

資料・学部記事

トマトの表面蛍光に基づく硬度推定モデル －積算温度の観点から－

小長谷 圭 志 (産業イノベーション学科)
高 橋 憲 子 (農学研究科)

Estimation of Tomato Fruit Firmness Based on Surface Autofluorescence:
Cumulative Temperature

Keiji KONAGAYA (Industrial Innovation)
Noriko TAKAHASHI (Graduate School of Agriculture)

キーワード：トマト、硬度、蛍光、積算温度、表面と内部の相関

Keywords: tomato, firmness, autofluorescence, degree day, surface-internal relationship

【原稿受付：2022年7月22日 受理・採録決定：2022年8月1日】

要旨

トマトの硬度は商品寿命を考える上で重要な品質であり、硬度を非破壊に推定できれば品質管理に応用できる。蛍光は、ほかの非破壊法と比べて、安価な可視域の撮像素子で広範囲の対象を即時に評価できる。本研究では、トマトの「りんか409」を例に360 nm励起の蛍光強度から果実硬度を推定することを検討した。収穫後、温度を10、17、25℃に設定し、硬度や蛍光の変化を測定した。21日後、両者の関係を調べ、蛍光強度から果実硬度を推定するための線形回帰式（相関係数0.73）を得た。成熟中、表面の蛍光と内部の蛍光は協調して変化しており、これにより果実全体の硬度が表面の蛍光により推定できた。さらに、回帰式は温度によらずに成立し、これは、硬度と蛍光強度の両方が7℃を生理的零度とした積算温度の関数で変化したことから説明した。これらの知見は、トマトの商品寿命や品質の予測に応用できる可能性がある。

Summary

The firmness of tomato is an important quality when considering the shelf life, thus non-destructive estimation of the firmness is important to control the quality. Autofluorescence photography can instantly evaluate a wide range of objects by using a cost-effective image sensor when it is compared with other methodologies. In this study, we tried to estimate a fruit firmness based on the autofluorescence excited at 360 nm of the tomato cultivar 'Rinka 409' as an example. After harvesting, the temperature was set at 10, 17, and 25 °C, and changes in the firmness and the fluorescence were recorded. Twenty-one days after the harvest, the relationship between the two was investigated, and a linear regression model was obtained to estimate fruit firmness from the autofluorescence ($r = 0.73$). During ripening, the surface fluorescence and the sectional fluorescence simultaneously changed, providing the physiological base of this model. Furthermore, the regression holds regardless of the temperature, in which both firmness and fluorescence changed as a function of cumulative temperature (*i.e.* thermal time) with a biological base temperature of 7 °C. These findings provide a new way to predict a shelf life and quality of tomatoes in the agricultural field.

1. 背景

トマトは日本だけでなく世界で最も多く生産出荷されている野菜（重量ベース）の一つである（FAO, 2022；農林水産省, 2018）。また、トマトは、果菜類の研究においてモデルとして扱われ、トマトの知見や技術がほかの野菜にも応用されることが期待されている（江面, 2009）。

ところで、日本のトマトの出荷現場では、傷果が除かれたあと、色や大きさ、形などに基づいて等級が決められる（栗田ら, 2006）。このとき、主にカラー画像が撮影され、熟度の判定がなされる。トマトの熟度は、着色の割合により定義され、緑から赤色への変化を何段階かに区分する。赤色のあとの過熟は、カラー画像では区別できないが、蛍光画像を使うと区別できる（Konagaya et al., 2020a）。その一方で、消費者は個々の品質を知りたい場合もあり、近年は、高糖度、高リコピン（Takahashi et al., 2018）、高GABAを特徴とした商品も多い。こうした化学成分を知るには、分離・精製を必要とするが、物理的な変化としては硬度が重要な要素となる（農文協, 2015）。

