

近赤外分光法による
ブルーベリー果実の成分評価

2015.3

東京農工大学大学院
連合農学研究科
環境資源共生科学専攻

白 文明

**EVALUATION OF INGREDIENTS OF
BLUEBERRY FRUITS BY
NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY**

2015.3

**United Graduate School of Agricultural Science
Tokyo University of Agriculture and Technology**

WENMING BAI

第一章 緒言

1.1	近赤外分光法の果実評価への応用	1
1.2	ブルーベリー果実の品質評価への近赤外分光法の応用	3
1.2.1	背景と現況	3
1.2.2	近赤外分光法	8
1.2.2-1	近赤外分光光度計	10
(1)	透過法	12
(2)	拡散反射法	13
1.2.2-2	ハイパースペクトルイメージングカメラ	14
1.3	本研究の目的	16
1.4	本博士論文の構成	17
1.5	引用文献	18

第二章 近赤外分光光度計によるブルーベリー果実の成分評価

2.1	はじめに	24
2.2	実験	26
2.2.1	測定試料	26
2.2.2	分光光度計の装置パラメータと近赤外スペクトルの測定	26
2.2.3	成分の化学分析	30
2.2.3-1	糖と有機酸	30
(1)	糖濃度の HPLC 分析	31
(2)	有機酸濃度の HPLC 分析	33
2.2.3-2	総アントシアニン量の HPLC 分析	35
2.3	定量モデルの作成と評価	39

2.4	結果と考察	42
2.4.1	ブルーベリー果実の近赤外スペクトルの特徴	42
2.4.2	糖濃度の予測結果	44
2.4.3	有機酸濃度の予測結果	49
2.4.4	総アントシアニン量の予測結果	54
2.4.5	定量モデルの測定部位依存性	58
2.5	まとめ	60
2.6	引用文献	61

第三章 ブルーベリー果実の成分評価に用いる実用装置の性能の検討

3.1	はじめに	63
3.2	実用化装置性能の決定	65
3.2.1	波長の選択	65
3.2.2	雑音レベル	66
3.2.3	波数安定度	69
3.2.4	分解能（波数）	72
3.3	測定部位の依存性	74
3.4	まとめ	75
3.5	引用文献	76

第四章 ハイパースペクトルイメージングカメラによる

ブルーベリー果実の成分評価

4.1	はじめに	77
4.2	実験	79

4.2.1	試料	79
4.2.2	ハイパースペクトルの測定	79
4.2.2-1	HSI システムの仕組み	79
4.2.2-2	HSI データの計測	80
4.2.3	化学分析	82
4.2.3-1	糖度	82
4.2.3-2	酸度	83
4.2.3-3	総アントシアニン量	83
4.3	データ解析手法	85
4.3.1	スペクトルの補正と抽出	85
4.3.2	定量モデルの作成と評価	87
4.4	結果及び考察	88
4.4.1	ブルーベリー果実のハイパースペクトルの特徴	88
4.4.2	糖度の予測結果	90
4.4.3	酸度の予測結果	93
4.4.4	総アントシアニン量の予測結果	95
4.5	まとめ	97
4.6	引用文献	98

第五章 総括

5.1	汎用近赤外分光光度計によるブルーベリー果実の成分評価	101
5.2	ブルーベリー果実の成分評価に用いる実用装置の性能の予測	103
5.3	ハイパースペクトルイメージングカメラによるブルーベリー果実の成分評価	104

第一章 緒言

1.1 近赤外分光法の果実評価への応用

近年、果実の内部品質を評価すること、つまり内部品質に関連する味わい成分、栄養効果成分などを定量的に分析することが果実の出荷、収穫、栽培などの色々な場面で必要となってきた。従来の定量測定法としては、化学分析や機器分析が主流となっているが、これらの方法は時間や手間かかり、コストも高いので、出荷する際の選果のような現場測定に応用することが難しい。そこで、非破壊迅速な分析手法の一つである近赤外分光法が、ここ数十年間のコンピューター技術やスペクトルデータ解析アルゴリズムの進歩に伴い、農業、工業、医薬品生産などの幅広い分野に応用されるようになってきた。特に農業生産物の果実や野菜の鮮度の判定（定性分析）やそれらに含まれる化学成分含有量の測定（定量分析）への近赤外分光法の応用研究が、多くの種類の果実やそれらの加工品（ジュース、ジャムなど）について報告されている¹⁻⁴⁾。

近赤外分光光度計を用いた果実の成分の定量分析に関する今までの研究では、測定対象としては、比較的大きな果実のスイカ⁵⁾、メロン⁶⁾、マンゴ⁷⁾、ナシ⁸⁾、ミカン⁹⁾、モモ、キウイフルーツ¹⁰⁾から比較的小さな果実のイチゴ、ビワ¹¹⁾、杏子¹²⁻¹⁴⁾、サクランボ、ブドウ¹⁵⁾などまで、幅広い種類の果実について研究が行われている。定量目的成分としては、糖と有機酸の濃度を表す糖度や酸度を果実の主な内部品質として近赤外分光法により評価する研究が多い。特に、糖度が実用化精度 ($R^2 > 0.85$, $RPD > 0.25$)¹⁶⁻¹⁷⁾以上で予測できると主張している研究が多数報告されている。一方、酸度（滴定酸度と単一有機酸の濃度）に対する予測精度が実用精度以上になっている研究はまだ少ない¹⁴⁾。上述の成分以外に、フェノール、アントシアニン、澱粉、或いは化学成分と直接関係がない乾燥質量、硬さなどの物理特性を近赤外分光法により予測する研究が行われてい

る。しかしこれらについては、実用化精度以上で予測することが難しい場合が多い。一方、実用化に向けて、果実の成分分析のためのオンラインシステムの開発研究も報告されるようになってきた。例えば、近赤外分光法によるオリーブ果実の遊離酸度、水分量、オイル含量¹⁸⁾とスイカの糖度⁵⁾をオンラインで測定するシステムの開発が報告されている。

測定法としては、果実や目的成分の光学特性により、異なる方式が採用されている。主な測定法としては拡散反射法、透過法及び光ファイバーを用いたインタラクタンス法が用いられている。これらの一般的に用いられる測定法とは別に、非接触で測定を行うハイパースペクトルイメージングの技術が最近発展してきて注目を集めるようになってきた。ハイパースペクトルイメージングは今まで、リモートセンシングで主に用いられてきた。しかし最近では、果実などの農作物や錠剤などの医薬製品の分析にも応用されるようになってきた。果実についてはすでに、桃の硬さ¹⁹⁾、リンゴの硬さと可溶性固形物含量(Soluble Solids Content, SSC)^{20,21)}、ブドウの総フィノール、糖度、滴定酸度、pH 値²²⁾、イチゴの含水量、SSC、pH 値²³⁾に関する定量分析や、みかん²⁴⁾、リンゴ^{25,26)}等の果実の傷付きや腐敗、汚染の検出などの定性判別が報告されている。しかし、上述の定量分析を行った研究報告の中で、予測精度が実用化精度以上になっている報告が非常に少ないのが現状である。また、可視域から近赤外域の短波長側の 1000 nm までの波長域を用いた分析例が多く報告され、1000 nm 以上の波長域を用いた研究が比較的少ないのが現状である²⁷⁾。

1.2 ブルーベリー果実の品質評価への近赤外分光法の応用

1.2.1 背景と現況

ブルーベリーは北アメリカ原産の果樹である。1968年に日本での経済栽培が始まった²⁸⁾。近年ブルーベリーは、健康に良い果実として消費者への人気が高まってきた。特に、ブルーベリー果実に豊富に含まれるアントシアニンは抗酸化力を持つ機能性物質であり、人間の筋肉疲労や運動による過酸化脂質の増加を抑制する効果や、ストレスの解消、目の疲労回復や視力改善などの生理活性を持つと報告されている²⁹⁻³¹⁾。日本ブルーベリー協会により取りまとめられた日本国内でのブルーベリーの輸入量状況と生産状況を Fig. 1.1 と Fig. 1.2 に引用する。これらの統計データから、ブルーベリーの輸入量や生産量が近年顕著に増え続けていることがわかる。このような動きの中で、2011年3月、東京農工大学ではブルーベリーをモデル植物とした「先進植物工場研究施設」が整備され、さまざまな品種のブルーベリーの高収量化、周年収穫化のための研究開発が行われている。代表的な品種のブルーベリー果実の写真を、Fig. 1.3 に示す。本研究はその研究開発の一翼を担うものであり、ブルーベリー果実に含まれる成分を非破壊分析法の一つである近赤外分光法により定量する手法の開発を目指したものである。生産現場で用いることが可能なブルーベリー果実の品質モニタリング技術を確立することが、最終の目的である。

ブルーベリー果実が含まれる成分の中で最も重要なものは、甘味に関与する糖、酸味に関与する有機酸、機能性物質であるアントシアニンの3つである。これらの成分の含有量は、熟成程度、品種、生育環境、収穫年度などの様々な要素に影響されて変動する³²⁾。そのために、各成分の含有量は果実により大きく変動する。同じ果樹から収穫したブルーベリー果実でも、各成分の含有量が幅広い領域に分布することがある。したがってこれらの成分を定量分析することは、栽培品種の選択、育成条件の設定、収穫時期の判断、安定な品質の果実

の出荷等を行う際に重要である。

これらの3成分の化学分析あるいは機器分析による定量法はすでに確立されていて、果実の品質評価にも応用されてきた。しかし従来の方法のいずれもが破壊分析であり、出荷前の果実の全品検査には用いることができない。しかも薬品や高価な機器類を用いるために、環境負荷や経済的な負担が大きい。さらに、これらの分析を行う際には多大な手間や時間が必要となる場合が多い。生産現場での果実の分析には、非破壊、簡便で薬品を使わず安価な分析法が適している。前述のように、近赤外分光法は多種果実の内部品質に関する定量分析法の開発に応用されている。しかし、本研究で扱うブルーベリー果実は、一つ一つの果実が小さくて取り扱いにくく、また非常に傷みやすいので、近赤外分光法による成分の定量分析に関する研究は今まで非常に少なかった。近赤外分光法を用いたブルーベリー果実に含まれる総可溶性個形物含量 (Total soluble solids, TSS)、総フェノール (Total phenols)、総フラボノイド (Total flavonoids)、総アントシアニン量 (Total anthocyanins)、アスコルビン酸塩 (Ascorbate) の定量分析が Nicoletta らによって報告されている³³⁾。しかし彼らの分析手法は、ブルーベリー果実をホモジナイズしてから近赤外スペクトルを測定する破壊的な方法なので、現場での全品検査に用いることはできない。本研究は、ブルーベリー果実の非破壊分析に近赤外分光法を本格的に応用することを目指した初めての例であると言える。

本研究では、近赤外分光法を用いてブルーベリーに含まれる糖、有機酸、アントシアニンの含有量を非破壊で実用精度以上の精度で予測することができるモデルの作成を目的とした。近赤外分光法により非破壊で成分分析を行う場合、定量モデルの予測精度が常に実際に必要とされる予測精度以上になるとは限らない。予測精度は目的成分の種類や濃度や測定対象の光学的な特徴などによって大きく変化する。そのため、近赤外分光法をブルーベリーの成分分析に応用

する場合にも、作成したモデルにより必要な精度以上で成分の含有量を予測できるかどうかを検討しなければならない。近赤外分光法により定量分析を行う場合、定量モデルの性能は、予測精度の指標である決定係数 R^2 (Coefficient of Determination) と RPD (Residual Predictive Deviation) により判定されることが多い。すなわち、 $R^2 > 0.85$ 、 $RPD > 2.5$ であれば実用的な性能を持つと考えられる^{16,34,35)}。本研究でも作成した定量モデルの性能をこの基準に従って評価して、基準を超える性能を持った定量モデルの作成を目指した。

近赤外分光法を果実の成分分析に応用する場合、従来は、分光光度計を用いて透過法や拡散反射法による測定が行われてきた。本研究でも、これらの方法を主に用いて分析手法の開発を行った。最近、従来とは異なった手法であるハイパースペクトルイメージングによる分析が注目されるようになってきた。この新しい測定技術のブルーベリー果実への応用がいくつか報告されている。それらは、ブルーベリー（果実だけではなくジャムなどの原料としてつぶしたもの）中に混入した異物（石、葉、毛髪など）の識別²⁴⁾、虫害の判別³⁶⁾等、主に定性分析への応用例である。ブルーベリー果実の硬さとSSCを予測する³⁷⁾定量分析の報告が一つある。しかし糖度、酸度、アントシアニンの定量分析に応用した報告は未だ見られない。本研究では、ハイパースペクトルイメージングの手法を用いてブルーベリー果実に含まれる糖、有機酸、アントシアニンの3成分の定量分析が可能かどうかについても検討した。

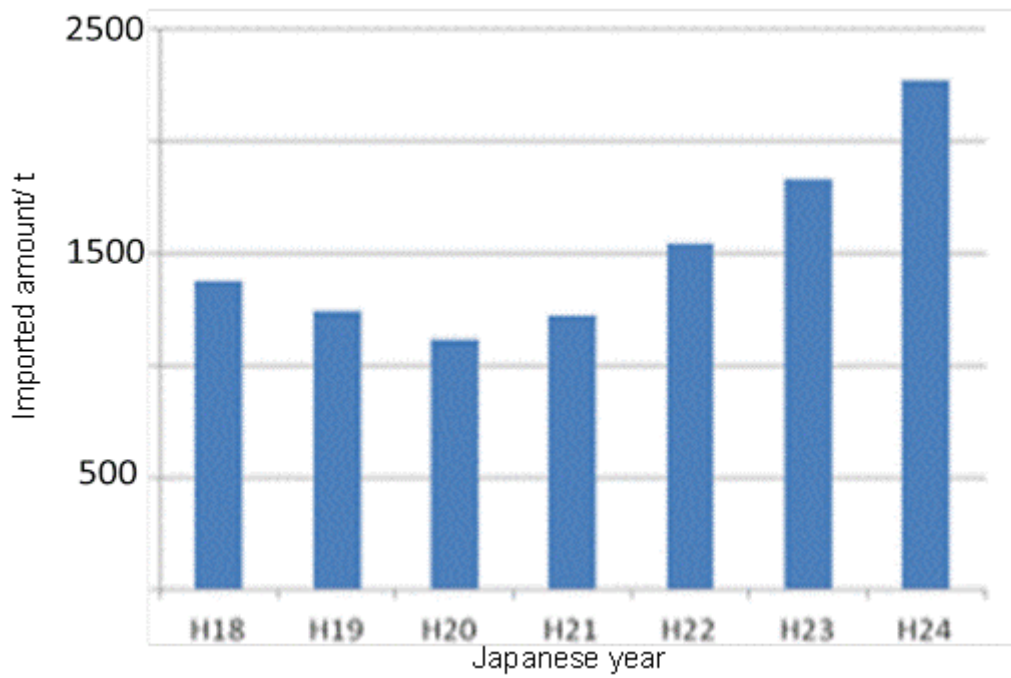


Fig. 1.1 Change of annually imported amount of blueberry fruits
 (Source: Trade Statistics of Japan)

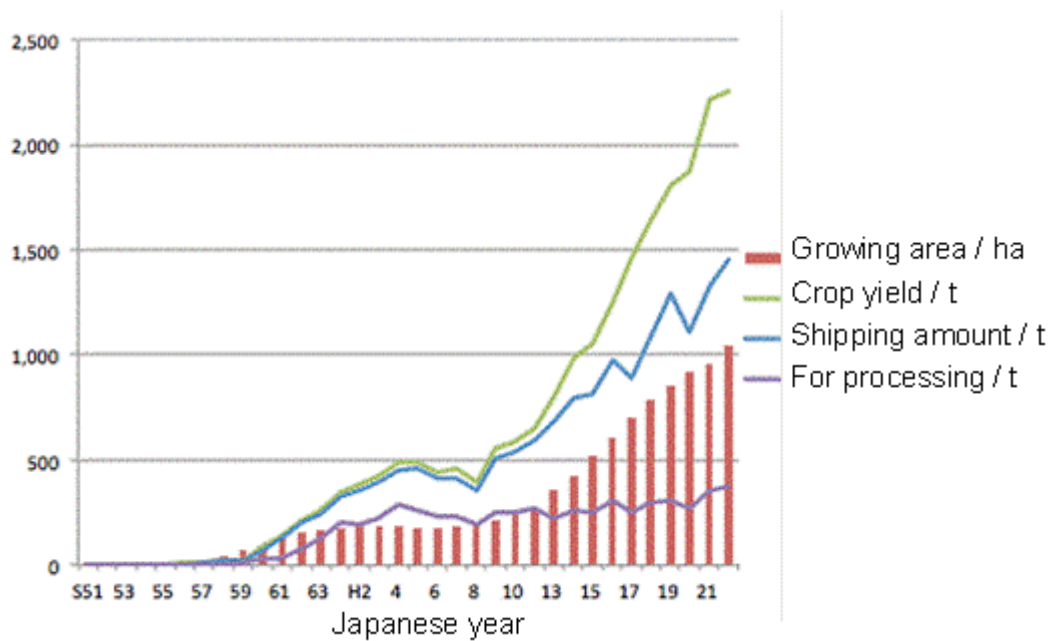


Fig. 1.2 Change of annual production amount of blueberry fruits
 (Source: Compiled from MAFF “Investigation of production dynamics of special fruits”)



Fig. 1.3 Typical cultivars of blueberry in the plant factory of TUAT
(Source: Presentation of plant factory in the TUAT)

1.2.2 近赤外分光法

本研究では、近赤外分光法（吸収スペクトルの測定）を分析手法として用いた。近赤外光は、波長がおよそ 800 nm–2500 nm の光（電磁波）である。この波長域は、可視光領域と赤外光（中赤外）領域の間に位置する。近赤外分光法では、測定対象の分子と近赤外領域の光の相互作用（光の吸収あるいは放射）の強度の波長依存性を表すスペクトル（それぞれ「吸収スペクトル」と「発光スペクトル」と呼ばれる）を測定する。スペクトルには、測定対象物質の分子レベルでの構造、物性、存在量の情報が含まれている。スペクトルを測定することにより、測定対象物質に関する定性的あるいは定量的な情報を得るのが、近赤外分光法である。

近赤外領域に観測される吸収は、赤外領域の吸収と同様に分子振動に起因する。しかし赤外領域に観測される吸収が主に分子振動の基本音によるものであるのに対して、近赤外領域に観測されるのは分子振動の倍音や結合音によるものである。分子振動が調和振動子であるとすると、倍音や結合音は禁制遷移となって吸収スペクトルには観測されない。しかし実際の分子振動には非調和性が存在するので、大きな非調和性を持つ振動の倍音や結合音は吸収スペクトルに観測される。近赤外吸収スペクトルに観測されるのは、主に大きな非調和性をもった C-H、O-H、N-H 結合に関係した振動である。

近赤外領域の吸収は本来禁制の遷移によるものなので、その強度は赤外領域の吸収と比べて遥かに小さく（およそ 1/100 ~ 1/1000）、近赤外光は測定対象の内部まで浸透あるいは通り抜けることができる。そのために、近赤外分光法は測定対象を切ったりつぶしたりしなくてもその内部の情報を得ることが可能な非破壊的な分析手法として用いることができる。

一方、近赤外スペクトルには狭い波長域に多数の倍音や結合音が重なって観測される。しかも多成分を含む測定対象（たとえば果実、野菜など）を成分分

離することなく非破壊で測定することが多い。そのために、重なりあって観測される多数のバンドを分離したり、それぞれを帰属したりすることは著しく難しく、具体的な成分に関する情報（成分の種類やその濃度）を吸収スペクトルに観測されるピークの帰属やランベルトーベール則の応用などにより直接得ることは事実上不可能である。そこで、近赤外吸収スペクトルはケモメトリックス（Chemometrics）法と呼ばれる数学的な手法を用いて解析することにより成分に関する情報を得ることが一般的に行われている。

近赤外分光法は、非破壊分析手法の一つとして農林水産業、製菓業、工業など様々な分野で広く用いられるようになってきた。特に農産物の生産や出荷の際に必要な定性・定量分析を近赤外分光法により行っている例は多数報告されている。最も有名な実用例として、果実への応用である。スーパーで売られているミカンなどの果実に、「光センサーによる検査済」との表示がしばしば見られる。これは近赤外分光法により非破壊的に糖度を（及び場合によっては酸度も）チェックしたことを示したものである。非破壊的な全品検査により、安定した果実を販売あるいは購入できるようになってきたのである。近赤外分光法は、ミカン、リンゴ、モモ、メロン、スイカ、イチゴ、サクランボ等多くの種類の果実に実用されているが、本研究で対象とするブルーベリーへの応用研究は、既に述べたようにまだほとんど行われていない。

従来の破壊分析手法と比べた近赤外分光法の利点を以下にまとめて示す。

- ① 従来の化学分析とは異なり薬品を使用しないので、より安全であり、環境にやさしく、かつ分析コストを低減することができる。
- ② 測定試料に対して物理的・化学的な前処理を行うことなく、そのまま測定することができる。非破壊迅速な測定が可能である。
- ③ 多成分の分析を同時に行うことが可能である。
- ④ 測定試料の化学成分に関する情報だけでなく、物理特性に関する情報

(定性的あるいは定量的な情報)を得ることができる場合もある。

近赤外スペクトルの測定は、通常は近赤外分光光度計を用いる。しかし最近ではハイパースペクトルカメラを用いた測定も行われるようになってきた。以下にそれぞれを簡単に説明する。

1.2.2-1 近赤外分光光度計

紫外・可視領域や赤外領域と同様に、近赤外領域でも汎用の分光光度計が多数市販されている。しかし、紫外・可視領域や赤外領域とは少し異なった状況があるので、本研究と関連させながらその状況を簡単に説明する。

紫外・可視領域の汎用分光光度計は掃引型(波長掃引をしてスペクトルを測定する方式)、赤外領域の汎用分光光度計はフーリエ変換型(干渉計を用いてまざインターフェログラムを測定し、それをフーリエ変換することによりスペクトルを得る方式)である場合がほとんどである。それに対して、近赤外領域の分光光度計は両方式が入り混じって用いられている。その理由は、近赤外領域の分光光度計が紫外・可視用の装置の測定領域を長波長側に拡張したものか、赤外用の装置の測定領域を短波長側に拡張したものであるためである。近赤外領域の測定に特化した汎用分光光度計も少ないながら市販されている。近赤外専用機も以前は掃引型とフーリエ変換型が共存していた。しかし最近では、フーリエ変換型が優勢な状況である。これは、フーリエ変換の方式を用いると、測定の積算が容易で微弱な吸収も測定可能であることや、得られるスペクトルの波長(波数)精度が高いことに起因している。しかし、掃引型にも安価であることなどの長所があるので、後述するような使用目的を特化した分光光度計の中には掃引型のものも多い。

近赤外分光法を用いた分析手法を開発する際には、スペクトルのわずかな変化により判別や定量を行うことが必要となるので、手法開発の段階ではできる

だけ高性能（高い S/N、波長再現性、再現性を持った高い感度など）の汎用分光光度計を用いる。本研究でも、高性能のフーリエ変換型近赤外分光光度計を用いて研究を進めた。

しかし高性能の汎用分光光度計は一般に大型で重量も大きく据え置き型なので、分析現場に持ち込むことが困難であることが多い。また非常に高価な装置であることも、実用現場への導入を難しくする。そのために、分析手法が確立すると、その分析に特化した分光光度計を設計製作することがしばしばある。例えば、ミカンに特化した分光光度計、食肉の品質評価に特化した分光光度計、エコフィード（食物残さから作る家畜飼料）の分析に特化した分光光度計などが市販されている。これらは特定の目的を達成するための必要最低限の性能のみを持つように作られていて、小型で軽量、安価であることが多い。ブルーベリーへの応用についても、最終目標はブルーベリー専用の分光光度計の設計製作である。しかし装置作りの段階になると機械設計のメーカーと取り組むことが一般的である。本研究では、分光装置の製作の段階までは進むことができなかったが、糖、有機酸、総アントシアニン量を現場で定量分析する分光装置に必要とされる性能を検討した。

他の波長域でのスペクトル測定とは異なり、近赤外分光法でのスペクトルの測定には透過法の他に、拡散反射法、透過反射法、インタラクタンス (Interactance) 法など様々な手法 (Fig. 1.4) が用いられる。同じ分光光度計を用いても、異なる測定法によりスペクトルを得ることが可能である。本研究では、どの方法で測定したスペクトルが最も良い分析値を与えるかについての検討を行ったので、以下に透過法と拡散反射法について簡単に紹介する。

