

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04576

研究課題名(和文) 励起蛍光マトリクスによる食肉表面の高感度清浄度評価技術の開発

研究課題名(英文) Development of high sensitive method for detection of cleanliness on meat surface by the excitation-emission matrix

研究代表者

大下 誠一(Oshita, Seiichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任教授

研究者番号：00115693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：食肉表面の一般生菌数を推定するために、豚肉表面の励起蛍光マトリクスを測定した。これと同時に、ふき取り法により表面付着物質を採取して、一般生菌数とATP量を測定した。励起蛍光マトリクスと一般生菌数およびATP量の経時的な変化を解析し、二次元Savitzky-Golay二次微分を適用して一般生菌数を推定するモデルをPLSRにより作成した。その結果、保存開始から72時間までのデータを用いた場合に、相関係数0.94、保存開始から48時間までのデータでは、波長を400～800 nmの範囲に特定すれば相関係数0.89の精度で推定が可能であった。

研究成果の概要(英文)：In order to estimate the plate count on pork meat surface, the excitation-emission matrix (EEM) obtained from spectroscopy data was measured. At the same time, both ATP content with bioluminescence method and plate count with swabbing method were also measured. The two-dimensional Savitzky-Golay second-order differentiation was applied to EEM data, then PLSR model was developed for estimating plate count by using EEM data. The PLSR model showed high correlation for the estimation of plate count with correlation coefficient of 0.94 and RMSEP= $\log_{10}(0.60, \text{mol cm}^{-2})$  for all the data from 0 h to 72h. Focusing on the initial preservation stage from 0 h to 48 h, the PLSR model gave the correlation coefficient of 0.89 and RMSEP= $\log_{10}(0.62, \text{mol cm}^{-2})$ .

研究分野：生物プロセス工学

キーワード：食肉 一般生菌数 ATP 励起蛍光マトリクス 清浄度評価

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の食肉の生産量は、豚肉が 200,000 トン、鶏肉が 300,000 トンと多く (FAO, 2012)、食肉処理場における衛生管理は、我が国の「食の安全」を確保する上で極めて重要である。食肉処理場での清浄度検査としては、広く、ふき取り検査が行われている。このふき取り検査自体に第一の問題がある。すなわち、ふき取り法とは 10cm 四方を綿棒でふき取る方法であり、食肉処理場の全面ではなくいくつかのスポットを検査するだけであるため、汚染箇所を見落とす危険性がある。

次に、ふき取り検査とは、培養法により生菌数を測定する方法 (標準平板菌数測定法) と生物発光法により ATP (アデノシン三リン酸) 量を測定する方法であるが、微生物の培養には時間を要し、ATP 測定には熟練を要する。このため、これら両者を同時に測定するのは、食肉加工場の現場では難しい。これが、第二の問題である。

一方で、清浄度評価の観点からは生菌数よりも ATP 量の方が適しているという指摘がある (Hawronskyj & Holah, 1997) が、生菌数と ATP 量を同時に測定できる方法が望ましい。

研究代表者らは、豚肉表面の ATP および一般生菌数の推定を試み、分光反射特性から ATP や一般生菌数を推定するモデルを提示した (大下ら, 2010, Oto et al., 2012)。さらに、励起蛍光マトリクスを用いた一般生菌数推定モデルも報告した (Oto et al., 2013)。しかし、推定モデルに大きな重みを持って寄与している要因はトリプトファン (トリプトファン) の蛍光強度であった。これは豚肉試料に由来するものであり、このモデルでは一般生菌数を間接的にしか表現出来ていない。さらに、豚肉由来のトリプトファン (トリプトファン) の蛍光強度は非常に強いので、保存初期で生菌数が少ない場合には微生物を検出できない弱点がある。この点が改善されれば、豚肉解体直後や保存初期における微生物数の変化を捉えることができると考えられる。微生物に由来する蛍光を適切に捉えて非破壊かつリアルタイムで生菌数や ATP 量を推定する技術は、現段階では確立されておらず、食肉の安全性を確保する上で、重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

