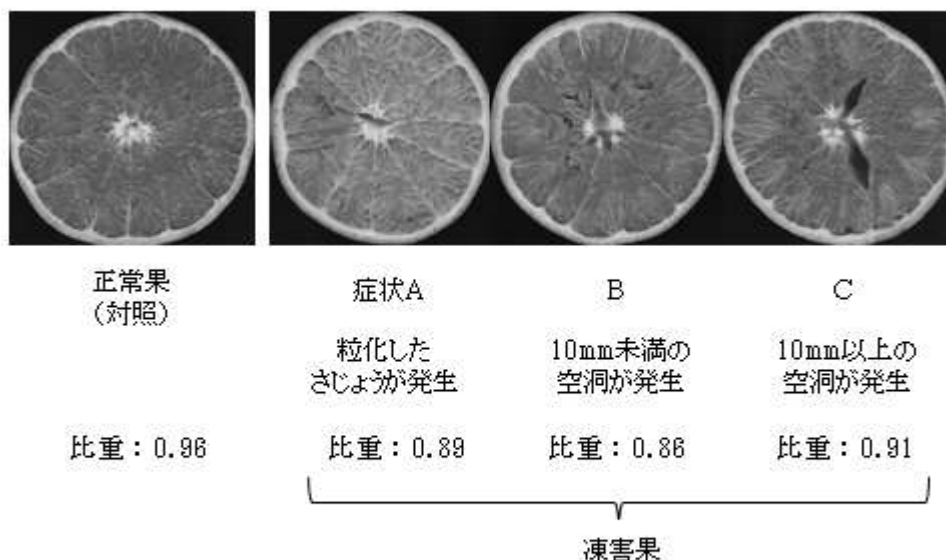


図8 正常果および凍害果の切断面 [巻末カラー写真参照]

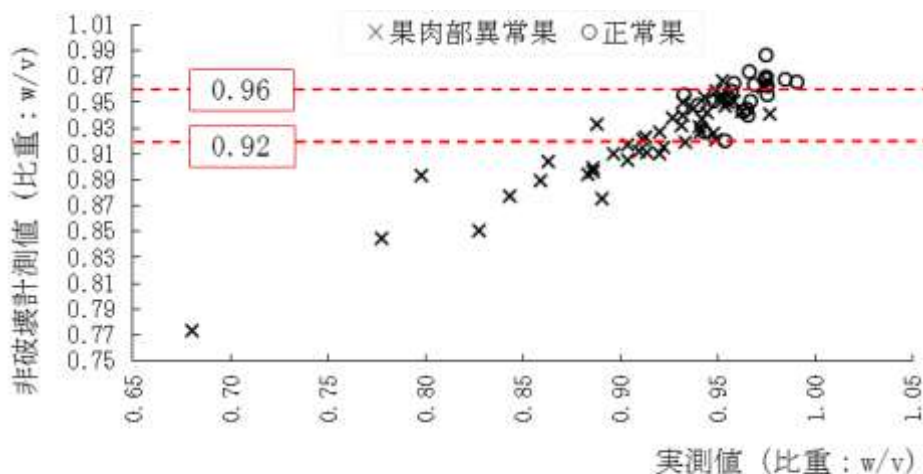


図9 ‘せとか’における正常果および果肉部異常果の比重の実測値と非破壊計測値の関係

引用文献

愛媛県農林水産部農業振興局農産園芸課 (2014) : 農作物の寒害・雪害対策資料, 愛媛県.

伊藤史朗・森本 進・服部 玄・伊藤秀和 (2012) : 可視・近赤外分光法を用いるブラッドオレンジ果肉における紫色の着色程度 of 非破壊計測の可能性, 照明学会誌, **96**, 747-751.

- 伊藤史朗・菊池 孝 (2015) : 現地で発生した中晩柑‘せとか’の寒害果と人工的低温処理果の品質比較, 近畿中国四国農研, 26, 47-53.
- 岩本睦夫 (1980) : 近赤外分光法による食品成分の非破壊測定, 日食工誌, 27(9), 464-472.
- Kawano, S., Abe, H., and Iwamoto, M. (1995) : Development of a calibration equation with temperature compensation for determining the Brix value in intact peaches, J, Near Infrared Spectrosc, 3, 211-218.
- 菊池泰志 (2013) : 全国初のブラッドオレンジ産地化への取り組み, 果実日本, 68 (12) , 38-42.
- 近赤外研究会 (2015) : 第 31 回近赤外フォーラム講演要旨集, 1-23, 茨城県.
- 小宮山誠一・加藤淳・本田博之・松島克幸 (2007) : 可視および近赤外分光法によるジャガイモデンプン価の非破壊計測と選別技術への応用, 日食科工, 54(6), 304-309.
- 小中原実 (1984) : カンキツの寒害とその防止対策, 農業気象, 39(4), 315-322.
- 松本和紀・矢羽田二郎・大倉英憲・牛島孝策・井樋昭宏 (2006) : 福岡県におけるカンキツ新品種果実の品質と耐寒性, 福岡県農林業総合試験場成果情報 (果樹) .
- 松本亮司・山本雅史・國賀武・吉岡照高・三谷宣仁・奥代直巳・山田彬雄・浅田謙介・池宮秀和・吉永勝一・内原茂・生山巖・村田広野 (2003) : カンキツ新品種‘せとか’, 果樹研究所研究報告, 2, 25-31.
- 宮本久美 (2003) : ウンシュウミカン選果工程における近赤外分光法による内部品質管理に関する研究, 和歌山農林水産総技セ特別研報, 5, 1-94.
- 中川行夫・本条 均・小中原実 (1976) : 晩生カンキツ果実の凍結によるす上がりの発生限界温度, 農業気象, 31(4), 195-198.
- 尾崎幸洋・河田 聡 (1996) : 近赤外分光法, 1-224, 学会出版センター, 東京.