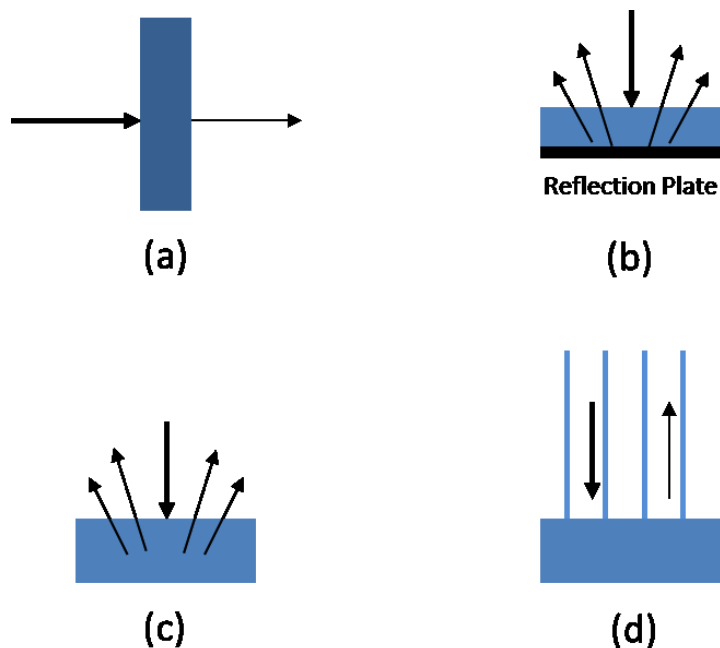


Fig. 1.4 (a)Transmission method, (b)Transmission reflection method,
(c)Diffuse reflectance method, (d)Interactance method

(1) 透過法

分光分析で最も良く用いられる測定法は、試料を通り抜けた（透過した）測定光によりスペクトルを得る方法である。次項に述べる拡散反射法とは異なり試料を透過する光によりスペクトルを得るので、試料が不均一な場合にも、試料全体の情報を得ることができる。しかし、試料の光路長（試料の厚さ）が大きくなると透過光強度が著しく小さくなり、S/N の大きな良好なスペクトルを得ることが困難になる。紫外・可視領域や赤外領域では、薄い（厚さが小さな）試料を調整して透過法により測定を行うことが一般的に行われているが、近赤外分光法では非破壊での測定が重要な意味を持つので、固体試料について厚さの調整をすることは通常行われな。良好なスペクトルを得ることが困難なほど厚さが大きな試料については、次項に述べる拡散反射法によりスペクトルを得る。

(2) 拡散反射法

拡散反射法とは、試料表面からの拡散反射光を測定することによりスペクトルを得る方法である。試料に照射された測定光の一部は、測定試料の内部に入り込み、透過や反射を繰り返した後に表面から出てくる。しがたって拡散反射光を測定することにより、試料のスペクトルを得ることができる。表面がなめらかではない（ザラザラの）固体や粉体など、拡散反射を起こしやすい試料に適した測定法である。近赤外分光法では、透過法が測定しがたい厚さの大きな試料のスペクトルを測定する際に、しばしば拡散反射法が用いられる。拡散反射法では、セラミック板などの標準試料の拡散反射光に対する試料の拡散反射光の強度を測定することにより吸収スペクトルを得る。得られたスペクトルには、測定光を照射した表面近傍の情報のみが含まれている。試料が不均一な場合には、拡散反射法で得られた情報は必ずしも試料全体を反映した情報にはならない。

拡散反射法では、吸収が弱い光ほど試料の内部を長い距離透過することができるので、吸収が弱いバンドが強調されたスペクトルが得られる。そこで、クベルカームンク変換（Kubelka-Munk transformation）と呼ばれる処理を測定されたスペクトルに施し、透過法で得られるスペクトルと等価なスペクトルに変換する。クベルカームンク変換後のスペクトルは、透過法で測定され、吸光度で表示されたスペクトルと同様に信号強度が試料の濃度に比例するので、定量分析に用いることができる。

拡散反射法での測定には、試料からさまざまな方向に射出される拡散反射光を効率よく集めて検出器へ導くために積分球（内側が硫酸バリウムなどの白色の物質でコーティングされた中空の球）を用いる（Fig. 1.5）。

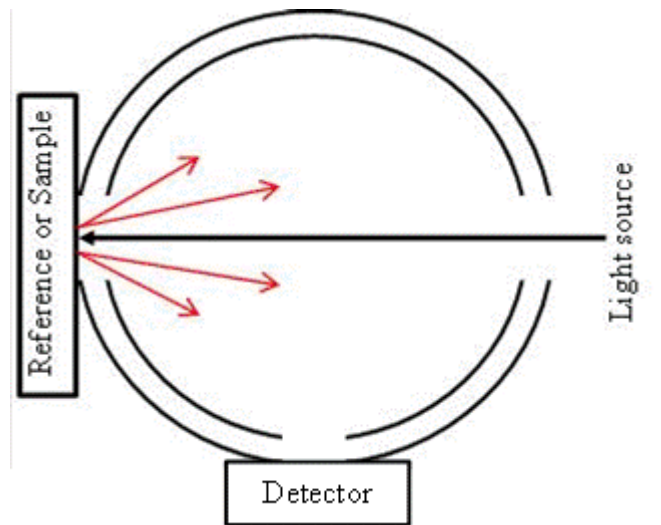


Fig. 1.5 Image of the integrating sphere to be used for diffuse reflectance method

1.2.2-2 ハイパースペクトルイメージングカメラ

ハイパースペクトルイメージング (Hyper Spectral Imaging : HSI) カメラとは、連続した異なる波長条件で撮影した画像を並べたハイパースペクトルを得るためのカメラである。ハイパースペクトルには、各画素が位置情報の他にスペクトル情報を持つ。デジタルカメラで撮影した写真は各画素が RGB の情報を持つが、その情報が RGB だけではなくスペクトル情報になっているものであると考えるとわかりやすい。試料の位置情報とスペクトル情報の双方を持つので、汎用近赤外分光光度計では得られない情報を引き出すことが可能になると期待される。一方、膨大な情報を測定したり解析したりする必要があるため、ハイパースペクトルを扱うには、従来とは異なった測定技術や解析技術が必要となる。

HSI カメラには、カメラのレンズの前に透過波長可変の光学フィルターを設置して一度に二次元の情報を得るものもあるが、一般的なカメラではライン分光方式と呼ばれる方法が用いられている。ライン分光方式では、測定対象の水平ライン上からの光をカメラに導入してそれを垂直の方向に分光し、CCD な

どの二次元検出器で水平空間位置情報と分光情報を測定する。水平ラインの位置を少しずつずらして測定を繰り返すことによりハイパースペクトルが得られる。測定する水平ラインを移動させる方法には、カメラと測定対象の相対位置を変化させる方法と、カメラのレンズの前に鏡を置いてその角度を変化させる方法の2つがある。いずれの場合でも、最終的に得られるのは空間情報を表すX、Y座標の値とスペクトル情報を表す波長軸からなる三次元のハイパースペクトルキューブ (Hyperspectral Cube) となる。

HSIカメラで測定するのは、輝度値スペクトルである。分析に用いるのは反射スペクトル或いは吸光度スペクトルなので、輝度値スペクトルから反射或いは吸光度のスペクトルに変換する。その為に、反射率がほぼ100%の標準反射板の輝度値をあらかじめ測定しておき、波長毎に試料の反射率或いは吸光度を求めることが必要である。本研究では、可視から近赤外までの領域のハイパースペクトルを測定したので、光源としてはハロゲンランプを用いた。

1.3 本研究の目的

科学技術の発展や生活水準の向上に伴い、果物に含まれる栄養成分を非破壊的に計測してから出荷することが可能となり、すでに実用化されている例もある³⁸⁾。

日本でも、ブルーベリーは日常的な果物として広まってきた。しかし、その内部品質に寄与する栄養成分を非破壊的に分析する手法は、まだ確立されていない。本研究では、非破壊分析法となる近赤外分光法を用いて、ブルーベリー果実に含まれる糖、有機酸及び総アントシアニン量を定量分析する手法の開発を行い、これらの3成分を実用精度以上の精度で定量分析する手法を確立して、出荷の際の選果など生産現場に用いることが可能な分析装置に必要な性能を明らかにすることを目的とした。

また、従来の分光計によるブルーベリー果実の定量分析では、果実を一つ一つ測定して成分濃度を予測する必要がある。しかし、測定方式が従来の分光計とは異なるハイパースペクトルイメージングカメラを用いれば、スペクトル情報と空間情報を同時に得ることができるので、多数の果実のスペクトルを同時に測定し成分濃度を予測することが可能となる。本研究は、ハイパースペクトルイメージングカメラを用いたブルーベリー果実の糖度、酸度と総アントシアニン量の定量分析の手法開発も目的とした。

1.4 本博士論文の構成

本論文は、以下のような構成で書かれている。第一章では、近赤外分光法の果実類やブルーベリー果実についての研究及び応用現状を概説した。また、本研究に用いた手法や解析法についても必要最小限の情報をまとめて概説した。第二章では、従来の分光光度計を用いたブルーベリー果実に含まれる糖、有機酸濃度と総アントシアニン量の定量分析手法の開発と作成した定量モデルの評価について述べる。また、従来の分光光度計の測定データに基づくデータシミュレーションの結果により、果実測定現場向けの分光装置の性能について述べる。第三章では、ハイパースペクトルイメージングの手法を用いた分析手法の開発と作成したモデルの評価について述べる。第四章は総括として、本研究で得られた成果の全体をまとめる。

1.5 引用文献

- 1) S. Saranwong, S. Kawano, "Fruits and Vegetables", in *Near-infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*, Ed by Y. Ozaki, W. F. McClure and A. A. Christy. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 219-245 (2007).
- 2) D. Cozzolino, W.U. Cynkar, N. Shah, P. Smith, "Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality", *Food Research International* **44**, 1888-1896 (2011).
- 3) F. Liu, Y. He, L. Wang, G. Sun, "Detection of Organic Acid and PH of Fruit Vinegars Using Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration", *Food Bioprocess Technology* **4**, 1331-1340 (2011).
- 4) J.C. Tewari, V. Dixit, B.K. Cho, K.A. Malik, "Determination of origin and sugar of citrus fruits using genetic algorithm, correspondence analysis and partial least square combined with fiber optic NIR spectroscopy", *Spectrochimica Acta Part A* **71**, 1119-1127 (2008).
- 5) D. Jie, L. Xie, X. Rao, Y. Ying, "Using visible and near infrared diffuse transmittance technique to predict soluble solids content of watermelon in an on-line detection system", *Postharvest Biology and Technology* **90**, 1-6 (2014).
- 6) Z. Seregely, T. Deak, G.D. Bisztray, "Distinguishing melon genotypes using NIR spectroscopy", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **72**, 195-203 (2004).
- 7) S. Saranwong, J. Sornsrivichai, S. Kawano, "Prediction of ripe-stage eating quality of mango fruit from its quality measured nondestructively by near infrared spectroscopy", *Postharvest Biology and Technology* **31**, 137-145 (2004).

- 8) Y. Liu, X. Chen, A. Ouyang, “Nondestructive determination of pear internal quality indices by visible and near-infrared spectrometry”, *LWT-Food and Technology* **41**, 1720-1725 (2008).
- 9) A.H. Gomez, Y. He, A.G. Pereira, “Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques”, *Journal of Food Engineering* **77**, 313-319 (2006).
- 10) P.N. Schaare, D.G. Fraser, “Comparison of reflectance, interactance and transmission model of visible-near infrared spectroscopy for measuring internal properties of Kiwifruit (*Actinidia chinensis*)”, *Postharvest Biology and Technology* **20**, 175-184 (2000).
- 11) X.P. Fu, J.P. Li, Y. Zhou, Y.B. Ying, L.J. Xie, X.Y. Niu, Z.K. Yan, H.Y. Yu, “Determination of soluble solid content and acidity of loquats based on FT-NIR spectroscopy”, *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **10**, 120-125 (2009).
- 12) A. Bureau, D. Ruiz, M. Reich, B. Gouble, D. Bertrand, J-M. Audergon, C.M.G.C. Renard, “Rapid and non-destructive analysis of apricot fruit quality using FT-near-infrared spectroscopy”, *Food Chemistry* **113**, 1323-1328 (2009).
- 13) G.A. Oliveira, S. Bureau, C.M.G.C. Renard, A.B.P. Netto, F. Castilhos, “Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species”, *Food Chemistry* **143**, 223-230 (2014).
- 14) B.M. Nicolai, K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K.I. Theron, J. Lammertyn, “Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review”, *Postharvest Biology and Technology* **46**, 99-118 (2007).

- 15) L.J. Janik, D. Cozzolino, R. Damberg, W. Cynkar, M. Gishen, "The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neural networks", *Analytica Chimica Acta* **594**, 107-118 (2007).
- 16) P.C. Williams, "Implementation of near-infrared technology." In *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2nd ed. Eds. P. Williams, K. Norris, St. Paul, USA: American Association of Cereal Chemists. pp. 145-169 (2001).
- 17) M. Bala, M. Singh, "Non destructive estimation of total phenol and crude fiber content in intact seeds of rapeseed-mustard using FTNIR", *Industrial Crops and Products* **42**, 357-362 (2013).
- 18) L.S. Chaparro, V. Baeten, J.A.F. Pierna, F.P. Rodriguez, "Near infrared spectroscopy (NIRS) for on-line determination of quality parameters in intact olives", *Food Chemistry* **139**, 1121-1126 (2013).
- 19) R. Lu, Y. Peng, "Hyperspectral Scattering for assessing Peach Fruit Firmness", *Biosystems Engineering* **93**, 161-171 (2006).
- 20) Y. Peng, R. Lu, "Analysis of spatially resolved hyperspectral scattering images for assessing apple fruit firmness and soluble solids content", *Postharvest Biological Technology* **48**, 52-62 (2008).
- 21) F. Mendoza, R. Lu, D. Ariana, H. Cen, B. Baile, "Integrated spectral and image analysis of hyperspectral scattering data for prediction of apple fruit firmness and soluble solids content", *Postharvest Biological Technology* **62**, 149-160 (2011).
- 22) J.N. Bueno, J.M.H. Hierro, F.J.R. Pulido, F.J. Heredia, "Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in

- red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: A preliminary approach”, *Food Chemistry* **152**, 586-591 (2014).
- 23) G. ElMasry, N. Wang, A. ElSayed, M. Ngadi, “Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry”, *Journal of Food Engineering* **81**, 98-107 (2007).
- 24) D. Lorente, J. Blasco, A.J. Serrano, E. Soria-Olivas, N. Aleixos, J. Gomez-Sanchis, “Comparison of ROC Feature Selection Method for the Detection of Decay in Citrus Fruit Using Hyperspectral Images”, *Food Bioprocess Technology* **6**, 3613-3619 (2013).
- 25) P.M. Mehl, Y.R. Chen, M.S. Kim, D.E. Chen, “Development of hyperspectral imaging technique for the detection of apple surface defects and contaminations”, *Journal of Food Engineering* **61**, 67-81 (2004).
- 26) G. ElMasry, N. Wang, C. Vigneault, J. Qiao, A. ElSayed, “Early detection of apple bruises on different background colors using hyperspectral imaging”, *LWT* **41**, 337-345 (2008).
- 27) A.A. Gown, C.P.J. Donnell, P.J. Cullen, J.M. Frias, “Hyperspectral imaging - an emerging process analytical tool for food quality and safety control”, *Trends in Food Science & Technology* **18**, 590-598 (2007).
- 28) 岩垣 駛夫、石川 駿二編著、”ブルーベリーの栽培”、誠文堂新光社、1984
- 29) 平山 匡男、「アントシアニンの視覚改善作用」-津田 孝範、須田 郁夫、津志田 藤二郎、アントシアニンの化学、建帛社、p.93-105 (2009).
- 30) 五十嵐 喜治、「酸化ストレス防御因子としてのアントシアニン」-津田 孝範、須田 郁夫、津志田 藤二郎、アントシアニンの化学、建帛社、pp.108-129 (2009).
- 31) W. Routray, V. Orsat, “Blueberry and their anthocyanins:factors affecting

- biosynthesis and properties”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**, 303-320 (2011).
- 32) A.D.R. Castrejon, I. Eichholz, S. Rohn, L.W. Kroh, S. Huyskens-keil, “Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening”, *Food Chemistry* **109**, 564-572 (2008).
- 33) N. Sinelli, A. Spinardi, V. Di Egidio, I. Mignani and E. Casiraghi, “Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy”, *Postharvest Biol. Technology* **50**, 31-36 (2008).
- 34) M.J. Edney, J.E. Morgan, P.C. Williams and L.D. Campbell, “Analysis of feed barley by near infrared reflectance spectroscopy”, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2**, 33-41 (1994).
- 35) G.W. Mathison, H. Hsu, R. Soofi-Siawash, G. Recinos-Diaz, E. K. Okine, J. Helm and P. Juskiw, “Prediction of composition and ruminal degradability characteristics of barley straw by near infrared reflectance spectroscopy”, *Canadian J. of Animal Sci.* **79**,519-523 (1999).
- 36) B.N. Peshlov, F.E. Dowell, F.A. Drummond, D.W. Donahue, “Comparison of three near infrared spectrophotometers for infestation detection in wild blueberries using multivariate calibration models,” *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **17**, 203-212 (2009).
- 37) G.A.L. Valenzuela, R. Lu, J.M. Aguilera, “Prediction of firmness and soluble solids content of blueberries using hyperspectral reflectance imaging”, *Journal of Food Engineering* **115**, 91-98 (2013).
- 38) K. Miyamoto, “Feedback of the fruit quality data measured by NIR

spectrophotometer to production control using GIS and taking new turn of agricultural research”, *Horticultural Research (Japan)* **3**, 245-250 (2004)

第二章 近赤外分光光度計によるブルーベリー果実の成分評価

2.1 はじめに

ブルーベリー果実の収穫や出荷の際の内部品質の評価は、現状では外観（見かけ）の観察にほぼ頼っている¹⁾。しかし果実の内部品質を決定する化学成分の含有量を色合いなどの外観パラメータから判断すると、予測値に大きな誤差が含まれる可能性が高い。一方、化学分析や機器分析を用いれば化学成分の含有量を正確に測定することが可能となるが、果実の出荷のような生産現場にこれらの方法を応用できるケースは限られている。したがって、品質が安定したブルーベリー果実を出荷するためには、非破壊かつ迅速な分析手法の開発が非常に重要な課題である。

本研究は非破壊分析法の一つである近赤外分光法によりブルーベリー果実の主要な内部品質である糖、有機酸の濃度と総アントシアニン量を実用精度 ($R^2 > 0.85$, $RPD > 2.5$) 以上の精度で定量分析する手法の開発を行った。

果実の近赤外スペクトルの測定には、第一章に述べたように種々の測定法が用いられる。本研究では、最も一般的に用いられている透過法と拡散反射法がブルーベリー果実の成分の定量分析に応用可能かどうか、またいずれの測定法が優位かを検討した。また、同一のブルーベリー果実でも測定部位（照射光が当たる部位）によってスペクトルの形状が変化する。測定部位によるスペクトルの形状変化が定量分析の予測精度にどのような影響を与えるかについても検討した。

近赤外分光法による定量分析は、①目的成分の濃度を化学分析等により実測した標準試料の近赤外スペクトルに基づいて定量モデルを作成し、②その定量モデルを用いて未知試料の近赤外スペクトルから成分濃度を予測する。したがって、定量モデルの作成に用いる標準試料の目的成分の濃度の実測値の正確さ

(確度) が定量モデルの予測精度に大きく影響する。本研究では、糖、有機酸の濃度と総アントシアニン量についてできるだけ高い確度で実測値を得る為に、糖度計や酸度計を用いた測定などの従来からの分析法に加えて、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography:HPLC) を用いた化学分析を行った。化学分析の実測値と近赤外スペクトルに最も一般的なケモメトリクス手法である PLS1 回帰分析を適用して、近赤外スペクトルから成分濃度を予測する定量モデルを作成した。

本研究では、ブルーベリー果実に含まれる成分のそれぞれに対して測定法と測定部位を組み合わせた6つの定量モデルを作成した。すなわち、一つの目的成分に対して、測定法として①透過法、あるいは②拡散反射法を選択し、測定部位としては①萼あ部位、②萼あ以外の部位、③萼あ部位と萼あ以外の部位の混合、のうちの1つを選択し、それぞれについて定量モデルを作成した。モデルの作成時には、予測に用いる波数域も検討した。すなわち、得られたスペクトルの全領域を予測に用いるのではなく、予測に有効な波数領域を選んで用いた。それぞれの定量モデルの予測精度を評価し、各成分の濃度を実用精度以上の精度で予測する為の測定法、測定部位、予測に用いる波数域を検討し、定量分析の手法を確立した。また、スペクトルを主成分スコアプロットして、測定部位を判別する方法を検討した。これは、スペクトルからそのスペクトルを測定した部位を判定して適切な(測定部位に対応した)定量モデルを適用する為である。

2.2 実験

2.2.1 測定試料

東京農工大学府中キャンパスの「先進植物工場研究施設」に栽培されている代表的なブルーベリー品種である Blueray、Cooper、G-113、Sharpblue、Baldwin を測定試料とした。化学分析の際の糖と有機酸の抽出法と総アントシアニンの抽出法が異なるので、糖・有機酸分析用の試料と総アントシアニン分析用の試料はそれぞれ用意した。糖と有機酸の定量モデル作成用に、3 品種 (Blueray、Cooper、G-113) 合計 30 粒のブルーベリー果実を 2013 年 6 月に収穫した。一方、総アントシアニンの定量モデル作成用には 3 品種 (Sharpblue、Baldwin、Blueray) 合計 70 粒のブルーベリー果実を 2012 年 6 月と 12 月に収穫した。

2.2.2 分光光度計の装置パラメータと近赤外スペクトルの測定

装置名：フーリエ変換近赤外分光光度計 MPA 型 (Bruker, Germany)

波数領域：12500-4000 cm^{-1}

分解能：16 cm^{-1}

積算回数：32

検出器：PbS (拡散反射法)、InGaAs (透過法)

干渉計：アライメントフリー RockSolid™

本研究では、透過法と拡散反射法を近赤外スペクトルの測定に用いた。これら 2 つの方法で得られるスペクトルは、含まれる情報が異なる。透過法の場合、測定光がブルーベリー果実を通り抜けるので、光路長が長くなり、検出器に到達する光の強度が非常に弱くなることがある。したがって、弱い光を高感度で検出できる InGaAs 検出器を用いた。透過法で 7000 cm^{-1} よりも低波数の測定を行うと、測定光のほとんどがブルーベリー果実に吸収されてしまい、かつ検出器の感度も落ちてくるので、有意な近赤外スペクトルデータを得ることが難し

い。一方拡散反射法では、ブルーベリー果実に照射して拡散反射してきた光を積分球により測定するから、ブルーベリー果実の表面近傍の情報を得ることになる。照射した光はブルーベリー果実の内側に数ミリメートル程度しみこんで反射してくる。そのために検出器に到達する光の強度は透過法に比べて強い。したがって拡散反射法では、近赤外全領域で感度がよい PbS 検出器を用いて測定を行う。透過法と拡散反射法のいずれを用いたほうが有利かは、測定の目的や条件によって異なる。そこで本研究では、2 つの測定法で得られたスペクトルのそれぞれについて定量モデルの開発を行った。スペクトル測定の様子を、Fig. 2.1 に示す。

近赤外分光光度計でブルーベリー果実の近赤外スペクトルを測定する場合、ブルーベリー果実上で近赤外光が当たる部位には任意性がある。ブルーベリー果実の表面には、「萼あ」(萼窪、calyx) と呼ばれる部位(花卉がついていた窪んだ部位)があつて、他の部分とは明らかに異なり、表面が粗い。果実の近赤外スペクトルを測定する場合、測定光を果実のどの部位に当てて測定するかによって得られる近赤外スペクトルが異なることが予想される。同一ブルーベリー果実の萼あ部位や萼あ以外の部位に測定光を当てて測定した近赤外スペクトルと、それらの差スペクトルを Fig. 2.2(a,b) に示す。拡散反射スペクトルの場合、萼あ以外の部位で測定されたスペクトルの吸光度は萼あ部位で測定された吸光度よりも高い。さらに、萼あ部位で測定したスペクトルでは、 5360 cm^{-1} 付近でベースラインの傾きが大きくなる。このような変化の原因としては、成分、特に水分の不均一分布や果実表面状況の違いが考えられる。このような測定部位の違いによるスペクトルの差異が定量モデルの予測精度に影響を与えるのかどうか、どの程度まで影響するのかについて検討した。測定データとしては、一つのブルーベリー果実について測定部位と測定法の組み合わせが異なる4つのスペクトルを測定した。

スペクトルを測定した果実は、引き続いて行う化学分析の為に、測定直後に重量を量り、糖と有機酸の分析に用いる果実は-30℃の冷凍庫に、総アントシアニン量の分析に用いる果実は-80℃の冷凍庫に保存した。

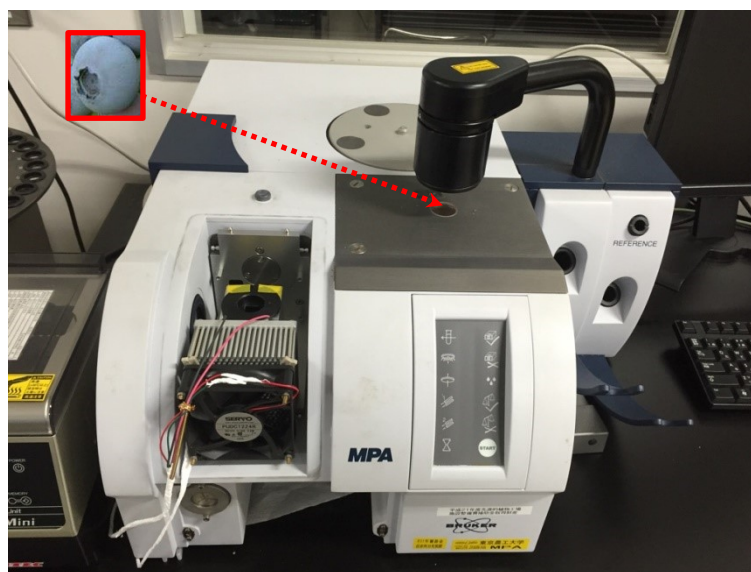


Fig. 2.1 A photo of the NIR spectrophotometer (MPA) used in this study. A blueberry fruit is put on the window pointed at by the red arrow when its spectra are measured either by the transmittance mode or by the diffuse reflectance mode.