食肉加工場における清浄度評価には、ふき取り検査による一般生菌数や ATP 量の測定が用いられている。しかし、ふき取り検査では全数検査やリアルタイムでの検査が不可能であるため、非破壊かつ迅速な清浄度評価法が強く望まれている。このため、紫外可視分光法による一般生菌数の非破壊推定モデルを構築した。しかし、紫外可視分光法では ATP とミオグロビン (食肉色素) に基づく間接的な微生物量の推定に留まっており、微生物に直接関係する物質を捉えられていない。そこで、励起蛍光マトリクス (2 次元表面の

各点における蛍光強度) を利用することにより検出の感度を高めると共に、微生物そのものに由来する蛍光を捉えて、食の安全を保证するための高感度清浄度評価技術確立することを目的とした。

この目的のため、食肉 (豚肉) を一定温度で保存し、表面の励起蛍光マトリクスを取得する。この情報と食肉表面を綿棒の先端でふき取って (ふき取り法) 得るサンプルから一般生菌数を培養法で、ATP 量を生物発光法で測定する。これらのデータに基づいて、一般生菌数および ATP 量の経時変化と高い相関を有する励起蛍光波長を特定し、それらの波長における蛍光強度から一般生菌数および ATP 量を推定するモデルを提示することを試みた。

## 3. 研究の方法

### 3.1 供試材料と保存条件

国産豚ロース肉を供試材料とした。精肉店にて厚さ 5mm にスライスした試料を入手後、クリーンベンチ内で脂身を除いて 45×45mm に整形した。これをポリプロピレンの円形プレートに載せ、滅菌シャーレに入れ、乾燥を抑えながら酸素供給を妨げないように、蓋をした (図 1)。試料の保存温度は 15°C とした。これは当研究室で調べた食肉加工場の作業場の上限温度である。食肉の品質保持の観点では 4°C に近い低温が適しているが、作業員の労働条件を鑑みて定められた現場の上限温度に合わせた。試料を 72 時間保存し、測定間隔は基本的に 12 時間ごととした。



図 1 整形した豚肉試料

### 3.2 蛍光強度の測定

各測定時間において、分光蛍光光度計 (F-7000, HITACHI) を用いて、豚肉表面の 4 か所の蛍光強度を測定した (図 2)。4 か所の測定範囲は、図 2 のように設定した。1 か所の測定が終わるたびに試料を 90 度回転させて測定部にセットした (図 3)。回転させる都合上、豚肉表面には厚さ 0.5mm の石英ガラス板を載せた。紫外光を透過する材質として石英ガラスを選定した。

蛍光強度は次式によって表わされる。

$$F = K I_0 c l \epsilon \phi$$

F: 蛍光強度、K: 装置定数、 $I_0$ : 励起光強度、

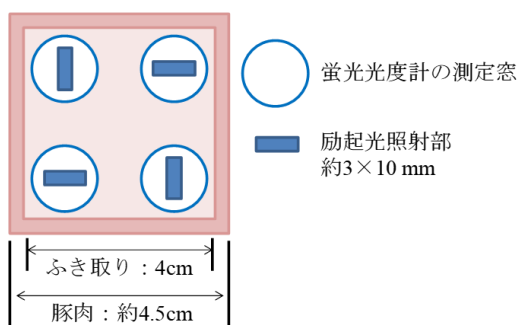


図2 豚肉表面の蛍光強度の測定位置



図3 蛍光強度測定部に設置した試料

c: 物質濃度、 $l$ : セルの光路長、 $\epsilon$ : 物質の吸収係数、 $\phi$ : 物質の量子収率

装置定数は、蛍光標準物質としてローダミンBを測定することにより得る。

濃度のみが異なる同一試料を測定する場合、蛍光強度は試料濃度に比例する。装置の設定として、励起波長を250-800 nm、蛍光波長を250-800 nm、サンプリング間隔を5nm、励起光スリット幅5 nm、蛍光スリット幅5 または10 nm、スキャンスピード60000 nm/min、ホトマル電圧430Vとした。ただし、NADPHの蛍光に焦点を当てた実験ではホトマル電圧を550Vにするなどの調整をした。