硬度は、果実が成熟する過程では必ず減少するから（立木, 2018）、成熟の時計として使うことができる。硬度の低下は多糖類の分解により引き起こされ、それは、果皮のレベルから果実内部まで広い範囲の組織で生じることが知られている（兵頭ら, 2010）。そのため、硬さと関連のある指標によって、潜在的な商品寿命を知ることができるため、重要な指標と言える。

トマトの硬度推定を手早く行うには、なるべく簡単な方法が望ましい。イメージングは、機械的な方法（荒木ら, 1988）と比較して、離れた距離から同時に複数の対象を認識できる点で選果システムの判定部を担うことがある（二宮, 2011）。近赤外分光法（キウイフルーツ）（村上ら, 2014）、弾性波（中野ら, 2008）、X線（ナシ）（小川, 2005）もテクスチャや硬度を推定するのに検討されているが、専用の高価な撮像素子が要ることや、広範囲の画像取得に時間がかかるなどの欠点がある。

それに対して、蛍光を撮影する方法は、汎用の撮像素子を安価に利用でき、高出力のLEDを使えば広範囲の同時撮影も可能である。これまでに、近紫外で励起される蛍光によって、過熟の進行を検知できることが明らかになっている（Nurulhuda et al., 2021）。その波長は、品種によって異なるが、桃太郎（Konagaya et al., 2020a）や大安吉日（Nurulhuda et al., 2021）では360 nm付近、「りんか409」では400 nm付近に励起極大が表れることが報告されている（Konagaya et al., 2021）。品種による波長の違いを克服できるような蛍光の観察方法があれば、より汎用性が高まる。

そこで、本研究では、品種「りんか409」において、桃太郎や大安吉日と同じ360 nmの励起波長で硬度の推定ができるか調べることとした。次に、硬度をなぜ表面の蛍光から推定できるのか、また、推定モデルが収穫後の温度に依存しない理由についても考察した。

2. 実験方法

2.1. 試料

本実験で使用したトマト「りんか409」（サカタのタネ）は、愛媛大学植物工場研究センター（松山市樽見）より提供いただいた。2020年9月にロックウールに定植した苗を環境制御の下、水耕施設にて長期多段栽培した株を対象とした。翌年の2021年4月19日に45果収穫し、実験に用いた。果実の直径は62～71 mm、果実高は45～54 mm、重量は104～144 gであった。また、完熟の程度として、色彩計TES135A plus（TES Co., Taiwan）で測定した赤道部の明度、彩度、色相は、それぞれ、20～22、16～21、40～43°であった。

また、同じサンプリングを5月にも実施し、一連の再現性を確認した。本論文は、既報（Konagaya 2021）の硬度の結果を再使用し、蛍光について別の波長（360 nm）を解析したものである。また、断面の画像や積算温度の解析を新たに加えた。

貯蔵は、温度制御されたインキュベーターMIR-254-PJ（PHC Co., Ltd.）で21日間実施した。無包装かつ暗所とした。温度は、10、17、25℃の3条件を設定し、湿度は成り行きとした。その結果、各条件の相対湿度はそれぞれ、60～75%、45～60%、30～35%であった。実験日は、温度毎に設定し、高温度や収穫後の初期ほど短いサンプリング間隔になるように調整した。条件ごとに、各実験日において3果ずつ取り出し、水道水で約30 s洗浄して塵などを落として実験に供した。

2.2. 硬度の測定

硬度はマグネステレー硬度計KM-05（藤原製作所）を使用して、赤道部の直径に対する約5%だけ変位したときの荷重として記録した。果実の柄方向が上面になるようにして、片側赤道線上約50°間隔で3か所記録し、それらの3つの平均をその果実の値として代表させた。収穫日の硬度は、0.73～1.03 kgfの範囲に収まった。硬度測定後、傷んでいないもう半分の果実片を蛍光画像や蛍光強度、蛍光顕微鏡画像の実験に供した。硬度計測後、15℃以下に保冷して、次の実験は30分以内に行った。