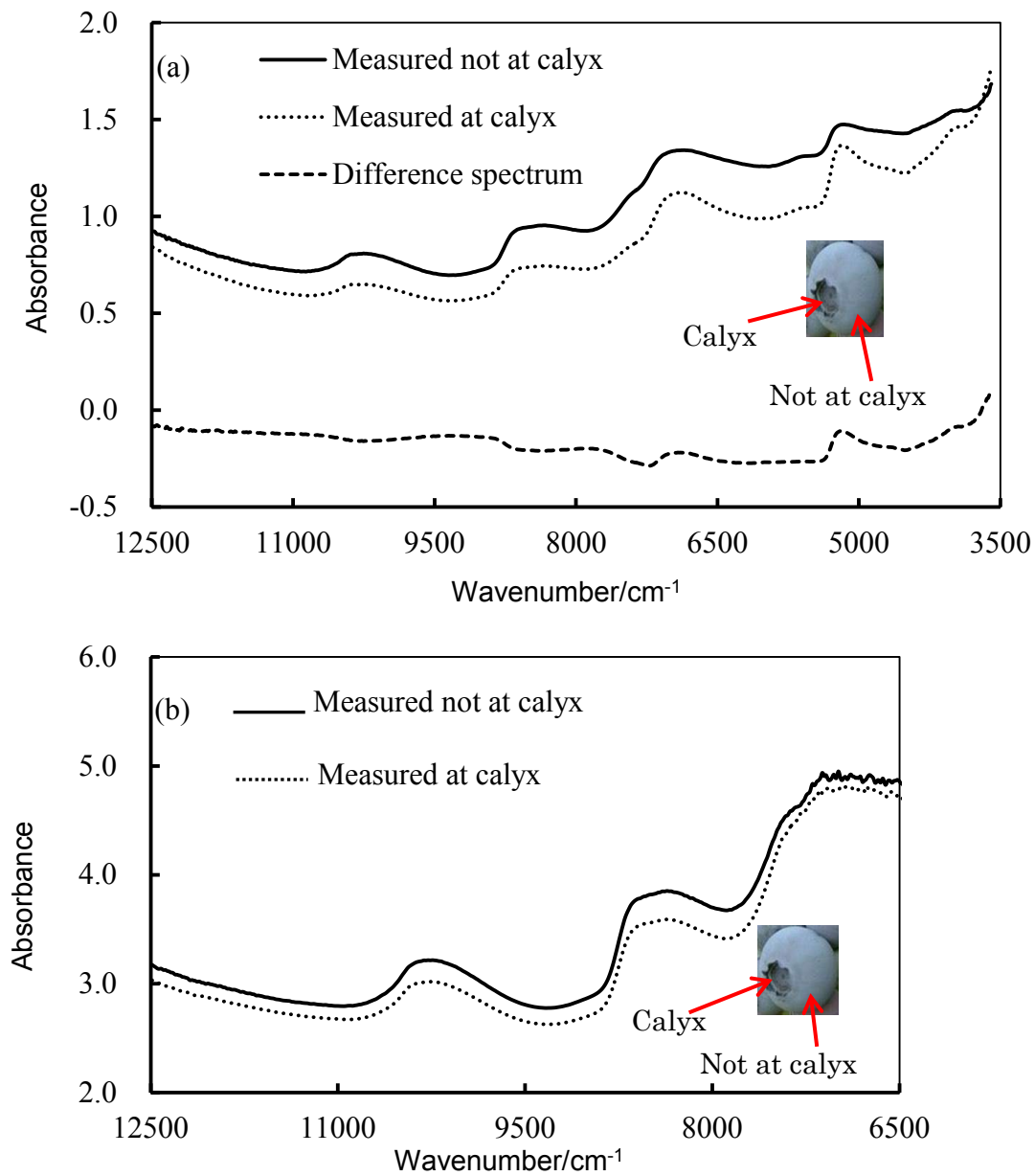


Fig. 2.2 Spectra of a blueberry fruit measured in (a) diffuse reflectance mode and (b) transmission mode. Spectra were measured at the calyx and at a position not at the calyx in each mode. In (a), a difference spectrum between the spectrum measured at the calyx and at the other position is also shown.

2.2.3 成分の化学分析

2.2.3-1 糖と有機酸

糖と有機酸は水溶性物質なので、果実ごとに超純水を用いて抽出して、HPLCにより定量分析を行った²⁾。抽出と前処理は、以下の手順に従って行った。

- 1) ブルーベリー果実をいくつかに切り、50 mL のビーカーに入れる。
- 2) 少量の超純水を加えて電子レンジに 20 秒間かけ、酵素を劣化させる。
- 3) ビーカーに適当な量の超純水を加え、5 分間ホモジナイズした後、3000 rpm で 10 分間遠心分離 (Kokusan, Japan) する。
- 4) 遠心分離液を 5B のろ紙により減圧濾過し、濾過液を集める。残渣に対して 3) からの操作をもう一巡行い、得られる濾過液を最初の濾過液と合わせる。
- 5) 濾過液の pH を 7 に調整し、超純水により 50 mL に定容する。
- 6) 色素、カチオン、アニオンを除く為に、濾過液を C18、CM、QMA の SEP カラム (Waters 社、sep-pak@plus) に通し、糖分析用の溶液を採取する。その後 QMA カラムを外し、C18 と CM の SEP カラムに通し、有機酸分析用の溶液を採取する。
- 7) 得られた溶液を 0.45 μm のフィルター付きのマイクロチューブ MCF (LMS, Japan) に入れて遠心分離し、HPLC 分析用の試料溶液とする。

次に、前処理をした試料溶液について、Prominence HPLC (SHIMADZU, Japan) を用いて糖と有機酸の定量分析を行った。HPLC 分析の各条件を次の頁に示す。

(1) 糖濃度の HPLC 分析

- 溶離液：超純水
- 分離カラム：ゲル濾過モード
- 検出器：屈折率検出器
- カラム室の温度：40°C
- 注入量：20 μ L

定量標準物質として、スクロース、グルコース、フルクトースの特級試薬 (Wako Pure Chemicals, Japan) を用いた。3種類の糖成分について、それぞれ濃度が異なる3つの標準溶液を作り (試料溶液中の成分濃度の範囲をカバーするように調整する)、試料溶液の HPLC 測定と同一の条件で測定した。各標準溶液にて得られるピーク面積と成分濃度に回帰計算を行い、検量線を作成した。この検量線に試料溶液についての HPLC の測定結果を当てはめることにより糖濃度を求めた。まず、標準溶液のピーク位置と試料溶液のピーク位置を比較することにより定性分析を行う。次に、試料溶液のピーク面積を事前に作成された検量線に当てはめる)。同様な操作を3種の糖についてそれぞれ行い、得られた各糖の濃度を合計し、ブルーベリー果実の糖濃度に換算する。Fig. 2.3 と Fig. 2.4 に、それぞれ試料溶液 (前処理済みのブルーベリー果実の糖抽出液) と標準溶液 (フルクトース) の HPLC のクロマトグラムの例を示す。

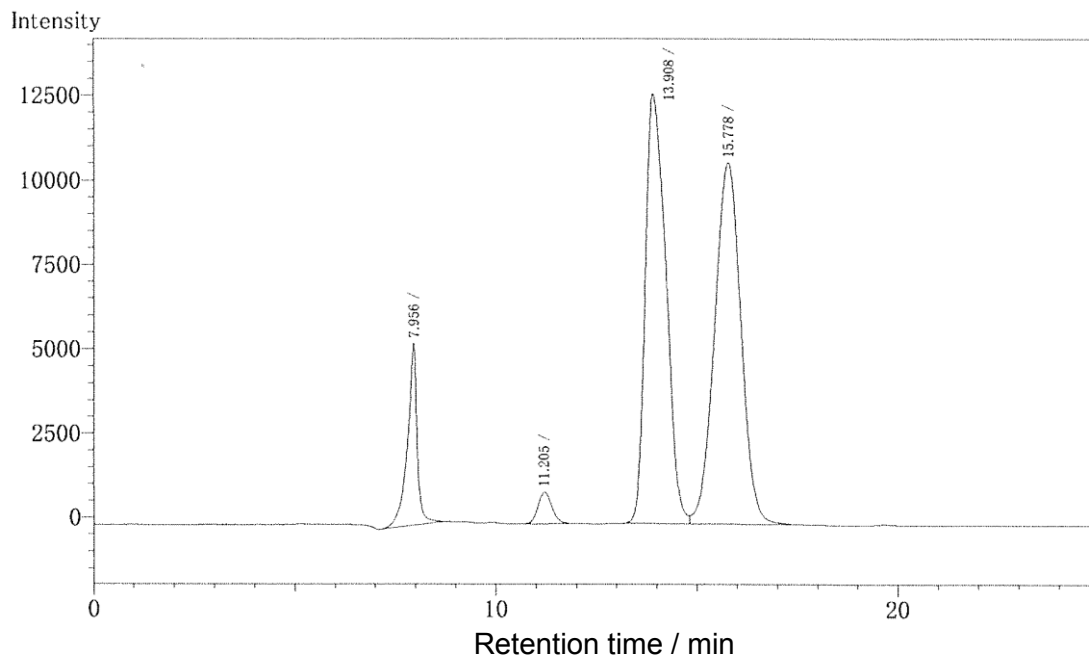


Fig. 2.3 An example of HPLC chromatogram of sugar of blueberry fruit

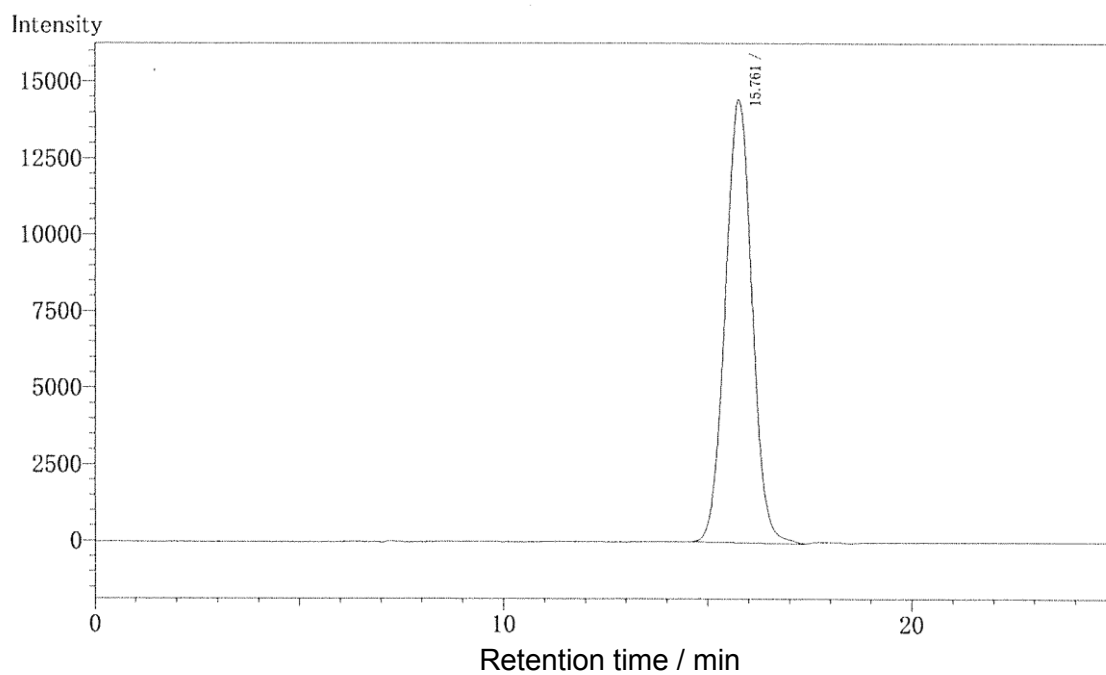


Fig. 2.4 HPLC chromatogram of standard (fructose)

(2) 有機酸濃度の HPLC 分析

- 溶離液：0.1%リン酸溶液（HPLC 用）
- 分離カラム：2本の直列接続の陽イオン交換カラム
- 検出器：紫外可視検出器（検出波長：210 nm）
- カラム室の温度：40°C
- 注入量：20 μ L

定量標準物質としては、キナ酸（Alfa Aesar, United Kingdom）、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の試薬特級（Wako Pure Chemicals, Japan）を用いた。糖分析と同様の方法で試料溶液の有機酸の濃度をそれぞれ求めて合計し、ブルーベリー果実の酸濃度に換算する。Fig. 2.5 と Fig. 2.6 に、それぞれ試料溶液（前処理済みのブルーベリー果実の有機酸抽出液）と標準溶液（クエン酸）の HPLC のクロマトグラムの例を示す。

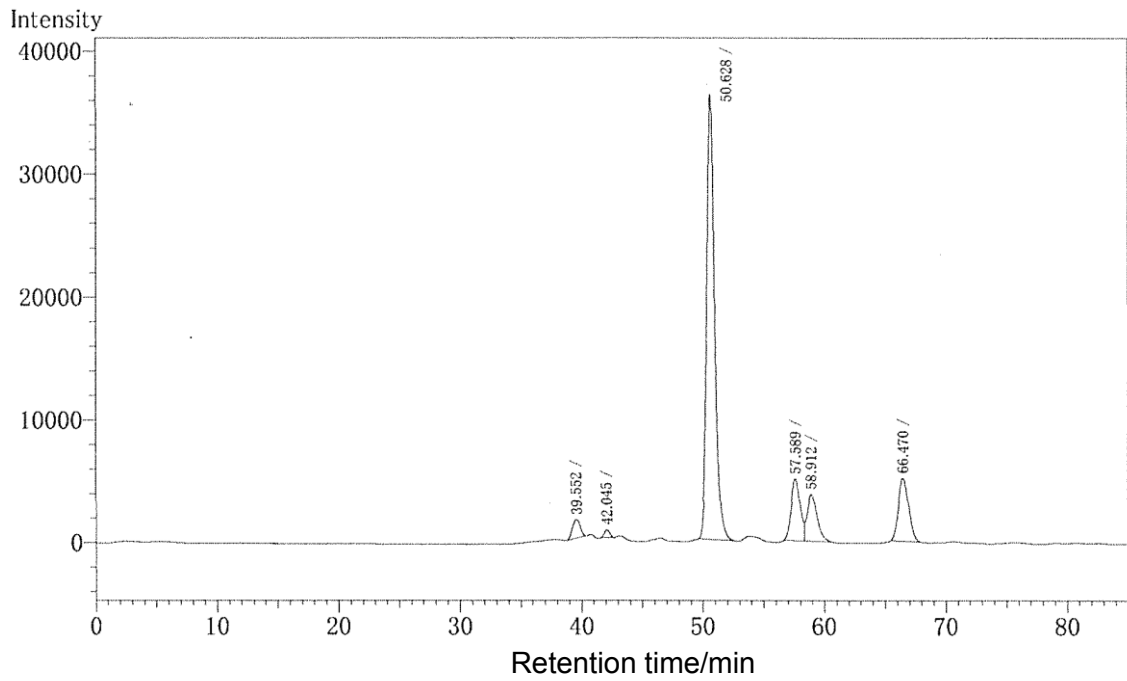


Fig. 2.5 An example of chromatogram of organic acid of blueberry fruit

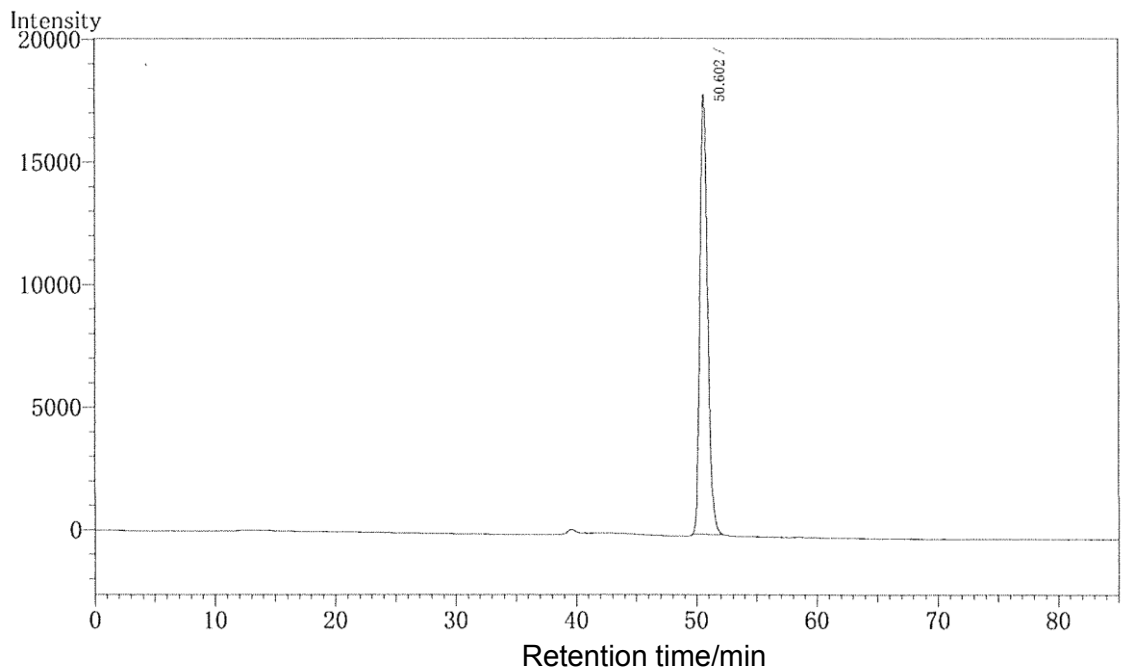


Fig. 2.6 HPLC chromatogram of standard (citric acid)

2.2.3-2 総アントシアニン量の HPLC 分析

アントシアニンは室温で不安定なので、ブルーベリー果実に含まれる総アントシアニン量を HPLC により定量分析する場合には、実験操作中のアントシアニンの分解や損失をできる限り抑えることが必要である。具体的な実験は、以下に述べる手順に従って行った。

- 1) 昇華現象を応用した真空凍結乾燥機 FRD-82M (Iwaki, Japan) により 12 時間真空乾燥した。
- 2) 乾燥した果実一つごとに対して、酸性有機溶媒 (アントシアニンが比較的安定に存在できる) の 2%トリフルオル酢酸のメタノール溶液を抽出液として (果実重量 g/抽出液体積 mL = 1/10)、4°Cの冷蔵庫中に 12 時間放置してアントシアニンを抽出した。
- 3) 抽出液を 2 mL のマイクロチップに入れて、低温超遠心分離機 CF15RXII (Hitachi Koki, Japan) を用いて遠心分離し、上澄み液を 0.45 μm のフィルター (Whatman, United Kingdom) を通した。

前処理を行った試料溶液について、アントシアニンの定量分析を HPLC 装置、Prominence UFLC (SHIMADZU, Japan) により行った

HPLC 分析の各条件は以下の通り。

- 溶離液 : A 溶離液は 0.1%トリフルオル酢酸の水溶液

B 溶離液は 0.5%トリフルオル酢酸のアセトニトリル溶液

糖や有機酸の HPLC 分析と異なり、2 種類の溶離液を用い、HPLC 測定の中で溶離液の組成を変えながら分析を進めるグラジエント法を用いた。

- 分離カラム : OP-DOS (逆相カラム)
- 検出器 : ダイオードアレイ (Photodiode Array: PDA) 紫外可視検出器 (アントシアニンの特徴吸収が現れる 520 nm を検出波長とした)
- カラム室の温度 : 40°C

➤ 注入量：10 μ L（オートサンプリングインジェクターにより注入）

➤ 洗浄液：超純水

ブルーベリーには Table 2.1 に示すように多数のアントシアニンが含まれている。糖と有機酸のようにあらゆる種類のアントシアニンに対してそれぞれの検量線を作成することは難しい。そこで本研究では、一般的に用いられている代表的な定量標準物質の Cyanidin-3-O-Glucoside Chloride（Fujicco All Rights Reserved, Japan）のみについて検量線を作成した。他種アントシアニンのモル吸光係数がこの標準物質と同じであるとみなし、検量線により個々のアントシアニン量を求めて、合計を総アントシアニン量とした。Fig. 2.7 と Fig. 2.8 に、それぞれ試料溶液（前処理済みのアントシアニン抽出液）と標準溶液（Cyanidin-3-O-Glucoside Chloride）の HPLC の測定結果（クロマトグラム）の例を示す。

Table 2.1 Anthocyanins analyzed by HPLC, listed in the order of retention time

Anthocyanin	Formula
Delphinidin-3-O-galactoside	$C_{21}H_{21}O_{12}$
Delphinidin-3-O-glucoside	$C_{21}H_{21}O_{12}$
Cyanidin-3-O-galactoside	$C_{21}H_{21}O_{11}$
Delphinidin-3-O-arabinoside	$C_{20}H_{19}O_{11}$
Cyanidin-3-O-glucoside	$C_{21}H_{21}O_{11}$
Petunidin-3-O-galactoside	$C_{22}H_{23}O_{12}$
Cyanidin-3-O-arabinoside	$C_{20}H_{19}O_{10}$
Petunidin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{23}O_{12}$
Peonidin-3-O-galactoside	$C_{22}H_{23}O_{11}$
Petunidin-3-O-arabinoside	$C_{21}H_{21}O_{11}$
Peonidin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{23}O_{11}$
Malvidin-3-O-galactoside	$C_{23}H_{25}O_{12}$
Malvidin-3-O-glucoside	$C_{23}H_{25}O_{12}$

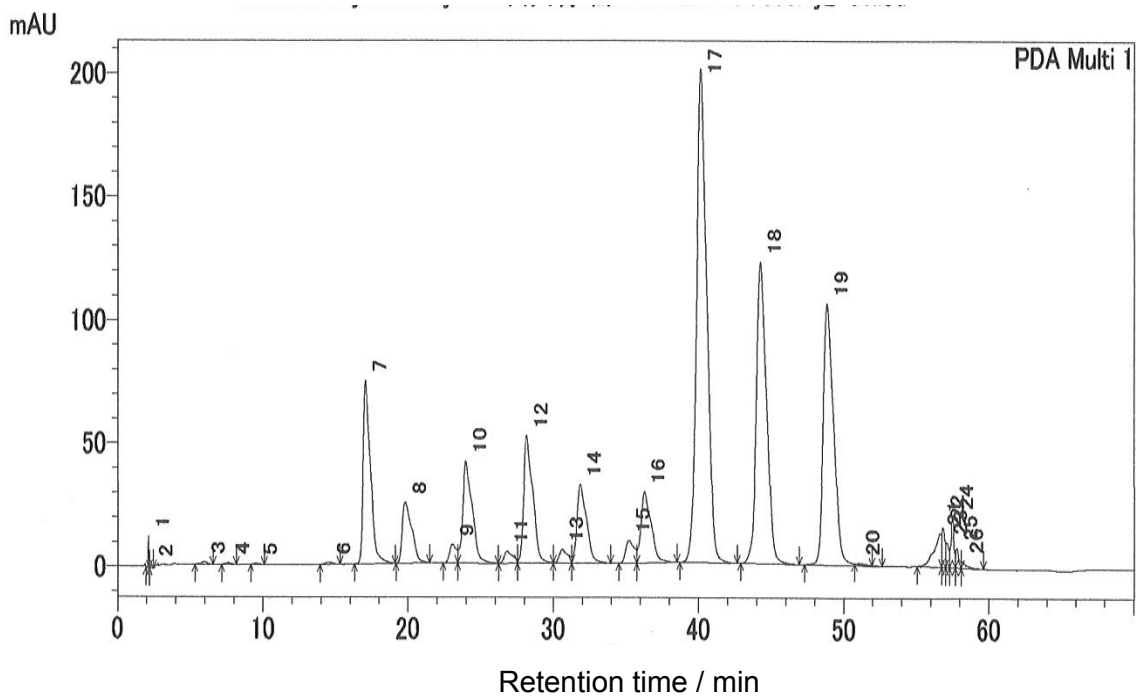


Fig. 2.7 An Example of HPLC chromatogram of anthocyanins of blueberry fruit

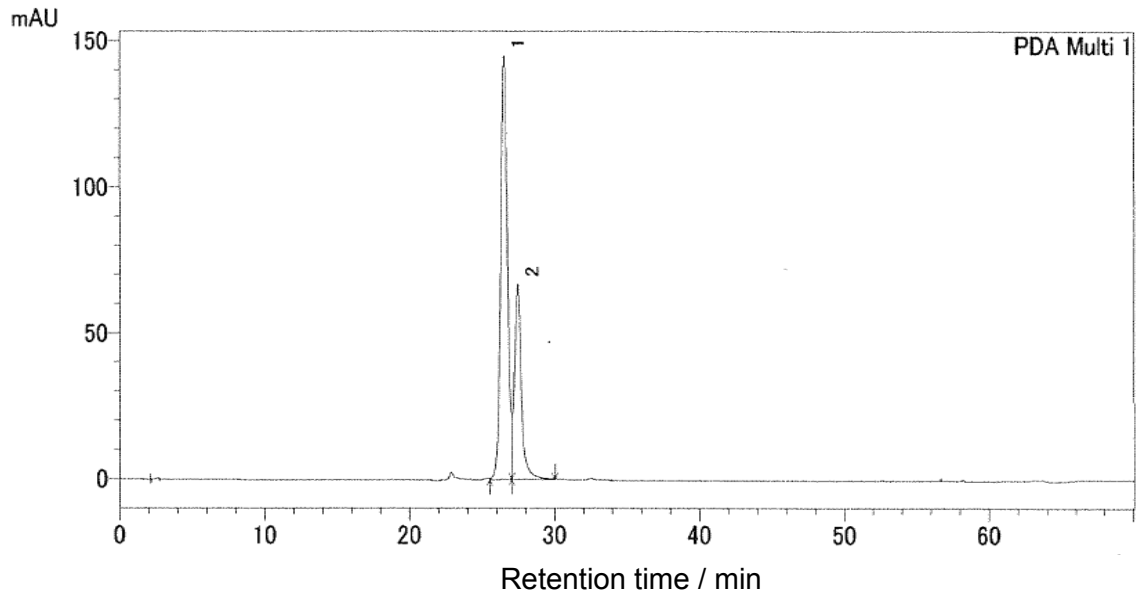


Fig. 2.8 HPLC chromatogram of standard (Cyanidin-3-O-Glucoside Chloride from Black Soybean)