### 3.3 一般生菌数の測定

各測定時間において、蛍光強度の測定後、一般生菌数を測定した。一般生菌数は、豚肉試料表面に存在する中温好気性細菌を培養し、コロニーを計数することで算出した。

作業は、微生物のコンタミを防ぐため、クリーンベンチで、ディスポーザブル手袋を着用して行った。ふき取りに使用する綿棒は、あらかじめオートクレーブで滅菌した。培養プレートは、使用前に冷蔵庫から取り出し室温に戻した。蛍光強度の測定後、試料をクリーンベンチ内に移動させた。蛍光強度測定に用いた豚肉試料から石英ガラスを取り外し、石英ガラス表面の4cm四方の範囲を綿棒でふき取った。同じ綿棒で、次に豚肉表面の4cm四方の範囲をふき取った。ふき取り範囲は、

4cm四方を切り抜いたポリプロピレンフィルムをのせて行った。効率よくふき取れるよう、綿棒は滅菌水で湿らせた。このとき、綿棒は豚肉表面を滑らせず、一方向に転がした(Bautista et al., 1997)。一方向に転がしながら4cm四方をふき取ったのち、ふき取る方向を90度変えて再びふき取った。綿棒の先をペンチで切り落として9 mlの滅菌水の容器に入れ、均等な濃度になるようよく振って試料原液を調製した。試料原液から滅菌スポイトで1 ml採取し、別の滅菌水のボトルに入れ、10倍希釈液を作成し、よく振り攪拌した。この作業を繰り返し、一般生菌の増殖を考慮して適当な希釈倍数まで希釈液を作成した。次に、作成した試料原液と希釈液につき、それぞれ2枚ずつの培養プレートを作成した。培養後、コロニーの数を計数し、一般生菌数を算出した。

手順は以下である。まず、2枚のプレートの平均を算出した。25~250個のコロニーがカウントできるプレートが2つの希釈倍率にまたがった場合、双方の希釈倍率の値を用いた。一般生菌数は、カウントしたプレートが試料原液の場合、 $(\text{平均コロニー数}) \times 9 \div 16 = \text{一般生菌数} [\text{CFU}/\text{cm}^2]$ 、10倍以上の希釈液の場合(これをn倍とする)は、希釈倍数に合わせ、 $(\text{平均コロニー数}) \times 9 \times n \div 16 = \text{一般生菌数} [\text{CFU}/\text{cm}^2]$ として算出した。

### 3.4 ATP量の測定

各測定時間において、培養プレートの作成後、生物発光法によりATP量を測定した。生物発光法とは、ATPのルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光を利用したATP定量法である。相対発光量(RLU)がATP量に比例することから、ATP量を求めることができる。

実験は以下の手順で行った。まず、ATP標準試薬(東洋ビーネット)のRLU測定を行った。 $10^{-7}$  MのATP標準試薬の原液を、10倍ずつ $10^5$ 倍まで希釈した。希釈には滅菌水を用いた。ATP標準試薬とその希釈液、滅菌水のRLUを、ATP抽出試薬、ATP発光試薬(東洋ビーネット(株))、ルミノメータ(ルミネッセンサーPSN、アトー(株))(Photo 2-6)を用いて測定した。RLU測定対象の溶液が100 $\mu$ l入った試験管をルミノメータにセットし、ATP抽出試薬100 $\mu$ lを加えると同時にストップウォッチで時間を計測し、10秒後に、ATP発光試薬100 $\mu$ lを加え、すぐにふたを閉めて測定を行った。次に、試料のRLUを測定した。作成した試料原液とその希釈液について、それぞれ2回ずつRLUを測定した。

このRLUからATP量を算出した。まず、ATP標準試薬のRLUからスタンダードカーブを作成した。このスタンダードカーブを用いて、試料のRLUからATP量(mol/100 $\mu$ l)を算出した。この際、使用した試薬の測定可能なATP量の範囲が $10^{-11}$ molから $10^{-16}$ molであることに留意し、試料原液とその希釈液のRLUのうち、この測定可能範囲に入る最大値

が計測された希釈倍数の結果を用いて ATP 量を算出した。こうすることで、測定精度を保ち、希釈を繰り返すことによる ATP 量の誤差を最小にするようにした。このようにして算出した ATP 量(mol/100 $\mu$ l)を、以下の式で、単位面積あたりの ATP 量に換算した。

$$(\text{ATP 量})[\text{mol} / 100 \mu\text{l}] \times \frac{9 \times 10^{-3}}{10^{-4}} + 16[\text{cm}^2] = (\text{ATP 量})[\text{mol} / \text{cm}^2]$$