2.3. 蛍光画像の撮影

トマトの果実片の表面と縦断面の画像を撮影した。蛍光画像はカラー画像の撮影装置を一部変更して取得した。蛍光画像の励起の波長は、「桃太郎ピース」や「大安吉日」でも蛍光が見られた365 nmとした。テーブルの直上25 cmに光源LDR2-60UV2-365-N（シーシーエス）の発光面を設置して、サンプル面で15 mW cm²を確保した。この照明のリングの中心から真上にカメラCanon Kiss X7（キヤノン）を治具で保持して画像を撮影した。焦点距離は画像の中心をサンプルが概ね占めるよう倍率を変えて、31 mmとした。シャッタースピードは手ぶれのないよう1/100 sとし、F値は光量確保のため5.6、ISOは3200とした。なお、反射光の影響をなくすため、ロングパスフィルターFGL400S（ソーラボ、カットオン波長400 nm）をレンズの手前に付けた。

2.4. 蛍光強度の測定

360 nm 励起の蛍光強度を詳細に知るため、蛍光画像の撮影後、蛍光強度を測定した。トマト果実半分の直径20 mmのポンチで果皮をくり抜き、厚みがある場合には3 mm程に薄く整形した。ただし、常に表面側は残した。そして、合成石英セルに入れて、表面の発光を検出し測定した。蛍光強度は、蛍光光度計RF-6000（島津製作所）で360 nm 励起の強度を1 nm 間隔で390 ~ 750 nm まで測定した。黄色の蛍光発光が見られたため、560 ~ 670 nm における蛍光強度の積分値（バンド幅は5 nm）を計算した。ただし、17℃、3日の値は例外的な大きさであり除外した。

2.5. 顕微鏡画像の撮影

蛍光強度の測定後、どの部位が蛍光発光しているかを調べるため、横断面の蛍光顕微画像を撮影した。卓上型マイクロスコープ3R-MSTVUSB273（スリー・アールシステム）を用いた。撮像素子には約500万画素CMOS（光学ズーム4x）を使用した。カラー画像の照明には白色LEDリング状を用いた。蛍光画像の励起には高出力のLED Omnicure LX405S（Lumen Dynamics Group Inc.）中心波長365 nmを使用し、サンプル表面より約4 cm、仰角約45°の位置と方向から照射した。この距離は使用したレンズ（焦点距離12 mm）において、励起強度（> 数 mW cm²）および観察空間を確保するためである。

サンプルはトマトの赤道部において横断面に平行に10 mm幅のいちよう切りをして得られる扇形の固体である。作業はカッター刃（オルファ）で手早く行い、サンプル製作後は10分以内に観察した。観察中、蛍光の増大や退色は気にならなかった。ただし、成熟の

進んだサンプルではゼリー部分が容易に脱離し、リング状のサンプルになった。

3. 結果

3.1. 360 nm 励起の黄色蛍光により硬度を推定できるかどうか

Fig. 1にトマトの硬度変化の例を示す。日数が増加するほど硬度は低下し、特に最初の2日間で大きく低下した。このような硬度の初期の急激な低下は、非線形関数（例えば、指数関数（Pinheiro et al., 2013））でモデル化されることがあるが、本実験でも同様の結果が得られた。また、温度の影響として、高温ほど最初の硬度低下が急激であり、これも先行研究と同様の結果となった（Pinheiro et al., 2013）。温度を一定にして保存しても日数に対して非線形的に硬度が変化することは、日数から硬度を推定する上で不便である。硬度と同様に非線形的に変化する指標があれば、その指標と硬度との間は線形となり都合がよい。