2.3 定量モデルの作成と評価

ブルーベリー果実の成分の定量分析では、どの品種の果実に対しても予測精度のよい定量モデルを作成することが重要である。そこで本研究では、品種を区別することなく、複数品種のブルーベリー果実に適用可能な定量モデルを作成する方針を取った。ブルーベリー果実の外観パラメータである大きさ、重量、硬さなどは大きくばらつく。これらの外観パラメータが定量モデルの予測精度に与える影響をできるだけ小さくする為に、外観パラメータのばらつきが大きな果実を積極的に用意した。本研究で用いたブルーベリー果実の外観パラメータと糖、有機酸濃度及び総アントシアニン量の実測値（HPLC による測定値）とその数値統計を Table 2.2 と Table 2.3 にまとめた。

本研究では、代表的な潜在変数回帰法の一つである PLS1 回帰分析法^{3,4)}を用いて、近赤外スペクトルと化学分析法で得られた実測値の相関を最大になるように潜在変数を求めて、それに基づく回帰計算により定量モデルを作成した。PLS1 回帰分析法による定量モデルの作成で、潜在変数に対して重回帰計算を行っているので、どこまでの潜在変数を用いて重回帰すれば安定なかつ予測精度の高いモデルが得られるかを決めなければならない。重回帰に用いる潜在変数が少な過ぎると、定量モデルの作成に必要な測定試料の情報が漏れる場合がある。一方、重回帰に用いる潜在変数が多すぎるとノイズも定量モデルの作成に用いられて、予測精度が落ちることが考えられる。また、測定対象や定量目的成分が異なると、重回帰に用いる潜在変数の最適な数が変化する。したがって、適当な潜在変数の数（潜在因子数）を決める為に、標準予測誤差を指標として、潜在因子数を増やしながらそれぞれの潜在因子数に対応する標準予測誤差を求めて、標準予測誤差の値が最小になる或いはあまり変化しなくなる時点での潜在因子数を最適と決める。

安定な PLS モデルを作成する為に、測定スペクトル上に現れるブルーベリー

果実の大きさや表面状況などの差異に起因する定量モデル化に不要なスペクトル情報をできる限り取り除く必要がある。本研究では、測定スペクトルに対していくつかのスペクトル前処理法を実行した。スムージング (Savitzky-Golay: SG法)⁵⁾、一次あるいは二次微分 (SG法)⁵⁾、Multiplicative Scatter Correction (MSC)法⁶⁾、Standard Normal Variate (SNV)法⁶⁾、Min-Max Normalization (MMN)法、Constant Offset Elimination (COE)法を目的成分や測定法に合わせて、それぞれに実行した。また、より高い予測精度を持った定量モデルを作成する為に、Moving Window PLS法⁷⁾を用いて有効な波数域の選択を行った。

作成した定量モデルの予測精度を評価する指標として、 R^2 、 RPD と $RMSEP(RMSECV)$ を用いた⁸⁾。それぞれの求め方を Equation 2.1~2.4 に示す。

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y'_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_m)^2} \quad \text{Equation 2.1}$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y'_i - y_i)^2} \quad \text{Equation 2.2}$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y'_i - y_i)^2} \quad \text{Equation 2.3}$$

$$RPD = \frac{SD}{RMSEP \text{ or } RMSECV} \quad \text{Equation 2.4}$$

y_i は*i*番目の試料の測定値、 y'_i は*i*番目の試料の予測値、 y_m は測定値の平均値、 n は試料数、 SD は測定値の標準偏差である。

総アントシアニン量に対する定量モデルの作成と評価は、MPA型近赤外分光光度計に付属しているデータ解析ソフトウェアを用いて実行した。糖と有機酸の定量モデルの作成と評価は、Microsoft Excelに搭載しているVisual Basic for Applications (<http://www.microsoft.com/>)とFreemat 4.0 (<http://freemat.sourceforge.net/>)を用いて実行した。また、定量モデルの作成に伴うスペクトル前処理や波長選択も上述のソフトウェアを用いて実行した。

Table 2.2 Results of analysis of the sugar content and organic acid content of 30 blueberry fruits by HPLC, together with their weight and diameter.

Sample number:30	Weight (g)	Diameter based on height ^{*a} (mm)	Diameter based of width ^{*b} (mm)	Total sugars (wt%)	Total organic acids (wt%)
Min. value	1.0	10.0	12.7	2.9	0.6
Max. value	2.6	14.4	17.2	10.2	2.3
Mean value	1.6	12.1	14.5	6.2	1.3
SD	0.4	1.1	1.2	1.9	0.5

^aHeight measured in the calyx direction.

^bWidth measured in the direction orthogonal to calyx.

Table 2.3 Results of analysis of the anthocyanin content of 70 blueberry fruits by HPLC, together with their weight and diameter.

Sample number:70	Weight (g)	Diameter baser on height ^{*a} (mm)	Diameter based of width ^{*b} (mm)	Total anthocyanins (mg/100g)
Min. value	0.9	10.0	11.7	37
Max. value	2.2	15.0	15.9	299
Mean value	1.3	12.0	13.5	159
SD	0.3	1.2	1.0	71

^aHeight measured in the calyx direction.

^bWidth measured in the direction orthogonal to calyx.

2.4 結果と考察

2.4.1 ブルーベリー果実の近赤外スペクトルの特徴

Fig. 2.9(a,b) に、拡散反射法と透過法により測定されたブルーベリー果実の近赤外スペクトルを示す(糖と有機酸の分析に用いた 30 粒ブルーベリー果実のスペクトルを用いて作成した)。拡散反射法で測定される近赤外スペクトルでは、顕著な吸収ピークとして、 5200 cm^{-1} 付近の O-H 伸縮振動と変角振動の結合音吸収⁹⁾に由来するピーク、 7050 cm^{-1} と 8500 cm^{-1} 付近の O-H 伸縮振動の第 1 倍音¹⁰⁾や C-H 伸縮振動の第 2 倍音^{11,12)}吸収に由来するピーク、 10500 cm^{-1} あたりの O-H 伸縮振動の第 2 倍音吸収¹²⁾に由来するようなピークが見られる。その中で吸光強度が比較的強い 5200 cm^{-1} と 7050 cm^{-1} 付近は果実に含まれる水分(含水量が高い)に由来すると考えられる¹⁰⁾。一方、透過法による測定では低波数側の分光情報を得ることができない。スペクトル上に現れる主な吸収ピークは 8500 cm^{-1} と 10500 cm^{-1} 付近の C-H 伸縮振動の第 2 倍音^{11,12)}と O-H 伸縮振動の第 2 倍音¹²⁾に由来するピークである。

近赤外分光法で測定されるブルーベリー果実のスペクトルはなだらかで、吸収ピークの半値幅が広い。これは、多くのピークが重なって現れているためである。そのために、スペクトルから目的成分に帰属するピークを見つけ出して、そのピークの吸光度と目的成分濃度を用いて単回帰により検量線を作成するという定量分析法はほとんど不可能である。そこで、統計的な手法であるケモメトリクス法により多変量解析を用いて定量分析を行うのが一般的である。

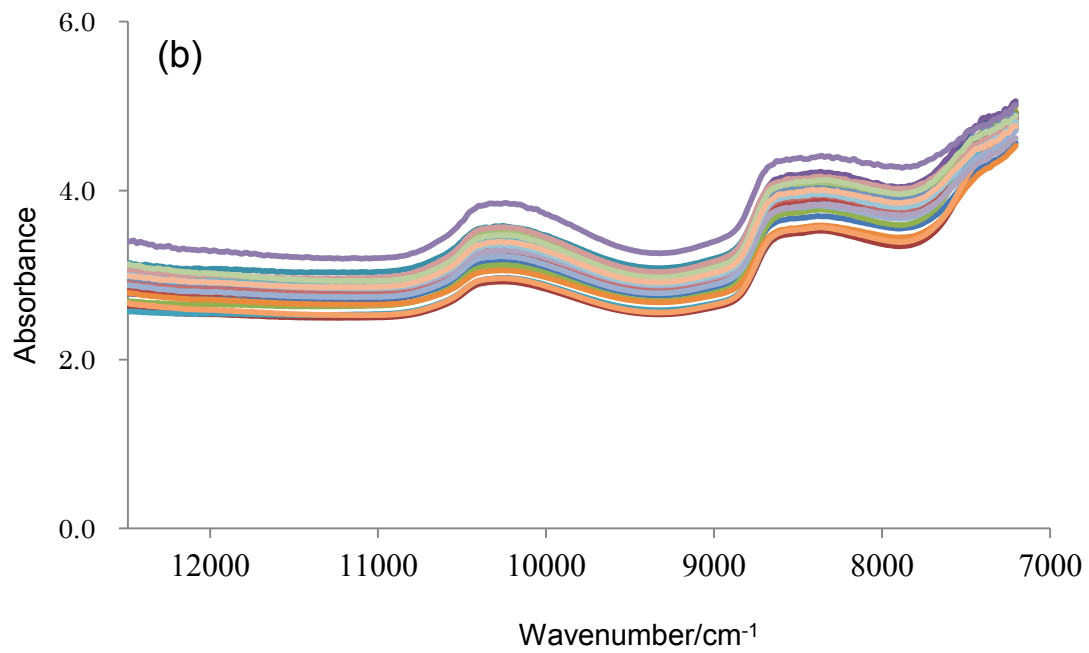
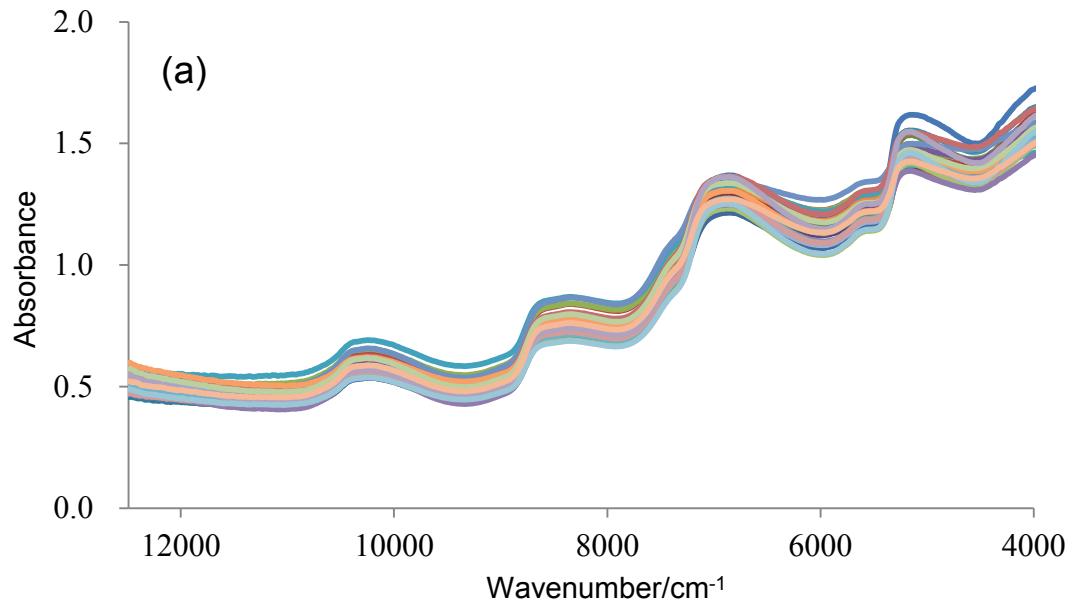


Fig. 2.9 Near-infrared absorption spectra of blueberry fruits measured in (a) diffuse reflectance mode and (b) transmission mode.

2.4.2 糖濃度の予測結果

糖と有機酸を HPLC 分析するときの前処理は共通なので、この両成分の測定は同一の試料セットを測定対象とした。

HPLC 分析の結果、ブルーベリー果実に含まれる糖成分の 90%以上がフルクトースとグルコース (1:1) であり、それ以外に少量のスクロースも含まれることがわかった。この結果は、過去の研究で報告されている実験データとほぼ一致している¹³⁾。HPLC 分析の結果と拡散反射法あるいは透過法により測定された近赤外スペクトルから作成した定量モデルの検証結果を Table 2.4 に示す。本実験に用いたブルーベリー果実の数が 30 粒と比較的少なかったため、クロスバリデーション (Leave-One-Out Cross-Validation: LOOCV) によりモデルの評価を行った。

Table 2.4 には、クロスバリデーションにより定量モデルの予測精度を評価した結果を示した。予測精度が最良の結果のみ示したので、測定法や測定部位によりスペクトル前処理法や解析に用いた波長域が異なる。Table 2.4 に示した結果から、定量モデルの予測精度が測定法や測定部位に依存することがわかる。これは、測定法が異なると試料の表面状況や成分の濃度分布などの違いによって近赤外スペクトルに現れる試料の化学成分に関する情報やノイズの特徴が変化することに起因すると考えられる。

近赤外分光法によりブルーベリー果実に含まれる糖濃度を予測する場合には、拡散反射法と透過法のいずれを用いても実用精度以上の精度で予測が可能であることがわかる。測定部位を特定して、萼あ部位と萼あ以外の部位に対してそれぞれ作成した定量モデルでも、測定部位を特定せず異なる測定部位について測定されたスペクトルに対して作成した定量モデルでも、実用精度以上の精度で予測できることがわかった。

透過法で測定したスペクトルに基づく定量モデルの濃度予測に用いる波数域は O-H 伸縮振動の第 2 倍音吸収¹²⁾に由来する 10500 cm^{-1} 付近、拡散反射法で測定したスペクトルに基づく定量モデルの濃度予測に用いる波数域は C-H 伸縮振動の第 2 倍音吸収^{11,12)}に由来する 8000 cm^{-1} 付近となった。Fig. 2.10 に示した糖（粉末状の試薬について、拡散反射法により測定）の近赤外スペクトルでも、これらの波数に吸収ピークが現れている。したがって、近赤外分光法によるブルーベリー果実の糖成分の濃度予測には O-H や C-H の伸縮振動の第 2 倍音による吸収が寄与していると考えられる。

萼あ部位での測定に対して作成した定量モデルの予測精度が他の部位での測定に対して作成した定量モデルよりも精度がよい。萼あ部位を透過法で測定した場合、測定する光が通る距離（光路長）が短いので（Table 2.2）、検出器に到達する光の強度が大きくなり、定量モデルの精度が向上したと考えられる。萼あ部位を拡散反射法で測定した場合、萼あ部位はブルーベリー果実の他の部位と比べて色や粗さなど明らかに異なる。測定される近赤外スペクトルのベースラインが低くなる。低いベースラインの為、ノイズも低くて、データのダイナミックスレンジも大きくなるので定量モデルの予測精度を向上させたと考える。

以上の内容をまとめると、拡散反射法と透過法のいずれを用いても、果実上のどの部位で測定を行っても、ブルーベリーに含まれる糖を実用化精度以上の精度で予測できることがわかった。ブルーベリー果実の場合、糖の含有量が比較的高い（数パーセント）ので、近赤外スペクトル測定中の外部要因の影響を受けにくいと考える。Fig. 2.11 に近赤外分光法による糖の予測値と HPLC による糖の測定値の相関を示す。よい相関が得られていることがわかる。

Table 2.4 Results of cross validation of models predicting sugar content of blueberry fruits constructed by PLSR.

Mode of measurement	Measurement position	Preprocessing	Wavenumber region used for analysis (cm ⁻¹)	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (g/100 g)	<i>R</i> ²
Diffuse reflectance	Calyx	2 nd D + MSC	8925-7390	3.4	0.5	0.91
	Other	MSC + 2 nd D	8539-7775	2.6	0.7	0.85
	Mix	MSC + 1 st D	8315-7706	3.1	0.6	0.89
Transmission	Calyx	MSC	10738-10128	3.3	0.5	0.91
	Other	None	12500-7000	3.1	0.5	0.89
	Mix	MSC + 2 nd D	12500-7000	2.5	0.7	0.83

Other: Position not at calyx

Mix: All measurements without distinguishing measurement position

MSC: Multiplicative scatter correction

1stD: First derivative

2ndD: Second derivative

Derivatives were calculated by SG method. A cubic function fitted for 51 points (for diffuse reflectance mode) or 71 points (for transmission mode) was used for the calculation of each data point.

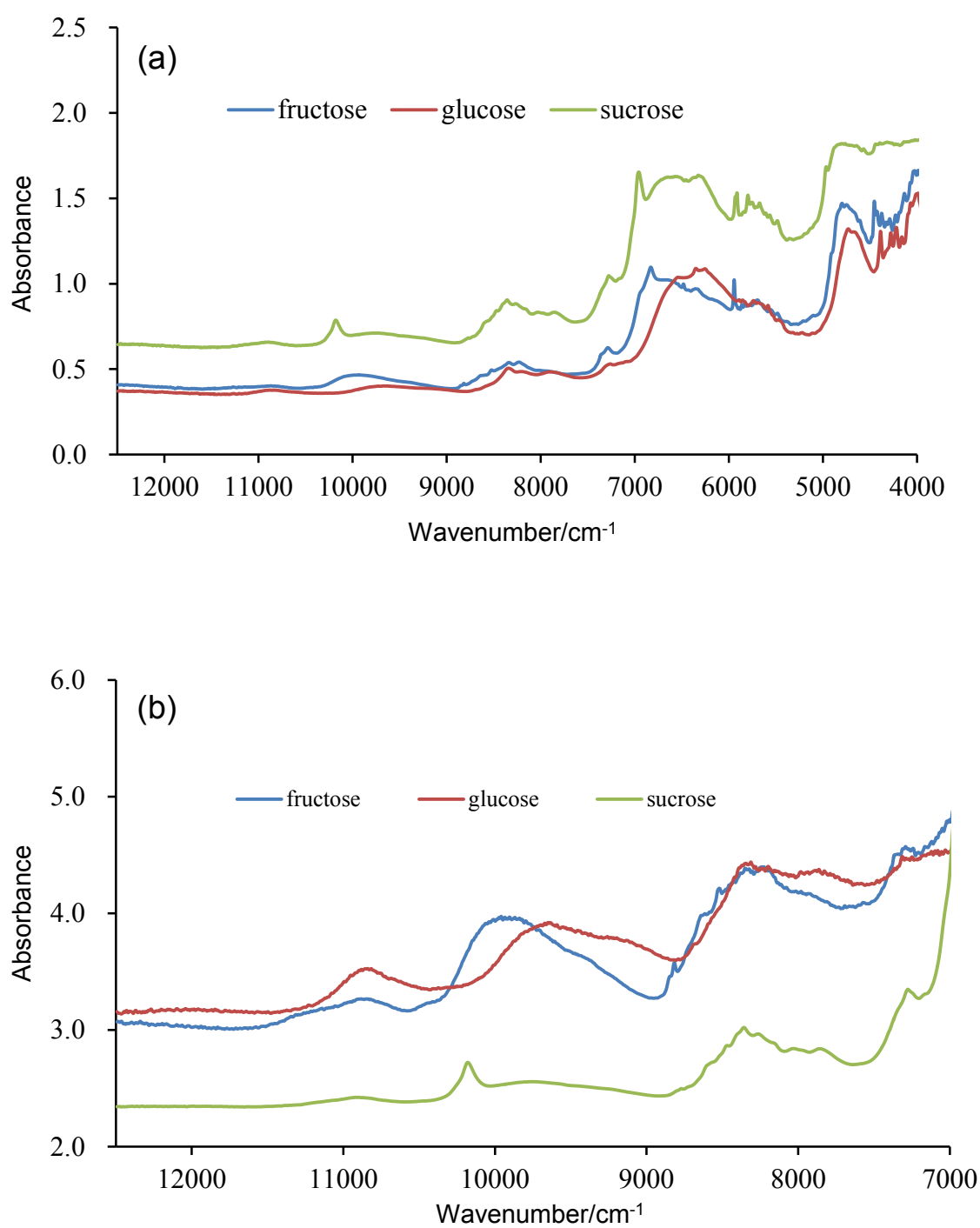


Fig. 2.10 Near-infrared absorption spectra of three sugars measured in diffuse reflectance mode (a) and transmission mode (b).

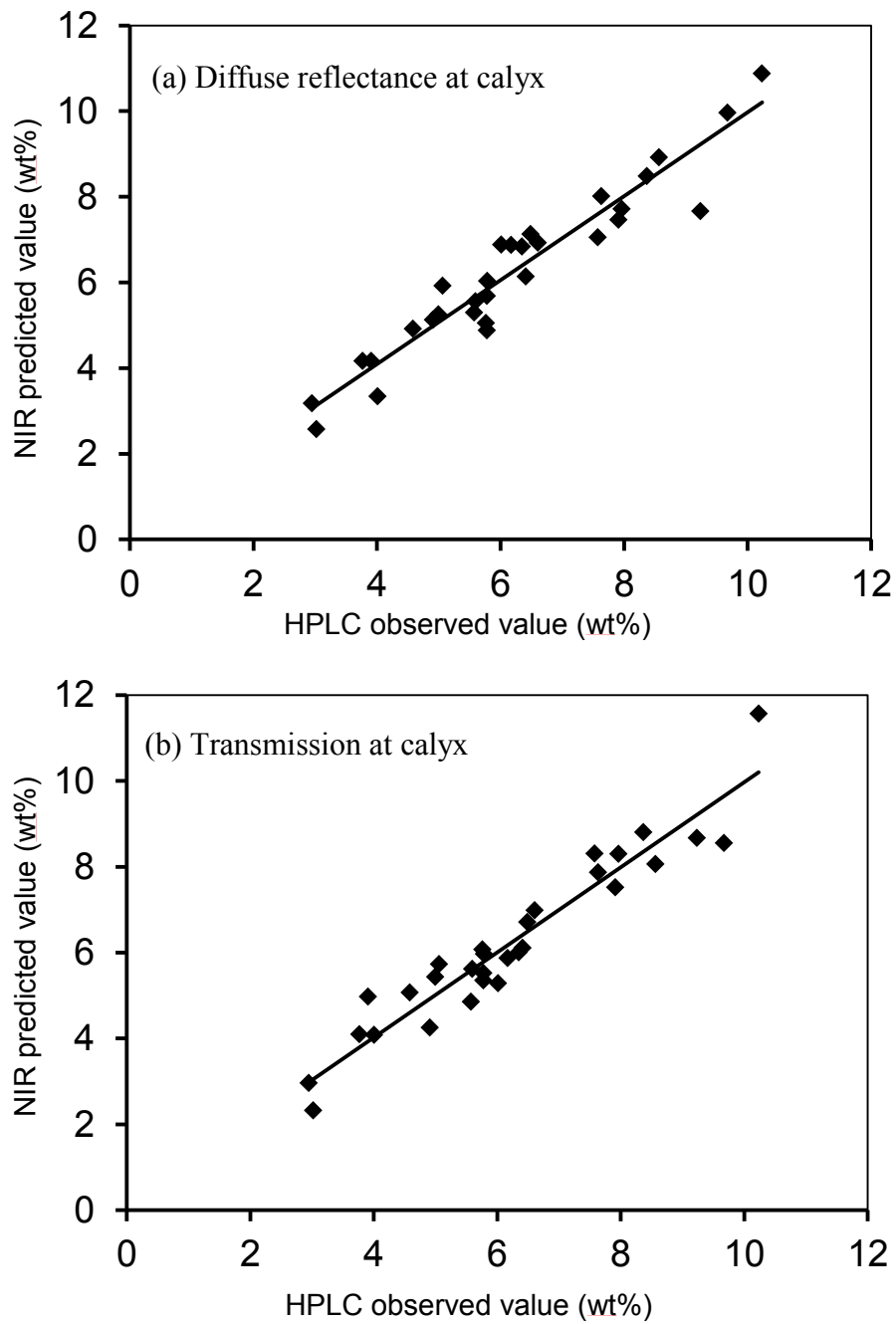


Fig. 2.11 Correlation between values predicted by near-infrared spectroscopy and sugar contents determined by HPLC.

2.4.3 有機酸濃度の予測結果

HPLC 分析により、ブルーベリー果実に含まれる有機酸の約半分がクエン酸であり、それ以外にリンゴ酸、コハク酸、キナ酸が含有されていることがわかった。この結果は、過去の研究で報告されているデータとほぼ一致している³⁾。これらの HPLC 分析の結果と拡散反射法あるいは透過法で測定された近赤外スペクトルを用いて作成した定量モデルの検証結果を Table 2.5 に示す。測定試料の数が少なかったため、糖の場合と同様にクロスバリデーションにより定量モデルの予測精度を評価した。

その結果、拡散反射法で測定した近赤外スペクトルに対して作成した定量モデルの予測精度が実用精度以上であることがわかった。糖の定量モデルと同じように有機酸の定量モデルの予測精度も測定部位に依存する。萼あ以外の部位に対して作成された定量モデルの予測精度が萼あ部位に対して作成された定量モデルの予測精度よりも若干高い。しかし、異なる測定部位に対して作成された定量モデルの予測精度を単純に比較して良いのかどうかは明らかではないので、どちらの測定部位が定量に有利なのかについては結論を出しにくい。測定部位を特定せずに作成された定量モデルの予測精度は、測定部位を萼あ部位あるいは萼あ以外の部位に特定した定量モデルに比べて明らかに悪いことがわかった。

Fig. 2.12a に示したように、拡散反射法で測定したスペクトルを用いた有機酸濃度の予測値と HPLC による実測値の間により相関が見られる。一方、Fig. 2.12b に示したように、透過法で測定したスペクトルを用いた場合は、有機酸濃度の予測値と HPLC の実測値との相関が低くなり、実用精度で有機酸濃度を予測することが難しいことがわかった。

透過法と拡散反射法を用いて測定したブルーベリー果実に含まれる主要な有機酸（純物質）の近赤外スペクトルを Fig. 2.13(a,b) に示す。ブルーベリー果実

に含まれる主要な有機酸成分は 7000 cm^{-1} よりも低波数の領域で吸収強度が強く、特徴吸収バンドを示している。しかし透過法をブルーベリー果実のスペクトル測定に用いた場合、 7000 cm^{-1} よりも低波数の領域のスペクトルを得ることができない。 10000 cm^{-1} 付近に吸収ピークが見られるが、ブルーベリー果実に含まれる水分由来の O-H 伸縮振動の第 2 倍音吸収帯と重なるため、この吸収を用いて有機酸濃度を予測することは困難である。ブルーベリー果実に含まれる有機酸の濃度は糖の濃度と比べてはるかに低い (Table 2.2) ので、この領域の有機酸による弱い吸収ピークは水の強い吸収ピークに隠されてしまうとも考えられる。したがって、有機酸成分が強い吸収を持つ波数域を定量モデルに用いないと実用精度以上の精度で濃度を予測することが難しい。拡散反射法によれば、 7000 cm^{-1} よりも低波数の領域のスペクトルを得ることができるので (Fig. 2.13a)、有機酸の定量分析に有利だと考えられる。また、ブルーベリー果実中の有機酸が主に果皮から近いところに分布していることも拡散反射法で精度良く濃度予測ができる理由であると考えられる。

糖濃度の測定とは異なり、萼あ部位を測定したスペクトルに対して作成した定量モデルのほうが予測精度が良いということはなかった。その原因として、ブルーベリー果実中の有機酸成分の不均一分布が考えられる。濃度の不均一分布は、測定部位を区別せずに作成した定量モデルの予測精度を低下させる。しかし、測定部位を特定して作成した定量モデルの予測精度に影響を与えない。したがって、有機酸濃度を予測する場合には、拡散反射法によりスペクトルを測定し、実際の測定部位と対応する定量モデルを用いる必要がある。しかし、ブルーベリー果実の部位を特定したスペクトル測定は、生産現場では困難である。そこで、スペクトルの解析手法である主成分分析¹⁴⁾を用いてスペクトルから測定部位を判別する方法を考案した。詳細は、2.4.5 節にて説明する。

Table 2.5 Results of cross validation of models predicting organic acid content of blueberry fruits constructed by PLSR.

Mode of measurement	Measurement position	Preprocessing	Wavenumber region used for analysis (cm ⁻¹)	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (g/100 g)	<i>R</i> ²
Diffuse reflectance	Calyx	2 nd D+MSC	7235-6857, 5970-5345	3.3	0.1	0.91
	Other	1 st D +MSC	7505-5446, 4605-4242	3.6	0.1	0.92
	Mix	1 st D	8369-7606, 6935-6171	2.6	0.2	0.86
Transmission	Calyx	MSC+2 nd D	11039-10545, 8678-8045	1.9	0.2	0.62
	Other	2 nd D	12500-7000	1.7	0.3	0.41
	Mix	2 nd D +MSC	12500-7000	1.7	0.3	0.41

Other: Position not at calyx

Mix: All measurements without distinguishing measurement position

MSC: Multiplicative scatter correction

1stD: First derivative

2ndD: Second derivative

Derivatives were calculated by SG method. A cubic function fitted for 31 points (for diffuse reflectance mode) or 101 points (for transmission mode) was used for the calculation of each data point.

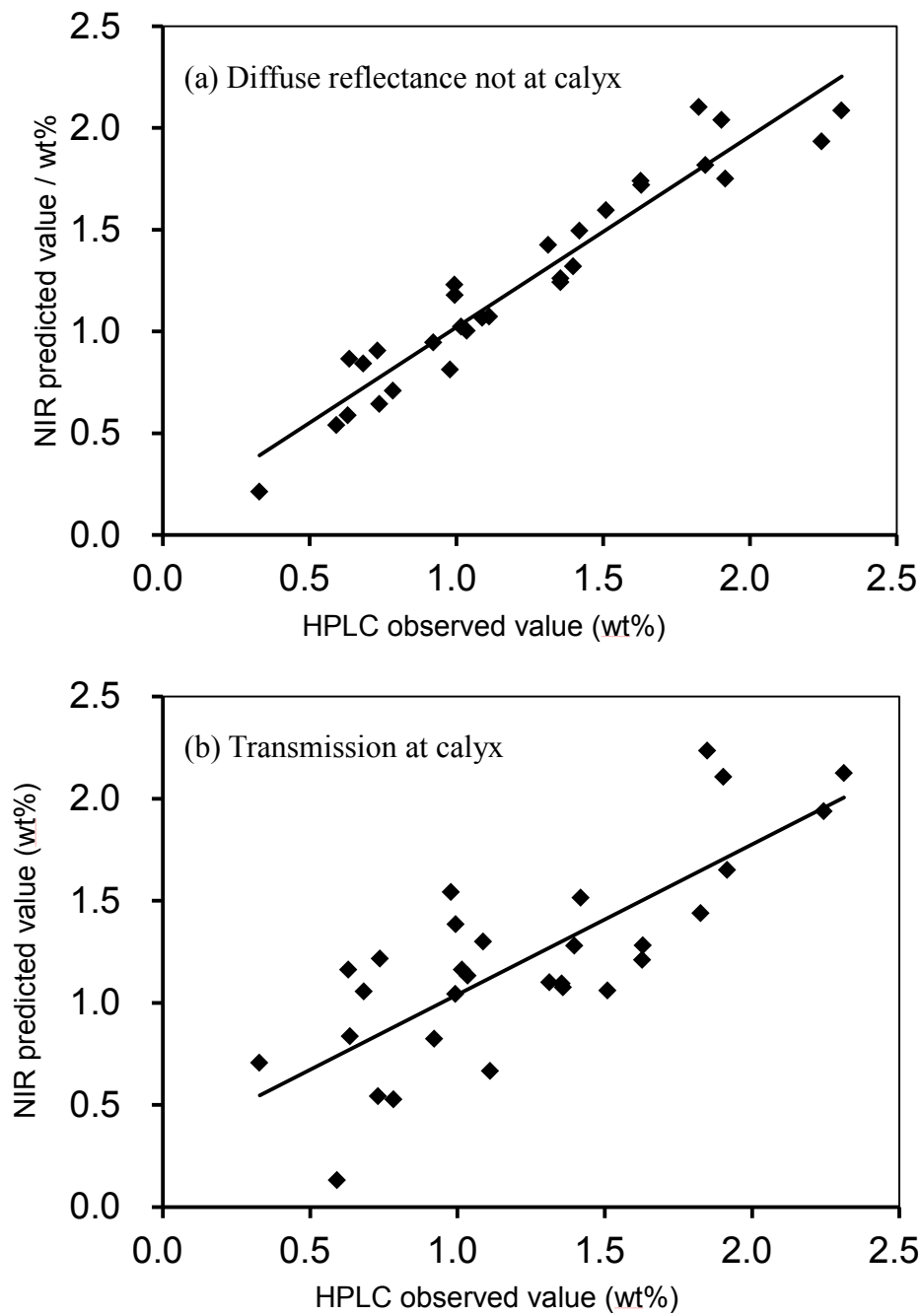


Fig. 2.12 Correlation between values predicted by near-infrared spectroscopy and organic acid contents determined by HPLC.

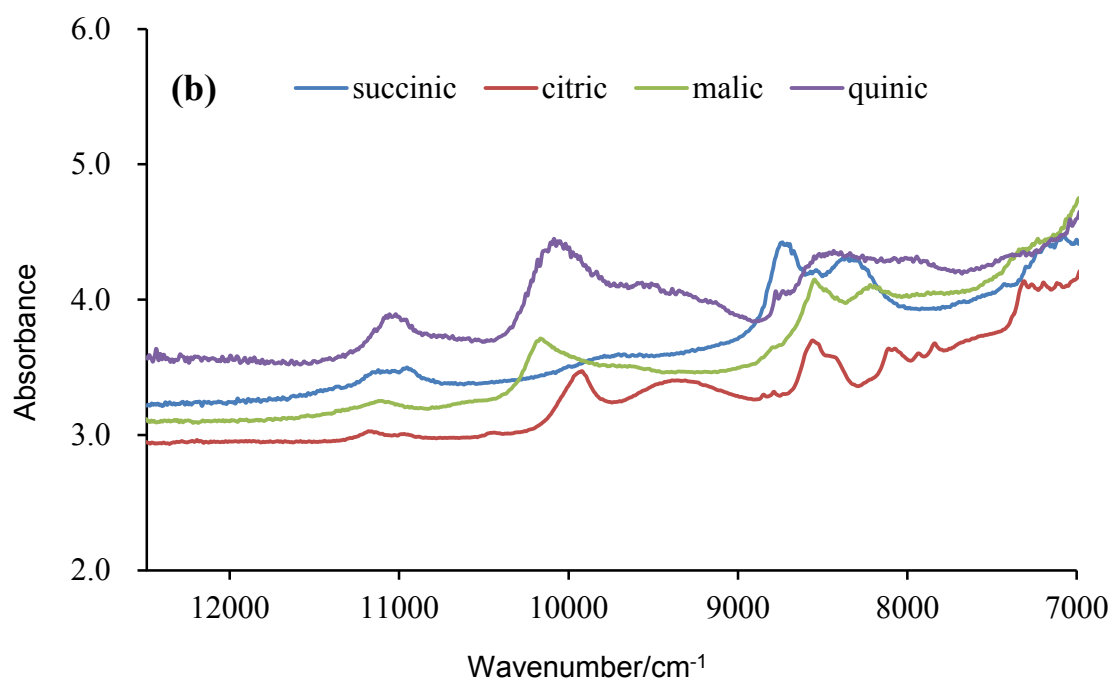
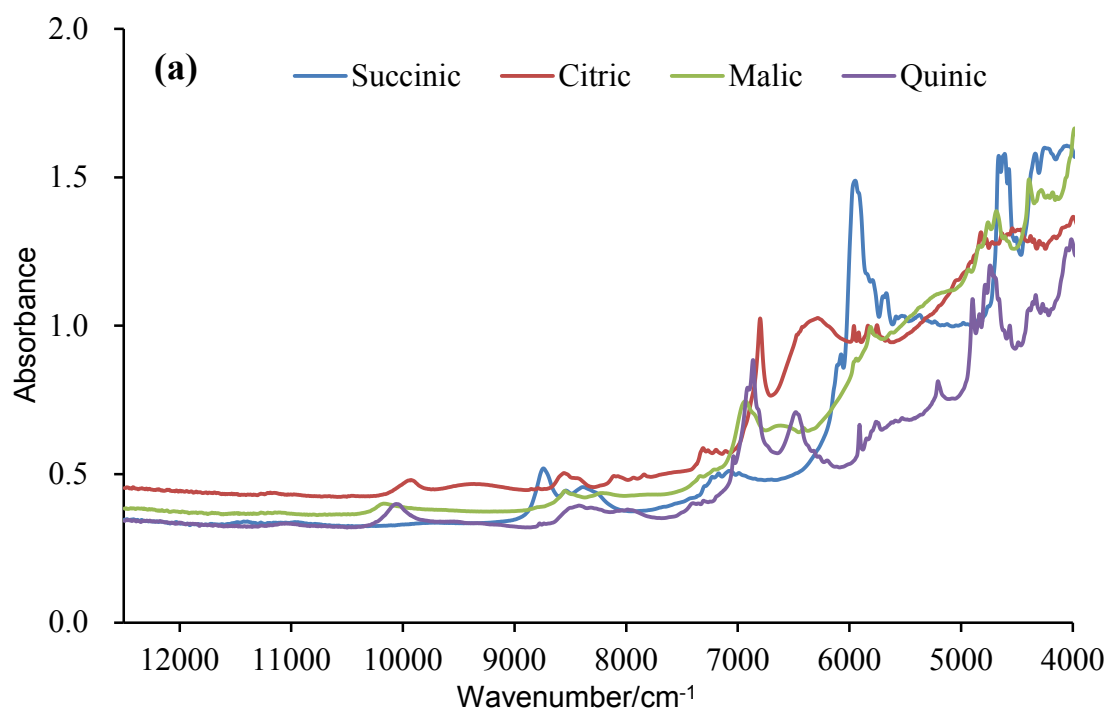


Fig. 2.13 Near-infrared absorption spectra of four organic acids measured in diffuse reflectance mode (a) and transmission mode (b).

2.4.4 総アントシアニン量の予測結果

本研究に用いたブルーベリー果実の HPLC 分析の結果をまとめた Table 2.3 から、総アントシアニン量が果実により幅広く変動することがわかる。HPLC 分析の結果と近赤外スペクトルを用いて、総アントシアニン量に対する定量モデルを作成した。糖と有機酸の分析に比べて試料の数が多かったため、予測精度の評価は外部バリデーションにより行った。外部バリデーションでは、試料をキャリブレーション（校正）セットとバリデーション（検証）セットに分ける。その為に、合計 70 粒のブルーベリー果実を総アントシアニン量の昇順に従って並べ、一つおきの試料で校正セット（35 個）と検証セット（35 個）に分けた。この分け方により、校正セットの濃度範囲が検証セットの濃度範囲をカバーするように調整することができる。Table 2.6 に、外部バリデーションによる定量モデルの予測精度の検証結果を示した。総アントシアニン量の定量分析では、測定法や測定部位によって予測精度は変化するが、いずれの場合も実用化精度以上の精度で定量分析が可能であることがわかった。近赤外分光による総アントシアニン量の予測値と HPLC による総アントシアニン量の実測値の相関を Fig. 2.14(a,b) に示した。

拡散反射法と透過法のいずれの場合でも、萼あ部位に対する定量モデルに比べて、萼あ以外の部位に対する定量モデルのほうがより良い予測精度を与える。総アントシアニン量の予測に用いられる高波数域の 12000 cm^{-1} 付近には色素であるアントシアニンの電子吸収があつて、濃度の予測に寄与していると考えられる。前述のようにブルーベリー果実の萼あ部位と萼あ以外の部位の表面状況が異なり、色合いも常に異なる。このような色合いの差異は、色素となるアントシアニンの濃度分布を表していると考えられる。濃度分布は定量モデルの予測精度を低下させる原因となるが、アントシアニン濃度の予測に関しては、測定部位を特定しないで作成した定量モデルの予測精度も実用精度以上となった。

ブルーベリー果実に含まれる総アントシアニン量は糖や有機酸の濃度と比べて極めて少ないので、近赤外分光法による予測精度が低くなることが予想された。しかし実際には、総アントシアニン量が本研究で測定した3成分の中で最良の予測精度を与えた。その原因としては、定量モデルの作成に用いた試料数が多いこととブルーベリー果実に含まれるアントシアニンの大部分が果皮近傍に集中していることが考えられる。また、アントシアニン分子の電子遷移に起因する強い吸収が近赤外領域の高波数側にあつて、定量モデルの予測精度に寄与していることも考えられる。

Table 2.6 Results of external validation of models predicting anthocyanin content of blueberry fruits constructed by PLSR.

Mode of measurement	Measurement position	Pre-processing	Wavenumber region used for analysis (cm ⁻¹)	<i>RPD</i>	<i>RMSEP</i> (mg/100 g)	<i>R</i> ²
Diffuse reflectance	Calyx	MSC	12489-7498, 5454-4598	2.8	25	0.87
	Other	COE	12489-9997, 8296-8270, 7984-7915, 6449-5863	3.3	21	0.91
	Mix	None	12489-7498, 6102-4597	3.1	21	0.90
Transmission	Calyx	1 st D	12489-11440, 11216-10853, 10537-9935, 9141-8439	2.9	24	0.88
	Other	MMN	11672-10846, 9172-9087, 8963-8917	3.6	20	0.92
	Mix	SNV	12289-11448, 10653-10592, 9157-9071, 8802-8640	3.1	22	0.89

Other: Position not at calyx

Mix: All measurements without distinguishing measurement positions

MSC: Multiplicative scatter correction

1stD: First derivative

SNV: Standard normal variate

MMN: Min.-max. normalization

COE: Constant offset elimination

Derivatives were calculated by SG method. A cubic function fitted for 17 points was used for the calculation of each data point.

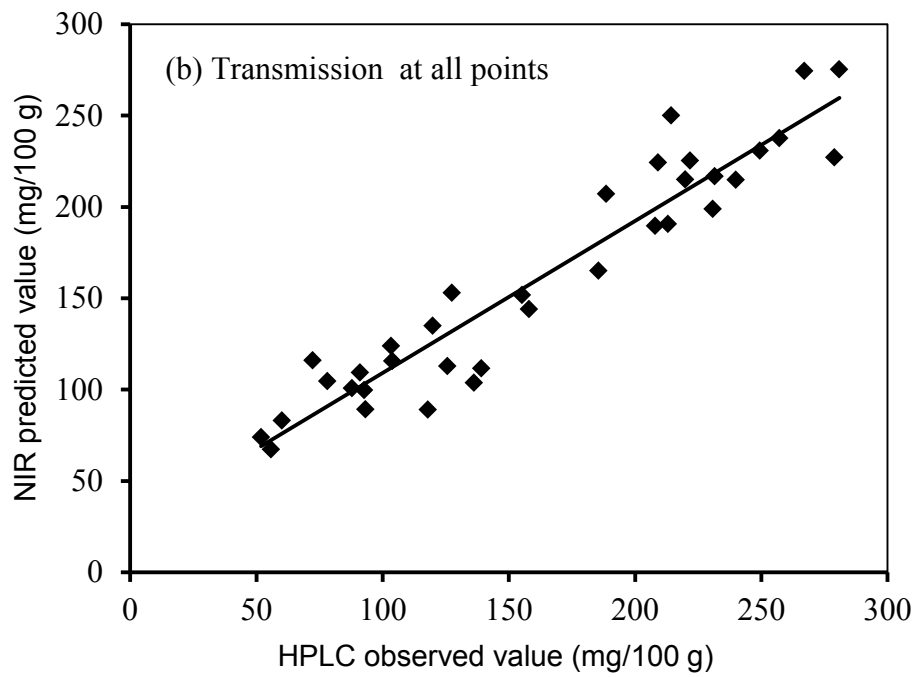
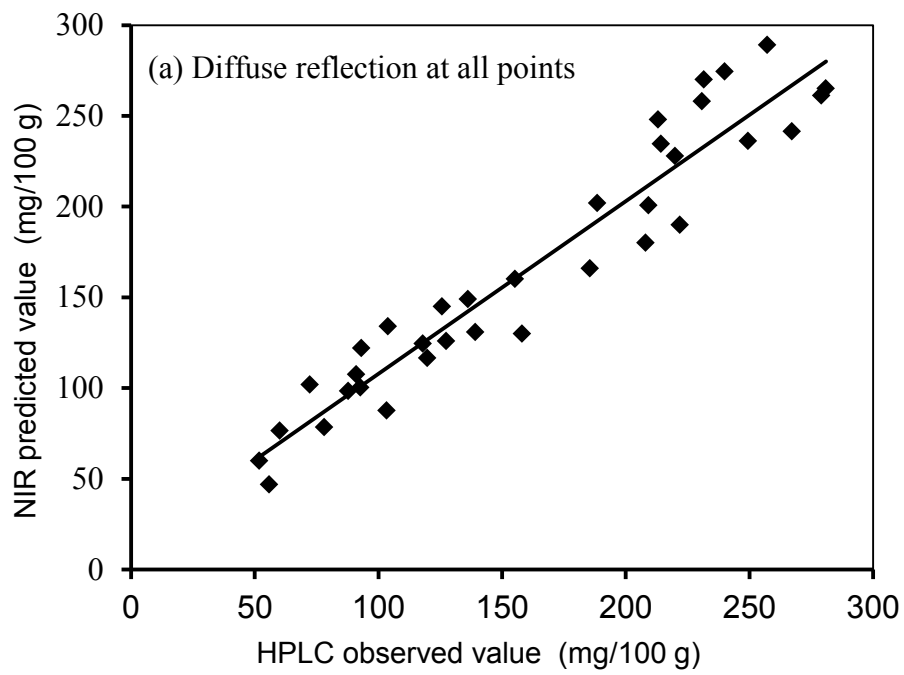


Fig. 2.14 Correlation between values predicted by near-infrared spectroscopy and anthocyanin contents determined by HPLC.

2.4.5 定量モデルの測定部位依存性

適当な測定法を選べば、ブルーベリー果実に含まれる糖と有機酸濃度及び総アントシアニン量を近赤外分光法により実用精度以上の精度で定量分析できることがわかった。その中で、有機酸に対する定量モデルの予測精度が測定部位に依存し、測定部位別に作成した定量モデルの予測精度が実用精度を上回ることがわかった。一方、測定部位を特定しないで作成した定量モデルの予測精度は明らかに低い。

スペクトルから測定部位を特定できれば、対応する部位別の定量モデルを用いてスペクトルから有機酸濃度を予測することができるので、精度を向上させることが可能である。そこで、スペクトルから測定部位を判別できないかについての検討を行った。

本研究では、測定部位を特定する為に、異なる部位で測定したスペクトルに対して主成分分析を行った。主成分分析は、近赤外スペクトルに含まれる情報を最大限に表すように順次に主成分を抽出しているため、低次元グラフに主成分スコアをプロットすることにより、スペクトルの特徴を捉えることが可能である。Fig. 2.14(a,b) では、ブルーベリー果実の萼あ部位と萼あ以外の部位で測定した近赤外スペクトルに主成分分析¹⁴⁾を行った結果を表す（主成分スコアプロット）。拡散反射法により測定されたスペクトルの主成分スコアプロット (Fig. 2.15a) では、萼あ部位での測定結果と萼あ以外の部位での測定結果が線形判別ラインにより完全に分けられているので、スペクトルから測定部位を判別できることがわかる。一方、透過法により測定されるスペクトルの主成分スコアプロット (Fig. 2.15b) では、萼あ部位と萼あ以外の部位での測定結果は線形判別ラインによりおおよそ分けられているが、一部が重なり合っている。したがって、スペクトルから測定部位を完全には判別できないことがわかる。

結果として、拡散反射法を用いた場合には、得られた近赤外スペクトルに主

成分分析を行うことで測定部位を特定できることがわかった。測定部位が特定された近赤外スペクトルにその部位に対応する定量モデルを適用することで、実用精度を上回る予測結果を得ることができる。

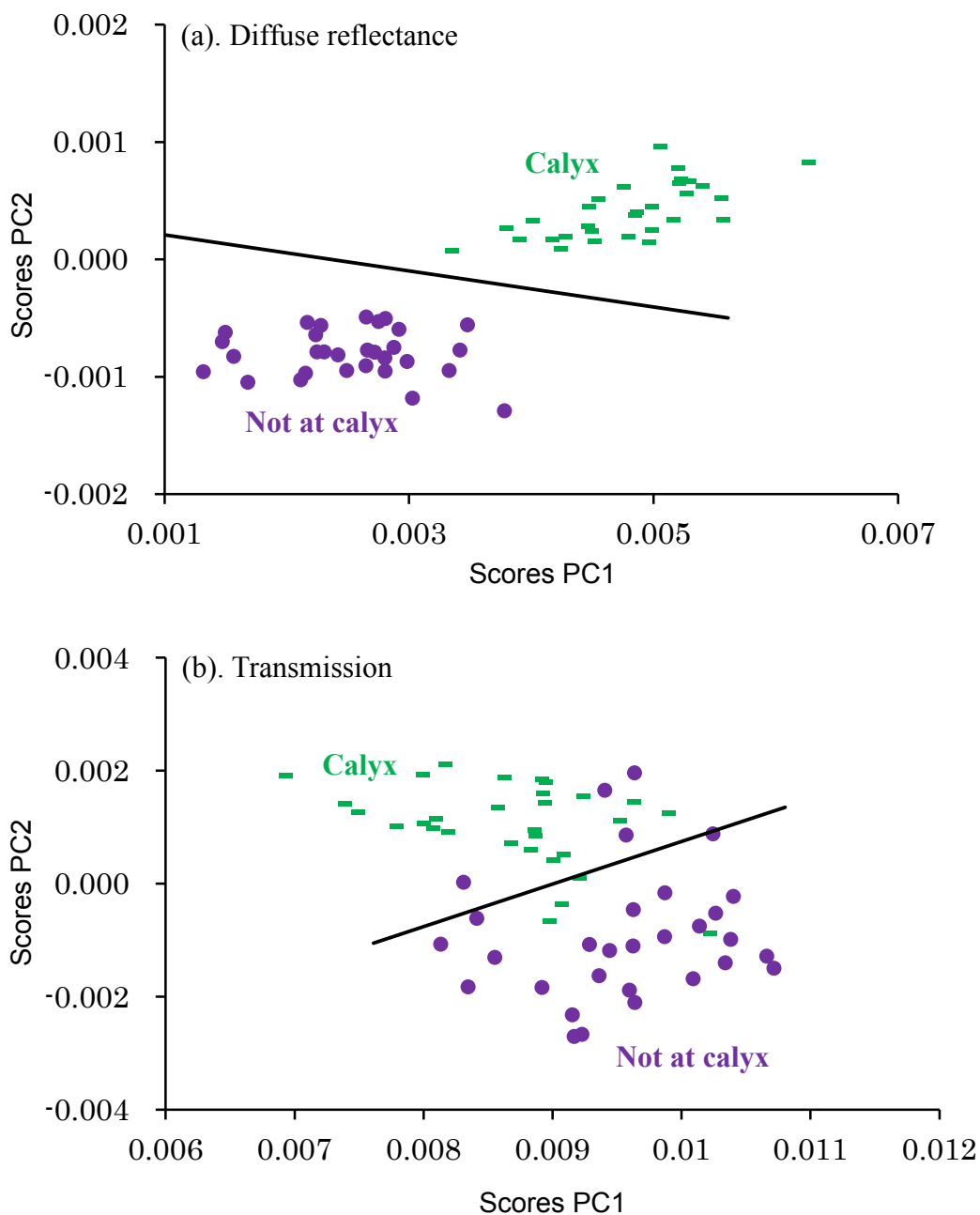


Fig. 2.15 PC1 vs. PC2 score plots of PCA results for spectra of blueberry fruits measured in (a) diffuse reflectance mode and (b) transmission mode. ■ and ● correspond, respectively, to the results of measurements at the calyx and at a positions not at the calyx.

2.5 まとめ

汎用近赤外分光光度計を用いて、複数品種のブルーベリー果実に含まれる糖、有機酸濃度、総アントシアニン量を予測する定量モデルを作成し、その定量モデルの予測精度を評価した。得られた結果を以下にまとめる。

- ① 各成分濃度の予測精度は、近赤外スペクトルの測定法やブルーベリー果実の測定部位によって異なる。
- ② 透過法を用いる場合には、どの部位で測定をしても糖濃度や総アントシアニン量を实用精度以上の精度で予測することができる。しかし透過法の測定では、有機酸成分に特有な吸収が現れる低波数のスペクトルを得ることができないので、有機酸濃度を实用精度以上の精度で予測することはできない。一方、拡散反射法を用いる場合、糖、有機酸濃度と総アントシアニン量を实用精度以上の精度で予測することができる。
- ③ 拡散反射法を用いる場合には、主成分分析法によりスペクトルからブルーベリー果実の測定部位を特定し、部位別の定量モデルで濃度を予測することにより予測精度を向上させることができる。
- ④ 濃度予測に用いる吸収帯として、糖の定量モデルでは、C-H や O-H の第2倍音に由来する吸収バンドが濃度の予測に寄与している。一方有機酸の定量モデルでは、C-H や O-H の第1倍音に由来する吸収バンドが濃度の予測に寄与していると考えられる。総アントシアニン量の定量モデルでは、色素であるアントシアニン分子の電子遷移に由来する吸収バンドの低波数端が近赤外領域の高波数端に現れ、濃度の予測に寄与していると考えられる。

以上の結果をまとめると、測定法を適切に選択することにより、近赤外分光法でブルーベリー果実に含まれる糖と有機酸の濃度及び総アントシアニン量を实用精度以上の精度で予測する手法が開発されたと言える。

2.6 引用文献

- 1) 石川駿二、小池洋男著、ブルーベリーの作業便利帳－種類・品種選びとよくなる株の作り方、農文協 (2006).
- 2) I. Ogiwara, Y. Ohtsuka, Y. Yoneda, K. Sakurai, N. Hakoda, I. Shimura, “Extraction Method by Water followed by Microwave Heating for Analyzing Sugars in Strawberry Fruits”, *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* **68**, 949-953 (1999).
- 3) S. Wold, M. Sjostrom, L. Eriksson, “PLS-regression: a basic tool of chemometrics”, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **58**, 109-130 (2001).
- 4) M. Sjostrom, S. Wold, “A multivariate calibration problem in analytical chemistry solved by partial least-squares models in latent variables”, *Analytica chimica acta* **150**, 61-70 (1983).
- 5) 吉村季織、高柳正夫、“Microsoft Excel を用いたケモメトリクス計算(5)－平化と数値微分－”、*Journal of Computational Chemistry, Japan* **11**, 149-158 (2012).
- 6) I.S. Helland, T. Naes, T. Isaksson, “Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic data”, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **29**, 233-241 (1995).
- 7) J.H. Jiang, R.J. Berry, H.W. Siesler, Y. Ozaki, “Wavelength interval selection in multicomponent spectral analysis by moving window partial least-squares regression with applications to mid-infrared and near-infrared spectroscopic data”, *Analytical Chemistry* **74**, 3555-3565 (2002).
- 8) P. Williams, K. Norris, (Eds.), *Near-Infrared Tech Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2nd edition, American Association of Cereal Chemist, St.

Paul, MN, USA (2001).

- 9) X. Niu, Z. Zhao, K. Jia, X. Li, “A feasibility study on quantitative analysis of glucose and fructose in lotus root powder by FT-NIR spectroscopy and chemometrics”, *Food Chemistry* **133**, 592-597 (2012).
- 10) J.C. Tewari, V. Dixit, B.K. Cho, K.A. Malik, “Determination of origin and sugars of citrus fruits using genetic algorithm, correspondence analysis and partial least square combined with fiber optic NIR spectroscopy”, *Spectrochimica Acta Part A* **71**, 1119-1127 (2008).
- 11) N. Sinelli, A. Spinardi, V. Di Egidio, I. Mignani, E. Casiraghi, “Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy”, *Postharvest Biological Technology* **50**, 31-36 (2008).
- 12) J. Workman, Jr., L. Weyer, Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy. CRC Press, Boca Raton, USA (2008).
- 13) J. Che, S. Suzuki, S. Ishikawa, H. Koike and I. Ogiwara, “Fruit Ripening and Quality Profile of 64 Cultivars in Three Species of Blueberries Grown in Tokyo”, *Horticultural Research (Japan)* **8**, 257-265 (2009).
- 14) S. WOLD, “Principal Component Analysis”, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2**, 37-52 (1987).

第三章 ブルーベリー果実の成分評価に用いる実用装置の性能の検討

3.1 はじめに

安定した品質の果実を出荷する為に、近赤外分光法による糖度、酸度などの内部品質の評価を生産現場で応用している例が、近年多く見られるようになってきた^{1,2)}。市販されている汎用近赤外分光光度計を用いれば、S/Nが非常に良いスペクトルを得ることができる。しかし、市販の分光光度計は大型、かつ高価なので、そのまま生産現場で果実選別などに用いることは難しい。そこで、特定の種類(一種あるいは複数種)の果実の分析に特化した分光光度計を設計・製造することが重要な課題となってきた。このような目的で製造された装置としては、例えば Fig. 3.1 と Fig. 3.2 のようなオンライン測定分光器や携帯型測定分光器が挙げられる。

近赤外分光法による定量分析では、試料や目的成分の光学的特性によって、十分な精度での予測のために必要とされる装置の性能が異なってくる³⁾。例えば、水のように近赤外領域に特徴的な強い吸収を示す成分の定量分析を行う場合には、近赤外分光光度計に必要とされる S/N は他の物質を分析する装置と比べて低く手も差支えない。本章では、汎用分光光度計で得られたデータと作成した定量モデルに基づいて、ブルーベリー果実に含まれる糖、有機酸濃度及び総アントシアニン量を実用精度以上の精度で測定する為にはどのような装置が必要となるのかを検討した。

第二章では、異なる測定法である透過法と拡散反射法をブルーベリー果実の定量分析に用い、予測精度をそれぞれ検討した。その結果、透過法を有機酸の実用分析に適うことが困難であることが明らかになった。一方、拡散反射法を用いれば、糖、有機酸の濃度及び総アントシアニン量を実用精度以上の精度で測定できる。したがって、実用化装置に用いる測定法は拡散反射法とするべ

きであると考えられる。すなわち、以降の実用化装置性能の検討は、測定法として拡散反射法を用いることを前提とする。

近赤外分光法は定量モデルを用いて、試料のスペクトルから成分の濃度を予測するので、測定したスペクトルの質（目的成分に関する有効情報）が定量モデルの予測精度に直接影響する⁴⁾。この近赤外スペクトルの質は、測定に用いられる分光光度計の装置性能によって決まる。測定精度に影響する装置性能の中で最も重要となるのは測定・解析に用いる波長域、雑音レベル、波数安定度、分解能である³⁾。ブルーベリー果実の実用分析に要求される各装置性能を検討する為に、汎用分光光度計で得られたスペクトルに数値的な操作を行い、雑音レベル、波数安定度、分解能を変更したスペクトルを作成する。これらのスペクトルを用いて再びデータ解析を行うことにより、各成分を実用精度よりも高い精度で予測する為に必要な装置性能を明らかにする。



Fig. 3.1 Online system for prediction of Brix and Acidity produced by SHIBUYA SEIKI CO., LTD
(Source: www.shibuya-sss.co.jp)



Fig. 3.2 Fruit selector K-BA100R for prediction of Brix produced by KUBOTA CO., LTD
(Source: www.rice-fruit.kubota.ne.jp/)

3.2 実用化装置性能の決定

3.2.1 波長の選択

2.3 節で、ブルーベリー果実に含まれる糖、有機酸濃度及び総アントシアニン量に対する定量モデルを作成する際に、解析に用いる波数域を明らかにしたので、その結果に従って各成分の定量分析に用いる波数域を選択した。

一般的には、糖と有機酸の濃度に対する定量モデルの予測精度は、果実の測定部位に依存する。しかし糖の定量の場合には、測定部位を特定しなくても予測精度の R^2 と RPD の値としてそれぞれ 0.89、3.1 が得られており、実用精度以上になっている。したがって、糖の濃度は測定部位を特定しない定量モデルで予測する方針を採用すべきであると考えられる。波数域としては、C-H 伸縮振動の第 2 倍音に対応する $8315\sim 7706\text{ cm}^{-1}$ が適当である。

一方、有機酸の場合、測定部位を特定しない定量モデルの予測精度の R^2 と RPD 値はそれぞれ 0.86、2.6 と実用精度ぎりぎりの値となっている。したがって、この定量モデルを有機酸の分析に用いることは難しいと考えられる。有機酸の定量には果実の測定部位を特定してそれぞれの部位に対応する定量モデルを用いて予測する方針を採用すべきである。2.3 節の結果から、萼あ部位に対する定量モデルに用いる波数域は $7235\sim 6857\text{ cm}^{-1}$ と $5970\sim 5345\text{ cm}^{-1}$ 、萼あ以外の部位に対する定量モデルに用いる波数域は $7505\sim 5446\text{ cm}^{-1}$ と $4605\sim 4242\text{ cm}^{-1}$ に設定すべきであると考えられる。

総アントシアニン量を予測する定量モデルの予測精度は測定部位にほとんど依存しない。また、測定部位を変えても用いる波数域は類似している。したがって、2.3 節で作成した定量モデルのいずれか一つで求めた波数域を用いればよいと考えられる。ここでは、萼あ以外の部位に対する定量モデルを採用し、波数域は高波数域を含む $12500\sim 7868\text{ cm}^{-1}$ を用いることとした。

3.2.2 雑音レベル

近赤外分光光度計で測定されるスペクトルには、その装置に起因する雑音が含まれている。本研究では、吸光度の μAbs を雑音の単位とした。糖、有機酸の濃度及び総アントシアニン量の定量分析に必要とされる装置の雑音レベル（これ以下に抑えなくてはいけないというレベル）を求める為に、異なるレベルの数値的な雑音を python の乱数発生モジュールにより作り、それを汎用分光光度計で得られた近赤外スペクトルに重畳した再びデータ解析を行い、それぞれの雑音レベルでの定量モデルの予測精度を求めた。このような解析により、各成分を実用化精度以上の精度で予測できる装置の雑音レベルを明らかにした。

Table 3.1~3.4 に、異なる雑音レベルを重畳したときの糖、有機酸の濃度及び総アントシアニン量の予測精度を表す。糖濃度を实用精度以上で測定する為には、装置の雑音レベルを $100 \mu\text{Abs}$ 以下に抑える必要がある。有機酸濃度を实用精度以上の精度で測定する為の雑音レベルの閾値は、測定部位によって異なることが見出された。実際の測定では、同一装置により果実の各部位のスペクトルを測定するので、どちらの部位でも实用精度に達するように雑音レベルの閾値を設定する必要がある。したがって、有機酸を実用精度以上の精度で予測する為には、装置の雑音レベルを $200 \mu\text{Abs}$ 以下に抑える必要があることがわかった。一方、総アントシアニン量を实用精度以上に予測する為には、雑音レベルを $20000 \mu\text{Abs}$ 以下に抑える必要がある。

Table 3.1 Prediction results of quantitative models of sugar contents constructed by the spectra of different noise levels

Noise level (μAbs)	R^2	RPD	$RMSECV(\text{g}/100\text{g})$
10	0.87	2.8	0.64
20	0.87	2.8	0.63
100	0.85	2.6	0.71
200	0.77	2.1	0.85
1000	0.43	1.3	1.4

Table 3.2 Prediction results of quantitative models of organic acid contents constructed by the spectra of different noise levels

Noise level (μAbs)	Other		
	R^2	RPD	$RMSECV(\text{g}/100\text{g})$
10	0.92	3.6	0.1
20	0.91	3.5	0.1
100	0.91	3.5	0.1
200	0.91	3.5	0.1
1000	0.91	3.4	0.1
1500	0.90	3.3	0.1
2000	0.78	2.1	0.2
10000	0.44	1.3	0.3

Table 3.3 Prediction results of quantitative models of organic acid contents constructed by the spectra of different noise levels

Noise level (μAbs)	Calyx		
	R^2	RPD	$RMSECV(\text{g}/100\text{g})$
10	0.91	3.3	0.1
20	0.91	3.3	0.1
100	0.89	3.0	0.1
200	0.91	3.5	0.1
500	0.83	2.5	0.2
1000	0.60	1.6	0.3
2000	0.62	1.6	0.3

Table 3.4 Prediction results of quantitative models of total anthocyanins constructed by the spectra of different noise levels

Noise level (μAbs)	R^2	RPD	$RMSECV(\text{mg}/100\text{g})$
10	0.91	3.3	21
20	0.91	3.3	21
100	0.90	3.3	21
200	0.90	3.3	21
1000	0.90	3.3	21
2000	0.90	3.3	21
10000	0.90	3.2	21
20000	0.90	3.2	21
100000	0.81	2.5	27
200000	0.72	2.0	35

3.2.3 波数安定度

生産現場で用いられる分光装置には、回折格子が用いられることが一般的である。回折格子により分光される光の波長（波数）は、光学系の変動によりシフトすることがある³⁾。この波長シフトが定量分析の予測精度に影響を及ぼす。そこで、波長（波数）シフトをどれぐらいまでに抑えれば予測精度が実用精度を満たすかをあらかじめ把握しておく必要がある。本研究では、汎用近赤外分光光度計で得られたスペクトルデータを全波数領域で一定量シフトさせた後、そのデータを用いて再びデータ解析を行い、定量モデルの予測精度を求めることにより波長（波数）シフトの影響を検討した。さまざまに波長（波数）をシフトさせたときの糖、有機酸濃度及び総アントシアニン量の予測精度を Table 3.5~3.8 に示した。糖濃度を実用精度以上の精度で予測する為には、波数シフトを 15 cm^{-1} 以内に抑える必要がある。有機酸濃度では、どちらの部位の測定でも実用精度を得るための波数シフト量は 15 cm^{-1} 以内である。総アントシアニン量の定量分析では、高波数側の比較的幅の広い吸収帯を用いているので、波数シフト量を 1387 cm^{-1} 以内にコントロールできれば実用精度以上の精度で予測ができる。つまり、スペクトル測定装置の波数安定度は総アントシアニン量の定量分析にはほとんど影響を与えないと考えられる。

Table 3.5 Prediction results of quantitative models of sugar contents constructed by the spectra of different wavenumber shifts

Shift of wavenumber (cm^{-1})	R^2	RPD	$RMSECV(\text{g}/100\text{g})$
-77	0.72	1.8	1.0
-38	0.71	1.8	1.0
-15	0.84	2.5	0.7
-7	0.86	2.8	0.6
7	0.87	2.8	0.6
15	0.85	2.6	0.7
38	0.81	2.3	0.8
77	0.67	1.7	1.0

Table 3.6 Prediction results of quantitative models of organic acid contents constructed by the spectra of different wavenumber shifts

Shift of wavenumber(cm^{-1})	Other		
	R^2	RPD	$RMSECV(\text{g}/100\text{g})$
-308	0.68	1.7	0.3
-269	0.84	2.6	0.2
-231	0.89	3.1	0.1
-77	0.89	3.2	0.1
23	0.89	3.1	0.1
38	0.86	2.7	0.1
46	0.84	2.5	0.1
77	0.76	2.1	0.2
231	0.77	2.1	0.2
308	0.67	1.7	0.3

Table 3.7 Prediction results of quantitative models of organic acid contents constructed by the spectra of different wavenumber shifts

Shift of wavenumber (cm ⁻¹)	Calyx		
	<i>R</i> ²	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (g/100g)
-154	0.69	1.8	0.3
-77	0.85	2.6	0.2
-61	0.89	3.1	0.2
15	0.85	2.6	0.2
23	0.82	2.4	0.2
61	0.79	2.2	0.2
77	0.80	2.3	0.2
154	0.64	1.7	0.3

Table 3.8 Prediction results of quantitative models of total anthocyanins constructed by the spectra of different wavenumber shifts

Shift of wavenumber (cm ⁻¹)	<i>R</i> ²	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (mg/100g)
771	0.88	2.9	25
1387	0.86	2.7	26
1542	0.80	2.2	32
1927	0.78	2.1	32
2313	0.75	2.2	31

3.2.4 分解能（波数）

定量分析の為に用いられる分光装置にとって、適当な分解能を採用することは目的成分を実用精度以上の精度で予測する為の重要な要素となる。本研究では、汎用分光光度計で得られるスペクトルデータの分解能を数値的にさまざまに変えて再びデータ解析を行い、実用精度での定量分析に必要な分解能を検討した。Table 3.9~3.12 に、種々の分解能のスペクトルを用いて作成した糖、有機酸濃度及び総アントシアニン量に対する定量モデルの予測精度を示した。

糖の濃度を実用精度以上の精度で予測する為には、波数分解能を 32 cm^{-1} 以下に設定する必要がある。有機酸の濃度を実用精度以上に予測するためには波数分解能を 16 cm^{-1} 以下に設定する必要がある。総アントシアニン量に対する定量モデルの予測精度は分解能の影響をほとんど受けないので、特に分解能の設定に工夫が必要無いことがわかった。

Table 3.9 Prediction results of quantitative models of sugar contents constructed by the spectra of different wavenumber resolutions

Resolution (cm^{-1})	R^2	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (g/100g)
16	0.89	3.1	0.6
32	0.85	2.6	0.7
64	0.63	1.5	1.1

Table 3.10 Prediction results of quantitative models of organic acid contents constructed by the spectra of different wavenumber resolutions

Resolution (cm^{-1})	Calyx		
	R^2	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (g/100g)
16	0.91	3.3	0.1
32	0.77	2.1	0.2
64	0.65	1.6	0.3

Table 3.11 Prediction results of quantitative models of organic acid contents constructed by the spectra of different wavenumber resolutions

Resolution (cm ⁻¹)	Other		
	<i>R</i> ²	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (g/100g)
16	0.92	3.6	0.1
32	0.83	2.4	0.2
64	0.84	2.6	0.2

Table 3.12 Prediction results of quantitative models of total anthocyanins constructed by the spectra of different wavenumber resolutions

Resolution (cm ⁻¹)	<i>R</i> ²	<i>RPD</i>	<i>RMSECV</i> (mg/100g)
16	0.91	3.3	21
32	0.91	3.3	21
48	0.91	3.3	21
64	0.91	3.3	21
80	0.91	3.2	21
96	0.91	3.2	21
112	0.91	3.3	21
128	0.90	3.2	21

3.3 測定部位の依存性

有機酸濃度の定量分析は、測定部位ごとに定量モデルを作成し、測定スペクトルにその部位に対応する定量モデルを適用して濃度を予測する。汎用分光光度計を用いた測定では、測定部位はスペクトルを主成分スコアプロットすることにより判別できる。しかし実用装置の性能は汎用分光光度計とは異なる。実用装置の性能で得られるスペクトルでも測定部位の判別が可能であることを確認しなければならない。

3.2 節で得られた実用装置に必要な装置性能に対応するスペクトルを用いて、主成分分析を行った。主成分スコアプロットの結果を Figure 3.3 に示す。異なる測定部位のスペクトルが線形判別ラインにより完全に分けられている。つまり、実用装置で得られるスペクトルでもスペクトルから測定部位を判別できることがわかった。実用装置を用いても、スペクトルから測定部位を判別し、部位別の定量モデルで成分濃度を予測することが可能である。

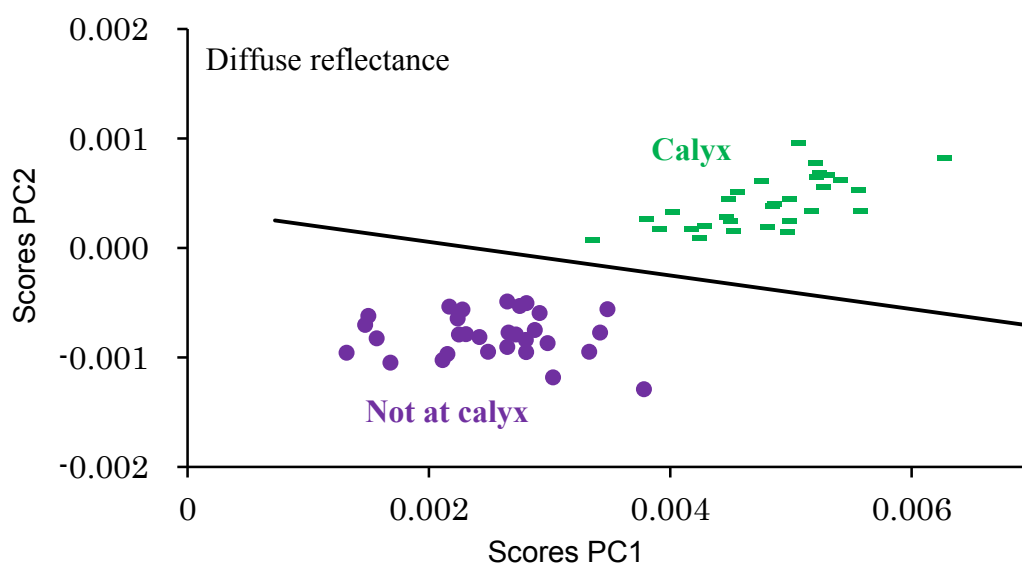


Fig. 3.3 PC1 vs. PC2 scores plots of PCA results for spectra of blueberry fruits measured in diffuse reflectance mode. ■ and ● correspond, respectively, to the results of measurements at the calyx and at a positions not at the calyx.

3.4 まとめ

本章では、汎用分光光度計の拡散反射法で得られるデータに基づき、シミュレーションを行い、現場測定で用いる分析装置の主要な性能を明らかにした。結果を以下にまとめる。

- 1) 定量分析に用いる波数域としては、糖濃度が O-H や C-H の第 2 倍音吸収に由来する高波数域、有機酸濃度が O-H や C-H の第 1 倍音吸収に由来する低波数域、総アントシアニン量がアントシアニン分子の電子遷移に由来する高波数域を用いた。
- 2) 雑音レベルの条件は、測定成分によって異なる。糖濃度分析のための測定では 100 μAbs 、有機酸濃度分析のための測定では 200 μAbs 、総アントシアニン量分析のための測定では 20000 μAbs 以下に抑える必要がある。
- 3) 波数安定度に必要な条件も、測定成分によって異なる。糖と有機酸濃度の測定には、波数シフトを 15 cm^{-1} 以内に抑える必要がある。総アントシアニン量の測定は、予測精度が波数シフトの影響をほとんど受けないので、波数の安定化を特に工夫する必要が無い。
- 4) 分解能に必要な条件も、測定成分によって異なる。糖濃度の測定では 32 cm^{-1} 、有機酸濃度の測定では 16 cm^{-1} 以内の分解能が必要である。総アントシアニン量の測定では、予測精度が分解能の影響をほとんど受けないので、分解能を特に工夫する必要が無い。

以上の性能を持つ装置であれば、第二章で確立した手法によりブルーベリー果実の各成分を実用精度以上の精度で定量分析できる。具体的に装置を製作する際には、各装置性能が予測精度に与える影響を総合的に検討し、各性能の目標値を適当に調整する必要がある。

3.5 引用文献

- 1). K. Miyamoto, “Feedback of the Fruit Quality Data Measured by NIR Spectrophotometer to Production Control Using GIS and Taking New Turn of Agricultural Research”, *Horticultural Research (Japan)* **3**, 245-250 (2004).
- 2). 宮本久美, “近赤外分光法によるミカン果実糖度の全数検査”, *ぶんせき*, **379**, 352-355 (2006).
- 3). 大倉 力、服部 秀、“近赤外分光計測の装置技術”, *分光研究*, **53**, 109-115 (2004).
- 4). 大倉 力、“近赤外分光・装置技術とその問題点”、*第28回近赤外フォーラム講演要旨集*、71-74 (2013)

第四章 ハイパースペクトルイメージングカメラによる ブルーベリー果実の成分評価

4.1 はじめに

従来の分光法で得られるブルーベリー果実のスペクトルは、測定光があたっている点（スポット）に対応する分光情報のみを持ち、そのスペクトルを用いて行った分析結果には目的成分の試料中での分布などの空間情報は持たない。また、果実一個ごとにスペクトルを測定して成分濃度を予測するので、多数の果実を同時に測定することもできない。

ブルーベリー果実を収穫や出荷する際の非破壊品質評価では、樹上あるいはパック詰めされた多数の果実を同時に分析できると効率が良く便利である。最近発達してきたハイパースペクトルイメージング（Hyperspectral Imaging: HSI）カメラを用いると、波長情報と空間情報を同時に得ることができる。従来はリモートセンシング測定に用いられることが多かったが、最近では果実の内部品質の分析にもしばしば用いられるようになってきた¹⁾。しかし、HSI カメラは回折格子を用いた分光方式なので、分解能がフーリエ変換型の汎用分光光度計に比べて劣る。また、測定試料の形状によっては照射光の散乱が起こりやすいので、測定データに含まれるノイズレベルが高く、S/N が低いことが多い。そのため、HSI カメラを用いた果実の成分分析での予測精度は、汎用分光光度計を用いた場合よりも低くなることが多い²⁾。

HSI カメラを用いた果実の定量分析に関する過去の研究では、可視から近赤外領域の短波長側（1000 nm）までの分光情報を用いて成分濃度を予測する例が多い³⁾。しかし、ブルーベリー果実に含まれる有機酸のように代表的な吸収バンドが近赤外の長波長域にのみ現れる成分（Fig. 2.13）については、HSI カメラを用いて定量分析を行ったときに実用精度を上回る予測精度を得ることは難

しいと考えられる。また、HSI カメラでは光の反射率を測定するので、原理的には拡散反射モードの測定を行っていることになる。第二章で、拡散反射法で測定したスペクトルを用いて作成した定量モデルは実用精度以上の精度で糖濃度を予測している。このとき、定量モデルに用いた波長域は 1250 nm (8000 cm^{-1}) 付近であり、C-H 伸縮振動の第 2 倍音の吸収に由来するものである。したがって、近赤外領域の長波長側の分光情報を用いれば、糖や有機酸の定量分析の予測精度の向上が十分に期待できる。総アントシアニン量の定量分析については、第二章で述べたように短波長（高波数）域の光が予測に寄与しているので、短波長域の分光情報が得られる HSI カメラでも総アントシアニン量を精度よく予測できると考える。

本章では、短波長域（400-1000 nm）と長波長域（800-1700 nm）の分光情報を得ることができる 2 台の HSI カメラを用いて、ブルーベリー果実の糖度、酸度及び総アントシアニン量を定量的に評価する手法の開発を行った。ハイパースペクトルを測定し、化学分析法で得られる糖度、酸度及び総アントシアニン量との相関を検討して定量モデルを作成した。糖度と酸度に対する定量モデルの評価は外部バリデーションにより行った。総アントシアニン量に対する定量モデルの評価はクロスバリデーションにより行った。

4.2 実験

4.2.1 試料

東京農工大学府中キャンパスの「先進植物工場研究施設」で栽培されている代表的なブルーベリー品種である Sharpblue と Misty の果実を測定試料とした。糖度と酸度の化学分析と総アントシアニン量の化学分析では抽出方法が異なるので、試料を糖度と酸度の測定用セットと総アントシアニン量の測定用セットの2つのセットにわけて収穫した。総アントシアニン量の定量分析に用いる果実は、2012年12月に合計24粒収穫した。糖と有機酸の定量分析に用いる果実は、2014年8月に合計105粒収穫した。

4.2.2 ハイパースペクトルの測定

4.2.2-1 HSI システムの仕組み

本研究では、ブルーベリー果実の各成分の定量分析に3種類のHSIカメラを用いた。糖度と酸度の定量分析には、短波長帯分光用のV10カメラと長波長帯分光用のN17Eカメラを用いた。一方、総アントシアニン量の定量分析には、短波長帯分光のNH7カメラを用いた。3種類のHSIシステムはいずれも、カメラ部、試料台部及び光源部からなる。カメラ部は透過回折格子によってスリットから入射する光を分光し、検出素子を二次元に配列した検出器でピクセルごとの分光データを計測する。測定波長域によって、用いる検出器の種類が異なる。光源には、可視光と近赤外光の光源としてよく用いられるハロゲンランプを使用した。カメラによって、異なる試料台を用いた。Table 4.1に、本研究で用いた3種類のHSIカメラの規格や性能をまとめて示す。

Table 4.1 Indexes of HSI cameras used in the present study

Camera	V10 (SPECIM, JFE Technoresearch Co.)	N17E (SPECIM, JFE Technoresearch Co.)	NH7 (EBA Japan Co.)
Wavelength Region	400-1000 nm	800-1700 nm	400-1000 nm
Detector	Charge-Coupled Device (CCD)	TE-cooled InGaAs Photodiode Array	Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS)
Lens	C-mount	C-mount	C-mount
Spatial Resolution/Line	640 pixel	320 pixel	1280 pixel
Resolution	9.0 nm	3.5 nm	5.0 nm
Dynamic range	8 bit	8 bit	10 bit

4.2.2-2 HSI データの計測

カメラにより、データの計測と補正の仕方が異なる。糖と有機酸濃度の測定は、カメラ部を固定し、ブルーベリー果実を載せる試料台を検出器の露出時間と同期させた速度で移動しながら水平ラインごとに測定する方式で行った。V10 カメラを用いる場合には、レンズの絞りを調整することにより検出器に届く光の強度を調整し（検出器の飽和現象を避ける）、検出器のダイナミックレンジを確認する必要がある（99%の標準反射板に対して、輝度値スペクトル上の最大ピーク値が 255 を超えないように調整する）。総アントシアニン量の測定では、カメラ部に内部スキャン機能が搭載されていたので、カメラ部と試料台

部を両方固定し、ブルーベリー果実を標準反射白板上に並べて載せ、測定した。

➤ 糖度と酸度の定量分析用に用いるハイパースペクトル

糖度と酸度の定量分析では、分光波長帯が異なる V10 カメラ (ImSpector V10, SPECIM, Finland) と N17E カメラ (ImSpector N17E, SPECIM, Finland) を用いてハイパースペクトルを測定した。収穫直後のブルーベリー果実を HSI システムの試料台に並べ、試料台を移動しながら水平ラインごとに V10 カメラにより 400~1000 nm 領域のハイパースペクトルを記録した。次にカメラ部を N17E カメラに変えて、800~1700 nm 領域のハイパースペクトルを水平ラインごとに記録した。太陽光と室内の蛍光灯の影響を避ける為に、実験室のカーテンを閉め、電気を消して測定を行った。ブルーベリー果実の分光情報は、空間上の 1 水平ラインが 1 枚のフィルムとなり、avi ファイルとして得られる。ハイパースペクトルを測定した後に、果実は重量を測り、糖度と酸度の化学分析の為に-30℃の冷凍庫に保存した。

➤ 総アントシアニン量の定量分析に用いるハイパースペクトル

総アントシアニン量の定量分析には、短波長域の分光情報が得られる NH7 カメラ (EBA JAPAN NH7, Japan) を用いて、ハイパースペクトルを測定した。NH7 カメラによるハイパースペクトルの測定は、反射率がほぼ 100%の標準反射用の白板 (polytetrafluoroethylene, PTFE) の上に収穫直後のブルーベリー果実を並べ、カメラ部と試料部両方を固定して、カメラ内部に搭載するスキャニング技術を用いて行った。太陽光と蛍光灯の影響を避けるために、実験室のカーテンを閉め、電気を消した後に測定を行った。ハイパースペクトルの測定後、果実は重量を量り、総アントシアニン量の化学分析の為に-80℃の冷凍庫に保存した。

4.2.3 化学分析

果実に含まれる糖濃度の定量分析には、屈折率糖度計によって測定される Brix°値を使うことが一般的である。JAS (Japanese Agricultural Standard) での果実飲料の糖度測定は、屈折率糖度計により Brix°値を測定することになっている。そこで、HSI カメラによるブルーベリー果実の糖濃度の定量分析では、ハイパースペクトルと Brix°値を用いて定量モデルを作成した。一方、ブルーベリー果実に含まれる主な有機酸はクエン酸であること⁴⁾に基づいて、酸濃度の化学分析は酸度計 (キノンと微量酸の共存時のボルタモグラムには、キノンの還元波よりも正電位に前置波が現れ、その波高が酸濃度に比例する) を用いて、すべての有機酸をクエン酸として換算する方法で行った⁵⁾。

総アントシアニン量の化学分析には、第2章の総アントシアニン量の化学定量分析と同様に HPLC 法を用いた。

4.2.3-1 糖度

ブルーベリー果実の糖度の化学定量分析は以下の手順に従って行った。

- ① -30°Cに保存していたブルーベリー果実をナイフによりいくつかにカットする。
- ② 糖を抽出する為に、カットしたブルーベリー果実をチューブ式ホモジナイザーVT-1 (ASONE CO., LTD, Japan) のチューブに入れ、3 mL のイオン交換水を加えて、5 分間ホモジナイズする。
- ③ 抽出液を小型遠心機 MCF-2360 (LMS CO., LTD, Japan) により 5 分間遠心分離を行った。
- ④ 遠心分離した後、上澄み液をマイクロピペットにより取り上げ、ポケット糖度計 PAL-J (ATAGO CO., LTD, Japan) により糖度値 (Brix°値) を測定する。

4.2.3-2 酸度

ブルーベリー果実の酸度の化学定量測定は前述 4.2.3-1 の①、②、③を行った後、上澄み液をマイクロピペットにより取り上げ、キノン標準液に入れて、十分混合した後、ポケット酸度計 PAL-AC1 (ATAGO CO., LTD, Japan) により酸度を測定した。

糖度と酸度の化学定量分析の前処理が共通なので、それぞれのブルーベリー果実について糖度と酸度の双方を測定した。

4.2.3-3 総アントシアニン量

総アントシアニン量の化学定量分析は、第 2 章の 2.2.2 節に説明した方法に従って行った。ここで用いたブルーベリー果実は、成熟の程度が第 2 章で用いたものと異なり、総アントシアニン量は比較的低い値を示した。

本章で化学定量分析により測定されたブルーベリー果実の糖度、酸度及び総アントシアニン量と果実重量の統計結果を Table 4.2 と Table 4.3 に示す。

Table 4.2 Results of analysis of the sugar contents and acidities of 105 blueberry fruits measured by Refractometer and Acidity Meter, together with their weights.

Sample number:105	Weight (g)	Sugar content (Brix°, wt%)	Acidity (convert citric acid concentration, wt%)
Min. value	0.8	5.0	0.2
Max. value	3.6	15.4	2.5
Mean value	1.8	11.2	1.1
SD	0.6	2.1	0.5

SD: Standard Deviation

Table 4.3 Results of analysis of the total anthocyanins of 24 blueberry fruits measured by HPLC, together with their weights.

Sample number:24	Weight (g)	Total anthocyanins (mg/100g)
Min	0.6	11
Max	1.9	97
Mean	1.2	42
SD	0.2	27

SD: Standard Deviation

4.3 データ解析手法

4.3.1 スペクトルの補正と抽出⁶⁻¹⁰⁾

HSI システムによる測定で得られるデータは、ピクセルごとの輝度値スペクトルである。成分の定量分析に関わるデータ解析では、成分濃度と比例関係を持つ吸光度に変換することが必要である。特に PLS 回帰分析のような線形モデルに基づく定量分析では、輝度値の値を吸光度に変換することが一般的である。また、光源から試料表面に届く光の照射強度のばらつき（ピクセル間の光の照射強度が異なる）が定量モデルの予測精度に影響を与えることになるので、定量モデルを作成する前に光のムラによる影響を補正する必要がある。

HSI カメラが異なると、測定データに対する補正の仕方も異なる。V10 と N17E カメラによる測定では、カメラ部を固定して果実を載せる試料台を移動しながら水平ラインごとに測定をするので、カメラに対して測定する水平ライン方向での絶対位置は変えず、水平ラインと垂直な方向での試料台位置のみ変えている。したがって、光の照射強度による差異の補正は水平ライン方向のみ行えば十分である。具体的な補正の仕方を Fig. 4.1 に示す。反射率が 99% の標準反射板を水平ライン方向に移動しながら水平 1 ライン上の各ピクセルでの標準反射板の輝度値スペクトルを得る。測定データの補正は、以下に示す式 4.1 と式 4.2 に従って、ピクセルと波長ごとに行う。

$$R = \frac{S-D}{W-D}(a) \quad \text{or} \quad R = \frac{S}{W}(b) \quad \text{Equation 4.1}$$

$$A = \log \frac{1}{R} \quad \text{Equation 4.2}$$

R は測定試料（ブルーベリー果実）の相対反射率の値、 S は測定試料の輝度値、 W は標準反射板の輝度値、 D はレンズのキャップを完全に閉めて、光が検出器に届かない状態での読み値、 A は試料の吸光度である。NH7 カメラを用いる場

合には、試料を測定するときと同じ条件で標準反射白板のみを測定し、対応するピクセルと波長ごとに式 4.1 と式 4.2 に従って補正を行った。

定量分析のためのデータ処理としては、HSI 三次元データの中から試料に当てはまるすべてのピクセル (Region of Interest: ROIs) での吸光度スペクトルを抽出し、その平均スペクトルを求めて試料に対応するスペクトルとして定量モデルの作成に用いた。スペクトルデータの補正と抽出はプログラミング言語の Python 2.7.8 (<http://www.python.org>) を用いて実行した。

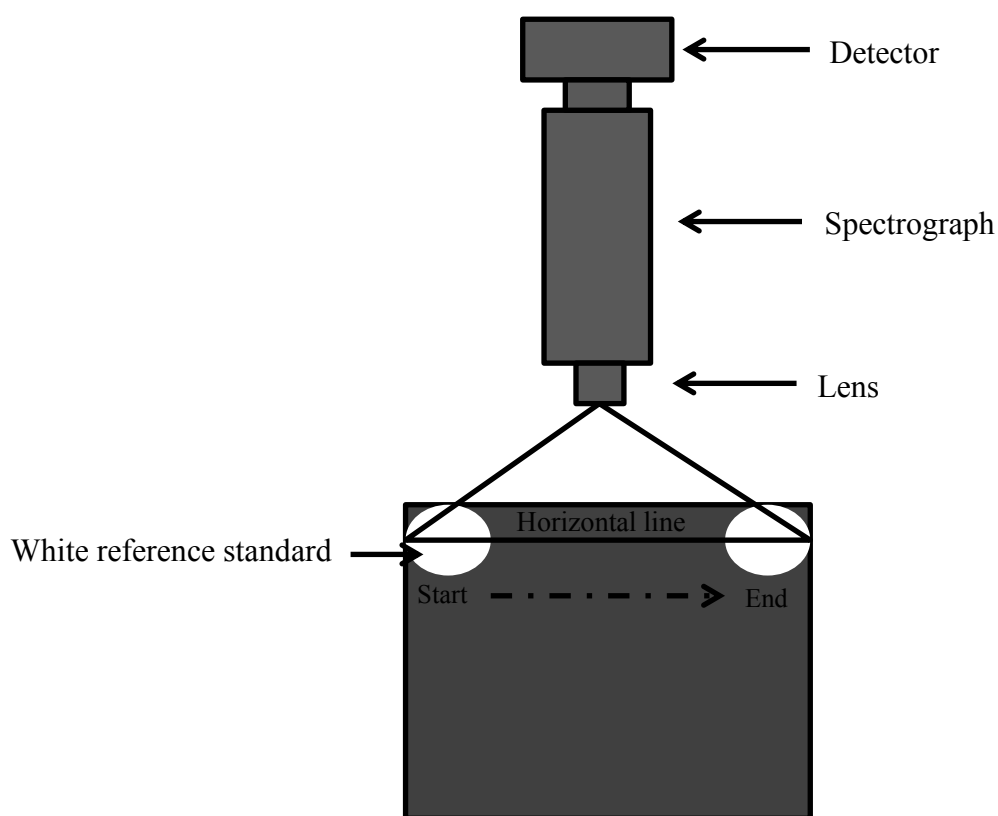


Fig. 4.1 Schematic of measurement of hyperspectral imaging camera

※測定の様子の説明：カメラがデータ採取モードになった後、標準反射板を開始位置から終了位置までゆっくり移動し、横 1 ライン上のピクセル毎のスペクトルを得る。

4.3.2 定量モデルの作成と評価

汎用分光光度計を用いた場合、糖と有機酸の濃度の予測精度がスペクトルを測定する部位に依存することを第2章で報告した。HSIカメラによる糖度と酸度の定量分析でも同様に、測定部位依存性を検討しなければならない。そこで本章でも、測定部位ごとに定量モデルを作成して、測定部位の違いが予測精度に与える影響を検討した。

定量モデルの作成と評価は、第2章の2.3節に述べた手法と同様な解析手順で行った。糖度と酸度については、外部バリデーションにより定量モデルの予測精度を評価したので、収穫した果実をキャリブレーションセット用70粒とバリデーションセット用35粒に分けた。試料の分け方は、105粒の果実を糖度値或いは酸度値の昇順に並べて、3粒ごとに1粒の果実をバリデーションセットに選び、残りの果実をキャリブレーションセットとした。PLSにより作成する定量モデルは、既知濃度間での線形性のみを保証するので、測定値が最大と最小の果実がキャリブレーションセットに含まれるよう、つまりキャリブレーションセットの果実の測定値範囲がバリデーションセットの果実の測定値範囲を含むように調整した。総アントシアニン量については、クロスバリデーションにより定量モデルの予測精度を評価した。

V10とN17Eカメラの測定で得られたスペクトルの両端（最長波長付近と最短波長付近）に強いノイズが見られるので、定量モデルの作成にはそのノイズが大きな部分を除いて用いた。

定量モデルの作成と評価の計算は、Microsoft Excel に搭載している Visual Basic for Applications (<http://www.microsoft.com/>) と Freemath 4.0 (<http://freemath.sourceforge.net/>) を用いて行った。また、定量モデルの作成に伴うスペクトル前処理もこれらのソフトウェアを用いて行った。

4.4 結果及び考察

4.4.1 ブルーベリー果実のハイパースペクトルの特徴

N17E、V10 カメラと NH7 カメラのそれぞれで同一の果実の萼あ部位のスペクトルと萼あ以外の部位のスペクトルを測定した。測定結果の例を、それぞれ Fig. 4.2、Fig. 4.3 と Fig. 4.4 に示す。

N17E カメラによる測定では、測定部位を変えてもスペクトルの波形は似ている。しかし、萼あ部位のスペクトルの吸光度が萼あ以外の部位に比べて常に低く（ベースラインが低く）、長波長側ほどこの差が大きくなる傾向が見られる。このスペクトルを第 2 章で述べた汎用近赤外分光光度計で測定した拡散反射スペクトルと比較したところ、主要な吸収バンド（C-H の第 2 倍音や O-H の第 1 倍音）の相対位置や強度は類似していることがわかった。したがって、N17E カメラを用いた HSI システムで得られる近赤外スペクトルには、汎用分光光度計と同じように果実の表面の情報が含まれていると考えられる。

一方、V10 カメラと NH7 カメラの測定で得られたスペクトルは、測定部位により形状は変化するが、N17E のような傾向は見られなかった。主な吸収バンドは可視光領域に現れた。これは、果皮近傍に集中している色素に由来するものと考えられる。

N17E と V10 カメラにより測定されたスペクトルには、形状がギザギザしており、ノイズレベルが高い。これは、HSI カメラのダイナミックレンジが狭いことと空間分解能が低いことに、少なくとも原因の一部があると考えられる。一方、NH7 カメラにより測定されたスペクトルのノイズレベルは比較的到低い。NH7 カメラは V10 や N17E カメラに比べてダイナミックレンジが広く空間分解能が高いので、質の高いスペクトルを得ることができるものと考えられる。

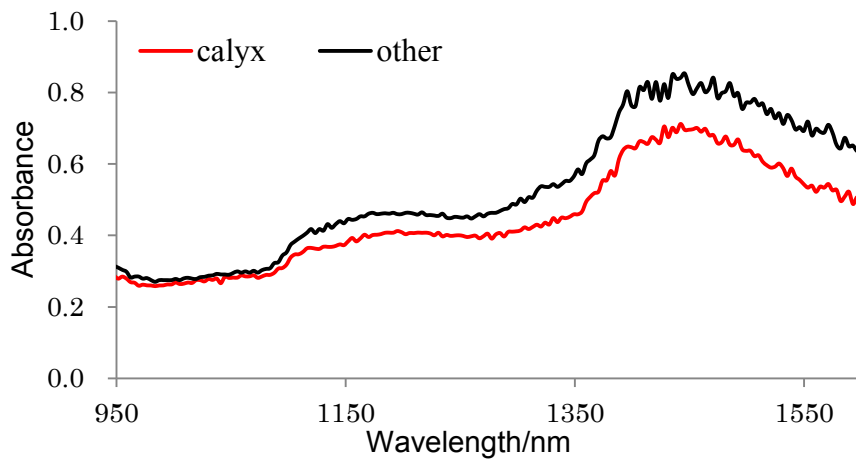


Fig. 4.2 Near-infrared absorption spectra of a blueberry fruit measured by N17E camera

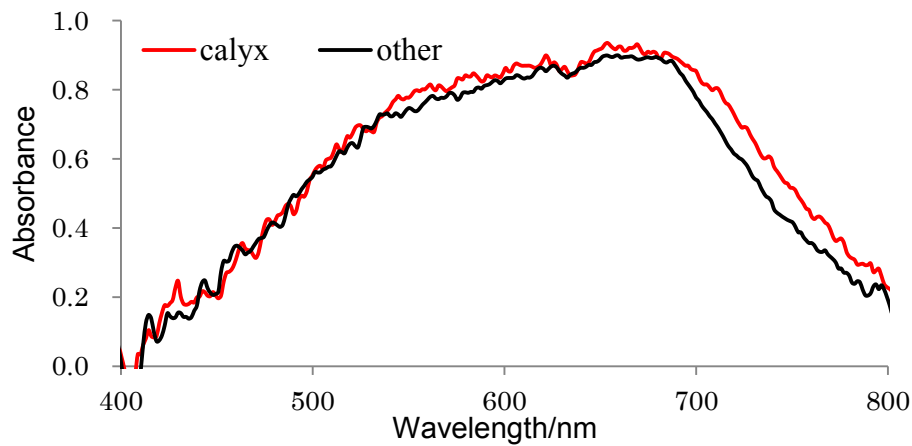


Fig. 4.3 Near-infrared absorption spectra of a blueberry fruit measured by V10 camera

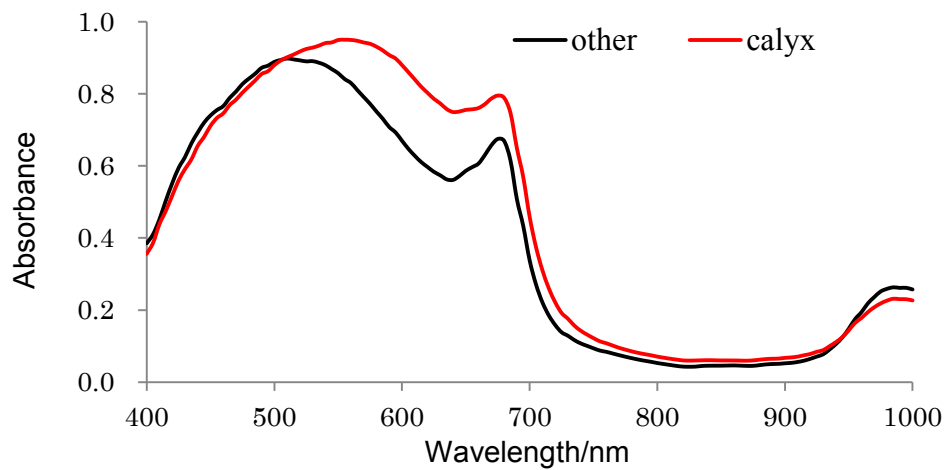


Fig. 4.4 Near-infrared absorption spectra of a blueberry fruit measured by NH7 camera

4.4.2 糖度の予測結果

Table 4.4 と Table 4.5 に、短波長分光カメラ V10 と長波長分光カメラ N17E の測定に基づいて作成した糖度に対する PLS 定量モデルの予測精度を測定部位ごとに評価した結果を示す。どちらのカメラを用いた場合にも、糖度に対する定量モデルの予測精度に第 2 章で述べたのと同じような部位依存性が現れた。最良な結果のみ表しているため、スペクトル前処理法はそれぞれ異なっている。萼あ部位で測定したスペクトルに対応する定量モデルが最も高い予測精度となり、V10 と N17E カメラでの R^2 と RPD がそれぞれ 0.56、1.5 と 0.71、1.8 になった。長波長領域の分光情報を用いることにより予測精度を向上させることができた。しかしこれらの結果は近赤外分光法を実用化するための基準である $R^2 > 0.85$ 、 $RPD > 2.5$ には全く届いておらず、今回の実験に用いた HSI カメラにより糖度測定を実用化することは難しいと考えられる。その原因には、以下のような要因が考えられる：

- ① 今回の実験に用いた HSI カメラの輝度値の階調は 8 bit (0~255 の間の値を取る) であり、ダイナミックレンジが小さいこと。またノイズが多くて S/N が低いこと。
- ② 空間分解能が低くて、ROIs に含まれるピクセル数が少ない。そのために、平均スペクトルが試料の代表とならない。ROIs に含まれるピクセル数が増えて平均計算に用いるスペクトルが多くなるほど、平均により正規分布に従う白色雑音を取り除ける可能性が高まると考えられる。
- ③ スペクトルの分解能が低くて、糖度の量と相関する弱い吸収バンドがスペクトル上に現れないこと。
- ④ リモートセンシング測定方式なので、スペクトルに含まれるノイズのレベルが高くて、微分処理 (ノイズレベルが高くなると微分することによってノイズ成分が強調され、定量解析の邪魔になる場合がある) などの

スペクトル前処理によってスペクトルの補正を行うことが難しい。

- ⑤ HSI システムによる測定は、測定試料の表面に反射した光を検出する測定方式なので、実質的には拡散反射モードでの測定になっている。つまり、光が果実の表面からどこまで内側に侵入しているかがわからないため、糖のように果実全体に広がって分布している成分に対しては、定量できるほどの成分情報がスペクトルに本当に含まれているのか未知数である。
- ⑥ 糖度を屈折率糖度計により測定した。屈折率糖度計では、糖以外の可溶性成分も糖度として測定される。定量モデル作成時に用いた化学分析の実測値の測定誤差が定量モデルの予測精度に悪い影響を与えた可能性がある。

Table 4.4 Results of validation of models predicting Brix values of blueberry fruits by spectra measured with V10 camera.

Measurement site	preprocessing	R^2	RPD	$RMSEP(g/100g)$
Calyx	2 nd D	0.29	1.2	1.5
Other	None	0.56	1.5	1.3
Mix	2 nd D	0.38	1.2	1.5

Calyx: calyx were toward the camera's lens

Other: calyx were not toward the camera's lens

Mix: All measurements without distinguishing measurement position

2ndD: Second derivative

Derivatives were calculated by SG method. A cubic function fitted for 71 points was used for the calculation of each data point.

Table 4.5 Results of validation of models predicting Brix value of blueberry fruits by spectra measured with N17E camera.

Measurement site	preprocessing	R^2	RPD	$RMSEP(g/100g)$
Calyx	MSC	0.71	1.8	1.1
Other	Non	0.53	1.4	1.3
Mix	2 nd D	0.38	1.3	1.5

Calyx: calyx were toward the camera's lens

Other: calyx were not toward the camera's lens

Mix: All measurements without distinguishing measurement position

MSC: Multiplicative scatter correction

2ndD: Second derivative

Derivatives were calculated by SG method. A cubic function fitted for 71 points was used for the calculation of each data point.

4.4.3 酸度の予測結果

Table 4.6 と Table 4.7 に、短波長分光カメラ V10 と長波長分光カメラ N17E の測定結果を用いて作成した酸度に対する PLS 定量モデルの予測精度を測定部位ごとに評価した結果を表す。短波長分光カメラ V10 の場合、定量モデルの予測精度は測定部位にほとんど影響されなかった。予測精度は最も高くても R^2 、 RPD がそれぞれ 0.61、1.6 となった。一方、長波長分光カメラ N17E を用いた場合、汎用分光光度計を用いた場合と同じように定量モデルの予測精度に部位依存性が現れた。表には最良の結果のみを示しているため、スペクトル前処理法がそれぞれ異なっている。萼あ以外の部位に対応する定量モデルが最も高い予測精度を表し、 R^2 、 RPD がそれぞれ 0.67、1.7 となった。長波長領域の分光情報を用いることにより酸度の予測精度を向上させることができた。しかしこれらの予測精度は、近赤外分光法を実用化するための基準である $R^2 > 0.85$ 、 $RPD > 2.5$ には大きく届いていない。したがって、今回に用いた HSI カメラにより酸度測定を実用化することは難しいと考えられる。

原因としては、糖度の場合に述べた 6 つの点以外に、果実に含まれる有機酸の濃度が比較的低いことが挙げられる。

Table 4.6 Results of validation of models predicting acidities of blueberry fruits by spectra measured with V10 camera.

Measurement site	Preprocessing	R^2	<i>RPD</i>	<i>RMSEP</i> (g/100g)
Calyx	1 st D	0.61	1.6	0.33
Other	2 nd D	0.58	1.5	0.34
Mix	None	0.59	1.6	0.34

Calyx: calyx were toward the camera's lens;

Other: calyx were not toward the camera's lens

Mix: All measurements without distinguishing measurement position

1stD: First derivative; 2ndD: Second derivative

Derivatives were calculated by SG method. A cubic function fitted for 71 points was used for the calculation of each data point.

Table 4.7 Results of validation of models predicting acidities of blueberry fruits by spectra measured with N17E camera.

Measurement site	Preprocessing	R^2	<i>RPD</i>	<i>RMSEP</i> (g/100g)
Calyx	None	0.41	1.3	0.38
Other	None	0.67	1.7	0.31
Mix	None	0.19	1.1	0.43

Calyx: calyx were toward the camera's lens

Other: calyx were not toward the camera's lens

Mix: All measurements without distinguishing measurement position

4.4.4 総アントシアニン量の予測結果

Table 4.8 に、短波長分光カメラ NH7 で得られたスペクトルを用いて作成した総アントシアニン量に対する PLS 定量モデルの予測精度を測定部位ごとに評価した結果を示す。NH7 カメラの定量モデルの予測精度は、測定部位に依存せず、実用化精度以上の精度で総アントシアニン量を予測できることを示している。ROIs をできる限り大きく選択すると、最良な予測精度が得られる。 R^2 、 RPD がそれぞれ 0.87、2.8 と得られており、実用精度を上回っている。

ブルーベリーに含まれる総アントシアニンの量は比較的少ないので、近赤外スペクトルにアントシアニンを定量するための情報が本当に含まれているかどうかを懸念していた。しかし、ブルーベリー果実に含まれるアントシアニンがほとんどが果皮近傍に集中していることや色素となるアントシアニンが可視光領域や近赤外領域の短波長側に特性吸収（一部の電子遷移による吸収も現れる可能性があると考え）を持つことが、定量モデルの精度に寄与していると考えられる。HSI カメラの測定方式が拡散反射モードと類似しているので、主に果皮近傍に分布するアントシアニンに関する情報がスペクトル上に明瞭に表れていると考えられる。

Table 4.8 Results of cross-validation of models predicting Total anthocyanins of blueberry fruits by spectra measured with NH7 camera.

Measurement site	Pre-processing	R^2	RPD	$RMSECV$ (mg/100g)
calyx	2 nd D	0.87	2.8	10
other	2 nd D	0.86	2.7	10
Mix	2 nd D	0.85	2.5	11

Calyx: calyx were toward the camera's lens

Other: calyx were not toward the camera's lens

Mix: All measurements without distinguishing measurement position

2ndD: Second derivative

Derivatives were calculated by SG method. A cubic function fitted for 71 points was used for the calculation of each data point.

4.5 まとめ

HSI システムによりブルーベリー果実の主要な品質である糖度（Brix°値）、酸度及び総アントシアニン量を非破壊的に測定する手法の開発を行った。

以下の結果が得られた。

- ① 総アントシアニン量に対する定量モデルとして、予測精度が測定部位にほとんど依存せず、実用化精度以上の精度で含有量を予測することが可能な方法を開発した。
- ② 糖度と酸度に対しては、今回の実験条件では実用化精度以上の精度での予測が困難であることがわかった。HSI カメラの性能の向上や HPLC を用いるなどして化学分析の精度を向上させることにより、実用精度以上の精度で糖度と酸度を予測する手法の開発が、十分に価値がある今後の研究課題となるものと考えられる。

4.6 引用文献

- 1) A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, J.M. Frias, "Hyperspectral imaging-an emerging process analytical tool for food quality and safety control", *Trends in Food Science & Technology* **18**, 590-598 (2007).
- 2) J. Burger, P. Geladi, "Hyperspectral NIR imaging for calibration and prediction: a comparison between image and spectrometer data for studying organic and biological samples", *Analyst* **131**, 1152-1160 (2006).
- 3) H. Huang, L. Liu, M.O. Ngadi, "Recent developments in hyperspectral imaging for assessment of food quality and safety", *Sensors* **14**, 7248-7276 (2014).
- 4) J. Che, S. Suzuki, S. Ishikawa, H. Koike, I. Ogiwara, "Fruit ripening and quality profile of 64 cultivars in three species of blueberries grown in Tokyo", *Horticultural Research (Japan)* **8**, 257-265 (2009).
- 5) 楠 文代, 布施 哲男, 高村 喜代子, "キノン還元前置波を利用する種々の実用電気分析", *ボーラログラフイー* 41(3), 51 (1995)
- 6) J. Burger, P. Geladi, "Hyperspectral NIR image regression part I: Calibration and correction", *Journal of Chemometrics* **19**, 355-363 (2005).
- 7) J. Burger, P. Geladi, "Hyperspectral NIR image regression part II: Dataset preprocessing diagnostics correction", *Journal of Chemometrics* **20**, 106-119 (2006).
- 8) C. Ravn, E. Skibsted, R. Bro, "Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms - Comparing common calibration approaches", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **48**, 554-561 (2008).
- 9) J. Zhao, S. Vittayapadung, Q. Chen, S. Chaitep, R. Chuaviroj,

“Nondestructive measurement of sugar content of apple using hyperspectral imaging technique”, *Maejo International Journal of Science and Technology* **3**, 130-142 (2009).

- 10) P. Williams, P. Geladi, G. Fox, M. Manley, “Maize kernel hardness classification by near infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate data analysis”, *Analytica Chimica Acta* **653**, 121-130 (2009).

第五章 総括

果実の品質に寄与する化学成分の定量的な評価に、非破壊かつ迅速な測定が可能な近赤外分光法を応用した。果実の収穫や出荷のときに、近赤外分光法により栄養成分を定量分析することは、安定した品質の果実を提供する為の有効な方法となる。すでに種々の果実への応用研究が報告され、さらには選果のような生産現場での測定に実用されている例もある。しかし、近年、健康に良いと言われて人々の注目を集めているブルーベリー果実の非破壊分析に近赤外分光法を応用した研究はほとんど報告されていない。本研究では、まず汎用近赤外分光光度計によりブルーベリー果実の糖、有機酸及びアントシアニン含有量を定量分析する手法の開発を行った。次に、その実験結果に基づいて、生産現場での測定で用いる実用化装置の持つべき性能を検討した。また、分光光度計とは測定方式が異なるハイパースペクトルイメージング (Hyperspectral Imaging: HSI) カメラを用いてブルーベリー果実に含まれる各成分の定量分析することが可能かどうかについての検討も行った。

以下に本研究を通じて得られた結果を簡潔にまとめて示す。

5.1 汎用近赤外分光光度計によるブルーベリー果実の成分評価

ブルーベリー果実の近赤外スペクトルは、測定法（透過法と拡散反射法）や測定部位（萼あ部位、萼あ以外の部位）によって大きく変化するので、測定法と測定部位をいろいろ組み合わせて定量モデルを作成し、それぞれの予測精度を評価した。その結果、各成分に対する定量モデルの予測精度とモデル作成に用いる前処理法や波数域が測定法や測定部位によって変化する。これは異なる測定法で得られる分光情報の違いや果実表面状況或いは成分分布の不均一に起因すると考えられる。

糖とアントシアニンの含有量の予測では、上述のいずれの測定法を用いても、どこの部位で測定をしても実用精度 ($R^2 > 0.85$ 、 $RPD > 2.5$) よりも高い精度が得られた。一方、有機酸の含有量の予測では、透過法で得られるスペクトルから実用精度で予測することは困難で、拡散反射法で測定したスペクトルにより予測する必要があることがわかった。これは、低波数域に観測される有機酸の特徴的な吸収帯を透過法では測定できないことや高波数域に観察される有機酸の吸収帯が重なって観測されている水分の吸収帯により妨害されていることに起因すると考えられる。また、拡散反射法による有機酸含有量の予測では、測定部位を特定しないで作成した定量モデルの精度が測定部位を特定して作成した定量モデルの精度と比べて明らかに低くなっていることがわかった。このことは、実際に測定を行った部位に対応するモデルにより予測を行うことでより高い精度が得られることを示している。なお、測定部位はスペクトルを主成分スコアプロットすることにより判別できることが見いだされたので、測定時に測定部位を特定しなくても、スペクトルから測定部位を判断して適切なモデルを適用することより予測精度を向上させることが可能である。

定量モデルの作成に用いた波数域は成分ごとに大きく異なる。これは、測定成分の含有量や光学的特性に起因すると考えられる。糖含有量の定量モデルで

は、C-H や O-H の第 2 倍音に由来するバンドが含有量の予測に寄与している。一方有機酸の定量モデルでは、C-H や O-H の第 1 倍音に由来するバンドが含有量の予測に寄与している。アントシアニンの定量モデルでは、色素であるアントシアニン分子の電子遷移に由来する吸収バンドの低波数端が近赤外領域の高波数側に現れ、含有量の予測に寄与していると考えられる。

以上の結論から、近赤外分光法によるブルーベリー果実の糖、有機酸濃度と総アントシアニン量を実用精度以上の精度で予測する手法が開発されたと考ええる。

5.2 ブルーベリー果実の成分評価に用いる実用装置の性能の予測

データシミュレーションにより、生産現場などでの測定で用いる装置に必要な性能（波数域、雑音レベル、波数安定度、分解能）を検討した。その結果、実用精度以上の精度で予測する為に必要な装置性能は成分ごとに異なることがわかった。各成分を実用精度以上の精度で予測する為に必要な装置性能は以下に示す通りである。

波数域としては、糖濃度の予測では O-H や C-H の第 2 倍音吸収が観測される波数領域、有機酸濃度の予測では O-H や C-H の第 1 倍音吸収が観測される低波数領域、総アントシアニン量の予測ではアントシアニン分子の電子遷移に由来するバンドが観測される近赤外の高波数領域を用いることが適当である。装置の雑音レベルとしては、糖濃度の予測では 100 μAbs 、有機酸濃度の予測では 500 μAbs （測定部位によって変化するが、要求される雑音レベルの低い方を装置性能の条件として用いる）、総アントシアニン量の予測では 20000 μAbs 以下に抑える必要がある。波数安定度としては、糖と有機酸濃度の予測では、波数シフトを 15 cm^{-1} 以内に抑える必要がある。総アントシアニン量の予測では、予測精度がほとんど波数シフトの影響を受けないので、波数の安定度については特に工夫をする必要が無い。分解能としては、糖濃度の予測では 32 cm^{-1} 、有機酸濃度の予測では 16 cm^{-1} 以内に設定する必要がある。総アントシアニン量の予測では、予測精度が分解能の影響をほとんど受けないので、特に工夫をする必要が無い。

以上のように決められた性能に従って装置を設計すれば、目標通りの予測精度でブルーベリー果実の各成分を予測できると考えられる。

5.3 ハイパースペクトルイメージングカメラによるブルーベリー果実の成分評価

HSI カメラにより同時に測定した多数の果実のハイパースペクトル（分光情報と空間情報を同時に得られる）を用いて糖、有機酸濃度と総アントシアニン量の定量モデルを作成し、予測精度を評価した。その結果、総アントシアニン量については、汎用近赤外分光光度計を用いた測定よりも精度は低いが、実用精度での予測が可能であることがわかった。一方、糖と有機酸濃度の予測は、現状では実用精度に到達していない。しかし、より高性能の HSI カメラを用いて測定を行えば、実用精度以上の精度での定量分析が可能だと考えている。

本研究に関する論文

Wenming Bai, Norio Yoshimura, Masao Takayanagi, Quantitative analysis of ingredients of blueberry fruits by near infrared spectroscopy, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, Volume 22, Issue 5, Pages 357-365 (2014)

謝 辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました、東京農工大学連合農学研究科 高柳正夫教授に深く感謝しております。また、ケモメトリックス解析手法のご指導を下さった同研究室の吉村季織博士研究員に深く感謝しております。

本論文のまとめにあたり、貴重なご指摘を下さった副指導教官の東京農工大学農学部 岡山隆之教授、荻原勲教授と宇都宮大学農学部 斎藤高弘教授、茨城大学農学部 中石克也教授に深く感謝しております。また、ブルーベリー果実の提供や液体クロマトグラフィーの実験にご協力して頂いた荻原研究室の車敬愛、堀内尚美博士研究員と同研究室の皆さんに深く感謝しております。

博士課程入学以降、最年長の学生として在籍してまいりましたが、後輩達に対する指導を殆ど行うことができず申し訳なく思っております。博士在籍中に付き合ってきた内田君、山形君、和田君、木村君、斎藤君、村上君、小林君とは、研究を含めていろいろなことについて交流していただき、大変うれしく感じております。

最後に留学生としての、研究生、修士課程、博士課程の六年間での研究生活を通じて、終始暖かい激励とご鞭撻をいただきました、主指導教官の高柳正夫教授に再び厚く感謝をしております。

学位論文要旨

近赤外分光法によるブルーベリー果実の成分評価 Evaluation of ingredients of blueberry fruits by near-infrared spectroscopy

環境資源共生科学専攻 森林資源物質科学大講座

白 文明

ブルーベリー果実の主な成分である糖、有機酸及びアントシアニン含有量の定量分析は、化学分析や分光法以外の機器分析で行われている。しかしこれらの方法は破壊分析であり、しかも手間や時間がかかる手法なので、収穫や出荷の現場での測定への応用は大きく制限される。本論文では、非破壊且つ迅速な測定を可能にする近赤外分光法により、ブルーベリー果実に含まれる糖、有機酸及びアントシアニン含有量を定量分析する手法を開発した。近赤外分光法による定量分析では、測定対象や目的成分によって定量精度が常に必要とされる精度以上になるとは限らない。そこで本研究は、まず汎用近赤外分光光度計を用いてブルーベリー果実に含まれる各成分の定量モデルを様々な条件で作成し、その予測精度を検討した。また、実験結果に基づいてデータシミュレーションを行い、現場測定に用いる実用的な分光計に要求される装置性能を検討した。さらに、分光光度計とは測定方式が異なるハイパースペクトルイメージング (Hyperspectral Imaging : HSI) カメラを用いて、ブルーベリー果実に含まれる各成分の定量分析が可能かどうかについての検討も行った。

緒言にあたる第1章に続く第2章では、汎用近赤外分光光度計による定量分析について検討した。ブルーベリー果実の近赤外スペクトルは、測定法（透過法と拡散反射法）と測定部位（萼部位と萼以外の部位）によって大きく変化する。その為に、モデルをつくる際のスペクトル前処理の方法や用いる波数領域が変化する。様々な組み合わせの測定法と測定部位でスペクトルを測定し、PLS (Partial Least Squares) 回帰分析により定量モデルを作成した。化学成分以外が原因のピークの除去、重なりあった吸収ピークの分離、安定な定量モデルの作成に最適なスペクトル前処理法を検討した。また定量モデル作成に有効な波

数域を見出す為に、MWPLS (Moving-Window PLS) 法を用いた。その結果、糖とアントシアニンの含有量予測は、上述のいずれの測定法を用いても、どこの部位で測定をしても実用精度 ($R^2 > 0.85$ 、 $RPD > 2.5$) よりも高い精度で可能であることがわかった。一方有機酸の含有量は、透過法で得られたスペクトルからは予測困難で、拡散反射法で測定したスペクトルにより予測する必要があることがわかった。これは、低波数域のみに観測される有機酸の特徴的な吸収帯を透過法では測定できないことに起因すると考えられる。有機酸の測定では、測定部位を特定した定量モデルを作成して、実際に測定を行った部位に対応するモデルによる予測を行う必要がある。糖やアントシアニンの定量では可能であった部位を特定しないモデルの作成は、酸に対してはできないことがわかった。なお、測定部位はスペクトルを主成分スコアプロットすることにより判別できることが見いだされたので、測定時に測定部位を特定しなくても、スペクトルから測定部位を判断して適切なモデルを適用することが可能である。

定量モデルの作成に用いた波数域は成分ごとに異なる。糖含有量の定量モデルでは、C-H や O-H の第 2 倍音に由来するバンドが含有量の予測に寄与している。一方有機酸の定量モデルでは、C-H や O-H の第 1 倍音に由来するバンドが含有量の予測に寄与していると考えられる。アントシアニンの定量モデルでは、色素であるアントシアニン分子の電子遷移に由来する吸収バンドの低波数端が近赤外領域の高波数側に現れ、含有量の予測に寄与していると考えられる。

第 3 章では、生産現場で用いる装置に必要な装置性能を検討した。大型で高価な汎用近赤外分光光度計を生産現場で用いることは困難なので、小型安価でかつ必要な精度で定量分析が可能な装置を作ることが重要である。そこで、汎用の分光光度計で得られたスペクトルデータに人工的に雑音を加える、波数をずらす、分解能を変えるなどの操作を数値的に加え、そのスペクトルデータの解析することに基づき、各成分を実用精度より高い精度で予測する為に必要な装置性能 (測定波数域、雑音レベル、波数安定度、分解能) を明らかにした。

第 4 章では、HSI カメラによる分析法の検討を扱った。樹上あるいはパック詰めされた多数の果実を同時に分析できると効率が良く便利である。そこで HSI カメラにより同時に測定した多数の果実のハイパースペクトル (分光情報と空間情報を同時に得られる) を用いて糖、有機酸及びアントシアニン含有量の定量モデルを作成し、予測精度を評価した。その結果、アントシアニン含有量の予測精度は、汎用近赤外分光光度計を用いた時よりも低いものの、実用精度以上あることがわかった。一方、糖と有機酸の定量の予測精度は、現状では実用精度に到達していない。しかし、より高性能の HSI カメラを用いて測定を行えば、実用精度以上での定量が可能となる可能性が高いと判断している。

第 5 章では、第 2 章～第 5 章で述べた結果を総括した。本研究の成果は、近赤外分光法をブルーベリー果実成分の非破壊分析に応用した初めての例である。本研究により、ブルーベリー果実の選果に有用な情報を得ることができた。