### 3.5 励起蛍光マトリックスの前処理

EEM の前処理として、二次元 Savitzky-Golay 二次微分について検討した。励起蛍光マトリックスは3次元データ構造のため、平面的な微分を検討した。具体的には、励起蛍光マトリックスを Savitzky-Golay 法により二次元的にスムージングをした後、二階の全微分を算出した。具体的には、まず微小窓(2m + 1) x (2m + 1)の領域を取り出す。ここでは m=2 とした。Savitzky-Golay 法で微小窓について EEM を二次曲面

$Z = f(x_i, y_i) = a_0 + a_1x_i + a_2y_i + a_3x_i^2 + a_4x_iy_i + a_5y_i^2$  で近似する。ここで、最小二乗法により係数 ( $a_0 \sim a_5$ ) を決定し、微小窓中心点において、

$$d^2z = \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x^2} (dx)^2 + 2 \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x \partial y} dx dy + \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial y^2} (dy)^2$$

により二階の全微分を求める方法で二次微分を算出した。実際には、計算のたび最小二乗法を適用する必要はなく、各ポイントにおける蛍光強度に定数(重み係数)をかけるだけで二次曲面の各係数(及び二次微分値)を求めることができる。 $A = (a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5)^T$ ,  $Z$  を各ポイントにおける蛍光強度  $Z = (z_1, z_2, z_3, \dots, z_n)^T$  とすると、 $A = C * Z$  で求めることができる。(Krum, 2001)。dx = dy = 1 とすれば、二階の全微分値は、

$d^2z = a_3 + 2 * a_4 + a_5 = A(4) + 2 * A(5) + A(6)$  で表される。なお計算には Matlab を用いた。散乱光の影響等により二次微分を正しく計算できない箇所は、ゼロとした。

### 3.6 PLSR (部分最小二乗回帰)

多変量解析は分光情報の解析に広く用いられている。なかでも PLSR(Partial Least Squared Regression)は、近年発達している回帰分析のひとつである。励起蛍光マトリックス(EEM)、紫外・可視および近赤外領域のスペクトルデータを扱う際には、X において情報が重複することが多い。これらを解決するのが PLSR である(Wold et al., 2001)。なお、PLSR では X と Y を同時に主成分分析し、それらのスコアについて最小二乗法を適用する。潜在変数(Latent Variable: LV)の決定にはクロスバリデーションを用い、(サンプル数: 2)、Y 分散が最小となる LV を最適主成分とした(Esbensen, 2007)。PLSR による一般生菌数・ATP 量の推定においては、各実験 112 サンプル (28 サンプル x 4 箇所) 中、84 サンプルでモデルを作成し(Training Set)、残りの 28 サンプルをモデルの検証(Test Set)に用いた。

## 4. 研究成果

### 4.1 一般生菌数と ATP 量

図4に示すように、一般生菌数と ATP 量の間には高い相関が認められ ( $R^2=0.93$ )、ATP 量が微生物汚染の指標となることが確認された。

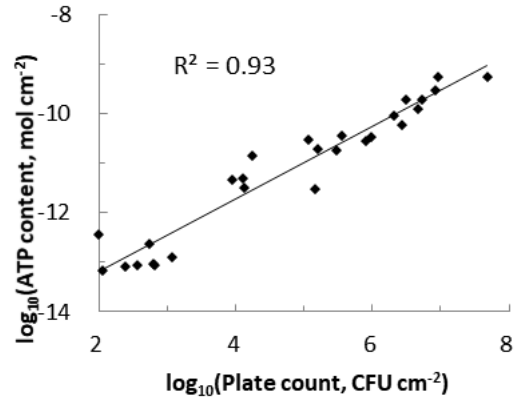


図4 一般生菌数と ATP 量の実測値

### 4.2 励起蛍光マトリックスと一般生菌数推定

図5に保存 72 h における励起蛍光マトリックスの全データ(蛍光強度: 0~10000)を示す。この図から蛍光強度が 2000 までの範囲を拡大して図6に示した。