Fig. 2に示した360 nm 励起の黄色蛍光強度は、非

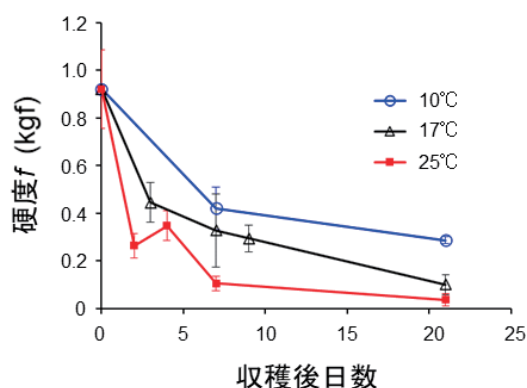


Fig. 1 トマト果実硬度の変化

Figure 1 adapted from the reference authored by Konagaya et al. (2021) under the permission of copyright owner (C) IOP publishing (2021) / CC BY-4.0.

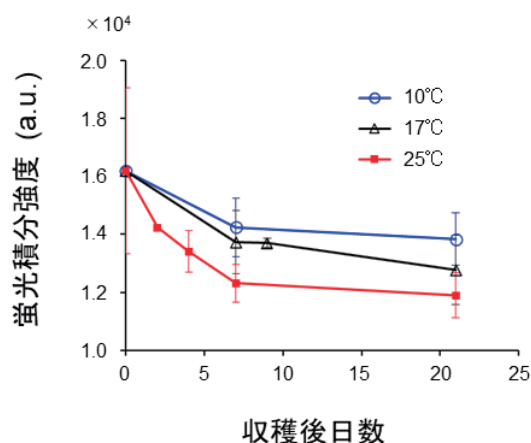


Fig. 2 トマトの360 nm 励起黄色蛍光(積分強度)の変化

線形的かつ、硬度と同様の減少傾向を示した。さらに、急激な減少のタイミングも収穫後2～7日と硬度と類似し、かつ、それらは高温ほど早いことも同様であった。そこで、360 nm 励起の黄色蛍光が温度によらずに硬度の指標になるか検討するために、硬度と蛍光強度との関係を散布図で Fig. 3 に示した。中間の硬度でばらつきが大きくなったが、全体としては硬度と蛍光強度との間に正の相関が見いだされた。また、それは温度に依存しなかった。

$$Y = a(X + b) \quad \text{式 (1)}$$

これを式で表現すると式 (1) のようにできる。ここで Y は蛍光強度 (a.u.)、 X は硬度 (kgf)、 a 、 b はそれぞれ、乗算的および加算的な係数である。 a は硬

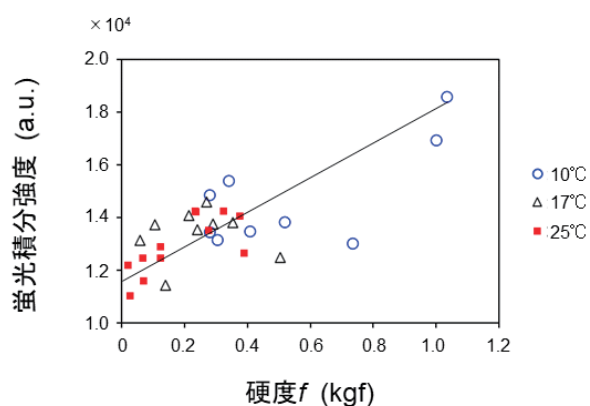


Fig. 3 トマト果実の硬度と蛍光積分強度 (360 nm 励起黄色蛍光) との関係

度の減少に伴う蛍光の減少の比、 b は硬度 0 (つまり、過熟が進んだ状態) の蛍光強度に影響する値である。最小二乗法により、二つのパラメーターを求めると、それぞれ $a = 4.47 \times 10^3$ a.u.、 $b = 2.74$ kgf となり、相関係数は 0.73 であった。

このことから、360 nm 励起蛍光によって硬度を推定でき、またそれは収穫後の温度によらないことが見いだされた。すでに、桃太郎や大安吉日も 360 nm 付近に蛍光の極大を持つことが分かっているため、この硬度推定法はほかの品種にも適用できる可能性がある。

3.2. 表面の蛍光から硬度を推定することの意味

硬度を表面の蛍光から推定できれば、飛躍的な発展を遂げている画像認識に付随して品質を評価でき、それに基づいて商品の価値を高めることができる。硬さの減少は、果実の成熟において普遍的な事象であるから (立木, 2018)、この知見はほかの果菜や果樹にも応用できる可能性もある。ただし、硬さは果実の全体により決まる値であり、それを表面の蛍光から推定しようとする今回の方法は注意すべき点もある。例えば、なぜ表面の蛍光発光が硬度とともに変化したかを考えておく必要がある。

表面の蛍光がどの組織から発生しているかを知るためには、顕微鏡画像を撮影すればよい。Fig. 4 はトマトの表面付近数百 μm の深さまでの横断面の画像である。カラー画像では照明が表面で反射して果実の無い上部まで薄く赤みがかっているが、成熟に伴い大きく色彩は変化しない。一方で、365 nm 励起の蛍光を観察すると、温度が高いほど、また、日数が経過するほ

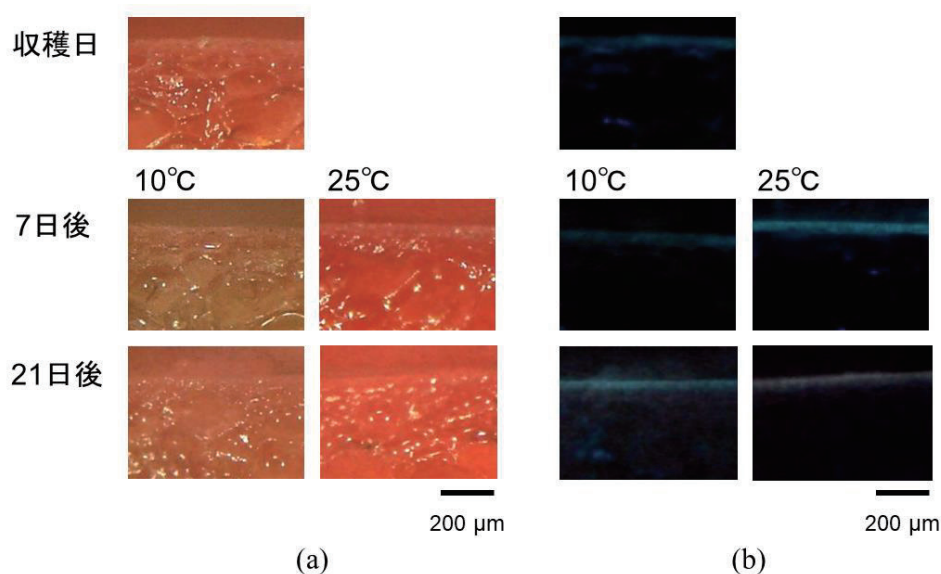


Fig. 4 トマト果実表面付近の横断面顕微画像
(a) カラー画像および (b) 365 nm 励起蛍光画像

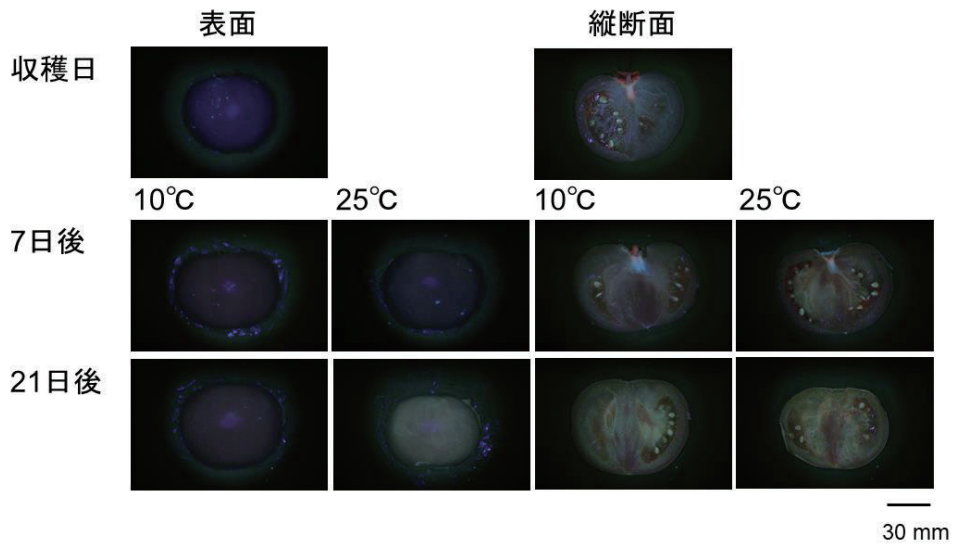


Fig. 5 トマト果実表面および縦断面の 365 nm 励起蛍光画像

ど、黄色蛍光がはっきりと観察できた。これは、一見、黄色強度の低下と反するようだが、すでに過去に桃太郎で報告しているように黄色の強さは発光のスペクトル形状によって決まり、強度の低下と同時に起こり得る (Konagaya et al., 2020b)。この蛍光の結果から、温度や日数によらず、表面からわずか 50 μm 未満の組織 (つまり、表皮のスケール) が発光していることが見いだされた。

次に、なぜ表皮の蛍光発光が硬度とともに変化したかを考えるため、表面の蛍光と縦断面の蛍光を比較した (Fig. 5)。すると、高温ほど、また日数が経過するほど表面の蛍光が黄色になるのと同様に、切断直後に観察した縦断面の蛍光も黄色くなった。表面と断面の蛍光は同じ時期に変化していることがわかった。つまり、成熟にともなう変化が表皮と内側で同時に起こり、表面の蛍光から果実の硬度を推定できたと考えら

れる。今後は、複数の組織にまたがる協調的な生理変化を調べることで、果実全体の品質を表面の蛍光から非破壊的に推定したい。

3.3. 蛍光に基づく硬度推定式はなぜ温度によらないのか

360 nm 励起の黄色蛍光から硬度を推定する式は、収穫後の温度によって変化しなかった。これは、実用性を考える上では重要であり、10、17、25°C の間の温度 (例えば、13°C) でも推定式が使える可能性を示唆している。これは、概念的には、温度が硬度と蛍光強度に同様に作用したと考えることもできる。収穫後の生理学では、品質を積算温度の関数で表すことがあり (中野, 2013; 蔦ら, 2020; 道総研, 2017)、トマトの硬度についても同様に考えると Fig. 6 (a) のように積算温度に対する硬度を図示できる。ここで、積

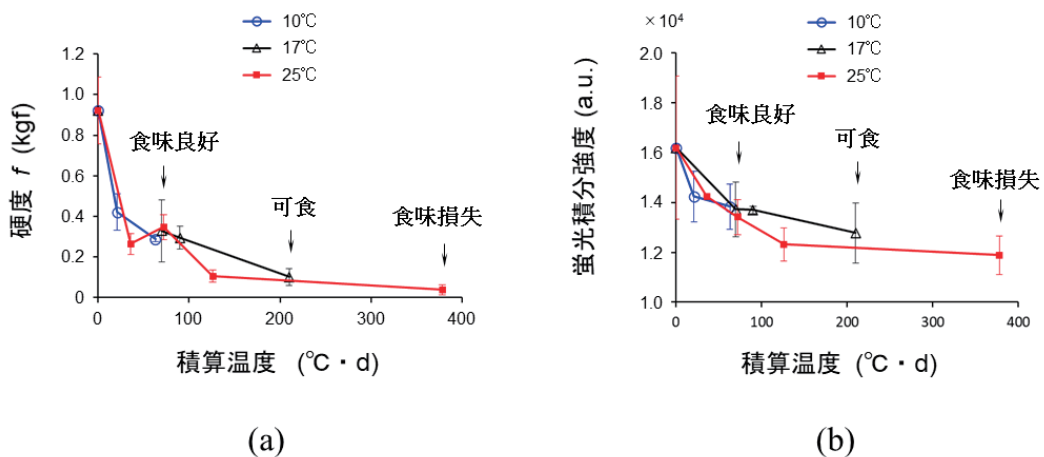


Fig. 6 トマト果実の硬度 (a) および蛍光積分強度 (b) の変化における積算温度に対する解析

算温度は、生理的な零度に対する差の日積算として式(2)により計算している(農研機構, 2006; 黒井ら, 1963)。

$$\text{積算温度} = \sum (\text{温度} - \text{生理的零度}) \\ \text{ただし、日積算 (}^{\circ}\text{C} \cdot \text{d)} \quad \text{式 (2)}$$

生理的零度を1°Cずつ変化させこのグラフを描くと、7°Cのときに最も温度条件ごとの硬度変化が重なった。このことから、「りんか409」については、7°Cが硬度についての生理的零度とみなすことができる。蛍光強度についても、同じように7°Cを生理的零度として積算温度を計算してグラフをFig. 6 (b) に描いた。すると、こちらも硬度と同様に保存温度によらないで強度変化が重なった。つまり、360 nm 励起の蛍光も硬度も、同じ生理的零度の積算温度に対して減少することが明らかになった。蛍光強度に積算温度の考え方を当てはめた報告は見つからない。今後は、この考え方をすることで、少ない条件で得られた推定式からも、果実の品質を内挿で推測できる可能性がある。

4. 結論

本研究では、トマト「りんか409」の硬度を360 nm 励起の蛍光強度から推定するためのモデルを検討した。その結果、硬度および黄色蛍光の強度は、収穫後2日で急減しその後漸減した。10、17、25°Cの比較では、温度が高いほど、最初の数日間の強度低下が顕著であった。この両者の関係は、温度によらずに成立し、線形回帰により $r = 0.73$ が得られた。果実全体の硬度がなぜ表面の蛍光から推定できるかという問いには、表面と内部で協調して変化する蛍光発光により説明した。また10~25°Cで同じ推定式が使えた理由としては、硬度と蛍光強度の両方が7°Cを生理的零度とする積算温度の関数となっていたことから説明した。硬度の減少は果実の成熟において普遍的であるので、今回の手法は、ほかの品目でも成り立ち、商品寿命の予測、品質の管理に活用できる可能性に期待したい。

謝辞

サンプル入手においては、本学 植物工場研究センター 技術専門職員の三好譲氏に多大なご協力をいただいた。また、本学 紙産業イノベーションセンターの福垣内暁准教授には複数の実験機器をお借りした。ここに、感謝の意を表す。

References

- FAO, 2022. Crop Information | Land & Water | Food and Agriculture Organization of the United Nations | Land & Water | Food and Agriculture Organization of the United Nations [WWW Document]. URL <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/tom> (accessed 1.25.22).
- Konagaya, K., Al Riza, D.F., Nie, S., Yoneda, M., Hirata, T., Takahashi, N., Kuramoto, M., Ogawa, Y., Suzuki, T., Kondo, N., 2020a. Monitoring mature tomato (red stage) quality during storage using ultraviolet-induced visible fluorescence image. *Postharvest Biology and Technology* 160, 111031.
- Konagaya, K., Al Riza, D.F., Ogawa, Y., Kohno, Y., Kuramoto, M., Takahashi, N., Suzuki, T., Kondo, N., 2020b. Autofluorescence changes of tomato surface tissues during overripening. *Photochem. Photobiol. Sci.* 19, 879–884.
- Konagaya, K., Takahashi, N., Fukugaichi, S., Morimatsu, K., Kuramoto, M., 2021. Effect of post-harvest temperature of tomato 'Rinka 409' on quality and autofluorescence during overripening. *IOP Conf. Ser. : Earth Environ. Sci.* 924, 012020.
- Nurulhuda, A., Riza, D.F.A., Muharfiza, Kuramoto, M., Suzuki, T., Kondo, N., 2021. Monitoring of fluorescence characteristic in tomato surface during over-ripening stage. *IOP Conf. Ser. : Earth Environ. Sci.* 733, 012016.
- Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Gonçalves, E.M., Silva, C.L.M., 2013. Kinetics of changes in the physical quality parameters of fresh tomato fruits (*Solanum lycopersicum*, cv. 'Zinac') during storage. *Journal of Food Engineering* 114, 338–345.
- Takahashi, N., Yokoyama, N., Takayama, K., Nishina, H., 2018. Estimation of Tomato Fruit Lycopene Content after Storage at Different Storage Temperatures and Durations. *Environmental Control in Biology* 56, 157–160.
- 中野有加, 桜井直樹, 藤路陽, 堀江秀樹, 中野明正, 鈴木克己, 2008. 弾性指標を用いたスライストマトの果肉硬度の非破壊評価. *園芸学研究* 7, 543–547.

- 中野浩平, 2013. 青果物の鮮度評価方法. 特許第5326166号.
- 二宮和則, 2011. 青果物の選果選別と品質評価技術の最前線. 農業機械学会誌 73, 169-173.
- 兵頭洋美, 佐藤忍, 岩井宏暁, 2010. トマト果実成熟過程における組織特異的なペクチンの合成と分解. 日本植物生理学会年会およびシンポジウム 講演要旨集 2010, 0802-0802.
- 小川, 2005. X線およびテラヘルツ電磁波を用いた農産物の品質評価に関する基礎研究 (博士 (農学)). 東北大学.
- 村上覚, 青木宏道, 浜部直哉, 太田充, 2014. グローブ型近赤外分光計測装置によるキウイフルーツ 'レインボーレッド' の果実品質分析. 静岡県農林技術研究所研究報告 21-28.
- 栗田充隆, 近藤直, 吉丸寿一, 二宮和則, 2006. トマトの等級判定のための色および形状特徴抽出方法. 植物環境工学 18, 145-153.
- 江面浩, 2009. トマトは研究開発のための次世代モデル植物. 園芸学会雑誌 78, 1-2.
- 立木美保, 2018. 果実軟化の生理, in: 『農業技術大系』 果樹編. p. 基 50 の 2-5.
- 荒木俊行, 山下純隆, 平野稔彦, 松本明芳, 1988. トマトの流通技術確立に関する研究 (5). 福岡県農業総合試験場研究報告. B, 園芸 97-100.
- 蔦瑞樹, 李心悦, 鈴木洋子, 前田育子, 藤原由美恵, 関山恭代, 2020. 切らずに測る野菜の鮮度 コマツナの可視 - 近赤外・核磁気共鳴融合分光とその解釈. Presented at the 人工知能学会全国大会論文集 第34回 (2020), 人工知能学会, p. 1F4OS2b01.
- 農文協, 2015. トマト大事典. 農山漁村文化協会.
- 農林水産省, 2018. 作物統計調査 作況調査 (野菜) 長期累年 2018年 | ファイル | 統計データを探す | 政府統計の総合窓口 [WWW Document]. URL <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427&cycle=0&year=2018&month=0&tclass1=000001032286&tclass2=000001037845&tclass3val=0> (accessed 1.25.22).
- 農研機構, 2006. 有効積算温度. 農業技術事典.
- 道総研, 2017. 氷なしでもシャキッと新鮮! プロッコリーの低コスト流通法. 平成29年 (第35回) 農業新技術発表会要旨 5-6.
- 黒井伊作, 白石義行, 今野茂, 1963. ブドウ樹の休眠打破に関する研究 (第1報). 園芸學會雑誌 32, 175-180.