Ex := 295 nm, Em = 325 nm にトリプトファン、Ex = 340 nm, Em = 460 nm に NAD(P)H (Lakowicz, 2006)、Ex = 420 nm, Em = 595 nm に亜鉛プロトポルフィリン IX、Ex = 420 nm, Em = 645 nm にプロトポルフィリン IX と亜鉛プロトポルフィリン IX によるピーク (Schneider et al., 2008)、および Ex = 450 nm, Em = 530 nm にリボフラビンの蛍光ピーク (Lakowicz, 2006) が観測された。

微生物はプロトポルフィリン IX を生成し (Dietel et al., 2007)、またリボフラビンを生成する (Wilson and Pardee., 1962) ので、これらの物質の蛍光強度は微生物の量を反映したものと考えられる。

そこで、励起蛍光マトリックスにおける二次元平面上の蛍光強度を変数 x として PLSR により一般生菌数を推定した結果を表1に示す。一般生菌数の推定について、 $r_p = 0.90$ ,

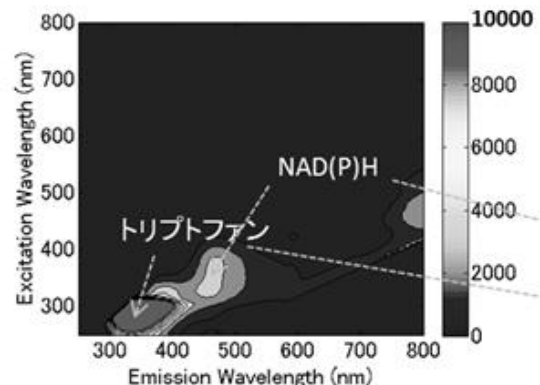


図5 励起蛍光マトリックスの1例(全データ)

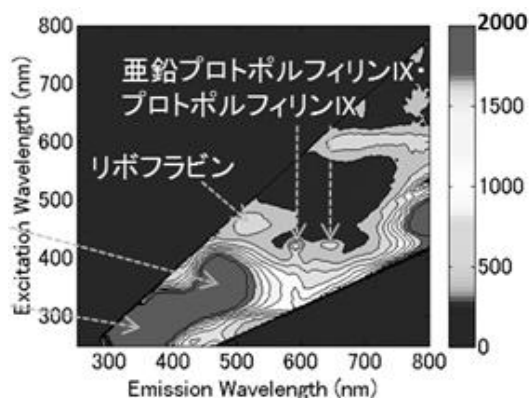


図6 蛍光強度 2000 までの拡大図

表1 PLSRIにより一般生菌数の推定結果( $10^2 \sim 10^8$  CFU  $\text{cm}^{-2}$ )

X	Y	$r_p$	RMSEP
FI	log (Plate count)	0.90	0.79
Second derivative of (FI)	log (Plate count)	0.94	0.60

\*FI: Fluorescence intensity

表2 PLSRIにより一般生菌数の推定結果( $10^2 \sim 10^6$  CFU  $\text{cm}^{-2}$ )

X	Y	$r_p$	RMSEP
FI (250~800 nm)	log (Plate count)	0.80	0.83
FI (400~800 nm)	log (Plate count)	0.89	0.62

RMSEP = 0.79 と高い精度で推定できた。また、説明変数を蛍光強度の二次微分とすることで、推定精度が向上し、励起蛍光マトリックスの二次微分が推定精度の向上につながる有用な前処理であることがわかった。

一方、實際上問題となる微生物汚染の低い範囲における推定を目的として、0~48 h に限定して推定モデルを作成したところ、高い推定精度は得られなかった(表2の上段)。原因としては、トリプトファン、および NAD(P)H が保存初期には大きく変化しないことが考えられた。

#### 4.3 波長を特定した一般生菌数の推定

微生物に由来する物質に着目すべく、波長を 400 nm 以降に特定して、PLSR により一般生菌数を推定するモデルを作成した。表2の下段および図7に示すように、一般生菌数の推定において  $r_p = 0.89$ , RMSEP = 0.62 の推定精度が得られ、波長の限定により推定精度が大幅に向上した。

図8に PLSR による一般生菌数の推定における回帰係数を示した。亜鉛プロトポルフィリン IX およびプロトポルフィリン IX (Ex = 420 nm, Em = 595 nm, および Ex = 420 nm, Em = 645 nm)、それにリボフラビン (Ex = 450 nm, Em = 530 nm) の回帰係数の絶対値が大きくなった。この結果は、微生物が亜鉛プロトポルフィリン IX、プロトポルフィリン IX、およびリボフラビンを生成することと一致する。したがって、微生物の増殖の初期段階において、微生物に直接由来する物質の変化を捉えた、実用的なモデルが作成できたと考える。

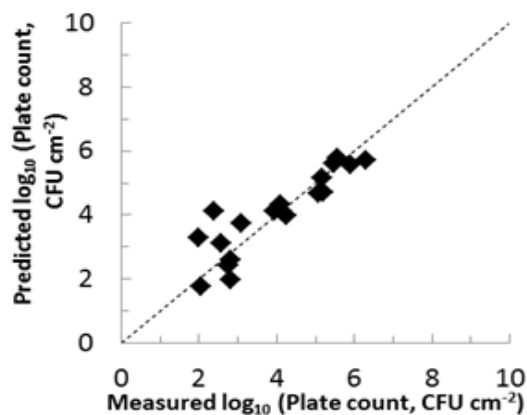


図7 一般生菌数の予測値と実測値 (蛍光強度 FI=400~800 nm, 一般生菌数  $10^2 \sim 10^6$  CFU  $\text{cm}^{-2}$  の範囲に限定)

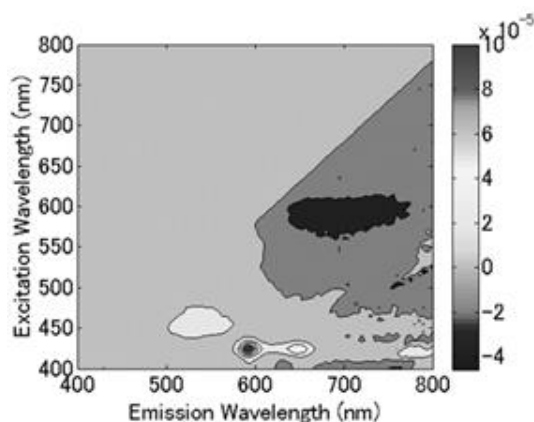


図8 PLSR を用いた一般生菌数の推定における回帰係数 ( $10^2 \sim 10^6$  CFU  $\text{cm}^{-2}$  の範囲)

#### 引用文献

- (1) FAO. (2012). Production, Live, Animals
- (2) Hawronskyj, J.-M. and Holah, J. (1997). Trends in Food Science and Technology, 8, 79-84.
- (3) N. Oto et al. (2012), Journal of Food Engineering 110, 9-17
- (3) N. Oto et al., Meat Science 93, 579-585 (2013)
- (4) 大下誠一ら, (2013), 特許第 5171366 号
- (5) Bautista, D.A. Sprung, D. W., Barbut, S. & Griffiths, M. W. (1997). Food Research International, 30, 10, 803-809.
- (6) Wold, S. et al. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 58, 109-130.
- (7) Esbensen, K. H. (2007), Multivariate Data Analysis - in practice. Aalborg University, Esbjerg.
- (8) Lakowicz. (2006). Principle of Fluorescence Spectroscopy.
- (9) Schneider et al. (2008). Meat Science, 80, 1320-1325.

- (10) Dietel et al. (2007). J. Photochem. Photobiol., B. 86, 77-86.  
(11) Wilson & Pardee. (1962). J. gen. Microbiol. 28, 283-303/

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Hiroaki Shirai, Seiichi Oshita, Yoshio Makino, Detection of fluorescence signals from ATP in the second derivative excitation–emission matrix of a pork meat surface for cleanliness evaluation, Journal of Food Engineering, 査読有, 168 (2016) 173–179

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.032>

2. Hiroaki Shirai, Ashim K. Datta, Seiichi Oshita, Penetration of aerobic bacteria into meat: A mechanistic understanding, Journal of Food Engineering, 査読有, 196 (2017) 193-207

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.012>

[学会発表] (計 1 件)

1. Hiroaki Shirai, Ashim K. Data, Seiichi Oshita, Yoshio Makino, Mathematical modeling of bacterial penetration into meat, The 8<sup>th</sup> International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems (2016), Toki Messe (Niigata, Japan)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大下 誠一 (OSHITA Seiichi)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
特任教授  
研究者番号 : 00115693

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし